

## 腎臓でのマグネシウム輸送体を介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** 本研究は腎臓でのマグネシウム再吸収に寄与する TRPM6 にフォーカスした研究を行った。これまでの研究より、腎臓でのマグネシウム再吸収に寄与する CNNM2 の腎臓特異的遺伝子欠損マウスでは血圧が低下することを明らかにしていた。このマウスでは、CNNM2と同じ腎臓の遠位尿細管で高発現する TRPM6 の発現レベルが大きく低下しており、密接な結びつきが示唆された。そこで TRPM6 の腎臓特異的欠損マウスを作成したところ、CNNM2 の腎臓特異的欠損マウスと同様に血圧が大きく低下していただけでなく、通常のマウスでは観察される活動期における血圧上昇が全く見られず、血圧の日周変動がほぼ消失していることがわかってきた。

そこで本研究では、この TRPM6 の腎臓特異的欠損マウスのより詳細な解析に取り組んだ。まず TRPM6 の発現分布を確認したところ、既報通り腸や腎臓、肺で強く発現していた。また腎臓ではその中でも遠位尿細管の頂端部に局在しており、同じ細胞の基側部に局在する CNNM2 と共役してマグネシウムの再吸収に寄与するという、これまでのモデルに合致する結果が得られた。実際、TRPM6 の腎臓特異的欠損マウスでのマグネシウム恒常性に対する影響を調べたところ、血中のマグネシウム量は CNNM2 の腎臓特異的欠損マウスと似たレベルで低下しており、また尿中のマグネシウム量は血中とは異なり TRPM6 の腎臓特異的欠損マウスで増加していた。

その上で、TRPM6 の腎臓特異的欠損マウスで見られた血圧の日周変動が消失していた原因を探るべく、活動量や血中レベルに日周性が見られるホルモンの量を調べた。その結果、活動量や血中バソプレッシン量の日周変動についてはコントロールマウスと明確な差異は見られなかったが、血中のレニン活性について、コントロールマウスで見られる活動期での上昇が TRPM6 の腎臓特異的欠損マウスではほとんど消失していた。このマウスで見られる血圧の日周変動の消失を説明する実験結果であり、今後さらなる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

マグネシウムは必須ミネラルであり、すべての生命体にとって必須の元素である<sup>(1)</sup>。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<sup>(2,3)</sup>。また過剰なマグネシウムの蓄積も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ことが知られている。細胞レベルでは、マグネシウムイオン ( $Mg^{2+}$ ) は ATP の産生や分解を含む、数多くの酵素反応に必須であることが知られている。つまり、マグネシウムの量は細胞・個体レベルの双方で厳密に調節されている必要があると考えられている。

個体レベルにおいて、マグネシウムの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いる。またそれぞれの臓器で、上皮細胞の内部を  $Mg^{2+}$  が通る「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」の二つが存在している。このうち paracellular pathway 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) の解析をきっかけに明らかにされてきた<sup>(4,5)</sup>。この家族性低マグネシウム血症の患者を解析した結果、原因遺伝子として密着結合を形成する

claudin-16/paracellin-1 および claudin-19 をコードする *CLDN16* および *CLDN19* が同定された。そしてその後の解析より、これらのクローディング分子は細胞同士の隙間に、 $Mg^{2+}$ を含む各種陽イオンが通過できるポアを形成することが明らかにされている。もう一つのマグネシウム吸収／再吸収経路である transcellular pathway については、「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)の患者の解析より、原因遺伝子が  $Mg^{2+}$ 透過性の陽イオンチャネル transient receptor potential – melastatin subfamily (TRPM)6 をコードしていることが報告されている。TRPM6 は類縁分子である TRPM7 と共に、腸の上皮細胞や腎臓の遠位尿細管細胞の頂端(管の内腔)側から細胞内に  $Mg^{2+}$ を取り込むことで transcellular pathway の起点となっている<sup>(6-10)</sup>。実際、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<sup>(11-13)</sup>。

