

## 心組織におけるにがり成分の代謝調節機構に関する基礎的研究

廣村 信<sup>1</sup>, 榎本 秀一<sup>2</sup>, 神野 伸一郎<sup>1</sup>, 福中 彩子<sup>1</sup>

<sup>1</sup>理化学研究所分子イメージング科学研究センター複数分子イメージング研究チーム

<sup>2</sup>岡山大学大学院医歯薬学総合研究科(薬)

**概要 研究目的** 近年、生体内のさまざまな微量元素が、生命活動、恒常性の維持および遺伝情報伝達などの多くの生理機能発現に関与していることが明らかになった。これまでに、複数核種同時イメージング装置(GREI; 1999年に申請者らの研究室が開発)により、にがり成分のMgの挙動をイメージング像として追跡することに世界で初めて成功した成果から、本研究は、にがり成分欠乏、特にMg欠乏状態での心臓組織における、にがり成分の代謝に関連する遺伝子発現や組織学的変化に着目して研究を行うことで、心臓に対するMgの重要性について検討した。

**研究成果の概要** Mg欠乏マウスでは、有意に血清Mg濃度が低下、および心筋梗塞の指標となるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)やクレアチンキナーゼ(CK)の値が、MgDマウスにおいて顕著に上昇していることが判明した。このことからMg欠乏によるマウスの突然死は、心筋梗塞由来によるものであることが考えられた。心臓組織の形態学的変化を調べたところ、Haematoxylin・Eosin染色およびPicrosirius red染色の結果から、MgDマウスの心筋組織においては、コラーゲン繊維を含む筋繊維構造の形態の破壊と炎症によるマクロファージや白血球等の血球系細胞の浸潤が起きていることが示された。さらに、透過型電子顕微鏡を用いた心筋組織の観察を行ったところ、アクチンフィラメントの破壊およびミトコンドリアの損傷が観察され、このことが心筋活動に影響を与えている結果を得た。

次に、リアルタイムPCR(qRT-PCR)による各Mg輸送タンパク質のmRNA発現量を定量解析した。その結果、Slc41a1はmRNA発現量には変化が無く、Slc41a3、MgT1、ACDP2およびMrs2のmRNA発現量はMgDマウスにおいて減少していた。一方で、Trpm7はMgDマウスでは、mRNAの発現量が亢進していた。これより、遺伝子発現が減少していたMg輸送タンパク質は細胞外からのMg取り込みに影響を与えているものと考えられ、遺伝子発現が亢進したTrpm7はMgの濃度バランスを感知していることが判明した。Mrs2はミトコンドリア膜に局在しているため、ミトコンドリアでのMg輸送に関与していることから、電子顕微鏡によって観察されたミトコンドリア構造の異常に深く関わっていることが示唆された。今後は心疾患発症におけるMgの関与をMg輸送タンパク質に限らずより多角的に研究を進めていく予定である。

### 1. 研究目的

近年、生体内のさまざまな微量元素が、生命活動、恒常性の維持および遺伝情報伝達などの多くの生理機能発現に関与していることが明らかになった。一方で、わが国における国民栄養調査において、マグネシウム(Mg)やカルシウム(Ca)をはじめとする各種ミネラルの慢性的摂取不足と言われており、これらミネラル(微量元素)の慢性的不足は心疾患や動脈硬化症の発症リスクに繋がると危惧されている。各種微量元素は食物からの吸収に

より補われるが、食の欧米化、医薬品によるキレート作用、長期輸液治療等により全身性の微量金属元素不足に陥っており、栄養補助食品としてのミネラル補給が必要とされる。製塩の副産物である「にがり」は、Mg、Ca、鉄(Fe)、マンガン(Mn)等の各種微量金属元素を多く含む「天然」の栄養補助食品として注目されている。しかしながら、にがりに含まれる微量金属元素自身の生体内における代謝や、元来生体が保有している微量金属元素との生体内ダイナミクスとの相互作用について、包括的に解析する研究

は殆どなされていなかった。共同研究者である岡山大学兼理化学研究所の榎本らは、複数核種同時イメージング装置(GREI; 1999年に申請者らの研究室が開発)により、にがり成分のMgの挙動をイメージング像として追跡することに世界で初めて成功した。この成功から、にがりに含まれる微量元素が、生体中の代謝調節機構にいかに関与しているかについて調べることで、にがりの有効性についての基礎的知見を得ることが可能になると考えた。本研究は、にがり成分欠乏、特にMg欠乏状態での心臓組織における、にがり成分の代謝に関連する遺伝子発現や組織学的変化に着目して研究を行うことで、心臓に対するMgの重要性について検討した。

