

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11630

研究課題名（和文）転写因子MXL-3による酸化ストレス応答と栄養シグナルの統合機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of Integration of Oxidative Stress Response and Nutritional Signaling by Transcription Factor MXL-3

研究代表者

安田 佳代（Yasuda, Kayo）

東海大学・健康学部・講師

研究者番号：90822734

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：転写因子MXL-3は栄養状態によって脂肪代謝に関わっていることが報告されていた。さらに酸化ストレスにも寄与しており、MXL-3を介した酸化ストレス応答と栄養シグナルとの関わりを調べることを目的としている。

本研究結果において、MXL-3はグルコース負荷において機能が亢進し、MXL-3を欠損させることによって成長率および寿命への影響が認められた。また、酸化ストレス時には転写因子SKN-1と協働する可能性があったが、グルコース負荷時においてはSKN-1の下流であるgst-4の発現は上昇するものの、MXL-3欠損株においても上昇することから、部分的な協働の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化研究において、代謝が亢進することにより酸化ストレスが上昇し、寿命の短縮につながるということが知られている。本研究で着眼している転写因子MXL-3は酸化ストレスや栄養状態によって脂肪代謝に関わっていることが報告されている。本研究結果では栄養過多により酸化ストレスが亢進し、その結果MXL-3が亢進している可能性、さらにmxl-3変異体は長寿を示すが、エネルギー代謝が亢進しているという興味深い知見が得られ、栄養シグナルと酸化ストレスの両方を統合的に解明することは慢性代謝疾患の解明に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：The transcription factor MXL-3 was reported to be involved in fat metabolism depending on nutritional status. Furthermore, it also contributes to oxidative stress, and the objective of this study was to investigate the relationship between the oxidative stress response mediated by MXL-3 and nutritional signals.

In this study, we found that MXL-3 function was enhanced under glucose administration, and that loss of MXL-3 had an effect on growth rate and lifespan. In addition, MXL-3 could cooperate with the transcription factor SKN-1 during oxidative stress, but the expression of gst-4, which is downstream of SKN-1, was upregulated during glucose administration, but also in MXL-3-deficient strains, suggesting the possibility of partial cooperation.

研究分野：生化学 栄養学

キーワード：酸化ストレス応答 栄養シグナル エネルギー代謝 C. elegans mxl-3

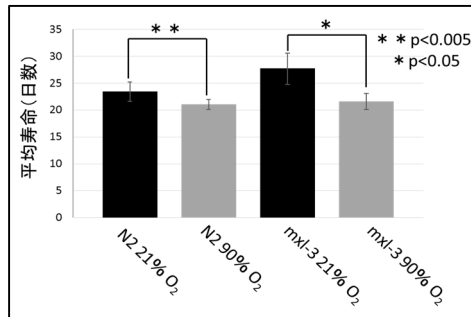
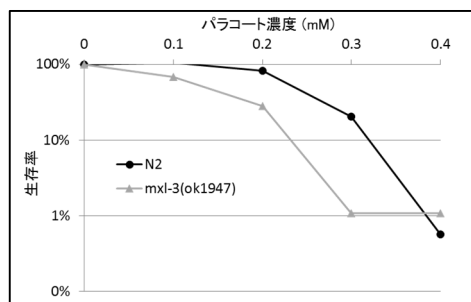
## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

MXL-3 は bHLH(basic helix-loop-helix)ドメインを有する転写因子であり、哺乳類 Max 転写因子のホモログとして知られている。MXL-3 は栄養が十分にある通常的环境下では、リソソームに局在するリパーゼの発現を抑制しているが、飢餓状態になると MXL-3 の発現が抑制され、リパーゼの発現が誘導され、結果としてリポファジーが促進されて脂肪が分解することが報告されている。そして近年、グルコース濃度に依存して MXL-3 が活性化し、脂肪合成が亢進することが報告された。これらの結果から栄養シグナルが MXL-3 の活性を介して代謝の統合を支配していることが示唆されている。

