抗ラット CRH 受容体抗体の作製と CRH 受容体の 生体内分布に関する研究

徳島大学医学部第一内科¹⁾, 同 第二解剖²⁾, 新潟薬科大学薬品製造学科³⁾

大 倉 敏 裕¹⁾, 張 辰 宇¹⁾, 藤 中 雄 一¹⁾, 横 越 浩¹⁾

久 野 節 二²⁾, 北 川 幸 巳³⁾, 齋 藤 史 郎¹⁾

Generation of Anti-rat CRH-Receptor (CRH-R) Antibody and Distribution of CRH-R in the Rat

Toshihiro OKURA¹⁾, Chen-Yu ZHANG¹⁾, Yuichi FUJINAKA¹⁾, Yutaka YOKOGOSHI¹⁾,
Setsuji HISANO²⁾, Kouki KITAGAWA³⁾ and Shiro SAITO¹⁾

¹⁾First Department of Internal Medicine and ²⁾Second Department of Anatomy, School of Medicine,
The University of Tokushima, Tokushima, Japan, ³⁾Department of Chemistry and Pharmaceutical
Technology, The Niigata College of Pharmacy, Niigata, Japan

The biochemical properties and tissue distribution of the CRH receptor (CRH-R) were examined in adult rats using a site-directed antipeptide antibody (anti-rCRHRc 20) that is specific for the C-terminal region of the rat's CRH-R. Anti-rCRHRc 20 was produced using a synthetic oligopeptide (rCRHRc 20: SIPT-SPTRVSFHSIKQST AV) corresponding to residues 396~415 of rCRH-R, which are located in the cytoplasmic tail of rCRH-R. The specificity of anti-rCRHRc 20 was examined by ELISA, immunoblotting and immunoprecipitation and immunohistochemistry. Affinity-purified anti-rCRHRc 20 specifically recognized 75 kDa protein, but also non-specifically recognized 58 kDa protein. Immunohistochemistry showed no specific staining. Double-labeling of rCRH-R using ¹²⁵I-CRH and anti-rCRHRc 20 showed that both the 75 kDa protein and the 58 kDa protein could bind specifically to CRH, indicating that 58 kDa is also a CRH-R with a similar C-terminal composition. Treatment of the immunoprecipitate with N-glycanase reduced the molecular weights of both the 75 kDa and 58 kDa proteins to 40~45 kDa, which correspond to the molecular weight deduced from rCRH-R cDNA.

In the immunoblotting experiment, affinity-purified anti-rCRHRc 20 detected the 75 kDa protein in all of the tissues examined including the hypothalamus, pituitary, cerebellum, thymus, adrenal gland, ovary and placenta, but also detected an apparent 58 kDa protein in the hypothalamus, cerebellum adrenal gland and ovary.

Our results indicate that the pituitary-type CRH-R is widely distributed in various rat tissues besides the pituitary, and that there is tissue-specific molecular heterogeneity in CRH-R proteins.

Keywords: corticotropin-releasing hormone (CRH), corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R), immunoblotting, anti-peptide antibody

緒 言

Corticotropin-releasing hormone (CRH) は, Vale らにより視床下部より単離された 41 個のアミノ酸からなるペプチドホルモンである。CRH は主として視床下部室傍核の小細胞性ニューロンで生合成され, 正中隆起外層より下垂体門脈中へ放出されて, 下垂体 ACTH 産生細胞に作用し, ACTH, β エンドルフィンおよび β リポトロピンの合成ならびに分泌を促進する¹⁾。この作用は膜上に存在する受容体ならびに cAMP を介して細胞内へ伝達されると推測されていたが, CRH 受容体 (CRH-R) 遺伝子のクローニングにより, CRH-R はアミノ酸 415 個よりなる 7 回膜貫通構造を有する G 蛋白共役型受容体であることが明らかになった²⁾³⁾。一方, CRH-R の蛋白レベルでの検討は, 標識 CRH を用いた結合実験やクロスリンク実験で行われているだけで^{4)~8)}, CRH 受容体蛋白の下垂体における構造やその発現細胞の分布, ならびに形態学的特徴に関しては不明の点が多い。また, 脳内各部, 脊髄, 網膜, 胃, 腸管, 脾臓, 副腎髄質, 胎盤などの視床下部以外の臓器で認められる CRH 様免疫活性^{9)~13)} の生理的意義を明らかにするためには, CRH-R 蛋白自体がどの組織において発現し, どのような細胞に局在を示すかを明らかにすることが必要である。

