

ラット心筋ミトコンドリアのモノアミンオキシダーゼ(MAO) 活性に対する甲状腺ホルモンの作用について

市 川 和 夫

信州大学医学部附属順応医学研究施設内分泌内科

(指導: 山田隆司教授)

Effect of Thyroid Hormone on Rat-Heart Monoamine Oxidase Activity

Kazuo ICHIKAWA

Department of Medicine, Institute of Adaptation Medicine,

Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Takashi YAMADA)

In an attempt to study the mechanism by which *in vivo* administration of thyroxine (T_4) influences monoamine oxidase (MAO) activity, rats underwent thyroidectomy and/or daily administration of 100 or 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of T_4 for 7-14 days. MAO activity in rat-heart outer mitochondrial membranes was not altered by the *in vivo* administration of T_4 , and T_4 did not alter MAO activity directly *in vitro*. But normal rat heart 105,000 \times g supernatant fraction markedly inhibited MAO activity in normal rat-heart outer mitochondrial membranes.

Analysis of hypothyroid rat-heart 105,000 \times g supernatant by Sephacryl S-200 column chromatography gave a few fractions that showed slight inhibition of MAO activity in normal rat heart outer mitochondrial membranes. In the hyperthyroid state, three fractions containing MAO inhibitory activities were obtained. Their approximate molecular weights were 35,000, 17,000, and 8,500, respectively. The smallest one was heat-stable, but the others were not. The findings that neither bovine serum albumin, rat serum, and human serum, nor such ions as Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , and K^+ in low concentrations inhibited MAO activity in rat heart outer mitochondrial membranes ruled out the possibility that either serum, contaminating rat heart 105,000 \times g supernatant, or changes in ionic strength during T_4 administration inhibited MAO activity in the outer mitochondrial membranes. Fraction B obtained by Sephacryl S-200 column chromatography inhibited MAO activity when the outer mitochondrial membranes were used as an enzyme source, but did not inhibit the MAO activity of solubilized MAO fraction, suggesting that the inhibitory fractions exert their function by affecting outer mitochondrial membranes.

These data suggest that T_4 administration *in vivo* stimulates the synthesis of certain proteins which affect outer mitochondrial membranes, resulting in inhibition of MAO activity. *Shinshu Med. J.*, 30: 597-608, 1982

(Received for publication August 10, 1982)

Key words : outer mitochondrial membrane, monoamine oxidase, thyroid hormone

ミトコンドリア外膜, モノアミンオキシダーゼ, 甲状腺ホルモン

I 緒言

心拍数の増加、心収縮力の上昇はほとんどの甲状腺機能亢進症患者にみられるが、これらの症状は正常人にエピネフリンを持続注入した場合にみられるものと類似することから、甲状腺ホルモンの作用の發揮に、少なくとも一部は交感神経系や副腎髄質が関与するものと推論されてきた。しかし、甲状腺機能亢進症では、必ずしも血中、尿中エピネフリン、ノルエピネフリンが増加せず、またそれらの代謝物にも著変がないことから、細胞レベルにおいて甲状腺ホルモンとカテコラミンの相互作用について研究がすすめられるようになった。事実、甲状腺ホルモンはカテコラミン受容体に影響を与え、カテコラミン感受性を高めることが明らかにされた¹⁾⁻⁴⁾。さらにカテコラミンの酸化を触媒するモノアミンオキシダーゼ(MAO)活性は、甲状腺ホルモン投与により影響を受けることが知られるようになった⁵⁾⁻⁹⁾。このような細胞レベルにおける知識の集積にもかかわらず、甲状腺ホルモンのMAOに対する作用機序は依然不明であるが、従来甲状腺ホルモンは蛋白合成を介し、その作用を發揮するとされており、MAOに対する作用も、蛋白合成を介して発現する可能性が考えられるであろう。この推論を確かめるため、著者はラット心筋の細胞分画法を用い、甲状腺ホルモンが、ミトコンドリア外で産生される蛋白を介し、MAO活性を調節するかどうかについて検討を行った。

II 研究材料および方法

A ラット心筋ミトコンドリア外膜の分離方法

ミトコンドリア外膜の分離には Wistar 系雄ラット(体重50~100 g) 30匹を使用した。ラットを断頭で屠殺後、心臓を摘出し、Comte と Gautheron の方法¹⁰⁾にしたがい、0~4°C の条件下で以下の操作を行った。ラット心筋を細切後、0.25M sucrose を含む 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) (buffer A) で homogenize し、homogenate を4重ガーゼで濾過した後、1,600×g, 10分間遠沈し、その上清をさらに、15,000×g, 20分間遠沈した。ミトコンドリア粗分画である沈査ペレットを buffer A に懸濁し、11,500×g, 20分間遠沈し、この操作を2回繰り返した。一方1,600×g 10分間遠沈で得られた沈査ペレットを37% sucrose を含む 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) に懸濁し、その上に buffer A を重層し、

20,000×g, 90分間遠沈し、2つの層の間に得られた分画を回収し、buffer A に懸濁したものを、前記の15,000×g 沈査ペレットとともにミトコンドリア分画として使用した。

