

## SLC41 輸送体ファミリーによる $Mg^{2+}$ 調節とその異常が導く病態機序

岩本 隆宏<sup>1</sup>, 喜多 紗斗美<sup>1</sup>, 田頭 秀章<sup>1</sup>, 後藤 雄輔<sup>1</sup>, 荒井 勇二<sup>2</sup>

<sup>1</sup>福岡大学医学部, <sup>2</sup>国立循環器病研究センター分子生物学部

**概要** マグネシウムイオン ( $Mg^{2+}$ ) は生体機能の調節と維持に必須の 2 価カチオンである。実際に、 $Mg^{2+}$  欠乏や  $Mg^{2+}$  代謝異常は、高血圧症や虚血性心疾患、不整脈、胃腸疾患、骨格筋不全など、様々な疾患に関係することが知られている。近年、 $Mg^{2+}$  輸送体の様々な分子実体 (候補遺伝子) が報告されているが、それらの  $Mg^{2+}$  制御機構、生理学的役割および病態学的意義については未だ不明な点が多い。

そこで、私達は、生理学的に重要な  $Mg^{2+}$  輸送体を特定する目的で、C57BL/6J マウスに正常マグネシウム食 (0.2% 含有)、低マグネシウム食 (0.01% 含有) もしくは高マグネシウム食 (0.5% 含有) を 4 週間摂取させて、各種臓器 (大動脈, 心臓, 腎臓, 小腸) における  $Mg^{2+}$  輸送体候補遺伝子の発現変化を調べたところ、TRPM7 ( $Mg^{2+}$  透過チャネル) と同様に、SLC41A1 および SLC41A2 がマグネシウム摂取量依存性に発現変化を示すことを見出した。これら 3 群のマウスでは、血中  $Mg^{2+}$  濃度および尿中  $Mg^{2+}$  排泄量がマグネシウム摂取量に相関して有意に変動していた。また、摘出大動脈標本のフェニレフリン収縮反応を比較したところ、正常マグネシウム食群に比べて、低マグネシウム食群で血管収縮反応の低下が観察された。次に、私達は、SLC41A1 および SLC41A2 の生体  $Mg^{2+}$  制御における機能的役割および病態学的意義を明らかにする目的で、両者の遺伝子欠損マウスを作成した。得られた SLC41A1/SLC41A2 ホモ欠損マウスはともに成獣まで成長し、各種臓器で標的遺伝子を特異的に欠損していることを確認した。これらホモ欠損マウスは、マグネシウム摂取量依存性の血中  $Mg^{2+}$  濃度および尿中  $Mg^{2+}$  排泄量の変動が野生型マウスのそれら変動と異なっており、SLC41A1/SLC41A2 は生理学的に重要な  $Mg^{2+}$  輸送体であることが推定された。また、SLC41A2 ホモ欠損マウス大動脈の血管収縮反応は、野生型マウスの反応に比べて減弱していること、さらに、高マグネシウム食負荷によりその血管収縮反応が回復することも観察した。

このように、SLC41A1/SLC41A2 は血管機能調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。SLC41A1/SLC41A2 ホモ欠損マウスは、 $Mg^{2+}$  代謝異常症の新規モデル動物として有用であると考えられた。

### 1. 研究目的

生体内マグネシウムイオン ( $Mg^{2+}$ ) は、消化管での吸収、腎での排泄および骨・筋での代謝により収支バランスが取られており、細胞外  $Mg^{2+}$  濃度 (遊離イオン) は 0.7~0.9 mM に調節されている。一方、細胞内  $Mg^{2+}$  濃度は 0.5~1.0 mM であり、細胞内外の  $Mg^{2+}$  濃度はほぼ等しく制御されている。また、その機能として、ATP の活性化に必須な因子であり、筋肉の収縮、アミノ酸合成、そして核酸合成や遺伝子発現など細胞の成長・進化の過程

