

NADPH 依存性高親和性細胞質甲状腺ホルモン
結合蛋白 (CTBP) のラットにおける
組織分布と成長に伴うその変化:
中枢神経系発達における CTBP の関与

鈴木 悟

信州大学医学部老年医学教室

(指導: 山田 隆司教授)

**Localization and Ontogenesis of NADPH-dependent High
Affinity Cytosolic 3, 5, 3'-Triiodo-L-Thyronine-Binding
Protein (CTBP) in Rats: Possible Role of CTBP
in the Development of the Central Nervous System**

Satoru SUZUKI

Department of Geriatrics, Endocrinology and Metabolism,

Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Takashi YAMADA)

It is well known that the development of several tissues is dependent on thyroid hormone. Especially, the thyroid-hormone-dependent growth of the central nervous system is believed to take place before birth. However, the precise mechanism of the hormone-dependent growth is uncertain.

Studies were undertaken to determine the concentration of the high affinity NADPH-dependent cytosolic 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine (T_3)-binding protein (CTBP) in various tissues in adult and developing rats. The affinity constant (K_a) and maximal binding capacity (MBC) for T_3 binding were calculated from the data obtained by Scatchard analysis. There were no significant differences in the K_a among various tissues. The MBC differed among tissues in adult rats, and was highest in kidney. When the levels of MBC were expressed by moles/DNA concentration, the order was as follows; kidney>heart \geq cerebrum \geq liver>>testis>cerebellum>spleen. CTBP was not detected before birth in liver, heart and spleen, but appeared 4 days after birth, and gradually increased until 6 weeks. The CTBP in kidney was also not detected before birth, but was observed at the time of birth, and gradually increased until 3 weeks. In contrast, CTBP was detected 5 days before birth, and increased temporarily around the time of birth, in cerebrum and cerebellum. The MBC in cerebrum, but not in cerebellum, began to increase again 2 weeks after birth. These results suggest that the target tissues of thyroid hormone are enriched with CTBP, and it was postulated that the CTBP plays an important role in the regulation of thyroid-hormone-dependent development of the central nervous system.

Shinshu Med. J., 39: 573-585, 1991

(Received for publication April 19, 1991)

Key words : 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine (T_3), NADPH-dependent 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine binding protein (CTBP), ontogenesis of CTBP, tissue localization of the CTBP, development of the central nervous system

3, 5, 3'-トリヨード-L-サイロニン (T_3), NADPH-依存性 T_3 結合蛋白 (CTBP), CTBP の発生, CTBP の組織分布, 中枢神経系の発達

I 緒 言

甲状腺ホルモンは細胞増殖, エネルギー代謝など細胞の持つ多くの機能に関与するのみならず, 細胞の分化, 特に胎生期から新生児期にかけての成長発達の維持に大きくかかわっている¹⁾⁻³⁾。細胞におけるこのホルモンの作用はステロイドホルモンと同様, 細胞核に存在する受容体を介して特異的な遺伝子の転写を開始することによって発現されることが知られている⁴⁾⁻⁶⁾。甲状腺ホルモンにはトリヨードサイロニン (3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine (T_3)) とサイロキシン (L-thyroxine (T_4)) の2種類が存在する。 T_4 の核受容体に対する親和性は T_3 のその約10分の1と低い⁷⁾⁸⁾。甲状腺ホルモンの血中主成分は T_4 であり, この T_4 は細胞に取り込まれた後, ミクロゾーム分画に存在する脱ヨード酵素により T_3 となる。この T_3 の核受容体への細胞内輸送機構は, 核受容体の構造, 機能の解明が急速に進んでいるにもかかわらず, 長い間不詳であった。

1989年ラット腎より細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白 (Cytosolic T_3 Binding Protein; CTBP) が発見された⁹⁾。この蛋白は分子量58,000, 沈降定数4.7Sのほぼ球形の蛋白である。NADPH $25\mu\text{M}$ 以上存在下で T_3 結合の最大活性をもつ。この蛋白1分子にはほぼ1分子の T_3 が結合し, その親和定数は $2.43 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ と核受容体のそれとほぼ同じ値を示す⁹⁾⁻¹³⁾。

今回は, この蛋白の組織分布, および各組織の胎生期からの発達に伴う変化をScatchard解析から得られた T_3 に対する親和定数 (K_d) と最大結合容量 (MBC) をもとに分析し, CTBPの機能的多様性について考察を行った。

II 方法および材料

A 研究材料

$[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ ($3,300\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) はNew England Nuclear (Boston MA, USA) より入手した。非放射性 T_3 および

NADPHはSigma Chemical Co. (St. Louis Mo, USA) のものを使用した。活性炭 (Derco G-60) はSargent-Welch Scientific Co. (Skokie, IL, USA) より, デキストラン T-70, Sephadex G-50はPharmacia Fine Chemical Inc. (Piscataway NJ, USA) より入手した。

B 実験動物

CTBPの組織分布については, Wistar系雄ラット (150~160g; 生後7~9週) (静岡実験動物) を使用した。発生および成長過程におけるCTBPの変化についてはWistar系ラット胎児 (出生5日前より) および出生後8週までの幼若雌雄ラットを使用した。出生5日以前の各組織はCTBPの調製には不十分な重量であり, 本研究の対象にはならなかった。

C 細胞質 T_3 結合蛋白の調整

各ラットは細胞質の調製4時間前より絶食とした。断頭で屠殺後, 腹大動脈を切開, 瀉血した後, 大脳, 小脳, 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 精巣を摘出した。各組織の重量を測定後, 冷却, 細切し, 5倍容量の2mM EGTAを含む0.32Mショ糖中でPotter-Elvehjem型ホモジナイザーでホモジナイズした。ホモジネートを $27,000 \times g$ 20分間 (4°C) 遠心後, その上清を, さらに $105,000 \times g$ で2時間 (4°C) 遠心した。内因性 T_3 , NADP, NADPHを除くため最終濃度が10% (w/v) になるように活性炭を加え 4°C で30分間攪拌した。その後, $27,000 \times g$ 30分間遠心して, その上清を回収し, 非活性型 T_3 結合蛋白画分として使用した。この活性炭処理により内因性 T_3 とNADPHの99%が細胞質分画より除去できた⁹⁾。

