ヒト子宮内膜のエストロゲン・レセプター量と 血中エストロゲンおよび子宮内膜での RNA 合成, 蛋白合成との関連性に関する研究

大阪大学医学部産婦人科教室

(主任: 倉智敬一教授)

金 豊 栄

Studies on the Interrelationship among Serum Estrogen Levels,
Estrogen Receptors (unbound cytoplasmic,
bound cytoplasmic and bound nuclear), RNA Syntheses
and Protein Syntheses in the Normal Endometrial Tissues

Poong Young KIM

Department of Obstetrics and Gynecology,

Osaka University Medical School,

Osaka, Japan

Director: Professor Keiichi Kurachi

The physiological effects of estrogen on normal human endometrial tissues were investigated. In the experimental animal uterus, it was well established that the first response to estrogen required RNA synthesis which then led to protein synthesis.

The aim of this investigation was to study the interrelationships among the serum estrogen levels, estrogen receptors (unbound cytoplasmic, bound cytoplasmic and bound nuclear), RNA syntheses and protein syntheses in normal human endometrial tissues.

The unbound cytoplasmic estrogen receptors were measured by the D.C.C. method, and bound cytoplasmic and nuclear estrogen receptors were measured by the protamine exchange method.

- 1) The unbound and bound estrogen receptor concentrations of the cytoplasmic fraction of normal human endometrial tissues were increased progressively throughout the proliferative phase, and were at their highest in the secretory phase and in the late secretory phase of the cycle.
- 2) The bound estrogen receptor concentrations of the nuclear fraction were highest in the late proliferative phase and lowest in the early secretory phase, but increased throughout the secretory phase.
- 3) RNA syntheses were increased progressively throughout the proliferative phase and highest in the late proliferative phase and lowest in the late secretory phase.
- 4) Protein syntheses were also highest in the late proliferative phase and lowest in the

early secretory phase, but increased throughout the secretory phase.

5) The serum estrogen levels have a positive relationship with unbound cytoplasmic receptors ($r=0.85$), bound cytoplasmic receptors ($r=0.79$) and bound nuclear receptors ($r=0.70$) in the proliferative phase, and a low positive relationship with unbound cytoplasmic receptors ($r=0.66$) and bound cytoplasmic receptors ($r=0.50$), but no relationship was found with bound nuclear receptors in the secretory phase.

6) The serum estrogen levels have a positive relationship with RNA syntheses ($r=0.86$) and protein syntheses ($r=0.84$) in the proliferative phase, but no relationship was found in the secretory phase.

7) RNA syntheses in the endometrium have a positive relationship with unbound cytoplasmic receptors ($r=0.88$), bound cytoplasmic receptors ($r=0.80$) and bound nuclear receptors ($r=0.79$) in the proliferative phase, but in the secretory phase, these have a positive relationship only with bound cytoplasmic receptors ($r=0.69$).

8) Protein syntheses in the endometrium have a positive relationship with unbound cytoplasmic receptors ($r=0.61$), bound cytoplasmic receptors ($r=0.68$) and bound nuclear receptors ($r=0.83$) in the proliferative phase, and a positive relationship only with bound nuclear receptors ($r=0.61$) in the secretory phase.

緒 言

1963年 Ui & Mueller⁶⁰⁾によってエストロゲン (E) が標的臓器において作用する際に RNA 合成, 蛋白合成を誘導する事実が報告され, その後ラットなどの動物子宮組織を用いた多くの報告がみられたが^{15) 23) 41) 7)}, 動物子宮では mRNA をはじめとして r-RNA, t-RNA が合成されることも明らかとなった。

近年エストロゲンレセプター (ER) の概念の確立と測定法などの発達とともに, 動物やヒト子宮組織の ER の性格や量に関する報告がみられるようになった⁵⁾。E は子宮細胞質 8 S レセプターと結合し^{30) 52)}, 動物では温度依存性の 8 S → 4 S → 5 S の transformation をうけ核内に移行し^{40) 34)}, 核内のアクセプターと呼ばれる場所に結合することが判明した。アクセプターと結合後に合成される RNA は子宮細胞の発育と機能分化のために必要な蛋白質合成を促進することになる。しかしながら, エストロゲンがヒト子宮内膜の ER を介して RNA 合成, 蛋白合成を誘導するに至る反応系についてその相互関係を明らかにした報告は未だ見られない。著者はヒト子宮内膜におけるエストロゲンの一連の反応をみるために, 同一婦人における子宮内膜 ER 量を細胞質遊離型 ER, 細胞質結合型 ER 及び核内結合型 ER に分けて測定し, 同時に血中エストロゲン量とヒト子宮内膜での RNA 合成, 蛋白合成についても検討して, 月経周期に伴う変動及びこれらの相互関係を検討した。

実 験 材 料

1) 子宮内膜組織は阪大産婦人科外来, 入院患者のうち内膜組織診を必要とした患者の中から正常月経周期をもち, 過去 3 ヶ月間ステロイド, ホルモン療法を受けていない患者で病理組織学的に正常と判断された内膜を用いた。採取した子宮内膜の一部は病理組織診及び日附診のためにホル

マリン固定し、その残りは生理食塩水にて血液成分を十分に洗浄除去した直後に、あるいは -80°C にて一週間以内凍結保存したものを材料とした。RNA 合成と蛋白合成能の検討は採取直後の検体で行った。

2) 血中E定量は内膜組織採取直後及び子宮全摘手術直前の患者の静脈より採血し、遠心分離して血清のみを -20°C にて凍結保存したものを使用した。溶血がみられた検体は除外した。

[method]

Fig. 1. The method of dextran coated charcoal and protamine assay. DOSE* means a proper quantity of $[^3\text{H}]$ estradiol.

