

マグネシウムは、小胞体ストレス応答に関与する 海洋深層水中の重要な物質と思われる

Magnesium is estimated to be a key component of deep ocean water related to endoplasmic reticulum stress response

山田勝久・柴田雄次

Katsuhisa Yamada and Yuji Shibata

Abstract

Eukaryotic cells cause endoplasmic reticulum (ER) stress when the eukaryote is exposed to environmental stress. Previous research suggested that deep ocean water (DOW) improved the decreased function of ER via ER stress response. However, the key component of DOW that affects ER stress response is unknown. In this study, budding yeast cells and normal human fibroblasts (NHF) were used to clarify the effective components of DOW. DOW activated ER stress response induced by temperature stress to the yeast. Among four major minerals in DOW, we focused on magnesium (Mg) in this study. Mg accelerated the recovery from the decreased function of yeast metabolism caused by ER stress. Furthermore, Mg suppressed not only the progress of apoptosis as an ER stress response induced by treatment with the oxidative stress to NHF, but also the degradation of collagen. Interestingly, this result suggested a possibility that the degradation of collagen through the treatment of the oxidative stress relates to ER stress response. This study shows that Mg is estimated to be major key element of DOW in the recovery process from the ER stress of eukaryotic cells.

Key Words: apoptosis, budding yeast, endoplasmic reticulum stress, fibroblast, magnesium

要 旨

真核生物が環境ストレスを受けると、その細胞内では小胞体 (ER) ストレス応答が起こる。これまでの研究は、海洋深層水 (DOW) がERストレス応答を介してER機能の低下を改善することを示した。しかし、DOW中のERストレス応答に関与する成分については不明であった。本研究では、DOWのその成分を解明するために、出芽酵母と正常ヒト線維芽細胞 (NHF) を用いた。DOWは出芽酵母の温度ストレス負荷で誘導されるERストレス応答を活性化した。DOWには4種の主要なミネラルが含まれるが、本研究でわれわれは、マグネシウム (Mg) に着目した。Mgは、ERストレスによる出芽酵母の代謝能低下からの回復を促進した。さらにMgは、NHFに対する酸化ストレス処理で誘発されるERストレス応答としてのアポトーシスの進行を抑制しただけでなく、コラーゲンの分解も抑制した。興味深いことに、この結果は、酸化ストレス負荷によるコラーゲンの分解が、ERストレスに関係している可能性を示した。本研究は、真核細胞のERストレスからの回復過程に関与する海洋深層水の主たる物質がマグネシウムであることを示唆する。

キーワード: アポトーシス, 出芽酵母, 小胞体ストレス, 線維芽細胞, マグネシウム

1. 緒 言

小胞体 (Endoplasmic reticulum, ER) ストレスは、脳虚血疾患、糖尿病、神経変性疾患、心臓疾患、動脈硬化症の発症と進展など多くの疾患との関連がわかっており (Yoshida, 2007), ER ストレス応答に関する研究はヒトの健康に大きく寄与するものと期待されている。ER ストレスは生活環境由来のストレス負荷により惹起されるが、ER ストレス応答により改善される。ER ストレス応答は、Unfolded protein response (UPR) が主たる機構である。UPR は、分子シャペロンによる ER 機能の改善をはじめ、改善が困難と判断された ER の排除はオートファジーで、改善が不可能な細胞の排除はアポトーシスという一連の応答機構がある (Szegezdi *et al.*, 2006)。われわれはこれまで、紫外線照射や人為的にカルシウム/マグネシウムバランスを失調させた培地により培養線維芽細胞に環境ストレスを負荷すると、カルシウム集積による石灰化現象が発現することを報告した。さらにこれらの石灰化現象を海洋深層水 (Deep ocean water, DOW) が抑制することを報告した (山田ら, 2016; 山田ら, 2017)。なお、動脈硬化の背景となる血管の石灰化では、線維芽細胞同様に間葉系細胞から分化した血管平滑筋細胞のアポトーシスが深く関与しているが、このアポトーシスは ER ストレス応答機構が関与している (塩井, 2020)。われわれは、血管平滑筋細胞の石灰化を DOW が抑制することを確認し (野村ら, 2020)、その作用機序として DOW が ER ストレス応答機構に作用していることを報告した (山本ら, 2022; 山田ら, 2023)。しかし、その作用成分については未解明であった。

そこで本研究では、環境ストレス負荷で惹起する ER ストレス応答機構に作用する DOW 中の主要成分について検討することを目的とした。

2. 材料と方法

2.1 材料

2.1.1 出芽酵母

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* NBRC104081, 独

立行政法人製品評価技術基盤機構, 供試菌) を予め YPD 培地 (Yeast extract: 1%, Peptone: 2%, D-glucose: 2%, いずれも (w/v)%) で培養 (27°C, 5 日間) して、以降の試験に供した。

