信州医誌，26(2)：154～171，1978

原　著

牛甲状腺 Troponin C-like phosphodiesterase activator protein の精製とその性状

小　林　良　二
信州大学医学部順応医学研究施設臨床部門
（主任：山田隆司教授）

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A TROPONIN C-LIKE PHOSPHODIESTERASE ACTIVATOR PROTEIN FROM BOVINE THYROID

Ryoji KOBAYASHI
Department of Medicine, Institute of Adaptation Medicine,
Faculty of Medicine, Shinshu University
(Director : Prof. Takashi Yamada)

SUMMARY

A troponin C-like phosphodiesterase activator from bovine thyroid has been purified to homogeneity. The overall purification was about 9,800-fold with a yield of 8%. Bovine thyroid activator protein is identical in biological properties to that isolated from bovine brain. They have the same specific activity regarding stimulation of bovine brain cyclic nucleotide phosphodiesterase. Both proteins form a Ca^{2+} dependent complex with heart muscle troponin I which is stable in 6 M urea-polyacrylamide gel and which is similar, but not identical, to the troponin C-troponin I complex.

The physicochemical properties of bovine thyroid activator protein are identical with those of bovine brain and other phosphodiesterase activator proteins and are similar to heart muscle and skeletal muscle troponin C as follows : (a) they bind 3−4 exchangeable calcium ions per mol with dissociation constants between 10^{-5} and 10^{-6} M (b) they are highly acidic with a high content of aspartic and glutamic acids and isoelectric points of approximately 4.1 (c) these proteins have an unusual ultraviolet absorption spectrum with six discrete maxima between 250 and 284 nm which are characteristic of phenylalanine and tyrosine and (d) these proteins have a low content of cysteine, histidine, tyrosine and proline. The tryptic peptide maps of bovine thyroid and brain activator protein are very similar. However, despite a very similar amino acid composition, the peptide map of bovine heart muscle troponin C is significantly different from that of the other two proteins. The molecular weight of thyroid and brain activator protein is 16,500 while that of heart troponin C is 18,500. Thyroid and brain activator protein, as well as heart troponin C, appear to undergo significant Ca^{2+} dependent conformational changes, as measured by the difference in the circular dichroism spectrum and electrophoretic mobility observed in the presence and absence of calcium ion.

Key words：フォスフォジエステラーゼ活性化蛋白 (phosphodiesterase activator protein)

トロポニンC (troponin C)
甲状腺ホルモン分泌 (thyroid hormone secretion)
収縮蛋白 (contractile protein)

I. 緒　言

甲状腺ホルモン分泌の動態については，ラベルされたホルモンの血中への放出（血中 PB ^{131}I の測定），コロイド小滴の算定等の技法を用いて詳細な検討が行われて来たが，ホルモン分泌の分子生物学的機構については，未だ充分な検討が行われていない。

しかし，最近我々は甲状腺より actin, myosin を分離・精製しその物理化学的，形態学的，酵素学的性状の検討を行い，これら収縮蛋白が endocytosis，偽足形成，コロイド小滴の運動に関与している可能性を示唆した[1]。

周知の如く，Ca^{2+} や cyclic nucleotide は筋収縮[2]，stimulation-secretion coupling[3] を含む種々の細胞機能の regulatory signal と考えられている[4]が，骨格筋においては，actomyosin ATPase は tropomyosin 及び troponin によって制御され，Ca^{2+} とこの troponin の subunit の1つである troponin C（以下 TN C と略す）との結合が key step をなすと考えられている。

Ca^{2+} は cyclic nucleotide 代謝においても，熱安定性で低分子の phosphodiesterase activator protein（以下 AP と略す）との結合を介して重要な調節機能を有していると考えられている[5)-11)]。牛脳及び心筋より精製された AP は，Ca^{2+} 結合性，等電点，ultraviolet absorption spectrum，分子量，アミノ酸組成，primary amino acid sequence の諸点で骨格筋 TN C に類似していると考えられ[12)13)]，更に，骨格筋[14)15)]及び心筋[16] TN C と AP の biological cross-reactivity が，極く最近報告されている。

今回，著者は，牛甲状腺より AP を精製しその性状を牛脳 AP 及び牛心筋 TN C と比較検討した。牛甲状腺 AP の物理化学的性状は牛脳 AP，牛心筋 TN C に類似しており，Ca^{2+} によって conformational change が起り，更に牛心筋 troponin I（以下 TN I と略す）との Ca^{2+} dependent complex formation が観察され甲状腺 AP が単に phosphodiesterase の活性化因子であるのみならず，甲状腺 actomyosin ATPase の Ca^{2+} transducer としての機能を持ち，甲状腺ホルモン分泌に関与している可能性が示唆された。

II. 実験方法

A. 実験材料

ATP, cyclic AMP, 5′-nucleotidase (grade IV), DEAE-cellulose, CM-cellulose は Sigma Chemical Co. より入手した。Sephadex G-100 は Pharmacia Fine Chemicals のものを用い，sodium dodecyl sulfate, acrylamide, N, N′-methylenebisacrylamide, N, N, N′, N′-tetramethylethylene diamine, ammonium persulfate, Coomassie brilliant blue, Chelex-100 は Bio Rad Laboratories の製品を用いた。$^{45}CaCl_2$ (specific activity ; 5mCi/mg) は New England Nuclear Corp. より入手した。牛甲状腺は，Pel-Freeze Biological, Inc. より入手した。

B. 実験方法

1. 牛心筋 troponin 及びその subunit の調製

牛心臓は，屠殺場より入手し，実験室まで氷中で運ばれた。周囲の脂肪，結合織，血管を除去した後，Tsukui and Ebashi の方法[17]により troponin を調製した。更に，Perry and Cole の方法[18]により，DEAE-cellulose 及び CM-cellulose を用いて，その subunit を調製した。

2. 牛脳 AP の調製

屠殺場より得た新鮮な牛脳を Lin らの報告[8]に準じ DEAE-cellulose chromatography の段階まで精製した。活性のある fraction を集め，固形硫安を100%飽和になるまで加え蛋白を遠心により回収した。沈澱を小量の 50mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 に溶解し，同一 buffer に透析した。濃縮した AP を同一 buffer で平衡化された Sephadex G 100 カラム (2.1×80.0cm) に apply し同一 buffer で elution を行った。AP は単一の対称性ピーク (Kd=0.29) として分離された。方法の詳細，純度については既に報告した[16]。

3. "Activator depleted phosphodiesterase" の調製

部分精製の "activator depleted phosphodiesterase" は，牛脳より Watterson らの方法[12]で調製した。

4．Polyacrylamide gel 電気泳動

標準 polyacrylamide 電気泳動は Tris-Glycine buffer, pH 8.9 系を用い Davis の方法[19]によった。Sodium dodecyl sulfate (0.1%) 存在下の電気泳動は，Weber and Osborn の方法[20]により，尿素-polyacrylamide gel 電気泳動は，Syska らの方法[21]に準じた。

5．Phosphodiesterase 活性化能の測定

Phosphodiesterase 活性及び AP の phosphodiesterase 活性化能は既に報告した方法[16]に準じて行った。AP の phosphodiesterase 活性化能を測定する場合，AP 量を phosphodiesterase を half-maximal に活性化する range に入る様調節した。AP の単位は，便宜的に一定量の phosphodiesterase (92n mole Pi released/10min) を 50% stimulation 出来る量を 1unit と定めた。

6．アミノ酸分析

アミノ酸分析は Beckman 120 amino acid analyzer を用い Kuo and Coffee の方法[22]で行った。蛋白標品は 6N HCl で 110°C，24時間水解した。

7．Peptide mapping

精製蛋白 (約 100μg) を 200μl の 0.1 M ammonium bicarbonate-0.1mM EGTA に溶解し，N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone trypsin (10% w/w) で 37°C，18時間消化した。消化物を凍結乾燥後，小量の蒸留水に溶解し，20cm×20cm Avicel thin layer plate (Brinkmann) に spot した。電気泳動は，formic acid/acetic acid/water (58/156/1786) 系で 1000 volt，2時間行い，第2次元は，pyridine/butanol/acetic acid/water (10/15/3/12) 系で ascending chromatography を行った。Peptide は ninhydrin spray で検出した。

8．Ultraviolet absorption spectrum

Ultraviolet absorption spectrum 測定には Cary 14 recording spectrophotometer を用いた。

9．Circular dichroism の測定及び helical content の推定

Circular dichroismの測定はCary model 60 spectropolarimeter を用い 25°C で行われ，helical content の推定は，Kuo and Coffee の報告[23]に準じて行われた。

