

ETUDE DE LA 21-HYDROXYLASE DES GLANDES SURRENALES DU CANARD DOMESTIQUE (*ANAS PLATYRHYNCHOS*)

H. LEBLANC*, J.-G. LEHOUX† et T. SANDOR‡

Laboratoire d'Endocrinologie, Hôpital Notre-Dame et Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada and Department of Zoology, The University of Sheffield, England

(Received 10 December 1971)

SUMMARY

The adrenal microsomal sediment of domestic duck (*Anas platyrhynchos*) contains an enzyme system which hydroxylates exogenous progesterone or 17α -hydroxyprogesterone to 11-deoxycorticosterone or to 11-deoxycortisol respectively. This system required atmospheric oxygen and reduced NADP. The microsomal 21-hydroxylase had a micromolar Michaelis-Menten constant, at saturation conditions produced 11.67 nmoles of 11-deoxycorticosterone/mg of microsomal protein/min and only the above two steroids were accepted as substrates. Optimal temperature for the 21-hydroxylase was 37°C (Q_{10} :1.4). The system required 2-3 moles of NADPH/moles of substrate for maximal activity. Carbon monoxide, metopirone, cytochrome c and p-chloromercuribenzoate inhibited partially the microsomal 21-hydroxylation. The spectrophotometric presence of cytochrome P-450 could be demonstrated. Progesterone, 17α -hydroxyprogesterone and metopirone induced type I (maximum at 406 nm and minimum at 420 nm) difference spectra. It is suggested that the duck adrenal microsomal 21-hydroxylase might differ in stoichiometry and substrate specificity from equivalent mammalian preparations.

RESUMÉ

La fraction microsomiale des glandes surrénales du canard (*Anas platyrhynchos*) possède un système enzymatique qui hydroxyle la progestérone et la 17α -hydroxyprogestérone en position 21. L'oxygène moléculaire et le NADPH sont nécessaires à la réaction. Cette 21-hydroxylase a un K_m de l'ordre de 10^{-6} M, métabolise 11.67 nmoles de DOC/mg de protéines/min et seulement les deux stéroïdes mentionnés plus haut sont acceptés comme substrat. Le système atteint une activité maximale à 37°C et a un Q_{10} de 1.4. Pour une activité maximum, le système requiert entre 2 et 3 molécules de NADPH par molécule de substrat. L'enzyme est inhibé par le monoxyde de carbone, la métopirone, le cytochrome c et le p-chloromercuribenzoate. Le cytochrome P-450 a été détecté spectrophotométriquement dans les microsomes. La progestérone, la 17α -hydroxyprogestérone et la métopirone induisent des différences de spectre de Type I (maximum à 406 nm et minimum à 420 nm). On conclut que la 21-hydroxylase des microsomes des glandes surrénales du canard domestique peut être différente de celles des microsomes des glandes surrénales de mammifères par la spécificité et la stoechiométrie.

*Bénéficiaire d'un "Studentship" du Conseil de Recherches Médicales du Canada.

†Bénéficiaire d'un "Fellowship" du Conseil de Recherches Médicales du Canada, 1969-1971.

Adresse actuelle: Département de Gynécologie et Obstétrique, Centre Hospitalier Universitaire, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Qué, Canada.

‡Associé du Conseil de Recherches Médicales du Canada.

Nomenclature: Progestérone: 4-prégnène-3, 20-dione, 17α -Hydroxyprogestérone: 17α -hydroxy-4-prégnène-3,20-dione, DOC: 21-hydroxy-4-prégnène-3,20-dione, 17α , 21-dihydroxyprogestérone: 17α , 21-dihydroxy-4-prégnène-3, 20-dione, 21-Deoxycortisol: 11β , 17α -dihydroxy-4-prégnène-3,20-dione, Cortisol: 11β , 17, 21-trihydroxy-4-prégnène-3, 20-dione, 21-Deoxycortisone: 17α -hydroxy-4-prégnène-3, 11, 20-trione, Cortisone: 17, 21-dihydroxy-4-prégnène-3, 11, 20-trione, Prégnénolone: 3α -hydroxy-5-prégnène-20-one, 21-Hydroxyprégnénolone: 3α , 21-dihydroxy-5-prégnène-20-one, 11β -Hydroxyprégnénolone: 3α , 21-dihydroxy-5-prégnène-20-one, 11β -Hydroxyprogestérone: 11β -hydroxy-4-prégnène-3, 20-dione, 20β -Dihydroprogestérone: 20β -hydroxy-4-prégnène-3-one.

