

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

蛋白質・核酸・酵素 (1998) 43(12):1910-1621.

カルシウムイオンとシグナル伝達 細胞内Ca²⁺ホメオスタシス Ca²⁺動員, 排出機構
Ca²⁺ポンプ 形質膜と小胞体

鈴木裕

B. Ca²⁺動員, 排出機構Ca²⁺ポンプ
形質膜と小胞体

鈴木 裕

形質膜と小胞体膜に存在するCa²⁺ポンプはCa²⁺排出系のなかでCa²⁺に対する親和性が最も高く、細胞休止時における低細胞質Ca²⁺レベルを設定し、細胞質Ca²⁺レベルの厳密な制御に貢献する。これらの実体はCa²⁺-ATPaseで、ATP分解によって得られるエネルギーを利用したCa²⁺輸送を行なう。最近の分子生物学的研究の進展とともに、これら2種のCa²⁺-ATPaseの分子構造とそれに立脚した輸送機構の理解が急速に深まっている。また両者を構成する各アイソフォームの機能と制御における差異がしだいに明らかになり、細胞Ca²⁺代謝調節における各アイソフォームの役割が推定されるようになってきた。

Key words [Ca²⁺-ATPase] [Ca²⁺ポンプ] [形質膜] [小胞体]

はじめに 形質膜Ca²⁺-ATPase (plasma membrane Ca²⁺-ATPase; PMCA) と小胞体Ca²⁺-ATPase [sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase; SERCA]はそれぞれ単一ポリペプチドからなる膜蛋白質で、高親和性Ca²⁺輸送部位をもち、ATPの加水分解に共役してCa²⁺を細胞質から細胞外あるいは細胞内Ca²⁺ストアである小胞体(ER)に汲み上げるCa²⁺ポンプである。この働きにより細胞質Ca²⁺は約10⁻⁷Mにまで低下し、それぞれの膜を介した濃度勾配は約10,000倍にも達する。PMCAは形質膜構成全蛋白質のわずか約0.1%にしかすぎない。骨格筋や心筋の場合SERCAは主要な小胞体膜構成蛋白質で、迅速な筋弛緩を可能にしている。PMCAとSERCAは異なる遺伝子群によってコードされ、さらに選択的スプライシングにより多数のアイソフォームを形成する。両者は、そのアミノ酸配列全体の相同性は約30%と低いが、構造上多くの共通点をもち、Ca²⁺輸送を可能にする共通のドメイン構造を形成する。両者は、輸送サイクルにおいてATP

のγリン酸基がAsp残基に転移したリン酸化中間体を形成するP型カチオン輸送ATPaseのメンバーである。一方、両者の制御機構は顕著に異なり、PMCAはカルモデュリン(CaM)、酸性リン脂質、各種プロテインキナーゼで制御され、SERCAの場合、心筋でホスホランバンによる制御を受ける。本稿では本誌増刊号「カルシウムイオンと細胞機能」(1988)以後の最近の発展に注目して、PMCAとSERCAの分子構造と機能について整理を試みた。

I. アイソフォームと分布

PMCA(分子量127~145K)は相同性の高い(75~85%)4種類の異なる遺伝子1~4にコードされ、さらに部位A,Cにおける選択的スプライシング(図1)により少なくとも26種類のアイソフォームを形成する。部位AではPMCA2~4で選択的スプライシングが起こる。PMCA2では全長135bpの選択的スプライシン

Hiroshi Suzuki, 旭川医科大学医学部医学科生化学第二講座(〒078-8510 旭川市西神楽四線5号3-11) [Department of Biochemistry, Asahikawa Medical College, Nishi-kagura, Asahikawa 078-8510, Japan]

Calcium Pumps of Plasma Membrane and Sarco(Endo)plasmic Reticulum

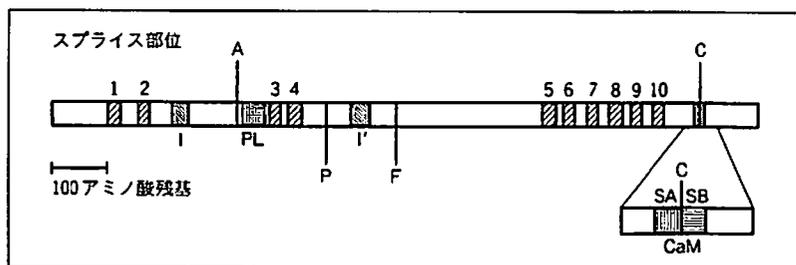


図1 形質膜 Ca²⁺-ATPase の選択的スプライシング部位 (A, C) と機能部位 1~10: 膜貫通ヘリックス, P: アシルリン酸化部位, F: FITC 標識部位 [PMCA1b ではそれぞれ Asp475(P) および Lys601(F)], PL: 酸性リン脂質結合領域, CaM: CaM 結合ドメイン (SA, SB: サブドメイン A および B), I, I': 自己抑制領域の結合部位。[文献2より改変]

グにより4種類のアイソフォームを, PMCA3 および 4 では 42 および 36bp の挿入の有無によりそれぞれ2種類のアイソフォームを形成する。部位 C において, PMCA1~3 ではそれぞれ全長 154, 227, 242 bp の選択的スプライシングにより5種類, 3種類, 7種類のアイソフォームを, PMCA4 では 178bp の挿入の有無により2種類のアイソフォームを形成する。PMCA1 と 4 はほとんどの細胞で発現するのでハウスキーピングアイソフォームと考えられ, 他方 PMCA2 と 3 は脳, 骨格筋, 心筋などで発現する^{13,14}。PMCA は Ca²⁺ 移動が起こる細胞面に局在することがさまざまな細胞で観察されている⁵。Fujimoto らは抗体標識法により, PMCA⁶ と 240 K イノシトール-1,4,5-三リン酸 (IP₃) レセプター様蛋白質⁷ がともにカベオラに局在することを血管内皮細胞や平滑筋細胞などさまざまな細胞で明らかにし, カベオラが Ca²⁺ の排出と流入の役割を担うことを示唆した。この結果はまた, シグナルとしての Ca²⁺ の濃度変化が最も必要とされる部位にカベオラが移動することによって, Ca²⁺ の流入と排出の部位の変化がもたらされることを意味し興味深い。

SERCA (分子量 105~115 K) は相同性の高い (75~85%) 3種類の異なる遺伝子 1~3 にコードされ, さらに組織あるいは分化段階に依存した選択的スプライシングを受ける。SERCA1a (成体型) と 1b (新生児型) は骨格筋の速筋で発現するアイソフォームである^{8,9}。ウサギ SERCA1a は 1,001 アミノ酸残基からなり, その C 末端残基が SERCA1b では 8 残基に置換されている。SERCA2 遺伝子からは組織に依存した選択的スプライシングにより4種類の mRNA (クラス 1~4) が生成する¹⁰。クラス 1 mRNA によりコードされる SERCA2a

は骨格筋の速筋と心筋の主要なアイソフォームで, また平滑筋でも発現する^{11,12}。ウサギ SERCA2a は 997 アミノ酸残基からなり, N 末端から 993 残基までの配列は SERCA2b と共通である。クラス 2~4 mRNA はいずれも SERCA2b をコードする。SERCA2b は SERCA2a より 45 (ヒト)¹³~49 (ニワトリ)¹⁴ 残基長い。

SERCA2b の mRNA はほとんどの細胞で確認されており, 平滑筋や非筋細胞では主要なアイソフォームでハウスキーピング ER Ca²⁺-ATPase として機能すると考えられている。999 アミノ酸残基 (ラット) からなる SERCA3 はやはり非筋細胞で発現する¹⁵。常に SERCA2b とともに発現するが, SERCA2b とは異なり発現レベルは顕著に組織に依存し, 小脳プルキンエ細胞, 結腸のおそらく分泌性上皮細胞, 肺および気管上皮細胞, リンパ系細胞など Ca²⁺ 取り込み・放出活性の高い細胞や Ca²⁺ シグナルが機能調節にとくに緻密に関与する細胞で高レベルに発現する¹⁶。SERCA2b と 3 がどのように役割を分担するのか, 細胞内局在とともに興味深い問題である。なお, SERCA と PMCA からなるキメラの解析から, 強い小胞体残留シグナルが SERCA の N 末端 85 残基内に存在することが示唆されている¹⁷。

II. 反応機構

図2(a)は筋小胞体 (SR) Ca²⁺-ATPase (SERCA1a) を用いた多くの研究によって明らかにされている Ca²⁺ 輸送機構である。生理的基質は Mg・ATP 複合体であるが, とくに断らないかぎり図および本文でも ATP と略した。

