

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24247025

研究課題名(和文) 神経軸索再生を制御するシグナル伝達機構

研究課題名(英文) Mechanism of signal transduction regulating axon regeneration

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) 35,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経の軸索再生は、促進・抑制シグナル経路により決定される。線虫では、JNK MAPキナーゼ経路が軸索再生を促進する。我々は、増殖因子SVH-1とその受容体SVH-2が、JNK経路を介して軸索再生を制御することを示した。また、エンドカンナビノイドのアナンドアミド(AEA)が、JNK経路に拮抗するGo_i ; GOA-1を介して軸索再生を抑制することを見出した。これらの結果から、複数の経路から構成されるシグナルネットワークが、JNK経路を介して軸索再生を制御することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The ability of neurons to regenerate their axons after injury is determined by a balance between signaling pathways that promote and inhibit regeneration. In *Caenorhabditis elegans*, JNK MAP kinase pathway is important for axon regeneration. We demonstrated that the SVH-1 growth factor and its receptor SVH-2 regulate axon regeneration via the JNK MAPK. We also found that the endocannabinoid anandamide (AEA) inhibits axon regeneration via the Go_i ; subunit GOA-1, which antagonizes the JNK pathway. In this study, we showed that a signaling network consisting of multiple pathways regulates axon regeneration via the JNK pathway.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：遺伝学 シグナル伝達 神経科学 脳・神経 軸索再生

1. 研究開始当初の背景

切断された神経軸索の再生研究は、事故や外科的手術などにより切断を受けた神経を修復し、元の正常な状態にまで回復させる方法を開発する上で必要な研究であり、学術的な面だけでなく医学的・社会的にも要請度の高い研究課題といえる。軸索を切断された神経は、まずその切断部の先端が速やかに退縮して短くなるが、その後退縮部分から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。この再生過程を精緻に制御するためには、様々な促進・抑制シグナルが絶妙なバランスの上に機能することが重要であるが、これらのシグナルの実体および制御機構は未解明である。

最近、モデル動物である線虫を用いた研究から、ストレス応答型 MAP キナーゼ (MAPK) 経路である DLK MAPKKK p38 経路と MLK MAPKKK JNK 経路が、運動神経切断後の軸索再生を正に制御することを明らかにした。この成果は、ストレス応答型 MAPK 経路が神経再生において重要な役割を果たすことを示すものであり、神経軸索再生研究の突破口となる成果である。さらに、マウスにおいても、DLK 経路が DRG 神経における神経突起再生に必要であることが示され、神経組織再生を促進するシグナル経路の種を越えた共通性が提示された。

線虫の DLK p38 経路と MLK JNK 経路は、MAPK ホスファターゼである VHP-1 により負の制御を受けており、*vhp-1* 欠損変異体では DLK p38 経路と MLK JNK 経路の異常活性化により致死となる。我々は、網羅的 RNAi スクリーニングでのノックダウンにより、*vhp-1* 欠損変異体の致死性を抑圧する遺伝子として、92 個の *svh* (suppressor of *vhp-1*) 遺伝子を分離し、これらが神経軸索再生に関わることを見出した。さらに、上皮細胞増殖因子受容体 (EGF 受容体) に結合する細胞内アダプター分子 GRB2 の線虫ホモログが、神経軸索再生を正に制御することも見出した。我々は以前、MAPKKK ファミリーに属するロイシンリッチリピートキナーゼ LRRK1 が、哺乳動物において EGF 受容体と GRB2 を介して結合し、EGF 受容体の細胞内輸送を制御することを報告している。哺乳動物の LRRK1 は、EGF 受容体だけでなくダイニンモーター蛋白質とも結合することにより、EGF 受容体のダイニン依存的反行輸送を制御している。従って、EGF 受容体が GRB2 を介して LRRK1 と結合し、ダイニンモーター蛋白質に依存して細胞体へと逆行輸送される機構が、神経軸索再生において重要な役割を果たしている可能性が推測された。

2. 研究の目的

上述の背景を踏まえ、本研究課題では神経切断によって生じる軸索再生を促進・抑制するシグナル因子群を同定し、これらの因子群による種を越えて保存された神経軸索再生機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

