

マグネシウム再吸収と共役した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細胞制御分野

概要 本研究は Mg^{2+} 排出タンパク質 CNNM2 を介したマグネシウム再吸収と血圧調節との関係を明らかにするべく、以前行ったマイクロアレイ解析において CNNM2 欠損マウスの腎臓で発現が有意に変動していることが判明していた Mg^{2+} 透過性チャネル TRPM6 に着目した解析を行った。まずマイクロアレイの解析結果を確認する目的で、CNNM2 欠損マウスの腎臓での TRPM6 発現量を qRT-PCR 法を用いて測定したところ、TRPM6 の mRNA 量の低下が確認された。またウェスタンブロットや組織切片での蛍光免疫染色においても TRPM6 の発現減少が確認された。この TRPM6 の発現低下機構を明らかにするべく、次に腎臓遠位尿細管由来の細胞株 MDCT を用いた機能解析を行った。CNNM ファミリーの分子機能である Mg^{2+} 排出との関連が考えられたので、CNNM2 や CNNM4 をノックダウンしたところ、細胞内の Mg^{2+} 量の上昇に伴い TRPM6 の発現量が低下していた。また培地中 (細胞外) の Mg^{2+} 濃度を大きく減らした条件下では TRPM6 発現量の CNNM2 と CNNM4 のノックダウンによる発現抑制効果は見られず、併せて TRPM6 が Mg^{2+} 量に応答して発現量を変動させていることが明らかとなった。

さらに TRPM6 と血圧調節との関係を明確にするため、TRPM6 の遺伝子欠損マウスを作出した。全身で TRPM6 を欠損している *Trpm6*^{-/-} マウス同士の交配からは TRPM6 ホモ欠損の産仔は得られず、既報通り TRPM6 を全身でホモ欠損しているマウスは胎性致死であることが確認された。そこで腎臓特異的に TRPM6 を欠損するマウスを作出したところ、CNNM2 欠損マウスと同様に血圧が低下していた。つまり、これまでの仮説どおり腎臓遠位尿細管におけるマグネシウム再吸収に共役して血圧が制御されていることが裏付けられた。今後さらなる解析を進めることで、マグネシウム再吸収を介した血圧調節機構の詳細を明らかにできると期待される。

1. 研究目的

マグネシウムはすべての生命体にとって必須の元素である⁽¹⁾。細胞レベルにおいて Mg^{2+} は ATP の産生・分解を含む多くの酵素反応に必須であり、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、そして過剰なマグネシウムの蓄積は徐脈や血圧低下などの症状を伴う、高マグネシウム血症へとつながる^(2, 3)。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。

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解析から明らかにされてきた。生体内マグネシウム量は腸からの吸収と腎臓での再吸収によって主に制

御されており、双方の臓器で上皮細胞の内部を Mg^{2+} が通る経路 (transcellular pathway) と、隣り合った上皮細胞同士の隙間を Mg^{2+} が通過する経路 (paracellular pathway) の二つで協調的に Mg^{2+} を輸送している。このうち paracellular pathway は密着結合 (tight junction) を形成する claudin-16/paracellin-1 と claudin-19 によって制御されており、それぞれをコードする遺伝子 *CLDN16* および *CLDN19* は、「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) の原因遺伝子として報告されている^(4,5)。もう一つのマグネシウム吸収/再吸収経路である transcellular pathway は、 Mg^{2+} 透過性の陽イオンチャネル transient receptor potential -

melastatin subfamily (TRPM) 6 と TRPM7 が重要な役割を果たしている。両分子は腸の上皮細胞や腎臓の遠位尿管細胞の頂端(管の内腔)側から細胞内に Mg^{2+} を取り込むことで transcellular pathway の起点となっており⁽⁶⁻¹⁰⁾、実際 *TRPM6* 遺伝子は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) の原因遺伝子として報告されているほか、*TRPM6* や *TRPM7* の遺伝子改変マウスでは血中マグネシウム濃度が低下していることも報告されている⁽¹¹⁻¹³⁾。

Transcellular pathway を介した Mg^{2+} の吸収/再吸収には、*TRPM6*/*TRPM7* により頂端側から細胞内に取り込まれた Mg^{2+} を反対側の基側部から排出する分子が必要である。このような分子の必要性は長い間指摘されてきたが、その実体は未解明であった。我々は近年、Cyclin M4 (CNNM4) がその細胞の基側部から 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⁽¹⁴⁾。CNNM は哺乳類では4遺伝子(*CNNM1-4*)のファミリーとして存在しており⁽¹⁵⁾、そのうち *CNNM2* 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⁽¹⁶⁾。加えて、ゲノムワイド関連解析(GWAS)より *CNNM2-4* と血中マグネシウム濃度との間に関連があることも示されている⁽¹⁷⁾。CNNM ファミリー遺伝子はいずれも膜タンパク質をコードしているが、中でも *CNNM4* の分子機能について我々は詳細な解析を行ってきた。 Mg^{2+} 感受性の蛍光プローブ Magnesium green を用いた実験などから、*CNNM4* は Na^+/Mg^{2+} 交換を促すことで Mg^{2+} の排出に携わることが判明している⁽¹⁴⁾。またマウスでは腸の上皮細胞に強く発現しており、その基側部に局在していることや、*CNNM4* 欠損マウスでは腸からのマグネシウム吸収効率の低下に伴い、血中マグネシウム濃度が低下していることを明らかにしてきた⁽¹⁸⁾。つまり、*CNNM4* がマグネシウムの恒常性維持に重要と指摘されてきた、基側部に局在する Mg^{2+} 排出分子であると判明した。また近年では *CNNM4* に加えて *CNNM2* を対象とした解析も進んできている。*CNNM2* は上述した家族性低マグネシウム血症の原因遺伝子であるだけでなく、*CNNM2* タンパク質が *TRPM6* の強く発現している腎臓の遠位尿管に高発現し、その基側部に局在していることや、細胞レ

