

## Mg<sup>2+</sup> トランスポーターMagEx2 による血圧調節機構の解明

船戸 洋佑, 三木 裕明

大阪大学微生物病研究所

**概要** MagEx は細胞内 Mg<sup>2+</sup> の排出に関わる膜蛋白質ファミリーである。私たちはこれまでに *MagEx2* 遺伝子欠損マウスの解析より *MagEx2* が腎臓でのマグネシウムの再吸収に寄与していることを示している。また近年のゲノムワイド関連解析 (GWAS) 解析より *MagEx2* 遺伝子とヒト高血圧との密接なつながりが示唆されているため、さらに *MagEx2* 欠損マウスの血圧を測ったところ、野生型マウスと比較して有意に低い血圧であった。疫学的な解析よりマグネシウムの摂取量と高血圧との関連がこれまで指摘されているが、その分子機序についてはよくわかっていない。そこで本研究ではさらに *MagEx* ファミリーの遺伝子欠損マウスの解析を進め、高血圧が起こる原因の本質的な理解を深めることを目指し研究を行った。

まず *MagEx2* 欠損による血圧低下をより明確にするべく、血圧センサーを外科的に埋め込み随時血圧をモニターする、テレメトリー法による解析を行った。その結果、これまでの tail cuff 法による解析結果と同様に、*MagEx2* 欠損マウスは野生型マウスと比較して明らかに血圧が低く、*MagEx2* の血圧調節における重要性が再確認された。次に DOCA 高食塩投与による食塩感受性の高血圧マウスモデルを利用して、人為的に高血圧を誘発した際の血圧について調べた。すると定常状態と同様に、*MagEx2* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比較して明らかに血圧が低く、高血圧の発症に *MagEx2* が重要であることが明らかとなった。

さらに、同じ *MagEx* ファミリーである *MagEx4* の遺伝子欠損マウスを用いた解析も行っている。*MagEx4* は *MagEx2* と同様に細胞から Mg<sup>2+</sup> を排出できるが、*MagEx2* とは異なり腸の上皮細胞に強く発現しており、腸からのマグネシウム吸収に重要であること、そして *MagEx4* 欠損マウスでは代償的に腎臓からのマグネシウム再吸収能が高まっていることを以前私たちは示している。この *MagEx4* の遺伝子欠損マウスは *MagEx2* の遺伝子欠損マウスとはほぼ同程度の血中マグネシウム濃度であったが、血圧は *MagEx2* 欠損マウスとは逆に増加していた。

これらの実験結果より、*MagEx2* による腎臓でのマグネシウム再吸収が血圧調節に重要であることが強く示唆された。

### 1. 研究目的

マグネシウムは必須ミネラルの一つである。細胞内の Mg<sup>2+</sup> はその殆どが 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・分解を含む多くの酵素反応に必須である<sup>(1)</sup>。また個体レベルでは、マグネシウムの欠乏はけいれんや不整脈などの症状を示す、低マグネシウム血症につながる事が知られている<sup>(2, 3)</sup>。そのため、細胞レベルと個体レベルの双方で、マグネシウムの量は厳密に調節されている必要がある。実際、様々な疫学的調査の結果から、マグネシウムの摂取量はがんや高血圧、

各種精神疾患など、さまざまな疾患と関わっていることが指摘されてきた<sup>(4)</sup>。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ほとんど未解明のまま残されている。

マグネシウムの恒常性維持機構は、家族性低マグネシウム血症の患者を対象とした遺伝子解析をきっかけに明らかとなってきた。生体内のマグネシウム量は腸での吸収と腎臓での再吸収によって制御されており、いずれの臓器でも上皮細胞の内部を Mg<sup>2+</sup> が通る経路と、隣り合った上皮細胞同士の隙間を Mg<sup>2+</sup> が通る経路の2つが存在す

る。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* および *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<sup>(5,6)</sup>。両蛋白質は腎臓のヘンレ係蹄の太い上行脚に高発現しており、この部位の上皮細胞の間隙に陽イオン透過性のチャネルを形成し、 $Mg^{2+}$  の輸送を可能にしている。実際 claudin-16 や claudin-19 に対する shRNA を恒常的に発現するトランスジェニックマウスでは、血中マグネシウム濃度が低下し、尿中のカルシウム濃度も増加するという、ヒトの病態に似た症状を示した。また異なる劣性の家族性低マグネシウム血症である、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) は  $Mg^{2+}$  透過性の陽イオンチャネル transient receptor potential – melastatin subfamily (TRPM) 6 をコードする *TRPM6* が原因遺伝子である。この *TRPM6* とやはり  $Mg^{2+}$  透過性の陽イオンチャネルを形成するファミリー分子 *TRPM7* は、腸の上皮細胞や腎臓の遠位尿細管細胞のそれぞれ頂端 (管腔) 側から細胞内に  $Mg^{2+}$  を取り込むことで、細胞の内部を通すタイプの  $Mg^{2+}$  吸収経路の起点となっている<sup>(7-11)</sup>。実際、*TRPM6* や *TRPM7* のヘテロ欠損マウスでは血中マグネシウム濃度が低下していることが報告されている<sup>(12,13)</sup>。

