

マグネシウム輸送体を介した腎臓からの血圧日周変動制御の機構解明

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ており、マグネシウムの再吸収に寄与することが知られている。我々はこれまでこの TRPM6 の新しい機能として、血圧の日周性に重要であることを明らかにしてきた。TRPM6 の腎臓特異的欠損マウスでは腎臓でのマグネシウムの再吸収が損なわれるだけでなく、血圧の日周変動が抑制されていた。さらに活動期冒頭に分泌され血圧上昇に寄与するホルモンであるレニンの分泌が減弱していることも見つけており、本研究ではさらにこの詳細を明らかにする目的で各種解析を行った。

まず以前腎臓のスライス培養実験で明らかにした、傍糸球体細胞からのアドレナリン刺激依存的なレニン分泌の TRPM6 欠損による減弱を定量的に評価するべく、マウスにアドレナリン β 作動薬であるイソプロテレノールを投与し、血中へのレニン分泌量を調べた。するとコントロールマウスと異なり TRPM6 の腎臓特異的欠損マウスではイソプロテレノールを腹腔内投与しても血中レニン活性の上昇は限定的であり、以前の結果と合わせて TRPM6 の腎臓特異的欠損により傍糸球体細胞からのアドレナリン刺激依存的なレニン分泌が減弱していると結論づけた。

また腎臓の組織染色や単離した傍糸球体細胞を用いたウェスタンブロットより、TRPM6 の腎臓特異的欠損マウスでは傍糸球体細胞におけるアドレナリン $\beta 1$ 受容体の発現低下が起きており、その結果交感神経刺激に応答せず、レニン分泌の日周性が損なわれていると考えられた。実際、野生型マウスへのレニン阻害剤投与や腎デナベーション手術により、TRPM6 の腎臓特異的欠損と同様に血圧の日周性が抑制され、傍糸球体細胞へのカテコールアミン刺激に伴うレニン分泌が血圧日周性の制御に重要性であるという考えと合致する結果が得られた。

さらに、マグネシウム投与による血圧日周性への影響を調べたところ、高マグネシウム食を与えた野生型マウスでは顕著に腎臓遠位尿細管での TRPM6 の発現量が低下しており、そして血圧の日周性が弱まっていた。

これらの実験結果より、腎臓における TRPM6 が血圧日周性変動に重要であることがさらにサポートされ、またその発現量がマグネシウム投与によりコントロールできることも合わせて明らかとなった。

1. 研究目的

高血圧は加齢とともに発症率が高まる典型的な加齢性疾患のひとつであり、虚血性心疾患や脳卒中など、致死性の各種疾患へと結びつく。これら高血圧と関連した事象は血圧が急激に上昇する活動期の入り口、ヒトなどの昼行性動物では早朝の時間帯で頻繁に生じる¹⁾。この活動期初期の血圧上昇には交感神経系の活発化や、それに伴う昇圧ホルモンレニンの分泌が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²⁾。

血圧は食事から摂取するミネラルの量が密接に関わる。ナトリウムやカリウムの重要性がよく指摘されるが、疫学的な調査よりマグネシウムの摂取量が増えるにつれて血圧が低下傾向にあることも示されている³⁻⁶⁾。またマグネシウムは主に尿から排泄されることから、定常状態では摂取したマグネシウムのうち実際に腸から体内へと吸収される量は概ね尿中排泄量と合致するが、この尿中マグネシウム排泄量もまた高血圧の発症率と負の相関を示すことが報告されている⁷⁾。このような報告はいずれもマグネシウムの

恒常性を適正に保つことが血圧調節に重要であると示すものであり、さらにはマグネシウム恒常性維持に関わる各種マグネシウム輸送分子の血圧調節への関与を示唆するものと考えられる。

