

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590264

研究課題名(和文)二重還流モデル腎集合管細胞を用いたイオンチャネル発現の分子制御機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms for expression of renal potassium channels in doubly-perfused cultured collecting duct cells.

研究代表者

久保川 学 (Kubokawa, Manabu)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：70153327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：腎集合管より尿へのカリウム排泄は、ROMKと名付けられたKチャネルにより行われている。しかし、チャネルの膜発現機序には不明な点も多く、その解明は分子生理学的に重要である。本研究ではクローニングしたROMK遺伝子を培養マウスM1細胞に導入し、培養条件の違いに対するチャネル発現の影響をチャネル活性の観察と、細胞内のチャネル発現の形態を観察し検討した。その結果、二重還流法によるM1細胞管腔膜には発現に必要とされるPDZドメイン結合部を欠損させたROMKでも高率に発現することを見出した。このことは、ROMKの管腔膜のみへの発現は膜選択的であるが、これは膜蛋白特異性を有しない結果であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Renal K secretion is mediated by the collecting duct cell, and apical ROMK K channels are responsible for this secretion. Although regulation of the ROMK K channel activity has been examined by many researchers, precise mechanisms for channel expression to the apical membrane is still unknown. In this study, we investigated the expression mechanisms using exogeneously transfected cloned ROMK K channels to cultured M-1 kidney cells. Channel expression was observed with fluorescent microscope and channel current was examined using the patch-clamp technique. As the results, expression of ROMK to the apical membrane required no PDZ domain in the membrane, but other membranes required PDZ domain to express ROMK K channels. Since ROMK K channels are expressed only to the apical membrane but not the basolateral membrane in vivo, it is suggested that ROMK K channels are selectively expressed to the apical membrane in the epithelial cells which may possess no ROMK-PDZ domain in the membrane.

研究分野：医歯約学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：ROMK Kチャネル 膜蛋白質遺伝子発現 遺伝子発現 M-1細胞 管腔膜

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 腎尿細管には種々の蛋白質が存在し、生体における体液の恒常性維持のために各機能を担っている。集合管細胞からクローニングされ、ROMK と名付けられた K チャネルは、多くの研究により、集合管細胞管腔膜に存在し、尿中へのカリウム排泄に重要な役割を果たしていると考えられている。さらにその後、この K チャネルの開閉機能が ATP や様々なリン酸化酵素によって制御されていることが明らかになり、専らチャネル機能の調節に関する研究が多くなされてきた。

(2) 一方、集合管でのナトリウム再吸収に関与すると考えられている上皮型 Na チャネル (ENaC) や水再吸収に関与するアキュアポリンと名付けられた水チャネルなどは、その発現機序について多くの研究がなされている。そのような状況で、未だ不明な点が多い ROMK の管腔膜への発現機序について研究することは、分子生理学的意義とともに、臨床におけるカリウムホメオスタシスへの関与についても貴重な知見を提供できるものと考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) 腎によるカリウム排泄の重要な経路と考えられている集合管管腔膜の ROMK K チャネルの開閉機序に関しては多くの研究がなされている。実際、その開口促進は尿へのカリウム排泄を増加させ、逆にチャネル閉鎖はカリウム排泄を減らし、高カリウム血症をきたすことが明らかにされている。とくに臨床的にはサイクロスポリン A のような免疫抑制薬は細胞内カルシウムを増加させ、それが C キナーゼ (PKC) や  $Ca^{2+}$ /カルモジュリン依存性キナーゼ (CaMK) を活性化させ、チャネルを閉鎖させることにより高カリウム血症を誘発することなどが知られている。しかしながら、カリウム排泄量を調節しているのは、チャネルの開閉のみではなく、その管腔膜に発現しているチャネルの数にも大きく依存している。多くのチャネルが存在し、それらがすべて開口しているときと、わずかな K チャネルしか発現していない状態で開口している場合は、カリウム排泄量も当然異なっている。

(2) 本研究では、これまでの研究では未だ明らかにされていない ROMK K チャネルの発現調節の機序や発現した K チャネルの局在について細胞膜分子の検討や ROMK 遺伝子の変異株などを用いて研究した。ROMK K チャネルの発現には何が必要なのか、あるいは何があれば発現しないのかという根本的な発現の分子メカニズムを解明したいと考えた。さらに、ROMK K チャネルは、in vivo の尿尿細管細胞では何故、極性を有する管腔膜にのみに限局して発現するのか、それを決定しているのは何かを明らかにしたいと考え、研究を計画した。

