

学位論文 博士（理学）

蛍光イメージング法を用いた神経細胞における
細胞内マグネシウムイオン濃度調節機構に関する研究



2015 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

山中 龍

目次

第1章 緒言.....	1
本論文の構成.....	1
1.1 マグネシウム.....	2
1.1.1 マグネシウム研究の歴史.....	2
1.1.2 マグネシウムの物理化学的特性.....	3
1.2 生体におけるマグネシウム.....	4
1.2.1 生命の誕生と初期進化におけるマグネシウムの役割.....	4
1.2.2 生体におけるマグネシウム恒常性.....	5
1.2.3 マグネシウムの生理的役割と神経系疾患.....	20
1.3 細胞外マグネシウムイオン.....	25
1.3.1 細胞外マグネシウムイオンの NMDA 受容体ブロックによる神経興奮性制御.....	25
1.4 細胞内マグネシウムイオン.....	27
1.4.1 細胞内マグネシウムイオンの分布.....	27
1.4.2 細胞内マグネシウムイオンの役割.....	30
1.5 生体におけるマグネシウムイオンの測定方法.....	41
1.6 本研究の目的.....	45
1.7 第1章の参考文献.....	46
第2章 一酸化窒素による細胞内 Mg^{2+} 動員.....	72
概要.....	72
2.1 はじめに.....	72
2.2 実験手法.....	74
2.2.2 蛍光指示薬の負荷.....	76
2.2.3 共焦点顕微鏡による蛍光イメージング.....	77
2.3 実験結果.....	78
2.3.1 NO/cGMP/PKG シグナル経路を介した $[Mg^{2+}]_i$ 上昇.....	78
2.3.2 ミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出.....	81
2.3.3 ミトコンドリア膜電位の関与.....	84
2.3.4 ミトコンドリアの Mg^{2+} 放出への $mitoK_{ATP}$ チャンネルの関与.....	85
2.3.5 PKC 活性化を介したポジティブフィードバック経路の関与.....	87
2.4 考察.....	88
2.5 第2章のまとめ.....	89
2.6 第2章の参考文献.....	90

第3章 神経脱分極による Mg^{2+} 動員	95
概要	95
3.1 はじめに	95
3.2 実験手法	96
3.2.1 ラット海馬神経細胞の分散培養	96
3.2.2 蛍光指示薬の負荷	96
3.2.3 共焦点顕微鏡による蛍光イメージング	96
3.3 実験結果	97
3.3.1 電流刺激による神経活動と同時に起こる細胞内 Mg^{2+} 濃度の上昇	97
3.3.2 電流刺激の強度と Mg^{2+} 応答の関係	100
3.3.3 神経細胞の自発活動による Mg^{2+} 流入	102
3.3.4 神経細胞の脱分極による Mg^{2+} 流入	105
3.4 考察	108
3.4.1 本研究の成果	108
3.4.2 神経細胞の脱分極による Mg^{2+} 動員の分子メカニズム	108
3.4.3 神経細胞の脱分極	108
3.4.4 細胞内 $[Mg^{2+}]_i$ 上昇の機能的役割	109
3.5 第3章のまとめ	109
3.6 第3章の参考文献	110
第4章 結言	115
4.1 結果のまとめ	115
4.2 本研究の意義	117
4.3 神経細胞における Mg^{2+} 調節機構に関する研究における今後の展望	119
第4章の参考文献	120

第1章 緒言

本論文の構成

本論文では第1章において、マグネシウムの研究の歴史、物理化学的特性に関して述べる。次に生体における Mg^{2+} の取り込み機構に関して述べ、中枢神経系まで輸送されるメカニズムに関して議論する。また、 Mg^{2+} の生理学的な役割と Mg^{2+} が関わる神経系の疾患に関して議論する。そして最後に生体試料における Mg^{2+} 測定方法に関して議論する。

第2章において一酸化窒素による細胞内 Mg^{2+} 動員とそのメカニズムに関して明らかにしたことを述べ、生体内におけるその役割に関して議論する。

第3章においては通常の神経活動における Mg^{2+} 動員とそのメカニズムに関して明らかにしたことを述べ、生体内におけるその役割に関して議論する。

最後に、第4章では第2章、第3章の結果を詳細に考察し、今後の展望を述べる。

1.1 マグネシウム

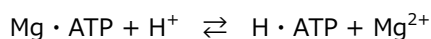
1.1.1 マグネシウム研究の歴史

マグネシウムの語源は古代ギリシアにマグネシアという地方があり、その地域で採れる白マグネシウム (magnesium alba) と呼ばれていた物質が種々の病気の治療に有効であるとされていた。その白マグネシウムの中にマグネシウムが含まれており、それにちなんでマグネシウムと名付けられたとされている (糸川ら、1995年)。1618年に発見されたロンドンの南の村エプソム (Epsom) の鉱泉の水は、傷を治し、便秘を防ぐ作用があり、その水を蒸発させて生じた塩はエプソム塩として名付けられ薬用として利用されていた。このエプソム塩には硫酸マグネシウムが多く含有していたと考えられている。1755年スコットランド人の Joseph Black によって MgO は CaO とは異なる物質であることが認識され (Black, 1796)、1808年にイギリスの Davy によって Mg は初めて単離された (Davy, 1808; Witte, 2010)。1920年アメリカの化学者 Denis は血漿中に Mg が含有されていることを見出した (Denis, 1922)。1926年、フランスの Leroy によってマウスの成長に Mg が必要であることが示され (Leroy, 1926)、生体における Mg²⁺の重要性が認識された。

1.1.2 マグネシウムの物理化学的特性

マグネシウム (Mg) は周期表において 12 番目、アルカリ土類金属に分類される。Mg には ^{24}Mg 、 ^{25}Mg 、 ^{26}Mg の 3 種類の安定同位体が存在し、その大半は ^{24}Mg (78.99%) である。比分子量 24.305 Da、融点 648.8°C、沸点 1,090°C である。Mg $^{2+}$ は水に溶けやすく、海水においては 2 番目に多い陽イオンである。Mg $^{2+}$ のイオン半径は比較的小さいが (Mg : 0.86 Å, Ca : 1.14 Å)、水に溶けると多くの水分子と結合する (Mg : 6-7 分子、Ca、Ba : 1-2 分子)。水和状態において、Mg $^{2+}$ は 2 個の水和殻をもち、水和状態の半径は非水和状態の~400 倍と大きく、他のイオン (Na $^{+}$ 、K $^{+}$ 、Ca $^{2+}$) と比べても大きい (Ca $^{2+}$ の場合 28 倍)。また、水分子の交換速度は他のイオンに比べ遅い (Wolf and Cittadini, 2003)。これらの物理化学的特性によって水中では Mg $^{2+}$ は同じ二価の陽イオンである Ca $^{2+}$ よりも安定である (Wolf and Cittadini, 2003)。Mg $^{2+}$ はチャネルやトランスポーターを通る際に、脱水される必要がある。しかし脱水にも Ca $^{2+}$ よりも Mg $^{2+}$ のほうが必要とするエネルギーは大きい。(de Baaij et al., 2015 ; Sigel and Sigel, 1990)。したがって、Mg $^{2+}$ の輸送に関わるシステムは他のイオンの輸送システムとは異なる可能性がある。この共通の課題を達成する必要があることが、原核生物、真核生物にわたって Mg $^{2+}$ 輸送分子が類似している理由であると考えられている (Sigel and Sigel, 1990)。

細胞内において、Mg $^{2+}$ は Ca $^{2+}$ だけではなく、プロトン (H $^{+}$) やアミン (-NH $^{2+}$) と競合する。リン酸基 (phosphate group) の pKa は 6.5 程度のため、pH が 6.0 程度まで下がると、Mg $^{2+}$ はアデノシン三リン酸 (Adenosine-5'-triphosphate; ATP) から離れ、Mg 依存的な反応に影響を与える (Pasternak et al., 2010)。



ニッケル (Ni $^{2+}$) は Mg $^{2+}$ と最も物理化学的性質 (大きさや水分子の交換速度) が似ている金属であるが、生体内において微量であること、酸素ドナーよりも窒素ドナーと結合しやすい性質があることによって Mg $^{2+}$ と競合することはない。その他の Mg $^{2+}$ と似た物理化学的性質を持つ金属であるマンガン (Mn $^{2+}$) やリチウム (Li $^{2+}$) は Mg $^{2+}$ と置き換え可能である場合がある (Wolf and Cittadini, 2003)。

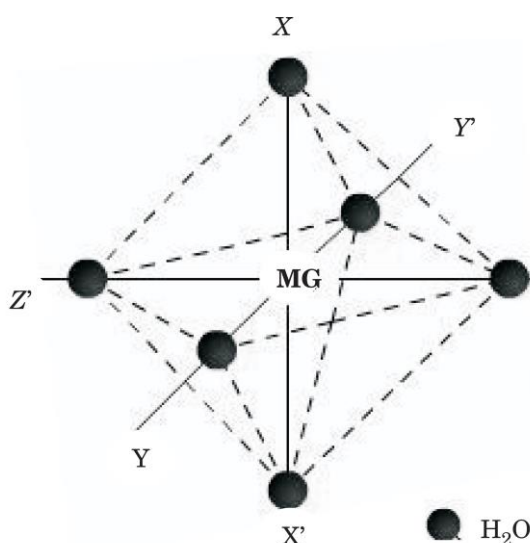


図 1-1 水和状態の Mg $^{2+}$ 分子 (Mg(H $_2$ O) $_6$) $^{2+}$)

1.2 生体におけるマグネシウム

1.2.1 生命の誕生と初期進化におけるマグネシウムの役割

生命は約 38 億年前に海中で誕生し、長い時間を経て 4.2 億年前に植物が上陸したと考えられている。生体に必須の元素は海水中濃度に高いものに多く Mg もその例外ではない。(1) 生体のエネルギー通貨 ATP 細胞内では Mg と錯体を形成していること、(2) 植物細胞において光合成を担う葉緑素(クロロフィル)は中央のポリフィリン環に Mg を配していること、(3) 解糖系やミトコンドリアにおける ATP 合成に関わる酵素反応には Mg が必要であること、(4) Mg は DNA・RNA の構造の安定化に必要であることなど、生命の誕生や初期進化のプロセスにおいても中心的な役割を果たしてきたことが予想される。このようにマグネシウムは生命の根源的な反応と分子構造維持に重要な役割を担っている。表 1-1 に、様々な動物種における Mg 濃度を示した。水棲無脊椎動物以外の陸上の無脊椎動物、脊椎動物において Mg 濃度はほぼ一定であることがわかる(表 1-1)。

表 1-1 海水、淡水および、生体における主なイオン組成

	Na (mM)	K (mM)	Ca (mM)	Mg (mM)	Cl (mM)
Sea Water	470	10	10	54	548
Fresh Water (North America)	0.39	0.04	0.52	0.21	0.23
Marine Invertebrate Starfish <i>Asterias</i>	428	10	12	49	487
Marine Vertebrate Sculpin <i>Myoxocephalus</i>	194	4	3	2	177
Terrestrial Invertebrate Cockroach <i>Periplaneta</i>	161	8	4	6	144
Freshwater Invertebrate Crayfish <i>Cambarus</i>	146	4	8	4	139
Freshwater Vertebrate Salmon <i>Oncorhynchus</i>	147	9	3	1	117
Terrestrial Vertebrate Human <i>Homo</i>	142	4	5	2	104

Harris (1996) より一部改変

1.2.2 生体におけるマグネシウム恒常性

1.2.2.1 生体におけるマグネシウムの分布と代謝回転

通常の成人の身体には約 1,000 mmol (22–26 g) のマグネシウムが含まれており、表 1–2 にその分布を示した。身体に存在する Mg の 50–60% が骨に存在しており、そのうちの 30% が血漿液と平衡状態にあり、血漿中の Mg 濃度を一定に維持する Mg 貯蔵器官としての機能を果たしている (Swaminathan, 2003)。そして、身体に存在する Mg のうち、約 20% は骨格筋 (skeletal muscle)、19% がその他の軟組織 (soft tissue)、そして残りの 1% 以下が血漿中に存在する (Swaminathan, 2003)。健康なヒトの血漿 Mg²⁺ 濃度は 0.7–1.1 mM であり通常の Mg²⁺ 濃度を保つために 1 日あたり男性 420mg、女性 320 mg の Mg²⁺ を摂取することが推奨されている。食事によって摂取された Mg は小腸および大腸によって吸収される。通常時は摂取量の ~30–50% (約 100 mg/日) が吸収され、Mg 摂取量が低い場合、吸収率は約 80% まで上昇する。小腸および大腸において吸収された Mg は血流によって全身に供給される。その後、腎臓で再吸収され残りの Mg は尿として排出される (約 100 mg/日)。腸における Mg 吸収量は他のイオンと比較して厳密に制御されておらず、生体内 Mg 調節は主に腎臓における再吸収と排出のメカニズムによって行なわれている (de Baaij et al., 2015)。ヒトにおける Mg の代謝回転 (turnover) の概要を示した (図 1–2)。また、中枢神経系の間質を満たす脳間質液 (brain interstitial fluid; ISF) は脳血液関門 (blood-brain barrier; BBB) によって脳内の毛細血管と隔てられており、血液脳関門によって神経細胞やグリア細胞の細胞外液の構成要素は厳密に制御されている。また、脳室および、くも膜下腔を満たす脳脊髄液 (cerebrospinal fluid) は血液髄液関門 (blood-CSF barrier; BCB) によって区画化されており、CSF 中の Mg 濃度は血漿中より高い (Bradbury et al. 1972)。また、CSF と脳間質液の間の物質輸送はあまり制限されていないため、一般に CSF と脳間質液の組成は類似していると考えられている (Reiber, 2003; Sharma, 2003, pp.362)。そのため中枢神経系を構成する細胞は他の細胞よりも高い Mg 濃度環境にいる。

表 1–2 ヒトの組織における Mg の分布

Tissue	Weight (Kg wet wt)	Concentration (mmol/Kg wet wt)	Content (mmol)	Content (mg)	% of total body
Serum	3	0.85	2.6	63.2	0.3
Red blood cells	2	2.5	5	122	0.5
Soft tissue	22.7	8.5	193	4690	19.3
Muscle	30	9	270	6560	27
Bone	12.3	43.2	530.1	12900	52.9
TOTAL	70		1000.7	24300	100

Swaminathan (2003)より

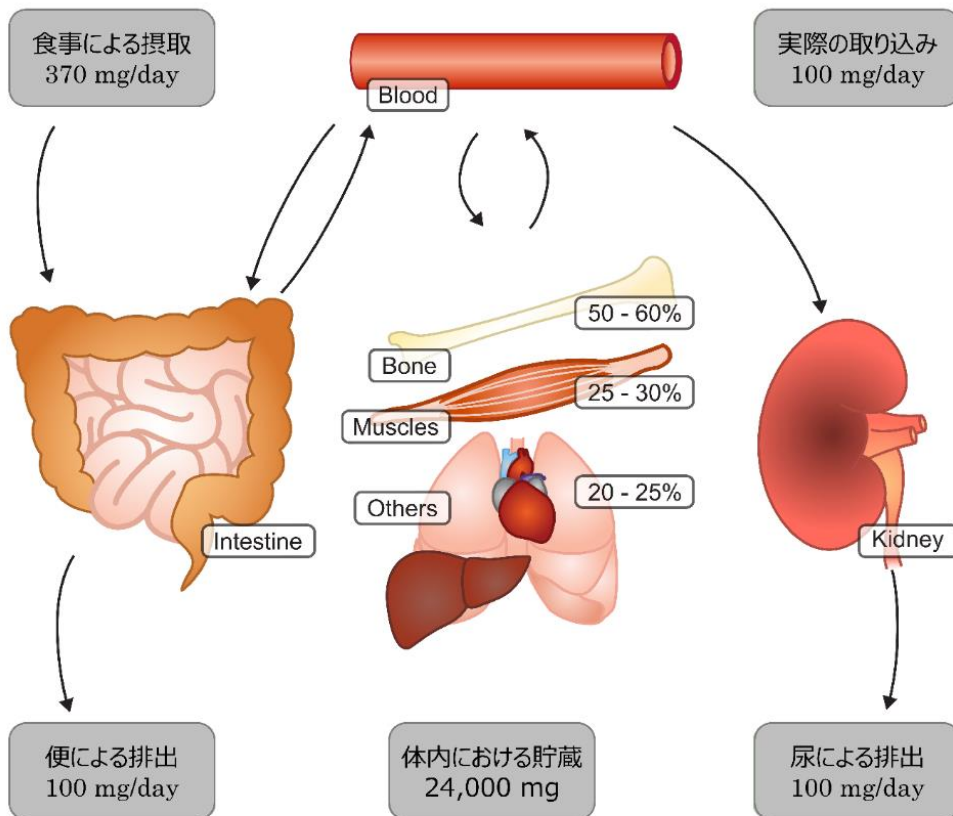


図 1-2 ヒトにおけるマグネシウムの代謝回転の概要

de Baaij et al., 2015 より改変

次に、小腸及び大腸における Mg の吸収、骨による血漿 Mg 濃度の調節、腎臓における Mg の再吸収および排出のメカニズムと血液脳関門、血液髄液関門による中枢神経系の組織液中の Mg 調節機構に関してそれぞれ述べる。

哺乳類の腸管における Mg 吸収のメカニズムは内皮細胞の間を受動拡散によって通過する細胞間隙短経路 (paracellular route) と能動輸送によって内皮細胞の中を通り抜ける経細胞輸送 transcellular transport) の 2 種類が知られている。腸管における Mg 吸収の 80–90%は細胞間隙短経路 (paracellular transport) を介した受動輸送による吸収である。

1.2.2.2 小腸における Mg²⁺吸収

小腸における Mg²⁺吸収は、腸管の管腔側における (1) Mg 濃度と線形相関を示すこと (Karbach and Rummel, 1990; Quamme, 2008)、(2) 小腸の上皮細胞 (epithelial) には Mg²⁺チャネル TRPM6 が発現していないこと (Groenestege et al., 2006) より、細胞間隙短経路 (paracellular route) を介した受動的なものであると考えられている (de Baaij et al., 2015)。胃と小腸をつなぐ消化管である十二指腸 (duodenum) では、小腸の管腔側の電位は内皮細胞をはさんだ基底側に対して低く、Mg はわずかに排出されている (Partridge, 1978)。空腸 (late jejunum) や回腸 (ileum) などの小腸のより遠位の部位においては、管腔内の Mg²⁺濃度は高く、内皮細胞をはさんだ電位差は ~15 mV となるため、受動輸送による吸収が行なわれる (Fordtran, 1968)。この Mg²⁺取り込みの K_m 値は 4–12 mM である (Milla et al., 1979; Schweigel and Martens, 2000)。このことより、まず水分や NaCl が吸収されることによって管腔内の Mg²⁺が濃縮されることによって初めて Mg²⁺吸収が起こると考えられている (de Baaij et al., 2015)。小腸はタイトジャンクションを形成する claudins 1, 3, 4, 5 および 8 の発現が比較的低いため (Amasheh et al., 2011; Schweigel and Martens, 2000)、腸の中で最も paracellular transport による輸送効率が高い部位である。Claudins 16 および 19 は Mg 輸送タンパク質であることが知られているが、腸においては発現していない (Amasheh et al., 2011; Hou et al., 2008)。図 1–3 (左) に小腸における Mg²⁺取り込み機構の概要を示した。

1.2.2.3 大腸における Mg²⁺吸収

盲腸 (cecum) 及び結腸 (colon) における腸細胞 (enterocyte) の腸間腔側には Mg チャネルである transient receptor potential melastatin 6 (TRPM6) 及び transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) が発現しており、細胞内を通り抜ける経路 (経細胞輸送 : transcellular route) による Mg 輸送が行なわれている。Transcellular transport は細胞内を通る輸送のため paracellular transport よりも厳密に制御されている。腸における TRPM6 の発現は盲腸と結腸に局在しており (Groenestege et al., 2006; Lameris et al., 2013)、ラットにおいては吸収される全 Mg²⁺の 37%の Mg²⁺がこの経路によって取り込まれていることがわかっている (Karbach, 1989)。最近のラットを用いた研究によって、CNNM4 が Na⁺/Mg²⁺交換体として機能し、腸細胞 (enterocyte) の基底側 (basolateral) への Mg²⁺排出 (体内への取り込み) することがわかってきた (Yamazaki et al., 2013)。Cyclin And CBS Domain Divalent Metal Cation Transport Mediator 4 (CNNM4) をノックアウトしたマウスでは低マグネシウム血症が発症すること、CNNM4 を過剰発現した細胞においては Mg²⁺の排出が増加しているということもこの結果を支持している。しかし、CNNM4 に変異がある患者において低マグネシウム血症は見られない (Parry et al., 2009; Polok et al., 2009)。これはヒトの CNNM4 変異状態において、Mg²⁺取り込

みを補完する他のメカニズムの存在を示唆している。腸細胞において 1,25-dihydroxyvitamin D3 [1,25-(OH)₂D₃]シグナル（カルシトリオール）¹Ca²⁺の吸収を担う Ca²⁺チャネルの発現量を上昇させる（de Barboza et al., 2015）。しかし、[1,25-(OH)₂D₃]シグナルによって Mg²⁺の吸収を担う TRPM6 の発現量は変化せず、取り込み量も変化しない（Groenestege et al., 2006; Karbach, 1989）。したがって Mg²⁺吸収は Ca²⁺吸収とは異なり、ビタミン D の影響を受けないと考えられる。図 1-3（右）に大腸における Mg²⁺取り込み機構の概要を示した。

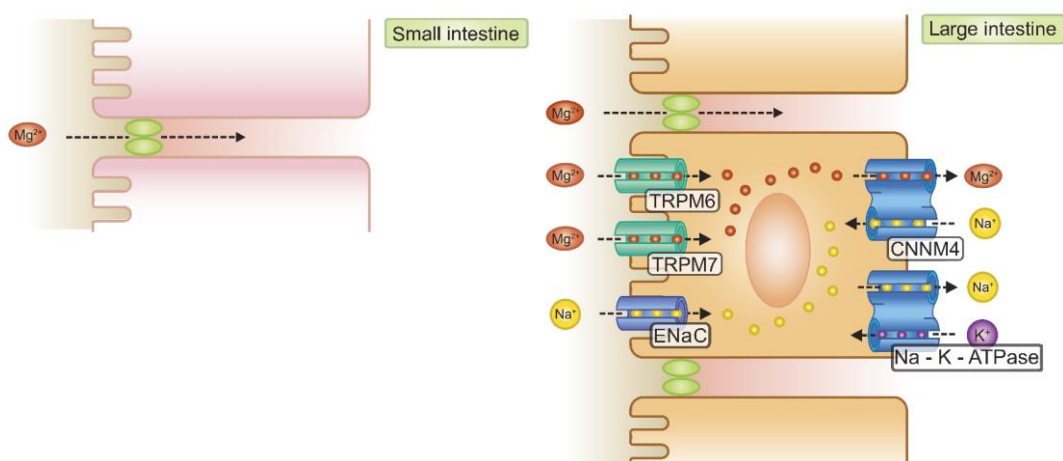


図 1-3 小腸および大腸における Mg²⁺取り込み機構

de Baaij et al., 2015 より改変

¹ ビタミン D の一種

1.2.2.4 骨における Mg^{2+}

生体の Mg^{2+} 量の約 50–60%は骨に貯蔵されている (de Baaij et al., 2015)。骨における Mg^{2+} は骨芽細胞 (osteoblast) による骨の石灰化 (bone mineralization) と溶骨細胞 (osteoclast) による骨の再吸収 (bone resorption) の平衡によって維持されている。そのため、骨内の Mg^{2+} 貯蔵量は身体全体に存在する Mg^{2+} 量の指標と捉えられる (Ferrè et al., 2012)。低マグネシウム血症は骨における金属イオン密度の減少と関連しており、高マグネシウム血症は骨代謝の異常によって起こる無形成骨症 (adynamic bone disease) のリスクファクターとなる (Ferrè et al., 2012)。

骨において Mg^{2+} はヒドロキシアパタイト結晶の表面に結合しており、 Mg^{2+} は骨芽細胞 (osteoblast) の増殖を誘導する。そのため、食事における Mg^{2+} の不足は骨芽細胞の減少および骨重量の減少をもたらす。また、 Mg^{2+} 不足は tumor necrosis factor (TNF)- α 、interleukin (IL)-1 β 、サブスタンス P (substance P) といった炎症誘発性 (proinflammatory) のサイトカインの分泌を増加させる。このサイトカイン分泌の増加は骨の再吸収が起こっていることを示唆している。これらの効果は、低マグネシウム血症による副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone; PTH)、1, 25(OH)2D3 (ビタミン D の一種) の減少によってさらに増幅される。SPY (sex determining region Y) -box 9 (SOX 9) は生体内の全ての軟骨組織に発現し、軟骨形成 (chondrogenesis) において重要な転写因子としての機能を果たす。 Mg^{2+} 欠乏は SOX 9 の減少を引き起こし軟骨細胞 (chondrocyte) によるカラム形成 (column formation) を抑制する。一方で、 Mg^{2+} 摂取量の減少は SOX9 の活性を増加させることも知られている。

1.2.2.5 腎臓における Mg^{2+} 再吸収と排出

腎臓において、1日あたり約 2400 mg の Mg^{2+} が糸球体 (glomeruli) によってろ過されており、ろ過された Mg^{2+} の 10–25% が近位尿細管 (proximal tubule; PT)、50–70% がヘンレ係蹄の太い上行脚 (Thick ascending limb of loop of Henle ; TAL)、10% が遠位尿細管 (Distal convoluted tubule ; DCT) によって吸収され、連結管 (connecting tubule; DT) によって膀胱へと送られる。最終的に、糸球体によってろ過された Mg^{2+} の 95–99% (2300 mg) がネフロン (nephron) によって再吸収され、残りの 100 mg が尿中に排出される。図 1-4 に腎臓における Mg^{2+} 再吸収と排出メカニズムの概要を示した。

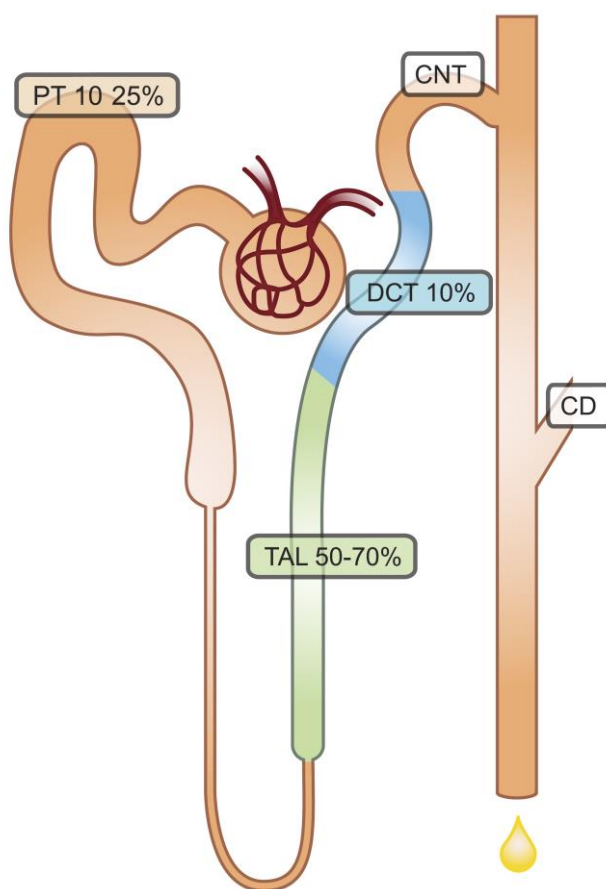


図 1-4 腎臓における Mg^{2+} 再吸収

de Baaij et al., 2015 より改変

近位尿細管 (proximal tubule) による Mg^{2+} 再吸収

糸球体 (Glomeruli) において血漿中の Mg^{2+} の 70% は透過する。そのため、近位尿細管の初めのほうでは 0.5-0.7 mM の Mg^{2+} が存在している (de Baaij et al., 2015)。そのうち ~10-25% の Mg^{2+} がネフロン (nephron) の近位尿細管 (proximal convoluted tubule) によって再吸収される (Le Grimellec et al., 1975; Quamme et al., 1978)。近位尿細管における Mg^{2+} 吸収は主に細胞間隙短経路 (paracellular pathway) を介したものである。近位尿細管上流部位の上皮細胞を挟んだ基底側の電位は間腔側より 6 mV 低くなっており、わずかに排出側に傾いている。一方で、下流部位における電位差は 3 mV となっているため (Kokko, 1973)、 Mg^{2+} はより下流部位において再吸収されている。吸収が起こるためには Aquaporin 1 (AQP1) による水分子の取り込みの結果、近位尿細管の Mg^{2+} 濃度が間質に比べて 1.9 倍以上に高くなることが必要であると考えられている (Le Grimellec et al., 1975)。一般には近位尿細管における Mg^{2+} 吸収は主に paracellular pathway であると考えられているが、イオン輸送体阻害剤である amiloride の影響を受ける Mg^{2+} 輸送が存在している (Ikari et al., 2002)。どちらの経路を介する場合においても Mg^{2+} 取り込みには水分子の輸送、またそれに先行する Na^+ 輸送が必要である。ホルモンによる Na^+ 再吸収の調節は間接的に Mg^{2+} の再吸収を調節している可能性がある (de Baaij et al., 2015)。図 1-5 に近位尿細管における Mg^{2+} 再吸収機構の概要を示した。

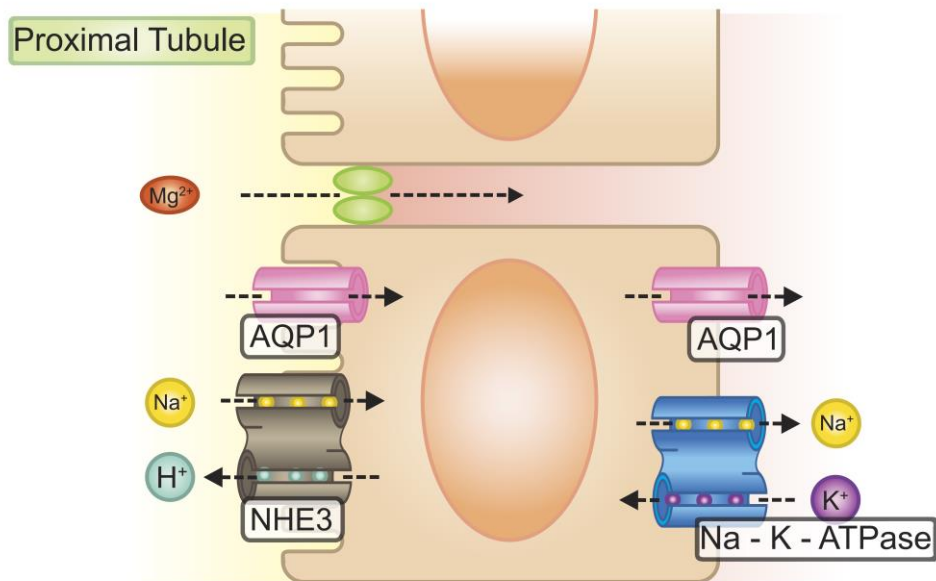


図 1-5 近位尿細管 (proximal tubule) による Mg^{2+} 再吸収

de Baaij et al., 2015 より改変

ヘンレ係蹄の太い上行脚 (Thick ascending limb of loop of Henle ; TAL)

多くのイオンが近位尿細管で再吸収される一方、 Mg^{2+} 再吸収は主にヘンレ係蹄の太い上行脚 (thick ascending limb of loop of Henle; TAL) で行なわれる (Hoenderop et al., 2002; Lambers et al., 2006; Renkema et al., 2008)。その割合は腎臓における Mg^{2+} 再吸収の~50-70%に達する。TAL における Mg^{2+} 再吸収は細胞間隙短経路 (paracellular pathway) を介したものであり、間腔側の基底側に対する正の電位 (+10 mV) に依存している。この電位差は $Na^+-K^+-2Cl^-$ 共輸送体 (NKCC2) によるイオンの取り込みと間腔側への K^+ 排出によって形成されている (Greger and Velázquez, 1987)。その他にも renal outer medullary potassium (ROMK) チャネルを介した K^+ 排出と paracellular pathway を介した Na^+ の逆流が TAL における間腔側と基底側間の電位差を生成している (Mandon et al., 1993)。この細胞間隙短経路 (paracellular pathway) による Mg^{2+} 再吸収は tight junction のイオン透過性に依存している。タイトジャンクションの主要な構成要素は claudin ファミリーであり、現在ヒトにおいて 26 種類の claudin が発見されており (Günzel and Alan, 2013)、TAL においては claudin 3, 10, 11, 14, 16, 19 が発現している。特に、claudin 16, 19 の変異は腎臓において Mg 欠乏になるため、claudin 16, 19 は Mg^{2+} 透過性に影響を与えるものと考えられている (Konrad et al., 2006)。このように claudin 16 は細胞間隙短経路 (paracellular pathway) における Mg^{2+} チャネルとして考えられているが、claudin 16 は Na^+ の透過性も増加させる (Himmerkus et al., 2008; Hou et al., 2008; Shan et al., 2009)。そのため、claudin 16 は TAL における Na^+ を逆流させることによって間腔側と基底側間の電位差を生成し、間接的に Mg^{2+} 取り込みに関わっている可能性がある (de Baaij et al., 2015)。claudin 19 に関してはほとんど研究がされていない。claudin 19 のノックダウンマウスにおいて尿中 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} の増加、血漿中の Mg^{2+} の減少をもたらす (Hou et al., 2009)。このように claudin16, 19 はそれぞれ腎臓における Mg^{2+} 再吸収に関わっているが、タイトジャンクションの形成には claudin16 と claudin19 の相互作用が必要であることもわかっている (Hou et al., 2008; 2009)。また一方で、Claudin 14 は Claudin 16 もしくは Claudin 14, claudin 14-claudin 16 複合体と共発現するとタイトジャンクションの陽イオン選択性を減少させる (Gong et al., 2012)。そのため、claudin 14 のノックアウトマウスにおいて血漿中の Mg^{2+} 濃度は上昇し、尿中の Mg^{2+} 濃度は減少する (de Baaij et al., 2015)。claudin 14 の発現は Ca^{2+} 濃度の影響を受けることが知られており、claudin 14 の発現調節に関わる Ca sensitive receptor (CaSR)は Mg^{2+} によっても活性化されることがわかっている (de Baaij et al., 2015)。そのため血漿中の Mg^{2+} 濃度は claudin14 の発現レベルを介して Mg^{2+} 取り込みを調節している可能性があり、今後の研究が期待されている。近年、claudin 10 が TAL 透過するイオンの選択性に関わっていることがわかり、claudin 10 ノックアウトマウスにおいて高マグネシウム血症 (hypermagnesemia)、腎石灰化症 (nephrocalcinosis) を発症し、 Na^+ の paracellular 経路の透過性が失われることがわかっている (de Baaij et al., 2015)。図 1-6 にヘンレ係蹄の太い上行脚 TAL における Mg^{2+} 再吸収機構の概要を示した。

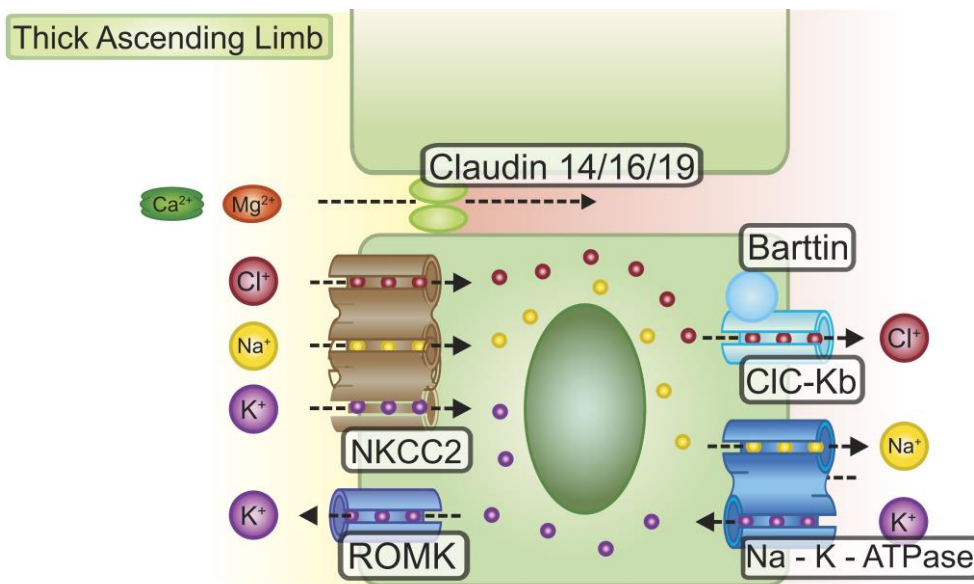


図 1-6 Thick ascending limb of loop of Henle ; TAL による Mg^{2+} 再吸収

de Baaij et al., 2015 より改変

遠位尿細管 (Distal convoluted tubule ; DCT)

遠位尿細管では経細胞輸送 (transcellular pathway) による厳密に制御された Mg^{2+} 再吸収によって、尿中に排出する Mg^{2+} 濃度を調節している。その結果、遠位尿細管において、約 10%の Mg^{2+} が経細胞輸送 (transcellular pathway) によって再吸収されている (Brunette et al., 1974)。腎臓では DCT 細胞において TRPM6 チャンネルが特異的に発現しており、DCT 細胞は TRPM6 チャンネルを介して間腔側の Mg^{2+} を取り込んでいる (Voets et al., 2004)。遠位尿細管内の $[Mg^{2+}]$ は 0.2–0.7 mM、通常の細胞内 $[Mg^{2+}]$ は 0.5–1.0 mM であるため DCT 細胞の細胞内と腸管における $[Mg^{2+}]$ 勾配はほとんど存在しない。したがって、遠位尿細管内における、DCT 細胞への Mg^{2+} 流入は負の膜電位によるものである。この膜電位は間腔側の電位依存性 K^+ チャンネル $Kv1.1$ が K^+ 排出を行うことによって形成されており、細胞内 $[Mg^{2+}]$ は $Kv1.1$ チャンネルの活性を抑制し膜電位形成を阻害することによって細胞の Mg^{2+} 取り込みを抑制する負のフィードバックによって Mg^{2+} の取り込み量を調節している (Gómez-Hernandez et al., 1997)。ただし DCT における $Kv1.1$ の発現量は少なく (Glaudemans et al., 2009; de Baaij et al., 2013)、他のチャンネルと協調して機能することによって Mg^{2+} 取り込みを制御していると考えられる。実際、ROMK チャンネルも $Kv1.1$ チャンネルと同様に、DCT 細胞の膜電位形成に寄与し、細胞内 $[Mg^{2+}]$ によって抑制されている。また ROMK チャンネルの発現は Mg^{2+} 摂取量によって制御されているという報告もある (Xu et al., 1997; de Baaij et al., 2013)。