種を越えて保存された神経軸索再生を制御するシグナル伝達機構を、モデル動物である線虫と哺乳動物培養細胞を用いて解析を進めた。特に、線虫の MLK JNK 経路上で機能すると想定される SVH 因子群および EGF-LRRK-ダイニンを中心に、神経軸索再生を制御するシグナル因子の同定と機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) 網羅的 RNAi スクリーニングにより、*vhp-1* 欠損変異体の致死性を抑圧する遺伝子として分離した *svh* 遺伝子のうち、*svh-1* は、N 末端にシグナルペプチドを持ち、さらに Kringle ドメイン、N ドメイン、セリンプロテアーゼドメイン等を持つ新規分泌蛋白質をコードしていた。これらのドメインは、ヒトの増殖因子である HGF や MSP にも共通に存在することから、SVH-1 は HGF/MSP タイプの増殖因子として機能することが推測された。また、*svh-2* は哺乳動物の HGF や MSP の受容体として知られる c-Met および Ron と相同性が高い受容体型チロシンキナーゼをコードしていた。これらのことから、SVH-1 と SVH-2 は哺乳動物の HGF/MSP および Met/Ron と同様、増殖因子と受容体としてそれぞれ機能すると考えられた。*svh-1* と *svh-2* 遺伝子の欠損変異体をそれぞれ作成し、軸索再生に対する効果を調べたところ、野生型の若い大人の線虫では、切断された軸索のうち約 80% の軸索が再生するのに対し、*svh-1*、*svh-2* 欠損変異体ではどちらも再生率が約 20% まで低下していた。ちなみに、神経を切断しない通常の状態では、*svh-1*、*svh-2* 欠損変異は神経軸索の走行に影響しない。これらのことから、SVH-1 と SVH-2 は共に発生過程における神経軸索形成には関与せず、切断された神経軸索の再生に特異的に関与することが示された。

次に、SVH-1 と SVH-2 が機能する細胞を調べる目的で、これらの遺伝子の発現パターンについてそれぞれ検討した。まず、*svh-1* 遺伝子の発現パターンについてレポーター遺伝子を用いて調べたところ、ADL と呼ばれる一対の頭部感覚神経において特異的に発現していた。また、*svh-1* 遺伝子を ADL で特異的に発現するプロモーターにつないで *svh-1* 変異体に導入したところ、その軸索再生低下の表現型がレスキューされた。さらに、野生型の線虫で ADL 神経をレーザー照射で殺した場合、軸索再生率は *svh-1* 変異体と同レベルまで低下した。これらのことから、SVH-1 は ADL 神経で特異的に発現することにより、神

経軸索再生を制御することが明らかになった。一方、*svh-2* 遺伝子の発現パターンを調べたところ、筋肉や腸などでの発現は見られたが、神経では発現が観察されなかった。しかし、軸索を切断した神経細胞において、切断後4時間前後で *svh-2* 遺伝子の発現が特異的に誘導されることが判明した。さらに、*svh-2* 遺伝子を切断神経で特異的に発現させると、*svh-2* 変異体の軸索再生低下の表現型が回復した。従って、SVH-2 は切断された神経で細胞自律的に機能していることが示唆された。以上の結果から、SVH-2 は通常神経では発現していないが、軸索が切断されると発現が誘導され、その結果生じた SVH-2 タンパク質が ADL 神経から分泌された SVH-1 シグナルを受け取り、軸索再生を制御すると考えられる。

次に、*svh-1* と *svh-2* の遺伝学的上下関係について検討したところ、*svh-1* と *svh-2* が同一経路で機能すること、*svh-1* の下流で *svh-2* が機能することが示唆された。従って、SVH-1 と SVH-2 はそれぞれのホモロジーから予想された増殖因子 受容体の関係と合致する方向で、軸索再生を制御していることが示された。さらに、SVH-1 と SVH-2 を過剰活性化した場合の軸索再生への効果について検討した。野生型の線虫では、軸索再生開始は約 80%の切断軸索で起こるが、そのうち標的である背側まで伸長して到達するものは5%前後である。ところが、野生型の線虫で SVH-1 あるいは SVH-2 を多量発現させると、再生した軸索の背側到達率は 40%~60%まで促進された。この時、切断軸索先端に形成される成長円錐は、野生型の線虫と比べて明らかに大きく、その活動も活発であった。また、線虫の軸索再生率は、加齢と共に低下するが、SVH-1 の多量発現はその低下も抑制した。同様な表現型は、SVH-2 を多量発現させた時にも起こる。これらのことから、SVH-1 SVH-2 の過剰活性化は、軸索の再生能を高め、加齢による軸索再生率の低下を抑えることが明らかになった。

