

助成番号 0740

ナトリウム感受性および非感受性高血圧ラットにおけるマグネシウム輸送 カチオンチャネルの発現・機能解析

村木 克彦, 伊藤 友香, 波多野 紀行

愛知学院大学薬学部

概要 マグネシウムは、生体内において酵素活性の調節やイオンチャネル開閉の制御、細胞膜の安定化などに寄与する二価イオンで、細胞内で最も多く存在する二価イオンである。マグネシウムの大部分が飲料水や食事により摂取されており、疫学調査からマグネシウムを多く摂取することにより血圧が低下することが知られている。最近、transient receptor potential (TRP) 型カチオンチャネルのサブタイプの TRPM6 および TRPM7 型カチオンチャネルがマグネシウム輸送担体として機能することが明らかとなったが、高血圧症との関連は不明である。

そこで本研究では、高血圧症と TRPM6 型および TRPM7 型カチオンチャネルの関連について、両カチオンチャネルの各種臓器における発現を検討するために、高血圧モデル動物として最も広く用いられている高血圧自然発症ラット SHR (Spontaneous hypertensive rats) と、Wistar-Kyoto 正常血圧ラット(WKY)における遺伝子発現を比較した。

高血圧状態となった 14 週齢の SHR と、正常血圧である 14 週齢の WKY の臓器(心臓, 大動脈, 肝臓, 腎臓, 脂肪)から RNA を抽出し、逆転写後 PCR 法により TRPM6、TRPM7 遺伝子発現について検討した。SHR、WKY ともに肝臓と腎臓において TRPM6 遺伝子の発現が確認でき、特に腎臓において強い発現が認められた。肝臓での TRPM6 の発現は WKY と比較して SHR で発現が上昇していた。しかし大動脈では、TRPM6 の発現は確認できなかった。一方、TRPM7 は心臓、大動脈、肝臓、腎臓、脂肪すべての臓器で発現していたが、SHR と WKY 間で発現量の違いはみられなかった。

次に高血圧を発症していない 4 週齢の SHR、WKY を用いて各種臓器(脳, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脂肪)から RNA を抽出し、TRPM6、TRPM7 遺伝子発現について検討した。14 週齢ラットの場合と同様腎臓において TRPM6 遺伝子の強い発現が認められ、TRPM7 はどの組織においても発現が認められた。

以上の結果から、血管平滑筋では TRPM7 型カチオンチャネルがマグネシウムの輸送に関与している可能性が示唆された。しかし SHR、WKY で発現量に違いがなかったことから食塩非感受性高血圧ラットにおいて高血圧症と TRPM6、TRPM7 型カチオンチャネルの関連は低いと考えられる。

1. 研究目的

マグネシウムは、生体内において酵素活性の調節やイオンチャネル開閉の制御、細胞膜の安定化などに寄与する二価イオンで、細胞内で最も多く存在する二価イオンである。マグネシウムの大部分が飲料水や食事により摂取されており、疫学調査からマグネシウムを多く摂取することにより血圧が低下することが知られている¹⁾。一方、塩化マグネシウム剤は切迫性流産の治療に適用され、子宮筋を弛

緩させる。また動物実験により、塩化マグネシウムの投与が血管の筋緊張を抑制することが明らかとなっている²⁾。最近、transient receptor potential (TRP) 型カチオンチャネルのサブタイプのひとつである TRPM7 型カチオンチャネルが血管平滑筋においてマグネシウム輸送担体として機能することが明らかとなった³⁾が、高血圧症とくに食塩感受性高血圧症との関連は不明である。さらに最近、TRPM6 型カチオンチャネルもマグネシウム輸送担体として機能す

ることが報告された⁴⁾が、血管平滑筋での TRPM6 型カチオンチャンネルのタンパク発現や機能、さらに高血圧症との関連は全く不明である。

そこで本研究では、マグネシウム輸送担体として機能する TRPM6 型および TRPM7 型カチオンチャンネルの各種臓器における発現を検討し、高血圧モデル動物として最も広く用いられている高血圧自然発症ラット SHR (Spontaneous hypertensive rats) と、Wistar-Kyoto 正常血圧ラット (WKY) における TRPM6、TRPM7 型カチオンチャンネルの遺伝子発現を比較した。

