マウス顎下腺アンドロゲンレセプターの 細胞質ならびに核画分への分布と テストステロン投与の影響

客 本 斉 子

岩手医科大学歯学部口腔生化学（主任：太田稔教授）

〔受付：昭和62年1月5日〕

Distribution of androgen receptors between cytosolic and nuclear fractions in mouse submandibular glands and effects of testosterone injection

Seiko Kyakumoto

*Department of Biochemistry, Iwate Medical University School of Dentistry
Chuodori 1-3-27, Morioka, Iwate-Ken 020 (Chief: Prof. Minoru Ota)*

〔Accepted for publication: January 5, 1987〕

Key words: Mouse / submandibular gland / androgen receptor / distribution / testosterone injection

Abstract: Cytosolic and nuclear androgen receptors in mouse submandibular glands of male and female mice were measured by the hydroxyapatite adsorption method using [³H]R1881 as a ligand. The number of androgen binding sites in the nucleus was much higher in males than in females (1,052 fmol/mg DNA and 32 fmol/mg DNA, respectively), while the number in the cytosol was higher in females than in males (512 fmol/mg DNA and 368 fmol/mg DNA, respectively). These observations show that androgen receptors exist mainly (74 %) in the nuclei of males, while they exist mostly (94 %) in the cytosol of females and that there is a sex difference in the distribution of the androgen receptor between the cytosolic and nuclear fractions of the submandibular gland.

The injection of testosterone altered the cellular distribution of the androgen receptor in female mice. The cytosolic receptor decreased and concomitantly the nuclear receptor increased 1 hour after injection. The decreased level of the cytosolic receptor gradually replenished, whereas the increased level of the nuclear receptor decreased gradually to the pretreatment level. The period required for the replenishment of the cytosolic receptor or for the reduction of the receptor accumulated in the nucleus was dependent on the dose of testosterone injected to the mice. Therefore, the change in the levels of cytosolic and nuclear androgen receptors following testosterone injection seemed to be parallel with the level of circulating androgen.

The process of replenishment of cytosol receptors was inhibited by cycloheximide, indicating that replenishment is dependent on protein synthesis. However, actinomycin D had no inhibitory effect on the receptor replenishment, suggesting that testosterone regulates the receptor synthesis in a post-transcriptional process.

緒 言

マウス顎下腺はアンドロゲン依存性臓器であり

岩手県盛岡市中央通1-3-27 〒020

形態学的にも生化学的にも顕著な性差が認められる。形態学的には顆粒管が雌に較べ雄でより発達しており¹⁾、生化学的には神経成長因子²⁾、上皮成長因子³⁾などの生理活性ペプチドやある種の蛋白

分解酵素活性⁴⁾などが雄で有意に高値を示す。またアンドロゲン投与によりこれらのポリペプチドや蛋白質の生合成の誘導が認められる^{3,4)}。一方マウスの顎下腺細胞質画分(150,000×g 上清画分)にはアンドロゲンに特異的であつ親和性の高いアンドロゲンレセプターが存在する^{5,6)}が、この細胞質レセプター量は意外にも雌で雄より有意に高い^{7,8)}。我々はラット顎下腺細胞質画分についてもアンドロゲンレセプターを検索し同様の結果を得た⁹⁾。しかし、これらの知見はアンドロゲンレセプターはアンドロゲンにより誘導されるとの従来の定説^{10,11)}からは説明しがたい。当研究室の佐藤らは mersalyl と monothioglycerol を用いたレセプターの exchange assay¹²⁾で、マウス顎下腺の細胞質アンドロゲンレセプターはそのほとんどがステロイドと結合していない非占有型(un-occupied)レセプターである⁸⁾ことを報告している。従来より、ステロイドレセプターの作用機構として提唱されてきた二段階説¹³⁾に従えば、細胞質アンドロゲンレセプターははじめにアンドロゲンと結合し占有型(occupied)レセプターとなり、形成されたアンドロゲン-レセプター複合体は活性型レセプターへと変換し、この活性型レセプターは直ちに核アクセプター部位へ結合すると考えられる。しかしながら、これまでの顎下腺アンドロゲンレセプターに関する報告はいずれも細胞質を用いての実験によるものであり、核内のアンドロゲンレセプターの測定や性質についての検討はなされていない。

1984年に二つの研究グループによって、エストロゲンレセプターは *in vivo* で核にのみ存在すると報告された。1つは King らによるモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的手法¹⁴⁾、他方は Welshons らによる enucleation 法¹⁵⁾によるもので、共にレセプターは核にのみ検出され細胞質には検出されなかった。従って Welshons らはこれらの結果にもとづき次のような新しいモデルを提唱した。すなわちレセプターはステロイドとの結合の有無にかかわらず *in vivo* では核内に存在する。従来から測定されていた細胞質レセプターはもともと核内に存在していたレセプターが細胞質調製時すなわち組織をホモジナイズする

際に核から細胞質画分へと漏出してきたもので人為的産物であるとの新説を提案した。すなわち unoccupied レセプターは核成分との結合がゆるいためホモジナイズの際細胞質画分へ漏出してくる一方、occupied レセプターは核成分との親和性が高く強固に結合しているためホモジナイズで核より漏出されることはないとしている。この新説は、これまで認められていた Jensen らの二段階説に波紋を投げかけた。しかし、従来の細胞質と核レセプターの二種のレセプターを、核への親和性が異なる二種の核レセプターと考え、また細胞質から核への移行という現象を、核低親和性から高親和性レセプターへの状態の変化と仮定すれば、新説とも矛盾のないものと考えられる。従って著者が本報告において用いる細胞質レセプターならびに核レセプターという表現は、それぞれ細胞分画法による150,000×g 遠心上清として得られる細胞質画分(cytosolic fraction)ならびに1,500×g 沈殿として得られる調製核画分(nuclear fraction)に見い出されるレセプターという意味であり、本来レセプターが細胞質に存在するあるいは核に存在するといった細胞内局在性を意味するものではない。

本報告では、マウス顎下腺におけるアンドロゲンの作用機構を解明するため、雌雄の核アンドロゲンレセプターの有無について検討した。また核レセプターの物理化学的性状についても検索した。一方、核レセプター量の測定と並行して雌雄の細胞質レセプター量も測定し、顎下腺アンドロゲンレセプターの細胞質ならびに核画分への分布を雌雄マウスで比較検討した。さらに、雌に testosterone を投与し、細胞質ならびに核画分のアンドロゲンレセプターの量的な変動とその変動の機構、ならびに物理化学的性状について検討した。

実験材料及び方法

1. 実験材料

(1) 実験動物

8週令の ddY 系雌雄マウスを静岡実験動物より購入し、14時間、10時間の明暗サイクル、22±1°C の条件下にて、固形飼料(オリエンタル酵母, MF)を与え自由飲水にて飼育した。その後9-10

週令にて実験に供した。

(2) 試薬

トリチウム標識合成アンドロゲン [6,7- ^3H] methyltrienolone (17 β -hydroxy-17-methyl-4, 9, 11-estratriene または R1881, 87 Ci/mmol), 非標識 R1881 ならびに L-[4, 5- ^3H (N)]leucine は New England Nuclear より, また [5, 6- ^3H] uridine 5'-triphosphate tetrasodium salt ([^3H] UTP) は ICN Radiochemicals より購入した。標品の純度は使用前に thin-layer chromatography を行ない確認した。Mibolerone (17 β -hydroxy-7 α , 17-dimethyl-4-estren-3-one) は Amersham より, triamcinolone acetonide (TA) は三共化学より, testosterone propionate (TP), pyridoxal 5'-phosphate (PLP) は半井化学より, また cycloheximide (CXM), actinomycinD (AcD), diisopropylfluorophosphate (DFP) および上記以外のステロイドは Sigma より購入した。Leupeptin はペプチド研究所より, dithiothreitol (DTT) は Boehringer Mannheim より, Sephacryl S-200 は Pharmacia より, hydroxyapatite は生化学工業より購入した。その他試薬類は和光純薬特級を用いた。

2. 方法

(1) 投与

マウス (9週令) は TP, CXM, AcD の単独投与群, TP と CXM ならびに TP と AcD の同時投与群さらに各実験群の対照群へ任意に分けた。TP は propylene glycol に溶解し, 100 μl を頸部皮下へ, CXM は生理食塩水に溶解し 400 μl を頸部皮下あるいは 100 μl を腹腔内へ, AcD は生理食塩水に溶解し 400 μl を腹腔内へそれぞれ投与した。 [^3H]Leucine 及び [^3H]UTP 投与の際はそれぞれを生理食塩水に溶解し 100 μl を腹腔内へ投与した。試薬の投与濃度は各項にそれぞれ記載した。

(2) 細胞質ならびに核アンドロゲンレセプターの調製

マウスは頸椎脱臼にて屠殺後, 直ちに顎下腺を摘出し氷冷した生理食塩水中に入れた。附着している結合組織を除去後重量を測定した。以下の全ての操作は 0-4°C 下にて行った。細胞質画分を得

るために組織は3倍容の TEDMG 緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 20 mM sodium molybdate, 10% (v/v) glycerol, 0.5mM leupeptin, 1mM DFP, pH 7.4) 中にてガラス-テフロンホモジナイザーを用いホモジナイズした。続いてホモジネートを 150,000 $\times g$ 30 分間超遠心し, 上清を細胞質アンドロゲンレセプター画分として用いた。一方核画分を得るために, 組織を8倍容の hexylene glycol (HG) 緩衝液 (1M HG, 0.1 mM MgCl_2 , 2mM DTT, 5mM EGTA, 10mM Tris-HCl, 0.5mM leupeptin, 1mM DFP, pH 7.4) を用いてガラス-テフロンホモジナイザーにてホモジナイズした。ホモジネートはガーゼでろ過後 1,500 $\times g$ 10 分間遠心した。沈殿を HG 緩衝液に懸濁し, 1,500 $\times g$ 遠心沈殿物を得た。HG 緩衝液による洗浄をさらに2度繰り返し核画分を得た¹⁶⁾。また核調製の簡便法として, 細胞質調製時に得られた沈殿を HG 緩衝液で3回洗浄し, 1,500 $\times g$ 遠心により得られた沈殿物を核画分とした。両核画分はさらに組織重量の3倍容の PLP 緩衝液 (5mM PLP, 20 mM sodium barbital, 1.5mM EDTA, 0.15M KCl, 5mM DTT, 20% glycerol, pH8.0) にて 0°C 30分間抽出した。抽出後 80,000 $\times g$ 1時間遠心し核抽出物 (nuclear extract, NE) を得, これを核アンドロゲンレセプター画分とした。なお核の回収率は約50%で両調製法による差は認められなかった。

