ラット顎下腺アンドロゲンレセプターの 酸性条件での安定性

佐 藤 政 直

岩手医科大学歯学部口腔生化学講座 (主任 : 太田稔教授)

〔受付 : 昭和62年10月24日〕

Stability of the androgen receptor from rat submandibular gland under acidic conditions

Masanao Sato

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

〔Accepted for publication : October 24, 1987〕

Key words: Androgen receptor / submandibular gland / steroid receptor / pH / rat

Abstract, The [^3H]miborelone ([^3H]MI)-binding ability of the androgen receptor (AR) from rat submandibular gland has been studied under acidic conditions. Both in the presence and absence of 10 mM molybdate, the [^3H]MI-binding ability was decreased as the pH of the cytosol decreased with the addition of acetic acid and HCl, with pH 5.9 giving 50 % binding. This loss of the binding ability was recovered when the acidic precipitate obtained by centrifugation was dissolved in a buffer at pH 7.3. In the presence of molybdate, this recovery of the binding clearly correlated with the protein content of the precipitate. In the absence of molybdate, however, the maximum binding recovered in the precipitate was achieved at pH 4.9, and rapidly decreased at lower pH values (1/2 value obtained at pH 4.1), even though the protein content in the precipitate was still rather high. When the cytosol was first labeled with [^3H]MI and then the pH was decreased in the absence of molybdate, [^3H]MI-AR complexes remained unchanged until reaching pH 5 and the amount was then decreased, with pH 4.2 giving 50 % binding. These results indicate that both unoccupied and liganded AR denatures irreversibly at pH 4.1-4.2. On the other hand, in the presence of molybdate, [^3H]MI-AR complexes were more resistant under acidic conditions and a considerable amount of the complexes could still be observed until pH 3. In addition, under acidic conditions in the presence of 0.5 M KCl, AR was transformed to a state which could bind to DNA-cellulose. In conclusion, AR from rat submandibular gland exists in a specific state between pH 4.1-5.9 ; AR at this state has no ligand-binding ability, but once formed, [^3H]MI-AR complexes do not dissociate. At lower pH values, AR is transformed, and subsequently denatures. Moreover, similar results were obtained from AR from rat prostate, glucocorticoid receptor from rat liver, and estrogen receptor from rat uterus, indicating that these are the common characteristics among these receptors.

緒 言

マウスやラット顎下腺はアンドロゲン 依存性器

岩手県盛岡市中央通 1-3-27 (〒020)

官であり、形態学的¹⁾にも、生化学的²⁻⁴⁾にも顕著な性差が認められる。アンドロゲンなどの、ステロイドホルモンはそれぞれのホルモンの標的臓器の細胞内に存在するステロイドホルモンレセプタ

ーと結合することによりその作用を発現する⁵⁾。事実、マウスやラットの細胞質画分にはアンドロゲンに特異的で高親和性のアンドロゲンレセプターが存在している⁶⁻⁹⁾。アンドロゲンレセプターは雄のみでなく雌の顎下腺にも存在し、その結合親和性や特異性、ストークス半径、沈降係数、DNA-cellulose 結合型へ転換する性質（活性化）などの物理化学的性質は雄のそれと同一であった^{8,10)}。しかしその存在状態は対照的で、雄ではアンドロゲンレセプターの70-80%が活性型として核に、雌では非活性型としてほとんどが細胞質画分に存在していた¹¹⁾。この差異は血中のアンドロゲン濃度に依存すると考えられた^{12,13)}。

ところで、一般にタンパク質の構造や機能、またこの両者の関係を明らかにするための有力な手段に、pH や温度、イオン強度などの条件を変動させ、種々の生化学的測定をおこなうという方法がある。ラットやマウスの顎下腺アンドロゲンレセプターは加温処理や高イオン強度条件^{9,14)}、透析やゲルクロマトグラフィー^{8,15)}により活性化される。この際、DNA 結合能の獲得と共に、分子量の減少、表面電荷の変化を伴い、これらの性質はラット前立腺^{16,17)}マウス腎臓¹⁸⁾やヒト陰茎部アンドロゲンレセプター¹⁹⁾さらに他のステロイドレセプター²⁰⁻²⁴⁾と同様であった。

一方、種々の pH でのステロイドレセプターの挙動に関する研究は非常に少ない。しかしながら、ラット肝臓の^[3H] triamcinolone (^[3H] TA)-グルココルチコイドレセプター複合体は、pH 8 の条件で活性化されることが知られている^{25,26)}。また Wilson²⁷⁾ は Dunning tumor のアンドロゲンレセプターの沈降係数が pH 7-8 で 7.9S から 6.8S まで pH に依存して変動することを見いだした。これらの報告はステロイドレセプターが pH に依存してその性質や分子構造が変化することを示唆している。しかしステロイドレセプターの不安定性のために、これまで pH の効果についてその生化学的性質を詳細に検討した例はない。例えばラット子宮のエストロゲンレセプターのエストラジオール結合能は pH 6.5 より減少し、pH 5.8 で1/2となる²⁸⁾。ラット肝の^[3H] TA-グルココルチコイドレセプター複合体は pH 6-8 の範囲で

のみ安定であると報告されている²⁵⁾。ラット前立腺アンドロゲンレセプターについてはその結合能は pH 6.4-7.5 で最大であり、pH 6 ではほぼ最大結合の1/2に減少する²⁹⁾。このように、ステロイドレセプターは非常に pH 変化に対して不安定であり、pH 6 以下では変性すると考えられてきた。

最近村山と伊藤³⁰⁾がブタ子宮のエストロゲンレセプターの酸性条件でのリガンド結合能について興味深い報告をしている。エストロゲンレセプターは pH 5.5以下では見かけ上リガンド結合能を示さないが、pH 5-5.5ではレセプターはリガンドを結合した状態で沈澱して存在するという。この結果から、彼らはエストロゲンレセプターは pH 5-5.5 の領域においても本質的には結合能を有していると結論した。本報告では、ラット顎下腺アンドロゲンレセプターの酸性条件でのリガンド結合能について検討した。その結果アンドロゲンレセプターもこれまで信じられていたほど酸性条件において不安定ではないことを見いだした。またこの結果が他の組織のアンドロゲンレセプターでも、さらに他のステロイドレセプターにも一般的な現象かどうか検討した。

材料及び方法

1. 実験材料

(1) 実験動物

8週齢の Wistar 系ラット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8-10週齢にて実験に供した。

(2) 試薬

トリチウム標識合成アンドロゲン、^[3H] miborelone (7 α , 17 α -dimethyl [¹⁷ α -³H]-19-nortestosterone, ^[3H] MI, 72Ci/mmol)、並びに非標識 MI は Amersham より購入した。トリチウム標識合成グルココルチコイド、^[3H] triamcinolone acetoneide ([6, 7-³H(N)] triamcinolone acetoneide, ^[3H] TA, 37Ci/mmol)、トリチウム標識エストラジオール [2, 4, 6, 7-³H] estradiol (99Ci/mmol) は New England Nuclear より購入した。Leupeptin は ペプチド研より、DNA-cellu-

loseは和光純薬より購入した。DEAE-cellulose と phosphocellulose は Whatman より, hydroxyapatite (HAP) は生化学工業より購入した。その他試薬類は特級を用いた。