D 細胞質 T_3 結合の測定

シリコン処理したプラスチックチューブを使用して T_3 結合活性の測定を行った。非特異的結合は 10^{-6}M の非放射性 T_3 の存在下での蛋白結合 $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ を測定することによって得た。特異的結合は, 非放射性 T_3 を加えない時に得られた蛋白結合放射活性より, 非特異的結合としての放射活性を差し引くことによって計

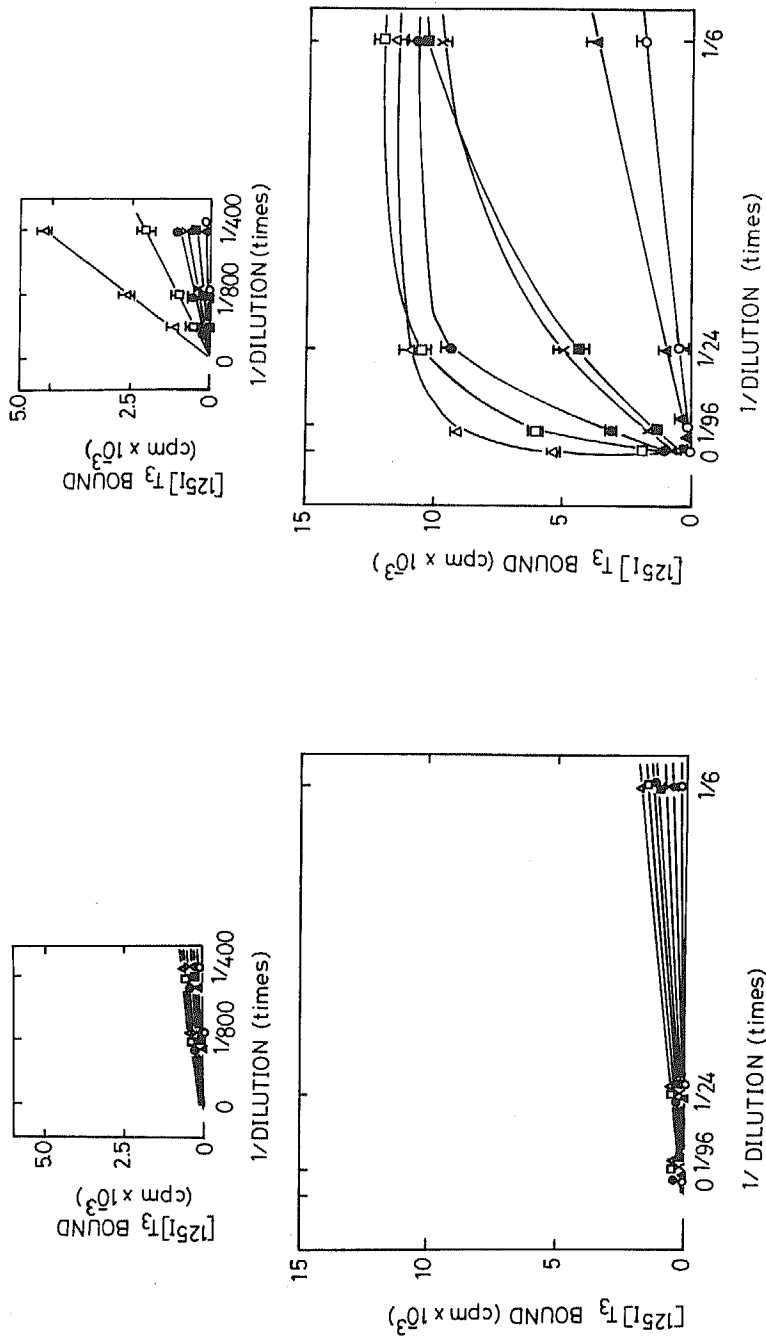


Fig. 1. [¹²⁵I]T₃ binding to charcoal-treated cytosol in various tissues of rat [¹²⁵I]T₃ binding to charcoal-treated cytosol was measured in the absence (left panels) or presence (right panels) of 25 μM NADPH. Charcoal-treated cytosol was prepared from cerebrium (●), cerebellum (▲), heart (■), liver (□), kidney (△), testis (×) and spleen (○) in adult rats. The cytosol obtained from each tissue was treated with charcoal as described, and diluted as indicated in figures. Abscissa represents reciprocal to times of dilution. Each value indicates the mean ± SD of four determinations of specific [¹²⁵I]T₃ binding.

