

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研究テーマ	遺伝子編集マウス作出法 iGONAD を用いた IKS-TG マウスの遺伝子編集				
研究組織	代表者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	坂本 多穂
	研究分担者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	黒川 洵子
		所属・職名	薬学部・学部4年	氏名	須藤 優香
		所属・職名	薬学部・学部5年	氏名	加地 憲武
	発表者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	坂本 多穂

講演題目	ヒト心筋 I _{Ks} チャネル心臓特異的遺伝子改変マウスの作製
------	---

研究の目的、成果及び今後の展望

心筋 I_{Ks} チャネルは、心筋活動電位再分極相の形成を担う K⁺チャネルで、イオン透過孔を形成する α サブユニット KCNQ1 遺伝子と β サブユニット KCNE1 遺伝子によりコードされる。以前、我々は I_{Ks} チャネルが一酸化窒素(NO)により活性化して心筋活動電位短縮を起こすことを報告した。敗血症時には自然免疫応答により NO 濃度が急上昇するが、I_{Ks} チャネルはこの際に活性化し、心筋電気活動の恒常性維持に関与する可能性がある。我々は、ヒト I_{Ks} チャネル心筋特異的発現トランスジェニックマウス(I_{Ks}-TG マウス)にて、敗血症症状が野生型マウスよりも軽度であることを示した。そこで、I_{Ks} チャネルの NO 感受性をつかさどる KCNQ1 の 455 番目のシステイン残基をアラニンに置換したマウス(I_{Ks}-C445A-TG マウス)作出を目指した。

マウスに導入するための変異 pJG/αMHC-KCNE1-KCNQ1 プラスミドを作製した。pJG/αMHC ベクター(pBSK2(+))ベースで αMHC promoter を挿入したプラスミドに、pcDNA3.1(-)KCNE1-KCNQ1 を平滑末端と粘着末端でライゲーションし、サブクローニングした。ベクター側は SalI でカットした粘着末端を KOD+ Neo で平滑化し、セルフライゲーションを防ぐために CIAP で脱リン酸化した。インサート側は NheI でカットした粘着末端を Klenow fragment で平滑化した。作製したプラスミドをコンピテントセルに導入し、LB 培地で培養した。コロニー PCR でコンストラクトを確認したコロニーを液体 LB 培地で培養し、Midi-Prep でプラスミドを回収した。作製したプラスミドのシーケンス解析をユーロフィン株式会社にて行い、KCNQ1-KCNE1 の配列と各種変異が正確にコードされていることを確認した。哺乳類細胞へ変異 KCNE1-KCNQ1 融合チャネルを発現させるための変異 pcDNA3.1(-)KCNE1-KCNQ1 プラスミドを作製した。作製したプラスミドを CHO-K1 細胞に一過的に強制発現させ、パッチクランプ法により、脱分極刺激で活性化する外向き K⁺電流を観測した。その結果、KCNE1 と KCNQ1 の 2 つのクローンを別々のプラスミドで共発現させたとときと同様の I_{Ks} チャネル電流に特徴的な遅い活性化が観察された。従って、KCNE1 と変異体 KCNQ1 を融合しても、チャネル機能に変化がないことが示された。このプラスミドを導入したマウスを生理学研究所の平林真澄先生のもとで現在作製中である。今後はこのマウスを用い、敗血症における I_{Ks} チャネル活性と NO 感受性の関与について詳細を検討する。