

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340037

研究課題名(和文) 線虫の放射線耐性に関わるシグナル伝達経路の解明

研究課題名(英文) Elucidation of signal transduction pathway related to a radiation resistance of the nematode

研究代表者

石井 直明 (ISHII, Naoaki)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：60096196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：線虫*C. elegans*の耐性幼虫期に放射線を照射すると寿命延長効果が見られ、転写因子MXL-3の発現が上昇すると報告してきた。

放射線が生体内の水と反応し発生する活性酸素が細胞傷害に大きく寄与することが知られ、MXL-3が酸化ストレス応答に関わるSKN-1と結合する報告がある。事実、生体内に活性酸素を過剰に発生させるパラコートに曝露させると発現量上昇が認められ、またmxl-3突然変異体はパラコート高感受性を示し、高濃度酸素ストレス下で寿命短縮効果が顕著に現れた。本研究では、転写因子MXL-3がSKN-1と協調して、酸化ストレス応答に関与している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that X-ray irradiation extends lifespan and up-regulates the expression of mxl-3 at a dauer larval stage of the nematode *Caenorhabditis elegans*.

It is well known that reactive oxygen species generated from radiation react with water in vivo contributes to the cellular damages and it is reported that MXL-3 binds to SKN-1 related to oxidative stress. In fact, mxl-3 mRNA levels was up-regulated in wild type worms exposed to paraquat and then the mxl-3 mutant was hypersensitive to paraquat and is short lived under oxygen stress of high concentration. Our result raise the possibility that MXL-3 is involved in response to oxidative stress in collaboration with SKN-1.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 老化 活性酸素 *C. elegans* ホルミシス シグナル伝達経路 MXL-3 SKN-1

1. 研究開始当初の背景

線虫は放射線に対して強い耐性を示すことが知られている。これまでの研究から、線虫 *C. elegans* の特殊なステージである耐性幼虫期の初期に放射線を照射した後、正常な幼虫期の虫に戻すと、成熟後の寿命が延長することを見出した。この強い放射線ホルミシス効果は、遺伝子発現の網羅的な解析から、放射線照射によって転写因子である MXL-3 が関わっていることが示唆された。本研究では MXL-3 の下流にある遺伝子の同定と放射線耐性の関わりを調べることで、このシグナル伝達経路を介した放射線耐性の応答メカニズムを明らかにすることを目的とした。しかし、この放射線による寿命延長効果は耐性幼虫期の特定の時期のみ現れないことが明らかになった。

MXL-3 は bHLH-LZ (basic helix-loop-helix-leucine zipper) ドメインを有する転写因子で哺乳類 Max 転写因子のホモログとして知られおり、飢餓ストレス下における脂質代謝に関与していることが報告されている。飢餓状態で栄養がなくなると細胞が弱り、さまざまな病気に罹りやすくなるので、生物が飢餓状態に陥ると、さまざまなストレスに対する防御機構を強めることが分かっている。

放射線は生体内の水と反応して活性酸素を生じ、これが細胞を傷害することが知られており、また MKX-3 が酸化ストレス応答に関わる SKN-1 と結合するという報告が出たことから、MXL-3 の酸化ストレス応答への関与を詳細に調べることを目的とした。

2. 研究の目的

(1) MXL-3 転写因子

当研究室では、線虫 *C. elegans* の耐性幼虫期と呼ばれる、様々なストレスに対して耐性をもつ発生期に電離放射線(X線)を照射し、マイクロアレイによるゲノムワイドな遺伝子発現解析を行い、その影響を調べた。その結果、未照射のものに比べて、細胞障害影響関連遺伝子群(小胞体ストレス応答、細胞死誘導シグナル、細胞骨格構築蛋白質、抗酸化物質合成、異物代謝、自然免疫など)や、エネルギー代謝遺伝子群(糖新生、 β 酸化、不飽和脂肪酸合成、アミノ酸代謝)の発現上昇を確認した。発現上昇した遺伝子群の中で、機能性遺伝子の発現調整を行うと推測される転写因子を絞り込み、リアルタイムPCRによって発現量を確認したところ、転写因子 MXL-3 の遺伝子発現量の上昇を確認した。転写因子 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 転写因子は、餌が十分にある環境ではリソソームに局在するリパーゼ遺伝子の発現を抑制している。飢餓状態になると MXL-3 遺伝子の発現が抑制され、TFEB と相

