ラット顎下腺におけるミネラルコルチコイド レセプターの性状の解析

田 村 潔

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: 平成3年8月15日〕

Characterization of mineralocorticoid receptor in rat submandibular gland

Kiyoshi Tamura

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

〔Accepted for publication: August 15, 1991〕

Key words: Mineralocorticoid receptor / glucocorticoid receptor / submandibular gland / aldosterone / Wistar rats

Abstract: It has been reported that mineralocorticoid receptor (MR) exists in kidney, intestine, heart and brain, but the distribution to oral tissues is poorly understood. Considering the function of mineralocorticoids as modulators of electrolyte secretion, the transport of electrolytes in salivary glands may be regulated by mineralocorticoids. In this report, the author characterized MR in rat submandibular gland. The cytosol obtained from rat submandibular gland and kidney was incubated with 20 nM [3 H]aldosterone and a ten-fold excess of RU28362 (pure synthetic glucocorticoid) to suppress the binding of [3 H]aldosterone to glucocorticoid receptor. The cytosol of rat submandibular gland contained 90 kDa heat shock protein which was associated with MR. The apparent dissociation constant for [3 H]aldosterone was 0.72 ± 0.18 nM in submandibular gland and 0.47 ± 0.13 nM in kidney, and the number of binding sites was 47.8 ± 19.0 fmol/mg protein in submandibular gland and 26.4 ± 8.6 fmol/mg protein in kidney. MR from both rat submandibular gland and kidney eluted at 0.2-0.25 M NaCl on TSK-DEAE5PW HPLC, whereas a new peak appeared at 0.12 M NaCl after the treatment with 0.5 M NaCl for 1.5 h. DNA-cellulose binding activity remarkably increased after exposure to 0.4 M NaCl for 1.5 h at 0-4°C. Northern blot analysis using rat MR cRNA probe revealed a 6 kb transcript in both submandibular gland and kidney. These findings suggest that significant amounts of MR exist in rat submandibular gland and that its biochemical characteristics are almost identical to those of kidney. Similar to other steroid hormone receptors such as GR, the transformation process which acquires the DNA-binding activity seems to be needed for the action of MR. Aldosterone-MR system may regulate the excretion and adsorption of Na^+ - K^+ in rat submandibular gland.

緒 言

1962年 Jensen ら¹⁾は子宮組織中にエストロゲンレセプターが存在する事を発見し、ステロイドホルモンが標的臓器においてその作用を発揮するためには、これらの組織に特異的なレセプターが存在する必要があることを明らかにした。他のステロイドホルモンも同様に特異的レセプターを介してその作用を発現する事が明らかになった。ミネラルコルチコイドはグルコルチコイドと共に副腎皮質で合成されるステロイドホルモンで、コルチコステロイドと総称される²⁾。グルコルチコイドレセプター (GR) の解析は比較的以前から進められ多くの知見が得られてきた³⁻⁶⁾が、ミネラルコルチコイドレセプター (MR) に関しては、ミネラルコルチコイドが非常に不安定な物質であること、またステロイドレセプターのうちでもMRは特にその存在量が少ないため単離精製が困難で、いくつかの試みにも関わらず、その性質にはまだ不明な点が多い。

最近 Arriza ら⁷⁾はMRとGRとの類似性に着目し、すでに構造の決定したGRのDNA結合部位のオリゴヌクレオチドをプローブとしてヒト腎cDNAライブラリーからヒトMRのcDNAを分離し、その全塩基配列を決定した。ヒトMRは984個のアミノ酸からなり、602番から670番にかけてDNA binding domain、734番から984番にかけてsteroid binding domainが存在することが判明した。既に一次構造の決定しているヒトGRとアミノ酸配列を比較してみると、DNA binding domain については94%、steroid binding domain に関しては57%の相同性が認められるが、immunogenic region を含むアミノ末端部分では相同性が少なく15%以下である。一方最近、ラットMRcDNAがクローニングされたが、ヒトMRとアミノ酸配列レベルで比較するとDNA binding domain に関して90%、steroid binding domain で89%の相同性が認められた⁸⁾。今日までこれまで知られている全てのステロイドレセプターがクローニングされたが、その結果ステロイドホルモンレセプター間でも特にMRとGRの両者は大変類似していることが確認され、また *in*

vitro においてグルコルチコイドがMRに結合親和性を有する事も確認された。

唾液腺からの外分泌は交感神経系ならびに副交感神経系によって調節されているが、唾液腺には自律神経系の生理活性物質に対するレセプターのみでなく種々のペプチドやステロイドホルモンのレセプターも存在する⁹⁻¹⁷⁾。腎臓と同様唾液腺におけるイオンの能動輸送においても自律神経系でのコントロールのみならずミネラルコルチコイドが関与していることが予想され、MRの存在が予想される。事実、少なくとも耳下腺にはMRの存在が報告されている¹²⁾。このように唾液腺はミネラルコルチコイドの標的臓器と考えられるにも関わらず、筆者の知る限り実際にMRを測定した報告はほとんど無く、その性質を腎臓のそれと比較検討した文献は見あたらない。本研究では、唾液腺、中でも顎下腺を対象臓器としてMRの性状を検討した。加えてNorthern blotによりMRmRNAに関する結果も得たので報告する。

材料と方法

1. 実験材料

(1) 実験動物

8週齢の雄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後、8-16週齢にて実験に供した。副腎摘出群は両側の副腎を摘出した後、生理食塩水を与え3~4日後に実験に供した。

(2) 試薬

トリチウム標識アルドステロン(alдостероне D-[1,2-³H(N)], 49.5Ci/mmol), トリチウム標識triamcinolone acetone (TA [6, 7-³H(N)], 37Ci/mmol), 非標識TA, 合成グルコルチコイドのRU28362 [11β, 17β-dihydroxy-6-methyl-17α-(1-propyl) androsta-1, 4, 6-trien-3-one] はNew England Nuclear DuPont社, (Boston, MA, USA)より購入した。[α-³²P] UTP (3,000 Ci/mmol, Bresatec Ltd 製) は和光純薬工業より、また非標識アルドステロンはMERCK社より購入した。Leupeptin はペプチド研究所より、

dithiothreitol (DTT) は Boehringer Mannheim より、ヤギ peroxidase 標識抗ウサギ IgG 抗体は Cappel Lab 社 (Ine, USA) より、DNA セルロースは和光純薬より、DEAE セルロースは Whatman より、ハイドロキシアパタイトは生化学工業より、TSK-DEAE5PW (0.75cm×7.5cm) は東ソーよりそれぞれ購入した。その他の試薬は特級を用いた。