Ca²⁺ に対する親和性からみると, サイクルにおいて酵素は高親和性 (E₁, E₁', E₁P) と低親和性 (E₂, E₂P) の2つの状態をとる¹⁸。高親和性輸送部位への Ca²⁺ 結合 [pH7 で解離常数 (K_d) = 0.3~0.5 μM, Hill 係数 = 2] によって酵素が活性化され (ステップ 1), 続いて触媒部位に結合した ATP (K_d = 4~5 μM) の γ リン酸基が Asp351^{8,19-21} に転移してリン酸化中間体 (EP) が形

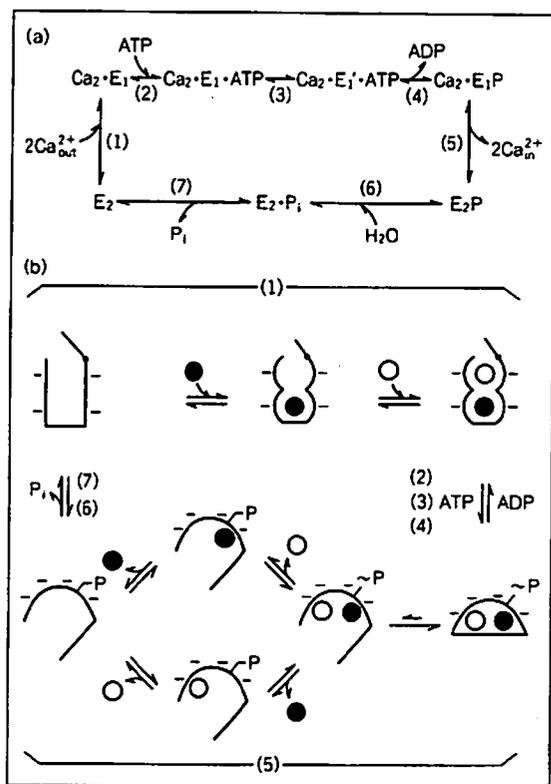


図2 筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の反応機構 (a) と輸送サイクルにおける Ca^{2+} と輸送部位の挙動 (b) (a) out は細胞質側, in は小胞体内腔側を示す。(b) ●, ○: Ca^{2+} , - : Ca^{2+} の配位子を示す。[文献 41 より改変]

成される(ステップ2~4)。このリン酸基転移にはステップ3で触媒部位に起こる構造変化が必須である(後述)。形成したEPはADP感受型リン酸化中間体(E_1P)で、そのアシルリン酸結合は高エネルギーリン酸結合の一種であり、ADPを加えると速やかに逆反応によってATPを生成する²²⁻²⁴。 E_1P 形成に伴い輸送部位の Ca^{2+} は膜の両側からアクセスできない閉塞状態となる²⁵⁻²⁷。 E_1P は続いてADP非感受型(低エネルギー型)リン酸化中間体(E_2P)に構造転移する(ステップ5)。この過程で Ca^{2+} 輸送部位は内腔側を向き、同時に親和性が数千分の1に低下して Ca^{2+} が放出される。最後にアシルリン酸結合が加水分解され(ステップ6,7)輸送の1サイクルが終了する。 Ca^{2+} 放出に伴い Ca^{2+} 1個あたり1個の H^+ がEPに内腔側から結合し、次のサイクルで Ca^{2+} が再び結合する際、細胞質側に放出される^{28,29}。

Ca^{2+} -ATPase 活性のATP濃度依存性は単純なミカエリス-メンテン型でなく高濃度(〜mM)のATPで活性は増大し²³、ステップ1³⁰、ステップ5³¹、およびステップ6~7³²が低親和性のATP結合(後述)によって促進される。このサイクルは可逆的で、 Ca^{2+} 非存在下、酵素は P_i と Mg^{2+} によってリン酸化され³³⁻³⁵、さらに高濃度 Ca^{2+} とADPを加えるとATPを生成する¹⁸。なお、 E_2P 形成に伴い触媒部位は顕著に疎水性になることを示す結果とリン酸基転移の熱力学的考察から、EPの触媒部位における水の排除がADP感受性消失の本質であると示唆されている³⁶。

ステップ1における Ca^{2+} 結合は協同的に作用する2つの部位に逐次的に起こり(図2b)、第1部位への Ca^{2+} 結合により第2部位の Ca^{2+} 親和性が著明に増大し、また第2部位への Ca^{2+} 結合で第1部位の Ca^{2+} はきわめてはずれにくい状態となる³⁷⁻³⁹。2個の Ca^{2+} の内腔側への放出については、逐次的(first-in-first-out)⁴⁰か、あるいは Ca^{2+} 閉塞を解除する律速の構造変化に続いて一相性に起こる(図2b)^{41,42}か議論が続いている。他方、最近 Ca^{2+} 放出が二相性に起こる条件で、閉塞されている2個の Ca^{2+} が2つの部位間で交換可能であることを示唆する結果も観察されている³⁹。

PMCAについては主として赤血球膜(主要なイソフォームはPMCA4b)からCaM親和性カラムを利用して精製された酵素について反応機構が調べられてきた^{1,5}。 Ca^{2+} 輸送機構は基本的にはSERCAと同様だが、PMCAでは細胞外に輸送される Ca^{2+} はATP1分子あたり1個である⁴³。またPMCAはCaM結合($K_d=10\sim 100$ nM, ストイキオメトリーは1:1)により活性化され、 Ca^{2+} の K_m は $10\sim 20$ μM から $0.3\sim 0.5$ μM に低下し、輸送の V_{max} は5~10倍増大する。CaMはEPの形成と分解を促進し、また E_1 - E_2 平衡を E_1 側にシフトさせると示唆されている。

III. 分子構造

1. 2次構造予測と立体構造

SERCA1aと2aの疎水性度プロファイルに基づいた2次構造予測から、分子は疎水性の高い10カ所の α ヘリックス(M1~M10)で膜を貫通すると考えられている^{8,11}(図3a)。M2からM3にかけて(M2/M3)およびM4/M5には長い親水性細胞質領域があり、ヘリッ

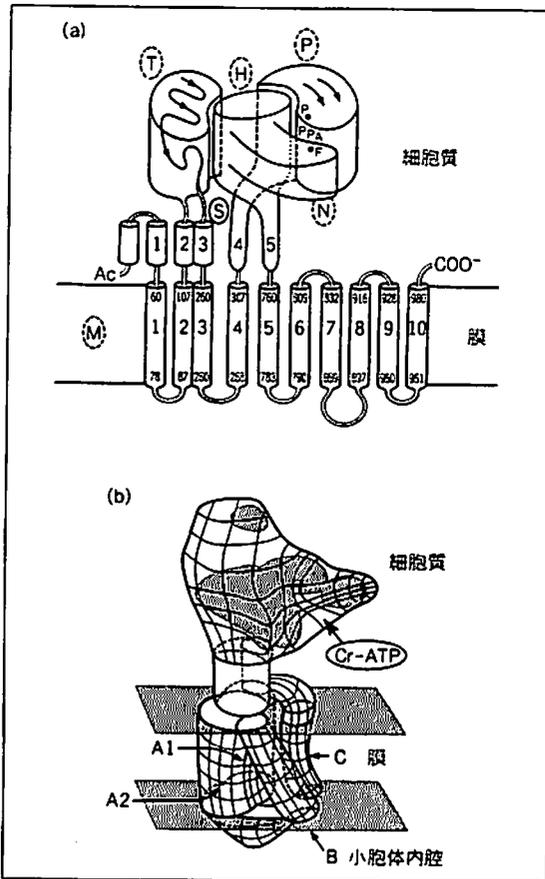


図3 筋小胞体 Ca²⁺-ATPase のドメイン構造予測 (a) と 3次元構造モデル (b)

(a) 細胞質領域は T (トランスダクション), P (リン酸化), N (ヌクレオチド結合), H (ヒンジ) の各ドメインを形成し, S (ストーク) 部分により M (膜貫通) ドメインに接続される。P_o: アシルリン酸化部位 (Asp351), *F: FITC 標識部位 (Lys1515)。各膜貫通ヘリックスの始まりと終わりの残基番号を示した。[a は文献 47, b は文献 49 より改変]

クス構造のストークによって膜貫通ヘリックスに接続される。M2/M3 ループは T (SERCA1a では A132-Q238) ドメインを, M4/M5 ループは P (N330-R505), N (R505-P681), および H (P681-S741) ドメインを形成する。N 末端と C 末端にも親水性領域があり細胞質側に露出している。この 2 次構造モデルは抗体や蛋白質分解酵素などを利用したいくつもの実験結果によって支持されている^{44,45)}。なお, SERCA2b の長い C 末端領域は疎水性が高く, 11 番目の膜貫通ヘリックスを形成することが予測され, 実際 SERCA2b の C 末端は ER 内腔側に存在することが抗体標識法で観察されてい

