

平成 30 年 5 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291042

研究課題名(和文)細胞および個体でのマグネシウム調節とその分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism regulating intracellular and organismal magnesium levels

研究代表者

三木 裕明(MIKI, Hiroaki)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：80302602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、哺乳動物系の培養細胞、マウス、線虫、などさまざまな実験材料を利用してMg²⁺トランスポーターCNNMの解析を実施した。その結果、CNNMが細胞内のMg²⁺量調節や腸でのマグネシウム吸収に重要であることを明らかにした。また、Mg²⁺量に応じて細胞のエネルギー状態が変化して、mTORシグナル伝達などに大きな影響を与えていることも分かった。さらにMg²⁺調節異常が精子の機能不全や腸上皮の細胞増殖、分化異常につながることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this research project, I performed multiple analyses on CNNM Mg²⁺ transporter proteins, using mammalian cultured cells, mice, and nematodes. As a result, I elucidated that CNNM proteins play important roles in regulating intracellular Mg²⁺ levels and Mg²⁺ absorption in the intestine. Intracellular Mg²⁺ levels affected the energy status of cells, which had a significant impact on mTOR signaling. Moreover, I found that dysregulation of Mg²⁺ levels caused sperm malfunction and imbalance of proliferation/differentiation of intestinal epithelia.

研究分野：細胞生物学

キーワード：マグネシウム

1. 研究開始当初の背景

私たちはがん悪性化に関わる PRL の標的分子として膜タンパク質の CNNM/MagEx を同定し、それが細胞外への Mg^{2+} 排出トランスポーターとして機能することを見つけていた。PRL は CNNM に直接結合することで、 Mg^{2+} 排出を阻害していたが、その制御の仕組みなどはまったく分かっていなかった。また、CNNM のファミリー分子の一つ CNNM4 が腸の上皮で高発現しており、その遺伝子欠損マウスの解析から、腸でのマグネシウム吸収に重要であることも明らかにしていた。これらの CNNM ファミリーに関する一連の研究から、CNNM が細胞内のマグネシウム量や個体レベルでのマグネシウム恒常性の調節に極めて重要な働きをしていることが分かってきていたが、その調節の仕組みや医学生物学的重要性についてはほとんど不明だった。

2. 研究の目的

上記のような背景のもと、本研究では哺乳動物系の培養細胞、マウス、線虫などさまざまな実験材料を用いて解析を行った。培養細胞を用いる解析で、細胞内マグネシウム調節の仕組みや、そのシグナル伝達等への効果を明らかにするための解析を行った。またマウスや線虫などのモデル生物を用いた解析では、CNNM ファミリーの遺伝子欠損、機能不全変異体を作成することで、生物個体などマクロなレベルでの生命機能とマグネシウム調節の関連を明らかにするための解析を行った。

3. 研究の方法

CNNM ファミリーによる Mg^{2+} 調節の仕組みやその重要性を明らかにするため、哺乳動物系の培養細胞、マウス、線虫を用いて解析を行った。培養細胞の解析では、CNNM ファミリーの過剰発現や RNA 干渉法によるノックダウンを行って、細胞のエネルギー状態やシグナル伝達にどのような変化が生じているか調べた。マウスの解析では、CNNM ファミリー遺伝子を欠損させた各種マウスを作成して、マグネシウム恒常性や腸上皮の増殖や分化、また生殖や精子機能等について調べた。また線虫の解析では、CNNM オルソログ遺伝子ファミリー 5 種それぞれの機能欠損変異体や、それらをかけ合わせることで得られた多重変異体を用いて、生殖や寿命など線虫の表現型にどのような変化が生じるのかについて調べた。

4. 研究成果

(1) 培養細胞での解析で得られた成果: 細胞内 Mg^{2+} の定量イメージング解析によって、PRL や CNNM の量を過剰発現やノックダウンで変化させた時に細胞内 Mg^{2+} 量が変動することを確認した。またこのような Mg^{2+} 変動が ATP レベルを変化させて AMP キナーゼの活性を調節し、その下流の mTOR シグナル伝達に大きな影響を与えていることも明らかとなった。これら

