

ブタ子宮内膜におけるエストロゲンレセプターに対するエストロゲンおよびエストロゲン様化学物質の結合の競合

著者	岡野 彰, 高橋 ひとみ, 高橋 昌志, 下司 雅也
雑誌名	畜産草地研究所研究報告
巻	7
ページ	1-7
発行年	2007-03-16
URL	http://doi.org/10.24514/00002102

doi: 10.24514/00002102

ブタ子宮内膜におけるエストロジェンレセプターに対する エストロジェンおよびエストロジェン様化学物質の結合の競合

岡野 彰・高橋ひとみ・高橋昌志¹⁾・下司雅也

高度繁殖技術研究チーム

¹⁾ 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター

要 約

野生動物やヒトにおいて、エストロジェン様化学物質がエストロジェンのアゴニストあるいはアンタゴニストとしてエストロジェンレセプターと結合競合するために、内分泌かく乱物質として生殖障害を引き起こすことが報告されている。一方、ブタ子宮内膜におけるエストロジェンとエストロジェン様化学物質がエストロジェンレセプターへの結合競合を示すか否かについての報告はこれまで無い。そのため、我々はブタ子宮内膜におけるエストロジェンレセプターへのエストロジェンと5つのエストロジェン様化学物質の結合競合を明らかにしようとした。我々は子宮内膜におけるエストロジェンレセプターの性状を明らかにするため、放射レセプター測定法を実施した。子宮内膜の細胞質および核分画の調整は、1.5mM EDTA, 1mM dithiothreitol を含む低張の1.5mM トリス-HCl 緩衝液を用いて行った。放射レセプター測定法の最適条件を決定するため、両分画と放射性リガンドである³H-estradiol-17 η (E₂)を4, 20および37°Cで0.5, 2, 4, 8および24時間反応させた。その結果、エストロジェンレセプターが子宮内膜の両分画に存在することが確認され、³H-E₂の結合量は、分画のタンパク質量に依存し、4°Cで24時間あるいは37°Cで2時間の反応で最大に達した。エストロジェンレセプターの結合定数は、放射レセプター測定法の結果をもとに Scatchard 分析で解析した。結合定数は、発情周期の時期によって変動し、K_dおよびB_{max}は、それぞれ0.12~0.49nMと0.12~0.015nmol/mg protein の範囲で推移した。³H-E₂とE₂および各種エストロジェン様化学物質(diethylstilbestrol: DES, *p,p'*-isopropylidenediphenol: Bis, *p-n*-nonylphenol: Non, daidzein: Da, coumestrol: Coum, bis (2-ethylhexyl) phthalate: Ph)との間での結合競合を検討した結果、エストロジェンレセプターはE₂およびエストロジェン様化学物質と種々の程度での親和性を示した。高い結合親和性は、Des, E₂, Non の順であった。Coum, Bis, DaそしてPhの結合親和性は、E₂に比べて1,000から10,000分の1程度と低かった。

キーワード：エストロジェンレセプター・内分泌かく乱物質・ブタ子宮内膜

緒 言

我々の生活環境には、既知あるいは未知のエストロジェン様の作用を持つ膨大な数のエストロジェン様化学物質が存在する可能性が重大な問題として世界的に危惧されている。近年、ヒトや野生動物において、エストロジェン様化学物質がエストロジェンレセプターと結合して、アゴニストあるいはアンタゴニストとして細胞内信号伝達系を介して生殖障害を引き起こすことが報告され

ている²⁵⁾。エストロジェン様の作用を持つ環境汚染物質が、雄性生殖系を雌性化させることを示唆する報告もある^{3, 4, 24)}。流産防止のため強い合成エストロジェンであるdiethylstilbestrol (DES)を投与された母親から生まれた子供において、膣や精巣のガンが高率に発症すると報告されている^{5, 10)}。DESの危険性は、実験的にも確認されている^{8, 9)}。全くエストロジェンを含まない培地を用いてポリスチレン製の培養皿で培養されたヒトの乳腺細