実験方法

1) 細胞質分画と核分画の作製方法

子宮内膜組織湿重量の10倍量の TED buffer (0.01M Tris-HCl, pH 7.4 at 4°C 1.5mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol) を加えて、Teflon homogenizer により氷中で homogenate を作製した。homogenate を polycarbonate tube に移し、 4°C 下 $105000 \times g$ で1時間遠心後上清のみを採取し、非特異的結合及び非結合ステロイドを除く目的で、上清と同量の dextran coated charcoal (D. C. C.) (0.25% Norit A, 0.0025% Dextran T70) を加えて充分攪拌してから再び 4°C 下 $800 \times g$ で10分間遠心した。ここで得られた上清を細胞質分画とした。この一部を用いて蛋白定量を行っ

た。先に得られた沈澱には 0.6 M KCl-Tris EDTA buffer (0.01 M Tris-HCl, 0.6 M potassium-chloride, 1.5 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol pH 8.5)⁷⁰を加えて homogenize し、再び 4℃ 105000×g で30分間遠心して上清を採取しこれを核分画とした。この時得られた沈澱には 2 ccの 0.5 N perchloric acid 液を加え、DNA 定量を行った。

2) 細胞質分画遊離型エストロゲンレセプター量の検討

細胞質分画遊離型エストロゲンレセプター量の検討には Dextran Coated Charcoal method (D. C. C. 法)⁶⁾を用いた。細胞質分画は 2 mg/ml の蛋白濃度に TED buffer にて調整したものを 0.2 ml 使用した。isotope は 2×10^{-8} M の $^3\text{H}\text{E}_2$ に 10^{-5} M ME_2 を加えた 0.2 ml TED buffer と、 10^{-5} M ME_2 を加えていないものをそれぞれ 2 本ずつ準備した。blank としては試料 0.2 ml の代りに TED buffer 0.2 ml を用いて同様に 2 本ずつ準備し計 8 本を 4℃ で 3 時間 incubate した。各々に 0.6 ml の D. C. C. を加えときどき攪拌しながら 4℃ 下で 15 分間 incubate 後 800×g で 10 分間遠心分離して得られた上清 0.5 ml を counting vial に移し 5 ml の Toluene P. P. O.-P. O. P. O. P. (5.0 g P. P. O. 0.1 g P. O. P. O. P. in 1 l toluene) を加え Nuclear-Chicago Corp., Mark II Liquid Scintillation System を使用してその radioactivity を測定した。各々の vial の測定値 (DPM) は cold E_2 を加えなかった 2 検体の平均値からその blank の平均値を差引いた値と cold E_2 を加えた 2 検体の平均値からその blank 検体の平均値を差引いた値を求めその差を femto mole に換算して femto moles/10mg protein で表わした。

3) 細胞質分画結合型および核分画結合型エストロゲンレセプター量の検討

細胞質分画結合型、核分画結合型エストロゲンレセプター量の検討には protamine 法^{42) 10) 34)}を用いた。細胞質分画は TED buffer にて希釈し 2 mg/ml の蛋白濃度に調整したものを使用した。核分画は先に得られた上清を TED buffer にて 5 倍希釈したものを使用した。細胞質分画は 1 検体につき 0.2 ml を用いて 8 本準備した。この内 4 本は cold E_2 を加えるものでその内の 2 本は 30℃ で残りの 2 本は 4℃ で incubate するためのものとした。核分画は 1 検体につき 0.5 ml 使用して同様に 8 本の検体を準備した。これら総計 16 本の検体に各々 0.25 ml の protamine sulfate (1 mg/ml)^{60) 10)}を加えよく攪拌した後、10 分間 4℃ 下で放置し、800×g にて 15 分間遠心分離を行い上清を除去した。沈澱には 8 本の検体に 5×10^{-9} M $^3\text{H}\text{E}_2$ を含む TED buffer 0.4 ml を加えた。残りの 8 検体には 10^{-5} M E_2 を含む 5×10^{-9} M $^3\text{H}\text{E}_2$ の入った TED buffer 0.4 ml を加えそれぞれ 8 本ずつ 30℃ と 4℃ で 3 時間の incubation を行った。incubate 後に上清を除去した後、1 cc の TE buffer (0.01 M Tris, 0.0015 M EDTA) にて 3 回洗浄し 5 ml の Toluene, P. P. O., P. O. P. O. P. を加え 30 分間 4℃ 下に放置し、この上清全量を counting vial に移し、D. C. C. 法と同様にその radioactivity を測定した。計測値 (DPM) は細胞質分画の検体で duplicate した平均値を求め、30℃、4℃ 各々で cold E_2 を加えなかった検体から加えた検体の値を差引いて求めた。核分画においても同様に計算を行いそれぞれ 30℃ の値から 4℃ の値を差引いた数値を結合型レセプター量とした。細胞質分画の値は femto moles/10mg protein に換算し、核分画は femto moles/10mg DNA に換算した。

4) RNA 合成、蛋白合成能の検討^{58) 59)}

採取直後の内膜 30 mg をそれぞれ $2 \times 2 \times 2$ mm 四方程度に mince し各々を 0.5 ml TED buffer 中で incubate した。RNA 合成には ^3H -Uridine 1 μC を、蛋白合成には ^{14}C -Valine 0.5 μC をトレーサーとして加え、37℃ で 1 時間正確に incubate した後組織のみを取り出し、5% TCA 1 ml にて氷中で homogenize した。RNA 合成は 4℃ にて 30 分間 incubate し、蛋白合成は glass tube にて 10 分

間 boil したものを 4°C $800\times g$ にて15分間遠心した。上清を除去した沈澱に 5% TCA 1ml を各々加えよく攪拌し再び $800\times g$ で10分間遠心した。上清を除去した沈澱に 1 N NaOH 0.5ml を加え室温にて約10時間以上放置した後に 5 ml の Toluene, P. P. O., P. O. P. O. P. を加えて counting vial に移しその radioactivity を測定した。(Fig.2.)

Fig. 2. Method of determination of RNA synthesis and protein synthesis.

5) 血中Eの測定法

採取直後に遠心分離して得られた血清を凍結保存し、測定時に室温にて溶解した。第一ラジオアイソトープ研究所の Estradiol radioimmunoassay Kit を用いて以下のごとく測定した。被検血清 0.3ml と回収率測定用として 160pg の E_2 を含む標準 E_2 原液 0.2ml に蒸留水を加え、総量を 0.3ml にした。各試験管にあらかじめ冷却しておいたエーテルを 3ml 加え、よく攪拌した後に10分間静置し、ドライアイス槽に浸けて水層を凍結させ、エーテル層を測定用試験管に移し、約 40°C 下で N_2 -gas 気流中でエーテルを留去させた。n-Hexane 1ml と 50% メタノールを 0.4ml 加え 30 秒間よく攪拌した後に $1000\times g$ で約 5 分間遠心した。上層の n-Hexane を吸引除去し再び n-Hexane を 2ml 加え吸引除去をくりかえした。約 60°C にて N_2 gas 気流中で内容物を留去させ、緩衝液を 0.5ml 加え攪拌したのち、あらかじめ調製した標準 E_2 溶液を濃度のうすい液から順に各試験管に 0.5ml 加えた。さらに $^{125}\text{I}\text{E}_2$ 溶液 0.1ml を各試験管に加え軽く攪拌した後、 E_2 抗血清 0.1ml を N-サンプル用とし

て作製したものを除く各試験管に加えた。40℃にて15分間 incubate した後、第二抗体溶液 (anti-rabbit γ -globulin) を0.1ml 加え、2℃～8℃で一夜放置した後、2000×g で15分間遠心分離し、上清を吸引除去しその radioactivity を測定した。(Fig. 3.)