我々は, CRH-R 蛋白の組織分布ならびに局在を明らかにするためにラット (r) CRH-R に対する抗体を作製し, 各組織において CRH-R の発現ならびに構造の検討を行った。

材 料 と 方 法

1) 動 物

抗体の作製には, 日本白色種の雄家兎 (体重 2.0~2.5 Kg) 3 匹を用いた。また, 受容体の生体内分布の検討には, SD 系の週齢 8~10 週の雄および雌ラットを使用した。

2) 試 薬

用いた試薬は次のとおりである。

Keyhole limpet hemocyanin (KLH) (CALBIOCHEN, USA), Complete Freund adjuvant (和光純薬工業), Incomplete Freund adjuvant (和光純薬工業), N-glycanase (Genzyme, USA), プロテイン A セファロース (SIGMA Chemicals, St. Louis, MO)

3) 抗ラット CRH-R ペプチド抗体 (抗 rCRHRc 20) の作製と精製

a) 免疫原の作製

rCRH-R の cDNA 配列より推定される受容体のアミノ酸配列を基に C 末端の 20 個のアミノ酸残基 (S³⁹⁶ IPTSPTRVSFHSIKQSTAV⁴¹⁵) の配列に相当するオリゴペプチド (rCRHRc 20) を固相法にて合成した。

合成 rCRHRc 20 5 mg と Keyhole limpet hemocyanin (KLH) 20 mg をグルタルアルデヒド処理により結合させ免疫原とした。

b) 家兎の免疫

免疫原 (300 μ g/ml) 1.5 ml と complete Freund adjuvant 1.5 ml を混合してエマルジョンを作製し, 家兎の背部約 10 箇所約 0.1 cc ずつ皮下注射した。追加免疫には, エマルジョンの作製に incomplete Freund adjuvant を用い, 2 週間毎に初回と同様の皮下注射を行った。この時 10 ml の耳朶血を採血

し、血清を分離し-4°Cで保存した。

c) ELISAによる抗体価の検討

96-well polystyrene microtiter plate (semiflat-bottom, Corning, NY, USA) に、コーティング緩衝液 (0.1 M 重炭酸緩衝液, pH 9.6) で溶解した合成 CRH-R フラグメント (10 µg/ml) を 100 µl ずつ加え、4°C で 18 時間インキュベートした。洗浄緩衝液 (0.05 % Tween-20 を含む 0.05 M PBS, pH 7.4) で洗浄した後、各ウェルに 1 % BSA を含む 0.05 M PBS (pH 7.4) を加えてブロッキングした。洗浄後、測定用緩衝液 (0.05 M PBS, 0.2 % BSA および 0.1 % Tween-20 を含む) で希釈した原抗血清 100 µl を加え、4°C でさらに 24 時間インキュベートした。再度洗浄の後、horse radish peroxidase (HRP) 結合抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (1 : 2000, Zymed Laboratories, USA) 100 µl を加え、室温で 1 時間インキュベートし、再度洗浄した後、ペルオキシダーゼ発色キット (住友ベークライト, 東京) を用いて、室温で 5 分間反応させ、吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad, USA) を用いて測定した。BLANK には、測定用緩衝液のみを加えたウェルを用いた。測定は全て二重測定を行った。

d) 免疫グロブリン分画の調整

プロテイン A カラム (AmpureTMPA kit: Amersham USA) を用いて添付の手順に従い原血清より IgG 分画を得た後、凍結乾燥して-80°C にて保存した。

