

原 著

甲状腺刺激物質の作用機序に関する研究

佐 藤 誠 也

信州大学医学部順応医学研究施設臨床部門

STUDIES ON THE MECHANISM OF ACTION OF THYROID
STIMULATING SUBSTANCES

Seiya SATO

Department of Medicine, Institute of Adaptation Medicine, School
of Medicine, Shinshu University

Key words: 牛甲状腺細胞膜 (bovine thyroid plasma membrane)
甲状腺刺激ホルモン (thyroid stimulating hormone)
アデニールサイクラーゼ (adenyl cyclase), プロスタグランディン (prostaglandins)

1. まえがき

甲状腺刺激因子としては古くから知られている thyroid stimulating hormone (TSH) 以外に, 甲状腺機能亢進症患者血中に特異的に見出される long-acting thyroid stimulator (LATS), および最近注目されつつある Prostaglandins がある。これらの甲状腺刺激物質の作用機序を説明するうえで Sutherland 一派の提唱した Cyclic AMP 学説—ホルモン作用は細胞内成分である Cyclic AMP によって伝達される—が適応されつつある^{2)~4)}。

この Cyclic AMP (C-AMP) は ATP を基質として Mg 存在下で, Adenyl cyclase (AC) によって細胞内で産生されるが⁵⁾, C-AMP がホルモンの作用伝達因子であるという立場を取れば, AC の活性化はホルモンの primary action であり, ホルモン—AC の相互関係を明らかにすることはその作用機序を解明する第一の鍵といえよう。

しかしながら現在の所, 甲状腺の AC 活性化機構はほとんどわかっていない。TSH, LATS, Prostaglandin E (PGE) がいずれも共通して AC—C-AMP 系を刺激促進させるとしてもポリペプチドである TSH, 一種の IgG と考えられる LATS, また不飽和脂肪酸である Prostaglandins など著しく化学的構造の異なる物質がはたして相互にどのような活性化機構を通じ, C-AMP を上昇させるのであろうか?

さらに甲状腺組織内因子である Prostaglandins が外因子である TSH や LATS の AC 活性化にどのような役割を果たしているか, Prostaglandins の生理的役割を明らかにすることは, 臨床的にもきわめて興味深い。

著者⁸⁾はすでに, 牛甲状腺単離細胞中の AC が TSH, LATS あるいは PGE によって活性化されることを確認するとともに, PGE の類似構造物質で antagonist である, 7-ox-13-prostynoic acid や, 7-ox-15-hydroxy-13-prostynoic acid が PGE による単離細胞中 AC の活性化を抑制するばかりでなく, TSH や LATS の AC 活性化も抑制する事実を報告した。さらに, PGE antagonist は, dibutyl cyclic AMP によって刺激促進される甲状腺単離細胞の I⁻ transport や polystylen latex beads の取り込みを抑制しないので, antagonist は, 甲状腺の AC—Cyclic AMP (C-AMP) 系に働いた結果, 抑制効果を発揮したものであることを示唆した⁸⁾。

上記の成績から著者は甲状腺の AC 活性化の receptor に関して次の様な可能性を推論した。1) TSH, LATS, PGE は共通した receptor site を持ち, antagonist は同一部位に働いて阻害作用を示した, 2) 三者の receptor site は異なっているが, TSH, LATS は PGE を介して AC を活性化し antagonist は, PGE を抑制した結果 TSH, LATS の AC 活性

化が二次的に抑制された, 3) TSH, LATS の AC 活性化に PGE は介在せず antagonist は, none specific に TSH, LATS に対しても阻害作用を示した。

上記の推論を明らかにする目的で本稿では, AC の局在するといわれている甲状腺 plasma membrane (P. M.) を分離し, AC を部分的に濃縮するとともに, 単離細胞よりも, よりホルモン receptor-AC の単純化された条件下で甲状腺刺激物質の AC 活性化におよぼす相互関係を単離細胞実験の成績と比較検討した。

2. 方法および材料

1) 牛甲状腺 plasma membrane の分離方法

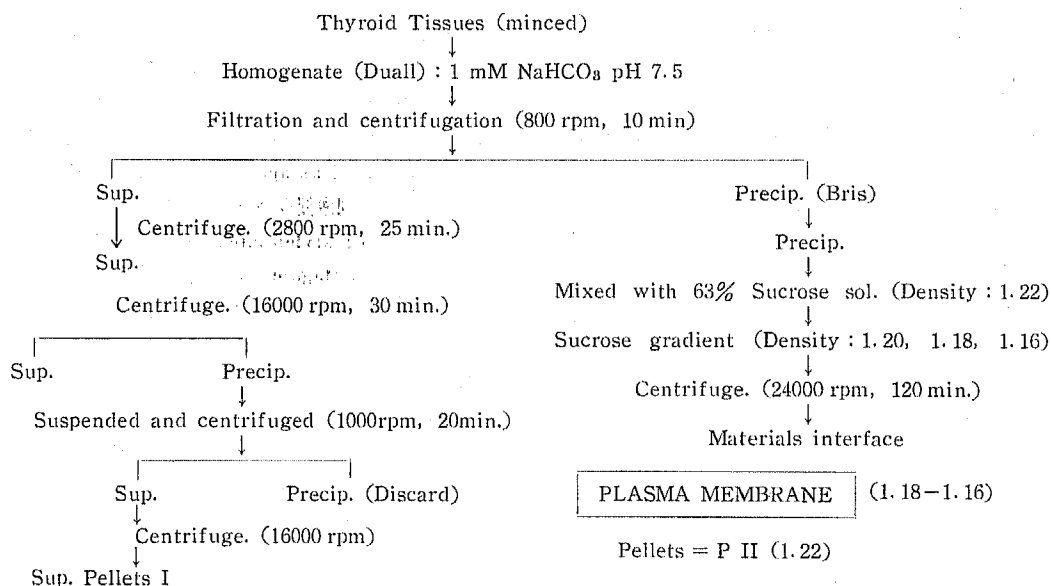
P. M. の分離は Yamashita¹⁰⁾ らの方法を一部改良して行なったので, その大略を表 1 に示した。氷冷した新鮮な牛甲状腺約 30g を細かく切片にした後, 約 300ml の 1 mM NaHCO₃ (pH 7.5) により Duall の homogenizer で homogenate を作る (homogenize は 4°C 以下で 10 stroke 以上行なわない様注意する)。homogenate は, 4 重ガーゼ (又は No. 40 か No. 120 の cheese cloth) でろ過した後, 800 rpm で 25 分間冷凍遠心する。上清をさらに 2800 rpm で 25 分間冷凍遠心後, 沈渣を約 150ml の NaHCO₃ で洗滌した後, 2800 rpm で 25 分間再遠心分離する。沈渣を