このミトコンドリア分画を 10mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) (buffer B) に懸濁し、20分間攪拌した後、105,000×g, 60分間遠沈し、沈査ペレットを buffer B に懸濁後、11,500×g, 15分間遠沈し、沈査ペレットはミトコンドリア内膜の分離に用いた。上清をさらに105,000×g, 60分間遠沈した。その沈査ペレットを buffer A に懸濁し、これを25.2%, 37.7%, 51.7% W/V の不連続シヨ糖密度勾配遠心法を用いて165,000×g, 45分間遠沈し、0.25M sucrose と 25.2% sucrose の間に得られた分画を buffer B に懸濁後、100,000×g, 60分間遠沈し、この沈査ペレットをミトコンドリア外膜として用いた。こうして得られたミトコンドリア外膜は、-70°C にて2カ月間貯蔵してもその MAO 活性は変わらなかった。

B 可溶性 MAO 活性の分離方法

前記のごとく分離したミトコンドリア外膜を、0.4% Triton X-100 を含む 10mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) とともに室温で30分間攪拌した後、105,000×g, 60分間遠沈した。この105,000×g 上清中に含まれる MAO 活性を、すでに 0.4% Triton X-100 を含む 10mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) で平衡した Sephadex G-200 (Pharmacia Co) カラムクロマトグラフィー (2.0×50cm) を用いて分離した。それぞれの分画について MAO 活性を測定し、活性の得られた単一ピークの部分よりさらに Triton X-100 を除く目的で Amberlite XAD-2 (Sigma Chemical Co) カラムを用いた。酵素の溶出には 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) を用い、MAO 活性を示す分画を可溶性 MAO 活性として用いた。こうして得られた可溶性 MAO 活性は -70°C にて2カ月間貯蔵しても活性は変わらなかった。

C ラット心筋ミクロソーム分画と、105,000×g 上清分画の分離方法

ラット心筋 homogenate よりミトコンドリア分画を除いた15,000×g 上清を、75,000×g, 10分間遠沈し、その上清をさらに105,000×g, 90分間遠沈した。こうして得られた上清を 105,000×g 上清分画として用い、105,000×g 沈査ペレットを buffer A に懸濁

し、さらに105,000×g 90分間遠沈した。この操作をもう一度繰り返して、得られた沈査ペレットを buffer A に懸濁し、ミクロソーム分画として用いた。

D MAO 活性の測定方法

buffer B 200 μl に 50μl の酵素分画すなわちミトコンドリア外膜 (蛋白量にして 0.1~0.25μg) または可溶性 MAO 活性 (蛋白量にして 0.01~0.02μg), 25μl の [¹⁴C]tryptamine (0.45~0.75μCi/25μl; 30 mCi/mmol) を加え、34°C で20分間インキュベーションを行った。2N HCl 0.2ml を加えて反応を止め、さらに 2ml のトルエンを加えてよく振盪混和し、1,000×g 5分間遠沈した。上層のトルエン分画 1ml を液体シンチレーター [0.4% 2,5-diphenyloxazole and 0.01% 1,4-bis-(5-phenyloxazole-2yl)-benzene in toluen and Triton X-100(2:1)] に加え、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。非特異的活性は、MAO 酵素分画を熱処理 (96°C 10分間) し不活性化させた標品を用い求めた。この値をそれぞれの計測値から差し引いた値を、MAO により特異的に酸化された [¹⁴C] tryptamine の量とした¹¹⁾。

E その他の方法

ラット血中 T₃, T₄ は屠殺時ラットの心臓穿刺を行い血液を採取し、その血清を用いてラジオイムノアッセイで測定した。蛋白濃度は Lowry らの方法¹²⁾で測定した。L-Thyroxine (T₄), cytochrome c, bovine serum albumin (BSA), および ovalbumin

は Sigma Chemical Co. より、 [¹⁴C] tryptamine (30mCi/mmol) は New England Nuclear より購入した。

統計学的分析は Student's t テストにより行った。p 値が0.05未満のとき統計学的に有意であるとした。

III 結 果

A ラット心筋ミトコンドリア外膜における MAO 活性

MAO 活性はミトコンドリア外膜に存在することが知られており、今回の実験においても、Table 1 に示すごとくミトコンドリア外膜分画に高い MAO 活性を認めた。しかし、ミトコンドリア内膜分画、ミクロソーム分画、105,000×g 上清分画においてもわずかながら MAO 活性を認めており、これらの分画にもわずかにミトコンドリア外膜が混在しているものと考えられた。

Fig. 1-A にミトコンドリア外膜の蛋白濃度と、20分間のインキュベーションで測定した MAO 活性との関係を示した。Fig. 1-B に 0.25μg のミトコンドリア外膜を酵素源とした時の 0°C と 34°C における MAO 活性の時間経過を示した。以後の実験において、MAO 活性は、34°C 20分間のインキュベーションにおいて、特異的に酸化された [¹⁴C] tryptamine の量であらわした。

B ラット心筋ミトコンドリア外膜における MAO 活性に対する 105,000×g 上清分画およびミクロ

Table 1. Localization of MAO activity in normal rat heart

		[¹⁴ C]tryptamine oxidized (nmoles/0.25μg protein per 20min)		
		Treatment		MAO activity
		A unheated	B heated	(A-B)
Outer mitochondrial membrane	{exp. 1	22.40	0.07	22.33
	{exp. 2	21.06	0.07	20.99
Inner mitochondrial membrane	{exp. 1	1.75	0.06	1.69
	{exp. 2	1.65	0.05	1.60
Microsome	{exp. 1	1.50	0.07	1.43
	{exp. 2	1.46	0.06	1.40
105,000×g supernatant	{exp. 1	2.45	0.07	2.38
	{exp. 2	1.28	0.06	1.22

Fractions prepared from normal rat hearts were preincubated at 0°C (A unheated) or at 96°C (B heated) for 10 min before measuring MAO activity. Data are the mean of triplicate determinations.

