The Mode of Action of Thyroid Stimulator (TSH and LATS)

Yukio OCHI

Second Department of Medicine, Kyoto Prefectural University
of Medicine, Kyoto Japan

TSH stimulates the secretion and synthesis of thyroid hormone, and also stimulates many metabolic pathways i.e., salt and water, carbohydrate, phosphorus and phospholipid, nucleic acid, amino acid and protein metabolism. Evidence has been accumulated that LATS causes a prolong effect on the thyroid and LATS differs in several respects from TSH. Until now the precise role of TSH and LATS at cellular level has not been known and the mode of action of two substances is not clear.

In this paper, the metabolic effects of TSH and LATS on the thyroid were examined extensively using both in vitro and in vivo systems. The incorporation of ^{32}P into the thyroid gland after a single injection of LATS and TSH was increased about 2 fold in the thyroxine treated mice. Also specific activities of RNA and phospholipid in the gland were increased remarkably. Experiments using ^3H -uridine, TSH and LATS increased the incorporated radioactivity per RNA.

A single injection of TSH or LATS into mice failed to stimulate the incorporation of ^3H -leucine into thyroidal protein. While the continuous injection of LATS for 5 days caused increased thyroid weight, augmented protein content and increased incorporation of ^3H -leucine. Also the specific activity of incorporated radioactivity per mg thyroid protein was significantly increased. Treatment with LATS or TSH for 8 days produced marked goiter formation accompanied by a high I^{131} thyroidal uptake. LATS stimulates protein synthesis in the gland, as does TSH.

Using McKenzie's method, cyclic 3' 5' AMP (C 3' 5' AMP) and Dibutyryl cyclic 3' 5' AMP (D.C 3' 5' AMP) were found to increase thyroid hormone release from mouse thyroid in vivo. Other adenine nucleotides were also active. Simultaneous injection of theophylline and caffeine with C 3' 5' AMP and D.C 3' 5' AMP augmented the stimulatory effect of these adenine nucleotides on hormone release, although theophylline or caffeine had only a slight effect alone. No effect was obtained by the injection of NaF with D.C 3' 5' AMP. These adenine nucleotides have no enhancing action on hormone release from mouse thyroids during in vitro incubations, and no stimulatory effects were obtained by the nucleotides on the hydrolysis of thyroglobulin in mouse thyroid homogenates. These adenine nucleotides appeared to have no direct action on the enzyme participating in the breakdown of thyroglobulin.

According to Pastan's method, the effect of TSH on cyclase activity was determined using beef and rabbit thyroid homogenate, but the increase of cyclic AMP synthesis from ^3H -ATP (or ^{14}C -ATP) was not obtained by the large doses of TSH. Similarly also LATS

haven't any stimulating action on adenylyl cyclase activity. NaF did not elevate adenylyl cyclase activity, but inhibited ATP destruction by the inhibition of ATPase. Theophylline inhibited cyclic AMP destruction significantly. Using beef thyroid slices, ^3H -adenine was preincubated for 1 hr and then TSH (Armour or NIH) or LATS was incubated for 30 min. with theophylline or NaF. The incorporated radioactivity into cyclic AMP in whole thyroid slice was examined. TSH and LATS similarly stimulated the incorporation of ^3H -adenine into cyclic AMP in beef thyroid slice, especially in the presence of theophylline. However, the stimulatory effect of NaF on cyclic AMP formation was very slight.

Both TSH and LATS elevated cyclic AMP levels in the gland, however it may be some of effects of both these thyroid stimulator. It is possible that TSH and LATS have similar stimulating action on various metabolism in the thyroid.

