

## 細胞膜と細胞内顆粒に局在する排出型マグネシウム輸送体の活性解析

加藤 明

東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター

**概要** 海水魚は約 50 mM もの  $Mg^{2+}$  を含む海水中に生息しており、常に  $Mg^{2+}$  過剰摂取の危機に曝されている。海水魚は海水環境で体液  $Mg^{2+}$  の恒常性を維持するために腎尿細管を介して尿中に  $Mg^{2+}$  を活発に分泌し、約 150 mM にまで濃縮して排出する事が知られる。海水魚腎臓の解析から、我々は排出型  $Mg^{2+}$  輸送体として solute carrier family 41 member 1 (Slc41a1) 及び cyclin and CBS domain divalent metal cation transport mediator 3 (Cnnm3) を同定し、海水魚の近位尿細管による  $Mg^{2+}$  排出モデルを世界に先駆けて提案した。興味深いことに Slc41a1 は細胞内顆粒に、Cnnm3 は細胞膜に局在していた。ヒト細胞では、細胞内遊離  $Mg^{2+}$  濃度は膜電位から算出される電気化学的平衡の 1/200 以下の濃度に維持される。細胞は  $Mg^{2+}$  を細胞質から細胞外に排出し続けることで細胞内遊離  $Mg^{2+}$  濃度を低く維持しているが、動物細胞の細胞膜に存在する排出型  $Mg^{2+}$  輸送体の分子実体は長い間謎であった。近年、Slc41 ファミリーや Cnnm ファミリーを介した  $Mg^{2+}$  排出の報告が国内外から相次いで報告され、ホットな研究分野になりつつある。

そこで本研究ではヒトと海水魚の Slc41 及び Cnnm ファミリーをアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、 $Mg^{2+}$  輸送活性の解析を試みた。イオン選択性微小電極法、二電極電位固定法、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) によりアフリカツメガエル卵母細胞の細胞内遊離イオン活性、細胞外  $Mg^{2+}$  依存的膜電流、細胞内イオン含量を解析する実験系を構築することに成功し、現在、Slc41 や Cnnm ファミリーによる  $Mg^{2+}$  排出活性の特徴を明らかにすべく解析を進めている。

### 1. 研究目的

$Mg^{2+}$  は細胞内液で 3 番目、細胞外液で 4 番目に多い陽イオンであり、細胞の生存に不可欠である。一方、体内の  $Mg^{2+}$  代謝機構は不明な点が多く、生理学に残された大きな疑問の一つとなっている。動物細胞において細胞内遊離  $Mg^{2+}$  濃度は膜電位から算出される電気化学的平衡の 1/200 以下に維持されているが、 $Mg^{2+}$  を排出して細胞内  $Mg^{2+}$  を低く維持する分子機構は特に謎が多い。海水は多量に  $Mg^{2+}$  を含むことから「高  $Mg^{2+}$  環境」であると捉えることができ、その中で生息する真骨魚類は尿中に  $Mg^{2+}$  を積極的に分泌・濃縮する仕組みを発達させてきたことから  $Mg^{2+}$  排出機構を考える上で比較生理学上、興味深い動物モデルとなっている<sup>9)</sup>。

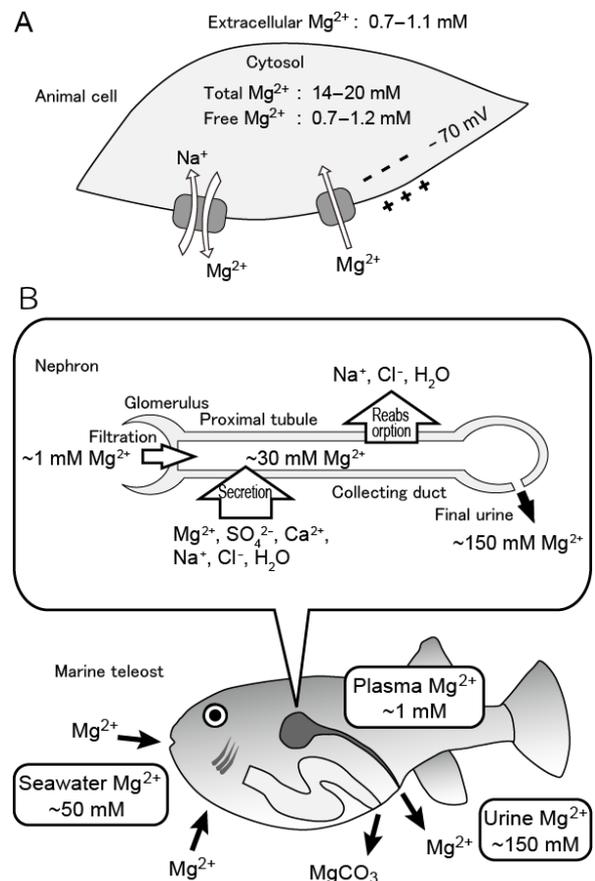
海水にはモル濃度で約 50 mM もの  $Mg^{2+}$  が含まれる。これは日本人にとっては豆腐の凝固剤「にがり」の主成分としてなじみ深く、 $Na^+$  の約 1/10 の濃度に相当する。海に生