## 3. 研究の方法

(1) ROMK1 遺伝子クローニングと細胞内導入。ROMK のクローニングはヒトの ROMK1 遺伝子の塩基配列に従いおこない、C 末端、或は N 末端に EGFP を連結させ ROMK1 遺伝子を作成した。この遺伝子をリポフェクタミン (LTX) を用いて実験 48 時間前に培養 M-1 細胞へ導入した。

(2) M-1 細胞の培養条件。

コラーゲン処理したガラス上で単純に培養したものを極性を持たない単一細胞として用い、メンブレン (膜) インサートを有する培養皿上でシート状に培養したものを極性をもつ細胞として実験に用いた。なお、走査電子顕微鏡で、単一細胞の細胞膜表面は平滑であること、およびインサート上のコンフルエント細胞は管腔膜特有の微絨毛を有することを確認した。

(3) パッチクランプ法。

cell-attached クランプ法と whole-cell クランプ法を用い、前者は個々のチャネル電流が観察されるため、観察されたチャネル数を記録し、後者は全細胞電流が観察されるため、K チャネルブロッカーを用いて、それで減少した電流が K チャネル成分であると判断して、K チャネルの相対的発現度を求めた。

なお、インサート上のコンフルエント細胞は管腔膜面と側底膜とを別々に二重還流し、細胞極性のある in vivo 尿細管に近い状態とし、培養皿上面が管腔膜を形成することにより、そこに存在するチャネルを観察した (図 1)。

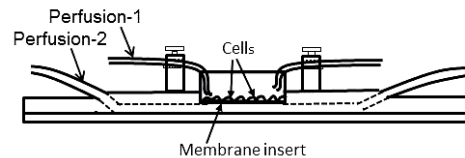


図1. インサート上M-1細胞の二重還流

(4) 蛍光顕微鏡を用いた観察。

ROMK 遺伝子に連結させた EGFP の蛍光観察により、細胞内の ROMK の局在を観察した。なお、M-1 細胞には遺伝子導入なしでは ROMK K チャネルのような内向き整流性の K チャネルがみられないことがすでに分かっているため、パッチクランプ実験はすべて EGFP 蛍光を認める細胞で行った。

## 4. 研究成果

(1) EGFP 結合部位の違いによる ROMK K チャネルの発現。

EGFP 結合 ROMK1 遺伝子導入を試みた培養 M-1 細胞の内、実際に細胞内に EGFP の蛍光を認めたのは全体の 5 % 以前後であり、細胞の培養条件による差や EGFP 結合部位の違いによる明らかな差は認めなかった。

まず、EGFP を ROMK1 の C 末端に結合させた

もの (ROMK1-EGFP) と、N 末端に結合させたもの (EDFP-ROMK1) を用い、細胞内蛍光の発現状況を観察した。この比較において、C 末端に EGFP を結合させた ROMK1-EGFP の方が、N 末端に EGFP を結合させた EGFP-ROMK の方が蛍光発現細胞の頻度は同様であったが、蛍光強度は ROMK-EGFP の方が高かったため、この ROMK-EGFP を用いて実験を行った。

次に、単一細胞に ROMK1-EGFP を導入させた細胞のチャネル電流をパッチクランプ法で観察した。この条件下で観察された K チャネル電流は全体として頻度が低く、また観察されたときのチャネル数は少なかった。また、EGFP は細胞質全体にみられるが、細胞膜を FM4-64X で染色すると、EGFP の一部は細胞膜にまでは広がっていないように見えることが多かった。

一方、コンフルエントに増殖したインサート上の細胞では、細胞質の蛍光強度は単一細胞と明らかな差はなかったが、EGFP は細胞膜に小胞状に広がっていることが多かった。さらに、観察されたチャネル電流では、単一細胞では少ないチャネル電流が見られたが、コンフルエント細胞では3つ以上のチャネル電流が見られることが多かった (図2)。