Transcellular pathway による  $Mg^{2+}$ の吸収／再吸収には、TRPM6 や TRPM7 により頂端側から細胞内に取り込まれた  $Mg^{2+}$ を、反対側である基側部から排出する分子が必要である。このような分子として近年、Cyclin M(CNNM)がそのような特性をもつことが明らかにされてきた<sup>(14)</sup>。CNNM は哺乳類では *CNNM1-4* の 4 遺伝子からなるファミリーとして存在しており<sup>(15)</sup>、このうち *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)の原因遺伝子として報告されている<sup>(16)</sup>。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おり、CNNM ファミリー分子がマグネシウム恒常性維持に関わっていることが示唆されていた<sup>(17)</sup>。実際、 $Mg^{2+}$ 感受性の蛍光プローブ Magnesium green を用いたその後の機能解析などから、CNNM ファミリー蛋白質の中でも特に *CNNM4* や *CNNM2* が  $Mg^{2+}$ の排出を強く促すことや、 $Na^+/Mg^{2+}$ 交換を介して  $Mg^{2+}$ の排出を促すことなどが判明している<sup>(14, 18)</sup>。またマウスでの発現解析から、*CNNM4* と *CNNM2* はそれぞれ発現臓器が異なっており、*CNNM4* が腸の上皮細胞に強く発現している一方、*CNNM2* は腎臓の遠位尿細管に高発現していること、そしていずれも細胞の基側部に局在していることが報告され

ている<sup>(14, 19)</sup>。さらに *CNNM4* や *CNNM2* の欠損マウスでの解析より、それぞれの欠損により腸および腎臓からのマグネシウム(再)吸収効率がそれぞれ低下しており、血中マグネシウム濃度が低下していることも明らかにされている<sup>(14, 19)</sup>。

*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が、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。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<sup>(20, 21)</sup>。実際、*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ている<sup>(19)</sup>。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。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。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  $Mg^{2+}$ 透過性チャネル *TRPM6* の遺伝子発現レベルが下がっていた。そこで *TRPM6* の腎臓特異的欠損マウスを作成したところ、*CNNM2* の腎臓特異的欠損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* の腎臓特異的欠損マウスでは通常のマウスで見られる血圧の日周変動が著しく損なわれていた。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血圧の表現型の詳細を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 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*<sup>fl/fl</sup>) を作出した。さらに、*FlpO* マウス<sup>(22)</sup>との交配により floxed アレル(fl)を、そして腎尿細管で Cre リコンビナーゼを発現する *Six2-Cre* マウス<sup>(23)</sup>との交配により腎臓特異的な TRPM6 欠損マウス (*Trpm6*<sup>fl/fl</sup>; *Six2-Cre*) を得ている。

### 2.2 テレメトリー法による活動量測定

マウスの側腹部の皮下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、同時刻の活動量の平均値をその後の解析に用いている。

### 2.3 細胞培養

HEK293 細胞はダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) に、ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) を 10% 添加したもので培養した。遺伝子導入は LipofectAmine 2000 (Invitrogen) を用いて行った。

### 2.4 発現コンストラクト

ヒト TRPM6 の cDNA は Dharmacon 社より購入した (IMAGE: 100062461)。cDNA 断片を pCMV-Tag2B (Agilent) に挿入することで哺乳類細胞発現用のコンストラクトを作成した。

### 2.5 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>(24)</sup>、マウス抗  $\beta$  チューブリン抗体 (T4026): SIGMA 社より購入、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、ウサギ抗 CNNM4 抗体: 以前の文献で

作成したもの<sup>(14)</sup>。

また、下記の市販 2 次抗体も利用している。Alexa Fluor 488 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: Life technologies 社より購入、alkaline phosphatase (AP) 標識抗ウサギ IgG および抗マウス IgG 抗体: Promega 社より購入、Clean-Blot IP Detection Kit (免疫沈降後のサンプルのウェスタンブロットに使用): Thermo 社より購入。

