

# 細胞質トリヨードチロニン結合活性におよぼす 甲状腺ホルモンの影響

—甲状腺ホルモン標的組織における細胞内  
negative feedback 機構の存在—

西 井 裕

信州大学医学部老年科学教室

(指導: 山田 隆司教授)

## Effect of Thyroid Hormone on Cytosolic 3, 5, 3'-L-Triiodothyronine Binding Activity: Evidence for the Presence of Intracellular Negative Feedback Mechanism in Thyroid Hormone Target Tissues

Yutaka NISHII

*Department of Gerontology, Endocrinology and Metabolism,*

*Shinshu University School of Medicine*

*(Director: Prof. Takashi YAMADA)*

Treatment of rat kidney cytosol with charcoal decreased specific 3,5,3'-L-Triiodothyronine ( $T_3$ ) binding. Decreased  $T_3$  binding in charcoal-treated cytosol could be restored by the addition of boiled kidney cytosol. The results suggested that  $T_3$  binding protein in cytosol is present in inactive and active forms, and that the active form is generated from the inactive form by an activating factor which is present in boiled cytosol fraction.

The inactive form of cytosolic  $T_3$  binding protein did not modify nuclear  $T_3$  binding, whereas the active form inhibited it. The activating factor did not modify nuclear  $T_3$  binding. When the active form of cytosolic  $T_3$  binding protein and nuclei were simultaneously added to the incubation medium, it was observed that a large amount of  $T_3$  could bind to cytosolic  $T_3$  binding protein. The inactive form of cytosolic  $T_3$  binding protein and activating factor were increased by  $T_4$  administration to thyroidectomized rats. A mixture of the inactive form of cytosolic  $T_3$  binding protein and activating factor, both of which were prepared from  $T_4$ -injected rat kidney, strongly inhibited the nuclear  $T_3$  binding.

The results suggested that the active form of cytosolic  $T_3$  binding protein contributes to determining the amount of free  $T_3$  that can be transferred to the nuclear receptor, and that change in the cytosolic  $T_3$  binding protein and in the factor which activate cytosolic  $T_3$  binding protein plays a role in the negative feedback regulation of thyroid hormone action in target tissues. *Shinshu Med. J.*, 36: 231-244, 1988

(Received for publication November 13, 1987)

**Key words:** cytosolic  $T_3$  binding activity, cytosolic  $T_3$  binding activator, intracellular negative feedback mechanism, nuclear  $T_3$  receptor

細胞質  $T_3$  結合活性, 細胞質  $T_3$  結合活性化因子, 細胞内ネガティブフィードバック機構, 核  $T_3$  受容体

## I 緒 言

甲状腺ホルモンは、その特異的受容体に結合し、ホルモン作用を発現すると考えられている<sup>1)2)</sup>。特に、核受容体への結合は、ホルモン応答性遺伝子の転写活性を制御することが知られ<sup>3)-5)</sup>、重要な作用機序の1つと考えられている。一方、甲状腺ホルモン受容体は、核のみではなく、細胞質<sup>6)-8)</sup>、細胞膜<sup>9)</sup>、ミトコンドリア<sup>10)11)</sup>、にも存在し、それぞれの受容体が固有の機能を有していると思われるが、それらの生理的作用は充分解明されていない。

細胞質ホルモン結合蛋白は、核受容体と異なり、トリヨードチロニン ( $T_3$ ) との結合親和性は低いが、その最大結合容量 (MBC) は大きく<sup>12)</sup>、核あるいは他の細胞内小器官に存在する  $T_3$  受容体へ供給されるホルモンの貯蔵的役割を有していると考えられていた<sup>13)</sup>。そのため、その生理的重要性は、ほとんど考慮されていなかった<sup>14)</sup>。

ステロイドホルモン、ビタミン  $D_3$  などの受容体は細胞質に存在し<sup>15)16)</sup>、ホルモンと結合した後 heat shock protein などと、解離することによって活性型に変化し、核内 DNA に結合してホルモン作用が発現される事実が知られるようになった<sup>16)-18)</sup>。しかし、甲状腺ホルモンではこのような機構は発見されていない。細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白は、上記ステロイドホルモン、ビタミン  $D_3$  の場合と異なり、細胞質の熱処理に安定な物質によって活性型に変換される事実が知られ<sup>19)20)</sup>、このことによって細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白が核受容体、その他の受容体の機能に影響を及ぼす可能性が示されてきた<sup>21)22)</sup>。

本研究は、細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白が、核へ移行するホルモン量の決定に重要な役割を有している可能性を追求するため行われた。また、この調節作用が甲状腺ホルモンの欠損状態あるいは過剰状態でどのように変化するかを考察した。

## II 研究材料と方法

## A 研究材料

$[^{125}I]$   $T_3$  ( $1250 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ) は New England Nuclear (Boston MA, USA) より入手した。非放射性  $T_3$  (Sodium salt), L-チロキシン ( $T_4$ ), トリプシン (ブタ膵臓由来), トリプシンインヒビター (Soybean), プロテアーゼ (細菌由来), RNase, DNase

ジチオスレイトール (DTT), 牛胸腺 DNA, 牛血清アルブミン (BSA) は Sigma Chemical Co. (St. Louis Mo, USA) のものを使用した。チャコール (Derco G-60) を Sargent-Welch Scientific Co. (Skokie, IL, USA) より入手した。デキストラン T-70, Sephacryl S-200, Sephadex G-50 は Pharmacia Fine Chemical Inc. (Piscataway NJ, USA) より入手した。 $T_3$ ,  $T_4$  のラジオイムノアッセイキットは第一化学のものを使用した。

## B 実験動物

実験には Wistar 系雄ラット (150~160 g) を使用した。ラットを甲状腺摘除し、その3週後より、一群には生理食塩水 (生食) を、もう一群には  $30^\circ\text{C}$  の生食に溶解した  $T_4$  ( $100 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{日}$ ) を皮下に投与した。それぞれの群を、さらに3群に分け1日、3日、5日の連続投与を行った。

C 細胞質  $T_3$  結合蛋白の調製<sup>19)</sup>

甲状腺摘除ラットおよび甲状腺摘除ラットに生食あるいは  $T_4$  を1日、3日、5日皮下注したラットは、細胞質の調製4時間前より絶食とした。ラットは断頭で屠殺後、腹大動脈を切開、瀉血した後、両側腎を摘出した。腎は皮膜を取り除き、重量測定後、冷却、細切した。細切後、冷却生食液で充分洗浄、この組織を3倍容量の  $0.5\text{mM}$  EDTA を含む  $10\text{mM}$  Hepes buffer (pH 7.4) 中で Waring blender を用いて破碎した。その後 Dounce 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 ( $2^\circ\text{C}$ ) 遠心後、その上清を、さらに  $105,000 \times g$  で2時間 ( $2^\circ\text{C}$ ) 遠心した。この上清には  $T_3$  結合活性が認められたので、非活性型  $T_3$  結合蛋白を調製するため、10% (最終濃度) のチャコールを加え  $4^\circ\text{C}$  で30分間インキュベートした。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。なお、後述するようにこの画分には活性化因子を加えないかぎり、 $[^{125}I]$   $T_3$  結合活性は認められなかった。

D  $T_3$  結合活性化因子の調製

腎ホモジネートを  $105,000 \times g$  で2時間 ( $2^\circ\text{C}$ ) 遠心した上清を  $95\sim 100^\circ\text{C}$  で5分間熱処理し、急速冷却後、 $27,000 \times g$  30分間遠心分離し、その上清を、 $T_3$  結合活性化因子を含む画分として使用した。この画分には  $T_3$  結合活性は認められなかった。