## 2. 研究方法

### 2.1 Mg欠乏マウス(MgDマウス)およびMgレスキューマウス(MgD+Mg)の作製

ICRマウス(雄性, 5週齢)は日本エスエルシー株式会社から購入した。Mg欠乏マウス(MgD)の作製は、Mg欠乏飼料(AIN93G MgO free: オリエンタル酵母株式会社)にて飼育を行い、28~40日目において振戦を発症したマウスをMgDマウスとした。Mg欠乏飼料を25日間与えた後、AIN93G標準飼料に置き換え、さらに1週間飼育することでMgレスキューモデル(MgD+Mg)とした。なお、コントロールマウスはAIN93G標準飼料(オリエンタル酵母株式会社)を用いて飼育を行った。

### 2.2 血清マグネシウム濃度および血清成分測定

コントロール、MgDおよびMgD+Mgマウスをソムノペンチルで麻酔後、腹部採血を行った。その後、7,500 rpm、4°C、10分間の遠心分離により血清を得た。血清マグネシウム濃度の測定は、マグネシウム測定キット(マグネシウムB-テストワコー: 和光純薬工業株式会社)を用いて、吸光度計(JASCO V-570)で測定を行った。生化学分析は、マルチローターII-VEPL(一般検診II)(セントラル科学貿易)を用いて、ABAXIS EAにて測定を行った。

### 2.3 心組織の組織染色観察

各モデルマウスの心臓を、Optical Cutting Temperature (O.C.T) compound (SAKURA)に包埋後、マイクローム(LEICA CM1850)で7 μmに薄切した。組織切片を4%パラホルムアルデヒド/PBSで固定後、ヘマトキシリン・エオシンを用いて、常法に従い染色を行った。また、コラーゲ

ン繊維を染色するために、4%パラホルムアルデヒド/PBSで固定した組織切片を、Picosirius red stain kit (Polysciences, Inc.)を用いて染色を行った。いずれの組織染色サンプルもNikon ECLIPSE TE2000-Uにて観察を行った。

### 2.4 透過型電子顕微鏡を用いた心組織の観察

各モデルマウスをソムノペンチルで麻酔後、2%グルタルアルデヒド 2%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、緩衝液で洗浄し、2%オスミウムで後固定を行った。脱水後、Spurr樹脂に包埋し、熱重合後、ウルトラマイクローム(ライカEM UG6)にて超薄切切片を作製し、ウランと鉛の二重染色を行った。透過型電子顕微鏡(日立H7650)において観察を行った。

### 2.5 Mg輸送タンパク質の遺伝子発現変化

各モデルマウスの心臓を液体窒素で凍結し保存した。トータルRNAは、凍結組織、約100 mgからTRIzol(インビトロジェン株式会社)およびPureLink RNA Mini Kit(インビトロジェン株式会社)を用いて抽出・精製した。2 μgのトータルRNAを用いて、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(東洋紡株式会社)にて、逆転写反応を行い1本鎖cDNAを合成した。得られたcDNA原液を滅菌水にて5倍希釈し、その1 μLを、LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green Iを用いて、リアルタイムPCR(qRT-PCR)を行い、Mg輸送タンパク質のmRNAの発現量を定量解析した。なお内部標準にはβアクチンのmRNAを用いた。qRT-PCRに使用したプライマーはTable 1に示した。

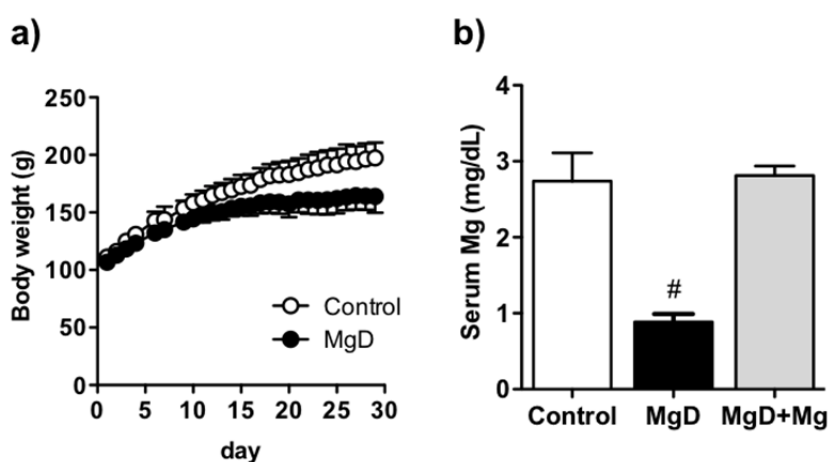
## 3. 研究結果と考察

### 3.1 モデルマウスのMg濃度および血清成分の測定

Mg freeの餌による飼育によるMgDマウスは、コントロールマウスと比べ、約10日目より体重の増加が起きなくなった(Fig. 1a)。実験に使用する最終日まで、MgDマウスの体重はコントロールマウスと比べ有意に低いままであったが、摂餌量に変化はなかった(data not shown)。さらに、Mg free食を与え始めて11日目より振戦を生じるマウスが観察されはじめ、突然死するマウスが現れた。25日目より、Mgレスキュー試験として、振戦を生じているMgDマウスに正常食を与えて1週間飼育を行ったところ、MgDマウスの振戦が抑制された。この期間中、MgDマウス群は振戦

