
筋小胞体カルシウムポンプの N 末端ドメインによる折りたたみの安定化機構

(12680602)

平成 12 年度～平成 13 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C) (2)) 研究成果報告書

平成 14 年 2 月 5 日

研究代表者 大保 貴嗣
(旭川医科大学医学部講師)

は し が き

研究組織

研究代表者：大保 貴嗣（旭川医科大学医学部講師）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 12 年度	2,200	0	2,200
平成 13 年度	1,400	0	1,400
総計	3,600	0	3,600

研究発表

（1）学会誌等

1. 大保 貴嗣、山崎 和生、上堂地 美佳、鈴木 裕

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の C876-C888 ジスルフィド結合は ATP 加水分解と Ca^{2+} 輸送の共役に重要である

生化学、72 巻、8 号、2000 年 8 月 25 日

2. 上堂地 美佳、大保 貴嗣、山崎 和生、鈴木 裕

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の Val-200 への部位特異的変異導入は Ca^{2+} -ATPase 活性を抑制する

生化学、72 巻、8 号、2000 年 8 月 25 日

3. 山崎 和生、大保 貴嗣、上堂地 美佳、鈴木 裕

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase のマグネシウム・フッ素複合体は Ca^{2+} 非存在下での C12E8 による可溶化に対して安定である

生化学、72 巻、8 号、2000 年 8 月 25 日

4. Danko Stefania, Daiho Takashi, Yamasaki Kazuo, Kamidochi Mika, Suzuki Hiroshi, and Toyoshima Chikashi

ADP-insensitive Phosphoenzyme Intermediate of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase Has a Compact Conformation Resistant to Proteinase K, V8 Protease and Trypsin

FEBS Letters, Vol.489, No.2-3, 2001, Feb 2

5. 山崎 和生、大保 貴嗣、鈴木 裕

Ca²⁺非存在下での可溶化筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の ATP, ADP, および Mg²⁺による安定化とイオン強度の影響

生化学、73 卷、8 号、2001 年 8 月 25 日

6. Stefania Danko、山崎 和生、大保 貴嗣、鈴木 裕、豊島 近

Proteinase K, V8, Trypsin による限定分解によって明らかになった筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の触媒過程におけるドメイン集合体変化

生化学、73 卷、8 号、2001 年 8 月 25 日

7. 加藤 早苗、上堂地 美佳、大保 貴嗣、山崎 和生、鈴木 裕

筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の Val-200 への変異導入はリン酸化中間体の迅速な異性化と加水分解を阻害する

生化学、73 卷、8 号、2001 年 8 月 25 日

8. 大保 貴嗣、王 国麗、山崎 和生、加藤 早苗、鈴木 裕

筋小胞体 Ca²⁺-ATPase (SERCA1a) の Cys 残基の部位特異的変異

生化学、73 卷、8 号、2001 年 8 月 25 日

9. Daiho Takashi, Yamasaki Kazuo, Saino Tomoyuki, Kamidochi Mika, Satoh Katsuhiko, Iizuka Hajime, and Suzuki Hiroshi

Mutations of Either or Both of Cys⁸⁷⁶ and Cys⁸⁸⁸ of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Result in a Complete Loss of Ca²⁺ Transport Activity without a Loss of Ca²⁺-dependent ATPase Activity
ROLE OF THE CYS⁸⁷⁶-CYS⁸⁸⁸ DISULFIDE BOND

The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, No. 35, 2001, Aug 31

10. Danko Stefania, Yamasaki Kazuo, Daiho Takashi, Suzuki Hiroshi, and Toyoshima Chikashi
Organization of Cytoplasmic Domains of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase in E₁P and E₁ATP States: a Limited Proteolysis Study

FEBS Letters Vol. 505, No. 1, 2001, Sep 7

11. Yamasaki Kazuo, Daiho Takashi, and Suzuki Hiroshi

Remarkable stability of solubilized and delipidated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase with tightly bound fluoride and magnesium against detergent-induced denaturation

The Journal of Biological Chemistry, Vol. 277, 2002, in Press

(2) 口頭発表

1. Suzuki Hiroshi, Daiho Takashi, Yamasaki Kazuo, Saino Tomoyuki, and Kanazawa Tohru
Deletions or Specific Substitutions of a Few Residues in the NH₂-terminal Region (Ala3 to Thr9) of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Cause Inactivation and Rapid Degradation of the Enzyme Expressed in COS-1 Cells

Gordon Conference on Muscle: Excitation Contraction Coupling, 2000, June 11

2. 大保 貴嗣、山崎 和生、上堂地 美佳、鈴木 裕

筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の C876-C888 ジスルフィド結合は ATP 加水分解と Ca²⁺輸送の共役に必要である

日本生体エネルギー研究会、2000年9月15日

3. 大保 貴嗣、山崎 和生、上堂地 美佳、鈴木 裕

筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の C876-C888 ジスルフィド結合は ATP 加水分解と Ca²⁺輸送の共役に重要である

日本生化学会、2000年10月13日

4. 上堂地 美佳、大保 貴嗣、山崎 和生、鈴木 裕

筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の Val-200 への部位特異的変異導入は Ca²⁺-ATPase 活性を抑制する

日本生化学会、2000年10月13日

5. 山崎 和生、大保 貴嗣、上堂地 美佳、鈴木 裕

筋小胞体 Ca²⁺-ATPase のマグネシウム・フッ素複合体は Ca²⁺非存在下での C12E8 による可溶化に対して安定である

日本生化学会、2000年10月13日

6. Danko Stefania, 山崎 和生、大保 貴嗣、豊島 近、鈴木 裕

筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の細胞質 3 ドメインは触媒過程で4種の異なる集合状態を変化する: E₁、E₁ATP~E₁P、E₂P、及び E₂ のドメイン構造

