

Mg²⁺トランスポーターMagEx2 と高血圧

船戸 洋佑, 三木 裕明

大阪大学微生物病研究所

概要 食塩感受性(本態性)高血圧は、心臓や脳血管などにおける致死的な疾患と密接に関わっているが、その具体的な原因はいまだによく分かっていない。一方で、高血圧に関するゲノムワイド関連解析(GWAS)が近年行われており、関連する遺伝子がいくつか報告されてきている。その中でも、複数のグループによる解析結果で共通してトップランクに挙がってくる遺伝子の一つに *MagEx2* があり、高血圧との密接な関わりが示唆されている。

我々は細胞内 Mg²⁺の排出に関わる膜蛋白質 *MagEx* の解析に携わり、腸から生体内へのマグネシウムの吸収に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。また上述の *MagEx2* が *MagEx* ファミリーの一員であり、培養細胞レベルで *MagEx* と同様の Mg²⁺ 排出能を有していることを確認した。*MagEx2* は生体内におけるマグネシウムの再吸収に関わる、腎臓の遠位尿細管に強く発現している。これらの実験結果などから *MagEx2* がマグネシウムの再吸収に寄与していることが想起されたため、*MagEx2* の遺伝子ノックアウトマウスを作出した。ホモ欠損マウスは胎生致死であったため、ヘテロ欠損マウスで解析を行った結果、実際にマグネシウムの再吸収不全を確認すると共に、血圧が有意に低下していることが明らかとなった。さらに *Six2-Cre* マウスとの交配により *MagEx2* を腎臓で特異的に欠損するマウスを作出したところ、同様にマグネシウムの再吸収不全と血圧の低下が観察された。これらの結果より、*MagEx2* が腎臓でマグネシウム再吸収と血圧調節に働くことが明らかとなった。

さらに、野生型および腎臓特異的 *MagEx2* 欠損マウスの腎臓サンプルを用いたウェスタンブロットを行ったが、*MagEx2* が高発現する遠位尿細管で血圧調節に働く、食塩再吸収トランスポーターNCC の発現量やリン酸化レベルに明確な差は認められなかった。DNA チップを用いたトランスクリプトーム解析を行ったところ、複数の遺伝子の発現が腎臓特異的 *MagEx2* 欠損マウスで変動しており、中には血圧調節との関連が指摘されている遺伝子も見受けられた。したがって、*MagEx2* はこれらの遺伝子の発現調節を介して血圧の調節を行っている可能性が考えられ、今後より詳細な解析を行うことで新しい血圧調節が明らかになるものと期待される。

1. 研究目的

マグネシウムは必須ミネラルの一つである。哺乳類の細胞内において、マグネシウムの大半は DNA や蛋白質、ATP などに結合した状態で存在しており、ATP の産生や分解を含む、数多くの酵素反応に必須の役割を果たしている^(1,2)。個体レベルでは、ヒトの血中マグネシウム濃度は通常 0.7–1 mM の間に保たれており、この範囲を外れると低あるいは高マグネシウム血症と診断される。特に、けいれんや不整脈などの症状を誘発する低マグネシウム血症の患者数は多く、全入院患者の 1 割以上が低マグネシウ

ム血症と診断されたという報告もある⁽³⁾。また大規模な疫学的調査の結果から、古くよりマグネシウムの摂取量とがんや高血圧、各種精神疾患など、さまざまな疾患とが関わっていると指摘されてきた。しかし、マグネシウム恒常性の破綻がこれらの病気と関わる、その具体的な仕組みは全くわかっていない。

個体レベルでのマグネシウム恒常性は、腸からの吸収、そして腎臓からの再吸収によって維持されている。また、いずれの臓器においても、隣り合った上皮細胞の間から Mg²⁺を通す経路と、上皮細胞の内部に一度 Mg²⁺を取り込

み、その後生体側へと排出することで輸送する経路の2つが存在する。このようなマグネシウムの吸収・再吸収の仕組みを実際に担う分子群は、さまざまな家族性低マグネシウム血症患者の遺伝子解析から明らかとなってきた。

高カルシウム尿症と腎石灰化を伴う家族性低マグネシウム血症 (familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis, FHHNC) の原因遺伝子 *CLDN16*、*CLDN19* は、それぞれ密着結合を形成する蛋白質 claudin-16/paracellin-1 および claudin-19 をコードしている^(4,5)。この2つの分子は腎臓のヘンレ係蹄の太い上行脚に高発現しており、隣り合った上皮細胞同士の間を陽イオン透過性のチャネルを形成することで、細胞と細胞の間より Mg^{2+} を通している。また、transient receptor potential – melastatin subfamily (TRPM) 6 は Mg^{2+} 透過性の陽イオンチャネルであるが、*TRPM6* 遺伝子の変異が二次性低カルシウム血症を伴う低マグネシウム血症 (hypomagnesemia with secondary hypocalcemia, HSH) の患者で見つかっている^(6,7)。この TRPM6 とファミリー分子 TRPM7 は、腸上皮および腎臓遠位尿細管細胞の頂端部 (内腔側) から細胞内へ Mg^{2+} を取り込むことで、細胞の内部を通す Mg^{2+} 吸収経路の起点となっている⁽⁸⁻¹¹⁾。さらにこの Mg^{2+} を体腔側へ運ぶためには、上皮細胞の基側部 (生体側) に局在する Mg^{2+} 排出分子の存在が不可欠と古くより考えられてきた。しかし、その分子実体は長らく不明のままであった。

