

令和元年6月21日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08188

研究課題名(和文)細胞内マグネシウム恒常性維持におけるTRPM7チャネルの役割

研究課題名(英文) Involvement of TRPM7 in intracellular magnesium homeostasis

研究代表者

田代 倫子 (Tashiro, Michiko)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：20398762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラット心室筋細胞において、TRPM7チャネルを活性化させるナルトリベンは、Mgイオンの流入も加速させ、その効果はTRPM7に対する効果と同等だった。ラット心筋由来の培養細胞株H9c2細胞のTRPM7発現をRNA干渉法にて抑制すると、細胞内Mgイオン濃度は保たれていたが、細胞外Mg濃度上昇によって促進されるMg流入は減弱した。以上より、心筋細胞でTRPM7はMg流入経路として働くことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マグネシウム(Mg)イオンは細胞内で300以上の反応の補酵素として働き、代謝やDNA合成でも重要な役割を担う。心筋細胞内のMg濃度調節系の破綻は心不全や不整脈を引き起こす。このため、細胞内Mg濃度は一定に維持されているが、調節機構はまだ解明されていない。調節を担う分子の解明は、創薬へと発展し、治療に繋がっていく。本研究ではラット心室筋細胞へのMg流入が促進される時に、TRPM7が流入経路となることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：In rat ventricular myocytes, Mg²⁺ influx rate was increased by naltriben which activates TRPM7 channel, in a concentration-dependent manner. This effect is similar to that reported for TRPM7. H9c2 cells derived from the rat heart were transfected with shRNA of TRPM7 or non-targeting shRNA (control). Intracellular free magnesium concentration ([Mg²⁺]_i) of TRPM7 knockdown cells was not significantly different from that of control cells. The addition of extracellular Mg²⁺ raised [Mg²⁺]_i in control cells. The increment in [Mg²⁺]_i of TRPM7 knockdown cells was significantly smaller than that of control cells. In conclusion, it is suggested that TRPM7 knockdown decreases the rate of Mg²⁺ influx in H9c2 myocytes, although cytoplasmic Mg²⁺ homeostasis appears to be still maintained at normal [Mg²⁺]_o.

研究分野：細胞生理学

キーワード：マグネシウム TRPM7 心筋細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内 Mg^{2+} は細胞の分化増殖、細胞内酵素反応、イオンチャネルの調節などに関わり、細胞機能維持に重要な役割を持つ。 Mg^{2+} 恒常性の破綻は心不全を惹起する悪循環を促し、重篤な不整脈の誘因となる。 Mg^{2+} 欠乏が癌転移や糖尿病などの代謝性疾患を増悪させる報告もあり、生体内 Mg^{2+} 恒常性維持の破綻が多くの疾病と深く関わっている。

(2) 細胞内 Mg^{2+} が厳密に維持されている制御機構については未だ不明な点が多い。 Mg^{2+} 輸送体分子がいくつか同定されてきたが、哺乳類細胞で生理的に Mg^{2+} チャンネルとして働く分子は分かっていない。哺乳類細胞の Mg 輸送体候補として、非選択性陽イオンチャネルである TRP チャンネルファミリーの TRPM(メラスタチン)サブファミリーに属する TRPM7 や SLC41A1 が挙げられているが、生体内 Mg^{2+} 恒常性維持に必要などうかの見解は一致していない。

2. 研究の目的

細胞内 Mg^{2+} 恒常性維持には複数の分子が関連している可能性があるため、細胞内環境を維持したまま Mg^{2+} 輸送体の性質を検討する研究計画を立てた。分子レベルからの細胞内 Mg^{2+} 濃度調節機構の解明に向けて、本研究では Mg^{2+} チャンネルの候補である TRPM7 チャンネルに着目した。内在性 TRPM7 の発現を抑制した細胞を機能解析し、細胞内 Mg^{2+} 濃度調節機構における TRPM7 チャンネルの役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 内在性 TRPM7 活性を調節した標本

