

腸管における細胞間食塩輸送に対する老化とマグネシウム代謝異常の影響

五十里 彰¹, 林 久由², 田渕 圭章³, 吉野 雄太¹

¹ 岐阜薬科大学薬学部, ² 静岡県立大学食品栄養科学部, ³ 富山大学生命科学先端研究センター

概要 細胞内のマグネシウムは ATP を利用する酵素の補助因子として働き、生理機能の維持において重要な役割を果たす。マグネシウムはカルシウムと相反する作用をもち、その欠乏は高血圧、糖尿病、慢性腎臓病の悪化の一因になりうる。特に高齢者では、慢性的なマグネシウム不足とともに、食塩バランスの異常が問題になることが多い。しかし、食塩バランスの調節におけるマグネシウムの役割は大部分が不明である。

食塩は腸管上皮細胞の細胞膜に発現するイオンチャネルやトランスポーターを介して吸収されると考えられている。しかし、近年、タイトジャンクション構成因子のクローディン (CLDN) が細胞間を介した食塩吸収の制御に関与することが明らかになってきた。CLDN には 20 種類以上のサブタイプが存在し、その発現パターンの違いにより電解質イオンの透過性が変化する。しかし、CLDN サブタイプの発現に対する老化やマグネシウムの影響は不明である。

予備検討において、老齢マウスの腸管で CLDN3, 7, 15 の発現量が増加することを見出した。また、正常マウス結腸由来の MCE301 細胞を低マグネシウム培地で培養することにより、CLDN3, 7, 15 の発現量が増加した。そこで本研究では、CLDN サブタイプの発現と細胞間食塩輸送に及ぼすマグネシウム不足の影響を検討した。

マウス結腸由来の MCE301 細胞を低マグネシウム培地に暴露すると、細胞内マグネシウム濃度が低下し、CLDN3, 7, 15 の発現量が増加した。同様の結果が、TRPM6 発現のノックダウンにより得られた。低マグネシウム培地暴露による CLDN 発現の増加は、AMPK 阻害剤の共処理によって阻害されたが、mTOR 活性化薬は効果がなかった。そのため、AMPK は mTOR 以外の因子を介して、CLDN3, 7, 15 発現を増加させることが示唆された。次に、細胞局在に対するマグネシウム濃度の影響を検討した。正常マグネシウム濃度下で CLDN7 はタイトジャンクションに、CLDN3, 15 は細胞質に分布しており、低マグネシウム培地暴露によって発現量は増加したが、細胞局在は変化しなかった。最後に、細胞間バリア機能に対するマグネシウム濃度の影響を検討した。低マグネシウム培地への暴露により経上皮膜電気抵抗値(TER)は低下し、この効果は CLDN7 のノックダウンにより部分的に阻害された。また、CLDN7 の過剰発現により TER が低下した。希釈電位法を用いてイオン選択性を検討したところ、低マグネシウム培地への暴露により塩素イオン/ナトリウムイオン輸送比は変化しなかったが、CLDN7 発現のノックダウンにより低下した。以上の結果から、加齢に伴いマグネシウム濃度が低下すると、CLDN サブタイプの発現変化を介して食塩透過性が亢進することが示唆された。

1. 研究目的

細胞内のマグネシウムは ATP を利用する酵素の補助因子として働き、生理機能の維持において重要な役割を果たす。マグネシウムはカルシウムと相反する作用をもち、その欠乏は高血圧、糖尿病、慢性腎臓病の悪化の一因になりうる。特に高齢者では、慢性的なマグネシウム不足

とともに、食塩バランスの異常が問題になることが多い。しかし、食塩バランスの調節におけるマグネシウムの役割は大部分が不明である。

食塩は腸管上皮細胞の細胞膜に発現する上皮型ナトリウムチャネル (ENaC)、嚢胞性線維症膜貫通調節因子 (CFTR)、ナトリウム/プロトン交換体 (NHE)などを介して吸収

されると考えられている。しかし、近年、タイトジャンクション構成因子のクローディン(CLDN)が細胞間を介した食塩吸収の制御に関与することが明らかになってきた。CLDNには27種類のサブタイプが存在し、その発現パターンの違いにより電解質イオンの透過性が変化する。これまでに申請者は、食塩欠乏食で飼育したマウスを用いて、結腸におけるCLDN2とCLDN7の発現量が増加することを発見した^(1,2)。さらに、CLDN2とCLDN7の発現はそれぞれアルドステロンとアンジオテンシン II によって調節されることを解明した。CLDN2はナトリウムポア、CLDN7は塩素ポアを形成し、食塩の吸収制御に関与することが示唆された。しかし、CLDNサブタイプの発現に対する老化やマグネシウムの影響は不明である。