動物個体内におけるマグネシウム恒常性維持機構は腸からの吸収と腎臓での再吸収によって成り立つ。腎臓での再吸収について、血液が糸球体でろ過されることによって原尿が形成され、そこに含まれるマグネシウムは尿細管の各部位を通る過程で再吸収される。中でもマグネシウム再吸収の最終ステップを担うのが遠位尿細管(Distal convoluted tubule, DCT)であり、尿として排泄されるマグネシウム量を決定する⁸⁾。DCTの頂端部にはMg²⁺透過性の陽イオンチャネル TRPM6 が高発現しており、原尿からDCT細胞へとマグネシウムを取り込むことでこの部位でのマグネシウム再吸収の起点となる⁹⁻¹¹⁾。取り込まれたマグネシウムは反対の基側部に局在するMg²⁺排出トランスポーターcyclin M2 (CNNM2)を介して体内へ送り込まれる¹²⁻¹⁵⁾。マグネシウム再吸収における両分子の重要性は、双方の遺伝子変異がそれぞれ家族性低マグネシウム血症の原因となっていることや^{9, 10, 12, 14)}、それぞれの腎臓特異的欠損マウスを用いた解析の結果から明確に示されている^{15, 16)}。

このCNNM2は体内のマグネシウム恒常性維持だけでなく、血圧とも関連していることが大規模なゲノムワイド関連解析(GWAS)から指摘されている。実際CNNM2の腎臓特異的欠損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^{15, 16)}。このマウスを用いてトランスクリプトーム解析を行ったところ、腎臓でCNNM2を欠損させるとさまざまな遺伝子の発現が変動しており、中でも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の発現レベルが顕著に下がっていた¹⁶⁾。そしてTRPM6の腎臓特異的欠損マウスではCNNM2の腎臓特異的欠損時と同様に血圧が低下しており、さらに血圧の日周変動が損なわれていた。この血圧の日周変動消失の原因を追究したところ、活動期冒頭に分泌され血圧上昇に寄与するレニンの分泌が減弱しており、2021年度はさらにこの詳細を明らかにすべく各種解析を行った。

2. 研究方法

2.1 マウス

本研究では全て20 - 26°C、12時間の明暗周期に維持されたSPF環境で飼育した、C57BL/6J系統のマウスを利用した。TRPM6の遺伝子欠損マウスはInternational Mouse Phenotyping Consortiumより購入した、*Trpm6*遺伝子のtrappedアレル(-)を持つES細胞から作出した。キメラマウスを作出後、*FlpO*マウス¹⁷⁾との交配でfloxedアレル(f)を有するマウスを作出し、引き続き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¹⁸⁾と交配させ目的の腎臓特異的なTRPM6欠損マウス(*Trpm6*^{fl/fl}; *Six2-Cre*)を得た。

2.2 テレメトリ法による血圧測定および各種マウス処置

マウスの頸動脈に外科的に血圧測定用カテーテル(TA11PA-C10, Data Sciences International社)を挿入し、3-4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使用した。腎デナベーション手術はカテーテル挿入2週間前に以下の方法にて実施した。マウスの腹部を5-10mmほど切開し、腎血管を露出させた。その後周囲の結合組織を除去した後、95%エタノール下に2分浸した。直後にPBSに2分浸した後、縫合した。疑似手術の場合はエタノール処理以外を同様に実施した。アリスキレン投与は浸透圧ポンプ(ALZET社より購入)を皮下に埋め込むことで、25mg/体重(kg)/日の速度にて投与し、測定は皮下移植後翌日より開始した。マグネシウム投与は日本クレア社で調製した高マグネシウム(0.6%)含有食を血圧測定1ヵ月前から与えることで実施した。

2.3 抗体

本研究では以下の抗体を利用した。1次抗体;ウサギ抗TRPM6抗体:自作¹⁶⁾、モルモット抗NCC抗体:東京医科歯科大学、内田博士より供与¹⁹⁾、ヒツジ抗レニン抗体(染色用): Innovative Research社より購入、ヤギ抗レニン抗体(ウェスタンブロット用):R&D Systems社より購入、ウサギ抗アドレナリンβ1受容体抗体:Invitrogen社より購入。2次抗体;Alexa Fluor 488標識抗ウサギ、抗ヒツジIgG抗体、Alexa Fluor 568標識抗ウサギ、抗モルモットIgG抗体:いずれもLife technologies社より購入、アルカリホスファターゼ標識抗ウサギおよび抗ヤギIgG抗体:プロメガ社より購入。

