

## 9337 腎でのナトリウム輸送に及ぼす新しいVasopressin受容体(Vp)の役割とその病態生理学的意義に関する研究

助成研究者:遠藤 仁(杏林大学 医学部)

共同研究者:武田 理夫(杏林大学)

細山田 真(杏林大学)

下垂体後葉から分泌されるペプチドホルモンのvasopressin (AVP) は体液恒常性の維持に中心的な役割を果たしている。AVPにはV<sub>1</sub>とV<sub>2</sub>の2種類の受容体の存在が知られておりV<sub>2</sub>受容体は腎髄質に存在し、水やナトリウム再吸収を促進することにより抗利尿効果を発現する。しかるに、本研究者はこのV<sub>1</sub>とV<sub>2</sub>と異なる受容体 (Vp)を腎の近位尿細管に見い出した。Vpの生理的意義としては細胞内ATP濃度を指標としてナトリウム利尿作用が示唆されている。本研究の目的はVp遺伝子を採取し、さらに詳細にVpの機能的役割を明らかにすることである。

まず結合実験によるライブラリースクリーニングを試みた。ラット腎臓cDNAライブラリーをサブグループに分け、プラスミドDNAを抽出しDEAE-dextran法でCOS-1細胞に導入し、<sup>3</sup>H]-AVPを用いて結合実験を行った。陽性コントロールとしては既知のV<sub>1</sub>とV<sub>2</sub>受容体発現細胞を用いた。1次から3次へとスクリーニングを重ねたが、AVP受容体発現の増強は認められなかった。次いでパニング法を行った。すなわちラット腎臓cDNAライブラリーを発現させたCOS-1細胞をAVP付着シャーレに結合させることによりスクリーニングを進めた。2次パニングの後結合実験を行ったが、陽性グループを同定できなかった。さらにPCRクローニングを試みた。鑄型としては細胞内遊離カルシウム濃度測定によりVp発現の認められたSV-40T抗原導入transgenic mice由来S<sub>1</sub>細胞およびラット腎臓cDNAを用いた。S<sub>1</sub>細胞に関してはVp選択的発現細胞株を作出し鑄型として用いることを計画したが、V<sub>1</sub>発現細胞の採取に留まった。プライマーは既知のAVP受容体ファミリーの膜貫通部の共通アミノ酸配列を参考にして作成したdegenerative primerを用いた。得られたPCR産物の塩基配列を解析したところ、既知のAVP受容体遺伝子は含まれていたが目的とする新規のAVP受容体遺伝子は得られなかった。さらにPCRに用いたdegenerative primerをプローブとしてS<sub>1</sub>細胞のcDNAライブラリーをlow stringencyでハイブリダイゼーションスクリーニングしたが2つのプローブに共通のシグナルは得られなかった。

以上より結合実験によるスクリーニング、パニング法ではVp遺伝子採取に至らなかったことから、スクリーニング法としてより高感度の測定系を用いる必要があると考えられた。またPCRクローニングの結果から、Vpは既知のAVP受容体ファミリーとはホモロジーが低いことが示唆された。今後Vp遺伝子の採取には高感度のアフリカツメガエル卵母細胞を用いた発現クローニングが必要であると考え、既に研究を開始している。



9337 腎でのナトリウム輸送に及ぼす新しいVasopressin 受容体 (Vp) の役割とその病態生理学的意義に関する研究

助成研究者: 遠藤 仁 (杏林大学 医学部)

共同研究者: 武田 理夫 (杏林大学)

細山田 真 (杏林大学)