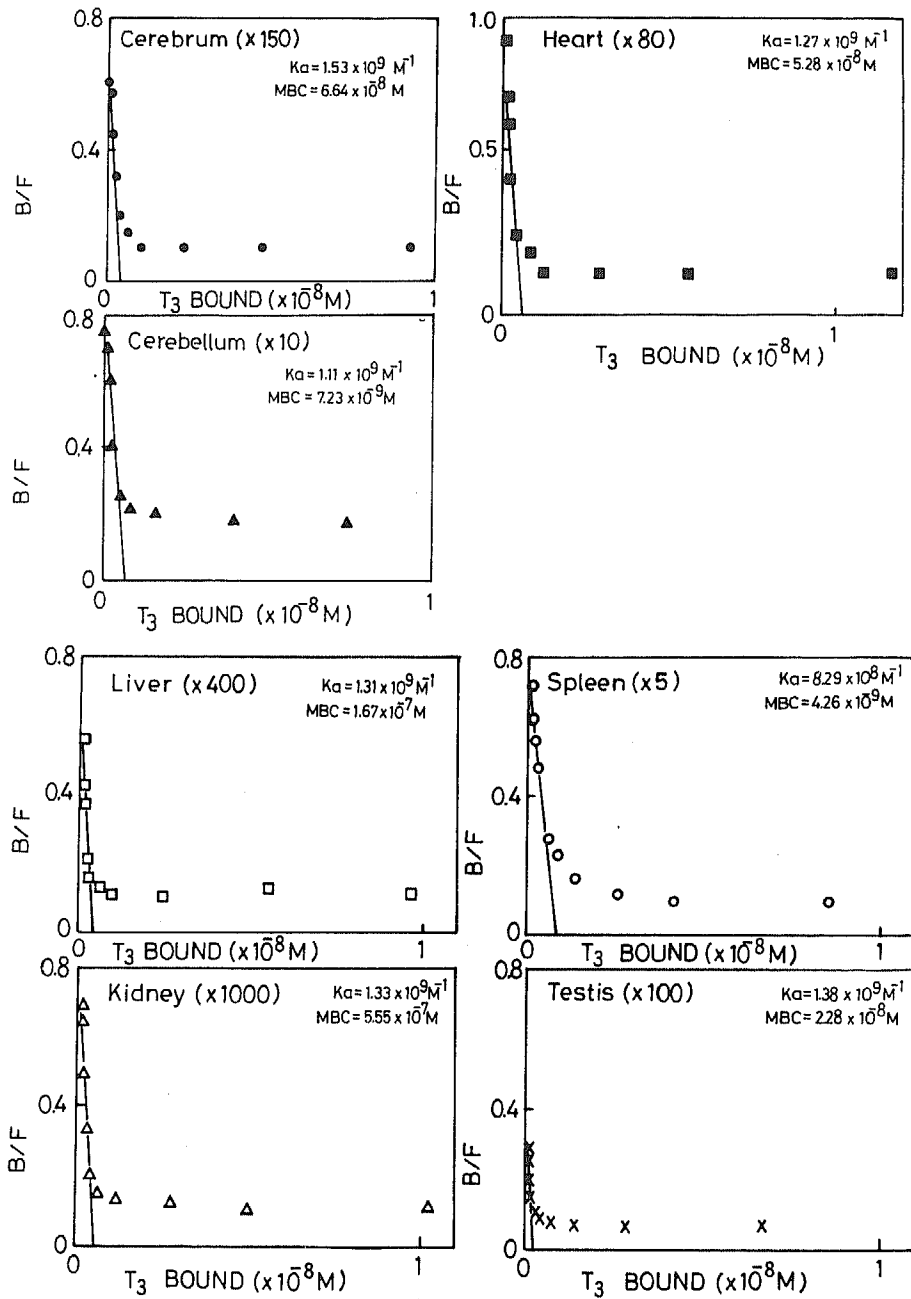


Fig. 2 Scatchard plots of NADPH-dependent [¹²⁵I]T₃ binding to charcoal-treated cytosol prepared from various tissues in rat

Data obtained from the competition-inhibition curve plotted were replotted by the method of Scatchard (14). These curves were analyzed according to a two-site model of receptor binding. The values of K_a and maximal binding capacity in each high affinity component are presented. Numbers in parentheses indicate times of dilutions of cytosol of each original tissue.

算した。各組織の細胞質を5~2,000倍に希釈しそれぞれへのNADPH依存性 $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ 特異的結合を求め、直線関係の得られる濃度の細胞質を用いてScatchard解析を行った¹⁴⁾。Scatchard解析を行うための T_3 結合実験は以下の方法で行った。方法は文献9)によった。50 μl の検体にNADPH 25 μl (最終濃度50 μM)、約 1×10^5 cpm (6.3×10^{-12} moles) の $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ 20 μl を加え、非放射性 T_3 (25 μl) (10^{-10} ~ 10^{-6} M) 存在下で0°C, 30分間インキュベーションした。その後、デキストラン活性炭法を用いて蛋白結合 T_3 と遊離ホルモンを分離し、それぞれの放射活性を測定した。デキストラン活性炭法はデキストラン T-70 1% (w/v)、活性炭 2% (w/v) をインキュベーションメディウムに加える前に0°Cに冷却したもの40 μl を使用した。このデキストラン活性炭法は細胞質非存在下で 10^{-4} Mの非放射性 T_3 存在下でも加えた $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ の99.5%が活性炭に吸収された。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。各組織、各発達段階における組織のCTBPの最大結合容量と親和性はScatchard解析を用い一次回帰直線より算出した¹⁵⁾。2群間の比較は、一元配置分散分析法を用い、それぞれP値が0.05以下を統計的に有意差があると推定した。

E その他の方法

蛋白濃度はLowryら¹⁶⁾の方法を用いて測定し、標準蛋白として牛血清アルブミンを用いた。DNA量の測定は、Burton¹⁷⁾の方法を用い、標準DNAとして牛胸線DNAを用いた。

III 結 果

A 活性炭処理細胞質分画におけるNADPH依存性高親和性甲状腺ホルモン結合蛋白の親和性

それぞれの組織でNADPH依存性 $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ 結合の存在が確認された。このNADPH依存性 $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ 結合活性は、細胞質の希釈倍率を高くすると、どの組織でも倍率と平行した比例関係が成立した。しかし、希釈倍率が低いと希釈倍率と結合活性の間の比例関係は認められずBound/Total (%)で約70~80%で最大値を示した (Fig. 1)。すなわち低希釈領域では加えたホルモン量に対し、過剰のCTBPが存在することを疑わせた。

このため比例関係の成立する希釈倍率で希釈した各組織でのNADPH依存性 T_3 結合についてScatchard

Table 1 Affinity constants for T_3 binding in the NADPH-dependent high affinity cytosolic T_3 binding protein in various tissues in adult rats

Tissues	$K_d (\times 10^6 \text{M}^{-1})$
Cerebrum	1.13 \pm 0.25 (6)
Cerebellum	1.11 \pm 0.23 (6)
Heart	1.13 \pm 0.21 (6)
Liver	1.21 \pm 0.15 (6)
Kidney	1.53 \pm 0.35 (6)
Testis	1.27 \pm 0.17 (5)
Spleen	0.61 \pm 0.22 (4)

The affinity constants were calculated from Scatchard plots of $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ binding to charcoal-treated cytosol of various tissues in adult rats. Each value indicates the mean \pm SD. The number in parentheses is the number of animals studied.

