

39

助成番号 0039

生理機能調節・病態における細胞内Mg濃度変動とナトリウム-マグネシウム交換輸送機構の役割

助成研究者：小西 真人(東京医科大学 医学部 生理学第1)

共同研究者：中山 晋介(名古屋大学 医学部 細胞生理)

心筋細胞における神経性・ホルモン性の細胞内 Mg^{2+} 濃度($[Mg^{2+}]_i$)調節の分子機構を明らかにする目的で、 Mg^{2+} くみ出し能動輸送を全心臓レベル・心筋細胞レベルの両面から検討した。名古屋大学の中山は核磁気共鳴スペクトロスコピーにより灌流した全心臓で $[Mg^{2+}]_i$ を測定し、東京医科大学の小西はラット心室筋細胞に蛍光色素 furaptra を導入して $[Mg^{2+}]_i$ を測定した。灌流したラット全心臓の $[Mg^{2+}]_i$ は β アドレナリン受容体刺激あるいは forskolin の投与により低下した。一方、carbachol によるムスカリン受容体刺激は β 受容体刺激による $[Mg^{2+}]_i$ の低下を抑制した。生理的濃度の insulin は $[Mg^{2+}]_i$ の上昇を引き起こし、 β 受容体刺激による $[Mg^{2+}]_i$ の低下に拮抗した。これらの insulin の効果は protei kinase C の抑制薬で消失したので、insulin がPKCを介して $[Mg^{2+}]_i$ を制御していることが示唆された。小西らはこれらの $[Mg^{2+}]_i$ 制御に重要と思われる Mg^{2+} くみ出し機構について心筋細胞で実験を行った。イオノマイシンをもちいて細胞内に Mg^{2+} を負荷した後、細胞からの排出過程を $[Mg^{2+}]_i$ の低下速度から検討した。 $[Mg^{2+}]_i$ の低下速度は細胞外 Na^+ に強く依存し、細胞外 140 mM Na^+ 存在下では急速であるのに対し、細胞外無 Na^+ 条件下では $[Mg^{2+}]_i$ はまったく低下しなかった。細胞外 Na^+ 濃度依存性の解析から、90 mM Na^+ により半分の活性が得られることがわかった。さらに imipramine によって $[Mg^{2+}]_i$ 低下速度が抑制されることから、心筋細胞には Na^+ - Mg^{2+} 交換輸送が存在し Mg^{2+} のくみ出しに重要な役割を果たしていることが示唆された。心筋でみられた Na^+ - Mg^{2+} 交換輸送活性を分子的に同定する目的で、小西らは培養液中の Mg^{2+} 濃度を段階的に増加させることにより、極端な高 Mg^{2+} (100 mM)環境下でも増殖できる Mg^{2+} 耐性変異MCT細胞を得ることに成功した。この細胞の $[Mg^{2+}]_i$ を furaptra で測定したところ、細胞外 Na^+ 存在下では野生細胞にくらべ変異細胞の $[Mg^{2+}]_i$ が低いこと、細胞内から細胞外への Mg^{2+} くみ出し速度が変異細胞で有意に速いことがわかった。細胞外無 Na^+ 条件下では変異細胞の $[Mg^{2+}]_i$ が上昇し、 Mg^{2+} くみ出し速度が抑制される結果、野生細胞との差は消失した。この結果は変異MCT細胞では細胞膜 Na^+ - Mg^{2+} 交換輸送体が高発現していることを強く示唆した。今後 suppression subtractive hybridization 法により Mg^{2+} 耐性変異細胞株において発現が増強している遺伝子の解析を行うことを計画している。

4

助成番号 0039

生理機能調節・病態における細胞内 Mg 濃度変動とナトリウム
—マグネシウム交換輸送機構の役割

助成研究者：小西 真人 (東京医科大学 医学部 生理学第1)

共同研究者：中山 晋介 (名古屋大学 医学部 細胞生理)

研究目的

マグネシウムイオン (Mg^{2+}) は、 Ca^{2+} と同様細胞機能調節においてきわめて重要な役割を演じている。したがって、細胞内 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 濃度は厳密に制御されており、この制御からの逸脱は細胞機能の破綻をきたす。生理学的、生化学的実験から、 Mg^{2+} が多くの細胞内酵素、イオンチャンネル、細胞内 Ca^{2+} 動態や筋細胞の収縮性に影響を与えることが示され、また組織・細胞のMg含有量がカテコラミン、アセチルコリン、インシュリンなど多くの生理活性物質によって変動することが明らかにされてきた。一方、多くの疫学的研究からMg欠乏が循環器疾患、特に致死性不整脈と関連することが強く示唆されてきた¹⁾。

非興奮性細胞および静止状態にある興奮性細胞においては、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} は膜電位により細胞外から細胞内へと駆動されるため、細胞内濃度を一定に維持するには能動的くみ出し機構が必要となる。細胞内 Ca^{2+} 濃度を調節する能動輸送機構としては、細胞膜の Na^+ - Ca^{2+} 交換機構、 Ca^{2+} -ATPaseなどが既に明らかにされ、輸送体がクローニングされた。しかし、細胞内 Mg^{2+} 濃度 ($[Mg^{2+}]_i$) を一定に保つ輸送体は同定されていない。Mgに関する分子生物学的研究の進展を妨げている大きな原因として、これまで $[Mg^{2+}]_i$ の簡便で正確なアッセイ法が確立されていなかったことが挙げられる。東京医科大学の小西らは蛍光色素により、また名古屋大学の中山らは核磁気共鳴スペクトロスコーピー (MRS) により高い時間分解能で比較的容易に $[Mg^{2+}]_i$ を定量する方法を確立した²⁻⁴⁾。

本研究ではこれらの実績をふまえ、モデル実験系であるラットの心筋において神経性・ホルモン性の $[Mg^{2+}]_i$ 調節の分子機構を明らかにする。さらに $[Mg^{2+}]_i$ を維持する分子機構の実体に迫るべく、分子生物学的に能動輸送機構の同定を行うことを目的とした。

