

綜 説

細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白質：
その性状と役割

橋 爪 潔 志

信州大学医学部老年医学教室

Role of Cytosolic Thyroid Hormone-Binding
Protein in Thyroid Hormone Action

Kiyoshi HASHIZUME

Department of Geriatrics, Endocrinology and Metabolism,
Shinshu University School of Medicine

Key words: 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (L-T₃), cytosolic T₃-binding protein (CTBP), nuclear T₃ receptor (NT₃R), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, CTBP-acceptor protein

3,5,3'-トリヨード-L-チロニン (L-T₃), 細胞質 T₃-結合蛋白質 (CTBP), 核 T₃受容体 (NT₃R), ニコチン酸アミド-アデニン-ジ-ヌクレオチド-リン酸, 細胞質 T₃-結合蛋白質受容蛋白

I はじめに

甲状腺ホルモンは、細胞増殖¹⁾, 分化²⁾, エネルギー代謝³⁾など細胞の持つ多くの機能に関与する。その作用機序の解明は、核受容体 (Nuclear 3,5,3'-triiodo-L-thyronine receptor) (NT₃R) の発見以来⁴⁻⁶⁾, 飛躍的に進んでいる。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たのも事実である。たとえばホルモン応答性遺伝子と受容体との相互関係⁷⁻¹⁰⁾, 受容体機能の核蛋白による修飾¹¹⁻¹³⁾などである。この研究分野に関しては、共同研究者の市川の綜説に詳しく述べられているので参照されたい¹⁴⁾。NT₃R が甲状腺ホルモンの情報処理に重要であることが判明したが、細胞内でのホルモン輸送機構は不明のままであった。著者らは、細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白質 (Cytosolic T₃-binding protein) (CTBP) に着目し、その機能について分析を行ってきた。著者らの研究成果をまとめてみたい。

II 細胞内甲状腺ホルモン結合蛋白質の特徴

現在までに、数種類の細胞内甲状腺ホルモン結合蛋白質

が分離されている。それぞれは、細胞内での局在性、機能によって分子構造が異なる。また、同一機能を有していても、種、組織、個体の年齢によって分子構造が異なる¹⁵⁾⁻²²⁾。とはいえ、native な形で精製された結合蛋白質は少なく、同一機能を有した結合蛋白質といえどもさらに分化した機能がそれぞれに付加される可能性は少なくない。機能的に分類するとおおよそ次の2種類に分けられる。1つは甲状腺ホルモン作用に直接関連する受容体で、これには NT₃R の他に、ミトコンドリア受容体 (MT₃R)²²⁾, 細胞膜受容体 (PMTR)²³⁾などがある。もう1つは細胞内甲状腺ホルモン輸送蛋白である。

NT₃R に関しては市川の綜説に詳しい¹⁴⁾。MT₃R, PMTR に関しては、著者らもホルモン結合活性を認めてはいるが²²⁾²⁴⁾, ホルモン作用に直接関連した情報処理機能を両分子に確認できないため、果たして受容体と言い得るか否か、問題が残されている (注1)。(注1) ホルモン受容体とは、ホルモンを結合するばかりでなく、ホルモン情報を別の形に修飾し、その作用を増幅する機能を有する物質、あるいは機構である。したがって MT₃R, PMTR が受容体か否かは判明し

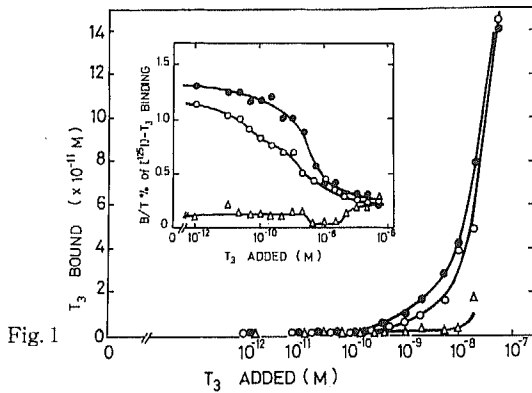


Fig. 1

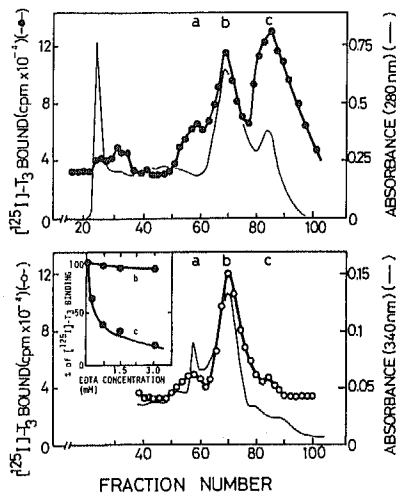


Fig. 2

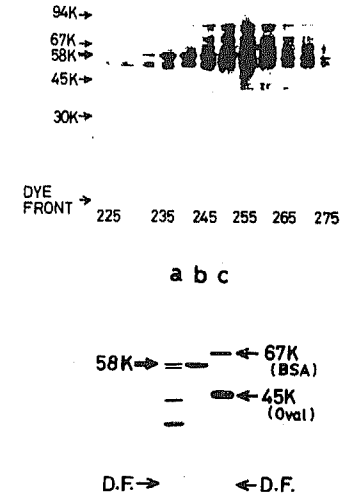
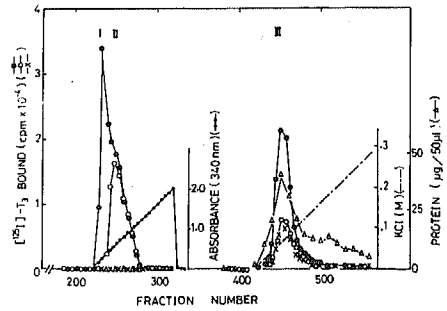


Fig. 3

Fig. 1 T_3 binding to isolated rat kidney nuclei. $[^{125}I]$ T_3 binding to the nuclei ($90 \mu\text{g}$ DNA) was measured in the presence of various concentrations of unlabeled T_3 . The assay was performed in the absence (●) or presence (○) of charcoal-treated cytosol ($30 \mu\text{g}$ protein). The binding was also measured in the presence of combination of charcoal-treated cytosol with heat-treated cytosol (the amount added was equivalent to that of charcoal-treated-cytosol) (△).