(3) 緩衝液

以下の緩衝液を使用した。

TEDG buffer: 20mM Tris-HCl (pH 7.3), 1mM EDTA, 1mM DTT, 10% (v/v) glycerol

TEDMG buffer: 10mM sodium molybdate を含む TEDG buffer

TMD buffer: 10mM Tris-HCl (pH 7.3), 10mM sodium molybdate, 0.5mM DTT

PMD buffer: 20mM sodium phosphate (pH 7.3), 10mM sodium molybdate, 0.5mM DTT

ハイブリダイゼーション buffer: 6×standard saline citrate (SSC, 1×SSC は, 0.15M NaCl, 0.015M sodium citrate, pH 7.0), 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 50% formamide, 5×Denhardt's reagent, 100μg/ml denatured salmon sperm DNA, 200μg/ml yeast tRNA

2. 方法

(1) 細胞質画分調製法

ラットを過麻酔もしくは頸椎脱臼にて屠殺後、ただちに生理食塩水にて血管還流の後、目的臓器(顎下腺、腎臓、肝臓)を摘出し、氷冷した生理食塩水に入れた。臓器に付着している結合組織を除去後重量を測定した。

以下の操作は特にことわらない限りすべて 0-4°C にて行った。組織を 3~5 倍容の、0.5 mM leupeptin を含む TEDMG buffer もしくは TEDG buffer 中でガラスステフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズし、続いてホモネートを 150,000×g, 40 分間遠心した。得られた上清を細胞質画分として、以下の実験に供した。

(2) [³H]リガンドによるレセプターの標識

MR の結合を測定する場合は細胞質画分に 20 nM [³H] アルドステロンならびに 200nM の RU 28362 を添加し、14-16 時間インキュベートした。ここで用いた RU 28362 は GR にもみ特異的に結合し、MR とは結合しないことが知られている¹⁸⁻²⁰⁾ 純粋な合成グルココルチコイドである。アルドステロンは弱いながらも GR にも結合能を有するため^{19,20)}、本研究では [³H]アルドステロンに対し、10 倍量の RU 28362 を共存させることにより [³H]アルドステロンの GR への結合をブロックした。一方 GR を測定する際には、細胞質を 20nM の [³H]TA と 14-16 時間インキュベートした。非特異的結合はそれぞれの [³H]リガンドと同一の非標識リガンドを 200 倍量 (4μM) 加え、同一の条件でインキュベートする事により測定した。それぞれの特異的結合は、非標識ステロイド非存在下における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事により求めた。

(3) TSK-DEAE5PW High Performance

Liquid Chromatography (HPLC) によるレセプターの分析

標識した細胞質画分を dextran coated charcoal (DCC; 0.5% charcoal, 0.1% dextran T70) で 2 回処理し、非結合リガンドを除去した。さらに、セルロースアセテートフィルター (0.45μm, ADVANTEC 社) を通した後、25mM NaCl を含む PMD buffer で平衡化した TSK-DEAE5PW カラムに添加した。カラムを 25mM NaCl を含む PMD buffer で洗浄後、0.025-0.5M NaCl の linear gradient にて溶出した。

(4) 結合親和性の測定 (Scatchard plot²¹⁾)

TEDMG buffer 中で得た細胞質画分に 0.25-20nM の [³H]アルドステロンと 10 倍濃度 RU 28362 を添加し、14-16 時間インキュベートした後、0.25ml のハイドロキシアパタイトに吸着させた。遠心後上清の一部 (20μl) を採取し、非結合リガンド濃度を計測した。一方ハイドロキシアパタイトに結合したレセプターは、1ml の TMD buffer で 3 回洗浄し遊離の [³H]アルドステロンの完全に除いた後、結合した [³H]アルドステロンを 1ml のエタノールで溶出し、これに ACS-

II シンチレーター (Amersham) を添加し攪拌後放射活性を測定した。それぞれの MR に対する特異的結合は、非標識アルドステロン非存在下における全結合量から 200 倍量の非標識アルドステロン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。

(5) 90kDa Heat Shock Protein (HSP90) の検出

i) 抗体の作製並びにイムノブロット分析

ラット肝臓からの HSP 90 の精製および抗 HSP 90 抗体の作成は根本ら²²⁾ によった。電気泳動は 10 % 濃度アクリルアミドで Laemmli²³⁾ の系を用いた。電気泳動の後タンパク質をニトロセルロースフィルターに転写し、200 倍希釈の抗血清により反応させた。この過程は Ohara-Nemoto²⁴⁾ らの方法によった。二次抗体にはヤギ peroxylase 標識—抗ウサギ IgG 抗体を用い、4-chloro-1-naphthol にて発色した。

ii) 抗HSP90抗体樹脂による分析

Protein A-Sepharose (60 μ l) に抗HSP90血清 (50または200 μ l) を加え1時間インキュベートした。未結合タンパク質を1ml の TMD buffer で3回洗浄し、これを抗HSP90抗体樹脂とした。³Hアルドステロンとインキュベートした顎下腺細胞質 (100 μ l) と用意したアフィニティー樹脂 (60 μ l) を混ぜ1時間保持した。その後、1ml の TMD buffer にて3回洗浄し遊離のステロイド等の非結合物を除いた。200 倍濃度の非標識アルドステロン非存在下で樹脂に結合した放射活性から非標識アルドステロン存在下のそれを計測し、その差を抗体樹脂に結合した MR とした。一方、全レセプター量を決定するために同時にハイドロキシアパタイトアッセイを行った。

(6) MR の *in vitro* における活性化実験

0.5M NaCl 処理と、加温 (23°C, 30分) による MR の活性化を試みた。TEDG buffer で調製した細胞質を ³Hアルドステロンでインキュベートし、続いて0.5M NaCl にて1.5時間インキュベートした。これを DCC の沈澱で2回処理し、遠心を行い上清を得た。試料の脱塩のために TMD buffer で平衡化した PD-10カラム (Pharmacia) にて濾過した後、セルロースアセテートフィルタ

