

Nontransformed Androgen Receptor の 核内受容体に関する研究

奈良県立医科大学第2解剖学教室

中山正成

STUDY OF NUCLEAR ACCEPTOR OF NONTRANSFORMED ANDROGEN RECEPTOR COMPLEXES

MASANARI NAKAYAMA

The 2nd Department of Anatomy, Nara Medical University

Received November 29, 1993

Abstract: In the presence of molybdate, nontransformed androgen receptor was isolated from rat testis cytosol fraction applied on 5α -dihydrotestosterone affinity column (FPLC system) with the one-step method. These androgen receptor complexes consisted of five major proteins (90-kDa, 80-kDa, 68-kDa, 52-kDa and 47-kDa) and reacted to 52-kDa protein with anti-androgen receptor antibody on nitrocellulose membrane, but not to 80-kDa. Recently, constituents of nontransformed androgen receptor, except for hormone binding proteins, are thought to be heat shock proteins, so that 90-kDa and also 47-kDa may be heat shock proteins. Sixty-eight-kDa is thought to be proteins contaminated through isolation method and to be bovine serum albumin. The acceptor proteins in nucleus against nontransformed androgen receptor are histone H3 protein confirmed by western blot analysis so that in the nucleus, rat testis androgen receptor may be localized on histone H3 of nucleosome core and stand by near hormone responsive elements for ligand activation processes.

Index Terms

nontransformed androgen receptor, acceptor, histone H3, colloidal gold, Western blot

緒 言

前回の報告(奈医誌, 40巻5号)¹⁾でモリブデン酸処理した cytosol より得た非活性型アンドロゲンホルモンレセプター複合体の受容体が DNA ではなく核タンパク質であることをコロイド金標識した nontransformed androgen receptor を用いて組織化学的に証明した。

ステロイドホルモンレセプター複合体の核内受容体の研究は遺伝子の発現や転写調節機構の研究に良いモデルである。一方ホルモンレセプターの活性型および非活性型の受容体結合ドメインの研究は種々のホルモンレセプター異常疾患の治療につながると思われる。現在の所、

非活性型の核内受容体は種々のヒストンタンパク質複合体³⁻⁶⁾、非ヒストンタンパク質・DNA 複合体(CP-3・DNA)⁷⁾や非ヒストンタンパク質複合体⁸⁻⁹⁾が核内受容体の可能性として報告されている。近年主にコアヒストンであるとの報告が多くなりつつあるが、これまでの報告ではコアヒストン内でも若干違い、単一タンパク質ではないとの報告が見られる。

ホルモンレセプター複合体を単離するのにモリブデン酸(Na_2MoO_4)を用いる理由はレセプターにリガンドが結合していない状態は非常に不安定で、またホルモンが結合すると非活性型のレセプターが活性型に変化する。そこでリガンドが結合していない状態でレセプター複合体

を得るためにはモリブデン酸による方法が最も良い。この利点については総説¹⁰⁾に述べられているが、Leach¹¹⁾らはリガンドが結合していない不安定な状態のレセプター複合体の安定化とレセプターの活性化の阻害にモリブデン酸がタングステン酸より有効であること、さらにSchidereit¹²⁾らやJohnson¹³⁾らはこのモリブデン酸処理した活性型レセプターにはリガンドとDNAへの結合能も保持していることを報告している。一方Boerら¹⁴⁾は活性型アンドロゲンレセプターのモリブデン酸の影響について、DNA binding activityは5%弱であること、即ちモリブデン酸はDNAへの結合を阻害すると報告している。一方非活性型アンドロゲンレセプター複合体の核内受容体へのモリブデン酸の影響については報告がない。それ故、モリブデン酸で安定化した非活性型ホルモンレセプター複合体に核内受容体への結合能が保持されているかどうか検討すべき価値がある。

ホルモンレセプター複合体の構成タンパク質はモリブデン酸存在下ではステロイド結合能を持つ2種類(分子量110-kDa, 80-kDa)のタンパク質とステロイド結合能を持たない分子量90-kDaの3種類のタンパク質からなっている¹⁵⁾との報告や、また分子量59-kDaや、27-kDaのタンパク質もそれぞれ非活性型レセプター複合体の構成成分であるという報告^{13,15)}もある。この構成成分の中の分子量90-kDaのタンパク質は熱ショックタンパク質の一種(hsp-90)¹⁶⁾であること、さらにリン酸化¹⁷⁾された状態であり、非活性型では2量体含まれていると報告¹⁶⁾している。

