

マグネシウムを中心としたミネラル栄養に関する基礎的研究

誌名	日本栄養・食糧学会誌 : Nippon eiy shokury gakkaiishi = Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science
ISSN	02873516
著者名	松井, 徹
発行元	日本栄養・食糧学会
巻/号	72巻5号
掲載ページ	p. 211-219
発行年月	2019年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



マグネシウムを中心としたミネラル栄養に関する基礎的研究

(令和元年度日本栄養・食糧学会学会賞受賞)

松井 徹^{*.1}

(2019年7月29日受付; 2019年8月9日受理)

要旨: 日本を含め先進諸国ではマグネシウム (Mg) 摂取不足が問題となっている。本稿では、われわれが行ってきた Mg を中心としたミネラル栄養に関する基礎的研究を紹介する。溶解性は Mg 吸収に大きな影響を及ぼすが、海藻や飲用水中 Mg の吸収を検討し、溶解している Mg の形態や消化管内滞留時間も Mg 吸収に影響を及ぼすことを示した。Mg 欠乏は肝臓中マスト細胞数を増加させることを明らかにした。肝臓および肝臓を構成する細胞のモデル培養系を用いた代謝物の網羅的解析によって、Mg 欠乏により生じる新奇な代謝異常を明らかにした。Mg 欠乏時の肝臓中金属類の網羅的解析を行い、モリブデンなど8種の金属類濃度が変動することを見出した。また、Mg 欠乏による肝臓中亜鉛トランスポーター (Zip14) とメタロチオネインの発現増加が肝臓中亜鉛を増加させること、Mg 欠乏は鉄過剰に対するヘプシジン発現応答を抑制することによって鉄代謝を攪乱することを示した。加えて、アクチビン B やインターロイキン-1 β が、ヘプシジン発現亢進を生じる分子機構を解明した。

キーワード: マグネシウム, メタボロミクス, メタロミクス, ラット, 培養細胞

1. はじめに

マグネシウム (Mg) は 300 種以上の酵素の活性に必要であり、前臨床的な Mg 欠乏では炎症性サイトカイン産生が増加するとともに軽度の炎症や酸化ストレスが生じ、慢性 Mg 欠乏は心血管疾患、2 型糖尿病、慢性腎疾患、骨粗鬆症、神経精神疾患の発症と関連があるとされている¹⁾。Mg 欠乏を生じる要因としては、その摂取不足が最も重要であるが、アルコールの多量摂取は尿中 Mg 排泄を増加させる²⁾。また、激しい運動によって尿中 Mg 排泄が増加するとともに血漿中 Mg 濃度は低下する³⁾。さらに、軽度の心理的ストレスや寒冷ストレスが尿中 Mg 排泄を増加させることも報告されている⁴⁾。

アメリカ合衆国において 60% の成人は平均推定必要量を満たす Mg を摂取していないとされており⁵⁾、英国、ドイツやアイルランドにおける Mg 摂取量も少ない⁶⁾。日本人の食事摂取基準 (2015 年版)⁷⁾によると、成人における Mg の推定平均必要量は女性で 230-240 mg/d、男性で 280-310 mg/d であるが、平成 29 年国民健康・栄養調査報告⁸⁾では、Mg の平均摂取量は女性で 190-230 mg/d、男性で 218-285 mg/d となっている。したがって、他の先進諸国同様に日本人においても Mg は不足しやすいと

判断できる。さらに、海外では Mg 摂取量は減少傾向にあり、これは食品の精製度増加や Mg を含まない肥料の利用が原因であることが示唆されている⁶⁾。平成 17 年国民健康・栄養調査報告⁹⁾と平成 29 年国民健康・栄養調査報告⁸⁾における Mg の平均摂取量を比較すると、この間に Mg 摂取量が約 30 mg/d 減少していることがわかる。これは、主な Mg 供給源である穀類、緑黄色野菜類、魚介類、果実類の摂取が減少したことが一因であろう。一方、感度と信頼性が高い Mg 栄養状態のバイオマーカーや高度にコントロールされた出納試験がなかったことから、現在の Mg 摂取基準は問題であることが指摘されてきた¹⁾。近年、精度が高い出納試験結果が報告されており、出納が 0 となる Mg 摂取水準は、体重が 70 kg の場合、男女ともに 175 mg/d であり、現在の Mg 摂取基準は健康なヒトにおける基準としては高すぎることが示されている¹⁾。しかしながら、日本国内におけるコホート研究において、Mg 摂取の第 1 四分位群 (Mg 摂取量 \leq 148.5 mg/d) では、第 3 四分位群 (Mg 摂取量 171.6-195.5 mg/d) や第 4 四分位群 (Mg 摂取量 $>$ 195.5 mg/d) よりも 2 型糖尿病の発生率が高いことが示されている¹⁰⁾。したがって、比較的多くの日本人においても Mg 欠乏症が生じている可能性が高い。

* 連絡者・別刷請求先 (matsui@kais.kyoto-u.ac.jp)

¹ 京都大学農学研究科応用生物科学専攻動物栄養科学分野 (606-8502 京都市左京区北白川追分町)

健康増進の取り組みを推進する上で、Mg 栄養への配慮は重要であるが、Mg 栄養に関する基礎研究は極めて不足している。われわれは、その基盤となる Mg を中心としたミネラル栄養に関する研究を行ってきた。

2. Mg の溶解性と吸収

食品に含まれるミネラルなど栄養素がどの程度利用されるかを示す指標にバイオアベイラビリティがある。さらに、バイオアベイラビリティはバイオアクセシビリティと生体内活性によって決定されることが提唱されている¹¹⁾。栄養素のバイオアクセシビリティに影響を及ぼす要因としては、1) 消化による変化、2) 吸収性、3) 初回通過効果、すなわち消化管組織内における代謝と循環血移行前の門脈や肝臓における代謝がある。また、生体内活性に影響を及ぼす要因としては、1) 循環血中における代謝や他の物質との相互作用、2) 標的器官への輸送と取り込み、3) 標的器官における蓄積と 4) 生理作用がある。なお、薬学分野や毒学分野では、栄養学分野で定義されているバイオアクセシビリティをバイオアベイラビリティと呼び、消化による変化・変換のみをバイオアクセシビリティの要因とすることが多い。学術分野にかかわらず、人工消化後の栄養素の溶解性が容易に得られるバイオアクセシビリティの指標 (*in vivo* バイオアクセシビリティ) として用いられている¹¹⁾。