10. Analytical ultracentrifugation

精製蛋白を Kuo and Coffee の報告[22]に準じ，Spinco model E ultracentrifuge を用い 20°C で分析した。

11. Ca^{2+} 結合実験

Ca^{2+} 濃度が，critical な実験においては，試薬，蒸留水等を Chelex-100 カラムを通し，Ca^{2+} を除去した。AP より Ca^{2+} を除く目的で，AP 標品は 10mM EGTA 中で 4°C 40分間 incubate した後，大量の 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 に対して透析を繰返し EGTA を除去した。平衡透析は，Lin らの方法[8]に準じて行い，解離定数を計算した。

12. Isoelectric focusing

等電点は，Kuo and Coffee の報告[22]に準じ polyacrylamide gel を用いた analytical isoelectric focusing によって決定した。

13. 蛋白定量

蛋白濃度は Lowry 法[24]によって測定した。

Ⅲ．実験結果

A．甲状腺 AP の精製

1．Crude extract supernatant の調製

凍結甲状腺を溶解し，周囲の結合組織，脂肪を除き 0～4°C の生理的食塩水で洗った後，500g の甲状腺組織をカミソリで細切後，5倍量の 1mM $MgSO_4$，1 mM 2-mercaptoethanol，20mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 (Buffer A) と供に Waring Blendor で 0°C 2分間 homogenize した。以下の step も特に記さない限り 0～4°C で行われた。Homogenate を Sorvall SS-1 rotor で 22,000×g 30分間遠心し，その上清を glass wool を通し crude extract supernatant とした。

2．熱処理及び硫安分画

約 2.5ℓ の crude extract をステンレス，スティール製のビーカーに入れ boiling water bath 中で6分間攪伴しながら加熱した後，すみやかに ice bath 中に入れ冷却した。凝固した蛋白を 12,000×g 20分間の遠心で除き，その上清 100ml 当り 28g の固形硫安を加え，60分間の静置後，沈澱を遠心で除き，その上清に原液 100ml 当り約 38g の硫安を加え 100% 飽和とした。遠心によって得られた沈澱を小量の Buffer A に溶解し大量の Buffer A に対して透析した。

3．DEAE-cellulose chromatography

透析後の蛋白を Buffer A で平衡化した DEAE-cellulose カラム (2.5×30.0cm) に apply し，0.15 M 硫安を含む Buffer A で溶出液に蛋白を含まなく

なるまで洗った後，0.3M 硫安を含む Buffer A で AP を溶出した。Fig. 1 に示す様にこの条件で，大略95%の混在蛋白が除れ，AP は効果的に 0.3M 硫安を含む Buffer A で溶出された。3ml/min の速度で溶出を行い 12ml づつ fractionation した。AP を含む fraction を集め，固形硫安を 100% 飽和となる様に加え 22,000×g 15分間の遠心によって蛋白を集め，50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 に対して透析した。

4. Sephadex G-100 による gel filtration

濃縮された AP を 50mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 で平衡化した Sephadex G-100 カラム (2.0×80.0 cm) に apply し，同一の buffer で 12ml/hour の速度で溶出し，3ml づつ fractionation した。Fig. 2 に示す様に AP は27～31番の fraction に単一で対称的なピークとして溶出した。AP 活性のある fraction を集め蒸留水に対し透析後，凍結乾燥し保存した。Table I に，精製段階を示したが，AP はこの方法で約 9800 倍精製され回収率は約 8% であった。

B. 甲状腺 AP の純度と分子量

甲状腺 AP の最終標品の純度を標準 polyacrylamide 電気泳動，sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide 電気泳動で確めたが，この両者で単一バンドを形成した (Fig. 3)。更に甲状腺 AP は，脳 AP と co-migrate し，分子量が等しいことを示唆し，心筋 TN C は AP よりやや遅く泳動された。心筋 TN C と甲状腺 AP の混合物を泳動すると2つのバンドが観察され，心筋 TN C は甲状腺 AP よりやや大きいと考えられた。これら蛋白の泳動度を既知の蛋白の泳動度と比較し分子量を算定すると，甲状腺・脳 AP は 16,500，心筋 TN C は 18,500 と計算され

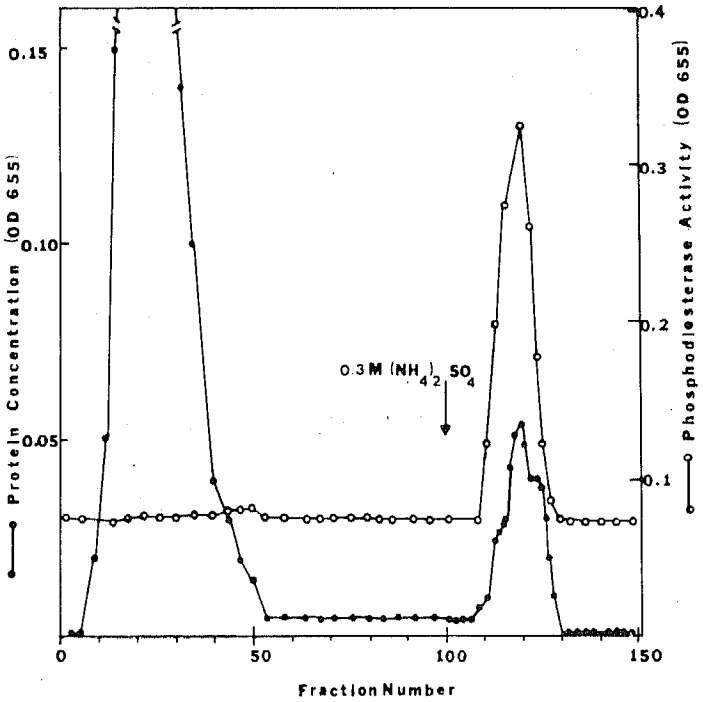

Fig. 1 Chromatography on DEAE-cellulose. The protein obtained from ammonium sulfate fractionation was chromatographed on a 2.5×30 cm column of DEAE-cellulose. The column was washed extensively with 0.15 M ammonium sulfate in Buffer A. Elution of the activator protein was achieved by elution with 0.3 M ammonium sulfate in Buffer A. The flow rate was 3 ml per min and fractions of 12 ml each were collected and assayed for phosphodiesterase activator activity (○) and protein concentration (●).

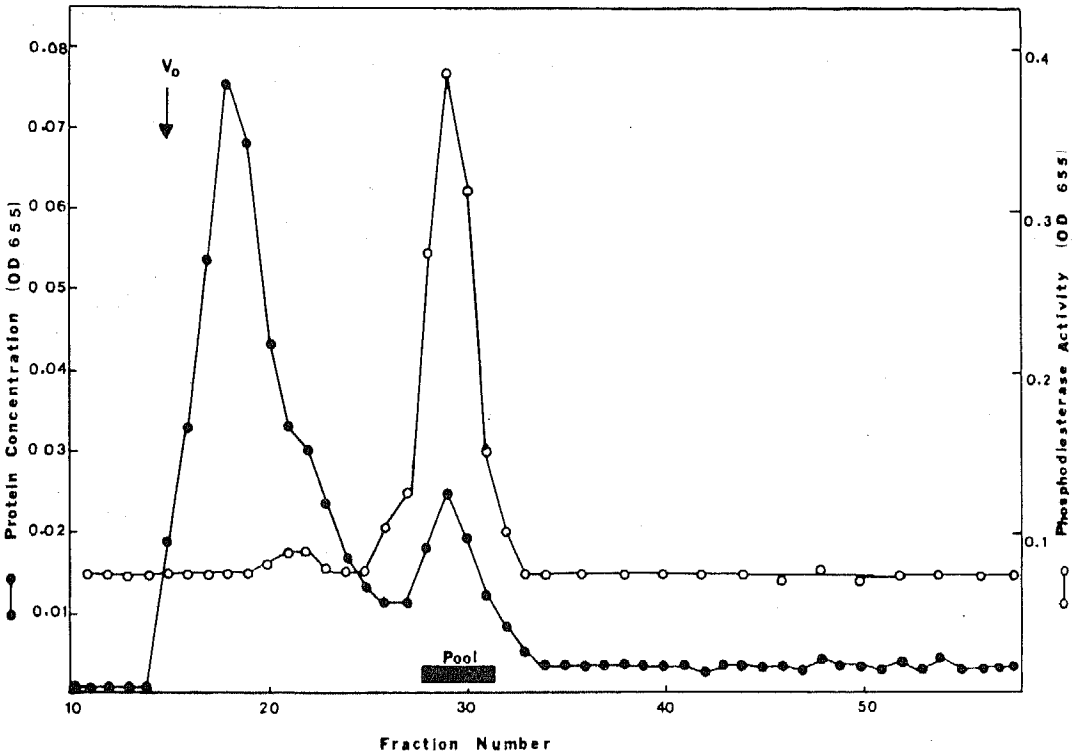

Fig. 2 Gel filtration on Sephadex G-100. The pool of thyroid activator protein obtained from the DEAE-cellulose column was concentrated and chromatographed on a 2.0×80 cm column of Sephadex G-100. The column was eluted with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 at a flow rate of 12 ml per hr. Fractions were monitored for phosphodiesterase activator activity (○) and protein concentration (●).