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)中に包埋し液体窒素上で徐々に凍らせた。その後、クライオスタット CM1900(ライカ社)を用いて厚さ 20 μm 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, 1 時間インキュベートを 2 度行った。その後、PBS-MT で希釈した 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 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

マウスの血液を尾部より採取し、EDTA を含むチューブに回収後遠心した上清を血漿サンプルとして、Renin assay kit (Abcam 社より購入) を用いてレニン量を測定した。

2. 6 傍糸球体細胞の単離

4 匹のマウスより腎臓を採取し、バッファー1 (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 10 mM グルコース, 20 mM スクロース, 10 mM Tris-HCl [pH 7.4]) 中でミンチにした後、0.25%トリプシンと 0.1%コラゲナーゼを加え 37°C で 2 時間処理した。細胞塊をセルストーレーナー(ポアサイズ 40 μm , Falcon 社より購入)を用いて除き、通過した細胞をバッファー1で一度洗浄後 20 倍量の 30%等張パーコール液と混和した。この溶液を 27,000 \times g で 25 min 遠心して得られた 3 つのバンドをそれぞれ回収し、その後の解析に使用した。

2. 7 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 two-tailed t-tests (unpaired)あるいは two-way ANOVA および Holm-Sidak による 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 腎臓特異的な TRPM6 欠損によるアドレナリン刺激による血中レニン放出の減弱

これまでの解析より腎臓で TRPM6 を欠損させると、血圧だけでなく昇圧ホルモンであるレニンの血中レベルの日周期性もまた失われることがわかっている。さらに腎臓のスライス培養実験から、傍糸球体細胞からのアドレナリン刺激依存的なレニンの分泌が TRPM6 の欠損により減弱していることも見つかっており、このことが血圧日周期性の消失と関わっている可能性が考えられた。そこでまずこれまでの結果をより定量的に理解するべく、マウスにアドレナリン β 作動薬であるイソプロテレノールを投与し、血中へのレニン分泌を促した際の TRPM6 欠損の効果を調べた。コントロールマウス(*Trpm6*^{+/+}; *Six2-Cre* マウス)では想定どおりイソプロテレノールを腹腔内投与すると血中のレニン活性が有意に上昇しており、腎臓傍糸球体細胞の膜上に発現するアドレナリン β 1 受容体を刺激することでレニンの分泌が促進されたと考えられた (Fig.1)。一方で、TRPM6 の腎臓特異的欠損マウス(*Trpm6*^{fl/fl}; *Six2-Cre* マウス)ではイソプロテレノールを腹腔内投与しても血中レニン活性の上昇は限定的であり、以前の結果と合わせて TRPM6 の腎臓特異的欠損により傍糸球体細胞からのアドレナリン刺激依存的なレニン分泌が減弱していると結論づけた。

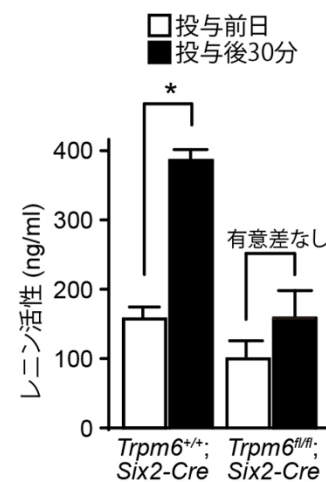


Fig.1 腎臓特異的な TRPM6 によるアドレナリン刺激依存的な血中レニン放出の減弱

各遺伝子型のマウスに 10 mg/kg のイソプロテレノールを腹腔内注射し、前日および投与後 30 分の血漿レニンを測定した。グラフは *Trpm6*^{+/+}; *Six2-Cre* マウス 4 匹分、*Trpm6*^{fl/fl}; *Six2-Cre* マウス 8 匹分の結果を平均±標準誤差で示し、 p 値は two-way ANOVA および Holm-Sidak による post hoc tests で求めた。アスタリスク(*)は $p < 0.05$ を示す。

