

## 9438 ナトリウム-マグネシウム交換機構の生体内分布とその生理的意義

助成研究者：中山 晋介 (名古屋大学 医学部)

共同研究者：富田 忠雄 (名古屋大学 医学部)

松原 達昭 (名古屋大学 医学部)

研究目的) 一般に生体組織は多量のMgを含有しているため、これまで細胞内遊離Mg濃度( $[Mg]_i$ )は数ミリモルであろうと推定されてきた。このMg濃度では、細胞内酵素の活性化はMgにたいしてすでに飽和しているので、従来、カルシウムや環状ヌクレオチド等の細胞内セカンドメッセンジャーの研究において、細胞内Mg濃度は一定であると仮定されてきた。しかしながら、80年代後半から90年代にかけて、種々の新しい方法でMgが測定されたところ、 $[Mg]_i$ はサブミリモルのオーダー以下であることがコンセンサスとなってきた。この濃度領域では多くの細胞内酵素の活性が大きく変化するので、Mgイオンによる細胞機能の修飾があることが示唆される。

私たちはこれまで、モルモットの盲腸紐平滑筋において、磷の核磁気共鳴スペクトルから細胞内遊離Mg濃度を測定したところ0.3-0.4 mMであった。外液のイオン組成をかえた実験から、細胞膜のNa-Mg交換機構が、Naの濃度勾配のエネルギーを利用してMgをくみ出し、このように $[Mg]_i$ を低濃度に保っていることが示唆された。本研究では、このNa-Mg交換機構の存在と生理的意義を確かめるため、代表的Na担体阻害薬であるアミロライドとウアバインの作用を調べた。

結果と考察) アミロライドは、Naチャンネル、Na-H、Na-Ca交換等のNa関連担体を広く非特異的にブロックすることが知られている。アミロライドは、Ca除去液中でモルモット盲腸紐平滑筋の $[Mg]_i$ を有為に上昇させた。一方、Na-Kポンプ阻害剤であるウアバインもCa除去液中で $[Mg]_i$ を上昇させた。細胞内pHで $[Mg]_i$ の計算を補正しても、この結果は影響を受けなかった。細胞内Rb濃度の測定より、アミロライドは盲腸紐平滑筋において、Na-Kポンプ活性を抑制しないことが分かった。また、アミロライドはCa、Mg除去液中での細胞内含有Mgの流出に、僅かな影響しか及ぼさなかった。以上の結果より、アミロライドは細胞膜に存在するNa-Mg交換を直接ブロックして $[Mg]_i$ を上昇させ、一方、ウアバインはNa-Kポンプ抑制作用により細胞内Naを上昇させて、間接的にNa-Mg交換を阻害し、 $[Mg]_i$ を上昇させることが示唆された。また、平滑筋において、このNa-Mg交換機構が細胞内Mg濃度調節に、最も重要な働きをしているであろうと推測された。アミロライドやウアバインには多くの関連物質や誘導体があり、実験や臨床医学の場でもよく使われている。これら薬物の長期投与は、 $[Mg]_i$ の変化を引き起こし、生体反応に重要な影響を及ぼすかもしれない。



## 9438 ナトリウム-マグネシウム交換機構の生体内分布とその生理的意義

助成研究者：中山 晋介 (名古屋大学 医学部)

共同研究者：富田 忠雄 (名古屋大学 医学部)

松原 達昭 (名古屋大学 医学部)

## 1. 研究目的

一般に生体組織は多量のMgを含有しているため、これまで細胞内遊離Mg濃度([Mg]<sub>i</sub>)は数ミリモルであろうと推定されてきた。このMg濃度では、細胞内酵素の活性化はMgにたいしてすでに飽和しているため、従来、カルシウムや環状ヌクレオチド等の細胞内セカンドメッセンジャーの研究において、細胞内Mg濃度は一定であると仮定されてきた。しかしながら、80年代後半から90年代にかけて、種々の新しい方法でMgが測定されたところ、[Mg]<sub>i</sub>はサブミリモルのオーダー以下であることがコンセンサスとなってきた。この濃度領域では多くの細胞内酵素の活性が大きく変化するので、Mgイオンによる細胞機能の修飾があることが示唆される(4)。

私たちはこれまで、モルモットの盲腸組平滑筋において、燐の核磁気共鳴スペクトルから細胞内遊離Mg濃度を測定したところ0.3-0.4 mMであった(13)(14)。外液のイオン組成をかえた実験から、細胞膜のNa-Mg交換機構が、Naの濃度勾配のエネルギーを利用してMgをくみ出し、このように[Mg]<sub>i</sub>を低濃度に保っていることが示唆された(14)。

