

助成番号 0729

Naに依存した細胞内Mg濃度制御の統合的解析

小西 真人, 渡辺 賢, 井上 華, 田代 倫子

東京医科大学医学部細胞生理学

概要 心筋細胞を材料として用い、 Mg^{2+} 透過チャネル/輸送体および Na^+ - Mg^{2+} 交換輸送体が細胞内Mg濃度制御にどのように関わっているかを生理学的手法により検討した。ラットの単一心室筋に蛍光 Mg^{2+} 指示薬 furaptra を導入し、細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度($[Mg^{2+}]_i$)を測定した。一部の実験では、同様に細胞内に導入した蛍光 Na^+ 指示薬 SBFI により細胞内遊離 Na^+ 濃度($[Na^+]_i$)を測定した。 Mg^{2+} 能動輸送のエネルギー源を知るために Na^+ - Mg^{2+} 交換輸送体に対する細胞内ATPの寄与を調べた。ミトコンドリアの脱共役剤である FCCP(carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone)または酸化的リン酸化によるATPの産生を抑制する KCN を投与して細胞内ATPを枯渇させると、 $[Mg^{2+}]_i$ は上昇し、細胞は硬直 rigor に陥った。Rigor の状態にある細胞では、 Mg^{2+} を負荷した正常細胞にくらべて、 Na^+ によって活性化され Mg^{2+} 汲み出し輸送は強く(約90%)抑制された。KCN の処理時間が短い(60 - 90分)場合、rigorをおこさずに $[Mg^{2+}]_i$ を上昇させることができる。そのような細胞では、 Mg^{2+} 汲み出し速度は約50%抑制された。細胞内代謝が停止した時におこる細胞内アシドーシスと $[Na^+]_i$ の上昇の影響について検討した。細胞を H^+ イオノフォアである nigericin で処理し、細胞外高 K^+ (150 mM)条件下で細胞内pHを細胞外pH(7.15)と平衡化させた。このような細胞においても、rigor条件下における Mg^{2+} 汲み出し輸送の抑制は解除されなかった。SBFIにより $[Na^+]_i$ を測定した。細胞外 Na^+ を投与すると、時間を追って $[Na^+]_i$ は上昇した。しかし、 Mg^{2+} 汲み出し輸送速度を解析した初期(Na^+ 投与後30 - 150s)の $[Na^+]_i$ は平均5.0 - 10.5 mMであり、 Mg^{2+} 輸送を50%抑制する $[Na^+]_i$ (約40 mM)より低かった。 Mg^{2+} 汲み出し輸送に対して細胞内ATPがどのように作用しているかを検討するために、実験温度を $15^\circ C$ から $35^\circ C$ の範囲で変化させ、輸送速度を測定した。 Mg^{2+} 汲み出し輸送速度の温度依存性(Q_{10})は1.56と見積もられた。

細胞への Mg^{2+} の流入経路に関して予備的な実験を行った。細胞を細胞外無 Na^+ 、高 Mg^{2+} 液で灌流すると、 $25^\circ C$ においては $[Mg^{2+}]_i$ は変化しなかったが、 $35^\circ C$ では $[Mg^{2+}]_i$ は直線的に上昇し、非常に高い濃度に達した。細胞外液を再びTyrode液に戻すと、 $[Mg^{2+}]_i$ はベースラインに向かって低下した。現在、この高い温度依存性を指標にして、心筋における Mg^{2+} の流入経路を同定することを試みている。

1. 研究目的

マグネシウムイオン(Mg^{2+})は、細胞機能の調節と維持に必須な元素である。 Mg^{2+} は多くの細胞内酵素、イオンチャネル、細胞内 Ca^{2+} 動態や筋細胞の収縮性に影響を与える。また転写や翻訳に必要であり、細胞の分裂、分化、成長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。

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⁾。

今までの多くの研究によって、細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度($[Mg^{2+}]_i$)は細胞外遊離 Mg^{2+} 濃度($[Mg^{2+}]_o$)とほぼ等しく維持されていることがわかってきた。細胞内電位が負