当研究室では元来がんの悪性化に関わる研究を行っており、その一環で当時機能不明であった膜蛋白質 Magnesium Exporting Protein (MagEx) ががん悪性化に重要であることを発見した⁽¹²⁾。この MagEx の機能をライブイメージング実験などによって調べた結果、MagEx は Na^+/Mg^{2+} 交換体として働くことで Mg^{2+} を細胞外へと排出することを明らかにしている⁽¹³⁾。さらに MagEx の生体内における役割を明らかにするべく、その発現パターンを調べたところ、腸に強く発現しており、また腸上皮細胞の基側部に局在していた (Fig. 1)。MagEx の遺伝子欠損マウスを作出したところ、ホモ欠損型のマウスにおいて腸からの Mg^{2+} 吸収効率が低下しており、血中 Mg^{2+} 濃度も有意に低下していることが明らかとなった。これらの実験結果より、MagEx がこれまで不明であった、腸上皮細胞の基側部から Mg^{2+} を排出し、体腔へと送り込む分子であることが明らかとなった。

哺乳類では MagEx と似たドメイン構造をしているファミリー分子 (MagEx2, 3, 4) が存在している⁽¹⁴⁾。私たちは培養細胞を用いたライブイメージング実験の結果、少なくとも MagEx2 は MagEx と同様の Mg^{2+} 排出能をもつことを明らかにした⁽¹⁵⁾。また、MagEx2 の発現パターンを調べた結果、既報どおり生体内におけるマグネシウムの再吸収に関わる、腎臓の遠位尿細管の基側部に強く発現していることを見つけている⁽¹⁶⁾。これらの実験結果より、MagEx2 が腸上皮細胞における MagEx と同様に、基側部から Mg^{2+} を排出することで体腔へと送り込む役割を果たしており、腎臓でのマグネシウムの再吸収に寄与していることが想起された。

MagEx2 はマグネシウム再吸収以外にも、高血圧との関わりが指摘されている。食塩感受性 (本態性) 高血圧は、心臓や脳血管などにおける致命的な疾患と密接に関わっていることが広く知られている。また、患者数も多く、古くから研究されているものの、その具体的な原因はいまだによく分かっていない。一方、近年のゲノム解析技術の進歩に伴い、高血圧のような複数の要因が関わると想定される疾患を遺伝学的に調べることが可能となってきている。特に、大規模集団からのサンプルにおける遺伝子多型をゲノムワイドで調べることで疾患と関連する遺伝子領域を絞り込む、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) は高血圧に関して盛んに行われている。その中でも、複数のグループによる解析結果で共通してトップランクに挙がってくる遺伝子の一つが MagEx2 であり、高血圧との密接な関わりが示唆された⁽¹⁷⁾。

これらの予備的な知見より、MagEx2 がマグネシウムの再吸収、および血圧調節に関わっている可能性が考えられたので、われわれは MagEx2 の遺伝子欠損マウスを作出し、その解析に取り組むこととした。

2. 研究方法

2.1 マウス

MagEx2 の遺伝子欠損マウスの作成は下記の方法で行った (Fig. 1 参照)。まず C57BL6 マウス由来の胚性幹 (ES) 細胞にターゲティングベクターを導入し、相同性組換えを起こした ES 細胞をサザンプロット法により選別した。この ES 細胞を用いてキメラマウス、そして MagEx2 の floxed アレルをもつマウスを作出した。さらに、全身で Cre リコンビ

ナーゼを発現する CAG-Cre マウス(大阪大学・岡部博士より供与⁽¹⁸⁾)を掛け合わせることで MagEx2 の欠損アレルをもつ、MagEx2 遺伝子欠損マウスを得た。また腎臓特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Six2-Cre マウス⁽¹⁹⁾はジャクソン研究所より購入しており、floxed マウスとの掛け合わせにより腎臓特異的な MagEx2 の欠損マウスを得ている。

2.2 抗体

抗 MagEx2 ウサギポリクローナル抗体は大腸菌を用いて発現、精製した MagEx2 カルボキシル末端部(アミノ酸番号 608-876)の His タグ付きリコンビナント蛋白質をウサギに免疫し、得られた血清を MagEx2 カルボキシル末端部(アミノ酸番号 486-876)の GST タグ付き組換え蛋白質でアフィニティー精製することで得た。抗 NCC モルモットポリクローナル抗体(蛍光組織染色用)は内田信一博士(東京医科歯科大学)に供与していただいた。また、抗

NCC ウサギポリクローナル抗体(ウェスタンブロット用)はミリポアより、抗リン酸化 NCC ヒツジポリクローナル抗体は University of Dundee よりそれぞれ購入した。

2.3 元素定量

マウスの血液は、下行大動脈より採取した。また尿や糞は代謝ケージ(日本クレア)を用いて採取している。キシリジブルーを用いたマグネシウムの比色定量にはマグネシウム B-テストワコー(和光純薬)を使用した。また各種元素の定量は ICPS-8100(島津製作所)を用いた誘導結合プラズマ発光分光(ICP-OES)法により行った。

2.4 血圧測定

マウスの血圧測定は過去の報告に倣い⁽²⁰⁾、非観血血圧測定装置 BP-98A(ソフトロン)を用いて行った。2ヶ月齢のマウスを保定器に入れ、38°Cで保温することにより尾動脈への血流を増加させた後、尾にカフプローブをはめて測定した。