本研究ではまず、これまで使っていたモルモット盲腸組平滑筋においてNa-Mg交換機構の存在と生理的意義を確かめるため、代表的薬物であるアミロライドとウアバインの作用を調べた。アミロライドは、Naチャンネル、Na-H、Na-Ca交換等のNa関連担体を広く非特異的にブロックすることが知られている(3)。そこで、この盲腸組平滑筋に存在するNa-Mg交換もアミロライドによりブロックされ、細胞内Mgの上昇が期待される。一方、Na-Kポンプの特異的阻害剤であるウアバインは、細胞膜内外のNaイオン勾配をなくすので、Na-Mg交換機構がNa濃度勾配のエネルギーを利用していると仮定すると、この薬物も二次的に細胞内Mgの上昇をきたすことが想像される。赤血球細胞において、ラジオアイソトープを用いた実験から、アミロライドがNa依存性Mg流出入を抑制することが知られている(5)(6)。しかしながらこれまで、これらの薬物が実際に細胞内Mg濃度を変化させるということを証明する研究はなかった。

アミロライドやウアバインは、多くのNa担体を介して、細胞内pHを変化させ間接的に細胞内Mg濃度に影響を与える可能性があるため、本研究中のデータ解析では、燐の核磁気共鳴(<sup>31</sup>P-NMR)スペクトル中のpH感受性ピークを使い(11)(13)(14)、その影響を考慮した。そして、Na-Kポンプ活性の指標として、ルビジウム(<sup>87</sup>Rb)の核磁気共鳴を利用し

て、経時的に細胞内Rb濃度を測定した。

## 2. 研究方法

### 2.1. 標本作製と溶液

モルモット(300-400g)より摘出した盲腸紐をNMRサンプル管(10mm diameter)内に固定し、まず正常液を12ml/分で灌流した。そのサンプル管の温度は、実験中32°Cに保たれた。灌流装置はメインマグネットから約3m離された。標本をメインマグネットに挿入してから、サンプル管中の水の<sup>1</sup>Hシグナルを用いて、磁場の均一度の再調整をした。正常液の組成は以下の通りである(mM): NaCl 137.9; KHC03 5.9; CaCl<sub>2</sub> 2.4; MgCl<sub>2</sub> 1.2; glucose 11.8; HEPES 5. 溶液のpHは7.4-7.5に保たれた。また、溶液は酸素ガスでバブルされた。

### 2.2. <sup>31</sup>P-NMR測定

磷の核磁気共鳴(<sup>31</sup>P-NMR)測定で用いられた方法の詳細は、以前私たちが発表したものと基本的に同じものである。(11)-(14)日本電子社製NMRスペクトロメーターを109.4 MHzで使用し、磷化合物の測定をした。30度のフリップ角に相当するラジオ周波数パルスを0.6秒間隔で与え、2500回の積算(25min)で1枚のスペクトルを得た。スペクトルピークの周波数は、ホスホクレアチンピーク基準として、p.p.m.単位で測定した。スペクトルのデジタル分解能は、積算されたNMRシグナルをゼロフィリングするにより、約0.005p.p.m.にセットした。

測定は、標本が洗浄液で灌流されてから、少なくとも100分後に始めた。正常液灌流下で、平滑筋標本から得られたスペクトルには、6つの主なピークがあった: ホスホモノエステル(PME), 無機磷酸(Pi), ホスホクレアチン(PCr), ATPの $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ピーク。ホスホモノエステルピークは6.8と6.3p.p.m.に分かれ、それぞれPME1, PME2とした(図1参照)。化合物の相対濃度は、これらピークの面積にあらかじめ求めておいたSaturation Factor(12)を考慮に入れて計算した。 $\gamma$ と $\alpha$ ATPピークは、ADPも少量含むので、 $\beta$ ATPピークの面積からATP濃度を計算した。

### 2.3. 細胞内pHと遊離Mg濃度評価

細胞内pHの変化は、遊離Mg濃度評価に影響を与えるので、pH感受性ピークであるPiまたはPME-1の共鳴周波数を連続的に測定した。これらピークからの細胞内pHの計算は、以前の論文に記載したとおりである(11)-(14)。

遊離Mg濃度([Mg]<sub>i</sub>)は、MgATPの見かけ上の解離定数( $K_D^{MgATP}$ )を仮定し、メタルフリー型とMg結合型ATPの比から計算できる(8)。ATPの共鳴周波数は、Mgの結合に比例してシフトする。この研究では、前の研究と同様に(13)(14)、主に $\alpha$ と $\beta$ ATPピークの共鳴周波数の差から[Mg]<sub>i</sub>を計算した(この計算式では、細胞内pHは7.2と仮定された)。細胞内pH

変化は、ATPの共鳴周波数にも影響を与える。薬物投与時の細胞内pHの影響を評価するため、1) 上記の方法で求めた細胞内pHでMg濃度計算式を補正するか、または、2) pHとMgの $\alpha$ と $\beta$ ATPピーク共鳴周波数へ与える影響は異なるので、これを利用して2つの方程式を作り、同時に細胞内pHとMg濃度を算出する方法をとった(11)。