る⁴⁶⁾。PMCA の疎水性度プロファイルも SERCA1, 2a, 3 にほとんど等しく, 同様の 10 回膜貫通ドメイン構造が予想されている (図 1)^{1,2,5)}。PMCA の C 末端細胞質領域はとくに長く (SERCA1a では 20 残基に対し, PMCA4b では 160 残基), 活性制御に関与する (後述)。

M4/M5 ループにはアシルリン酸化部位 (Asp351) や ATP アナログで親和標識される残基 (後述) があり, P 型カチオン輸送 ATPase 間で保存されているいくつかの領域と ATP 結合部位に特徴的な α ヘリックスと β 構造の規則的なくり返しがある。そこでヌクレオチド結合部位の立体構造が, ホスホグリセレートキナーゼ, ヘキソキナーゼなどのドメイン構造を参考に予想された (図 3a)⁴⁷⁾。ATP 結合部位は N, P, H ドメインから構成され, ATP の γ リン酸基が P, H ドメインに達する様子がわかるように頭部上端に描いてある。SRCa²⁺-ATPase は Ca²⁺ 非存在下バナジウム酸により小胞体膜上でらせん状に配列してチューブ状結晶を形成し, 他方, 界面活性剤で可溶化した SRCa²⁺-ATPase は高濃度 Ca²⁺ と脂質存在下で配列して平面を形成しさらにそれが重なりあった 3 次元結晶を形成する⁴⁸⁾。

前者のチューブ状結晶を用いて, 低温電子顕微鏡法により 14 Å の分解能で Ca²⁺-ATPase の 3 次元構造が再構成された (図 3b)⁴⁹⁾。分子 [120 (高さ) × 50 × 80 Å] の形状は膜に対し著しく非対称で, その特徴は構造予測によく対応づけることができる。鳥の頭と首に似た細胞質部分の体積は全体の約 70% を占め, 内腔側領域の体積はわずか 5% にすぎない。膜の厚さは 32 Å, 首の部分 (ストーク) は高さ約 25 Å で 2 つのセグメントからなる。膜表面から約 50 Å 上方, 嘴に相当するところに 3 つの塊に囲まれたくぼみが存在する。非加水分解 ATP アナログの β , γ -bidentate chromium (III) ATP (Cr-ATP) を結合させた結晶では, このくぼみが埋まって見える⁵⁰⁾。この距離は蛍光エネルギー移動法により ATP 結合部位と膜面との距離として見積もられた値⁵¹⁾ にほぼ一致している。膜内領域は 3 つのセグメント A, B, C からなる。A はさらに細胞質側のストークに直結する A1 と, 内腔側の塊により B と結合する A2 とに分けられる。これらのセグメントの構成について現時点では次のように推察されている。Ca²⁺ 輸送部位形成に重要な M4~M6, M8 (後述) は太い A に含まれ, ストークに直結する M2~M5 は A1 を, M6, M8

は A2 を構成する。細胞質側比較的長い N 末端領域をもつ M1 は細胞質側の比較的大きな密度につながる C を、ほかの膜貫通ヘリックスより長く、しかも内腔側で長いループにより M8 につながる M7 は B を構成する^{44,49}。よりよい結晶の高分解能による解析で Ca^{2+} -ATPase の構造が明らかにされることが待たれる。

2. Ca^{2+} 輸送部位

ATP による EP 形成や Cr-ATP による Ca^{2+} 閉塞⁵²には第 1 と第 2 の両部位への Ca^{2+} 結合が必要であり、他方 P_i からの EP 形成は第 1 部位へ Ca^{2+} が結合するだけで阻害されること、また正の協同性により第 2 部位への Ca^{2+} 結合は高親和性になることなどを指標にして、SERCA1a の部位特異的変異により、 Ca^{2+} の配位子として機能する残基の同定と識別が行なわれた⁵²⁻⁵⁴。その結果、M4 の Glu309, M5 の Glu771, M6 の Asn796, Thr799, Asp800, M8 の Glu908 が Ca^{2+} 結合に関与すること、さらに Glu309 と Asn796 は第 2 部位の配位子、Glu771 と Thr799 は第 1 部位の配位子であり、Asp800 は配位子として両部位に関与すること、Glu908 は輸送部位形成のための周辺残基としての役割をもつことが示唆されている。このように Ca^{2+} の配位子が複数の膜貫通ヘリックスに存在することは、これらのヘリックスの適切な配向が高親和性 Ca^{2+} 結合部位の形成に必須で、また細胞質ドメインにおける ATP 分解と共役した配向性の変化によって Ca^{2+} 輸送が起こることを意味する。これらのヘリックスに変異導入されたシステイン残基間の架橋実験から、M4 と M6 は 40° の角度で右巻きスーパーコイルを形成し、Glu309, Asn796, Asp800 は M4 と M6 の接触面に、Thr799 はその側面に位置することが示唆された⁵⁵。そして M5 の Glu771 を M6 の Thr799 に面して配置することにより、2 つの Ca^{2+} 結合部位が(膜中で上下に重なるのではなく)、横に並んで位置したモデルが提出されている^{54,55}。PMCA では、Glu771, Thr799, Glu908 はそれぞれ Ala, Met, Gln に置換されている。これらの置換が、あるいはまた M5 には荷電残基のないことが、PMCA では輸送される Ca^{2+} が ATP1 個あたり 1 個である原因なのかもしれない。PMCA でも保存されている Glu309, Asn796, Asp800 に相当する残基へ変異を導入すると、やはり ATP からの EP 形成と輸送活性は消失する⁵⁶。なお、SERCA1a での変異導入により、M4 の内腔側端の

Lys297 は内腔への Ca^{2+} 放出のゲートとして⁵⁷、M6/M7 ループは Ca^{2+} が輸送部位へアクセスするための(あるいは Ca^{2+} 閉塞のための)ゲートとして機能することが示唆されている⁵⁸。また M4 と M5 の細胞質側あるいは内腔側の膜表面近傍に存在する残基への変異導入は ATP 分解と Ca^{2+} 輸送の脱共役をひき起こす^{52,57}。

3. 触媒部位

SR Ca^{2+} -ATPase で ATP 結合部位を構成する残基と結合部位の構造の詳細が化学(親和)修飾を利用して明らかになってきた。ATP のアデノシン部分の占める領域に結合するフルオレセイン 5-イソチオシアネート (FITC) は Lys 515 を親和標識する(図 3a)^{59,60}。アデノシン三リン酸ピリドキサルは Ca^{2+} 存在下で Lys684 を⁶¹、 Ca^{2+} 非存在下で Lys 684 と Lys 492 を標識する⁶²。Lys492 はまた、2',3'-O-(2,4,6-トリニトロフェニル)-8-アジド-AMP (TNP-8-アジド-AMP) および-ATP⁶³ や 7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸サクシニミジルエステル⁶⁴ で標識される。8-アジド-ADP は Thr532 と Thr533 を標識する⁶⁵。

Yamagata らは Lys492 がピリドキサル 5'-リン酸で修飾され、その結果触媒部位への ATP 結合が阻害されることを見だし、ATP やそのアナログによる修飾抑制と酵素の保護を解析して、Lys492 は触媒部位に結合した ATP の α リン酸基の占める領域に位置すると結論した⁶⁶。Yamasaki らは Lys492 が 3'-O-(5-フルオロ-2,4-ジニトロフェニル)-ATP で親和修飾されることを見だし、Lys492 は触媒部位に結合した ATP のリボース部分の 3'-OH 基側で、 α -リン酸基の近傍に位置すると結論した⁶⁷。 Ca^{2+} 輸送の基質となるアセチルリン酸の分解活性や P_i からの EP 形成をこれらの修飾は阻害しないので、Lys492 は触媒には必須でない^{66,67}。

Kimura らは 1,2-シクロヘキサジオン (CHD) 修飾により、Arg489 と Arg678 は触媒部位に結合した ATP の三リン酸部分(おそらくは α -リン酸基)の占める領域に、Arg505 はアデノシン部分の占める領域のごく近傍に存在すること、1 次構造上離れたこれらの領域から ATP 結合部位が形成されると結論した⁶⁸。アセチルリン酸からの正反応による EP 形成や P_i からの逆反応による EP 形成は、これらの残基の修飾によりほとんど阻害されなかった。McIntosh らは Lys492 と