## E ラット腎核の調製

ラット腎の核は、DeGroot および Toressani の方

法<sup>23)</sup>を改変して調製した。ラット腎を0.32M ショ糖の中でホモジナイズした後、10分間、2°C、1,000×gで遠心し、その沈渣を3.0mM MgCl<sub>2</sub>を含む、2.2M ショ糖に浮遊させ、最終ショ糖濃度を1.6Mとした。この粗核分画を8mlの2.2M ショ糖および5mlの1.8M ショ糖(両ショ糖液ともに3.0mM MgCl<sub>2</sub>を含む)の不連続密度勾配上に静置し、2°C 2時間、105,000×gで遠心した。沈渣として得られた核分画を3mM MgCl<sub>2</sub>を含む0.32M ショ糖に浮遊し実験に供した。Triton X-100処理は本実験では行わなかった。

#### F 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 assay を行った。インキュベーション buffer 225 $\mu$ l (最終濃度約3.2%のグリセロールを含む、20mM Hepes, pH 7.4) 中に約50,000 cpm の [<sup>125</sup>I]  $T_3$  25 $\mu$ l を加え、50 $\mu$ l のチャコール処理した細胞質画分および50 $\mu$ l の熱処理した細胞質画分を加えた。反応の開始はチャコール処理画分を加えた後、速やかに攪拌後20°C $\pm$ 1°Cのインキュベーション浴槽中で振とうすることによって行った。インキュベーション時間(反応時間)は結果の項でそれぞれの実験で示したが通常は15分間とした。反応終了後、チューブを急速に0°Cに冷却し、デキストラン・チャコール法を用いて蛋白結合  $T_3$  と遊離ホルモンを分離した<sup>19)</sup>。冷却した反応液中にあらかじめ0°Cに冷却した500 $\mu$ lの1%チャコール(wt/vol)および0.8%のデキストラン(wt/vol)を含む溶液(5%グリセロールを含む10mM Hepes pH 7.4)を加え、短時間(約2~3秒)、Vortex 上で攪拌した後、2分間0°Cに静置した。その後、0°C1,200×gで5分間遠心し、上清に含まれる放射活性を測定した。非特異的結合(non-specific binding)は、10<sup>-6</sup>Mの非放射性  $T_3$  を加え、チャコール・デキストラン法によって得た蛋白結合 [<sup>125</sup>I]  $T_3$  を測定することによって得た。特異的結合(specific binding)は、非放射性  $T_3$  を加えない時に得られた放射活性(total binding)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算した。

このチャコール・デキストラン法は、10<sup>-4</sup>Mの非放射性  $T_3$  存在下でも加えた [<sup>125</sup>I]  $T_3$  (50,000~60,000 cpm)の99.5%がチャコールに吸収された。またここに実験で使用した活性化因子の50倍量の因子を加えても [<sup>125</sup>I]  $T_3$  の分離に影響は認められなかった。また加えた蛋白の97%が上清に回収された。

#### G 核受容体への $T_3$ 結合の測定

0.32M ショ糖, 3.0mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT を含む10mM Tris-HCl pH7.85 の buffer (550 $\mu$ l) 中に DNA 量として30 $\mu$ gを含む核分画を加え、50,000 cpm の [<sup>125</sup>I]  $T_3$  を加えて結合反応を行った。反応は20°Cで30分間行った。また、それぞれの実験の目的に合わせ、50~100 $\mu$ l のチャコール処理細胞質画分および熱処理細胞質画分を加えた。インキュベーション終了後、反応液を0°Cに冷却し、遠心により核を沈渣として回収した。この沈渣に、あらかじめ0°Cに冷却しておいた1.0mlの0.32M ショ糖, 3.0mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25% Triton X-100を含む Tris-HCl buffer (pH 7.85) を加え、軽く vortex で攪拌(2秒)した後、さらに遠心し、ここで得られた沈渣を Triton X-100 を含まない buffer で洗浄後、核に含まれる放射活性を測定した。

#### H その他の方法

蛋白濃度は Lowry らの方法<sup>24)</sup>を用いて測定し、標準蛋白として BSA を用いた。DNA 濃度の測定は、Burton の方法<sup>25)</sup>を用い、標準 DNA として牛胸腺 DNA を用いた。ラット血中および細胞質画分の  $T_3$ ,  $T_4$  濃度はラジオイムノアッセイキットを用い、Hiramatsu らの方法<sup>26)</sup>で測定した。2群間の比較は、Student's *t*-test を行い、甲状腺摘除の前および後の指標の比較は paired の *t*-test を行った。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。

### III 結 果

#### A ラット腎細胞質の $T_3$ 結合活性のチャコールによる不活化と熱処理画分による再活性化

無処置ラット腎の105,000×g上清中の  $T_3$  結合活性は、チャコール処理により不活性化され、一方、この不活化細胞質  $T_3$  結合活性に105,000×g上清の熱処理画分を加えると再び活性化される現象が認められた(Fig. 1)。これは、熱処理に安定でしかもチャコールに吸着される細胞質  $T_3$  結合活性化因子が存在することを示しているものと考えられる。Fig. 2 は、チャコール処理した  $T_3$  結合蛋白への  $T_3$  の結合を見たものである。Time course および細胞質蛋白濃度依存性のいずれの実験でも、チャコール処理細胞質への [<sup>125</sup>I]  $T_3$  の結合は見られなかった(Fig. 2 B, D)。ここへ熱処理した細胞質画分を加えると [<sup>125</sup>I]  $T_3$  結合活性が認められた。20°Cの条件では、約10~20分のインキュベーションで、結合は最大を示し、また

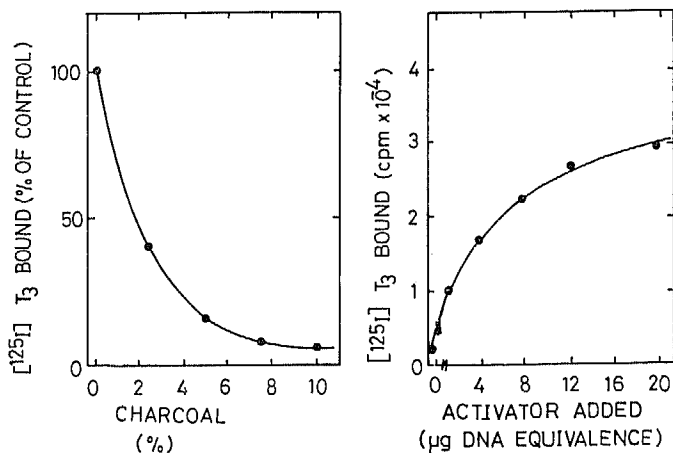


Fig.1 Inactivation of the  $\text{T}_3$  binding activity in rat kidney cytosol by charcoal treatment and reactivation of charcoal-treated cytosolic  $\text{T}_3$  binding activity by boiled cytosol.

