

ストレプトゾトシン (STZ) 糖尿病ラットにおける 甲状腺ホルモン作用について

武田 貞二

信州大学医学部老年医学教室

(指導: 山田 隆司教授)

Thyroid Hormone Action in Streptozotocin (STZ)-Diabetic Rats

Teiji TAKEDA

Department of Geriatrics, Endocrinology and Metabolism

Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Takashi YAMADA)

Malic enzyme (ME) activity, 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3)-responsive hepatic nuclear protein (n protein), cytosolic T_3 -binding protein (CTBP) and hepatic nuclear T_3 receptor (NTR) were measured in diabetic rats before and after administrations of insulin (4 IU/100g body weight) and/or T_3 (5 μ g/100g body weight), in order to evaluate whether thyroid hormone action is altered in streptozotocin (STZ)-diabetic rats.

First, the n protein was purified and its monospecific antibody was raised. On Western blotting analysis, total hepatic n protein was decreased in thyroidectomized (Tx) rats, and increased within 12 hours after administration of 1 μ g T_3 /100g body weight. Maximal response was attained at 0.3 μ g T_3 /100g body weight 24 hours after the treatment. The n protein was present mainly in nuclei, very slightly in cytosol and microsome and was absent in mitochondria after subcellular fractionation of rat liver by differential centrifugation. The ME activity, n protein, and CTBP were decreased in diabetic rats and were increased after administrations of insulin and/or T_3 . NTR was not altered in diabetic rats regardless of administration of insulin. However, T_3 -induced activity of ME was diminished in diabetic rats compared to normal and Tx rats. The increase in ME activity was synergistic after repeated simultaneous administrations of insulin and T_3 so that the increase was more than the summation of responses to these hormones alone. In addition, the response of the ME activity to T_3 was restored after administration of insulin to diabetic rats. Although the response of the ME activity to a single or repeated injection of T_3 was blunted, a single injection of insulin after repeated administrations of T_3 drastically increased the ME activity to the level attained by simultaneous repeated injections of T_3 and insulin. These results indicate that T_3 action is not diminished in diabetic rats and apparent diminution of the response of the ME activity is due to lack of insulin necessary for ME activity.

Shinshu Med. J., 39: 803-818, 1991

(Received for publication August 5, 1991)

Key words: diabetes mellitus, 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3), malic enzyme, n protein, cytosolic T_3 -binding protein (CTBP)

糖尿病, 3,5,3'-トリヨード-L-チロニン, リンゴ酸酵素, n 蛋白, 細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白

I 緒 言

急性または慢性的重篤な疾患では血清中の甲状腺刺激ホルモン (TSH) は正常にもかかわらず、トリヨードチロニン (T_3) が低下することが以前よりヒトおよびラットにおいて報告されてきた¹⁾⁻⁶⁾。このような血清 TSH と T_3 に解離の認められる病態は nonthyroidal illness (NTI) と呼ばれ、細菌感染による敗血症ラット⁷⁾、絶食ラット⁸⁾⁻¹⁵⁾、ストレプトゾトシン (STZ) 投与による糖尿病 (DM) ラット⁵⁽⁶⁾⁽¹⁵⁾⁻¹⁹⁾ を用いて数多くの研究がなされてきた。これらの研究によると NTI の原因として、末梢レベルでのチロキシン (T_4) から T_3 への転換の低下¹⁵⁾⁽¹⁶⁾、血中無機ヨードの甲状腺細胞内への取り込みの変化⁷⁾⁽¹⁴⁾、血中における T_4 と結合蛋白に対する結合阻害物質の存在²⁰⁾、末梢における T_4 の代謝の低下⁹⁾、肝細胞への T_4 の取り込みの低下¹⁰⁾、細胞核 T_3 受容体 (NTR) の減少⁵⁽⁶⁾⁽¹¹⁾⁻¹³⁾ などが報告されてきた。このような NTI の病態下で末梢における細胞レベルでの甲状腺ホルモン作用はどのように変化しているかを STZ 投与による糖尿病ラットの肝および腎を用い、 T_3 応答性蛋白を指標に検討した。

この指標として、細胞質画分のリンゴ酸酵素 (malic enzyme; ME) 活性と 1978 年、Bernal ら²¹⁾ によって報告され、のちに n 蛋白と名付けられたラット肝細胞核蛋白を用いた。ME は T_3 応答性蛋白の 1 つとして以前から知られ²²⁾⁻²⁵⁾、培養肝細胞でも T_3 投与によりその活性が増加することが確かめられている²³⁾⁽²⁴⁾。また、STZ 糖尿病ラット肝ではその活性が減少することが報告されてきた⁵⁾⁽²⁶⁾。一方、n 蛋白は Bernal らによると、肝細胞核抽出液において甲状腺摘除 (T_x) で減少し、 T_x ラットに T_3 を投与すると増加するとされている。その後の研究で、n 蛋白は絶食にすると減少し、絶食ラットに摂食させると再び増加するなど栄養状態の影響を受けること、下垂体摘除ラットでも減少し、 T_3 投与で増加するが、成長ホルモン (GH) を投与しても増加しないこと、また、分子量が 110,000 から 125,000 Da で肝に多く存在し、他臓器にほとんど存在しないことなどが報告された²⁷⁾。

これら ME 活性と n 蛋白を指標にし、同時に T_3 の核への移行に関与すると考えられる細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白 (CTBP)²⁸⁾⁽²⁹⁾ や T_3 作用を媒介するとされる肝細胞核 T_3 受容体 (NTR) も測定し、糖尿病状態における末梢での T_3 作用について検討した。

II 実験材料と方法

実験にはウィスター系雄ラット (100~200 g) を使用した。糖尿病ラットは体重 100 g あたり 4 mg のストレプトゾトシン (STZ) を静脈内投与した後 1 カ月間通常飼育し、血糖値が 400 mg/dl 以上のものを DM 群として実験に供した。5 μ g/100 g 体重の T_3 を DM ラットに 12 時間ごと 1 回から 3 回腹腔内投与し、その群を T_3 群とした。インスリンは即効型インスリン (アクトラビッドヒューマン 40 中性注射液) 3 単位/100 g 体重と中間型インスリン (モノタードヒューマン 40 亜鉛水性懸濁注射液) 1 単位/100 g 体重を混合して DM ラットに 12 時間ごと 1 回または複数回皮下投与し、その群を I 群とした。また、STZ 投与後 5 日目から I 群と同量のインスリンを 24 時間ごとに 1 カ月間皮下投与した群を DM+I [A] 群、STZ 投与後 1 カ月間通常飼育し、さらにその後 1 カ月間同量のインスリンを 24 時間ごと皮下投与した群を DM+I [B] 群とした。 T_3 とインスリンを 12 時間ごと 1 回から 3 回同時投与した群を I+ T_3 群、正常ラットに 10 mM リン酸カリウム、pH 7.5 を含む 0.15 M NaCl (PBS) のみを腹腔内投与した群を NL 群、正常ラットの体重増加を DM ラットのそれと等しくするため食餌制限 (約 48 Cal/日) した群を FR 群とした。また、正常ラットを 9% (W/V) 抱水クロラルール (0.4 ml/100 g 体重) 麻酔下で甲状腺摘除し、術後 1 カ月間低ヨード食 (CLEA DIET No. 011, 日本クレア社, Tokyo, Japan) で飼育し、血清 T_3 、 T_4 濃度がそれぞれ 45 ng/dl, 0.5 μ g/dl 以下のものを T_x 群として実験に供した。

A 血清 T_3 、 T_4 濃度の測定

無麻酔下で頸椎脱臼させたラットを開腹し、腹部大動脈より採血した。得られた血液を血清分離した後、Boehringer Mannheim 社 (Mannheim, Germany) の Enzymun-Test T_3 、 T_4 キットを用いて enzyme immunoassay 法により測定した。

B 肝および腎リンゴ酸酵素 (ME) 活性の測定

各群のラットから肝と腎を摘出し、組織重量の 5 倍量の緩衝液 A (0.32 M sucrose/2 mM $MgCl_2$ /2 mM EDTA/20 mM Tris-HCl, pH 7.4) を加え、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーでホモジナイズ (8 往復) し、4°C で 1,000 \times g, 10 分間、遠心した。その上清を 4°C で 100,000 \times g, 30 分間遠心し、細胞質画分である上清を採取した。得られた細胞質から Ochoa³⁰⁾ の