解析を行った。各発達段階における T_3 結合の活性も比例関係の成立する希釈された細胞質を用いてScatchard解析を行った。いずれの組織でも T_3 結合は高親和性低結合容量と低親和性高結合容量の2種類の成分に分けることができた (Fig. 2)。

各組織での高親和性CTBPの親和定数をTable 1に示した。成熟動物では脾臓を除いてそれぞれの組織間で有意差を認めなかった。脾臓でのNADPH依存性高親和性CTBPの親和性は他の組織のその約1/2であった。ここでは測定値を示さないが、各発達段階 (出生5日前より生後6週まで) におけるそれぞれの組織のNADPH依存性CTBPの親和性もほぼ同じ値を示し、各発達段階間の有意差は認められなかった。

B NADPH依存性高親和性細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白の組織分布

成熟ラットにおける各組織のNADPH依存性 T_3 結合の最大結合容量を組織重量あたり (moles/g tissue) (Fig. 3a) とDNAあたり (moles/ μg DNA) (Fig. 3b) に換算した。肝臓を1とした時の各組織の最大結合容量は組織重量あたりで、大脳0.28, 小脳0.04, 心臓0.32, 脾臓0.03, 腎臓2.61, 精巣0.15であり、またDNAあたりでは大脳1.2, 小脳0.06, 心臓2.05, 脾臓0.007, 腎臓2.75, 精巣0.16であった。DNAあたりの最大結合容量は大脳、心臓の間で有意差を認めなかった。肝では大脳、心臓より低い値が得られたが統計的には有意差が認められなかった。また小脳、脾臓、精巣では組織重量あたり、DNAあたりいずれでも他

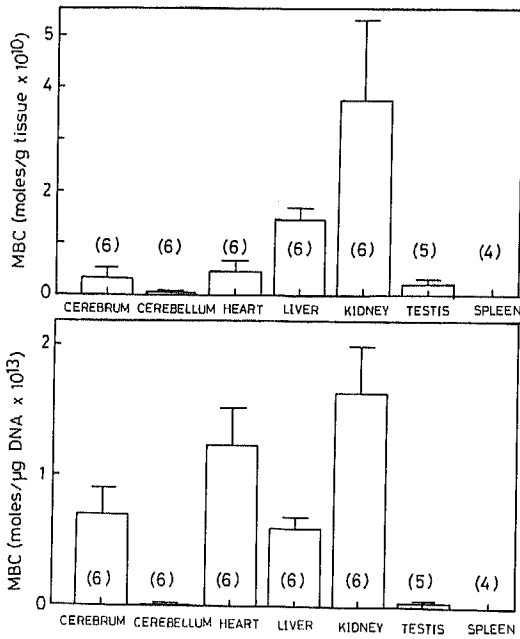


Fig. 3 Maximal binding capacity for T_3 in NADPH-dependent high affinity CTBP in various tissues

Each maximal binding capacity was determined by Scatchard analysis as described in methods and Fig. 2. The upper and lower panels show the maximal binding capacity of NADPH-dependent CTBP expressed per g tissue and per μg DNA, respectively. Each value indicates the mean \pm SD. Numbers in parentheses represented numbers of animals studied. Statistical significance of differences was determined by one way analysis of variance and was shown in Table 2.

Table 2 Comparison of the content of NADPH-dependent high affinity cytosolic T_3 binding-protein among various tissues in rats

Tissues	moles/g tissue						
	Cx	Ce	H	L	K	T	S
Cerebrum (Cx)	B	*	NS	*	*	NS	*
Cerebellum (Ce)	NS		*	*	*	NS	NS
Heart (H)	NS	*		*	*	NS	*
Liver (L)	NS	NS	NS		*	*	*
Kidney (K)	*	*	NS	*		*	*
Testis (T)	NS	NS	*	NS	*		NS
Spleen (S)	NS	NS	*	NS	*	NS	
	Cx	Ce	H	L	K	T	S
Tissues	moles/ μg DNA						

Statistically significant differences were determined by one way analysis of variance. Twenty one combinations between each different tissue are presented. Area A shows statistical differences between the concentrations normalized per g tissue of NADPH-dependent CTBP. Area B shows statistical differences between those normalized per μg DNA. (Cx; cerebrum, Ce; cerebellum, H; heart, L; liver, K; kidney T; testis, S; spleen) NS; Not significantly different. *; $p < 0.05$.

の組織に比べ結合容量は著しく低かった。各組織間の最大結合容量の有意差検定を行った結果を Table 2に示す。

C 脳の発達過程における NADPH 依存性 CTBP の変化

NADPH 依存性 CTBP は胎生期にすでに存在した。

大脳では組織重量あたりの最大結合容量、DNA あたりの最大結合容量ともに、出生前後で一過性に上昇するが、その後急激に減少し、生後 2 週間で最低値となりその後緩徐に上昇した。このように組織重量、DNA あたりの最大結合容量はそれぞれ成熟期と出生前後で高値を示した。一方小脳では T_3 結合活性は大

