

9440 心筋・血管平滑筋細胞内 Mg^{2+} の調節機構に関する研究

助成研究者：栗原 敏(東京慈恵会医科大学 医学部)

共同研究者：小西 真人(東京慈恵会医科大学 医学部)

マグネシウムは細胞内に最も多く含まれる二価陽イオンであり、種々の酵素反応をはじめ細胞機能の調節に重要な役割を果たしている。遊離 Mg^{2+} 濃度の心筋細胞内レベルとその制御機構を知る目的で、ラット単一心室筋細胞に蛍光 Mg^{2+} 指示薬 furaptraを導入し、その蛍光信号から細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度とその変動をモニターした。細胞外高 Mg 濃度、細胞外低 Na 濃度、 β アドレナリン受容体作動薬、 CO_2 アシドーシスなどの種々の刺激に対して細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度は1時間以上にわたって大きな変動を示さず、安定に保たれた。ミトコンドリアの酸化的磷酸化を抑制し細胞内ATPが枯渇させると、細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度は約2倍に上昇した。この結果から、細胞内遊離 Mg^{2+} レベルは正常な細胞では非常に安定に維持されているが、細胞内ATP減少などの病的な状態では不安定になり得ることが示唆された。

9440 心筋・血管平滑筋細胞内 Mg^{2+} の調節機構に関する研究

助成研究者：栗原 敏 (東京慈恵会医科大学 医学部)

共同研究者：小西 真人 (東京慈恵会医科大学 医学部)