方法により蛋白 1 mg あたり 1 分間に生成される NADPH の量 (nmol) として ME 活性 (U/mg 蛋白) を表した。

C n 蛋白の精製と抗 n 蛋白抗体の作製

n 蛋白は T_3 によって誘導されるため²¹⁾, これを精製する目的で正常ラットに 1 μ g/100 g 体重の T_3 を 24 時間ごと 2 回投与し, その 12 時間後のラットの肝を材料とした。摘出した肝の細胞核抽出液を Ichikawa と DeGroot²¹⁾の方法で調製し, 核抽出液中に含まれる n 蛋白の精製をその分子量と T_3 に対する応答性を指標に, 次に述べるカラムクロマトグラフィーによって行った。

50mM NaCl/1mM EDTA/10mM Tris-HCl, pH8.2 の緩衝液で平衡化したモノ Q セファロースカラム (カラム容積 9 ml) に吸着した 75 g 分の肝から得られた核抽出蛋白を, 0.05M から 1.0M の NaCl 濃度勾配により溶出した。n 蛋白を含む分画に, 4.0M NaCl を加え最終濃度 0.5M NaCl とした後, 0.5M KCl/0.2mM EDTA/ 10mM リン酸ナトリウム, pH7.7 の緩衝液で平衡化したハイドロキシアパタイト (HAP) カラム (カラム容積 10ml) に吸着させた。吸着した蛋白を 10mM から 200mM のリン酸ナトリウム濃度勾配により溶出し, n 蛋白を含む分画を水に対し透析し, 凍結乾燥した。この試料を SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にかけた後, ゲルの両側と中央を約 1 cm 幅切りとり, Coomassie brilliant blue を用いて蛋白染色を行い, n 蛋白の位置を同定し, 蛋白染色していないゲルから n 蛋白を含む部分を切り出した。この切り出したゲルを 0.04M ホウ酸/0.41M Tris-HCl, pH8.3 の緩衝液を満たした透析バッグの中に入れ, 4°C, 100V の電圧で電氣的に蛋白を溶出した (3 時間) 後, 水に対し透析した。以上のような操作によって最終的に単一の蛋白として分離した精製蛋白標品を凍結乾燥し, その 0.5mg を PBS に溶かし, 等量の Freund's complete adjuvant (Sigma 社, St. Louis, MO) に乳化させ, 家兎の腋窩に注射した。4 週間後, 0.5mg の精製蛋白を含む生理食塩水を家兎に静脈内投与し, その 2 週間後, 頸動脈より採血した。血清中の抗体は 50% 硫酸沈澱で部分的に精製し, PBS に対する透析後, PBS を加えて最終的にもとの血清と同じ容量にした。得られた抗体は, ウェスタンブロット法により n 蛋白に特異的であることが確認された (後述)。

D ラット肝の灌流実験による n 蛋白のホルモン応答

性の検討

ホルモンの直接効果により n 蛋白が増加するかどうか調べるため, 次のような灌流実験を行った¹⁰⁾。 T_x ラットをベントバルビタール (5 mg/100 g 体重) 麻酔下で開腹し, 門脈に 18 ゲージのテフロンチューブを挿入した。他方, 右心房より下大静脈にテフロンチューブを挿入し, 門脈から下大静脈へ 10ml/分 の速度で灌流した。最初, 灌流液 (Williams E に最終濃度 10^{-7} M のインスリン, 10^{-8} M の dexamethasone, 100,000 units/l のベニシリン G, 0.1g/l のストレプトマイシンを添加) に T_3 を加えず 2 時間灌流し, 肝の一部を切除した後, 灌流液に T_3 (最終濃度 10^{-7} M) を添加し, さらに 6 時間灌流を続けた。これら部分切除した肝と T_3 を加え最後まで灌流を続けた肝の細胞核抽出液中の n 蛋白の量をウェスタンブロット法で比較した。また, T_3 を加えず 8 時間灌流したものをコントロールとして用いた。DM ラットの肝を灌流する実験では, 灌流液に T_3 を加え, インスリンを加えず 2 時間灌流し, 肝の一部を切除した。その後, 灌流液にインスリン (最終濃度 10^{-7} M) を添加し, さらに 6 時間灌流を続けた。部分切除した肝と, インスリンを加えさらに 6 時間灌流した肝の細胞核抽出液中の n 蛋白の量をウェスタンブロット法で比較した。

E ウェスタンブロット法による n 蛋白の解析

ウェスタンブロット法による解析は次のように行った。サンプルを SDS-PAGE にかけた後, ゲルを 20% (V/V) メタノールを含む 4°C の 0.193M glycine/25 mM Tris-HCl, pH8.35 の緩衝液中で 12 時間通電 (30 V) し, ゲル中の蛋白をニトロセルロース膜上に移した。以下の操作をすべて室温で行った。ニトロセルロース膜を蒸留水で洗浄した後, 5% の牛血清アルブミン (BSA) を含む 0.15M NaCl/50mM Tris-HCl, pH7.6 (TBS) の緩衝液で 1 時間インキュベーションした。これを TBS で短時間洗浄し, 3% BSA と 0.05% Tween 20 を含む TBS (TBS-BSA-T) で 15 分間洗浄した。次に, 抗 n 蛋白抗体 (1 次抗体) を TBS-BSA-T で 200 倍に希釈し, その溶液 15ml 中でニトロセルロース膜を 1 時間インキュベーションした。その後, 0.3% Tween 20 を含む TBS で 1 回, TBS で 2 回, TBS-BSA-T で 1 回, それぞれ 10 分ずつ (計 40 分間) 洗浄した。TBS-BSA-T で 500 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗兎 IgG 抗体 (2 次抗体) (Cappel Laboratories, Cochranville, PA) で 1 時間インキュベーションし, TBS-BSA-T で 1 回,

Table 1 Several indexes in DM, DM+I and FR groups

	NL	DM	DM+I			DM+I	DM+I	FR
			12h	24h	36h	[A]	[B]	
T ₃ [ng/dl]	125.2±11.4 (5)	80.8±6.4** (4)	117.3±9.5 (3)	120.0±6.0 (2)	124.0±3.6 (3)	105.7±5.0 (3)	134.0±4.0 (2)	125.5±10.5 (2)
T ₄ [μg/dl]	4.0±0.6 (5)	2.3±0.1** (4)	4.7±0.7 (3)	3.1±0.3 (2)	3.7±0.7 (3)	3.3±0.1 (3)	3.7±0.1 (2)	4.2±0.5 (2)
Weight gain [g/month]	54.7±4.6 (4)	-8.0±10.2** (4)	ND	ND	ND	48.3±5.6 (3)	46.5±3.5 (2)	-11.0±5.0 (2)
Blood sugar [mg/dl]	97.4±20.6 (5)	506±56** (5)	300±161 (3)	212±69 (2)	336±226 (2)	221±172 (3)	440±63 (2)	98.0±4.0 (2)
LW/BW [%]	3.6±0.4 (5)	4.6±0.4* (5)	4.6±0.2* (3)	5.3±0.5 (2)	5.5±0.5 (2)	7.6±0.9** (3)	7.3±0.2 (2)	3.7±0.2 (2)

Serum T₃, T₄, body weight gain (g/month), blood sugar (mg/dl) and liver weight/body weight (LW/BW)(%) were determined in the following rats.

NL: normal rats with vehicle (PBS) administration. DM: untreated diabetic rats.

DM+I, 12h: diabetic rats treated with insulin 12 hours before sacrifice.

DM+I, 24h: diabetic rats treated with insulin 24 and 12 hours before sacrifice.

DM+I, 36h: diabetic rats treated with insulin 36, 24 and 12 hours before sacrifice.

DM+I[A]: diabetic rats with daily insulin administration for a month started from 5 days after STZ administration. DM+I[B]: diabetic rats with daily insulin administration for a month after 30 days of STZ administration.

FR: normal rats whose food intake was reduced, to match the weight gain to diabetic rats.

ND: not determined. Each value is the mean±standard deviation (SD) of more than 3 samples or the mean±range of 2 samples. The number in parentheses is the number of animals studied. *: p<0.05 compared to NL group, **: p<0.01 compared to NL group.