Table I Purification of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Activator Protein from Bovine Thyroid[a]

Step	Total protein	Total activity	Specific activity	Yield
	mg	$\times 10^3$ unit[b]	unit/mg	%
1. Homogenate	145,000	128	0.88	100
2. Supernatant	48,000	69	1.44	54
3. Boiled supernatant	43,200	68	1.58	53
4. Ammonium Sulfate (50~100% precipitate)	240	29	122	23
5. DEAE-Cellulose	5	15	3008	12
6. Sephadex G-100	1.2	10	8625	8

[a] : Purification from 500 g of wet weight thyroid glands.

[b] : A unit is defined as the amount of protein required to give 50 % stimulation of a fixed amount (92 nmol Pi released/10 min) of activator-depleted phosphodiesterase.

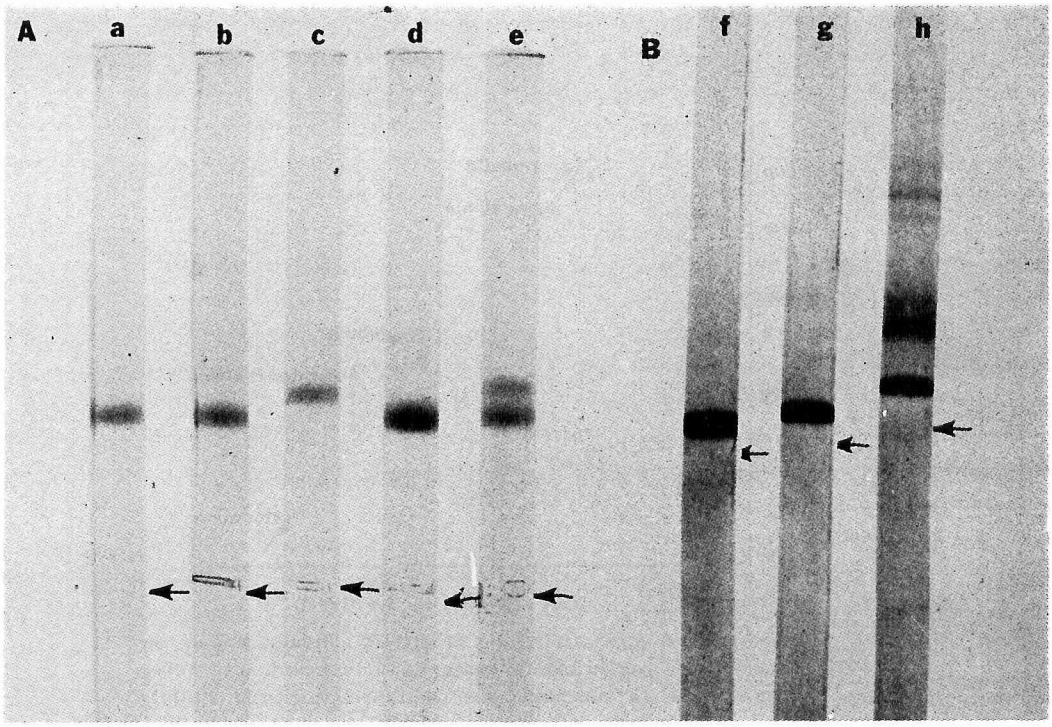

Fig. 3 Sodium dodecyl sulfate -10% polyacrylamide gel electrophoresis (A) and standard 7.5 % polyacrylamide gel electrophoresis (B)
Arrows indicate dye front.
a : Bovine thyroid activator protein (10 μg)
b : Bovine brain activator protein (10 μg)
c : Bovine heart muscle TN C (10 μg)
d : Bovine thyroid activator protein (10 μg) + Bovine brain activator protein (10 μg)
e : Bovine thyroid activator protein (10 μg) + Bovine heart TN C (10 μg)
f : Bovine thyroid activator protein (25 μg)
g : Bovine brain activator protein (25 μg)
h : Bovine heart TN C (25 μg)

た (Fig. 4)。

更に沈降平衡法によって non-denaturating condition (50mM Tris-HCl, pH 7.5) で甲状腺 AP, 脳 AP, 心筋 TN C の分子量を測定し，この結果を Fig. 5 に示した。ln concentration を radial distance の 2 乗の関数として plot すると，この 3 種の蛋白とも，軽度の非直線性が観察された。この非直線性は，低イオン強度，中性付近でこの種の蛋白が持つ大きな net negative charge によって引き起されるものと考えられた[12]。このデータより，甲状腺 AP, 脳 AP, 心筋 TN C の分子量を計算すると各々 16,084, 16,103, 19,240 という結果が得られ，これは sodium dodecyl sulfate polyacrylamide 電気泳動より得られた結果とよく一致し，この 3 種の蛋白は single polypeptide chain であると考えられた。

C. Phosphodiesterase 活性

甲状腺 AP は，脳 AP と同様に "activator depleted phosphodiesterase" を活性化した (Fig. 6)。Ca^{2+} 存在下では，甲状腺 AP, 脳 AP は共に phosphodiesterase を活性化したが，Ca^{2+} が存在しないと両者とも，phosphodiesterase 活性に全く影響を与えなかった。甲状腺 AP, 脳 AP の比活性は同

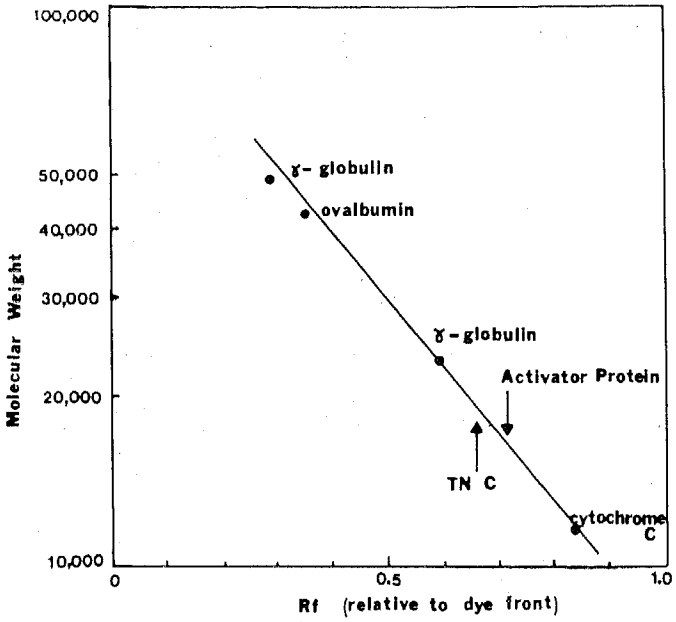

Fig. 4 Determination of molecular weight of thyroid activator protein on 10% polyacrylamide gels in sodium dodecyl sulfate according to Weber and Osborn[20]. Protein standards used and their molecular weights were IgG immunoglobulin (50,000 and 23,500), ovalbumin (43,000), heart TN C (18,500) and cytochrome c (11,700). The mobility of both the thyroid activator protein and heart TN C are indicated by arrows.

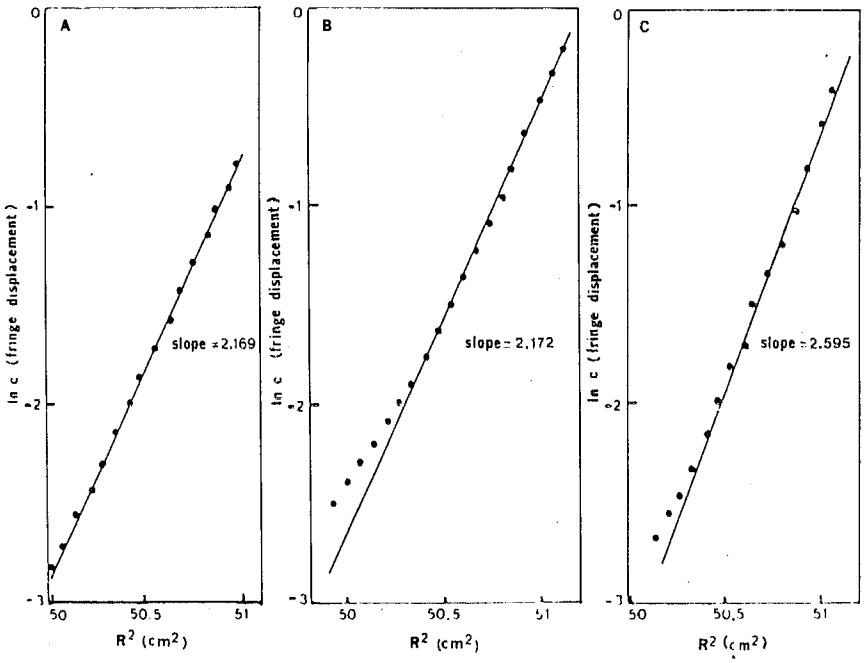

Fig. 5 Determination of molecular weight by sedimentation equilibrium analy-

sis. Sedimentation was performed at 20° and 48,000 rpm for 18 hr. Samples were dialyzed for 24 hr. at 4° against 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) prior to centrifugation. A, bovine thyroid activator protein ; B, bovine brain activator protein ; C, bovine heart TN C.