予備検討において、高齢マウスの腸管でTRPM6マグネシウムチャンネルとCLDN3, 4, 7, 8, 15の発現量が増加することを見出した。また、正常マウス結腸由来のMCE301細胞を低マグネシウム培地で培養することにより、CLDN3, 7, 15の発現量が増加することを発見した。CLDN15ノックアウトマウスは低ナトリウム血症を呈することが報告されている⁽³⁾。

以上の知見から、『マグネシウムは腸管における細胞間食塩吸収の制御に関与する』という仮説を立てた。この仮説の検証に向け、本研究では加齢によるTRPM6の発現低下の機序を調べるとともに、マグネシウムがCLDNサブタイプの発現調節因子、細胞局在、細胞間食塩輸送に及ぼす影響を検討した。

2. 研究方法

2.1 動物実験

実験にはC57BL/6Nマウス(雄性, 6と49週齢, 日本エスエルシー)を使用した。動物実験は、岐阜薬科大学動物実験委員会の承認を得て実施した。通常食で7日間飼育後、結腸を摘出した。

2.2 細胞培養とトランスフェクション

マウス結腸由来MCE301細胞を、DMEM培地(5%ウシ胎児血清含)で培養した。3~4日毎に0.25%トリプシン溶液を用いて継代した。2 x 10⁵個の細胞を35 mm dishに播種してから24時間後に、HilyMax(同仁化学研究所)を用いてプラスミドDNAをトランスフェクションした。

2.3 リアルタイムPCR

マウス大腸組織およびMCE301細胞をTRI Reagent(Molecular Research Center)で溶解し、プロトコールに従ってtotal RNAを調製した。ReverTraAce qPCR RT Kit(東洋紡)を用いてcDNAを調製後、THUNDERBIRD qPCR Mix(東洋紡)を用いてリアルタイムPCRを行った。なお、リアルタイムPCRの解析には、リアルタイムPCR Eco(アズワン)を使用した。

2.4 SDS-PAGEとウエスタンブロット

細胞を回収後、lysis buffer(1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1% SDS)で懸濁し、20秒間のソニケーションにより細胞膜を破壊した。その後、8000 rpmで5分間遠心して得られた上清画分を細胞ライセートとして使用した。10%または12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。セミドライ方式でゲルからPVDF膜へタンパク質を転写後、一次抗体(1000倍希釈)で一晩インキュベートした。ブロッキングには2%スキムミルクを使用した。一次抗体を洗浄後、HRP標識二次抗体(3000倍希釈)を室温で1.5時間インキュベートした。C-DiGit Blot Scanner(LI-COR)を用いて、タンパク質のバンドを検出した。

2.5 蛍光免疫染色

細胞をカバーガラス上に培養し、メタノールで固定した。0.2% Triton X-100で膜の透過処理を行い、4%ブロックエースでブロッキングした。各種一次抗体(100倍希釈)を一晩インキュベート後、Alexa Fluor 488標識およびAlexa Fluor 555標識二次抗体(100倍希釈)を室温で1.5時間インキュベートした。LSM700共焦点レーザー顕微鏡(Zeiss)を用いて、標的タンパク質の細胞局在を調べた。

2.6 細胞間透過性の解析

細胞間を介した電解質イオンおよび低分子化合物の透過性を評価するため、細胞をトランスウェルのインサート上に培養した。低分子化合物として、水溶性蛍光プローブのルシファーイエロー(LY)を使用した。電解質イオンの透過性は、経上皮膜電気抵抗値(TER)を指標として評価した。イオン選択性を評価するため、ユッシングチャンバーにトランスウェルを設置し、希釈電位法で膜間電位、ナトリウムイオン透過性、塩素イオン透過性を測定した。