TBS-0.05% Tween 20 で2回, TBSで1回, それぞれ10分ずつ(計40分間)洗浄した。最後に, 3 mg のクロロナフトールと2.5μl の30% H₂O₂を含むTBS 5 mlを用い, ニトロセルロース膜上にn蛋白のバンドを発色させた。

ニトロセルロース膜上のn蛋白を, 必要なものについては島津社 (Kyoto, Japan) のDual-wavelength Flying Scanner CS-9000を用い, デンシトメトリーにより定量した。定量は, 基準となる正常ラットのn蛋白の量とデンシトメトリーの値が比例関係にあるところで行った。

F 肝細胞核T₃受容体 (NTR) と肝, 腎細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白 (CTBP) の測定

ラット肝細胞核を前述した方法で調製し, Surksら³²⁾の方法により [¹²⁵I] T₃の核への結合を測定し, Scatchard解析³³⁾によりT₃の核への最大結合容量と親和性を比較した。細胞核への [¹²⁵I] T₃結合能の97%はNTR特異的な結合であることを, 非標識T₃やT₃のアナログを用いて競合阻害の実験で確認した。

CTBPへのT₃結合能を次の方法で確認した²⁸⁾。

ME活性測定の場合と同様にラット肝および腎の細胞質画分を調製し, 内因性T₃, NADP, NADPHを除くため最終濃度が10% (W/V) となるように活性炭を加え, 4°Cで30分間インキュベーションした。その後, 27,000×g, 30分間遠心し, その上清をT₃結合能測定試料とした。得られた試料を100~1,000倍に希釈し, その50μlにNADPH (最終濃度50μM) を25μl, [¹²⁵I] T₃を20μl, 非標識T₃を25μl加え, 氷水中で30分間インキュベーションした。その後1% (W/V) のデキストランT-70を含む氷冷した2% (W/V) の活性炭40μlを加え遠心した後, 上清の80μlを別のチューブにとり, 蛋白結合 [¹²⁵I] T₃の放射活性を測定した。NTR, CTBPともに, 同時に3×10⁻⁷M非標識T₃を加えた試料における [¹²⁵I] T₃の結合を非特異的結合とした。全 [¹²⁵I] T₃結合からこれを差し引いた [¹²⁵I] T₃の結合活性を特異的結合 (specific binding) とした。また, Scatchard解析は6×10⁴cpm (18.8pg) の [¹²⁵I] T₃に種々の量の非標識T₃ (10⁻¹⁰~3×10⁻⁹M) を加えて行い, 得られた結果からNTRおよびCTBPの最大結合容量と親

和性を算出した。放射活性の測定はシンチレーションスペクトロメーター (Packard Instrument Co., Downers Grove, IL, USA) を使用した。

G 材料および統計学的処理

STZ は和光社 (Osaka, Japan), 3,5,3'-triiodo-L-

thyronine (T_3) および NADPH は Sigma 社 (St. Louis, MO, USA) のものを, インスリンは Novo 社 (Copenhagen, Denmark) のヒトインスリンを用いた。モノ Q セファロースは Pharmacia Fine Chemical 社 (Piskataway, NJ) から入手し, ハイドロキシア

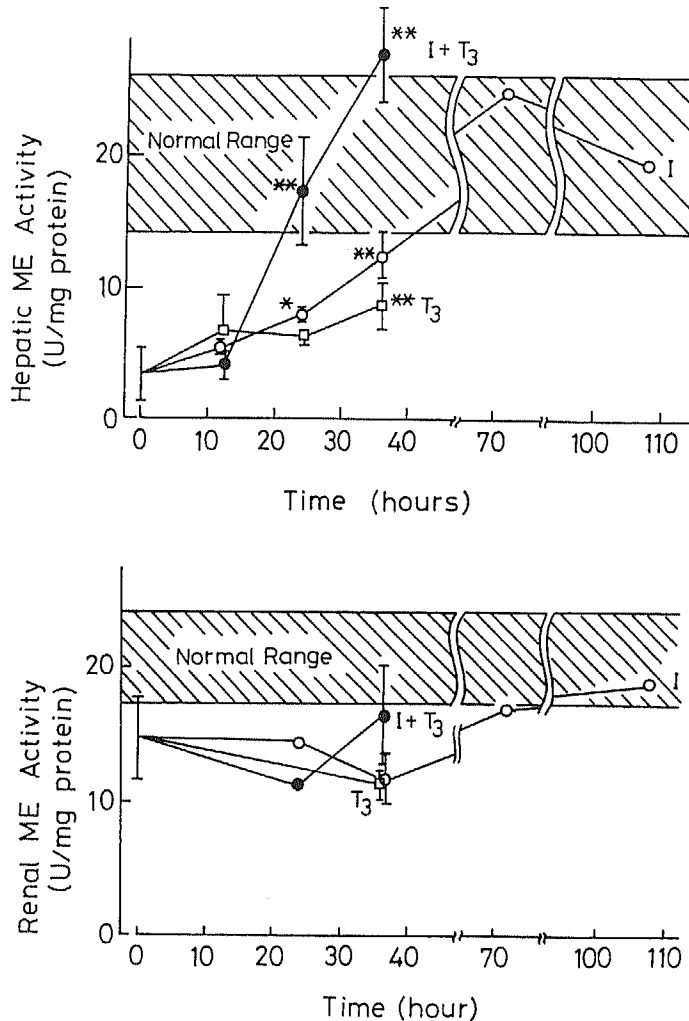


Fig. 1 Time course of hepatic and renal malic enzyme (ME) activities after administration of insulin and/or T_3 to diabetic rats.

Diabetic rats were treated with insulin (—○—), T_3 (—□—) or insulin and T_3 (—●—) every 12 hours. Rats were sacrificed 12 hours after the last injection. The ME activities of the livers and kidneys are shown in upper and lower panels, respectively. Each result indicates the mean \pm SD of 4 animals except for 24 hours T_3 alone (mean and range of 2 animals) and 12 hours insulin and T_3 (mean and range of 2 animals). *: $p < 0.05$ compared to DM group (0 hour), **: $p < 0.01$ compared to DM group (0 hour).

Table 2 Response of malic enzyme (ME) to a single injection of T_3

		A : ME activity before T_3 [U/mg protein]	B : ME activity after T_3 [U/mg protein]	Δ ME increased (B-A) [U/mg protein]	Ratio (B/A)
DM	(5)	5.5 \pm 1.5	6.7 \pm 2.5	1.2 \pm 1.2	1.2 \pm 0.2
DM+I \times 1	(2)	5.3 \pm 0.5	9.7 \pm 0.7	4.4 \pm 0.2	1.8 \pm 0.1
DM+I \times 3	(3)	15.5 \pm 2.4**	32.9 \pm 11.9**	17.4 \pm 9.5*	2.1 \pm 0.5*
NL	(3)	22.9 \pm 1.4**	42.6 \pm 3.8**	19.8 \pm 2.5**	1.9 \pm 0.1**
T_x	(1)	7.6	26.0	18.4	3.43

Diabetic rats were treated with insulin (I) (4 IU/100g body weight) once (DM+I \times 1) or three times (DM+I \times 3) every 12 hours. A single injection of T_3 (5 μ g/100g body weight) was given 12 hours after the last insulin administration. These rats were sacrificed 12 hours after the injection of T_3 and ME activities were measured. " Δ ME increased" was calculated by subtracting the ME activity before the T_3 injection from that after the T_3 injection (B-A). "Ratio" was calculated by dividing the ME activity after the T_3 injection by that before the T_3 injection. The number in parentheses is the number of animals studied. Each value is the mean \pm SD of more than 3 samples or the mean \pm range of 2 samples. *: $p<0.05$ compared to DM group, **: $p<0.01$ compared to DM group.

Table 3 Response of malic enzyme (ME) to a single injection of insulin (I)

		A : ME activity before I [U/mg protein]	B : ME activity after I [U/mg protein]	Δ ME increased (B-A) [U/mg protein]	Ratio (B/A)
DM	(4)	4.9 \pm 1.4	4.7 \pm 0.8	-0.2 \pm 1.0	1.0 \pm 0.2
DM+ $T_3\times$ 1	(2)	7.7 \pm 1.1	13.5 \pm 2.9	5.8 \pm 1.7	1.7 \pm 0.1
DM+ $T_3\times$ 3	(3)	9.5 \pm 1.4*	25.8 \pm 5.2**	16.4 \pm 3.9**	2.7 \pm 0.2**

Diabetic rats were treated with T_3 (5 μ g/100g body weight) once (DM+ $T_3\times$ 1) or three times (DM+ $T_3\times$ 3) every 12 hours. A single injection of insulin (4 IU/100g body weight) was given 12 hours after the last T_3 administration. These rats were sacrificed 12 hours after the injection of insulin and ME activities were measured. " Δ ME increased" was calculated by subtracting the ME activity before the insulin injection from that after the insulin injection (B-A). "Ratio" was calculated by dividing the ME activity after the insulin injection by that before the insulin injection. The number in parentheses is the number of animals studied. Each value is the mean \pm SD of more than 3 samples or the mean \pm range of 2 samples. *: $p<0.05$ compared to DM group, **: $P<0.01$ compared to DM group.