Mg は主にイオンとして吸収され、胆汁への排泄はほとんどなく、また肝臓における蓄積はわずかであるので、バイオアクセシビリティは消化管内の形態によってほぼ決定される。また、血液中にはアルブミンなどと結合した形態またはイオンとして輸送されるので、標的器官への輸送と取り込み、標的器官における蓄積や生理作用は摂取した Mg 源の大きな影響を受けないと考えられる。

クエン酸 Mg など溶解性が高い Mg 源は、ヒトにおいてバイオアクセシビリティが高いことが報告されており¹²⁾、ラットにおいても溶解性が高い有機酸 Mg 塩のバイオアベイラビリティは高いことが報告されている¹³⁾。

2.1 海藻中 Mg

海藻類は日本人が通常摂取している食品では最も Mg 含量が高い。しかし、数種の実験動物中の Mg は吸収されにくいことが報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。われわれは可食である緑藻のアオサ (*Ulva* spp.)、褐藻であるコンブ (*Laminaria japonica*)、または紅藻であるフノリ (*Gloiopeltis* spp.) を主な Mg 源とした飼料を給与したラットにおける見掛けの吸収を比較検討した¹⁶⁾。全体的に *in vitro* バイオアクセシブルな Mg 摂取量の増加にともなって見掛けの Mg 吸収量は増加したが、*in vitro* バイオアクセシビリティによって説明される Mg 吸収よりも、フノリ中の Mg は吸収されにくく、コンブ中の Mg は吸収されやすかった (図1)。海藻類には多くの水溶性繊維が含まれているが、海藻に含まれる主要な水溶性繊維の種類は大きく異なる。イオン交換能を有する食物繊維はミネラ

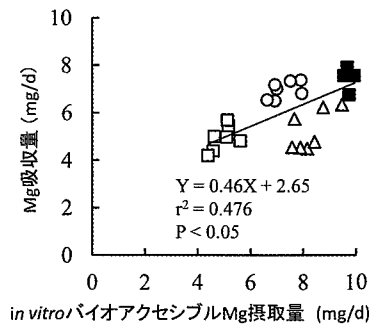


図1 海藻を給与したラットにおける *in vitro* バイオアクセシブル Mg 摂取量と見掛けの Mg 吸収量の関係
ラットにアオサ (□)、フノリ (△)、コンブ (○)、または対照である酸化マグネシウム (■) を主な Mg 源とする飼料を給与した。(Nakamura *et al.*, *J Sci Food Agric* (2012)¹⁶⁾を基に作成)

ル吸収を抑制するが、下部消化管で発酵しやすい食物繊維は、発酵による pH の低下を介して Mg の溶解性を高め、その結果大腸での Mg 吸収を増加する¹²⁾。したがって、人工消化後の Mg の溶解性から得られる海藻類の *in vitro* バイオアクセシビリティ評価には限界がある。Mg の *in vitro* バイオアクセシビリティ評価には、人工消化後の溶解性ではなくイオン化の程度を用いるとともに、Mg のように下部消化管でも吸収される栄養素では下部消化管での変化も考慮した人工消化法の開発が必要であろう。

2.2 飲用水中 Mg

アメリカ合衆国では Mg 総摂取量の 9-27% が飲用水から供給されている。また、国内で市販されているミネラルウォーターには 200 mg/L 以上の Mg を含むものがあり、Mg 濃度の高いミネラルウォーターは良い Mg 源となる。ヒトにおいて、液状物の多くは摂取後速やかに胃から十二指腸に移行するが、固形物はほとんどが胃内に滞留する¹⁷⁾ので、飲用水中 Mg の多くは胃内で固形物と混和せず、高いバイオアクセシビリティを保ったまま十二指腸に流下すると考えられる。ヒトにおけるミネラルウォーター中 Mg のバイオアベイラビリティに関する報告があるが、結果は一致していない¹⁸⁾¹⁹⁾。われわれは、²⁵Mg で標識した飲用水を用いて、異なる Mg 濃度の飲用水を同じ液量で 1 日あたりの Mg 投与量が等しくなるように回数を変えて与える試験を行い、Mg 吸収は飲用水中 Mg 濃度が高まるにつれて低下することを示した²⁰⁾。一方、Mg 濃度が高い飲用水でも 1 回あたりの液量を少なくして同じ回数与えると、Mg 吸収には差が認められなくなった (図2)。これらの結果から、単回の飲用水摂取では、Mg はすみやかに流下するために小腸における高い濃度を長時間維持できず、Mg 吸収率が低下することが示唆された。したがって、消化管内滞留時間も Mg のバイオアクセシビリティに影響すると考えられた。

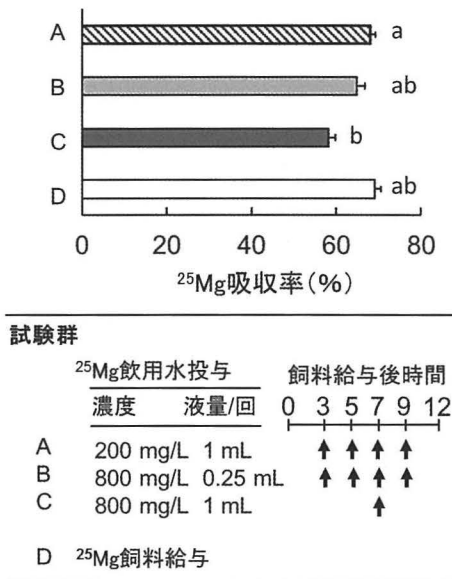


図2 ラットにおいて飲用水の濃度と投与パターンがMg吸収に及ぼす影響
²⁵Mg標識飼料給与群には、3時間標識飼料を給与後に非標識飼料を給与した。²⁵Mg標識飲用水投与群には、1日のMg摂取量が標識飼料給与群と同一になるように飲用水として投与したMgに相当する量を減じた飼料を給与した。矢印は飲用水投与を示している。平均±標準偏差 (n=7)。a, b異なる文字間に有意差あり (p<0.05)。(Nakamura *et al.*, *Nutr Res* (2012)²⁰ 改変)