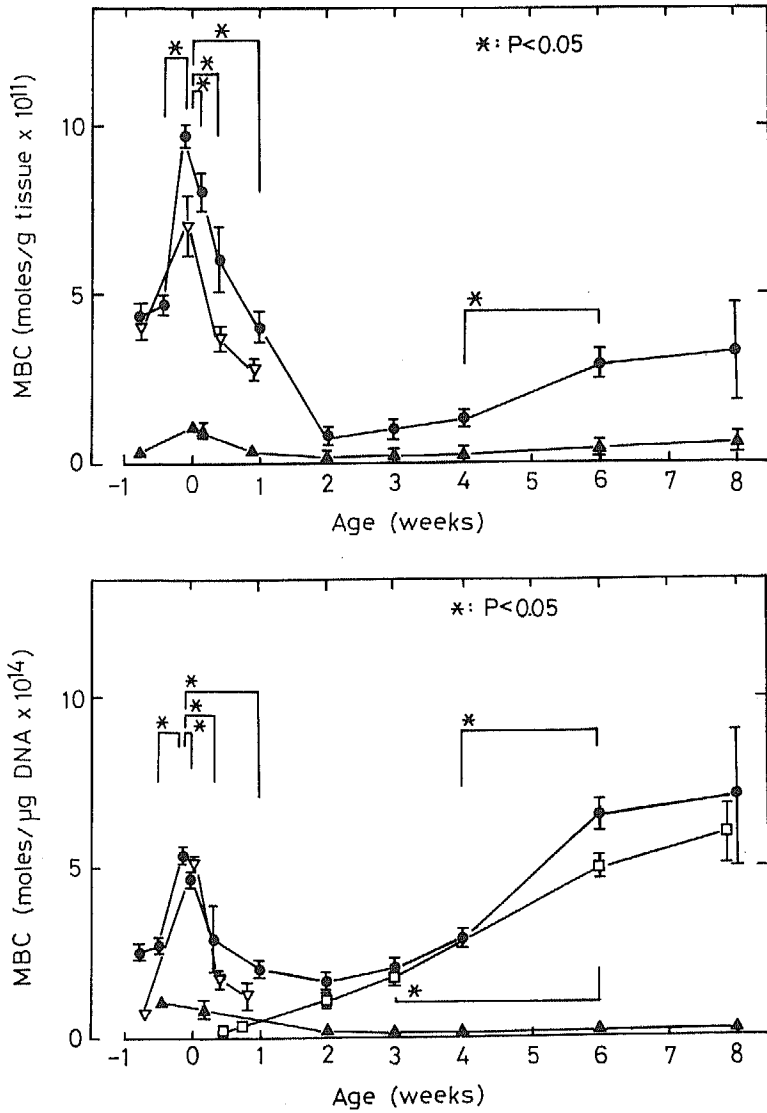


Fig. 4 Changes in the level of maximal binding capacity in NADPH-dependent CTBP in rat brain during development

Each datum was obtained from Scatchard plot of [¹²⁵I]T₃ binding to the charcoal-treated cytosol in whole brain (-▽-), cerebrum (-●-) and cerebellum (-▲-). The upper and lower panels show the changes in the maximal binding capacity of NADPH-dependent CTBP expressed per g tissue and per μg DNA, respectively. For comparison, changes in concentration of NADPH-dependent CTBP in liver (-□-) are also illustrated in the lower panel. The error bars indicate the standard deviations of the data determined for triplicate or quadruplicate determinations. Statistical significance of differences were determined by one way analysis of variance. Each value indicates the mean ± SD.

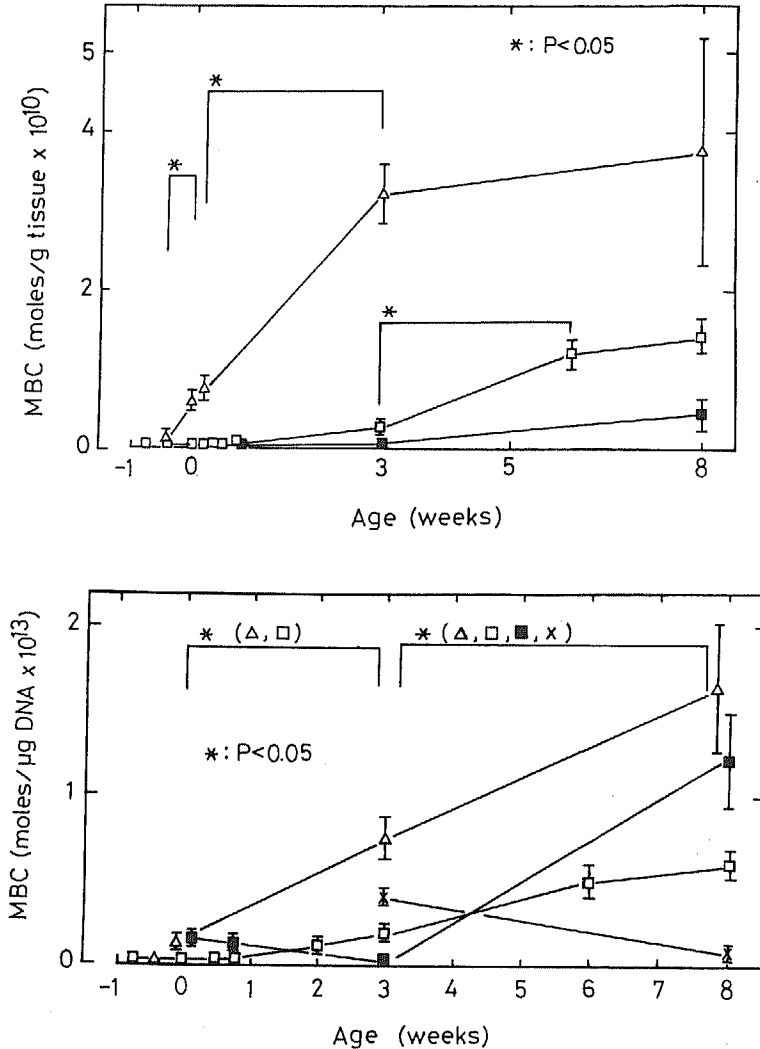


Fig. 5 Changes in the level of maximal binding capacity in NADPH-dependent CTBP in rat liver, kidney, heart and testis during development in rats.

Data were obtained from Scatchard plots of [¹²⁵I]T₃ binding to the charcoal-treated cytosol in heart (-●-), liver (-□-), kidney (-△-) and testis (-×-). The upper and lower panels show the changes in the maximal binding capacity of NADPH-dependent CTBP expressed per g tissue and per μg DNA, respectively. The error bars indicate the standard deviations of the data determined for triplicate determinations.

脳に比べ低かったが組織重量あたりの最大結合容量の変化は脳のそれと同じであった。小脳では胎生期のDNA量が出生後に比し低いため (Table 3), 全経過を通してDNAあたりの最大結合容量は胎生期にのみ最高値を示し、大脳でみられた2峰性は観察されなかった。脳全体 (大脳, 小脳を含めて) を用いて測定し

た最大結合容量の変化も出生前後で一過性の上昇を示した (Fig.4)。

D 肝, 心, 腎, 精巣の発達過程におけるNADPH依存性CTBPの変化

肝ではNADPH依存性CTBPは胎生期には認められず, 出生後4日目ではじめて測定可能となった。組

Table 3 DNA contents of various tissues in adult and developing rats

Tissues	DNA (mg/g tissue)										
	age (days)										
	-5 (2)	-3 (4)	-1 (4)	0 (5)	1 (5)	2 (5)	3 (5)	6 (5)	21 (5)	28 (5)	adult (6)
Whole brain	9.1			1.5			1.8	2.8			
Cerebrum	2.0	1.8	1.7	1.9	1.6	1.5	1.3	1.4	1.2	1.1	0.39±0.20
Cerebellum		0.3	0.9	1.0	1.1	1.4	1.5	1.2	3.2	2.8	1.81±0.43
Heart					0.4			0.4	1.9	1.5	0.40±0.18
Live	9.3			5.1		3.3		1.7	3.2	2.4	2.40±0.15
Kidney		7.6	5.5						4.3	4.4	2.40±1.03
Testis									7.7	4.7	2.16±0.21
Spleen											10.95±0.33

DNA in the homogenate of tissues were measured by the method of Burton (15). Values in adult rats (6 animals) are expressed as mean±SD, and values in developing rats are mean of 2 to 5 animals. The number in parentheses indicates the number of animals studied.

