

活性型ビタミン D₃ による 甲状腺ホルモン細胞内輸送調節

片井 みゆき

信州大学医学部老年医学教室

(主任: 橋爪 潔志教授)

Regulation of Intracellular Thyroid Hormone Translocation by Active Vitamin D₃

Miyuki KATAI

Department of Geriatrics, Endocrinology and Metabolism,

Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Kiyoshi HASHIZUME)

Effects of active vitamin D₃ on the levels of cytosolic NADPH-dependent 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T₃)-binding protein (NADPH-dependent CTBP) and on the cellular T₃ uptake were investigated in cultured dRLh 84 cells. 1,25-(OH)₂-dihydroxycholecalciferol (1,25-(OH)₂-vitamin D₃) increased the level of NADPH-dependent CTBP without changes in the affinity for T₃ in dRLh 84 cells. Treatment of the cells with 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ reduced whole cell uptake of T₃ in the early phase (0-3 minutes) of incubation, whereas the T₃ uptake increased in the later phase (6 minutes incubation or later).

The uptake of T₃ into the nuclei was increased by pretreatment of the cells with 1,25-(OH)₂-vitamin D₃. The pretreatment decreased the rate of T₃ release from cells. However, the rate of release from nuclei to the extranuclear space was not influenced by such pretreatment. The active vitamin D₃-induced increase in the NADPH-dependent CTBP was observed not only in dRLh 84 cells but also in rat kidney and liver, which are target tissues of thyroid hormone. These results suggest that active vitamin D₃ plays an important role in the regulation of intracellular thyroid hormone translocation in target tissues by controlling the level of NADPH-dependent CTBP. *Shinshu Med J* 41: 325-338, 1993

(Received for publication March 29, 1993)

Key words: NADPH-dependent cytosolic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T₃)-binding protein, active vitamin D₃, cellular uptake of thyroid hormone, intracellular thyroid hormone translocation
NADPH 依存性細胞質 T₃結合蛋白, 活性型ビタミン D₃, 細胞への甲状腺ホルモン取り込み, 細胞内甲状腺ホルモン移送

I はじめに

甲状腺ホルモンには L-thyroxine (T₄) と 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T₃) がある。前者は末梢組織の細胞内で 5'-monodeiodinase により後者に変換され、一

度細胞外へ放出された後、標的組織に到達する¹⁾。標的組織では T₃ が細胞核にある受容体 (核受容体) に結合し、甲状腺ホルモン応答性遺伝子のホルモン応答部位 (thyroid hormone response element(s)) にホルモン-受容体複合体 (hormone-receptor com-

plex)として結合することにより、その遺伝子の発現を調節している²⁾。現在までに、この応答性遺伝子は多数確認されており、ヒトではほとんどの細胞に何らかの応答性遺伝子が存在すると推測されている³⁾。一方、この核受容体へのホルモンの移送機構についての詳細は明らかにされていない¹⁴⁾。Hashizumeら⁵⁾は、ラット腎細胞質にNADPH依存性 T_3 結合蛋白を発見し、これが細胞内 T_3 移送の調節に重要であることを報告した。この蛋白はその活性化の違いにより細胞質に取り込まれた T_3 を核外の細胞質に貯蔵する効果を有したり、核へのホルモン移送を積極的に亢進させる役割を演じたりすると考えられている⁶⁷⁾。しかし、これらの現象は、今まで単離核を用いた実験系で観察されているのみで、細胞レベルでの確認はなされていなかった。また、NADPH依存性細胞質 T_3 結合蛋白は、vitamin D_3 、 T_3 、estrogenなどで誘導されることが実験的に証明されている⁸⁾。これらのホルモン受容体はerb A superfamilyと呼ばれるきわめて相同性の高い構造を有しており、機能的にもある程度連関していることが示されている⁹⁾。

そこで、本研究では、NADPH依存性細胞質 T_3 結合蛋白と細胞内 T_3 移送との関係に及ぼすvitamin D_3 の影響を培養細胞を用いて検討した。

II 実験方法と材料

A 実験動物の調製と細胞質の分画

ウィスター系雄ラット (Shizuoka Experimental Animals Inc., Shizuoka, Japan) (約50g) を、まず2群に分け、1群 (A: 7匹) は普通の飼育食、他の1群 (18匹) はビタミンD欠乏食で飼育した。ビタミンD欠乏食はSudaら⁹⁾の方法で調製されたもの (日畜製薬, 東京) を用いた。上記飼育開始3週間後、後者はさらに3群 (B: 6匹, C: 6匹, D: 6匹) に分け、B, Cには0時間後、Dには0,24時間後にそれぞれ 1α -OH-dihydroxycholecalciferol (1α -OH-vitamin D_3) (中外製薬, 東京) 0.2 μ g/kgを腹腔内に投与した。コントロール群 (A) には普通食飼育3週間後に生理食塩水を投与した。最初の腹腔内投与から、0 (A, B), 12 (C) または48時間後 (D) (最終投与から24時間後) に肝、腎を摘出し、それぞれの細胞質を分画した。さらに、内因性の甲状腺ホルモン、NADPH、NADPを除去するためチャコール (Sargent Welch Scientific Co., Skokie, IL, U. S. A.) 処理を既述の方法⁹⁾で行い、これを最終調整細胞質分画と

した。すなわちチャコールが全体の10%になるように、得られた細胞質分画へ加え、30分間0°Cでインキュベートし、その40,000 \times g上清分画を T_3 結合実験に用いた。このチャコール処理により加えた T_3 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U. S. A.) (10^{-8} M) の99.5%は除去された¹⁰⁾。また、 T_3 結合能はこのチャコール処理により処理前の12~13%にまで低下した⁶⁾。コントロールラットの腎細胞質では、チャコール処理により低下した T_3 結合活性は50 μ M NADPH (Sigma) を加えることにより基礎値の6.5~7.2倍に上昇した⁶⁾。

B ラット肝、腎細胞質への T_3 およびビタミン D_3 の結合測定

ラット肝、腎より得られたチャコール処理細胞質への T_3 結合実験は既述した方法¹¹⁾で行った。すなわち、DNA約1.0 μ gに相当する細胞質に50,000cpmの $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ (104-126MBq/ μ g) (New England Nuclear, Boston, MA, U. S. A.) を加え、50 μ M-NADPH存在下または非存在下で、30分間0°Cでインキュベートし、その後、氷冷チャコールを加え (最終濃度は0.5%)、2秒間攪はん後、10,000 \times g 3分間遠心分離し、上清の放射活性を蛋白結合 T_3 と判断した。 10^{-7} M非標識 T_3 存在下での $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ のチャコールへの結合は細胞質を含まない時、約99.5%であり、また0°Cの条件でチャコールからの $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ の解離は10分間に1.2%であった¹⁰⁾。チャコールを添加後、遠心分離終了までの時間はほぼ10分間であったが、上記の諸因子は最終結合量の算定には誤差範囲と見なし、これを無視した。特異的 $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ の結合は 10^{-7} Mの非標識 T_3 存在下での放射活性の結合を非標識 T_3 非存在下での放射活性の結合から差し引いて計算した。 T_3 結合の性状はScatchard分析により行った¹²⁾。すなわち48pMの放射性 T_3 の細胞質への結合を種々の濃度の非標識 T_3 (0.2-5.8nM) 存在下で測定し、特異的結合を算出して分析した。

