腎皮質副甲状腺ホルモン受容体

矢 島 由紀子* 齊 藤 寿 一**

* 東京都臨床医学総合研究所医化学部 〒113 東京都文京区本駒込 3-18-22

** 自治医科大学内分泌代謝科 〒329-04 栃木県河内郡南河内町大字薬師寺 3311

The Renal Receptor for Parathyroid Hormone

Yukiko Yajima* and Toshikazu Saito**

* Department of Physiological Chemistry, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Honkomagome 3, Bunkyo-ku, Tokyo 113

** Division of Endocrinology and Metabolism, Jichi Medical School, Minami-Kawauchimachi, Tochigi 329-04

The structural requirement for full biological activity of parathyroid hormone (PTH), on 84-amino acid single-chain polypeptide is satisfied by the 34-amino acid fragment at its NH₂-terminal. The procedure to obtain a radioligand with both high specific radioactivity and bioactivity includes a gentle iodination using electrolysis or lactoperoxidase. The sulfur-free analogue [Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴] bPTH (1-34) amide, is stable during the oxidation and is also used as a radioligand. The PTH receptor in plasma membrane of chicken renal cortex is a single component with high affinity to bPTH (1-34), ($K_d=7$ to 10nM). Guanyl nucleotides stimulate not only PTH dependent adenylate cyclase activity but also the dissociation of ¹²⁵I-bPTH (1-34) from a plasma membrane of canine renal cortex.

Pseudohypoparathyroidism Type 1 (PHP-1) is an inherited disease characterized by its resistance to stimulation of adenylate cyclase by PTH. The erythrocytes of patients with PHP-1 show partially deficient activity of a guanyl nucleotide regulatory protein that is required for a functional coupling of hormone receptors and catalytic adenylate cyclase. It is also reported, however, that some of the clinically evident PHP-1 patients are possessed of quantitatively and qualitatively normal N-protein activities in erythrocytes. These findings suggest the biochemical and genetic heterogeneity of the disorder classified as PHP-1.

Key Words: Parathyroid Hormone (PTH), Renal receptor, Adenylate cyclase, Pseudohypoparathyroidism Type 1 (PHP-1), Guanyl nucleotide regulatory protein (N-protein)

はじめに

1. 標識 PTH の作製
2. 腎皮質 PTH 受容体の性質
3. 受容体結合性と PTH の分子構造
4. PTH-アデニレートサイクラーゼの共役について
5. PTH の脱感受性
6. 受容体性疾患との関連性について

おわりに

はじめに

副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone, PTH) は副甲状腺から分泌されるホルモンで84のアミノ酸からなる直鎖のペプチドホルモンである。その標的組織は、骨、腸管と腎臓に存在する。腎臓において、PTH は近位尿細管でリンの再吸収を抑制して尿中のリンの排泄を増加させ、また遠位尿細管でのカルシウムの再吸収を促進して尿中のカルシウム排泄を減少させて、生体内のカルシウムのホメオスタシスに欠くことの出来ない重要なホルモンである。

Fig. 1 天然のウシ PTH (1-84) のアミノ酸配列

PTH は他のペプチドホルモンと同様にその作用は標的組織の形質膜の受容体を介してアデニレートサイクラーゼを活性化して起こることが多くの報告から示されている。しかしながら、PTH-受容体の関係についての研究は主に、受容体との結合能を保持した標識 PTH の調製と親和性の高い受容体標品の入手の困難さから容易に進まなかった。即ち、ペプチドホルモンをヨード標識する際に用いられる通常の方法では、PTH が酸化を受け生物活性を失う。また、実験室的に用いられるラットやウシの腎皮質の形質膜は PTH に対し親和性が非常に低かった。しかし、最近3つのグループが受容体親和性の高い標識 PTH の作成に成功し、特に腎皮質の受容体の解明がされつつある。本稿ではこれらの知見を展望し、また、広義の受容体疾患の1つと考えられる偽性副甲状腺機能低下症について紹介する。

1. 標識 PTH の作製

PTH は Fig. 1 に示す如く、84 コのアミノ酸からなる直鎖のペプチドで、N 端から34までのアミノ酸配列部分で PTH の生物活性を完全に発揮し得ることが確認されている^{1,2)}。C 端側は PTH の免疫学的性質を担い、ウサギ等で通常形成される PTH の抗体は C 端側に依

存している。現在はほとんどの生物実験に合成ウシ副甲状腺ホルモン、bPTH (1-34) が用いられている。先に述べたように bPTH (1-34) は通常のヨードモノクロライド法やクロラミン T 法による放射性ヨードの標識では分子内の8位と18位のメチオニンがメチオニンスルフォキサイドまたはスルホンになり生物活性を失ってしまう。Nissenson ら³⁾ は先に Sammon ら⁴⁾ が開発した、穏和な電解標識 (electrolysis labeling) 法による PTH のヨード標識法を更に改良して特異性の高い ¹²⁵I-bPTH の調製に成功した。即ち、白金皿に 15~25 μ g の bPTH (1-34) と 4~6mCi の Na ¹²⁵I を入れ、4°C でインキュベーションを行った。40 μ A の電流を流し、電圧が 780mV に到達したら、常に 780mV になるよう維持しつつ電流を徐々に減少させ 5 μ A になった所でメルカプトエタノール (1.0mM) を加えて反応を停止させた。未反応のヨードは Dowex1-X4 で除去し、Biogel P-2 で脱塩した。この電解標識法で標識した ¹²⁵I-bPTH (1-34) について、更に、ラットやウシのそれに比べて非常に親和性の高いニワトリ腎