では、SVH-1 と SVH-2 は、MLK JNK 経路と DLK p38 経路のどちらの経路で機能しているのだろうか？ この問題について生化学的に検討した結果、SVH-2 は MLK-1 と直接結合し、そのチロシン残基をリン酸化することを見出した。一方、SVH-2 と DLK-1 との間で生化学的相互作用は見出せなかった。さらに、*svh-2* 欠失変異体において、JNK の活性が顕著に低下していることが明らかになった。以上の結果から、SVH-2 は JNK 型 MAPK カスケードの上流で機能していることが示唆された。

本成果については、Nature Neuroscience 誌で発表した。

(2) *svh-3* 遺伝子は、「体内麻薬物質」とも呼ばれる脂質メディエーターのアナンダミド (AEA) を分解する酵素をコードしていた。AEA

は三量体G蛋白質Goαの線虫ホモログGOA-1を介して、別の三量体G蛋白質Gqαホモログ EGL-30、およびホスホリパーゼCホモログ EGL-8からなるジアシルグリセロール (DAG) 産生経路を抑制することで、神経軸索再生を負に制御していた。DAGの下流でプロテインキナーゼCホモログTPA-1が機能すること、TPA-1はJNK経路のMAPKKKであるMLK-1のactivation loopに位置する355番目のセリンをリン酸化することにより、これを活性化することも示された。以上のことから、SVH-3により代謝される脂質メディエーターAEAによるJNK MAPK 経路、および神経軸索再生の抑制機構とそのメカニズムが解明された。

以上の成果については、Nature Communications誌で発表した。

(3) *svh-5* 遺伝子は、Ets 型の転写因子をコードしていた。しかし、*svh-5* 変異体では神経軸索再生率の顕著な低下が見出されなかったことから、神経軸索再生では別の Ets 型転写因子が機能しているのではないかと予想し、SVH-5 と類似した Ets 型転写因子をコードする *ets-4* について検討した。その結果、軸索再生率の顕著な低下が認められた。ETS-4 が転写因子であることから、これが軸索切断による *svh-2* の発現誘導に関与する可能性について検討した。*ets-4* 変異体では、神経切断による *svh-2* 遺伝子の発現誘導が起こらないことが判明した。また、*svh-2* を切断神経において別のプロモーターにより恒常的に発現させることにより、*ets-4* 変異体の軸索再生率の低下が抑圧された。さらに、*svh-2* 遺伝子のプロモーター領域には Ets 結合サイトが存在し、それを欠損させると神経切断による *svh-2* の発現誘導が起こらなくなった。よって、*ets-4* が軸索切断による *svh-2* の発現誘導を介して神経軸索再生を制御することが明らかとなった。

我々はさらに、ETS-4 の N 端側にプロテインキナーゼ A (PKA) によるリン酸化コンセンサス配列が存在することを見出した。そこで、生化学的に検討したところ、実際に ETS-4 が PKA によってリン酸化されることを確認した。PKA はセカンドメッセンジャーである cAMP により活性化される。cAMP 合成酵素アデニル酸シクラーゼをコードする *acy-1* 遺伝子の欠損変異体で *svh-2* の発現誘導を検討したところ、*acy-1* 変異体では神経切断による *svh-2* の発現誘導が起きないことが判明した。さらに、リン酸化模倣型の改変 ETS-4 を作成して *acy-1* 変異体で発現させたところ、神経切断による *svh-2* の発現誘導が再び起こるようになった。ただし、リン酸化模倣型の ETS-4 を単に発現させただけでは *svh-2* の発現誘導は起こらず、その発現誘導が依然として神経切断依存性であったことから、cAMP-ETS-4 経路に加えて、もう一つ別のシグナルが神経切断による *svh-2* の発現誘導に必要であると想定された。*svh* 遺伝子のうち、*svh-8* は C/EBP

型の転写因子をコードする遺伝子 *cebp-1* と同一であったことから、これがもう一つのシグナルになる可能性について検討した。軸索切断による *svh-2* の発現誘導を検討したところ、*cebp-1* 変異体では *ets-4* 変異体と同様に発現誘導が起こらなかった。これまでの解析から、*cebp-1* は DLK p38 経路の下流で機能することが示されている。そこで、*dlk-1* 変異体における *svh-2* の発現誘導について検討したところ、軸索切断による *svh-2* の発現誘導が見られなかった。これらのことから、cAMP-ETS-4 経路と DLK-1-CEBP-1 経路の両方が、神経軸索切断による *svh-2* 発現誘導に必要であることが明らかになった。