胞が、エストロジェン添加した培地を用いた場合と類似した細胞増殖をすることが観察されている²⁶⁾。この様なエストロジェン含有培地と類似した細胞増殖を起こさせた因子は、実験に用いられた培養皿を生産する際に使用された化学物質の nonylphenol (Non) に起因することが示されている²⁷⁾。一方、環境汚染物質のエストロジェン様作用が、ヒトや野生動物の雄での精子数減少を起こせるとの報告もある^{17, 24)}。また、海洋の魚類におけるエストロジェンとエストロジェン様化学物質の間でのエストロジェンレセプターへの結合競合についての報告がなされている¹⁴⁾。さらに、哺乳動物種の生殖におけるエストロジェン様化学物質の影響について遺伝子的側面から新たな研究も行われるようになった^{7, 14)}。しかし、これらの研究対象は、ヒト、げっ歯類、野生動物また鋭敏な培養細胞に限定されている。

生活環境に存在するエストロジェン様化学物質の我が国の家畜飼養現場での生殖現象への悪影響について、問題の顕在化はまだ確認されていないが、その可能性を否定することが出来ないとの観点から、内分泌かく乱物質の研究を行うことが必要と考えられる。そこで、重要な家畜の1つであるブタを対象として本研究を実施した。ブタの子宮内膜はエストロジェンの標的器官の1つであるが、ブタ子宮内膜におけるエストロジェンレセプターに対するエストロジェンとエストロジェン様化学物質の結合親和性についての詳細かつ信頼性のある報告が無い。そのため本実験で我々は、ブタ子宮内膜のエストロジェンレセプターの測定に古典的な放射レセプター測定法^{11, 20)}を用いエストロジェンレセプターの特性を明らかにするとともに、エストロジェンと幾つかのエストロジェン様化学物質間での結合競合を検討した。

材料および方法

実験動物と採材

発情期および発情周期12および15日目の子宮は、畜産草地研究所で飼育した交雑種 (Landrace×Large White×Duroc) の成熟雌ブタを当所の実験と場で放血と殺後直ちに採取した。供試ブタの取り扱い、当所の実験動物取り扱い指針に基づいて行った。摘出子宮は、氷冷状態で研究室に持ち帰った後、切開し眼科用ハサミで筋層より内膜組織を剥離した。内膜組織は、低張性のTED緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1.5mM EDTA, 1mM dithiothreitol, pH 7.4) で洗浄した後、放射レセプター測定法用の細胞質および核分画の調整まで -80°C に凍結保存した。

試薬

天然型エストロジェンとして estradiol-17 β (E_2) および強いエストロジェン作用を持つ合成エストロジェン DES は、Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, USA) より購入した。エストロジェン様化学物質である bis (2-ethylhexyl) phthalate (Ph), *p,p*-isopropylidenediphenol (Bis) および *p-n*-nonylphenol (Non) は、和光純薬より購入した。植物性のエストロジェン daidzein (Da) および coumestrol (Coum) は、Fluka (Buchs, Switzerland) より購入した。放射性トリチウムで標識された $^3\text{H-E}_2$ は、NEN Life Science product (Boston, Ma, USA) より購入した。シンチレーション液 Clear-sol I, Norit A, dextran T-70 および Triton X-100 は、ナカライテスク (京都) より購入した。

細胞質および核分画の調整

凍結保存した子宮内膜組織を破砕機クライオプレス (マイクロテック・ニチオン, 船橋) によって粉末状に破砕した。次いで、破砕後の子宮内膜組織を TED 緩衝液に浮遊させ、ポリトロン・ホモゲナイザー (Brinkman, Westbury, USA) によって均一の液状とした後、 $1,000\times\text{g}$ で10分間の遠心分離を行い、上清を粗細胞質分画とした。沈渣はさらに粗核分画とした。粗細胞質分画の内因性のステロイドを除去するため、dextran-coated charcoal (DCC) ペレットとともに30分間振とう混和した後、 $105,000\times\text{g}$ で1時間遠心分離を行い、上清を細胞質分画とした。DCC ペレットとして、TED 緩衝液に0.5% charcoal (Norit A) と0.05% dextran (T-70) を混和し、 $1,000\times\text{g}$ で10分間の遠心分離による沈渣を用いた。粗核分画を0.25% Triton X-100を含むTMD緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1.5mM MgCl_2 , 1mM dithiothreitol, pH7.4) 中で $1,000\times\text{g}$ の遠心洗浄を行い、更に Triton X-100 を含まないTMD緩衝液で2回遠心洗浄を行った。洗浄後の沈渣を2.4Mのショ糖を含むTMD緩衝液に浮遊させ、アングルローター日立70P-72を装着した日立70P-72超遠心機で $90,000\times\text{g}$ で1時間の遠心処理後、得られた沈渣を0.5mM bacitracinを含むTED緩衝液で洗浄し、TED緩衝液に0.5mM bacitracin および0.6mM KClを加えた緩衝液に30分間浮遊させ、 $105,000\times\text{g}$ で1時間超遠心して上清に核分画を得た。細胞質および核分画のタンパク質量は、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質としてLowry法で測定した¹⁵⁾。

