Mode of Action of ACTH—An Adrenergic Receptor Mechanism in Adrenal Steroidogenic Response to ACTH

S. MATSUKURA

Division of Medicine, Kyoto Hospital of Japan Monopoly Corporation, Kyoto, Japan

Cyclic 3', 5'-AMP has now been established as an intracellular second messenger mediating many of the actions of a variety of different hormones including ACTH. The level of this nucleotide depends upon the relative activities of at least two enzymes, viz., adenylyl cyclase, which is at first activated by each hormone and catalyzes the conversion of ATP to cyclic AMP, and phosphodiesterase, which catalyzes the breakdown of cyclic AMP to 5'-AMP. It has been recently reported that the metabolic effects of catecholamines are differentially affected by alpha and beta adrenergic agents. Stimulation of the alpha adrenergic receptor inhibits, and stimulation of the beta adrenergic receptor enhances the effects of catecholamines on cyclic AMP accumulation probably via their effects on adenylyl cyclase. This is also the case with vasopressin and MSH. Few data have been reported about the role of an adrenergic receptor mechanism in adrenal steroidogenic response to ACTH.

In the present study both alpha adrenergic blocker, thymoxamine (5 to 50 $\mu\text{g/ml}$), and beta adrenergic stimulator, isoproterenol (1 $\mu\text{g/ml}$), were found to potentiate the rat adrenal steroidogenic response to ACTH *in vitro*, while both alpha adrenergic stimulator, methoxamine (1 to 20 $\mu\text{g/ml}$), and beta adrenergic blocker, alprenolol (10 to 25 $\mu\text{g/ml}$), to inhibit the response to ACTH. These results indicate that the general hypothesis (increase of hormone response by stimulation of the beta adrenergic receptor and decrease by stimulation of the alpha adrenergic receptor) may be valid in adrenal steroidogenic response to ACTH *in vitro*. Alpha adrenergic stimulator, phenylephrine (1 to 20 $\mu\text{g/ml}$), and alpha adrenergic blocker, phentolamine (5 $\mu\text{g/ml}$), had no effect on the steroidogenesis induced by ACTH at the amounts used. Beta adrenergic blocker, propranolol (5 $\mu\text{g/ml}$), was shown to interfere with fluorescence of corticosterone by sulfuric acid-ethanol, resulting in the apparent potentiation of adrenal steroidogenesis by ACTH *in vitro*. Adenylyl cyclase in rat adrenal homogenate was activated in the presence of isoproterenol and thymoxamine, and inhibited in the presence of propranolol, lending further support to the involvement of an adrenergic receptor mechanism in the adrenal. These adrenergic agents had no effect on phosphodiesterase activity. Prostaglandin E_1 (0.5 to 20 $\mu\text{g/ml}$) was without effect on the steroidogenic response to ACTH. Omitting calcium from the medium and adding EGTA (1 mM) completely abolished the effect of ACTH on steroidogenesis and partially inhibited the dibutyryl cyclic-AMP-induced steroidogenic response. Theophylline (1 mM) decreased rather than increased the ste-

roidogenic action of ACTH and was without effect on the response to submaximal dose of dibutyryl cyclic AMP. On the contrary, imidazole (1 mM) potentiated the action of ACTH on steroidogenesis. These contradictory effects on adrenal steroidogenesis by ACTH may be explained by the possible action of these two agents on protein synthesis in rat adrenal tissue, a process which is essential for the steroidogenesis by ACTH. The fact that addition of cycloheximide (0.4 mg/ml) to medium inhibited completely the ACTH-induced steroidogenesis in vitro, also confirms the importance of new protein synthesis.

(See pp. 618~624)

