甲状腺ホルモンの核受容体

第三編：Triiodothyronine 静注後の 核受容体の結合能の時間的変動

京都大学医学部 内科第二講座

(指導：井村裕夫教授)

中 村 浩 淑

Sequential Changes in the Nuclear Triiodothyronine Receptors and Mitochondrial α -Glycerophosphate Dehydrogenase Activity after the Administration of Triiodothyronine

Hirotohi NAKAMURA

The Second Department of Internal Medicine

Kyoto University School of Medicine

Kyoto, Japan

(Director: Prof. Hiroo Imura, M.D.)

The dynamics of the induction of nuclear triiodothyronine (T3)-receptors and mitochondrial α -glycerophosphate dehydrogenase (α -GPD) were studied in rat liver after a single injection of a large amount of T3. The maximal binding capacity (C_{max}) and association constant (K_a) of the nuclear receptors were determined by Scatchard analyses with and without correction for endogenous T3 measured by radioimmunoassay. It was demonstrated that the administration of T3 induced sequential increases in the number of nuclear T3-receptors and α -GPD activity in the liver. The nuclear receptors were rapidly increased to 2.5 times the hypothyroid level and thereafter decreased with a half-life of about 2 days. A parallel change in α -GPD activity was noted after a lag period. The total amount of extracted nuclear proteins in the liver was increased 3 days after the administration of T3. It seems likely, therefore, that the T3-induced increase in nuclear receptors is responsible, at least in part, for the induction of this enzyme. The possibility is also suggested that the nuclear receptors may be a nonhistone protein selectively synthesized in an early stage of the hormonal stimulation. Following the injection of T3, marked changes in apparent K_a were seen when no correction was made for the amount of endogenous T3 bound to the extracted nuclear proteins. With the correction, however, K_a remained the same despite the changes in the nuclear receptors and enzyme activity. The results obtained provide further evidence for the hormonal modulation of the nuclear receptors which is closely linked with the hormonal effect.

緒 言

甲状腺ホルモンの作用機序において、その核受容体の結合能が、他の多くのホルモンに見られるように、血中ホルモンレベルにより変動するか否か、また変動するとすればそれがホルモン作用といかに関連しているかは、極めて興味ある問題である。特に甲状腺ホルモンの核受容体の場合は、内因性 T_3 により飽和されている割合が高いことから、受容体の結合容量の変化が直接ホルモン作用の調節因子として働いている可能性が考えられる。これまでに報告されているラット肝を用いた実験では、いずれも核受容体の結合能の変動は見出されていないが、^{4) 11) 17)} その実験方法に種々の問題点が含まれており充分詳細な検討とは言い難い。Oppenheimer らは、核受容体の結合能は甲状腺機能状態にかかわらず常に一定であり、ホルモン効果は核受容体が triiodothyronine (T_3) により結合される割合とその持続時間によって規定される、とするいわゆる nuclear occupancy 説を提唱している。^{11) 12)} しかしながら我々は $40 \mu\text{g}/100\text{g}$ 体重の T_3 を 3 日間投与して作成した高度の機能亢進症ラットでは、肝 T_3 -核受容体の最大結合能が機能低下症ラットに比べ有意に増加していることを見出した。⁹⁾ そしてまた核受容体の親和定数 (K_a)、最大結合能 (C_{max}) の変動を Scatchard plot から求める場合には、内因性 T_3 量を補正することが重要であることを報告した。⁹⁾ 今回甲摘ラットに大量の T_3 を一回静注したあとの核受容体の結合能の時間的変動と、肝ミトコンドリア α -glycerophosphate dehydrogenase (α -GPD) 活性との関連を検討した。

