

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03544

研究課題名（和文）神経軸索再生を制御するsvh遺伝子群の解析

研究課題名（英文）Analysis of svh genes regulating axon regeneration

研究代表者

久本 直毅（Hisamoto, Naoki）

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：80283456

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：神経は軸索と呼ばれる長い突起を持ち、それが物理的に切断されるとさまざまな神経障害が起こる。そこで多くの神経は切断された軸索を再生する能力を持つが、その再生を誘導する分子メカニズムについてはその一部しかわかっていない。本研究では、モデル生物である線虫を用いて、軸索再生を制御する新規因子の同定と解析を試みた。その結果、いくつかのsvh遺伝子を含めた多くの制御因子を同定し、軸索再生におけるそれらの機能および役割について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、線虫をモデル動物として、神経軸索再生を制御する複数の因子、およびそれらが制御する複数のシグナル伝達経路について明らかにした。神経軸索再生機構の種を超えて保存された機構の解明は、脊髄損傷をはじめとする神経損傷を回復させる方法を開発するために必要な基礎生物学的知見であるという意味で、社会的にも重要な研究である。今回の研究で新たに明らかになった因子はほぼ全てがヒトにも存在することから、本研究成果が神経損傷治療につながる研究の礎になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Nerves have long projections called axons, and when they are physically severed, various neurological disorders occur. Many nerves have the ability to regenerate severed axons, but the molecular mechanisms that induce regeneration are only partially understood. In this study, we attempted to identify and analyze the novel factors that regulate axon regeneration using the model organism *C. elegans*. As a result, we identified many regulatory factors, including several svh genes, and clarified their functions and roles in axon regeneration.

研究分野：分子生物学

キーワード：軸索再生 *C. elegans*

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は軸索と呼ばれる長い神経繊維を介して神経シグナルを伝達している。外傷や手術によって軸索が切断されると、半身不随や麻痺などの運動障害や感覚障害が生じることがあり、そしてそれがしばしば治療不能であることは人口に膾炙した事実である。そのような切断を受けた軸索を修復し、機能的な状態にまで回復させる方法の探索は、患者の苦痛を緩和するだけでなく、介助削減や患者の社会復帰を通じて公共に益するものであり、社会的にも喫緊の課題である。

神経細胞は、基本的に切断された軸索を修復・再生する能力を保持している。切断を受けた軸索は、まずその切断部の先端が速やかに退縮して短くなる。その後、退縮した軸索先端が成長円錐を形成して伸長し、標的となる細胞に再び到達することにより機能的な軸索を再形成する。この現象を軸索再生と呼ぶ。これまでの培養細胞を用いた解析から、軸索再生の制御系は「切断を受けた神経の内在性シグナル」と、「神経外部からのシグナル」の2種類あることが示唆されており、それに関わる因子も培養細胞レベルでは複数同定されている。ただ、それらの因子が本当に生体内で機能しているかを知るためには個体レベルでの研究が必要不可欠であり、哺乳動物個体を用いた軸索再生の解析は非常に高度な技術と長い時間を必要とすることから、一部の研究を除いて解析があまり進んでいないのが現状である。