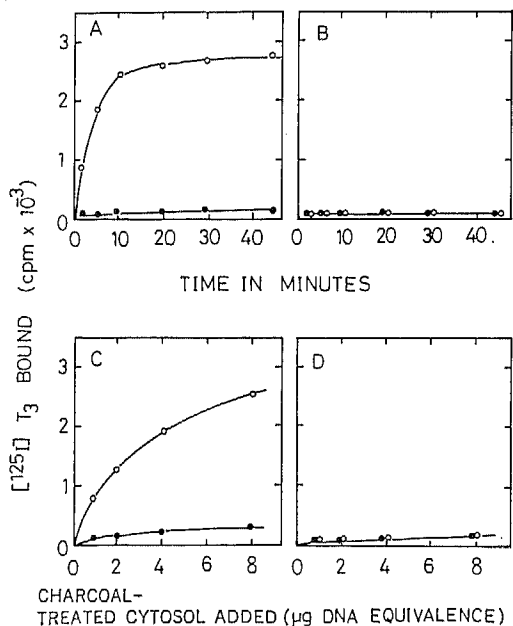
(Left panel) Rat kidney cytosol was incubated with various concentrations of charcoal at  $4^\circ\text{C}$  for 30 min. After incubation the mixture was centrifuged at  $27,000 \times g$  for 30 min. Aliquots of the supernatant were assayed for total  $\text{T}_3$  binding activity. The binding reaction was performed at  $20^\circ\text{C}$  for 15 min. Duplicate tubes containing  $10^{-6}\text{M}$  unlabeled  $\text{T}_3$  were included to determine nonspecific binding of  $[^{125}\text{I}] \text{T}_3$ . Specific  $\text{T}_3$  binding was calculated by subtracting nonspecific binding from total binding. (Right panel) Rat kidney cytosol was treated with 10% charcoal for 30 min at  $4^\circ\text{C}$ . Aliquots of the supernatant (125  $\mu\text{g}$  protein) were incubated with various concentrations of boiled cytosol. The binding reaction was performed at  $20^\circ\text{C}$  for 15 min.

Each point represents mean of duplicate determinations

Table 1 Effects of thyroidectomy or  $\text{T}_4$  administration in thyroidectomized rats on body weight, kidney weight, serum  $\text{T}_4$  and  $\text{T}_3$  concentrations, and DNA contents in kidney

Treatment of rats		Body weight (g)	Kidney weight (g)	$\text{T}_4$ ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )	$\text{T}_3$ ( $\text{ng}/100\text{ml}$ )	DNA content in Kidney (mg)
Sham-operated						
+Saline	(7)	$168.5 \pm 6.1$	$1.60 \pm 0.16$	$5.5 \pm 1.3$	$96 \pm 11$	$7.83 \pm 0.26$
Thyroidectomized						
+Saline (1 day)	(7)	$106.1 \pm 5.8 a$	$0.84 \pm 0.07 a$	$0.6 \pm 0.1 a$	$29 \pm 8 a$	$6.16 \pm 0.21 a$
+Saline (3 days)	(7)	$104.4 \pm 6.6 b$	$0.85 \pm 0.08 b$	$0.5 \pm 0.1 b$	$26 \pm 7 b$	$6.17 \pm 0.33 b$
+Saline (5 days)	(7)	$98.3 \pm 9.4 c$	$0.82 \pm 0.07 c$	$0.5 \pm 0.1 c$	$28 \pm 6 c$	$6.04 \pm 0.25 c$
Thyroidectomized						
+ $\text{T}_4$ (1 day)	(7)	$115.8 \pm 4.2 d$	$0.86 \pm 0.08 d$	$3.2 \pm 0.6 d$	$94 \pm 12 d$	$6.27 \pm 0.36 d$
+ $\text{T}_4$ (3 days)	(7)	$123.3 \pm 7.5 e$	$1.02 \pm 0.06 e$	$10.3 \pm 3.2 e$	$164 \pm 28 e$	$7.17 \pm 0.18 e$
+ $\text{T}_4$ (5 days)	(7)	$131.7 \pm 2.4 f$	$1.26 \pm 0.12 f$	$10.8 \pm 2.5 f$	$176 \pm 28 f$	$7.84 \pm 0.40 f$

P values of  $a$  vs  $b$  in  $\text{T}_4$  and  $\text{T}_3$  concentrations were  $<0.05$ . P values of  $a$  vs  $d$  in body weight, kidney weight, and DNA content were  $>0.5$ . P values of  $b$  vs  $e$  and of  $c$  vs  $f$  in body weight, kidney weight,  $\text{T}_4$  and  $\text{T}_3$  concentrations, and DNA contents in kidney were  $<0.05$ . Numbers of animals in each group were in parentheses.



Each point represents mean of duplicate determinations.

この条件下では細胞質の蛋白濃度依存性が示された (Fig. 2 A, C)。これらの実験では、非放射性 T<sub>3</sub> (10<sup>-6</sup> M) 存在下では [125I] T<sub>3</sub> の結合が著しく低下し (非存在下での計測値の約 1.5~2%) この値を非特異的結合と考えた。

#### B 甲状腺摘除および T<sub>4</sub> 投与による、ラット体重、腎重量、血中 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 濃度、および腎の総 DNA 量の変化

Table 1 に甲状腺摘除ラットに生食あるいは T<sub>4</sub> を投与した時の、それぞれの指標の変化をまとめた。甲状腺摘除ラットでは T<sub>4</sub> 投与群で生食投与群に比べ、体重、腎重量は高い傾向があり、また、血中 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 濃度は T<sub>4</sub> 投与群で生食投与群よりも有意に高い傾向が認められた。腎蛋白量はチャコール処理細胞質および熱処理細胞質の両画分で T<sub>4</sub> 投与群で高い傾向が認められた。

#### C 甲状腺摘除および T<sub>4</sub> 投与によるラット腎細胞質の T<sub>3</sub> 結合活性化因子の変化

甲状腺摘除により腎細胞質の T<sub>3</sub> 結合活性化因子はやや上昇した。ここに T<sub>4</sub> を投与すると活性化因子は

Fig. 2 Effect of activating factor on cytosolic T<sub>3</sub> binding.

Charcoal-treated cytosol was prepared by 105,000 × g supernatant of rat kidney with 10 % charcoal for 30 min at 4°C. Charcoal was removed by centrifugation at 27,000 × g for 30 min at 4°C. Boiled kidney cytosol was prepared by placing 105,000 × g supernatant in a boiling water bath for 5 min and removing denatured protein by centrifugation at 27,000 × g for 30 min. Fig. 2A and Fig. 2B illustrate the time course of [125I] T<sub>3</sub> binding to cytosol. Fig. 2A shows the binding in presence of 30 μg DNA equivalence of activating factor and Fig. 2B shows the binding in the absence of activating factor. Charcoal-treated cytosol was adjusted to 8 μg DNA equivalence/tube. Fig. 2C and Fig. 2D illustrate the effect of various concentrations of charcoal-treated cytosol on T<sub>3</sub> binding. Fig. 2C shows the binding in the presence of 30 μg DNA equivalence of activating factor and Fig. 2D shows the binding in the absence of activating factor. Binding reaction was carried out at 20°C for 15 min. in the absence (—○—) or presence (—●—) of 10<sup>-6</sup>M unlabeled T<sub>3</sub>.