## 1. 研究目的

1.1 下垂体後葉から分泌されるペプチドホルモンであるアルギニンバソプレシン(以下AVPと略す)は体液恒常性の維持に中心的な役割を果している。このAVPにはV<sub>1</sub>とV<sub>2</sub>の2種類の受容体の存在が従来から知られている。V<sub>1</sub>受容体は主に血管に存在し、血管収縮そして昇圧作用をもたらす。一方V<sub>2</sub>受容体は腎内の太いヘンレの係蹄と集合尿管に存在し、水やナトリウムの再吸収を促進させ抗利尿効果を発現する。助成研究者らはこのV<sub>1</sub>およびV<sub>2</sub>の受容体拮抗薬では抑制されない新しいAVP受容体を腎の近位尿管起始部(以下S<sub>1</sub>と略す)に見出しこれをVpと名付けた<sup>1)</sup>。

1.2 Vpの生理学的意義としては細胞内ATP濃度を指標としてNa利尿作用が示唆された。このことは以前より報告されている腎動脈内へのAVP注入により近位尿管においてナトリウム再吸収が抑制されるという所見<sup>2)</sup>と一致する。昨年度は高血圧自然発症ラット(SHR)から単離した新鮮ネフロン内の細胞内カルシウム濃度(以下[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>と略す)およびAVP濃度を測定することにより、このVpの病態生理学的意義を検討した。本年度はさらにVpの機能的役割を詳細に明らかにするためにVpのcDNAクローニングを試みた。

## 2. 研究方法

### 2.1 ラット腎臓cDNAライブラリーの作成

ラットの全腎臓からpoly(A)<sup>+</sup>RNAを調製しcDNAを合成した。このcDNAをPUC19と動物細胞発現ベクター-pcDNA1のコンポジットプラスミドに組み込んでライブラリーを調製した。

### 2.2 V<sub>1</sub>およびV<sub>2</sub>の受容体一過性発現細胞および安定発現細胞の作出

ラットV<sub>1</sub>およびV<sub>2</sub>の受容体の塩基配列に基づいてV<sub>1</sub>およびV<sub>2</sub>に対するプライマーを作製し、前述のラット腎臓cDNAを鋳型としてPCRを施行してV<sub>1</sub>およびV<sub>2</sub>の全長cDNAを得た。一過性発現細胞はこのcDNAを前述のコンポジットプラスミドに組み込みDEAE-dextran法でCOS-1細胞にtransfectionして作製した。安定発現細胞の作製に際してはまずネオマイシン耐性遺伝子を含むV<sub>1</sub>およびV<sub>2</sub>発現ベクターを作製した。これをリン酸カルシウム法でCHO細胞に導入しG418選択を行った。そしてG418耐性のCHO細胞を[<sup>3</sup>H]-AVPを用いた結合実験を用いてスクリーニングを行った。

### 2.3 結合実験によるライブラリースクリーニング

2.1のcDNAライブラリーの $3 \times 10^4$ コロニーを98分割し、それぞれのサブグループからプラスミドを抽出した。このプラスミドDNAをDEAE-dextran法でCOS-1細胞に導入し、 $[^3\text{H}]$ -AVPを用いた結合実験を行った。陽性グループをさらにサブライブラリーに分けスクリーニングを繰り返した。

### 2.4 パニング法によるクローニング

ラット腎臓cDNAライブラリーをCOS-1細胞にトランスフェクションし発現させ、AVP付着シャーレに結合させることによりAVPレセプター発現細胞を選択する。結合した細胞からHirt法によってプラスミドを抽出した。この操作を繰り返してcDNAを濃縮させた後、結合実験でスクリーニングを行った。

### 2.5 SV-40LargeT抗原遺伝子導入トランスジェニックマウス由来S<sub>1</sub>細胞株の作出

SV-40LargeT抗原をコードする遺伝子を胚に導入して作出したトランスジェニックマウスを作出した。そして同マウスから微小単離法<sup>3)</sup>を用いてS<sub>1</sub>セグメントを採取し、培養して非クローン細胞を得た<sup>4)</sup>。さらにこの細胞からモノクローン細胞を得るために(1)20継代の細胞から限界希釈法を用いて30クローンの細胞を得た。(2)60継代の細胞にネオマイシン耐性遺伝子を導入し、G418(ネオマイシン)選択を行い40クローンの細胞を得た。

