

---

Ca<sup>2+</sup>ポンプのエネルギー転換機構ならびに  
遺伝子異常による細胞病態の分子基盤

---

16370066

平成16年度~平成17年度科学研究費補助金  
(基盤研究(B))研究成果報告書

平成18年5月

研究代表者 鈴木 裕  
(旭川医科大学医学部教授)

は し が き

研究組織

研究代表者： 鈴木 裕 (旭川医科大学医学部教授)  
研究分担者： 大保 貴嗣 (旭川医科大学医学部助教授)  
研究分担者： 山崎 和生 (旭川医科大学医学部助手)  
研究分担者： 加藤 早苗 (旭川医科大学医学部助手)

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 16 年度	11,600	0	11,600
平成 17 年度	3,600	0	3,600
総 計	15,200	0	15,200

研究発表

(1) 学会誌等

1. Kazuo Yamasaki, Katsuhiko Sato, Takashi Daiho, Yuki Miyauchi, Hidetoshi Takahashi, Akemi Ishida-Yamamoto, Satoshi Nakamura, Hajime Iizuka, and Hiroshi Suzuki

Distinct type of Abnormality in Kinetic Properties of Three Darier Disease-causing Sarco(endo)plasmic Reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA2b) Mutants

生化学、76 巻、8 号、2004 年 8 月 25 日

2. Takashi Daiho, Yuki Miyauchi, Kazuo Yamasaki, Katsuhiko Sato, Hidetoshi Takahashi, Akemi Ishida-Yamamoto, Satoshi Nakamura, Hajime Iizuka, and Hiroshi Suzuki

Comprehensive and systematic analysis of function and expression of the 51 missense mutants of SERCA2b found in Darier's Disease patients

生化学、76 巻、8 号、2004 年 8 月 25 日

3. Guoli Wang, Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, Stefania Danko, and Hiroshi Suzuki

Essential Roles of Hydrophobic Interactions at the Interface of Gathered P and A Domains of Sarcoplasmic Reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase in Energy Transduction

生化学、76 巻、8 号、2004 年 8 月 25 日

4. Hiroshi Suzuki, Stefania Danko, Kazuo Yamasaki, and Takashi Daiho

Distinct natures of Be/F-bound, Al/F-bound, and Mg/F-bound stable analogues of an ADP-insensitive phosphoenzyme intermediate of sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase

生化学、76 巻、8 号、2004 年 8 月 25 日

5. Stefania Danko, Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, and Hiroshi Suzuki

Distinct natures of beryllium fluoride-bound, aluminum fluoride-bound, and magnesium fluoride-bound stable analogues of an ADP-insensitive phosphoenzyme intermediate of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase: changes in catalytic and transport sites during phosphoenzyme hydrolysis

*The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 15, 2004, Jan 30

6. Katsuhiko Sato, Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, Yuki Miyauchi, Hidetoshi Takahashi, Akemi Ishida-Yamamoto, Satoshi Nakamura, Hajime Iizuka, and Hiroshi Suzuki

Distinct types of abnormality in kinetic properties of three Darier disease-causing sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mutants that exhibit normal expression and high  $\text{Ca}^{2+}$  transport activity

*The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 34, 2004, Jun 18

7. Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, Stefania Danko, and Hiroshi Suzuki

Multiple and Distinct Effects of Mutations of Tyr<sup>122</sup>, Glu<sup>123</sup>, Arg<sup>324</sup>, and Arg<sup>334</sup> Involved in Interactions between the Top Part of Second and Fourth Transmembrane Helices in Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

*The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 3, 2004, Jan 16

8. Guoli Wang, Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, and Hiroshi Suzuki

Critical hydrophobic interactions between phosphorylation and actuator domains of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase for hydrolysis of phosphorylated intermediate

*The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, No. 28, 2005, May 17

9. Hiroshi Suzuki

Structure and function of Ca pump and the molecular basis of genetic diseases caused by its mutations

生物物理、44 卷、1 号、2004 年 11 月 25 日

10. Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, and Hiroshi Suzuki

$\text{Ca}^{2+}$  occlusion and de-occlusion at transport sites of phosphoenzyme intermediates of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase studied by mutagenesis