e) rCRHRc 20 固定化カラムによる抗体の精製

rCRHRc 20 1 mg を Affi-Gell 10 Gell (Bio-Rad, USA) 1 ml に添付の手順に従い結合させて cCRHRc 20 固定化カラムを作製した。この rCRHRc 20 固定化カラムを 10~20 ml の TBS 緩衝液 (0.15 M の NaCl を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 7.5) で洗浄し、これに抗 CRH-R 抗血清 IgG 分画を TBS 緩衝液に溶解してカラムに添加した。4°C で一晩攪拌した後、カラムを TBS 緩衝液 10 ml, 洗浄緩衝液 (1 M NaCl と 1 % Triton X-100 を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 7.5) 20 ml, TBS 緩衝液 20 ml, さらに 0.15 M NaCl 10 ml で順次洗浄した。次に、1/2 カラム体積の溶出緩衝液 (0.1 M Gly-HCl, pH 2.3) 1 ml を少量ずつ添加し、1 M Tris 溶液 0.1 ml を加えた試験管に回収した。溶出分画の蛋白濃度を分光光度計 (波長 280 nm) で測定し、精製した抗体は分注して-80°C で凍結保存した。

4) 膜分画の調整

ラットをエーテル麻酔後、断頭屠殺し、速やかに各組織を採取し、10 倍量の 0°C のホモジネート液 (1 mM EDTA と 0.9 % NaCl を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 7.4) でホモジネートし、4°C で 755 × g, 10 分間遠沈した。その上清を分離し、4°C で 27,000 × g, 20 分間遠沈した。上清を捨て、残ったペレットを洗浄緩衝液 (0.5 M NaCl と 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 7.4) に懸濁し、遠心して洗浄した。この操作を 1 M および 2 M NaCl を含む同緩衝液にて各 1 回ずつ行った。最後に残った沈渣を保存緩衝液 (10 % v/v グリセロールを含むホモジネート液に leupeptin 0.1 mg/l, chromostatin 0.1 mg/l, pepstatin 0.1 mg/l および aprotinin 500 U/ml を加えたもの) に懸濁し、BCA 法 (BCA プロテインアッセイキット, PIERCE, USA) により蛋白量を測定し、-80°C で凍結保存した。

5) 抗体の特異性の検討

a) ELISA

前述の ELISA の系を用い精製抗 rCRHRc 20 の親和定数を Beatty らの方法により求めた¹⁴⁾。

b) ウェスタンブロット

ラットの各臓器から得られた膜分画 100 μ g を Lameri らの方法により SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、泳動終了後セミドライ転写装置 (ATTO 社, JAPAN) を用いてニトロセルロース膜 (Schleicher and Schuell 社, USA) へ転写した。転写終了後ニトロセルロース膜をブロッキング緩衝液 (0.01 M PBS, 5 % skim milk 加) 100 ml に移し、室温で 2 時間ブロッキングを行い、次にブロッキング緩衝液 20 ml で希釈 (3000 倍~150 倍) した精製抗 rCRHRc 20 と 4°C で 12~24 時間インキュベートした。次にニトロセルロース膜を 0.05 % Tween 20 を加えたブロッキング緩衝液で 5 分間ずつ 3 回洗浄し、その後ブロッキング緩衝液で 2000 倍希釈した第 2 抗体 (HRP-goat anti rabbit IgG, Zymed Laboratories, USA) に移し、37°C で 2 時間反応させた。反応後、洗浄緩衝液 (0.01 M PBS, 0.05 % Tween 20) で 5 分間ずつ 3 回洗浄した。結合した抗体の検出には化学蛍光法 (ECL-Western blot キット, Amersham 社, 英国) を用いた。吸収試験には一次抗体とのインキュベートの時に 100 μ g/ml の rCRHRc 20 を添加した。

