(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3540009号

(P3540009)

(45)発行日　平成16年7月7日(2004.7.7)　(24)登録日　平成16年4月2日(2004.4.2)

(51)Int.Cl.[7]	F I
C12N 15/00	C12N 15/00
C07K 14/705	C07K 14/705
C07K 16/28	C07K 16/28
C12N 1/15	C12N 1/15
C12N 1/19	C12N 1/19

請求項の数 8　(全 28 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平6-124028
(22)出願日　平成6年6月6日(1994.6.6)
(65)公開番号　特開平7-327676
(43)公開日　平成7年12月19日(1995.12.19)
審査請求日　平成13年5月25日(2001.5.25)

(73)特許権者　000006677
山之内製薬株式会社
東京都中央区日本橋本町２丁目３番１１号
(74)復代理人　100109357
弁理士　矢野　恵美子
(74)代理人　100089200
弁理士　長井　省三
(74)代理人　100098501
弁理士　森田　拓
(72)発明者　斎藤　仁之
茨城県つくば市二の宮３丁目１３番地の１　ルーミーにのみや３１３
(72)発明者　杉本　貫
茨城県つくば市二の宮３丁目１３番地の１　ルーミーにのみや４１５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】バソプレッシンＶ１ｂ受容体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

配列番号２記載のアミノ酸配列からなるバソプレッシンＶ１ｂ受容体ポリペプチド、または、配列番号２記載のアミノ酸配列の中の一つ若しくは二つ以上の部位において，一つ若しくは二つ以上のアミノ酸残基が欠失，挿入若しくは置換されており、かつ、バソプレッシン結合活性を有するポリペプチド。

【請求項２】

配列番号２記載のアミノ酸配列からなる請求項１記載のポリペプチド。

【請求項３】

請求項１又は請求項２記載のポリペプチドをコードする塩基配列からなるＤＮＡ。

【請求項４】

請求項２記載のポリペプチドをコードする塩基配列からなるＤＮＡを含有する組換えベクター。

【請求項５】

請求項４記載の組換えベクターで形質転換された細胞。

【請求項６】

請求項５記載の細胞から調製したヒトバソプレッシンＶ１ｂ受容体を含む膜分画。

【請求項７】

請求項２記載のポリペプチドをコードするＤＮＡを組込んだ発現プラスミドを動物細胞に移入したＶ１ｂ受容体発現細胞，または該細胞膜分画を取得し，被験薬物による、標識リ

ガンドとヒトバソプレッシンＶ１ｂ受容体の結合阻害実験を行い，標識リガンドの該細胞あるいは該細胞膜分画への結合量を定量することによるヒトバソプレッシンＶ１ｂ受容体に作動性の薬物のスクリーニング法。

【請求項８】

請求項２記載のポリペプチドに結合するモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【産業上の利用分野】

本発明は，新規なバソプレッシンＶ１ｂ（以下，Ｖ１ｂという）受容体のポリペプチド，この新規なポリペプチドをコードしているＤＮＡ，該ＤＮＡを含有するベクター，該ベクターを含有する形質転換細胞及び該細胞を使用した薬物スクリーニング法に関するものである。

【０００２】

【従来の技術】

バソプレッシンは，生体内で血圧調節をはじめとした，種々の役割を果す重要な生理活性ペプチドである。このペプチドの生理作用は，他の生理活性物質と同様に，ペプチドが受容体に結合することにより誘導される。現在，このペプチドが結合する受容体は，性質の異なるものが複数存在する事が示されている。それぞれの受容体の性質を明らかにすることはバソプレッシンの生理的役割の解明，引いては，バソプレッシン系の異常により引き起こされる疾患の解明，治療法の発見等につながるものと考えられる。

【０００３】

バソプレッシン受容体は，オキシトシン受容体も含めてバソプレッシン／オキシトシン受容体群と考えられている。オキシトシン受容体はバソプレッシンよりも，オキシトシンがより強く結合する受容体である。バソプレッシン受容体はいずれもオキシトシンよりもバソプレッシンが強く結合する受容体だが，バソプレッシン受容体拮抗剤によるリガンド－受容体の結合阻害実験から大きく２種類［バソプレッシンＶ１（以下，Ｖ１という）受容体，及びバソプレッシンＶ２（以下，Ｖ２という）受容体］に分類することができる。Ｖ１受容体は，バソプレッシン受容体拮抗剤［ｄＰｅｎ^{1}，Ｔｙｒ（Ｍｅ）^{2}，Ａｒｇ^{8}］ｖａｓｏｐｒｅｓｓｉｎにより選択的に阻害される受容体であり（Ｂａｎｋｏｗｓｋｉ，Ｋ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，２１，８５０（１９７８）），Ｖ２受容体はバソプレッシン受容体拮抗剤［ｄ（CH_2）$_5^1$，Ｄ－Ｉｌｅ^{2}，Ｉｌｅ^{4}，Ａｒｇ^{8}］ｖａｓｏｐｒｅｓｓｉｎにより選択的に阻害される受容体である（Ｍａｎｎｉｎｇ，Ｍ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，２７，４２３（１９８４））。

このうちＶ１受容体は更に，バソプレッシン受容体拮抗剤［ｄ（CH_2）$_5^1$，Ｔｙｒ（Ｍｅ）^{2}，Ａｒｇ^{8}］ｖａｓｏｐｒｅｓｓｉｎ阻害の強さの違いからＶ１ａ受容体とＶ１ｂ受容体の２つに分類されている［Ｋｒｕｓｚｙｓｋｉ，Ｍ．，ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，２３，３６４（１９８０），Ａｎｔｏｍｉ，Ｆ．Ａ．，Ｎｅｕｒｏｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．，３９，１８６－１８８（１９８４］。

【０００４】

バソプレッシン受容体の遺伝子は，Ｖ２受容体に関してはヒト腎臓（Ｂｉｒｎｂａｕｍｅｒ Ｍ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３７５，３３３‐３３５（１９９２）），ラット腎臓（Ｌｏｒａｉｔ Ｓ．Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３５７，３３６‐３３９（１９９２）），ブタ腎臓由来細胞株（Ｇｏｒｂｕｌｅｖ，Ｖ．，ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２１５，１‐７（１９９３））より単離されている。また，Ｖ１ａ受容体に関しては，ラット肝臓（Ｍｏｒｅｌ Ａ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３５６，５２３‐５２６（１９９２）），ヒト肝臓（Ｍａｒｃ Ｔ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６９，３３０４‐３３１０（１９９４））より単離されている。さらに，オキシトシン受容体に関しては，ヒト子宮（Ｋｉｍｕｒａ Ｔ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３５６，５２６‐５２９（１９９２）），ブタ腎臓由来細胞株（Ｇｏｒｂｕｌｅｖ，Ｖ．，ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２１５，１

‐７（１９９３））より単離されている。
しかしながら現時点では，Ｖ１ｂ受容体の遺伝子はどの種においても単離されていない。
【０００５】
各受容体は組織特異的に発現していることが知られている。Ｖ２受容体は，腎臓の尿細管に発現しており，抗利尿作用を通して，血圧の調節に関与していると考えられている。また，Ｖ１ａ受容体は肝臓，血小板，血管平滑筋、腎メサンギウム細胞などに発現しており，糖代謝，凝集，血圧調節に関与すると考えられている（Ｆｅｒｅｎｃ Ａ．Ｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ ｒｅｖｅｗ，４３，７３‐１００（１９９１））。さらにオキシトシン受容体は主に産褥期の子宮に発現しており，子宮の収縮に関与していると考えられている（Ｋｉｍｕｒａ Ｔ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３５６，５２６‐５２９（１９９２））。一方，Ｖ１ｂ受容体は脳下垂体前葉に発現しており，ＡＣＴＨ，β－エンドロフィンの分泌制御などに関与していると考えられている（Ａｎｄｒｅａｓ ｋ．，Ａｃｔａ Ｅｎｄｏｃｌｉｎｏｌｏｇｉｃａ，１２９，４８９－４９６（１９９３））。
従って，Ｖ１ｂ受容体に関与している疾患過程の究明において，Ｖ１ｂ受容体及びその遺伝子が望まれている。
【０００６】
更に，受容体に関係した薬物の探索は，リガンドと受容体の結合阻害実験で行われている。この結合阻害実験では，放射性元素で標識されたリガンドと受容体を高発現した動物組織を用いて実施される。使用する動物組織は，現実的にはヒト以外の入手可能な動物組織が選ばれる。しかしながら，受容体の性質は，動物種の差によって異なることが常である。
よって，ヒトの疾患改善を目的とした薬物の探索においても，ヒト由来の受容体が必要とされている。
【０００７】
【発明が解決しようとする課題】
本発明の目的は，ヒトＶ１ｂ受容体又は該受容体と同等の機能を有するポリペプチドをコードする遺伝子を提供することである。また，本発明の別の目的は，該遺伝子を用いて発現させたヒトＶ１ｂ受容体または該受容体と同様の機能を有するポリペプチドを提供することである。さらに，ヒトＶ１ｂ受容体のポリペプチドを使用したヒトＶ１ｂ受容体に作動性の薬物（例えばＶ１ｂ受容体拮抗剤等）のスクリーニング法を提供することである。
【０００８】
【課題を解決するための手段】
本発明者らは，遺伝子工学的な手法を用いて，鋭意研究を行なった結果，配列番号２記載のアミノ酸配列からなるヒトＶ１ｂ受容体ポリペプチド，前記ポリペプチドをコードする塩基配列からなるヒトＶ１ｂ受容体をコードするＤＮＡもしくは配列番号１記載の塩基配列からなるヒトＶ１ｂ受容体をコードするＤＮＡ，前記ＤＮＡを含有する組換えベクター，前記組換えベクターで形質転換された細胞を見出し本発明を完成した。
【０００９】
以下，本発明Ｖ１ｂ受容体につき詳述する。
（製造法）
第１製法
ヒトＶ１ｂ受容体ＤＮＡを産生する能力を有するヒト細胞あるいは組織からｍＲＮＡを抽出する。次いでこのｍＲＮＡを鋳型として該受容体ｍＲＮＡまたは一部のｍＲＮＡ領域をはさんだ２種類のプライマーを用いる。逆転写酵素－ポリメラーゼ連鎖反応（以下ＲＴ－ＰＣＲという）を行うことにより，該受容体ｃＤＮＡまたはその一部を得ることができる。さらに，得られたヒトＶ１ｂ受容体ｃＤＮＡまたはその一部を適当な発現ベクターに組み込むことにより，宿主細胞を発現させ，該受容体ＤＮＡを製造することができる。
１）ｍＲＮＡの抽出
本発明のヒトＶ１ｂ受容体ＤＮＡは該受容体産性能力を有するヒト細胞，例えばヒト脳下

