ACTH の脂肪細胞における生物活性と カルシウムイオン及び cAMP の関係

東京医科大学内科第三講座

(指導: 伊藤久雄教授)

鳥 居 宣 夫

The Role of Ca Ions and cAMP in ACTH Lipolysis

Nobuo TORII

The Third Department of Internal Medicine

Tokyo Medical College

Tokyo, Japan

(Director: Prof. Hisao Ito, M.D.)

Ca ions and cAMP are known to be involved in the action of hormones.

In this study, the actions of Ca ions and cAMP in ACTH lipolysis were investigated by comparing ACTH₁₋₂₄, ACTH₁₋₁₀ and ACTH₁₁₋₂₄ with regard to: lipolytic activity, binding affinity to the fat cell membrane, changes in Ca ion binding to the fat cell membrane and cAMP formation. Rat adipocytes were used.

Lipolytic activity was measured in terms of the amount of FFA released from fat cells into the medium after incubation with the ACTH analogs at 37°C for 30 minutes.

Binding affinity to the fat cell membrane was expressed as competitive binding affinity, determined by simultaneously incubating fat cell ghosts with ¹²⁵I-ACTH₁₋₂₄ and unlabelled ACTH analogs at 4°C for 40 minutes.

Changes in Ca ion binding to the fat cell membrane was expressed as Ca binding capacity, measured by simultaneously incubating fat cell ghosts with ⁴⁵Ca and ACTH analogs at 24°C for 20 minutes.

CAMP formation was measured by RIA as the amount of cAMP formed in fat cells incubated with 10⁻⁶M ACTH analogs at 37°C for 0, 3, 5 and 10 minutes.

FFA release after incubation with each of the ACTH analogs at 10⁻⁶M was 1.17mEq/L/tube for ACTH₁₋₂₄, 0.26mEq/L/tube for ACTH₁₋₁₀ and 0.25mEq/L/tube for ACTH₁₁₋₂₄, showing a high value only for ACTH₁₋₂₄.

The binding affinity to the fat cell membrane (high affinity constant) was 4.4×10⁻⁸M for ACTH₁₋₂₄, 4.6×10⁻⁸M for ACTH₁₋₁₀ and 4.6×10⁻⁸M for ACTH₁₁₋₂₄. There were no significant differences among the binding affinities of these ACTH analogs.

The binding capacity of ⁴⁵Ca⁺⁺ to the fat cell membrane (high affinity constant) was 3.64×10⁻⁶M for ACTH₁₋₂₄, 4.49×10⁻⁶M for ACTH₁₋₁₀ and 5.46×10⁻⁶M for ACTH₁₁₋₂₄.

There were no significant differences among these ACTH analogs.

The increase in cAMP formation during the first 3 minutes of incubation was 35.5 fmol/mg dry weight of fat cells for ACTH₁₋₂₄, 2.2 fmol/mg for ACTH₁₋₁₀ and 1.8 fmol/mg for ACTH₁₁₋₂₄. An increase was only observed for ACTH₁₋₂₄.

The fact that FFA release and cAMP formation were high only with ACTH₁₋₂₄ among the ACTH analogs tested indicates that cAMP formation plays an important role in the lipolytic activity of ACTH in fat cells and that the three-dimensional structure of ACTH is important for cAMP formation.

結 言

Rasmussen²⁶⁾は各種ホルモンの作用発現には、cAMPとカルシウムイオン(以下Ca⁺⁺)の両者が関与している可能性を報告し、その後も両者については多くの研究が行なわれている²⁾。

ACTHの脂肪動員作用にも当初adenyl cyclaseの関与が報告されていたが^{4) 5) 6)}、adenyl cyclaseの活性化にCa⁺⁺が必要な事が報告され、ACTHにおいてもCa⁺⁺の重要性が認められて来ている^{1) 23)}。しかし、その相互関係については不明な点が多い。

そこで著者は今回、ACTHの脂肪動員作用におけるadenyl cyclaseと、Ca⁺⁺の役割を明らかにするため、従来ACTHの生物活性部位といわれているACTH₁₋₁₀、結合部位といわれているACTH₁₁₋₂₄をラット脂肪細胞に作用させ、これらACTH analogのfree fatty acids(以下FFA)放出、レセプターへの結合能、膜結合Ca⁺⁺、cAMP産生能について検討した。