### 2.6 細胞内遊離カルシウム濃度( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )測定

2.5で得られた各細胞をカバーガラス上に培養し10%牛胎児血清(FCS), 2mM pyruvate, 2mM glutamate, 2mM aspartate, 10mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$ を含むHanks溶液中で $10\mu\text{M}$  Fura2/AMを25°C, 30分間取り込ませた。その後細胞をFCS非含有Hanks溶液中で10分間incubationし、実験に使用した<sup>5)</sup>。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は二波長蛍光顕微鏡で測定した。

### 2.7 既知のAVP受容体遺伝子とのホモロジーを利用する方法

2.5でV<sub>p</sub>発現を確認したS<sub>1</sub>細胞よりRNAを抽出し、以前に共同研究者がエンドセリン受容体の解析に用いた方法<sup>6)</sup>に従ってreverse transcription (RT)を行いcDNAを得た。このcDNAおよび前記のラット全腎cDNAライブラリーを鋳型として用いたPolymerase chain reaction (PCR)によりV<sub>p</sub>の採取を試みた。プライマーとしてはV<sub>p</sub>がAVP受容体ファミリーの一員であることを前提に作成した。すなわち既にクローニングされているV<sub>1</sub>、V<sub>2</sub>およびオキシトシン受容体の第2膜貫通部、第4膜貫通部および第6膜貫通部の共通アミノ酸配列を参考にして上流2種類および下流1種類を作成した。PCR産物として予想される長さは720bpと366bpであった。さらにはV<sub>p</sub>がG蛋白質共役型受容体に含まれていることを前提にV<sub>1</sub>、V<sub>2</sub>、オキシトシンのみならず、ソマトスタチン、 $\beta_2$ -アドレナリン、ドーパミンDIB、そしてメラノコルチン受容体の第6膜貫通部および第7膜貫通部のアミノ酸配列を基にしてプライマーを作成した。この場合は上記の鋳型以外にオリゴdTプライマーおよびランダムプライマーを用いて作製した腎cDNAも鋳型として用いた。予想されるPCR産物

は600bpである。PCRの反応条件については(1)アニーリングの温度および時間(2)サイクル設定(3)反応液中のMgCl<sub>2</sub>濃度について、Fig. 1に示すような種々の条件で施行した。そして得られたPCR産物をPUCベクターにサブクローニングし、シークエンスを行って解析した。さらにはPCRに用いたプライマーをプローブとして用いて、S<sub>i</sub>細胞cDNAライブラリーをlow stringencyでコロニーハイブリダイゼーションを行いスクリーニングした。

## 2.8 アフリカツメガエル卵母細胞を用いたクローニング

アフリカツメガエルより卵母細胞を取り出し、コラゲナーゼ処理して卵母細胞を分離する。そして卵母細胞の中から成熟度の良いものを選別する。組織あるいは細胞から採取したmRNAあるいはcDNAをin vitro transcriptionして得られたcRNAをマイクロインジェクションする。

## 3. 研究結果

### 3.1 V<sub>1</sub>およびV<sub>2</sub>一過性発現細胞および安定発現細胞の作出

DEAE-dextran法による遺伝子導入効率についてはβ-galactosidase assayを用いて導入法の至適条件について検討した。その結果最大発現は導入後3日目に認められ、またDMSOショックの併用が有効であることが明らかとなった。Fig. 2に示すようにプラスミドのみのコントロール(mock)に比べV<sub>1</sub>およびV<sub>2</sub>で有意の結合が認められた。安定発現細胞はG418選択の結果得られたクローンを[<sup>3</sup>H]-AVPによる結合実験でスクリーニングし採取した。V<sub>1</sub>は21クローン中4クローンで、V<sub>2</sub>は20クローン中2クローンで発現株が得られた。