ーで濾過し、TSK-DEAE5PW HPLC にて観察した。

一方、加温処理については細胞質画分を TEDG buffer または、50mM NaCl を含む TEDG buffer で調製し、³Hアルドステロンにて標識後、23°C 30分の加温処理した。ついで DCC 沈澱により遊離のリガンドを除去し、以下、前述と同様の処理を行い、TSK-DEAE5PW HPLC にて観察した。

(7) ミニカラム法

ミニカラム法は Holbrook らの方法²⁵⁾ を多少変更して行った。すなわち TMD buffer で平衡化した 0.25ml の DNA セルロース、DEAE セルロース、ハイドロキシアパタイトをそれぞれ 1ml のピペットマンチップに充填し、上からこの順に直接3個のチップを重ねた¹³⁾。TEDG buffer 中で得た細胞質画分を、10nM ³Hアルドステロンにて標識後、0.4M NaCl にて1.5時間インキュベートした。得られた試料を8倍希釈し NaCl 濃度を0.05M としてから、その0.8ml をトップのカラムに重層し吸着後、1ml の TMD buffer で3回洗浄した。一方加温処理の場合は23°C, 30分間処理した細胞質をトップのカラムに重層し、以下同様の処理を施した。この際、遊離のステロイドは全てのカラムを素通りし、活性型レセプター (transformed receptor) は DNA セルロースに、非活性型レセプター (nontransformed receptor) は DEAE セルロースに、またプロテアーゼにより部分分解されたレセプター (mero-receptor) はハイドロキシアパタイトに吸着する。各カラムに吸着した ³Hアルドステロンは 1ml のエタノールにて溶出し、放射活性を測定した。これら3種のカラムの特異的結合量の和を ³Hアルドステロンの総結合量とした。それぞれの結合の割合はこれらの総特異的結合量を 100 % とし、その百分率にて表した。

(8) タンパク質濃度定量

Bovine serum albumin を標準とし、Bradford の方法²⁶⁾ によりタンパク質濃度を測定した。測定には、SLT イージーリーダー EAR400 (SLT-LABINSTRUMENTS 社, AUSTRIA) を用いた。

(9) Northern blot

i) プローブ標識

p26MR は Dr. P. D. Patel (University of Michigan Medical School, USA) より供与を受けた。この plasmid は pGEM3 vector の EcoRI-HindIII site に rat MRcDNA の一部 (Fig. 8 の黒塗りの部分) を挿入している。p26MR を EcoRI で linealize した後, phenol/chloroform 処理し, エタノールで沈澱させた。この DNA 1 μ g を用い, Promega の リボプローブ作製キット (Promega Corporation) を用い添付の指示書通りに 50 μ Ci [α^{32} P] UTP と SP6RNA polymerase により標識した。標識後放射活性を測定し, 13 $\times$ 10⁶cpm をハイブリダイゼーションに用いた。

ii) Total RNA および poly(A)⁺RNA の調製

雄 Wistar 系ラットを副腎摘出群とコントロール群に分け, 先の方法で飼育し, 屠殺後直ちに顎下腺, 腎臓を摘出しエタノールドライアイスバスで凍結し -80°C で保存した。顎下腺では約 0.5g, 腎臓では約 1g の組織を用いた。Guanidinium/Hot Phenol 法²⁷⁾により total RNA を調製した。引き続き total RNA の 750 μ g を用いて Oligo (dT)-Latex 粒子 (日本ロッシュ) を用いて垣塚ら²⁸⁾の方法により poly(A)⁺RNA の精製を行った。

iii) 電気泳動およびハイブリダイゼーション

Total RNA 並びに poly(A)⁺RNA を用いた電気泳動の過程は村松ら²⁹⁾の方法に従い, 4.5 μ g の poly(A)⁺RNA を電気泳動に用いた。

電気泳動終了後, キャピラリー法により RNA をニトロセルロースフィルター (ADVANTEC 社), もしくはマグナナイロン 66 フィルター (MICRON SEPARATION INC.) に 14-16 時間転写した。転写終了後, 80°C, 2 時間のベーキングにより RNA を膜に固定した³⁰⁾。固定後のフィルターをハイブリダイゼーション buffer 中で 42°C, 14-16 時間振盪し プレハイブリダイゼーションを行った後, プレハイブリダイゼーション buffer を同一の buffer で交換し, これに先に記したプローブを加え, 42°C, 14-16 時間ハイブリダイゼーションを行った。その後, 100ml の 2 $\times$ SSC, 0.1%

SDS buffer で室温で 1 時間振盪した。続いて 100 ml の 0.1 $\times$ SSC, 0.5% SDS buffer で 65°C で 1 時間振盪し, バックグラウンドの放射活性が取り除かれるまで, 0.1 $\times$ SSC, 0.5% SDS buffer での洗浄を繰り返した。洗浄後, フィルターは AIF RX film (富士写真フイルム株式会社) でオートラジオグラフィーを行った。オートラジオグラフィー後のフィルターは 100°C, 5 分間煮沸し結合したプローブを取り除いた後, β actin DNA プローブを用い, 同様にハイブリダイゼーションを行った。

結 果

(1) TSK-DEAE5PW HPLC による MR の分析

顎下腺細胞質を [3 H]アルドステロンにより標識し TSK-DEAE5PW ion exchange HPLC により分析すると, フラクシオン 4 とフラクシオン 22 付近に 2 つのピークが観察された (Fig. 1A)。このうちフラクシオン 4 の小さなピークは主に遊離の [3 H]アルドステロン からなると思われた。もう一つのピークは 0.2-0.25M NaCl の比較的高い塩濃度で溶出された。このピークは 200 倍量の非標識アルドステロンの添加により消失するため, 特異的結合と考えられた。このピークは腎臓や肝臓においても観察されるが, その結合量は顎下腺に比べかなり低い (Fig. 1B)。本実験の条件下, すなわち 10 倍濃度の純粋なグルココルチコイドである RU 28362 の共存下では, MR がほとんど存在しないとされている肝臓細胞質画分への [3 H]アルドステロンの結合をほぼ完全にブロックできた。このことから 10 倍量 (200nM) の RU 28362 の添加により腎臓や顎下腺においても [3 H]アルドステロンの GR への結合は完全にブロックされ, [3 H]アルドステロンは MR のみと結合していると考えられた。従って以下の全ての実験でも 10 倍量の RU 28362 を加えている。

顎下腺においてはフラクシオンあたり腎臓の約 1.8 倍の [3 H]アルドステロン結合が観察された。またいずれも同一の位置に溶出したことから, 腎臓と顎下腺の MR の電気的性質はほぼ同一であると判断された。これらのことから顎下腺に MR

Fig. 1 DEAE ion-exchange HPLC of nontransformed MR.