実験材料及び方法

1) ACTH analogs

本研究に使用したanalogのACTH₁₋₂₄は第一製薬、ACTH₁₋₁₀及びACTH₁₁₋₂₄はCiba-geigy社(スイス)のものを用了。

2) 各種ACTH analogsによる脂肪動員作用及びcAMP産生量の測定

ウィスター系雄ラット(150~200g)の副睾丸脂肪組織より、Rodbell²⁸⁾の方法にて遊離脂肪細胞を作製し、これを4%ウシアルブミンを含むKrebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4)にて脂肪細胞浮遊液(脂肪細胞約 1×10^6 個/ml)とし、この浮遊液0.9 mlに各種ACTH analogs 10^{-9} ~ 10^{-5} Mを添加、37℃、30分間インキュベーション後、メジウム中に放出されたFFAをLaurell-TAC法²¹⁾により測定した。cAMP産生は、上記浮遊液0.9 mlを37℃にて 10^{-6} MのACTH analogを添加直後、3分、5分、10分間インキュベーション後直ちに冷凍乾固(ドライアイス、エタノールにて)し、radioimmunoassay(ヤマサ醤油社製)にて脂肪細胞内cAMPを測定した。cAMP産生は脂肪細胞乾燥重量mg(冷凍乾固時測定)当たりで表わした。

3) 脂肪細胞ゴースト(fat cell ghosts; fat cell plasma membrane rich fraction)への各種ACTH analogsの結合

Thorell & Johansson³⁰⁾の方法に準じ標識ACTH₁₋₂₄を作製、精製はBerson & Yalow³⁾の方法に従って行なった。

Rodbell²⁸⁾の方法に従い作製した200 μ lの脂肪細胞ゴースト(80 μ g protein 含)に 3×10^4 cpm

^{125}I -ACTH₁₋₂₄, 0.5%ウシアルブミン, 1mM-EDTAを含むTris-HCl buffer (pH7.5)と, 種々の濃度の非標識 ACTH₁₋₂₄, ACTH₁₋₁₀ 及び ACTH₁₁₋₂₄を加え 4℃, 40分間インキュベーション後, 1100×g, 4℃, 20分間遠心し沈澱物で測定した。各実験共 ^{125}I -ACTH₁₋₂₄の脂肪細胞ゴーストへの結合率は非標識 ACTH analogを添加し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×100)で表わした。

4) 脂肪細胞ゴーストへの $^{45}\text{Ca}^{++}$ の結合

脂肪細胞ゴースト200 μl (80 μg protein 含)に, 0.5 μCi ・ $^{45}\text{CaCl}_2$, 10^{-5} M CaCl_2 を含む20mM Tris-HCl buffer(pH7.5)に種々の濃度の ACTH analogを加え, 24℃, 20分間インキュベーション後, 2000×g, 4℃, 30分間遠心した。得られた沈澱物を, PPO・POPOPを含むトルエン・エタノールに溶解し, liquid scintillation counterにて測定した。 $^{45}\text{Ca}^{++}$ の結合はACTH analog非存在下での値を100としたrelative Ca^{++} binding capacityで表わした。

検定はStudent's-t testで行なった。

成 績

1) 各種 ACTH analogs の脂肪動員活性

ACTH₁₋₂₄, ACTH₁₋₁₀ 及び ACTH₁₁₋₂₄の脂肪動員活性のdose-response curveをFig.1に示した。

ACTH₁₋₂₄では 10^{-9} M より有意の脂肪動員活性を認め, 10^{-7} M で $1.65 \pm 0.1\text{ mEq/L}$ とほぼplateauに達し, 10^{-6} M で $1.74 \pm 0.1\text{ mEq/L}$ と頂値を示した。

Fig. 1. Dose-response curve for FFA release and ACTH analogs. FFA release by fat cells incubated with various concentrations of ACTH₁₋₂₄ (●—●), ACTH₁₋₁₀ (●----●) and ACTH₁₁₋₂₄ (●---●) for 30 min as described in experimental procedure.

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 4 experiments.

*1-3, *1-2 & *1-3 $P < 0.01$

一方 ACTH₁₋₁₀ では 10^{-4} Mにて 0.45 ± 0.2 mEq/Lと FFAの放出傾向を認めたが、前値に比べ有意の変化ではなかった。又 ACTH₁₁₋₂₄ も 10^{-4} Mにて 0.29 ± 0.02 mEq/Lと FFAの放出傾向を認めるも前値に比べ有意の変化ではなかった。

すなわち 10^{-10} Mから 10^{-4} Mの濃度での ACTH analogsの脂肪動員活性を比較すると、ACTH₁₋₂₄ は 10^{-6} Mにて最大活性を認めたが、ACTH₁₋₁₀ 及び ACTH₁₁₋₂₄ は共に有意の活性を認めなかった。