6) 蛋白定量

BSA (Bovine Serum Albumin) 1mg を1ml の蒸留水に溶解した液を作り、そのつど標準曲線を作製し、Folin-Wu 変法⁵³⁾を用いて行った。検体はその希釈率にあわせて0.2ml～0.6ml を使用した。総量0.6ml の検体と各種濃度の BSA 液0.6ml にそれぞれ I 液 (2% Na_2CO_3 100ml W/V = A と $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 無水酒石酸 = B を使用直前に A : B = 50 : 1 の割合で混合) 3 ml を加え混合し、10分間室温にて放置、II 液 (Folin ciocalteu reagent : H_2O = 1 : 0.8) 0.3ml を加えよく攪拌し30分間室温にて放置し、750m μ で O.D. を測定し、標準曲線より蛋白量を求めた。

7) DNA 定量

DNA standard 曲線は0.4mg DNA を5mM NaOH に溶解したものから3週毎に再作製したものを使用し1N PCA で希釈して標準曲線を作製し Diphenylamine 法⁹⁾を用いて定量を行った。diphenylamine reagent (diphenylamine 1.5g, acetic acid 100ml, Conc, H_2SO_4 1.5ml—A 液, aqueous acetaldehyde (16mg/ml)—B 液, A : B = 200 : 1) は実験当日に作製した。検体1ml に、reagent 2ml を加え室内で16～18時間放置し、600m μ で O.D. を測定し DNA 量を求めた。

Fig. 3. Procedure of ^{125}I -E₂ kit RIA.

Fig. 4.(A) The saturation kinetics of the endometrial estradiol binding protein (DCC method 4°C).

(B) Scatchard plot of the data.

Fig. 5. The saturation kinetics of the endometrial estradiol binding protein. (protamine method 30°C ~ 4°C)

実験条件の検討

1) D.C.C. 法での $^3\text{H}\text{E}_2$ 濃度変化に伴う結合能の検討のため、各種濃度下での4°C, 3時間incubateして得た Saturation Curve を Fig. 4. (A) に示した。 $20 \times 10^{-9} \text{ M}$ 附近ですでに plateau に達していた。(B). はこの data から求めた Scatchard plot である。 k_d はおよそ $1.55 \times 10^{-10} \text{ M}$ であった。

2) protamine 法での $^3\text{H}\text{E}_2$ 濃度変化に伴う結合能の検討を Fig. 5. に示した。細胞質分画、核分画共に $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 附近で plateau に達した。

Fig. 6. The time course of $[^3\text{H}]$ estradiol exchanged with estrogen saturated cytoplasmic receptor sites by the D.C.C. assay at 4°C .

Fig. 7.(A) The time course of $[^3\text{H}]$ estradiol exchanged with estrogen saturated cytoplasmic receptor sites by the protamine assay at 30°C and 4°C .

(B) The time course of $[^3\text{H}]$ estradiol exchanged with estrogen saturated nuclear receptor sites by the protamine assay at 30°C and 4°C .

3) D.C.C. 法での incubation 時間による結合能の検討で, cold E を加えなかった値より cold E を加えた値を差引いた値が 1 時間でほぼ plateau に達した。(Fig. 6.)

4) 細胞質分画結合型 ER 量の検討のために, 5×10^{-9} M 濃度の条件下での incubation 時間と温度変化に伴う結合能の検討を Fig. 7.(A) に示した。30℃ では 1 時間でほぼ plateau に達し 3 時間以後は下降する傾向がみられた。4℃ 下でも 30 分でほぼ plateau に達した。核分画結合型 ER 量の検討を Fig. 7.(B) に示した。30℃ では 30 分間でほぼ plateau に達した。0℃ では 2 時間でほぼ plateau に達した。

5) D.C.C. 法での検体蛋白濃度の検討で, 検体の希釈による結合の減少は直線的であった。(Fig. 8.)

Fig. 8. The effect of dilution on the assessment of estrogen receptor concentrations.

Cytoplasmic fractions were diluted with buffer to 1ml and the concentrations of estrogen receptor sites were measured as described in Methods. (D.C.C. Method)

成 績

1) 血中エストロゲン量の性周期に伴う変動

正常月経周期における血中E量をプロットした。平均値でみると, 増殖期初期 (EP)より中期 (MP) にかけて上昇し後期 (LP) で最高値に達した。分泌期初期 (ES) では急減するが中期 (MS) で再び上昇し第二のピークを作り後期 (LS) では再び減少し ES の水準にもどった。

(Fig. 9.(A).)

2) 子宮内膜における RNA 合成の性周期に伴う変動

正常子宮内膜での月経周期に伴う RNA 合成の変動は DPM/10mg wet wt で表した。(Fig. 9.(B)) EP より MP にかけて上昇し LP で最高値を示した。ES では減少がみられ MS でもほぼ同値であるが LS では再び低値を示した。

3) 子宮内膜における蛋白合成の性周期に伴う変動

正常子宮内膜での月経周期に伴う蛋白合成の変動を示したが, RNA 合成に比して EP でもかなり高い値を示す例が多いが MP にかけて上昇し LP で最高値を示した。ES では急減したが MS にかけて再び上昇し LS でも MS の値に近い高い値を示した。(Fig. 9.(c).)

Fig. 9. (A) Serum estrogen level in the normal menstrual cycle.
 (B) Variation of RNA synthesis in normal endometria during the menstrual cycle.
 (C) Variation of protein synthesis in normal endometria during the menstrual cycle.

Fig. 10. Concentration of unbound cytoplasmic estrogen receptors (A), bound cytoplasmic estrogen receptors (B), bound nuclear estrogen receptors (C) in normal endometria throughout the menstrual cycle.

4) 細胞質遊離型 ER 量の性周期に伴う変動

D.C.C. 法で求めた遊離型 ER 量を縦軸に femto moles/mg protein で表わし月経周期に伴う変動を示した。EP より MP にかけてやや上昇し LP では最高値を示した。ES では急減したが MS で再び上昇したが LS では低下した。(Fig. 10.(A).)