2. ACTH の作用機序—特に Adrenergic Agents の意義

専売公社京都病院内科

松 倉 茂

1 緒 言

Haynes ら¹⁾により cyclic 3', 5'-AMP (C-AMP) が ACTH による副腎皮質ステロイド産生の細胞内 mediator であることが提唱されて以来, C-AMP の second messenger としての役割が注目されている²⁾³⁾. われわれも白ネズミにおいて in vivo で C-AMP およびより強力な誘導体 dibutyryl cyclic 3', 5'-AMP (DBC-AMP) の投与により ACTH 同様ステロイド産生が増加することを認めている⁴⁾. Grahame-Smith ら⁵⁾はさらに白ネズミ副腎に ACTH を添加すると corticosterone 産生増加に先立つて C-AMP の増加が起こり, しかもその増加は添加した ACTH 用量に相関することを報告している. 従つて C-AMP が ACTH 作用の細胞内 mediator であることはほぼ確実であるが, 次にこの nucleotide が如何なる機序で mitochondria 内での cholesterol の酵素的水酸化反応による pregnenolone への転換に関与しているかは明らかでない. Haynes ら¹⁾の ACTH がまず C-AMP を産生し次いでこれにより phosphorylase が活性化され glycogen 分解に始まる解糖過程によりステロイド産生に必要な TPNH が産生されるという仮説も必ずしも実験的に証明されていない⁶⁾. 今回 ACTH の C-AMP 産生を介するステロイド産生経路が catecholamines の adrenergic receptor⁷⁾に類似していることから各種 adrenergic agent および adenylyl cyclase 系に関与する若干の薬剤のステロイド産生への影響を検討した.

2 実験方法

体重150—200gの雄白ネズミを断頭後副腎を摘出し脂肪を取除き半切し, 2 ml の Krebs-Ringer bicarbonate buffer (2%牛血清アルブミンと0.01Mブドウ糖を含む) 中で 95%O₂, 5%CO₂ のもとに37°Cで30分間振とうしながら preincubate した. 次いで各種薬剤を加えた新鮮な medium 中で1時間同様に incubate し, medium 中に放出された corticosterone を硫酸蛍光法⁸⁾により測定した.

adenylyl cyclase 活性の測定は Taunton ら⁹⁾の方法により ¹⁴C-ATP を 2 mg 相当の白ネズミ副腎 homogenate と10分間 37°C で incubate し, 産生された ¹⁴C-C-AMP を Dowex 50 column を使用せずに ZnSO₄, Ba(OH)₂ で3回遠沈分離後¹⁰⁾, 上清の放射能を Bray 氏液に加え liquid scintillation counter により測定した. phosphodiesterase 活性は Chase ら¹¹⁾の方法により ³H-C-AMP を 2 mg 相当の副腎 homogenate と 37°C で3分間 incubate し同様な方法で一回遠沈分離後上清の放射能を counter で測定し, 水解された ³H-C-AMP の量であらわした.

3 実験成績

1) DBC-AMP の in vitro でのステロイド産生への影響 各用量の DBC-AMP を medium に添加すると dose-dependent なステロイド産生がみられ, in vitro でも ACTH 同様な効果が認められた (Fig. 1).

2) 各種 adrenergic agent の in vitro でのステロイド産生および副腎 adenylyl cyclase 活性への影響

Fig. 1. Effect of graded doses of dibutyryl cyclic AMP on adrenal steroidogenesis in vitro. Each bar represents the mean $\pm$ SEM.

Fig. 2. Effect of propranolol (a beta blocker) on adrenal steroidogenic response to ACTH in vitro. Each bar represents the mean $\pm$ SEM.

Fig. 3. Effect of alprenolol (a beta blocker) on adrenal steroidogenic response to ACTH in vitro. Each bar represents the mean $\pm$ SEM.

Fig. 4. Effect of isoproterenol (a beta stimulant) on adrenal steroidogenic response to ACTH in vitro. Each bar represents the mean $\pm$ SEM.

Fig. 5. Effect of thymoxamine (an alpha blocker) on adrenal steroidogenic response to ACTH in vitro. Each bar represents the mean $\pm$ SEM.

Fig. 6. Effect of methoxamine (an alpha stimulant) on adrenal steroidogenic response to ACTH in vitro. Each bar represents the mean $\pm$ SEM.

われわれは β -blocker, propranolol が in vivo で ACTH のステロイド産生作用を増強することを認めた¹²⁾が, in vitro でも dose-dependent なステロイド産生増強作用がみられた (Fig. 2) しかし β -blocker, alprenolol はむしろ ACTH のステロイド産生を抑制した (Fig. 3). β -stimulator, isoproterenol は ACTH の作用に影響しないかむしろ増強した (Fig. 4). α -blocker, thymoxamine は 10 μ g/2ml の濃度で ACTH

Table 1. Effect of adrenergic agents on adrenal steroidogenic response to ACTH in vitro. $\uparrow$, $\downarrow$, and $\rightarrow$, represent potentiation, inhibition, and no effect, respectively.

