

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500797

研究課題名(和文) 運動時のMgの有用性とメカニズムに関する研究

研究課題名(英文) The research for Mg availability and dynamics during exercise

研究代表者

酒井 健介 (SAKAI, Kensuke)

城西国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：70406784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：運動負荷は、ラットの見かけのMg吸収率の増加し、骨格筋におけるTRPM7の発現量を高めた。とりわけ運動直後にTRPM7の発現量の増加が確認されたことから、運動負荷に伴う代謝性アシドーシスの影響について検討したが、塩化アンモニウム投与によるアシドーシスモデルでは運動負荷時とは異なる発現様式を示した。また骨格筋ではTRPM7以外にCLDN16が、消化管でも同様にTRPM7とCLDN16が、腎臓ではTRPM7とCLDN16に加えTRPM6の発現が認められ、運動負荷による生体内Mg動態に異なるMg輸送タンパク質が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Exercise loading induced the increase in apparent Mg absorption and the expression of TRPM7, which is one of Mg-transporter in rat skeletal muscle. Especially in immediately after exercise, the expression of TRPM7 was elevated, it will be suggested that exercise-induced metabolic acidosis related to the expression of TRPM7. The expression pattern of TRPM7 in metabolic acidosis rat induced administrated 1.5% NH4Cl solution was different from in swimming exercised rat. Moreover other Mg-transporters, such as TRPM6 and CLDN16 were expressed in kidney and intestine. These results suggested that some Mg-transporters affect Mg dynamics in exercised rat.

研究分野：スポーツ栄養学

キーワード：運動 マグネシウム TRPM7

## 1. 研究開始当初の背景

マグネシウム (Mg) は生体内に豊富に存在する元素であり、骨 (50-60%) や骨格筋 (25-30%) に分布している。とりわけ細胞内における陽イオンとしてはカリウムイオンに次いで多い元素である。Mg は骨格筋細胞においては糖代謝関連酵素活性や筋収縮などとの関連が示唆され、いずれの機能も筋運動の継続に不可欠な要素である。そのため Mg 栄養が筋運動や運動パフォーマンスに及ぼす影響については重要と考えられるが、その生体内動態については十分に解明されていない。先の研究では (課題番号: 22700654 若手研究 (B) 運動時の摂取 Mg の動態解明と疾病予防効果) ラットに運動負荷を供した際に Mg の見かけの吸収率が上昇することを報告し、またその際に骨格筋における Mg 輸送タンパク質の一つである TRPM7 の発現量の増加と血中 Mg 濃度の低下、骨格筋中の Mg 含量の増加を確認した。これらの結果は運動負荷により Mg 要求性が亢進し、その一部が骨格筋に分布することを示唆するものであった。そのため同研究では、高 Mg 食を給餌した運動負荷ラットにおける Mg 吸収および骨格筋への Mg の取込みについて検討したが、運動負荷により見かけの Mg 吸収率および骨格筋における TRPM7 発現量は増加したものの、骨格筋中 Mg 含量には有意な影響を及ぼさなかった。これらの結果は、運動時の Mg 動態についての十分な解明をもたらすものではなかった。

Pokan R et al. は心疾患患者が対象ではあるものの、Mg 投与が持久性運動指標の一つである最大酸素摂取量が改善されたことを報告している (Pokan R et al. *Br J Sports Med*, 40: 773-778, 2006)。また Mg の摂取不足は高血圧 (Ascerio et al. 27:1065-1072, 1996) をはじめとする種々の慢性疾患の発症との関係も報告されている。運動の実施と Mg 摂取については、健康面およびスポーツパフォーマンスの両面への影響が考えられるが、いずれにおいても未だ十分な知見は得られていない状況にある。そのため申請者は、運動負荷モデルラットを対象に、運動時の Mg の有用性を生体動態のメカニズム解析に関する研究を計画した。