#### 2.4. $^{87}\text{Rb}$ -NMR測定

$^{87}\text{Rb}$ の測定のため、スペクトロメーターを88.4MHzで使った。90度のフリップ角に相当するラジオ周波数パルスを、0.15秒ごとに与えた。この間隔は $^{87}\text{Rb}$ の縦緩和時間より十分長いので(2)(17)、磁価が飽和して小さくならないであろうと考えられる。 $^{87}\text{Rb}$ スペクトルは2000回のNMRシグナル積算(5分)ごとに得られた。

細胞内Rb濃度を測定するとき、溶液に5mMのRbCl( $^{87}\text{Rb}$  27.85%,  $^{85}\text{Rb}$  72.15%)が加えられた。投与最初の5分間の細胞内Rb取り込みは無視できると仮定して(この時のシグナルは、ほぼ細胞外Rbを反映すると思われるので)、このシグナルを、この後引き続き得られるシグナルから差分して、細胞内Rb濃度変化を推定した。本研究で私たちは、細胞内Rb濃度をNa-Kポンプ活性の指標として使った。この標本において、RbのNa-Kポンプ活性化の半最大濃度は、Kとほぼ同値であるという報告が、ラジオアイソトープを使った実験よりなされている(19)。また、 $^{87}\text{Rb}$ の感度は $^{39}\text{K}$ の約19倍あり、この実験に有利であった(2)(17)。

### 3. 研究結果

#### 3.1. 盲腸組平滑筋の細胞内Mg濃度

Na-Mg交換機構が、細胞内遊離Mg濃度を電気化学平衡から予測される値よりずっと低く保っているということが、私たちのこれまでのモルモット盲腸組平滑筋の実験から示唆されている(14)。そこで、いろいろなNa担体を阻害することが知られるアミロライドの作用を、まず調べた。モルモット盲腸組からえられた燐の核磁気共鳴スペクトルの $\alpha$ と $\beta$ ATPピークの共鳴周波数の差から、細胞内遊離Mg濃度([Mg]<sub>i</sub>)を計算すると、本実験で使われた標本の平均は、正常液中で $0.34 \pm 0.04\text{mM}$ (n=18)であった。

正常液に1mMのアミロライドを加えても150分間、3つの標本において[Mg]<sub>i</sub>はほとんど変化がなかった。このアミロライド投与中、細胞内pHはごくわずか(0.05 U)上昇した。別の標本において、細胞外Mgを1.2から12mMに増やした後、アミロライド(1mM)を投与したところ、[Mg]<sub>i</sub>は150分後に約0.08mM上昇した。そして、この薬物を洗い流すと、[Mg]<sub>i</sub>はもとの値に戻った。