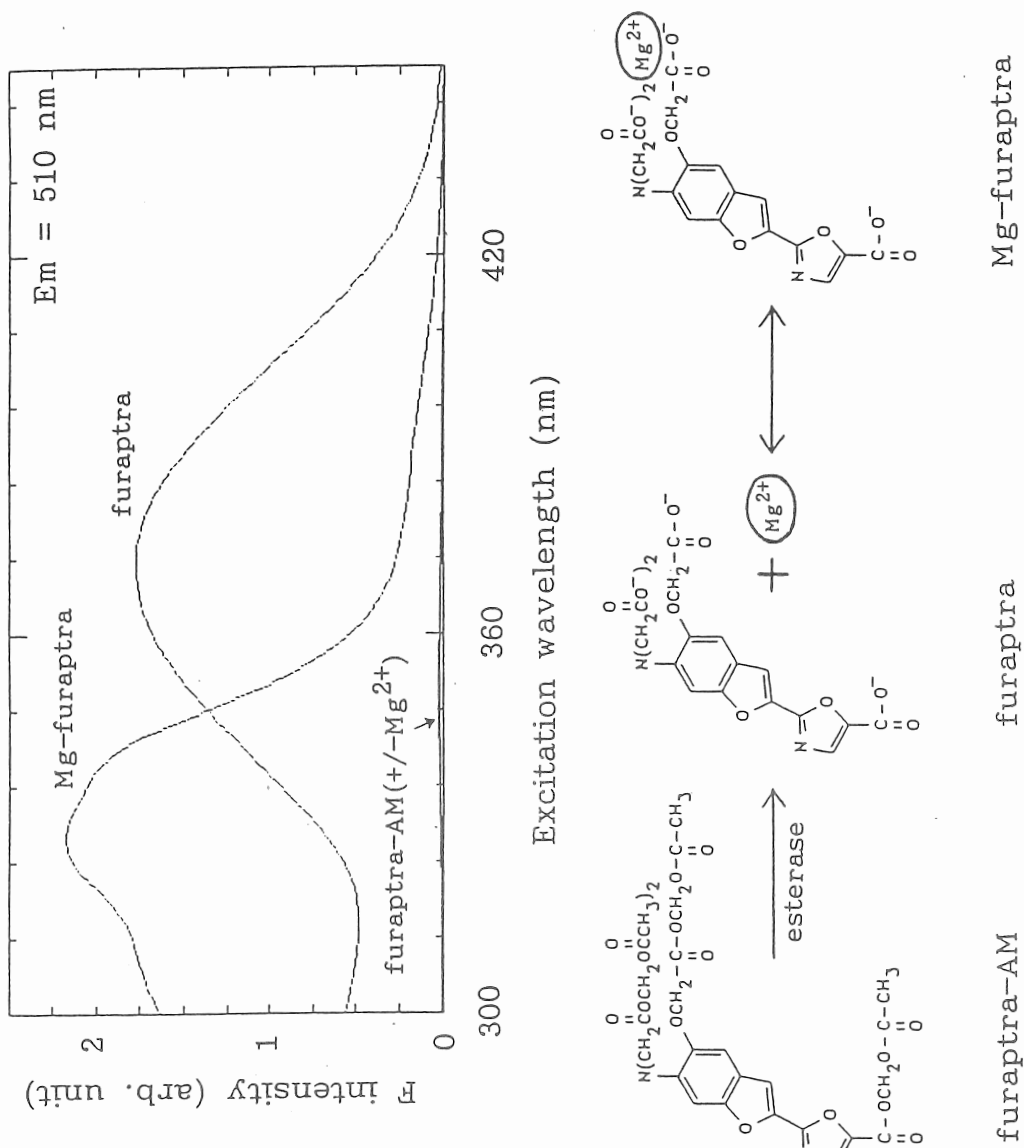
研究目的

マグネシウムは細胞内に最も多く含まれる二価陽イオンであり、種々の酵素反応をはじめ細胞機能の調節に重要な役割を果たしていると考えられている。筋細胞内では、細胞内ATPはほとんどMg結合型(MgATP)で存在し、MgATPが筋小胞体やミオシンATPaseの活性に必要であることが知られている¹⁾。したがって、種々の生理的・病的状態で細胞内ATP濃度の変動すれば、細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度も変化することが予想される。また、細胞膜に Mg^{2+} 輸送機構が存在するとの報告^{2,3)}もあるが、詳細については全く明らかになっていない。本研究では心筋・平滑筋細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度の定量とその制御機構について、種々の生理的・病的条件下で比較検討した。Rajur⁴⁾によって開発された蛍光 Mg^{2+} 指示薬furaptraは遊離 Mg^{2+} 濃度に反応して蛍光励起スペクトルが短波長シフトし、単一細胞での細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度測定を可能にした。本研究では、furaptraを単一心室筋細胞に適用し、静止状態における細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度を定量した。また、数時間にわたって単一細胞からの蛍光信号を測定することにより、1)細胞外高 Mg^{2+} 濃度、2)細胞外低 Na^+ 濃度、3) β 受容体刺激、4)酸化的磷酸化の阻害、5)細胞内アシドーシスなどの条件下で、細胞内 Mg^{2+} 濃度がどのように影響を受けるかを比較的ゆっくりした時間経過で観察した。

研究方法

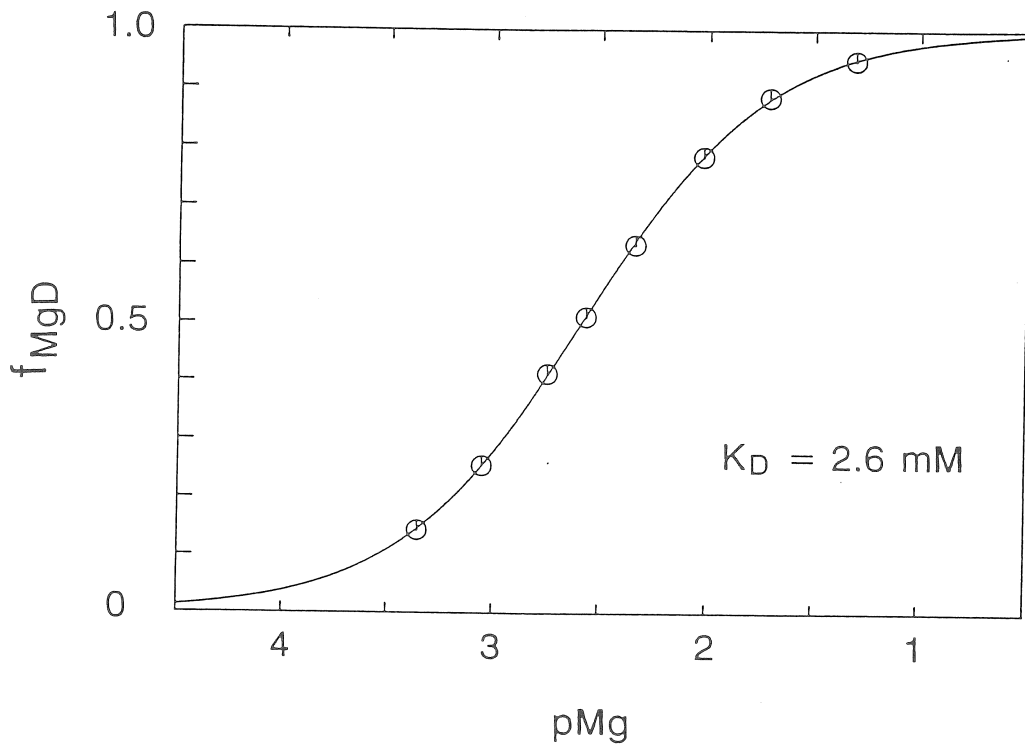
ウィスター系ラットからペントバルビタール麻酔下に心臓を摘出し、ランゲンドルフ装置にて灌流した。コラゲナーゼ、プロテアーゼを含む溶液で灌流して、単一心室筋細胞を分離した。細胞をfuraptraのアセトキシメチルエステル(furaptra-AM)を含むTyrode液中にインキュベートすることにより、furaptraを細胞内に導入した。furaptra-AMは細胞