INTRODUCTION

LE SYSTEME enzymatique impliqué dans l'hydroxylation de la position 21 des stéroïdes a été mis en évidence dans les glandes surrénales et les tissus interrénaux de nombreux vertébrés [1]. Chez le boeuf, cet enzyme est localisé dans la fraction microsomiale et, pour agir, nécessite la présence de NADPH et d'oxygène moléculaire [2, 3]. De plus, des travaux récents ont porté sur la participation du cytochrome P-450 lors de l'hydroxylation de cette position du noyau stéroïdien [4].

Dans les glandes surrénales des oiseaux, la 21-hydroxylase a été mise en évidence [5] mais n'a jamais été bien caractérisée. Dans l'optique de la biochimie comparée, nous voulons rapporter ici les résultats de nos travaux portant sur la caractérisation préliminaire de la 21-hydroxylase provenant de la fraction microsomiale des glandes surrénales du canard domestique (*Anas platyrhynchos*). Les principaux points étudiés portent sur la cinétique de l'enzyme, ses besoins en cofacteurs, l'effet de certains inhibiteurs et la participation du cytochrome P-450.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Tissus. Les canards ont été tués par décapitation, les glandes surrénales prélevées et nettoyées immédiatement. L'homogénat a été centrifugé dans une solution de sucrose 0.25M selon la méthode de Schneider et Hogeboom [6]. Les microsomes obtenus après centrifugation à 105,000 g pendant 60 min ont été dilués selon les proportions suivantes: 1 mg de protéines/ml de milieu ou tel que spécifié. La pureté de la fraction microsomiale a été déterminée par des essais enzymatiques [7, 8]. On y a trouvé une très grande activité de la glucose-6-phosphatase et seulement quelques traces de la cytochrome c oxydase. La méthode utilisée pour la détermination des protéines est celle de Lowry *et al.* [9].

Substrat. La [4-¹⁴C] progestérone a été utilisée comme substrat en présence de progestérone non-radioactive. Le premier composé provient de New England Nuclear Corporation, Boston, Massachusetts, il a une activité spécifique de 57.3 mCi/mmole. Son homogénéité a été vérifiée par chromatographie sur couche mince (chloroforme : acétone/95 : 5 v/v). Le précurseur non-radioactif ajouté afin de diluer le matériel marqué a été purifié par des cristallisations. Il a été acheté chez Ika-pharm, Ramat Gan, Israël. Les substrats radioactifs utilisés pour l'étude sur la spécificité ont été les suivants: [4-¹⁴C] prégénolone, 52.4 mCi/mmole, (7-³H) 17 α -hydroxyprogestérone, 10 Ci/mM, [4-¹⁴C] 11 β -hydroxyprogestérone, 57.3 mCi/mmole. La 11 β -hydroxyprogestérone a été produite dans notre laboratoire [24]. La 18-hydroxyprogestérone est un don de G. D. Searle & Co., U.S.A. au Dr. A. Z. Mehdi. Le 21-déoxycortisol, la 21-déoxycortisone, la 20 β -dihydroprogestérone ont été obtenus de Ika-pharm, Ramat-Gan, Israel.

Milieu d'incubation. Une solution de Krebs-Ringer Carbonate-bicarbonate (pH 7.4) contenant 185 mg de glucose et 2 g d'albumine sérique de boeuf (20) par 100 ml de solution a été utilisée comme milieu d'incubation.

