

令和 2 年 4 月 11 日現在

機関番号：25503

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15108

研究課題名（和文）細胞周期におけるマグネシウムイオンの機能解明

研究課題名（英文）Role of intracellular magnesium in cell-cycle progression

研究代表者

山中 龍 (Yamanaka, Ryu)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号：90795436

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、蛍光イメージング法を用いて細胞周期の進行にともなう細胞内マグネシウムイオン濃度の計測を行ない、そのメカニズムと役割の解明を目指した。それによって細胞内マグネシウムイオンは細胞周期のステージによって、それぞれ別のメカニズムで細胞周期の進行を制御していることを明らかにした。また、細胞内マグネシウムイオンは細胞増殖に関わる複数の細胞内シグナル分子を制御していることも明らかにした。これらの成果は査読論文2報、報告済み、1報に関して論文投稿準備を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞周期の進行と細胞内マグネシウムイオン動態の関係に着目した研究を行なった。細胞周期の進行は細胞増殖速度を決定するが、マグネシウムイオンが制御している可能性を示唆した。この結果は、マグネシウムイオンは、がん等、細胞増殖がかかわる疾患の治療や予防のターゲット分子である可能性を示唆している。つまり今回、発見した細胞内Mgイオン動態とその役割は細胞生物学における基礎的な知見になるだけでなく、がんなど細胞分裂に関わる疾患の治療法開発のための重要な知見となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we revealed that the concentration of the intracellular magnesium ion is dynamically changed during the progression of cell-cycle, and the changes actively regulate cell-cycle progression in each stages of cell-cycle. In addition, we revealed that intracellular magnesium regulates several intracellular signalling related to cell proliferation. We reported two paper and are preparing a paper about these results for the submission.

研究分野：生物物理

キーワード：マグネシウムイオン 蛍光イメージング 細胞周期 生物物理

## 1. 研究開始当初の背景

マグネシウム (Mg) イオンは細胞内において多岐にわたる化学反応の補酵素やエネルギー物質である ATP の補因子として機能し、細胞内のほとんどの化学反応と関わっている。そのため細胞内 Mg イオン濃度変動は様々な細胞現象に影響を与え得る。しかし、Mg イオンの細胞内動態とその生理学的役割に関する知見は乏しい。その主な理由として、生きている細胞内の Mg イオン濃度変化を正確に測定する方法がなかったことが挙げられる。そこで 2000 年ごろより研究代表者らの研究グループは新規の化合物型 Mg プローブの開発を行ない、細胞質 (Komatsu et al., JACS, 2004) や細胞内小器官 (Shindo et al. PLoS One, 2011; JACS, 2014) における細胞内 Mg イオン動態の測定に成功していた。また、研究代表者は開発した化合物型 Mg プローブを用いて、細胞内 Mg イオン動態に関する研究を行っており、その成果として、神経伝達物質である一酸化窒素によってミトコンドリアから Mg イオンが細胞質中へと放出されること (Yamanaka et al. FEBS letter, 2013)、通常の生理的な神経活動に伴って細胞外から細胞質中へと Mg が流入することを明らかにしていた (Yamanaka et al. Neuroscience, 2015)。また、研究代表者らの研究グループは特に神経変性疾患に着目し、パーキンソン病の細胞モデルにおいて細胞内 Mg イオンが保護効果を示すこと (Shindo, Yamanaka et al., BBA, 2015)、パーキンソン病様細胞障害に伴って Mg イオンチャネルの発現量は劇的に変化することを明らかにしていた (Shindo, Yamanaka et al., BBA, 2016)。このように研究代表者は細胞内 Mg イオン動態とそのメカニズムを解明し、細胞機能における Mg イオンの重要性を明らかにしていた。また、当時、免疫細胞においても Mg イオンはセカンドメッセンジャーとしての役割を果たすことが示され (Li et al., Nature, 2011)、細胞内 Mg イオンの重要性はますます注目されつつあった。さらに 2016 年には、Mg イオンは概日リズムの調節因子であることが示された (Feeney et al. Nature, 2016)。この研究において Feeney らは概日時計に応じて細胞内 Mg イオン濃度は変動し、その Mg イオン濃度変動は細胞内代謝を制御していることを示していた。同時期に申請者も細胞内 Mg イオンと細胞内代謝に関する研究を進めており、Feeney らの論文において明らかにできていなかった細胞内 Mg イオン濃度変動が細胞の代謝を制御するメカニズムを説明する論文を Feeney らの報告からわずか 3 か月後に発表することに成功していた (Yamanaka et al. Scientific Report, 2016)。細胞周期における細胞内 Mg イオンの重要性は以前より認識されていたが、細胞内 Mg イオン濃度の周期的変動とその役割が明らかになったことによって、概日リズムと密接な関係があるとされる細胞周期と Mg イオンの関係はますます重要である可能性が高いと考えられた。また申請者の予備実験において細胞内 Mg イオン濃度に応じた代謝調節因子、代謝物量、細胞分裂頻度の変化を確認しており、細胞内 Mg イオン動態が細胞周期、代謝変動と密接に関わっていることは高いと考えられたが、ほとんど分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