## 2. 研究の目的

運動・スポーツの実施は健康の保持増進やその競技力向上など様々な目的で実施されている。Mg は生体内において糖質由来のエネルギー産生システムへの関与や酸化ストレスの軽減など、運動の実施により得られる有益性と密接にかかわっている。しかしながら、平成 26 年の国民健康・栄養調査の結果では、15 歳以上の男女において Mg の平均摂取量が RDA を下回る状況にある。そのため、運動時の Mg 生体要求性や生体内動態について明らかにすることは重要であると考えた。先の研究では、食餌由来の Mg 摂取量に関わら

ず運動負荷により見かけの Mg 摂取量が増加した。このため、Mg 摂取量が十分でない状況を想定した場合には、運動実施と Mg 摂取のタイミングが運動時の Mg 生体内動態の関係を明らかとすることに意義があると考えた。そこでラット飼育期間中の Mg 摂取量を一定とし、運動負荷前に高 Mg 食を与え、運動負荷後に低 Mg 食を与えるラットと運動負荷前に低 Mg 食を与え、運動負荷後に高 Mg 食を与えるラット、そして運動前後の Mg 摂取量が一定のラットにおける Mg の吸収率に及ぼす影響を検討することを計画した。また過剰な Mg の摂取は時に下痢を始め下部消化管における健康障害を引き起こす可能性もあり、これらのデザインは運動時の効果的な Mg 摂取方法を明らかとすることで、多くのスポーツ選手の Mg 栄養に貢献できるものと考えた。

一方で、運動時の Mg の生体動態を解明するためには、骨格筋のみならず消化管における Mg 輸送や腎における Mg 排泄などについても検討する必要があると考える。そこで先の研究では、TRPM7 に焦点を絞って検討してきたが、本研究ではさまざまな Mg 輸送タンパク質の各臓器における発現についても検討することを計画した。具体的には、消化管と骨格筋、腎臓を対象臓器に MagT1、TRPM6、TRPM7、CLDN16 の発現量について検討することを計画した。

また運動による生体 Mg 動態への直接的な影響について検討することを目的に、代謝性アシドーシスが Mg 動態にもたらす影響についても検討することを計画した。運動負荷は乳酸アシドーシスを誘導するため、Mg 輸送タンパク質の発現に及ぼす代謝性アシドーシスの影響を検討することを試みた。代謝性アシドーシスは塩化アンモニウム投与 (Charoenphadhu et al. *Am J Gastrointest Liver Physiol*, 291:G446-455, 2006) によるモデルとチアミン欠乏による乳酸アシドーシスモデルにおける検討を計画した。それぞれのモデル動物における見かけの Mg 吸収率、各臓器中の Mg 分布、そして各臓器における Mg 輸送タンパク質の発現量について検討し、それぞれの臓器間での関係性を明らかにすることを目的とした。なおチアミン欠乏による乳酸アシドーシスモデルを検討する前には、血中および組織中チアミン濃度の測定系を HPLC にて構築する。

以上の一連の研究を通じ、運動時の生体 Mg 動態および要求性に及ぼす影響とその要因の探索を行うことを目的とした。運動負荷に伴う生体影響についてはその他種々の要因の影響が考えられるが、現段階では代謝性アシドーシスのみに着目した。得られた結果は運動実施者におけるパフォーマンスの向上や体調維持に貢献するものと考え、また望ましい Mg 栄養の摂取に関する栄養教育にも貢献するものとする。