である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、細胞内 Mg^{2+} は膜電位により細胞外から細胞内へと駆動され、能動的な汲み出し輸送がなければ $[Mg^{2+}]_i$ は $[Mg^{2+}]_o$ の数百倍に達することになる。したがって、 $[Mg^{2+}]_i$ は、チャネルを通した受動的流入と能動的汲み出し輸送のバランスによって維持されていると考えられる。近年、TRP (transient receptor potential) channel superfamily のメンバーである TRP-M6 および TRP-M7 チャネルが Mg^{2+} 流入経路であることが強く示唆されている。また SLC41 transporter family のメンバーである SLC41A1 および SLC41A2 が Mg^{2+} 流入に関わっているという報告もなされている^{2), 3)}。一方、 Mg をくみ出す能動輸送体分子は同定されていないが、研究代表者らのグループは Na^+ の流入と交換に Mg^{2+} を汲み出す $Na-Mg$ 交換輸送を実験的に示し、その輸送特性を詳細に検討した⁴⁻⁸⁾。このような Mg^{2+} 透過チャネル/輸送体による Mg^{2+} 流入と Na^+-Mg^{2+} 交換輸送による Mg^{2+} 汲み出しは、体からの Mg^{2+} 排泄調節においても重要な役割を担っている。腎遠位尿細管においては、 Mg^{2+} は尿細管細胞を通して再吸収される。この際、 Mg^{2+} は尿細管腔側から Mg^{2+} 透過チャネル/輸送体を通して尿細管細胞に流入し、血管腔側から Na^+-Mg^{2+} 交換輸送により排出されると考えられている。このようにチャネル、輸送体がどのように $[Mg^{2+}]_i$ の制御に関わっているか、それらの機能的連携については不明である。本申請研究では、主として心筋細胞を材料として用い、 Mg^{2+} 透過チャネル/輸送体および Na^+-Mg^{2+} 交換輸送体が細胞内 Mg 濃度制御にどのように関わっているかを生理学的手法により解析することを目的とした。

2. 研究方法

2.1 単一心筋細胞

Wistar 系ラットからペントバルビタール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パー内で単離した細胞を正常 Tyrode 液で灌流した。蛍光 Mg^{2+} 指示薬 furaptra の acetoxymethyl エステル (furaptra AM) 5 μ M を含む Tyrode 溶液で 15 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^{9), 10)}。

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

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(1)式にあてはめることにより、 R_{min} 、 R_{max} 、 K_D 値を求めた¹⁰⁾。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、蛍光測定の実験は主として Ca-free 条件下 (0.1 mM EGTA 存在下) で行った (25°C)。細胞内遊離 Na^+ 濃度 ($[Na^+]_i$) の測定には、蛍光 Na^+ 指示薬 SBF1 を用いた。Furatptra と同様に、SBFI-AM 20 μ M を含む Tyrode 溶液で 120 分間処理することにより、細胞内に furaptra を導入した。励起光 340 nm と 382 nm での 500 nm の蛍光強度 (F_{340} と F_{382}) の比 ($R=F_{382}/F_{340}$) から、上記 (1) 式を準用して $[Na^+]_i$ を計算した。細胞内での R_{min} 、 R_{max} 、 K_D は、上述の furaptra と同様、細胞を Gramicidin D で処理して細胞内外の一価イオン濃度を平衡化し、種々の既知細胞外 Na^+ 濃度における R 値を最小自乗法であてはめることにより求めた⁷⁾。

2.2 蛍光色素に対する pH、温度の影響

$[Mg^{2+}]_i$ 、 $[Na^+]_i$ を測定するために使用した色素の蛍光は温度や pH によって影響を受ける可能性がある。そこで、furaptra および SBF1 の蛍光を溶液 pH と温度を種々に変えて蛍光分光高度計にて測定した。Furatptra の R_{min} 、 R_{max} 、 K_D は pH 6.5 - 7.7 の範囲でほとんど変化しなかった (Fig. 1A)。また温度を 15°C から 35°C まで変化させると furaptra の K_D は有意に低下した (Fig. 1B)。そこで本実験では、これらの温度による furatptra の R_{min} 、 R_{max} 、 K_D 変化を補正した。SBFI の Na^+ に対する K_D は、pH が 7.2 か