1) TRPM7 活性を調節する薬剤で細胞を処理した。

ラット心室筋の急性単離細胞を用いて、TRPM7 活性調節薬存在下での Mg 輸送能を解析した。活性剤としてナルトリベン、抑制剤として NS8593 を用いた。

2) TRPM7 蛋白の発現を抑制するため、細胞に TRPM7shRNA を導入した。

成獣ラット心室筋細胞を初代培養し、TRPM7shRNA を組換えたアデノウイルス(rAdV)を感染させ、48 時間後の細胞で Mg 輸送能の解析を行った。

ラット心筋由来培養細胞 (H9c2 細胞株) にリポフェクション法で TRPM7shRNA を導入し、72 時間後の細胞で機能解析を行った。

(2) 経時的 $[Mg^{2+}]_i$ 測定による Mg^{2+} 輸送速度の解析

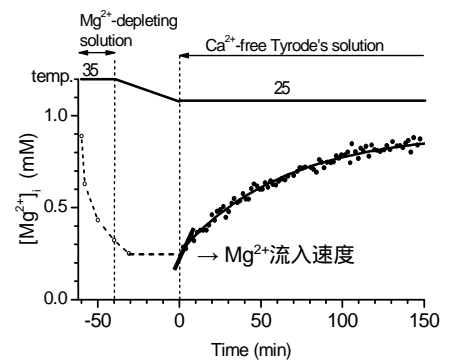
細胞内に蛍光 Mg 指示薬(furaptra)を AM 体にて負荷し、2 波長励起によって得られた蛍光強度比から $[Mg^{2+}]_i$ を見積もる。細胞内較正は以前同一実験装置で得られた値を用いる。

1) Mg^{2+} 流入速度測定のプロトコール (図A)

細胞を高 K^+ 、 Mg^{2+} 除去液に浸漬し、予め細胞内 Mg^{2+} 濃度を低下させる。

細胞外灌流液を生理的なイオン濃度溶液 (Ca^{2+} -free Tyrode's solution : $140Na^+$ 、 $4K^+$ 、 $1Mg^{2+}$) に変えると、細胞内へ Mg^{2+} が取り込まれていく。この過程で $[Mg^{2+}]_i$ の経時変化を測定すると、指数曲線で近似する。 $t=0$ の微分値を Mg^{2+} 流入速度として解析する。

図A Mg^{2+} 流入実験例

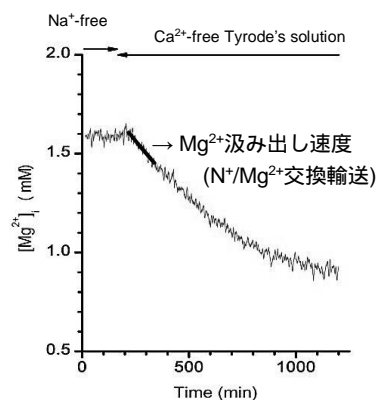


2) Mg^{2+} 汲み出し速度測定のプロトコール (図B)

細胞を高 Mg^{2+} 、低 Na^+ 液に浸漬し、予め細胞内 Mg^{2+} 濃度を上昇させる。

細胞外灌流液を生理的なイオン濃度溶液に変えると、細胞外へ Mg^{2+} が汲み出されていく。この過程で $[Mg^{2+}]_i$ の経時変化を Mg^{2+} 汲み出し速度として解析する。

図B Mg^{2+} 汲み出し実験例

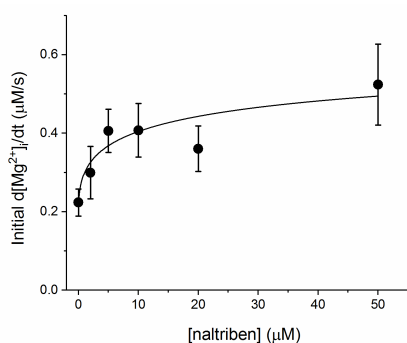


(3) TRPM7 以外の Mg^{2+} 輸送体分子、SLC41A1 についても組換えたアデノウイルス(rAdV)を作成し、成獣ラット心室筋初代培養細胞に感染させた。3 日後に細胞内外の Na^+ 濃度勾配に依存した Mg^{2+} 汲み出し輸送能の解析を行った。

4. 研究成果

(1) ラット心室筋の急性単離細胞で観られる Mg^{2+} 流入は、TRPM7活性化剤のナルトリベンによって促進され、TRPM7抑制剤のNS8593によって抑制された。 Mg^{2+} 流入速度に対するナルトリベンの効果は容量依存性を示し、50%効果濃度(EC50)は24 μM だった (図C)。この効果はTRPM7に対する効果と同等であった。細胞を生理的な細胞外液で灌流中にナルトリベンを投与しても細胞内遊離 Mg イオン濃度は上昇しないが、ナルトリベン投与と同時に細胞外 Na イオンを除去すると Mg 濃度は上昇し、 Na イオンの再添加で元に戻った。つまり、TRPM7の活性化によって Mg イオンは流入するが、過剰な Mg イオンは Na - Mg 交換輸送によって汲み出されると考えられる。この結果よりTRPM7による Mg 流入が細胞内 Mg 恒常性維持に関与している可能性が示唆された。