Fig. 2 Sephadex G-50 column chromatography of T_3 binding activating factors. Rat kidney boiled cytosol was applied to a Sephadex G-50 column (2.0×60 cm). After elution, activation of T_3 binding was measured in each fraction in the absence (upper panel) or presence of 1.0 mM EDTA (lower panel). CTBP (partially purified by a Sephacryl S-200 column chromatography) ($52 \mu\text{g}$ protein) was incubated with a $100 \mu\text{l}$ aliquot of each fraction and $[^{125}I]$ T_3 ($200,000$ cpm). In the absence of EDTA, three different T_3 binding activating factors (a, b, and c in upper panel) were separated. Inset in the lower panel shows the effect of EDTA on stimulation of T_3 binding by factor b or c. The specific binding is illustrated. Absorbance at 280 nm (upper panel) and at 340 nm (lower panel) were monitored.

Fig. 3 Purification of CTBP.

Upper panel : CTBP partially purified by Q-Sepharose was further purified by column chromatography with Blue Sepharose CL-6B. $[^{125}I]$ T_3 binding activity was measured in the presence (●) or absence (○) of $25 \mu\text{M}$ NADPH in each fraction. The non-specific binding is also illustrated in the presence of NADPH (X). Middle panel : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of each fraction obtained in upper panel. Lower panel : SDS-PAGE of CTBP obtained by Blue-Sepharose (lane a) and by final purification with Sephacryl S-200 column chromatography (lane b). D. F. indicates dye front.

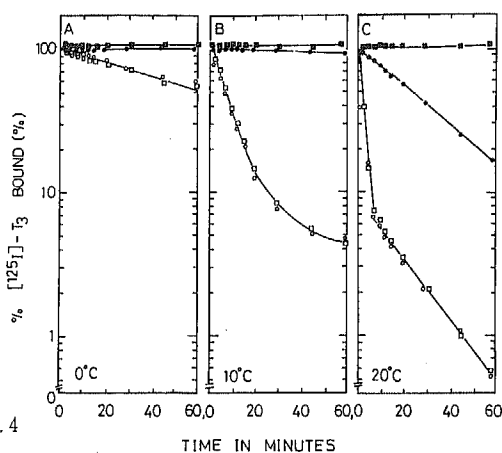


Fig. 4

Fig. 4 Dissociation of $[^{125}\text{I}] \text{T}_3$ from CTBP.

$[^{125}\text{I}] \text{T}_3$ -saturated CTBP (0.004 μg protein) was incubated in the absence (open symbols) or presence (closed symbols) of 25 μM NADPH. Circles and squares indicate $[^{125}\text{I}] \text{T}_3$ bound to CTBP in the presence or absence of 10^{-9}M unlabeled T_3 , respectively.

Fig. 5 T_3 binding activity in purified CTBP.

Upper panel: Effects of NADPH analogues on $[^{125}\text{I}] \text{T}_3$ binding. Specific bindings are illustrated. *Lower panel*: Effects of iodothyronine analogues on $[^{125}\text{I}] \text{T}_3$ binding to CTBP in the presence of 25 μM NADPH. The purified CTBP (0.012 μg protein) was incubated with $[^{125}\text{I}] \text{T}_3$ ($1.5 \times 10^{-10}\text{M}$).

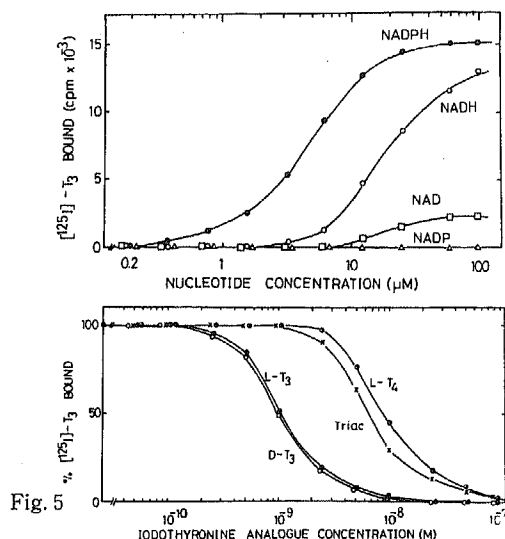


Fig. 5

ていない。) 甲状腺ホルモン作用は、種々の細胞内小器官に及ぶが、それらの多くは NT_3R を介した蛋白新生による調節現象と捉えられることが少なくない²⁵⁾。たとえば、ミトコンドリア蛋白合成²⁵⁾, $\text{Ca} \text{ ATPase}$ ²⁶⁾, Peroxisomal flavin enzymes²⁷⁾, モノアミン酸化酵素²⁸⁾, Ca 依存性蛋白分解酵素²⁹⁾, Phosphatidylinositol 特異性 phospholipase C³⁰⁾, などに対する甲状腺ホルモンの調節は甲状腺ホルモン依存性に産生された蛋白によるものと思われる。したがって、 MT_3R , PMTR の生理的意義は、今後、解明されるものである。 NT_3R を介した遺伝子発現によって誘導される蛋白も少なからず同定されている。たとえば甲状腺刺激ホルモン (TSH)³¹⁾, ラット成長ホルモン (GH)³²⁾³³⁾, ラット肝 Spot 14³⁴⁾, リンゴ酸酵素³⁵⁾, 心筋ミオシン重鎖³⁶⁾ などである。一方、細胞内甲状腺ホルモン輸送蛋白は受容体とは異なった蛋白で CTBP の 1 つの活性型として捉えられることを著者らはラット腎を用いて明確にした。次にこの CTBP の多様性とその機能について論じたい。

III 細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白の多様性

CTBP の研究は、生体内に存在する甲状腺ホルモンが L-T_3 , $\text{L-thyroxine (L-T}_4)$ であることが判明されるのと同時に始まっている³⁷⁾。まずはじめに、ホルモン受容体としての機能蛋白の分離が細胞膜、細胞内小器官そして細胞質で試みられた。この中で容易に得られたのが CTBP であった³⁸⁾。多くの研究者によりその精製と機能の解明が試みられた³⁹⁾。しかし、この蛋白の興味は、急速に薄れていった。精製途中で結合活性が消失するため、CTBP は人工産物の可能性もあると考えられ、一方、細胞核に L-T_3 との親和性が高い NT_3R が発見され、この蛋白に研究が集中したためである³⁹⁾⁴⁰⁾。しかし、 NT_3R を中心とした研究の中で、CTBP の機能の見直しが迫られる事実が発見された。著者らは CTBP がいわゆる人工産物ではないことを証明した。すなわち、 L-T_3 結合活性を著しく上昇させる内因性物質を発見し、この物質の存在下では、CTBP の活性は消失しないことを認めたのである⁴¹⁾。一方、著者らとは別に核への L-T_3 の移行を調