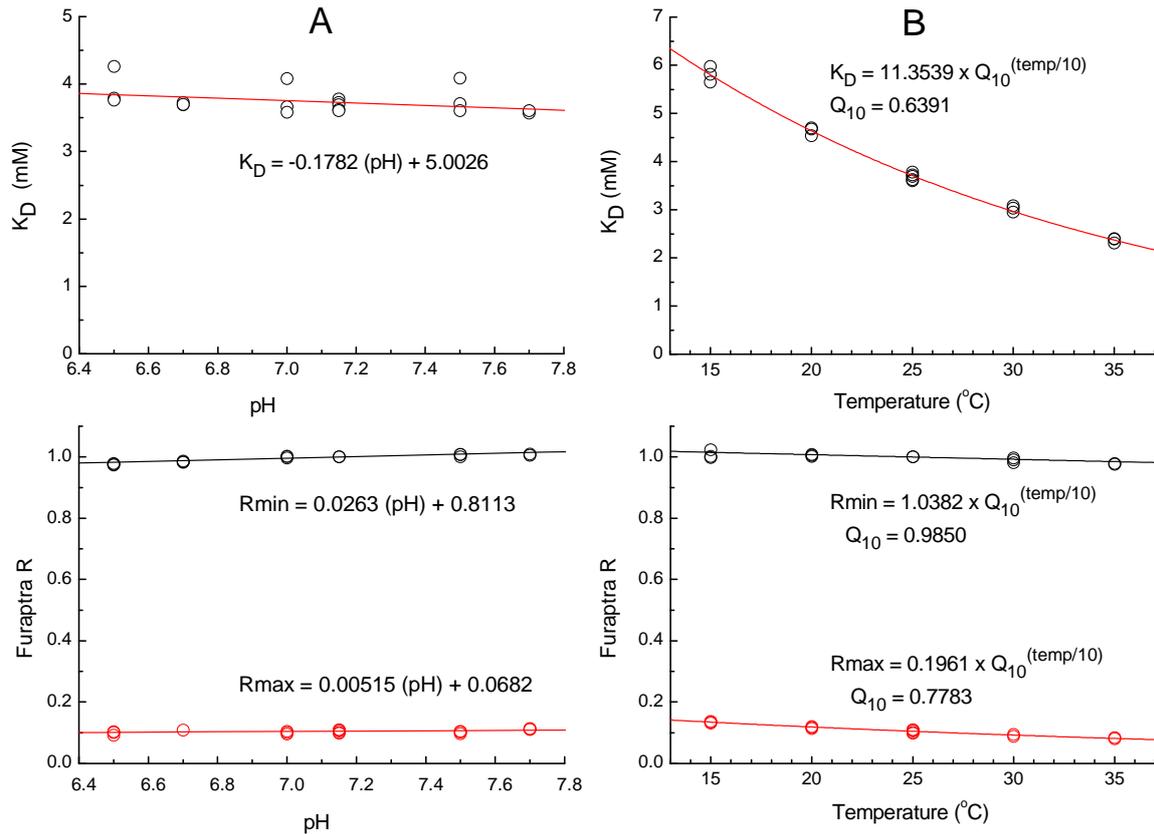


Fig. 1. Effects of pH and temperature on furaptra fluorescence parameters: R_{min} , R_{max} and K_D . In A, the solution pH was changed between 6.5 and 7.7 at 25°C. In B, temperature was changed between 15°C and 35°C, while solution pH was kept at 7.15. Spectrofluorometer measurements in 1-cm quartz cells.

ら 6.8 まで低下することによって、約 15% 増加することがわかったので、細胞内アシドーシスの実験ではこの変化を補正した。

3. 研究結果

3.1 Mg^{2+} 汲み出し輸送に対する細胞内 ATP の寄与

正常な心筋細胞を無 Na^+ -高 Mg^{2+} 溶液に浸漬して細胞内に Mg^{2+} を負荷した後、細胞外 Na^+ を投与すると、 Mg^{2+} 汲み出し輸送が活性化され、 $[Mg^{2+}]_i$ は急速に低下する^{4), 5)}。 Mg^{2+} を汲み出す輸送のエネルギー源としては、 Na^+ の流入が最も重要と考えられるが、ATP の加水分解によるエネルギーが輸送に関与しているか否かは不明である。そこで心筋細胞において、細胞内 ATP を変化させて Mg^{2+} 汲み出し輸送速度を比較した。心筋細胞の ATP 産生は、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化に負うところが非常に大きいことが知られている。そこで、ミトコンドリアの酸化的リン酸化を脱共役あるいは抑制する薬

物を用いて細胞内 ATP を枯渇させ、正常細胞と Mg^{2+} 汲み出し輸送速度を比較した。ミトコンドリアの脱共役剤である FCCP (carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone) を投与して細胞内 ATP を急速に分解させると、細胞は硬直 rigor に陥った。ATP は細胞内ではほとんど Mg^{2+} と結合した状態 (Mg -ATP) として存在しており、分解した ATP から遊離した Mg^{2+} により $[Mg^{2+}]_i$ は 2.5 - 3 mM 程度まで上昇した。Rigor 状態にある細胞に細胞外 Na^+ を投与することにより Mg^{2+} 汲み出し輸送を活性化した。正常細胞に Mg^{2+} を負荷して $[Mg^{2+}]_i$ が 2.5 - 3 mM 程度に上昇した時の Mg^{2+} 汲み出し輸送速度をコントロールとした。

KCN (5 mM) はミトコンドリアの酸化的リン酸化による ATP の産生を抑制し、120 分で細胞内 ATP を枯渇させる。FCCP、KCN のいずれの場合も、rigor の状態にある細胞では Na^+ によって活性化され Mg^{2+} 汲み出し輸送は強く (約 90%) 抑制された。KCN の処理時間が短い (60 - 90