#### 3.2. カルシウム除去液中での薬物作用

##### 3.2.1. 可逆的Mg濃度変化

これまでの実験から私たちは、Mgイオンの受動的透過性はCaによって減弱されている

ことを報告してきた(13)。そこで、薬物のNa-Mg交換抑制の作用をより明確に示すため、以下の実験はCa除去液中で行った。

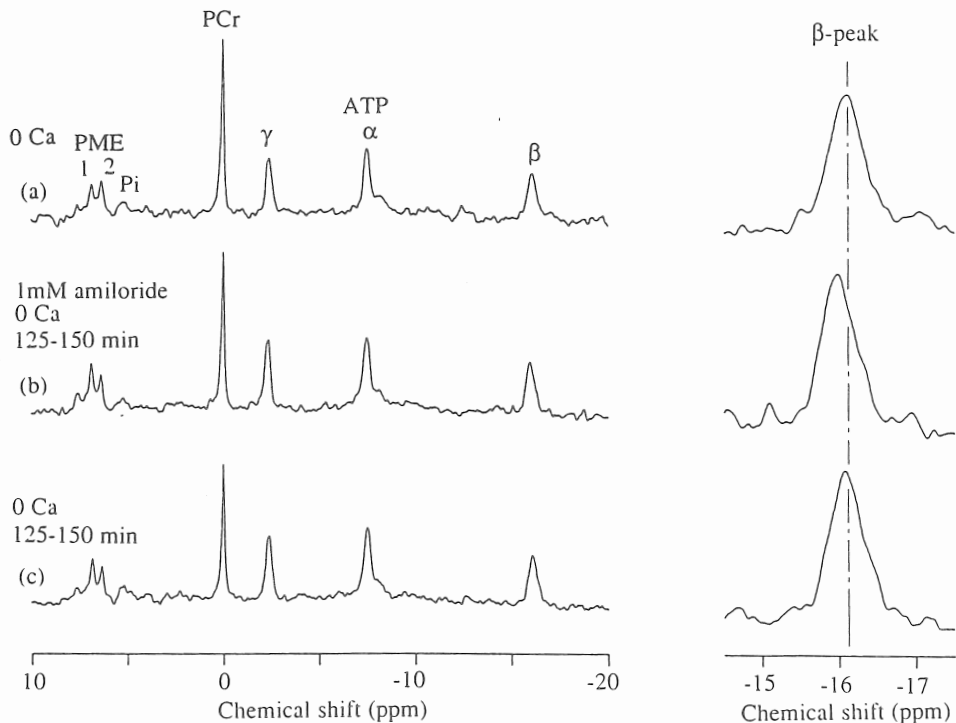


図1. アミロライドの $^{31}\text{P}$ -NMRスペクトルへの影響。それぞれのスペクトルは25分間のシグナル積算によるものである。Ca除去液中で25分間測定した後、150分間アミロライド(1mM)を投与した。その後、薬物を150分間洗い流した。 $\beta$ ピークは、右に拡大表示されている。

図1はアミロライド長期投与時の、磷の核磁気共鳴スペクトル変化である。標本は、アミロライド投与50分前から、Ca除去液で灌流された。 $[\text{Mg}]_i$ の変化によって主に $\beta$ ATPピークの共鳴周波数が変化するので、図1では、 $\beta$ ATPピークが拡大して示してある。アミロライド投与後150分間で、 $\beta$ ATPピークは $0.13 \pm 0.05 \text{ p.p.m. (n=4)}$ 高周波数側へシフトした。このケミカルシフト変化は、 $[\text{Mg}]_i$ が $0.38 \pm 0.03$ から $0.86 \pm 0.28 \text{ mM}$ へ上昇したことに相当する(図2)。この後、アミロライドを洗い流すと、 $\beta$ ATPピークの共鳴周波数はもとに戻った。この事実は、平滑筋細胞にNa-Mg交換が存在し、アミロライドがこの機構を抑制して、 $[\text{Mg}]_i$ を上昇させるという仮説に一致する。

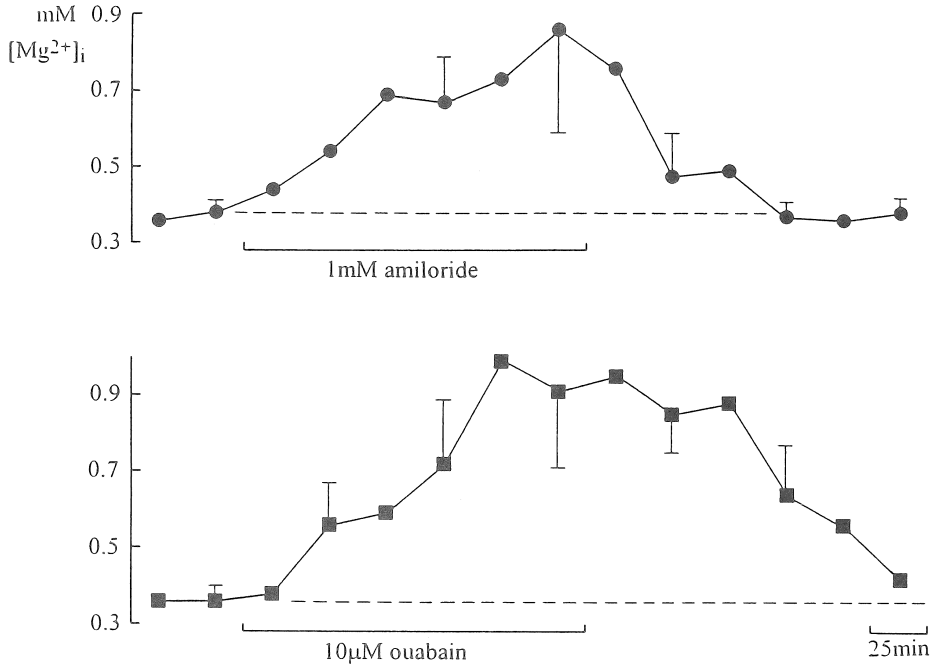


図2. アミロライド(上)とウアバイン(下)投与による[Mg]<sub>i</sub>変化。縦線はS.D. (n=4).

表1. アミロライド(A)とウアバイン(B)投与時の高エネルギー磷酸変化。コントロールのATP濃度を1として相対的に示した。(平均±S.D.)