チャコール処理細胞質への $1,25$ -(OH) $_2$ -dihydroxycholecalciferol ($1,25$ -(OH) $_2$ -vitamin D_3) の結合はチャコールを用い、結合、非結合 $1,25$ -(OH) $_2$ -vitamin D_3 とを分離した。リガンドとして $[^3\text{H}]\text{1,25}$ -(OH) $_2$ -dihydroxycholecalciferol ($[^3\text{H}]\text{1,25}$ -(OH) $_2$ -vitamin D_3) (New England Nuclear) (6475MBq/ μ mol) を用い、特異的結合は 10^{-7} Mの非標識 $1,25$ -(OH) $_2$ -vitamin D_3 (中外製薬) 存在下での放射活性の結合を差し引くことによって算出した。結合のため

のインキュベーションは室温(約20°C)で0.45mM モリブデン酸ナトリウム存在下, pH7.5で1時間行った。

それぞれの組織の核分画は既述の方法⁹⁾で調製し, また核分画への T₃の結合は既述の方法⁹⁾¹³⁾で測定した。

C 培養細胞の調製と細胞質 T₃およびビタミン D₃結合活性の測定

dRLh 84 (dRLh) 細胞 (Japan Cancer Research Resource Bank, Tokyo), Clone 9細胞, HepG2, GH3細胞 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, U. S. A.) を実験に用いた。それぞれの細胞は penicillin (50U/ml), streptomycin (50μg/ml) を含む Ham's F-12K (Flow Laboratories, McLean, VA, U. S. A.) を基礎メディウムとし, 10% 胎児牛血清 (FCS) (Brooklyn, Australia) 存在下, 5% CO₂ in air (湿度100%) で培養した。培養時間はそれぞれの実験結果の項に示すが, 実験条件が整うま

では, メディウムは隔日で fresh なものに交換した。1, 25-(OH)₂-vitamin D₃は99.9%のエタノールに溶解し, 培養液中のエタノールの最終濃度は0.04%になるように調製した。このためコントロール培養も0.04% エタノールとなるよう調製した。T₃結合測定では, 培養後0.02% EDTA, 0.25% トリプシン (Sigma) を加えた Phosphate buffered-saline (PBS) で細胞を遊離し, その後, PBS 単独で細胞を3回洗浄後0.32M sucrose, 0.5mM EGTA を含む10mM Tris-HCl (pH7.4) に浮遊し, ホモジナイズ後, その60,000×g 上清を調製, さらにこれをチャコール処理してその上清に含まれる T₃結合活性を前項の方法で測定した。測定の方法は前項で示したとおりである。1, 25-(OH)₂-vitamin D₃結合活性は, 得られた細胞質分画への結合を前述した方法で測定した。細胞核は遊離細胞を0.5% Triton X-100で処理して調製し¹⁴⁾, これへ

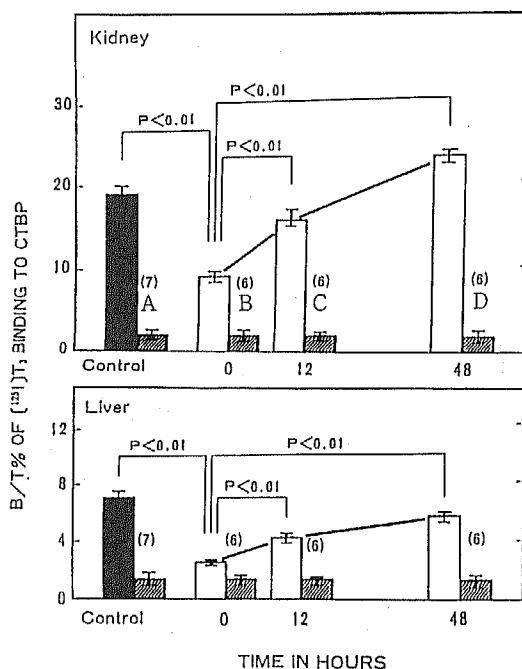


Fig. 1 Effect of 1 α -OH-vitamin D₃ on the NADPH-dependent cytosolic T₃ binding activity in rat deprived from vitamin D.

Rats were treated with vitamin D deficient diet and cytosol fractions were obtained as mentioned in Materials and Methods. 0, 12 and 48 hrs indicate the time after the first injection of 1 α -OH-vitamin D₃. Control cytosol was obtained from rats given regular diet. indicates the [¹²⁵I] T₃ binding in the absence of NADPH. Each value indicates the mean \pm SD. The number in each column indicates the number of animals.

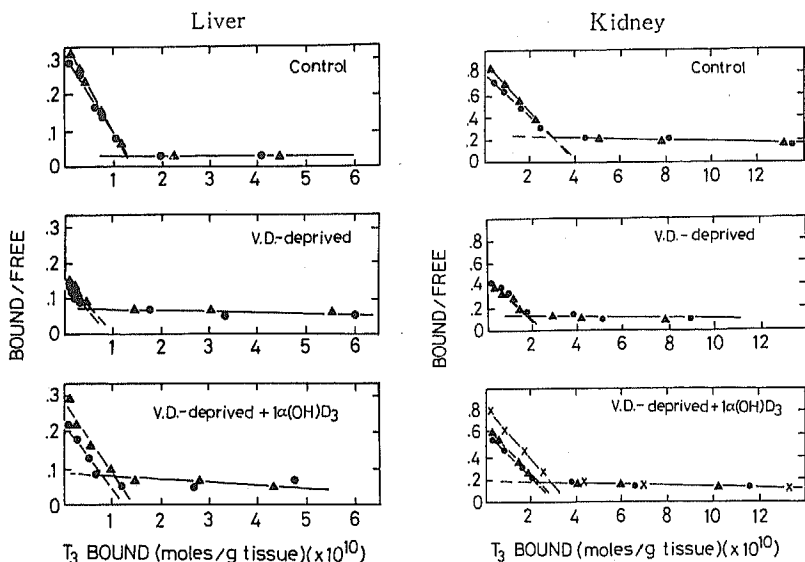


Fig. 2 Scatchard analyses of $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ binding to the cytosol fraction prepared from control, vitamin D-deprived (V. D.-deprived) and $1\alpha\text{-OH-vitamin D}_3$ -administered V. D.-deprived (V. D.-deprived + $1\alpha\text{-(OH)D}_3$) rats. NADPH-dependent cytosolic T_3 bindings in liver (left panel) and in kidney (right panel) before and 12 hrs after administration of $1\alpha\text{-(OH)-vitamin D}_3$ ($0.2\mu\text{g/kg}$) to vitamin D-deprived rats are shown. Results of two (or three) different experiments are shown in each figure.

