

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390066
 研究課題名（和文） 細胞内マグネシウム濃度制御のシステム解析
 研究課題名（英文） Regulation of intracellular magnesium concentration

研究代表者

小西 真人（KONISHI MASATO）
 東京医科大学・医学部・教授
 研究者番号：20138746

研究成果の概要：

細胞内マグネシウム濃度を維持する重要な輸送機構である Na/Mg 交換輸送について、心筋を用いてシステマティックな実験および解析を行い、その機能の詳細を明らかにした。細胞内外の Na, K, Mg, Ca イオン濃度を種々に変えて実験を行い、Mg くみ出し輸送のイオン選択性を調べたところ、Na/Mg 交換輸送は、細胞外 Na と細胞内 Mg によってのみ活性化され、細胞内 Na と細胞外 Mg によってのみ抑制されることがわかった。また Na/Mg 交換輸送には細胞内 ATP の存在が必須であり、細胞内 ATP 濃度が約 400 μM 以下になると Mg くみ出し輸送が抑制されることが明らかになった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2007 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：マグネシウム、膜輸送、心筋、ATP

1. 研究開始当初の背景

一般に細胞内 Mg 濃度は細胞外とほぼ同じレベルに維持されている。2 価イオンである Mg イオンは負の細胞内電位により引きつけられ、細胞外から細胞内へと受動的に流入すると考えられる。細胞内で、Mg は種々の部位に結合すると共にミトコンドリアなどの細胞内器官に分布する。一方、Mg を能動的に細胞外に汲み出す輸送担体が細胞膜に存在することが実

験的に示されている。このように受動的流入と能動的汲み出しのバランスにより細胞内濃度が維持されていると考えられるが、詳細はまったく明らかになっていない。同じ 2 価イオンである Ca の細胞内濃度維持機構については、分子レベルでの理解が進んでいるのに対して研究が立ち遅れている大きな要因として、細胞外からの流入路および汲み出し輸送担体の分子実体が明らかになっていなかったこ

とがあげられる。

しかし近年、TRP (transient receptor potential) channel super familyのメンバーであるTRP-M6およびTRP-M7チャンネルがMgを透過し、また細胞内Mg濃度の低下によって開口することが報告された (Schmitz et al., Cell 114:191-200, 2003)。このことは、これらのチャンネルがMg流入経路であることを強く示唆する。一方、Mgをくみ出す能動輸送体分子は同定されていないが、研究代表者らのグループはNaの流入と交換にMgをくみ出すNa-Mg交換輸送を実験的に示し、その輸送特性を詳細に検討した。さらにNa-Mg交換輸送体分子を同定する目的で、高Mg環境に耐性を示す培養細胞株の樹立に3年をかけて取り組み、100 mMという高Mg濃度下でも増殖するマウス腎上皮 (MCT)由来細胞の変異株を樹立することに成功した。この変異株を用いた実験では、高Mg環境下でも細胞内Mg濃度は低く保たれており、Na-Mg交換輸送体が高発現していることが強く示唆された。また細胞内器官内Mgを定量し、細胞質Mg結合を計算することにより、細胞内全Mg濃度を見積もる方法を開発した。

2. 研究の目的

上述のように細胞内 Mg 濃度制御にかかわるチャンネル、輸送体などの「役者」については、ある程度明らかになってきたといえるが、細胞内 Mg 濃度制御におけるそれぞれの生理的役割については不明である。本申請研究では、心筋細胞を材料として用い、TRP-M6 およびTRP-M7 チャンネル、Na-Mg 交換輸送体、細胞内器官の Mg 取り込み / 放出が細胞内 Mg 濃度制御にどのように関わっているかを生理学的手法により解析する。native にチャンネルを発現している心筋細胞においてチャンネルを通る Mg 電流と細胞内 Mg 濃度を同時測定する。方法としては、電気生理学的測定と蛍光イメージングを組み合わせる。これにより TRP-M チャンネルによって実際に細胞内 Mg 濃度が変動し得ることを確認する。最終的には、Mg の流入、汲み出し、細胞内取り込み / 結合を包括的に記述する数理モデルを構築する。国内外の多数のグループが Mg 流入路としての TRP-M チャンネルに注目しており、近年多数の報告がある (Schlingmann KP and Gudermann T, J Physiol 566:301-308, 2005)。Na-Mg 交換輸送による Mg 汲み出しについても研究代表者らのグループが報告している。しかし、TRP-M チャンネルおよび Na-Mg 交換輸送が、システムとしてどのように細胞内 Mg 濃度調節を行っているか解明するには至っていない。