パタイトは Muench³⁴⁾の方法により調製した。また、 $[^{125}\text{I}]\text{ }T_3$ (2,200 μ Ci/ μ mol) は New England Nuclear 社 (Boston, MA, USA) から、灌流液に用いた Williams E は Flow Laboratories 社 (Irvine, Scotland) からそれぞれ入手した。

実験は複数回繰り返して行い、各群のデータを平均値 \pm 標準偏差あるいは平均値 \pm 範囲として表した。またデータを Student's t test により分析し、 $p<0.05$ を統計学的に有意とした。

III 結 果

A 各群ラットにおける血清 T_3 , T_4 濃度と種々の指

標の変化

DM 群では正常群に比べ血清 T_3 , T_4 濃度は両者とも有意に低下した。この低下はインスリン投与12時間後には回復し、正常群と有意な差を認めなかった (Table 1)。また、正常ラットの食餌量を制限し、体重増加を DM 群とマッチさせた群 (FR) のそれぞれの値は、正常群と有意な差を認めなかった。体重の増加は正常群, DM+I [A, B] において45~55 g/月であったが、DM と FR 群ではそれぞれ-8.0 g/月, -11.0 g/月であった。血糖値はDM群で506 \pm 56mg/dl と高かったが、インスリン治療により低下した。しかし、正常群やFR群にまでは回復しなかった。

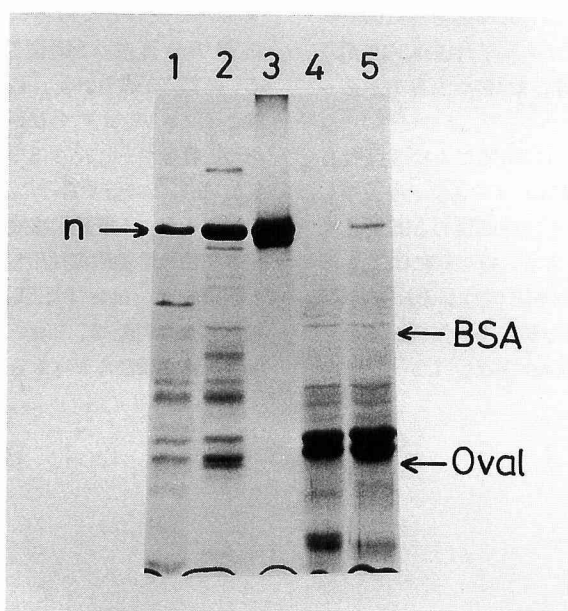


Fig. 2 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and silver staining of proteins at each purification step of rat hepatic n protein.

Samples were hepatic nuclear globulin extracts of thyroidectomized (lane 4) and T_3 -treated (lane 5) rats, and the n protein preparations at the steps of mono Q-Sepharose (lane 1) and hydroxylapatite (lane 2) column chromatography, and electroelution (lane 3). BSA: bovine serum albumin, Oval: ovalbumin.

体重あたりの肝重量 (LW/BW) は正常ラットに比べ、DM ラットで高く、インスリン投与でさらに増加した。しかし、DM ラットは体重減少が強いので、実際の肝重量は減少していたにもかかわらず LW/BW が高い結果となった。インスリン投与とともない実際の肝重量は増加した。

B DM ラット、肝、腎の細胞質画分における ME 活性の変動

肝における ME 活性は DM 群では正常群に比べ有意に低下しており、DM 群にインスリン単独、 T_3 単独、またはインスリン+ T_3 を12時間ごとに1回から3回投与すると、1回の投与(12時間後)では I、 T_3 、I+ T_3 のいずれの群でも有意な上昇がなく、3者間に有意な差を認めなかったが、3回投与後(36時間後)にはいずれも有意な上昇を認めた (Fig. 1, upper panel)。36時間後の増加量(36時間後の ME 活性-0時間の ME 活性)はインスリン単独投与群で9.1U/mg 蛋白、 T_3 単独投与群で5.3U/mg 蛋白、インスリ

ン+ T_3 投与群で24.3U/mg 蛋白と、それぞれ単独投与した場合の増加の和(14.4)よりも同時投与群で著明に高かった。一方、腎における ME 活性は正常群に比し DM 群で有意な低下は示すものの、DM 群にインスリン、 T_3 の単独または同時投与を行っても有意な変動を認めなかった (Fig. 1, lower panel)。

以上の結果は、肝ではインスリンにより T_3 に対する ME の応答性が増加することを示唆する。そこで肝における ME 活性の変動のメカニズムを詳しく調べるため次の実験を行った。DM ラットにインスリンを1回、または12時間ごとに3回投与しておき、最終投与の12時間後に T_3 を投与し、この T_3 投与前と投与12時間後の ME 活性を測定した (Table 2)。DM ラットでインスリンを投与しない群の ME 活性の上昇量は1.2U/mg 蛋白であるのに対し、インスリンを1回、3回投与しておいた群ではそれぞれ、4.4、17.4U/mg 蛋白であった。上昇率でもインスリン非投与群で1.2倍、1回投与で1.8倍、3回投与で2.1倍と、イン

スリン非投与群の T_3 に対する ME の応答性の低下が示唆された。正常群, T_x 群はそれぞれ 19.8, 18.4 U/mg 蛋白の増加, または 1.9 倍, 3.4 倍の上昇率があった。

同様に, T_3 を 1 回, または 12 時間ごとに 3 回投与しておき, 最終投与の 12 時間後にインスリンを投与し, このインスリン投与前と投与 12 時間後の ME 活性を比較した (Table 3)。インスリン投与前には T_3 の非投与群, 1 回, 3 回投与群の ME 活性がそれぞれ 4.9, 7.7, 9.5 U/mg 蛋白と T_3 投与群で高い傾向が認められたが, 大きな差は認められなかった。しかし, イン

スリンを投与したのちには, それぞれ 4.7, 13.5, 25.8 U/mg 蛋白の ME 活性を示し, T_3 投与回数に相応した反応がみられた。 T_3 非投与群, 1 回, 3 回投与群でインスリンに対する ME 活性の増加は, それぞれその上昇量で -0.2, 5.8, 16.4 U/mg 蛋白, 上昇率で 1.0, 1.7, 2.7 倍であった。

C DM ラット肝細胞核抽出液における n 蛋白の変動

n 蛋白は肝細胞核抽出液において T_x ラットで減少し (Fig. 2, lane 4), T_x ラットに T_3 を投与すると増加した (Fig. 2, lane 5)。Fig. 2 の lane 1 から 3 は n 蛋白精製における各段階の SDS-PAGE の蛋白

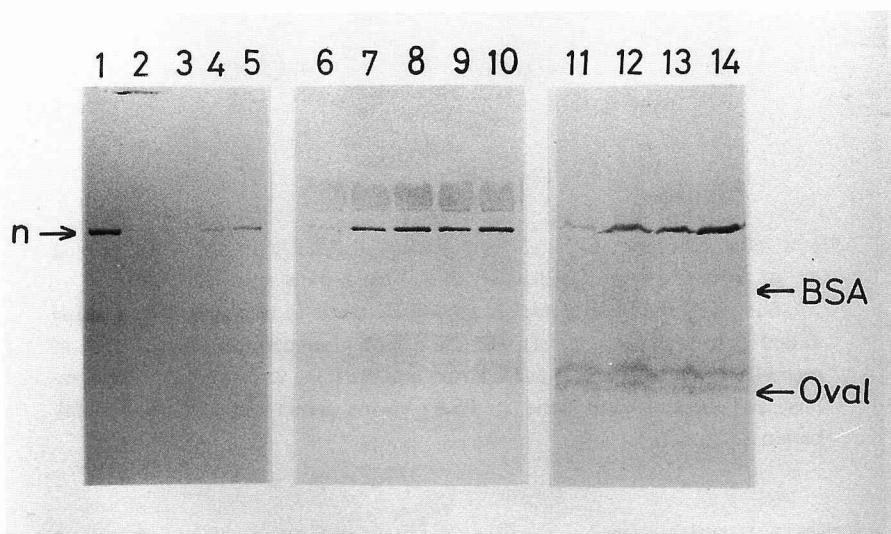


Fig. 3 Subcellular localization and T_3 -responsiveness of n protein.