3. Mg欠乏による肝臓の変化

多くの酵素の補因子としてMgは働いているので、Mg欠乏の症状は多様であると考えられる。肝臓は、金属類を含む多様な物質の体内代謝において重要な器官で

あり、Mg欠乏の影響を強く受ける可能性がある。Mgの摂取増加は肝疾患による死亡のリスクを低減することが報告されている²¹⁾。また、金属類の代謝には多様な関連があり、Mg欠乏はラット肝臓中の鉄含量を上昇させるとともに酸化ストレスを生じる²²⁾。このように、ある金属類の不適切な摂取は二次的に他の金属類の過不足を生じる可能性がある。われわれは、Mg欠乏が肝臓中有機物代謝と金属類代謝に及ぼす影響を中心に検討した。

3.1 マスト細胞の誘導

ラットにおける典型的なMg欠乏症としては、皮膚の炎症反応があり、これにはマスト細胞が関与していることが知られている。そこで、われわれはMg欠乏ラットの肝臓におけるマスト細胞の出現を検討した²³⁾。正常なラットの肝臓ではほとんどマスト細胞は認められなかったが、Mg欠乏ラットでは肝臓の門脈三つ組周囲に多くのマスト細胞が認められた(図3)。キマーゼ活性を有するマスト細胞プロテアーゼの遺伝子発現をqRT-PCRを用いて検討したところ、対照ラットでは検出されなかったが、Mg欠乏ラットでは検出された。Mg欠乏はラット肝臓における脂肪合成を促進し、肝臓のトリアシルグリセロール濃度を増加させる²⁴⁾。われわれの試験においても、脂肪で構成されていると考えられる空胞がMg欠乏ラットの肝臓の門脈三つ組付近で認められた(図3)。疫学研究によって、低Mg血症はインスリン抵抗性とは独立した非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)発症リスク要因となることが示唆されている²⁵⁾。また、NASHモデル動物の肝臓ではキマーゼ活性が増加すること、キマーゼ阻害剤は、肝臓の脂肪蓄積、炎症と線維化を防止することが報告されている²⁶⁾。したがって、Mg欠乏によるマスト細胞誘導は、肝脂肪症の一因となり、

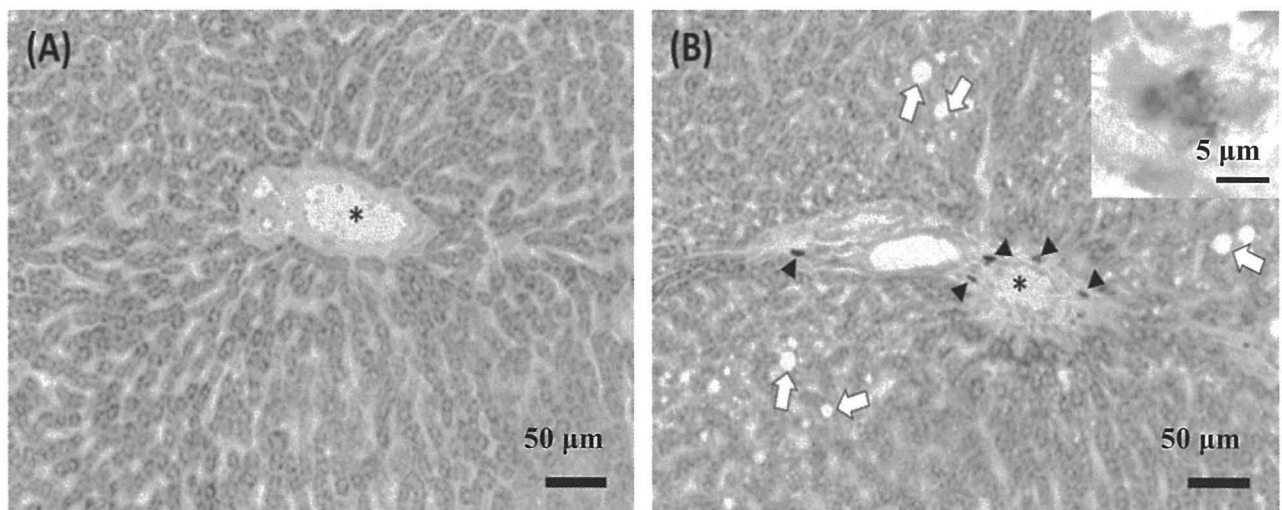


図3 ラットの肝臓においてMg欠乏はマスト細胞を誘導する
 (A) 対照ラット, (B) Mg欠乏ラット。肝臓のトルイジンブルー染色像。Mg欠乏ラット肝臓の門脈(*)の三つ組周囲に多くのマスト細胞(矢頭)が認められたが、対照ラットの肝臓ではマスト細胞は認められなかった。マスト細胞はメタクロマジーを示す顆粒を有していた(挿入図)。また、Mg欠乏ラット肝臓の門脈三つ組付近に脂肪滴と考えられる空胞(矢印)が認められたが、対照ラットの肝臓では空胞は認められなかった。(Takemoto *et al.*, *J Nutr Sci Vitaminol* (2013)²³ 転載)

さらに肝脂肪症から NASH への進展にも関連している可能性が示唆された。

3.2 有機物代謝の変化

ヒト乳腺がん由来細胞では、極度の Mg 欠乏によって細胞内の ATP 不足を介し AMP 活性化プロテインキナーゼの活性化が促進され、グルコース代謝やグルタミン代謝が変化する²⁷⁾。しかし、Mg 欠乏が肝臓における有機物代謝に及ぼす影響に関する研究は少なく、これまでに得られている知見は断片的であった。そこで、われわれは、ラット肝臓における Mg 欠乏による有機物代謝の変化を、GC-MS を用いたメタボローム解析によって探索した。また、肝臓を構成する細胞のモデルを用い、Mg 欠乏が有機物代謝に及ぼす影響も検討した。