(A)	Control	Amirolide 150min	Wash-out 150min
[ATP]	1	1.02±0.04	0.98±0.05
[PCr]	2.22±0.12	2.13±0.11	1.89±0.16
(B)	Control	Ouabain 150min	Wash-out 150 min
[ATP]	1	0.98±0.04	0.95±0.06
[PCr]	1.82±0.33	1.67±0.32	1.61±0.24

もし、Na-Mg交換機構が存在し、Na勾配のエネルギーを利用してMgを細胞外へくみ出しているならば、Na濃度勾配を減弱させるような処理をすれば、「Mg」<sub>i</sub>は上昇するはずである。ウアバインはNa-Kポンプ抑制剤としてよく知られており、この標本においては10µMの濃度

で、Na-Kポンプに依存する酸素消費を完全に抑制する(13)。ウアバイン(10 $\mu$ M)をCa除去液中で投与したとき、150分後[Mg]<sub>i</sub>は0.36 $\pm$ 0.04から0.91 $\pm$ 0.20mMへと上昇した。引き続きウアバインを洗い流すと、150分で[Mg]<sub>i</sub>はほぼコントロールに近い値に戻った。

Ca除去液中で行ったアミロライド投与の実験では、相対的なホスホクレアチン([PCr])濃度はコントロールスペクトルのATPを1とすると、2.22 $\pm$ 0.12であった。[PCr]はこの実験中ゆっくりと低下していった(アミロライド投与150分後、2.13 $\pm$ 0.11；洗い流し150分後、1.89 $\pm$ 0.16)。一方、[ATP]は殆ど変化しなかった。同様の燐化合物濃度変化が、ウアバイン投与の実験でもみられた(表1)。アミロライド、ウアバイン投与どちらの実験でも、高エネルギー燐酸濃度の変化と、[Mg]<sub>i</sub>変化は対応しなかった。

### 3.2.2. pH解析

アミロライド、ウアバインともNa依存性pH調節機構(1)に影響して、細胞内pHを変化させる可能性がある。pHは[Mg]<sub>i</sub>調節機構に影響する可能性があり、また[Mg]<sub>i</sub>計算にも影響を与える。Ca除去液中では、一般に細胞内pHを計算する無機燐のピークが小さいので、本研究では、次の2つの方法を用いて細胞内pHを推定し、[Mg]<sub>i</sub>を補正した。1)  $\beta$ と $\gamma$ ATPの共鳴周波数から直接pHと[Mg]<sub>i</sub>を計算する。2) ホスホモノエステル(PME-1)ピークから細胞内pHを推定し、そのpHで[Mg]<sub>i</sub>の計算を補正する。どちらの方法でもアミロライドまたはウアバイン投与中、細胞内pHはやや上昇した。そして、それら薬物を洗い流しても、pHは元に戻らず、むしろ上昇した。このpH補正をしても、[Mg]<sub>i</sub>は薬物投与中上昇し、洗い流しによってもとに戻るといった傾向は変わらなかった。([Mg]<sub>i</sub>の上昇はpH補正をしないときに比べてやや減少した。)

### 3.3. 細胞内Mg枯渇

細胞外のMgとCaを同時に除去(+ 1mM EDTA)すると、[Mg]<sub>i</sub>は100分後に約10 $\mu$ M以下に低下することを、私たちは以前報告した(13)。今回の実験では3つの標本において、MgとCaを除去するとき、同時に1mMのアミロライドを加えた。すると、[Mg]<sub>i</sub>は100分後約30 $\mu$ Mとなり、150分後には約19 $\mu$ Mとなった。アミロライドがあっても、[Mg]<sub>i</sub>は大きく減少したが、その減少はアミロライドがないときに比べ小さかった。アミロライドが、MgとCa除去処理による[Mg]<sub>i</sub>低下を部分的に抑制したということは、アミロライド非感受性のMgの膜通過経路があることを示唆する。

### 3.4. 細胞内Rb濃度

異なる組織において、アミロライドはいろいろな強さでNa-Kポンプを抑制することが知られている e.g.(16)。もし、私たちの使った盲腸組平滑筋で、アミロライドがNa-Kポンプを抑制すれば、アミロライドはNa勾配の減少を介して、Na-Mg交換を間接的に抑制して、