ベルの実験から *CNNM2* が *CNNM4* と同様に Mg^{2+} 排出を促すことがわかってきた⁽¹⁹⁾。*CNNM4* が腸上皮でマグネシウムの吸収に寄与しているのと同じように、*CNNM2* は腎臓遠位尿管での Mg^{2+} 再吸収に関わっていると予想され、実際 *CNNM2* の腎臓特異的遺伝子欠損マウスでは腎臓でのマグネシウム再吸収が低下し、血中マグネシウム量が低下していることが明らかとなった⁽²⁰⁾。

CNNM2 について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。患者数も多く、古くより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。また 10-15% の患者では今も血圧のコントロールができておらず、その観点からも高血圧の発症メカニズムの理解と、よりよい降圧剤の開発が望まれている。このような状況の中、近年のゲノム解析技術の進歩に伴い GWAS により高血圧と遺伝学的に関わる遺伝子群が明らかとなってきた。そし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 *CNNM2* であり、高血圧との密接な関わりが示唆されてきた^(21, 22)。そこで野生型および *CNNM2* ヘテロ欠損マウスを対象として血圧を測定したところ、*CNNM2* 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 *CNNM2* 欠損マウスを用いた場合でも同様の結果が得られた⁽²⁰⁾。これらの実験結果より、*CNNM2* の腎臓での働きが血圧調節にも関わっていると示唆された。また興味深いことに、腸でのマグネシウム吸収に関わる *CNNM4* 欠損マウスの血圧を測定したところ、*CNNM2* 欠損マウスとは逆に血圧が上昇していた。いずれのマウスも血中のマグネシウム濃度は野生型マウスと比較して同程度に低下しており、体内のマグネシウム量よりも、むしろ腎臓でのマグネシウム再吸収に共役して血圧が制御されている可能性が示唆された。そこでマイクロアレイにより *CNNM2* 欠損マウスの腎臓での遺伝子発現を網羅的に調べたところ、いくつかの遺伝子の発現が有意に変動していた(**Fig. 1** 参照)。特に興味深いことに、*CNNM2* と同じ遠位尿管に高発現し、マグネシウムの再吸収に寄与する Mg^{2+} 透過性チャネル *TRPM6* の遺伝子発現レベルが下がっていた。

本研究ではこれらの実験結果に基づき、マグネシウムの再吸収機構と共役した血圧調節の仕組みを明らかにす

Up			Down		
fold	p value	Gene	fold	p value	Gene
6.394	0.046	<i>Cldn11</i>	-6.364	0.051	<i>Cnnm2</i>
5.002	0.016	<i>Slc14a2</i>	-4.472	0.062	<i>Pvalb</i>
4.109	0.066	<i>Pde4d</i>	-3.768	0.099	<i>Cmtm4</i>
3.834	0.026	<i>Aldh1a3</i>	-2.730	0.030	<i>Mapk8</i>
3.379	0.050	<i>Gcnt3</i>	-2.648	0.077	<i>Trpm6</i>
2.872	0.090	<i>Tal2</i>	-2.430	0.002	<i>Grin2c</i>
2.812	0.091	<i>Gm567</i>	-2.292	0.049	<i>Olf1372-ps1</i>
2.758	0.049	<i>1810037I17Rik</i>	-2.106	0.096	<i>B020031M17Rik</i>
2.724	0.026	<i>AA467197</i>	-2.012	0.054	<i>Sdad1</i>
2.467	0.029	<i>Crif1</i>			
2.446	0.015	<i>Calml3</i>			
2.445	0.081	<i>Gulo</i>			
2.401	0.067	<i>Akr1b3</i>			
2.389	0.074	<i>Adh6a</i>			
2.234	0.006	<i>Fgb</i>			
2.203	0.043	<i>Ndr4</i>			
2.126	0.026	<i>R3hdm1</i>			
2.091	0.014	<i>Lamb3</i>			
2.024	0.012	<i>Gm3916</i>			

Fig. 1. *CNNM2* 欠損マウス腎臓での遺伝子発現の変動 (2014 年度の研究成果)

2 か月齢の *Cnnm2*^{+/+}; *Six2-Cre* および *Cnnm2*^{fl/fl}; *Six2-Cre* 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。*Cnnm2*^{fl/fl}; *Six2-Cre* 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。

るべく、*TRPM6* の関与を明らかにすることを目的に *CNNM2* 欠損マウスや培養細胞、そして *TRPM6* 欠損マウスを用いてより詳細な解析を行った。