第 1 日目で著明に上昇した (Fig. 3 B, C, D)。無処理ラット、および甲状腺摘除ラットに生食または T<sub>4</sub> 皮下注射ラットより得られた、活性化因子には、T<sub>3</sub> 結合活性を有していなかった。 (Fig. 3A)。またこの活性化因子を含む画分の T<sub>3</sub> 濃度 (内因性 T<sub>3</sub> 濃度) は、甲状腺摘除前、甲状腺摘除後 3 週、T<sub>4</sub> 投与開始 1 日、3 日、5 日のそれぞれで、1.1 × 10<sup>-11</sup>M, 0.05 × 10<sup>-11</sup>M, 0.7 × 10<sup>-11</sup>M, 1.1 × 10<sup>-11</sup>M, 1.6 × 10<sup>-11</sup>M であった。これらの濃度の T<sub>3</sub> を外因性に加えた場合、細胞質 [125I] T<sub>3</sub> 結合は影響をうけなかった。また活性化因子を含む画分の内因性 T<sub>4</sub> 濃度は、それぞれ、2.0 × 10<sup>-10</sup>M, 0.5 × 10<sup>-10</sup>M, 1.4 × 10<sup>-10</sup>M, 2.4 × 10<sup>-10</sup>M および 2.9 × 10<sup>-10</sup>M であった。これら T<sub>4</sub> も外因性に加えた場合細胞質の [125I] T<sub>3</sub> の結合には影響をおよぼさなかった。実験で使用したチャコール処理した細胞質画分には T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> を検知できなかった。Fig. 4 には甲状腺摘除 21 日後から、生食あるいは T<sub>4</sub> を 3 日間投与して得た活性化因子による、無処理ラットより得たチャコール処理細胞質の [125I] T<sub>3</sub> の結合の変化を調べてみた。Scatchard analysis により両者の活性化因

子存在下でそれぞれ1つの  $T_3$  結合部位と1つの  $T_3$  結合親和性が確認された。両者の活性化因子によって親和性の変化は認められなかったが、最大  $T_3$  結合容量 (MBC) は、 $T_4$  投与群由来の活性化因子を加えると高く、甲状腺摘除ラットの活性化因子を加えると低かった。また活性化因子を含まない条件下では、細胞質への  $T_3$  の結合は全く認められなかった。正常無処理のラット、および甲状腺摘除後生食または  $T_4$  皮下注射したラットより得られた活性化因子を Sephadex G-50 のカラムを用いて分離すると、どの群から得られた活性化因子も同一部位に溶出された (Fig. 5)。

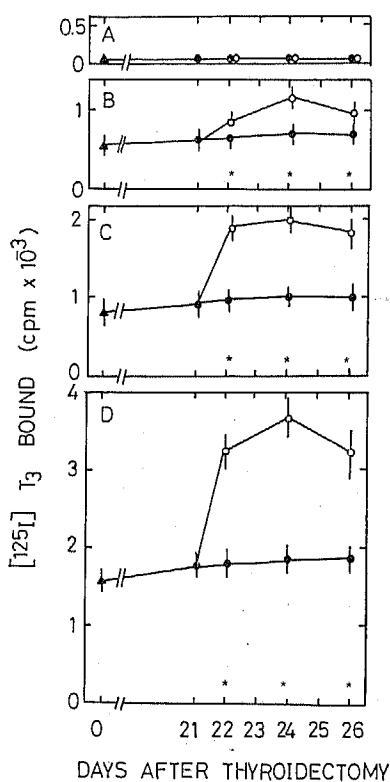


Fig. 3 Effect of  $T_4$  administration to thyroidectomized rats on kidney cytosolic activating factor.

Twenty-one days after thyroidectomy, rats were divided into two groups. One was injected with saline (—●—) and the other was given  $T_4$  (—○—) as described in *Methods*. One, 3, and 5 days after the beginning of the injections, rats were killed and activating factor was prepared. The binding assay was performed in the absence

(Fig. 3A) or presence (Fig. 3B, 3C, and 3D) of  $2.0\mu\text{g}$  DNA equivalence of charcoal-treated cytosol prepared from untreated rat kidneys. The activating factor was adjusted to 8 (3A and 3B), 16 (3C), or 32 (3D)  $\mu\text{g}$  DNA equivalence/tube. Each value indicates the mean  $\pm$  SE of 7 animals, and \* indicates significant difference ( $p < 0.05$ ) between the two (saline-injected and  $T_4$ -injected) groups. —▲—: [ $^{125}\text{I}$ ]  $T_3$  binding to cytosol in the presence of activating factor prepared from untreated rat kidneys.

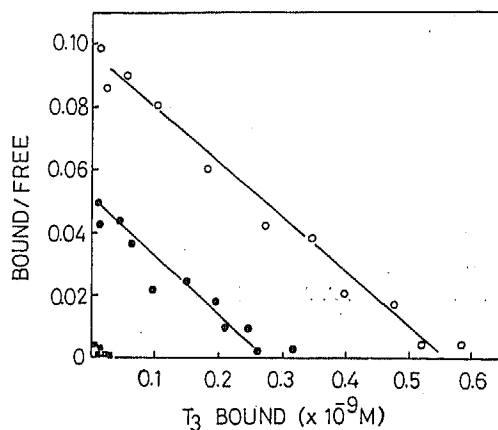


Fig. 4 Effect of activating factors prepared from hypothyroid or hyperthyroid rat kidney on  $T_3$  binding of charcoal-treated cytosol; analysis by Scatchard plots.

Charcoal-treated cytosol ( $2.0\mu\text{g}$  DNA equivalence) was incubated with 50,000 cpm of [ $^{125}\text{I}$ ]  $T_3$  and with various concentrations (0 to  $10^{-9}\text{M}$ ) of unlabeled  $T_3$  in the absence (—■—) or the presence of  $16\mu\text{g}$  DNA equivalence of activating factor prepared from 3-day  $T_4$ -administered thyroidectomized rat kidney (—○—) ( $K_d = 1.7 \times 10^{-9}\text{M}^{-1}$ ), or the presence of  $16\mu\text{g}$  DNA equivalence of activating factor prepared from 3-day saline-administered thyroidectomized rat kidney (—●—) ( $K_d = 1.8 \times 10^{-9}\text{M}^{-1}$ ).

#### D 甲状腺摘除および $T_4$ 投与によるチャコール処理細胞質の $T_3$ 結合活性の変化

次に、チャコール処理細胞質において、甲状腺摘除および正常無処理のラットより調製した活性化因子を加えて  $T_4$  投与により  $T_3$  結合活性が変化するかどうかを観察した。甲状腺摘除によりチャコール処理画分

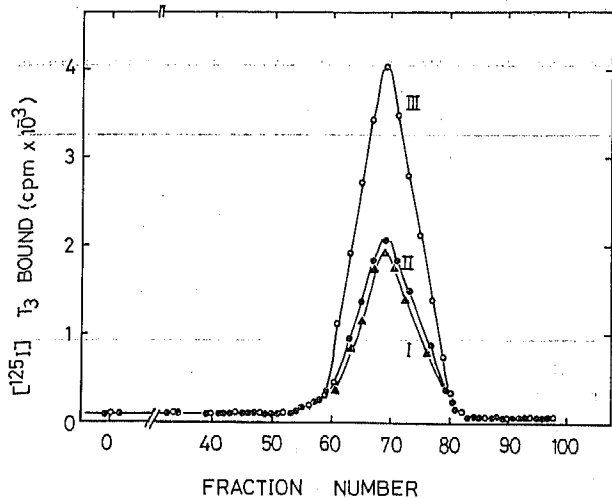


Fig. 5 Sephadex G-50 column chromatography of activating factors. 160 $\mu$ g of DNA equivalent boiled cytosol /3 ml prepared from untreated rat kidney (I), 3-day saline-administered thyroidectomized rat kidney (II) and from 3-day T<sub>4</sub>-administered thyroidectomized rat kidney (III) were separately applied to a Sephadex G-50 column (2.0  $\times$  60cm) equilibrated with 10 mM Hepes pH 7.5, containing 0.5 mM EDTA and 5% glycerol. Fractions of 1.75ml were collected. [<sup>125</sup>I]T<sub>3</sub> binding to charcoal-treated cytosol (2 $\mu$ g DNA equivalence) was measured in the presence of 50 $\mu$ l of aliquot of each fraction.