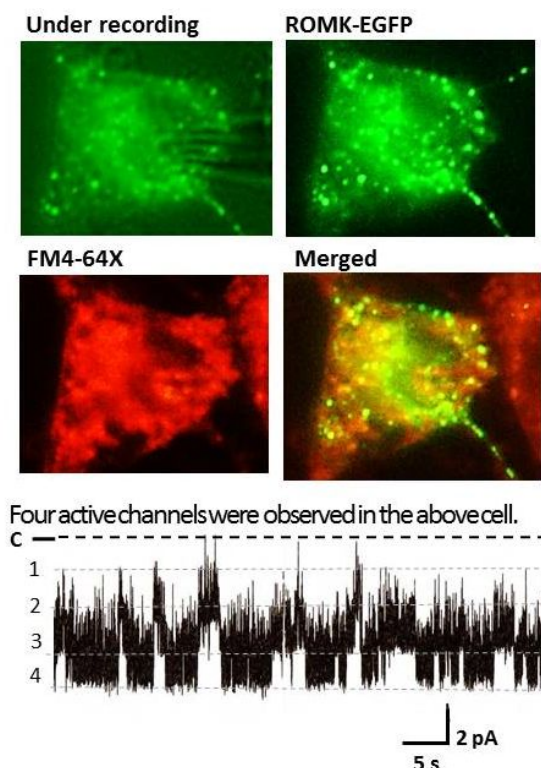


図2. ROMK-EGFP 発現 M-1 細胞の蛍光像とパッチクランプ法でみられたチャネル電流

これらの実験結果を統計処理したものが結果が図3と図4である。単一細胞では、コンフルエント細胞に比べ、チャネルの観察頻度(図3)、およびパッチパイペット内に観察されたチャネルの数(図4)ともに有意に低かった。しかしながら、inside-out パッチに

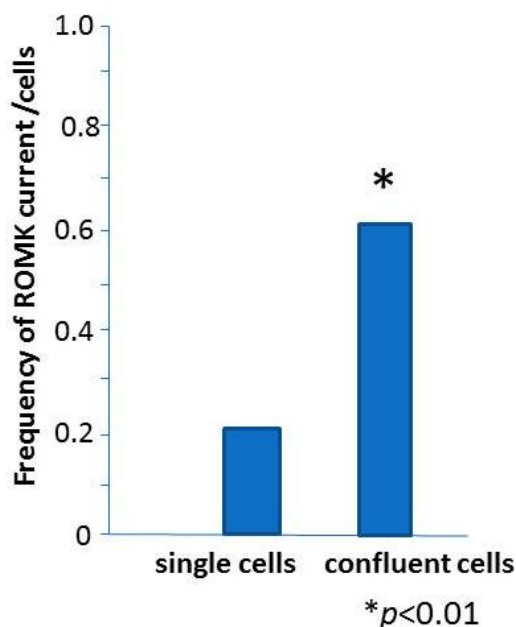


図3. 単一細胞とコンフルエント細胞で観察された ROMK K チャネルの頻度

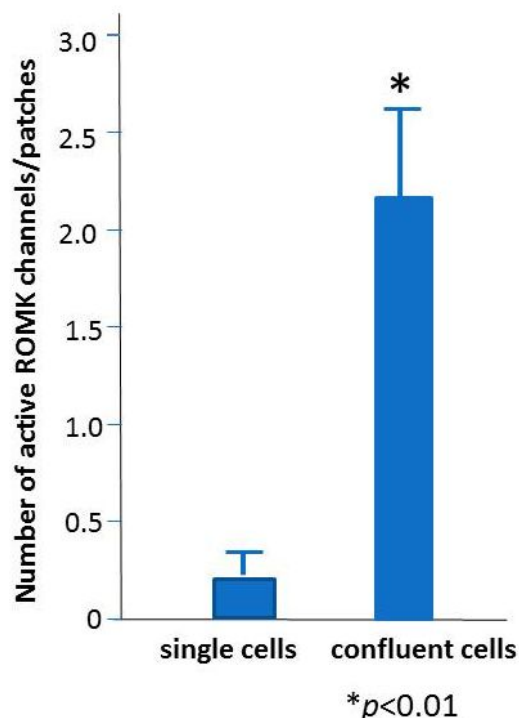


図4. 単一細胞とコンフルエント細胞で観察された単一パッチ電極内のチャネル数

よる観察では、細胞全体を表すことはできない。そこで次に、whole-cell クランプ法による全細胞膜電流の観察を行なった。この際、K チャネルブロッカーである  $Ba^{2+}$  (2 mM) を用い、 $Ba^{2+}$  によって減少した電流成分が K チャネルの指標として、全細胞膜電流における ROMK K チャネルの占める割合を求めた。また、ROMK K チャネルは細胞内に ATP が存在しないと run-down を起こし、チャネルが閉じてし