エストロジェンレセプターの放射レセプター測定法と結

合競合

細胞質および核分画に対する放射レセプター測定法の最適な実験条件を決定するため、両分画と放射性リガンド ($^3\text{H-E}_2$) とを 4, 20 あるいは 37°C で 0.5, 2, 4, 8 および 24 時間反応させた。エストロゲンに結合しなかった非結合の $^3\text{H-E}_2$ は、DCC 法で分離を行った。各サンプルを測定用のバイアルに入れ、3ml のシンチレーション液を添加して $^3\text{H-E}_2$ の放射活性を測定した。細胞質および核分画を 100 倍過剰の非標識 DES の存在および非存在下で $^3\text{H-E}_2$ を添加し、全量を $200\ \mu\text{l}$ とし 4°C で 20 時間反応させた。特異的な結合は、全結合量から非標識 DES の存在下の非特異的な結合を差し引いて算出した。解離平衡定数 (K_d) と最大結合量を Scatchard 分析で決定した²³⁾。 $^3\text{H-E}_2$ と E_2 あるいは各エストロゲン様化学物質 (DES, Da, Coum, Bis, Non および Ph) との結合競合 (IC_{50} : $^3\text{H-E}_2$ の結合を 50% 抑制) を同様に放射レセプター測定法で検討した。

統計分析

放射レセプター測定法と結合競合実験は 3 例反復で 2 回以上行い、得られた結果は、Scatchard 分析した。 IC_{50} は、GraphPad PRISM 計算ソフト (GraphPad Software, San Diego, USA) で分析した。

結果および考察

予備の実験によって、細胞質および核分画に対する $^3\text{H-E}_2$ の反応時間 (1-20 時間) とタンパク質量 (0.05~0.4mg/tube) を検討したところ、 $^3\text{H-E}_2$ の特異的な結合

は、反応時間 8 時間までは直線的に増加し、その後 24 時間まで殆ど変化しなかった。結合に関わるタンパク質量は、0.05 から 0.4mg/tube まで直線的に増加した。エストロゲンレセプターの存在が、ブタ子宮内膜の細胞質および核分画のいずれでも確認できた。 $^3\text{H-E}_2$ のエストロゲンレセプターへの結合量は、両分画に含まれるタンパク質量に依存し、 4°C で 24 時間あるいは 37°C で 2 時間で飽和に達した。ブタ子宮内膜の細胞質および核分画での $^3\text{H-E}_2$ の結合を Scatchard 分析したところ、リガンドがエストロゲンレセプターの一部と結合し、両者の間で直線的な関係が成り立つことが明らかになった。結合親和性は、ブタの発情周期のステージによって変化し、 K_d が 0.12~0.49nM, B_{max} は 0.12-0.015nmol/mg protein の範囲で推移した (Figure 1)。一方、核分画では、 K_d が 0.194~1.22nM, B_{max} は 0.14-0.019nmol/mg protein の範囲にあった。これらの結果は、魚類の精巣¹⁷⁾、ニワトリの視床下部・下垂体¹¹⁾ およびラットやブタの卵胞¹²⁾ におけるエストロゲンレセプターに関する報告と良く一致した^{11, 12, 14)}。