2. 方法

(1) 緩衝液

用いた緩衝液は buffer A : 50mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% (v/v) glycerol, pH 7.3; buffer B: buffer A に10mM sodium molybdate を含む; buffer C: 10mM Tris-HCl, 10mM sodium molybdate, 0.5mM DTT, pH 7.3. Fig. 2 の実験については buffer B に HCl を加え, pH を 3-8 に調製して使用した。

(2) 細胞質の調製と ^3H ステロイドによる標識

雌ラットを頸椎脱臼にて屠殺後, 氷冷した生理食塩水にて灌流し, 顎下腺を摘出し, 同食塩水中にいた。付着する結合組織を除去後, 重量を測定した。以下の全ての操作, 実験は $0-4^{\circ}\text{C}$ にて行った。組織は8倍容の buffer A またはB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。ホモジネートを $150,000\times g$ 30分間遠心し, 上清を得た。上清を1/4容の phosphocellulose (あらかじめ buffer A またはBにて平衡化した後に遠心し, 上清を除いた沈澱) とインキュ

ベートし, 10分後に $1,500\times g$, 5分の遠心により, 上清を得, これを細胞質とした。

得られた細胞質を 10nM ^3H MI と3時間インキュベートした。その後, 等量の dextran-coated charcoal 懸濁液 (0.5% activated charcoal, 0.1% dextran T-70を buffer A に懸濁, DCC) をあらかじめ遠心して得た沈澱と10分間インキュベートした後, $1,500\times g$, 10分間遠心しすることにより遊離のステロイドを除去した。

前立腺アンドロゲンレセプター, 肝グルコルチコイドレセプター, 子宮エストロゲンレセプターに関する実験では, それぞれ, 実験の14-18時間前に去勢した雄, 無傷雄, 無傷雌ラットを屠殺し, 肝臓については生理食塩水にて灌流後組織を摘出し, 以下顎下腺と同様に細胞質を調製した。前立腺アンドロゲンレセプターは10nM ^3H MI, 肝臓グルコルチコイドレセプターは 20nM ^3H TA, 子宮エストロゲンレセプターは 5 nM ^3H エストラジオールにより4-6時間標識した。

(3) 酸性化の条件 (Fig. 1)

非標識細胞質, または上記のごとく ^3H ステロイドにて標識した細胞質を攪拌しながら pH 7.3 から5までは酢酸 (0.5-2 M) を, pH 5以下は塩酸 (1-2 M) を一滴ずつ加えて pH を下げ

Fig. 1 Outline of acidification of the cytosol.

^aomitted when the cytosol was originally labeled with ^3H MI.

た。それぞれの pH においてふた組の酸性化細胞質 (各0.1ml) を得た。そのうちの一方は6,000×g, 10分間遠心し、得られた沈澱は0.1ml の buffer B (pH 7.3) に溶解した。ただし、試料が pH 5 以下の場合には溶解する buffer B の pH を 8.2とした。すでに [³H] MI により標識した試料についてはミニカラム法により結合量とその型を決定した。一方、非標識細胞質を酸性化した場合にはこの後、[³H] ステロイドと3-6時間インキュベートしたのちミニカラム法をおこなった。一部の実験では [³H] ステロイドと同時に100倍量の非標識ステロイドを加え、これを非特異的結合とした。

(4) ミニカラム法

ミニカラム法は Holbrook らの方法³¹⁾を多少改変⁹⁾して行った。すなわち Buffer C に平衡化した 0.25 ml の DNA-cellulose, DEAE-cellulose, HAP をそれぞれ 1 ml のピペットマンチップにつめ、上からこの順に直接3個のチップを重ねた。0.1ml の試料をトップのカラムに重層し、3 ml の buffer C で洗浄した。遊離のステロイドは全てのカラムを素通りし、活性化型 (transformed-)、非活性化型 (nontransformed-)、並びにプロテアーゼにより部分分解されたレセプター (mero-receptor) はそれぞれ DNA-cellulose, DEAE-cellulose, HAP に吸着した。この transformed, nontransformed という用語はこれ以外にそれぞれ activated と nonactivated, または unactivated ともいい、こちらの方が日本語との対応もよいが、これらの語はステロイドレセプターのリガンドを結合する状態と結合しえない状態という意味にも用いられる。特に本研究では、後で示すようにレセプターが酸性条件下でリガンドを結合しない状態をとるので、混同をさけるために英文では transformed, nontransformed とした。各カラムに結合した [³H] ステロイドは 1 ml のエタノールにて溶出し、これに ACS-II シンチレーター (Amersham) を添加後、37% の効率にてその放射活性を測定した。[³H] ステロイドの総結合量はこれら3種カラムの結合量の和とした。あるいは HAP カラムのみに試料を添加して、以下同様の操作をおこない、直接総結合量を求めた。

(5) 高速液体クロマトグラフィー

TSK G4000SW カラム (東洋ソーダ) を用い LKB のシステムにより高速液体クロマトグラフィーを行なった。カラムを 20mM sodium phosphate buffer (pH 7.3), 10mM sodium molybdate, 1mM DTT にて平衡化し、試料添加後、同緩衝液で溶出した。ストークス半径は以下の標準タンパク質により求めた。Thyroglobulin (8.5 nm), ferritin (6.1nm), bovine albumin (3.6 nm), ribonuclease A (1.6nm)。

(6) タンパク定量

Bovine albumin を標準とし、Bradford³²⁾の方法に従った。通常ラット顎下腺細胞質のタンパク濃度は約 4 mg/ml であった。

結 果

1. 細胞質タンパク質の沈澱と [³H] MI 結合活性の関係

これまで各種のクロマトグラフィー法がステロイドレセプターの分離やその物理化学的性質の検討のために利用されている。そのほとんどは pH 7-8 の条件で行われており、広い pH 領域で DNA-cellulose, DEAE-cellulose, HAP とレセプターの結合を検討した報告はない。当研究室ではすでに中性条件でのミニカラム法がアンドロゲンやグルコルチコイドレセプターのレセプター型を決定するのに非常に簡便な方法であると報告している⁹⁾。そこで本研究では最初に、ミニカラム法が酸性 pH でも [³H] MI-アンドロゲンレセプター複合体とその型の定量に利用できるかどうかを検討した。顎下腺細胞質を [³H] MI 存在下で 0.3M KCl, 一時間活性化処理したのち、DCC 処理を行い [³H] MI-アンドロゲンレセプター複合体を得、そのうち一定量 (0.1ml) を HAP のみのミニカラムへ添加した。カラムをまず buffer C (pH 7.3) で、ついで pH 3 から pH 8 までの各 buffer でそれぞれ 0.5ml づつ 3 回洗浄した (Fig. 2a)。結果は総結合より非特異的結合を引いた特異的結合であらわした。総結合は pH 7 で最大で、それ以下の pH, 特に pH 6 から 4 にかけて減少した。非特異的結合は測定した pH 範囲で一定で低値を示すので、特異的結合は総結合と同

