



Title	The Thermal Sensitivity of Sarcoplasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
Author(s)	永田, 善明
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3155163">https://doi.org/10.11501/3155163</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	永 田 善 明
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 4 1 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 11 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	The Thermal Sensitivity of Sarcoplasmic Reticulum $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の熱感受性)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小倉 明彦
	(副査) 教 授 倉光 成紀 助教授 中村 準 助教授 山本 泰望

### 論 文 内 容 の 要 旨

筋小胞体 (SR) 膜に存在する  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase は、ATP 加水分解反応と共に筋細胞中の  $\text{Ca}^{2+}$  を濃度勾配に逆らって SR 内腔に輸送する反応を触媒している。SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase は他の輸送系に比べて調製の容易さや純度の高さなどの利点が多いことから能動輸送の研究に頻繁に用いられ、輸送機構の解明は著しく進展したが、エネルギー共役、機能一構造連関、膜中での機能的運動に関する分子レベルでの解明にはまだ多くの問題が残されている。本論文では、温度感受性が著しく異なるウサギおよびホタテガイ SR を用いてこれらの問題を検討し、以下の結果を得た。

#### (1) ホタテガイ $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の熱感受性

ホタテガイ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase は、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下における熱処理では 37°C で失活してしまうが、EGTA によって処理溶液中の  $\text{Ca}^{2+}$  を除いてやると  $\text{Ca}^{2+}$  輸送と ATP 分解との間に脱共役が引き起こされる。この熱失活は  $\text{Ca}^{2+}$  濃度依存的であり、その依存曲線の  $K_d$  および Hill 係数から分子上の  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位より 2 mol の  $\text{Ca}^{2+}$  が取り除かれた時に、ATP 分解活性の保護と脱共役が起こると考えられる。一方、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下であっても、AMP-PNP を処理溶液中に添加してやると EGTA 存在下と同様に保護効果が見られた。E2 条件または AMP-PNP 存在下では、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase は膜上で 2 量体を形成しているという報告があり、さらにホタテガイ筋小胞体の膜構造を界面活性剤によって破壊してやると保護効果が失われることから、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の熱失活からの保護には膜構造が関与していると考えられる。

#### (2) ホタテガイ $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の cDNA クローニング

以上のようなホタテガイ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase とウサギ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の熱感受性の違いは、両者の一次構造の違いに由来するのではないかと考え、ホタテガイ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 遺伝子のクローニングを行った。得られたクローンの解析より、ホタテガイ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase とウサギ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の相同性は約 70% であり、活性に必須なアミノ酸残基は全て保存されていた。また、両者で異なるアミノ酸残基は細胞質領域に集中していることより、両者の熱感受性の相違は細胞質領域の構造の違いによるものではないかと予想された。

#### (3) 細胞質領域に存在する Cys 残基と熱感受性との関係

ウサギ SR を glutathione 存在下で熱処理した後、残存する  $\text{Ca}^{2+}$  輸送活性を測定した結果、ホタテガイ SR と同様、38-39 °C で活性がほぼ完全に失われた。この結果は、S-S 結合が  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase タンパク質の熱感受性に関与している可能性を示唆している。さらに SH 試薬を用いてウサギ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の細胞質領域に存在する Cys 残基を修飾し

たところ、Cys 12, Cys 349, Cys 377, Cys 674 および Cys 675 は修飾を受けなかった。このことは、これら Cys 残基のうちいずれかが S-S 結合を形成してゐる可能性を示唆している。そこで、ウサギ  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase に存在するこれら 5 つの Cys 残基をホタテガイ  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase のアミノ酸に置換した変異タンパク質を作成し、温度感受性を調べた。その結果、C 675L 変異  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase に顕著な熱安定性の低下がみられた。また、ホタテガイ  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase とウサギ  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase の両者で保存されている Cys 349 は、ホタテガイ  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase でのみ修飾を受けることから、Cys 349 が Cys 675 と S-S 結合を形成して熱安定性に寄与しているのではないかと考え、Cys 349 を Ala に置換した変異蛋白質を作成し、同様に熱感受性を検討した。その結果、Cys 349Ala 変異  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase においても熱安定性の顕著な低下がみられた。以上の結果から、ウサギ  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase では Cys 675 が Cys 349 との間で S-S 結合を形成し、熱安定性に寄与している可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase (SRCA) は、筋収縮を引き起こす細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を制御する重要なイオンポンプである。永田君は、ホタテガイ筋の SRCA がウサギ筋の SRCA に比べて熱変性しやすいことに気づき、熱変性の機構を知ることがイオン輸送の機構解明に資すると考え、本研究を開始し、以下のような成果を得た。

1) ホタテガイ SRCA は、熱変性すると反応中間体形成段階で結合した  $\text{Ca}^{2+}$  を確保 (occlude) できなくなる; 2) ホタテガイ SRCA の cDNA をクローニングし、一次構造をウサギ SRCA と比較すると、システイン残基の配置に差がある; 3) ウサギ SRCA のシステイン残基を 1 つずつホタテガイ型に置換していくと、細胞質に面した特定位置 (349番と 675番) の置換で熱安定性を失う。したがって、これらのシステイン残基間に架橋のないことがホタテガイ SRCA を熱脆弱性にし、かつこの周辺の構造が  $\text{Ca}^{2+}$  の確保に関与していることが示唆される。以上の成果は筋収縮の制御機構解明に寄与するところが大きく、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。