Cytosols were labeled with 20 nM [^3H] aldosterone and a ten-fold molar excess of RU28362 in TEDMG buffer. The samples were treated with DCC twice, and filtrated with a 0.45 μm cellulose-acetate filter. The sample was applied on a TSK-DEAE5PW column equilibrated with PMD buffer plus 25 mM NaCl. The column was washed with PMD buffer containing 25 mM NaCl and bound [^3H] aldosterone-receptor complex was eluted with a 0.025-0.5 M linear gradient of NaCl in PMD buffer. Flow rate was 0.5 ml/min. One ml fractions were collected. (A) The cytosol from submandibular gland labeled in the absence (○) or presence (●) of radioinert aldosterone. (B) The cytosols were prepared from rat liver (Δ), submandibular gland (○) and kidney (□), and labeled with [^3H] aldosterone without cold aldosterone.

が存在することが確認された。

一方 [^3H]TA により GR を標識し、同様に TSK-DEAE5PW HPLC により分析を試みた結果、顎下腺、腎臓、肝臓いずれも同一の NaCl 濃

Fig. 2 DEAE ion-exchange HPLC of nontransformed GR.

Cytosols were incubated with 20 nM [^3H] TA with or without a 200-fold molar excess of unlabeled TA in TEDMG buffer. Following the treatment with DCC, the supernatant was applied on a TSK-DEAE5PW ion exchange HPLC column. Liver (Δ), kidney (□) in the absence of unlabeled TA and submandibular gland in the absence (○) or presence (●) of a 200-fold molar excess of unlabeled TA.

度0.2-0.25M の位置にピークが観察された (Fig. 2)。GR の標的器官として知られる肝臓には、予想されたように三者中最も大量の [^3H]TA-GR 複合体が観察された。腎臓と顎下腺にもレセプターの存在が観察されたが、三者の中では顎下腺で最も少なかった。また Fig. 1 と Fig. 2 を比較すると MR, GR とほぼ同様の塩濃度で溶出している。これは cDNA クローニングの結果⁵⁻⁷⁾から予想されていたように両者が比較的類似した一次構造を持つためと思われた。

(2) 顎下腺における HSP90 の検出と MR との結合

既に GR にはこれらの HPLC による分析条件、すなわち低イオン強度、モリブデート存在下では、レセプター分子に HSP90が結合していることが知られている³¹⁾。そこでまず顎下腺における HSP90の存在を検討するため、ラット肝臓より精製した HSP90より抗血清を作製し、免疫プロットを試みた結果、顎下腺細胞質にもラット肝臓と同じ90kDa の位置に抗体に反応するバンドが検出された (Fig. 3)。

続いて抗HSP90抗体樹脂により顎下腺の MR が HSP90の抗体を結合しているか否かを検討したところ、対照のウサギ血清ではほとんど結合が

Fig. 3 Immunoblot analysis of HSP90 in the cytosol from rat submandibular gland and liver.

Samples were subjected to electrophoresis in a 10% acrylamide gel and transferred to a nitrocellulose filter. The nitrocellulose was then incubated with 200-fold diluted antiserum against HSP90 and stained as described in "Materials and Methods". The samples were from the following sources: lane 1, submandibular gland; lane 2, liver.

見られないのに対し、特異抗体を結合したアフィニティー樹脂には $[^3\text{H}]$ アルドステロン-MR複合体が結合した (Fig. 4)。

これらの結果から顎下腺細胞質にはHSP90が存在し、MRと結合して存在すると結論した。

(3) 結合親和性の測定

顎下腺および腎臓のMRの $[^3\text{H}]$ アルドステロンの結合親和性をScatchard解析により決定した。Fig. 5Aに示すようにともに飽和性の特異的結合を示した。そのScatchard plotはFig. 5Bに示すようにいずれも1相性の直線となり、単一の結合部位の存在が確認された。

MRの $[^3\text{H}]$ アルドステロンとの結合の解離定数は、顎下腺で $0.72 \pm 0.18 \text{ nM}$ ($n=4$)、腎臓で $0.47 \pm 0.13 \text{ nM}$ ($n=4$)と比較的近似した値であったが、一方結合部位数では、顎下腺で $47.8 \pm 19.0 \text{ fmol/mg protein}$ ($n=4$)、腎臓で $26.4 \pm 8.6 \text{ fmol/mg protein}$ ($n=4$)と顎下腺で腎臓の約1.8倍の値を示した。この結果は、Fig. 1BのTSK-DEAE5PW HPLCの結果とよく一致している。

(4) MRの高イオン強度における活性化の

Fig. 4 Immunoadsorption analysis of MR.

Sixty μl of protein A-Sepharose was incubated with anti-HSP90 antiserum (50 or 200 μl) with occasional mixing. After 1 h incubation, unbound proteins were washed with 1 ml of TMD buffer. One hundred μl of the cytosol from rat submandibular gland labeled with 20 nM $[^3\text{H}]$ aldosterone in the presence or absence of a 200-fold molar excess of radioinert aldosterone was mixed with 60 μl of protein A-Sepharose conjugated with anti-HSP90 antibody (○) or non-immune antibody (●). After 1 h incubation, the resin was washed with 1 ml of TMD buffer three times. Bound radioactivity was counted and specific binding was determined by the difference between total and nonspecific bindings. Results are shown as percent of total receptor concentration (100%) which was determined by hydroxyapatite assay.