**Table 1.** List of Primer sets of Mg transporter gene for qRT-PCR analysis

Gene name (GenBank No.)	Primer sequence	Tm (°C)
Slc41a1 (NM_173865.3)	5'-tcggacccaactttgcaggaatg-3'	60
	5'-atgccgttcattgtggaggaagg-3'	
Slc41a2 (NM_177388.3)	5'-tgttgtgtacctgtttgctgctgtgc-3'	60
	5'-actgtctgggtcctttctctttcc-3'	
Slc41a3 (NM_027868.2)	5'-acctcatctgctgtggaagg-3'	59
	5'-gccatgtcagccgaactgtcac-3'	
Trpm6 (NM_153417.1)	5'-gaccataccgtttacaccaatccagc-3'	59
	5'-tgccatgtctgcaccaagag-3'	
Trpm7 (NM_021450.2)	5'-aggctatgctgatgctcttg-3'	60
	5'-attggattggttgacctg-3'	
MagT1 (NM_001190409.1)	5'-gctgaaccacatggtc-3'	59
	5'-cacatcctcttctctcc-3'	
ACDP2 (NM_001102471.1)	5'-tggggagcagcaacaac-3'	59
	5'-atccgagacgccatcaag-3'	
Mrs2 (NM_001013389.1)	5'-ctcccttcaacttttgctg-3'	60
	5'-ccataacataatcccgaacc-3'	
Actb (NM_007393)	5'-cccagagcaagagaggtatc-3'	60
	5'-tcacaatgcctgtgtacga-3'	



**Fig. 1.** Changes of body weight and serum Mg concentration. #P<0.05 Control vs MgD mice.

および突然死が続いていた。1週間のMgレスキュー試験終了後(開始から32日目)、各群のマウス血清を採取し、血清マグネシウム濃度を測定したところ、MgDマウスでは有意にMg濃度が減少しており、Mgレスキューマウス(MgD+Mg)では、ほぼコントロールマウスの血清Mg濃度

にまで回復をしていた(**Fig. 1b**)。

これら各マウスのMg以外の血清成分について、マルチローターII-VEPL(ABAXIS EA)を用いて解析を行ったところ、心筋梗塞の指標となるアスパラギン酸アミトランスフェラーゼ(AST)やクレアチニンキナーゼ(CK)の値が、

MgD マウスにおいて顕著に上昇していることが判明した (Fig. 2a and b)。また、総ビリルビン (TBIL) の値も MgD マウスにおいて有意に上昇していた (Fig. 2h)。MgD+Mg マウスにおいては、AST、CK および TBIL 値はコントロールマウスの値にまで回復していた。一方で、血清中に含まれるナトリウム、カルシウム、カリウム (Fig. 2d, e and f) や、グルコース、血中尿素窒素およびアルブミン (Fig. 2c, g and i) については有意な変化はみとめなかった。以上の結果から、Mg 欠乏によるマウスの突然死は、心筋梗塞由来によるものであることが示唆された。

### 3. 2 心組織の組織化学的検討

血清成分の測定結果より、MgD マウスにおいては心筋梗塞の指標となる AST および CK 値が、コントロールマウ

スおよび MgD+Mg マウスよりも有意に高値を示していたことから、心臓組織における形態学的変化に異常をきたしているものと考え、Haematoxylin・Eosin 染色 (HE 染色) とコラーゲン染色 (Picrosirius red 染色) を行った。HE 染色より、MgD マウスの心筋組織においては、コントロールマウス (Fig. 3a) と比べ、筋繊維構造の破壊が惹起しているような形態が観察された (Fig. 3b)。MgD+Mg マウスでは、一部筋繊維構造が乱れている形態であった (Fig. 3c)。MgD マウスにおいては、特にコントロールマウスと比べ、細胞核の染色が多く観察された。このことは、Mg 欠乏では、炎症状態になることが知られていることから、これら細胞核の染色は、マクロファージや白血球等の血球系細胞の浸潤であることが考えられた。さらに、Picrosirius red 染色を行