垂体細胞から該受容体をコードするものを包含するｍＲＮＡを既知の方法により抽出する。
抽出法としては，グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法，グアニジン・チオシアネート－グアニジン・塩酸法等が挙げられるが，好ましくはグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法が挙げられる。
２）ｍＲＮＡの精製
ｍＲＮＡの精製は常法に従えばよく，例えばｍＲＮＡをオリゴ（ｄＴ）セルロースカラムに吸着・溶出させ，精製することができる。さらに，ショ糖密度勾配遠心法等によりｍＲＮＡをさらに分画することもできる。
また，ｍＲＮＡを抽出せずとも，抽出済ｍＲＮＡが市販されている。
上記のｍＲＮＡがヒトＶ１ｂ受容体をコードするものを含むことを確認するためには，ｍＲＮＡを翻訳させ，該受容体に特異的な抗体を作用させて検出する等の方法で行うことができる。
【００１０】
例えば，アフリカツメガエル（Ｘｅｎｏｐｕｓ　ｌａｅｖｉｓ）の卵母細胞にｍＲＮＡを注入して翻訳させたり（Ｇｕｒｄｏｎ，Ｊ．Ｂ．　ｅｔ　ａｌ．（１９７２）Ｎａｔｕｒｅ　２３３，１７７－１８２），あるいはウサギ網状赤血球系や小麦胚芽系を利用した翻訳反応が行われている（Ｓｃｈｌｅｉｆ，Ｒ．Ｆ．ａｎｄ　Ｗｅｎｓｉｎｋ，Ｐ．Ｃ．（１９８１）：“　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　”，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌｏｇ，ＮＹ．）。
３）第１鎖ｃＤＮＡの合成及び該ｃＤＮＡを鋳型としたＰＣＲ
精製されたｍＲＮＡをランダムプライマー又はオリゴｄＴプライマーの存在　下で，逆転写酵素反応を行い第１鎖ｃＤＮＡを合成する。
この合成は常法によって行うことができる。
得られた第１鎖ｃＤＮＡを用い，目的遺伝子の一部の領域をはさんだ２種類のプライマーを用いてＰＣＲに供し，目的とするヒトＶ１ｂ受容体ＤＮＡを増幅する。
得られたＤＮＡをアガロースゲル電気泳動等により分画する。
所望により，上記ＤＮＡを制限酸素等で切断し，接続することによって目的とするＤＮＡ断片を得ることもできる。
【００１１】
第２製法：
本発明の遺伝子は上述の製造法の他，常法の遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。まず，前述２）で得たｍＲＮＡを鋳型として逆転写酵素を用いて１本鎖ｃＤＮＡを合成した後，この１本鎖ｃＤＮＡから２本鎖ｃＤＮＡを合成する。その方法としてはＳｉヌクレアーゼ法（Ｅｆｓｔｒａｔｉａｄｉｓ，Ａ．ｅｔ　ａｌ．（１９７６）Ｃｅｌｌ　７．　２７９－２８８），Ｌａｎｄ法（Ｌａｎｄ，Ｈ．　ｅｔ　ａｌ．（１９８１）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．９．２２５１－２２６６），Ｏ．Ｊｏｏｎ　Ｙｏｏ法（Ｙｏｏ，Ｏ．Ｊ．　ｅｔ　ａｌ．（１９８３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７９，１０４９－１０５３），Ｏｋａｙａｍａ－Ｂｅｒｇ法（Ｏｋａｙａｍａ，Ｈ．ａｎｄ　Ｂｅｒｇ，Ｐ．（１９８２）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．２，１６１－１７０）などが挙げられる。
次に，上述の方法で得られる組換えプラスミドを大腸菌，例えばＤＨ５α株に導入して形質転換させて，テトラサイクリン耐性あるいはアンピシリン耐性を指標として組換体を選択することができる。宿主細胞の形質転換は，例えば，宿主細胞が大腸菌の場合にはＨａｎａｈａｎの方法（Ｈａｎａｈａｎ，Ｄ．（１９８３）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１６６，５５７－５８０），すなわち$CaCl_2$や$MgCl_2$または$RbCl$を共存させて調製したコンピテント細胞に該組換えＤＮＡ体を加える方法により実施することができる。なお，ベクターとしてはプラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターも用いることができる。
上記により得られる形質転換株から，目的のヒトＶ１ｂ受容体のＤＮＡを有する株を選択

する方法としては，例えば以下に示す各種方法を採用できる。
【００１２】
▲１▼　合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法
ヒトＶ１ｂ受容体の全部または一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し（この場合コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列または考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数個のヌクレオチド配列のどちらでもよく，また後者の場合，イノシンを含ませてその種類を減らすこともできる），これをプローブ（^{32}Ｐ又は^{33}Ｐで標識する）として，形質転換株のＤＮＡを変性固定したニトロセルロースフィルターとハイブリダイズさせ，得られたポジティブ株を検索して，これを選択する。
▲２▼　ポリメラーゼ連鎖反応により作製したプローブを用いるスクリーニング法
ヒトＶ１ｂ受容体の一部に対応するセンスプライマーとアンチセンスプライマーのオリゴヌクレオチドを合成し，これらを組合せてポリメラーゼ連鎖反応（Ｓａｉｋｉ，Ｒ．ｋ．ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３９，４８７－４９１）を行い，目的のヒトＶ１ｂ受容体の全部又は一部をコードするＤＮＡ断片を増幅する。ここで用いる鋳型ＤＮＡとしては，ヒトＶ１ｂ受容体を産生する細胞のｍＲＮＡより逆転写反応にて合成したｃＤＮＡ，またはゲノムＤＮＡを用いることができる。このようにして調製したＤＮＡを断片を^{32}Ｐ又は^{33}Ｐで標識し，これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーションまたはプラークハイブリダイゼーションを行うことにより目的のクローンを選択する。
【００１３】
▲３▼　他の動物細胞でヒトＶ１ｂ受容体を産生させてスクリーニングする方法
形質転換株を培養し，遺伝子を増幅させ，その遺伝子を動物細胞にトランスフェクトし（この場合，自己複製可能で転写プロモーター領域を含むプラスミドもしくは動物細胞の染色体に組み込まれ得るようなプラスミドのいずれでもよい），遺伝子にコードされた蛋白を細胞表面に産生させる。ヒトＶ１ｂ受容体に対する抗体を用いて該受容体を検出することにより，又はバソプレッシンとの結合を指標として元の形質転換株より目的のヒトＶ１ｂ受容体をコードするｃＤＮＡを有する株を選択する。
▲４▼　ヒトＶ１ｂ受容体に対するバソプレッシンの結合を指標として選択する方法
あらかじめ，ｃＤＮＡを発現ベクターに組込み，形質転換株表面で蛋白を産生させ，標識したバソプレッシンを用いて所望のヒトＶ１ｂ受容体産生株を検出し，目的株を選択する。
▲５▼　ヒトＶ１ｂ受容体に対する抗体を用いて選択する方法
あらかじめ，ｃＤＮＡを発現ベクターに組込み，形質転換株表面で蛋白を産生させ，ヒトＶ１ｂ受容体に対する抗体および該抗体に対する２次抗体を用いて，所望のヒトＶ１ｂ受容体産生株を検出し，目的の株を選択する。
▲６▼　セレクティブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーションの系を用いる方法
形質転換株から得られるｃＤＮＡを，ニトロセルロースフィルター等にブロットしヒトＶ１ｂ受容体細胞からのｍＲＮＡをハイブリダイズさせた後，ｃＤＮＡに結合したｍＲＮＡを解離させ，回収する。回収されたｍＲＮＡを蛋白翻訳系，例えばアフリカツメガエルの卵母細胞への注入や，ウサギ網状赤血球ライゼートや小麦胚芽等の無細胞系で蛋白に翻訳させる。ヒトＶ１ｂ受容体に対する抗体を用いて検出して，目的の株を選択する。
得られた目的の形質転換株よりヒトＶ１ｂ受容体をコードするＤＮＡを採取する方法は，公知の方法（Ｍａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．ｅｔ　ａｌ．（１９８２）：“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ－Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ”Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，　ＮＹ）に従い実施できる。例えば細胞よりプラスミドＤＮＡに相当する画分を分離し，該プラスミドＤＮＡよりｃＤＮＡ領域を切り出すことにより行ない得る。
【００１４】
得られた目的の形質転換株よりヒトＶ１ｂ受容体をコードするＤＮＡを採取する方法は，公知の方法（Ｍａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．ｅｔ　ａｌ．（１９８２）：“Ｍｏｌｅｃｕｌ

ａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ ”Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，ＮＹ）に従い実施できる。例えば細胞よりプラスミドＤＮＡに相当する画分を分離し，該プラスミドＤＮＡよりｃＤＮＡ領域を切り出すことにより行ない得る。

以上，得られるＤＮＡの配列決定は，例えばマキサム－ギルバートの化学修飾法（Ｍａｘａｍ，Ａ．Ｍ．ａｎｄ Ｇｉｌｂｅｒｔ，Ｗ．（１９８０）：“ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ ”６５，４９９－５５９）やＭ１３を用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法（Ｍｅｓｓｉｎｇ，Ｊ． ａｎｄＶｉｅｉｒａ，Ｊ（１９８２）Ｇｅｎｅ １９，２６９－２７６）等により行うことができる。

このようにしてクローン化されたヒトＶ１ｂ受容体をコードする遺伝子を含む断片は，適当なベクターＤＮＡに再び組込むことにより，他の真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに，これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかわる配列を導入することにより，それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。

真核生物の宿主細胞には，脊椎動物，昆虫，酵母等の細胞が含まれ，脊椎動物細胞としては，例えばサルの細胞であるＣＯＳ細胞（Ｇｌｕｚｍａｎ，Ｙ．（１９８１）Ｃｅｌｌ ２３，１７５－１８２）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株（Ｕｒｌａｕｂ，Ｇ．ａｎｄ Ｃｈａｓｉｎ，Ｌ．Ａ．（１９８０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７，４２１６－４２２０）等がよく用いられているが，これらに限定されるわけではない。

【００１５】

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては，通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター，ＲＮＡのスプライス部位，ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき，これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては，ＳＶ４０の初期プロモーターを有するｐＳＶ２ｄｈｆｒ（Ｓｕｂｒａｍａｎｉ，Ｓ． ｅｔ ａｌ．（１９８１）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１，８５４－８６４）等を例示できるが，これに限定されない。

宿主細胞として，ＣＯＳ細胞を用いる場合を例に挙げると，発現ベクターとしては，ＳＶ４０複製起点を有し，ＣＯＳ細胞において自律増殖が可能であり，さらに転写プロモーター，転写終結シグナルおよびＲＮＡスプライス部位を備えたものを用いることができる。該発現ベクターはＤＥＡＥ－デキストラン法（Ｌｕｔｈｍａｎ，Ｈ．ａｎｄ Ｍａｇｎｕｓｓｏｎ，Ｇ．（１９８３） Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１１，１２９５－１３０８），リン酸カルシウム－ＤＮＡ共沈殿法（Ｇｒａｈａｍ，Ｆ．Ｌ． ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｄ，Ａ．Ｊ．（１９７３）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ５２，４５６－４５７）および電気パスル穿孔法（Ｎｅｕｍａｎｎ，Ｅ．ｅｔ ａｌ．（１９８２） ＥＭＢＯ Ｊ．１，８４１－８４５）等によりＣＯＳ細胞に取り込ませることができ，かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。また，宿主細胞としてＣＨＯ細胞を用いる場合には，発現ベクターと共に，Ｇ４１８耐性マーカーとして機能するｎｅｏ遺伝子を発現し得るベクター，例えばｐＲＳＶｎｅｏ（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．（１９８９）：“ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ－ＡＬａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ ”Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，ＮＹ）やｐＳＶ２－ｎｅｏ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ，Ｐ．Ｊ．ａｎｄ Ｂｅｒｇ，Ｐ．（１９８２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ａｐｐｌ．Ｇｅｎｅｔ．１，３２７－３４１）等をコ・トランスフェクトし，Ｇ４１８耐性のコロニーを選択することによりヒトＶ１ｂ受容体を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

【００１６】

上記で得られる所望の形質転換体は，常法に従い培養することができ，該培養により細胞内または細胞表面にヒトＶ１ｂ受容体が生産される。該培養に用いられる培地としては，採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき，例えば上記ＣＯＳ細胞であればＲＰＭＩ－１６４０培地やダルベッコ修正イーグル最小必須培地（ＤＭＥＭ）等

の培地に必要に応じ牛胎児血清（ＦＢＳ）等の血清成分を添加したものを使用できる。
上記により，形質転換体の細胞内または細胞表面に生産されるヒトＶ１ｂ受容体は，該受容体の物理的性質や化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により，それらより分離・精製することができる。該方法としては，具体的には例えば受容体を含む膜分画を可溶化した後，通常の蛋白沈殿剤による処理，限外濾過，分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過），吸着クロマトグラフィー，イオン交換体クロマトグラフィー，アフィニティクロマトグラフィー，高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）等の各種液体クロマトグラフィー，透析法，これらの組合せ等を例示できる。
受容体の可溶化の際，強固に受容体に結合するが可逆的であるようなリガンドをラジオアイソトープで標識して，これで受容体を標識した後に受容体を可溶化することができる。また，できるだけ緩和な可溶化剤（ＣＨＡＰＳ，Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００，ジキトニン等）で受容体を可溶化することにより，可溶化後も受容体の特性を保持することができる。
膜分画は常法に従って得ることができる。例えばＶ１ｂ受容体を表面に発現した細胞を培養し，これらをバッファーに懸濁後，ホモジナイズし遠心分離することにより得られる。
このようにして本発明ＤＮＡを利用して遺伝子工学的手法により得られる物質がヒトＶ１ｂ受容体機能を発現するためには，必ずしも配列表配列番号２に示されるアミノ酸配列のすべてを有するものである必要は無く，例えばその一部の配列であって，それがヒトＶ１ｂ受容体機能を示す限り，それらのアミノ酸配列もまた本発明のポリペプチドに包含される。また配列番号１で示される受容体をコードするＤＮＡも本発明に含まれる。
該ヒトＶ１ｂ受容体をコードするＤＮＡは，配列番号１で示されるヌクレオチド配列が好適である。

【００１７】

一般に真核生物の遺伝子はインターフェロン遺伝子等で知られているように，多型現象（ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍ）を示すと考えられ（例えば，Ｎｉｓｈｉ，Ｔ．ｅｔａｌ．（１９８５）Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．９７，１５３－１５９を参照），この多型現象によって１個またはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあれば，ヌクレオチド配列の変化はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。配列番号２で示されるアミノ酸配列からなるヒトＶ１ｂ受容体，アミノ酸配列の中の一つ若しくは二つ以上の部位において，一つ若しくは二つ以上のアミノ酸残基が欠失，挿入若しくは置換されているポリペプチドでもバソプレッシン結合活性を有することがある。これらのポリペプチドを本発明においては，ヒトＶ１ｂ受容体の同効物と呼ぶ。

【００１８】

例えば，インターロイキン２（ＩＬ－２）遺伝子のシステインに相当するヌクレオチド配列をセリンに相当するヌクレオチド配列に変換して得られた蛋白がＩＬ－２活性を保持することも既に公知となっている（Ｗａｎｇ，Ａ．ｅｔ　ａｌ．（１９８４）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２４，１４３－１４３３）。それゆえ，それ等天然に存在するかあるいは人工合成されたポリペプチド，ヒトＶ１ｂ受容体結合活性を有する限りそれ等のポリペプチドは全て本発明に含まれる。
また，これらのポリペプチドをコードする，同効のヌクレオチド配列からなるＤＮＡをすべて本発明に含まれる。
このような各種の本発明のＤＮＡは，上記ヒトＶ１ｂ受容体の情報に基づいて，例えばホスファイト・トリエステル法（Ｈｕｎｋａｐｉｌｌｅｒ，Ｍ．ｅｔａｌ．（１９８４）Ｎａｔｕｒｅ　１０，１０５－１１１）等の常法に従い，核酸の化学合成により製造することもできる。
なお，所望アミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり，その選択も任意でよく，例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる（Ｃｒａｎｔｈａｍ，Ｒ．ｅｔ　ａｌ．（１９８１）Ｎｕｃｌｅｉｃ　ＡｃｉｄｓＲｅｓ．９　ｒ４３－ｒ７４）。さらに，これらヌクレオチド配列のコドンの一部改変は，常法に従い，所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したサイトスペシフィック

・ミュータジェネシス（ｓｉｔｅ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ）（Ｍａｒｋ，Ｄ．Ｆ． ｅｔａｌ．（１９８４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１，５６６２－５６６６）等に従うことができる。
更に，本発明ヒトＶ１ｂ受容体に作動性の薬物のスクリーニング法は，次のようにして行うことができる。
前述のヒトＶ１ｂ受容体のＤＮＡを組込んだ発現プラスミドを動物細胞に移入したＶ１ｂ受容体発現細胞を収集し，また適宜細胞を破壊して膜分画を取ることができる。この細胞そのまま，または細胞膜分画を受容体標品とし，標識リガンド例えば［^{3}Ｈ］Ａｒｇ^{8}バソプレッシンと被験薬物との結合阻害実験を行い，標識リガンドの細胞あるいは細胞膜分画への結合量を定量することにより実施できる。

【００１９】
更に本発明は，該受容体のポリペプチドのモノクローナル抗体を以下に示す常法により製造することができる。当該モノクローナル抗体は，Ｖ１ｂ受容体作動薬，診断薬又はポリペプチドの分離精製の手段等に有用である。
モノクローナル抗体，あるいは断片としてはヒトＶ１ｂ受容体に結合するものであれば何れも包括されるが，特に該受容体を発現させた細胞で感作して作製したモノクローナル抗体および断片Ｆ（ａｂ’）$_{2}$，Ｆａｂ’，Ｆａｂが挙げられる。モノクローナル抗体はマウスハイブリドーマ，あるいはハイブリドーマを限界希釈法等の方法で更にクローニングして選ばれるところの，例えば抗体生産性が高い細胞の変種を培地又はマウスの腹水中で培養することにより生産される。その断片Ｆ（ａｂ’）$_{2}$，Ｆａｂ’，Ｆａｂはモノクローナル抗体をタンパク質分解酵素，好ましくはトリプシン，パパイン，ペプシンからなる群より選ばれた酵素を用いて消化し，適切な精製を行うことによって得られる。
あるいはモノクローナル抗体をコードする遺伝子の一部を発現ベクターに組み込み，大腸菌に導入して生産させることによっても得ることができる。マウスハイブリドーマは該受容体を発現させた細胞で感作したＢａｌｂ／ｃ系マウスの脾細胞とマウスの骨髄腫細胞Ｐ３×６３Ａｒｇ^{8}／Ｕ１（Ｐ３Ｕ１）とを常法，例えばケーラーとミルスタイン（Ｋｕｅｌｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ）の細胞融合法により融合して得ることができる。