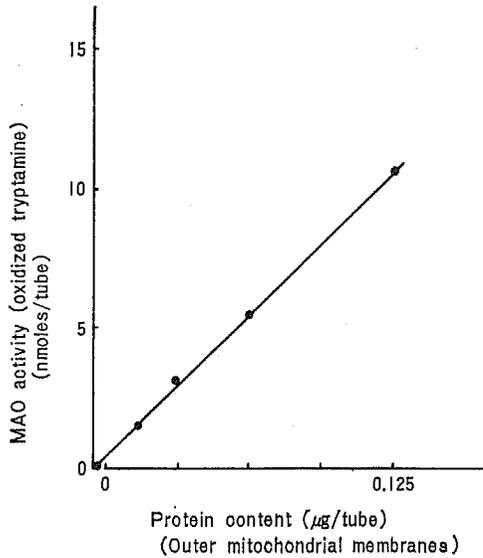


Fig. 1-A

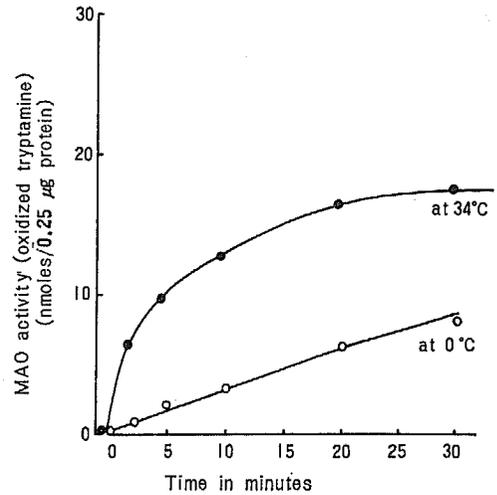


Fig. 1-B

Fig. 1 MAO activity in outer mitochondrial membranes obtained from normal rat hearts. Fig. 1-A shows the relation between MAO activity and the amount of outer membranes.

The time course of MAO activity of the outer membranes is shown in Fig. 1-B. Assay for MAO activity was done at 34°C (—●—) or at 0°C (---○---). Points are the mean of duplicate determinations.

Table 2. Effect of the cytosolic and microsomal fractions on MAO activity in outer mitochondrial membranes

Group	Number of determinations	Fraction added (50µl)	MAO activity (nmoles/0.25 µg mitochondrial membrane protein per 20min)	p value
A	5	buffer	22.4±0.18	
B	5	microsomal fraction (40µg protein)	18.0±0.67	A vs B p<0.005
C	5	cytosolic fraction (40µg protein)	10.2±0.64	A vs C p<0.005

Outer mitochondrial membranes, microsomal and cytosolic fractions were prepared from untreated rat hearts. Data are the mean ± SEM.

ソーム分画の影響

Table 2 に示すように、ラット心筋ミトコンドリア外膜における MAO 活性に対し、ミクロソーム分画、105,000×g 上清分画はともに有意に抑制効果を示したが、105,000×g 上清分画において、より著しかった。

C 甲状腺ホルモン投与によるミトコンドリア外膜の MAO 活性に対する影響

甲状腺摘除術を行って10日後のラットと、甲状腺摘

除術を行って後10日目より7日間200µg/kg/日の T₄ を投与したラットについて血中 T₄ 濃度を測定してみると、それぞれ 0.48±0.05µg/100ml、28.8±1.8µg/100ml と前者は甲状腺機能低下状態を、後者は甲状腺機能亢進状態を示していると考えられた。この両者においてミトコンドリア外膜における MAO 活性を比較してみると有意の差は見出されなかった (Table 3)。しかし、ラット心筋の homogenate においては甲状腺機能によって MAO 活性が影響を受けること

Table 3. Effect of T₄-administration on MAO activity in outer mitochondrial membranes and the cytosolic fraction

Treatment	T ₄ concentration in serum (μg/100ml)	MAO activity (nmoles.25/μg protein per 20min)	
		Outer mitochondrial membranes	Cytosolic fraction
Thyroidectomy*	0.48±0.05	28.7±1.4	0.72±0.01
Thyroidectomy** + T ₄	28.80±1.18	27.6±1.2	0.68±0.02

*5 rats were thyroidectomized and used 10 days after operation.

**T₄ (200 μg/kg) was administered to 5 rats subcutaneously once a day for 7 days beginning 10 days after thyroidectomy. Data are the mean±SEM. There is no significant difference in MAO activity between the two groups.

