

ラット脳 Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素および 抑制蛋白に対する甲状腺ホルモン作用

宮 本 高 秀

信州大学医学部老年医学教室
(指導: 山田 隆司教授)

Effect of Thyroid Hormone on Ca^{2+} -dependent Proteinase and its Inhibitory System in Rat Brain

Takahide MIYAMOTO

*Department of Gerontology, Endocrinology and Metabolism, Shinshu
University School of Medicine
(Director: Prof. Takashi YAMADA)*

The effect of thyroid hormone on the generation of protein inhibitors for Ca^{2+} -dependent proteinase in rat brain was investigated. Four different inhibitory activities (I, II, III and IV) were isolated from immature (7-day-old) rat brain. The molecular weights of these inhibitors, which were estimated by gel-exclusion chromatography on Sephacryl S-200 column, were approximately 280,000 (I), 70,000 (II), 50,000 (III) and 35,000 (IV). All of these inhibitory activities were decreased by thyroidectomy. Four-day T_4 administration (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ daily) to thyroidectomized immature animal reversibly increased the activity of three (I, II and IV) inhibitors. However, the activity of inhibitor III did not recover with the same treatment. Inhibitor III was the most potent among the four inhibitors in rat brain. In mature rats (40-day-old), four different inhibitors were identified in the brain. The molecular weights were identical to those obtained in immature rat brain. As observed in immature animals, all of the inhibitory activities were decreased by thyroidectomy. In contrast to the results obtained in immature animals, however, inhibitor III as well as I, II, and IV was restored by T_4 administration (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ daily) to thyroidectomized mature rats.

The four inhibitors which were prepared from control (untreated) rat brain cytosol were inactivated by trypsin or by proteinase, whereas the activities were not destroyed by treatment with DNase or RNase, suggesting that these inhibitors were proteins.

The results suggested that thyroid hormone stimulated the generation of protein inhibitors for Ca^{2+} -dependent proteinase in brain, and that irreversible damage in the most potent inhibitory protein is induced by thyroid hormone deficiency in immature animal. The phenomenon may be related to the neonatal hypothyroidism-induced irreversible damage to the central nervous system in patients with cretinism. *Shinshu Med. J.*, 36: 141-154, 1988

(Received for publication September 30, 1987)

Key words: calcium-dependent proteinase, inhibitor for calcium-dependent proteinase, thyroid hormone, cretinism

Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素, Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素抑制蛋白, 甲状腺ホルモン, クレチン症

I 緒 言

クレチン症は、幼若期における甲状腺ホルモンの不足で生じ、その病態は、中枢神経系の不可逆的変化を特徴とすることが知られている¹⁾²⁾。このように幼若期の中枢神経系の発達に甲状腺ホルモンに依存している可能性は指摘されているにもかかわらず、その発症の機構は全く不明である。

最近、甲状腺ホルモンの作用機序として、次のような機構が想定されている。すなわち標的組織の細胞核に存在する特異的受容体にホルモンが結合し、さらにホルモン結合受容体-DNA 複合体の生成により、DNA から mRNA への転写が促進され、特異的蛋白質あるいはペプチドが合成され、その結果としてホルモン作用が発現されるというものである³⁾⁻²¹⁾。

中枢神経系も甲状腺ホルモンの標的組織と考えられている¹⁾²⁾。しかし、他の標的組織と異なり、甲状腺ホルモン受容体の量(すなわち受容体数)は、実験動物で観察すると、幼若期に一過性に増加することが知られている²²⁾⁻²⁵⁾。さらに、この時期での大量のホルモン-受容体複合体の生成が中枢神経系の発達に重要な役割を果たしている可能性も指摘されている²⁶⁾。しかし、このような大量のホルモン需要と中枢神経系における代謝系との間の関係は判っていない²⁷⁾⁻²⁹⁾。

一方、甲状腺ホルモンは、細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存した代謝系に対して調節的作用を有することが知られている³⁰⁾⁻³⁵⁾。たとえばミトコンドリアからの Ca^{2+} 放出の促進³⁰⁾³¹⁾、 Ca^{2+} 依存性 ATPase 活性の抑制などが甲状腺ホルモンによって誘導され³²⁾、結果として細胞質 Ca^{2+} 濃度が上昇する事実も知られている。 Ca^{2+} 依存性代謝機構の1つとして、 Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素が知られている。本酵素は、細胞内で標的となる蛋白質を限定分解し、代謝の流れを一定の方向に決定する重要な作用を有すると考えられている³⁶⁾⁻³⁹⁾。この酵素活性は、通常、その抑制蛋白により抑制されているが⁴⁰⁾⁻⁴⁴⁾、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により活性化される。このような代謝系は、中枢神経細胞の分化、増殖にも重要な役割を果たしているものと考えられている³⁶⁾⁻³⁹⁾。

以上の研究報告を下に、本研究は、1)中枢神経系の Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素およびその抑制系が甲状腺ホルモンによりどのような影響を受けるか。2)幼若動物と成熟動物でのホルモン作用を比較することにより、幼若期での不可逆的変化がどのようなものであるかを

解明することを目的として実験を行った。

II 研究材料および方法

A 実験動物の調製

Wistar 系雄ラットを実験動物として用いた。幼若ラットとして7日齢(平均約30g)および成熟ラットとして40日齢(平均約200g)を使用した。両群ラットをおのおの2群にわけ、1群に甲状腺摘除を行い、他の群は sham operation を行った。手術2週後、前者をさらに3群にわけ、第1群は生理食塩水を4日間、第2群にはチロキシン(T_4)(100 μ g/kg)を2日間、第3群には T_4 を4日間連日皮下に投与した。 T_4 は、生理食塩水に溶解して投与した。 Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素およびその抑制蛋白調製のための屠殺前12時間は絶食とした。

B ラット脳細胞質の分離

ラットを断頭で屠殺後、開頭により大脳を摘出し、0~4°C の条件下で以下の操作を行った。ラット大脳を細切後 Potter 型ホモジナイザーを用いて3倍量の0.25 M sucrose, 1.0 mM EGTA, 5.0 mM 2-メルカプトエタノールを含む 20mM Tris-HCl (pH 7.4) でホモジナイズし、homogenate を 10,000 \times g, 20分間遠沈した。得られた上清を 105,000 \times g, 2時間遠沈後その上清をラット脳細胞質分画として使用した。

C Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素の調製

Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素の調製は DeMartino の方法⁴³⁾を改変して行った。前記のごとく調整した細胞質に含まれる Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素を、0.5mM EGTA, 5.0mM 2-メルカプトエタノール, 200mM KCl, 5.0% グリセロールを含んだ 20mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer にて平衡化した Sephacryl S-200 カラムクロマトグラフィー (2.2 \times 60cm) によって分離した。それぞれの分画について酵素活性を測定し、活性を示した単一ピークの分画を 0.5mM EGTA, 5.0mM 2-メルカプトエタノールおよび 4.0% グリセロールを含む 20mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer に対して10時間透析した。さらに、同じ buffer で平衡化した DE-52 cellulose カラムに蛋白を吸着させた後 KCl の連続濃度勾配 (0-400mM) を用いて、 Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素を溶出、部分精製を行った。この酵素活性を示す分画を以下の実験に用いた。

D Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素抑制蛋白の調製

B で得られた細胞質を 90°C, 5分間熱処理し、0°C に冷却後、遠沈した。得られた上清に含まれる抑制蛋

甲状腺ホルモンと Ca 依存性蛋白分解酵素抑制蛋白

白を, 0.5mM EGTA, 5.0mM 2-メルカプトエタノール, 200mM KCl および 5.0% グリセロールを含む 20mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer で平衡化した Sephacryl S-200 カラム (2.2×90cm) を用いて部分精製した。各分画の Ca²⁺ 依存性蛋白分解活性に対する抑制活性を示す分画を抑制蛋白分画として用いた。得られた Ca²⁺ 依存性蛋白分解酵素およびその抑制蛋白は -70°C の条件下にて 2 カ月間貯蔵してもそれぞれの活性は変わらなかった。

E Ca²⁺ 依存性蛋白分解酵素活性の測定

Ca²⁺ 依存性蛋白分解酵素活性は Wilenthal らの方法⁴⁴⁾にしたがい [¹⁴C] カゼインの加水分解を指標として測定した。Incubation buffer (160mM Tris-HCl pH 7.4, 0.35mM EGTA, 35mM 2-メルカプトエタノール, 100mM KCl) 100μl に 100μl の酵素分画, 100μl の蒸留水, 50μl の 37.5mM CaCl₂ 又は蒸留水を加え, 最後に 25μl の [¹⁴C] カゼイン (10,000~24,000cpm/25μl, 2.5~5.0μCi/mg) を加えて反応を開始した。incubation は 34°C で40分間行い, incubation 終了後速やかにチューブを氷水中にうつし, 50μl の 0.3% 牛血清アルブミン(BSA) および 50μl の 50%TCA を加え反応を止めた。攪拌した後, 1,200×g, 5分間遠沈し上清 200μl をシンチレーション溶液 [0.4% 2,5-diphenyloxazole; toluene and Triton X-100(2:1)]

5mlに加え, さらに 1ml のメタノールを加えて, シンチレーションスペクトロメーターで放射能の計測を行った。

F ラット血中トリヨードチロニン (T₃), T₄ の測定

屠殺時ラットの心臓穿刺を行い血液を採取し, その血清中の T₃, T₄ をラジオイムノアッセイで測定した⁴⁵⁾。

G そ の 他

蛋白質の定量には Lowry らの方法⁴⁶⁾を用い, BSA を標準蛋白として用いた。また, DNA の定量には, Burton の方法⁴⁷⁾を用い, 牛胸腺 DNA を標準 DNA として測定した。統計的分析は, Student's *t* test を行い, 2群間でP値が0.05以下を統計学的有意差があると推定した。

H 使用した研究材料

[¹⁴C] カゼインは, New England Nuclear (Boston MA, USA) より入手した。2-メルカプトエタノールは半井化学より, また牛胸腺 DNA, BSA, トリプシン (from porcine pancreas), トリプシンインヒビター (from soybean), プロテアーゼ (TypeVII, from Bacillus amyloliquefaciens), T₄(sodium salt) は, Sigma Chemical Co (St. Louis MO. USA) より入手した。Sephacryl S-200 は, Pharmacia Fine Chemical Inc. (Piscataway NJ. USA) より, DE

Table 1 Gross changes during T₄ administration to thyroidectomized-immature rats

Treatment of Rats	Body Weight (g)	Brain Weight (g)	Serum Concentration		DNA Content in Brain (μg)	[¹⁴ C] Caseinolytic Activity	
			T ₃ (ng/100ml)	T ₄ (μg/100ml)		Ca ²⁺ (-) cpm/μgDNA	Ca ²⁺ (+) cpm/μgDNA
Sham-operated +Saline (7)	60.9±3.6 ^a	1.1±0.1	107.7±5.4 ^a	4.95±0.15 ^a	984±62	4804±470	5383±524
Thyroidectomized +Saline (7)	36.0±3.0 ^b	1.1±0.1	25.6±7.5 ^b	0.79±0.22 ^b	963±78	4320±460	5573±598
Thyroidectomized +T ₄ (2 days) (7)	38.4±2.4 ^c	1.1±0.1	100.0±4.7 ^c	3.15±0.20 ^c	954±43	4456±483	5562±660
Thyroidectomized +T ₄ (4 days) (7)	43.2±4.2 ^d	1.2±0.1	172.0±15.0 ^d	8.60±0.64 ^d	1050±122	5041±560	5543±584

[¹⁴C] caseinolytic activity in 105,000×g supernatant was measured in the absence (Ca²⁺(-)) or presence (Ca²⁺(+)) of 2.0 mM CaCl₂. One hundred μl of aliquot, which was adjusted to contain 1.0 μg DNA equivalence, and 24,000 cpm of [¹⁴C] casein were added to the assay medium. P values of *a vs. b*, and *b vs. d* in body weight, and T₃ and T₄ concentrations were less than 0.05. Parenthesis indicates the number of animals in each group. In two additional experiments similar results were obtained.

-52 cellulose は Whatman Co. (Clifton NJ. USA) より得た。また、 T_3 , T_4 のラジオイムノアッセイキットは、第一ラジオアイソトープ社より得た。

III 結 果

A 甲状腺摘除および T_4 投与による体重, 脳重量, 血清 T_3 , T_4 濃度, 脳 DNA 量の変化

体重, 脳重量, 血中 T_3 , T_4 , 脳 DNA 量を測定した。Table 1 に示すように体重の増加率は甲状腺摘除群ではコントロール群のそれに比べ減少し, T_4 投与により回復した。脳重量および脳 DNA 量は甲状腺摘除により影響を受けなかった。さらに, これら甲状腺摘除動物に T_4 を投与しても, 著しい変化を示さなかった。脳総蛋白質量は甲状腺摘除群で sham operation 群に比べ低下し, T_4 投与により増加傾向を示した。血清 T_3 , T_4 値は甲状腺摘除により減少し, T_4 投与により上昇した。

B 甲状腺摘除および T_4 投与による Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素の変化とその部分精製

脳細胞質すなわち $105,000 \times g$ 上清に存在する Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素活性を測定した。甲状腺摘除 2 週間後から生理食塩水を投与した群と甲状腺摘除 2 週間後から T_4 を投与した群で, Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素活性に有意な差を認めなかった。脳細胞質には, Ca^{2+} 非

依存性蛋白分解酵素, また, Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素に対する抑制蛋白が大量に存在することが知られている(40-42)。Table 1 に示してあるように, 粗細胞質分画を用いた実験では, Ca^{2+} 非存在下での酵素活性に対し, Ca^{2+} による酵素活性の上昇は著明ではなかった。この結果は, 粗細胞質分画に, Ca^{2+} 非依存性蛋白分解酵素および Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素抑制蛋白が大量に混入していることを示し, 上記 2 群間での酵素活性の差は, さらに精製した酵素およびその抑制系を用いて観察する必要があると考えられた。そこで, ゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィーによってさらに Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素を精製した。Fig. 1A に示すように, Sephacryl S-200 カラムを用いたゲル濾過により, Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素は, Ca^{2+} 非依存性蛋白分解活性から分離された。しかし, この Ca^{2+} 依存性蛋白分解活性を含む分画を, 5 分間熱処理して抑制蛋白としての活性を測定してみると, この分画には, 抑制蛋白が含まれていることがわかった (Table 2)。このため, さらに DE-52 カラムを用いた Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素の精製を試みた。Fig. 1B に示すように, 2 つの異なった Ca^{2+} 依存性蛋白分解活性が分離された。1 つは $0.02M$ KCl で溶出され, その活性は $100 \mu M$ Ca^{2+} で最大活性を示し, $25 \mu M$ Ca^{2+} で 50% の活性を示した。もう 1 つは $0.18M$ KCl で溶