メタボローム解析によってラットの肝臓では 105 産物が検出され、Mg 欠乏によって 21 代謝物が増加し、12 代謝物が減少した²⁸⁾。MetaboAnalyst を用いた代謝経路解析では、タウリン・ヒポタウリン代謝 (Fold enrichment, 7.4)、メチオニン代謝 (Fold enrichment, 4.3)、グリシン・セリン・トレオニン代謝 (Fold enrichment, 4.0) が Mg 欠乏の影響を受ける経路として選択された (図 4)。Mg 欠乏によってタウリンに加え、その前駆物質であるヒポタウリンも増加していたことから、肝臓におけるタウリン合成が促進されていることが示唆された。Mg 欠乏ラットの肝臓ではグリシン、セリンとトレオニンが増加したが、 α -ケト酪酸は減少した。トレオニンから α -ケト酪酸を合成する L-トレオニン-3-デヒドロゲナーゼ (EC. 1.1.1.103) の活性は 3-ヒドロキシ酪酸や脂肪酸によって阻害されることが知られている。Mg 欠乏ラットの肝臓ではいくつかの脂肪酸やケトン体が増加していたので、L-トレオニン-3-デヒドロゲナーゼ活性が低

下している可能性がある。Mg 欠乏によって 5'-メチルトチオアデノシンが減少し、プトレシンは減少傾向を示した。また、スベルミジン分解の律速酵素であり、その発現で活性が調節されているスベルミジン/スベルミン N^1 -アセチルトランスフェラーゼ 1 (EC 2.3.1.57) の遺伝子発現は Mg 欠乏によって促進された。スベルミジンは検出されなかったが、Mg 欠乏によってスベルミジン含量も減少している可能性がある。スベルミジンは肝実質細胞のアポトーシスを抑止することが知られている。長期的な Mg 欠乏は肝臓においてアポトーシスを生じる²⁹⁾が、この一因として、スベルミジンの減少が示唆された。

代謝経路解析では影響を及ぼす経路として選択されなかったが、Mg 欠乏ラットの肝臓では、グルコース 6-リン酸、クエン酸回路を構成するクエン酸、フマル酸、リンゴ酸が減少した。肝臓におけるグルコース-6-ホスファターゼ (EC 3.1.3.9) 活性や HepG2 におけるグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.49) 活性が Mg 欠乏によって増加することが報告されており³⁰⁾³¹⁾、Mg 欠乏によるこれら酵素の活性増加が、Mg 欠乏ラットの肝臓中グルコース 6-リン酸を減少させることが示唆された。また、Mg 欠乏時には、肝臓中ミトコンドリアのピルビン酸カルボキシラーゼ (EC 6.4.1.1) 活性が低下すること³²⁾、肝臓のミトコンドリア数が減少することが報告されており³³⁾、Mg 欠乏によるミトコンドリア数の減少と機能の低下が、クエン酸回路を構成する有機酸の減少に関連している可能性がある。

肝臓を構成する細胞のモデルとして HepG2 (肝実質細胞)、RAW264.7 (クッパー細胞) と HUVEC (類洞内皮細胞) を、Mg を含まない培地で培養した³⁴⁾。メタボローム解析と MetaboAnalyst による代謝経路解析によって、Mg 欠乏は HUVEC において最も多様な代謝経路に影響を及ぼすことが示された (表 1)。したがって、Mg 欠乏によって血管内皮細胞では他種の細胞よりも多くの代謝経路が影響を受けることが示された。これら 3 種の細胞では、遊離アミノ酸含量の変化から、Mg 欠乏の影響を受ける代謝経路としてタンパク質合成が選択された。一方、Mg 欠乏による遊離アミノ酸の変化は細胞ごとに異なっており、HepG2 や HUVEC では、いくつかの遊離アミノ酸が Mg 欠乏によって増加したが、RAW264.7 では、逆にいくつかの遊離アミノ酸が減少した。RNA-seq を用いた網羅的遺伝子発現解析によって、Mg 欠乏の HepG2 細胞では、いくつかのプロテアソームサブユニット遺伝子の発現が増加することが示された。プロテアソームサブユニット発現量はプロテアソーム活性を反映していることから、プロテアソーム活性の促進を介したタンパク質分解が Mg 欠乏の HepG2 で生じていることが示唆された。

先に述べたように、ラットの肝臓では、Mg 欠乏がタウリン・ヒポタウリン代謝、メチオニン代謝とグリシン・セリン・トレオニン代謝に影響を及ぼしていたが、これ

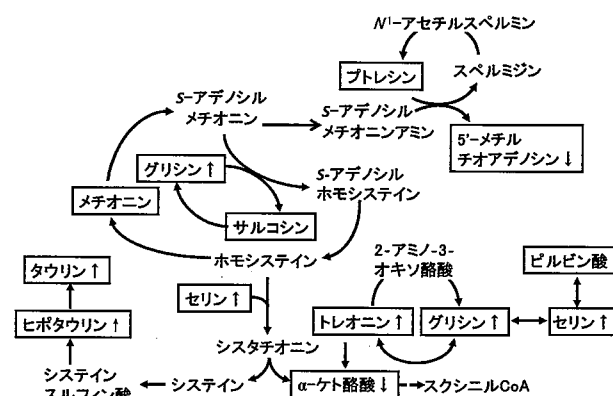


図 4 ラットの肝臓において Mg 欠乏が影響を及ぼす有機物代謝経路

MetaboAnalyst のエンリッチメント解析によって Mg 欠乏の影響を受けた代謝経路として選択されたタウリン・ヒポタウリン代謝、メチオニン代謝とグリシン・セリン・トレオニン代謝を示した。検出された代謝物を四角で囲んだ。上向き矢印は Mg 欠乏によって増加した代謝物を、下向き矢印は Mg 欠乏によって減少した代謝物を示している。(Shigematsu *et al.*, *Br J Nutr* (2016)²⁸⁾ 改変)

表1 肝臓を構成する細胞モデルにおいて Mg 欠乏が影響を及ぼす有機物代謝経路

HepG2	FE	RAW264.7	FE	HUVEC	FE
タンパク質合成	10.8	タンパク質合成	8.1	アラニン代謝	13.1
β-アラニン代謝	7.9	タウリン・ヒポタウリン代謝	7.4	グルタチオン代謝	11.8
ガラクトース代謝	6.2	システイン代謝	6.4	タウリン・ヒポタウリン代謝	11.2
アンモニアリサイクル	5.7	グリシン・セリン・トレオニン代謝	5.0	タンパク質合成	10.3
		アンモニアリサイクル	4.3	システイン代謝	9.8
				リンゴ酸-アスパラギン酸シャトル	9.8
				パントテン酸・CoA 合成	7.8
				グルコース-アラニン回路	6.5
				グリシン・セリン・トレオニン代謝	6.0
				メチオニン代謝	4.9
				糖新生	4.4