Incubation. Le substrat a été dissous dans environ 0.1 ml de 1,2-propane-diol avant l'addition de la fraction microsomiale et du milieu. Le mélange réactionnel a été incubé à une température de 37°C pendant 15 min ou tel que spécifié. En plus, un système générateur de NADPH a été utilisé comme source réductrice: NADP (0.22 μ moles/ml), glucose-6-phosphate (0.64 μ moles/ml), glucose-6-phosphate déhydrogénase (1 unité internationale).

Extraction. Après chacune des incubations, le mélange réactionnel a été

extrait avec 4 fois un volume d'acétate d'éthyle et les extraits réunis en une seule fraction ont été évaporés à la température ambiante.

Identification. Le résidu sec de l'extraction a d'abord été analysé par des chromatographies dans les systèmes de Bush [10]. Le résidu sec provenant des incubations avec la progestérone et la prégénolone a été chromatographié dans le système A, avec le 21-déoxycortisol et la 21-déoxycortisone dans le système B₅, avec la 11 β -hydroxyprogestérone, la 20 β -dihydroprogestérone, la 17 α -hydroxyprogestérone et la 18-hydroxyprogestérone dans le système B₁. L'identité des métabolites de la progestérone a finalement été déterminée par l'obtention d'activités spécifiques constantes $\pm 5\%$ après la formation d'un dérivé (acétate) et des cristallisations. La détection et le comptage de la radioactivité ont été effectués tel que décrit précédemment [11].

Spectrophotométrie. Les travaux sur le cytochrome P-450 ont été faits sur un spectrophotomètre Unicam SP 8000. Les spectres du cytochrome P-450 ont été lus à 0°C, en présence de β -mercaptoéthylamine tel que décrit précédemment [12], entre les longueurs d'ondes suivantes: 400 et 520 nm.

Essai enzymatique. La transformation de la progestérone en DOC en présence de la fraction microsomiale a servi d'indice de l'activité enzymatique.

RESULTATS

Nécessité de l'oxygène. La transformation de la progestérone en DOC a été diminuée de 80% lorsqu'on a fait barboter de l'azote au lieu de l'oxygène dans le milieu lors de l'incubation.

Cofacteurs. L'hydroxylation en position 21 requiert la présence de NADPH pour une activité maximum. Voir les détails au Tableau 1. Notons que le système générateur de NADPH peut remplacer le NADPH.

Etude en fonction du temps. La quantité de progestérone transformée en DOC (Fig. 1) augmente linéairement pendant les 30 premières min de l'incubation pour ensuite atteindre un plateau vers 60 min. Calculé d'après la vitesse initiale, il y a eu formation de 11.67 nmoles de DOC/mg de protéines/min.

Spécificité de l'enzyme. Sauf pour la progestérone et la 17 α -hydroxyprogestérone, il nous a été impossible de détecter une transformation des substrats montrés dans le Tableau 2 en produits 21 hydroxylés ou en d'autres métabolites car après

Tableau 1. Etude sur l'utilisation de cofacteurs par la 21-hydroxylase

	μ moles de cofacteurs par ml	nmoles de DOC formées per ml
NAD	0.5	1.18
NADH	0.5	1.56
NADP	0.7	1.02
NADPH	0.5	3.50
NADH +	0.3	1.12
ATP	0.4	

Les conditions d'incubation étaient les suivantes: microsomes 0.2 mg de protéines/ml; progestérone 127 nmoles/ml; dans un volume total de 5 ml. Incubé à 37°C pendant 20 min.

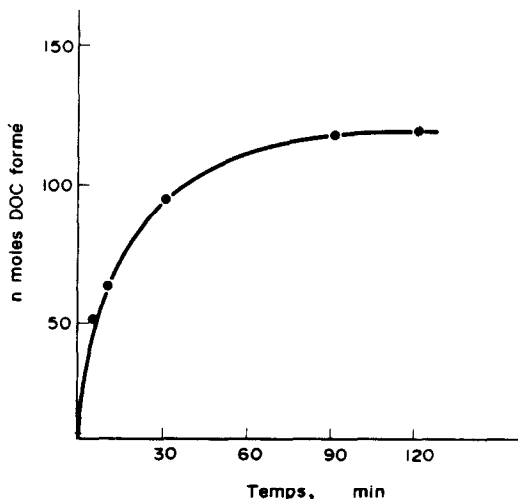


Fig. 1. Transformation de la progestérone en DOC en fonction du temps. Les conditions d'incubation étaient les suivantes: microsomes 0.15 mg de protéines/ml; progestérone 26.5 nmoles/ml; dans un volume total de 6 ml. Incubé à 37°C.