2) 各種 ACTH analogs の脂肪細胞膜への結合能

各種 ACTH analogs の脂肪細胞への結合を標識 ACTH₁₋₂₄ の各種 ACTH analogs による置換でみた。Fig. 2に見る如く、標識 ACTH₁₋₂₄ の結合率は 10^{-7} M以上の非標識 ACTH₁₋₂₄ の存在下で直線的に低下し、 10^{-4} Mでほぼ plateau に達した。 10^{-7} M以上の非標識 ACTH₁₋₁₀ の存在下では標識 ACTH₁₋₂₄ の結合率は 10^{-4} Mまで直線的に低下した。非標識 ACTH₁₁₋₂₄ 存在下でも標識 ACTH₁₋₂₄ は 10^{-7} Mより 10^{-5} Mまで直線的に低下し、 10^{-4} Mでほぼ plateau となった。

Fig. 2. Competitive displacement of ^{125}I -ACTH₁₋₂₄ from fat cell ghosts by unlabelled ACTH analogs. The competitive displacement curve of ^{125}I -ACTH₁₋₂₄ from fat cell ghosts by unlabelled ACTH₁₋₂₄ (●—●), ACTH₁₋₁₀ (●- - -●) and ACTH₁₁₋₂₄ (●—●). Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of 4 experiments.

この結果に基づき Scatchard plotsを行なうと (Fig. 3), ACTH₁₋₂₄ の解離定数は 4.4×10^{-8} Mであり、ACTH₁₋₁₀, 4.6×10^{-8} M, ACTH₁₁₋₂₄, 4.6×10^{-8} Mであった。

すなわち脂肪動員作用は ACTH₁₋₂₄ にのみ認めただけであるが、脂肪細胞膜への結合親和性は、ACTH₁₋₂₄, ACTH₁₋₁₀ 及び ACTH₁₁₋₂₄ 共有意差は認めなかった。

3) 各種 ACTH analogs による脂肪細胞膜結合 Ca^{++} の変化

各種 ACTH analogs の濃度による脂肪細胞ゴーストへの $^{45}\text{Ca}^{++}$ の結合能の変化を Fig. 4に示した。

$^{45}\text{Ca}^{++}$ の結合率は ACTH₁₋₂₄ では 10^{-8} Mから 10^{-6} Mまでゆるやかな減少を示したが、 10^{-6} Mより $^{45}\text{Ca}^{++}$ の結合率は大きく減少した。

Fig. 3. Scatchard plots of the data in Fig. 2. B/F is the bound to free ^{125}I -ACTH ratio.

The K_d was obtained from the slope of the line.

- ACTH_{1-24} $K_d : 4.4 \times 10^{-8} \text{M}$
- - -● ACTH_{1-10} $K_d : 4.6 \times 10^{-8} \text{M}$
- · - · ACTH_{11-24} $K_d : 4.6 \times 10^{-8} \text{M}$

Fig. 4. The inhibitory effect of ACTH analogs on the binding of ^{45}Ca in fat cell ghosts. Inhibition of ^{45}Ca binding capacity in fat cell ghosts by various concentrations of ACTH_{1-24} (●—●), ACTH_{1-10} (●- - -●) and ACTH_{11-24} (●- · - ·). ^{45}Ca binding capacity was calculated as $B/B_0 \times 100$. B_0 was ^{45}Ca binding when ACTH was not added to the incubation medium. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of 4 experiments.

ACTH₁₋₁₀ 及び ACTH₁₁₋₂₄ は 10^{-8} M から 10^{-6} M では, ACTH₁₋₂₄ で認めたゆるやかな減少は明らかではないが, 10^{-6} M より減少は ACTH₁₋₂₄ とほぼ同程度であった。すなわち $^{45}\text{Ca}^{++}$ の結合率は, ACTH analogの濃度上昇に従い減少を認めた。

以上の結果に基づき Scatchard plotsを行ない, Fig. 5に示した。

これによると, $^{45}\text{Ca}^{++}$ の結合での各 ACTH analogの解離定数は, ACTH₁₋₂₄ で 3.64×10^{-6} M (low affinity constant 1.03×10^{-4} M), ACTH₁₋₁₀, 4.49×10^{-6} M (low affinity constant 1.04×10^{-4} M), ACTH₁₁₋₂₄, 5.46×10^{-6} M (low affinity constant 6.30×10^{-5} M) であった。ACTH₁₋₂₄, ACTH₁₋₁₀ 及び ACTH₁₁₋₂₄ 共脂肪細胞膜への $^{45}\text{Ca}^{++}$ の結合を同程度抑制した。

Fig. 5. Scatchard analysis of the data in Fig. 4. This scatchard analysis was done as the inhibitory effect of ACTH analogs on ^{45}C binding to fat cell ghosts. B/F means bound ACTH analogs to free ^{45}Ca ratio.