3ml~4ml の NaHCO₃ で充分浮遊させた後, SW 25 roter 用 tube 3 本に分注し, 各 tube に 63% sucrose 10ml を加えて混和する (density 約 1.22)。以下, density 1.20 (7ml), 1.18 (10ml), 1.16 (5ml) を静かに重層する。遠心分離は SW 25 roter を用いて 24,000 rpm 2 時間, 4°C 以下で行なう。density 1.18 と 1.16 の中間層に分離される P. M. をガラス毛细管で静かに捕集後 (density 1.18 層に分離される mitochondria の contamination に注意する), 適量の NaHCO₃ 液を混和して P. M. を 16,000 rpm 30 分間で再沈渣させ, さらに NaHCO₃ で洗滌する。分離した P. M. はただちに少量の NaHCO₃ で浮遊させた後, dry ice-acetone で凍結し, -20°C~-80°C で保存する。30g の新鮮甲状腺から, 最終的には 7~19mg の P. M. が得られる。

2) 各酵素活性の測定

Adenyl cyclase assay : Zor⁴⁾ らの方法に順じて行なったが, 基質 AT³²P- α から産生された C-AM³²P の分離には, Almina column と Krishna 法を併用した著者らの改良法¹¹⁾を用いた。incubation medium は 50 μ l の 40 mM Tris-HCl buffer pH 7.8 で, 3 \times 10⁻⁸M ATP, 1 μ C AT³²P- α (International Chemical Nuclea. Co.), 3.5 \times 10⁻⁸M MgCl₂, 10⁻²M Theophylline, 4 \times 10⁻⁸M C-AMP (除くこともある), 0.1% Bovine Serum Albumin を含み, さらに,

表 1 牛甲状腺 Plasma membrane の分離



generation system として、 $2 \times 10^{-2} M$ phosphoenolpyruvate, $250 \mu g/ml$ pyruvate kinase, $250 \mu g/ml$ Myokinase を含む。incubation は、 $50 \mu g \sim 100 \mu g/50 \mu l$ の P. M. を加えて $37^\circ C$, 10 分間行ない、反応は 3 分間煮沸して停止した。産生された C-AM ^{32}P の回収率は、各 tube ごとに、 3H -C-AMP (Schwarz Bio-Research Inc.) を反応終了後、incubation medium に添加して測定し、最終的に C-AM ^{32}P を回収率で補正した。

その他、Na-K-ATPase 活性は Stanburg $^{12)}$ らの方法、5'-Nucleotidase 活性は、McKeel $^{13)}$ らの方法、Cytochrome C Oxidase 活性の測定は Whorton $^{14)}$ らの方法によって測定した。また phosphodiesterase 活性は 3H -C-AMP の加水分解を指標とする Bas-tomsky $^{15)}$ らの方法によって行ない、未分解の C-AMP の分離は、著者らの方法を用いた。牛 TSH は、Armour 社製の Thytropar を使用した。Prostaglandin E $_2$ は、Dr. J. Pike (Upjohn Co. USA), 7-ox-13-prostynoic acid は Dr. J. Fried (Chicago 大学) より提供されたが、いずれも使用時 $0.1 ml$ のエタノールに溶解後、 $0.9 ml$ の Na $_2$ CO $_3$ ($0.2 mg/ml$ pH 7.0) で稀釈した。LATS-IgG は、Baumstark $^{16)}$ の方法に従い、DEAE-Sephadex-A 50 カラムクロマトグラフィーで精製した。TSH Bioassay (McKenzie 法) で測定した LATS-IgG の活性を血中 ^{131}I 放出からみると、その増加率は、 $(3920 \pm 380/0.5 mg \text{ protein weight})$ であった。LATS-IgG はさらに Smith $^{17)}$ らの方法により isoelectric focusing で精製したが、この LATS-IgG 分画は DEAE-Sephadex-A 50 により精製した LATS に比較して約 50 倍の specific activity ($3760 \pm 260/0.01 mg \text{ protein weight}$) を示した。

AC assay に使用した AT ^{32}P - α ($500 \sim 2000 mc/$

$mmol$) は International Chemical and Nuclear Co. から、また 3H -C-AMP は、Schwarz Bio-Research から入手した。

3. 成 績

1) 牛甲状腺 P. M. の分離と P. M. 中

AC 測定法の検討

牛甲状腺の homogenate 及び P. M. 中の種々の酵素活性を比較検討した成績は表 2 に示した。P. M. を分離すると、P. M. の結合性酵素といわれている Na-K-ATPase、及び 5'-Nucleotidase 活性は、homogenate に比較して各々、32.4 倍、8.5 倍に高められた。Cytochrome C Oxidase はほとんど検出されなかったため、mitochondria の contamination はきわめて少ないものと思われる。一方、phosphodiesterase 活性は homogenate よりも若干低値を示したが、得られた P. M. によって必ずしも一定せず、homogenate よりも高値を示す場合が認められた。

2) P. M. 使用時の AC assay の検討

従来、homogenate 中の AC 活性測定に ATP の generation system として使用して来た phosphoenolpyruvate (PEP) + pyruvatekinase (PK) の system と PEP + PK + Myokinase (MK), Creatinephosphate (CP) + Creatine phosphokinase (C PK) の各 system のいずれが最も適しているか比較検討した。結果は図 1 に示した様に、AC の basal level (control) には各 system の間で、特に差は認められないが、TSH に対する反応性は MK を添加した system が最も高く、最適の方法であると考えられた。

次に TSH により活性化される P. M. 中の AC に及ぼす種々の濃度の基質 ATP の影響について検討した。incubation medium に $1 \mu C$ の AT ^{32}P - α