(See pp. 625~630)

シンポジウム I ホルモンの作用機序

3. 甲状腺刺激ホルモン (TSH 及び LATS) の作用機序

京都府立医科大学丸本内科

越 智 幸 男, 八 谷 孝

阿 部 勢 津 子, 塩 見 勝 彦

結 論

TSH は甲状腺ホルモン合成分泌を促がすと同時に、甲状腺内の諸物質代謝を促進さす。代謝面では腺内の水、塩類代謝、酸素消費、ヨード代謝、糖、磷及び磷脂質、更に蛋白及び核酸代謝等を促進する。これらの多彩な代謝促進の primary step が如何なる機序によって行なわれるかに関しては、統一した見解はない。しかし、細胞膜の透過性の変化や、細胞内の特定の酵素系への影響又は、核酸及び蛋白合成などという問題について研究がなされている。

近年甲状腺機能亢進症患者血中に、TSH と異なる Long Acting Thyroid Stimulator (LATS) が存在することが確認され、この LATS は TSH よりも甲状腺を長時間刺激すること、また免疫学的にも TSH と異なる物質とされている¹⁾²⁾ (Table 1)。今回は現在までに発表されている TSH と LATS の甲状腺への作用点を比較検討しながら私達の研究結果を述べてみたい。

Table 1 Comparison of TSH and LATS

Characteristic	TSH	LATS
Response by McKenzie method	2hr>8hr	2hr<8hr
Biologic half life		
Rat	<20 min	7.5hr
Human	30 min	25 days
Heat stability		
56°C for 30 min	No loss	No loss
70°C for 10 min	About 55% lost	Almost completely lost
Sedimentation constant	4S (mw 20,000)	7S (mw 160,000)
Neutralization with antibody	Anti-TSH antibody	Anti-IgG antibody
Kidney passage	+ ?	- ?
Placenta passage	-	+
Thyroxine suppression	+	-
Bates extraction	+	-
Electrophoresis	No single spot	γ -Globulin fraction
Stimulatory response	All animals	Mammalian species

(A) 甲状腺刺激物質の諸代謝促進作用

(1) 糖代謝に及ぼす影響

TSH は甲状腺内の Hexose Monophosphate Pathway (HMP) を特異的に促進する。ゆえに糖代謝に関

与する腺内の酵素活性に及ぼす TSH の影響を観察してみた。すなわち G-6-PDH 及び 6-PGDH 等への TSH の影響をラットを用いて観察すると、TSH 10U 投与 24 時間以内では、本酵素活性上昇は殆んど認められない。しかし、propylthiouracil の様な抗甲状腺剤の連続投与によつて、甲状腺重量増加が認められると酵素活性は著明に上昇した。TSH により HMP が促進されると G-6-PDH や 6-PGDH の作用によつて TPNH の生成増加が起り、この TPNH が iodotyrosine の脱ヨード酵素の補酵素となつて作用することが推定される³⁾。

ラット甲状腺内の脱ヨード酵素活性に及ぼす TSH の影響を観察すると、TSH 2 単位 1 回注射 6 時間後までは僅かに活性上昇が認められるのみである。一方本酵素活性測定時に甲状腺ホモジネート内に TPNH を多量に加えると、酵素活性は約 100 倍も増加した。この様な TPNH 飽和条件下での酵素活性を測定すると、酵素活性の著増が起るが、TSH 処理の有無は特に酵素活性に影響を及ぼさなかつた。本酵素活性に及ぼす TSH の速効性の促進反応は、cofactor の利用増大によるものであつて、酵素蛋白質自体の増量は二次的であると推定される⁴⁾。

(2) 磷及び磷脂質代謝に及ぼす影響

TSH により P^{32} の腺内とり込みと phospholipid への転入促進作用が認められるという報告は多い。

LATS も TSH と同様に *in vitro* で phospholipid 代謝促進作用があることが報告されている。*In vivo* でも、LATS は TSH と同様な促進作用がある。すなわちマウスに TSH 80mu 及び LATS-IgG 60mg 注射 4 時間後に P^{32} を投与し、更に 4 時間後における単位 phospholipid の放射能の転入は増加することを確認した⁵⁾。