●—● ACTH₁₋₂₄ Kd : 3.64×10^{-6} M
 ●----● ACTH₁₋₁₀ Kd : 4.49×10^{-6} M
 ●-.-.-● ACTH₁₁₋₂₄ Kd : 5.46×10^{-6} M

4) 各種 ACTH analogs の cAMP 生成量

各種 ACTH analogs による脂肪細胞での cAMP 産生量を time-course curve で比較検討した。

Fig. 6に ACTH₁₋₂₄ と ACTH₁₋₁₀ 添加群で比較して示した。ACTH 無添加でインキュベーション 3 分後に cAMP の増加を認めたが前値に比し有意ではなかった。ACTH₁₋₂₄ 添加では 3 分後を頂値とする cAMP の有意の増加が認められた。ACTH₁₋₁₀ 添加では 3 分後に cAMP の増加が認められたが前値と有意差なく, 又無添加群の 3 分後の値に比べて低値であったが有意ではなかった。

ACTH₁₁₋₂₄ 添加では(Fig. 7) 前値に比べ有意な cAMP の増加は認められず, 無添加群と比べ cAMP の産生は低かったが有意ではなかった。

さらに ACTH₁₋₁₀ と ACTH₁₁₋₂₄ の同時添加においても (Fig. 8) 有意な cAMP の増加は認められなかった。

Fig. 6. Time-course curve for cAMP formation and ACTH analogs. cAMP formation by fat cell incubated with 10^{-6} M ACTH₁₋₂₄ (●—●), ACTH₁₋₁₀ (●- - -●) and without ACTH (○—○). Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of 4 experiments.

Fig. 7. Time-course curve for cAMP formation and ACTH analogs. cAMP formation by fat cell incubated with 10^{-6} M ACTH₁₋₂₄ (●—●), ACTH₁₁₋₂₄ (●- - -●) and without ACTH (○—○). Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of 4 experiments.

Fig. 8. Time-course curve for cAMP and ACTH analogs. cAMP formation by fat cell incubated with 10^{-6} M ACTH₁₋₂₄ (●—●), ACTH₁₋₁₀ + ACTH₁₁₋₂₄ (●- - -●) and without ACTH (○—○). Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of 4 experiments.

Table 1. Comparison FFA release, binding affinities of ACTH analogs to fat cell receptors, 45 Ca binding to fat cell ghosts and cAMP formation on fat cells.

	FFA release (10^{-6} M ACTH analogs)	binding affinities (high affinity constants)	45 Ca binding capacity (high affinity constants)	cAMP formation (Δ 3 min)
ACTH ₁₋₂₄	1.17 ± 0.10 mEq/L	4.4×10^{-8} M	3.64×10^{-6} M	35.3 fmol/mg
ACTH ₁₋₁₀	0.26 ± 0.01 mEq/L	4.6×10^{-8} M	4.49×10^{-6} M	2.2 fmol/mg
ACTH ₁₁₋₂₄	0.25 ± 0.04 mEq/L	4.6×10^{-8} M	5.46×10^{-6} M	1.8 fmol/mg

High affinity constants was calculated by Scatchard plots.

以上の結果をまとめて Table 1 に示した。 10^{-6} M の各種 ACTH analogs の添加で放出された FFA 量を指標として脂肪動員活性をみると、ACTH₁₋₂₄ で 1.17 ± 0.1 mEq/L の活性を認めたが ACTH₁₋₁₀、ACTH₁₁₋₂₄ では各々 0.26 ± 0.01 mEq/L、 0.25 ± 0.04 mEq/L と活性を認めなかった。この脂肪動員活性と ACTH analog の膜結合能を比較すると、解離定数は ACTH₁₋₂₄、 4.4×10^{-8} M、ACTH₁₋₁₀、 4.6×10^{-8} M、ACTH₁₁₋₂₄、 4.6×10^{-8} M と親和性は各 analog 共にほとんど同程度認められた。さらに 45 Ca⁺⁺ binding capacity を比較しても、解離定数は各々 3.64×10^{-6} M、 4.49×10^{-6} M、 5.46

$\times 10^{-6}$ M と各 analog で同程度の $^{45}\text{Ca}^{++}$ binding capacity を示した。

以上の結果からは、各 analog による脂肪動員活性の差異を膜結合能あるいは $^{45}\text{Ca}^{++}$ binding capacity の差から説明する事は困難であった。

cAMP 産生と脂肪動員活性を比較すると、3 分後の cAMP 産生量は ACTH₁₋₂₄, 35.3 fmol/mg, ACTH₁₋₁₀, 2.2 fmol/mg, ACTH₁₁₋₂₄, 1.8 fmol/mg であり、脂肪動員活性と cAMP 産生量には相関関係のある事が示唆された。

考 察

1) 脂肪動員活性と ACTH analog の結合能

ACTH₁₋₂₄ が脂肪動員作用を有する事はすでに知られている^{12,14}。今回も ACTH₁₋₂₄ は 10^{-6} M で最大活性を示す脂肪動員作用を示した。一方、ACTH₁₋₁₀ 及び ACTH₁₁₋₂₄ は有意の脂肪動員作用を示さなかった。

