

令和元年9月3日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H01751

研究課題名(和文) Mgイオンはエネルギー代謝を制御する新規な細胞内情報伝達物質か？

研究課題名(英文) Is Mg ion a novel second messenger for regulating energy metabolism?

研究代表者

岡 浩太郎 (OKA, KOTARO)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授

研究者番号：10276412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞内マグネシウム(Mg)イオン動態をイメージングにより網羅的かつ定量的に調べ、細胞内情報伝達物質としてのMgイオンの新規な役割を明らかにした。培養初期の神経細胞について研究を進めたところ、抑制性神経伝達物質であるGABAの神経回路成熟への関与を明らかにできた。このGABAの効果は細胞内Mgイオンの動員を介していた。特にこれまで明らかにされていなかったMgイオンのシグナル伝達下流で、細胞内シグナル分子であるERKの活性を抑制、CREBの活性を促進、mTORの活性を促進した。特にmTORシグナルに関しては、Mgイオンは活性のオン・オフを切り替えるスイッチの役割を担っていることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Mgイオンはその重要性については広く理解されていたものの、具体的な役割については未知の点が多かった。今回の研究では、Mgイオンの細胞内動員は同じ2価の陽イオンであるCaとは大きく異なることを明らかにするとともに、これまで不明であったMgイオン下流の情報伝達過程について明らかにすることに成功した。特に主要なシグナル経路であるERK、CREB、mTORのリン酸化過程をMg動員が異なる仕方で制御していることを明らかにした。これらの結果はMgイオンの生理的な役割の理解を深めるとともに、様々な細胞レベルでの疾患や病態を理解する一助になるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the dynamics of intracellular magnesium (Mg) ions comprehensively and quantitatively by several fluorescent imagings, and clarified the novel role of Mg ion as an intracellular signal transducer. In the research on culture neurons in the early developmental stages, we revealed that an inhibitory neurotransmitter, GABA, was involved in the maturation of neural circuits. This effect of GABA was mediated by the mobilization of intracellular Mg ions. In particular, downstream of Mg ion signal transduction, which has not been clarified so far, it suppressed the activity of the intracellular signal molecule ERK, promoted the activity of CREB, and promoted the activity of mTOR. Especially for the mTOR signal, it was shown that Mg ion plays a role of a switch to turn on / off the activity.

研究分野：生体生命情報学・神経科学・生物物理

キーワード：生体生命情報学 シグナル伝達 神経科学 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

生体中のマグネシウム (Mg) イオンの役割の重要性については、片頭痛、高血圧、糖尿病、パーキンソン病など種々の疾病と関連していることが臨床現場では従来知られていた。しかしながら、細胞レベルでの Mg イオンの役割の理解は進んでおらず、細胞膜やミトコンドリア内膜に幾つかのチャネルや輸送体の存在が知られている程度であった (図 1)。しかしながら最近になって細胞内 Mg イオンの役割に着目した論文が免疫関連細胞の研究で目立つようになり (例えば Jin et al. Science, 2008.)、とりわけ “Second messenger role for Mg²⁺ revealed by human T-cell immunodeficiency” という刺激的なタイトルの論文が提出されている (Li et al. nature, 2011)。しかしながらこの論文では、レセプターから下流の直接 Mg イオンが関係したシグナル伝達の肝心な部分は未知である。またこの論文の研究には Mg イオン選択性の低い蛍光プローブが利用されていることから、その結果の評価には慎重になる必要がある。しかしながら Mg イオンをセカンドメッセンジャーとして調べる研究が今後大きな展開をみせる兆しが世界的にある。

現在までにわかっている細胞内 Mg 動員機構は図 1 に示したようにわずかなものである。ここで Ca イオンの細胞内動態についての研究が飛躍的に進んだ背景には、多くの人が使いやすい蛍光プローブを利用して、自らの興味がある現象について調べたことが一因となっている。同様に、多くの研究者が利用可能な Mg イオン計測手法の確立は重要な研究課題である。免疫系細胞については先に述べたように Mg イオンに関してその重要性を認識した研究が進められているが、他の細胞でも同じような研究の試みがなされていくものと期待される。また動態がわかることにより、例えば細胞内マグネシウムイオンと選択的に結合してシグナル伝達を司るタンパク質 (カルシウム研究におけるカルモジュリンのようなタンパク質) が見出されるものと期待される。また仮に特定のターゲットタンパク質が Mg イオンに関しては見出されなかったとしても、細胞内での顕著な Mg イオン濃度の変動は、多くの Mg イオン要求性の酵素反応を修飾する可能性が高いため、種々の生理現象と関与するものと期待される。