Table 4 Weight of various tissues in adult and developing rats

Tissues	Weight (g)						
	age (days)						
	-3	-1	+2	+5	+21	+28	adult
Cerebrum	0.11	0.12	0.18	0.28	1.06	1.11	1.16±0.13
Cerebellum	0.05	0.09	0.09	0.11	0.23	0.37	0.34±0.04
Heart	0.02	0.03	0.04	0.04	0.24	0.35	0.57±0.03
Liver	0.18	0.25	0.27	0.25	1.77	3.66	4.74±0.76
Kidneys	0.02	0.04	0.06	0.09	0.55	0.79	1.16±0.14
Testis					0.33	0.87	1.26±0.25
Spleen							0.37±0.07

Values in adult animals are expressed as mean ± SD, and values in developing rats are mean of 2 to 5 animals.

織重量あたり、DNA あたりの最大結合容量は、ともに以後徐々に上昇し6週目で成熟ラットのそれとなった。心、腎においても組織重量あたり、DNA あたりの最大結合容量の変化は肝臓における変化と類似した。しかし腎では微量の T_3 結合活性が胎生末期に認められ、また成熟ラットの最大結合容量に至るまでの時間は出生後3週目と肝、心に比し短かった。精巣では出生前の変化は検索し得なかったが生後より結合活性が認められた。しかし、生後3週から8週にかけてDNA あたりの最大結合容量は他の組織のそれが上昇する中で唯一減少傾向にあった (Fig. 5)。

E 各組織の個体の成長に伴う DNA 量の変化

成熟ラットの各組織の単位重量あたりの DNA 量は脾臓が最も高く、以下腎臓、肝臓、精巣、小脳と続い

た。大脳、心臓は、腎臓、肝臓の約 1/6 の量であった (Table 3)。発達過程における各組織の単位重量あたりの DNA 量は胎生期では成熟期のそれと比べてどの臓器でも高く、成長にしたがって減少する傾向が認められた (Table 3)。

各組織の重量は個体の成長とともに増加したが大脳、小脳は生後約1カ月ではほぼ成熟ラットの重量になりその後の増加はみられなかった (Table 4)。

IV 考 察

細胞質に甲状腺ホルモンを結合する蛋白が存在することは以前より報告されており、その構造あるいは酵素活性などから Pyruvate kinase (EC 2. 7. 1. 40) (M_2)¹⁸⁾, L-thyroxine 5'-deiodinase¹⁹⁾などと類似して

いることが報告されていた。しかし、これらとはまったく異なった NADPH 依存性細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白 (NADPH-dependent CTBP) が発見された⁹⁾。各組織で NADPH 依存性 CTBP は、少なくとも 2 種類の型に分けることができた。すなわち T_3 に対する高親和性と低親和性の 2 つの成分である。Scatchard 分析上、低親和性成分が高親和性成分に影響を与えていることは確かであるが、それぞれの検体で低親和性成分は少なく、また組織間でこの成分の親和性はほぼ同じであるため、この成分を無視して高親和性結合の親和性、最大結合容量を算出した。本研究での高親和性 CTBP の親和性が精製 CTBP の親和性¹⁰⁾よりも低いのはこのためであると考えられる。脾臓の NADPH 依存性 T_3 結合は negative cooperativity を示したが、これは総結合活性が低く、かつ高親和性成分に対する低親和性成分の比率が高いためと思われた。この場合も低親和性成分を無視して高親和性成分の親和性を算出したため必ずしも得られた親和性が正しいものとは言えない。しかし、比較のためにこれを提示した。

高親和性 CTBP の T_3 に対する親和性が、核受容体の親和性⁶⁾ とほぼ同じ値を示すことは、この蛋白が甲状腺ホルモンの作用に調節的な役割を担っていることの 1 つの裏づけといえる。この高親和性蛋白の親和性は各組織間で有意差が認められず、またそれぞれの組織での、各成長期に伴う変化も認められなかった。核受容体の T_3 に対する親和性も、各組織、各成長期で変化を認めない²⁰⁾。しかしながら、 T_3 に対する親和性が一定であっても、核受容体をコードする遺伝子はクロモソーム 17 と 3 に局在し、これに伴ってそれぞれ異なる 2 種類の型 $\alpha^{21)$ 、 $\beta^{22)}$ が存在する。さらに、それぞれの発現は組織別にまた成長期により異なるとされている²³⁾。このような報告に基づいて推測すると、CTBP にも遺伝子レベルでの多様性が存在する可能性がある。すなわち NADPH 依存性 CTBP の遺伝子発現が組織、年齢によって異なる可能性があると考えられる。しかし、詳細は不明である。

成熟ラットの甲状腺ホルモン核受容体の DNA あたりの最大結合容量は、組織によって異なり、下垂体が最も高く、肝臓、腎臓、心臓、脳とつづき脾臓、精巣ではほとんど認められない²⁴⁾²⁵⁾。最近の報告では、腎臓の最大結合容量は脳、心臓のそれより低いとされているが、脾臓、精巣の最大結合容量は少ないとされている²³⁾。NADPH 依存性高親和性 CTBP の DNA

あたりの最大結合容量は腎臓で高く、以下心臓、大脳、肝臓とつづくが、これら 3 組織間での最大結合容量に有意差を認めていない。これに対し小脳、精巣、脾臓では著しく低い。この結果は核受容体の DNA あたりの最大結合容量の組織分布と同様、甲状腺ホルモンの作用するとされている組織²⁶⁾に、特異的に高い結合容量が存在することを示していると思われる。したがって、核受容体のみならず CTBP も甲状腺ホルモンの働きに直接関与している可能性を示唆する。一方、核受容体と違い NADPH 依存性 CTBP は腎臓、心臓といったエネルギー代謝の盛んな組織に特に多く、CTBP が甲状腺ホルモンの熱産生作用にも関与している可能性があると考えられた。しかしこの点については未だ不明である。