ACTH analog による脂肪動員作用を比較した成績は少ない。藤林⁹⁾によると、ACTH₁₋₂₄ の脂肪動員作用の最大活性は 10^{-7} M で 103.5% (エピネフリン $1 \mu\text{g/ml}$ 添加時の FFA 放出量を 100% とする) となり、一方 [Gly¹] ACTH₁₋₁₀ でも最大活性が 10^{-5} M で 23.7% と有意の活性を認めている。ACTH₁₋₁₀ について著者の成績と異なるのは、藤林が [Gly¹] ACTH₁₋₁₀ を用いたことによる ACTH analog の分子構造の違いによるものかもしれない。

ACTH₁₁₋₂₄ の脂肪動員活性についての報告は見あたらないが、副腎細胞での steroid 産生についてみると、ACTH₁₁₋₂₄ では活性が全くないとする報告が多い³⁵。著者の脂肪細胞での脂肪動員活性も同様であり、ACTH₁₁₋₂₄ の副腎作用と脂肪動員作用には大きな差はないと思われた。

ACTH₁₋₂₄ は脂肪細胞に対し特異的結合能を有する事はすでに報告されているが⁹⁾、今回各種 ACTH analogs の脂肪細胞への結合能を解離定数で比較すると、ACTH₁₋₂₄, ACTH₁₋₁₀ 及び ACTH₁₁₋₂₄ 共ほぼ同程度の解離定数を示した。

Lang らは¹⁹⁾ ACTH₁₋₂₄ の脂肪細胞への解離定数を 1.2×10^{-9} M と報告しているが、今回著者の成績はこれよりやや低い。これは使用した標識 ACTH の比放射能 (specific activity) の差によるかもしれない。

副腎細胞で報告されている解離定数が $10^{-13} \sim 10^{-7}$ M であることから³⁰、今回の ACTH₁₋₂₄ の脂肪細胞への結合は脂肪動員作用に関連したものと考えられた。

Saez らは³⁰⁾ ACTH₁₋₁₀ 及び ACTH₁₁₋₂₄ 共に ACTH₁₋₂₄ に比べ弱い (各々 $\frac{1}{6}$, $\frac{1}{6}$) 副腎細胞への結合を示し、かつ各々結合部位が異なる事を報告している。今回著者の成績で、脂肪細胞でも ACTH₁₋₂₄ との膜分画への競合的結合反応からみて、ACTH₁₋₁₀ 及び ACTH₁₁₋₂₄ の両者にも ACTH₁₋₂₄ と共通の膜分画レセプターへの結合部位があると考えられ、しかもその ACTH₁₋₁₀ 及び ACTH₁₁₋₂₄ の生物活性から考えられるよりも強い結合親和性をもつことが示唆された。この様にレセプターとホルモンとの親和性が直ちにホルモン作用の強さを意味しないことは Hoffman ら¹³⁾ によっても認められている。

ACTH が脂肪動員作用を表わすには、レセプター結合部位において ACTH₁₋₁₀ 及び ACTH₁₁₋₂₄ の両者のアミノ酸残基を含む立体構造が重要なかもしれない。

2) 各種 ACTH analogs による adenylyl cyclase の活性化と $^{45}\text{Ca}^{++}$ 結合能

上述の如く ACTH の脂肪動員作用と膜レセプターへの結合親和性に解離が認められた。そこでこ

の解離を解釈するために second messenger と考えられる cAMP と Ca^{++} について検討した。

adenyl cyclase の活性化の有無をみると ACTH₁₋₂₄ は有意の cAMP 産生増加を認め、ACTH₁₋₁₀ 及び ACTH₁₁₋₂₄ では cAMP 産生の有意の増加がなかったことから、ACTH₁₋₂₄ は脂肪細胞の adenylyl cyclase を活性化するが、ACTH₁₋₁₀ 及び ACTH₁₁₋₂₄ は adenylyl cyclase を活性化しないものと考えられる。

又結合部位の異なると考えられる ACTH₁₋₁₀ 及び ACTH₁₁₋₂₄ を同時添加しても adenylyl cyclase の活性化は認められず、脂肪細胞の adenylyl cyclase の活性化には ACTH の10位と11位を含む ACTH の立体構造が重要な役割を有すると推測された。

又、Seelig ら³⁵⁾によれば ACTH が副腎皮質細胞の膜レセプターと結合すると立体構造の変化を生じ、8-21位のアミノ酸残基はループ状になり、21-24位のアミノ酸は7-8位のアミノ酸と交叉する形を示すと報告しているが、これは著者の結果と考え合わせると興味深い知見である。