2.1.2 培養線維芽細胞

正常ヒト線維芽細胞 (NB1RGB; RCG0222, 理化学研究所バイオリソース研究センター, 供試細胞) を播種 (1.25×10^5 個/穴, 24 穴プレート) し、10% 牛胎仔血清 (FBS) 含有 α -MEM 培地で馴化培養 (6 日間, 2 回培地交換, 37°C, 5% CO₂) して、以降の試験に供した。

2.2 環境ストレス負荷による ER ストレス応答

2.2.1 供試菌に対する温度ストレスの負荷

2.1.1 項の供試菌の培養液 (OD₆₆₀: 約 0.7/200 μ L, 96 穴プレート) を恒温槽内 (40°C, 24 時間) に静置して温度ストレスを負荷し、ER ストレスを惹起させた (Morano *et al.*, 2012)。

2.2.2 供試細胞に対する酸化ストレスの負荷

2.1.2 項で馴化した供試細胞の培地を除去してダルベッコ変法 PBS (-) (DPBS) で洗浄 (0.5 mL/穴, 2 回) した後、1.6 mM 過酸化水素 (H₂O₂) 含有 DPBS を 0.5 mL/穴となるように加えたのち恒温槽内 (37°C, 5% CO₂, 1 時間) に静置して、ER ストレスが惹起することが知られている酸化ストレス (Zeeshan *et al.*, 2016) を負荷した。

2.3 試料の添加と培養

2.3.1 供試菌の海水添加培養

10, 20 および 30% (v/v) 海洋深層水 (DOW) 添加 YPD20 培地 (Yeast extract: 1%, Peptone: 2%, D-glucose: 20%, いずれも (w/v)%) を調製し、これに 2.2.1 項で ER ストレスを惹起させた供試菌を接種 (10 μ L/10 mL) して 27°C で培養した。DOW の代わりに表面海水 (SSW) で同様に調製した培地を比較対照とし、これらの海水の代わりに精製水で調製した培地を陰性対照とした。

2.3.2 供試菌の Mg 未含人工 DOW ミネラル組成液添加培養

Table 1 の DOW のミネラル組成を参考にして、それに含まれる Na, K, Ca および Mg の 4 つの主要ミ

Table 1 Characteristics of the concentrations of major mineral elements in SSW, DOW and ED mineral water

Mineral element	Concentration (mM)		
	SSW	DOW	ED mineral water
Na	393.5	426.7	22.8
K	9.3	10.3	0.2
Mg	46.5	50.2	50.2
Ca	8.7	9.8	7.2
Cl	491.8	533.3	119.0

The analysis of major minerals was conducted by ICP analysis in the DOW factory of the Akazawa onsen village after each sample water collected in the sea area of Izu-Akazawa in July 2022.

ネラル成分のうち、Mgを除いた人工DOWミネラル組成液をNaCl（試薬特級、富士フィルム和光）、KCl（試薬特級、富士フィルム和光）およびCaCl₂（試薬特級、富士フィルム和光）を用いて調製し、これを10%添加して調製したYPD20培地に、2.2.1項と同様に操作してERストレスを惹起させた供試菌を接種（10 μL/10 mL）し、27℃による培養4日目の代謝能について、同様に操作した10%DOWおよびSSW添加YPD20培地による代謝能と比較した。

2.3.3 供試菌のMg添加培養

塩化マグネシウム（MgCl₂・6H₂O、試薬特級、以後Mg）を用いて、2.5、5および10 mM Mg添加のYPD20培地を調製し、これに2.2.1項でERストレスを惹起させた供試菌を接種（10 μL/5 mL）して27℃で培養した。Mgの代わりに精製水で調製した培地を対照とした。

2.3.4 供試細胞のMg添加培養

2.2.2項でERストレスを負荷した供試細胞を5 mM Mg添加の5%FBS含有Eagle's MEM培地で1晩培養した（37℃、5%CO₂）。5 mM Mgの代わりに0.1 mM 4-Phenylbutyric acid（4-PBA、試薬特級）を添加した培地を陽性対照、精製水を添加した培地を陰性対照として検討した。