Fig. 2 Binding of $[^3\text{H}]$ MI-AR complexes to minicolumns between pH 3 and 8. (a) The cytosol in buffer A was incubated with $[^3\text{H}]$ MI for 3h in the presence or absence of a 100-fold molar excess of radioinert MI, and an additional 1h in 0.3M KCl. After DCC treatment, 0.1ml aliquots of $[^3\text{H}]$ MI-labeled cytosol were applied to HAP minicolumns. The columns were washed three times with 0.5ml of buffer C, and three times with 0.5ml of buffer B adjusted to a pH ranging between 3 and 8 as indicated. Radioactivity bound to the columns was eluted with 1ml of ethanol and counted. Specific bound radioactivity (O) was determined by subtracting the nonspecific bound radioactivity with cold MI (□) from the total bound radioactivity without cold MI (●). (b) The same experiment was performed except that the nonspecific binding was not measured and the samples were analysed by minicolumns with three kinds of resins. Total amount of the binding (●) was measured as the sum of the bindings of DNA-cellulose (O), DEAE-cellulose (□) and HAP (Δ).

様の pH 依存性を示した。この pH 6-4 における結合量の減少は、 $[^3\text{H}]$ MI-アンドロゲンレセプター複合体が酸性条件で不安定なため実際に複合体量が減少するためか、または複合体は安定だが、このような pH 範囲では HAP と複合体の親和性が減少するためという二つの可能性が考えられた。そこで同様に処理した標識細胞質を 3 種の樹脂を重ねたミニカラムへ添加し以下同様に洗浄した (Fig. 2b)。

DEAE-cellulose に結合した複合体量は pH 3-7 でほとんど変化しなかったが、DNA-cellulose 結合量は pH 6-4 で減少した。HAP 結合は測定した pH 範囲で一定であった。全体の $[^3\text{H}]$ MI-アンドロゲンレセプター複合体量も pH 6-4 では DNA-cellulose 結合量の減少に従い減少した。DNA-cellulose カラムは三種のミニカラム

のうちトップに位置するので、もし酸性条件における DNA-cellulose 結合の減少が、DNA-cellulose とレセプターの親和性の減少によるなら、引き続き通過するミニカラム、すなわち DEAE-cellulose、または HAP への結合が増加するはずである。結果はそうではなく、むしろ酸性条件では活性型レセプターが不安定であり、 $[^3\text{H}]$ MI がレセプターより解離し、DNA-cellulose 結合が減少したことを示唆している。この結果はさらに Fig. 2a で見られた HAP 測定による特異的結合の酸性側での減少も、レセプターとリガンドの解離、特に $[^3\text{H}]$ MI-活性型レセプターの解離によることを示している。それゆえにこれらの結果より HAP ミニカラムのみでも、また三種のカラムを重ねたミニカラム法でも、中性条件のみでなく酸性条件でも $[^3\text{H}]$ MI-アンドロゲンレセプター

Fig. 3 Relationship between precipitation of cytosolic proteins and $[^3\text{H}]$ MI-binding ability of the acidified cytosol. Acid solutions were added to the cytosol in buffer A or B with stirring, to decrease the pH as described in Fig. 1. Two aliquots (0.1ml each) were withdrawn from the acidified cytosol at each pH, as indicated. A series of samples were centrifuged at $6,000 \times g$ for 10min and the supernatants and the precipitates were separated. (a) The acidified cytosol in buffer A (□) or B (○) at every pH value as indicated was incubated with $[^3\text{H}]$ MI for 3h and the total binding was measured by a HAP minicolumn. The protein concentration of the supernatant of the acidic cytosol in buffer A (■) or B (●) was determined. (b and c) The precipitate obtained from acidic cytosol in buffer A (b) or B (c) was dissolved in the original volume (0.1ml) of buffer B, and then, the protein concentration (●) and $[^3\text{H}]$ MI-binding (○) were determined. At several pH values, the samples were incubated with $[^3\text{H}]$ MI in the presence of a 100-fold molar excess of radioinert MI (□). Results are indicated as per cent of the original cytosol in buffer A and B. Total bindings of original cytosols in buffer A and B were 2444 and 3463 dpm/0.1ml, respectively.

複合体を定量的に測定しようと結論した。また以下の実験ではミニカラムに添加する酸性 pH のサンプル量は0.1ml であり、洗浄は pH 7.3の緩衝液でおこなったので、ミニカラム法実施中の活性型 $[^3\text{H}]$ MI-アンドロゲンレセプター複合体の解離には非常に少ないものと考えられる。またこれ

らの結果は酸性条件でも $[^3\text{H}]$ MI-アンドロゲンレセプター複合体がすみやかに変性するものではないこと、特に非活性型の $[^3\text{H}]$ MI-アンドロゲンレセプター複合体はかなり安定であることを示唆している。さらに $[^3\text{H}]$ MI 非特異的結合は総結合の1/10程度であり、その量は酸性条件でも増

加することはなかったので、以下の実験では特に記述しないかぎり非特異的結合を測定せず、結果は総結合で示した。

つぎに酸性条件での顎下腺細胞質タンパク質の沈澱とアンドロゲンレセプターの ^3H MI 結合能の関係について検討した。Fig. 3a に示したように上清のタンパク質量は pH 6 付近から減少し始めた。その経過は 10mM sodium molybdate の有無によりやや異なり、pH 6-4 では molybdate 存在下でやや上清のタンパク量は多かった。pH 4 以下では molybdate 存在下では上清のタンパク量はさらに減少するのに対し、非存在下では上清のタンパク質量は pH 4 で最小で以下増加した。一方細胞質の ^3H MI 結合能は酸性条件で急速に減少した。すなわち molybdate の有無に関わらず、その結合能は pH 5.9 でほぼ半減した。この pH では細胞質タンパク質はまだほとんど沈澱していない。このことは酸性条件でのレセプターの ^3H MI 結合能の喪失が細胞質タンパク質の酸沈澱とは無関係の現象であることを示している。またタンパク質の沈澱する経過が molybdate の有無で異なるのに対し、結合能の減少は molybdate の存否に依存しないこともこれを支持する。pH 6 付近でみられるこのリガンド結合能の減少からこれまで一般にアンドロゲンレセプターやさらに他のステロイドレセプターは酸性条件で非常に不安定であると考えられてきたように思われる。ところが、酸沈澱したタンパク質を、再び pH 7.3 の緩衝液に溶解し、 ^3H MI とインキュベーションすると、 ^3H MI の結合が検出された (Fig. 3b and c)。非特異的結合はこれらの条件で常にわずかであった (四角で示す)。特に molybdate 存在下では ^3H MI 結合能は沈澱するタンパク量に依存し、一度 pH 3 以下の酸性条件にさらされた後でも pH を中性に戻すことより結合能を回復した。つまり pH 5.9 でのアンドロゲンレセプターの ^3H MI 結合能の喪失は可逆的であることを示している。一方、molybdate を含まない条件で細胞質を酸性化すると、沈澱するタンパク量は pH 4 まで増加しつつけるにもかかわらず、沈澱より回収される ^3H MI 結合は pH 4.9 ± 0.1 ($n = 4$) にて最大となり、以下減少し