TSK-DEAE5PW HPLCによる観察

GRやエストロゲンレセプターではリガンドを結合してもHSP90を結合した状態では、DNA結合能はなく、特異遺伝子の転写活性を調節することは出来ない³²⁾。DNA結合型に変化するためには、活性化 (transformation, または activation) と呼ばれる状態変化を経なければならない。顎下腺のMRもHSP90を結合することが確認され、また既に鶏の小腸のMRではGRなどと同様の活性化が起こることが報告されている³³⁾。GRやアンドロゲンレセプターでは、*in vitro*では、加温処理や、塩処理、透析やゲルクロマトグラフィーによって活性化が生じる¹³⁻¹⁶⁾。そこで本実験ではまず塩処理による活性化を試みた。

顎下腺および腎臓の細胞質画分を0.5 M NaCl

Fig. 5 Scatchard analysis of $[^3\text{H}]$ aldosterone binding to MR.

(A) The cytosols were prepared from submandibular glands and kidneys of male adrenalectomized rats. One hundred μl cytosol was incubated with 0.25–20 nM of $[^3\text{H}]$ aldosterone. Samples containing a 200-fold excess molar of unlabeled aldosterone were run in parallel. Following overnight incubation, bound radioactivity was measured by hydroxyapatite adsorption assay. Nonadsorbed $[^3\text{H}]$ aldosterone to hydroxyapatite was also measured to determine free $[^3\text{H}]$ aldosterone concentration. Results are from one of four experiments, all of which gave similar results. The specific binding (S) was determined by subtracting the nonspecific binding with radioinert aldosterone (N) from the total binding without it (T). (B) The data were plotted according to Scatchard²¹⁾. The cytosol from submandibular gland (●) and kidney (■).

にて1.5時間処理し、レセプターの状態変化を TSK-DEAE5PW HPLC にて観察した。非塩処理条件では 0.2–0.25 M 付近に MR のピークが見られたが、このピークが塩処理によりほとんど消失し、新たに 0.12 M NaCl の位置に $[^3\text{H}]$ アルドステロンのピークが検出された。またフラク

Fig. 6 DEAE ion-exchange HPLC of MR exposed to 0.5 M NaCl

Cytosols incubated with 20 nM $[^3\text{H}]$ aldosterone and a ten-fold molar excess of RU28362 in TEDG buffer were exposed to 0.5 M NaCl at 0°C for 1.5 h, and then treated with DCC twice. Following desalting with a PD10 column, 1.5 ml of peak fraction was applied on a TSK-DEAE5PW column equilibrated with PMD buffer plus 25 mM NaCl. The cytosol of submandibular gland labeled in the absence (○) or presence (●) of radioinert aldosterone. The cytosol of kidney in the absence (□) or presence (■) of a 200-fold molar excess of unlabeled aldosterone.

ション4と8の gradient 以前の部分にも2つのピークが観察されるが、フラクション4付近のピークは非特異的結合との差が観察されないためレセプター分子以外の結合、または遊離のリガンドであると考えられた。一方フラクション8付近のピークは、非特異結合では消失する事から特異的な結合ではあるが、steroid binding domain のみを有する mero-receptor であると推察された。顎下腺 MR と腎臓 MR では 0.12 M NaCl のピークはその大きさ以外には差異はほとんど無かった (Fig. 6)。

一方、同一条件で標識した細胞質を 23°C 30分間の加温処理による活性化を試みたが、本条件では活性化を観察することは出来なかった。また細胞質を 50mM NaCl を含む TEDG buffer で調製し $[^3\text{H}]$ アルドステロンにて標識した後、同様に 23°C 30分間の加温処理を試みたが、同様に活性化は観察できなかった (Fig. 7)。

(5) ミニカラム法による DNA 結合能の解析
先の TSK-DEAE5PW HPLC による観察では、塩処理により $[^3\text{H}]$ アルドステロン-MR 複合

体の新たなピークが観察されたので、ミニカラム法を用い、同様の塩処理により $[^3\text{H}]$ アルドステロン-MR 複合体の DNA 結合能が増大するか否かを検討した。Table 1 に示すように、0.4 M NaCl 未処理群では顎下腺、腎臓それぞれ2.8%、0%とほとんど DNA セルロースには結合せず、

Fig. 7 DEAE ion-exchange HPLC of MR warmed at 23°C for 30 min.

Cytosols incubated with 20 nM $[^3\text{H}]$ aldosterone and a ten-fold molar excess of RU28362 in TEDG buffer were warmed for 30 min at 23°C, and then treated with DCC twice. The supernatants were applied on the column equilibrated with PMD buffer plus 25 mM NaCl. The cytosol of submandibular gland labeled in the absence (○) or presence (●) of radioinert aldosterone. The cytosol of kidney in the absence (□) or presence (■) of a 200-fold molar excess of unlabeled aldosterone.

レセプターの多くが DEAE セルロースに結合する (各々, 94.1%, 99.4%) ことからレセプターは非活性型で存在すると思われたが、塩処理の後では、顎下腺で2.8%から49.0%, 腎臓で0%から40.0%と、ともに著しい DNA 結合の増加が観察された。

一方、23°C, 30 分間の加温による活性化では TSK-DEAE5PW HPLC による観察と同様に DNA 結合能にも変化を認めなかった (Table 2)。

また DEAE5PW に結合せず gradient 以前に溶出するピークはミニカラム法でも DNA, DEAE セルロースの両者に結合せず、ハイドロキシアパタイトによってのみ吸着されるレセプターであると思われた。おそらく *in vitro* での操作中、特に活性化処理中に内在性のプロテアーゼにより分解を受けた産物であろうと思われた。MR の塩処理における TSK-DEAE5PW HPLC による観察ならびに、ミニカラム法の結果を総合し、HPLC で 0.2-0.25 M NaCl に溶出するピークは DNA 非結合型、0.12 M NaCl のピークが DNA 結合型であると結論した。これらの結果から、塩処理によって MR は HSP90 を解離し、DNA 結合能を獲得した 活性型レセプターへ変換する事が示唆された。

(6) Northern blot 法による MRmRNA の

Table 1 Minicolumn binding assay of MR exposed to 0.4M NaCl

		DNA-cellulose (%)	DEAE-cellulose (%)	Hydroxyapatite (%)
Submandibular gland				
0.4 M NaCl	—	2.8	94.1	3.0
	+	49.0	20.3	30.7
Kidney				
0.4 M NaCl	—	0	99.4	0.6
	+	40.0	28.3	31.6

Cytosols incubated with 10 nM $[^3\text{H}]$ aldosterone and a ten-fold molar excess of RU28362 in TEDG buffer were exposed to 0.4 M NaCl for 1.5 h, and then treated with DCC and 8-fold diluted with TEDMG buffer. Thereafter, treated cytosols were applied onto the top minicolumn and washed with 1 ml of TMD buffer 3 times. Samples containing a 200-fold excess molar of unlabeled aldosterone were run in parallel. Bound radioactivity was extracted from each column with 1 ml ethanol and counted. Total $[^3\text{H}]$ aldosterone binding was estimated as the sum of these three bindings. Results are shown as percentage of sum of specific bindings.