3. 研究結果

3.1 CLDN サブタイプとマグネシウムチャネルの発現に対する加齢の影響

若齢と老齢マウスの腸管における CLDN サブタイプの mRNA 量を比較したところ、老齢マウスで CLDN3, 7, 15 の発現量が増加し、CLDN4, 8 の発現量が減少していた。また、マグネシウムチャネルの mRNA 量を比較したところ、腸管や腎尿管に特異的に発現する TRPM6 の発現量が老齢マウスで減少していたが、TRPM7 や CNNM4 の発現量は有意に変化していなかった (**Fig. 1**)。TRPM6 発現に対する加齢の影響を解明するため、マウス腸管由来 MCE301 細胞を用いて老化促進剤である tenovin-6 の効果を検討した。その結果、tenovin-6 処理により TRPM6 mRNA 量は減少したが、TRPM7 と CNNM4 の mRNA 量は有意に変化しなかった。また、tenovin-6 処理により

TRPM6 のプロモーター活性が低下した。以上の結果から、加齢により転写過程を介して TRPM6 発現が低下することが示唆された。

3.2 細胞内遊離マグネシウム濃度 ($[Mg^{2+}]_i$) に対する TRPM6 発現の影響

加齢による TRPM6 発現の低下が、細胞内マグネシウム恒常性に及ぼす影響を解明するため、蛍光プローブを用いて $[Mg^{2+}]_i$ を測定した。その結果、tenovin-6 処理、TRPM6 発現のノックダウン、低濃度マグネシウム培地への曝露により、 $[Mg^{2+}]_i$ が有意に低下した (**Fig. 2**)。以上の結果から、TRPM6 は腸管上皮細胞の細胞内マグネシウム恒常性の維持に関与し、加齢によって $[Mg^{2+}]_i$ の維持値が低下することが示唆された。

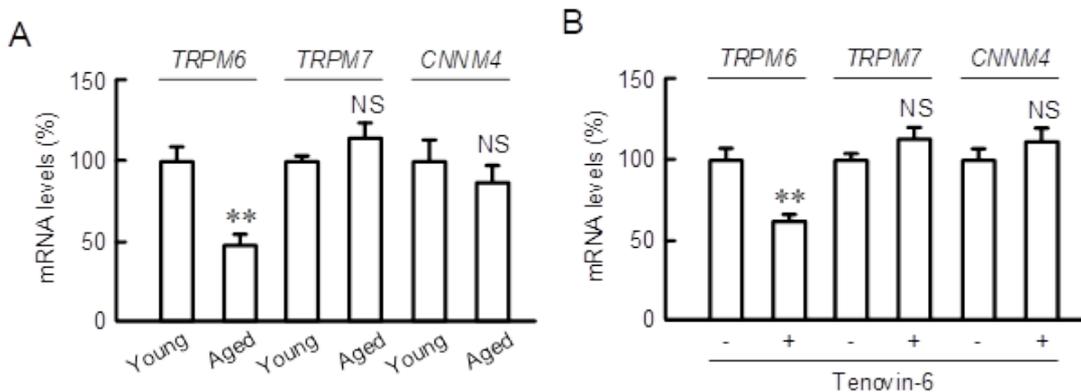


Fig. 1 Effects of aging on the expression of Mg^{2+} transporters

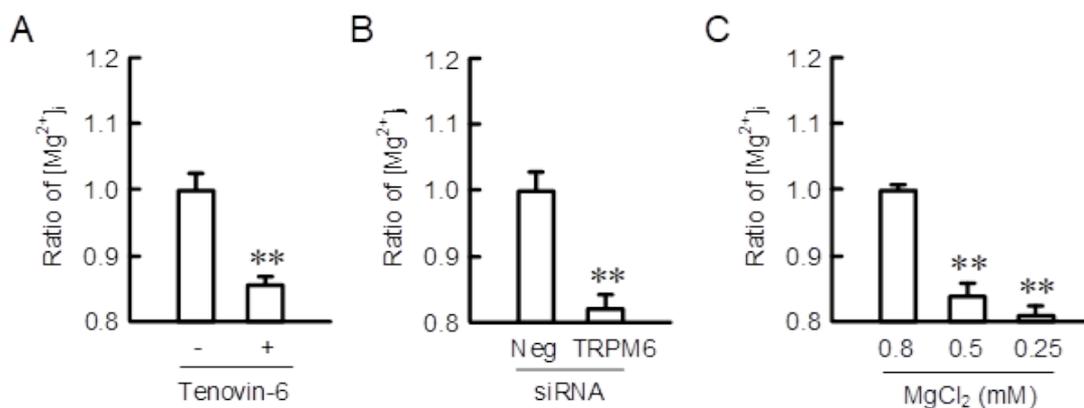


Fig. 2 Effects of tenovin-6, TRPM6 expression, and extracellular Mg^{2+} concentration on $[Mg^{2+}]_i$