研究方法

1. 核磁気共鳴スペクトロスコーピー

Wistar 系ラットから麻酔下に心臓を摘出、ランゲンドルフ装置に装着し、大動脈から逆行性に酸素化した正常 Krebs-Henseleit 溶液で灌流した (37°C)。心臓を核磁気共鳴スペクトロメータ (JEOL GSX270W) のメインマグネット (6.4 T) 孔に挿入し、灌流を保ちながら

測定を行った。水からのプロトン信号(270 MHz)を用いて磁場の均一化を行った。リン化合物検出のため、核磁気共鳴スペクトロメータは109.4 MHzで駆動した。パルスは0.6秒間隔とし、2500パルスの信号(25分)を加算平均した。通常の条件下では、スペクトルに細胞内リン酸化合物の6つの主なピーク、すなわちフォスホモノエステル、無機リン酸、クレアチンリン酸とATPの3つのピーク(α 、 β 、 γ)が検出される。ATPの α ピークと β ピーク間のシフト(δ)は $[Mg^{2+}]_i$ の関数として表される⁵⁾⁶⁾。

$$[Mg^{2+}]_i = K_D [(\delta - \delta_{\min}) / (\delta_{\max} - \delta)] \quad (1)$$

ここで δ_{\min} と δ_{\max} は、それぞれ Mg^{2+} 非存在下、飽和 Mg^{2+} 濃度における δ 値であり、 K_D は Mg^{2+} とATPの解離定数である。 δ_{\min} と δ_{\max} の値は37°C、pH 7.2で得られた文献値を用いた⁵⁾。 K_D の値は従来低い値(41 μ M)が用いられていたが、最近得られた値(37°C、pH 7.2で87 μ M⁷⁾; 従来値よりおよそ2倍高い)を用いた。これらのパラメータはpHの影響を受けるので、無機リン酸のシフトから細胞内pHを見積もり、その値を用いて補正した⁸⁾。

2. 単一心筋細胞

Wistar系ラットから麻酔下に心臓を摘出、ランゲンドルフ灌流を確立後、酵素溶液(collagenase 0.2 mg/ml、protease 0.04 mg/ml、BSA 0.6 mg/ml)を灌流することにより単一心室筋細胞を分離し、実験に供した。倒立蛍光顕微鏡のステージ上にあるチャンバー内で単離した細胞を正常Tyrode液で灌流した。蛍光Mg指示薬furaptraのacetoxymethylエステル(furaptra AM)4 μ Mを含むTyrode溶液で10分間処理することにより、細胞内にfuraptraを導入した。2波長の紫外光(350 nmと382 nm)を100 Hzで切り替えて細胞内furaptraを励起し、500 nmの蛍光を測定した(F_{350} と F_{382})。 F_{382} と F_{350} の比($R = F_{382} / F_{350}$)は指示薬の細胞内濃度に依存せず、 $[Mg^{2+}]_i$ の関数と考えられる²⁾³⁾。

$$[Mg^{2+}]_i = K_D [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)] \quad (2)$$

ここで R_{\min} と R_{\max} は、それぞれ Mg^{2+} 非存在下、飽和 Mg^{2+} 濃度におけるR値であり、 K_D は解離定数である。細胞内におけるこれらのパラメータ値を求めるため、furaptraを導入した細胞をイオノフォア混合溶液(ionomycin, monensin, nigericin, valinomycin)で処理し、細胞内外の Mg^{2+} 濃度を平衡化した。種々の既知細胞外 Mg^{2+} 濃度におけるR値を最小自乗法で(2)式にあてはめることにより、 R_{\min} 、 R_{\max} 、 K_D 値を求めた³⁾。これにより計算された正常Tyrode液での平均 $[Mg^{2+}]_i$ は0.91 mMで、他の方法で見積もられた値と良い一致を示した。Furaptraは低親和性ながら Ca^{2+} とも結合する。細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の干渉をさけるため、蛍光測定の実験はすべてCa-free条件下(0.1 mM EGTA存在下)で行った(25°C)。

3. 培養細胞における Mg^{2+} 輸送体発現

腎上皮由来の培養細胞株 MCT (mouse cortical tubular) 細胞を高 Mg^{2+} 環境下で培養することにより発現する細胞膜の Mg^{2+} 輸送体分子の検討を行った。MCT 細胞の野生株は 40 mM Mg^{2+} を含む培養液中でも増殖することができるが、60 mM $[Mg^{2+}]_i$ ではほとんどが死滅する。しかしごく希に生き残る細胞があり、この細胞を60 mM $[Mg^{2+}]_i$ 培養液で維持すると次第に増殖するようになる。さらに培養液中の $[Mg^{2+}]_i$ を 70 mM にすると、ほとんどが死滅するが希に生き残る細胞がある。生き残った細胞は70 mM $[Mg^{2+}]_i$ 培養液で維持することができる。このように培養液の $[Mg^{2+}]_i$ を 70 mM、80 mM、90 mM、100 mM と段階的に高くして細胞を選択していくことにより、100 mM $[Mg^{2+}]_i$ でも増殖可能な変異細胞株が得られた。この Mg^{2+} 耐性変異株は通常の培養液(1 mM $[Mg^{2+}]_i$)中では死滅してしまう。このような Mg^{2+} 耐性変異株と野生株の $[Mg^{2+}]_i$ を蛍光 Mg 指示薬 furaptra を用いて測定し、比較した。ガラス底培養皿に野生株または Mg^{2+} 耐性変異株の MCT 細胞を培養し、furaptra AM 5 μ M を含む Tyrode 溶液で 12 分間処理することにより、細胞内に furaptra を導入した。350 nm と 382 nm での励起による細胞クラスタからの 500 nm の蛍光強度比 ($R = F_{382}/F_{350}$) から $[Mg^{2+}]_i$ を求めた(式2)。MCT 細胞においては furaptra の細胞からのリークが速く、イオノフォアで細胞内外の Mg^{2+} 濃度を平衡化して式2のパラメータ値を求めることは困難であり、 R_{min} 、 R_{max} 、 K_D 値は心筋細胞内で得られた値を用いた³⁾。これにより計算された正常 Tyrode 液での野生 MCT 細胞株の平均 $[Mg^{2+}]_i$ は約 0.7 mM であった。心筋細胞と同様、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の干渉をさけるため実験はすべて Ca-free 条件下 (0.1 mM EGTA 存在下)で行った(25°C)。

