

氏名	松川茂 まつかわしげる
学位の種類	薬学博士
学位記番号	論薬博第220号
学位授与の日付	昭和54年9月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	甲状腺におけるチログロブリン生合成過程 —特にチログロブリンの沃素化反応の Site と Maturation—

(主査)
論文調査委員 教授 富田謙吉 教授 山科郁男 教授 高木博司

論文内容の要旨

甲状腺ホルモンのチロキシンは分子量約67万(沈降定数19S)の糖蛋白質のチログロブリンに組み込まれた形で合成され、細胞腔にコロイドとして一時貯えられた後、細胞内に再吸収され、加水分解を受け遊離型となり、血中に分泌されることが知られている。Tg 蛋白骨格の合成や糖添加の過程に関しては、一般に次のように考えられている。即ち、甲状腺細胞に取り込まれたアミノ酸が粗面小胞体上のポリリボソーム上でチログロブリンは、まず前駆ペプチドとして合成され、粗面小胞体腔に押し出され移動し、ゴルジ装置を経由する間に会合し、同時に種々の糖が添加される。しかし、チロキシン及びその前段階のチロキシン残基の沃素化がチログロブリン生合成のどのような過程で、甲状腺のどの部位でおこなわれるかに関しては、まだ確かなことは分かっていない。

そこで、甲状腺ホルモン全合成過程及びその制御機構の解明に役立てることを目的として、チログロブリン生合成の各過程を詳細に検討した。まずチログロブリンの沃素化反応に中心的役割を果す甲状腺のヘム蛋白のペルオキシダーゼに着目し、その局在部位を生化学的、組織化学的に研究した。次に甲状腺の *in vitro*, *in vivo* での沃素化反応を多角的に解析し、それのおこる細胞内部位、並びにチログロブリンの Maturation に対する役割について検討した。

甲状腺における甲状腺ペルオキシダーゼの局在部位

(1) 生化学的研究の知見—細胞分画法の結果、ペルオキシダーゼは、可溶性酵素ではなく、主としてミクロゾーム画分に結合していることが分かった。ミクロゾームを細分画し、化学組成、酵素活性、電顕所見から検討した結果、粗面小胞体が局在部位であることが判明した。しかしミクロゾームに含まれる密度の低い滑面膜にも無視できない量のペルオキシダーゼが存在した。これらのうち形質膜、ゴルジ膜には極めて僅かしか活性は見いだされなかった。又単離核、ミトコンドリア、リソゾームにも活性はなかった。

(2) 組織化学的研究の知見—灌流し摘出したラット甲状腺を前固定してから、3,3'-ジアミノベンチジンと H_2O_2 と共にインキュベーションした。この電顕超薄切片を鉛で染色し、電顕で観察した。ペルオキシダーゼ反応を示す黒い沈着物は粗面小胞体の腔内、核膜 Apical 小胞、Lateral 小胞には必ず、ゴルジ

装置の小胞には時々見いだされた。一方、ミクロビリ、形質膜、ミトコンドリア、リソゾームには存在しない。これらの知見は、核膜を除く多くの点で生化学的知見と一致する。ここでは更に、生化学的研究で指摘されたペルオキシダーゼの存在する滑面膜成分は、チログロブリンの分泌顆粒と考えられる Apical 小胞や Lateral 小胞の破片である可能性と、*luciferase* 反応にはペルオキシダーゼ反応がおこらないことが新たに明らかになった。

ペルオキシダーゼの局在に関する以上の知見と、沃素化反応部位を示すオートラジオグラフィの知見—沃素化は*luciferase* 反応のミクロビリに接した部位である—との間には大きな相異がある。そこでチログロブリンの生合成過程と沃素化反応の関係を検討し、沃素化の部位を推定することにした。

甲状腺におけるチログロブリンの生合成と沃素化反応

最も適切な情報をえるため、ブタ又はラット甲状腺を用い、*in vitro* 又は *in vivo* 系を用いて実験を進めた。

① ^{131}I でラベルした甲状腺の*luciferase* 成分と細胞質成分に富む画分における ^{131}I -チログロブリン含量の比較結果、別の実験で、インキュベーション中に*luciferase* から外液にしみ出すチログロブリンは ^{131}I でラベルされていないこと、及び、甲状腺顆粒成分も ^{131}I で、かなりラベルされていることなどは、沃素化が*luciferase* 反応内だけでおこるとすると、うまく説明できない。

