脂肪細胞における ACTH の生物活性と特異的結合能

東京医科大学内科第三講座

藤 林 繁

Biological Activity and Specific Binding of ACTH to Fat Cells

Shigeru FUJIBAYASHI

The Third Department of Internal Medicine

Tokyo Medical College

Tokyo, Japan

(Director: Prof. Senji Umehara, M.D.)

The earliest biological event in the action of ACTH upon its target tissue is thought to be an interaction of ACTH peptide with the cell membrane. This study was undertaken in order to clarify the relationship between ACTH's ability and its specific binding to fat cells. First of all, the lipolytic abilities of ACTH analogues were compared with ACTH(1-24) in order to determine what portion of the ACTH molecule is responsible for the lipolytic action of the hormone. Secondly, competitive displacement experiments were carried out in order to explain the action of the adrenergic blocking agent, phentolamine, on the lipolysis of ACTH.

Isolated fat cells were incubated with several kinds of ACTH peptides in the presence or absence of adrenergic blocking agents at 37°C for 2 hrs. Then the lipolytic action of ACTH was determined by measuring the free fatty acid levels in the medium. These lipolytic activities were expressed as the ratios of the amount of free fatty acid released to that of 1μg/ml epinephrine. On the other hand, 80μg/0.2ml of fat cell ghosts were incubated at 4°C for 40 min. with $3-4 \times 10^4$ cpm of ^{125}I -labelled ACTH(1-24) and unlabelled ACTH(1-24) in the presence or absence of adrenergic blocking agents. After centrifugation, the radioactivities of the fat cell ghosts were measured.

I. Dose dependent responses were found in the lipolysis stimulated with ACTH(1-24) at the concentration of $10^{-10} \sim 10^{-7}\text{M}$. Then, lipolytic abilities of ACTH analogues were compared with ACTH(1-24). The relative lipolytic activity of ACTH(1-18) was 91.2 and 105.7% of ACTH(1-24) at the concentration of 10^{-7} and 10^{-6}M , respectively. Therefore, ACTH(1-18) showed almost the same equivalent lipolytic activity as that of ACTH(1-24). The relative lipolytic activity of ACTH(1-14) was 17.3 and 69.9% at the concentration of 10^{-7} and 10^{-6}M , respectively. It was therefore concluded that ACTH(1-14) showed an apparent lipolytic activity. The relative lipolytic activity of ACTH(1-10) was 2.7 and 4.2 at the concentration of 10^{-7} and 10^{-6}M , respectively. These values

do not differ significantly from the control value (basal lipolytic activity in the absence of ACTH), however, ACTH(1–10) stimulated lipolysis at the concentration of 10^{-5} M. Therefore, it was ascertained that ACTH(1–10) had a slight lipolytic activity.

When fat cell ghosts were incubated with 125 I-labelled ACTH(1–24), 18.0% of total radioactivities bound the fat cell ghosts. Displacement of 125 I-labelled ACTH(1–24) occurred in the presence of unlabelled ACTH(1–24). Displacement of binding was not seen at the concentration under 10^{-7} M of ACTH. But the radioactivities of ACTH in the ghost cells showed a liner decrease according to an increase in the concentration of unlabelled ACTH (1–24) added. 6.3% of the bound radioactivity was not displaced over the concentration of 10^{-4} M of ACTH. Displacement of labelled ACTH binding the fat cell ghosts did not occur with the addition of insulin and epinephrine. It seemed that ACTH has no common receptor with those of insulin and epinephrine.

Second, influences of ACTH analogues on the binding of ACTH(1–24) with fat cell ghosts were examined. Unlabelled ACTH analogues caused also the displacement of labelled ACTH(1–24). Evaluation of binding experiments by the Scatchard method showed that not less than two receptor sites were present in adipocytes. The affinity constants were 1.0×10^{-9} M (low affinity constant was 1.3×10^{-7} M) for ACTH(1–24), 7.6×10^{-10} M (1.7×10^{-7} M) for ACTH(1–18) and 2.2×10^{-9} M (9.4×10^{-8} M) for ACTH(1–10). ACTH(1–18) showed the same extent of lipolytic activity and binding ability to the fat cells as ACTH (1–24). ACTH(1–14) showed higher lipolytic activity than that of ACTH(1–10), and lower activity than those of ACTH(1–18) and ACTH(1–24). ACTH(1–10) showed moderate binding ability to fat cells in spite of very low lipolytic activity. The binding affinity of ACTH(1–10) was 66% of that of ACTH(1–24) (logarithmic ratio), and relative lipolytic activity of ACTH(1–10) was less than 1% of that of ACTH(1–24). Therefore, the discrepancy between biological activity and specific binding ability was found in the lipolytic action of ACTH peptides. These results suggest that residues 1–18 are indispensable for the full ability in lipolysis and for the full binding capability of ACTH.

II. In the presence of phentolamine, the release of FFA was partially, or completely, inhibited compared with the effect of ACTH alone. The relative lipolytic activity of epinephrine was reduced from 100.0 to 79.8 by propranolol at 10^{-6} M. Conversely, propranolol at the concentration of 10^{-6} M, had no inhibitory effect on the activation of lipolysis by ACTH(1–24). Therefore, the lipolytic action of ACTH was inhibited by the alpha-adrenergic blocking agent, phentolamine, and not inhibited by the beta-adrenergic blocking agent, propranolol. In the presence of phentolamine as well as propranolol, no significant effect on the binding of ACTH(1–24) was observed. In a case of the addition of phentolamine to the fat cells incubated with labelled ACTH(1–24), the affinity constant for ACTH (1–24) to the fat cell ghosts was unchanged. It was ascertained that these two adrenergic blocking agents did not show any influence on the binding of labelled ACTH to the receptor sites. These results suggest that the antilipolytic effect of phentolamine may be caused by something other than the inhibition of binding of the receptor for ACTH peptides.