### 3. 研究の方法

(1) 運動負荷が Mg 摂取のタイミングが Mg 吸収に及ぼす影響

6 週齢雄性 SD ラット 36 匹を安静群 (9 匹) と運動群 (27 匹) に割付けた。運動群には 1 日おきに 2 時間連続強制遊泳を施し、飼育期間を 20 日間とした。飼育 15-17 日目の 3 日間に出納試験を実施、この期間は運動負荷を中止した。運動群はさらに運動実施日に高 Mg 食 (750ppm) を給餌する群 (9 匹) と低 Mg 食 (250ppm) を給餌する群 (9 匹)、通常 Mg 食 (500ppm) を給餌する群 (9 匹) に割付け、運動実施日の給餌は運動負荷後に行うものとした。なお飼育期間中の総 Mg 摂取量を一定にするため、運動後高 Mg 食のラットは運動非実施日には低 Mg 食を、運動後低 Mg 食のラットには運動非実施日に低 Mg 食を給餌し、運動後通常 Mg 食のラットには飼育期間中を通じて通常 Mg 食を給餌した。飼育終了後には血中 Mg 濃度、見かけの Mg 吸収率、骨格筋 Mg 含量および骨格筋 TRPM7 発現量 (western blot) を測定した。

(2) 運動負荷直後のラット骨格筋 TRPM7 の発現に及ぼす影響

これまでの一連の研究における血中 Mg 濃度や骨格筋 TRPM7 発現量については、一定期間の飼育後に標的サンプルを摘出するものであった。具体的には飼育期間最終日 17 - 19 時での 2 時間の強制遊泳後、翌日午前解剖を行うといった手続きであった。このため摘出筋は運動負荷後 12 時間以上が経過し、また個体によっても運動負荷後の経過時間が異なるものだった。

6 週齢雄性 SD ラットを用い、運動負荷後のラット骨格筋の TRPM7 の発現量を測定した。安静および運動負荷ラットはそれぞれ AIN-93G に基づく精製飼料にて 1 週間飼育した。運動負荷は 2 時間連続強制遊泳とした。安静ラット、運動負荷ラットそれぞれ、飼育最終日に運動前、運動負荷 5 分後、運動負荷 60 分後、運動負荷 24 時間後に割付け、それぞれのタイミングで全血採血屠殺後、骨格筋の摘出を行った。採血からは血液ガス (i-STAT1、扶桑薬品工業) を測定し、骨格筋からは TRPM7 (RT-PCR) を測定した。TRPM7 のプライマーは、Primer BLAST を用いて設計した (Forward: 5' -ACGGCACGGTTGG AAAGTAT-3'、Reverse: 5' -TCGACCTGACCTCCGGTTAT-3')

(3) 塩化アンモニウム投与による代謝性アシドーシスモデルにおける Mg 輸送タンパク質の発現

6 週齢雄性 SD ラット 32 匹を安静群 (16 匹)、運動群 (16 匹) に割付け、運動群には 2 時間連続強制遊泳を施した。16 日間の飼育期間中は AIN-93G に基づく精製飼料を 1 日あたり 20 g 給餌し、それぞれのラットの半数には 1.5% 塩化アンモニウム溶液を、残りには蒸留水を自由飲水させた。飼育 3 日目に尾採血により

血液ガス (i-STAT1、扶桑薬品工業) を測定し、飼育 9 日目から 3 日間の出納試験を行った。この 3 日間は運動負荷を中止し、飲水も全て蒸留水とした。飼育終了後に腓腹筋、腎臓、小腸を摘出し TRPM6 (Forward: 5' -TGGTCTGTGCGAAGCACAC-3'、Reverse: 5' -TCCCTCCATCCTCCGAATGT-3')、TRPM7 (Forward: 5' -ACGGCACGGTTGG AAAGTAT-3'、Reverse: 5' -TCGACCTGACCTCCGGTTAT-3')、MagT1 (Forward: 5' -GTTGGGGTTGCTTCTTGCTG-3'、Reverse: 5' -TGAGTGCATTCTCCAACCCC-3')、CLDN16 (Forward: 5' -GACCCCTCGCTCTGGTACAAC-3'、Reverse: 5' -TCAGCGTTCACCATCCAACA-3')、G3PDH (Forward: 5' -TTGTTGCCATCAACGACCCC-3'、Reverse: 5' -ATGAGCCCTCCACAATGCC-3') の発現量を測定した。