細胞質の蛋白量は, ウシ血清アルブミンを標準とし, Lowry らの方法¹⁷⁾により測定した。また核抽出物, 抽出残渣および細胞質調製後の遠心残渣の DNA 量は, ウシ胸腺 DNA を標準とし Burton 法¹⁸⁾により測定した。

(3) 細胞質ならびに核アンドロゲンレセプターの測定

細胞質あるいは核抽出物は特記しない場合は 2.5nM [^3H]R1881と, [^3H]R1881 の 100 倍量すなわち 250nM の非標識 R1881 の存在ならびに非存在下で 0°C にてそれぞれ記載した時間インキュベートした。続いて 250 μl の hydroxyapatite 懸濁液 (hydroxyapatite を等量の TMD 緩衝液 (10mM Tris-HCl, 10mM sodium molybdate,

1mM DTT, pH 7.4) に懸濁) を加え0°C にて10分毎に試験管を攪拌しつつ30分間インキュベートし, hydroxyapatite に $[^3\text{H}]\text{R1881}$ -レセプター複合体を結合させた¹⁹⁾。ついで, これを800×g 5分間遠心し, 沈殿を 2ml の TMD 緩衝液で3回洗浄し遊離の $[^3\text{H}]\text{R1881}$ を除去した。結合ステロイドは 2ml ethanol にて一晚抽出し, これに ACS-II シンチレーター (Amersham) を添加後 アロカ 液体シンチレーションカウンター (Aloka LSC-903) にて測定した。

実験によつては, $[^3\text{H}]\text{R1881}$ -レセプター複合体を遊離の $[^3\text{H}]\text{R1881}$ から分離する手段として dextran-coated charcoal (DCC) 法²⁰⁾を用いた。すなわち, $[^3\text{H}]\text{R1881}$ -レセプター複合体と等量の DCC 懸濁液 (1% activated charcoal, 0.5% dextran T-70 を TE 緩衝液 (50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.4) に懸濁) を加え0°C 10分間放置後, 800×g 5分間遠心しその上清の放射活性を測定した。

$[^3\text{H}]\text{R1881}$ のアンドロゲンレセプターに対する特異的結合は, 非標識ステロイド非存在下での全結合量から非標識ステロイド存在下における非特異的結合量を差し引くことにより求めた。

(4) 組織スライスをを用いてのアンドロゲンレセプターの標識と核レセプターの抽出

核アンドロゲンレセプターの PLP 緩衝液による抽出効率を決めるため以下の実験を行なった。雄顎下腺組織をメスを用いて厚さおよそ 1mm のスライスとし, これを Eagle's Minimal Essential Medium (MEM)²¹⁾ 中にて 2.5nM $[^3\text{H}]\text{R1881}$ と100倍量の非標識 R1881 の存在ならびに非存在下にて0°C, 3時間インキュベートした。その後スライスに phosphate-buffered saline (日本) 2ml を加え800×g 5分間遠心した。この洗浄操作はさらに2回繰り返した後, 前述の方法(2)と同様にスライスより核画分を調製し, $[^3\text{H}]\text{R1881}$ で標識された核レセプターを各種濃度の PLP 緩衝液にて抽出した。ついで, 核抽出物と残渣を 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中に懸濁し同様に放射活性を測定した。

(5) グリセロール密度勾配遠心法による沈降係数の測定

細胞質ならびに核抽出物は, 非標識 R1881 の存在, 非存在下にて 2.5nM $[^3\text{H}]\text{R1881}$ と0°C で3時間(細胞質)あるいは24時間(核抽出物)インキュベートした。その後 DCC 沈殿 (DCC 懸濁液を800×g 10分間遠心することにより得た) とインキュベートし遊離の $[^3\text{H}]\text{R1881}$ を除去後, 上清を 5ml の15-30% (v/v) のグリセロール直線密度勾配に重層した。グリセロール密度配は density gradient fractionator (日立) を用い, 0.5mM leupeptin を含む TED 緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, pH 7.4) にて作成した。なお実験によつては, 0.4M KCl, 10mM sodium molybdate, 1mM PLP を含む密度勾配も使用した。核抽出物を標品として用いる場合は, 標品中に20%の glycerol を含むためこれを10%となるよう glycerol を含まない PLP 緩衝液で2倍に希釈後重層した。遠心は0-2°C にて 230,000×g, 22時間行なった。遠心後8滴(約200 μl) ずつのフラクションを集め (density gradient fractionator 使用) 放射活性を測定した。マーカーには, マッコウクジラミオグロビン (2.0S), 卵白アルブミン (3.5S), ウシ血清アルブミン (4.6S), ウマ γ -グロブリン (7.0S) を用いた。

(6) Sephacryl S-200 ゲルマトグラフィーによる分子量の測定

$[^3\text{H}]\text{R1881}$ で標識した核抽出物は DCC 沈殿にて遊離の $[^3\text{H}]\text{R1881}$ を除去後, 500 μl を 1mM PLP を含む TEDM 緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1mM EGTA, 1mM DTT, 10mM sodium molybdate, pH 7.4) であらかじめ平衡化した Sephacryl S-200カラム (0.9×50cm) へ重層し, 同緩衝液で溶出した。フラクションは各 1.2ml とし, その中の 1ml を用いて放射活性を測定した。マーカーにはビタミン B₁₂ (分子量1,400), マッコウクジラミオグロビン (17,000), 卵白アルブミン (45,000), ウシヘモグロビン (64,500), ウマ γ -グロブリン (160,000), ブルーデキストラン (3,000,000) を用いた。

(7) 細胞質ならびに核レセプターからのリガンドの解離実験

雄マウス顎下腺細胞質ならびに核抽出物を

[^3H]R1881 で標識後これを二分し、一方に [^3H]R1881 の100倍量の非標識 R1881 を添加、他方は対照として TE 緩衝液を添加後インキュベートした。この反応液の一定量 (200 μl) を経時的に hydroxyapatite に吸着させ、方法 (3) で記載したごとく放射活性を測定した。

(8) [^3H]Leucine ならびに [^3H]UTP の取り込みにおける CXM ならびに AcD の効果

CXM による蛋白合成阻害は、*in vivo* で投与した [^3H]leucine の顎下腺過塩素酸沈殿画分への取り込み量を測定した。すなわちマウスに各種条件で CXM を投与後各時間に [^3H]leucine を一匹当り 20 μCi 投与した。1時間後に顎下腺を摘出し0.5N HClO_4 中でホモジナイズ後800 $\times$ g 10分間の遠心により沈殿を得た。ついで0.3N HClO_4 で3回沈殿を洗浄し、蒸留水に懸濁後放射活性を測定した。AcD による RNA 合成阻害は、同様に *in vivo* で投与した [^3H]UTP の顎下腺過塩素酸沈殿画分への取り込み量を測定し求めた。すなわちマウスに AcD を体重 100g 当り 1mg を投与後、1,3ないし6時間後に [^3H]UTP を一匹当り 20 μCi 投与した。1時間後に顎下腺を摘出し、 [^3H]leucine の取り込み実験と同様にして取り込まれた [^3H]UTP の放射活性を測定した。

(9) Testosterone 投与後の細胞質ならびに核レセプター量の変動

雌マウスに TP を 100g 体重当り testosterone として5, 50もしくは500 μg 皮下投与後経時的に顎下腺を摘出し、細胞質ならびに核アンドロゲンレセプター量を前述の方法により測定した。

(10) Testosterone 投与後の細胞質ならびに核アンドロゲンレセプターの変動に及ぼす CXM 及び AcD の効果

雌マウスに CXM を初回に100g 体重当り 24mg, 続いて2.4mg の量を毎時間投与した。CXM の初回投与の1時間後に TP を 100g 体重当り testosterone として 5 μg 投与し、経時的に細胞質ならびに核アンドロゲンレセプター量を測定した。また AcD は100g 体重当り1mg を投与し、その1時間後に CXM の場合と同様に TP を投与し細胞質ならびに核アンドロゲンレセプター量

を測定した。対照群には、CXM あるいは AcD を含まない生理食塩水を投与した。また CXM および AcD のみのアンドロゲンレセプターに対する影響は、CXM あるいは AcD を前述のごとく投与し TP を投与しないマウスを用いて並行して行うことにより検討した。

結 果

I. 雌雄マウス 顎下腺アンドロゲンレセプターの細胞質ならびに核画分への分布

1. PLP による核アンドロゲンレセプターの抽出

雄マウス顎下腺核画分より種々の濃度の PLP で抽出した核抽出物 (NE) と [^3H]R1881 との結合を測定した。Table 1のごとく、PLP の濃度の増加に伴い結合量が増大し、2-5mM PLP で [^3H]R1881 結合量 すなわちレセプターの抽出はほぼ最大となった。なお、抽出が最大であった 5mM PLP と 0.4M KCl では結合量に差は認められなかった。一方、顎下腺の組織をスライスし、これと [^3H]R1881 をインキュベーションし標識した後、核レセプターを各種濃度の PLP で抽出し NE ならびに沈渣中の放射活性を測定した場合も同様の傾向を示した (Table 2)。すなわち 2-5mM PLP で抽出は最大であったが、抽出が進むに伴い沈渣中の放射活性は減少した。また 2-5mM PLP で抽出した際の沈渣中の放射活性は核画分に取り込まれた全放射活性のわずか 5-7%であった。なお 5mM PLP と 0.4M KCl では抽出効率に差は認められなかった。これらの結果は、顎下腺の核アンドロゲンレセプターは 5mM PLP により 93-95% とほぼ完全に核画分から抽出できることを示しており、以下核レセプターの抽出には 5mM PLP を用いた。

2. 核アンドロゲンレセプターの exchange assay

一般に、細胞分画法により調製した核画分にみいだされるアンドロゲンレセプターは内因性のアンドロゲンにより占有 (occupy) されていると考えられる。そこで核レセプターの測定にはすでにレセプターと結合しているアンドロゲンを [^3H]R1881 で交換することが必要とされる。そこで0

Table 1 Extraction of nuclear androgen receptor from male mouse submandibular glands with pyridoxal 5'-phosphate.

Conditions	Specific binding (fmol/mg DNA)
Barbital buffer	238.0
+ 1 mM PLP	301.6
+ 2 mM PLP	482.0
+ 5 mM PLP	522.8
+ 10 mM PLP	445.6
0.4 M KCl in TEDMG buffer	518.8

Nuclear androgen receptors were extracted with 0-10 mM pyridoxal 5'-phosphate (PLP) in barbital buffer containing 0.15 M KCl for 30 min at 0°C from the nuclear fractions of submandibular glands in male mice. 200 μ l aliquots of the nuclear extracts were incubated with 2.5 nM [^{3} H]R1881 in the presence or absence of a 100-fold molar excess of unlabeled R1881 for 24 h at 0°C. Bound radioactivities were measured by the hydroxyapatite adsorption method as described in Materials and Methods. Results are shown as specific binding. Values are from one of three determinations.