* Nat. Commun. 12, 3683 (2021) より一部改変, 他の図も同様

3. 2 傍糸球体細胞上のアドレナリン β1 受容体の発現低下

交感神経が活性化されると、神経末端より放出されたカテコールアミンが傍糸球体細胞上のアドレナリン β1 受容体を活性化させ、その結果としてレニンが分泌される²⁰⁾。そこで TRPM6 欠損により傍糸球体細胞上のアドレナリン β1 受容体の性状に変化が起きている可能性を考え、抗アドレナリン β1 受容体抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。コントロールマウス由来の腎臓切片ではアドレナリン β1 受容体の染色シグナルが線状に観察され、これは血管上のアドレナリン β1 受容体が染色されていると考えられた。またその先端部にアドレナリン β1 受容体とレニンの双方の染色シグナルが観察される細胞を認め、これが傍糸球体細胞であると考えられた (Fig.2A)。一方で TRPM6 の腎臓特異的欠損マウス由来の切片では、血管部分と思われるアドレナリン β1 受容体の筋状のシグナルはコントロールマウスと同様に観察されたが、レニン陽性細胞ではアドレナリン β1 受容体のシグナルが見られない場合が多く、レニン、アドレナリン β1 受容体双方のシグナルが陽性の細胞の割合は有意に減少していた (Fig.2B)。この結果より傍糸球体細胞におけるアドレナリン β1 受容体の発現量低下の可能性が示唆されたので、より定量的に解析するべく傍糸球体細胞を生化学的に単離することとした。既報に倣って²¹⁾、採取した腎臓をトリプシンとコラゲナーゼを用いて細胞を分散させ、パーコール密度勾配遠心により分画を行った。過去の報告どおり複数のバンドが観察されたので、それぞれを分取し抗レニン抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、バンド 3 の細胞集団で強いレニンのシグナルが観察され、この画分に傍糸球体細胞が濃縮されていると考えられた。抗アドレナリン β1 受容体を用いたウェスタンブロットではバンド 2 およびバンド 3 にシグナルが観察され、また傍糸球体細胞が多く含まれると考えられたバンド 3 のシグナルは TRPM6 の腎臓特異的欠損マウスより採取したサンプルでは減弱していた。これらの結果より、TRPM6 の腎臓特異的欠損により傍糸球体細胞におけるアドレナリン β1 受容体の発現低下が起きており、その結果レニン分泌の日周性が損なわれていると考えられた。

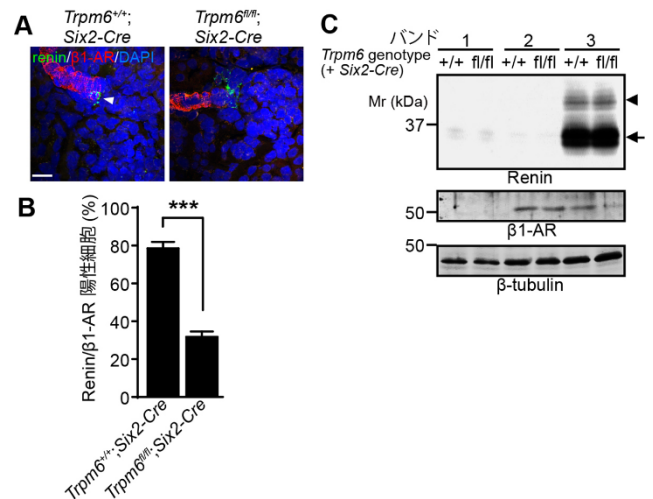


Fig.2 腎臓傍糸球体細胞におけるアドレナリン β1 受容体の発現低下

(A) 各遺伝子型のマウス腎臓の凍結切片の蛍光免疫染色を行った。スケールバー:20 μm

(B) レニンとアドレナリン β1 受容体 (β1-AR) のシグナルが双方観察される細胞が近接する糸球体の割合。3 匹のマウスの結果を平均±標準誤差で示し、*p* 値はスチューデントの two-tailed *t*-tests (unpaired) で求めた。アスタリスク 3 つは *p* < 0.001 を示す。