特に本研究では、エネルギー代謝に関して細胞内 Mg イオンが情報伝達分子としてどのような役割を演じているのかについて着目する。新規な Mg イオンプローブを利用した我々の研究から、ミトコンドリア膜電位の脱分極によりミトコンドリアから Mg イオンが細胞質にミトコンドリアから放出されること (Kubota et al. BBRC, 2003, Kubota et al. BBA, 2005, Fujii et al. JACS, 2014)、ミトコンドリアからの Mg イオン放出には細胞外からの Ca イオン流入がトリガーとなること (Sindo et al. JNR, 2010)、一酸化窒素(NO)刺激に伴い、NO-cGMP-PKG 経路を介してミトコンドリアからの Mg イオン放出が起きること (Yamanaka et al. FEBS Lett., 2014) を示し、ミトコンドリアが細胞内 Mg 動員の主たるソースであることを世界に先駆けて明らかにしてきた。また細胞内 Ca イオン、cGMP、cAMP を同時イメージングするための新規な手法の開発 (Niino et al. PLoS one, 2009, 2010)、神経成長円錐における cAMP、cGMP、Ca イオンの同時計測によるセカンドメッセンジャークロストークの可視化 (Kobayashi et al. Sci. Rep., 2013) にも成功している。ミトコンドリアエネルギー代謝に関しては、NAD(P)H の蛍光定量計測が可能で新規蛍光プローブの開発に世界で初めて成功した (Komatsu et al. Angew. Chem. Int. Ed., 2014)。この計測技術を利用して、ミトコンドリアに特化してアセチル化を行い、エネルギー代謝をスイッチングする新技術を開発している (Shindo et al. 投稿中)。これらの技術は、細胞内情報伝達のクロストークとミトコンドリア機能との関係を定量的に調べようという本提案研究に利用することができる。併せて我々のグループは細胞内 Mg イオン濃度計測用蛍光プローブの開発を 2000 年より進めてきており (Suzuki et al. Anal. Chem. 2000)、生理的な Ca イオン濃度変化に一切影響されずに細胞内 Mg イオン濃度が定量可能な KMG-104 とその誘導体 (Komatsu et al. JACS, 2004, Fujii et al. JACS, 2014) は現在標準的な細胞内 Mg イオン濃度計測プローブとして利用されている。

以上のようにエネルギー代謝と関連づけた種々の細胞内セカンドメッセンジャー動態の計測から細胞内 Mg イオン動態を定量的に調査するための準備は十分に整ってきている。

2. 研究の目的

神経細胞内マグネシウム (Mg) イオン動態をイメージングにより網羅的かつ定量的に調べることで、エネルギー代謝を制御する細胞内情報伝達物質としての Mg イオンの新規な役割を明らかにする。我々が開発してきた蛍光 Mg イオンプローブと種々の細胞内セカンドメッセンジャーとエネルギー代謝物質 (カルシウム (Ca) イオン、サイクリック GMP およびサイクリック AMP、ATP、NAD(P)H) プローブの他、新規な細胞内温度計測技術の開発により、種々の刺激や擾乱を神経細胞に加えた際の細胞内 Mg 動員の機構について網羅的な時系列データを取