### 3.2 結合実験によるスクリーニング

3.1の一過性発現細胞を陽性対照に用いた。1次スクリーニングではcDNA library全体を1グループ300クローンからなる98のサブグループに分けて、COS-1細胞に導入してスクリーニングを行った。得られた陽性グループを30クローンからなる20のサブグループに分けてさらに2次スクリーニングを行った。その結果得られた陽性グループをさらに5クローンからなる12のサブグループに分けて3次スクリーニングを行ったが、サブグループの中に有意の結合を示すグループは認められなかった。

### 3.3 パニング法によるクローニング

1次パニングで得られたプラスミドを大腸菌に導入して解析した結果600コロニーが得られた。このプラスミドを再びCOS-1細胞に導入して2次パニングを行い52クローンが得られた。さらにこれを12グループに分け結合実験を行ったところ、8グループが陽性であった。そこでこれらを結合実験でスクリーニングしたが陽性群は得られなかった。

### 3.4 SV-40 largeT抗原導入トランスジェニックマウス由来S<sub>i</sub>細胞内遊離カルシウム濃度に及ぼすAVPの影響

Fig. 3には非クローン細胞およびクローン細胞の中の1つであるEMP-127における10<sup>-7</sup>M AVPによる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇およびV<sub>1</sub>およびV<sub>2</sub>受容体拮抗薬で処理した後の10<sup>-7</sup>M AVPによる

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇すなわちV<sub>p</sub>依存性の反応を示す。そして非クローン細胞およびクローン細胞を用いて行った同様の実験の結果の要約をFig. 4に示す。この図からわかるように非クローン細胞および22種類のクローン化細胞中10クローンでAVP依存性の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇が認められた。さらにV<sub>1</sub>およびV<sub>2</sub>受容体拮抗薬で前処理した場合のAVPによるV<sub>p</sub>を介する[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇は8クローン中4クローンで認められた。またS<sub>1</sub>細胞のAVP受容体発現をup-regulationさせる条件についても検討した。即ちconfluency、血清の条件、さらには本細胞は温度感受性T抗原をコードしているので培養温度条件を変えて検討してみた。結果として既に同抗原をコードしている他の細胞株で報告されているように<sup>9)</sup>、39.5°Cで2日間培養することにより発現の増強が認められたので、この条件下で培養後RNAを採取することとした。G418選択で得られた細胞に関しては、40クローン中7クローンでAVP反応が認められたが、すべてのクローンでAVP依存性[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇はV<sub>1</sub>受容体拮抗薬前処理により抑制された。

### 3.5 既知のAVP受容体とのホモロジーを利用する方法

AVP受容体ファミリー内の相同性に基づいたプライマーを用いた場合には予想された長さのPCR産物は得られなかった。さらにG蛋白質共役型受容体の膜貫通部にプライマーを設定してPCRを行った場合はFig. 5に示すように予想された600bpにバンドが認められた。得られたPCR産物を低融点アガロースゲルで切り出し、PUCベクターにサブクローニングしてシークエンスを行い解析した。その結果ラットV<sub>1</sub>、V<sub>2</sub>、ナトリウムグルコーストランスポーターが得られたが、他に既知のAVP受容体ファミリー遺伝子および他のG蛋白共役型受容体遺伝子と異なるが相同性を示すものは得られなかった。さらに、PCRに用いたプライマーをプローブとして、S<sub>1</sub>細胞cDNAライブラリー20000コロニーを45°Cのlow stringencyでハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。しかし上流プライマー、下流プライマーに共通のシグナルを示すクローンは得られなかった。

### 3.6 アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた発現クローニング

既に以下の予備実験を終了している。

- 1)アフリカツメガエル卵母細胞にmRNAをマイクロインジェクションした後の同細胞の安定生存。
- 2)グルタミン酸トランスポーターcDNA<sup>7)</sup>をin vitro transcriptionして作成したcRNAをマイクロインジェクションした後のグルタミン酸トランスポーターの卵母細胞における有効発現。

