

甲状腺沃素集積に関する研究

—所謂 front-running substance (f.r.s.) の研究—

金沢大学医学部第二病理学教室(主任 石川大刀雄教授)

松 本 治

(受付昭和35年10月31日)

甲状腺について知られている最大の機能は甲状腺ホルモンを形成し¹⁾²⁾³⁾, 貯蔵し, 血行中へ分泌することである⁴⁾⁵⁾⁶⁾. 甲状腺において, 無機沃度からホルモンの生成される過程を要約すると, 第1に血漿中に存在する沃素イオンが大量に甲状腺に摂取され⁷⁾⁸⁾, 次いでこの沃素イオンが組織内にて酸化せられてサイロキシンが合成される過程の⁹⁾ 2つに大別することが出来る. この両過程は, 甲状腺ホルモン生成の上からは實際上不即不離の関係にあるものであるが, 一応別個の機転によるものと考えられ, それぞれの立場から数多くの実験報告が行われている. 血液中の沃素イオンが如何なる機構によつて大量に甲状腺にとりこまれるかは明らかではなく, 又この摂取された沃素イオンがどのような形になつているのかも未解決の問題である¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾.

比較的純粹にイオンの細胞膜透過現象の立場から甲状腺による沃度濃縮現象を取り上げたものに, Freinkel and Ingbar¹⁹⁾ の報告がある. 即ち, タバゾールで羊の甲状腺(スライス)の有機沃素化反応を止め, これに種々の新陳代謝阻害剤(例えば, -SH 基, Carbonic anhydrase, Alkaline-phosphatase, Phosphate-bond energy 等に対する阻害剤)を作用させた時, 甲状腺スライスの沃素イオン濃縮率がどのようにかわるかを報告している.

広義の沃度濃縮作用の立場から見ると, Morton and Chaikoff²⁰⁾ 等は沃素イオンの濃縮現象は無傷の甲状腺細胞によつてのみ高度に営まれるが, ホモジエネートにすると最早濃縮作用は行われないと報告し, Weiss は同じくスライスとホモジエネートを用いて諸種の条件下における酸素消費²¹⁾と, 沃度濃縮²²⁾について報告している. 但し両者の関係にはふれていない. 一方 Wyngaarden²³⁾²⁴⁾ 等は甲状腺のホモジエネートがセロファン膜を通して I^{131} を濃縮することを報じた.

甲状腺による沃素イオンの濃縮と, その行われる組織学的部位の探究は, 放射性 I^{131} の出現以来, Radio-autography によつて詳しく追究されているが, Leblond and Gross²⁵⁾ は生理的存在量に等しい I^{131} を用いて, 血清中の沃素イオンは濾胞上皮細胞で先ず濃縮され, 続いて, 細胞内で有機化反応が起り, 生成されたホルモンが濾胞腔に分泌され, 貯蔵されると述べ, Gorbman 等²⁶⁾, Wollman and Wodinsky²⁷⁾ 等は I^{131} を大量に投与して最初から I^{131} がコロイド中に現われるのが, すべての沃素化反応は濾胞腔内で行われると対立的な意見を述べている.

とりこまれた沃度がどのような形であるかも不明であるが, Taurog, Chaikoff and Tong²⁸⁾ 等は先ず無機の状態にあると述べ, Vanderlaan 等²⁹⁾ 並びに Wyngaarden 等³⁰⁾ は蛋白質と結合しているという.

何れにしても甲状腺には, mono-iodo-tyrosine から thyroxine に至る有機性沃素を生成する能力とは別個に無機の沃素イオンを濃縮する何らかのメカニズムが存在し, これによつて甲状腺は無機の沃素イオンを血清から速かにしかも大量にとりこみ固定する.

私は, 教室同人の, 甲状腺の無機沃度の濃縮, それに続くホルモンの生成, ホルモンの血中への分泌という各過程に対する研究部門のうち, 純粹な沃度摂取という段階のみに限定せず, それ以後の過程をも含めた広い意味における沃度濃縮作用をとりあげ, 甲状腺の沃素イオン濃縮作用が甲状腺ホモジエネートを用いた *in vitro* の状態においても, 特異的に強度に存在し, その濃縮力はホモジエネート中の特殊な蛋白質分割に基づくものであること, 而して, この分割の沃素イオン濃縮力に影響を及ぼす各種の条件を検討し, 更に分割にとりこまれた沃素イオンの結合したこの特殊な蛋白質がホルモン生成以前のもの即ち, mono-iodo-tyrosine 以前のものとして性格つけられるべき物質であるとの成績が得られたので, ここにその実験経過を報告す

The Mechanism of Iodine Accumulation into Thyroid Gland. Osamu Matsumoto, Department of Pathology (Director: Prof. T.Ishikawa), School of Medicine, University of Kanazawa.

る。

実験材料並びに実験方法

1. 実験に用いた甲状腺は主に屠殺直後入手した牛の甲状腺を使用した。

ホモジエネートは、氷室中において、組織被膜を剝離し、細切した後に、pH 7.6 の 0.1M 磷酸緩衝液を加え、Waring blender を用いてホモジエナイズした。Blender から取り出した磨砕物は、3,000 r.p.m. で10分間遠心して磨砕残渣を除き、上清を一度濾過したものをホモジエネートとして用いた³¹⁾³²⁾。通常濃度は被膜剝離組織量に3倍量の緩衝液を加えたものとした。

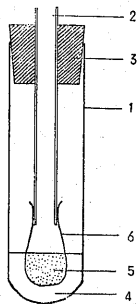
その他に、本実験において用いた臓器はすべて牛から得たもので、ホモジエネートにする処理は甲状腺の場合と同様に行つた。

2. ホモジエネートの活性測定方法

a. 透析平衡方法

Wyngaarden²⁴⁾の方法を応用して次の如くに行つた。

第 1 図



1. 小試験管 (内径: 1.5 cm 長: 9cm)
2. 硝子管 (内径: 4mm 長: 10cm)
3. ゴム栓 (硝子管支持, 固定用)
4. 緩衝液
5. ホモジエネート
6. セロファン膜

第1図の如き装置を用い、試験管内には、2ml の I^{131} を含んだ pH 7.6, 0.1M の磷酸緩衝液を入れ、セロファン室内にはホモジエネート 0.5ml を入れる。反応進行中液量の変化をきたさないように両者の液表面は正確に一致させる。被検物質は機酸緩衝液中に添加し、その濃度は全液量 2.5ml 中のモル濃度で表わした。

3°C に保つた氷室中に24時間実験試料を定置する。反応終了後、その内液、外液からそれぞれ 0.2ml を取り、放射性物質計数用試料皿に入れる。 I^{131} の気酸を防止するために 0.1N 苛性ソーダを1滴加えてから乾燥する。充分に乾燥した後に、端窓型 Geiger-Müller counter にて放射能を測定し、内液と外液の I^{131} の計数値の比、即ち、

$$H/M = \frac{\text{Homogenate } I^{131} \text{ counts}}{\text{Medium } I^{131} \text{ counts}}$$

を求めた。H/M 値が 1.0 以上のとき、ホモジエネートによる I^{131} の濃縮があると判定される。

b. 有機化値並びに f.r.s. 値測定方法

Homogenate	0.2 ml
0.1M pH 7.6 Phosphate-buffer	0.1 ml
Carrier-free I^{131}	1.0 μ c (0.06mlに規正)
0.04M $CuSO_4$	0.02 ml
0.04M Tyrosine	0.02 ml

通常上記反応系を用い、37°C に2時間、incubate する。反応終了後、その一部を予め緩衝化した濾紙の原点に着け、醋酸ブタノール溶媒で展開して、原点、inorganic, mono-iodo-tyrosine, solvent front, の各部分の放射能を測定し、濾紙上の全 I^{131} に対する各部分の I^{131} のパーセントを求める。原点と moniodotyrosine 部分のパーセントの和を、そのホモジエネートの有機化値とし、solvent front 部分のパーセントを f.r.s. (醋酸ブタノールを溶媒として展開したとき front の位置に証明される部分、即ち front-running substance) 値とする。

3. ペーパークロマトグラフィー³³⁾

ホモジエネートの活性測定方法から得られる試料はペーパークロマトグラフィーの一次元上昇法を用いて展開した。

ペーパーは東洋濾紙 No. 50 を用い、展開溶媒としては次の組成のものを用いた。

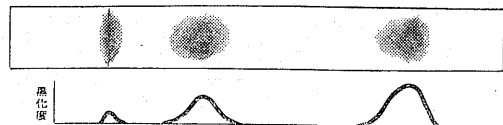
ブタノール	4	} (容量比)
水	2	
氷醋酸	1	

ペーパーは予め 0.1M, pH 7.6 磷酸緩衝液を噴霧して乾燥し、緩衝化して置く。反応液を着ける前に、原点に 1M のハイボ溶液 30 μ l を塗布してクロマト展開中の沃素イオンの酸化を防いだ。展開終了後直ちに乾燥して測定に供した。

放射能測定は原点より 1cm 間隔にて行ない、各部分の計数値の百分率を求めた。第2図はその代表的解析像を Radioautography によつて示したものである。

ペーパーの測定は 1cm 毎に切り離した濾胞片を、

第 2 図



3°C, 24時間、透析平衡法を行い、反応終了後ペーパークロマトにて展開した pH 4.5 等電点沈澱蛋白質の Radioautogram.

測定用試料皿に入れて行つたが、この場合には濾胞発色法の適用が不可能となるので、Geiger-Müller 管の支持台の底に 1cm 幅の窓を作り、その間を 1cm 毎にペーパーを移動させつつ測定する装置も利用した。

4. 濾紙電気泳動法³⁴⁾

甲状腺 ホモジエネートの蛋白分割を解析するために、濾紙による電気泳動法を用いた。自家製の定電流、定電圧発生装置を使用した。電圧は 0~400 Volt、電流は 0~40mA の発生能力を有する。

通電溶媒として用いられた緩衝液の組成は次の如くである。

Veronal-Na	5.88 gr	}
Na-acetate	3.88 gr	
K-oxalate	1.38 gr	
N/10 HCl	20.0 cc	

Aqua dest にとがして全量を 1l とする。
pH 8.9 $\mu=0.1$

濾紙は東洋濾紙 No. 50 を使用した濾紙の長さは 30 cm 濾紙幅は同時に流す試料の数に応じて 6~10cm のものを用いた。濾紙を枠に固定した後両端を溶媒に浸し、自然に浸透する溶媒が濾紙の中央で合致した後電流を通じた。通ずる電流の強さは常に濾紙幅 1cm 当り、0.5mA、に規正する。予め 10~15 分電流を通じ、その状態が安定した後一度通電を停止して試料を原点に着けた。その試料は予め通電緩衝液にて 12 時間透析して置く。電気泳動は 3°C において 20~24 時間行ない、終了後濾紙を取りはずし、直ちに乾燥して発色させた。

蛋白確認試薬として用いた染色液の組成は次の如くである。

Bromphenol Blau	0.05 gr	}	Aqua dest にとがして 全量を 100cc とする。
昇 汞	1.0 gr		
水 醋 酸	2.0 gr		

濾紙を染色液に 15~20 分入れて取り出し、2% の醋酸溶液で数回洗濯した後乾燥して分布に供した。

実験成績並びに考案

1. 透析平衡方法による成績

1) 甲状腺ホモジエネートを用いて、3°C、24時間透析平衡方法を行なうと、外液に加えられた I¹³¹ はセロファン膜を通じてホモジエネートによつて濃縮せられ、第 1 表に見られる成績が得られた。

この表に見られる如く、甲状腺ホモジエネートの H/M 値には 1.9~4.2 の変移がうかがわれる。これは甲状腺機能が、性別、飼料、季節、年齢、個体差等の条件によつて若干の差異のあることの現われであ

第 1 表 透析平衡方法による甲状腺ホモジエネートの H/M

	内液 I ¹³¹	外液 I ¹³¹	H/M
実験No. 1	7226	2087	3.4
2	6787	1812	3.7
3	7072	1864	3.7
4	3440	1260	2.7
5	4408	1262	3.4
6	5032	1176	4.2
7	4480	1883	2.3
8	2366	1245	1.9
平均値			(3.1)

第 2 表 各種臓器ホモジエネートの H/M

	最小	最大 (H/M)
甲状腺	1.9	~ 4.2
肝臓	1.0	~ 1.1
腎臓	1.0	~ 1.1
脾臓	1.0	~ 1.1
脾臓	1.0	~ 1.1
腸管	1.0	~ 1.1
顎下腺	1.0	~ 1.2
耳下腺	1.0	~ 1.1

る。

第 2 表は、各種臓器別にそれぞれの沃素イオン濃縮作用をしらべた実験成績である。

表に見られる如く、肝臓並びにその他の臓器のホモジエネートには沃素イオン濃縮作用が認められない。特に顎下腺に関しては、教室同人の詳しい研究があるが(未発表)、その tyrosine-iodinase 作用が甲状腺に比してより高活性であることが明らかにされ、又人において唾液中に血漿の 40 倍の沃素が証明されている。これらの事実から、顎下腺ホモジエネートの H/M に注目したが、その値が 1.2 を越えることがなく、有意の濃縮作用があると判定することは出来なかつた。

即ち、甲状腺と他の臓器の H/M 値を比較することによつて、各種臓器中ホモジエネートの状態において、セロファン膜を通して沃素イオンを濃縮し得る能力は甲状腺に特有のものであると結論することが出来る。

2) 反応自体の吟味、甲状腺ホモジエネートの H/M 値に影響を及ぼす各種の要素

透析平衡法による甲状腺ホモジエネートの H/M 値は平均 3.2 の成績を示したが、緩衝液の相違、反応

液の pH, 平衡時間の長短, 並びに平衡中の温度等によつて, その値が如何に変化するかを検討した.

i) 緩衝液の相異

第3表は緩衝液として0.8%生理的食塩水, リンゲル氏液, クレブス・リンガー氏液を用いた場合の成績である.