はじめに

ラット脂肪組織はきわめて多くのホルモンに対して感受性を有している。ACTH^{*}, TSH, グルカゴン, エピネフリンおよびインスリンなどが生体エネルギー代謝の調節に関与していることから見れば, 脂肪細胞がさまざまなホルモンに対するレセプターを備えているのは理解できるかもしれない。すでに多くのホルモンのレセプターが脂肪細胞膜上に存在することが実証されている。例えば, インスリンにおいては, 脂肪細胞膜をレセプターとした radioreceptor assay がよく用いられるようになり, インスリン・レセプターの性状分析の有力な手段となっている。

しかし, 脂肪細胞膜をレセプターとした ACTH の radioreceptor assay は, 現在までほとんど行なわれていない。そこで, まず, ラット脂肪細胞に ACTH レセプターが存在することを実証することを試みた。次いで, この手技を用いて, ACTH アナログ^{**}の結合能と脂肪動員活性との関係を明らかにし, 副腎における報告と比較して, ACTH の構造と生物学的活性との関連を検討した。

さらに, ACTH の脂肪動員作用を阻害することが知られている phentolamine が ACTH のレセプター結合に作用するかどうかを検討した。

実験方法

1. ACTH アナログ

本実験に使用した ACTH アナログは ACTH₁₋₂₄ (第一製薬), [Gly¹] ACTH₁₋₁₈ amide・[Gly¹] ACTH₁₋₁₄・[Gly¹] ACTH₁₋₁₀ (以上, 塩野義製薬) の4種である。

2. 遊離脂肪細胞の調製と lipolytic activity の算出

自由に摂水摂食させた Donryu 系雄ラット (体重180~230 g) を断頭屠殺し, 副睾丸脂肪組織を摘出し, これを Rodbell の方法²⁷⁾により, collagenase (Sigma 社) を作用させて遊離脂肪細胞を作製した。この遊離脂肪細胞を, 4%ウシ・アルブミン (Sigma 社) を含む Krebs-Ringer bicarbonate buffer PH 7.4 中に浮遊させた。遊離脂肪細胞浮遊液0.8 ml に諸種 ACTH アナログ, エピネフリン (第一製薬), および adrenergic blocker (propranolol 《住友化学》, phentolamine 《Ciba-武田》) を単独あるいは併用して添加し, 全量を1.0 ml とした。気相には酸素95%, 炭酸ガス5%の混合気を充満させ, 37℃で2時間インキュベートした。インキュベーション終了後, ただちに遠心分離し, 脂肪細胞を除去したメジウムより0.2 ml を採り, メジウム中に放出された遊離脂肪酸 (FFA) を Itaya-Ui の方法²⁸⁾で測定した。

脂肪動員活性の指標として, エピネフリン 1 μg/ml を含む脂肪細胞浮遊液を2時間インキュベートしたときにメジウム中に放出された FFA を100とした。これを基準として, 各々の ACTH アナログによってメジウム中に放出された FFA 量を relative lipolytic activity として換算し, 各実験系における脂肪動員活性の比較に用いた。

3. 脂肪細胞ゴースト (ghost) の作製

前記の方法で作製した遊離脂肪細胞を, Rodbell の方法²⁸⁾に準じて, 5 mM Tris-HCl 低張液 PH 7.2を加え, 4℃で遠沈し, 脂肪細胞ゴースト (fat cell ghosts; fat cell plasma membrane rich fraction) を作製した。この沈渣を 1 mM KHCO₃ 溶液 PH 7.2に再浮遊させ, タンパク濃度 2~3 mg/ml の濃厚液として, アッセイまで4℃に保存した。

脚注 * adrenocorticotrophic hormone, corticotropin.

脚注 ** ACTH analogue, ACTH N末端フラグメントと同義。1位を Gly で置換したもの, C末端をアミド化したものをも用いたので, この語を使用した。

1 mCi Na ¹²⁵ I	10 μ l
2~2.5 μ g ACTH ₁₋₂₄	20 μ l
4 μ g lactoperoxidase	20 μ l
0.3 % H ₂ O ₂	10 μ l
0.25 M phosphate-albumin buffer	500 μ l

↓

agitate for 10 sec

↓

purify ¹²⁵I-ACTH₁₋₂₄ with Quso method

↓

store in aliquots at -20°C

Fig. 1. Enzymic radioiodination of ACTH₁₋₂₄.

• fat cell ghost : 80 μ g protein,	200 μ l
• ¹²⁵ I-ACTH ₁₋₂₄ : 3~4 $\times$ 10 ⁴ cpm,	100 μ l
• unlabeled ACTH ₁₋₂₄ or reagents,	100 μ l
• 20 mM Tris-HCl buffer pH 7.5	100 μ l
containing 0.5 % BSA, 1 mM EDTA	

↓

incubate for 40 min at 4°C

↓

centrifuge at 3,000 rpm for 20 min at 4°C

↓

wash with 1.0 ml of buffer

↓

centrifuge and decant again

↓

count the radioactivity of bound ¹²⁵I-ACTH₁₋₂₄ in the precipitate

Fig. 2. Procedure for binding and displacement studies.

4. 標識 ACTH の作製 (Fig. 1.)

Thorell & Johansson の方法⁴²⁾に準じ, Fig. 1. に示したように, Na¹²⁵I (1 mCi/0.01 ml; RCC 製) 1 mCi に対し, ACTH₁₋₂₄ を 2.0~2.5 μ g 加え, lactoperoxidase (Sigma 社) を用いて標識した。したがって比放射能は 400~500 μ Ci/ μ g となった。また, 精製は Berson & Yalow の方法²⁾に従い, Quso (microfine silica; philadelphia Quartz 社) を用いて行なった。

5. 脂肪細胞ゴーストへの標識 ACTH 結合率の測定 (Fig. 2.)

Fig. 2. に示したように, タンパク量に換算して約 80 μ g の脂肪細胞ゴーストに対して 3~4 $\times$ 10⁴ cpm の標識 ACTH を加えた。これに, 0.5% ウシ・アルブミン, 1 mM EDTA を含む 20 mM Tris-HCl buffer PH 7.5 を加えて全量を 0.5 ml とした。さらに, 必要に応じて非標識 ACTH, adrenergic blocker, エピネフリンを加えた。これを 4°C で 40 分間インキュベートした。インキュベーション終了後, 3,000 rpm, 4°C で遠沈し, free と bound 標識 ACTH を分離した。分離後, 脂肪細胞ゴーストに結合した ¹²⁵I-ACTH₁₋₂₄ の放射活性を well type scintillation counter で測定した。各実験系での標識 ACTH の脂肪細胞ゴーストへの結合は非標識 ACTH を加えない場合の脂肪細胞ゴーストの放射活性 (Bo) に対する比 (B/Bo) で表わした。

実験成績

I. 諸種 ACTH アナログの脂肪動員活性および脂肪細胞ゴーストへの結合能

a. ACTH₁₋₂₄ のラット脂肪細胞に対する作用

ACTH₁₋₂₄ の dose response を Fig. 3. に示した。Fig. 3. の横軸に示した各濃度で、ACTH₁₋₂₄ の脂肪動員活性を測定した。それを relative activity で表わすと、control では 1.7 ± 2.6 であった。 10^{-10} M では 2.3 ± 0.7 と control と有意差はなかったが、 10^{-9} M では 11.3 ± 3.5 , 4.3×10^{-9} M 25.7 ± 2.2 , 10^{-8} M 87.8 ± 3.9 と、ACTH₁₋₂₄ の濃度上昇に伴い、lipolytic activity は増加した。 10^{-7} M では 103.5 ± 8.6 とその lipolytic activity の増加はゆるやかとなり、 10^{-6} M に至ると 105.6 ± 4.2 となり、plateau に達した。したがって、本実験系では、ACTH₁₋₂₄ の脂肪動員作用は 10^{-9} M よりみとめられ、 10^{-6} M で最高に達したといえる。Lineweaver-Burk plot²⁶⁾ で計算した half maximal dosis は 2.7×10^{-9} M であった。

Fig. 3. Log concentration-response curve for ACTH₁₋₂₄ induced lipolysis. The fat cells were incubated with ACTH₁₋₂₄ for 2 hrs. Negative logarithmic scales are used on the abscissa for hormone concentration in mol/l. The closed circles and solid line show the lipolytic activity of ACTH₁₋₂₄ ($M \pm SD$).