(C) 各遺伝子型のマウス腎臓より分離した細胞をパーコール密度勾配遠心で分画し、各画分の細胞溶解液をウェスタンブロットで解析した。矢頭、矢印はレニンの前駆体および成熟型を示す。

3. 3 レニン阻害および腎デナベーション術による血圧日周性の抑制

これまでの実験結果より、TRPM6 の腎臓特異的欠損による血圧の日周性の消失にはレニン分泌の減弱が関わっていると考えられた。そこでこの仮説を検証するべく、野生型マウスへのレニン阻害剤の投与実験を行った。臨床的にも用いられるレニン阻害剤として知られるアリスキレン²²⁾を皮下に埋め込んだ浸透圧ポンプを用いて投与したところ、血圧が低下しただけでなく、その日周性も弱まっており、これまで見つけてきた血中レニンの血圧日周性制御における重要性を裏付ける結果が得られた (Fig.3A)。さらに傍糸球体細胞からのレニン分泌の重要性を調べる目的で、傍糸球体細胞にカテコールアミン刺激を行う腎神経の除去 (腎デナベーション) 手術を野生型マウスに対して行った。このマウスの血圧を 24 時間測定したところ、TRPM6 の腎臓特異的欠損やアリスキレン投与時と同様に血圧の日周性が抑えられており、傍糸球体細胞へのカテ

コールアミン刺激に伴うレニン分泌が重要性であるという考えと合致する結果であった (Fig.3B)。

3.4 高マグネシウム食投与による血圧日周性の抑制

最後に、マグネシウム投与による血圧日周性への影響を調べた。マウスに高マグネシウム食 (0.6%マグネシウム含有) を与えた野生型マウスとコントロールの食餌 (0.3%マグネシウム含有) を与えた野生型マウスを準備した。まずはそれぞれのマウスにおける血中マグネシウム量を確認したところ、想定どおり高マグネシウム食投与マウスでは血中マグネシウム量が有意に増加していた (Fig.4A)。

またウェスタンブロットや蛍光免疫染色で TRPM6 の発現量への影響を調べたところ、高マグネシウム食投与マウスでは顕著に TRPM6 の発現量が低下しており、その効果は CNNM2 の腎臓特異的欠損よりも顕著であった (Fig.4B, C)。この高マグネシウム食投与マウスの血圧を測定したところ、TRPM6 の腎臓特異的欠損マウスと同様に血圧の日周性が弱まっていた (Fig.4D)。これらの実験結果より腎臓における TRPM6 が血圧日周性変動に重要であることがさらにサポートされ、またその発現量がマグネシウム投与によりコントロールできることも合わせて明らかとなった。