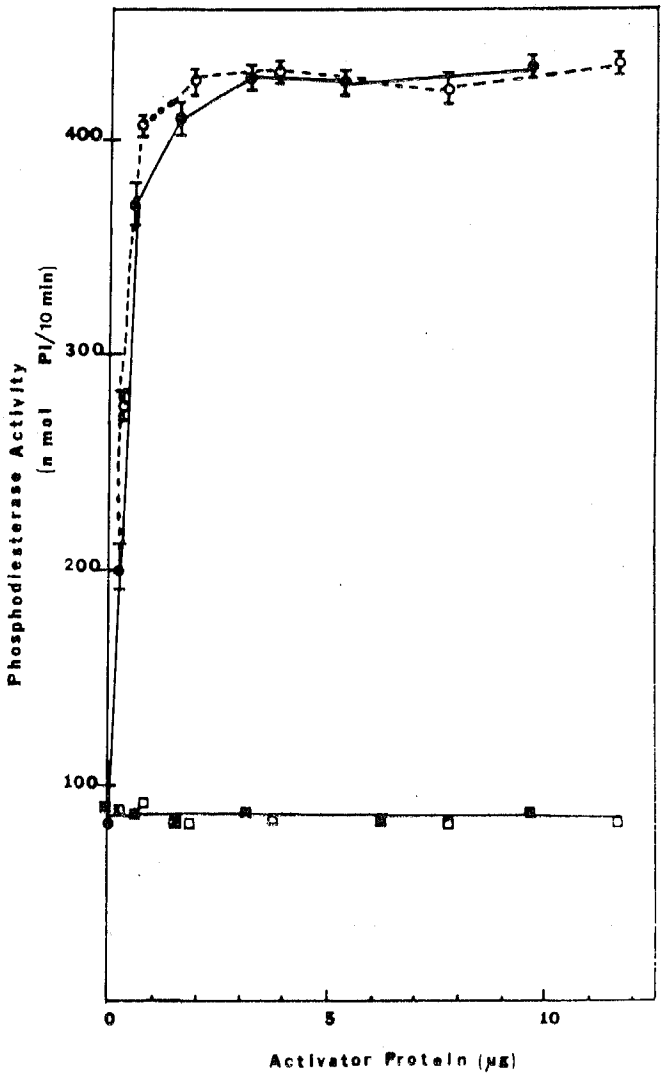

Fig. 6 Activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase by bovine thyroid (●) and bovine brain (○) activator proteins. Assays were performed as previously desribed[16] using 0.5 ml of incubation mixtures containing 50 μg of phosphodiesterase and varying amounts of activator protein as shown. Error bars indicate the standard deviation from the mean value for 3 determinations. The calcium dependence of the activation is illustrated by the inability of either thyroid activator protein (■) or brain activator protein (□) to stimulate phosphodiesterase in the presence of 0.1 mM EGTA.

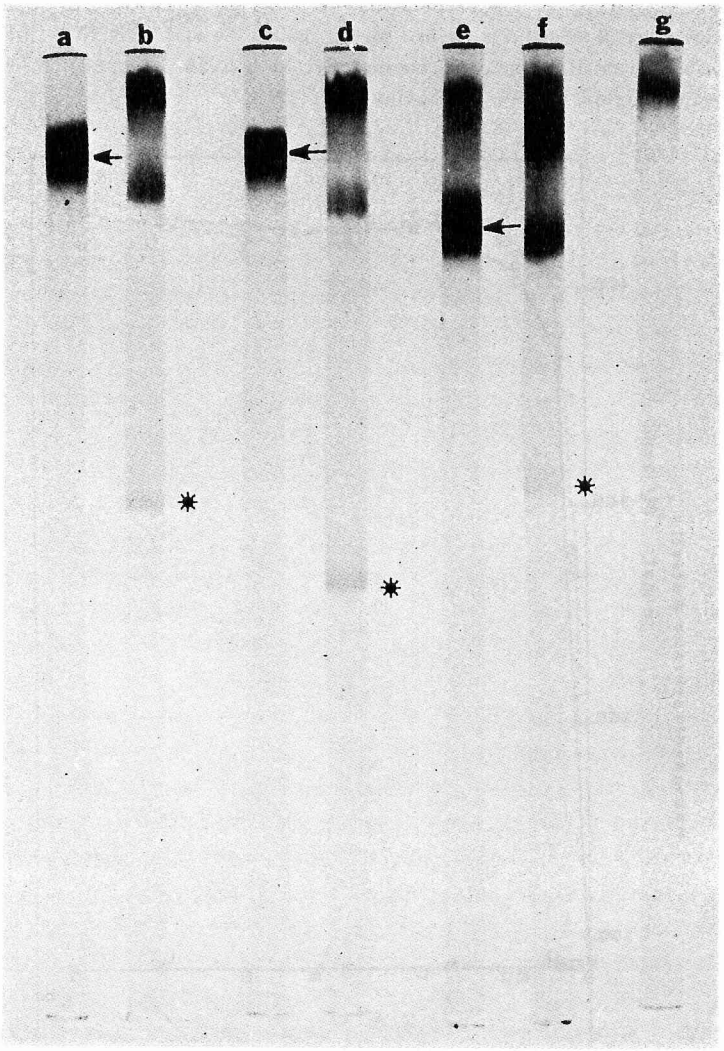

Fig. 7 6 M urea-polyacrylamide gel electrophoresis at pH 8.6
Arrows indicate the complex. Free acivator protein and troponin C are observed as fast migrating bands (*).

a : Bovine thyroid activator protein (30 μg) + bovine heart muscle TN I (45 μg) with 0.1 mM $CaCl_2$

b : Bovine thyroid activator protein (30 μg) + bovine heart muscle TN I (45 μg) with 0.2 mM EGTA

c : Bovine brain activator protein (30 μg) + bovine heart muscle TN I (45 μg) with 0.1 mM $CaCl_2$

d : Bovine brain activator protein (30 μg) + bovine heart TN I (45 μg) with 0.2 mM EGTA

e : Bovine heart muscle TN C (30 μg) + bovine heart muscle TN I (45 μg) with 0.1 mM $CaCl_2$

f : Bovine heart muscle TN C (30 μg) + bovine heart muscle TN I (45 μg) with 0.2 mM EGTA

g : Bovine heart muscle TN I (45 μg)

一であり，従来の報告[12]にも一致した。

D．甲状腺 AP と心筋 TN I の complex 形成

TN C と TN I が Ca^{2+} の存在下で特異的な complex を形成し，この complex は 6～8M urea-polyacrylamide 電気泳動下でも安定であること[25]から，甲状腺 AP が TN C 同様 TN I と complex を形成するかどうか検討した。事実，脳 AP は TN C 同様，ウサギ骨格筋 TN I[14]及び，牛心筋 TN I[16]と Ca^{2+} 存在下で同様な complex を形成することが報告されている。

Fig. 7 に示す様に，心筋 TN C は心筋 TN I と Ca^{2+} 存在下で特異的な complex を形成し，EGTA の添加で解離する。同様に，甲状腺 AP，脳 AP も TN I と complex を形成し EGTA の添加によって解離することがわかる。この条件下では，TN I はほとんど泳動されず，ゲルの最上部に位置している。骨格筋 TN C-TN I complex，脳 AP-骨格筋 TN I complex は，0.2mM EGTA の添加で完全に解離するとされているが[14][25]，本実験では，同様の条件で，心筋 TN C-TN I complex，AP-TN I complex とも部分的にしか解離しない。これは，心筋 TN I と骨格筋 TN I との差か，又は他の原因によるものか不明である。

E．Ca^{2+} 結合性

平衡透析法によって得られた Ca^{2+} の甲状腺 AP への結合性を Scatchard plot によって解析すると，甲状腺 AP は2つの high affnity site と2つの low affinity site を持ち，解離定数は各々 2.1×10^{-6}M と 4.1×10^{-5}M であることがわかる（Fig. 8）。