同性を示す HLH-30 転写因子の発現量が上昇する。HLH-30 転写因子はリソソームに局在するリパーゼ遺伝子及びオートファジーに関与する遺伝子を発現させ、その結果リポファジーが活性化し、脂肪が分解する。MXL-3 遺伝子が欠損した突然変異体は飢餓と同じ状態になり、N2 野生株に比べて寿命が延長する。さらに、酸化ストレス応答に関与する SKN-1 転写因子と結合することが報告されている。放射線は生体内の水と反応して活性酸素を産生することが知られており、MXL-3 または MXL-3 及び SKN-1 によって形成されたダイマーが、酸化ストレス応答に関与している可能性が考えられる(図1C)。本研究では MXL-3 の酸化ストレスへの関わりを調べた。

(2) 酸化ストレス

哺乳類を含む好気性生物は、酸素の大部分をエネルギー産生に利用し、高い運動性、機能性を維持している。一方で、生体内に取り込まれた酸素の数%が、ミトコンドリア内の電子伝達の過程で活性酸素種(Reactive oxygen species; ROS)の一種であるスーパーオキシド(O_2^-)へと変換される。ROS は酸素分子由来の分子種で、通常酸素分子より反応性に富むため、生体内では核酸やタンパク質、脂質などが酸化修飾を受ける。ROS にはスーパーオキシド(O_2^-)に加えて、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシラジカル($\cdot OH$)などがあり、生体内ではこれらをスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)やカタラーゼなどの抗酸化酵素や、ビタミン A、C、E などの抗酸化物質などで消去する。活性酸素産生系が消去系を上回ることを酸化ストレスと呼び、過剰に産生した ROS は上述したように、生体分子を酸化する。酸化ストレスが蓄積すると細胞機能が破綻し、老化の促進や糖尿病、動脈硬化などをはじめとする様々な疾患を引き起こす。

(3) 放射線と酸化ストレス

活性酸素は様々な要因で作り出されるが、放射線もまたその要因の一つである。生体内の水が放射線照射を受けると、電離及び励起によって $\cdot OH$ 、水素ラジカル($H\cdot$)、水和電子(e^-_{aq})に分解され、二次的に O_2^- や H_2O_2 が生成される。こうして生じた ROS はその近傍に存在する DNA や様々な生体分子へ酸化損傷を与える。放射線が生体に与える作用には、放射線が直接、生体分子に損傷を与える直接作用と、放射線によって生じた活性酸素が生体分子に損傷を与える間接作用が知られているが、その90%が間接作用であると考えられている。

(4) 線虫 *C. elegans*

線虫 *C. elegans* は体長1mm程度の小さな虫で、成虫では約1000個の細胞からなる。表皮、筋肉、神経、消化器官、生殖器官など、

生物として必要最低限の体制をもち、20 で飼育した場合、1 世代期間が 3 日半、最大寿命が約 30 日と短い。非寄生性の線虫であり、餌として大腸菌を用いる、凍結して長期保存できるなど実験動物として扱いやすい。受精後約 15 時間で孵化し、孵化直後の幼虫を L1 幼虫期と呼ぶ。その後、3 回の脱皮で L2、L3、L4 幼虫期を経て、成虫となる。成虫となった時点で生殖細胞以外の体細胞分裂が終了しているため、細胞に蓄積された障害の影響を調べるのに最適である。卵巣と精巣をもつ雌雄同体が基本であるため、自家受精によって次世代が生まれる。そのため、神経や筋肉に異常が生じても交配が可能であるため、遺伝学研究にとって利点がある。さらに、遺伝的な背景が均一であり、ヒトのように遺伝的な多様性がないことから、遺伝子の特定が容易である。多細胞生物ではじめて全ゲノム配列が決定され、約 19,000 の遺伝子が存在することが分かっている。それらの遺伝子にはヒトの遺伝子と相同関係をもつものが多く存在する。これらのことから、老化や発生、行動などあらゆる生物学の分野で広く用いられている。酸化ストレス応答に関与する遺伝子群は、哺乳類をはじめとする多くの種に保存されており、*C. elegans* でも確認されている。そのため、酸化ストレス応答のメカニズム解明に非常に有用なモデル生物である。