Fig. 4. Comparison of lipolytic activities between ACTH₁₋₂₄ and other peptides. The fat cells were incubated with ACTH peptides for 2 hrs. Each open bar represents the relative lipolytic activities of their ACTH peptides at 10^{-7} M; hatched bar, at 10^{-6} M; striped bar, at 10^{-5} M ($Mean \pm SD$).

b. 諸種 ACTH アナログの脂肪動員活性

諸種 ACTH アナログを脂肪細胞浮遊液に添加して 2 時間インキュベートしたときの脂肪動員活性を比較した (Fig. 4.)。

ACTH₁₋₁₀ では 10^{-7} M, 10^{-6} M の relative lipolytic activity は、各々 2.7 ± 1.7 , 4.2 ± 2.1 となり、ホルモン無添加時の relative activity 2.7 ± 1.1 と有意差なく、脂肪動員活性は明らかでなかった。しかし、 10^{-5} M と高濃度では、 23.7 ± 1.0 と軽度の活性をみとめた。half maximal dose は 1.1×10^{-5} M であった。

ACTH₁₋₁₄ では 10^{-7} M で 17.3 ± 2.4 と relative lipolytic activity は軽度に上昇し、 10^{-6} M では 69.9 ± 13.2 と明らかな活性を示した。half maximal dose は 5.3×10^{-7} M であった。

ACTH₁₋₁₈ では、 10^{-7} M, 10^{-6} M で、各々 91.2 ± 3.6 , 105.7 ± 5.9 と、ともに明らかな脂肪動員活性をみとめた。half maximal dose は 2.5×10^{-8} M であった。

以上をまとめると、 10^{-7} M の濃度で ACTH アナログの脂肪動員活性は、ACTH₁₋₁₀ は 2.7 とほとんど脂肪動員活性を有さず、ACTH₁₋₁₄ は 17.3 と弱い活性を示した。ACTH₁₋₁₈ は 91.2 と ACTH₁₋₂₄ の活性 103.5 と比べてほぼ同程度の脂肪動員活性を示した。また、half maximal dose で比較すると、ACTH₁₋₂₄ 2.7×10^{-9} M に対し、ACTH₁₋₁₀ 1.1×10^{-5} M, ACTH₁₋₁₄ 5.3×10^{-7} M, ACTH₁₋₁₈ 2.5×10^{-8} M であった。

c. 諸種 ACTH アナログの脂肪細胞膜への特異的結合能

先に述べた方法で得た脂肪細胞膜を試料として、標識 ACTH とともにインキュベートすると、総放射活性の $18.0 \pm 2.0\%$ (Bo/T) が細胞膜に結合した。

Fig. 5. は横軸に示した量の非標識 ACTH₁₋₂₄ を加えて標識 ACTH₁₋₂₄ の置換をみたものである。標識 ACTH₁₋₂₄ の結合率を $B/B_0 \times 100$ で表わすと、非標識 ACTH₁₋₂₄ 10^{-8} M では 100.5 ± 5.1 , 10^{-7} M 99.1 ± 4.1 , 10^{-6} M 75.5 ± 4.4 , 10^{-5} M 44.3 ± 4.0 , 10^{-4} M 35.0 ± 3.1 となった。

Fig. 5. Competitive displacement of ^{125}I -ACTH₁₋₂₄ from fat cell ghosts by unlabelled ACTH₁₋₂₄. Fat cell ghosts, 80 μg protein/0.2 ml, were incubated (4°C , 40 min) with varying concentrations of unlabelled ACTH₁₋₂₄, and ^{125}I -ACTH were added as described in Fig. 2. The counts bound (B_0) in the absence of unlabelled ACTH₁₋₂₄ were $18.0 \pm 2.0\%$ bound of the total counts of 3.4×10^4 cpm. B represents the counts bound in the presence of unlabelled ACTH₁₋₂₄. Closed circles are the means with SD.

Fig. 6. The influence of insulin and epinephrine on the binding of ACTH with fat cell ghosts. The indicated concentration of unlabelled ACTH₁₋₂₄, epinephrine, insulin and ¹²⁵I-ACTH₁₋₂₄, were added to fat cell ghosts as described in Fig. 6. ($M \pm SD$).

x---x : insulin, ▲---▲ : epinephrine, ●---● : unlabelled ACTH₁₋₂₄.

Fig. 7. Inhibitory effects of ACTH analogues on ¹²⁵I-ACTH₁₋₂₄ binding to fat cell ghosts. The solid line and black circles (●---●) show the competitive displacement curve of ¹²⁵I-ACTH₁₋₂₄ from fat cell ghosts by unlabelled ACTH₁₋₂₄ (this is the same as that of Fig. 6.). The indicated concentrations of unlabelled ACTH₁₋₁₈ (○---○), and unlabelled ACTH₁₋₁₀ (x---x), and ¹²⁵I-ACTH₁₋₂₄, were added to fat cell ghosts. Brackets indicate SD.

ここに得られた実験系では、非標識 ACTH の濃度が 10^{-7} M 未満では標識 ACTH₁₋₂₄ の置換は明らかでなく、結合率の低下はなかった。しかし、非標識 ACTH の濃度がそれ以上 (10^{-7} M) に増加すると、標識 ACTH₁₋₂₄ は非標識 ACTH₁₋₂₄ で置換された。 $10^{-7} \sim 10^{-5}$ M の間で非標識 ACTH₁₋₂₄ の濃度上昇にともなって、ほぼ直線的に結合率が低下し、 10^{-4} M ではほぼ plateau に達する sigmoid curve を得た。なお、最高濃度 (10^{-4} M) の非標識 ACTH を加えてもなお置換しない標識 ACTH の結合率、すなわち、非特異的結合を B/T であらわすと $6.3 \pm 1.0\%$ になった。

この脂肪細胞膜を用い、標識 ACTH とともに非標識 ACTH の代りにエピネフリン、インスリンを加え、標識 ACTH がそれらで置換されるか否かを検討した (Fig. 6.)