### 2.6 元素定量

血清の調製については、マウスの全血液を下行大動脈より採取した後、30 分室温でインキュベートしてから遠心し、上清をサンプルとした。また尿は代謝ケージ (日本クレア) を用いて採取している。キシリジル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。

### 2.7 ホルモンの定量

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各ホルモンの定量に用いている。血漿レニン活性は Abcam 社より購入した Renin assay kit (fluorometric) を利用して測定した。また血漿中の Arg8-Vasopressin (AVP) 含有量は Enzo Life Sciences 社の Arg8-Vasopressin ELISA kit を用いて定量している。

### 2.8 統計処理

全ての統計解析データは平均  $\pm$  標準誤差で示している。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。

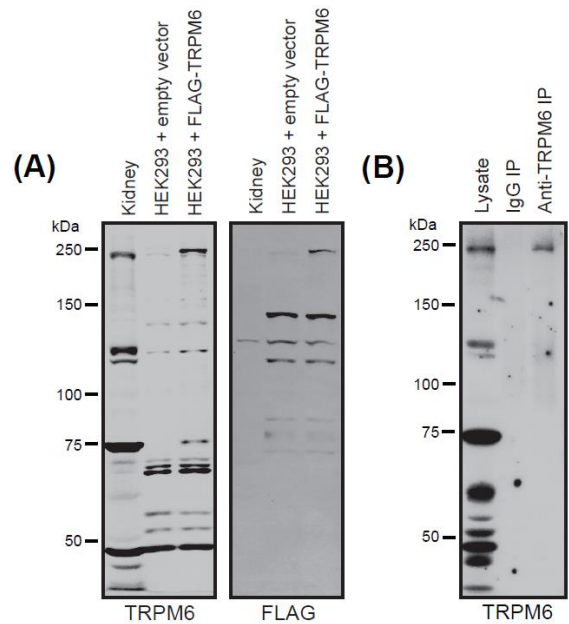
## 3. 研究結果

### 3.1 抗 TRPM6 抗体の作成と発現解析

我々は TRPM6 の発現部位を確認する目的で、TRPM6 の組換え精製蛋白質を調製し、ウサギに免疫することで TRPM6 に対する抗血清を得た。さらにアフィニティー精製を行うことにより、抗 TRPM6 抗体を得ている。この抗 TRPM6 抗体の検証として、まず TRPM6 が高発現していると知られる腎臓の組織抽出液を調製し、ウェスタンブロットを行った。その結果、想定される 250 kDa 前後の

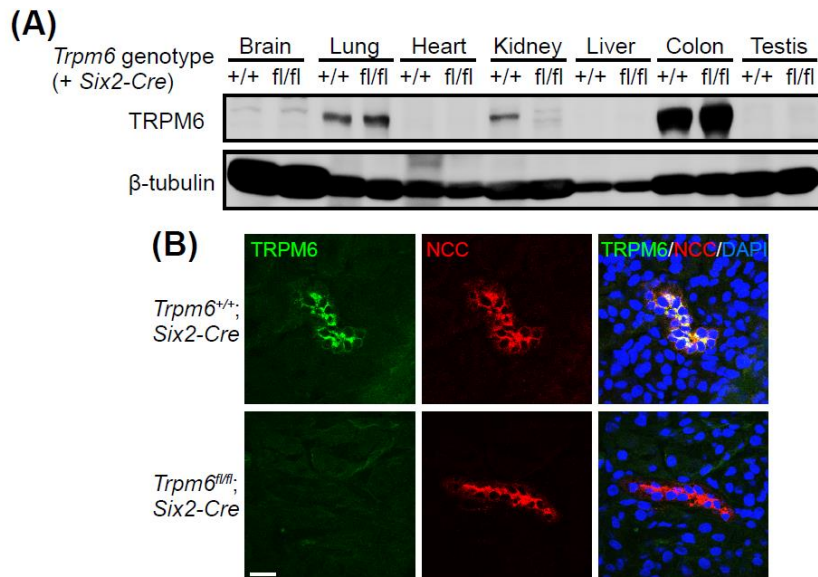
位置に比較的明瞭なシグナルが観察された (**Fig. 1A**)。このシグナルの位置は HEK293 細胞に FLAG タグ付き TRPM6 を発現させた場合に見られるシグナルとほぼ同じであり、この抗体が TRPM6 を認識している可能性が高いと考えられた。一方で、この抗体でウェスタンブロットを行った際には想定される TRPM6 の位置以外にも複数のバンドが見られた。次に腎臓の組織抽出液を用いて、この抗 TRPM6 抗体による免疫沈降を行った。沈降物に対する抗 TRPM6 抗体によるウェスタンブロットを行ったところ、TRPM6 のサイズにのみ明瞭なシグナルが観察された (**Fig. 1B**)。これらの実験結果より、この抗 TRPM6 抗体は特に 3 次元構造を維持している TRPM6 を強く認識していると考えられた。

