

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 1 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460351

研究課題名(和文) SLC41輸送体群によるMg²⁺制御機構とその破綻に基づく病態機序研究課題名(英文) Mg²⁺ regulation by SLC41 transporters and pathological mechanism for its abnormality

研究代表者

岩本 隆宏 (Iwamoto, Takahiro)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：20300973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マグネシウムイオンは生体機能の調節と維持に必須の2価カチオンである。実際に、マグネシウム代謝異常は、高血圧症や虚血性心疾患など、様々な疾患に関係することが知られている。近年、マグネシウム輸送体の候補遺伝子が報告されているが、それらの生理的役割については不明な点が多い。今回、マグネシウム輸送体ファミリーの遺伝子欠損マウスを作出したところ、SLC41A2輸送体欠損マウスの血管反応が減弱していることを見出した。つまり、SLC41A2輸送体は血管収縮制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cellular Mg²⁺ plays an important role in various cellular functions, such as energy metabolism, channel activity, and enzyme activity. Therefore, various diseases are caused by abnormal Mg²⁺ regulation. Recently, several Mg²⁺ transporters are cloned, but their functional roles are still well unknown. We first observed that the expression levels of SLC41 transporters in aorta were dependent on the Mg²⁺ intake (low, normal, or high). In addition, we found that phenylephrine-induced contraction was reduced in isolated aorta from low-magnesium-fed mice. Furthermore, we next generated SLC41A1/A2-knockout mice. Interestingly, phenylephrine-induced contraction was reduced in isolated aorta from SLC41A2-knockout mice fed with normal-magnesium diet. These results suggest that SLC41A1/A2 play an important role in vascular function. Further work will be required to define the pathological role of SLC41A1/A2 in cardiovascular diseases.

研究分野：膜輸送体

キーワード：イオン輸送体 マグネシウム 病態モデル

1. 研究開始当初の背景

生体内マグネシウムイオンは、消化管での吸収、腎での排泄および骨・筋での代謝により収支バランスが取られており、細胞外 Mg^{2+} 濃度は $0.7 \sim 0.9 \text{ mM}$ に調節されている。一方、細胞内 Mg^{2+} 濃度は $0.5 \sim 1.0 \text{ mM}$ であり、細胞内外の Mg^{2+} 濃度はほぼ等しく制御されている。また、その機能については、ATP の活性化に必須な因子であり、筋肉の収縮、アミノ酸合成、そして核酸合成や遺伝子発現など細胞の成長・進化の過程で重要な 2 価カチオンであることが知られている。実際に、 Mg^{2+} 欠乏や Mg^{2+} 代謝異常は、動脈硬化症、糖尿病、不整脈、筋収縮不全、肝硬変など、様々な疾患に関係することが知られている。しかしながら、 Mg^{2+} 輸送体の病態学的役割および疾患関連メカニズムについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

近年、 Mg^{2+} 輸送体の様々な分子実体 (候補遺伝子) が報告されている。 Mg^{2+} 透過性チャネルとしては、TRPM6、TRPM7 が同定されている。一方、 Mg^{2+} トランスポーターとしては、SLC41 ファミリー、MagT1 などの候補遺伝子は挙げられているものの、 Mg^{2+} 制御機構、発現分布、生理学的役割および病態学的意義については未だ不明な点が多い。特に、SLC41 ファミリーに関して、その詳細はほとんど不明である。そこで、本研究では、独自に作製した SLC41A1 および SLC41A2 遺伝子欠損マウスを用いて、SLC41 ファミリーの生理学的・病態学的役割の解明に取り組むことにした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

8~12 週齢の C57BL/6J マウスを 3 群に分けて、正常マグネシウム食 (0.2% 含有)、低マグネシウム食 (0.01% 含有)、高マグネシウム食 (0.5% 含有) を与えた。マグネシウム変動食の開始から 4 週目においてサンプルを採取し、血管機能測定および生化学的解析を行った。