2. 研究方法

2.1 組織からの RNA の調製

動物実験を計画、実施するに際しては、「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守した。14 週齢、4 週齢 SHR または WKY から各種臓器(脳あるいは大動脈、心臓、肝臓、腎臓、副精巣周囲脂肪)を摘出し、ホモジナイザーにより粉砕した。AGPC 法 (Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol Chloroform Method) により RNA を抽出した。RNA 量は波長 260 nm の吸光度を測定することにより算出した。(A₂₆₀=1 を 40 µg/ml RNA) とした。

2.2 逆転写反応

抽出した total RNA を 0.2 µg/ml とし、そのうち 10 µl を使用した。プロトコールに従い反応溶液を調製し (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems))、25°C で 10 分、37°C で 120 分、85°C で 5 秒処理した。この反応液を 5 倍希釈し cDNA 溶液とした。

2.3 PCR 法

PCR 法による遺伝子増幅には以下のプライマーを用いた。

rat TRPM6 (XM_219747) (112 bps: 3542-3653)
 forward: 5'-AGATGTTCTTCCAAGTCAA-3'
 complement: 5'-ACGGTCAAGGCAGAGAGATC-3'
 rat TRPM7 (XM_001056331) (150 bps: 3039-3188)
 forward: 5'-TGGACTAAGATTTGGAGCAA-3'
 complement: 5'-TAAGGTCCTGCCTGTTGATTT-3'
 rat GAPDH (NM_017008) (104 bps: 1533-1636)
 forward: 5'-CATGGCCTTCCGTGTTCT-3'
 complement: 5'-CCTGCTTACCACCTTCTTGA-3'

cDNA 溶液 1 µl に反応液 3.05 µl (2x PCR buffer, 0.8 mM dNTP, 5 pmol 各プライマー, 0.005 U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems)) を加え、全量を 10 µl にし 25 サイクル (GAPDH)、30 サイクル (TRPM7)、35 サイクル (TRPM6) で遺伝子の増幅を行った。5 ml の PCR 産物を 2% アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイド染色により解析した。

3. 研究結果

3.1 高血圧ラットにおける各種臓器での TRPM6、TRPM7 遺伝子発現

高血圧状態となった 14 週齢の SHR と、正常血圧である 14 週齢の WKY の臓器(心臓、大動脈、肝臓、腎臓、脂肪)から RNA を抽出し、逆転写後 PCR 法により TRPM6、TRPM7 遺伝子発現について検討した (Figure 1A)。

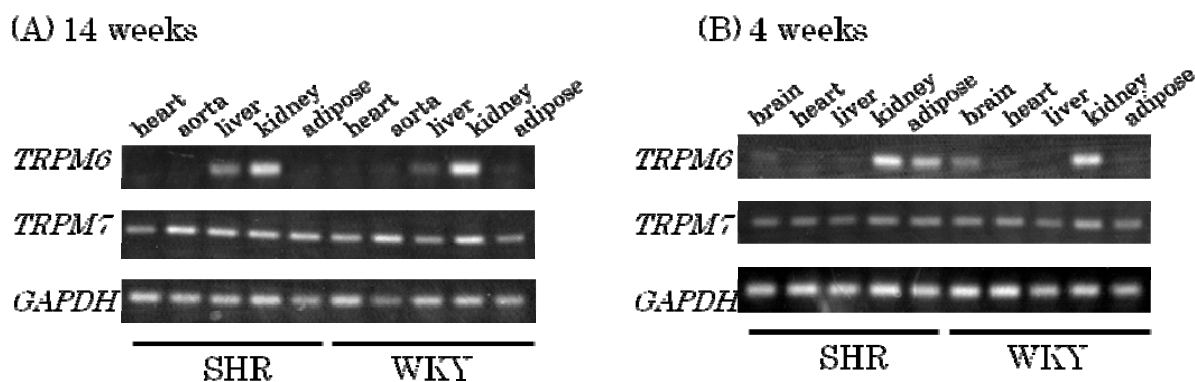


Figure 1. Expression of TRPM6 and TRPM7 in various tissues from adult (A) or juvenile (B) SHR and WKY