2. 研究方法

2.1 マウス

CNNM2 の遺伝子改変マウスの各系統は以前の研究で用いたもの⁽²⁰⁾を本研究でも利用している。*TRPM6* の遺伝子欠損マウスは International Mouse Phenotyping Consortium より購入した *TRPM6* 欠損 ES 細胞を用いてキメラマウスと *TRPM6* の trapped アレル(-)をもつマウス (*Trpm6*^{fl/fl}) を作出した。さらに、*FlpO* マウス⁽²³⁾との交配により floxed アレル(fl)を、そして腎尿管で Cre リコンビナーゼを発現する *Six2-Cre* マウス⁽²⁴⁾との交配により腎臓特異的な *TRPM6* 欠損マウス (*Trpm6*^{fl/fl}; *Six2-Cre*) を得ている。

2.2 テレメトリー法による血圧測定

以前の報告例に倣い⁽²⁰⁾、2-3 か月齢のマウスの左頸動脈に外科的に血圧測定用のカテーテル (TA11PA-C10, Data Sciences International) を挿入し、2 週間の回復期をおいた後に測定を行った。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。

2.3 細胞培養

Peter Friedman 博士 (University of Pittsburgh) らによって樹立された遠位尿細管由来細胞 MDCT⁽²⁵⁾ は Friedman 博士および田村功一博士 (横浜市大) より分与いただいた。MDCT 細胞はダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) とハム F-12 培地を 1:1 で混合した培地に、さらにウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) を 5% 添加したもので培養した。マグネシウム量を変動させた条件での培養は、magnesium/calcium free DMEM (Thermo) に PBS で透析してマグネシウムを除去した FBS, 1.8 mM CaCl₂, および各濃度の MgCl₂ を加えた培地で行った。遺伝子導入は LipofectAmine RNAiMAX (Invitrogen) を用いて行った。

2.4 ノックダウン実験

マウス *CNNM2* および *CNNM4* に対する RNA 干渉実験用の 2 本鎖 RNA は、それぞれ SIGMA 社と Invitrogen 社より購入したものを利用した。標的配列はそれぞれ以下のとおりである。

CNNM2-siRNA: 5'-CCATTGTGCAGCGAGTGAA-3'

CNNM4-siRNA: 5'-GGTGGACGAG ACCACA ACTCTT-3'

またコントロール実験用として、Invitrogen 社の negative

control LO GC を利用した。

2. 5 qRT-PCR

以前の解析例に則って⁽²⁶⁾, マウス腎臓あるいは MDCT 細胞より全 RNA を抽出後, cDNA を合成し定量的 PCR 法により mRNA 量を測定した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動によって検証しており, 非特異的な DNA の増幅のないことを確認している。用いたプライマーは以下のとおり:

Pvalb, 5'-CGCTGAGGACATCAAGAAGG-3'

and 5'-CCGGGTTCTTTTCTTCAGG-3';

Slc12a3, 5'-CTTCGGCCACTGGCATTCTG-3'

and 5'-GATGGCAAGGTAGGAGATGG-3';

Trpm6, 5'-AAAGCCATGCGAGTTATCAGC-3'

and 5'-CTTCACAATGAAAACCTGCCC-3'.

Gapdh に対するプライマーは以前用いたもの⁽²⁷⁾と同じ配列である。

2. 6 抗体

以下の抗体を利用した。モルモット抗 NCC 抗体(免疫染色用):東京医科歯科大学, 内田信一博士よりご供与いただいた⁽²⁷⁾, マウス抗 β チューブリン抗体 (T4026): SIGMA 社より購入, ウサギ抗 CNNM2 抗体:以前の報告で使用したもの⁽²⁰⁾, ウサギ抗 TRPM6 抗体:TRPM6 の中央部分(アミノ酸番号 1270-1453)を His タグ付きタンパク質として大腸菌で発現させ, 精製したものをウサギに免疫して抗血清を得たのち, TRPM6 の中央部分(アミノ酸番号 1270-1497)を GST タグ付きタンパク質として大腸菌で発現させ, 精製したものを用いてアフィニティー精製したもの, ウサギ抗 CNNM4 抗体:以前の文献で作成したもの⁽¹⁴⁾。

2. 7 細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度の定量

細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度の定量は以前の報告のとおり⁽¹⁴⁾, レシオメトリックな蛍光 Mg^{2+} インジケーターである Mag-fura2を用いて行った。2 μ M の Mag-fura2-AM を添加した細胞培養液(血清抜き)を用いて細胞内に Mag-fura2 を導入したのち, ORCA-Flash 4.0 CMOS カメラ(浜松フォトニクス)と USH-1030L 水銀ランプ(オリンパス)を設置した IX81 顕微鏡(オリンパス)を用いて測定を行った。励起光:330–350 nm および 370–390 nm, 蛍光:505–545 nm のシグナルを測定し, 以下の式に基づいて細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度を算出した。

$$[FreeMg^{2+}]_i = K_d Q \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)}$$

R: 励起光 330–350 nm のときのシグナル強度 (F1) を励起光 370–390 nm のときのシグナル強度 (F2) で割った値 (R = F1/F2)