研究結果

1. 核磁気共鳴スペクトロスコピーによる全心臓での測定

心臓を正常 Krebs-Henseleit 溶液で 120 分間灌流しても、 $[Mg^{2+}]_i$ は変化しなかった。イソプロテレノール (ISO、50 nM) による β アドレナリン受容体刺激により、 $[Mg^{2+}]_i$ は緩徐な時間経過で有意に低下し(100分で平均21%)、ISO の washout により元のレベルに回復した。Caチャンネル拮抗薬 verapamil を投与して心臓の収縮を強く抑制してもこの ISO の効果が同様に観察されたことから、ISO による $[Mg^{2+}]_i$ の低下は心臓の収縮性や細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化によるものではないと考えられた。また、水溶性 forskolin 誘導体 NKH477 (0.5 μ M) は ISO と同様の時間経過で $[Mg^{2+}]_i$ の低下を引き起こした(100分で平均13%)ことから、心臓において細胞内 cyclic AMP が $[Mg^{2+}]_i$ の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された⁴⁾。一方 carbachol (CCh、5 μ M) によるムスカリン受容体刺激は、それ自体では $[Mg^{2+}]_i$ の変化を引き起こさなかったが、50 nM ISO による $[Mg^{2+}]_i$ の低下を完全に抑制した。同様に、0.5 μ M NKH477 による $[Mg^{2+}]_i$ の低下は 5-40 μ M CCh により濃度依存的に抑制された⁴⁾。

中山らは、さらに $[Mg^{2+}]_i$ の制御における β アドレナリン受容体とインシュリン受容体の相互関係について検討した(Fig.1)。生理的濃度および病態生理的濃度のインシュリン(100-1000 $\mu U/ml$)は心臓の収縮性を高めると同時に有意な $[Mg^{2+}]_i$ の上昇(15-21%)を引き起こした。またインシュリン(100-1000 $\mu U/ml$)は100 nM ISOによる $[Mg^{2+}]_i$ の低下(上述)を強く抑制した。このインシュリンの作用は、protein kinase C (PKC)の抑制薬であるLY333531(100 nM)により拮抗され、インシュリンがPKCの活性化を介して $[Mg^{2+}]_i$ を制御し、 β アドレナリン受容体刺激による $[Mg^{2+}]_i$ の低下に拮抗していることを示唆している⁹⁾。

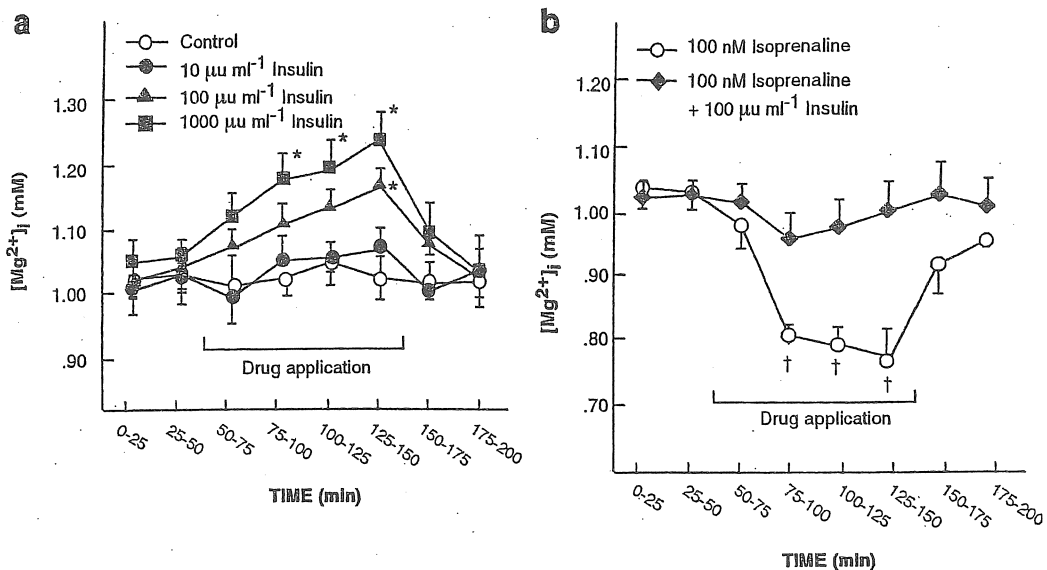


Fig. 1 Time course of changes in $[Mg^{2+}]_i$. Each point was obtained by accumulation of ^{31}P -MRS signals over 25 min. Various concentrations of insulin alone (a) and insulin plus 100 nM isoproterenol (isoproterenol) (b) were applied for 100 min. Vertical bars are S.E.M. values (n=5). * $P < 0.05$ vs the control group at the same time points. Reproduced from Amano et al.⁹⁾ by copyright permission.

