脳内グルココルチコイドレセプターに 関する実験的研究

神戸大学医学部第三内科

(指導: 井村裕夫教授
藤田拓男教授)

坪 井 誠 吉

Studies on the Glucocorticoid Receptor in Rat Brain Cytosol

Seikichi TSUBOI

Third Division, Department of Medicine

Kobe University School of Medicine

Kobe, Japan

(Director: Professor Hiroo Imura
Professor Takuo Fujita)

The binding of ^3H -corticosterone or ^3H -dexamethasone to macromolecules in cytosols of the brain has been studied in vitro in adrenalectomized male rats.

The cytosol fraction was incubated with ^3H -corticosterone at $2\sim 4^\circ\text{C}$ for 4 h. Steroid bound to cytosol was separated from the unbound fraction by three methods: gel chromatography of Sephadex G-25, dextran coated charcoal absorption and the protamine precipitation procedure.

The binding properties were analyzed by Scatchard plots. The dissociation constant (K) was found to be $5.4 \times 10^{-9}\text{M}$, and the number of binding sites/mg cytosol protein was 0.49 p moles, indicating a binding with high affinity and limited capacity for ^3H -corticosterone.

The ontogeny of the cytosol glucocorticoid binding micromolecules was investigated in the various brain regions of 20, 30 and 65 day-old male. The concentration of corticosterone binding sites was higher at 30 days than at other days. The ^3H -corticosterone binding capacity was highest in the hippocampus and septum. Chromatography of the cytosol proteins on Sephadex G-200 showed the presence of two stable corticosterone binding proteins. One (A) was eluted at the void volume fraction, suggesting that its molecular weight is greater than 200,000, and another (B) appeared in the portion corresponding to the elution position of transcortin in serum.

When the same procedure was applied to the study on ^3H -dexamethasone binding properties, only one peak (C) was eluted at the void volume fraction. The competitive binding studies of each peak indicated that A and C had a high degree of specificity for corticosterone, cortisol and dexamethasone. After absorption by anti-rat serum using the affinity chromatography, peak B was found to be retained on the column, since it dis-

appeared when the eluate was further applied on a Sephadex G-200 column. The B binder seems, therefore, to be antigenically similar to transcortin in serum.

緒 言

ステロイドホルモンの作用は、その標的組織中のレセプターを介して行われると今日一般に考えられている。脳に対するグルコルチコイドの作用についても他の組織と同様に、微量の血中グルコルチコイドを特異的に感知する細胞質受容体との結合を通じて種々の効果が発揮され则认为されている。

したがって、脳組織における細胞質受容体の分析は、内分泌系と中枢神経系との関係の解明に役立つのみでなく、広く生体の調節機構の解明にも通じる重要な課題であると考えられる。そこで筆者は、主として副腎剔出ラットの脳細胞質受容体分析法について基礎的検討を行うとともに受容体の局在、発達段階における量的変化、さらにその性状について検討を加えた。

ASSAY PROCEDURE FOR THE BINDING OF CORTICOSTERONE TO RAT BRAIN CYTOSOL IN VITRO

Fig. 1. Assay procedure for the binding of corticosterone or dexamethasone to rat brain cytosol in vitro.

実験材料および方法

実験には通常生後30日のウイスター系オスラットを用いたが、一部の実験では、生後20日、65日のラットも用いた。実験動物は14時間照明(05:00~19:00)、10時間暗黒(19:00~05:00)の環境下で、室温20℃で飼育した。原則として両側副腎剔除後0.9%生理的食塩水、固型飼料で飼育し、7日後実験に供した。

エーテル麻酔下で、左心室より生理的食塩水を注入し、血液を出来るだけ除いた後に断頭屠殺を行った。脳を摘出した後、全脳もしくは McEwen⁽¹³⁾の方法に準じて解剖学的に脳各部位を分け実験に用いた。全脳または各部位切片に0.25 M Sucrose, 1 mM EDTA を含む pH 7.5 の50mM Tris 緩衝液 (Tris-EDTA buffer) を約4倍量加え、ポリトロンでホモジナイズした。