## 4. 考察

4.1 AVPによる生体の水電解質調節の研究は種々の方法を駆使して進められてきたが、近年2種類のAVP受容体サブタイプの1次構造の決定および非ペプチド性AVP受容体拮抗薬の開発によりAVP研究は新しい局面を迎えつつある。我々も糸球体で濾過された水、ナトリウムの65%を再吸収する腎内の近位尿細管に、既知のAVP受容体拮抗薬では抑制されない新しいAVP受容体(V<sub>p</sub>)を見出した<sup>1)</sup>。昨年度はV<sub>p</sub>の病態生理学的意義についてSHRを用いて追求したが、本年はさらに詳細にその機能的役割を明らかにするためにそ

のcDNAクローニングを試みた。

4.2 現在のところAVP受容体拮抗薬としてはVp発見時に用いられたペプチド系のManning Compoundsおよびその後開発された非ペプチド性拮抗薬が良く知られている。VpはV<sub>1</sub>およびV<sub>2</sub>に対する受容体拮抗薬では阻害されないAVP受容体であることがその存在根拠であるので、AVP受容体拮抗薬の薬理学的特性を正しく理解することはVpの遺伝子クローニングを行う上で極めて有用であると考えられる。すなわち今回我々が作出した安定発現細胞を用いてこれらのAVP受容体拮抗薬の結合特性および生理活性を結合実験および[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>測定あるいはサイクリックAMP測定により検討することが必要とされ、目下実施中である。

4.3 動物発現細胞発現ベクターはpcDNA1はSV-40複製開始起点をもっており、SV-40T抗原を恒常的に発現するアフリカミドリザル線維芽細胞由来のCOS-1細胞の中で取り込まれたcDNAは増幅をうけ多量の産物を発現する。そこで上記の腎臓cDNAライブラリーをpcDNA1に組み込みCOS-1細胞に導入し、受容体を同細胞上に発現させ結合実験を用いたスクリーニングおよびパニング法を試みた。結果はスクリーニングを重ねてもAVP受容体発現の増強は認められなかった。この理由としてはCOS-1細胞の発現力の限界などにより結合実験の検出感度が十分でなく、一次スクリーニングで偽陽性群を選択した可能性を否定できない。また用いたcDNAの翻訳開始点が欠如していた可能性そして処理クローン絶対数の不足なども可能性として考えられる。情報伝達系はアゴニストと受容体との結合により始まるがその後G蛋白、酵素そして二次性情報伝達物質と続く過程においてその情報は質的に変化し量的にも増幅される。今回の結果はVp採取に関してはスクリーニングに用いる生物学的活性測定法としては膜蛋白レベルの解析では不十分であり、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇あるいはそれに続くカルシウム依存性のクロライドチャンネルの開口による電流測定などの検出系を用いる必要が示唆された。

4.4 SV-40largeT抗原遺伝子は上皮系、間質系のいわゆる接着性をもつ細胞の不死化には好適と考えられる。我々はSV-40largeT抗原導入トランスジェニックマウスから微小単離法を用いてネフロン各セグメントを採取、培養して各セグメントの細胞株を作出している<sup>4)</sup>。Vpの存在するS<sub>1</sub>由来の細胞株は形態、生理機能、代謝機能においてS<sub>1</sub>固有の特性を保持していることが我々の検討で明らかにされている。腎組織に比べてこのような培養細胞に含まれるmRNAの種類は限られており、また目的とする遺伝子を高度に発現している細胞を培養することによりmRNAを大量に採取可能であるためクローニングの材料としては極めて有用と考えられる。そこで非クローン化S<sub>1</sub>細胞においてVp依存性の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇を認めていたが、さらに高いレベルで発現している細胞の選択を試みた。結果に示したが、限界希釈法で得られたクローン化細胞にはVp発現の保たれている株も認めたが、有意に発現増強を示す株は得られなかった。G418選択を用いた細胞クローン化法は限界希釈法に比べネオマイシン耐性遺伝子を持っていない細胞を"feeder layer"として用いることができるので比較的培養条件が安定している。しかし同法を用いて得られた細胞においては