Tableau 2. Spécificité de la 21-hydroxylase envers différents substrats stéroïdiens

Substrat	Produit théorique	Produit obtenu	% de transformation
21-Deoxycortisol	Cortisol	aucun	—
21-Deoxycortisone	Cortisone	aucun	—
Prégnénolone*	21-hydroxyprégnénolone	aucun	—
11 β -Hydroxyprogestérone*	Corticostérone	aucun	—
20 β -Dihydroprogestérone	20 β , 21-dihydroxy-4-prégnèn-3-one	aucun	—
Progestérone*	DOC	DOC	52
17 α -Hydroxyprogestérone*	17 α , 21-dihydroxyprogestérone	17 α , 21-dihydroxyprogestérone	74
18-Hydroxyprogestérone	18-hydroxy-11-deoxycorticostérone	aucun	—

Les conditions d'incubation étaient les suivantes: microsomes 0.5 mg de protéines/ml; substrats 80 nmoles/ml dans un volume total de 2 ml. Incubé à 37°C pendant 15 min. Dans les expériences utilisant des substrats radioactifs (*), leur concentration, après incubation, a été mesurée par le comptage de la radioactivité. Dans les autres cas, la concentration a été déterminée par spectrophotométrie à l'ultraviolet. Autres détails au Protocole expérimental.

la chromatographie, la concentration initiale du substrat n'avait pas varié.

Concentration de l'enzyme. Lorsque la concentration de l'enzyme est augmentée dans le milieu d'incubation, on remarque une augmentation proportionnelle de la transformation de la progestérone en DOC. Voir Fig. 2.

Concentration du substrat. De même, lorsqu'on maintient fixe la concentration de l'enzyme dans l'incubateur et qu'on augmente la concentration du précurseur, on observe une augmentation proportionnelle de la 21 hydroxylation de la pro-

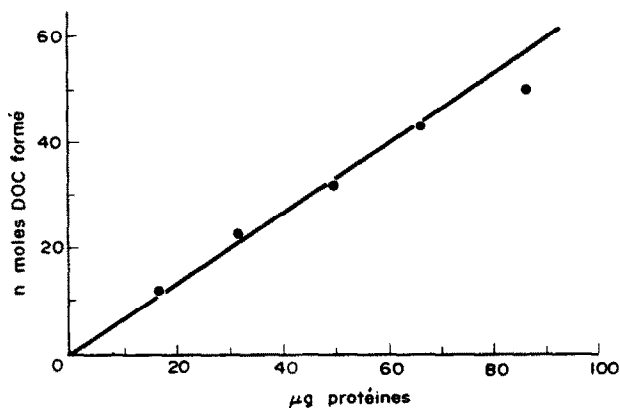


Fig. 2. Transformation de la progestérone en fonction de la concentration de l'enzyme. Les conditions de l'incubation étaient les suivantes: progestérone 37.0 nmoles/ml; dans un volume total de 5 ml. Incubé pendant 15 min.

gestérone en DOC. Voir Fig. 3. Le K_m (constante de Michaelis-Menten) calculé à partir des valeurs obtenues est de l'ordre de 10^{-6} M.

Effet de la température. La température optimale pour la conversion de la progestérone en DOC est de 37°C (Fig. 4). A 30°C, la transformation est environ 20% moindre qu'à 37°C. A 100°C, l'enzyme est dénaturé puisque nous ne retrouvons plus aucune activité. Le coefficient de température (Q_{10}) mesuré entre 30° et 37°C est de 1.4.