105,000 g で60分間超遠沈したのち上清をサイトゾール分画として以下の実験に用いた。実験方法のあらましを図1に示した。

サイトゾール中の蛋白濃度は Lowry 法⁽¹¹⁾により測定し、通常の実験では蛋白濃度が2 mg/ml になるように希釈して用いた。

³H 標識ステロイドとして、New England Nuclear 社製のコルチコステロン(B) (80Ci/m mole)及び、デキサメサゾン (Dex) (22.6Ci/m mole)を用いた。非標識ステロイドは全て Sigma 社より購入した。

標識ステロイドとサイトゾールを0~4℃で、4~5時間インキュベイトし、目的に応じてデキストラン炭末法、プロタミン法、あるいはセファデックス G-25カラムクロストグラフィー法 (G-25カラム)により結合、非結合分画 (Bound, Free) を分離した。

さらに約1000倍量の非標識ステロイドを加えた系列を作製し、同一の分離操作により得た結合量を非特異的結合量とし、これを非標識ステロイド非添加群の結合量より差し引いて真の結合量を求めた。

Table 1. Effect of CBG on the binding of ³H-corticosterone to protein of brain cytosol.

	I	II
Adrenal status	adrenalectomized	adrenalectomized
Serum added (adrenalectomized, 20μl)	(-)	(+)
Disint./min./mg protein	74880±4830	92920±5420

n=3

mean±S.D.

デキストラン炭末法は、⁽²⁾ステロイドとインキュベイトしたサイトゾール (蛋白濃度 2 mg/ml) 0.5 ml にデキストラン炭末溶液 (Norit A 380mg, デキストラン500 38mg を50mM Tris-H Cl, pH 7.5, 100ml) を0.2ml 加え、10秒間ボルテックスで振盪し、0℃に10分間静置したのち3000 g, 10分間遠沈した。上清の0.5 ml を正確にカウンティングバイアルに移し、トルエンシンチレーター (ppO 10 g, メタノール 20ml, トルエン 980ml) 10ml を加えて、液体シンチレーションカウンターで結合分画の放射能を計測した。

プロタミン法は⁽²³⁾インキュベーション後のサイトゾール0.5ml に、2.88mg/ml の濃度に protamine sulf-

ate を溶解した水溶液 2 ml を加え、10秒間ボルテックスで振盪して20分間静置後遠沈し、上清の一部を計測した。

この際計測したのは非結合分画の放射能であり、全体量からの差を求め結合量を算出した。デキストラン炭末法と同様の手技で非特異的結合量を求め差し引いて真の結合量を求めた。

G-25カラムによる Bound と Free の分離操作には内径 1 cm、高さ25cm のカラムを用い、インキュベーション後のサンプルを乗せて、Tris-EDTA buffer で溶出した。

セファデックス G-200カラムクロマトグラフィー (G-200カラム、内径2.5cm、高さ100cm) は、流速 20cc/h、上行式で行ない 5 ml ずつ採取した。あらかじめ G-25カラムで遊離分画を除去した後、結合分画についてこの G-200カラムを行った。

アフィニティークロマトグラフィーには、CNBr-activated Sepharose 4 B (Pharmacia Fine Chemical 社製) に抗ラット血清蛋白血清 (Dakopatts, Denmark) を Pharmacia Fine Chemical 社製の資料に基づき、カップリングして、得られたゲル約 3 ml をミニカラム (内径1.2cm、高さ7cm) に充てんして用いた。サイトゾールと ^3H -B との結合分画を G-25カラムで得、このカラムを通し、このカラムに結合しないで流出した分画を採集し、G-200カラムで溶出した。

結 果

(1) コルチコステロン受容体分析法の基礎的検討

両側副腎別出ラットの脳サイトゾールを用いてプロタミン法により受容体のコルチコステロンに対する結合度を検討した。血液中に存在する Corti costeroid Binding Globulin (CBG) のプロタミン法に及ぼす影響をみる目的で、両側副腎別出ラット血漿を脳サイトゾールに添加した群としない群について ^3H -B の蛋白結合分画を比較した。

ラット血清を添加した群では、プロタミン法によっても結合分画の放射能が非添加群に比較して有意に高値であった。(表1)

サイトゾールに ^3H -B (2×10^{-8} M) を加えてから24時間後まで結合能の変化を観察した結果、インキュベーションの開始5時間後で結合は最大に達し、以後24時間まで観察したが、徐々に低下することを認めた。(図2) インキュベーションの際に添加する ^3H -B の濃度を種々変えて結合能に及ぼす影響を検討した結果、 10^{-8} M 前後で平衡に達した。(図3)