エストロゲンレセプター量と親和性は、発情周期のステージによって変化するが、ブタにおいてその量は他の哺乳動物と同様にエストロゲン量が高くなる発情期で高い。現在エストロゲンレセプターには α と β 型のあることが明らかにされている^{12, 13)}。しかし、これら α と β 型のエストロゲンレセプターを識別しうる適当なリガンドが現在存在しないため、我々は、従来エストロゲンレセプターの測定に用いられてきたのと同様な両タイプのエストロゲンレセプターを合計した量での測

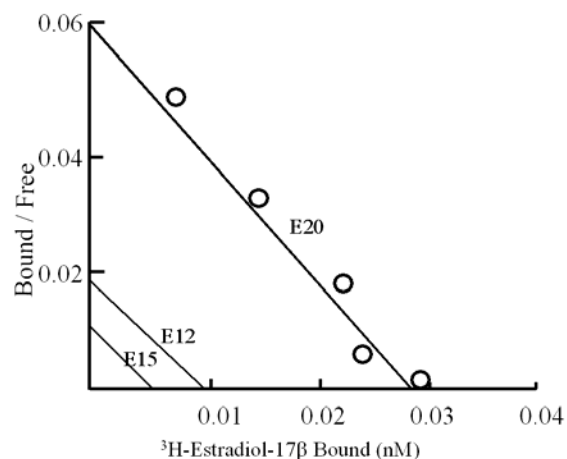


Figure 1. Representative Scatchard plot of $^3\text{H-Estradiol-17}\ \beta$ binding in porcine endometrial cytosolic fraction. E20 (Estrus): $K_d=0.32\text{nM}$; $B_{\text{max}}=0.24\text{nmol/mg protein}$, E15: $K_d=0.063\text{nM}$; $B_{\text{max}}=0.013\text{nmol/mg protein}$, E12: $K_d=0.138\text{nM}$; $B_{\text{max}}=0.045\text{nmol/mg protein}$; E: Estrous cycle

定を行った²⁸⁾。

本結合実験では、細胞質および核分画に対して生体で産生される強いエストロゲンである E_2 および E_2 より強いエストロゲン作用を有する合成エストロゲンである DES が高い特異性を持って結合した。また供試した他の4種類のエストロゲン様化学物質も種々の程度で競合的にエストロゲンレセプターと結合しうることが明らかになった。 $^3H-E_2$ との結合競合 IC_{50} は、Des と E_2 で極めて高く、次いで Non, Coum, Bis, Da, Ph の順であった (Figure 2-3, Table 1)。本研究のブタ子宮内膜におけるエストロゲンと幾つかのエストロゲン様化学物質と間での結合競合の結果は、大西洋に生息するニベ科の魚の一種 Atlantic croaker (*Microbotiics undulates*) 精巣における同様な試験結果と良く一致した¹⁴⁾。

本研究において分析した化学物質エストロゲン様作

用を有するアゴニストであり²⁷⁾、それらの IC_{50} は大きな濃度差があった。DES は、 E_2 の強いアゴニストである合成エストロゲンであり、エストロゲンレセプターに対して E_2 より強い親和性を示す。DES はかつて家畜の肥育目的で使用されたが、およそ 200pM と極めて低い濃度で $^3H-E_2$ に対して IC_{50} に達するため、現在ではこの目的での使用が禁止されており、家畜の飼育環境から排除されるべき物質となっている。多くの化学工業から生み出される物質がエストロゲン様化学物質の作用を有するので、環境汚染を引き起こし内分泌かく乱物質 (Endocrine disturbing chemical : EDC) となると推定される。本研究の結果は、ポリカーボネート製品を生産する際に使用される Non がエストロゲンレセプターに対して親和性が高いことを示した。Non は他の3つのエストロゲン様化学物質よりエストロゲンレセプターに対して相対的