息する多くの無脊椎動物やヌタウナギは海水と同程度～約半分の濃度の  $Mg^{2+}$  を体液中に有し、細胞は 10～50 mM もの  $Mg^{2+}$  を含む体液の中で正常に機能する。一方、海に生息する真骨魚類(以下、海水魚と記す)の血漿に含まれる  $Mg^{2+}$  は、哺乳動物と同じレベルに維持されている。海水魚の尿には 150 mM もの  $Mg^{2+}$  が含まれることから<sup>17)</sup>、海水魚の主要な  $Mg^{2+}$  排出器官は腎臓であることが知られている(Fig. 1B)。Beyenbach は海水魚から単離した尿細管に充填したミネラルオイルの中に形成された水層の間隙の形成・成長を解析し、海水魚の近位尿細管が活発に分泌液(原尿)を管腔内に分泌すること、その分泌液は平均 26 mM の  $Mg^{2+}$  を含むことなどを明らかにした<sup>1)</sup>。海水魚の腎臓では糸球体濾過はあまり活発でなく、尿細管分泌の原尿形成に対する寄与が大きい。したがって  $Mg^{2+}$  排出においても尿細管分泌が重要な役割を担う。

イオンは強い電荷を有するため、一般に脂質膜をほとんど透過しない。したがって  $Mg^{2+}$  の膜輸送は膜タンパク質を介して行われる。これまで  $Mg^{2+}$  を輸送するタンパク質はさまざまな生物種から同定され、近年、その数が増加した<sup>(3)</sup>。  $Mg^{2+}$  輸送体は主にチャネル(ユニポーター)、交換輸送体、ATPase に分類される<sup>(9)</sup>。細胞は一般的に負の膜電位を有することから、  $Mg^{2+}$  チャネルの活性化は  $Mg^{2+}$  の取り込みにつながる。したがって  $Mg^{2+}$  を細胞内に取り込む経路の主役は  $Mg^{2+}$  チャネルであると考えられている (Fig. 1A)。  $Mg^{2+}$  チャネルの中には細胞内  $Mg^{2+}$  濃度を検出して開閉を制御するシステムを有するものも報告されており、細胞内  $Mg^{2+}$  濃度の主要な調節因子となっている。一方、交換輸送体はカウンターイオンの濃度勾配を利用して  $Mg^{2+}$  を細胞内から細胞外や内膜の内腔に輸送することができる。動物細胞において  $Mg^{2+}$  を外に排出する輸送体の主力は  $Na^+/Mg^{2+}$  交換輸送体であると考えられている<sup>(3)</sup>。1989年、Maguireらのグループは高濃度  $Mg^{2+}$  要求性の *大腸菌*・*サルモネラ* 菌株を樹立し、それらを相補する因子として *CorA*, *CorB*, *CorC*, *CorD*, *MgtA*, *MgtB*, *MgtE* を同定した<sup>(13)</sup>。これらのホモログをコードする遺伝子は酵母や脊椎動物などの真核生物にも広く存在する。TRP (transient receptor potential) チャネルファミリーは陽イオンチャネルのファミリーとして知られ、  $Mg^{2+}$  恒常性への寄与が哺乳動物、シロウジョウバエ、線虫などで報告されている<sup>(15)</sup>。GoytainとQuammeらは低  $Mg^{2+}$  培地で培養したマウス尿細管由来上皮細胞の発現解析などから  $Mg^{2+}$  輸送体を探索し、MagT (magnesium transporter), NIPA (nonimprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome), MMgTs (membrane  $Mg^{2+}$  transporters), HIP14 (Huntingtin-interacting protein)などを新たに同定した<sup>(14)</sup>。家族性低マグネシウム血症の連鎖解析から *claudin-16* (*paracellin-1*)と *claudin-19* の変異が同定され、これらのタンパク質により形成される密着結合 (tight junction) は  $Mg^{2+}$  の傍細胞輸送を担うことも明らかにされている<sup>(6)</sup>。植物では哺乳類  $Na^+/Ca^{2+}$  交換輸送体 (NCX) のホモログの解析から、液胞膜に局在する  $Mg^{2+}/H^+$  交換輸送体 (*AtMHX*) が同定されている<sup>(16)</sup>。