この論文では、ラット精巣より得たモリブデン酸安定化アンドロゲンレセプター複合体を抗アンドロゲンレセプター抗体による確認と、得られたレセプター複合体の構成成分のSDS-PAGE分析の結果、さらにアンドロゲンレセプター複合体の核内受容体についてwestern blotで得た結果はモリブデン酸の影響が無く、モリブデン酸存在下でも核内受容体を同定することが可能であることを報告する。

材料と方法

材料

Wister Rat(6週令)(オリエンタルバイオサービス(株))を購入後、繁殖飼育し、約30匹の雄ラットをエーテル麻酔し、摘出した精巣を氷冷したPBS(pH 7.4)で血液を出来るだけ取り除き、これをレセプター抽出材料とした。

同時に摘出した肝臓は核タンパク質の抽出材料とした。他の試薬類は中山ら¹⁾の報告に記載してある。

方法

(1) レセプターの単離とコロイド金標識

モリブデン酸安定化アンドロゲンレセプター複合体の単離方法およびレセプターへのコロイド金標識法は中山ら¹⁾の報告に記載してある。

(2) 核タンパク質の抽出

(a) High-mobility group proteinsはGoodwinら¹⁸⁾の方法により抽出した。約100grのラット肝臓を約3倍量(v/v)の氷冷した5% perchloric acid(PCA)を加え氷冷しながらWaring blenderでmaximum speed, 3分細切後、2分間放置し、これを3回繰り返してHitachi SCR-20高速冷却遠心機で2,500×g 4℃30分遠心した。上清をデカントして沈査を同様の方法で3回繰り返して抽出し、集めた上清をガーゼとglass filterで濾過し、これに最終濃度18%になるように100% Trichloroacetic acid(TCA)を加え、これを4,500×g 4℃15分遠心し沈査を集めた。この沈査をacetone/conc.-HCl(400:1, v/v)に溶かし、3倍量のアセトンを加え4,500×g 4℃10分遠心した。混在する大部分のヒストンH1を除くために沈査を0.1N HClに溶かし、3倍量のアセトンを加え4,500×g 4℃10分遠心し、上清にさらに3倍量のアセトンを加え4,500×g 10分遠心した。

この沈査をHigh-mobility group proteins分画とした。

(b) ヒストンタンパク質の抽出は約50grのラット肝臓をChauveauの方法¹⁹⁾によりシュークロス核を得、これに0.25N H₂SO₄を加え、氷冷中で1時間攪拌し、24,000×g 4℃30分遠心した。この上清に6倍量のアセトンを加え-20℃に一晩放置後、これを10,000×g 4℃30分遠心して沈査を得た。この沈査をヒストン分画とした。

(3) 変性ゲル電気泳動

Sodium laurylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)はLaemmliの方法²⁰⁾により行った。各試料は10mM Tris-HCl(pH 8.0)-1mM EDTA-1% SDS-5mM β-mercaptoethanolに溶かし、90℃1分間加熱し、不溶性のものがあれば固形Ureaを加えて溶かした。Stacking gelは1.1mlの44.4% polyacrylamide-1.2% bisacrylamide, 2.5mlの0.5M Tris-HCl(pH 6.8), 6.2mlの蒸留水、各々100μlの10% sodium laurylsulfate, 10% ammonium persulfate, 10μlのTEMEDを加えた。running gelは12% polyacrylamide gelを作成した。4.9mlの44.4% polyacrylamide-1.2% bisacrylamide, 4.5mlの1.5M Tris-HCl(pH 8.8), 8.25mlの蒸留水、各々180μlの10%

ammonium persulfate, 10 % sodium laurylsulfate, 最後に 18 μ l の TEMED を加え作成した. 分子量マーカーは prestained marker (Bio-Rad Lab.) を使用した. Myosin (M. W. 205,000), β -galactosidase (116,500), Phosphorylase B (106,000), Bovine serum albumin (80,000), Ovalbumin (49,500), Carbonic anhydrase (32,500), Soybean trypsin inhibitor (27,500), Lysozyme (18,500). 泳動緩衝液は 0.05 M Tris-HCl-0.4 M glycine-1 % SDS (pH 8.5) を用い, 泳動はマーカー (Bromophenol blue, BPB) がゲル下端に来るまで行った. ゲルの染色は 2.5 % Coomassie Brilliant Blue (R 250), 50 % methanol-5 % acetic acid で 20 時間染色し, 7.5 % acetic acid-5 % methanol で脱染後, 40 % methanol-10 % acetic acid で洗浄し, シルバーステインキット (Bio-Rad) で銀染色した.