3. 3 CLDN サブタイプの発現に対するマグネシウム濃度の影響

MCE301 細胞を 0.8, 0.5, 0.25 mM マグネシウム含有培地に曝露したところ、マグネシウム濃度の低下に伴い、CLDN3, 7, 15 の mRNA 量が増加した (Fig. 3)。これらの変化は、老齢マウスの腸管における結果と一致する。また、siRNA による TRPM6 発現のノックダウンにより、CLDN3, 7, 15 の mRNA 量が増加した。以上の結果から、 $[Mg^{2+}]_i$ の低下により CLDN3, 7, 15 の発現量が増加することが示唆された。

3. 4 低マグネシウム培地暴露による CLDN サブタイプの発現増加機序の解明

マグネシウムは ATP 産生に必須のミネラルであり、 $[Mg^{2+}]_i$ 低下の誘導処理により ATP 濃度も低下した (Fig. 4)。ATP 濃度は AMP との平衡で成り立つ。AMP 濃度の上昇により、AMPK の活性化、mTOR の不活性化が誘導されることが報告されている。マグネシウム濃度の低下による CLDN3, 7, 15 発現の増加は、AMPK 阻害薬である dorsomorphin の共処理により阻害された (Fig. 5)。

一方、mTOR 活性化薬である MHY1485 の共処理により阻害されなかった。以上より、AMPK は mTOR 以外の因子を介して、CLDN3, 7, 15 発現量を増加させることが示唆された。

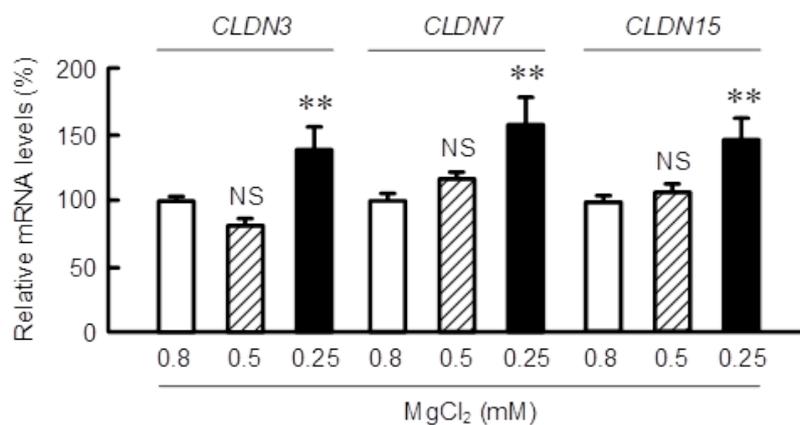


Fig. 3 Effect of Mg^{2+} deficiency on the expression of CLDN subtypes

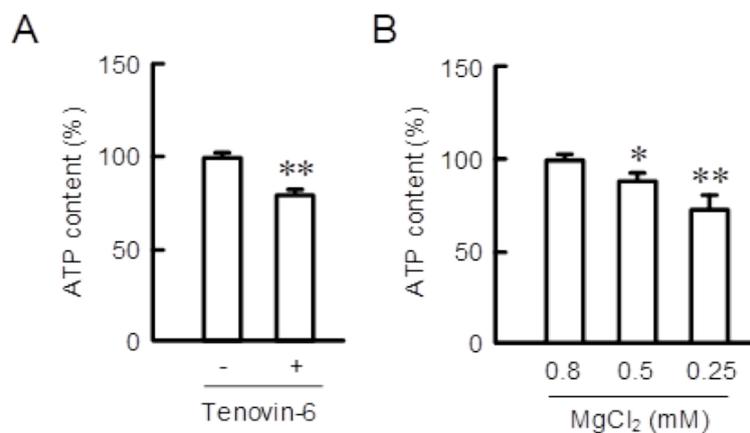


Fig. 4 Effect of tenovin-6 and extracellular Mg^{2+} concentration on ATP content

