

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657090

研究課題名(和文) MagExによるマグネシウムの生体吸収機構の解明

研究課題名(英文) Magnesium absorption by MagEx

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：未解明であるマグネシウムの生体吸収機構を明らかにするため、マグネシウムの吸収に関わる腸上皮の基底側に局在するMg²⁺排出トランスポーターMagExの遺伝子破壊マウスを作出した。ホモ欠損マウスでは血中マグネシウム濃度が低下していた。また腸からのマグネシウム吸収能を比較するべく糞中のマグネシウム量を測定したところMagExの欠損により増加していたが、摂食量について野生型マウスと明確な差は認められなかった。これらの実験結果より、MagExが生体内へのマグネシウムの吸収に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Transcellular Mg²⁺ transport across epithelia is essential for magnesium homeostasis. Apical entry and basolateral extrusion is required to accomplish this process, but molecules responsible for basolateral extrusion have not yet been identified. I perform functional analyses of uncharacterized membrane protein MagEx. Live imaging analyses reveal that MagEx can extrude Mg²⁺ by exchanging intracellular Mg²⁺ with extracellular Na⁺. Immunohistochemical analyses show that MagEx is strongly expressed in intestinal epithelia, and localizes to their basolateral membrane. To clarify the in vivo role of MagEx, its knockout mice was generated. Homozygotes show hypomagnesemia, and intestinal absorption of magnesium is impaired in these mice. These results show that MagEx is the basolaterally located Mg²⁺ extrusion molecule, and demonstrate the crucial importance of Mg²⁺ extrusion by MagEx in magnesium homeostasis.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：膜輸送と輸送タンパク質 マグネシウム 恒常性

1. 研究開始当初の背景

マグネシウムは必須ミネラルの1つとして広く知られており、ATPの産生/分解を含む多くの酵素反応にマグネシウムイオン(Mg^{2+})が必要である。しかしながら、マグネシウムの生体への取り込み機構については、よくわかっていない。マグネシウムの食物からの吸収について、腸上皮の細胞と細胞の間を通る仕組みと、細胞自身を通る仕組みの2つが知られている。特に細胞自身を通る仕組みに関しては、腸上皮細胞の頂端(消化管腔)側にある Mg^{2+} 透過性のイオンチャネルTRPM6/7が重要であることが知られており、実際、TRPM6遺伝子の変異が遺伝性の低マグネシウム血症の患者より見つかった。しかし、腸上皮細胞内に入ったマグネシウムがどのようにして体腔へ取り込まれるのか、その機構については未解明のままであった。私は機能未知の膜蛋白質MagExの解析に取り組み、MagExがこれまで未同定であった Mg^{2+} を細胞外に排出する Mg^{2+} - Na^+ 交換体であることを発見した。またMagExを特異的に認識する抗体を用いてその発現箇所を調べた結果、ウエスタンブロット解析によりMagExが腸に大量に存在していること、そして組織染色から栄養成分の吸収に関わる腸上皮細胞の基底(体腔)側に存在していることを発見した。これらの予備的実験結果より、MagExが腸上皮細胞の基底側より体腔へ Mg^{2+} を「排出する」ことによりマグネシウムを生体内へと送り込んでおり、個体レベルでのマグネシウム吸収に寄与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では上記の仮説を、in vitro培養細胞系からマウス個体レベルを含む重層的な実験手法(具体的には下記「3. 研究の方法」に詳述)を用いて検討することで、これまで未解明であったマグネシウム吸収機構を解明することを目的としていた。

3. 研究の方法

(1) MagEx遺伝子ノックアウトマウスを作出し、その解析を行う。血中、尿中や各種組織中のマグネシウム濃度を微量元素の定量法として知られている、ICP-OES法などで測定する。また糞中のマグネシウム量を測定、算出し、食餌中のマグネシウム量と比較することで、腸から吸収されているマグネシウム量を導き出す。野生型マウスと比べることで、腸からのマグネシウムの吸収に差があるかについて、明らかにする。また、低マグネシウム血症の患者において観察される食欲不振、衰弱、痙攣などを中心に、その表現型を観察する。一方で、このMagEx遺伝子ノックアウトマウスは、MagExプロモーター下でLacZを発現するように設計されている。このことを利用し、ヘテロマウスでlacZ染色を行い、腸上皮でのMagExの発現を確認するとと

