Biosynthesis of Thyroid Hormones

Yoichi KONDO

Department of Physical Biochemistry, Institute of Endocrinology,
Gunma University, Maebashi, Japan

Several problems are involved in the studies on the biosynthesis of thyroid hormones:

1) How are iodine atoms incorporated into a thyroglobulin (TG) molecule? 2) How is the matured TG molecule built up? 3) how are carbohydrates incorporated in a TG molecule? 4) How are amino acids assembled to make up TG polypeptides? 5) How is TG hydrolyzed to produce T_3 and T_4 ? Recent progresses concerning the first four questions are briefly summarized and discussed below.

Tarutani's recent finding of non-iodinated TG from goitrogen-treated pigs confirmed that the most of iodine atoms are incorporated into TG after the formation of molecules with M.W. of 660,000. Micro villi or adjacent region was reported as a site of the iodination from biochemical and electron microscopic studies. With regard to the final step of the iodination, two DIT residues in TG polypeptides were suggested to be direct precursors of thyroxine on the basis of the comparison of chemically-iodinated and enzymatically iodinated TG with naturally existing TG. Studies on carbohydrate incorporation into TG were progressed by Spiro and Bouchilloux et. al. They concluded that carbohydrates are incorporated at microsomal membranes, presumably at rough surfaced E.R, into TG polypeptides after the completion of peptide formation. Enzymological studies on the process also have been taken place by Spiro. The biochemical mechanism of thyroxine formation, the actual process of molecular maturation in vivo, the roles of carbohydrate for the building of the molecule and for the biological functions of the molecule are some of the points remaining to be elucidated.

The in vitro studies on protein synthesis in the thyroid have been done by the author as well as American and French groups. Although Nunez reported that amino acids are incorporated into the same protein fraction as matured TG in his polysomal system, all others' results were not consistent with his conclusion and confirmed the microsomal synthesis of matured TG and the inability of polysomes in terms of production of the matured TG. In the author's studies a new polysomal system was reconstructed which consisted of pig thyroid polysomes, liver t-RNA charged with labeled and unlabeled amino acids and liver cell sap as an enzyme mixture supplemented with the amino acid activating system. For the first 10 min. of incubation did the reaction proceed rapidly and slowed down after that period. An average length of the newly synthesized portion of the peptides in non-dialysable proteins which were released from polysomes by the treatment with RNase and EDTA (0.1 M) or with SDS (0.1%), corresponded to 20 amino acid residues. Amino acid incorporation increased with the concentration of polysomes showing the dependency of the

reaction on the polysomes. Six labeled amino acids were compared in their rates of incorporation into protein. Glutamic acid showed the highest value and others were in the same order as that of amino acid content of TG, though the order was not very different from that of a few other proteins including serum albumin. 20–30% of the labeled proteins released from polysomes were immunologically active against anti-TG serum when supplemented with anti- γ -globulin serum. The percentage of the active protein increased with reaction time slightly but reproducibly even after total incorporation ceased its increase. Sizes of the labeled proteins were measured by a disc electrophoresis in the presence of 0.1% SDS and were shown to be widely distributed from 20,000 to 150,000 as M.W. which was similar to a quarter subunit of TG.

These results strongly suggested that the thyroid polysomes could synthesize in vitro a considerable length of TG polypeptides in the quarter subunit of TG and the possibility to reconstruct a complete set of TG synthesizing system including an iodinating and a glycosylating system in addition to the peptide synthesizing system. This would provide further informations on regulatory sites of the synthetic pathway. (See pp. 881~885)

シンポジウムⅡ 甲状腺研究の進歩

1. 甲状腺ホルモンの合成

群馬大学内分泌研究所物理化学部

近 藤 洋 一

甲状腺ホルモンは周知のように甲状腺でチログロブリンのアミノ酸残基として合成され、加水分解後、チロキシン、トリヨードチロシンとして血液中に放出される。この全過程には図1に示すような各種の過程が含まれ、全体としてTSHの制御下にあると考えられる。

Fig. 1. Illustrated pathway of the biosynthesis of thyroid hormones in thyroid.

- 1) アミノ酸は活性化され、ポリゾーム上で、チログロブリンポリペプチドを作る。
- 2) チログロブリンサブユニットは重合し、最終的には19Sの完成チログロブリン分子を作る。
- 3) 単糖類はUDP誘導体を作つて活性化され、膜上で重合中のチログロブリン分子、または、重合化の完成したチログロブリンペプチドに結合する。

4) 血中から濃縮, 導入された I^- はペルオキシダーゼにより酸化され, コロイドと細胞境界附近の膜上で重合化の終わったチログロブリンに導入され, MIT, DIT, T_3 , T_4 等を作る.