ALPHA STIMULANT	
METHOXAMINE $\downarrow$	PHENYLEPHRINE $\rightarrow$
ALPHA BLOCKER	
THYMOXAMINE $\uparrow$	PHENTOLAMINE $\rightarrow$
BETA STIMULANT	
ISOPROTERENOL $\uparrow$, $\rightarrow$	
BETA BLOCKER	
ALPRENOLOL $\downarrow$	

のステロイド産生を促進したが (Fig. 5), α -blocker, phentolamine は用いた濃度では効果がなかった。

α -stimulator, methoxamine は ACTH のステロイド産生を著明に抑制したが (Fig. 6), α -stimulator, phenylephrine は用いた濃度では一定の効果を認めなかった。以上各 adrenergic agent の ACTH によるステロイド産生への影響を一括表示すると Table 1 の如くで, β -blocker, propranolol を例外として ACTH の作用は α -receptor を介して抑制的に, β -receptor を介して促進的に働いている事が明らかである。

そこでさらに兎副腎皮質を用いて同様に検討すると白ネズミ副腎でみられたように propranolol は ACTH のステロイド産生を増強したが, cycloheximide 0.8mg/2ml の添加でも propranolol によるとみなされるステロイド産生は全く抑制されなかった (Fig. 7)。また EGTA を加えた Ca^{++} free の medium 中でも propranolol によるとみなされるステロイド産生は抑制がみられず, 本剤がステロイド産生過程のどの部位に作用するかを決定することは極めて困難であった。そこで corticosterone の蛍光測定に際して通常 medium に加える 10 μ g の propranolol を water blank, corticosterone 1 μ g に添加すると明らかな硫酸蛍光への干渉を認めた (Fig. 8)。蛍光測定に用いる励起光 464m μ で corticosterone, propranolol の蛍光スペクトルを描くと 526, 515m μ にそれぞれ peak を有する極めて類似した pattern を程した。従って propranolol の ACTH によるステロイド産

Table 2. Effect of adrenergic agents on adenylyl cyclase activity in adrenal in vitro. Values are the mean of duplicate determinations.

	^{14}C -Cyclic AMP Produced (cpm)
Propranolol 5 μ g	13,366
Alprenolol 10 μ g	14,784
Isoproterenol 2 μ g	17,185
Thymoxamine 5 μ g	15,182
Phentolamine 5 μ g	14,883
Control	14,395

Fig. 7. Effect of propranolol on adrenal steroidogenic response in rabbit. Each bar represents the mean $\pm$ SEM.

Fig. 8. Interference with fluorescence by propranolol.

Fig. 9. Effect of adrenergic agents on phosphodiesterase activity in adrenal in vitro. Values are the mean of duplicate determinations.

Fig. 10. Effect of prostaglandin E_1 on adrenal steroidogenesis in vitro. Each bar represents the mean $\pm$ SEM.

Fig. 12. Effect of theophylline on adrenal steroidogenesis in vitro. Each bar represents the mean $\pm$ SEM.

Fig. 14. Effect of cycloheximide on adrenal steroidogenesis in vitro. Each bar represents the mean $\pm$ SEM.

Fig. 11. Effect of calcium removal and EGTA on adrenal steroidogenesis in vitro. EGTA was added to give a final concentration of 1mM. Each bar represents the mean $\pm$ SEM.

Fig. 13. Effect of imidazole on adrenal steroidogenesis in vitro. Each bar represents the mean $\pm$ SEM.

生への影響は蛍光測定への干渉によるみかけの促進作用であることが明らかとなった。

次に adrenergic agents の副腎 adenylyl cyclase 活性への影響を ^{14}C -ATP の ^{14}C -C-AMP への転換でみると propranolol で抑制, isoproterenol, thymoxamine で促進を認め (Table 2), in vitro でのステロイド産生におよぼす効果と一致する結果を得た。また各種 adrenergic agent の副腎 phosphodiesterase 活性への効果を ^3H -C-AMP の水解の度合により比較すると, adrenergic agents では対照と有意の差を認めなかつた (Fig. 9)。

以上の結果より adrenergic agents は adenylyl cyclase 活性への効果を介してステロイド産生へ影響しているものと考えられる。

3) prostaglandin E_1 の in vitro でのステロイド産生への影響 用いた各濃度とも ACTH のステロイド産生に一定の効果を認めなかつた (Fig. 10)。

4) Ca^{++} の in vitro でのステロイド産生への影響 second incubation の medium に Ca^{++} を加えず EGTA を 1mM の濃度に加えると ACTH のステロイド産生は全く抑制され, ACTH を加えない basal level も低下した。一方 DBC-AMP のステロイド産生も一部抑制された (Fig. 11)。