DCT 細胞における TRPM6 チャンネルの活性は DCT 細胞内の $[Mg^{2+}]$ によって制御されており、細胞内 Mg^{2+} は厳密に制御されていると考えられる。その他にも TRPM6 チャンネルは転写量、細胞膜の局在、チャンネル活性の程度といった多くの因子によって制御されている (Cao et al., 2008)。例えば、EGF や insulin は PI3K-Akt-Rac1 経路依存的なメカニズムによって TRPM6 の細胞膜への挿入を増加させる (Nair et al., 2012; Thebault et al., 2009)。また、insulin は cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) 依存的なチャンネルのリン酸化を介して TRPM6 の活性を制御する。したがって、EGFR やインスリン受容体の活性が低い患者は低マグネシウム血症に罹患しやすい (Nair et al., 2012; Schrag et al., 2005)。加えて、エストロゲン (estrogen) は TRPM6 の mRNA 量を上昇させる (Groenestege et al., 2006)。その他にも、receptor for activated C-kinase 1 (RACK1) や prohibitin2 (PHB2/REA) といった TRPM6 の調節因子が発見されてきている。RACK1 は自己リン酸化状態にある TRPM6 のキナーゼ部位と相互作用し TRPM6 の活性を減少させる (Cao et al., 2008; 2009)。このように遠位尿細管における DCT 細胞への Mg^{2+} 取り込みは様々な因子による直接的・間接的なメカニズムによって制御を受けている。DCT 細胞に取り込まれた Mg^{2+} の血中への排出機構に関しては不明な点が多いが、cyclin M2 (CNNM2 ; ACDP2 としても知られる)が腎臓において DCT 細胞、連結管 (connecting tube; CN) CNT 細胞の基底側に局在していることが知られており (de Baaij et al., 2012; Stuver et al., 2011; Wang et al., 2003)、 Mg^{2+} 摂取量の減少は CNNM2 発現を増加させる (Stuver et al., 2011; de Baaij et al., 2013)。また、 Mg^{2+} 輸送体 SLC41A1 も、間腔側・基底側など細胞内局在に関してはわかっていないが、DCT 細胞における発現が確認されている (Hurd et al., 2013)。SLC41A1 の変異は髄質性囊胞腎 (nephronophthisis) 様の表現型をもたらす (Hurd et al., 2013)。また、SLC41A1 が Mg^{2+} の取り込み・排出の両方に関与していることも報告されている (Kolisek et al., 2012)、腎臓機能における SLC41A1 の役割はわかっていない。図 1-7 に遠位尿

細管における Mg^{2+} 再吸収機構の概要を示した。

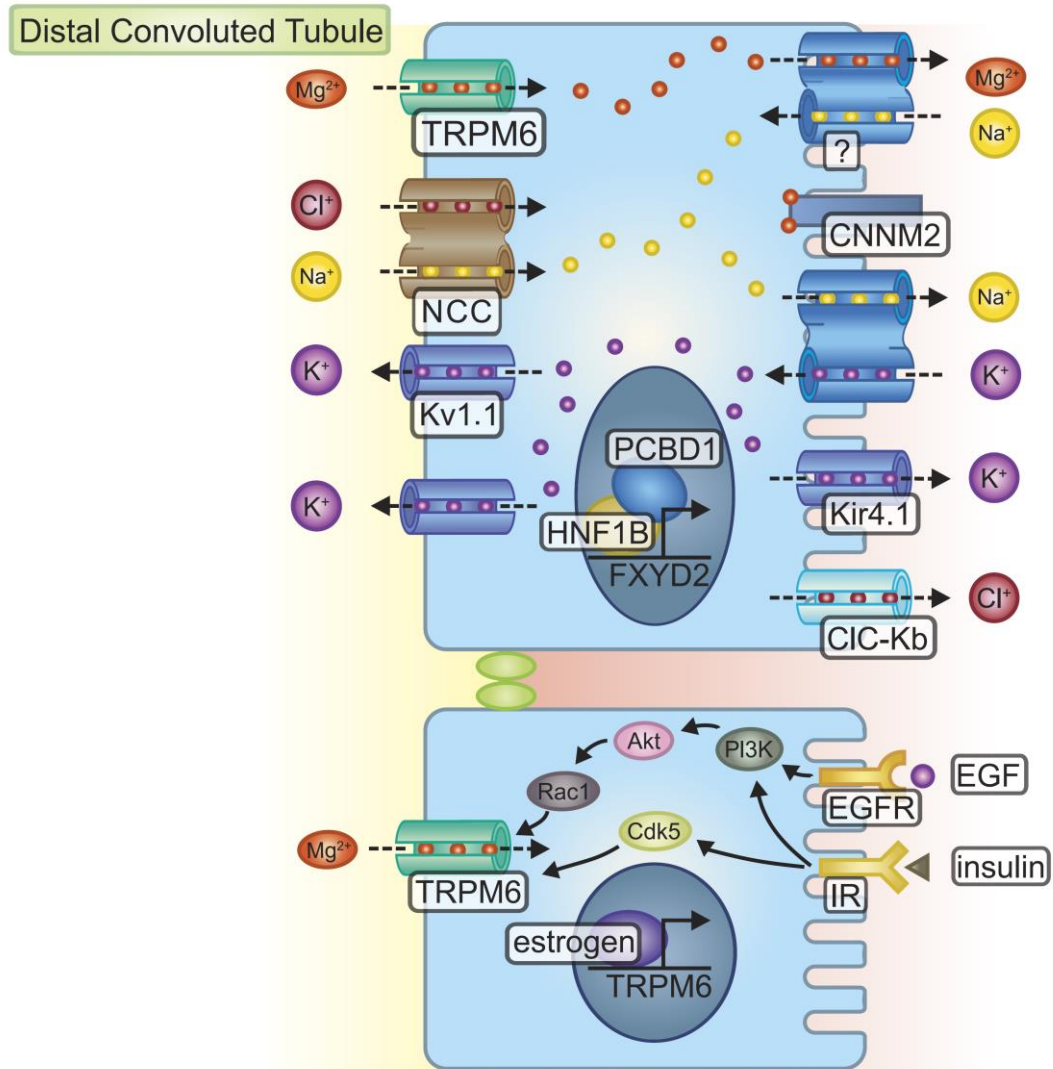


図 1-7 遠位尿細管 (Distal convoluted tubule ; DCT)

de Baaij et al., 2015 より改変

1.2.2.6 脳における Mg^{2+}

中枢神経系の神経細胞やグリア細胞は、最適に機能するために高度に特殊化した環境を必要としている。脳内の間質液 (interstitial fluid) と脳質およびくも膜下腔を満たす脳脊髄液 (cerebrospinal fluid; CSF) は、それぞれの調節機構によって構成物質の組成は決められている。脳内の間質液は血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB)、脳脊髄液は血液髄液関門 (blood-CSF barrier; BCSFB) によってホメオスタシスが調節されている (Kandel et al., 2014, pp.1534)。そこで、血液脳関門と血液髄液関門における Mg^{2+} 調節機構に関してそれぞれ記述する。

血液脳関門 (Blood Brain Barrier)

血液脳関門は脳の毛細血管の内皮細胞から成る、血液と脳組織液との間の物質交換を制限する機構である。これにより血漿中の物質濃度の変動の影響を小さくし、神経細胞の細胞外環境を安定化する機能を持っている。脳内の小血管は、血管管腔表面を途切れなく覆う血管内皮細胞 (endothelial cells) で形成されている。反管腔側では、毛細血管の基板内に埋まっている周皮細胞 (pericyte) や平滑筋様細胞と接している。血管付近のアストロサイトは突起をのぼして毛細血管を取り囲み、毛細血管—アストロサイト複合体を形成している。これらの内皮細胞とその間の広範囲にわたる細胞間結合は、血液脳関門の主要な構成要素である (Kandel et al., 2014, pp.1534)。脳の毛細血管の 95% は脳血液関門を有しており、ほぼすべての神経細胞が個別の毛細血管によって栄養の供給を受けている。また、脳の内皮細胞はタイトジャンクションによって強く結合し高い電気抵抗を持っている。タイトジャンクションは傍細胞経路 (paracellular pathway) による物質の透過を制御して血液脳関門のバリア機能を担っている。また成熟した血液脳関門は、(1) ペリサイト (2) アストロサイト (3) 神経細胞の少なくとも 3 種類の細胞によって調節されている。図 1-8 に脳血液関門の構造を示した。

また、脳血液関門による物質輸送には以下の 3 つの様式がある。

(1) 脂溶性物質の拡散

脂溶性が高い物質は内皮細胞の細胞膜を透過するため拡散によって脳血液関門を通過する。

(2) 特定の水性物質の促進輸送、エネルギー依存性の受容体介在性輸送

濃度勾配を利用したエネルギー非依存的グルコース輸送、エネルギー依存的アミノ酸輸送など

(3) イオンチャネル

特異的チャネルによる電解質の輸送など

脳への Mg^{2+} 流入は血液脳関門の成熟度合いと関係しており (Chan et al., 1992)、胎児のヒツジやモルモットの大脳半球において、 K^+ 量が最小、 Cl^- 量、 Na^+ 量が最大に達するとき Mg^{2+} 量は大きく減少する (Bradbury et al., 1972)。また生後ラットの発達において、脳の Mg 量は部位によって異なり、生後 5 日目においてマグネシウムは橋 (pons) と延髄 (medulla) において顕著に高く、大脳皮質 (cerebral cortex) において低い。5 日を過ぎるとすべての部位において、水分量の減少と組織重量の増加と同時に Mg^{2+} 量は減少する (Chan et al., 1992)。毛細血管中の Mg^{2+} は BBB を透過し (Sacco et al., 2007)、血

液中から脳へと輸送される。皮質の細胞外液 (extracellular fluid; ECF または interstitial fluid) における Mg^{2+} 濃度は血漿液、脳槽 CSF の Mg^{2+} 濃度よりも高いため、血液から ECF への能動輸送が行なわれていると考えられる (Bito, 1969)。また、脳の内皮細胞において腎臓において Mg^{2+} の取り込み機構として機能している TRPM6、TRPM7 が発現していることより (Fonfria et al., 2006)、BBB における脳内への Mg 取り込みに関しても TRPM6 と TRPM7 が主要な役割を果たしていることが示唆されている。BBB の構造は腎臓の遠位尿細管と類似していることが知られており、BBB の Mg^{2+} 輸送機構は遠位尿細管における Mg^{2+} 輸送機構から推測することはできる。しかし実際のメカニズムはほとんどわかっていないため、さらなる研究が期待されている。

脳脊髄液 (cerebrospinal fluid; CSF)

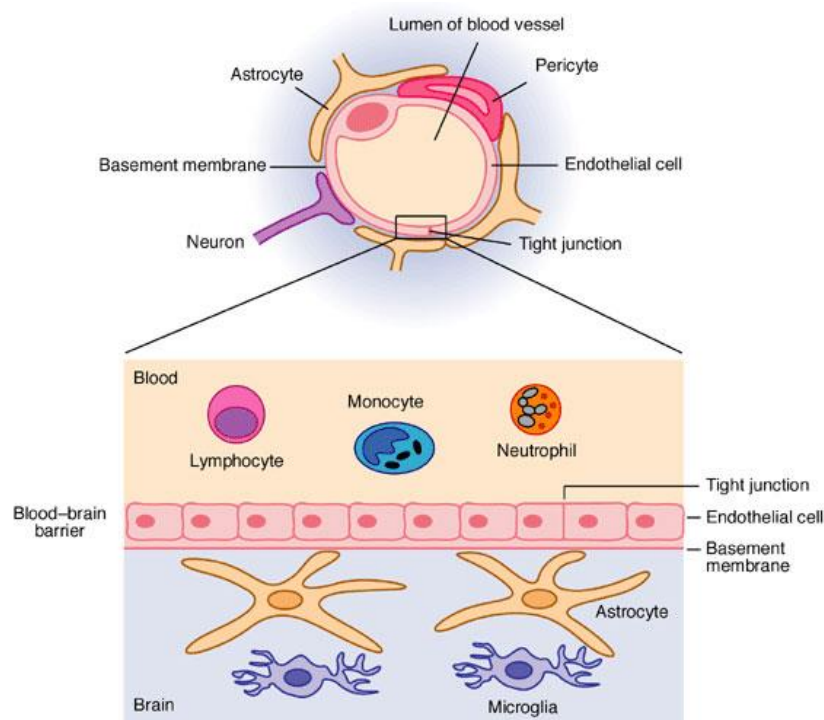
脳脊髄液 (CSF) の総量は、約 140 mL とされており、側脳室と第 3 脳室は約 12 mL、脊髄のくも膜下腔は約 30 mL の脳脊髄液を含み、残りの 100 mL は脳のくも膜下腔と主な脳槽に含まれる。脳脊髄液はくも膜絨毛の集合体から成るくも膜顆粒とくも膜絨毛によって吸収され、硬膜を通り抜けて上矢状静脈洞と他の静脈構造の内腔へと入る。くも膜顆粒は弁として機能することによって、くも膜下腔から静脈血へ脳脊髄液が一方方向に流れることを可能にしている。脳脊髄液 (CSF) は脈絡叢 (choroid plexus) から脳質へと分泌されており、成人の脳脊髄液の生成速度は 1 分あたり 0.35 mL、1 日あたり約 500 mL であるため、1 日に 3~4 回脳脊髄液の全量が入れ替わっている。脳脊髄液にはいくつかの機能がある。(1) 脳脊髄液は間質液と交流があるため神経細胞とグリア細胞の細胞外環境を一定に保つのに役立っている。(2) 脳室系からくも膜下腔または静脈洞への一方方向の流れは、脳に対して有毒物質を除去する機能ももっている。(3) 脳脊髄液は頭部が動いた際に生じる頭蓋骨内での衝撃から脳を守る、物理的なクッションの役割も担っている。脳脊髄液の浮力によって脳 (平均重量 1400g) は浮かんでいるため、みかけの重量は 50g 以下となっている。(4) また、脳脊髄液はリンパ液としての機能を果たすことも知られている。脈絡叢は腎臓の遠位尿細管や集合管と構造が似ており、脳脊髄液の化学的安定性を保つために毛細血管濾過や上皮分泌機構を用いている (Kandel et al., 2014)。

血液 CSF 関門 (blood-CSF barrier ; BCSFB)

血液と CSF は脈絡叢の血液 CSF 関門によって隔てられており、CSF は脈絡叢 (choroidal plexus) の上皮細胞 (epithelium) によって形成される血液髄液関門によって産生される。脈絡叢における CSF 産生のメカニズムは未だ不明な点が多いが、腎臓の遠位尿細管における物質輸送機構と類似していると考えられている。血液髄液関門によって血液と CSF が隔てられていることにより、血漿中の物質濃度が変化したとしても CSF 中の物質濃度はただちに変わらない。実際、腹腔内注射による Mg^{2+} 投与では、血中 Mg^{2+} 濃度は上昇するが CSF 中の Mg^{2+} 濃度は変化しない (Sun et al., 2009)。脈絡叢の上皮細胞は CSF 中の Mg^{2+} 濃度を感知して、 Mg^{2+} 分泌速度を変化させることによって CSF 中の Mg^{2+} 濃度を維持している (Oppelt et al., 1963; Reed and Yen 1978)。ヒツジやネコの単離脈絡叢を用いた実験によって、脈絡叢は濃度勾配に反して Mg^{2+} を輸送していることが示されており (Allsop, 1986; Reed and Yen, 1978)、*in vivo* においても Mg^{2+} が CNS 内へと流入していることが確認されている (Allsop and Pauli, 1985)。

したがって、CSF 中の Mg^{2+} 濃度は血しょう中の Mg^{2+} 濃度より高く維持されており (Oppelt et al., 1963; Nischwitz et al., 2008; Amtorp and Sørensen, 1974; Bradbury et al., 1972)、ヒトにおいては CSF の Mg^{2+} 濃度は血清 Mg^{2+} 濃度の 1.3 倍であることがわかっている (Nischwitz et al., 2008)。また通常、脳室 CSF の Mg^{2+} 濃度は腰部 CSF の Mg^{2+} 濃度より高く、血液中の Mg^{2+} 濃度変化の影響は腰部 CSF よりも脳室 CSF の方が受けやすい (Allsop and Pauli, 1985)。鉄、銅、亜鉛といった高分子量金属イオンの取り込みは受容体を介したシグナル経路によって厳密に制御されている一方で、 Mg^{2+} や Ca^{2+} などの低分子量金属イオンは特異性の低いイオンチャネルによって調節されていることが示唆されている (Nischwitz et al., 2008)。

また脈絡叢における Mg^{2+} 輸送は他イオン濃度の影響を受けることが知られており、高濃度 K^+ は Mg^{2+} 輸送量の減少を引き起こし、高濃度 Ca^{2+} はそのような効果を引き起こさない (Allsop, 1986)。これらの事実をまとめると、脈絡叢細胞の能動輸送によって CSF 中の Mg^{2+} 濃度は血漿中より高く保たれていると言える。また、最近では食事による摂取によって CSF 中の Mg^{2+} 濃度を上昇させる化合物 magnesium-L-threonate (MgT) が開発され、非侵襲的に CSF 中の Mg^{2+} 濃度を上昇させることが可能となっている (Slutsky et al., 2010)。



The blood-brain barrier (BBB)

図 1-8 脳血液関門 (Blood Brain Barrier)

Francis et al., 2003

表 1-3 体液のイオン組成

ionic species	Blood plasma	central spinal fluid	in mammalian cells
Na^+	150 mM ^a	147 mM ^a	12 mM ^c
K^+	4.6 mM ^a	2.9 mM ^a	139 mM ^c
Mg^{2+}	1.6 mM ^a	2.2 mM ^a	0.5–1.2 mM ^c (total: 10–30 mM)
Ca^{2+}	4.7 mM ^a	2.3 mM ^a	< 200 nM ^c
Cl^-	102 mM ^b	119 mM ^b	4 mM ^c
Zn^{2+}	20 μM ^d	150 nM ^c	0.1–1 nM (total: 200 μM) ^d

^aCerebrospinal Fluid in Diseases of the Nervous System. Fishman. (1992)

^bPrinciples of Neural Science. 5th edition. Kandel et al. (2012)

^cMolecular Cell Biology. 4th edition. Lodish et al. (2000)

^dTakeda et al. (2013)

1.2.3 マグネシウムの生理的役割と神経系疾患

1.2.3.1 発生におけるマグネシウムイオンの役割

ラットにおいて妊娠時の Mg^{2+} 欠乏は胎児の奇形 (malformation) や吸収 (resorption) [胚または胎盤形成後に胚の発生が止まり、吸収あるいは吸収されつつある状態] を引き起こす (Hurley et al., 1976)。また、 Mg^{2+} 欠乏状態にある母親から生まれた子どもは、発達遅延 (growth retardation) や脂質代謝異常、インスリン耐性、糖尿病の発症確率が高くなる。ヒトにおいても Mg^{2+} 欠乏が胎児の成長や発生に悪影響をおよぼすことがわかっている (Venu et al., 2008)。臍帯血 (cord blood) 血小板 (platelet) における細胞内 $[Mg^{2+}]$ 減少は、small for gestational age (SGA) ² と関連しており (Venu et al., 2008)、妊娠 25 週目より前における Mg の経口摂取は早産 (preterm birth)、低出生体重児、SGA の発生確率を減らす効果がある (Makrides and Crowther, 2001; 2014)。妊娠・授乳期の女性の Mg^{2+} 要求量は通常時より高く (妊娠 320–400 mg/day ; 通常 320–360 mg/day (米国))、 Mg^{2+} 摂取量が 378 mg/day 以下になると、神経管欠損 (neural tube defect)、二分脊椎症 (spina bifida) のリスクが 2–3 倍になる (Groenen et al., 2004)。一般に、成長や分化が顕著な組織においては Mg^{2+} 欠乏の影響を受けやすい傾向にある (Komiya et al., 2014)。

発生において重要な機能を果たす Mg^{2+} 調節機構として TRPM7 と TRPM6 チャンネルがある。TRPM7 と TRPM6 は二価の陽イオンチャンネルであり、細胞内 Mg^{2+} の恒常性維持に重要な機能を果たしている。TRPM6、TRPM7 はイオンチャンネルドメインとキナーゼドメインからなり、イオンチャンネルとキナーゼの両方の機能を持っている (Runnels, 2011)。低マグネシウム血症の患者において TRPM7 の変異は確認されていないが、キナーゼドメインを欠損した TRPM7 を発現する遺伝子改変マウスにおいて、小腸の Mg^{2+} 吸収の機能不全による低マグネシウム血症 (hypomagnesemia) が発症する (Ryazanova et al., 2010)。このことより小腸における TRPM7 を介した Mg^{2+} 取り込みには TRPM7 の機能は必要であると考えられる。TRPM7 欠損マウスにおいては受精後 7.5 日目の胚において異常が生じ、重篤な胚では原腸陥入 (gastrulation) の開始、中胚葉形成 (mesoderm formation) は起こるが、7.5–8.5 日目に致死となる (Ryazanova et al., 2010; Jin et al., 2012)。この TRPM7 欠損による原腸形成の機能不全は Mg^{2+} トランスポーター SLC41A2 の過剰発現、TRPM6 の過剰発現、もしくは Mg^{2+} 添加によって防ぐことができる (Ca^{2+} 添加では防げない)。これらの事実より TRPM7 による Mg^{2+} 調節機構は発生に重要であると考えられている。また、TRPM6 の変異は家族性低マグネシウム血症の原因であることが知られているが、TRPM6 欠損マウスにおいては発生致死 (embryonic mortality)、神経管異常 (neural tube defects) が起こることが知られている (Walder et al., 2009)。

胞胚期 (blastula) の後、原腸陥入が起こることによって、胚は単純な中空の丸い形から中心に腸管をもった左右対称な構造へと変化する。このとき Wnt シグナル (Wnt pathway) が原腸胚形成や収斂伸長 (convergent extension) に関わっていることが知られている。TRPM7 欠損による原腸陥入の異常は、Wnt シグナルを構成する分子 Dishevelled (Dvl) の発現によって抑えることができる。このため、TRPM7 は Dvl の上流で機能していると考えられる (Volpe and Vezu, 1993)。また、繊維芽細胞にお

²胎児や新生児が妊娠期間に比べて小さいこと

る TRPM7 の欠損は細胞極性 (polarity) や移動 (migration) を阻害する (Su et al., 2011)。また、TRPM7 は細胞の極性や運動に関わるとされる Rac や small GTPase cdc42 の活性化には必要であることが知られている。また TRPM7 欠損による細胞極性や運動の異常は Mg^{2+} トランスポーターである SLC41A2 過剰発現によって緩和されることから、TRPM7 欠損による発生致死は Mg^{2+} 恒常性維持の機能不全が細胞の極性と運動制御の異常をもたらしていると考えられている (Su et al., 2011)。また、TRPM7 を欠損させると Embryonic Stem (ES) 細胞や induced pluripotent stem (iPS) 細胞は死滅し (Ryazanova et al., 2010; Jin et al., 2012)、DT40 細胞においては細胞周期が停止する (Schmitz et al., 2003)。また DT40 細胞³ における TRPM7 欠損による細胞周期の停止は Mg^{2+} 添加によって抑制される (Schmitz et al., 2003; Ryazanova et al., 2010)。このように、TRPM7 による Mg^{2+} 調節が発生・分化に重要な役割を果たしていることを支持する報告は多数存在する。しかし TRPM7 を介した Ca^{2+} シグナルが細胞接着や運動性の制御に関わっていることや (Clark et al., 2006; Su et al., 2006; Visser et al., 2013; Wei et al., 2009)、 Mg^{2+} が Ca^{2+} シグナルに影響を与えることによって間接的に細胞移動に影響を与えていること (Volpe and Vezu, 1993) が知られており、TRPM7 の機能解析によって明らかになった TRPM7 の機能は Mg^{2+} もしくは Ca^{2+} どちらの調節機能に拠るものなのか未だ不明な点が多い (Komiya et al., 2014)。

³ ニワトリの B 細胞株

1.2.3.2 マグネシウムが記憶と学習に与える影響

Mg²⁺摂取が認知機能の向上をもたらすことは以前より知られていた (Landfield and Morgan, 1984)。しかしながら、脳血液関門 (blood-brain barrier ; BBB) は血液中の金属イオン濃度の変化から脳組織を保護する機能をもっており、腹腔内注射では脳内の Mg²⁺濃度変化はおこらない (Sun et al., 2009)。しかし脳内の Mg²⁺濃度を増加させる化合物である MgT を摂取したラットにおいて、認知機能が向上する (Slutsky et al., 2010)。また MgT をアルツハイマー病モデルマウスに投与すると認知機能の低下が緩和され (Li et al., 2013)、また細胞外 Mg²⁺濃度を 50%、4 時間上昇させると、シナプス可塑性の増強をもたらすことがわかっている (Slutsky et al., 2004)。後述するように Mg²⁺は通常細胞機能において重要な役割を担っているため、神経細胞の機能におけるそれらの機能が認知機能に影響を与えていると考えられている。その他にも細胞外 Mg²⁺は神経機能において重要な役割を担っている N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を電位依存的に抑制しており (Mg²⁺ブロック)、神経活動を調節している。したがって細胞外[Mg²⁺]は神経活動に影響を与える。Mg²⁺ブロックの影響を受けない NMDA 受容体を発現する変異体ショウジョウバエ (*Drosophila*) において、連合学習は影響を受けないが長期記憶の形成には欠陥を生じ、CREB リプレッサーアイソフォーム (CREB repressor isoform) の発現を上昇させ、CREB 依存的な遺伝子発現に影響を与える (Miyashita et al., 2012)。また外傷性脳損傷 (traumatic brain injury) 後、Mg²⁺を添加すると認知機能の回復が促進される (Hoane, 2004; 2007)。このように Mg²⁺は細胞内・細胞外の両方から神経細胞の機能に影響を与えることによって認知機能を調節していると考えられているが、Mg²⁺が認知機能に影響を与えるメカニズムはほとんどわかっていない (Vink et al., 2011)。

1.2.3.3 マグネシウムとアルツハイマー病

Mg はアルツハイマー病 (AD) との関連も示唆されている。AD は一般に最も多い神経変性疾患であり、65 歳以上の高齢者の約 6–8%において見られる。AD は進行性の認知障害と神経原繊維変化 (intracellular neurofibrillary tangles)、老人斑 (senile plaques) といった病理学的特長によって特定される (Braak and Braak, 1991)。老人斑は 39–42 アミノ酸であるアミロイドβによって形成されており、アミロイドβが蓄積すると神経細胞の変性や脱落を引き起こし、脳の萎縮をもたらす。アミロイドβは脳にあるアミロイドβ前駆体タンパク質 (Amyloid-β precursor protein ; APP) がγ-セクレターゼによって切断されてβ-C-terminal fragment (β-CTF) が生成される。このβ-CTFがγ-セクレターゼによって切断されるとアミロイドβが生成される。アミロイドβには、大きく分けて 40 個のアミノ酸からなる Aβ40 と 42 個のアミノ酸からなる Aβ42 の 2 種類のものがある。Aβ42 の方が、凝集性が強いいため、先に脳に蓄積する。通常、Aβ40 の方が Aβ42 に比べて産生される量は多いが、Aβ42 の産生される割合が増加すると、Aβ42 の凝集が起こり、結果として老人斑が形成される原因となる。図 1–9 に AD の病理学的メカニズムをまとめた。AD 患者の血清、脳組織における Mg²⁺濃度は健常者と比較して低く (Durlach, 1990; Glick, 1990a; Lemke, 1995; Andradi et al., 2000; 2005; Vural et al., 2010)、血清中 Mg²⁺濃度が低いと、global deterioration scale (GDS)⁴、clinical dementia rating (CDR)⁵の結果はより重篤であった (Cilliler et al., 2007)。Mg²⁺と認知機能とのかかわりに関して、脳内の Mg²⁺濃度上昇は記憶と学習の能力を増強すること (Landfield et al., 1984 ; Slutsky et al., 2010)、Mg²⁺の経口摂取は認知症患者の記憶能力とそのほかの症状を改善すること (Glick et al., 1990b) Mg²⁺投与は脳損傷後の認知機能の回復を促進すること (Enomoto et al., 2005; Hoane, 2005; 2007)、Mg²⁺欠乏は感情の記憶の機能不全をもたらすこと (Bardgett et al., 2005; 2007) が報告されている。

家族性アルツハイマー病の原因遺伝子 presenilin1 (PS1) に変異を加えたマウスのアルツハイマー病モデルにおいて、βセクレターゼ (BACE1) の過剰発現、NMDA 受容体シグナルの抑制、sAPPβ、β-CTF 量の増加が見られるが、脳内 Mg²⁺濃度上昇を誘導すると、これらの症状を防ぎ、Aβによる NMDA 受容体の情報伝達障害を防ぎ、AD において過剰に活性化することが知られている calpain/calcineurin/Cdk5 シグナル経路の活性も抑制される (Li et al., 2014)。APP の代謝経路として、APP はα-セクレターゼによって切断されるとα-CTF と sAPPαに分解される。sAPPαは可溶性分子であり、細胞ストレスに対する神経保護 (Mattson et al., 1993; Schubert and Behl, 1993) や神経突起伸長の活性化 (Small et al., 1994)、シナプス形成を制御 (Morimoto et al., 1998) する効果をもっていることが知られている。高細胞外[Mg²⁺]条件においては CTFα、sAPPαが上昇していること、低細胞外[Mg²⁺]条件においては CTFβ の蓄積と Aβ の放出が促進される (Yu et al., 2010)。β-セクレターゼは細胞内で機能する一方で、α-セクレターゼは細胞膜で機能するが、高[Mg²⁺]条件においては、APP は膜状に保留されており、低[Mg²⁺]条件においては細胞表面の APP 量は少ない。このことが、細胞外[Mg²⁺]がα-セクレターゼとβ-セクレターゼの活性のバランスを変化させるメカニズムであると考えられている (Yu et al., 2010)。

⁴面接と介護者の両方から認知症の程度を 7 段階に評価する指標

⁵介護者から情報を得た後に被験者に質問を行ない、重症度に応じて 5 段階に評価する指標

しかし、高濃度の Mg^{2+} は有害であるという報告もあり (Clark and Brown, 1992; Fung et al., 1995; Hallak, 1998; Ladner and Lee, 1999)、AD 治療における Mg の扱いは未だ議論されている最中である。

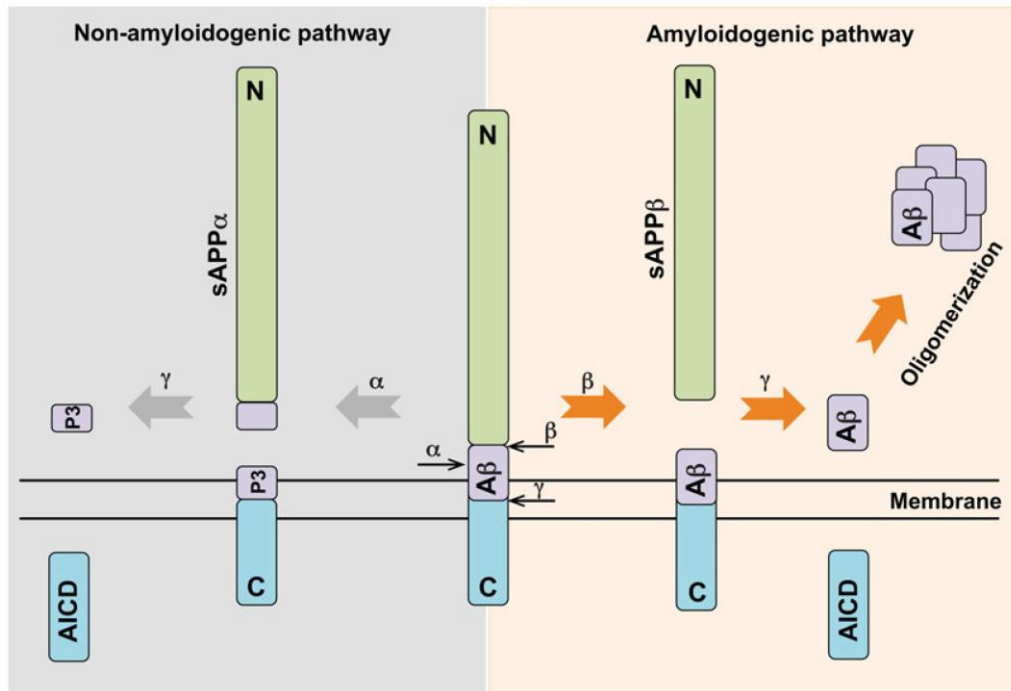


図 1-9 アルツハイマー病の細胞病理学的メカニズムの概念図

Nicolas and Hassan (2014)より

1.3 細胞外マグネシウムイオン

1.3.1 細胞外マグネシウムイオンの NMDA 受容体ブロックによる神経興奮性制御

細胞外 Mg^{2+} はグルタミン酸受容体である NMDA 受容体の活性制御に寄与している。通常の膜電位 (-70 mV) においては、 Mg^{2+} は NMDA 受容体をブロックしているが、AMPA 受容体が活性化し陽イオンの流入が起こり、膜電位が -60 mV まで上昇すると Mg^{2+} ブロックは緩和され、NMDA 受容体は活性化する。この Mg^{2+} ブロックの解除メカニズムには“早い要素”と“遅い要素”から成っており、チャンネルを構成するサブユニットの割合によって性質は決まっている。細胞外の Mg^{2+} 濃度が減少すると、NMDA 受容体の Mg^{2+} ブロックは緩和され、比較的弱い脱分極で NMDA チャンネルが開くため、神経細胞の興奮性が過剰になる (hyperexcitability) 原因となる。NMDA 受容体は興奮性の神経伝達、神経可塑性、神経興奮毒性に関わっており、結果として、発生における可塑性、記憶と学習において重要な機能を果たしているため、 Mg^{2+} もこれらの現象に関わっていると考えられる (de Baaij et al., 2015)。

表 1-7 アルツハイマー病とマグネシウムに関わる文献リスト

Alzheimer's Disease		species	effects	summary	Ref.
human	AD patients	Mg concentration	No difference of Mg contents in serum and hair between AD and healthy participants		Koç et al. (2015)
human	AD patients	Mg concentration	plasma Mg is decreased in brain regions of diseased patients compared to the controls.		Andrasi et al. (2000; 2005)
human	AD patients	Mg concentration	Mg contents is decreased in brain regions of diseased patients compared to the controls.		Vural et al. (2010)
human	AD patients	Mg concentration	free Mg ²⁺ , not total Mg, is decreased in brain regions of mild-to-moderate AD patients		Barbagallo (2011)
human	AD patients	Mg concentration	A negative correlation exist between Mg levels and Global Deterioration Scale (GDS) and Clinical Dementia Rating (CDR)		Cillier et al. (2007)
human	lymphocytes	Mg concentration	significant correlations were found between cognitive impairment and the Mg/K ratio in lymphocytes		Borella et al. (1990)
human	hair	Mg concentration	Hair calcium and magnesium concentrations were significantly lower in senile dementia of Alzheimer type than that of normal aged.		Kobayashi et al. (1988)
human	human brains	Mg concentration	In the hippocampus, but not in the frontal cortex of AD patients, Mg content was decreased as compared to controls.		Gransberg et al. (1987)
human	patients with dementia of the Alzheimer type	Mg concentration	plasma Mg is decreased in dementia of the Alzheimer type		Lenke (1995)
human	human	Mg concentration	Plasma Mg in Psychiatric patients negatively correlate with symptom		Kirov et al. (1994)
human	cognitively healthy individuals	risk factor	Higher magnesium intake was associated with a reduced risk of developing mild cognitive impairment and mild cognitive disorders		Chebain et al. (2013)
rat	aged and young rats	learning and memory	Chronically elevating plasma Mg ²⁺ improves hippocampal frequency potentiation and reversal learning in aged and young rats		Landfield and Morgan (1984)
rat	streptozotocin-induced sporadic AD model rats	learning and memory	Mg treatment protects cognitive functions and synaptic plasticity by inhibiting GSK-3β		Xu et al. (2014)
rat	aged rat	learning and memory	novel compound MgT regulates NMDAR signaling, prevents synapse loss, and reverses memory deficits in aged rats		Slusky et al. (2010)
mouse	PS1 mutant family AD model mouse	learning and memory	novel compound MgT regulates NMDAR signaling, prevents synapse loss, and reverses memory deficits in AD model rats		Li et al. (2013)
mouse	Mg-deficient mice	learning and memory	A chronic magnesium deficiency lead to specific impairments in emotional memory		Bardgett et al. (2005)
human	dementia patients	dementia improvement	Mg in the treatment of dementia facilitates learning and contributes to improvement in other symptoms		Ozark and Cillier (2006)
-	DNA and Aβ mixture	DNA nicking	Mg ²⁺ (1 mM) enhanced DNA nicking activity of Aβ		Suram et al. (2007)
rat	rat brain cortex extract	tau metabolism	tau is a substrate of ATP/Mg ²⁺ -dependent proteasome protease system		Zhang et al. (2005)
human	human brains	tau metabolism	Mg increased the activities of brain protein phosphatase PP-2A1 and PP-2B toward PHF II-tau		Wang et al. (1995)
human	corticobasal degeneration from human	tau aggregation	Ca ²⁺ and Mg ²⁺ selectively induce aggregates of PHF-tau but not normal human tau		Yang and Kisilek-Reding (1999)
human	human brains	Protein phosphorylation	Drastic reduction of the zinc- and magnesium-stimulated protein tyrosine kinase activities in Alzheimer's disease hippocampus		Vener et al. (1993)
Mouse N2a neuroblastoma cells	PS1 mutant family AD model cells	APP metabolism	Mg modulates the APP trafficking and processing and that in the presence of high extracellular Mg levels		Yu et al. (2010)
vitro	HEK293 cells	APP metabolism	Mg ²⁺ at physiological level defibrillate the Aβ protein fibrils		Chautan et al. (1997)
-	-	presenilin	Normal function of PS involves regulation of TRPM7 through a PIP2-dependent mechanism		Oh et al. (2012)

the role of magnesium deficiency in dementias

Ciłek (1990); Review

Review

1.4 細胞内マグネシウムイオン

1.4.1 細胞内マグネシウムイオンの分布

ヒトの身体の約 60%は水分であるが、このうち 3 分の 2 は細胞内液であり残りの 3 分の 1 が細胞外液である。細胞内において Mg は K^+ に次いで細胞内に多い陽イオンである。哺乳類の多くの細胞において全 Mg 量は 14–20 mM 存在しているが、その多くは他の物質と結合しており遊離 Mg^{2+} 濃度は 0.5–0.7 mM である (Grubbs and Maguire, 1986; Romani and Scarpa, 1992)。また、細胞内の遊離 Mg^{2+} 濃度は細胞外より低いレベルに維持されていることが、細胞膜間の電気化学的ポテンシャルの計測によってわかっている (Flatman, 1984)。そのため細胞内 Mg^{2+} 濃度は流入量を調節することによって維持されている (Romani, 2007; 2011)。電子プローブマイクロアナリシス法 (Electron probe microanalysis ; EPMA) によって細胞内 Mg^{2+} の多くは核、ミトコンドリア、小胞体に存在していることが示されている (Francesco et al., 1998)。次に、核、ミトコンドリア、小胞体、細胞質における Mg^{2+} に関してそれぞれ記述する。