インスリンを 10 mU/ml (7.2×10^{-5} M) 加えた場合の結合率 (B/Bo) は $106.9 \pm 8.4\%$ となり、100 mU/ml (7.2×10^{-4} M) では 102.8 ± 3.4 、1,000 mU/ml (7.2×10^{-3} M) では 106.7 ± 3.0 となった。

エピネフリンを 10^{-6} M 加えると 92.0 ± 1.4 、 10^{-5} M では 92.7 ± 5.0 、 10^{-4} M では 89.2 ± 2.8 となった。

すなわち、インスリンを加えても、標識 ACTH の競合的置換はおこらなかった。エピネフリンを加えた場合、見かけ上の置換が起こったが、dose dependent competition は見られなかった。したがって、脂肪細胞膜上の ACTH 結合部位はエピネフリン、インスリンとは異なると考えられた。

次に、標識 ACTH₁₋₂₄ の脂肪細胞膜への結合が ACTH アナログで置換されるか否かをみたのが Fig. 7. である。

非標識 ACTH₁₋₁₈ を 10^{-7} M 加えると、結合率は 97.4 ± 5.5 となり、 10^{-6} M では 68.1 ± 1.6 、 10^{-5} M では 47.2 ± 2.9 、 10^{-4} M では 34.5 ± 1.5 となった。非標識 ACTH₁₋₁₈ は非標識 ACTH₁₋₂₄ とほぼ同程度の競合的置換をみた。

非標識 ACTH₁₋₁₀ を 10^{-7} M 加えると、結合率は 106.8 ± 3.8 となり、 10^{-7} M では 97.2 ± 4.0 、 10^{-5} M では 40.2 ± 2.3 、 10^{-4} M では 28.6 ± 3.0 となった。すなわち、ACTH₁₋₁₀ は 10^{-6} M では全く標識 ACTH の有意の置換を起こさなかったが、 10^{-5} M 以上では明らかな競合的置換をみとめた。

Fig. 8. Scatchard plots of the data in Fig. 7. B/F is the bound to free ^{125}I -ACTH ratio. The K_a are obtained from the slope of lines.

- ACTH₁₋₂₄ K_a : 1.0×10^{-9} M (high affinity)
 1.3×10^{-7} M (low affinity)
- ACTH₁₋₁₈ K_a : 7.6×10^{-10} M (high affinity)
 1.7×10^{-7} M (low affinity)
- ×—× ACTH₁₋₁₀ K_a : 2.2×10^{-9} M (high affinity)
 9.4×10^{-8} M (low affinity)

この結果に基づき, Scatchard plots³⁰⁾を行なったのが Fig. 8. であるこれによると ACTH₁₋₂₄ の平衡定数は 1.0×10^{-9} M (low affinity constant: 1.3×10^{-7} M) となった。同様にして, ACTH アナログの平衡定数を求めると, ACTH₁₋₁₈ では 7.6×10^{-10} M (low affinity constant: 1.7×10^{-7} M), ACTH₁₋₁₀ では 2.2×10^{-9} M (low affinity constant: 9.4×10^{-8} M) となった。

以上の結果を脂肪動員活性と対比してまとめたのが Tab. 1. である。ACTH₁₋₁₀ と ACTH₁₋₂₄ とを比較すると, その binding affinity はそれぞれ 1.0×10^{-9} M, 2.2×10^{-9} M と, ともに 10^{-9} M のオーダーであったが, その lipolytic activity の half maximal dosis は各々 2.7×10^{-9} M, 1.1×10^{-5} M と, 10^{-4} M オーダーの差があった。すなわち, ACTH₁₋₁₀ では脂肪動員活性とレセプター結合能とに大差があった。

Table 1. Lipolytic activities and binding affinities of ACTH analogues.

ACTH analogues	lipolytic activities		binding affinities (high affinity constants)
	relative lipolytic activities at 10^{-7} M	half maximal doses	
ACTH ₁₋₂₄	103.5	2.7×10^{-9} M	1.0×10^{-9} M
Gly ¹ ACTH ₁₋₁₈ amide	91.2	2.5×10^{-8} M	7.6×10^{-10} M
Gly ¹ ACTH ₁₋₁₄	17.3	5.3×10^{-7} M	—
Gly ¹ ACTH ₁₋₁₀	2.7	1.1×10^{-5} M	2.2×10^{-9} M

Half maximal doses are calculated by Lineweaver-Burk plots.

High affinity constants are calculated by Scatchard plots.

Values are expressed as the means. See legends for Fig. 3, 4 and 8.

Table 2. Effects of adrenergic blockers on hormone-induced lipolysis.

hormones	adrenergic blockers		
	none	phentolamine 10^{-4} M	propranolol 10^{-6} M
none	1.7 ± 2.6	-3.7 ± 1.9	2.9 ± 0.9
ACTH ₁₋₂₄ 4.3×10^{-9} M	25.7 ± 2.2	-3.0 ± 2.4	25.3 ± 4.6
10^{-7} M	103.5 ± 8.6	47.4 ± 4.8	—
epinephrine 1 μ g/ml	100.0 ± 7.8	79.8 ± 3.9	76.6 ± 5.9

Fat cells were incubated for 2 hrs in the presence of hormones, and rates of lipolysis were determined by measuring the free fatty acid levels in the medium. These lipolytic activities were expressed as the ratios to the velocity of FFA release with 1 μ g/ml epinephrine. Values are means $\pm$ SD.

2. ACTH の脂肪動員活性および脂肪細胞ゴーストへの結合能に対する adrenergic blocker の影響

a. ACTH の脂肪動員活性に及ぼす adrenergic blocker の影響

Tab. 2. に ACTH $_{1-24}$ の脂肪動員活性に及ぼす phentolamine の影響を示した。

ACTH $_{1-24}$ を 4.3×10^{-9} M 添加した場合, relative lipolytic activity は 25.7 ± 2.2 となった。これに phentolamine を 10^{-4} M 加えると, lipolytic activity は -3.0 ± 2.4 となった。この値は basal lipolytic activity (ACTH を加えない場合の lipolytic activity) 1.7 ± 0.6 , および phentolamine 10^{-4} M 単独添加時の lipolytic activity -3.7 ± 1.9 と差がなかった。すなわち, 低濃度の ACTH の脂肪動員活性は phentolamine で完全にブロックされた。