SHR、WKYともに肝臓と腎臓においてTRPM6 遺伝子の発現が確認でき、特に腎臓において強い発現が認められた。肝臓でのTRPM6の発現はWKYと比較してSHRで発現が上昇していた。しかし大動脈では、TRPM6の発現は確認できなかった。

一方、TRPM7は心臓、大動脈、肝臓、腎臓、脂肪すべての臓器で発現が確認していたが、SHRとWKY間で発現量の違いはみられなかった。

3.2 高血圧となっていない4週齢のSHR、WKYにおける各種臓器でのTRPM6、TRPM7 遺伝子発現

次に高血圧を発症していない4週齢のSHR、WKYを用いて各種臓器(脳、心臓、肝臓、腎臓、脂肪)からRNAを抽出し、TRPM6、TRPM7 遺伝子発現について検討した(Figure 1B)。14週齢ラットの場合と同様腎臓においてTRPM6 遺伝子の強い発現が認められた。また、TRPM6 遺伝子は4週齢のSHRの脂肪組織、4週齢のWKYの脳において多く発現していた。TRPM7はどの組織においても発現が認められた。

4. 考察

以上の結果から、Mg輸送を担うTRPM6、TRPM7型カチオンチャンネルに関して、SHR、WKYともに、TRPM6型カチオンチャンネルは腎臓において強い発現が認められ、一方TRPM7型カチオンチャンネルは多くの臓器に発現していることが明らかとなった。TRPM7は広範囲に発現し、TRPM7 遺伝子を欠損させた細胞は致死であることから細胞の生存に必須の因子だと考えられる⁵⁾。

今回の実験において、TRPM6は大動脈において発現は認められなかった。TRPM6は腎臓以外にも小腸、大腸など食物からのMg²⁺の吸収、体液中からのMg²⁺の再吸収に関わる組織で高発現していることが明らかとなっている。血管平滑筋におけるMg²⁺取り込みにはTRPM6の関与は低いと考えられる。また低マグネシウム血症による二次的な低カルシウム血症の原因遺伝子としてTRPM6が同定されている⁶⁾。

血管平滑筋細胞でのTRPM6、TRPM7の発現についてはまだ未解明な部分が多く存在する。アンジオテンシンII(AngII)は血管収縮、増殖、炎症などに関与しているホルモンであり、血管平滑筋の機能制御に重要な役割を果たしている。血管平滑筋をAngIIで24時間刺激すると

TRPM7の発現、細胞内のマグネシウムイオン濃度([Mg²⁺]_i)が上昇し、DNA合成、タンパク合成は亢進する³⁾。この現象はTRPM7の発現を抑制した細胞では観察されなかったことから、TRPM7は血管平滑筋においてAngIIによる[Mg²⁺]_i制御、細胞増殖に関与していると推察される。また、16週齢SHRにおいては、WKYと異なりAngIIによるTRPM7 遺伝子、タンパク発現の上昇が観察されず、定常状態での[Mg²⁺]_iは減少していた⁷⁾。このことから、TRPM7発現あるいは活性の変化が高血圧症の発症、進展に関与する可能性がある。

Figure 1に示したように、SHR、WKYにおいて単離直後の大動脈でのTRPM7 遺伝子発現量に違いはみられなかったことから、TRPM7 活性制御の変化が高血圧症の発症あるいは進展に重要な役割を果たしている可能性が高い。

TRPM7の活性制御については、ホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸(PIP2)やcAMPによる制御、キナーゼドメインによる制御^{8,9,10)}、[Mg²⁺]_iまたはMg²⁺-ATPによるチャンネルの阻害などが知られている¹¹⁾。最近、細胞内外の浸透圧の違いがTRPM7 活性を制御することが明らかとなった¹²⁾。予備的な検討ではあるが本研究においても、14週齢のSHR、WKYにおいて水輸送に関与するいくつかの分子の発現が異なっていることを明らかにしている。今後、これらの分子とTRPM7 活性の制御について検討したいと考えている。

5. 今後の展開

SHR、WKYでいくつかの水輸送に関与する分子の発現が異なることが明らかとなったので、これらの分子の発現制御機構、あるいはTRPM7 活性への影響について明らかにし、高血圧発症あるいは進展との関与を検討していく予定である。