脂肪細胞での ACTH の脂肪動員作用には Ca^{++} が重要であると報告されている^{10) 23)}。

脂肪細胞ゴーストの⁴⁵Ca⁺⁺結合に及ぼす ACTH analog による抑制を比較検討すると、⁴⁵Ca⁺⁺結合は ACTH₁₋₂₄ では濃度依存性に低下し、 10^{-6} M より大きく低下した。ACTH₁₋₁₀ 及び ACTH₁₁₋₂₄ でも同様に濃度依存性の⁴⁵Ca⁺⁺結合の低下を示し、各 analog の⁴⁵Ca⁺⁺結合能の抑制を high affinity constant で表わすと、ACTH₁₋₂₄ で 3.64×10^{-6} M, ACTH₁₋₁₀ で 4.49×10^{-6} M, ACTH₁₁₋₂₄ で 5.64×10^{-6} M とほぼ同程度であった。

今回の実験条件下での⁴⁵Ca⁺⁺結合の低下が、膜結合 Ca^{++} プールより細胞内への Ca^{++} の influx を反映していると考ええると¹¹⁾、各 analog 共に同程度の Ca^{++} の influx を引き起こす事が示唆された。すなわち各 ACTH analog 共、膜レセプターへの結合と Ca^{++} の influx を同程度に引き起こすと考えられた。

ホルモン作用における Ca^{++} と cAMP との関係については種々の報告がある。

ACTH の cAMP 産生には Ca^{++} の存在が重要であると考えられ^{18) 20) 33)}、以前の著者らの検討でもメジウム中の Ca^{++} 濃度を 10^{-7} M 以下にすると、脂肪細胞での ACTH₁₋₂₄ による cAMP 産生は完全に抑制された¹⁰⁾。

Saez ら³¹⁾は、ACTH の副腎細胞でのホルモン作用発現における Ca^{++} 及び cAMP の役割について、 Ca^{++} が adenylyl cyclase の活性化の step に作用し cAMP の上昇を促し、この時の Ca^{++} は ACTH による膜透過性の増大により細胞内への Ca^{++} の influx が起こり作用すると述べている。しかし、今回の実験では ACTH₁₋₁₀ 及び ACTH₁₁₋₂₄ は膜レセプターに結合し、 Ca^{++} の influx を促すが ACTH₁₋₂₄ と異なり adenylyl cyclase の活性化は認めなかった。

Rasmussen²⁵⁾は cAMP が膜の Ca^{++} 透過性を変化させると報告しているが、福元¹¹⁾の研究の結果では dbcAMP もテオフィリンも脂肪細胞ゴーストへの Ca^{++} 結合に有意の変化を示さず、cAMP の産生のない ACTH₁₋₁₀ 及び ACTH₁₁₋₂₄ で Ca^{++} の influx が起こる事が推定されることから、脂肪細胞では cAMP が膜の Ca^{++} 透過性を変化させるとは考えにくい。

以上の様に、膜結合 Ca^{++} の influx と adenylyl cyclase の活性化とは直接的には関係がないと推測された。

最近脂肪細胞の脂肪動員作用には、 Ca^{++} の細胞内での再分布が重要な役割を果たすとの報告がある^{15) 16) 17) 27)}。つまり ACTH は細胞内 microsome への Ca^{++} uptake と細胞内 cAMP の上昇が認められた時のみに脂肪動員作用を示し、たとえ cAMP の上昇が認められても microsome への Ca^{++} uptake が

認められない時には、脂肪動員作用を示さないと報告している¹⁶⁾。又、この細胞内でのCa⁺⁺再分布には細胞外Ca⁺⁺の細胞内へのinfluxの増大が関与しているとの報告もある^{15) 27)}。今回著者らの実験では、ACTH₁₋₂₄、ACTH₁₋₁₀及びACTH₁₁₋₂₄共Ca⁺⁺の細胞内へのinfluxは認められたが、これらACTH analogによる細胞内のCa⁺⁺再分布については明らかではない。

しかしこれらの報告では、cAMP産生を認めない状態については検討されておらず、又脂肪細胞はCa⁺⁺非存在下でも脂肪動員活性が完全には抑制されない事も報告されている¹⁷⁾。

さらに脂肪細胞の脂肪動員活性とcAMP産生量との間に相関が認められる事^{7) 8) 22) 37) 38)}、又cAMP産生とprotein kinase activityとが良く相関するとの報告もあり^{37) 38)}、脂肪細胞での脂肪動員活性にはcAMPが重要な役割を示すと考えられた。