細胞内に存在する主なイオンのうち Mg だ

けはその細胞内濃度調節機構が不明のままであり、本研究の成果は細胞生理学的に大きな意義がある。さらに、TRP-M チャンネルによる Mg 流入と Na-Mg 交換輸送による Mg 汲み出しは、腎尿細管における Mg 再吸収においても重要な役割を担っている。遠位尿細管においては、Mg は尿細管細胞を通して再吸収される。この際、Mg は尿細管腔側から TRP-M チャンネルを通して尿細管細胞に流入し、血管腔側から Na-Mg 交換輸送により排出されると考えられている (Konrad M et al., Am J Physiol 286:F599-605, 2004)。TRP-M チャンネルの突然変異は生体の Mg ホメオスタシスの異常をきたす (二次性低 Ca 血症を伴う低 Mg 血症、Schlingmann KP et al., Nature Genetics 31:166-170, 2002)。このように、本研究の成果は、生体の Mg ホメオスタシスおよびその異常による病態の解明へと展開することができる。

3. 研究の方法

Na-Mg交換輸送系によるMg汲み出し輸送および細胞内器官によるMg取り込み / 放出機構の検討を行った。

1)Na-Mg交換輸送の機能解析

心筋細胞を用いて細胞内Mg濃度を時間 / 空間高分解能で測定した。特に細胞内外のイオン濃度および細胞の代謝によるMg汲み出し輸送の調節を明らかにした。

ラットの心臓をランゲンドルフ灌流し、コラゲナーゼで処理することにより、単離心室筋細胞を得た。細胞に蛍光Mg指示薬 furaptra を AM エステルを用いて導入した後、AM エステルを洗い流した。細胞を倒立顕微鏡のステージ上に置いたチャンパー内で灌流し、指示薬を 350nm および 382nm の 2 波長で励起し、500nm の蛍光を落射蛍光装置により測定した。既に確立した方法 (Watanabe M and Konishi M, Pflugers Arch 442:35-40, 2001) により、382nm 励起による蛍光強度 (F382) と 350nm 励起による蛍光強度 (F350) の比から細胞内 Mg 濃度を求めた。

細胞を高 Mg 濃度、低 Na 濃度の溶液に浸漬すると、非常に遅い時間経過で細胞内 Mg 濃度が上昇した (Mg 負荷)。このような Mg 負荷細胞を 1mM Mg を含む溶液で灌流しても、細胞外に Na がないと、細胞内 Mg 濃度は高いまま維持された。細胞外 140mM Na を加えると、細胞内 Mg 濃度は急激に減少しはじめた (細胞外 Na 依存性 Mg くみ出し輸送)。この細胞内 Mg 濃度低下の初期速度を解析して、Mg くみ出し輸送速度の指標とした。

細胞内電位を固定するために穿孔パッチクランプ法を用いた。アンフォテリシン B を含む溶液を入れたピペットでギガシールを

作成し、細胞膜の穿孔を膜容量の変化でモニターした。ピペットから種々の1価、2価イオン組成の溶液で細胞内を灌流し、また細胞外液中のイオン組成を変えて Mg しみ出し輸送速度を測定することにより、細胞内外の1価、2価イオンによる影響を調べた。

2) Na-Mg交換輸送の細胞内ATPによる調節

心筋細胞の ATP 産生は、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化に負うところが非常に大きいことが知られている。そこで、細胞をミトコンドリア脱共役剤である FCCP(carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine) または電子伝達系の阻害薬 KCN で処理し、ATP を枯渇させ、Mg しみ出し速度を解析して、正常代謝を保った細胞と比較した。一部の実験では、Cooled CCD camera により細胞内 Mg のイメージングを行い、細胞の短縮と細胞内 Mg 濃度の関係を測定し、解析した。

4. 研究成果

細胞内外の1価、2価イオン濃度を変えて、細胞外 Na に依存した Mg しみ出し速度を測定した。Mg しみ出し輸送は、細胞外 Na 濃度で活性化され、その 50%活性化 Na 濃度は 55mM であった。また細胞内 Mg によって、50%活性化 1.9mM で活性化された。輸送は、細胞内 Na によって抑制され、Na 濃度が約 40mM で 50%抑制された。細胞外 Mg によっても輸送は抑制され、50%抑制濃度は約 10mM であった。

その他のイオンについては、K, Ca, Cl について検討を行った。細胞外 K を除去しても、また細胞内 K を Cs で置換しても、輸送速度は有意に変化しなかった。また細胞内外の Ca 濃度や Cl 濃度によっても有意な変化はみられなかった(表1)