の T_3 の結合活性の測定, Scatchard 分析は既述した方法で行った¹³⁾。

D 細胞への T_3 取り込み実験

細胞への T_3 の取り込みは $1,25\text{-(OH)}_2\text{-vitamin D}_3$ で細胞を処理後, FCS を除いた Ham's F-12K にメEDIUM を変え $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ ($400,000\text{cpm}$) を加え, 37°C でインキュベートし, その間に細胞に取り込まれる放射活性を測定することにより観察した。インキュベーション後, 氷冷した PBS で細胞を洗浄し, 0.5% Triton X-100 を含む SMT (0.25M sucrose, 1mM MgCl_2 , 20mM Tris-HCl, $\text{pH}7.4$) $2,000\mu\text{l}$ に浮遊させ, そのうち $800\mu\text{l}$ を全細胞 (whole cell) への T_3 の取り込み測定用に分取, また別の $800\mu\text{l}$ を $3,000\text{rpm}$, 10 分間遠心分離し, 核分画を調製した。さらにこの分画を 2 度 SMT で洗浄した後, これに含まれる放射活性を測定して核に取り込まれた T_3 の量とした¹⁴⁾。残りの $400\mu\text{l}$ は DNA の測定に用いた。インキュベーションメEDIUM に 10^{-6}M の非標識 T_3 を加え, この条件での放射活性の細胞への摂取量を非特異的な T_3 取り込みとした。

E 細胞からの T_3 の放出

$1,25\text{-(OH)}_2\text{-vitamin D}_3$ 存在下あるいは非存在下で細胞を培養後, 10^{-9}M の非標識 T_3 と, $400,000\text{cpm}$ の放射性 T_3 を含む (ただし FCS を含まない) Ham's F-12K で 90 分間 37°C でインキュベートし, その後放射性 T_3 の細胞への再取り込みと, 濃度勾配による細胞内 T_3 の放出を防ぐため, 10^{-8}M の非標識 T_3 を含む Ham's F-12K にメEDIUM を変えて, さらにインキュベートした。インキュベート開始後, 経時的に細胞内の残留放射活性を測定し, 細胞からの T_3 の消失 (放出) 速度を算定した。

F その他の方法

蛋白濃度は Lowry ら¹⁵⁾ の方法を用い, 牛アルブミン (fraction V: Sigma) を標準品として測定し, DNA は Burton¹⁶⁾ の方法を用い, 牛胸腺 DNA (Sigma) を標準品として測定した。メEDIUM 中の T_3 濃度はラジオイムノアッセイを用い¹⁷⁾, また $1,25\text{-(OH)}_2\text{-vitamin D}_3$ 濃度は competitive protein binding assay を用い¹⁸⁾, それぞれ既述の方法で測定した。群間の統計処理には Student's t test を行い P 値が

Table 1 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ binding activity in rat kidney and liver

Tissues	No.	[³ H]-1,25-(OH) ₂ -vitamin D ₃ binding (cpm/100μg protein)		
		Total binding	Non-specific binding	Specific binding
Liver	5	2244 ± 216	688 ± 128	1556 ± 344
Kidney	5	7648 ± 366	546 ± 224	7102 ± 324

Charcoal-treated cytosol was incubated with 25,000 cpm [³H]1,25-(OH)₂-vitamin D₃ in the absence (total binding) or presence (non-specific) of 10⁻⁷M unlabeled 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ for 1 hr at room temperature. Each datum indicates the mean ± SD of five determinations.

Table 2 NADPH-dependent cytosolic T₃ binding activity in cultured cells

Cells	No.	Pretreatment with 10 ⁻⁸ M 1,25-(OH) ₂ -vitamin D ₃	Bound/Total % of [¹²⁵ I]T ₃ binding	
			NADPH(0 μM)	NADPH(50 μM)
Clone 9	5	-	0.40 ± 0.08	0.36 ± 0.10
	5	+	0.36 ± 0.12	0.38 ± 0.10
HepG2	5	-	4.41 ± 0.62	4.72 ± 0.53
	5	+	4.22 ± 0.48	4.43 ± 0.61
GH3	5	-	0.31 ± 0.06	0.28 ± 0.06
	5	+	0.25 ± 0.07	0.28 ± 0.07
dRLh 84	5	-	1.25 ± 0.31 — * —	7.60 ± 0.88
	5	+	1.38 ± 0.66 — * —	14.60 ± 2.89>**

Charcoal-treated cytosol which was prepared from cultured cells was incubated with 50,000 cpm [¹²⁵I]T₃ for 30 min. Each datum indicates the mean ± SD of five determinations of specific [¹²⁵I]T₃ binding.

*NADPH(0 μM) vs. NADPH(50 μM) : P<0.05

**Vitamin D₃(-), NADPH(50 μM) vs. Vitamin D₃(+), NADPH(50 μM): P<0.05

0.05以下を有意差があると判定した。

III 結 果

A ビタミンD₃による、ラット腎および肝細胞質T₃結合蛋白の誘導

ラットをビタミンD欠乏食で3週間飼育すると腎、肝ともにNADPH依存性細胞質T₃結合活性は低下した。しかし、NADPH非依存性のT₃結合活性には変化が認められなかった。このビタミンD欠乏食飼育ラットに1α-OH-vitamin D₃を投与するとNADPH依存性のT₃結合活性は12時間後で有意に増加し、48時間後には約2倍に上昇した。この変化は腎、肝、両組織で確認された。一方、NADPH非依存性のT₃結合活性には1α-OH-vitamin D₃はなんら影響を示さなかった (Fig.1)。1α-OH-vitamin D₃によるNADPH依存性のT₃結合の性状の変化をScatchard分析で観察した。Fig.2に示すように1α-OH-vitamin D₃投与前、および後の両者で異なった2種類のT₃親和性が

観察された。1α-OH-vitamin D₃投与により高親和性結合成分では最大結合容量(MBC)の増大が認められたが、結合親和性(Ka)には変化は認められなかった。

B ラット腎、肝のビタミンD₃結合活性

1α-OH-vitamin D₃によるNADPH依存性細胞質T₃結合活性の上昇は、ビタミンD₃受容体を介して生じている可能性がある。実際にこの受容体がラット腎、肝に存在するかどうかを検討した。Table 1に示すように、1,25-(OH)₂-vitamin D₃の特異的結合活性が両組織に認められた。

C 培養細胞でのNADPH依存性T₃結合活性

ラット腎および肝で見られたビタミンD₃の効果を細胞レベルで明らかにするために、各種培養細胞を用いて、ビタミンD₃感受性NADPH依存性T₃結合活性の誘導の有無を検討した。その結果、Clone 9, GH3, HepG2細胞にはNADPH依存性細胞質T₃結合活性は認められなかった (Table 2)。一方、dRLh

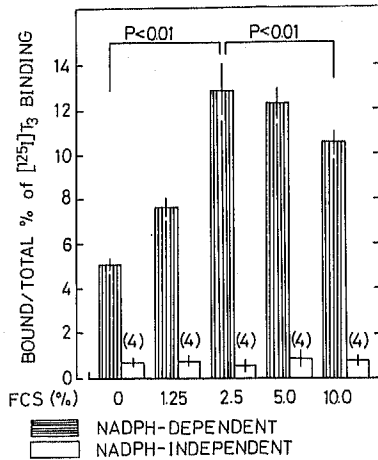


Fig. 3 Effect of FCS on the NADPH-dependent cytosolic T₃ binding activity in dRLh 84 cells. dRLh 84 cells were incubated with 10⁻⁸M 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ in the presence of various concentrations of FCS for 12 hrs. After incubation [¹²⁵I]T₃ binding activity in charcoal-treated cytosol was determined. Each datum indicates the mean ± SD.