そこで次にこの抗体を用いて TRPM6 の発現分布を調べた。各臓器の組織抽出液を調製しウェスタンブロットを行ったところ、腸で最もシグナルが強く、また肺や腎臓のサンプルからも明瞭なシグナルが観察された (**Fig. 2A**)。この結果は、過去に報告されている qPCR 法を用いた解析結果とよく合致していた<sup>(25)</sup>。また腎尿細管で Cre リコンビナーゼを発現する *Six2-Cre* マウスとの交配で作成した腎臓特異的 *TRPM6* 欠損マウスでは、想定どおり腎臓での TRPM6 のシグナルのみが消失しており、他の臓器のシ



**Fig.1.** 抗 TRPM6 抗体の検証

- (A) マウス腎臓および各コンストラクトを発現させた HEK293 細胞から抽出液を調製し、抗 TRPM6 および抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。
- (B) マウス腎臓の組織抽出液を調製し、抗 TRPM6 抗体を用いた免疫沈降を行った。その後、沈降物に対して抗 TRPM6 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。



**Fig.2.** TRPM6 の発現分布

- (A) 各遺伝子型のマウス (2 か月齢) より各臓器を摘出し、その抽出液を用いて抗 TRPM6 抗体によるウェスタンブロットを行った。
- (B) 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。

グナルに大きな変化は見られなかった。さらに腎臓の組織切片を作成して、抗 TRPM6 抗体による染色を行ったところ、一部の尿細管の頂端部において強い染色シグナルが観察された (Fig. 2B)。このシグナルが観察された部位は遠位尿細管の頂端部に局在することが知られている NCC の染色シグナルとほぼ完全に重複しており、TRPM6 が既報通り遠位尿細管の頂端部に局在していることが確認された。

### 3.2 抗 TRPM6 抗体の作成と発現解析

次に、腎臓特異的な TRPM6 の欠損によるマグネシウムの恒常性に与える影響を調べた。コントロール (*Trpm6*<sup>+/+</sup>; *Six2-Cre*) および腎臓特異的 TRPM6 欠損マウス (*Trpm6*<sup>fl/fl</sup>; *Six2-Cre*) より全血液を採取し、その血清サンプル中に含まれるマグネシウムの量を調べた。まず Mg<sup>2+</sup> が結合することにより色が変わり、マグネシウムの比色定量に用いられるキシリジルブルーを用いた定量を行ったところ、腎臓特異的 TRPM6 欠損マウスではコントロールマウスと比較して有意に血清中のマグネシウム量が低下していると判明した (Fig. 3A)。この減少幅 (約 23%減) は腎臓特異的 *CNNM2* 欠損マウスでの減少幅 (約 31%減) と比較的近く、腎臓遠位尿細管での transcellular pathway を介した Mg<sup>2+</sup> の再吸収という、同一経路で働いているという我々