2.4 ERストレス応答

2.4.1 供試菌のERストレス応答（代謝量変動）

2.3.2項および2.3.3項の培養における供試菌のグルコースの代謝によるアルコール産生に伴う培養液重量変動（田中、1941）を代謝量の指標として計測した。

2.4.2 供試細胞のERストレス応答（アポトーシス進行）

2.3.4項で培養した供試細胞の培地を除去後、DPBSで洗浄（0.5 mL/穴、2回）し、冷メタノール（1 mL/穴）で固定した。酸化ストレス負荷による影響として、細胞の形態を位相差顕微鏡（CKX41、オリンパス）で観察した。タンパク質の酸化程度は、カルボニル化タンパク質の生成をFTCZ染色法（Fujita *et al.*, 2007）で観察した。またERストレス応答として、アポトーシスの状態をAnnexin V-FITCアポトーシス検出キット（Van Engeland M. *et al.*, 1996；Casciola-Rosen *et al.*, 1996、ナカライテスク）で染色して蛍光顕微鏡（CKX41、蛍光光源：U-RFLT50、オリンパス）を用いて観察した。供試細胞の機能に及ぼす影響は、産生されて供試細胞の周辺に沈着したコラーゲンをコラーゲンステイン法（López-de León and Rojkind, 1985；コスモバイオ）により染色して位相差顕微鏡で観察した。

2.5 統計処理

本研究では、実験データは平均値±標準偏差で表し、二群の母集団間の差異の検定にはStudent's *t*-testによる解析、また三群以上の母集団間の差異の検定には、Tukeyによる多重解析により有意差を判定した。

3. 結果

3.1 供試菌のERストレス応答

YPD20培地で培養した温度ストレス負荷供試菌の代謝量（Fig. 1, Solid line）は、全期間を通してストレス未負荷（Fig. 1, Dashed line）に比して低値を示したが、培養4日目以後の代謝量の増加速度（直線の傾き、代謝能）は、温度ストレス未負荷と同程度まで回復を示した。

温度ストレス負荷供試菌の培養における海水添加の影響について、代謝能低下が認められた培養3日目の代謝量で比較したところ、10%DOW添加（Fig. 2A, b）にのみ、海水無添加（Fig. 2A, a）に比して有意に高値を示した。一方10%SSW添加（Fig. 2A, e）で

は有意差はないが、海水無添加 (Fig. 2A, a) と同等以上の代謝量がみられた。しかし20および30%のDOW添加 (Fig. 2A, cおよびd) ならびに20% SSW添加 (Fig. 2A, f) には海水無添加 (Fig. 2A, a) の代謝量との間に差異はみられず、30%SSW添加 (Fig. 2A, g) では海水無添加および10-30%DOW添加の代謝量よりも低値を示した。さらに海水添加培養でみられた温度ストレス負荷供試菌の代謝量の回復は、海水中の4種の主要ミネラルからMgを除いて

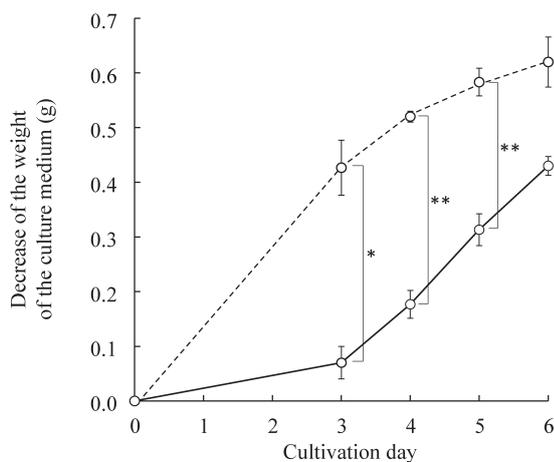


Fig. 1 Effect of the temperature stress on the yeast metabolism

The test yeast was cultured with YPD20 medium at 27°C for 6 days after the treatment of temperature stress (-○-: without the treatment, —○—: with the treatment). Asterisks indicate a significant difference between with and without of the temperature stress ($n=3$, mean \pm SD, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, Student's t -test).

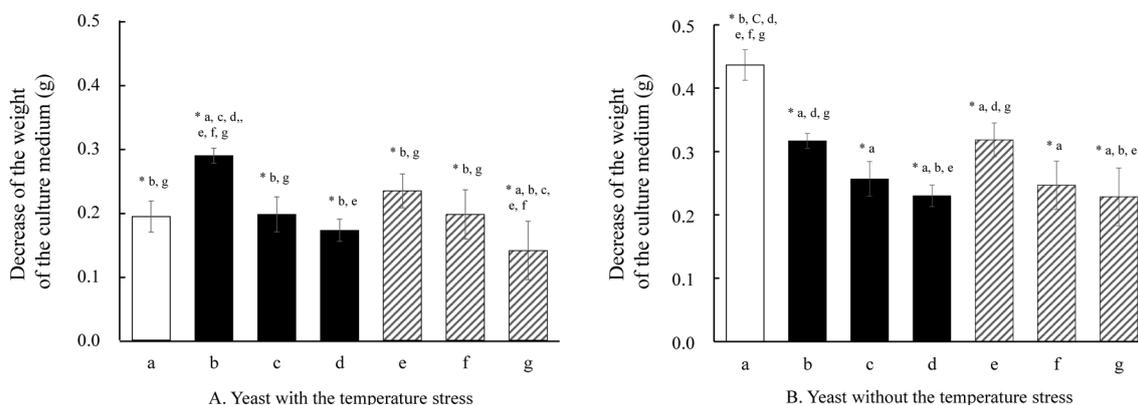


Fig. 2 Supplementation effect of seawater on the test yeast metabolism with and without the treatment of temperature stress