Table 2 Extraction of nuclear androgen receptor from male mouse submandibular glands with pyridoxal 5'-phosphate using tissue slices labeled with [^{3} H]R1881

Conditions	Specific binding (fmol/mg DNA)		
	NE	ppt	total
Barbital buffer	25.5	22.8	48.3
+ 1 mM PLP	40.3	9.4	49.7
+ 2 mM PLP	54.6	2.7	57.3
+ 5 mM PLP	54.5	4.2	58.7
+ 10 mM PLP	47.3	5.5	52.8
0.4 M KCl in TEDMG buffer	54.5	3.3	57.8

Tissues from male mice were sliced and incubated with 2.5 nM [^{3} H]R1881 in MEM for 3 h at 0°C in the presence or absence of a 100-fold molar excess of unlabeled R1881. Nuclear androgen receptors were extracted with 0-10 mM PLP and centrifuged. Nuclear extracts (NE) and pellets obtained were counted for radioactivity as described in Materials and Methods. Results are shown as specific bindings. Values are from one of two determinations, both revealed identical results.

°C, 17°C, 22°C にて [^{3} H]R1881 の結合を経時的に測定し交換測定法 (exchange assay) の最適条件を検討した。Table 3 に示したように0°C では、24-48時間で結合は飽和に達し、72時間でも安定であった。一方17°C では、3時間の結合量は0°C の場合より高いものの24ならびに48時間で結合は減少した。22°C では3時間ですでに結合は0°C の場合より低く、24,48時間とさらに減少した。17°C あるいは22°C での結合でみられた長時間のインキュベーションによる結合量の減少は、加温によるレセプターの分解、不活性化もしくはリガンドすなわち [^{3} H]R1881のレセプター

からの解離によるものと思われた。これらの結果よりマウス顎下腺の核アンドロゲンレセプターの exchange assay は、高温下で行うより、0°C 長時間の条件下で行うほうが効果的であることが示され、以後0°C で結合を行った。

3. 細胞質ならびに核アンドロゲンレセプターと [^{3} H]R1881 の結合の経時的变化

雌雄顎下腺より調製した細胞質ならびに核抽出物と [^{3} H]R1881 との結合を0°C にて経時的に測定した。雌では、細胞質画分に含まれるレセプター (細胞質レセプター) は1.5時間のインキュベーションで [^{3} H]R1881 との結合は完全に飽和

Table 3 Exchange assay of male mouse nuclear androgen receptor

Incubation time (h)	Specific binding (fmol/mg DNA)		
	0° C	17° C	22° C
3	234.4	332.9	192.9
24	510.6	263.8	70.2
48	523.4	257.5	30.8
72	522.5	N. D.	N. D.

Nuclear extract of male mouse submandibular gland was incubated with 2.5 nM [^3H]R1881 at 0, 17, or 22°C in the presence or absence of a 100-fold molar excess of unlabeled R1881. After indicated periods of incubation, the mixture was treated with hydroxyapatite and bound radioactivity was measured as described in Materials and Methods. Results are shown as specific binding. N.D. ; not determined.

Fig. 1 Time course of [^3H]R1881 binding with cytosolic and nuclear androgen receptors in female mouse submandibular glands. Cytosol (○) or nuclear extracts (●) in female mouse submandibular glands were incubated with 2.5 nM [^3H]R1881 at 0°C in the presence or absence of a 100-fold molar excess of unlabeled R 1881. At indicated times, 200 μl aliquots of the mixture were treated with hydroxyapatite and bound radioactivities were measured as described in Materials and Methods. Results are from one of three experiments, all of which revealed a similar tendency. Specific bindings are expressed as fmol per mg DNA.

し、48時間でも結合量はほぼ維持された。核抽出物に含まれるレセプター（核レセプター）は、3時間で結合が飽和に達し、その後72時間でも安定であった（Fig.1）。一方雄では、細胞質レセプターと [^3H]R1881 との結合は3時間でも飽和結合量の80%ほどでその後6時間で飽和に達し、雌

Fig. 2 Time course of [^3H]R1881 binding with cytosolic and nuclear androgen receptors in male mouse submandibular glands. Cytosol (○) or nuclear extracts (●) in male mouse submandibular glands were incubated with 2.5 nM [^3H]R1881 at 0°C in the presence or absence of a 100-fold molar excess of unlabeled R1881. At indicated times, 200 μl aliquots of the mixture were treated with hydroxyapatite and bound radioactivities were measured as described in Materials and Methods. Results are from one of three experiments, all of which revealed similar tendency.

に比べ飽和結合量が少ないにもかかわらず飽和に時間がかかった。しかし、いったん飽和に達してからは結合は48時間でも安定であった。核レセプターは3時間で約45%、24時間で約90%と徐々にexchangeされ24-48時間で結合は飽和に達し、72時間でも安定であった（Fig.2）。なお Fig.1 および Fig.2 から、細胞質レセプターは雌で雄より高い一方、核レセプターは雄で雌より著しく高い

Fig. 3 Scatchard analyses of cytosolic and nuclear androgen receptors. Aliquots (100 μ l) of cytosol (a, b) or nuclear extracts (c, d) of male (a, c) and female (b, d) mouse submandibular glands were incubated with increasing concentrations (0.5-3 nM) of [^{3} H]R1881 in the presence or absence of a 100-fold molar excess of unlabeled R1881. Bound and free steroids were separated by the hydroxyapatite and bound radioactivities were measured as described in Materials and Methods. Insertions represent saturation analyses. Nonspecific binding levels in cytosol or nuclear extracts were similar in both sexes, respectively. Results are from one of three separate experiments, all of which gave identical results. T; total binding, S; specific binding, NS; nonspecific binding.

ことが [^{3} H]R1881 との 飽和結合量から示された。これらの結果から考え、以後レセプターの測定は細胞質では0°C 3ないし6時間、核では0°C 48時間の結合で行った。

4. 顎下腺アンドロゲンレセプターの細胞質ならびに核画分への分布における性差

Fig.1 および Fig.2 で見られた細胞質ならびに核レセプターの [^{3} H]R1881 との 飽和結合量における雌雄差をレセプターと [^{3} H]R1881 の結合の Scatchard 解析によりさらに詳細に検討した (Fig.3a-d)。雌雄とも、細胞質あるいは核レセプターそれぞれは 飽和性の 特異的結合を示し、

Table 4 Values of dissociation constants (Kd) and numbers of binding sites (NBS) of androgen receptor in cytosol and nucleus

Sex	Kd(nM)		NBS (fmol/mg DNA)	
	Cytosol	Nucleus	Cytosol	Nucleus
Male	0.8	0.9	368 (25.9%)	1,052 (74.1%)
Female	0.8	0.9	512 (94.1%)	32 (5.9%)

Results are one of three separate experiments, respectively. Each value of NBS is expressed as fmol per mg DNA.

その Scatchard プロットはいずれの場合も一相性の直線を示し一種類の結合部位の存在が確認された。 $[^3\text{H}]\text{R1881}$ との結合の解離定数 K_d と結合部位数 NBS を Scatchard プロットより算出し Table 4 にまとめた。 K_d は細胞質 (0.8nM), 核レセプター (0.9nM) とともに性差はなく, また細胞質と核レセプターでほぼ同じ値を示し, 高親和性の結合を示した。NBS は, 細胞質レセプターでは雄2,024 fmol/g tissue (368 fmol/mg DNA), 雌2,867 fmol/g tissue (512 fmol/mg DNA) であり, 一方核レセプターでは雄4,864 fmol/g tissue (1,052 fmol/mg DNA), 雌146 fmol/g tissue (32 fmol/mg DNA) であった。これらの結果より, レセプターの細胞質ならびに核画分への分布には顕著な性差があり, 雄で大半 (74%) が核に見い出される一方雌ではそのほとんど (94%) が細胞質に見い出されることが示された。

II. 核レセプターの物理化学的性状

雄マウス顎下腺より得た核抽出物を過剰の非放射性ステロイドの存在ならびに非存在下に $[^3\text{H}]\text{-R1881}$ で標識後 DCC 法により遊離の $[^3\text{H}]\text{-R1881}$ を吸着除去した上清を核レセプター標品として, この物理化学的性状について検討した。

1. グリセロール密度勾配遠心法

核レセプターを各種条件下すなわち密度勾配中に 0.4M KCl を含む高塩強度下, KCl を含まない低塩強度下, さらに 1mM PLP と 0.15M KCl を含む条件下にて遠心した。密度勾配の作成にはレセプターに対し安定化効果の高い²²⁾グリセロールを用いた。Fig. 4 に示したように, いずれの条件下でも核レセプターは, 沈降係数約3.8S に単一ピークを示した。なおこのピークは100倍量の非放射性 R1881 の存在で消失することよりアンドロゲンに特異的であることが示された。

2. Sephacryl S-200 ゲルクロマトグラフィー
核レセプターの分子量をゲルクロマトグラフィーにより推測した。カラムから溶出された放射活性を Fig. 5 に示したが, フラクシオン23と25に100倍量の過剰の R1881 で減少する特異的なピークが得られ, これらが核レセプターのピークと思われた。マーカー蛋白質の片対数プロットよりピークの分子量を求めると, フラクシオン23は分子量約46,000, 一方フラクシオン25は約17,000 であった。またフラクシオン 30 以降の放射活性は, DCC 処理により消失することから遊離の $[^3\text{H}]\text{R1881}$ であることが示された (データは示さない)。なおフラクシオン 25 の分子量約 17,000 のピークはフラクシオン23由来で, おそらくは分子量46,000のものが部分的に蛋白分解を受けたものと思われた。

3. 各種ステロイドによる競合実験

核アンドロゲンレセプターと $[^3\text{H}]\text{R1881}$ の結合に対する各種非放射性ステロイドの競合を Table 5 に示した。各競合ステロイドの濃度は $[^3\text{H}]\text{R1881}$ の100倍量とした。結果は100倍量の非放射性 R1881 による競合阻害を100%としこれに対する% (displacing ability) として表示した。合成アンドロゲンの mibolerone およびネイティブなアンドロゲンの testosterone, 5 α -dihydro-testosterone は R1881 と同程度に強い競合を示したが androstenedione では競合は約66%と少なかった。一方, estradiol-17 β , progesterone あるいは triamcinolone や cortisol などでは競合は非常に少ないかあるいは全く認められなかった。このことから顎下腺核画分における $[^3\text{H}]\text{R1881}$ の結合はアンドロゲンに特異的であることが示された。

4. アンドロゲンレセプターからの $[^3\text{H}]\text{R1881}$

Fig. 4 Glycerol density gradient analysis of nuclear androgen receptors. Nuclear extract from male mouse submandibular glands was incubated with 2.5 nM [^3H] R1881 in the presence (□) or absence (●, ○, Δ) of a 100-fold molar excess of unlabeled R1881 for 20 h at 0°C. Unbound steroids were removed with DCC pellets, and samples were diluted two-fold. An aliquot (200 μl) was then layered on 15-30% linear glycerol density gradient with (○), without (●) 0.4 M KCl or with 1 mM PLP (Δ) and spun for 22 h at 230,000×g. Fractions of 8 drops each were counted for radioactivity. M; sperm whale myoglobin (2S), B; bovine serum albumin (4.6S) and G; horse γ-globulin (7S) were used for markers.

