Osaka University Knowledge Archive

Title	Cloning and functional expression of a novel isoform of ROMK inwardly rectifying ATP-dependent K+ channel, ROMK6 (Kir1.1f)
Author(s)	近藤, 千香子
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40746
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【49】

氏　　名	近　藤　千香子（こんどう　ちかこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　13722　号
学位授与年月日	平成10年 3 月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学　位　論　文　名	Cloning and functional expression of a novel isoform of ROMK inwardly rectifying ATP-dependent K^+ channel, ROMK6 (Kir1. 1f) （ATP依存性内向き整流カリウムチャネルROMK1（Kir1. 1a）の新規isoformのクローニング及びその機能解析）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　松澤　佑次 （副査） 教　授　多田　道彦　　教　授　倉智　嘉久

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

内向き整流性カリウム（K^+）チャネルは，種々の細胞の興奮性の調節及びK^+イオンの分泌に関与している。このチャネルファミリーに属するROMKチャネルは腎皮質集合管上皮細胞のapical membrane側に存在するlow-conductance K^+チャネルであると考えられている。ROMKチャネル遺伝子は5つのエクソンよりなり，splicingによりヒトでは5つ（hROMK1-5），ラットでは3つ（rROMK1-3）の5'側が異なるmRNAのisoformが形成されることが報告されている。これらのisoformは腎尿細管上皮において各々発現分布が異なっており，ROMKmRNAの多様性が尿細管各部位でのK^+イオンの分泌調節に重要であることが示唆されている。本研究の目的はROMKチャネルmRNAにさらに多様性があるか否かを明らかにすることである。

【方法ならびに成績】

1）クローニング

rROMK1（Kir1. 1a）の塩基配列をもとにオリゴヌクレオチドプライマーを作成し，RT-PCR法によりラット腎臓より抽出した全RNAを用いてクローニングを行った。得られたPCR産物をpBluescript II SK^-に組み込み塩基配列を決定した。今回のクローニングにより128lbp及び1403bpの長さの二種類のcDNA fragmentが単離された。前者はrROMK1そのものであった。後者ではROMK1の開始コドンから35bp下流域に122bpの塩基配列の挿入を認めROMK1の新たなsplicing variantと考えられたのでROMK6（Kir1. 1f）と命名した。この122bpの塩基配列の挿入によりROMK6はframe shiftをおこし，アミノ酸配列上はROMK1のN末端側の19アミノ酸が欠如した蛋白であることが予想された。今回見い出された122bpは今までに報告されているヒト及びラットROMKの5つのエクソンとは異なっており，rROMK1遺伝子には新たなエクソン（exon5）が存在することが示唆された。

2）機能解析

チャネルの発現およびその電気生理学的検討はアフリカツメガエル卵母細胞にそれぞれ滅菌水，ROMK1およびROMK6cRNAを注入し，二本電極膜電位固定法を用いて行った。ROMK6を発現させた卵母細胞では，ROMK1を発現させたときとほぼ同じ性質を示すBa^{2+}感受性の弱い内向き整流カリウム電流が記録された。

3）発現分布

ROMK1とROMK6の発現分布をRT-PCR法を用いて比較検討した。

ROMK 1mRNAは腎臓，脳，脾，など限られた組織にのみ発現していたのに対し，ROMK6mRNAは腎臓，脳のみでなく，心臓，眼，肺，肝，脾，膵や骨格筋と広範囲の組織に存在することが示された。また，腎臓と骨格筋より得られたRT-PCR産物をベクターに組み込み，新たなROMKisoform（ROMK6）と同じ核酸配列であることを再度確認した。

【総括】

1）ATP依存性内向き整流カリウムチャネル（rROMK1／Kir1. 1a）の新しいisoformであるrROMK6（Kir1. 1f）をラット腎臓よりRT-PCR法を用いて単離した。

2）rROMK6（Kir1. 1f）蛋白はROMK1蛋白よりN末端側19アミノ酸が短いと予想された。

3）rROMK6は電気生理学的にはrROMK1とほぼ同じBa^{2+}感受性の弱い内向き整流性を示すK^+チャネルを発現した。

4）rROMK6の発現分布はこれまで報告されているROMKisoformとは異なり，腎臓，脳ばかりでなく心臓，眼，肺，肝，脾，膵，骨格筋と種々の器官に存在することが明らかとなった。

【考察】

rROMK6は種々の器官に広く存在する組織細胞，たとえば血管平滑筋細胞，内皮細胞，上皮細胞および末梢神経細胞などに発現している可能性が考えられる。rROMK6と同じアミノ酸配列であるrROMK2はATP-binding cassette（ABC）蛋白の一つである嚢胞性線維症の原因遺伝子CFTRと連関し，上皮細胞のATP感受性K^+（K_{ATP}）チャネルを構成している可能性が示唆されている。ところが，CFTRは腎臓，肺，膵臓や消化管などの上皮細胞に広く分布しており，一方，rROMK2は腎臓など限られた臓器にのみ発現している。したがって，多くの器官にある上皮細胞では必ずしもrROMK2がCFTRとカップリングするのではなく，広範囲の器官に分布しているrROMK6がCFTRとK_{ATP}チャネルを構成し，K^+イオンの分泌に関与している可能性があると思われた。

論文審査の結果の要旨

本研究は，内向き整流性K^+チャネルファミリーのひとつであるROMKチャネルのmRNAの多様性について検討したものである。

ROMK1チャネルは，免疫組織染色法による検討で腎皮質集合管上皮細胞のapical membrane側に存在することが知られており，また電気生理学的にも集合管細胞のapical membrane側に存在するlow-conductanceのカリウムチャネルに類似するとされている。ROMKチャネルmRNAは5つのexonが報告されており，各々の組み合わせによりヒトでは5つ（hROMK1-5），ラットでは3つ（rROMK1-3）のisoformが報告されている。これらのisoformの発現分布は明らかに異なっており，それぞれのisoformが尿細管各部位でのカリウムイオンの分泌調節に特異な役割を担っていると考えられている。以上の事を背景に，RT-PCR法を用いてラット腎臓より新たなexonの存在を示唆する新しいクローンを単離した。このクローンは，想定アミノ酸配列より2つの膜貫通領域（M1，M2）とポア形成部位（H5を有していた。さらに，rROMK1の36と37番目の塩基配列の間に122bpの塩基挿入を認める構造をしていた。この122bpの挿入により，rROMK6はフレームシフトをおこしrROMK1より19アミノ酸短いcDNAをコードしていた。以上より新たなクローンはROMKサブファミリーのisoform，rROMK6とした。電気生理学的検討でもrROMK6の電流はrROMK1と同じように弱い内向き整流カリウム電流として認められており，機能的なカリウム

チャネルを構成する裏付けがなされている。発現分布からはrROMK6が，他のisoformと大きく異なり，広範囲の組織に発現する唯一のチャネルで，種々の組織におけるカリウムイオンの分泌に関与すると考えられた。本論文は広範囲の組織におけるカリウムイオンの輸送に大きく関わる新たなチャネル蛋白をクローン化しており，これは今後のROMKチャネルの分子機構解明，さらには広範囲の組織に存在する細胞，例えば血管平滑筋，内皮細胞，上皮細胞や末梢神経細胞などのカリウムイオン輸送の研究にとって重要であると考え，学位に値するものと認める。