The test yeast was cultured with YPD20 medium at 27°C for 3 days after the treatment of temperature stress. Figures indicate the supplementation effect of seawater on the metabolic ability of the test yeast with the treatment (Fig. 2A) and without the treatment (Fig. 2B). Open columns indicate the test yeast metabolic ability without the supplementation of seawater. Closed columns indicate the metabolic ability with DOW supplementation in the following concentrations, b: 10%, c: 20%, d: 30%. Hatched columns indicate the metabolic ability with SSW supplementation in the following concentrations, e: 10%, f: 20%, g: 30%. Asterisks indicate a significant difference between each alphabet ($n=6$, mean \pm SD, * $p<0.05$, Tukey test, ANOVA).

調製した人工DOWミネラル組成液にはみられなかった (Fig. 3).

次にMgが温度ストレス負荷により低下する供試菌の代謝能 (Fig. 4, —○—: 試料無添加) に及ぼす影響を検討した結果, Mgには用量依存的な代謝能回復促進作用がみられた (Fig. 4, —●—: 2.5 mM Mg添加; —▲—: 5 mM Mg添加; —◆—: 10 mM Mg添加). 特に10 mM Mg添加では, 培養4日目には温度ストレス未負荷供試菌の代謝量 (Fig. 4, —○—) に追い付くほど顕著な代謝能回復作用を示した.

3.2 供試細胞のERストレス応答

酸化ストレスを負荷して1晩培養後の供試細胞の形態 (Fig. 5B) は, 未負荷 (Fig. 5A) に比べて委縮していた. この委縮現象は, 5 mM Mg添加培養 (Fig. 5C) でも改善はみられなかった. また供試細胞に対する酸化ストレスの負荷により, 未負荷供試細胞 (Fig. 6A) にはみられない細胞内タンパク質のカルボニル化が確認された (Fig. 6B). このタンパク質のカルボニル化現象は, 5 mM Mg添加培養で改善されず (Fig. 6C), 0.1 mM 4-PBA添加培養でも改善されなかった (Fig. 6D).

次にアポトーシス状態の検討では, 酸化ストレス未負荷供試細胞にはAnnexin V-FITC染色 (Fig. 7A) およびPropidium iodide (PI) 染色 (Fig. 7E) による発

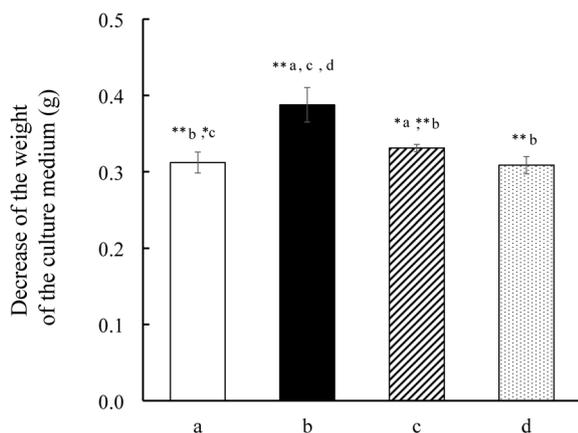


Fig. 3 Effect of three kinds of supplied seawater on the recovery of yeast metabolism

After the treatment, test yeast was cultured with YPD20 medium containing 10% of each seawater for 4 days. Open column indicates the yeast metabolism without any supplementation (a). Closed column indicates the yeast metabolism with DOW supplementation (b). Diagonal lined column indicates the yeast metabolism with SSW supplementation (c). Dotted column indicates the yeast metabolism with supplementation of the synthetic DOW mineral liquid lacking Mg (d). Asterisks indicate a significant difference between following groups: a vs. b; a vs. c; a vs. d; b vs. c; b vs. d; c vs. d ($n=6$, mean \pm SD, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, Tukey test, ANOVA).