実 験 方 法

体重 $140-150\text{g}$ のウイスター系雄ラットに甲状腺摘除術を施行し、2 週間飼育して体重増加がほぼ見られず安定してきたもののみを実験に使用した。ラットに体重 100g 当り $1250 \mu\text{g}$ の T_3 を股静脈より静注した。静注前 (A 群)、静注後一日目 (B 群)、三日目 (C 群)、及び五日目 (D 群) にラットを脱血屠殺し、直ちに肝より既報の方法⁸⁾ で 0.4M KCl -抽出核受容体を作成した。単離核から核受容体を抽出する時の蛋白質の抽出率は、A 群: $32.3 \pm 2.8\%$ (mean $\pm$ SD), B 群: $32.2 \pm 4.6\%$, C 群: $37.4 \pm 5.6\%$, D 群: $37.0 \pm 4.0\%$ で各群間に有意差は認められなかった。

血中 T_3 及び抽出核蛋白中の T_3 量の測定は前報⁹⁾ と同様の方法で行った。内因性 T_3 は inter assay のバラツキを防ぐ為、全検体を一回の assay で同時に測定しこれを 4 回繰りかえてその平均値をとった。

抽出核受容体と T_3 の結合は既報⁸⁾ と同様の方法で行い、内因性 T_3 量を補正した場合としない場合とで Scatchard plot を行って、親和定数 (K_a)、最大結合能 (C_{max}) を求めた。

DNA は Schmidt-Thannhauser-Schneider 法¹⁵⁾ で抽出し、Burton の方法²⁾ で、また蛋白濃度は Lowry の方法⁷⁾ で測定した。ミトコンドリア α -GPD 活性は Lee & Lardy の方法⁶⁾ に準じて測定し、蛋白 1mg 、1 分間あたりの $\text{OD}_{500\text{nm}}$ の増加で活性を表わした。又、推計学的検定法は Student t test によった。

実 験 成 績

1. T_3 静注後の血中 T_3 、内因性 T_3 、DNA、核蛋白、抽出核蛋白濃度及び α -GPD 活性
コントロールの甲摘ラット群 (A 群) では血中 T_3 濃度は全例測定感度以下 (20ng/dl 以下) であった。

T₃を1250 μ g/100g体重静注した後、血中T₃は第一日目には18300 $\pm$ 3400ng/dlと極めて高値に達し、その後急速に減少した。抽出核蛋白中に含まれる内因性T₃量も、静注後第一日目に頂値をとったが血中T₃に比べその後の減少は緩徐であった(表1)。

肝1g相当の単離核及びそれより0.4M KClにて抽出した核蛋白の蛋白濃度は、静注三日目(C群)に有意の増加を示したが、五日目(D群)にはもとのレベルに復していた。ミトコンドリア α -GPD活性は、T₃投与第一日目より明かな上昇を示し、三日目にはコントロール値の8.1倍と頂値に達し、五日目もなお前値の5.6倍と高い活性を維持していた。一方肝1g当りのDNA含量は、各群間で有意差を認めなかった(表1)。

Table 1. Concentration of serum T₃, endogenous T₃, DNA, nuclear protein, 0.4M KCl-extracted nuclear protein and α -GPD activity after the injection of L-T₃.

	No. *	serum T ₃ (ng/100ml)	endogenous T ₃ (ng/100ml)	DNA (mg/g.liver)	nuclear protein (mg/g.liver)	extracted nuclear protein (mg.protein/ g.liver)	α -GPD activity ** ($\times 10^3$ OD/min/mg)
A before T ₃ - injection	5	< 20	8.0 $\pm$ 3.8	2.67 $\pm$ 0.26	4.40 $\pm$ 0.65	1.48 $\pm$ 0.22	30.0 $\pm$ 9.4
B 1 day after injection	6	18300 $\pm$ 3400	140.1 $\pm$ 18.9	2.68 $\pm$ 0.47	5.36 $\pm$ 0.40	1.78 $\pm$ 0.29	83.4 ^b $\pm$ 24.4
C 3 days after injection	6	148 $\pm$ 37	64.3 $\pm$ 14.6	2.83 $\pm$ 0.85	5.49 ^a $\pm$ 0.40	2.10 ^a $\pm$ 0.28	243.0 ^b $\pm$ 56.0
D 5 days after injection	5	24 $\pm$ 9.5	20.2 $\pm$ 5.7	2.35 $\pm$ 0.48	4.59 $\pm$ 0.33	1.78 $\pm$ 0.13	166.5 ^b $\pm$ 68.0

Significance of difference from the corresponding values of Group A, ^ap<0.05, ^bp<0.005
All the data given are mean $\pm$ SD.