肝臓を構成する細胞のモデルとして HepG2 (肝実質細胞), RAW264.7 (クッパー細胞) と HUVEC (類洞内皮細胞) とを, Mg を含まない培地で培養した。MetaboAnalyst のエンリッチメント解析によって Mg 欠乏の影響を受ける有機物代謝経路として選択された経路を示した。FE: fold enrichment。 (Shigematsu *et al.*, *J Nutr Biochem* (2018)³⁴⁾ を基に作成)

ら代謝経路を構成する代謝物は HUVEC でも同様に変化しており, Mg 欠乏に応答する代謝経路として選択された。一方, RAW264.7 でも, タウリン・ヒポタウリン代謝とグリシン・セリン・トレオニン代謝が Mg 欠乏に応答する代謝経路として選択されたが, これら代謝経路を構成する代謝物は肝臓や HUVEC とは逆に変化しており, HepG2 ではこれら代謝経路への影響は認められなかった。肝臓を構成する細胞数の 20% 程度が血管内皮細胞である。Mg 欠乏ラットの肝臓における代謝変化は, 血管内皮細胞における代謝変化を反映している可能性がある。また, Mg 欠乏条件下で培養した RAW264.7 の conditioned medium は HepG2 と HUVEC におけるいくつかの代謝物濃度に影響を及ぼした。さらに, RAW264.7 との共培養時には, HUVEC におけるリポ多糖 (LPS) 誘導性のインターロイキン (IL)-1β と IL-6 の遺伝子発現が Mg 欠乏によって増加した。これらの結果から, Mg 欠乏は肝臓を構成する各細胞の有機物代謝に対して異なる影響を及ぼすとともに, Mg 欠乏への代謝応答は, 細胞間のコミュニケーションの影響を受けることが示唆された。

3.3 金属類代謝の変化

Mg 欠乏が肝臓における金属類濃度に及ぼす影響を検討するため, ICP-MS を用いた網羅的解析を行った³⁵⁾。その結果, 32 種の金属類が検出され, Mg 欠乏によって鉄, 銅, 亜鉛, モリブデン, イットリウム, ジルコニウムが増加すること, スカンジウムとニオブが減少することが明らかになった。この中で, Mg 欠乏によるモリブデン, イットリウム, ジルコニウム, スカンジウムとニオブ濃度の変化は新奇の発見であった。次いで他の器官におけるモリブデン濃度も検討したところ, Mg 欠乏時のモリブデン増加は肝臓特異的であった³⁶⁾。さらに, モリブデンを取り込むとされているモリブデントランスポーター 2 (Mot2) の遺伝子発現が, 肝臓のみで Mg 欠

乏によって低下することが明らかになった。

Mg 欠乏は肝臓中のメタロチオネインの遺伝子とタンパク質の発現, 亜鉛を取り込むトランスポーターである Zip14 の遺伝子発現を促進したが, 他の亜鉛トランスポーター (Zip1, Zip5, ZnT1, ZnT5, ZnT6) の遺伝子発現には影響を及ぼさなかった³⁷⁾ (図 5)。Mg 欠乏によって肝臓で酸化ストレスが生じていたが, 酸化ストレスに応答してメタロチオネイン発現は増加することが知られている。以上の結果から, Mg 欠乏は肝臓における Zip14 発現増加や酸化ストレスを介したメタロチオネイン発現増加によって肝臓中亜鉛を増加させることが示唆された。

鉄過剰に応答した BMP6 シグナルを介してヘプシジン転写が増加し, 鉄吸収が抑制されることで鉄恒常性が維持されている³⁸⁾。われわれは, Mg 欠乏ラットの肝臓では, 鉄の増加にともなって BMP6 遺伝子発現は促進されるが, BMP6 受容体の発現が低下しており, その結果, ヘプシジン発現は変化しないことを明らかにした³⁹⁾ (図 6)。これらの結果から, Mg 欠乏は鉄過剰に対する

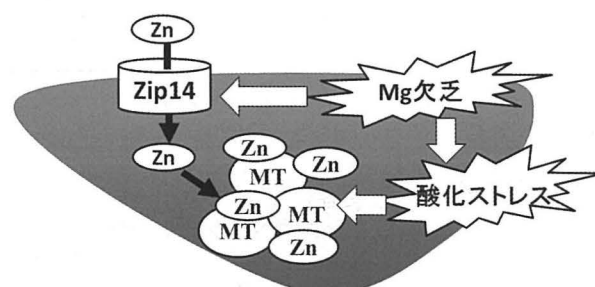


図5 ラットの肝臓において Mg 欠乏が亜鉛濃度を上昇させるメカニズム

Mg 欠乏は亜鉛を取り込むトランスポーターである Zip14 の発現増加と酸化ストレスを介したメタロチオネイン (MT) 発現増加によって肝臓中亜鉛濃度を上昇させる。(Kotani *et al.*, *Br J Nutr* (2013)³⁷⁾ を基に作成)

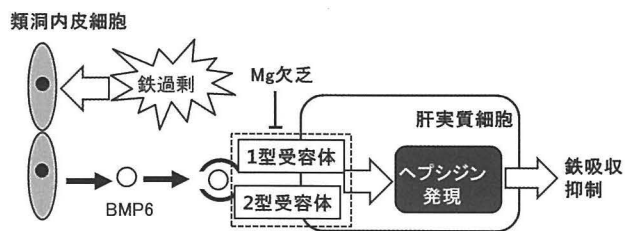


図6 ラットの肝臓において Mg 欠乏がヘプシジン発現に及ぼす影響

鉄過剰は類洞内皮細胞における BMP6 発現を増加し、BMP6 は肝実質細胞の BMP1型/2 型受容体の活性化を介して鉄吸収抑制ホルモンであるヘプシジン発現を増加する。Mg 欠乏時には BMP 受容体発現が抑制されるため、BMP6 発現増加にヘプシジン発現は応答しない。(Ishizaki *et al.*, *Br J Nutr* (2011)³⁹⁾を基に作成)