Arg678 が ATP 結合部位の中で近接していることを、グルタルアルデヒドによる架橋実験で示唆している⁶⁹⁾。

これら P, N, H ドメインに存在し ATP 結合部位を構成する残基のいくつかや P 型カチオン輸送 ATPase 間で保存されている残基について、変異導入により役割が推定されている^{52,70,71)}。最近 Lys492 とその近傍残基の変異体についての詳細な解析により、P 型カチオン輸送 ATPase 間で非常に保存性の高い Phe487, Lys492 は基質 ATP 結合 (高親和性 ATP 結合) と調節部位への ATP 結合 (低親和性 ATP 結合) に必須の役割を果たすことが明らかにされた⁷²⁾。またこの解析により、Lys492 は結合した ATP の α -リン酸基のごく近傍に位置するという Yamagata ら⁶⁶⁾ と Yamasaki ら⁶⁷⁾ の結論が強く支持された⁷²⁾。

T ドメインと N 末端細胞質領域の役割はいままでほとんど理解されていなかった。最近 Saino らは Arg198 が CHD で修飾され P_i と Mg²⁺ からの EP 形成が阻害されること、P_i と Mg²⁺ からの EP 形成の遷移状態アナログを形成する F⁻+Mg²⁺⁷³⁻⁷⁵⁾ や バナジン酸 + Mg²⁺^{76,77)} はこの修飾を抑制して酵素を保護することを見いだした⁷⁸⁾。Yamasaki らは、これらの遷移状態アナログが His5 のジエチルピロカルボン酸修飾を著明に抑制し、P_i と Mg²⁺ からの EP 形成のこの修飾による阻害から酵素を保護することを見いだした⁷⁹⁾。これらの残基の修飾はアセチルリン酸からの EP 形成を阻害しない。一方、アセチルリン酸から形成した EP の加水分解を著明に抑制することが His5 修飾酵素で示された。以上より Arg198 と His 5 は、P_i と Mg²⁺ からの EP 形成 (ステップ 6) の遷移状態では触媒部位の一部を形成するかあるいはそのごく近傍に位置することが強く示唆された。部位特異的変異によりこれらの残基およびその領域の役割が明確になると期待される。

4. 制御部位

PMCA の長い C 末端細胞質領域には、CaM 結合ドメイン、自己抑制領域、プロテインキナーゼによってリン酸化される残基が存在し、活性制御に関与する (後述)。また PMCA の M2/M3 ループには酸性リン脂質結合領域が存在し、やはり活性制御に関与する。一方 SERCA はこれらの制御部位をもたないが、心筋 (SERCA2a) ではホスホランパンによる制御を受け、アシルリン酸化部位 (Asp351) の C 末端側の特定配列

(Lys397-Val402) がこの制御に必須であることが示されている⁸⁰⁾。

IV. Ca²⁺ 輸送と構造変化

輸送部位への Ca²⁺ 結合はどのようにして触媒部位を活性化し、触媒部位はどのように挙動することによって ATP からエネルギーを取り出し、このエネルギーを輸送部位に伝達するのであろう。ATP 分解と Ca²⁺ 輸送が異なるドメインで、しかも離れた位置で共役するのは、触媒部位と輸送部位が構造変化を介した long range の相互作用を行なうことによると考えられている。Ca²⁺ 輸送に伴う分子構造の変化についての解析が SRCa²⁺-ATPase で進んでいる。酵素のトリプトファン蛍光は 2 個の Ca²⁺ の逐次的な結合 (ステップ 1) に伴い二相性に増大する⁸¹⁾。この変化は、脂質-蛋白質界面に結合し、エネルギー移動によって膜内やそのごく近傍のトリプトファン残基の蛍光を選択的に消光する Ca²⁺ イオノフォア A23187 によって消失するので、輸送部位近傍の構造変化を反映する⁸²⁾。この二相性の変化に対応して、Lys515 を標識した FITC⁸³⁾ や ATP 結合部位近傍の Cys674 を標識した N-アセチル-N'-(5-スルフォ-1-ナフチル) エチレンジアミン (EDANS)⁸⁴⁾ の蛍光も Ca²⁺ によりそれぞれ二相性に減少および増大する。高濃度の A23187 は、膜貫通ドメインのおそらく深部のトリプトファン残基近傍に潜り込むことによって、この FITC 蛍光の二相目の変化と酵素の活性化をブロックする^{85,86)}。このように Ca²⁺ 結合によって誘起される膜貫通ドメイン、さらに触媒部位の逐次的な構造変化に伴って酵素は活性化する。EDANS 蛍光の増大は定常状態蛍光異方性の増大を伴うので、Cys674 近傍の構造は Ca²⁺ 結合によって運動性がより束縛された状態になる⁸⁶⁾。他方、Cys344/Cys364 領域の運動性の制限は Ca²⁺ 結合である程度解除されることが示唆されている⁸⁷⁾。アデノシン三リン酸ピリドキサールの標識部位が Ca²⁺ で変化すること (前述) や、H, T ドメイン中の特定部位のトリプシン⁸⁸⁾ や V8⁸⁹⁾ 切断に対する感受性が Ca²⁺ で変化することは上記の観察とともに、輸送部位への Ca²⁺ 結合による構造変化が P, N, H, T の各ドメインに及ぶことを示している。

筆者らは Cys674 を標識した EDANS の蛍光変化と EP 形成の速度論的解析から、ステップ 3 の Ca₂/酵素/

基質複合体において、以後の反応の生起に必要な構造変化が触媒部位に起こることを明らかにした^{84,90}。さらに蛍光のスペクトルと異方性の解析から、この構造変化の結果 Cys674 近傍の構造はより親水性で緩んだ状態になること、この状態は E₁P、E₂P を通して保たれることが示された⁸⁰。Kubo らは基質分子の構造のうちアデニン部分と触媒部位の特異的相互作用が、ステップ3の構造変化を著明に促進して迅速な Ca²⁺ 輸送を行なうために必須であることを明らかにした⁹¹。Daiho と Kanazawa は特異的ジスルフィド結合のジチオスレイトールによる開裂には Ca₂/酵素/基質複合体の形成が必須であること、そしてこの開裂は E₁P → E₂P のブロックをもたらすことを見いだした⁹²。Ca₂/酵素/基質複合体における構造変化は T ドメインや H ドメインにも及ぶことが、これらのドメイン中の特定部位が Ca²⁺ と AMP-PNP の共存下でトリプシン切断から保護されることによって示されている⁸⁸。

筆者ら⁹³ および Obara ら⁹⁴ はさらに、触媒部位近傍の構造はリン酸基転移 (ステップ4)、E₁P → E₂P (ステップ5) で逐次的に変化することを EDANS 標識酵素を用いて明らかにした。ステップ4をステップ3から分離して追跡することは、リン酸基転移が非常に速い Mg · ATP の代わりに EP 形成が著明に速い Ca · ATP^{95,96} を利用することにより可能となった。またこの実験から、ステップ3の構造変化は基質メタルイオンの種類によらず非常に速いが、ステップ4では生理的基質メタルイオンである Mg²⁺ が迅速な構造変化とリン酸基転移を可能にすることが明らかとなった。ステップ4のリン酸基転移に水分子は直接関与しないことが立体化学的解析によって証明されている⁹⁷ が、筆者らは水分子はこの反応の活性化エネルギーを下げ、迅速なリン酸基転移を行なうために重要であることを強く示唆した⁹⁸。

このように触媒部位の構造はステップ3~5で連続して変化していく。これらの構造変化はどのステップで輸送部位に伝達され、その構造を変化させるのだろうか。Ca²⁺ で活性化した酵素に ATP を加えるとトリプトファン蛍光は1~2%減少する⁸¹。Nakamura らは E₁P が蓄積する条件で、トリプトファン蛍光は Ca₂/酵素/基質複合体では変化しないが E₁P 形成に伴い減少することを観察した^{99,100}。次に筆者らは E₂P が選択的に蓄積する条件下 (E₂P 分解を促進して E₂P 蓄積を抑制

する K⁺ ¹⁰¹) の非存在下で、しかも Kawashima らが E₂P 分解の選択的阻害剤として働くことを見いだしていた高濃度の lasalocid¹⁰² 存在下)、E₁P → E₂P に伴うトリプトファン蛍光がさらに減少することを示した¹⁰³。これらの変化は A23187 によって消光された。以上より、ステップ3で触媒部位において以後のステップの生起に必須の構造変化が起こり、ステップ4と5で触媒部位の構造変化が逐次膜貫通ドメインに伝達され、輸送部位の構造を変化させて Ca²⁺ の閉塞と内腔側への放出をひき起こすことが強く示唆された¹⁰⁰。