第3表 緩衝液と甲状腺ホモジエネートの H/M

緩 衝 液	H/M
0.1M pH 7.6 燐 酸 緩 衝 液	4.2 3.8
クレブス・リンガー氏 液	4.0 3.8
リ ン ゲ ル 氏 液	4.1 3.9
0.8 % 塩 食 水	3.9 3.8

表に見られる如く, 上記緩衝液によつては H/M に殆んど変化はなく, その成績は 0.1M pH 7.6 燐酸緩衝液を用いた時と同等であつた,

ii) 平衡時間の長短

第4図は平衡時間と H/M 値の変化を示したもので, 時間の経過と共に H/M 値は増加し, 24時間附近で最高に達し, その後は僅かに低下の線をたどる.

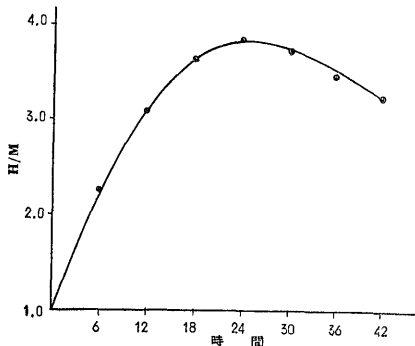
iii) 反応液の pH

反応液の pH を変えると, pH 7.0~7.6 に H/M の最高値が見出され, pH 3 以下及び pH 10 以上では値が 1.0 となり, 内外液中の I¹³¹ は平衡状態のままにとどまる(第4図).

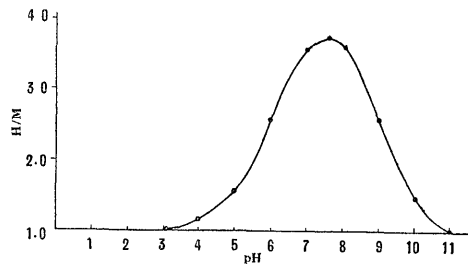
iv) 平衡中の温度

第5図は平衡中の温度を 3°C 並びに 37°C に保つた場合の比較を示したものであるが, 最初の数時間は 37°C の場合が 3°C の時より幾らか高い値を示す. し

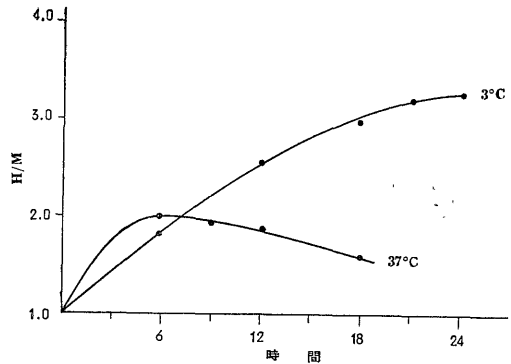
第3図 平衡法: 3°C, 反応時間と H/M との関係



第4図 透析平衡法: 3°C, 24時間 pH の変化と H/M



第5図 透析平衡法: 3°C と 37°C の比較



かし24時間では, 3°Cの方が遙かに高い値を示した. 37°Cにおいては, 最初の数時間を経過するとホモジエネートに腐敗変性が起り活性が次第に低下して来るものと思される.

以上の成績によつて, 甲状腺ホモジエネートはセロファン膜を通して沃素イオンを特異的に濃縮することが確認せられ, 又温度, 時間, pH 条件等の変化に見られる実験成績は Wyngarrden⁶⁾のそれと大差がなかつた.

3) 甲状腺抽出液の分割

セロファン膜を通して緩衝液中の I¹³¹ を濃縮する甲状腺ホモジエネートの特異作用が, 一体甲状腺ホモジエネート中の何れの分割に属するかを検するために次の如き実験を行つた.

i) 硫酸塩析範囲の測定

先ず硫酸塩析範囲の測定を試みたが, 塩析後蛋白液中より透析によつて硫酸を除く操作中, 試料が強く薄まり, 十分な活性測定が不能となり, 満足すべき結果を得ることが出来なかつた.

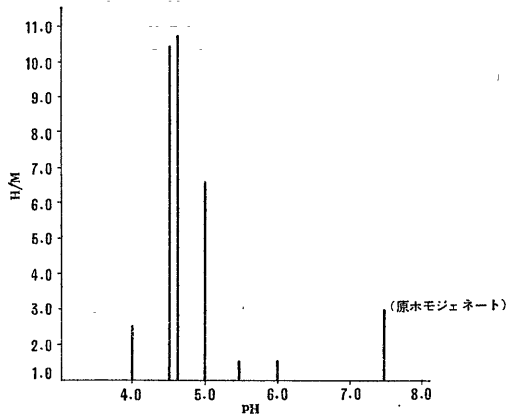
ii) 等電点沈澱による分割

30%甲状腺ホモジエネート 1ml を10本の試験管に分注, 0.1~1.0N の醋酸を用いて, pH を 3.0~7.0迄の間にそれぞれ規正して 3°C に24時間放置後, 4000 r.p.m. 10分間遠心してその上清を捨て, 沈澱に

第4表 甲状腺ホモジエネートの各 pH 値における沈澱蛋白分割の H/M 値

pH	3.0	3.5	4.0	4.5	4.6	4.8	5.0	5.5	6.0	7.0	7.5
Experiment No. 1	1.0	1.0	2.5	10.5	10.9	10.8	6.6	1.5	1.5	1.0	3.0
No. 2	1.0	2.0	4.8	8.8		6.5	2.0				2.3
No. 3		1.0	4.1	4.2		2.5	1.3	1.0			1.5
No. 4		2.5	6.0	6.9	6.6	6.5	2.0	1.0			2.9

第6図 各々の pH にて沈澱して来る蛋白分割の H/M



pH7.5, 1/10N 磷酸緩衝液 1ml 宛を加え, なお 1/10 N 苛性ソーダを用いて pH を 7.5 に補正して溶解させた後, 透析平衡法によつてそれらの活性を検した.

その結果は第4表, 第6図の如くである.

原ホモジエネートが 3.0 の H/M 値を示すとき, pH 5.0 等電点沈澱蛋白質は H/M 値 6.6, pH 4.8 のとき 10.8, pH 4.6 では 10.9, pH 4.5 では 10.5 の値を示した.

即ち, 甲状腺ホモジエネートがセロファン膜を通して I¹³¹ を集める機能は, pH 4.0~5.0 の域で等電点沈澱する蛋白分割に含まれていることが明らかになった.

4) ホモジエネート中の濃縮作用阻害物質の存在について

ここに1つ注目すべき事実があつた. 即ち pH 4.5 で等電点沈澱を行ない, 遠心分離したとき, 上清を取り除くことなく, 攪拌して再び pH を 7.6 に戻しその濃縮度を検すると, 原ホモジエネートと同活性を示す.

しかるに一度除いた上清を24時間大量の蒸溜水にて透析し, それを加えて溶解させ, pH を規正してその濃縮度を検すると, 原ホモジエネートより幾分 I¹³¹ の濃縮力の増加を見た. その成績は第5表に示した.

又上記実験において述べた如く, 沈澱を磷酸緩衝液を用いて溶解したものは, 可成りな高活性を示す. この事実は, 等電点沈澱の際に, 上清中に溶存せる蛋白質, 並びにその他の種々の溶解物質が取り除かれた後に, I¹³¹ 濃縮力の増加したことを意味している.

即ち甲状腺ホモジエネートは, それ自体のうちに I¹³¹ の濃縮活性を妨げる生体内阻害物質を含んでいることを証明する. しかし, ホモジエネート操作中に, 或いは阻害物質が生じたのかも知れないという疑問が起きるが, この物質の性質に関しては教室同人鈴木が詳しく研究した. この生体内阻害物質の強さは甲状腺ホモジエネートの I¹³¹ 濃縮力に個体差のある如く, 各々の甲状腺によつて異なり, 又ホモジエネートの I¹³¹ 濃縮力と生体内阻害物質の間に一定した関係は認められなかつた.

生体内阻害物質に関する第5表の成績を解説したものが第7図であり, pH 4.5 等電点沈澱を行つた後, その上清を用いた場合, I¹³¹ の濃縮力が既に失われていることも同時に示した.

以上の成績に従つて, その後の実験には何れも甲状腺ホモジエネートから pH 4.5 にて等電点沈澱して来る蛋白分割を用いた.

pH 4.5 等電点沈澱蛋白質を用いた場合の沃素イオン濃縮作用が, 緩衝液の相違, 反応液の pH, 平衡時間の長短, 平衡中の温度等によつて受ける影響はホモジエネート自体の受ける影響の成績と一致した.

