



Title	Cloning and functional expression of a novel isoform of ROMK inwardly rectifying ATP-dependent K <sup>+</sup> channel, ROMK6 (Kir1.1f)
Author(s)	近藤, 千香子
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40746">https://hdl.handle.net/11094/40746</a>
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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	近 藤 千 香 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 7 2 2 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 <sup>+</sup> 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<sup>+</sup>) チャネルは、種々の細胞の興奮性の調節及び K<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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 は尿管細管上皮において各々発現分布が異なり、ROMK mRNA の多様性が尿管細管各部位での K<sup>+</sup> 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<sup>-</sup> 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128bp 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 ROMK6 cRNA 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<sup>2+</sup> 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 と関連し、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る。

### 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

チャン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ンネルで、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ンネル蛋白をクローン化しており、これは今後の ROMK チャン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。