日本生体エネルギー研究会、2001年9月6日

7. 佐藤 克彦、大保 貴嗣、山崎 和生、斉野 朝幸、上堂地 美佳、鈴木 裕、高橋 英俊、山本 明美、飯塚 一

ダリエー病患者で発見された小胞体 Ca²⁺-ATPase (SERCA) Cys875 のミスセンス変異はジスルフィド結合を開裂させ、ATP 加水分解と Ca²⁺輸送の共役を障害する

日本研究皮膚科学会、2001年9月8日

8. 山崎 和生、大保 貴嗣、鈴木 裕

Ca²⁺非存在下での可溶化筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の ATP, ADP, および Mg²⁺による安定化とイオン強度の影響

日本生化学会、2001年10月27日

9. Stefania Danko、山崎 和生、大保 貴嗣、鈴木 裕、豊島 近

Proteinase K, V8, Trypsin による限定分解によって明らかになった筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の触媒過程におけるドメイン集合体変化

日本生化学会、2001年10月27日

10. 加藤 早苗、上堂地 美佳、大保 貴嗣、山崎 和生、鈴木 裕

筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の Val-200 への変異導入はリン酸化中間体の迅速な異性化と加水分解を阻害する

日本生化学会、2001年10月27日

11. 大保 貴嗣、王 国麗、山崎 和生、加藤 早苗、鈴木 裕

筋小胞体 Ca²⁺-ATPase (SERCA1a) の Cys 残基の部位特異的変異

日本生化学会、2001年10月27日

(3) 出版物

1. Daiho Takashi, Yamasaki Kazuo, Suzuki Hiroshi, Saino Tomoyuki, and Kanazawa Tohru

Deletions or Specific Substitutions of a Few Residues in the NH₂-terminal Ala3-Thr9 Region of Sarcoplasmic Ca²⁺-ATPase Cause Inactivation and Rapid Degradation of the Enzyme Expressed in COS-1 Cells

Excerpta Medical International Congress Series *The Na/K-ATPase and Related ATPases* (Taniguchi, K. and Kaya, S. Eds.), Elsevier, 2000

2. Yamasaki Kazuo, Daiho Takashi, Suzuki Hiroshi, Saino Tomoyuki, and Kanazawa Tohru

Mutations of Arginine-198 in Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Cause Inhibition of Hydrolysis of the Phosphoenzyme Intermediate Formed from Inorganic Phosphate

Excerpta Medical International Congress Series *The Na/K-ATPase and Related ATPases* (Taniguchi, K. and Kaya, S. Eds.), Elsevier, 2000

3. Suzuki Hiroshi, Daiho Takashi, Yamasaki Kazuo, and Kanazawa Tohru

Only Half of the Ca^{2+} -ATPase Molecules Present in Sarcoplasmic Reticulum Vesicles Can Be Phosphorylated with ATP or Inorganic Phosphate

Excerpta Medical International Congress Series *The Na/K-ATPase and Related ATPases* (Taniguchi, K. and Kaya, S. Eds.), Elsevier, 2000

研究成果

1. 筋小胞体カルシウムポンプの第7、8膜貫通ヘリックス間内腔ループに存在する Cys876 と Cys888 の機能を調べた。兎骨格筋から単離した本酵素をペプシン消化し、ジスルフィド結合を含むペプチドを精製し、上記 Cys 間にジスルフィド結合が形成されていることを示した。本酵素の変異体 C876A、C888A、C876A/C888A はいずれも Ca^{2+} 輸送機能を完全に失っていたが、ATPase 触媒過程は野生型に比べて異常はなかった。これらの結果から、このジスルフィド結合が ATP 加水分解と Ca^{2+} 輸送の共役に重要な高次構造を安定化することを示唆した。

2. 本酵素の細胞質ドメインはリン酸化ドメイン (P)、ヌクレオチド結合ドメイン (N)、細胞質小ドメイン (A) より構成されるが、触媒過程でこれらの3ドメインの集合状態変化を調べた。Proteinase K (prtK) と V8 による A ドメイン-膜ドメイン連結ループの (A-M ループ) 切断、trypsin による A ドメインの切断に対する抵抗性を解析した。その結果から、基質結合酵素 (CaE/ATP) および ADP 感受性リン酸化酵素で P、N、A-M ループが集合するが A はまだであり、 Ca^{2+} 輸送 step である ADP 非感受性型へのリン酸化酵素異性化によって A が約 90° 回転して3ドメインが最もコンパクトな構造になることを示唆した。

3. 可溶化した筋小胞体カルシウムポンプは Ca^{2+} 無しで迅速に変性することから、 Ca^{2+} 非結合酵素の結晶解析などが困難であった。一方、 Mg^{2+} とフッ素は本酵素に固く結合して E2P のアナログとなる。そこで Mg^{2+} /F 結合型と、非結合型酵素を可溶化後、親和性カラムで精製し、 4°C にて Ca^{2+} 無しでの可溶化安定性を調べた。、 Mg^{2+} /F 非結合型酵素は5日の半減期で活性が消失するが、 Mg^{2+} /F 結合型酵素は20日以上活性は完全に保たれることを示した。

上記1と2の成果は、以下に綴じた論文として国際誌に掲載された。

3の成果は現在印刷中である。