R_{max} : R の最大値

R_{min} : R の最小値

Q: 最小の Mg^{2+} 濃度のときの F2 の値を最大の Mg^{2+} 濃度のときの F2 の値で割った値 ($F2_{min}/F2_{max}$)

K_d : 1.5 mM (文献値⁽²⁸⁾を利用)

このうち R_{min} , R_{max} , $F2_{min}$ および $F2_{max}$ は各測定後に実験により特定した。 R_{min} と $F2_{min}$ は培養液中に 6 μ M の 4-Bromo-A23187 (Wako) と 10 mM の EDTA を添加することで求めた。また R_{max} と $F2_{max}$ は培養液中に 6 μ M の 4-Bromo-A23187 と 50 mM の $MgCl_2$ を加えた溶液中で求めた。

2. 8 統計処理

全ての統計解析データは平均 \pm 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), カイ 2 乗検定あるいは 2-way ANOVA のいずれかを用いて行い, $p < 0.05$ を有意と判定した。

3. 研究結果

3. 1 CNNM2 欠損マウス腎臓における TRPM6 の発現低下

本研究ではまず以前のマイクロアレイの解析結果を確認する目的で, CNNM2 欠損マウスの腎臓での TRPM6 発現量を qRT-PCR 法を用いて測定した。マイクロアレイの解析結果のとおり, TRPM6 の mRNA 量は腎臓特異的 CNNM2 ホモ欠損マウスで有意に低下していた (Fig. 2A)。また TRPM6 の mRNA 量は全身での CNNM2 ヘテロ欠損マウスでも有意に低下していた。一方, TRPM6 と同様にマイクロアレイの解析結果で発現量が有意に低下しており, また遠位尿細管に高発現する *Pvalb* については, 腎臓特異的 CNNM2 ホモ欠損マウスでは有意に低下していたものの, 全身での CNNM2 ヘテロ欠損マウスと野生型マウスで発現量に明確な差異は見られなかった。血圧は腎臓特異的 CNNM2 ホモ欠損マウスと全身での CNNM2 ヘテロ

欠損マウスの双方で低下しており、この結果より TRPM6 の発現低下が血圧低下と密接に関わっている可能性が示唆された。また、以前のウェスタンブロット解析の結果と同様に、NCC (*slc12a3* 遺伝子によってコード) については発現量に有意な差異は見られなかった。次にウェスタンブロットによりタンパク質レベルでの確認も行った (Fig. 2B)。RT-PCR 法での結果と同様に、腎臓特異的 *CNNM2* ホモ欠損マウスでは腎臓での TRPM6 のタンパク質発現量が

有意に低下していた。さらに、腎臓の組織切片で蛍光免疫染色を行った (Fig. 2C)。コントロールのマウスでは TRPM6 のシグナルは遠位尿細管細胞の頂端側に局在することが知られている、NCC のシグナルと共局在していた。そして *CNNM2* 欠損マウスでは TRPM6 のシグナルが顕著に弱まっていた。これらの実験結果より、*CNNM2* が TRPM6 の発現量維持に寄与していることが明らかとなった。