Table 2 Minicolumn binding assay of MR warmed at 23°C

		DNA-cellulose (%)	DEAE-cellulose (%)	Hydroxyapatite (%)
Submandibular gland				
23°C 30min	—	7.7	82.4	9.9
	+	3.5	41.2	55.3
Kidney				
23°C 30min	—	16.4	83.6	0
	+	23.7	65.0	11.3

Cytosols incubated with 10 nM [^3H]aldosterone and a ten-fold molar excess of RU28362 in TEDG buffer were kept at 0-4°C or warmed for 30 min at 23°C, and samples treated with DCC were applied onto the top minicolumn and washed with 1 ml of TMD buffer 3 times. Results are shown as percentage of sum of specific bindings.

観察

予備実験で DNA プロブを用いて Northern blot を行ったが特異的なバンドが現れなかった。そこで感度を上げるために rat MRcDNA の一部を pGEM3 vector に組み込んだプラスミドを用いて RNA プロブを作製し Northern blot を行った。プロブに用いた領域は steroid binding domain の C 末端側と一部の 3' 末端非翻訳領域を含む (Fig. 8)。

顎下腺、腎臓の poly(A)⁺RNA の Northern blot の結果, Fig. 9 に示すように 6 kb の位置に transcript が観察された。副腎提出群、コントロール群ともに差は認めなかった。6kb に先行するバンドは、28S リボソーム RNA に対する非特異的結合と思われた。

考 察

顎下腺細胞質の MR の存在を [^3H]アルドステロンを用いた TSK-DEAE5PW HPLC により観察した結果、顎下腺でフラクションあたり腎臓の約 1.8 倍のレセプターの存在が認められた。また蛋白濃度あたりの結合部位数でも、顎下腺で腎臓の 1.8 倍の存在が確認された。これらの結果から顎下腺も腎臓と同様に、MR を介したミネラルコルチコイドの支配を受け、その電解質代謝や、腺分泌のコントロールが行われていることが示唆された。顎下腺 MR と腎臓のそれはほぼ同じリガンド結合親和性を有し、この値はラットの脳や腎臓、鶏の小腸、また *in vitro* で発現したヒト

MR 等の他の組織から得られた値と近似していた^{7,8,20,33)}。顎下腺と腎臓の MR の性質を検討すると、HPLC の溶出の位置、活性型への変換などいくつかの類似性が示された。また、Northern blot でも類似した結果が得られた。これらの結果は両組織で発現している MR がほとんどあるいは全く同一の分子であることを強く示唆する。

同時に顎下腺 GR を [^3H]TA にて標識し、同様の分析を試みたところ、肝臓の 1/3 程度ではあるが顎下腺にも GR の存在が確認された。最近 Antakly ら¹⁷⁾もラット顎下腺に GR が存在すると報告している。

従来 MR はアルドステロンと最も強く結合すると考えられてきたが、*in vitro* ではグルココルチコイドであるコルチコステロンやコルチゾールもアルドステロンとほぼ同程度の親和性を有し、また合成グルココルチコイドであるデキサメサゾンとも比較的強い結合能を有する¹⁹⁾。しかしながら腎臓や脳組織からの細胞質分画法によって得た試料は、MR と GR の両者を含むため^{19,20)}、両者の結合を明確に区別する事が困難であり、このことが MR の解析上の障害となっていた。本研究では [^3H]アルドステロンの GR への結合をブロックするために、 [^3H]アルドステロンに対し、10 倍濃度の RU28362 の添加によって [^3H]アルドステロンの GR への結合をブロックした。MR をほとんど発現していないと考えられる肝臓細胞質で [^3H]アルドステロンの結合がほとんど認められなかったことから、腎臓や顎下腺での

Fig. 8 Schematic illustration rat MR and p26 MR.

Rat MR is schematically illustrated. Dotted and closed boxes represent coding region of rat MR and p26MR, respectively. A, E and H represent *Ava*I, *Eco*RI and *Hind* III sites, respectively.

GR への $[^3\text{H}]$ アルドステロンの結合もほぼ完全にブロックされ、 $[^3\text{H}]$ アルドステロンは MR とのみ結合したと考えられた。

In vitro ではこのように合成のグルコルチコイドで GR をブロックする事により MR の定量が可能である。しかしながら、生理学的にはコルチコステロンやコルチゾールはグルコルチコイドの作用のみを示し、電解質作用は少ない。この事実、すなわちコルチコステロンやコルチゾールがアルドステロンと同程度に MR と強く結合するにも関わらず、アルドステロンのみが強い電解質作用を示す現象は長い間説明がつかなかった。しかし近年この疑問が解明されつつある。一つは、コルチゾールは、血中の corticosteroid-binding globulin と結合しており、遊離型コルチゾールは少なく、MR とは結合しにくい状態にあるためとする考え方である³⁴⁾。一方 Funder ら^{12,35)}や

Fig. 9 Northern blot analysis of MRmRNAs of rat submandibular gland and kidney.