表 2 牛 甲 状 腺 P. M. 中 の 酵 素 活 性

Enzyme	Homogenate	P. M.	P. M./Homogenate
Na-K-ATPase (1)	0.17	5.71	32.4
5'-Nucleotidase (2)	0.4	3.4	8.5
Cytochrome C Oxidase (3)	0.01	0	—
Phosphodiesterase (4)	84.4	70.6	—

(1) Optical Density/hour/mg protein

(2) μ mol/hour/mg protein

(3) mg PO $_4$ /hour/mg protein

(4) % C-AMP hydrolysed

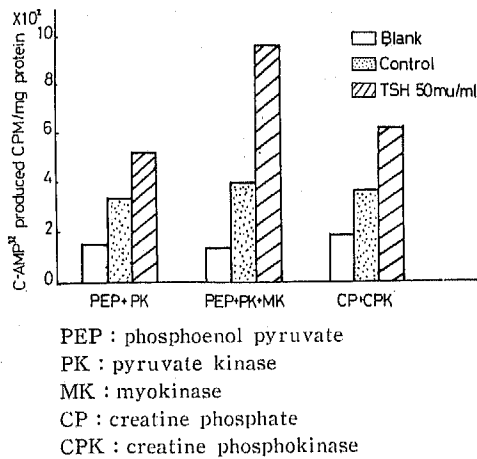


図1 Adenyl Cyclase Assay における ATP generation system の比較 (P. M.)

(約 10^{-7} M) と未標識の ATP 10^{-5} M から 10^{-2} M を添加した時の TSH 50 mU/ml による AC 活性化を図2に示した。この際、medium 中の $MgCl_2$ 3×10^{-8} M 存在下では ATP 添加により明らかに TSH に対する AC の反応性は増加し、 $2 \sim 4 \times 10^{-8}$ でほぼピークに達した。それ以上の高濃度の ATP 添加ではむしろ TSH の反応性は急激に低下した。

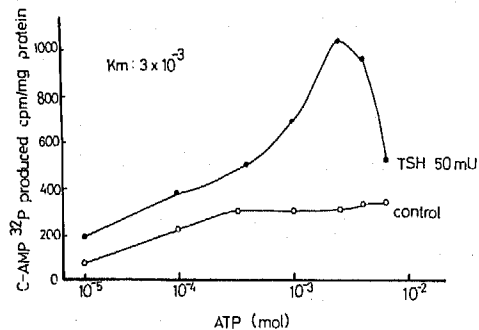


図2 Adenyl Cyclase Assay における基質 ATP 濃度の影響 (P. M.)

homogenate あるいは、単離細胞中 AC 活性測定時には ATP 10^{-5} M の添加で充分 TSH により活性化されるので、P. M. の場合と異なっており、P. M. 使用時には添加する基質 ATP 量を考慮する必要がある。

3) P. M. 中 AC 活性の安定性

甲状腺の homogenate あるいは、組織切片を用いた実験でも AC が失活しやすいことはすでに指摘さ

れてきたが、P. M. として分離することによりさらにその傾向は著明である。P. M. 中の AC は窒素ガス飽和で -80°C に保存した時 1 ヶ月間 -20°C の凍結保存でも 4~5 日間はほぼ分離した時の活性を保ったが、 4°C 冷蔵庫保存では一夜で 80% 以上失活した。また一回以上凍結融解した P. M. は使用不可能であった。従って 4°C 以下の条件下で本酵素の分離操作をすべ

4) 各 subfraction における AC 活性の比較

各 subfraction における AC の specific activity を図3に示した。800 rpm pellet では AC 活性の basal level が homogenate の約 3.7 倍、TSH 反応性は 3.7 倍と両者ともほぼ同率に高まっているが、P. M. では、basal level が homogenate の 5.2 倍に対して、TSH 反応性は、14.7 倍と急激に高まった。すなわち P. M. 分画では TSH 反応性の AC が特異的に濃縮されていることを示す。なお sucrose gra-

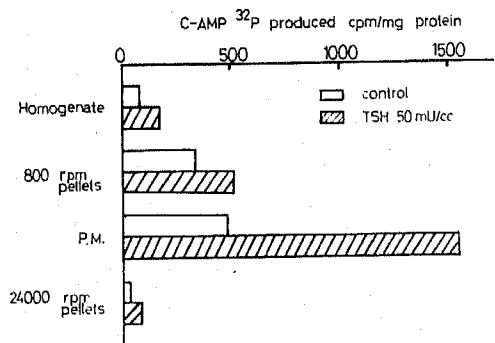


図3 subfraction における Adenyl Cyclase の specific activity

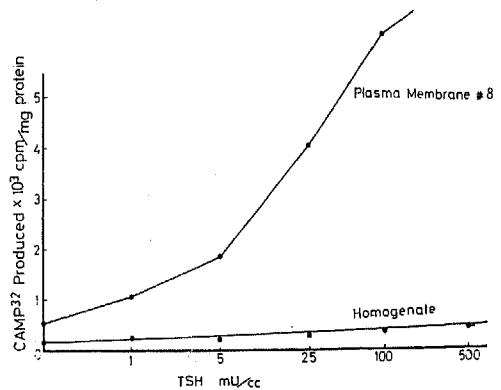


図4 P. M. 中 Adenyl Cyclase の TSH に対する反応曲線

dient の際得られた pellet にはほとんど AC 活性は認められなかった。

5) TSH dose response curve

種々の TSH 濃度に対する P. M. 中の AC 反応用量曲線を図 4 に示した。TSH の最少感度は 0.5 mU/ml であり 50 mU/ml 以上ではほぼ直線的に AC は活性化される。点線で示した homogenate 中の AC 活性化と比較して明らかなように P. M. 中 AC の TSH 反応性は、きわめて高く、その specific activity は homogenate の約 15~30 倍であった。