(4) Western Blot とコロイド金標識抗体染色

(a) 抗体へのコロイド金標識

monoclonal (Rat) anti-androgen receptor antibody (IgG) (Clone AN1-15) (Affi. Bioreagents, Co. Ltd.) 10 μ l を 5 ml の 5 nm コロイド金溶液に加え 3 分後, 5 % polyethylene glycol (# 20,000) を 0.15 ml 加え, 26,000 rpm 4 $^{\circ}$ C 40 分間遠心し, 上清を出来るだけ除き, 1 ml の 0.05 % polyethylene glycol-5 % glycerol-0.01 % NaN₃ に再懸濁し, 同液を含む 10-20 % glycerin linear density gradient に重層し, 日立 RPS 40T rotor で 14,000 rpm 4 $^{\circ}$ C 30 分間遠心し, 5 nm 金粒子バンド部分を集めた.

(b) 非活性型アンドロゲンレセプター中のレセプターの検出

泳動後, ゲルおよび nitrocellulose membrane (BA-85) (Schleicher & Schuel Co. Ltd.) を 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 20 % methanol のプロットィング緩衝液に 15 分間浸し, 毛細管式プロットィングを室温下で 20 時間行った. nontransformed androgen receptor を泳動したレーンをスライスし, 1 % Bovine serum albumin-PBS (pH 7.4) に 15 分間置き, 0.05 % Tween 20-PBS (pH 7.4) で洗浄後, 希釈したコロイド金標識抗アンドロゲンレセプター抗体と 4 $^{\circ}$ C 20 時間反応させ, 0.05 % Tween-20-PBS (pH 7.4) で一晩洗浄した. さらに PBS (pH 7.4) で洗浄後, 銀増感キット (Janssen Life Sciences Prod.) でコロイド金を増感した.

(c) 非活性型アンドロゲンレセプターの核内受容体の検索

核タンパク質 (ヒストンと HMG の両方を含む) 分画を 12 % SDS-PAGE で泳動後, 前述の毛細管式プロッテ

ィング法で nitrocellulose membrane に転写した. 0.05 % Tween-20-PBS (pH 7.4) で 15 分 3 回ブロッキングと洗浄をして, 5 nm コロイド金標識 nontransformed androgen receptor と 4 $^{\circ}$ C 20 時間反応後, 0.05 % Tween-20-PBS (pH 7.4) で一晩 3 回洗浄した.

結 果

モリブデン酸存在下で 5 α -dihydrotestosterone affinity column を用いてラット精巣より非活性型複合体を中山らりの方法で単離した. これを 12 % SDS slab gel で分析し, Coomassie brilliant blue で染色した. このゲルを脱色後 40 % アルコールにつけて, 銀染色を行った結果が Fig. 1 に示してある. Coomassie brilliant blue

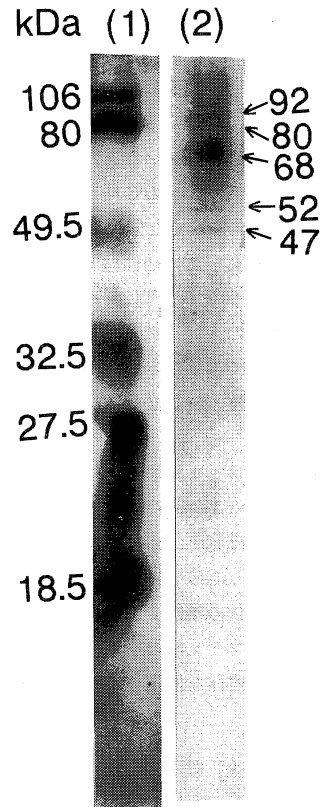


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of nontransformed androgen receptor complexes prepared from rat testis cytosol in the presence of molybdate. Androgen receptor complexes consist of five major proteins, some of them are heat shock proteins (see results and discussions) (lane 2), and marker proteins (lane 1). Gel is stained with Coomassie brilliant blue and then silver stain (lane 1 and 2).