(4) チアミン欠乏モデルによる乳酸アシドーシスモデルの検討

- HPLC システムによる組織中チアミン濃度測定系の確立 -

ラット骨格筋や血清等生体試料を 5% TCA で処理し、中和後、1% タカジアスターゼで処理したサンプルを Eluent: 0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / 5% MeOH (Flow rate: 0.8 mL/min)、Reagent: 0.01% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> / 15% NaOH (Flow rate: 0.6 mL/min) にて HPLC にて測定した。カラムは Shodex Rs-pak NN-614 f 6.0 x 150 mm を用い Ex 375 nm / Em 450nm で検出した。

### 4. 研究成果

(1) 運動負荷が Mg 摂取のタイミングが Mg 吸収に及ぼす影響

血清 Mg 濃度および骨格筋 Mg 含量は、運動負荷後に高 Mg 食を給餌したラットで高値を示したが統計的有意差は確認されなかった。解剖前日の飼料中 Mg 含量がこれら測定結果に影響を及ぼしたことが示唆される。一方、見かけの Mg 吸収率は安静ラットに比べ運動負荷ラットで高値を示し、運動負荷後に低 Mg 食を給餌したラットが安静ラットに比して有意な高値を示した (61.2±9.8% vs 69.8±5.1%)。またラット骨格筋における TRPM7 の発現量についても安静ラットに比べ運動負荷ラットで高値を示し、運動負荷後通常 Mg 食ラットおよび低 Mg 食ラットで安静ラットに比して有意な高値を示した (100.0% vs 153.5% vs 160.8%)。これらの結果は先の研究結果の再現性を示すものであったが、血清 Mg 濃度、骨格筋 Mg 含量、見かけの Mg 吸収率および骨格筋 TRPM7 発現量の 4 変量間に有意な関係性を見出すには至らなかった。本研究の結果、運動実施前後の Mg 摂取について、その摂取量の違いは生体 Mg 動態に有意な影響を及ぼさないことが示唆された。

(2) 運動負荷直後のラット骨格筋 TRPM7 の発現に及ぼす影響

これまで、運動負荷後 12 時間以上が経過した骨格筋における TRPM7 の発現を検討して

きたため、運動負荷直後の発現量について検討した。運動負荷前、負荷 5 分後、60 分後、24 時間後のラット骨格筋の TRPM7 発現量を検討したところ、運動負荷直後には運動負荷前の 142.5%にまで発現量が増加し、負荷後 60 分では 136.7%、24 時間後には 113.6%と徐々に減少した。これらの結果は、運動負荷刺激が直接 TRPM7 の発現に影響を及ぼすことを示唆している。運動負荷直後の pH は運動前より低下したが、TRPM7 発現量と血液 pH、pCO<sub>2</sub>、pO<sub>2</sub> などの有意な相関は確認されなかった。しかしながら、運動直後の増加とその後の減少は、代謝性アシドーシスの影響を示唆するものと考え、アシドーシスモデル動物を用いた研究を計画した。