(2) SLC41A1/A2 遺伝子欠損マウスの作製

SLC41A1 および SLC41A2 の各野生型ゲノム断片をクローニングし、その当該 exon を loxP 配列で挟み、ネオマイシン耐性遺伝子 (neo) を挟んだ配列を挿入した相同組換え用ベクターを作製した。ES 細胞で相同組換えを行い、相同組換え確認した後、遺伝子欠損マウスを得た。これらのマウスは、マグネシウム変動食による血中 Mg^{2+} 動態が野生型マウスと比較して明らかに異なっていた。

(3) 血管収縮機能の解析

マウスから大動脈を剥離し、リング標本作製した。緩衝液に浸した後、1.0 g の静止張力を掛けた条件下で 30 分静置した。血管収縮力の測定にはマイクロティシューオーガ

バス (MTOB-1Z、ラボサポート社) を用いた。収縮試験には、フェニレフリン ($10^{-9} \sim 10^{-5} \text{ M}$) を加え、収縮力を測定した。

(4) Real-time PCR

各組織から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出後、QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) にて逆転写を行い、cDNA を抽出した後、SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN) を用いて Real-time PCR を行った。相対的な遺伝子量は比較 Ct 法により検討し、GAPDH 量を基準とした。

4. 研究成果

(1) マグネシウム変動食による各種 Mg^{2+} 輸送体発現量の比較

まず初めに、野生型マウスに正常マグネシウム食 (0.2% 含有)、低マグネシウム食 (0.01% 含有) もしくは高マグネシウム食 (0.5% 含有) を 4 週間摂取させて、各種臓器 (大動脈、腎臓、小腸) における Mg^{2+} 輸送体候補遺伝子の発現変化を調べたところ、小腸、腎臓、血管において、SLC41A1、SLC41A2、TRPM7 が各々マグネシウム摂取量依存性に発現変化を示すことを見出した。

(2) マグネシウム変動食による大動脈標本のフェニレフリン収縮反応の変化

次に、マグネシウム変動食による血管機能への影響を調べるため、マグナス装置を用いて、摘出大動脈標本のフェニレフリン収縮反応を検討した。興味深いことに、高マグネシウム食では変化が認められないのに対し、低マグネシウム食を 4 週間処置したマウスにおいて、フェニレフリン収縮反応が有意に低下した。一方、60mM High K^+ 刺激による収縮反応には、変化が認められなかった。

(3) SLC41A1/A2 欠損マウスの大動脈標本のフェニレフリン収縮反応の比較

これまでの結果から、SLC41A1/A2 は Mg^{2+} 輸送に関与していることが示唆されたため、SLC41A1/A2 欠損マウスを作製することにした。得られた SLC41A1/A2 欠損マウスはともに成獣まで成長し、各種臓器で標的遺伝子の特異的に欠損していることを確認した。

次に、これらマウスを用いて、SLC41A1 および SLC41A2 の血管機能について解析した。SLC41A1 欠損マウスにおいては、野生型マウスと同等の血管反応性であったが、SLC41A2 欠損マウスにおいては、フェニレフリン収縮反応の有意な低下が観察された。一方、60mM High K^+ 刺激による収縮反応には、変化が認められなかった。

(4) SLC41A1/A2 欠損マウスにおけるマグネシウム変動食の影響

SLC41A1 欠損マウスにおいては、野生型マウスと同様に、低マグネシウム食 4 週間処置マウスにおいて、フェニレフリン収縮反応が

有意に低下した。一方、SLC41A2 欠損マウスにおいては、低マグネシウム食処置において、フェニレフリン収縮反応に変化はみられず、低下したままであるのに対し、高マグネシウム食処置において、フェニレフリン収縮反応に有意な回復効果が認められた。60mM High K⁺刺激による収縮反応には、それぞれの群において変化が認められなかった。

(5) 考察

本研究において、SLC41A1/A2 はマグネシウム摂取量依存性に発現量が変化すること、低マグネシウム食によりフェニレフリン血管収縮反応が低下すること、SLC41A2 欠損マウスにおいてフェニレフリン血管収縮反応が低下すること、さらに、その収縮反応の低下は高マグネシウム食により回復することを見出した。これらの結果より、SLC41A2 輸送体は血管収縮制御に重要な役割を果たすことが示唆された。今後、その病態生理学的役割および詳細な機序について詳細に解析していく予定である。

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8件)