*TRPM6* や *TRPM7* により腸上皮や遠位尿細管の頂端側より細胞内に取り込まれた  $Mg^{2+}$  を体腔側へ運ぶためには、反対側である基側部より  $Mg^{2+}$  を排出する分子が必要である。しかし、その分子実体は長らく未解明であった。我々は近年、*MagEx4* 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を明らかにした<sup>(14)</sup>。*MagEx* は膜蛋白質であり、哺乳類では4遺伝子 (*MagEx1-4*) のファミリーとして存在している<sup>(15)</sup>。*MagEx2* は優性の家族性低マグネシウム血症である、癲癇や精神遅滞を伴う低マグネシウム血症 (hypomagnesemia with seizures and mental retardation, HSMR) の原因遺伝子であると報告されており<sup>(16)</sup>、また *MagEx2, 3, 4* の遺伝子領域内での一塩基多型のタイプの違いにより、血中マグネシウム濃度に有意な差が生じることも示されている<sup>(17)</sup>。我々は以前より *MagEx4* を対象に研究しており、 $Mg^{2+}$  感受性の蛍光プローブを用いた実験

などから *MagEx4* が細胞外に多く存在する  $Na^+$  との対向輸送により  $Mg^{2+}$  の排出を促すことや、腸の上皮細胞に強く発現しており、その基側部 (体腔側) に局在していることなどを明らかにしてきた<sup>(14, 18)</sup>。実際に *MagEx4* 遺伝子欠損マウスでは血中  $Mg^{2+}$  濃度が有意に低下しており、また腸からの  $Mg^{2+}$  吸収効率が低下しており、これら一連の実験結果より、*MagEx4* がマグネシウムの恒常性維持に重要な基側部の  $Mg^{2+}$  排出分子であると結論づけた。

我々は現在、さらに研究対象を *MagEx2* にも広げて解析を進めている。上述のように *MagEx2* は優性の家族性低マグネシウム血症の原因遺伝子であり、また *MagEx2* 蛋白質は *TRPM6* が強く発現している腎臓の遠位尿細管に同じく高発現し、その基側部に局在していること、そして培養細胞レベルでの実験から、*MagEx2* が *MagEx4* と同様に  $Mg^{2+}$  排出を促すことを確認している<sup>(19)</sup>。このため、*MagEx4* が腸上皮で  $Mg^{2+}$  の吸収に寄与しているのと同じように、*MagEx2* は腎臓遠位尿細管での  $Mg^{2+}$  再吸収に関わっていると予想された。*MagEx2* の遺伝子欠損マウスを作出したところ、全身性の *MagEx2* ホモ欠損マウスは胎生致死であった。そこで全身性の *MagEx2* ヘテロ欠損個体を用いた解析を行ったところ、ヘテロ欠損マウスでは腎臓でのマグネシウムの再吸収が弱まり、そのため血中のマグネシウム濃度が減少していることを示唆する結果が得られた。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、腎臓特異的に *Cre* リコンビナーゼを発現する *Six2-Cre* マウスとの交配により腎臓特異的な *MagEx2* ホモ欠損マウスを作出した。このマウスを用いて再度解析を行ったところ、全身で *MagEx2* をヘテロ欠損するマウスと同様に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。これらの実験結果より、*MagEx2* は腎臓での再吸収に重要な役割を果たしていることが示された。

*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死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。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疾患を遺伝学的に調べるのが可能となってきている。そして高血圧を対象とし

たゲノムワイド関連解析 (GWAS) において、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てきた<sup>(20, 21)</sup>。そこで野生型および *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ところ、*MagEx2* ヘテロ欠損マウスでは血圧が低下しており、腎臓特異的な *MagEx2* 欠損マウスを用いた場合でも同様の結果が得られた。これらの実験結果より、*MagEx2* の腎臓での働きが血圧調節にも関わっていることが示唆された。しかし *MagEx2* 欠損マウスの腎臓において、*MagEx2* が発現している腎臓遠位尿細管で同じく高発現している食塩再吸収トランスポーター NCC の量やその活性調節に関わるリン酸化のレベルに明確な変化はなく、*MagEx2* による血圧制御はこれまで知られていない新しい仕組みが関与している可能性が示唆された。

そこで本研究では、*MagEx2* と  $Mg^{2+}$  輸送が血圧を調節する、その仕組みを明らかにするべく、2014 年度に引き続き *MagEx* ファミリー遺伝子を欠損するマウスのより詳細な解析を行った。

## 2. 研究方法

### 2.1 マウス

*MagEx2* 遺伝子の欠損アレルを持つ各種マウス系統は、以下の方法によって作成されている。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 細胞をサザンブ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<sup>(22)</sup>) 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<sup>(23)</sup> 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* 欠損マウスを得ている。