Table 2 Presence of heat-stable inhibitor for Ca^{2+} -dependent proteinase in the enzyme-containing fraction

Groups	Sources of Enzyme	Sources of Heated-Material	[^{14}C] caseinolytic Activity (cpm/100 μl enzyme fraction)			
			$Ca^{2+}(-)$	P values	$Ca^{2+}(+)$	P values
A	Peak I in Fig. 1-A	(-) Peak I in Fig. 1-A	2408 ± 220 2286 ± 214	N.S.	2564 ± 212 2465 ± 238	N.S.
B	Peak II in Fig. 1-A	(-) Peak II in Fig. 1-A	84 ± 64 66 ± 56		N.S.	
C	Peak I in Fig. 1-B	(-) Peak I in Fig. 1-B	66 ± 44 78 ± 66	N.S.		520 ± 66 544 ± 78
D	Peak II in Fig. 1-B	(-) Peak II in Fig. 1-B	64 ± 38 65 ± 43		N.S.	4409 ± 224 4387 ± 328

Two ml of enzyme-containing fraction was placed in boiled water bath for 5 min and homogenized by Dounce-type homogenizer. One hundred μl of the aliquot of the supernatant after removal of denatured proteins by centrifugation was added to the assay medium. [^{14}C] casein (20,000 cpm) hydrolysis was measured in the absence or presence of 2.0 mM $CaCl_2$ as described in Table 1. Each value indicates the mean \pm SEM of five determinations. N.S. indicates not significant. In two additional experiments, similar results were obtained.

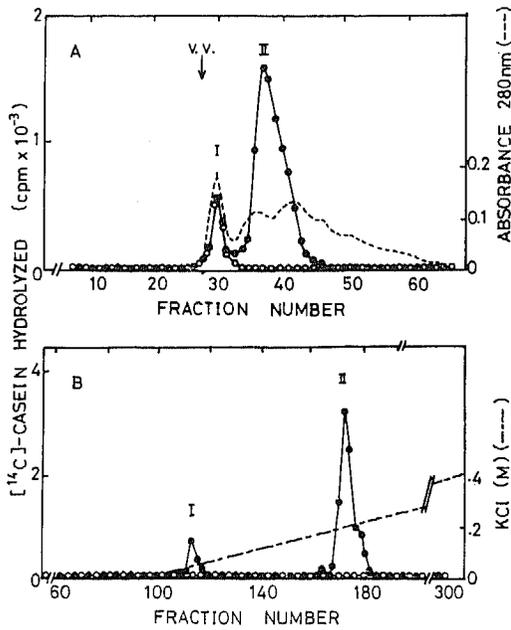


Fig. 1 Purification of Ca²⁺-dependent proteinase in rat brain by Sephacryl S-200 (A) and by DE-52 cellulose (B) column chromatography

105,000×g supernatant of rat brain was prepared from untreated rat. Ca²⁺-dependent proteinase obtained by Sephacryl S-200 column chromatography (Peak II in Fig. 1-A) was applied to DE-52 cellulose column. [¹⁴C] caseinolytic activity (12,000 cpm of [¹⁴C] casein was added to the assay medium) in each fraction (100-μl aliquot of each fraction) was determined in the absence (—○—) or presence (—●—) of 2.0 mM CaCl₂. V.V. indicates the void volume of the column.

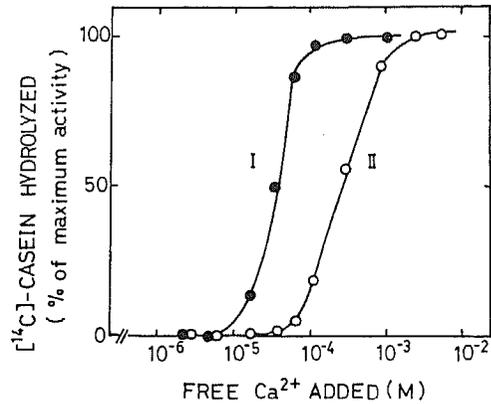


Fig. 2 Effect of various concentrations of Ca²⁺ on Ca²⁺-dependent proteinase

Two enzymes (I (—●—) and II (—○—)) were prepared by using DE-52 cellulose column chromatography as shown in Fig. 1-B. The enzyme activity was measured in the presence of various concentrations of CaCl₂. Free Ca²⁺ concentration was adjusted by means of a metal-metal chelator buffer system using 0.1 mM EGTA as a chelator.

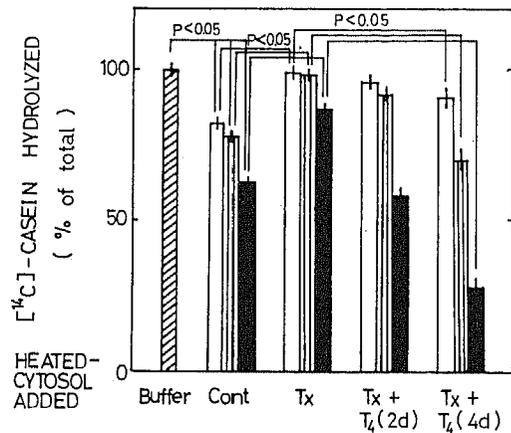


Fig. 3 Changes in inhibitor for Ca²⁺-dependent proteinase in brain during T₄ administration to thyroidectomized-immature rats.

Cytosol fraction was obtained from control (saline-administered sham operated rats) (Cont), thyroidectomized (T_x), T₄ (2 days)-administered thyroidectomized ((T_x+T₄(2d)), and T₄(4 days)-administered thyroidectomized (T_x+T₄(4d)) rats. The cytosol fraction was boiled as described and the heated cytosol was adjusted to 1.0 μg DNA equivalence/100 μl (□), 2.5 μg DNA equivalence/100 μl (▨) and 5.0 μg DNA equivalence/100 μl (■).

Each heated material was added to the assay medium and Ca²⁺-dependent proteinase (25 μg of enzyme protein which was prepared by using DE-52 cellulose column chromatography (peak II) and 20,000 cpm of [¹⁴C] casein were added to the medium. "Buffer" indicates that the assay was done in the absence of heated cytosol. Each value indicates the mean ± SEM of results obtained from 7 animals. In two additional experiments, similar results were obtained.