の解離

[^3H]R1881 で標識した核レセプターに過剰量の非放射性 R1881 を添加し、経時的に核レセプターからの [^3H]R1881 の解離を測定した (Fig. 6)。細胞質レセプターについてもこれと並行し

Fig. 5 Sephacryl S-200 gel chromatography of nuclear androgen receptor. Nuclear extract from male mouse submandibular glands was incubated with [^3H]R1881 in the presence (□) or absence (●) of a 100-fold molar excess of unlabeled R1881. After DCC treatment, an aliquot (500 μl) of the bound fraction was applied on Sephacryl S-200 equilibrated with TEDM buffer containing 1 mM pyridoxal 5'-phosphate. Elution was carried out with the same buffer and 1.2 ml of each fraction was collected and counted for radioactivity. B; blue dextran, G; horse γ-globulin, H; bovine hemoglobin, A; egg albumin, M; sperm whale myoglobin, V; vitamin B₁₂ were used for markers.

て行い比較した。核レセプターからの [^3H]R1881の解離は非放射性 R1881の添加徐後々に起り、6時間では約20%が解離した。また半減期は約24時間であった。細胞質レセプターでは3時間で約20%解離し、半減期は約15時間と核レセプターの場合より短く解離の早いことが示された。

III. Testosterone 投与後の雌マウス顎下腺アンドロゲンレセプターの動態

Iの結果より雌マウス顎下腺では雄とは対照的にアンドロゲンレセプターのほとんどが細胞質に存在した。雌マウス顎下腺におけるアンドロゲンレセプターが、アンドロゲンによる生理作用を担うことができると仮定すれば、アンドロゲン投与により核レセプターの増加が期待される。そこで、つぎの実験を行った。

1. Testosterone 投与による細胞質ならびに核レセプター量の変動

前述のごとく雌に TP を体重100g 当り 600 μg

Table 5 Competition of various steroids for nuclear androgen receptor

Steroids	Displacing ability (%)
R1881	100
Mibolerone	97.8
Testosterone	96.7
5 α -dihydrotestosterone	93.5
Androstenedione	65.7
Estradiol-17 β	6.7
Progesterone	0
Triamcinolone acetonide	0
Cortisol	0

Competition of various steroids for nuclear androgen receptor. Aliquots (100 μ l) of nuclear extract from male mouse submandibular glands were incubated with 2.5 nM [^{3} H]R1881 at 0°C for 24 h in the presence or absence of a 100-fold molar excess of unlabeled steroids. Unbound steroids were separated by DCC. The displacing ability is compared for those in the absence of competitors (0 %) and in the presence of a 100-fold molar excess of unlabeled R1881 (100 %). Values given are the mean of three separate experiments in triplicate.

Fig. 6 Dissociation kinetics of nuclear and cytosolic androgen receptors. Nuclear extract or cytosol from male mouse submandibular glands was incubated with 2.5 nM [^{3} H]R1881 for 48 h for nuclear receptor (●) or 6 h for cytosol receptor (○) at 0°C. Dissociation was started by the addition of a 100-fold molar excess of unlabeled R1881. Aliquots were removed at several time intervals, and remaining [^{3} H]R1881 bound was determined by the hydroxyapatite adsorption method. To correct the loss of receptor binding activity during the incubation period, specific binding at each point was determined by incubation with [^{3} H] R1881 in the presence or absence of unlabeled R1881 as a control.

Fig. 7 Effects of testosterone injection on the dynamics of cytosolic and nuclear androgen receptors. Female mice were injected s.c. with TP (500 μ g testosterone/100 g body weight) in propylene glycol or with propylene glycol alone as a control (time 0) and sacrificed at 15, 30, 60, 120 min, 24, 48, and 72 h after each injection. Cytosolic (a) and nuclear (b) androgen receptors in submandibular glands were measured by the hydroxyapatite adsorption method as described in Materials and Methods and expressed per mg DNA. Experiments were performed at least 3 times and the typical data are shown.

(testosterone として 500 μ g) 投与し、細胞質ならびに核レセプター量を経時的に測定した (Fig. 7a, b)。投与後30分で細胞質レセプターは急激な減少を示し、同時に核レセプターは増加した。増

加した核レセプターのレベルはその後少なくとも24時間は維持され、48-72時間で投与前のレベルに減少した。一方、投与後の細胞質レセプターの減少は少なくとも2時間は続いたが、その後徐々

に増加し24時間で投与前のレベルの約60%, 48時間で約80%そして72時間ではほぼ100%と完全に回復した(細胞質レセプターの replenishment)。つぎに投与 TP の量を100g 体重当り testosterone として5, 50および500 μg の三段階とし細胞質ならびに核レセプターの変動を調べた(Fig. 8)。結果は mg 蛋白当りの fmol で示した。なお細胞質の1mg 蛋白は約79 μg DNA に相当することが組織一定量当りの DNA 含量より算定された。投与 testosterone 量が体重100g 当り500 μg の場合には投与後に減少した細胞質レセプターの replenishment は6時間までは起らず, 12時間後からは徐々に replenishment されてきたものの, 24時間後も投与前のレベルの約50%程度であった(Fig. 8a)。体重100g 当り50 μg の testosterone 量では3時間後に replenishment が起り, 6時間で投与前のレベルの約50-60%, 24時間では約70-80%であった。testosterone の投与量を体重100g 当り5 μg とすると replenishment はさらに速く, 3時間後には約60%, 6時間で約80%, 24時間ではほぼ投与前のレベルまで replenishment された。これらの結果は, 投与量の多いほど replenishment に要する時間が長いことを示した。一方核レセプターは, いずれの投与量においても投与後1時間で増加した(Fig. 8b)。しかしながら100g 体重当り5 μg の testosterone の投与では核レセプターの増加量は50あるいは500 μg の投与の場合より少なかった。また, 500 μg 量では24時間でも核レセプターの増加レベルは維持されたが50 μg 量では12時間以後減少し24時間で投与前のレベルへ戻った。さらに, 5 μg 量では投与後10時間には減少し始め15時間で投与前のレベルとなった。従って, 投与量の多いほど投与前のレベルへ戻るのに時間を要することが示され, 核レセプターの経時的変動も投与 TP 濃度に依存することが明らかになった。

2. 細胞質レセプターの replenishment 機構

細胞質アンドロゲンレセプターの replenishment に蛋白合成が関与するか否かを蛋白合成阻害剤 cycloheximide (CXM) を用いて検討した。初めにマウス顎下腺において CXM が蛋白合成を90%以上阻害する投与条件を検討した(Fig. 9)。

Fig. 8 Effects of various doses of testosterone on the dynamics of cytosolic and nuclear androgen receptors. Female mice were injected various doses of TP (5(●), 50 (○) and 500 (Δ) μg testosterone/100g body weight). The animals were killed at indicated times and cytosolic (a) and nuclear (b) androgen receptors in submandibular glands were measured by the hydroxyapatite adsorption method as described in Materials and Methods. Specific binding of [³H]R1881 with cytosolic receptor was expressed per mg protein. Results are from one of three experiments, all of which gave identical results.

100g 体重当り2.4mg の CXM を腹腔内へ一回投与すると, 1時間後には蛋白合成の指標となる顎下腺過塩素酸沈殿画分への [³H]leucine の取り込みは, CXM を投与しない対照の約50%までいったん減少したものの, 6時間では対照レベルまで回復した(Fig. 9a)。そこでこの量を毎時間連続投与したところ, 6時間で75%, 12時間では90%の阻害を示した(Fig. 9b)。つぎに CXM の投

Fig. 9 Effects of cycloheximide on the protein synthesis. *In vivo* incorporation of ^3H leucine into perchloric acid precipitable protein in female mouse submandibular gland was determined as described in Materials and Methods. 20 μCi of ^3H leucine was injected i. p. into CXM-pretreated mice 1h before sacrifice. Injection of CXM was performed by four different ways a; single injection (i.p.) at a level of 2.4 mg/100g body weight, b; every hour injections (i.p.) at a level of 2.4 mg/100g body weight, c; single injection (s.c.) at a level of 24 mg/100g body weight, d; single injection at a level of 24 mg/100g body weight at a first time, and followed by every hour injections at a level of 2.4 mg/100g body weight every hour (c+b).

与量を10倍すなわち体重100g 当り24 mg とし一回皮下投与すると、投与後1時間で90%の阻害を示した。しかしながらその阻害効果は持続的ではなく、時間とともに ^3H leucine の取り込みは回復した (Fig. 9c)。そこで CXM を初回に体

重100g 当り24mg の量を皮下投与後、続いて2.4 mg の量を維持量として腹腔内へ毎時間連続投与したところ、 ^3H leucine の取り込みすなわち蛋白合成を、投与後1時間から7時間にわたって90%以上阻害することができた (Fig. 9d)。この

Fig. 10 Effects of cycloheximide on the dynamics of cytosolic and nuclear androgen receptors after injection of testosterone. Female mice were treated with CXM (○) as described in the legend for Figure 9d. Control (●) was injected vehicle only. TP (5 μ g testosterone/100 g body weight) was injected (s.c.) 1h after the first injection of CXM. At indicated times after the injection of TP, mice were sacrificed, and cytosolic (a) and nuclear (b) receptors were measured by the hydroxyapatite adsorption method as described in Materials and Methods. Inhibition of the incorporation of [^{3} H]leucine (c) by CXM was determined in the parallel experiment as described in Materials and Methods. (Δ); mice injected with CXM only. Typical data are shown from five separate experiments.