Inhibiteurs. Le Tableau 3 nous montre les composés étudiés, leur concentration de même que le pourcentage relatif de transformation de la progestérone en DOC effectuée par les différentes préparations incubées avec ou sans addition d'aucun inhibiteur. Les deux inhibitions les plus marquées ont été obtenues avec le cytochrome c et le p-chloromercuribenzoate; le monoxyde de carbone, le cyanure et la métopirone ont donné des inhibitions plus faibles.

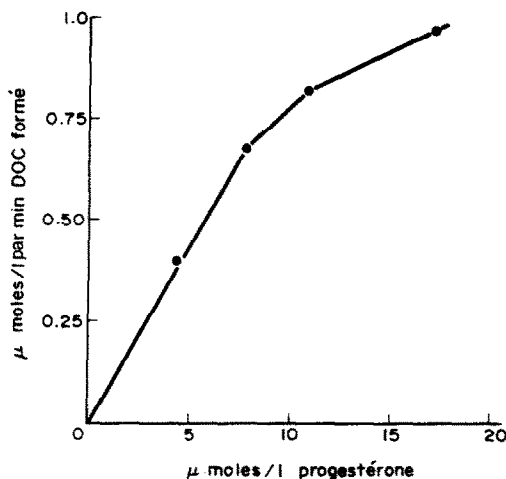


Fig. 3. Transformation de la progestérone en DOC en fonction de la concentration de la progestérone. Les conditions d'incubation étaient les suivantes: microsomes 0.13 mg de protéines/ml; dans un volume total de 5 ml. Incubé à 37°C pendant 10 min.

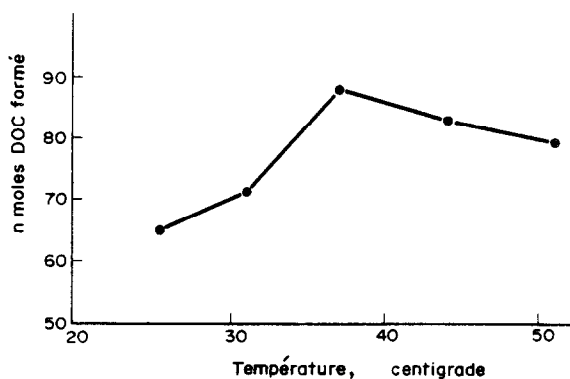


Fig. 4. Effet de la température sur la transformation de la progestérone en DOC. Les conditions d'incubation étaient les suivantes: microsomes 0.2 mg de protéines/ml; progestérone 25.5 nmoles/ml; dans un volume total de 5 ml. Incubé pendant 15 min.

Tableau 3. Effets d'inhibiteurs sur la 21 hydroxylation de la progestérone

Inhibiteurs	μ moles d'inhibiteurs par ml	% de transformation
Aucun	—	100
Monoxyde de carbone (Lumière)	—	69
Cyanure (CN)	100	72
Nitruure (NaN_3)	100	95
Cytochrome c	10	3
p-chloromercuribenzoate	10	8
Iodoacétate	100	97
Métopirone	100	78

Les conditions d'incubation étaient les suivantes: microsomes 0.17 mg de protéines/ml; progestérone 21.2 nmoles/ml; dans un volume total de 6 ml. Incubé à 37°C pendant 15 min.

Variation de la concentration du NADPH. Pour atteindre sa vitesse maximum, l'enzyme nécessite de 2 à 3 molécules de NADPH par molécule de progestérone incubée. Voir la Fig. 5. De plus, les courbes de Lineweaver-Burk faites à partir d'une variation de la concentration de NADPH pour différentes concentrations fixes de progestérone donnent une série de droites qui se coupent à gauche de l'ordonnée (Fig. 6)[21].

Présence du cytochrome P-450. Une différence de spectre d'absorption possédant les caractéristiques d'un complexe CO-cytochrome P-450[19] est obtenue lorsqu'une suspension de microsomes réduits est répartie dans deux cuvettes et qu'on fait barboter du monoxyde de carbone dans l'une des cuvettes pendant 2 min. Voir Fig. 7.