【００２０】
上記ハイブリドーマを培養する培地としてはダルベッコ氏変法イーグル氏最小必須培地（Ｄａｌｂｅｃｃｏ’ｓ ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｍｉｎｉｍｕｍ ｅｓｓｅｎｔｉａｌ ｍｅｄｉｕｍ：以下ＤＭＥＭと略記する）にウシ胎仔血清，Ｌ－グルタミン，グルコース，ピルビン酸ナトリウム，２－メルカプトエタノール及び抗生物質（例えばペニシリンＧ，ストレプトマイシン，ゲンタマイシン等）を含有せしめた培地等が使われる。この発現のハイブリドーマの培養は通常，培地中で３７℃にて５％二酸化炭素，９５％空気の気相で２～４日間，あるいは２，６，１０，１４－テトラメチルペンタデカン（商品名プリスタン，アルドリッチ社製）で前処理されたＢａｌｂ／ｃ系マウスの腹腔内にて１０～２０日間程度で行われ，精製可能な量の抗体が産生される。このように製造されたモノクローナル抗体は培養上清あるいは腹水からタンパク質の単離精製の常法により分離精製することができる。そのような方法としては例えば，遠心分離，透析，硫酸アンモニウムによる塩析，ＤＥＡＥ－セルロース，ハイドロキシルアパタイト，プロテインＡアガロース等によるカラムクロマトグラフィー等が挙げられる。このように分離精製された抗体につき常法により，ペプシン，パパイン等のタンパク質分解酵素によって消化を行い，引続きタンパク質の単離精製を行って活性のある断片，例えばＦ（ａｂ’）２，Ｆａｂ’，Ｆａｂ，Ｆｖを得ることができる。

【００２１】
【発明の効果】
本発明は，新規なヒトＶ１ｂ受容体を提供することにある。本発明の受容体はヒトのＶ１ｂ受容体に起因する疾患に関する該受容体作用薬の探索及び評価に有用である。
また，該受容体のモノクローナル抗体も該受容体作動薬，診断薬又はポリペプチドの分離精製の手段等に有用である。

さらに，本発明のベクターの一部を改変することにより，ヒトＶ１ｂ受容体タンパク質を作成することも可能である。得られた変異体のリガンド結合活性を検討することにより，該受容体のどのアミノ酸配列が結合に重要であるかを検討することができる。得られた情報は，結合阻害物にどのような構造が必要であるかを検索する上で重要である。さらに，受容体は該リガンドと結合するための構造だけでなく，細胞内のセカンド・メッセンジャーの変動を制御するための構造も有している。ベクター改変による変異タンパク質の作成は，結合に重要な構造だけでなく，セカンド・メッセンジャー制御に関係した構造をも明らかにするであろう。このことは，セカンド・メッセンジャーの変動を制御することを作用機作としたバソプレッシンの阻害物質のデザインに重要な情報を提供するであろう。これらのことから，本発明がヒトＶ１ｂ受容体を提供することにより，該受容体を用いた作動性物質（例えば拮抗作用物質）等のスクリーニング方法を確立し，これにより活性の高い化合物を選択し，該受容体の関与する疾患に対する治療薬を提供することができる。

【００２２】

【実施例】

以下に実施例により本発明を詳述するが，本発明は該実施例によって限定されるものではない

実施例１

ＰＣＲによる特定ＤＮＡ断片の増幅

ヒトＶ１ｂ受容体のＤＮＡを得るために，既に単離されている前述のＤＮＡ遺伝子［例えばヒト腎臓，ラット腎臓，ブタ腎臓由来細胞株，ラット肝臓又はヒト肝臓より得られたＶ１ａ受容体，Ｖ２受容体，オキシトシン受容体の遺伝子］の配列の中からバソプレッシン受容体又はオキシトシン受容体に保存されている遺伝子配列をもとにして，混合プライマーを合成し，ヒト脳下垂体のｍＲＮＡを鋳型として，ＲＴ－ＰＣＲを行なった。実行の詳細を以下に示す。

混合プライマーとしてＦｏｒｗａｒｄプライマーとＲｅｖｅｒｓｅプライマーを合成した。Ｆｏｒｗａｒｄプライマーの配列は，５’－ＴＧＧＣＣＡＴＧ（Ａ／Ｔ）Ｃ （Ａ／Ｇ）（Ｃ／Ｇ）（Ｃ／Ｔ）（Ｃ／Ｇ）ＧＡＣＣＧ－３’，Ｒｅｖｅｒｓｅプライマーの配列は５’－（Ａ／Ｇ）（Ａ／Ｃ）ＴＧＡＡＧＡＡ（Ａ／Ｇ／Ｔ） ＧＧ（Ｃ／Ｔ）Ｇ（Ｃ／Ｔ）ＣＣＡＧＣＡ－３’であった。合成オリゴヌクレオチドは固相法を原理とする全自動ＤＮＡ合成機を使用して作成した。各々のオリゴヌクレオチドの精製は，ＯＰＣカートリッジ（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ社）を使用して行なった。

【００２３】

ヒト下垂体ｐｏｌｙＡ$^{+}$ＲＮＡ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社）１μｇから，ｃＤＮＡ合成キット（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ ｍａｎｎｈｅｉｍ社）のプロトコルに従って，２０μｌ反応液中でランダムプライマーを用いて一本鎖ｃＤＮＡを合成した。得られた一本鎖ｃＤＮＡ（１μｌ）を鋳型として，５０μｌの反応液中でＴａｑ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（１．２５ｕｎｉｔｓ；Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ社）によるポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を実施した。ＰＣＲは，Ｆｏｒｗａｒｄプライマー，Ｒｅｖｅｒｓｅプライマーをそれぞれ６０ｐｍｏｌ用い，変性温度９４℃（１分間），アニーリング温度５５℃（２分間），ポリメラーゼ反応温度７２℃（２分間）からなる工程を１サイクルとし，この工程を３０サイクル行なった。得られたＰＣＲ産物をアガロース・ゲル電気泳動により分画し，５２０塩基対付近のＤＮＡ断片をゲルから切り出し，ＤＮＡ精製キット（ＥＮＥＣＬＥＡＮ ＩＩ；ＢＩＯ １０１社）により精製した。精製したＤＮＡ断片をＴＡクローニングキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）に従ってｐＣＲＩＩベクターに挿入し，大腸菌ＪＭ１０９に形質転換を行ない，生じたコロニーのうちｃＤＮＡが組込まれているものをクローン化した。

ｐＣＲＩＩベクターに挿入されたＲＴ－ＰＣＲ産物の塩基配列は，Ｔａｑ ＤｙｅＤｅｏｘｙ Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ Ｃｙｃｌｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ 法 （Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ社）によって決定した。塩基配列を決定した１０クローンのすべてが同一の新規の配列であり，アミノ酸におけるヒトＶ１ａ受容体，ヒトオキシトシン受容体，ヒト

Ｖ２受容体との相同性が５０％，４９％，３９％であり，この新規遺伝子断片がバソプレッシン受容体のファミリーに属することが予測された。そこで，以下の工程で，この新規遺伝子の翻訳領域ｃＤＮＡ全長のクローニングを行なった。

【００２４】

ヒトＶ１ｂ受容体のクローニング

ヒトＶ１ｂ受容体のＤＮＡのクローニングは，ヒト下垂体のλｇｔ１０　ｃＤＮＡライブラリー（ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ社）から，上記新規ｃＤＮＡ断片を^{32}Ｐで標識したプローブとして，プラーク・ハイブリダイゼーション法を用いて行なった。プローブはＤＮＡランダムラベル化キット（ＢｃａＢＥＳＴ　ＤＮＡ　ｌａｂｅｌｉｎｇ　ｓｙｓｔｅｍ；ＴＡＫＡＲＡ社）に従って標識した。

大腸菌Ｃ６００にヒト下垂体のλｇｔ１０　ｃＤＮＡライブラリーを感染させ，８×１０^{5}個のプラークをプレート上に出現させ，以下に示すプラーク・ハイブリダイゼーション法により，候補組換えファージのスクリーニングを行なった。出現したファージのプラークはナイロンフィルター（Ｄｕｐｏｎｔ　ＮＥＮ社）に２枚転写した。転写したナイロンフィルターは変性用溶液（０．５Ｍ　ＮａＯＨ）で変性処理を５分間を２回行ない，次に中和用溶液（１Ｍ　Ｔｒｉｓ‐ＨＣｌ　ｐＨ８．０）で中和処理を５分間を２回行なった。さらにオートクレーブを１００℃で１分間行なった後，２×ＳＳＣ（１×ＳＳＣ；０．０１５Ｍ　Ｓｏｄｉｕｍ　ｃｉｔｒａｔｅ，０．１５Ｍ　Ｓｏｄｉｕｍ　ｃｈｌｏｒｉｄｅ）で５分間洗浄し，風乾した。