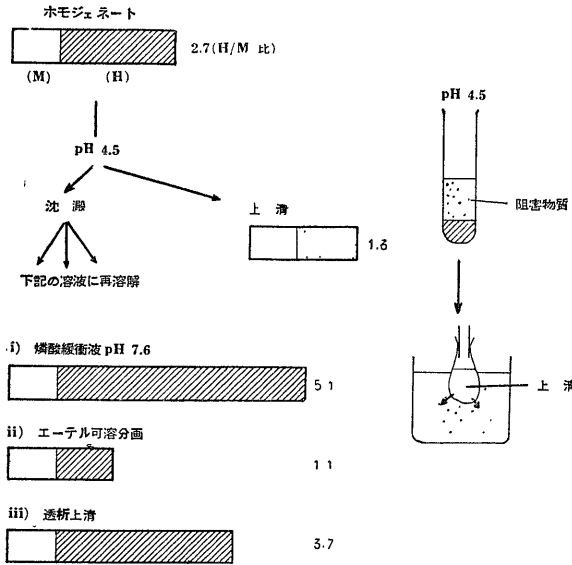
5) 蛋白量と H/M 値の関係

甲状腺 ホモジエネートを pH 4.5 で等電点沈澱さ

第5表 生体内阻害物質

Homogenate H/M	pH 4.5 Sediment を Buffer に溶解した H/M	pH 4.5 Sediment + Supernatant. H/M	pH 4.5 Sediment + 透析 Supernatant H/M
2.7	5.1	2.7	3.7
4.7	6.6	4.8	5.3
3.2	5.5	3.1	3.5

第7図 沃度濃縮に対して甲状腺ホモジエネートの保有する阻害作用



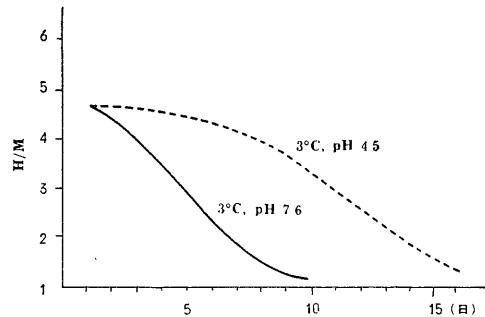
せ、上清を除いて再び 0.1M 磷酸緩衝液を添加し溶解して pH を 7.6 に規正せんとするとき、磷酸緩衝液の加える量を除いた上清より少量とする。即ち等電点沈澱蛋白質溶液の濃度を高くすると、その I^{131} 濃縮力は増加し、私の行った実験の最高値は 14.2 の H/M 値を示した。このとき加えた緩衝液の量は原ホモジエネートに比べ1/4容になる場合のものであった。反対に、加える緩衝液の量を増加して、原ホモジエネートより増量すると H/M 値は次第に減少する。その 1 つの実験例を第 6 表に示した。

pH 4.5 等電点沈澱蛋白質は 2~3 回、等電点沈澱の操作を繰返すと、その後の I^{131} 濃縮力が比較的安定し、3°C の氷室内に保存すると最初の 1 週間は、活性に大なる変化がなく使用に耐え得るが、その後は徐々に活性が低下して成績が不安定となる。なお保存中は pH を 4.5 に保ち、用に臨み pH を必要な点に規

第6表 蛋白量と H/M の関係

蛋白溶液濃度	Exp. No. 1	Exp. No.2
Buffer 1/4 容	14.2	
〃 1/2 容	6.5	
原ホモジエネート	4.1	3.9
× 2 容	2.9	3.0
× 4 容	1.8	2.8
× 8 容	1.2	1.9

第8図 pH 4.5 等電点沈澱蛋白質の保存状態による活性値の変化



正して実験を行った。

第 8 図は 保存中の pH を 4.5 と 7.6 に保つた場合の活性の変化を両者について比較したものである。

6) 透析平衡法に及ぼす金属イオンの影響

透析平衡法による甲状腺ホモジエネートの I^{131} 濃縮作用に金属イオンが如何なる影響を示すかを検するため、次の如き実験を行った。即ち銅イオンとして硫酸銅、その他の金属として硫酸亜鉛、硫酸マグネシウム、塩化マンガン、塩化カルシウムを用い、全量 2.5 ml における最終濃度が $10^{-8}M$ となる如くに加えた。H/M に作用して、これに促進的な影響を与えたのは銅イオンのみであった。銅イオンによる促進作用の成績は第 7 表の如くであった。

7) 抗甲状腺剤並びに 2, 3 のイオンが透析平衡法

第7表 透析平衡法の銅イオン (CuSO₄) による促進

	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
1) 甲状腺ホモジエネート	3.81	2.7	2.0	1.36
($10^{-8}M$) Cu を加えた場合	7.8	4.7	3.8	2.4
2) pH 4.5 等電点沈澱蛋白質	5.9	6.6	8.4	2.1
($10^{-8}M$) Cu を加えた場合	8.2	8.3	9.7	3.2
3) 上 清	1.1	1.1	1.1	1.0
($10^{-8}M$) Cu を加えた場合	1.4	1.2	1.3	1.0

第 8 表 抗甲状腺剤並びに種々のイオンの H/M に対する影響

種 類	イオン M	0	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²
対 照	H/M	2.7						
Methiocil		2.7	1.8	1.8	1.1	1.0	1.0	1.0
Thiourea		2.7	1.8	1.5	1.1	1.0	1.0	1.0
KCNS		2.7	2.6	2.4	2.0	1.9	1.3	1.0
Anillin		2.7	2.5	2.0	1.2	1.0	1.0	1.0
PAS		2.7	2.6	2.3	2.0	1.3	1.2	1.0
P.A.B.A.		2.7	2.6	2.5	1.9	1.4	1.1	1.0
Silver-acetate		2.7	2.1	1.6	1.1	1.0	1.0	1.0
Mercuri-acetate		2.7	1.8	1.5	1.2	1.0	1.0	1.0

に及ぼす影響について (35)(36)(37)(38)(39)(40)

甲状腺機能に影響する抗甲状腺剤が、透析平衡法による甲状腺ホモジエネート I¹³¹ の濃縮作用に如何なる影響を及ぼすかを検討するために、次に述べるような 2, 3 の抗甲状腺剤を取りあげた。

Thioureylen 基を有する化合物としては、Methylthiouracil, Thiourea, Aminobenzen 化合物としては、PAS, PABA, 並びに Aniline, 硫シアン化合物としては Kalium Thiocyanate⁽⁴¹⁾

その他の物質としては、醋酸銀、醋酸水銀等の作用を検した。

上記各物質の10倍稀釈液を磷酸緩衝液に加え、3°C, 24時間透析平衡法を行った。それぞれはホモジエネートの I¹³¹ 集積能に対し阻害作用を示したが、各々の場合の H/M 値の推移、並びに I¹³¹ 集積完全阻害の濃度は第 8 表の如くであつた。

即ち、Methiocil, Thiourea は 10⁻⁴M の濃度で完全に阻害作用を現わし、PAS, PABA は 10⁻²M の濃度で、KCNS は 10⁻²M, 又アニリン、醋酸銀、醋酸水銀等は 10⁻⁴M の濃度において甲状腺ホモジエネートの I¹³¹ 濃縮作用の阻害剤なることが明らかになつた。

8) 濃縮沃素のペーパークロマトグラフィによる解析

これまでの実験経過から、甲状腺ホモジエネートの沃素濃縮作用は、pH 4.5 等電点沈澱蛋白分割によつて行われていることが確かめられたが、このときセロファン膜を通して蛋白分割にとりこまれた沃素イオンが如何なる状態にあるのかを知るために、透析平衡法終了後の反応液をペーパークロマトグラフィによつて展開し、解析した。

この実験に用いられた実験系の試料は、甲状腺ホモジエネートから pH 4.5 にて等電点沈澱する蛋白質分割を 10⁻¹M 磷酸緩衝液で原ホモジエネートと等量

になる如く再溶解し、pH を規正したものを対照群として、

銅イオンを反応系に加えた場合

チロゼンを加えた場合

チロゼン並びに銅イオンを加えた場合

以上 3 者について先づ基本実験を行った。その実験成績は次の如くである。

i. 基本的解析

a. pH 4.5 等電点沈澱蛋白分割のみの場合のペーパークロマトグラフィ

透析平行法終了後の反応液を醋酸ブタノール溶媒で展開し、放射能を計測すると、セロファン室内の I¹³¹ は inorganic-I¹³¹, monoiodotyrosin-I¹³¹, 並びに front-running I¹³¹ として特徴づけられる 3 つの部分に分かれる。その数例を第 9 表に示した。この表に見られるように、30%~50% は inorganic の部分に存在するが、この部分は水に対して透析を行なうとセロファン室から取り除くことが出来るし、又反応終了後反応液を pH 4.5 として等電点沈澱させると上清に含まれる部分であつて、これは反応終了後、物理的に平衡状態にある内、外面液中の I¹³¹ に相当するものである。

Monoiodotyrosine と同定される部分の I¹³¹ は概ね 2%~4% 程度に現われるが、第 3 の部分として 40%~60% 程度に front の位置近くに現われる I¹³¹ の部分がある。通常 front の位置に証明される I¹³¹ は iodine と同定される部分であるが、この場合 iodine とするには量的に了解することが出来ないで、front の位置に証明される部分の I¹³¹ の本態に興味をもたれた。

front に現われる I¹³¹ は反応終了後、透析を行つても依然として証明されるので、透析によつてもセロファン室より流出することのないことが明らかになつた。この事実は反応終了後の反応液中において front 部分の I¹³¹ が、何らかの形において蛋白質分割と結

第9表 ペーパークロマトグラフィーによる I^{131} の分布

	原 点	Inorganic I^{131}	Moiiodotyrosine I^{131}	Front-running I^{131}	H/M
No. 1	17.5(%)	48.5(%)	4.0(%)	30.0(%)	3.4
2	12.2	32.5	5.6	49.7	4.0
3	15.8	12.7	4.0	67.5	10.3
4	10.0	35.3	—	54.7	4.1
5	6.0	43.8	2.9	47.3	3.8
6	16.1	40.8	3.5	39.2	4.0
7	17.6	35.9	4.0	42.5	4.1

合した状態にあるべきことを意味する。従つて展開した場合に原点に止まるべきである。この点に関しては後にふれる。

以上の成績から甲状腺ホモジネートによつてセロファン室とにりこまれた沃素イオンの存在状態が明らかとなつた。

原点の吟味

ペーパークロマトグラフィーを用いた展開像において、原点に止まる部分はそれ以下の解析結果にかなりの影響を与えるが、第9表に見られる実験成績においても6%~20%の開きが観察される。原点に止まる部分は蛋白質と何らかの形において結合した状態にあるため、展開溶媒では分離して来ないと考えられるので、この部分の帰趨を判定するために反応液を加水分解した後展開した。加水分解は蛋白水解酵素ナガーゼを用いて遂行した。反応終了後の液にナガーゼを加え、25°Cにおいて、24時間行つた。

加水分解終了後の展開成績と原反応液の展開成績の比較は第10表の如くである。

アルカリ加水分解も行つたが、この場合加水分解の進行と共に反応液が次第に石鹼液状に変化し遂には銹状となつて、反応終了後展開に供することが不可能と

なつた。

透析平法終了後の反応液をナガーゼ加水分解すると、原点の I^{131} は大凡そ2~4%の範囲に落着く。このとき原点以下の分布の変化を検討すると、inorganicの部分には認められるような変動はなく、front-runningの部分は原点の I^{131} の減少に応じた増加を示した。mono-iodotyrosineの部分も著明とはいえないが幾分の増加を示す。従つて原点に止まる I^{131} は、その大部分が front-running の部分に相当すべきものであることが明らかになつた。

一方、各サンプルの H/M 値を検討すると、第9表においては意味づけに困難を感じるが、第10表においては明らかに H/M 値の大小がサンプルの front-running I^{131} の多少と平行関係にあること、同時に又、それが inorganic の部分の多少とも関係を有することが明らかになる。

以上の成績を総合すると次の如くに結論することが出来る。

pH 4.5 等電点沈澱蛋白分割によつてセロファン膜を通して濃縮された沃素イオンは、水に対する透析態度から、この蛋白分割に結合し、醋酸ブタノール（脂肪溶媒）で展開すると比較的容易に蛋白分割から離れ

第10表 透析平衡法終了後 反応液そのままと水解した後に展開した場合の I^{131} 分布

	原 点(%)	Inorganic I^{131} (%)	Monoiodotyrosine I^{131} (%)	Front-running I^{131} (%)	H/M
No. 1 水 解	15.8 2.6	12.7 12.0	4.0 4.2	67.5 81.2	10.3
No. 2 水 解	17.5 3.8	48.5 47.9	4.0 4.1	30.0 44.2	3.4
No. 3 水 解	12.2 2.0	32.5 32.1	5.6 5.6	49.7 60.3	4.0
No. 4 水 解	10.0 4.0	35.3 35.0	— 0.9	54.7 60.1	4.1
No. 5 水 解	16.1 3.2	40.8 41.0	3.5 3.2	39.2 52.2	3.8

て front の位置に現われる。しかしてその量は蛋白分割の沃素イオン濃縮活性即ち H/M に比例する。

b. 銅イオンとチロヂンを夫々単独に加えた場合
銅イオンを加えた場合
銅イオンを加えると pH 4.5 等電点沈澱蛋白分割の H/M は著明に増加する。
チロヂンを加えた場合
H/M 値に変化は見られない。
両者の場合のペーパークロマトグラフィーは第11表

の如くである。

銅イオンを加えた場合には H/M が増加したが、同時に front-running I¹³¹ にも増量が認められた。第11表 (ii) に見られる如く、チロヂンのみを加えた場合、H/M に変化が認められないのみならず、その他の部分にも有意の量的変化は認められない。

monoiodotyrosine I¹³¹ は銅イオンを加えた場合に有意と認むべき増量がある。但しその絶対量は僅少である。チロヂンを加えた場合では、この部分に有意と