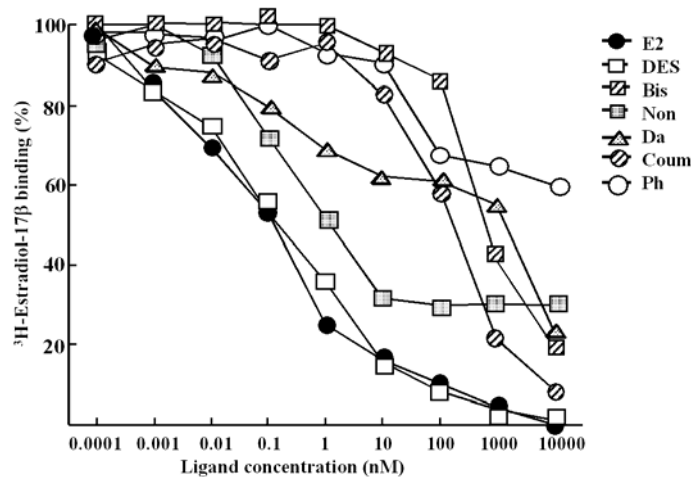


Figure 2. Competitive binding of 3H -estradiol-17 β and ligands to estrogen receptors (cytosolic fraction)

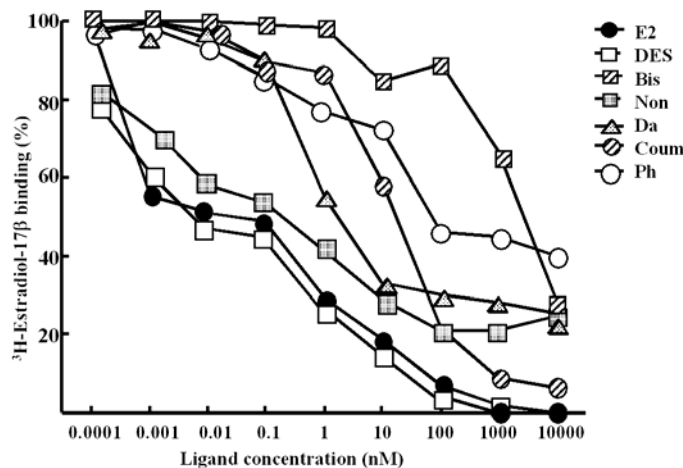


Figure 3. Competitive binding of 3H -estradiol-17 β and ligands to estrogen receptor (nuclear fraction)

Table 1. IC₅₀ of xenobiotic chemical competitors for the porcine endometrial cytosolic and nuclear estrogen receptors
IC₅₀ is the competitor concentration required to reduce the specific radioligand binding by 50% (=ratio of IC₅₀ values).

	IC ₅₀	
	Cytosolic	Nuclear
Estradiol-17 η	117.00 pM	87.20 pM
Diethylstilbestrol	193.00 pM	1.42 pM
Bisphenol	687.00 nM	8.48 σ M
Nonylphenol	710.00 pM	4.83 nM
Diadzein	1.68 σ M	1.08 σ M
Coumestrol	151.00 nM	22.40 nM
Phtalate	20.00 σ M	22.40 σ M

IC₅₀ is the competitor concentration required to reduce the specific radioligand binding by 50% (=ratio of IC₅₀ values).

に高い親和性を示し、³H-E₂に対して700pMでIC₅₀に達する。この結果は、幾つかの動物種や培養細胞での報告された結果と一致するため、Nonは畜産業にとって問題を投げかける可能性のある物質と言える。しかし、我が国においてNonがIC₅₀に対する濃度で家畜飼養の飼料や飲水に汚染されている可能性は低いと想定される¹⁸⁾。このため、エストロゲン様化学物質が直接家畜の繁殖成績に悪影響を及ぼすことも可能性として皆無に近い。

本研究で検討した他の3つの物質は、エストロゲンレセプターとの親和性が極めて低いことから弱いエストロゲン様作用しか発揮し得ないことが推定される。豆科牧草中に含まれるCoumやDaの様な植物性エストロゲンは、数十年前にオーストラリアでヒツジの繁殖障害を引き起こしたことが良く知られている¹⁾。しかし、プラスチック製品の可塑剤として繁用されるPhや植物性エストロゲンは、IC₅₀が1-20 μ Mと哺乳動物の血中ステロイドホルモン濃度に比べて極めて高濃度である。そのため、我が国の家畜飼養環境に1 μ M以上の高濃度でこれらの物質が存在する可能性もまた皆無に近く、これらはEDCとしての脅威は低いと見なしうる。ブタにおける血中のエストロゲン濃度はウシに比べて高く⁶⁾、外部的からのEDCに対してウシより生理的に感受性が低く、EDCが繁殖障害に関わる可能性も低いとも想定しうる。しかし、NonやBisは化学工業分野で広く用いられている物質であり、また今後も未知のエストロゲン様化学物質がEDCとして化学工業から生み出される可能性もあるので、エストロゲン様化学物質についての監視は畜産業にとって常に怠ってはならないと考えられる^{2, 16, 19, 21, 22, 29)}。