5) ヨウ度化されたチログロブリンは細胞中リボゾームに局在すると思われる加水分解酵素で分解され, T_3 , T_4 などが血液中に放出される.

I ヨウ素化反応

従来甲状腺ホルモン合成の研究は主として4)のヨウ素化の過程にのみ集中されてきた。ヨウ素化反応が重合化したチログロブリンを基質として起こり, 分子として完成したチログロブリンが徐々にヨウ素化の程度の高いものに変化することは既に古典的となつた I.H. Goldberg らによる切片による研究, 最近の藤田らの電顕ラジオオートグラムによる研究, 当研究室宇井ら¹⁾によるチログロブリンのヨウ素含量の不均一性に関する研究, 樽谷²⁾による無ヨウ素重合チログロブリンの発見によつて明らかにされているばかりでなく, 甲状腺顆粒成分にある酵素によつて実際19Sチログロブリンをヨウ素化し得ることが著者³⁾によつて示され, 酵素レベルでこの機構を調べる端緒が開かれた。この酵素系は, 著者, 細谷ら, Taurog らその他により可溶化され, ペルオキシダーゼとしての性格が明らかにされるとともに, MIT, DIT の生成ばかりでなく I^- と19Sチログロブリンのみを基質としてチロキシン残基をも合成し得ること, この反応による19Sチログロブリン中での各ヨウ素化アミノ酸の生産量や, Edelhoch らによる化学的ヨウ素化反応の結果, 天然の19Sチログロブリンの分析によるヨウ素化アミノ酸の量比との対比から, DIT の重合による T_4 の生成は19Sチログロブリン中の2つの DIT 間の反応によるものであつて遊離 DIT またはその誘導体を必要としないとの推論はほぼ肯定せざるを得ないのではないかと思われる。

この反応が細胞質中の膜成分で行なわれることは前述の酵素化学的研究によつても明らかであるが, Nadler, Wollman らによる電顕ラジオオートグラムの古典的研究ばかりでなく, 最近の藤田らの電子顕微鏡によるラジオオートグラムによつてもコロイドと上皮細胞の接触点にこの反応の場があると考えられる。また追認されていないが Lissitzky らは辺縁部の microvilli を単離してここにヨウ素化酵素系があると報告している。これらの観察は前述したようにヨウ素化が19Sチログロブリンの完成後, あるいは一旦コロイドに貯溜された後でも進行するという推論に別の面から根拠を与えることとなろう。

したがつて, この過程で, 今後明らかにされねばならない重点は, ①ヨウ素アミノ酸が縮合してチロキシンや T_3 を作る反応の生化学的機構と, ②ペルオキシダーゼ系に過酸化水素を供給する代謝系を明らかにすることだと思われる。

II チログロブリンの重合化

第二に, チログロブリンの重合化の過程については Goldberg の古典的研究および Edelhoch, フランスの研究者, あるいは樽谷, 宇井らによる19Sチログロブリンのサブユニット構造の研究によつて少なくとも19Sチログロブリンの完成に至るまでに数Sの大きさをもつた分子, 19S分子の半の分子量をもつた12S分子, おそらくは更に16~17S分子から19S分子へと分子の高次構造の変化があることは疑いないところである。しかし, Goldberg が示したように重合化の中間段階として安定な12S分子が完成された19S分子と共に細胞中に溶けた状態で存在し, 時間と共に19S分子に変化するかどうかは再検討の余地があると思われる。そう考える理由は *in vivo* でネズミの甲状腺に H^3 -Luc をとりこませ, チログロブリンの合成を観察した実験では12S分子の生成はなかつたという Salvatore の報告, 膜成分に結合した状態の新生タンパク質にかなりの19S分子が含まれ, 少なくとも音波処理で可溶化した部分については, 12S分子を含まないという Goldberg 自身の報告, 糖成分の導入が可溶性および可溶化19S分子のみに起こつて可溶性12S分子には起こらないという Bouchilloux らの報告などである。また, もともと後に述べるように糖部分の導入や重合化はヨウ素化と違って19Sタンパクの完成後いつまでも続くことは考えられず, 一度可溶性となつた12Sタンパクが更に糖部分を取り入れ, あるいは重合化するために膜上に結合すると考えるのは少々無理ではない