また, ACTH $_{1-24}$ を 10^{-7} M 添加した場合の relative lipolytic activity は 103.5 ± 8.6 であったが, ACTH 10^{-7} M とともに phentolamine を 10^{-4} M 添加すると, lipolytic activity は 47.4 ± 4.8 と低下し, 高濃度の ACTH $_{1-24}$ の脂肪動員活性も phentolamine により抑制された。

一方, エピネフリンに対する phentolamine の影響を ACTH の場合と同じ方法で調べた。エピネフリン $1 \mu\text{g/ml}$ の lipolytic activity は 100.0 ± 7.8 であり, phentolamine 10^{-4} M を添加すると, lipolytic activity は 79.8 ± 3.9 と低下し, エピネフリンの脂肪動員活性も phentolamine で抑制された。

また, phentolamine 10^{-4} M 単独添加時の lipolytic activity -3.0 ± 2.4 は basal lipolytic activity 1.7 ± 1.9 よりも有意に低かった ($p < 0.001$)。すなわち, phentolamine は hormone-induced lipolysis ばかりでなく, わずかながら basal lipolysis をも抑制した。

Tab. 2. に示したように, ACTH $_{1-24}$ 4.3×10^{-9} M および propranolol 10^{-6} M を同時に加えた場合の relative lipolytic activity は 25.3 ± 4.6 となった。これは ACTH $_{1-24}$ 4.3×10^{-9} M のみを加えた場合の relative lipolytic activity 25.3 ± 2.2 と比較して差がなかった。すなわち, ACTH の脂肪動員活性は propranolol によって抑制されなかった。

一方, エピネフリン $1 \mu\text{g/ml}$ に propranolol を 10^{-6} M 加えると lipolytic activity は 76.6 ± 5.9 と有意の低下をみとめた。すなわち, エピネフリンの脂肪動員作用は ACTH と異なり, propranolol により抑制された。

以上をまとめると, β -blocker, propranolol はエピネフリンの脂肪動員作用を抑制したが, ACTH の脂肪動員作用を抑制しなかった。一方, α -blocker, phentolamine はエピネフリンの脂肪動員作用, ACTH の脂肪動員作用をともに抑制した。また, phentolamine は basal lipolysis をも抑制した。

すなわち, α -, β -blocker の効果から見て, ACTH レセプターはエピネフリン・レセプターとは異なるものと考えられた。しかし, phentolamine の効果は basal lipolysis, ACTH-induced lipolysis, epinephrine-induced lipolysis のすべてにおいて見られており, ACTH レセプターに直接作用するとは考えられなかった。

b) ACTH の特異的結合に及ぼす adrenergic blocker の影響

脂肪細胞膜に標識 ACTH とともに, 非標識 ACTH の代りに phentolamine, propranolol を加えた場合の標識 ACTH の細胞膜への結合率を Fig. 9. に示した。

phentolamine を 10^{-7} M 加えた場合の標識 ACTH の結合率は 102.2 ± 4.6 , 10^{-6} M では 108.3 ± 1.7 , 10^{-5} M では 104.7 ± 4.2 , 10^{-4} M では 104.8 ± 2.7 となった。これらはいずれも, $B_o / T \times 100$

$=100.0 \pm 5.4$ と有意差がなかった。すなわち, phentolamine は標識 ACTH の細胞膜への結合には競合しなかった。

propranolol を 10^{-7} M 加えた場合の標識 ACTH の結合率は 97.4 ± 4.9 , 10^{-6} M では 95.7 ± 3.0 , 10^{-5} M では 96.5 ± 3.5 , 10^{-4} M では 98.1 ± 1.6 となった。これらはいずれも $B_0/T \times 100 = 100.0 \pm 5.4$ と有意差がなかった。すなわち, ACTH のレセプター結合に対し, propranolol は競合しなかった。

Fig. 9. Effects of adrenergic blockers on the ACTH binding to fat cell ghosts. The indicated concentration of phentolamine, propranolol and ^{125}I -ACTH₁₋₂₄, were added to fat cell ghosts as described in Fig. 6 ($M \pm \text{SD}$).

x---x: phentolamine, ▲---▲: propranolol,
●---●: unlabelled ACTH₁₋₂₄.

Fig. 10. Influence of phentolamine on the binding of ACTH to fat cell ghosts. The indicated concentration of unlabelled ACTH₁₋₂₄, together with 10^{-4} M of phentolamine and ^{125}I -ACTH₁₋₂₄, were added to fat cell ghosts as described in Fig. 6 ($M \pm \text{SD}$).

●---●: ACTH, x---x: ACTH + phentolamine.

Fig. 10. は標識 ACTH に非標識 ACTH を加え、さらに phentolamine を 10^{-4} M 加えた場合の標識 ACTH の脂肪細胞膜への結合を示したものである。図の下段に示した各濃度の非標識 ACTH を加えると同時に、phentolamine を 10^{-4} M 加えた。

phentolamine を加えない場合の標識 ACTH の結合率は、前述のように、非標識 ACTH 0 で 100.0 ± 5.4 , 10^{-8} M で 102.9 ± 3.8 , 10^{-7} M で 96.2 ± 3.9 , 10^{-6} M で 64.6 ± 2.8 , 10^{-5} M で 39.8 ± 1.6 であった。

phentolamine を 10^{-4} M 加えた場合の標識 ACTH の結合率は 106.1 ± 2.8 , それに非標識 ACTH 10^{-8} M 加えた場合は 96.6 ± 4.3 , 10^{-7} M で 97.1 ± 1.6 , 10^{-6} M で 69.1 ± 3.6 , 10^{-5} M で 49.2 ± 7.2 となった。また、Scatchard plots から求めた平衡定数は 1.0×10^{-9} M であった。すなわち、標識 ACTH の細胞膜への結合は、各濃度の ACTH 存在下で phentolamine が共存しても、何ら影響を受けなかった。

このことから、phentolamine は ACTH と受容体との特異的結合に何ら干渉せず、結合部位にも影響を与えないことが明らかであった。

総括と考按

1) ACTH レセプター

ACTH $_{1-39}$ の脂肪動員作用は White ら⁴¹⁾ によって見出だされたが、その後、Hollenberg ら¹⁶⁾ により、それが副腎を介さない直接作用であることが明らかにされた。その後、ACTH $_{1-24}$ も、副腎皮質に対してステロイド産生促進作用を有するばかりでなく、脂肪動員作用をも有することが、Gries ら¹²⁾ によって明らかにされた。

この副腎に対する作用は、ACTH を不溶性粒子と結合させ、細胞通過を阻害してもステロイド産生をみとめること³⁴⁾、また、副腎の細胞膜に標識 ACTH が結合すること²²⁾ などから、ACTH は副腎の細胞膜レセプターに結合することにより、作用を発揮することが実証された。