4. TSH, LATS, PGE による牛甲状腺 P. M. 中 AC 活性化

1) TSH, PGE₂ による牛甲状腺 P. M. 中の AC 活性化

牛甲状腺単離細胞中の AC 活性を充分上昇させる濃度 $10^{-4} \sim 10^{-8} \text{ M}$ (TSH $10 \text{ mU} \sim 100 \text{ mU/ml}$ に相当) の PGE₂ を用い P. M. 中 AC 活性に及ぼす影響を検討した。図 5 各種濃度の TSH や PGE₂ を投与した場合、P. M. 中の AC 活性がどう変化するかを示したものである。PGE₂ は 10^{-6} M の濃度で若干 control よりも P. M. の AC 活性を上昇させる。しかし、単離細胞ではほぼ maximum な反応を引き起す PGE₂ 10^{-4} M はかえって P. M. の AC を刺激しなかった。これにくらべ TSH は使用した全領域において P. M. の AC を刺激した。すなわち、PGE₂ は intact cell の AC を刺激しないのに対し、TSH はそのいずれの場合にも AC を刺激することが明らかになった。

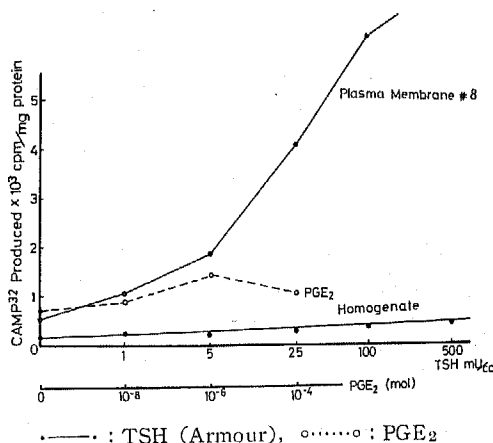
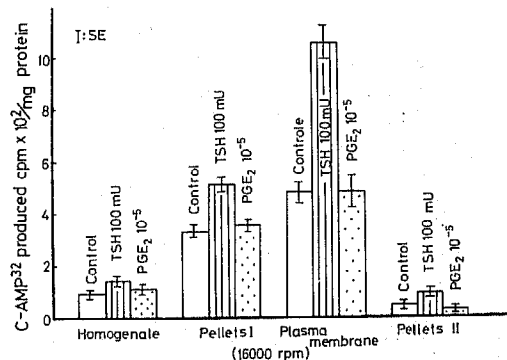


図 5 TSH, PGE₂ による牛甲状腺 P. M. 中 Adenyl Cyclase の活性化

2) subfraction 中 AC の TSH, PGE₂ に対する反応性

上記の実験に用いた P. M. は牛甲状腺 homogenate の 300 rpm 沈渣から抽出分離したもので、3000 rpm の上清に PGE₂ に反応する AC が分離されている可能性がある。このため図 6 に示した様に 3000 rpm 上清をさらに、16000 rpm で遠心分離して得た Pellets I に PGE₂ 10^{-5} M を添加して AC 活性を測定したが、TSH, PGE による AC 反応性のパターンは P. M. の場合とほとんど変わらず特に PGE₂ に対して反応性の高い AC 活性は認められなかった。また sucrose gradient の段階で遠心分離 24000 rpm により得られる沈渣 Pellets II には、TSH, PGE₂ 反応性の AC 活性はほとんど認められなかった。



Pellets I, II は表 1 説明を参照

SE : Standard Error

図 6 TSH, PGE₂ による subfraction 中 Adenyl Cyclase の活性化

3) TSH の P. M. 中 AC 活性化に及ぼす PGE₂ の影響

TSH あるいは PGE₂ を 4°C , 30 分間 preincubate した後、TSH 群には PGE₂ を PGE₂ 群には TSH をさらに添加して 37°C で 10 分間 incubate し、P. M. 中 AC 活性を検討した。成績は図 7 に示したように全く preincubation を行わず TSH minimum 量の 10 mU/ml , maximum 量の 100 mU/ml 及び PGE₂ 10^{-5} M を各々単独で添加した群 (No preincubation 群) に対し、preincubation 中、なんら添加せず、incubation で TSH, PGE₂ を同時に添加した群 (No pretreatment 群) では、若干 C-AMP が高値を示したが推計学的に有意差は認められなかった。PGE₂ 10^{-5} で preincubate した後 TSH を加えると、No pretreatment 群に比べ C-AMP の増加はやや低

値を示す傾向を示したが有意差はない。また TSH で preincubation した後、incubation で PGE_2 を添加した群も PGE_2 前処置とほぼ同様の C-AMP の上昇がみられた。以上の成績から TSH の P. M. 中 AC 活性化には、 PGE_2 はなんら有意の影響は及ぼさないとされる。

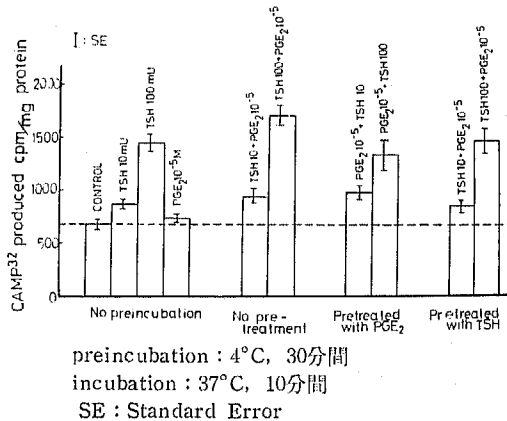
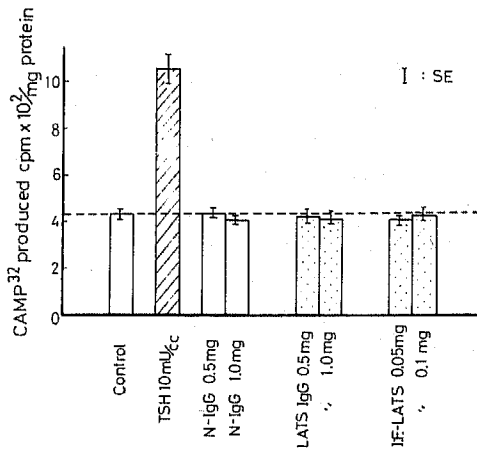