(3) 核酸代謝に及ぼす影響

TSH によつて甲状腺内 RNA 量の著増が起るという報告は多い。LATS も TSH と同様に核酸代謝促進作用がある。すなわち *in vivo* にて、TSH 80mu 及び LATS-IgG 60mg 投与 4 時間後に H^3 -uridine を注射し、更に 4 時間後のマウス甲状腺内への H^3 -uridine の転入を観察すると、甲状腺全体でも単位 RNA 当たりでも増大が認められた⁶⁾。

(4) アミノ酸及び蛋白質代謝に及ぼす影響

TSH 投与によつて、甲状腺切片への諸種アミノ酸転入が促進をうけると報告されている。*In vivo* にて、TSH 及び LATS のマウス甲状腺内蛋白質代謝を観察すると、TSH 80mu、LATS-IgG 60mg の連続投与によつて、甲状腺重量増加が 5 日間で約 2 倍になる。この場合 H^3 -leucine の転入は単位蛋白当たりでも著明であつた。しかし同量の TSH 及び LATS の 1 回注射の場合には腺内への H^3 -leucine の転入促進は殆んど認められなかつた⁷⁾。

(5) ヨード代謝に及ぼす影響

LATS は TSH に比べて甲状腺からの T_4 分泌を長時間促進し、更に甲状腺 I^{131} uptake もも促進する。すなわち LATS 又は TSH を 8 日間注射して、甲状腺重量がそれぞれ 2 倍及び 1.5 倍以上増加した時に、 I^{131} uptake もそれぞれ対照の数倍に増加した⁸⁾。

(B) TSH 及び LATS の活性と分子量

TSH と LATS は上述の様に甲状腺への作用はほぼ同じである。現在までに知られている TSH と LATS の甲状腺への作用の差違としては、TSH はヒヨコの甲状腺を刺激するが、LATS は全然刺激しないことである。しかも、分子量 16 万の LATS を papain 又は pepsin 更にこれらに cysteine を加えて処理して得た分画、すなわち分子量 10 万及び 5 万の小分子はマウスの甲状腺刺激作用を持つているが、ヒヨコの甲状腺を刺激しなかつた⁹⁾。現在までのところ TSH や LATS は甲状腺細胞膜に touch したのみで、甲状腺への多彩な刺激反応を惹起するのか、細胞膜を通過して核まで到達して作用するのかは不明である。

(C) 甲状腺刺激物質と Cyclic AMP

甲状腺刺激物質により促進をうける甲状腺内の代謝のうち、Actinomycin D や Puromycin で直ちに抑制されないものとして、ヨード代謝、糖代謝及び磷代謝等がある。ゆゑに甲状腺刺激物質の甲状腺への first

step は新しい蛋白及び核酸合成を特に必要としないものと推定される。

最近, peptide hormone の標的臓器への作用機序の first step として cyclic 3',5'-AMP 説が提唱されている⁸⁾。Cyclic AMP が TSH と同様な甲状腺内の代謝を促進するという報告がある。Cyclic AMP よりも一層細胞膜透過性の高い dibutyryl cyclic AMP は in vivo および in vitro で甲状腺に TSH が作用したのと同様な変化, すなわち形態学的変化, 糖代謝, 磷及び磷脂質代謝等を促進した^{9)~12)}。

また Pastan らは TSH が甲状腺 homogenate 中で cyclic AMP の増量を起したと報告している¹³⁾。Gilman, Rall らは甲状腺切片レベルでの cyclic AMP 生成促進が TSH で起ることを報告した¹⁴⁾。

① Cyclic AMP の甲状腺刺激作用

イ. in vivo の実験

McKenzie 法を用いて観察すると thyroxine 分泌は AMP, ADP, ATP, cyclic 3',5'-AMP, 及び dibutyryl cyclic 3',5'-AMP 等の adenine nucleotide 5mg で促進された。しかしこれらの反応は TSH 0.5mu 程度であつた。一方 GTP, UTP, CTP, Cyclic 2',3'-AMP, 3'-AMP, 2'-AMP, adenosine 及び adenine 等では促進されなかつた (Fig. 1)。