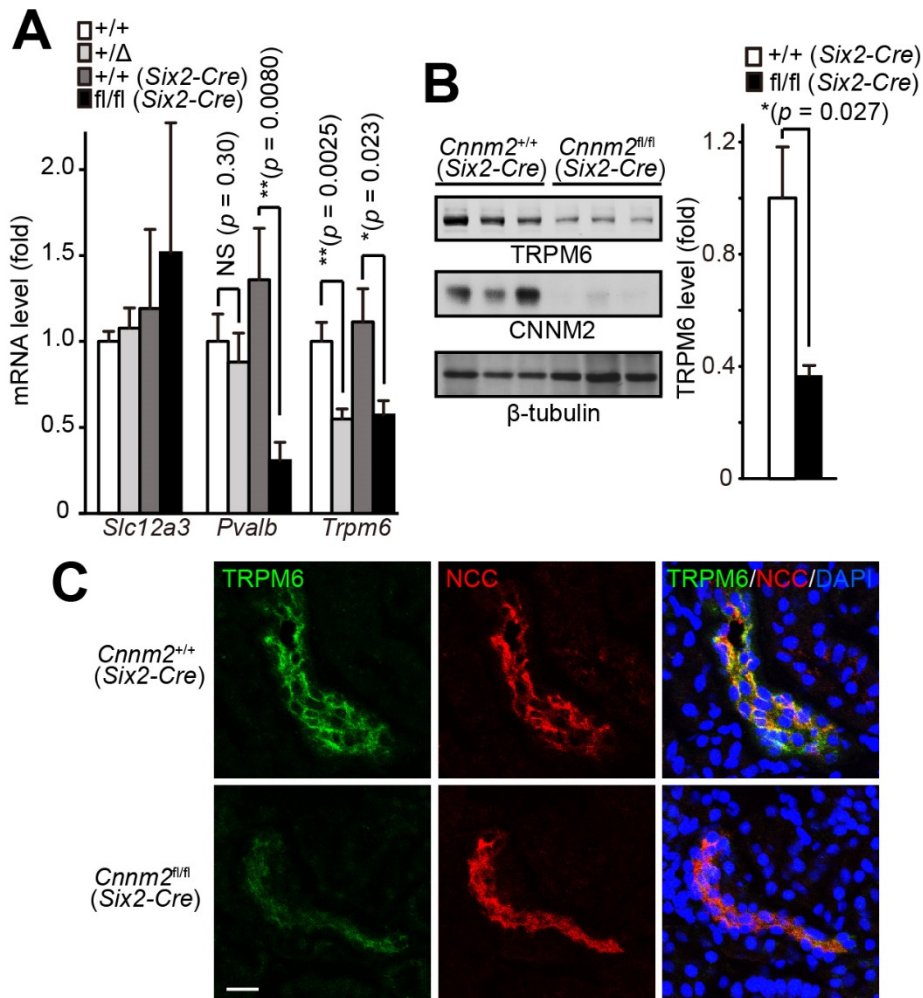


Fig.2. *CNNM2* 欠損マウスにおける TRPM6 の発現量低下

(A) 各遺伝子型のマウス (2-3 か月齢) より腎臓を摘出し、qRT-PCR により各遺伝子の発現量を求めた。実験結果は各 8-9 匹の平均 \pm 標準誤差で示しており、 p 値はそれぞれスチューデントの t 検定 (両側) を用いて行った。アスタリスク 1 つ (*) は $p < 0.05$ を、アスタリスク 2 つ (**) は $p < 0.01$ をそれぞれ示す。(B) 腎臓の組織抽出液を用いて、各抗体によるウェスタンブロットを行った。右の棒グラフは各バンドの定量結果であり、3 匹の平均 \pm 標準誤差で示している。アスタリスク 1 つ (*) は $p < 0.05$ を示す。(C) 腎臓の切片の蛍光免疫染色像。青は DAPI 染色による核のシグナルを、緑および赤はそれぞれ抗 TRPM6 抗体と抗 NCC 抗体による染色シグナルを示す。スケールバーは 20 μm を示す。

3. 2 マグネシウム依存的な TRPM6 の発現制御

CNNM2 欠損マウスにおける TRPM6 の発現低下機構を明らかにするべく、腎臓遠位尿細管由来の細胞株 MDCT を用いた機能解析を行った。CNNM ファミリーの分子機能である Mg^{2+} 排出との関連が考えられたので、まず CNNM2 をノックダウンし細胞内の Mg^{2+} 量を定量したところ、コントロール siRNA を導入した細胞と比べて細胞内 Mg^{2+} 濃度が有意に上昇していた (Fig. 3A)。そしてこのとき、TRPM6 の発現量を qRT-PCR 法によって測定したところ有意に低下しており、CNNM2 欠損マウスの状況が再現できていることが確認された (Fig. 3B)。またさらに CNNM4 もノックダウンしたところ、細胞内 Mg^{2+} 濃度はさらに上昇し、そして TRPM6 の発現量もさらに低下した。つまり、TRPM6 の発現量は細胞内 Mg^{2+} 濃度と負の相関を示

すことが明らかとなった。さらに Mg^{2+} との関係を確認するため、培地中 (細胞外) の Mg^{2+} 濃度を変動させた条件下で再度 TRPM6 の発現量を調べた (Fig. 3C)。その結果、TRPM6 の発現量は培地中の Mg^{2+} 量を通常の培地とほぼ同じである 1.0 mM から 0.2 mM, 0.1 mM, 0.02 mM と減らすにつれて上昇していた。また培地中の Mg^{2+} 濃度を大きく減らした 0.02 mM の条件下では、CNNM2 と CNNM4 のノックダウンによる TRPM6 の発現抑制効果は見られなくなっていた。すでに培地中の Mg^{2+} 量が最小限であり、細胞内にマグネシウムを取り込むことができないため CNNM2 と CNNM4 をノックダウンしても効果が見られなかったと解釈できる。つまりこれらの実験結果より、TRPM6 は Mg^{2+} の量に反応して発現量を変動させていることが明確となった。