第11表 (i) Cu イオンを加えた場合のペーパークロマトグラフィー

	原 点 I ¹³¹	inorganic I ¹³¹	Monoiodotyrosine I ¹³¹	Front-running I ¹³¹	H/M
No. 1 + Cu	10.0 13.8	35.3 18.1	— 5.8	54.7 62.3	4.1 9.4
No. 2 + Cu	6.0 15.2	43.8 22.0	2.9 4.5	47.3 58.3	3.8 8.0
No. 3 + Cu	5.4 9.6	55.5 41.7	4.0 4.9	35.1 43.8	2.4 3.8

第11表 (ii) Tyrosine を加えた場分のペーパークロマトグラフィー

	原 点 I ¹³¹	Inorganic I ¹³¹	Monoiodotyrosin I ¹³¹	Front-running I ¹³¹	H/M
No. 1 + Ty	9.2 8.9	44.2 44.5	5.6 5.5	41.0 41.1	3.1 3.0
No. 2 + Ty	18.0 17.8	36.8 35.5	1.0 0.9	44.2 45.8	3.9 4.0
No. 3 + Ty	6.3 6.5	49.7 50.9	2.0 2.1	42.0 40.5	3.0 3.0

第12表 銅イオンとチロヂンを共に入れた場合の解析

	原 点 I ¹³¹ (%)	Inorganic I ¹³¹ (%)	Monoiodotyrosine I ¹³¹ (%)	Front-running I ¹³¹ (%)	H/M
No. 1 + Cu +CuTy	10.0 13.8 13.6	35.3 18.1 18.3	— 5.8 5.7	54.7 62.3 62.4	4.1 9.4 9.2
No. 2 Cu Cu+Ty	6.0 15.2 14.0	43.8 22.0 23.0	2.9 4.5 4.6	47.3 58.3 58.4	3.8 8.0 8.0
No. 3 Cu Cu+Ty	5.4 9.6 12.8	55.5 41.7 41.8	4.0 4.9 4.8	35.1 43.8 40.6	2.4 3.8 3.8
No. 4 Cu Cu+Ty	6.8 10.5 10.0	56.7 42.1 42.5	2.4 3.4 3.4	34.1 44.0 44.1	2.3 3.9 4.0
No. 5 Cu+Ty	5.3 9.8	52.9 40.5	3.1 3.2	38.7 46.5	2.3 4.0
No. 6 Cu+Ty	8.8 13.0	48.6 37.2	2.8 4.3	39.8 45.5	2.5 4.2

認められる変化は現われなかつた。

c. 銅イオン並びにチロヂンを共に加えた場合

夫々を単独に加えた場合の成績は上述の如くであるが、続いて両者を共に加えた場合の影響について検討を行つた。加える銅イオン並びにチロヂンの濃度は最終濃度 $10^{-3}M$ に規正した。第12表はその実験成績を示したものである。

表に見られる如く、銅イオンとチロヂンを共に加えた場合に、H/M 値が増加し、それに伴う front-running I^{131} の増量と、moniodotyrosine I^{131} の増加が認められた。しかし表に対比して示した如く、夫々の部分の増加は銅イオンを単独に加えた場合の成績とは、本質的には全然変らない。

ペーパークロマトグラフィーによる基本的解析の実験成績から次の結論が得られた。

甲状腺ホルモンがセロファン膜を通して沃素イオンの濃縮を行なうとき、その主役を演ずるものは、pH 4.5 等電点沈澱蛋白質である。濃縮された沃素イオンはこの蛋白分割と結合した状態にあるが、醋酸ブタノールを溶媒として展開すれば front の位置に現われる。蛋白分割の濃縮活性、即ち H/M に平行して、front-running の沃素イオンは増減するが、銅イオンは濃縮活性を促進し、同時に moniodotyrosine 部分の生成にも関与する。しかしチロヂン単独では何れの作用にも影響を及ぼさない。又銅イオン、チロヂン両者を共に作用させた場合、その影響は銅イオンを

単独に用いたときと同等の成績を示す。

ii. 抗甲状腺剤を作用させた場合の解析

抗甲状腺剤が甲状腺ホルモン沃素イオン濃縮作用を阻害することは既に明らかであるが、濃縮作用即ち front-running substance の消長と阻害作用の関係を見るために、次の如き実験を行つた。

即ち各種の抗甲状腺剤の段階的稀釈液を作り、夫々の実験系に加えて、 $37^{\circ}C$ 、2時間、incubate 法を行ない、反応終了後、各々について醋酸ブタノール溶媒を用いたペーパークロマトグラフィーを行ない、その分析像を比較検討した。

第13表並びに前述の第8表から観察されるように、抗甲状腺剤の作用はホルモンの沃素イオン濃縮活性、即ち H/M を阻害し、その段階的稀釈液の作用は f.r.s. の消長と平行している。H/M は 1.0 になると f.r.s. は消失し、次第に活性が回復すると共に、f.r.s. の量は増加する。moniodotyrosine の部分は f.r.s. が現われると証明されるようになる。但し、何れの薬剤を用いても f.r.s. が証明されずに moniodotyrosine の証明されることはなかつた。moniodotyrosine の証明される場合の消長を第14表に示した。

次に抗甲状腺剤の作用を綜括的に述べると、Methiocil, Thiourea は $10^{-4}M$ の濃度において、透析平行法の沃素濃縮活性を完全に阻止し、それを $37^{\circ}C$ 、2時間 incubate 法で行なうと f.r.s. は消失している。

KCNS は $10^{-2}M$ で、PAS, PABA も $10^{-2}M$ 、又

第13表 抗甲状腺剤と f.r.s.- I^{131} の消長のペーパークロマトグラフィー ($37^{\circ}C$, 2 hrs, Incubate)

	$10^{-7}M$	$10^{-6}M$	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Paper Chromatography	f.r.s. I^{131}	f.r.s. I^{131}	f.r.s. I^{131}	f.r.s. I^{131}	f.r.s. I^{131}	f.r.s. I^{131}
	inorg. I^{131}	inorg. I^{131}	inorg. I^{131}	inorg. I^{131}	inorg. I^{131}	inorg. I^{131}
Methiocil	53.7%	10.5%	4.1%	0%	0%	0%
	26.7%	80.5%	94.8%	100%	100%	100%
Thiourea	48.2	11.5	0.5	0	0	0
	38.1	88.2	99	100	100	100
K.C.N.S	42.0	32.3	29.0	12.0	0.5	0
	55.2	65.5	70.0	86.0	99.0	100
PAS	43.0	12.3	15.0	0	0	0
	56.0	85.0	82.0	100	100	100
P.A.B.A	45.0	32.0	15.5	6.0	0.5	0
	42.0	64.5	80.1	93.0	99	100
Silver-acetate	49.2	39.0	1.0	0	0	0
	42.0	59.5	98.0	100	100	100
Mercuri-acetat	50.2	38.2	1.09	0	0	0
	42.0	60.0	8.2	100	100	100

第14表 Monoiodotyrosine の消長と抗甲状腺剤 (37°C, 2 hrs, Incubate)

P.A.B.A				醋 酸 銀			
	Inorganic I ¹³¹ (%)	Monoiodo-tyrosine I ¹³¹	f.r.s. I ¹³¹		Inorganic I ¹³¹	Monoiodo-tyrosine I ¹³¹	f.r.s. I ¹³¹
対照	58	4.0	30	対照	44.5	5.6	49.7
10 ⁻⁶	72	4.1	20	10 ⁻⁷	49.5	5.0	38.1
10 ⁻⁵	80	4.0	11	10 ⁻⁶	49.4	5.0	38.2
10 ⁻⁴	70	1.0	28	10 ⁻⁵	52.9	3.1	38.0
10 ⁻³	91	以下	8	10 ⁻⁴	100	/	/

アニリン, 醋酸銀, 醋酸水銀等は 10⁻⁴M で完全に透析平行法の濃縮活性を阻害し, 37°C, 2時間 incubate法の f.r.s. 出現を抑える. 濃縮活性が回復すると f.r.s. が現われ, 同時に monoiodotyrosine も現われる.

従つて, 抗甲状腺剤は甲状腺ホモジエネートの pH 4.5 等電点沈澱蛋白分割が沃素イオンを結合する能力を阻害すると結論することが出来る. この事実は逆に, 蛋白分割が結合している I¹³¹ の恐らくその大部分は front-running substance I¹³¹ として表わし得る形で存在することを意味する. 何故ならば F.r.S. が消失したとき, それ以外に証明される I¹³¹ のすべては inorganic の形で存在するからである.

9) 透析平衡法による実験成績の小括

甲状腺ホモジエネートがセロファン膜を通して沃素イオンを濃縮し得ることが確かめられた. 濃縮作用を現わすためには種々の条件が関与するが, pH 7.6, 1/10N 磷酸緩衝液を用い, 3°C, 24時間透析平衡を行った場合に最高の活性度を示す. 種々の金属イオンのうち, 銅イオンは甲状腺ホモジエネートの沃素濃縮作用を著しく促進するが, 他の金属イオンには促進作用が認められない.

等電点沈澱法を用いて甲状腺ホモジエネートの濃縮作用を営む分割が遂究せられ, pH 4.5 等電点沈澱蛋白質の分割にあることが見出された. pH 4.5 等電点沈澱蛋白質による沃素イオン濃縮作用は, pH, 温度, 平衡時間等によつて影響されるが, そのときの成績は甲状腺ホモジエネートの成績と一致し, 銅イオンによつて著しく促進される.

等電点沈澱法の操作成績から, 甲状腺ホモジエネート中に生体内阻害物質の存在が見出され, それは水に対して透析を行なうによつてホモジエネートから除去することが出来る. 甲状腺ホモジエネート中の生体内阻害剤の存在は一定しない.

種々の抗甲状腺剤は甲状腺ホモジエネート, 換言すれば, pH 4.5 等電点沈澱蛋白質の沃素イオン濃縮活

性を阻害する.

ペーパークロマトグラフィーを用いて, 濃縮された沃素イオンの存在状態を分析すると inorganic, monoiodotyrosine, front-running substance の3者に大別される.

front-running substance は pH 4.5 等電点沈澱蛋白質の沃素イオン濃縮活性が高まると f.r.s. は増加し, 抗甲状腺剤によつて濃縮活性が阻害されると, 同時に f.r.s. も消失する. 又濃縮活性の復活と比例して現われる.

front-running substance として現われる沃素イオンは, 醋酸ブタノールで展開する前に, 水に対して透析を行つても流出して失われることはない. 又反応液を加水分解しないで展開したとき, 原点に止まる沃素イオンが加水分解後には f.r.s. の位置に現われて来るので, f.r.s. の沃素イオンは蛋白質と結合しているが, 醋酸ブタノールによつて比較的容易に蛋白質と切り離されるために, front の位置に流れるのであろう. 即ち, この沃素イオンは蛋白質の保有する基のうちで醋酸ブタノールによつて蛋白から切り離されて来る物質と結合した状態になっている (f.r.s.). 若し, lipoprotein をここに想定して, その lipid 基の部分に沃素イオンが結合しているとすれば, 醋酸ブタノールで展開を行なうとき, 沃素イオンを結合した lipid 部分が切り離され front の位置に現われて来る可能性がある.

2. front-running substance の抽出

醋酸ブタノールを溶媒として反応液をペーパークロマトグラフィーで検すると, front-running I¹³¹ として証明される分割は最先端へ流れる. この事実は f.r.s. I¹³¹ がブタノール易溶性であることを示している. そこで, n-ブタノールによる front-running substance I¹³¹ の抽出を試みた.