Fig. 1



膜を透過して細胞内に入り、細胞内でエステラーゼにより加水分解をうけて細胞膜不透過の furaptra となり、細胞内にトラップされる。furaptra-AM は 300 - 420 nm の励起光によりほとんど蛍光を出さないのが、furaptra は 510 nm 付近にピークを持つ強い蛍光を出す (Fig.-1)。furaptra の蛍光励起スペクトルは Mg^{2+} との結合により変化し、ピークが Mg^{2+} 非結合時の 370 nm から、 Mg^{2+} 結合時の 325 nm へと短波長側にシフトする。励起波長 345 nm の蛍光強度は Mg^{2+} 結合によって変化せず (isosbestic wavelength)、したがって遊離 Mg^{2+} 濃度によらず細胞内指示薬濃度の依存する。furaptra と Mg^{2+} との結合反応の解離定数を求めるため、キュベット内で塩溶液中の Mg^{2+} 濃度を変えて furaptra の蛍光信号を測定した (32°C) (Fig.-2)。Figure-2 の縦軸は furaptra の蛍光信号から計算した、 Mg^{2+} と結合状態にある furaptra 分子の割合を示す。実測データは Mg^{2+} と furaptra が 1 : 1 で結合する場合の理論曲線によくフィットすることができ、解離定数は 2.6 mM であった。

Fig. 2



細胞内に furaptra を負荷後、顕微鏡下に桿状構造を保ち、フィールド刺激により単収縮する細胞を選んで実験を行った。自発収縮を起こしている細胞は除外した。実験は、倒

立顕微鏡 (ニコン、DIAPHOT) のステージ上においたチャンパー内で、nominally Ca^{2+} -free で 1 mM Mg^{2+} を含む Tyrode 液で灌流して行った。液温は 30-33°C に保った。単一細胞からの蛍光は二波長蛍光分光光度計を用い、モノクロメータにより 330 nm から 420 nm の波長で励起し、ブロッキングフィルターを通して 490 nm より長波長の蛍光を測定した。ほとんどの実験では 380 nm と 345 nm の励起光をチョッパーにより高速で切り換え (100 Hz)、それぞれの励起波長における蛍光強度の比を遊離 Mg^{2+} 濃度として解析し、細胞内 Mg^{2+} 濃度を求めた⁵⁾。

研究結果

細胞内から得られた fura2/3 の蛍光励起スペクトルは、380 nm にピークを示し、*in vitro* の溶液中で測定した Mg^{2+} 非結合状態のスペクトルによく似ていた。このことは、細胞内 fura2/3 分子の大部分が Mg^{2+} 非結合状態にあり、細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度が fura2/3 の解離定数よりかなり低いことを示唆する。細胞内スペクトルを、 Mg^{2+} 非結合 (Mg^{2+} -free 溶液中で測定)、結合 (飽和 Mg^{2+} 溶液中で測定) 状態における *in vitro* スペクトルの線形結合で最小自乗法によりあてはめると、細胞内スペクトルは約 20% Mg^{2+} と結合しているスペクトルで非常によく近似することができた ($20.5 \pm 0.5\%$, 平均値 \pm 標準誤差; $N = 22$)。求められた細胞内細胞内 Mg^{2+} 結合より、fura2/3 の解離定数を 2.6 mM (上述) として細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度を計算すると、平均 0.67 mM であった。遊離 Mg^{2+} 濃度の値は、細胞外 Mg^{2+} 濃度を 1.0 mM から 0.5 mM に低下させても有意に変化しなかった。また、Miyata⁶⁾ の方法により free acid 型の fura2/3 を導入した細胞でも有意な差はなかった。