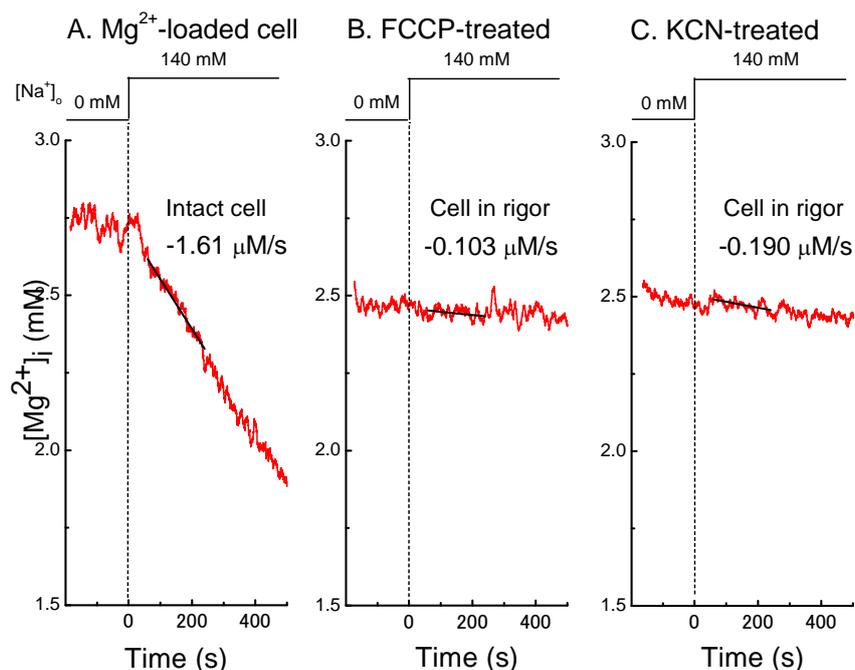


Fig. 2. Effects of intracellular ATP depletion on the rate of changes in $[Mg^{2+}]_i$. (A) a control cell loaded with Mg^{2+} , (B) a cell in rigor after treatment with 1 μM FCCP, (C) a cell in rigor after treatment with 5 mM KCN.

分)場合、rigor をおこさずに $[Mg^{2+}]_i$ を上昇させることができる。そのような細胞では、 Mg^{2+} 汲み出し速度は約50%抑制された。

細胞内代謝が停止すると、細胞内 ATP 濃度以外にも様々な変化がおこる。その一つとして細胞内 pH が7.2から6.8程度にまで低下する(細胞内アシドーシス)¹¹⁾。細胞内アシドーシスの影響を検討するために、細胞をH⁺イオノフォアである nigericin で処理し、細胞外高 K⁺ (150 mM)条件下で細胞内 pHを細胞外 pH(7.15)と平衡化させた。このような細胞においても、rigor 条件下における Mg^{2+} 汲み出し輸送の抑制は解除されなかった。

別の可能性として、ATP の枯渇により Na⁺-K⁺ ポンプが停止することによって $[Na^+]_i$ が上昇することが考えられる。 $[Na^+]_i$ の上昇は、Na⁺の駆動力を減少させ、 Mg^{2+} 輸送を抑制する⁷⁾。蛍光色素 SBFIにより Mg^{2+} 汲み出し輸送中の $[Na^+]_i$ を測定した。細胞内アシドーシスの影響を考慮して、SBFIの蛍光信号に対する pHの影響を補正した。細胞外 Na⁺を投与すると、時間を追って $[Na^+]_i$ は上昇した。しかし、 Mg^{2+} 汲み出し輸送速度を解析した初期(Na⁺投与後30-150s)の $[Na^+]_i$ は平均5.0-10.5 mMであり、 Mg^{2+} 輸送を50%抑制する $[Na^+]_i$ (約40 mM)より低かった。

3. 2 Mg^{2+} 汲み出し輸送に対する温度の影響

Mg^{2+} 汲み出し輸送に対して細胞内 ATP がどのように作用しているかを検討するために、実験温度を15°Cから35°Cの範囲で変化させ、輸送速度を測定した。 Mg^{2+} 汲み出し輸送速度の温度依存性は、 $Q_{10}=1.56$ の曲線によくフィットすることができた(Fig. 3)。 Q_{10} が低いことは、この Mg^{2+} 汲み出し輸送分子がATPを直接加水分解するQ type ATPaseとは異なり、ATPがその他の機序(輸送体分子への結合またはリン酸化)を介して間接的に輸送を調節していることを示唆する。

3. 3 Mg^{2+} 流入経路の探索

細胞への Mg^{2+} の流入経路に関しては、TRP-M6およびTRP-M7チャンネルがMg流入経路であることが強く示唆されている一方、SLC41 transporter familyの一つがMg流入に関わっているという報告もなされている^{2,3)}。心筋細胞では、細胞外無Na⁺条件下で、細胞外高 Mg^{2+} によって $[Mg^{2+}]_i$ が上昇することが報告されている¹²⁾。この $[Mg^{2+}]_i$ 上昇は温度依存性が非常に高く、25°Cでは非常に遅いが、35°Cでははっきりと観察できる。この温度依存性を指標にして、心筋における Mg^{2+} の流入経路を同定できる可能性があり、予備的な実験を行った。その結果をFig. 4に示す。