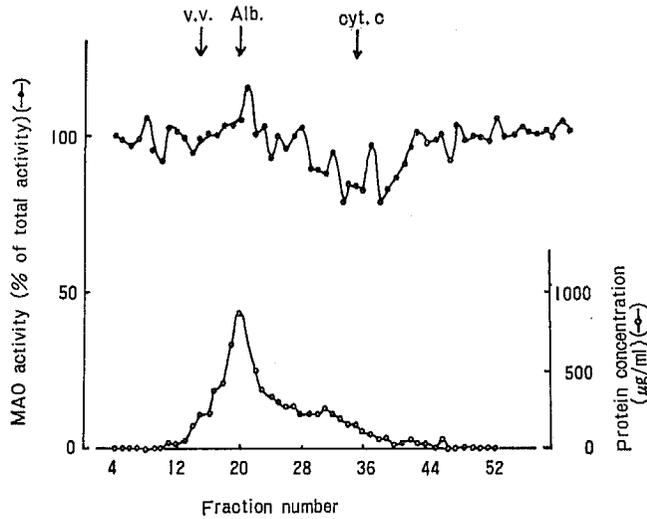


Fig. 2-A

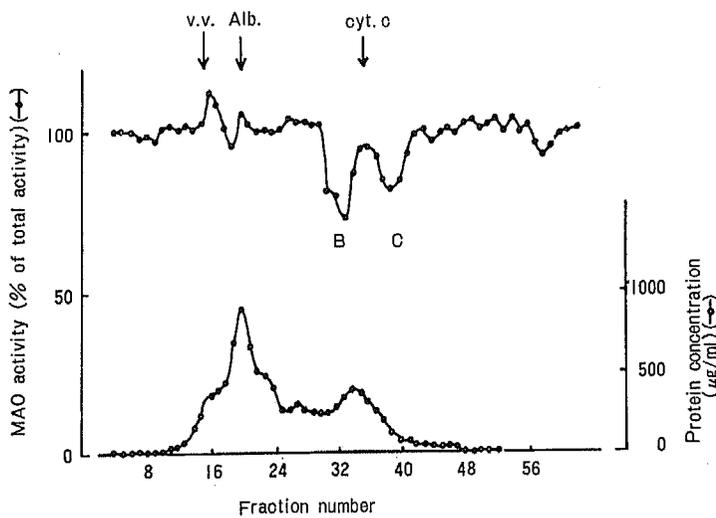


Fig. 2-B

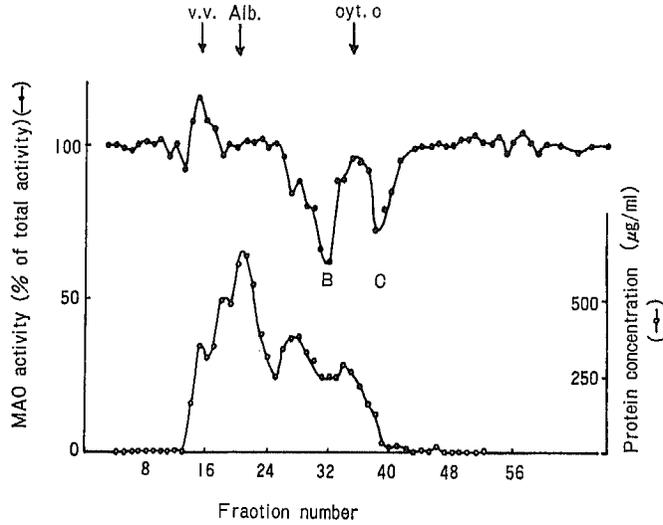


Fig. 2-C

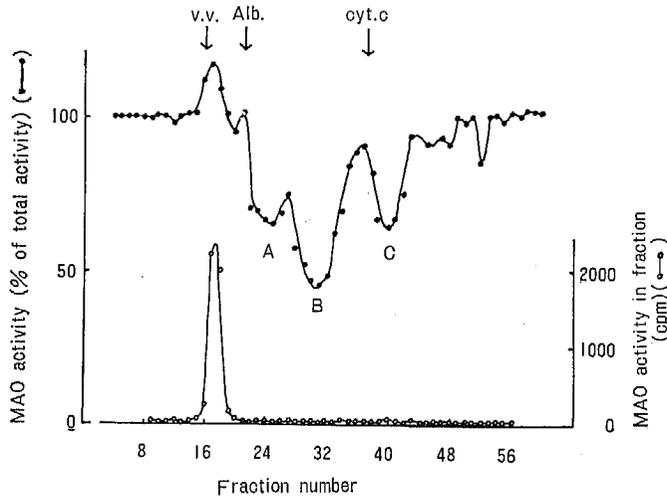


Fig. 2-D

Fig. 2 Changes in gel filtration profile of MAO inhibitory activity during T_4 treatment in rats.

Rats (5 animals) were thyroidectomized. $105,000 \times g$ supernatant of heart homogenate was prepared 10 days after operation. Cytosolic fraction (480 mg of protein) was applied to a Sephacryl S-200 column (2.0×60 cm) which had been equilibrated with 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4). The activity of MAO in the outer membranes was assayed in the presence or absence of each fraction (Fig. 2-A). The gel filtration profile of inhibitory activities in cytosol derived from T_4 ($100 \mu g/kg$ daily)-treated thyroidectomized rats is shown in Fig. 2-B (T_4 administered for 7 days) and in Fig. 2-C (T_4 administered for 14 days). 480 mg of protein was applied in each case. Fig. 2-D shows a gel filtration profile of inhibitory activities in heart cytosol prepared from T_4 ($200 \mu g/kg$ daily for 10 days)-treated rats which had previously undergone a sham operation. In this case, 320 mg protein of cytosol was applied to the column. The MAO activity in each fraction was found to be in the same position as in Fig. 2-D. Total activity indicates enzyme activity in the absence of cytosol.

