

機関番号：32645

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590219

研究課題名 (和文) ナトリウム・マグネシウム交換系のアデノシン三リン酸依存性の解析

研究課題名 (英文) Analysis of ATP-dependency of Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup> exchange

研究代表者

横山 倫子 (YOKOYAMA MICHIKO)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：20398762

研究成果の概要 (和文)：ラット心室筋単離細胞を代謝阻害剤で処理し、細胞内アデノシン三リン酸 (ATP) が枯渇させると、MgATP から Mg<sup>2+</sup> が遊離するためと考えられる細胞内遊離 Mg<sup>2+</sup> 濃度の上昇が見られ、細胞が硬直状態となる。この時、Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup> 交換輸送が約 90% 抑制された。代謝阻害剤による Na<sup>+</sup> や H<sup>+</sup> 濃度上昇ではこれほどの抑制は起きないため、Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup> 交換輸送活性には ATP が必要と示唆した。

研究成果の概要 (英文)：We studied Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup> transport rate after metabolic inhibition in rat ventricular myocyte. A decrease in ATP below the threshold of rigor cross-bridge formation, rather than elevation of [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> or intracellular acidosis, inhibits the Mg<sup>2+</sup> efflux (~90%), suggesting the absolute necessity of ATP for the Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup> exchange.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：生体膜・チャネル・トランスポーター・能動輸送

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内遊離Mg<sup>2+</sup>濃度 ([Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) の調節機構はまだ明らかにされていない。近年は、Mg<sup>2+</sup>流入経路については分子レベルに解明されつつある。高度高熱菌由来のMg<sup>2+</sup>輸送体 (MgtE) の立体構造が解明され、マグネシウムセンサーによる細胞内外のMg<sup>2+</sup>バランス維持機構が報告されている。哺乳類においては、TRP (transient receptor potential) チャネルのサブファミリーであるTRPM6とTRPM7がMg<sup>2+</sup>チャネルである可能性が報告されている。一方、Mg<sup>2+</sup> の汲み出しに関しては、細胞内外のNa<sup>+</sup>

濃度勾配を利用した能動的輸送、Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup>交換輸送の存在が示唆され、性質についても研究が進んでいるが、分子同定には至っていない。

## 2. 研究の目的

Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup>交換輸送は、心筋細胞の[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>調節機構として、細胞外へMg<sup>2+</sup>を汲み出す働きを持つ。Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup>交換輸送活性を研究する中で、本研究では、エネルギー依存性についての検討を目的とした。

### 3. 研究の方法

ラット心室筋から単離した生筋細胞に蛍光色素法を適用し、 $[Mg^{2+}]_i$ の経時的变化を測定する。細胞外 $Na^+$ によって細胞外に汲み出される $Mg^{2+}$ 濃度を見積り、 $Na^+/Mg^{2+}$ 交換活性を計算する。代謝阻害剤投与により、細胞内アデノシン三リン酸(ATP)を枯渇させた時の $Na^+/Mg^{2+}$ 交換活性の変化を検討する。

### 4. 研究成果

(1)ラット心室筋単離細胞を代謝阻害剤(FCCP, KCN)で処理すると、MgATP から $Mg^{2+}$ が遊離するためと考えられる $[Mg^{2+}]_i$ の上昇(約0.9 mMの定常値から2.5mM程度)を認め、細胞が硬直状態となり約50%に収縮した。この状態では、 $Na^+$ に依存した細胞内 $Mg^{2+}$ の汲み出しが約90%抑制された。そこで、ATPの減少による細胞内二次的变化による影響について検証した。まず、細胞内 $Na^+$ 濃度を蛍光 $Na$ 指示薬(SBFI)を用いて測定し、細胞内 $Na^+$ の上昇(5.0-10.5 mM)が、 $Na^+/Mg^{2+}$ 交換輸送活性を50%抑制する濃度(40mM)にも達していないことを示した。次に、細胞内酸性化を防ぐために一価イオンの膜透過性を上げるナイジェリシンで処理をしたが、 $Mg^{2+}$ 汲み出しは抑制されたままだった。以上の結果より、代謝阻害時に見られた $Mg^{2+}$ 汲み出し抑制は細胞内の $Na^+$ 上昇や酸性化だけによるものではないと考察した。

(2)  $Na^+/Mg^{2+}$ 交換輸送活性の阻害剤について検討した。これまで阻害剤としてよく知られているイミプラミンの阻害効果の濃度依存性を調べると、50%阻害濃度( $IC_{50}$ )は25°Cで59  $\mu$ M、35°Cで67  $\mu$ Mとなった。他のチャンネルや輸送体で用いられる阻害剤も試して比較検討したところ、 $Na^+/Ca^{2+}$ 交換系阻害剤のKB-R7943が最も強い阻害効果を認め、濃度依存性を示した。KB-R7943の $Na^+/Mg^{2+}$ 交換系に対する $IC_{50}$ は25°Cで21  $\mu$ M、35°Cで16  $\mu$ Mとなり、イミプラミンよりも阻害効果が3から4倍強いことが分かった。今後、KB-R7943が $Na^+/Mg^{2+}$ 交換系の機能を研究する際に有用である可能性を示唆した。

### 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2件)

- ① Michiko Tashiro, Hana Inoue and Masato Konishi, KB-R7943 inhibits  $Na^+$ -dependent  $Mg^{2+}$  efflux in rat ventricular myocytes. J Physiol Sci

査読あり 60:415-424 2010

- ② Michiko Tashiro, Hana Inoue and Masato Konishi, Metabolic inhibition strongly inhibits  $Na^+$ -dependent  $Mg^{2+}$  efflux in rat ventricular myocytes. Biophys J 査読あり 96:4941-4950 2009

[学会発表] (計3件)

- ① Michiko Tashiro, Hana Inoue and Masato Konishi. Is ATP required for activities of the  $Na^+/Mg^{2+}$  exchange? 第53回アメリカ生物物理学会. ボストン(アメリカ合衆国マサチューセッツ州) 2009年3月4日
- ② 田代倫子, 井上 華, 小西真人.  $Na^+$ 依存性 $Mg^{2+}$ 汲みだし輸送活性に対する $Na^+/Ca^{2+}$ 交換輸送阻害薬の効果. 第87回日本生理学会 盛岡市民文化ホール(岩手県) 2010年5月20日
- ③ 田代倫子, 井上 華, 小西真人. ラット心室筋細胞における $Mg^{2+}$ 輸送に対する $Mg^{2+}$ 欠乏の影響. 第88回日本生理学会(誌上開催) 2011年3月29日