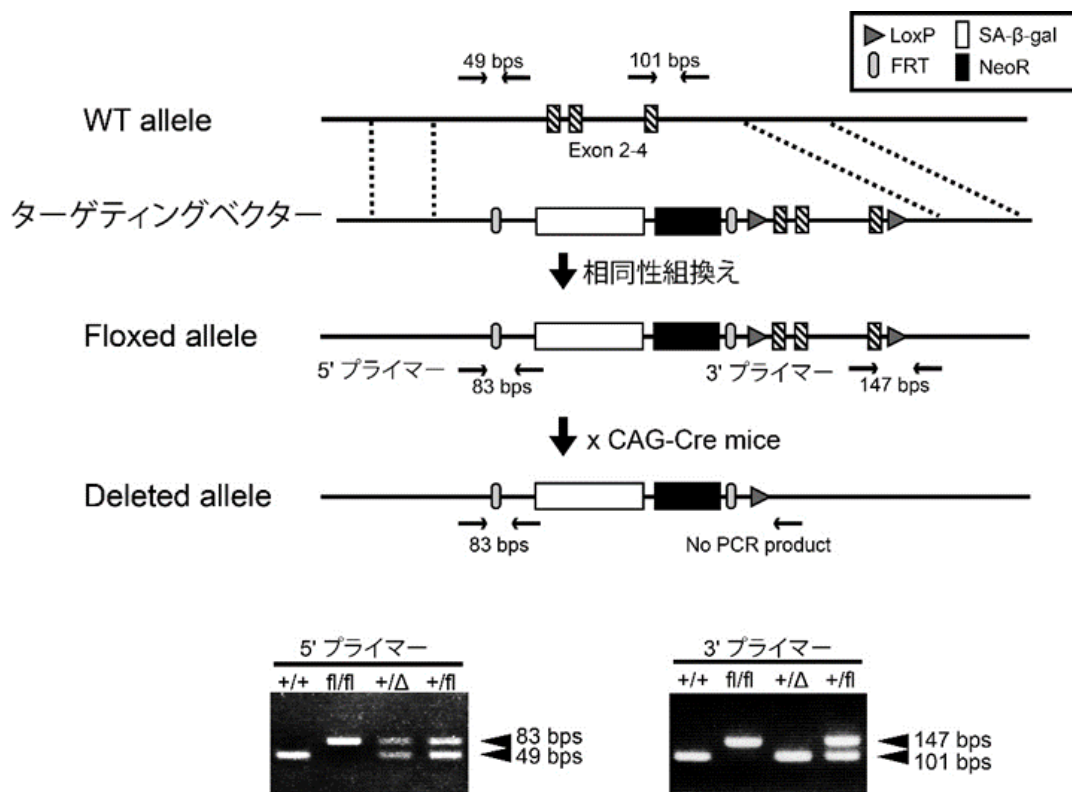


Fig. 1. MagEx2 遺伝子改変マウスの設計図

まず、相同性組換えにより MagEx2 遺伝子の第 2-4 エクソンをはさむように LoxP サイトおよびネオマイシン耐性カセット(NeoR)などを導入した、floxed allele を作成した。その後、CAG-Cre マウスとの交配によって第 2-4 エクソンを欠く、deleted allele を作成している。各々の allele が正しくできていることを各系統のマウス由来のゲノムを鋳型とした PCR によって確認している(図下部)。

2.5 マイクロアレイ解析

2ヶ月齢の Six2-Cre; *MagEx2*^{+/+} および Six2-Cre; *MagEx2*^{fl/fl} マウスの腎臓を採取し、RNeasy extraction kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。その後、以前の解析に倣って⁽²¹⁾ Cy-3 あるいは Cy-5 でラベルした cRNA をハイブリダイズさせた。双方の場合においてシグナルに明確な差が見受けられた遺伝子 ($p < 0.1$ で2倍より大きいあるいは0.5倍より小さい) をリストに掲載している。

2.6 組織染色

胎生 18.5 日目の *MagEx2*^{+/+} および *MagEx2*^{Δ/Δ} マウスを OCT compound (サクラファインテック) 中に包埋し、その後クライオスタット CM1900 (ライカ) を用いて厚さ 10 μm の切片を作成した。サンプルを 2% パラホルムアルデヒド/PBS で固定した後、ブロッキング操作として 2% スキムミルク / 0.3% Triton X-100/PBS (PBS-MT) 中で1時間インキュベートを2度行った。その後、PBS-MT に希釈した1次抗体中で4℃、一晩インキュベートした。PBS-MT で洗浄後、PBS-MT に希釈した2次抗体中で4℃、一晩インキュベートを行い、再度 PBS-MT で洗浄した後にカバーガラスを載せ、封入した。観察にはレーザー走査型共焦点顕微鏡 FV1000 (オリンパス) を使用している。

3. 研究結果

3.1 *MagEx2* 遺伝子欠損マウスの作出

我々は *MagEx2* の個体レベルでの機能を明らかにするべく、*MagEx2* の遺伝子欠損マウスを作出した。Fig. 1 に示すように、まず *MagEx2* の遺伝子座に LoxP サイトを挿入した floxed allele をもつ組換え ES 細胞を作成し、この細胞を用いてキメラ、そしてヘテロ改変マウスを作出した。引き続き、全身で Cre リコンビナーゼを発現する CAG-Cre マウスと交配を行い、deleted allele をもつ *MagEx2* 欠損マウスを作出した。ホモ欠損個体は胎生期で致死となることが判明したため、まずヘテロ欠損マウスで解析を行うこととした。また *MagEx2* を高発現し、かつマグネシウムの再吸収を行う腎臓 (Fig. 2) での特異的欠損マウスも作成した。このマウスは腎臓で Cre リコンビナーゼを発現する Six2-Cre マウスと *MagEx2* の floxed マウスとの掛け合わせにより作出し、解析に供している。