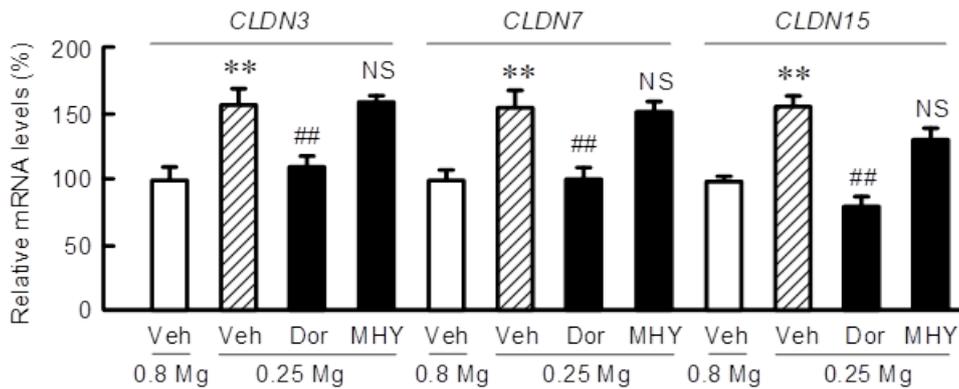


Fig. 5 Effects of AMPK/mTOR signal inhibitors on CLDNs expression

3. 5 CLDN の細胞局在に対する低マグネシウム培地暴露の影響

蛍光免疫染色により、CLDN サブタイプの細胞局在に対するマグネシウム不足の影響を検討した。その結果、0.8 mM の正常値では、CLDN7 は細胞の隣接部位に分布し、低マグネシウム培地暴露により隣接部位での分布量が増加した (**Fig. 6**)。一方、CLDN3 と 15 は主に細胞質内に分布し、低マグネシウム培地暴露により細胞質内で分布量が増加した。以上より、タイトジャンクション領域におけるタンパク質発現量に変化がみられた CLDN7 について、機能解析を行うことにした。

3. 6 細胞間バリア機能に対する低マグネシウム培地暴露の影響

細胞間イオン透過性を TER で、細胞間低分子透過性を LY 移行量で解析した。低マグネシウム培地暴露により TER が低下し、この効果は CLDN7 のノックダウンにより阻害された (**Fig. 7**)。また、CLDN7 の過剰発現により TER が

低下した。以上より、CLDN7 は電解質イオンの細胞間透過性を増加させることが示された。次に低分子透過性に対する効果を検討したところ、低マグネシウム培地暴露により透過性が増加し、この効果は CLDN7 のノックダウンにより阻害された。また、CLDN7 の過剰発現により低分子透過性が低下した。以上より、CLDN7 は低分子に対する細胞間バリア機能を強化することが示された。

TRPM7 の電解質イオン選択性を解明するため、希釈電位法を用いてナトリウムイオンと塩素イオンの透過性を調べた。その結果、希釈電位は低マグネシウム培地暴露により有意に変化しなかったが、CLDN7 発現のノックダウンにより低下した (**Fig. 8**)。また、塩素イオンとナトリウムイオンの輸送比 (P_{Cl}/P_{Na}) も低マグネシウム培地暴露により有意に変化しなかったが、CLDN7 発現のノックダウンにより低下した。以上より、CLDN7 は塩素イオン透過性を亢進させることが示唆された。