*MagEx4* 遺伝子欠損マウスは EUCOMM より購入した ES 細胞 (ID: EPD0426\_1\_C08) を用いて作成した<sup>(14)</sup>。この ES 細胞は *MagEx4* の floxed アレルをもっており、このマウ

スと CAG-Cre マウスを交配させることにより、*MagEx4* 欠損マウスを作出した<sup>(24)</sup>。

### 2.2 Deoxycorticosterone acetate (DOCA)-高食塩付加による高血圧マウスの作成

DOCA および高食塩付加による高血圧マウスの作成は、岩本らの方法を一部改変して行った<sup>(25)</sup>。2-3 か月齢のマウスの腹腔内にペントバルビタール (ソムノペンチル、40-50 mg/kg) を投与することで麻酔下におき、その状態で右腎を摘出した。1 週間の回復期間ののち、飲水への食塩付加 (1% NaCl) および週 2 回の DOCA 投与 (1 回に 75 mg/kg を皮下注射、SIGMA より購入。Olive oil に懸濁させた状態で投与) を 8 週間にわたり行った。コントロール群は偽手術のみ行い、DOCA や食塩の投与は行わなかった。

### 2.3 Tail cuff 法による血圧測定

Tail cuff 法によるマウスの血圧測定は過去の報告に倣い<sup>(26)</sup>、非観血血圧測定装置 BP-98A (ソフトロン) を用いて行った。明期 (13:00-18:00) の間に 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。一度に 6-12 回測定し、最高値および最低値を除いた平均値をその後の統計学的な解析に用いている。

### 2.4 テレメトリー法による血圧測定

2-3 か月齢のマウスの腹腔内にペントバルビタール (ソムノペンチル、40-50 mg/kg) を投与することで麻酔下におき、その後左頸動脈に血圧測定用のカテーテル (TA11PA-C10, Data Sciences International) を挿入した。2 週間の回復期をおいた後、測定を行っている。測定は 1 時間毎に 2 分間行い、最低 3 日間連続で計測した。各々のマウスについて、同時刻の血圧の平均値をその後の解析に用いている。

### 2.5 統計処理

全ての統計解析データは平均±標準誤差で示してある。有意差検定はスチューデントの t 検定 (両側) を用いて行い、 $p < 0.05$  を有意と判定した。

## 3. 研究結果

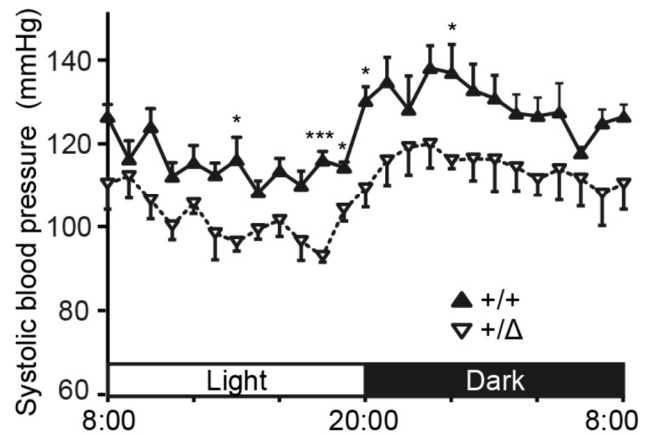
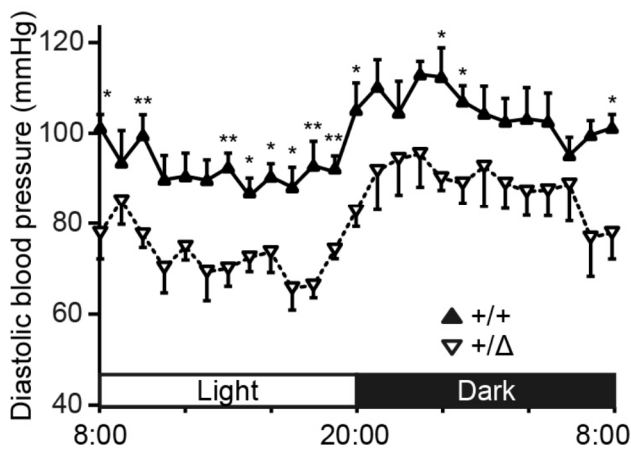
### 3.1 テレメトリー法による *MagEx2* 欠損マウスの血圧測定