本研究では、高血圧自然発症ラットSHRを用いたが、DOCA(deoxycorticosterone)食塩高血圧ラットにおいてもマグネシウム投与により高血圧症状が改善することが知られている¹³⁾。このラットにおけるTRPM6、TRPM7の発現、活性制御について検討する。また、マグネシウム摂取によりこれらのモデルラットの症状が改善されるか検討していきたい。

血管平滑筋におけるマグネシウムイオンの運搬には

TRPM6、TRPM7 カチオン以外にも $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ 交換体や $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 交換体が関与している(Figure 2)。AngIIによって誘導される高血圧において、 $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ 交換体の阻害により高血圧症状が改善する¹⁴⁾。 $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ 交換体も

TRPM7 と同様に高血圧の発症、進展に重要な役割を果たしていると考えられる。今後 $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ 交換体も含めた血管平滑筋細胞でのマグネシウムの輸送機構の解明を進めていきたい。

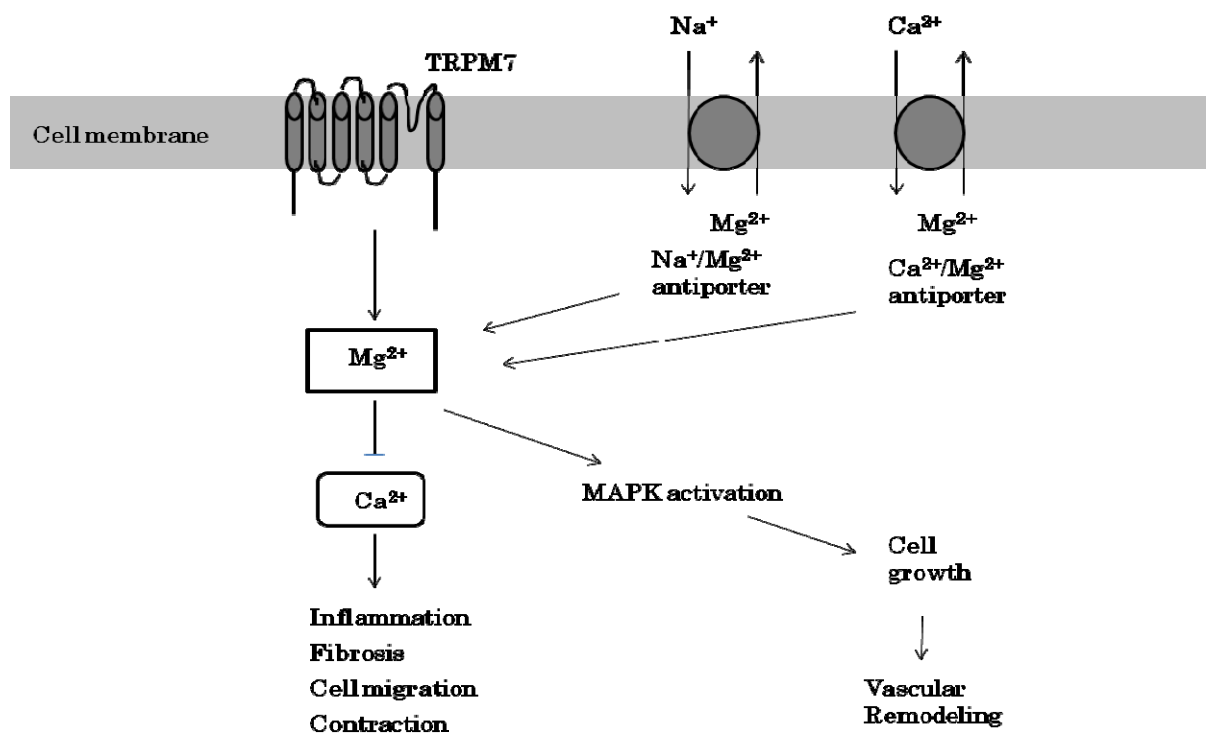


Figure 2. Magnesium transport mechanism in vascular smooth muscle cells

文献

- Whelton PK, Klag MJ. Magnesium and blood pressure: review of the epidemiologic and clinical trial experience. *Am J Cardiol.* **63**: 26G-30G, 1989.
- Landau R, Scott JA, Smiley RM. Magnesium-induced vasodilation in the dorsal hand vein. *BJOG.* **111**: 446-451, 2004.
- He Y, Yao G, Savoia C, Touyz RM. Transient receptor potential melastatin 7 ion channels regulate magnesium homeostasis in vascular smooth muscle cells: role of angiotensin II. *Circ Res.* **96**: 207-215, 2005.
- Naderi AS, Reilly RF Jr. Hereditary etiologies of hypomagnesemia. *Nat Clin Pract Nephrol.* **4**: 80-89, 2008.
- Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, Kurosaki T, Kinet JP, Penner R, Scharenberg AM, Fleig A. LTRPC7 is a Mg²⁺-ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* **411**: 590-595, 2001.
- Schlingmann KP, Weber S, Peters M, Niemann Nejsum L, Vitzthum H, Klingel K, Kratz M, Haddad E, Ristoff E, Dinour D, Syrrou M, Nielsen S, Sassen M, Waldegger S, Seyberth HW, Konrad M. Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet.* **31**:166-170, 2002.
- Touyz RM, He Y, Montezano AC, Yao G, Chubanov V, Gudermann T, Callera GE. Differential regulation of transient receptor potential melastatin 6 and 7 cation channels by ANG II in vascular smooth muscle cells from

- spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **290**: R73- R78, 2006.
- 8) Runnels LW, Yue L, Clapham DE. The TRPM7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis. *Nat Cell Biol.* **4**: 329-336, 2002.
- 9) Takezawa R, Schmitz C, Demeuse P, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A. Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 6009-6014, 2004.