多くの組織/細胞において Mg^{2+} を細胞外に排出する機構として Na^+ の受動的流入のエネルギーを利用する Na^+-Mg^{2+} 交換輸送が提唱されている。心筋においてもアミロライドに感受性のある Mg^{2+} 能動輸送体が報告されており、中山らは ISO による $[Mg^{2+}]_i$ の低下がアミロライドにより抑制されることを観察している(未発表データ)。アミロライドは Na^+ によって駆動される多くのイオン輸送を抑制することが知られており、 Na^+-Mg^{2+} 交換輸送の存在を指示する結果が蓄積されつつある。しかし、 Na^+-Mg^{2+} 交換輸送が重要ではないとする報告も多く、結論は得られていない。そこで小西らは、より単純な実験系である

単一心筋細胞を用いて心筋に Na^+ - Mg^{2+} 交換輸送が存在することを検証し、さらにその特性について詳細に検討した¹⁰⁾。

2. 単一心筋細胞における Mg^{2+} くみ出し機構の検討

蛍光指示薬 fura-2/AM を導入した細胞は、細胞外 Ca^{2+} -free Tyrode 溶液で灌流下では $[\text{Mg}^{2+}]_i$ は長時間にわたって安定していた。細胞外 Ca^{2+} -free、高 Mg^{2+} (10 mM) 条件下において ionomycin (10 μM) で処理すると、 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ は緩徐な時間経過で上昇した。Ionomycin による $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 変化は細胞外 Mg^{2+} 濃度が低いと小さくなり、0.4 mM Mg^{2+} 条件下ではほとんどみられなくなった。Ionomycin は細胞膜の2価イオン透過性を高めるイオノフォアであるので、 Ca^{2+} -free 条件下では細胞膜を通した受動的 Mg^{2+} 輸送を促進すると考えられる。この Mg^{2+} 流入による $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 上昇速度は細胞外 Na^+ 濃度に依存し、細胞外 Na^+ -free 条件下(Na^+ をN-methyl-D-glucamine で置換)では細胞外130 mM Na^+ 存在下に比べて有意に大きな値を示した¹⁰⁾。これらの結果は平滑筋で報告されている細胞外 Na^+ 依存性 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 変化¹²⁾と同様であり、「 Mg^{2+} が Na^+ 依存性の経路で細胞外にくみ出されているために、見かけ上 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 上昇が抑制される」という仮説で説明することができる。この仮説をさらに検証するために、次に Mg^{2+} のくみ出しに対する Na^+ の効果を検討した¹⁰⁾。

Ionomycin と高 Mg^{2+} (10 mM) によって $[\text{Mg}^{2+}]_i$ が上昇した後、ionomycin を洗い流し細胞外 Mg^{2+} 濃度を通常レベル(1.2 mM)に戻すと、 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ は急速に低下し静止レベル(約 0.9 mM)で定常状態となる(Mg^{2+} の net のくみ出し)。Fig. 2aはこのようにして観察された Mg^{2+} 負荷状態からの $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 低下速度を解析するための実験結果を示す¹⁰⁾。 Mg^{2+} 負荷後(横軸の時間0)、 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ は静止レベルより約 0.7 mM 高い(縦軸の0レベル)。 Mg^{2+} の net のくみ出しによる $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 低下速度は細胞外 Na^+ 濃度に強く依存し、細胞外 140 mM Na^+ 存在下では急速であるのに対し、細胞外 Na^+ -free 条件下では $[\text{Mg}^{2+}]_i$ はまったく低下せず、むしろやや上昇した。 Na^+ 濃度を変えて負荷解除後10分間の $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 低下速度を解析した結果、 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 低下速度は Na^+ 濃度依存性に促進され、約 90 mM Na^+ により最大の半分の活性が得られることが示された(Fig. 2b)。 Mg^{2+} のくみ出しに対する膜電位の影響を調べるため、同様の実験を高 K^+ (56 mM) による細胞膜電位脱分極条件下で行った。高 K^+ 条件下では、正常 K^+ (6 mM) 条件下にくらべて $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 低下速度は大きくなり、 Na^+ 濃度- $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 低下速度関係(Fig. 2b)は左に(低 Na^+ 濃度側に)シフトした。さらに赤血球で Na^+ - Mg^{2+} 交換輸送を抑制する imipramine の効果¹³⁾について検討した。200 μM imipramine は細胞外 Na^+ -free 条件下での $[\text{Mg}^{2+}]_i$ には影響を与えなかったが、140 mM Na^+ 存在下での $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 低下を強く(83%)抑制した。この imipramine の効果は速やかに wash out された。Imipramine 濃度(2-500 μM) - 反応関係から、imipramine は $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 低下速度を90%以上抑制し、半抑制濃度は約 80 μM であることがわかった。これらの結果より、心筋細胞には Na^+ - Mg^{2+} 交換輸送体が存在し Mg^{2+} のくみ出しに重要な役割を果たしていることが強く示唆された¹⁰⁾。