た。これは pH 4.9 以下でレセプターの不可逆的変性が起こるためではないかと考えられた。また pH 4.5-5 の範囲の結合は沈澱するタンパク量に比べ、高い値を示したが、これについては後で検討する。このように、pH 6 でのレセプター結合能の喪失は molybdate 非依存性であるのに対し、pH 4.9 以下の酸沈澱に見いだされる結合活性の回復は molybdate に依存する現象であることが明らかとなった。

2. 酸性条件にて沈澱する ^3H MI 結合能の性質

Molybdate 存在下、pH 4.0 にて沈澱する細胞質タンパク質を buffer B に再溶解したのち、 ^3H MI とインキュベーションした試料を TSK G 4000SW に添加しゲルクロマトグラフィーを行った。Fig. 4 に示すように、Fraction 27 付近に特異的 ^3H MI 結合のピークが得られた。この位置は細胞質を ^3H MI にてラベルして得られる位置とほとんど同位置で、その Stokes 半径は 8.1nm であった。Fraction 42 付近のピークは遊離の ^3H MI であった。Molybdate 非存在下で pH 5.0、または molybdate 存在下 pH 4.0 の条件で沈澱し、再溶解により回復する ^3H MI 結合のそれぞれ 86%、90% は DEAE-cellulose 結合型であった (Table 1)。これらの結果は、酸性条件で沈澱し再溶解によって得られた ^3H MI 結合が、細胞質のそれと同様の、いわゆる非活性型レセプターであることを示している。

3. 酸性条件における ^3H MI-アンドロゲンレセプター複合体の安定性

次に Fig. 2 の実験と逆に細胞質をあらかじめ ^3H MI により標識し、 ^3H MI-アンドロゲンレセプター複合体を得、その後に細胞質の pH を下げ、アンドロゲンレセプターがすでに結合している ^3H MI の保持能力について検討した。酸性条件での ^3H MI 結合能を測定した実験 (Fig. 3a) と条件を合わせるために各 pH にて 3 時間放置した後に、残存する ^3H MI-アンドロゲンレセプター複合体量を HAP ミニカラム法により測定した (Fig. 5)。本条件では Fig. 3a で見られたような pH 5.9 での結合能の減少はなく、より低い pH 条件でもかなりの量の複合体が残っ

Fig. 4 Gel chromatography of the acidic precipitate. The precipitate obtained from the acidic cytosol at pH 4.0 in buffer B was dissolved in the original volume of buffer B and incubated with $[^3\text{H}]$ MI in the presence ($\square$) or absence ($\bullet$) of a 100-fold molar excess of radioinert MI. After DCC treatment, 1ml of the sample was loaded onto a TSK G4000SW column equilibrated in 20mM sodium phosphate buffer (pH 7.3) containing 10mM molybdate and 0.5mM DTT. As a control, 1ml of $[^3\text{H}]$ MI-labeled cytosol in buffer B was loaded onto the column ($\circ$). The flow rate was 0.5ml/min and 0.75 ml of the fractions were collected and counted for radioactivity. Stokes radii were estimated using the following standard: blue dextran 2000 (V_0 , void volume), thyroglobulin (T, 8.5nm), ferritin (F, 6.1nm), bovine albumin (B, 3.6 nm), and ribonuclease A (R, 1.6nm).

た。また複合体量の減少は molybdate 依存性であった。すなわち molybdate 非存在下では pH 4.1 ± 0.1 ($n = 4$) で複合体量は1/2となり, molybdate 存在下では, 複合体はさらに低い pH まで安定であった。またこの試料を遠心すると, 沈澱に $[^3\text{H}]$ MI-アンドロゲンレセプター複合体が得られた (Fig. 5b)。つまり, $[^3\text{H}]$ MI-アンドロゲンレセプター複合体は, 酸性条件で解離することなく沈澱することを示している。また molybdate 非存在下で pH 5付近より観察される複合体

Fig. 5 Stability and precipitation of $[^3\text{H}]$ MI-AR complexes under acidic conditions. The cytosol in buffer A or B was incubated with $[^3\text{H}]$ MI for 3h, treated with DCC, and acidified at various pH values as indicated. (a) After being kept for 3h at each pH level, 0.1ml of the sample in buffer A ($\bullet$) or B ($\circ$) was applied to a HAP minicolumn. As a control, results in Fig. 2a on the binding of the cytosol in buffer A (dotted line) and B (line) are depicted. (b) After 3h of acidification, the precipitate was obtained by centrifugation from the acidified cytosol in buffer A ($\bullet$) or B ($\circ$), dissolved in 0.1 ml of buffer B, and applied to a HAP minicolumn. Results are indicated as per cent of the $[^3\text{H}]$ MI-binding to that of the original cytosol in buffer A (1,377 dpm/0.1ml) and B (3,654 dpm/0.1ml).

量の減少が, molybdate により抑制されたが, これは Fig. 3b, c で観察されたりガンド結合能の不可逆変性過程とよく一致する。この一致はアンドロゲンレセプターがリガンドの結合に依存せずに, その1/2が pH 4.1付近で変性することを強く示唆する。

4. 酸性条件でのアンドロゲンレセプターの活

Table 1 Minicolumn binding assay of the precipitate of acidic cytosol

	Molybdate	Total bound dpm (per cent)	DNA-cellulose bound dpm (per cent)	DEAE-cellulose bound dpm (per cent)
Cytosol	—	4347 (100)	304 (7)	4043 (93)
Precipitate (pH 5.0)	—	2149 (100)	293 (14)	1856 (86)
Cytosol	+	1072 (100)	61 (6)	1011 (94)
Precipitate (pH 4.0)	+	963 (100)	98 (10)	865 (90)

The cytosol in buffer A or B was acidified to pH 5.0 and 4.0, respectively, and was centrifuged at $6,000\times g$ for 10 min. The precipitate obtained was dissolved in the original volume of buffer B and 0.1ml/ aliquot was incubated with [^3H] MI for 3h. As a control, the cytosol in buffer A or B was incubated with [^3H] MI and all samples were assayed by minicolumns of DNA-cellulose and DEAE-cellulose. A HAP column was omitted because its binding was low (data not shown). Total binding was estimated as the sum of DNA-cellulose and DEAE-cellulose bound. Results are indicated as both radioactivity bound and per cent of the binding to the total bound for each sample.