細胞質

細胞質中の遊離 Mg^{2+} 濃度は 0.5–0.7 mM である (Grubbs and Maguire, 1986; Romani and Scarpa, 1992)。また、細胞質 $[Mg^{2+}]$ は細胞外からの流入、細胞外への流出、細胞内のバッファリング、細胞内小器官の取り込み・放出によって制御されている (Romani, 2007; 2011)。多くの実験によって細胞質 $[Mg^{2+}]$ 変化は観察されてきたが、細胞質 $[Mg^{2+}]$ 変化は数 10 μ M 数–100 μ M 程度 (Günther, 2006) であり比較的安定している (Romani, 2006; 2011)。これは細胞が電気化学ポテンシャルに逆らって細胞内 Mg^{2+} を排出し一定に保つメカニズムを有していることを示している。細胞質中の Mg^{2+} は主に ATP などのリン酸ヌクレオチドやリン酸代謝物、タンパク質に結合している。表 1–4 に、細胞質中において Mg^{2+} と結合している物質と Mg^{2+} の結合量をまとめた。

表 1–4 細胞質中 Mg^{2+} と他物質への結合量のまとめ

	intracellular concentration	Affinity to Mg^{2+}	Chelated Mg^{2+}	free rate (%)
ribosomes	7–70 mM	~2 mM	1.2–12 mM	82.9
ATP	9.6 mM	38–80 μ M	9 mM	6.3
ADP	0.55 mM	300 μ M	0.2 mM	63.6
AMP	0.28 mM	10 mM	N/A	100.0
UTP	8.3 mM	69 μ M	8 mM	3.6
GTP	4.9 mM	38–80 μ M	4.5 mM	8.2
CTP	2.7 mM	38–80 μ M	2.5 mM	7.4
PPi	0.2–0.5 mM	~24 μ M	0.2–0.5 mM	0.0

(Pontes et al., 2015)

核

核内の Mg^{2+} は 118 ± 3 (105 ± 3) mmol/kg dry wt (Francesco et al., 1998) である。核内の Mg^{2+} の多くはクロマチンや核酸と結合していることがわかっている (Romani, 2007)。核内 $[Mg^{2+}]$ 調節機構はほとんどわかっていないが、核外のイオン濃度に応じて非線形に変化することがわかっている (Kroeger and Trösch, 1974)。また、甲状腺がん (thyroid gland) 患者の腫瘍細胞の核における Mg 量の増加 (Lukács et al., 1996) や、脳腫瘍や浸潤している腫瘍細胞の核内 Mg 量の増加 (Chandra et al., 2015) が報告されている。しかし、核膜は多孔性の構造をしており、細胞質と核内の環境において遊離 $[Mg^{2+}]$ 勾配が存在していることは考えにくいという主張もある (Romani, 2011)。その場合、核内の Mg^{2+} 量はクロマチンや核酸などの Mg 結合タンパク質の量や構造によって決まっていると考えられる。核内 Mg 機能に関して、核内における生理学的なレベルでの $[Mg^{2+}]$ 変化は basic leucine zipper (B-ZIP) 転写因子およびその下流の遺伝子発現 (Craig et al., 2001) や DNA の構造 (Anastassopoulou and Theophanides, 2002) に影響を与えることが知られている。しかし、核内 Mg^{2+} 濃度が細胞質 Mg^{2+} 濃度と常に同じなのか、輸送メカニズムが存在しているのかは未だ明らかになっていない。

小胞体

小胞体において Mg^{2+} はリボタンパク質やリン脂質に結合している。 Mg^{2+} 蛍光指示薬 Fura2/FF を用いた実験によって小胞体内の Mg^{2+} 濃度は 1.0 mM と見積もられている (Sugiyama and Goldman, 1995)。しかし、小胞体内には高濃度の Ca^{2+} (mM レベル) が蓄えられており Ca^{2+} 干渉の影響を完全に排除することは難しい (Romani, 2011)。またカフェインによって小胞体表面のリアノジン受容体を刺激すると、小胞体から Ca^{2+} 放出が誘導され小胞体の Mg^{2+} は大きく増加する (Somlyo et al., 1985)。また、小胞体における Ca^{2+} 取り込みを阻害すると細胞内からの Mg^{2+} 排出が増加する (Fagan and Romani, 2001) ことなど、小胞体の Ca^{2+} 動態が細胞内外の Mg^{2+} 調節と協調していることが示唆されているが詳しいことはわかっていない。また、小胞体 Mg^{2+} の役割として、リアノジン受容体の間腔側の部位に Mg^{2+} が結合すると Ca^{2+} の放出が阻害される (Laver and Honen, 2008) ことがわかっているが、生理学的条件下において、小胞体内 $[Mg^{2+}]$ が細胞内シグナルによって変化し、小胞体における Ca^{2+} シグナルの調節をおこなっているという報告はない。

ミトコンドリア

ミトコンドリアのマトリックスにおける $[Mg^{2+}]$ は 0.8–1.2 mM である。ミトコンドリアにおいて Mg^{2+} はアデニンホスホヌクレオチドや未知の Mg^{2+} 特異的な結合タンパク質と複合体を形成している (Romani, 2011)。ミトコンドリアにおける Mg^{2+} 濃度変化は様々な役割をもっている。(1) ATP の合成・輸送に加えて Mg^{2+} はコハク酸デヒドロゲナーゼ (succinate dehydrogenase) やグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (glutamate dehydrogenase)、チトクロム c オキシダーゼ (cytochrome c oxidase) といったミトコンドリア酵素の機能を制御することによって呼吸速度に影響を与える。 Mg^{2+} はミトコンドリア膜電位、 K^+/H^+ antiporter を制御することによるミトコンドリア体積にも影響を与え、エネルギー産生を調節している (Wolf and Trapani, 2008)。

その他

Mg²⁺は高いエネルギーを持つ物質と結合するため、細胞の種類によっては特有の Mg²⁺を貯蔵している (Grubbs, 2002)。筋肉におけるクレアチンリン酸 (creatine phosphate) (Gupta and Moore, 1980)、赤血球における 2,3 bisphosphoglycerate (2,3-DPG) (Raftos et al., 1999) 及びヘモグロビンなどが例である。

1.4.2 細胞内マグネシウムイオンの役割

Mg^{2+} は Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- など他の主要な生体イオンとは異なり、細胞内外の濃度差は小さい。しかし、細胞内の Mg 濃度は厳密に制御されており細胞内 Mg^{2+} 濃度は一定に保たれている。このことは、細胞内 Mg が厳密に最適な状態に保たれていることが、細胞にとって重要であることを支持する。また、他のイオン輸送タンパク質と比較して Mg 輸送タンパク質の種類は多いことも、 Mg 恒常性の維持が細胞にとって重要であることを示している。また、 Mg 輸送タンパク質の種類の多さは、全ての生物種で細胞内 $[Mg^{2+}]$ 調節が重要な意味を持っていることを示している。そこで以下に Mg^{2+} の役割をまとめた。

1.4.2.1 イオンチャネルの制御

細胞内・細胞外の Mg^{2+} は様々なイオンチャネルの活性を制御する。多くのチャネルが Mg^{2+} の調節を受けることが知られているが、 Mg^{2+} のチャネルに与える影響は大きく以下の 3 つに分類できる (Guilet-Bara et al., 2007)。

タイプ 1 : Mg^{2+} がチャネル開口を誘導し、イオン電流を誘発する

calcium-activated potassium channel (K_{Ca} チャネル) には 2 種類の large conductance な BK チャネルと lower conductance な SK チャネルに分類されるが、BK チャネルがこのタイプの Mg^{2+} 調節を受ける。BK チャネルには 3 つの金属結合部位が存在しており 2 つの高親和性部位は Ca^{2+} 依存的に活性化し、細胞膜内側の RCK ドメインに存在する低親和性部位は Mg^{2+} と結合する。生理条件下 (細胞内 $[Mg^{2+}] = 0.1 \sim 10$ mM) における、この金属結合部位への Mg^{2+} 結合は BK チャネルを Ca^{2+} 非依存的に活性化することが知られている。

タイプ 2 : Mg^{2+} がチャネル開口をブロックし、不可逆的にイオン電流を減少させる。

このタイプの Mg^{2+} 調節機構では、正に帯電した Mg^{2+} と負に帯電したタンパク質部位が共有結合してチャネルを不活性化する。高濃度の Mg^{2+} 存在下において水和殻が失われるとこの効果は不可逆的である。細胞内 Mg^{2+} によって、このような調節を受けるチャネルとして TRPM7 が知られている。

タイプ 3 : Mg^{2+} がチャネルを阻害し、可逆的にイオン電流を減少させる

このタイプの Mg^{2+} 調節機構では、 Mg^{2+} と負電荷を帯びたタンパク質間の弱い電気的結合によってチャネルを不活性化している。多くのチャネルはこのタイプの Mg^{2+} による調節を受けている。

細胞内・細胞外両方の Mg^{2+} はチャネルの活性を制御する役割をもっている。表 1-5 に細胞内 Mg^{2+} によるチャネルの活性の制御に関する報告をまとめた。

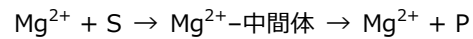
表 1-5 細胞内 Mg²⁺による主なイオンチャネル活性の制御

channel	type		effect	reference
Na ⁺ channel	voltage-gated		inhibition	Pusch et al. (1989)
	voltage-gated		inhibition	Silverman et al. (2000)
K ⁺ channel	Ca ²⁺ -activated	BK channel	activation	Cui et al. (2009), Yang et al. (2015), Lee and Cui (2010)
		SK channel	-	-
		IK channel	-	-
	Inwardly rectifying	ROMK	inhibition	Lu and MacKinnon (1994)
		GPCR regulated	inhibition	Horie and Irisawa (1989)
		ATP-sensitive	inhibition	Horie et al. (1987), Findlay (1987)
	tandem pore domain		-	-
Ca ²⁺ channel	voltage-gated	L-type	inhibition	Zhao et al. (2015)
		P/Q-type	-	-
		N-type	-	-
		R-type	-	-
		T-type	-	-
	ligand-gated	NMDA	inhibition	Johnson and Ascher (1990)
IP ₃ receptor		inhibition	Volpe et al. (1990)	
Ryanodine receptor 1		inhibition	Meissner and Henderson (1987)	
Ryanodine receptor 2		inhibition	Steele and Duke (2007)	
divalent cation	TRP	TRPM7	rundown	Kozak et al. (2005)

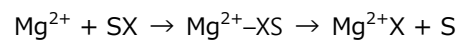
1.4.2.2 酵素反応の制御

Mg²⁺は 600 種以上の酵素の補酵素である。そのため、Mg²⁺は様々な生物化学反応に影響を与える代謝制御因子でもあると考えられる。基本的には Mg²⁺の補酵素としての機能は、結合した基質に対してLewis酸としてはたらくことである。一般的に補因子としての Mg²⁺の機能 Mg²⁺が補酵素として機能するメカニズムはほとんどの場合、以下の3種類に分類できる (Cowan, 1995)。

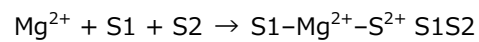
(1) Mg²⁺が中間体の安定化に寄与する



(2) Mg²⁺が生成物の安定化に寄与する



(3) Mg²⁺が2つの基質と結合し、近接効果 (proximity effect) により反応を促進する



上記の3つに加えて、ribonuclease H, exonuclease, topoisomerase などの Mg²⁺が直接酵素に結合することによって酵素の構造に影響を与え触媒効果をもたらす場合がある。Mg²⁺を必要とする酵素反応は表 1-6 に示すようにさらに詳細に分類可能である (Wolf and Cittadini, 2003)。

表 1 - 6 Mg²⁺を必要とする酵素の主要なクラス

Enzyme	Requirement
kinases	ATP-Mg phosphate transfer
G-proteins	GTP-Mg Phosphate transfer
Adenylate cyclase	ATP-Mg substrate
ATPases	ATP-Mg substrate
Alkaline phosphatase	Mg binds and activates the enzyme
Enolase	Mg binds the enzyme
Isocitrate lyase	Mg-isocitrate substrate
Glutamine synthase	Mg in the enzyme
Methyl aspartate	Mg binds the enzyme
Pyrophosphatase	Mg bound to substrate
Xylose isomerase	Mg binds the enzyme
Ribulosephosphate carboxylase	Mg in the enzyme

Wolf and Cittadini (2003) より

1.4.2.3 ゲノムの安定性

ゲノムの完全性を維持するためには DNA 複製時における遺伝情報の正確な伝達が必要である。DNA の遺伝情報は塩基配列のチェック機構によって高い信頼性 (fidelity) を保ち複製されている。Mg²⁺ はゲノムの安定性に寄与することが知られている。Mg²⁺ がゲノムの安定性を維持するメカニズムとしては (1) Mg²⁺ がもつ DNA 修復機構関連酵素の補因子として役割と (2) Mg²⁺ の DNA への結合による DNA 障害因子に対する競合阻害効果によって説明できる (Hartwig, 2001)。

1976 年 Loeb らは高い信頼性をもった DNA 複製にはマグネシウムが必須であることを示した (Sirover and Loeb, 1976; Sirover and Loeb, 1977)。Mg²⁺ の代わりに Co²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺ も DNA ポリメラーゼ反応の補因子として機能することは可能であるが、DNA 複製の信頼性が極端に減少することが知られている (Sirover and Loeb, 1976; Sirover and Loeb, 1977)。DNA は外的要因 (紫外線、電磁放射、高温、ウイルス、多環芳香族炭化水素、放射線治療、化学治療など) や内的要因 (活性酸素種 (ROS) など) によって損傷を受ける。そのため変異確率を減らし、高い DNA 複製を維持するために細胞は様々な DNA 修復システムを発達させてきた。そのような DNA 修復システムのうち Mg²⁺ が重要な役割を果たすことがわかっている DNA 修復システムである、塩基除去修復 (nucleotide excision repair; NER)、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER)、ミスマッチ修復 (mismatch repair; MMR) に関して記述する。また、Mg²⁺ の DNA 結合による DNA 保護効果に関しては第 1.4.2.4 節「DNA・RNA の安定性」にて詳細に後述する。

塩基除去修復 (nucleotide excision repair; NER)

塩基除去修復は外的要因によって生じた変異の修復を担っている。また、NER は損傷塩基を含む数十ヌクレオチドを除去することで修復を行なうため、障害部位非特異的な修復が行なわれる。この DNA 修復プロセスは、20 種類以上のタンパク質の協調的な活動 (coordinated action) によって行なわれる。NER 関連タンパク質の多くは、損傷部位の認識と切断に関わるタンパク質で、基本的に NER における全ての過程で Mg²⁺ が必須の補因子としての機能を果たしている。In vitro の実験において、切断反応における Mg²⁺ の最適濃度は 4.5–7 mM であり、Mg²⁺ 非存在 (0 mM)・高濃度条件 (18 mM) においては完全に反応は阻害される (Calsou and Salles, 1994)。

ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER)

ヌクレオチド除去修復は内的要因によって生じた変異塩基を認識して N-グリコシル結合を切断する DNA グリコシダーゼがはたらく。生じた脱プリン/ピリミジン部位 (AP 部位) の DNA 一本鎖を AP エンドヌクレアーゼが切断する。その後、生じた 1 塩基ギャップを DNA ポリメラーゼβが修復する。このとき Mg²⁺ は human AP site-specific DNA repair endonuclease (HAP1 ; APE もしくは Ref-1 と同義) の補因子として機能することが知られている。また Mn²⁺ および Ni²⁺ も Mg²⁺ と同様に HAP1 の補因子として機能するが、その効率は Mg²⁺ と比較して減少する (Mn²⁺ : 50% ; Ni²⁺ : 90%) (Barzilay et al., 1995)。その他にもさまざまな BER 関連酵素の活性には Mg²⁺ が必要であることが報告されている (Hartwig, 2001)。

ミスマッチ修復 (mismatch repair; MMR)

ミスマッチ修復は細胞が分裂する際に生じる DNA の複製エラーを修復する。このミスマッチ修復において、ミスマッチ部位 DNA を切断する酵素 MutL の機能には Mg^{2+} が必要であることが示されている (Ban et al., 1999)。

1.4.2.4 DNA・RNAの安定化

核内の Mg^{2+} の半分以上は核酸とヌクレオチドに結合している。核酸はポリアニオンであり、負の電荷をもったリン酸基を中和するための対イオン (counterion) が必要である。核内においては金属イオンが核酸と相互作用し、二重らせん構造を安定化もしくは不安定化している (Cini et al., 1984; Theophanides and Tajmir-Riahi, 1985; Theophanides and Anastassopoulou, 1987)。DNA と金属イオンの相互作用では、プリンのN7 部位、ピリミジンのN3 部位が金属イオンと化学結合を形成する (図 1-10) (Anastassopoulou and Theophanides, 2002)。 Mg^{2+} は DNA と結合することによって DNA の二次構造、三次構造を安定化する役割を担っている (Pelletier et al., 1994)。正の電荷をもつ Mg^{2+} は 6 つの水分子が配位した状態 ($Mg(H_2O)_6^{2+}$) で DNA のリン酸基の負の電荷と引き合う。水分子が 6 個配位した $Mg(H_2O)_6^{2+}$ は N7 グアニン部位と O6 部位と水素結合を形成する (Anastassopoulou and Theophanides, 2002)。 ($Mg(H_2O)_6^{2+}$) が配位した状態ではこの部位に変性因子は攻撃できなくなるため DNA は安定化する。このように Mg^{2+} は水分子の O-H 基の水素結合を強化する効果がある (Suh et al., 1993; Teeter et al., 1980; Theophanides, 1984)。 Na^+ や K^+ など細胞内に大量に存在する他の陽イオンにおいても、同様の効果があると考えられるが、水分子の O 元素を引き付ける力が弱いため Mg^{2+} が最も DNA の安定化に寄与している。実際、DNA の電気泳動結果より得られた、金属イオンと水分子との親和性は $Mg^{2+} \gg Li^+ > Na^+ > K^+$ である (Bleam et al., 1980)。そのため、生理条件下の核内で主に核酸に結合する陽イオンは Mg^{2+} である。

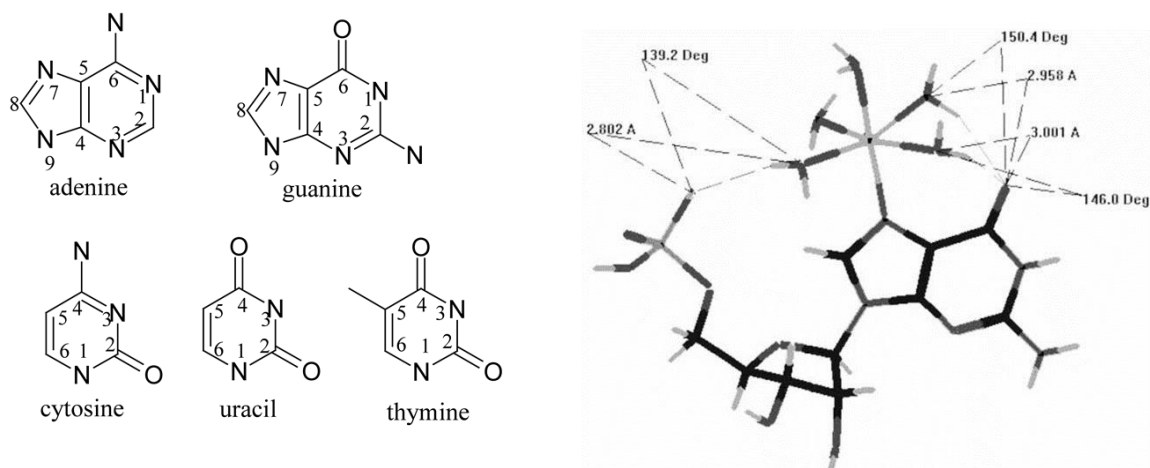


図 1-10 DNA と Mg^{2+} の相互作用

Anastassopoulou and Theophanides (2002) より

Mg^{2+} 結合は結合部位の負の電荷密度を減らし、DNA をヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) から保護する (Anastassopoulou and Theophanides, 2002)。また、1 Å レベルの解像度における B-DNA の結晶構造解析によって DNA の特定の塩基配列が形成する minor groove に Mg^{2+} 、 Ca^{2+} が結合することが明らかになった (Chiu and Dickerson, 2000)。このように水和状態にある Mg^{2+} ($Mg(H_2O)_6^{2+}$) は配列特異的、

非特異的に、DNA 分子中の負の電荷を帯びた元素 (O,N) との間に水素結合形成する。そして結合部位周辺の負の電荷密度を減らし DNA の構造を安定化する。

このように Mg^{2+} は DNA を安定化する一方で、 Mg^{2+} は共有結合 (Mg-O) を形成し DNA と結合する場合がある。この結合によって DNA は二重らせん構造は歪曲し、部分的に崩れる (図 1-11)。この Mg^{2+} による DNA の三次構造の歪曲は、結果的に細胞死をもたらすと考えられる (Anastassopoulou and Theophanides, 2002)。このように核内の Mg^{2+} には DNA 構造の安定化効果と不安定化効果の両方があるが (図 1-12)、通常条件の Mg^{2+} 濃度においては安定化効果が優勢であると考えられる。このことは、適度な Mg 添加は細胞に対して保護的な効果をもたらすが、過度の Mg^{2+} 添加は細胞に対して毒性をもたらすという相反する Mg^{2+} の効果の原因であると考えられている (Anastassopoulou and Theophanides, 2002)。RNA についても、 Mg^{2+} は核酸と相互作用することによって核酸の安定化・不安定化に寄与していると考えられている (Anastassopoulou and Theophanides, 2002)。

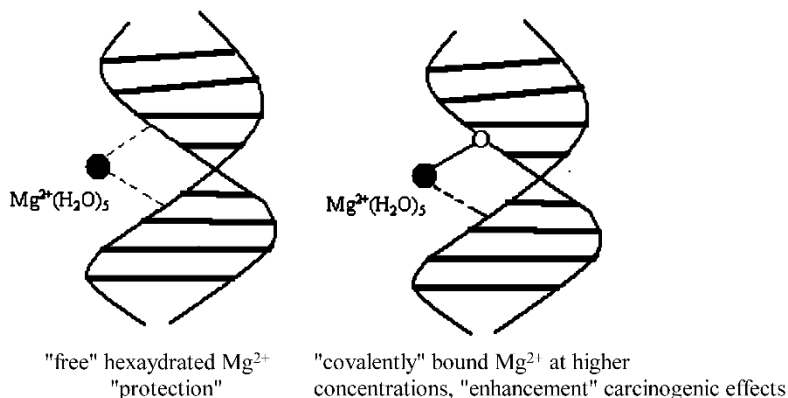


図 1-11 Mg^{2+} の DNA に対する水素結合による保護効果と共有結合による毒性効果

Anastassopoulou and Theophanides (2002) より

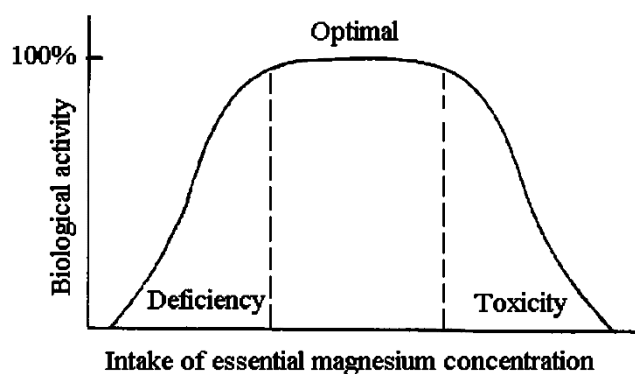


図 1-12 Mg^{2+} 細胞に対して与える影響の概念図

Anastassopoulou and Theophanides (2002) より

1.4.2.5 セカンドメッセンジャーとしての役割

Mg^{2+} は細胞内において2番目に多い陽イオンであり、二価陽イオンの中では最も多く細胞質に存在する。 Mg^{2+} は多くの酵素の補酵素としての機能を有し、細胞外シグナルに応じたGタンパク質結合型受容体の活性化によって細胞内 Mg^{2+} 濃度は変化することも知られている。そのため、 Mg^{2+} がセカンドメッセンジャーとして機能している可能性があると考えられてきた (Takaya et al., 2000)。細胞周期において、G1期の細胞がG1/Sチェックポイントを通過し、S期に入りDNA合成を行う前に、タンパク質合成が活発になる。成長因子に応答し、このときに起こる生物化学反応の全体をcoordinate responseと呼ぶ。 Mg^{2+} はこのcoordinate responseに関わる多くの反応を活性化することが知られている。また、実際に成長因子によって細胞質 $[Mg^{2+}]$ はタンパク質合成に最適なレベルまで増加する。そのため、 Mg^{2+} は細胞増殖に関わる反応を活性化するmulti-targetなセカンドメッセンジャーであると主張されてきた (Rubin, 2005ab; 2007)。しかし、 Ca^{2+} のように Mg^{2+} 濃度変化が特定の酵素反応からなるシグナル経路の活性化を“引き起こす”わけではないため、厳密な意味で Ca^{2+} のようなセカンドメッセンジャーであるとは考えられていなかった。そのため、 Mg^{2+} がセカンドメッセンジャーとしての機能を果たしているかについては長い間明らかにされてこなかった。しかし2011年、免疫系のT細胞において、T細胞受容体(T cell receptor; TCR)の活性化によって Mg^{2+} 選択的チャネルMagT1からの Mg^{2+} 流入が引き起こされ、PLC γ 1活性化を促進していることが発見された (Li et al., 2011)。この結果は、以下のセカンドメッセンジャーの要件を満たしているため、 Mg^{2+} はセカンドメッセンジャーであることが示された。

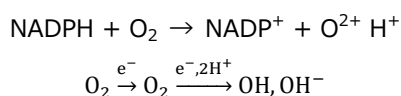
セカンドメッセンジャーの要件

- (1) 細胞表面の受容体に結合する情報伝達物質に応じて急激に濃度変化をする。
- (2) 一つ以上の細胞プロセスの速度を変化させる
- (3) その細胞腫ごとに異なる酵素反応に影響を与えることによって細胞腫特有の現象に影響をあたえる

しかし Mg^{2+} がセカンドメッセンジャーとしての役割を果たしている現象は、他の細胞腫においては今のところ見つかっていない。

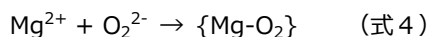
1.4.4.6 活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) とマグネシウム

酸素原子は多くの代謝プロセスにおいて電子受容体として機能を果たす (Roberfroid and Calderon; 1995)。生体において多くの酸素がシトクロム P450 依存的な酵素反応によって水へと変換される。シトクロム P450 は様々な基質を酸化することによって様々な役割を果たすことが知られている。例えば、肝臓において解毒、ステロイドホルモンの生合成、脂肪酸の代謝などにも関わっている。この時の使用される酸素の約 5% はスーパーオキシドアニオン (superoxide anion) に変換される (Fridovich; 1984)。また、生体における反応においてスーパーオキシドアニオン、過酸化水素を最も生産する反応としてキサンチンオキシダーゼ⁶、NADPH/NADH オキシダーゼによる反応が知られている (Cross and Jones, 1991; Gamaley and Klyubin, 1999)。



これらの反応によって生じるヒドロキシラジカル (OH) やスーパーオキシドアニオン ($\text{O}_2^{\cdot-}$) といった中間物質は生体において毒性を示す。生体における様々な反応において、スーパーオキシドアニオンは生じるが、ディスムターゼ (dismutase) によって H_2O_2 に変換され最終的に水に変換される。しかし生体内のラジカルや活性酸素種の産生が一定量を超えると細胞は機能を維持できなくなる。

Mg^{2+} 欠乏の動物において、フリーラジカルの産生量は増加していることが知られている (Weglicki and Phillips, 1992; Weglicki et al., 1994; 2000; Dubray and Rayssiguier, 1997)。放射線分解によって活性酸素種を発生させた水溶液中における 5'-guanosine monophosphate ($5'\text{-GMPNa}_2$) の分解量を Mg^{2+} 存在下と Mg^{2+} 非存在下で比較したところ、 Mg^{2+} 存在下では分解量は 4 割であった (Anastassopoulou and Dovas, 2001)。この結果は、以下の反応によって Mg^{2+} が free radical を分解することが示唆している。



このことは、無酸素条件下 (anoxy condition) のモルモットの脳内において、 Mg^{2+} が活性酸素種の産生を抑制するという実験結果も支持している (Anastassopoulou and Brekoulakis, 1994; Masumoto et al., 1992; Maulik et al., 1999; Fritz et al., 1999)。このように、 Mg^{2+} はその物理化学的特性によってラジカルから生体を保護していると考えられている。

⁶尿酸代謝に関わる酵素

1.5 生体におけるマグネシウムイオンの測定方法

1.5.1 蛍光イメージング法

蛍光イメージング法による Mg^{2+} 測定は、 Mg^{2+} と相互作用することによって蛍光特性が変化する蛍光指示薬を細胞内に導入し、蛍光特性を測定することによって細胞内 Mg^{2+} 濃度を計測する方法である。この方法は生きた細胞内において遊離 $[Mg^{2+}]$ の経時変化を測定することが可能である。この方法の欠点として、 Mg^{2+} 選択的のよい Mg^{2+} 蛍光指示薬がほとんど存在しないことである。蛍光イメージング法による細胞内イオンの測定は、1970年代後半 Roger Tsien らによる Ca^{2+} キレーターの一部を蛍光団に置換して作製した Ca^{2+} 蛍光指示薬を用いた測定が最初である (Tsien, 1980)。その後、 Ca^{2+} 蛍光指示薬は改良され、現在、目的に応じて様々な Ca^{2+} 指示薬を使うことができる。 Mg^{2+} 蛍光指示薬についても、 Ca^{2+} 蛍光指示薬の時と同様のアイデアで Mg^{2+} が開発されてきた。他の二価陽イオンと同様に、細胞内 Mg^{2+} は遊離型 Mg^{2+} と結合型 Mg^{2+} の両方の状態で存在している。細胞内のほとんどの Mg^{2+} は核酸、ATP、タンパク質、リン脂質などの負電荷をもった分子と結合している。他の二価陽イオンの遊離型濃度は数桁単位で変化するが (Ca^{2+} の場合 10 nM から 100 μ M 程度)、 Mg^{2+} は sub-millimolar の範囲で維持されている。したがって、細胞内 $[Mg^{2+}]$ 変化を測定するためには、バックグラウンド $[Mg^{2+}]$ が高い中でわずかな細胞内の $[Mg^{2+}]$ 変化を検出する必要がある (Trapani et al., 2010)。最初に開発され現在も広く使用されている Mg^{2+} 蛍光指示薬は APTRA (o-aminophenol-N, N, O-triacetic acid) をキレーター構造に持っている。しかし、APTRA 構造は Ca^{2+} に対する親和性が高く、 Ca^{2+} 濃度が増える条件下において APTRA 構造を Mg^{2+} 認識部位に持つ Mg^{2+} 蛍光指示薬を用いた Mg^{2+} イメージングは適切ではない。そこで様々な観察条件に合わせた Mg^{2+} 蛍光指示薬が開発されてきた。表 1-7 にこれまで開発されてきた Mg^{2+} 蛍光指示薬の一覧を示す。これらの Mg^{2+} プローブによって $[Ca^{2+}]$ 濃度変化の影響を受けない細胞内 Mg^{2+} 測定やミトコンドリアなどの細胞内小器官における Mg^{2+} 測定が可能となった。また近年、開発されつつある蛍光タンパク質型 Mg^{2+} 蛍光指示薬は遺伝子操作によって測定対象に導入することが可能なため、個体レベルでの長時間 Mg^{2+} 測定を実現する可能性を秘めており、今後の開発が待たれている。

表 1-7 Mg²⁺ 蛍光指示薬の性能

Indicator	Binding site	Fluorophore	Absorption maximum (nm)		Emission maximum (nm)		Kd (Mg ²⁺)	Kd (Ca ²⁺)	F _{max} /F _{min} (R _{max} /R _{min})	Comments	pH	Measurement	Ref.
			Free	Bound	Free	Bound							
Mag-fura-2	APTRA	Furan	369	330	511	491	1.9 nM	25 μM	(6-30)	ratometric	insensitive	cytosol	Haugland et al. (2002), Takahashi et al., (1999)
Mag-fura-5	APTRA	Furan	369	332	505	482	2.3 nM	28 μM		ratometric	insensitive	cytosol	Ilier et al. (1992)
Mag-indo-1	APTRA	Indole	349	330	480	417	2.7 nM	35 μM	(12)	ratometric	insensitive	cytosol	Haugland et al. (2002), Takahashi et al., (1999)
Mag-fluo-4	APTRA	Fluorescein	490	493	None	517	4.7 nM	22 μM		monometric	insensitive	cytosol	Haugland et al. (2002)
Magnesium GreenTM	APTRA	Fluorescein	506	506	531	531	1.0 nM	6 μM		monometric	insensitive	cytosol	Kuhn et al. (1995)
KMG-104	beta-Diketone	Fluorescein	502	504	523	523	2.1 nM	7.5 nM	8.18	monometric	insensitive	cytosol	Komatsu et al. (2004)
KMG-104-Ash	beta-Diketone	Fluorescein	520	522	541	541	1.7 nM	>> 100 nM	> 6	ratometric	insensitive	TC tag	Fujii et al. (2014)
DCHQ1	Diaza-18-crown-16	Hydroxyquinoline	363	363	505	505	44 μM	N.D.	4.1	monometric	insensitive	total Mg	Farrugia et al. (2006)
DCHQ5	Diaza-18-crown-16	Hydroxyquinoline	(360 or 488)			(525)	? μM	N.D.	-	monometric	insensitive?	total Mg	Sargenti et al. (2014)
AMg1	APTRA	Naphthalene	365	365	498	498	1.4 nM	9 μM	15	monometric	insensitive	cytosol	Kim and Jung et al. (2007)
CMg1	beta-Keto acid	Benzo[h]chromene	413	443	556	559	1.3 nM	3.6 μM	1.3	monometric	insensitive	cytosol	Kim and Yang et al. (2007)
FMg1	APTRA	2-acetyl-7-deihylamino-9,9-dimethyl-9H-fluorene	362		540		1.6 (1.5) nM	sensitive	16	monometric	insensitive	cytosol	Dong et al. (2012)
FMg2	APTRA		368		555		1.4 (1.7) nM	sensitive	24	monometric	insensitive	cytosol	Dong et al. (2012)
Roy and Bharadwaj	NO2 donor set	Coumarin	488	555	None	602	<1 nM	16.7 μM	-550	ratometric	-	vitro	Roy and Bharadwaj (2008)
Hana et al.	Benzo-15-crown-5	Naphthaleneacetamide	258	250	338	338	2.9 nM	1.3 μM	40.6	monometric	-	vitro	Hana et al. (2007)
Song et al.	Pteranthromitazole	Calix[4]arene	332	347	409	493	33.6 nM	N.D.	(16)	ratometric	-	vitro	Song et al. (2007)
Ishida et al.	Pteranthroline	Porphyrin	496	575	583	631	26.8 nM	N.D.	10	ratometric	-	vitro	Ishida et al. (2010)
KMG-301	beta-Diketone	rhodamine	550		570		3.79 nM	N.D.	45	monometric	insensitive	mitochondria	Shindo et al. (2011), Sairna et al. (2014)
Mag-mito	APTRA	1, 2, 3-triazole	356	330	495	482	6.7 nM	53.5 nM	(2.7)	ratometric	insensitive	mitochondria	Zhang et al. (2015)

genetically encoded indicator

Indicator	Binding site	Fluorophore	Excitation	Emission	Emission	Kd (Mg ²⁺)	Kd (Ca ²⁺)	F _{max} /F _{min} (R _{max} /R _{min})	Comments	pKa	type	Ref.
MagFRET-1	HS-Ca ²⁺	Cerulean and ChRine	433	475	-	148 μM	10 μM	(1.49)	ratometric	sensitive?	FRET	Linderburg et al. (2013)
MagIC	ep173Venus mutant	ep173Venus and mCherry	516	530	587	5.1 nM	4.8 nM	(1.5)	ratometric	7.5	non-FRET	Koldenkova et al. (2015)

1.5.2 その他の Mg^{2+} 測定方法

原子吸光分析法 (Atomic absorption spectroscopy)

原子吸光法は試料を高温中で原子化し、これに測定元素特有の波長に光を透過させると基底状態の原子が光を吸収して励起状態に遷移する。この時の光の吸光度から元素濃度を測定することができる方法である。個体試料は溶液化した後、測定に持ち込む必要がある。したがって、細胞内の総 Mg^{2+} 量の変化や、細胞外液中に放出された Mg^{2+} 量変化の測定に用いられる (Seiler et al., 1990; Günther et al., 1990)。

イオン選択性電極法

イオン選択性電極法は、特定のイオンのみを透過する電極を細胞に刺入し、細胞外の参照電極との電位差を測定することによって、ネルンストの式を用いてイオン濃度を見積もる方法である。この手法は遊離の $[Mg^{2+}]$ を直接計測することができることが利点である。一方、通常の細胞において細胞内と細胞外における $[Mg^{2+}]$ 勾配は小さいため、測定される電位差は非常に小さいことが問題点として挙げられる。その他にも細胞に直接電極を刺入する必要があるため技術的困難が伴うこと、イオン電極の Mg^{2+} 選択性が低いといった問題点がある (McGuigan and Blatter, 1989; McGuigan et al., 1991; Huijgen et al., 1999)。

放射性同位体

Mg^{2+} の放射性同位体である ^{27}Mg もしくは ^{28}Mg を細胞に取り込ませて、細胞内外での ^{27}Mg 、 ^{28}Mg の移動量を測定し、膜を介した輸送を測定することが可能である。欠点としては、半減期が短いため用途が限られること、高価であることなどが挙げられる (Flik et al., 1993)。

電子プローブマイクロアナリシス法 (Electron probe microanalysis ; EPMA)

試料に電子線を照射すると、電子と物質は強い相互作用をおこし様々な電磁波が放出される。中でも特性 X 線は元素ごとに固有の波長を持っている。このため特性 X 線を検出することによって、試料の表面 (深さ 1 μm 程度) に含まれる元素の特定が可能である。高い空間分解能 (100–200 nm も可能) で測定することができるが、結合 Mg^{2+} と遊離 Mg^{2+} の区別ができないこと、凍結切片で試料調整する必要があるため生きた状態での試料観察はできないことが欠点として挙げられる (Somlyo et al., 1986; Bond et al., 1987)。

^{31}P 核磁気共鳴法 (^{31}P NMR; ^{31}P Nuclear magnetic resonance)

ATP の NMR スペクトルは遊離 ATP と Mg^{2+} と複合体を形成しているときでは β 位のスペクトルがシフトする。これを利用して ^{31}P -NMR スペクトルから遊離 ATP、Mg-ATP 濃度を測定することができる。また、この結果から解離定数を用いて Mg^{2+} 濃度を見積もることが可能である。生きた細胞において経時変化を測定することが可能である。この方法の欠点として細胞内の正確な解離定数は不明なため、正確な $[Mg^{2+}]$ を見積もることは困難であることが挙げられる (Gupta et al., 1983; Iotti et al., 1996; 2000)。

誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS ; inductively coupled plasma mass spectroscopy)

誘導結合プラズマ質量分析は、アルゴンガスに高電圧を掛けることによって生じたプラズマに高周波数の変動磁場による渦電流を流し試料を高温 (6000~10000K) に加熱する。これによって生成した気体原子を質量分析計に導入することによって元素の同定、定量を行う方法である。これによって少量の試料に対しても高感度で Mg^{2+} 量を測定することができる (Yasui and Ota, 1998)。

1.6 本研究の目的

前述したように、生体内、特に神経系における Mg^{2+} の重要性は多くの研究によって報告されている。しかしながら神経細胞における Mg^{2+} の調節機構に関してほとんどわかっていない。そこで本論文においては、神経細胞の Mg^{2+} 調節機構を解明することを目的として行った研究成果を報告する。

1.7 第1章の参考文献

糸川嘉則, 齊藤昇. マグネシウム 成人病との関係. 光生館, 東京. 1995:38-9.