部位特異的変異を導入すると E₁P → E₂P の抑制をもたらす残基が各細胞質ドメインや M4, M8, S4, S1 など広範囲に存在する^{52,54,57}。また T ドメイン中の特定部位のトリプシン切断は E₁P → E₂P の阻害をひき起こす⁸⁸。Asp351 を囲む Cys344 と Cys364 の両方を N-エチルマレimidで修飾すると E₁P → E₂P は抑制され¹⁰⁴、また Cys344 を標識したプローブの蛍光は E₁P → E₂P で変化する¹⁰⁵。あらかじめ Ca²⁺ で活性化した酵素に高濃度の A23187 を加えると、A23187 は膜貫通ドメインのおそらく深部に潜り込み E₁P → E₂P を選択的にブロックする⁸⁵。このようなさまざまな観察は、上記の筆者らの結果とともに、分子の広範囲にわたる領域が E₁P → E₂P の構造転移に関与することを示している。また M4, M5, M6 中の残基あるいは S5 中の Lys784 への変異導入が、E₂P 分解の抑制^{52,54,57} あるいは促進¹⁰⁶) をもたらすことは、ステップ6~7でも膜貫通ドメインと触媒部位との間に long range の相互作用が存在することを示唆している。このように構造変化の相互伝達には分子の広範囲の領域が関与すると示唆されているが、輸送サイクルにおけるドメイン間の相対的動きは蛍光エネルギー移動法で検知できるほど大きくないようである^{48,51}。触媒部位で起こる構造変化が細胞質ドメイン間のわずかなずれをひき起こし、さらにそれがストークを介して膜貫通ヘリックスの配向性の変化を誘起するのかもしれない。

V. 機能単位

前述のように SRCa²⁺-ATPase のいくつかの反応ステップは低親和性の ATP 結合によって促進される。最近の部位特異的変異を利用した結果は、この調節部位と触媒部位が1次構造上は同一のものであることを強

く示唆している⁷²⁾(前述)。そしてこの調節部位は Ca²⁺-ATPase の分子間相互作用によって生じたことを示唆する多くの結果^{107,108)} や SR 膜上で Ca²⁺-ATPase は実際に 2 量体を形成していることが観察されている^{49,109)}。Nakamura らは、分子間相互作用の結果 Ca²⁺ 結合の速度論的性質が異なる 2 種類の分子が形成することを示唆している^{110,111)}。一方、界面活性剤で可溶化した単量体でも正常な Ca²⁺-ATPase 反応が進行すること、調節部位は(ステップ4でADPを遊離した)触媒部位であることを示唆する結果も提出されていて^{112,113)}、Ca²⁺ 輸送の機能単位が 2 量体か単量体かについて意見は一致していない。

機能単位を明らかにするには ATP や P_i でリン酸化される触媒部位、低親和性 ATP 結合部位および Ca²⁺-ATPase ポリペプチド鎖のストイキオメトリーをまず確定することが必須である。筆者らは SR 小胞の TNP-ATP 結合とその ATP による阻害を解析し、Ca²⁺-ATPase には ATP でリン酸化される触媒部位 1 モルあたり 1 モルの高親和性 ATP 結合部位(触媒部位)と 1 モルの低親和性 ATP 結合部位が存在することを示した¹¹⁴⁾。さらに Nakamura らは、Ca²⁺-ATPase 1 分子あたり FITC 標識部位(Lys515)は 1 個であり、この親和標識は ATP ですべて抑制されること、さらに ATP や P_i によるリン酸化とこの FITC 標識のストイキオメトリーは 0.5:1 であることを示した¹¹⁵⁾。これらの結果は Ca²⁺-ATPase 1 分子には 1 次構造上 1 つの ATP 結合部位が存在すること、このうち半数が ATP や P_i でリン酸化される触媒部位であること(half-of-the-sites reactivity)を示し、輸送の機能単位が Ca²⁺-ATPase の 2 量体であることを強く支持するものである。

Daiho と Kanazawa は SR 小胞の Ca²⁺-ATPase の全システイン量から Ca²⁺-ATPase ポリペプチド鎖量を見積もることにより、リン酸化部位はやはり Ca²⁺-ATPase 分子の半数であることを示した⁹²⁾。Daiho ら⁷³⁾ と Kubota ら⁷⁴⁾ はさらに、P_i と Mg²⁺ による EP 形成の遷移状態アナログを形成する F⁻+Mg²⁺ の酵素への結合を解析し、SR 小胞に存在する Ca²⁺-ATPase 分子のうち半数のみが触媒的に活性(ATP や P_i でリン酸化される状態)でほかの半数は不活性(ATP や P_i でリン酸化されない状態)であること、また活性な分子と不活性な分子は 1 Mg²⁺ と 2 F⁻ の結合(および遊離)において速度論的に等しく均一なものであることを強

く示唆した。今後、Ca²⁺-ATPase の分子間相互作用の構造上、機能上の実体をさらに理解することが Ca²⁺ 輸送と ATP による調節の機構を明らかにするうえで必須である。

VI. 活性制御と各アイソフォームの機能特性

1. PMCA

選択的スプライシング部位 C におけるペプチド挿入のない PMCA4b では約 28 残基配列から CaM 結合ドメインが形成される(図 1)¹¹⁶⁾。CaM 結合ドメインはまた自己抑制領域を構成する。プロテアーゼ処理や遺伝子操作によりこの C 末端領域を除去すると CaM 結合と同様の活性化が起こり、これに CaM 結合ペプチド(CaM 結合ドメイン配列の合成ペプチド)を加えると native な酵素の CaM 非存在下とほぼ同様の抑制された活性が回復する¹¹⁶⁾。C 末端領域を除去した PMCA4b と CaM 結合ペプチドとの架橋実験から、CaM 結合ドメインはリン酸化部位(Asp465)の前後、T ドメイン 220 番残基領域と N ドメイン 540 番残基領域に結合して自己を抑制し、CaM はこの結合を解離させると結論されている(図 1)。Na⁺,K⁺-ATPase の α サブユニットと PMCA の C 末端 165 残基からなるキメラが CaM 感受性をもつという観察は、PMCA の自己抑制領域と相互作用する領域が P 型カチオン輸送 ATPase 間で保存されている可能性を示唆している¹¹⁶⁾。PMCA の全アイソフォーム間で CaM 結合ドメインの N 末端側 18 残基配列(SA, 図 1)はほとんど等しいが、その C 末端の部位 C における選択的スプライシングは CaM 結合ドメインと自己抑制領域の構造を変化させる。PMCA4b は 4a に比べ、顕著に高い CaM 親和性を持ち、CaM 非存在下では自己抑制領域との顕著に強い相互作用によって活性はより強く抑制されている¹¹⁷⁾。除去する C 末端領域の長さを変えた変異体の解析から、PMCA4a の CaM 結合ドメインは、4b よりさらに 21 残基長い配列から構成され、他方 4a の自己抑制領域はこのドメイン内に存在するが、4b では CaM 結合ドメインとその C 末端側にある第 2 の領域から構成されることがわかった¹¹⁷⁾。PMCA1 の部位 C におけるペプチド挿入は CaM 親和性の pH 依存性に著明な変化をもたらす¹¹⁾。

ホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸(PIP₂)、ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジルセ

リンなどは、酸性リン脂質結合領域 (図 1, PMCA4b では Lys339-Leu368) と相互作用して PMCA の Ca^{2+} に対する親和性と輸送の V_{\max} を増大させる¹⁴⁵⁾。IP₃ やジアシルグリセロールはこの効果をもたない。部位 A における選択的スライシングは脂質による活性制御を調節する可能性があるが、これらの制御が *in vivo* で Ca^{2+} 濃度調節にどのように貢献するかは明らかでない。

C キナーゼにより平滑筋¹¹⁸⁾、心筋¹¹⁹⁾、赤血球¹²⁰⁾ などの PMCA はリン酸化され、 Ca^{2+} 親和性と活性が増大する。赤血球膜 Ca^{2+} -ATPase において C キナーゼでリン酸化される残基の 1 つは PMCA4b の CaM 結合ドメイン中央の Thr1102 であり、このリン酸化は自己抑制領域の解離をひき起こすこと、および CaM 結合を抑制することが示唆された¹²⁰⁾。この Thr 残基はすべてのアイソフォームで保存されているが、C キナーゼでほとんどリン酸化されないアイソフォーム (PMCA2b, 3b) も見いだされている¹²¹⁾。さらに PMCA2a, 3a および 4b において C キナーゼで最も容易にリン酸化される残基はこの Thr でなく CaM 結合ドメインあるいは第 2 自己抑制領域中のほかの残基であり、しかもリン酸化の効果もまったく異なることが観察され、初期に示唆された Thr1102 のリン酸化の意義は明確ではなくなってきた¹²¹⁾。