c) 標識 CRH と抗 rCRHRc 20 による CRH-R の二重標識

¹²⁵I 標識 rCRH (ペプチド研, 大阪) をヨードゲン法で作製した (比放射活性 1.1 mCi/ μ g)。

ラット下垂体ならびに副腎の凍結膜分画 100 μ g を解凍後 4°C で 13,000 $\times$ g 10 分間遠沈し、沈渣に結合緩衝液 (40 mM/l EDTA-Na₂, bacitracin および 0.1 % BSA を含む 50 mM/l Tris-HCl 緩衝液, pH 7.4) 100 μ l と ¹²⁵I-標識 CRH 100 μ l (30,000 cpm) ならびに 50 μ g/ml 非標識 CRH 100 μ l または結合緩衝液 100 μ l を加え、25°C, 30 分間インキュベートした⁸⁾。次に反応液を 4°C, 20,000 $\times$ g で 5 分間遠沈し、沈渣を SDS-PAGE 用泳動用緩衝液 100 μ l に加えて攪拌し、室温で一夜インキュベートし、10 % ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行いニトロセルロース膜へ転写し、上述のように精製抗 rCRHRc 20 を用いてウェスタンブロットを行った。最後に化学発光が消失したのを確認の後、ニトロセルロース膜のオートラジオグラフィを行った。

d) 抗 rCRHRc 20 による免疫沈降と N-グリカナーゼ処理

ラット下垂体ならびに副腎の膜分画 10 μ g をヨードゲン法で ¹²⁵I によりヨード化した。ヨード化物 0.5 ml に 0.25 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) 2.5 ml, 10 倍濃度の免疫沈降緩衝液 (150 mM NaCl, 1 mM EDTA および 10 % Nonidet P40 を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 7.5) 300 μ l と精製抗 rCRHRc 20 200 μ l を試験管内で加え、4°C で 12 時間インキュベートした。さらに、プロテイン A セファロースを 100 μ l 加え、室温で 2 時間攪拌し、755 $\times$ g 5 分間遠沈した。沈渣を 10 % Nonidet P 40 を含まない免疫沈降緩衝液 1.2 ml で 2 回洗浄し、13,000 $\times$ g 30 秒間の遠沈を行い、沈渣に 0.5 % SDS と 1 % 2-メルカプトエタノールを含む 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 8.0) 30 μ l 加え 3 分間煮沸した後、13,000 $\times$ g, 30 秒間で遠沈した。この 10 μ l の上清と 1.55 % Triton X-100 を含む 44 mM 磷酸緩衝液 (pH 8.0) 37 μ l および N-グリカナーゼ (10 U/40 μ l) 3 μ l を加え、37°C で 12 時間インキュベートした。その後、この反応液で SDS-PAGE (10 % ゲル) を行い、ゲルを乾燥後オートラジオグラフィを行った。

e) 免疫組織化学

SD 系雄 9 週齢ラットをペントバルビタール麻酔下に 4 % パラホルムアルデヒド (0.1 M 磷酸緩衝液, pH 7.4) で経心性灌流固定し, 下垂体を採取した。組織を同固定液で一晩浸漬固定し, エタノール脱水後, パラフィン包埋して, 5 μ m 厚の連続切片を作製した。免疫染色はアビジン-ビチオン-ペルオキシダーゼ複合体 (ABC) 法により以下のように行った。切片を脱パラフィン後, 3 % 過酸化水素水により室温で 15 分間処理した。一部の切片については 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で 10 分間, マイクロウェーブ照射後, 同様に過酸化水素水処理を行った。次に, 切片を精製抗 rCRH-R 抗体 (10 % 正常ヤギ血清, 0.1 % KLH および 0.1 % アジ化ナトリウムを含む 0.02 M PBS pH 7.4) 中に 4°C で一晩処理した。PBS で洗浄後, ビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG (200 倍希釈) と ABC (ベクター社, エリートキット) でそれぞれ 37°C, 1 時間処理し免疫反応をジアミノベンジンと過酸化水素で標識した。