AVP反応の著明な増強を認めたが、発現受容体のサブタイプはV<sub>1</sub>であった。そこで非クローンS<sub>1</sub>細胞をクローニングの材料として用いることにした。

4.5 ラットV<sub>2</sub>受容体はラットV<sub>1</sub>受容体の膜貫通部のアミノ酸配列に基づいて作成した degenerative primerを用いたPCR cloningにより採取された<sup>9)</sup>。このことからわかるようにAVP受容体ファミリーを構成する既知のラットV<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>ヒトオキシトシン受容体は互いにアミノ酸配列上特にその膜貫通部に高い相同性を有している。そこで我々はV<sub>p</sub>も同じAVPをアゴニストとするAVP受容体ファミリーの一員であること、さらには7回膜貫通型G蛋白質共役型受容体の中に含まれることを前提にプライマーを作成しPCRクローニングを試みた。4.4で述べたようにV<sub>p</sub>が比較的安定発現していた非クローン細胞からRNAを採取してRT-PCR法を施行した。しかしながら既知の遺伝子しか得られなかったことから、V<sub>p</sub>は既知のAVP受容体ファミリーと塩基配列上の相同性が低い可能性が示唆された。

4.6 上記のように結合実験によるスクリーニング、パニング法および既知のAVP受容体とのホモロジーを利用するクローニング法ではV<sub>p</sub>遺伝子採取に至らなかったため、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた発現クローニングを開始している。本発現系を用いて既にGTP結合蛋白質共役型受容体遺伝子であるV<sub>2</sub>受容体、オキシトシン受容体を始めとして、血小板活性化因子受容体、セロトニン受容体など多くの受容体の遺伝子がクローニングされている。アフリカツメガエル卵母細胞は細胞内にリボゾームやtRNAなどを大量に貯蔵しているためにmRNAを効率よく翻訳する可能性がある。さらにスクリーニングに用いる生物学的活性測定法としては[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇にともなうクロライドチャンネルの開口そしてクロライド電流の変化は受容体結合あるいは[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇よりも増幅効果が認められ、検出感度は極めて高くまた再現性においても優れている。

## 5. 今後の課題

V<sub>2</sub>受容体あるいは水チャンネルの遺伝子クローニングなどにより腎における水電解質輸送の研究は分子レベルで急速に解明されつつあるが未だ不明の点も多い。それゆえにV<sub>p</sub>のcDNAをクローニングし、同遺伝子を用いてV<sub>p</sub>受容体の腎での機能的役割を解明することは極めて意義深いと考えられる。本年度は結合実験によるスクリーニング、パニング法および既知のAVP受容体とのホモロジーを利用するクローニングを試みたが遺伝子を採取するには至らなかった。今後はアフリカツメガエル卵母細胞を用いた発現クローニングでV<sub>p</sub>の遺伝子クローニングを進める所存である。

## 6. 文献

1. Jung KY, Endou H : A novel vasopressin receptor in rat early proximal tubule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180: 131-137, 1991.
2. Kurtzman NA, Rogers PW, Boonjarern S, Arruda JAL : Effect of infusion of pharmacologic amounts of vasopressin on renal electrolyte excretion. *Am. J. Physiol.* 228:



890-894, 1975.