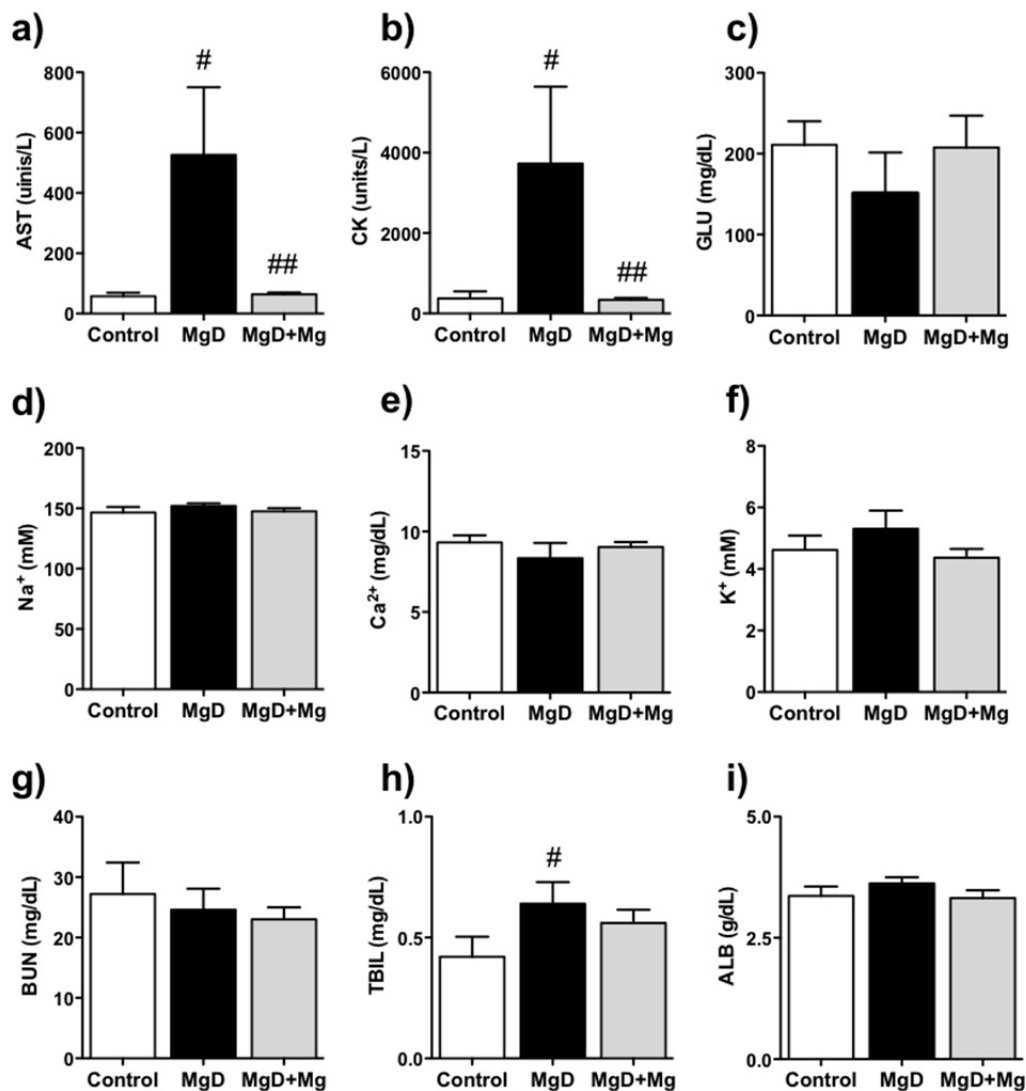


Fig. 2. Analysis of serum markers. #P<0.05 Control vs MgD, ##P<0.05 MgD vs MgD+Mg.

ったところ、コントロールマウスでは、筋繊維に沿ってコラーゲン繊維の存在が認められるが(Fig. 3d)、MgD マウスにおいては、コラーゲン繊維が破壊されている形態が観察された(Fig. 3e)。一方で、MgD+Mg マウスでは一部コラーゲン繊維の形状が回復していた(Fig. 3f)。以上の染色結果から、MgD マウスの心筋組織においては、筋繊維構造の破壊が起きていることが示された。

さらに、微細な構造を観察するために、透過型電子顕

微鏡を用いて心筋組織の観察を行った。Fig. 4 は各マウスの左心室部位の電子顕微鏡観察写真である。Fig. 4a より、コントロールマウスでは、アクチンフィラメントの形状が直線上に、またミトコンドリアもアクチンフィラメントに沿った状態で観察できて、Fig. 4b の MgD マウスにおいては、アクチンフィラメントの破壊がおきており、フィラメントに空隙ができているのが観察される。また、ミトコンドリアにおいてもコントロールと比べ、密度が薄く、またミトコンドリア内クリ