性化

前章で pH 4.9以下特に4.1付近でのアンドロゲンレセプターの失活が molybdate に依存することを示した。また Fig. 2b の結果は酸性条件下で活性型アンドロゲンレセプターが非活性型より失活しやすいことを示唆していた。すでによく知られているように molybdate は最も強力なステロイドレセプターの活性化阻害剤である³³⁻³⁵⁾。そこで酸性条件下でのアンドロゲンレセプターの不可逆的変性がレセプターの活性化と関連する可能性が考えられたので以下の実験を行った。Fig. と同様に細胞質をあらかじめ [^3H] MI により標識し、以下酸性化を行った。沈澱の [^3H] MI-アンドロゲンレセプター複合体はほとんど DEAE-cellulose に結合する非活性型レセプターであった。しかしながら、pH 5以下では常に少量の DNA-cellulose 結合がみられた (Fig. 6)。各 pH での活性型レセプターの量は増加することはなかったが、その総結合に占める割合は pH 5以下上昇し、pH 4.0で40%であった。pH 5.6と6でも高い割合が得られたが、この場合はほとんど複合体が沈澱していないためと思われる。このことは pH 5以下の [^3H] MI-アンドロゲンレセプター複合体の減少は、レセプターの活性化とそれにつづく変性によって説明しうることを示唆する。しかしながら、非活性型レセプターが、活性型とはならず、直接変性するとしても、この現象を矛盾せずに説

Fig. 6 DNA-binding ability of the acidic precipitate. The pH of the cytosol in buffer A was decreased and 0.1ml/ aliquot was obtained at each pH level as indicated. The acidified cytosol was centrifuged and the precipitate obtained was dissolved in 0.1ml/ of buffer B, and incubated with [^3H]MI. After 3h, the sample was applied to minicolumns with DNA-cellulose (○) and DEAE-cellulose (□). A HAP column was omitted because the binding was low (data not shown). Total bound radioactivity (●) was obtained as the sum of the bindings to DNA-cellulose and DEAE-cellulose. Results are indicated as per cent of the total binding of the original cytosol (4,347 dpm/0.1ml). Cross marks indicate per cent of DNA-cellulose bound to the total bound at each pH value.

Table 2 Transformation of androgen receptor in the presence of 0.5 M KCl under acidic conditions

	Treatment	Total bound	DNA-cellulose bound dpm (per cent)	DEAE-cellulose bound	HAP bound
Cytosol	—	3100 (100)	411 (13)	2464 (80)	225 (7)
	0.5 M KCl	3202 (100)	990 (31)	1997 (62)	215 (7)
	0.5 M KCl →pH 3.0	3139 (100)	2156 (69)	721 (23)	262 (8)
Precipitate	0.5 M KCl →pH 3.0 →centrifuge	1578 (100)	1031 (65)	462 (29)	84 (5)

The cytosol in buffer A was incubated with [3 H] MI for 3h and further incubated with 0.5M KCl. After 1h, free steroid was removed by the DCC method and the cytosol was acidified to pH 3.0. The acidic cytosol was centrifuged and the precipitate obtained was dissolved in the original volume of buffer B. Thereafter, an aliquot (0.1 ml) of the sample at each step was applied to the minicolumn and counted. Results are indicated as both radioactivity bound and per cent of the binding of each column to total bound radioactivity in each sample.

明できると考えられるので、この実験からは明確な結果が得られなかった。

ところで、ある種類のタンパク質は酸性条件で塩の共存により安定化することが知られている。アンドロゲンレセプターも molybdate 非存在、0.5M KCl 存在下で、より低い pH, pH 3 付近まで、安定に存在することを見いだした (Table 2)。そこで molybdate 非存在にて [3 H] MI により標識した細胞質を 0.5M KCl 条件にしたのちに酸性化すると、pH 3 で DNA-cellulose に結合する [3 H] MI-アンドロゲンレセプター複合体の割合は総結合の 67% を占め、0.5M KCl 処理した細胞質 (31%) の 2.2 倍であり、量的にも同様であった (Table 2)。この場合でも [3 H] MI-アンドロゲンレセプター複合体は沈澱していた。0.5M KCl 存在下と非存在下では条件が異なり、0.5M KCl 存在、酸性条件下で起こる活性化が同様に KCl 非存在下でも起こるとは断定できない。しかしながら、酸沈澱から回収される [3 H] MI 結合能や [3 H] MI-アンドロゲンレセプター複合体が molybdate 存在下ではより低い pH まで安定であること、また、中性条件にて形成された [3 H] MI-アンドロゲンレセプター複合体も、酸性条件でその活性型が非活性型より、より不安定である事実 (Fig. 2b) は、KCl 非存在下においても酸性条件 (pH 4.9 以下) でレセプターの活性化が起こり、すみやかに活性型レセプターが変性する

ことを示唆している。

5. ラット前立腺アンドロゲンレセプター、肝臓グルコルチコイドレセプター、ならびに子宮エストロゲンレセプターの酸性条件での安定性

これまでの結果はラット顎下腺アンドロゲンレセプターが酸性条件でも比較的安定であることを示している。そこで次に、このような性質が、顎下腺アンドロゲンレセプターに特異的な現象かどうかを検討した。まずアンドロゲンの標的臓器として最もよく研究されているラット前立腺アンドロゲンレセプターについて検討した。Fig. 7 に示すように、前立腺アンドロゲンレセプターの場合は、その [3 H] MI 結合能は pH 6.4 にて半減するが、酸沈澱した細胞質タンパクを中性の緩衝液に再溶解することにより、その結合能をほぼ完全に回復した。肝臓グルコルチコイドレセプター、子宮エストロゲンレセプターでも同様の結果が得られた (Figs. 8, 9)。ただしエストロゲンレセプターの場合は、酸性条件での [3 H] エストラジオール結合能は比較的低 pH まで保たれ、pH 5.2 で半減した。沈澱については顎下腺アンドロゲンレセプターの場合と同様に、沈澱より回復する [3 H] ステロイド結合能と沈澱する [3 H] ステロイドレセプター複合体の pH プロフィールはほとんど同様のパターンを示した。沈澱より回収される結合の最大量はほとんど細胞質の結合量と同程度であり、特にグルコルチコイドレセプタ

Fig. 7 $[^3\text{H}]$ MI-binding ability of rat prostate cytosol under acidic conditions. The cytosol from rat prostate in buffer B was acidified and two aliquots (0.1ml each) were withdrawn at various pH values. A series of the acidic cytosols were centrifuged at $6,000\times g$ for 10min and the resulting precipitates were dissolved in 0.1ml of buffer B. The acidified cytosol (○) and the sample derived from the precipitate (●) at each pH level were then incubated with $[^3\text{H}]$ MI. After 4h, the samples were applied to HAP minicolumns and bound radioactivity was counted. Results are expressed as per cent of the binding to that of the original cytosol (4,908dpm/0.1ml).