が知られているので、次にミトコンドリア外の物質が甲状腺機能によって影響を受け、それが MAO 活性を調節している可能性を考え、前記の実験で示したラット心筋105,000×g上清分画の MAO 活性抑制効果についてさらに詳しく検討した。

ラットをそれぞれ5匹づつ4群に分け、第1群は甲状腺摘除後10日目より7日間、生食を皮下に投与し、第2群は甲状腺摘除後10日目より7日間、100μg/kg/日の T₄ を皮下に投与し、第3群は甲状腺摘除後10日目より14日間、100 μg/kg/日の T₄ を皮下に投与し、第4群はラットの前頸部に偽手術を行って後10日目より10日間、200μg/kg/日の T₄ を皮下に投与した。

第1群より第4群までのラットにつき、心筋105,000×g上清を分離し、その480mgを Sephadryl S-200 (Pharmacia Co) カラムクロマトグラフィー (2.0×60cm) で分離し、それぞれの分画について正常ラット心筋ミトコンドリア外膜の MAO 活性に対する抑制効果を見た。

第1群のラットにおいて、血中 T₄、T₃ はそれぞれ 0.29±0.15μg/100ml, 0.40±0.21 ng/ml と低く、甲状腺機能低下状態を示していると考えられた。Fig. 2-A に示すごとく軽度の MAO 活性抑制効果を確認した。図において v. v. は void volume の位置を、Alb, cyt c はそれぞれ、BSA, cytochrome c の溶出された位置を示した。

第2群のラットにおいて、血中 T₄、T₃ はそれぞれ 0.84±0.18 μg/100ml, 1.62±0.24 ng/ml であった。Fig. 2-B に示すごとく、B, C で示した2つの MAO 活性抑制効果を示す分画が得られた。

第3群のラットにおいて、血中 T₄、T₃ はそれぞれ 11.53±2.23 μg/100ml, 3.66±0.44 ng/ml であった。Fig. 2-C に示すごとく、B, C で示した MAO 活性

Table 4. Effect of serum and bovine serum albumin on MAO activity in outer mitochondrial membranes

Added substances	% inhibition
Buffer	0.0
Fraction B	56.9
Fraction C	41.6
BSA	0.6
Normal human serum	0.4
Normal rat serum	1.2

Fractions B and C were obtained by Sephadryl S-200 gel filtration of T₄ (100μg/kg daily for 14 days)-treated thyroidectomized rat-heart cytosol (Fig. 2-C). Added substances were diluted in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) and adjusted to 30 μg/ml in final concentration in the incubation medium. Data indicate the mean of duplicate determinations.

抑制効果を示す分画はさらに著明になった。

第4群のラットにおいて、血中 T₄、T₃ はそれぞれ 55.3±10.8 μg/100ml, 17.8±2.4 ng/ml であり、著明な甲状腺機能亢進状態を示していた。Fig. 2-D に示すごとく、さらに MAO 活性抑制効果が著明となり、A で示した抑制効果を示す分画が、B, C の溶出される以前に溶出された。この図において明らかなように、105,000×g上清分画に含まれる MAO 活性は、MAO 活性抑制効果を示す分画とは別の分画 (void volume の位置) に溶出された。

D ラット心筋ミトコンドリア外膜の MAO 活性におよぼす血清蛋白の影響

これらの MAO 活性抑制効果が、105,000×g上清中に混在する血清蛋白による可能性がある。しかし、

Table 5. Effects of Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, and EGTA on MAO activity

Added ions Concentration (mM)	% of MAO activity							
	0.02	0.04	0.07	0.14	0.28	0.57	1.14	2.27
CaCl ₂	98.9	103.6	97.1	90.7	91.8	92.8	92.7	90.6
MgCl ₂	104.4	99.1	98.0	100.4	105.8	99.8	100.4	89.4
NaCl ₂	—	—	—	96.8	—	—	—	98.6
KCl	—	—	—	102.8	—	—	—	99.6
EGTA	95.2	93.8	92.3	99.0	95.1	84.5	—	—

Outer mitochondrial membranes obtained from normal rat heart were used as enzyme source. Data indicate the mean of duplicate determinations.

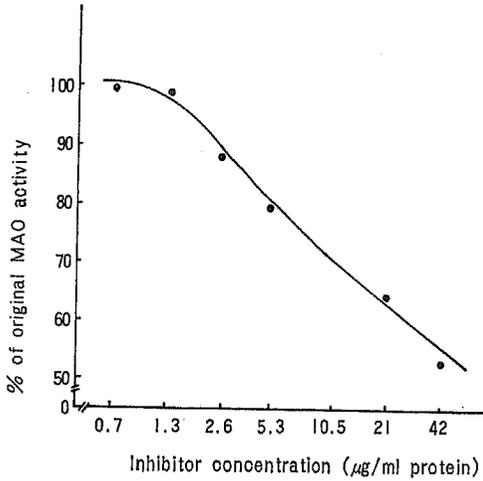


Fig. 3-A

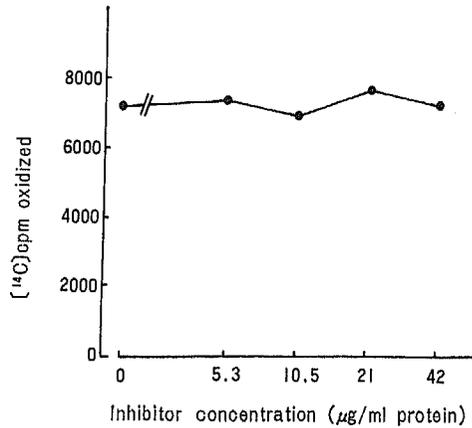


Fig. 3-B

Fig. 3 Effect of inhibitory fraction B on MAO activity.