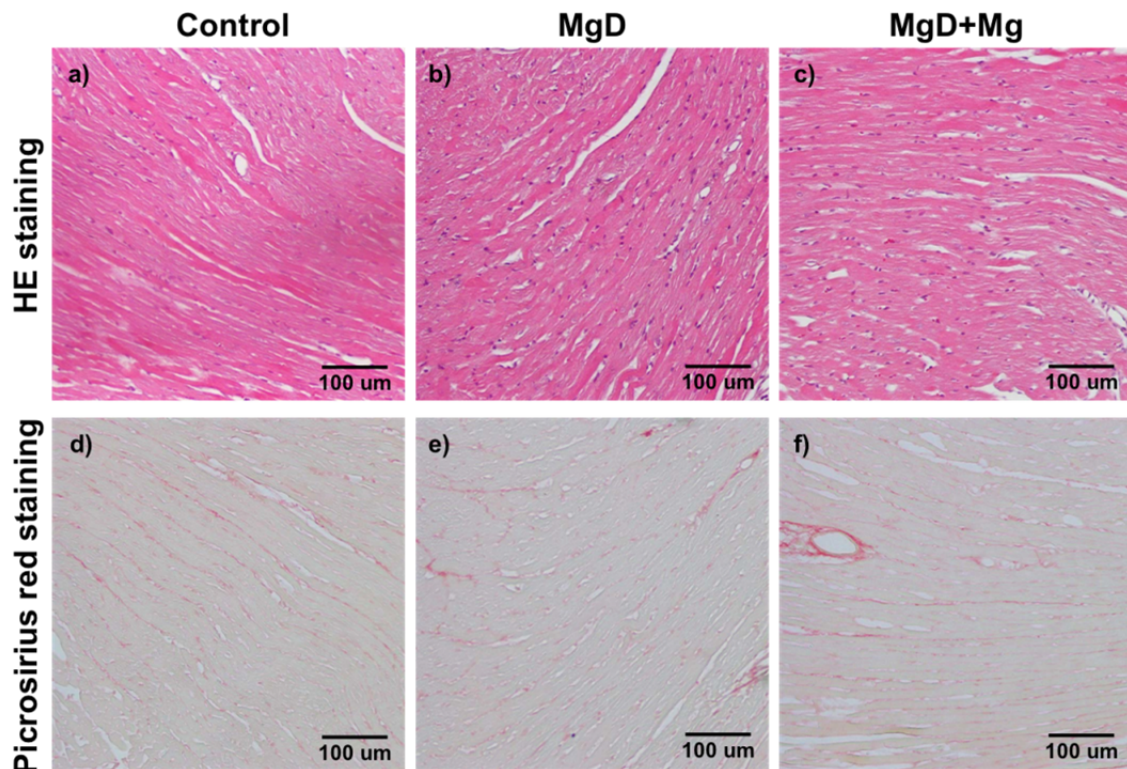


Fig. 3. Histological staining of cardiac muscle

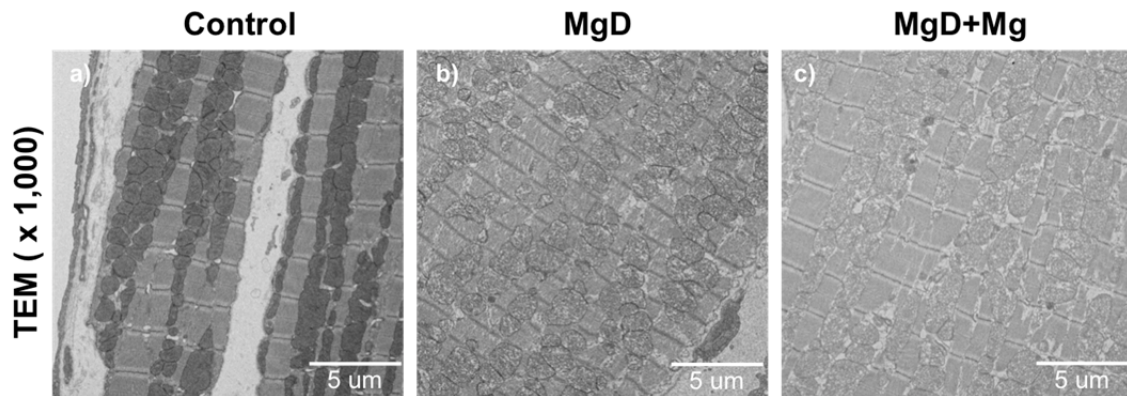


Fig. 4. Electron-microscopic analysis of cardiac muscle

ステの崩壊が観察できた。一方で、MgD+Mg マウスの組織においては、一部アクチンフィラメントの再構築が観察された。Fig. 4c ではミトコンドリアの形態が MgD と同様であるが、観察場所においては、ミトコンドリアが回復している箇所もあった。以上のことから、MgD マウスにおける心筋組織では、アクチンフィラメントの破壊およびミトコンドリアの損傷が観察され、このことが心筋活動に影響を与えているものと考えられた。