生化学、77 卷、8 号、2005 年 8 月 25 日

11. Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, and Hiroshi Suzuki

Analysis of  $\text{Ca}^{2+}$ -release process in the phosphorylated intermediates of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by mutagenesis

生化学、77 卷、8 号、2005 年 8 月 25 日

12. Stefania Danko, Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, and Hiroshi Suzuki  
Stable analogs for phosphoenzyme intermediates of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase  
生物物理、45、1号、2005年10月19日

13. Hiroshi Suzuki  
Changes in Cytoplasmic Domain Organization and Energy Transduction in Calcium Pump  
生物物理、45卷、1号、2005年

14. Masaki Yoshida, Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, Hajime Iizuka, and Hiroshi Suzuki  
ATP2C1 is specifically localized in the basal layer of normal epidermis and its depletion triggers  
keratinocyte differentiation  
*Journal of Dermatological Science*, 2006 Apr 16; [Epub ahead of print] in press

(2) 口頭発表

1. Yuki Miyauchi, Hidetoshi Takahashi, Akemi Ishida-Yamamoto, Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho,  
Katsuhiko Sato, Hiroshi Suzuki, and Hajime Iizuka  
Comprehensive and systematic analysis of function and expression of the 51 missense mutants of  
SERCA2b found in Darier's Disease patients  
第29回日本研究皮膚科学会年次学術大会、2004年4月15日

2. Kazuo Yamasaki, Katsuhiko Sato, Takashi Daiho, Yuki Miyauchi, Hidetoshi Takahashi, Akemi  
Ishida-Yamamoto, Satoshi Nakamura, Hajime Iizuka, and Hiroshi Suzuki  
Distinct type of Abnormality in Kinetic Properties of Three Darier Disease-causing  
Sarco(endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA2b) Mutants  
第77回日本生化学会大会、2004年10月14日

3. Takashi Daiho, Yuki Miyauchi, Kazuo Yamasaki, Katsuhiko Sato, Hidetoshi Takahashi, Akemi  
Ishida-Yamamoto, Satoshi Nakamura, Hajime Iizuka, and Hiroshi Suzuki  
Comprehensive and systematic analysis of function and expression of the 51 missense mutants of  
SERCA2b found in Darier's Disease patients  
第77回日本生化学会大会、2004年10月14日

4. Guoli Wang, Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, Stefania Danko, and Hiroshi Suzuki  
Essential Roles of Hydrophobic Interactions at the Interface of Gathered P and A Domains of  
Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in Energy Transduction  
第77回日本生化学会大会、2004年10月14日

5. Hiroshi Suzuki, Stefania Danko, Kazuo Yamasaki, and Takashi Daiho  
Distinct natures of Be/F-bound, Al/F-bound, and Mg/F-bound stable analogues of an  
ADP-insensitive phosphoenzyme intermediate of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase  
第77回日本生化学会大会、2004年10月14日