で重要な 2 価カチオンであることが知られている。実際に、 $Mg^{2+}$  欠乏や  $Mg^{2+}$  代謝異常は、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性アシドーシス、不整脈、筋収縮不全、肝硬変など、様々な疾患に関係することが知られている<sup>(1)</sup>。また、心血管疾患の重要な因子に成り得ることも報告されている<sup>(2)</sup>。しかしながら、生体  $Mg^{2+}$  の分子制御機構、生理学的役割および病態学的意義については未だ不明な点が多い。

近年、 $Mg^{2+}$  輸送体の分子実体 (候補遺伝子)

がいろいろと報告されている<sup>(3, 4)</sup>。SLC41 輸送体ファミリーは  $Mg^{2+}$  輸送体の一種であり、 $Mg^{2+}$  流入や  $Na^+$  依存性  $Mg^{2+}$  排出に関わる可能性が示唆されているが、その機能的役割については未だ明確になっていない。最近、SLC41 同族体の細菌 MgtE が  $Mg^{2+}$  結合ドメインを持つ  $Mg^{2+}$  トランスポーター (もしくは  $Mg^{2+}$  チャネル) であることが構造解析により証明された<sup>(5)</sup>。SLC41 輸送体には、3種の分子種 (SLC41A1 ~ SLC41A3) が存在している。SLC41A1 と SLC41A2 は幅広く臓器に発現しているが、特に SLC41A1 は心臓、腎臓に、SLC41A2 はリンパ節、平滑筋、肺に高発現している。なお、SLC41A3 については、mRNA の発現は各臓器で認められるものの、論文報告は未だほとんどない。カエル卵母細胞発現系において、SLC41A1 と SLC41A2 による  $Mg^{2+}$  電流 ( $Mg^{2+}$  流入) が確認されている<sup>(6)</sup>。一方、HEK293 細胞発現系では、SLC41A1 による  $Na^+/Mg^{2+}$  交換輸送活性 ( $Mg^{2+}$  排出) が観察されている<sup>(7)</sup>。そこで、本研究では、独自に作製した SLC41A1、SLC41A2 ホモ欠損マウスを用い、SLC41 輸送体ファミリーの生体  $Mg^{2+}$  制御における機能的役割、特に、心血管機能維持における生理学的病態学的役割を解明したいと考えている。

## 2. 研究方法

### 2.1 SLC41A1 および SLC41A2 欠損マウスの作製

SLC41A1、SLC41A2 遺伝子欠損マウスを独自に作製し、ホモ欠損マウスを樹立した。ホモ欠損マウス大動脈における各種  $Mg^{2+}$  輸送体の発現を real-time PCR で調べたところ、標的 SLC41 分子種の特異的欠損を確認した。対象とした他の  $Mg^{2+}$  輸送体 (TRPM7, MagT1, ACDP2) の代償的变化は認められず、これらホモ欠損マウスを使用することで、SLC41A1 および SLC41A2 分子種の機能的役割が特異的に解析できるものと考えられた。これら SLC41A1、SLC41A2 ホモ欠損マウスでは、血中  $Mg^{2+}$  濃度および尿中  $Mg^{2+}$  排泄量の変動が野生型マウスと異なっていた。

### 2.2 マグネシウム変動食の負荷実験

8-12 週齢の C57BL/6J マウス (野生型) および SLC41A1、SLC41A2 遺伝子欠損マウスを正常マグネシウム食 (0.2% 含有)、低マグネシウム食 (0.01% 含有)、高マグネシウム食 (0.5% 含有) で 4 週間飼育した後、各種臓器を摘出し、血管機能測定および生化学的解析を行った。

### 2.3 摘出血管機能測定

マウスから大動脈を摘出し、長さ 2 mm のリング標本を作製した。混合ガスで酸素化した Krebs-Ringer 緩衝液で満たしたオーガンバス内に懸垂した後、1.0 g の静止張力下で 30 分以上安定化させた。血管反応は高 K 緩衝液の収縮反応を測定し、洗浄後、フェニレフリン ( $10^{-9}$ – $10^{-5}$  M) の収縮反応を測定した。なお、測定装置には シグナルコンディショナー (model SC20AZ-4, ラボサポート社) およびマイクロティッシュオーガンバス (MTOB-1Z, ラボサポート社) を用いた。