Abrams SA, Wen JP. Methodologies for using stable isotopes to assess magnesium absorption and secretion in children. *Journal of the American College of Nutrition*. 1999;18(1):30-5.

Allsop TF. Transfer of magnesium across the perfused choroid plexus of sheep. *Australian journal of biological sciences*. 1986;39(2):161-70.

Allsop TF, Pauli JV. Magnesium concentrations in the ventricular and lumbar cerebrospinal fluid of hypomagnesaemic cows. *Research in veterinary science*. 1985;38(1):61-4.

Alvarez-Leefmans FJ, Giraldez F, Gamino SM. Intracellular free magnesium in excitable cells: its measurement and its biologic significance. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1987;65(5):915-25.

Amasheh S, Fromm M, Günzel D. Claudins of intestine and nephron – a correlation of molecular tight junction structure and barrier function. *Acta Physiologica*. 2011;201(1):133-40.

Amtorp O, Sørensen SC. The ontogenetic development of concentration differences for protein and ions between plasma and cerebrospinal fluid in rabbits and rats. *The Journal of physiology*. 1974;243(2):387-400.

Anastassopoulou J, Theophanides T. Magnesium–DNA interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. Irradiation and free radicals. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2002;42(1):79-91.

Anastassopoulou J, Dovas A, Hydroperoxyl radicals and magnesium in health. In: Rayssiguier Y, Mazur A, Durlach J, editors. *Advances in magnesium research: nutrition and health* (Chapter 51). London: John Livvey Eurotext, 2001:309-13.

Anastassopoulou J, Brekoulakis J. The Role of Oxygen in Radiolysis of Aqueous Solutions of Magnesium Guanosine-5'-Monophosphate Complexes. In *Properties and Chemistry of Biomolecular Systems* 1994 (pp. 31-36). Springer Netherlands.

Andrási E, Páli N, Molnár Z, Kösel S. Brain aluminum, magnesium and phosphorus contents of control and Alzheimer-diseased patients. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2005;7(4):273-84.

Andrási E, Igaz S, Molnár Z, Mako S. Disturbances of magnesium concentrations in various brain areas in Alzheimer's disease. *Magnesium research: official organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium*. 2000;13(3):189-96.

Ban C, Junop M, Yang W. Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair. *Cell*. 1999;97(1):85-97.

Barbagallo M, Belvedere M, Di Bella G, Dominguez LJ. Altered ionized magnesium levels in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Magnesium Research*. 2011;24(3):115-21.

Bardgett ME, Schultheis PJ, Muzny A, Riddle MD, Wagge JR. Magnesium deficiency reduces fear-induced conditional lick suppression in mice. *Magnesium research*. 2007;20(1):58-65.

Bardgett ME, Schultheis PJ, McGill DL, Richmond RE, Wagge JR. Magnesium deficiency impairs fear conditioning in mice. *Brain research*. 2005;1038(1):100-6.

Barzilay G, Mol CD, Robson CN, Walker LJ, Cunningham RP, Tainer JA, Hickson ID. Identification of critical active-site residues in the multifunctional human DNA repair enzyme HAP1. *Nature Structural & Molecular Biology*. 1995;2(7):561-8.

Berk A, Zipursky S, Lodish H. *Molecular Cell Biology* 4th edition.

Bito LZ. Blood-brain barrier: evidence for active cation transport between blood and the extracellular fluid of brain. *Science*. 1969;165(3888):81-3.

Black J. *Experiments upon magnesia alba, quick-lime, and other alkaline substances*. W. Creech; 1796.

Bleam ML, Anderson CF, Record MT. Relative binding affinities of monovalent cations for double-stranded DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1980;77(6):3085-9.

Bond M, Vadasz G, Somlyo AV, Somlyo AP. Subcellular calcium and magnesium mobilization in rat

liver stimulated in vivo with vasopressin and glucagon. *Journal of Biological Chemistry*. 1987 Nov 15;262(32):15630-6.

Borella P, Giardino A, Neri M, Andermarker E. Magnesium and potassium status in elderly subjects with and without dementia of the Alzheimer type. *Magnesium research: official organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium*. 1990;3(4):283-9.

Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica*. 1991;82(4):239-59.

Bradbury MW, Crowder J, Desai S, Reynolds JM, Reynolds M, Saunders NR. Electrolytes and water in the brain and cerebrospinal fluid of the foetal sheep and guinea - pig. *The Journal of physiology*. 1972;227(2):591-610.

Brunette MG, Vigneault N, Carriere S. Micropuncture study of magnesium transport along the nephron in the young rat. *American Journal of Physiology - Legacy Content*. 1974;227(4):891-6.

Calsou P, Salles B. Properties of damage-dependent DNA incision by nucleotide excision repair in human cell-free extracts. *Nucleic acids research*. 1994 Nov 25;22(23):4937-42.

Cao G, van der Wijst J, van der Kemp A, van Zeeland F, Bindels RJ, Hoenderop JG. Regulation of the epithelial Mg^{2+} channel TRPM6 by estrogen and the associated repressor protein of estrogen receptor activity (REA). *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(22):14788-95.

Cao G, Hoenderop JG, Bindels RJ. Insight into the molecular regulation of the epithelial magnesium channel TRPM6. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2008;17(4):373-8.

Cao G, Thébault S, Van Der Wijst J, Van Der Kemp A, Lasonder E, Bindels RJ, Hoenderop JG. RACK1 inhibits TRPM6 activity via phosphorylation of the fused α -kinase domain. *Current Biology*. 2008;18(3):168-76.

Chan AW, Minski MJ, Lim L, Lai JC. Changes in brain regional manganese and magnesium levels during postnatal development: modulations by chronic manganese administration. *Metabolic brain disease*. 1992;7(1):21-33.

Chandra S, Parker DJ, Barth RF, Pannullo SC. Quantitative imaging of magnesium distribution at single-cell resolution in brain tumors and infiltrating tumor cells with secondary ion mass spectrometry (SIMS). *Journal of neuro-oncology*. 2015;1-9.

Chauhan A, Chauhan VP, Rubenstein R, Wegiel J, Wisniewski HM. Media from rhabdomyosarcoma and neuroblastoma cell cultures stimulate in vitro aggregation and fibrillization of amyloid beta-protein. *Neurochemical research*. 1997;22(2):227-32.

Cherbuin N, Kumar R, Sachdev PS, Anstey KJ. Dietary Mineral Intake and Risk of Mild Cognitive Impairment: The PATH through Life Project. *Frontiers in aging neuroscience*. 2013;6:4-4.

Chiu TK, Dickerson RE. 1 Å crystal structures of B-DNA reveal sequence-specific binding and groove-specific bending of DNA by magnesium and calcium. *Journal of molecular biology*. 2000;301(4):915-45.

Çilliler AE, Öztürk Ş, Özbakır Ş. Serum magnesium level and clinical deterioration in Alzheimer's disease. *Gerontology*. 2007;53(6):419-22.

Cini R, Burla MC, Nunzi A, Polidori GP, Zanazzi PF. Preparation and physico-chemical properties of the ternary complexes formed between adenosine 5'-triphosphoric acid, bis (2-pyridyl) amine, and divalent metal ions. Crystal and molecular structures of the compounds containing Mg II and Ca II. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*. 1984(11):2467-76.

Clark BA, Brown RS. Unsuspected morbid hypermagnesemia in elderly patients. *American journal of nephrology*. 1992;12(5):336-43.

Clark K, Langeslag M, van Leeuwen B, Ran L, Ryazanov AG, Figdor CG, Moolenaar WH, Jalink K, van Leeuwen FN. TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion. *The EMBO journal*. 2006;25(2):290-301.

Corkey BE, Duszynski J, Rich TL, Matschinsky B, Williamson JR. Regulation of free and bound magnesium in rat hepatocytes and isolated mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 1986;261(6):2567-74.

Craig JC, Schumacher MA, Mansoor SE, Farrens DL, Brennan RG, Goodman RH. Consensus and variant cAMP-regulated enhancers have distinct CREB-binding properties. *Journal of Biological*

Chemistry. 2001;276(15):11719-28.

Cross AR, Jones OT. Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1991;1057(3):281-98.

Cowan JA. *Biological chemistry of magnesium*. VCH Publishers; 1995.

Cui J, Yang H, Lee US. Molecular mechanisms of BK channel activation. *Cellular and molecular life sciences*. 2009;66(5):852-75.

Davy H. *Electro-chemical researches, on the decomposition of the earths; with observations on the metals obtained from the alkaline earths, and on the amalgam procured from ammonia*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. 1808:333-70.

Denis W. The determination of magnesium in blood, plasma, and serum. *Journal of Biological Chemistry*. 1922;52(2):411-5.

de Baaij JH, Hoenderop JG, Bindels RJ. Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiological reviews*. 2015;95(1):1-46.

de Baaij JH, Koerkamp MJ, Lavrijsen M, van Zeeland F, Meijer H, Holstege FC, Bindels RJ, Hoenderop JG. Elucidation of the distal convoluted tubule transcriptome identifies new candidate genes involved in renal Mg²⁺ handling. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2013;305(11):F1563-73.

de Baaij JH, Stuiver M, Meij IC, Lainez S, Kopplin K, Venselaar H, Müller D, Bindels RJ, Hoenderop JG. Membrane topology and intracellular processing of cyclin M2 (CNNM2). *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(17):13644-55.

de Barboza GD, Guizzardi S, de Talamoni NT. Molecular aspects of intestinal calcium absorption. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2015;21(23):7142.

Dong X, Han JH, Heo CH, Kim HM, Liu Z, Cho BR. Dual-Color Imaging of Magnesium/Calcium Ion Activities with Two-Photon Fluorescent Probes. *Analytical chemistry*. 2012;84(19):8110-3.

Dubray C, Rayssiguier Y. Magnesium, inflammation and pain. In *Magnesium: Current Status and*

New Developments 1997 (pp. 303-311). Springer Netherlands.

Durlach J. Magnesium depletion and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Magnesium research: official organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium*. 1990;3(3):217-8.

Enomoto T, Osugi T, Satoh H, McIntosh TK, Nabeshima T. Pre-injury magnesium treatment prevents traumatic brain injury-induced hippocampal ERK activation, neuronal loss, and cognitive dysfunction in the radial-arm maze test. *Journal of neurotrauma*. 2005;22(7):783-92.

Fagan TE, Romani A. α 1-Adrenoceptor-induced Mg^{2+} extrusion from rat hepatocytes occurs via Na^{+} -dependent transport mechanism. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2001;280(6):G1145-56.

Farruggia G, Iotti S, Prodi L, Montalti M, Zaccheroni N, Savage PB, Trapani V, Sale P, Wolf FI. 8-Hydroxyquinoline derivatives as fluorescent sensors for magnesium in living cells. *Journal of the American Chemical Society*. 2006;128(1):344-50.

Feillet-Coudray C, Coudray C, Tressol JC, Pépin D, Mazur A, Abrams SA, Rayssiguier Y. Exchangeable magnesium pool masses in healthy women: effects of magnesium supplementation. *The American journal of clinical nutrition*. 2002;75(1):72-8.

Ferrè S, Hoenderop JG, Bindels RJ. Sensing mechanisms involved in Ca^{2+} and Mg^{2+} homeostasis. *Kidney international*. 2012;82(11):1157-66.

Findlay I. ATP-sensitive K^{+} channels in rat ventricular myocytes are blocked and inactivated by internal divalent cations. *Pflügers Archiv*. 1987;410(3):313-20.

Fishman RA. *Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system*. WB Saunders company; 1992.

Flatman PW. Mechanisms of magnesium transport. *Annual Review of Physiology*. 1991;53(1):259-71.

Flatman PW. Magnesium transport across cell membranes. *Journal of membrane Biology*. 1984;80(1):1-4.

Flatman PW. Methods to control and determine red cell Mg and Ca levels. *Red Cell*. 1982.

Flik G, Van der Velden JA, Kolar ZI. Radiotracer probes in cellular magnesium transport studies. *Magnesium and the Cell*. Ed: Birch NJ, Academic Press, London. 1993.

Fonfria E, Murdock PR, Cusdin FS, Benham CD, Kellsell RE, McNulty S. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 2006;26(3):159-78.

Fordtran JS, Rector Jr FC, Carter NW. The mechanisms of sodium absorption in the human small intestine. *Journal of clinical investigation*. 1968;47(4):884.

Francesco A, Desnoyer RW, Covacci V, Wolf FI, Romani A, Cittadini A, Bond M. Changes in magnesium content and subcellular distribution during retinoic acid-induced differentiation of HL60 cells. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1998;360(2):149-57.

Fridovich I. Overview: biological sources of O₂⁻. *Methods in enzymology*. 1984;105:59.

Fritz KI, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Mg²⁺-dependent modification of the N-methyl-D-aspartate receptor following graded hypoxia in the cerebral cortex of newborn piglets. *Neuroscience*. 1999;92(2):685-92.

Fujii T, Shindo Y, Hotta K, Citterio D, Nishiyama S, Suzuki K, Oka K. Design and Synthesis of a FLASH-Type Mg²⁺ Fluorescent Probe for Specific Protein Labeling. *Journal of the American Chemical Society*. 2014;136(6):2374-81.

Fung MC, Weintraub M, Bowen DL. Hypermagnesemia: elderly over-the-counter drug users at risk. *Archives of family medicine*. 1995;4(8):718.

Gamaley IA, Klyubin IV. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *International review of cytology*. 1999;188:203-55.

Glaudemans B, van der Wijst J, Scola RH, Lorenzoni PJ, Heister A, van der Kemp AW, Knoers NV, Hoenderop JG, Bindels RJ. A missense mutation in the Kv1.1 voltage-gated potassium channel-encoding gene KCNA1 is linked to human autosomal dominant hypomagnesemia. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(4):936.

Glick JL. Dementias: the role of magnesium deficiency and an hypothesis concerning the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Medical hypotheses*. 1990;31(3):211-25.

Glick JL. Use of magnesium in the management of dementias. *Medical Science Research*. 1990.

Gómez-Hernandez JM, Lorra C, Pardo LA, Stühmer W, Pongs O, Heinemann SH, Elliott AA. Molecular basis for different pore properties of potassium channels from the rat brain Kv1 gene family. *Pflügers Archiv*. 1997;434(6):661-8.

Gong Y, Renigunta V, Himmerkus N, Zhang J, Renigunta A, Bleich M, Hou J. Claudin - 14 regulates renal Ca^{2+} transport in response to CaSR signalling via a novel microRNA pathway. *The EMBO journal*. 2012;31(8):1999-2012.

Gramsbergen JB, Mountjoy CQ, Rossor MN, Reynolds GP, Roth M, Korf J. A correlative study on hippocampal cation shifts and amino acids and clinico-pathological data in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 1987;8(6):487-94.

Greger R, Velázquez H. The cortical thick ascending limb and early distal convoluted tubule in the urinary concentrating mechanism. *Kidney Int*. 1987;31(2):590-6.

Groenen PM, van Rooij IA, Peer PG, Ocké MC, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP. Low maternal dietary intakes of iron, magnesium, and niacin are associated with spina bifida in the offspring. *The Journal of nutrition*. 2004;134(6):1516-22.

Groenestege WM, Hoenderop JG, van den Heuvel L, Knoers N, Bindels RJ. The epithelial Mg^{2+} channel transient receptor potential melastatin 6 is regulated by dietary Mg^{2+} content and estrogens. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(4):1035-43.

Grubbs RD. Intracellular magnesium and magnesium buffering. *Biometals*. 2002;15(3):251-9.

Grubbs RD, Maguire ME. Magnesium as a regulatory cation: criteria and evaluation. *Magnesium*. 1986;6(3):113-27.

Guiet-Bara A, Durlach J, Bara M. Magnesium ions and ionic channels: activation, inhibition or block—a hypothesis. *Magnesium Research*. 2007;20(2):100-6.

Günther T. Concentration, compartmentation and metabolic function of intracellular free Mg²⁺. Magnesium research. 2006;19(4):225-36.

Günther T, Vormann J, Höllriegel V. Characterization of Na⁺-dependent Mg²⁺ efflux from Mg²⁺-loaded rat erythrocytes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 1990;1023(3):455-61.

Günzel D, Alan SL. Claudins and the modulation of tight junction permeability. Physiological reviews. 2013;93(2):525-69.

Gupta RK, Gupta P, Yushok WD, Rose ZB. Measurement of the dissociation constant of MgATP at physiological nucleotide levels by a combination of 31 P NMR and optical absorbance spectroscopy. Biochemical and biophysical research communications. 1983;117(1):210-6.

Gupta RK, Moore RD. 31P NMR studies of intracellular free Mg²⁺ in intact frog skeletal muscle. Journal of Biological Chemistry. 1980;255(9):3987-93.

Habas R, Kato Y, He X. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. Cell. 2001;107(7):843-54.

Hallak M. Effect of parenteral magnesium sulfate administration on excitatory amino acid receptors in the rat brain. Magnesium research: official organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium. 1998;11(2):117-31.

Hama H, Morozumi T, Nakamura H. Novel Mg²⁺-responsive fluorescent chemosensor based on benzo-15-crown-5 possessing 1-naphthaleneacetamide moiety. Tetrahedron letters. 2007;48(10):1859-61.

Harris CL, Liem KF. Concepts in zoology. second edition. HarperCollins; 1996.

Hartwig A. Role of magnesium in genomic stability. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2001;475(1):113-21.

Haugland RP. Handbook of fluorescent probes and research products. Molecular Probes; 2002.

Himmerkus N, Shan Q, Goerke B, Hou J, Goodenough DA, Bleich M. Salt and acid-base metabolism in claudin-16 knockdown mice: impact for the pathophysiology of FHHNC patients. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2008;295(6):F1641-7.

Hoane MR. Assessment of cognitive function following magnesium therapy in the traumatically injured brain. *Magnesium Research*. 2007;20(4):229-36.

Hoane MR. Treatment with magnesium improves reference memory but not working memory while reducing GFAP expression following traumatic brain injury. *Restorative neurology and neuroscience*. 2005;23(2):67-78.

Hoane MR. Magnesium therapy and recovery of function in experimental models of brain injury and neurodegenerative disease. *Clinical calcium*. 2004;14(8):65-70.

Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. ECaC: the gatekeeper of transepithelial Ca²⁺ transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2002;1600(1):6-11.

Horie MI, Irisawa HI. Dual effects of intracellular magnesium on muscarinic potassium channel current in single guinea-pig atrial cells. *The Journal of physiology*. 1989;408(1):313-32.

Horie M, Irisawa H, Noma A. Voltage-dependent magnesium block of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channel in guinea-pig ventricular cells. *The Journal of Physiology*. 1987;387(1):251-72.

Hou J, Renigunta A, Gomes AS, Hou M, Paul DL, Waldegger S, Goodenough DA. Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(36):15350-5.

Hou J, Renigunta A, Konrad M, Gomes AS, Schneeberger EE, Paul DL, Waldegger S, Goodenough DA. Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(2):619.

Huijgen HJ, Sanders R, Cecco SA, Rehak NN, Sanders GT, Elin RJ. Serum ionized magnesium: comparison of results obtained with three ion-selective analyzers. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 1999;37(4):465-70.

Hurd TW, Otto EA, Mishima E, Gee HY, Inoue H, Inazu M, Yamada H, Halbritter J, Seki G, Konishi M, Zhou W. Mutation of the Mg^{2+} transporter SLC41A1 results in a nephronophthisis-like phenotype. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2013:ASN-2012101034.

Hurley LS, Cosens G, Theriault LL. Teratogenic effects of magnesium deficiency in rats. *The Journal of nutrition*. 1976;106(9):1254-60.

Ikari A, Nakajima K, Taki S, Suketa Y. Up-regulation of Na^{+} -dependent Mg^{2+} transport by nitric oxide and cyclic GMP pathway in renal epithelial cells. *European journal of pharmacology*. 2002;451(2):133-9.

Illner H, McGuigan JA, Lüthi D. Evaluation of mag-fura-5, the new fluorescent indicator for free magnesium measurements. *Pflügers Archiv*. 1992;422(2):179-84.

Iotti S, Frassinetti C, Alderighi L, Sabatini A, Vacca A, Barbiroli B. In vivo assessment of free magnesium concentration in human brain by ^{31}P MRS. A new calibration curve based on a mathematical algorithm. *NMR in biomedicine*. 1996;9(1):24-32.

Iotti S, Frassinetti C, Alderighi L, Sabatini A, Vacca A, Barbiroli B. In vivo ^{31}P -MRS assessment of cytosolic $[Mg^{2+}]$ in the human skeletal muscle in different metabolic conditions. *Magnetic resonance imaging*. 2000;18(5):607-14.

Ishida M, Naruta Y, Tani F. A Porphyrin - Related Macrocycle with an Embedded 1, 10 - Phenanthroline Moiety: Fluorescent Magnesium (II) Ion Sensor. *Angewandte Chemie International Edition*. 2010;49(1):91-4.

Jin J, Wu LJ, Jun J, Cheng X, Xu H, Andrews NC, Clapham DE. The channel kinase, TRPM7, is required for early embryonic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(5):E225-33.

Johnson JW, Ascher P. Voltage-dependent block by intracellular Mg^{2+} of N-methyl-D-aspartate-activated channels. *Biophysical journal*. 1990;57(5):1085.

ER. Kandel, JH. Schwartz, TM. Jessell, SA. Siegelbaum, AJ. Hudspeth, *Principles of Neural Science*, Fifth Edition (2012). McGraw-Hill Education.

Karbach U, Rummel W. Cellular and paracellular magnesium transport across the terminal ileum of the rat and its interaction with the calcium transport. *Gastroenterology*. 1990;98(4):985-92.

Karbach U. Magnesium transport across colon ascendens of the rat. *Digestive diseases and sciences*. 1989;34(12):1825-31.

Kim HM, Yang PR, Seo MS, Yi JS, Hong JH, Jeon SJ, Ko YG, Lee KJ, Cho BR. Magnesium ion selective two-photon fluorescent probe based on a benzo [h] chromene derivative for in vivo imaging. *The Journal of organic chemistry*. 2007;72(6):2088-96.

Kim HM, Jung C, Kim BR, Jung SY, Hong JH, Ko YG, Lee KJ, Cho BR. Environment - Sensitive Two - Photon Probe for Intracellular Free Magnesium Ions in Live Tissue. *Angewandte Chemie International Edition*. 2007;46(19):3460-3.

Kirov GK, Birch NJ, Steadman P, Ramsey RG. Plasma magnesium levels in a population of psychiatric patients: correlations with symptoms. *Neuropsychobiology*. 1994;30(2-3):73-8.

Kobayashi S, Fujiwara S, Arimoto S, Koide H, Fukuda J, Shimode K, Yamaguchi S, Okada K, Tsunematsu T. Hair aluminium in normal aged and senile dementia of Alzheimer type. *Progress in clinical and biological research*. 1988;317:1095-109.

KoKko JP. Proximal tubule potential difference. Dependence on glucose, HCO_3^- , and amino acids. *Journal of Clinical Investigation*. 1973;52(6):1362.

Koldenkova VP, Matsuda T, Nagai T. MagIC, a genetically encoded fluorescent indicator for monitoring cellular Mg^{2+} using a non-Förster resonance energy transfer ratiometric imaging approach. *Journal of Biomedical Optics*. 2015;20(10):101203-.

Kolisek M, Nestler A, Vormann J, Schweigel-Röntgen M. Human gene SLC41A1 encodes for the $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ exchanger. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2012;302(1):C318-26.

Komatsu H, Iwasawa N, Citterio D, Suzuki Y, Kubota T, Tokuno K, Kitamura Y, Oka K, Suzuki K. Design and synthesis of highly sensitive and selective fluorescein-derived magnesium fluorescent probes and application to intracellular 3D Mg^{2+} imaging. *Journal of the American Chemical Society*. 2004;126(50):16353-60.

Komiya Y, Su LT, Chen HC, Habas R, Runnels LW. Magnesium and embryonic development. *Magnesium Research*. 2014;27(1):1-8.

Konrad M, Schaller A, Seelow D, Pandey AV, Waldegger S, Lesslauer A, Vitzthum H, Suzuki Y, Luk JM, Becker C, Schlingmann KP. Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *The American Journal of Human Genetics*. 2006;79(5):949-57.

Koc ER, Ilhan A, AYTÜRK Z, Acar B, GÜRLER M, ALTUNTAŞ A, Karapirli M, Bodur AS. A comparison of hair and serum trace elements in patients with Alzheimer disease and healthy participants. *Turkish journal of medical sciences*. 2015;45(5):1034-9.

Kozak JA, Matsushita M, Nairn AC, Cahalan MD. Charge screening by internal pH and polyvalent cations as a mechanism for activation, inhibition, and rundown of TRPM7/MIC channels. *The Journal of general physiology*. 2005;126(5):499-514.

Kroeger H, Trösch W. Influence of the explantation milieu on intranuclear [Na], [K] and [Mg] of *Chironomus thummi* salivary gland cells. *Journal of cellular physiology*. 1974;83(1):19-25.

Kuhn MA, Hoyland B, Carter S, Zhang C, Haugland RP. Fluorescent ion indicators for detecting heavy metals. In *Photonics West'95 1995* (pp. 238-244). International Society for Optics and Photonics.

Ladner CJ, Lee JM. Reduced High-Affinity Agonist Binding at the M₁ Muscarinic Receptor in Alzheimer's Disease Brain: Differential Sensitivity to Agonists and Divalent Cations. *Experimental neurology*. 1999;158(2):451-8.

Lambers TT, Bindels RJ, Hoenderop JG. Coordinated control of renal Ca²⁺ handling. *Kidney international*. 2006;69(4):650-4.

Lameris AL, Hess MW, van Kruijsbergen I, Hoenderop JG, Bindels RJ. Omeprazole enhances the colonic expression of the Mg²⁺ transporter TRPM6. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 2013;465(11):1613-20.

Landfield PW, Morgan GA. Chronically elevating plasma Mg²⁺ improves hippocampal frequency potentiation and reversal learning in aged and young rats. *Brain research*. 1984;322(1):167-71.

- Laver DR, Honen BN. Luminal Mg^{2+} , a key factor controlling RYR2-mediated Ca^{2+} release: cytoplasmic and luminal regulation modeled in a tetrameric channel. *The Journal of general physiology*. 2008;132(4):429-46.
- Le Grimellec C, Giocondi MC, Philippe P. Micropuncture study along the proximal convoluted tubule electrolyte reabsorption in first convolutions. *Pflügers Archiv*. 1975;354(2):133-50.
- Lemke MR. Plasma magnesium decrease and altered calcium/magnesium ratio in severe dementia of the Alzheimer type. *Biological psychiatry*. 1995;37(5):341-3.
- Leroy J. Necessity of magnesium for growth of mice. *Compt Rend Soc Biol (Paris)*. 1926;94:431-3.
- Lee US, Cui J. BK channel activation: structural and functional insights. *Trends in neurosciences*. 2010;33(9):415-23.
- Levy LA, Murphy E, Raju B, London RE. Measurement of cytosolic free magnesium ion concentration by fluorine-19 NMR. *Biochemistry*. 1988;27(11):4041-8.
- Li FY, Chaigne-Delalande B, Kanellopoulou C, Davis JC, Matthews HF, Douek DC, Cohen JI, Uzel G, Su HC, Lenardo MJ. Second messenger role for Mg^{2+} revealed by human T-cell immunodeficiency. *Nature*. 2011;475(7357):471-6.
- Li W, Yu J, Liu Y, Huang X, Abumaria N, Zhu Y, Huang X, Xiong W, Ren C, Liu XG, Chui D. Elevation of brain magnesium prevents synaptic loss and reverses cognitive deficits in Alzheimer's disease mouse model. *Molecular brain*. 2014;7(1):65.
- Lindenburg LH, Vinkenborg JL, Oortwijn J, Aper SJ, Merckx M. MagFRET: the first genetically encoded fluorescent Mg^{2+} sensor. *PloS one*. 2013;8(12):e82009.
- Liu X, Wu Y, Zhou Y. Intracellular linkers are involved in Mg^{2+} -dependent modulation of the Eag potassium channel. *Channels*. 2010;4(4):311-8.
- London RE. Methods for measurement of intracellular magnesium: NMR and fluorescence. *Annual review of physiology*. 1991;53(1):241-58.

Lu Z, MacKinnon R. Electrostatic tuning of Mg^{2+} affinity in an inward-rectifier K^+ channel. *Nature*. 1994;371(6494):243-6.

Lukacs GL, Zs-Nagy I, Steiber J, Györi F, Balazs G. Relative intranuclear magnesium and phosphorus contents in normal and tumor cells of the human thyroid gland as revealed by energy-dispersive X-ray microanalysis. *Scanning microscopy*. 1995;10(4):1191-200.

Makrides M, Crosby DD, Bain E, Crowther CA. Magnesium supplementation in pregnancy. *The Cochrane Library*. 2014.

Makrides M, Crowther CA. Magnesium supplementation in pregnancy. *The Cochrane Library*. 2001.

Mandon B, Siga E, Roinel N, De Rouffignac C. Ca^{2+} , Mg^{2+} and K^+ transport in the cortical and medullary thick ascending limb of the rat nephron: influence of transepithelial voltage. *Pflügers Archiv*. 1993;424(5-6):558-60.

Masumoto N, Tasaka K, Mizuki J, Miyake A, Tanizawa O. Regulation of intracellular Mg^{2+} by superoxide in amnion cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1992;182(2):906-12.

Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the β -amyloid precursor protein. *Neuron*. 1993;10(2):243-54.

Maulik D, Zanelli S, Numagami Y, Ohnishi ST, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Oxygen free radical generation during in-utero hypoxia in the fetal guinea pig brain: the effects of maturity and of magnesium sulfate administration. *Brain research*. 1999;817(1):117-22.

McGuigan JA, Blatter LA, Buri A. Use of ion selective microelectrodes to measure intracellular free Mg^{2+} . In *Mg^{2+} and excitable membranes 1991* (pp. 1-19). Springer Berlin Heidelberg.

McGuigan JA, Blatter LA. Measurement of free magnesium using magnesium selective microelectrodes. *Magnesium-Bulletin*. 1989;11(3):139-42.

Meissner G, Henderson JS. Rapid calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles is

dependent on Ca^{2+} and is modulated by Mg^{2+} , adenine nucleotide, and calmodulin. *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262(7):3065-73.

Meissner G. Ryanodine activation and inhibition of the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*. 1986;261(14):6300-6.

Milla PJ, Aggett PJ, Wolff OH, Harries JT. Studies in primary hypomagnesaemia: evidence for defective carrier-mediated small intestinal transport of magnesium. *Gut*. 1979;20(11):1028-33.

Miyashita T, Oda Y, Horiuchi J, Yin JC, Morimoto T, Saitoe M. Mg^{2+} block of *Drosophila* NMDA receptors is required for long-term memory formation and CREB-dependent gene expression. *Neuron*. 2012;74(5):887-98.

Morimoto T, Ohsawa I, Takamura C, Ishiguro M, Kohsaka S. Involvement of amyloid precursor protein in functional synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Journal of neuroscience research*. 1998;51(2):185-95.

Nair AV, Hocher B, Verkaart S, van Zeeland F, Pfab T, Slowinski T, Chen YP, Schlingmann KP, Schaller A, Gallati S, Bindels RJ. Loss of insulin-induced activation of TRPM6 magnesium channels results in impaired glucose tolerance during pregnancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(28):11324-9.

Nicolas M, Hassan BA. Amyloid precursor protein and neural development. *Development*. 2014;141(13):2543-8.

Nischwitz V, Berthele A, Michalke B. Speciation analysis of selected metals and determination of their total contents in paired serum and cerebrospinal fluid samples: An approach to investigate the permeability of the human blood-cerebrospinal fluid-barrier. *Analytica chimica acta*. 2008;627(2):258-69.

Oh HG, Chun YS, Kim Y, Youn SH, Shin S, Park MK, Kim TW, Chung S. Modulation of transient receptor potential melastatin related 7 channel by presenilins. *Developmental neurobiology*. 2012;72(6):865-77.

Oppelt WW, MacIntyre I, Rall DP. Magnesium exchange between blood and cerebrospinal fluid. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1963;205(5):959-62.

Ozturk S, Cillier AE. Magnesium supplementation in the treatment of dementia patients. *Medical hypotheses*. 2006;67(5):1223-5.

Parry DA, Mighell AJ, El-Sayed W, Shore RC, Jalili IK, Dollfus H, Bloch-Zupan A, Carlos R, Carr IM, Downey LM, Blain KM. Mutations in CNNM4 cause Jalili syndrome, consisting of autosomal-recessive cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta. *The American Journal of Human Genetics*. 2009;84(2):266-73.

Partridge IG. Studies on digestion and absorption in the intestines of growing pigs. 4. Effects of dietary cellulose and sodium levels on mineral absorption. *The British journal of nutrition*. 1978;39(3):539-45.

Pasternak K, Kocot J, Horecka A. Biochemistry of magnesium. *Journal of Elementology*. 2010;15(3):601-16.

Pelletier H, Sawaya MR, Kumar AH, Wilson SH, Kraut J. Structures of ternary complexes of rat DNA polymerase beta, a DNA template-primer, and ddCTP. *Science*. 1994;264(5167):1891-903.

Polok B, Escher P, Ambresin A, Chouery E, Bolay S, Meunier I, Nan F, Hamel C, Munier FL, Thilo B, Mégarbané A. Mutations in CNNM4 cause recessive cone-rod dystrophy with amelogenesis imperfecta. *The American Journal of Human Genetics*. 2009;84(2):259-65.

Pontes MH, Sevostyanova A, Groisman EA. When too much ATP is bad for protein synthesis. *Journal of molecular biology*. 2015;427(16):2586-94.

Pusch M, Conti F, Stühmer W. Intracellular magnesium blocks sodium outward currents in a voltage-and dose-dependent manner. *Biophysical journal*. 1989;55(6):1267-71.

Quamme GA. Recent developments in intestinal magnesium absorption. *Current opinion in gastroenterology*. 2008;24(2):230-5.

Quamme GA, Wong NL, Dirks JH, Roinel N, De Rouffignac C, Morel F. Magnesium handling in the dog kidney: a micropuncture study. *Pflügers Archiv*. 1978;377(1):95-9.