5) theophylline および imidazole の in vitro でのステロイド産生への影響 C-AMP を水解する phosphodiesterase の抑制剤および促進剤である theophylline と imidazole のステロイド産生への影響をみると, 前者は ACTH の作用をむしろ抑制し DBC-AMP によるステロイド産生にも効果がなかった (Fig. 12). 一方後者は ACTH の作用を抑制するどころか促進効果がみられた (Fig. 13). ACTH を加えない basal level での imidazole のステロイド産生促進作用は蛋白合成阻止剤 cycloheximide の添加により抑制された (Fig. 13). また phosphodiesterase へのこれら薬剤の影響をみると, imidazole は酵素活性を促進し, theophylline は逆に抑制することが認められた (Fig. 9).

6) cycloheximide の in vitro でのステロイド産生への影響 蛋白合成阻止剤 cycloheximide の添加により ACTH によるステロイド産生は全く抑制された. なお ACTH を加えない basal level の抑制はみられなかった (Fig. 14).

4 考 按

Sutherland ら²³⁾は ACTH を含む各 hormone が target organ に作用する際に先ず細胞膜 adenylyl cyclase を活性化し ATP からの C-AMP の産生を促がし, この C-AMP が細胞内で second messenger として酵素の活性化, ホルモン産生, 細胞膜透過性の変化などの組織特有な現象を惹起するという two messenger system 説を提唱している. また細胞膜 adenylyl cyclase は各 hormone が選択的に作用する膜外面の regulatory unit と, その情報により細胞内で ATP より C-AMP を産生する膜内面の catalytic unit よりなるとされている⁷⁾. しかも hormone の adenylyl cyclase への作用は α -receptor を介して抑制的に, β -receptor を介して促進的に働くことが adrenergic agents を用いた実験により catecholamines²⁷⁾, vasopressin²³⁾, MSH¹³⁾ で明らかにされている.

副腎皮質での adrenergic receptor に関しては Cushman ら¹⁴⁾が犬副腎の灌流実験で adrenergic blocking agents は ACTH, C-AMP の効果に影響しなかったとしている. 最近 Taunton ら¹⁵⁾はハツカネズミの副腎腫瘍を用い propranolol が ACTH による adenylyl cyclase の活性化を完全に抑制することを報告している. われわれは今回 β -blocker, propranolol のステロイド産生促進作用は corticosterone の蛍光測定への干渉による見かけのものであり, ACTH の副腎皮質での作用にも他の hormone でみられる adrenergic receptor の原則があてはまることを in vitro のステロイド産生および adenylyl cyclase 活性の測定により明らかにした. 同系統の adrenergic agent でもその効果が一致しなかったのは添加した用量および各 agent の性質の差によると考えられる. また各 adrenergic agent は phosphodiesterase 活性への影響がみられなかったことより主に adenylyl cyclase に作用することが明らかである.

prostaglandin E_1 の副腎皮質への影響についてはまだ一致した見解をみないが¹⁵⁾¹⁶⁾, 今回の実験では ACTH のステロイド産生作用に対して一定の効果を認めなかった.

ACTH の副腎皮質での作用に Ca^{++} が必要であることは, in vitro のステロイド産生¹⁷⁾, 副腎 adenylyl cyclase 活性化¹⁸⁾ への影響で確かめられている. 本実験でも Ca^{++} を添加せず 1mM の濃度の EGTA を加えた medium では ACTH のステロイド産生が完全に抑制された. 一方 DBC-AMP の作用も一部抑制されたことにより Ca^{++} は DBC-AMP の細胞内への透過性あるいは C-AMP 産生以後のステロイド産生経路にも作用している可能性が推測される.

一般に methyl xanthines は C-AMP の水解酵素 phosphodiesterase 活性を抑制し²³⁾, その結果 C-AMP が細胞内に蓄積するため theophylline の添加により ACTH, C-AMP によるステロイド産生作用は増強することが予想されるが, 今回の実験でも theophylline はむしろ抑制ないし効果のないことが観察された. Holkerston ら¹⁹⁾は theophylline によりステロイド産生に必要な蛋白合成が阻害されるのがその原因であろうとしている. 一方 imidazole は phosphodiesterase 活性をたかめ²²⁾ C-AMP の破壊を促進するため ACTH のステロイド産生を抑制すると考えられるが, 本実験ではむしろ増強することを認めた. cycloheximide の添加により ACTH を加えない basal level での imidazole によるステロイド産生が抑制され