3.2 *MagEx2* は腎臓でマグネシウムの再吸収に働く

MagEx2 が生体でのマグネシウム恒常性に寄与しているかどうか、明らかにするべく、まず野生型と *MagEx2* ヘテロ欠損マウスの比較を行った。両系統より採取した血液中のマグネシウム量を、Mg²⁺ とキレート錯体を作ることで吸

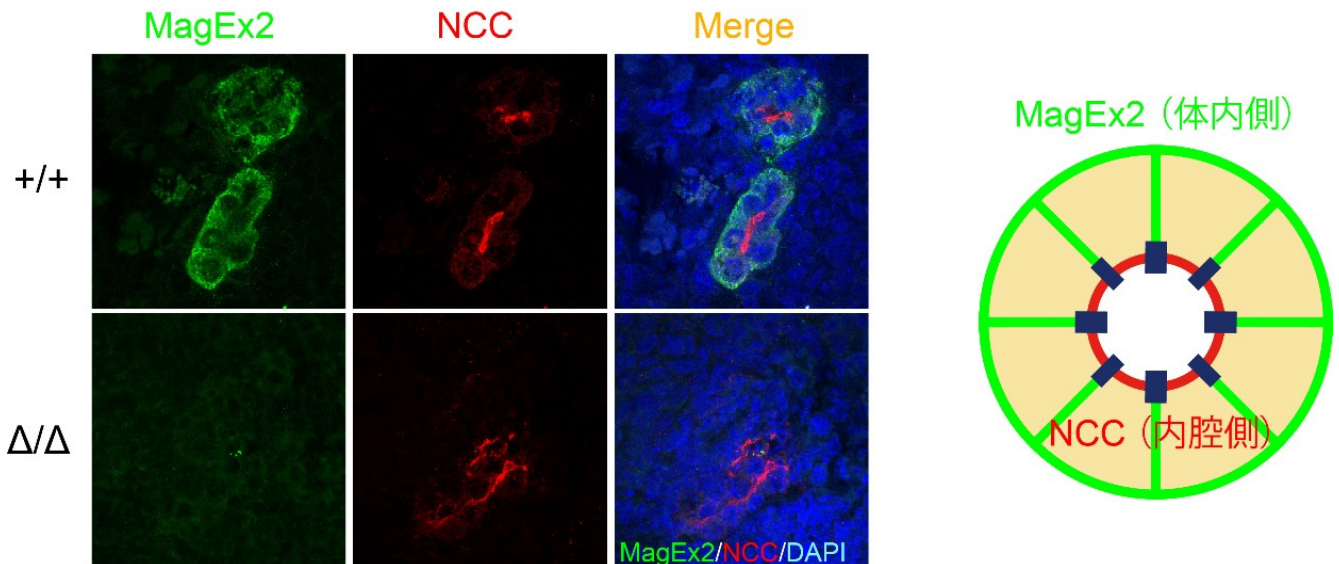


Fig. 2. *MagEx2* の発現

胎生 18.5 日の胎児の腎臓切片を作成し、抗 *MagEx2* 抗体を用いて蛍光組織染色を行った。右模式図にも示すように、*MagEx2* は遠位尿細管の頂端部 (尿細管内腔側) に発現している NCC と同じ細胞の反対側に発現していた。

光スペクトルの変わる、キシリジブルーを用いて測ったところ、ヘテロ欠損マウスでは血中のマグネシウム量が有意に低下していた (Fig. 3)。次に代謝ケージを用いて尿、糞を集め、そのマグネシウム量を測ることにした。もし両系統のマウス間でマグネシウムの再吸収に差がない場合、ヘテロ欠損マウスの尿中マグネシウム量は血中マグネシウム量と同様に低下していることが想定される。しかし、尿中のマグネシウム量について、両系統の間に明確な差は認められなかった。つまり、*MagEx2* ヘテロ欠損マウスでは

マグネシウムの再吸収が弱まった結果、血中のマグネシウム量から想定される量よりも多くマグネシウムが尿へと排出されるようになっていた。糞中のマグネシウム量や摂食量については *MagEx2* のヘテロ欠損による明確な差異はなく、マグネシウムの吸収には大きな変化がないことが明らかとなった。また、血中および尿中の他の元素量を ICP-OES 法により測定したところ、測定したナトリウム、カルシウムおよびカリウムについては両系統の間に有意な差は認められなかった。