の研究成果から、PRL/CNNM による細胞内 Mg^{2+} 調節が細胞のエネルギー状態や、それに応答するシグナル伝達を変化させていることが分かった。

(2) 線虫での解析で得られた成果: 線虫の 5 つの CNNM ファミリー遺伝子のうち、CNNM-1 と CNNM-3 の二重変異体で生殖巣が発達せずに不稔となっていた。この回復を指標とした RNA 干渉スクリーニングで AMP キナーゼを含むいくつかの関連遺伝子が見つかり、それぞれの変異体との掛け合わせを行ってその効果をさらに確認した。上述したように、AMP キナーゼとの機能的関連は培養細胞を用いた実験でも確認されており、それを遺伝学的に裏付けることができた。またスクリーニングでは AMP キナーゼの他にもエンドサイトーシス関連の遺伝子や代謝産物の輸送に関連する遺伝子なども見つかってきており、その一部に関しては変異体でのレスキュー効果も確認できている。 Mg^{2+} 調節がどのような生物学的現象に重要なのかについて、新たな可能性を示唆する結果となった。

(3) マウスでの解析で得られた成果: CNNM4 遺伝子ホモ欠損マウスが雄性の不妊であったので、精子を採取して調べたところ Ca^{2+} シグナル応答性に起こる運動様式の超活性化ができず、受精能を失っていた。精子内での Mg^{2+} 量が増加していたので、 Mg^{2+} を除いた培地で精子をインキュベートすると、超活性化が回復した。これらの結果から細胞内 Mg^{2+} が過剰になると、 Ca^{2+} シグナルに異常を来すことが明らかになった。また CNNM4 欠損マウスの腸上皮では顕著な組織構築異常は見られなかったものの、増殖性細胞の割合が増加しており、逆に分化した細胞の割合は減少していた。さらに、精子で見られたのと同様の Ca^{2+} 流入の異常が腸上皮細胞でも観察されることが明らかになり、 Mg^{2+} 調節と Ca^{2+} シグナルの普遍的な関連が示唆された。

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 12 件)

- ① Yoshida A, Funato Y, Miki H. Phosphatase of regenerating liver maintains cellular magnesium homeostasis. *Biochem J*. 査読有 475, 2018, 1129-1139
DOI: 10.1042/BCJ20170756
- ② Funato Y, Furutani K, Kurachi Y, Miki H. CNNM proteins are Na^+/Mg^{2+} exchangers playing a central role in transepithelial Mg^{2+} (re)absorption. *J Physiol*. 査読有 596, 2018, 743-746
DOI: 10.1113/JP275248