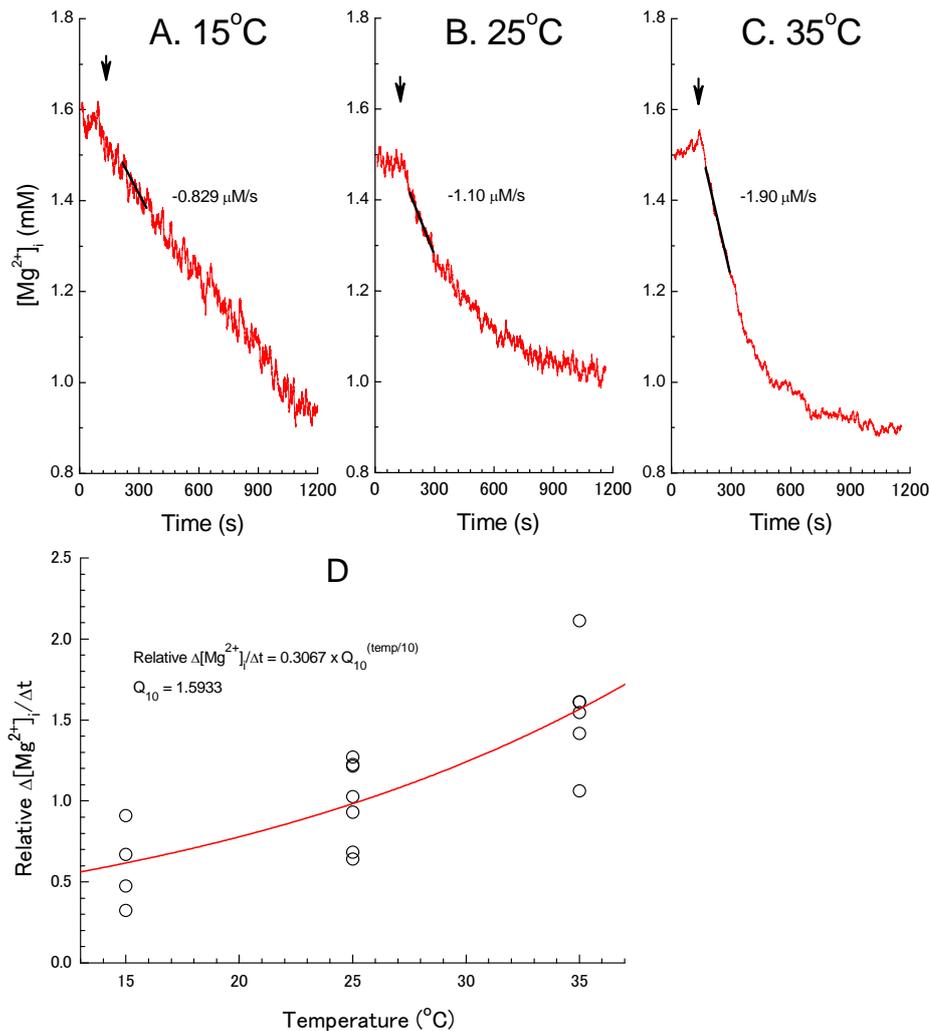


Fig. 3. Measurements of the rate of changes in $[Mg^{2+}]_i$ at 15°C (A), 25°C (B) and 35°C (C). Typical traces are shown in A-C, and plots of the pooled data are shown in D.

細胞を細胞外高 Mg^{2+} 濃度の条件におくことにより、細胞膜を通しての Mg^{2+} の流入が増大することが期待される。また細胞外無 Na^+ にすることにより、 Na^+ に依存した Mg^{2+} 汲み出し輸送が抑制されるので、細胞内に流入した Mg^{2+} によって $[Mg^{2+}]_i$ が上昇するのを観察することができるはずである。25°C においては、細胞外無 Na^+ 条件下で $[Mg^{2+}]_i$ の上昇は観察されなかった (Fig. 4A)。

多くの細胞で、むしろ $[Mg^{2+}]_i$ はわずかに低下する傾向にあった (Fig. 4A の負の傾き)。Furaptra は Mg^{2+} だけでなく Na^+ とわずかに結合するため、この見かけ上の $[Mg^{2+}]_i$ の低下は、おそらく無 Na^+ による $[Na^+]_i$ の低下を反映しているものと考えている。それに対して、35°C では、多くの細胞でははっきりした $[Mg^{2+}]_i$ の上昇が観察された (Fig. 4B)。細胞外無 Na^+ 、高 Mg^{2+} 灌流により $[Mg^{2+}]_i$ は直線的に上