阻害効果は CXM の投与を続けることにより少なくとも12時間までは持続された（データは示さない）。

続いて Fig. 9d の方法でマウスに CXM を投与し、顎下腺の蛋白合成が90%以上阻害されている条件下で、TP 投与後の細胞質レセプターの replenishment を検討した (Fig. 10)。TP 投与1時間前より CXM の投与を始めた。CXM の投与は、TP 投与1時間で見られる細胞質レセプターの減少には影響を与えなかったが、その後のレセプターの replenishment に対し阻害効果を示した。すなわち生理食塩水を投与した対照群では TP 投与後3時間で投与前のレベルの約30-40%、6時間で約60-70%と replenishment が起こる一方、CXM 投与群では replenishment はほとんど起らなかった (Fig. 10a)。この時 [^{3} H]leucine の顎下腺過塩素酸沈殿画分への取り込みは顕著に抑制されていることが確認された (Fig. 10c)。なお、CXM の投与は核レセプターの変動には影響を及ぼさなかった (Fig. 10b)。すなわち投与後

1時間で増加した核レセプターレベルは対照、CXM 投与群ともに6時間後も維持された。さらに CXM のみの連続投与による細胞質ならびに核レセプター量への影響は認められなかった (Fig. 10a, b)。

つぎに細胞質レセプターの replenishment における RNA 合成の関与を検討した (Fig. 11)。RNA 合成阻害剤、AcD は testosterone 投与後の細胞質レセプターの減少および replenishment に対しともに影響を及ぼさなかった (Fig. 11a)。この時 [^{3} H]UTP の顎下腺過塩素酸沈殿画分への取り込みは、AcD 投与後1-6時間に渡って抑制された (Fig. 11c)。また AcD は CXM と同様核レセプターの変動には影響を及ぼさなかった (Fig. 11b)。さらに AcD のみの投与による細胞質ならびに核レセプターレベルへの影響は認められなかった (Fig. 11a, b)。

3. Testosterone 投与後のレセプターの性状

TP 投与後核に出現するレセプターと、細胞質に replenishment されるレセプターの性状に関し

Fig. 11 Effects of actinomycinD on the dynamics of cytosol and nuclear androgen receptors after injection of TP. Female mice were treated (i.p.) with AcD (1mg/100g body weight) (○) 1 h before injection (s.c.) of TP (5 μ g testosterone/100g body weight). Control (●) was injected vehicle only. At indicated times after injection of TP, mice were sacrificed, and cytosol (a) and nuclear (b) receptors were measured by the hydroxyapatite adsorption method as described in Materials and Methods. (Δ); mice injected with AcD only. Inhibition of the incorporation of [³H]UTP (c) by AcD was determined in the parallel experiment as described in Materials and Methods. Typical data are shown from three experiments.

検討した。

投与後一時間の核レセプターの Scatchard 解析の結果は、飽和性かつ一相性の結合を示し、Kd は 2.0nM, NBS は 492.3fmol/mg DNA だった (Fig. 12)。ここで得られた Kd は Table 4 で示した核レセプターのものと類似していたが、NBS は雄よりは小さく雌の細胞質レセプターののそれとほぼ同じであった。

各種ステロイドによる競合実験の結果は、アンドロゲンで強い競合阻害を示した一方、estradiol-17 β や progesterone, あるいは TA などのグルコルチコイドでは阻害が認められず、Table 5 で示した雄マウスの核レセプターの結果とほぼ同様であった (Table 6)。アンドロゲン作用の弱い androstenedione では Table 5 の成績と同様に特異性が低かった。

グリセロール密度勾配遠心の結果は高塩、低塩強度下ともに、3.8S に特異的な結合が得られ (Fig. 13), これも Fig. 4 の雄の核レセプターのものと全く同じであった。

一方 TP 投与24時間後に細胞質に replenishment されたレセプターは Scatchard 解析 (Fig.

14) の結果、飽和性かつ一相性の結合を示し Kd は 0.85nM と、投与前の細胞質レセプターの Kd (Table 4) と同じであった。なお NBS は 232.8fmol/mg DNA と投与前の細胞質レセプターの NBS に較べ少なかったが、これは投与した testosterone の量すなわち体重100g 当り 500 μ g では投与後24時間で replenishment は完全ではないことを示しており、このことは Fig. 7a の結果とも一致した。

Table 7 に TP 投与前の細胞質レセプターと TP 投与24時間に細胞質に replenishment されたレセプターの競合実験の結果を示した。その結果、これら両者のレセプター間にはステロイド特異性についての差異は認められず、ともにアンドロゲンに特異的であり、その他のステロイドでは阻害は非常に少ないかあるいは全く認められなかった。阻害の傾向は Table 5 で示した核レセプターの結果と同様であった。

グリセロール密度勾配遠心法による解析 (Fig. 15) により、細胞質レセプターは低塩、sodium molybdate 存在下における遠心で約 8S に特異的ピークとして検出されたが 100g 体重当り 500 μ g

Fig. 12 Scatchard analysis of androgen receptor accumulated in the nuclei after injection of testosterone. Female mice were injected with TP (500 μ g testosterone/100 g body weight). 1 hour after injection, nuclear extract from submandibular glands was prepared and incubated with increasing concentrations (0.5–3 nM) of [^{3} H]R1881 in the presence or absence of a 100-fold molar excess of unlabeled R1881. Bound radioactivity was measured as described in Materials and Methods. Results are from one of three separate experiments, all of which gave similar results. T ; total binding, S ; specific binding, NS ; nonspecific binding.

Table 6 Competition of various steroids for androgen receptor accumulated in the nucleus after injection of testosterone

Steroids	Displacing ability (%)
R1881	100
Mibolerone	101.7
Testosterone	98.4
5 α -dihydrotestosterone	96.8
Androstenedione	35.2
Estradiol-17 β	5.1
Progesterone	0
Triamcinolone acetonide	0
Cortisol	0

Female mice were injected with TP (500 μ g testosterone/100g body weight). 1 h after injection, nuclear extract was prepared and incubated with 2.5 nM [^{3} H]R1881 at 0°C for 24 h in the presence or absence of a 100-fold molar excess of unlabeled steroids. Details are described in the legend of Table 5.

Fig. 13 Glycerol density gradient analysis of androgen receptor accumulated in the nuclei after injection of testosterone. Female mice were injected with TP (500 μ g testosterone/100g body weight). 1 hour after injection, nuclear extract from submandibular glands was prepared and incubated with [^{3} H]R 1881 in the presence ($\square$) or absence ($\bullet$, $\circ$) of a 100-fold molar excess of unlabeled R1881. After DCC treatment, bound fraction (200 μ l) diluted two-fold was layered onto the glycerol gradient with ($\circ$) or without ($\bullet$) 0.4 M KCl as described in Materials and Methods. Centrifugation was performed at 230,000 $\times$ g for 22 h and 8 drops fractions were counted for radioactivity. O; ovine albumin (3.5S), B; bovine serum albumin (4.6S) and G; horse γ -globulin (7S) were used for markers.

の testosterone 投与後 1 時間でこのピークは消失した。しかし、24 時間後にピークは再び出現し、48 ないし 72 時間後にはピークの大きさはコントロールレベルへと回復した。この結果は Fig. 7a で

示した TP 投与後の細胞質レセプター量の経時的変化とも一致し、細胞質レセプターが replenishment されていく様子がレセプターのピークからも確認できた。なお、レセプター分子の大きさは、replenishment されたレセプターも投与前の細胞質レセプターと同じく沈降係数は 8S であった。

考 察

I. 核レセプターの測定法

核内に存在するレセプターは KCl や NaCl など可溶化され核画分より抽出できる。各種ステロイドホルモンレセプターの核からの抽出には従来 0.4-0.5M KCl が用いられて来た^{23,24)}。一方、PLP が肝臓や胸腺のグルココルチコイドレセプターと DNA セルロースあるいは核との結合を阻害することが示されて以来、PLP を用いて核レセプターを抽出する試みがなされた。この方法は、1978年に Cidlowski と Thanassi²⁵⁾ によりグルココルチコイドレセプターに対して試みられて以来、エストロゲン²⁶⁾、プロゲステロン²⁷⁾ やアンドロゲン^{28,29)} の各レセプターにも用いられ、良い成績が得られている。特にアンドロゲンレセプターでは、KCl より抽出効果が高く、ほとんどの核レセプターを抽出できる²⁹⁾ と報告されている。PLP による核レセプターの抽出は、PLP がレセプターの、おそらくは核結合に関与していると思われるリジン残基との間にシッフ塩基をつくり、その結果レセプターが核アクセプター部位から離れるものと考えられている。本実験でも PLP は、およそ 94% のマウス顎下腺核レセプターを抽出した (Table 2) が、0.4M KCl による抽出との差は認められなかった (Table 1, 2)。斯くして得た核レセプターは通常 occupied 型であると考えられた。このことは、雄マウスを去勢した場合核レセプターは 10 時間以内にそのほとんどが消失してしまい、unoccupied 型レセプターは核内に長い間とどまることはないという結果から推測された。そこで、核レセプターを正確に検出測定するためにトリチウム標識ステロイドとの exchange assay を行った。Exchange assay は多くのエストロゲンレセプターでは標識リガンドとの交換速度を早めるため 30°C 30 分といった加温条件下で行う³⁰⁾ こ

Fig. 14 Scatchard analysis of replenished androgen receptor in the cytosol after injection of testosterone. 24 h after injection of TP (500 μ g testosterone/100g body weight), the mice were sacrificed and cytosol was prepared from female mouse submandibular glands. The cytosol was incubated with increasing concentrations (0.5–3 nM) of [^{3} H]R1881 in the presence or absence of a 100-fold molar excess of unlabeled R1881. Bound radioactivity was measured as described in Materials and Methods. Insertion represents saturation analysis. Results are from one of three separate experiments, all of which gave identical results, T; total binding, S; specific binding, NS; nonspecific binding.

Table 7 Competition of various steroids for cytosolic and replenished androgen receptors in the cytosol after injection of testosterone

Steroids	Displacing ability (%)	
	Rc	replenished Rc
R 1881	100	100
Mibolerone	95.8	98.1
Testosterone	98.2	88.8
5 α -dihydrotestosterone	87.3	89.6
Androstenedione	53.6	52.8
Estradiol-17 β	12.6	14.9
Progesterone	0	0
Triamcinolone acetonide	5.8	9.6
Cortisol	0	0

Cytosol of submandibular glands was prepared from intact female mice (Rc) or female mice injected with TP (5 μ g testosterone/100 g body weight) 24 h before the sacrifice (replenished Rc). Cytosol were incubated with [^{3} H]R1881 at 0°C for 3 h in the presence or absence of a 100-fold excess of unlabeled steroids. Daitails are described in the legend of Table 5.