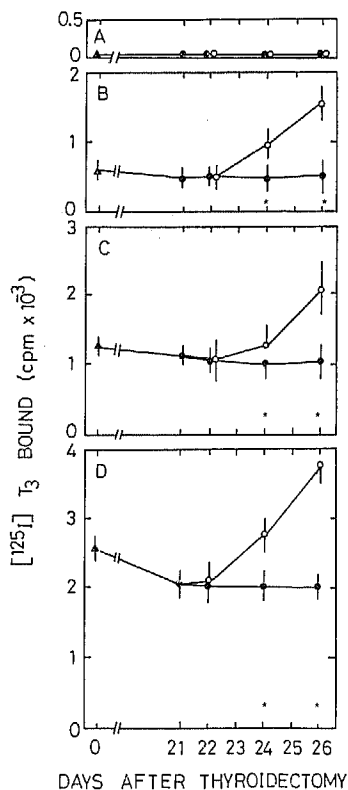


Fig. 6 Changes in the cytosolic T<sub>3</sub> binding activity during T<sub>4</sub> or saline administration to thyroidectomized rats.

Rats were treated as described in Fig. 3. One, 3, and 5 days after the beginning of the injections, rats were killed and charcoal-treated cytosol was prepared as described in *Methods*. [<sup>125</sup>I]T<sub>3</sub> binding to each charcoal-treated cytosol was measured in the absence (6A) or presence (6B, 6C, 6D) of 32 $\mu$ g DNA equivalence of activating factor prepared from untreated rat kidney. One (6A and 6B) 2.0 (6C) or 8.0 $\mu$ g (6D) DNA equivalence of cytosol was added to the incubation medium. Incubation was performed at 20 $^{\circ}$ C for 15 min. —●—: [<sup>125</sup>I]T<sub>3</sub> binding to the cytosol prepared from saline-administered animals, and —○—: [<sup>125</sup>I]T<sub>3</sub> binding to the cytosol prepared from T<sub>4</sub>-administered animals. Each value indicates the mean  $\pm$  SE of 7 animals, and \* indicates significant difference between two groups. —▲—: [<sup>125</sup>I]T<sub>3</sub> binding to the cytosol prepared from untreated rat kidneys.

Table 2 Effect of hydrolytic enzymes or boiling on  $T_3$  binding activity in charcoal-treated cytosol

Group	Treatment of cytosol	$[^{125}I]T_3$ binding (cpm/125 $\mu$ g protein)	P values
A	None (incubated at 20°C for 20 min)	44,350 $\pm$ 550	
B	Trypsin (500 $\mu$ g/ml)	2,380 $\pm$ 240	A vs B, <0.001
C	Protease (500 $\mu$ g/ml)	4,680 $\pm$ 280	A vs C, <0.001
D	RNase (330 $\mu$ g/ml)	44,020 $\pm$ 960	A vs D, N.S.
E	DNase (330 $\mu$ g/ml)	45,560 $\pm$ 1,020	A vs E, N.S.
F	Boiling for 5 min	100 $\pm$ 40	A vs F, <0.001

Charcoal-treated cytosol (125  $\mu$ g protein) was digested for 20 min at 20°C in the absence (A) or the presence of the indicated concentrations of enzymes. After incubation,  $[^{125}I]T_3$  binding activity was determined in the presence of boiled cytosol (20  $\mu$ g DNA equivalence). In the case of trypsin treatment, the reaction was terminated by trypsin inhibitor after incubation of cytosol with trypsin.

Charcoal-treated cytosol and boiled cytosol used in the assay were prepared from untreated rat kidneys. Each value represents the specific binding of  $[^{125}I]T_3$  (100,000 cpm added), and indicates the mean $\pm$ SE of five determinations. N.S.: not significant.

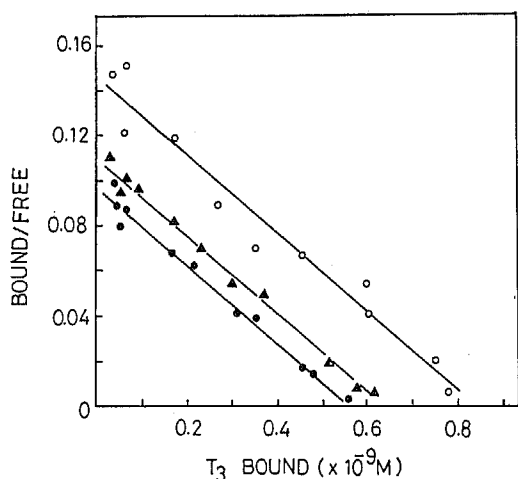


Fig. 7 Changes in  $T_3$  binding activity of charcoal-treated cytosol during  $T_4$  administration to thyroidectomized rat in the presence of activating factor; analysis by Scatchard plots.

Charcoal-treated cytosol (2.0  $\mu$ g DNA equivalence) prepared from untreated rat kidney ( $\text{---}\blacktriangle\text{---}$ ) ( $K_a=1.8 \times 10^9 M^{-1}$ ), 3-day saline-treated thyroidectomized rat kidney ( $\text{---}\bullet\text{---}$ ) ( $K_a=1.7 \times 10^9 M^{-1}$ ), or 3-day  $T_4$ -administered thyroidectomized rat kidney ( $\text{---}\circ\text{---}$ ) ( $K_a=1.7 \times 10^9 M^{-1}$ ) was incubated with 50,000 cpm of  $[^{125}I]T_3$  and with 16.0  $\mu$ g DNA equivalence of activating factor prepared from untreated rat kidney in the presence of various concentrations of unlabeled  $T_3$  ( $0-10^{-6} M$ ) for 15 min at 20°C.

の $T_3$ 結合活性は低下した。しかし、この甲状腺摘除ラットに $T_4$ を投与すると、その活性は上昇した (Fig. 6B, C, D)。その上昇の仕方は、活性化因子の場合と異なり、 $T_4$ 投与3日で始めて生食投与群との間に有意差を認めた。それぞれの群のラットから得られたチャコール処理細胞質への $T_3$ の結合は活性化因子非存在下では認められなかった (Fig. 6A)。Scatchard analysisを用いて検討すると、それぞれのチャコール処理細胞質の $T_3$ 結合は、正常無処理のラットより得

た細胞質熱処理画分を加えた条件下で、甲状腺摘除によりそのMBCが低下し、 $T_4$ 投与により上昇した。しかし $T_3$ の結合親和性には変化が認められなかった (Fig. 7)。Sephacryl S-200によるゲル濾過では、どの群のラットの細胞質 $T_3$ 結合活性も、分子量60,000~70,000の同一部位に溶出された。