昇し、非常に高い濃度に達した。細胞外液を再び Tyrode 液に戻すと、 $[Mg^{2+}]_i$ はベースラインに向かって低下した。Tyrode 液中における $[Mg^{2+}]_i$ の低下は上述の Na^+ - Mg^{2+} 交換輸送によるものと考えられる。Fig. 4 に示す結果は、 Mg^{2+} 流入経路の非常に高い温度感受性を示唆するものであり、実験的に Mg^{2+} 流入経路の同定に指標として用いることができる可能性がある。もし Mg^{2+} 流入が Mg^{2+} 透過チャネルによるか、起電性 Mg^{2+} 輸送体による場合には、 Mg^{2+} 流入に伴って膜電流が流れる。現在、パッチクランプ法により $[Mg^{2+}]_i$ の上昇過程における膜電流解析を行っている。困難な問題点は、35°C における $[Mg^{2+}]_i$ の上昇がすべての細胞で観察されるわけではないこと、また観察された場合も細胞により速度が大きく異なることである。

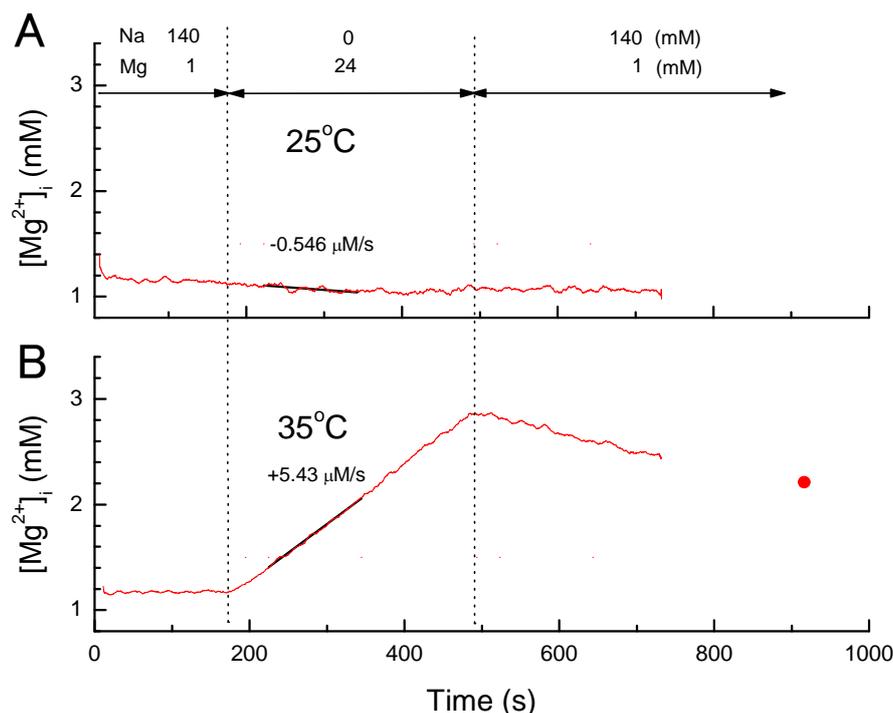


Fig. 4. Examples of experimental records taken at 25°C (A) and 35°C (B) from two different cells. Cells were initially incubated in Ca²⁺-free Tyrode's solution, and extracellular concentrations of Na⁺ and Mg²⁺ (in mM) were changed as shown at the top of the panel. In B, an additional fluorescence measurement was made 3 min later (a filled circle).

4. 考 察

本申請研究では、主として心筋細胞を材料として用い、Mg²⁺透過チャネル/輸送体およびNa⁺-Mg²⁺交換輸送体が細胞内遊離Mg²⁺濃度制御にどのように関わっているかを生理学的手法により解析することを目的とした。Na⁺-Mg²⁺交換輸送の機能については、現在までの研究で解析が進められ、その性質が明らかにされてきた。Na⁺-Mg²⁺交換輸送は、1)強い脱分極により輸送速度が増大する⁵⁾、2)細胞外Na⁺により活性化される(55 mMで最大の50%活性化)⁷⁾、3)細胞内Na⁺によって抑制される(およそ40 mMで50%抑制)⁷⁾、4)静止レベル以上の細胞内Mg²⁺によって活性化される(1.9 mMで最大の50%活性化)⁶⁾、5)細胞外Mg²⁺によって抑制される(およそ10 mMで50%抑制)⁶⁾、6)細胞内外のK⁺、Ca²⁺、Cl⁻濃度は輸送速度に影響しない⁸⁾。さらに本研究で、細胞内ATPがNa⁺-Mg²⁺交換輸送に必要であることが示された。ATPの作用機序についてはまだ明らかではないが、直接輸送体がATPを加水分解する可能性は低いと考えられる。ATPがリガンドとして輸送体に結合するのか、輸送体タンパク質(あるいは関連タンパク質)をリン酸化する基質として