6. 山崎 和生、王 国麗、大保 貴嗣、鈴木 裕  
筋小胞体CaポンプのTyr122残基を中心とした疎水性相互作用の重要性  
日本生体エネルギー研究会第30回討論会、2004年12月18日
7. 鈴木 裕、山崎 和生、大保 貴嗣、佐藤 克彦、宮内 勇貴、高橋 英俊、山本 明  
美、中村 哲史、Danko Stefania、飯塚 一  
小胞体Caポンプ分子異常によるダリエー病  
日本生体エネルギー研究会第30回討論会、2004年12月18日
8. Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, Guoli Wang, Danko Stefania, and Hiroshi Suzuki  
Changes in Interactions between Phosphorylation and Actuator-domains of sarco(endo)plasmic  
reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase during Processing of Phosphoenzyme Intermediate  
11<sup>th</sup> International Conference on Na,K-ATPase & Related Cation Pumps, 2005年9月6日
9. Stefania Danko, Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, and Hiroshi Suzuki  
Distinct natures of Be/F-bound, Al/F-bound, and Mg/F-bound stable analogues of an  
ADP-insensitive phosphoenzyme intermediate of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase  
11<sup>th</sup> International Conference on Na,K-ATPase & Related Cation Pumps, 2005年9月6日
10. Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, and Hiroshi Suzuki  
 $\text{Ca}^{2+}$  occlusion and de-occlusion at transport sites of phosphoenzyme intermediates of sarcoplasmic  
reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase studied by mutagenesis  
第78回日本生化学会大会、2005年10月20日
11. Kazuo Yamasaki, Guoli Wang, Takashi Daiho and Hiroshi Suzuki  
Analysis of  $\text{Ca}^{2+}$ -release process in the phosphorylated intermediates of sarcoplasmic reticulum  
 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by mutagenesis  
第78回日本生化学会大会、2005年10月20日
12. ダンコー ステファアーニア、山崎 和生、大保 貴嗣、鈴木 裕  
筋小胞体 Ca-ATPase リン酸化中間体の安定な構造アナログの開発  
第43回日本生物物理学会年会、2005年11月23日
13. 大保貴嗣、山崎和生、鈴木裕  
筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase リン酸化中間体の輸送部位における  $\text{Ca}^{2+}$ 閉塞/脱閉塞の部位特異的  
変異による研究  
日本生体エネルギー研究会第31回討論会、2005年12月21日
14. 山崎和生、大保貴嗣、鈴木裕  
筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase リン酸化中間体からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出過程の部位特異的変異による解析  
日本生体エネルギー研究会第31回討論会、2005年12月21日

## 研究成果

P型カチオン輸送 ATPase の代表的メンバーである小胞体膜  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプは、ATP 加水分解に共役して  $\text{Ca}^{2+}$  を数千倍の濃度勾配に逆らい小胞内腔に汲み上げ、細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  動態と機能を制御する。ATP 加水分解過程では自己リン酸化中間体を形成する。本研究プロジェクトにより、小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプの細胞質の三つのドメインが  $\text{Ca}^{2+}$  輸送過程で四種の顕著に異なる集合状態を変化すること、そして自己リン酸化中間体の異性化における A ドメインの  $90^\circ$  以上にも及ぶ回転とこのドメインの P および N ドメインへの強い結合が輸送部位から内腔への  $\text{Ca}^{2+}$  放出を可能にすること、さらにこれらの変化に必須である構造因子を残基レベルで明らかにすることができた。また自己リン酸化中間体の種々の安定な構造アナログを開発して結晶構造解析に供するだけでなく、これらアナログの構造特性解明と反応過程への帰属により、触媒部位と  $\text{Ca}^{2+}$  放出路の協調した動きがいかに関内腔への  $\text{Ca}^{2+}$  放出と内腔  $\text{Ca}^{2+}$  の輸送部位へのアクセス（すなわち細胞質への漏れ出し）を制御するかを明らかとした。他方、小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ遺伝子異常による病態発症について、ダリエー病で報告された殆ど全ての残基置換および削除変異が  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプタンパクに与える影響を解析し、家系に依存した異なる内容のポンプ分子異常が発症原因となっていることを明らかにした。また  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプと同じく P 型カチオン輸送 ATPase に属するゴルジ装置  $\text{Ca}^{2+}\text{Mn}^{2+}$  ポンプについて、皮膚組織基底層に特異的に発現・局在していることを発見した。そして  $\text{Mn}^{2+}$  選択的イオノフォアおよび  $\text{Ca}^{2+}\text{Mn}^{2+}$  ポンプの siRNA によるノックアウト実験により、 $\text{Ca}^{2+}\text{Mn}^{2+}$  ポンプとそれにより設定される基底層角化細胞ゴルジ装置は、角化細胞の分化に必須に機能することを明らかにした。これにより  $\text{Ca}^{2+}\text{Mn}^{2+}$  ポンプ遺伝子異常による病態発症の理解のための分子基盤を確立した。これらの成果はすべて本分野の代表的国際誌に発表した。次頁より、これらの学会誌論文別刷りを綴じ、具体的内容の報告とする。