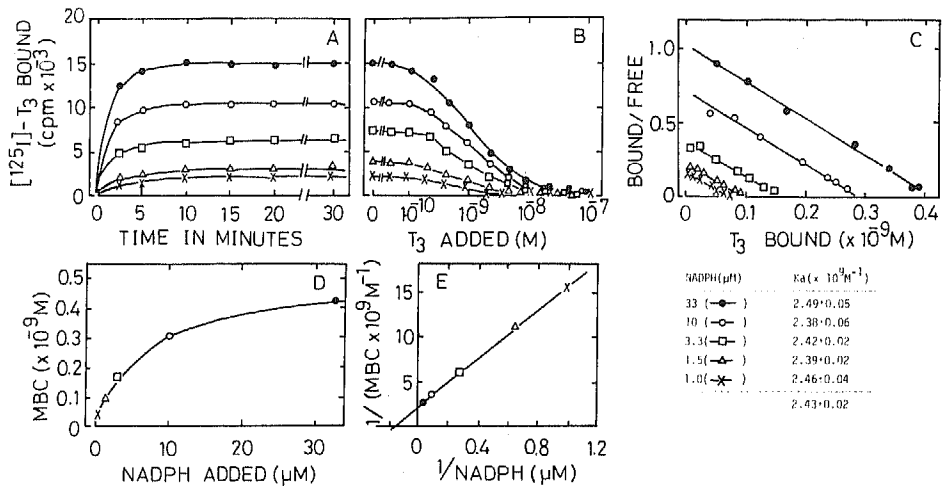


Fig. 6 Characteristics of T_3 binding activity in purified CTBP. A: Time course of $[^{125}\text{I}] T_3$ binding to the purified CTBP ($0.012 \mu\text{g}$ protein were added) at 0°C . Specific binding is illustrated. B: Displacement of $[^{125}\text{I}] T_3$ binding by various concentrations of unlabeled T_3 . Incubation was carried out for 30 min. at 0°C . C: Scatchard analyses of T_3 binding, which were obtained from the data shown in Fig. 6-B. D: Effect of various concentrations of NADPH on the maximal T_3 binding capacity in purified CTBP. E: Double reciprocal analysis of maximal binding capacity for T_3 and NADPH concentration, which was obtained from the data of Fig. 6-D.

節する蛋白が細胞質に発見された^{40,42}。著者らはこの調節蛋白が内因性活性化物質で活性化されたCTBPであることを確認した (Fig. 1)⁴³。CTBPが NT_3R への $L-T_3$ の結合, または核への $L-T_3$ の移行を調節する蛋白であることが明確になり, ホルモン作用におけるCTBPの役割が無視できなくなったのである。また, 核以外の標的小器官としてミトコンドリアへの $L-T_3$ の移行もこの活性型CTBPによって調節されることが証明された⁴⁴。

この一連の研究で少なくとも3種類のCTBP活性化因子が発見された^{41,45}。これらは熱処理に対し比較的安定であった。その1つは, 二価陽イオンであった。 Ca^{2+} が最も強力な活性化作用を有し⁴¹, 他の活性化因子の作用を相乗的に増加させる作用を示した⁴⁶。この二価イオン以外の活性化因子の単離, 精製が必要であった。これらの物質の1つ (Fig. 2 b) は 340nm に最大吸収を示し, phosphatase 処理により不活化され, 分子量が約 $600\sim 900$ と算出されたため, NADPHであろうと推測された⁴¹。外因性NADPHとこの内因性活性化因子の作用を比較したところ活性化機序に差を認めず内因性因子はNADPHであると断定できた

のである⁴¹。この発見によりCTBPには活性型と非活性型とが存在し, 従来いわれた精製段階での結合活性の消失はそれぞれの段階での活性化因子の除去による結果であったことが判ったのである (Fig. 2, 3)。もう1つのCTBP活性化因子 (Fig. 2 a) は収量が著しく少ないため, 未だその本体は不明である。おそらく後述するようなNADPのごとくCTBPの機能決定にかかわるものと著者らは考えている。

IV 細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白の精製とその性状

著者らは, 次の2点に着目してCTBPの精製を試みた。すなわちチャコール処理によりCTBPが不活化されること, 次にNADPHによる活性化は, NADPHのCTBPへの結合によるということである。チャコール処理により, ラット腎 $100,000\text{mg}$ 上清に存在する $L-T_3$ 結合活性の90%以上が消失する⁴¹。Q-Sepharoseを用いたイオン交換クロマトグラフィーで分離すると約 0.2M KClでNADPH依存性CTBPが溶出された。Blue Sepharoseを用いた affinity column chromatography でさらに精製するとCTBPは,

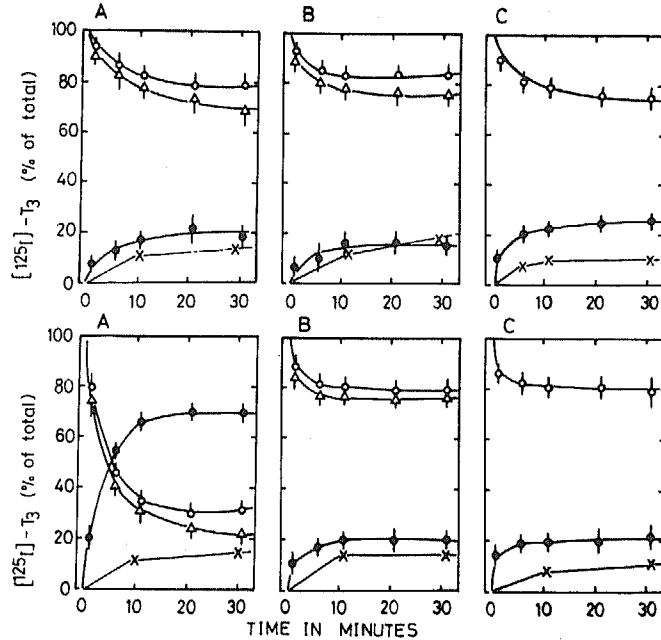


Fig. 7 $[^{125}\text{I}] \text{T}_3$ -CTBP complexes binding to nuclei treated with DNase I.