細胞外環境を種々に変化させたときの細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度の変化を、比較的長い時間経過で単一細胞からモニターした。細胞外 Mg^{2+} 濃度を 0.5 mM から 20 mM に増加すると、細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度はゆっくりとした時間経過で上昇し、一時間後に約 100 μ M 増加した (6 例の細胞の平均値)。細胞外 Mg^{2+} 濃度を再び 0.5 mM に戻すと、細胞内遊離濃度はもとのレベルまで減少した。細胞外高 Mg^{2+} 濃度 (20 mM) にさらに長時間の細胞を浸漬すると (4 °C) 細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度はさらに増加し、6 時間後には平均 37% (240 μ M) 増加した。

もし、細胞内外の遊離 Mg^{2+} 濃度が細胞膜をはさんで受動的に分布しているなら、細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度は細胞外より数百倍高くなるはずである。しかし、現在までの研究結果^{7,8)}、また本研究の結果 (上述) は細胞内遊離 Mg^{2+} レベルは 1 mM 付近であることを示しており、細胞膜になんらかの Mg^{2+} くみ出し機構があることが示唆される。そこで、

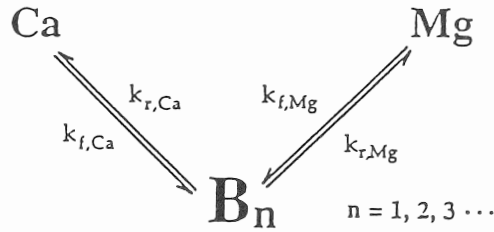
細胞膜 Mg^{2+} 輸送機構が細胞外 Na^+ 濃度、細胞内c-AMP濃度によって制御されている可能性²⁾を検討した。Tyrode液中のNaClをTMACl (tetramethylammonium chloride) で置換して、細胞外 Na^+ 濃度を低下させた。もし、細胞内 Mg^{2+} が細胞膜の Na^+-Mg^{2+} 交換系により輸御されているのなら、細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度は増加することが、予想されたが、少なくとも1時間の灌流では有為な細胞内 Mg^{2+} 濃度変化は認められなかった。NaClをK-methanesulphonateで置換して細胞膜を脱分極させても、細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度は変化しなかった。また、 $10\ \mu M$ isoproterenol を作用させても細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度の変化は見られず、細胞内c-AMP濃度により制御される Mg^{2+} 輸送機構³⁾の存在を支持する結果は得られなかった。

心虚血時には、心筋細胞でミトコンドリアの酸化的磷酸化が抑制される一方、細胞内アシドーシス⁹⁾がおり、これらの変化が心筋の収縮に影響を与えられている。この際、細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度が変化し、この Mg^{2+} 濃度変化が細胞機能を修飾している可能性がある¹⁰⁾。そこで、ミトコンドリアの酸化的磷酸化の抑制、および細胞内アシドーシスの細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度に及ぼす影響について検討した。酸化的磷酸化を抑制するため、FCCP (carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone) を使用し、さらに灌流液からブドウ糖を除いた。 $1\ \mu M$ FCCP 投与後、細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度は急速に上昇し、約5分で一定レベルに達した。細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度は最終的に $0.6-0.7\ mM$ 増加し、静止時の Mg^{2+} 濃度の約2倍に達した。 Mg^{2+} 濃度の変化に少し遅れて細胞は短縮し始め、FCCP 投与後約7、8分で静止長の半分程度まで短縮した。短縮した細胞をATPを含む溶液中でTriton-X (1%) で処理すると弛緩するので、この短縮は細胞内ATPの枯渇による、Rigor であると考えられた。同様に、灌流液を $5\% CO_2$ で飽和させて、細胞内および細胞外アシドーシスの細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度に対する影響を検討したが、有意な変化はみられなかった。

考察

ラット心室筋細胞において、細胞外 Mg^{2+} 濃度のわずかな変化 ($1.0\ mM$ から $0.5\ mM$) は細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度の有意の変化をひきおこさなかった。このことは、 Mg^{2+} 投与後比較速くに見られる抗不整脈作用は細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度変化によるものではないことを強く示唆する。この効果はおそらく細胞外からの作用によるものであろう。また、細胞外 Mg^{2+} 濃度を非常に極端に上げて ($20\ mM$)、細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度の変化は非常に緩徐で、少なくとも数時間の範囲で大きな変化はみられなかった。他の種々な細胞環境の変化 (細胞外低 Na^+ 、細胞外高 K^+ 、細胞内c-AMP濃度、アシドーシス) によっても、