Lanes from 1 to 5 show the subcellular localization of n protein after differential centrifugation. A normal liver (8g) was homogenized in 50 ml of buffer A (0.32 M sucrose/2mM $MgCl_2$ /2mM EDTA/20mM Tris-HCl, pH7.4). Nuclear globulin extract (lane 1), heavy mitochondrial fraction (lane 2), light mitochondrial fraction (lane 3), microsomal fraction (lane 4) and cytosolic fraction (lane 5) were prepared according to de Duve et al³⁴. Final volume was adjusted to 50 ml each and 10 μ l each of these fractions was used. Lanes from 6 to 10 show induction of n protein with various doses of T_3 . Thyroidectomized rats (95-105g body weight) were injected with vehicle (PBS) alone (lane 6), 0.1 μ g T_3 (lane 7), 0.3 μ g T_3 (lane 8), 1.0 μ g T_3 (lane 9) or 5.0 μ g T_3 (lane 10). Rats were sacrificed 24 hours after the treatment and liver (2g) was homogenized in 10 ml of buffer A. Five μ l each of whole homogenate was used. Lanes from 11 to 14 show time course of n protein induction by T_3 . Thyroidectomized rats were given T_3 (1.0 μ g/100g body weight). Rats were sacrificed 0 hour (lane 11), 12 hours (lane 12), 24 hours (lane 13) and 48 hours (lane 14) after the treatment. Five μ l each of whole homogenate was used. These samples were electrophoresed and Western blotting was performed by the use of anti-n protein antibody.

BSA: bovine serum albumin, Oval: ovalbumin.

染色を示している。すなわち、lane 1 はモノQセファロースカラムで精製後、lane 2 はHAPカラムで精製後、そしてlane 3 は最終的にSDS-PAGEで精製した後の試料をそれぞれ示した。

n 蛋白のDM ラットにおけるホルモンによる変動を調べる前に抗n 蛋白抗体を用いて、核局在性、 T_3 応答性を確認した。正常ラット肝ホモジネートを遠心分離し、それぞれの細胞画分をde Duve ら³⁵⁾の方法により調製した後、ウェスタンブロットを行うと、n 蛋白は核画分に多く存在し、細胞質、マイクロゾーム画分にもわずかに存在した (Fig. 3, lane 1~5)。また、 T_x ラットに種々の量の T_3 を投与し24時間後の肝全ホモジネートにおける n 蛋白の増加をみると肝臓全体における n 蛋白量が T_3 により増加し、体重100 gあたり0.1 μ g の T_3 投与で増加がみられ、体重100 gあたり0.3 μ g の T_3 投与で最大の反応が認められた (Fig. 3,

lane 6~10)。また、 T_3 投与後12時間で n 蛋白の増加を認めた (Fig. 3, lane 11~14)。

灌流実験を行うと、 T_3 を含まない灌流液で2時間灌流した肝では n 蛋白の増加はほとんど認められないが (Fig. 4, lane 1), その後 T_3 を加え6時間灌流すると n 蛋白は増加した (Fig. 4, lane 2)。一方、肝切除後 T_3 を加えぬまま6時間灌流した肝では、n 蛋白は増加しなかった (Fig. 4, lane 3, 4)。このことは n 蛋白が T_3 の肝に対する直接作用により増加したことを示唆していた。

この T_3 応答性 n 蛋白がDM ラットにインスリンまたは T_3 を投与した後、どのような変動を示すか検討した。これらのホルモン投与前 (Fig. 5, lane 1, 5) に比べ、 T_3 単独 (Fig. 5, lane 2, 6), インスリン単独 (Fig. 5, lane 3, 7), 両者同時 (Fig. 5, lane 4, 8) 投与12時間後には肝細胞核抽出液中の

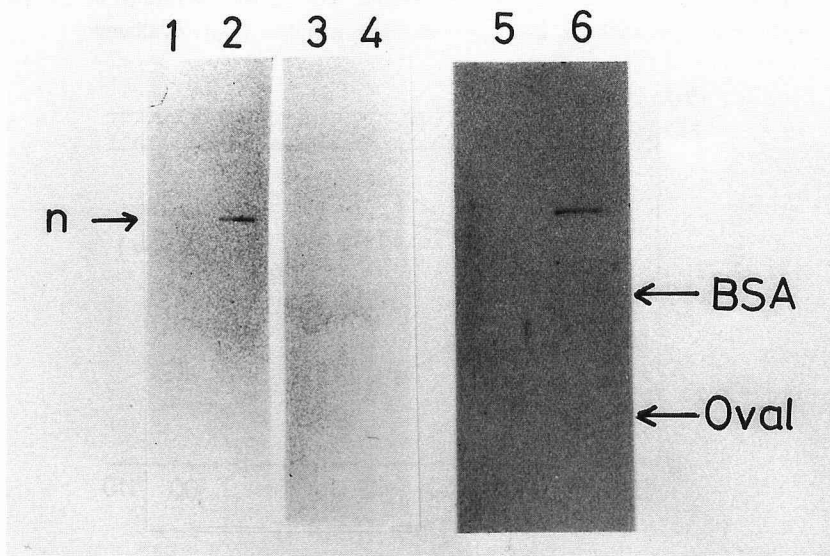


Fig. 4 Induction of n protein by T_3 and insulin in perfused liver.

Perfusion of livers from two thyroidectomized rats were performed. No T_3 was added for the first 2 hours of perfusion and partial hepatectomy was performed (lane 1,3). Then the perfusion was continued for additional 6 hours with (lane 2) or without (lane 4) the addition of 10^{-7} M T_3 . A liver from a diabetic rat was also perfused for 2 hours without insulin (lane 5) and partial hepatectomy was performed. Then 10^{-7} M insulin was added and the perfusion was continued for additional 6 hours (lane 6). Nuclear globulin extracts prepared from these livers were electrophoresed (30 μ g protein in each sample) and analyzed by Western blotting by the use of anti-n protein antibody. BSA: bovine serum albumin, Oval: ovalbumin.

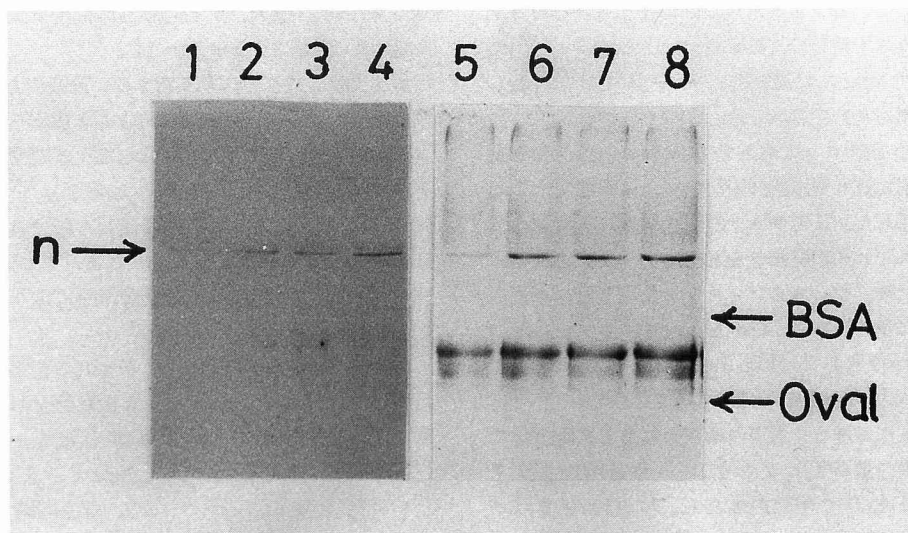


Fig. 5 Induction of n protein by T_3 and insulin in diabetic rats.

Hepatic nuclear globulin extracts were prepared from diabetic rats given vehicle alone (lane 1,5), T_3 (lane 2,6), insulin (lane 3,7), or T_3 and insulin (lane 4,8). They were applied to SDS-PAGE and Western blotting was performed by the use of anti-n protein antibody. BSA : bovine serum albumin, Oval : ovalbumin.