図 7 TSH, PGE_2 前処理 P. M. 中の Adenyl Cyclase 活性に及ぼす TSH, PGE_2 の相互作用

4) LATS による牛甲状腺 P. M. 中の AC 活性化

牛甲状腺単離細胞中 AC の活性化の際、maximum 量の反応を示した LATS-IgG 0.5mg から 10mg/tube



N-IgG : normal-IgG
LATS-IgG : DEAE-Sephadex column で精製
I. F.-LATS : Isoelectric focusing で精製
SE : Standard Error

図 8 LATS の牛甲状腺 P. M. 中 Adenyl Cyclase 活性に及ぼす影響

を P. M. に添加すると、図 8 の様に、AC 活性は control あるいは normal (N)-IgG 添加の場合に比較して増加が認められなかった。また isoelectric focusing (I. F.) で高度に精製した LATS (LATS-IgG の 50 倍の力価)、0.05mg から 0.1mg の添加でも AC 活性の増加は認められなかった。

5) TSH の P. M. 中 AC 活性化に及ぼす PGE_2 antagonist の影響

種々の濃度の TSH すなわち 5mU/ml から 500mU/ml の範囲でみられる P. M. 中 AC 活性化に対し、 PGE_2 の antagonist である 7-ox-13-prostynoic acid (P. Y.) がどのように作用を示すか検討した。

P. Y. 5μg/ml を TSH と同時に incubation medium に添加すると図 9 に示したように P. Y. は TSH の AC 活性化にはなんら影響を及ぼさず牛甲状腺単離細胞中にみられたような TSH に対する抑制効果は全く認められなかった。

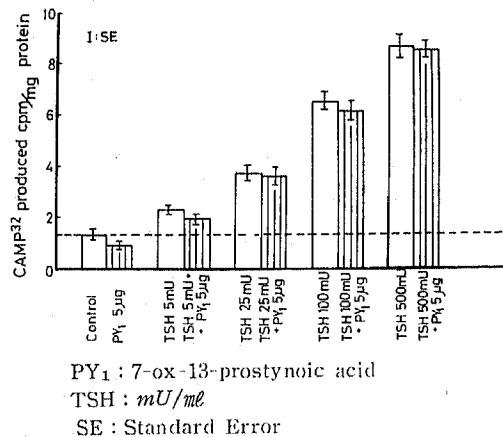


図 9 TSH による P. M. 中 Adenyl Cyclase 活性化に及ぼす PGE_2 antagonist の影響

5. 考 按

ホルモンの primary action が AC の活性化にあり、細胞側にはホルモンの作用の伝達を感知する receptor (受容体) 機構が存在し、その機構を通じて AC は活性化されるという概念は Sutherland らの C-AMP 説¹⁾によって導かれた。この概念は、その後 Pastan¹⁸⁾¹⁹⁾らが報告した trypsin, phospholipase C 処理牛甲状腺切片ではもはや TSH による AC 活性化が起らない事実や、巨大分子化した ACTH, Insulin でもなおホルモン作用効果が発現するなどの成績²⁰⁾²¹⁾からホルモンは細胞内に取り込まなくても作

用することが実証され確実視されるようになった。

AC が plasma membrane に局在するという事実は最初 erythrocyte²²⁾や肝細胞膜²³⁾の実験から明らかにされた。甲状腺については Stanbury¹²⁾らが Wallach²⁴⁾らの方法を用いて P. M. の分離を行ない、分画中に $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ が濃縮されることを見出したが TSH に反応する AC を証明することができなかった。しかし最近 Yamashita¹⁰⁾, Wolff³⁵⁾らが各々異なった方法で TSH 反応性の AC を P. M. 中に濃縮したが、今回、著者も Yamashita らの方法によって牛甲状腺から P. M. を分離し P. M. 中に TSH 反応性のきわめて高い AC が存在することを確認した。

前二者の分離法の相違は前者が、3000 rpm 沈渣すなわち核分画から P. M. の分離を行っているのに対して、後者は 3000 rpm 上清から分離をすすめていることである。したがって Wolff³⁵⁾らは、mitochondria の contamination を最小にするため複雑な操作と長時間を要する欠点があり、その上極めて熱に不安定な AC の失活を招き TSH に対する AC の反応性も著者の成績と比較して劣っている。著者の成績では 50 mU/mg の TSH 添加によって control の 4~5 倍に AC 活性が高まるが、Wolff らの場合、約 2 倍の増加にとどまっている。

P. M. の marker として $\text{Na} - \text{K} - \text{ATPase}$ ²⁵⁾および、5'-Nucleotidase²⁶⁾の両酵素が指摘されているが著者らの分離した P. M. 中の両酵素活性は、homogenate のそれに比較して、10数倍に濃縮されており Yamashita¹⁰⁾, Wolff³⁵⁾らの成績とよく一致している。しかも、P. M. 中に mitochondria の specific な酵素である Cytochrome C oxidase がほとんど検出されなかったことは、分離操作中最も contaminate しやすい mitochondria が P. M. 分画から能率良く除去されているといえよう。

Jarett²⁷⁾らは脂肪組織から分離した P. M. には phosphodiesterase (PDE) 活性は認められないことを報告しているが、著者の成績では甲状腺 P. M. 中に明らかに PDE 活性が認められる。しかし甲状腺 P. M. 中の PDE 活性は、homogenate 中のそれと specific activity の上でほとんど有意差が認められないため PDE が P. M. に結合した酵素とは考えにくい。

AC が極めて不安定で失活しやすい酵素であることが本酵素の分離とその本体の究明を著しく遅らせたが著者も今回の P. M. 分離にあたって上記の事実を

痛感した。AC の不安定性は receptor site が機械的操作によって壊れやすく耐熱性に非常に乏しいことに由来しているため P. M. 分離にあたって 4°C 以下の低温下で全操作を行うこと、homogenizer を選択し手動で homogenize するなど厳守する必要がある。

P. M. 使用時の AC assay を行う場合には、homogenate やスライスなどの場合と異なり P. M. 中に ATPase 含有量が異常に高まるため incubation medium 中に基質 ATP を 10^{-8} 前後添加する必要があることを指摘し、generation system として、phosphoenol pyruvate-pyruvate kinase-myokinase が最も適していることを明らかにした。この際 ATP は単に generation system を有効に維持させるためばかりでなく、AC に対して effector として働く可能性が推察された。