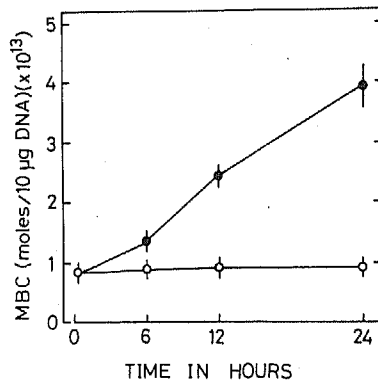


Fig. 4 Changes in the maximal binding capacity of NADPH-dependent cytosolic T₃ binding in dRLh 84 cells during incubation with 1,25-(OH)₂-vitamin D₃.

Cells were incubated in the absence(○) or presence(●) of 10⁻⁸M 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ for indicated times. The maximal binding capacity (MBC) in each cytosol fraction was estimated by Scatchard analysis. Each value indicates the mean ± SD of four determinations. P value is less than 0.01 between the cells treated with 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ and control cells at 12 hrs and at 24 hrs.

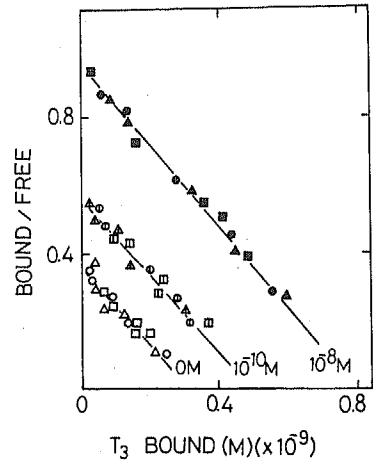


Fig. 5 Effect of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ on the NADPH-dependent cytosolic T₃ binding.

dRLh 84 cells were incubated with various concentrations of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ for 12 hrs, and T₃ binding activity in each group was estimated by Scatchard analysis. Results obtained from two or three different experiments are shown.

細胞にはこの活性の誘導が認められ、さらに1,25-(OH)₂-vitamin D₃による NADPH 依存性細胞質 T₃ 結合活性の増大も認められた。1,25-(OH)₂-vitamin D₃による dRLh 細胞での結合活性誘導の実験には10% FCS が添加されているが、FCS の効果を判定する目的で10⁻⁸M 1,25-(OH)₂-vitamin D₃存在下、各種濃度の FCS の影響を検討した。Fig. 3 に示すように FCS 濃度を上昇させると2.5~5.0% FCS が1,25-(OH)₂-vitamin D₃の効果をもっと増強させた。しかし、10% FCS では2.5~5.0% FCS の条件に比べ、抑制傾向が認められた。この結果は繰り返し得られており、おそらく刺激性と抑制性の少なくとも2種類以上の調節因子が FCS に存在すると考えられる。また外因性に加えられた1,25-(OH)₂-vitamin D₃は非生理的高濃度であることから(測定された10% FCS 中の内因性1,25-(OH)₂-vitamin D₃濃度は10⁻¹²M 以下)、FCS 中にビタミン D₃の作用を抑制するかなり強力な物質が存在することを示すと考えられる。しかし、この点については本研究ではこれ以上追求はできなかった。

D dRLh 細胞におけるビタミン D₃の NADPH 依存性細胞質 T₃結合活性の誘導

前述したように2.5~5.0% FCS が1,25-(OH)₂-vitamin D₃による NADPH 依存性 T₃結合活性の誘導

Table 3 Effect of actinomycin D on the [¹²⁵I]T₃ binding activity in dRLh 84 cells

Groups	No.	Actinomycin D (0.1 μg/ml)	1,25-(OH) ₂ vitamin D ₃ (10 ⁻⁹ M)	Bound/total % of [¹²⁵ I]T ₃ binding	
				NADPH(0 μM)	NADPH(50 μM)
A	3	(-)	(-)	1.28 ± 0.62	6.99 ± 0.78
B	3	(-)	(+)	1.64 ± 1.20	13.84 ± 2.02
C	3	(+)	(-)	1.33 ± 0.58	2.11 ± 0.93
D	3	(+)	(+)	1.41 ± 0.55	3.12 ± 1.24

dRLh 84 cells were incubated with or without actinomycin D for 2 hrs, and further incubated in the absence or presence of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ for 12 hrs. Each value indicates the mean ± SD of specific binding of [¹²⁵I]T₃ to the charcoal-treated cytosol (10 μg DNA equivalence), in which non-specific binding was defined as the radioactive T₃ bound in the presence of 10⁻⁷M unlabeled T₃. A. vs. B : P<0.01, B. vs. D : P<0.01. (NADPH 50 μM).

Table 4 Effect of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ on the nuclear T₃ binding in dRLh 84 cells

Groups	No.	1,25-(OH) ₂ -vitamin D ₃ (10 ⁻⁸ M)	Bound/total % of [¹²⁵ I]T ₃ binding	P value
A	4	(-)	4.4 ± 1.1	A vs. B
B	4	(+)	4.6 ± 1.4	N. S.

After incubation of the dRLh 84 cells with 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ for 12 hrs, nuclear fraction was prepared, then [¹²⁵I]T₃ binding to the nuclear receptors (10 μg DNA equivalence) was assessed. Each datum indicates the mean ± SD of the specific binding of [¹²⁵I]T₃, in which the non-specific binding was defined as the radioactive T₃ bound in the presence of 10⁻⁷M unlabeled T₃.

Table 5 [³H]1,25-(OH)₂-vitamin D₃ binding activity in dRLh 84 cells

	Bound/total % of [³ H]-1,25-(OH) ₂ -vitamin D ₃ binding		
	Total binding	Non-specific binding	Specific binding
Experiment 1	4.8 ± 2.1	2.1 ± 0.6	2.7 ± 0.9
Experiment 2	5.3 ± 2.2	1.6 ± 0.7	3.7 ± 0.9

Charcoal-treated cytosol was incubated with 45,000 cpm [³H]1,25-(OH)₂-vitamin D₃ in the absence (total binding) or presence (non-specific binding) of 10⁻⁷M unlabeled 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ for 1 hr at room temperature. Each datum indicates the mean ± SD of four determinations.

に最適であることから、以下の実験は5.0% FCSを基礎とした培養条件下で行った。Fig. 4に1,25-(OH)₂-vitamin D₃によるdRLh細胞でのNADPH依存性T₃結合活性の誘導の経時的変化を示した。24時間の培養まではほぼ直線的にT₃結合活性の上昇が認められた。12時間の時点でT₃結合活性のScatchard分析を行うと10⁻⁸Mの1,25-(OH)₂-vitamin D₃でほぼ最大となるMBCの上昇が認められた(Fig. 5)。一方、NADPH非依存性のT₃結合活性は、NADPH依存性T₃結合活性に比べ著しく小さいものであった。また、1,25-

(OH)₂-vitamin D₃はNADPH非依存性T₃結合の性状(親和性(Ka)および最大結合容量(MBC))に対し、ほとんど影響を及ぼさず、1,25-(OH)₂-vitamin D₃によるNADPH非依存性T₃結合活性の誘導も認められなかった。

また、1,25-(OH)₂-vitamin D₃によるNADPH依存性細胞質T₃結合活性の誘導はactinomycin Dによって抑制された。しかし、NADPH非依存性T₃結合活性に対してはactinomycin Dは影響を与えなかった(Table 3)。