どの群のラットから得た細胞質 $T_3$ 結合活性も、トリプシンあるいはプロテアーゼによる前処理で低下したが、DNase, RNaseでは影響を受けなかった



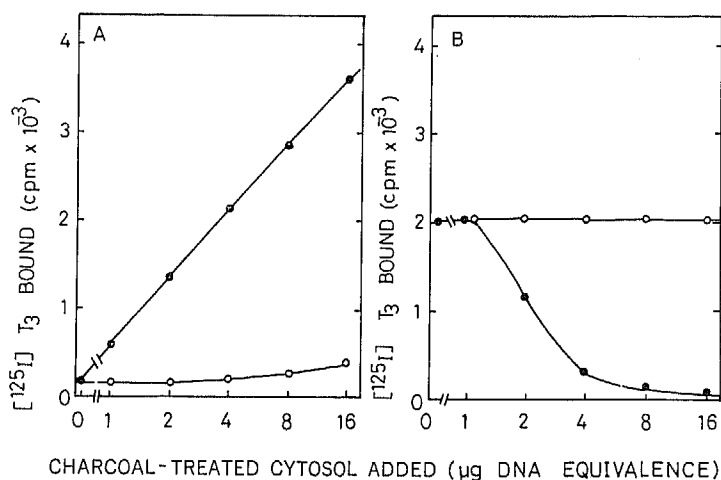


Fig. 8 Effect of cytosolic T<sub>3</sub> binding protein on nuclear T<sub>3</sub> binding. Nuclei, charcoal-treated cytosol, and activating factor were prepared from untreated rat kidneys. Nuclei (30 µg DNA) were incubated with various concentrations of charcoal-treated cytosol in the absence (—○—) or presence (—●—) of 32.0 µg DNA equivalence of activating factor for 30 min. at 20°C. After the reaction, [<sup>125</sup>I]T<sub>3</sub> binding to cytosol (8A) and to nuclei (8B) were measured. Each point represents mean of duplicate determinations.

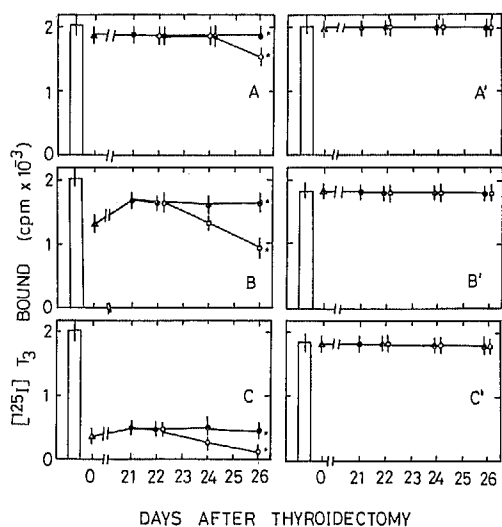


Fig. 9 Effect on nuclear T<sub>3</sub> binding of cytosolic T<sub>3</sub> binding protein prepared from saline-administered thyroidectomized or T<sub>4</sub>-administered thyroidectomized rat kidneys. Rats were treated as described in Fig. 3, and charcoal-treated cytosol was prepared. Nuclear [<sup>125</sup>I]T<sub>3</sub> binding assay was done in the presence of 1.0 (9A and 9A'), 2.0 (9B and 9B') or 8.0 (9C and 9C') µg DNA equivalence of charcoal-treated cytosol prepared from untreated rat kidneys (—▲—), saline-injected-thyroidectomized rat kidneys (—●—), or from T<sub>4</sub>-treated thyroidectomized rat kidneys (—○—). The assay was carried out in the absence (9A', 9B' and 9C') or presence (9A, 9B and 9C) of 16.0 µg DNA equivalence of activating factor prepared from untreated rat kidneys. Open bars indicate mean ± SE of [<sup>125</sup>I]-T<sub>3</sub> binding to nuclei in the absence of cytosolic T<sub>3</sub> binding protein. Each value indicates the mean ± SE of 7 animals, and \* indicates significant difference (p < 0.05) between two groups. (● vs ○).

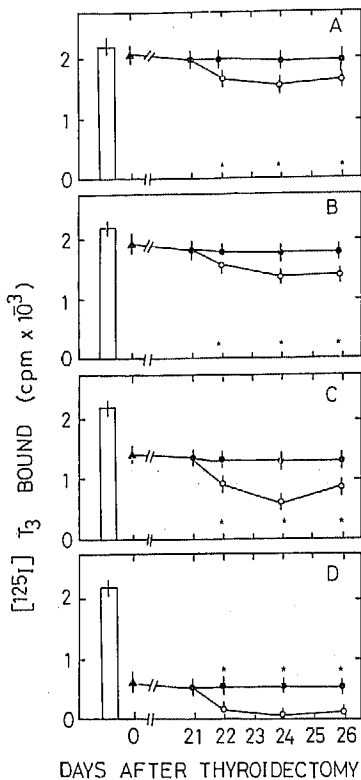


Fig. 10 Effect of activating factors prepared from saline-administered or  $T_4$ -administered thyroidectomized rats on nuclear  $T_3$  binding.

Rats were treated as described in Fig. 3, and activating factor was prepared from each animal. Nuclear  $[^{125}I]T_3$  binding assay was carried out as described in Fig. 8 in the presence of 2.0 (10A), 8.0 (10B), 16.0 (10C) and 32.0 (10D)  $\mu\text{g}$  DNA equivalence of activating factors prepared from saline-injected thyroidectomized rat kidneys ( $\bullet\text{---}\bullet$ ),  $T_4$ -administered thyroidectomized rat kidneys ( $\text{---}\circ\text{---}$ ), or from untreated rat kidneys ( $\text{---}\blacktriangle\text{---}$ ). Charcoal-treated cytosol (2.0  $\mu\text{g}$  DNA equivalence added) and nuclei (30  $\mu\text{g}$  DNA equivalence) were prepared from untreated rat kidneys. Each value indicates mean  $\pm$  SE of 7 animals, and \* indicates significant difference ( $p < 0.05$ ) between two groups. ( $\bullet$  vs  $\circ$ ) Open bars indicate the mean  $\pm$  SE of  $[^{125}I]T_3$  binding to nuclei in the absence of both cytosol and activating factor.

(Table 2). 活性化因子は、トリプシン、プロテアーゼ、DNase、RNase いずれの前処理によってもその活性は影響をうけなかった。

#### E 細胞質 $T_3$ 結合活性およびその活性化因子の核

##### $T_3$ 結合におよぼす影響

細胞質  $T_3$  結合活性およびその活性化因子が核  $T_3$  結合にどのような影響をおよぼすか *in vitro* の系で観察した。ラット腎より得られた核、チャコール処理した細胞質、および熱処理細胞質の混合溶液に  $[^{125}I]T_3$  を加えて、細胞質および核への  $T_3$  の結合を調べた。Fig. 8 に示すように活性化因子存在下では、細胞質への結合が見られたが、非存在下ではこれは認められなかった。一方同時に測定した核への  $T_3$  の結合は活性化因子非存在下ではチャコール処理細胞質の濃度が上昇しても認められたが、活性化因子存在下では、チャコール処理細胞質の濃度依存性に、核への  $T_3$  の結合の低下が認められた。

甲状腺摘除および  $T_4$  投与ラット腎から得たチャコール処理細胞質存在下での核への  $T_3$  の結合を観察すると、活性化因子非存在下では、どの群のラットより得られた細胞質も核  $T_3$  結合に影響をおよぼさなかった (Fig. 9 A', B', C')。しかし、活性化因子存在下で測定すると、 $T_4$  投与のラットから得たチャコール処理細胞質は、生食投与のラットから得たチャコール処理細胞質を加えた時に比べ、有意な差をもって核  $T_3$  結合を抑制した (Fig. 9 A, B, C)。