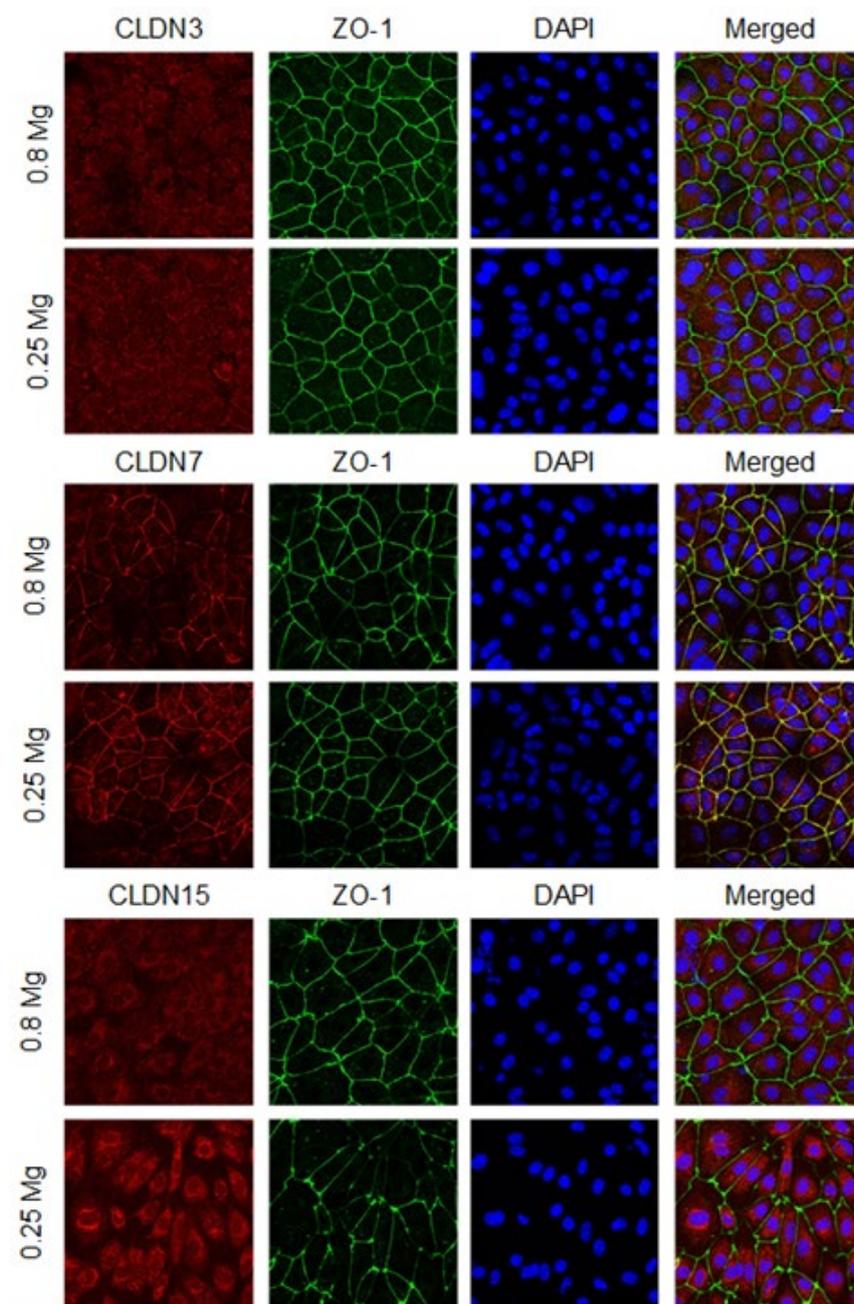


Fig. 6 Effect of Mg^{2+} deficiency on the cellular localization of CLDNs

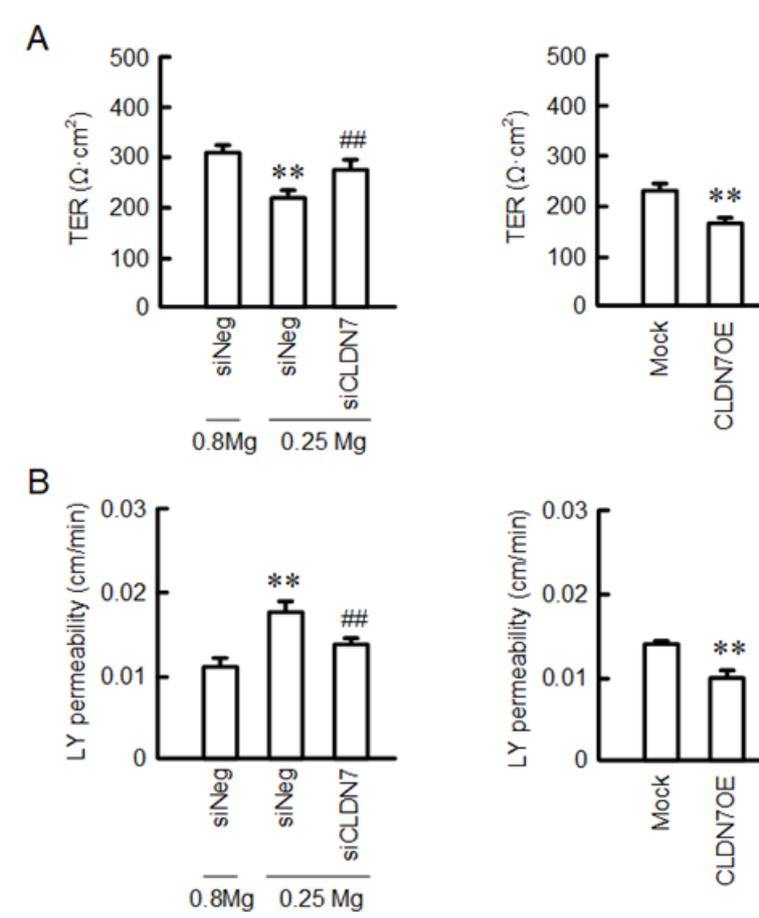


Fig. 7 Effect of CLDN7 expression on paracellular permeability

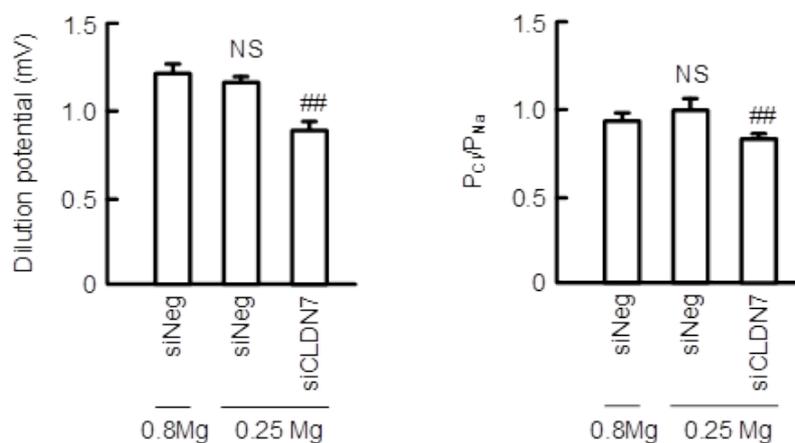


Fig. 8 Effect of CLDN7 expression on dilution potential and P_{Cl}/P_{Na}

4. 考察

細胞膜上に発現するマグネシウムチャネルとして、TRPM6, TRPM7, CNNM4 などが報告されている。TRPM6 は腸管と腎尿細管の管腔膜に選択的に発現するのに対し、TRPM7 は全身的に発現する。また、CNNM4

は主に腸管の基底膜に発現する。食事などから摂取されたマグネシウムは TRPM6 を介して腸管上皮細胞内へ取り込まれ、CNNM4 を介して血管側へ排出される。そのため、マグネシウムの吸収制御において TRPM6 は重要な役割を果たすが、疾患などとの関係は大部分が不明であ

る。本研究において、加齢により TRPM6 発現が低下することを見出した。マグネシウムは生理機能の維持に不可欠なため、マグネシウム吸収の異常は加齢関連疾患に関与することが示唆される。