上記のような事実から細胞周期における代謝の周期的変動にも細胞内 Mg イオン濃度変動が関与していることが予想された。しかし細胞内 Mg 動態を長時間にわたって測定する手法はなかったため、細胞周期のような長期間にわたる現象において Mg イオンの動態とその役割を解明することは困難であった。そこで本研究では (1) 細胞周期の進行における細胞内マグネシウムイオン濃度動態を計測する技術を開発し、(2) 細胞周期における細胞

内 Mg 動態とその役割を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

上記のように本研究は（1）細胞周期の進行における細胞内マグネシウムイオン濃度動態を計測する技術を開発、および（2）細胞周期の進行における細胞内 Mg 動態の役割を解明、の2段階の実験を行なった。

#### （1）細胞周期の進行における細胞内マグネシウムイオン濃度動態を計測する技術を開発：

様々な細胞周期ステージの細胞を含む不均一な細胞集団に対して、シングルセルレベルの解像度で数万～数十万個の細胞の蛍光・明視野像の多色イメージングを行なった。得られた多次元データに対して次元圧縮といった数理統計解析によって、個々の細胞の細胞周期におけるステージを算出する計算式を求めた。そしてシングルセルレベルの細胞情報から個々の細胞が細胞周期のどのステージにいるかを定量化し、それぞれの細胞に関して、細胞内マグネシウムイオン濃度の計測を行なった。図1に細胞周期の進行にともなう細胞内 Mg イオン濃度を計測する具体的な手順を示した。

#### （2）細胞周期の進行における細胞内 Mg 動態の役割を解明：

1. Mg イオン輸送タンパク質のスクリーニングを行ない、細胞周期の進行にともなう Mg イオン濃度のダイナミックな変化に関与するタンパク質を探索した。
2. 細胞内シグナル分子などの分子に着目して、細胞内 Mg イオン濃度が影響を与える分子のスクリーニングを行ない、細胞内 Mg イオンが影響を与えるシグナル伝達経路や細胞内現象を免疫抗体染色法や種々の蛍光プローブを用いた蛍光イメージング法を用いて探索した。
3. 生細胞の蛍光イメージング法を用いて、細胞内 Mg イオン濃度の違いによって細胞周期の進行にどのような違いが生じるかを調べた。

### 4. 研究成果

1. 細胞周期ステージ別に細胞内 Mg イオン濃度を並べ替える解析手法によって、細胞内マグネシウムイオン濃度のダイナミクスを再構築することに成功した。それによって細胞内 Mg イオンは細胞周期の進行にともなってダイナミックに変化することを発見した。この研究成果は投稿論文として発表すべく準備中である。