従って以後 ^3H -B を用いて、プロタミン法による受容体分析を行う際には、蛋白濃度 2 mg/ml のサイトゾール 0.5ml に 2×10^{-8} M の ^3H -B を加えて、 0°C で5時間インキュベーションした。

上記方法に従ってラット脳サイトゾール中のコルチコステロンに対する受容体を Scatchard plot⁽⁹⁾ により分析した結果、解離定数は、 5.4×10^{-9} M、最大結合部位数は、0.49 pmole/mg cyto sol protein であった。(図4)

サイトゾール中のコルチコステロン結合蛋白の特異性を検討する目的で、 ^3H -B の100倍量の濃度の各種非標識ステロイドを添加して、コルチコステロンとサイトゾールの結合に及ぼす影響を観察した。(表2) 非標識ステロイドを添加していない時の結合を100%として各ステロイドの結合能を表現した。

コルチコステロンは、もとより、コルチゾール、17OH プロゲステロン、プロゲステロン、DOC などに、 ^3H -B を置換する性状があることが判明した。

生後20日、30日、65日の3群を正常群と副腎摘出群とに分けて、サイトゾールの ^3H -B に対する結合能をプロタミン法で観察した。

正常群、副腎摘出群とも生後30日目にその結合能は最も上昇しており、特に副腎摘出群では著明に増加していることが明らかとなった。(図5)

Fig. 2. Time course of binding of ^3H -corticosterone to rat brain cytosol.
cytosol protein; 2 mg/ml, 0.5 ml.
 ^3H -corticosterone; $2 \times 10^{-8}\text{M}$

Fig. 3. Binding to brain cytosol as a function of ^3H -corticosterone concentration.
cytosol protein; 2 mg/ml, 0.5 ml.
○ — ○ ^3H -corticosterone
x — x plus excess cold corticosterone

Fig. 4. Scatchard plot of ^3H -corticosterone binding to brain cytosol.
 $K_{\text{dissoc}} = 5.4 \times 10^{-9} \text{ M}$

Table 2. Steroid binding specificity of cytosol protein as steroid with ^3H -corticosterone. Steroid bound was separated from unbound steroid by protamine precipitation procedure.

COMPETING STEROID	% OF CONTROL
CORTICOSTERONE	31
CORTISOL	34
DEXAMETHASONE	48
17-OH	
PROGESTERONE	52
PROGESTERONE	55
DEOXYCORTISOL	57
ALDOSTERONE	70
TESTOSTERONE	76
17 β ESTRADIOL	90

Fig. 5. Changes in the concentration of ^3H -corticosterone binding sites in brain cytosol at different stages of development. Adrenalectomy was performed 7 days prior to the experiment.

Fig. 6. Changes in the concentration of ^3H -corticosterone binding sites in regional brain cytosol.

生後30日, 65日目の副腎別出ラットについてサイトゾールと ^3H -Bの結合量を脳の部位別に検討した。いずれの部位においても生後30日の結合が大であり, 部位別にみれば海馬での結合能が他の部位に比較して有意に高値であった。(図6)

(2) グルコルチコイド受容体の性状

脳サイトゾールまたはラット血清と ^3H -Bとをインキュベイトして, 各々をG-25カラムを用い溶出したパターンを図7に示す。

Fig. 7. Gel filtration on Sephadex G-25 of the cytosol and CBG fraction bound to ^3H -corticosterone.

Fig. 8. Gel chromatogram on Sephadex G-200 column of the macro-molecular fractions from brain cytosol and blood serum labeled in vitro with ^3H -corticosterone and ^3H -dexamethasone.

両者とも結合分画は4~10mlの間に溶出され、非結合分画との分離は良好であった。より分離を明確にするため、検体にデキストランブルーを加え、溶出した。次にラット血清と ^3H -B、脳サイトゾールと ^3H -Bあるいは ^3H -Dexを夫々インキュベイトしたものを、G-25カラムで結合分画のみを分離して、これをさらにG-200カラムで分析した。

脳サイトゾールと $^3\text{H-B}$ の結合体については、明らかに分子量の異なる2つのピークが得られた。すなわち、void volume 付近に1つと、ラット血清と $^3\text{H-B}$ の結合体が溶出される位置に一致した部位に1つが溶出された。 $^3\text{H-Dex}$ の結合体は void volume 付近の1つのピークのみで $^3\text{H-B}$ の場合に見られる如き血清蛋白との結合分画に一致してみられるピークは観察されなかった。(図8)