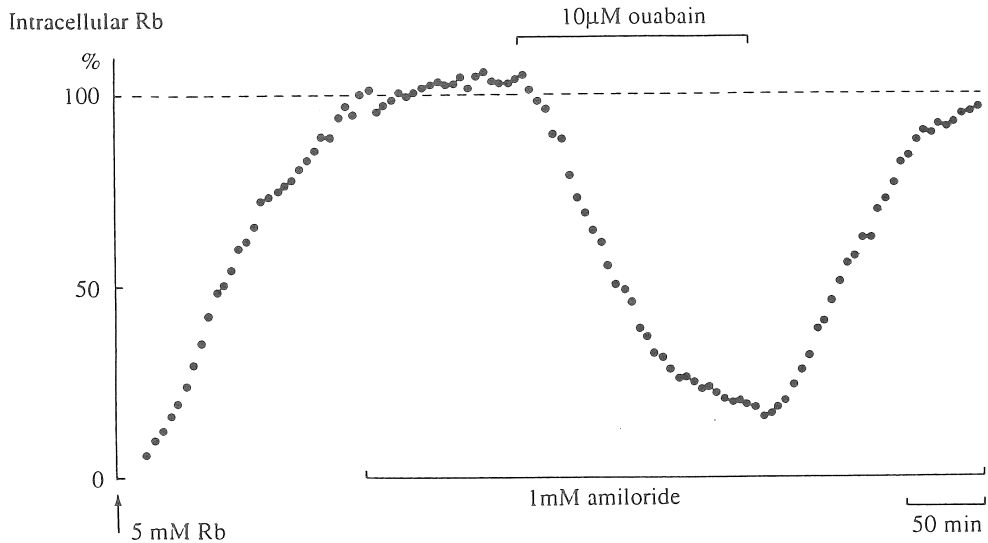


図3. 細胞内Rb濃度変化。Ca除去液に5mMのRbを150分間加え、Rbを細胞内に取り込ませた。そしてアミロライド(1mM)を100分間投与した後、アミロライド存在下でウアバイン(10 $\mu$ M)を100分間加えた。

[Mg]<sub>i</sub>を増加させたのかもしれない。このことを確かめるため、Na-Kポンプ活性の指標として、細胞内Rb濃度を5分ごとに測定した。細胞外液に5mM-Rbを加えた最初の5分間の細胞内へのRbの取り込みは、無視できると考えられる(細胞外Rbのみを反映するであろう)。そこで、この最初の5分間に測定されたNMRシグナルを、以後のものから差し引いてやると、細胞内Rb濃度変化が推定できる。図3は、細胞内Rb濃度変化を示したグラフである。Rbを150分間付加した後、アミロライド(1mM)を加えたが、Rb濃度は100分間殆ど変化しなかった。対照的にウアバイン(10 $\mu$ M)は、150分間でRb濃度を約20%に減少させた。そして、その後のウアバインの洗い流しでは、アミロライドが存在するにも関わらず、150分間で細胞内Rbをほぼ元の値まで回復させた。同様の結果を、別の2つの標本でも得た。

#### 4. 考察

本研究において、代表的Na担体ブロッカーであるアミロライドとウアバイン投与により、[Mg]<sub>i</sub>が有意に上昇することが示された。この変化の傾向は、細胞内pH変化を考慮に入れても同様であった。

Na担体と細胞内pHに影響を与える多くの因子が、[Mg]<sub>i</sub>を変化させる可能性がある。例えば、心筋において細胞内アシドーシスは、H<sup>+</sup>とMg<sup>2+</sup>の陽イオン結合サイトにおける競合により、[Mg]<sub>i</sub>を上昇させるという報告がある(7)。また、私たちは本実験で使用したモルモ

ット盲腸組平滑筋組織には、Na-Mg交換機構が存在することを、これまでの実験から示唆してきた。心筋において多くの論文が e.g. (10)(18)、Na-HとNa-Ca交換の相互作用から起こる細胞内Ca濃度の上昇を報告している。そして、Na-Ca交換とNa-Mg交換は多くの類似点を持つことも指摘されている(4)。そこで、このCa調節機序のように、細胞内アシドーシスが細胞内Na濃度の上昇を介して、 $[Mg]_i$ を増加させる可能性もある。

しかしながら、本実験では、Ca除去液中で、アミロライドは細胞内pHを低下させることなく、 $[Mg]_i$ を増加させた。そして、細胞内Rb濃度測定の結果から、アミロライドは、この標本ではNa-Kポンプを抑制しないことが分かった。アミロライドはNa勾配にも影響を与えず、 $H^+$ と $Mg^{2+}$ の競合作用を介すこともなく、 $[Mg]_i$ を上昇させた。おそらく、アミロライドは他のNa担体への作用と同様に、Na-Mg交換を直接ブロックし、受動的に流入したMgをくみ出すことができなかつたためと考えられる。また、細胞外液のMgとCaを除去したとき、アミロライドは、 $[Mg]_i$ の低下を僅かに抑制した。これは、Na-Mg交換もMg, Ca除去時には、細胞内Mg流出に寄与しているが、大半はCaによって抑制される、アミロライド非感受性の受動的経路によるものであろうと推測された。