A キナーゼにより赤血球膜 Ca^{2+} -ATPase の Ca^{2+} 親和性と活性が増大する。リン酸化された残基は PMCA1b にのみ存在する Ser1178 と同定された¹²²⁾。cGMP によって培養ラット血管平滑筋細胞の PMCA による Ca^{2+} 排出が促進され¹²³⁾、またウシ血管平滑筋から精製した PMCA は G キナーゼでリン酸化され Ca^{2+} 親和性と輸送活性が増大することが報告されている¹²⁴⁾。一方、cGMP によるブタ血管平滑筋の PMCA の活性化は分子量 240 K の蛋白質のリン酸化に伴って起こるとも報告されている¹²⁵⁾。チロシンキナーゼ pp60^{src} で血小板や赤血球の PMCA を処理すると、また血小板のトロンビン処理により、PMCA4b の Tyr1176 がリン酸化され酵素は著明に抑制される¹²⁶⁾。他方、pp60^{src} により PMCA1 の Tyr590 がリン酸化されている可能性もある。細胞 Ca^{2+} 代謝調節における PMCA の各種キナーゼによるリン酸化の意義を明確にするには各アイソフォームについて、また *in vivo* でさらに情報を蓄積する必要がある。

2. SERCA

COS 細胞で発現した SERCA 各アイソフォームの機能特性が比較された¹²⁷⁾。非筋細胞のハウスキーピングアイソフォームと考えられている SERCA2b はほかのアイソフォームの約 1/2 の低いターンオーバー値をもつ。SERCA2b 変異体の解析から C 末端 12 残基がこの特性に重要であることが明らかにされた¹²⁸⁾。限られた非筋細胞で高レベルに発現する SERCA3 (前述) はほかのアイソフォームに比べ、 Ca^{2+} に対し有意に低い親和性で、輸送活性の至適 pH が高く、またバナジン酸による阻害に対し感受性が高い。SERCA3 と 2a からなるキメラの解析から、SERCA3 の N/H ドメインが M5/M10 の膜貫通領域との相互作用によって低 Ca^{2+} 親和性をもたらすと結論された¹²⁹⁾。また SERCA3 は SERCA2 や 1 とは異なりホスホランバンに非感受性であり、ホスホランバンによる制御にはアシルリン酸化部位の C 末端側の特定配列が必須であることが示されている (前述)⁸⁰⁾。なお、心筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) の Ser38 は内在性膜結合 Ca^{2+} /CaM 依存性プロテインキナーゼでリン酸化される¹³⁰⁾ が、これにより輸送活性は増大する¹³¹⁾ か影響されない^{132,133)} か意見は一致していない。

SERCA の各アイソフォームを特異的に強く阻害し、PMCA やほかの P 型カチオン輸送 ATPase, F₁-ATPase, イオンチャンネルなどには顕著な影響を与えない阻害剤としてタブシガーギン¹³⁴⁻¹³⁶⁾、シクロピアゾン酸¹³⁷⁾、および 2,5-ジ-(タート-ブチル)-1-4-ベンゾヒドロキノン (tBuBHQ)¹³⁸⁾ が見いだされている。一方、PMCA の特異的阻害剤はみつつかっていない。タブシガーギンは E₂ 状態の SERCA に 1:1 のストイキオメトリーで結合して ($K_d = 2\text{pM}$ ¹³⁹⁾) dead-end complex を形成する。SERCA1 と Na⁺, K⁺-ATPase からなるキメラの解析^{140,141)} とタブシガーギンアジド誘導体による標識実験¹⁴²⁾ から、S3/M3 にタブシガーギンの結合部位があることが示唆されている。シクロピアゾン酸や tBuBHQ に対する SERCA の親和性はタブシガーギンよりかなり低く K_d は 1 μM 程度である。平滑筋細胞、神経膠星状細胞、下垂体細胞などで、ER にはこれらの阻害剤に対し非感受性の Ca^{2+} ストアコンパートメントが存在することが観察されている^{143,144)}。またタブシガーギン存在下で生育できるようになった細胞の Ca^{2+} ストアにはタブシガーギンでは阻害されない Ca^{2+} -ATPase が発現している¹⁴⁵⁾。これらは Ca^{2+} -ATPase 分子種の

ER 膜状での分布や発現調節などの点からも興味深い。

おわりに ATP 分解と Ca²⁺ 輸送の共役機構についてさらに深く理解するために本稿で述べたような課題が残されている。また細胞 Ca²⁺ 代謝調節に PMCA と SERCA の各アイソフォームがどのように役割を分担し貢献するのか、各アイソフォームの分布、発現調節、機能特性と制御などについての解析がさらに進展することによって理解されると期待する。最近植物で N 末端細胞質領域に CaM 結合ドメインをもつ Ca²⁺-ATPase が同定された¹⁴⁰⁾。植物あるいは酵母などでも PMCA や SERCA タイプの高親和性 Ca²⁺ 輸送 ATPase についてこのように情報が蓄積しつつあるが、本稿では紹介できなかった。

文 献

- 1) Carafoli, E. : *FASEB J.*, 8, 993-1002 (1994)
- 2) Carafoli, E., Stauffer, T. : *J. Neurobiol.*, 25, 312-324 (1994)
- 3) Greeb, J., Shull, G. E. : *J. Biol. Chem.*, 264, 18569-18576 (1989)
- 4) Brandt, P., Neve, R. L., Kammesheidt, A., Rhoads, R. E., Vanaman, T. C. : *J. Biol. Chem.*, 267, 4376-4385 (1992)
- 5) Penniston, J. T., Enyedi, A. : *Cell Physiol. Biochem.*, 4, 148-159 (1994)
- 6) Fujimoto, T. : *J. Cell Biol.*, 120, 1147-1157 (1993)
- 7) Fujimoto, T., Nakade, S., Miyawaki, K., Miko-shiba, K., Ogawa, K. : *J. Cell Biol.*, 119, 1507-1513 (1992)
- 8) Brandl, C. J., Green, N. M., Korczak, B., MacLennan, D. H. : *Cell*, 44, 597-607 (1986)
- 9) Brandl, C. J., deLeon, S., Martin, D. R., MacLennan, D. H. : *J. Biol. Chem.*, 262, 3768-3774 (1987)
- 10) Verboomen, H., Mertens, L., Eggermont, J., Wuytack, F., Van Den Bosch, L. : *Biosci. Rep.*, 15, 307-315 (1995)
- 11) MacLennan, D. H., Brandl, C. J., Korczak, B., Green, N. M. : *Nature*, 316, 696-700 (1985)
- 12) Lytton, J., Zarin-Herzberg, A., Periasamy, M., MacLennan, D. H. : *J. Biol. Chem.*, 264, 7059-7065 (1989)
- 13) Lytton, J., MacLennan, D. H. : *J. Biol. Chem.*, 263, 15024-15031 (1988)
- 14) Campbell, A. M., Kessler, P. D., Sagara, Y., Inesi, G., Fambrough, D. M. : *J. Biol. Chem.*, 266, 16050-16055 (1991)
- 15) Burk, S. E., Lytton, J., MacLennan, D. H., Shull, G. E. : *J. Biol. Chem.*, 264, 18561-18568 (1989)
- 16) Wu K.-D., Lee, W.-S., Wey, J., Bungard, D., Lytton, J. : *Am. J. Physiol.*, 269, C775-C784 (1995)
- 17) Foletti, D., Guerini, D., Carafoli, E. : *FASEB J.*, 9, 670-680 (1995)
- 18) de Meis, L., Vianna, A. L. : *Annu. Rev. Biochem.*, 48, 275-292 (1979)
- 19) Degani, C., Boyer, P. D. : *J. Biol. Chem.*, 248, 8222-8226 (1973)
- 20) Bastide, F., Meissner, G., Fleischer, S., Post, R. L. : *J. Biol. Chem.*, 248, 8385-8391 (1973)
- 21) Allen, G., Green, N. M. : *FEBS Lett.*, 63, 188-192 (1976)
- 22) Makinose, M. : *Pflügers Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere*, 294, R82-R83 (1967)
- 23) Yamamoto, T., Tonomura, Y. : *J. Biochem.*, 62, 558-575 (1967)
- 24) Kanazawa, T., Yamada, S., Tonomura, Y. : *J. Biochem.*, 68, 593-595 (1970)
- 25) Takakuwa, Y., Kanazawa, T. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 88, 1209-1216 (1979)
- 26) Dupont, Y. : *Eur. J. Biochem.*, 109, 231-238 (1980)
- 27) Takisawa, H., Makinose, M. : *Nature*, 290, 271-273 (1981)
- 28) Yamaguchi, M., Kanazawa, T. : *J. Biol. Chem.*, 259, 9526-9531 (1984)
- 29) Yamaguchi, M., Kanazawa, T. : *J. Biol. Chem.*, 260, 4896-4900 (1985)
- 30) Wakabayashi, S., Shigekawa, M. : *Biochemistry*, 29, 7309-7318 (1990)
- 31) Wakabayashi, S., Ogurusu, T., Shigekawa, M. : *J. Biol. Chem.*, 261, 9762-9769 (1986)
- 32) Shigekawa, M., Dougherty, J. P., Katz, A. M. : *J. Biol. Chem.*, 253, 1442-1450 (1978)
- 33) Kanazawa, T., Boyer, P. D. : *J. Biol. Chem.*, 248, 3163-3172 (1973)
- 34) Masuda, H., de Meis, L. : *Biochemistry*, 12, 4581-4585 (1973)
- 35) Kanazawa, T. : *J. Biol. Chem.*, 250, 113-119 (1975)
- 36) de Meis, L. : *Biochim. Biophys. Acta*, 973, 333-349 (1989)
- 37) Nakamura, J. : *Biochim. Biophys. Acta*, 870, 495-501 (1986)
- 38) Inesi, G., Chen, L., Sumbilla, C., Lewis, D., Kirtley, M. E. : *Biosci. Rep.*, 15, 327-339 (1995)
- 39) Mintz, E., Guillain, F. : *Biochim. Biophys. Acta*, 1318, 52-70 (1997)
- 40) Inesi, G. : *J. Biol. Chem.*, 262, 16338-16342 (1987)
- 41) Hanel, A. M., Jencks, W. P. : *Biochemistry*, 30, 11320-11330 (1991)
- 42) Orłowski, S., Champeil, P. : *Biochemistry*, 30, 11331-11342 (1991)
- 43) Hao, L., Rigaud, J.-L., Inesi, G. : *J. Biol. Chem.*, 269, 14268-14275 (1994)
- 44) Stokes, D. L., Taylor, W. R., Green, N. M. : *FEBS Lett.*, 346, 32-38 (1994)
- 45) Møller, J. V., Juul, B., le Maire, M. : *Biochim. Biophys. Acta* 1286, 1-51 (1996)
- 46) Campbell, A. M., Kessler, P. D., Fambrough, D.