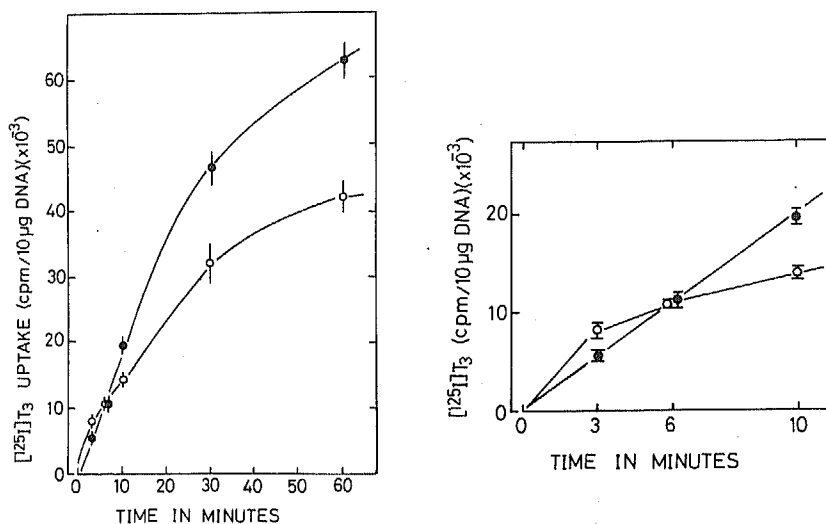


Fig. 6 Effect of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ on whole cell T₃ uptake into dRLh 84 cells.

dRLh 84 cells were preincubated in the absence (○) or presence (●) of 10⁻⁸ M 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ for 12 hrs. After incubation the cells were incubated with radioactive T₃ in the absence or presence of 10⁻⁵M unlabeled T₃ for indicated times. Right panel shows changes in whole cell [¹²⁵I]T₃ uptake in the early phase (0-10 min.) of incubation with radioactive T₃. Each datum indicates the mean ± SD of four determinations of specific uptake of [¹²⁵I]T₃, where non-specific [¹²⁵I]T₃ uptake was determined in the presence of 10⁻⁵M unlabeled T₃.

E ビタミン D₃のdRLh細胞におけるT₃核受容体におよぼす効果

NADPH依存性細胞質T₃結合活性を測定した時と同条件で核受容体がビタミンD₃によって影響を受けるか否かを検討した。核受容体へのT₃の結合は、1,25-(OH)₂-vitamin D₃処理で影響を受けなかった (Table 4)。

F dRLh細胞のビタミンD₃結合活性

dRLh細胞でビタミンD₃結合活性を測定した。チャコール処理した細胞質分画に特異的1,25-(OH)₂-vitamin D₃結合活性が認められた (Table 5)。

G dRLh細胞へのT₃摂取におよぼすビタミンD₃の効果

細胞質NADPH依存性T₃結合活性がビタミンD₃で誘導されることが判明したが、この変化と細胞へのT₃の取り込みとの間に関連があるかどうかを調べた。1,25-(OH)₂-vitamin D₃存在下で細胞を12時間培養し、その後、FCSを除いたメディアムに変え、放射性T₃を細胞外に加えて、その細胞 (whole cell) への取り

込みを計測した。1,25-(OH)₂-vitamin D₃処理細胞では非処理細胞に比べ、初期 (0~3分) には細胞内へのT₃の取り込みは抑制されたが、6分以降では1,25-(OH)₂-vitamin D₃処理細胞で取り込みが増強された (Fig. 6)。この2相性効果は1,25-(OH)₂-vitamin D₃の濃度を変えて細胞を処理しても再現された (Fig. 7)。一方、核へのT₃取り込みを観察すると、2相性の取り込みは認められず、1,25-(OH)₂-vitamin D₃処理細胞ではT₃取り込みがインキュベーション初期より促進されている結果が得られた (Fig. 8)。

H dRLh細胞からのT₃放出に及ぼすビタミンD₃の効果

dRLh細胞 (whole cell) へのT₃の取り込みに対し、ビタミンD₃が2相性効果 (初期での抑制、次第に刺激性への転換) を示したことは、ビタミンD₃が細胞内T₃の貯蔵を促進し、細胞外へのT₃の放出を抑制した可能性を示すものである。そのため、取り込まれたT₃の細胞外への放出に、ビタミンD₃前処理がどのように関与するかを観察した。

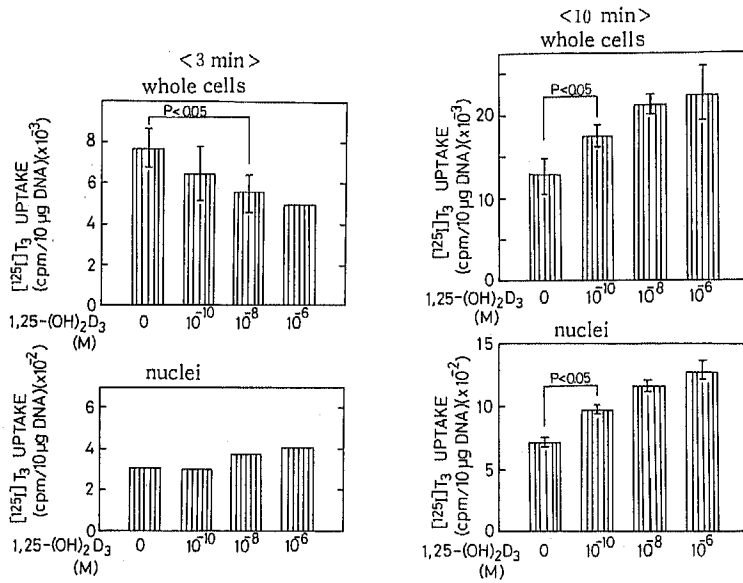


Fig. 7 Effect of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ on the cellular uptake of [¹²⁵I]T₃ in dRLh 84 cells.

The cells were incubated in the presence of various concentrations of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ for 12 hrs. After incubation the cells were further incubated with radioactive T₃ for 3 min (left panel) or 10 min (right panel) in the absence or presence of 10⁻⁵M unlabeled T₃. The specific [¹²⁵I]T₃ uptake into whole cells (upper panel) or nuclei (lower panel) was determined. Each datum indicates the mean ± SD of four determinations.

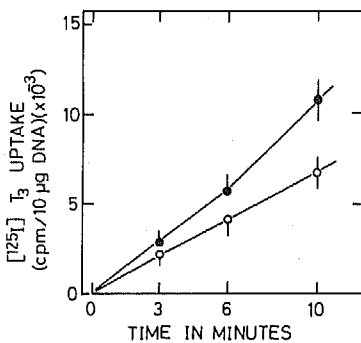


Fig. 8 Time course of nuclear uptake of [¹²⁵I]T₃ in dRLh 84 cells.

dRLh 84 cells were preincubated in the absence (○) or presence (●) of 10⁻⁸M 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ for 12 hrs. After incubation the cells were incubated with radioactive T₃ in the absence or presence of 10⁻⁵M unlabeled T₃ for indicated times. Each datum indicates the mean ± SD of four determinations of specific uptake of [¹²⁵I]T₃.