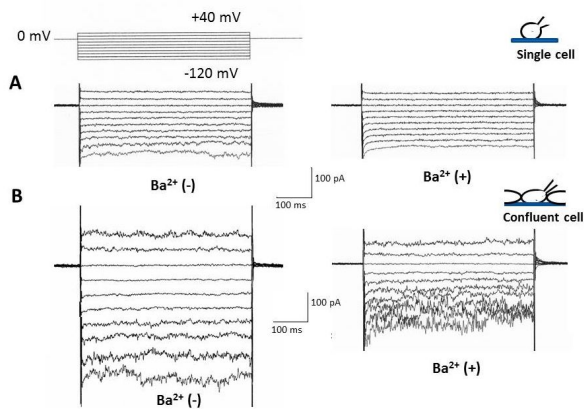


図5. ROMKを発現した単一細胞(A)とコンフルエント細胞(B)の全細胞電流とそれに対するBa<sup>2+</sup>の影響

まうため、whole-cell クランプ実験においては、パイペット内に0.1 mM ATPを加えた。

ROMK1 導入による whole-cell クランプ実験例を図5に示す。これらの図に示すように、コンフルエント細胞では全細胞電流が大きく、しかも Ba<sup>2+</sup>の影響を大きくうけているのが分かる。以上の結果は、C末端にEGFPを結合させたROMK1ではコンフルエント細胞の関空面に多く発現することが示唆された。

しかしながら、チャンネルの細胞膜発現には膜蛋白であるPDZドメインにチャンネル蛋白が結合することが必要であると考えられており、ROMK1のPDZドメイン結合部位はそのC末端にあるとされている。したがって、C末端へのEGFP連結はPDZ結合部位を阻害している可能性がある。そこで、つぎにROMK1のC末端を解放し、N末端にEGFPを連結させたEGFP-ROMK1をM-1細胞に導入して実験を行った。

EGFP-ROMK1を導入したM-1細胞では、C末端の例とは異なり、単一細胞でも多くのROMK1 Kチャンネルの発現を認めるようになった(図6)。すなわち、単一細胞の細胞膜へのROMK1発現にはPDZ結合部位が重要な役割を果たすものと考えられ、M-1細胞にはPDZドメインが存在すると示唆された。

一方、コンフルエント細胞の管腔膜ではEGFP-ROMK1でもROMK1-EGFPであってもチャンネル観察の頻度に差はなかった(図7)。

これらの結果は単一細胞の表面膜にROMK1 Kチャンネルが発現するにはPDZドメイン結合部位が重要であると考えられていたが、コンフルエント細胞の管腔膜ではROMK1 Kチャンネルの発現に、PDZを必要としないことが示唆された。

(2)ROMK1発現におけるPDZドメイン結合部位の役割。

ROMK1のPDZ結合部位はC末端のペプチドからなり、それに相当する塩基を切除し、PDZ結合部位を持たないEGFP-ROMK1 PDZbを作成し(図8)、それを単一細胞、およびコンフル