5) 細胞質結合型 ER 量の性周期に伴う変動

protamine 法で求めた細胞質分画結合型 ER 量を femto moles/mg protein で表わし月経周期に伴う変動を示した。EP より MP にかけて増加し LP で最高値を示した。ES では急減したが MS にかけて上昇し LS で再び ES の水準に低下した。(Fig. 10.(B))

6) 核内結合型 ER 量の性周期に伴う変動

protamine 法で求めた核分画結合型 ER 量を femto moles/mg DNA で表わし月経周期に伴う変動を示した。平均値でみると EP より MP にかけて上昇し LP で最高値を示した。ES では急減したが再び上昇し LS ではほぼ LP の値に近くなった。(Fig. 10.(c).)

7) 血中エストロゲン量と細胞質遊離型 ER 量との相関

横軸に血中E量を、縦軸に D.C.C. 法で求めた細胞質分画遊離型 ER 量をプロットして増殖期と分泌期での相関を示したグラフである。Fig. 11.(A). 増殖期では高い正の相関 ($r = 0.85$, $P < 0.05$) がみられたが分泌期でもやや低い正の相関 ($r = 0.66$) がみられた。(B). は protamine 法で求めた細胞質分画結合型 ER 量と血中E量との相関を示したグラフである。増殖期では高い正の相関 ($r = 0.79$) がみられたが分泌期では相関は低かった。($r = 0.50$) (C) は核分画結合型 ER 量と血中E量との相関をみたグラフである。増殖期では正の相関 ($r = 0.70$) がみられたが、分泌期では一定の関係はみられなかった。

8) 細胞質分画遊離型 ER 量と RNA 合成、蛋白合成との相関

細胞質分画遊離型 ER 量と RNA 合成(A). 蛋白合成(B)との関係を示したグラフである。Fig. 12. (A) RNA 合成は細胞質分画遊離型 ER 量と増殖期で高い正の相関 ($r = 0.88$) がみられたが、分泌期では相関がみられなかった。(B)蛋白合成でも同様に増殖期でのみ低いながら正の相関 ($r = 0.6$) がみられた。

Fig. 11. Correlation between serum E_2 level and unbound cytoplasmic estrogen receptor (A), bound cytoplasmic estrogen receptor (B), bound nuclear estrogen receptor (C) in proliferative phase and secretory phase of menstrual cycle.

Fig. 12. Correlation between cytosol unbound ER and RNA synthesis (A), protein synthesis (B) in proliferative phase and secretory phase of menstrual cycle.

Fig. 13. Correlation between cytosol bound ER and RNA synthesis (A), protein synthesis (B) in proliferative phase and secretory phase of menstrual cycle.

Fig. 14. Correlation between nuclear bound ER and RNA synthesis (A), protein synthesis (B) in proliferative phase and secretory phase of menstrual cycle.

Fig. 15. Correlation between serum E level and RNA synthesis (A), protein synthesis (B) in proliferative phase and secretory phase of menstrual cycle.

9) 細胞質分画結合型 ER 量と RNA 合成、蛋白合成との相関

細胞質分画結合型 ER 量と RNA 合成(A), 蛋白合成(B)との関係をみたグラフである。(Fig. 13.) RNA 合成は増殖期で高い正の相関 ($r=0.80$) がみられ, 分泌期でも正の相関 ($r=0.69$) がみられた。蛋白合成は増殖期で低いながら正の相関 ($r=0.68$) がみられたが, 分泌期では相関はみられなかった。

10) 核分画結合型 ER 量と RNA 合成、蛋白合成との相関

核分画結合型 ER 量と RNA 合成(A), 蛋白合成(B)との関係をみたグラフである。(Fig. 14.) RNA 合成は増殖期で高い正の相関 ($r=0.79$) がみられたが, 分泌期ではみられなかった。蛋白合成とは増殖期で高い正の相関 ($r=0.83$) がみられ, 分泌期では低いながら正の相関 ($r=0.61$) がみられた。

11) 血中 E 量と RNA 合成、蛋白合成との相関

血中 E 量と RNA 合成(A), 蛋白合成(B)との関係を示したグラフである。(Fig. 15.) RNA 合成, 蛋白合成共に増殖期でのみ高い正の相関 ($r=0.86$, $r=0.84$) がみられた。

考 案

卵巣から分泌されたエストロゲンは循環系を介して子宮などの標的臓器に達するが, 血中では α_1 -globulin 分画や albumin 分画を中心とした蛋白質と結合した形で存在している^{1) 4) 6)}。この結合蛋白を sucrose gradient で解析すると 6 s の単一ピークが認められ, ラット子宮などにみられるような 8 s, 4 s, 5 s のピークとは無関係であった⁵⁾。血中エストロゲンが標的細胞に作用をおよぼすにはまず細胞膜を透過して⁷⁾, 細胞質内にとり込まれるがここで, エストロゲンと特異的に結合する“receptor”⁵⁾と呼ばれる高分子物質と結合してはじめて hormone としての生物的作用を発揮する第一段階に入る。このレセプター分子はステロイド特異性があり, 結合親和性がきわめて大きく, 一定の結合部位数を持ち, 標的細胞に局在する蛋白性の巨大分子である³⁾。この specific estrogen receptor の存在は Glascock et al²⁾, Jensen et al³⁾ 等によって追求められた。その後ヒト子宮細胞質のレセプターは約 8 s の大きさで, cytosol 8 s receptor と呼ばれた³⁾。核内に見出されるレセプターは細胞質内のものより沈降係数の小さい 4~5 s であり, nuclear 5 s receptor と呼ばれている^{6) 6)}。ヒト子宮内膜については Krishnan et al⁴⁾ が 8.5 s と 5.1 s でピークがみられると報告した。ヒト子宮内膜ではこの 8 s receptor $\rightarrow$ (4 SR) $\rightarrow$ 5 SR への receptor transformation が温度依存性をもたず, activate energy がなくても極めてスムーズに移行していくと考えられている^{4) 3) 1)}。Korenman et al⁴⁾, Jensen et al³⁾ らはラットを用いた実験で細胞質内 8 SR とエストロゲンの複合体が核内に移行する際には解離されて 4 S の大きさの RE_2 複合体を形成する事を確認している。核内に取り込まれた複合体は核クロマチンのアクセプター部位と結合してその構造上の変化がもたらされる⁵⁾。この結果, RNA ポリメラーゼ活性の増加とクロマチンのテンプレート活性の増加が起これ RNA 合成が促進される⁵⁾。RNA 合成は特に E_2 に特異なメッセージを持つ m-RNA 以外に, 一般蛋白合成にも必要な γ -RNA, t-RNA もかなり多量に合成されており^{1) 5) 2) 2)}, つづいてホルモン作用を代行する作用蛋白が産生され, ホルモンの効果が出現し⁵⁾, 子宮組織細胞の発育と機能分化に関与し子宮内膜細胞などの増殖期像を形成するための礎地作りをしている⁶⁾。