Hearts of T_4 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ daily)-treated thyroidectomized rats were used as the source of inhibitory fraction B (inhibitor) which was obtained by gel filtration. Actions of inhibitor on outer-membrane-associated MAO activity (Fig. 3-A) and on solubilized MAO activity prepared from the outer mitochondrial membranes (Fig. 3-B) are shown. The MAO activities in outer membranes and in solubilized fraction were 23.8 nmoles oxidized tryptamine/0.25 μg protein per 20 min and 147 nmoles oxidized tryptamine/0.25 μg protein per 20 min, respectively.

Table 6. Effect of T_3 on MAO activity in *in vitro*

Added T_3 (ng/ml)	% of MAO activity
0	100.0
0.05	98.4
0.10	98.2
0.50	98.2
1.00	98.2
5.0	98.6
10.0	91.4
50.0	98.6

Outer mitochondrial membranes obtained from normal rat heart were used. Before the measurement of MAO activity, membrane fraction was preincubated with various concentrations of T_3 for 30 min, at 34°C. Data indicate the mean of duplicate determinations.

BSA, 正常ヒト血清, 正常ラット血清の正常ラット心筋ミトコンドリア外膜に対する影響をみたところ, これらは 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度においても MAO 活性に影響しなかった (Table 4).

Table 7. Effect of heating on the activity of MAO inhibitory fractions

Added fraction	protein concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Treatment	% of MAO activity
Buffer	0		100.0
Fraction A	62	unheated	72.2
Fraction A	62	heated	97.8
Fraction B	48	unheated	57.2
Fraction B	48	heated	98.1
Fraction C	22	unheated	63.8
Fraction C	22	heated	60.4

Fractions A, B, and C were obtained by Sephadryl S-200 gel filtration of hyperthyroid rat-heart cytosol (Fig. 2-D). Each fraction was incubated at 96°C (heated) or at 0°C (unheated) for 10 min. MAO activity in outer mitochondrial membrane was measured in the presence of these inhibitory fractions. Data indicate the mean of duplicate determinations.

E ラット心筋ミトコンドリア外膜の MAO 活性におよぼす電解質の影響

Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , EGTA の正常ラット心

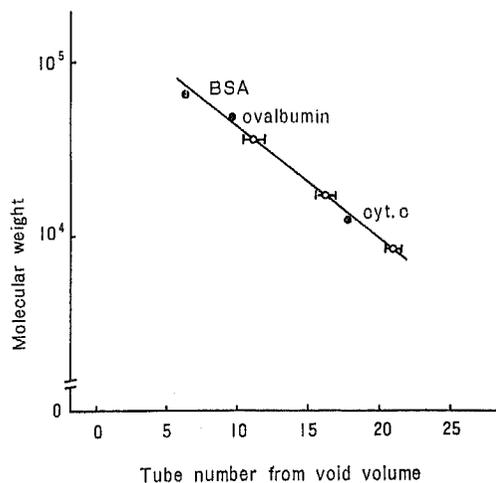


Fig. 4 Calibration of the molecular weights of inhibitors.

Hearts of T_4 (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ daily)-treated rats were used as the source of the inhibitors. Bovine serum albumin (BSA; mol. wt, 68,000), ovalbumin (mol. wt, 46,000), and cytochrome c (cyt c; mol. wt, 12,300) were used as markers.

筋ミトコンドリア外膜の MAO 活性に対する影響を調べたが、これら電解質は 2.27mM の濃度においても何ら影響をおよぼさなかった (Table 5)。

F ラット心筋ミトコンドリア外膜の MAO 活性におよぼす *in vitro* での T_3 の影響

甲状腺ホルモンが直接心筋ミトコンドリア外膜に作用して MAO 活性を抑制する可能性を検討するため、*in vitro* において、 T_3 を 50ng/ml 加えたが、正常ラット心筋ミトコンドリア外膜の MAO 活性はまったく影響をうけなかった (Table 6)。

G ラット心筋105,000×g上清より得られた MAO 活性抑制の機序についての検討

前の実験で得られたBの分画について、その蛋白濃度とミトコンドリア外膜の MAO 活性に対する抑制効果の関係を示したが、濃度依存性の抑制である事が明らかである (Fig. 3-A)。しかし、分画Bは可溶性 MAO 活性に対しては何ら抑制効果を示さなかった (Fig. 3-B)。同様の結果は、分画A, Cを用いた実験でも得られた。

H ラット心筋105,000×g上清より得られた MAO 活性抑制物質についての検討

Sephacryl S-200 カラムクロマトグラフィーを用いて、前の実験で得られた抑制物質のおおよその分子量を推定すると、35,000 (分画A), 17,000 (分画B), 8,500 (分画C) であった (Fig. 4)。

分画AとBは96°C, 10分間の熱処理により MAO 活性抑制効果は消失したが、分画Cは同様の熱処理によっても MAO 活性抑制効果は認められた (Table 7)。

IV 考 察

甲状腺ホルモン投与により、ラット心筋ミトコンドリアにおける MAO 活性が変化を受けることが報告されている⁵⁾⁸⁾⁹⁾。また MAO 活性はミトコンドリア外膜に存在するとされ、今回の実験においてもミトコンドリア外膜に高い MAO 活性が認められた。MAO は基質に対する特異性と阻害剤の違いにより、AとBの subtype に分けられ¹³⁾⁻¹⁵⁾、それぞれは甲状腺機能状態により異なる影響を受ける。甲状腺機能亢進状態により抑制を受ける MAO は B type であるとされている⁵⁾。この実験においては、A, B どちらの type の MAO に対しても基質となり得る tryptamine を基質として選んだ¹³⁾¹⁴⁾¹⁶⁾。