【００２５】

乾燥したナイロンメンブレンをプレ・ハイブリダイゼーション液（６×ＳＳＣ，５０％Ｆｏｒｍａｍｉｄｅ，０．１％ＳＤＳ，０．２％Ｆｉｃｏｌｌ，０．２％Ｐｏｌｙｖｉｎｙｌｐｙｒｒｏｌｙｄｏｎｅ，０．２％ＢＳＡ，０．１ｍｇ／ｍｌサケ精子ＤＮＡ）中で４２℃，２時間インキュベーションし，プレ・ハイブリダイゼーションを行なった。プレ・ハイブリダイゼーションが終了したフィルターに，^{32}Ｐ標識プローブを含むプレハイブリダイゼーション液と同一組成の液を加え，４２℃，１６時間インキュベートし，ハイブリダイゼーションを行なった。

次にフィルターを室温にて，４×ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ溶液，２×ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ溶液，１×ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ溶液の順番で，各１０分間ずつ洗浄し，さらに１×ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ溶液で３７℃，４２℃，５０℃で各１０分間ずつ洗浄した。フィルターを風乾後，Ｘ線フィルムに－８０℃で１日間露光した。オートラジオグラフィーの結果，５個の陽性クローンを得た。この陽性部分の寒天をかきとり，ＳＭ　（１００ｍＭ　ＮａＣｌ，８ｍＭ　$MgSO_4$）溶液に懸濁後，このファージ液を用いて，２回目，３回目のスクリーニングを上記の方法と同様に行ない，目的のファージを単一のものに精製した。

【００２６】

単一にしたファージ液から，ファージＤＮＡ精製キット（ＱＵＩＡＧＥＮ社）によファージＤＮＡを精製した。精製したファージＤＮＡを制限酵素ＥｃｏＲＩにより消化し，挿入遺伝子を切り出した。切り出された遺伝子をアガロースゲル電気泳動により分離した後，ＤＮＡ精製キット（ＧＥＮＥＣＬＥＡＮ　ＩＩ　；ＢＩＯ　１０１社）により精製した。精製したＤＮＡはライゲーションキット（ＴＡＫＡＲＡ社）を用いて，ｐＣＲＩＩプラスミドベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）のＥｃｏＲＩサイトに挿入した。ライゲーション液を大腸菌ＪＭ１０９株に感染させてプレートにまき，プラスミドを含む大腸菌のコロニーを得た。これらのコロニーから目的の遺伝子を含むプラスミドを単離し，この遺伝子の長さを決定したところ，最長のもので１．８ｋｂの遺伝子を持つことが分った。

この遺伝子について合成プライマーを使用してＴａｑ　ＤｙｅＤｅｏｘｙ　Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ　Ｃｙｃｌｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ法（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社）により全塩基配列を決定した。その結果より，成熟なタンパク質をコードすると推測される塩基配列，及びそのアミノ酸配列を配列表の配列番号１及び配列番号２に示す。

【００２７】

塩基配列の解析決定した塩基配列によりコードされるアミノ酸配列には，Ｇ蛋白質結合型の受容体に見られる７回の疎水性領域が存在し，このアミノ酸配列とヒトＶ１ａ受容体，ヒトオキシトシン受容体，ヒトＶ２受容体のアミノ酸配列との相同性は，それぞれ４５％，４５％，３９％であった。

ｍＲＮＡとのハイブリダイゼーションによる組織分布の検討ノーザンブロット法により各組織での発現の検討を行なった。ヒトの下垂体，肝臓，腎臓のｐｏｌｙＡ+ＲＮＡ（Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ社）を１％ＲＮＡアガロースゲル（５０ｍＭ ＭＯＰＳ，１ｍＭ ＥＤＴＡ，２０×ＳＳＣ，２．２ＭＦｏｒｍａｌ ｅｈｙｄｅ）に５μｇ／レーンとなるようにのせて電気泳動した。泳動終了後後１０×ＳＳＣを使用してキャピラリーブロッティングを行ない，ナイロンメンブレン（Ｈｙｂｏｎｄ‐Ｎ ｍｅｍｂｒａｎｅ；Ａｍｅｒｓｈａｍ社）に転写した。転写後のメンブレンを用い，プレ・ハイブリダイゼーション液（６×ＳＳＣ，５０％Ｆｏｒｍａｍｉｄｅ，０．１％ＳＤＳ，０．２％Ｆｉｃｏｌｌ，０．２％Ｐｏｌｙｖｉｎｙｌｐｙｒｒｏｌｙｄｏｎｅ，０．２％ＢＳＡ，０．１ｍｇ／ｍｌサケ精子ＤＮＡ）中で４２℃，２時間インキュベーションし，プレ・ハイブリダイゼーションを行なった。プレ・ハイブリダイゼーション終了後，32Ｐ標識プローブを含むプレハイブリダイゼーション液と同一組成の液に替え，４２℃，２４時間インキュベートし，ハイブリダゼーションを行なった。プローブは１．８ｋｂのｃＤＮＡを用いた。メンブレンの洗浄は，４×ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ溶液で室温２０分間，２×ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ溶液で４２℃，２０分間，０．５×ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ溶液で５２℃，６２℃で各２０分間ずつ洗浄した。洗浄後，Ｘ線フィルムに－８０℃で５日間露光した。この結果本発明遺伝子は，肝臓，腎臓には発現しておらず，下垂体に特異的に発現していることが確認された。また，この遺伝子のｍＲＮＡのサイズは５．２ｋｂであることが分った（図１）。

【００２８】

ＰＣＲ法による組織分布の検討

ＰＣＲ法により各組織での発現の検討を行なった。ヒトの全脳，下垂体，心臓，肺，膵臓，肝臓，腎臓，骨格筋，胎盤のｐｏｌｙＡ+ＲＮＡ（Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ社）１μｇから，ｃＤＮＡ合成キット（Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ社）に従って，２０μｌ反応液中でランダムプライマーを用いた一本鎖ｃＤＮＡを合成した。得られた一本鎖 Ｔａｑ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（１．２５ｕｎｉｔｓ；ＰｅｒｋｉＥｌｍｅｒ社）によるＰＣＲを実施した。ＰＣＲは，Ｆｏｒｗａｒｄプライマーとして５’－ＡＣＴＧＴＣＣＴＧＧ ＴＧＣＴＧＧＣＧＡ‐３’をＲｅｖｅｒｓｅプライマーとして５’－ＴＧＡＧＣＡＴＧＧＴ ＣＡＣＣＧＧＣＡＧＡ－３’をそれぞれ２０ｐｍｏｌずつ用い，変性温度９４℃（１分間），アニーリング温度６０℃（２分間），ポリメラーゼ反応温度７２℃（２分間）からなる工程を１サイクルとし，工程を２２サイクル行なった。得られたＰＣＲ産物をアガロース・ゲル電気泳動に供し，泳動終了後，１０×ＳＳＣを使用してキャピラリーブロッティングを行ない，ナイロンメンブレン（Ｈｙｂｏｎｄ‐Ｎ ｍｅｍｂｒａｎｅ；Ａｍｅｒｓｈａｍ社）に転写した。

【００２９】

転写後のメンブレンを用いて，プレ・ハイブリダイゼーション液（６×ＳＳＣ，５０％Ｆｏｒｍａｍｉｄｅ，０．１％ＳＤＳ，０．２％Ｆｉｃｏｌｌ，０．２％Ｐｏｌｙｖｉｎｙｌｐｙｒｒｏｌｙｄｏｎｅ，０．２％ＢＳＡ，０．１ｍｇ／ｍｌサケ精子ＤＮＡ）中で４２℃，２時間インキュベーションし，プレ・ハイブリダイゼーションを行なった。プレ・ハイブリダイゼーション終了後，１．８ｋｂのｃＤＮＡを32Ｐで標識したプローブを含むプレハイブリダイゼーション液と同一組成の液に替え，４２℃，２４時間インキュベートし，ハイブリダイゼーションを行なった。メンブレンの洗浄は，４×ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ溶液で室温２０分間，２×ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ溶液で４２℃，２分間，０．５×ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ溶液で５２℃，６２℃で各２０分間ずつ洗浄した。洗浄後，Ｘ線フィルムに－８０℃で１日間露光した。この結果，下垂体にのみ，特異的な増幅（５２０ｂｐ）が見られ，他の組織においてはこの遺伝子の増幅は見られなかった（図２）。

以上より，本発明の遺伝子は下垂体に特異的に発現している遺伝子で，ヒトＶ１ａ受容体

に近い配列を持っていることが明らかとなった。この事より本発明の受容体は，これまでの薬理学的な研究から下垂体での存在が示唆されてきたヒトＶ１ｂ受容体であることが強く推測された。

【００３０】

実施例２

ヒトＶ１ｂ受容体のＣＯＳ細胞における発現の誘導

ヒトＶ１ｂ受容体の遺伝子を組み込んだ発現ベクターを用いて，アフリカミドリザル腎臓由来繊維芽細胞株（ＣＯＳ）に遺伝子導入（ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ）を行ない，同受容体を発現させた。単離されたヒトＶ１ｂ受容体の翻訳領域を含んだｃＤＮＡを発現用ベクター，ｐＥＦ－ＢＯＳ（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １８，５３２２（１９９０））に挿入した。得られたプラスミドＤＮＡ，５０μｇをＤＥＡＥ・ｄｅｘｔｒａｎ（２０μｇ／ｍｌ）とともにＣＯＳ細胞（約3×10^{-6}ｃｅｌｌｓ）培養液（５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ，ＤＭＥＭ ｐＨ７．４）中に添加した。ＤＮＡ／ｄｅｘｔｒａｎ添加１８時間後に培地を取り除き，クロロキン添加培養液（０．１ｍＭ ｃｈｌｏｒｏｑｕｉｎｅ，５ｍＭ ＨＥＰＥＳ，ＤＭＥＭ ｐＨ７．４）で２．５時間処理した。培養液を１０％牛胎児血清含有ＤＭＥＭに置換した後，３日間培養した。