ACTH の脂肪動員作用も脂肪細胞膜レセプターに結合して作用するものと推定されていたが、実証は遅れていた。著者の成績では、¹²⁵I-ACTH の結合は非標識 ACTH により競合的に抑制され、ACTH の脂肪細胞膜上のレセプターに特異的に結合すると考えられた。この成績を Scatchard plots を用いて解析すると、脂肪細胞の ACTH レセプターは、high affinity low capacity および、low affinity high capacity を示す少なくとも 2 種以上の receptor sites が存在し、high affinity receptor の平衡定数は 1.0×10^{-9} M、レセプターの数 $2.9 \text{ pM}/\mu\text{g protein}$ と計算された。この点に関しては、これまでのところ、Lang らによる報告²¹⁾ のみのようである。それは、著者の実験方法とは異なり、標識 ACTH として ³H-ACTH を使用しており、また、intact fat cells を標品として用いている。それによると、ACTH $_{1-39}$ では平衡定数は 1.2×10^{-8} M、ACTH $_{1-24}$ では 1.2×10^{-9} M であったとされている。著者の ACTH $_{1-24}$ の成績の high affinity constant はこれにはほぼ一致するものであった。この場合、Lang らの値がやや低いのは標識に 3 H を使用したため⁴⁾ か、あるいはレセプターとして用いた標品の相異による可能性が考えられる。著者の方法では細胞膜分画を用いており、細胞が破壊される過程で脂肪滴が細胞膜外表面に接触して標識ホルモンの結合を阻害する可能性を全く除去している。

binding affinity は著者の成績も Lang らの成績も、副腎皮質で報告されている値^{22) 30)} の約 1/10 である。今回の成績はペプチド・ホルモンの通常の affinity constant $10^{-10} \sim 10^{-8}$ M の間にあり¹⁹⁾、

この点からも, “non receptor but specific binding”⁵⁾ を見ている可能性は少ないと考えられた。すなわち, 著者は ACTH radioreceptor assay の標品として脂肪細胞ゴーストが用いられることを示した。ただし, low affinity constant を持つレセプターは “wash out されない” ACTH の作用¹⁶⁾²⁰⁾の一部である可能性が残されており, その意義は不明であった。

2) ACTH 脂肪動員作用からみた構造と活性

前述の手技を用いて, ACTH アナログの脂肪動員活性とレセプターへの結合能との関係を比較検討した。 10^{-7} M の脂肪動員活性で比較した場合, ACTH₁₋₂₄ の活性 103.5 に対して [Gly¹] A-C TH₁₋₁₈ amide は 88.1 と, 大差はなかったが, [Gly¹] ACTH₁₋₁₄ は 17.3 と低下し, [Gly¹] ACTH₁₋₁₀ は 2.7 と著しく低い活性を示した。これまで, ACTH₁₋₁₄ の脂肪動員活性を測定した成績は見当たらないが, 著者の成績は α -MSH (ACTH₁₋₁₃ amide と書ける)²³⁾ よりも高く, ACTH₁₋₁₆ の活性³⁰⁾ とほぼ同程度であった。

また, 活性を得る half maximal doses で比較すると, ACTH₁₋₂₄ 2.7×10^{-9} M, ACTH₁₋₁₈ 2.5×10^{-8} M, ACTH₁₋₁₄ 5.3×10^{-7} M, ACTH₁₋₁₀ 1.1×10^{-5} M であった。

一方, レセプターへの結合能を high affinity receptor への平衡定数で示すと, ACTH₁₋₁₈ は 7.6×10^{-10} M と, ACTH₁₋₂₄ よりやや強い親和性を示した。また, ACTH₁₋₁₀ の平衡定数は 2.2×10^{-9} M であった。

すなわち, ACTH₁₋₁₀ の脂肪動員活性はレセプター結合能に比べて, はるかに低かった。また, ACTH₁₋₁₈ が ACTH₁₋₂₄ よりやや強い親和性を示したのは, C 末端が amide 化されて, C 末端付近の塩基性が高まっていることも考慮する必要がある。それに比べて ACTH₁₋₁₈ の脂肪動員活性が ACTH₁₋₂₄ よりやや低いのは, インキュベーションが 2 時間とやや長いこと, より短鎖の, ACTH₁₋₁₈ では degradation が起こりやすい。これを考慮すると, ACTH₁₋₁₈ は ACTH₁₋₂₄ とほぼ同程度の活性を示したと言うのが妥当な成績であった。

ところで, ラットでは ACTH の副腎作用と脂肪動員作用とに必要なアミノ酸残基が似通っており²⁴⁾ 副腎作用と向神経作用におけるほどの違いはない⁶⁾ とする意見がある。これは, 最終反応である生物学的活性について述べただけであり, 結合と作用との関係についての通則を示しているものではない。この点に関しては, 副腎細胞では ACTH₁₋₁₀ の活性・結合能がともに非常に低く ACTH₁₁₋₂₄ が結合能のみを有して活性が全くないとする報告¹⁰⁾¹⁴⁾¹⁵⁾が多い。今回の著者の成績は ACTH₁₋₁₀ が遊離脂肪細胞に対し, わずかではあるが明らかな生物活性を有し, かつ, 相当のレセプター結合能を示したので, これらの報告とは反する。

近年, 副腎細胞側の結合部位を 2 つに分けて考え, ACTH₁₁₋₂₄ は ACTH₁₋₁₀ を第二の結合部位に適合させる役割を果たし, ACTH₁₋₁₀ の結合部位が占拠されたときにのみ生物学的活性があらわれるとする仮説²⁹⁾がある。しかし, これらの説明でも, ACTH₁₋₁₀ が脂肪細胞レセプターに対して強い結合能を持つことは説明できない。

今回の著者の成績は, ACTH₁₋₁₀ の脂肪細胞に対する結合能は副腎細胞に対する報告値よりもはるかに強いものであった。ホルモン作用の発現がレセプターとの結合に始まることから考えて, ACTH の細胞膜レセプターは副腎と脂肪細胞とでは, かなり性質が異なり, 両細胞に対する ACTH 感受性の相異の一つはここに帰因するとえる。

3. ACTH レセプターとエピネフリン・レセプター

現在, エピネフリンは主として β -レセプターを介して作用することが通説となっている⁸⁾¹³⁾³⁷⁾。

これは, propranolol などの β -blocker により, エピネフリンの脂肪動員作用が拮抗的に抑制される³⁶⁾ ことに端を発し, 標識 propranolol がエピネフリンと競合的に結合する¹⁾ ことにより, 実証されている。