Fig. 15 Glycerol gradient analysis of cytosol androgen receptor at indicated times after injection of testosterone. Female mice were injected with TP (500 μ g testosterone/100 g body weight) and killed 1 (—O—), 24 (O), 48 (Δ), or 72 ($\square$) h after injection. Cytosol was prepared and incubated as described in Materials and Methods. After DCC treatment, bound fraction (200 μ l) was then layered onto glycerol gradient containing 10 mM sodium molybdate as described in Materials and Methods. Centrifugation was performed at 230,000 $\times$ g for 22h and 8 drops fractions were counted for radioactivity. O; ovine albumin (3.5S), B; bovine serum albumin (4.6S) and G; horse γ -globulin (7S) were used for markers. (●); intact females.

とが多い。しかしながら、アンドロゲンレセプターはエストロゲンレセプターなど他のステロイドホルモンレセプターに較べると熱による不安定性が高く³¹⁾、本実験においても、インキュベーションの際にレセプターの構造を安定化する glycerol や sodium molybdate³²⁾ が含まれているにもかかわらず加温により $[^3\text{H}]\text{R1881}$ との結合は減少した (Table 3)。すなわち、核レセプターの exchange assay は 0°C で48-72時間と長時間に渡りインキュベーションを行う必要があり前立腺のアンドロゲンレセプターの場合³³⁾と同じであった。

雌の細胞質レセプターは unoccupied 型であることがすでに明らかにされている⁸⁾が、本実験でも雌の細胞質レセプターと $[^3\text{H}]\text{R1881}$ との結合は 0°C , 1.5時間と、短時間で飽和に達した (Fig. 1)。従って、雌の細胞質レセプターは 0°C , 1.5時間で全量の測定が可能と思われる。細胞質レセプターと $[^3\text{H}]\text{R1881}$ との親和性は雌雄と

も同じ (Table 4) であるので、雄の細胞質レセプターが雌と同様に unoccupied 型であると考えたと 0°C , 1.5時間で結合は飽和に達することが予想された。しかしながら、雄では雌より細胞質レセプター量が少ないにもかかわらず、 0°C , 3時間のインキュベーションでも完全に飽和に達せず (Fig. 2), 細胞質にも occupied 型レセプターの存在が推測された。ここで、unoccupied レセプターが 0°C , 3時間で全量測定できているものとし、また Fig. 2 の結果すなわち核レセプターの、3時間および48時間の特異的結合量 (3時間; 250 fmol/mg DNA, 48時間; 550 fmol/mg DNA) から、核レセプターすなわち occupied 型レセプターの45%が 0°C 3時間で exchange されないと考えると、雄の細胞質レセプターの72%が unoccupied 型で28%が occupied 型と計算される。この28%の occupied 型レセプターが存在する原因として、一つには細胞質中へ核レセプターが混

入する可能性、他には組織をホモジナイズする際に組織中の毛細血管由来の血液が混入し、本来 unoccupied 型であったレセプターがこれら血液中の内因性アンドロゲンにより occupy されてしまう可能性が考えられる。ここで、血中のテストステロン濃度は8-9週令（無傷）雄で300ng/dl 雌で 25ng/dl と雄で雌に比べ顕著に高い³⁴⁾ことを考えると、特に雄では細胞質レセプターが一部 occupied 型となる後者の可能性が高いと思われる。

II. 細胞質と核画分へのレセプターの分布における性差とその意義

細胞質ならびに核レセプターの Scatchard 解析 (Fig. 3) の結果は、レセプターの細胞質ならびに核への分布における著しい性差を示した。細胞質レセプター量は雌で雄より約1.5倍高く（雄 368 fmol/mg DNA, 雌 512fmol/mg DNA）、一方核レセプターは雄で雌の約30倍と著明に高かった（雄 1,052fmol/mg DNA, 雌 32fmol/mg DNA）(Table 4)。従って、全レセプター量では、雄で 1,420fmol/mg DNA, 雌で 544fmol/mg DNA と、（血中アンドロゲン濃度の高い）雄で高かった。また、雄では全レセプターの74%が occupied 型核レセプターとして、一方雌では94%とほとんどが unoccupied 型細胞質レセプターとして検出された。これらの知見は、マウス顎下腺における神経成長因子、上皮成長因子やある種のプロテアーゼなどが雄で雌より高いという事実を説明し得るものである。すなわち、これらの生理活性ペプチドなどの合成あるいは誘導には、アンドロゲンのレセプターを介しての作用機構が考えられ、特に occupied 型核レセプターの存在が必要と思われる。この考えは、当研究室の馬場による、マウスの成長過程における顎下腺エストロプロテアーゼの出現と共に核アンドロゲンレセプター量が増加する³⁵⁾との報告からも支持される。また、この核レセプターの増加時期は血中のテストステロンの上昇時期とほぼ一致していた³⁶⁾。すなわち、occupied 型核アンドロゲンレセプターの増加は血中のアンドロゲン濃度の増加に依存すると考えられた。従ってもし雌でも、血中のアンドロゲン濃度が上昇すれば、実際相当量存在する unoccupied

型細胞質レセプターにアンドロゲンが結合し直ちに occupied 型核レセプターの増加が起り、その結果作用発現に至ることができるものと考えられる。雌マウスではアンドロゲンとして副腎皮質から微量の dehydroepiandrosterone が分泌されるが、これが脂肪組織で代謝されアンドロゲン活性の高い testosterone となり、血流を介し顎下腺や腎臓などの標的器官に運ばれる。実際、9週令雌マウスに体重100g当り、5 μ g の testosterone を投与した際の血中の testosterone 濃度は 0.4 μ g/dl, 500 μ g testosterone 投与では 34 μ g/dl と投与前 (25ng/dl) に比べ顕著に高値を示した。この際、顎下腺の核レセプターは顕著に増加した (Fig. 8b)。一方、成熟雌マウスに testosterone を投与することにより顎下腺のエストロプロテアーゼ量が増加することが報告されている^{8,35)}。従って、雌でも血中のアンドロゲン濃度が上昇することによりアンドロゲン作用が発現されることが顎下腺において明らかとなった。雌マウス顎下腺におけるアンドロゲン作用のもう一例として、最近松本らが妊娠マウスを用いた実験で興味ある知見を得ている³⁷⁾。すなわち妊娠マウスでは体内アンドロゲン濃度が上昇し、これにより顎下腺における上皮成長因子の合成が促進され、その結果乳腺細胞の増殖と乳汁への上皮成長因子の分泌を促進するとの報告である。しかしながら、顎下腺でのアンドロゲンによるエストロプロテアーゼや上皮成長因子などの生理活性物質の誘導は、さらにいかなる作用の発現へつながるかといった生理的意義に関しては未だ不明の点が多い。

III. 雌マウスへのテストステロン投与後に起る細胞質レセプターの replenishment 機構

雌マウスへの testosterone 投与は細胞質レセプターの減少とともに核レセプターの増加を引き起こした (Fig. 8a, b)。しかし、いったん減少した細胞質レセプターはその後投与前のレベルへと回復し、いわゆる replenishment が起った。ステロイドホルモンの replenishment に関しては多くの報告があるにもかかわらず、未だ定説は得られず議論が多い。Replenishment 機構としては、大きくつぎの3つの機構に分類される。すなわち 1) 蛋白合成を介する機構³⁸⁻⁴²⁾、2) 核からの re-

cycling による機構⁴⁸⁻⁴⁹⁾, 3) その両者を合わせた機構⁴⁶⁻⁴⁸⁾である。ここで 2) の recycling という表現は従来の二段階説での表現であり, これは新説で考えると核高親和性から低親和性レセプターへの変換と考えることができる。本実験では, replenishment が CXM 投与で阻害されることにより蛋白合成を介することを認めた (Fig. 10)。CXM のマウスに対する蛋白合成阻害効果はラットに比べて非常に弱い^{41,49)}。すなわちマウスでは, 急性毒性を示す CXM の血中濃度は体重100g 当り 19mg であるのに対し, ラットでは, 体重100g 当り 0.2mg であるから, マウスは CXM に対し約100倍の耐性がある。本実験では急性毒性量を若干越える体重100g 当り24mg の CXM を投与したにもかかわらずその効果は持続的ではなく, 毎時間維持量の CXM を連続投与する必要があった (Fig. 9c, d)。このことは, マウスでは CXM に対するより迅速な代謝系が存在する可能性を示唆する。また CXM のレセプターへの影響として, 長時間にわたる CXM の投与あるいはレセプターとの接触がレセプター量を減少させる^{38,41)}との報告がある。そこで, 本実験でも対照として CXM のみの連続投与を行いレセプター量を測定したが, 細胞質, 核レセプターともに影響は認められなかった (Fig. 10a, b)。このことは, 本実験条件下においては CXM はマウス顎下腺アンドロゲンレセプターに対し毒性はないことを示している。また Fig. 7 および 8 の結果からは, TP 投与後1時間で上昇した核レセプターは, 投与後に減少した細胞質レセプターの replenishment が起り始めているにもかかわらずしばらくの間そのレベルを維持した。すなわち, 細胞質レセプターの replenishment と, 上昇した核レセプターがコントロールレベルへと回復する時期にはずれがあり, この現象は TP の投与量にかかわらず共通して見られた。このことは細胞質レセプターの replenishment が核レセプターの recycling にはよらないことを推測させる。また Fig. 10の結果から, 少なくとも TP 投与後6時間までは核レセプターの維持には細胞質レセプターの供給を必要としないことが示された。しかし, 実験時間を延長した場合には, CXM 投与では細胞質レセプターの供給がな