形質膜を用いる親和性吸着 (affinity adsorption) を行い精製した。即ち、粗ニワトリ腎形質膜と 15~25 μ Ci の ¹²⁵I-bPTH (1-34) を混和し 4°C で2時間反応させた後、2,000 $\times$ g で5分間遠心し、沈査を反応用緩衝液で洗った後、膜に結合した ¹²⁵I-bPTH を 0.1M 酢酸ではずした。電解標識法で標識した ¹²⁵I-bPTH (1-34) はニワトリ腎皮質細胞膜親和性吸着の精製で特異的結合が 2.3% から 16.5% に上昇し、受容体の研究に耐え得る標識 PTH となった。一方、Potts, Jr. ら^{5,6)} は長年にわたり PTH の構造活性相関の研究にたずさわり、PTH 分子内でメチオニンがこのホルモンの生物活性に重要であることを確認している。現在、ウシ、ブタ、ヒトの PTH のアミノ酸配列は完全にわかっており、いずれも N 端側の生物活性発現領域で8位にメチオニン分子を有し、更に、ウシ、ヒトでは 18 位にもメチオニン分子が存在する。そこで彼らは、メチオニンと構造的に似ている S 基の無いノルロイシンをメチオニンの位置に入れかえ、また、34位のフェニルアラニンをチロシンに入れかえて、[Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴] bPTH (1-34) アミドを固相合成法で合成した (Fig. 2)。この PTH アナログは、*in vivo* と *in vitro* で PTH の作用を充分に発現し、天然の bPTH (1-34) の約2倍の生物活性を示した。また、PTH 受容

体との結合様式も飽和になり、特異的で天然の PTH のアゴニストとしての性質を保有することが明らかになった。このアナログは通常のクロラミンT法によるヨード標識の際の酸化にも耐え、 ^{125}I -[Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴] bPTH (1-34) アミドを形成した⁷⁾。この化合物は Nissenson らの天然の PTH の場合と異なり、通常の精製法で十分に特異性の高いものが得られ、PTH 受容体と結合しうることとわかっており、比放射能は $500 \pm 75 \text{ mCi/mg}$ でヨード/ペプチド比は 1 であった。

これまでは PTH の標識リガンドの作成に当り、N 端側 (1-34) のアミノ酸配列の断片のみを用いて、受容体との関係が論じられてきた。しかし、一方では、*in vivo* で標的組織の受容体と反応し主たる生物活性を示す体内での存在形態は、元のままの 84-アミノ酸直鎖であるという考え^{8,9)} も出されている。更に、1-84 のアミノ酸直鎖は N 端断片に分解することなしで、そのままの形態で腎組織のアデニレートサイクラーゼを賦活化することも報告されている¹⁰⁾。実際に、Kremer ら¹¹⁾ は bPTH(1-84) をラクトパーオキシダーゼ法で ^{125}I 標識して、ウサギの腎皮質形質膜の PTH 受容体の性質を検討している。ラクトパーオキシダーゼ法で標識した ^{125}I -bPTH (1-84) は逆相液体クロマトグラフィーを 2 回通すことにより、生物活性を有する特異性の高い標識ホルモンとなった。現在までの PTH の研究はほとんどが活性部位の断片 (1-34) を用いた研究であるから、 ^{125}I -PTH (1-84) と受容体の相互関係を知ることは、*in vivo* の PTH の反応を理解する上で非常に重要であると考えられる。

2. 腎皮質 PTH 受容体の性質

ニワトリの腎皮質の形質膜には、ラットやウシに比べて、PTH に対し高い親和性を有する受容体が存在する。Nissenson ら³⁾ は古典的な Fitzpatrick の方法¹²⁾ に従って、純度の高いニワトリ腎皮質形質膜を精製した。即ち、雄ニワトリ (4~6 週令) の腎皮質を 1mM EDTA (pH 7.4) を含む氷冷した 0.25M ショ糖中でホモジェナイズし、ガーゼ濾過後、4°C、 $1475 \times g$ で遠心して上清のミクロゾーム分画を除く。沈査に 2M のショ糖液を添加して、ホモジェナイズして、 $13,300 \times g$ で 10 分遠心すると、上層に膜とミトコンドリア画分を得る。この上層が 0.25M のショ糖液になるように水を加えて希釈した後、 $35,000 \times g$ で 15 分遠心すると沈査は二層となり、上

Fig. 2 [Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴] bPTH (1-34) アミド

Fig. 3 ニワトリ腎皮質細胞膜と ^{125}I -bPTH (1-34) の結合と解離に対する時間の影響

層に膜画分、下層にミトコンドリア画分が得られる。上層を等張のショ糖液に取り、よく混和して $35,000 \times g$ で 15 分遠心する。この操作を 3 回くり返して得た沈査を一定量に希釈して -80°C に保存する。この標品は膜のマーカー酵素として知られている ウバイン-感受性 ATPase 活性が粗膜に比べて 7 倍に上昇し、コハク酸脱水素酵素活性により予想されるミトコンドリア画分の混入は 10% 以下であった。このニワトリ腎皮質の PTH 受容体は、 ^{125}I -bPTH (1-34) と急速に結合し (Fig. 3)、50% 飽和結合時間は 2 分で、30 分後には平衡に達した。