の考えかと矛盾しないものであった。また、ICP-OES 法を用いて各元素の量を定量したところ、マグネシウムについてはキシリジルブルーでの測定結果と同様に腎臓特異的 TRPM6 欠損マウスで有意に低下していたが、カルシウム、ナトリウム、カリウムについては特に明確な差は見られなかった (Fig. 3B)。これらの実験結果より、腎臓での TRPM6 が生体内でのマグネシウム恒常性に寄与しているということが確認された。さらに腎臓の TRPM6 がマグネシウムの再吸収に寄与していることを明確にするために、代謝ケージ内でマウスを飼育し、尿を採取した。尿中のマグネシウム量をキシリジルブルー法によって調べたところ、血清中とは逆に腎臓特異的 TRPM6 欠損マウスで有意にマグネシウム量が増加しており、原尿からのマグネシウム再吸収の異常が明らかとなった (Fig. 3A)。

### 3.3 TRPM6 欠損マウスにおける血中レニン活性の日周変動異常

この腎臓特異的 TRPM6 欠損マウスでは腎臓特異的 *CNNM2* 欠損マウスと同様に血圧が低下しているだけではなく、血圧の日周変動がほぼ完全に消失していた。そこで全身の概日リズムに対する影響を調べる目的で、我々は次に腎臓特異的 TRPM6 欠損マウスの活動量の 24 時間変動をモニターした。その結果、活動量についてはコント

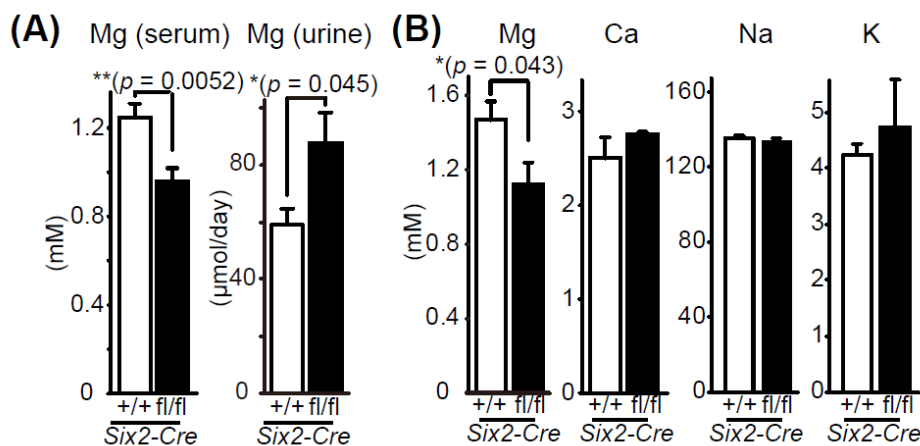


Fig.3. 腎臓特異的 TRPM6 欠損マウスにおけるマグネシウムの恒常性異常

(A) 各遺伝子型のマウス (2-3 か月齢) より血清 (n = 7-8) と尿 (n = 7-9) を採取し、キシリジルブルーを用いた比色定量法によりマグネシウムの濃度を定量した。棒グラフはその平均±標準誤差を示しており、各 p 値はスチューデントの両側 t 検定によって求めた。