以上の成果については、PLoS Genetics 誌で発表した。

(4) EGF、LRRK1、およびダイニンによる軸索再生の制御については、GRB2 の線虫ホモログが軸索再生を正に制御する結果は得られた。しかし、GRB2 の上流で機能する EGFR の欠損変異体における軸索再生の結果がバックグラウンドにより変わってしまうこと、LRRK1 およびダイニンの変異体において統計的に有意な再生率の低下が見られなかったことなどから、EGFR-LRRK-ダイニンからなる経路は神経軸索再生において中核的な役割は担っている可能性は低いと結論した。GRB2 の神経軸索再生における役割の解明は、今後の課題である。

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)

(1) Li, C., Hisamoto, N., Nix, P., Kanao, S., Mizuno, T., Bastiani, M., and Matsumoto, K. The growth factor SVH-1 regulates axon regeneration in *C. elegans* via the JNK MAPK cascade. *Nature Neurosci.* 15, 551-557 (2012). doi: 10.1038/nn.3052.

(2) Pastuhov, S. Iv., Fujiki, K., Nix, P., Kanao, S., Bastiani, M., Matsumoto, K., and Hisamoto, N. Endocannabinoid-G α signalling inhibits axon regeneration in *Caenorhabditis elegans* by antagonizing the G α -PKC-JNK signaling. *Nature Commun.* 3, e1136 (2012). doi: 10.1038/ncomms2136.

(3) Ishikawa, K., Nara, A., Matsumoto, K., and Hanafusa, H. EGFR-dependent phosphorylation of Leucine-rich repeat kinase LRRK1 is important for proper endosomal trafficking of EGFR. *Mol. Biol. Cell* 23, 1294-1306 (2012). doi: 10.1091/mbc.E11-09-0780.

(4) Hattori, A., Mizuno, T., Akamatsu, M.,

Hisamoto, N., and Matsumoto, K. The *C. elegans* JNK signaling pathway activates expression of stress response genes by derepressing the Fos/HDAC repressor complex. *PLoS Genet.* 9, e1003315 (2013). doi: 10.1371/journal.pgen.1003315.

(5) Hisamoto, N., Li, C., Yoshida, M., and Matsumoto, K. The *C. elegans* HGF/plasminogen-like protein SVH-1 has protease-dependent and -independent functions. *Cell Reports* 9, 1628-1634 (2014). doi: 10.1016/j.celrep.2014.10.056.

(6) Hanafusa, H., Kedashiro, S., Tezuka, M., Funatsu, M., Usami, S., Toyoshima, F., and Matsumoto, K. PLK1-dependent activation of LRRK1 regulates spindle orientation by phosphorylating CDK5RAP2. *Nature Cell Biol.* 17, 1024-1035 (2015). doi: 10.1038/ncb3204.

(7) Li, C., Hisamoto, N., and Matsumoto, K. Axon regeneration is regulated by Ets-C/EBP transcription complexes generated by activation of the cAMP/Ca²⁺ signaling pathways. *PLoS Genet.* 11, e1005603 (2015). doi: 10.1371/journal.pgen.1005603.

(8) Kedashiro, S., Pastuhov, S., Nishioka, T., Watanabe, W., Kaibuchi, K., Matsumoto, K., and Hanafusa, H. Phosphorylation of CLIP-170 by LRRK1 regulates EGFR trafficking by promoting recruitment of p150Glued to MT plus-ends. *J. Cell Sci.* 128, 385-396 (2015). doi: 10.1242/jcs.161547.

(9) Pastuhov, S., Hisamoto, N., and Matsumoto, K. MAP kinase cascades regulating axon regeneration in *C. elegans*. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 91, 63-75 (2015). doi: 10.2183/pjab.91.63.

[学会発表](計21件)

(1) 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、台北(台湾)

(2) 永盛 友樹、久本 直毅、松本 邦弘
Regulation of axon regeneration by two distinct receptor-type tyrosine kinases in *C. elegans*
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（福岡県・福岡市）

(3) 服部 鮎奈、水野 智亮、赤松 まゆ子、久本 直毅、松本 邦弘

The C.elegans JNK Signaling Pathway Activates Expression of Stress Response Genes by Derepressing the Fos/HDAC Repressor Complex

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（福岡県・福岡市）

(4) 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、バステリアニマイケル、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（福岡県・福岡市）