脊椎動物における  $Mg^{2+}$  排出の分子機構を明らかにするため、我々は比較モデルとして海水魚腎臓の解析を行った。動物モデルとしてはトラフグ (*Takifugu rubripes*) とそ

の近縁種メフグ (*Takifugu obscurus*) を選定した。海水魚のトラフグは2002年に脊椎動物としてはヒトに次いで2番目にゲノム解読が完了している。メフグはトラフグの近縁種であるが、産卵のために中国や韓国の河川を遡上し、淡水・海水のどちらでも生息することができる<sup>(10)</sup>。淡水・海水のどちらでも生息できる広塩性魚類は淡水・海水で飼育した時の遺伝子発現の変化を同種内で比較できるため、分子モデルの解析を行う上で都合が良い。両種の遺伝子配列は非翻訳領域を含めて99%一致しており、比較的最近種分岐したと考えられている<sup>(19)</sup>。公開されていたトラフグゲノム配列から  $Mg^{2+}$  輸送体の候補を網羅的に同定し、それらの組織発現や淡水・海水順応時の発現量の変化を解析したところ、メフグ腎臓においては *Slc41a1* と *Cnnm3* の発現が海水適応時に上昇し、 *Cnnm2* の発現が淡水適応時



**Fig. 1.**  $Mg^{2+}$  homeostasis of animal cell and marine teleost. (A)  $Mg^{2+}$  influx channel and efflux exchanger involved in  $Mg^{2+}$  homeostasis in animal cell. (B)  $Mg^{2+}$  homeostasis of marine teleost living in excess  $Mg^{2+}$  environment and renal tubular  $Mg^{2+}$  secretion.

に上昇することを見出した。免疫組織化学による解析の結果、Slc41a1 は近位尿細管細胞の細胞内顆粒膜に、Cnm3 は同じ近位尿細管細胞の側底膜(basolateral 膜)に局在する事が明らかとなった。海水魚腎臓の近位尿細管の細胞内には  $Mg^{2+}$  を高濃度を含む顆粒の存在が報告されていたことから<sup>(2)</sup>,  $Mg^{2+}$  排出には顆粒の開口放出が関与し、Slc41a1 が顆粒内への  $Mg^{2+}$  の蓄積を担うことが示唆された<sup>(7, 8)</sup>。これらの結果は、細胞膜と細胞内顆粒にそれぞれ局在する  $Mg^{2+}$  輸送体による  $Mg^{2+}$  排出機構が海水魚の腎臓以外の細胞やヒトの細胞にも存在することを示唆している。これらの知見を踏まえ、本研究では様々な臓器に発現する海水魚とヒトの Slc41 及び Cnm ファミリーの活性解析を試みた。