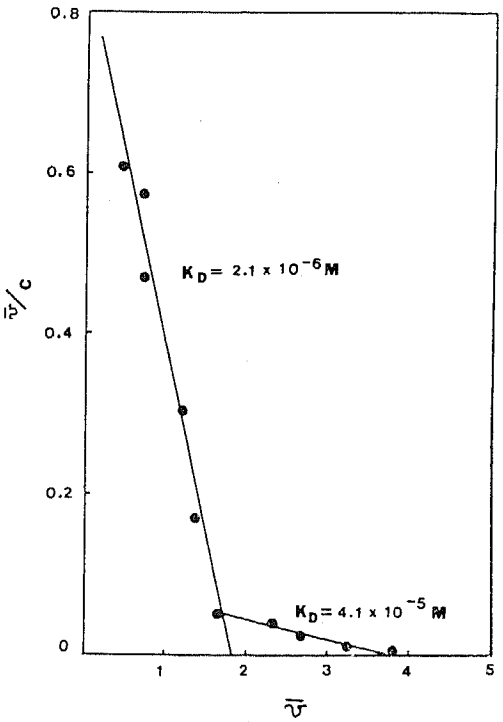

Fig. 8 Scatchard plot of Ca^{2+} binding by the bovine thyroid activator protein. The data shown are from equilibrium dialysis experiments performed as described under "Methods". The mols of Ca^{2+} bound per mol of activator protein, $\bar{\nu}$, was calculated from the difference in radioactivity in the protein solution inside the dialysis tubing and that in the buffer outside the tubing after equilibration had been reached. (C) is the concentration of Ca^{2+} in the buffer outside the dialysis tubing.

F．アミノ酸組成

甲状腺 AP，脳 AP，心筋 TN C のアミノ酸組成は従来報告されている Ca^{2+} 結合蛋白のアミノ酸組成と共に Table II に示した。甲状腺 AP は，① histidine, tyrosine, proline の含量が低く，② cysteine を欠き，③ aspartic acid と glutamic acid が約30％を占め，④ 45％が non-polar residue で55％が polar residue であること等，特徴的なアミノ酸組成を示し，更に Table II に掲げた Ca^{2+} 結合蛋白は全て良く類似していることがわかった。更にアミノ酸組成の類似性を明かにする目的でこれらのデータから Metzger らの報告[26]にのっとって，Difference Index を計算し，Table III に示した。甲状腺 AP は，豚脳 AP，牛脳 AP，副腎髄質 Ca^{2+} 結合蛋白，心筋 AP とほとんど同一であり，更に，心筋 TN C よりも骨格筋 TN C に類似していることがわかる。

G．Tryptic peptide map

Fig. 9 に甲状腺 AP，脳 AP，心筋 TN C の peptide map を示した。甲状腺 AP と脳 AP は良く似た peptide map を示し，アミノ酸分析の結果を支持したが，アミノ酸組成の類似性にもかかわらず，AP と心筋 TN C は異った peptide map を示した。

Table II Comparative Amino Acid Compositions of Phosphodiesterase Activator Proteins and Muscle Calcium Binding Proteins

	Bovine thyroid activator protein		Bovine brain activator protein		Bovine heart TN C		Phosphodiesterase activator protein				Bovine adrenal medulla Ca^{2+} binding protein[h]	Bovine heart muscle TN C[i]	Rabbit skeletal muscle TN C[j]
	Residues per mol[a]	Nearest integer residue per mol	Residues per mol[b]	Nearest integer residue per mol	Residues per mol[c]	Nearest integer residue per mol	A[d]	B[e]	C[f]	D[g]			
Lysine	8.74	9	9.29	9	17.70	18	9	8	8	7	8	13	9
Histidine	1.46	1	1.64	2	0.00	0	1	1	1	1	1	0	1
Arginine	5.46	5	5.72	6	3.87	4	6	7	7	6	5	4	7
Aspartic Acid	22.08	22	22.00	22	19.96	20	25	24	24	24～25	22	27	22
Threonine	11.93	12	11.54	12	6.12	6	12	14	12	13	11	7	6
Serine	6.07	6	5.63	6	4.06	4	3	5	5	6	5	5	7
Glutamic Acid	28.67	29	27.46	27	25.79	26	30	30	29	29～30	25	29	31
Proline	4.51	5	3.84	4	3.11	3	2	2	2	2	2	2	1
Glycine	13.37	13	13.01	13	12.55	13	12	13	12	12～13	12	12	13
Alanine	11.82	12	9.21	9	7.24	7	12	13	12	11～12	11	7	13
Half-cystine	ND[k]	ND	ND	ND	0.76	1	0	0	0	0	1	2	1
Valine	9.70	10	8.49	8	10.05	10	9	8	8	8	9	8	7
Methionine	5.98	6	4.59	5	11.79	12	11	10	10	9	8	11	10
Isoleucine	6.75	7	6.62	7	8.86	9	8	9	8	9	7	8	9
Leucine	9.46	9	9.49	9	14.76	15	10	11	10	11	8	13	9
Tyrosine	1.99	2	1.79	2	3.07	3	2	2	2	2	2	3	2
Phenylalanine	8.44	8	7.45	7	11.90	12	9	10	8	8	7	9	10
Tryptophan	……[l]	…	……	…	……	…	0	0	0	0.1	0	0	0

[a] : Values calculated for a subunit size of 16,500
[b] : Values calculated for a subunit size of 16,500
[c] : Values calculated for a subunit size of 18,500
[d] : Bovine heart : Values taken from the data of Stevens et al.[13]
[e] : Bovine brain : Values taken from the data of Lin et al.[8]
[f] : Bovine brain : Values taken from the data of Watterson et al[12]
[g] : Pig brain : Values taken from the data of Klee[29]
[h] : Values taken from the data of Kuo and Coffee[22]
[i] : Values taken from the sequence data of van Eard and Takahashi[33]
[j] : Values taken from the sequence data of Collins et al.[34]
[k] : non-detectable
[l] : not determined

Table III Comparison of Difference Index of Phosphodiesterase Activator Proteins and Muscle Calcium Binding Proteins

		Difference Index
Bovine thyroid activator protein	vs. Bovine brain activator protein	3.88
	vs. Bovine brain activator protein[a]	3.90
	vs. Bovine brain activator protein[b]	5.71
	vs. Bovine heart activator protein[c]	5.25
	vs. Pig brain activator protein[d]	5.52～6.04
	vs. Bovine adrenal medulla Ca^{2+} binding protein[e]	3.89
	vs. Rabbit skeletal muscle troponin C[f]	9.43
	vs. Bovine heart muscle troponin C	17.45
	vs. Bovine heart muscle troponin C[g]	15.77

[a] : Values calculated from the data of Lin et al.[8]
[b] : 〃 Watterson et al.[12]
[c] : 〃 Stevens et al.[13]
[d] : 〃 Klee[20]
[e] : 〃 Kuo and Coffee[22]
[f] : 〃 Collins et al.[34]
[g] : 〃 van Eard and Takahashi[33]

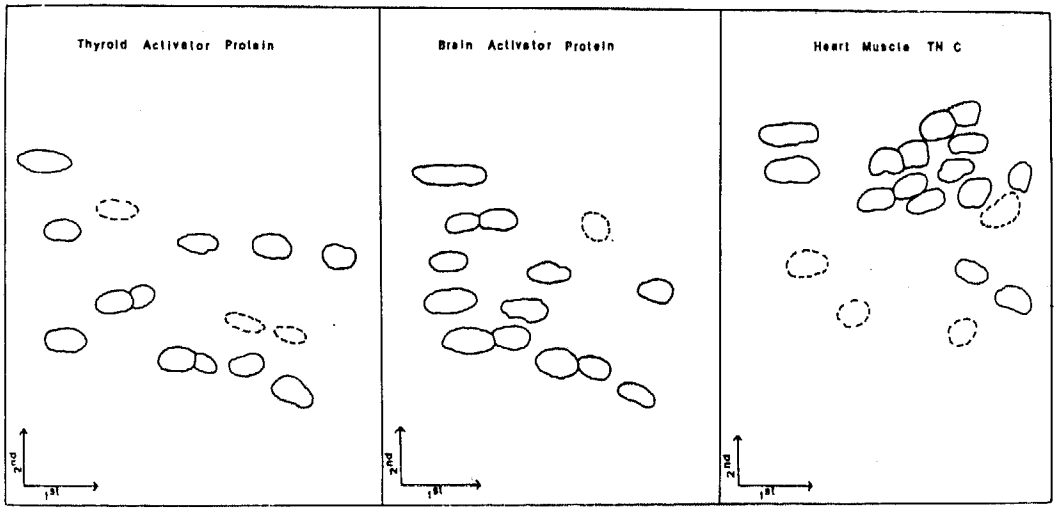

Fig. 9 Tryptic peptide maps of bovine thyroid activator protein, brain activator protein, and heart muscle TN C. Electrophoresis was carried out in the first dimension using formic acid/acetic acid/water (58/156/1786) and ascending chromatography was performed in the second dimension with pyridine/butanol/acetic acid/water (10/15/3/12).