ーについては pH 4.6の沈澱より回復する $[^3\text{H}]$ TA 結合能は細胞質のそれを26%上回った (Fig. 8a)。同様の現象は実はすでに顎下腺アンドロゲンレセプターでも見られている。すなわち Fig. 3b に示されたように、顎下腺アンドロゲンレセプターでも pH 4.8 の沈澱より回復する $[^3\text{H}]$ MI 結合能は53%であり、(細胞質の結合能を上回ってはいないが) 回収されるタンパク量比21%より予想される最大の結合 (21%) より2.5倍も大きい。この結果は、細胞質が molybdate を含まない場合、酸沈澱したタンパク質を molybdate を含む緩衝液に溶解したために細胞質とひとたび沈澱した試料とで結合測定条件が異なるために生じた差異だと考えられた。例えば肝グルココルチコイドレセプターの場合、沈澱より回復する $[^3\text{H}]$ TA 結合能の最大値が、molybdate を含まない細胞質より通常20-50%高値を示すが、その値は molybdate を含む細胞質の結合量とほとんど一致した (Table

Fig. 8 $[^3\text{H}]$ TA-binding of rat liver cytosol under acidic conditions. (a) The cytosol in buffer A from rat liver was acidified and two aliquots (0.1ml) were withdrawn at various pH values. A series of samples were centrifuged and the precipitates obtained were dissolved in 0.1ml of buffer B. The acidic cytosols (○) and the samples from the precipitates (●) were incubated with 20nM $[^3\text{H}]$ TA for 5h and the bindings were measured by HAP minicolumns. Results are indicated as per cent of the binding to that of the original cytosol (12,100 dpm/0.1ml). (b) Rat liver cytosol in buffer A was incubated with 20nM $[^3\text{H}]$ TA for 5h and free steroid was removed by the DCC method. Then, $[^3\text{H}]$ TA-labeled cytosol was acidified and two aliquots (0.1ml) were withdrawn at various pH values. After being kept for 5h, a series of samples were centrifuged at $6,000\times g$ for 10 min, and the precipitates obtained were dissolved in 0.1ml of buffer B. Thereafter, $[^3\text{H}]$ TA-labeled and acidified cytosol (○) and the precipitate dissolved in buffer B (●) were applied to HAP minicolumns and the bindings were measured. Results are indicated as per cent of the binding to that of the original cytosol (9,204 dpm/0.1ml).

Fig. 9 $[^3\text{H}]$ Estradiol-binding of rat uterus cytosol under acidic conditions. (a and b) The same experiments in Fig. 8a and b were performed on rat uterine cytosol in buffer A. The samples were incubated with 5nM $[^3\text{H}]$ estradiol for 4h. Results are indicated as per cent of the binding to that of the original cytosols (17,571 dpm/0.1ml). Symbols are the same as those in Fig. 8.

3)。しかしながら酸沈澱したタンパク質を molybdate を含まない緩衝液に溶解した場合には molybdate を含まない細胞質の結合より、少ない値しか得られず、このことは肝グルコルチコイドレセプターよりも特に $[^3\text{H}]$ ステロイド結合容量の低い顎下腺アンドロゲンレセプター⁹⁾ について解析する上には不利であった。そのため今回の全ての実験において、沈澱は molybdate を含む緩衝液、すなわち buffer B にて溶解した。

Figs. 7-9 の結果は顎下腺アンドロゲンレセプターのみでなく、前立腺アンドロゲンレセプター、さらに他のステロイドレセプター、すくなくともグルコルチコイドやエストロゲンレセプターにおいて、これらのレセプターが、酸性条件で、これまで考えられてきたよりも安定であることを示している。

考 察

これまでアンドロゲンレセプターを含めステロイドレセプターは pH 6 以下の酸性条件では変性すると考えられてきた^{25,28,29)}。これは主に pH 6 以下でステロイドレセプターがリガンド結合能を失うという事実によっている。また通常リガンド-レセプター複合体の定量に用いられる DCC 法では、遊離のリガンドをチャコールに吸着させ、上清にリガンド-レセプター複合体を得る。その

Table 3 Effects of molybdate on the recovery of $[^3\text{H}]$ TA-binding ability of the glucocorticoid receptor in the acidic precipitate

	pH	Molybdate		$[^3\text{H}]$ TA-binding (dpm)
		Original buffer	Buffer dissolving precipitate	
Cytosol	7.3	—		9456±839 ^a (100.0±8.9)
		+		11607±314 ^a (122.7±3.3)
Precipitate	4.8	—	—	4638 (49.0)
		—	+	11617 (122.9)
	4.7	—	—	4190 (44.3)
		—	+	11779 (124.6)

^a s. d.

Acid solutions were added to the rat liver cytosol in buffer A to adjust pH to 4.7-4.8. An aliquot (0.1ml) of the acidified cytosol was centrifuged and the precipitate obtained was dissolved in 0.1 ml of buffer A (—molybdate) or B (+molybdate). The samples were incubated with $[^3\text{H}]$ TA for 4h and $[^3\text{H}]$ TA-binding was measured with HAP minicolumns. As a control, the cytosol prepared in buffer A or B was incubated with $[^3\text{H}]$ TA for 4h and $[^3\text{H}]$ TA-binding was measured with a HAP minicolumn.

Fig. 10 Schematic model of the states of AR under acidic conditions.

State I: AR interacts with [^3H]MI and [^3H]MI-AR complexes are stable.

State II: AR does not interact with [^3H]MI, but once formed [^3H]MI-AR complexes are stable.

State III: AR is transformed, and then, denatures irreversibly.

ため、中性 pH においてリガンドとインキュベーションした後に pH を下げた場合でも、リガンド-レセプター複合体は沈澱するため DCC 法では検出不可能であり、結果として、ステロイドレセプターは酸性条件ではリガンドを結合しないと考えられてきたと思われる。この点、今回用いたミニカラム法では、沈澱した [^3H] MI-アンドロゲンレセプター複合体も定量可能なので、酸性条件でのレセプター分析に適しているといえる。

本研究はアンドロゲンレセプターは中性以下、pH 5.9 と 4 付近において 2 段階の遷移過程と、それに応じた 3 種類の状態をとることを明らかにした (Fig. 10)。第一の状態は中性から pH 5.9 までであり、この状態のアンドロゲンレセプターは [^3H] MI 結合を有している。これまでのほとんどのアンドロゲンレセプターの研究はこの状態のレセプターに関するものである⁶⁻¹⁸⁾。第二番目の状態は molybdate 非存在下では pH 5.9-4 付近までであり、molybdate 存在下ではより低い pH まで保たれる。アンドロゲンレセプターはこの pH 領域において [^3H] MI 結合能は持たないが、ひとたび、中性条件で形成された [^3H] MI-アンドロゲンレセプター複合体は解離しない。アンドロゲンレセプターはこのうち、molybdate 非存在下では pH 4.9 をピークとして、molybdate 存在下ではより低い pH において沈澱するが、これは細胞質タンパク質の沈澱に存在する非特異的現象であり、レセプターの本質的な性質とは無関係であると思われる。一方、すでに村山と伊藤³⁰⁾はブタ子宮のエストロゲンレセプターについて同様の検討をおこない、pH 5-5.5 でエストロゲンレ