1,25-(OH)₂-vitamin D₃処理または非処理細胞を90分間放射性T₃とインキュベーションして、ほぼ細胞内T₃が飽和状態になった後(細胞内T₃を飽和させるため10⁻⁶Mの非標識T₃を同時に加えた)、メディウムを変更して(細胞内外のT₃の濃度差に基づく拡散によるT₃放出、または再取り込みを防ぐため10⁻⁶MのT₃を加えた)細胞内から細胞外へのT₃放出を観察した。Fig. 9に示すように、1,25-(OH)₂-vitamin D₃非処理細胞ではrapid phaseとslow phaseの2種類の放射性T₃放出が観察された。細胞内に貯留したT₃の半減期をrapid phaseで計算すると、1,25-(OH)₂-vitamin D₃処理細胞では192分と、非処理細胞での42.5分と比べ有意に延長した。この結果より、1,25-(OH)₂-vitamin D₃処理細胞では非処理細胞に比べ、rapid phaseのT₃の放出は著明に抑制された。一方、核に取り込まれた放射性T₃の放出に対しては、1,25-(OH)₂-vitamin D₃による前処置は何ら影響を示さなかった (Fig. 10)。

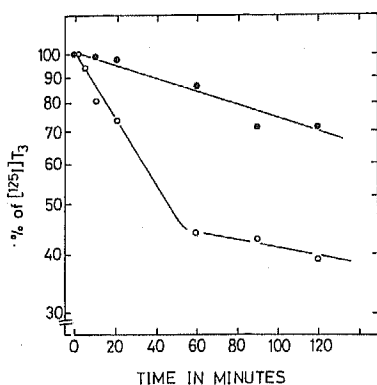


Fig. 9 Effect of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ on the release of [¹²⁵I]T₃ from dRLh 84 cells.

Cells were incubated in the absence (○) or presence (●) of 10⁻⁸M 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ for 12 hrs. After the incubation the cells were preloaded with 10⁻⁹M unlabeled T₃ and tracer amount (400,000 cpm) of radioactive T₃ for 90 min. Then the cells were transferred to the medium which contained 10⁻⁶M unlabeled T₃. After incubation the content of radioactivity in whole cells was determined. Each datum indicates the mean of duplicate determinations. In additional two experiments, the similar results were obtained.

IV 考 察

甲状腺ホルモンは細胞の増殖³⁾, 分化¹⁹⁾, エネルギー代謝²⁰⁾など細胞の持つ多くの機能に関与する。その作用機構の解明は核受容体の発見以来、飛躍的に進んでいる²¹⁾⁻²³⁾。しかし、受容体機能が解明されるに伴い、解決されねばならない多くの問題が提起されてきている。その中の一つが甲状腺ホルモンの標的細胞での取り込みおよび細胞内ホルモン移送機構の解明である。

従来、細胞内には特別なホルモン移送担体はなく、甲状腺ホルモンは拡散により標的細胞に取り込まれ、また核外から核受容体への移動も拡散に基づく機構で行われると考えられてきた²⁴⁾。しかし、最近、細胞内へのホルモンの摂取、また核外から核受容体への移行が active transport による可能性のあることが報告されている²⁵⁾²⁶⁾。In vitro の系で細胞質 NADPH 依存性 T₃ 結合蛋白はその存在様式により甲状腺ホルモンの細胞内貯留を促進したり、また核への甲状腺ホルモン移送に積極的に関与したりすることが判明しており¹⁰⁾²⁷⁾、また、甲状腺ホルモンの細胞内移行がステロイドホル

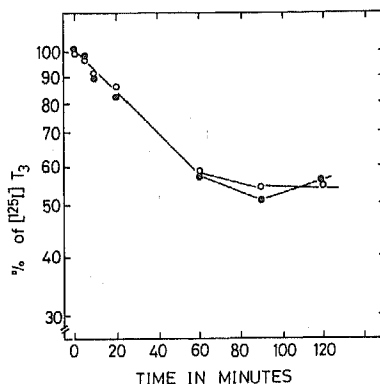


Fig. 10 Effect of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ on the release of [¹²⁵I]T₃ from nuclei in dRLh 84 cells.

Cells were incubated in the absence (○) or presence (●) of 10⁻⁸M 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ for 12 hrs. After the incubation the cells were preloaded with 10⁻⁹M unlabeled T₃ and tracer amount (400,000 cpm) of radioactive T₃ for 90 min. Then the cells were transferred to the medium which contained 10⁻⁵M unlabeled T₃. After incubation the content of radioactivity in nuclei was determined. Each datum indicates the mean of duplicate determinations. In additional two experiments, the similar results were obtained.

モンのそれと同じように heat shock protein (HSP) に依存して調節される可能性も指摘されているからである¹⁴⁾。しかし、細胞内の NADPH 依存性 T₃ 結合蛋白の増減が、細胞内へのホルモンの取り込みを調節するかどうかはまだ判っていない。本研究はそのような機構が存在することを、間接的にはあるが、培養細胞を用いて検討することを目的とした。甲状腺ホルモンが NADPH 依存性 CTBP を増加させることは動物実験で証明されている¹¹⁾。一方、甲状腺ホルモン受容体の結合する塩基配列は、ビタミン D₃ 受容体の結合するそれに類似し²⁸⁾、また両受容体が heterodimer を形成することから²⁹⁾³⁰⁾、ビタミン D₃ も甲状腺ホルモンと同様な作用を有する可能性がある。本研究はこれらの成果を利用して実験が進められた。

ラット肝、腎には、甲状腺ホルモン受容体が存在する³¹⁾。一方、本研究で示したようにビタミン D₃ (1,25-(OH)₂-vitamin D₃) の受容体もこれらの組織に存在する。ラットの肝、腎では甲状腺ホルモンにより CTBP が増加するが¹¹⁾、同様にビタミン D₃ (1α-OH-vitamin D₃) でも増加が認められた。細胞株により異なった結果が得られたが、ビタミン D₃ (1,25-

(OH)₂-vitamin D₃) および甲状腺ホルモン (T₃) 受容体が存在するdRLh細胞ではビタミンD₃でNADPH依存性T₃結合活性が増加した。このため細胞内甲状腺ホルモン移送に関与すると考えられるNADPH依存性T₃結合活性の影響を観察するためにはdRLh細胞が条件を備えていると考えられ、この細胞を用いて研究を行った。

まず、ビタミンD₃によるNADPH依存性T₃結合活性増加作用はラットの腎、肝で見られたと同様、dRLh細胞でもT₃の親和性ではなく最大結合能(容量)の増加として認められた。このことはビタミンD₃はNADPH依存性T₃結合蛋白の量を増加させるが、この蛋白のT₃結合の性状には変化をきたさないことを示す。さらに1,25-(OH)₂-vitamin D₃によるこの蛋白の増加がactinomycin Dにより抑制されたことは、ビタミンD₃によるNADPH依存性T₃結合蛋白の増加は、この蛋白の転写の段階に関与していることを示している。したがって、少なくとも、NADPH依存性T₃結合蛋白に対し、ビタミンD₃は質的というよりも量的に関与することが推測できる。一方、ビタミンD₃はラット腎、肝およびdRLh細胞でT₃核受容体を増加させない。さらにNADPH非依存性の甲状腺ホルモン結合蛋白に対して、ビタミンD₃は何ら影響を与えていない。これらの事実は複数存在する細胞内甲状腺ホルモン結合蛋白のうちNADPH依存性の甲状腺ホルモン結合蛋白のみがビタミンD₃によって影響を受けることを示唆する。NADPH依存性T₃結合蛋白が甲状腺ホルモン移送に関与するとすれば、ビタミンD₃処理によりdRLh細胞への細胞外からのT₃の取り込み(whole cell uptake)または核へのT₃の移行(nuclear T₃ uptake)が修飾される可能性がある。