エント細胞に導入し、その膜発現について検討した。

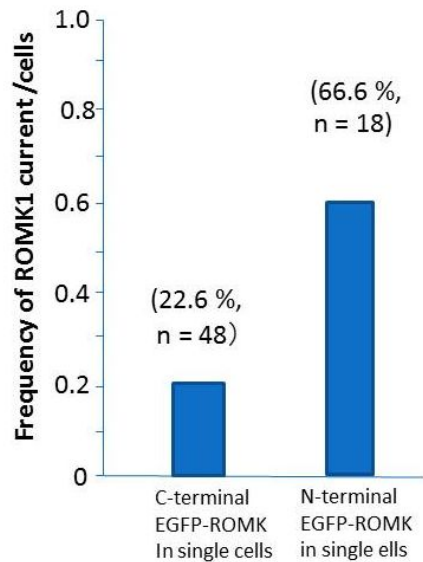


図6. ROMKにEGFPをC末端に結合したものと(N末端に結合して単一細胞に発現させたときのチャンネルの観察頻度

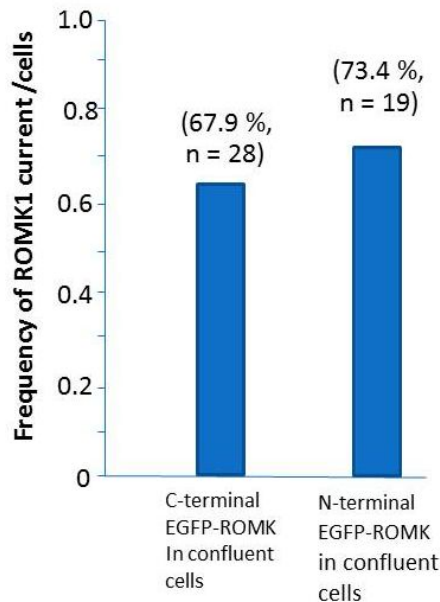


図7. ROMKにEGFPをC末端に結合したものと(左)N末端に結合し田茂の(右)でコンフルエント細胞に発現させたときの、チャンネルの観察頻度

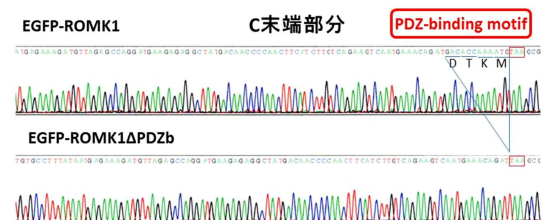


図8. ROMK1におけるPDZ結合部位とその除去後

EGFP-ROMK1 PDZb を用いるにあたり、その細胞内局在や細胞表面への可視的局在を、正常な EGFP-ROMK1 と比較した。その結果、PDZb の湯無にかかわらず、携帯的な差は蛍光顕微鏡で見出すことはできなかった。

この結果の図 9 はガラス坂上で観察したものであったが、インサート上のコンフルエント細胞においても同様の実験を行い、PDZ ドメイン結合部のあるものとなないものとの蛍光観察で、その局在を観察した。

この状態でパッチクランプ法により、実際の膜表面の ROMK1 K チャネルの発現を観察した。その結果、単一細胞においては C 末端に EGFP を連結 ROMK1-EGFP と同様に ROMK1 K チ

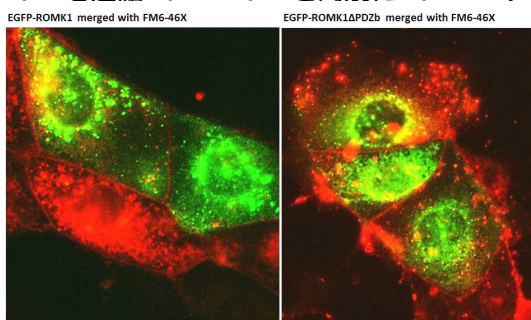


図 9. EGFP-ROMK (左) と EGFP-ROMK PDZb (右) の蛍光写真 (FM4-64X との二重染色)

ヤネルの発現は減少した。この時のチャネル発現頻度は、ROMK1-EGFP のときと同様であったことから、C 末端に EGFP を連結させたときの発現頻度現象は、PDZ ドメイン結合部位を阻害して結果であると考えられた (図 10)。

一方、コンフルエント細胞の管腔膜における ROMK1 K チャネルの発現頻度は PDZ ドメインがあるなし関わらず、同様の高い発現頻度を認めた。すなわち、これらの結果は ROMK1 の管腔膜発現には PDZ ドメインは必要がなく、管腔膜では無作為条件で発現することが示唆される結果であった (図 11)。すなわち、管腔膜には ROMK1 に適合する PDZ ドメインがその発現には不要であり、一方、単一細胞膜への