たことより、恐らく本剤は蛋白合成系に促進的に作用するのではないかと推測される。

ACTH によるステロイド産生が各種蛋白合成阻止剤により完全に抑制されること^{20)~22)}, cycloheximide 添加により ACTH によるステロイド産生が抑制された場合にも C-AMP の増加は認められること⁶⁾より, ACTH により C-AMP が産生され, 次いでこの C-AMP により turn over の早い regulatory protein がつくられ, この蛋白が未だ不明の機序により mitochondria 内での cholesterol

から pregnenolone への酵素的酸化反応による転換を促進しステロイド産生が起起こると考えられている²³⁾. 今回の実験でも cycloheximide の添加により in vitro での ACTH によるステロイド産生の完全な抑制を認めた。

5 結 語

以上の ACTH による副腎皮質ステロイド産生経路とこれに関与する諸因子の作用部位を一括すると Fig. 15 の如くである。われわれは今回特に adrenergic agents の副腎での ACTH の作用における意義を明らかにし, さらに prostaglandin E_1 , theophylline, imidazole, Ca^{++} , cycloheximide などの効果についても検討し若干の興味ある事実を認めた。

謝 辞 本シンポジウムに参加の機会を与えられた西川光夫会長, 座長の山村雄一, 宇井信生の諸教授に深謝いたします。また共同研究者京都大学第二内科井村裕夫, 加藤譲の両先生に感謝いたします。

文 献

- 1) HAYNES, R.C., JR., E.W. SUTHERLAND and T.W. RALL: Recent Prog. Horm. Res., 16: 121, (1960)
- 2) ROBISON, G.A., R.W. BUTCHER and E.W. SUTHERLAND: Ann. Rev. Biochem., 37: 149, (1968)
- 3) SUTHERLAND, E.W., G.A. ROBISON and R.W. BUTCHER: Circulation, 37: 279, (1968)
- 4) IMURA, H., S. MATSUKURA, H. MATSUYAMA, T. SETSUDA and T. MIYAKE: Endocrinology, 76: 933, (1965)
- 5) GRAHAME-SMITH, D.G., R.W. BUTCHER, R.L. NEY and E.W. SUTHERLAND: J. Biol. Chem., 242: 5535, (1967).
- 6) HILF, R.: New Eng. J. Med., 273: 798, (1965).
- 7) ROBISON, G.A., R.W. BUTCHER and E.W. SUTHERLAND: Ann. New York Acad. Sc., 139: 703, (1967).
- 8) 井村裕夫: 内科宝函, 9: 130, (1962).
- 9) TAUNTON, O.D., J. ROTH and I. PASTAN: Biochem. Biophys. Res. Comm., 29: 1, (1967).
- 10) KUO, J.F. and E.C. DE RENZO: J. Biol. Chem., 244: 2252, (1969).
- 11) CHASE, L.R., S.A. FEDAK and G.D. AURBACH: Endocrinology, 84: 761, (1969).
- 12) 井村裕夫, 松山 均, 松倉 茂: 日本臨牀, 27: 103, (1969).
- 13) ABE, K., G.A. ROBISON, G.W. LIDDLE, R.W. BUTCHER, W.E. NICHOLSON and C.E. BAIRD: Endocrinology, 85: 674, (1969).
- 14) CUSHMAN, P., S. ALTER and J.G. HILTON: J. Endocr., 34: 271, (1966).
- 15) TAUNTON, D.P., J. ROTH and I. PASTAN: J. Biol. Chem., 244: 247, (1969).
- 16) FLACK, J.D., R. JESSUP and P.W. RAMWELL: Science, 163: 691, (1969).
- 17) BIRMINGHAM, M.K., F.H. ELLIOTT and H.-L. VALÈRE: Endocrinology, 53: 687, (1953).
- 18) BÄR, H.-P. and O. HECHTER: Biochem. Biophys. Res. Comm., 35: 681, (1969).
- 19) HALKERSTON, I.D.K., M. FEINSTEIN and O. HECHTER: Proc. Soc.

Fig. 15. Mechanism of action of ACTH.

- Exp. Biol. Med., 122 : 896, (1966). 20) FERGUSON, J.J. JR. : J. Biol. Chem., 238 : 2754, (1963). 21) GARREN, L.D., R.L. NEY and W.W. DAVIS : Proc. Nat. Acad. Sci., 53 : 1443, (1965). 22) FARESE, R.V. : Biochim. Biophys. Acta, 87 : 699, (1964). 23) GARREN, L.D. : Vitamines and Hormones, 26 : 119, (1968).