C. elegans の研究体制は世界的なレベルで整備されている。ゲノム情報や解剖学的な情報などはデータベースで整備されており、研究に有用な情報はインターネットを通じて簡単に取得できる。突然変異が国内外の遺伝センターに登録されており、これらもインターネットを通じて手に入れることができる。

3. 研究の方法

(1) パラコート曝露による *mxl-3* 遺伝子の発現量

30 mM パラコートを線虫 *C. elegans* の N2 野生株に 1~5 時間曝露させたのち、RNA を抽出し、cDNA を合成後、リアルタイム PCR で *mxl-3* 遺伝子の発現量を調べた。

(2) パラコート感受性試験

パラコートは生体内で過剰に活性酸素を発生させることが知られている。*mxl-3* 突然変異体が活性酸素に感受性を示すかどうかを確認するため、パラコートを添加した NGM 寒天培地(終濃度 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mM)に L1 幼虫を移し、L4 幼虫以上に成長した個体を計測した。

(3) 高濃度酸素下での寿命測定

mxl-3 突然変異体が高濃度の酸素にも感受性を示すかどうかを確認するため、N2 野生株及び *mxl-3* 突然変異体を高濃度酸素 (酸素濃度 90%) に曝露し、寿命測定を行った。

(4) フィーディング RNAi による *skn-1* のノック

クダウン

MXL-3 は酸化ストレス応答に関与する SKN-1 と結合するという報告がある。MXL-3 と SKN-1 が形成したダイマーが酸化ストレス応答に関与するかどうかを調べるため、N2 野生株及び *mxl-3* 突然変異体に対してフィーディング RNAi による *skn-1* のノックダウンを行い、酸化ストレス下で表現形解析を行った。