新生児に発症する原発性甲状腺機能低下症 (クレチン症) のおもな臨床症状の 1 つは精神発達の非可逆的な遅延である。甲状腺ホルモンが中枢神経系の発達に深く関与していることは、古くから知られており、数多くの研究が成されてきた²⁷⁾²⁸⁾。クレチン症は出生直後での甲状腺ホルモン不足が発症の原因と考えられている。甲状腺ホルモン核受容体の面からは、ラット大脳、小脳²⁰⁾、ラット肝²⁹⁾、ヒト脳、肺³⁰⁾、ラット肺³¹⁾の成長に伴う変化が報告されている。ラット脳では DNA あたりの最大結合容量は出生約 8 日前に出現し、出生 2 日前には成熟期とほぼ同量が存在し、生後 2 日から 6 日で一過性に約 2 倍に増え、以後徐々に減少する。この一過性の受容体の上昇が中枢神経系の発達に関与すると考えられている²⁰⁾。一方、肝臓では出生約 5 日前より出現し、一過性の上昇を示さずに成熟期まで徐々に増加する²⁹⁾。

Geel³²⁾は小脳では細胞分化の進む生後間もない頃には細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白の最大結合容量はほとんど変化しないが、親和性は徐々に低下し、肝臓では親和性はさほど変化しないが、最大結合容量は発育とともに上昇すると報告している。しかしながら彼の示した細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白は、親和定数が $0.88 \sim 6.40 \times 10^7 M^{-1}$ と低く、生理的意味はないと考えられ、この組織間の細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白の性状の変化に生理的な意味づけは不可能であると考えられる。

NADPH 依存性 CTBP の成長に伴う変化は、核受容体のそれに類似している。すなわち、DNA あたりの最大結合容量は中枢神経系では出生 5 日前から成熟ラットの 30% 以上にあり、中枢神経系の発達が著しい

出生前後で一時的に増加する。これに対し肝臓での成長に伴う変化は出生時には測定限界以下であったが徐々に増加し、成熟期の最大結合容量に近づく。腎臓、心臓での最大結合容量の変化もほぼ肝臓と同じ傾向を示した。これらのことから核受容体と同様、CTBPも中枢神経系の発達に深くかかわっていることが推測されたが、大脳、小脳におけるCTBPの一時的増加の時期が核受容体のそれよりも早いことは、中枢神経系発達における核受容体とは異なったCTBPの特異的役割が存在することを示すと考えられる。

甲状腺ホルモンの作用は、おもに細胞内核受容体とホルモンが結合し、遺伝子発現が促進されることにより現れる。したがって、核受容体に実際に占める T_3 の量は、甲状腺ホルモン作用の強さを表す1つの目安と考えられる。正常ラットにおいて各組織間で核受容体の30~50%は T_3 と結合した形で存在することが知られている²⁴⁾。一方、細胞質の T_3 含量²⁵⁾から算出すると存在する T_3 が1:1でCTBPにすべて結合すると仮定した場合、CTBPの量に対するCTBP- T_3 結合型の量の占める割合は平均約5.4%ときわめて低く、生理的条件下では、細胞質に存在する T_3 のほとんどが結合型として存在すると考えられる。このことは、ホルモン結合蛋白としての核受容体の多くの分子がホルモンの占有されていることから考えると、NADPH依存性CTBPの生理的な意味はやや異なるものであることを示している。

核受容体はNADPHなどのピリジヌクレオチドでそのホルモン活性は影響されない。したがってNADPH依存性CTBPと核受容体とは異なるものと推測される。NADPH依存性CTBPはdithiothreitol存在下でNADPによっても活性化される。これら2種類のCTBPの活性型は異なった作用を有すると推測されている。すなわちNADPH依存性に活性化さ

れたCTBPは細胞内 T_3 の濃度の維持に関与し、NADPH依存性に活性化されたCTBPは、 T_3 の核への輸送蛋白として作用すると考えられている³⁴⁾。このためNADPH依存性高親和性CTBPの量は細胞内 T_3 濃度の維持のみではなく核受容体への T_3 の輸送をも促進すると考えられる³⁴⁾。本研究ではNADPH活性型については観察し得なかったが、核への T_3 の作用を検討する上では今後詳細な研究が必要であろう。

中枢神経系発達における甲状腺ホルモンの作用はきわめて重要である。CTBP依存性の中枢神経系の特異的発達が存在する可能性が示されたが、不明な部分はまだ多い。CTBPの機能などを含めて今後詳細な検討が必要であろう。

V 結 語

NADPH依存性高親和性CTBPの組織分布、各組織の成長過程における変化は、ほぼ甲状腺ホルモン核受容体のそれと類似していた。しかし、核受容体のそれらに比べ成熟ラットでは腎、心で最大結合容量が高く、また出生前後で一過性に中枢神経系で高くなっていた。これらのことよりNADPH依存性高親和性CTBPは甲状腺ホルモンの作用する標的組織に多く、特に中枢神経系では、この発達に関与するホルモンの作用出現時に上昇していることが示された。以上NADPH依存性高親和性CTBPには、組織特異的な量、また個体の発生過程により最大結合容量が変化することなどの多様性が存在する可能性が示された。

本稿の要旨は平成3年6月、第64回日本内分泌学会総会で発表した。

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

文 献

- 1) Schwartz, H. L.: Effect of thyroid hormone on growth and development. In: Oppenheimer, J. H. and Samuels, H. H. (eds.), Molecular basis of thyroid hormone action, pp. 413-444, Academic Press, New York, 1983
- 2) Galton, V. A.: Thyroid hormone action in amphibian metamorphosis. In: Oppenheimer, J. H. and Samuels, H. H. (eds.), Molecular basis of thyroid hormone action, pp. 445-484, Academic Press, New York, 1983
- 3) Guernsey, D. L. and Edelman, I. S.: Regulation of thermogenesis by thyroid hormones. In: Oppenheimer, J. H. and Samuels, H. H. (eds.), Molecular basis of thyroid hormone action, pp. 293-324, Academic Press, New York, 1983