脳サイトゾールのコルチコステロン結合蛋白、デキサメサゾン結合蛋白について種々のステロイドの交叉反応性を検討した。すなわち、G-200カラムでそれぞれのピークを分離して各種非標識ステロイドを添加して競合反応を行い、デキストラン炭末法で結合分画を分離した。非標識ステロイドを加えないときの Bound の計測値を100%とし、標識ステロイドの100倍量 ($2 \times 10^{-6} \text{ M}$) の各種ステロイドを加えた際の Bound の計測値を%で示した。(表3)

Table 3. Steroid binding specificity of the macromolecular fractions from brain cytosol eluted by Sephadex G-200 column chromatography. Steroid bound was separated by dextran coated charcoal.

Competing steroids	% of control		
	$^3\text{H-Corticosterone}$ First peak	Second peak	$^3\text{H-Dexamethasone}$ First peak
Corticosterone	43	54	45
Dexamethasone	44	96	44
Cortisol	44	53	44
Deoxycortisol	47	68	50
Deoxycorticosterone	48.5	64	49
Progesterone	56	71	60
D H T	77	92	82
Aldosterone	87	96	85
Estradiol	87.5	93	90
Testosterone	95	97	98

コルチコステロンの void volume 付近の第1のピークとデキサメサゾンのピークについては、ステロイドの特異性に関して、ほぼ同様の傾向が認められ、それぞれコルチコステロン、デキサメサゾン、コルチゾールを始めとして、デオキシコルチゾール、DOCなどのコルチコイドに対して両分画ともほぼ平行した親和性を有することが明らかとなった。又、コルチコステロンの第2ピークについては、デキサメサゾン以外の上記のコルチコイド群にある程度の親和性をもつことが明らかになった。

$^3\text{H-B}$ と脳サイトゾールとの結合に、非標識デキサメサゾンを 2×10^{-8} , 2×10^{-6} , $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ を加えたときの影響を、G-200カラムで調べた結果を図9に示した。また $^3\text{H-Dex}$ と脳サイトゾールとの結合に、非標識コルチコステロンを同様に加えて影響をみた結果を図9に示した。

$^3\text{H-B}$ と脳サイトゾールとの結合分画の第1ピークは第2ピークと異なり(図9)、デキサメサゾンにより抑制された。一方、 $^3\text{H-Dex}$ のピークも非標識コルチコステロンにより抑制されることが認められた。次に $^3\text{H-B}$ と脳サイトゾール(蛋白濃度40mg/ml, 1ml)をインキュベイトした後、ラット血清蛋白抗血清を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより検討した。すなわちインキュベーション後、G-25カラムで結合分画をとり出し、抗ラット血清蛋白血清-Sephareseのミニカラムに乗せ、溶出した、全部画をさらにG-200カラムで溶出した。

アフィニティークロマトグラフィーの前処置により、コルチコステロンの第2ピークは認められなくなった。(図11)

Fig. 9. Effect of addition of unlabeled dexamethasone on gel chromatogram on Sephadex G-200 column chromatography of the macromolecular fractions from brain cytosol labeled in vitro with ³H-corticosterone (plus unlabeled dexamethasone).

Fig. 10. Sephadex G-200 column chromatography of the macromolecular fractions from brain cytosol labeled in vitro with ³H-dexamethasone (plus unlabeled corticosterone).

考 按

ステロイドホルモンの標的細胞内に、特定のステロイドホルモンを識別して結合する蛋白質性の受容体があり、ホルモンとこの受容体の結合体は核へ移行し遺伝子活性化機構を介して、一連の複雑な作用が発揮されるものと考えられている。ステロイドホルモンのうち極めて多岐の組織に亘って、多彩な作用を発揮するグルココルチコイドも、これら一連の受容体機構を介してその作用が発現することが明らかになっている。

Fig. 11. Effect of addition of unlabeled corticosterone on gel chromatogram on Sephadex G-200 column of ^3H -dexamethasone brain cytosol protein complex.