ATPが必要なのかは、今後検討すべき課題である。

Mg²⁺流入経路の同定については、予備実験結果から強い温度依存性があることがわかり、これが今後の研究の手がかりとなると考えている。興味深いことに、哺乳類のMg²⁺輸送に関与していることが示唆されているSLC41A1輸送体/チャネルについても非常に高い温度依存性が報告されている²⁾。SLC41A1を発現させたHEK293細胞において、細胞外高Mg²⁺濃度条件下での[Mg²⁺]_iの上昇は25°Cでは非常にわずかであるが、37°Cでは速やかな[Mg²⁺]_iの上昇がみられた²⁾。SLC41A1は心筋細胞に非常に強く発現していることも知られている²⁾。本研究の予備実験で観察された温度依存性(Fig. 4)も考え合わせると、心筋細胞のMg²⁺流入経路の少なくとも一部はSLC41A1輸送体/チャネルである可能性がある。もしMg²⁺流入が起電性Mg²⁺輸送体によるか、Mg²⁺透過チャネルによる場合には、Mg²⁺流入に伴って膜電流が流れる。現在、パッチクランプ法により[Mg²⁺]_iの上昇過程における膜電流解析を行っている。もし、Fig. 4Bにみられる[Mg²⁺]_iの上昇がMg²⁺透過チャネルによるものだとすると、流れる電流量を計算で予測することができる。心筋細胞の

細胞質容積／細胞容積比が0.5、細胞質 Mg^{2+} 緩衝能(＝全 Mg 濃度変化／遊離 Mg^{2+} 濃度変化)が2.5、細胞表面積／細胞容積比が $0.63 \mu M^{-1}$ であると仮定すると、200 pF の容量をもつ細胞では40 pA の内向き電流が流れると計算できる。もし Mg^{2+} 流入が1分子の Mg^{2+} と1分子の一価陽イオンを交換する起電性輸送体だとすると、流れる電流は20 pA になる。現在までのところ、このような電流のはっきりした証拠は得られていない。

5. 今後の課題

Na^+ - Mg^{2+} 交換輸送体に関しては、細胞内 ATP の作用機序をさらに詳細に検討する必要がある。細胞内 ATP やその他の高エネルギーリン酸化合物濃度をコントロールする方法としては、パッチピペットからの細胞内灌流による方法が考えられる。その場合の実験上の問題点としては、細胞内灌流によって細胞内 ATP が変動すると細胞が収縮してピペットのシールが困難になることがあげられる。さらに、パッチピペットからの灌流によって $[Mg^{2+}]_i$ が固定されることにより、 Mg^{2+} 輸送速度が影響を受ける可能性がある。代わり得る方法としては、細胞膜の小胞を分離して、その中の高エネルギーリン酸化合物濃度をコントロールし $[Mg^{2+}]$ を測定する方法である。この方向で、現在赤血球ゴーストを用いた実験を計画している。赤血球を低浸透圧条件におくと、破裂して細胞の内容物が失われるが、適当な条件に戻すと赤血球膜は再びシールし、ゴーストができる。赤血球の破裂・再シールを適当な溶液内で行うことにより、ゴースト内の溶液条件がコントロールできる。

Mg^{2+} 流入経路に関しては、強い温度依存性をさらに追及する。困難な問題点は、すべての細胞で $[Mg^{2+}]_i$ の上昇が観察されるわけではないこと、また観察された場合も細胞により速度が大きく異なることである。すべての細胞で確実に $[Mg^{2+}]_i$ が大きく上昇する実験条件を検討する必要がある。さらに、その際に流れる微小な電流を確実に検出する条件を模索する必要がある。

Na^+ - Mg^{2+} 交換輸送および Mg^{2+} 流入経路の基本的な機能解析が完了すれば、それらを組み込んだ細胞モデルを構築することが可能である。現在までに、細胞内 Mg^{2+} 緩衝系について文献的に多くの情報が得られており、基本的な手法は既に確立している。細胞の Mg^{2+} 制御に関する数理モデルは、生体の Mg^{2+} ホメオスタシスへの Na^+