- M. : *J. Biol. Chem.*, **267**, 9321-9325 (1992)
- 47) Green, N. M., MacLennan, D. H. : *Biochem. Soc. Trans.*, **17**, 819-822 (1990)
- 48) Martonosi, A. N. : *Biosci. Rep.*, **15**, 263-281 (1995)
- 49) Toyoshima, C., Sasabe, H., Stokes, D. L. : *Nature*, **362**, 469-471 (1993)
- 50) Yonekura, K., Stokes, D. L., Sasabe, H., Toyoshima, C. : *Biophys. J.*, **72**, 997-1005 (1997)
- 51) Bigelow D. J., Inesi, G. : *Biochim. Biophys. Acta*, **1113**, 323-338 (1992)
- 52) Andersen, J. P. : *Biosci. Rep.*, **15**, 243-261 (1995)
- 53) Clarke, D. M., Loo, T. W., Inesi, G., MacLennan, D. H. : *Nature*, **339**, 476-478 (1989)
- 54) MacLennan, D. H., Rice, W. J., Green, N. M. : *J. Biol. Chem.*, **272**, 28815-28818 (1997)
- 55) Rice, W. J., Green, N. M., MacLennan D. H. : *J. Biol. Chem.*, **272**, 31412-31419 (1996)
- 56) Guerini, D., Foletti D., Vellani, F., Carafoli, E. : *Biochemistry*, **35**, 3290-3296 (1996)
- 57) Chen, L., Sumbilla, C., Lewis, D., Zhong, L., Strock, C., Kirtley, M. E., Inesi, G. : *J. Biol. Chem.*, **271**, 10745-10752 (1996)
- 58) Falson, P., Menguy, T., Corre, F., Bouneau, L., de Gracia, A. G., Soulié, S., Centeno, F., Møller, J. V., Champeil, P., le Maire, M. : *J. Biol. Chem.*, **272**, 17258-17262 (1997)
- 59) Pick, U., Bassilian, S. : *FEBS Lett.*, **123**, 127-130 (1981)
- 60) Mitchinson, C., Wilderspin, A. F., Trinnaman, B. J., Green N. M. : *FEBS Lett.*, **146**, 87-92 (1982)
- 61) Yamamoto, H., Tagaya, M., Fukui, T., Kawakita, M. : *J. Biochem.*, **103**, 452-457 (1988)
- 62) Yamamoto, H., Imamura, Y., Tagaya, M., Fukui, T., Kawakita, M. : *J. Biochem.*, **106**, 1121-1125 (1989)
- 63) McIntosh, D. B., Woolley, D. G., Berman, M. C. : *J. Biol. Chem.*, **267**, 5301-5309 (1992)
- 64) Stefanova, H. I., Mata, A. M., East, J. M., Gore, M. G., Lee, A. G. : *Biochemistry*, **32**, 356-362 (1993)
- 65) Lacapère, J.-J., Garin, J., Trinnaman, B., Green, N. M. : *Biochemistry*, **32**, 3414-3421 (1993)
- 66) Yamagata, K., Daiho, T., Kanazawa, T. : *J. Biol. Chem.*, **268**, 20930-20936 (1993)
- 67) Yamasaki, K., Daiho, T., Kanazawa, T. : *J. Biol. Chem.*, **269**, 4129-4134 (1994)
- 68) Kimura, K., Suzuki, H., Daiho, T., Yamasaki, K., Kanazawa, T. : *J. Biol. Chem.*, **271**, 28933-28941 (1996)
- 69) McIntosh, D. B. : *J. Biol. Chem.*, **267**, 22328-22335 (1992)
- 70) Maruyama, K., MacLennan D. H. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3314-3318 (1988)
- 71) MacLennan, D. H., Clarke, D. M., Loo, T. W., Skerjanc, I. S. : *Acta Physiol. Scand.*, **607**, 141-150 (1992)
- 72) McIntosh, D. B., Woolley, D. G., Vilsen, B., Andersen, J. P. : *J. Biol. Chem.*, **271**, 25778-25789 (1996)
- 73) Murphy, A. J., Coll, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **267**, 5229-5235 (1992)
- 74) Kubota, T., Daiho, T., Kanazawa, T. : *Biochim. Biophys. Acta* **1163**, 131-143 (1993)
- 75) Daiho, T., Kubota, T., Kanazawa, T. : *Biochemistry*, **32**, 10021-10026 (1993)
- 76) Dupont, Y., Bennett, N. : *FEBS Lett.*, **139**, 237-240 (1982)
- 77) Inesi, G., Lewis, D., Murphy, A. J. : *J. Biol. Chem.*, **259**, 996-1003 (1984)
- 78) Saino, T., Daiho, T., Kanazawa, T. : *J. Biol. Chem.*, **272**, 21142-21150 (1997)
- 79) Yamasaki, K., Daiho, T., Saino, T., Kanazawa, T. : *J. Biol. Chem.*, **272**, 30627-30636 (1997)
- 80) Toyofuku, T., Kurzydowski, K., Tada, M., MacLennan D. H. : *J. Biol. Chem.*, **269**, 22929-22932 (1994)
- 81) Dupont, Y., Bennett, N., Pougeois, R., Lacapère, J.-J. : *in Structure and Function of Sarcoplasmic Reticulum* (ed. Fleischer, S., Tonomura, Y.), pp. 225-248, Academic Press, Orlando (1985)
- 82) de Foresta, B., Champeil, P., le Maire, M. : *Eur. J. Biochem.*, **194**, 383-388 (1990)
- 83) Ohmiya, H., Kanazawa, T. : *J. Biochem.*, **109**, 751-757 (1991)
- 84) Suzuki, H., Obara, M., Kuwayama, H., Kanazawa, T. : *J. Biol. Chem.*, **262**, 15448-15456 (1987)
- 85) Hara, H., Kanazawa, T. : *J. Biol. Chem.*, **261**, 16584-16590 (1986)
- 86) Suzuki, H., Obara, M., Kubo, K., Kanazawa, T. : *J. Biol. Chem.*, **264**, 920-927 (1989)
- 87) Suzuki, S., Kawato, S., Kouyama, T., Kinoshita K. Jr., Ikegami, A., Kawakita, M. : *Biochemistry*, **28**, 7734-7740 (1989)
- 88) Imamura, Y., Kawakita, M. : *J. Biochem.*, **105**, 775-781 (1989)
- 89) le Maire, M., Lund, S., Viel, A., Champeil, P., Møller, J. V. : *J. Biol. Chem.*, **265**, 1111-1123 (1990)
- 90) 鈴木 裕 : 生化学, **64**, 1444-1449 (1992)
- 91) Kubo, K., Suzuki, H., Kanazawa, T. : *Biochim. Biophys. Acta*, **1040**, 251-259 (1990)
- 92) Daiho, T., Kanazawa, T. : *J. Biol. Chem.*, **269**, 11060-11064 (1994)
- 93) Suzuki, H., Nakamura, S., Kanazawa, T. : *Biochemistry*, **33**, 8240-8246 (1994)
- 94) Obara, M., Suzuki, H., Kanazawa, T. : *J. Biol. Chem.*, **263**, 3690-3697 (1988)
- 95) Yamada, S., Ikemoto, N. : *J. Biol. Chem.*, **255**, 3108-3119 (1980)
- 96) Shigekawa, M., Wakabayashi, S., Nakamura, H. : *J. Biol. Chem.*, **258**, 8698-8707 (1983)
- 97) Webb, M. R., Trentham, D. R. : *J. Biol. Chem.*, **256**, 4884-4887 (1981)
- 98) Suzuki, H., Kanazawa, T. : *J. Biol. Chem.*, **271**, 5481-5486 (1996)
- 99) Nakamura, S., Suzuki, H., Kanazawa, T. : *J. Biol. Chem.*, **269**, 16015-16019 (1994)
- 100) Kanazawa, T., Suzuki, H., Daiho, T., Yamasaki, K. : *Biosci. Rep.*, **15**, 317-326 (1995)