H. Ultraviolet absorption spectrum 及び Isoelectric focusing

甲状腺 AP の ultraviolet spectrum は，脳 AP，心筋 TN C に極めて類似し (Fig. 10)，等電点は 4.1 で，脳 AP，心筋 TN C の等電点と同一であった (Fig. 11)。また，これらの結果は，脳 AP，骨格筋 TN C についての従来の報告[12)25)] と良く一致した。

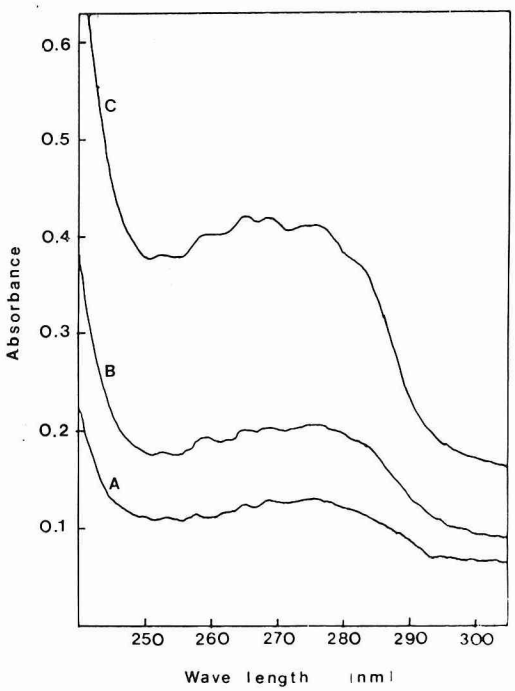

Fig. 10 Ultraviolet absorption spectra of bovine thyroid activator protein (A), brain activator protein (B), and heart TN C (C). In each case, the buffer was 50 mM Tris-HCl, pH 7.5.

I. Ca^{2+} の電気泳動度への影響

甲状腺 APを 0.2mM EGTA 又は 0.1mM Ca^{2+} の存在下で電気泳動した結果を Fig. 12 に示した。Ca^{2+} の存在下では，EGTA 存在下に比し，甲状腺 AP は速く泳動され，脳 AP，TN C についても同様な事実が観察され，これらの結果は既に報告された骨格筋 TN C[25]，心筋 TN C[16]，脳 AP[16]についての観察と一致する。

J. Circular dichroism spectrum

Ca^{2+} の電気泳動度への影響は，TN C[25]や AP[16]の conformational change を反映するものと考えられることから，甲状腺 AP，脳 AP 及び心筋 TN C の circular dichroism spectrum を Ca^{2+} の存在下及び EGTA 存在下で測定した (Fig. 13)。甲状腺 AP の 250nm 以下での spectrum は 222nm と 207nm で最小値をとり，これは，この蛋白の一定部分が helical conformation を持っていることを示し，更に Ca^{2+} を EGTA 添加により除去すると 222nm，207nm の両波長で，ellipticity が著明に減少することが観察

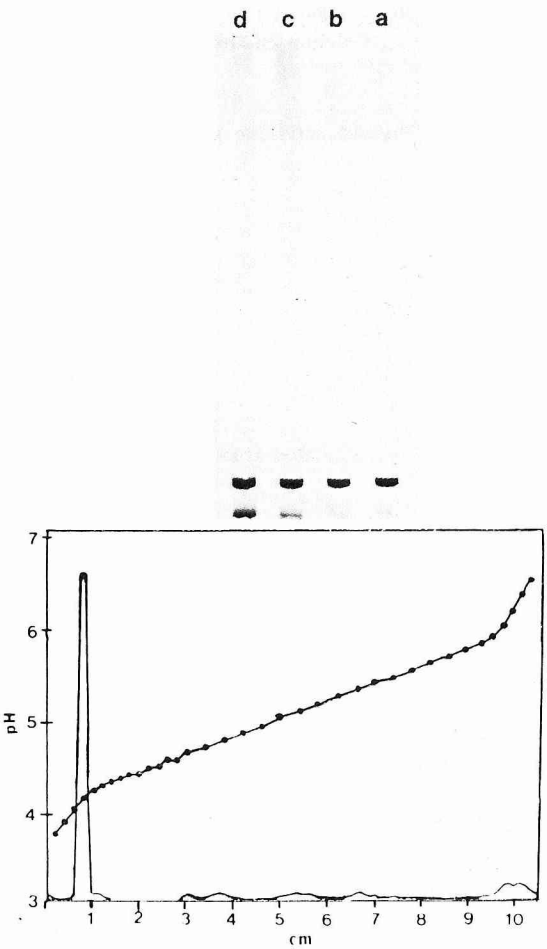

Fig. 11 Isoelectric focusing of bovine thyroid activator protein on polyacrylamide gel.
a : Bovine thyroid activator protein (30 μg)
b : Bovine brain activator protein (30 μg)
c : Bovine heart muscle TN C (30 μg)
d : Bovine thyroid activator protein (15 μg) + bovine heart muscle TN C (15 μg)
Solid line indicated densitometery (absorbance at 550 nm) of gel a.

された。Ca^{2+} 存在下では $\{\theta\}$ 222nm は −22,880 deg cm^2/d mol であり，Ca^{2+} 非存在下では $\{\theta\}$ 222nm は −16,000 deg cm^2/d mol であった。207 nm の band でも同様な変化が観察されたが，減少の程度は 222nm の band に比し小さかった。Fig. 13 に同時に図示した様に，脳 AP，心筋 TN C も同様な Ca^{2+} 依存性 conformational change が観察され，

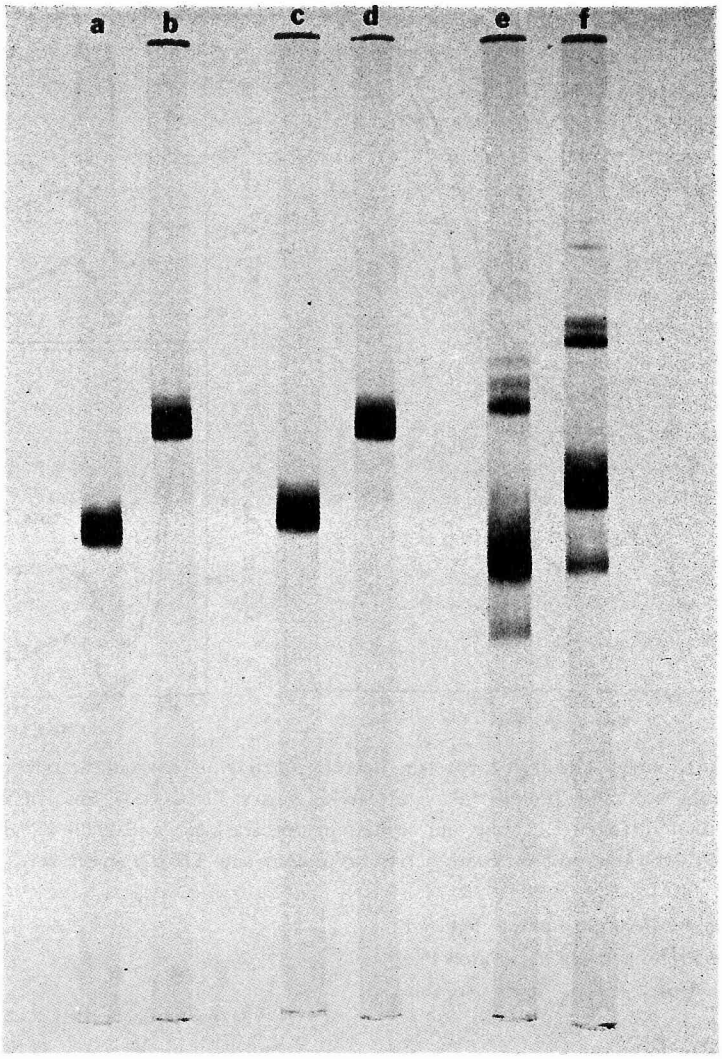

Fig. 12 6 M urea-5% polyacrylamide gel electrophoresis
a : Bovine thyroid activator protein (30 μg) with 0.1 mM $CaCl_2$
b : Bovine thyroid activator protein (30 μg) with 0.2 mM EGTA
c : Bovine brain activator protein (30 μg) with 0.1 mM $CaCl_2$
d : Bovine brain activator protein (30 μg) with 0.2 mM EGTA
e : Bovine heart muscle TN C (30 μg) with 0.1 mM $CaCl_2$
f : Bovine heart mnscle TN C (30 μg) with 0.2 mM EGTA