もに、他の組織における発現も解析する。また、高マグネシウム食などによるマグネシウムの付加等により表現型が回復するか、あるいは逆に低マグネシウム食により、表現型が増悪化するかどうか、明らかにする。

(2) 予備的実験により、極性研究のモデルとして汎用されるMDCK細胞をシート状に培養しMagExを発現させると、マウス腸上皮と同様に基底側に局在することを確認している。この実験系を用いて、MagExが基底側に局在する分子機構を明らかにする。MDCK細胞にMagExの野生型および各種変異体を導入し、その局在を共焦点顕微鏡で観察する。また、シート状に培養しているMDCK細胞の頂端側、あるいは基底側からビオチンを加えて、頂端、基底側の片方の膜蛋白質のみを標識する生化学的実験も併せて行う。これらにより、野生型および変異型MagExの局在を調べ、MagExが基底側に局在するために必要なアミノ酸領域を特定する。また、基底側への局在化機構の一つとして、AP-1B複合体の関与が知られている(Gravotta *et al.* PNAS 104, 1564-1569)。AP-1B複合体の構成因子とMagExとの結合解析や、RNA干渉法による発現抑制実験を行い、MagExの基底側への局在制御における同複合体の重要性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 作出したMagEx遺伝子ノックアウトマウスの血中マグネシウム濃度をキシリジルブルー法により測定したところ、野生型マウスと比較して、有意に低下していた。また、ICP-OES法を用いた各種元素の定量の結果においても、同様にMagEx遺伝子ノックアウトマウスにおいて血中のマグネシウム濃度が低下しており、一方で測定した他の元素(ナトリウム、カリウム、カルシウム)については明確な差異が認められなかった。また、食餌中のマグネシウム量を減らしたところ、MagEx遺伝子ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して早く死亡することが判明した。併せて、MagEx遺伝子ノックアウトマウスではマグネシウム恒常性に異常をきたしていることが明らかとなった。

これらのマウスにおける腸からのマグネシウムの吸収能を明らかにするべく、糞中のマグネシウム量を測定、算出した。その結果、MagEx遺伝子ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して糞中のマグネシウム量が有意に増加していた。一方、野生型およびMagEx遺伝子ノックアウトマウスの間で摂食量に明確な差異は見受けられなかった。従って、これらの結果はMagEx遺伝子ノックアウトマウスでは腸におけるマグネシウムの吸収が弱まっていることを示しており、MagExが腸でのマグネシウムの吸収に重要な役割を果たしていることを強く示唆しているものと位置づけられる。

一方で、尿中のマグネシウム濃度を測定したところ、野生型のマウスと比較して顕著に低下していた。このことは、*MagEx* 遺伝子ノックアウトマウスでは血中マグネシウム濃度の低下に反応して、腎臓におけるマグネシウムの再吸収能を高め、排出されるマグネシウムの量を抑えることで血中マグネシウム濃度のさらなる低下を防いでいると考えられる。今後さらにこの具体的な分子機序を明らかにすることで、また新たなマグネシウム恒常性の維持機構が明らかになることが期待される。

(2) さらに、この *MagEx* 遺伝子ノックアウトマウスでは歯のエナメル質の形成に異常が見受けられた。電子顕微鏡を用いて詳細な構造を観察したところ、*MagEx* 遺伝子ノックアウトマウス由来のエナメル質はエナメル小柱の形成が不十分であり、小柱間の隙間が大きくなっていった。また、元素分析を行ったところ、マグネシウムの量が多くなっており、一方でカルシウムやリンの量が少なくなっていた。高硬度のエナメル質の形成時において、マグネシウムを除去することが重要と考えられており、*MagEx* 遺伝子ノックアウトマウスではこのマグネシウムの除去が不十分なため、エナメル質の形成に異常が生じていると考えられる。歯の組織染色を行った結果、*MagEx* はエナメル質の形成に重要な役割を果たす、エナメル芽細胞に発現しており、またエナメル質と反対側の基底側に局在していた。つまり、*MagEx* は基底側から Mg^{2+} を排出することで、エナメル芽細胞を介したマグネシウムの除去に重要な役割を果たしていることが示唆される。