古くから、一つの概念として知られてきたホルモン receptor の機構すなわち薬理学的定義の上から区別されるカテコラミンの作用における α -, β -receptor の概念に、Robison ら²⁸⁾は、AC の活性化機構をあてはめて、より実体的な意義を与えた。AC は一種の複合酵素と考えられホルモンの種類と量を検知する receptor (regulatory subunit) と、receptor によって活性が抑制されている catalytic subunit から成り立っていると仮定した。

上記の仮説は最近、Sutherland¹⁾をはじめとて多くの研究者により、脂肪組織の lipolytic response におよぼす epinephrine, ACTH, glucagon, TSH, LH などの作用効果^{27,29)}や心収縮増加³⁰⁾におよぼす adrenergic blocking agents や C-AMP の影響などの面から実証されつつある。

著者は、牛甲状腺単離細胞に、TSH, LATS, PGE の maximum 量を同時に添加しても AC は3者の相加的反應として活性化されなかったことから TSH, LATS, PGE に対応する AC (catalytic subunit) は単一であることを示唆するとともに⁸⁾、PGE の antagonist が TSH, LATS の AC 活性化におよぼす抑制作用から甲状腺刺激因子の receptor site について3つの可能性を推論した^{8,9)}。

今回の実験成績によると、牛甲状腺単離細胞でみられた PGE_2 および LATS による著明な AC 活性化が、TSH に対してきわめて反応性の高い牛甲状腺 P. M. 中の AC ではほとんど認められない事実から、第一の可能性は少ないと思われる。さらに PGE_2 で前処理した P. M. に TSH を添加して incubation しても

TSH の AC 活性化が PGE 未処理の P. M. に対する TSH の反応と有意差を示さない事実は上記の推論を一層支持している。そこで TSH, LATS, PGE が各々異なった receptor site を持つとするならば、TSH, LATS の AC 活性化に PGE が介在するという第二の可能性は P. M. の実験から一層考えにくいように思われる。すなわち今回の実験で TSH は PGE によっては活性化されない AC を著しく活性化することが明らかであるため、TSH には単独で TSH に対して specific な receptor と結合することにより直接的に AC を活性化する機構が存在することは間違いない。

しかしながら、最近 Yu³⁰⁾らは牛甲状腺単離細胞中の PGE₁ および PGE₂ が TSH 10mU/ml から 100 mU/ml によって control level の 30% から 80% 増加することを radioimmunoassay で明らかにしており、この際、luteinizing hormone (LH), human growth hormone (HGH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) は無効であったと報告している。また P. M. には PGE の precursor である arachidonic acid が膜の構成成分として存在しており³²⁾、今回の著者の実験では使用した牛甲状腺 P. M. に PGE が存在しないという証明はない。

もし Yu らの成績が事実とすれば、TSH の AC 活性化機構には直接結合して伝達する receptor と、PEG の合成を促進し間接的に伝達する receptor の二つの経路が存在する可能性は否定できない。P. M. を使用する AC assay は、receptor-AC 機構に限ってみると確かに単純化された実験条件といえるが反面非常に非生理的条件下での AC 活性化を観察しているといえよう。従って生理的条件の下では、PGE によって mediate されるような TSH, あるいは LATS の AC 活性化機構が存在するのかもしれない。一応現在の段階では第三の可能性すなわち TSH, LATS, PGE は各々異なった receptor site と結合して、共通した AC (catalytic subunit) を活性化し PGE antagonist は TSH, LATS の AC 活性化に対しても none specific な抑制阻害を示したものと考えるのが最も合理的と思われる。

しかし、antagonist は、P. M. の実験では TSH の AC 活性化になんら影響を及ぼさないためその阻害部位は TSH と receptor の結合部位に直接働いた結果でなく間接的なものであろうと推察される。

Yamashita³⁴⁾らは著者と異なる観点から AC 活性

化における TSH と LATS の receptor の相違を推論している。すなわち、TSH 感受性の P. M. を LATS によって前処理すると TSH に対する AC の反応性が著しく抑制されることを見出した。しかし、この LATS による抑制は Lineweaver-Burk の plot では非競合的阻害のタイプを示すことから両者は各々異なった receptor site を持ち、LATS による抑制は LATS が膜に結合することにより膜構造を立体的に変化させた結果であろうと推論している。従来 TSH と LATS との間には作用機序の面で相違が明らかにされておらず、その意味から両者の primary action である AC 活性化機構上 receptor site が異なるという今回の成績は今後 LATS 研究にとってきわめて興味深い。

単離細胞と P. M. を用いた際にみられる PGE の AC 活性化の相違は何故生じたのであろうか？。まず著者らは PGE に対して反応性の高い AC が P. M. の分離過程で他の分画に除去された可能性を考えた。

著者は甲状腺 homogenate の 3000 rpm 沈渣、すなわち、核分画から P. M. の分離を行なっている。他の研究者¹²⁾³⁵⁾のほとんどが mitochondria の分画から P. M. を分離している点からみて、相当量の AC が 3000 rpm 上清分画に存在している可能性がある。しかし著者が、3000 rpm 上清から 16000 rpm で得られる pellet を用いても全く PGE₂ による AC 活性上昇が認められなかった。従って上記の可能性は否定されよう。次に P. M. の分離過程で PGE₂ の receptor site が失活した可能性があげられる。事実、肝 P. M. 中 AC 活性に対する ACTH, glucagon, epinephrine の反応性は分離段階で失われるが、その程度は各々異なっており、glucagon, ACTH, epinephrine の順に失活しやすいという報告がある²⁷⁾。しかし著者が単離細胞を用いた経験によると、TSH に対する AC 反応性が失われていても PGE に充分反応する場合が多く、むしろ TSH に比較して PGE の receptor が安定しているようにみえる。さらに、P. M. の分離過程で失活が最もおこりやすい sucrose gradient の段階を避けた pellet I 分画でも、PGE に対する AC 反応性はきわめて低いなどの理由から、PGE の receptor のみが特に破壊されたとは考え難い。単離脂肪細胞にみられる PGE の C-AMP 産生抑制は broken cell では認められないことから、PGE の抑制作用発現には完全な膜構造が必要であるという Ramwell³³⁾の研究がある。甲状腺でも同様の可能性が考えられる