② 甲状腺内で ^{131}I でラベルされたチログロブリンは、*luciferase* 反応内のチログロブリンが余り解離しない SDS 濃度 (0.3 mM) でも、12 S サブユニット (1/2) に解離したが、ラベル時間と共に非解離性成分が増加してゆく。この沃素化様式は、精製したミクロゾーム結合性チログロブリン (新しく合成され、沃素含量は低い) を化学的に沃素化して沃素含量をふやしていった場合に極めて類似するが、*luciferase* 反応のチログロブリン (沃素含量が高い) を同じようにした場合とは全く異なる。従って甲状腺における沃素化反応は新しく合成され沃素含量の低いチログロブリンに対して選択的におこなわれること、そして、それが可能なシステムは*luciferase* 反応ではなく、細胞内にあることが推定された。

③ SDS によるチログロブリンの解離反応と沃素化アミノ酸の分析から、沃素含量の多少がチログロブリンの Maturation を決めていることが明らかになった。更に、チロキシン生成には、チログロブリンの沃素化が十分おこなわれ、SDS によって解離しなくなる時と一致しておこなわれることからみて、チログロブリンの Maturation による構造変化が大きく寄与していることが示唆される。

④ チログロブリンの合成から*luciferase* 反応への分泌までに 3.5~4 時間を要するという知見に基づき、この全過程のどこで沃素化がおこるかを推定した。3H-チロシンや 3H-ガラクトースを取り込んだチログロブリンは、0.3 mM SDS で容易に解離し、沃素含量の低いことを予想させた。事実、90分のものでは沃素含量はゼロに近い。しかし 3 時間では、蛋白中の 3H-チロシンの一部はモノ・ヨード及びジ・ヨードチロシンに変化していた。このことは沃素化が分泌直前のチログロブリンを包む細胞器官でおこることを示唆する。

⑤ その細胞器官の性質を知るために、 ^{131}I でラベルされた甲状腺ホモジネートをショ糖密度勾配遠心した結果、 ^{131}I を結合した成分は密度が低く、ペルオキシダーゼ活性を有する顆粒に一致した。

以上のことから、沃素化反応は、12 S サブユニットが会合し、ゴルジ装置に達しガラクトースが添加さ

れるまでは少く、その後及び分泌顆粒 (Apical 小胞) に入り、分泌されるまでの間に、主としておこなわれることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

甲状腺ホルモン (チロキシン, T_4 ; トリヨードチロニン, T_3) の生合成は、糖蛋白チオグロブリン (Tg) のペプチド結合に組みこまれた形で甲状腺上皮細胞において行われ、(1) Tg の蛋白部分の合成、(2) 糖鎖の添加、(3) Tg のチロジン残基の沃素化、(4) 沃素化チロジンの T_4 への変換という複雑な過程を経るものとされている。(1)、(2)についてはかなり明らかにされつつあるが、(3)、(4)の過程には不明の点が多い。著者は、沃素化反応におけるペルオキシダーゼの重要性に鑑み、(a) 生化学的方法、即ち、甲状腺ホモジエネートの種々の細胞器官由来の成分への遠心分画法の確立、(b) 組織化学的方法、即ち、電子顕微鏡観察のための組織固定、反応、染色の最適条件の設定を行い、これら二法を併用してペルオキシダーゼの細胞内局在部位を確かめ、Tg の成熟と沃素化反応の関連について次の知見を得た。ペルオキシダーゼは、ラット、ブタの甲状腺の核質、リソゾーム、ミトコンドリアには存在せず、小胞体、特に粗面小胞体に多く、また、濾胞腔に面する部分にある apical 小胞にも存在する。正常ラットの甲状腺では、ミクロビリヤその近傍の濾胞腔内にもこの酵素は存在しない。ゴルジ装置も殆んどペルオキシダーゼはないが、ガラクトース転位酵素活性はあり、糖鎖の添加に関与すると考えられる。Tg の成熟と沃素化との関連については、Tg の沃素含量と Na dodecyl sulfate (SDS) による解離性との関連、 ^{131}I -Tg アミノ酸の分析、 ^{131}I と ^3H -チロジンまたは ^3H -ガラクトースとによる Tg の二重標識、ならびに、これら 3 つの化合物による三重標識法による Tg へのとりこみの経時的变化を検討した。その結果、in vitro、in vivo いずれにおいても、 ^{131}I や ^{125}I は新しくアミノ酸から合成され、まだ沃素化の進んでいない新生グロブリンにとりこまれる。 ^3H -チロジンは最初 3~8 S と 12 S 蛋白に、ついで 17~18 S 蛋白、Tg 前駆体にとりこまれる。 ^3H -ガラクトースは、ゴルジ体で 17~18 S にとりこまれる。さらにおくれて、ゴルジ装置から apical 小胞に Tg 前駆体が移動する間にヨードチロジンの生成、シアル酸の添加が行われることが判明した。以上の成果は、これまで疑義が多かった甲状腺のペルオキシダーゼの細胞内局在性を確立し、濾胞内における Tg の成熟ならびにチロキン形成過程の概観を明らかにしたもので、甲状腺ホルモン生合成機構の解明に寄与するところが多い。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。