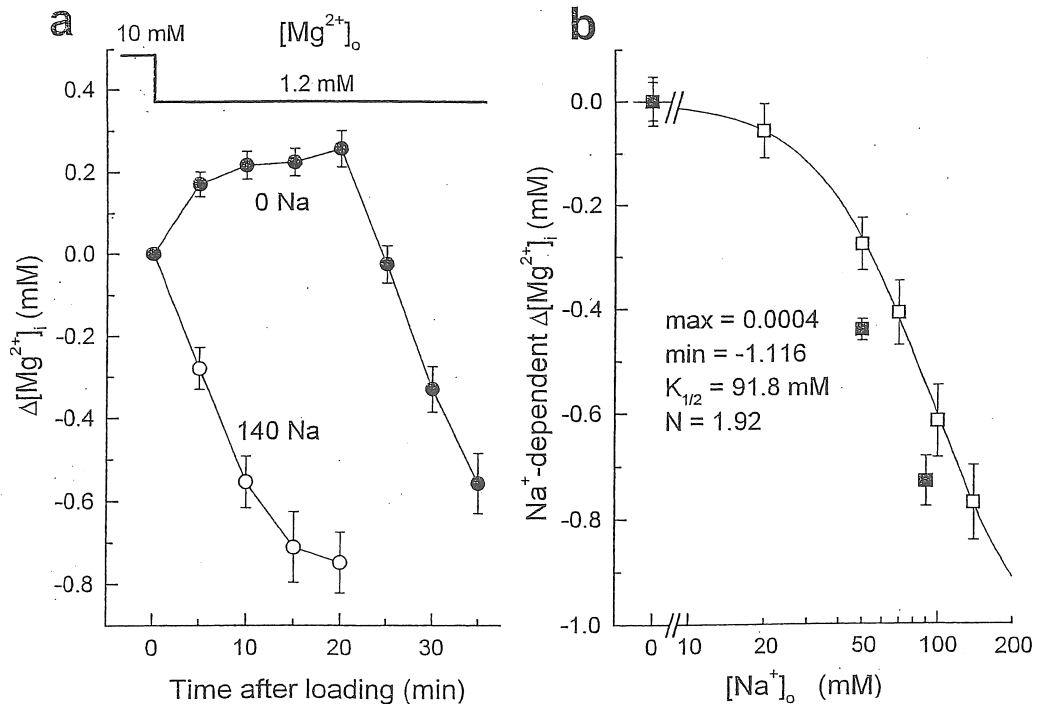


Fig. 2 Effect of extracellular Na^+ on $[Mg^{2+}]_i$. (a) After cells were loaded with Mg^{2+} by 10 μM ionomycin plus 10 mM Mg^{2+} , the perfusate was changed, at zero time, to the test solution containing 1.2 mM Mg^{2+} and either 0 mM or 140 mM Na^+ (indicated in the panel) for 20 min. Cells were then washed by Ca^{2+} -free Tyrode solution containing 1.2 mM Mg^{2+} and 140 mM Na^+ . Each symbol represents mean \pm S.E.M. of 8 cells. (b) Extracellular Na^+ dependence of the changes in $[Mg^{2+}]_i$ (ordinate) measured at 10 min after application of the test solutions containing either 6 mM K^+ (open squares) or 56 mM K^+ (filled squares). Na^+ -dependent changes in $[Mg^{2+}]_i$ were calculated by subtraction of the values at zero Na^+ for each data set. Solid line indicates the least-squares fit of the data at 5.9 mM K^+ by the Hill type curve with parameters shown in the panel; min and max are denote, respectively, minimum and maximum values of Na^+ -dependent changes in $[Mg^{2+}]_i$, N is the Hill coefficient, and $K_{1/2}$ is Na^+ concentration that gives midpoint value of the Na^+ -dependent changes in $[Mg^{2+}]_i$ between min and max. Reproduced and modified from Tashiro and Konishi¹⁰⁾ by copyright permission.

3. 変異培養細胞における Mg^{2+} くみ出し活性

前項までで明らかになった Na^+ - Mg^{2+} 交換輸送活性を担う輸送体を実体として同定する目的で、小西らは腎上皮細胞由来株化細胞に輸送体を高発現させ、その機能解析を

行った^{13) 14)}。腎尿細管における Mg^{2+} 再吸収機構としては、transcellular および paracellular の経路が想定されているが、前者は心筋細胞を含む多くの細胞で $[Mg^{2+}]_i$ を調節する Mg^{2+} くみ出し機構と共通あるいは類似の機構と考えられている。

培養液中の Mg^{2+} 濃度を段階的に増加させることにより、極端な高 Mg^{2+} (100 mM) 環境下でも増殖可能な Mg^{2+} 耐性変異株を得ることに成功した。生理的細胞外 Mg^{2+} 濃度 (1 mM) においては野生株の $[Mg^{2+}]_i$ は平均 0.71 mM であったのに対し、 Mg^{2+} 耐性変異株では 0.40 mM と有意に低い値を示していた。細胞外高 Mg^{2+} (51 mM) 負荷により野生株、変異株ともに $[Mg^{2+}]_i$ は上昇したが、変異株と野生株の平均値はそれぞれ 0.79 mM と 1.08 mM で、 Mg^{2+} 耐性変異株で有意に低かった。細胞外無 Na^+ 条件下では変異株の $[Mg^{2+}]_i$ は野生株とほぼ同じレベルにまで上昇し、野生株と耐性変異株間の $[Mg^{2+}]_i$ の差は消失した。