結局著者の今回の結果からはACTHの脂肪細胞における脂肪動員作用がcAMP産生と相関し、膜結合Ca⁺⁺の変化とは相関しない事より、脂肪細胞でのACTHのホルモン作用発現にはまずACTH分子の立体構造によりadenyl cyclaseが活性化され、脂肪細胞内cAMP濃度の上昇する事が重要であり、膜結合Ca⁺⁺の細胞内へのinfluxはこれに直接関与しないと考えられた。

しかし、cAMP産生と細胞内Ca⁺⁺の再分布との関連についてはさらに研究を重ねる必要を認めた。

結 語

- 1) ACTH₁₋₂₄には脂肪動員活性を認めたが、ACTH₁₋₁₀及びACTH₁₁₋₂₄には脂肪動員活性は認めなかった。
- 2) ACTH₁₋₂₄、ACTH₁₋₁₀及びACTH₁₁₋₂₄は脂肪細胞に対し高い結合親和性を有していた。
- 3) 脂肪細胞膜への⁴⁵Ca⁺⁺結合においてACTH₁₋₂₄、ACTH₁₋₁₀及びACTH₁₁₋₂₄は同程度の解離定数を示した。
- 4) 脂肪細胞でACTH₁₋₂₄は有意のcAMP産生を認めたが、ACTH₁₋₁₀及びACTH₁₁₋₂₄はcAMP産生を認めなかった。ACTH₁₋₁₀及びACTH₁₁₋₂₄の同時添加でもcAMP産生は認めなかった。
- 5) 脂肪細胞でのACTHのホルモン作用発現には、ACTHの立体構造が重要であり脂肪細胞膜結合Ca⁺⁺の変化は直接関与していないことが推測された。

本論文の一部は、第53回及び第54回日本内分泌学会総会並びにFirst International Congress on Hormone and Cancer (1979, Rome, Italy)において発表した。

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を頂きました伊藤久雄教授に深謝いたしますと共に終始御指導を頂きました故杉本民雄教授、能登谷洋子講師に厚く感謝いたします。又種々御協力下さった福元良英博士に感謝いたします。

文 献

- 1) Bär, H.P. and Hechter, O.: Adenyl cyclase and hormone action, I. Effects of adrenocorticotrophic hormone, glucagon and epinephrine on the plasma membrane of rat fat cell. *Proct. Natl. Acad. Sci.*, 63: 350-356, 1969.
- 2) Berridge, M.J.: The interaction of cyclic nucleotides and calcium in the control of cellular activity, 1-98. Ed, by P. Greengard and G.A. Robison, *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, vol.6, Raven Press, New York, 1975.
- 3) Berson, S.A. and Yalow, R.S.: Radioimmunoassay of ACTH in

- plasma. *J. Clin. Invest.*, 47: 2725–2751, 1968.
- 4) 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.
- 5) Butcher, R.W. and Baird, C.E.: The regulation of cyclic AMP and lipolysis in adipose tissue by hormones and other agents. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 4: 5–23, 1969.
- 6) Fain, J.N.: Biochemical aspects of drug and hormone action on adipose tissue. *Pharmacol. Rev.*, 25: 67–118, 1973.
- 7) Fan, C.C. and Ho, R.J.: Response of white adipocyte of mouse and rabbit to catecholamines and ACTH. I. Correlation of cyclic AMP levels and initial rates of lipolysis. *Mol. Cell. Biochem.*, 34: 35–41, 1981.
- 8) Forn, J. and Greengard, P.: Regulation by lipolytic and antilipolytic compounds of the phosphorylation of specific proteins in isolated intact fat cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 176: 721–733, 1976.
- 9) 藤林 繁: 脂肪細胞におけるACTHの生物活性と特異的結合能, 日内分泌会誌, 55: 833–849, 1979.
- 10) 福元良英, 鳥居宣夫, 藤林 繁, 能登谷洋子, 杉本民雄, 梅原千治: ACTHの作用におけるCaとcAMPの関係及びphentolamineの作用, 日内分泌会誌, 55: 408, 1979.
- 11) Fukumoto, Y.: Calcium release from membrane-bound calcium pool induced by ACTH. *Int. J. Clin. Pharm. Ther. Toxicol.*, 20: 209–211, 1982.
- 12) Greis, F.A. and Bethge, H.: A comparison of the lipolytic effects of β^{1-24} -corticotropin and extracted procine ACTH. *Metabolism*, 16: 967–976, 1967.
- 13) Hofmann, K., Montibeller, J.A. and Finn, F.M.: ACTH antagonists. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71: 80–83, 1974.
- 14) Hollenberg, C.H., Raben, M.S. and Astwood, E.B.: The lipolytic response to corticotropin. *Endocrinology*, 68: 589–598, 1961.
- 15) 井沢鉄也, 小清水英司, 駒林隆夫, 坪井 実: ラット副睾丸脂肪組織におけるエピネフリン, ノルエピネフリン, カフェインおよびACTHの脂肪動員作用に及ぼす Ca^{2+} ならびにカルモデュリン阻害剤の影響, 日本生理誌, 45: 36–44, 1983.
- 16) Kawai, A.: The effects of lipolytic hormones on calcium uptake in endoplasmic reticulum of adipocytes. *Horm. Metab. Res.*, 15: 533–538, 1983.
- 17) 川室厚子, 高嶋隼二, 松岡 瑛: Epinephrine刺激による灌流ラット脂肪細胞のglycerolおよびcAMP放出動態, 日内分泌会誌, 56: 1593–1605, 1980.
- 18) Kuo, J.F.: Differential effects of Ca^{2+} , EDTA and adrenergic blocking agents on the actions of some hormones on adenosine 3', 5'-monophosphate levels in isolated adipose cells as determined by prior labeling with $[8-^{14}\text{C}]$ adenine. *Biochem. Biophys. Acta*, 208: 509–516, 1970.
- 19) 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.
- 20) Lefkowitz, R.J., Roth, J. and Pastan, I.: Effects of calcium on ACTH stimulation of adrenal: Separation of hormone binding from adenyl cyclase activation. *Nature*, 228: 864–866, 1970.
- 21) 前畑英介, 中 甫: 2(2-Thiazolylazo)-p-cresolを用いた遊離脂肪酸の比色定量, 臨床化学, 1: 447–456, 1972.
- 22) Macho, L. and Kolena, J.: Lipolysis and cyclic-3', 5'-AMP content in rat adipose tissue at different age. *Endocrinol. Exp.*, 9: 93–99, 1975.
- 23) 奥田拓男, 藤井節郎: ホルモン作用におけるカルシウムの役割, 総合臨床, 23: 1283–1289, 1974.
- 24) Postnov, Yu. V., Orlov, S.N., Reznikova, M.B. and Pokudin, N.I.: Features of adipocyte