#### 細胞周期ステージの定量化と並べ替えによるダイナミクス再構成

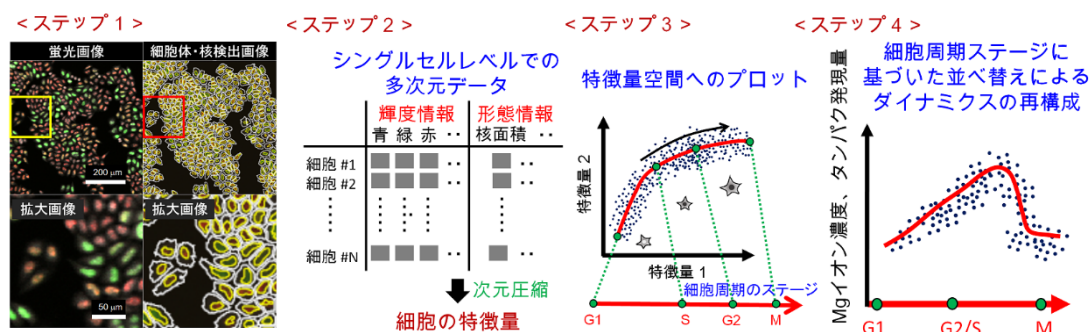


図1 細胞周期進行にともなう細胞内 Mg イオン濃度のダイナミクス測定

2. 細胞内 Mg イオン濃度変化が活性に影響を与えるシグナル分子をスクリーニングした結果、ERK、mTOR といったシグナル分子は細胞内 Mg イオンの活性制御を受けるこ

とが明らかとなった。これらのシグナル分子は細胞内 Mg イオン濃度に依存して活性レベルが変化することを定量的に示すことに成功した。この成果は 2018 年 *Current Biology* 誌にて発表した。

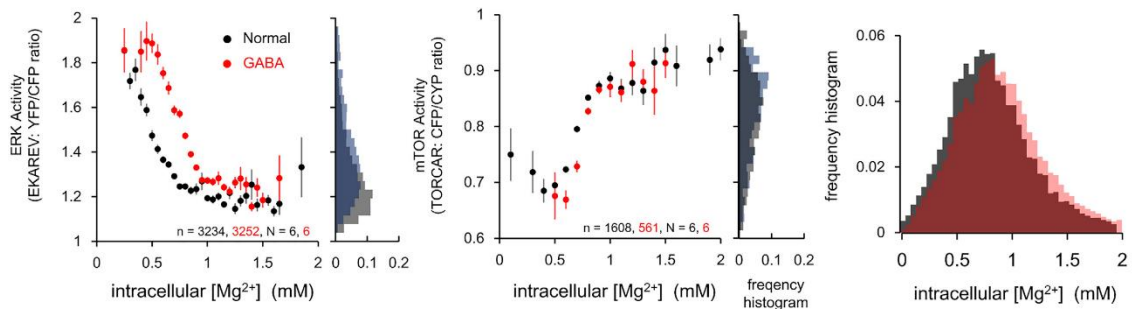


図2 細胞内シグナル分子の活性の細胞内 Mg イオン濃度依存性

- 細胞内 Mg イオン濃度の違いによって細胞周期の進行にどのような違いが生じるかを調べた。その結果、Mg イオン濃度は細胞周期の進行に重要な役割を果たしていることを発見した。この研究成果は投稿論文として発表すべく準備中である。

また、上記の研究成果に加えて細胞内 Mg イオンの役割を包括的にまとめた内容を 2019 年 *International Journal of Molecular Science* 誌にレビュー論文として報告した。これらの結果をまとめると、細胞内 Mg イオンは細胞内の広範な現象を制御するマルチターゲットな制御因子である可能性がある。今回、発見した細胞内 Mg イオン動態とその役割は細胞生物学における基礎的な知見になるだけでなく、がんなど細胞分裂に関わる疾患の治療法開発のための重要な知見となる。