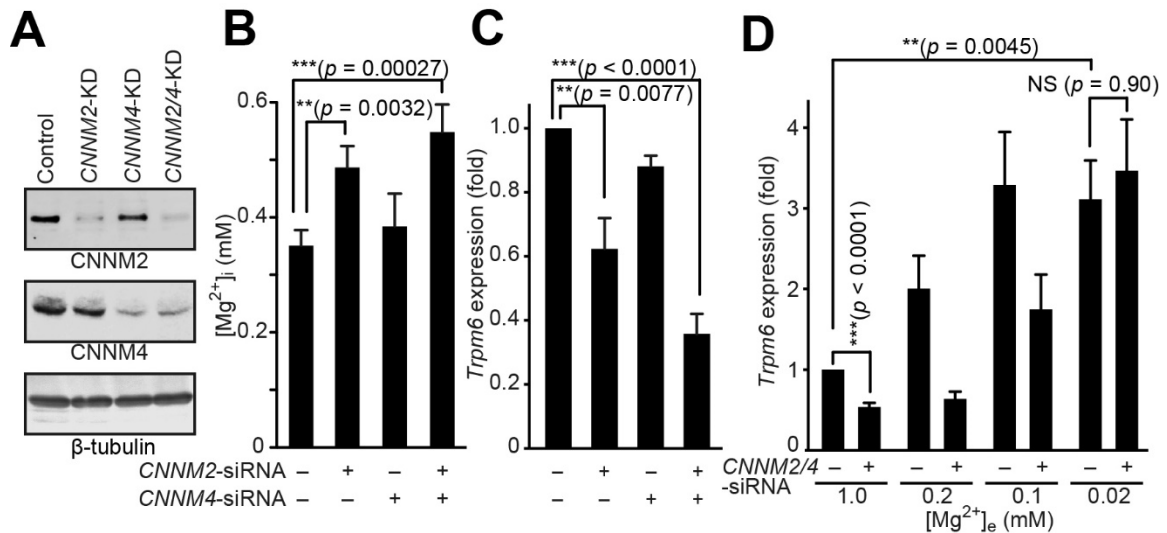


Fig.3. マグネシウム依存的な TRPM6 の発現制御

(A) MDCT 細胞に CNNM2 あるいは CNNM4 に対する siRNA を導入し、細胞溶解液を回収後ウェスタンブロット法により各タンパク質の発現量を解析した。(B) siRNA を導入した MDCT 細胞の細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度 ($[Mg^{2+}]_i$) を Mag-fura2 を用いて測定した。グラフは 43-84 細胞の平均 \pm 標準誤差を示しており、 p 値はそれぞれスチューデントの t 検定 (両側) を用いて行った。アスタリスク 2 つ (**) は $p < 0.01$ を、アスタリスク 3 つ (***) は $p < 0.001$ をそれぞれ示す。(C) siRNA を導入した MDCT 細胞を回収し、qRT-PCR 法により mRNA 量を測定した。実験結果は 4 回の平均 \pm 標準誤差で示しており、 p 値はそれぞれスチューデントの t 検定 (両側) を用いて行った。アスタリスク 2 つ (**) は $p < 0.01$ を、アスタリスク 3 つ (***) は $p < 0.001$ をそれぞれ示す。(D) siRNA を導入した MDCT 細胞をさまざまな細胞外 Mg^{2+} 濃度の培地中で 16 時間培養した。細胞を回収後、qRT-PCR 法により TRPM6 の mRNA 量を測定した。実験結果は 7-10 回の平均 \pm 標準誤差で示しており、 p 値はそれぞれスチューデントの t 検定 (両側) を用いて行った。アスタリスク 2 つ (**) は $p < 0.01$ を、アスタリスク 3 つ (***) は $p < 0.001$ をそれぞれ示す。

3.3 TRPM6 欠損マウスでの血圧低下

次に TRPM6 と血圧との関係を明確にするため、TRPM6 の遺伝子欠損マウスを作出した (Fig. 4A, B)。全身で TRPM6 を欠損している *Trpm6*^{+/+} マウス同士の交配か

らは TRPM6 ホモ欠損の産仔は得られず (Fig. 4C)、既報通り TRPM6 を全身でホモ欠損しているマウスは胎性致死であることが確認された。そこで次に *FlpO* マウスとの交配により *Trpm6*^{fl} アレルを作成し、さらに *Six2-Cre* マウスと

