

Title	The strong inwardly rectifying background potassium channel (IK1) in cardiac myocytes is composed of Kir2.2 (IRK2) : RT-PCR analysis of single myocyte mRNA
Author(s)	松本, 重人
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41659
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について こちら 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	まつもと しげと 松 本 重 人
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 4 5 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 11 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	The strong inwardly rectifying background potassium channel (I_{K1}) in cardiac myocytes is composed of Kir2.2 (IRK 2) : RT-PCR analysis of single myocyte mRNA. (膜二回貫通内向き整流性カリウムチャネル (Kir2.0) のサブユニットである IRK 2 は、心筋におけるカリウム背景電流 (I_{K1}) を構成する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 倉智 嘉久 (副査) 教 授 松澤 佑次 教 授 三木 直正

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

内向き整流性カリウムチャネル (Kir) はカリウムイオンを通すことで細胞の静止膜電位をカリウム平衡膜電位附近まで低下させ、正常な心筋の活動電位の発生に必須の役割を果たしていることが知られている。このカリウム背景電流 (I_{K1}) を構成する古典的内向き整流性カリウムチャネルが、今までクローニングされた膜 2 回貫通型カリウムチャネル (Kir2.0) のどのサブユニットで構成されているかを明かにするのが本研究の目的である。

【方法ならびに成績】

材料はランゲンドルフ法でラットの心臓に16%コラゲナーゼ含有する灌流液を導入し、単離した心房、心室筋細胞を顕微鏡下で微細ガラス管を用いて吸引採取し使用した。まず心筋における mRNA の発現を単離心筋細胞を対象に RT-PCR 法により検討した。報告されている 3 つの Kir2.0 サブユニットそれぞれに特異的な DNA 配列に対するオリゴヌクレオチドプライマーを作成し、単離細胞から抽出した mRNA を鋳型とする cDNA に対して RT-PCR を行ったところ、Kir2.2 に対する増幅バンドを確認できたが、Kir2.1, 2.3 については 2 種類のプライマーで検討したが RNA の発現は見られなかった。次に Kir2.0 サブユニットそれぞれを、HEK293T 細胞、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ各々のチャネルをパッチクランプ法によって測定し、先に単離した心筋細胞のカリウム背景電流 (I_{K1}) と比較検討した。Kir2.1, 2.2, 2.3 それぞれを発現した系から得られた各チャネルのシングルチャネルのコンダクタンスはそれぞれ、Kir2.1 : ~ 21 pS, Kir2.2 : ~ 29 pS, Kir2.3 : ~ 11 pS であった。一方心筋から得られたチャネルのコンダクタンスは 28pS で、Kir2.2 のそれとほぼ同じであった。また -80 mV における平均開口時間は Kir2.1 : ~ 250 msec, Kir2.2 : ~ 100 msec, Kir2.3 : ~ 300 msec に対し、 I_{K1} では ~ 100 msec で Kir2.2 とほぼ同じであった。

【総括】

今までその構成ユニットの不明であった心筋細胞のカリウム背景電流 (I_{K1}) は mRNA の発現と電気生理学的検討により、Kir2.2 サブユニットで構成されていると示唆された。

論文審査の結果の要旨

心臓は全身に血液を循環させるポンプである。心臓の規則正しい調律は洞結節にあるペースメーカー細胞の自発的興奮により制御され、興奮は刺激伝導系つまり、房室結節を介し His 束、プルキンエ繊維を伝って心室筋に到達する経路を通り心臓全体のリズムカルな収縮、弛緩を行っている。

心臓の各部位には電氣的に分化した各細胞が機能的に働いており、それぞれの電氣的特徴は洞結節での浅い静止膜電位と短い活動電位、一方プルキンエ繊維、心室筋での深い静止膜電位と長い持続時間ということで表される。この電氣生理学的差は、古典的内向き整流性 K^+ チャンネル (I_{K1}) の発現濃度の差に依存しており、 I_{K1} の分子生物学的解析が、心臓生理を解明する上で重要な点であった。

本研究は I_{K1} 電流の電氣生理学的特徴を実際に提示した上で、今まで I_{K1} に電氣生理学的特徴の持っている Kir2.0 サブファミリーのクローンを強制発現した系と比較検討したものである。ここでパッチクランプ法を用いて、Kir2.2 が I_{K1} 電流とほぼ同様のチャンネル性質を持つことを示している。分子生物学的にはノザンプロットの結果を踏まえ、個々の心筋細胞から single cell RT-PCR による mRNA の微量解析という新しい手法を使い、Kir2.2 のみの mRNA の発現をしめしている。このことから I_{K1} 電流は Kir2.2 によって構成され、心臓における各部での電氣生理学的特徴を決定する重要な分子であることを明らかにした。

今まで未知であった I_{K1} チャンネル分子の同定を single cell RT-PCR という新しい技法を取り入れて検討しており、またその結論は心臓の電氣的分化に言及し、心臓電氣生理学の見地からも大きく貢献した内容であると考ええる。以上より本研究論文は学位に値するものと認める。