Upper panel : Binding of complexes to nuclei treated with DNase I and 0.38 M KCl-containing buffer. *Lower panel* : Binding of complexes to nuclei treated with DNase I and 0.5 M NaCl-containing buffer. Binding of NADP-activated CTBP- $[^{125}\text{I}] \text{T}_3$ complex (A), NADPH-activated CTBP- $[^{125}\text{I}] \text{T}_3$ complex (B), and $[^{125}\text{I}] \text{T}_3$ (C) to nuclei are illustrated. The total radioactivity (○) in the supernatant, $[^{125}\text{I}] \text{T}_3$ bound to CTBP (△), $[^{125}\text{I}] \text{T}_3$ retained to nuclei (●) and non-specific binding (×) of $[^{125}\text{I}] \text{T}_3$ are shown.

5~6 μM の NADPH で溶出された⁴⁷⁾。この CTBP は 32.5 Å のストークス半径、また、4.7 S の沈降定数を有し、分子量は約 58,000 で球状に近い蛋白であると推測された。得られた精製標品は SDS-polyacrylamide 電気泳動法で 58 kDa の単一蛋白として同定された (Fig. 3)。

従来 CTBP は、L- T_3 との親和性が NT₃R のそれに比べ約 1/100 であることからホルモン結合蛋白としてはきわめて結合能の低い蛋白とされていた³⁹⁾⁴⁸⁾。しかし、NADPH 存在下では精製 CTBP と L- T_3 との親和性 ($K_a = 2.43 \times 10^9 \text{M}^{-1}$) は NT₃R と L- T_3 のそれとほぼ同じ値を示した⁴⁷⁾。これは、NT₃R と CTBP との間で、ホルモンとしての生理的作用を有する L- T_3 に対し、1 : 1 の力で競合作用が生じることを示す重要な発見となった。CTBP からの L- T_3 の解離は NADPH 存在下では認められないが、NADPH 濃度を下げることにより段階的に解離が進み、解離定数の

算定から 2 種類の結合様式が存在すると推定された (Fig. 4)。NADH にも L- T_3 結合増強作用が認められた。しかし、その作用発現には NADPH による活性化と比べると、10 倍以上の濃度が必要であり、NADPH が最も強力な CTBP 活性化因子であると判断された⁴¹⁾。NADP には CTBP 活性化作用を認めない (Fig. 5)⁴¹⁾。しかし、-SH 保護剤である dithiothreitol (DTT) 存在下では NADP による CTBP の活性化が認められた⁴⁹⁾。NADPH 刺激に対し、DTT は影響を示さない。これらの実験結果から NADPH は CTBP に結合すると CTBP から -SH 基を露出し、これに伴って L- T_3 結合能が出現するのであろうと推測された。しかし予測に反し、DTT、還元型 glutathione, l-cysteine などはそれら単独では L- T_3 結合活性を誘導しない⁴⁷⁾。このため NADP による活性化機構は NADPH によるそれとは異なるものであり、それぞれの活性化 CTBP は機能的にも異なっていると類

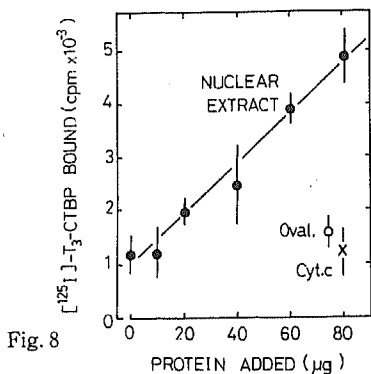


Fig. 8

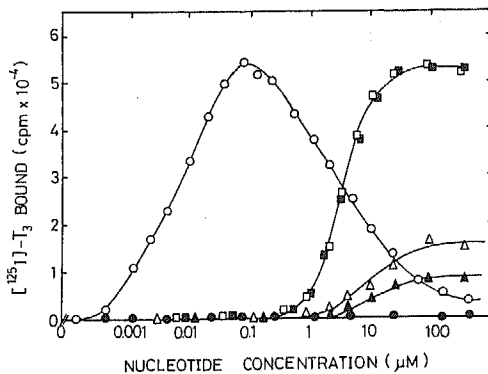


Fig. 9

Fig. 8 NADP-activated CTBP- $[^{125}\text{I}] \text{ T}_3$ binding to the chromatin reconstituted with acceptor protein.

Chromatin was prepared by extraction of rat kidney nuclei with 0.5 M NaCl. The acceptor protein (nuclear extract), partially purified from rat kidney nuclei, was reconstituted to the chromatin and binding of NADP-activated CTBP- $[^{125}\text{I}] \text{ T}_3$ to the nuclei was estimated. Cytochrome c (Cyt. c) and ovalbumin (Oval.), were examined in their activity to be reconstituted to the chromatin.

Fig. 9 Effect of NADPH, NADP and NAD on $[^{125}\text{I}] \text{ T}_3$ binding to the purified CTBP.

Purified CTBP (0.012 μg protein) was incubated with various concentrations of NADPH (squares), NADP (circles) and NAD (triangles) in the absence (closed symbols) or presence (open symbols) of 1.0 mM DTT. Specific binding is illustrated.

推された。

最近 proto-oncogene の 1 つである c-erb A の product が NT_3R とほぼ同様な性質と構造を有すると報告された。この product の断片に対する抗体は細胞質の蛋白、それも分子量 58,000 の甲状腺ホルモン結合蛋白を認識することから、NADPH-依存性 CTBP と NT_3R との異同が問題となった⁵⁰。しかし、著者らの精製した CTBP は DNA 結合能を有さず、また L-T_3 の analogue による放射性 L-T_3 の結合に対する阻止の程度は、CTBP と NT_3R の間で異なることから

(CTBP : $\text{L-T}_3 = \text{D-T}_3 > \text{triiodothyroacetic acid (Triac)} > \text{L-T}_4$ (Fig. 5)⁴⁷, $\text{NT}_3\text{R} : \text{Triac} > \text{L-T}_3 > \text{D-T}_3 > \text{L-T}_4$ ¹³), CTBP と NT_3R とは、部分的に homology があるとしても、異なった蛋白と考えられる。 NT_3R の分子量は CTBP のそれよりやや小さくて約 50,000 であることも両者の間の相異を示すものである^{13,47}。甲状腺ホルモン結合蛋白でホルモンに対し高親和性を示すものの中に、Thyroxine-binding globulin (TBG) がある。ラットではごく微量にしか存在しないがヒトでは血清中に約 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で

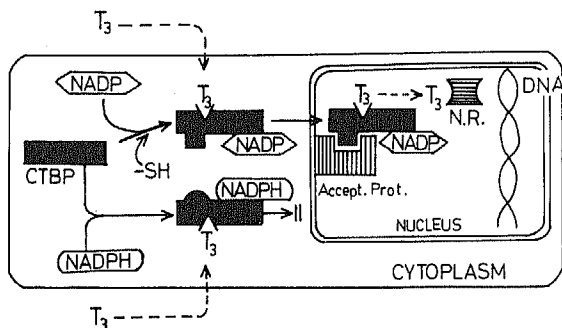


Fig. 10 A model of CTBP regulation of intracellular T_3 translocation. N.R. indicates nuclear T_3 receptor.