Liaison de substrats au cytochrome P-450. La progestérone ou la 17 α -hydroxyprogestérone ou la métopirone, mis en présence d'une suspension de microsomes de glandes surrénales de canard préalablement réduits par la dithionite induisent des différences de spectre d'absorption caractérisées par un minimum à 420 nm et un maximum à 406 nm (Type I)[22].

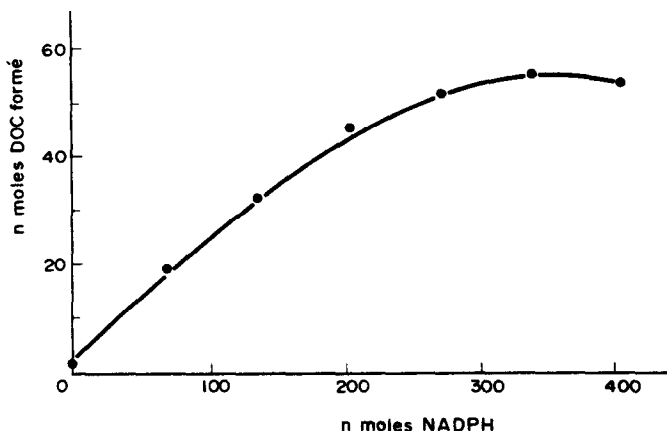


Fig. 5. Transformation de la progestérone en DOC en fonction de la concentration de NADPH. Les conditions d'incubation étaient les suivantes: microsomes 0.2 mg de protéines/ml; progestérone 25.5 nmoles/ml; dans un volume total de 5 ml. Incubé à 37°C pendant 15 min.

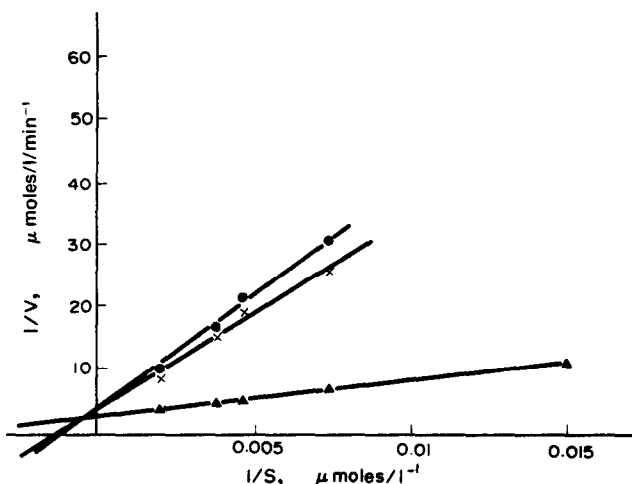


Fig. 6. Courbe de $1/v$ en fonction de $1/S$ avec différentes concentrations fixes de progestérone. (●—●) 12.7 nmoles de progestérone/ml (x—x) 19.1 nmoles de progestérone/ml; (▲—▲) 25.5 nmoles de progestérone/ml; dans un volume total de 5 ml. Incubé à 37°C pendant 15 min.

DISCUSSION

Au cours de notre étude nous avons observé que la 21-hydroxylase des microsomes des glandes surrénales de canard nécessite la présence d'oxygène moléculaire et de NADPH. Sur cet aspect, cet enzyme se compare à celui du boeuf [2, 3]. Pour ce qui est de la spécificité de l'enzyme envers différents substrats, la 21-hydroxylase ne semble accepter que la progestérone ou la 17α -hydroxyprogestérone. Aucun des autres substrats utilisés même s'ils contiennent le groupement fonctionnel 4-èn-3-one, n'a pu être transformés. La 21-hydroxylase des glandes surrénales de canard se distingue ici de celle des mammifères car chez le boeuf cet enzyme peut utiliser comme substrats le plupart des stéroïdes non-hydroxylés en position 21 [3].