が、甲状腺 homogenate では PGE_2 によって明らかに AC が活性化されるのでその可能性は少なく、従って homogenate 中では存在するなんらかの co-factor が P. M. 作成中に除去され、PGE の AC 活性化が起こらないと考えるのが最も妥当であろう。

甲状腺機能亢進症患者血中 LATS も PGE と同様 P. M. 中の AC 活性化を促進させなかった点で Wolff らの成績と一致し、LATS による促進を認めた Yamashita³⁴⁾ らの成績を確認出来なかった。

上記の不一致の原因として P. M. 分離法の相違や分離した P. M. の TSH に対する感度差を上げることが出来るかもしれない。

しかし著者らは Yamashita¹⁰⁾ らと同じ方法で P. M. を分離し、しかもこの P. M. 中 AC は 50mU/ml の TSH 添加で control の 5 倍に増加しており、P. M. 分離法の相違や P. M. の感受性の差は存在しないと思われる。しかも DEAE-カラムクロマトグラフィーで精製した LATS-IgG よりも 5 倍の力価を示す isoelectric focusing で精製した LATS-IgG でも AC 活性化が起こらないことから考察し、単に感度の差のみに起因しているとは考えられないであろう。一般に LATS は TSH と異なって in-vitro の実験では甲状腺刺激効果がきわめて弱い。例えば、AC assay でも homogenate を使用する AT^{32}P 法では LATS によって AC の活性化は認められないが、生理的条件下により近い組織切片の Adenine- ^{14}C ラベル法で AC の活性化がはじめて認められる⁵⁾。以上の様な事実から考え併せると LATS の P. M. 中 AC 活性化にも先に述べた PGE の場合と同様ななんらかの co-factor か、または完全な膜構造が必要である可能性も否定できない。今後さらに詳細な検討が必要であろう。

以上、甲状腺刺激物質の primary action である AC 活性化、特に receptor 機構について著者の成績を述べたが、TSH, LATS の AC 活性化における PGE の生理的役割については複雑で、現在の段階では統一的に説明することは困難であった。おそらく PGE は TSH, LATS の AC 活性化を増強的に促進すると思われる³⁶⁾ が単離細胞では PGE の量的変化によってはむしろ TSH の AC 活性化を抑制する場合もあることが指摘されている³⁾。従って PGE には、2つの相反する作用効果があり TSH の刺激作用を regulate しているのかもしれない。

このような多様な PGE の TSH におよぼす相互作用を解明するためには P. M. 中 AC を PGE が活性化しない原因の追求 (intact cell と broken cell の間にみられる差異) をはじめとして、人血中あるいは甲状腺組織中における Prostaglandins の生理的変動を確実に把握することが今後の課題であろう。

ま と め

1) 牛甲状腺より分離した P. M. 中の Na-K-ATPase 活性は homogenate の約 32 倍、5'-Nucleotidase 活性は約 8.5 倍であった。また Cytochrome C oxidase 活性はほとんど検出されなかった。phosphodiesterase 活性は一般に homogenate よりも低値を示した。

2) P. M. を使用する場合は AC assay には ATP generation system として phosphoenol pyruvate-pyruvate kinase-myokinase 系が最も効果的であった。また incubation medium に添加する ATP の最適量は、 $3 \times 10^{-8}\text{M}$ MgCl_2 に対して $2 \sim 4 \times 10^{-8}\text{M}$ であった。

3) P. M. 分離過程で AC の TSH に対する反応性は 3000 rpm pellet で homogenate の約 3.7 倍に過ぎないが、P. M. では 14.7 倍と急激に高まり AC が特異的に P. M. 分画に濃縮されることを確認した。

4) P. M. 中の AC 活性は TSH の 0.5mU/ml から 500mU/ml の間で TSH 濃度の増加に伴い上昇した。P. M. 中 AC の TSH に対する反応性は specific activity の上からみて homogenate の約 15~30 倍に高められた。

5) PGE_2 10^{-6}M から 10^{-4}M 、また LATS-IgG $0.5\text{mg} \sim 1\text{mg/ml}$ および LATS-IgG の 50 倍の力価を示す isoelectric-focusing で精製した LATS $0.05\text{mg} \sim 0.1\text{mg/ml}$ によっても P. M. 中の AC は活性化されなかった。

6) P. M. 分離過程でえられた subfraction, すなわち 3000 rpm 上清分画ならびに sucrose gradient の段階でえた 24000 rpm pellet 分画には PGE に対して反応性の高い AC 活性は認められなかった。

7) PGE_2 で 4°C 、30 分間前処理した P. M. に TSH を添加した場合と、前処理を行わない P. M. に TSH を添加した場合の TSH による P. M. 中 AC 活性化には有意の相違が認められなかった。

8) TSH による P. M. 中 AC 活性化に PGE の

antagonist はなんら影響を及ぼさなかった。

(稿を終るにのぞみ、終始御指導、御校閲戴いた山田隆司教授に深謝を表します。)