の寄与を明らかにし、体内 N^+ 代謝の異常による病態の解明へと展開することができる。

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. Kolisek M, Launay P, Beck A, Sponder G, Serafini N, Brenkus M, Froschauer Em, Martens H, Flieg A, Schweigel M: SLC41A1 is a novel mammalian Mg^{2+} carrier. *J Biol Chem*, on line M707276200, 2008.
3. Sahni J, Nelson B, Scharenberg AM: SLC41A2 encodes a plasma-membrane Mg^{2+} transporter. *Biochem J* 401:505-513, 2007.
4. Tashiro M, Konishi M: Sodium gradient-dependent transport of magnesium in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 279:C1955-C1962, 2000.
5. Tashiro M, Tursun P, Miyazaki T, Watanabe M, Konishi M: Effects of membrane potential on Na^+ -dependent Mg^{2+} extrusion from rat ventricular myocytes. *Jpn J Physiol* 52:541-551, 2002.
6. Tursun P, Tashiro M, Konishi M: Modulation of Mg^{2+} efflux from rat ventricular myocytes studies with the fluorescent indicator furaptra. *Biophys J* 88:1911-1924, 2005.
7. Tashiro M, Tursun P, Konishi M: Intracellular and extracellular concentrations of Na^+ modulate Mg^{2+} transport in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 89:3235-3247, 2005.
8. Tashiro M, Tursun P, Miyazaki T, Watanabe M, Konishi M: Effects of intracellular and extracellular concentrations of Ca^{2+} , K^+ and Cl^- on the Na^+ -dependent Mg^{2+} efflux in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 91:244-254, 2006.
9. 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.
10. Watanabe M, Konishi M: Intracellular calibration of the fluorescent Mg^{2+} indicator furaptra in rat

- ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 442:35-40, 2001.
11. Ralenkotter L, Dales C, Delcamp TJ, Hadley RW: Cytosolic $[Ca^{2+}]$, $[Na^+]$, and pH in guinea pig ventricular myocytes exposed to anoxia and reoxygenation. *Am J Physiol* 272:H2679-2685, 1997.
12. Alumulla HA, Bush PG, Steele MG, Ellis D, Flatman PW: Loading rat heart myocytes with Mg^{2+} using low $[Na^+]$ solutions. *J Physiol* 575:443-454, 2006.

No. 0729

System Analysis of Na-Dependent Regulation of Intracellular Mg Ion Concentration

Masato Konishi, Masaru Watanabe, Hana Inoue, Michiko Tashiro

Department of Physiology, Tokyo Medical University

Summary

We investigated regulation of intracellular Mg^{2+} concentration ($[Mg^{2+}]_i$) by Mg^{2+} permeable channels/transporters and the Na^+ - Mg^{2+} exchange transport in cardiac muscle. Single ventricular myocytes enzymatically isolated from rats were loaded with the fluorescent Mg^{2+} indicator fura-2, and $[Mg^{2+}]_i$ was measured. In some experiments, intracellular Na^+ concentration ($[Na^+]_i$) was similarly measured with the fluorescent indicator SBFI. Contribution of intracellular ATP to the Na^+ - Mg^{2+} exchange was studied. After treatment of the cells with either FCCP, carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone, or KCN, intracellular depletion of ATP induced a rise of $[Mg^{2+}]_i$ up to 2.5-3 mM and shortened cell length (due to rigor contraction). The relative initial rates of decrease in $[Mg^{2+}]_i$ upon introduction of extracellular Na^+ (Mg^{2+} efflux by the Na^+ - Mg^{2+} exchange) were markedly (by ~90%) reduced in the cells depleted of ATP, compared with that in the Mg^{2+} -loaded cells. The slowed Mg efflux was not attributed to an increase in $[Na^+]_i$, because $[Na^+]_i$ measured with a Na^+ indicator SBFI was, on average, 5.0 - 10.5 mM ($n = 4$) within the time range for initial $\Delta[Mg^{2+}]_i/\Delta t$ measurements, while $[Na^+]_i$ at the half inhibition of the Mg^{2+} efflux is about 40 mM. To cancel intracellular acidosis caused by metabolic inhibition, application of nigericin, a proton ionophore, did not reverse the FCCP- or KCN-induced inhibition of the Mg^{2+} efflux. These results suggest requirement of cellular ATP for the Na^+ -dependent Mg^{2+} transport in cardiac myocytes. Mechanism of ATP action was further studied by measuring Mg^{2+} efflux rate at different temperatures between 15°C and 35°C. Temperature dependence (Q_{10}) of the Na^+ - Mg^{2+} exchange transport was estimated to be 1.56, which is lower than that expected for processes directly coupled to ATP hydrolysis.

Preliminary experiments were carried out on the Mg^{2+} efflux pathway. When the cells were superfused with a low- Na^+ , high- Mg^{2+} solution, $[Mg^{2+}]_i$ quickly and linearly increased to very high levels at 35°C, but no significant rise of $[Mg^{2+}]_i$ was observed at 25°C. This high temperature dependence could be a good signature of the Mg^{2+} channels/transporters which are responsible for Mg^{2+} influx. Experiments were now ongoing to identify the Mg^{2+} influx pathways in cardiac myocytes.