Poly (A)⁺RNA (4.5 $\mu\text{g}/\text{lane}$) isolated from submandibular gland and kidney of adrenalectomized or untreated rat was electrophoresed on a 1% agarose gel, transferred to Magnanlyon 66 membrane (Micron Separation Inc.), and hybridized to $[^{32}\text{P}]$ labeled RNA probe as described in "Materials and Methods". After washing of the filter at 100°C for 5 min, the filter was rehybridized with mouse β actin DNA probe. Migration of ribosomal RNAs (28S and 18S) is indicated. The samples were the following sources: lane 1, adrenalectomized rat kidney; lane 2, nontreated rat kidney; lane 3, adrenalectomized rat submandibular gland; lane 4, nontreated rat submandibular gland. The exposure time of autoradiogram was 24 h.

Stewart ら³⁶⁾は、組織がミネラルコルチコイドの標的臓器であるか否かは MR の存在だけでなく、 11β -hydroxysteroid dehydrogenase の存在によって決定されると主張している。この酵素は生理活性を有するグルコルチコイドに作用し、コルチゾールはコルチゾンに、コルチコステロンは 11β -デヒドロコルチコステロンに転換され、これらは MR に結合能を有しないために選択的にアルドステロンのみと結合とするとした考え方である。すなわち MR の存在のみでなくこの酵素の存在がミネラルコルチコイドの標的臓器である条件の一つとした。本研究により、顎下腺に MR が豊富に存在し、MR のレセプターを介した効果の発現

が予想されたが、顎下腺中の 11β -hydroxysteroid dehydrogenase の活性を測定してはいないため、この説を証明することは出来なかった。

MR は GR やアンドロゲンレセプターと同様にリガンド非結合状態では HSP90 と結合して DNA 非結合型で存在すると考えられている。今回ラット顎下腺の MR も同様に HSP90 と結合していることが示された。また塩処理に伴う TSK-DEAE5PW ion exchange HPLC 上での挙動の変化も、活性型は非活性型よりも酸性度が少なく、MR が強い酸性タンパク質である HSP90 を解離したために生じた変化であると思われた。しかしながら、加温処理では HPLC 上でピークのシフトは見られなかった。これはミニカラム法でも同様で、塩処理による DNA 結合度の飛躍的な増大に比し、加温処理では変化に乏しい結果となった。この原因は不明ではあるが、生体内温度が 37°C とより高く、そのような温度条件では MR は容易に活性化するのもかもしれない。しかし *in vitro* では MR はそのような条件では失活しやすく、生体内と同じ条件での加温処理を *in vitro* で試みることは出来なかった。このように塩処理によって誘導されたレセプターの変換は、レセプター分子の表面荷電の変化や HSP90 の解離を伴い、レセプターの DNA binding domain が露出するものと思われた。

結 論

ラット顎下腺に MR の存在を確認した。その

性質は腎臓のそれと類似していたがその量はタンパク濃度あたり顎下腺で腎臓の 1.8 倍を有していた。顎下腺に HSP90 の存在を確認し、また顎下腺細胞質 MR は HSP90 と結合していた。塩処理による活性化の結果、顎下腺および腎臓 MR の DNA 結合能の増大、同時に TSK-DEAE5PW HPLC 上でのピークのシフトを伴った。Northern blot による観察では顎下腺、腎臓ともに 6 kb の位置に MR mRNA のバンドを観察した。一方顎下腺に GR も存在したが、その量は、腎臓よりも少なかった。

本研究より、顎下腺に MR が存在しミネラルコルチコイドの標的器官として調節されていることが示唆された。

謝辞：稿を終えるにあたり、研究全般にわたり御指導ならびに御校閲を賜った岩手医科大学歯学部口腔生化学講座太田 稔教授、ならびに終始実験の指導を賜り、かつ有益な御教示を頂いた根本孝幸講師、また御協力頂きました佐藤詔子助教授以下教室員各位、ならびに歯科放射線学講座、根本優子助手に感謝申し上げます。

また p26MR を供与頂いた Dr. P. D. Patel (Mental Health Research Institute University of Michigan Medical School, USA) に感謝致します。

本論文の要旨の一部は第32回歯科基礎医学会総会(1990年10月20-21日,千葉), The 73rd Annual Meeting of American Endocrine Society (June 19-22, 1991, Washington, D. C., USA), 第33回歯科基礎医学会総会(1991年10月8, 9日, 鹿児島)において発表した。

抄録：従来より腎臓、小腸、心臓や脳組織におけるミネラルコルチコイドレセプター (MR) の存在が確認され多くの知見が得られてきたが、口腔組織におけるその存在やその生化学的性状の検討はほとんどなされていない。ミネラルコルチコイドの担う電解質代謝の作用を考慮すると、唾液腺でのイオン輸送にミネラルコルチコイドによる調節が関与する事が推測された。ここでは、ラット顎下腺 MR の性状を検討した。ラット顎下腺より得た細胞質画分を 20nM の $[^3\text{H}]$ アルドステロンと $[^3\text{H}]$ アルドステロンのグルコルチコイドレセプターへの結合をブロックする目的でその10倍量の合成グルコルチコイド (RU28362) を添加し結合を測定した。顎下腺 MR の $[^3\text{H}]$ アルドステロンに対する結合親和性は $0.72 \pm 0.18 \text{ nM}$ で腎臓のそれ ($0.47 \pm 0.13 \text{ nM}$) と近似した値を示したが、結合部位数は、顎下腺で $47.8 \pm 19.0 \text{ fmol/mg protein}$ 、腎臓で $26.4 \pm 8.6 \text{ fmol/mg protein}$ と顎下腺で腎臓の約1.8倍の値を示した。ラット顎下腺細胞質には HSP90 が存在し、MR は HSP90 と複合体を形成していた。両組織の MR はともに、TSK-DEAE 5PW HPLC において 0.2-0.25M NaCl の位置に溶出したが、0.5M NaCl で1.5時間処理した後では、HPLC での溶出の位置は、0.12M へとシフトした。塩処理にともない、顎下腺、腎臓の MR は共に DNA 結合度の著しい増大が見られた。これらの現象は MR に結合していた HSP90 が解離した結果によると思われた。Northern

blot では、腎臓、顎下腺ともに 6 kb の位置に MRmRNA が観察された。これらの観察から顎下腺の MR と腎臓の MR は同一かまたはきわめて類似した構造を有していることが判明した。