1. Tashiro M, Watanabe Y, Yamakawa T, Yamashita K, Kita S, Iwamoto T, Kimura J. Suppressive Effect of carvedilol on Na⁺/Ca²⁺ exchange current in isolated guinea-pig cardiac ventricular myocytes. *Pharmacology*, 99(1-2):40-47, 2017. 査読有
2. Nishiyama K, Tanioka K, Azuma YT, Hayashi S, Fujimoto Y, Yoshida N, Kita S, Suzuki S, Nakajima H, Iwamoto T, Takeuchi T. Na⁺/Ca²⁺ exchanger contributes to stool transport in mice with experimental diarrhea. *J Vet Med Sci*. 79(2):403-411, 2017. 査読有
3. Fujimoto Y, Hayashi S, Azuma YT, Mukai K, Nishiyama K, Kita S, Morioka A, Nakajima H, Iwamoto T, Takeuchi T. Overexpression of Na⁺/Ca²⁺ exchanger 1 display enhanced relaxation in the gastric fundus. *J Pharmacol Sci*, 132(3):181-186, 2016. 査読有
4. Yamashita K, Watanabe Y, Kita S, Iwamoto T, Kimura J. Inhibitory effect of YM-244769, a novel Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitor on Na⁺/Ca²⁺ exchange current in guinea pig cardiac ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 389(11):1205-1214, 2016. 査読有
5. Nishiyama K, Azuma YT, Morioka A, Yoshida N, Teramoto M, Tanioka K, Kita S,

Hayashi S, Nakajima H, Iwamoto T, Takeuchi T. Roles of Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1 and NCX2 in motility in mouse ileum. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 389(10):1081-1090, 2016. 査読有

6. Azuma YT, Hayashi S, Nishiyama K, Kita S, Mukai K, Nakajima H, Iwamoto T, Takeuchi T. Na⁺/Ca²⁺ exchanger-heterozygote knockout mice display increased relaxation in gastric fundus and accelerated gastric transit in vivo. *Neurogastroenterol Motil*, 28(6):827-836, 2016. 査読有
7. Gotoh Y, Kita S, Tagashira H, Horie I, Arai Y, Uchida S, Iwamoto T. Genetic knockout and pharmacologic inhibition of NCX2 cause natriuresis and hypercalciuria. *Biochem Biophys Res Commun*, 456(2):670-675, 2015. 査読有
8. Wang Y, Chen L, Li M, Cha H, Iwamoto T, Zhang J. Conditional knockout of smooth muscle sodium calcium exchanger type-1 lowers blood pressure and attenuates Angiotensin II-salt hypertension. *Physiol Rep*. 3(1): e12273(1-14), 2015. 査読有

[学会発表](計4件)

1. 田頭秀章、喜多紗斗美、荒井勇二、岩本隆宏 Transgenic mice overexpressing dominant negative TRPM7 mutant are useful tools for studying magnesium disorders、第90回日本薬理学会年会、2017年3月16日、長崎
2. 田頭秀章、喜多紗斗美、奥田裕子、荒井勇二、岩本隆宏 新規マグネシウム代謝異常症モデルマウスの開発とその病態解析、第69回日本薬理学会西南部会、2016年11月26日、松山
3. 田頭秀章、喜多紗斗美、奥田裕子、岩本隆宏 マグネシウム代謝異常モデルマウスの開発とその研究応用の可能性、第1回日本臨床薬理学会九州沖縄地方会、2016年7月2日、大分
4. 田頭秀章、喜多紗斗美、荒井勇二、岩本隆宏 Functional analysis of renal Na⁺/Ca²⁺ exchangers using several genetically altered mice、第89回日本薬理学会年会、2016年3月11日、横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/pharmaco/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩本 隆宏 (IWAMOTO, Takahiro)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号：20300973

(2)研究分担者

藤井 誠 (FUJII, Makoto)
福岡大学・医学部・講師
研究者番号：30398086

後藤 雄輔 (GOTOH, Yusuke)
福岡大学・医学部・助教
研究者番号：90609489

(3)連携研究者

喜多 紗斗美 (KITA, Satomi)
福岡大学・医学部・准教授
研究者番号：10461500