出され、その活性は 1.0mM Ca^{2+} で最大活性を示し、250 μ M Ca^{2+} で50%の活性を示した (Fig. 2)。前者が生理的には、より重要と考えられたが、量的に少ないため、抑制蛋白の活性を測定する以下の実験には後者を用いた。また、この DE-52 カラムクロマトグラフィーにより得られた Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素分画には、抑制蛋白の混入を認めなかった。(Table 2)

C 幼若ラット脳 Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素抑制蛋白の T_4 投与による影響

幼若雄ラット (30g, 7日齢) に甲状腺摘除を行い、その1週間後より4日間生理食塩水を投与した群 (T_x 群) と T_4 (100 μ g/kg) を2日間投与した群 ($T_x + T_4$ 2日群), および4日間投与した群 ($T_x + T_4$ 4日群) にわけて実験を行った。それぞれの群の脳細胞質分画を 90°C, 5分間熱処理し遠沈して得られた Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素抑制蛋白分画を用いてその抑制効果を比較してみると、Fig. 3 に示すように、抑制効果

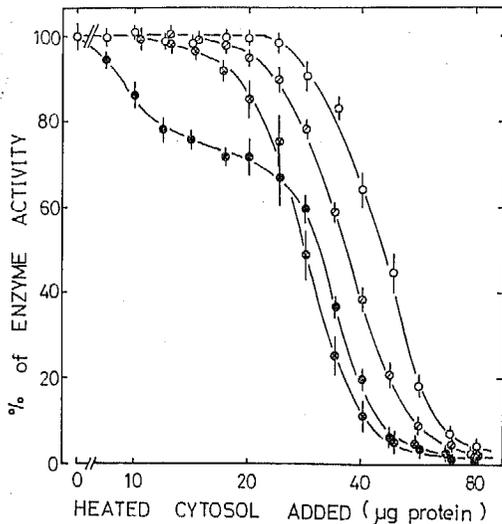


Fig. 4 Effect of various concentrations of heated cytosol on Ca^{2+} -dependent proteinase.

Heated cytosol was prepared as described from sham operated (—●—) thyroidectomized(—○—), T_4 (2 days)-treated thyroidectomized (—○/—), and T_4 (4 days)-treated thyroidectomized(—⊗—) rats. The enzyme activity was measured in the presence of various concentrations of heated cytosol. The assay condition was similar to that of Fig. 3. Each value indicates the mean \pm SEM of results obtained from 7 animals.

はコントロール群 (sham operation+生理食塩水) に比し T_x 群で著明に低下していた。この低下した抑制効果は、 T_4 投与により回復した。そこで、各群より得られた熱処理細胞質の種々の濃度を加えて、 Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素活性に対する抑制活性を測定したところ、50%抑制はコントロール群では30 μ g, T_x 群では47 μ g, $T_x + T_4$ 2日群では36 μ g, $T_x + T_4$ 4日群では28 μ g の蛋白量で得られた。また、コントロールラットより得られた熱処理細胞質による抑制曲線では、低濃度蛋白で抑制効果を有するコンポーネントと高濃

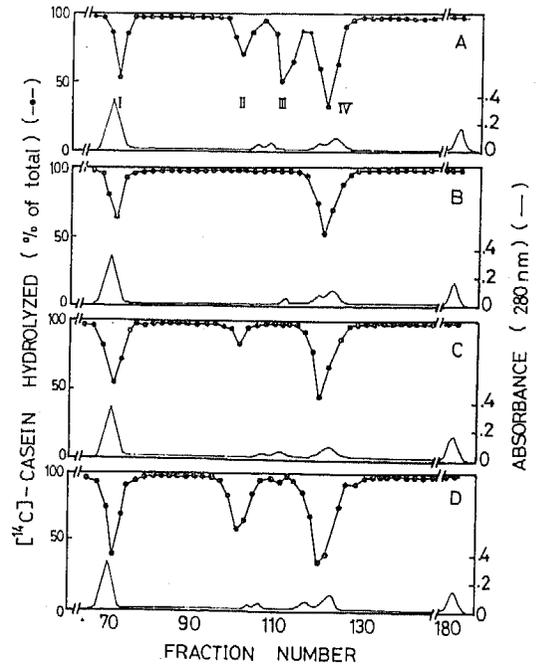


Fig. 5 Sephacryl S-200 column chromatography profiles of inhibitors for Ca^{2+} -dependent proteinase.

Heated cytosol was prepared from sham operated (A), thyroidectomized (B), T_4 (2 days)-treated thyroidectomized (C) and T_4 (4 days)-treated thyroidectomized (D) immature rats. Each heated material was adjusted to 500 μ g DNA equivalence/3.0ml and applied to a column. The elution condition is described under *Materials and Methods*. Ca^{2+} -dependent proteinase activity was measured in the presence of 100 μ l of each fraction. The assay condition was similar to that described in Fig. 3. Four different inhibitors (I, II, III, and IV) were separated from heated cytosol prepared from sham operated animals.

度蛋白でそれを示すコンポーネントの2つのコンポーネントが観察されたが、 T_x 群および T_x+T_4 投与群における抑制曲線は、高濃度蛋白で抑制するコンポーネントのみを示した (Fig. 4)。

D Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素抑制蛋白の Sephacryl S-200 カラムクロマトグラフィー

以上の結果より、甲状腺摘除により抑制蛋白の量的変化だけでなく不可逆的な質的变化がおこっている可能性も考えられ、Sephacryl S-200 カラムクロマトグラフィーによって抑制蛋白の部分精製とその分子量の推定を試みた。Fig. 5A は Sephacryl S-200 によるゲル濾過のパターンを示す。コントロールラットの熱処理細胞質には I, II, III, IV の異なった抑制蛋白が存在し、その分子量はそれぞれ約 280,000 (I), 70,000 (II), 50,000 (III), 35,000 (IV) であった (Fig. 6)。

抑制蛋白 I および IV の活性は、甲状腺摘除により低下し、II および III の活性は消失した (Fig. 5 B)。甲状腺摘除ラットに T_4 を2日間投与すると、I および IV は回復し II の活性も出現したが、抑制蛋白 III は消失したままであった (Fig. 5 C)。I, II, IV の活性は、4日間の T_4 投与によってさらに増加したが、III の活性は回復しなかった (Fig. 5D)。

Fig. 7 では I ~ IV のそれぞれの抑制蛋白の種々の濃度での抑制効果を示している。抑制蛋白 III が最も強い抑制効果を有し、50%抑制を示す抑制蛋白 III の蛋白濃度は I, II, IV のそれぞれの10分の1以下であった。

これらの抑制活性 I ~ IV が蛋白質か否かを調べるためにそれぞれ加水分解酵素で前処理を行って、その抑制効果を調べた。Table 3 で示すように、それぞれの

抑制活性はトリプシンおよびプロテアーゼで不活化されたが、RNase および DNase では不活化されなかった。

E 成熟ラット脳細胞質 Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素抑制蛋白におよぼす T_4 投与の影響

幼若動物と成熟動物とで、 Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素抑制蛋白におよぼす甲状腺ホルモン作用に差があるかどうかを検討するために、次に、生後40日齢のラッ