【００３１】

実施例３

［^{3}Ｈ］Ａｒｇ^{8}バソプレッシン結合実験

ＣＯＳ細胞に遺伝子導入したヒトＶ１ｂ受容体遺伝子の発現は，［^{3}Ｈ］Ａｒｇ^{8}バソプレッシン結合実験を行なうことにより確認した。遺伝子導入後，３日間培養したＣＯＳ細胞をセル・スクレイパーで培養ディッシュより剥離し，遠心分離（（１，０００×ｇ，１０分）により細胞を回収した後，細胞膜調製用ｂｕｆｆｅｒ（３ｍＭ $MgSO_4$，１ｍＭ ＥＧＴＡ，５０ｍＭ Ｔｒｉｓ‐－Ｃｌ，ｐＨ７．４）に懸濁させ，グラス・ホモジナイザーで細胞を破砕した。この細胞破砕懸濁液を遠心分離（３８，０００×ｇ，６０分）し，沈殿をふたたび細胞膜調製用ｂｕｆｆｅｒに懸濁したものを細胞膜分画とし，プロテインアッセイキット（Ｂｉｏ‐Ｒａｄ社）による蛋白定量後，使用するまで－８０℃で保存した。

保存していた細胞膜分画を結合実験用ｂｕｆｆｅｒ（０．１％ ＢＳＡ，０．１ｍｇ／ｍｌ Ｂａｃｉｔｒａｓｉｎ，３ｍＭ $MgSO_4$，１ｍＭ ＥＧＴＡ，５０ｍＭ Ｔｒｉｓ‐ＨＣｌ，ｐＨ ７．４）に懸濁させた（０．３‐１ｍｇｐｒｏｔｅｉｎ／ｍｌ）。この細胞膜懸濁液０．２ｍｌに［^{3}Ｈ］Ａｒｇ^{8}バソプレッシン０．０５ｍｌ（最終濃度０．０５－５ｎＭ）を添加した後，２２℃で１時間静置した。反応後，セル・ハーベスターを用いて，細胞膜をグラス・フィルター上に回収した後，氷冷した洗浄用ｂｕｆｆｅｒ（０．０１％ ＢＳＡ，５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．４）で洗浄した。回収した細胞膜上の放射活性を液体シンチレーション・カクテル（ＡＱＵＡＳＯＬ ＩＩ；ＤｕＰｏｎｔＮＥＮ社)を用いて，液体シンチレーション・カウンターにより測定し，総結合とした。非特異的結合は，１μＭの非標識Ａｒｇ^{8}バソプレッシン存在下での標識Ａｒｇ^{8}バソプレッシン結合とし，総結合から非特異的結合を差し引いた値を特異的結合とした。その結果，この細胞膜には［^{3}Ｈ］Ａｒｇ^{8}バソプレッシンの特異的結合がみられた。さらにスキャチャード解析を行なった結果，ＣＯＳ細胞に発現したヒト・１ｂ受容体のＫｄ値は０．１７ｎＭ，Ｖ１ｂ受容体のＫｄ値は０．１７ｎＭ，Ｂｍａｘ値は２０３ｆｍｏｌ／ｍｇ ｐｔｏｔｅｉｎであった。

【００３２】

バソプレッシン受容体の薬理学的特性は，Ａｒｇ^{8}バソプレッシン，オキシトシン，に加え，これまでに各組織を用いて検討及び開発されてきたＶ１ａ受容体選択的拮抗剤［ｄ（$CH_2)_5^1$，Ｔｙｒ（Ｍｅ）^{2}，Ａｒｇ^{8}］ｖａｓｏｐｒｅｓｓｉｎ；Ｓｉｇｍａ社：Ｋｒｕｓｚｙｎｓｋｉ，Ｍ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，２３，３６４（１９８０）），Ｖ２受容体選択的拮抗剤（［２３，ｄ（$CH_2)_5^1$，Ｄ－Ｉｌｅ^{2}，Ｉｌｅ^{4}，Ａｒｇ^{8}，Ａｌａ^{9}］ｖａｓｏｐｒｅｓｓｉｎ ； Ｂａｃｈｅｍ Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ社；

Ｍａｎｎｉｎｇ，Ｍ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｌａｂ．，Ｃｌｉｎ．Ｍｅｄ．，１１４，６１７（１９８９）），Ｖ１ａ／Ｖ２受容体選択的拮抗剤（［Ｄｅｓ－Ｇｌｙ^{9}，ｄ（ＣＨ$_{2}$）$_{5}$^{1}，Ｔｙｒ（Ｅｔ）^{2}，Ｖａｌ^{4}，Ａｒｇ^{8}］ｖａｓｏｐｒｅｓｓｉｎ；Ｓｉｇｍａ社；Ｊａｒｄ，Ｓ．，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．，３０，１７１（１９８６）），Ｖ１受容体選択的拮抗剤（ｄＰｅｎ^{1}，Ｔｙｒ（Ｍｅ）^{2}，Ａｒｇ^{8}］ｖａｓｏｐｒｅｓｓｉｎ；Ｂａｃｈｅｍ Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ社；Ｂａｎｋｏｗｓｋｉ，Ｋ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，２１，８５０（１９７８）），及びＶ１ｂ受容体選択的作動剤（Ｄｅａｍｉｎｏ^{1}，Ｄ－３－（Ｐｙｒｉｄｙｌ）Ａｌａ^{2}，Ａｒｇ^{8}］ｖａｓｏｐｒｅｓｓｉｎ；Ｂａｃｈｅｍ Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ社；Ｓｃｈｗａｒｔｚ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．，１２９，１１０７（１９９１））の受容体結合阻害作用を検討することにより評価した。

【００３３】

阻害作用は［^{3}Ｈ］Ａｒｇ^{8}バソプレッシンの特異的結合を５０％に抑制する薬剤濃度（ＩＣ$_{50}$値）を薬剤の阻害の強さとした。その結果，各薬剤はそれぞれ異なる強さで本受容体と［^{3}Ｈ］Ａｒｇ^{8}バソプレッシンとの特異的結合を阻害した。阻害の強さは，強い順にＡｒｇ^{8}バソプレッシン（ＩＣ$_{50}$＝０．４６ｎＭ），Ｖ１ｂ選択的作動剤（ＩＣ$_{50}$＝１９ｎＭ），Ｖ１受容体選択的拮抗剤（ＩＣ$_{50}$＝２９ｎＭ），Ｖ１ａ受容体選択的拮抗剤（ＩＣ$_{50}$＝８５ｎＭ），オキシトシン（ＩＣ$_{50}$＝１，５００ｎＭ），Ｖ２受容体選択的拮抗剤（ＩＣ$_{50}$＝４，０００ｎＭ），Ｖ１ａ／Ｖ２受容体選択的拮抗剤（ＩＣ$_{50}$＝９０，０００ｎＭ）であった。このことより，本発明の受容体は，ヒトＶ１ｂ受容体であることが確認された（図３）。