2014 年度の解析では比較的簡便に測定が行える tail

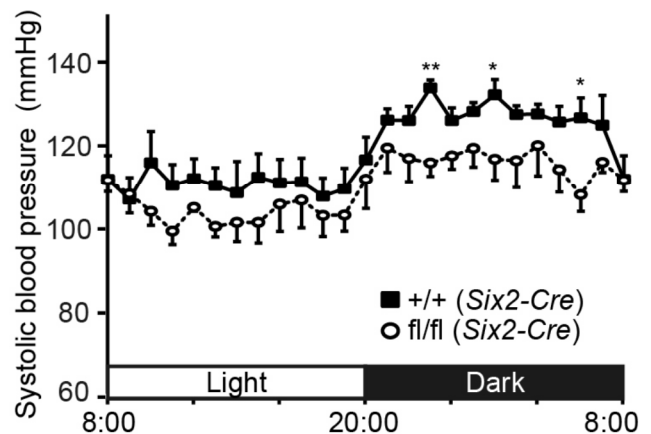
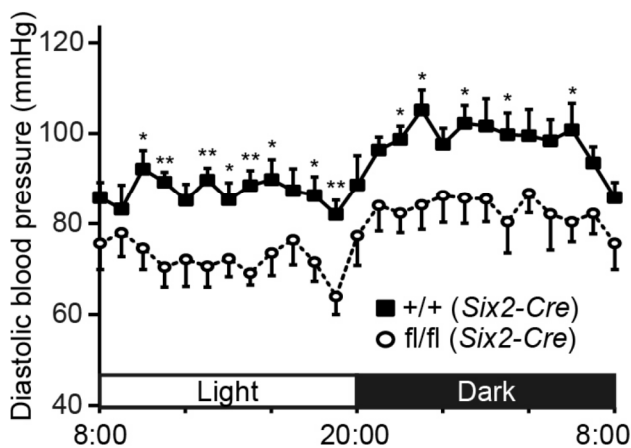
cuff 法で血圧を測定していたが、一部報告ではより信頼性の高い解析方法として、血圧センサーを外科的に頸動脈に埋め込み、随時血圧をモニターすることのできるテレメトリー法を推奨している<sup>(27)</sup>。そこで、今年度の研究ではまずこのテレメトリー法を用いて再度 *MagEx2* 欠損マウスの血圧を測定することから開始した。麻酔下においた *MagEx2* の全身性ヘテロ欠損マウス(全身性ホモ欠損マウスは胎生致死)と腎臓特異的ホモ欠損マウスの頸動脈に血圧センサーを埋め込み、2 週間の回復期間をおいた後、

測定を行った。その結果、tail cuff 法での解析時と同様に両系統のマウスは野生型マウスと比較して血圧が低く、また収縮期血圧よりも拡張期血圧のほうがより差の大きいことが明らかとなった (Fig. 1)。またテレメトリー法によって可能となった24時間体制での血圧測定の結果より、*MagEx2* 欠損による血圧低下は明期、暗期に関わらず同程度生じていることも明らかとなった。これらの実験結果より、*MagEx2* が血圧調節に関わっていることが明確に示された。

**A**



**B**



**Fig. 1.** テレメトリー法による血圧測定

*MagEx2* 遺伝子について、各遺伝子型の系統のマウスに血圧測定器を埋め込み、テレメトリー法による血圧測定を行った。2-3 か月齢のマウス 5 匹ずつを用いて行った実験結果を平均±標準誤差で示している。アスタリスク(\*, \*\*)はそれぞれ  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  を示している。

### 3. 2 MagEx2 は高血圧の発症に関わる

これまでの血圧測定実験はいずれも通常の飼育状態のマウスを用いて行ってきた。そこで次に、MagEx2 が病的な高血圧の発症に関わるのかどうか明らかにするべく、高血圧のマウスモデルを用いた実験を行うことにした。マウスは比較的血圧が上昇しにくい動物種だが、いくつか特定の実験操作によって血圧を一定量上げられることが知られている<sup>(28)</sup>。Six2-Cre マウスとの交配実験の結果より MagEx2 による血圧制御はその腎臓での働きが重要ということがわかっているので、今回は腎臓の機能に関わる食塩感受性(本態性)高血圧のモデルとして用いられ、また特定の遺伝学的操作を必要としない DOCA-高食塩モデルを採用した。外科手術により MagEx2 の全身性ヘテロ欠損マウスと腎臓特異的ホモ欠損マウスの腎臓を片方摘出し、1 週間の回復期間をおいた後に飲水中に 1%で NaCl を混ぜることで食塩負荷をかけた。同時に、鉍質コルチコイドである DOCA を週に 2 度、皮下投与することで食塩の再吸収を亢進させ、体内での食塩貯留をさらに促した。この処置を 8 週間続けた結果、既報通り野生型マウスにおいて一定の血圧増加が観察された (Fig. 2)。一方で、MagEx2 の全身性ヘテロ欠損マウスと腎臓特異的ホモ欠損マウスの両系統の血圧は野生型マウスと比較して明らかに低く、特に腎臓特異的ホモ欠損マウスでは収縮期、

拡張期血圧のいずれもが偽手術のみで食塩や DOCA の投与がなかった、「通常飼育状態」の野生型マウスとほぼ同程度であった。つまり、MagEx2 の腎臓での働きが高血圧の発症と密接にかかわっていることが実験的に明らかとなった。

