

マグネシウム応答性の腎臓を起点とした血圧の日周変動制御機構の解明

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

(現:京都大学工学研究科合成・生物化学専攻生体認識化学分野)

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。そして高マグネシウム食を与えた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、マグネシウム投与により TRPM6 の発現量調節を介して血圧の日周変動をコントロールすることも合わせて明らかにされてきた。マグネシウム投与の血圧制御手段としての可能性が示唆された一方で、副作用等については検討されておらず、その点について解析を行った。

上記の目的で、様々なマグネシウム量の食餌をマウスに与えて 2 週間から 1 ヶ月、飼育を行った。その結果、マグネシウム量に依存して血中のマグネシウム量は増減していた。また腎臓遠位尿細管細胞における TRPM6 の発現量は既報通り高マグネシウム食で減弱していただけでなく、食餌中のマグネシウム量に対して明確に逆相関していた。

これらの実験結果より、体内マグネシウム量や腎臓遠位尿細管細胞における TRPM6 の発現レベルを食餌中のマグネシウム量によりコントロールできることが確認された。この状況のマウスの状態を調べた結果、その育成には食餌による違いはなく、また腎臓等の組織構築にも影響は認められなかった。またマグネシウムと老化との関連が指摘されているため、細胞老化についても細胞老化のマーカー分子である p16 の発現を可視化できる p16-Luc マウスを用いた生体イメージングによって調べたが、食餌中のマグネシウム量による明確な差異は実験期間の間では認められなかった。一方で、高マグネシウム食を投与されたマウスは投与後数日より下痢の症状を呈しており、その傾向は実験期間を通して継続して見られた。以上の実験結果より、高マグネシウム食投与では下痢以外の明確な悪影響は観察されず、投与経路の検討などにより副作用のない、安全な血圧コントロール法が開発できる可能性が示唆された。今後さらに長期間かつより高齢なマウスへの投与実験や高血圧誘導モデルなどでの検討を行い血圧日周性への影響を含め評価を進めることで、その有用性が明らかにできると思われる。

1. 研究目的

現在我が国の高齢者の割合は 30%に迫っており、加齢とともに生じる機能低下や各種加齢性疾患への対応が急務となっている。高血圧は典型的な加齢性疾患のひとつであり、年齢とともに発症率が上昇するのみならず、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。また近年では新型コロナウイルス感染時の肺炎発症およ

び死亡の大きなリスクファクターとしても注目されている⁽¹⁾。高血圧の治療について、カルシウム拮抗薬やアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬などの優れた降圧剤が多数開発・認可され利用されている一方で、一部の高血圧患者ではこれらの降圧剤に抵抗性を示していることも報告されており、また高血圧の根治は難しく生涯渡っての対処

療法になるケースが大半であることから、新しくかつ安全な降圧薬の開発が求められている。

上述した虚血性心疾患や脳卒中といった、高血圧と関連した致死性のインシデントは血圧が急激に上昇する活動期の入り口、ヒトでは早朝の時間帯で頻繁に生じる⁽²⁾。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⁽³⁾。

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(塩分)の摂取過多が高血圧の大きなリスクファクターであることはよく知られているが、他にもカリウムやマグネシウムも血圧制御に重要であることがわかってきつつある。疫学的な調査より、マグネシウムの摂取量が増えると血圧が低下傾向にあることが示されている^(4,7)。また尿中マグネシウム量(概ね体内吸収量と合致すると考えられている)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⁽⁸⁾。このような疫学的な研究報告はいずれもマグネシウムを十分に摂取し、体内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様々なマグネシウム輸送蛋白質の血圧調節への関与を示唆するものと考えられる。

ヒトなど、高等動物の個体内におけるマグネシウムの恒常性は腸からの吸収、および腎臓での再吸収によって主に制御されており、特に腎臓での再吸収の寄与が大きい(腸での吸収と比べて10倍くらい多い)⁽⁹⁾。再吸収は血液が糸球体でろ過されることによって作られた原尿に含まれる成分が、尿細管の各部位を通る際に体内へと戻される過程であり、特にマグネシウムの場合はその最終ステップを担っているのが遠位曲尿細管(Distal convoluted tubule, DCT)であり、そのためこの部位でのマグネシウム再吸収の度合いにより尿として実際に排泄されるマグネシウム量が規定されている。DCTにおけるマグネシウム再吸収は、まず原尿が通過する管腔側(いわゆる apical/頂端部)より Mg^{2+} 透過性の陽イオンチャネル TRPM6 を介して DCT 細胞へとマグネシウムを取り込む⁽¹⁰⁻¹²⁾。そして細胞内へと取り込まれたマグネシウムは反対の体内側(いわゆる basolateral/基側部)に局在する Mg^{2+} 排出トランスポーター cyclin M2 (CNNM2) を介して体内へ送り出される⁽¹³⁻¹⁶⁾。マグネシウム再吸収における両分子の重要性は、両遺伝子がそれぞれ異なるタイプの家族性低マグネシウム血症

の責任遺伝子として同定されていること^(10, 11, 13, 15)、および両遺伝子をマウス腎臓で特異的に遺伝子欠損させると腎臓からの再吸収が減弱することからも明確となっている^(16, 17)。

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が損なわれるだけでなく、血圧も低下することが示されている^(16, 17)。さらに、このマウス腎臓では TRPM6 の発現レベルも顕著に下がっており⁽¹⁷⁾、実際 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いる⁽¹⁷⁾。ただ興味深いことに、TRPM6 の腎臓特異的欠損マウスでの24時間血圧を測定すると、ただ血圧が低下傾向にあるのではなく、血圧の日周変動が損なわれていた。そしてこの血圧の日周変動消失の原因として、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いることや、レニン分泌細胞である傍糸球体細胞におけるアドレナリン受容体の発現レベルが低下していることが明らかとなっている⁽¹⁷⁾。

これらの知見はマグネシウムの恒常性維持機構を介して、血圧特にその日周性が制御されていることを示すものであり、実際に高マグネシウム食投与マウスでは TRPM6 の発現量が低下し血圧日周性が減弱することも示されている⁽¹⁷⁾。マグネシウムは豆腐(にがり)やナッツなど、食物に普通に含まれるものであり、サプリメントとしても販売されているなど、安全性については十分に担保されていることから新しい血圧制御法としての可能性が考えられる。一方で、マグネシウムがそもそもなぜ TRPM6 の発現レベルを下げるのかはよくわかっておらず、また上述の下剤(下痢誘導)効果との共存など、投与方法等に関する改善も必要であるなど、課題は多く残されている。

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 環境で飼育しており、C57BL/6J および B6 アルビノ系統(B6N-Tyrc-Brd/BrdCrCl)のマウスを利用した。p16-Luc のトランスジェニックマウス⁽¹⁸⁾は、大阪大学微生物病研究所の原英二博士および河本新平博士よりご供与いただいた。各種マグネシウム濃度の特殊配合餌(マグネシ

ウム含有量 0.0027%, 0.02%, 0.1%, 0.3%および 0.6%)は日本クレアより購入した。2ヵ月齢のマウスに上記の各種マグネシウム濃度の餌を与え 14 日間飼育した。その後マウスを解剖し、採血および腎臓の摘出を行った。また 7 日目と 14 日目には糞の採取も行った。

2. 2 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:以前の論文にて自作⁽¹⁶⁾, モルモット抗 NCC 抗体:東京医科歯科大学, 内田信一博士より供与。2 次抗体;Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ, 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. 3 マウス腎臓組織切片のヘマトキシリン・エオジン

染色

マウスから摘出した腎臓を氷冷 PBS で洗浄後, OCT compound (サクラファインテック)に包埋し, 液体窒素上で徐々に凍らせた。この凍結したブロックを用いて, 凍結マイクロトーム (CM1900, Leica)により厚さ 20 μm の凍結組織切片を作製した。凍結組織切片を 3.7%ホルムアルデヒドに浸し, 室温で 10 分間の固定処理後, マイヤーヘマトキシリン溶液 (和光純薬)に 15 分間浸け, さらにその後, 流水中で 20 分間洗浄した。次に 0.1% エオジン Y エタノール溶液 (和光純薬)に 30 秒間浸し, 脱水処理後に封入剤マリノール (武藤化学)を用いて封入した。サンプルは実体顕微鏡 (SZX16, オリンパス)で観察し, 備え付けのデジタルカメラ (DP70, オリンパス)で画像を取得した。

2. 4 抗体染色

前項と同様にして作成した凍結組織切片を PBS で希釈した 2%パラホルムアルデヒド溶液に浸し, 氷上で 10 分間の固定処理を行った。その後 0.2% glycine / PBS (pH 8.0)を用いて氷上で 10 分間処理後, 2%スキムミルク, 0.1%Triton X-100/PBS (PBS-MT)にサンプルを浸し, 氷上で 1 時間のブロッキング処理を 2 回行った。その後, 抗 NCC 抗体 (1000 倍希釈)および抗 TRPM6 抗体 (200 倍希釈)を 1 次抗体として含む PBS-MT をサンプルに滴下し, 4°Cで一晩反応させた。PBS-MT で氷上にて 10 分間, 5 回洗浄した後, diaminido-2-phenylindole (DAPI) (1000 倍希釈)および蛍光標識 2 次抗体 (2000 倍希釈)を含む PBS-MT をサンプルに滴下し, 4°Cで一晩反応させた。PBS-MT で 10 分間, 氷上にて 5 回洗浄した後, PBS で一度洗浄してから封入し, 共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV1000, オリンパス)で観察した。

2. 5 qRT-PCR

マウスから摘出した腎臓に RNAiso Plus (タカラバイオ)を加えた後, ホモジナイザーを用いて組織を破碎し, 全 RNA を抽出した。その後, Revertra Ace (東洋紡)と Oligo (dT)プライマー (東洋紡)を用いた逆転写反応により cDNA を合成し, 得られた cDNA に PCR 反作用のプライマー (下記)と THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡)を混和し, Mini OpticonリアルタイムPCRシステム (Bio-Rad)を使用してPCRを行った。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。用いたプライマーの配列は以下のとおりである: Trpm6, 5'-AAAGCCATGCGAGTTATCAGC-3' and 5'-CTTACAATGAAAACCTGCCC-3'。Gapdh に対するプライマーは以前用いたもの⁽¹⁹⁾と同じ配列である。

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。キシリジ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 糞中の水分量の算出

マウスを 1 個体ずつ空の飼育用ケージに入れ, その後 10 ~30 分間に排便された糞を採取した。この採取直後の糞の重量を測定し, これを湿重量とした。その後, 2 週間以上自然乾燥させた後に再度重量を測定し, これを乾燥重量とした。そして湿重量と乾燥重量の差を水分量とした。

2. 8 マウスの *in vivo* 発光イメージング

イソフルラン (2.5%, 和光純薬)を用いて麻酔下においた p16-Luc マウスに対して, PBS に溶解した 30 mg/ml の D-ルシフェリンカリウム (和光純薬)を 100 μl 腹腔内投与し, その 10 分後に発光を IVIS Lumina XRMS Series III (パーキンエルマー)にて測定を行い, 付属のソフトウェア Living Image (パーキンエルマー)を用いて解析を行った。

2. 9 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 one-way ANOVA および Holm 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 食餌中のマグネシウム量の違いによる体重変動の影響および下剤効果

先行研究では食餌中のマグネシウム量を増やすことにより血圧の日周変動を抑制できていたが⁽¹⁷⁾、一方でマグネシウムは下剤として広く使われているなど、そのまま適用するには難点も存在する。そこで実際に先行研究において用いたマグネシウム量がマウスの成育および糞に与える影響を調べてみた。所属飼育施設で通常使用されている餌と同様のマグネシウム量(0.3%)を含むコントロール食、およびそれよりマグネシウム量が少ない食餌(0.1%および 0.0027%:配合によって作成できるマウス餌における

マグネシウム量の最小値)、そして血圧の日周変動を抑制できていた、高マグネシウム食(0.6%)を2ヵ月齢のC57BL/6Jマウスに2週間与え続けた。体重経過を調べたところ、食餌中のマグネシウム量による体重への違いは認められず(**Fig. 1A**)、少なくともこのスパンにおいてはマウスの成育に食餌中のマグネシウム量は大きな影響を及ぼさないことがわかった。

一方で、食餌を変更してから数日以内に高マグネシウム食投与マウスでは糞の軟化傾向が観察され、その後投与期間を通じて同様の傾向が見られた(**Fig. 1B**)。実際に糞中の水分量を測定したところ、食餌中のマグネシウム量と糞中の水分量の間には正の相関関係があることがわかった。

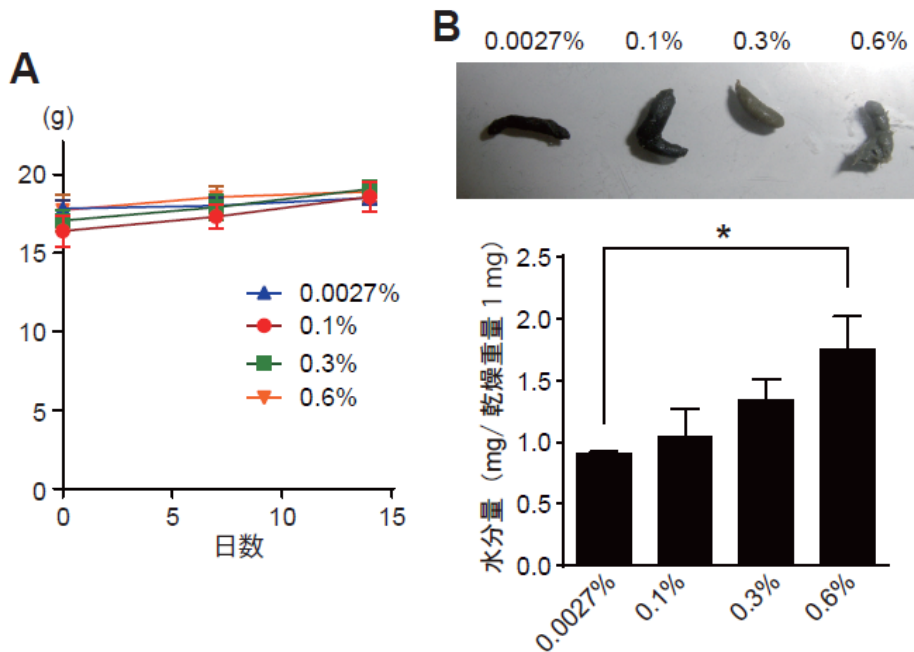


Fig. 1 マグネシウム摂取量の違いによる体重および糞水分量への影響

- (A) C57BL/6J マウスを各マグネシウム濃度の餌で飼育したマウスの体重を実験開始日(0日)、7日目、14日目と測定し、各群の平均±標準誤差でグラフに示している。測定に用いた個体数は、それぞれ4個体(マグネシウム濃度0.0027%)、4個体(0.1%)、4個体(0.3%)、5個体(0.6%)である。
- (B) C57BL/6J マウスを各マグネシウム濃度の餌で14日間飼育後、それぞれの個体から糞を採取した。写真は各群で代表的な糞の外観を示している。また採取直後の重量(湿重量)と自然乾燥後の重量(乾燥重量)の差を水分量とし、乾燥重量1mgあたりの水分量をそれぞれ平均±標準誤差で図示している。p値はone-way ANOVAおよびHolmによるpost hoc testsにより求められており、アスタリスク(*)は統計有意差が存在すること($p < 0.05$)を示す。また、解析に用いた個体数はそれぞれ4個体(マグネシウム濃度0.0027%)、3個体(0.1%)、4個体(0.3%餌)、4個体(0.6%)である。

3. 2 食餌中のマグネシウム量の違いによる

血中マグネシウム量への影響

次に、これらの様々なマグネシウム量を与えられたマウスにおける血中マグネシウム量を調べた。まず血清中のマグネシウム量をマグネシウムのキレート剤であり、マグネシウムの存在下で吸光度が変化するキシリジルブルーを用いて定量した。その結果、血清中のマグネシウム量は食餌中のマグネシウム量に応じて増加する傾向があり、特に0.6%マグネシウム食投与マウスでは約2 mMと、一般的なマウス血中マグネシウム量として知られる1–1.5 mMと比べて明らかに高い値を示した (Fig. 2A)。また逆に0.0027%マグネシウム食を与えられたマウスでは1 mMを

下回っており、明らかに他の群と比べてマグネシウム量が低くなっていた。

他の元素についても調べるべく、種々の元素を定量的に測定できる ICP-OES 法によりマグネシウムおよびナトリウム、カルシウムの血清中含有量も測った (Fig. 2B)。マグネシウムについてはキシリジルブルーでの測定時と同様に、食餌中のマグネシウム量に応じて増加する傾向が観察された。一方で測定した他の元素については、食餌中のマグネシウム量による違いは観察されなかった。これらの実験結果より、食餌中のマグネシウム量に応じて体内マグネシウム量を選択的に操作できることが示唆された。

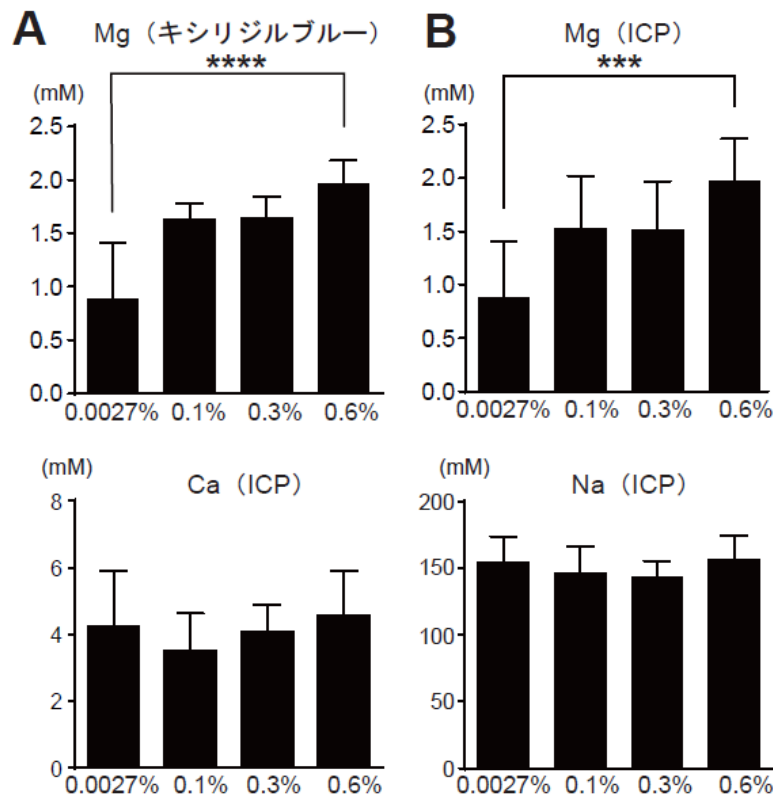


Fig. 2 マグネシウム摂取量の違いによる血中マグネシウム量への影響

(A) C57BL/6J マウスを各マグネシウム濃度の餌で 14 日間飼育した後、マウスを解剖し採血を行った。そして血清中のマグネシウム濃度を、キシリジルブルーを用いた比色定量法によって定量した。

(B) 血清中の各元素量を ICP 発光分析法を用いて定量した。

それぞれの測定結果について、各群の平均±標準誤差をグラフに示している。 p 値は one-way ANOVA および Holm による post hoc tests により求められており、アスタリスク (***, ****) は統計有意差が存在すること (***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$) を示す。また解析に用いた個体数は、キシリジルブルーを用いた比色定量についてはそれぞれ 8 個体 (マグネシウム濃度 0.0027%), 8 個体 (0.1%), 7 個体 (0.3%), 9 個体 (0.6%) であり、ICP 発光分析についてはそれぞれ 7 個体 (0.0027%), 8 個体 (0.1%), 6 個体 (0.3%), 8 個体 (0.6%) である。

3.3 食餌中のマグネシウム量の違いによる TRPM6 発現量への影響

さらに、これらの様々なマグネシウム量の食餌を与えられたマウスを解剖し、特に腎臓に着目した解析を行った。まず RT-qPCR 法により腎臓における *Trpm6* 遺伝子の発現量を定量したところ、想定通り 0.6%マグネシウムを含む餌を投与されたマウスでは発現レベルが大きく低下しており、0.0027%マグネシウム食投与マウスの 1/5 以下となっていた (Fig. 3A)。また *Trpm6* と同様にその発現量がマグネシウム応答性であることが指摘されている *Cnnm2* の発現量についても調べたところ、*Trpm6* と比べて差は小さいものの、同様に 0.6%マグネシウム餌の投与群の方が腎臓における *Cnnm2* の発現量が低くなっていた。

次に実際に TRPM6 が高発現していると知られる遠位尿細管細胞での TRPM6 蛋白質の発現レベルについて、蛍光免疫染色によって調べた (Fig. 3B)。その結果、TRPM6 の染色シグナルは遠位尿細管細胞のマーカー蛋白質である NCC の染色シグナルとよく重なっており、TRPM6 が遠位尿細管細胞の、しかも NCC と同じ頂端膜に強く発現していることが確認できた。そしてその TRPM6 の染色シグナルは RT-qPCR 法での結果と同様に食餌中のマグネシウム量と負の相関関係を示しており、特に 0.6%マグネシウムを含む餌を投与されたマウスの腎臓ではほとんど検出されなかった。

並行して、腎臓の組織構築に対する食餌中のマグネシウム量の影響をヘマトキシリン・エオジン染色により調べた (Fig. 3C)。その結果、各群で明確な違いは観察されず、少なくともこの実験条件下では組織の形態レベルで大きな影響は出ないことが明らかとなった。

3.4 食餌中のマグネシウム量の違いによる細胞老化への影響

マグネシウムは加齢とともにその体内量が低下することが知られている。またマウスやラット等の実験動物を用いた解析より、マグネシウムの食餌中添加により体内マグネシウム量を補充することで、記憶などの加齢に伴う機能低下が回復したり、寿命そのものが延長することが報告されている^(20, 21)。そこで最後に、食餌中のマグネシウム量の違いによる細胞老化への影響について、細胞老化のマーカー分子として知られる p16 の量を検出できる、p16-Luc マウス⁽¹⁸⁾を用いた解析を行った。マグネシウム量が 0.0027%

の餌で飼育し続けるとマウスが死亡することが知られているので、餌中のマグネシウム量を 0.02%, 0.1%, 0.3%, および 0.6%で 1 ヶ月間与え続け、その際の p16 の量を発光イメージングによって調べた (Fig. 4)。その結果、各群でのシグナルには大きな差は見られず、この投与期間では細胞老化に与える影響は限定的であることが判明した。

4. 考察

本研究では先行研究で血圧日周性の抑制効果があると明らかにしている食餌中マグネシウム量の増加について、その応用可能性を踏まえ様々な影響について解析した。その結果、生育など本研究で調べた多くの項目については、悪影響は見られなかったものの、マグネシウム製剤の実使用例として知られる下剤としての効果は明確に観察された (Fig. 1B)。マグネシウム製剤が下剤効果を示す仕組みは明確にはされていないが、腸内腔の浸透圧を高めることで腸細胞からの水分分泌を増やしている可能性が指摘されている。経皮吸収させるなど、投与方法を工夫することでマグネシウムの下剤効果を回避しつつ、血圧日周性を抑制できる可能性がある。また本研究では 0.0027%, 0.1%, 0.3%そして 0.6%のマグネシウム濃度の食餌を用いているが、血中マグネシウム量や腎臓遠位尿細管における TRPM6 の発現量はマグネシウム量の増減に応じてそれぞれ増減していた。そのため、十分な血圧日周性抑制効果が見られつつ下剤効果を最小限に抑えられる濃度を探る方法も考えられる。また本解析では生後 2 ヶ月と比較的若齢のマウスを用いており、またマグネシウム調節餌の投与期間も最長 1 ヶ月に留まっている。加齢性疾患である高血圧の予防・治療に向けた検証としては、さらに長期間、そしてより高齢の個体での解析も行うことが今後必要と想定される。マグネシウム応答性のゲノム領域として翻訳調節に重要な部位は報告されているが^(23, 24)、mRNA 量の制御に重要な部位はわかっていない。現在、*Trpm6* の mRNA 量がマグネシウム低下によって増加する、その仕組みを明らかにするべくプロモーター解析も実施中である。その特定によりマグネシウムに細胞がどのようにして応答し恒常性を維持しているのか、その仕組みが明らかとなるだけでなく、その人為的操作に血圧をコントロールする、また新しい手法の開発にもつながる可能性がある。また TRPM6 を介してレニン分泌についても、現在レニン分泌細胞である傍糸球体細胞におけるアドレナリン受容体の

発現量低下がわかっているものの、その原因については未解明である。その仕組みを明らかにすることで、また新

た治療標的としてのターゲット分子が見つかる期待される。

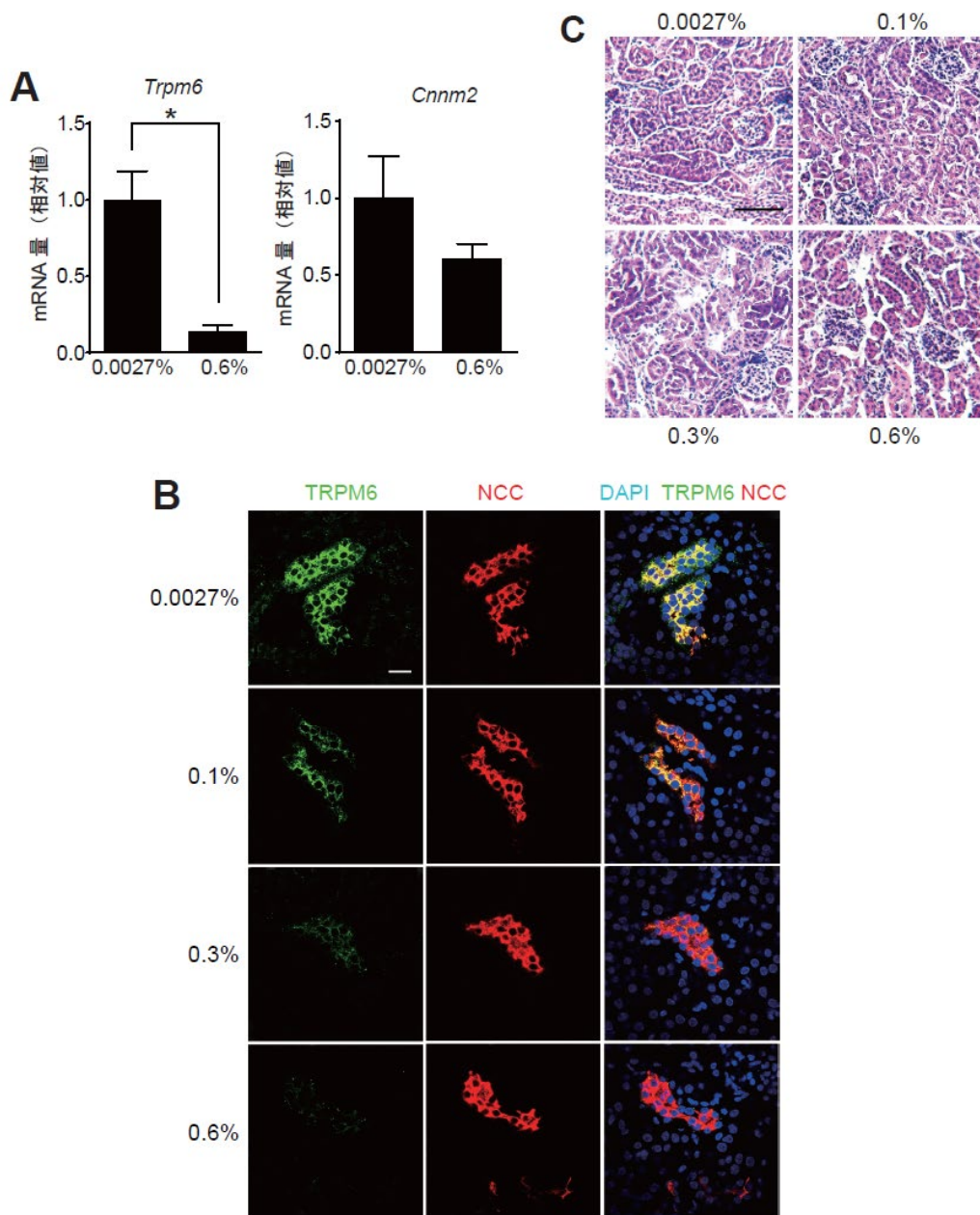


Fig. 3 マグネシウム摂取量の違いによる腎臓への影響

- (A) C57BL/6J マウスをマグネシウム欠乏食(0.0027%)あるいは高マグネシウム食(0.6%)で 14 日間飼育後、それぞれ腎臓を摘出し、リアルタイム PCR 法により *Trpm6* および *cnnm2* の mRNA 量を測定した。それぞれ *Gapdh* の発現量で補正した値をそれぞれ平均±標準誤差でグラフに示している。*p* 値はスチューデントの two-tailed t-tests (unpaired) により求められており、アスタリスク(*)は統計有意差が存在すること($P < 0.05$)を示す。また、解析に用いた個体数は各群につきそれぞれ 3 個体ずつである。
- (B) C57BL/6J マウスを各マグネシウム濃度の餌で 14 日間飼育後、腎臓を摘出して凍結組織切片を作製し、抗 TRPM6 抗体による蛍光免疫染色を行った。代表的な染色像を示しており、緑は TRPM6 のシグナルを、赤は遠位尿細管のマーカールとして同時に染色した NCC のシグナルを、そして青は DAPI により染色された核 DNA のシグナルをそれぞれ示している。またスケールバーは 20 μm を示している。
- (C) (B) で作製した組織切片を用いてヘマトキシリン・エオジン染色を行った。代表的な染色像を示しており、スケールバーは 250 μm を示している。

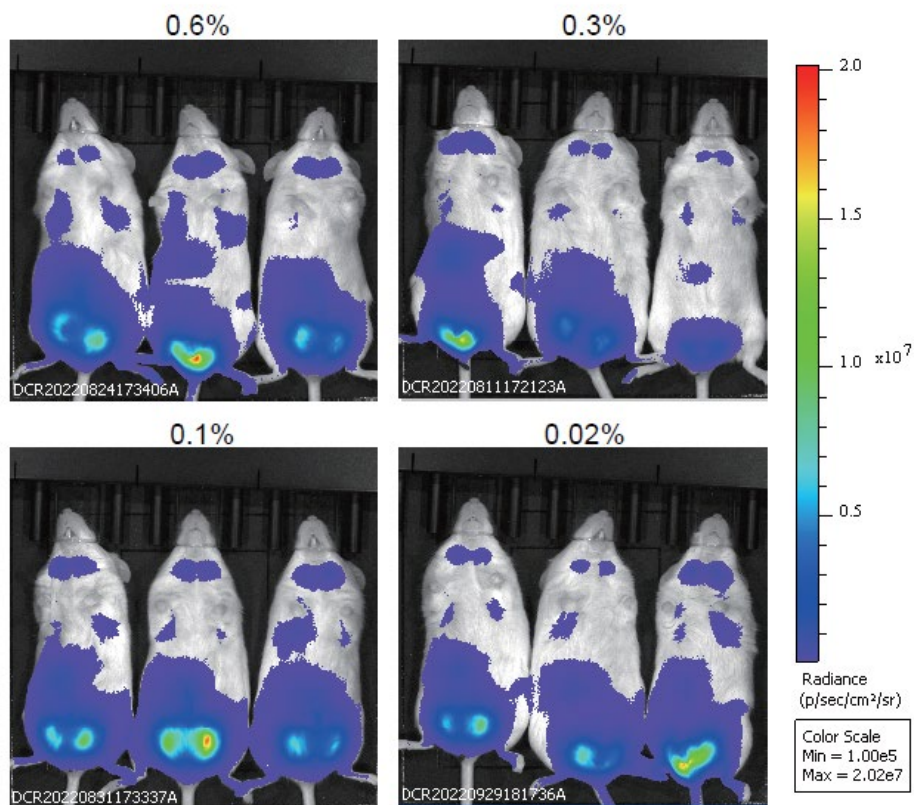


Fig. 4 マグネシウム摂取量の違いによる細胞老化への影響

B6 アルビノ系統の p16-Luc マウスを各マグネシウム濃度の餌で 1 ヶ月飼育後、発光イメージングを行った。発光シグナルは疑似カラーによって示されており、スケールバーを右に図示してある。

5. 文献

- Ernesto, L. et al. Hypertension and COVID-19, *Am. J. Hypertens.* 33, 373–374 (2020).
- Giles, T. D. Circadian rhythm of blood pressure and the relation to cardiovascular events. *J. Hypertens.* 24, S11–S16 (2006).
- 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).
- Witteaman, J. C. et al. A prospective study of nutritional factors and hypertension among US women. *Circulation* 80, 1320–1327 (1989).
- Ascherio, A. et al. A prospective study of nutritional factors and hypertension among US men. *Circulation* 86, 1475–1484 (1992).
- Ascherio, A. et al. Prospective study of nutritional factors, blood pressure, and hypertension among US women. *Hypertension* 27, 1065–1072 (1996).
- 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).
- Joosten, M. M. et al. Urinary and plasma magnesium and risk of ischemic heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 97, 1299–1306 (2013).
- Giménez-Mascarell, P. et al. Novel Aspects of Renal Magnesium Homeostasis. *Front. Pediatr.* 6, 77 (2018).
- 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).

11. Walder, R. Y. et al. Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat. Genet.* 31, 171–174 (2002).
12. Voets, T. et al. TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. *J. Biol. Chem.* 279, 19–25 (2004).
13. Stuiver, M. et al. CNNM2, encoding a basolateral protein required for renal Mg²⁺ handling, is mutated in dominant hypomagnesemia. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 333–343 (2011).
14. de Baaij, J. H. et al. Membrane topology and intracellular processing of cyclin M2 (CNNM2). *J. Biol. Chem.* 287, 13644–13655 (2012).
15. Arjona, F.J. et al. CNNM2 mutations cause impaired brain development and seizures in patients with hypomagnesemia. *PLoS Genet.* 10, e1004267 (2014).
16. Funato, Y. et al. Renal function of cyclin M2 Mg²⁺ transporter maintains blood pressure. *J. Hypertens.* 35, 585–592 (2017).
17. 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).
18. Yamakoshi, K. et al. Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *J. Cell Biol.* 186, 393–407 (2009).
19. Funato, Y. et al. Nucleoredoxin sustains Wnt/ β -catenin signaling by retaining a pool of inactive dishevelled protein. *Curr. Biol.* 20, 1945–1952 (2010).
20. Slutsky, I. et al. Enhancement of learning and memory by elevating brain magnesium. *Neuron.* 65, 165–177 (2010).
21. Chubanov, V. et al. Epithelial magnesium transport by TRPM6 is essential for prenatal development and adult survival. *Elife.* 5, e20914 (2016)
22. Izzo, A.A. et al. The osmotic and intrinsic mechanisms of the pharmacological laxative action of oral high doses of magnesium sulphate. Importance of the release of digestive polypeptides and nitric oxide. *Magnes Res.* 9, 133–138 (1996).
23. Nikonorova, I.A. et al. Identification of a Mg²⁺-sensitive ORF in the 5'-leader of TRPM7 magnesium channel mRNA. *Nucleic Acids Res.* 42, 12779–12788 (2014).
24. Hardy, S. et al. Magnesium-sensitive upstream ORF controls PRL phosphatase expression to mediate energy metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 116, 2925–2934 (2019).

Mechanistic Analyses of Circadian Variation of Blood Pressure Triggered by Renal Response to Magnesium.

Yosuke Funato, Hiroaki Miki

Department of Cellular Regulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University
(Present affiliation: Department of Synthetic Chemistry and Biochemistry, Graduate School of Engineering,
Kyoto University)

Summary

TRPM6 is strongly expressed in renal distal convoluted tubule (DCT) cells and plays an essential role in magnesium reabsorption. We have previously shown a novel role of TRPM6 in regulating the circadian variation of blood pressure. Kidney-specific TRPM6-KO mice not only showed impaired renal magnesium reabsorption but also showed attenuated circadian blood pressure variation. Furthermore, mice fed a high-magnesium diet showed decreased TRPM6 expression in DCT and suppressed circadian blood pressure variation. These results suggest an interesting possibility that blood pressure, especially its circadian variation can be controlled by magnesium administration and subsequent suppression of TRPM6 expression. However, little is known about how continuous administration of magnesium affects organisms, especially its adverse effects.

To clarify this issue, mice were fed diets containing various amounts of magnesium (0.0027%, 0.1%, 0.3%, or 0.6%) for 2-4 weeks. First, we checked the serum magnesium levels, and confirmed that it correlates with the amount of magnesium in their diets. Also, the expression level of TRPM6 was inversely correlated with the dietary magnesium content, and typically it was almost undetectable in mice fed a high-magnesium diet. In these mice, there were no significant difference on growth, kidney tissue architectures, and cell senescence, but mice fed high magnesium diet showed symptoms of diarrhea.

These results suggest that by optimizing the route of magnesium administration may avoid diarrhea and provide a safe blood pressure control method without obvious adverse effects. Nevertheless, further experiments will be required, including further long-term administration in older mice and in induced hypertension models, to evaluate the efficacy and safety of magnesium administration as novel methods to control circadian blood pressure variation.