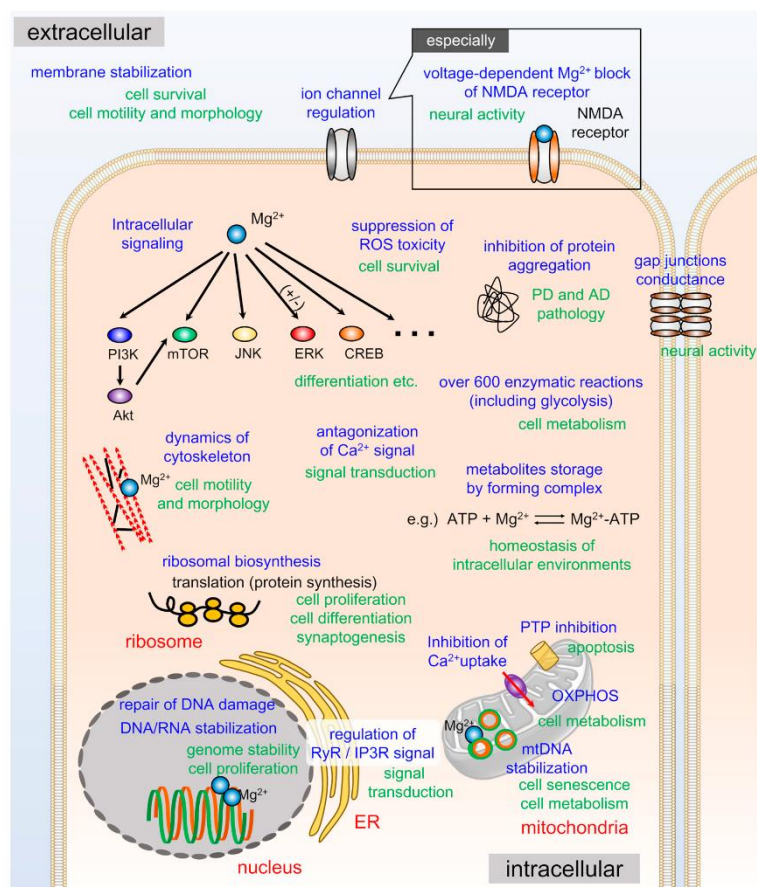


図3 細胞内における Mg イオンの役割

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryu Yamanaka, Yutaka Shindo, Kotaro Oka	4. 巻 20
2. 論文標題 Magnesium Is a Key Player in Neuronal Maturation and Neuropathology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3439 ~ 3439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20143439	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ryu Yamanaka, Yutaka Shindo, Kohji Hotta, Koji Suzuki, Kotaro Oka	4. 巻 28
2. 論文標題 GABA-Induced Intracellular Mg <sup>2+</sup> Mobilization Integrates and Coordinates Cellular Information Processing for the Maturation of Neural Networks	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3984-3991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.10.044">https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.10.044</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Ryu Yamanaka, Kotaro Oka
2. 発表標題 Quantitative analysis of cell cycle progression within heterogeneous cell population using information theory.
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Bioimaging (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中龍、新藤豊、堀田耕司、鈴木孝治、岡浩太郎
2. 発表標題 神経ネットワークの成熟におけるMg <sup>2+</sup> シグナルの定量的解析
3. 学会等名 定量生物学の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryu Yamanaka, Yutaka Shindo, Kohji Hotta, Koji Suzuki, Kotaro Oka
2. 発表標題 GABA-induced intracellular Mg <sup>2+</sup> mobilization integrates and coordinates cellular information processing for the maturation of neural networks
3. 学会等名 2019, Winter Q-bio (国際学会)
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 Yutaka Shindo, Ryu Yamanaka, Koji Suzuki, Kohji Hotta, Kotaro Oka
2. 発表標題 GABA-induced Mg <sup>2+</sup> signaling facilitates neuronal differentiation in developing neurons
3. 学会等名 日本神経科学学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryu Yamanaka, Yutaka Shindo, Kohji Hotta, Koji Suzuki, Kotaro Oka
2. 発表標題 Magnesium signaling activated by GABA facilitates neuronal differentiation in developing neurons
3. 学会等名 Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

javascript: onSave()

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----