正常月経周期をもつ女性の血中 E_2 量はその周期に伴い変動している^{4) 2) 6) 2)}。増殖期初期より中期にかけて増加し, 排卵前の後期で最高値に達する。排卵後の分泌期初期には急減するが中期で再

び増加しているが、後期には減少している。著者の radioimmunoassay の結果も諸家の結果とよく一致した。

子宮内膜組織における $^3\text{HE}_2$ の affinity は子宮筋組織に比べて高い^{16) 43) 37)}。子宮内膜組織における $^3\text{HE}_2$ retention は増殖期、分泌期では明らかに違いがみられる^{16) 18) 26) 67) 50)}。ヒト子宮組織におけるエストロゲンレセプター (ER) 量の月経周期に伴う変動に関する報告は多くみられるが、ほとんどが細胞質遊離型 ER 量の検討である^{16) 18) 26) 67) 50)}。増殖期が分泌期に比べて多いとする報告が多数ではあるが、月経周期の細分による変動の報告にはかなりの異見がある。Brush *et al*⁸⁾, Pollow *et al*⁵⁹⁾ は増殖期初期に高値であり以後14日目まで減少するとし, Trams *et al*⁶⁷⁾, Maass *et al*⁴⁷⁾, Hahnel *et al*²⁷⁾, Evans *et al*¹⁷⁾, もほぼ同様の報告をしている。しかし Robertson *et al*⁶²⁾ は増殖期後期で最高値を示し、月経初期及び末期では低い値を示すと報告している。Crocker *et al*¹³⁾ は細胞質分画における ER 量は、増殖期初期より後期にかけて増加し最高値を示すが、排卵後は減少していると報告した。同時に核分画 ER 量は増殖期後期で初期のほぼ3倍の値を示すが以後減少して分泌期初期ではその半量に、後期ではさらに半減していると報告している。著者は細胞質遊離型 ER 量及び細胞質分画結合型 ER 量、核分画結合型 ER 量を同一検体につき検討した。その変動傾向は、細胞質分画の遊離型 ER 量と結合型 ER 量の変動とはほぼ一致する。核内結合型 ER 量の変動は増殖期では一致するが分泌期では差がみられ、後期に向って増加し分泌期後期の ER 量は増殖期後期の ER 量にほぼ同値の結果を得た。

血中 E_2 と子宮内膜における細胞質分画遊離型 ER 量とは正の相関がみられるという報告は多い^{62) 13) 16)}。著者は月経周期を増殖期、分泌期に2分してその相関係数 ($P < 0.05$) を求めた。その結果、遊離型 ER 量は増殖期で高い正の相関 ($r = 0.85$) がみられたが、分泌期では低い正の相関 ($r = 0.66$) がみられた。細胞質分画結合型 ER 量は増殖期で遊離型 ER 量との相関係数よりもやや低い正の相関 ($r = 0.79$) がみられ、分泌期での相関係数は $r = 0.50$ と低値であった。核分画結合型 ER 量と血中 E_2 量との間には負の相関があるとの報告^{33) 47)} があるが、Robertson *et al*²⁸⁾ はこれに否定的であり、Muechler *et al*⁵⁰⁾ は相関関係がなかったとしている。著者の成績では増殖期においては他の ER に比べて核内結合型 ER 量と E_2 との相関が最も低い正の相関 ($r = 0.70$) がみられ、分泌期では相関関係はみられなかった。核内 ER 量の増加に比例して細胞質分画 ER 量は一旦減少すると考えられるが、ER の新合成が E により誘導されるために、血中 E 量の変化と平行して増加したものと考えられる。排卵後は progesterone 優位の状態になり、この progesterone による抗 estrogen 作用のために^{67) 12) 35)}、分泌期初期で細胞質分画、核分画共に ER 量の急減現象がみられたが、分泌期中期では再び E_2 の再上昇のためか、細胞質分画 ER 量、核分画 ER 量ともに影響を受け増加傾向がみられた。

子宮内膜組織はその部位によって ER 量に違いがみられるとの報告がなされている³⁵⁾。Lunan *et al*⁴⁶⁾ は増殖期では細胞質 ER 量、核内 ER 量共に体部で一番高値を示し底部では最低値を示したと報告している。John *et al*⁴⁰⁾ は増殖期でも特に後期では子宮体部と頸部とでは10倍以上の差がみられたと報告している。著者は子宮内膜組織採取方法をすべて全域にわたる採取を原則としたのではば平均された値を得ていると考えている。

血中 E_2 量の変動に伴う子宮組織細胞における RNA 合成、蛋白合成に関する報告は動物子宮を用いた報告がみられる^{21) 43) 3)}。ヒト子宮内膜についてはあまり報告がなく、Nordqvist *et al*⁵¹⁾ が RNA 合成に関して、月経周期第16日目で最高値を示すが、21日目には低値を示したと報告している。H-