- 101) Shigekawa, M., Dougherty, J. P. : *J. Biol. Chem.*, **253**, 1451-1457 (1978)
- 102) Kawashima, T., Hara, H., Kanazawa, T. : *J. Biol. Chem.*, **265**, 10993-10999 (1990)
- 103) Suzuki, H., Kanazawa, T. : *J. Biol. Chem.*, **270**, 3089-3093 (1995)
- 104) Kawakita, M., Yamashita, T. : *J. Biochem.*, **102**, 103-109 (1987)
- 105) Wakabayashi, S., Imagawa, T., Shigekawa, M. : *J. Biochem.*, **107**, 563-571 (1990)
- 106) Sørensen, T., Vilsen, B., Andersen, J. P. : *J. Biol. Chem.*, **272**, 30244-30253 (1997)
- 107) Ikemoto, N. : *Annu. Rev. Physiol.*, **44**, 297-317 (1982)
- 108) Ferreira, S. T., Verjovski-Almeida, S. : *J. Biol. Chem.*, **263**, 9973-9980 (1988)
- 109) Hymel, L., Maurer, A., Berenski, C., Jung, C. Y., Fleischer, S. : *J. Biol. Chem.*, **259**, 4890-4895 (1984)
- 110) Nakamura, J. : *J. Biol. Chem.*, **269**, 30822-30827 (1994)
- 111) Nakamura, J., Tajima, G. : *J. Biol. Chem.*, **270**, 17350-17354 (1995)
- 112) Andersen, J. P. : *Biochim. Biophys. Acta*, **988**, 47-72 (1989)
- 113) Heegaard, C. W., le Maire, M., Gulik-Krzywicki, T., Möller, J. V. : *J. Biol. Chem.*, **265**, 12020-12028 (1990)
- 114) Suzuki, H., Kubota, T., Kubo, K., Kanazawa, T. : *Biochemistry*, **29**, 7040-7045 (1990)
- 115) Nakamura, S., Suzuki, H., Kanazawa, T. : *J. Biol. Chem.*, **272**, 6232-6237 (1997)
- 116) Ishi, T., Takeyasu, K. : *EMBO J.*, **14**, 58-67 (1995)
- 117) Verma, A. K., Enyedi, A., Filoteo, A. G., Strehler, E. E., Penniston, J. T. : *J. Biol. Chem.*, **271**, 3714-3718 (1996)
- 118) Furukawa, K., Tawada, Y., Shigekawa, M. : *J. Biol. Chem.*, **264**, 4844-4849 (1989)
- 119) Ogurusu, T., Wakabayashi, S., Furukawa, K., Tawada-Iwata, Y., Imagawa, T., Shigekawa, M. : *J. Biochem.*, **108**, 222-229 (1990)
- 120) Wang, K. K. W., Wright, L. C., Machan, C. L., Allen, B. G., Conigrave, A. D., Roufogalis, B. D. : *J. Biol. Chem.*, **266**, 9078-9085 (1991)
- 121) Enyedi, A., Elwess, N. L., Filoteo, A. G., Verma, A. K., Paszty, K., Penniston, J. T. : *J. Biol. Chem.*, **272**, 27525-27528 (1997)
- 122) James, P. H., Pruschy, M., Vorherr, T. E., Penniston, J. T., Carafoli, E. : *Biochemistry*, **28**, 4253-4258 (1989)
- 123) Furukawa, K., Tawada, Y., Shigekawa, M. : *J. Biol. Chem.*, **263**, 8058-8065 (1988)
- 124) Furukawa, K., Nakamura, H. : *J. Biochem.*, **101**, 287-290 (1987)
- 125) Yoshida, Y., Sun, H.-T., Cai, J.-Q., Imai, S. : *J. Biol. Chem.*, **266**, 19819-19825 (1991)
- 126) Dean, W. L., Chen, D., Brandt, P. C., Vanaman, T. C. : *J. Biol. Chem.*, **272**, 15113-15119 (1997)
- 127) Lytton, J., Westlin, M., Burk, S. E., Shull, G. E., MacLennan, D. H. : *J. Biol. Chem.*, **267**, 14483-14489 (1992)
- 128) Verboomen, H., Wuytack, F., Van Den Bosch, L., Mertens, L., Casteels, R. : *Biochem. J.*, **303**, 979-984 (1994)
- 129) Toyofuku, T., Kurzydowski, K., Lytton, J., MacLennan, D. H. : *J. Biol. Chem.*, **267**, 14490-14496 (1992)
- 130) Toyofuku, T., Kurzydowski, K., Narayanan, N., MacLennan, D. H. : *J. Biol. Chem.*, **269**, 26492-26496 (1994)
- 131) Xu, A., Hawkins, C., Narayanan, N. : *J. Biol. Chem.*, **268**, 8394-8397 (1993)
- 132) Odermatt A., Kurzydowski K., MacLennan, D. H. : *J. Biol. Chem.*, **271**, 14206-14213 (1996)
- 133) Reddy L. G., Jones L. R., Pace, R. C., Stokes D. L. : *J. Biol. Chem.*, **271**, 14964-14970 (1996)
- 134) Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R., Dawson, A. P. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2466-2470 (1990)
- 135) Lytton, J., Westlin, M., Hanley, M. R. : *J. Biol. Chem.*, **266**, 17067-17071 (1991)
- 136) Inesi, G., Sagara, Y. : *J. Membr. Biol.*, **141**, 1-6 (1994)
- 137) Seidler, N. W., Jona, I., Vegh, M., Martonosi, A. : *J. Biol. Chem.*, **264**, 17816-17823 (1989)
- 138) Kass, G. E. N., Duddy, S. K., Moore, G. A., Orrenius, S. : *J. Biol. Chem.*, **264**, 15192-15198 (1989)
- 139) Davidson, G. A., Varhol, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **270**, 11731-11734 (1995)
- 140) Ishii, T., Lemas, M. V., Takeyasu, K. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6103-6107 (1994)
- 141) Nørregaard, A., Vilsen, B., Andersen, J. P. : *J. Biol. Chem.*, **269**, 26598-26601 (1994)
- 142) Hua, S., Inesi, G. : *Biochemistry*, **36**, 11865-11872 (1997)
- 143) Tanaka, Y., Tashjian, A. H. Jr. : *Biochemistry*, **32**, 12062-12073 (1993)
- 144) Golovina, V. A., Blaustein, M. P. : *Science*, **275**, 1643-1648 (1997)
- 145) Yu, M., Zhang, L., Rishi, A. K., Khadeer, M., Inesi, G., Hussain, A. : *J. Biol. Chem.*, **273**, 3542-3546 (1998)
- 146) Harper, J. F., Hong, B., Hwang, I., Guo, H. Q., Stoddard, R., Huang, J. F., Palmgren, M. G., Sze, H. : *J. Biol. Chem.*, **273**, 1099-1106 (1998)