### 3. 3 腎臓でのマグネシウム再吸収が血圧調節に重要である

これまでの MagEx2 欠損マウスを用いた研究から、MagEx2 が血圧調節に関わっていることを明らかにしている。MagEx2 欠損マウスの摂食量、飲水量、糞中のマグネシウム量などについては野生型マウスと明確な差がなかったことから、MagEx2 による血圧調節にはマグネシウムの摂取や吸収量は関与していないと考えられる。一方で、MagEx2 欠損マウスでは腎臓でのマグネシウム再吸収能が落ちており、その結果血中マグネシウム量が低下していたため、上述のどちらが血圧調節に寄与しているのか、この点は未解明のままであった。この点を明らかにするべく、同じ MagEx ファミリーである MagEx4 欠損マウスを用いた解析を行った。MagEx4 は MagEx2 と同様に細胞から Mg<sup>2+</sup>を排出できるが、MagEx2 とは異なり腸の上皮細胞に強く発現しており、腸からのマグネシウム吸収に重要であることを以前私たちは示している。また MagEx4 欠損マウスでは MagEx2 欠損マウスとほぼ同程度にまで血中マグネ

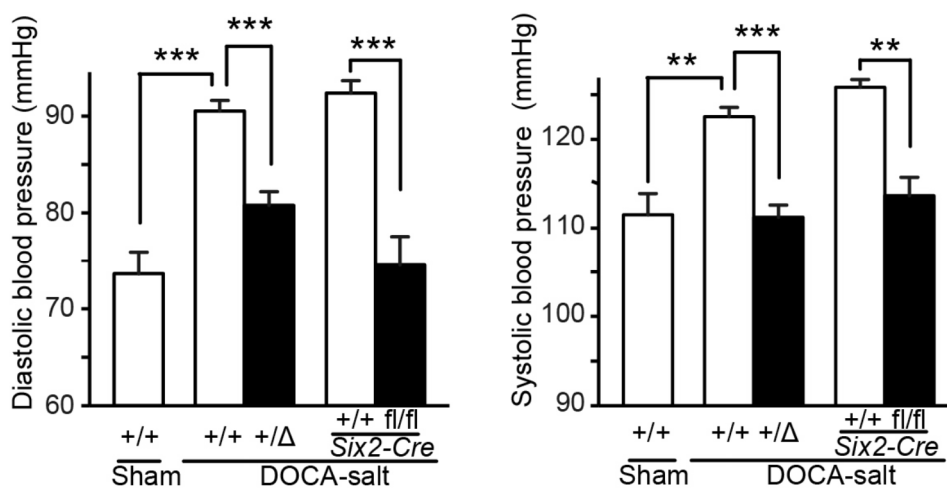


Fig. 2. DOCA-高食塩モデルにおける MagEx2 欠損マウスの血圧

MagEx2 の各遺伝子型のマウス(2-3 か月齢)の片腎を摘出し、その後 DOCA および食塩を 8 週間投与した。コントロール群(sham)は偽手術のみ施し、DOCA や食塩投与は行っていない。血圧は tail cuff 法により測定しており、5-10 匹ずつを用いて行った実験結果を平均±標準誤差で示している。アスタリスク(\*, \*\*, \*\*\*)はそれぞれ  $p < 0.01$  および  $p < 0.001$  を示している。

シウム量が低下しているが、マグネシウム再吸収能については *MagEx2* 欠損マウスとは逆で、むしろ代償的に野生型より高まっていた。この *MagEx4* 欠損マウスの血圧を調べたところ、*MagEx2* 欠損マウスとは逆に増加していた (Fig. 3)。*MagEx2* と *MagEx4*、この2つのマグネシウムトランスポーターの遺伝子欠損マウスの比較より、腎臓でのマグネシウム再吸収が血圧調節に重要であることが強く示唆された (Fig. 4)。

#### 4. 考察

本研究により *MagEx2* による腎臓でのマグネシウム再吸収の働きが血圧調節に重要であること、そして高血圧の発症にも寄与していることが明らかとなった。これまで疫学

的な調査などからマグネシウムが高血圧の発症や病態に関わっていることは度々指摘されてきたが、具体的にマグネシウムがどのようにして血圧を調節しているのか、その詳細は全くわかっていなかった。今回我々は *MagEx* ファミリーの各種遺伝子欠損マウスを用いた解析、比較により、腎臓でのマグネシウム再吸収の働きそのものが血圧調節と密接に結びついていることを明らかにできた (Fig. 3, Fig. 4)。また高血圧のマウスモデルを用いた解析から、この *MagEx2* による血圧調節機構が高血圧の発症にも関わっていることも実験的に示すことができています (Fig. 2)。これらの実験結果は *MagEx2* が高血圧の発症や進行を防ぐ、そのターゲットとなりうることを示唆しており、今後 *MagEx2* の働きを調節する薬剤を見つけることで、新しい機序の降圧剤の開発につながる可能性も考えられる。