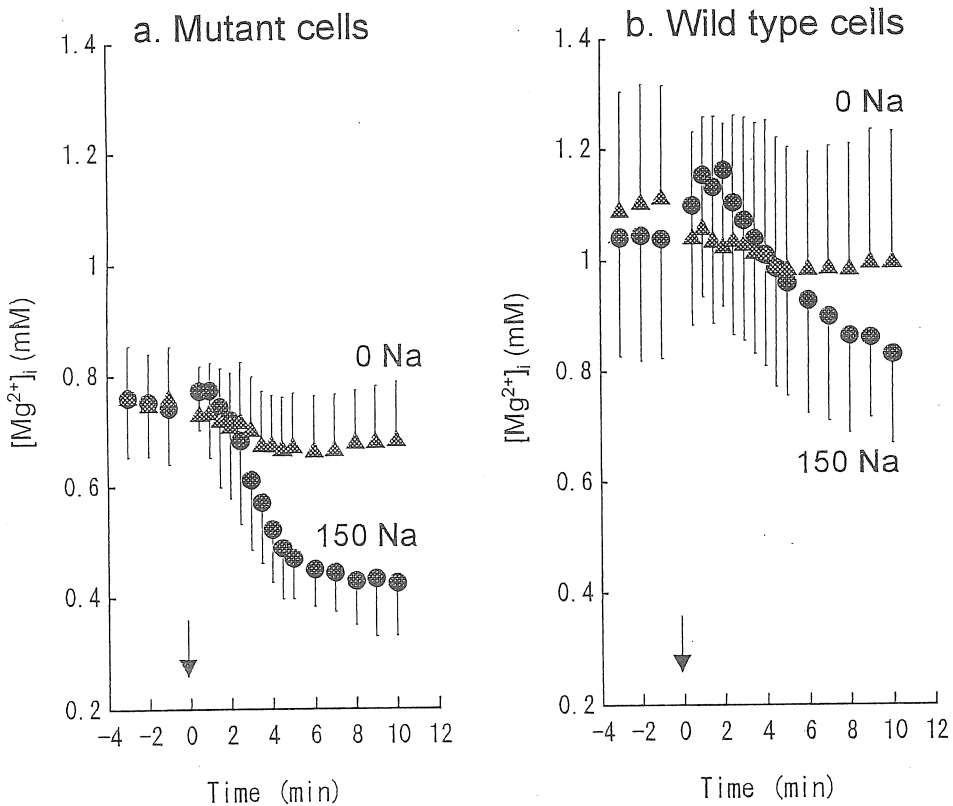


Fig. 3 Effect of extracellular Na^+ on in $[Mg^{2+}]_i$ of Mg^{2+} -tolerant cells (a) and wild type MCT cells (b). After cells were incubated in the solution containing 51 mM Mg^{2+} for 30min, the perfusate was changed, at zero time (indicated by arrows), to the test solution containing 1.0 mM Mg^{2+} and either 0 mM (triangles) or 150 mM Na^+ (circles). Each symbol represents mean \pm S.D.

細胞内から細胞外への Mg^{2+} のくみ出し速度を検討する目的で、細胞外 Mg^{2+} 濃度を 51 mM から 1 mM へと低下させた時の $[Mg^{2+}]_i$ 変化の時間経過を野生株と Mg^{2+} 耐性変異株で比較した(Fig.3)。細胞外 150 mM Na^+ が存在すると、 $[Mg^{2+}]_i$ は低下するが、その低下速度は Mg^{2+} 耐性変異株で有意に速かった。細胞外 Mg^{2+} 濃度 1 mM でも 51 mM でも、 Na^+ -free 条件下では野生株、変異株ともに $[Mg^{2+}]_i$ の低下は強く抑制され、両者間に差はみられなかった(Fig.3)。

$[Mg^{2+}]_i$ 低下速度は 51 mM Mg^{2+} 条件下での初期 $[Mg^{2+}]_i$ にも依存し、特に変異株では初期 $[Mg^{2+}]_i$ が高いほど $[Mg^{2+}]_i$ 低下が速かった(Fig.4a)。Fig.4から明らかなように、細胞外 150 mM Na^+ 存在下では同じ初期 $[Mg^{2+}]_i$ での $[Mg^{2+}]_i$ 低下速度は変異株で有意に大きかったが(Fig.4a)、細胞外 Na^+ -free 条件下では両者の差は消失した(Fig.4b)。

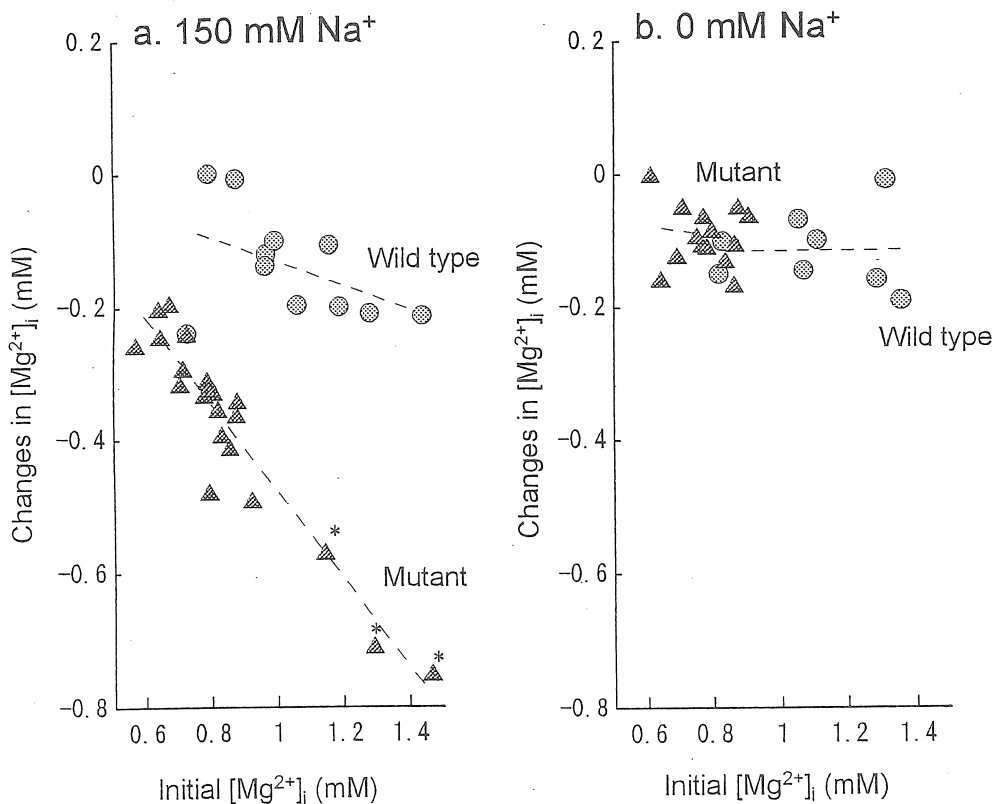


Fig. 4 Analysis of the experiments of the type shown in Fig. 3. Relation between initial levels of $[Mg^{2+}]_i$ (measured in 51 mM extracellular Mg^{2+}) and changes in $[Mg^{2+}]_i$ during 7 min after perfusion with 1 mM Mg^{2+} either in the presence (a) or in the absence (b) of extracellular Na^+ . Three data points with asterisks in (a) were obtained after the cells had been incubated in 100 mM extracellular Mg^{2+} .