sensitivity to lipolytic agents in spontaneously hypertensive rats. Possible role of altered intracellular calcium distribution. *Pflügers Archiv.*, 384: 183–188, 1980.

25) Rasmussen, H. and Tenenhouse, A.: Cyclic adenosine monophosphate, Ca^{++} and membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 59: 1364–1370, 1968.

26) Rasmussen, H.: Cell communication, calcium ion, and cyclic adenosine monophosphate. *Science*, 170: 404–412, 1970.

27) Rasmussen, M.J. and Clausen, T.: The stimulating effect of 3', 5'-(cyclic) adenosine monophosphate and lipolytic hormone on 3-o-methylglucose transport and $^{45}\text{C}^{2+}$ release in adipocyte and skeletal muscle of the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 693: 389–397, 1982.

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

29) 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.

30) Saez, J.M., Dazord, A., Morera, A.M. and Bataille, P.: Interactions of adrenocorticotrophic hormone with its adrenal receptors. Degradation of ACTH_{1-24} and ACTH_{11-24} . *J. Biol. Chem.*, 250: 1683–1689, 1975.

31) Saez, J.M., Morera, A.M. and Dazord, A.: Mediators of the effects of ACTH on adrenal cells, 563–579. Ed. by J.E. Dumont, P. Greengard and G.A. Robison, *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, vol. 14, Raven Press. New York, 1981.

32) 齊藤栄造, 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: 477–483, 1976.

33) Schimmel, R.J.: The role of calcium ion in epinephrine activation of lipolysis. *Horm. Metab. Res.*, 8: 195–201, 1976.

34) Schimmel, R.J.: Calcium antagonists and lipolysis in isolated rat epididymal adipocytes: Effects of Tetracaine, Manganese, Cobaltous and Lanthanum ions and D 600. *Horm. Metab. Res.*, 10: 128–134, 1978.

35) Seelig, S., Sayers, G., Schwyzer, R. and Schiller, P.: Isolated adrenal cells: ACTH_{11-24} , a competitive antagonist of ACTH_{1-39} and ACTH_{1-10} . *FEBS Letters*, 19: 232–234, 1971.

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

37) Wong, E.H., Loten, E.G. and Park, C.R.: The correlation of cyclic AMP and protein kinase activity in adipocytes with lipolysis stimulated by ACTH: The effect of adenosine deaminase and Actinomycin D. *J. Cyclic Nucleotide Res.*, 5: 359–374, 1978.

38) Wong, E.H. and Loten, E.G.: The antilipolytic action of insulin on adrenocorticotrophin-stimulated rat adipocytes. The roles of adenosine 3', 5'-monophosphate and the protein kinase dependent on adenosine 3', 5'-monophosphate. *Eur. J. Biochem.*, 115: 17–22, 1981.

(受付日: 59. 9. 10)