Theophylline や caffeine 等の methyl xanthine 剤は, 単独では thyroxine 分泌は促進しないが,

Fig. 2. Effect of methylxanthine compounds or NaF alone or given simultaneously with Dibutyryl-3', 5'-AMP (D, C-3', 5'-AMP) on thyroid hormone release in McKenzie method. Theophylline (TH), Caffeine (CF), or NaF was injected i.v. 1mg. per mouse. D.C.-3', 5'-AMP (5mg.) was injected simultaneously with theophylline or NaF.

Cyclic AMP や dibutyryl AMP の作用をわずかに増強した。NaF は cyclic AMP や dibutyryl cyclic AMP の作用に影響を与えなかつた¹⁵⁾ (Fig. 2)。

ロ. in vitro の実験

125 I でラベルされた甲状腺を直接 cyclic AMP や dibutyryl cyclic AMP, その他の adenine nucleotide と保生しても, 多量の thyroglobulin が短時間に保生液中に漏出するために, 遊離の thyroxine 増加を認めなかつた。放射性ヨードでラベルされた甲状腺を homogenate し, これに種々の adenine nucleotide を添加しても, thyroglobulin の加水分解の促進を認めなかつた¹⁵⁾。

② Cyclase に及ぼす影響

イ. ホモジネートを用いる実験

牛甲状腺ホモジネートを用いて, 腺内の cyclase 活性を H^3 -ATP を基質として検討した。実験条件はほぼ Pastan らの方法に準じて行なつた¹³⁾。しかし Pastan の報告した様な TSH による cyclic AMP 生成増大を認めなかつた。この点に関しては更に検討の予定である。

また NaF の添加は Cyclic AMP 生成に影響を及ぼさなかつた。一方 theophylline によつては著明な Cyclic AMP 生成増大が認められた (Fig. 3)。しかしこの theophylline による生成増大は, phosphodiesterase の活性抑制によるもので, cyclase 活性促進によるものではない。

Fig. 3.
EFFECT OF TSH, THEOPHYLLINE AND NaF ON ADENYL CYCLASE ACTIVITY IN BEEF THYROID HOMOGENATE

Reaction mixture of 0.06ml contained; ATP 0.65mM, 2×10^5 cpm of 3H -8-ATP, theophylline 8mM, $MgCl_2$ 2mM, tris-HCl 21mM, 0.08% bovine albumin and 2mg of thyroid homogenate. C-AMP (Cyclic AMP)

Fig. 4.

EFFECT OF TSH, LATS AND NaF ON H^3 -CYCLIC-3',5'-AMP HYDROLYSIS IN BEEF THYROID HOMOGENATE

LATS-IgG (1mg) produced a 500% response in McKenzie method. Incubation conditions were identical to those described in Fig. 3. except that ATP was omitted, and each reaction mixture contained 100 picomoles 3H -cyclic-3', 5'-AMP.

なぜならば牛甲状腺 homogenate で H^3 -cyclic AMP の分解に関与する phosphodiesterase 活性を theophylline は著明に抑制したからである (Fig. 4). また LATS も甲状腺 homogenate を用いての実験で, cyclase 活性及び cyclic AMP 分解に何ら影響を及ぼさなかった。

また甲状腺 homogenate を用い, 基質 ATP の分解に及ぼす theophylline, NaF 及び TSH の影響を観察した. Theophylline や TSH は何らの影響をも認めなかったが, NaF は ATP の分解を著明に抑制した. これらのことより NaF は cyclase 活性には影響を及ぼさないが, ATPase 活性を抑制するものと推定される (Fig. 5).