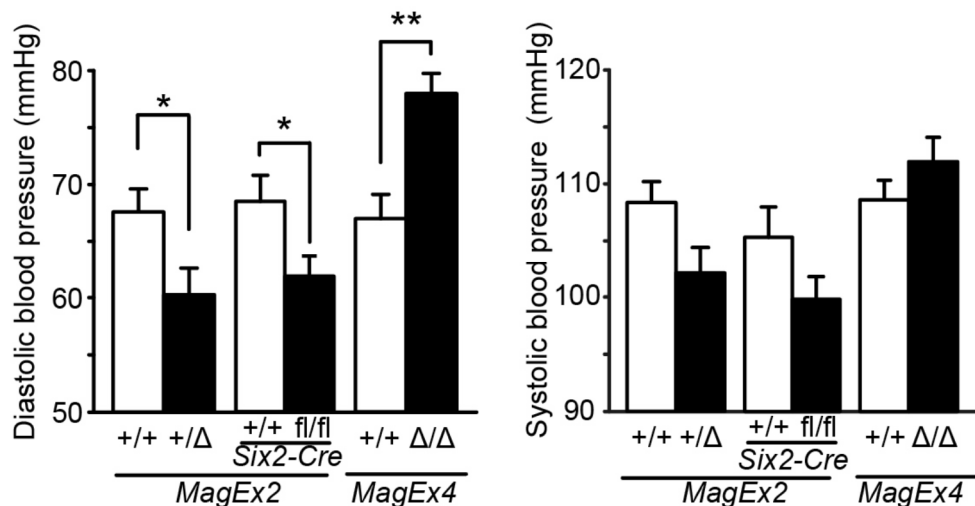


Fig. 3. 腎臓でのマグネシウム再吸収が血圧調節に重要である

*MagEx2* および *MagEx4* の各遺伝子型のマウス (2-3 か月齢) のマウスの血圧を tail-cuff 法により測定した。7-13 匹ずつを用いて行った実験結果を平均 ± 標準誤差で示している。アスタリスク (\*, \*\*) はそれぞれ  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  を示している。

遺伝子型	血中 Mg 量	Mg 摂取量	Mg 再吸収効率	血圧
全身性 <i>MagEx2</i> ヘテロ欠損	低下	野生型程度	低下	低下
腎臓特異的 <i>MagEx2</i> ホモ欠損	低下	野生型程度	低下	低下
全身性 <i>MagEx4</i> ホモ欠損	低下	野生型程度	上昇	上昇

Fig. 4. 各遺伝子型の結果の比較図

各系統のマウスにおけるマグネシウム恒常性の変化、および血圧の変動を示している。血圧の変動とマグネシウム再吸収能が相関しており、マグネシウムの再吸収が血圧調節に重要な役割を果たしていることが強く示唆される。

## 5. 今後の課題

今回の研究によってマグネシウムによる血圧調節の「場」として腎臓が重要であることが示されたが、そのさらに詳細な分子機構については今後の課題として残されている。MagEx2 の高発現している腎臓の遠位尿細管はマグネシウムの再吸収だけでなく、ナトリウムの再吸収での重要な働きをしていることが広く知られている。そして、この遠位尿細管でのナトリウム再吸収に積極的に関わっているのが食塩再吸収トランスポーターNCC である。一般的にはNCC の働きはその発現量やリン酸化の制御によって担われていると考えられているが、2014 年度の研究から少なくともNCC の発現量やリン酸化の度合いはMagEx2 欠損で

大きく変動していないことを明らかにしている。そのため、これまで知られていない、新しい形で MagEx2 とマグネシウム再吸収が食塩再吸収の働きを制御していると考えられる。NCC はリン酸化以外にもユビキチン化など多様な翻訳後修飾を受けることが知られている<sup>(29)</sup>。また、遠位尿細管でのナトリウム再吸収は NCC だけでは説明できないことも知られており、ENaC をはじめとする複数の陽イオンチャネルの寄与が指摘されている<sup>(30)</sup>。今後はこれらの分子について、マウスおよび培養細胞などを用いたより詳細な解析を行うことで、MagEx2 による腎臓でのマグネシウム再吸収が血圧を調節する、その分子機序に迫れると考えられる (Fig. 5)。