## 2. 研究方法

### 2.1 $Mg^{2+}$ 輸送体の発現解析

ヒトとフグの  $Mg^{2+}$  輸送体全長 cDNA を得るために、様々な臓器における Slc41 ファミリー、Cnm ファミリーの発現解析を RT-PCR により行った。ヒトの各臓器由来の total RNA はクロンテックより購入した。海水飼育したトラフグ、海水飼育したメフグ、淡水飼育したメフグの各臓器由来の total RNA は Isogen RNA 抽出用試薬(ニッポンジーン)を用いて精製した。各臓器の total RNA は逆転写酵素(SuperScript III, サーマフィッシャーサイエンティフィック)とオリゴ dT プライマーを用いて逆転写反応を行い、cDNA を得た。ヒト、トラフグゲノムデータベースより得られたすべての Slc41 及び Cnm ファミリーメンバーの mRNA 配列に対して 300~600 bp 程度の増幅断片が得られるような特異的プライマーを終始コドン近傍にデザインし、各臓器由来の cDNA をテンプレートに用いて PCR 反応を行った。PCR 反応は GoTaq Greem master mix(プロメガ)を用いて 27-28 サイクル行った。得られた産物を 1.2%アガロースゲルで分離し、臭化エチジウムにより検出し、それぞれの遺伝子を高発現する臓器をヒト、フグにおいてそれぞれ特定した。

### 2.2 $Mg^{2+}$ 輸送体のクローニングと発現ベクターの構築

ヒト、トラフグゲノムデータベースより得られたすべての Slc41 及び Cnm ファミリーメンバーの mRNA 配列に対して全翻訳領域を含むような特異的プライマーをデザインした。それぞれの遺伝子を高発現する臓器由来の cDNA を

テンプレートに KOD plus neo DNA polymerase(東洋紡)を用いて PCR 反応を行い、得られた産物をアフリカツメガエル卵母細胞発現ベクター pGEMHE<sup>(12)</sup>もしくは哺乳動物細胞発現ベクター pcDNA3(サーモフィッシャーサイエンティフィック)、pEGFP(クロンテック)に挿入した。得られたプラスミドに変異が無いことを DNA シークエンスにより確認した。

### 2.3 アフリカツメガエル卵母細胞における $Mg^{2+}$ 輸送体の発現

pGEMHE に構築したプラスミドを NucleoBond Xtra Midi Kit(タカラバイオ)により精製し、制限酵素 Not I(タカラバイオ)で切断して直鎖化した。直鎖化したプラスミドを GenElute PCR Clean-Up Kit(シグマアルドリッチ)により精製して RNase free 化し、得られた精製標品を用いて mMESSAGING mMACHINE T7 Transcription Kit(サーモフィッシャーサイエンティフィック)により cRNA を合成した。

野生型アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の成熟メスを中和した MS-222(ナカライ)溶液と氷冷により麻酔し、卵巣を摘出した。コラゲナーゼ(シグマアルドリッチ)処理により卵母細胞を分離し、インジェクションに適したステージ V~VI の卵母細胞を実体顕微鏡下で分離した。それぞれの卵母細胞に対し 25 ng の cRNA をインジェクションし、OR3 培地中 16°C にて 3~6 日間培養して活性解析に用いた。ネガティブコントロールとしては同じカエル由来の卵母細胞に同量の滅菌水をインジェクションしたものをを用いた。

### 2.4 培養細胞における $Mg^{2+}$ 輸送体の発現

pcDNA3 もしくは pEGFP に構築したプラスミドを NucleoBond Xtra Midi Kit により精製した。得られたプラスミドを FuGENE6(プロメガ)もしくは Lipofectamine LTX(サーモフィッシャーサイエンティフィック)により COS-7 細胞や MDCK 細胞に導入した。発現した  $Mg^{2+}$  輸送体の細胞内局在は蛍光顕微鏡による直接観察(pEGFP の発現細胞)もしくは間接蛍光免疫染色(pcDNA3 の発現細胞)により、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

### 2.5 $Mg^{2+}$ 輸送体の活性解析

細胞膜に発現した  $Mg^{2+}$  輸送体の活性は、様々な  $Mg^{2+}$  濃度のバッファーでインキュベートした時の細胞内遊離  $Mg^{2+}$  の濃度変化として観察する事ができる。細胞内遊離  $Mg^{2+}$  濃度はイオン選択性微小電極法により解析した。マ