脳 AP についての従来の報告[27]とも一致した。

Helical content を circular dichroism spectrum から推定した結果を Table IV に示したが，Ca^{2+} 存在下では，甲状腺 AP では約61%が α-helical conformation を示し，Ca^{2+} 非存在下では，約46%に減少する。脳 AP は Ca^{2+} 存在下で約43%が α-helical conformation を示し，非存在下では約34%に減少し，心筋 TN C では約46%が約35%へと減少することがわかった。

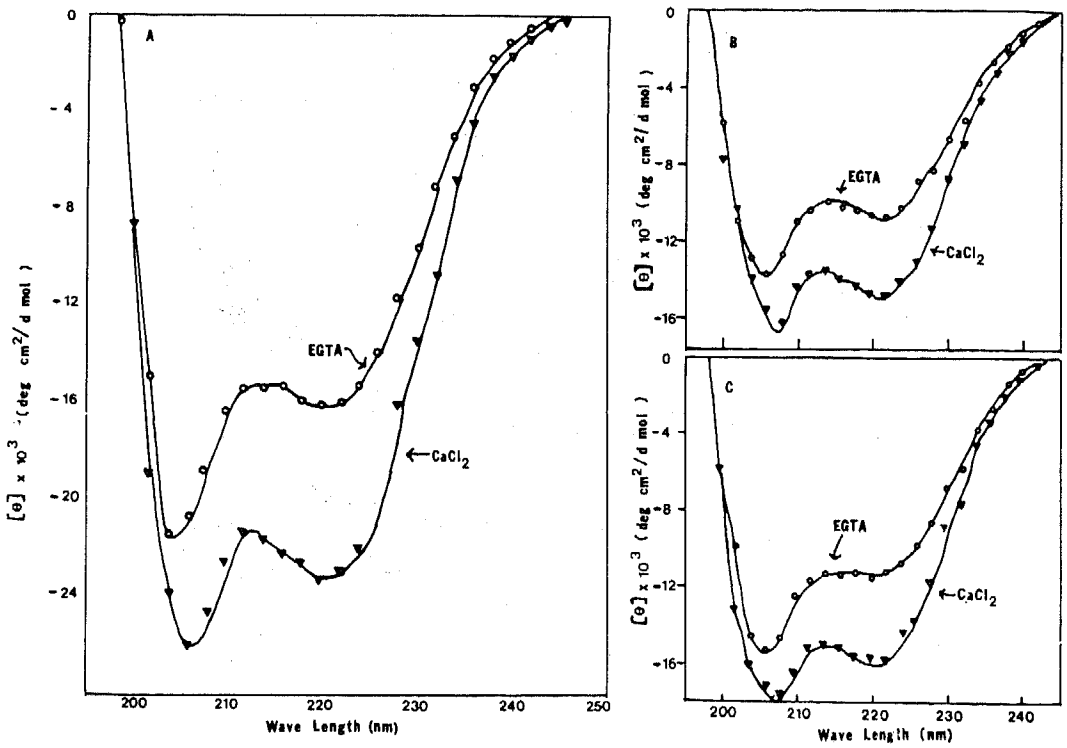

Fig. 13 Far-ultraviolet circular dichroism spectra of bovine thyroid activator protein (A), bovine brain activator protein (B), and bovine heart TN C (C). Spectra were measured with constant nitrogen flushing and protein concentrations of 0.22, 0.42, and 0.67 mg/ml for thyroid activator protein, brain activator protein and TN C respectively.

Table IV Helical Content of Bovine Thyroid Activator Protein, Brain Activator Protein and Heart TN C from Circular Dichroism

	[θ] 222 nm deg cm²/d mol	% helix
Thyroid Activator Protein		
$CaCl_2$ (0.1 mM)	−22,880	61
EGTA (3.0 mM)	−16,000	46
Brain Activator Protein		
$CaCl_2$ (0.1 mM)	−14,631	43
EGTA (3.0 mM)	−10,685	34
Bovine Heart TN C		
$CaCl_2$ (0.1 mM)	−15,856	46
EGTA (3.0 mM)	−11,151	35

Ⅳ. 考　察

種々の non-muscle cell において，偽足形成，exocytosis，endocytosis，細胞内顆粒の運動等の細胞運動は収縮蛋白によって制御されていると考えられている[28]。甲状腺からも actin, myosin が精製され，その性状が検討され，この仮説を支持する成績が得られた[1]が，本実験においては，収縮蛋白がコロイド小滴形成や，甲状腺ホルモン分泌にどう関与しているかを明らかにする目的で，殊にその一環として筋肉の tropomyosin や tropnin といった regulatory protein が甲状腺にも存在するかどうかを明らかにする目的で troponin C-like phosphodiesterase activator protein を精製し，その性状について検討を加えた。

甲状腺 AP は，熱処理，硫安分画，イオン交換カラム，ゲルロ過によって精製されたが，この蛋白が，耐

熱性で酸性蛋白であるという性状を利用している。精製途上に起った問題点の一つは，甲状腺に大量に含まれる thyroglobulin（甲状腺可溶性蛋白の約80%と考えられている）が熱処理によっても凝固しないことであったが，これは硫安分画を行うことによってとり除れた。DEAE-cellulose chromatography によっても大量の混在蛋白が除れ，Sephadex G-100 カラムを用いることで95%以上の純度を持った AP を得ることが出来た。

この方法によって精製された甲状腺 AP は，脳 AP とほとんど同一の生物学的性状を有していた。即ち，甲状腺 AP，脳 AP は phosphodiesterase 活性化能において同一の specific activity を有し，更に 6 M urea-polyacrylamide gel 内で心筋 TN I と TN C-TN I complex に似た Ca^{2+} dependent complex を形成した。牛心筋 TN C もまた Ca^{2+} 存在下で phosphodiesterase を活性化する能力を持っているが最大に活性化するためには 200 倍以上の蛋白量を必要とした[16]。

甲状腺 AP の物理化学的性状は，他臓器の AP と同一であり[7)8)12)13)22)27)29)]，骨格筋 TN C，心筋 TN C[12)13)25)]に類似していた。類似点を整理すると，① これらの蛋白は 1 モル当り 3 ～ 4 個の Ca^{2+} 結合部位を持ち，その解離定数は 10^{-5}～10^{-6}M であり，② 酸性蛋白で aspartic acid，glutamic acid を大量に含み等電点は 4.1 であり，③ 通常の蛋白と異った ultraviolet absorption spectrum を示し 250～280nm の間に 6 つのピークを持ちこれは phenylalanine と tyrosine に特徴的と考えられ，④ cysteine，histidine，tyrosine，proline の含量が低く，⑤ アミノ酸組成から Difference Index を計算すると甲状腺 AP は，牛脳 AP，豚脳 AP，牛副腎髄質 Ca^{2+} 結合蛋白とほとんど同一で，心筋 TN C よりも骨格筋 TN C に類似している。AP と TN C の大きな相違点は，その peptide map (Fig. 9 と ref. 13) と分子量である。

上記の類似点に加え，甲状腺 AP，脳 AP は心筋 TN C同様 Ca^{2+} に依存する conformational change をすると考えられ，骨格筋 TN C で観察された[25)]と同様，この変化は電気泳動で確められた。更に甲状腺 AP の circular dichroism からも Ca^{2+} 依存性の helical-coil transition が推測され holoprotein の helical content は61%，apoprotein のそれは46%であると考えられた。同様の可逆性，Ca^{2+} 依存性の conformational change は脳 AP 及び心筋 TN C でも観察されたが，脳 AP，心筋 TN C の helical content は Ca^{2+} の存否にかかわらず，甲状腺 AP の helical content より低いと考えられた。この差異の詳細は不明であるが，ラット睾丸 AP も又，脳 AP，心筋 TN C よりも helical content が高いと考えられている[30)]。同様の helical-coil transition は骨格筋 TN C[31)]，副腎髄質 Ca^{2+} 結合蛋白[23)]，牛脳 AP[32)]，豚脳 AP[29)]でも観察されている。

以上の結果の如く，甲状腺 AP は，他臓器の AP 同様，筋肉 TN C と構造上類似した蛋白であると考えられるが，Amphlett ら[14)]は，最近，牛脳 AP が骨格筋 TN I と Ca^{2+} 依存性 complex を形成し，更に骨格筋 actomyosin に TN C と同様の作用を持っていることを報告し，私達もまた脳 AP と心筋 TN I が Ca^{2+} 依存性 complex を形成することを見出している[16)]。更に Dedman ら[15)]は，独立にラット睾丸 AP と骨格筋 TN C との間に同様の biological cross-reactivity を見出している。本研究においても事実，甲状腺 AP は，心筋 TN I と Ca^{2+} 依存性 complex を形成し，この complex は，脳 AP－心筋 TN I complex とほぼ同一であり，TN C-TN I complex に類似していることが判明した。