抗体の吸収試験では rCRHRc 20 (100 μ g/ml) を一次抗体に添加した。

結 果

1) 抗 rCRHRc 20 の抗体価

4 週目より 2 匹の家兎に抗体価の上昇を認めた。その後 3 回の追加免疫により抗体価は 12,000 倍まで上昇した。

2) 特異性の検討

a) ELISA による抗 rCRHRc 20 の親和性

精製抗 rCRHRc 20 の親和定数 (K_a) は $1.04 \pm 0.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ であった。

b) ウェスタンブロット

① 原抗血清を用いたブロット

ラットの下垂体, 副腎の多数のバンドが認められ, 合成 rCRHRc 20 を用いた吸収試験でもバンドの消失は認められなかった。(data not shown)

② 精製抗 rCRHRc 20 を用いたブロット

ラット下垂体では, 分子量 75 kDa のバンドが主として認められたが, 副腎では 75 kDa と 58 kDa の 2 本のバンドが主として認められた。吸収試験では 75 kDa のバンドは消失したが, 58 kDa のバンドは完全には消失しなかった (Fig. 1-b, c)。

c) 受容体の二重標識

^{125}I -合成 CRH を結合した CRH 受容体はラットの下垂体では 75 kDa の 1 本のバンドが, 副腎では 75 kDa と 58 kDa の 2 本のバンドが認められた。いずれのバンドも非標識 CRH により減弱あるいは消失した (Fig. 1-a)。同時に行ったウェスタンブロットでは下垂体で 75 kDa, 副腎で 75 kDa, 58 kDa のバンドがオートラジオグラフィーのバンドに一致して認められた。(Fig. 1-b)。

d) 受容体の免疫沈降と N-グリカナナーゼ処理

rCRHRc 20 を用いた免疫沈降では, ウェスタンブロットの場合と同様にラット下垂体で 75 kDa, 副腎で 75 kDa と 58 kDa のバンドを認めた。これらのバンドは N-グリカナナーゼ処理により減弱あるいは消失した。一方, 40~45 kDa のバンドは N-グリカナナーゼ処理後に増強した (Fig. 2)。

Fig. 1 Double-labeling of rCRH-R using anti-rCRHRc 20. (a) (b) 100 μ g of membrane fractions prepared from rat pituitary and adrenal gland were incubated with 125 I-CRH in the absence (-) or presence (+) of unlabeled CRH. The samples were transferred to nitrocellulose membrane after SDS-PAGE. The autoradiography of the membrane (a) were performed after immunoblotting (b). (c) Immunoblotting using anti-rCRHRc 20 in the presence of synthetic rCRHRc 20 (100 μ g/ml).

e) 免疫組織化学

下垂体, 副腎のいずれにも陽性細胞が見出された。下垂体の陽性細胞は隣接切片による検討で ACTH 陽性であった。rCRHRc 20 を用いた抗体の吸収試験は陰性であった。(data not shown)

3) CRH 受容体の組織分布

ウエスタンブロットを用いてラットの各臓器における CRH-R の発現を検討したところ、Fig. 3 に示すように、視床下部、下垂体、小脳、胸腺、副腎、卵巣および胎盤の全てにおいて 75 kDa のバンドの発現を認めた。さらに視床下部、小脳、副腎、卵巣および胎盤では明確な 58 kDa のバンドを認めた。

Fig. 2 Immunoprecipitation and N-glycanase treatment of rCRHR. After iodination of 10 μ g of rat pituitary or adrenal membrane fraction, the membrane proteins were solubilized and immunoprecipitated using anti-rCRHRc 20. The precipitates were treated with N-glycanase (10 U/40 μ l).

Fig. 3 Western blotting of membrane fractions from various tissues of rats using anti-rCRHRc 20.

