

99600865

筋小胞体カルシウムポンプの触媒部位の構造と作動機構に関する研究

(01580181)

平成2年度科学研究費補助金（一般研究（C））研究成果報告書



平成2年3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講師）

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： 大宮博士（旭川医科大学医学部助手）

研究経費

平成元年度	1,300千円
平成2年度	1,200千円
計	2,500千円

研究発表

（1）学会誌等

1. 鈴木 裕、久保光司、久保田達也、小原充裕、金沢 徹

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase における触媒部位以外の低親和性 ATP
結合部位の存在

生化学、61巻、9号、959-959頁、1989年9月25日

2. 大保貴嗣、鈴木 裕、金沢 徹

5'-p-Fluorosulfonylbenzoyl adenosine による筋小胞体

Ca²⁺-ATPase の活性阻害

生化学、61巻、 9号、 959-959頁、1989年 9月25日

3. 久保光司、鈴木 裕、金沢 徹

基質アナログの結合による筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の構造変

化： Ca・酵素・基質複合体における変化

生化学、61巻、 9号、 959-959頁、1989年 9月25日

4. 川島哲也、原 久人、金沢 徹

Lasalocid による骨格筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の阻害： ADP

非感受性 EP の加水分解とその逆反応の抑制

生化学、61巻、 9号、 959-959頁、1989年 9月25日

5. 金沢 徹、鈴木 裕、久保田達也、久保光司

筋小胞体 Ca²⁺-ATPase における 2 種類の ATP 結合部位の

存在

日本生体エネルギー研究会第15回討論会・講演要旨集、12-12

頁、1989年12月21日

6. 鈴木 裕、久保光司、金沢 徹

基質結合による筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の Ca^{2+} 依存性構造変

化： 基質分子のアデニン部分による構造変化の促進

日本生体エネルギー研究会第15回討論会・講演要旨集、108-

108 頁、1989年12月21日

7. 鈴木 裕、大宮博士、金沢 徹

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase に存在する二種類の ATP 結合部位へ

の FITC 結合

生化学、62巻、 7号、 745-745頁、1990年 7月25日

8. 大宮博士、川島哲也、金沢 徹

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の Ca^{2+} による活性化に伴う構造変化

の A23187 による阻害

生化学、62巻、 7号、 912-912頁、1990年 7月25日

9. 鈴木 裕、大宮博士、金沢 徹

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase に存在する二種類の ATP 結合部位へ

の FITC 結合

日本生体エネルギー研究会第16回討論会・講演要旨集、 4-5頁

1990年12月20日

10. 大保貴嗣、久保田達也、金沢 徹

骨格筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の FSBA による化学修飾

日本生体エネルギー研究会第16回討論会・講演要旨集、 6-7頁

1990年12月20日

11. Tetsuya Kawashima, Hisato Hara, and Tohru Kanazawa

Selective Inhibition by Lasalocid of Hydrolysis of the
ADP-insensitive Phosphoenzyme in the Catalytic Cycle of
Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase

The Journal of Biological Chemistry, Vol. 265, No. 19,

pp. 10993-10999, 1990

12. Koji Kubo, Hiroshi Suzuki, and Tohru Kanazawa

Characterization of the substrate-induced conformational
change of N-iodoacetyl-N'-(5-sulfo-1-naphthyl)