まず、種々の甲状腺機能状態で、ミトコンドリア外膜における MAO 活性がどのような変化を受けるかを観察したところ、ミトコンドリア外膜自体の MAO 活性は影響を受けないことが判明した。これは今までの諸家の報告が、組織の homogenate などの粗な分画を用いたのに対し、精製されたミトコンドリア外膜を使用したことによると考えられる。したがって、諸家の報告が正しいとするならば、甲状腺機能亢進状態とすることにより、ミトコンドリア外の環境に変化が生じ、これがミトコンドリア外膜の MAO 活性を変化させている可能性が考えられた。

そこで、正常ラット心筋ミトコンドリア外膜に正常ラット心筋 105,000×g 上清を加えたところ、明らかに MAO 活性は抑制された。この105,000×g上清における MAO 活性抑制効果が、甲状腺機能状態での様に変化を受けるかをさらに詳しく検討するため、種々の甲状腺機能状態における、ラット心筋 105,000×g 上清を、Sephacryl S-200 カラムクロマトグラフィーを用いて分離し、検討したところ、甲状腺機能低下ラットに比べ、 T_4 を投与したラットにおいては、Fig. 2-B, C に示したごとく、2つの MAO 活性抑制分画が得られ、さらに大量の T_4 を投与したところ、

分画B, C以外にAに示した MAO 活性を抑制する分画が得られた (Fig. 2-D)。また, これらの分画はミトコンドリア外膜の MAO 活性を抑制するが, 可溶化 MAO 活性に対しては何ら抑制効果を示さなかった。すなわち, この抑制物質は直接 MAO 活性を低下させるのではなく, ミトコンドリア外膜に影響を与え, 2次的に MAO 活性を抑制するものと考えられた。

A, B, Cの各分画に含まれる MAO 活性抑制物質の分子量を推定すると, AはBの, またBはCの2倍であり, AはBの, また, BはCの dimer である可能性が考えられた。また, Cは熱処理後にも依然 MAO 活性抑制効果を有する点から, Cは MAO 活性抑制物質の最小単位としてきわめて安定した構造を有するものと考えられた。データは示していないが, 分画Bはトリプシン処理によりその MAO 活性抑制効果を失った。

甲状腺ホルモンの作用により, ミトコンドリア内外のイオン環境が変化することも知られている¹⁷⁾。

このイオン環境の変化が MAO 活性に影響を与える可能性を検討するため, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , EGTA の影響を調べたが, 何の影響もみられなかった。次に, ラット心筋 105,000×g 上清分画に混在する血清の影響を考慮したが, 血清は MAO 活性に影響しないものと考えられた。さらに T_3 をミトコンドリア外膜に直接加え, *in vitro* でその作用を検討したが, ほとんど影響はなかった。

甲状腺ホルモンは細胞の核に作用し, 蛋白合成系を刺激していると考えられている¹⁸⁾⁻²³⁾が, この刺激系と甲状腺ホルモンによる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 MAO 活性抑制物質の合成におよぼす甲状腺ホルモンの直接的な作用については説明してはいないが, 甲状腺ホルモンが何らかの MAO 活性抑制物質を合成する可能性を示した。さらに, 甲状腺ホルモンにより合成された物質が MAO 活性そのものにでなく, ミトコンドリア外膜に直接作用し, ミトコンドリアの機能全体に重要な影響をおよぼしている可能性が示されたことにより, 甲状腺ホルモンが生体にとって重要な調節的役割を果たす蛋白の誘導を行っている可能性が示された。今後, これらの甲状腺ホルモンに誘導される物質の精製, およびそれらの他の代謝系への関与などを解明することが課題であろうと考えられる。

V 結 語

ラット心筋ミトコンドリア外膜における MAO 活性が, 甲状腺ホルモン投与によりどのような影響を受けるかを調べた。

まず, 甲状腺機能の変化によりラット心筋ミトコンドリア外膜自体の MAO 活性は変化を受けないこと, また *in vitro* において T_3 は直接ラット心筋ミトコンドリア外膜の MAO 活性を変化させないことが判明した。

そこでラット心筋 105,000×g 上清をラット心筋ミトコンドリア外膜に作用させると MAO 活性は著明に減少し, 何らかの抑制物質の存在が推測された。BSA, ラット血清, ヒト血清, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , EGTA を用いてこれらの MAO 活性に対する影響を観察した結果, 105,000×g 上清における MAO 活性抑制効果は, 混在していた血清によるものであったり, 甲状腺ホルモン投与によるミトコンドリア内外のイオン環境の変化の結果である可能性は否定された。そこで種々の甲状腺機能状態のラットにおいて, 心筋105,000×g 上清における MAO 活性抑制効果を Sephacryl S-200 カラムクロマトグラフィーを用いてさらに詳しく分析すると, 甲状腺ホルモンは, まず分子量約 17,000 (分画B) と分子量約 8,500 (分画C) の MAO 活性抑制物質を産生し, さらに大量の甲状腺ホルモンを投与すると, 分子量約 35,000 (分画A) の MAO 活性抑制物質を産生することによって MAO 活性を低下させていることが推測された。

この物質は, ミトコンドリア外膜の MAO 活性を抑制するが, 可溶化 MAO 活性に対しては影響しないという事実から, ミトコンドリア外膜に対してまず影響をおよぼし, ひいては MAO 活性を低下させていると考えられた。