一方, ACTH の脂肪動員作用が β -blocker では抑制されない^{7) 8) 13) 36)} で, α -blocker, phentolamine で明らかに抑制される^{8) 13) 36)} ことが指摘されている。この際, phentolamine はエピネフリンの脂肪動員作用よりも ACTH の脂肪動員作用をやや強く抑制するという報告が少なくない^{8) 36)}。これらの事実は, ACTH が α -レセプターを介して作用する可能性を残すことになろう。しかし, 著者の実験では, エピネフリンも phentolamine も ACTH の特異的結合に影響を及ぼさないという成績を得た。このことは, ACTH のレセプターとエピネフリンのレセプター, phentolamine の作用部位は, 各々, 異なることを明らかにしている。

4. phentolamine の脂肪動員に対する阻害作用機構

細胞膜へのホルモン結合は, 外部からの薬剤などによって変化するといわれている²⁵⁾。そこで, ACTH, phentolamine 共存下での結合状態の変化をみた。high affinity receptor の平衡定数, レセプターの数ともに, phentolamine の添加ではほとんど変化がなく, また, 非特異的結合にも変化はなかった。したがって, phentolamine は ACTH のレセプター結合に対しては作用せず, その作用部位はレセプター結合以外の段階であると結論した。

ACTH が cyclic AMP を上昇させる³⁾ ことから, phentolamine が ACTH による cyclic AMP 産生を低下させて脂肪動員作用を抑制する可能性が考えられる。しかし, これまでの成績では, phentolamine は cyclic AMP の産生機構を介さずに^{11) 32) 37)}, antilipolytic action を介すと考えられる。また, phosphodiesterase を介して作用する可能性も, 現在のところ, 否定されている³⁷⁾。

phentolamine は hormone-induced lipolysis ばかりか, わずかではあるが明らかに basal lipolysis をも抑制した。phentolamine と同様に, hormone-induced lipolysis, basal lipolysis の両方を抑制する効果をもつ procaine がラット脂肪細胞の membrane-bound-calcium に変化を与えるという報告^{17) 35)} がある。したがって, phentolamine が膜のイオン透過性に変化を与え, 細胞の Ca^{2+} などの陽イオンのレベルや flux に変化をきたす可能性が考えられる。また, ACTH の脂肪動員作用には, Ca^{2+} を必要とする部分⁴⁰⁾ と, 必要としない部分²⁰⁾ とがあるという説もある。しかし, 今回の結合をみた実験は, 手技の必要上から, すべて EDTA を加えて行なっているため, ACTH の膜レセプターへの結合に Ca^{2+} がどの程度の役割を果たしているか, また, それに phentolamine がどう関わっているか, 確認できなかった。

また, phentolamine が ACTH の脂肪動員作用を抑制する様式が非拮抗的であることから, phentolamine の作用部位がレセプター以外の段階にある³⁶⁾ とした古典的な業績がある。また, 非拮抗的であることを, 酸化的リン酸化に共役した電子伝達系に対する作用であるとする解釈⁹⁾ もある。

以上の事実から考えて, phentolamine の ACTH 脂肪動員抑制作用は, 現在のところ, 実験手技上の問題は残されているが, ACTH の作用機序の今後の解明に糸口を与えるものと言えよう。

結 語

脂肪細胞膜による ACTH の radioreceptor assay を試み, ACTH レセプターに対する直接の影響を観察し, 以下の結論を得た。

- 1) ACTH₁₋₂₄ はラット脂肪細胞膜に対し, 特異的結合を示した。その結合の平衡定数は副腎

における報告値の1/10程度であった ($K_a = 1.0 \times 10^{-9}$ M)。

2) ACTH アナログの結合能と脂肪動員活性とは必ずしも平行しなかった。とくに, ACTH₁₋₁₀の結合の平衡定数は 2.2×10^{-9} M と, ACTH₁₋₂₄ と同じオーダーであったが, ACTH₁₋₁₀ の lipolytic activity の half maximal dosis は 1.1×10^{-5} M と ACTH₁₋₂₄ の half maximal dosis 2.7×10^{-9} M と 10^{-4} M オーダーの開きがあった。このことから, 脂肪細胞の ACTH レセプターは副腎細胞のそれとは異なる性質を示す成績を得た。

3) ACTH の特異的結合に対し, エピネフリン, phentolamine, propranolol はいずれも影響を及ぼさなかった。すなわち, 脂肪細胞の ACTH レセプターは adrenergic α -, β - receptor のいずれとも関連をもたないことを示す成績を得た。

4) ACTH の脂肪動員作用を抑制する phentolamine の作用部位について, ACTH レセプター以外に存在を指摘し, 考察を加えた。

稿を終えるに臨み, ご指導ご校閲を頂いた恩師梅原千治教授に深謝いたしますとともに, 直接ご指導を頂いた杉本民雄助教授, 能登谷洋子講師に感謝いたします。また, 研究費の一部を補助して頂いた東実基金に感謝いたします。

なお, 本論文の一部は 1) 第48回日本内分泌学会総会 (1975, 京都), 2) 第72回日本内科学会総会 (1975, 京都), 3) 第49回日本内分泌学会総会 (1976, 東京), 4) V. International Congress of Endocrinology (1976, Hamburg, Fed. Rep. Germany) において発表した。

文 献

- 1) Atlas, D., Steer, M.L. and Levitzki, A.: Stereospecific binding of propranolol and catecholamines to the β -adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 71: 4246-4248, 1974.
- 2) Berson, S.A. and Yalow, R.S.: Radioimmunoassay of ACTH in plasma. *J. Clin. Invest.*, 47: 2725-2751, 1968.
- 3) Butcher, R.W., Baird, C.E. and Sutherland, E.W.: Effects of lipolytic and antilipolytic substances on adenosine 3', 5'-monophosphate levels in isolated fat cells. *J. Biol. Chem.*, 243: 1705-1712, 1968.
- 4) Chang, K., Jacobs, S. and Cuatrecasas, P.: Quantitative aspects of hormone-receptor interaction of high affinity. Effect of receptor concentration and measurement of dissociation constants of labelled and unlabelled hormones. *Biochim. Biophys. Acta.*, 406: 294-303, 1975.
- 5) Cuatrecasas, P., Hollenberg, M.D., Chang, K. and Bennett, V.: Hormone receptor complexes and their modulation of membrane function. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 31: 37-94, 1975.
- 6) Eberle, A. and Schwyzer, R.: α -Melanotropin receptors: Non-identical hormonal message sequences (active sites) triggering receptors in melanocytes, adipocytes and CNS cells. 291-304. Ed. by R.A. Bradshaw, W.A. Frazier, R.C. Merrel, D.I. Gottlieb and R.A. Hogue-Angeletti, *Surface Membrane Receptors*, Plenum Press, New York and London, 1976.
- 7) Fain, J.N., Galton, D.J. and Kovacev, V.P.: Effects of drugs on the lipolytic action of hormones in isolated fat cells. *Mol. Pharmacol.*, 2: 237-247, 1966.
- 8) Fain, J.N.: Adrenergic blockade of hormone-induced lipolysis in isolated fat cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 139: 879-890, 1967.
- 9) Fain, J.N.: Biochemical aspects of

drugs and hormone action on adipose tissue. *Pharmacol. Rev.*, 25: 67–118, 1973.