グルコルチコイドは中枢神経系に対しては、ACTH 分泌のネガティブ・フィードバック機構⁽¹²⁾⁽²⁴⁾向精神作用、日内リズム⁽²⁰⁾⁽²⁵⁾等の多くの現象が知られているが、その作用機構の詳細に関しては不明な点が多い。従って脳におけるグルコルチコイドの受容体機構の第一歩である脳細胞質受容体の特性を検討することは、グルコルチコイドの中枢性作用を理解する上で極めて重要である。

細胞質受容体の性状を調べる目的には現在種々の受容体分析法が確立されている。今回の実験では手技が簡便で受容体の定量的解析が可能であることから、in vitro の系を用いた。すなわち、脳組織をホモジナイズし、超遠沈を行って、細胞質に相当すると思われる上清分画すなわちサイトゾール分画を調製し、一定量の標識ステロイドとインキュベイトし、その結合量を測定した。受容体結合、非結合分画の分離法としてはデキストラン炭末法、プロタミン法、G-25カラム法の3法について検討した。この in vitro の測定系で最も問題となる因子は受容体蛋白以外の非特異的結合、とくにサイトゾールを調節する際に混入するCBG，あるいは細胞内にその存在が想定されているCBG様蛋白の影響である。デキストラン炭末法やG-25カラム法の長所、欠点についてはすでに報告したが⁽²¹⁾，特にサンプルの蛋白濃度、炭末量、操作中の温度に留意する必要がある。

プロタミンはサイトゾール中の受容体蛋白結合体を特異的に沈澱させ、アルブミンや他の結合蛋白との結合体には影響を与えないため、プロタミン法ではサイトゾール受容体蛋白を特異的に検討できると報告⁽²⁾されている。しかしながら今回の実験では、副腎剔出により比較的非結合CBGが増加していると思われるラット血清を添加することにより20%程度の結合容量の増加が見られたことから、プロタミン法でも全くCBGの影響を受けないとは考えられず、この方法により得た結果の解釈についても吟味する必要がある。

しかし、脳摘出前に灌流を十分行えば血液成分中のアルブミンやCBGはほぼ完全に除去出来るため、これら血液の因子の影響はほとんど無視しても差しつかえないと考えられる。

一般に受容体の特性は標的組織局在性、ステロイドに対する結合親和性、結合容量、結合特異性によって示される。ラット全脳ホモネートより得たサイトゾールについてコルチコステロンの結合親和性、結合容量を検討したが、解離定数は 5.4×10^{-9} M、結合部位数は0.49 pmole/mg of cyto sol proteinであり、極めて親和性が高く、その結合は飽和性であることが認められた。この値は諸家のグルコルチコイド受容体の検討結果⁽⁶⁾ともよく一致する値であった。

M cEwen ら⁽¹³⁾は、副腎別出ラットに³H-B を静注して、経時的に放射能の脳内分布を *in vivo* で観察した。彼らは大脳辺縁系の一部で他の部位に比較して、選択的に長期に放射能が取り込まれることを観察した。その後 *in vitro* の実験でも検討を加え⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾ 大脳辺縁系のなかでも海馬での選択的取り込みが大であり、ついで中隔や視床下部、脳幹の順で³H-B の結合が多くみられたと報告している。さらに温度依存性の核への取り込みもやはり海馬でもっとも多く、扁桃、大脳皮質、視床下部の順であったとしている。

今回の細胞質受容体の分布を検討した実験結果でも、やはり海馬に最も多く、ついで中隔、視床下部、視床、中脳に多く分布していた。ACTH 分泌調節機構の重要な因子であるネガティブフィードバック機序もこの受容体分布の立場からみると、海馬の受容体の結合を通じて作動する可能性も考えられている⁽⁸⁾⁽¹³⁾。なお、下垂体サイトゾールの結合能については、一定濃度の蛋白 (2 mg/ml) を得るには、約50個の下垂体を必要とするため、他部位との同時検討を3回しか行えず、今回の実験では例数の多い他部位ほど明確な値を得ることができなかった。結合能を検討する実験では、常に蛋白濃度を一定にすることが重要で、少ない蛋白量を用い得られた成績を蛋白量で補正することは誤った結果をうる原因であると考えられる。

ACTH 分泌調節機構を脳の各部位における受容体量の多少により考察することは難かしいが、他の研究方法による結果⁽⁷⁾⁽¹⁰⁾⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾⁽²⁷⁾から、海馬以外に、扁桃核、視床下部、下垂体が作用点として考えられる。しかし、作用点の詳細については今後新しい手技を用いた研究が必要である。