Fig. 4 ニワトリ腎皮質細胞膜への ^{125}I -bPTH (1-34) の結合の Scatchard plots

腎の膜に対する PTH の結合率は pH の上昇とともに高くなり、pH 8.0 でプラトーに達した。PTH の結合数はニワトリ腎皮質で 4~6pmol/mg タンパクの値を示し、 K_d 値は 7~10nM で一種類の高い親和性の結合部位の存在が明らかになった (Fig. 4)。結合部位相互間の協同性 (cooperativity) は存在しないことも確認されている。また、PTH の形質膜への結合量とアデニレートサイクラーゼ活性化との関係は同一の腎皮質形質膜を用いて同一の条件下で、PTH の膜結合量とアデニレートサイクラーゼ活性化の濃度依存性をみることにより検討した (Fig. 5)。この結合実験の Scatchard 分析から K_d 値は 16nM であったのに対し、アデニレートサイクラーゼ活性化の K_m 値は 17nM と両者はほぼ等しい値を示している。このことから、ニワトリ腎皮質形質膜において PTH 結合はアデニレートサイクラーゼに共役していることが強力に示唆される。一方、Segre ら⁷⁾ は合成 bPTH (1-34) アナログのヨード標識化合物を用いてイヌの腎皮質形質膜の PTH 受容体の性質を調べている。即ち、 ^{125}I -[Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴] bPTH (1-34) アミドは、37°C で膜に急速に結合し、結合数は 0.3pmol/mg 膜タンパクとニワトリに比べて低いが、アデニレートサイクラーゼ活性化との間に良い相関性を示した。

このように PTH のアデニレートサイクラーゼ活性化への関与が示唆された膜の、PTH 結合成分、受容体の実体は、容易に解明されたいが、最近の光化学的親和 (photo affinity) 標識の手技の発達¹³⁾ から、PTH に結合する膜成分がおよぼるげながら姿をあわしつつある。

Fig. 5 ニワトリ腎細胞膜において受容体結合とアデニレートサイクラーゼ活性化を行う bPTH (1-34) の濃度依存性

Fig. 6 NAPS- ^{125}I -bPTH (1-34) アナログと bPTH (1-34) 10 μg 存在下 (○) で反応した場合と存在しないで反応した場合 (●) のイヌ腎細胞膜の SDS 電気泳動分画

天然の bPTH (1-34) は光化学的親和試薬と反応すると生物活性を失うので、酸化に安定なアナログ、[Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴] bPTH (1-34) アミドを用いて、23位のトリプトファン基に 2-Nitro-5-azidophenylsulfenyl chloride (NAPS) を導入した光不安定な PTH は、[Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴] bPTH (1-34) アミドと同等にイヌの腎皮質形質膜に結合し、アデニレートサイクラーゼを活性化するのであった¹⁴⁾。これに更に放射性ヨード標識した NAP S- ^{125}I -[Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴] bPTH (1-34) アミドとイヌ腎皮質形質膜を 30°C で 60 分反応させた後、UV 照射することによりホルモンと受容体の間に共有結合を生じ

Table 1 bPTH (1-34) アナログの膜結合性と PTH の生物活性
(アデニレートサイクラーゼ活性) の阻害率の比較

Compound	Binding constant (renal membrane)	Inhibition constant (adenylate cyclase)
3—Nle ⁸ —Nle ¹⁸ —Tyr ³⁴ -Amide	1.2×10^{-8}	1.2×10^{-8}
7—Nle ⁸ —Nle ¹⁸ —Tyr ³⁴ -Amide	1.1×10^{-6}	3×10^{-6}
10—Nle ¹⁸ —Tyr ³⁴ -Amide	2.7×10^{-6}	7×10^{-6}
15—Nle ¹⁸ —Tyr ³⁴ -Amide	3.2×10^{-5}	3.7×10^{-5}
20—Tyr ³⁴ -Amide	7.3×10^{-5}	7×10^{-5}
25—Tyr ³⁴ -Amide	3.4×10^{-4}	No inhibition
28—Tyr ³⁴ -Amide	No binding	Not tested

させることができる。未反応のホルモンを除いた後、膜を可溶化して SDS 電気泳動で分画したのが Fig. 6 である。NAPS-¹²⁵I-[Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴] bPTH (1-34) アミドと結合した膜成分は 2 種類存在したが、反応系に過剰の bPTH (1-34) を添加することにより、分子量 60,000 のバンドの放射活性が低下したことから、PTH に特異的に結合する膜成分はこのバンドと考えられた。ホルモンと受容体との間の非共有結合を光化学的親和試薬を用いることにより、より強固な共有結合に代えるのであるが、Draper ら¹⁴⁾ は NAPS-bPTH (1-34) アナログで光分解を起こさせた膜はアデニレートサイクラーゼ活性化能を保持することを示した。一方、Coltrera ら¹⁵⁾ も酸化に安定な bPTH (1-34) アナログのリジン残基に 2 種の光化学的親和試薬 4-fluoro-3-nitrophenyl azido (FNPA) または、N-Succinimidyl-6 (4'-azido-2'-nitrophenyl amino)-hexanoate (SMHA) を標識し、イヌの腎皮質形質膜と反応させ、光分解を行って膜を単離可溶化後に SDS 電気泳動により、PTH に特異的な膜成分を調べた。それによると、PTH に特異的な膜成分は FNPA を用いた場合も SMHA を用いた場合も、ともに分子量が約 70,000 のものであった。これらの結果は、PTH のリジン残基の位置で結合する受容体とトリプトファン残基で結合する受容体とは異なる膜成分を意味するのであろうか。PTH には複数の異なる腎皮質受容体の存在を示唆する報告¹⁶⁾ もあり、この問題を解決するには、今後の受容体の単離、精製の成績を待たなければならないであろう。