Table 1



$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ Buffers

Species	[]	K_D	k_f	k_r
	($\mu\text{mol/l}$)	(M)	($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	(s^{-1})
Furaptra - Ca	300	4.7e-05	1.25e08	5875
- Mg		3.6e-03	3.33e04	120
Troponin - Ca	2 x 70	3.3e-09	1.0e08	0.33
- Mg		3.3e-05	3.33e04	1.11
Myosin - Ca	2 x 70	3.33e-08	1.37e07	0.46
- Mg		3.64e-04	1.57e04	0.057
CaMod 1 - Ca	6	1.88e-06	1.25e08	235
- Mg		1.96e-03	3.33e04	64.7
CaMod 2 - Ca	6	1.84e-06	1.25e08	230
- Mg		2.92e-03	3.33e04	96.4
CaMod 3 - Ca	6	7.49e-06	1.25e08	938
- Mg		1.25e-03	3.33e04	51.3
CaMod 4 - Ca	6	6.14e-05	1.25e08	7675
- Mg		6.14e-03	3.33e04	203
ATP - Ca	3000	2.0e-04	1.25e08	2.5e04
- Mg		9.0e-05	3.33e04	3.0
P-Creatine - Ca	12000	7.1e-02	1.25e08	8.9e06
- Mg		5.0e-02	3.33e04	1670

1時間程度の範囲では細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度は有意に変化しなかった。このことから、細胞内 Mg^{2+} は正常な細胞では非常に安定に約1 mM付近に保たれており、細胞機能の速い調節にはあまり重要な役割を果たしているとは考えにくい。Table-1に細胞内の Mg^{2+} 結合部位を示す。細胞内の主な Mg^{2+} 結合部位としては、ATP、クレアチン磷酸（P-Creatine）、カルモジュリン（CaMod1 - CaMod4、1分子に4つの結合部位を持つ）、トロポニン、ミオシンなどがあり、これらの結合部位に結合している Mg は遊離 Mg^{2+} よりはるかに多いと考えられる¹¹⁾。したがって、わずかな遊離 Mg^{2+} 減少（あるいは増加）があったとしても、結合 Mg^{2+} の解離（あるいは結合）により速やかに補われてしまい、遊離 Mg^{2+} 濃度の変化としては反映されないのかもしれない。細胞内の主要な Mg^{2+} 結合部位であるATPが枯渇した条件で、遊離 Mg^{2+} 濃度の大きな変化が観察されたことは、この仮説を支持するものである。

本研究では、ミトコンドリアの酸化的磷酸化の阻害により、細胞内 Mg^{2+} 濃度が大きく変化することが示された。このことから、正常では非常に安定に維持されている細胞内遊離 Mg^{2+} レベルが低酸素状態では変動しやすくなり、細胞機能に二次的な影響を与える可能性があると考えられる。

今後の課題

本研究の結果から、細胞内 Mg^{2+} による細胞機能制御に関する今後の重要な研究課題が明らかになった。細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度は正常な細胞では安定に維持されていて、短時間（2-3時間）では細胞環境により変化しにくいのは既に述べたとおりであるが、さらに長い時間、すなわち数十時間から日の時間経過でどのように変動するかについてはわからない。今後は、より長い時間経過で細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度をモニターする実験が必要であろう。本研究で用いた単離心筋細胞では、細胞の劣化が避けられず、数時間以上の実験は困難である。より長時間の実験には培養細胞の使用を考えている。現在まだ予備実験の段階ではあるが、血管平滑筋細胞のモデルとして、ラット大動脈由来のA7r5細胞にfuraptraを導入し、細胞内 Mg^{2+} 濃度の定量を行っている。この細胞でも、細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度は短時間では変化しにくいという結果が得られており、少なくとも定性的には心筋と同様である。今後は日のオーダーでの細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度変化を検討していきたい。

もう一つの重要な課題は、病的な状態での細胞内 Mg^{2+} レベルの変動であろう。虚血、低酸素状態で細胞内高エネルギー磷酸化合物が枯渇したときに起こる遊離 Mg^{2+} 濃度変化が細胞機能にどのような影響を与えるかはよくわかっていない。本研究で観察された2倍