一方、甲状腺摘除および  $T_4$  投与ラットより得た熱処理細胞質に含まれる活性化因子による核  $T_3$  結合におよぼす影響を観察すると、いずれの活性化因子もそれら単独では核への  $T_3$  の結合には影響を示さなかった。しかし、チャコール処理細胞質存在下では、生食投与群より得られた活性化因子に比べ、 $T_4$  投与群より得られた活性化因子で、核への  $T_3$  結合の低下が認められた (Fig. 10 A, B, C, D)。

#### IV 考 察

細胞内甲状腺ホルモン結合部位は、核、ミトコンドリア、細胞膜、さらに細胞質に存在する。 $T_3$  と結合した核受容体が DNA の一部に結合し<sup>27)-29)</sup>、DNA から mRNA への転写が開始され<sup>30)-32)</sup>、生理的に重要な蛋白合成が制御される<sup>33)-36)</sup>。ミトコンドリアにも甲状腺ホルモン受容体が存在し<sup>11)12)</sup>、甲状腺ホルモンが直接関与する代謝系の存在も想定されているが、このホルモンによるミトコンドリアへの作用は、むしろ

る核への作用に引き続いて生じる2次的なものである可能性も高い<sup>33)34)</sup>。細胞膜に存在する甲状腺ホルモン受容蛋白は、 $T_3$ 、 $T_4$  細胞への取り込みに関与すると考えられている。特に、ホルモンが血中の結合蛋白に結合して取り込まれる時に生じるホルモン—受容体複合体のインターナリゼーション機構を稼働させるための重要な step が、膜受容体—ホルモン複合体の生成であると考えられている<sup>9)37)</sup>。

一方、細胞質甲状腺ホルモン結合活性の生理的意味については、まだほとんど判っていない。DNA から RNA への転写を調節して作用する他のホルモン、たとえばステロイドホルモン、ビタミン  $D_3$  などの受容体は細胞質に存在し、これらがホルモンを結合して活性化型に変化すると、DNA の結合も可能になることが示され、これらのホルモンの作用機序において細胞質受容体は、重要な役割を果たしていると考えられている<sup>16)–18)</sup>。しかし、細胞質  $T_3$  受容蛋白はそのような細胞内での transformation を生じない。また DNA への結合も示さないことより、ステロイドホルモンあるいはビタミン  $D_3$  などの細胞質受容体とは、全く別の効果を有するものと考えられる<sup>14)</sup>。

本研究では、細胞質  $T_3$  結合蛋白には、非活性化型と活性化型が存在することを示した。前者は、細胞質をチャコール処理することにより得られ、後者は熱処理細胞質を加えることによって得られる。この活性化型細胞質  $T_3$  受容蛋白は、現在までのところ核受容体と比較して同一な性格を有していると思われる実験結果は得られていない<sup>19)</sup>。一方この活性化型受容蛋白は、核受容体への  $T_3$  の結合に対して抑制効果を有することが認められた。*In vitro* の系で観察すると、活性化型受容体と preincubation した核とコントロールとして buffer あるいは熱処理した活性化型受容蛋白と preincubation した核との間で  $T_3$  結合に差が認められていない。したがって活性化型細胞質  $T_3$  受容蛋白が核蛋白に直接関与する可能性は低いと思われる<sup>13)14)</sup>。本研究で示したように非活性化型受容蛋白は、核への  $T_3$  の結合に影響をおよぼさず、活性化型受容蛋白存在下でのみ、核への  $T_3$  結合が抑制された。同時に測定した細胞質  $T_3$  受容蛋白に  $T_3$  の結合が活性化型受容蛋白にのみ認められたことにより、incubation 溶液中に存在する核へ移行可能な遊離ホルモンの量が、活性化型細胞質受容蛋白によって減少する可能性が示唆された。この事実は、活性化型細胞質受容蛋白は、核への  $T_3$  の移行に対し調節的役割を果たしていることを示すと考

えられる<sup>38)</sup>。

このような考察の下に、細胞質甲状腺ホルモン受容蛋白の生理的意味をさらに追求した。すなわち、甲状腺ホルモンが不足している状態あるいは過剰な状態いづれにおいても、核への  $T_3$  供給量をできるだけ一定にする機構が存在し、これに細胞質  $T_3$  結合蛋白とその活性化因子が関与している可能性を調べた。細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白の量を甲状腺摘除ラットに生食を投与した群と  $T_4$  を投与した群とで比較観察すると、ホルモン投与ラットで有意に高い値が得られた。また活性化因子もホルモン投与により上昇した。これらの事実は甲状腺ホルモン投与により、細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白の  $T_3$  結合活性が上昇し、核への  $T_3$  の移行が制限される機構が誘導されることを示す。本研究では、ホルモン投与群より得られた細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白および活性化因子が非投与群のそれよりも核への  $T_3$  の移行を低下させる事実を確認した。したがって、細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白およびその活性化因子は甲状腺ホルモン標的組織で細胞内の negative feedback 機構の役割を果たしていると考えられる。

核  $T_3$  受容体は、核膜を取り除いた状態では、*in vitro* でインキュベーション溶液中に核から大量に放出されることが知られている<sup>39)</sup>。本研究では核  $T_3$  受容体の *in vitro* でのインキュベーション中に核からの受容体の放出量を測定したが、核を細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白存在下と非存在下で、また活性化因子存在下と非存在下でインキュベーションした後の核の  $T_3$  結合活性に差はなく、核  $T_3$  受容体の核からの放出は、実験中では極く少なかったものと思われた。

## V 結 語

ラット腎細胞質には非活性化型と活性化型の甲状腺ホルモン ( $T_3$ ) 結合蛋白が存在する。後者は、前者に熱処理細胞質画分に存在する活性化因子を加えることによって誘導される。活性化型細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白は、多量の遊離ホルモンを結合することにより、核受容体へ移行する  $T_3$  の量を減少させる。甲状腺ホルモン投与により、この細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白は増加し、また活性化因子も増加することから、細胞内に甲状腺ホルモン作用発現に対する negative feedback 機構が存在する可能性を指摘した。