以上の結果を総合し，更に甲状腺に myosin や actin が存在すること[1)]を考え合せるとこの蛋白は，単に phosphodiesterase の活性化蛋白であるのみならず，甲状腺 actomyosin ATPase の Ca^{2+} transducer 即ち，TN C として働き，甲状腺ホルモン分泌に必要なコロイド小滴形成，偽足形成等に関与するものと考えられる。

V. 結　語

甲状腺より troponin C-like phosphodiesterase activator protein を精製し，その性状を脳 AP，心筋 TN C と比較検討した。

① 甲状腺 AP の phosphodiesterase 活性化能は脳 AP と同一であり，更に心筋 TN I と Ca^{2+} 依存性 complex を形成した。甲状腺 AP-心筋 TN I complex は，脳 AP-心筋 TN I complex とほぼ同一で，TN C-TN I complex に類似していた。

② 甲状腺 AP の物理化学的性状は，脳 AP とほぼ同一で心筋 TN C に類似していた。

③ 甲状腺 AP は Ca^{2+} の存否によって，脳 AP や心筋 TN C と同様の helical-coil transition を行う

ものと考えられた。

以上の結果から，甲状腺APは，phosphodiesterase の活性化蛋白であるのみならず，甲状腺 actomyosin の Ca^{2+} transducer であることが示唆された。

本稿の要旨は，第51回（1978年6月）日本内分泌学会総会で発表した。

終始御懇切な御指導御校閲をいただいた，山田隆司教授に深く感謝致します。

参考文献

1) Kobayashi, R., Goldman, R. D., Hartshorne, D. J. and Field, J. B. : Purification and characterization of myosin from bovine thyroid. J. Biol. Chem., 252 : 8285－8291, 1977

2) Ebashi, S. and Endo, M. : Calcium ion and muscle contraction. Prog. Biophys. Mol. Biol., 18 : 123－186, 1968

3) Trifaró, J. M. : Common mechanism of hormone secretion. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 17 : 27－47, 1977

4) Berridge, M. J. : The interaction of cyclic nucleotides and calcium in the control of cellular activity. Adv. Cyc. Nuc. Res., 6 : 1－98, 1975

5) Kakiuchi, S., Yamazaki, R. and Kamijima, H. : Properties of a heat-stable phosphodiesterase activating factor isolated from brain extract : Studies on cyclic 3′, 5′-nucleotide phosphodiesterase (II) Proc. Japan Acad., 46 : 587－592, 1970

6) Cheung, W. Y. : Cyclic 3′, 5′-nucleotide phosphodiesterase, demonstration of an activator. Biochem. Biophys. Res. Commun., 38 : 533－538, 1970

7) Teo, T. S. and Wang, T. H. : Purification and properties of the protein activator of bovine heart cyclic adenosine 3′, 5′-monophosphate phosphodiesterase. J. Biol. Chem., 248 : 588－595, 1973

8) Lin, Y. M., Liu, Y. P. and Cheung, W. Y. : Cyclic 3′, 5′-nucleotide phosphodiesterase, Purification, characterization, and active form of the protein activator from bovine brain. J. Biol. Chem., 249 : 4943－4954, 1974

9) Wolff, D. J. and Brostrom, C. O. : Calcium-binding phosphoprotein from pig brain : Identification as a calcium-dependent regulator of brain cyclic nucleotide phosphodiesterase. Arch. Biochem. Biophys., 163 : 349－358, 1974

10) Brostrom, C. O., Hwang, Y. C., Brenkenridge, B. M. and Wolff, D. J. : Identification of a calcium-binding protein as a calcium-dependent regulator of brain adenylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72 : 64－68, 1975

11) Lin, Y. M., Liu, Y. P. and Cheung, W. Y. : Cyclic 3′, 5′-nucleotide phosphodiesterase, Ca^{2+}-dependent formation of bovine brain enzyme-activator complex. FEBS Letters, 49 : 356－360, 1975

12) Watterson, D. M., Harrelson, W. G. Jr., Keller, P. M., Sharief, F. and Vanaman, T. C. : Structural similarities between the Ca^{2+}-dependent regulatory proteins of 3′ : 5′-cyclic nucleotide phosphodiesterase and actomyosin ATPase. J. Biol. Chem., 251 : 4501－4513, 1976

13) Stevens, F. C., Walsh, M., Ho, H. C., Teo, T. S. and Wang, J. H. : Comparison of calcium-binding proteins, bovine heart and brain protein activators of cyclic nucleotide phosphodiesterase and rabbit skeletal muscle troponin C. J. Biol. Chem., 251 : 4495－4500, 1976

14) Amphlett, G. W., Vanaman, T. C. and Perry, S. V. : Effect of the troponin C-like protein from bovine brain (brain modulator protein) on the Mg^{2+}-stimulated ATPase of skeletal muscle actomysoin. FEBS Letters, 72 : 163－168, 1976

15) Dedman, J. R., Potter, J. D. and Means, A. R. : Biological cross-reactivity of rat testis phosphodiesterase activator protein and rabbit skeletal muscle troponin-C. J. Biol. Chem., 252 : 2437－2440, 1977

16) Kobayashi, R. and Field, J. B. : Functional relationship between bovine brain phospho-

diesterase activator protein and bovine heart troponin C. Biochim. Biophys. Acta, in press

17) Tsukui, R. and Ebashi, S. : Cardiac troponin. J. Biochem. (Tokyo), 73 : 1119−1121, 1973

18) Perry, S. V. and Cole, H. A. : Phosphorylation of troponin and the effects of interactions between the components of the complex. Biochem. J., 141 : 733−743, 1974

19) Davis, B. J. : Disc electrophoresis - II Method and application to human serum proteins. Ann. NY. Acad. Sci., 121 : 404−427, 1964

20) Weber, K. and Osborn, M. : The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244 : 4406−4412, 1969

21) Syska, H., Perry, S. V. and Trayer, I. P. : A new method of preparation of troponin I (inhibitory protein) using affinity chromatography. Evidence for three different forms of troponin I in striated muscle. FEBS Letters, 40 : 253−257, 1974

22) Kuo, I. C. Y. and Coffee, C. J. : Purification and characterization of a troponin C-like protein from bovine adrenal medulla. J. Biol. Chem., 252 : 1603−1609, 1976

23) Kuo, I. C. Y. and Coffee, C. J. : Bovine adrenal medulla troponin-C. J. Biol. Chem., 251 : 6315−6319, 1976

24) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193 : 265−275, 1951

25) Head, J. F. and Perry, S. V. : The interaction of the calcium-binding protein (troponin C) with bivalent cations and the inhibitory protein (troponin I). Biochem. J., 137 : 145−154, 1974

26) Metzger, H., Shapiro, M. B., Mosimann, J. E. and Vinton, J. E. : Assessment of compositional relatedness between proteins. Nature, 219 : 1166−1168, 1969

27) Wolff, D. J., Poirier, P. G., Brostrom, C. O. and Brostrom, M. A. : Divalent cation binding properties of bovine brain Ca^{2+}-dependent regulator protein. J. Biol. Chem., 252 : 4108−4117, 1977

28) Pollard, T. D. and Weihing, R. A. : Actin and myosin and cell movement. CRC Crit. Rev. Biochem., 2 : 1−65, 1974

29) Klee, C. B. : Conformational transition accompanying the binding of Ca^{2+} to the protein activator of 3′, 5′-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase. Biochemistry, 16 : 1017−1024, 1977

30) Dedman, J. R., Potter, J. D., Jackson, R. L., Johnson, J. D. and Means, A. R. : Physicochemical properties of rat testis Ca^{2+}-dependent regulator protein of cyclic nucleotide phosphodiesterase. J. Biol. Chem., 252 : 8415−8422, 1977

31) Murray, A. C. and Kay, C. M. : Hydrodynamic and optical properties of troponin A. Demonstration of a conformational change upon binding calcium ion. Biochemistry, 11 : 2622−2627, 1972

32) Liu, Y. P. and Cheung, W. Y. : Cyclic 3′ : 5′-nucleotide phosphodiesterase, Ca^{2+} confers more helical conformation to the protein activator. J. Biol. Chem., 251 : 4193−4198, 1976

33) van Eard, J. P. and Takahashi, K. : The amino acid sequence of bovine cardiac troponin-C. Comparison with rabbit skeletal troponin-C. Biochem. Biophys, Res. Commun., 64 : 122−127, 1975

34) Collins, J. H., Potter, J. D., Horn, M. J., Wilshire, G. and Jackman, N. : The amino acid sequence of rabbit skeletal muscle troponin C : gene replication and homology with calcium-binding proteins from carp and hake muscle. FEBS Letters, 36 : 268−272, 1973

(53. 4. 7 受稿)