### 2.4 Real-time PCR

各組織から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出後、QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) にて逆転写を行い、cDNA を抽出した後、SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN) を用いて Real-time PCR を行った。相対的な遺伝子量は比較 Ct 法により検討し、GAPDH 量を基準とした。

### 2.5 統計学的手法

データは、平均±標準誤差で表し、 $p < 0.05$  で統計学的有意とした。解析には、ANOVA、post hoc test として Tukey's test により検定処理した。

## 3. 研究結果

### 3.1 各種 $Mg^{2+}$ 輸送体発現量に及ぼすマグネシウム変動食の影響

C57BL/6J マウス (野生型) に、正常マグネシウム食 (0.2% 含有)、低マグネシウム食 (0.01% 含有) もしくは高マグネシウム食 (0.5% 含有) を 4 週間摂取させて、各種臓器 (大動脈、腎臓、小腸) における  $Mg^{2+}$  輸送体候補遺伝子の発現変化を調べたところ、小腸においては、SLC41A1 発現量、腎臓にお

いては SLC41A2 発現量が、血管における TRPM7 発現量と同様にマグネシウム摂取量依存性に発現変化を示すことを見出した (Fig. 1)。

### 3.2 マウス大動脈血管収縮反応に及ぼすマグネシウム変動食の影響

マグネシウム変動食による血管機能変化を検討する目的で、大動脈標本のフェニレフリン収縮反

応を解析した。興味深いことに、低マグネシウム食負荷したマウス大動脈において、フェニレフリン収縮反応の有意な低下が観察された (Fig. 2)。一方、高マグネシウム食負荷では有意な変化は認められなかった。なお、高 K<sup>+</sup>刺激の血管収縮反応は全ての群で類似していた。