存在し、ホルモン作用発現調節としての役割を担っている⁵¹⁾。TBGは、糖蛋白質の1つであり、レクチンに高い親和性を示す⁵¹⁾。しかし、CTBPは、これを精製しても、また crude の状態でも、レクチンに結合しない⁴¹⁾。したがって、分離精製されたCTBPはTBGとも異なるものである。

V 甲状腺ホルモン作用における細胞質 甲状腺ホルモン結合蛋白質の役割

NADPH 依存性以外にも数種類の異なった分子がCTBPとして存在する。これらはクローニングされておらず、したがって分子構造の homology によるCTBP機能の推測は困難である。最近、これらの蛋白にも固有の機能があるという報告が発表された。Pyruvate kinase⁵²⁾、L-thyroxine 5'-deiodinase⁵³⁾などである。しかし、著者らが精製したCTBPにそれらの活性は認められない。NADPH-依存性CTBPが多様性を有することは前述した。この多様性に基づく特異的役割があっても不思議ではない。NADPHとの親和性が高いため、単に甲状腺ホルモンの細胞内reservoirとして存在するばかりでなく、酸化還元の担体としての役割を有している可能性がある。しかし、この点は未だ不明である。

当初、ホルモン作用におけるCTBPの役割はないと考えられていた。しかし、この蛋白を無視して甲状腺ホルモン作用機構のすべてを説明することができない事実が発見された。単離培養細胞を用いた実験と、単離核を用いた *in vitro* の実験とで比べるとNT₃Rへのホルモン結合時間は前者で異常に長い。これは、ホルモンが細胞内に入ってからNT₃Rに結合するまでに何らかの調節機構が介在することを示す^{54)~57)}。著者らはNADPH依存性CTBPに着目した。Scatchard分析によって算出された最大結合能をdouble reciprocal analysisで分析するとNADPH存在下でCTBPは16,400pmol L-T₃/mg蛋白のL-T₃を結合する。これは、分子量58,000のCTBP 1分子が1分子のL-T₃を結合することを示す(Fig. 6)⁴⁷⁾。CTBP 1分子が1分子のホルモンを高親和性で結合することは、著者らに次の考えを抱かせた。すなわち、個々のCTBPは1分子のL-T₃をNT₃Rへ移動させる可能性があるというものである。しかし、このNADPH活性型CTBPは、核へのL-T₃の移行を抑制した⁵⁸⁾。しかも、CTBPはNT₃Rに比べ大量に存在し(約200~300倍)⁵⁹⁾、生理的濃度の約2.5~5%のNADPH

で完全に活性化され得る⁴⁷⁾。このような条件では、細胞内に取り込まれたホルモンはすべてNADPH活性型CTBPに結合し、核へ移行するホルモンは皆無となる。事実、細胞に取り込まれたホルモンはたとえ細胞外に大量のホルモンを加えた条件でも99.5%以上がCTBP結合型として分離されるのである⁵⁹⁾。一方、精製されたNADPH依存性CTBPを一度非活化すると、この蛋白はNADPHのみならずNADPによっても再活性化が認められる⁴⁹⁾。前述したように、後者の場合-SH保護剤の添加が必要であった。核へのL-T₃の結合は-SH保護剤の添加で親和性の上昇がみられる⁹⁾。そこで、このNADP活性型CTBPが核へのL-T₃の移行に関与するものと想定して実験を行った。CTBP存在下では単離核へのL-T₃の結合にNADPが必須であり、さらに細胞核を0.38M KClを含む緩衝液で処理すると90%のNT₃Rが抽出されるにもかかわらず、NADP活性型CTBP存在下ではこのクロマチンにL-T₃は特異的に結合したのである(Fig. 7)⁶⁰⁾。この結果より、核内にNADP活性型CTBP-L-T₃結合物質受容機能の存在が類推された。実験的にNADP活性型CTBPはL-T₃を結合したまま核内に移行し、これを結合する核内acceptor protein (AP)の存在が証明された⁶⁰⁾。この段階ではAPがNT₃Rと同一であるかどうかに興味の1つであった。このため、APの分離が試みられた。ゲル濾過法により抽出核蛋白からこの蛋白が分離された。得られたAPは、しかしながら、DNA結合性の蛋白ではない。分子量(約200,000)も、いわゆるNT₃Rのそれとは異なるものであった。しかし、APを再構築したクロマチンを用いた実験で、CTBP-L-T₃とAPとの親和性はきわめて高い(Ka=1.6×10⁹M⁻¹)ことが判明した(Fig. 8)⁶¹⁾。一方、NT₃RとL-T₃との親和性はNADP活性型CTBPとL-T₃とのそれにほぼ等しい⁴⁷⁾。これらの結果は、核内に移行したNADP活性型CTBPがAPに強力に結合し、ここでNT₃RとCTBPとの間でホルモンの授受が行われることを示したのである。しかし、このような機構の存在は、NADPH依存性CTBPの場合と異なり、細胞質にNADPが存在する限り、L-T₃が無規律にAPへ移行することを示し、NT₃RのすべてがL-T₃によって飽和されるまでこの反応が継続することを意味する。すなわち、一見、合理的機能がNADPによって誘導されるごとくに思われたが、これは、単離培養細胞を用いた実験結果と全く矛盾するのである。ここにもう1つ、興味ある事実