細胞へのT₃の取り込み(whole cell uptake)を観察するとビタミンD₃(1,25-(OH)₂-vitamin D₃)処理により2相性の効果が認められた。まず第一は初期に生じる細胞内へのT₃取り込みの抑制であり、これに引続き細胞内T₃が著増する。この実験結果は次のことを示唆する。すなわち、ビタミンD₃はT₃の細胞への取り込みに対し、少なくとも2種類以上(抑制性と誘導性)の調節機構を誘導するということである。結果の項でも示したように、1,25-(OH)₂-vitamin D₃非処理細胞でもT₃が細胞へ取り込まれることが確認された。したがって、細胞内へのT₃の取り込みは、active transport, passive diffusionいずれかは不明であるが、ビタミンD₃非依存性として存在するものと

考えられる。このビタミンD₃非依存性の取り込みに対し、1,25-(OH)₂-vitamin D₃処理細胞のearly phaseで見られたT₃取り込みの抑制効果から、ビタミンD₃はT₃取り込みに対し抑制効果を有すると仮定すると、1,25-(OH)₂-vitamin D₃処理細胞のlater phaseに生じる細胞内T₃の増加は仮定と矛盾した実験結果である。一方、細胞内に取り込まれたT₃の放出を観察するとビタミンD₃非処理細胞でのT₃の放出に対し、1,25-(OH)₂-vitamin D₃処理細胞でのそれは著明に抑制されていることが判明した。細胞内に残留するT₃量を測定して得られた半減期はearly phaseではビタミンD₃非処理細胞のそれに比べて1,25-(OH)₂-vitamin D₃処理細胞では約4.5倍に延長している。この実験結果から考えるとT₃取り込みの実験結果(early phaseでの低下, later phaseでの促進)はビタミンD₃処理により取り込みが抑制されたというよりも、むしろ細胞内のT₃の細胞外への放出が抑制された結果を示すものと考えられる。

*In vitro*の実験ではNADPH依存性T₃結合蛋白はNADPHで活性化された場合、細胞内甲状腺ホルモンの貯留を刺激すると予測される観察結果が得られている⁷⁾¹⁰⁾。結果は示していないが、T₃の放出実験で、インキュベーション開始から60分後でも細胞内T₃の99%はNADPH依存性T₃結合蛋白に結合していたことが判明している。以上より、ビタミンD₃によるT₃の放出抑制は、増加したNADPH依存性T₃結合蛋白による効果と考えられる。

一方、核へのT₃の移行(取り込み)はビタミンD₃非処理細胞に比べ、1,25-(OH)₂-vitamin D₃処理細胞でインキュベーションの初期(0~6分)から高い。細胞内(whole cell)に取り込まれる全T₃の量に対しても核へのT₃の移行が促進されていることが判る。NADPH依存性T₃結合蛋白が1,25-(OH)₂-vitamin D₃で増加していることから考えると細胞外へのT₃の放出の抑制と同時に核外compartmentから核へのT₃の移行も抑制される可能性がある⁵⁾³²⁾。しかし、実験結果では核への移行がビタミンD₃処理で刺激された。おそらく細胞質NADPH依存性T₃結合蛋白の一部が細胞質から核へのT₃の移行に対し促進的に作用しているものと考えられる。核からのT₃の放出を観察すると1,25-(OH)₂-vitamin D₃処理により核に存在するT₃の量の半減期と非処理群のそれとの間に差を認めない。このことも核へのT₃の移行が促進されたと考えた方が考えやすい。NADPH依存性T₃結合蛋白は

NADPによって活性化されると、細胞質から核への T_3 の移行を促進することが*in vitro*の実験で確認されている⁷²⁾。おそらくビタミン D_3 によって増加したNADPH依存性 T_3 結合蛋白の一部はNADPによって活性化され、細胞質から核への T_3 の移行が促進されたものと考えられる。しかし、本研究では細胞内のNADP濃度の測定が行われておらず詳細は不明である。

本研究ではビタミン D_3 によって誘導されるカルシウム結合蛋白の変化を観察していない。細胞質カルシウム濃度は少なからずNADPH依存性 T_3 結合蛋白への T_3 の結合に影響を与える³³⁾。したがって、細胞内freeカルシウム濃度の測定とfreeカルシウム濃度の変化に伴うNADPH依存性 T_3 結合蛋白への T_3 の結合の変化、さらにこれら一連の反応に伴う T_3 の細胞内移行についても検索が必要と思われるが、本研究ではこの点についての詳細を検討することはできなかった。

dRLh細胞を用いてビタミン D_3 による甲状腺ホルモンの細胞内移行におよぼす影響を観察したが、ラット肝、腎でのビタミン D_3 によるNADPH依存性 T_3 結

合蛋白の変化はdRLh細胞のそれとほぼ同様であり、ラット肝、腎でもビタミン D_3 による細胞内甲状腺ホルモン移送調節が生じていると思われる。またこれら肝、腎以外の甲状腺ホルモンの標的組織でもNADPH依存性 T_3 結合蛋白がホルモン作用を調節することが示唆されており³⁴⁾、ビタミン D_3 依存性のNADPH依存性 T_3 結合蛋白合成調節は甲状腺ホルモンの標的組織の多くで甲状腺ホルモン作用の重要な調節ステップであると考えられる。

V おわりに

ビタミン D_3 のNADPH依存性 T_3 結合蛋白と T_3 の細胞内取り込みへの影響を観察することにより、NADPH依存性 T_3 結合蛋白が細胞への T_3 の摂取、さらに核への T_3 の移行に対し、調節的に作用する可能性が示唆された。本研究の一部は第9回国際内分泌学会(Ninth International Congress of Endocrinology)(ニース, フランス, 8月30日~9月5日, 1992年)で発表した。稿を終わるにあたり、御指導、御校閲を賜りました橋爪潔志教授ならびに市川和夫助手、鈴木悟医師(シカゴ大学留学中)に謝意を表します。