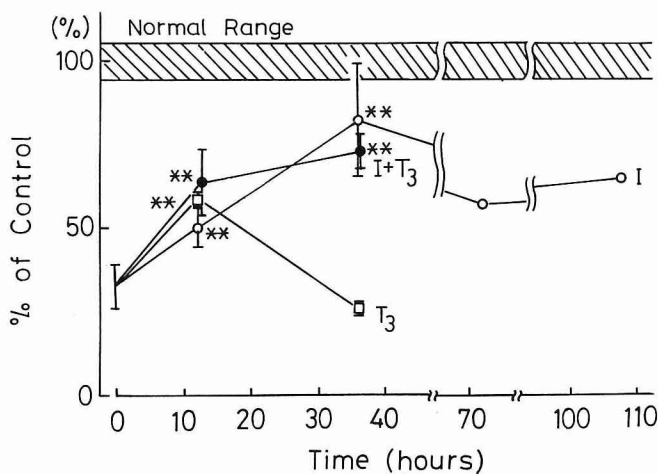


Fig. 6 Time course of induction of n protein in hepatic nuclear extract of diabetic rats given T_3 and/or insulin.

Diabetic rats treated with insulin (—○—), T_3 (—□—) or insulin and T_3 (—●—) were sacrificed 12 hours after the last treatment. Hepatic nuclear globulin extracts were prepared. Each of them containing $30\mu\text{g}$ protein was applied to SDS-PAGE and Western blotting was performed by the use of anti-n protein antibody. The amount of n protein was determined by densitometry and is expressed as the percentage to that of normal rats. Each result indicates the mean \pm SD of 3 or 4 animals except for 36 hours T_3 alone (mean and range of 2 animals). *: $p < 0.05$ compared to DM group (0 hour), **: $P < 0.01$ compared to DM group (0 hour).

Table 4 Hepatic nuclear T_3 receptors (NTR) in various groups

Nuclear T_3 receptors	NL	DM	DM+I			DM+ T_3	DM+I T_3
			12h	24h	36h		
Maximal T_3 -binding capacity [fmol/100 μ g DNA]	110.1 \pm 19.0 (4)	105.7 \pm 18.3 (5)	93.5 \pm 19.5 (5)	96.5 (1)	103.4 (1)	102.3 \pm 25.3 (3)	120.4 \pm 17.3 (3)
K_a [$\times 10^9$ l/mol]	5.1 \pm 0.3 (4)	7.1 \pm 2.3 (5)	8.5 \pm 4.3 (5)	7.5 (1)	6.9 (1)	9.4 \pm 5.8 (3)	7.2 \pm 0.7 (3)

Scatchard analysis of T_3 binding to rat hepatic nuclear T_3 receptors was performed as described in Materials and Methods, and maximal T_3 binding capacity and affinity constant (K_a) of T_3 to isolated nuclei were calculated. Rats were treated as described in Table 1. DM+ T_3 : diabetic rats treated with T_3 12 hours before sacrifice. DM+I T_3 : diabetic rats treated with insulin and T_3 12 hours before sacrifice. Each value is the mean \pm SD. The number in parentheses is the number of animals studied.

Table 5 Hepatic and renal malic enzyme, and cytosolic T_3 -binding protein in various groups

	NL	DM	DM+I [A]	DM+I [B]	FR
Hepatic ME activity [U/mg protein]	20.1 \pm 5.9** (8)	3.3 \pm 2.1 (10)	24.8 \pm 4.8** (3)	47.5 \pm 4.1 (2)	23.4 \pm 3.6 (2)
Renal ME activity [U/mg protein]	20.7 \pm 3.5* (5)	14.7 \pm 3.1 (4)	31.8 \pm 4.2** (3)	28.7 \pm 6.0 (2)	37.4 \pm 0.2 (2)
Hepatic CTBP [pmol/mg protein]	1.70 \pm 0.96** (8)	0.21 \pm 0.06 (6)	1.69 \pm 0.63** (3)	0.32 \pm 0.03 (2)	0.45 \pm 0.04 (2)
Renal CTBP [pmol/mg protein]	8.51 \pm 1.48 (3)	6.13 \pm 0.99 (5)	6.26 \pm 1.43 (3)	7.75 \pm 0.82 (2)	4.54 \pm 0.03 (2)

Hepatic and renal malic enzyme (ME) activity and cytosolic T_3 -binding protein (CTBP) were measured as described in Materials and Methods. Rats were treated as described in Table 1. Each value is the mean \pm SD of more than 3 samples or the mean \pm range of 2 samples. The number in parentheses is the number of animals studied. *: $p<0.05$ compared to DM group, **: $p<0.01$ compared to DM group.

n蛋白の増加が認められた。Fig. 5, lane 5~8の実験ではBSAとOvalbumin (Oval)の間の位置に非特異的なバンドが認められたが、これは洗浄が不完全であったためと思われる。

n蛋白が T_3 のみでなく、インスリンにも反応することが示されたが、この効果がインスリンの直接効果か、または血中甲状腺ホルモン上昇を介した作用かを検討するために灌流実験を行った。その結果、インスリン非存在下では認められなかったが、インスリン存在下での灌流肝ではn蛋白が誘導された (Fig. 4, lane 5, 6)。このためn蛋白の増加はインスリンの肝における直接作用であると考えられた。

このn蛋白をデンストメトリーで定量すると、DM群に比べインスリンまたは T_3 投与12時間後の増加はすべての投与群において有意であった (Fig. 6)。し

かし、 T_3 とインスリンの同時投与ではインスリン単独投与と比べ差がなくMEとは異なっていた。36時間後に T_3 単独でn蛋白はDM群レベルまで低下したがその理由については明らかでない。

D DMラット肝細胞核 T_3 受容体 (NTR) とCTBPの変動

次にDM状態におけるMEの甲状腺ホルモンに対する反応低下の原因を細胞レベルで調べるため、甲状腺ホルモンの作用を媒介するとされるNTRと核への T_3 の移行に関与すると考えられるCTBPを測定した。NTRはDM群、I群、正常群、いずれの群間にも差がなかった (Table 4)。しかし、CTBPは、DMラット肝で $[^{125}I]$ T_3 に対する最大結合容量が正常群に比し著明に減少した (Table 5)。DMラットに12時間ごとにインスリン、 T_3 を単独あるいは同時投与する

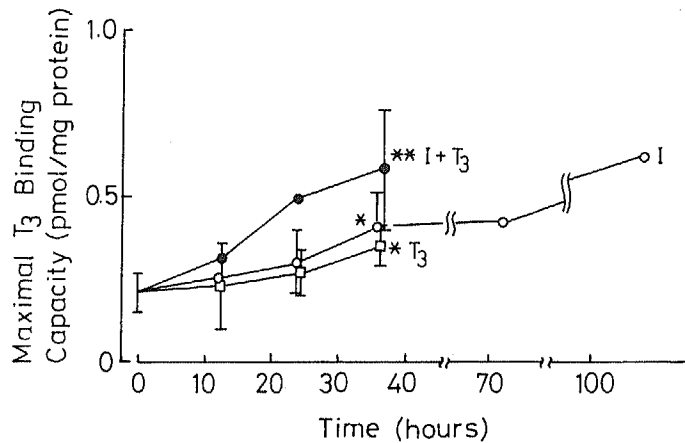


Fig. 7 Time course of alteration of hepatic cytosolic T_3 -binding protein (CTBP) in diabetic rats given T_3 and/or insulin.

Diabetic rats treated with insulin (—○—), T_3 (—■—) or insulin and T_3 (—●—) were sacrificed 12 hours after the last treatment. Hepatic cytosols were prepared and maximal T_3 binding capacities of CTBP were measured. Each result indicates the mean \pm SD of 3 animals except for 12 and 24 hours T_3 alone and 24 hours insulin alone (mean and range of 2 animals). *: $p < 0.05$ compared to DM group (0 hour), **: $p < 0.01$ compared to DM group (0 hour).

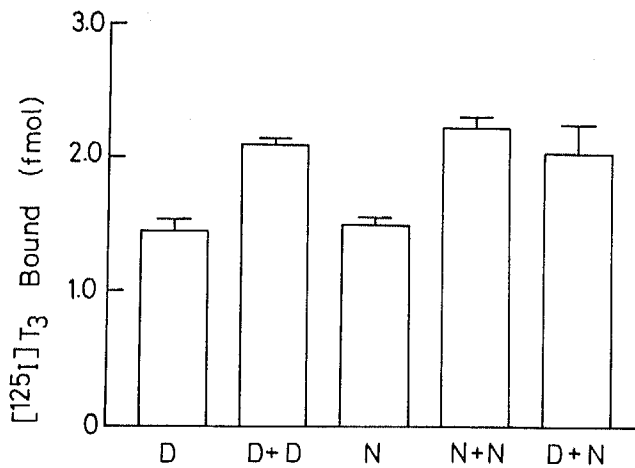


Fig. 8 Mixing experiment of CTBP from normal and diabetic rats.