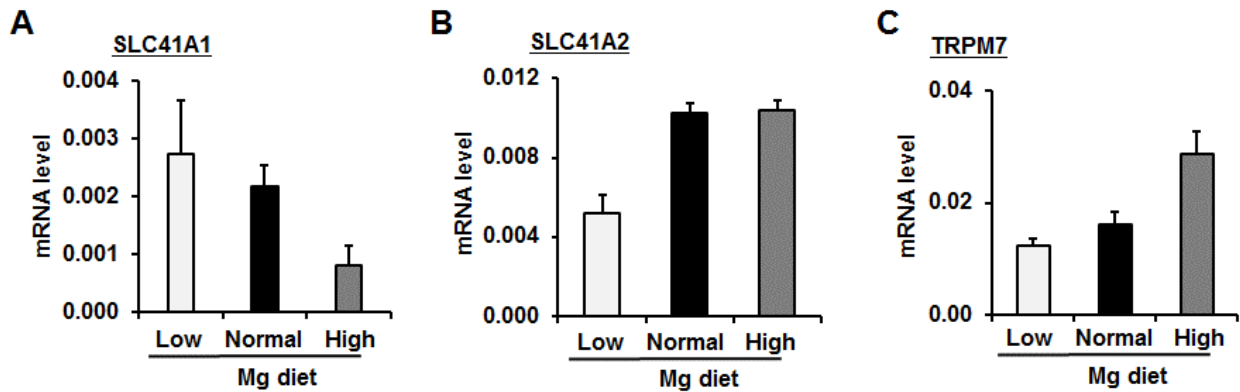


Fig. 1. マグネシウム変動食による各種 Mg<sup>2+</sup>輸送体発現量の変化

(A)小腸において SLC41A1、(B)腎臓において SLC41A2、(C)血管において TRPM7 のマグネシウム摂取量依存性の発現変化が観察された。

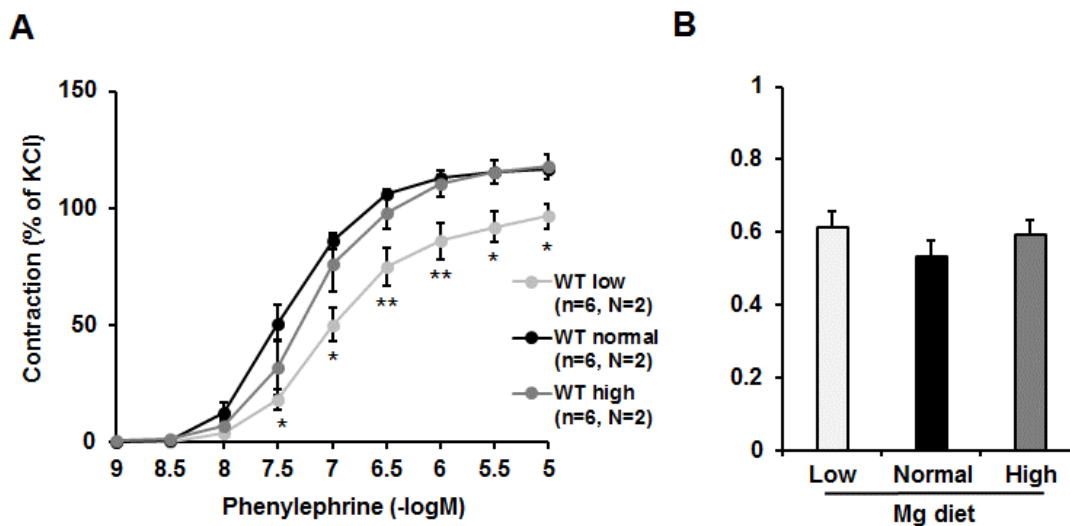


Fig. 2. マウス大動脈標本のフェニレフリン収縮反応に対するマグネシウム変動食影響

(A) 高マグネシウム食負荷ではフェニレフリン収縮反応の変化が認められないのに対し、低マグネシウム食負荷ではフェニレフリン収縮反応の有意な低下が観察された。(B) 高 K<sup>+</sup>刺激による収縮反応には、変化が認められなかった。

\*:p<0.05, \*\*:p<0.01 vs. Normal Mg

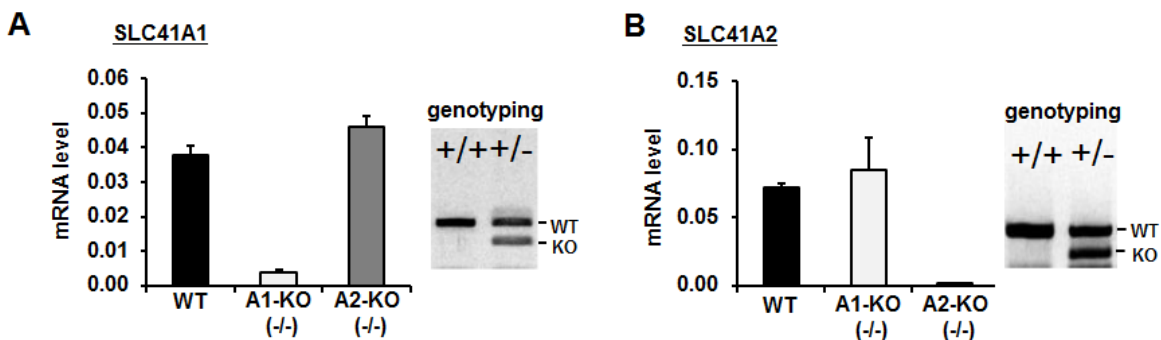
### 3.3 SLC41A1、SLC41A2 ホモ欠損マウスの血管収縮反応の比較

SLC41A1、SLC41A2 ホモ欠損マウスはともに成獣まで成長し、各種臓器で標的遺伝子の特異的に欠損していることを確認した(**Fig. 3**)。これらマウスの大動脈標本の血管反応性を比較したところ、SLC41A2 ホモ欠損マウスにおいて、フェニレフリン収縮反応が有意に低下していることを見出した(**Fig. 4**)。一方、SLC41A1 ホモ欠損マウスにおいては、野生型マウスと比較し変化が認められなかった。なお、高  $K^+$ 刺激の血管収縮反応は両マウス