文 献

- 1) Jensen, E. V. and Jacobson, H. I.: Basic guides to the mechanism of estrogen action. Recent Prog. Horm. Res. **18** : 387-414, 1962.
- 2) Morris, D. J.: The metabolism and mechanism of action of aldosterone. Endocrine Rev. **2** : 234-247, 1981.
- 3) Wrangé, Ö., Carlstedt-Duke, J. and Gustafsson, J. -Å.: Purification of the glucocorticoid receptor from rat liver cytosol. J. Biol. Chem. **254** : 9284-9290, 1979.
- 4) Wrangé, Ö., Okret, S., Radojčić, M., Carlstedt-Duke, J. and Gustafsson, J. -Å.: Characterization of the purified activated glucocorticoid receptor from rat liver cytosol. J. Biol. Chem. **259** : 4534-4541, 1984.
- 5) Hollenberg, S. M., Weinberger, C., Ong, E. S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E. B., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M.: Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. Nature **318** : 635-641, 1985.
- 6) Weinberger, C., Hollenberg, S. M., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M.: Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the *v-erb-A* oncogene product. Nature **318** : 670-672, 1985.
- 7) Arriza, J. L., Weinberger, C., Cerelli, G., Glaser, T. M., Handelin, B. L., Housman, D. E. and Evans, R. M.: Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. Science **237** : 268-275, 1987.
- 8) Patel, P. D., Sherman, T. G., Goldman, D. J. and Watson, S. J.: Molecular cloning of a mineralocorticoid (type I) receptor complementary DNA from rat hippocampus. Mol. Endocrinol. **3** : 1877-1885, 1989.
- 9) Verhoeven, G.: Androgen binding proteins in mouse submandibular gland. J. Steroid Biochem. **10** : 129-138, 1979.
- 10) Mcvie, R., Levine, L. S. and New, M. I.: The biologic significance of the aldosterone concentration in saliva. Pediatr. Res. **13** : 755-759, 1979.
- 11) Walker, R. F., Riad-Fahmy, D. and Read, G. F.: Adrenal status assessed by direct radioimmunoassay of cortisol in whole saliva or parotid saliva. Clin. Chem. **24** : 1460-1463, 1978.
- 12) Funder, J. W., Pearce, P. T., Smith, R. and Smith, A. L.: Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. Science **242** : 583-585, 1988.
- 13) 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.
- 14) Sato, N., Nemoto, T., Baba, R. and Ota, M.: Dialysis-induced transformation of mouse submandibular androgen-receptor. Biochem. Int. **10** : 771-776, 1985.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) Antakly, T., Zhang, C., Sarrieau, A. and Raquidan, D.: Cell-specific expression of the glucocorticoid receptor within granular convoluted tubules of the rat submaxillary gland. Endocrinology **128** : 617-622, 1991.
- 18) Hermann, T., Schramm, K. and Ghraf, R.: Photoaffinity labeling with [³H] Ru28362: a powerful tool for the study of rat brain glucocorticoid receptors. J. Steroid Biochem. **26** : 417-423, 1987.
- 19) Reul, J. M. H. M., Kloet, E. R., Sluijs, F. J., Rijnberk, A. and Rothuizen, J.: Binding characteristics of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in dog brain and pituitary. Endocrinology **127** : 907-915, 1990.
- 20) Tashima, Y., Terui, M., Itoh, H., Mizunuma, H., Kobayashi, R. and Marumo, F.: Identical properties of aldosterone and corticosterone binders and their presence in rat brain and kidney. J. Biochem. **106** : 446-454, 1989.
- 21) Scatchard, G.: The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. N. Y. Acad. Sci. **51** : 660-672, 1949.
- 22) Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y. and Ota, M.: Purification and characterization of a

- nonhormone-binding component of the non-transformed glucocorticoid receptor from rat liver. *J. Biochem.* **102** : 513-523, 1987.
- 23) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature.* **227** : 680-685, 1970.
 - 24) Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T., Sato, N. and Ota, M.: Characterization of the non-transformed and transformed androgen receptor and heat shock protein 90 with high-performance hydrophobic-interaction chromatography. *J. Steroid Biochem.* **31** : 295-304, 1988.
 - 25) 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.
 - 26) 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.
 - 27) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, (Maniatis, T.) 1st edn., pp. 194-195, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, 1982.
 - 28) 垣塚 彰: Oligo (dT)-Latex 粒子を用いたポリ(A)⁺RNA の精製方法 実験医学 Vol. 7, pp. 2065-2068, 羊土社, 東京, 1989.
 - 29) 村松正実: ラボマニュアル遺伝子工学 (村松正実編), 第1版, pp 73-76, 丸善, 東京, 1988.
 - 30) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, (Maniatis, T.) 2nd. edn., pp. 7.46-7.48, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, 1989.
 - 31) Sanchez, E. R., Toft, D. O., Schlesinger, M. J. and Pratt, W. B.: Evidence that the 90-kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein. *J. Biol. Chem.* **260** : 12398-12401, 1985.
 - 32) Mendel, D. B., Bodwell, J. E., Gametchu, B., Harrison, R. W. and Munck, A.: Molybdate-stabilized nonactivated glucocorticoid-receptor complexes contain a 90-KDa non-steroid-binding phosphoprotein that is lost on activation. *J. Biol. Chem.* **261** : 3758-3763, 1986.
 - 33) Rafestin-Oblin, M.-E., Couette, B., Radanyi, C., Lombes, M. and Baulieu, E.-E.: Mineralocorticoid receptor of the chick intestine: oligomeric structure and transformation. *J. Biol. Chem.* **264** : 9304-9309, 1989.
 - 34) 関原久彦: ミネラルコルチコイド (Receptor 日本臨牀増刊), 通巻593号 pp 1291-1295, 日本臨牀社, 1989.
 - 35) Rundle, S. E., Funder, J. W., Lakshmi, V. and Monder, C.: The internal localization of mineralocorticoid receptors and 11 β -dehydrogenase: immunocytochemical studies. *Endocrinology* **125** : 1700-1704, 1989.
 - 36) Stewart, P. M., Shackleton, C. H. L. and Edwards, C. R. W.: The cortisol $\leftrightarrow$ cortisone shuttle and the genesis of hypertension. In *corticosteroids and peptide hormones in hypertension*, (ed. by Mentero, F. and Vecsei, P.), pp. 163-177, Raven Press, NY, 1987.