The amount of cytosol from diabetic rats was adjusted to give [125 I] T_3 binding activity equal to that of normal rats. Specific [125 I] T_3 binding activity of rat hepatic cytosol was determined by the use of 28.9 fmol [125 I] T_3 . Cytosols were mixed with the following combinations. D+D: hepatic cytosols from 2 diabetic rats, N+N: hepatic cytosols from 2 normal rats, D+N: hepatic cytosols from a diabetic and a normal rats. Each vertical line represents the standard deviation.

と徐々に増加傾向を示した (Fig. 7)。36時間後にいずれの処置でも DM 群に比べ有意な上昇を示したが、依然、正常ラットに比べ低下していた。また、 T_3 、インスリン同時投与に対する反応は、それらを単独に投与したときの反応と比べ差がなかった (Fig. 7)。

次に DM 状態での T_3 に対する CTBP 結合活性の減少の原因が CTBP 抑制物質によるのか、または CTBP 自体の減少によるのかを調べるため DM ラット CTBP と正常ラット CTBP を混合し、その T_3 の結合活性をみた。DM ラット CTBP と正常ラット CTBP とを加えた活性は DM 同士または正常同士を加えた活性と変わりなく (Fig. 8)、DM における CTBP の減少は CTBP 蛋白自体の量的減少によると考えられた。この実験において 1.5fmol の T_3 結合活性を持つ CTBP 同士を混合しても約 2.0fmol にしか増加しなかったのは、加えた T_3 の量が不十分であったために相対的にならなかったと考えられた。

DM ラットにおける CTBP の減少が STZ の毒性効果によるものかどうかを見るため、STZ 投与後 5 日目よりインスリンを 1 カ月間投与したラット肝の CTBP を測定すると、この群の CTBP は正常化した (Table 5, DM+I [A]) が、DM を 1 カ月未治療のまま放置すると、その後 1 カ月間インスリン投与しても CTBP は正常化しなかった (Table 5, DM+I [B])。次に、DM 状態での CTBP 減少が栄養状態を反映しているかどうかを調べるため、FR 群のラット肝 CTBP を測定したところ、FR 群でも CTBP は減少していたが DM 群の減少ほどではなかった (Table 5, FR)。

IV 考 察

STZ 投与による実験 DM ラットでは血清 T_3 、 T_4 濃度が低下すると報告されている⁵⁰⁾。今回の検討でも DM 群で血清 T_3 、 T_4 濃度は正常ラット群に比し有意に低下していた。FR 群の血清 T_3 レベルに関しては、低下するとする報告と⁵¹⁾、有意な低下を示さないとする報告がある³⁰⁾。本実験に用いた FR 群ラットの体重の増加は DM 群のそれと非常に近いが血清 T_3 、 T_4 レベルは正常範囲内であった。おそらく、低栄養、飢餓の程度の違いにより報告間のデータの相違が生じるものと考えられる。実際、正常ラットを絶食にしても低下する¹¹⁾。

DM 状態で肝 ME 活性は正常群と比べ有意に低下しており、インスリン投与により上昇した。また、DM

ラットに T_3 を投与しても ME 活性は上昇したが、正常ラットに投与した場合と比べるとその上昇の割合は低い。これらの結果は ME が DM 状態で T_3 、インスリンそれぞれに応答する蛋白であるが、 T_3 の効果はインスリンに依存することを暗示する。 T_3 とインスリンは単独で投与した場合よりも同時投与を繰り返した場合に ME 活性の増加が著明である。DM ラットでは上昇量、上昇率ともに T_3 に対する応答性は低下しており、この低下はインスリンを投与することにより回復した。これは T_3 の作用に対しインスリンが協調的に作用することを示すものと考えられる。DM ラットに T_3 を 1 回または 3 回投与した後、インスリンを投与すると、 T_3 を 3 回投与しておいた群で上昇量、上昇率ともに著明な増加が認められた。したがって、DM ラットでは T_3 による効果は障害されているが内在しており、インスリンによって顕在化したものと考えられる。このことは ME 活性の発現に T_3 とインスリンの両方の作用が必要であるが、ME 活性発現までの過程でどちらか一方でも欠けると ME 活性は低下することを示唆する。本実験で投与された T_3 は核の T_3 受容体をほぼ完全に占有する量である³⁷⁾。このため ME の T_3 応答性に対するインスリンの作用をさらに明確にするために、 T_3 に対する容量依存性を調べるのが重要であろう。

一方、 T_3 応答性蛋白の 1 つである肝細胞核抽出液中の n 蛋白は DM 状態で著明に減少し、インスリンまたは T_3 投与 12 時間後には有意な増加を示す。しかし、ME とは異なり I 群と I + T_3 群間でその増加に差はなかった。

T_3 の核への移行に関与するとされる CTBP は DM 状態で著減しており、インスリンまたは T_3 の単独投与により増加した。CTBP が T_3 投与により増加することは報告されており³⁸⁾、今回は DM ラットでも T_3 依存性があることを示した。したがって CTBP は ME や n 蛋白と同様、甲状腺ホルモン応答性蛋白としての指標となり得るものと考えられる。さらに本研究は CTBP が DM ラットで減少し、インスリン投与で上昇することを明らかにした。しかし、ME と異なり T_3 単独と T_3 + インスリンの間にその上昇において差はなく、DM における T_3 に対する CTBP の応答性は n 蛋白と同様、インスリン投与による影響を受けないと考えられる。

肝細胞核 T_3 受容体 (NTR) の数が DM ラットで低下していない事実は、DM における T_3 作用の低下が

ないという結果を裏付けるものである。しかし、DMで減少するとの報告⁵⁾⁶⁾¹⁸⁾²⁰⁾とほとんど変化しないとの報告²⁶⁾がある。これらの報告結果の違いはラットのDMの程度、あるいは低栄養の程度の違いによる可能性が考えられる。たとえば、肝細胞NTRは絶食によって減少することが知られており¹¹⁾⁻¹³⁾、DMラットでは栄養状態の低下が関与する可能性は高い。

NTRに対しCTBPはDM状態で著減している。NTRに変化を認めないにもかかわらず T_3 効果が低下していたことはこのCTBPによる T_3 の核への移行の変化による可能性が考えられる。しかし、CTBPは細胞内のNADP, NADPH, SH基によりその細胞核への結合活性が微妙に調節されているため²⁸⁾²⁹⁾、単にCTBP量の変化のみでは核への T_3 の移行が変化したかどうかは不明である。CTBPの減少により T_3 作用や T_3 の核への取り込みがどのように影響を受けるかは今後の課題である。このDMラットにおけるCTBPの低下は、インスリンを長期間投与すると回復し、また、FR群でもCTBPは減少するがDM群ほどの低下を示さなかった。これらより、CTBPの減少はSTZの毒性効果のためではなく、DMによる

栄養障害とインスリン作用の低下によるものと考えられた。

腎のME活性、CTBPは、肝のそれらに比べDM状態あるいは食餌制限で著明な低下を示さず、ホルモン投与によっても顕著な変動を示さなかった。このことは臓器間でインスリンや T_3 の作用が異なっていることを示唆している。

本論文の要旨は、n蛋白の精製と分析に関して、第32回日本内分泌学会甲状腺分科会（1989年11月、群馬）、第63回日本内分泌学会学術総会（1990年5月、大阪）、第63回日本生化学会大会（1990年9月、大阪）において、糖尿病における甲状腺ホルモン作用の修飾に関して、第34回日本糖尿病学会年次学術集会（1991年5月、山形）、第64回日本内分泌学会学術総会（1991年6月、東京）において発表した。

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師、山田隆司教授、ならびに市川和夫助手に深甚なる謝意を表します。同時に本研究に際し、御教示御指導下さいました橋爪潔志講師に深謝致します。