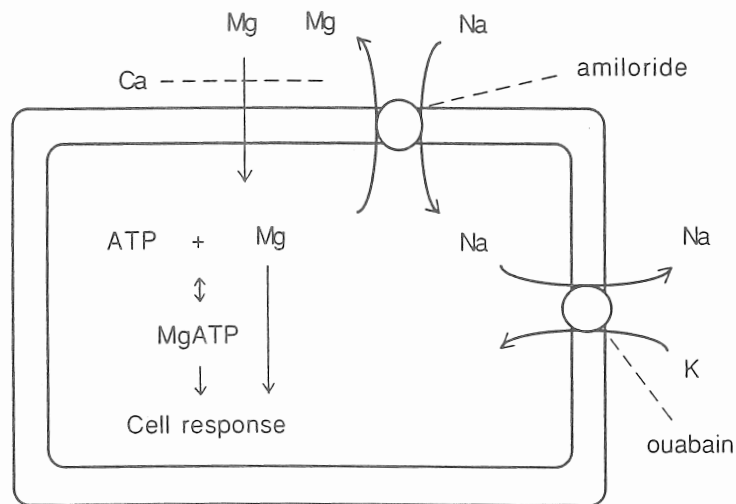


図4. 平滑筋における細胞内Mg濃度調節機構と薬物作用のモデル。

一方、ウアバインも細胞内を酸性化しなかつたが、細胞内Rb濃度を著明に減少させた。このことは、細胞内Na濃度を上昇させることを介して、ウアバインが二次的に $[Mg]_i$ を増加させていることを示唆する。このアミロライドとウアバインによる細胞内Mg上昇機序を図4に簡単にまとめた。アミロライド、ウアバインとも細胞内の高エネルギーリン酸化合物

の濃度を低下させないで $[Mg]_i$ を増加したので、Na-Mg交換機構は、ATPの加水分解エネルギーを利用しているのではないだろうと考えられた。しかしながら、アミロライドは、多くの蛋白質リン酸化過程も阻害することが知られている(15)。また、Na-Ca交換機構は、細胞内Naによって不活性化されることが、最近報告されている(9)。同様なNaの作用が、Na-Mg交換にもあれば、ウアバインによる $[Mg]_i$ 上昇は、この作用によって説明されるかもしれない。これらのことから、ATPによって駆動されるMgポンプ存在の可能性を、完全に除くことはできなかった。

## 5. 結語

本研究は、アミロライドやウアバインのように代表的な薬物が、直接または間接的に、Mgくみ出し機構(Na-Mg交換機構)を阻害して、細胞内遊離Mg濃度を上昇させることを明らかにした。実験的または臨床的に、これらの薬物の関連物質や誘導体はよく使われている。細胞膜のMg透過性が低いため、Ca除去液のような条件によって、本実験では大きな $[Mg]_i$ の上昇が示されたが、生理的条件下でも、このような作用を持つ薬物の長期慢性投与を行えば、 $[Mg]_i$ が変化して、細胞機能に様々な影響を与えるのではないかと想像された。今後、細胞内Mg変化による長期慢性的な細胞機能の修飾を(細胞反応のバックグラウンドとしての意味を含めて)明らかにしていくことは、生物機構の生理学的研究のみならず、病態生理学的にも大きな意味を持つことが期待される。

## 6. 文献

- (1) Aickin, C.C. (1994). Regulation of intracellular pH in the smooth muscle guinea-pig ureter:  $Na^+$  dependence. *Journal of Physiology* 479, 301-316.
- (2) Allis, J.L. & Radda, G.K. (1989). Selective detection of intracellular  $^{87}Rb^+$  by double-quantum filtration. *Journal of Magnetic Resonance* 84, 372-375.
- (3) Benos, D.J. (1988). Amiloride: Chemistry, kinetics, and structure-activity relationship. In  $Na^+/H^+$  exchange, ed. Grinstein, S., pp 121-136. CRC Press Inc., Florida.
- (4) Flatman, P.W. (1991). Mechanisms of magnesium transport. *Annual Review of Physiology* 53, 259-271.
- (5) Flatman, P.W. & Smith, L.M. (1990). Magnesium transport in ferret red cells. *Journal of Physiology* 431, 11-25.
- (6) Flatman, P.W. & Smith, L.M. (1991). Sodium-dependent magnesium uptake by ferret red cells. *Journal of Physiology* 443, 217-230.
- (7) Freudenrich, C.C., Murphy, E., Levy, L.A., London, R.E. & Lieberman, M. (1992). Intracellular pH modulates cytosolic free magnesium in cultured chicken heart cells. *American Journal of Physiology* 262, C1024-1030.
- (8) Gupta, R.K., Gupta, P. & Moore, R.D. (1984). NMR studies of intracellular metal ions in intact cells and