色はみられなかったが、酸化ストレス負荷供試細胞ではAnnexin V-FITC染色 (Fig. 7B) およびPI染色 (Fig. 7F) による発色が共に明瞭に出現したことから、アポトーシスの進行が確認された。一方、5 mM Mg添加培養の供試細胞ではAnnexin V-FITC染色 (Fig. 7C) およびPI染色の発色 (Fig. 7G) が褪色し、アポトーシスの進行が抑制されたことを示唆した。また陽性対照の0.1 mM 4-PBA添加培養では、Annexin V-FITC染色 (Fig. 7D) およびPI染色 (Fig. 7H) による発色が殆ど消失した。

次に酸化ストレス未負荷供試細胞の1晩培養では、供試細胞周辺に産生したコラーゲンが普遍的にみられたが (Fig. 8A, Dark black part), 酸化ストレス負荷供試細胞では周辺のコラーゲンは殆ど消失していた (Fig. 8B)。一方、5 mM Mg添加培地による酸化ストレス負荷供試細胞の培養では、供試細胞周辺のコラーゲンは維持されていた (Fig. 8C, Dark black part)。また、同時に検討した0.1 mM 4-PBA添加培養でもMg添加と同様に、供試細胞周辺のコラーゲンは維持されていた (Fig. 8D, Dark black part)。

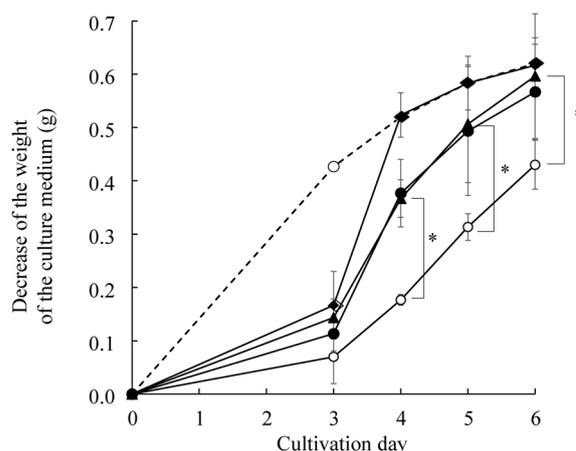


Fig. 4 Supplementation effect of Mg on the test yeast metabolism decreased by the treatment of temperature stress

The test yeast was cultured with YPD20 medium including various concentrations of Mg at 27°C for 6 days after the treatment of temperature stress (-○-: without the treatment, —○—: without any supplementation after the treatment, —●—: 2.5 mM Mg supplementation after the treatment, —▲—: 5 mM Mg supplementation after the treatment, —◆—: 10 mM Mg supplementation after the treatment). Asterisks indicate a significant difference between with and without the supplementation of 5 mM Mg in the yeast treated with the temperature stress ($n=3$, mean \pm SD, * $p<0.05$, Student's t -test).

4. 考 察

近年、多くの疾病の根底には、ERストレスの存在が知られている (小見田ら, 2013)。ERは、脂質やステロイドの合成、タンパク質の折りたたみや成熟化、カルシウム貯蔵および解毒を担う細胞小器官であるが、環境ストレス負荷により不良タンパク質が蓄積するとERストレスを惹起する (遠山・今泉, 2008)。これに対してER内では、新規タンパク質の合成抑制、分子シャペロンによるタンパク質の折りたたみ直し、さらに不良タンパク質の分解等、ERストレス応答が活性化されてERの機能改善が図られる。しかしそれでも改善が困難と判断された細胞ではアポトーシスが誘導され、その進行に伴い組織から排除される (浦野, 2004)。アポトーシスにより多くの細胞が組織から排除されると、機能不全に陥り疾病発症の原因となる。