- ③ Matsui Y, Funato Y, Imamura H, Miki H, Mizukami S, Kikuchi K. Visualization of long-term Mg^{2+} dynamics in apoptotic cells using a novel targetable fluorescent probe. *Chem Sci*. 査読有 8, 2017, 8255-8264
DOI: 10.1039/c7sc03954a
- ④ Funato Y, Yamazaki D, Miki H. Renal function of cyclin M2 Mg^{2+} transporter maintains blood pressure. *J Hypertens*. 査読有 35, 2017, 585-592
DOI: 10.1097/HJH.0000000000001211
- ⑤ Gulerez I, Funato Y, Wu H, Yang M, Kozlov G, Miki H, Gehring K. Phosphocysteine in the PRL-CNNM pathway mediates magnesium homeostasis. *EMBO Rep*. 査読有 17, 1890-1900
DOI: 10.15252/embr.201643393
- ⑥ Ishii T, Funato Y, Hashizume O, Yamazaki D, Hirata Y, Nishiwaki K, Kono N, Arai H, Miki H. Mg^{2+} Extrusion from Intestinal Epithelia by CNNM Proteins Is Essential for Gonadogenesis via AMPK-TORC1 Signaling in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*. 査読有 12, 2016, e1006276
DOI: 10.1371/journal.pgen.1006276
- ⑦ Yamazaki D, Funato Y, Miyata H, Ikawa M, Miki H. Complementary role of CNNM2 in sperm motility and Ca^{2+} influx during capacitation. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 474, 2016, 441-446
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.05.001
- ⑧ Yamazaki D, Miyata H, Funato Y, Fujihara Y, Ikawa M, Miki H. The Mg^{2+} transporter CNNM4 regulates sperm Ca^{2+} homeostasis and is essential for reproduction. *J Cell Sci*. 査読有 129, 2016, 1940-1949
DOI: 10.1242/jcs.182220
- ⑨ Hirata Y, Funato Y, Miki H. Basolateral sorting of the Mg^{2+} transporter CNNM4 requires interaction with AP-1A and AP-1B. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 455, 2014, 184-189
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.10.138
- ⑩ Funato Y, Yamazaki D, Mizukami S, Du L, Kikuchi K, Miki H. Membrane protein CNNM4-dependent Mg^{2+} efflux suppresses tumor progression. *J Clin Invest*. 査読有 124, 2014, 5398-5410
DOI: 10.1172/JCI76614
- ⑪ Yugi K, Kubota H, Toyoshima Y, Noguchi R, Kawata K, Komori Y, Uda S, Kunida K, Tomizawa Y, Funato Y, Miki H, Matsumoto M, Nakayama KI, Kashikura K, Endo K, Ikeda K, Soga T, Kuroda S. Reconstruction of insulin signal flow from phosphoproteome and metabolome data. *Cell Rep*. 査読有 8, 2014, 1171-11783
DOI: 10.1016/j.celrep.2014.07.021
- ⑫ Hirata Y, Funato Y, Takano Y, Miki H. Mg^{2+} -dependent interactions of ATP with the cystathionine- β -synthase (CBS) domains of a magnesium transporter. *J Biol Chem*. 査読有 289, 2014, 14731-14739
DOI: 10.1074/jbc.M114.551176
- [学会発表] (計 12 件)
- ① 三木 裕明. PRL/CNNM 複合体による Mg^{2+} 排出の調節と PRL の Cys リン酸化. 生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成 シンポジウム. 2018 町田
- ② 三木 裕明. がんの浸潤運動における PRL の役割. 第 69 回日本細胞生物学会大会シンポジウム. 2017 仙台
- ③ 三木 裕明. がんの悪性化と酸性環境適応の分子機構. 第 44 回日本毒性学会学術年会シンポジウム. 2017 横浜
- ④ 三木 裕明. PRL によるがん悪性化と pH 依存性の細胞死. 第 25 回日本 Cell Death 学会学術集会シンポジウム. 2016 東京
- ⑤ 三木 裕明. 細胞内マグネシウム調節とがん悪性化. 第 53 回日本臨床分子医学会学術集会シンポジウム. 2016 東京
- ⑥ 三木 裕明. 細胞内マグネシウム調節の異常とがん悪性化. タイムシグナルと制御シンポジウム. 2016 下田
- ⑦ 三木 裕明. PRL によるがん悪性化と上皮組織内の細胞間相互作用. 第 68 回日本細胞生物学会大会シンポジウム. 2016 京都
- ⑧ 三木 裕明. PRL による細胞内マグネシウムイオン量のレドックス制御. 第 43 回日本毒性学会学術年会シンポジウム. 2016 名古屋

- ⑨ 三木 裕明. Mg イオントランスポーターCNNM/MagEx の分子機能とがん悪性化. 生理学研究所研究会. 2015 岡崎
- ⑩ Miki H. Redox regulation of magnesium-ion transporter MagEx/CNNM. BMB2015 Symposium. 2015 神戸
- ⑪ 三木 裕明. マグネシウムイオン輸送のレドックス制御. 第15回日本蛋白質科学会年会シンポジウム. 2015 徳島
- ⑫ Miki H. Mg²⁺ efflux by CNNM4 Mediates Intestinal Magnesium Absorption and Suppresses Malignant Progression of Tumors. International Symposium on Ion Channels, transporters, and small molecules as key regulators of homeostatic systems. 2015 名古屋

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/cellreg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木 裕明 (MIKI, Hiroaki)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号：80302602

(2) 連携研究者

山崎 大輔 (YAMAZAKI, Daisuke)
大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号：50422415

船戸 洋佑 (FUNATO, Yosuke)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：60505775