図C Mg 流入速度に対するナルトリベンの効果



(2) 成獣ラット心室筋の初代培養細胞にTRPM7shRNA、SLC41A1shRNAを組換えアデノウイルスを用いて導入し、共発現させたGFP蛋白の蛍光により遺伝子導入が確認された細胞で Mg 輸送能の解析を行った。4日以上培養も試みたが、初代培養細胞では形態の変化や線維芽細胞との融合が見られ、 Mg^{2+} 輸送能の再現性が低かった。本実験の標本としては不相当と考え、株化細胞を用いた実験に変更した。

(3) ラット心室筋細胞由来の培養細胞株であるH9c2細胞を用いて、RNA干渉法によりTRPM7の発現を抑制した。TRPM7のshRNA(small hairpin RNA)と共に導入の指標として蛍光蛋白質(GFP)遺伝子をリポフェクション法で細胞内へ導入した。48時間培養の結果、遺伝子導入効率は約50%、TRPM7遺伝子発現は非標的遺伝子のshRNAを組み込んだ細胞(コントロール)と比べて約40%に抑制されていた。遺伝子導入後72時間の細胞に蛍光 Mg 指示薬(mag-fura-2)を負荷し、細胞内遊離 Mg イオン濃度を測定した。TRPM7遺伝子発現を抑制した細胞群の細胞内 Mg イオン濃度は 1.00 ± 0.05 mM ($n=9$)となり、コントロール群(1.01 ± 0.06 mM, $n=10$)と比べて有意差が無かった。次に、細胞外液の Mg 濃度を高くして(1.92 mM)、30分間灌流すると、TRPM7遺伝子発現が抑制された細胞群では、コントロールと比べて細胞内 Mg イオン濃度の上昇が鈍くなった。細胞内 Mg 濃度が上昇した時に観られる Na - Mg 交換輸送を利用した Mg イオンの汲み出し活性には、TRPM7遺伝子発現抑制は影響しなかった。以上の結果から、生体の心筋細胞でTRPM7の減少は Mg 恒常性維持に影響しないが、TRPM7が生理的な Mg 流入経路となることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tashiro M, Inoue H, Konishi M. Modulation of Mg^{2+} influx and cytoplasmic free Mg^{2+} concentration in rat ventricular myocytes. J Physiol Sci 査読有, vol. 69, 2019, pp97-102

〔学会発表〕(計 8 件)

田代倫子、井上 華、小林 了、小西真人. TRPM7 遺伝子発現を抑制した H9c2 細胞へのマグネシウムイオンの流入. 第9回アジアオセアニア生理学会(第96回日本生理学会) 2019

田代倫子、井上 華、田井 忍、小西真人. TRPM7 チャネルの活性化は細胞外 Na^+ 非存在下で細胞内 Mg^{2+} 濃度を上昇させる. 第95回日本生理学会, 2018

田代倫子、井上 華、田井 忍、小西真人. TRPM7 の生理的役割を探索する薬理的アプローチ. 第181回東京医科大学医学会総会, 2018

田代倫子、小比類巻-下澤 生、井上 華、田井 忍、福田紀男、小林 了、小西真人. ラット心室筋細胞の Na^+ 依存性 Mg^{2+} 汲み出し機構における SLC41A1 の役割. 第94回日本生理学会, 2017

Tashiro M, Inoue H, Tai S, Konishi M. Effects of an activator of TRPM7, naltriben, on magnesium influx of rat ventricular myocytes. 61th Annual Meeting of the Biophysical Society, 2017

田代倫子、小比類巻-下澤 生、井上 華、田井 忍、福田紀男、小林 了、小西真人. 成獣ラット心室筋初代培養細胞の Mg²⁺恒常性. 第 93 回日本生理学、2016

Tashiro M, Inoue H, Tai S, Konishi M. Magnesium influx in primary cultured ventricular myocytes of adult rats. 60th Annual Meeting of the Biophysical Society, 2016

田代倫子、井上 華、田井 忍、小西真人. TRPM7 は生理的 Mg チャネルなのか？第 246 回生理学東京談話会、2015

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：井上 華

ローマ字氏名：Hana Inoue

所属研究機関名：東京医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号 (8 桁): 20390700