1) f.r.s.-I¹³¹ の抽出

甲状腺ホモジエネートの pH 4.5 等電点沈澱蛋白質に, I¹³¹ 並びに銅イオンを加えて, 37°C, 2時間反応

第15表 各層クロマトグラフィーによる分析

	Butanol			Water		
	inorganic I ¹³¹	Monoiodo- tyrosine I ¹³¹	Front-r-S I ¹³¹	inorganic I ¹³¹	Monoiodoty I ¹³¹	F.r.S. I ¹³¹
No. 1	42(%)	1	56(%)	98(%)	1	1(%)
No. 2	41	1	57	99	1	0.5
No. 3	38	0.5 (痕跡)	61	98.5	(痕跡)	1.0
No. 4	45	1	53	98	1	(痕跡)

させる、反応終了後反応液に、2~3ml のn-ブタノールを加えて充分に攪拌振盪する。10分間 3,000 r.p.m.にて遠心を行つた後、試験管を取り出して観察すると、3層に分離しているのが観察される。第1層は、帯黄色のブタノール層、第2層は蛋白質層、第3層は、軽く白濁する水層の3層から構成される。

ブタノール相、蛋白相、並びに水相の各々について、先ず定性的に放射能の有無を検査すると、3相共に I¹³¹ の存在することが認められた。それで各相に含まれる I¹³¹ の状態を検討するために、夫々の相について醋酸ブタノールを用いたペーパークロマトグラフィーを行つた(第15表)。

ブタノール相についての分析結果は、38~45%の inorganic I¹³¹ と 53~61% の front-running I¹³¹ の両者であつて、反応系に monoiodo-tyrosine I¹³¹ が存在すると、抽出操作中ブタノール相に僅かの量にとけ込んで来るものが証明された。しかるに、水相について証明出来る I¹³¹ の大部分は inorganic I¹³¹ で、front-running I¹³¹ は 1% 或いはそれ以下であつた。蛋白質は、ブタノール抽出操作中凝固し、ペーパークロマトグラフに適用出来なかつた。蛋白部分の成績は表示されていないが、front-running I¹³¹ は殆んど完全にブタノールによつて抽出されることが明らかとなつた。抽出操作後、ブタノールは黄に帯色するか黄色が増加すると I¹³¹ のパーセントの増えるのが認められた。

ブタノールに抽出された f.r.s. I¹³¹ 分劃をブタノールが完全に流出する迄、大量の蒸溜水によつて透析を行なうと、ブタノールに置換した水相中に、僅かに黄色に着色した絮状物質の浮游するのを認めた。絮状物質を含む液を濾紙を用いて濾過し、濾液と濾紙上物質の夫々についてその放射能を検すると、濾液には放射能が殆んど認められず、濾紙上に全部の放射能が計数された。即ち、ブタノールに抽出された f.r.s.-I¹³¹ を透析する。ブタノールは水と置換されるが、f.r.s.-I¹³¹ は絮状物質として透析膜内に浮游し、膜外に行かないことが明らかとなつた。濾過後、濾紙を乾燥して再びブタノールで抽出し、そのブタノールについて放

射能を測定すると、I¹³¹ の存在が明らかであるので、これについてペーパークロマトグラフィーを行つた。展開終了後 I¹³¹ の分析行なうと、放射能は front の位置にのみ著明に証明され、その他の如何なる部位にも放射能の存在は認められなかつた。

透析膜中の絮状物質を含んだ水相液にブタノールを加えて再抽出を行なうと、振盪後、分離して来る水相には既に絮状物質は認められず、ブタノール相は黄色に着色している。両者を夫々展開して放射能を分析すると、水相には放射能がなく、ブタノールには front の位置にのみ放射能を証明し、ブタノールによつて容易に水から再抽出されることが明らかとなつた。これ迄の操作の結果によつて次の如くに結論が下された。

37°C, 2時間 incubate 法の反応終了後、反応液にブタノールを加え充分に振盪して遠心分離する。分離した第1回ブタノール抽出液を水に対して透析を行ない、ブタノールが完全に水と置換すると絮状物質が生ずる。これに再びブタノールを加え第2回の抽出を行なうと、絮状物質に容易にしかも完全にブタノール相に移行する。かくして front-running substance-I¹³¹ のブタノール抽出液が得られる。

透析平衡法を行つた場合の反応液からも同様にしてブタノール抽出液が得られるが、前者に比し、この方法は反応に長時間を要する。

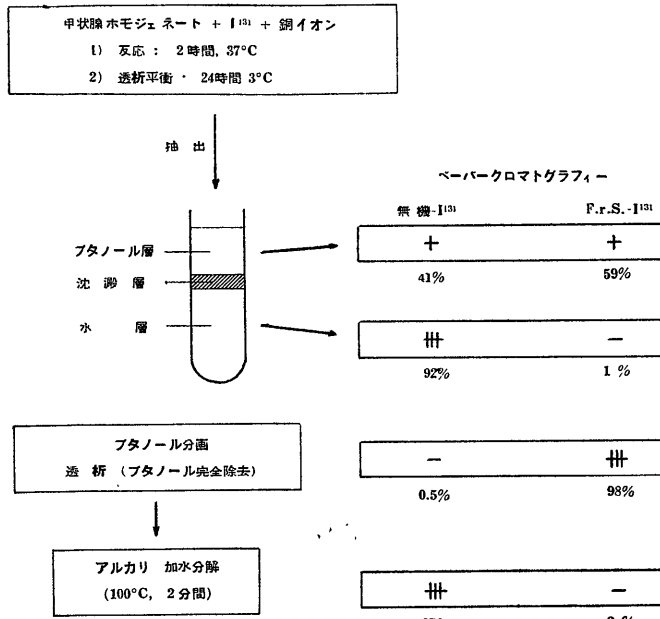
37°C, 2時間 incubate 法、或いは 3°C, 24時間、透析平衡法による反応液から front-running substance をブタノールを用いて抽出する手続を各段階における抽出液のペーパークロマトグラフィーの成績を加味して、第9図に示した。

2) 抽出方法に対する検討

甲状腺ホモジエネート或いはその pH 4.5 等電点沈澱蛋白分劃から、f.r.s.-I¹³¹ を抽出するために、ブタノールを用いたが、その他の溶媒、エチルアルコール、エーテル、クロロホルム、アセトン等についても、その抽出能力を検してブタノールの抽出力と比較した。

先ずブタノールを用いて f.r.s.-I¹³¹ の第1回抽出を

第9図 f.r.s. の抽出



行ない、水に対して透析し、絮状物質の形とし、絮状物質について各々の抽出力を試験した。溶媒のうち水に溶解し、分離しないものがあるので、絮状物質を濾過し、乾燥して f.r.s.-I¹³¹ の固着した濾紙を材料として、それを充分量の溶媒に浸し、1 分間後取り出して濾紙上の残存放射能を測定した。

残存量は、ブタノールに最少、エーテル、アセトン、クロロホルム、エチルアルコールの順に増加し、又、エチルアルコール、エーテル混液を加えても完全に溶解しなかつた。即ち抽出液としてはn-ブタノールが最良であることが明らかとなつた。

3) 抽出 f.r.s. の沃素イオン濃縮活性

I¹³¹ を加えて反応させた後にブタノールで抽出する

のと同様な方法によつて、未反応活性溶液からブタノール抽出を行ない、水に対して透析すると、外見上全く同一の絮状物質の沃素イオンとの反応能力を検討した。

第16表の如くに、f.r.s. ブタノール抽出液、絮状物質浮游液、10°C、5 分間で濃縮活性を失つた甲状腺ホモジネートに絮状物質を浮游させた液等を用いて夫々 37°C、2 時間反応させ、そのペーパークロマトグラフィーを検討したが、何れの場合にも f.r.s.-I¹³¹ を証明することが出来なかつた。以上の反応を透析反応法で行つても結果は同じく否定的であつた。f.r.s. 抽出操作中、出いた溶液の蛋白質はブタノールによつて凝固変性を起こし、絮状物質を加えた場合の濃縮力の回復、非回復は追求することが出来なかつた。

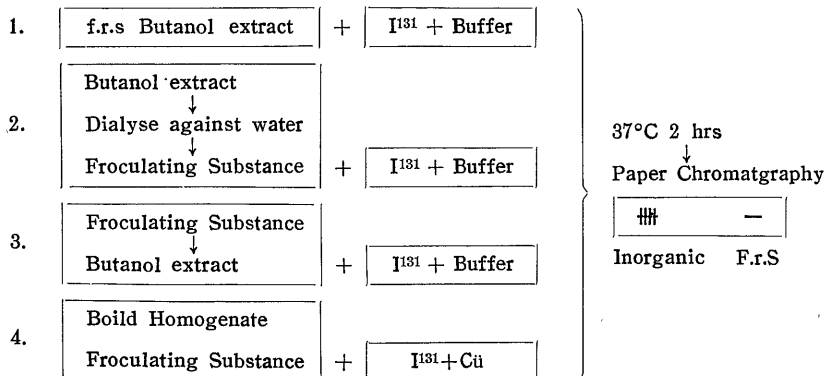
以上の成績から、ブタノールによつて抽出された f.r.s. は、それ単独では沃素イオンを結合する能力を有しないと結論することが出来る。

4) 小 括

甲状腺ホモジネートの沃素イオン濃縮作用に対する追究は、pH 4.5 等電点沈澱蛋白分割の分離を導き、本実験においては、pH 4.5 等電点沈澱蛋白質にとりこまれた沃素イオン結合物質、即ち f.r.s. を絮状物質として単離し得る段階に達した。

セロファン膜を通してホモジネートにとりこまれた沃素イオンは、平衡状態に達して無機の状態にあるもの以外は殆んど大部分のものが、pH 4.5 等電点蛋白分割と結合した状態にある、蛋白に結合した状態に

第16表 f.r.s. の沃素イオン結合力の検定



あるこの沃素イオンは、ペーパークロマトで front の位置に流れる物質、所謂 front-running substance に含まれ、ブタノールによつて容易に蛋白分割から f.r.s.- I^{131} の形で抽出される。

3. front-running substance の染色

front-running substance が代表的な脂肪溶媒であるブタノールに極めて容易に溶ける点から、この物質は脂質か、それに類する物質の可能性がある。かかる想定の下に、脂質、並びに脂肪酸を中心とする発色反応を次の如くに行つた。

甲状腺ホモジエネートからブタノールで抽出される f.r.s. を発色用試料として用いたのであるが、等電点沈澱操作中、上清に含まれて来る種々の物質が予め除去出来る利点があるので、pH 4.5 等電点沈澱分割から第 1 回目のブタノール抽出を行なうようにした。

第 1 回ブタノール抽出液を水で透析して絮状物質として、第 2 回目の抽出を行つた。第 2 回目のブタノール抽出液を、醋酸ブタノールを溶媒としたペーパークロマトグラフにて展開し、乾燥した後発色させた。

抽出に用いる n-ブタノールにしばしば含まれて来る脂肪酸が発色反応に障害を及ぼすことがある故、試薬として用いるブタノールは、10% NaOH 液を加えて振盪後、発生する沈澱物質を分別して蒸溜したものをを用いた。

1) B.P.B. 染色

a) B.P.B. 蛋白確認試薬

i. 組 成

B.P.B. 蛋白確認試薬は濾紙電気泳動法の結果の解析に不可欠の染色液で、その組成は第 1 章、実験方法に述べた。

ii. 染色方法

濾紙を染色液に 15~20 分入れて取り出し、2% の醋酸溶液にて数回洗滌した後、乾燥。

iii. 染色の結果

甲状腺ホモジエネートを展開した濾紙は、この染色にて原液のみが発色し、その他の部分には発色点を見ない。 I^{131} でラベルしたホモジエネートを用いて I^{131} の証明出来る f.r.s. の部分に発色は見られない。