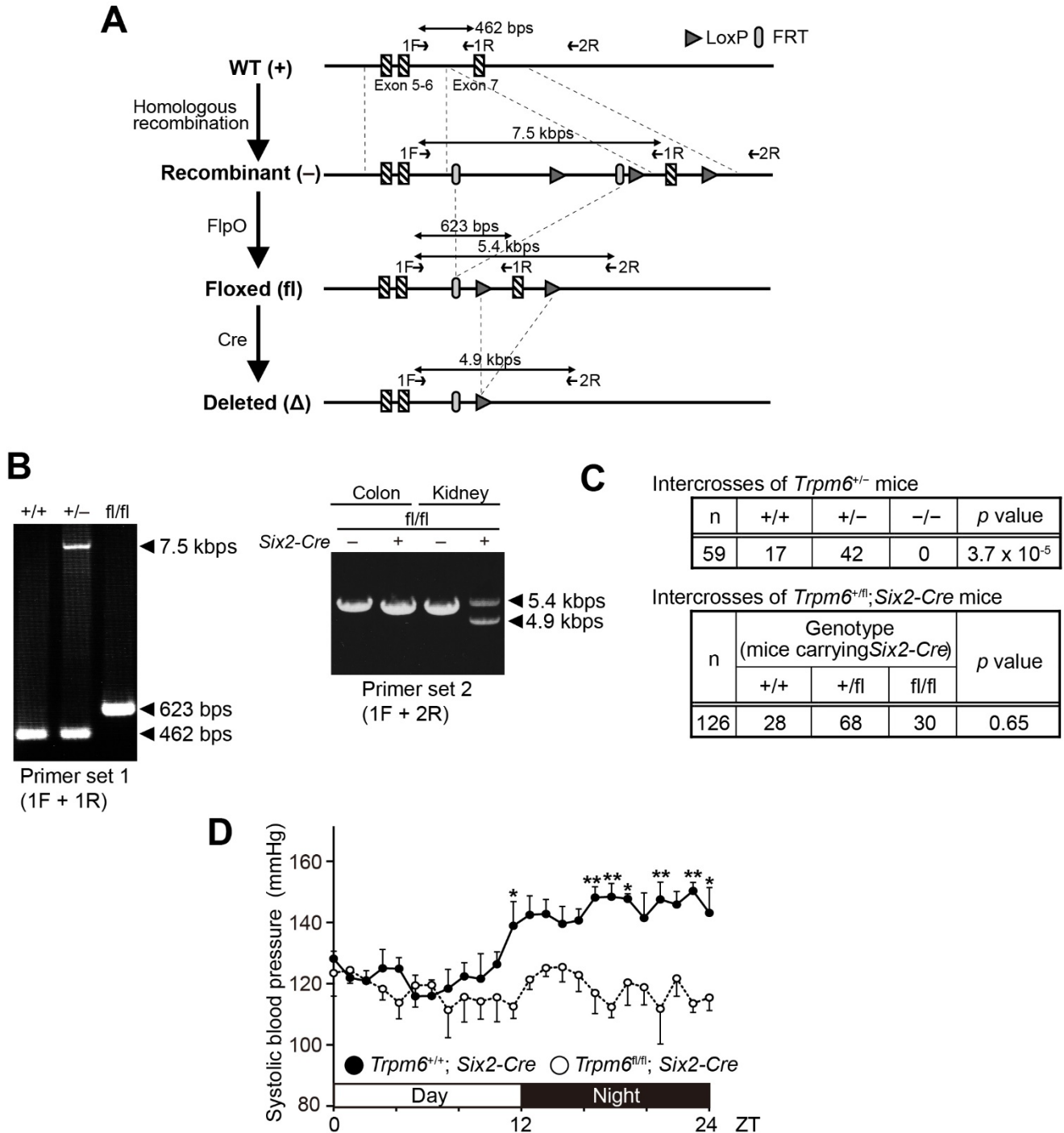


Fig. 4. TRPM6 欠損マウスの表現型

(A) TRPM6 欠損マウスの設計図 (B) PCR による TRPM6 欠損の確認 (C) 各遺伝子型のマウスの交配時における産仔数 (D) 各遺伝子型のマウスの血圧をテレメリー法にて測定した。実験結果は各 4 匹の平均 ± 標準誤差で示しており、*p* 値は 2-way ANOVA を用いて行った。アスタリスク 1 つ (*) は *p* < 0.05 を、アスタリスク 2 つ (**) は *p* < 0.01 をそれぞれ示す。

交配させることで腎臓特異的に TRPM6 を欠損する *Trpm6^{fl/fl}; Six2-Cre* マウスを作出した。*Trpm6^{fl/fl}; Six2-Cre* マウスの産仔数はコントロールマウス (*Trpm6^{+/+}; Six2-Cre*) と比べて有意な差はなかった (Fig. 4C)。この *Trpm6^{+/+}; Six2-Cre* マウスと *Trpm6^{fl/fl}; Six2-Cre* マウスを用いて、テレメトリー法により血圧を測ったところ、*CNNM2* 欠損マウスと同様に血圧が低下していた (Fig. 4D)。つまり、これまでの仮説どおり腎臓遠位尿細管におけるマグネシウム再吸収に共役して血圧が制御されていることが裏付けられた。また興味深いことに、通常のマウスでは活動期(マウスの場合は夜間)に入るとみられる血圧上昇が *TRPM6* 欠損マウスではほとんど消失していた。

4. 考察

本研究により *CNNM2* 欠損により腎臓遠位尿細管での TRPM6 の発現量が低下することが明確となった。そして MDCT 細胞を用いた実験も含め、細胞内での Mg^{2+} の蓄積が TRPM6 発現低下の原因であることが明らかとなった。これまで食餌中のマグネシウム量と TRPM6 の発現量が逆相関することは知られていたが⁽²⁹⁾、細胞内の Mg^{2+} 濃度が重要であることも今回の解析から明確になった。細胞内の Mg^{2+} がどのように TRPM6 の発現量を制御しているのかは不明である。我々は最近、TRPM6 と同様に低マグネシウム状態で発現量が上昇する分子 PRL の解析を行い、転写因子 STAT が重要であることを発見している⁽³⁰⁾。TRPM6 のプロモーター領域にも STAT のコンセンサス配列が存在しており、PRL と同様に STAT によって発現量が Mg^{2+} 依存的に制御されている可能性がある。

5. 今後の課題

本研究により TRPM6 と *CNNM2* を介した腎臓での Mg^{2+} 再吸収が血圧調節に重要であることが明確となったが、その具体的な分子機序については今後の検討課題として残されている。両タンパク質が発現する遠位尿細管で高発現する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大きな変化はなかったことから、NCC を介さない形での血圧制御を行っていると考えられる。特に TRPM6 の遺伝子改変マウスでは活動期での血圧上昇が起こらなかったことから、活動期における血圧上昇に重要な役割を果たしているレニンの分泌状況などに変化が起