表 1

	Extracellular	Intracellular
Na ⁺	<i>Required for activity</i> (K _a = 55 mM)	<i>Inhibition</i> (K _i = 40 mM)
K ⁺	<i>No effect</i> (0 - 75 mM)	<i>No effect</i> (Cs ⁺ replacement)
Mg ²⁺	<i>Inhibition</i> (K _i = 10 mM)	<i>Required for activity</i> (K _a = 1.9 mM)
Ca ²⁺	<i>No effect</i> (0 - 2 mM)	<i>No effect</i> (Inhibition by overload?)
Cl ⁻	<i>No effect</i> (0 - 142 mM)	<i>No effect</i> (M _s replacement)

以上の結果より、Mg しみ出し輸送は、Na と交換に Mg がしみ出される Na/Mg 交換輸送であり、他のイオンの関与は必須でないことが強く示唆された。

Mg をしみ出す輸送のエネルギー源としては、Na の流入が最も重要と考えられるが、ATP の加水分解によるエネルギーが輸送に関与しているか否かは不明である。そこで心筋細胞において、細胞内 ATP を変化させて Mg しみ出し輸送速度を比較した。ミトコンドリアの脱共役剤である FCCP を投与して細胞内 ATP を急速に分解させると、細胞は硬直 rigor に陥った。ATP は細胞内ではほとんど Mg と結合した状態 (Mg-ATP) として存在しており、分解した ATP から遊離した Mg により細胞内 Mg 濃度は 2.5-3mM 程度まで上昇した。Rigor 状態にある細胞に細胞外 Na を投与することにより Mg しみ出し輸送を活性化した。正常細胞に Mg を負荷して細胞内 Mg 濃度が 2.5-3mM 程度に上昇した時の Mg しみ出し輸送速度をコントロールとした。KCN (5mM) はミトコンドリアの酸化的リン酸化による ATP の産生を抑制し、120 分で細胞内 ATP を枯渇させる。FCCP、KCN のいずれの場合も、rigor の状態にある細胞では Na によって活性化され Mg しみ出し輸送は強く (約 90%) 抑制された。KCN の処理時間が短い (60-90 分) 場合、rigor をおこさずに細胞内 Mg を上昇させることができる。そのような細胞では、Mg しみ出し速度は約 50%抑制された。

細胞内代謝が停止すると、細胞内 ATP 濃度以外にも様々な変化がおこる。その一つとして細胞内 pH が 7.2 から 6.8 程度にまで低下する (細胞内アシドーシス)。細胞内アシドーシスの影響を検討するために、細胞を H イオノフォアである nigericin で処理し、細胞外高 K (150mM) 条件下で細胞内 pH を細胞外 pH (7.15) と平衡化させた。このような細胞においても、rigor 条件下における Mg しみ出し輸送の抑制は解除されなかった。

別の可能性として、ATP の枯渇により Na-K ポンプが停止することによって細胞内 Na 濃度が上昇することが考えられる。細胞内 Na 濃度の上昇は、Na の駆動力を減少させ、Mg²⁺輸送を抑制する。蛍光色素 SBF1 により Mg しみ出し輸送中の細胞内 Na 濃度を測定した。細胞外 Na を投与すると、時間を追って細胞内 Na 濃度は上昇した。しかし、Mg²⁺しみ出し輸送速度を解析した初期 (Na⁺投与後 30-150s) の細胞内 Na 濃度は平均 5.0-10.5mM であり、Mg 輸送を 50%抑制する細胞内 Na 濃度 (約 40mM) より低かった。

以上の結果より、代謝障害時には、細胞内 pH や Na 濃度ではなく、ATP の枯渇が Mg しみ出し輸送を抑制する重要な要因であること

が強く示唆された。Mg ぐみ出し輸送が、どの程度の ATP 濃度で活性化されるかを見積もるため、細胞内高エネルギーリン酸化合物の変動を記述する数理モデルを開発した。このモデルにより、代謝阻害時により細胞内 ATP が 400 μ M 以下に低下すると、Mg ぐみ出し輸送の抑制が見られることが示唆された。

本研究は、心筋細胞内 Mg 濃度を維持する上で重要な役割をはたす Na/Mg 交換輸送のイオン選択性および ATP 依存性が明らかになった。本研究で得られた定量的なデータは細胞レベルで細胞内 Mg 濃度制御を記述する数理モデルを構築する上で非常に重要な基礎となるものである。

5. 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)

Tashiro, M., Inoue, H. and Konishi, M.: Metabolic inhibition strongly inhibits Na⁺-dependent Mg²⁺ efflux in rat ventricular myocytes. *Biophysical Journal*, in press (査読有)。

Hashimoto, R., Yumoto, M., Watanabe, M., Konishi, M., Haraoka, J. and Miki, T.: Differential effects of an expected actin-tropomyosin binding region of heat shock protein 20 on the relaxation in skinned carotid artery and taenia cecum from guinea pig. *Journal of Smooth Muscle Research*, 45:63-74, 2009 (査読有)。