【００３４】

【配列表】

配列番号 ：１

配列の長さ：１２７５

配列の型 ：核酸

鎖の数 ：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ｃＤＮＡ ｔｏ ｍＲＮＡ

起源

生物名：ホモ・サピエンス

組織の種類：下垂体

配列

ATGGATTCTG GGCCTCTGTG GGATGCCAAC CCCACCCCTC GGGGCACCCT CTCTGCCCCC 60

AATGCCACAA CACCCTGGCT GGGCCGGGAT GAGGAGCTGG CCAAGGTGGA GATCGGAGTC 120

CTGGCCACTG TCCTGGTGCT GGCGACCGGG GGCAACCTGG CTGTGCTGCT GACCCTGGGC 180

CAGCTGGGCC GCAAGCGCTC CCGCATGCAC CTGTTCGTGC TGCACTTAGC CCTGACAGAC 240

CTGGCCGTGG CGCTCTTCCA GGTGCTGCCA CAGCTGCTGT GGGACATCAC CTACCGCTTC 300

CAGGGCCCCG ACCTCCTGTG CAGGGCCGTC AAGTACCTGC AGGTGCTCAG CATGTTTGCC 360

TCCACCTACA TGCTGCTGGC CATGACGCTG GACCGCTACC TGGCTGTCTG TCACCCCCTG 420

CGCAGCCTCC AGCAGCCAGG CCAGTCCACC TACCTGCTCA TCGCTGCTCC CTGGCTGCTG 480

GCCGCCATCT TCAGCCTCCC TCAAGTCTTC ATTTTTTCCC TGCGGGAGGT GATCCAGGGC 540

TCAGGGGTGC TGGACTGCTG GGCAGACTTC GGCTTCCCTT GGGGGCCACG GGCCTACCTC 600

ACCTGGACCA CCCTGGCTAT CTTCGTTCTG CCGGTGACCA TGCTCACGGC CTGCTACAGC 660

CTCATCTGCC ATGAGATCTG TAAAAACCTA AAAGTCAAGA CACAGGCCTG GCGGGTGGGA 720

GGAGGGGGCT GGAGGACTTG GGACAGGCCC TCACCTTCCA CCTTAGCTGC CACCACTCGG 780

GGGCTGCCAT CTCGGGTCAG CAGCATCAAC ACCATCTCAC GGGCCAAGAT CCGAACAGTG 840

AAGATGACCT TTGTCATCGT GCTGGCCTAC ATCGCTTGCT GGGCTCCCTT CTTCAGTGTC 900

CAGATGTGGT CCGTGTGGGA CAAGAATGCC CCTGATGAAG ATTCCACCAA TGTGGCTTTC 960

ACCATCTCTA TGCTTTTGGG CAACCTCAAC AGCTGCTGCA ACCCCTGGAT CTACATGGGC 1020

TTCAACAGCC ACCTGTTACC GCGGCCCCTG CGTCACCTTG CCTGCTGTGG GGGTCCCCAG 1080

CCCAGGATGC GCCGGCGGCT CTCCGACGGC AGCCTCTCGA GCCGCCACAC CACGCTGCTG 1140

ACCCGCTCCA GCTGCCCGGC CACCCTCAGC CTCAGCCTCA GCCTAACCCT CAGTGGGAGG 1200

CCCAGGCCTG AAGAGTCACC AAGGGACTTG GAGCTGGCAG ATGGGGAAGG CACCGCTGAG 1260

ACCATCATCT TTTAG 1275

配列番号 ：２

配列の長さ ：４２４

トポロジー ：直鎖状

配列の種類 ：ペプチド

起源生物名 ：ホモ・サピエンス

組織の種類：下垂体

配列

Met Asp Ser Gly Pro Leu Trp Asp Ala Asn Pro Thr Pro Arg Gly Thr

1 5 10 15

Leu Ser Ala Pro Asn Ala Thr Thr Pro Trp Leu Gly Arg Asp Glu Glu

20 25 30

Leu Ala Lys Val Glu Ile Gly Val Leu Ala Thr Val Leu Val Leu Ala
35 40 45

Thr Gly Gly Asn Leu Ala Val Leu Leu Thr Leu Gly Gln Leu Gly Arg
50 55 60

Lys Arg Ser Arg Met His Leu Phe Val Leu His Leu Ala Leu Thr Asp
65 70 75 80

Leu Ala Val Ala Leu Phe Gln Val Leu Pro Gln Leu Leu Trp Asp Ile
85 90 95

Thr Tyr Arg Phe Gln Gly Pro Asp Leu Leu Cys Arg Ala Val Lys Tyr
100 105 110

Leu Gln Val Leu Ser Met Phe Ala Ser Thr Tyr Met Leu Leu Ala Met
115 120 125

Thr Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Val Cys His Pro Leu Arg Ser Leu Gln

130 135 140

Gln Pro Gly Gln Ser Thr Tyr Leu Leu Ile Ala Ala Pro Trp Leu Leu
145 150 155 160

Ala Ala Ile Phe Ser Leu Pro Gln Val Phe Ile Phe Ser Leu Arg Glu
165 170 175

Val Ile Gln Gly Ser Gly Val Leu Asp Cys Trp Ala Asp Phe Gly Phe
180 185 190

Pro Trp Gly Pro Arg Ala Tyr Leu Thr Trp Thr Thr Leu Ala Ile Phe
195 200 205

Val Leu Pro Val Thr Met Leu Thr Ala Cys Tyr Ser Leu Ile Cys His
210 215 220

Glu Ile Cys Lys Asn Leu Lys Val Lys Thr Gln Ala Trp Arg Val Gly
225 230 235 240

Gly Gly Gly Trp Arg Thr Trp Asp Arg Pro Ser Pro Ser Thr Leu Ala
245 250 255

Ala Thr Thr Arg Gly Leu Pro Ser Arg Val Ser Ser Ile Asn Thr Ile
260 265 270

Ser Arg Ala Lys Ile Arg Thr Val Lys Met Thr Phe Val Ile Val Leu
275 280 285

Ala Tyr Ile Ala Cys Trp Ala Pro Phe Phe Ser Val Gln Met Trp Ser
290 295 300

Val Trp Asp Lys Asn Ala Pro Asp Glu Asp Ser Thr Asn Val Ala Phe
305 310 315 320

Thr Ile Ser Met Leu Leu Gly Asn Leu Asn Ser Cys Cys Asn Pro Trp
325 330 335

Ile Tyr Met Gly Phe Asn Ser His Leu Leu Pro Arg Pro Leu Arg His
340 345 350

Leu Ala Cys Cys Gly Gly Pro Gln Pro Arg Met Arg Arg Arg Leu Ser
355 360 365

Asp Gly Ser Leu Ser Ser Arg His Thr Thr Leu Leu Thr Arg Ser Ser
370 375 380

Cys Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Leu Ser Leu Thr Leu Ser Gly Arg
385 390 395 400

Pro Arg Pro Glu Glu Ser Pro Arg Asp Leu Glu Leu Ala Asp Gly Glu
405 410 415

Gly Thr Ala Glu Thr Ile Ile Phe
420

配列番号 ： 3

配列の長さ：２０

配列の型　：核酸

鎖の数　：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成プライマー

配列

ＴＧＧＣＣＡＴＧＷＣ　ＲＳＹＳＧＡＣＣＧ　２０

配列番号４

配列の長さ：２１

配列の型　：核酸

鎖の数　：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成プライマー

配列

ＲＭＴＧＡＡＧＡＡＤ　ＧＧＹＧＹＣＣＡＧＣ　Ａ　２１

配列番号　：５

配列の長さ：１９

配列の型　：核酸

鎖の数　：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成プライマー

配列

ＡＣＴＧＴＣＣＴＧＧ　ＴＧＣＴＧＧＣＧＡ　１９

配列番号：６

配列の長さ：２０

配列の型　：核酸

鎖の数　：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成プライマー

配列

ＴＧＡＧＣＡＴＧＧＴ　ＣＡＣＣＧＧＣＡＧＡ　２０

【配列表】

配列番号　：１
配列の長さ：１２７５
配列の型　：核酸
鎖の数　　：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ｃＤＮＡ　ｔｏ　ｍＲＮＡ
起源
　生物名：ホモ・サピエンス
　組織の種類：下垂体
配列

ATGGATTCTG GGCCTCTGTG GGATGCCAAC CCCACCCCTC GGGGCACCCT CTCTGCCCCC 60
AATGCCACAA CACCCTGGCT GGGCCGGGAT GAGGAGCTGG CCAAGGTGGA GATCGGAGTC 120
CTGGCCACTG TCCTGGTGCT GGCGACCGGG GGCAACCTGG CTGTGCTGCT GACCCTGGGC 180
CAGCTGGGCC GCAAGCGCTC CCGCATGCAC CTGTTCGTGC TGCACTTAGC CCTGACAGAC 240
CTGGCCGTGG CGCTCTTCCA GGTGCTGCCA CAGCTGCTGT GGGACATCAC CTACCGCTTC 300
CAGGGCCCCG ACCTCCTGTG CAGGGCCGTC AAGTACCTGC AGGTGCTCAG CATGTTTGCC 360
TCCACCTACA TGCTGCTGGC CATGACGCTG GACCGCTACC TGGCTGTCTG TCACCCCCTG 420
CGCAGCCTCC AGCAGCCAGG CCAGTCCACC TACCTGCTCA TCGCTGCTCC CTGGCTGCTG 480
GCCGCCATCT TCAGCCTCCC TCAAGTCTTC ATTTTTTCCC TGCGGGAGGT GATCCAGGGC 540
TCAGGGGTGC TGGACTGCTG GGCAGACTTC GGCTTCCCTT GGGGGCCACG GGCCTACCTC 600
ACCTGGACCA CCCTGGCTAT CTTCGTTCTG CCGGTGACCA TGCTCACGGC CTGCTACAGC 660
CTCATCTGCC ATGAGATCTG TAAAAACCTA AAAGTCAAGA CACAGGCCTG GCGGGTGGGA 720
GGAGGGGGCT GGAGGACTTG GGACAGGCCC TCACCTTCCA CCTTAGCTGC CACCACTCGG 780
GGGCTGCCAT CTCGGGTCAG CAGCATCAAC ACCATCTCAC GGGCCAAGAT CCGAACAGTG 840
AAGATGACCT TTGTCATCGT GCTGGCCTAC ATCGCTTGCT GGGCTCCCTT CTTCAGTGTC 900
CAGATGTGGT CCGTGTGGGA CAAGAATGCC CCTGATGAAG ATTCCACCAA TGTGGCTTTC 960
ACCATCTCTA TGCTTTTGGG CAACCTCAAC AGCTGCTGCA ACCCCTGGAT CTACATGGGC 1020
TTCAACAGCC ACCTGTTACC GCGGCCCCTG CGTCACCTTG CCTGCTGTGG GGGTCCCCAG 1080
CCCAGGATGC GCCGGCGGCT CTCCGACGGC AGCCTCTCGA GCCGCCACAC CACGCTGCTG 1140

ACCCGCTCCA GCTGCCCGGC CACCCTCAGC CTCAGCCTCA GCCTAACCCT CAGTGGGAGG 1200
CCCAGGCCTG AAGAGTCACC AAGGGACTTG GAGCTGGCAG ATGGGGAAGG CACCGCTGAG 1260
ACCATCATCT TTTAG 1275

配列番号　：２
配列の長さ　：４２４
トポロジー　：直鎖状
配列の種類　：ペプチド
起源
　生物名　：ホモ・サピエンス
　組織の種類：下垂体
配列

Met Asp Ser Gly Pro Leu Trp Asp Ala Asn Pro Thr Pro Arg Gly Thr
1 5 10 15
Leu Ser Ala Pro Asn Ala Thr Thr Pro Trp Leu Gly Arg Asp Glu Glu
20 25 30
Leu Ala Lys Val Glu Ile Gly Val Leu Ala Thr Val Leu Val Leu Ala
35 40 45
Thr Gly Gly Asn Leu Ala Val Leu Leu Thr Leu Gly Gln Leu Gly Arg
50 55 60
Lys Arg Ser Arg Met His Leu Phe Val Leu His Leu Ala Leu Thr Asp
65 70 75 80
Leu Ala Val Ala Leu Phe Gln Val Leu Pro Gln Leu Leu Trp Asp Ile
85 90 95
Thr Tyr Arg Phe Gln Gly Pro Asp Leu Leu Cys Arg Ala Val Lys Tyr
100 105 110
Leu Gln Val Leu Ser Met Phe Ala Ser Thr Tyr Met Leu Leu Ala Met
115 120 125
Thr Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Val Cys His Pro Leu Arg Ser Leu Gln
130 135 140