腸管上皮細胞は糖やアミノ酸などの栄養素の吸収だけでなく、電解質イオンや水の輸送制御も担う。これまで電解質イオンの輸送はイオンチャネルやトランスポーターによって調節されることが報告されていたが、ノックアウトマウスを用いた解析により、CLDN も関与することが明らかになってきた。本研究において、老齢マウスで CLDN3, 7, 15 の発現量が増加し、CLDN4, 8 の発現量が減少することを見出した。さらに、マグネシウムと CLDN 発現の関係を調べたところ、マグネシウム濃度の低下により CLDN3, 7, 15 の発現量が増加した。CLDN3, 15 はタイトジャンクションに分布しなかったため、これらの機能は不明である。一方、CLDN7 と細胞間バリア機能の関係を調べたところ、CLDN7 は低分子に対してバリア、塩素イオンに対してポアを形成することが示唆された。これまでに CLDN7 は塩素イオン透過性を亢進させることが報告されており⁴⁾、我々の結果は過去の報告と一致する。

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を用いた解析において、AMPK 活性化剤処理によって腸管上皮細胞の TER が増加し、高分子デキストラン(4000 Da)の透過性が低下したことから、AMPK はバリア機能を強化すると考えられている⁶⁾。一方、低マグネシウム培地への曝露によって MCE301 細胞の AMPK を活性化したところ、LY 透過性は低下したが、TER が増加した。そのため、AMPK は低分子に対するバリア機能を増強すると示唆された。一方、電解質イオン透過性の差異は、動物種、細胞種、刺激の違いなどが影響したと考えられるため、さらなる検討が必要である。

5. 今後の課題

本研究では、加齢により TRPM6 発現の低下を介して $[Mg^{2+}]_i$ が低下すること、 $[Mg^{2+}]_i$ の低下により CLDN3, 7, 15 の発現量が増加すること、CLDN3, 7, 15 の発現増加に AMPK の活性化が関与することを解明した。しかし、そ