こっている可能性がある。これらの点を含め今後詳細な解析を進めることで、マグネシウム再吸収を介した血圧調節機構の詳細を明らかにできると期待される。

6. 文献

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. *et al.* Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. *Science* **285**, 103–106 (1999).
5. Schlingmann, K.P. *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).
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. *et al.* 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. *et al.* Regulation of vertebrate cellular Mg^{2+} homeostasis by TRPM7. *Cell* **114**, 191–200 (2003).
10. Voets, T. *et al.* TRPM6 forms the Mg^{2+} influx channel involved in intestinal and renal Mg^{2+} absorption. *J. Biol. Chem.* **279**, 19–25 (2003).
11. Ryazanova, L.V. *et al.* TRPM7 is essential for Mg^{2+} homeostasis in mammals. *Nat. Commun.* **1**, 109

- (2010).
12. Chubanov V. *et al.* Epithelial magnesium transport by TRPM6 is essential for prenatal development and adult survival. *Elife* **5**, e20914 (2016).
 13. Walder, R.Y. *et al.* defective in *Trpm6* show embryonic mortality and neural tube defects. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4367–4375 (2009).
 14. Yamazaki, D. *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. *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel gene family of four ancient conserved domain proteins (ACDP). *Gene* **306**, 37–44 (2003).
 16. Stuver, M. *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. *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^{2+} efflux suppresses tumor progression. *J. Clin. Invest.* **124**, 5398–5410 (2014).
 19. Hirata, Y., Funato, Y., Takano, Y., and Miki, H. Mg^{2+} -Dependent Interactions of ATP with the Cystathionine- β -Synthase (CBS) Domains of a Magnesium Transporter. *J. Biol. Chem.* **289**, 14731–14739 (2014).
 20. Funato, Y., Yamazaki, D., and Miki, H. Renal function of cyclin M2 Mg^{2+} transporter maintains blood pressure. *J. Hypertens.* **35**, 585–592 (2017).
 21. Levy, D. *et al.* Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat. Genet.* **41**, 677–687 (2009).
 22. Kato, N. *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).
 23. Yamazaki, D., Miyata, H., Funato, Y., Fujihara, Y., Ikawa, M., and Miki, H. The Mg^{2+} transporter CNNM4 regulates sperm Ca^{2+} homeostasis and is essential for reproduction. *J. Cell Sci.* **129**, 1940–1949 (2016).
 24. Kobayashi, A. *et al.* Six2 defines and regulates a multipotent self-renewing nephron progenitor population throughout mammalian kidney development. *Cell Stem Cell* **3**, 169–181 (2008).
 25. Gesek, F.A. and Friedman, P.A. Mechanism of calcium transport stimulated by chlorothiazide in mouse distal convoluted tubule cells. *J. Clin. Invest.* **90**, 429–438 (1992).
 26. Funato, Y. *et al.* Nucleoredoxin sustains Wnt/ β -catenin signaling by retaining a pool of inactive dishevelled protein. *Curr. Biol.* **20**, 1945–1952 (2010).
 27. Ohno, M. *et al.* Immunolocalization of WNK4 in mouse kidney. *Histochem. Cell Biol.* **136**, 25–35 (2011).
 28. Günther, T. Concentration, compartmentation and metabolic function of intracellular free Mg^{2+} . *Magnes. Res.* **19**, 225–236 (2006).
 29. Groenestegge, W.M. *et al.* The epithelial Mg^{2+} channel transient receptor potential melastatin 6 is regulated by dietary Mg^{2+} content and estrogens. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1035–1043 (2006).
 30. Yoshida, A., Funato, Y., and Miki, H. Phosphatase of regenerating liver maintains cellular magnesium homeostasis. *Biochem. J.* **475**, 1129–1139 (2018).

Blood Pressure Regulation Coupled with Magnesium Reabsorption

Yosuke Funato, Hiroaki Miki

Department of Cellular Regulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

Summary

In this study, we aimed to clarify the relationship between Mg^{2+} exporting protein CNNM2 and blood pressure regulation. For this purpose, we focused on Mg^{2+} -permeable cation channel TRPM6, since microarray analyses revealed that the expression level of TRPM6 was significantly downregulated in CNNM2-knockout kidneys.

First, to confirm the result of microarray analyses, we quantified the TRPM6 expression level in CNNM2 knockout mouse kidneys via qRT-PCR, and confirmed that TRPM6 expression is indeed downregulated. The result was also confirmed by immunoblotting and immunofluorescence studies. To explore the mechanism of this TRPM6 downregulation, we next performed a series of analyses with distal convoluted tubule cell-derived cell line, MDCT. CNNM2 and/or CNNM4 knockdown raised the intracellular Mg^{2+} level, and the expression level of TRPM6 downregulated concomitantly. Also, when we reduced the extracellular (or medium) Mg^{2+} level, the downregulation of TRPM6 by CNNM2/4 knockdown was not observed. These results suggest that TRPM6 expression level is regulated through Mg^{2+} availability.

Furthermore, to clarify the relationship between TRPM6 and blood pressure regulation, we generated TRPM6 knockout mice. As reported, systemic knockout of TRPM6 revealed to be embryonic lethal, and when we generated kidney-specific TRPM6 knockout mice, the blood pressure was downregulated, as CNNM2 knockout mice are. Therefore, these results point out the importance of renal magnesium reabsorption in blood pressure regulation. Further detailed analyses will clarify the molecular mechanism of this blood pressure regulatory machinery.