3. 受容体結合性と PTH の分子構造

イヌの腎皮質形質膜を用いた Segre ら⁷⁾ の実験によれば、bPTH (1-34) は天然の PTH (1-84) と同等の膜結合性を示した。ニワトリでも³⁾ 同様の結果を得ている。

1-34 の分子断片が PTH の生物活性 (アデニレートサイクラーゼ活性化) と膜結合性の主たる因子となっていることは明らかである。そこで PTH (1-34) の構造活性相関の研究を行ったのが Potts, Jr らの仕事である^{5,6,17-20)}。彼らは PTH (1-34) の分子断片よりも酸化に安定な bPTH (1-34) アミドを固相法で合成し、それを酵素処理により種々の短いペプチド断片とし、それらの膜結合性と生物活性を比較した。プベチド鎖を N 端側から切っていくと生物活性は決定的な損失を示し²¹⁾、N 端側のアラニン-バリンを欠除した (3-34) 配列は生物活性を完全に消失していた。しかし、膜結合性は 1-34 配列と同等であり、1-34 の強力な競合阻害剤となることを示した¹⁸⁾。更に、それ以上 N 端側を短縮して行くと、膜結合性と PTH のアデニレートサイクラーゼ活性化に対する阻害は互いに平行的に徐々に低下した (Table 1)。1-34 配列のうち N 端側から短縮して 25-34 の分子断片までは腎皮質形質膜への結合活性を有したが、28-34 のペプチド鎖はもはや結合活性を示さなかった。一方、C 端の 28-34 を除いた 1-27 分子断片は弱い アデニレートサイクラーゼ活性化能を持ち、膜への結合性を示してアゴニストとしての性格を有することが明らかになった。1-27 分子断片を更に短縮して膜への結合をみると、10-27 分子断片までは結合性を示したが 15-27 のプベチド鎖では結合性は示さなかった (Table 2)。Potts, Jr. らはこれらの膨大な PTH 構造活性相関の研究から、PTH (1-34) 分子内で 25-34 配列と 10-27 配列の 2 カ所の領域が膜結合に関与していることを明らかにした。1 分子内で 2 つの異なる結合領域が存在することはペプチドホルモンにおいては非常に稀で、MSH においてのみ報告²²⁾ があるだけである。

Table 2 bPTH (1-27) の腎皮質細胞膜結合性

Compound		Binding constant mean ($K_B \pm S. E.$)
PTH 1-27		M
1	27-Amide	$2.2 (\pm 0.5) \times 10^{-5}$
5	27-Amide	$3.9 (\pm 0.3) \times 10^{-4}$
10	27-Amide	$5.0 (\pm 1.1) \times 10^{-3}$
15	27-Amide	No binding

Fig. 7 ホルモンアデニレートサイクラーゼ 活性化機構

H: ホルモン, R: 受容体
G: グアニルスクレオチド結合タンパク
C: アデニレートサイクラーゼ

4. PTH-アデニレートサイクラーゼの共役について

PTH が腎皮質の受容体と結合し、アデニレートサイクラーゼ活性を賦活化するが、その間にグアニルスクレオチド結合タンパク (G/F, Gタンパク, Nタンパク) と称する調節タンパクが介在するとの予想は、Rodbell²³⁾ の膜受容体を介するホルモンの作用機構の仮説 (Fig. 7) が提唱されて以来、広汎な支持を得ている。しかし、実際には、カテコールアミンの β -アドレナリンアゴニストによるアデニレートサイクラーゼ活性化機構でNタンパクの役割が明らかになっているのみ²⁴⁾ で、その他のホルモンと神経伝達物質については、その受容体とアデニレートサイクラーゼ活性化の関係はブラックボックスの中にあると言ってよい。

PTH の場合、Nタンパクの調節に關与するグアニルスクレオチドとその誘導体との関係はイヌの腎皮質形質膜を用いて検討がなされている^{16,25-27)}。GTP ないし

Fig. 8 ニワトリ腎皮質細胞膜への PTH 結合に及ぼす $G_{pp}(\text{NH})_p$ の影響

GTP アナログ, $G_{pp}(\text{NH})_p$ は PTH の腎皮質のアデニレートサイクラーゼ活性化を著しく増強することは明らかで²⁵⁻²⁷⁾、アデニレートサイクラーゼに対する PTH-受容体の複合体の形成を促進すると思われた。ニワトリの腎皮質形質膜を用いた Nissenson らの成績では²⁸⁾、確かにグアニルスクレオチドが PTH のアデニレートサイクラーゼ賦活化作用を増強するが、PTH の受容体結合には影響しないことが明らかになった (Fig. 8)。一方、イヌの腎皮質形質膜を用いた Teitelbaum ら¹⁶⁾は、GTP と GTP アナログは PTH のアデニレートサイクラーゼ賦活化作用を増強するばかりでなく、PTH-受容体結合に強力な調節作用をもたらすことを報告している。PTH の受容体に対する結合はグアニルスクレオチドの存在により親和性が低下し (Fig. 9)、解離も著しく促進された ($t_{1/2} \approx 200$ 分 $\rightarrow t_{1/2} \approx 1$ 分) (Fig. 10)。しかし、このグアニルスクレオチドの作用は受容体と PTH 競合阻害剤, $[\text{Nle}^8, \text{Nle}^{18}, \text{Tyr}^{34}]$ bPTH (3-34) アミドの結合には影響を与えなかった。これらの結果は、イヌの腎皮質形質膜における PTH の作用は β -アドレナリンアゴニストと非常に近似していることを示唆するものであ

