

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の触媒部位の構造と機能

一部位特異的変異による解析一

(09680609)

平成9年度～平成10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11年2月

研究代表者 金 沢 徹  
(旭川医科大学医学部教授)

## 研究組織

研究代表者：金 沢 徹（旭川医科大学医学部教授）  
研究分担者：鈴木 裕（旭川医科大学医学部助教授）  
研究分担者：大保 貴 嗣（旭川医科大学医学部助手）  
研究分担者：山 崎 和 生（旭川医科大学医学部助手）

## 研究経費

平成 9 年度	2,200 千円
平成10年度	1,100 千円
計	3,300 千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

#### 1. 齋野朝幸、大保貴嗣、金沢徹

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の Arg-198 のシクロヘキサンジオンによる修飾は Pi からのリン酸化中間体形成を阻害する

生化学、69 巻、7 号、1997 年 7 月 25 日

#### 2. 山崎和生、大保貴嗣、齋野朝幸、鈴木裕、金沢徹

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の His-5 のジエチルピロカーボネートによる修飾はリン酸化中間体の加水分解をブロックする

生化学、69 巻、7 号、1997 年 7 月 25 日

3. Tomoyuki Saino, Takashi Daiho, and Tohru Kanazawa

Modification of Arginine-198 in Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by 1,2-Cyclohexanedione Causes Inhibition of Formation of the Phosphoenzyme Intermediate from Inorganic Phosphate

The Journal of Biological Chemistry, Vol.272, No.34, August 22, 1997

4. Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, Tomoyuki Saino, and Tohru Kanazawa

Modification of Histidine 5 in Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by Diethyl Pyrocarbonate Causes Strong Inhibition of Formation of the Phosphoenzyme Intermediate from Inorganic Phosphate

The Journal of Biological Chemistry, Vol.272, No.49, December 5, 1997

5. 大保貴嗣、山崎和生、齋野朝幸、鈴木裕、金沢徹

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase N末端ドメインの Ser<sup>6</sup>-Lys<sup>7</sup>-Ser<sup>8</sup> は酵素の native conformation を安定化する

生化学、70巻、8号、1998年8月25日

6. 大保貴嗣、鈴木裕、山崎和生、齋野朝幸、金沢徹

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の Arg-198 への部位特異的変異導入は Pi から形成したリン酸化中間体の加水分解を抑制する

生化学、70巻、8号、1998年8月25日

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

Mutations of Arg<sup>198</sup> in sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase cause inhibition of hydrolysis of the phosphoenzyme intermediate formed from inorganic phosphate

FEBS Letters, Vol.444, No.1, 1999

(2) 口頭発表

1. 齋野朝幸、大保貴嗣、金沢徹

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の Arg-198 のシクロヘキサジオンによる修飾は Pi からのリン酸化中間体形成を阻害する

第70回日本生化学会大会、1997年9月24日

2. 山崎和生、大保貴嗣、齋野朝幸、鈴木裕、金沢徹

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の His-5 のジエチルピロカーボネートによる修飾はリン酸化中間体の加水分解をブロックする

第 70 回日本生化学会大会、1997 年 9 月 24 日

3. 大保貴嗣、山崎和生、齋野朝幸、鈴木裕、金沢徹

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の N 末端ドメインの Ser<sup>6</sup>-Lys<sup>7</sup>-Ser<sup>8</sup> は酵素の native conformation を安定化する、また Arg<sup>198</sup> の部位特異的変異はリン酸化中間体の加水分解を強く阻害する

第 35 回日本生化学会北海道支部例会、1998 年 7 月 11 日

4. 大保貴嗣、山崎和生、齋野朝幸、鈴木裕、金沢徹

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase N 末端ドメインの Ser<sup>6</sup>-Lys<sup>7</sup>-Ser<sup>8</sup> は酵素の native conformation を安定化する

第 71 回日本生化学会大会、1998 年 10 月 17 日

5. 大保貴嗣、鈴木裕、山崎和生、齋野朝幸、金沢徹

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の Arg-198 への部位特異的変異導入は Pi から形成したリン酸化中間体の加水分解を抑制する

第 71 回日本生化学会大会、1998 年 10 月 17 日

## 研究 成 果

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の Arg<sup>198</sup> の機能的役割を部位特異的変異を用いて調べた。この部位特異的変異では、Arg<sup>198</sup> が lysine、glutamine、glutamic acid、alanine、及び isoleucine で置換された。これらの変異体を発現させた COS-1 細胞から分離した小胞体膜を用いて速度論的解析を行った。Arg<sup>198</sup> を lysine で置換した変異体の turnover 速度は野生型の turnover 速度とほとんど変わらなかったが、Arg<sup>198</sup> を glutamine、alanine、及び isoleucine で置換した変異体では、turnover 速度は野生型に比べて可成り減少し、Arg<sup>198</sup> を glutamic acid で置換した変異体ではさらに著明に減少した。定常状態で  $\text{K}^+$  存在下で ATP から作られるリン酸化酵素は、Arg<sup>198</sup> を lysine で置換した変異体では、野生型と同じように、ほとんど完全に ADP 感受性であった。しかし、Arg<sup>198</sup> を glutamine で置換した変異体では、ADP 非感受性リン酸化酵素が可成り蓄積した。Arg<sup>198</sup> を alanine 及び isoleucine で置換した変異体では、ADP 非感受性リン酸化酵素はさらに多く蓄積した。Arg<sup>198</sup> を glutamic acid で置換した変異体では、ADP 非感受性リン酸化酵素は最も多く蓄積した。初めに  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase を <sup>32</sup>Pi でリン酸化した後非放射性 Pi で希釈することにより、ADP 非感受性リン酸化酵素の脱リン酸の速度を測定した。この速度は Arg<sup>198</sup> を glutamic acid で置換した変異体では、中程度に減少した。Arg<sup>198</sup> を alanine で置換した変異体では、脱リン酸の速度はさらに大きく減少した。Arg<sup>198</sup> を glutamic acid で置換した変異体では、脱リン酸の速度は最も大きく減少した。しかし、Arg<sup>198</sup> を lysine で置換した変異体では、脱リン酸の速度はほとんど減少しなかった。これらの結果は、Arg<sup>198</sup> の正電荷と高い親水性が ADP 非感受性リン酸化酵素の速い加水分解に重要な役割を果たしていることを示している。