グネシウム選択性微小ガラス電極(以下 Mg 電極)は Magnesium ionophore II-cocktail A(フルカ)を用いて作製した。Mg 電極と KCl 電極をエレクトロメータに接続し、1 mM もしくは 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>を含む 100 mM KCl 溶液により電極の校正を行った。その後チャンバー内で両電極を卵母細胞に刺入し、細胞内 Mg<sup>2+</sup>濃度を解析した。細胞膜に発現した Mg<sup>2+</sup>輸送体の活性が起電性(electrogenic)か電気的中性(electroneutral)かを調べるため、二電極電位固定法による膜電流の解析を行った。二電極電位固定法の解析は卵母細胞クランプアンプを用いて行った。

細胞内の全 Mg<sup>2+</sup>を定量するため様々な条件でインキュベートした卵母細胞を脱イオン水で1秒洗浄した後に乾燥させ、その後濃硝酸を加えて 120°C, 3 時間酸化処理した。得られた酸化物を 0.08 M 硝酸溶液に溶解し、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)により Mg 総量を定量した。

### 3. 研究結果

#### 3.1 ヒト, フグの Slc41 ファミリーの発現部位の解析

ヒトゲノムには Slc41 ファミリーに属する遺伝子が3つ(SLC41A1, SLC41A2, SLC41A3)存在する<sup>(8)</sup>。トラフグには Slc41a2, Slc41a3 に対応する遺伝子(パラログ)がそれぞれ2つずつあるので、計5遺伝子(Slc41a1, Slc41a2a, Slc41a2b, Slc41a3a, Slc41a3b)存在する。新骨魚類では他の主要な脊椎動物より 1 回多く全ゲノム重複したことが知られるため、Slc41a2とSlc41a3のパラログはおそらく全ゲノム重複により生じたと考えられる。フグ Slc41a1 遺伝子が1つしかないのは、全ゲノム重複後に余剰となった遺伝子が欠損して1つに戻ったためと考えられる。

フグ Slc41a1 は腎臓に最も高発現し、次いで心臓、脳、腸、骨格筋など他の様々な組織にも発現が観察された。ヒト SLC41A1 も心臓、脳、腎臓、骨格筋などの組織において高いレベルの発現が観察された。フグ Slc41a2a は腸とエラにおいて、Slc41a2b は腎臓において発現が観察されたが、ヒト SLC41A2 は大腸、小腸、腎臓、肝臓、胎盤などに発現が観察された。フグ Slc41a3a は骨格筋に、Slc41a3b は心筋と脳において高いレベルの発現が観察された。一方、ヒト SLC41A3 は腎臓、大腸、小腸、脳、心臓、骨格筋など様々な臓器において高いレベルの発現が観察された。

#### 3.2 ヒト, フグの Cnmm ファミリーの発現部位の解析

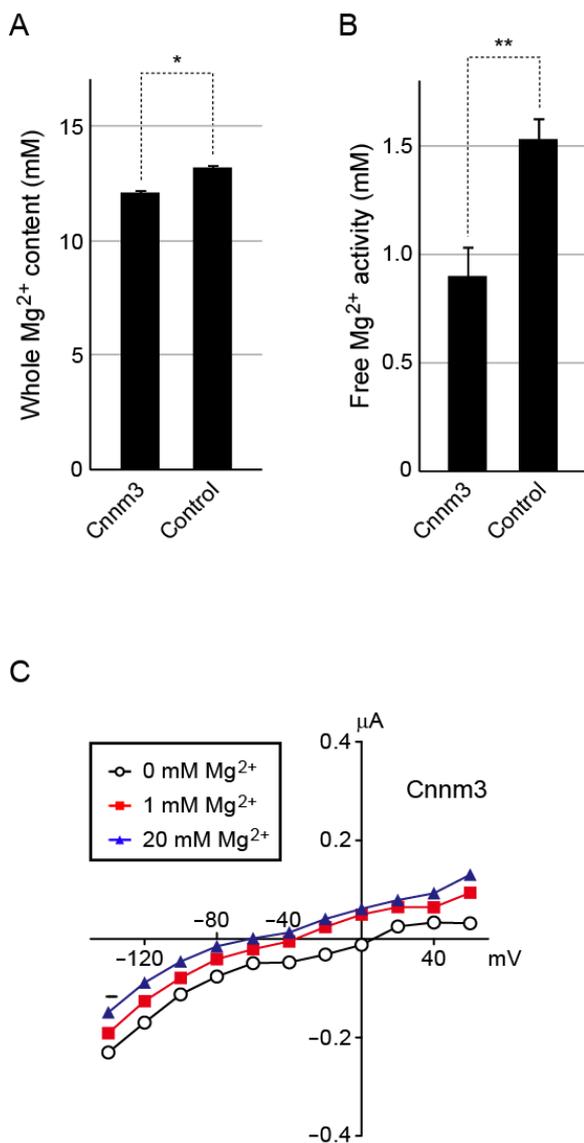
ヒトゲノムには Cnmm ファミリーに属する遺伝子が4つ(CNNM1, CNNM2, CNNM3, CNNM4)存在する。トラフグには Cnmm1, Cnmm4 に対応するパラログ遺伝子がそれぞれ2つずつあるので、計 6 遺伝子(Cnmm1a, Cnmm1b, Cnmm2, Cnmm3, Cnmm4a, Cnmm4b)存在する<sup>(7)</sup>。トラフグ Cnmm パラログ遺伝子は Slc41 ファミリー同様、全ゲノム重複により生じたと考えられる。フグにおいては Cnmm1a, Cnmm1b 共に脳に最も多く発現するが、ヒトにおいても CNNM1 は脳特異的な発現が観察されたフグにおいて Cnmm2 は脳と淡水適応時にのみ腎臓に発現が観察されるが、ヒト CNNM2 は腎臓、大腸、肝臓、脳、胎盤など多くの組織に発現が観察された。Cnmm3 はフグ、ヒトどちらにおいても様々な組織で発現が観察された。フグ Cnmm4a は腎臓、腸、脾臓、エラに高発現し、Cnmm4b は脳に高発現する。ヒト CNNM4 は大腸をはじめ小腸、肝臓、腎臓、脳、心臓、骨格筋などにも発現が観察された。