\*は  $p < 0.05$ , \*\*は  $p < 0.01$  をそれぞれ表す。

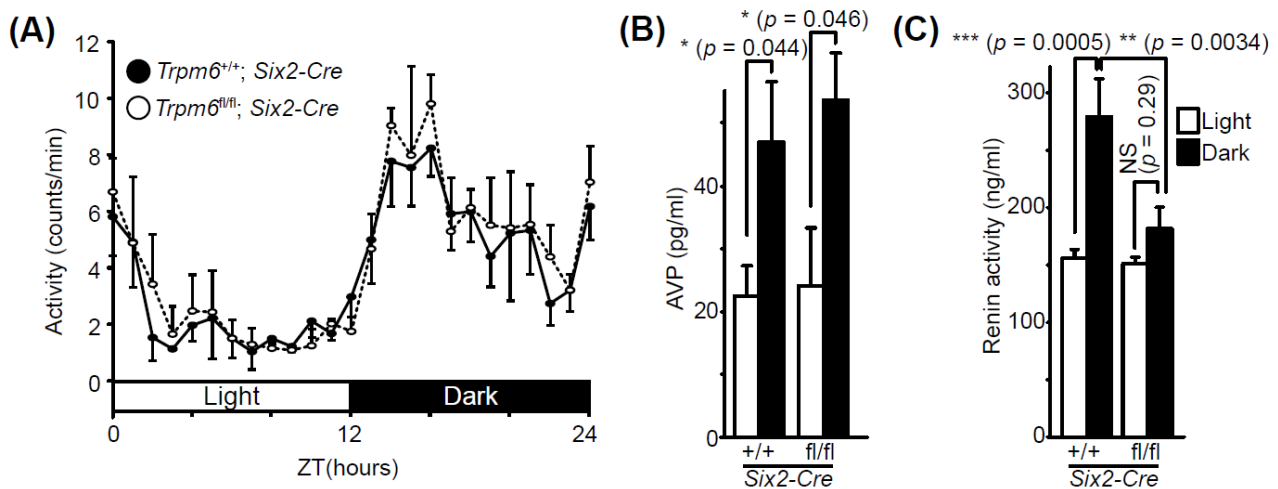
(B) 各遺伝子型のマウス (2-3 か月齢) より採取した血清 (n = 10-12) を用いて、ICP-ES 法により各元素の濃度をもとめた。棒グラフはその平均±標準誤差を示しており、各 p 値はスチューデントの両側 t 検定によって求めた。\*は  $p < 0.05$  を表す。

ロールと同様に活動期(マウスなら夜間)に上昇しており、両群に明確な差は見られなかった(Fig. 4A)。また、血中濃度が日周変動するホルモンであるバソプレッシン(Arginine vasopressin, AVP)<sup>(26)</sup>の量を調べた。その結果、活動量と同様にコントロールマウス、腎臓特異的 *TRPM6* 欠損マウスのいずれも活動期でその濃度が上昇しており、両者に明らかな違いは見られなかった(Fig. 4B)。

血圧の日周変動には中枢系からの交感神経系のインプットが重要であると知られており、その下流の一つに腎臓からのレニンの分泌があると知られている<sup>(27)</sup>。そこで、血中のレニン活性を調べたところ、AVP の測定結果とは異なり活動期でのレニン活性の上昇がコントロール細胞では見られた一方、腎臓特異的 *TRPM6* 欠損マウスではほとんど観察されなかった(Fig. 4C)。

#### 4. 考察

本研究により腎臓遠位尿細管での *TRPM6* が腎臓でのマグネシウム再吸収に寄与していることが確認され、そしてこの腎臓での *TRPM6* の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が明らかとなった。血圧の日周変動、特に活動期開始時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密接に関連していることが知られている<sup>(28)</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、腎臓への神経を遮断する「腎デナベーション手術」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と報告されている<sup>(29-31)</sup>。しかし、この手術はかなりの技量を必要としており、そのためか効果がほとんど見られない症例も報告されている。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考えられる。



**Fig.4.** 腎臓特異的 *TRPM6* 欠損マウスにおけるレニン分泌の異常

- (A) 各遺伝子型のマウス(2-3 か月齢)の活動量を測定した。棒グラフはその平均±標準誤差を示している(n = 3)。
- (B) 6 ZT(明期)および14 ZT(暗期)で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AVP量を測定した。棒グラフはその平均±標準誤差を示している(n = 4-5)。各 *p* 値は2-way ANOVA および Holm-Sidak post hoc tests によって求めた。\*は *p* < 0.05 を表す。
- (C) 6 ZT(明期)および14 ZT(暗期)で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。棒グラフはその平均±標準誤差を示している(n = 7-8)。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 それぞれを表す。



