



Title	ラット下垂体前葉におけるACTH作用増強因子の存在
Author(s)	飯田, さよみ
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33068
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	飯 田 さ よ み
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 5 5 6 2 号
学位授与の日付	昭 和 57 年 3 月 16 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	ラット下垂体前葉における ACTH 作用増強因子の存在
論文審査委員	(主査) 教 授 垂井清一郎 (副査) 教 授 松本 圭史 教 授 宮井 潔

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

大分子 ACTH は生物活性をもたないが、蛋白分解酵素の作用を受けて、小分子 ACTH に分解され生物活性が発現することが知られている。この ACTH 生物活性発現機構の研究過程において、ACTH のステロイド産生刺激作用を増強する因子の存在を認め、ACTH-potentiating factor (APF) と命名した。すなわち、蛋白分解酵素を含む無処理の下垂体前葉抽出液を ACTH 生物活性がほとんど認められない程度に稀釈し、それを大分子 ACTH 分画に添加してふ置し、生物活性発現の時間経過を調べた。ところが、予想に反し、ふ置前にてすでに著明な生物活性の出現が認められた。同様の現象が、煮沸処理により酵素活性を失活させた下垂体前葉抽出液と大分子 ACTH 分画の混合にても確認されたので、生物活性の発現は、下垂体前葉抽出液に含まれる蛋白分解酵素の作用によるものではないと考えられた。そこで、大分子 ACTH 分画に、微量の合成 ACTH—(1—18) を添加してステロイド産生を調べると、各々単独ではステロイド産生作用は軽微であるにもかかわらず、両者の混合により著明にステロイド産生を増加させる事実を確認した。したがって、大分子 ACTH 分画には APF が含まれているという結論に到達し、ラット下垂体前葉に APF が存在することの証明と、その性状について検討を加えた。

〔方法ならびに成績〕

ACTH 生物活性は、ラット副腎をトリプシン処理にて遊離細胞を得、Krebs-Ringer bicarbonate 緩衝液 (ブドウ糖 200 mg/dl, アルブミン 0.5 %) (KRBGA) にて細胞浮遊液を作成し、その 50 μ l を試料 20 μ l に添加して 37°C 2 時間ふ置した後、産生されたコルチコステロンを、Competitive protein

binding assay を用いて測定することによりなされた。ACTH radioimmunoassay は、ACTH—(19—24) を認識する抗体を用いて測定し、蛋白濃度は Lowry らの方法によりおこなった。6 匹の Wistar 系雄ラット (150 ~ 200 gr) を断頭し下垂体摘出後、分離した前葉、湿重量 45mg を 0.1 N 酢酸 3 ml にて 20 分間煮沸後、ホモジナイズし、2500rpm にて遠沈した上清を凍結乾燥した。この試料を、1.5 ml の 0.01 M, pH 4.64 酢酸アンモニウムで溶解し、1 ml を CM—セルロースに添加した。0.01 M, pH 4.6 4 酢酸アンモニウム 0.1 M, pH 6.67 酢酸アンモニウム、0.2 M 同緩衝液、0.1N HCl の順で溶出した。各分画に、ACTH—(1—18) 125 pg/ml の添加の有無にて ACTH 生物活性を比較すると、0.1 M, pH 6.67 酢酸アンモニウム 0.2 M 同緩衝液、0.1 N HCl にて溶出された分画に APF が存在し、これを各々 Fr. I, II, III と名付けた。この各 Fr. に一致して、radioimmunoassayable ACTH (RIA—ACTH) も 3 つのピークを認めた。Fr. I, II, III を稀釈して、種々な合成 ACTH に添加してステロイド産生を調べると、統計学的に有意に、ACTH—(1—24)、ACTH—(1—18) のステロイド産生を増強した。17—19 を Lysine に置換して酵素分解を受けがたい合成 ACTH—(1—19) に対しても、Fr. III は APF 活性を示した。Fr. I を Bio Gel P—10 (90×1.5 cm) にてゲルろ過を行い、各分画 6 ml ずつ 35 分画まで採取した。各分画に、ACTH—(1—18) 125 pg/ml の添加の有無にて生物活性を調べると、ACTH の生物活性 (Bio—ACTH) は分子量約 8000 の分画と、小分子分画とに 2 つのピークとして認められ、前者の分画に APF が存在した。また、この分画には、RIA—ACTH が含まれている。同様に、Fr. III を Bio Gel P—10 にてゲルろ過を行った。各分画に ACTH—(1—18) 125 pg/ml の添加の有無にて生物活性を調べると、分子量約 15000 分画、10000 分画に APF が存在し、この両分画とも Bio—ACTH はないが、RIA—ACTH は分子量約 15000 分画には認められた。さらに、分子量約 15000 分画を、6 段階、倍々稀釈をし、ACTH—(1—18) 125 pg/ml の添加の有無にてステロイド産生を調べた結果、APF の稀釈曲線が得られた。合成 ACTH—(1—24) および合成 ACTH—(1—18) の各種濃度に、分子量約 15000 分画を一定量添加すると、ACTH—(1—24) では、20 ~ 400 pg/ml, ACTH—(1—18) では 50 ~ 420 pg/ml の濃度範囲で ACTH のステロイド産生刺激作用の増強が認められた。

〔総括〕

- (1) ラット下垂体前葉に、熱に安定な ACTH 作用増強因子が存在することが明らかとなった。
- (2) APF は ACTH—(1—18) のみならず、ACTH—(1—24) にも同様の効果を認めた。また酵素分解を受けにくい ACTH—(1—19) にも同様の効果があり、APF の作用は、蛋白分解酵素の阻害によるものではない可能性が示された。
- (3) APF の性状は、CM—セルロースによる陽イオン交換クロマトでの溶出様式の相違、Bio Gel P—10 でのゲルろ過による大きさの相違、RIA—ACTH, Bio—ACTH の活性の相違等により、存在様式が異なるものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

本論文は、ACTH作用増強因子(ACTH-Potentiating Factors, APF)というまったく新しい生物活性物質の存在の証明に関する研究である。ラット遊離副腎細胞系を用いて、そのもの自体にはステロイド産生刺激作用はないが、微量のACTHに添加した際ACTHのステロイド産生刺激作用を増強する物質(APF)が、ラット下垂体前葉に存在することを明らかにした。また、陽イオン交換クロマト法やゲルろ過法を用いて、APFの性状を検討し、大きさ及び荷電状態が異なる形態で存在することを示した。従来、副腎細胞でのステロイド産生は、ACTHの量によってのみ規定されと考えられてきたが、本因子が副腎細胞のレベルでACTH作用を調節するという事実は、今だ未解決のホルモンの作用機構を考えていく上の貴重な導となる研究である。故に、本論文は医学博士論文として価値があると認定した。