文 献

- 1) Refetoff S, Larsen PR: Transport, cellular uptake, and metabolism of thyroid hormone. In: DeGroot LJ (ed), Endocrinology. 2nd ed, pp 541-561, Saunders Co, Philadelphia, 1989
- 2) Chin WW: Nuclear thyroid hormone receptor. In: Parker MG (ed), Nuclear hormone receptors, pp 79-102, Academic Press, New York, 1991
- 3) Schwartz HL: Effect of thyroid hormone on growth and development. In: Oppenheimer JH, Samuels HH (eds), Molecular basis of thyroid hormone action, pp 413-444, Academic Press, New York, 1983
- 4) Barsano CP, DeGroot LJ: Nuclear-cytoplasm interrelationships. In: Oppenheimer JH, Samuels HH (eds), Molecular basis of thyroid hormone action, pp 140-178, Academic Press, New York, 1983
- 5) Hashizume K, Kobayashi M, Miyamoto T: Active and inactive forms of 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine (T_3)-binding protein in rat kidney cytosol: Possible role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in activation of T_3 binding. Endocrinology 119: 710-719, 1986
- 6) Hashizume K, Miyamoto T, Kobayashi M, Suzuki S, Ichikawa K, Yamauchi K, Ohtsuka H, Takeda T: Cytosolic 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine (T_3)-binding protein (CTBP) regulation of nuclear T_3 binding: evidence for the presence of T_3 -CTBP complex-binding sites in nuclei. Endocrinology 124: 2851-2856, 1989
- 7) Hashizume K, Miyamoto T, Yamauchi K, Ichikawa K, Kobayashi M, Ohtsuka H, Sakurai A, Suzuki S, Yamada T: Counterregulation of nuclear 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine (T_3) binding by oxidized and reduced-nicotinamide adenine dinucleotide phosphates in the presence of cytosolic T_3 -binding protein in vitro. Endocrinology 124: 1678-1683, 1989
- 8) Katai M, Suzuki S, Hashizume K, Ichikawa K, Nishii Y, Takeda T, Sakurai A, Nagasawa T: Induction of NADPH-dependent cytosolic 3, 5, 3'-triiodothyronine binding protein by T_3 , Vitamin D_3 , Retinoic acid

- and estrogen. Abstract of 9th International Congress of Endocrinology, abstract No. 05-31-028, 1992
- 9) Suda T, Deluca HF, Tanaka V : Biological activity of 25-hydroxyergocalciferol in rats. *J Nutr* 100 : 1049-1052, 1970
 - 10) Hashizume K, Miyamoto T, Kobayashi M, Ichikawa K, Nishii Y, Yamauchi K, Sakurai A, Ohtsuka H, 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
 - 11) Nishii Y, Hashizume K, Ichikawa K, Miyamoto T, Suzuki S, Takeda T, Yamauchi K, Kobayashi M, Yamada T : Changes in cytosolic 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine (T3) binding activity during administration of L-thyroxine to thyroidectomized rats : cytosolic T3-binding protein and its activator act as intracellular regulators for nuclear T3 binding. *J Endocrinol* 123 : 99-104, 1989
 - 12) Scatchard G : The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci* 51 : 660-672, 1949
 - 13) Ichikawa K, DeGroot LJ : Separation of DNA binding domain from hormone and core histone binding domain by trypsin digestion of rat liver nuclear thyroid hormone receptor. *J Biol Chem* 261 : 16540-16546, 1986
 - 14) Ichikawa K, Hashizume K, Kobayashi M, Nishii Y, Ohtsuka H, Suzuki S, Takeda T, Yamada T : Heat shock decreases nuclear transport of 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine in clone 9 cells. *Endocrinology* 130 : 2317-2324, 1992
 - 15) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 266-275, 1951
 - 16) Burton K : Study of the condition and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J* 62 : 315-319, 1956
 - 17) Hashizume K, Ichikawa K, Sakurai A, Suzuki S, Takeda T, Kobayashi M, Miyamoto T, Arai M, Nagasawa T : Administration of thyroxine in treated Graves' disease-effects on the levels of antibodies to thyroid-stimulating hormone receptors and on the risk of recurrence of hyperthyroidism. *N Engl J Med* 324 : 947-953, 1991
 - 18) Hashizume K, Ichikawa K, Suzuki S, Takeda T, Kobayashi M, Ma X-T : Calorie restriction increases serum parathyroid hormone and decreases serum calcitonin levels in patients with maturity-onset diabetes mellitus. *J Bone Mineral Metab* 10 : 173-183, 1992
 - 19) Galton VA : Thyroid hormone action in amphibian metamorphosis. In : Oppenheimer JH, Samuels HH (eds), *Molecular basis of thyroid hormone action*, pp 445-484, Academic Press, New York, 1983
 - 20) Guernsey DL, Edelman IS : Regulation of thermogenesis by thyroid hormone. In : Oppenheimer JH, Samuels HH (eds), *Molecular basis of thyroid hormone action*, pp 293-324, Academic Press, New York, 1983
 - 21) Surks MI, Koerner D, Dillmann W, Oppenheimer JH : Limited capacity binding for L-triiodothyronine in rat liver nuclei : Localization to the chromatin and partial characterization of the L-triiodothyronine-chromatin complex. *J Biol Chem* 248 : 7066-7072, 1983
 - 22) Samuels HH, Tsai JS : Thyroid hormone action in cell culture : demonstration of nuclear receptors in intact cells and isolated nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70 : 3488-3492, 1973
 - 23) DeGroot LJ, Toressani L : Triiodothyronine binding to isolated liver cell nuclei. *Endocrinology* 96 : 357-369, 1975
 - 24) Eckel J, Rao GS, Rao ML, Breuer H : Uptake of triiodothyronine by isolated rat liver cells. *Biochem J* 182 : 473-491, 1979
 - 25) Docter R, Krenning EP, Bernard HF, Hennemann G : Active transport of iodothyronines into human

- cultured fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 65: 624-628, 1987
- 26) Hennemann G, Krenning EP, Polhuys M, Mol JA, Bernard HF, Visser TJ, Docter R: Carrier-mediated transport of thyroid hormone into rat hepatocytes is rate-limiting in total cellular uptake and metabolism. *Endocrinology* 119: 1870-1872, 1986
 - 27) Hashizume K, Miyamoto T, Ichikawa K, Yamauchi K, Sakurai A, Ohtsuka H, Kobayashi M, Nishii Y, Yamada T: Evidence for the presence of two active forms of cytosolic 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine (T3)-binding protein (CTBP) in rat kidney: specialized functions of two CTBPs in intracellular T3 translocation. *J Biol Chem* 264: 4864-4871, 1989
 - 28) Zhang X-K, Hoffman B, Tran P B-V, Graupner G, Pfahl M: Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature* 355: 441-446, 1992
 - 29) Kliewer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM: Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D₃ signalling. *Nature* 355: 446-449, 1992
 - 30) Carlberg C, Bendik I, Wyss A, Meier E, Sturzenbecker LJ, Grippo JF, Hunziker W: Two nuclear signalling pathways for vitamin D. *Nature* 361: 657-660, 1993
 - 31) Hashizume K, Ichikawa K, Suzuki S, Takeda T, Yamauchi K, Kobayashi M: Evidence for the presence of protein kinases which stimulate phosphorylation of c-erb A protein in rat kidney nuclei. *Endocrinol Jpn* 38: 205-212, 1991
 - 32) Ichikawa K, Hashizume K: Cellular binding proteins of thyroid hormone. *Life Sci* 49: 1513-1522, 1991
 - 33) Hashizume K, Miyamoto T, Nishii Y, Kobayashi M: Evidence for the presence of active and inactive forms of cytosolic triiodothyronine binding protein in rat kidney: Cooperative action of Ca²⁺ in NADPH activation. *Endocrinol Jpn* 34: 479-482, 1987
 - 34) Suzuki S, Hashizume K, Ichikawa K, Takeda T: Ontogenesis of the high affinity NADPH-dependent cytosolic 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine-binding protein in rat. *Endocrinology* 129: 2571-2574, 1991

(5. 3. 29 受稿)