

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657001

研究課題名(和文) 線虫をモデル系としたアナンダミド受容体の同定と機能解明

研究課題名(英文) Identification and functional characterization of anandamide receptors in *Caenorhabditis elegans* as a model organism.

研究代表者

松本 邦弘 (Matsumoto, Kunihiro)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70116375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：内因性カンナビノイドの一種であるアナンダミドは、多くの生理学的過程に関与することが知られている。哺乳動物では、CB1/CB2およびTRPVに加えて、未知の受容体CBxがアナンダミド受容体として存在することが示唆されている。我々は、新規アナンダミド受容体を同定するために、線虫*Caenorhabditis elegans*をモデル生物とした機能的スクリーニングを試みた。その結果、sfah-1およびsfah-2と名付けた線虫の新規7回膜貫通型受容体の同定に成功した。SFAH-1はCB1およびCB2受容体と弱い相同性を示すのに対し、SFAH-2は脊椎動物のある種のペプチド受容体と相同性を示した。

研究成果の概要(英文)：Anandamide, a member of endocannabinoids, is known to be involved in many physiological processes. CB1, CB2 and TRPV act as anandamide receptors in mammals. In addition, it has been suggested that mammals have an unidentified receptor CBx for anandamide. To identify new anandamide receptors, we performed a functional screening by using a nematode *Caenorhabditis elegans* as a model organism. As a result, we successfully identified new nematode seven-transmembrane receptors, designated as SFAH-1 and SFAH-2. SFAH-1 shows a weak similarity to CB1 and CB2 receptors, whereas SFAH-2 shows a similarity to a certain kind of vertebrate peptide receptor.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、遺伝・ゲノム動態

キーワード：遺伝学 遺伝子 シグナル伝達 神経科学 生理活性

1. 研究開始当初の背景

アナンダミドはマリファナ様の作用を持つ内因性カンナビノイドの一種であり、哺乳動物において鎮痛、行動制御や血圧制御など多様な作用を持つ物質である。哺乳動物ではアナンダミド受容体として7回膜貫通型受容体であるCB1およびCB2が同定されており、これらは三量体G蛋白質を介して細胞内にシグナルを伝達する。また、別のタイプのアナンダミド受容体として、バニロイド受容体の一つであるTRPV1も知られている。

これまでの研究から、アナンダミドの主要な作用の一つとして血管拡張作用が知られているが、この作用の大半はCB1、CB2、TRPVのいずれも介していないことから、CB1/2およびTRPV以外の未知のアナンダミド受容体(CBx)が血管拡張作用を仲介すると推測されている(Jarai et al., *PNAS* 23, 14136-14141, 1999; Offertaler et al., *Mol. Pharmacol.* 63, p699-705, 2003; Kozłowska et al., *J. Hypertens.* 25, 2240-2248, 2007)。これまで数多くの研究者がCBxの同定に挑戦しており、GPR55やGPR119、転写制御因子PPARなどがCBxの候補としてに取り沙汰された。しかし、いずれもCBxとは異なるという結論になっており、結局のところCBxの分子実体は15年以上にもわたって不明のままである。

アナンダミドは哺乳動物だけでなく、より下等な動物にも存在することが分かっている。最近、質量分析による解析から、モデル生物の線虫 *Caenorhabditis elegans* においてもアナンダミドの存在が報告された(Lehtonen, et al., *Chem. Biodiversity* 5, 2431-2441, 2008)。しかし、線虫のアナンダミドが生体内でどのような機能を果たしているかについては、全く不明であった。さらに、ゲノム配列の解析から線虫にTRPVのホモログが存在することは分かっていたが、CB1/CB2ホモログについては高い相同性を示すものがないため、その存在について長い間疑問視されていた。

代表者は、本研究の開始までに線虫用いた遺伝学的手法により、アナンダミドが軸索切断後の再生を負に制御するという知見を得ていた。また、この表現型がアナンダミドの分解酵素FAAHの線虫ホモログ *faah-1* の欠損変異体でも同様に起こることも見出していた。さらに、この表現型は三量体Gタンパク質 $G\alpha$ の線虫ホモログである *goa-1* の欠損変異により完全に抑圧される(全て当時未発表)。しかし、その下流でどのような機構により神経軸索再生が負に制御されるのかについては不明であった。また、線虫のアナンダミド受容体についても同定できていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、線虫をモデル動物として用いることにより、新規のG蛋白質共役型のアナ

ンダミド受容体を機能的に同定することを目的とした。具体的には、*faah-1* 変異体で見られる軸索再生の低下現象が、アナンダミド受容体の欠損変異により抑圧されると推測し、それに基づいて *faah-1* 変異体を用いたスクリーニングにより、線虫のアナンダミド受容体を機能的に同定することを試みた。