かと思われる。

III 糖成分の導入反応

糖成分の導入反応についてはアメリカの Spiro 夫妻の研究が重要であるが、タンパク部分の合成との関係に関しては、最近前述の Bonchilloux らの研究がある他あまり大きな進展はない。Spiro らは早くから 10% におよぶチログロブリンの糖含量に注目し、その組成やペプチドとの結合点にアスパラギンがあることを明らかにした。また、ミクロゾーム膜成分に実際に糖を含むチログロブリンがあることも確かめ、最近では膜から、チログロブリンの糖ペプチドに更に単糖を結合させる酵素を抽出し、チログロブリンの糖成分合成機構の酵素化学に進み出した。一方 Bouchilloux らは粗面小胞体が合成の場であることを示す data を発表した。これは従来想像さるていたゴルジ装置が糖導入反応の起こる場所だという考えに否定的な結果といえよう。

この方面における残された問題は糖部分のもつ生理的な意味とそれに関連してチログロブリンサブユニットの重合化と糖部分の合成と関係があるかどうかということ、ヨウ素化、チロキシンの合成に糖部分が必要かどうかという点であろう。

IV ポリゾームによるタンパク質合成

チログロブリンのタンパク質としての合成反応に関しては、近年急速に関心が高まり、著者の他アメリカ、フランスの数ヶ所の研究室で研究が始められた。それらはいずれも無細胞系でチログロブリンの合成できる系を再構成し、合成の微細な機構を明らかにしようとするものであつた。Nunez らはポリゾームのみで 19S の完成チログロブリンができると考えられるような報告をしたが、これはおそらく多量に混在していた 19S チログロブリンに吸着もしくは交換した新生ポリペプチドを観察していたものと思われ、他のすべての研究者の結果は否定的であつた。一般的に認められたことはミクロゾーム分画を含むタンパク質合成反応系は 19S チログロブリンを作ることができること、しかし、ミクロゾーム分画をデオキシコール酸などで処理し、膜成分を可溶化して除いたポリゾーム系では 19S チログロブリンはできないということであつた。

一方著者は新しいポリゾーム反応系を組立て、チログロブリンのポリペプチドが合成され得ることを確認した。この反応系の特徴は系内の因子の役割を明らかにするためにポリゾームのみブタ甲状腺から調製し、他の因子はすべて肝臓の調製品を用いたところにある。すなわち、放射性アミノ酸を含む 20 種のアミノ酸を酵素的に負荷した肝臓の転移 RNA と、この転移 RNA からアミノ酸をポリゾーム上に運ぶ転移酵素を含む肝臓の上清分画である。更に、GTP, K^+ イオン等反応に必要な低分子物質の他転移 RNA ヘアミノ酸を補供給するため多量の非放射性アミノ酸、ATP 供給系を加えた。

甲状腺ポリゾーム⁴⁾⁵⁾はミクロゾーム分画を含む抽出液を 0.8% デオキシコール酸処理した後、2M の蔗糖溶液を通して遠心分離する通常の方法によつて調製されるが、最高 30~35 個のリボゾームよりなるポリゾームを含む。

反応は一定時間後、 $1\mu\text{g/ml}$ になるように RNase を加え、更に終濃度 0.1M になるよう EDTA または 0.1% になるように SDS を加えることによつてポリゾームを分解し、反応を止めると同時に新生タンパク質を分離する。

図 2 に示すようにタンパク質への放射性アミノ酸のとりこみは、最初の 10 分間ではほぼ完了し、その量は最初転移 RNA 上に存在したアミノ酸の 10~15% に相当する。この量は加えたポリゾーム中のリボゾームの約 10% がペプチド合成に関して活性があると考えると、1 本のペプチドあたり平均約 20 ケのアミノ酸残基を負荷したことになり、かなりの長さのペプチドの延長化が行われたといえよう。この反応で種々のアミノ酸のとりこまれる量は必ずしも同じではない。グルタミン酸、アスパラギン酸、ロイシン、アルギニン、フェニルアラニン、チロシンの 6 種の放射性アミノ酸を使つて 1 時間の反応後、タンパク質分画を塩酸で加水分解し、ペーパークロマトグラフィーによつて各アミノ酸を分離し、6 種のアミノ酸のとり込み量をしらべた。

Fig. 2. Time course of protein biosynthesis by thyroid polysomes.

Amino acid incorporations into the total extractable proteins (○—○), the proteins reacting with anti-thyroglobulin (○---○), and the proteins precipitated with normal serum (○-----○).