ヘプシジン発現応答を抑制することによって鉄代謝を攪乱することが示された。

4. ヘプシジン発現による炎症性貧血誘導の分子機構

ヘプシジンは、鉄過剰以外に重度の炎症によっても発現が増加することが知られており、ヘプシジン発現増加が炎症性貧血の病因となる。炎症によるヘプシジン発現増加には IL-6 が関与すると考えられてきたが、IL-6 欠損

マウスでも LPS 投与によって誘導される炎症がヘプシジン発現を増強することから、IL-6 以外の要因も炎症時のヘプシジン発現増加に関連していることが示唆されている⁴⁰⁾。TGF-βファミリーは、TGF-βサブグループ、アクチビンサブグループと BMP サブグループに大別される。これらは固有の受容体複合体を介して遺伝子発現を調節する R-Smad を活性化する。通常、アクチビンと TGF-β は R-Smad として AR-Smad (Smad2 と Smad3) を活性化(リン酸化)する。一方、BMP は R-Smad として BR-Smad (Smad1, Smad5 と Smad8) を活性化(リン酸化)する。われわれは、LPS 処理がマウス肝臓のクッパー細胞や類洞内皮細胞におけるアクチビン B 発現を誘導すること、アクチビン B は通常とは異なり、鉄過剰時に増加する BMP6 と同様に BR-Smad の活性化を介してヘプシジンの発現を増加することを明らかにした⁴¹⁾(図7)。

また、われわれは、LPS 処理がマウス肝臓においてクッパー細胞の IL-1β 発現を誘導すること、IL-1β は肝実質細胞において NF-κB の活性化を介して C/EBPδ の発現を促進し、C/EBPδ がヘプシジン転写を促進することを明らかにした⁴²⁾(図7)。さらに、IL-1β は NF-κB の活性化を介して IL-6 発現も促進することも明らかにしている。

以上の結果から、炎症はアクチビン B や IL-1β 発現を

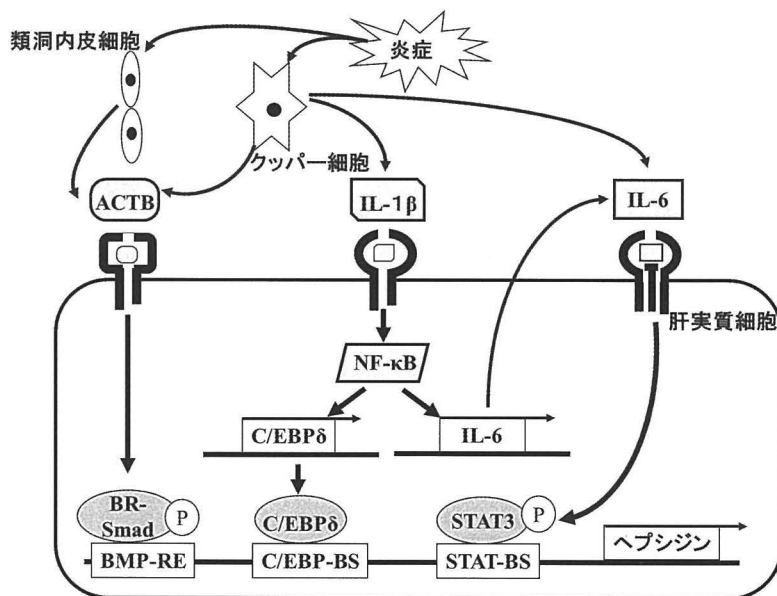


図7 炎症性貧血発症の新たな分子メカニズム
炎症は、類洞内皮細胞とクッパー細胞のアクチビン B (ACTB) 発現とクッパー細胞の IL-1β 発現を促進する。アクチビン B は肝実質細胞の受容体と結合し、BMP 応答性 Smad (BR-Smad) を活性化する。BR-Smad はヘプシジン遺伝子調節領域中の BMP 反応領域 (BMP-RE) と結合し、ヘプシジンの転写を促進する。IL-1β は肝実質細胞の受容体と結合し、NF-κB の活性化を介して C/EBPδ の発現を促進する。C/EBPδ はヘプシジン遺伝子調節領域中の C/EBP 結合領域 (C/EBP-BS) と結合し、ヘプシジンの転写を促進する。また、IL-1β は肝実質細胞において、NF-κB の活性化を介し IL-6 発現を増加させる。IL-6 は STAT3 を活性化し、STAT3 はヘプシジン遺伝子調節領域中の STAT 結合領域 (STAT-BS) と結合し、ヘプシジンの転写を促進する。(Kanamori *et al.*, *J Biol Chem* (2017)⁴²⁾ 改変)

誘導することによってヘプシジン発現を増強することが明らかになり、他の炎症応答とともにこれらがヘプシジン過剰による炎症性貧血の病因であることが示唆された。

5. おわりに

Mg 不足を補うためには、バイオアベイラブルな Mg を多く含む食品を積極的に摂取することが効率的であるが、たとえば、コンブはヨウ素を多く含んでおり、コンブを常食するとヨウ素過剰が危惧される⁷⁾。したがって、バイオアベイラブルな Mg を多く含む食品を組み合わせる摂取することが望まれる。このためには、食品に含まれるバイオアベイラブルな Mg 量を明らかにすることが重要となるが、バイオアベイラビリティ測定には多くの労力を要するので、多様な食品への適用は困難である。有害金属の研究では、その暴露評価に *in vitro* バイオアクセシビリティが用いられている⁴³⁾。現行の *in vitro* バイオアクセシビリティ測定法は Mg に関しては問題があるので測定法を改良し、*in vitro* バイオアクセシビリティをバイオアベイラビリティの指標とすることが可能であろう。Mg 欠乏は、有機物や金属類の代謝に多様な影響を及ぼす。したがって、Mg 不足時の代謝変化に起因する未知の欠乏症があることが予想され、これらを探索することも重要である。また、Mg 栄養状態の鋭敏なバイオマーカーは知られていないが、Mg 欠乏時の代謝変化がバイオマーカー探索の基盤となる。鉄代謝恒常性の中心であるヘプシジンの研究は緒に就いたところであり、分子メカニズムを含めた更なる検討が必要である。今後も、マグネシウムを中心としたミネラル栄養に関する基礎的研究とそれらを基盤とした応用研究の更なる進展が望まれる。