### 3.3 心組織における Mg 輸送タンパク質の遺伝子発現解析

これまでの研究成果でもある複数分子同時イメージング装置 (GREI) による心組織の Mg 減少という代謝イメージングの結果と、今回の心筋組織の観察結果から、Mg 欠乏での心筋組織の異常発症に際して、Mg 輸送タンパク質の遺伝子発現が変化しているか、リアルタイム PCR (qRT-PCR) により各 Mg 輸送タンパク質の mRNA 発現量を定量解析した。

現在、Mg 選択的な輸送タンパク質として、Table 2 に示した遺伝子が知られている。

これら遺伝子には、未だ組織発現の検討も成されていないものが含まれているため、はじめにコントロールマウスの心臓における各 Mg 遺伝子の mRNA 発現量を調べた。β-actin を内部標準として使用した。Fig. 5 にその結果を示す。この結果から、Solute carrier family に属する Slc41a1

および 3、Transient receptor ion channel M7 (Trpm7)、Mg transporter 1 (MgT1)、Mammalian ancient conserved domain protein 2 (ACDP2)、および Mitochondrial RNA splicing 2 (Mrs2) の発現を確認した。Slc41a2 および Trpm6 は顕著に低発現であるため、心組織では、上記 6 種類の Mg 輸送タンパク質が、Mg 制御に関与していることが判明した。

次に、この 6 種類の Mg 遺伝子に関して、MgD マウスおよび MgD+Mg マウスにおける mRNA 発現量を qRT-PCR により解析を行い、コントロールマウスの発現量

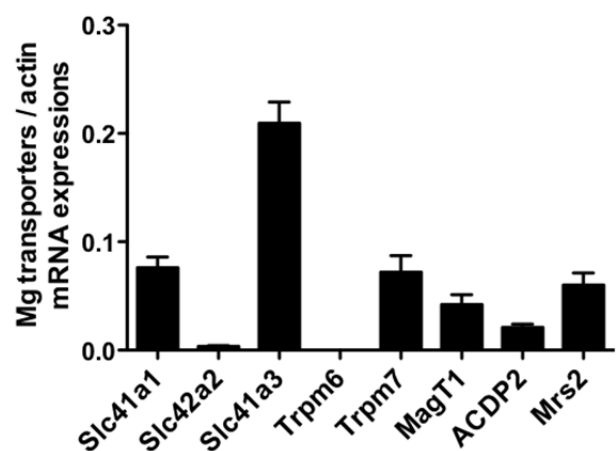


Fig. 5. Gene expression analysis of Mg transporters in cardiac muscle

Table 2. List of Mg transporter family

Transporter	Cell/Tissue	function
Slc41a1	Heart Kidney	Divalent cation uptake
Slc41a2	Kidney	Divalent cation uptake (except for Ca)
Slc41a3	Unknown	Unknown
Trpm6	Renal tubule Vascular smooth muscle cell	Mg uptake into kidney and intestine
Trpm7	Renal tubule Vascular smooth muscle cell Cardiomyocyte	Mg uptake, Cell growth
MagT1	Distal tubules T- cell	Mg uptake
ACDP2	Renal cortex	Divalent cation uptake (except for Ca)
Mrs2	Mitochondrial inner membrane	Mg uptake into mitochondria

に対しての倍率変化を Fig. 6 に示した。この結果から、Slc41a1 は mRNA 発現量に変化は無く (Fig. 6a)、Slc41a3、MgT1、ACDP2 および Mrs2 の mRNA 発現量は MgD マウスにおいて減少していた (Fig. 6b, d, e, and f)。一方で、MgD マウスにおける Trpm7 は、mRNA の発現量が亢進していた (Fig. 6c)。MgD における遺伝子発現に変化のあったものは、MgD+Mg マウスでは、ほぼコントロールマウスの値まで回復していた。以上の結果から、Slc41a3 および Mrs2 以外の Mg 輸送タンパク質は細胞膜に局在していることが知られているため、遺伝子発現が減少していた MgT1、ACDP2 は細胞外からの Mg 取り込みに影響を与えているものと考えられる。Slc41a3 はアミノ酸一次配列の構造上 Mg transporter に分類されているが、細胞内局在や機能に関して未だ不明である。本実験で得られた結果は、Slc41a3 の心筋組織における Mg 輸送などの機能解析につながることを示された。一方で、Mg 欠乏状態では Trpm7 の遺伝子発現が亢進していたため、Trpm7 は Mg の濃度バランスを感知して、その発現量を制御していることが示唆される。Mrs2 はミトコンドリア膜に局在し、ミトコンドリアでの Mg 輸送に関与していることから、電子顕微鏡に