Table 1. Incorporation of Various Amino Acids into Protein by Pig Thyroid Polysomes

Incorporated		AA Contents in TG	
		(Pig)	(Calf)
Glu	100	100	100
Leu	81	82	72
Asp	53	58	57
Arg	36	53	49
Phe	25	39	45
Tyr	13	18	19

第1表はグルタミン酸を100とした相対値をブタとウシのチログロブリンのこれら6種のアミノ酸含量と比較して並記している。この6種に関する限り相対的とりこみ量はチログロブリンのアミノ酸含量に非常に近い値を示す。またこの値は転移RNA上に負荷されたアミノ酸の量比とは全く異なるのでポリゾームの情報に依存していると思われる。もっともこれら6種のアミノ酸含量は血清アルブミンなど他の2, 3のタンパク質でもあまり大きな違いはないのでこの比較のみからチログロブリンペプチドの生成を確認することはできない。

V ポリゾームにより合成されたタンパク質の性質

ポリゾームにより合成されたタンパク質のチログロブリンとの類縁性を調べるためには免疫学的方法が用いられた。精製したブタチログロブリンでウサギを免疫してつくった抗血清とその抗血清に対する抗体としてウサギチログロブリンに対する抗血清を加え、可溶性抗原抗体結合物をも沈澱し得るよう考慮した。対照として抗チログロブリン血清の代りに正常ウサギ血清を加えた系から得られた沈澱中の放射活性を測定した。図2は反応の進行に伴い免疫学的にチログロブリン類縁性ある新生タンパク質が徐々に増加してくることを示している。対照実験では沈澱する放射活性ははるかに低く、特異的な沈澱から得られる値との差から、新生タンパク質の20~30%はチログロブリンと同じ抗原性を有すると考えられる。

チログロブリンの最小単位として現在もつとも有力視されているのは分子量660000の完成分子の半単位体であつて、尿素中で還元することによりこの半単位体、分子量にして165000のサブユニットが生ずるという。Edelhochらの報告に基づいている。サブユニット間の結合にはSH基の酸化過程が必要であるので、ポリゾーム上で合成されるタンパク質の大きさは最大のサブユニットであろうと考えられる。新生タンパク質は前記のようにEDTAまたはSDSで可溶化せられるが、EDTA可溶化物は直ちに非特異的な再重合化を起し、真の大きさを示さない。そこで、0.1%のSDSの存在下で蔗糖密度勾配遠心法またはディスク電気泳動を行うという方法で大きさを調べた。図3には蔗糖密度勾配遠心法により、第1回の遠心により得られた重い分画と軽い分画とをそれぞれ集め、別々に再遠心した結果を示す。大きさの標準として血清アルブミンを用い、その位置を影で示した。SDS Iとして示される軽い分画はアルブミンより軽いものが主たる成分であり、SDS IIとして示した重い分画の放射性タンパク質は7~8 S附近、ほぼアルブミンの倍の分子

Fig. 3. Sizes of the proteins synthesized by polysomes (Analysis by a sucrose density gradient centrifugation).

The samples, SDSI and SDSII, were obtained from the first centrifugation under the similar condition, as the lighter fractions (SDS I) and the heavier (SDS II). The fractions were pooled and subjected to the second centrifugation at 39,000rpm for 24 hrs. The shadowed pattern indicates the position of serum albumin (M.W.=69,000) in the centrifugation. Radioactivities and optical densities are expressed by relative values.

SALABE, G., ROBBINS, J. and RALL, J.E. *Endocrinology*, **83**, 1123 (1968).

量を想像させる位置まで広がっている。この結果は5%ポリアクリルアミド中でのディスク電気泳動でも確認された。この場合には第一次の蔗糖密度勾配遠心でアルブミンを中心に3つに分け、それぞれ泳動した。この方法では最も重い分画は分子量140,000のアルブミン2量体と同じか、やや重いことを示し、最も軽い分画は20,000前後と考えられる。

VI 結 語

これらの結果からチログロブリンの最小単位となるポリペプチドの合成が甲状腺ポリゾームによつて行なわれることはほぼ疑いがないと思われる。この反応系は糖成分の合成系、ヨウ素化系を含まないが、これらの系を組合せたチログロブリンの完全合成系を作ることも不可能ではないと思われる。そのような再構成系は、前記した各反応系についての知見をあわせて、合成機構のみならず合成過程におけるTSHその他による調節部位を明らかにする上でも重要な役割を果たすと考えられよう。

文 献

- 1) UI, N., TARUTANI, O., KONDO, Y. and TAMURA, H., *Nature* **191**, 1199 (1961).
- 2) TARUTANI, O. and UI, N.: *Biochem. Res. Commun.* **33**, 733 (1968).
- 3) KONDO, Y.: *J. Biochem.* **50**, 210 (1961).
- 4) KONDO, Y., DeNAYER, P., LABAW, L.W., ROBBINS, J. and RALL, J.E.: *Endocrinology*, **83**, 1117 (1968).
- 5) KONDO, Y., DeNAYER, P.,