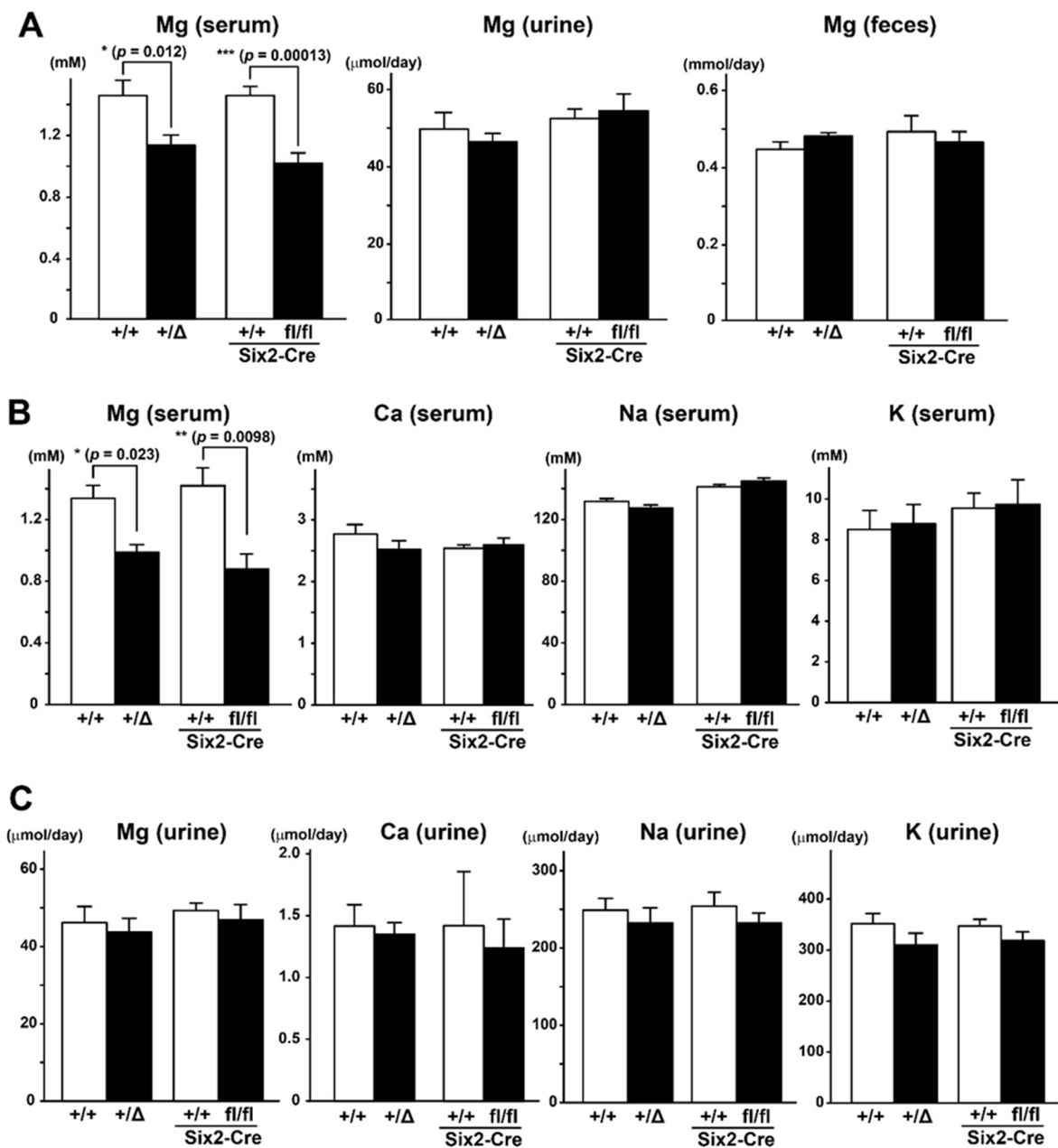


Fig. 3. *MagEx2* はマグネシウムの再吸収に重要である

各系統のマウスより血液、尿および糞を採取し、キシリジブルーを用いてマグネシウム量を測定した。

次に、腎臓での MagEx2 が実際にマグネシウム再吸収に重要であることを確認するため、腎臓特異的な MagEx2 欠損マウスでの解析を行った。実際にこのマウスの腎臓と脳での MagEx2 の発現をウェスタンブロット法により調べたところ、腎臓でのみ MagEx2 の発現がほぼ消失していることを確認している。この腎臓特異的な MagEx2 欠損マウスを用いて血中、尿中、および糞中のマグネシウム量を測ったところ、全身で MagEx2 をヘテロ欠損するマウスと同様に、血中のマグネシウム量のみが有意に減少しており、やはりマグネシウムの再吸収が低下していることが明らかとなった (Fig. 3)。また、ICP-OES 解析の結果、血中や尿中における測定した他の元素の量に明確な差異はなかった。これらの実験結果より、MagEx2 は腎臓での再吸収が低下したことにより、尿中へのマグネシウム排泄が多くなり、その結果血中マグネシウム濃度が低下したと考えられた。

3.3 MagEx2 は血圧調節に重要である

次に、MagEx2 の関与の可能性が指摘されている、血圧について調べることにした。まず野生型および MagEx2 ヘテロ欠損マウスを対象として、tail cuff 法 (血圧センサーを尾に巻き、圧力をかけて血圧を測定する非観血測定法の一つ) により血圧を測定した。その結果、MagEx2 ヘテロ欠損マウスでは血圧が低下しており、特に拡張期血圧は 10% 程度の明確な低下が認められた (Fig. 4)。さらに腎臓特異的な MagEx2 欠損マウスを用いて解析を行った結果、やはり血圧が低下しており、拡張期血圧についてより明確な差があった。これらの実験結果より、腎臓の MagEx2 が血圧調節に重要な働きを担っていることが明らかとなっ

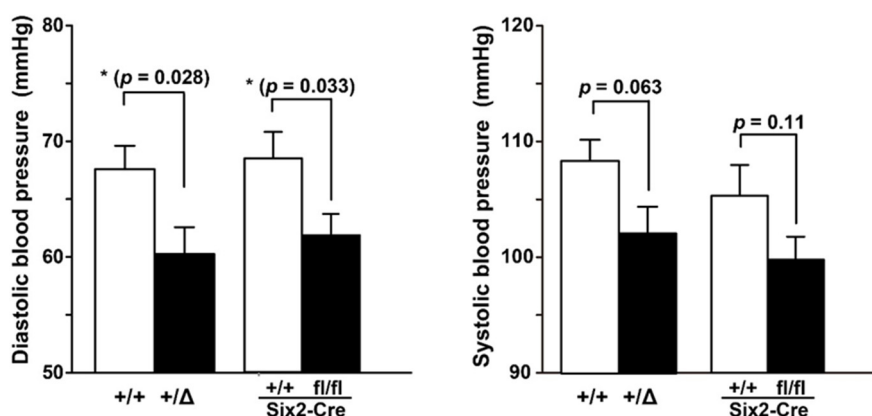


Fig. 4. MagEx2 欠損マウスの血圧

各系統のマウスを用いて、tail cuff 法により血圧を測定した。MagEx2 の欠損により血圧が低下しており、特に拡張期血圧 (左) で有意な差が見受けられた。