よって観察されたミトコンドリア構造の異常に深く関わっていることが考えられる。

#### 4. まとめ

これまでに、複数核種同時イメージング装置 (GREI; 1999 年に申請者らの研究室が開発) により、にがり成分の Mg の挙動をイメージング像として追跡することに世界で初めて成功した<sup>1)</sup>。この研究成果において、マグネシウム欠乏マウス (MgD) の心組織では、マグネシウム (Mg) の吸収が減少している結果となり、この Mg の吸収減少が、心組織における種々の生理学・生化学的反応における阻害反応を来し、心疾患を発症していることが示された。今回、この研究背景を基に、Mg 欠乏状態での心筋組織における組織学的変化および Mg 輸送タンパク質の遺伝子発現変化について検討を行った。本研究による、Mg 欠乏マウスの心筋組織の形態学的観察において、アクチンフィラメントの構造異常およびミトコンドリアの形態異常が示された。この結果は、Mg 欠乏食により引き起こされる心筋梗塞の発症を裏付ける結果であると考えられた。さらに、Mg 輸送タンパク質の遺伝子発現解析により、細胞膜上に局

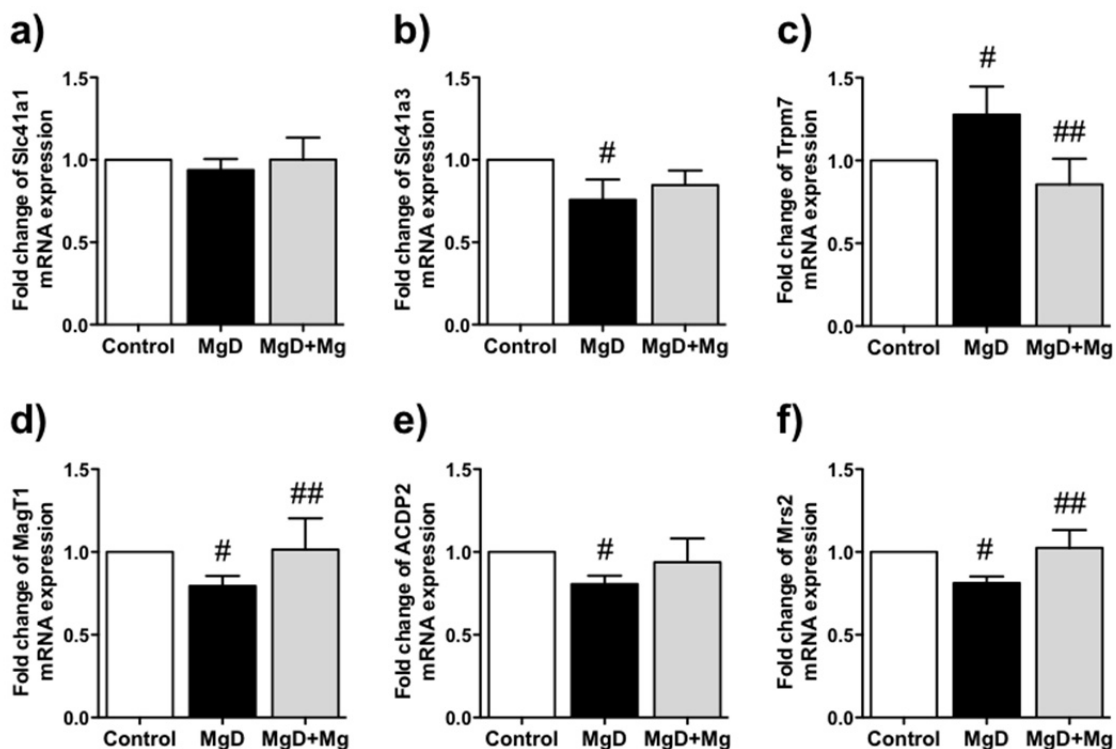


Fig. 6. Analysis of mRNA expression of Mg transporters in cardiac muscle. #P<0.05 Control vs MgD, ##P<0.05 MgD vs MgD+Mg