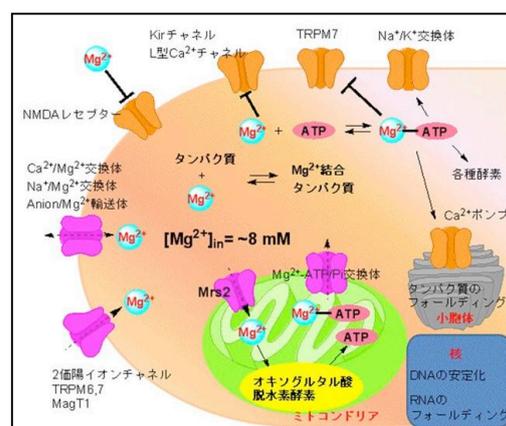


図 1 細胞内での Mg 動員

得する。新規な Mg イオン動態解析ツールの開発を並行して進めるとともに、計測したセカンドメッセンジャークロストークについて定量的な理解を深める。

3. 研究の方法

主にラット培養神経細胞を用いて、細胞内 Mg イオン動員メカニズムを、マルチカラーイメージング技術を利用した包括的な解析を種々の蛍光イメージング技術を併用して進める。具体的にはこれまでに我々が開発してきた有機低分子型の Mg イオンプローブに加え、蛍光タンパク質型の Mg イオンプローブを利用して、細胞内の Mg イオン動員メカニズムを明らかにし、その生理的意味を示す。また Mg イオンとエネルギー代謝やタンパク質リン酸化との関係を明らかにするために、これらをイメージングするための FRET 型蛍光タンパク質プローブを併用する。

4. 研究成果

4.1 パーキンソン病様に細胞死が誘導される際の Mg イオン輸送体の変化

PC12 細胞にパーキンソン病様の細胞死を誘導することが知られている MPP⁺処理を行ったところ、ミトコンドリアからの一過的な細胞質への Mg イオンの流出とそれから 16 時間以上にわたる細胞内 Mg イオン濃度の低減を見出した。興味深いことには、この細胞死は細胞内 Mg イオン濃度変化に依存しており、例えば細胞外 Mg イオン濃度を上昇させることにより、この細胞死を緩和することができることを明らかにした。この結果はエネルギー代謝、Mg イオン濃度と細胞死との関係を明確に示すものである。さらにこの MPP⁺処理を行なっている間に様々な Mg イオン輸送タンパク質発現動態を RT-PCR 法により調べた。今回調べた 13 種の Mg イオン輸送タンパク質では、SLC41A2 の mRNA 発現レベルは増加し、ACDP2、NIPA1 と MMgT2 は減少した。SLC41A2、ACDP2 または NIPA1 をノックダウンすると MPP⁺により誘導された細胞変性を加速し、またこれらの過剰発現はそれを減速させた。NIPA1 および MMgT2 の mRNA 発現レベルの低下は、ミトコンドリア電子伝達系の阻害剤であるロテノンや、過酸化水素およびミトコンドリアの脱共役剤である FCCP によっても誘引された。このことは、ミトコンドリア機能障害がこの下方制御に関連していることを示している。SLC41A2 の mRNA の増加は脱共役剤 FCCP および MPP⁺によって誘導された。このことはミトコンドリア膜電位の脱分極およびそれに伴う細胞 ATP 枯渇が細胞死を誘引していることを示している。これらのことは、ミトコンドリア機能を介した細胞内 Mg イオンの役割を考える上で重要な知見である(発表論文⑥)。

4.2 ミトコンドリア機能と Mg イオンとの関係

細胞内 Mg イオン動態の解析とエネルギー代謝との関係解明をメタボロームと蛍光イメージングを併用して進めた。我々は細胞内 Mg イオンがエネルギー代謝を制御するような特別な情報伝達物質ではないかと考えており、特にミトコンドリアでの Mg イオンの恒常性の調節がエネルギー代謝に重要な関与をしているのではないかと考えている。我々はミトコンドリアの脱共役剤を細胞に加えると、ミトコンドリアから大量の Mg イオンが細胞質に放出されることを明らかにし、ミトコンドリアは細胞内の主要な Mg イオンストアであることを示した。本年度は特にミトコンドリアの主要な Mg イオン輸送体である Mrs2 に着目して研究を進めた。この輸送体をノックダウンすると、細胞内 ATP 濃度は減少し、その際にエネルギー代謝とミトコンドリア形態が大きく変化することを見出した。さらにこの細胞では種々の細胞ストレスに対する耐性が低下していることを明らかにした(発表論文④)。

またミトコンドリア機能をその場で改変することを目指して、ミトコンドリアのタンパク質を特異的にアセチル化する新規な化学物質 tributylphosphine (PBU3) の創生とそれによるミトコンドリア機能の改変にも成功した(発表論文⑤)。PBU3 の添加と除去により、ミトコンドリア断片化を可逆的に誘導することができた。このことは、PBU3 はミトコンドリア機能解析ツールとして利用できることを示した。