ともに野生型マウスと類似していた。

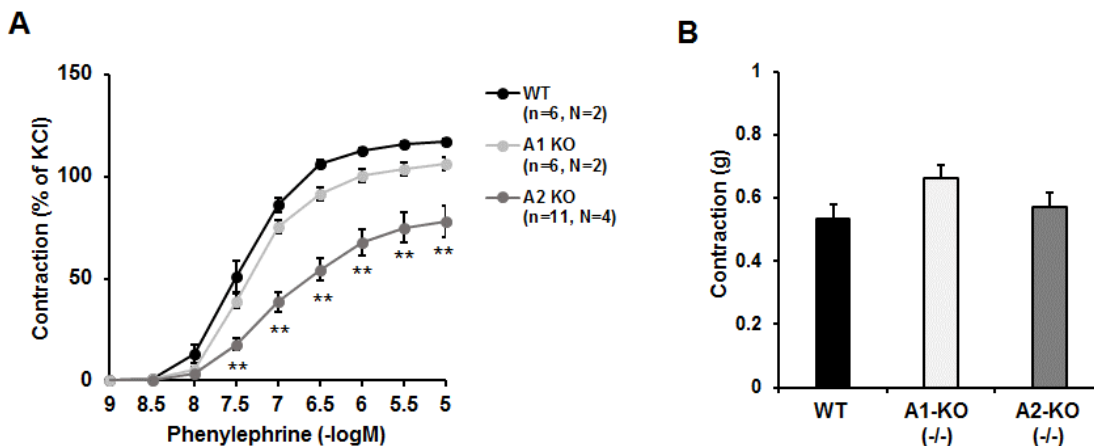
### 3.4 SLC41A1、SLC41A2 ホモ欠損マウスの血管収縮反応に及ぼすマグネシウム変動食の影響

SLC41A1 ホモ欠損マウスでは、野生型マウスと同様に、低マグネシウム食負荷によるフェニレフリン収縮反応の有意な低下が認められた(**Fig. 5**)。また、SLC41A2ホモ欠損マウスでは、正常マグネシウム食負荷においてフェニレフリン収縮反応が既に低下しているが、低マグネシウム食負荷によりフェニレフリン収縮反応のさらなる低下は観察されなかつた。



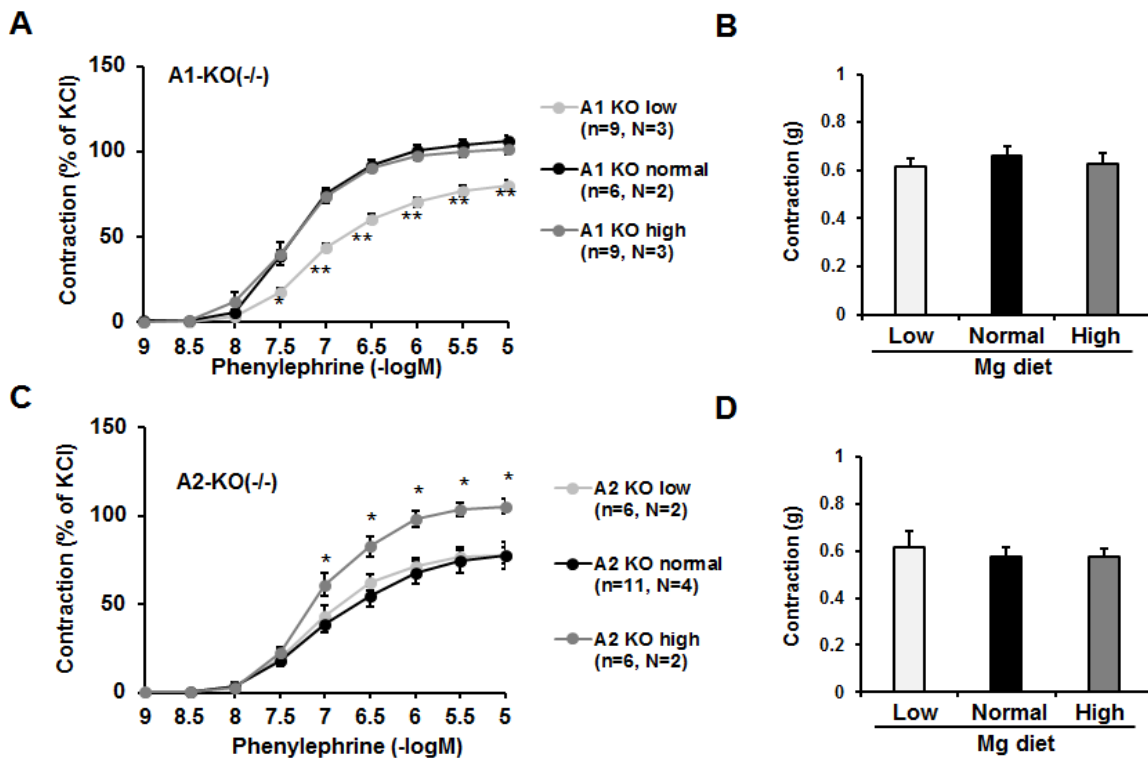
**Fig. 3.** SLC41A1、SLC41A2 ホモ欠損マウスの発現解析

