

筋小胞体カルシウムポンプのATP結合部位の  
構造と機能に関する研究

課題番号 04670134

平成5年度科学研究費補助金（一般研究(C)）研究成果報告書

平成6年2月

研究代表者 鈴木 裕  
(旭川医科大学医学部助教授)

# 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)

## 研究経費

|       |         |
|-------|---------|
| 平成4年度 | 1,000千円 |
| 平成5年度 | 1,100千円 |
| 計     | 2,100千円 |

## 研究発表

### (1) 学会誌

・鈴木 裕、中村 哲史、金沢 徹

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseの触媒部位と FITC 結合部位の stoichiometry、生化学、64、平成4年8月

・鈴木 裕

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseアーゼ、生化学、64、平成4年12月

・中村 哲史、鈴木 裕、金沢 徹

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseの 8-thiocyano-ATP による親和修飾、生化学、65、平成5年8月

・鈴木 裕、中村 哲史、金沢 徹

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseのリン酸化中間体形成における構造変化と基質メタルイオンの影響、生体エネルギー研究会第19回討論会講演要旨集、平成5年12月

### (2) 口頭発表

・鈴木 裕、中村 哲史、金沢 徹

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseの触媒部位と FITC 結合部位の stoichiometry、

日本生化学会、平成4年10月

・中村 哲史、鈴木 裕、金沢 徹

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseの 8-thiocyano-ATP による親和修飾、

日本生化学会、平成5年10月

・鈴木 裕、中村 哲史、金沢 徹

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseのリン酸化中間体形成における構造変化と基質メタルイオンの影響、生体エネルギー研究会(第19回討論会)、平成5年12月

## 研究成果

- (1) 研究成果要旨 . . . . . 3頁
- (2) 研究成果資料-1 . . . . . 4-6頁
- (3) 研究成果資料-2 . . . . . 7-43頁
- (4) 研究成果資料-3 . . . . . 44-50頁
- (5) 研究成果資料-4 . . . . . 51-53頁

## ( 1 ) 研究成果要旨

### 1. (研究成果資料-1、研究成果資料-2、及び研究成果資料-3、参照)

Ca<sup>2+</sup>-ATPaseのATPやPiでリン酸化される触媒部位含量(4.57-4.94 nmol/mg蛋白)は、FITCでラベルされたLys-515量(8.19 nmol/mg蛋白)及び分子量から計算されるCa<sup>2+</sup>-ATPaseポリペプチド量(9.06nmol/mg蛋白)の約1/2であった。従って、Ca<sup>2+</sup>-ATPase1分子には1個のATP結合部位(Lys-515のFITC結合部位)が存在すること、この内の半数がATPやPiでリン酸化される触媒部位であること(half-of-the-sites reactivity)が明らかとなり、Ca<sup>2+</sup>輸送の機能単位はCa<sup>2+</sup>-ATPaseの二量体であると結論された。また、ATPによるリン酸化を完全に阻害するFITC結合量は6.4 nmol/mg蛋白であり、二量体を構成するCa<sup>2+</sup>-ATPase分子の内の方のATP結合部位により選択的にFITCが結合してリン酸化を阻害することが強く示唆された。

### 2. (研究成果資料-3、及び研究成果資料-4、参照)

次に、我々はATP結合によって起こるCa<sup>2+</sup>-ATPase分子の構造変化を解析することに研究を進展させている。このため、Ca<sup>2+</sup>-ATPaseの内因性トリプトファン蛍光、及び特異的アミノ酸残基に導入した外因性プローブの蛍光のATPによる変化をストップドフロー法で測定し、これらの時間経過をラビッドクエンチング法によって測定したリン酸化中間体(EP)形成の時間経過と比較している。現在のところ、細胞質領域に存在するATP結合部位近傍では酵素・ATP複合体が形成するステップとEPが形成するステップで構造変化が起こること、他方Ca<sup>2+</sup>輸送部位が存在する膜貫通領域とその近傍ではEPが形成するステップで構造変化が起こることを示唆する結果が得られている。そこで今後、触媒部位及びCa<sup>2+</sup>輸送部位において、Ca<sup>2+</sup>輸送のどの過程でどのような構造変化が起こるかを明確にし、両部位間における構造変化の伝達機構について検討したい。さらに、これらの変化におけるCa<sup>2+</sup>-ATPaseの分子間相互作用の役割について検討したい。