4. 研究成果

(1) パラコート曝露による *mxl-3* 遺伝子の発現量

3 時間以上の曝露させたもので発現量上昇が認められた(図 1)。

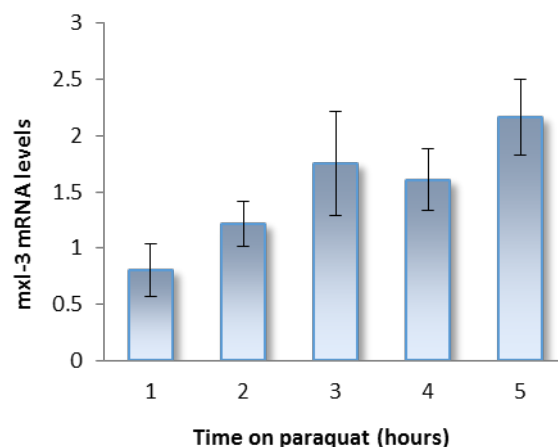


図 1 パラコート曝露による *mxl-3* 遺伝子の発現量

(2) パラコート感受性試験

mxl-3 突然変異体は N2 野生株に比べ、パラコートに対して高感受性を示した(図 2)。

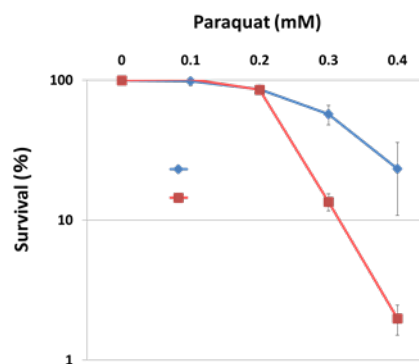


図 2 パラコート感受性試験

(3) 高濃度酸素下での寿命測定

高濃度酸素下では、通常の大気中 (酸素濃度 21%) に比べて、N2 野生株では 10%、*mxl-3* 変異体では 21% 平均寿命が短縮した(図 3)。

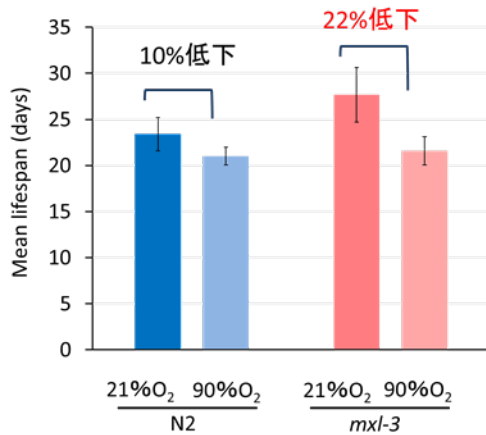


図3 高濃度酸素下での寿命測定

(4) フィーディングRNAiによる *skn-1* のノックダウン

skn-1 RNAi 処理した野生株ではパラコートに高い感受性を示した。一方、*mxl-3* 変異体に *skn-1* RNAi 処理した虫のパラコート感受性は *skn-1* RNAi 処理した野生株や *mxl-3* 突然変異体のパラコート感受性と同等な感受性を示した(図4)

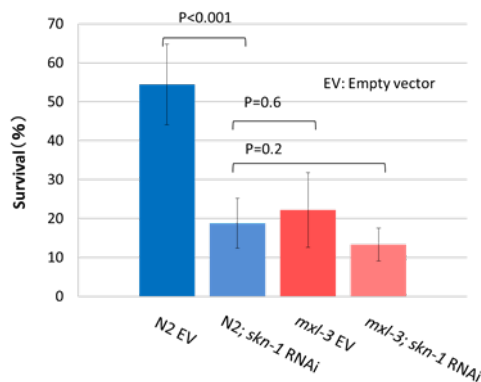


図4 フィーディング RNAi による *skn-1* のノックダウン

以上の結果より、MXL-3 は SKN-1 と協調して酸化ストレス応答に参与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

Arai M, Nakada Y, Kajiwaru K, Kimura M, Ishii N, Preparation of clinically useful sennoside-reduced Rhubarb, Tokai J. Exp. Clin. Med. 査読有, 41 巻, 2016, 24-29
URL: <http://mj-med-u-tokai.com/>

Ishii T, Yasuda K, Miyazawa M, Mitsushita J, Johnson TE, Hartman PS, Ishii N,

Infertility and recurrent miscarriage with complex II deficiency-dependent mitochondrial oxidative stress in animal models, Mechanisms of Ageing and Development, 査読有, 155, 2016, 22-35
DDI: 10.1016/j.mad.2016.02.013

Moro T, Nakao S, Sumiyoshi H, Ishii T, Miyazawa M, Ishii N, Sato T, Iida Y, Okada Y, Tanaka M, Hayashi H, Ueha S, Matsushima K, Inagaki Y, A combination of mitochondrial oxidative stress and excess fat/caloric intake accelerates steatohepatitis by enhancing hepatic CC chemokine production in mice, PLOS ONE, 査読有, 11 巻 (1), 2016, e0146592
DDI: e0146592

Yamada C, Kishimoto N, Yukumatsu N, Takeda A, Ogata T, Kikuchi E, Kuroda E, Kubo A, Ishii N, Nishizaki Y, Longitudinal trajectories of adiponectin and HDL-C levels over a 3 year survey within the antiaging health checkup system at Tokai University Tokyo Hospital. Health Evaluation and Promotion, 査読有, 42 巻, 2015, 444-447
DDI: 10.7143/jhep.42.444

Nishizaki Y, Yamada C, Kishimoto N, Shiozawa H, Takeda A, Ogata T, Kuroda E, Kubo A, Kuwahira I, Ishii N, Retrospective on nine years of the Anti-Aging Health Check-ups in Tokai University Tokyo Hospital: From establishment to future. Health Evaluation and Promotion. 査読有, 42 巻, 2015, 465-470
DDI: 10.7143/jhep.42.465

Ishii T, Miyazawa M, Takanashi Y, Tanigawa M, Yasuda K, Onouchi H, Kawabe N, Mitsushita J, Hartman PS, Ishii N, Genetically induced oxidative stress in mice causes thrombocytosis splenomegaly and placental angiodysplasia that leads to recurrent abortion. Redox Biology, 査読有, 2 巻, 2014, 679-685
DDI: 10.1016/j.redox.2014.05.001