Raftos JE, Lew VL, Flatman PW. Refinement and evaluation of a model of Mg^{2+} buffering in human red cells. *European Journal of Biochemistry*. 1999;263(3):635-45.

Ray D, Bharadwaj PK. A coumarin-derived fluorescence probe selective for magnesium. *Inorganic chemistry*. 2008;47(7):2252-4.

Reed DJ, Yen MH. The role of the cat choroid plexus in regulating cerebrospinal fluid magnesium. *The Journal of physiology*. 1978;281(1):477-85.

Reiber H. Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restorative neurology and neuroscience*. 2003;21(4):79-96.

Renkema KY, Alexander RT, Bindels RJ, Hoenderop JG. Calcium and phosphate homeostasis: concerted interplay of new regulators. *Annals of medicine*. 2008;40(2):82-91.

Roberfroid MB, Calderon PB. Free radicals and oxidation phenomena in biological systems. M. Dekker; 1995.

Romani AM. Cellular magnesium homeostasis. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2011;512(1):1-23.

Romani A. Regulation of magnesium homeostasis and transport in mammalian cells. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2007;458(1):90-102.

Romani A, Scarpa A. Regulation of cell magnesium. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1992;298(1):1-2.

Rubin H. The logic of the Membrane, Magnesium, Mitosis (MMM) model for the regulation of animal cell proliferation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2007;458(1):16-23.

Rubin H. Magnesium: the missing element in molecular views of cell proliferation control. *Bioessays*. 2005;27(3):311-20.

Rubin H. The membrane, magnesium, mitosis (MMM) model of cell proliferation control. *Magnesium research*. 2005;18(4):268-74.

Runnels LW. TRPM6 and TRPM7: A Mul-TRP-PLIK-cation of channel functions. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2011;12(1):42.

Ryazanova LV, Rondon LJ, Zierler S, Hu Z, Galli J, Yamaguchi TP, Mazur A, Fleig A, Ryazanov AG. TRPM7 is essential for Mg²⁺ homeostasis in mammals. *Nature communications*. 2010;1:109.

Sacco RL, Chong JY, Prabhakaran S, Elkind MS. Experimental treatments for acute ischaemic stroke. *The Lancet*. 2007;369(9558):331-41.

Salimi MH, Heughebaert JC, Nancollas GH. Crystal growth of calcium phosphates in the presence of magnesium ions. *Langmuir*. 1985;1(1):119-22.

Sargenti A, Farruggia G, Malucelli E, Cappadone C, Merolle L, Marraccini C, Andreani G, Prodi L, Zaccheroni N, Sgarzi M, Trombini C. A novel fluorescent chemosensor allows the assessment of intracellular total magnesium in small samples. *Analyst*. 2014;139(5):1201-7.

Seiler HG. Determination of magnesium in biological materials. *Metal ions in biological systems*. 1990;26:611-24.

Scarpa A. Measurements of cation transport with metallochromic indicators. *Methods in enzymology*. 1979;56:301.

Schmitz C, Perraud AL, Johnson CO, Inabe K, Smith MK, Penner R, Kurosaki T, Fleig A, Scharenberg AM. Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7. *Cell*. 2003;114(2):191-200.

Schrag D, Chung KY, Flombaum C, Saltz L. Cetuximab therapy and symptomatic hypomagnesemia. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(16):1221-4.

Schubert D, Behl C. The expression of amyloid beta protein precursor protects nerve cells from β -amyloid and glutamate toxicity and alters their interaction with the extracellular matrix. *Brain research*. 1993;629(2):275-82.

Schwartz SC, Pinto-Pacheco B, Pitteloud JP, Buccella D. Formation of Ternary Complexes with MgATP: Effects on the Detection of Mg²⁺ in Biological Samples by Bidentate Fluorescent Sensors. *Inorganic chemistry*. 2014;53(6):3204-9.

Schweigel M, Martens H. Magnesium transport in the gastrointestinal tract. *Front Biosci.* 2000;5:D666-77.

Shan Q, Himmerkus N, Hou J, Goodenough DA, Bleich M. Insights into driving forces and paracellular permeability from claudin-16 knockdown mouse. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2009;1165(1):148-51.

Sharma HS. Blood-spinal cord and brain barriers in health and disease. Academic Press; 2003.

Shindo Y, Fujii T, Komatsu H, Citterio D, Hotta K, Suzuki K, Oka K. Newly developed Mg²⁺-selective fluorescent probe enables visualization of Mg²⁺ dynamics in mitochondria. *PloS one.* 2011;6(8):e23684-.

Sigel H, Sigel A. Compendium on magnesium and its role in biology, nutrition, and physiology. Dekker; 1990.

Shan Q, Himmerkus N, Hou J, Goodenough DA, Bleich M. Insights into driving forces and paracellular permeability from claudin-16 knockdown mouse. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2009;1165(1):148-51.

Silverman WR, Tang CY, Mock AF, Huh KB, Papazian DM. Mg²⁺ modulates voltage-dependent activation in ether-à-go-go potassium channels by binding between transmembrane segments S2 and S3. *The Journal of general physiology.* 2000;116(5):663-78.

Sirover MA, Loeb LA. On the fidelity of DNA replication. Effect of metal activators during synthesis with avian myeloblastosis virus DNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry.* 1977;252(11):3605-10.

Sirover MA, Loeb LA. Infidelity of DNA synthesis in vitro: screening for potential metal mutagens or carcinogens. *Science.* 1976;194(4272):1434-6.

Slutsky I, Abumaria N, Wu LJ, Huang C, Zhang L, Li B, Zhao X, Govindarajan A, Zhao MG, Zhuo M, Tonegawa S. Enhancement of learning and memory by elevating brain magnesium. *Neuron.* 2010;65(2):165-77.

Small DH, Nurcombe V, Reed G, Clarris H, Moir R, Beyreuther K, Masters CL. A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *The Journal of neuroscience*. 1994;14(4):2117-27.

Somlyo AV, Bond M, Shuman H, Somlyo AP. Electron - Probe X Ray Microanalysis of In Situ Calcium and Other Ion Movements in Muscle and Liver. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1986;483(1):229-40.

Somlyo AV, Bond M, Somlyo AP, Scarpa A. Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985;82(15):5231-5.

Song KC, Choi MG, Ryu DH, Kim KN, Chang SK. Ratiometric chemosensing of Mg^{2+} ions by a calix [4] arene diamide derivative. *Tetrahedron letters*. 2007;48(31):5397-400.

Steele DS, Duke AM. Defective Mg^{2+} regulation of RyR1 as a causal factor in malignant hyperthermia. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2007;458(1):57-64.

Stuiver M, Lainez S, Will C, Terryn S, Günzel D, Debaix H, Sommer K, Kopplin K, Thumfart J, Kampik NB, Querfeld U. CNNM2, encoding a basolateral protein required for renal Mg^{2+} handling, is mutated in dominant hypomagnesemia. *The American Journal of Human Genetics*. 2011;88(3):333-43.

Sugiyama TA, Goldman WF. Measurement of SR free Ca^{2+} and Mg^{2+} in permeabilized smooth muscle cells with use of furaptra. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1995;269(3):C698-705.

Su LT, Chen HC, González-Pagán O, Overton JD, Xie J, Yue L, Runnels LW. TRPM7 activates m-calpain by stress-dependent stimulation of p38 MAPK and c-Jun N-terminal kinase. *Journal of molecular biology*. 2010;396(4):858-69.

Su L, Liu W, Chen H, González-Pagán O, Habas R, Runnels L. TRPM7 regulates polarized cell movements. *Biochem. J*. 2011;434:513-21.

Su LT, Agapito MA, Li M, Simonson WT, Huttenlocher A, Habas R, Yue L, Runnels LW. TRPM7 regulates cell adhesion by controlling the calcium-dependent protease calpain. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(16):11260-70.

Suh WC, Ross W, Record MT. Two open complexes and a requirement for Mg²⁺ to open the lambda PR transcription start site. *Science*. 1993;259(5093):358-61.

Suram A, Hegde ML, Rao KS. A new evidence for DNA nicking property of amyloid β -peptide (1-42): Relevance to Alzheimer's disease. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2007;463(2):245-52.

Slutsky I, Abumaria N, Wu LJ, Huang C, Zhang L, Li B, Zhao X, Govindarajan A, Zhao MG, Zhuo M, Tonegawa S. Enhancement of learning and memory by elevating brain magnesium. *Neuron*. 2010;65(2):165-77.

Sun L, Kosugi Y, Kawakami E, Piao YS, Hashimoto T, Oyanagi K. Magnesium concentration in the cerebrospinal fluid of mice and its response to changes in serum magnesium concentration. *Magnesium Research*. 2009;22(4):266-72.

Swaminathan R. Magnesium metabolism and its disorders. *The Clinical Biochemist Reviews*. 2003;24(2):47.

Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B. Measurement of intracellular calcium. *Physiological reviews*. 1999;79(4):1089-125.

Takaya J, Higashino H, Kobayashi Y. Can magnesium act as a second messenger? Current data on translocation induced by various biologically active substances. *Magnesium research*. 2000;13(2):139-46.

Takeda A, Nakamura M, Fujii H, Tamano H. Synaptic Zn²⁺ homeostasis and its significance. *Metallomics*. 2013;5(5):417-23.

Teeter MM, Quigley GJ, Rich A. Metal ions and transfer RNA. *Nucleic Acid-Metal Ion Interactions*. Wiley-Interscience: New York, NY. 1980:145-77.

Thebault S, Alexander RT, Groenestege WM, Hoenderop JG, Bindels RJ. EGF increases TRPM6

activity and surface expression. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2009;20(1):78-85.

Theophanides T, Anastassopoulou J. Metal binding and conformational changes. *Spectroscopy of biological molecules—new advances*, Willey, Chichester. 1987:433-8.

Theophanides T, Tajmir-Riahi HA. Flexibility of DNA and RNA upon binding to different metal cations. An investigation of the B to A to Z conformational transition by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 1985;2(5):995-1004.

Theophanides T. Metal ions in biological system. *International Journal of Quantum Chemistry*. 1984;26(5):933-41.

Vener AV, Aksenova MV, Burbaeva GS. Drastic reduction of the zinc-and magnesium-stimulated protein tyrosine kinase activities in Alzheimer's disease hippocampus. *FEBS letters*. 1993;328(1-2):6-8.

Venu L, Padmavathi IJ, Kishore YD, Bhanu NV, Rao KR, Sainath PB, Ganeshan M, Raghunath M. Long - term Effects of Maternal Magnesium Restriction on Adiposity and Insulin Resistance in Rat Pups. *Obesity*. 2008;16(6):1270-6.

Vink R, Nechifor M, editors. *Magnesium in the Central Nervous System*. University of Adelaide Press; 2011.

Visser D, Langeslag M, Kedziora KM, Klarenbeek J, Kamermans A, Horgen FD, Fleig A, van Leeuwen FN, Jalink K. TRPM7 triggers Ca^{2+} sparks and invadosome formation in neuroblastoma cells. *Cell Calcium*. 2013;54(6):404-15.

Voets T, Nilius B, Hoefs S, van der Kemp AW, Droogmans G, Bindels RJ, Hoenderop JG. TRPM6 forms the Mg^{2+} influx channel involved in intestinal and renal Mg^{2+} absorption. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(1):19-25.

Volpe P, Vezu L. Intracellular magnesium and inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor: molecular mechanisms of interaction, physiology and pharmacology. *Magnesium research: official organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium*. 1993;6(3):267-74.

Volpe PO, Alderson-Lang BH, Nickols GA. Regulation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release. I. Effect of Mg^{2+} . *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1990;258(6):C1077-85.

Vural H, Demirin H, Kara Y, Eren I, Delibas N. Alterations of plasma magnesium, copper, zinc, iron and selenium concentrations and some related erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2010;24(3):169-73.

Walder RY, Yang B, Stokes JB, Kirby PA, Cao X, Shi P, Searby CC, Husted RF, Sheffield VC. Mice defective in *Trpm6* show embryonic mortality and neural tube defects. *Human molecular genetics*. 2009;18(22):4367-75.

Wang CY, Shi JD, Yang P, Kumar PG, Li QZ, Run QG, Su YC, Scott HS, Kao KJ, She JX. Molecular cloning and characterization of a novel gene family of four ancient conserved domain proteins (ACDP). *Gene*. 2003;306:37-44.

Wang M, Tashiro M, Berlin JR. Regulation of L-type calcium current by intracellular magnesium in rat cardiac myocytes. *The Journal of physiology*. 2004;555(2):383-96.

Wang JZ, Gong CX, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and- 2B. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(9):4854-60.

Weglicki WB, Kramer JH, Mak IT, Dickens BF, Komarov AM, Phillips TM. Proinflammatory neuropeptides in magnesium deficiency. In *METAL IONS IN BIOLOGY AND MEDICINE- INTERNATIONAL SYMPOSIUM- 2000* (Vol. 6, pp. 472-474). John Libbey; 1998.

Weglicki WB, Phillips TM, MAK I, Cassidy MM, Dickens BF, Stafford R, Kramer JH. Cytokines, Neuropeptides, and Reperfusion Injury during Magnesium Deficiency a. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1994;723(1):246-57.

Weglicki WB, Phillips TM. Pathobiology of magnesium deficiency: a cytokine/neurogenic inflammation hypothesis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1992;263(3):R734-7.

Wei C, Wang X, Chen M, Ouyang K, Song LS, Cheng H. Calcium flickers steer cell migration. *Nature*. 2009;457(7231):901-5.

Witte F. The history of biodegradable magnesium implants: a review. *Acta biomaterialia*. 2010;6(5):1680-92.

Wolf FE, Trapani V. Cell (patho) physiology of magnesium. *Clinical science*. 2008;114:27-35.

Wolf FI, Cittadini A. Chemistry and biochemistry of magnesium. *Molecular aspects of medicine*. 2003;24(1):3-9.

Xu ZP, Li L, Bao J, Wang ZH, Zeng J, Liu EJ, Li XG, Huang RX, Gao D, Li MZ, Zhang Y. Magnesium protects cognitive functions and synaptic plasticity in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's model. *PloS one*. 2014;9(9):e108645.

Xu JZ, Hall AE, Peterson LN, Bienkowski MJ, Eessalu TE, Hebert SC. Localization of the ROMK protein on apical membranes of rat kidney nephron segments. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1997;273(5):F739-48.

Yamazaki D, Funato Y, Miura J, Sato S, Toyosawa S, Furutani K, Kurachi Y, Omori Y, Furukawa T, Tsuda T, Kuwabata S. Basolateral Mg²⁺ extrusion via CNNM4 mediates transcellular Mg²⁺ transport across epithelia: a mouse model. *ProS Genetics*. 2013; 9(12): e1003983.

Yang H, Zhang G, Cui J. BK channels: multiple sensors, one activation gate. *Frontiers in physiology*. 2015;6.

Yang H, Shi J, Zhang G, Yang J, Delaloye K, Cui J. Activation of Slo1 BK channels by Mg²⁺ coordinated between the voltage sensor and RCK1 domains. *Nature structural & molecular biology*. 2008;15(11):1152-9.

Yang LS, Ksiezak-Reding H. Ca²⁺ and Mg²⁺ selectively induce aggregates of PHF-tau but not normal human tau. *Journal of neuroscience research*. 1999;55(1):36-43.

Yasui M, Ota K. Aluminum decreases the magnesium concentration of spinal cord and trabecular bone in rats fed a low calcium, high aluminum diet. *Journal of the neurological sciences*. 1998;157(1):37-41.

Yu J, Sun M, Chen Z, Lu J, Liu Y, Zhou L, Xu X, Fan D, Chui D. Magnesium modulates amyloid- β protein precursor trafficking and processing. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010;20(4):1091.

Zhang G, Gruskos JJ, Afzal MS, Buccella D. Visualizing changes in mitochondrial Mg^{2+} during apoptosis with organelle-targeted triazole-based ratiometric fluorescent sensors. *Chemical Science*. 2015;6(12):6841-6.

Zhang JY, Liu SJ, Li HL, Wang JZ. Microtubule-associated protein tau is a substrate of ATP/ Mg^{2+} -dependent proteasome protease system. *Journal of neural transmission*. 2005;112(4):547-55.

Zhao M, Feng R, Shao D, Liu S, Lei M, Wang H, Sun X, Guo F, Hu H, Kameyama M, Hao L. Mg^{2+} -dependent facilitation and inactivation of L-type Ca^{2+} channels in guinea pig ventricular myocytes. *Journal of pharmacological sciences*. 2015;129(3):143-9.

第2章 一酸化窒素による細胞内 Mg^{2+}

動員

概要

神経細胞の細胞内 Mg^{2+} 制御機構に対して一酸化窒素 (NO) が関与しているかどうかを解明することを目的として、マグネシウムイオン選択的蛍光指示薬 KMG-104 を用いた蛍光イメージング法によってラット海馬神経細胞内の Mg^{2+} 濃度変化の解析を行った。その結果、NO/cGMP/PKG シグナル経路の活性化はミトコンドリア ATP 作動性カリウムチャネル (mitoK_{ATP} チャネル) 活性化を介し、ミトコンドリア脱分極をともなって、ミトコンドリアから細胞質への Mg^{2+} 放出を引き起こすことがわかった。さらに、この Mg^{2+} 放出は mitoK_{ATP} チャネル活性化、ミトコンドリア脱分極、PKC 活性化からなるポジティブフィードバック経路を介して増強されることがわかった。

2.1 はじめに

細胞内の主要な Mg^{2+} 貯蔵器官はミトコンドリアであり (Kubota et al., 2005)、ATP 合成、電子伝達系、活性酸素の解毒などのミトコンドリアの基本的な機能は Mg^{2+} の影響を受ける (Wolf et al., 2008)。ミトコンドリアへの過剰な Ca^{2+} の取り込みは神経毒性の原因であることが知られているが、細胞質中の Mg^{2+} はミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込みを阻害する (Szanda et al., 2009; Pradhan et al., 2011; Racay, 2008)。偏頭痛、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経系疾患において、 Mg^{2+} は重要な機能を果たすことが示唆されている (Yasui et al., 1992; Boska et al., 2002; Andrasz et al., 2005; Hashimoto et al., 2008)。特に、パーキンソン病患者の脳内の Mg^{2+} は健常者と比較して少ないことや (Yasui et al., 1992)、食事における Mg^{2+} 摂取量が少ないとパーキンソン病の発症率が高くなることが知られており (Miyake et al., 2011; Oyanagi et al., 2006)、パーキンソン病の病態と脳内の Mg^{2+} 量は密接な関係があると考えられる。

パーキンソン病患者の脳において、一酸化窒素合成酵素 (neuronal Nitric Oxide Synthase ; nNOS) が過剰発現しており (Eve et al., 1998)、nNOS 遺伝子欠損マウスはパーキンソン病誘導薬 MPTP の毒性に対してより耐性を有している (Predborski et al., 1996)。一方で、一酸化窒素は cGMP/PKG シグナル経路を活性化し、ミトコンドリアの ATP 作動性カリウムチャネル (mitoK_{ATP} チャネル) を調節する (Chai and Lin, 2010)。mitoK_{ATP} チャネルの活性化は *in vitro*、*in vivo* のパーキンソン病モデルにおける神経細胞障害を抑制することがわかっている (Zhou et al., 2008; Yang et al., 2006)。また、ラットの食事における Mg^{2+} 欠乏は一酸化窒素合成酵素の活性化すること (Shah et al., 2011)、パーキンソン病

誘導薬 MPTP の活性型代謝物である MPP⁺によってミトコンドリア内の Mg²⁺濃度は徐々に減少することなど (Shindo et al., 2011)、様々な研究によって一酸化窒素シグナル及び細胞内 Mg²⁺とパーキンソン病の関わりが示唆されているが、一酸化窒素シグナルが細胞内[Mg²⁺] ([Mg²⁺]_i) に与える影響に関してはほとんどわかっていない。そこで、一酸化窒素シグナルと細胞内 Mg²⁺の関係を明らかにすることを目的として、一酸化窒素刺激時の[Mg²⁺]_i 動態の計測をおこなった。

2.2 実験手法

2.2.1 ラット海馬神経細胞の分散培養

妊娠 18 日目の wister rat から摘出した胎児ラットの脳 (図 2-S1) から海馬 CA1 領域を取り出し (図 2-S2)、氷冷した PBS(-) に速やかに入れた。そして、神経細胞分散キット (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) を用いて分散し、poly-L-lysine を一晩コーティングしたガラスベースディッシュのガラス面に 40×10^4 個 / ml の神経細胞溶液を $200 \mu\text{L}$ ずつ播種した。翌日に 1.8 mL の培養液を添加した。なお、培養液は Neuro Basal に 2 mM グルタミン、0.5% ペニシリン・ストレプトマイシン、B-27 supplement を添加したものをを用いた。

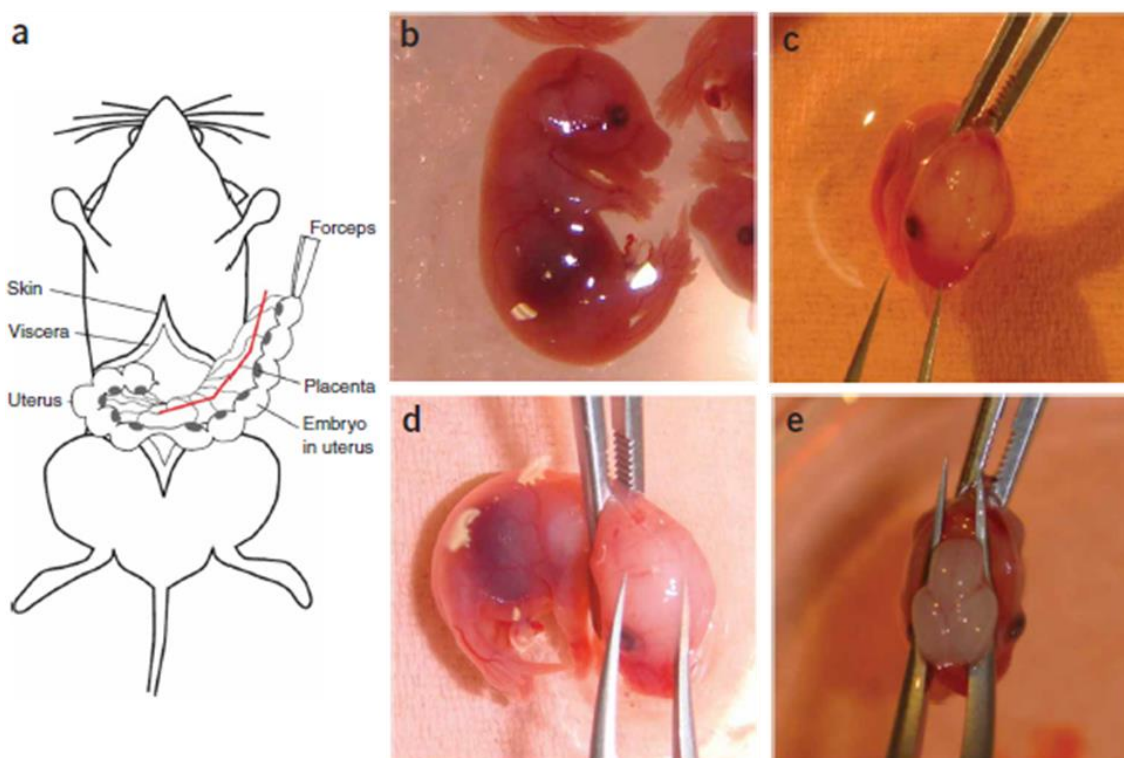


図 2-S1 胎児からの脳摘出

(Fath et al., 2008)

図 2-S1 胎児からの脳摘出

- (a) 妊娠 18 日目のラットの腹部を切開し、子宮ごと胎児を摘出する。
- (b) 子宮から胎児を取り出す
- (c) ラットの頭部を動かさないように固定する
- (d) 頭蓋骨に切込みを入れる
- (e) 頭蓋骨の切れ目から脳を摘出する

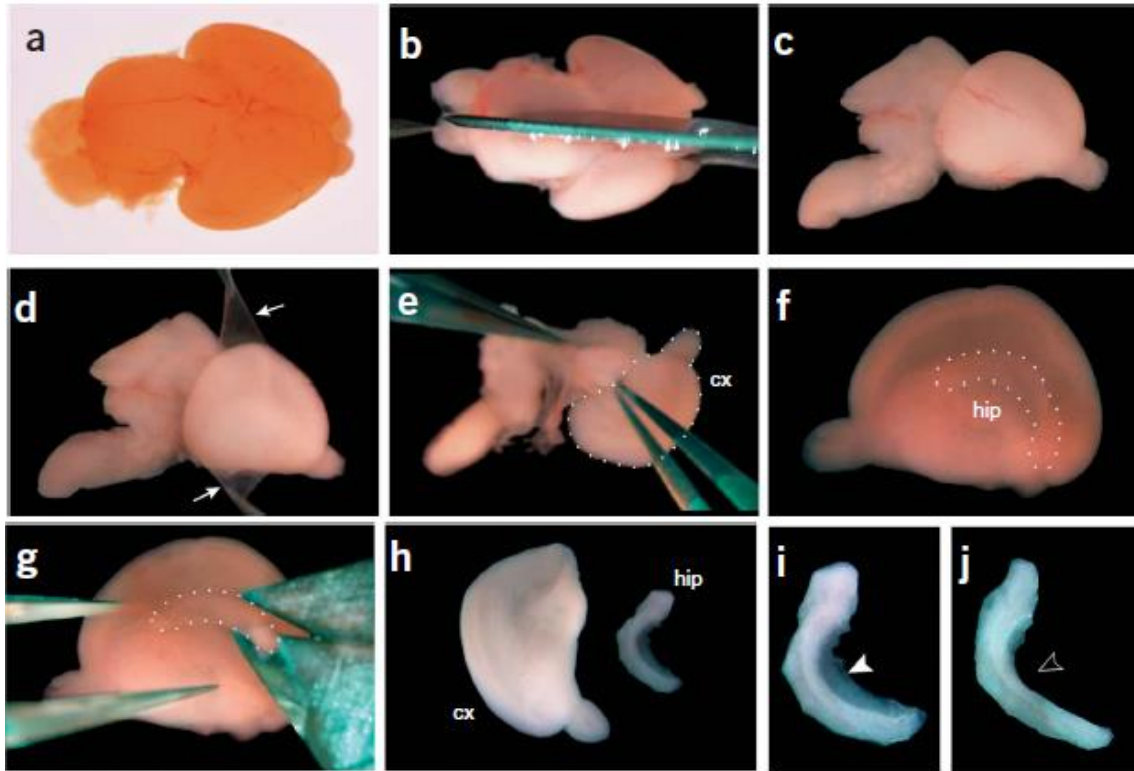


図 2-S2 脳からの海馬摘出

(Fath et al., 2009)

図 2-S2 脳からの海馬摘出

- (a-c) 脳の半球部分に分ける
- (d) 血管を含む膜を取り除く
- (e-j) 海馬部位を摘出する

2.2.2 蛍光指示薬の負荷

5-7 日間培養したラット海馬神経細胞に KMG-104-AM (5 μ M) を培養液に添加し、37°Cの CO₂ インキュベータ内で 30 分間静置した。そして、NaOH と HEPES (5 mM) を用いて pH7.4 に調製した Hank's balanced salt solution (HBSS) を用いて 2 回洗浄し、KMG-104-AM の acetoxymethyl ester を加水分解するために 37°Cの CO₂ インキュベータ内で 15 分間静置した。阻害剤前処理条件や Mg²⁺-free、Ca²⁺-free 条件下における実験においては、それぞれの条件の細胞外液で加水分解処理をおこなった。KMG-104 とその性質を図 2-S3 に示した。

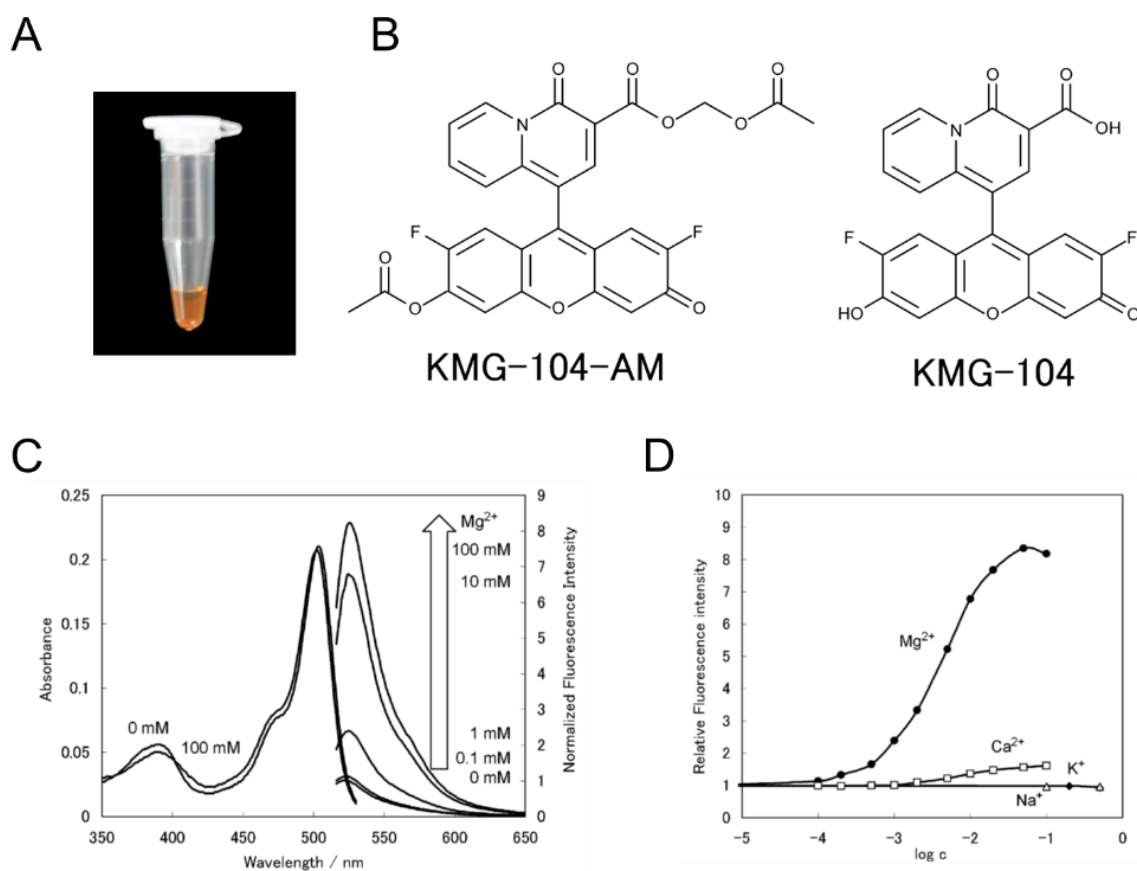


図 2-S3 KMG-104 とその性質

図 2-S3 KMG-104 とその性質

- (A) KMG-104-AM の 10 mM ストック
- (B) KMG-104-AM および KMG-104 の化学構造式
- (C) KMG-104 の吸収スペクトルと蛍光スペクトル
- (D) KMG-104 の蛍光強度のイオン (Mg²⁺, Ca²⁺, Na⁺, K⁺) 濃度依存性

(Komatsu et al., 2004)

2.2.3 共焦点顕微鏡による蛍光イメージング

蛍光イメージング法は共焦点レーザー顕微鏡（FluoViewFV1000；オリンパス社、東京、日本）を用いておこなった。KMG-104 と TMRE の同時イメージングはアルゴンレーザーによる 488 nm とヘリウムネオンレーザーによる 559 nm の波長で同時励起し、560 nm のダイクロイックミラーで分離した。そして、500–540 nm の蛍光を KMG-104 シグナル、600–700 nm の蛍光を TMRE シグナルとして取得した。それぞれの蛍光画像は FluoView software package を用いて取得・解析を行った。データの定量化に関して、手動で決定した関心領域（Region of Interest；ROI）内の平均蛍光輝度を蛍光強度として算出した。

2.3 実験結果

2.3.1 NO/cGMP/PKG シグナル経路を介した $[Mg^{2+}]_i$ 上昇

KMG-104 を負荷したラット海馬神経細胞に一酸化窒素 (NO) の供給剤である SNAP (100 μ M) を添加したところ、KMG-104 シグナルの上昇が確認された (図 2-1; A 上, B 上)。一酸化窒素は cGMP 生成を誘導することが知られているため、cGMP がこの $[Mg^{2+}]_i$ 上昇に関与しているかどうかを調べるために cGMP の膜透過型アナログである 8-Br-cGMP (100 μ M) を添加した。その結果、SNAP 添加と同様に、8-Br-cGMP 添加によって $[Mg^{2+}]_i$ が上昇することがわかった (図 2-1; A 下, B 下)。また、cGMP の下流分子として知られる PKG の阻害剤 KT5823 (5 μ M) で前処理した細胞において 8-Br-cGMP (100 μ M) 刺激を行ったところ、 $[Mg^{2+}]_i$ 上昇は抑制されることがわかった (図 2-1; C)。これらの結果より、NO/cGMP/PKG シグナル経路の活性化は細胞内 Mg^{2+} 動員を誘導することがわかった。

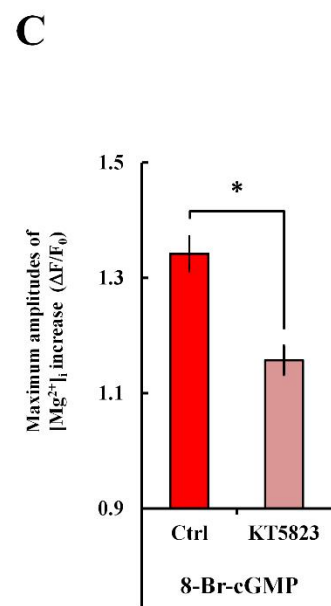
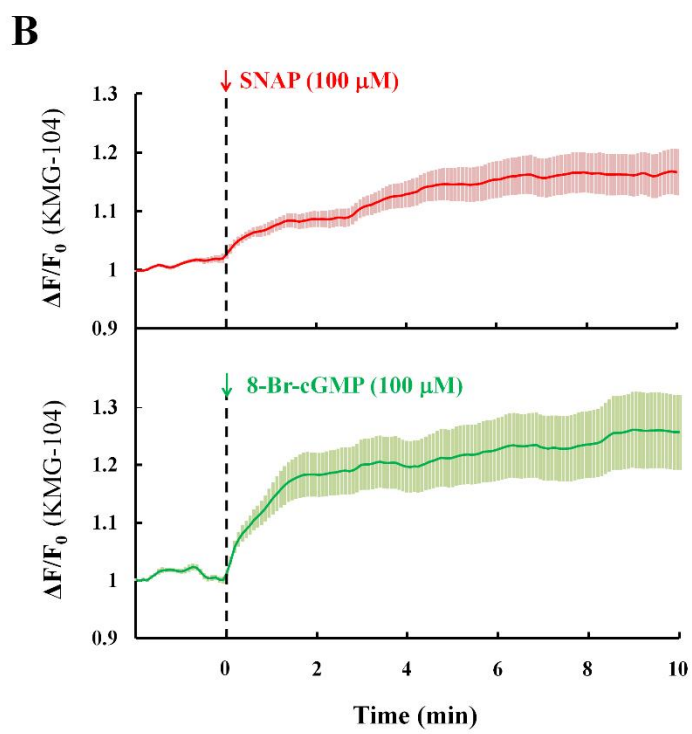
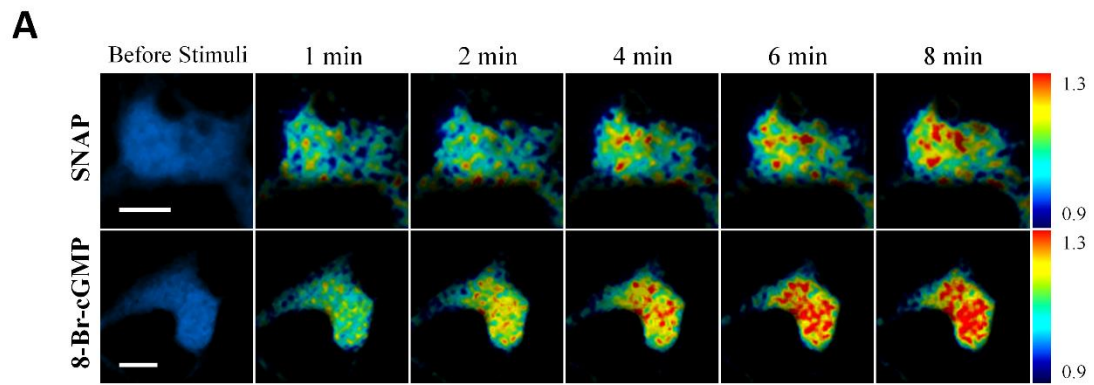


図 2-1 NO/cGMP/PKG 経路の活性化による細胞内[Mg²⁺]動員

(A) 一酸化窒素供給剤 SNAP (100 μM) 刺激 (上) および cGMP 膜透過型アナログ 8-Br-cGMP (100 μM) 刺激 (下) に対するラット海馬神経細胞における KMG-104 の蛍光輝度変化率の様子の一例を示した。画像上に示した時間における蛍光輝度変化率を擬似カラーで示した。スケールバーは 50 μm を示す。

(B) 分散培養したラット海馬神経細胞に対して、SNAP (上) 刺激および 8-Br-cGMP (下) 刺激を行なったときの KMG-104 の蛍光輝度変化率の経時変化を示した。SNAP 刺激 (n = 116; N = 7)、8-Br-cGMP 刺激 (n = 132, N = 8) はそれぞれ細胞内[Mg²⁺]上昇を引き起こした。グラフの実線は平均値、エラーバーは標準誤差 (SEM) を表す。

(C) PKG 阻害剤 KT5823 (5 μM) を前処理によって 8-Br-cGMP (100 μM) 刺激による細胞内[Mg²⁺]上昇は通常条件における細胞内[Mg²⁺]上昇 (n = 132, N = 8) と比較して抑制された (n = 57, N = 3)。棒グラフは刺激後 10 分間の最大値の平均値、エラーバーは標準誤差 (SEM) を表す。