神経軸索再生は無脊椎動物からヒトまで種を越えて普遍的に起こる現象である。近年のレーザー技術の発展により、遺伝学・分子生物学的手法に秀でたモデル生物である線虫 *C. elegans* においても神経切断実験が可能となり、それにより神経軸索再生への新たなアプローチが可能となった。その技術を用いて、申請者は線虫の JNK 型 MAP キナーゼ経路 (JNK 経路) と p38 型 MAP キナーゼ経路 (p38 経路) が共に神経軸索再生に必要であることを報告した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011)。その後、遺伝学をベースにしたゲノムワイド RNAi スクリーニングにより、線虫の JNK 経路上で神経軸索再生を制御する因子の候補として、92 個の *svh* 遺伝子を同定した。そのうち、SVH-1 は線虫の肝細胞増殖因子 (HGF) のホモログをコードしており、HGF 受容体 Met のホモログ SVH-2 を介して JNK 経路を活性化することで、軸索再生を正に制御していた (Nat. Neurosci., 2012, Cell Rep., 2014)。一方、SVH-2 は通常は神経で発現していないが、軸索を切断すると切断神経においてその発現が誘導される。その発現誘導には転写因子である ETS-4 と CEBP-1 の両方が必要であり、cAMP-PKA 経路によりリン酸化された ETS-4 が、Ca²⁺流入により活性化された p38 経路の下流で活性化される CEBP-1 との複合体形成を介して *svh-2* プロモーターを活性化する (PLoS Genet., 2015)。一方、エンドカンナビノイド分解酵素 SVH-3 の解析から、体内麻薬物質であるアナンダミドが JNK 経路を抑制することにより、神経軸索再生を負に制御することも見出した (Nat. Commun., 2012)。さらに、IV 型コラーゲンが Discoidin receptor kinase ホモログである SVH-4/DDR-2 を介して SVH-2 の上流で機能すること (PLoS Genet., 2016)、また死細胞を認識して貪食を誘導するインテグリン-Rac 経路が神経軸索再生も制御しており、MAP4K である MAX-2 を介して JNK 経路の上流で機能することも見出している (J. Neurosci., 2016)。さらに興味深いことに、軸索を切断された神経は、その本来の種類によらずいずれも一過的にセロトニン産生神経となり、それがセロトニン受容体を介して切断神経自身に作用することで、cAMP-PKA 経路および Rho-PKC 経路を介して JNK 経路を活性化し、軸索再生を促進することも明らかにした (Nat. Commun., 2016)。しかし、残りの *svh* 遺伝子については未解析のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、軸索再生を制御する因子の候補として単離された *svh* 遺伝子のうち、いくつかの未解析のものに焦点を当てて解析を進めた。さらにその周辺で機能する因子を探索・同定し、それらの因子と既知の軸索再生制御シグナル経路との関係について明らかにすることにより、種を越えて保存された軸索再生機構のより深い理解を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、軸索再生を制御する因子の候補として単離された *svh* 遺伝子のうち、*svh-6, 9, 10, 11, 12, 14* およびその周辺で機能する因子について、遺伝学、分子生物学および細胞生物学的手法により解析を進めた。また、それらの因子の周辺で機能する因子の探索、および既知のシグナル経路との関係についても解明を試みた。

4. 研究成果

(1) SVH-6 による軸索再生制御

SVH-6 は哺乳動物のテンシンのホモログをコードする。*svh-6* 欠損変異体では、切断した神経軸索の再生率が顕著に低下した。軸索再生を制御する JNK 経路との遺伝学的関係を調べたところ、SVH-6 は JNK 経路の MAPKKK である MLK-1 の上流で機能することが示唆

された。SVH-6にはSH2ドメインとPTBドメインの2つのドメインがあるが、次にそのどちらが軸索再生に必要であるか知るために、各々のドメインに変異を導入した変異型SVH-6遺伝子を用いてレスキュー実験を行った。その結果、両方のドメインが軸索再生に必要であることが判明した。一般にSH2ドメインはリン酸化チロシンに結合する。そこでチロシンキナーゼSVH-2とSVH-6の関係について生化学的に調べたところ、SVH-6のSH2ドメインが自己リン酸化したSVH-2の細胞質ドメインと結合することが判明した。一方、SVH-6のPTBドメインは、線虫のインテグリンであるPAT-3の細胞質ドメインとの結合に必要であった。線虫のインテグリン経路はMAP4KであるMAX-2を介してMLK-1のセリン残基のリン酸化を誘導することで、MLK-1を活性化する。そこで*svh-6*変異体でMAX-2を多量発現したところ、その再生率低下の表現型が抑圧された。一方、SVH-2はMLK-1のチロシン残基をリン酸化することで、MLK-1とMAPKKであるMEK-1との結合を促進する。そこで*svh-6*変異体でSVH-2を多量発現したところ、それによっても再生率低下の表現型が抑圧された。以上の結果から、SVH-6はSVH-2とインテグリンの両方に結合することで、MLK-1のセリン残基とチロシン残基の両方のリン酸化が同じ場所で効率的に起こるようにする役割があることが示唆された。本研究成果はJournal of Neuroscience誌に掲載された。

(2) 糖鎖付加酵素群による軸索再生制御

SVH-9からSVH-12は、いずれもゴルジ体における糖鎖付加に関連した因子をコードする。そこで、これらの因子のうち、特にフコース転移酵素SVH-11について詳細に解析を行なった。SVH-11は切断神経において機能していたことから、1回膜貫通型受容体であるSVH-2またはそのさらに上流で機能する1回膜貫通型受容体SVH-4のどちらかをゴルジ体で糖鎖修飾する可能性が考えられた。そこでそれぞれの因子を*svh-11*変異体で多量発現したところ、SVH-2の多量発現により*svh-11*変異体の軸索再生低下の表現型が抑圧されたが、SVH-4の多量発現では抑圧されなかった。このことから、SVH-11がSVH-4を糖鎖修飾する可能性が想定された。そこでSVH-4の細胞外ドメインにある4つのN-グリコシル化サイトが軸索再生に必要かどうか、変異を導入したSVH-4遺伝子を用いて検討したところ、N141が必要であることがわかった。さらに、SVH-4タンパク質はフコース結合レクチンであるAOLにより認識されるが、N141をアラニンに置換した変異を持つSVH-4は認識されなかった。これらのことから、SVH-4のN141を介したフコースの糖鎖修飾が軸索再生に必要であることが示唆された。本成果はGenetics誌に掲載された。