文 献

- 1) Bermudez, F., Surks, M. I. and Oppenheimer, J. H.: High incidence of decreased serum triiodothyronine concentration in patients with nonthyroidal disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 41: 27-40, 1975
- 2) Maturlo, S. J., Rosenbaum, R. L., Pan, C. and Surks, M. I.: Variable thyrotropin response to thyrotropin-releasing hormone after small decreases in plasma free thyroid hormone concentrations in patients with nonthyroidal diseases. *J Clin Invest*, 66: 451-456, 1980
- 3) Williams, G. R., Franklyn, J. A., Neuberger, J. M. and Sheppard, M. C.: Thyroid hormone receptor expression in the "sick euthyroid" syndrome. *Lancet*, 2: 1477-1481, 1989
- 4) Chopra, I. J., Chopra, U., Smith, S. R., Reza, M. and Solomon, D. H.: Reciprocal changes in serum concentrations of 3, 3', 5'-triiodothyronine (reverse T_3) and 3, 3', 5-triiodothyronine (T_3) in systemic illnesses. *J Clin Endocrinol Metab*, 41: 1043-1049, 1975
- 5) Jolin, T.: Response of hepatic mitochondrial α -glycerophosphate dehydrogenase and malic enzyme to 3, 5, 3'-triiodothyronine in streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology*, 123: 248-257, 1988
- 6) Wiersinga, W. M., Frank, H. J. L., Chopra, I. J. and Solomon, D. H.: Alterations in hepatic nuclear binding of triiodothyronine in experimental diabetes mellitus in rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 99: 79-85, 1982
- 7) Shambaugh III, G. E. and Beisel, W. R.: Alterations in thyroid physiology during pneumococcal septicemia in the rat. *Endocrinology*, 79: 511-523, 1966
- 8) Oppenheimer, J. H. and Schwartz, H. L.: Factors determining the level of activity of 3, 5, 3'-triiodothyronine-responsive hepatic enzymes in the starved rat. *Endocrinology*, 107: 1460-1468, 1980
- 9) Ingbar, D. H. and Galton, V. A.: The effect of food deprivation on the peripheral metabolism of thyroxine in rats. *Endocrinology*, 96: 1525-1532, 1975

- 10) Jennings, A. S., Ferguson, D. C. and Utiger, R. D. : Regulation of the conversion of thyroxine to triiodothyronine in the perfused rat liver. *J Clin Invest*, 64 : 1614-1623, 1979
- 11) DeGroot, L. J., Coleoni, A. H., Rue, P. A., Seo, H., Martino, E. and Refetoff, S. : Reduced nuclear triiodothyronine receptors in starvation-induced hypothyroidism. *Biochem Biophys Res Commun*, 79 : 173-178, 1977
- 12) Burman, K. D., Lukes, Y., Wright, F. D. and Wartofsky, L. : Reduction in hepatic triiodothyronine binding capacity induced by fasting. *Endocrinology*, 101 : 1331-1334, 1977
- 13) Schussler, G. C. and Orlando, J. : Fasting decreases triiodothyronine receptor capacity. *Science*, 199 : 686-688, 1978
- 14) Harris, A. R. C., Fang, S., Azizi, F., Lipworth, L., Vagenakis, A. G. and Braverman, L. E. : Effect of starvation on hypothalamic-pituitary-thyroid function in the rat. *Metabolism*, 27 : 1074-1083, 1978
- 15) Balsam, A. and Ingbar, S. H. : The influence of fasting, diabetes, and several pharmacological agents on the pathways of thyroxine metabolism in rat liver. *J Clin Invest*, 62 : 415-424, 1978
- 16) Ortiz-Caro, J., Obregón, M. J., Pascual, A. and Jolin, T. : Decreased T_4 to T_3 conversion in tissues of streptozotocin-diabetic rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 106 : 86-91, 1984
- 17) Das, D. K. and Ganguly, M. : Diabetes, hypophysectomy, or thyroidectomy reduces nuclear L-triiodothyronine-binding capacity of rat lung. *Endocrinology*, 109 : 296-300, 1981
- 18) Ortiz-Caro, J. and Jolin, T. : Triiodothyronine and insulin effects on malic enzyme in hypothyroid and diabetic rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 124 : 569-576, 1991
- 19) Jolin, T. : Diabetes decreases liver and kidney nuclear 3, 5, 3'-triiodothyronine receptors in rats. *Endocrinology*, 120 : 2144-2151, 1987
- 20) Chopra, I. J., Chua Teco, G. N., Nguyen, A. H. and Solomon, D. H. : In search of an inhibitor of thyroid hormone binding to serum proteins in nonthyroid illnesses. *J Clin Endocrinol Metab*, 49 : 63-69, 1979
- 21) Bernal, J., Coleoni, A. H. and DeGroot, L. J. : Triiodothyronine stimulation of nuclear protein synthesis. *Endocrinology*, 102 : 452-459, 1978
- 22) Tarentino, A. L., Richert, D. A. and Westerfeld, W. W. : The concurrent induction of hepatic α -glycerophosphate dehydrogenase and malate dehydrogenase by thyroid hormone. *Biochim Biophys Acta*, 124 : 295-309, 1966
- 23) Goodridge, A. G., Garay, A. and Silpananta, P. : Regulation of lipogenesis and the total activities of lipogenic enzymes in a primary culture of hepatocytes from prenatal and early postnatal chicks. *J Biol Chem*, 249 : 1469-1475, 1974
- 24) Goodridge, A. G. and Adelman, T. G. : Regulation of malic enzyme synthesis by insulin, triiodothyronine, and glucagon in liver cells in culture. *J Biol Chem*, 251 : 3027-3032, 1976
- 25) Oppenheimer, J. H., Silva, E., Schwartz, H. L. and Surks, M. I. : Stimulation of hepatic mitochondrial α -glycerophosphate dehydrogenase and malic enzyme by L-triiodothyronine. *J Clin Invest*, 59 : 517-527, 1977
- 26) Kaiser, F. E., Mariash, C. N., Schwartz, H. L. and Oppenheimer, J. H. : Inhibition of malic enzyme induction by triiodothyronine in the diabetic rat : reversal by fructose feeding. *Metabolism*, 29 : 767-772, 1980
- 27) 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
- 28) Hashizume, K., Miyamoto, T., Ichikawa, K., Yamauchi, K., Kobayashi, M., Sakurai, A., Ohtsuka, H., Nishii, Y. and Yamada, T. : Purification and characterization of NADPH-dependent cytosolic 3, 5, 3'-

- triiodo-L-thyronine binding protein in rat kidney. *J Biol Chem*, 264 : 4857-4863, 1989
- 29) Hashizume, K., Miyamoto, T., Ichikawa, K., Yamauchi, K., Sakurai, A., Ohtsuka, H., Kobayashi, M., Nishii, Y. and Yamada, T. : Evidence for the presence of two active forms of cytosolic 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine (T_3)-binding protein (CTBP) in rat kidney. *J Biol Chem*, 264 : 4864-4871, 1989
 - 30) Ochoa, S. : "Malic" enzyme. *Methods Enzymol*, 1 : 739-753, 1955
 - 31) 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
 - 32) Surks, M. I., Koener, D. H. and Oppenheimer, J. H. : In vitro binding of L-triiodothyronine to receptors in rat liver nuclei : kinetics of binding, extraction properties, and lack of requirement of cytosol protein. *J Clin Invest*, 55 : 50-60, 1975
 - 33) Scatchard, G. : The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci*, 51 : 660-672, 1949
 - 34) Muench, K. H. : Fractionation of transfer ribonucleic acid on columns of hydroxylapatite. *Procedures Nucleic Acid Research*, 2 : 515-523, 1971
 - 35) de Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. : Tissue fractionation studies. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem J*, 60 : 604-617, 1955
 - 36) Las, M. S. and Surks, M. I. : Dissociation of serum triiodothyronine concentration and hepatic nuclear triiodothyronine-binding capacity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Endocrinology*, 109 : 1259-1263, 1981
 - 37) Seelig, S., Liaw, C., Towle, H. C. and Oppenheimer, J. H. : Thyroid hormone attenuates and augments hepatic gene expression at a pretranslational level. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78 : 4733-4737, 1981
 - 38) Nishii, Y., Hashizume, K., Ichikawa, K., Miyamoto, T., Suzuki, S., Takeda, T., Yamauchi, K., Kobayashi, M. and Yamada, T. : Changes in cytosolic 3, 5, 3' -tri-iodo-L-thyronine (T_3) binding activity during administration of L-thyroxine to thyroidectomized rats : cytosolic T_3 -binding protein and its activator act as intracellular regulators for nuclear T_3 binding. *J Endocrinol*, 123 : 99-104, 1989

(3 . 8 . 5 受稿)