- 10) Schmitz C, Perraud AL, Johnson CO, Inabe K, Smith MK, Penner R, Kurosaki T, Fleig A, Scharenberg AM. Regulation of vertebrate cellular Mg^{2+} homeostasis by TRPM7. *Cell* **114**: 191-200, 2003.
- 11) Demeuse P, Penner R, Fleig A. TRPM7 channel is regulated by magnesium nucleotides via its kinase domain. *J Gen Physiol.* **127**: 421-434, 2006.
- 12) Bessac BF, Fleig A. TRPM7 channel is sensitive to osmotic gradients in human kidney cells. *J Physiol.* **582**: 1073-1086, 2007.
- 13) Berthon N, Laurant P, Hayoz D, Fellmann D, Brunner HR, Berthelot A. *Can J Physiol Pharmacol.* **80**: 553-561, 2002. Magnesium supplementation and deoxycortico sterone acetate--salt hypertension: effect on arterial mechanical properties and on activity of endothelin-1.
- 14) Touyz RM, Yao G. Inhibitors of Na^+/Mg^{2+} exchange activity attenuate the development of hypertension in angiotensin II-induced hypertensive rats. *J Hypertens.* **21**: 337-344, 2003.

No. 0740

Function and Expression of Mg^{2+} Permeable Cation Channels in Na^+ Dependent and Independent Hypertensive Rats

Katsuhiko Muraki, Yuka Itoh, Noriyuki Hatano

Aichi Gakuin University

Summary

Magnesium ion (Mg^{2+}) is the second most common intracellular cation in mammalian cells. Experimental and clinical studies suggest that Mg^{2+} deficiency plays an obligatory role in the pathogenesis of hypertension. The exact mechanisms are unclear, but effects on the vasculature have been implicated. Recently, TRPM6 and TRPM7 cation channels involved in the transient receptor potential melastatin (TRPM) ion channel family were identified as magnesium transporters,.

In this study, we investigated gene expression of TRPM6 and TRPM7 in various tissues from spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto rats (WKY). TRPM6 gene was highly expressed in kidney of WKY (14 weeks old), while TRPM7 gene was detected in heart, aorta, liver, kidney and adipose of WKY, suggesting that TRPM7 but not TRPM6 is involved in regulating magnesium influx in vascular smooth muscle cells. However, the expression level of TRPM7 in SHR (14 weeks old) was not different from that in WKY. TRPM7 gene was also detected in brain, heart, aorta, liver, kidney and adipose of juvenile prehypertensive SHR (4 weeks old) and WKY (4 years old) and the expression level in both rats was comparable.

Taken together, these data suggest that both TRPM6 and TRPM7 have minor roles in the pathogenesis of hypertension in Na^+ independent hypertensive rats.