また我々は相関分析法を用いることによりミトコンドリア機能と神経細胞機能との関係を明らかにする研究も進めた。ミトコンドリアの神経機能への寄与は最近関心が持たれている。しかし、ほとんどの場合、ミトコンドリア活性はミトコンドリア内膜電位 (IMPmito) の測定値を使用して推定されており、ミトコンドリア ATP の動態 (ATPmito) についてはほとんど知られていなかった。そこで、神経活動に伴うミトコンドリアの変化と神経運動との関係を明らかにするために、神経細胞における IMPmito と ATPmito の同時イメージングを行なった。ミトコンドリアの大きさ、輸送速度、輸送方向は ATPmito や IMPmito に依存しないことがわかった。しかし、ミトコンドリアの分裂/融合中に ATPmito と IMPmito の変化が見られた。IMPmito はミトコンドリア分裂により脱分極し、融合により過分極した。一方で ATPmito レベルは融合後に増加した。ミトコンドリアの密度は軸索突起より成長円錐 (GC) の方が高いため、トータルな ATPmito シグナル(密度×ATPmito)は GC の方が高かった。GC でのこのトータルシグナルは軸索伸長と相関していることがわかった。しかし、平均 IMPmito は、GC では比較的過分極していたが、GC での IMPmito と軸索伸長との間に相関はなかった。これ差異を明らかにするために詳細な相関分析を行なったところ、IMPmito と ATPmito のレベルが常に正確に相関しているわけではないことが明らかとなった。このことはミトコンドリア機能と神経細胞機能とのカップリングが短時間で変化することを示し

ている（発表論文②）。

4.3 神経回路の成熟における Mg イオン動員の必要性

まず、これまでに我々が開発してきた細胞内 Mg イオンプローブを用いて、神経ネットワーク形成時において細胞内マグネシウムイオン濃度の変化をもたらす生理的な刺激の探索を行った。その結果、神経発生の初期において神経伝達物質の一種である γ -アミノ酪酸 (GABA) がミトコンドリアから細胞質中へと Mg イオンの放出を誘導することを発見した。この放出された Mg イオンは細胞内シグナル ERK の活性を抑制、CREB の活性を促進、mTOR の活性を促進する事を明らかにした。特に mTOR シグナルに関しては、Mg イオンは活性のオン・オフを切り替えるスイッチの役割を担っていることを示すことに成功した。さらに、Mg イオンシグナルは神経突起の太さや、神経細胞間のシナプスによる結合を増強し、神経細胞ネットワークにおける細胞同士の機能的な結合を促進することを明らかにした。このように GABA によって誘導される

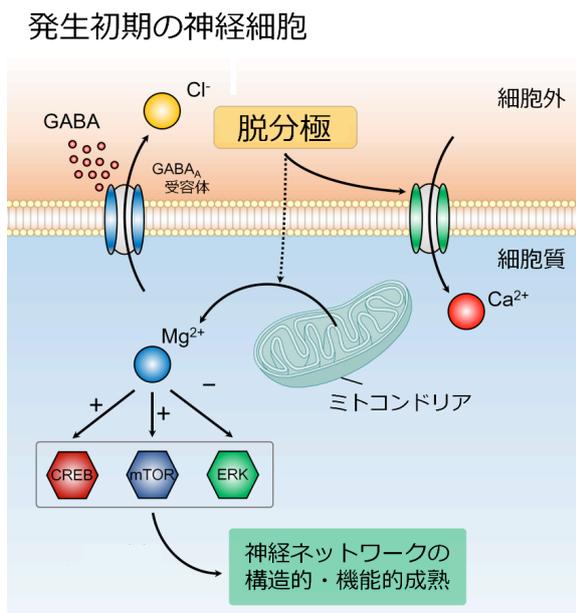


図2 神経回路の成熟と Mg イオンの動員

ミトコンドリアからの Mg イオン放出は、複数の細胞内シグナルを制御することによって神経ネットワークの成熟を促進しているものと思われる。これらの実験結果は、細胞内 Mg イオンは新規の情報伝達物質であることを示している。従来から良く知られている細胞内シグナル伝達では、シグナル分子は特異性が高く、特定のシグナル分子が活性化するターゲットは単一の下流分子であることが一般的であった。しかし本研究で、Mg イオンは複数の下流シグナルを制御する“マルチターゲット”な細胞内情報伝達物質であることを示した。このことは、Ca シグナルのような洗練された情報伝達システムを獲得する前の発生ステージにおいて、Mg イオンは同時に複数の下流シグナルを制御することによって情報伝達を行っている可能性を示唆する。本研究の結果は、細胞分化が進む段階における細胞のシグナル伝達システムの獲得過程について新たな視点を与える結果が得られた（発表論文①）。