が示された。NADP 活性化型 CTBP は $0.1\mu\text{M}$ という低濃度の NADP で得られる。この濃度は細胞質の遊離型 NADP 濃度の 10% 以下である。したがって、NADPH 活性化型 CTBP と同様に、NADP 活性化型 CTBP も大量に存在する可能性が示唆される。しかし、 $0.2\mu\text{M}$ 以上の NADP は CTBP の活性化を低下させたのである (Fig. 9)⁶¹⁾。このことは、NADP 活性化型、すなわち L-T_3 輸送蛋白としての CTBP は非常に厳格にその量が決定されることを示唆する。NADP 活性化型 CTBP の量は NADP 濃度のみならず、おそらく NADPH と NADP の比によっても決定されるものと思われるがその詳細は不明である。いずれにせよ、これらの結果は NADPH 活性化型 CTBP がホルモンの細胞内 reservoir としての役割を有すると同時に、 L-T_3 輸送蛋白としての NADP 活性化型 CTBP との間に互換性を有し、しかも後者への変換は、 L-T_3 の NT_3R への移行の律速段階になっていることを意味するものと考えられたのである⁶⁰⁾。

VI 細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白質の臨床的意義と今後の展望

あらゆるホルモン作用は常に negative feedback 機構によって調節されている。これは細胞増殖、分化、細胞の特異的機能の維持などを一定の速度に調節する意味で重要である。この negative feedback は最近の新しいホルモン、成長因子、cytokine の相次ぐ発見と、それらの作用の解明によりさらに複雑で幾重にもなっていることが示唆されている。Autocrine, paracrine の考え方が導入され、さらに、intracellular negative feedback が存在することも知られるようになった。CTBP もその役割の一端を担っていると考えられる。NADPH の多くは pentose phosphate shunt の活性化に伴って合成されるが、pentose phosphate shunt は L-T_3 によって活性化され⁶²⁾、この NADPH 依存性に TSH は甲状腺からのホルモン分泌を刺激する⁶³⁾。(ちなみに甲状腺は脳を除く他の組織に比べ NT_3R mRNA 量が最も多い²⁰⁾)。 L-T_3 は標的組織での NADPH 産生を促し、prohormone としての L-T_4 から L-T_3 への変換活性を上昇させる⁶³⁾。このように NADPH 産生系が活性化することにより、甲状腺機能亢進の方向に代謝系は偏移する。一方、CTBP の活性化は微量の NADPH によって生じるためホルモンの NT_3R への移行が阻止されることになり、ホルモン作用の過剰発現を律することになる。こ

れとは逆に、甲状腺ホルモン作用が低下し NADPH 産生が低下すると NADP の NADPH に対する比が上がり、核への L-T_3 の移行が促進される (Fig. 10)。確かに甲状腺機能低下症と亢進症では核への L-T_3 の移行速度は異なることが証明されている⁵⁵⁾⁵⁷⁾⁶⁰⁾。これらの現象は、古典的 negative feedback のみならず標的細胞内でも negative feedback 調節が存在することを示している。このような機序が存在することは臨床的に甲状腺ホルモン作用の評価による甲状腺機能状態の診断が重要であることを示す。ラジオイムノアッセイの導入により内分泌疾患の診断法が飛躍的に改善されたが、以来これに依存する診断が主流になり、臨床症状が無視されることがしばしばである。もちろんこの診断法は有益である。しかし、患者から得られるホルモン測定値以外に臨床症状その他の検査所見から甲状腺ホルモンの作用発現の状態、 NT_3R 、CTBP を始めとするホルモン結合蛋白によるホルモン作用調節機構の分析などが甲状腺疾患の診断に加味されなければならないことでもある⁶⁴⁾⁶⁵⁾。その簡便な方法の確立が期待される。

甲状腺ホルモンは中枢神経系の発達、老化に対する防御作用、癌発育制御、他のホルモンとの許容作用など生命の根源に深くかかわる。これらの一つ一つに特異的受容体があるのと同様、CTBP もそれぞれに対し異なった機能を有すると考えられる。ホルモン作用という観点以外に CTBP の持つ意義が検討されるのも近いと思われる。

VII おわりに

CTBP を中心に甲状腺ホルモンの作用の調節機序について現在までの研究成果の概要を述べた。稿を終るにあたり多大な助言を提供して下さった研究者の方々、また、共同研究者に感謝する次第である。特に NT_3R の生化学、ホルモンによる遺伝子発現に精力的に実験を重ねた市川和夫君、CTBP の機能分析と精製を完成した宮本高秀君、小林睦博君、留学先から貴重な情報を提供してくれた桜井晃洋君、CTBP の negative feedback における意義を確立した西井裕君、CTBP の分子修飾と情報伝達の研究に従事した鈴木悟君、武田貞二君、荒井みゆき君、データの computer 処理に協力してくれた山内恵史君、常に暖かく我々の研究を見守り、助言下さった生化学教室、橋本隆教授、シカゴ大学、Leslie J. DeGroot 教授に深謝いたします。

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) Caynis, E. Sarangarjan, R., Lombes, A., Nahon, E., Edelman, I. S. and Erlanger, B. F. : Identification of an epitope shared by the DNA-binding domain of glucocorticoid receptor and the B chain of insulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86 : 2138-2142, 1989
- 8) Koenig, R. J., Brent, G. A., Warne, R. L., Larsen, P. R. and Moor, D. D. : Thyroid hormone receptor binds to a site in the rat growth hormone promoter required for induction by thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84 : 5670-5674, 1987
- 9) Glass, C. K., Franco, R., Weinberger, C., Albert, V. R., Evans, R. M. and Rosenfeld, M. G. : A c-erb-A binding site in rat growth hormone gene mediates transactivity by thyroid hormone. *Nature*, 329 : 738-741, 1987
- 10) Lavin, T. N., Baxter, L. J. and Horita, S. : The thyroid hormone receptor binds to multiple domains of the rat growth hormone 5'-flanking sequence. *J Biol Chem*, 263 : 9418-9425, 1988
- 11) Sakurai, A., Ichikawa, K., Hashizume, K., Miyamoto, T., Yamauchi, K., Ohtsuka, H., Nishii, Y. and Yamada, T. : Possible role of histones in the organization of rat liver thyroid hormone receptors in chromatin. *J Endocrinol*, 121 : 337-341, 1989
- 12) Ichikawa, K., Bentley, S., Fee, M. and Degroot, L. J. : Modification of deoxyribonucleic acid-thyroid hormone receptor interaction by histones. *Endocrinology*, 121 : 893-899, 1987
- 13) Ichikawa, K. and DeGroot, L. J. : Separation of DNA binding domain from hormone and core histone binding domains by trypsin digestion of rat liver nuclear thyroid hormone receptor. *J Biol Chem*, 261 : 16540-16546, 1986
- 14) 市川和夫 : 細胞における甲状腺ホルモンの作用機序. *信州医誌*, 35 : 707-716, 1987
- 15) Ichikawa, K., Hashizume, K., Miyamoto, T., Sakurai, A., Yamauchi, K., Nishii, Y. and Yamada, T. : Differences in nuclear thyroid hormone receptors among species. *Gen Comp Endocrinol*, 74 : 68-76, 1989
- 16) Nakai, A., Seino, S., Sakurai, A., Szilak, I., Bell, G. I. and DeGroot, L. J. : Characterization of thyroid hormone receptor expressed in human kidney and other tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85 : 2781-2785, 1988
- 17) Ye, Z.-S., Forman, B. M., Aranda, A., Pascual, A., Park, H.-Y., Casanova, J. and Samuels, H. H. : Rat growth hormone gene expression : Both cell-specific and thyroid hormone response elements are required for thyroid hormone regulation. *J Biol Chem*, 263 : 7821-7829, 1988