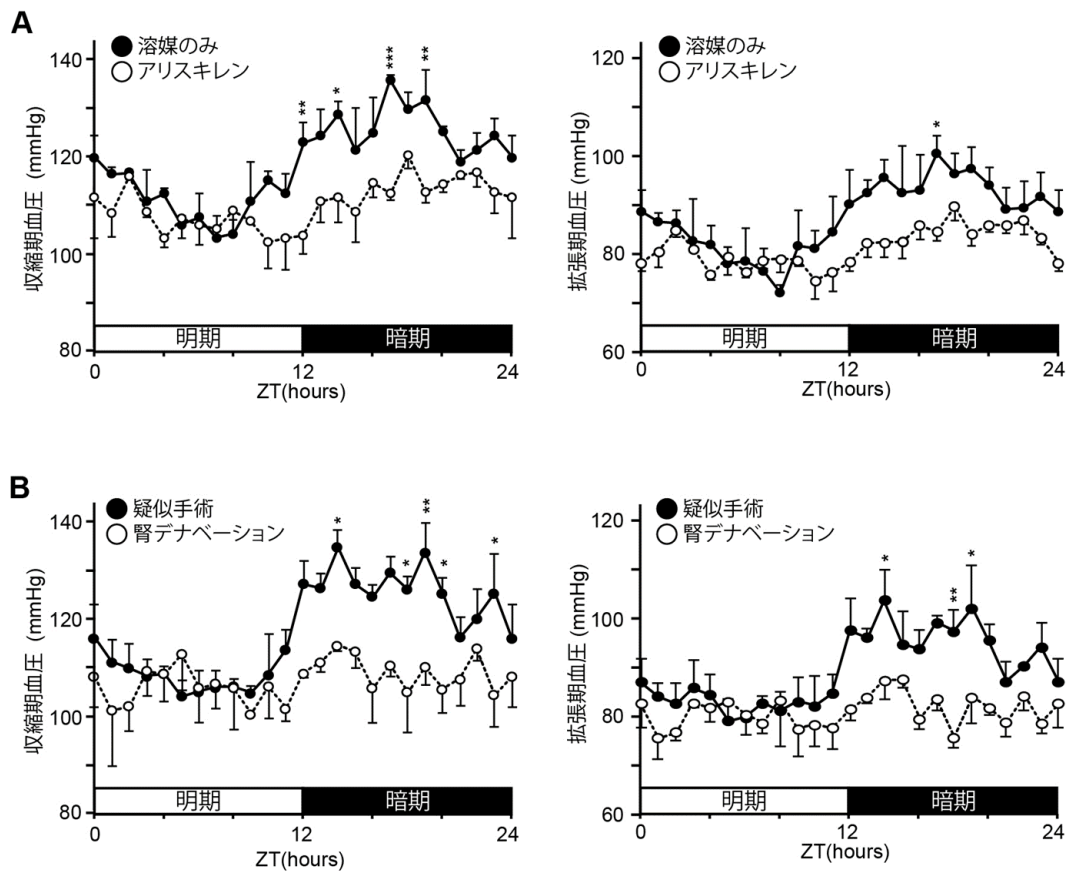


Fig.3 レニン阻害および腎デナベーション術の血圧日周性への影響

(A) 野生型マウスにアリスキレンを 25 mg/体重(kg)/日で投与し、血圧を測定した。

(B) 野生型マウスに腎デナベーション術を施し血圧を測定した。

A, B いずれも各群 3 匹ずつの結果を平均±標準誤差で示しており、*p* 値は two-way ANOVA および Holm-Sidak による post hoc tests で求めた。アスタリスク 1 - 3 つは $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ を示す。