- tissues. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 13, 221-246.
- (9) Hilgemann, D.W. (1990). Regulation and deregulation of cardiac  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  exchange in giant excised sarcolemmal membrane patches. *Nature* 344, 242-245.
- (10) Kaila, K. & Vaughan-Jones, R.D. (1987). Influence of sodium-hydrogen exchange on intracellular pH, sodium and tension in sheep cardiac Purkinje fibres. *Journal of Physiology* 390, 93-118.
- (11) Nakayama, S., Nomura, H. & Tomita, T. (1994). Intracellular-free magnesium in the smooth muscle of guinea pig taenia caeci: A concomitant analysis for magnesium and pH upon sodium removal. *Journal of General Physiology* 103, 833-851.
- (12) Nakayama, S., Seo, Y., Takai, A., Tomita, T. & Watari, H. (1988). Phosphorous compounds studied by  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy in the taenia of guinea-pig caecum. *Journal of Physiology* 402, 565-578.
- (13) Nakayama, S. & Tomita, T. (1990). Depletion of intracellular free  $\text{Mg}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$ - and  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution in the taenia isolated from guinea-pig caecum. *Journal of Physiology* 421, 363-378.
- (14) Nakayama, S. & Tomita, T. (1991). Regulation of intracellular free magnesium concentration in the taenia of guinea-pig caecum. *Journal of Physiology* 435, 559-572.
- (15) Ozaki, H., Moriyama, T., Karaki, H., Kohama, K. & Cragoe Jr., E.J. (1989). Direct inhibition of contractile apparatus by analogues of amiloride in the smooth muscle of guinea-pig taenia caecum and chicken gizzard. *Biochemical Pharmacology* 38, 915-922.
- (16) Soltoff, S.P. & Mandel, L.J. (1983). Amiloride directly inhibits the Na, K-ATPase activity of rabbit kidney proximal tubules. *Science* 220, 957-959.
- (17) Steward, M.C., Seo, Y., Murakami, M. & Watari, H. (1991). NMR relaxation characteristics of rubidium-87 in perfused rat salivary glands. *Proceedings of the Royal Society B* 243, 115-120.
- (18) Vaughan-Jones, R.D., Lederer, W. & Eisner, D.A. (1983).  $\text{Ca}^{2+}$  ions can affect intracellular pH in mammalian cardiac muscle. *Nature* 303, 522-524.
- (19) Widdicombe, J.H. (1981). The ionic properties of the sodium pump. In *Smooth Muscle*, eds. Bulbring, Brading, Jones & Tomita, pp. 93-104. Edward Arnold, London.

## Physiological Relevance of Sodium-magnesium Exchange

Shinsuke NAKAYAMA, Tadao TOMITA and Tatsuaki MATSUBARA

Departments of Physiology and Internal Medicine, School of Medicine, Nagoya University

### Summary

To investigate physiological relevance of  $\text{Na}^+$ - $\text{Mg}^{2+}$  exchange, we examined the effects of amiloride and ouabain on the regulation of intracellular, free  $\text{Mg}^{2+}$  concentration ( $[\text{Mg}^{2+}]_i$ ) in smooth muscle of the guinea-pig taenia caeci, using nuclear magnetic resonance (NMR) techniques.  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  were mainly estimated from the separation of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -ATP peaks observed in  $^{31}\text{P}$ -NMR spectra. In normal and nominally  $\text{Ca}^{2+}$ -free solutions,  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  was approximately 0.3-0.4 mM. Application of either amiloride or ouabain in  $\text{Ca}^{2+}$ -free solutions significantly increased  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  (by approx. 0.5 mM) with only a small change in ATP content. Wash-outs of the drugs reversed the changes in  $[\text{Mg}^{2+}]_i$ . Since changes in  $\text{pH}_i$  may affect  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  regulation as well as perturb estimation of  $[\text{Mg}^{2+}]_i$ ,  $\text{pH}_i$  during the experiments were estimated using two methods: 1) from the chemical shifts of PME-1 (phosphorylethanolamine); 2) from the chemical shifts of  $\gamma$ - and  $\beta$ -ATP. After correction for  $\text{pH}_i$ , a significant increase in  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  was still obtained 150 min after application of either drug. In the presence of amiloride simultaneous removal of extracellular  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  significantly depleted intracellular  $\text{Mg}^{2+}$ , as was seen in the absence of amiloride. However, amiloride slowed the speed of the depletion in  $\text{Mg}^{2+}$ - and  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution. The results suggest the presence of amiloride-insensitive pathway through which  $\text{Mg}^{2+}$  is passively transported across the plasma membrane. The intracellular  $\text{Rb}^+$  concentration was monitored as an index of  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pump activity, using  $^{87}\text{Rb}$ -NMR. The intracellular  $\text{Rb}^+$  concentration was hardly changed by amiloride, but reduced to approximately 20% of the control value by additional applications of ouabain. Subsequent wash-outs of ouabain restored the intracellular  $\text{Rb}^+$  in the presence of amiloride. These results are consistent with the hypothesis that in smooth muscle,  $\text{Na}^+$ - $\text{Mg}^{2+}$  exchange maintains low  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  using the energy from  $\text{Na}^+$ -gradient across the plasma membrane. Although many other factors may cause changes in  $[\text{Mg}^{2+}]_i$ , it seems likely that amiloride directly inhibits the  $\text{Na}^+$ - $\text{Mg}^{2+}$  exchanger, whilst ouabain does so indirectly through reduction of the  $\text{Na}^+$ -gradient across the plasma membrane. These types of the drugs are often used in animal experiments and clinical therapy. Prolonged and chronic applications of such drugs may modulate the cellular response through changes in  $[\text{Mg}^{2+}]_i$ .