REFERENCES

- 1) Sutherland, E. W., Robison, G. A. and Butcher, R. : Some aspects of the biological role of adenosine 3', 5' monophosphate (cyclic AMP), *Circulation*, 37 : 279-305, 1968
- 2) Gilman, A. G. and Roll, T. W. : Studies on the relation of cyclic 3', 5' AMP to TSH action in beef thyroid slices, *Fed. Proc.*, 25 : 617-618, 1966
- 3) Pastan, I. and Katzen, R. : Activation of adenylyl cyclase in thyroid homogenates by TSH, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 29 : 792-798, 1967
- 4) Zor, U., Kaneko, T., Lowe, I. P., Bloom, G. and Field, J. B. : Effect of TSH and prostaglandins on thyroid adenylyl cyclase activation and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, *J. Biol. Chem.*, 244 : 5189-5195, 1969
- 5) Kaneko, T., Zor, U. and Field, J. B. : Stimulation of thyroid adenylyl cyclase activity and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate by long-acting thyroid stimulator, *Metabolism*, 19 : 430-438, 1970
- 6) Field, J., Dekker, A., Zor, U. and Kaneko, T. : In vitro effects of prostaglandins on thyroid gland metabolism, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 100 : 278-316, 1971
- 7) Sutherland, E. W., Roll, T. W. and Menoni, T. : Adenylyl cyclase. I. Distribution, preparation and properties, *J. Biol. Chem.*, 237 : 1220-1226, 1962
- 8) Sato, S., Szabo, M., Kowalski and Burke, G. : Role of prostaglandin in thyrotropin action on thyroid, *Endocrinology*, 90 : 343-356, 1972
- 9) Burke, G. and Sato, S. : Effect of long-acting thyroid stimulator and prostaglandin antagonist on adenylyl cyclase activity in isolated bovine thyroid cells, *Life Sci.*, (II) 10 : 969-981, 1971
- 10) Yamashita, K. and Field, J. B. : Preparation of thyroid plasma membranes containing a TSH responsive adenylyl cyclase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40 : 171-177, 1970
- 11) 佐藤誠也 : Alumina column を用いる Cyclic AMP の分離法とその応用, *ホルモンと臨床*, 21 : 73-78, 1973
- 12) Stanbury, J. B., Wicken, J. and Lafferty, M. A. : Preparation and properties of thyroid cell membranes, *J. Membrane Biol.*, 1 : 459-467, 1969
- 13) McKeel, D. W. and Jarett, L. : Preparation and characterization of a plasma membrane fraction from isolated fat cells, *J. Cell. Biol.*, 44 : 417-432, 1970
- 14) Warton, D. C. : In *method of enzymology*, vol. X, pp 245-252, Acad. Press, New York, 1967
- 15) Bastomsky, C. H., Zakarija, M. and McKenzie, J. M. : Thyroid hydrolysis of cyclic AMP as influenced by thyroid gland activity, *Biochem. Biophys. Acta*, 230 : 286-295, 1971
- 16) Baumstark, J. S., Lattin, R. J. and Bardawil, W. A. : A preparative method for the separation of 7S gamma globulin from human serum, *Arch. Biochem.*, 108 : 514-522, 1964
- 17) Smith, B. R. : Characterization of long-acting thyroid stimulator γ G binding protein, *Biochem. Biophys. Acta*, 229 : 649-662, 1971
- 18) Macchia, V., Pastan, I. and Katzen, R. : Action of phospholipase C on the thyroid. Abolition of the response to TSH, *J. Biol. Chem.*, 242 : 3726-3730, 1967
- 19) Pastan, I., Roch, J. and Macchia, V. : Binding of hormone to tissue : The first step in polypeptide hormone action, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 56 : 1802-1809, 1966
- 20) Schimmer, B. P., Ueda, K. and Sato, G. H. : Site of action of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in adrenal cell culture, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32 : 806-810, 1968
- 21) Cuatrecasas, P. : Interaction of insulin with cell membrane, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*,

- 63 : 450-457, 1969
- 22) Davoren, P. R. and Sutherland, E. W. : The cellular location of adenylyl cyclase in the pigeon erythrocyte, *J. Biol. Chem.*, 238 : 3016-3123, 1963
- 23) Pohl, S. L., Birnbaumer, L. and Rodbell, M. : Glucagon-sensitive adenylyl cyclase in plasma membrane of hepatic parenchymal cells, *Science*, 164 : 566-567, 1969
- 24) Wallach, D. F. H. : In *methods in enzymology*, vol. VIII, pp 164-172, Acad. Press, N. Y., 1966
- 25) Lansing, A. I., Belkhome, M. L. and Lynch, W. E. : Enzymes of plasma membranes of the liver, *J. Biol. Chem.*, 242 : 1772-1775, 1967
- 26) Coleman, R. and Finean, J. B. : Preparation and properties of isolated plasma membranes from guinea-pig tissues, *Biochem. Biophys. Acta*, 125 : 197-206, 1966
- 27) Jarett, L., Reuter, M., McKeel, D. W. and Smith, R. M. : Loss of adenylyl cyclase hormone receptors during purification of fat cell plasma membrane, *Endocrinology*, 89 : 1186-1190, 1971
- 28) Robison, G. A., Butcher, R. W. and Sutherland, E. W. : Adenylyl cyclase as an adrenergic receptor, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 139 : 703-723, 1967
- 29) Butcher, R. W., Ho, R. J., Meng, H. C. and Sutherland, E. W. : Adenosine 3', 5'-monophosphate in biological materials : Measurement of cyclic 3', 5'-AMP in tissues and the role of the cyclic nucleotide in the lipolytic response of fat to epinephrine, *J. Biol. Chem.*, 240 : 4545-4523, 1965
- 30) Mayer, S. E., Namn, D. H. and Rice, L. : Effects of glucagon on cyclic 3', 5'-AMP, phospholipase activity and contractility of heart muscle of the rat, *Circ. Res.*, 26 : 255-233, 1970
- 31) Yu, S. C. and Burke, G. : Thyrotropin increases prostaglandin levels in isolated thyroid cells, *J. Clin. Invest.*, 51 : 1038-1042, 1972
- 32) Bergström, S., Danielsson, H. and Samuelsson, B. : The enzymatic formation of prostaglandin E₂ from arachidonic acid prostaglandins and related factors, *Biochem. Biophys. Acta*, 90 : 207-210, 1964
- 33) Ramwell, P. W. and Show, J. E. : Biological significance of prostaglandins, *Recent Prog. Hormone Res.*, 26 : 139-187, 1970
- 34) Yamashita, K. and Field, J. B. : Effects of long-acting thyroid stimulator on thyrotropin stimulation of adenylyl cyclase activity in thyroid plasma membranes, *J. Clin. Invest.*, 51 : 463-472, 1972
- 35) Wolff, J. and Jones, A. B. : The purification of Bovine thyroid plasma membranes and the properties of membrane-bound adenylyl cyclase, *J. Biol. Chem.*, 246 : 3939-3947, 1971
- 36) Sato, S., Kowolski, K. and Burke, G. : Effects of a prostaglandin antagonist, polyphloretin phosphate, on the basal and stimulated thyroid function, *Prostaglandins*, 1 : 345-363, 1972

(1972. 12. 19 受稿)