amilton et al.³⁰⁾ は正常ラット子宮組織全体の RNA 量は estrus で卵巣剔除ラットの子宮に比べて 2 倍、蛋白量は 6 倍に達し、正常ラット estrus での蛋白含有量は diestrus に比べて、3 倍～6 倍の増加を示したことを報告している。Atkinson et al.¹⁾ はヒト子宮内膜細胞での RNA 量は増殖期で増加し、分泌期では減少していると報告した。Schmidt et al.⁶⁰⁾ はヒト子宮内膜の RNA 量の月経周期に伴う変動は、EP で高く、LP でやや低下し、ES ではさらに低下する。MS では最低値を示すが、LS では急増して最高値を示したと報告している。Gross et al.²⁵⁾ は EP より LP にかけて高値を示すが ES、LS では減少していると報告している。著者は RNA 合成の変動を検討し細分した月経周期についてプロットした。増殖期初期より増加し後期で最高値を示したが、分泌期初期中期ではほぼ増殖期中期の値に減少し分泌期後期ではさらに減少してその値は増殖期初期の値に近くなっていた。血中 E_2 量との相関は増殖期では高い正の相関 ($r=0.86$) がみられたが、分泌期では相関がみられなかった。ステロイドホルモンによる蛋白合成の促進は Cellular RNA の定性的定量的変化によってもたらされていると考えられ、target organ での specific mRNA がそのアミノ酸配列を決定している。Gorski et al.^{15) 4)}、Hamilton et al.^{29) 30) 32) 28) 31)}、によると E_2 投与 1 時間～4 時間後、最初に合成される RNA は r-RNA であり、すべての RNA 合成が増加するのは 3～5 時間後であるとしている。Ozaki et al.⁵⁸⁾ は未熟ラットに estrogen を投与した後の子宮で合成される RNA は代謝回転の速い m-RNA と r-RNA、t-RNA から成ると報告し、またこの estrogen 大量投与実験によると、RNA 合成は投与直後から 36 時間にかけて促進されるが、蛋白合成は 6 時間目に促進すると報告している。ヒト子宮内膜に関するこの様な実験はみられないが少なくとも RNA 合成につづいて蛋白合成が起きてくることには間違いがない。著者は蛋白合成能の月経周期に伴う変動をみたが、増殖期初期からかなり高い値を示す例があるが、増殖期後期で最高値に達し、分泌期初期では急減して増殖期初期よりも低い値を示した。その後増加し分泌期後期では増殖期中期の値に近づいている。ヒト子宮内膜の月経周期に伴う蛋白量の変動に関しては Stein et al.³²⁾ が nucleoprotein について EP より LP にかけて上昇し LP で最高値を示すが ES、LS では低値を示したとの報告と、Schmidt et al.⁶⁰⁾ が子宮内膜蛋白量について EP で最高値を示し、ES で最低値を示したとする報告はあるが蛋白合成能の検討は他にはみられない。血中 E_2 量とは増殖期でのみ高い正の相関 ($r=0.84$) がみられた。

ER 量と RNA 合成、蛋白合成との関係をみると、細胞質遊離型 ER 量とは増殖期でのみ正の相関がみられた。($r=0.88$, $r=0.61$) 細胞質分画結合型 ER 量と RNA 合成は増殖期で高い正の相関 ($r=0.80$) がみられ、分泌期でも低いながら正の相関 ($r=0.69$) がみられた。核内結合型 ER 量と RNA 合成とは増殖期でのみ正の相関 ($r=0.79$) がみられたが、これは遊離型 ER 量との相関係数より低値になっている。一方蛋白合成は増殖期で高い正の相関 ($r=0.83$) がみられ、遊離型 ER 量との相関係数に比して高値を示した。

結 語

1) 血中エストロゲン量の月経周期に伴う変動は、EP より MP にかけて上昇し、LP で最高値を示した。ES では急減したが、MS でやや増加し、LS では再び低下した。

2) D.C.C. 法で求めた細胞質分画遊離型 ER 量の月経周期に伴う変動は、EP に低く、MP にかけて増加して、LP で最高値を示した。ES では急減したが、MS でやや増加し、LS で再び低下した。

3) protamine 法で求めた細胞質分画結合型 ER 量の変動は, EP より MP にかけて増加し, LP で最高値を示した。ES では急減したが, MS では増加し, LS では再び低下した。

4) protamine 法で求めた核分画結合型 ER 量は, EP より MP にかけて増加し, LP で最高値を示した。ES では急減したが, その後再び MS にかけて増加し, LS ではさらに増加した。

5) RNA 合成は, EP より MP にかけて増加して, LP で最高値を示した。ES, MS では低下した。LS ではさらに低下した。

6) 蛋白合成は, EP より MP にかけて増加し, LP で最高値を示した。ES では急減したが, 以後 LS にかけて増加の傾向がみられた。

7) 血中エストロゲン量と ER 量との関係を見ると, 細胞質分画遊離型 ER 量とは増殖期で $r = 0.85$ ($P < 0.05$), 分泌期で $r = 0.66$ と共に正の相関がみられた。細胞質分画結合型 ER 量とは, 増殖期で $r = 0.79$ と正の相関がみられたが, 分泌期では $r = 0.50$ と低値であった。核分画結合型 ER 量は, 増殖期でのみ $r = 0.70$ と正の相関がみられた。

8) 血中エストロゲン量と RNA 合成, 蛋白合成との関係は, 増殖期では共に $r = 0.86$, $r = 0.84$ と正の相関がみられたが, 分泌期では共に相関はみられなかった。

9) RNA 合成は, 細胞質分画遊離型 ER 量との間に, 増殖期でのみ $r = 0.88$ と正の相関がみられた。細胞質分画結合型 ER 量とは, 増殖期で $r = 0.80$, 分泌期でも $r = 0.69$ と正の相関がみられた。核分画結合型 ER 量とは, 増殖期でのみ $r = 0.79$ と正の相関がみられた。

10) 蛋白合成は, 細胞質分画遊離型 ER 量との間に, 増殖期でのみ $r = 0.61$ と正の相関がみられた。細胞質分画結合型 ER 量とは, 増殖期でのみ $r = 0.68$ と正の相関がみられた。核分画結合型 ER 量とは, 増殖期で $r = 0.83$, 分泌期では $r = 0.61$ と正の相関がみられた。

稿を終るに臨み, 御指導と御校閲を賜った恩師倉智敬一教授に衷心より感謝するとともに直接御指導御鞭撻をいただいた尾崎公己講師, University of Texas Health Science Center,

Dr, David T, Zava, Baylor College of Medicine, Texas Medical Center. Dr, Roy G, Smith, 御協力をいただきました教室内分泌研究室, 病理学研究室の諸先生方に厚く感謝の意を示します。

なお本論文の一部は第30回日本産科婦人科学会総会(昭和53年4月8日), 第59回近畿産科婦人科学会学術集会(昭和53年11月12日), 第60回近畿産科婦人科学会学術集会(昭和54年5月12日), 第52回日本内分泌学会総会(昭和54年6月7日), 第3回産婦人科代謝研究会(昭和55年2月3日)において発表した。

文 献

- 1) Atkinson, W.B.: Histochemical studies on abnormal growth of human endometrium. Cancer, N.Y. 2: 132, 1949.
- 2) Baird, D.T. and Guevara, A.: Concentration of unconjugated estrone and estradiol in peripheral plasma in nonpregnant women throughout the menstrual cycle, castrate and postmenopausal women and in men. J. Clin. Endocr., 29: 149-156, 1969.
- 3) Barnea A, et al: Estrogen induced protein. time course of synthesis. Biochem. 9: 1899, 1970.
- 4) Barry, J. and Gorski, J.: Uterine ribonucleic acid polymerase. Effect of estrogen on nucleotide incorporation into 3' chain termini. Biochem. 10: 12, 2384-2390, 1971.
- 5) Baulieu, EE., Wira,