(3) SVH-14およびその周辺で機能する因子群による軸索再生制御

SVH-14/MXL-1は、Myc型転写因子Maxの線虫ホモログをコードする。SVH-14は切断神経で機能しており、その変異体では軸索再生率の顕著な低下が見られたが、遺伝子を導入してSVH-2を切断神経で発現させるとその軸索再生率が回復した。SVH-2は通常は神経で発現していないが、軸索を切断すると切断神経においてその発現が誘導される。しかし、*svh-14*欠損変異体では軸索を切断してもその発現誘導が見られなかった。哺乳動物では、MaxはMadと複合体を形成して転写を制御することが知られており、線虫SVH-14もMadホモログMDL-1と結合することが知られている。そこで、SVH-14がMDL-1と複合体を形成して軸索再生を制御する可能性を考え、*mdl-1*変異体の軸索再生率を検討したところ、予想に反して再生率の低下は見られなかった。そこでSVH-14は別の因子と結合して機能すると考え、酵母ツーハイブリッド法でSVH-14に結合する新規因子を探索した結果、TDP2の線虫ホモログTDPT-1を新たに同定した。興味深いことに、*tdpt-1*欠損変異体では軸索再生率は野生型よりむしろ高い値を示し、かつこの変異は*svh-14*変異による再生率の低下の表現型を抑圧した。生化学的解析から、TDPT-1はSVH-2の発現を誘導する転写因子ETS-4と結合してそのSUMO化を誘導すること、かつそのSUMO化がPKAによるETS-4のリン酸化による活性化を抑制することが示された。さらに遺伝学的解析から、*svh-14*変異体の再生率低下の表現型はSUMO化酵素の変異によっても抑圧されること、また*tdpt-1*は*ets-4*の上流で機能することも示された。最後に、神経軸索を切断するとMDL-1が速やかに分解されることも見出した。これらのことから、軸索切断前はMDL-1がSVH-14と結合することで、フリーになったTDPT-1がETS-4をSUMO化して抑制しているが、軸索を切断するとMDL-1が分解され、フリーになったSVH-14がTDPT-1に結合することでこれを抑制し、その結果ETS-4はSUMO化されなくなりPKAによるリン酸化を受けてSVH-2の発現を誘導する、という機構が示唆された。本成果はCell Reports誌に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hisamoto Naoki, Tsuge Anna, Pastuhov Strahil Iv., Shimizu Tatsuhiro, Hanafusa Hiroshi, Matsumoto Kunihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Phosphatidylserine exposure mediated by ABC transporter activates the integrin signaling pathway promoting axon regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-05478-w	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 -
1. 著者名 Shimizu Tatsuhiro, Pastuhov Strahil Iv., Hanafusa Hiroshi, Matsumoto Kunihiro, Hisamoto Naoki	4. 巻 24
2. 論文標題 The C.elegans BRCA2-ALP/Enigma Complex Regulates Axon Regeneration via a Rho GTPase-ROCK-MLC Phosphorylation Pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1880 ~ 1889
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2018.07.049	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 -
1. 著者名 Choudhary Bikash, Kamak Madhushree, Ratnakaran Neena, Kumar Jitendra, Awasthi Anjali, Li Chun, Nguyen Ken, Matsumoto Kunihiro, Hisamoto Naoki, Koushika Sandhya P.	4. 巻 13
2. 論文標題 UNC-16/JIP3 regulates early events in synaptic vesicle protein trafficking via LRK-1/LRRK2 and AP complexes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1007100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1007100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Pastuhov Strahil, Shimizu Tatsuhiro, Hisamoto Naoki	4. 巻 7
2. 論文標題 Heavy Metal Stress Assay of Caenorhabditis elegans	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 e2312
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21769/BioProtoc.2312	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hisamoto Naoki, Matsumoto Kunihiro	4. 巻 44
2. 論文標題 Signal transduction cascades in axon regeneration: insights from <i>C. elegans</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Current Opinion in Genetics & Development	6. 最初と最後の頁 54 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gde.2017.01.010	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Yoshiki, Hanafusa Hiroshi, Pastuhov Strahil Iv, Shimizu Tatsuhiro, Li Chun, Hisamoto Naoki, Matsumoto Kunihiro	4. 巻 20
2. 論文標題 TDP2 negatively regulates axon regeneration by inducing SUMOylation of an Ets transcription factor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e47517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201847517	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 -