3. 研究の方法

まず、*faah-1* 変異体を用いた神経軸索再生のアクセシ系についていくつかの解析を行い、系の構成およびその上下流のシグナル経路について明らかにした。また、線虫でアナンダミド受容体をスクリーニングし、その機能を解析するための新規アクセシ系の開発も行った。一方、アナンダミド受容体の探索については、最初に線虫のゲノムデータ情報を用いて、独自の指標によりアナンダミド受容体の候補の選定を行った。次に、候補遺伝子の欠損変異を単離し、*faah-1* 変異体との二重変異にすることにより、*faah-1* 変異体の軸索再生低下の表現型を抑圧するものをスクリーニングした。

4. 研究成果

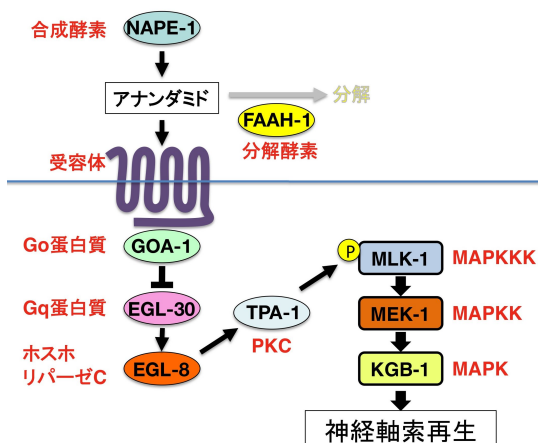
(1) FAAH-1による神経軸索再生制御についての基本的解析

代表者は、線虫の *faah-1* 欠損変異体において、線虫にアナンダミドを投与した場合と同様に、軸索切断後の神経再生の頻度が低下することを見出していた(当時未発表)。まず、この表現型が本当にアナンダミドを介した効果であるかについて検討した。哺乳動物では、アナンダミド合成酵素としてNAPEが同定されている。そこで、NAPEの線虫ホモログNAPE-1を同定した。次に、*nape-1* 欠損変異が *faah-1* 欠損変異による神経軸索再生に与える効果を検討した結果、*faah-1* 欠損変異による軸索再生の低下が *nape-1* 変異により抑圧されることを見出した。このことから、*faah-1* 欠損変異による軸索再生の低下はNAPE-1に依存したものであること、すなわちアナンダミドの合成に依存したものであることが示された。

一方、アナンダミドシグナルを伝達する三量体G蛋白質GOA-1について、その下流のシグナルについて解析した。これまでの神経機能の解析から、GOA-1は同じく三量体G蛋白質 $Gq\alpha$ のホモログEGL-30、ホスホリパーゼCホモログEGL-8およびプロテインキナーゼC(PKC)ホモログTPA-1からなる経路を負に制御することで、シナプスからの神経伝達物質の開口放出を制御することが報告されていた(Miller et al., *Neuron* 24, 323-333, 1999)。そこで、これらの因子の神経軸索再生への関与を検討した結果、いずれの因子もGOA-1とは逆に軸索再生を正に制御していた。また、遺伝学的解析から、この経路はJNKカスケードを構成するMAPKKKであるMLK-1と同一かつ上流の経路で機能すること

が示唆された。

次に、EGL-30-EGL-8-TPA-1 経路と MLK-1 との関係について、生化学的手法により検討した。哺乳動物培養細胞を用いた解析から、MLK-1 は TPA-1 と複合体を形成することがわかった。MLK-1 のキナーゼドメインの活性化ループの中には、プロテインキナーゼ C によりリン酸化されるモチーフが存在していたので、TPA-1 がこの部位をリン酸化するか調べたところ、TPA-1 のキナーゼ活性依存的にセリン 355 がリン酸化された。TPA-1 は MLK-1 と同一経路かつ細胞自律的に機能しており、またセリン 355 をグルタミン酸に変えた MLK-1 はアナンダミドに対して非感受性を示す一方、セリンをアラニンに変えた MLK-1 は *mlk-1* 変異体のレスキュー能を失った。以上の結果から、アナンダミドは GOA-1 を介して EGL-30-EGL-8-TPA-1 経路を介した MLK-1 のセリン 355 のリン酸化を抑制することで軸索再生を負に制御しており、また FAAH-1 はアナンダミドを分解することで軸索再生を正に制御することが示唆された(下図、Strahil et al., 2012、業績参照)。



(2) 線虫のアナンダミド受容体の探索

上述の結果から、線虫では NAPE-1 により産生されたアナンダミドが GOA-1 を介して軸索再生の抑制シグナルを伝達すると推測された。しかし、線虫には哺乳動物の CB1、CB2 の明らかなホモログが存在しないため、線虫においてどのようなタイプの G タンパク質共役型受容体がアナンダミド受容体として機能しているのか、これまで不明であった。そこで、*faah-1* 変異体の神経軸索再生率低下の表現型を抑圧するサプレッサー変異をスクリーニングすることにより、線虫のアナンダミド受容体の機能的な同定を試みた。これまでの構造学的解析から、CB1 受容体でカンナビノイドの結合に重要なアミノ酸残基がいくつか推測されていた(McAllister et al., *J. Med. Chem.* 46, 5139-5152, 2003)。そこでまず、それらのアミノ酸の大部分が保存されており、かつ GOA-1 に共役することが予想された 7 回膜貫通蛋白質を受容体候補として選び出した。次に、候補遺伝子の欠損変異を