3. Takeda M, Koide H, Jung KY, Endou H : Intranephron distribution of glycine-amidinotransferase in rats. *Renal Physiol. Biochem.* 15: 113-118, 1992.
4. Sekine T, Hosoyamada M, Haga A, Takeda M, Endou H, Suzuki M, Obinata M : Ammonia production in cell lines established from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Contr. Nephrol.* 110:98-112, 1994
5. Jung KY, Endou H : Biphasic increasing effect of angiotensin-II on intracellular free calcium in isolated rat early proximal tubule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165: 1221-1228, 1989.
- 6 Takeda M, Iwasaki S, Yoshida H, Kon V: Divergent expression of ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptor in mesangial cells exposed to cyclosporine. *Am. J. Pathol.* 144: 473-479, 1994.
7. Kanai Y, Hediger MA: Primary structure and functional characterization of high affinity glutamate transporter. *Nature* 360: 467-471, 1992.
8. Prie D, Ronco PM, Baudouin B, Geniteau-Legendre M, Martine M, Piedagnel R, Estrade S, Lelongt B, Verroust PJ, Cassingena N, and Vandewalle A: Activation of the simian virus 40 (SV40) genome abrogates sensitivity to AVP in a rabbit collecting tubule cell line by repressing membrane expression of AVP receptors. *J. Cell. Biol.* 113: 951-962, 1991.
9. Loalit SJ, O'Carroll AM, McBride OW, Koining M, Morel A, Brownstein MJ: Cloning and characterization of a vasopressin V<sub>2</sub> receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. *Nature* 357:336-339, 1992.

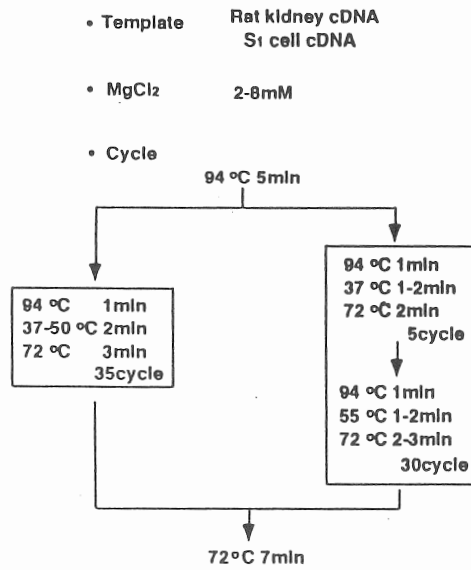


Figure 1 PCR conditions

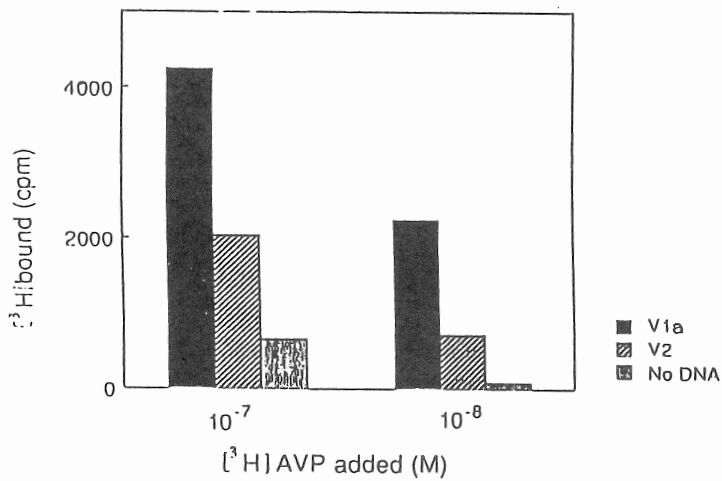


Figure 2 Binding of [<sup>3</sup>H]-AVP to the V<sub>1</sub> (a) and V<sub>2</sub> (b) receptor in COS-1 cells.