## 5. 今後の課題

今回 TRPM6 を介して制御される血圧の日周変動にレニンの日周変動が関わることを明らかにしたが、その詳細な機構解明は今後の課題として残されている。レニンは腎臓の傍糸球体細胞から分泌されるホルモンであり、その分泌には交感神経系や、隣接する緻密斑から分泌されるプロスタグランジンによる刺激などが関わっている。傍糸球体細胞や緻密斑細胞はいずれも TRPM6 が高発現する遠位尿細管細胞と隣接しており、TRPM6 の欠損により遠位尿細管細胞の性状が変化することで傍糸球体細胞や緻密斑細胞に影響を与え、レニン分泌不全を引き起こしていると想定される。今後より詳細な解析を行うことで、この新しいレニン分泌機構を明らかにできると期待される。

## 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., 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. Hirata, Y., Funato, Y., Takano, Y., and Miki, H.  $Mg^{2+}$ -Dependent Interactions of ATP with the Cystathionine- $\beta$ -Synthase (CBS) Domains of a Magnesium Transporter. *J. Biol. Chem.* **289**, 14731–14739 (2014).
19. Funato, Y., Yamazaki, D., and Miki, H. Renal function of cyclin M2  $Mg^{2+}$  transporter maintains blood

- pressure. *J. Hypertens.* **35**, 585–592 (2017).
20. Levy, D. *et al.* Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat. Genet.* **41**, 677–687 (2009).
21. 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).
22. 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).
23. 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).
24. Ohno, M. *et al.* Immunolocalization of WNK4 in mouse kidney. *Histochem. Cell Biol.* **136**, 25–35 (2011).
25. Groenestegge, W.M. *et al.* The epithelial Mg<sup>2+</sup> channel transient receptor potential melastatin 6 is regulated by dietary Mg<sup>2+</sup> content and estrogens. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1035–1043 (2006).
26. Greeley, G.H. Jr *et al.* A diurnal plasma vasopressin rhythm in rats. *Life Sci.* **31**, 2843–2846 (1982).
27. 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).
28. Giles, T. D. Circadian rhythm of blood pressure and the relation to cardiovascular events. *J. Hypertens.* **24**, S11–S16 (2006).
29. 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).
30. 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).
31. 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).



## Blood Pressure Regulation via Renal Mg<sup>2+</sup> Transporters

Yosuke Funato, Hiroaki Miki

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

### Summary

In this study, we focused on TRPM6, which is involved in renal magnesium reabsorption. Our previous studies have clarified that mice with renal-specific knockout of *TRPM6*, gene encoding Mg<sup>2+</sup>-permeable channel involved in renal magnesium reabsorption, showed no blood pressure elevation at the start of the active period, indicating that the circadian blood pressure variation was almost completely disappeared in this mice. First, we confirmed the expression of TRPM6 in mice, and found that TRPM6 is strongly expressed in intestine, kidney, and lung, which is consistent with the previous report. We also confirmed that TRPM6 in the kidney was localized at the apical membrane of distal convoluted tubule, where the final step of magnesium reabsorption occurs. Elemental analyses revealed that renal-specific knockout of *TRPM6* decreased the blood magnesium level to the similar level of renal-specific *CNNM2* knockout mice. Magnesium level of urine was elevated in renal-specific *TRPM6* knockout mice, confirming the importance of *TRPM6* in renal magnesium reabsorption. We also analyzed the circadian variation of locomotor activity and hormones. The locomotor activity and blood AVP level of renal-specific *TRPM6* knockout mice were similar to that of control mice, elevated at active (night) period. On the other hand, the plasma renin activity in renal-specific *TRPM6* knockout mice did not raise at active period as control mice did. Collectively, the renin secretion defect might explain the disappearance of circadian blood pressure variation in this knockout mice, and further analyses may clarify the detailed mechanism of this phenotype.