グルコルチコイド受容体のうち特に家兎胸腺やラット肺では発育段階に応じて受容体の数が劇的に変化することが知られている。

これらの変動はすなわち生後の胸腺の萎縮や肺胞換気機能などの生理的変化と合致している。Ballard⁽¹⁾やRoth⁽¹⁹⁾は兎やラットの種々の臓器についてグルコルチコイド受容体の年令的变化を検討し、肝や脳、筋肉、前立腺などでも年令とともに明らかに結合量が変動することを認め、受容体の質的量的変化に起因するとしている。

Nelson ら⁽¹⁷⁾は生後11~12ヶ月と28~29ヶ月のマウスで脳諸部位の結合量を比較し、結合量に差を認め、28~29ヶ月のマウスで高値であったとしている。筆者は副腎別出ラットについて生後65日までの³H-B の結合量を観察し生後30日前後で最も結合量が多く、部位別にみても、海馬において30日のものが有意に大であった。Olpe ら⁽¹⁸⁾も同様の成績を報告している。ラットにおいて血中コルチステロンの典型的な日内リズムは生後21~25日頃に完成すると云われており⁽⁹⁾今回の実験でみられたように脳内および部位別のサイトゾールの³H-B 結合能が生後30日で増加していたことは、受容体の量の変化が日内リズムの発生にも何らかの関係をもつ可能性も示唆するとも考えられ興味深い。

グルコルチコイドの細胞質受容体は蔗糖密度勾配法では沈降係数が7 Sで、セファデックスやセファローズクロマイグラフィによる溶出度より分子量は200,000以上の大分子であることが明らかにされている。⁽⁶⁾筆者もセファデックス G-200 カラムを用いるゲル濾過によりコルチステロンおよびデキサメサゾン受容体の性状を検討した結果、void volume 付近に³H-B、³H-Dex の複合体が溶出され、両ホルモンの受容体は分子量200,000以上と推定された。³H-B の場合にはさらに血中 CBG と移動度を同じくする部位にもう一つの³H-B 複合体が溶出されることを認めた。

このコルチステロンとデキサメサゾンの大分子複合体については、De Kloet ら⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾による詳細な検討があり、一部に若干の相異があるが、かなり共通した性質をもつものであることが明らかにされている。今回、それぞれの受容体蛋白分画について、各種ステロイドに対する結合特異性を検討した結果、大分子のそれはいわゆるコルチステロン、デキサメサゾンなどのグルコルチコイドに特異的に結合能を有していた。一方、CBG 様蛋白受容体はデキサメサゾンとは殆んど結合ず、血中 CBG のステロイドホルモンへの結合特異性と全く同様であった。

この CBG 様受容体は、洗浄後のヒトリンパ球⁽²⁶⁾や生理的食塩水で灌流した骨格筋に存在するとの報告

もあり, CBG 様蛋白が血液中の CBG の混入である可能性は少ない。但し, 細胞膜に付着している CBG, 組織液中の CBG が溶化の際に混入する可能性は, なお残されている。

今回の実験ではラット全血清抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィー処理により, CBG 様受容体が全く消失した。このことはこの CBG 様受容体が, 単に分子量のみでなく, 免疫学的にも血中 CBG と類似していることを示すものと思われる。しかし, CBG 様蛋白の起源や存在部位, 役割, さらには真の受容体であるか否かについても現時点では全く不明であり, 今後検討されるべき問題である。

結 語

ラット脳を用いて細胞質グルココルチコイド受容体について基礎的検討を行った。

1) ステロイドホルモン受容体結合ステロイドと非結合ステロイドについて, プロタミン法, ゲル濾過法の3者を検討した。それぞれの方法に長所と問題点があり, 目的に応じ使い分けるのが妥当である。

2) 脳サイトゾールの反応をスキチャード, プロットにより解析し, 解離定数, 5.4×10^{-9} M, 結合部位数, 0.49p mole/mg 蛋白濃度の値を得た。

3) 生後20, 30, 65日目のラット脳を用い全脳, 各部位別に $^3\text{H-B}$ の結合度を調べ, いずれも, 30日目に高値を得た。部位別には海馬に最も著明で中隔, 視床, 中脳の結合がこれに次いた。