10) Finn, F.M., Widnell, C.C. and Hofmann, K.: Localization of an adrenocorticotrophic hormone receptor on bovine adrenal cortex membranes. *J. Biol. Chem.*, 247: 5695–5702, 1972.

11) 福元良英, 菊地孝雄, 壺岐洋子, 藤林 繁, 杉本民雄, 梅原千治: ACTH の lipolysis と cyclic AMP 産生に及ぼす α , β -blocker の効果. *日内分泌会誌*. 53: 423, 1977.

12) Gries, F.A. and Bethge, H.: A comparison of the lipolytic effects of β^{1-24} -corticotropin and extracted porcine ACTH. *Metabolism*, 16: 957–976, 1967.

13) Himms-Hagen, J.: Adrenergic receptors for metabolic responses in adipose tissue. *Fed. Proc.*, 29: 1388–1401, 1970.

14) Hofmann, K., Wingerder, W. and Finn, F.M.: Corelation of adrenocorticotrophic activity of ACTH analogs with degree of binding to an adrenal cortical particulate preparation. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 67: 829–836, 1970.

15) Hofmann, K., Montibeller, J.A. and Finn, F.M.: ACTH antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 71: 80–83, 1974.

16) Hollenberg, C.H., Raben, M.S. and Astwood, E.B.: The lipolytic response to corticotropin. *Endocrinology*, 68: 589–598, 1961.

17) Hope-Gill, H., Vydelingum, N., Kissebah, A.H., Tulloch, B.R. and Fraser, T.R.: Stimulation and enhancement of the adipose tissue insulin response by procaine hydrochloride: Evidence for a role of calcium in insulin action. *Horm. Metab. Res.*, 6: 457–463, 1974.

18) Itaya, K. and Ui, M.: Colorimetric determination of free fatty acids in biological fluids. *J. Lipid Res.*, 6: 16–20, 1965.

19) Kahn, C.R. and Roth, J.: Cell membrane receptors for polypeptide hormones. *Am. J. Clin. Pathol.*, 63: 656–667, 1975.

20) Katocs, A.S. Jr., Largis, E.E. and Allen, D.O.: Role of Ca^{2+} in adrenocorticotrophic hormone-stimulated lipolysis in the perfused fat cell system. *J. Biol. Chem.*, 249: 2000–2004, 1974.

21) Lang, U., Karlaganis, G., Vogel, R. and Schwyzer, R.: Hormone-receptor interactions. Adrenocorticotrophic hormone binding site increase in isolated fat cells by phenoxazones. *Biochemistry*, 13: 2626–2633, 1974.

22) Lefkowitz, R.J., Roth, J., Pricer, W. and Pastan, I.: ACTH receptors in the adrenal: Specific binding of ACTH- ^{125}I and its relation to adenyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 65: 745–752, 1970.

23) Ramachandran, J. and Lee, V.: Divergent effects of adrenocorticotropin and melanotropin on isolated rat and rabbit adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 428: 339–346, 1976.

24) Ramachandran, J., Farmer, S.W., Liles, S. and Li, C.H.: Comparison of the steroidogenic and melanotropic activities of corticotropin, α -melanotropin and analogs with their lipolytic activities in rat and rabbit adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 428: 347–354, 1976.

25) Reichert, L.E. Jr., Leidenberger, F. and Trowbridge, C.G.: Studies on luteinizing hormone and its subunits: Development and application of a radioligand receptor assay and properties of the hormone-receptor interaction. *Recent Prog. Horm. Res.*, 29: 497–532, 1973.

26) Rodbard, D.: Mathematics of hormone-receptor interaction. I. Basic principles. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 36: 289–326, 1973.

27) Rodbell, M.: Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.*, 239: 375–380, 1964.

28) Rodbell, M.:

Metabolism of isolated fat cells. V. Preparation of "ghosts" and their properties; adenyl cyclase and other enzymes. J. Biol. Chem., 242: 5744–5750, 1967.

29) Saez, J.M., Dazord, A., Morena, A.M. and Bataille, P.: Interactions of adrenocorticotrophic hormone with its adrenal receptors. J. Biol. Chem., 250: 1683–1689, 1975.

30) 斉藤栄造, 市川陽一, 川越光博, 阿部好文, 本間光夫, 吉田幸一郎, 有川一美: ACTH radioreceptor assay の実際。日本臨床, 34: 477–490, 1976.

31) Scatchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci., 51: 660–672, 1949.

32) Schimmel, R.J.: Responses of adipose tissue to sequential lipolytic stimuli. Endocrinology, 94: 1372–1380, 1974.

33) Schotz, M.C. and Page, I.H.: Effect of adrenergic blocking agents on the release of free fatty acids from rat adipose tissue. J. Lipid Res., 1: 466–468, 1960.

34) Selinger, R.C.L. and Civen, M.: ACTH diazotized to agarose: Effects on isolated adrenal cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 43: 793–799, 1971.

35) Siddle, K. and Hales, C.N.: The effect of local anaesthetics on lipolysis in fat-cells. Biochem. J., 130: 34, 1972.

36) Stock, K. and Westermann, E.: Competitive and non-competitive inhibition of lipolysis by α - and β -adrenergic blocking agents, methoxamine derivatives, and prostaglandin E_1 . Life Sciences, 5: 1667–1678, 1966.

37) Stock, K. and Thomas, T.: Biphasic effect of the α -adrenolytic phentolamine on hormone-stimulated formation of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate in isolated fat cells of rats. Metabolism, 24: 277–286, 1975.

38) 田中 明: 合成 ACTH の生物学的特性。最新医学, 23: 911–919, 1968.

39) Thorell, J.I. and Johansson, B.G.: Enzymic iodination of polypeptides with ^{125}I to high specific activity. Biochim. Biophys. Acta., 251: 363–369, 1971.

40) Vaughn, M.: The metabolism of adipose tissue *in vitro*. J. Lipid Res., 2: 293–316, 1961.

41) White, J.E. and Engel, F.L.: Lipolytic action of corticotropin on rat adipose tissue *in vitro*. J. Clin. Invest., 37: 1556–1563, 1958.