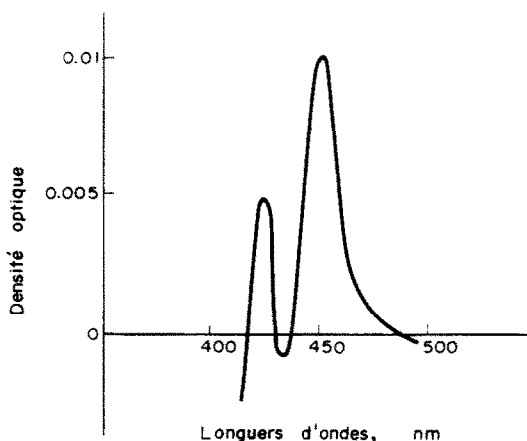


Fig. 7. Différence de spectre d'une suspension de microsomes (Mc). (Mc + dithionite + CO)-(Mc + dithionite) à une température de 0°C.

Quant à la cinétique de l'enzyme, l'étude de la variation de la concentration du substrat nous a permis de remarquer l'inhibition de la réaction lorsque la concentration du substrat est trop élevée et d'établir que la valeur du K_m est de l'ordre de 10^{-6} M; cette valeur de K_m est similaire à celle de la 21-hydroxylase des glandes surrénales de boeuf[13].

L'inhibition de la biosynthèse des corticostéroïdes par la métopirone est bien connue. On a d'abord pensé que cet inhibiteur n'agissait que sur l'hydroxylation de la position 11β , mais on a aussi rapporté une inhibition de l'hydroxylation de la position 18[14, 15], de la position 19[16] et de la position 20[17] par cette substance. Nos résultats nous démontrent que la métopirone inhibe aussi l'hydroxylation en position 21 chez le canard. Les deux inhibitions les plus marquées de la transformation de la progestérone en DOC ont toutefois été notées avec le cytochrome c et le p-chloromercuribenzoate. Le rôle du premier composé serait possiblement celui d'un compétiteur pour les électrons du NADPH; quant au second composé, il se lierait aux groupements sulfhydryles de l'enzyme. L'inhibition de la 21-hydroxylase des microsomes par la métopirone semble noncompétitive et beaucoup moins marquée contrairement à celle des enzymes de la stéroïdogénèse dans les mitochondries[11, 23]. De plus la métopirone induit des différences de spectre de type I avec les microsomes et de type II avec les mitochondries. Ces données peuvent être interprétées comme l'indication d'une différence qualitative entre le cytochrome P-450 des microsomes et des mitochondries.

La nécessité de la présence d'oxygène moléculaire et du NADPH pour la 21 hydroxylation dans les microsomes de la glande surrénale indique que cette réaction est une fonction oxydative mixte. Cooper *et coll.*[4] ont démontré que la 21 hydroxylation chez le boeuf nécessite une molécule de NADPH par molécule de DOC formée. Cependant nos résultats, obtenus avec le canard, laissent croire que plus d'une molécule de NADPH est nécessaire pour l'hydroxylation d'une molécule de progestérone en position 21. En effet, par la mise en graphique des valeurs de l'inverse de la vitesse d'une réaction en fonction des valeurs de l'inverse de la concentration d'un des substrats (NADPH), la concentration du deuxième substrat étant fixe (progestérone), on obtient une série de droites

(Fig. 7) [21]. Théoriquement, si les droites se croisent à gauche de l'ordonnée, plus d'une molécule du premier substrat est impliqué dans la réaction. D'après Cleland [18], si une seule molécule de NADPH était impliquée, on obtiendrait une série de lignes parallèles. De plus, d'après la Fig. 5, on peut calculer que la réaction ne s'effectue à son maximum que lorsque le rapport NADPH/substrat est plus grand que 2.5.