考 察

CRH 受容体蛋白の組織分布ならびに局在細胞を同定するためラット CRH 受容体 (rCRH-R) の C 末端の 20 個のアミノ酸配列を基にペプチド (rCRHRc 20) を合成し, この合成フラグメントに対する抗体を作製した。我々が rCRH-R の C 末端ペプチドを抗体の作製に選んだ理由は, この C 末端のアミノ酸配列が各種の膜貫通型ホルモン受容体のアミノ酸配列と相同性が低いこと, 同部位はセリン, スレオニン残基に富み, 細胞内のプロテインキナーゼによるリン酸化を受ける可能性があり, 細胞の機能状態の評価が免疫組織化学的に可能ではないかと考えたからである。

原血清による抗体の特異性の検討では満足 of いく結果は得られなかったため, rCRHRc 20 固定化カラムにより抗 rCRHRc 20 の精製を行った。精製抗 rCRHRc 20 の rCRHRc 20 フラグメントに対する親和定数は $1.04 \pm 0.50 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ で, ウェスタンブロットでは 75 kDa と 58 kDa の二本のバンドを認め, ラット下垂体の免疫組織化学染色において ACTH 細胞が染色された。しかし, rCRHRc 20 を用いた抗体の吸収試験ではウェスタンブロットの 75 kDa のバンドは消失を認めたが 58 kDa のバンドの消失は認めなかった。免疫組織化学的にも吸収試験は陰性であり, この抗体は特異的な 75 kDa の蛋白以外に非特異的蛋白をも認識していることが考えられた。そのため, 標識 CRH と精製抗 rCRHRc 20 による二重標識ならびに膜分画と精製抗 rCRHRc 20 により得られた免疫沈降物の糖鎖切断の 2 つの方法で抗体の特異性をさらに検討したところ, 標識 CRH によりラベルされる蛋白と精製抗 rCRHRc 20 の認識する蛋白の分子量は等しく, 免疫沈降物の N-グリカナーゼ処理により 75 kDa と 58 kDa のバンドが消失し, 40~50 kDa のバンドが増強した。この結果は我々の精製抗 rCRHRc 20 は CRH と結合能を有する分子量の異なる 2 種類の蛋白を認識し, かつその蛋白の分子量の違いは糖鎖によるものであることを示唆した。Gligoriadis らも標識 CRH を用いたラベリング実験により rCRH-R は下垂体では 75 kDa, 脳では 58 kDa あること, N-グリカナーゼ処理により両方のバンドは共に 40~45 kDa となることを報告しており⁴¹⁾, また cDNA から同様の分子量と考えられている²³⁾。

以上より, 我々の作製した抗体は CRH との結合能を有する 58 kDa の蛋白と非特異的に結合するものの, 75 kDa の CRH-R を特異的に認識するため, CRH-R 蛋白のウェスタンブロットによる検討は可能であると考えられた。一方, 免疫組織染色の場合は染色された蛋白の特異性の判定は困難と考えられたため, 本抗体による検討は以後行わなかった。

CRH は視床下部, 小脳, 胸腺, 副腎, 卵巣および胎盤での発現が認められている。その作用としては, 下垂体における ACTH-副腎皮質系のホルモン分泌調節のみならず, 中枢神経系では神経伝達物質あるいはモジュレーターとして, 交感神経節では末梢の自律神経系の調節を行っている¹⁶⁾。また, 脾臓, 卵巣, 胎盤では局所ホルモンあるいはサイトカインとして重要な役割を果たしている^{917)~19)}。我々はウェスタンブロットにより視床下部, 下垂体, 小脳, 胸腺, 副腎, 卵巣および胎盤の全てに 75 kDa の CRH-R 蛋白の存在を確認し, CRH が下垂体以外の組織においても下垂体と同一の CRH-R を介して作用することが明らかとなった。

我々の作製した抗体が CRH との結合能を有する 58 kDa の蛋白を非特異的に認識することより, CRH-R 類似の膜蛋白の存在が考えられたが, 本論文執筆中に, 新しい CRH-R がクローニングされ