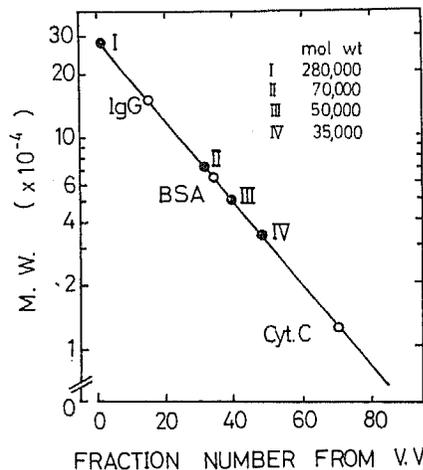
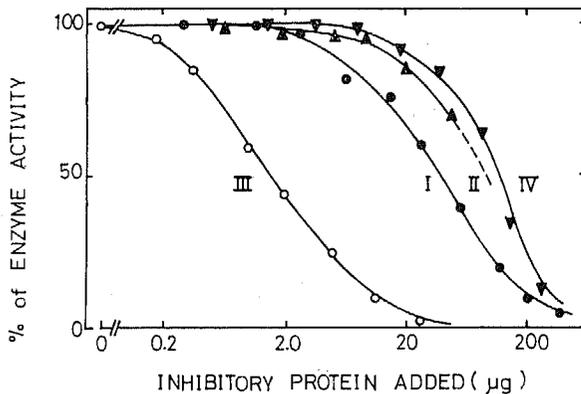


Fig. 6 Calibration of the molecular weight of inhibitors.

Sham operated rats were used as the source of inhibitor. Human immunoglobulin G (IgG), BSA, and cytochrome c (Cyt. c) were used as markers.

Fig. 7 Inhibition of Ca^{2+} -dependent proteinase by partially purified inhibitors.



Inhibitory proteins I (—●—), II (—▲—), III (—○—), and IV (—▼—) were partially purified by using gel filtration. The source of the inhibitors was sham operated-immature rat brain. The fractionated inhibitors were concentrated and diluted to indicated protein concentrations separately. The assay condition was similar to that described in Fig. 3. Each value indicates the mean of triplicate determinations.

トを用いて実験を行った。

成熟コントロールラット脳細胞質には、幼若コントロールラット細胞質にみられたのと同様な分子量を有する4つの抑制蛋白が認められた。成熟ラットにおい

ても甲状腺摘除により、抑制蛋白Ⅱ、Ⅲが消失した。

これは幼若ラットで見られた効果と同様であった。しかし、この動物に4日間 T_4 を投与すると抑制蛋白ⅡだけでなくⅢの回復も認められた (Fig. 8)。

Table 3 Effect of hydrolytic enzymes on the inhibitory activity in Ca^{2+} -dependent proteinase inhibitors

Inhibitor added	Groups	Treatment of inhibitor	[^{14}C] caseinolytic activity (% of maximum activity)	P values
I	A	No inhibitor	100±2	
	B	Buffer	42±1	A vs. B, <0.001
	C	Trypsin (500µg/ml)	98±2	B vs. C, <0.001
	D	Protease (500µg/ml)	97±3	B vs. D, <0.001
	E	DNase (330µg/ml)	44±2	B vs. E, N. S.
	F	RNase (330µg/ml)	43±3	B vs. F, N. S.
II	G	No inhibitor	100±3	
	H	Buffer	44±3	G vs. H, <0.001
	I	Trypsin (500µg/ml)	96±6	H vs. I, <0.001
	J	Protease (500µg/ml)	98±4	H vs. J, <0.001
	K	DNase (330µg/ml)	46±4	H vs. K, N. S.
	L	RNase (330µg/ml)	42±3	H vs. L, N. S.
III	M	No inhibitor	100±4	
	N	Buffer	41±3	M vs. N, <0.001
	O	Trypsin (500µg/ml)	101±2	N vs. O, <0.001
	P	Protease (500µg/ml)	99±5	N vs. P, <0.001
	Q	DNase (330µg/ml)	42±3	N vs. Q, N. S.
	R	RNase (330µg/ml)	42±3	N vs. R, N. S.
IV	S	No inhibitor	100±3	
	T	Buffer	40±2	S vs. T, <0.001
	U	Trypsin (500µg/ml)	98±4	T vs. U, <0.001
	V	Protease (500µg/ml)	99±3	T vs. V, <0.001
	W	DNase (330µg/ml)	41±5	T vs. W, N. S.
	X	RNase (330µg/ml)	41±3	T vs. X, N. S.

Each inhibitor (500 µl) which was obtained as described in Fig. 5-A was incubated for 15 min at 30°C with the indicated concentrations of enzymes. After incubation, the mixture was boiled and after removal of denatured proteins by centrifugation, 100 µl of aliquot was added to the assay medium. The enzyme used in this study was obtained by DE-52 cellulose column chromatography (Peak II in Fig. 1-B) and 25 µg protein was added to the assay medium. In experiments A, G, M and S, 100 µl of elution buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, containing 0.5 mM EGTA, 5.0 mM 2-mercaptoethanol, 100 mM KCl and 5% glycerol) were substituted for inhibitor-containing fraction. Each value indicates the mean of triplicate determinations. N.S. indicates not significant.

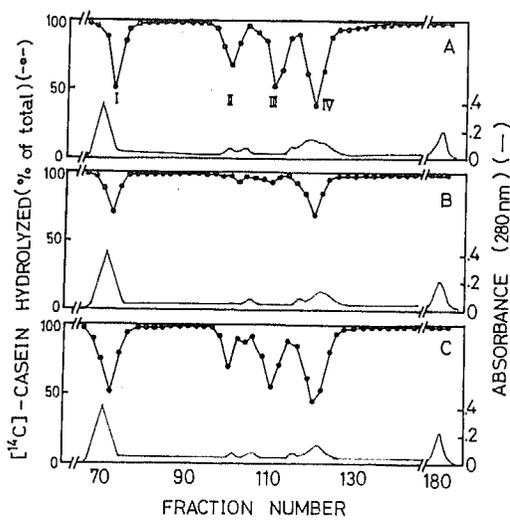


Fig. 8 Changes in inhibitor for Ca^{2+} -dependent proteinase in brain during T_4 administration to thyroidectomized-mature rats.

Heated cytosol was prepared from sham operated (A), thyroidectomized (B), and T_4 (4 days)-treated thyroidectomized (C) mature rats' brain. Each heated material was adjusted to 500 μ g DNA equivalence/3.0 ml and was applied to a column of Sephacryl S-200. The elution condition was similar to that of experiment in Fig. 5. Ca^{2+} -dependent proteinase activity was measured in the presence of 100 μ l of aliquot of each fraction. The enzyme which was used in this study was obtained from sham operated immature rats and was purified by DE-52 cellulose column chromatography.