染色ではタンパク質バンドは68-kDaのみしか同定できなかったが、銀染色を行うことによって微量のタンパク質バンドも出現可能となった。Fig. 1のlane 2が非活性型アンドロゲンレセプター複合体を泳動した結果である。同定されたバンドは92-kDa, 80-kDa, 68-kDa, 52-kDa, 47-kDaの5種類が主なものであった。しかしモリブデン酸が存在しない条件下で活性型アンドロゲンレセプターを精製²⁾したときには65-kDaのみのタンパク質しか出現しなかった。68-kDa中にこのタンパク質が含まれているかどうかはバンドが不明瞭で確認できなかった。恐らく、この最も多く含まれている68-kDaのタンパク質画分は5 α -dihydrotestosterone affinity columnを作成する際、ligandはbovine serum albuminと結合したものをSepharose 4 B columnに不溶化したので、カラムを十分に洗浄したにもかかわらず、このalbuminが混入してきたものと考えられ、非活性型アンドロゲンレセプター複合体とは無関係な構成成分と考えられる。92-kDaタンパク質はTaiら¹⁹⁾が報告している様にモリブデン酸存在下で得られる非活性型アンドロゲンレセプター複合体にはこのタンパク質が存在しており、しかもこれは熱ショックタンパク質(hsp 90)であるとJoabら²¹⁾が報告しているものと一致する。80-kDaタンパク質はモリブデン酸存在下で得られたという報告があり、また活性型、即ちモリブデン酸がない状態では~79 kDaタンパク質(form II 又は subunit B)が得られるという報告²²⁾があり、これがそれに該当するかどうかは不明である。52-kDa および 47-kDa についても Johnson らの報告¹⁹⁾と一致する部分はあるが、いずれにせよ、抗体による同定を行わなければならない。

Fig. 2にモリブデン酸存在下で得られた非活性型アンドロゲンレセプター複合体中に androgen receptor が含まれているかどうかを抗体を用いて同定を行った。用いた抗体はChangら¹⁷⁾が作成した monoclonal antibody で非活性型アンドロゲンレセプター複合体と反応する特異的抗体である。報告では他の非活性型ホルモンレセプターとは反応しないのでレセプター複合体に含まれる共通部分とは反応しないはずである。この抗体で assay した結果、52-kDa タンパク質がこの抗体と強く反応したが、一方、80-kDa との反応は非常に弱い反応しか示さず不明瞭であった。これは western blot 法が高分子になるほど転写効率が悪くなるために引き起こされた結果かも知れない。従って Johnson ら²³⁾の報告とは一部異なる分子量のものが androgen receptor であることがわかった。この理由はモリブデン酸存在下で精製する際に、内在性 protease により抗体に対する epitope は温存されたま

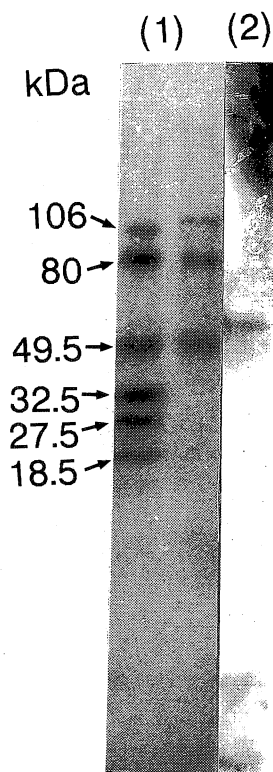


Fig. 2. Western blot of rat testis nontransformed androgen receptor complexes (NTAR) with colloidal gold labeled monoclonal (Rat) anti-androgen receptor antibody. After NTAR was gel electrophoresis, it was blotted onto nitrocellulose membrane. After reaction with antibody to nitrocellulose membrane, colloidal gold was enhanced by silver stain kit (lane 2), and left two lanes are marker proteins, stained with Coomassie brilliant blue (lane 1).