た。

3.4 MagEx2 遺伝子欠損マウスの腎臓

MagEx2 の高発現している腎臓遠位尿細管は食塩再吸収が盛んに行われており、食塩再吸収トランスポーター NCC が発現している。実際に、NCC の阻害剤であるサイアザイドは降圧、利尿薬としてよく用いられている。NCC の機能は自身の発現量や膜局在のほか、SPAK や OSR などによるリン酸化によって調節されている。そこで、野生型および腎臓特異的な MagEx2 欠損マウスの腎臓を取り出し、その発現とリン酸化レベルをウェスタンブロット法により解析した。意外なことに、腎臓特異的な MagEx2 欠損マウスの腎臓において NCC の発現量やリン酸化レベルは野生型と比較して明確な差が見受けられなかった (Fig. 5)。したがって、MagEx2 の欠損による血圧低下には、これまで知られている NCC の制御とは異なる仕組みが働いている可能性が示唆された。

MagEx2 の欠損により血圧が低下する、その仕組みを探るため、野生型および腎臓特異的な MagEx2 欠損マウスの腎臓より RNA を抽出し、マイクロアレイによる発現解析を行った。その結果、MagEx2 の欠損により発現が変動している遺伝子が多数確認され、MagEx2 の発現している遠位尿細管での発現が報告されている遺伝子や、血圧調節との関わりが指摘されている遺伝子も含まれていた (Table 1)。これらの遺伝子の発現変動により、MagEx2 欠損マウスでは血圧が低下していた可能性が大いに考えられる。

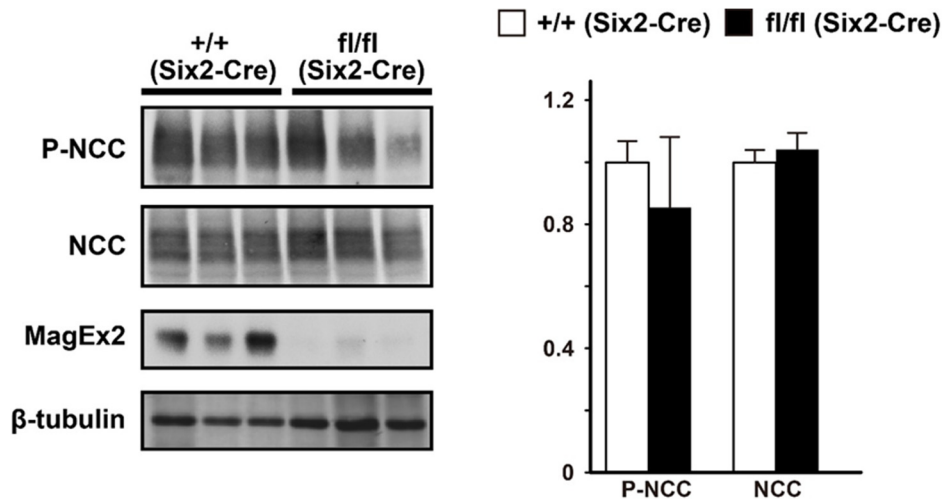


Fig. 5. *MagEx2* 欠損マウスにおける NCC の発現およびリン酸化
各系統のマウスの腎臓を採取し、その組織抽出液を用いてウェスタンブロットを行った。右はデンシトメトリーによる定量結果である。両系統で NCC の発現量およびリン酸化レベルに明確な差異は認められなかった。

Table 1. *MagEx2* 欠損マウス腎臓での遺伝子発現の変動

Up			Down		
fold	p value	Gene	fold	p value	Gene
6.394	0.046	Cldn11	-6.364	0.051	MagEx2
5.002	0.016	Slc14a2	-4.472	0.062	Pvalb
4.109	0.066	Pde4d	-3.768	0.099	Cmtm4
3.834	0.026	Aldh1a3	-2.730	0.030	Mapk8
3.379	0.050	Gcnt3	-2.648	0.077	Trpm6
2.872	0.090	Tal2	-2.430	0.002	Grin2c
2.812	0.091	Gm567	-2.292	0.049	Olf1372-ps1
2.758	0.049	1810037I17Rik	-2.106	0.096	B020031M17Rik
2.724	0.026	AA467197	-2.012	0.054	Sdad1
2.467	0.029	Crif1			
2.446	0.015	Calml3			
2.445	0.081	Gulo			
2.401	0.067	Akr1b3			
2.389	0.074	Adh6a			
2.234	0.006	Fgb			
2.203	0.043	Ndr4			
2.126	0.026	R3hdml			
2.091	0.014	Lamb3			
2.024	0.012	Gm3916			

Six2-Cre; *MagEx2*^{+/+} および Six2-Cre; *MagEx2*^{fl/fl} マウスの腎臓を採取し、マイクロアレイ解析によって遺伝子の発現を比較した。Six2-Cre; *MagEx2*^{fl/fl} マウスで発現が 2 倍より大きいあるいは 0.5 倍より小さく、*p* 値が 0.1 未満のものをリストに掲載している。