#### 3.3 Slc41, Cnmm ファミリーの発現と細胞内局在

フグ Slc41a1 を卵母細胞に発現させてその局在を間接蛍光免疫染色により解析したところ、その大部分は細胞内顆粒に局在していた。一方フグ Cnmm3 を卵母細胞に発現させてその局在を間接蛍光免疫染色により解析すると、細胞膜における発現が観察された。COS-7 細胞や MDCK 細胞においてEGFPに融合させた Slc41a1 を発現させたところ、卵母細胞同様に細胞内顆粒における Slc41a1 の局在が観察された。フグ Cnmm3 を MDCK 細胞に発現させてその局在を間接蛍光免疫染色により解析したところ、basolateral 膜への局在が観察された。

#### 3.4 Slc41, Cnmm ファミリーの活性解析

イオン選択性微小電極法、二電極電位固定法、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)によりアフリカツメガエル卵母細胞に発現させた Mg<sup>2+</sup>輸送体の活性を評価する測定系を本学に立ち上げることに成功した。Mg<sup>2+</sup>選択性電極は同じオーダーの Ca<sup>2+</sup>も検出するが、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度は Mg<sup>2+</sup>に比べて約1万倍低いことから、影響は無視できる。フグ Cnmm3 を発現させた卵母細胞では、通常培地における定常状態の細胞内遊離 Mg<sup>2+</sup>濃度、Mg 総量が共に減少していた(Fig. 2A, B)。このことから、Cnmm3 は何らかの Mg<sup>2+</sup>排出活性を有する可能性が示唆された。二電極電位固定法により膜電流を解析したが、細胞外 Mg<sup>2+</sup>依存的な膜電流を観察することはできなかった(Fig. 2C)。他のフ



**Fig. 2.** Activity of pufferfish Cnm3 expressed in *Xenopus* oocytes. (A) Whole Mg<sup>2+</sup> content of Cnm3 and control oocytes analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). (B) Intracellular free Mg<sup>2+</sup> concentration of Cnm3 and control oocytes analyzed by ion-selective microelectrode. (C) No Mg<sup>2+</sup>-dependent current was observed by two-electrode voltage clamp.