Mg²⁺くみ出しの細胞外Na⁺濃度依存性をさらに詳細に調べたところ、心筋細胞でみられたのと同様に[Mg²⁺]_i低下速度はNa⁺濃度依存性に促進された。最大の半分の活性が得られるNa⁺濃度は約 25 mM で、心筋より低いNa⁺で活性化されることが示された。Imipramine の効果についても検討した。150 mM Na⁺存在下での[Mg²⁺]_i低下速度は 200 μM imipramine により強く抑制され、細胞外Na⁺-free 条件下での低下速度と有意差がなかった(細胞外Na⁺に依存した[Mg²⁺]_i低下を少なくとも85%抑制した)。半抑制濃度は50 μMと200 μMの間にあり、心筋で得られた80 μMとおおよそ一致を示した。これらの結果は、野生MCT細胞においても細胞外Na⁺に依存したMg²⁺のくみ出し機構が存在するが、Mg²⁺耐性変異株ではその活性が増大していることを示している。すなわち、細胞膜Na⁺-Mg²⁺交換輸送体が高発現していることが強く示唆された^{13) 14)}。

考察

本研究は、心筋細胞[Mg²⁺]_i制御維持機構としてのMg²⁺くみ出し輸送を組織レベル、細胞レベルの両面から、また異なる手法(核磁気共鳴、蛍光指示薬)をもちいて検討した。その結果、1)心筋細胞において、Na⁺の流入と交換にMg²⁺を排出するNa⁺-Mg²⁺交換輸送機構が存在することが確認された。このNa⁺-Mg²⁺交換輸送が抑制されるとMg²⁺のくみ出しがほぼ完全に抑制される(Fig.2a)ことから、この輸送体は心筋細胞のMg²⁺維持機構として重要な役割を担っていると考えられる¹⁰⁾。2)種々のホルモンによる受容体刺激、βアドレナリン受容体、アセチルコリン(ムスカリン)受容体、インシュリン受容体が[Mg²⁺]_iの変動をひきおこすことが明らかとなった⁴⁾⁹⁾。おそらくこれらの受容体刺激がcAMP、PKCなどの細胞内信号伝達系を介してNa⁺-Mg²⁺交換輸送活性を変化させることにより[Mg²⁺]_iを制御していると推察される。ホルモンや神経の生理的、病態生理的作用にこのような[Mg²⁺]_iの変動が関連していることが考えられる。カテコラミンは急性心筋梗塞の増悪因子のひとつであることが知られている。本研究において、インシュリンの投与がβアドレナリン受容体刺激による[Mg²⁺]_i減少に拮抗したことは、GIK療法(glucose, insulin および K⁺の投与)の細胞内機序のひとつである可能性がある。3)Na⁺-Mg²⁺交換輸送の担体分子の分子実体を捉える手がかりとなり得る方法論(すなわち高Mg²⁺耐性細胞株)を確立した^{13) 14)}。現在までMg²⁺輸送蛋白質のクローニングはなされているのみで、真核細胞ではなされていない。植物で液胞輸送の担体が、動物では細胞間隙で細胞外Mg²⁺濃度調節に関わる蛋白質が明らかにされているのみである。本研究で確立した細胞株は、Mg²⁺輸送体蛋白質を同定し、まったく未知であった細胞膜Mg²⁺輸送の分子機構とその生理的役割を明らかにする上で重要な手段を与えると考える。

今後の課題

今後の研究として、一つにはホルモン、自律神経による[Mg²⁺]_i変動の分子機構を検討

していく必要がある。方法的には、全心臓レベルの $[Mg^{2+}]_i$ 変動を基礎として、単一心筋細胞レベルで光学的・電気生理学的手法をもちいて Mg^{2+} 輸送の定量的な解析を進める。たとえば、穿孔パッチクランプ法をもちいて膜電位を制御し、 Mg^{2+} による膜電流解析または蛍光色素による $[Mg^{2+}]_i$ 測定を併用してより詳細に Na^+-Mg^{2+} 交換輸送機構の特性を調べる。また他の輸送系と Na^+-Mg^{2+} 交換輸送の相互関係を検討するには、既知の輸送蛋白を発現させた培養細胞をもちいて研究を進める 15)(たとえば文献 15)。第2に、本実験で観察された $[Mg^{2+}]_i$ 変動が細胞作用をどのように制御しているかが問題となる。そのためには、細胞膜の透過性を高めたり(たとえば文献 16)、パッチピペットから細胞内還流して $[Mg^{2+}]_i$ を変え、同時に細胞機能を測定する実験が必要である。

さらに本研究の次のステップとして明らかに重要かつ興味ある課題は、細胞膜 Mg^{2+} 輸送体蛋白質の分子実体の解明である。本研究で得られた Mg^{2+} 耐性変異株においては細胞膜 Na^+-Mg^{2+} 交換輸送体が高発現していることが強く示唆された。 Mg^{2+} 輸送体の同定の目的で、海外の複数の研究機関で Mg^{2+} 耐性変異株の作成が着手されており、その途中経過が報告されている。小西らは既に 100 mM Mg^{2+} 環境下でも増殖できる変異株を得ており一歩先んじている。現在 suppression subtractive hybridization 法をもちいて Mg^{2+} 耐性変異株において発現が増強している遺伝子の解析を行うことを計画している。