4. 考 察

本研究により *MagEx2* が腎臓におけるマグネシウムの再吸収、そして血圧調節に重要であることが明らかとなった。我々は腸からの細胞内部を経由するマグネシウムの吸収にファミリー分子 *MagEx* が重要であることを以前明ら

かにしており⁽¹³⁾、今回の結果と併せて、ようやく個体レベルでマグネシウムの恒常性を維持する、その分子群が出揃ったと考えられる。今後これらの分子の詳細な機能の解明や、遺伝子欠損マウスなどを用いた個体レベルでの解析などを通じて、マグネシウムが関わると指摘されている、

さまざまな疾患との具体的な関係が明らかになっていくものと期待される。特に、今回自分は MagEx2 が血圧調節に関わっていることを明らかにしており、今後 MagEx2 の解析を通じて、マグネシウムによってどのように血圧が制御されているのか、明らかにできる可能性が高い。

古くよりマグネシウムの摂取量は血圧と負の相関関係にあることが知られており、マグネシウムの摂取不足は血中マグネシウム量の低下を介して高血圧を誘発すると考えられてきた。しかし、MagEx2 欠損マウスでは血中マグネシウム量が野生型と比較して低いにも関わらず血圧も低下しており、これまでのモデルに再考を促す興味深い結果となっている。最近の疫学的研究から、血中のマグネシウム量ではなく、むしろ尿中のマグネシウム量と高血圧の発症リスクとが強く逆相関していることが明らかとなっている⁽²²⁾。さらに研究を進めることで、血中のマグネシウムではなく、マグネシウムの再吸収と排泄が血圧調節に重要であるという新しい概念を提唱できる可能性がある。

5. 今後の課題

MagEx2 によってどのように血圧が制御されるのか、その仕組みはいまだわかっておらず、今後の大きな課題と位置づけられる。マイクロアレイ解析の結果では複数の遺伝子が MagEx2 欠損マウスの腎臓で変動していることがわかっており、その中には血圧制御との関連がこれまでに指摘されているものも含まれている。今後これらの遺伝子の発現変動と MagEx2 欠損との関連を細かく調べることで、MagEx2 欠損による血圧調節機構の詳細が明らかになるものと期待される。

また、MagEx2 の欠損マウスでは低常時よりも血圧が低下していたが、MagEx2 による血圧調節機構が高血圧の病態とどのように関わるかは明らかとなっていない。DOCA-高食塩モデルなど、マウスでの高血圧モデルがいくつか知られており、今後これらのモデルを用いて高血圧症と MagEx2 との関わりを具体的に解き明かすことで、MagEx2 が新規降圧剤のターゲットとして有望かどうか、検証が進むものと考えられる。

6. 文献等

1. Rubin, H. Central role for magnesium in coordinate control of metabolism and growth in animal cells. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA **72**, 3551–3555 (1975).

2. Romani, A. Regulation of magnesium homeostasis and transport in mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **458**, 90–102 (2007).
3. Watson, R.R., Preedy, V.R., and Zibadi, S. (Eds.) *Magnesium in Human Health and Disease* New York, Humana Press (2013).
4. Simon, D.B., Lu, Y., Choate, K.A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., McCredie, D., Milford, D., Sanjad, S., and Lifton, R.P. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. *Science* **285**, 103–106 (1999).
5. Schlingmann, K.P., Weber, S., Peters, M., Niemann Nejsun, L., Vitzthum, H., Klingel, K., Kratz, M., Haddad, E., Ristoff, E., Dinour, D., Syrou, M., Nielsen, S., Sassen, M., Waldegger, S., Seyberth, H.W., and Konrad, M. Mutation in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am. J. Hum. Genet.* **79**, 949–957 (2006).
6. Schlingmann, K. P. *et al.*, Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat. Genet.* **31**, 166–170 (2002).
7. Walder, R.Y., Landau, D., Meyer, P., Shalev, H., Tsolia, M., Borochowitz, Z., Boettger, M.B., Beck, G.E., Englehardt, R.K., Carmi, R., and Sheffield, V.C. Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat. Genet.* **31**, 171–174 (2002).
8. Runnels, L.W., Yue, L., and Clapham, D.E. TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science* **291**, 1043–1047 (2001).
9. Schmitz, C., Perraud, A.L., Johnson, C.O., Inabe, K., Smith, M.K., Penner, R., Kuroski, T., Fleig, A., and Scharenberg, A.M. Regulation of vertebrate cellular Mg^{2+} homeostasis by TRPM7. *Cell* **114**, 191–200 (2003).