- 18) Murray, M. B., Zilz, N. D., McCreary, N. L., MacDonald, M. J. and Towles, H. C., Isolation and characterization of rat cDNA clones for two-distinct thyroid hormone receptors. *J Biol Chem*, 263 : 12770-12777, 1988
- 19) Ichikawa, K. and DeGroot, L. J. : Thyroid hormone receptors in a human hepatoma cell line : Multiple receptor forms on isoelectric focusing. *Mol Cell Endocrinol*, 51 : 135-143, 1987
- 20) Sakurai, A., Nakai, A. and DeGroot, L. J. : Expression of three groups of thyroid hormone receptor in human tissues. *Mol Endocrinol*, 3 : 392-399, 1989
- 21) Schmidt, E. D. L., van Beeren, H. C., Korfage, H., Dissault, J. H., Wiersinga, W. M. and Lamers, W. H. : Localization of c-erbA proteins in rat liver using monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun*, 164 : 1053-1059, 1989
- 22) Thompson, C. C., Weinberger, C., Lebo, R. and Evans, R. : Identification of a novel thyroid hormone receptor expressed in the mammalian central nervous system. *Science*, 327 : 1610-1614, 1987
- 23) Horiuchi, R., Yamauchi, K., Hayashi, I., Koya, S., Takeuchi, Y., Kato, K., Kobayashi, M. and Takikawa, H. : Purification and characterization of 55-kDa protein with 3,5,3'-triiodo-thyronine binding activity and protein disulfide-isomerase activity from beef liver membrane. *Eur J Biochem*, 183 : 529-538, 1989
- 24) Hashizume, K., Ichikawa, K. and Kobayashi, M. : Effect of calcium ion on triiodothyronine binding to kidney outer mitochondrial membrane *in vitro*. *Endocrinol Jpn*, 31 : 311-320, 1984
- 25) Ichikawa, K., Hashizume, K., Kobayashi, M. and Yamada, T. : Evidence for induction by thyroid hormone of cytosolic proteins which control mitochondrial protein synthesis. *Endocrinology*, 117 : 1749-1758, 1985
- 26) Haraguchi, K., Hashizume, K., Ichikawa, K. and Kobayashi, M. : The effect of thyroid hormone on the high affinity Ca^{2+} -ATPase in rat liver plasma membrane. *Endocrinol Jpn*, 31 : 141-149, 1984
- 27) Ichikawa, K., Hashizume, K., Yamada, T. and Hashimoto, T. : Effect of thyroid hormone on peroxisomal flavin enzymes in rat liver and kidney. *Endocrinol Jpn*, 34 : 245-250, 1987
- 28) Ichikawa, K., Hashizume, K. and Yamada, T. : Monoamine oxidase inhibitory modulators in rat heart cytosol : Evidence for induction by thyroid hormone. *Endocrinology*, 111 : 1803-1809, 1982
- 29) 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 Ca^{2+} -dependent proteinase in brain : Evidence for the induction of irreversible changes in immature rats. *Endocrinology*, 123 : 1916-1922, 1988
- 30) Hashizume, K., Yamauchi, K., Kobayashi, M. and Miyamoto, T. : Thyroid hormone inhibition of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in rat liver. *Endocrinol Jpn*, 32 : 481-487, 1985
- 31) Shupnik, M. M., Chin, W. W., Habener, J. F. and Ridgway, E. C. : Transcriptional regulation of the thyrotropin subunit genes by thyroid hormone. *J Biol Chem*, 260 : 2900-2903, 1985
- 32) Nyborg, J. K., Nguyen, A. P. and Spindler, S. R. : Relationship between thyroid and glucocorticoid hormone receptor occupancy, growth hormone gene transcription, and mRNA accumulation. *J Biol Chem*, 259 : 12377-12381, 1984
- 33) Nyborg, J. K. and Spindler, S. R. : Alterations in local chromatin structure accompany thyroid hormone induction of growth hormone gene transcription. *J Biol Chem*, 261 : 5685-5688, 1986
- 34) Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L., Mariash, C. N., Kinlaw, W. B., Wong, N. C. W. and Freaque, H. C. : Advances in our understanding of thyroid hormone action at a cellular level. *Endocr Rev*, 8 : 288-307, 1987
- 35) Dozin, B., Magnusson, M. A. and Nikodem, V. M. : Thyroid hormone regulation of malic enzyme synthesis : dual tissue-specific control. *J Biol Chem*, 261 : 10290-10292, 1986
- 36) Markham, B. E., Ball, J. J., Gustafson, T. A. and Morkin, E. : Interaction of a protein factor within a thyroid hormone-sensitive region of rat α -myosin heavy chain gene. *J Biol Chem*, 262 : 12856-12862, 1987
- 37) Tata, J. R., Ernster, L. and Suranyi, E. M. : Interaction between thyroid hormone and cellular constitu-