- 4) Surks, M. I., Koerner, D., Dillmann, W. and Oppenheimer, J. H.: Limited capacity binding sites 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, 1973
- 5) Samuels, H. H. and Tsai, J. S.: Thyroid hormone action in cell culture: Demonstration of nuclear receptors in intact cells and isolated nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70: 3488-3492, 1973
- 6) DeGroot, L. J. and Toressani, L.: Triiodothyronine binding to isolated liver cell nuclei. *Endocrinology*, 96: 357-369, 1975
- 7) Apriletti, J. W., Eberhardt, N. L., Latham, K. R. and Baxter, J. D.: Affinity chromatography of thyroid hormone receptors. *J Biol Chem*, 256: 12094-12101, 1981
- 8) Bolger, M. B. and Jorgensen, E. C.: Molecular interactions between thyroid hormone analogues and the rat liver nuclear receptor. *J Biol Chem*, 255: 10271-10278, 1980
- 9) Hashizume, K., Kobayashi, M. and Miyamoto, T.: Active and inactive forms of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T3)-binding protein in rat kidney cytosol: Possible role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in activation of T3 binding. *Endocrinology*, 119: 710-719, 1986
- 10) Hashizume, K., Miyamoto, T., Ichikawa, K., Yamauchi, K., 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
- 11) 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 (T3)-binding protein (CTBP) in rat kidney: Specialized functions of two CTBPs in intracellular T3 translocation. *J Biol Chem*, 269: 4864-4871, 1989
- 12) Hashizume, K., Miyamoto, T., Yamauchi, K., Ichikawa, K., Kobayashi, M., Ohtsuka, H., Sakurai, A., Suzuki, S. and Yamada, T.: Counter-regulation of nuclear 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T3) binding by oxidized and reduced-nicotinamide adenine dinucleotide phosphates in the presence of cytosolic T3 binding in vitro. *Endocrinology*, 124: 1678-1683, 1989
- 13) Hashizume, K., Miyamoto, T., Kobayashi, M., Suzuki, S., Ichikawa, K., Yamauchi, K., Ohtsuka, H. and Takeda, T.: Cytosolic 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine (T3) binding protein (CTBP) regulation of nuclear T3 binding: Evidence for the presence of T3-CTBP complex-binding sites in nuclei. *Endocrinology*, 124: 2851-2856, 1989
- 14) Scatchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci*, 51: 660-672, 1949
- 15) Kahn, C. R.: Membrane receptors for peptide hormones. In: DeGroot, L. J. (ed.), *Endocrinology*, pp. 40-57, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1989
- 16) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 266-275, 1951
- 17) Burton, K.: Study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J*, 62: 315-319, 1956
- 18) Kato, H., Fukuda, T., Parkinson, C., Mcphie, P. and Cheng, S.-H.: Cytosolic thyroid hormone-binding protein is a monomer of pyruvate kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 7861-7865, 1989
- 19) Goswami, A. and Rosenberg, I. N.: Iodothyronine 5'-deiodinase in rat kidney microsomes: Sensitivity to propylthiouracil. *Endocrinology*, 123: 2774-2781, 1988
- 20) Schwartz, H. L. and Oppenheimer, J. H.: Ontogenesis of 3,5,3'-triiodothyronine receptors in neonatal rat brain: Dissociation between receptor concentration and stimulation of oxygen consumption by 3,5,3'-triiodothyronine. *Endocrinology*, 103: 943-948, 1978

- 21) Sap, J., Muñoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H. and Vennström B.: The *c-erb-A* protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature*, 324: 635-640, 1986
- 22) Weinberger, C., Thompson, C. C., Ong, E. S., Lebo, R., Gruol, D. J. and Evans, R. M.: The *c-erb-A* gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature*, 324: 641-646, 1986
- 23) Strait, K. A., Schwartz, H. L., Perez-Castillo, A. and Oppenheimer, J. H.: Relationship of *c-erb-A* mRNA content to tissue triiodothyronine nuclear binding capacity and function in developing and adult rats. *J Biol Chem*, 265: 10514-10521, 1990
- 24) Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L. and Surks, M. I.: Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: Liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen and testis. *Endocrinology*, 95: 897-903, 1974
- 25) Eberhardt, N. L., Valcana, T. and Timiras, P. S.: Triiodothyronine nuclear receptors: An *in vitro* comparison of the binding of triiodothyronine to nuclei of adult rat liver, cerebral hemisphere, and anterior pituitary. *Endocrinology*, 102: 556-561, 1978
- 26) DeGroot, L. J., Larsen, P. R., Refetoff, S. and Stanbury, J. B.: Hormone synthesis, secretion, and action. In: *The thyroid and its diseases*, pp. 36-117, John Wiley and Sons, New York, 1984
- 27) Fisher, D. A. and Klein, A. H.: Thyroid development and disorders of thyroid function in the newborn. *N Engl J Med*, 304: 702-712, 1981
- 28) Miyamoto, T., Hashizume, K., Ichikawa, K., Yamauchi, K., Nishii, Y., Sakurai, A., Kobayashi, M., Ohtsuka, H. and Yamada, T.: Effect of thyroid hormone on the protein inhibitors for Ca²⁺-dependent proteinase in brain: Evidence for the induction of irreversible changes in immature rats. *Endocrinology*, 123: 1916-1922, 1988
- 29) DeGroot, L. J., Robertson M. and Rue, P. A.: Triiodothyronine receptors during maturation. *Endocrinology*, 100: 1511-1515, 1977
- 30) Bernal, J. and Pekonen, F.: Ontogenesis of the nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptor in the human fetal brain. *Endocrinology*, 114: 677-679, 1984
- 31) Perez-Castillo, A., Bernal, J., Ferreiro, B. and Pans, T.: The early ontogenesis of thyroid hormone receptor in the rat fetus. *Endocrinology*, 117: 2457-2461, 1985
- 32) Geel, S. E.: Development-related changes of triiodothyronine binding to brain cytosol receptors. *Nature*, 269: 428-430, 1977
- 33) van Doorn, J., van der Heide, D. and Roelfsema, F.: Sources and quantity of 3,5,3'-triiodothyronine in several tissues of the rat. *J Clin Invest*, 72: 1778-1792, 1983
- 34) Hashizume, K., Suzuki, S., Ichikawa, K. and Takeda, T.: Purification of cytosolic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T3)-binding protein (CTBP) which regulates nuclear T3 translocation. *Biochem Biophys Res Commun*, 174: 1084-1089, 1991

(3. 4. 19 受稿)