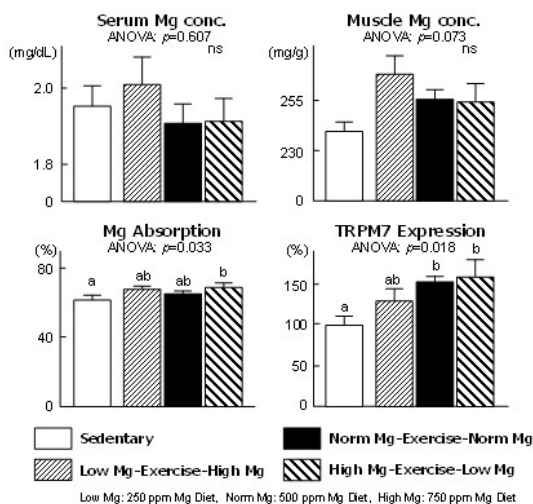


図1 運動負荷と Mg 摂取タイミングによる生体 Mg 動態

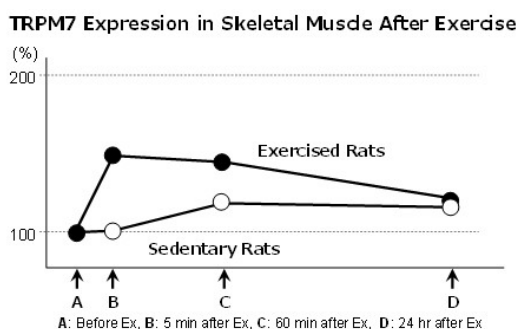


図2 運動負荷後の骨格筋 TRPM7 の発現量

(3) 塩化アンモニウム投与による代謝性アシドーシスモデルにおける Mg 輸送タンパク質の発現  
代謝性アシドーシスがラット Mg 輸送タンパク質の発現に及ぼす影響について検討した。飼育 3 日目に測定したアシドーシスの程度 (血液 pH) については塩化アンモニウム投与 (AC:  $p=0.066$ ) および運動負荷 (EX:  $p=0.011$ ) いずれも統計的有意な影響を及ぼしていた。見かけの Mg 吸収率については、EX では有意傾向の増加 ( $p=0.088$ )、AC では有意な低下 ( $p=0.012$ ) が確認された。また

AC は有意な排尿量の増加をもたらした ( $p<0.001$ )。

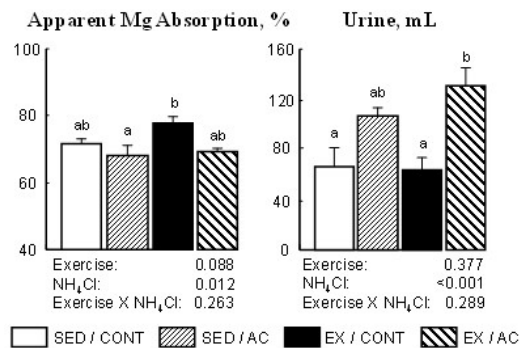


図3 代謝性アシドーシスにおける Mg 吸収

一方で、組織別の Mg 輸送タンパク質の発現量について検討した。骨格筋については TRPM7 および CLDN16 の発現は確認されたが、MagT1 および TRPM6 の発現は確認されなかった。TRPM7 および CLDN16 では AC および EX の主効果でそれぞれ有意差を確認し、2 要因の交互作用においても優位さが確認された。一方腎臓では、TRPM6、TRPM7 および CLDN16 の発現を、消化管では TRPM7 および CLDN16 の発現が確認されたものの、発現頻度の再現性に十分な確証を得るに至らず、統計解析は行っていない。MagT1 については検討した 3 つの臓器すべてにおいて検出されず、プライマー設計を再検討する必要が考えられる。また本研究では、骨格筋 Mg 含有量は EX により有意な増加を確認しなかった。見かけの Mg 吸収率の増加および尿中排泄量に有意差がなかったことから Mg 生体保留量は増加したと考えられるが、この結果を説明する結果を見出すには至らなかった。腎臓や消化管における Mg 輸送タンパク質の発現量を含め今後、継続的な評価を必要とする。

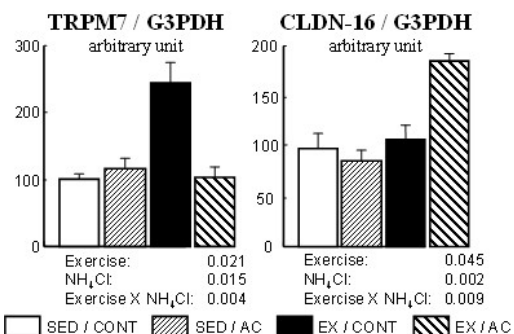


図4 代謝性アシドーシスにおける Mg トランスポーターの発現

(4) チアミン欠乏モデルによる乳酸アシドーシスモデルの検討  
- HPLC システムによる組織中チアミン濃度測定系の確立 -  
HPLC でチアミン測定系を確立した。骨格筋ホモジネートを除タンパク、中和を経て酵素することで、未処理のサンプルに対しピークが