2.3.2 ミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出

一酸化窒素による $[Mg^{2+}]_i$ の上昇の Mg^{2+} 供給源が細胞内もしくは細胞外かを明らかにすることを目的として、細胞外 Mg^{2+} を含まない Mg^{2+} -free 条件下において SNAP (100 μ M) 刺激を行ったところ、 Mg^{2+} -free 条件下においても $[Mg^{2+}]_i$ 上昇が確認された (図 2-2 ; A)。この結果より、一酸化窒素による $[Mg^{2+}]_i$ 上昇は細胞内 Mg^{2+} 貯蔵器官からの放出が原因であることが示された。我々の研究グループの先行研究において、細胞内の主要な Mg^{2+} 貯蔵器官はミトコンドリアであることや、ミトコンドリア脱共役剤 FCCP 添加はミトコンドリアからの Mg^{2+} の放出を誘導することを明らかにしてきた (Kubota et al., 2003; 2005 ; Shindo et al., 2010; 2011)。そこで一酸化窒素による Mg^{2+} 動員の原因がミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出が原因であるかどうかを明らかにすることを目的として、FCCP (5 μ M) 添加後に SNAP (100 μ M) 刺激を行った時の $[Mg^{2+}]_i$ 動態の計測を行った。FCCP 添加後 $[Mg^{2+}]_i$ 上昇が観察されたが、その後の SNAP 刺激においては $[Mg^{2+}]_i$ 上昇は観察されなかった (図 2-2B, C)。この結果は、FCCP 刺激によってミトコンドリア内 Mg^{2+} が枯渇した状態では $[Mg^{2+}]_i$ 上昇はされないことを示している。つまり、一酸化窒素による $[Mg^{2+}]_i$ 上昇の原因はミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出が原因であることがわかった。

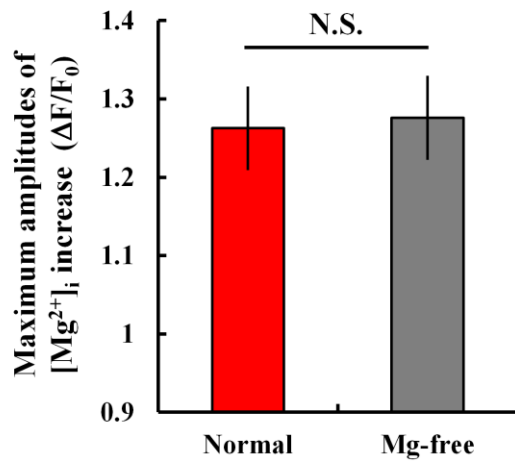
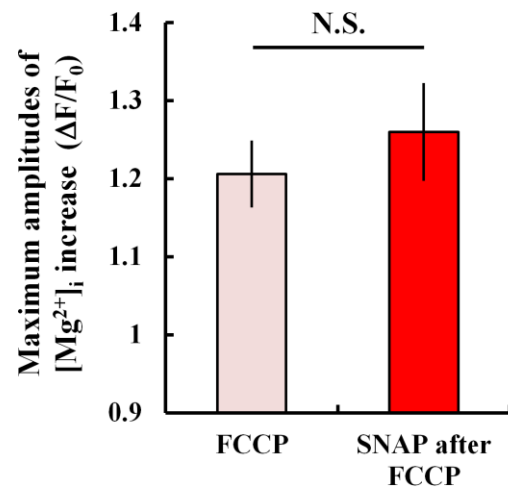
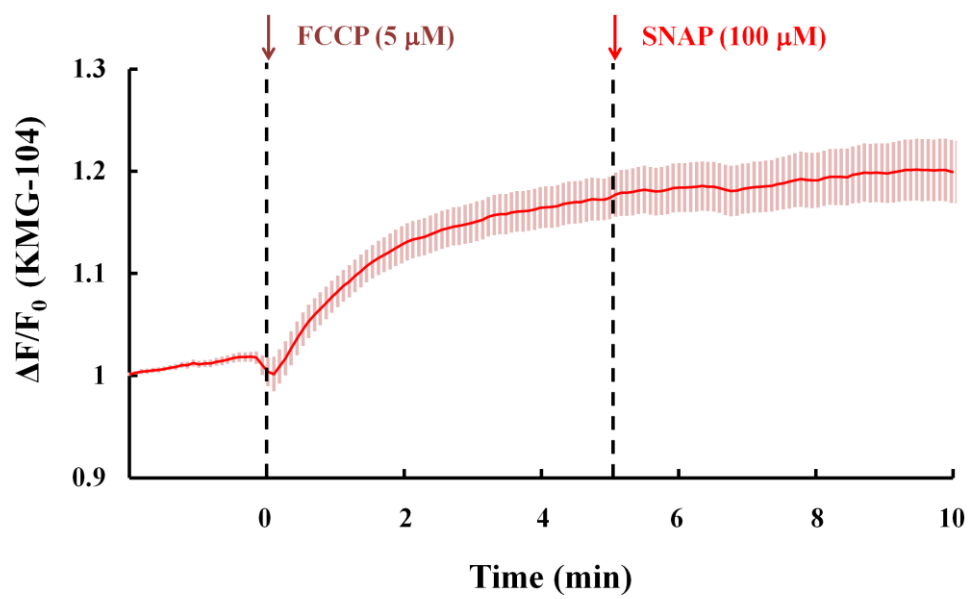
A**C****B**

図2-2 一酸化窒素による Mg^{2+} 動員の Mg^{2+} 供給源はミトコンドリア

(A) 通常の細胞外液 (normal; $n = 116$, $N = 7$) と Mg^{2+} を含まない細胞外液 (Mg^{2+} -free; $n = 103$, $N = 5$) において SNAP (100 μ M) 刺激したときの Mg^{2+} 応答のピーク値を比較したところ Mg^{2+} 応答のピーク値に有意な差はなかった。棒グラフは Mg^{2+} 応答のピーク値の平均値、エラーバーは標準誤差 (SEM) を表す。

(B) ミトコンドリア脱共役剤 FCCP (5 μ M) を添加しミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出を誘導した後、SNAP (100 μ M) 刺激を行なったときの KMG-104 蛍光強度変化率の経時変化を示した。グラフの実線は平均値、エラーバーは標準誤差 (SEM) を表す。

(C) FCCP 添加によるミトコンドリアの Mg^{2+} 放出を誘導した細胞において、SNAP (100 μ M) 刺激を行なったときの刺激前後の KMG-104 蛍光強度変化率を比較した ($n = 78$, $N = 5$)。その結果、SNAP 刺激の前後では KMG-104 の蛍光強度変化率には差はなかった。このことは一酸化窒素による細胞内 [Mg^{2+}] 上昇の Mg^{2+} 供給源はミトコンドリアであることを示している。棒グラフは蛍光強度変化率のピーク値の平均値、エラーバーは平均誤差 (SEM) を表す。

2.3.3 ミトコンドリア膜電位の関与

FCCP による $[Mg^{2+}]_i$ 増加にはミトコンドリア内膜の膜電位の脱分極が関わっていることが知られている (Kubota et al., 2003 ; Shindo et al., 2010)。そこで、NO/cGMP/PKG 経路に活性化による $[Mg^{2+}]_i$ 上昇に伴ってミトコンドリア膜電位の脱分極が起こるかどうかを明らかにすることを目的として、細胞内 Mg^{2+} 蛍光指示薬 KMG-104 と膜電位感受性色素 TMRE を用いて SNAP、8-Br-cGMP 刺激時の $[Mg^{2+}]_i$ とミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) の同時イメージングを行った。その結果、SNAP (5 μ M) 及び 8-Br-cGMP (100 μ M) 刺激はそれぞれ、ミトコンドリア脱分極を誘導することがわかった (図 2-3)。この結果は、NO/cGMP/PKG 経路の活性化による $[Mg^{2+}]_i$ 放出にはミトコンドリアの脱分極を伴っていることがわかった。

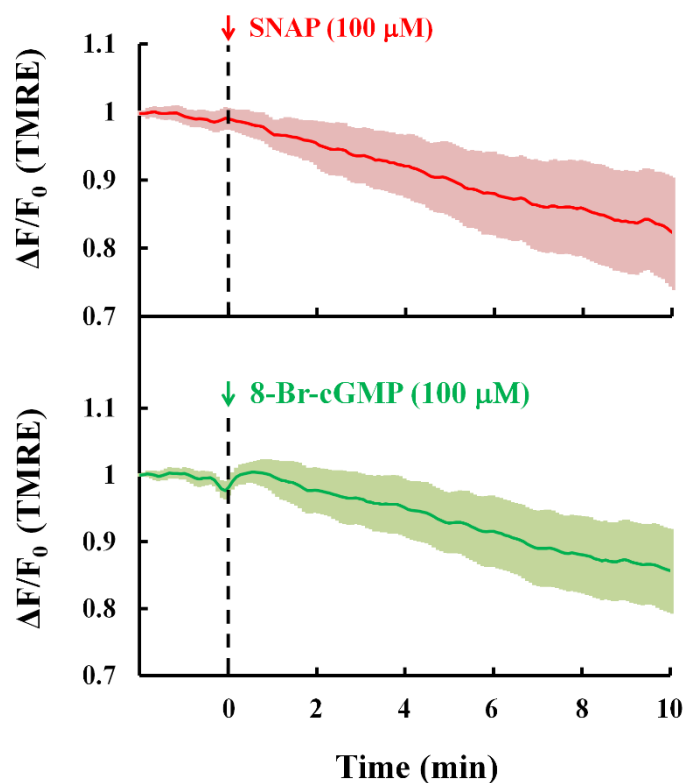


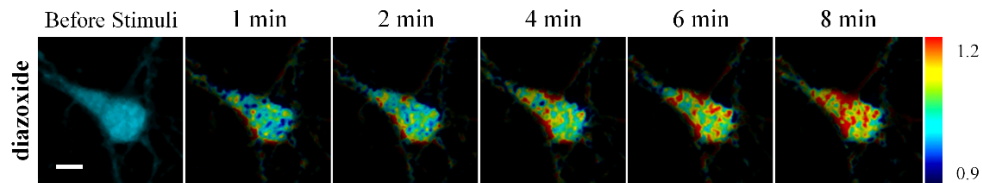
図 2-3 NO/cGMP/PKG 経路の活性化によるミトコンドリアの脱分極

ミトコンドリア膜電位感受性色素 TMRE を負荷した細胞に対して、SNAP 刺激、8-Br-cGMP 刺激を行なったときのミトコンドリア膜電位の経時変化を示した。SNAP 刺激 (n = 13, N = 4)、8-Br-cGMP 刺激 (n = 27, N = 4) はそれぞれミトコンドリア膜電位の脱分極を引き起こした。

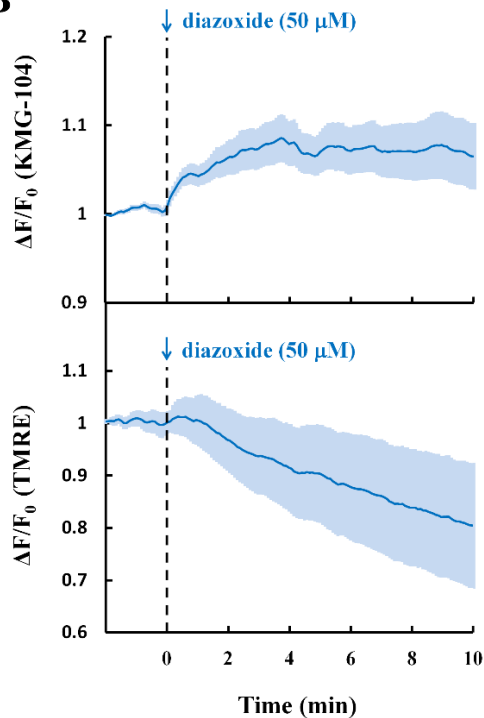
2.3.4 ミトコンドリアの Mg^{2+} 放出への $mitoK_{ATP}$ チャンネルの関与

PKG 活性化の下流で活性化され、ミトコンドリア脱分極を誘導するものとしてミトコンドリアの ATP 作動性カリウムチャンネル ($mitoK_{ATP}$ チャンネル) の活性化が知られている (Chai and Lin ; 2010)。 $mitoK_{ATP}$ チャンネル活性化が NO/cGMP/PKG 経路活性化による $[Mg^{2+}]_i$ 上昇に関与しているかどうかを明らかにすることを目的として、まず $mitoK_{ATP}$ チャンネルの開口剤 diazoxide 刺激の $[Mg^{2+}]_i$ 動態とミトコンドリアの膜電位 ($\Delta\Psi_m$) を計測した。その結果、diazoxide 添加によって $[Mg^{2+}]_i$ 上昇とミトコンドリアの脱分極が観察された (図 2-4 ; A, B)。また、 $mitoK_{ATP}$ チャンネルの阻害剤 5-HD (500 μM) の前処理によって、SNAP (100 μM)、8-Br-cGMP (100 μM)、diazoxide (50 μM) 刺激による $[Mg^{2+}]_i$ 増加はそれぞれ抑制された (図 2-4 ; C)。さらに、PKG 阻害剤 KT5820 (5 μM) 前処理では diazoxide による $[Mg^{2+}]_i$ 上昇は抑制されなかった (図 2-4 ; D)。これらの結果より、NO/cGMP/PKG 経路の下流で $mitoK_{ATP}$ チャンネル活性化が起こり、ミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出が誘導されることがわかった。

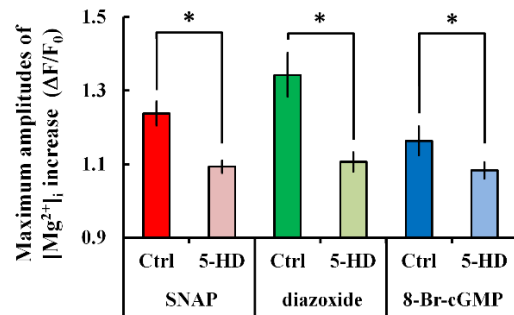
A



B



C



D

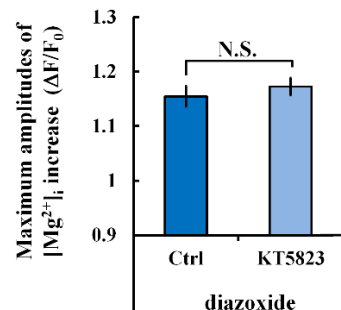


図2-4 NO/cGMP/PKG シグナルを介したミトコンドリア ATP 作動性 K⁺チャンネル活性化による細胞内[Mg²⁺]上昇

(A) ミトコンドリアの ATP 作動性 K⁺チャンネル (mitoK_{ATP} チャンネル) 開口剤 diazoxide (50 μM) 刺激に対する海馬神経細胞の KMG-104 蛍光強度変化率の様子の一例を示した。画像上に示した時間における蛍光強度変化率を擬似カラーで示した。スケールバーは 50 μm で示す。

(B) 海馬神経細胞に対して diazoxide (50 μM) 刺激を行なったときの KMG-104 の蛍光輝度変化率の経時変化を示した。diazoxide 刺激は細胞内[Mg²⁺]上昇を引き起こした。グラフの実線は平均値、エラーバーは標準誤差 (SEM) を表す。

(C) mitoK_{ATP} チャンネル阻害剤 5-HD (500 μM) を前処理した海馬神経細胞において SNAP (100 μM) 刺激 (n = 83, N = 4)、8-Br-cGMP (100 μM) 刺激 (n = 72, N = 4)、diazoxide (50 μM) 刺激 (n = 62, N = 4) による細胞内[Mg²⁺]上昇は通常条件下における SNAP 刺激 (n = 116, N = 7)、8-Br-cGMP 刺激 (n = 132, N = 8)、diazoxide 刺激 (n = 125, N = 8) と比較して抑制された。この結果は NO/cGMP/PKG 経路活性化による[Mg²⁺]上昇は mitoK_{ATP} チャンネルの活性化を介していることを示している。棒グラフは蛍光輝度変化率のピーク値の平均値、エラーバーは標準誤差 (SEM) を表す。

(D) PKG 阻害剤 KT5823 (5 μM) を前処理した海馬神経細胞において diazoxide (50 μM) 刺激による細胞内[Mg²⁺]上昇は通常条件下における diazoxide 刺激に対する[Mg²⁺]上昇と同様に起こった。この結果は、mitoK_{ATP} チャンネル活性化による[Mg²⁺]上昇はシグナル伝達経路において PKG 活性化の下流で起こっていることを示している。棒グラフは蛍光輝度変化率のピーク値の平均値、エラーバーは標準誤差 (SEM) を表す。

2.3.5 PKC 活性化を介したポジティブフィードバック経路の関与

mitoK_{ATP} チャンネル活性化は活性酸素種 (Reactive Oxygen Species ; ROS) 産生を誘導し、生成された ROS は PKC を活性化し (Costa and Garlid, 2008)、活性化された PKC は mitoK_{ATP} チャンネルのさらなる活性化を誘導する (Grover, 2006; O'Rourke, 2000 ; Hassouna et al., 2004)。このシグナル経路はポジティブフィードバック経路として機能し、mitoK_{ATP} チャンネルの強力で持続的な活性化をもたらすことが知られている (Costa and Garlid, 2008 ; O'Rourke, 2000 ; Costa et al., 2006)。そこで、このポジティブフィードバック経路が NO/cGMP/PKG 経路を介したミトコンドリアからの Mg²⁺放出の増強に関与しているかどうかを明らかにすることを目的として、PKC 阻害剤 Go6987 (10 μM) 前処理した神経細胞において SNAP 及び diazoxide 刺激時の [Mg²⁺]_i 応答を計測した。その結果 PKC 阻害剤条件において、SNAP (100 μM)、diazoxide (50 μM) 刺激による [Mg²⁺]_i 増加は抑制された (図 2-5)。その結果、PKC 活性化からなるポジティブフィードバック経路は NO/cGMP/PKG 経路活性化を介した mitoK_{ATP} チャンネル活性化によるミトコンドリアからの Mg²⁺放出増強に寄与していることがわかった。

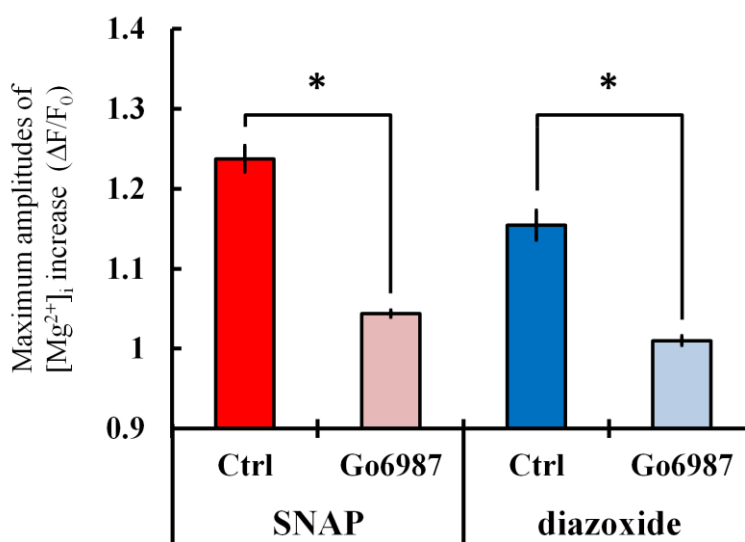


図 2-5 PKC 活性化を介したポジティブフィードバック経路の関与

PKC 阻害剤 Go6987 (10 μM) を前処理した海馬神経細胞において SNAP (100 μM) 刺激 (n = 87, N = 6)、diazoxide (50 μM) 刺激 (n = 86, N = 7) による細胞内 [Mg²⁺]_i 上昇は通常条件下における SNAP 刺激 (n = 116, N = 7)、diazoxide 刺激 (n = 125, N = 8) と比較して抑制された。この結果は NO/cGMP/PKG 経路活性化による [Mg²⁺]_i 上昇は PKC を介したポジティブフィードバック経路の影響を受けていることを示している。棒グラフは蛍光輝度変化率のピーク値の平均値、エラーバーは標準誤差 (SEM) を表す。

2.4 考察

本研究において、NO/cGMP/PKG 経路を介した mitoK_{ATP} チャンネルの活性化を介した[Mg²⁺]_i 上昇を示した。mitoK_{ATP} チャンネルの活性化は PKC 活性化を介したポジティブフィードバック経路によって増幅されていることを示した。cGMP/PKG シグナル経路によって mitoK_{ATP} チャンネルが制御されていることは以前から知られている (Chai and Lin, 2010; Costa and Garlid, 2005)。さらに mitoK_{ATP} チャンネルの活性化が ROS 産生を誘導し (Oldenburg et al., 2004)、ミトコンドリアの脱分極を誘導する (Park et al., 2011) ことも先行研究と一致している。今回、一酸化窒素、cGMP 経路がミトコンドリアから Mg²⁺ 放出とミトコンドリア脱分極を誘導することを示した。一酸化窒素はチトクロム c オキシダーゼに結合することによってミトコンドリアの呼吸鎖を阻害する一方で、mitoK_{ATP} チャンネルを阻害した状態で一酸化窒素刺激をおこなってもミトコンドリアから Mg²⁺ 放出は起こらなかったことより、一酸化窒素によるミトコンドリアの呼吸鎖の阻害がミトコンドリアからの Mg²⁺ 放出の原因ではないことがわかる。FCCP によってミトコンドリアの Mg²⁺ を枯渇させた状態で一酸化窒素刺激をおこなっても、さらなる Mg²⁺ 放出は起こらなかった。ミトコンドリアの脱分極がミトコンドリアからの Mg²⁺ 放出の原因になっているかどうかは不明であるが、これらの結果はミトコンドリアの膜電位がミトコンドリアの Mg²⁺ 制御機構と関連があることを示唆している。同様の現象はグルタミン酸によるミトコンドリア放出においても確認されている (Shindo et al., 2010)。

mitoK_{ATP} チャンネルの活性化はパーキンソン病 (Tai et al., 2003; Hu et al., 2005)、外傷性脳損傷 (Jiang et al., 2013)、虚血性障害 (Ardehali and O'Rourke, 2005) の疾患モデルにおいて細胞の保護効果があることが知られている。最近の研究において mitoK_{ATP} チャンネルの活性化は神経細胞を細胞ストレスから保護する効果が報告されている (Busija et al., 2004; 2008; Xie et al., 2010)。しかし、mitoK_{ATP} チャンネルの神経保護効果のメカニズムに関しては、ミトコンドリア脱分極がミトコンドリアへの Ca²⁺ 流入を抑えることによって細胞死を防いでいることが示唆されている (Ardehali and O'Rourke, 2005) が、その詳細はいまだ明らかになっていない。細胞内 Mg²⁺ は ROS を減少させ、細胞死を誘導するシグナルである p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)、c-Jun- N-terminal kinase (JNK) の活性を緩和することによって細胞の生存に関わっていることが知られている (Hsiang-Chin et al., 2012)。mitoK_{ATP} チャンネルの活性化、ROS 産生、PKC 活性化によるポジティブフィードバック経路はミトコンドリアの Mg²⁺ 放出に関わっているが、ミトコンドリアのマトリックスにおける Mg²⁺ は mitoK_{ATP} チャンネルの活性化を阻害していることが知られている (Bednarczyk et al., 2005)。そのため、ミトコンドリアから Mg²⁺ が放出されることは mitoK_{ATP} チャンネルの活性化を誘導するポジティブフィードバック経路を形成していることも考えられる。このようにミトコンドリアからの Mg²⁺ 放出は 2 つのポジティブフィードバック経路によって活性化して持続的な[Mg²⁺]_i 上昇を維持していると考えられる。[Mg²⁺]_i 上昇が ROS を減少させるのに十分なレベルまで上昇すると、ROS によるポジティブフィードバック経路が機能しなくなるため、ミトコンドリアからの Mg²⁺ 放出は収まると考えられる。実際、diazoxide による mitoK_{ATP} チャンネルの活性化は紫外線による MAPK 活性化を抑制すること (Cao et al., 2007) や、ロテノンによる細胞ストレス時のミトコンドリアにおける p38/JNK シグナルの活性化を抑制する (Cao et al., 2007) ことが知られている。こ

これらの事実より NO/cGMP/PKG シグナルによる Mg^{2+} 動員は神経細胞の生存を制御していると考えられる。

2.5 第2章のまとめ

第2章においては、神経伝達物質である一酸化窒素は cGMP、PKG 経路を介してミトコンドリアの ATP 作動性 K^+ チャンネルを活性化することによってミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出を誘導することを示した。このミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出にはミトコンドリアの脱分極が伴っていることを示した。また、ミトコンドリアの ATP 作動性 K^+ チャンネルの活性化はミトコンドリア脱分極の誘導、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species ; ROS) の産生、PKC の活性化を介した制御機構の影響を受けて、ミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出を調節していることも明らかにした。ミトコンドリアから Mg^{2+} が放出されることを明らかにしたが、ミトコンドリアの Mg^{2+} 制御に関しては未だ不明な点が多く今後の研究が期待されている。

2.6 第2章の参考文献

Andrási E, Páli N, Molnár Z, Kösel S. Brain aluminum, magnesium and phosphorus contents of control and Alzheimer-diseased patients. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2005;7(4):273-84.

Ardehali H, O'Rourke B. Mitochondrial K_{ATP} channels in cell survival and death. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2005;39(1):7-16.

Bednarczyk P, Dołowy K, Szewczyk A. Matrix Mg^{2+} regulates mitochondrial ATP-dependent potassium channel from heart. *FEBS letters*. 2005;579(7):1625-32.

Boska MD, Welch KM, Barker PB, Nelson JA, Schultz L. Contrasts in cortical magnesium, phospholipid and energy metabolism between migraine syndromes. *Neurology*. 2002;58(8):1227-33.

Busija DW, Gaspar T, Domoki F, Katakam PV, Bari F. Mitochondrial-mediated suppression of ROS production upon exposure of neurons to lethal stress: mitochondrial targeted preconditioning. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(13):1471-7.

Busija DW, Lacza Z, Rajapakse N, Shimizu K, Kis B, Bari F, Domoki F, Horiguchi T. Targeting mitochondrial ATP-sensitive potassium channels—a novel approach to neuroprotection. *Brain research reviews*. 2004;46(3):282-94.

Cao C, Healey S, Amaral A, Lee - Couture A, Wan S, Kouttab N, Chu W, Wan Y. ATP - sensitive potassium channel: A novel target for protection against UV - induced human skin cell damage. *Journal of cellular physiology*. 2007;212(1):252-63.

Chai Y, Lin YF. Stimulation of neuronal K_{ATP} channels by cGMP-dependent protein kinase: involvement of ROS and 5-hydroxydecanoate-sensitive factors in signal transduction. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2010;298(4):C875-92.

Costa AD, Garlid KD. Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKC ϵ , ROS, and MPT. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2008;295(2):H874-82.

Costa AD, Garlid KD, West IC, Lincoln TM, Downey JM, Cohen MV, Critz SD. Protein kinase G

transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circulation research*. 2005;97(4):329-36.

Costa AD, Jakob R, Costa CL, Andrukhiv K, West IC, Garlid KD. The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(30):20801-8.

Eve DJ, Nisbet AP, Kingsbury AE, Hewson EL, Daniel SE, Lees AJ, Marsden CD, Foster OJ. Basal ganglia neuronal nitric oxide synthase mRNA expression in Parkinson's disease. *Molecular brain research*. 1998;63(1):62-71.

Fath T, Ke YD, Gunning P, Götz J, Ittner LM. Primary support cultures of hippocampal and substantia nigra neurons. *Nature protocols*. 2008;4(1):78-85.

Grover GJ. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels and mitochondrial protein kinase C: sometimes it's good to have a close neighbor. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2006;290(5):H1752-3.

Hashimoto T, Nishi K, Nagasao J, Tsuji S, Oyanagi K. Magnesium exerts both preventive and ameliorating effects in an in vitro rat Parkinson disease model involving 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) toxicity in dopaminergic neurons. *Brain research*. 2008;1197:143-51.

Hassouna A, Matata BM, Galinanes M. PKC-ε is upstream and PKC-α is downstream of mitoKATP channels in the signal transduction pathway of ischemic preconditioning of human myocardium. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2004;287(5):C1418-25.

Hsiang-Chin C, Li-Ting S, Omayra GP, Jeffrey DO, Loren WR. A key role for Mg²⁺ in TRPM7's control of ROS levels during cell stress. *Biochemical Journal*. 2012;445(3):441-8.

Hu LF, Wang S, Shi XR, Yao HH, Sun YH, Ding JH, Liu SY, Hu G. ATP - sensitive potassium channel opener iptakalim protected against the cytotoxicity of MPP⁺ on SH - SY5Y cells by decreasing extracellular glutamate level. *Journal of neurochemistry*. 2005;94(6):1570-9.

Jiang X, Huang Y, Lin W, Gao D, Fei Z. Protective effects of hydrogen sulfide in a rat model of traumatic brain injury via activation of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and reduction of oxidative stress. *Journal of surgical research*. 2013;184(2):e27-35.

Kubota T, Shindo Y, Tokuno K, Komatsu H, Ogawa H, Kudo S, Kitamura Y, Suzuki K, Oka K. Mitochondria are intracellular magnesium stores: investigation by simultaneous fluorescent imagings in PC12 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2005;1744(1):19-28.

Kubota T, Tokuno K, Nakagawa J, Kitamura Y, Ogawa H, Suzuki Y, Suzuki K, Oka K. Na⁺/Mg²⁺ transporter acts as a Mg²⁺ buffering mechanism in PC12 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;303(1):332-6.

Miyake Y, Tanaka K, Fukushima W, Sasaki S, Kiyohara C, Tsuboi Y, Yamada T, Oeda T, Miki T, Kawamura N, Sakae N. Dietary intake of metals and risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan. *Journal of the neurological sciences*. 2011;306(1):98-102.

Oldenburg O, Qin Q, Krieg T, Yang XM, Philipp S, Critz SD, Cohen MV, Downey JM. Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoK_{ATP} channel opening and leads to cardioprotection. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2004;286(1):H468-76.

O'Rourke B. Myocardial K_{ATP} channels in preconditioning. *Circulation research*. 2000;87(10):845-55.

Oyanagi K, Kawakami E, Kikuchi - Horie K, Ohara K, Ogata K, Takahama S, Wada M, Kihira T, Yasui M. Magnesium deficiency over generations in rats with special references to the pathogenesis of the parkinsonism-dementia complex and amyotrophic lateral sclerosis of Guam. *Neuropathology*. 2006;26(2):115-28.

Park J, Lee J, Choi C. Mitochondrial network determines intracellular ROS dynamics and sensitivity to oxidative stress through switching inter-mitochondrial messengers. *PloS one*. 2011;6(8):e23211.

Pradhan RK, Qi F, Beard DA, Dash RK. Characterization of Mg²⁺ inhibition of mitochondrial Ca²⁺ uptake by a mechanistic model of mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Biophysical journal*. 2011;101(9):2071-81.

Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokoyama R, Shibata T, Dawson VL, Dawson TM. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(10):4565-71.

Racay P. Effect of magnesium on calcium-induced depolarisation of mitochondrial transmembrane potential. *Cell biology international*. 2008;32(1):136-45.

Shah NC, Liu JP, Iqbal J, Hussain M, Jiang XC, Li Z, Li Y, Zheng T, Li W, Sica AC, Perez-Albela JL. Mg deficiency results in modulation of serum lipids, glutathione, and NO synthase isozyme activation in cardiovascular tissues: relevance to de novo synthesis of ceramide, serum Mg and atherogenesis. *Int J Clin Exp Med*. 2011;4(2):103-18.

Shindo Y, Fujii T, Komatsu H, Citterio D, Hotta K, Suzuki K, Oka K. Newly developed Mg^{2+} -selective fluorescent probe enables visualization of Mg^{2+} dynamics in mitochondria. *PloS one*. 2011;6(8):e23684.

Shindo Y, Fujimoto A, Hotta K, Suzuki K, Oka K. Glutamate - induced calcium increase mediates magnesium release from mitochondria in rat hippocampal neurons. *Journal of neuroscience research*. 2010;88(14):3125-32.

Szanda G, Rajki A, Gallego-Sandín S, Garcia-Sancho J, Spät A. Effect of cytosolic Mg^{2+} on mitochondrial Ca^{2+} signaling. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 2009;457(4):941-54.

Tai KK, McCrossan ZA, Abbott GW. Activation of mitochondrial ATP - sensitive potassium channels increases cell viability against rotenone - induced cell death. *Journal of neurochemistry*. 2003;84(5):1193-200.

Trapani V, Farruggia G, Marraccini C, Iotti S, Cittadini A, Wolf FI. Intracellular magnesium detection: imaging a brighter future. *Analyst*. 2010;135(8):1855-66.

Tsien RY. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*. 1980;19(11):2396-404.

Wolf FE, Trapani V. Cell (patho) physiology of magnesium. *Clinical science*. 2008;114:27-35.

Xie J, Duan L, Qian X, Huang X, Ding J, Hu G. KATP channel openers protect mesencephalic neurons against MPP⁺ - induced cytotoxicity *via* inhibition of ROS production. *Journal of neuroscience research*. 2010;88(2):428-37.

Yang Y, Liu X, Long Y, Wang F, Ding JH, Liu SY, Sun YH, Yao HH, Wang H, Wu J, Hu G. Activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels improves rotenone-related motor and neurochemical alterations in rats. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2006;9(01):51-61.

Yasui M, Yase Y, Kihira T, Adachi K, Suzuki Y. Magnesium and calcium contents in CNS tissues of amyotrophic lateral sclerosis patients from the Kii peninsula, Japan. *European neurology*. 1992;32(2):95-8.

Zhou F, Yao HH, Wu JY, Ding JH, Sun T, Hu G. Opening of microglial K_{ATP} channels inhibits rotenone - induced neuroinflammation. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008;12(5a):1559-70.