これまでの研究において、アポトーシスに起因する細胞の石灰化をDOWが抑制することを報告した (山田ら, 2016; 野村ら, 2020)。DOWのアポトーシ

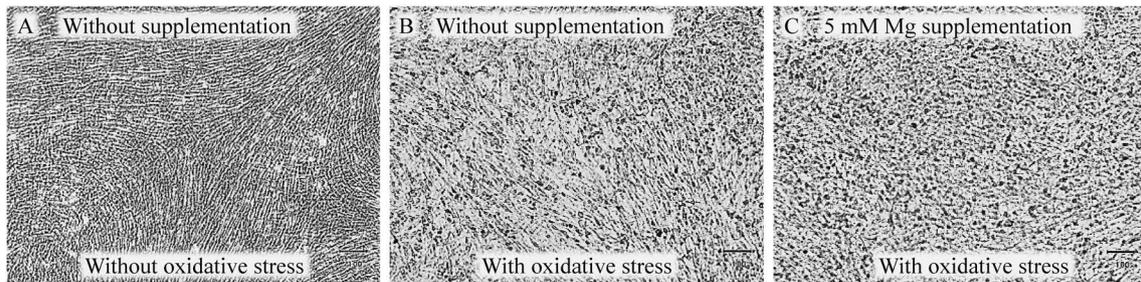
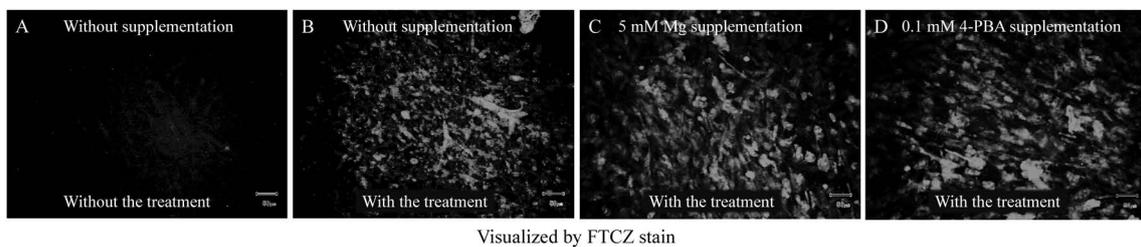


Fig. 5 Cell morphology changes of fibroblasts by the treatment of oxidative stress and the supplementation effect of Mg

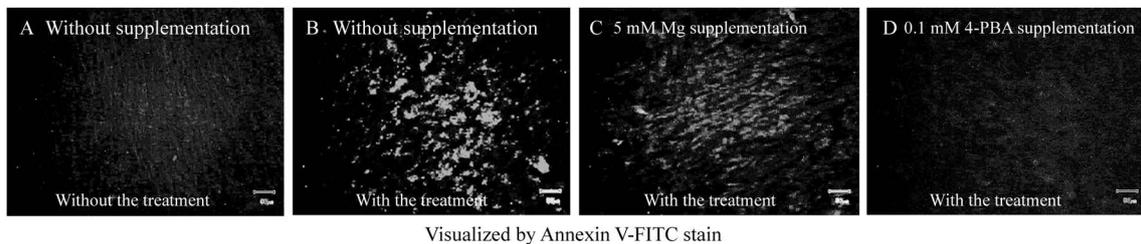
The test cells were cultured with Eagle's MEM containing 5% FBS for overnight after the treatment of oxidative stress. The test cells were cultured without the treatment (A), with the medium not supplied anything after the treatment (B), and with the medium supplied 5 mM Mg after the treatment (C).



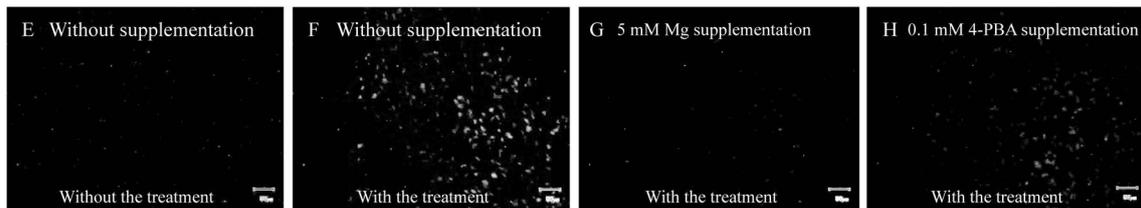
Visualized by FTCZ stain

Fig. 6 Supplementation effect of Mg and the chemical chaperone on the carbonylation of proteins in fibroblasts. The test cells were cultured with Eagle's MEM containing 5% FBS for overnight after the treatment of oxidative stress

The carbonylation of proteins in the test cells were visualized by FTCZ stain method using the fluorescence microscope. The test cells were cultured without the treatment (A), with the medium not supplied anything after the treatment (B), with the medium supplied 5 mM Mg after the treatment (C), and with the medium supplied 0.1 mM 4-PBA after the treatment (D).



Visualized by Annexin V-FITC stain



Visualized by PI stain

Fig. 7 Supplementation effect of Mg and the chemical chaperone on the progress of apoptosis in fibroblasts

The test cells were cultured with Eagle's MEM containing 5% FBS for overnight after the treatment of oxidative stress. The progress of apoptosis in the test cells was visualized by Annexin V-FITC (A to D) and PI (E to H) stain method using the fluorescence microscope. The test cells were cultured without the treatment (A, E), with the medium not supplied anything after the treatment (B, F), with the medium supplied 5 mM Mg after the treatment (C, G), and with the medium supplied 0.1 mM 4-PBA after the treatment (D, H).