Ikeuchi M, Saruwatari K, Takeda Y, Shimoda M, Nakashima A, Inoue M, Oroguchi T, Ishii N, Yoshii F, Haida M, Evaluating "Cosmetic Therapy" by using near-infrared spectroscopy. World Journal of Neuroscience, 査読有, 4 巻, 2014, 194-201
DDI: 10.2016/wins.2014.42023

Hartman PS, Barry J, Finstad W, Khan N, Tanaka M, Yasuda K, Ishii N,

Ethyl methansulfonate induces mutations in *Caenorhabditis elegans* embryos at a high frequency, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis. 査読有、766-767 巻、2014、44-48
DDI: 10.1016/j.mrfmmm, 2014.05.011

Ishii T, Miyazawa M, Onouchi H, Yasuda K, Hartman PS, Ishii N, Model animals for the study oxidative stress from complex II, Biochimica et Biophysica Acta 査読有、1827 巻、2013、588-597
DDI: 10.2016/j.bbabi.2012.10.016

〔学会発表〕(計 8 件)

石井直明、老化のシグナル、心血管代謝週間 2015 (招待講演)、2015 年 12 月 10 日~2015 年 12 月 12 日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市中央区)

高橋航大、安田佳代、石井恭正、笹川昇、石井直明、線虫 *C. elegans* の MXL-3 転写因子の酸化ストレス応答、日本基礎老化学会第 38 回大会、2015 年 06 月 12 日~2015 年 06 月 14 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市西区みなとみらい)

Takahashi K, Yasuda K, Ishii T, Sasagawa N, Hartman P, Ishii N, Oxidative stress response of a transcription factor MXL-3 in the nematode *C. elegans*, *C. elegans* 20th International Meeting (国際学会)、2015 年 06 月 24 日~2015 年 06 月 28 日、UCLA (California, USA)

石井恭正、高梨由美、宮沢正樹、安田佳代、石井直明 ミトコンドリア酸化ストレスによる脳内グリア環境の加齢変化 第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会 2014 年 09 月 04 日~2014 年 09 月 05 日 同社大学 今出川キャンパス良心館 (京都府 上京区)

石井恭正、宮沢正樹、安田佳代、石井直明 ミトコンドリア複合体 II 電子伝達異常に起因する酸化ストレスと生体の加齢変容 日本ミトコンドリア学会-日本基礎老化学会 Joint Meeting 2014 年 10 月 25 日~2014 年 10 月 25 日 東海大学高輪キャンパス (東京 品川)

石井恭正、安田佳代、石井直明 酸化ストレスと老化のモデル研究 第 66 回日本皮膚科学会西部支部学術大会 2014 年 11 月 08 日~2014 年 11 月 09 日 アルファあなぶきホール (香川県 高松市)

Ishii T, Takanashi Y, Miyazawa M, Yasuda K, Hartman PS, Ishii N Age-dependent redox regulations with mitochondrial reactive oxygen species in hippocampal regions The 2014 Cold Spring Harbor Laboratory meeting on Molecular Genetics of Aging 2014 年 09 月 29 日~2014 年 10 月 03 日 Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor USA)

石井恭正、高梨由美、柳原倫太郎、浅利真司、安田佳代、石井直明 ミトコンドリア酸化ストレスに惹起される脳内環境の加齢変化および記憶障害 日本基礎老化学会 2013 年 06 月 04 日~2013 年 06 月 06 日 大阪中之島センター (大阪府北区中之島)

〔図書〕(計 4 件)

石井直明 東海教育研究所 アンチエイジング読本 2015 157

Ishii N, Ishii T, Hartman PS, Springer, Aging mechanisms: Longevity, metabolism, and brain aging, Oxidative stress and *C. elegans* models, 2015, 111-122 (総ページ数 439)

石井直明 化学同人 老化の生物学, Overview 2014 1-9 (総ページ数 351)

石井恭正、石井直明 化学同人 老化の生物学、酸化ストレス 2014 200-213 (総ページ数 351)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 直明 (ISHII Naoaki)
東海大学・医学部・教授
研究者番号: 60096196