SLC41A1、SLC41A2 ホモ欠損マウスにおいて、各種臓器(A,B は大動脈の結果)で標的遺伝子の特異的に欠損していることを確認した。



**Fig. 4.** SLC41A1、SLC41A2 ホモ欠損マウスの大動脈標本におけるフェニレフリン収縮反応

(A) SLC41A1 ホモ欠損マウスにおいては野生型マウス(WT)とほぼ同様の血管収縮反応が認められたのに対し、SLC41A2 ホモ欠損マウスにおいては血管収縮反応が有意に低下した。(B) 高  $K^+$ 刺激による収縮反応には、有意な変化が認められなかった。 \*\*:p<0.01 vs. WT



**Fig. 5.** SLC41A1、SLC41A2 ホモ欠損マウスのフェニレフリン収縮反応に対するマグネシウム変動食の影響  
 (A) SLC41A1 ホモ欠損マウスにおいて、低マグネシウム食負荷によるフェニレフリン収縮反応の低下が観察された。(C) SLC41A2 ホモ欠損マウスにおいては、低マグネシウム食負荷マウスによるフェニレフリン収縮反応の低下は認められず、高マグネシウム食負荷によるフェニレフリン収縮反応の増大が見られた。(B, D) 高K<sup>+</sup>刺激による収縮反応には、それぞれの群において変化が認められなかった。\*:p<0.05, \*\*:p<0.01 vs. Normal Mg

った。一方、高マグネシウム食負荷では、フェニレフリン収縮反応の有意な増大が見られた (Fig. 5)。なお、高 K<sup>+</sup>刺激による収縮反応には、それぞれの群において変化が認められなかった。

#### 4. 考察

申請者らは、これまでに、Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換輸送体(NCX)の遺伝子改変マウスや特異的阻害薬を開発・応用することにより、塩分摂取や交感神経亢進による高血圧症や狭心症<sup>(8)</sup>、膵島細胞移植後の早期膵島障害<sup>(9)</sup>、脳虚血再灌流障害<sup>(10)</sup>にNCX1を介するCa<sup>2+</sup>流入が関与することを明らかにしてきた。さらに研究を進展させる目的で、生体Mg<sup>2+</sup>の生理学的・病態学的意義に着目し、Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup>交換輸送体の分子実体の解明に興味を持って調査していたところ、「SLC41A1はNa<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup>交換輸送活性を有する」との論文報告を見出した<sup>(7)</sup>。しかし、この報告

はSLC41A1の高発現細胞(HEK293)を用いてNa<sup>+</sup>依存性Mg<sup>2+</sup>輸送活性を測定した内容であり、さらに生理的な条件で検証する必要があると考えられた。そこで、本研究では、SLC41A1ならびにSLC41A2の遺伝子欠損マウスを用いて、これらSLC41分子種のMg<sup>2+</sup>輸送特性を生理的な組織・細胞レベルで解析するとともに、その生理学的役割や病態学的意義について詳細に解析することにした。