ま分解され、低分子量の androgen receptor になったと考えられる。従ってこの 52-kDa タンパク質は 110-kDa androgen receptor から由来したものである。このことからモリブデン酸存在下で 5 α -dihydrotestosterone affinity column を用いて、ラット精巣ホモジネートから直接非活性型アンドロゲンレセプター複合体を単離できたと考えられる。

Fig. 3はこの論文のテーマである非活性型アンドロゲンレセプター複合体が核内でどのような形態で存在するのかを検索したものである。問題点はモリブデン酸が結合している状態の非活性型アンドロゲンレセプター複合体で DNA やタンパク質に対して親和性が温存されているかどうかである。Boerら¹⁴⁾は活性型アンドロゲンレセ

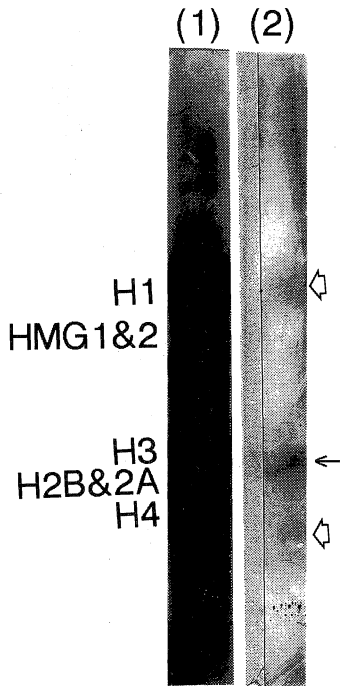


Fig. 3. Western blot analysis of nuclear acceptor proteins against rat testis nontransformed androgen receptor complexes. Lane 1 and 2 were blotted nuclear proteins and reacted with colloidal gold labeled with nontransformed androgen receptor complexes (lane 2) and stained with Coomassie brilliant blue (lane 1).

ターに対するモリブデン酸の影響は確かにDNAへの結合を阻害すると報告しているが、一方モリブデン酸存在下で得た非活性型アンドロゲンレセプター複合体にはDNAへの結合能は温存されているとScheidereitら¹²⁾は報告しているので、タンパク質に対しても温存されているかどうか確認する価値があると同時にモリブデン酸存在下では安定した非活性型ホルモンレセプター複合体が得られるので、この方法が確立されれば非活性型ホルモンレセプター複合体に対する核内受容体研究が容易になると考えられる。そこでコロイド金粒子のnitrocellulose membraneへの非特異的吸着を防ぐためにTween-20を用いてassayを行った結果、Fig. 3に示すように主にhistone H3へ非活性型アンドロゲンレセプター複合体は強い親和性を示した。コロイド金の集積密度が高く銀増感せずとも十分に検出された。非常に弱い反応であるがhistone H1と未確認の低分子量の核タンパク質とも反応しているようであった。この非活性型アンドロゲンレセプター複合体中にはalbuminが含まれ

ているが、それによる非特異的親和性は観察されず、特異的な染色性のみが示された。従ってモリブデン酸が存在してもタンパク質に対する親和性が失われていないと考えられる結果を得、非活性型アンドロゲンレセプター複合体の核内受容体はhistone H3がメインであると考察される結果を得た。

考 察

この論文ではモリブデン酸存在下で非活性型アンドロゲンレセプター複合体を5 α -dihydrotestosterone affinity columnで精製し、市販の抗体を用いて証明した。これはradioisotopeを用いなくともhormone receptorを単離できることも示している。さらにこの非活性型アンドロゲンレセプター複合体に対する核内受容体がhistone H3と考えられることを示し、またモリブデン酸が非活性型アンドロゲンレセプター複合体の受容体結合部位に対して阻害しないと考察されることを示した。

モリブデン酸存在下でラット精巣cytosolより非活性型アンドロゲンレセプター複合体を精製すると5種類の構成成分を示し、若干の分子量差は見られたものの、これまでに報告されたものが得られたと考えられる。このことはモリブデン酸が非活性型ホルモンレセプター複合体の単離精製に有用かつ普遍性があることの証明でもある¹⁰⁻¹¹⁾。SDS-PAGEで出現した92-kDaは熱ショックタンパク質(hsp 90)^{16,22)}であり、最近の報告では、この複合体のレセプタータンパク質以外のnonhormone binding proteinsは全て熱ショックタンパク質、即ち最近さらにこの複合体構成成分であると言われている。56-kDa²⁴⁾、70-kDa²⁵⁾も構成員の一部であり、これらが全てhsp 56、hsp 70であると報告されている。hormoneが活性化される際にはこれら熱ショックタンパク質は遊離すると考えられており²⁶⁾、またこれらの機能は不明であるが、hsp 90についてはactin binding活性があることから、核内のhormone receptorの輸送¹⁶⁾にかかわっていると考えられている。今回得た非活性型アンドロゲンレセプター複合体をSDS-PAGE分析の結果、90-kDaタンパク質が2量体¹⁶⁾含まれているかどうかは判定困難であった。さらに新たに報告されている70-kDa、56-kDaも確認できなかったが、恐らく56-kDaはSDS-PAGEで示された47-kDaがこれに相当すると考えられるが熱ショックタンパク質に対する抗体がないので確認不能であった。