在する Mg 輸送タンパク質の mRNA 発現の減少が見られた。今回、未だ機能未知である Slc41a3 が心筋組織において発現量が高く、一方で Mg 欠乏状態ではその mRNA の発現量が抑制していたことから、心筋組織の Slc41a3 による Mg 制御の新たな研究展開を指し示す結果を得た。さらに、ミトコンドリア膜に局在する Mrs2 の mRNA 発現レベルが減少する結果を得た。今回観察されたミトコンドリアの形態学的異常は、ミトコンドリア膜での ATP-ADP 交換反応の阻害と同様な結果でもあるため、Mg 欠乏におけるミトコンドリア形態異常は、細胞質内 ATP-Mg 濃度の恒常性破綻とともに Mg 欠乏における Mrs2 の遺伝子発現の抑制も、ミトコンドリアの異常化の一端を担っていることが予想された<sup>2)</sup>。最近の研究では、MgT1 が免疫細胞である T 細胞において、T 細胞受容体リン酸化シグナル伝達に直接関わっていることも判明している<sup>3)</sup>。また、これまでの多くの Mg 研究において Mg 欠乏状態では、酸化ストレスを亢進し、心筋組織内での遊離亜鉛の増加等も報告されている<sup>4,5)</sup>。これらの知見からも、Mg 欠乏では Mg 輸送タンパク質を介したシグナル伝達や、他の生体金属元素への代謝反応へも影響を及ぼしていることから、今後は心疾患発症における Mg の関与を Mg 輸送タンパク質に限らずより多角的に研究を進めていく予定である。

## 参考文献

- 1) Hiromura M., Kanayama T., Enomoto-Igarashi K., Haba H. and Enomoto S. Metabolic interaction of bitter and various trace elements in mice by using multi-tracer technology and gamma-ray emission imaging system (GREI) as a new modality for multiple molecular imaging. *Bull. Soc. Sea Water Sci., Jpn.*, **64**, 196-201 (2010)
- 2) Inoue A., Akada N., Higashikawa K., Watanabe K., Kamino S., Hiromura M. and Enomoto S. Essential role of Mg and Mg transporter in the myocardial infarction of Mg deficient mice. *under preparation*
- 3) Li FY., Chaigne-Delalande B., Kanellopoulou C., Davis JC., Matthews HF., Douek DC., Cohen JL., Yzel G., Su HC. and Lenardo MJ. Second messenger for Mg<sup>2+</sup> revealed by human T-cell immunodeficiency. *Nature* **475**, 471-476 (2011)
- 4) Wolf FI. and Trapani V. Cell (patho) physiology of magnesium. *Clinical Sci.* 114, 27-35 (2008)
- 5) Rubin H. Magnesium: the missing element in molecular views of cell proliferation control. *BioEssay* **27**, 311-320 (2005)



## Basic Study for Metabolisms of Bittern and Biometal in the Heart

Makoto Hiromura<sup>1</sup>, Shuichi Enomoto<sup>2</sup>, Shinichiro Kamino<sup>1</sup>, Ayako Fukunaka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Multiple Molecular Imaging Research Laboratory, RIKEN Center for Molecular Imaging Science

<sup>2</sup> Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

### Summary

Breakdown of biometal's homeostasis are closely contributed pathogenesis of several diseases, such as lifestyle-related disease and cardiac disease. The magnesium (Mg) is essential element for all living organisms as a cofactor for ATP, DNA, RNA, and metabolic enzymes. Recently, the relationship of Mg and cardiac disease has attracted attention. Animals and clinical studies have shown that Mg-deficiency has consequence of cardiac disease. However, molecular mechanisms of Mg on the development of cardiac disease are not well understood. To figure out molecular mechanisms of Mg, we investigated the histological change and the alterations of gene expression of Mg transporter family in the cardiac muscle of Mg-deficient mice.

Mg-deficient mice were fed by Mg-deficient diets (AIN93G MgO free) and distilled water. Control mice were fed by normal diets (AIN93G) and distilled water. Refeeding mice were fed by Mg-deficient diets for 25 days, and then displaced to normal diets for 7 days. Mg concentration or other biomarkers of serum were measured. To analyze the status of cardiac muscle in each group, we performed the histological staining and transmission electron microscopic study. Finally, we analyzed the gene expressions of several Mg transporters in the cardiac muscle of each group by quantitative RT-PCR (qRT-PCR).

Mg-deficient mice showed a significant reduction in serum Mg concentration compared with control mice. The levels of aspartate amino transferase and creatine kinase that are biomarker of myocardial infarction were higher than those of control mice. The structure of cardiac muscle in Mg-deficient mice showed the breakdown of cardiac myofibrillar structure and swelling of the mitochondria with the histological staining and transmission electron microscopic analysis. From qRT-PCR analysis, *Trpm7* mRNA was significantly increased than that of control mice. On the other hand, the mRNA expressions of *Slc41a3*, *MagT1*, *ACDP2* and *Mrs2* of Mg-deficient cardiac muscle were decreased. Our results suggested that ultrastructural alterations in Mg-deficient mice occurred in connection with varying expressions of Mg transporters. In future, we plan to proceed in a more diversified research, but not limited to the involvement of Mg transporter in the onset of heart disease.