まず、申請者らはSLC41A1、SLC41A2遺伝子欠損マウスを独自に作出し、両ホモ欠損マウスがともに成獣まで成長することを確認した。両ホモ欠損マウスの各臓器における各種Mg<sup>2+</sup>輸送体の発現をreal-time PCRで調べたところ、それぞれの標的SLC41分子種が特異的に欠損していることを観察した。対象とした他のMg<sup>2+</sup>輸送体(TRPM7, MagT1, ACDP2)の代償的变化は認められず、これらホモ欠損マウスを使用することで、SLC41A1および

SLC41A2 分子種の機能的役割が特異的に解析できるものと考えられた。また、予備的検討であるが、SLC41A1、SLC41A2 ホモ欠損マウスの血中  $Mg^{2+}$ 濃度、尿中  $Mg^{2+}$ 排泄量の動態を解析したところ、野生型マウスとは異なる動態を示すことを見出している。この結果は、SLC41A1、SLC41A2 が  $Mg^{2+}$ 代謝に影響を及ぼす輸送体であることを示唆しており、これらホモ欠損マウスを用いることにより、生体  $Mg^{2+}$ 制御における SLC41 輸送体の機能的役割や病態学的意義が多角的に解析できるものと考えられた。

本研究において、以下の実験結果を得た。1) マグネシウム変動食の負荷実験により、SLC41A1 および SLC41A2 の発現量はマグネシウム摂取量依存性に変化することを見出した。2) 低マグネシウム食負荷により、野生型マウス大動脈のフェニレフリン収縮反応が低下した。3) SLC41A2 ホモ欠損マウスでは、大動脈のフェニレフリン収縮反応が低下していた。また、その収縮反応は高マグネシウム食負荷により回復することを見出した。4) SLC41A1 ホモ欠損マウスでは、野生型マウスと同様に、低マグネシウム食負荷により、大動脈のフェニレフリン収縮反応が低下した。これらの結果より、SLC41A1、SLC41A2 は  $Mg^{2+}$ 依存性遺伝子であること、血管平滑筋収縮機能はマグネシウム依存性に制御されること、特に、SLC41A2 はそのマグネシウム依存性血管収縮機能制御に重要な役割を果たす可能性があること、が示唆された。これらの成果は、SLC41A1、SLC41A2 ホモ欠損マウスを用いて見出された新知見である。

マグネシウム異常症、特に低マグネシウム血症は臨床的に頻度の高い病態であり、その症状としては、脱力や振戦などの神経筋系の症状や不整脈を合併することが知られている。一方、高マグネシウム血症は低頻度であるが、慢性腎不全患者において合併しやすく、重篤になることが多いと言われている。本研究で作製した SLC41A1、SLC41A2 ホモ欠損マウスは、マグネシウム摂取量依存性の血中  $Mg^{2+}$ 濃度の変動が野生型マウスと異なっており、SLC41A1 および SLC41A2 は生理学的に重要な  $Mg^{2+}$ 輸送体であることが推定された。また、興味深いことに、SLC41A2 ホモ欠損マウスでは血管反応性の低下および腎機能の低下(未発表)が観察された。現在、これらの分子機序について解析中であるが、今後さらに、これらホモ欠損マウスを用いて、SLC41A1 および SLC41A2 の  $Mg^{2+}$

輸送体としての生理学的・病態学的役割を解析していく予定である。

## 5. 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を頂いた公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に厚く御礼申し上げます。