本稿の要旨は昭和62年6月、第60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) Oppenheimer, J.H., Koerner, D., Schwartz H.L. and Surks, M.I. : Specific nuclear triiodothyronine binding sites in rat liver and kidney. *J Clin Endocrinol Metab*, 35 : 330-333, 1972
- 2) Oppenheimer, J.H. : Thyroid hormone action at the cellular level. *Science*, 203 : 971-979, 1979
- 3) Viarengo, A., Zoucheddu, A., Taningher, M. and Orusen, M. : Sequential stimulation of nuclear RNA polymerase activities in livers from thyroidectomized rats treated with triiodothyronine. *Endocrinology*, 97 : 955-961, 1975
- 4) Kurtz, D.T., Sipple, A.E. and Feigelson, P. : Effect of thyroid hormones on the level of hepatic mRNA for  $\alpha_{2u}$  globulin. *Biochemistry*, 15 : 1031-1035, 1976
- 5) DeGroot, L.J., Rue, P.A., Robertson, M., Bernal, J. and Scherberg, N. : Triiodothyronine stimulates nuclear RNA synthesis. *Endocrinology*, 101 : 1690-1700, 1977
- 6) Dillmann, W., Surks, M.I. and Oppenheimer, J.H. : Quantitative aspects of triiodothyronine binding by cytosol protein in rat liver and kidney. *Endocrinology*, 95 : 492-498, 1974
- 7) Davis, P.J., Handwerger, B.S. and Glaser, F. : Physical properties of a dog liver and kidney cytosol protein that binds thyroid hormone. *J Biol Chem*, 249 : 6208-6217, 1974
- 8) Yoshizato, K., Kistler, A. and Frieden, E. : Metal ion dependence of the binding of triiodothyronine by cytosol proteins of bullfrog tadpole tissues. *J Biol Chem*, 249 : 656-659, 1974
- 9) Kitagawa, S., Obata, T., Hasumura, S., Pastan, I. and Cheng, S.Y. : A cellular 3, 3', 5-triiodo-L-thyronine binding protein from a human carcinoma cell line. Purification and characterization. *J Biol Chem*, 262 : 3903-3908, 1987
- 10) Hashizume, K. and Ichikawa, K. : Localization of 3, 5, 3'-L-triiodothyronine receptor in rat kidney mitochondrial membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, 106 : 920-926, 1982
- 11) Hashizume, K., Ichikawa, K. and Kobayashi, M. : Effect of calcium ion on triiodothyronine binding to kidney outer mitochondrial membranes. *Endocrinol Jpn*, 31 : 311-320, 1984
- 12) 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.140-178, Academic Press, New York, 1983
- 13) DeGroot, L.J., Toressani, J., Carrayon, P. and Triard, A. : Factors influencing triiodothyronine binding properties of liver nuclear receptors. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 83 : 293-304, 1976
- 14) Surks, M.I., Koerner, D. and Oppenheimer, J.H. : *In vitro* binding of L-triiodothyronine to receptors in rat liver nuclei : Kinetics of binding, extraction properties, and lack of requirement for cytosol proteins. *J Clin Invest*, 55 : 50-60, 1975
- 15) Milgrom, E. : Activation of steroid receptor complexes. In : Litwack, G. (ed.), *Biochemical action of hormone*, Vol. VIII, pp.466-493, Academic Press, New York, 1981
- 16) Sanchez, E.R., Meshinchi, S., Tierungroj, W., Schlesinger, M.J., Toft, D.O. and Pratt, W.B. : Relationships of the 90-kDa murine heat shock protein to the untransformed and transformed states of the L cell glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*, 262 : 6986-6991, 1987
- 17) Tierungroj, W., Meshinchi, S., Sanchez, E.R., Pratt, S.E., Grippo, J.F.D., Holmgren, A. and Pratt, W.B. : The role of sulfhydryl groups in permitting transformation and DNA binding of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*, 262 : 6992-7000, 1987
- 18) Hirst, M. and Feldman, D. : Salt-induced activation of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor to a DNA binding form. *J Biol Chem*, 262 : 7072-7075, 1987

- 19) Hashizume, K., Kobayashi, M. and Miyamoto, T. : Active and inactive forms of 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine (T<sub>3</sub>)-binding protein in rat kidney cytosol : Possible role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in activation of T<sub>3</sub> binding. *Endocrinology*, 119 : 710-719, 1986
- 20) 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<sup>2+</sup> in NADPH activation. *Endocrinol Jpn*, 34 : 479-487, 1987
- 21) Hashizume, K., Kobayashi, M., Miyamoto, T. and Yamauchi, K. : Dependence of the mitochondrial uptake of triiodothyronine (T<sub>3</sub>) in rat kidney on cytosolic T<sub>3</sub>-binding protein. *Endocrinology*, 119 : 1063-1070, 1986
- 22) Yamauchi, K., Kobayashi, M., Miyamoto, T., Nishii, Y., Sakurai, A. and Hashizume, K. : Active and inactive forms of T<sub>3</sub>-binding protein in rat kidney cytosol (III) : regulation of nuclear T<sub>3</sub> binding by cytosolic T<sub>3</sub> binding protein. In : Vichayanrat, W., Nitiyanant, C., Eastman, C. and Nagataki, S. (eds.), *Recent progress in thyroidology*, pp.156-160, Crystal House, Bangkok, 1987
- 23) DeGroot, L. J. and Torresani, L. : Triiodothyronine binding to isolated liver cell nuclei. *Endocrinology*, 96 : 357-369, 1975
- 24) 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
- 25) 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
- 26) Hiramatsu, K., Hashizume, K., Aizawa, T., Ichikawa, K. and Yamada, T. : Thyrotropin secretion in patients with hyperparathyroidism or hypoparathyroidism : Effect of serum calcium on thyrotropin release. *J Clin Endocrinol Metab*, 56 : 623-626, 1983
- 27) Kim, K. H. and Cohen, P. P. : Modification of tadpole liver chromatin by thyroxine treatment. *Biochemistry*, 5 : 1751-1758, 1966
- 28) Ichikawa, K. and DeGroot, L. J. : Separation of DNA binding domain from hormone and core histone binding domains by trypsin of rat liver nuclear thyroid hormone receptor. *J Biol Chem*, 261 : 16540-16546, 1986
- 29) Ichikawa, K., DeGroot, L. J., Refetoff, S., Horwitz, A. L. and Pollak, E. R. : Nuclear thyroid hormone receptors in cultured human fibroblasts : Improved method of isolation, partial characterization and interaction with chromatin. *Metabolism*, 35 : 861-868, 1986
- 30) Ye, Z. S. and Samuels, H. H. : Cell and sequence-specific binding of nuclear proteins to 5'-flanking DNA of the rat growth hormone gene. *J Biol Chem*, 262 : 6313-6317, 1987
- 31) Fleg, F., Copp, R. R., Casanova, J., Hrowitz, Z. D., Janocko, L., Plotnick, M. and Samuels, H. H. : cis-Acting elements of the rat growth hormone gene which mediate basal and regulated expression by thyroid hormone. *J Biol Chem*, 262 : 6373-6382, 1987
- 32) Jump, D. B., Wong, N. C. W. and Oppenheimer, J. H. : Chromatin structure and methylation state of a thyroid hormone-responsive gene in rat liver. *J Biol Chem*, 262 : 778-784, 1987
- 33) 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
- 34) Ichikawa, K., Hashizume, K. and Yamada, T. : Monoamine oxidase inhibitory modulators in rat heart cytosol. *Endocrinology*, 111 : 1803-1810, 1982
- 35) Haraguchi, K., Hashizume, K., Ichikawa, K. and Kobayashi, M. : The effect of thyroid hormone on the high affinity Ca<sup>2+</sup>-ATPase in rat liver plasma membrane. *Endocrinol Jpn*, 31 : 141-148, 1984
- 36) Hashizume, K., Yamauchi, K. and Miyamoto, T. : Thyroid hormone inhibition of phospho-

- tidylinositol-specific phospholipase C in rat liver. *Endocrinol Jpn*, 32 : 461-487, 1985
- 37) Horiuchi, R., Tohson, M.L., Willingham, M.C., Pastan, J. and Cheng, S.Y. : Inhibition of the nuclear entry of 3, 3', 5-triiodo-L-thyronine by Monodansyleadaverine in GH<sub>3</sub> cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79 : 5527-5531, 1982
- 38) Murthy, P.V.N., Banovac, B. and McKenzie, J.M. : Hypothyroid-induced changes in triiodothyronine binding to nuclei and cytosol-binding proteins in rat liver. *Endocrinology*, 102 : 1129-1136, 1978
- 39) Bernal, J. and DeGroot, L.J. : Thyroid hormone receptors : release of receptor to the medium during *in vitro* incubation of isolated rat liver nuclei. *Endocrinology*, 100 : 648-658, 1977  
(62. 11. 13 受稿)
-