グ及びヒト Slc41, Cnm ファミリーについても解析を進行中である。

#### 4. 考察

Slc41 や Cnm ファミリーは脊椎動物に広く存在し、種や系統による遺伝子数(主にパラログの数)に差異があるも

の、基本的な遺伝子構成は種を超えて保存されている。またそれぞれの組織発現については共通した傾向があるものの多様性も観察されたことから、Slc41 や Cnm ファミリーの様々な生理機能にも普遍性と多様性が両方存在する事が示唆された。生理機能が共通な部分に着目すれば、ヒト Mg<sup>2+</sup>代謝を解析する上で、魚類を単純モデル、下等モデルとして今後活用できる。種差に着目すれば環境適応に関連して遺伝子発現制御やタンパク質活性がそれぞれの種において適応的に進化した可能性が考えられ、比較モデルとして動物生理学上の重要な問題の解明に繋がられることが期待される。

アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた Mg<sup>2+</sup>輸送体の活性測定法として、イオン選択性微小電極法、二電極電位固定法、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)により細胞内遊離イオン活性、細胞外 Mg<sup>2+</sup>依存的膜電流、細胞内イオン含量を解析する実験系を立ち上げることに成功した。実験を繰り返せばヒト、フグ由来の Slc41, Cnm ファミリーの Mg<sup>2+</sup>輸送活性を評価することが可能となった。

#### 5. 今後の課題

フグ Slc41a1 は細胞内顆粒に局在するため、細胞内顆粒に Mg<sup>2+</sup>を濃縮する機能を担う可能性が考えられる。現在、内膜の総 Mg を ICP-MS 解析で評価中である。ヒト SLC41A1 は細胞膜の Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup>交換輸送体であるという報告があるが<sup>(11)</sup>、私たちの電気生理学的な解析からは現時点で細胞膜における活性を得られていない。フグ Cnm3 の活性解析からは electroneutral な Mg<sup>2+</sup>輸送体である可能性を示唆する活性データを得ることができたが、Cnm3 による何らかの陽イオンとの交換輸送、もしくは陰イオンとの共輸送活性を示すデータは得られておらず、解析を継続して進めている。哺乳動物においては Cnm2 と Cnm4 が Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup>交換輸送体である事を示す報告<sup>(5, 20)</sup>や Cnm2 が Mg<sup>2+</sup>チャンネルであるという報告<sup>(4)</sup>がある一方で、Cnm2 に Mg<sup>2+</sup>輸送活性は無いという報告もある<sup>(18)</sup>。我々は現時点で未だ明確な結論を得られていないが、立ち上げた解析技術を用いて活性測定を継続し、何らかの結論を発表したいと考えている。