なお、本稿で紹介したわれわれが行った動物実験は、すべて京都大学動物実験委員会または北里大学獣医学部動物実験委員会において承認されたものである。

利益相反

本論文発表内容に関連して申告すべき COI 状態はない。

本稿を終えるに当たり、栄誉ある日本栄養・食糧学会の学会賞を授与されたことにつきまして、選考委員の先生方ならびに関係者の皆様、ご推薦いただきました神戸大学農学研究科芦田均先生に心より御礼申し上げます。本研究は京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻動物栄養科学分野で行われたものです。本研究にご協力いただきました舟場正幸先生、友永省三先生、吉田宗弘先生（関西大学化学生命工学部）、村上賢先生（麻布大学獣医学部）、橋本統先生（北里大学獣医学部）、一緒に研究に取り組んだ動物栄養科学分野の大学院生と学生の皆様に厚く御礼申し上げます。

文 献

- Nielsen FH (2018) Dietary magnesium and chronic disease. *Adv Chronic Kidney Dis* **25**: 230–5.
- Shane SR, Flink EB (1991) Magnesium deficiency in alcohol addiction and withdrawal. *Magnes Trace Elem* **10**: 263–8.
- Deuster PA, Dolev E, Kyle SB, Anderson RA, Schoemaker EB (1987) Magnesium homeostasis during high-intensity anaerobic exercise in men. *J Appl Physiol* **62**: 545–50.
- 西牟田守, 児玉直子, 小野桂子, 松本好史, 寺となみ, 山田英明, 小林修平 (1988) ストレスによる尿中マグネシウム排泄の増大. *マグネシウム* **7**: 123–32.
- Nielsen FH (2010) Magnesium, inflammation, and obesity in chronic disease. *Nutr Rev* **68**: 333–40.
- Wester PO (1987) Magnesium. *Am J Clin Nutr* **45**: 1305–12.
- 厚生労働省 (2016). 「日本人の食事摂取基準 (2015 年版) 策定検討会」報告書. <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/0000041824.html> (2019 年 7 月 12 日閲覧).
- 厚生労働省 (2018). 平成 29 年国民健康・栄養調査報告. https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kenkou/eiyuu/h29-houkoku.html (2019 年 7 月 12 日閲覧).
- 厚生労働省 (2006). 平成 17 年国民健康・栄養調査報告. <https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyuu07/01.html> (2019 年 7 月 12 日閲覧).
- Hata A, Doi Y, Ninomiya T, Mukai N, Hirakawa Y, Hata J, Ozawa M, Uchida K, Shirota T, Kitazono T, Kiyohara Y (2013) Magnesium intake decreases Type 2 diabetes risk through the improvement of insulin resistance and inflammation: the Hisayama Study. *Diabet Med* **30**: 1487–94.
- Fernández-García E, Carvajal-Lérida I, Pérez-Gálvez A (2009) In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr Res* **29**: 751–60.
- Schuchardt JP, Hahn A (2017) Intestinal absorption and factors influencing bioavailability of magnesium—An update. *Curr Nutr Food Sci* **13**: 260–78.
- Coudray C, Rambeau M, Feillet-Coudray C, Gueux E, Tressol JC, Mazur A, Rayssiguier Y (2005) Study of magnesium bioavailability from ten organic and inorganic Mg salts in Mg-depleted rats using a stable isotope approach. *Magnes Res* **18**: 215–23.
- Urbano MG and Goñi I (2002) Bioavailability of nutrients in rats fed on edible seaweeds, Nori (*Porphyra tenera*) and Wakame (*Undaria pinnatifida*), as a source of dietary fibre. *Food Chem* **76**: 281–6.
- Kikunaga S, Miyata Y, Ishibashi G, Koyama F, Tano K (1999) The bioavailability of magnesium from Wakame (*Undaria pinnatifida*) and Hijiki (*Hijikia fusiforme*) and the effect of alginic acid on magnesium utilization of rats. *Plant Foods Hum Nutr* **53**: 265–74.
- Nakamura E, Yokota H, Matsui T (2012) The *in vitro* digestibility and absorption of magnesium in some edible seaweeds. *J Sci Food Agric* **92**: 2305–9.
- Dirksen C, Damgaard M, Bojsen-Møller KN, Jørgensen NB, Kielgast U, Jacobsen SH, Naver LS,