単離し、*faah-1* 変異体との二重変異にすることにより *faah-1* 変異体の軸索再生低下の表現型を抑圧するものをスクリーニングした。その結果、遺伝子欠損によりその表現型を部分的に抑圧できるアナンダミド受容体の候補として、新規 7 回膜貫通型受容体を同定し、*sfah-1* (*suppressor of faah-1*) と命名した。treefam による系統解析では、SFAH-1 はリガンドが不明な一群の Orphan receptor の集団に属していた。しかし、相同性検索では哺乳動物の CB1/2 に弱い相同性を示した。このことから、SFAH-1 はおそらく線虫の CB1/2 に類似した機能を持つ受容体として、アナンダミドシグナルを受容する役割を担っていると考えられる。

前述したように、線虫では NAPE-1 がアナンダミド合成酵素として機能することが示唆されている。そこで、NAPE-1 を線虫のいくつかの細胞で多量発現させたところ、切断神経である D 型運動神経で発現させた場合のみ、*faah-1* 変異体と同様に神経軸索再生の低下が起こることを新たに見出した。興味深いことに、NAPE-1 多量発現による軸索再生低下の表現型は、*sfah-1* 遺伝子の欠損によっては抑圧できなかったが、*sfah-1* の下流で機能すると考えられる *goa-1* の欠損変異により抑圧された。これらの結果から、GOA-1 の上流には SFAH-1 以外にも別のアナンダミド受容体が存在しており、それが細胞自律的に産生されたアナンダミドに対する応答に寄与するのではないかと推測された。

そこで NAPE-1 の多量発現による神経軸索再生低下の表現型を抑圧する変異体のスクリーニングを行った結果、SFAH-1 とは異なるサブタイプの 7 回膜貫通型受容体である SFAH-2 を新たに同定した。SFAH-2 は、哺乳動物のあるペプチド受容体と相同性を示したが、その受容体に関してはアナンダミドとの関係についてはこれまでに報告されていない。従って、SFAH-2 はこれまでに同定されていないアナンダミド受容体である可能性が高いと考えられる。

本研究により、(1) 線虫のアナンダミドシグナルによる神経軸索再生の低下について、その分子メカニズムを解明した。また、(2) アナンダミド受容体の候補として、Go 共役型の 7 回膜貫通型受容体である SFAH-1 および SFAH-2 を機能的に同定することにも成功した。SFAH-1 は哺乳動物の CB1/2 に弱い相同性を示すことから、おそらく線虫において CB1/2 に類似した機能を持つことが期待される。一方、SFAH-2 はこれまでにアナンダミド受容体として報告されていない 7 回膜貫通型受容体の線虫ホモログであった。このことから、SFAH-2 が長い間探し求められてきた未知の受容体 CBx である可能性が期待される。

Pastuhov, S. Iv., Fujiki, K., Nix, P., Kanao, S., Bastiani, M., Matsumoto, K., and Hisamoto, N.
Endocannabinoid-Gq α signalling inhibits axon regeneration in *Caenorhabditis elegans* by antagonizing the Gq α -PKC-JNK signaling.
Nature Commun. 査読有,3, e1136 (2012).

〔学会発表〕(計4件)

パストゥホフ ストラヒル、藤木 恒太、ニックス パオラ、金尾 朱夏、バスティ アニ マイケル、久本 直毅、松本 邦弘
Endocannabinoid regulation of JNK MAP kinase in axon regeneration

5th East Asia Worm Meeting

2012年6月27日~30日

台湾 Chientan Youth Activity Center、パストゥホフ ストラヒル、藤木 恒太、ニックス パオラ、金尾 朱夏、バスティ アニ マイケル、久本 直毅、松本 邦弘
Regulation of Axon Regeneration by Endocannabinoids

第35回日本分子生物学会年会

2012年12月11日~14日

マリンメッセ福岡

パストゥホフ ストラヒル、久本 直毅、松本 邦弘

Endocannabinoid AEA as injury signal in axon regeneration

第19回国際線虫学会(2013 International worm meeting)

2013年6月26日~30日

アメリカ カリフォルニア大学ロサンゼルス校

パストゥホフ ストラヒル、久本 直毅、松本 邦弘

Endocannabinoid AEA as injury signal in axon regeneration

第36回日本分子生物学会年会

2013年12月3日~12月6日

神戸ポートアイランド

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://bunshi3.bio.nagoya-u.ac.jp/~bunshi6/matsumoto_japanese/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 邦弘 (Matsumoto Kunihiro)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 70116375