## 腎臓遠位尿細管におけるNa<sup>+</sup> 再吸収

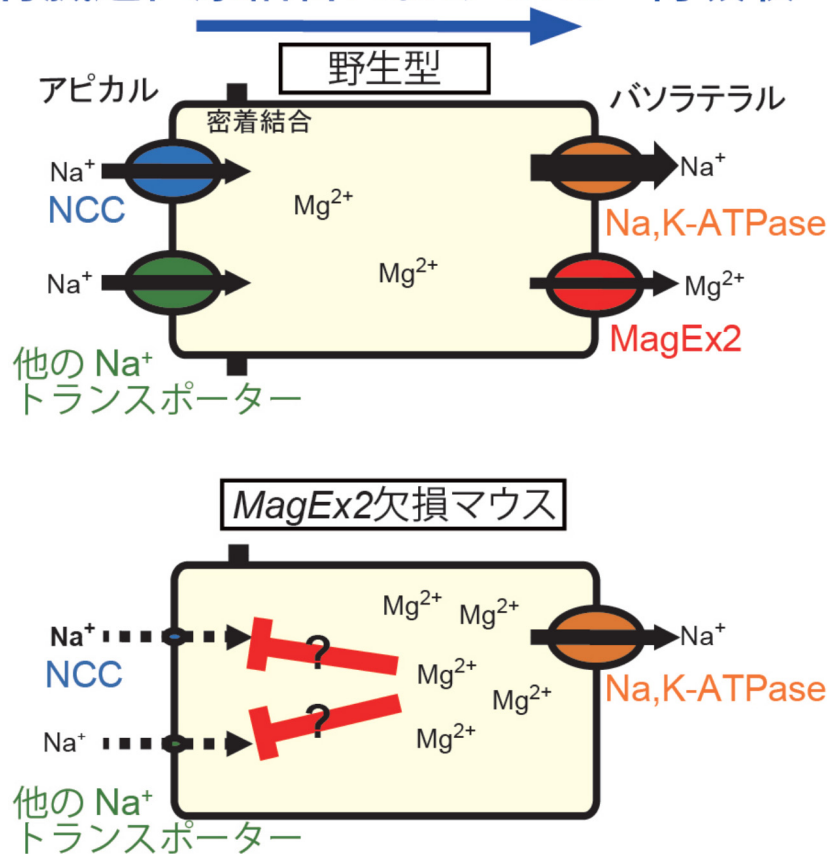


Fig. 5. MagEx2 による血圧調節のモデル図

野生型および MagEx2 欠損マウスにおける腎臓遠位尿細管での Mg<sup>2+</sup> および Na<sup>+</sup> 輸送のモデル図を示している。MagEx2 欠損マウスでは MagEx2 による Mg<sup>2+</sup> 排出がなくなるため遠位尿細管内の Mg<sup>2+</sup> 量が増加し、その影響で NCC や他の Na<sup>+</sup> を輸送するトランスポーター群の働きが弱められ、結果として Na<sup>+</sup> の再吸収量が低下することで血圧上昇が抑えられていると予想される。

## 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., Preeedy, V.R., and Zibadi, S. (Eds.) *Magnesium in Human Health and Disease* New York, Humana Press (2013).
4. Joosten, M.M., Gansevoort, R.T., Mukamal, K.J., Kootstra-Ros, J.E., Feskens, E.J., Geleijnse, J.M., Navis, G., Bakker, S.J.; PREVEND Study Group. Urinary magnesium excretion and risk of hypertension: the prevention of renal and vascular end-stage disease study. *Hypertension* **61**, 1161–1167 (2013).
5. Simon, D.B., Lu, Y., Choate, K.A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., *et al.* Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular  $Mg^{2+}$  resorption. *Science* **285**, 103–106 (1999).
6. Schlingmann, K.P., Weber, S., Peters, M., Niemann Nejsum, L., Vitzthum, H., Klingel, K., Kratz, M., Haddad, E., Ristoff, E., Dinour, D., *et al.* 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).
7. Schlingmann, K.P., Weber, S., Peters, M., Niemann Nejsum, L., Vitzthum, H., Klingel, K., Kratz, M., Haddad, E., Ristoff, E., Dinour, D., *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).
8. Walder, R.Y., Landau, D., Meyer, P., Shalev, H., Tsolia, M., Borochowitz, Z., Boettger, M.B., Beck, G.E., Englehardt, R.K., Carmi, R., *et al.* Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat. Genet.* **31**, 171–174 (2002).
9. 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).
10. Schmitz, C., Perraud, A.L., Johnson, C.O., Inabe, K., Smith, M.K., Penner, R., Kurosaki, T., Fleig, A., and Scharenberg, A.M. Regulation of vertebrate cellular  $Mg^{2+}$  homeostasis by TRPM7. *Cell* **114**, 191–200 (2003).
11. Voets, T., Nilius, B., Hoefs, S., van der Kemp, A.W., Droogmans, G., Bindels, R.J., and Hoenderop, J.G. TRPM6 forms the  $Mg^{2+}$  influx channel involved in intestinal and renal  $Mg^{2+}$  absorption. *J. Biol. Chem.* **279**, 19–25 (2003).
12. 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).
13. Walder, R.Y., Yang, B., Stokes, J.B., Kirby, P.A., Cao, X., Shi, P., Searby, C.C., Husted, R.F., Sheffield, V.C. Mice defective in *Trpm6* show embryonic mortality and neural tube defects. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4367–4375 (2009).
14. Yamazaki, D., Funato, Y., Miura, J., Sato, S., Toyosawa, S., Furutani, K., Kurachi, Y., Omori, Y., Furukawa, T., Tsuda, T., *et al.* Basolateral  $Mg^{2+}$  Extrusion via CNNM4 Mediates Transcellular  $Mg^{2+}$  Transport across Epithelia: A Mouse Model. *PLoS Genet.* **9**, e1003983 (2013).
15. 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).
16. Stuiver, M., Lainez, S., Will, C., Terry, S., Günzel, D., Debaix, H., Sommer, K., Kopplin, K., Thumfart, J., Kampik, N.B., *et al.* CNNM2, encoding a basolateral protein required for renal  $Mg^{2+}$  handling, is mutated in dominant hypomagnesemia. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 333–343 (2011).