ス抑制機序については、ERストレス応答機構におけるアポトーシスの実行因子であるカスパーゼ3遺伝子 (CASP3) の発現およびその活性抑制を確認しているが (山本ら, 2022), その作用物質について

は未解明であった。そこで本研究では、真核生物のモデル細胞として供試菌を用い、ERストレス応答 (Morano *et al.*, 2012) の指標として代謝能の変化について検討したところ、温度ストレス負荷供試菌の

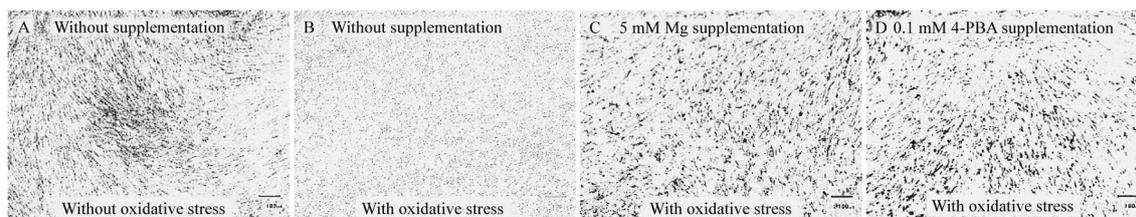


Fig. 8 Supplementation effect of Mg on the disappearance of collagen of fibroblasts induced by the treatment of oxidative stress

The test cells were cultured with Eagle's MEM containing 5% FBS for overnight after the treatment. Collagen produced by the test cells were visualized by the collagen stain method. Dark black parts indicate collagen protein. The test cells were cultured without the treatment (A), with the medium not supplied anything after the treatment (B), with the medium supplied 5 mM Mg after the treatment (C), and with the medium supplied 0.1 mM 4-PBA after the treatment (D).

代謝能は一時的に低下したが、その後の培養継続に伴って回復した。これは温度ストレス負荷で低下した供試菌のER機能が、ERストレス応答を介して改善された結果と考えられる。ERストレスにより顕著な代謝能低下が認められた培養3日目において、10% DOW添加培養は代謝能回復促進作用を示した。しかし、10%以上のDOW添加濃度ではその作用はみられなかった。供試菌への温度ストレス負荷の有無にかかわらず、海水の添加は濃度に依存して供試菌の代謝能が低下していることから、海水の添加濃度に伴う浸透圧上昇の影響により代謝能を抑制したものと推察される。また海水に含まれるNa, K, CaおよびMgの4つの主要ミネラルのうち、Mgを除いて調製した人工海水を10%添加したYPD20培地に温度ストレスを負荷した供試菌を接種して培養しても代謝能回復促進作用がみられなかったことから、代謝能回復促進作用には海水中のMgの影響が大きいことがわかる。本研究に供したDOWとSSW中のMg含有量を単純に比較すると、Mgの含量はDOWの方が高い (Table 1)。これはMg含量だけでなく、他の3種のミネラル含量もDOWに比べてSSWは低値を示している。SSWはDOWとは異なり、陸水の影響を受けて希釈されやすい。したがってDOWとSSWの間にみられた代謝能回復促進作用の差異は、両海水中のMg含量の相違に起因すると考えられる。

そこでER機能改善作用成分としてDOWに含まれるMgについて検討した。これまでのDOWの電気透析 (Electric dialysis; ED) 処理で1価イオンを削減したEDミネラル水にも石灰化抑制作用が認められ

たことから (山田ら, 2021), DOW中に含まれる4種のミネラルの中でER機能改善作用成分としてMgの可能性を推察していた (Table 1)。Mgは生体内で300種にもおよぶ酵素の補因子であり、その摂取不足は様々な疾病要因となることが知られているが (Elin, 1988), ERストレス応答におけるMgの機能についての報告はみられない。本研究で供試菌のERストレス応答におよぼすMgの影響を検討した結果、顕著な代謝能回復促進作用が認められた。

次に酸化ストレス負荷供試細胞のERストレス応答について検討した。酸化ストレスを負荷後1晩培養した供試細胞の形態は委縮し、酸化変性したカルボニル化タンパク質が普遍的にみられた。これらは、Mgやケミカルシャペロンの4-PBAを添加しても改善はみられなかった。また酸化ストレス負荷後1晩培養した供試細胞には、進行段階のアポトーシスが確認されたが、Mgやケミカルシャペロンの4-PBAの添加培養により、進行段階のアポトーシスは初期段階に改善された。このことは、MgがERストレス応答に関与している可能性を示唆しており、その機序は単純な抗酸化作用によるものではないと推察される。また酸化ストレス負荷した供試細胞周囲のコラーゲンが1晩の培養期間中に消失したことは、慢性的な創傷部位ではコラーゲンを分解するマトリックスメタロプロテアーゼ群 (MMPs) の活性を抑制因子 (Tissue inhibitors of MMPs, TIMPs) が減少してMMPsが活性化することが知られていることから (Bullen *et al.*, 1995), これと同様にTIMPsが減少し、相対的に活性化したMMPsによって分解された可能性がある。本研究で酸化ダメージを直接抑