Fig. 9 イヌ腎皮質細胞膜への PTH 結合に及ぼす $G_{pp}(\text{NH})_P$ の影響

Fig. 10 イヌ腎皮質細胞膜に結合した PTH の解離に及ぼす $G_{pp}(\text{NH})_P$ の影響

^{125}I -bPTH (1-34) アナログを膜と 37°C で 60 分反応後に、反応液に $G_{pp}(\text{NH})_P$ (100 μM) を加えた場合 (○) と加えない場合 (●) のリガンドの解離をみる

る。また、N タンパク活性を阻害する N-エチルマレイミドが PTH のアデニレートサイクラーゼ賦活化作用を抑制し、PTH の受容体結合に対する $G_{pp}(\text{NH})_P$ 作用を抑制することからも PTH 受容体-アデニレートサイクラーゼ系における N タンパクの存在が予想される。し

Fig. 11 ヒト赤血球膜の N 測定

A : コレラトキシンによる ADP リボシル化による N 測定

B : cyc⁻ 膜との再構成による N 測定

Normal : 正常人

PHP : 疑性副甲状腺機能低下症患者

HP : 副甲状腺機能低下症患者

かし、動物種によるグアニルヌクレオチドの作用の違いについては今後の研究にまたなければならないであろう。

5. PTH の脱感受性

生体内のホルモンの感受性は種々の環境に応じて変化している。PTH に関しては、それ自身²⁹⁾ またはビタミン D ないしカルシウム欠乏による³⁰⁾ 脱感受性 (desensitization) 機構が研究されている。即ち、ビタミン D の欠乏は腸管からのカルシウム吸収を抑制し、生体内のカルシウム濃度の低下を導き、カルシウム不足とともに PTH の分泌を促進する。

Tamayo ら²⁹⁾ はイヌの両側腎臓を用い、片側に bPTH (1-34) (1.5 μg /時間) を、他方の腎臓に对照液を 22 時間かん流した後に、腎皮質形質膜を単離して PTH の生物活性と受容体結合性を調べた。それによると高濃度の PTH にさらされた腎臓では对照に比べて PTH による酵素活性と受容体結合性はともに同程度に低下した。しかし、この PTH 処理をした膜に 10^{-3}M の GTP を添加するとアデニレートサイクラーゼ活性は对照と同程度にまで回復していた。先にイヌの腎皮質形質膜で観察された PTH-受容体の解離がグアニルヌクレオチドにより促進されることから、PTH 処理膜の脱感受性は受容体の消失よりは受容体への PTH の占拠 (occupancy) によって起こるものと考えられる。他方、ビタミン D やカルシウム欠乏食による二次的な副甲状腺ホルモン過剰症を来したニワトリを用いた Forte ら³⁰⁾ の成績では、

腎皮質形質膜の PTH 反応性の著しい低下がみられた。この脱感受性はビタミンD欠乏ニワトリでもカルシウム欠乏時でも、ともに PTH 受容体の親和性の変化によるものではなく結合部位の著しい減少によるものとされている。

一般にアデニレートサイクラーゼ系に共役するホルモンの脱感受性の主な要因は受容体の消失 (down-regulation) とされているが、受容体の占拠による感受性の低下はカニの赤血球におけるプロスタグランジン E³¹⁾ や β -アドレナリン作動薬³²⁾ の例がある。生理的な PTH の脱感受性が受容体のみならず、N タンパク やアデニレートサイクラーゼの活性部位の異常により来すか否かは不明である。

6. 受容体性疾患との関連性について

内分泌疾患で、ホルモンの過剰または欠損ではなく、ホルモンに対する耐性により引き起こされる受容体性疾患として、1942年に歴史的に初めて発見されたのが、PTH に関する偽性副甲状腺機能低下症 (pseudohypoparathyroidism, PHP) であった³³⁾。PHP の主な症状は低カルシウム血症を来す点で特発性副甲状腺機能低下症または手術的に副甲状腺を摘出した時にみられる症状と同じであったが、PTH に対する反応性が異なっていた。即ち、特発性副甲状腺機能低下症においては PHP の投与により諸症状が正常となり、腎臓のアデニレートサイクラーゼ活性が促進されて尿中の cAMP 量が増加する。しかし、PHP 患者では PTH を投与しても諸症状は改善されず、尿中 cAMP 量も上昇しなかった。また、血中 PTH レベルは特発性副甲状腺機能低下症の患者では非常に低く確認できないほどであったのに対し、PHP 患者では正常人のそれよりもむしろ高値であった。PHP の患者のなかには血清 PTH の上昇と尿中 cAMP の排泄は特発性副甲状腺機能低下症と同程度であるが、PTH によるリンの排泄効果のあらわれない患者があり、これを PHP-II 型とした³⁴⁾。PHP-I 型は、PTH を投与しても尿中に cAMP が排泄されない患者であるが、この中には PTH だけでは説明不可能な内分泌異常症を伴っている例があり、抗利尿ホルモン、TRH、ゴナドトロピン、グルカゴン、TSH 反応の耐性な症状を伴う PHP 患者の報告が相ついでいる³⁵⁻³⁷⁾。これらの内分泌異常症は、PTH 無反応性により起こる症状というより、これらホルモンに共通して考えられることが cAMP を second メッセンジャーとしていることから、cAMP 合成系の障害に由来すると思われた。ホルモン-アデニレ