ロ. 切片を用いる実験

H^3 -adenine を用いて, 牛甲状腺切片中の cyclic AMP への転入促進を TSH 及び LATS で検討した. 牛甲状腺切片 100mg と, H^3 -adenine を 1 時間 preincubation したのち, TSH 100mu 及び LATS-IgG 16mg を添加後 30 分保生した。

甲状腺切片 100mg 中の Cyclic AMP への H^3 -adenine の転入を示すと, 保生液中に theophylline がある場合には, H^3 -adenine の cyclic AMP への転入促進が認められた. しかも, NaF の添加は cyclic AMP をわずかに増量させた. TSH は Armour, NIH 共に著明に cyclic AMP への転入増大を起した. この場合 theophylline は更に著明な cyclic AMP 生成増加を起した. LATS は NaF 及び theophylline 単独の場合にも増加を認めたが, NaF と theophylline を同時に添加した場合にも, cyclic AMP への著明な転入増加を起した (Fig. 6).

Fig. 5.
EFFECT OF TSH, THEOPHYLLINE AND NaF ON ATP DESTRUCTION IN BEEF THYROID HOMOGENATE

Fig. 6.
EFFECT OF TSH, LATS ON H^3 -ADENINE INCORPORATION INTO CYCLIC-AMP BY BEEF THYROID SLICES

Reaction conditions ; Using thyroid slices, 3H -adenine $100\mu\text{C}/2\mu\text{g}$ was preincubated for 1hr. and then TSH, or LATS was incubated in 0.5ml of Krebs Ringer phosphate for 30min. with theophylline 8mM or NaF 10mM.

結 論

TSH と LATS はほぼ同様な甲状腺刺激作用をもっている。これらの甲状腺内諸代謝への刺激効果は Cyclic AMP によつても認められた。TSH と LATS は共に甲状腺切片で Cyclase 活性を上昇させ、Cyclic AMP 生成を増加させた。

しかし Cyclic AMP では TSH や LATS による著明な甲状腺刺激反応を完全には再現出来なかつた。これらの両刺激物質の甲状腺への first step が cyclic AMP の生成によるものかいなかは更に今後検討すべき問題である。

口演を終るにあたり、発表の機会を与えて下さいました本学会頭西川教授、司会をして載きました山村、宇井教授並びに終始御指導をたまりました丸本教授に深謝致します。

文 献

- 1) McKENZIE, J.M. : Recent Progr Hormon Res. 23 : 1, (1967)
- 2) OCHI, Y. and L.J. DeGROOT : New Eng. J. Med., 278 : 718, (1968)
- 3) 越智幸男, 丸本 晋, 横田 敬, 八谷 孝, 阿部勢津子 : ホルモンと臨床, 14 : 327, (1966).
- 4) 越智幸男, 横田 敬, 丸本 晋 : 日本内分泌学会雑誌, 41 : 804, (1965)
- 5) OCHI, Y. and L.J. DeGROOT : Biochem. Biophys. Acta., 170 : 198, (1968)
- 6) OCHI, Y. and L.J. DeGROOT : Endocrinology 85 : 344, (1969)
- 7) OCHI, Y. and L.J. DeGROOT : In Press in Endocrinologia Japonica
- 8) SUTHERLAND, F.W., G.A. ROBISON and BUTCHER, R.W. : Circulation 37 : 279, (1968)
- 9) BASTOMSKY, C.H. and J.M. McKENZIE : Amer. J. Physiol. 214 : 753, (1967)
- 10) PASTAN, I. and V. MACCHIA : J. Biol. Chem., 242 : 5757, (1967)
- 11) GILMAN, A.G. and T.W. RALL : J. Biol. Chem. 243 : 5872, (1968)
- 12) WILSON, B., E. RAGHUPATHY, T. TONOUE and W. TONG : Endocrinol. 83 : 877, (1968)
- 13) PASTAN, I. and R. KATZEN : Biochem. Biophys. Res. Comm. 29 : 792, (1967)
- 14) GILMAN, A.G. and T.W. RALL : Fed. Proc. 25 : 617, (1966)
- 15) OCHI, Y. and L.J. DeGROOT : Metabolism 18 : 331, (1969)