IV 考 察

幼若期における甲状腺ホルモンの不足は、中枢神経系の不可逆的な変化を引き起こす事が知られている¹⁾²⁾。また、脳細胞質における Ca^{2+} 依存性代謝系の1つである Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素およびその抑制系は、中枢神経系の発達に重要な役割を果たしていると考えられている³⁶⁾⁻³⁹⁾。そこで、この機構が甲状腺ホルモンにより何らかの調節を受け幼若期の中枢神経系の発達に影響をおよぼしている可能性が考えられるため今回の実験を行った。

まず、種々の甲状腺機能状態で、 Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素の抑制蛋白がどのような影響を受けるかを観察した。熱処理細胞質分画を用いた実験では、濃度依存曲線より2つの構成要素が抑制蛋白に存在する可能

性が考えられた。すなわち低濃度で50%抑制を示すコンポーネントと、より高濃度で50%抑制を示すコンポーネントである。

コントロール群 (sham operation+生理食塩水) の幼若ラットでは、この両者が認められている。しかし、甲状腺摘除幼若ラット群では、低濃度で50%抑制を示すコンポーネントが消失した。この実験結果は甲状腺ホルモンの不足により抑制蛋白の構成要素が変化することを示唆する。さらに、この変化は甲状腺ホルモン投与によっても回復せず、一方、成熟ラットを用いた実験では、このコンポーネントの甲状腺ホルモン投与による回復が認められた。したがって、幼若ラットにおける甲状腺機能低下状態では、成熟ラットのそれと異なり、この低濃度で50%抑制を示すコンポーネントを不可逆的に障害する機構が誘導されるものと考えられた。

Waxman と Krebs の報告⁴⁰⁾によると、 Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素抑制蛋白はいくつかの subfraction に分かれて存在していると考えられている。本実験においても、コントロール群では I~IV の4種類の Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素抑制活性が認められ、その中で III が最も強い抑制活性を示したため、この蛋白が生理的に重要な働きをしているものと考えられた。これら4種類の抑制蛋白のうち幼若ラットの甲状腺機能低下では、II および III の抑制活性が消失し、その可逆性は III では認められなかった。したがって抑制蛋白粗分画を使用した濃度依存曲線で認められたコントロール群と甲状腺摘除群との間の差は、抑制蛋白 III の量の差より生じたものである可能性がある。しかも、幼若ラットで不可逆的な変化を受けた抑制蛋白 III は、成熟ラットでは、甲状腺ホルモン投与により可逆的回復が認められている。この実験結果は、最も生理的に重要な意味をもつと思われる Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素抑制蛋白 III が、幼若期特異的に甲状腺ホルモンの調節を受け、その調節は、いちどホルモン欠乏状態になると不可逆的な状態に陥ることを示している。

甲状腺ホルモンは、細胞の核に作用し、蛋白合成を調節していると考えられている¹¹⁾⁻²⁹⁾が、この調節系と甲状腺ホルモン特有な生物反応系との間の直接的証明は未だ成されていない。本実験は Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素抑制蛋白の合成におよぼす甲状腺ホルモンの直接的作用については説明していない。甲状腺ホルモンが、幼若期における Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素抑制系に不可逆的な変化をおよぼす機構としては、もちろん

ん、甲状腺ホルモンが核受容体を介して誘導している可能性が考えられるが、また一方、 Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素抑制蛋白の subfraction の degradation その他にも関与する可能性があり、その詳細は不明である。

甲状腺ホルモンは、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ、 Ca^{2+} に依存した代謝系に影響をおよぼすことが知られている³⁰⁾⁻³⁵⁾。したがって甲状腺ホルモンは細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節と、本研究で明らかになったように Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素抑制蛋白生成の調節の2つの点から生理的に重要な役割を果たしているものと考えられる。 Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素には、I と II の2種類が存在し、前者は数 μM 程度の Ca^{2+} 濃度で活性化され、後者は $100\mu\text{M}$ の Ca^{2+} 濃度で活性化されると考えられている⁴⁰⁾。今回の実験でも、この2種類の酵素活性を認めた。細胞内の Ca^{2+} 濃度が $10\mu\text{M}$ 以下に維持されている事から考えると、I 型酵素の方が生理的に重要であると思われる。また、数 μM の Ca^{2+} 存在下では II から I 型への変換が生じるため⁴⁸⁾⁻⁵⁰⁾、甲状腺ホルモン投与動物では細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、I 型酵素活性が上昇するものと推測される。しかし、酵素活性抑制蛋白は、II から I への変換を強力に抑制する事実も知られ⁵⁰⁾、抑制蛋白が増加する甲状腺ホルモン投与動物で必ずしも I 型酵素活性が上昇しているとは断言し難いと考えられる。一方、甲状腺ホルモン不足状態では、 Ca^{2+} 濃度がほぼ正常に維持されているため、I 型の酵素活性は、 Ca^{2+} による影響を受けていないと思われるが、抑制蛋白が著明に低下するため、むしろこの酵素活性は上昇していると考えられる。しかし、これらの機構の詳細は不明であり、甲状腺ホルモンの Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素に関する作用機序を解明するためには、今後、 Ca^{2+} 濃度、I 型および II 型の酵素活性、抑制蛋白間の相互関係などを検討する必要があると思われた。

Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素により限定分解を受ける物質はいくつかの組織で同定されている⁵¹⁾⁻⁶³⁾。通常は、細胞質内には過剰の抑制蛋白が存在しているため、

これらの基質は Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素により影響を受けないが、何らかの形でこの抑制からはずれた際に、基質の限定分解を行い代謝の流れを変化させるものと考えられる。甲状腺機能低下状態も Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素抑制蛋白の低下により、このような代謝の流れの変化が生じている可能性が考えられる。神経組織においては、今のところこの基質が何であるか明らかではないが、今後この基質を含めて、 Ca^{2+} 依存性の代謝系を解明していく必要があると考えられた。

V 結 語

幼若期におけるラット脳細胞質 Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素および抑制系が、甲状腺ホルモンによりどのような影響を受けるかを調べた。

ラット脳細胞質を熱処理し、 Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素を除いたその抑制蛋白分画を用いて、甲状腺機能状態による影響を調べたところ、幼若コントロールラットでは4種類の抑制蛋白を認め、このうちの1つ(分画 III)が最も強力な抑制活性を示した。この抑制蛋白 III が、甲状腺機能低下状態で失活し、幼若ラットを用いた実験では、甲状腺ホルモン投与によってもその回復を認めなかった。成熟ラットを用いた場合は、甲状腺機能低下により失活したこの抑制蛋白 III が甲状腺ホルモン投与により回復した。

幼若期における、甲状腺ホルモンの低下はラット脳細胞質 Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素抑制蛋白に不可逆的な変化を与え、 Ca^{2+} 依存性代謝機構の1つである Ca^{2+} 依存性蛋白分解酵素およびその抑制系が不可逆的な変化を受けることが推測された。

本稿の要旨は昭和62年6月、第60回日本内分泌学会学術総会で発表した。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜った、恩師、山田隆司教授ならびに橋爪潔志講師に深く謝意を表します。

文 献

- 1) Hetzel, B. S. and Potter, B. J.: Iodine deficiency and the role of thyroid hormones in rat brain development. In : Dreosti, I. E. and Smith, R. M. (eds.), *Neurology of the Trace Elements*, Vol. 1, pp. 83-90, Humana Press, New Jersey, 1983
- 2) Dussalt, J.H.: Congenital hypothyroidism. In : Ingbar, S. H. and Braverman, L. E. (eds.), *Werner's The Thyroid. A fundamental and clinical text*, pp. 1399-1402, J. B. Lippincott, Philadelphia, 1986