ートサイクラーゼ共役系において上述のホルモンはそれぞれ異なる受容体に結合するので、それ以降の N タンパク-アデニレートサイクラーゼ系の障害が考えられた。PTH の標的組織は腎臓であるが、現在まで2例の PHP-I 型の患者の腎臓における PTH の反応性の報告がある^{38,39)}。1例の PHP 患者の腎臓は正常人と同じ完全な PTH 感受性のアデニレートサイクラーゼ活性を示したが³⁹⁾、もう1例においては、正常な PTH のアデニレートサイクラーゼ賦活化作用を発現するには GTP の添加を必要とした³⁸⁾。第2例の腎臓では N タンパクの GTP 親和性の異常を反映しているものと思われる。これについての実験的研究はヒトの赤血球膜に N タンパクが含まれていることが発見されて以来⁴⁰⁾、Farfel ら^{41,42)} により進められた。即ち、患者の赤血球膜の N 活性を測定することを考えた。測定方法は赤血球膜を用いて、(1)マウスリンパ腫細胞 S49 の変異株 cyc⁻ 細胞 (N 成分欠損株) と再構成させて、イソプロテノールとグアニルスクレオチドに反応して cAMP を合成する能力をみる方法と、(2)コレラトキシンは N タンパクの分子量42,000のサブユニットに ³²P-NAD から ³²P-ADP リボースの転移をもたらすので、その ADP リボシル化反応量を測定する2法であった。正常人に比べて PHP-I 型の患者の赤血球膜では約50%の N 活性の低下が2つの方法で確認された⁴¹⁾。他方、特発性副甲状腺機能低下症ならびに PHP-II 型の患者では N 活性は正常人と変らなかった。これらの結果は、赤血球膜における N 活性の欠損が PHP-I 型の信頼すべきマーカーであることを示唆するものである。この現象は、ホルモンによるアデニレートサイクラーゼ反応性の欠損した例にあてはめると、いく人かの PHP-I 型の患者にみられる PTH 以外の内分泌異常症の説明に好都合のようにみえる。また、赤血球ばかりでなく、PHP-I 型患者の他の組織、即ち、血小板⁴³⁾、皮膚⁴⁴⁾、リンパ球⁴⁵⁾ で N 活性を測定してみると、赤血球膜の場合と同じ結果が得られている。

日本では著者のグループ⁴⁶⁾が精力的に PHP-I 型患者の赤血球の N 活性を測定し、N 活性が正常人の約50%に減少した患者の他に、正常人と変わらない N 活性を有する患者も見出している。更に最近の Farfel ら⁴⁷⁾の報告でも正常人と同程度の N 活性を有する PHP-I 型患者について言及されており、PHP-I 型の病態は生化学的にも遺伝学的にも heterogenous な病型と考えられている。赤血球膜の N 活性の低い患者は全て、PHP-I 型の症状を有するが、N 活性が正常で PHP-I 型と同じ症状を呈する患者については種々の病因 (受容体-N タンパクな

いし、Nタンパク-活性部位の再構成不能、ホスホジエステラーゼ活性の異常高値)が考えられているが今のところその本態は不明である。更に、PHP-I型の病因をsecond メッセンジャー、cAMPの合成系のNタンパクの欠損だけに求めるのは非常な無理がある。即ち、N活性の50%の減少が90%ないし100%のPTH反応性の消失に結びつくであろうか。更に、cAMPを介して作用が発現するホルモンは他に多くあるのにどうしてのPTH反応だけが他に比べて非常に大きな影響を受けるかについても大きな疑問が存在している。

おわりに

PTHの腎臓における作用機構の研究は長い間、天然のPTHが酸化に弱く、また実験室的に扱いの容易なラットの腎皮質標品のPTH結合は非常に低い特異的結合と高い非特異的結合の故に進展がおくれている。しかし、Potts, Jr.らが開発したPTHアナログ、[Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴] bPTH (1-34) アミドの出現以来、各研究者はこれを用いてPTHの受容体の研究を著しく加速しつつある。bPTH (1-34)を電解標識法で標識したNissensonのグループでさえも、現在はこのアナログを用いてPTHの腎の受容体の研究をしている¹⁶⁾。

一方、ホルモン感受性アデニレートサイクラーゼ系に共役しているNタンパクの発見以後、速かに提示されたN欠損の内分泌疾患、PHP-Iについての業績は基礎および臨床内分泌学をつなぐ新しい地平を開くことになったといえる。しかし、腎臓においてPTHに反応するアデニレートサイクラーゼ活性化機構に関与するNタンパクの確認は未だされていない。また、PTHの作用は全てcAMPを介した作用とのみは言えず、生理的濃度のPTHがcAMPの上昇なしにリンの排泄を増加させることも報告されている⁴⁸⁾ことから、PTHの作用機構については今後の研究の動向が注目される。