甲状腺ホモジエネートそれ自体を展開させた場合、溶媒として醋酸ブタノールが用いられているので、蛋白質は凝固し、或いは濾紙に吸着して、原点に止まるのは当然である。

front の部位のこの染色液に対する態度から、f.r.s. が既に蛋白質分割から離れたものであると結論することが出来る。

ペロナール緩衝液による甲状腺ホモジエネートの電

気泳動的解析像は別項に詳しく述べられるが、B.P.B. 蛋白確認試薬によつて、6~7 の蛋白分割に分かれることが確認された。しかし、 I^{131} を利用すると、醋酸ブタノールで展開したものは、原点に蛋白分割はとどまるが、 I^{131} 即ち f.r.s.- I^{131} は front に流れて、明らかに蛋白分割から離れて来るにも拘らず、電気泳動では、6~7 に分かれる蛋白分割のうち、原点にとどまる蛋白分割以外に I^{131} を証明することが出来なかつた。この事実は共に存在することを意味する。

pH 4.5 等電点沈澱蛋白質を展開したものは、甲状腺ホモジエネートの場合と同様であつたが、電気泳動法の解析像は、ホモジエネートの場合とは異なつた。

即ち、原点にとどまる蛋白分割以外には、B.P.B. 蛋白試薬に染まる蛋白分割が存在せず、 I^{131} を利用すると原点の蛋白分割に放射能証明せられた。

以上の成績から、f.r.s. は B.P.B. 蛋白確認試薬によつては染まらないことが明らかになつた。

b) B.P.B. 脂肪酸染色

f.r.s. が蛋白確認試薬で染まらないことが明らかになつたので、蛋白分割の影響を除き成績判定を単純化するために、f.r.s. のブタノール抽出物を試料とし、同時に I^{131} を利用して f.r.s. の濾紙上の位置を確かめながら、脂肪並びに脂肪酸染色液に対する染色態度を検討した。

i. B.P.B. 脂肪酸染色液の組成

Bromphenol blue の 0.64% エチルアルコール溶液、溶解後クエン酸で pH 5.0 に調製する。

ii. 染色方法

ペーパークロマトにて展開後乾燥した濾紙を 5~10 分間染色液につけて乾燥する。

iii. 染色の結果

醋酸ブタノールで展開した濾紙はこの染色液に対して、濾紙全体が強く黄染した。これは判定を非常に困難にする。

濾紙全体の強い着色による判定の困難性を排除するために、種々の染色液で展開後染め出される部分が f.r.s. であることを確認し易いよう、試料を原点につけて乾燥し、展開に先立つてこの濾紙を染める。試料スポットが試薬に呈する色とを比較すると判定が正確となる。

試料スポットの場合、B.P.B. アルコール溶液に対して帯緑青色に鮮かに染まつた。しかし、上述の如く展開したものは濾紙全体の黄染が強く、充分乾燥した後に淡く緑色に染まることがあつたが、確認出来る程のものではなかつた。

2) B.T.B. 脂肪酸染色

i. 組成

Bromthymol blue の 0.04% の水溶液, 溶解後, 苛性ソーダにて pH 7.5 とする.

ii. 染色方法

濾紙を 5 分間染色液に入れて取り出し乾燥.

iii. 染色の結果

B.T.B. 水溶液に対して, 試料スポットは黄色に染まり, 展開した後も, 濾紙全体の緑の地色内に, **front** の位置に一致して黄染する部分が明瞭に認められた.

3) **B.C.P.** 脂肪酸染色

i. 組成

Bromcresol purple の 0.04% ホルマリン, エタノール (1:5 volume) 溶液, 溶解後, 0.1N 苛性ソーダにて pH 5.0 に調整する.

ii. 染色方法

濾紙を 5 分間染色液に入れて取り出し乾燥.

iii. 染色の結果

B.C.P. ホルマリン, エタノール溶液に対して, 試料スポットは帯緑黄色に染まるが, 展開後には, 濾紙全体が強く緑黄色に染まるので, **front** の位置に濃淡の差を認めることが出来なかつた.

4) **Sudan III, Sudan black** 染色

i. 組成

Sudan III 並びに **Sudan black** のアルコール飽和溶液.

ii. 染色方法

濾紙を 5 分間染色液に入れて取り出し乾燥する.

iii. 染色の結果

Sudan III, Sudan black のアルコール溶液に対して, 試料スポットは夫々帯黄紅色, 黒色に染まり, 又 **Sudan III** の場合は展開後にも, **front** の位置に一致して, ペーパー全体の染度に比して明らかに強く紅色に染まる部分が認められた.

5) アンモニア性硝酸銀並びに **P.A.S.** 反応, **P.A.S.** 反応

非常に鋭敏に反応する. 展開後の濾紙を反応液に入れると, **front** の位置に一致して直ちに色が現われた. 長時間反応させると濾紙全体が強く鮮紫紅色に染まり **front** の位置が確認出来なくなつた.

アンモニア性硝酸銀

アンモニア性硝酸銀に対して, 試料スポットは乾燥後 100°C 5 分間で明らかに黒褐色を呈する場合と, 時には逆に濾紙が黒変しても試料スポットが白し残る場合とがあつたが, 展開後には **front** の位置に限定された発色を見出すことが出来なかつた.

6) 小括

醋酸ブタノールを溶媒としたペーパークロマトグラフを利用すると, 甲状腺ホモジネートは展開後 **B.P.B.** 蛋白確認試薬によつて原点の位置のみが染め出され, **front** の位置には発色が見られなかつた.

pH 4.5 等電点沈澱蛋白質を展開した場合も蛋白確認試薬に対する成績は同一であつた.

濾紙電気泳動法で展開を行なうと, 甲状腺ホモジネートは **B.P.B.** 蛋白確認試薬によつて, 6~7 の分割に分かれることが確かめられた. しかるに pH 4.5 等電点沈澱蛋白分割は展開後にも原点から泳動しないことが蛋白試薬によつて明らかになつた.

f.r.s. はペーパークロマトグラフィでは **front** の位置に流れて来るが, 電気泳動法では原点の位置の蛋白分割, 即ち pH 4.5 等電点蛋白分割と共に泳動しなかつた.

ブタノールでかくも容易に抽出される **f.r.s.** に脂肪酸, 或いは脂肪の染色反応を行なうと, **Sudan III, Sudan black** 等の脂肪染色に対して陽性の成績が得られた. 又脂肪酸染色, 即ち **B.P.B.-**アルコール溶液, **B.T.B.-**水溶液, **BCP-**ホルマリン・アルコール溶液に対して試料スポットは何れも明瞭に陽性の染色態度を示した.

代表的糖反応の一種であるアンモニア性硝酸銀に対しては不定の反応を示したので, 還元基の存在を論ずることが出来なかつたが, **P.A.S.** 反応には強陽性に強く反応した.

以上の実験成績から, **f.r.s.** は脂質に類する物質であること, 又同時に還元作用基を有する物質であると結論することが出来た.

f.r.s. は pH 4.5 等電点沈澱蛋白質と共に存在した状態, 即ち **protein-f.r.s.** の状態で, 始めて沃素イオン濃縮活性を発揮する. 而して濃縮された沃素イオンは, **protein-f.r.s.-I** の形で存在する. ブタノールで抽出すると **f.r.s.-I** の形で容易に **protein** から離れて来る.

f.r.s. がブタノールに易容性で水には溶けず, 油脂性の架状物質を形成し, 脂肪酸, 並びに脂肪呈色反応に対して陽性なる成績から, **f.r.s.** に脂質に類する物質 (**lipo-**) の性格を附与することが出来るので, 原蛋白質と結合した状態, 即ち **protein-f.r.s.** を次のように書き直すことが出来る.

pH 4.5 等電点沈澱蛋白質は **lipo-protein** である.

更に **f.r.s.** の **P.A.S.** 反応に対する成績から **f.r.s.** に還元基, 即ち糖質の存在を想定するなれば, **protein-f.r.s.** を総称して, **glyco-lipo-protein** と呼ぶことが可能であろう.

4. 濾紙電気泳動による解析

甲状腺ホモジエネートの沃素イオン濃縮作用を透析平衡法, 37°C 2時間 incubate 法, 並びにクロマトグラフィー等を応用して種々検討し, 解析を加え, 色々の成績を得ることが出来たが, 更に濾紙電気泳動法を行ない, その主役蛋白分割の解明を試みた。

濾紙電気泳動法に用いた, 定電流定電圧発生装置, 濾紙, 緩衝液, 並びに実験の実施方法等については, 既に実験材料並びに実験方法の項において詳述した通りであるが, 電気泳動に関する全操作は, すべて 3°C の氷室内において実施した。

電気泳動による実験成績を次に述べる。

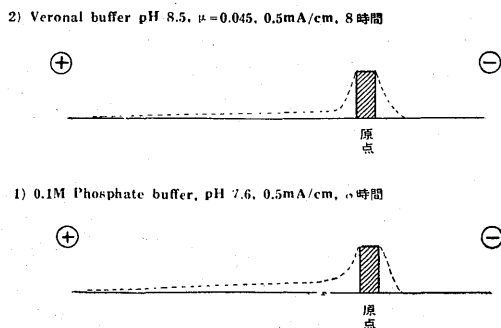
まず最初に磷酸緩衝液による電気泳動を試みたが, 電流を通ずる条件を色々に変えて見ても試料の分離状態が極めて悪く, 原点より陽極に向う少量の蛋白分割の流れを認めるのみで, 大部分の蛋白は原点にとどまった。通電時間を延長し, 電流を強めても, 流れる少量の蛋白分割の泳動距離が僅かに延びるのみであった。

従つて蛋白の電気泳動に一般的によく利用されるペロナール緩衝液を使用することにした。最初に使用したペロナール緩衝液の組成は, 次のもの即ち

Veronal-曹達	8.82 gr	} 蒸溜水にて2立と する。 pH8.5 μ=0.045
醋酸曹達	4.68 gr	
N/10 醋酸	80.8 ml	

を用いた。しかし, このペロナール緩衝液を用いても, 磷酸緩衝液と同様の解析像しか得られず, 最終的には実験方法の項に述べたペロナール緩衝液を用いて好結果を得た。

第 10 図

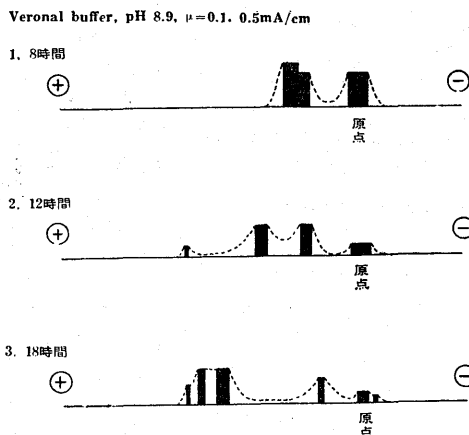


1) 甲状腺ホモジエネートの濾紙電気泳動

甲状腺ホモジエネートのペロナール緩衝液による電気泳動の結果は, 第12図がその典型的解析像である。

甲状腺ホモジエネートは電気泳動法に用いられる一般的な通電時間, 即ち 7~8 時間では, 僅かに分割の移

第11図 甲状腺ホモジエネートの濾紙電気泳動による蛋白分割

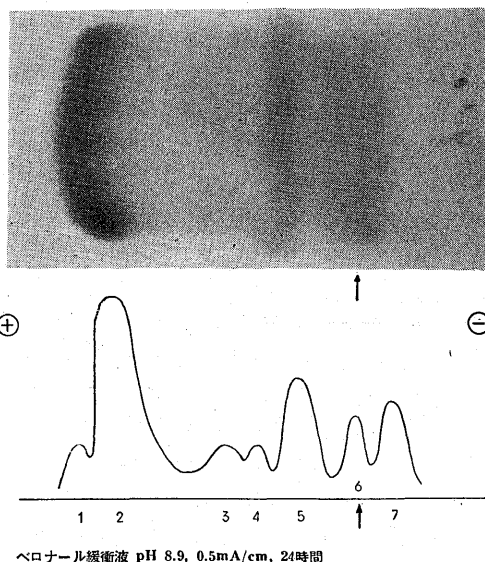


動が見られる程度で, 解析に供することは出来なかつた。通電時間を延長する, それと平行して移動する距離も延長し, 12~16時間の通電でその移動距離は概ね 6~7cm の長さ達し, 分割の状態が幾分明瞭となつて来た。20~24時間にして始めて最良の分離像が得られ解析に供することが出来た。第11図は通電時間差による分離状態を 8時間, 12時間, 18時間の 3つの場合について比較したものである。

甲状腺ホモジエネートの典型的解析像は, 第12図の如く, 20~24時間の通電にて始めて得られたが, 分離されて来る蛋白分割を検討すると次の如くである。

即ち陽極に最も近く蛋白確認試薬 B.P.B. に淡く染まる分割 (1); 続いてそれに接して極めて濃厚に染ま

第12図 甲状腺ホモジエネートの濾紙電気泳動像



る分劃 (2); 少し離れて原点に近く非常に淡く染まる分劃 (3); (4); 及び原点に接して中等度に染まる分劃 (5); 原点にとどまる分劃 (6); 最後に, 原点に接して陰極側に染まる唯一の分劃 (7); の各分劃を解析することが出来た。