- 3) Tata, J. R., Ernster, L., Lindberg, O., Arrhenius, E., Pedersen, S. and Hedman, R. : The action of thyroid hormones at the cell level. *Biochem J*, 86 : 408-428, 1963
- 4) Kim, K. H. and Cohen, P.P. : Modification of tadpole liver chromatin by thyroxine treatment. *Biochemistry*, 5 : 1751-1758, 1966
- 5) Oppenheimer, J. H., Koerner, D., Schwartz, H.L. and Surks, M.I. : Specific-nuclear triiodothyronine binding sites in rat liver and kidney. *J Clin Endocrinol Metab*, 35 : 330-333, 1972
- 6) Oppenheimer, J. H., Schwartz, L. and Surks, M.I. : Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen and testis. *Endocrinology*, 95 : 897-903, 1974
- 7) Viarengo, A., Zoucheddu, A., Taningher, M. and Orunseu, M. : Sequential stimulation of nuclear RNA polymerase activities in livers from thyroidectomized rats treated with triiodothyronine. *Endocrinology*, 97 : 955-961, 1975
- 8) Kurtz, D.T., Sipple, A.E. and Feigelson, P. : Effect of thyroid hormones on the level of hepatic mRNA for a globulin. *Biochemistry*, 15 : 1031-1036, 1976
- 9) Oppenheimer, J. H., Schwartz, L., Surks, M., Koerner, D. and Dillman, W.H. : Nuclear receptors and the initiation of thyroid hormone action. *Recent Prog Horm Res*, 32 : 529-557, 1976
- 10) Seo, H., Vassart, G., Bocas, H. and Refetoff, S. : Triiodothyronine stimulates specifically growth hormone mRNA in rat pituitary cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74 : 2054-2057, 1977
- 11) DeGroot, L.J., Rue, P.A., Robertson, M., Bernal, J. and Scherberg, N. : Triiodothyronine stimulates nuclear RNA synthesis. *Endocrinology*, 101 : 1690-1700, 1977
- 12) Oppenheimer, J.H. : Thyroid hormone action at the cellular level. *Science*, 203 : 971-979, 1979
- 13) Samuels, H.H., Stanley, F. and Casanova, J. : Relationship of receptor affinity to the modulation of thyroid hormone nuclear receptor levels and growth hormone synthesis by L-triiodothyronine and iodothyronine analogues in cultured GH₁ cells. *J Clin Invest*, 63 : 1229-1240, 1979
- 14) Coleoni, A.H. and DeGroot, L.J. : Liver nuclear protein phosphorylation *in vivo* and the effect of triiodothyronine. *Endocrinology*, 106 : 1103-1107, 1980
- 15) Barsano, C.P., Coleoni, A.H. and DeGroot, L.J. : Description and partial characterization of thyroid hormone-specific and thyroid hormone-dependent rat liver nuclear proteins. *Endocrinology*, 106 : 1475-1488, 1980
- 16) Ivarie, R.D., Baxter, J.D. and Morris, J.A. : Interaction of thyroid and glucocorticoid hormones in rat pituitary tumor cells. Specificity and diversity of the responses analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem*, 256 : 4520-4528, 1981
- 17) Ichikawa, K., Hashizume, K. and Yamada, T. : Monoamine oxidase inhibitory modulators in rat heart cytosol: Evidence for induction by thyroid hormone. *Endocrinology*, 111 : 1803-1809, 1982
- 18) Ichikawa, K., Hashizume, K., Kobayashi, M. and Yamada, T. : Evidence for induction by thyroid hormone of cytosolic proteins which control mitochondrial protein synthesis. *Endocrinology*, 117 : 1749-1758, 1985
- 19) Ichikawa, K. and DeGroot, L.J. : Separation of DNA binding domain from hormone and core histone binding domains by trypsin of rat liver nuclear thyroid hormone receptor. *J Biol Chem*, 261 : 16540-16546, 1986
- 20) Ichikawa, K., DeGroot, L.J., Refetoff, S., Horwitz, A.L. and Pollak, E.R. : Nuclear thyroid hormone receptors in cultured human fibroblasts: Improved method of isolation, partial characterization and interaction with chromatin. *Metabolism*, 35 : 861-868, 1986
- 21) Ichikawa, K. and DeGroot, L.J. : Purification and characterization of rat liver nuclear thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84 : 3420-3424, 1987
- 22) Schwartz, H.L. and Oppenheimer, J.H. : Ontogenesis of 3, 5, 3'-triiodothyronine receptors in neonatal rat brain: Dissociation between receptor concentration and stimulation of oxygen consumption by 3, 5, 3'-triiodothyronine. *Endocrinology*, 103 : 943-948, 1978

- 23) Valcana, T. and Timiras, P. : Nuclear triiodothyronine receptors in the developing rat brain. *Mol Cell Endocrinol* 11 : 31-35, 1978
- 24) Ruel, J., Coulombe, P. and Dussalt, J.H. : Characterization of nuclear 3, 5, 3'-triiodothyronine receptors in the developing rat lung. : Effects of hypo- and hyperthyroidism. *Pediatr Res*, 16 : 238-242, 1982
- 25) Perez-Castillo, A., Bernal, J., Ferreiro, B. and Pans, T. : The early ontogenesis of thyroid hormone receptors in the rat fetus. *Endocrinology*, 117 : 2457-2461, 1985
- 26) Kolodny, J.M., Larsen, P.R. and Silva, J.E. : *In vitro* 3, 5, 3'-triiodothyronine binding to rat cerebrocortical neuronal and glial nuclei suggests the presence of binding sites unavailable *in vivo*. *Endocrinology*, 116 : 2019-2028, 1985
- 27) Pasquini, L.M., Kaplus, B., Garcia-Argiz, C.A. and Gomez, C.J. : Hormonal regulation of brain development. I. The effect of neonatal thyroidectomy upon nucleic acids, protein and two enzymes in developing cerebral cortex and cerebellum of the rat. *Brain Res*, 6 : 621-634, 1967
- 28) Garcia-Argiz, C.A., Pasquini, J.M., Kaplus, B. and Gomez, C.J. : Hormonal regulation of brain development. II. Effect of neonatal thyroidectomy on succinate dehydrogenase and other enzymes in developing cerebral cortex and cerebellum of the rat. *Brain Res*, 6 : 635-646, 1967
- 29) Cocks, J.A., Balazs, R., Johnson, A.L. and Eayrs, J.T. Effect of thyroid hormone on the biochemical maturation of rat brain : conversion of glucose-carbon into amino acids. *J Neurochem*, 17 : 1275-1285, 1970
- 30) Harris, E.J. : Stimulation of mitochondrial calcium ion efflux by thiol-specific reagents and by thyroxine. The relationship to adenosine diphosphate retention and to mitochondrial permeability. *Biochem J*, 182 : 455-464, 1979
- 31) Shears, S.B. and Bronk, J.R. : The effects of thyroxine treatment, *in vivo* and *in vitro*, on Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria. *FEBS Lett*, 126 : 9-12, 1981
- 32) Haraguchi, K., Hashizume, K., Ichikawa, K. and Kobayashi, M. : The effect of thyroid hormone on the high affinity Ca^{2+} -ATPase in rat liver plasma membrane. *Endocrinol Japon*, 31 : 141-149, 1984
- 33) Hashizume, K., Ichikawa, K. and Kobayashi, M. : Effect of calcium ion on triiodothyronine binding to kidney outer mitochondrial membrane *in vitro*. *Endocrinol Japon*, 31 : 311-320, 1984
- 34) Hashizume, K., Yamauchi, K. and Miyamoto, T. : Thyroid hormone inhibition of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in rat liver. *Endocrinol Japon* 32 : 481-487, 1985
- 35) Hashizume, K., Kobayashi, M. and Miyamoto, T. : Active and inactive forms of 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine(T_3) binding protein in rat kidney cytosol : Possible role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in activation of T_3 binding. *Endocrinology*, 119 : 710-719, 1986
- 36) Gurof, G. : A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction in rat brain. *J Biol Chem*, 239 : 149-155, 1963
- 37) Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y. and Nishizuka, Y. : Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J Biol Chem*, 252 : 7610-7616, 1977
- 38) Hamon, M., Bourgoin, S., Artaud, F. and Hery, F. : Rat brain stem tryptophan hydroxylase : Mechanism of activation by calcium. *J Neurochem*, 28 : 811-818, 1977
- 39) Kishimoto, A., Kajikawa, N., Shiota, M. and Nishizuka, Y. : Proteolytic activation of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase by calcium-dependent neutral protease. *J Biol Chem*, 258 : 1156-1164, 1982
- 40) Waxman, L. and Krebs, E.G. : Identification of two protease inhibitors from bovine cardiac muscle. *J Biol Chem*, 253 : 5888-5891, 1978
- 41) Melloni, E., Sparatore, B., Salamaino, F., Michetti, M. and Pontremoli, S. : Cytosolic calcium dependent proteinase of human erythrocytes : Formation of an enzyme-natural inhibitor complex

