

---

筋小胞体カルシウムポンプの  
エネルギー共役の中心となる中間体の解析

---

16570107

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

平成18年 5月

研究代表者 山崎 和生

旭川医科大学 医学部 助手

<はしがき>

この報告書は平成 16-17 年度科学研究費補助金（基盤研究（C）「筋小胞体カルシウムポンプのエネルギー共役の中心となる中間体の解析」研究代表者：山崎 和生）の研究成果をまとめたものである。

研究組織

研究代表者： 山崎 和生（旭川医科大学・医学部・助手）

交付決定額（配分額）（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	2,200,000	0	2,200,000
平成 17 年度	1,300,000	0	1,300,000
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究発表

(1) 学会誌等

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<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA2b) Mutants”、  
生化学、 76 巻・8 号、p781、2004 年 8 月 25 日

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、p781、2004 年 8 月 25 日

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”、  
生化学、 76 巻・8 号、p781、2004 年 8 月 25 日

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”  
、生化学、 76 巻・8 号、p782、2004 年 8 月 25 日

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、279 卷・15 号、p14991-8、2004 年 4 月 9 日

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、279 卷・34 号、p35595-603、2004 年 8 月 20 日

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、280 卷・28 号、p26508-16、2005 年 7 月 15 日

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、p803、2005 年 8 月 25 日

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”

生化学、77 卷・8 号、p804、2005 年 8 月 25 日

## (2) 口頭発表

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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2b) Mutants”、

第 77 回日本生化学会大会 (横浜)、2004 年 10 月 14 日

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 (横浜)、2004 年 10 月 14 日

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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in Energy Transduction”、  
第 77 回日本生化学会大会（横浜）、2004 年 10 月 14 日

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結合の重要性  
日本生体エネルギー研究会第 30 回討論会（大阪）、2004 年 12 月 18 日

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（大阪）、2004 年 12 月 18 日

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（神戸）、2005 年 10 月 20 日

Kazuo Yamasaki, Guoli Wang, Takasahi 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（神戸）、2005 年 10 月 20 日

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（名古屋）、2005 年 12 月 21 日

山崎 和生、王 国麗、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（名古屋）、2005 年 12 月 21 日

### （3）出版物

なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況  
該当なし

## 研究成果

### 平成 16 年度

#### 組み換えタンパク発現系の最適化

組み換えタンパク発現系の最適化のため、Adeno virus、lipofection 法、electroporation 法を試みその結果を比較した。その結果どの方法を用いても、ミクロソームタンパク当たり 2%以上の発現量を得ることができたが、発現量が上昇するにつれて、発現したカルシウムポンプタンパク当たりのリン酸化中間体量は低下していく傾向にあった。これは無理に発現量を増やした場合、活性を持たないタンパクが増加することを示している。また定常的に SERCA1a を発現する組み換え細胞も作成したが、十分な発現量は得られなかった。以上の結果、本実験では lipofection 法をもちいて一過的に強制発現させた SERCA1a を用い解析を行うことにした。

#### 反応速度論的解析による、E2PCa 中間体の存在の実証

E2PCa 中間体存在の実証のため、今までの解析で E2PCa の蓄積が期待される複数の SERCA1a 変異体を用いて、Ca<sup>2+</sup>存在下で ATP を加えてリン酸化させ、定常状態が成り立っている時点で ADP-非感受性 EP (E2P+E2PCa) の量を測定した。その結果 ADP-非感受性 EP の量は WT では Ca<sup>2+</sup>濃度を変化させても変わらないが、変異体では Ca<sup>2+</sup>濃度を 1-100 μM の間で変化させると、大きく変化し、Ca<sup>2+</sup>濃度が低くなるほど ADP-非感受性 EP の量が増えた。この結果は ADP-非感受性 EP の中に Ca を結合している分子種 (E2PCa) が含まれていることを強く示唆しており、その Ca<sup>2+</sup>親和性は数 μM と見積もることができた。

#### 組み換えタンパクを用いた Ca<sup>2+</sup>結合測定

メンブレンフィルター上の <sup>45</sup>Ca を放射活性をイメージングプレートを用いて計測する方法を検討したところ、十分に SERCA1a の Ca<sup>2+</sup>結合測定に適用可能であるが、メンブレンによる遮蔽効果に留意する必要があることが分かった。

### 平成 17 年度

#### COS-1 細胞 Microsome 分画に発現した SERCA1a を用いた Ca<sup>2+</sup>結合量測定法の確立

従来 COS-1 細胞で発現させた SERCA1a (筋小胞体カルシウムポンプ)を用いる測定系では、発現量の低さとバックグラウンドの高さが問題となり、Ca<sup>2+</sup>-ATPase への Ca<sup>2+</sup>結合を直接測定することは非常に困難であった。今研究で、私は washer の組成を検討することにより、メンブレンフィルトレーション法で、発現した SERCA1a への Ca<sup>2+</sup>結合を直接測定する方法を確立し、簡便、安全に SERCA1a 変異体の酵素学的性質をより詳細に調べることが出来るようになった。

#### SERCA1a 変異体の E2P 中間体に存在する、内腔向き高親和性 Ca<sup>2+</sup>結合部位

今までの解析で E2P の蓄積が期待される変異体を用いて、定常状態で ADP-非感受性 EP (E2P+E2PCa) の量を測定した。その結果 ADP-非感受性 EP の量は WT では

Ca<sup>2+</sup>濃度を変化させても変わらないが、変異体では Ca<sup>2+</sup>濃度に依存して、大きく変化し、Ca<sup>2+</sup>濃度が低くなるほど ADP-非感受性 EP の量が増えた。またこの Ca<sup>2+</sup>濃度依存性は pH によって大きく変化し、pH が高いほど、高い Ca<sup>2+</sup>依存性を示した。これから求めた見掛けの Ca<sup>2+</sup>親和性は、pH7.3 で、150 μM 程度であり、この結果は変異体の E2P は内腔側の Ca<sup>2+</sup>に対して高い親和性を持っていることを示している。

#### E2PCa 中間体の検出

SERCA1a を Ca<sup>2+</sup>存在下、ATP を添加してリン酸化し、定常状態での E1P 量と Ca<sup>2+</sup>結合量の比較を行った。その結果 WT の場合 E1P の比率と、Ca<sup>2+</sup>結合量が完全に一致したのに対し、変異体では E1P の比率より Ca<sup>2+</sup>の結合量の方が多かった。このことは SERCA1a の反応経路に Ca<sup>2+</sup>を結合した E2P 中間体 (E2PCa) が存在することを強く示唆している。