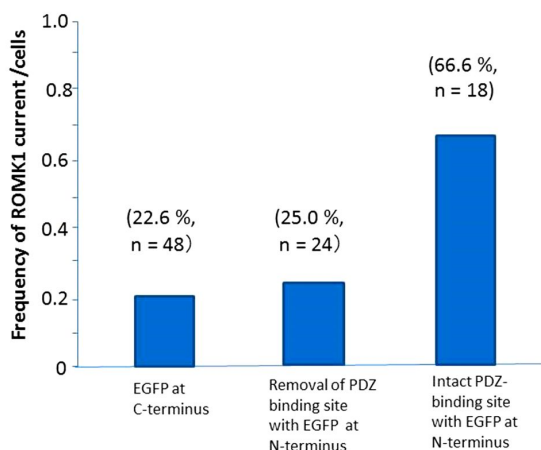


図 10. 単一細胞への 3 種類の ROMK1 K チャネルの導入とチャネル活性発現の比較

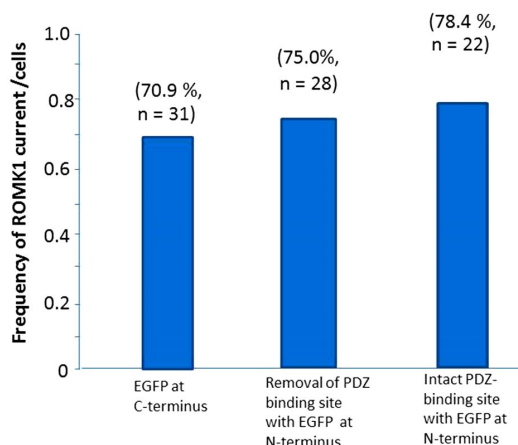


図 11. コンフルエント細胞の極性膜への 3 種類の ROMK1 導入とチャネル活性の発現頻度の比較

十分な発現は PDZ ドメインが必要である。これからの結果から、もし、集合管細胞の ROMK1 に相当する PDZ ドメインが存在しないのであれば、ROMK1 が管腔膜により強く発現し、極性のない細胞膜や側底膜には発現が認められないという、in vivo に近い状態が再現できるものと考えられた。

培養集合管細胞である M-1 細胞には ROMK1 に対する PDZ ドメインが存在し、管腔膜以外でもその結合によりチャネル発現がみられたため、今後、PDZ ドメインの存在についても検討する必要があると考えられる。

## 5. 以上主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1) Nakamura K, Komagiri Y, Kubokawa M.: Interleukin-1 $\beta$  suppresses activity of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel in human renal proximal tubule cells. J Physiol Sci 査読有、63: 377-387, 2013.

2) Kubokawa M, Nakamura K.: Roles of Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphorylation and dephosphorylation in regulation of potassium channels in renal tubule cells. Recent Res Devel Physiol, 査読有、5 175-191, 2012.

3) Nakamura K, Komagiri Y, Kubokawa M.: Effects of cytokines on K<sup>+</sup> channels in renal tubular epithelia. Clin Exp Nephrol, 査読有、16: 55-60, 2012.

4) Kubokawa M, Nakamura K, Komagiri Y.: Interaction between calcineurin and

Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase-II in modulating cellular functions. Enzyme Res、査読有、2011、DOI: 10.4061/2011/587359, 2011

5) Kubokawa M, Komagiri Y, Nakamura K.: Functional relationships between Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinases and phosphatase in regulation of K<sup>+</sup> channel activity and intracellular Ca<sup>2+</sup> in kidney tubule cells. J Iwate med Assoc 査読無、63: 209-218, 2011.

〔学会発表〕(計 5 件)

1) Kubokawa M, Nakamura K, Mayanagi T, Sobue K.: Characteristics of exogenous expression of ROMK K channels with EGFP fused to the different terminus in polarized and non-polarized membranes in cultured M-1 cells. 第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月、鹿児島.

2) Kubokawa M, Nakamura K, Mayanagi T, Sobue K.: Expression of exogenously transfected ROMK K<sup>+</sup> channel activity favors the polarized apical membrane of cultured M-1 collecting duct cells. 37th International Conference of Physiological Sciences (IUPS), Birmingham, UK, 2013 年 7 月.

3) 久保川 学, 中村一芳, 真柳 平, 祖父江 憲司: 培養 M1 集合管細胞への ROMK 遺伝子導入によるチャネル活性発現と細胞膜極性との関連. 第 56 回日本腎臓学会総会, 2013 年 5 月、東京

4) Kubokawa M, Nakamura K, Mayanagi T, Sobue K.: Functional expression of transfected ROMK potassium channels in polarized and non-polarized membranes of cultured M1 cells. 第 90 回日本生理学会大会, 東京、2103 年 3 月、東京.

5) Kubokawa M, Nakamura K, Komagiri Y: Regulation of Renal ATP-dependent Potassium Channels by Phosphorylation and Dephosphorylation Processes. 2012 International Ion Channel Conference, Jeju, Korea, 2012 年 8 月.

〔図書〕(計 1 件)

Kubokawa M, et al. InTech, Patch-Clamp Technique, 2012, pp.108.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等  
<http://physiology2.iwate-med.ac.jp/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保川学 (KUBOKAWA, Manabu)  
岩手医科大学医学部生理学講座教授  
研究者番号 : 70153327

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

中村一芳 (NAKAMURA, Kazuyoshi)  
岩手医科大学医学部生理学講座講師  
研究者番号 : 50237385

真柳 平 (MAYANAGI, Taira)  
岩手医科大学医歯薬総合研究所講師  
研究者番号 : 20432544

祖父江憲治 (SOBUE, Kenji)  
岩手医科大学医歯薬総合研究所所長  
研究者番号 : 20112047