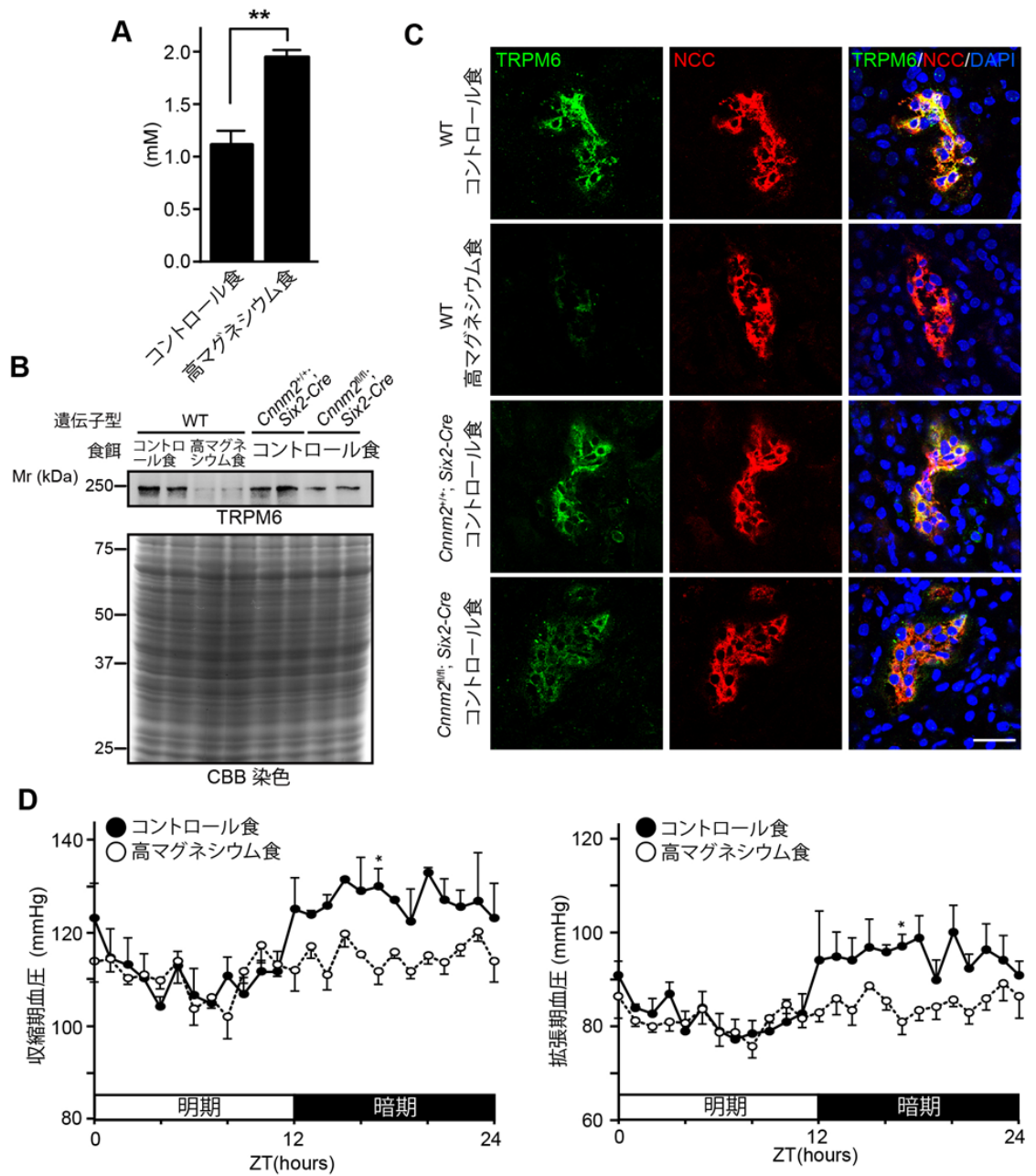


Fig.4 高マグネシウム食投与による血圧日周期性への影響

(A) 野生型マウスに図に示す食餌を与え、血中マグネシウム量をキシリジルブルーを用いて測定した。

グラフは各群 3 匹の平均±標準誤差を示し、*p* 値はスチューデントの two-tailed t-tests (unpaired)により求めた。

アスタリスク 2 つは *p* < 0.01 を示す。

(B) 各遺伝子型のマウスに図に示す食餌を与え、腎臓の溶解液を用いてウェスタンブロットを行った。

(C) 各遺伝子型のマウスに図に示す食餌を与え、腎臓から凍結切片を作成し蛍光免疫染色を行った。スケールバー: 20 μ m

(D) 野生型マウスに図に示した食餌を与え、血圧を測定した。各群 3 匹ずつの測定結果を平均±標準誤差で示しており、

p 値は two-way ANOVA および Holm-Sidak による post hoc tests により求めた。アスタリスク 1 つは *p* < 0.05 を示す。

4. 考察

本研究から TRPM6 の腎臓特異的マウスで生じている血圧の日周性の消失の仕組みとして、腎臓傍糸球体細胞でのアドレナリン β 1 受容体の発現低下に伴い活動期に生じる交感神経刺激に応答したレニンの分泌が減弱し、結果活動期における血圧上昇が損なわれることを発見した。近年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²³⁾、またその日周変動、特に活動期冒頭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²⁴⁾。この血圧上昇を防止する仕組みとして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」が実施されているが²⁵⁻²⁷⁾、この手術は技術的なハードルの高さから安定した結果が得られていない。今回明らかにした TRPM6 を介した血圧変動機構は同じ交感神経刺激に応答した血圧変動に関わっている一方で、マグネシウムの投与などより侵襲性の低い方法でも制御できる可能性が (Fig.4) 示唆された。現状ではなぜ TRPM6 の発現低下が近傍の傍糸球体細胞でのアドレナリン β 1 受容体の発現低下を引き起こすのかは不明であるが、今後その詳しい仕組みをさらに解析してゆくことで、この新しい血圧日周性制御機構の全容解明と、同機構を利用した新規血圧コントロール法の開発に貢献できる可能性がある。