程度の遊離 Mg^{2+} レベルの上昇が筋小胞体や収縮系をどの程度変化させるか、より定量的な研究が必要と思われる。この目的のためには、現在まで主として分離した小器官レベルの研究が行われてきたが、今後はより細胞構造の構築を保った系での研究が必要だと考える。

文献

- 1) White, R. E. & Harzell, H. C.: Magnesium ions in cardiac function. Regulator of ion channels and second messengers. *Biochem. Pharmacol.*, 38:859-867, 1989.
- 2) Fry, C. H.: Measurement and control of intracellular magnesium ion concentration in guinea pig and ferret ventricular myocardium. *Magnesium*, 5:306-316, 1986.
- 3) Romani, A. & Scarpa, A.: Hormonal control of Mg^{2+} transport in the heart. *Nature*, 346:841-844, 1990.
- 4) Raju, B., Murphy, E., Levy, L. A., Hall, R. D. & London, R. E.: A fluorescent indicator for measuring cytosolic free magnesium. *Am. J. Physiol.*, 256:C540-548, 1989.
- 5) Konishi, M., Suda, N. & Kurihara, S.: Fluorescence signals from the Mg^{2+}/Ca^{2+} indicator fura-2 in frog skeletal muscle fibers. *Biophys. J.*, 64:223-239, 1993.
- 6) Miyata, H., Silverman, H. S., Sollott, S. J., Lakatta, E. G., Stern, M. D. & Hansford, R. G.: Measurement of mitochondrial free Ca^{2+} concentration in living single rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.*, 261:H1123-1134, 1991.
- 7) Gupta, R. K., Gupta, P. & Moore, R. D.: NMR studies of intracellular magnesium during myocardial ischemia and reperfusion: Possible consequences for post-ischemic recovery. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 21:1209-1218, 1989.

- 8) Buri, A. & McGuigan, J. A. S.: intracellular free magnesium and its regulation studied in isolated ferret ventricular muscle with ion-selective microelectrodes. *Exp. Physiol.*, 75:751-761, 1990.
- 9) Allen, D. G., Morris, P. G., Orchard, C. H. & Pirolo, J. S.: The nuclear magnetic resonance study of metabolism in the ferret heart during hypoxia and inhibition of glycolysis. *J. Physiol. (Lond.)*, 410:297-323, 1985.
- 10) Murphy, E., Freudenrich, C. C., Levy, L. A., London, R. E. & Lieberman, M.: Monitorint cytosolic free magnesium in cultured chicken heart cells by use of the fluorescent indicator Fura-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:2981-2984, 1989.
- 11) Konishi, M. & Berlin, J. R.: Ca transients in cardiac myocytes measured with a low affinity fluorescent indicator, fura-2. *Biophys. J.*, 64:1331-1343, 1993.

Regulation of Intracellular Free Magnesium Concentration in Cardiac and
Vascular Smooth Muscle Cells.

Satoshi Kurihara and Masato Konishi

Department of Physiology,
The Jikei University School of Medicine

Summary

We estimated cytoplasmic Mg^{2+} concentration in single ventricular myocytes of rats. The myocytes were enzymatically isolated and were loaded with the fluorescent indicator, fura-2, and the fluorescence signals of single quiescent myocytes were measured at 32°C. The excitation spectrum of fura-2 measured in the myocytes was well-fitted by the spectra obtained *in vitro*; thus it was possible to calibrate the fluorescence signal in terms of cytoplasmic free Mg^{2+} concentration. The analysis implied that about 20% of the indicator molecules were Mg^{2+} -bound. If the *in vitro* value of the indicator dissociation constant for Mg^{2+} (2.6 mM) is assumed for the cytoplasm, free Mg^{2+} concentration in the cytoplasm is calculated to be 0.67 mM. Superfusion with a high extracellular Mg^{2+} concentration (20 mM) caused a slow and slight elevation in the cytoplasmic Mg^{2+} concentration over a period of a few hours. Other experimental interventions, including application of a low extracellular Na^+ concentration and isoproterenol, and CO_2 acidosis, did not cause a detectable change in the cytoplasmic Mg^{2+} concentration, whereas the application of an uncoupler, a blocker of oxidative phosphorylation in mitochondria, caused a rapid and large increase in the cytoplasmic Mg^{2+} concentration. It is suggested that the Mg^{2+} concentration in the cytoplasm is tightly maintained at around 1 mM, unless intracellular ATP is depleted.