移動した。標品に対しても同様の処理を行うことで、同じリテンションタイムにピークを検出することが可能となった。チアミン制限食でのラットの飼育により骨格筋中のチアミン濃度をどの程度コントロールするかを検討する必要がある。

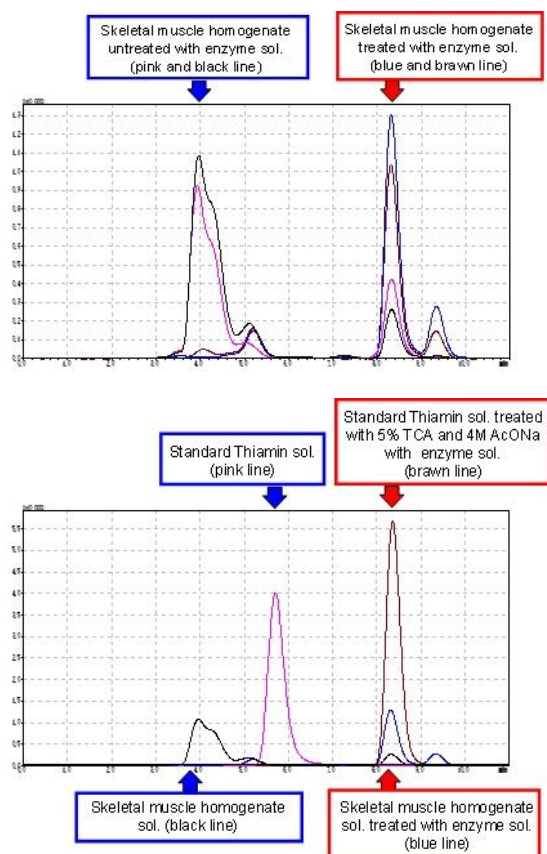


図5 HPLCシステムにおけるチアミンの検出

## 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)

[学会発表](計5件)

Sakai K, Shibata R, Sugo T, Shuto E, Ohta A. EXCESS DIETARY MAGNESIUM INCREASES EXPRESSION OF TRPM7, BUT DOES NOT IMPROVE THE AMOUNT OF MAGNESIUM IN RAT SKELETAL MUSCLE OF SWIMMING EXERCISED RATS. 19th annual Congress of the EUROPEAN COLLEGE OF SPORT SCIENCE, July 2, 2014, Amsterdam (Netherland)

Sakai K, Sugo T, Shibata R, Ohta A. SWIMMING EXERCISE INCREASE MAGNESIUM REQUIREMENT IN RATS. 18th annual Congress of the EUROPEAN COLLEGE OF SPORT SCIENCE, June 29, 2013, Barcelona (Spain)

柴田龍一、須藤利哉、御牧真代、太田篤胤、酒井健介 マグネシウム摂取量の違いが運動負荷ラット骨格筋に及ぼす影響 第67回日本体力医学会 2012年9月15

日 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市) 須藤利哉、柴田龍一、首藤恵理子、太田篤胤、酒井健介 運動負荷ラットにおけるマグネシウム代謝と骨格筋 TRPM7 の発現に関する研究 第67回日本体力医学会 2012年9月14日 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)

Sakai K, Hosoya M, Watanabe H, Ohta A. COMPARISON OF ATTITUDE AND BEHAVIOR FOR PROPER DIET IN ADOLESCENT FOOTBALL PLAYERS BETWEEN DIFFERENT TEAMS. 17th annual Congress of the EUROPEAN COLLEGE OF SPORT SCIENCE, July 7, 2012, Bruges (Belgium)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

酒井 健介 (SAKAI KENSUKE)  
城西国際大学・薬学部・准教授  
研究者番号：70406784