* number of rats ** α -glycerophosphate dehydrogenase activity

Table 2. Association constant (K_a) and maximal binding capacity (C_{max}) of T₃-nuclear receptor with and without correction of endogenous T₃.

group	No.	non-corrected		corrected	
		K _a ($\times 10^9$)	C _{max} (Pg.T ₃ / g.liver)	K _a ($\times 10^9$)	C _{max} (Pg.T ₃ / g.liver)
A before injection	5	11.4 $\pm$ 2.1	256.8 $\pm$ 86.6	14.5 $\pm$ 3.5	276.0 $\pm$ 90.1
B 1 day after injection	6	4.1 $\pm$ ^b 1.3	393.5 $\pm$ ^a 88.5	—	697.9 $\pm$ ^b 163.7
C 3 days after injection	6	7.5 $\pm$ 3.2	321.4 $\pm$ 105.0	[14.9 $\pm$ 1.7]	473.6 $\pm$ ^a 123.9
D 5 days after injection	5	10.1 $\pm$ 2.9	246.2 $\pm$ 85.7	16.0 $\pm$ 5.2	293.9 $\pm$ 95.9

Significance of difference from the corresponding values of Group A, ^ap<0.05, ^bp<0.005
All the data given are mean $\pm$ SD.

2. 内因性 T_3 補正前及び補正後の K_a , C_{max}

抽出核受容体の K_a , C_{max} を Scatchard plot より求めた結果を表2に示した。内因性 T_3 量を補正することなく行った Scatchard plot から求めた K_a 値は、静注後第一日目に $4.1 \pm 1.3 \times 10^9 M^{-1}$ と著しく低下しており、三日目、五日目と次第にコントロール値に復した。 C_{max} は第一日目で有意の増加を示し ($P < 0.05$)、その後は徐々に減少していった。補正しない時の Scatchard plot の著明な変化を図1に示した。

一方内因性 T_3 量を補正して Scatchard plot を行った場合、表2に示されるように K_a の値は各群間で有意差を認めなかった。但し静注第一日目のB群及び三日目のC群の一部(6匹中2匹)では、補正後の Scatchard plot 上各点が集中し K_a の値を正しく求めることは困難であった。これは後述のように核受容体の C_{max} に対し大過剰の T_3 が非特異的に抽出核蛋白中に存在する為と思われる。抽出核受容体の特異的結合部位が一種類である所から、各点は saturation analysis に相当して C_{max} の値を示す位置に集中したものである。補正後の C_{max} は第一日目では $697.9 \pm 163.7 \text{ pg} \cdot T_3 / \text{g} \cdot \text{肝}$ と前値の約2.5倍に増大し、三日目もなお有意に増加していたが、五日目は前値と同じレベルまで減少していた。増加した C_{max} の半減期は2日であった。

Fig. 1. Apparent changes in association constant (K_a) and maximal binding capacity (C_{max}) without correction for endogenous T_3 bound to nonhistone protein. Scatchard analyses were performed on the preparation obtained before and 1 day, 3 days and 5 days after a single intravenous injection of $1250 \mu\text{g } T_3/100 \text{ g body weight}$.