文 献

- 1) H. T. Keutmann, B. F. Dawson, G. D. Aurbach, J. T. Potts, Jr.: *Biochemistry*, **11**, 1973 (1972)
- 2) J. T. Potts, Jr., G. W. Tregear, H. T. Keutmann, H. D. Niall, R. Sauer, L. J. Defos, B. F. Dawson, M. L. Hogan, G. D. Aurbach: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **63**, 63 (1971)
- 3) R. A. Nissenson, C. D. Aurbach: *J. Biol. Chem.*, **254**, 1469 (1979)
- 4) P. J. Sammon, J. S. Brand, W. F. Neuman, L. G. Raisz: *Endocrinology*, **92**, 1596 (1973)
- 5) M. Rosenblatt, D. Goltzman, H. T. Keutmann, G. W. Tregear, J. T. Potts, Jr.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 159 (1976)
- 6) M. Rosenblatt, J. T. Potts, Jr.: *Endocr. Res. Commun.*, **4**, 115 (1977)
- 7) G. V. Segre, M. Rosenblatt, B. L. Reiner, J. E. Mahaffey, J. T. Potts, Jr.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 6980 (1979)
- 8) H. B. Brewer, Jr., R. Ronan: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67**, 1862 (1970)
- 9) H. T. Keutmann, G. D. Aurbach, B. F. Dawson, H. D. Niall, L. J. Defos, J. T. Potts, Jr.: *Biochemistry*, **10**, 2779 (1971)
- 10) D. Goltzman, A. Peythemann, E. N. Callahan, G. V. Segre, J. T. Potts, Jr.: *J. Clin. Invest.*, **57**, 8 (1976)
- 11) B. Kremer, H. P. J. Bennett, J. Michell, D. Goltzman: *J. Biol. Chem.*, **257**, 14048 (1982)
- 12) D. F. Fitzpatrick, R. G. Davenport, L. Forte, E. J. Landon: *J. Biol. Chem.*, **244**, 3561 (1969)
- 13) H. Bayley, J. R. Knowles: *Methods Enzymol.*, **46**, 69 (1977)
- 14) M. W. Draper, R. A. Nissenson, J. Winer, J. Ramachandran, C. D. Arnaud: *J. Biol. Chem.*, **257**, 3714 (1982)
- 15) M. D. Coltrera, J. T. Potts, Jr., M. Rosenblatt: *J. Biol. Chem.*, **256**, 10555 (1981)
- 16) A. P. Teitelbaum, R. A. Nissenson, C. D. Arnaud: *Endocrinology*, **111**, 1524 (1982)
- 17) M. Rosenblatt, E. N. Callahan, J. E. Mahaffey, A. Pont, J. T. Potts, Jr.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 5847 (1977)
- 18) J. E. Mahaffey, M. Rosenblatt, G. L. Shepard, J. T. Potts, Jr.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 6496 (1979)
- 19) S. R. Nussbaum, M. Rosenblatt, J. T. Potts, Jr.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 10183 (1980)
- 20) M. Rosenblatt, G. V. Segre, G. A. Tyler, G. L. Shepard, S. R. Nussbaum, J. T. Potts, Jr.: *Endocrinology*, **106**, 545 (1980)
- 21) G. W. Tregear, J. Van Rierschoten, E. Greene, T. H. Keutmann, H. D. Niall, B. Reit, J. A. Parsons, J. T. Potts, Jr.: *Endocrinology*, **93**, 1349 (1973)
- 22) A. Eberle, R. Schwyzler: *Clin. Endocrinol.*, **5**(suppl), 41s (1976)
- 23) M. Rodbell: *Nature*, **284**, 17 (1980)
- 24) L. E. Limbird, D. M. Gill, R. J. Lefkowitz: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 775 (1980)
- 25) N. H. Hunt, T. J. Martin, V. P. Michelangeli, J. A. Eisman: *J. Endocr.*, **69**, 401 (1976)
- 26) D. Goltzman, E. N. Callahan, G. W. Tregear, J. T. Potts, Jr.: *Endocrinology*, **103**, 1352 (1978)
- 27) E. Bellorin-Font, K. J. Martin: *Am. J. Physiol.*, **241**, F364 (1981)
- 28) R. A. Nissenson, K. O. Nyireddy, C. D. Arnaud: *Endocrinology*, **108**, 1949 (1981)
- 29) J. Tamayo, E. Bellorin-Font, G. Sicard, C. Anderson