セプターはリガンドを結合した状態で沈澱し、上清に回収されないために、これまで見かけ上結合能を失うを考えられてきたと報告している。しかしながら、本報告の結果は、顎下腺アンドロゲンレセプターの pH 5.9 での見かけのリガンド結合能の喪失はレセプタータンパク質の沈澱とは無関係の現象であることを示している。また前立腺アンドロゲンレセプター (Fig. 7) やグルココルチコイドレセプター (Fig. 8a) でも pH 5-6 の範囲の [^3H] ステロイド結合能は酸性化細胞質と沈澱の両者を加えても細胞質の結合能をかなり下回っている。このことはこれらのレセプターでも酸性化条件での細胞質の見かけの結合能の喪失が、タンパク質の沈澱とは無関係の現象であることを示唆する。一方、エストロゲンレセプターについては細胞質の [^3H] エストラジオール結合能が比較的低い pH まで安定なために、細胞質の結合能の減少と沈澱より回復する結合能が見かけ上逆相関するようになるのではないと思われる (Fig. 9a)。エストロゲンレセプターに関してはさらに検討が必要であろう。

これまで、リガンド結合能のないステロイドレセプターの存在を示唆するいくつかの報告がなされている^{33,36-39)}。そのうちのいくつかの報告は、このような状態のレセプターが ATP 濃度や、酸素分圧の低下により生じ、これらの条件を復帰することによりリガンド結合能が回復すると報告している^{36,37)}。しかしながらアンドロゲンレセプターに関して可逆的に結合能を失った状態が存在しうることを明らかにしたのは著者の知る限り本論文が最初である。実際に *in vivo* においてもリ

ガンド結合能のないアンドロゲンレセプターが存在するのかどうかは、興味深いところであり、今後重要な問題である。

アンドロゲンレセプターが pH に依存して可逆的にリガンド結合能を失う現象を説明する最もありそうな可能性は、 $[^3\text{H}]$ MI の結合に必須の pK 5.9 のアミノ酸残基が、おそらくアンドロゲンレセプターのリガンド結合部位、またはその近傍に存在する、しかしながらこのアミノ酸残基はひとたび結合した $[^3\text{H}]$ MI を結合した状態のまま保つには必要ではないというものである。この付近に pK をもつアミノ酸は唯一ヒスチジンだけであり、またヒスチジンはその pK 以下ではプロトン化して極性を増すが、それがきわめて非極性の分子であるステロイドの結合を妨げるのかもしれない。

第三の状態への変化、つまりアンドロゲンレセプターの変性は pH 4.9 以下主に pH 4.1 付近でおこる。この変換過程は molybdate 依存性である。それはこの過程が、実際にはレセプターの活性化とそれに引き続く活性型レセプターの酸変性という二つの段階からなることをよく示唆する。実際、molybdate 非存在、0.5M KCl 存在下では酸性条件でのアンドロゲンレセプターの活性化が認められたが、塩非存在下では明確な結果は得られなかった。これはこの条件で生ずる活性型アンドロゲンレセプターが、非常に不安定なためと思われる。

本研究はラット顎下腺 アンドロゲンレセプターのみではなく、前立腺アンドロゲンレセプター、

肝臓グルコルチコイドレセプターさらに子宮エストロゲンレセプターも、酸性条件においてかなり安定であることを示した。ただし、アンドロゲンとグルコルチコイドレセプターが共に pH 5.9 付近で見かけのリガンド結合能が半減するのに対し、エストロゲンレセプターではほぼ pH 5.2 で結合能は半減した。このことはエストロゲンレセプターが他のステロイドレセプターよりも加温処理などにも比較的安定である事実⁴⁰⁾との関連を思わせる。しかしながら Hansen と Gorski²⁸⁾ は同じラット子宮エストロゲンレセプターのリガンド結合能は pH 5.8 で半減すると報告しているものでこの点については、さらに検討する必要がある。いずれにしろアンドロゲン、グルコルチコイド、ならびにエストロゲンレセプターが酸性条件において、やや状態変化する pH が異なる可能性はあるにしろ、どれもよく似た性質を示すことは、一見、理解しにくいことである。しかしながら、これらのレセプターは、そのステロイド結合の特異性以外にはこれまでに知られている物理化学的性質がきわめて類似することから考えるとむしろ当然なのかも知れない。また本研究の結果はさらに他のステロイドレセプターつまりプロゲステロン、ミネラルコルチコイド、ビタミン D₃ レセプターなどについても、同様に酸性条件での安定性の再検討の必要性を示している。

謝辞：御指導ならびに御校閲を賜りました岩手医科大学歯学部口腔生化学講座太田稔教授に感謝いたします。また終始直接実験の指導を賜り、かつ有益な御助言をいただいた根本孝幸講師に感謝いたします。

抄録：ラット顎下腺アンドロゲンレセプターの酸性条件において合成アンドロゲンである $[^3\text{H}]$ miborelone ($[^3\text{H}]$ MI) 結合活性を検討した。10mM molybdate 存在下、非存在下とも $[^3\text{H}]$ MI 結合活性は pH 5.9 で半減した。この結合活性の喪失は、酸沈澱した細胞質タンパク質を中性の緩衝液に再溶解することにより回復した。Molybdate 存在下では結合活性の回復は、沈澱のタンパク量に一致したが、molybdate 非存在下では沈澱より回復する結合活性は pH 4.9 において最大値を示し、それ以降は急速に減少した。一方、molybdate を含まない細胞質をまず $[^3\text{H}]$ MI により標識しその後 pH を下げた場合には中性条件で形成された $[^3\text{H}]$ MI-アンドロゲンレセプター複合体はより安定であり、pH 4.2 にて半減した。Molybdate 存在下では複合体はさらに低い pH まで安定であった。Molybdate 存在下、非存在下とも $[^3\text{H}]$ MI-アンドロゲンレセプター複合体は $[^3\text{H}]$ MI 非存在下と同様に沈澱した。これらの結果はアンドロゲンレセプターが pH 4.1-5.9 ではその $[^3\text{H}]$ MI 結合活性について特殊な状態にあることを示唆している。すなわち、この領域ではアンドロゲンレセプターはリガンド結合活性はないが、あらかじめ $[^3\text{H}]$ MI が結合している場合は、酸化によりたとえレセプターが沈澱してもこのリガンドは保持される。さらにアンドロゲンレセプターは pH