ethylenediamine-labeled sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -

ATPase by using different kinds of substrate

Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1040, pp. 251-259,

1990

13. Hiroshi Suzuki, Tatsuya Kubota, Koji Kubo, and Tohru

Kanazawa

Existence of a Low-Affinity ATP-Binding Site in the

Unphosphorylated Ca^{2+} -ATPase of Sarcoplasmic Reticulum

Vesicles: Evidence from Binding of 2',3'-O-(2,4,6-

Trinitrocyclohexadienylidene)-[^3H]AMP and -[^3H]ATP

Biochemistry, Vol. 29, pp. 7040-7045, 1990

14. Hiroshi Ohmiya, and Tohru Kanazawa

Inhibition by A23187 of Conformational Changes Involved

in the Ca^{2+} -Induced Activation of Sarcoplasmic Reticulum

Ca^{2+} -ATPase

Journal of Biochemistry, in press, 1991

(2) □頭発表

1. 鈴木 裕、久保光司、久保田達也、小原充裕、金沢 徹

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase における触媒部位以外の低親和性 ATP

結合部位の存在

第62回日本生化学会大会、1989年11月 4日

2. 大保貴嗣、鈴木 裕、金沢 徹

5'-p-Fluorosulfonylbenzoyl adenosine による筋小胞体

Ca²⁺-ATPase の活性阻害

第62回日本生化学会大会、1989年11月 4日

3. 久保光司、鈴木 裕、金沢 徹

基質アナログの結合による筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の構造変

化： Ca・酵素・基質複合体における変化

第62回日本生化学会大会、1989年11月 4日

4. 川島哲也、原 久人、金沢 徹

Lasalocid による骨格筋小胞体 Ca²⁺-ATPase の阻害： ADP

非感受性 EP の加水分解とその逆反応の抑制

第62回日本生化学会大会、1989年11月 4日

5. 金沢 徹、鈴木 裕、久保田達也、久保光司

筋小胞体 Ca²⁺-ATPase における 2 種類の ATP 結合部位の

存在

日本生体エネルギー研究会第 15 回討論会、1989年12月21日

6. 鈴木 裕、久保光司、金沢 徹

基質結合による筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の Ca^{2+} 依存性構造変化：
基質分子のアデニン部分による構造変化の促進

日本生体エネルギー研究会第15回討論会、1989年12月21日

7. 鈴木 裕、大宮博士、金沢 徹

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase に存在する二種類の ATP 結合部位への FITC 結合

第63回日本生化学大会、1990年 9月15日

8. 大宮博士、川島哲也、金沢 徹

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の Ca^{2+} による活性化に伴う構造変化の A23187 による阻害

第63回日本生化学大会、1990年 9月14日

9. 鈴木 裕、大宮博士、金沢 徹

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase に存在する二種類の ATP 結合部位への FITC 結合

日本生体エネルギー研究会第16回討論会、1990年12月20日

大保貴嗣、久保田達也、金沢 徹

骨格筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の FSBA による化学修飾

日本生体エネルギー研究会第16回討論会、1990年12月20日

1. 家兎骨格筋から分離した筋小胞体を用いて、トリチウムでラベルした TNP-AMP と TNP-ATP の結合を測定することにより、筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase には、触媒部位のほかに、触媒部位 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明らかにした（学会誌に発表済、別刷り添付）。
2. Ca^{2+} -ATPase の触媒過程で起こる ADP 非感受性リン酸化酵素の加水分解がイオノフォア lasalocid によって選択的に強く阻害されることを明らかにした。また、この阻害が酵素分子内部に深く埋れた疎水性部分に結合する事によって起ることを示唆した（学会誌に発表済、別刷り添付）。
3. Ca^{2+} -ATPase の Cys⁶⁷⁴ を蛍光プローブ（I-EDANS）でラベルして蛍光強度と蛍光異方性を測定することにより、酵素・基質複合体で起こる酵素の構造変化が基質分子のアデニン部分により著明に加速されること、及び基質分子がアデニン部分をもたない場合はこの構造変化が全反応の律速となることを示した（学会誌に発表済、別刷り添付）。
4. 筋小胞体に対する FITC の結合を測定し且つその結合部位を同定することにより、筋小胞体のカルシウムポンプの機能単位が Ca^{2+} -ATPase の二量体であること、及びこの二量体のうち一方の ATPase 分子の ATP 結合部位は触媒活性をもち、他方の ATPase 分子の ATP 結合部位は触媒活性をもたない低親和性 ATP 結合部

位であることを強く示唆した（平成2年日本生化学会で発表）。

5. FITC でラベルした筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase を用いた蛍光測定により、イオノフォア A23187 が Ca^{2+} による酵素の活性化に伴う二相性構造変化のうち遅い第二相のみを選択的に阻害することを示すとともに、カルシウムポンプの Ca^{2+} 結合部位が二つの異なったドメインからなることを示唆した（J. Biochem.、1991年、印刷中）。