#### 6. 参考文献

1. Beyenbach KW. Direct demonstration of fluid

- secretion by glomerular renal tubules in a marine teleost. *Nature* 299: 54-66, 1982.
2. **Beyenbach KW.** Renal handling of magnesium in fish: from whole animal to brush border membrane vesicles. *Front Biosci* 5: D712-D719, 2000.
  3. **de Baaij JH, Hoenderop JG, and Bindels RJ.** Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiol Rev* 95: 1-46, 2015.
  4. **Goytain A, and Quamme GA.** Functional characterization of ACDP2 (ancient conserved domain protein), a divalent metal transporter. *Physiol Genomics* 22: 382-389, 2005.
  5. **Hirata Y, Funato Y, Takano Y, and Miki H.** Mg<sup>2+</sup>-dependent interactions of ATP with the cystathionine-beta-synthase (CBS) domains of a magnesium transporter. *J Biol Chem* 2014.
  6. **Hou J, and Goodenough DA.** Claudin-16 and claudin-19 function in the thick ascending limb. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19: 483-488, 2010.
  7. **Islam Z, Hayashi N, Inoue H, Umezawa T, Kimura Y, Doi H, Romero MF, Hirose S, and Kato A.** Identification and lateral membrane localization of cyclin M3, likely to be involved in renal Mg<sup>2+</sup> handling in seawater fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 307: R525-537, 2014.
  8. **Islam Z, Hayashi N, Yamamoto Y, Doi H, Romero MF, Hirose S, and Kato A.** Identification and proximal tubular localization of the Mg<sup>2+</sup> transporter, Slc41a1, in a seawater fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 305: R385-R396, 2013.
  9. **Kato A.** [Diversity of Mg<sup>2+</sup> transporters involved in magnesium homeostasis]. *Seikagaku* 87: 727-732, 2015.
  10. **Kato A, Doi H, Nakada T, Sakai H, and Hirose S.** *Takifugu obscurus* is a euryhaline fugu species very close to *Takifugu rubripes* and suitable for studying osmoregulation. *BMC Physiol* 5: 18, 2005.
  11. **Kolisek M, Nestler A, Vormann J, and Schweigel-Rontgen M.** The human gene *SLC41A1* encodes for the Na<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup> exchanger. *Am J Physiol Cell Physiol* 302: C318-C326, 2011.
  12. **Liman ER, Tytgat J, and Hess P.** Subunit stoichiometry of a mammalian K<sup>+</sup> channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* 9: 861-871, 1992.
  13. **Maguire ME.** Magnesium transporters: properties, regulation and structure. *Front Biosci* 11: 3149-3163, 2006.
  14. **Quamme GA.** Molecular identification of ancient and modern mammalian magnesium transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C407-429, 2010.
  15. **Schlingmann KP, Waldegger S, Konrad M, Chubanov V, and Gudermann T.** TRPM6 and TRPM7--Gatekeepers of human magnesium metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1772: 813-821, 2007.
  16. **Shaul O, Hilgemann DW, de-Almeida-Engler J, Van Montagu M, Inz D, and Galili G.** Cloning and characterization of a novel Mg<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *EMBO J* 18: 3973-3980, 1999.
  17. **Smith HW.** The absorption and excretion of water and salts by marine teleosts. *Am J Physiol* 93: 480-505, 1930.
  18. **Sponder G, Mastrototaro L, Kurth K, Merolle L, Zhang Z, Abdulhanan N, Smorodchenko A, Wolf K, Fleig A, Penner R, Iotti S, Aschenbach JR, Vormann J, and Kolisek M.** Human CNNM2 is not a Mg transporter per se. *Pflugers Arch* 2016.
  19. **Yamanoue Y, Miya M, Matsuura K, Miyazawa S, Tsukamoto N, Doi H, Takahashi H, Mabuchi K, Nishida M, and Sakai H.** Explosive speciation of *Takifugu*: another use of fugu as a model system for evolutionary biology. *Mol Biol Evol* 26: 623-629, 2009.
  20. **Yamazaki D, Funato Y, Miura J, Sato S, Toyosawa S, Furutani K, Kurachi Y, Omori Y, Furukawa T, Tsuda T, Kuwabata S, Mizukami S, Kikuchi K, and Miki H.** Basolateral Mg<sup>2+</sup> extrusion via CNNM4 mediates transcellular Mg<sup>2+</sup> transport across epithelia: a mouse model. *PLoS Genet* 9: e1003983, 2013.

## Functional Analysis of Magnesium Efflux Transporters Localized to the Plasma Membrane and Intracellular Vesicles

Akira Kato

Tokyo Institute of Technology, Center for Biological Resources and Informatics

### Summary

Marine teleosts live in water containing ~50 mM  $Mg^{2+}$ , thus they are at the risk of exposure to excess  $Mg^{2+}$ . To maintain plasma  $Mg^{2+}$  concentration at 1-2 mM, marine teleosts secrete  $Mg^{2+}$  into primary urine and excrete final urine that contains ~150 mM  $Mg^{2+}$ . From analyses of the kidney of marine teleosts, we identified solute carrier family 41 member 1 (Slc41a1) and cyclin and CBS domain divalent metal cation transport mediator 3 (Cnm3) as  $Mg^{2+}$  efflux transporters, and proposed a molecular model for  $Mg^{2+}$  secretion by the proximal tubule of marine teleosts. Interestingly, Slc41a1 and Cnm3 are localized to intracellular vesicles and basolateral membrane, respectively. To compare  $Mg^{2+}$  efflux system between human and fish at molecular level, we developed methods to analyze the activities of Slc41 and Cnm  $Mg^{2+}$  transporter families expressed in *Xenopus* oocytes. We succeeded to analyze intracellular free  $Mg^{2+}$  concentration, whole  $Mg^{2+}$  content, and  $Mg^{2+}$ -dependent membrane current by ion-selective microelectrode, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), and two-electrode voltage clamp, respectively. These methods are useful to identify and characterize  $Mg^{2+}$ -efflux activities of Slc41 and Cnm families in human and fish.