La nature des enzymes catalysant les réactions d'hydroxylation des stéroïdes a été récemment bien étudiée [19]. La 11 β -hydroxylase du boeuf par exemple comprend parmi ses constituants une hémoprotéine, le cytochrome P-450. Nous avons démontré que le cytochrome P-450 est également présent dans les microsomes de la glande surrénale de canard. Il semble également que ce cytochrome se lie aussi aux substrats stéroïdiens puisque des différences spectrales sont induites par l'addition de la progestérone et de la 17 α -hydroxyprogestérone à des suspensions de microsomes. Il est bien entendu que l'activité de la 21-hydroxylase est celle obtenue par une suspension de microsomes et que l'enzyme purifié n'a peut-être pas tout à fait les mêmes propriétés. C'est pourquoi nos expériences futures porteront sur la solubilisation de cet enzyme et son mécanisme d'action.

En résumé, nous pouvons conclure qu'à ce stade de nos investigations, il y a une différence entre les propriétés de la 21-hydroxylase des microsomes des glandes surrénales de canard (pris comme modèle pour la classe des oiseaux) et celles rapportées dans le cas des glandes surrénales de différentes espèces de mammifères [3]. Ces différences se manifestent surtout dans la spécificité et la stoechiométrie de la réaction.

REMERCIEMENTS

Ces études ont été effectuées grâce à une subvention du Conseil de Recherches Médicales du Canada (MT-1302) octroyée à T.S.

BIBLIOGRAPHIE

1. Levy H., Jeanloz R. W., Jacobsen R. P., Hechter O., Schenker V., et Pincus G.: *J. biol. Chem.* 211 (1954) 867.
2. Ryan K. J., et Engel L. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 78 (1956) 2654.
3. Ryan K. J., et Engel L. L.: *J. biol. Chem.* 225 (1957) 103.
4. Cooper D. Y., Narasimhulu S., Rosenthal O., et Estabrook R. W.: In *Functions of Adrenal Cortex*, Vol. 2, (Edité par McKerns K. W.). Appleton-Century-Crofts, New York (1968) pp. 897-942.
5. Sandor T.: Proceedings, Third International Congress of Endocrinology, Excerpta Medica I.C.S. 184 (1969) 730.
6. Schneider W. C., et Hogeboom G. H.: *J. biol. Chem.* 183 (1950) 123.
7. DeDuve C.: *Biochem. J.* 60 (1955) 604.
8. Cooperstein S. J., et Lazarow A.: *J. biol. Chem.* 189 (1951) 665.
9. Lowry O. M., Rosenbough, N. J., Forr A. L., et Randall R. S.: *J. biol. Chem.* 193 (1951) 265.
10. Bush I. E.: *Biochem. J.* 50 (1952) 370.
11. Sandor T., Fazekas A. G., Lehoux J.-G., Leblanc H., et Lanthier A.: *J. steroid Biochem.* 3 (1972) 661.
12. Sandor T., Lehoux J.-G. et Mehdi A. Z.: *Gen Comp. Endocrinol. Suppl* 3 (1972).
13. Bryan G. T. et Lewis A. M.: The Endocrine Society Program of the 51st Meeting, New York, No. 93, p. 77 (1969).
14. Kraulis I., et Birmingham M. K.: *Can. J. Biochem.* 43 (1965) 1471.
15. Sanzori N. P., et Péron F. G.: *Steroids* 8 (1966) 929.
16. Griffiths K.: *J. Endocrinol.* 26 (1963) 445.
17. Cheng S. C. et Carballeira A.: The Endocrine Society Program of the 51st Meeting, New York, No. 89, p. 75 (1969).

18. Cleland W. W.: *Biochim. biophys. Acta* **67** (1963) 104.
19. Simpson E. R., Cooper D. Y., et Estabrook R. W.: *Rec. Progr. Horm. Res.* **25** (1969) 523.
20. Makoff R., et Roberts S.: *Biochim. biophys. Acta* **90** (1964) 189.
21. Sih C. J.: *Science* **163** (1969) 1297.
22. McIntosh E. N., Uzgiris V. I., et Salhanick H. A.: *Endocrinology* **86** (1970) 656.
23. Williamson D. G., et O'Donnell V. J.: *Biochemistry* **8** (1969) 1306.
24. Sandor T., et Lanthier A.: *Endocrinology* **86** (1970) 552.