3. C_{max} と α -GPD 活性の時間的変動

T_3 静注後の C_{max} の増減と α -GPD 活性の変動を図2に示した。 C_{max} は静注後第一日目に頂値をとるのに対し、 α -GPD 活性はやや遅れ三日目に頂値をとり、前値に対する増加率は C_{max} (2.5倍) より α -GPD 活性の方が大であった (8.1倍)。しかし頂値に達した後は両者ともほぼ等しい速さで減衰し半減期は約2日であった。血中及び抽出核蛋白中の T_3 濃度は、これに対し、極めて急速な減少を示した(図2)。従って C_{max} の増減と α -GPD 活性の変動の間に、密接な関係が存在することが推測された。

Fig. 2. Sequential changes in the maximal binding capacity of the nuclear receptors for T3 (C_{max}) and mitochondrial α -glycerophosphate dehydrogenase (α -GPD) activity after administration of T3. The solid line indicates C_{max} , and the broken line, α -GPD activity. Each point represents the mean $\pm$ SD.

Fig. 3. Effect on Scatchard plots of two doses of stable T3 added in vitro. Nonhistone proteins obtained from hypothyroid rats were preincubated in vitro with (A) 20 pg T3 and (B) 100 pg T3 per 0.1 ml of NHP. The closed triangles ($\blacktriangle$) indicate Scatchard plots with correction for the added T3, and the open triangles ($\triangle$), those without the correction. The open circles ($\circ$) represent Scatchard plots of the original preparation which was not preincubated with stable T3.

4. In Vitro T_3 添加の Scatchard plot に及ぼす影響

前報で示したように、⁹⁾ 核受容体の K_a , C_{max} を Scatchard plot より求める場合、内因性の T_3 量を補正することが必要である。しかしながら今回、B 群及び C 群の一部では補正後の Scatchard plot からは C_{max} のみが求められ K_a を正しく求めることは困難であった。これは血中及び組織中の T_3 レベルが極めて高値であり、 C_{max} に比し大過剰の T_3 量が非特異的に抽出核蛋白に含まれている為と推測される。このことを確認する為に甲摘ラットより得た抽出核蛋白に、0.1ml 当り 20 及び 100 pg の T_3 を in vitro に結合させ、その Scatchard plot に及ぼす影響を調べた。添加 T_3 量を補正しない時は、いずれの場合も元来の値に比べ K_a , C_{max} とも低下した (図 3)。補正すると 20 pg T_3 添加例 (図 3-A) では、元来の Scatchard plot によく一致したが、B 群に相当する大過剰の 100 pg T_3 を添加した例 (図 3-B) では、補正後の各点が C_{max} の値を示す位置に集中してきて K_a を読みとることは不可能であった。従って大過剰の T_3 量が内因性に存在する場合には、 C_{max} のみ求めることが可能であるが、いずれの場合も内因性 T_3 量を補正して Scatchard plot を行うことが不可欠である。

考 案

体重 100g 当り 1250 μ g の T_3 を甲摘ラットに一回静注し、肝抽出核受容体の T_3 に対する結合親和性、最大結合能の変動を調べた。内因性 T_3 量を補正しない Scatchard plot では、一過性の C_{max} の有意の増加と K_a の極めて顕著な低下が見られたが、補正後の Scatchard plot では、更に明かな C_{max} の増加と共に、 K_a は恐らくは一定で変動していないであろうと考えられた (表 2)。肝 1 g 当りの DNA 含量は各群に有意差なく、単離核からの核蛋白の抽出率にも有意差はなかった。また ¹²⁵I- T_3 を in vivo に投与し今回と同様の方法で核受容体を抽出した前回の実験において、¹²⁵I- T_3 ・抽出核受容体複合体の抽出率に有意の差は見られなかった。⁹⁾ 従って今回の実験結果は、 T_3 投与により細胞一個当りの T_3 -核受容体の数が増加することを示すものであり、高度の機能亢進症ラットで核受容体の最大結合能の有意の増加を認めた前回の成績を更に確認するものである。