文献

1. Stitt FW, Clayton DG, Crawford MD, Morris JN: Clinical and biochemical indicators of cardiovascular disease among men living in hard and soft water areas. *Lancet* 1: 122-126, 1973.
2. Tashiro M, Konishi M: Basal intracellular free Mg^{2+} concentration in smooth muscle cells of guinea pig tenia cecum. *Biophys J* 73: 3358-3370, 1997.
3. Watanabe M, Konishi M: Intracellular calibration of the fluorescent Mg^{2+} indicator fura-2 in rat ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 442: 35-40, 2001.
4. Watanabe J, Nakayama S, Matsubara T, Hotta N: Regulation of intracellular free Mg^{2+} concentration in isolated rat hearts via β -adrenergic and muscarinic receptors. *J Mol Cell Cardiol* 30: 2307-2318, 1998.
5. Gupta RK, Gupta P, Moore RD: NMR studies of intracellular metal ions in intact cells and tissues. *Annu Rev Biophys Bioeng* 13: 221-246, 1984.
6. Nakayama S, Tomita T: Depletion of intracellular free Mg^{2+} in Mg^{2+} -and Ca^{2+} -free solution in the taenia isolated from guinea-pig caecum. *J Physiol (Lond)* 421: 363-378, 1990.
7. Zhang W, Trutmann AC, Luthi D, McGuigan JAS: Apparent Mg^{2+} -adenosine 5'-triphosphate dissociation constant measured with Mg^{2+} macroelectrodes under

- conditions pertinent ^{31}P NMR ionized magnesium determination. *Anal Biochem* 251: 246-250, 1997.
8. Nakayama S, Nomura H, Tomita T: Intracellular free magnesium in the smooth muscle of guinea pig taenia caeci: a concomitant analysis for magnesium and pH upon sodium removal. *J Gen Physiol* 103: 833-851, 1994.
 9. Amano T, Matsubara T, Watanabe J, Nakayama S, Hotta N: Insulin modulation of intracellular free magnesium in heart: involvement of protein kinase C. *Br J Pharmacol* 130: 731-738, 2000.
 10. Tashiro M, Konishi M: Sodium gradient-dependent transport of magnesium in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 279: C1955-C1962, 2000.
 11. Feray JC, Garay R: Demonstration of a Na^+ - Mg^{2+} exchange in human red cells by its sensitivity to tricyclic antidepressant drugs. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 338: 332-337, 1988.
 12. Tashiro M, Konishi M: Na^+ gradient-dependent Mg^{2+} transport in smooth muscle cells of guinea pig tenia cecum. *Biophys J* 73: 3371-3384, 1997.
 13. Watanabe M, Konishi M, Ohkido I, Matsufuji S: Enhanced Na dependent Mg extrusion in the mutant cells established from mouse renal tubular (MCT) cell line. *Jpn J Physiol, in press (abstract)*.
 14. 大城戸一郎、小西真人、渡辺 賢、細谷龍男、松藤千弥: 高マグネシウム耐性腎上皮細胞の樹立と解析. 日本腎臓学会誌 (抄録) 43: 262, 2001.
 15. Tashiro M, Konishi M, Iwamoto T, Shigekawa M, Kurihara S: Transport of magnesium by two isoforms of the Na^+ - Ca^{2+} exchanger expressed in CCL39 fibroblasts. *Pflügers Arch* 440: 819-827, 2000.
 16. Kawai M, Konishi M: Measurement of sarcoplasmic reticulum calcium content in skinned mammalian cardiac muscle. *Cell Calcium* 16: 123-136, 1994.

Roles of the sodium-magnesium exchange transport in physiological and
pathophysiological changes of intracellular free Mg concentration

Masto Konishi, Shinsuke Nakayama

Department of Physiology, Tokyo Medical University and

Department of Cell Physiology, Nagoya University Graduate School of Medicine

Summary

We investigated regulation of intracellular Mg^{2+} concentration ($[Mg^{2+}]_i$) in cardiac muscle. $[Mg^{2+}]_i$ measured by ^{31}P -MRS in the Langendorff-perfused rat hearts was decreased by β -adrenergic stimulation or application of forskolin. Muscarinic stimulation by carbachol did not change $[Mg^{2+}]_i$ by itself, but antagonized the $[Mg^{2+}]_i$ change induced by β -adrenergic stimulation. Insulin increased $[Mg^{2+}]_i$ and suppressed the decrease in $[Mg^{2+}]_i$ caused by β -adrenergic stimulation. Since these effects of insulin were inhibited by LY333531, a protein kinase C inhibitor, insulin modulates $[Mg^{2+}]_i$ presumably via activation of protein kinase C. We have further characterized the Mg^{2+} transporter that is responsible for the modulation of $[Mg^{2+}]_i$ by measurements of $[Mg^{2+}]_i$ with a fluorescent indicator fura-2 in ventricular myocytes enzymatically isolated from rat hearts. After $[Mg^{2+}]_i$ was raised by ionomycin and high extracellular Mg^{2+} concentration ($[Mg^{2+}]_o$), washout of ionomycin and lowering $[Mg^{2+}]_o$ caused rapid decline of $[Mg^{2+}]_i$ in the presence of Na^+ . This Mg^{2+} efflux was completely inhibited by withdrawal of extracellular Na^+ (half activated by 90 mM Na^+), and was largely attenuated by imipramine, an inhibitor of the Na^+ - Mg^{2+} exchange. The results suggest that Na^+ - Mg^{2+} exchange is an important mechanism to extrude Mg^{2+} in cardiac myocytes. To identify the transporter molecule, we established a mutant strain of mouse renal tubular (MCT) cells that can grow in the culture media with very high Mg^{2+} concentrations (>100 mM). An average $[Mg^{2+}]_i$ (measured with fura-2) in the Mg^{2+} -tolerant cells was kept lower than that in wild cells either at 51 mM or 1 mM $[Mg^{2+}]_o$. When $[Mg^{2+}]_o$ was lowered from 51 mM to 1 mM, decrease in $[Mg^{2+}]_i$ was significantly faster in the Mg^{2+} -tolerant cells than in wild cells. These differences between the Mg^{2+} -tolerant cells and wild cells were abolished in the absence of extracellular Na^+ . These results suggest that expression of Na^+ - Mg^{2+} exchanger was enhanced in the Mg^{2+} -tolerant cells to prevent $[Mg^{2+}]_i$ increase to higher levels.