4.4 Mg イオンによる細胞分裂期の染色体凝縮

細胞が分裂する際、ヒトでは全長 2 メートルにもおよぶゲノム DNA からコンパクトに凝縮した染色体が作られ、2 つの細胞に正確に分配される。半世紀以上前、細胞に大量に存在する Mg イオンがゲノム DNA 凝縮の鍵となりうることが提唱されたことがあったが、当時は細胞内 Mg イオン濃度を測定する手段が無かったため証明されぬまま忘れられていた。我々は、様々な蛍光タンパク質技術とイメージング技術を駆使して細胞分裂の際に Mg イオン濃度が一過的に上昇することを示すとともに、これが負の電気を帯びている DNA 同士の反発を弱め、染色体の凝縮を促進していることを明らかにした。本研究によって、実際に Mg²⁺ が細胞のなかで染色体の凝縮にかかわっていることが初めて証明された（発表論文③）。この研究は国立遺伝学研究所前島一博 教授、大阪大学永井健治 教授、京都大学今村博臣准教授らとの共同研究であり、我々は特に分裂時の細胞質での Mg イオン濃度の定量を行なった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 6 件）

- ① Yamanaka R, Shindo Y, Hotta K, Suzuki K, Oka K.: GABA-Induced Intracellular Mg²⁺ Mobilization Integrates and Coordinates Cellular Information Processing for the Maturation of Neural Networks. *Current Biology*: 28(24):3984-3991, 2018. doi: 10.1016/j.cub.2018.10.044.
- ② Suzuki R, Hotta K, Oka K.: Transitional correlation between inner-membrane potential and ATP levels of neuronal mitochondria. *Scientific Reports*: 8:2993, 11pages, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-21109-2.
- ③ Maeshima K, Matsuda T, Shindo Y, Imamura H, Tamura S, Imai R, Kawakami S, Nagashima R, Soga T, Noji H, Oka K., Nagai T.: A Transient Rise in Free Mg²⁺ Ions Released from ATP-Mg Hydrolysis Contributes to Mitotic Chromosome Condensation. *Curr Biol.*; 28(3): 444-451, 2018. doi: 10.1016/j.cub.2017.12.035.

- ④ Yamanaka R, Tabata S, Shindo Y, Hotta K, Suzuki K, Soga T, Oka K. : Mitochondrial Mg²⁺ homeostasis decides cellular energy metabolism and vulnerability to stress. *Scientific Reports*. 6:30027, 12pages, 2016. doi: 10.1038/srep30027.
- ⑤ Shindo Y, Komatsu H, Hotta K, Ariga K, Oka K. : An Artificial Reaction Promoter Modulates Mitochondrial Functions via Chemically Promoting Protein Acetylation. *Scientific Reports*. 6:29224, 9pages, 2016. doi: 10.1038/srep29224.
- ⑥ Shindo Y, Yamanaka R, Suzuki K, Hotta K, Oka K. : Altered expression of Mg²⁺ transport proteins during Parkinson's disease-like dopaminergic cell degeneration in PC12 cells. *Biochim Biophys Acta*. 1863(8):1979-84, 2016. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.05.003.

[学会発表] (計 20 件)