の下流に存在する mTOR は関与しなかったため、転写調節因子を含め、これらの CLDN の発現調節機構を検討する必要がある。また、CLDN3 と CLDN15 はタイトジャンクションへの局在が観察されなかったため、抗体を変更して再検討するとともに、機能解析を行う必要がある。

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をいただ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。

7. 文献

- 1) Furukawa, C., Ishizuka, N., Hayashi, H., Fujii, N., Manabe, A., Tabuchi, Y., Matsunaga, T., Endo, S., Ikari, A., Up-regulation of claudin-2 expression by aldosterone in colonic epithelial cells of mice fed with NaCl-depleted diets, *Sci. Rep.*, 7, 12223 (2017).
- 2) Hirota, C., Takashina, Y., Ikumi, N., Ishizuka, N., Hayashi, H., Tabuchi, Y., Yoshino, Y., Matsunaga, T., Ikari, A., Inverse regulation of claudin-2 and -7 expression by p53 and hepatocyte nuclear factor 4alpha in colonic MCE301 cells, *Tissue Barriers*, 9, 1860409 (2021).
- 3) Tamura, A., Hayashi, H., Imasato, M., Yamazaki, Y., Hagiwara, A., Wada, M., Noda, T., Watanabe, M., Suzuki, Y., Tsukita, S., Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na⁺ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine, *Gastroenterology*, 140, 913-923 (2011).
- 4) Hou, J., Gomes, A.S., Paul, D.L., Goodenough, D.A., Study of claudin function by RNA interference, *J Biol Chem*, 281, 36117-36123 (2006).
- 5) Sun, X., Yang, Q., Rogers, C.J., Du, M., Zhu, M.J., AMPK improves gut epithelial differentiation and barrier function via regulating Cdx2 expression, *Cell Death Differ*, 24, 819-831 (2017).

Effects of Aging and Magnesium Metabolism Disorder on Paracellular NaCl Transport in Intestines

Akira Ikari¹, Hisayoshi Hayashi², Yoshiaki Tabuchi³, Yuta Yoshino¹

¹ Department of Biopharmaceutical Sciences, Gifu Pharmaceutical University,

² School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka,

³ Life Science Research Center, University of Toyama

Summary

Intracellular Mg²⁺ functions as a cofactor for ATP-dependent enzymes and plays an important role in the control of physiological homeostasis. Hypertension, diabetes, and chronic kidney disease may be worsened by Mg²⁺ deficiency. However, the effect of Mg²⁺ deficiency on geriatric diseases is largely unknown. NaCl was previously thought to be absorbed via various ion channels and transporters in the plasma membrane of intestinal epithelial cells. Recently, the involvement of claudins (CLDNs), which are components of tight junctions (TJs), has been clarified. CLDNs contains subtypes over 20 and the function of TJs are controlled by the combination of each CLDNs. Here, we investigated the effect of aging and Mg²⁺ deficiency on the expression and function of CLDNs.

So far, we found that the colonic expression levels of CLDN3, 7, 15 in aged mice are higher than those in young mice. Mg²⁺ deficiency induced the elevation of CLDN3, 7, and 15 expression in the mouse colon-derived MCE301 cells. In addition, ATP level was reduced by Mg²⁺ deficiency. The reduction of ATP content induces the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK)/ mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. The elevation of CLDN3, 7, and 15 expression was inhibited by an AMPK inhibitor, but not by a mTOR activator. These results indicate that other downstream factors may be involved in the upregulation of these CLDNs. In the immunofluorescence assay, CLDN7 was localized at the TJs under normal conditions, whereas both CLDN3 and CLDN15 were mainly distributed in the cytosol. The fluorescence signals of these CLDNs were enhanced by Mg²⁺ deficiency, but the localization was unchanged. Transepithelial electrical resistance (TER) was decreased by Mg²⁺ deficiency, which was partially inhibited by CLDN7 silencing. In contrast, TER was decreased by CLDN7 overexpression. In a dilution assay, the ratio of permeability of Cl⁻ to Na⁺ was unchanged by Mg²⁺ deficiency, but that was reduced by CLDN7 silencing. Our data indicate that NaCl permeability may be enhanced with aging mediated via the change of some CLDNs expression.