引用文献

- 1) Bennets, H., Underwood, E. and Shier, F. (1946). A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pasture in Western Australia, *Austl. Vet. J.*, 22, 2-12.
- 2) Blair, R.M., Fanf, H., Branham, W.S., Hass, B.S., Dial, S.L., Moland, C.L., Tong, W., Shi, L., Perkins, R. and Sheehan, D.M. (2000). The estrogen receptors relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands, *Toxicol. Sci.*, 54, 38-153.
- 3) Colborn, T., Frederick, S.V-S. and Soto, A. M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ. Health Perspect.*, 101, 378-384.
- 4) Colborn, T., Dumannoski, D. and Myers J. P. (1996). "Our stolen future: Are we threatening our fertility, intelligence, and survival?", Penguin Books, Inc, New York.
- 5) Edelman, D.A. (1989). Diethylstilbestrol exposure and risk of clear cell cervical and vaginal adenocarcinoma, *Int. J. Fert.*, 34, 251-255.
- 6) Ericks, D. M., Guthrie, H. D. and Tanaka, K. (1987). Plasma estrogen, progesterone and lutenizing hormone levels during the estrous cycle in pigs, *Biol. Reprod.*, 6, 210-218.
- 7) Gandolfi, F., Pocar, P., Brevini, T. A. L. and Fischer, B. (2002). Impact of endocrine disruptors on ovarian function and embryonic development, *Domestic. Anim.*

- Endocrinol., 23, 189-201.
- 8) Goldberg, J.M. and Falcone, T. (1999). Effect of diethylbestrol on reproductive function, *Fert. Steril.*, 72, 1-7.
 - 9) Gupta, C. (2000). Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals, *Soc. Exp. Biol. Med.*, 224, 61-68.
 - 10) Herbst, A., Olfelder, H. and Posskamzer, D. (1971). Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal stilbestrol therapy and tumor appearance in young women, *New Engl. J. Med.*, 284, 878-881.
 - 11) Kawashima, M., Kamiyoshi, M. and Tanaka, K. (1987). Presence of estrogen receptors in the hen hypothalamus and pituitary, *Endocrinology*, 120, 582-588.
 - 12) Kawashima, M. and Greenwald, G.S. (1993). Comparison of follicular estrogen receptors in rat, hamster, and pig, *Biol. Reprod.*, 48, 172-179.
 - 13) Kuiper, G.G.J.M., Enmark, E, Pelto-Hikko, M., Nilsson, S. and Gustafsson, J.-Å. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93, 5925-5930.
 - 14) Loomis, A.K. and Thomas, P. (1999). Binding characteristics of estrogen receptor (ER) in Atlantic croaker (*Micropogonia undulatus*) testis: different affinity for estrogens and xenobiotics from that of hepatic ER, *Biol. Reprod.*, 61, 51-60.
 - 15) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.L., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagents, *J. Biochem.*, 193, 265-275.
 - 16) Markey, C.M., Rubin, B.S., Soto, A.M. and Sonnenschein, C. (2003). Endocrine disruptors: from wingspread to environmental developmental biology, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 83, 235-244.
 - 17) Naz, R. K. ed. (1999). "Endocrine disruptors: Effects on male and female reproductive systems", CRC Press, Boca Raton.
 - 18) 農林水産省農林水産技術会議事務局 (2005). 農林水産業における内分泌かく乱物質の動態解明と作用機構に関する総合研究, 研究成果 433, 133-240.
 - 19) Payne, J., Rajapakse, N., Wilkins, M. and Kortenkamp, A. (2000). Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens, *Environ Health Perspect.*, 108, 983-987.
 - 20) Rhind, S.M. (2002). Endocrine disrupting compounds and farm animals: their properties, action and routes of exposure, *Domest. Anim. Endocrinol.*, 23, 179-187.
 - 21) Rosselli, M., Reinhard, K., Imthurn, B., Keller, P. J. And Dubey, R.K. (2000). Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function, *Human Reprod Update*, 6, 332-350.
 - 22) Safe, S.H., Pallaroni, L., Yoon, K., Gaido, K., Ross, S., Saville, B. and McDonnell, D. (2001). Toxicology of environmental estrogens, *Reprod. Fert. Dev.*, 13, 307-315.
 - 23) Scatchard, G. (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions, *Ann. NY. Acad. Sci.*, 51, 660-672.
 - 24) Sharpe, R.M. and Skakkebaek, N. E. (1993). Are oestrogen involved in falling sperm count and disorders of the male reproductive tract?, *Lancet*, 341, 1392-1395.
 - 25) Sonnenschein, C. and Soto, A.M.(2001). Refelctions on bioanalytical techniques for detecting endocrine disrupting chemicals. In *Proceedings of the seminar "Environmental health aspects of endocrine disrupters"*, Hippocrates Foundation, Kos, Greece, 2-4, September 1999, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 21-37.
 - 26) Soto, A.M. and Sonnenschein, C. (1984). Mechanism of estrogen on cellular proliferation: Evidence for indirect and negative control on cloned breast tumor cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122, 1097-1103.
 - 27) Soto, A.M, Justicia, H. Wray, J.W. and Sonnenschein, C. (1991). p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene, *Environ. Health Perspec.*, 92, 167-173.
 - 28) Starchev, P., Rodriguez, H., Edqvist, L.-E. and Eriksson H. (1990). Characterization of uterine sex steroid receptors in the pig and their variation during the oestrous cycle, *J. Steroid. Biochem.*, 36, 689-699.
 - 29) White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P. and Parker, M.G. (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic?, *Endocrinology*, 135,175-182.