10. Voets, T., Nilius, B., Hoefs, S., van der Kemp, A.W., Droogmans, G., Bindels, R.J., and Hoenderop, J.G. TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. *J. Biol. Chem.* **279**, 19–25 (2003).
11. Ryazanova, L.V., Rondon, L.J., Zierler, S., Hu, Z., Galli, J., Yamaguchi, T.P., Mazur, A., Fleig, A., and Ryazanov, A.G. TRPM7 is essential for Mg(2+) homeostasis in mammals. *Nat. Commun.* **1**, 109 (2010).
12. Funato, Y., Yamazaki, D., Mizukami, S., Du, L., Kikuchi, K., and Miki, H. Membrane protein CNNM4-dependent Mg²⁺ efflux suppresses tumor progression. *J. Clin. Invest.* **124**, 5398–5410 (2014).
13. Yamazaki, D., Funato, Y., Miura, J., Sato, S., Toyosawa, S., Furutani, K., Kurachi, Y., Omori, Y., Furukawa, T., Tsuda, T., Kuwabata, S., Mizukami, S., Kikuchi, K., and Miki, H. Basolateral Mg²⁺ Extrusion via CNNM4 Mediates Transcellular Mg²⁺ Transport across Epithelia: A Mouse Model. *PLoS Genet.* **9**, e1003983 (2013).
14. Wang, C.Y., Shi, J.D., Yang, P., Kumar, P.G., Li, Q.Z., Run, Q.G., Su, Y.C., Scott, H.S., Kao, K.J., and She, J.X. Molecular cloning and characterization of a novel gene family of four ancient conserved domain proteins (ACDP). *Gene* **306**, 37–44 (2003).
15. Hirata, Y., Funato, Y., Takano, Y., and Miki, H. Mg²⁺-Dependent Interactions of ATP with the Cystathionine-β-Synthase (CBS) Domains of a Magnesium Transporter. *J. Biol. Chem.* **289**, 14731–14739 (2014).
16. Stuiver, M., Lainez, S., Will, C., Terryn, S., Günzel, D., Debaix, H., Sommer, K., Kopplin, K., Thumfart, J., Kampik, N.B., Querfeld, U., Willnow, T.E., Němec, V., Wagner, C.A., Hoenderop, J.G., Devuyst, O., Knoers, N.V., Bindels, R.J., Meij, I.C., and Müller, D. CNNM2, encoding a basolateral protein required for renal Mg²⁺ handling, is mutated in dominant hypomagnesemia. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 333–343 (2011).
17. Kato, N., Takeuchi, F., Tabara, Y., Kelly, T.N., Go, M.J., Sim, X., Tay, W.T., Chen, C.H., Zhang, Y., Yamamoto, K., Katsuya, T., Yokota, M., Kim, Y.J., Ong, R.T., Nabika, T., Gu, D., Chang, L.C., Kokubo, Y., Huang, W., Ohnaka, K., Yamori, Y., Nakashima, E., Jaquish, C.E., Lee, J.Y., Seielstad, M., Isono, M., Hixson, J.E., Chen, Y.T., Miki, T., Zhou, X., Sugiyama, T., Jeon, J.P., Liu, J.J., Takayanagi, R., Kim, S.S., Aung, T., Sung, Y.J., Zhang, X., Wong, T.Y., Han, B.G., Kobayashi, S., Ogihara, T., Zhu, D., Iwai, N., Wu, J.Y., Teo, Y.Y., Tai, E.S., Cho, Y.S., and He, J. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common variants associated with blood pressure variation in east Asians. *Nat. Genet.* **43**, 531–538 (2011).
18. Matsumura, H., Hasuwa, H., Inoue, N., Ikawa, M., and Okabe, M. Lineage-specific cell disruption in living mice by Cre-mediated expression of diphtheria toxin A chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 275–279 (2004).
19. Kobayashi, A., Valerius, M.T., Mugford, J.W., Carroll, T.J., Self, M., Oliver, G., and McMahon, A.P. Six2 defines and regulates a multipotent self-renewing nephron progenitor population throughout mammalian kidney development. *Cell Stem Cell* **3**, 169–181 (2008).
20. Kumasawa, K., Ikawa, M., Kidoya, H., Hasuwa, H., Saito-Fujita, T., Morioka, Y., Takakura, N., Kimura, T., and Okabe, M. Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 1451–1455 (2011).
21. Funato, Y., Terabayashi, T., Sakamoto, R., Okuzaki, D., Ichise, H., Nojima, H., Yoshida, N., and Miki H. Nucleoredoxin sustains Wnt/β-catenin signaling by retaining a pool of inactive Dishevelled protein. *Curr. Biol.* **20**, 1945–1952 (2010).
22. Joosten, M.M., Gansevoort, R.T., Mukamal, K.J., Kootstra-Ros, J.E., Feskens, E.J., Geleijnse, J.M., Navis, G., Bakker, S.J.; PREVENT Study Group. Urinary magnesium excretion and risk of hypertension: the prevention of renal and vascular end-stage disease study. *Hypertension* **61**, 1161–1167 (2013).

Mg²⁺ Transporter MagEx2 and Hypertension

Yosuke Funato, Hiroaki Miki

Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

Summary

Salt sensitive hypertension is associated with an increased risk of cardiovascular events, but the precise mechanisms underlying this disease are still largely unknown. Recent large-scale meta-analyses of genome-wide association studies (GWAS) identified several genes associated with blood pressure variation, and MagEx2 is the common gene identified in many independent studies.

MagEx2 belongs to the MagEx family, and we have previously shown that MagEx can stimulate Mg²⁺ efflux and plays an important role for the magnesium absorption from the intestine. Since MagEx2 can stimulate Mg²⁺ efflux as MagEx and it is highly expressed in distal convoluted tubule cells that are important for magnesium reabsorption, we hypothesized that MagEx2 might be involved in magnesium reabsorption as well as blood pressure regulation.

To address these issues, we generated MagEx2-knockout mice. Since homozygotes are embryonic lethal, experiments were performed with heterozygotes and kidney-specific knockout mice. Magnesium reabsorption was impaired in both heterozygotes and kidney-specific knockout mice, and blood pressure was also significantly lower in these mice. However, the expression and phosphorylation (activation) level of NCC, a transporter which is expressed in distal convoluted tubule and important for renal salt reabsorption/blood pressure regulation, was not so significantly altered. Transcriptome analyses revealed that expression level of several genes are significantly altered in MagEx2-knockout mice kidney. Further detailed analyses of these genes might reveal a novel mechanism of blood pressure regulation via MagEx2.