5以下で真の変性がおこり、pH 4.1でその1/2が変性する。この変性過程は、酸性条件でのアンドロゲンレセプターの活性化と、ひきつづき起こる活性型レセプターの変性よりなると考えられた。

References

- 1) Lacassegne, A.: Dimorphisme sexual de la glande sous-maxillaire chez ls souris. *Comp. Rend. Soc. Biol.* **133**: 180-181, 1940.
- 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) 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.
- 6) 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.
- 7) Verhoeven, G.: Androgen binding protein in the mouse submandibular gland. *J. Steroid Biochem.* **10**: 121-133, 1979.
- 8) Sato, N., Nemoto, T., Baba, R. and Ota, M.: Dialysis induced transformation of mouse submandibular androgen receptor. *Biochem. Int.* **10**: 771-766, 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) 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.
- 11) Kyakumoto, S., Kurokawa, R., Ohara-Nemoto, Y. and Ota, M.: Sex difference in the cytosolic and nuclear distribution of androgen receptor in mouse submandibular gland. *J. Endocrinol.* **108**: 267-273, 1986.
- 12) Kyakumoto, S., Kurokawa, R. and Ota, M.: Effect of castration and administration of testosterone on cytosol and nuclear androgen receptor in mouse submandibular gland. *Biochem. Int.* **11**: 701-707, 1985.
- 13) Sato, N., Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., 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.
- 14) Verhoeven, G. and Wilson, J. D.: Cytosol androgen binding in submandibular gland and kidney of the normal mouse and the mouse with testicular feminization. *Endocrinology* **99**: 79-92, 1976.
- 15) Sato, N., Ohara-Nemoto, Y. and Ota, M.: Transformation of androgen receptor from mouse submandibular glands by gel chromatography. *J. Endocrinol.* **108**: 123-127, 1986.
- 16) Mainwaring, W. I. P. and Irving, R.: The use of DNA cellulose chromatography and isoelectric focusing for the characterization and partial purification of steroid-receptor complexes. *Biochem. J.* **134**: 113-127, 1973.
- 17) Fang, S. and Liao, S.: Androgen receptors: steroid and tissue specific retention of 17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one-protein complex by the cell nuclei of ventral prostate. *J. Biol. Chem.* **246**: 16-24, 1971.
- 18) Lin, S.-Y. and Ohno, S.: The binding of androgen receptor to DNA and RNA. *Biochim. Biophys. Acta* **654**: 181-186, 1981.
- 19) Kovacs, W. J., Griffin, J. E. and Wilson J. D.: Transformation of human androgen receptor to the deoxyribonucleic acid-binding state. *Endocrinology* **113**: 1574-1581, 1983.
- 20) Shrader, W. T., Toft, D. O. and O'Malley, B. W.: Progesteronebinding protein of chick oviduct. VI. Interaction of purified progesterone receptor components with nuclear components.: *J. Biol. Chem.* **247**: 2401-2407, 1972.
- 21) Milgrom, E., Atger, M. and Baulieu, E. E.: Acidophilic activation of steroid hormone receptors. *Biochemistry* **12**: 5198-5295, 1973.
- 22) Holbrook, N. J., Bodwell, J. E., Jeffries, M. and Munck, A.: Characterization of nonactivated and activated glucocorticoid receptor-complexes from intact rat thymus cells. *J. Biol. Chem.* **258**: 6477-6485, 1983.
- 23) Vedeckis, W. V.: Subunit dissociation as a possible mechanism of glucocorticoid receptor activation. *Biochemistry* **22**: 1983-1989, 1983.
- 24) Sherman, M. R., Moran, M. C., Tazon, Z.

- F. B. and Setvens, Y.-W.: Structure, dissociation, and proteolysis of mammalian steroid receptors. *J. Biol. Chem.* **258** : 10366-10377, 1983.
- 25) Bailly, A., Savouret, J.-F., Sallas, N. and Milgrom, E.: Factors modifying the equilibrium between activated and non-activated forms of steroid-receptor complexes. *Eur. J. Biochem.* **88** : 623-632, 1978.
- 26) Bodine, P. V., Schmidt, T. J. and Litwack, G.: Evidence that pH induced activation of the rat hepatic glucocorticoid-receptor complex is irreversible. *J. steroid Biochem.* **20** : 683-689, 1984.
- 27) Wilson, E. M.: Interconversion of androgen receptor forms by divalent cations and 8S androgen receptor-promoting factor. *J. Biol. Chem.* **260** : 8683-8689, 1985.
- 28) Hansen, J. C. and Gorski, J.: Conformational and electrostatic properties of unoccupied and liganded estrogen receptors determined by aqueous two-phase partitioning. *Biochemistry* **24** : 6078-6085, 1985.
- 29) 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.
- 30) 村山 昭, 伊藤孝司: エストロゲンレセプターの酸沈澱 生化学 **58** : 973, 1986.
- 31) Holbrook, N. J., Bodwell, J. E. and Munck, A.: Effects of ATP and pyrophosphate on properties of glucocorticoid-receptor complexes from rat thymus cells. *J. Biol. Chem.* **258** : 14885-14894, 1983.
- 32) Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** : 248-254, 1976.
- 33) Nielsen, C. J., Sando, J. J., Vogel, W. M. and Pratt, W. B.: Glucocorticoid receptor inactivation under cell-free conditions. *J. Biol. Chem.* **252** : 7568-7578, 1977.
- 34) Nishigori, H. and Toft, D.: Inhibition of progesterone receptor activation by sodium molybdate. *Biochemistry* **19** : 77-83, 1980.
- 35) Noma, K., Nakao, K., Sato, B., Nishizawa, Y., Matsumoto, K. and Yamamura, Y.: Effect of molybdate on activation and stabilization of steroid receptors. *Endocrinology* **107** : 1205-1211, 1980.
- 36) Bell, P. A. and Munck, A.: Steroid-binding properties and stabilization of cytoplasmic glucocorticoid receptors from rat thymus cells. *Biochem. J.* **136** : 97-107, 1973.
- 37) Housley, P. R., Grippo, J. F., Dahmer, M. K. and Pratt, W. B.: Inactivation, activation, and stabilization of glucocorticoid receptors. in *Biochemical Actions of Hormones* (Litwack, G., ed) Vol. XI, pp 347-376, Academic Press, New York 1984.
- 38) Nakao, M., Sato, B., Koga, M., Noma, K., Kishimoto, S. and Matsumoto, K.: Identification of immunoassayable estrogen receptor lacking hormone binding ability in tamoxifen-treated rat uterus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **132** : 336-342, 1985.
- 39) Mendel, D. B., Bodwell, J. E. and Munck, A.: Glucocorticoid receptors lacking hormone-binding activity are bound in nuclei of ATP-depleted cells. *Nature* **324** : 478-480, 1986.
- 40) Notides, C. A. and Nielsen, S.: The molecular mechanism of the *in vitro* 4S to 5S transformation of the uterine estrogen receptor. *J. Biol. Chem.* **249** : 1866-1873, 1974.