17. Meyer, T.E., Verwoert, G.C., Hwang, S.J., Glazer, N.L., Smith, A.V., van Rooij, F.J., Ehret, G.B., Boerwinkle, E., Felix, J.F., Leak, T.S., *et al.* Genome-wide association studies of serum magnesium, potassium, and sodium concentrations identify six Loci influencing serum magnesium levels. *PLoS Genet.* **6**, e1001045 (2010).
18. Funato, Y., Yamazaki, D., Mizukami, S., Du, L., Kikuchi, K., and Miki, H. Membrane protein CNNM4-dependent Mg<sup>2+</sup> efflux suppresses tumor progression. *J. Clin. Invest.* **124**, 5398–5410 (2014).
19. Hirata, Y., Funato, Y., Takano, Y., and Miki, H. Mg<sup>2+</sup>-Dependent Interactions of ATP with the Cystathionine-β-Synthase (CBS) Domains of a Magnesium Transporter. *J. Biol. Chem.* **289**, 14731–14739 (2014).
20. Levy, D., Ehret, G.B., Rice, K., Verwoert, G.C., Launer, L.J., Dehghan, A., Glazer, N.L., Morrison, A.C., Johnson, A.D., Aspelund, T., *et al.* Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat. Genet.* **41**, 677–687 (2009).
21. Kato, N., Takeuchi, F., Tabara, Y., Kelly, T.N., Go, M.J., Sim, X., Tay, W.T., Chen, C.H., Zhang, Y., Yamamoto, K., *et al.* Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common variants associated with blood pressure variation in east Asians. *Nat. Genet.* **43**, 531–538 (2011).
22. 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).
23. 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).
24. Yamazaki, D., Miyata, H., Funato, Y., Fujihara, Y., Ikawa, M., and Miki, H. The Mg<sup>2+</sup> transporter CNNM4 regulates sperm Ca<sup>2+</sup> homeostasis and is essential for reproduction. *J. Cell Sci.* **129**, 1940–1949 (2016).
25. Iwamoto, T., Kita, S., Zhang, J., Blaustein, M.P., Arai, Y., Yoshida, S., Wakimoto, K., Komuro, I., Katsuragi, T. Salt-sensitive hypertension is triggered by Ca<sup>2+</sup> entry via Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger type-1 in vascular smooth muscle. *Nat. Med.* **10**, 1193–1199 (2004).
26. 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).
27. Kurtz, T.W., Griffin, K.A., Bidani, A.K., Davisson, R.L., and Hall, J.E. Recommendations for Blood Pressure Measurement in Humans and Experimental Animals. Part 2: Blood Pressure Measurement in Experimental Animals. *Hypertension* **45**, 299–310 (2005).
28. Monassier, L., Combe, R., Fertak, L.E. Mouse models of hypertension. *Drug Discov. Today Dis. Models* **3**, 273–281 (2006).
29. Rosenbaek, L.L., Kortenoeven, M.L., Aroankins, T.S., and Fenton, R.A. Phosphorylation decreases ubiquitylation of the thiazide-sensitive cotransporter NCC and subsequent clathrin-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* **289**, 13347–13361 (2014).
30. Subramanya, A.R. and Ellison, D.H. Distal convoluted tubule. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **9**, 2147–2163 (2014).

## Blood Pressure Regulation by Mg<sup>2+</sup> Transporter MagEx2

Yosuke Funato, Hiroaki Miki

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. We have previously found that magnesium reabsorption was impaired in mouse deficient of *MagEx2*, which encodes a Mg<sup>2+</sup> transporter. Also, we have shown by tail cuff method that the blood pressure was also significantly lower in *MagEx2*-deficient mice. In this study, we further analyzed this mouse strain to corroborate the importance of MagEx2 in blood pressure control.

First, we measured the blood pressure of *MagEx2*-deficient mice by radiotelemetry, another well-known method for blood pressure measurements in mouse studies. As expected, the blood pressure was significantly reduced in both systemic heterozygotes and kidney specific homozygotes of *MagEx2*-deficient allele. We next analyzed the blood pressure of *MagEx2*-deficient mice in hypertensive mouse model. For this purpose, we employed DOCA-salt method, which was frequently used to generate hypertensive mice. Under this condition, we observed a significant blood pressure increase in wild type mice, and the blood pressure was significantly lower in DOCA-salt treated *MagEx2*-deficient mouse strains.

Furthermore, we performed a comparative study with *MagEx4*-deficient mice, which encodes another MagEx family Mg<sup>2+</sup> transporter involved in intestinal magnesium absorption. While the blood magnesium level of *MagEx4*- and *MagEx2*-deficient mice were similarly low compared to wild type mice, the blood pressure of *MagEx4*-deficient mice was higher than wild type mice. Since the ratio of the renal magnesium reabsorption in *MagEx4*-deficient mice was higher than wild type mice, these experimental results strongly suggests that magnesium reabsorption mediated by MagEx2 is primarily important for the blood pressure regulation.