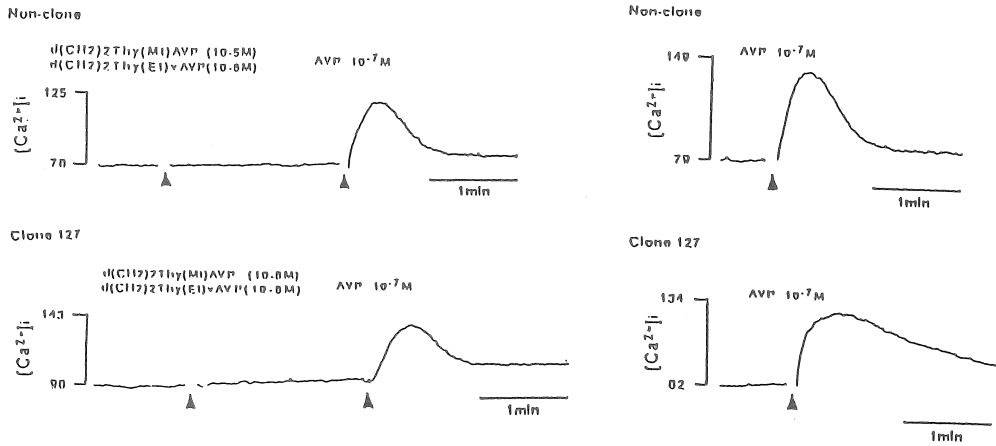


Figure 3 Calcium waveforms evoked by AVP and its analogues in S1 cells derived from SV-40 large T antigen transgenic mice.

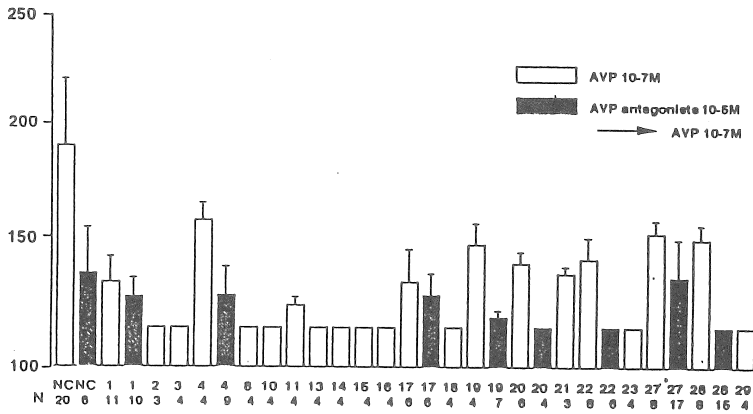


Figure 4 Effect of AVP and its analogues on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in S1 cells derived from SV-40 large T antigen transgenic mice.

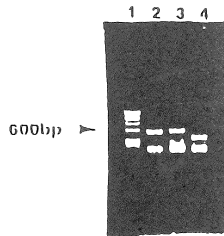


Figure 5 Ethidium bromide-stained agarose gel for PCR products.  
 1. DNA marker  
 2. Random hexamer primed rat kidney cDNA  
 3. Oligo-dT primed rat kidney cDNA  
 4. Rat kidney cDNA library

## **Role of a novel vasopressin receptor, Vp in intrarenal sodium transport and its pathophysiological significance**

Hitoshi Endou, Michio Takeda and Makoto Hosoyamada

Department of Pharmacology and Toxicology, Kyorin University School of Medicine

### **Summary**

Recently we reported that a new AVP receptor (Vp) in early proximal tubule (S<sub>1</sub>) using a cytosolic free calcium measurement. The physiological significance of Vp was an inhibition of the ATP-consuming on transport system based on changes in cellular ATP. In order to clarify further the functional significance of Vp, we have tried the molecular cloning of Vp. Although rat kidney cDNA library was screened with binding assay and panning method using COS-1 cell expression system, no positive clone was identified. Thus, we undertook PCR cloning. In order to collect highly Vp expressed cell as a template, we have screened cloned S1 cells derived from SV-40 large T antigen transgenic mice using cytosolic calcium measurement, resulting in the non-cloned cells as the most stably Vp-expressed cells. Degenerative primer was constructed according to the conserved amino acid sequence of AVP receptor family. PCR reaction was processed under various conditions. However, only cDNA for V<sub>1</sub> and V<sub>2</sub> have been cloned by PCR, suggesting that Vp may have a low homology with AVP receptor family. Therefore, we have started the expression cloning system using *Xenopus* oocytes for the molecular cloning of Vp.