(2) 研究成果資料－1

(4-6 頁)

○鈴木 裕、中村哲史、金沢 徹（旭川医大・医・二生化）

先に、筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase には ATP や Pi でリン酸化される触媒部位（高親和性 ATP 結合部位）の他に、リン酸化部位 1 モル当たり 1 モルの低親和性 ATP 結合部位が存在することを報告した（1）。その後我々は、筋小胞体（SRV）を用い、ATP 結合部位に特異的に反応するとされている fluorescein 5-isothiocyanate（FITC）の結合と、ATP や Pi による触媒部位のリン酸化について、両者の stoichiometry を調べてきた。今回は、FITC でラベルした SRV 及び ATP や Pi でリン酸化した SRV を LDS 存在下で高速ゲル濾過により分離してリン酸化部位と FITC 結合部位を測定する方法を用いた。

〔実験方法〕 家兎骨格筋から分離した SRV（0.5 mg/ml）を 15  $\mu\text{M}$  FITC と  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下、pH 8.0、25  $^{\circ}\text{C}$  で反応させた。遠心により集めた pellet を 2% LDS、0.1 M  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ 、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ 、20 mM Na-Pi（pH 7.0）で可溶化し、TSKgel G3000 SW<sub>XL</sub> と TSKgel G3000SW を連結したカラムを用いて高速ゲル濾過を行なった。分離した ATPase の FITC 結合量は 9% SDS、0.2 M Tris/HCl（pH 8.8）で、分子吸光係数を 80,000 として 496 nm の吸光度から求めた。この分子吸光係数は広く一般に採用されている値で、実際に我々が重量測定から推定した値と 2 - 3% の誤差でよく一致した。用いた FITC の純度は、逆相 HPLC を用いた複数条件下での分析によると、95% 以上であった。ATPase の触媒部位量は、至適条件で ATP または Pi から形成されるリン酸化酵素（EP）の量から求めた。TCA でリン酸化反応を止め沈澱を洗浄した後、1% LDS、0.1 M  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ 、0.05 M Li acetate（pH 4.5）で可溶化し、上記の方法で高速ゲル濾過を行ない、分離した ATPase の EP 量を測定した。

〔結果と考察〕 200 分間 FITC でラベルした SRV を高速ゲル濾過し、280 nm における吸収と 485 nm で励起した際の 525 nm における FITC の蛍光をモニターした（図 1）。FITC 結合量は溶出した ATPase 蛋白のピーク近傍で一定の値を示した。FITC 結合の時間経過を調べた（図 2）。結合量は高速ゲル濾過における ATPase 蛋白のピークでの値を用いた。反応開始後、FITC は速やかに結合し、結合量は 240 分で最大（8.61 - 9.22 nmol/mg）となった。なおこの時点で、加えた 15  $\mu\text{M}$  FITC のうち約 11  $\mu\text{M}$  が未反応のまま残存した。240 分間 FITC でラベルした SRV から得られた ATPase 蛋白のピーク分画を回収し sephadex G-50カラムで LDS を除いた後、1/1 量のトリプシンで 37  $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間加水分解した。その後、540,000  $\times g$ 、5 分間遠心して得られた上清を濾過することなしに直接逆相 HPLC に向け、ペプチドマップを得た（図 3）。濾過操作を省いたのは、濾過に用いるフィルターに FITC やペプチドが吸着するのを避けるためである。FITC の蛍光は peak 1 と peak 2 に分布した。シーケンシングの結果、peak 2 は Met-Phe-Val-X-Gly-Ala-Pro-Glu-Gly-Val-Ile-Asp-Arg（X: FITC-Lys-515）のペプチドであり、FITC は Lys-515 に結合していることが明らかとなった。一方、peak 1 はペプチドではなかった。これらの結論はアミノ酸分析の結果と一致した。図 3 で Peak 2 は全 FITC 蛍光強度の 84.6% であった。従って、Lys-515 に結合した FITC