- C.R., Milgrom, E. and Raynaud-Jammet, C.: Ribonucleic acid synthesis and oestradiol action in the uterus. *Kalolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology* 5th Symposium, 396–419, 1972.
- 6) Beato, M. and Feigelson, P.: Glucocorticoid-binding proteins of rat liver cytosol I. separation and identification of the binding proteins. *J. Biol. Chem.*, 147: 7890–7896, 1972.
- 7) Borthwick, N.M. and Smellie, R.M.: The effects of oestradiol-17 β on the ribonucleic acid polymerases of immature rabbit uterus. *Biochem. J.* 147, 91–101, 1975.
- 8) Brush, M.G., Tayler, R.W. and King, R.J.B.: The uptake of [6, 7-³H] Oestradiol by the normal human female reproductive tract. *J. Endocr.*, 39: 599–607, 1967.
- 9) Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, 62: 315–323, 1956.
- 10) Chamness, G.C., Huff, K. and McGuire, W.L.: Protamine-precipitated estrogen receptor: A solid-phase ligand exchange assay. *Steroids*, 25: 627–635, 1975.
- 11) Chan, L., Means, A.R. and O'Malley, B.W.: Rates of induction of specific translatable messenger RNAs for ovalbumin and avidin by steroid hormones. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 70: 1870–1874, 1973.
- 12) Clark, J.H., Anderson, J.N. and Peck, Jr. E.J.: Estrogen receptor Anti-estrogen complex: Atypical binding by uterine nuclei and effects on uterine growth. *Steroids*, 22: 707–719, 1973.
- 13) Crocker, S.G., Milton, P.J.D. and King, R.J.B.: Uptake of [6, 7-³H] oestradiol-17 β by normal and abnormal human endometrium. *J. Endocr.*, 62: 145–152, 1974.
- 14) Daughaday, W.H. and Kozaki, I.: Binding of corticosteroids by plasma proteins. III. The binding of corticosteroid and related hormones by human plasma and plasma protein fractions as measured by equilibrium dialysis. *J. Clin. Invest.*, 37: 511–518, 1958.
- 15) DeAngelo, A.B. and Gorski, J.: Role of RNA synthesis in the estrogen induction of a specific uterine protein. *Proc. of the Natl. Acad. of Sci.* 66: 693, 1970.
- 16) Evans, L.H. and Hähnel, R.: Oestrogen receptors in human uterine tissue. *J. Endocr.*, 50: 209–229, 1971.
- 17) Evans, L.H., Martin, J.D. and Hähnel, R.: Estrogen receptor concentration in normal and pathological human uterine tissues. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 38: 23–32, 1974.
- 18) Flickinger, G.L., Elsner, C. and Illingworth, D.V.: Estrogen and progesterone receptors in the female genital tract of humans and monkeys. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 286: 180–189, 1977.
- 19) Geschwendt, M. and Hamilton, T.H.: The transformation of the cytoplasmic oestradiol-receptor complex into the nuclear complex in a uterine cell-free system. *Biochem. J.*, 128: 611–616, 1972.
- 20) Glascock, R.F. and Hocketra, W.G.: Selective accumulation of tritium-labelled hexoestrol by the reproductive organs of immature female goats and sheep. *Biochem. J.*, 72: 673–782, 1959.
- 21) Gorski et al: Estrogen control of the synthesis of RNA and protein in the uterus. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 66: 91, 1965.
- 22) Gorski, J., Noteboom, W.D. and Nicolette, J.A.: Estrogen control of the synthesis of RNA and protein in the uterus. *J. Cell. and Comp. Physiol.*, 66: 91–110, 1965.
- 23) Greenman, D.I. and Kenney, F.T.: Effects of Alterations in hormonal status on ribosomes of rat uterus. *Arch. of Biochem. and Bioph.*

- 107, 1, 1964. 24) Grodsky, G.M. and Forsham, P.H.: An immunochemical assay of total extractable insulin in man. *J. Clin. Invest.*, 39: 1070–1079, 1960.
- 25) Gross, S.J.: Ribonucleoprotein, glucuronidase, and phospholipid in normal and abnormal endometrium. *Am. J. Obst. Gynec.* 90: 166–182, 1964. 26) Hähnel, R., Twaddle, E. and Brindle, L.: The influence of enzymes on the estrogen receptors of human uterus and breast carcinoma. *Steroids*, 24: 489–507, 1974. 27) Hähnel, R., Twaddle, E. and Ratajezak, T.: The specificity of the estrogen receptor of human uterus. *J. Steroid. Biochem.*, 4: 21–31, 1973. 28) Hamilton, T.: Control by estrogen of genetic transcription and translation. *Science*, 161: 649–661, 1968.
- 29) Hamilton, T.H.: Isotopic studies on estrogen-induced accelerations of ribonucleic acid and protein synthesis. *Proc. N.A.S.* 49: 373–379, 1963. 30) Hamilton, T.H.: Sequences of RNA and protein synthesis during early estrogen action. *Biochem. Proc. N.A.S.* vol. 51, 83–89, 1964. 31) Hamilton, T.H., Teng, C.S. and Means, A.R.: Early estrogen action: Nuclear synthesis and accumulation of protein correlated with enhancement of two DNA-dependent RNA polymerase activities. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 59: 1265–1272, 1968. 32) Hamilton, T.H., Widnell, C.C., Tata, J.R.: Sequential stimulations by oestrogen of nuclear RNA synthesis and DNA-dependent RNA polymerase activities in rat uterus. *Biochem. Biophys. Acta*, 108: 168–172, 1965.
- 33) Henderson, S.R. and Schalch, D.S.: Estrogen receptors in the human uterus. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 112: 762–771, 1972. 34) Horwitz, K.B. and McGuire, W.L.: Nuclear mechanisms of estrogen action. *J. Biol. Chem.* 253: 8185–8191, 1978.
- 35) Hsueh, A.J.W., Peck, Jr. E.J. and Clark, J.H.: Control of uterine estrogen receptor levels by progesterone. *Endocr.* 98: 438–444, 1976. 36) Jensen, E.V.: Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog. Horm. Res.* 18: 387, 1962.
- 37) Jensen, E.V.: Mechanism of estrogen action in relation to carcinogenesis. *Proc. Can. Cancer Res. Conf.* 6: 143, 1966. 38) Jensen, E.V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W.E., Jungblut, P.W. and DeSombre, E.R.: A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 59: 632–638, 1968.
- 39) Jensen, E.V., Suzuki, T., Numata, M., Smith, S. and DeSombre, E.R.: Estrogen-binding substances of target tissues. *Steroids*, 13: 417–427, 1969. 40) John, C.M.: Distribution of cytoplasmic estrogen and progesterone receptors in human endometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 132: 449, 1978. 41) Katzenellenbogen, B.S. and Gorski, J.: Estrogen action in vitro – Induction of the synthesis of a specific uterine protein. *J. Biol. Chem.* 247: 1299, 1972. 42) King, R.J.B., Gordon, J. and Steggle, A.W.: The properties of a nuclear acidic protein fraction that binds [6, 7-³H] oestradiol-17 β . *Biochem. J.* 114: 649–657, 1969. 43) Knowler et al: The synthesis of RNA in immature rat uterus responding to estradiol-17 β . *Biochem. J.* 125: 605, 1971.
- 44) Korenman, S.G. and Rao, B.R.: Reversible disaggregation of the cytosol-estrogen binding protein of uterine cytosol. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 61: 1028–1033, 1968.
- 45) Krishnan, A.R., Hingorani, V. and Laumas, K.R.: Binding of ³H-oestradiol with re-