非活性型アンドロゲンレセプター複合体は核タンパク質の内、histone H3と強い親和性を示したが、この結果は他の研究者の報告と一部分異なっている。thyroid hor-

mone receptor³⁴⁾では core histone へ, Vitamin D₃ receptor⁶⁾では histone H3 と histone H2A-H2B へ他の core histone よりも強く結合することを報告している。この違いはモリブデン酸によるのか, またはコロイド金標識によるものかどうかは現在の所不明であるが, モリブデン酸の影響により histone H3 以外の受容体結合部位が masking されている可能性は否定できない。しかし core histone の一部へこのモリブデン酸安定化非活性型アンドロゲンレセプター複合体が結合できることには相違ない結果である。さらにコロイド金標識による受容体結合部位がマスクされる可能性があるが, 特定の受容体結合部位のみがマスクされる可能性は低いと考えられる。従って, western blot assay での受容体への結合の強弱は考えにくく, コロイド金標識による影響は少ないと考えられる。

今回の結果から, アンドロゲンホルモンレセプターの遺伝子発現モデルを Fig. 4 に示した。このレセプター複合体は Fig. 4a に示すごとく, 熱ショックタンパク質のいずれかが恐らく nucleosome DNA の linker 部位の近傍の core histone(histone H3)へ結合²⁸⁾して待機していると考えられる。これが核内に入ってきた ligand(アンドロゲン)により活性化されると, 熱ショックタンパク質を離脱²⁶⁾し, Fig. 4b の如くホルモンレセプターは dimer を形成し²⁹⁾, TATA box の上流(-33bp)の hormone response elements(HRE)(5'-GG TACANNNTGTTCT-3', N は塩基不定)へ結合する。これが引き金となって TATA box へ転写調節因子が結合して RNA polymerase による mRNA の合成が誘導され, ホルモン応答遺伝子の発現¹²⁾が引き起こされるものと思われる。

文 献

- 1) 中山正成, 橋本研二, 奥田喜一, 山本浩司: 奈医誌. 40: 443, 1989.
- 2) 中山正成, 奥田喜一, 別府謙一, 橋本研二, 山本浩司: 奈医誌. 40: 315, 1989.
- 3) Ichikawa, K. and DeGroot, L. J.: J. Biol. Chem. 261: 16540, 1986.
- 4) Apriletti, J. W., Inoue, Y. D., Eberhardt, N. L. and Baxter, J. D.: J. Biol. Chem. 259: 10941, 1984.
- 5) Kallos, J., Fasy, T. M. and Hollander, V. P.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. R. 78: 2874, 1981.
- 6) Mellon, W. S.: Endocrinology 116: 1408, 1985.
- 7) Spelsverg, T. C., Gosse, B. J., Littlefield, B. A., Toyoda, H. and Seelke, R.: Biochemistry 23: 5103, 1984.
- 8) Surks, M. I., Koerner, D., Dillman, W. and Oppenheimer, J. H.: J. Biol. Chem. 248: 7066, 1973.
- 9) Torresani, J. and Degroot, L. J.: Endocrinology 96: 1201, 1975.
- 10) Baulieu, E. E., Binart, N., Buchou, T., Catelli, M. G., Garcia, T., Gasc, J. M., Groyer, A., Joab, I., Monchamont, B., Radanyi, M., uohimaa, P. and Mester, J.: in Steroid Hormone Receptors (Eriksson, H. and Gustafsson, J. A., eds). Elsevier, Amsterdam, p45, 1983.
- 11) Leach, K. L., Dahmer, M. K., Hammond, N. D., Sando, J. J. and Pratt, W. B.: J. Biol. Chem.