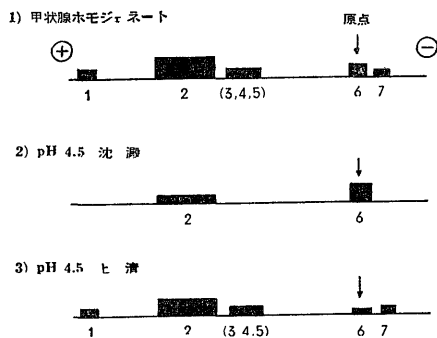
2) pH 4.5 等電点沈澱蛋白の電気泳動

ペロナール緩衝液を用いた濾紙電気泳動法によつて得られた甲状腺ホモジエネートの各分劃は更に次の順序によつて分析が進められた。

沃素イオン濃縮に主要なる役割を演ずる pH 4.5 等電点沈澱蛋白質が, 果して何れの分劃に属するものであるかを解明するために次のような方法を試みた。

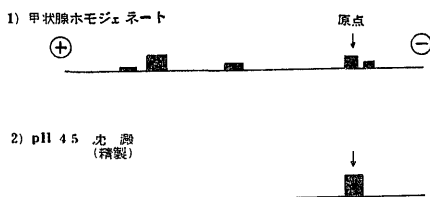
即ち, 1 枚の濾紙上に甲状腺ホモジエネート, pH 4.5 等電点沈澱蛋白質, 並びにその上清を並べて原点に着けて電気泳動法を行つた。この方法によつて得られた電気泳動像は第13図に示す如くであつて, 次の如く解析することが出来た。

第13図 甲状腺ホモジエネートと pH 4.5 により沈澱及び上清との比較 (ペロナール緩衝液: No. 2, pH 8.9, 24時間)



第14図 甲状腺ホモジエネートと精製した pH 4.5 沈澱の比較

(ペロナール緩衝液: No. 2, pH 8.9, 24時間)



pH 4.5 等電沈澱蛋白質の電気泳動像を甲状腺ホモジエネートの泳動像と比較すると, (2) と (6) の分劃のみが認められ, それ以外の分劃は消失し, しかも (2) の分劃は極めて淡い。一方上清の像には (1, 2, 3, 4, 5) と (6) に淡く, (7) の各分劃が認められ

た。

pH 4.5 等電点沈澱蛋白質を 2~3 回洗滌すると, その泳動像は第14図の如く, 甲状腺ホモジエネートに認められる (1), (2), (3), (4), (5) 及び (7) の各分劃は消失しており, (6) の分劃, 即ち原点から移動しない分劃のみとなつた。

甲状腺ホモジエネートの電気泳動的解析によつて, 甲状腺ホモジエネートは 6~7 の分劃に分かれるが, 沃素イオン濃縮活性を保有する pH 4.5 等電点沈澱蛋白質は, pH 8.6 ペロナール緩衝液を用いた電気泳動では, 原点の位置より移動しない蛋白分劃であることが明らかになつた。

3) I^{131} を利用した甲状腺濾紙電気泳動

pH 8.9 ペロナール緩衝液を用いて行つた甲状腺ホモジエネート及び pH 4.5 等電点沈澱蛋白質の電気泳動の結果を, 放射性沃度 I^{131} を加えて反応させた液を用いて更に詳しく分析した。

分析に供した試料は, 透析平衡法, 並びに, 37°C, 2 時間, incubate 法を用いて反応させ, 反応終了後の試料を 12 時間, ペロナール緩衝液で透析したものをを用いた。

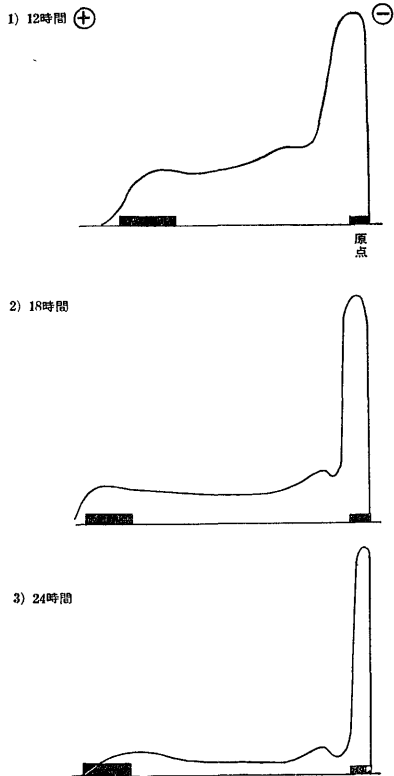
20~24 時間電気泳動した後, 直ちに濾紙を乾燥して, 原線の中央から縦に切断する。一片は蛋白確認試薬 B.P.B. にて染色し, 現われる分劃と対比しながら, 染色しない他の一片の I^{131} の放射能を測定した。染色したものの放射能が, 非染色濾紙の放射能に比して染色操作中殆んど失われることのないことが判明したので, 染色後, 電気泳動にて分けられる各分劃毎に正確に切断し, その部分の放射能をも検した。

上述の実験方法によつて得られた成績は, 第15図の通りであつた。この時には泳動像が甲状腺ホモジエネートが反応以前に示すような明瞭な分劃に分かれなかつたが, 解析には支障がなかつた。

反応液を展開し, 乾燥後 B.P.B. で染色すると泳動した各分劃が現われる。各分劃の放射能を計測すると, 原点にとどまる蛋白分劃が最高のカウントを示した。pH 4.5 等電点沈澱蛋白質を反応液として展開すると, 原点のみに放射能が認められたので, 沃素イオン濃縮に主役を演ずる pH 4.5 等電点沈澱蛋白が, ペロナール緩衝液による電気泳動法では原点にとどまること, 同時にこの蛋白分劃にセロファン膜を通してとりこまれた沃素イオンが結合していることが再確認された。

甲状腺ホモジエネートは, 分劃 (6) によつて強く沃素イオンを濃縮していることが, 上述の実験成績の解析から明らかになつたが第15図に見られる如く,

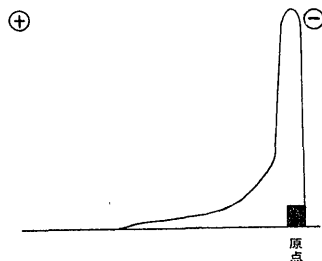
第15図 甲状腺ホモジネート + Cu⁺⁺ + Tyrosine
+ I¹³¹ → 36°C, 2時間反応 → 濾紙電気泳動
(ペロナール緩衝液: No. 2, 0.5mA/cm)



(6) 以外の分割にも僅かの放射能が認められた。これらの沃素イオンが単なる吸着か、或いは有機的結合をしたものかは実験的には明らかにされなかつたが、これ迄の実験成績から単なる蛋白質による吸着と断定しても大なる間違いはないと思われる。

2~3回洗滌した後、電気泳動を行なうと等電点沈澱蛋白質が濃縮した沃素イオンを蛋白質と一致して証明することが出来る(第16図)。

第16図 pH 4.5 沈澱 + Cu⁺⁺ + Tyrosine + I¹³¹ →
37°C, 2時間反応 → 濾紙電気泳動
(ペロナール緩衝液: No. 2, 0.5mA/cm, 18時間)



4) f.r.s. の濾紙電気泳動

f.r.s. を保有する蛋白分割が原点より移動せず、それが pH 4.5 等電点沈澱蛋白質であることが明らかにされたが、この分割を更に、電気泳動的に分別しようとの試みを色々な条件下に行つた。

2~3回洗滌した pH 4.5 等電点沈澱蛋白質を試料として、通電時間、電圧、電流強度、緩衝液常を色々に変化、組合せて電気泳動を行つたが、この蛋白分割を原点より移動させること、又更に細かい分割に分けることはことごとく不可能であつた。このとき I¹³¹ にてラベルした f.r.s. の行動をも同時に追究したが、常に蛋白分割と共にあることが明らかになつた。

唯1例、ペーパークロマトグラフを用いて front-running substance 発見の動機となつた醋酸ブタノールを通電溶媒として用いたときに、原点より僅かに陽性側に放射能の存在を認めたがこのとき、電圧を 400 Volt にあげても濾紙幅 1cm 当り 0.1mA 以上の電流を通ずることが困難であつた。これを B.P.B. 蛋白試薬で染色すると、原点は青に強く染まつて蛋白質の存在することを示し、放射能の認められる部分は黄染した。この成績は、一応、f.r.s. が蛋白から離れたことを意味するが、f.r.s. が電気泳動によつて本当に蛋白質から離れて来たものと結論することは困難であつた。何故なれば、I¹³¹ を証明し、B.P.B. で染め出された部分が原点に非常に近く存在して、しかもスポットの形が原線上の蛋白分割と平行した状態に存在せず、不規則であつた。それは何如にも醋酸ブタノールを浸した濾紙上に pH 4.5 蛋白質を着けたとき、f.r.s. が濾紙のブタノール中に溶け込み広がつたような印象を与えた。

f.r.s. のブタノール抽出液を試料とし、f.r.s. 単独の電気泳動を行つたが、成績 pH 4.5 は等電点沈澱蛋白質の場合と同様であつた。

5) 吟味

種々の溶媒を用いた場合の電気泳動の成績から、沃素イオン濃縮作用を演ずる蛋白分割がそれ以上の細かい分割に更に分かれなかつたこと、並びに原点から何れの極側へも移動しないことが明らかになつたのであるが、この原因を蛋白質自体の電氣的性質に帰すべきか、或いは又、濾紙の蛋白質吸着現象による泳動の阻害に帰すべきかは未解決である。

濾紙による吸着が泳動阻害の主要原因であるか否かを検するために、澱粉を用いた電気泳動法を行つたが、常に原点の部分に活性が認められ、澱粉使用によつても原点から移動することがなかつた。

又、連続濾紙電気泳動法による分別も試みたが、結

論を下せるような満足すべき結果が得られなかつた。

6) 甲状腺ホモジエネートの各分劃が蛋白確認試薬 B.P.B. に示す染色態度

電気泳動終了後、蛋白分劃を確認するために、濾紙を B.P.B. 蛋白試薬で染めるときに、各分劃の試薬に対する染色態度に、注意を喚起される一つの事実があつた。

ペロナール緩衝液で電気泳動を行ない、分かれて来る各分劃は、乾燥した濾紙を B.P.B. 染色液に入れたとき、原点以外の分劃には直ちに染色液が浸透して染め出される。

しかるに、原点の分劃のみは最初に染色液をはじいて液が浸透せず、その部分に染色液が次第に浸み込んで行く状態が明らかに観察された。従つて、他の各分劃は染色開始直後から、B.P.B. に対して固有の色調を強めて行くが、原点の部分に染色液が完全に浸透する迄に数分間を要した。この時、原点は一度黄色に染まり、その後は次第に蛋白質の色調を現わしてその濃度が増加した。

この現象は、原点にとどまる蛋白分劃が疎水性の構成部分を保有していることを暗示する。ここにおいて、ブタノールに極めて溶け易く、醋酸ブタノールを用いたペーパークロマトグラフィーで、f.r.s. として証明される物質が想起される。

即ち、原点に止まる蛋白質に含まれる f.r.s. が、原点部分の染色態度を決定するのであろう。この想定を確認するために、pH 4.5 等電点沈澱蛋白質に I^{131} を結合させ、n-ブタノールで抽出した f.r.s. を試料として電気泳動を試みた。その結果 I^{131} は原点に証明され、最初、染色液をはじき、次第に浸透して20分後にはその部分が淡い青色に染まつた。しかして濾紙上に原点以外に染まる他の分劃も、又放射能をも見出さなかつたので、ブタノールで抽出される物質は f.r.s. のみであると結論することが出来た。この場合淡く染まるのは抽出中、同時に少しく溶け込む蛋白質であろう。この時、試料としてブタノール抽出 f.r.s. を水で透析して絮状物質とし、再びブタノールで抽出したものを流すと、原点には I^{131} が証明されても、B.P.B. 液に染まることはなかつたし、他の如何なる分劃も見出すことはなかつた。