- ① Oka K. : Mg²⁺ as a second messenger in early developmental stages of neurons. IV International Magnesium Symposium "MAGNESIUM IN HEALTH AND DISEASE", 2019.
- ② Ariumura Y, Kikuchi T, Yamanaka R, Shido Y, Hotta K, Mochizuki M, Oka K. : Characterization of neural cells derived from human dental pulp stem cells. *Neuroscience 2018*, 2018.
- ③ 新藤豊, 山中龍, 鈴木孝治, 堀田耕司, 岡浩太郎, 細胞内局所でのマグネシウムイオンの FRET イメージング, 第 27 回日本バイオイメーjing学会学術集会 2018 年.
- ④ 新藤豊, 山中龍, 鈴木孝治, 堀田耕司, 岡浩太郎, 細胞内マグネシウムイメージング, 第 27 回日本バイオイメーjing学会学術集会, 2018.
- ⑤ 有村勇輝, 菊池瞳子, 山中龍, 新藤豊, 望月真衣, 中原貴, 岡浩太郎, ヒト歯髄幹細胞から神経分化させた細胞の特徴付け, 第 41 回日本神経科学大会, 2018.
- ⑥ Iizumi M, Suzuki R, Yamanaka R, Shindo Y, Hotta K, Oka K. : Estimation of metabolic energy balance in neurons by using fluorescent imagings. *Neuroscience 2017*, 2017.
- ⑦ Suzuki R, Hotta K, Oka K. : Native dynamics of mitochondrial membrane potential and ATP levels in growing neurites visualized by simultaneous imaging. *Neuroscience 2017*, 2017.
- ⑧ Arimura Y, Kikuchi T, Yamanaka R, Shindo Y, Hotta K, Mochizuki M, Nakahara T, Oka K. ; Characteristics of neuronal differentiated cells derived from human dental pulp stem cells (hDPSCs). *Neuroscience 2017*, 2017.
- ⑨ Oka K., Mitochondria, energy metabolism and Mg ions -their correlation with neurodegeneration, 2017 University of Cologne-Kaohsiung Medical University Joint Symposium on Cancer, Infection, Aging, Neurodegeneration, 2017.
- ⑩ 鈴木李夏, 堀田耕司, 岡浩太郎, 生理的条件下の細胞形態変化に伴う ATP レベル変動の定量的解析, 日本生物物理学会第 55 回年会, 2017.
- ⑪ 新藤豊, 山中龍, 鈴木孝治, 堀田耕司, 岡浩太郎, 局在化プローブを用いた細胞内マグネシウムイオンの FRET イメージング, 第 26 回バイオイメーjing学会学術集会, 2017.
- ⑫ 新藤豊, 山中龍, 鈴木孝治, 堀田耕司, 岡浩太郎, Na⁺/Mg²⁺交換体阻害によるグルタミン酸興奮毒性の緩和, 第 40 回日本神経科学大会, 2017.
- ⑬ 鈴木李夏, 堀田耕司, 岡浩太郎, 生理的条件下で伸長する神経突起におけるミトコンドリア動態の多面的解析, 第 40 回日本神経科学大会, 2017.
- ⑭ 有村勇輝, 菊池瞳子, 山中龍, 新藤豊, 堀田耕司, 望月真衣, 中原貴, 岡浩太郎, ヒト歯髄幹細胞から誘導した神経細胞とアストロサイトの特徴付け, 2017.
- ⑮ 飯泉美弦, 鈴木李夏, 山中龍, 新藤豊, 堀田耕司, 岡浩太郎, 蛍光イメージング法によるエネルギー代謝評価, 第 40 回日本神経科学大会, 2017.
- ⑯ Suzuki R, Hotta K, Oka K. : Simultaneous imaging of ATP levels and membrane potential in mitochondria during axonal transport. *Neuroscience 2016*, 2016.
- ⑰ Oka K., Is Mg ion a new second messenger?, Symposium on Ultrasensitive Protein Detection and Magnesium Homeostasis, 2016.
- ⑱ 鈴木李夏, 堀田耕司, 岡浩太郎, ミトコンドリア輸送・膜電位・ATP と神経伸展の相関解析, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016.
- ⑲ 鈴木李夏, 堀田耕司, 岡浩太郎, 伸長する神経突起でのミトコンドリア輸送・膜電位・ATP 同時イメージング, 第 25 回日本バイオイメーjing学会学術集会, 2016.
- ⑳ Suzuki R, Hotta K, Oka K., Analysis of mitochondrial movement and its ATP production

in elongating neurons, 第 39 回日本神経科学大会, 2016.

[図書] (計 1 件)

- ① 岡浩太郎, 「cAMP や cGMP などのセカンドメッセンジャーのイメージング」, 生体の科学, Vol. 68 No. 5 : 446-447.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : チッテリオ ダニエル

ローマ字氏名 : (Citterio, Daniel)

所属研究機関名 : 慶應義塾大学

部局名 : 理工学部 (矢上)

職名 : 教授

研究者番号 (8 桁) : 0 0 4 5 8 9 5 2

研究分担者氏名 : 舟橋 啓

ローマ字氏名 : (Funahashi, Akira)

所属研究機関名 : 慶應義塾大学

部局名 : 理工学部 (矢上)

職名 : 准教授

研究者番号 (8 桁) : 7 0 3 2 4 5 4 8

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : 有村 勇輝

ローマ字氏名 : (Arimura, Yuki)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。