一方、線虫 *C. elegans* は飢餓状態や劣悪な環境にさらされると、通常の発生期から外れ、耐性幼虫期へと移行する。これまで申請者らは、線虫の耐性幼虫期に低線量の電離放射線(X線)を照射すると、正常発生復帰後の寿命延長効果が認められ(Ref.1)、マイクロアレイによるゲノムワイドな解析により、*mxl-3* の発現が上昇し抗酸化作用や脂肪酸合成・分解の均衡に関わっていることを見出した。放射線は生体内の水と反応して活性酸素を発生させることが知られていることから、活性酸素誘導剤であるパラコートを暴露させた結果、*mxl-3* 遺伝子の発現は上昇することが明らかになり、*mxl-3* が欠損した変異体はパラコートに高感受性を示した。さらに、90%酸素濃度下で寿命測定を行ったところ、寿命延長効果が完全に失われた。

これらの結果から、転写因子 MXL-3 が脂質代謝や酸化ストレス応答に関与していることが示唆されているものの、未だ全体像としては未解明のままである。



### 2. 研究の目的

MXL-3 は、酸化ストレス応答転写因子 SKN-1 と結合する一方、HLH-30 と競合して脂質分解を抑制することから、MXL-3 が酸化ストレス応答と栄養シグナルにどのように寄与しているかを統合的に解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) MXL-3 の亢進とストレス種依存性の有無の検討

酸化ストレス(パラコート、90%)およびグルコースを負荷した *C. elegans* を回収、totalRNA を抽出し Real Time PCR 法にて *mxl-3* の発現量を確認した。MXL-3 の過剰発現体の作成は全身性で発現するプロモーター *dpy-30* を用いて構築した。

#### 2) 栄養シグナルと酸化ストレスの関連性の検および SKN-1 への寄与の検討

*Mxl-3::GFP* を導入したトランスジェニック (TG) 線虫にてパラコートおよびグルコース負荷をかけ、蛍光顕微鏡下で核移行の状況を観察する。グルコースによる酸化ストレスの検討として転写因子 SKN-1 の下流である *gst-4* の遺伝子発現を調べた。

#### 3) エネルギー代謝量の解析

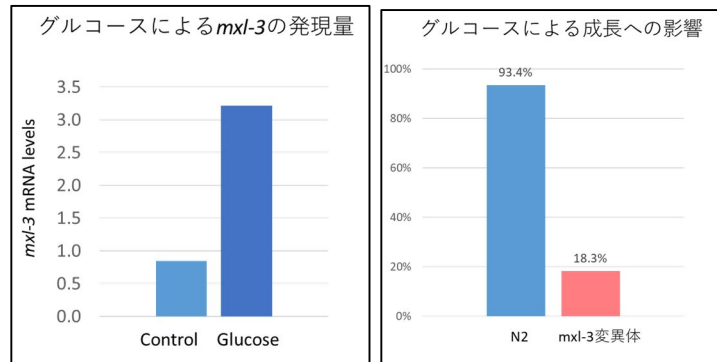
個体のエネルギー代謝を反映している酸素消費量にて測定を行った。

#### 4) 二重変異体の作出および寿命解析

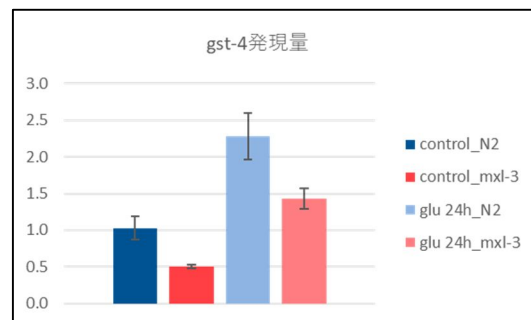
雌雄同体と *mxl-3* 変異体の雄を掛け合わせ、PCR 等で確認を行い作出した。作出された変異体を用いて、寒天培地上で寿命の測定を解析した。

#### 4. 研究成果

1) MXL-3の亢進にストレス依存性があるかを検討した。パラコートによる酸化ストレス負荷において発現量の上昇をすでに確認しており、同様の方法にて高グルコース負荷による *mxl-3* の発現量の検討をおこなった。その結果グルコース負荷24時間暴露にて *mxl-3* の発現量が上昇することが確認された。また、幼虫期に4日間グルコースを負荷するとさらに発現量が上昇することを確認している。興味深いことに、グルコース負荷は成長遅延を引き起こすが、*mxl-3* 変異体では成長率の低下が顕著に認められた。このことは、酸化ストレス暴露における、成長率の低下と同様の結果となった。