CRH 2 型受容体 (CRH-R type II) と命名された^{20,23)}。CRH-R type II は 411 個のアミノ酸残基よりなり、今回我々が、抗体を作製するために用いた CRH-R type I とはアミノ酸レベルで 69 % と高い相同性を有している。rCRHRc 20 に相当する部位にはわずか 3 個の違いしか認めないため、我々の精製抗 rCRHRc 20 が CRH-R type II と交差反応を示す可能性が十分に考えられる。ウエスタンブロットでは 58 kDa の蛋白は下垂体と胸腺では認められなかったが、その他の臓器では発現を認めた。RT-PCR ならびに in situ hybridization による CRH-R type II mRNA の検討では、ラットの脳、肺、心臓、マウスの心臓、骨格筋、消化管、副睾丸に発現を認めるが、下垂体には明らかな発現は認められていない^{21)~23)}。さらに CRH-R type II はスプライシングにより少なくともアミノ酸 411 個の α と 431 個の β の 2 つのアイソフォームの存在することが見出され²⁴⁾、in situ hybridization により α は視床下部、 β は肺、心臓、脳、海馬と選択的な組織発現が認められている²⁵⁾。以上の事実は、我々の抗体が非特異的に結合する 58 kDa の蛋白が CRH-R type II である可能性を否定するものではない。CRH-R type II に特異的なリガンドが存在しないため、現時点ではアフィニティーラベルによる CRH-R type II の分子量の検討は不可能であり、CRH-R type II に特異的な抗体を作製しウエスタンブロットによる検討が今後必要と考えられる。

結 語

合成 rCRHRc 20 を用いて家兔を免疫し、抗 rCRHRc 20 を作製した。精製抗 rCRHRc 20 の特異性を ELISA、ウエスタンブロット、免疫組織化学、免疫沈降により検討した結果、本抗体は 75 kDa の CRH-R 蛋白を特異的に認識することが明らかとなった。この抗体を用いたウエスタンブロットでは視床下部、下垂体、小脳、胸腺、副腎、卵巣、胎盤で 75 kDa の受容体蛋白の存在が確認され、これらの下垂体以外の組織においても下垂体と同一の CRH-R を介して CRH の情報が細胞内へ伝達されることが示唆された。

文 献

- 1) Aguilera, G., Harwood, J.P., Wilson, J.X., Morell, J., Brown, J.H. and Catt, K.J.: Mechanisms of action of corticotropin-releasing factor and other regulators of corticotropin release in rat pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 1983; 258: 8039 - 8045
- 2) Perrin, M.H., Donaldson, C.J., Chen, R., Lewis, K.A. and Vale, W.W.: Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinology*. 1993; 133: 3058 - 3061
- 3) Chen, R., Lewis, K.A., Perrin, M.H. and Vale, W.W.: Expression cloning of a human corticotropin-releasing factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993; 90: 9867 - 9871
- 4) Grigoriadis, D.E., Heroux, J.A. and De Souza, E.B.: Characterization and regulation of corticotropin-releasing factor receptors in the central nervous, endocrine and immune systems. *Ciba Foundation Symposium*. 1993; 172: 85 - 107
- 5) Millan, M.A., Jacobowitz, D.M., Hauger, R.L., Catt, K.J. and Aguilera, G.: Distribution of corticotropin-releasing factor receptors in primate brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986; 83: 1921 - 1925
- 6) Dave, J.R., Eiden, L.E. and Eskey, R.L.: Corticotropin-releasing factor binding to peripheral tissue and activation of the adenylate cyclase adenosine 3', 5'-monophosphate system. *Endocrinology*. 1985; 116: 2152 - 2159
- 7) Grigoriadis, D.E. and De Souza, E.B.: The brain corticotropin-releasing factor (CRF) receptor is of lower apparent molecular weight than the CRF receptor in anterior pituitary. *J. Biol. Chem.* 1988; 263, 10927 - 10931
- 8) Millan, M.A., Samra, A., Wynn, P.C., Catt, K.J. and Aguilera, G.: Receptors and actions of corticotropin-releasing hormone in the primate pituitary gland. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1987; 64: 1036 - 1041