- and K. J. Martin: *Endocrinology*, **111**, 1311 (1982)
- 30) L. R. Forte, S. M. Langeluttig, R. E. Poelling, M. L. Thomas: *Am. J. Physiol.*, **242**, E154 (1982)
- 31) R. J. Lefkowitz, D. Mullikin, C. L. Wood, T. B. Gore, C. Mukherjee: *J. Biol. Chem.*, **252**, 5295 (1977)
- 32) C. Mukherjee, R. J. Lefkowitz: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1494 (1976)
- 33) F. Albright, C. H. Burnett, P. H. Smith, W. Parson: *Endocrinology*, **30**, 922 (1942)
- 34) H. J. Rodriguez, H. Villarreal, S. Klahr, E. Slatopolsky: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **29**, 693 (1974)
- 35) A. S. Brickman, R. E. Weitzman: *Clin. Res.*, **26**, 164A (1978)
- 36) H. E. Carlson, A. S. Brickman, G. F. Bottazzo: *N. Engl. J. Med.*, **296**, 140 (1977)
- 37) J. I. Wolfsdorf, R. L. Rosenfield, V. S. Fang, R. Kobayashi, A. K. Razdan, M. H. Kim: *Acta Endocrinol.*, **88**, 321 (1978)
- 38) M. K. Drezner, W. M. Burch, Jr.: *J. Clin. Invest.*, **62**, 1222 (1978)
- 39) R. Marcus, J. F. Wilber, G. D. Aurbach: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **33**, 537 (1971)
- 40) H. R. Kaslow, Z. Farfel, G. L. Johnson, H. R. Bourne: *Mol. Pharmacol.*, **15**, 472 (1979)
- 41) Z. Farfel, A. S. Brickman, H. R. Kaslow, V. M. Brothers, H. R. Bourne: *N. Engl. J. Med.*, **303**, 237 (1980)
- 42) M. A. Levine, R. W. Downs, Jr., M. Singer, S. J. Marx, G. D. Aurbach, A. M. Spiegel: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **94**, 1319 (1980)
- 43) Z. Farfel, H. R. Bourne: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **51**, 1202 (1980)
- 44) H. R. Bourne, H. R. Kaslow, A. S. Brickman, Z. Farfel: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **53**, 636 (1981)
- 45) Z. Farfel, M. E. Abood, A. S. Brickman, H. R. Bourne: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **55**, 113 (1982)
- 46) 秋田朗子, 矢島由紀子, 斎藤寿一: 生化学, **54**, 736 (1982)
- 47) Z. Farfel, V. M. Brothers, A. S. Brickman, F. Corte, R. Near, H. R. Bourne: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **78**, 3098 (1981)
- 48) J. B. Puschett, J. Winaner, T. C. Chen, J. Fragola, D. B. Sytk, J. S. Robertson: *Miner. Electrolyte Metab.*, **6**, 190 (1981)

Selective Removal of Alkaline Phosphatase from Renal Brush-Border Membrane and Sodium-dependent Brush-Border Membrane Transport

腎刷子縁膜からのアルカリホスファターゼの選択的除去と Na^+ 依存性膜輸送

A. N. K. Yusufi, M. G. Low, S. T. Turner, T. P. Dousa: Division of Nephrology and Internal Medicine, Dept. of Physiology and Biophysics, Mayo Clinic and Foundation, Mayo Medical School, Rochester, Minnesota 55905 and the Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, Oklahoma 73104
J. Biol. Chem., **258** (9), 5695-5701 (1983)

腎臓における Pi の再吸収機構は、 Na^+ 勾配を駆動力とした能動輸送により腎尿細管刷子縁膜 (BBM) から吸収されることが、刷子縁膜小胞 (BBMV) を用いた実験より明らかになっている。しかし、その Pi 輸送およびその調節の分子機構は不明な点が多い。特に Pi 輸送とアルカリホスファターゼ (Al-Pase) との関連について非常に興味をもたれている。それは次の理由による。すなわち、ある病的状態で Pi の輸送が減少する場合、または食餌中の Pi の減少に伴う Pi 輸送活性の増加など、 Pi 輸送に変化がみられる場合に、Al-Pase 活性のみが Pi 輸送活性の変化と同じ挙動を示し、他の BBM の典型的な酵素活性の変動はみられないからである。著者らはこの Pi 輸送活性と Al-Pase 活性との関連性についてより直接的な実験を行うため、ウサギの腎皮質よりまず刷子縁膜シート (BBMS) を分離し、この BBMS に存在する Al-Pase を選択的に除去した後 BBMV を調製した。この除去は、*Staphylococcus aureus* の培養液から精製したホスファチデルイノシトールに特異的なホスホリパーゼ C (PI-PLC) を作用させて行っている。この BBMV を用い、 Na^+ 依存性グルコース、プロリン輸送、および BBM 特異的酵素である Al-Pase、ロイシンアミノペプチダーゼ、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ、マルターゼ等の酵素活性を測定し、BBM からの除去の

影響を調べた。PI-PLC の処理により約80%以上の Al-Pase 活性は減少した。この減少は Al-Pase 酵素タンパクの遊離によることが、ポリアクリルアミド電気泳動法を用いた酵素活性染色法により確かめられた。この PI-PLC 処理により Pi 輸送のみならず、他の輸送および膜酵素活性には変化がみられなかった。

次に食餌中の Pi 濃度影響による適応調節機構と Al-Pase との関連について、高 Pi 食 (1.2%P) あるいは低 Pi 食 (0.07%P) で飼育したウサギの腎 BBM を用いて実験した。高 Pi 食の場合、通常 Pi 食 (0.7%P) の場合と同様、PI-PLC 処理による Pi 輸送の変化はみられなかった。一方、低 Pi 食の場合は適応調節機構が働き、 Pi 輸送、Al-Pase 活性の増加がみられたが、PI-PLC 処理により Al-Pase 活性の84%が、減少したにもかかわらず、 Pi 輸送活性は逆に増加した。以上の結果は BBM に存在する Al-Pase は Na^+ 勾配依存性輸送機構に直接組み込まれていないこと、また低 Pi 食などでみられる適応調節による Pi 輸送の増加には、Al-Pase の存在も Al-Pase 活性の増加も必要がないことを示している。すなわち、輸送と Al-Pase 活性は独立して調節されているか、あるいは間接的に互いに関連していることを示す。

(山田一夫, 川崎 尚)