制しなかったMgやケミカルシャペロンが、コラーゲンの消失を抑制したことは興味深い現象である。なお現時点では、情報が不十分ゆえにその作用機序に関する詳細な考察は避けるが、酸化ストレス負荷からコラーゲンの消失に至る過程でERストレス応答が関与している可能性が考えられる。これについては、今後検討すべき新しい課題としたい。

本研究の結果、環境ストレス負荷に伴うERストレス応答において、Mgはケミカルシャペロン同様に、低下したER機能の改善に関与すると考えられる。このことは、MgがERストレス応答に関与するDOW中の重要な成分であることを示唆している。

参考文献

- Bullen E. C., Longaker M. T., Updike D. L., Benton R., Ladin D., Hou A. and E. W. Howard (1995) Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is decreased and activated gelatinase are increased in chronic wounds. *Soc. Invest. Derm.*, 104, 236-240.
- Casciola-Rosen, L., A. Rosen, M. Petri and M. Schliessel (1996) Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: Implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 1624-1629.
- Elin, R. J. (1988) Magnesium metabolism in health and disease. *Dis. Mon.*, 34, 161-218.
- Fujita H., Hirao T. and M. Takahashi (2007) A simple and non-invasive visualization for assessment of carbonylated protein in the stratum corneum. *Skin Res. Technol.*, 13, 84-90.
- López-De León, A. and M. Rojkind (1985) A simple micro-method for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J. Histochem. Cytochem.*, 33, 737-743.
- Morano, K. A., C. M. Grant and W. Scott Moye-Rowley (2012) The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190, 1157-1195.
- 野村道康・柴田雄次・山本 樹・山田勝久・竿本新太郎・武田隆久・木村美恵子 (2020) 大動脈由来平滑筋細胞の石灰化に対する海洋深層水の抑制効果. *マグネシウム*, 38, 5-10.
- 小見田真理・奥山陽太・神 久予・磯野史朗・青江知彦 (2013) 小胞体ストレスと疾患. *千葉医学*, 89, 87-94.
- 塩井 淳 (2020) 血管石灰化の発症機構. *大阪市医学会雑誌*, 69, 15-22.
- Szegezdi, E., S. E. Logue, A. M. Gorman and A. Samali (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.*, 7, 880-885.
- 田中正三・埴 雅壽・茂野悠一 (1941) 酵母の生化学的研究 (第二報). *日本化学会誌*, 62, 1081-1088.
- 遠山正彌・今泉和則 (2008) ERストレス. *血管医学*, 9, 325-330.
- 浦野文彦 (2004) 小胞体ストレス伝達システム. *化学と生物*, 42, 178-182.
- Van Engeland, M., F. C. Ramaekers, B. Schutte and C. P. Reutelingsperger (1996) A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry*, 24, 131-139.
- 山田勝久・鈴木正宏・野村道康・柴田雄次・今田千秋 (2016) 海洋深層水はCa/Mg比の増加による正常ヒト線維芽細胞の石灰化を抑制する. *海洋深層水研究*, 17, 1-8.
- 山田勝久・柴田雄次・野村道康・今田千秋 (2017) UVA照射により誘導される正常ヒト線維芽細胞の石灰化に対する海洋深層水の抑制効果. *海洋深層水研究*, 18, 1-7.
- 山田勝久・柴田雄次・山本 樹・野村道康 (2021) 正常ヒト由来線維芽細胞の石灰化に対する電気透析海洋深層水とアルカリフォスファターゼ活性阻害剤の相乗的抑制効果. *海洋深層水研究*, 22, 29-37.
- 山田勝久・柴田雄次 (2023) UVA照射で惹起される正常ヒト由来線維芽細胞の小胞体ストレスからのアポトーシス誘導と海洋深層水の添加効果. *海洋深層水研究*, 23, 95-103.
- 山本 樹・柴田雄次・野村道康・山田勝久 (2022) UVA照射で生じる培養ヒト皮膚由来線維芽細胞の石灰化機序と石灰化に対する海洋深層水の抑制作用に関する初期検討. *日本香粧会誌*, 46, 121-128.
- Yoshida, H. (2007) ER stress and diseases. *FEBS J.*, 274, 630-658.
- Zeeshan, H. M. A., G. H. Lee, H. R. Kim and H. J. Chae. (2016) Endoplasmic reticulum stress and associated ROS. *Int. J. Mol. Sci.*, 17, 327.

(2024年2月5日受付；2024年3月15日受理)