- 9) Webster, E.L. and De Souza, E.B.: Corticotropin-releasing factor receptors in mouse spleen: identification, autoradiographic localization, and regulation by divalent cations and guanine nucleotides. *Endocrinology*. 1988; 609 – 617
- 10) Mastorakos, G., Scopa, C.D., Vryonidou, A., Friedman, T.C., Kattis, D., Phenekos, C., Merino, K.J. and Chrousos, G.P.: Presence of immunoreactive corticotropin-releasing hormone in normal and polycystic human ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994; 79: 1191 – 1197
- 11) Karalis, K., Sano, H., Redwine, J., Listwak, S., Wilder, R.L. and Chrousos, G.P.: Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science*. 1991; 254: 421 – 423
- 12) Crofford, L.J., Sano, H. and Karalis, K.: Local secretion of corticotropin-releasing hormone in the joints of Lewis rats with inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest.* 1992; 90: 2555 – 2564
- 13) Yoon, D.J., Sklar, C. and David, R.: Presence of immunoreactive corticotropin-releasing factor in rat testis. *Endocrinology*. 1988; 122: 759 – 761
- 14) Beatty, J.D., Beatty, B.G. and Vlahos, W.G.: Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *J. Immunol. Methods*. 1987; 100: 173 – 179
- 15) Grigoriadis, D.E. and De Souza, E.B.: Heterogeneity between brain and pituitary corticotropin-releasing factor receptor is due to differential glycosylation. *Endocrinology*. 1989; 125: 1877 – 1888
- 16) Udelsman, R., Harwood, J.P., Millan, M.A., Chrousos, G.P., Goldstein, D.S., Zimlichman, R., Catt, K.J. and Aguilera, G.: Functional corticotropin releasing factors in the primate peripheral sympathetic nervous system. *Nature*. 1986; 319: 147 – 150
- 17) Frim, D.M., Emanuel, R.L., Robinson, B.G., Smas, C.M., Adler, G.K. and Majzoub, J.A.: Characterization and gestational regulation of corticotropin-releasing hormone messenger RNA in human placenta. *J. Clin. Invest.* 1988; 82: 287 – 292
- 18) Goland, R.S., Wardlaw, S.L., Stark, R.I., Brown, Jr. L.S. and Frntz, A.G.: High level of corticotropin-releasing hormone immunoactivity in maternal and fetal plasma during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1986; 63: 1199 – 1203
- 19) Goland, R.S., Jozak, S., Warren, W.B., Cowell, I.M., Stark, R.I. and Tropper, P.J.: Elevated levels of umbilical cord plasma corticotropin-releasing hormone in growth-retarded fetuses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993; 77: 1174 – 1179
- 20) Lovenberg, T.W., Liaw, C.W., Grigoriadis, D.E., Clevenger, W., Chalmers, D.T., De Souza, E.B. and Oltersdorf, T.: Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92: 836 – 840
- 21) Stenzel, P., Kesterson, R., Yeung, W., Cone, R.D., Rittenberg, M.B. and Stenzel-Poore, M.P.: Identification of a novel murine receptor for corticotropin-releasing hormone expressed in the heart. *Mol. Endocrinol.* 1995; 9: 637 – 645
- 22) Perrin, M., Donaldson, C., Chen, R., Blount, A., Berggren, T., Bilezikjian, L., Sawchenko, P. and Vale, W.: Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92: 2969 – 2973
- 23) Kishimoto, T., Pearse, R.V., Lin, C.R. and Rosenfeld, M.G.: A sauvagine/corticotropin-releasing factor receptor expressed in heart and skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92: 1180 – 1112
- 24) Lovenberg, T.W., Liaw, C.W., Grigoriadis, D.E., Clevenger, W., Chalmers, D.T., De Souza, D.E. and Oltersdorf, T.: Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing-factor receptor subtype from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92: 836 – 840
- 25) Lovenberg, T.W., Chalmers, D.T., Liu, C. and De Souza, E.B.: CRF_{2α} and CRF_{2β} mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology*. 1995; 136: 4139 – 4142

(受付日: '96, 1, 16)

(採択日: '96, 4, 3)

特 別 掲 載