いため CXM 非投与より早く核レセプターの減少が始まり, また細胞質レセプターも減少したままであることが予想される。さらに, replenishment が蛋白合成を介していることから CXM 投与では TP 投与1時間後以降に核レセプター量が増加することが期待されたが, 実際核レセプター量は投与一時間後の増加レベルを維持しており, その後の増加は認められなかった。しかし, この知見は核レセプターの processing を考えることにより説明されよう。すなわち, Horwitz と McGuire⁵⁰⁾が報告しているごとく, アンドロゲンに応答して細胞質アンドロゲンレセプターのターンオーバーが促進され, 同時に核レセプターの processing も急激に進むものと推察された。ここで核レセプターの processing には, アンドロゲンと結合しているが核アクセプター部位と強固に相互作用していない過剰のアンドロゲン-レセプター複合体に対してのプロテアーゼによる不活化が関与していると思われる。前述のごとく細胞質アンドロゲンレセプターの replenishment が蛋白合成を介するが, AcD が replenishment に影響をおよぼさないとの結果 (Fig. 11) は, testosterone によるアンドロゲンレセプターの合成が mRNA の合成を介さないいわゆる転写後調節であることを示唆している。またこのことは, Fig. 8a で見られたように, TP 投与後の replenishment がわずか3時間と非常に短時間で起っていることから納得のいくものである。ステロイドホルモン作用の発現は一般に mRNA, 続いて蛋白合成を介していると考えられているが, ステロイドホルモンの作用のある種のものでは AcD のような RNA 合成阻害剤に感受性のない例が報告されている。アンドロゲン作用の例としては, ヒナ鶏冠における成長応答⁵¹⁾, ラット前立腺における NADH 濃度の増加⁵²⁾, また, マウス腎臓におけるアルギナーゼ活性および蛋白質へのアミノ酸の取り込みの促進⁴⁹⁾などがあげられる。今回マウス顎下腺での TP 投与後の細胞質アンドロゲンレセプターの replenishment も, CXM では阻害されるが AcD では阻害されないいわゆる転写後調節の一例であると思われる。

IV. レセプターの性状

マウス顎下腺細胞質レセプターの物理化学的性状に関しては当教室の佐藤らが報告している⁵³⁾が、本報告においては核レセプターを中心に、細胞質レセプター、TP投与後の細胞質ならびに核レセプターなどの性状について比較検討した。レセプターと $[^3\text{H}]\text{R1881}$ との結合の親和性(Kd)は雌雄における細胞質、核レセプター、さらに雌マウスへのTP投与後の核レセプターおよびreplenishmentされたレセプターなどのいずれについても差はなく(Fig. 3, 12, 14), Kdの値はこれまでに報告されている標的臓器のアンドロゲンレセプターのものと同様であった。競合実験によって示された結合特異性は細胞質ならびに核レセプターあるいはアンドロゲン投与後のレセプターとも類似しており、各レセプターはアンドロゲンに特異的であった(Table 5, 6, 7)。さらに、アンドロゲンレセプターとリガンドとの結合にはステロイド骨格上の3位と17位が関与しており、特に3-COの構造は必須で、さらに17位は $17\beta\text{-OH}$ か 17-CO であることが必要と思われた。しかし 17-CO を有するandrostenedioneでは、 $17\beta\text{-OH}$ の構造をもつR1881, mibolerone, testosteroneおよび $5\alpha\text{-dihydrotestosterone}$ より特異性が低いことより、 $17\beta\text{-OH}$ がレセプターとの親和性を高めていることが推測される。なおcortisolには特異性がないことより17位の-OHは α では効果がないことが示唆された。また、アンドロゲンの中でも合成アンドロゲンの方がネイティブなtestosteroneや $5\alpha\text{-dihydrotestosterone}$ に比べ交換能が高いのは、合成アンドロゲンの場合代謝による減少がないことや、血中に存在するtestosterone-estradiol結合グロブリンと結合しないため非特異的結合が低く抑えられるためと思われる。

密度勾配遠心法による顎下腺アンドロゲンレセプターの沈降係数(S値)に関しては、当研究室の佐藤らが雌マウス細胞質レセプターが8Sであることを示し⁵³⁾、また雌ラット細胞質レセプターでも根本⁹⁾、根本ら⁵⁴⁾が8-9Sを報告している。これらの細胞質レセプターは加温や高塩強度下で4Sに変換され(変換型レセプター)^{8, 55)}、標的器官のアンドロゲンレセプターと同様にDNA-セルロースやクロマチン上のアクセプター

部位との結合が可能となる⁵⁵⁻⁵⁹⁾。本実験において、雄マウス核アンドロゲンレセプターのS値すなわち3.8Sは変換型の細胞質レセプターと類似していた(Fig. 4)。変換型細胞質アンドロゲンレセプターと核アンドロゲンレセプターの大きさに関してBruchovskyら⁶⁰⁾はラット前立腺変換型レセプターで4.4S、分子量87,000、Changら⁶¹⁾は同じく4.5S、分子量85,000と報告しているが、後者では、精製したレセプターでも全く同じであった。一方核より抽出したレセプターに関してはMulderら²⁸⁾がラット前立腺PLP抽出物を用いて4-5S、同じくKCl抽出物を用いて3-4Sという報告があるように、やはり変換型レセプターと核レセプターの大きさは類似していた。本実験で得られた3.8Sと佐藤らの変換型レセプターの4Sとの若干の違いは、プロテアーゼによるレセプターの部分分解によるものと思われた。このことから、よりネイティブなS値を得るためにはグラジエント中への各種のプロテアーゼインヒビターの添加などの考慮が必要と思われた。またPLPはレセプターのS値に影響を与えないとの報告がある⁶²⁾が、本実験でも、PLPの存在、非存在にかかわらずS値は同じであった(Fig. 4)。また、Sephacryl S-200ゲルクロマトグラフィー(Fig. 5)で得られたレセプターの分子量46,000は前述した前立腺核アンドロゲンレセプターの85,000-87,000に比べ小さいがこれもプロテアーゼによる分解によるものと思われた。一方replenishmentされたレセプターは約8Sを示した(Fig. 15)が、これは核レセプターの4S(Fig. 4)とは明らかに異なっており、細胞質レセプターと同じであった。この結果からも細胞質レセプターのreplenishmentは蛋白合成によるものであることが推測された。

結 論

雌雄マウス顎下腺アンドロゲンレセプターの細胞質ならびに核画分への分布ならびにtestosterone投与後のレセプターの動態に関し検討し以下の結果を得た。

1. 雄では細胞質レセプターは368 fmol/mg DNA、核レセプターは1,052 fmol/mg DNAと、

全レセプターの74%が核に存在した。

2. 雌では細胞質レセプターは 512 fmol/mg DNA, 核レセプターは 32fmol/mgDNA と、全レセプターの94%が細胞質に存在した。

3. 雌の細胞質レセプターは testosterone 投与後1時間でその大半が核に検出され、同時に細胞質レセプターは減少した。しかし、時間とともにこれら両レセプターは投与前のレベルへと回復した。

4. Testosterone 投与後に減少した細胞質レセプターの replenishment, ならびに投与後に増加した核レセプターの投与前レベルへの減少に要する時間は投与 testosterone 量に依存した。

5. 細胞質レセプターの replenishment は CXM では阻害されるが AcD では阻害されなかった。

6. 細胞質ならびに核レセプターとも、リガンドとの親和性ならびに特異性には差は認められなかった。分子の大きさに関しては、核レセプターの沈降係数は 3-4S と、細胞質レセプターの約 8S

より小さい値を示し、これらの値は標的細胞においての報告とそれぞれ一致した。なお、testosterone 投与後の核ならびに細胞質レセプターとも、投与前のそれぞれのレセプターとの性状の違いは認められなかった。

上記の結果より成熟マウス顎下腺アンドロゲンレセプターの細胞質ならびに核画分への分布には性差があること、また testosterone 投与によりこの分布が変化することより、レセプターの分布は血中のアンドロゲン濃度により規定されていることが示唆された。

謝辞：稿を終えるにあたり終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました太田稔教授に心より謝意を表します。また御協力いただきました教員各位に感謝いたします。

なお、本研究の一部は昭和60年度ならびに61年度文部省科学研究費補助金、奨励研究 A：課題番号 60771529 (60年度)、61771470 (61年度) によった。

抄録：雌雄マウス顎下腺より調製した細胞質ならびに核画分中のアンドロゲンレセプターを、合成アンドロゲン [^3H]R1881をリガンドとしてハイドロキシアパタイト法により測定した。その結果、レセプターの一般性状には雌雄差は認められないが、その量は核レセプターは雄 (1,052fmol/mg DNA) で雌 (32fmol/mg DNA) より著明に高く、一方細胞質レセプターは雌 (512fmol/mg DNA) で雄 (368fmol/mg DNA) より有意に高かった。すなわち雄では全レセプター量の74%が核画分に、残り26%が細胞質画分に見い出される一方、雌では94%が細胞質画分に見い出され核画分にはほとんど検出されなかった。従って顎下腺アンドロゲンレセプターの細胞質ならびに核画分への分布には性差が認められることが判明した。さらに雌に testosterone を投与し両画分に検出されるレセプターの変動を調べたところ、投与後1時間で細胞質レセプターが急激に減少し、同時に核レセプターが増加した。その後細胞質レセプターは徐々に回復 (replenishment) し、核レセプターも投与前のレベルまで減少した。なお、両レセプターの回復に要する時間は投与 testosterone 量に依存した。すなわち、testosterone 量の多いほど細胞質レセプターの replenishment ならびに核レセプターの投与前レベルへの減少に時間を要した。従ってこれらの変化は血中のアンドロゲンの濃度変化とパラレルであることが示唆された。また、細胞質レセプターの replenishment は蛋白合成阻害剤の cycloheximide では阻害されるが、RNA 合成阻害剤の actinomycinD により阻害されないことより、この過程は蛋白合成を介して起るものの、その調節部位は転写後レベルであることが示唆された。

文 献

- 1) Gresik, E. W. and Barka, T.: Precocious development of granular convoluted tubules in the mouse submandibular gland induced by thyroxine or by thyroxine and testosterone. *J. Anat.* **159**: 177-185, 1980.
- 2) Caramia, F., Angeletti, P. U. and Levi-Montalcini, R.: Experimental analysis of the mouse submandibular gland in relationship to its nerve-growth factor content. *Endocrinology* **70**: 915-922, 1962.
- 3) Byyny, R. L., Orth, D. N and Cohen, S.: Radioimmunoassay of epidermal growth

- factor. *Endocrinology* **90** : 1261-1266, 1972.
- 4) Angeletti, R. A., Angeletti, P. U. and Calissano, P.: Testosterone induction of esteroprolytic activity in the mouse submaxillary gland. *Biochim. Biophys. Acta* **139** : 372-381, 1967.
  - 5) Verhoeven, G.: Androgen binding protein in mouse submandibular gland. *J. Steroid Biochem.* **10** : 121-133, 1979.
  - 6) Sato, N., Nemoto, T., Baba, R. and Ota, M.: Dialysis induced transformation of mouse submandibular androgen receptor. *Biochem. Int.* **10** : 771-776, 1985.
  - 7) Wilson, J. D. and Goldstein, J. L.: Evidence for increased cytoplasmic androgen binding in the submandibular gland of the mouse with testicular feminization. *J. Biol. Chem.* **247** : 7342-7348, 1972.
  - 8) Sato, N., Nemoto, T., Nemoto, Y. O., Baba, R. and Ota, M.: Effects of castration and sex hormones on the androgen receptor of the mouse submandibular gland. *Jpn. J. Oral Biol.* **27** : 640-648, 1985.
  - 9) Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Sato, N., Kyakumoto, S. and Ota, M.: Characterization of nontransformed and transformed androgen receptor from rat submandibular gland. *Biochim. Biophys. Acta* **839** : 249-257, 1985.
  - 10) Louis, B. G. and Fritz, I. B.: Stimulation by androgens of the production of androgen binding protein by cultured Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **7** : 9-16, 1977.
  - 11) Boesel, R. W., Klipper, R. and Shain, S. A.: Androgen regulation of androgen receptor content and distribution in the ventral and dorsolateral prostates of aging AXC rats. *Steroids* **35** : 157-177, 1980.
  - 12) Traish, A., Mullar, R. E. and Wotiz, H. H.: A new procedure for the quantitation of nuclear and cytoplasmic androgen receptors. *J. Biol. Chem.* **256** : 12028-12033, 1981.
  - 13) Jensen, E. V., Suzuki, T., Numata, M., Smith, S. and DeSombre, E. R.: Estrogen-binding substances of target tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **59** : 632-638, 1968.
  - 14) King, W. J. and Greene, G. G. L.: Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* **307** : 745-747, 1984.
  - 15) Welshons, W. V., Lieberman, M. E. and Gorski, J.: Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature* **307** : 747-749, 1984.
  - 16) Hardin, J. W., Clark, J. H., Glasser, S. R. and Peck, E. J., Jr.: RNA polymerase activity and uterine growth: differential stimulation by estradiol, estriol, and nafoxidine. *Biochemistry* **15** : 1370-1374, 1976.
  - 17) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265-275, 1951.
  - 18) 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.
  - 19) Walters, M. R. and Clark, J. H.: Cytosol progesterone receptors of the rat uterus: assay and receptor characteristics. *J. Steroid Biochem.* **8** : 1137-1144, 1977.
  - 20) Beato, M. and Feigelson, P.: Glucocorticoid-binding proteins of rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.* **247** : 7890-7896, 1972.
  - 21) Eagle, H.: Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* **130** : 432-437, 1959.
  - 22) Ogle, T. F.: Action of glycerol and sodium molybdate in stabilization of the progesterone receptor from rat trophoblast. *J. Biol. Chem.* **258** : 4982-4988, 1983.
  - 23) Logeat, F., Cunff, M. L., Pamphile, R. and Milgrom, E.: The nuclear-bound form of the progesterone receptor is generated through a hormone-dependent phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131** : 421-427, 1985.
  - 24) Miller, M. A., Mullick, A., Green, G. L. and Katzenellenbogen, B. S.: Characterization of the subunit nature of nuclear estrogen receptors by chemical cross-linking and dense amino acid labeling. *Endocrinology* **117** : 515-522, 1985.
  - 25) Cidlowski, J. A. and Thanassi, J. W.: Extraction of nuclear glucocorticoid-receptor complexes with pyridoxal phosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **82** : 1140-1146, 1978.
  - 26) Muller, R. E., Traish, A. and Wotiz, H. H.: Effects of pyridoxal 5'-phosphate on uterine estrogen receptor. *J. Biol. Chem.* **225** : 4062-4067, 1980.
  - 27) Isomaa, V.: *In vitro* binding to and *in vivo* effect on the cytosol and nuclear progesterone receptors of various progestins, and their relationship to synthesis of various progestins, and their relationship to synthesis of uteroglobin in rabbit uterus. *Biochim. Biophys. Acta* **675** : 9-16, 1981.
  - 28) Mulder, E., Vrij, L. and Foekens, J. A.: Extraction of nuclear androgen receptors from rat prostate with different reagents.

- Mol. Cell. Endocrinol. **23** : 283-296, 1981.
- 29) Isomaa, V., Pajunen, A. E. I., Bardin, C. W. and Janne, O. A.: Nuclear androgen receptors in the mouse kidney: validation of a new assay. *Endocrinology* **111** : 833-843, 1982.
  - 30) Anderson, J. N., Clark, J. M. and Peck, E. J. Jr.: Determination of specific sites by [³H]oestradiol exchange. *Biochem. J.* **126** : 561-567, 1972.
  - 31) 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.
  - 32) Wright, W. W., Chan, K. C. and Bardin, C. W.: Characterization of the stabilizing effect of sodium molybdate on the androgen receptor present in mouse kidney. *Endocrinology* **108** : 2210-2216, 1981.
  - 33) Hechter, O., Mechaber, E., Zwick, A., Campfield, L. A., Eychenne, B., Baulieu, E. E. and Robel, P.: Optimal radioligand exchange conditions for measurement of occupied androgen receptor sites in rat ventral prostate. *Arch. Biochem. Biophys.* **224** : 49-68, 1983.
  - 34) Tarui, M., Koshika, S. and Nakayama, Y.: Changes in testosterone and dihydrotestosterone in the rat submandibular gland during development. *Folia Endocrinol. Jpn.* **59** : 1013-1021, 1983.
  - 35) 馬場利恵：マウス顎下腺における esteroprotease に関する研究. 歯基礎誌 **28** : 573-589, 1986.
  - 36) Dunn, J. F. and Wilson, F. D.: Developmental study of androgen responsiveness in the submandibular gland of the mouse. *Endocrinology* **96** : 1571-1578, 1975.
  - 37) 松本圭史, 佐藤文三：レセプター機構と疾患—ホルモンを中心として—ステロイドレセプター. 日本医師会誌 **93** : 2243-2249, 1985.
  - 38) Jensen, E. V., Suzuki, T., Numata, M., Smith, S. and DeSombre, E. R.: Estrogen-binding substances of target tissues. *Steroids* **13** : 417-427, 1981.
  - 39) Sarff, M. and Gorski, J.: Control of estrogen binding protein concentration under basal conditions and after estrogen administration. *Biochemistry* **10** : 2557-2563, 1971.
  - 40) Cidlowski, J. A. and Muldoon, T. G.: The dynamics of intracellular estrogen receptor regulations as influenced by 17 β -estradiol. *Biol. Reprod.* **18** : 234-246, 1978.
  - 41) Terakawa, N., Tsutsumi, H., Aono, T., Kurachi, K. and Matsumoto, K.: Replenishment of pituitary estrogen receptor in chronically estrogenized rats. *J. Steroid Biochem.* **21** : 9-13, 1984.
  - 42) Steinsapir, F., Evans, A. C., Bryhan, Jr. M. and Muldoon, T. G.: Androgen receptor dynamics in the rat ventral prostate. *Biochim. Biophys. Acta* **842** : 1-11, 1985.
  - 43) Kassis, J. A. and Gorski, J.: Estrogen receptor replenishment. *J. Biol. Chem.* **256** : 7378-7382, 1981.
  - 44) Rossini, G. P. and Liao, S.: Intracellular inactivation, reactivation and dynamic status of prostate androgen receptors. *Biochem. J.* **208** : 383-392, 1982.
  - 45) Sanborn, B. M., Wagle, J. R. and Steinberger, A.: Control of androgen cytosol receptor concentrations in sertoli cells: Effect of androgens. *Endocrinology* **114** : 2388-2393, 1984.
  - 46) Mester, B. J. and Baulieu, E. E.: Dynamics of oestrogen-receptor distribution between the cytosol and nuclear fractions of immature rat uterus after oestradiol administration. *Biochem. J.* **146** : 617-623, 1975.
  - 47) Hsueh, A. J. W., Peck, E. J. Jr. and Clark, J. H.: Control of uterine estrogen receptor levels by progesterone. *Endocrinology* **98** : 438-444, 1976.
  - 48) Cidlowski, J. A. and Muldoon, T. G.: Estrogen regulation of cytoplasmic receptor populations in estrogen responsive tissues of the rat. *Endocrinology* **95** : 1621-1629, 1974.
  - 49) Frieden, E. H. and Fishel, S. S.: Differential sensitivity of parameters of androgen action to metabolic inhibitors: Arginase and β -glucuronidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31** : 515-521, 1968.
  - 50) Horwitz, K. B. and McGuire, W. L.: Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. *J. Biol. Chem.* **253** : 2223-2228, 1978.
  - 51) Talwar, G. P., Modi, S. and Rao, K. N.: DNA-dependent synthesis of RNA is not implicated in growth response of chick comb to androgens. *Science* **150** : 1315-1316, 1965.
  - 52) Ritter, C.: NAD biosynthesis as an early part of androgen action. *Mol. Pharmacol.* **2** : 125-133, 1966.
  - 53) Sato, N., Ohara-Nemoto, Y. and Ota, M.: Transformation of androgen receptors from mouse submandibular glands by gel chromatography. *J. Endocrinol.* **108** : 123-127, 1986.
  - 54) Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T., Sato, N., Kyakumoto, S. and Ota, M.: Comparison of androgen receptor in male and female rat submandibular glands. *Jpn. J. Oral Biol.* **27** : 679-684, 1985.

- 55) Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T. and Ota, M.: Conversion from 4 S androgen receptor from rat submandibular gland to higher molecular form and the effect of sodium molybdate. *J. Steroid Biochem.* **23** : 643-649, 1985.
- 56) Kyakumoto, S., Sato, N., Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y. and Ota, M.: Activation of the rat liver androgen-receptor complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120** : 953-958, 1984.
- 57) Ota, M., Sato, N. and Kyakumoto, S.: Interaction of hepatic chromatin with androgen-receptor complex. *Exp. Clin. Endocrinol.* **84** : 159-166, 1984.
- 58) Ota, M., Kyakumoto, S. and Nemoto, T.: Demonstration and characterization of cytosol androgen receptor in rat exorbital lacrimal gland. *Biochem. Int.* **10** : 129-135, 1985.
- 59) Webster, R. A., Pikler, G. M. and Spelsberg, T. C.: Nuclear binding of progesterone in hen oviduct: Role of acidic chromatin proteins in high-affinity binding. *Biochem. J.* **156** : 409-418, 1976.
- 60) Bruchovsky, N., Rennie, P. S. and Vanson, A.: Studies on the regulation of the concentration of androgens and androgen receptors in nuclei of prostatic cells. *Biochim. Biophys. Acta* **394** : 248-266, 1975.
- 61) Chang, C. C., Towley, D. R. and Tindall, D. J.: Purification and characterization of the androgen receptor from rat ventral prostate. *Biochemistry* **22** : 6170-6175, 1983.
- 62) Hiipakka, R. and Liao, S.: Effect of pyridoxal phosphate on the androgen receptor from rat prostate: Inhibition of receptor aggregation and receptor binding to nuclei and to DNA-cellulose. *J. Steroid Biochem.* **13** : 841-846, 1980.