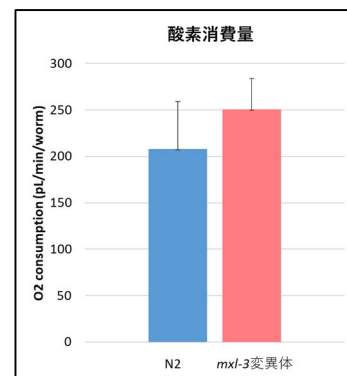


2) 栄養シグナルと酸化ストレスの関連性の検討において高グルコース食で MXL-3 が活性化することが報告されており、高グルコースが酸化ストレスを引き起こし MXL-3 が活性化したのではないかという可能性を検討した。当初は *Mxl-3::GFP* を導入したトランスジェニック (TG) 線虫を用い、高グルコース食に抗酸化剤を投与し MXL-3 の活性化を確認する予定であったが、核移行の個体差が激しいため計画を変更した。酸化ストレス時の MXL-3 には転写因子 SKN-1 が関与していることから、SKN-1 の下流因子である *gst-4* の発現量にて酸化ストレスの状況を検討した。その結果、グルコース投与によって *gst-4* の発現量が上昇することから、グルコース負荷により酸化ストレスが亢進することが示唆された。しかしながら *mxl-3* 変異体においてもグルコース負荷で *gst-4* の発現量が上昇したことから、酸化ストレスにおける SKN-1 の作用に MXL-3 が必ずしも必要ではないことが示唆された。*skn-1* 変異体と *mxl-3* 変異体との二重変異体を作成し、SKN-1 との協働性の確認を行う予定である。



次に、栄養シグナルを介したインスリンシグナルと酸化ストレスとの相関も確認するため、インスリンシグナル下流の *daf-16* と *mxl-3* 変異体との二重変異体を作成した。寿命解析を行った結果、*mxl-3* 変異体の寿命延長効果が *daf-16* 変異体によって消失した。このことから、MXL-3 はインスリンシグナルとも関与している可能性が示唆された。

3) *mxl-3* 変異体は寿命が延長しているが、寿命延長効果が認められる変異体は、エネルギー代謝が低下している可能性が考えられる。そのため、代謝の指標の一つである酸素消費量の測定を行い検討した。その結果、*mxl-3* 変異体は酸素消費量が低下しておらず、やや高値の傾向が認められた。この結果から、何らかの代謝が亢進していることが示唆され、低エネルギー代謝による長寿命株ではないため、詳細な代謝動態を検討する必要がある。



#### 参考文献

1. Onodera A, Yanase S, Ishii T, Yasuda K, Miyazawa M, Hartman PS, Ishii N. Post-dauer life span of *Caenorhabditis elegans* dauer larvae can be modified by X-irradiation. J Radiat Res. 2010;51(1):67-71.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasuda Kayo, Miyazawa Masaki, Ishii Takamasa, Ishii Naoaki	4. 巻 73
2. 論文標題 The role of nutrition and oxidative stress as aging factors in <i>Caenorhabditis elegans</i> ;	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 173 ~ 177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcfn.23-44	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yunosuke SAKAI, Takamasa ISHII, Masaki MIYAZAWA, Naoaki ISHII, Kayo YASUDA
2. 発表標題 The function of transcription factor MXL-3 involved in oxidative stress and nutrition signal
3. 学会等名 第45回日本基礎老化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井悠之介、田中優希、宮沢正樹、石井恭正、石井直明、安田佳代
2. 発表標題 酸化ストレスと栄養シグナルに関する転写因子MXL-3の機能解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田佳代、石井恭正、宮沢正樹、石井直明
2. 発表標題 酸化ストレスと栄養シグナルに関わる転写因子MXL-3の機能解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮沢 正樹 (Miyazawa Masaki)  (10554818)	東海大学・健康学部・准教授  (32644)	
研究分担者	石井 恭正 (Takamasa Ishii)  (20548680)	東海大学・医学部・准教授  (32644)	
研究分担者	石井 直明 (Naoaki Ishii)  (60096196)	東海大学・健康学部・教授  (32644)	
研究分担者	築瀬 澄乃 (Yanase Sumino)  (90249061)	大東文化大学・スポーツ健康科学部・教授  (32636)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------