T_3 静注後 C_{max} は第一日めに前値の 2.5 倍に増加し、一方 α -GPD 活性はやや遅れて三日目に頂値をとった (8.1 倍) が、その後両者とも半減期約 2 日のほぼ等しい速さで減衰した。 α -GPD の誘導には正常ラットで 13.4 時間の absolute refractory period が存在することが報告されており、¹³⁾ 一定の時間的間隔を持って変動する C_{max} と α -GPD 間には密接な関連が存在することが推測される。甲状腺ホルモンに対する組織の反応性と、その組織中の核受容体の結合容量との間に相関が見られ、¹⁰⁾ また前回の我々の実験で C_{max} の増加と α -GPD 活性の間に有意の正相関が認められた ⁹⁾ ことと合わせ考えると、 α -GPD 活性の上昇に C_{max} の一過性の増大が直接関与している可能性は強いと思われる。最近 Oppenheimer らは、¹⁴⁾ 核受容体が T_3 に 100% 結合されている状態での特異的酵素の誘導の最大速度は、47% の核受容体が結合されている機能正常状態の時の 9 ないし 19.5 倍であり、理論値の 2.13 倍に比しはるかに大きいことを報告している。そして彼らは C_{max} が一定であるとの前提から、この“増幅機構”が受容体以降の未知のメカニズムによるものであろうと推論している。我々の見出した核受容体の結合容量の増大は、この“増幅機構”の少くとも一部を説明するのに有用である。

C_{max} は核蛋白全体の動きに比べ早期に増加している (表 1)。このことは核蛋白質のうちで受容体蛋白が早期にかなり選択的に生成されている可能性を示している。最近 glucagon, ⁵⁾ estrogen, ^{3) 19)}

cortisol¹⁶⁾あるいは甲状腺ホルモン¹⁷⁾¹⁸⁾等種々のホルモンにより選択的に生成されたり、リン酸化されたりする非ヒストン蛋白の存在が知られている。Bernalら¹⁾は比較的少量の T_3 投与によって、5時間以内に de novo に合成される核蛋白を見出しているが、これと T_3 -核受容体との関係は現在の所不明である。

一方 K_a は、内因性 T_3 を補正しない時は一過性に著明な低下が見られたが、補正後の Scatchard plot では各群間に有意差はなかった。静注後一日目のB群では K_a を正しく求めることは不可能であったが、これは C_{max} に比べ大過剰の内因性 T_3 が存在する為と思われる。このことはB群の内因性 T_3 量に匹敵する T_3 を in vitro に抽出核蛋白に添加し、Scatchard plot に及ぼす影響をみた実験結果からも確認された(図3)。前報⁹⁾の我々の実験成績と合わせると核受容体の K_a は、甲状腺機能にかかわらず一定であると考えられる。

結 論

甲摘ラットに1250 μ g/100 g 体重の T_3 を静注しその後の核受容体の結合能と肝ミトコンドリア α -GPD 活性の時間的変動を検討した。

(1) 核受容体の最大結合能は静注後一日目に明かに増加し、その後次第に減少した。半減期は約2日であった。

(2) α -GPD 活性は、 C_{max} の増加よりやや遅れ三日目に頂値をとったがその後は C_{max} とほぼ同じ速度で減衰し、両者間に密接な関連が存在することがうかがわれた。前報の実験成績⁹⁾と合わせ、核受容体の結合能自体がホルモン効果発現を調節する因子の一つとして働いている可能性がある。

(3) 内因性 T_3 補正後の Scatchard plot から、静注後一日目の親和定数を正しく求めることは困難であったが、その他の各群間に有意差はみられず、甲状腺機能状態にかかわらず親和定数は一定と考えられた。

御指導と御校閲を賜りました恩師井村裕夫教授に心より深く感謝致します。また本実験に直接御指導と御助言を載いた天理よろず相談所病院内分泌内科部長 浜田 哲博士に深謝します。抗 T_3 血清を載いた竹田洋祐博士、標識 T_3 の提供を載いたダイナボット R I 研究所に感謝の意を表します。なお本実験は京大放射性同位元素総合センターで行われたものである。