第3章 神経脱分極による Mg^{2+} 動員

概要

先行研究において、いくつかのストレス条件において細胞内 $[Mg^{2+}]$ が変化することが明らかになってきた。そこで本研究では通常の神経活動において細胞内 $[Mg^{2+}]$ が変化するかを明らかにすることを目的として、マグネシウムイオン選択的蛍光指示薬 KMG-104 を用いた蛍光イメージング法によってラット海馬神経細胞内の Mg^{2+} 濃度変化の解析を行った。その結果、電流刺激・薬剤刺激による脱分極誘導時、自発活動時において細胞外から Mg^{2+} の流入が起こることによって細胞内 $[Mg^{2+}]$ が上昇することが明らかになった。この結果は通常の神経活動時に起こる $[Mg^{2+}]$ 変化が神経機能を調節していることを示唆した。

3.1 はじめに

中枢神経系において、脳内の Mg^{2+} 量を上昇させると記憶と学習の能力が向上することが知られている (Slutsky et al., 2010)。単一神経細胞レベルにおいても、 $[Mg^{2+}]_i$ 変化は電気シナプスの可塑性を制御することがわかっている (Palacios-Prado et al., 2013; 2014)。これらの事実は細胞内 Mg^{2+} は神経活動の重要な調節因子であることを示している。しかし神経活動における細胞内 $[Mg^{2+}]$ ($[Mg^{2+}]_i$) 変化に関してはほとんど調べられてこなかった。

先行研究によってラット海馬神経細胞において神経興奮毒性の原因となる高濃度のグルタミン酸刺激によるミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入は、ミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出を引き起こすこと (Shindo et al., 2010)、低酸素刺激は transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) を介して Mg^{2+} 流入を引き起こすこと (Zhang et al., 2011) が知られている。これらストレス条件において Mg^{2+} 動員であるが、生理条件下の通常の神経細胞において細胞内 $[Mg^{2+}]$ 変化が起こるかどうかに関してはわかっていない。 Mg^{2+} 蛍光指示薬 mag-Fura-2 を用いた実験によって、興奮性神経伝達物質グルタミン酸や、神経細胞脱分極剤 veratridine (Brocard et al., 1993)、高濃度 KCl 刺激 (Kato et al., 1998; Gotoh et al., 1999) によって神経細胞内で Mg^{2+} 動員が誘導されることは報告されていた。しかしながら、従来の Mg^{2+} プローブは Mg^{2+} 選択性が低く、 $[Ca^{2+}]_i$ 変化に関しても応答してしまうため、神経興奮などの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を伴う現象においては、正確な $[Mg^{2+}]_i$ 変化を計測するときには注意が必要である (Stout and Reynolds, 1999)。そこで、我々の研究グループは生きている細胞内において $[Ca^{2+}]_i$ 変化の影響を受けずに $[Mg^{2+}]_i$ 動態を計測するための蛍光イメージング法の開発をおこなってきた (Suzuki et al., 2002; Komatsu et al., 2005; Shindo et al., 2011; Fujii et al., 2014)。我々のグループが開発した KMG-104 は $[Ca^{2+}]_i$ 動態の影響を受けずに $[Mg^{2+}]_i$ 動態を測定することが可能である (Komatsu et al., 2005; Trapani et al., 2010)。そこで、本研究では神経活動内において $[Mg^{2+}]$ が変化するかどうかを解明することを目的として研究を行った。

3.2 実験手法

3.2.1 ラット海馬神経細胞の分散培養

本章の実験で用いたラット海馬神経細胞は本論文、第2章に記載する方法で用意した。

3.2.2 蛍光指示薬の負荷

5–7日間培養したラット海馬神経細胞に KMG-104-AM (5 μ M)、FuraRed-AM (5 μ M) を培養液に添加し、37°CのCO₂インキュベータ内で30分間静置した。そして、NaOHとHEPES (5 mM) を用いてpH7.4に調整したHank's balanced salt solution (HBSS) を用いて2回洗浄し、KMG-104-AMのacetoxymethyl esterを加水分解するために37°CのCO₂インキュベータ内で15分間静置した。阻害剤前処理条件やMg²⁺-free、Ca²⁺-free条件下における実験においては、それぞれの条件の細胞外液で加水分解処理をおこなった。

3.2.3 共焦点顕微鏡による蛍光イメージング

蛍光イメージング法は共焦点レーザー顕微鏡 (FluoViewFV1000 ; オリンパス社、東京、日本) を用いておこなった。KMG-104とFuraRedの同時イメージングはアルゴンレーザーによる488 nmの波長で励起し、560 nmのダイクロイックミラーで分離した。そして、500–560 nmの蛍光をKMG-104シグナル、630–730 nmの蛍光をFuraRedシグナルとして取得した。それぞれの蛍光画像はFluoView software package を用いて取得・解析を行った。データの定量化に関して、手動で決定した関心領域 (Region of Interest ; ROI) 内の平均蛍光輝度を蛍光強度として算出した。

3.3 実験結果

3.3.1 電流刺激による神経活動と同時に起こる細胞内 Mg^{2+} 濃度の上昇

神経活動時の $[Mg^{2+}]_i$ 動態を計測することを目的として、リアルタイム Mg^{2+} イメージングを行っている神経細胞に対して直接電流刺激を可能にする実験系を作製した (Tanamoto et al., 2015)。まず、神経細胞の蛍光イメージングと電気刺激を同時に行うために、導電性かつ透過性の ITO フィルムを形成したガラス電極を作製した。作製した ITO ガラス電極上で初代培養したラット海馬神経細胞に KMG-104-AM と FuraRed-AM を負荷し、細胞内 $[Mg^{2+}]$ と細胞内 $[Ca^{2+}]$ 動態を可視化した (図 3-1A)。先行研究において、 Mg^{2+} 感受性色素 mag-fura-2 を負荷した神経細胞において、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸、 Na^+ チャンネル開口剤 veratridine による Mg^{2+} 動員 (Brocard et al., 1993) や、神経脱分極刺激である高濃度 KCl 刺激による Mg^{2+} 動員 (Kato et al., 1997 ; Gotoh et al., 1999) が報告されている。しかし、従来の Mg^{2+} 指示薬は Mg^{2+} 選択性が低く Ca^{2+} 濃度変化も検出することが知られているため、 $[Ca^{2+}]_i$ 変化が大きい細胞における使用は注意を要する。実際、神経細胞において、グルタミン酸、veratridine、高濃度 KCl といった刺激細胞外からの Ca^{2+} 流入を引き起こすことが知られており、 Mg^{2+} 測定における Ca^{2+} による干渉は無視できない。しかし本研究で使用した KMG-104 は Ca^{2+} の影響を受けずに細胞内 $[Mg^{2+}]$ 動態の測定が可能である。電流刺激に応じた Ca^{2+} 応答が観察されたことより、ITO 電極による電流刺激は神経活動の誘発に成功した。そして Ca^{2+} 応答を示したタイミングで Mg^{2+} 応答も観察された (図 3-1B)。また、この時の Ca^{2+} 応答と Mg^{2+} 応答に相関はなかった (図 3-1C)。また、統計的にも Mg^{2+} は応答していることが確認できた (図 3-1D)。

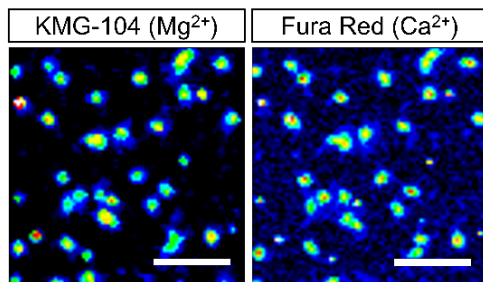
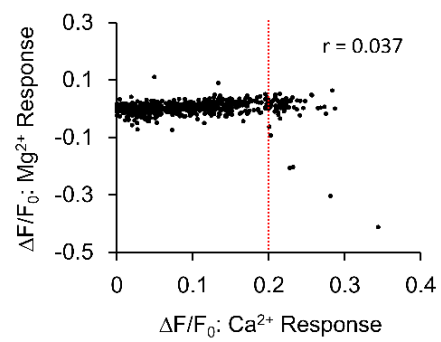
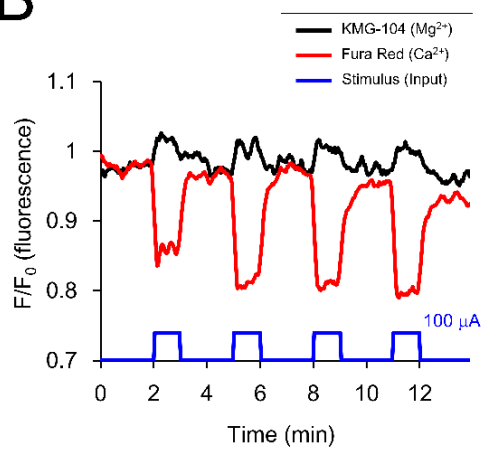
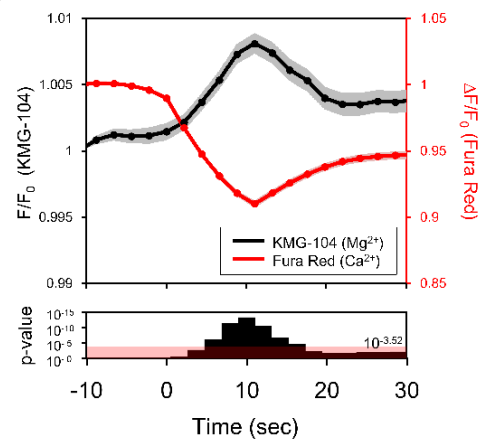
A**C****B****D**

図3-1 電流刺激による神経活動時の細胞内 Mg^{2+} 動員

(A) ITO ガラス電極上に播種したラット海馬神経細胞の染色画像（左：KMG-104；右：Fura Red）を示した。KMG-104 と Fura Red の蛍光強度を擬似カラーで示した。スケールバーは 50 μm を示す。

(B) 分散培養したラット海馬神経細胞に対して、ITO ガラス電極を介した電流刺激を行なったときの刺激電流強度（青色）、KMG-104（黒色）及び Fura Red（赤色）蛍光強度変化率の経時変化の一例を示した。電流刺激のタイミングで細胞内 $[Ca^{2+}]$ 上昇（Fura Red 蛍光強度の減少）が引き起こされていることは電流刺激が神経活動を誘発していることを示している。また、ほぼ同じタイミングで細胞内 $[Mg^{2+}]$ 上昇（KMG-104 蛍光強度の増加）が引き起こされることがわかった。

(C) 電流刺激による Mg^{2+} の応答強度（ Ca^{2+} 応答開始後 8.8–13.2 秒における蛍光強度変化率の平均）と Ca^{2+} の応答強度（Fura Red 蛍光強度減少のピーク値）の関係を示した。また Mg^{2+} の応答強度と Ca^{2+} の応答強度に相関はなかった（ $r = 0.037, p > 0.1$ ）。

(D) Ca^{2+} 応答の開始タイミング前後（-10–30 秒）の $[Ca^{2+}]$ および $[Mg^{2+}]$ 動態を示した（上）。グラフの実線は平均値、エラーバーは標準誤差（SEM）を表す。-7.5 秒における KMG-104 の蛍光強度変化率と任意のタイミングの蛍光強度変化率の t-検定による p 値を示した。また、Benferroni 補正を行なったときの有意水準を赤い帯で示した。

3.3.2 電流刺激の強度と Mg^{2+} 応答の関係

電氣的刺激に対する $[Mg^{2+}]_i$ 増加と $[Ca^{2+}]_i$ 増加の強度には相関がなかった (図 3-1C)。ITO 電極で加える電流刺激の強度と Mg^{2+} 応答と Ca^{2+} 応答の大きさの関係を調べることを目的として、様々な強度の電流刺激を加えた時の Mg^{2+} 応答と Ca^{2+} 応答を同時計測した (図 3-2A)。その結果、刺激強度と Ca^{2+} 応答の大きさに強い相関が見える細胞 (図 3-2B、 $r > 0.5$) の Mg^{2+} 応答でさえ、刺激強度と相関は見られなかった (図 3-2C)。

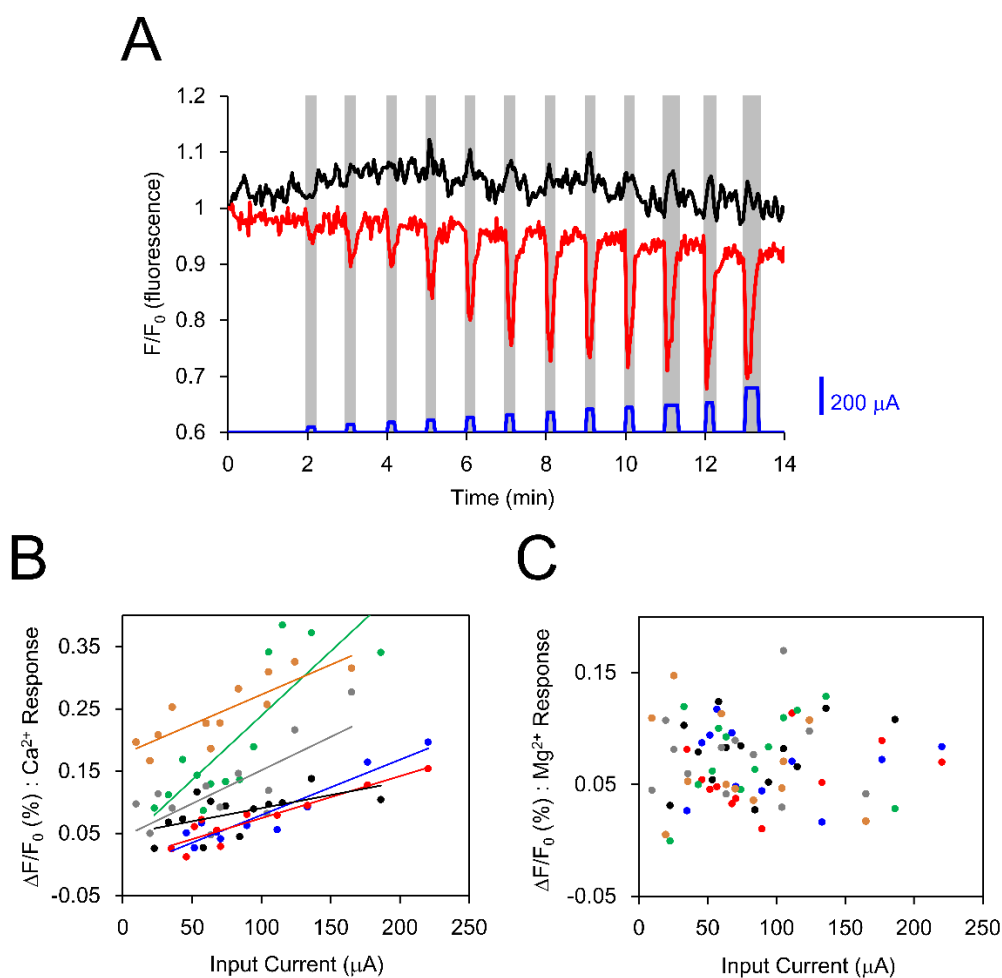


図3-2 刺激強度と Mg^{2+} 応答の強度、 Ca^{2+} 応答の強度の相関

(A) 分散培養したラット海馬神経細胞に対して、ITO ガラス電極を介して徐々に刺激強度を増加させて電流刺激を行なったときの刺激電流強度（青色）、KMG-104（黒色）及び Fura Red（赤色）蛍光強度変化率の経時変化の一例を示した。

(B) ITO 電極による電流刺激の強度と Ca^{2+} 応答の大きさの関係をグラフに示した。刺激強度と Ca^{2+} 応答の大きさに相関が見られる細胞の代表的な応答を示した ($r > 0.5$)。

(C) ITO 電極による電流刺激の強度と Mg^{2+} 応答の大きさの関係をグラフに示した。刺激強度と Ca^{2+} 応答の大きさに相関が見られる細胞においても刺激強度と Mg^{2+} 応答には相関が見られなかった ($R = -0.023$; $p = 0.68$)。

3.3.3 神経細胞の自発活動による Mg^{2+} 流入

神経活動に伴う $[Mg^{2+}]_i$ 上昇に関して、自発的な神経活動においても $[Mg^{2+}]_i$ 上昇が起こるかどうかを調べた。先行研究において電位依存性 K^+ チャンネルの阻害は神経細胞の興奮性を増強することが知られている (Johnston et al., 2010)。電位依存性 K^+ チャンネルの阻害剤である Tetraethylammonium (TEA ; 10 mM) を添加することによって、神経細胞の興奮性を増強し自発発火の頻度を増加させた。TEA 処理によって神経細胞の興奮性が增强しているかどうかを確認するために、蛍光エネルギー転移 (Fluorescence resonance energy transfer ; FRET) 型の膜電位感受性蛍光タンパク質 (Voltage sensitive fluorescent protein ; VSFP2.42 ; Akemann et al., 2012) を用いて、神経細胞の膜電位イメージングをおこなった (図 3-3A 左)。単発のスパイクを検出するために 1 ミリ秒単位の膜電位変化の計測をおこなうことを目的として、線走査 (line-scanning) による計測をおこなった。その結果、TEA 添加によって神経細胞の発火数は増加することがわかった (図 3-3A 右)。次に、TEA 添加条件下で KMG-104 と FuraRed-AM を用いて、海馬神経細胞における $[Mg^{2+}]_i$ と $[Ca^{2+}]_i$ の同時計測をおこなった。その結果、それぞれの細胞において非同期的で散発的な Ca^{2+} 自発活動が観察された (図 3-3B ; 黒線 : Mg^{2+} , 赤線 : Ca^{2+})。 Ca^{2+} 応答を示したタイミング、つまり神経活動時の $[Mg^{2+}]_i$ 動態を解析することを目的として、 Ca^{2+} 応答のタイミングを時刻 0 としてタイミングをそろえた $[Mg^{2+}]_i$ 動態と $[Ca^{2+}]_i$ 動態の平均を算出した (図 3-3D)。 Ca^{2+} 応答のタイミングから徐々に $[Mg^{2+}]_i$ 増加が起こっていることがわかった (図 3-3D)。その結果より、神経細胞の自発的な活動において $[Mg^{2+}]_i$ 上昇が誘導されていることがわかった。 Ca^{2+} 応答の検出に関しては、 Ca^{2+} 応答の時間微分値が全計測時間の標準偏差の 2.58 倍を超えたタイミングのうち、 $[Ca^{2+}]_i$ 増加が 0.7725 を超えたものを Ca^{2+} 応答とした。閾値 0.7725 に関しては Ca^{2+} 応答の大きさのヒストグラムを描き、2 つの峰の間の谷にあたる値を大津の二値化法 (Otsu, 1975) を用いて決定した (図 3-3C)。神経活動における $[Mg^{2+}]_i$ 上昇は数分にわたって持続した。そこで、単発の神経活動が $[Mg^{2+}]_i$ 上昇を引き起こすかどうかを明らかにすることを目的として、単発の Ca^{2+} 応答の前後の $[Mg^{2+}]_i$ 動態、 $[Ca^{2+}]_i$ 動態の平均を算出した (図 3-3E)。

次に、神経活動に伴う $[Mg^{2+}]_i$ 上昇の Mg^{2+} 供給源が細胞内もしくは細胞外かを明らかにすることを目的として、細胞外に Mg^{2+} を含まない Mg^{2+} -free 条件下において、同様の実験をおこなったところ、 Ca^{2+} 応答のタイミングにおいて、通常条件下において観察されたような $[Mg^{2+}]_i$ 上昇は観察されなかった (図 3-3F, G)。この結果より、神経細胞の自発活動による $[Mg^{2+}]_i$ 上昇は神経細胞外からの Mg^{2+} 流入が原因であることがわかった。

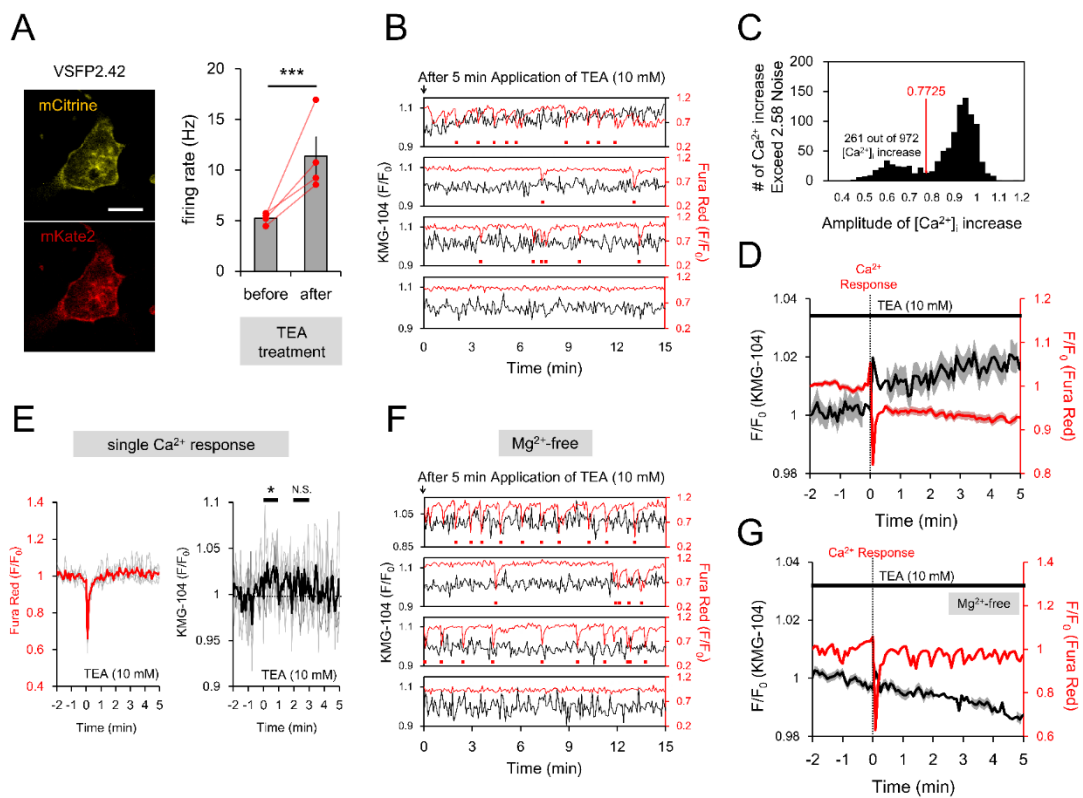


図3-3 自発的な活動による細胞外からの Mg^{2+} 流入

(A) FRET 型の膜電位感受性蛍光タンパク質 VSFP2.42 を発現させた代表的な細胞を示した (左)。FRET ドナー-mCitrine の蛍光画像 (黄色) と FRET アクセプター-mKate2 の蛍光画像 (赤色) を示した。スケールバーは 10 μm を示す。膜電位イメージングより検出した神経細胞の発火回数を TEA 刺激の前後で比較した。TEA 刺激によって神経活動の頻度が上昇することを示した。

(B) TEA 添加によって興奮性を増強した神経細胞において KMG-104 (黒) と Fura Red (赤) の蛍光強度変化率の経時変化を示した。代表的な応答を示した細胞を 4 例示した。

(C) Ca^{2+} シグナルの微分値が標準偏差の 2.58 倍を超えた応答の応答強度のヒストグラムを示した

(黒)。大津の二値化法によって二峰性を示すヒストグラムの谷の部分を検出した (赤)。

(D) (C) で求めた閾値 (0.773) よりも応答が大きい $[Ca^{2+}]$ 増加のタイミングを Ca^{2+} 応答の開始タイミングと定義し、その前後の Mg^{2+} および Ca^{2+} 動態を集め平均化処理し示した。実線は平均値、エラーバーは標準誤差 (SEM) を示した (922 イベント, 5 回実験)。

(E) 単発の Ca^{2+} 応答を示したタイミングの前後の Mg^{2+} 動態、 Ca^{2+} 動態を集め平均化処理し示した。実線は平均値、エラーバーは標準誤差 (SEM) を示した (4 イベント, 5 回実験)。

(F) 細胞外に Mg^{2+} を含まない条件において、TEA 添加によって興奮性を増強した神経細胞において KMG-104 (黒) と Fura Red (赤) の蛍光強度変化率の経時変化を示した。代表的な応答を示した細胞を 4 例示した。

(G) 細胞外に Mg^{2+} を含まない条件において、(C) で求めた閾値 (0.773) よりも応答が大きい $[Ca^{2+}]$ 増加のタイミングを Ca^{2+} 応答の開始タイミングと定義し、その前後の Mg^{2+} および Ca^{2+} 動態を集め平均化処理し示した。実線は平均値、エラーバーは標準誤差 (SEM) を示した (922 イベント, 5 回実験)。

3.3.4 神経細胞の脱分極による Mg^{2+} 流入

神経活動に伴う Mg^{2+} 流入に神経細胞の脱分極が直接関与しているかどうかを調べることを目的として、神経細胞の脱分極誘導剤 veratridine を用いた実験をおこなった。まず、電位依存性 Na^+ チャネル開口剤である veratridine 添加によって神経細胞の脱分極が誘導されるかを確認することを目的とし、膜電位感受性蛍光タンパク質 VSFP2.42 を用いて、veratridine (30 μ M) 刺激時の神経細胞の膜電位イメージングをおこなった (図 3-4A)。その結果、veratridine 刺激によって FRET donor である YFP の蛍光量の減少と、acceptor である mKate2 の蛍光量の増加が観察された。つまり veratridine 刺激によって神経細胞の脱分極が誘導されていることがわかった。また、発火数についても veratridine 刺激によって増加していた (図 3-4B)。次に、KMG-104-AM と FuraRed-AM を負荷した神経細胞において、veratridine 刺激時の $[Mg^{2+}]_i$ 動態と $[Ca^{2+}]_i$ 動態を観察した (図 3-4C)。その結果、veratridine 刺激によって $[Mg^{2+}]_i$ 上昇と $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が引き起こされることがわかった。また、この $[Mg^{2+}]_i$ 上昇は細胞外に Mg^{2+} を含まない Mg^{2+} -free 条件下においては起こらないこと (図 3-4C) から、神経細胞の脱分極は細胞外から Mg^{2+} 流入を誘導していることがわかった。

最後に、 Mg^{2+} 流入の分子メカニズムを明らかにすることを目的として薬効範囲の広い二価陽イオンチャネル阻害剤である 2-APB (100 μ M) 前処理条件で veratridine (30 μ M) 刺激時の $[Mg^{2+}]_i$ 動態の測定をおこなった。2-APB 前処理によって veratridine 刺激による $[Mg^{2+}]_i$ 上昇は抑制された (図 3-4C, D, E)。その結果より、神経細胞の脱分極による Mg^{2+} 流入には 2-APB 感受性のメカニズムを介していることがわかった。Veratridine 刺激による Mg^{2+} 流入に Ca^{2+} シグナルが関与しているかどうかを調べるために細胞外に Ca^{2+} を含まない Ca^{2+} -free 条件下において veratridine 刺激をおこなったところ、 $[Mg^{2+}]_i$ 増加は観察されなかった (図 3-4F, G)。この結果より、veratridine 刺激による Mg^{2+} 流入は Ca^{2+} シグナルを介している可能性があることがわかった。

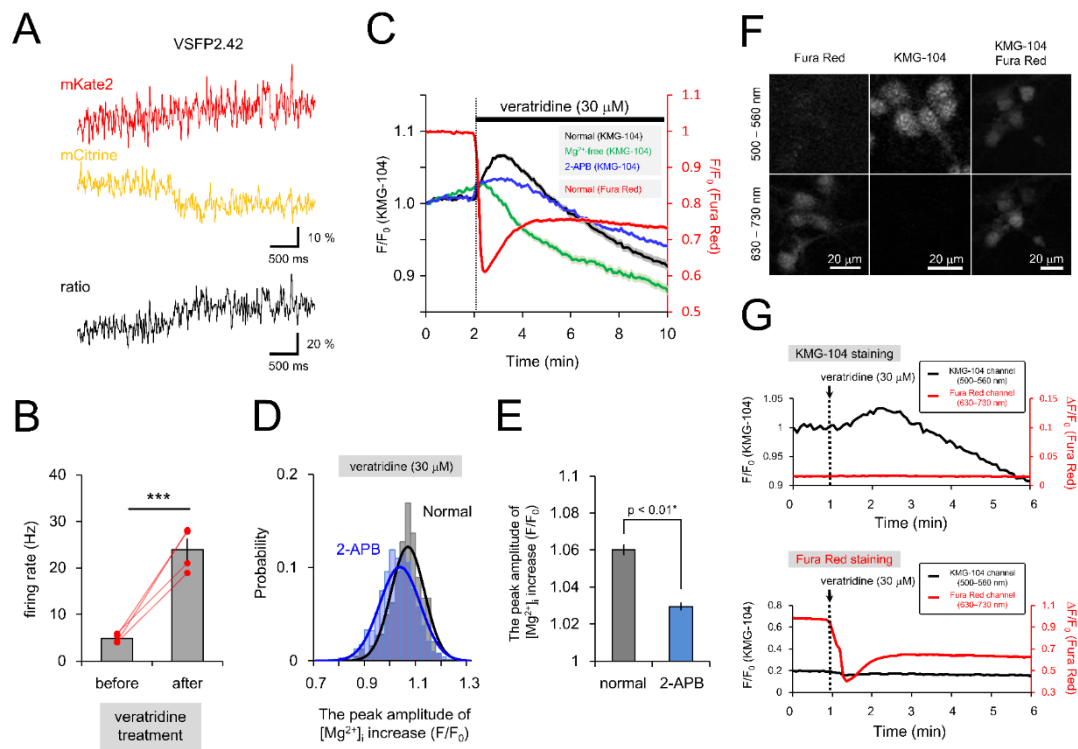


図3-4 神経細胞の脱分極による細胞外からの Mg^{2+} 流入

(A) 膜電位感受性蛍光タンパク質 VSFP2.42 を発現させた神経細胞において、 Na^+ チャネル開口剤 veratridine (30 μM) 刺激による蛍光強度変化率の経時変化の一例を示した。FRET ドナーである mCitrine の蛍光強度の減少、FRET アクセプターである mKate2 の蛍光強度の増加が観察された。これにより mKate2/mCitrine 比は増加しており、veratridine 刺激によって神経細胞は脱分極していること示した。

(B) 膜電位イメージングより検出した神経細胞の発火回数を veratridine (30 μM) 刺激の前後で比較した。veratridine 刺激によって神経活動の頻度が上昇することを示した ($n = 4$)。

(C) veratridine 刺激時の KMG-104 (黒) と Fura Red (赤) の蛍光強度変化率の経時変化を示した ($n = 627, N = 4$)。また、細胞外に Mg^{2+} を含まない条件下で veratridine 刺激を行ったときの KMG-104 の蛍光強度変化率の経時変化を示した ($n = 671, N = 4$)。また、二価陽イオンチャネル阻害剤 2-APB で前処理した条件において veratridine 刺激を行ったときの KMG-104 の蛍光強度変化率の経時変化を示した ($n = 2171, N = 8$)。実線は平均値、エラーバーは標準誤差 (SEM) を示す。

(D) 2-APB で前処理した条件において veratridine (30 μM) 刺激を行ったときの KMG-104 のピーク値における蛍光強度変化率のヒストグラム

(E) 2-APB で前処理した条件において veratridine (30 μM) 刺激を行ったときの KMG-104 の蛍光強度変化率ピーク値は通常条件で veratridine 刺激を行ったときの KMG-104 の蛍光強度変化率よりも小さかった ($p < 10^{-17}$)。

(F) KMG-104 と Fura Red (左)、KMG-104 単体 (中央)、Fura Red 単体 (右) で染色した細胞を KMG-104 チャンネル (上)、Fura Red チャンネル (下) で観察したときに得られた像。

(G) KMG104 単体で染色した細胞を veratridine (30 μM) 刺激したときの KMG-104 チャンネルと Fura Red チャンネルで取得されたシグナルの変化率 (上) Fura Red 単体で染色した細胞を veratridine 刺激したときの KMG-104 チャンネルと Fura Red チャンネルで取得されたシグナルの変化率 (下)。

3.4 考察

3.4.1 本研究の成果

ラット海馬神経細胞の神経活動において細胞外から Mg^{2+} 流入が起こることを示した。まず、ITO 電極を介した電流刺激によって Ca^{2+} 応答が見られるタイミングで Mg^{2+} 応答した。次に、様々な強度の電流刺激を加えたときの Mg^{2+} 応答と Ca^{2+} 応答の応答強度依存性を調べたところ、 Ca^{2+} 応答に関しては刺激強度に応じた大きさの応答を示したが、 Mg^{2+} 応答に関しては刺激強度によらない応答を示した。次に、 K^+ チャネル阻害剤 TEA を添加して神経興奮性を増強させたところ、散発的な Ca^{2+} 応答が観察され、 Ca^{2+} 応答が確認されたタイミングで細胞内 $[Mg^{2+}]_i$ は上昇した。最後に N^+ チャネル開口剤 veratridine を用いた脱分極刺激は神経細胞内 $[Mg^{2+}]_i$ 上昇を引き起こすことを示した。これらの結果から、神経細胞の脱分極によって細胞外からの Mg^{2+} 流入が起こることがわかった。

3.4.2 神経細胞の脱分極による Mg^{2+} 動員の分子メカニズム

我々のグループの先行研究において明らかになった興奮性神経情報伝達物質グルタミン酸による Mg^{2+} 動員や (Shindo et al., 2010)、第 2 章において明らかになった一酸化窒素による Mg^{2+} 動員では、ミトコンドリアの放出が原因であり、神経伝達物質による細胞外からの Mg^{2+} 流入経路に関しては明らかになっていない。神経細胞の脱分極においては、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} チャネルといったいくつかの電位依存性チャネルを活性化することが知られており、これらの電位依存性チャネルの下流シグナルが Mg^{2+} 流入を引き起こしている可能性がある。また、 Na^+/Ca^{2+} 交換体による二価陽イオンの輸送は特異性が低く、 Ca^{2+} だけではなく Mg^{2+} も輸送するため、細胞内 Mg^{2+} の調節機構としての機能している (Romani et al., 2011)。通常、 Na^+ 依存的な Mg^{2+} (Ca^{2+}) 輸送は細胞内 Mg^{2+} (Ca^{2+}) の排出に機能しているが、一部の交換体は逆輸送や双方向輸送をおこなう場合があることが知られている (Günther and Vormann, 1995; Cefaratti et al., 2000)。また、一部の Na^+/Ca^{2+} 交換体は膜電位依存的に輸送方向が逆転することが知られている (Yu and Choi et al., 1997)。したがって、神経細胞の脱分極時における Na^+/Ca^{2+} 交換体を介した Mg^{2+} の逆輸送が神経活動による Mg^{2+} 流入に関与しているかもしれない。この仮説に関して、 Na^+/Ca^{2+} 交換体による二価陽イオンの輸送は細胞外 Ca^{2+} の影響を受けることが知られており (Uetani et al., 2003)、 Ca^{2+} -free 条件下の脱分極刺激時において Mg^{2+} 流入が起こらなかった結果とも一致している。

3.4.3 神経細胞の脱分極

先行研究における神経興奮が引き起こす $[Mg^{2+}]_i$ 上昇は細胞外の Mg^{2+} は必要ないと報告していた (Kato et al., 1998; Gotoh et al., 1999)。しかし、本研究において神経脱分極による $[Mg^{2+}]_i$ 上昇は細胞外からの Mg^{2+} 流入が原因であることを示した。この矛盾は、先行研究で用いられていた細胞内 Mg^{2+} 蛍光指示薬 Mag-Fura-2 の選択性が低く、 Ca^{2+} 濃度変化に対しても応答を示してしまっていたことが原因である。これまで、海馬神経細胞において興奮毒性モデルである高濃度グルタミン酸刺激や、2 章における一酸化窒素刺激、虚血性外傷モデルにおける TRPM7 を介した Mg^{2+} 流入などの Mg^{2+} 動員に関して報告さ

れてきた (Zhang et al., 2011)。これらの先行研究においては、病理モデルにおける Mg^{2+} 濃度変化であったが、本研究で報告した Mg^{2+} 動員に関しては生理学的条件下における通常の神経活動に伴う Mg^{2+} 動員である。

3.4.4 細胞内 $[Mg^{2+}]_i$ 上昇の機能的役割

神経活動における細胞内 $[Mg^{2+}]$ 変化は短期的にはチャネルの活性を制御する。細胞内 Mg^{2+} は興奮性細胞において生理学的な Ca^{2+} ブロッカーとして機能することが知られている (Politi and Preston, 2003)。細胞内 Mg^{2+} のチャネル阻害効果は ATP 作動性 K^+ チャネル (Horie et al., 1987)、内向き整流性 K^+ チャネル (Matsuda, 1988)、 Ca^{2+} チャネル (Hartzell and White, 1989)、ムスカリン性 K^+ チャネル (Horie and Irisawa, 1989)、 Na^+ チャネル (Pusch et al., 1989)、NMDA チャネル (Johnson and Ascher, 1990)、TRP チャネル (Obukhov and Nowyky, 2005)、ギャップジャンクション (Palacios-Prado et al., 2013; 2014)、リアノジン受容体 (Meissner, 1986; Steele and Duke, 2007; Laver and Honen, 2008)、 IP_3 受容体 (Volpe et al., 1990; Gorza et al., 1993) など多岐にわたる。細胞内 $[Mg^{2+}]$ の一過的な変化はただちにこれらのチャネルの活性を制御すると考えられる。また、持続的な $[Mg^{2+}]$ 増加はタンパク質合成を必要とする神経可塑性といった現象に影響を与える。また細胞内 Mg^{2+} は CREB の CRE への結合を増強することが知られている (Craig et al., 2001; Moll et al., 2002)。したがって細胞内 $[Mg^{2+}]$ 変化は CREB の下流にある遺伝子発現を制御すると考えられる (Sakamoto et al., 2011)。また、生理学的に起こる $[Mg^{2+}]$ 変化はタンパク質合成速度を変化させることが知られている (Rubin, 2005; Vidair and Rubin 2005)。実際、細胞外 Mg^{2+} は PC12 細胞の突起身長に必要であること (Koike, 1983)、脳内の $[Mg^{2+}]$ を上昇させると認知機能とシナプス可塑性が増強される (Slutsky et al., 2014)。

3.5 第3章のまとめ

第3章においては、神経活動が細胞外から Mg^{2+} 流入を引き起こすこと、 Mg^{2+} 流入と Ca^{2+} 応答の強度の関しては相関がないこと、 Mg^{2+} 流入は 2-APB の影響を受けるメカニズムによって引き起こされていることを示した。この神経活動による Mg^{2+} 流入はチャネル活性や酵素活性の制御を介して神経可塑性を調節して可能性がある。

3.6 第3章の参考文献

Akemann W, Mutoh H, Perron A, Park YK, Iwamoto Y, Knöpfel T. Imaging neural circuit dynamics with a voltage-sensitive fluorescent protein. *Journal of neurophysiology*. 2012;1

Brocard JB, Rajdev S, Reynolds IJ. Glutamate-induced increases in intracellular free Mg^{2+} in cultured cortical neurons. *Neuron*. 1993;11(4):751-7.

Cefaratti C, Romani A, Scarpa A. Differential localization and operation of distinct Mg^{2+} transporters in apical and basolateral sides of rat liver plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(6):3772-80.

Craig JC, Schumacher MA, Mansoor SE, Farrens DL, Brennan RG, Goodman RH. Consensus and variant cAMP-regulated enhancers have distinct CREB-binding properties. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(15):11719-28.

Fujii T, Shindo Y, Hotta K, Citterio D, Nishiyama S, Suzuki K, Oka K. Design and Synthesis of a FIAsh-Type Mg^{2+} Fluorescent Probe for Specific Protein Labeling. *Journal of the American Chemical Society*. 2014;136(6):2374-81.

Gorza L, Schiaffino S, Volpe P. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor in heart: evidence for its concentration in Purkinje myocytes of the conduction system. *The Journal of cell biology*. 1993;121(2):345-53.

Gotoh H, Kajikawa M, Kato H, Suto K. Intracellular Mg^{2+} surge follows Ca^{2+} increase during depolarization in cultured neurons. *Brain research*. 1999;828(1):163-8.

Günther T, Vormann J. Reversibility of Na^+/Mg^{2+} antiport in rat erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1995;1234(1):105-10.

Hartzell HC, White RE. Effects of magnesium on inactivation of the voltage-gated calcium current in cardiac myocytes. *The Journal of general physiology*. 1989;94(4):745-67.

Horie MI, Irisawa HI. Dual effects of intracellular magnesium on muscarinic potassium channel current in single guinea-pig atrial cells. *The Journal of physiology*. 1989;408(1):313-32.

Horie M, Irisawa H, Noma A. Voltage-dependent magnesium block of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channel in guinea-pig ventricular cells. *The Journal of Physiology*. 1987;387(1):251-72.

Johnson JW, Ascher P. Voltage-dependent block by intracellular Mg^{2+} of N-methyl-D-aspartate-activated channels. *Biophysical journal*. 1990;57(5):1085.

Johnston J, Forsythe ID, Kopp-Scheinflug C. SYMPOSIUM REVIEW: Going native: voltage-gated potassium channels controlling neuronal excitability. *The Journal of physiology*. 2010;588(17):3187-200.

Kato H, Gotoh H, Kajikawa M, Suto K. Depolarization triggers intracellular magnesium surge in cultured dorsal root ganglion neurons. *Brain research*. 1998;779(1):329-33.

Koike T. Nerve growth factor-induced neurite outgrowth of rat pheochromocytoma PC 12 cells: dependence on extracellular Mg^{2+} and Ca^{2+} . *Brain research*. 1983;289(1):293-303.

Komatsu H, Miki T, Citterio D, Kubota T, Shindo Y, Kitamura Y, Oka K, Suzuki K. Single molecular multianalyte (Ca^{2+} , Mg^{2+}) fluorescent probe and applications to bioimaging. *Journal of the American Chemical Society*. 2005;127(31):10798-9.

Laver DR, Honen BN. Luminal Mg^{2+} , a key factor controlling RYR2-mediated Ca^{2+} release: cytoplasmic and luminal regulation modeled in a tetrameric channel. *The Journal of general physiology*. 2008;132(4):429-46.

Matsuda HI. Open-state substructure of inwardly rectifying potassium channels revealed by magnesium block in guinea-pig heart cells. *The Journal of physiology*. 1988;397(1):237-58.