- induced by Ca^{2+} ions. *Biochem Biophys Res Commun*, 106 : 731-740, 1982
- 42) Mykles, D.L. and Skinner, D.M. : Four Ca^{2+} -dependent proteinase activities isolated from crustacean muscle differ in size, net charge, and sensitivity to Ca^{2+} and inhibitors. *J Biol Chem*, 261 : 9865-9871, 1985
 - 43) DeMartino, G.N. : Cytoplasmic proteases of rat liver parenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 108 : 1325-1330, 1982
 - 44) Wilenthal, K., Wakeland, J.R., Ord, J.M. and Stull, J.T. : Interference with lysosomal proteolysis fails to reduce cardiac myosin degradation. *Biochem Biophys Res Commun*, 96 : 793-798, 1980
 - 45) Hiramatsu, K., Hashizume, K., Aizawa, T., Ichikawa, K. and Yamada, T. : Thyrotropin secretion in patients with hyperparathyroidism or hypoparathyroidism: Effect of serum calcium on thyrotropin release. *J Clin Endocrinol Metab*, 56 : 623-626, 1983
 - 46) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193 : 266-275, 1951
 - 47) Burton, K. : Study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J*, 62 : 315-323, 1956
 - 48) Suzuki, K., Tsuji, S., Kubota, S., Kimiura, Y. and Imahori, K. : Limited autolysis of Ca^{2+} -activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to Ca^{2+} ions. *J Biochem (Tokyo)*, 90 : 275-278, 1981
 - 49) Hathaway, D.R., Werth, D.K. and Haeberle, J.R. : Limited autolysis reduces the Ca^{2+} requirement of a smooth muscle Ca^{2+} -activated protease. *J Biol Chem*, 257 : 9072-9077, 1982
 - 50) DeMartino, G.N., Huff, C.A. and Croall, D.E. : Autoproteolysis of the small subunit of calcium-dependent protease II activates and regulates protease activity. *J Biol Chem*, 261 : 12047-12052, 1986
 - 51) Belocopitow, E., Appleman, M.M. and Torres, H.N. : Factors affecting the activity of muscle glycogen synthetase II. The regulation by Ca^{2+} . *J Biol Chem*, 240 : 3473-3478, 1965
 - 52) Dayton, W.R., Reville, W.J., Goll, D.E. and Stromer, M.H. : A Ca^{2+} -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme. *Biochemistry*, 15 : 2159-2166, 1976
 - 53) Puca, G.A., Nola, E., Sica, V. and Bresciani, F. : Estrogen binding proteins in calf uterus. Molecular and functional characterization of the receptor transforming factor: A Ca^{2+} -activated protease. *J Biol Chem*, 252 : 1358-1366, 1977
 - 54) Phillips, D.R. and Jakobova, M. : Ca^{2+} -dependent protease in human platelets. Specific cleavage of platelet polypeptides in the presence of added Ca^{2+} . *J Biol Chem* 252 : 5602-5605, 1977
 - 55) Davies, P.J.A., Wallach, D., Willingham, M.C. and Pastan, I. : Filamin-actin interaction. Dissociation of binding from gelation by Ca^{2+} -activated proteolysis. *J Biol Chem*, 253 : 4036-4042, 1977
 - 56) Mellgren, R.L., Aylward, J.H., Killilea, S.D. and Lee, E.Y.C. : The activation and dissociation of a native high molecular weight form of rabbit skeletal muscle phosphorylase phosphatase by endogenous Ca^{2+} -dependent protease. *J Biol Chem*, 254 : 648-652, 1979
 - 57) Gache, Y., Landon, F., Touitou, H. and Olomucki, A. : Susceptibility of platelet α -actinin to a Ca^{2+} -activated neutral protease. *Biochem Biophys Res Commun*, 124 : 877-881, 1984
 - 58) Pontremoli, S., Melloni, E., Sparatore, B., Michetti, M. and Horecker, B.L. : A dual role for the Ca^{2+} -requiring proteinase in the degradation of hemoglobin by erythrocyte membrane proteinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81 : 6714-6716, 1984
 - 59) Fox, J.E.B., Goll, D.E., Reynolds, C.C. and Phillips, D.R. : Identification of two proteins (actin-binding protein and P235) that are hydrolyzed by endogenous Ca^{2+} -dependent protease during platelet aggregation. *J Biol Chem*, 260 : 1060-1066, 1985
 - 60) Melloni, E., Pontremoli, S., Michetti, M., Sacco, O., Sparatore, B. and Horecker, B.L. : The involvement of calcium in the activation of protein kinase C in neutrophils stimulated by phorbol myristic acid. *J Biol Chem*, 261 : 4101-4105, 1986

- 61) Pontremoli, S. Melloni, E., Michetti, M., Sacco, O., Salamino, F., Sparatore, B. and Horecker, B.L. : Biochemical responses in activated human neutrophils mediated by protein kinase C and a Ca^{2+} -requiring proteinase. *J Biol Chem*, 261 : 8309-8313, 1986
- 62) Melloni, E., Sparatore, B., Salamino, F., Michetti, M. and Pontremoli, S. : Cytosolic calcium-dependent neutral proteinase of human erythrocytes: The role of calcium ions on the molecular and catalytic properties of the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*, 107 : 1053-1059, 1982
- 63) Pershdsigh, H.A. and McDonald, J.M. : A high affinity calcium-stimulated magnesium-dependent adenosine triphosphatase in rat adipocytes plasma membranes. *J Biol Chem*, 255 : 4098-4093, 1980

(62. 9. 30 受稿)