- ceptors in the human endometrium and myometrium. *Acta Endocrin.* 74: 756–768, 1973.
- 46) Lunan, C.B. and Green, B.: Oestradiol-17 β uptake in vitro into the nuclei of endometrium from different regions of the human uterus. *Acta Endocrin.* 78: 353–363, 1975.
- 47) Maass, H., Bruemmer, P., Egert, D., Engel, B., Hohmeister, H., Lehmann, F. and Trams, G.: On the existence of receptors for estradiol in normal and malignant human tissue and the mode of action of progesterone. *Acta Obst. Gynecol. Scand.*, 19: 30–34, 1971.
- 48) Martin, J.E.: Estrogen receptors in the human uterus: Characterization by sucrose gradient centrifugation. *Endocr.* 91: 594, 1972.
- 49) Mikhail, G., Wu, C.H., Ferin, M. and Vande Wiele, R.L.: Radioimmunoassay of plasma estrone and estradiol. *Steroids*, 15: 333–352, 1970.
- 50) Mueller, E.K., Flickinger, G.L., Mangan, C.E. and Mikhail, G.: Estradiol binding by human endometrial tissue. *Gynecol. Oncol.* 3: 244–250, 1975.
- 51) Nordqvist, S.: The synthesis of DNA and RNA in normal human endometrium in short-term incubation in vitro and its response to oestradiol and progesterone. *J. Endocr.*, 48: 17–28, 1970.
- 52) Notides, A.C., Hamilton, D.E. and Rusolph, J.H.: Estrogen-binding proteins of the human uterus. *Biochem. et Biophys. Acta*, 271: 214–224, 1972.
- 53) Oliver, H.L., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265–275, 1951.
- 54) O'Malley, B.W., Schwartz, R. and Schrader, W.T.: A review of regulation of gene expression by steroid hormone receptors. *J. Steroid. Biochem.*, 7: 1151–1159, 1976.
- 55) Ozaki, M., Kubo, T., Kim, H. and Kurachi, K.: Studies on the RNA synthesized in the ovary of immature rats after PMS administration. *Acta Obst. et Gynaec. Jap.* 21: 49–57, 1974.
- 56) 尾崎公巳, 倉智敏一: ヒト子宮内膜におけるエストロゲンレセプターに関する研究——エネルギー必要性, 温度に対する安定性, サブユニット構造などについて——*日内分泌会誌*, 52: 774–783, 1976.
- 57) 尾崎公巳, 倉智敏一: ヒト子宮内膜におけるエストロゲンレセプターに関する研究——主にその温度依存性について——*日産婦誌*, 28: 487–492, 1976.
- 58) 尾崎公巳, 倉智敏一: 大量 estradiol-17 β 投与後の間脳, 下垂体, 卵巣系における蛋白質, 核酸合成の変動について。*日産婦誌*, 29: 277–284, 1977.
- 59) Pollow, K., Lubbert, H., Elmar, B.: Characterization and comparison of receptors for 17 β -estradiol and progesterone in human proliferative endometrium and endometrial carcinoma. *Endocr.* 96: 319–328, 1975.
- 60) Puca, G. and Bresciani, F.: Receptor molecule for estrogens: Isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 55: 1574–1581, 1966.
- 61) Ratajczak, T. and Hähnel, R.: Estradiol receptors: Influence of plasma proteins on detection and quantitation. *J. of Steroid Bioch.* 7: 741–744, 1976.
- 62) Robertson, D.M., Mester, J., Beilby, J., Steele, S.J. and Kellie, A.E.: The measurement of high-affinity oestradiol receptors in human uterine endometrium and myometrium. *Acta Endocrinologica*, 68: 534–542, 1971.
- 63) Rosenfeld, G.C., Comstock, J.P., Means, A.R. and O'Malley, B.W.: Estrogen-induced synthesis of ovalbumin messenger RNA and its translation in a cell-free system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46: 1695–1703, 1972.
- 64) Schmidt, H., Berle, P. and Voigt, K.D.: Alteration of protein, nucleic acids and enzyme

- activities in the human endometrium during the normal menstrual cycle. *Acta Endocrinologica*, 61: 729–736, 1969.
- 65) Sherman, B.M. and Korenman, S.G.: Hormonal characteristics of the human menstrual cycle throughout reproductive life. *J. Clin. Invest.*, 55: 699–706, 1975.
- 66) Steggles, A.W. and King, R.J.B.: The use of protamine to study [6, 7-³H] oestradiol-17 β binding in rat uterus. *Biochem. J.* 118: 695–701, 1970.
- 67) Trams, G., Engel, B., Lehman, F. and Maass, H.: Specific binding of oestradiol in human uterine tissue. *Acta Endocrinologica*, 72: 351–360, 1973.
- 68) Ui, H. and Mueller, G.C.: Role of RNA synthesis in mechanism of estrogen action. *Federation Proc.*, 22: 409, 1963a. The role of RNA synthesis in early estrogen action. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.*, 50: 256, 1963b.
- 69) Wyss, R.H.: Inhibition of uterine receptor binding of estradiol by antiestrogens. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 28: 1824, 1968.
- 70) Zava, D.T., Harrington, N.Y. and McGuire, W.L.: Nuclear estradiol receptor in the adult rat uterus: a new exchange assay. *Biochemistry*, 15: 4292–4297, 1976.