Meissner G. Ryanodine activation and inhibition of the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*. 1986;261(14):6300-6.

Moll JR, Acharya A, Gal J, Mir AA, Vinson C. Magnesium is required for specific DNA binding of the CREB B-ZIP domain. *Nucleic acids research*. 2002;30(5):1240-6.

Obukhov AG, Nowycky MC. A cytosolic residue mediates Mg^{2+} block and regulates inward current

amplitude of a transient receptor potential channel. *The Journal of neuroscience*. 2005;25(5):1234-9.

Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms. *Automatica*. 1975;11(285-296):23-7.

Palacios-Prado N, Chapuis S, Panjkovich A, Fregeac J, Nagy JI, Bukauskas FF. Molecular determinants of magnesium-dependent synaptic plasticity at electrical synapses formed by connexin36. *Nature communications*. 2014;5.

Palacios-Prado N, Hoge G, Marandykina A, Rimkute L, Chapuis S, Paulauskas N, Skeberdis VA, O'Brien J, Pereda AE, Bennett MV, Bukauskas FF. Intracellular magnesium-dependent modulation of gap junction channels formed by neuronal connexin36. *The Journal of Neuroscience*. 2013;33(11):4741-53.

Politi HC, Preston RR. Is it time to rethink the role of Mg^{2+} in membrane excitability?. *Neuroreport*. 2003;14(5):659-68.

Pusch M, Conti F, Stühmer W. Intracellular magnesium blocks sodium outward currents in a voltage-and dose-dependent manner. *Biophysical journal*. 1989;55(6):1267-71.

Romani AM. Cellular magnesium homeostasis. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2011;512(1):1-23.

Rubin H. The membrane, magnesium, mitosis (MMM) model of cell proliferation control. *Magnesium research*. 2005;18(4):268-74.

Sakamoto K, Karelina K, Obrietan K. CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *Journal of neurochemistry*. 2011;116(1):1-9.

Shindo Y, Fujii T, Komatsu H, Citterio D, Hotta K, Suzuki K, Oka K. Newly developed Mg^{2+} -selective fluorescent probe enables visualization of Mg^{2+} dynamics in mitochondria. *PloS one*. 2011;6(8):e23684-.

Shindo Y, Fujimoto A, Hotta K, Suzuki K, Oka K. Glutamate-induced calcium increase mediates magnesium release from mitochondria in rat hippocampal neurons. *Journal of neuroscience*

research. 2010;88(14):3125-32.

Slutsky I, Abumaria N, Wu LJ, Huang C, Zhang L, Li B, Zhao X, Govindarajan A, Zhao MG, Zhuo M, Tonegawa S. Enhancement of learning and memory by elevating brain magnesium. *Neuron*. 2010;65(2):165-77.

Slutsky I, Sadeghpour S, Li B, Liu G. Enhancement of synaptic plasticity through chronically reduced Ca^{2+} flux during uncorrelated activity. *Neuron*. 2004;44(5):835-49.

Steele DS, Duke AM. Defective Mg^{2+} regulation of RyR1 as a causal factor in malignant hyperthermia. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2007;458(1):57-64.

Stout AK, Reynolds IJ. High-affinity calcium indicators underestimate increases in intracellular calcium concentrations associated with excitotoxic glutamate stimulations. *Neuroscience*. 1999;89(1):91-100.

Suzuki Y, Komatsu H, Ikeda T, Saito N, Araki S, Citterio D, Hisamoto H, Kitamura Y, Kubota T, Nakagawa J, Oka K. Design and synthesis of Mg^{2+} -selective fluoroionophores based on a coumarin derivative and application for Mg^{2+} measurement in a living cell. *Analytical chemistry*. 2002;74(6):1423-8.

Tanamoto R, Shindo Y, Miki N, Matsumoto Y, Hotta K, Oka K. Electrical stimulation of cultured neurons using a simply patterned indium-tin-oxide (ITO) glass electrode. *Journal of neuroscience methods*. 2015;253:272-8.

Trapani V, Farruggia G, Marraccini C, Iotti S, Cittadini A, Wolf FI. Intracellular magnesium detection: imaging a brighter future. *Analyst*. 2010;135(8):1855-66.

Uetani T, Matsubara T, Nomura H, Murohara T, Nakayama S. Ca^{2+} -dependent modulation of intracellular Mg^{2+} concentration with amiloride and KB-R7943 in pig carotid artery. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(48):47491-7.

Vidair C, Rubin H. Mg^{2+} as activator of uridine phosphorylation in coordination with other cellular responses to growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(3):662-6.

Volpe PO, Alderson-Lang BH, Nickols GA. Regulation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release. I. Effect of Mg^{2+} . American Journal of Physiology-Cell Physiology. 1990;258(6):C1077-85.

Volpe P, Vezu L. Intracellular magnesium and inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor: molecular mechanisms of interaction, physiology and pharmacology. Magnesium research: official organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium. 1993;6(3):267-74.

Yu SP, Choi DW. Na^{2+} - Ca^{2+} Exchange Currents in Cortical Neurons: Concomitant Forward and Reverse Operation and Effect of Glutamate. European Journal of Neuroscience. 1997;9(6):1273-81.

Zhang J, Zhao F, Zhao Y, Wang J, Pei L, Sun N, Shi J. Hypoxia induces an increase in intracellular magnesium via transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels in rat hippocampal neurons in vitro. Journal of Biological Chemistry. 2011;286(23):20194-207.

第4章 結言

4.1 結果のまとめ

本学位論文では、神経細胞における細胞内での Mg^{2+} 濃度変化について議論した。シグナル伝達経路である NO/cGMP/PKG 経路の活性化がミトコンドリアの ATP 作動性 K^+ チャンネルを介してミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出を誘導していること、通常の神経活動が細胞外から Mg^{2+} 流入を引き起こしていることを明らかにした。細胞内 Mg^{2+} は第 1 章で述べたようにチャンネルの制御、酵素反応の制御、ゲノムの安定化、タンパク質や DNA・RNA の構造維持などに様々な機能を果たしている (Romani et al., 2011; Wolf et al., 2008)。したがって、今回明らかにした細胞内 $[Mg^{2+}]$ 上昇は上記の機能に影響を与えることによって細胞機能を調節していると考えられる。また、生体内の Mg^{2+} はパーキンソン病、アルツハイマー病、偏頭痛、脳虚血、外傷性能損傷、うつ病などの様々な疾患との関連が報告されており (Vink et al., 2011)、本研究で明らかにした細胞内 $[Mg^{2+}]$ 上昇がこれらの疾患の発症や進行に関わっている可能性は高い。

第 2 章では、分散培養したラット海馬神経細胞において一酸化窒素刺激によってミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出を誘導することを示した。また、このミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出は NO/cGMP/PKG シグナル経路を介したミトコンドリアの ATP 作動性 K^+ チャンネルの活性化が引き金になることを示した。さらに、このミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出は、ミトコンドリアの ATP 作動性 K^+ チャンネルの活性化によるミトコンドリアの脱分極、活性酸素種 (ROS) 産生、PKC の活性化を介してミトコンドリア ATP 作動性 K^+ チャンネルを活性化する正のフィードバック経路によって増強されていることも示した。一酸化窒素は神経細胞に対して適度な濃度では保護効果、過剰な濃度では毒性効果をもたらす (Mejia-Garcia & Paes-de-Carvalho, 2007)。NO/cGMP/PKG シグナル経路の下流で活性化するミトコンドリアの ATP 作動性 K^+ チャンネルは、一度、細胞ストレスを受けるとその後のストレスに対して細胞は体制を持つ現象であるプレコンディショニング効果に関わっていると考えられている (Busija et al., 2004; Testai et al., 2015)。しかし、ミトコンドリアの ATP 作動性 K^+ チャンネルが細胞に対して保護効果をもたらすメカニズムに関しては未解明な部分が多く、ミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出がミトコンドリアの ATP 作動性 K^+ チャンネルの保護効果の一部を担っている可能性がある。

第 3 章では、分散培養したラット海馬神経細胞において生理条件下の神経活動において細胞外から Mg^{2+} が流入することを示した。まず神経活動時の細胞内 $[Mg^{2+}]$ 動態を調べるために、電気伝導性、光学的透過性をもつ ITO (indium tin oxide) ガラス電極上に神経細胞を分散培養することによって電流刺激時の細胞内 $[Mg^{2+}]$ 、細胞内 $[Ca^{2+}]$ 動態を蛍光イメージング法で測定することに成功した。この測定によって電流刺激によって神経活動を誘発したときに、細胞内 $[Mg^{2+}]$ は上昇することを明らかにした。また電位依存性 K^+ チャンネルの阻害剤を添加することによって神経活動の興奮性を増強した神経細胞の自発活動時に細胞外から Mg^{2+} が流入することを示した。第 1 章で記述したように静止状態における Mg^{2+} 濃度が高く変化率が小さいため、細胞内 Mg^{2+} イメージングでは通常上の神経活動で起こりうるような細胞内

[Mg²⁺]変化を検出することは難しかった。そこで、神経活動のタイミングでの Mg²⁺動態を多数測定し、神経活動のタイミングを合わせて平均化処理を行なうことによって神経細胞の自発活動における[Mg²⁺]変化を捉えることに成功した。先行研究においても Mg²⁺蛍光指示薬を用いた実験によって脱分極誘導剤が神経細胞内[Mg²⁺]上昇を引き起こす事を示していたが、後にその研究で使用された Mg²⁺プローブは Ca²⁺の干渉を受けることが示された。したがって、神経細胞の脱分極が細胞内[Mg²⁺]を変化させるかどうかについては長い間不明であった。Ca²⁺干渉を受けない実験系を用いて、神経活動時に神経細胞内[Mg²⁺]上昇が起こること示したのは本研究が初めてである。また、薬理刺激ではなく自発的な神経活動における[Mg²⁺]動態を捉えたことは、通常の神経活動において起こる細胞内[Mg²⁺]変化が神経細胞の生理学的機能を調節していることを示唆した。

4.2 本研究の意義

第2章では分散培養したラット海馬神経細胞において一酸化窒素刺激によってミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出を誘導した。生体内における一酸化窒素は細胞に対して保護効果と毒性効果の両方をもっている。一酸化窒素は細胞内のグアニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内cGMPレベルの上昇を誘導し下流のシグナル伝達経路を活性化する役割を担う一方で比較的高濃度では活性酸素種として機能しDNA、小胞体、ミトコンドリアに障害を与えることによってストレス応答を引き起こす (Mejia-Garcia & Paes-de-Carvalho, 2007)。ミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出は、高濃度グルタミン酸刺激 (Shindo et al., 2010)、パーキンソン病誘導薬 MPTP の活性型代謝物 MPP⁺刺激 (Shindo et al., 2011) といった神経細胞に対して毒性条件において報告されてきた。しかし、今回明らかにしたミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出経路はNO/cGMP/PKG 経路およびミトコンドリアのATP作動性 K^+ チャネルを介している。これらのシグナル経路 (Karaçay and Bonthius, 2015)、およびチャネル (Busija et al., 2004; Testai et al., 2015) の活性化は細胞に対して神経細胞保護作用を持つことが知られている。したがって、一酸化窒素によるミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出は細胞に対して保護効果を持っていると考えられる。実際、細胞質中の Mg^{2+} 濃度が低いほどMPP⁺の細胞毒性に対して脆弱であるという報告もある (Shindo et al., 2015)。しかし、ミトコンドリアから Mg^{2+} が放出されミトコンドリア中の Mg^{2+} 濃度が減少するとミトコンドリアにおける酵素反応は抑制され、呼吸速度は減少すると考えられる (Wolf et al., 2008)。ミトコンドリアのATP作動性 K^+ チャネルの細胞保護メカニズムは明らかになっていないが、ミトコンドリアのATP作動性 K^+ チャネルの活性化はATP合成を活性化することが知られている。通常、ミトコンドリアのATP作動性 K^+ チャネルの活性化によってミトコンドリア内に K^+ が流入した結果、浸透圧により水が流入しミトコンドリアは膨張する (Garlid and Paucek, 2003)。通常ミトコンドリアの膨張によりATP合成は促進されるが、過度に膨張するとミトコンドリアは破裂してしまい細胞死の原因となる (Petit et al., 1998)。そのため、 K^+ の過度な流入を防ぐための機構として H^+/K^+ 交換体が存在し K^+ を汲みだしている。この H^+/K^+ 交換体交換体はミトコンドリア内の Mg^{2+} によって抑制されていることが知られているため Mg^{2+} 放出は H^+/K^+ 交換体活性化を誘導する (Bednarczyk et al., 2005)。このようにミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出はミトコンドリア内の K^+ 濃度を調節することによって過度なミトコンドリアATP作動性 K^+ チャネルの活性化によるミトコンドリアの破裂、そしてそれに続く細胞障害を防いでいるのではないかと考えられる。本研究の意義としては Mg^{2+} が神経細胞の保護メカニズムの一部を担う可能性のあることを発見したという点にある。

3章において通常の神経活動で細胞外からの Mg^{2+} 流入が起こっていることを示した。中枢神経系における細胞外液はその他の組織における細胞外液より Mg^{2+} 濃度が高いことが知られており (Vink et al., 2011)、神経活動による細胞外からの Mg^{2+} 流入は神経細胞特有の機能に影響を与えている可能性がある。脳内の Mg^{2+} 濃度を上昇させる薬剤の摂取によって、記憶と学習の能力が向上することや (Slutsky et al., 2010)、アルツハイマー病による認知機能の低下を抑制させること (Li et al., 2013) がわかっている。細胞内 Mg^{2+} は第 1 章で記述したようにイオンチャネルの制御、酵素反応の制御など多様な役割を担っており、それらの機能を介して神経細胞の機能を制御している。 Mg^{2+} が影響を与える分子は多岐にわたっており特定のイオンチャネル・酵素に着目して議論することは難しい。いずれにしても細胞外から細胞内へ $[Mg^{2+}]$ が流入することは、一般的には神経保護作用を持つと考えられる (Shindo et al., 2015)。 Mg^{2+} は様々な Ca^{2+} 結合タンパク質の Ca^{2+} 結合部位と親和性が高いため“生理学的な Ca^{2+} シグナルの阻害因子 (physiological Ca^{2+} antagonist)”と言われている (Politi and Preston, 2003)。実際、細胞内 Mg^{2+} は神経活動時に細胞外から Ca^{2+} 流入を引き起こす主なメカニズムである NMDA 受容体を細胞内・外から電位依存的に抑制することや、小胞体からの Ca^{2+} 放出に関わる分子であるリアノジン受容体 (Ryanodine receptor) や IP_3 受容体の活性を抑制することが知られている (Long and Romani, 2014; Barbagallo et al., 2009)。神経細胞が異常活動による過剰の Ca^{2+} 流入の結果、ミトコンドリアに大量の Ca^{2+} が取り込まれると細胞毒性を引き起こす(神経興奮毒性)。 Mg^{2+} による Ca^{2+} シグナルの抑制効果は、細胞外からの Ca^{2+} 流入、細胞内小器官からの Ca^{2+} 放出 (Meissner and Henderson, 1987; Steele and Duke, 2007; Laver and Honen, 2008) や下流分子への結合 (Grabarek, 2011) が知られている。実際、細胞質中の Mg^{2+} はミトコンドリアによる Ca^{2+} の取り込みを抑制する (Jacobus et al., 1975; Szanda et al., 2009; Pradhan et al., 2011)。その他にも細胞内 Mg^{2+} は解糖系や TCA 回路におけるエネルギー産生に関わる酵素の補因子として機能することが知られており (Wolf and Trapani, 2008)、細胞外からの Mg^{2+} 流入は細胞内のエネルギー産生の活性化に寄与している可能性がある。また、細胞内 $[Mg^{2+}]$ 増加は、多くのチャネルの活性化を抑制する一方で様々な酵素反応を活性化する (Wolf and Trapani, 2008; Swaminathan, 2003)。これは一度 $[Mg^{2+}]$ 増加が起こるとチャネル開口による次の神経活動を抑制し、酵素反応を活性化することによってリン酸化反応などの酵素反応を介した細胞内シグナル伝達の効率を高めると同時に、細胞外から続けて入力されるシグナルに対する感度を下げることによって、一回目の刺激に対する応答を正確に伝える役割を果たしている可能性がある。本研究においては神経活動における細胞内 $[Mg^{2+}]$ 上昇が細胞に与える影響に関しては明らかにはしなかったが、前述のように細胞内 $[Mg^{2+}]$ 上昇は多岐にわたる分子に影響を与え神経細胞を調節していることを示唆したことは、医学・生物学的にも大きな意義がある。

4.3 神経細胞における Mg^{2+} 調節機構に関する研究における今後の展望

本学位論文では神経伝達物質による Mg^{2+} 動員機構と通常の神経活動における Mg^{2+} 動員に関して詳細に調べた内容を報告した。本研究の初期段階において神経細胞内 $[Mg^{2+}]$ 変化をもたらす神経伝達物質を発見することを目的として神経伝達物質スクリーニングを行なった。その結果、一酸化窒素以外にも抑制性神経伝達物質である GABA などによって細胞内 $[Mg^{2+}]$ 変化が誘導されることを見出している。それらの神経伝達物質についても細胞内 $[Mg^{2+}]$ 変化をもたらすメカニズムを解明する必要がある。また、一酸化窒素による細胞内 $[Mg^{2+}]$ 上昇はセカンドメッセンジャーである cGMP シグナルを介していた。その他にも Ca^{2+} 、cAMP などのセカンドメッセンジャーと Mg^{2+} 調節機構の関係を解明することは神経細胞における細胞内 $[Mg^{2+}]$ 調節機構を包括的に理解するために必要である。

2 章で示した一酸化窒素刺激による細胞内 $[Mg^{2+}]$ 上昇はミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出によるものであった。細胞質と比べてミトコンドリアは細胞内に占める体積が小さいため、ミトコンドリアが細胞質 $[Mg^{2+}]$ を変化させる量の Mg^{2+} を放出する場合、ミトコンドリア $[Mg^{2+}]$ 減少は非常に大きくなると考えられる。ミトコンドリア内の大きな $[Mg^{2+}]$ 変化はミトコンドリア内のチャネルの活性や酵素反応に影響を与えることが考えられる。そこで、ミトコンドリアの $[Mg^{2+}]$ 調節機構に関わるタンパク質の役割とミトコンドリア内の $[Mg^{2+}]$ が細胞機能に与える影響を調べることが重要である。

2 章、3 章において示した細胞質 $[Mg^{2+}]$ 上昇に関して、一酸化窒素による細胞質 $[Mg^{2+}]$ 上昇はミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出、神経活動による $[Mg^{2+}]$ 上昇は細胞外からの Mg^{2+} 流入によって細胞質 $[Mg^{2+}]$ 上昇を引き起こした。細胞外およびミトコンドリアからの細胞質への Mg^{2+} 動員機構は他の細胞種においても報告されている。PC12 細胞に対して MPP⁺ を添加したパーキンソン病細胞モデルにおいて、MPP⁺ 添加後の細胞質 $[Mg^{2+}]$ 上昇が大きいほどその後の細胞生存率は高い (Shindo et al., 2015)。MPP⁺ による細胞質 $[Mg^{2+}]$ 上昇はミトコンドリアからの Mg^{2+} 放出と細胞外からの Mg^{2+} 流入の両方が原因である (Shindo et al., 2015)。したがって、細胞質 $[Mg^{2+}]$ 上昇は細胞に保護効果をもたらすが、ミトコンドリア内の Mg^{2+} が放出されることが細胞に保護もしくは毒性効果をもたらすかは不明である。今後の細胞内 Mg^{2+} 研究は細胞内 Mg^{2+} の分布の変化が細胞内小器官そして細胞機能にもたらす影響について解析することが必要である。

また今後の Mg^{2+} 研究を発展させるためには蛍光タンパク質型 Mg^{2+} プロープの開発が期待されている。本研究においては化合物型の Mg^{2+} プロープを用いたが、細胞内小器官における Mg^{2+} 測定や長時間の Mg^{2+} 測定、生きた個体における Mg^{2+} 測定は困難である (Trapani et al., 2010)。それらの課題を解決する蛍光タンパク質型 Mg^{2+} プロープの開発が期待されており、近年 2 つ別のグループによって蛍光タンパク質型 Mg^{2+} プロープが開発された。しかし、それらのプロープは $[Ca^{2+}]$ 変化や pH 変化の影響を受けするため、使用する場合は注意が必要である。今後は、 Ca^{2+} や pH など Mg^{2+} 以外の因子の影響を受けない蛍光タンパク質型 Mg^{2+} プロープの開発が期待されている。

第 4 章の参考文献

- Barbagallo M, Belvedere M, Dominguez LJ. Magnesium homeostasis and aging. *Magnesium Research*. 2009;22(4):235-46.
- Bednarczyk P, Dołowy K, Szewczyk A. Matrix Mg^{2+} regulates mitochondrial ATP-dependent potassium channel from heart. *FEBS letters*. 2005;579(7):1625-32.
- Busija DW, Lacza Z, Rajapakse N, Shimizu K, Kis B, Bari F, Domoki F, Horiguchi T. Targeting mitochondrial ATP-sensitive potassium channels—a novel approach to neuroprotection. *Brain research reviews*. 2004;46(3):282-94.
- Garlid KD, Dos Santos P, Xie ZJ, Costa AD, Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2003;1606(1):1-21.
- Garlid KD, Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the K^+ cycle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2003;1606(1):23-41.
- Grabarek Z. Insights into modulation of calcium signaling by magnesium in calmodulin, troponin C and related EF-hand proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2011;1813(5):913-21.
- Jacobus WE, Tiozzo RO, Lugli GI, Lehninger AL, Carafoli ER. Aspects of energy-linked calcium accumulation by rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 1975;250(19):7863-70.
- Karaçay B, Bonthius DJ. The Neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) Gene and Neuroprotection Against Alcohol Toxicity. *Cellular and molecular neurobiology*. 2015;35(4):449-61.
- Laver DR, Honen BN. Luminal Mg^{2+} , a key factor controlling RYR2-mediated Ca^{2+} release: cytoplasmic and luminal regulation modeled in a tetrameric channel. *The Journal of general physiology*. 2008;132(4):429-46.
- Li W, Yu J, Liu Y, Huang X, Abumaria N, Zhu Y, Huang X, Xiong W, Ren C, Liu XG, Chui D. Elevation of brain magnesium prevents and reverses cognitive deficits and synaptic loss in Alzheimer's disease mouse model. *The Journal of Neuroscience*. 2013;33(19):8423-41.

Long S, Romani AM. Role of Cellular Magnesium in Human Diseases. *Austin journal of nutrition and food sciences*. 2014;2(10).

Meissner G, Henderson JS. Rapid calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles is dependent on Ca^{2+} and is modulated by Mg^{2+} , adenine nucleotide, and calmodulin. *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262(7):3065-73.

Mejía - García TA, Paes - de - Carvalho R. Nitric oxide regulates cell survival in purified cultures of avian retinal neurons: involvement of multiple transduction pathways. *Journal of neurochemistry*. 2007;100(2):382-94.

Petit PX, Goubern M, Diolez P, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling: the impact of irreversible permeability transition. *FEBS letters*. 1998;426(1):111-6.

Politi HC, Preston RR. Is it time to rethink the role of Mg^{2+} in membrane excitability?. *Neuroreport*. 2003;14(5):659-68.

Pradhan RK, Qi F, Beard DA, Dash RK. Characterization of Mg^{2+} inhibition of mitochondrial Ca^{2+} uptake by a mechanistic model of mitochondrial Ca^{2+} uniporter. *Biophysical journal*. 2011;101(9):2071-81.

Romani AM. Cellular magnesium homeostasis. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2011;512(1):1-23.

Shindo Y, Yamanaka R, Suzuki K, Hotta K, Oka K. Intracellular magnesium level determines cell viability in the MPP^+ model of Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2015;1853(12):3182-91.

Shindo Y, Fujii T, Komatsu H, Citterio D, Hotta K, Suzuki K, Oka K. Newly developed Mg^{2+} -selective fluorescent probe enables visualization of Mg^{2+} dynamics in mitochondria. *PloS one*. 2011;6(8):e23684.

Shindo Y, Fujimoto A, Hotta K, Suzuki K, Oka K. Glutamate - induced calcium increase mediates magnesium release from mitochondria in rat hippocampal neurons. *Journal of neuroscience*

research. 2010;88(14):3125-32.

Slutsky I, Abumaria N, Wu LJ, Huang C, Zhang L, Li B, Zhao X, Govindarajan A, Zhao MG, Zhuo M, Tonegawa S. Enhancement of learning and memory by elevating brain magnesium. *Neuron*. 2010;65(2):165-77.

Steele DS, Duke AM. Defective Mg^{2+} regulation of RyR1 as a causal factor in malignant hyperthermia. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2007;458(1):57-64.

Swaminathan R. Magnesium metabolism and its disorders. *The Clinical Biochemist Reviews*. 2003;24(2):47.

Szanda G, Rajki A, Gallego-Sandín S, Garcia-Sancho J, Spät A. Effect of cytosolic Mg^{2+} on mitochondrial Ca^{2+} signaling. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 2009;457(4):941-54.

Testai L, Rapposelli S, Martelli A, Breschi MC, Calderone V. Mitochondrial Potassium Channels as Pharmacological Target for Cardioprotective Drugs. *Medicinal research reviews*. 2015;35(3):520-53.

Trapani V, Farruggia G, Marraccini C, Iotti S, Cittadini A, Wolf FI. Intracellular magnesium detection: imaging a brighter future. *Analyst*. 2010;135(8):1855-66.

Vink R, Nechifor M, editors. *Magnesium in the Central Nervous System*. University of Adelaide Press; 2011.

Wolf FE, Trapani V. Cell (patho) physiology of magnesium. *Clinical science*. 2008;114:27-35.

付録 研究業績

主論文に関連する原著論文

[1] Ryu Yamanaka, Yutaka Shindo, Takamasa Karube, Kohji Hotta, Koji Suzuki, Kotaro Oka. Neural depolarization triggers Mg^{2+} influx in rat hippocampal neurons. *Neuroscience*. 2015 310:731-41.

[2] Ryu Yamanaka, Yutaka Shindo, Kohji Hotta, Koji Suzuki, Kotaro Oka. NO/cGMP/PKG signaling pathway induces magnesium release mediated by $mitoK_{ATP}$ channel opening in rat hippocampal neurons. *FEBS Letters*. 2013, Aug, 19; 587(16) :2643 - 2648.

その他の原著論文

[1] Yutaka Shindo, Ryu Yamanaka, Koji Suzuki, Kohji Hotta, Kotaro Oka. Intracellular magnesium level determines cell viability in the MPP^{+} model of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2015, Aug, 28; 1853(12):3182-3191.

国際会議発表（筆頭）

[1] Ryu Yamanaka, Yutaka Shindo, Takamasa Karube, Ryo Tanamoto, Kohji Hotta, Koji Suzuki, Kotaro Oka. Magnesium influx triggered by neural depolarization. 45th Society for Neuroscience, Chicago, the United States of America (20, Oct, 2015).

[2] Ryu Yamanaka, Yutaka Shindo, Kohji Hotta, Koji Suzuki, Kotaro Oka. NO/cGMP/PKG signaling induced mitochondrial Mg^{2+} release *via* $mitoK_{ATP}$ channel activation in rat hippocampal neurons. Magnesium in Translational Medicine, Smolenice Castle, Slovakia (5th, May, 2014).

[3] Ryu Yamanaka, Yutaka Shindo, Kohji Hotta, Koji Suzuki, Kotaro Oka. Mg^{2+} mobilization mediated by both GABA(A) and GABA(B) receptors in rat hippocampal neurons. 43rd Society for Neuroscience, San Diego, the United States of America (13, Nov, 2013).

- [4] Ryu Yamanaka, Yutaka Shindo, Kohji Hotta, Koji Suzuki, Kotaro Oka. Intracellular Mg^{2+} mobilization by nitric oxide in rat hippocampal neurons. 42nd Society for Neuroscience, New Orleans, the United States of America (14, Oct, 2012).
- [5] Ryu Yamanaka, Yutaka Shindo, Kohji Hotta, Koji Suzuki, Kotaro Oka. Mg^{2+} influx and release from intracellular store induced by GABA stimuli in rat hippocampal neurons. 41st Society for Neuroscience, Washington DC, the United States of America (16, Nov, 2011).

国際会議発表（非筆頭）

- [1] Brad Hamilton, Harumi Kogami, Yuichi Okuda, Kaishu Shiina, Ryu Yamanaka, Paul Cizdziel, Yutaka Shindo, Yu Ching (Zachary) Lin, Shunsuke Yoshida, Kotaro Oka, Misuru Inamura. Human iPSC-derived neuronal cell sub-populations that are suitable for drug development and the study of divergent neurological disorders. International Society for Stem Cell Research 2015, Suzhou, China (19-22, Oct, 2015).
- [2] Brad Hamilton, Harumi Kogami, Yuichi Okuda, Kaishu Shiina, Ryu Yamanaka, Yu Ching (Zachary) Lin, Shunsuke Yoshida, Kotaro Oka, Misuru Inamura. Human IPS cell-derived neurons and their applications for disease model research and development. International Society for Stem Cell Research 2015, Suzhou, China (19-22, Oct, 2015).
- [3] Akihiro Enya, Ryu Yamanaka, Yutaka Shindo, Takayuki Kitogo, Kohji Hotta, Kotaro Oka. Characterization of neurons derived from human iPS cells with CREB phosphorylation and calcium dynamics. 43rd Society for Neuroscience, San Diego, the United States of America (9-13, Nov., 2013).
- [4] Yutaka Shindo, Ryu Yamanaka, Kohji, Hotta, Koji Suzuki, Kotaro Oka. Increase in intracellular magnesium concentration has protective effect in MPP⁺ model of Parkinson's disease in PC12 cells. 43rd Society for Neuroscience, San Diego, the United States of America (9-13, Nov., 2013).
- [5] Akihiro Enya, Ryu Yamanaka, Yutaka Shindo, Takayuki Kitogo, Kohji Hotta, Kotaro Oka. Upregulation of cellular Mg^{2+} transport attenuates the toxicity of 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion (MPP⁺) in PC12 cell. 42nd Society for Neuroscience, New Orleans, the United States of America (17, Oct., 2012).

国内学会発表（筆頭）

- [1] 山中龍、新藤豊、苅部亮、棚元亮、堀田耕司、鈴木孝治、岡浩太郎、神経の脱分極によるマグネシウム動員、第 38 回日本神経科学大会、神戸（2015 年 7 月 2 日）

- [2] 山中龍、新藤豊、苅部亮、棚元亮、堀田耕司、鈴木孝治、岡浩太郎、ラット海馬神経細胞における神経活動にともなう細胞内マグネシウムイオン濃度上昇、第 37 回日本神経科学大会、横浜（2014 年 9 月 12 日）

- [3] 山中龍、新藤豊、堀田耕司、鈴木孝治、岡浩太郎、一酸化窒素によるマグネシウム動員機構の解明、第 22 回バイオイメージング学会、東京大学（2013 年 9 月 16 日）

- [4] 山中龍、新藤豊、堀田耕司、鈴木孝治、岡浩太郎、ラット海馬神経細胞における GABA による二元的なマグネシウム動員、第 36 回日本神経科学大会、京都（2013 年 6 月 22 日）

- [5] 山中龍、新藤豊、堀田耕司、鈴木孝治、岡浩太郎、ラット海馬神経細胞における一酸化窒素がもたらす細胞内マグネシウム動員、第 35 回日本神経科学大会、名古屋（2012 年 9 月 19 日）

- [6] 山中龍、新藤豊、堀田耕司、鈴木孝治、岡浩太郎、ラット海馬神経細胞における GABA 刺激による細胞内マグネシウムの測定、第 34 回日本神経科学大会、横浜（2011 年 9 月 16 日）

- [7] 山中龍、新藤豊、堀田耕司、鈴木孝治、岡浩太郎、GABA 刺激による神経細胞マグネシウム動員、第 20 回バイオイメージング学会、千歳科学技術大学（北海道）、（2011 年 9 月 1 日）

国内学会発表（非筆頭）

- [1] 鈴木美穂、新藤豊、山中龍、岡浩太郎、アポトーシス誘導過程に關与する信号伝達の上流から下流の単一細胞内における応答パターンの可視化、第 23 回バイオイメージング学会、大阪（2014 年 9 月 5 日）

- [2] 新藤豊、藤井智彦、山中龍、堀田耕司、西山繁、ダニエル・チッテリオ、鈴木孝治、岡浩太郎、細胞内局所でのマグネシウムイオン濃度変化の計測、第 23 回バイオイメージング学会、大阪（2014 年 9 月 5 日）

- [3] 塩谷晃弘、山中龍、新藤豊、堀田耕司、木藤古孝行、岡浩太郎、ヒト iPS 細胞から分化させた神経細胞の蛍光イメージング法を用いた特徴づけ、第 22 回バイオイメージング学会、東京大学（2013 年 9 月 16 日）

[4] 塩谷晃弘、山中龍、新藤豊、堀田耕司、木藤古孝行、岡浩太郎、Characterization of neurons derived from human iPS cells with calcium dynamics、第 36 回日本神経科学大会、京都（2013 年 6 月 22 日）

[5] 新藤豊、山中龍、鈴木孝治、堀田耕司、岡浩太郎、PC12 細胞を用いたパーキンソン病モデルにおける細胞内マグネシウム濃度変化 第 36 回日本神経科学大会、第 36 回日本神経科学大会、京都（2013 年 6 月 20-23 日）

[6] 新藤豊、藤井智彦、山中龍、堀田耕司、鈴木孝治、岡浩太郎、神経細胞内の局所的なマグネシウム濃度変化の計測 第 34 回日本神経科学大会、第 34 回日本神経科学大会、横浜、（2011 年 9 月 14-17 日）

謝辞

本研究は、著者が慶應義塾大学大学院理工学研究科後期博士課程在学中に、同大学理工学部生命情報学科の岡浩太郎教授の指導の下に行ないました。本研究を遂行するにあたってご指導、ご鞭撻を賜りました慶應義塾大学教授 岡浩太郎先生に心より感謝申し上げます。先生には学部4年生から現在に至るまで、研究に関してのみならず様々な要諦を学ばせて頂きました。大変多忙にも関わらずいつも気に掛けて下さり、研究室生活につまづいた時に相談にのって頂いたことは感謝の念に堪えません。マイペースで頼りない私が本研究を完成させることができたのは、先生の寛大さと懇切丁寧な御指導のおかげです。また学部4年生から6年間におよぶ研究室生活が、日々、自分の成長を実感することができる有意義なものとなったのは先生のおかげである事は疑いの余地はありません。繰り返しになりますが、心より感謝申し上げます。

本論文の執筆にあたり、ご多忙にも関わらず本学位論文の副査を引き受けてくださりました慶應義塾大学教授 井本正哉先生、同大学准教授 土井信英先生、舟橋啓先生に深く感謝申し上げます。また、論文を精査していただいた上での的確な助言と有益な議論の場を提供して頂きましたことに改めて拝謝いたします。

更に、博士論文研究において研究結果を記載することはありませんでしたが、メタボローム解析の実験を行なうにあたってご助力、ご指導を賜りました慶應義塾大学教授 曾我朋義先生には厚く御礼申し上げます。

慶應義塾大学講師 堀田耕司先生に厚く御礼申し上げます。堀田先生には研究生活において暗礁に乗り上げた時には何度も助けて頂きました。また、堀田先生の研究に対する熱意、学生に対する親身な対応にはいつも勇気付けられました。堀田先生の研究に対する行動的な姿勢、観照的な考察を目の当たりにすると新たな着眼点に気づかされることがあり、本研究を遂行するにあたって多くことを学ばせて頂きました。心より感謝申し上げます。

私が学部4年生の頃から現在に至るまで研究に関する助言やディスカッションに加え、個人的な相談にのって頂いた慶應義塾大学特任助教 新藤豊博士にも厚く御礼申し上げます。私と同様に、同じマグネシウムを研究対象とする新藤博士とのディスカッションは研究指針の立て方や実験結果のまとめ方に至るまで多くのことを学ぶ機会となっていました。また面倒見の良い新藤博士の的確なアドバイス・細やかな心遣いは非常に心強く精神的な支えとなりました。本博士論文研究は新藤博士のサポートなくして完成させることはできませんでした。心より感謝申し上げます。

また、メタボローム解析の実験を行なうにあたって、実験面での御助力、御指摘頂きました慶應義塾大学先端生命科学研究所特任助教 田畑祥博士に厚く御礼申し上げます。

研究に関して熱く議論をした下井利修様、研究に関するディスカッションや徹夜の作業を共にした棚元亮様、いつも明るく話しかけて下さった岩崎麻衣博士、持ち前の明るさで研究室を楽しい雰囲気にして下さった中村充博士に加え研究室の諸先輩の皆様には大変お世話になりました。経験・知識豊かな諸先輩方のアドバイスなくしては本研究を完成させることは出来ませんでした。本当にありがとうございます。

また研究に関するディスカッションや他愛もない話に花を咲かせた設楽久志君、同じ細胞班の仲間として解剖やディスカッションを行った鈴木李夏さん、同じ後期博士課程に在籍していた彼らの存在は研究室生活を楽しく有意義なものとするだけでなく、研究に対する意欲を駆り立ててくれました。本当にありがとうございます。

前期博士課程卒業まで研究室生活を共にした同期、小林孝彦君、丸山曜資君、二階達也君、高延岳史君、庭野真理子さんには卒業してもなお様々な相談にのって頂きました。また、同じ細胞班の後輩である永瀬史章君、苅部堯応君、塩谷晃弘君、鈴木李夏さん、遠藤友理香さん、椎名海舟君、中井友美さん、穴戸萌香さん、学部・前期博士課程を含め6年間の研究室生活が実り多く充実したものとなったのは皆様のおかげです。本当にありがとうございます。

研究生を送る上で様々なサポートをして下さった上ヶ迫いとか女史に加え、紙面では触れられなかった研究室の皆様には深く感謝いたします。皆様のおかげで本博士論文が日の目を見る事となりました。

最後に、離れていても体調を気遣ってくれる父母と兄に感謝いたします。

平成 28 年 2 月末日