4) 脳サイトゾール中の $^3\text{H-B}$ との結合体は, セファデックス G-200カラムを用いるゲル濾過法で, 分子量200,000以上の大分子のものと, 血中 CBG と一致する分子の大きさのものと2つを認めた。後者は抗ラット血清を用いたアフィニティークロマトグラフィーで除かれ, 免疫学的に CBG と共通した性質をもつことが分った。

脳サイトゾール中の $^3\text{H-Dex}$ との結合体のそれは, 分子量200,000以上のものだけ認められた。この3つの結合体の各々につき, 各種ステロイドホルモン特異性を検討し, 分子量200,000以上の $^3\text{H-Dex}$ の結合体は, 非常によく似たものであること, 一方いわゆる CBG 様結合体は血中の CBG とよく似た性質を有することを認めた。

本論文の要旨は, 第48, 49回日本内分泌学会総会において発表した。

稿を終るにあたり, 研究当初より御指導と御校閲をいただいた井村裕夫教授, 藤田拓男教授, 戸田嘉秋教授, 松倉茂助教授, 阪本登博士に感謝致します。

文 献

- 1) Ballard, P.I., Baxter, J.D., Higgins, S.J., Rousseau, G.G., and Tomkins, G.M.: *Endocrinology*, 94: 998-1002, 1974.
- 2) Beato, M., and Feigelson, P.: *J. Biol. Chem.*, 247, 24: 7890-7904, 1972.
- 3) De Kloet, E.R., Wallach, G., and McEwen, B.S.: *Endocrinology*, 96: 598-609, 1975.
- 4) De Kloet, E.R., and McEwen, B.S.: *Biochemica et Biophys. Acta*, 421: 115-123, 1976.
- 5) De Kloet, E.R., and McEwen, B.S.: *Biochim. Biophys. Acta*, 421: 124-132, 1976.
- 6) Grosser, I.B., Stevens, W., and Reed, J.D.: *Brain Res.*, 57: 387-395, 1973.
- 7) Hebb, C.O., and Silver, A.: *J. Physiol.*, 134: 718-728, 1959.
- 8) Hiroshige, T., Sakakura, M., and Itoh, S.: *Endocr. Jap.*, 16: 465-473, 1969.
- 9) Krieger, D.T.: *Science*, 178: 1205-1207, 1972.
- 10) Lanier, L.P.: *Neuroendocrinology*, 3: 337-347, 1968.
- 11) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, 193:

- 265–275, 1951. 12) McEwen, B.S., Maguus, C., and Wallach, G.: *Endocrinology*, 90: 217–226, 1972. 13) McEwen, B.S., Weiss, J.M., Schwartz, L.S.: *Brain Res.*, 16: 227–242, 1969. 14) McEwen, B.S., Weiss, J.M., and Schwartz, L.S.: *Brain Res.*, 17: 471–482, 1970. 15) McEwen, B.S., and Wallach, G.: *Brain Res.*, 57: 373–386, 1973. 16) Michal, E.K.: *Brain Res.*, 65: 180–183, 1974. 17) Nelson, J.F., Holinka, C.F., Latham, K.R., Allen, J.K., and Finch, C.E.: *Brain Res.*, 115: 345–351, 1976. 18) Olpe, H.R., and McEwen, B.S.: *Brain Res.*, 105: 121–128, 1976. 19) Roth, G.S.: *Endocrinology*, 94: 82–90, 1974. 20) 阪本 登: *日本内分泌誌*, 49: 671–678, 1973. 21) 阪本 登, 坪井誠吉, 井村裕夫: *日本臨床*, 34: 58–64, 1976. 22) Scatchard, G.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51: 660–668, 1949. 23) Steggles, A.W., and King, R.J.B.: *Biochem. J.*, 118: 695–701, 1970. 24) Takebe, K., Sakakura, M., and Mashimo, K.: *Endocrinology*, 90: 1515–1520, 1972. 25) Tsuboi, S., Toda, Y., Yoshimura, H., Sakamoto, N., Asahina, K., and Imura, H.: *Antarctic Record*, 57: 97–105, 1976. 26) Werthamer, S., Samuels, A.J., and Amaral, L.: *J. Biol. Chem.*, 248: 6398–6407, 1973. 27) Watanabe, H., Orth, D.N., and Toft, D.O.: *Biochemistry*, 13: 332–336, 1974.