量は 7.29 - 7.80 nmol/mg となる。他方、ATP と Pi から形成された EP の量は夫々  $4.31 \pm 0.39$ 、 $4.56 \pm 0.27$  nmol/mg であった。

FITC 結合の ATP による阻害を、反応時間 20 分で調べた (図 4)。ATP 濃度を 30 mM まで上げると全 FITC 結合量は約 20% に減少した。Peak 2 は 30 mM ATP によって約 7% に減少したが、Peak 1 は殆ど変化しなかった。

[結論] 以上の結果は、本実験で分離した筋小胞体には  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 1 モル当たり 1 モルの ATP 結合部位 (即ち FITC 結合部位; Lys-515) が存在すること、及びそのうち半数が ATP や Pi によってリン酸化されることを示している。

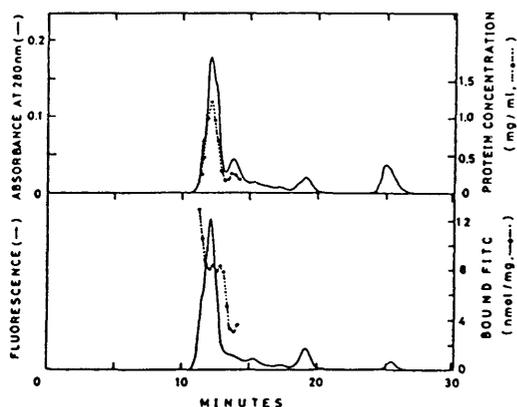


図 1

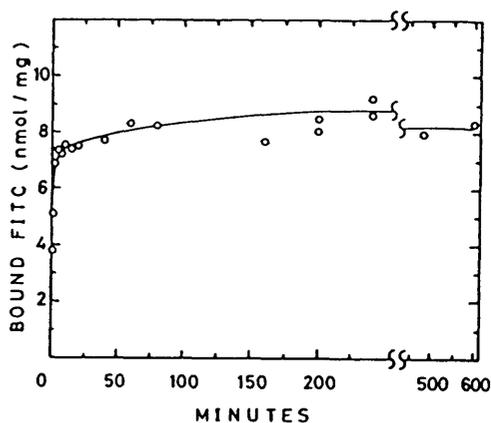


図 2

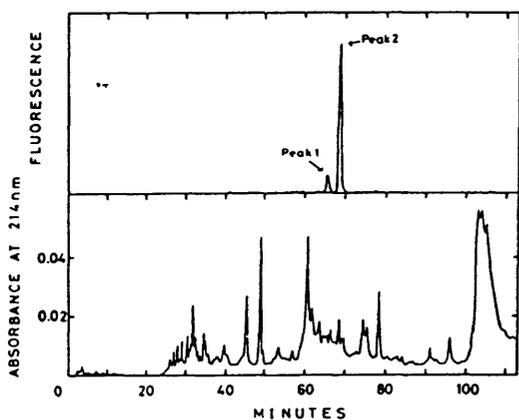


図 3

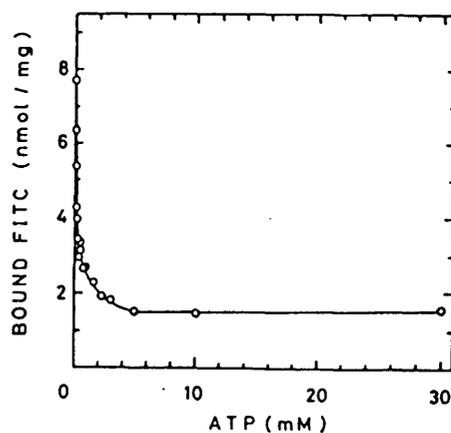


図 4

#### [文献]

1. Suzuki, H., Kubota, T., Kubo, K., and Kanazawa, T. (1990) *Biochemistry* 29, 7040-7045

The stoichiometry of phosphorylatable catalytic sites to fluorescein 5-isothiocyanate-binding sites in the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum vesicles.

Suzuki, H., Nakamura, S., and Kanazawa, T. (Dept. Biochem., Asahikawa Med. Coll.)