分画A, Bに得られた抑制物質は, 熱処理により不活化されるが, 分画Cに得られた抑制物質は不活化されない性質を有するものと考えられた。

本稿の要旨は昭和56年10月, 第54回日本生化学会, 昭和57年6月, 第55回日本内分泌学会総会, 昭和57年8月, 7th Asia and Oceania Congress of Endocrinology で発表した。

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助手に深く謝意を表します。

文 献

- 1) Williams, L. T., Lefkowitz, R. J., Watanabe, A. M., Hathway, D. R. H. and Besch, H. R. Jr. : Thyroid hormone regulation of beta-adrenergic receptor number. *J Biol Chem*, 252 : 2787-2789, 1977
- 2) Will-shahab, L., Wollenberger, A. and Schulze, W. : Modulation by thyroid hormone of catecholamine binding sites and of adenylate cyclase activity in heart muscle. In : Wollemann, M. (ed.), *Properties of Purified Cholinergic and Adrenergic Receptors*, 37, pp. 107-127, Amsterdam, North-Holland 1975. W3 FE 322 9th, 1974
- 3) Guarnieri, T., Filburn, C. R., Beard, E. S. and Lakatta, E. G. : Enhanced contractile response and protein kinase activation to threshold levels of beta-adrenergic stimulation in hyperthyroid rat heart. *J Clin Invest*, 65 : 861-868, 1980
- 4) Scarpace, P. J. and Abrass, I. B. : Thyroid hormone regulation of rat heart, lymphocyte, and lung beta-adrenergic receptors. *Endocrinology*, 108 : 1007-1011, 1981
- 5) Tong, J. H. and D'Iorio, A. : Differential effects of L-thyroxine on cardiac and hepatic monoamine oxidase activity toward benzylamine and serotonin. *Endocrinology*, 98 : 761-766, 1976
- 6) Soukes, T. L., Missala, K., Bastomsky, C. H. and Fang, T. Y. : Metabolism of monoamines and diamines in hyperthyroid and hypothyroid rats. *Can J Biochem*, 55 : 789-795, 1977
- 7) Brucker, R. F. and Cohen, P. P. : Alterations in enzyme and cytochrome profiles of *Rana catesbeiana* liver organelles during thyroxine-induced metamorphosis. *J Biol Chem*, 251 : 6161-6169, 1976
- 8) Gripois, D. and Fernandez, C. : Effects of thyroid hormone on the evolution of monoamine oxidase activity in the brain and heart of the developing rat. *Enzyme*, 22 : 378-384, 1977
- 9) Uteley, H. G. : Effect of thyromimetic compounds on myocardial and hepatic monoamine oxidase activity in the rat. *Endocrinology*, 75 : 975-977, 1964
- 10) Comte, J. and Gautheron, D. C. : Preparation of outer membrane from pig heart mitochondria. *Methods in Enzymol*, 55 : 98-104, 1979
- 11) Wurtman, R. J. and Axelrod, J. : A sensitive and specific assay for the estimation of monoamine oxidase. *Biochem pharmacol*, 12 : 1439-1441, 1963
- 12) 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
- 13) McEwen, C. M. Jr., Sasaki, G. and Lenz, W. R. Jr. : Human liver mitochondrial monoamine oxidase. I. Kinetic studies of model interactions. *J Biol Chem*, 243 : 5217-5225, 1968
- 14) McEwen, C. M. Jr., Sasaki, G. and Jones, D. C. : Human liver mitochondrial monoamine oxidase. II. Determinations of substrate and inhibitor specificities. *Biochemistry*, 8 : 3952-3962, 1969
- 15) Johnston, J. P. : Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidation in brain tissue. *Biochem Pharmacol*, 17 : 1285-1297, 1968
- 16) Donnelly, C. H., Richelson, E. and Murphy, D. J. : Properties of monoamine oxidase in mouse neuroblastoma N1E-115 cells. *Biochem Pharmacol*, 25 : 1639-1643, 1976
- 17) Shears, S. B. and Bronk, J. R. : The effect of thyroxine treatment, *in vivo* and *in vitro*, on Ca²⁺ efflux from rat liver mitochondria. *FEBS Lett*, 126 : 9-12, 1981
- 18) Sokoloff, L. and Kaufman, S. : Thyroxine stimulation of amino acid incorporation into protein. *J Biol Chem*, 236 : 795-803, 1961
- 19) Weiss, W. P. and Sokoloff, L. : Reversal of thyroxine-induced hypermetabolism by Puromycine. *Science*, 140 : 1324-1326, 1963
- 20) Kim, K. H. and Cohen, P. P. : Modification of tadpole liver chromatin by thyroxine treatment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 55 : 1251-1255, 1966
- 21) Tata, J. R. and Widnell, C. C. : Ribonucleic acid synthesis during the early action of thyroid

- hormones. *Biochem J*, 98 : 604-620, 1966
- 22) Viarengo, A., Zoucheddu, A., Taningher, M. and Orunesu, M. : Sequential stimulation of nuclear RNA polymerase activities in livers from thyroidectomized rats treated with triiodothyronine. *Endocrinology*, 97 : 955-961, 1975
- 23) Kurtz, D.T., Sippel, A.E. and Feigelson, P. : Effect of thyroid hormone on the level of hepatic mRNA for α_{2u} globulin. *Biochemistry*, 15 : 1031-1036, 1976

(57.8.10 受稿)