Gln Pro Gly Gln Ser Thr Tyr Leu Leu Ile Ala Ala Pro Trp Leu Leu
145 150 155 160
Ala Ala Ile Phe Ser Leu Pro Gln Val Phe Ile Phe Ser Leu Arg Glu
165 170 175
Val Ile Gln Gly Ser Gly Val Leu Asp Cys Trp Ala Asp Phe Gly Phe
180 185 190
Pro Trp Gly Pro Arg Ala Tyr Leu Thr Trp Thr Thr Leu Ala Ile Phe
195 200 205
Val Leu Pro Val Thr Met Leu Thr Ala Cys Tyr Ser Leu Ile Cys His
210 215 220
Glu Ile Cys Lys Asn Leu Lys Val Lys Thr Gln Ala Trp Arg Val Gly
225 230 235 240
Gly Gly Gly Trp Arg Thr Trp Asp Arg Pro Ser Pro Ser Thr Leu Ala
245 250 255
Ala Thr Thr Arg Gly Leu Pro Ser Arg Val Ser Ser Ile Asn Thr Ile
260 265 270
Ser Arg Ala Lys Ile Arg Thr Val Lys Met Thr Phe Val Ile Val Leu
275 280 285
Ala Tyr Ile Ala Cys Trp Ala Pro Phe Phe Ser Val Gln Met Trp Ser
290 295 300
Val Trp Asp Lys Asn Ala Pro Asp Glu Asp Ser Thr Asn Val Ala Phe
305 310 315 320
Thr Ile Ser Met Leu Leu Gly Asn Leu Asn Ser Cys Cys Asn Pro Trp
325 330 335
Ile Tyr Met Gly Phe Asn Ser His Leu Leu Pro Arg Pro Leu Arg His
340 345 350
Leu Ala Cys Cys Gly Gly Pro Gln Pro Arg Met Arg Arg Arg Leu Ser
355 360 365
Asp Gly Ser Leu Ser Ser Arg His Thr Thr Leu Leu Thr Arg Ser Ser

３７０ ３７５ ３８０

Cys Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Leu Thr Leu Ser Gly Arg

３８５ ３９０ ３９５ ４００

Pro Arg Pro Glu Glu Ser Pro Arg Asp Leu Glu Leu Ala Asp Gly Glu

４０５ ４１０ ４１５

Gly Thr Ala Glu Thr Ile Ile Phe

４２０ ４２４

配列番号 ：３

配列の長さ：２０

配列の型 ：核酸

鎖の数 ：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成プライマー

配列

ＴＧＧＣＣＡＴＧＷＣ ＲＳＹＳＧＡＣＣＧ ２０

配列番号４

配列の長さ：２１

配列の型 ：核酸

鎖の数 ：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成プライマー

配列

ＲＭＴＧＡＡＧＡＡＤ ＧＧＹＧＹＣＣＡＧＣ Ａ ２１

配列番号 ：５

配列の長さ：１９

配列の型 ：核酸

鎖の数 ：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成プライマー

配列

ＡＣＴＧＴＣＣＴＧＧ　ＴＧＣＴＧＧＣＧＡ　１９

配列番号：６

配列の長さ：２０

配列の型　：核酸

鎖の数　　：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成プライマー

配列

ＴＧＡＧＣＡＴＧＧＴ　ＣＡＣＣＧＧＣＡＧＡ　２０

【図面の簡単な説明】

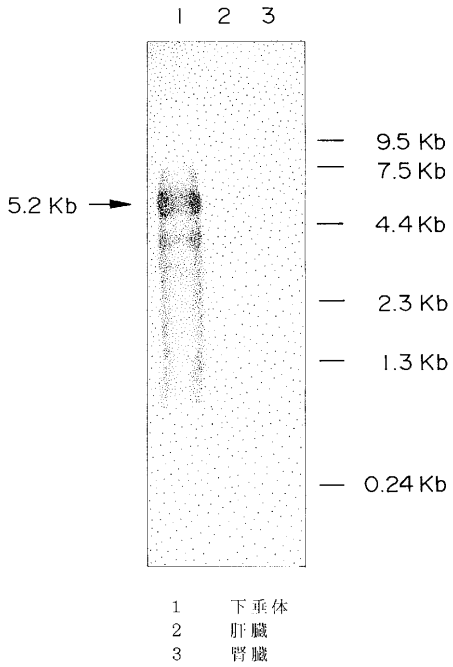
【図１】ヒトＶ１ｂ受容体　ｍＲＮＡのノーザンブロッティング法による検出結果図である。

【図２】ヒトＶ１ｂ受容体　ｍＲＮＡのＰＣＲ－サザンハイブリダイゼーション法による検出結果図である。

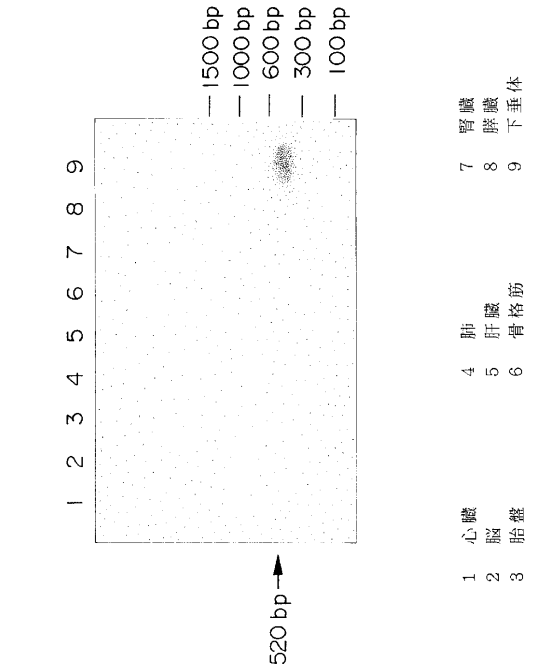
【図３】ヒトＶ１ｂ受容体への結合阻害試験

－●－：［Ａｒｇ^{8}］バソプレッシン，－○－：オキシトシン，－■－：Ｖ１ａ受容体選択的拮抗剤［ｄ（CH_2）$_5^1$，Ｔｙｒ（Ｍｅ）^{2}，Ａｒｇ^{8}］バソプレッシン，－□－：Ｖ２受容体選択的拮抗剤［ｄ（ＣＨ）^{2}）$_1^5$，ＤＩｌｅ^{2}，Ｉｌｅ^{4}，Ａｒｇ^{8}，Ａｌａ^{9}］バソプレッシン，－▲－：Ｖ１ａ／Ｖ２受容体選択的拮抗剤［ｄｅｓＧｌｙ^{9}，ｄ（CH_2）$_5^1$，Ｔｙｒ（Ｅｔ）^{2}，Ｖａｌ^{4}，Ａｒｇ^{8}］バソプレッシン，－△－：Ｖ１ａ／Ｖ１ｂ受容体選択的拮抗剤［ｄＰｅｎ^{1}，Ｔｙｒ（Ｍｅ）^{2}，Ａｒｇ^{8}］バソプレッシン］，－◆－：Ｖ１ｂ受容体選択的作動剤［Ｄｅａｍｉｎｏ^{1}，Ｄ－３－（Ｐｙｒｉｄｙｌ）Ａｌａ^{2}，Ａｒｇ^{8}］バソプレッシン］

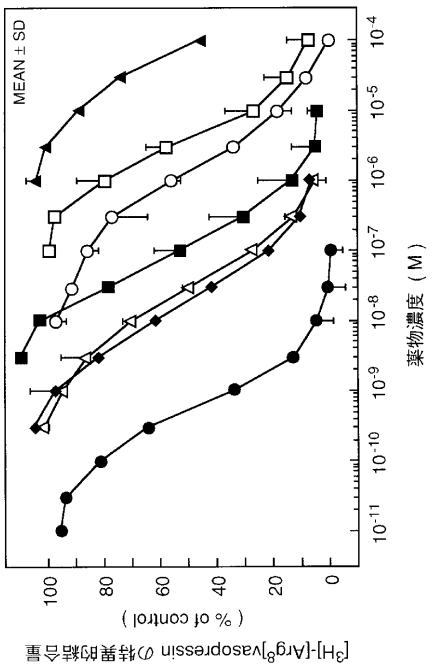
【図１】


1 2 3
5.2 Kb
9.5 Kb
7.5 Kb
4.4 Kb
2.3 Kb
1.3 Kb
0.24 Kb
1 下垂体
2 肝臓
3 腎臓

【図２】


1500 bp
1000 bp
600 bp
300 bp
100 bp
1 2 3 4 5 6 7 8 9
520 bp
1 心臓
2 脳
3 胎盤
4 肺
5 肝臓
6 骨格筋
7 腎臓
8 膵臓
9 下垂体

【図３】


MEAN ± SD
[3H]-[Arg8]vasopressin の特異的結合量
(% of control)
薬物濃度 (M)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]		FI		
C12N	1/21	C12N	1/21	
C12N	5/10	G01N	33/53	D
G01N	33/53	C12N	5/00	A

(72)発明者 望月 忍
茨城県つくば市春日２丁目３５番地の２ エトワール春日１０２

審査官 新留 豊

(56)参考文献 Marc Thibonnier, et al, "Molecular Cloning,Sequencing,and Functional Expression of a c DNA Encoding the Human V1a Vasopressin, J.Biol.Chem, １９９４年, Vol.269, No.5, pp.330 4-3310

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
SwissProt/PIR/GeneSeq
CA(STN)