Fig. 4a

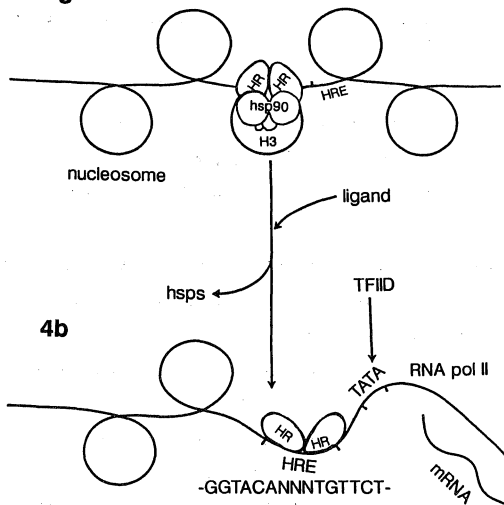


Fig. 4. Explanation of expression of hormone responsive genes by androgen receptor. The nontransformed androgen receptor complexes are localized and/or stand by on histone H3 of nucleosome near by the site of hormone responsive elements(HRE)(Fig. 4a). When androgen combined to receptor complexes, they released all heat shock proteins and formed dimer complexes with hormone receptor(HR). Then the dimer combined to the site of specific base arrangement of hormone responsive elements(HRE, -GGTACANNNTGTTCT-, N is changeable)and subsequently TF IID can bind to TATA box and mRNA will be transcribed by RNA polymerase II (Fig. 4b).

- 254 : 11884, 1979.
- 12) Scheidereit, C., Geisse, S., Westphal, H. M. and Beat, M. : *Nature* **304** : 749, 1983.
 - 13) Johnson, M. P., Young, C. Y. F., Rowley, D. R. and Tindall, D. J. : *Biochemistry* **26** : 3174, 1987.
 - 14) de Boer, W., Bolt, J., Brinkmann, A. O. and Mulder, E. : *Biochim. Biophys. Acta* **889** : 240, 1986.
 - 15) Tai, P. K. K., Maeda, Y., Nakao, K., Wakim, N. G., Duhring, J. L. and Faber, L. E. : *Biochemistry* **25** : 5269, 1986.
 - 16) Denis, M., Wikstrom, A. C. and Gustafsson, J. A. : *J. Biol. Chem.* **262** : 11803, 1987.
 - 17) Dougherty, J. J., Puri, R. K. and Toft, D. O. : *J. Biol. Chem.* **257** : 14226, 1982.
 - 18) Goodwin, G. H., Rabbani, A., Nicolas, R. H. and Johns, E. W. : *FEBS Lett.* **80** : 413, 1977.
 - 19) Chauveau, J., Moulee, Y. and Rouiller, C. H. : *Exp. Cell Res.* **11** : 317, 1956.
 - 20) Laemmli, U. K. : *Nature* **227** : 680, 1970.
 - 21) Joab, I., Radanyi, C., Renoir, M., Buchou, T., Gatelli, M. G., Brinart, N., Mester, J. and Baulieu, E. E. : *Nature* **308** : 850, 1984.
 - 22) Okret, S., Wikstrom, A. C. and Gustafsson, J. A. : *Biochemistry* **24** : 6581, 1985.
 - 23) Chang, C., Whelan, C. T., Popovich, T. C., Kokontis, J. and Liao, S. : *Endocrinology* **123** : 1097, 1989.
 - 24) Veldscholte, J., Berrevoets, C. A., Brinkmann, A. O., Grootegoed, J. A. and Mulder, E. : *Biochemistry* **31** : 2393, 1992.
 - 25) Sanchez, E. R. : *J. Biol. Chem.* **265** : 22067, 1990.
 - 26) Renoir, J. M., Buchou, T., Mester, J., Radanyi, C. and Baulieu, E. E. : *Biochemistry* **23** : 6016, 1984.
 - 27) Oikarinen, J. : *FEBS Lett.* **294** : 6, 1991.
 - 28) Rennie, P. S. : *J. Biol. Chem.* **254** : 3947, 1979.
 - 29) Freedman, L. P., Yosinaga, S. K., Vanderbilt, J. N. and Yamamoto, K. R. : *Science* **245** : 298, 1989.