- ents. I. Binding to isolated subcellular particles and sub-particulate fraction. *Biochim Biophys Acta*, 60 : 461-479, 1962
- 38) Tata, J. R., Ernster, L. and Suranyi, E. M. : Interaction between thyroid hormone and cellular constituents. II. Intracellular distribution and the cell sap effect. *Biochim Biophys Acta*, 60 : 480-490, 1962
- 39) Dillman, W., Surks, M. I. and Oppenheimer, J. H. : Quantitative aspects of iodothyronine binding by cytosol proteins in rat liver and kidney. *Endocrinology*, 95 : 492-498, 1974
- 40) Barsano, C. P. and DeGroot, L. J. : Nuclear-cytoplasmic interrelationships. In : Oppenheimer, J. H. and Samuels, H. H. (eds.), *Molecular basis of thyroid hormone action*, pp. 139-177, Academic Press, New York, 1983
- 41) Hashizume, K., Kobayashi, M. and 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
- 42) DeGroot, L. J., Toressani, J., Carrayon, P. and Tirard, A. : Factors influencing triiodothyronine binding properties of liver nuclear receptors. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 83 : 293-298, 1976
- 43) Yamauchi, K., Miyamoto, T., Kobayashi, M., Nishii, Y. and Hashizume, K. : Active and inactive forms of T_3 -binding protein in rat kidney cytosol : (III) regulation of nuclear T_3 binding by cytosolic T_3 -binding protein. In : Vichayanrat, A., Nitiyanrat, W., Eastman, C. and Nagataki, S. (eds.), pp. 156-160, *Recent Progress in Thyroidology*, Crystal House Press, Bangkok, 1987
- 44) Hashizume, K., Kobayashi, M., Miyamoto, T. and Yamada, T. : Dependence of the mitochondrial uptake of triiodothyronine (T_3) in rat kidney on cytosolic T_3 -binding protein. *Endocrinology*, 119 : 1063-1070, 1986
- 45) Miyamoto, T., Kobayashi, M., Nishii, Y., Yamauchi, K., Sakurai, A. and Hashizume, K. : Active and inactive forms of T_3 -binding protein in rat kidney cytosol : (I) role of NADPH in activation of T_3 binding. In : Vichayanrat, A., Nitiyanrat, W., Eastman, C. and Nagataki, S. (eds.), pp. 146-150, *Recent Progress in Thyroidology*, Crystal House Press, Bangkok, 1987
- 46) Hashizume, K., Miyamoto, T., Nishii, Y. and Kobayashi, M. : Evidence for the presence of active and inactive forms of cytosolic triiodothyronine binding protein in rat kidney : cooperative action of Ca^{2+} in NADPH activation. *Endocrinol Jpn*, 34 : 479-487, 1987
- 47) 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
- 48) Samuels, H. H. and Tsai, J. S., Casanova, J. and Stanley, F. : Thyroid hormone action. *In vitro* characterization of solubilized nuclear receptors from rat liver and cultured GH1 cells. *J Clin Invest*, 54 : 853-865, 1974
- 49) Suzuki, S., Hashizume, K., Miyamoto, T., Takeda, T., Ichikawa, K., Yamauchi, K. and Ohtsuka, H. : Evidence for the presence of two active forms of cytosolic T_3 -binding protein (CTBP) in rat kidney : Special functions of two CTBPs in intracellular T_3 translocation. In : Lee, M., Koh, C.-S., Eastman, C. and Nagataki, S. (eds.), *Progress in Thyroidology*, pp. 301-304, Korea Medical Publishing Company, Souel, 1989
- 50) Fukuda, T., Willingham, M. C. and Cheng, S.-Y. : Antipeptide antibodies recognize c-erb A and related protein in human A431 carcinoma cells. *Endocrinology*, 123 : 2646-2652, 1988
- 51) Hashizume, K., Sakurai, A., Miyamoto, T., Yamauchi, K. and Nishii, Y. : Effect of thyroxine-binding globulin (TBG) on thyroxine (T_4) uptake by human peripheral mononuclear cells : Evidence of TBG-dependent uptake of T_4 . *Endocrinol Jpn*, 33 : 665-674, 1986
- 52) Kato, H., Fukuda, T., Parkison, 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

- 53) Goswami, A. and Rosenberg, I. N. : Iodothyronine 5'-deiodinase in rat kidney microsomes : sensitivity to propylthiouracil. *Endocrinology*, 123 : 2774-2781, 1988
- 54) Halpern, J. and Hinkle, J. : Evidence for an active step in thyroid hormone transport to nuclei : drug inhibition of L-¹²⁵I-triiodo-thyronine binding to nuclear receptor in rat pituitary tumor cells. *Endocrinology*, 110 : 1070-1072, 1982
- 55) Schwartz, H. L., Trencé, D., Oppenheimer, J. H., Jiang, N. S. and Jump, O. B. : Distribution and metabolism of L- and D-triiodothyronine (T₃) in rat : preferential accumulation of L-T₃ by hepatic and cardiac nuclei and probable explanation of the differential biological potency of T₃ enantiomers. *Endocrinology*, 113 : 1236-1241, 1983
- 56) Mooradian, A. G., Schwartz, H. L., Mariash, C. N. and Oppenheimer, J. H. : Transcellular and transnuclear transport of 3,5,3'-triiodo-thyronine in isolated hepatocytes. *Endocrinology*, 117 : 2449-2455, 1985
- 57) Oppenheimer J. H. and Schwartz, H. L. : Stereospecific transport of triiodothyronine from plasma to cytosol and from cytosol to nucleus in rat liver, kidney, brain and heart. *J Clin Invest*, 75 : 147-154, 1985
- 58) Hashizume, K., Miyamoto, T., Yamauchi, K., Ichikawa, K., Kobayashi, M., Ohtsuka, H., Sakurai, A., Suzuki, S. and Yamada, T. : Counterregulation 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 protein *in vitro*. *Endocrinology*, 124 : 1678-1683, 1989
- 59) 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'-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
- 60) 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
- 61) 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*, 264 : 4864-4871, 1989
- 62) Mariash, C. N. and Oppenheimer, J. H. : Thyroid hormone-carbohydrate interaction. In : Oppenheimer, J. H. and Samuels, H. H. (eds), *Molecular basis of thyroid hormone action*, pp. 266-292, Academic Press, New York, 1983
- 63) Hashizume, K., Onaya, T. and Sato, A. : The role of pentose phosphate shunt in thyrotropin-induced thyroid hormone secretion : *in vivo* and *in vitro* studies with 6-aminonicotinamide in mouse thyroid. *Endocrinology*, 97 : 962-969, 1975
- 64) Ichikawa, K., Hughes, I. A., Horwitz, A. and DeGroot, L. J. : Characterization of nuclear thyroid hormone receptors of cultured skin fibroblasts from patients with resistance to thyroid hormone. *Metabolism*, 36 : 392-399, 1987
- 65) Sakurai, A., Takeda, K., Ain, K., Ceccarelli, P., Nakai, A., Seino, S., Bell, G. I., Refetoff, S. and DeGroot, L. J. : Generalized resistance to thyroid hormone associated with a mutation in the ligand-binding domain of the thyroid hormone receptor β . *Proc Natl Acad Sci USA*, 86 : 8977-8981, 1989

(2. 5. 29 受稿)