Musha, S., Watanabe, M., Tomoda, A. and Konishi, M.: Mechanisms of the inhibitory effects of a phenoxazine compound, 2-amino-4,4 α -dihydro-4 α -7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one, on the contraction of the smooth muscle of the guinea pig taenia cecum. *Journal of Smooth Muscle Research* 43:15-24, 2007 (査読有)。

Kusakari, Y., Hongo, K., Kawai, M., Konishi, M. and Kurihara, S.: Use of the Ca-shortening curve to estimate the myofilament responsiveness to Ca²⁺ in tetanized rat ventricular myocytes. *Journal of Physiological Sciences* 56:219-226, 2006 (査読有)。

Tashiro, M., Tursun, P., and Konishi,

M.: Effects of intracellular and extracellular concentrations of Ca²⁺, K⁺ and Cl⁻ on the Na⁺-dependent Mg²⁺ efflux in rat ventricular myocytes. *Biophysical Journal*, 91:244-254, 2006 (査読有)。

[学会発表](計 10 件)

Tashiro, M., Inoue, H. and Konishi, M.: Is ATP required for activities of the Na⁺/Mg²⁺ exchange? 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society, 2009 年 3 月 4 日, Boston, Massachusetts, U.S.A. 小西真人, 田代倫子, 井上 華: 心筋細胞内 Mg²⁺濃度制御. 第 28 回日本マグネシウム学会総会 シンポジウム“マグネシウムの輸送”, 2008 年 11 月 29 日, 広島。

田代倫子, 小西真人: Metabolic inhibition of cardiac myocytes causes a large increase in intracellular Mg²⁺ concentration by breakdown of ATP and inhibition of Mg²⁺ transport. 第 31 回心筋代謝研究会, 2008 年 7 月 13 日 東京. 田代倫子, 小西真人: ラット心室筋細胞におけるナトリウム依存性マグネシウム汲み出し輸送に対する代謝阻害と細胞内 pH の影響. 第 85 回日本生理学会, 2008 年 3 月 27 日, 東京

田代倫子, 小西真人: 心筋代謝阻害時の Na⁺/Mg²⁺交換輸送活性. 第 84 回日本生理学会, 2007 年 3 月 20 日, 大阪

Konishi, M. and Tashiro M.: Metabolic inhibition largely diminishes Na⁺-Mg²⁺ exchange in rat ventricular myocytes. 51st Annual Meeting of the Biophysical Society, 2007 年 3 月 5 日, Baltimore, Maryland, U.S.A.

Konishi, M., Tashiro, M. and Tursun, P.: Na⁺/Mg²⁺ exchange as an active extrusion pathway of cellular magnesium. 11th International Magnesium Symposium, 2006 年 10 月 25 日, Mie, Japan.

Tashiro, M., Watanabe, M. and Konishi, M.: Na⁺-dependent Mg²⁺ efflux is largely inhibited in deenergized heart cells. 11th International Magnesium Symposium, 2006 年 10 月 24 日, Mie, Japan.

Konishi, M., Tashiro, M. and Tursun, P.: Na⁺/Mg²⁺ exchange in rat ventricular myocytes. 6th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies, 2006 年 10 月

17 日, Seoul, Korea.

Konishi, M., Tursun, P. and Tashiro, M.: Intracellular magnesium concentration is maintained by sodium/magnesium exchange in cardiac myocytes. 2nd world congress of International Academy of Cardiovascular Sciences, 2006 年 7 月 14 日, Hokkaido, Japan.

[その他]

ホームページ

<http://www.tokyo-med.ac.jp/physiol/Pub2.html>

第 27 回日本マグネシウム学会総会 市民公開シンポジウム「ミネラルと健康」オーガナイザー、2007 年 11 月 9 日, 東京.

筋肉の構造と機能のシンポジウム オーガナイザー (3/24/2008)

第 28 回日本マグネシウム学会総会 シンポジウム“ マグネシウムの輸送 ”オーガナイザー

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小西 真人 (KONISHI MASATO)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 20138746

(2)研究分担者

廣瀬 謙造 (HIROSE KENZO)

名古屋大学・医学部・教授

研究者番号 : 0 0 2 9 2 7 3 0

中山 晋介 (NAKAYAMA SHINSUKE)

名古屋大学・医学部・准教授

研究者番号 : 3 0 1 9 2 2 3 0

渡辺 賢 (WATANABE MASARU)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 6 0 1 9 1 7 9 8

横山 倫子 (YOKOYAMA MICHIKO)

東京医科大学・医学部・兼任講師

研究者番号 : 2 0 3 9 8 7 6 2