1. 著者名 Shimizu Tatsuhiro, Kato Yuka, Sakai Yoshiki, Hisamoto Naoki, Matsumoto Kunihiro	4. 巻 213
2. 論文標題 N-Glycosylation of the Discoidin Domain Receptor Is Required for Axon Regeneration in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genetics	6. 最初と最後の頁 491 ~ 500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1534/genetics.119.302492	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 -

1. 著者名 Hisamoto Naoki, Shimizu Tatsuhiro, Asai Kazuma, Sakai Yoshiki, Pastuhov Strahil I., Hanafusa Hiroshi, Matsumoto Kunihiro	4. 巻 39
2. 論文標題 <i>C. elegans</i> Tensin Promotes Axon Regeneration by Linking the Met-like SVH-2 and Integrin Signaling Pathways	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 5662 ~ 5672
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2059-18.2019	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15件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 T. Shimizu
2. 発表標題 The C. elegans BRCA2-ALP/Enigma complex regulates axon regeneration via a Rho GTPase-MLC phosphorylation pathway.
3. 学会等名 2018 Asia-Pacific Meeting, Seoul, Korea (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hisamoto N
2. 発表標題 The role of serotonin in C. elegans axon regeneration.
3. 学会等名 International Workshop on NeuroScience, Nagoya, Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takeo M, Kato Y, Matsumoto K, K, Hisamoto N
2. 発表標題 N-glycosylation is required for axon regeneration in Caenorhabditis elegans through modification of discoidin domain receptor.
3. 学会等名 21st International C. elegans Conference, Los Angeles, USA (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清水達太、松本邦弘、久本直毅
2. 発表標題 線虫EnigmaホモログによるRhoキナーゼシグナルを介した神経軸索再生制御
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹生実希子、松本邦弘、久本直毅
2. 発表標題 線虫においてコンドロイチン硫酸は加齢依存的な神経軸索の再生能低下に關与する
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Pastuhov SI, Hisamoto N, tsuge A, Shimizu T, Hanafusa H, Matsumoto K
2. 発表標題 Phosphatidylserine exposure mediated by ABC transporter activates the integrin signaling pathway promoting axon regeneration.
3. 学会等名 22st International C. elegans Conference, Los Angeles, USA (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakai Y, Hanafusa H, Li C, Shimizu T, Pastuhov SI, Hisamoto N, Matsumoto K
2. 発表標題 C. elegans TDP2 homolog negatively regulates axon regeneration by inducing SUMOylation of an Ets transcription factor.
3. 学会等名 22st International C. elegans Conference, Los Angeles, USA (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimizu T, Asai K, Sakai Y, Pastuhov SI, Hanafusa H, Matsumoto K, Hisamoto N
2. 発表標題 C. elegans Tensin promotes axon regeneration by connecting the Met-like SVH-2 and integrin signaling pathway.
3. 学会等名 22st International C. elegans Conference, Los Angeles, USA (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久本直毅
2. 発表標題 C. elegans Tensin regulates axon regeneration via Met-like signaling.
3. 学会等名 NEURO2019、新潟（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水達太、松本邦弘、久本直毅
2. 発表標題 RNA編集による線虫の神経軸索の再生制御機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会、横浜
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 酒井芳樹、清水達太、Strahil Iv. Pastuhov、松本邦弘、久本直毅
2. 発表標題 乳がん原因遺伝子による神経軸索再生の制御機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会、横浜
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹生実希子、松本邦弘、久本直毅
2. 発表標題 線虫の神経軸索再生におけるインシュリンシグナル経路とHGF様増殖因子シグナル経路との関係
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会、横浜
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 酒井 芳樹、花房 洋、Strahil Iv. Pastuhov、清水 達太、Chun Li、久本 直毅、松本 邦弘
2. 発表標題 Max転写因子MXL-1はEts転写因子のSUMO化制御を介して軸索再生を促進する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会、福岡
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水 達太、等々力 靖子、花房 洋、酒井 芳樹、Strahil Iv. Pastuhov、松本 邦弘、久本 直毅
2. 発表標題 線虫C. elegansのF-boxタンパク質SVH-24はMad転写因子の分解により軸索切断依存的な遺伝子発現を活性化する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会、福岡
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田 航平、清水 達太、李 春、平野 秀美、Strahil Pastuhov、花房 洋、松本 邦弘、久本 直毅
2. 発表標題 CDK-14によるnon-canonical Wntシグナル経路を介した神経軸索再生の制御機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会、福岡
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------