(3) *MagEx* が基底側に局在する分子機構を明らかにするべく、これまでに膜蛋白質の基底側局在に重要な役割を果たしていることが報告されているクラスリンアダプター複合体 AP-1B の寄与について検討した。この目的で、MDCK 細胞に対して、AP-1B の基質認識サブユニットである $\mu 1B$ の発現抑制実験を行った。レトロウィルスを用いて $\mu 1B$ に対する shRNA をコードするベクターを導入し、 $\mu 1B$ の発現抑制株を樹立したが、*MagEx* の局在は基底側のみで観察され、少なくとも AP-1B 以外の寄与が想定された。最近、一部の基底側局在蛋白質について AP-1B 以外に AP-1A も相補的に働くことが報告されているため、次に AP-1A の関与について検討するべく、AP-1A の $\mu 1A$ サブユニットの発現抑制実験を行った。上記 $\mu 1B$ 発現抑制株に対して $\mu 1A$ に対する siRNA を導入し、2重発現抑制細胞を作成したところ、*MagEx* のシグナルが頂端部にも観察されるようになった。また、 $\mu 1A$ に対する発現抑制のみでは *MagEx* は基底側に局在していたことから、AP-1A と AP-1B が相補的に働くことで、*MagEx* は基底側に局在化しているということが強く示唆された。実

際、免疫沈降法を用いて *MagEx* と $\mu 1A$ 、 $\mu 1B$ の複合体形成を調べたところ、いずれも *MagEx* と共沈することが確認された。

次に、*MagEx* のどの部位が基底側局在に重要であるかを明らかにするべく、旧来より蛋白質の基側部局在に重要であると知られている、YXX Φ (Φ は大きな側鎖をもつ疎水性アミノ酸残基)および LL モチーフについて、各々アラニンに置換した変異体を作成し、その局在を観察した。その結果、*MagEx* のアミノ酸配列中に存在する YXX Φ 、LL モチーフの中で、3つの LL モチーフを変異させた場合に部分的に頂端部への局在が見受けられるようになった。そして、3つの LL モチーフ全てをアラニンに置換した変異体では、 $\mu 1A$ 、 $\mu 1B$ を発現抑制した場合と同様に、大半の細胞で *MagEx* が頂端部にも局在していた。また、免疫沈降実験において、この変異体 *MagEx* は $\mu 1A$ 、 $\mu 1B$ との共沈をみとめなかった。これらの実験結果より、*MagEx* の基側部への局在は LL モチーフを介して AP-1A、AP-1B 複合体と相互作用することにより担われていることが強く示唆された。

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4件)

Funato, Y. and Miki, H. Reversible oxidation of PRL family protein-tyrosine phosphatases. *Methods* 65, 184–189 (2014) 査読有
doi: 10.1016/j.ymeth.2013.06.032

#Yamazaki, D., #Funato, Y., Miura, J., Sato, S., Toyosawa, S., Furutani, K., Kurachi, Y., Omori, Y., Furukawa, T., Tsuda, T., Kuwabata, S., Mizukami, S., Kikuchi, K., and Miki, H. (#: equal contribution) Basolateral Mg^{2+} Extrusion via CNNM4 Mediates Transcellular Mg^{2+} Transport across Epithelia: A Mouse Model. *PLOS Genet.* 9, e1003983 (2013) 査読有
doi: 10.1371/journal.pgen.1003983

Funato, Y., Hayashi, T., Irino, Y., Takenawa, T., and Miki, H. Nucleoredoxin regulates glucose metabolism via phosphofructokinase 1 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 440, 737–742 (2013) 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.138

Ishii, T., Funato, Y., and Miki, H. Thioredoxin-related protein 32 (TRP32) specifically reduces oxidized phosphatase of regenerating liver (PRL). *J. Biol. Chem.* 288, 7263–7270 (2013) 査読有
doi: 10.1074/jbc.M112.418004

〔学会発表〕(計2件)

船戸洋佑、山崎大輔、三木裕明「マグネシウム排出分子 MagEx とがん転移」第91回日本生理学会大会 2014.3.16 鹿児島

船戸洋佑、三木裕明
「蛋白質の可逆的な酸化修飾を介したシグナル伝達の制御」
第85回日本生化学会大会 2012.12.15 福岡

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

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