Binding Competition Between Estrogen and Xenobiotic Chemicals with Estrogen Receptors in the Porcine Endometrium

Akira OKANO, Hitomi TAKAHASHI, Masashi TAKAHASHI¹⁾ and Masaya GESHI

Reproductive Biology and Technology Research Team

¹⁾National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region

Summary

Evidences for xenobiotic chemical (XBC) induced reproductive disorders have been reported in wild animals and human, because XBCs act as the disruptor of the estrogen receptor (ER) in agonistic or antagonistic manner. There is no report about the binding competition of estrogen and XBCs to ER in the porcine endometrium. Therefore, we characterized and quantified the binding competition to ER between estrogen and six XBCs (diethylstilbestrol: DES, *p,p'*-isopropylidenediphenol: Bis, *p-n*-nonylphenol: Non, daidzein:Da, coumestrol :Coum, bis (2-ethylhexyl) phthalate: Ph). To clarify ER characteristics, we carried out radio-receptor assay (RRA) of ER in the endometrium. Cytosolic and nuclear fractions were prepared from endometrial tissue with hypotonic 10mM Tris-HCl with 1.5mM EDTA and 1mM dithiothreitol. To choose optimum conditions for RRA, both fractions were incubated with radioactive ligand (³H-estradiol-17 β :³H-E₂) at 4, 20 or 37°C for 0.5, 2, 4, 8 or 24h. ERs were identified in both fractions of the endometrium. Binding of ³H-E₂ depended on the protein amount, and reacted to the maximal at 24h and 2h after incubation, respectively at 4°C and 37°C. Secondly, binding affinities were examined by Scatchard analysis. Binding characteristics were varied on the stages of estrous cycle and the range of K_d and B_{max} were 0.12~0.49nM and 0.12~0.015nmol/mg protein, respectively. Binding competitions between ³H-E₂ and E₂ or each of XBC were examined. Competition studies demonstrated that ER bound E₂ and XBCs with several degrees of binding affinity. Higher binding affinities of binding were found in Des, followed by E₂ and Non. Binding competitions of Coum, Bis, Da and Ph to E₂ were relatively low.

Key words: Estrogen receptor, Endocrine Disturbing Substance, Porcine endometrium