

## マグネシウム輸送体を介した血圧日周変動の制御機構の解明

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

TRPM6 は腎臓の遠位尿細管に強く発現し、その頂端部に局在している。この分子の機能として、マグネシウムの再吸収に携わり、全身のマグネシウム恒常性に貢献する分子として知られている。我々はこれまでにこの TRPM6 の新たな機能として、血圧の日周性に重要であることを明らかにしてきた。TRPM6 の腎臓特異的ノックアウトマウスでは既報のとおり腎臓におけるマグネシウムの再吸収不全を示していたが、それだけでなく血圧の日周変動がほぼ完全に消失することを明らかにしてきた。一方で、活動量については日周変動がほぼ野生型と同一であり、異なる原因で血圧の日周変動が消失していると考えられた。そこで本研究はこの TRPM6 の腎臓特異的欠損により血圧の日周変動が消失する原因を探るべく、各種解析を行った。

TRPM6 が高発現する遠位尿細管細胞の隣には緻密斑と呼ばれる部位があり、レニンの分泌を制御している。レニンは血圧と同様に活動期にその血中量が高くなること、そして血圧の制御に重要な役割を果たしていることが知られている。そして予備的検討より、TRPM6 の腎臓特異的ノックアウトマウスでは夜間でも血中レニン量が低いことも突き止めていた。そこで1日を6時点に分けて血液を採取し、血中レニン量を測ることで血中レニン量の日周性を調べたところ、血圧と同様に TRPM6 の腎臓特異的ノックアウトマウスで日周性がほぼ完全に消失していた。

また蛍光免疫染色やスライス培養法を用いた検討から、TRPM6 が高発現する遠位尿細管が緻密斑だけでなく、レニンの分泌細胞である傍糸球体細胞にも隣接すること、そしてアドレナリン刺激によるレニンの分泌が TRPM6 の腎臓特異的欠損により減弱していることが明らかとなった。つまり、TRPM6 の腎臓特異的欠損により交感神経刺激依存的なレニン分泌が抑制された結果、交感神経が活発に作動する活動期になってもレニンの血中量が上がらず、血圧の日周性が生じなくなると想定された。今後、なぜ TRPM6 の欠損によりなぜアドレナリン刺激への応答性が生じなくなったのかなど、さらなる詳細な解析を進めることで、TRPM6 を介した血圧の日周性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

高血圧は肥満とならび寿命を縮める大きな要因であり、虚血性心疾患や脳卒中などの致死性疾患との関わりが指摘されている。これらの高血圧関連の発作は血圧が急に上昇する活動期の開始時、すなわちヒトでは早朝に頻繁に生じることが知られている<sup>(1)</sup>。この血圧上昇は交感神経系の活動に伴うレニンの分泌が密接に関わっていると考えられているが、その制御機構はよくわかっていない<sup>(2)</sup>。

血圧の制御にはナトリウムやカリウムを含めた、食事でのミネラルが密接に関わっている。マグネシウムは様々な生命現象に関わる必須ミネラルとして知られており、疫学的な調査よりマグネシウムの摂取量と血圧との間に有意な負の相関があることが示されている<sup>(3-6)</sup>。また摂取量だけでなく、マグネシウムの体内への吸収量とほぼ一致することが知られている、尿からのマグネシウム排泄量も高血圧の発症率と負の相関を示すことも報告されている<sup>(7)</sup>。これら一連の報告は個体レベルでのマグネシウム恒常性の維

持が血圧調節に重要であることを示すものであり、さらにはマグネシウム恒常性維持に関わる  $Mg^{2+}$  輸送体の血圧調節への関与を示唆するものと位置づけられる。

全身レベルでのマグネシウム恒常性維持は、主に腸からの吸収と腎臓での再吸収が大きな貢献を果たしており、特に腎臓では多量のマグネシウムが絶えず再吸収されている。糸球体で血液がろ過されてできた原尿には多量のマグネシウムが含まれており、尿細管の各種部位を通る過程でその大半が再吸収される。量的には腎臓尿細管の中でもヘンレ係蹄の太い上行脚と呼ばれる部位で最も多く再吸収されるが、最終的に尿中に含まれるマグネシウムの量そのものは遠位曲尿細管 (Distal convoluted tubule, DCT) での再吸収の割合によって厳密に制御されている<sup>(8)</sup>。DCTを含め、各部位でのマグネシウム再吸収に関わる分子群は、低マグネシウム血症を示す各種先天性疾患の患者を対象とした遺伝学的解析から明らかにされてきた。二次性の低カルシウム血症を伴う家族性劣性低マグネシウム血症 (Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia, HSH; <https://omim.org/entry/602014>) の患者は、transient receptor potential melastatin-related 6 (TRPM6) という  $Mg^{2+}$  透過性のイオンチャネルに変異を有する<sup>(9, 10)</sup>。TRPM6 は DCT 細胞のアピカル (管腔) 側に局在しており、原尿から DCT 細胞への  $Mg^{2+}$  の取り込みを司る<sup>(11)</sup>。DCT を介したマグネシウム再吸収に関与するもう一つの重要分子が基側部に局在する  $Mg^{2+}$  トランスポーター cyclin M2 (CNNM2) である<sup>(12, 13)</sup>。CNNM2 遺伝子の変異は優性の家族性低マグネシウム血症の原因となっており (<https://www.omim.org/entry/616418>)、患者の解析より腎臓におけるマグネシウム再吸収に異常が生じていることも報告されている<sup>(12, 14)</sup>。CNNM2 の欠損によるマグネシウム再吸収異常と血中マグネシウム量の低下はマウスにおける腎臓特異的な *Cnnm2* ノックアウトにより、実験的にも証明されている<sup>(15)</sup>。CNNM2 は DCT 細胞の基側部より  $Mg^{2+}$  を排出することで、DCT を介したマグネシウム再吸収に寄与している<sup>(16)</sup>。また興味深いことに、*Cnnm2* ノックアウトマウスはマグネシウム再吸収不全だけでなく、血圧の低下を示すことも明らかにされている。この実験結果は GWAS 解析による高血圧関連遺伝子の解析で、複数のグループにより CNNM2 がトップランクの遺伝子として挙げられたこととも合致する<sup>(17, 18)</sup>。しかし、CNNM2 により血圧が制御される、

その詳細な仕組みについてはまだほとんどわかっていない。

そこで我々はマイクロアレイにより *Cnnm2* ノックアウトマウスの腎臓での遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、いくつかの遺伝子の発現が有意に変動しており、特に興味深いことに、CNNM2 と同じ遠位尿細管に高発現し、マグネシウムの再吸収に寄与する TRPM6 の遺伝子発現レベルが下がっていた。そこで *Trpm6* の腎臓特異的ノックアウトマウスを作成したところ、*Cnnm2* の腎臓特異的ノックアウトマウスと同様に血圧が低下していた。また興味深いことに、*Trpm6* の腎臓特異的ノックアウトマウスでは通常のマウスで見られる血圧の日周変動が損なわれていることも突き止めている。そこで本研究では、この *Trpm6* の腎臓特異的欠損マウスで見られた表現型の詳細をさらに明らかにする目的で、各種解析を行った。

## 2. 研究方法

### 2.1 マウス

*Trpm6* ノックアウトマウスは International Mouse Phenotyping Consortium より購入した *Trpm6* 欠損 ES 細胞を用いて作出した。キメラマウスと *Trpm6* の trapped アレル (-) をもつマウス (*Trpm6*<sup>fl/fl</sup>) を作出したのち、*FlpO* マウス<sup>(19)</sup> との交配により floxed アレル (fl) を、そして腎尿細管で特異的に Cre リコンビナーゼを発現する *Six2-Cre* マウス<sup>(20)</sup> との交配により腎臓特異的な *Trpm6* ノックアウトマウス (*Trpm6*<sup>fl/fl</sup>; *Six2-Cre*) を得た。

### 2.2 テレメトリ法による血圧測定

マウスの頸動脈に外科的に血圧測定用のカテーテル (TA11PA-C10, Data Sciences International 社) を挿入し、2-3 週間の回復期間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 5 日間連続で計測した。各々のマウスについて、各日の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 抗体

本研究では以下の 1 次抗体を利用した。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<sup>(21)</sup>, 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、精製したものをを用いてアフィニティー精製したもの、ヒツジ抗レニン抗体: Innovative Research 社より購入、ウサギ抗 nNOS 抗体: Cayman 社より購入。また、下記の市販の蛍光標識 2 次抗体も利用している。Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体, Alexa Fluor 488 標識抗ヒツジ IgG 抗体, Alexa Fluor 568 標識抗ウサギ IgG 抗体および Alexa Fluor 568 標識抗モルモット IgG 抗体: いずれも Life technologies 社より購入。

## 2. 4 抗体染色

マウスより摘出した腎臓組織を氷冷 PBS で洗浄したのち、OCT compound (サクラファインテック社)中に包埋し、その後クライオスタット CM1900 (ライカ社)を用いて厚さ 20  $\mu\text{m}$  の切片を作成した。サンプルを氷冷 2%パラホルムアルデヒド/PBS で 10 分間固定した後、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 4°Cにて 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°C、一晚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°C、一晚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 (オリンパス社)を使用した。

## 2. 5 血中レニンの定量

マウスの全血液を下行大動脈より採取し、EDTA を含むチューブに回収した。すぐに遠心を行い、その上清を血漿サンプルとして使用した。レニンの測定は Abcam 社より購入した Renin assay kit (fluorometric)を利用した。

## 2. 6 腎臓切片のスライス培養

マウスより摘出した腎臓組織を氷冷した生理食塩水で洗浄し、ビブラトーム (Dosaka EM 社)を用いて厚さ 0.4 mm の組織スライス片を作成した。その後、Krebs-Ringer bicarbonate solution (KRBS; 118.5 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM Glucose, saturated with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> and adjusted to pH 7.4) 下にて 37°Cで 15 分インキュベートした。KRBS で洗浄後、薬剤を含む KRBS 下で 37°Cにて 30 分インキュベートした。スライス片はその後 2%パラホルムアルデヒドで 4°C、2 時間インキュベートすることで固定し、上の 2. 4 と同様の手法で免疫蛍光染色を行った。処理し

た薬剤は以下のとおり、イソプロテレノール: シグマ社より購入, PGE<sub>2</sub>: Cayman 社より購入, db-cAMP: 富士フィルム和光純薬社より購入。

## 2. 8 RNA 回収と定量 PCR

RNA はマウスより摘出した臓器より、RNAiso plus (Takara 社)を用いて抽出した。その後、定量 PCR は Luna Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs 社)を用いて、Mini Opticon リアルタイム PCR 検出システム (Bio-Rad 社)にて行った。用いた各プライマーの配列は下記の通りである。*Bmal1*: 5'-GCA GTG CCA CTG ACT ACC AAG A -3' および 5'-TCC TGG ACA TTG CAT TGC AT-3', *Per2*: 5'-GGC TTC ACC ATG CCT GTT GT-3' および 5'-GGA GTT ATT TCG GAG GCA AGT GT-3', *Trpm7*: 5'-TTT GGT GTT CCC AGA AAA GC-3' および 5'- ACC AAG TTC CAG GAC CAC AG-3'。

## 2. 9 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)あるいは 2-way ANOVA (Holm-Sidak post hoc tests)のいずれかを用いて行い、 $p < 0.05$  を有意と判定した。

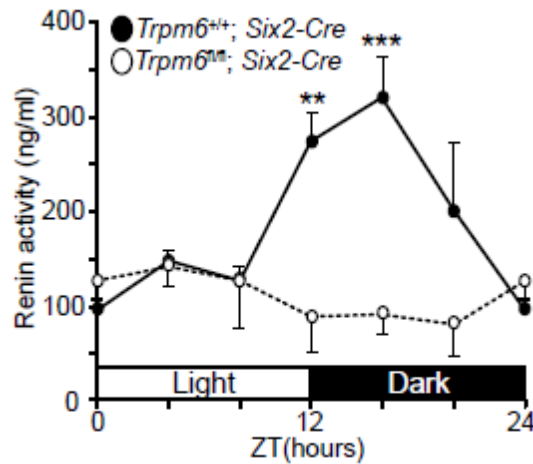
## 3. 研究結果

### 3. 1 *Trpm6* の腎臓特異的ノックアウトマウスにおけるレニン分泌の日周変動の消失

レニンは血圧の調節に重要な役割を果たしており、またその血中量は血圧とほぼ同様の日周期性、つまり活動期に高くなることが知られている。そこで、*Trpm6* の腎臓特異的ノックアウトにより血圧の日周変動が損なわれた原因を探る目的で、4 時間おきにマウスの全血を採取し、レニンの血中量を測定した。その結果、**Fig. 1** に示すように野生型マウスでは既報どおり明確な日周変動を示しており、血圧同様に活動期に高くなっていたのに対して、*Trpm6* の腎臓特異的ノックアウトマウスでは変動がほぼ消失しており、この血中レニンの日周性の消失が血圧の日周変動の消失に関与している可能性が示唆された。

### 3. 2 DCT はレニン分泌細胞に隣接する

TRPM6 の発現する DCT 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に伴う体液量の調節を介して、血圧制御にも重要な役割を担っていることが知られている<sup>(16)</sup>。DCT のアピカル膜にはサイアザイド系降圧剤の標的



**Fig.1** 腎臓特異的 *TRPM6* 欠損マウスにおける血中レニン量の日周変動の消失

各時刻 (ZT: zeitgeber time, ZT = 0 が明期の開始時で, ZT = 12 が暗期の開始時) にて各遺伝子型のマウス (2-4 か月齢) より全血を採取し, 血漿中のレニン活性を測定した。グラフはその平均±標準誤差を示している (n = 3-6)。各 *p* 値は 2-way ANOVA および Holm-Sidak post hoc tests によって求めた。\*\*は  $p < 0.01$ , \*\*\*は  $p < 0.001$  それぞれを表している。

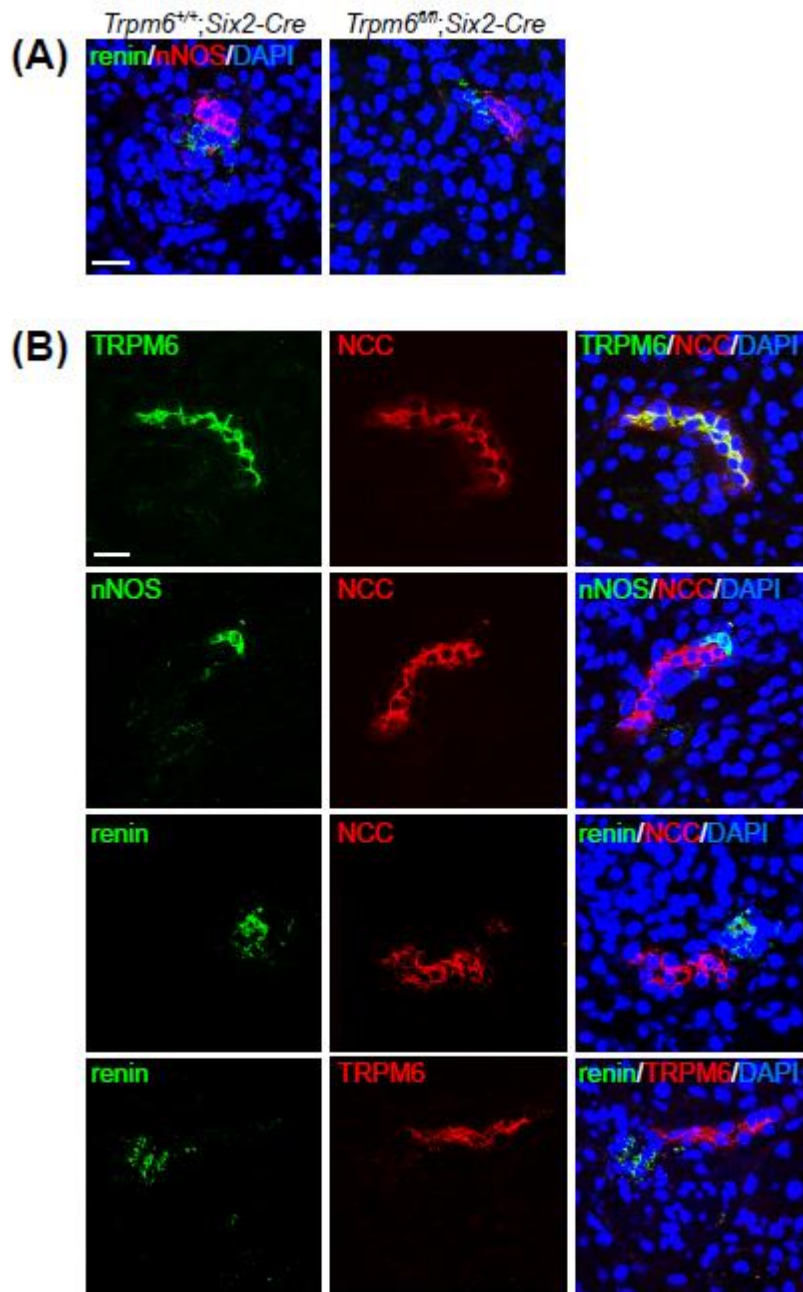
分子として知られる Na-Cl co-transporter (NCC) を筆頭に, 他にも epithelial sodium channel (ENaC) や Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 2 (NHE2) などが発現しており, 原尿から DCT への Na<sup>+</sup> の取り込みを担っている。DCT 細胞内の Na<sup>+</sup> はその後, 基側部に局在するポンプ分子 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase により排出されることで体内へと再吸収される。また DCT は緻密斑と呼ばれる, 尿細管の中でもレニン放出の調節に特化した細胞がある部位のすぐ下流にあることも知られている<sup>(20,21)</sup>。緻密斑の細胞は原尿中の Cl<sup>-</sup> 量を検知し, PGE<sub>2</sub> などの分泌を介して隣接する傍糸球体 (juxtaglomerular, JG) 細胞からのレニン分泌を促している。

*Trpm6* の腎臓特異的ノックアウトマウスで血中レニン量の日周変動が消失していたことから, *TRPM6* の発現する DCT が JG 細胞からのレニン分泌に関わっている可能性が考えられた。その可能性を検証する第一歩として, DCT と JG 細胞との間の位置関係を免疫蛍光染色法により調べた。まず緻密斑と JG 細胞のマーカータンパク質である nNOS およびレニンに対する抗体を用いて染色を行い, これまで多くのグループにより報告されているように, 両者が隣接することを確認した (Fig. 2A)。さらに, *TRPM6* およ

び NCC を DCT のマーカータンパク質として, それらに対する抗体と抗レニン, あるいは抗 nNOS 抗体を用いた共染色実験を行った。その結果, *TRPM6* および NCC の染色シグナルはレニンの染色シグナルといずれも隣接しており, DCT と緻密斑, そして JG 細胞がそれぞれ近傍に位置することが明らかとなった (Fig. 2B)。

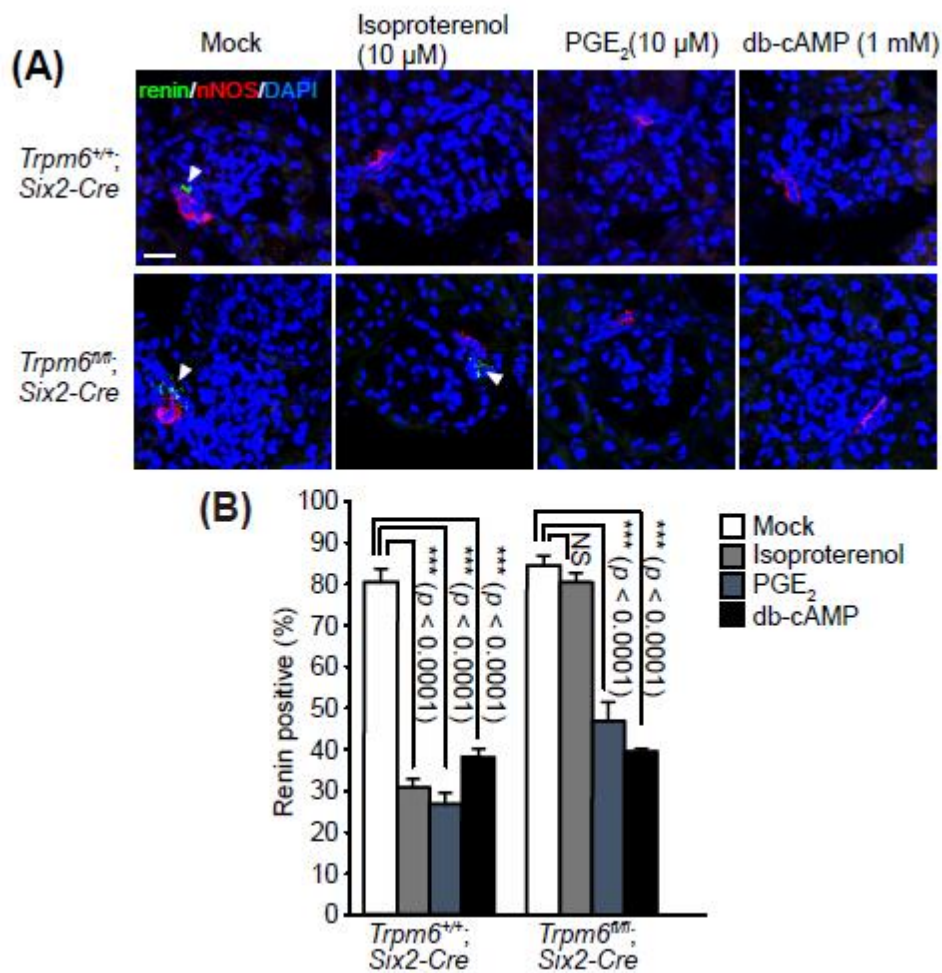
### 3. 3 スライス培養におけるレニンの放出

Fig. 1 のように *Trpm6* の腎臓特異的ノックアウトマウスでは活動期の血中レニン量の上昇が認められなかったことから, レニンの分泌に異常がある可能性が想起された。そこで, レニン分泌に対する *Trpm6* ノックアウトの影響をより直接調べる目的で, スライス培養系を用いた実験を行った。コントロールマウスにおいて, 摘出した腎臓より作成したスライス片を β アドレナリン受容体の作動薬であるイソプロテレノールで処理したところ, レニンの陽性シグナルがほぼ消失しており, 想定通り JG 細胞から分泌されることが確認された。一方で, *Trpm6* の腎臓特異的ノックアウトマウス由来の組織片をイソプロテレノールで処理した場合, レニンの陽性シグナルが消失した JG 細胞はほとんど観察されなかった (Fig. 3)。また, 緻密斑より分泌され, β アドレナリン



**Fig.2 DCT は JG 細胞と隣接している**

各遺伝子型のマウス(2か月齢)の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図で示した抗体による染色シグナルの、単独およびマージ像をそれぞれ図示している。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$  を示している。



**Fig.3** スライス培養におけるレニンの放出

- (A) 各遺伝子型のマウス(2-3か月齢)より採取した腎臓組織を用いて組織スライス片を作成し、各薬剤を投与し30分間インキュベートした。その後、蛍光抗体染色によりレニン(緑)およびnNOS(赤)を可視化した。スケールバーは20 μmを示している。
- (B) Aにおける、レニン陽性部位の割合の定量結果。棒グラフは平均±標準誤差を示しており、各 *p* 値は 2-way ANOVA および Holm-Sidak post hoc tests によって求めた。\*\*\*は  $p < 0.001$  を、NSは not significant, すなわち有意差なし( $p \geq 0.05$ )をそれぞれ表す( $n = 2-6$ )。

受容体刺激とは独立してレニンの分泌を促すプロスタグランジン(PG)E<sub>2</sub>処理や、βアドレナリン受容体刺激やPGE<sub>2</sub>処理の下流で産生され、レニン分泌を促すcAMPの膜透過性アナログであるdb-cAMPの処理ではいずれもコン

ロールマウスと*Trpm6*の腎臓特異的ノックアウトマウスで差異は見られなかった。つまり*Trpm6*の腎臓特異的ノックアウトにより、βアドレナリン受容体刺激に対する抵抗性が生

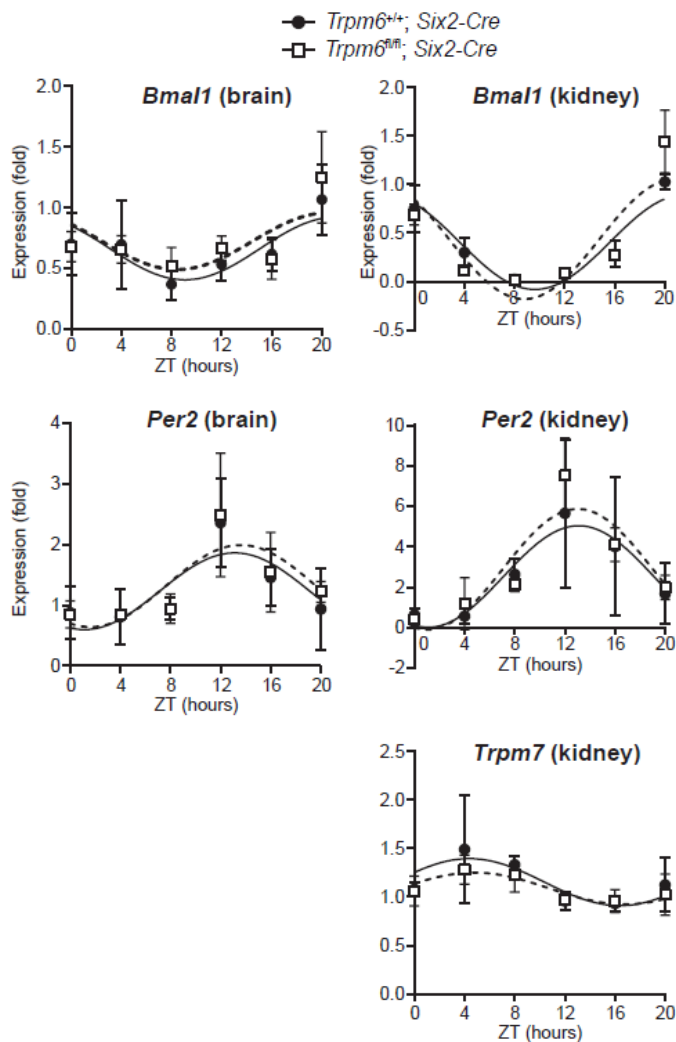


じており、その結果活動期になってもレニンの分泌が促進されないと想定された。

### 3. 4 時計遺伝子の発現変動

日周期性について、多くは「時計遺伝子」と呼ばれる概日リズムの制御に中心的な役割を果たしている遺伝子群が重要な役割を果たしている。そこで、概日リズム制御の起点となる脳、および実際 *Trpm6* がノックアウトされている腎臓における時計遺伝子の発現変動を定量 PCR 法によって調べた。代表的な時計遺伝子として知られる *Bmal1* お

よび *Per2* について調べたところ、**Fig. 4** に示すようにいずれも *Trpm6* の腎臓特異的ノックアウトによる差異は見られず、どちらの遺伝子型のマウスにおいても既報通りの明確な日周変動を示していた。そのため、*Trpm6* の腎臓特異的ノックアウトマウスで観察された血中レニン量の日周変動の消失は時計遺伝子の発現パターンの変化によるものではないことが明らかとなった。また類縁分子 *Trpm7* の発現量も調べたが、*Trpm6* の遺伝子型による違いは見られなかった。



**Fig.4** 腎臓および脳における各遺伝子の発現変動

各時刻のマウスより脳および腎臓の各組織を摘出し、RNAを単離後、定量PCR法により各遺伝子の発現量の時刻ごとの発現量を調べた。グラフにおける各点およびバーはそれぞれの平均±標準誤差 (n = 3-4)を示しており、また線はcosinor法を用いて作成した近似曲線である。

#### 4. 考 察

腎臓における TRPM6 の働きとして、これまでマグネシウムの再吸収における重要性が広く知られている。本研究はこれに加え、これまで知られていなかった働きとして、レニンの日周性を調節し、血圧の日周変動を制御することを明らかにした。また TRPM6 が高発現する DCT がレニン分泌細胞である JG 細胞と接していること、さらにはスライス培養を用いた解析より、アドレナリン受容体刺激によるレニンの分泌に TRPM6 が必要であることも突き止めている。今後どのようにして TRPM6 がアドレナリン受容体の状態を制御しているのか、その詳細を追究することで、TRPM6 によるレニン分泌、そして血圧の日周性の制御の仕組みが明らかになると想定される。

最近のヒトにおける大規模解析から血圧は寿命と密接に関わることが明らかになってきており<sup>(25)</sup>、またその日周変動、特に活動期開始時(ヒトの場合朝早く)の急激な血圧上昇は脳卒中など、高血圧に関連する致命的なイベントと深く関連していることが知られている<sup>(26)</sup>。この血圧上昇には交感神経系の活性化が寄与していると考えられており、腎臓への交感神経刺激を遮断する「腎デナベーション手術」と呼ばれる手法により活動期における過度な血圧上昇を防ぐことができる事例が報告されている<sup>(27-29)</sup>。しかし、この手術はかなりの技量を必要としており、効果がほとんど見られない症例も報告されている。特別な技術を必要としない、かつより確実な手法の開発が望まれており、今回明らかにした TRPM6 を介した血圧変動機構をより詳しく解析してゆくことで、その開発に貢献できる可能性がある。

#### 5. 文 献

1. Giles, T. D. Circadian rhythm of blood pressure and the relation to cardiovascular events. *J. Hypertens.* 24, S11–S16 (2006).
2. Smolensky, M. H., Portaluppi, F., & Hermida, R. C. Circadian and Cyclic Environmental Determinants of Blood Pressure Patterning. In *Blood Pressure Monitoring in Cardiovascular Medicine and Therapeutics, Third Edition.* (eds White, W. B.) Part II, Chapter 6, 105–128 (Springer, New York, 2016).
3. Witteman, J. C. et al. A prospective study of nutritional factors and hypertension among US women. *Circulation* 80, 1320–1327 (1989).
4. Ascherio, A. et al. A prospective study of nutritional factors and hypertension among US men. *Circulation* 86, 1475–1484 (1992).
5. Ascherio, A. et al. Prospective study of nutritional factors, blood pressure, and hypertension among US women. *Hypertension* 27, 1065–1072 (1996).
6. Song, Y. et al. Dietary magnesium intake and risk of incident hypertension among middle-aged and older US women in a 10-year follow-up study. *Am. J. Cardiol.* 98, 1616–1621 (2006).
7. Joosten, M. M. et al. Urinary and plasma magnesium and risk of ischemic heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 97, 1299–1306 (2013).
8. Giménez-Mascarell, P., Schirrmacher, C. E., Martínez-Cruz, L. A., & Müller, D. Novel Aspects of Renal Magnesium Homeostasis. *Front. Pediatr.* 6, 77 (2018).
9. 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).
10. Walder, R. Y. et al. Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat. Genet.* 31, 171–174 (2002).
11. Voets, T. et al. TRPM6 forms the Mg<sup>2+</sup> influx channel involved in intestinal and renal Mg<sup>2+</sup> absorption. *J. Biol. Chem.* 279, 19–25 (2004).
12. Stuver, M. et al. CNNM2, encoding a basolateral protein required for renal Mg<sup>2+</sup> handling, is mutated in dominant hypomagnesemia. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 333–343 (2011).
13. de Baaij, J. H. et al. Membrane topology and intracellular processing of cyclin M2 (CNNM2). *J. Biol. Chem.* 287, 13644–13655 (2012).
14. Arjona, F.J. et al. CNNM2 mutations cause impaired brain development and seizures in patients with hypomagnesemia. *PLoS Genet.* 10, e1004267 (2014).



15. Funato, Y., Yamazaki, D., & Miki, H. Renal function of cyclin M2 Mg<sup>2+</sup> transporter maintains blood pressure. *J. Hypertens.* 35, 585–592 (2017).
16. Hirata, Y., Funato, Y., Takano, Y., & Miki, H. Mg<sup>2+</sup>-dependent interactions of ATP with the cystathionine- $\beta$ -synthase (CBS) domains of a magnesium transporter. *J. Biol. Chem.* 289, 14731–14739 (2014).
17. Levy, D. et al. Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat. Genet.* 41, 677–687 (2009).
18. 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).
19. 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).
20. 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).
21. Ohno, M. et al. Immunolocalization of WNK4 in mouse kidney. *Histochem. Cell Biol.* 136, 25–35 (2011).
22. Kurtz, A. Renin release: sites, mechanisms, and control. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 377–399 (2011).
23. Friis, U. G. et al. Regulation of renin secretion by renal juxtaglomerular cells. *Pflugers Arch.* 465, 25–37 (2013).
24. Sakaue, S. et al. Trans-biobank analysis with 676,000 individuals elucidates the association of polygenic risk scores of complex traits with human lifespan. *Nat Med.* 26, 542–548 (2020).
25. Smolensky, M. H. et al. Circadian and Cyclic Environmental Determinants of Blood Pressure Patterning. In *Blood Pressure Monitoring in Cardiovascular Medicine and Therapeutics, Third Edition.* (eds White, W. B.) Part II, Chapter 6, 105–128 (Springer, New York, 2016).
26. Giles, T. D. Circadian rhythm of blood pressure and the relation to cardiovascular events. *J. Hypertens.* 24, S11–S16 (2006).
27. Krum, H. et al. Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: a multicentre safety and proof-of-principle cohort study. *Lancet* 373, 1275–1281 (2009).
28. Azizi, M. et al. Endovascular ultrasound renal denervation to treat hypertension (RADIANCE-HTN SOLO): a multicentre, international, single-blind, randomised, sham-controlled trial. *Lancet* 391, 2335–2345 (2018).
29. Kandzari, D. E. et al. Effect of renal denervation on blood pressure in the presence of antihypertensive drugs: 6-month efficacy and safety results from the SPYRAL HTN-ON MED proof-of-concept randomised trial. *Lancet* 391, 2346–2355 (2018).

## Regulation of Circadian Blood Pressure Variation via Magnesium Transporter

Yosuke Funato, Hiroaki Miki

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

### Summary

TRPM6 is a  $Mg^{2+}$  permeable channel which localizes at the apical membrane of the renal distal convoluted tubule. It is known to be important for the organismal  $Mg^{2+}$  homeostasis, by participating in magnesium reabsorption through this distal convoluted tubule cells. Our previous research revealed that TRPM6 is also involved in circadian blood pressure variation; renal specific knockout of *Trpm6* in mice not just show defective renal magnesium reabsorption as reported, but also almost completely blunted the circadian blood pressure variation. However, the circadian variation of the locomotor activity was not altered, and thus further study was awaited.

In this study, we analyzed this mouse strain to explore the mechanism behind this phenomenon. It is known that distal convoluted tubule, where TRPM6 expresses, is adjacent to macula densa, a region known to regulate renin secretion from juxtaglomerular cells. By immunofluorescence microscopy, we also found that distal convoluted cells are also at the proximity of juxtaglomerular cells. Renin is known to raise blood pressure, and as like the blood pressure, the blood renin content is also known to show circadian variation with sharp rise during the active period. Thus we analyzed the blood renin content of renal specific *Trpm6* knockout mice, and found that it did not elevate during the active period, which is very similar to the results of blood pressure measurement.

We also performed experiments using renal slice culture, and found that renin secretion by adrenergic agonist treatment was impaired by renal specific *Trpm6* knockout. Thus, it can be assumed that blood pressure variation was lost in renal specific *Trpm6* knockout mice was due to the defective adrenergic receptor activation, and further detailed analyses may clarify the overall molecular mechanism of this phenotype.