文 献

- 1) Bernal, J., Coleoni, A.H. & DeGroot, L.J., Triiodothyronine stimulation of nuclear protein synthesis. *Endocrinology* 102: 452-459, 1978.
- 2) Burton, K., Determination of DNA concentration with diphenylamine. *Methods in Enzymology* XII-B: 163-166, 1967.
- 3) Cohen, M.E. & Hamilton, T.H., Effect of estradiol-17 β on the synthesis of specific uterine nonhistone chromosomal proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72: 4346-4350, 1975.
- 4) DeGroot, L.J., Torresani, J., Carrayon, P. & Tirard, A., Factors influencing triiodothyronine binding properties of liver nuclear receptors. *Acta Endocrinol.* 83: 293-304, 1976.
- 5) Enea, V. & Allfrey, V.G., Selective synthesis of liver nuclear acidic proteins following glucagon administration in vivo. *Nature* 242: 265-267, 1973.
- 6) Lee, Y.-P. & Lardy, H.A., Influence of thyroid hormones on L- α -glycerophosphate dehydrogenases and other dehydrogenases in various organs of the rat.

- J. Biol. Chem. 240: 1427–1436, 1965. 7) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265–275, 1951. 8) 中村浩淑: 甲状腺ホルモンの核受容体 (第一編) 家兎肝核受容体の性状, 日内分泌会誌. 55: 944–953, 1979. 9) 中村浩淑: 甲状腺ホルモンの核受容体 (第二編) 甲状腺機能亢進症ラットにおける核受容体の結合能の増加について, 日内分泌会誌. 55: 954–962, 1979. 10) Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L. & Surks, M.I., Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen and testis. Endocrinology 95: 897–903, 1974. 11) Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L. & Surks, M.I., Nuclear binding capacity appears to limit the hepatic response to L-triiodothyronine (T3). Endocr. Res. Commun. 2: 309–325, 1975. 12) Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., Surks, M.I., Koerner, D. & Dillmann, W.H., Nuclear receptors and the initiation of thyroid hormone action. Recent Prog. Hormone Res. 32: 529–565, 1976. 13) Oppenheimer, J.H., Silva, E., Schwartz, H.L. & Surks, M.I., Stimulation of hepatic mitochondrial α -glycerophosphate dehydrogenase and malic enzyme by L-triiodothyronine. Characteristics of the response with specific nuclear thyroid hormone binding sites fully saturated. J. Clin. Invest. 59: 517–527, 1977. 14) Oppenheimer, J.H., Coulombe, P. & Schwartz, J. L., Nonlinear (amplified) relationship between nuclear occupancy by triiodothyronine and the appearance rate of hepatic α -glycerophosphate dehydrogenase and malic enzyme in the rat. J. Clin. Invest. 61: 987–997, 1978. 15) Schneider, W.C., Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. Methods in Enzymology III: 680–684, 1957. 16) Shelton, K.R. & Allfrey, V.G., Selective synthesis of a nuclear acidic protein in liver cells stimulated by cortisol. Nature 228: 132–134, 1970. 17) Spindler, B.J., MacLeod, K.M., Ring, J. & Baxter, J.D., Thyroid hormone receptors: Binding characteristics and lack of hormonal dependency for nuclear localization. J. Biol. Chem. 250: 4113–4118, 1975. 18) Taningher, M., Molinari, M.P. & Cesarone, C.F., Early increase in the phosphorylation of liver chromatin nonhistone proteins from thyroidectomized rats treated with triiodothyronine. Endocrinology 101: 1221–1227, 1977. 19) Teng, C.S. & Hamilton, T.H., Regulation by estrogen of organ-specific synthesis of a nuclear acidic protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 40: 1231–1238, 1970.