6. 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. 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).
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. et al. 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^{2+} influx channel involved in intestinal and renal Mg^{2+} absorption. *J. Biol. Chem.* 279, 19–25 (2004).
12. Stuiver, 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).
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. et al. Renal function of cyclin M2 Mg^{2+} transporter maintains blood pressure. *J. Hypertens.* 35, 585–592 (2017).
16. Funato, Y. et al. Importance of the renal ion channel TRPM6 in the circadian secretion of renin to raise blood pressure. *Nat. Commun.* 12, 3683 (2021).

17. Yamazaki, D. et al. The Mg²⁺ transporter CNNM4 regulates sperm Ca²⁺ homeostasis and is essential for reproduction. *J. Cell Sci.* 129, 1940–1949 (2016).
18. 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).
19. Ohno, M. et al. Immunolocalization of WNK4 in mouse kidney. *Histochem. Cell Biol.* 136, 25–35 (2011).
20. Kurtz, A. Renin release: sites, mechanisms, and control. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 377–399 (2011).
21. Della Bruna, R. et al. Regulation of renin secretion and renin synthesis by second messengers in isolated mouse juxtaglomerular cells. *Cell Physiol. Biochem.* 1, 98–110 (1991).
22. Jensen, C. et al. Aliskiren: the first renin inhibitor for clinical treatment. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 399–410 (2008).
23. 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).
24. Giles, T. D. Circadian rhythm of blood pressure and the relation to cardiovascular events. *J. Hypertens.* 24, S11–S16 (2006).
25. 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).
26. 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).
27. 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).

Mechanistic Analyses of Circadian Blood Pressure Regulation via Renal Magnesium Transporting Molecules

Yosuke Funato and Hiroaki Miki

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

Summary

TRPM6 is a Mg^{2+} permeable channel strongly expresses at the renal distal convoluted tubule, and participates in magnesium reabsorption. We have previously revealed the novel role of TRPM6 as a regulatory molecule of circadian blood pressure variation; renal specific ablation of TRPM6 in mice not just show deficiency in magnesium reabsorption, but also showed suppressed circadian blood pressure variation. Moreover, we have found that the secretion of renin, the hormone involved in blood pressure control, is suppressed, and thus in this study we sought to clarify the detail of this impaired secretion.

First, to confirm and quantitatively evaluate the impaired renin secretion from the renal juxtaglomerular cells by TRPM6-deficiency, found from kidney slice culture experiments, we administered isoproterenol, a beta-adrenergic agonist, to mice and examined the amount of renin secreted into the blood. Expectedly, we found that unlike control mice, renal-specific TRPM6 knockout mice showed limited increase in blood renin activity after intraperitoneal isoproterenol administration. Next, we analyzed the expression level of adrenergic $\beta 1$ receptor at the juxtaglomerular cells by immunofluorescence analyses of kidney sections and western blotting analyses of isolated juxtaglomerular cells. The results show that renal-specific knockout of TRPM6 in mice results in decreased expression of adrenergic $\beta 1$ receptors in juxtaglomerular cells, which should lead to impaired response to sympathetic nerve stimulation and renin secretion. Consistently, administration of renin inhibitors or renal denervation to wild-type mice suppressed circadian variation of blood pressure, as in kidney-specific TRPM6 knockout mice. We also examined the effect of magnesium administration on circadian blood pressure variation. In wild-type mice fed a high-magnesium diet, TRPM6 expression in distal convoluted tubule was markedly decreased, and the circadian blood pressure variation was suppressed. Collectively, these results demonstrate that the importance of renal TRPM6 in circadian variation of blood pressure, and that it can be controlled by magnesium administration.