1) Nielsen FH (2018) Dietary magnesium and chronic

- Worm D, Holst JJ, Madsbad S, Hansen DL, Madsen JL (2013) Fast pouch emptying, delayed small intestinal transit, and exaggerated gut hormone responses after Roux-en-Y gastric bypass. *Neurogastroenterol Motil* **25**: 346-e255.
- 18) Verhas M, de la Guéronnière V, Grognet JM, Paternot J, Hermanne A, Van den Winkel P, Gheldof R, Martin P, Fantino M, Rayssiguier Y (2002) Magnesium bioavailability from mineral water. A study in adult men. *Eur J Clin Nutr* **56**: 442-7.
- 19) Sabatier M, Arnaud MJ, Kastenmayer P, Rytz A, Barclay DV (2002) Meal effect on magnesium bioavailability from mineral water in healthy women. *Am J Clin Nutr* **75**: 65-71.
- 20) Nakamura E, Tai H, Uozumi Y, Nakagawa K, Matsui T (2012) Magnesium absorption from mineral water decreases with increasing quantities of magnesium per serving in rats. *Nutr Res* **32**: 59-65.
- 21) Wu L, Zhu X, Fan L, Kabagambe EK, Song Y, Tao M, Zhong X, Hou L, Shrubsole MJ, Liu J, Dai Q (2017) Magnesium intake and mortality due to liver diseases: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey Cohort. *Sci Rep* **7**: 17913.
- 22) Vormann J, Günther T, Höllriegel V, Schumann K (1995) Effect of various degrees and duration of magnesium deficiency on lipid peroxidation and mineral metabolism in rats. *J Nutr Biochem* **6**: 681-8.
- 23) Takemoto S, Yamamoto A, Tomonaga S, Funaba M, Matsui T (2013) Magnesium deficiency induces the emergence of mast cells in the liver of rats. *J Nutr Sci Vitaminol* **59**: 560-3.
- 24) Nassir F, Mazur A, Giannoni F, Gueux E, Davidson NO, Rayssiguier Y (1995) Magnesium deficiency modulates hepatic lipogenesis and apolipoprotein gene expression in the rat. *Biochim Biophys Acta* **1257**: 125-32.
- 25) Rodríguez-Hernández H, Gonzalez JL, Rodríguez-Morán M, Guerrero-Romero F (2005) Hypomagnesemia, insulin resistance, and non-alcoholic steatohepatitis in obese subjects. *Arch Med Res* **36**: 362-6.
- 26) Takai S, Jin D (2018) Chymase inhibitor as a novel therapeutic agent for non-alcoholic steatohepatitis. *Front Pharmacol* **9**: 144.
- 27) Hardy S, Kostantin E, Wang SJ, Hristova T, Galicia-Vázquez G, Baranov PV, Pelletier J, Tremblay ML (2019) Magnesium-sensitive upstream ORF controls PRL phosphatase expression to mediate energy metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**: 2925-34.
- 28) Shigematsu M, Nakagawa R, Tomonaga S, Funaba M, Matsui T (2016) Fluctuations in metabolite content in the liver of magnesium-deficient rats. *Br J Nutr* **116**: 1694-9.
- 29) Martin H, Uring-Lambert B, Adrian M, Lahlou A, Bonet A, Demougeot C, Devaux S, Laurant P, Richert L, Berthelot A (2008) Effects of long-term dietary intake of magnesium on oxidative stress, apoptosis and ageing in rat liver. *Magn Res* **21**: 124-30.
- 30) Barfell A, Crumbly A, Romani A (2011) Enhanced glucose 6-phosphatase activity in liver of rats exposed to Mg²⁺-deficient diet. *Arch Biochem Biophys* **509**: 157-63.
- 31) Voma C, Barfell A, Croniger C, Romani A (2014) Reduced cellular Mg²⁺ content enhances hexose 6-phosphate dehydrogenase activity and expression in HepG2 and HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys* **548**: 11-9.
- 32) Kimura M, Ujihara M, Yokoi K (1996) Tissue manganese levels and liver pyruvate carboxylase activity in magnesium-deficient rats. *Biol Trace Elem Res* **52**: 171-9.
- 33) George GA, Heaton FW (1975) Changes in cellular composition during magnesium deficiency. *Biochem J* **152**: 609-15.
- 34) Shigematsu M, Tomonaga S, Shimokawa F, Murakami M, Imamura T, Matsui T, Funaba M (2018) Regulatory responses of hepatocytes, macrophages and vascular endothelial cells to magnesium deficiency. *J Nutr Biochem* **56**: 35-47.
- 35) Kim KH, Funaba M, Yoshida M, Matsui T (2013) The effects of magnesium deficiency on molybdenum metabolism in rats. *Biol Trace Elem Res* **151**: 100-4.
- 36) Kim KH, Ishizaki N, Iguchi E, Funaba M, Matsui T (2011) Effect of magnesium deficiency on various mineral concentrations in rat liver. *Biol Trace Elem Res* **144**: 865-71.
- 37) Kotani M, Kim KH, Ishizaki N, Funaba M, Matsui T (2013) Magnesium and calcium deficiencies additively increase zinc concentrations and metallothionein expression in the rat liver. *Br J Nutr* **109**: 425-32.
- 38) Meynard D, Babitt JL, Lin HY (2014) The liver: conductor of systemic iron balance. *Blood* **123**: 168-176.
- 39) Ishizaki N, Kotani M, Funaba M, Matsui T (2011) Hecpudin expression in the liver of rats fed a magnesium-deficient diet. *Br J Nutr* **106**: 1169-72.
- 40) Lee P, Peng H, Gelbart T, Beutler E (2004) The IL-6- and lipopolysaccharide-induced transcription of hepcidin in HFE-, transferrin receptor 2-, and β_2 -microglobulin-deficient hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 9263-5.
- 41) Kanamori Y, Sugiyama M, Hashimoto O, Murakami M, Matsui T, Funaba M (2016) Regulation of hepcidin expression by inflammation-induced activin B. *Sci Rep* **6**: 38702.
- 42) Kanamori Y, Murakami M, Sugiyama M, Hashimoto O, Matsui T, Funaba M (2017) Interleukin-1 β (IL-1 β) transcriptionally activates hepcidin by inducing CCAAT enhancer-binding protein δ (C/EBP δ) expression in hepatocytes. *J Biol Chem* **292**: 10275-87.
- 43) Zhuang P, Li Y, Zou B, Su F, Zhang C, Mo H, Li Z (2016) Oral bioaccessibility and human exposure assessment of cadmium and lead in market vegetables in the Pearl River Delta, South China. *Environ Sci Pollut Res Int* **23**: 24402-10.

J Jpn Soc Nutr Food Sci 72: 211-219 (2019)

Review

Basic Studies of Mineral Nutrition Centered on Magnesium

(JSNFS Award for Excellence in Research (2019))

Tohru Matsui^{*,1}

(Received July 29, 2019; Accepted August 9, 2019)

Summary: Magnesium (Mg) deficiency is an actual dietary problem in developed countries including Japan. We have studied mineral nutrition centered on Mg using laboratory animals and cultured cells. We evaluated Mg absorption from marine algae and drinking water, and the results indicated that the forms of soluble Mg and sojourn time of Mg in the digestive tract affected Mg absorption. Mg deficiency induced the appearance of mast cells in the liver, a phenomenon that has been linked to the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. Comprehensive and non-targeted analysis of metabolites clarified that Mg deficiency disturbs some aspects of metabolism in both the liver and hepatic cell models. Comprehensive and targeted analysis of metals indicated that Mg deficiency affected the hepatic concentration of 8 metals including molybdenum. Mg deficiency increased the hepatic zinc concentration through increased expression of the zinc transporter (Zip14) and metallothionein genes. Mg deficiency increased the hepatic iron concentration by the unresponsive expression of hepcidin gene as a result of BMP signal blunting. Activin B and interleukin-1 β enhanced the expression of hepcidin, which is probably one aspect of the pathogenesis of inflammatory anemia.

Key words: magnesium, metabolomics, metallomics, rat, cell culture

* Corresponding author (matsui@kais.kyoto-u.ac.jp)

¹ Laboratory of Nutritional Science of Animals, Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kitashirakawa oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan