

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	古谷勇馬
論文題目	Effects of Magnesium Deficiency on Expression of Myogenic Regulatory Factors (マグネシウム欠乏が筋原性制御因子の発現に及ぼす影響)		
(論文内容の要旨)			
マグネシウムの欠乏は様々な組織に悪影響を及ぼすことが知られている。骨格筋もその1つであり、マグネシウム欠乏により骨格筋の成長が抑制されることが報告されているものの、その原因は明らかになっていない。骨格筋の形成（成長）には筋原性制御因子群が重要な役割を果たしている。筋原性制御因子群には Myogenic factor 5 (Myf5)、Myogenic differentiation 1 (MyoD)、Myogenin、Muscle regulatory factor 4 (MRF4) と呼ばれる 4 つの転写因子があり、これらが段階的に発現することによって骨格筋が形成される。 本研究では、ラットの骨格筋においてマグネシウム欠乏が筋原性制御因子群遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。次いで、分化刺激に応じて融合し多核の筋管細胞に分化する C2C12 細胞を用い、マグネシウム欠乏が筋原性制御因子群遺伝子発現に及ぼす影響のメカニズムを検討した。本論文の内容は以下のように要約される。			
1. マグネシウム欠乏飼料を給与されたラットでは、低マグネシウム血症と耳部における炎症反応が認められ、マグネシウム欠乏状態であることが確認された。マグネシウム欠乏ラットの腓腹筋重量は低下したが、筋原性制御因子群のうち、Myogenin と MRF4 の遺伝子発現は増加した。Transforming growth factor-β1 (TGF-β1) の遺伝子発現および酸化ストレスマーカーである Heme oxigenase-1 (HO-1) がマグネシウム欠乏により増加した。一方、他の TGF-βファミリーリガンドである Bone morphogenetic protein-4、Inhibin-βa および Myostatin の遺伝子発現はマグネシウム欠乏の影響を受けなかった。 2. C2C12 筋管形成モデル培養系において、マグネシウム欠乏、酸化ストレスおよびカルシウムイオノフォアの影響を検討した。筋芽細胞と筋管細胞とが混在する時期にマグネシウム欠乏培地で培養すると、MyoD および Myosin heavy chain 2b (MyHC2b) の遺伝子発現は増加した。分化刺激時から培地に過酸化水素水を添加することで HO-1 の遺伝子発現が増加することから、酸化ストレスの惹起が確認されるとともに、MyoD、Myogenin および MyHC2b の遺伝子発現が減少した。マグネシウム欠乏時には細胞内カルシウムイオン濃度が上昇すると考えられている。そこで、カルシウムイオノフォアである A23187 を筋芽細胞時期、分化刺激時期および筋芽細胞と筋管細胞が混在する時期の培地に添加したが、A23187 処理はいずれの時期に			

においても筋原性制御因子群ならびに MyHC2b の遺伝子発現に影響を及ぼさなかった。これらの結果から、筋原性制御因子群の遺伝子発現は、酸化ストレスにより負に調節されるが、細胞外マグネシウム濃度の低下により正に調節されることが明らかになった。

3. C2C12 筋管形成モデル培養系を用いて、内因性の TGF- β 活性の影響を検討した。TGF- β は受容体に結合したのち Smad2 をリン酸化し、標的遺伝子の発現を制御する。C2C12 細胞における Smad2 のリン酸化レベルにより TGF- β 活性を評価したところ、筋芽細胞と筋管細胞が混在する時期に最大となった。また、TGF- β 2 と TGF- β 3 の遺伝子発現もこの時期に増加した。TGF- β 受容体の阻害剤である A-83-01 を培地に添加すると、Myf5、MyoD、MyHC2b の遺伝子発現ならびに MyHC タンパク質の発現が増加した。また、筋管細胞中の核の数も A-83-01 処理により増加した。この現象は、筋芽細胞の培地ならびに分化刺激培地に A-83-01 を添加した場合においても再現された。これらの結果から、内因性の TGF- β はいずれの時期においても筋管形成に対して抑制的に作用することが明らかになった。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。
論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

マグネシウム欠乏は骨格筋の成長を抑制することが知られているが、その原因は明らかになっていなかった。本論文は、動物個体を用い、マグネシウム欠乏が筋形成に必須な筋原性制御因子群遺伝子発現に及ぼす影響を検討するとともに、そのメカニズムを細胞培養系により解析したものであり、評価すべき主な点は以下のとおりである。

1. マグネシウム欠乏ラットの骨格筋では酸化ストレスが高まり、その成長が抑制されるにもかかわらず Myogenin および MRF4 の遺伝子発現が増加すること、また、TGF- β 1 の遺伝子発現も増加することを明らかにした。
2. C2C12 筋管形成モデル培養系を用い、マグネシウム欠乏により MyoD および MyHC2b の遺伝子発現が増加することを明らかにするとともに、酸化ストレスが MyoD、Myogenin、MyHC2b の遺伝子発現を減少させることを示した。一方、マグネシウム欠乏が誘導すると考えられる細胞内カルシウムイオン濃度上昇は、筋原性制御因子群および MyHC2b の遺伝子発現に影響を及ぼさないことを明らかにした。
3. C2C12 筋管形成モデル培養系では、TGF- β 2 および TGF- β 3 の遺伝子発現ならびに内因性の TGF- β 活性が筋芽細胞・筋管細胞混在時に増加することを明らかにした。また、どの分化段階においても、内因性の TGF- β 活性の阻害は、Myf5、MyoD、MyHC2b の遺伝子発現ならびに MyHC タンパク質の発現を増加させ、筋管形成の促進を引き起こすことを明らかにした。

以上のように本論文は、マグネシウム欠乏が動物個体における骨格筋成長に及ぼす影響を検討し、そのメカニズムを C2C12 筋管形成モデル培養系により明らかにしたものであり、動物栄養科学、動物生理学、細胞生物学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 23 年 2 月 17 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降