かくして、甲状腺ホモジエネートの各分劃のうち、原点にとどまる pH 4.5 等電点沈澱蛋白質の B.P.B. 染色液に対する態度を決定するものが、その構成一部分としての f.r.s. であることが確かめられた。

又甲状腺ホモジエネート、或いは、pH 4.5 等電点沈澱蛋白質を試料として電気泳動を行つた場合に、疎

水性、脂溶性の構成部分即ち f.r.s. が影響を現わして、各分劃のうち、pH 4.5 等電点沈澱蛋白質と同定される分劃を原点にとどまらせるのであろう。このことは f.r.s. が電気泳動的にも、又一方、醋酸ブタノール以外を溶媒としたペーパークロマトグラフィーでも原点から動かない事実が証明する。

上述の実験成績から、沃素イオン濃縮に決定的な役割を演ずる f.r.s. が甲状腺ホモジエネート中の pH 4.5 等電点沈澱蛋白質の側鎖の構成分子であると結論づけることが出来た。

7) 小 括

0.1 μ pH 8.9 ペロナール緩衝液を用いて甲状腺ホモジエネート、pH 4.5 等電点沈澱蛋白質、並びに front-running substance の電気泳動を行つた。

甲状腺ホモジエネートは濾紙幅 1cm 当り、0.5mA、20~24 時間の電気泳動で 6~7 の蛋白分劃に分かれる。この分劃のうち、原点の位置にとどまる部分が、pH 4.5 等電点沈澱蛋白質であることが証明せられた。

放射性沃度 I^{131} を利用すると、電気泳動法によつても、セロファン膜を通じて甲状腺ホモジエネートによつて濃縮された沃素イオンが、pH 4.5 等電点沈澱蛋白質に結合していることが確認せられた。更に又、pH 4.5 等電点沈澱蛋白質と結合している沃素イオンは、醋酸ブタノールを用いたペーパークロマトグラフで front に流れる f.r.s. と結合しており、その f.r.s. が pH 4.5 等電点沈澱蛋白質の側鎖の構成部分であることが明らかとなつた。

電気泳動終了後、B.P.B. 蛋白確認試薬に対して各分劃の示す染色態度から、pH 4.5 等電点沈澱蛋白質の有する疎水性が、f.r.s. 単独の電気泳動の成績から、側鎖として有する f.r.s. の性質に基づくことが確認され、それが又、この蛋白質が電氣的に原点から動かない性質を助長していることを推定させる。f.r.s. が pH 4.5 等電点沈澱蛋白質の疎水性、並びに蛋白の電氣的性質を幾分左右するという成績は、ペーパークロマトグラフ及び、f.r.s. の抽出、染色等の項に亘つて論ぜられて来た f.r.s. が "lipo" であるとの想定を裏書きし、益々その確実性を附与する。

結 論

主として甲状腺ホモジエネートを用い、沃素イオン (I^{131}) と反応した後、醋酸ブタノール溶媒でペーパークロマトグラフィーを行つた際、溶媒前端に現われる沃素を含んだ物質、即ち f.r.s. について追究を進め、下記の結果を得た。

1. 透析平衡法によつて沃素イオンの濃縮能を検し、それが甲状腺に特異的であることを確認し、等電点沈電法により甲状腺ホモジエネートから強い濃縮能を示す分劃を分離し得た。又同時にこの濃縮能を阻害する物質が、そのホモジエネート中に存在することを見出した。

ここに分離した蛋白分劃を用いて、沃素イオンの濃縮能が、溶媒前端に現われる f.r.s. に起因することをいい得た。

2. f.r.s.-I¹³¹ 結合体を反応液から n-ブタノールで抽出し、絮状物質として取り出した。その性状は脂質に類し、沃素の結合状態は、NaOH アルカリで容易に解離することより、薄弱な結合であると判定した。

f.r.s.-I¹³¹ を抽出するのと同様な方法にて抽出した f.r.s. と沃素イオンを反応させても、もはや沃素イオンと結合する能方を有しなかつた。

3. ペーパークロマトグラフィで展開した後の f.r.s. の染色結果は、脂肪並びに脂肪酸染色に対し、明瞭に陽性であつた。

4. 甲状腺蛋白質を濾紙電気泳動法により泳動させて、それが 6~7 の分劃に分かれることを認めた。このうち沃素濃縮に関与する分劃は原点より泳動しない蛋白であつた。pH 4.5 で再度沈澱させて精製した蛋白分劃は、ほぼ単一に迄精製され、それは非泳動性の蛋白と一致した。沃素と反応させた後の沃動像と I¹³¹ の保有量は原点に一致して見られ、native な状態における、沃養濃縮に関与する物質は、f.r.s.-I¹³¹ として示される。lipid と蛋白が結合した状態の "lipo-protein" であることを推察させる。

最後に、この f.r.s. が Taurog 等が推論しているような、有機沃素形成の中間的な物質ではないことを証明した研究同人渡辺の成績を考慮に入れるならば、この物質が甲状腺の "iodine trap" に関与している可能性をより強固にする。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導並びに御快問を賜つた恩師石川教授並びに渡辺博士及び教室員諸兄に深甚な感謝の意を表する。

文 献

1) Reineke, E. P. : Vitamins and Hormons, Vol. 4, p. 207, New York, Academic Press Inc., 1946. 2) Harington, C. H. : The thyroid gland, p. 1, London, Oxford Univ. Press, 1938. 3) Oswald, A. : Z. physiol. Chem., 27, 14 (1899). 4) De Robertis, E. : Anat. Record., 80, 219 (1941). 5) Michel,

R. : Ann. Rev. Physiol., 18, 463 (1956). 6) Tong, W. Taurog, A. & Chaikoff, I. L. : J. Biol. Chem., 207, 59 (1954). 7) Yagi, Y., Michel, R. & Rock, J. : Bull. soc. chim. biol., 35, 289 (1953). 8) Shellabarger, C. J. & Lipton, L. I. : Am. Goiter Assoc. Ann. Meeting, Abstr., 6, 38 (1955). 9) Harington, C. R. & Barger, G. : Biochem. J., 21, 169 (1927). 10) Dempsey, E. W. : Endocrinol., 34, 27 (1944). 11) Dempsey, E. W. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 50, 336 (1949). 12) Fawcett, D. M. & Kirkwood, S. : J. Biol. Chem., 209, 249 (1954). 13) Roche, J., Michel, R. & Volpert, E. : Compt. rend. soc. biol., 148, 21 (1954). 14) McQuillan, M. T., Morton, R. K., Stanley, D. G. & Trikojus, V. M. : Nature, 173, 305 (1954). 15) Gross, J. & Pitt-Rivers, R. : Vitamins and Hormons, Vol. 11, p. 159, New York, Academic Press Inc., 1953. 16) Roche, J. Lissitzky, S. & Michel, R. : Biochim. et Biophys. Acta, 11, 220 (1953). 17) Roche, J., Michel, R. & Wolf, W. : Compt. rend., 240, 251 (1955). 18) Robbins, J., Peterman, M. L. & Rall, J. E. : J. Biol. Chem., 212, 403 (1955). 19) Freinker, N. & Ingbar, S. H. : J. Clin. Endocrinol. and Metabol., 15, 442 (1955). 20) Morton, M. E. & Chaikoff, I. L. : J. Biol. Chem., 147, 1 (1943). 21) Weiss, B. : J. Biol. Chem., 193, 509 (1951). 22) Weiss, B. : J. Biol. Chem., 201, 31 (1953). 23) Wyngaarden, J. B., Stanbury, J. B. & Du Toit, C. H. : J. Clin. Endocrinol. & Metabol., 11, 1259 (1951). 24) Wyngaarden, J. B. & Stanbury, J. B. : J. Biol. Chem., 212, 151 (1955). 25) Leblond, C. P. & Gross, J. : Endocrinol., 43, 306 (1948). 26) Gorbman, A., Lissitzky, S., Michel, R. & Roche, J. : Endocrinol., 51, 311 (1952). 27) Wollman, S. H. & Wodinsky, I. : Endocrinol., 56, 9 (1955). 28) Taurog, A., Chaikoff, I. L. & Tnog, W. : J. Biol. Chem., 178, 997 (1949). 29) Vanderlaan, J. E. & Vanderlaan, W. P. : Endocrinol., 40, 403 (1947). 30) Wyngaarden, A. : J. Clin. Endocrinol., 12, 1259 (1952).

- 31) **Taurog, A., Potter, G. D. & Chaikoff, I. L.** : J. Biol. Chem., **213**, 119 (1955).
- 32) **Fawcett, D. M. & Kirkwood, S.** : J. Biol. Chem., **205**, 795 (1953). 33) 佐竹一夫 : クロマトグラフィ, 67頁, 共立全書, 12, 第13版, 東京, 共立出版, 1956. 34) 小林茂三郎・村井京子 : 濾紙電気泳動法の実際 (森五彦・小林茂三郎編), 104頁, 東京, 南江堂, 1955. 35) **Astwood, E. B.** : J. Pharmacol. and Exp. Therap., **78**, 79 (1943). 36) **MacGavack, T. H.** : The Thyroid, p. 162, St. Louis, C. V. Mosby Co., 1951. 37) **Goodman, L. S. & Gilman, A.** : The Pharmacological Basis of Therapeutics, p. 1543, 2nd Edition, New York, McMillan Co., 1953. 38) **Astwood, E. B., Bissell, A. & Hughes, A. M.** : Endocrinol., **37**, 456 (1945). 39) **Stanley, M. M. & Astwood, E. B.** : Endocrinol., **41**, 66 (1947). 40) **Astwood, E. B.** : Ann. Int. Med., **30**, 1987 (1949). 41) **Wyngaarden, J. B., Stanbury, J. B. & Rapp, N.** : Endocrinol., **52**, 568 (1953).

Abstract

I have been able to prove that the iodine-concentrating function of thyroid tissue can be found also, *in vitro*, in the experiments using homogenate of the thyroid tissue, and this function is attributed to the specific protein fraction present in the homogenate. Furthermore I have investigated every sort of conditions influencing the function, and carried out the analytical studies on the binding state of iodine incorporated into this specific protein fraction, and concluded that the specific fraction is supposed to be a chemical substance different from the thyroid hormone, in another words, a substance prior to mono-iodo-tyrosine.

1. After confirming the specific iodine-concentrating function of homogenated thyroid tissue by means of the equilibrium technique, the specific fraction having strong iodine-concentrating power has been separated from the homogenate by means of isoelectric sedimentation.

In the homogenate, also, a substance which inhibits the accumulation of iodine has been obtained. In the paper chromatographic development of this separated protein fraction, a substance which is found on the anterior border of the developmental picture is supposed to cause the iodine concentrating function of thyroid tissue, and named "front running substance." (F.r.S.)

2. The F.r.S. tagged with ^{131}I can be extracted with butanol from the homogenate incubated with ^{131}I and obtained as flocky substance. The property of the F.r.S. is similar to fatty substances and its binding with iodine is considered to be loose because iodine can be easily dissociated in alkali solution with NaOH.

The extracted and refined F.r.S. can not incorporate iodine without the help of the homogenate.

3. The F.r.S. developed by means of paper chromatography reacts positively on the staining dyes for fat and fatty acid.

4. The protein of the thyroid tissue has been investigated by means of paper electrophoresis and can be divided into six or seven fractions. The fraction which is related with the iodine concentrating function of thyroid tissue do not migrate from the original point.

The protein fraction which is sedimentated at pH 4.5 and refined to be pure, corresponds with this non-migrating fraction.

In the electrophoretic picture of F.r.S. tagged with ^{131}I , ^{131}I is detected only around the original point.

Viewing from these experimental results, the substance which is related with the iodine-concentrating function of thyroid tissue is surmised to be a kind of lipo-protein.

Taking Watanabe's report into consideration that the F.r.S. can not be assumed as a intermediate substance in the process of the production of thyroid hormone against the conclusion of Taurog et al, the substance may play a important role in the mechanism of trapping iodine into thyroidal tissue.