## 6. 文献等

1. Jahnhen-Dechent T, Ketteler M. Magnesium basics. **Clin Kidney J.** 5 (Suppl 1): i3-i14, 2012.
2. Touyz RM. Transient receptor potential melastatin 6 and 7 channels, magnesium transport, and vascular biology: implications in hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 294(3):H1103-H1118, 2008.
3. Yogi A, Callera GE, Antunes TT, Tostes RC, Touyz RM. Vascular biology of magnesium and its transporters in hypertension. **Magnes Res.** 23(4):S207-S215, 2010.
4. Ferrè S, Hoenderop JG, Bindels RJ. Insight into renal  $Mg^{2+}$  transporters. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 20(2):169-176, 2011.
5. Hattori M, Tanaka Y, Fukai S, Ishitani R, Nureki O. Crystal structure of the MgtE  $Mg^{2+}$  transporter. **Nature.** 448(7157):1072-1075, 2007.
6. Goytain A, Quamme GA. Functional characterization of the mouse solute carrier, SLC41A2. **Biochem Biophys Res Commun.** 330(3):701-705, 2005.
7. Kolisek M, Nestler A, Vormann J, Schweigel-Röntgen M. Human gene SLC41A1 encodes for the  $Na^{+}/Mg^{2+}$  exchanger. **Am J Physiol Cell Physiol.** 302(1): C318-C326, 2012.
8. Iwamoto T, Kita S, Zhang J, Blaustein MP, Arai Y, Yoshida S, Wakimoto K, Komuro I, Katsuragi T. Salt-sensitive hypertension is triggered by  $Ca^{2+}$  entry via  $Na^{+}/Ca^{2+}$  exchanger type-1 in vascular smooth muscle. **Nat Med.** 10(11): 1193-1199, 2004.
9. Mera T, Itoh T, Kita S, Kodama S, Kojima D, Nishinakamura H, Okamoto K, Ohkura M, Nakai J, Iyoda T, Iwamoto T, Matsuda T, Baba A, Omori K, Ono J, Watarai H, Taniguchi M, Yasunami Y. Pretreatment of

donor islets with the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger inhibitor improves the efficiency of islet transplantation. **Am J Transplant.** 13(8): 2154-2160, 2013.

10. Morimoto N, Kita S, Shimazawa M, Namimatsu H, Tsuruma K, Hayakawa K, Mishima K, Egashira N, Iyoda T, Horie I, Gotoh Y, Iwasaki K, Fujiwara M,

Matsuda T, Baba A, Komuro I, Horie K, Takeda J, Iwamoto T, Hara H. Preferential involvement of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger type-1 in the brain damage caused by transient focal cerebral ischemia in mice. **Biochem Biophys Res Commun.** 429(3-4): 186-190, 2012.

## Regulation of Cellular Mg<sup>2+</sup> by SLC41 Family and Pathological Mechanism for Its Abnormality

Takahiro Iwamoto<sup>1</sup>, Satomi Kita<sup>1</sup>, Hideaki Tagashira<sup>1</sup>, Yusuke Gotoh<sup>1</sup>, Yuji Arai<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Fukuoka University,

<sup>2</sup>Department of Bioscience and Genetics, National Cerebral and Cardiovascular Center

### Summary

Mg<sup>2+</sup> is an important divalent cation and plays an essential role in various cellular functions, such as cellular energy metabolism, ion channel activity, and enzyme activity. Mg<sup>2+</sup> homeostasis primarily depends on the balance between intestinal absorption and renal excretion. Mg<sup>2+</sup> deficiency or abnormal Mg<sup>2+</sup> metabolism is related to various cardiovascular diseases. Recently, various candidate genes of Mg<sup>2+</sup> transporter are reported, but their functional roles are still well unknown. We first treated mice with three kinds of magnesium diets (low-magnesium diet, normal-magnesium diet, or high-magnesium diet) for 4 weeks, and found that the expression levels of SLC41A1 and SLC41A2 in aorta were dependent on the Mg<sup>2+</sup> intake. Therefore, the aim of the present study is to determine the physiological roles of SLC41A1 and SLC41A2. We also found that phenylephrine-induced contraction was reduced in isolated aorta from low-magnesium-fed mice. Furthermore, we next generated SLC41A1/SLC41A2-knockout mice. Interestingly, phenylephrine-induced contraction was reduced in isolated aorta from SLC41A2-knockout mice fed with normal-magnesium diet. When SLC41A2-knockout mice were treated with high-magnesium diet, the phenylephrine-induced contraction was recovered. These results suggest that SLC41A1/SLC41A2 play an important role in vascular function. Further work will be required to define the pathological role of SLC41A1/SLC41A2 in cardiovascular diseases.