(5) 永盛 友樹、久本 直毅、松本 邦弘

Regulatory mechanism of axonal regeneration in C. elegans

第 65 回日本細胞生物学会大会、2013 年 6 月 19 日～21 日、ウインクあいち（愛知県・名古屋市）

(6) 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、ロサンゼルス市（アメリカ合衆国）

(7) 久本 直毅、吉田 誠希、李 春、松本 邦弘

The C.elegans plasminogen/HGF-like protein SVH-1 is regulated for larval developmental growth

第 19 回国際線虫学会（2013 International worm meeting）、2013 年 6 月 26 日～30 日、ロサンゼルス市（アメリカ合衆国）

(8) アラム タニムル、廣瀬 和也、パストゥホフ ストラヒル、久本 直毅、松本 邦弘

CED-10 Rac signaling pathway regulates axon regeneration in C. elegans via JNK MAPK pathway

第 19 回国際線虫学会（2013 International worm meeting）、2013 年 6 月 26 日～30 日、ロサンゼルス市（アメリカ合衆国）

(9) アラム タニムル、廣瀬 和也、パストゥホフ ストラヒル、久本 直毅、松本 邦弘

CED-10 Rac signaling pathway regulates axon regeneration in C. elegans via JNK MAPK pathway

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（兵庫県・神戸市）

(10) 李 春、久本 直毅、松本 邦弘

SVH-5, an HLH-type transcription factor, regulates axon regeneration in C. elegans by activating the transcription of the svh-2 gene encoding a receptor tyrosine kinase

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（兵庫県・神戸市）

(11) 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（兵庫県・神戸市）

(12) 浅井 一真、久本 直毅、松本 邦弘

Regulation of axon regeneration in C. elegans by an actin-binding protein SVH-6

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（兵庫県・神戸市）

(13) アラム タニムル、久本 直毅、松本 邦弘

セロトニン・Rho シグナル伝達経路による神経軸索再生の制御機構

第 66 回日本細胞生物学会大会、2014 年 6 月 11 日～23 日、奈良県新公会堂・東大寺総合文化センター（奈良県・奈良市）

(14) 李 春、久本 直毅、松本 邦弘

SVH-5 transcription factor regulates axon regeneration in C. elegans by activating the transcription of the svh-2 gene encoding a receptor tyrosine kinase

The 6th Asia-Pacific C. elegans Meeting、2014 年 7 月 15 日～19 日、奈良県新公会堂・東大寺総合文化センター（奈良県・奈良市）

(15) アラム タニムル、福園 嵩、パストゥホフ ストラヒル、福島 沖之、李 春、服部 鮎奈、花房 洋、久本 直毅、松本 邦弘

The UNC-23-HSP-1 chaperone system determines localization of Parkinson disease-related kinase LRK-1 in C. elegans Society for Neuroscience annual meeting 2014、2014 年 11 月 15 日～19 日、ワシントン D.C（アメリカ合衆国）

(16) アラム タニムル、丸山 裕生、久本 直毅、松本 邦弘

線虫の Rho シグナル伝達経路はミオシン軽鎖のリン酸化を介して神経軸索再生を制御す

る
第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月
25 日～27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・
横浜市)

(17) 久本 直毅、李 春、吉田 誠希、松本 邦
弘

線虫 HGF/プラスミノーゲン様タンパク質
SVH-1 は増殖因子としてだけでなく細胞外
マトリクスを調節するプロテアーゼとして
も機能する

第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月
25 日～27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・
横浜市)

(18) 丸山 裕生、アラム タニムル、久本 直
毅、松本 邦弘

セロトニン伝達経路による神経軸索再生の
制御機構

第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月
25 日～27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・
横浜市)

(19) パストゥホフ ストラヒル、久本 直毅、
松本 邦弘

線虫の神経軸再生を制御するエンドカンナ
ビノイド受容体の同定

第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月
25 日～27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・
横浜市)

(20) 加藤 優佳、久本 直毅、松本 邦弘

糖鎖修飾因子群による神経軸索の再生制御

第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月
25 日～27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・
横浜市)

(21) パストゥホフ ストラヒル、久本 直毅、
松本 邦弘

Identification of endocannabinoid
receptors regulating axon regeneration in
C. elegans

6th International Conference on
Phospholipase A2 and Lipid Mediators
(PLM2015)、2015 年 2 月 10 日～11 日、Keyo
Plaza Hotel (東京都)

〔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

(2) 連携研究者

久本 直毅 (HISAMOTO, Naoki)

名古屋大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：80283456

花房 洋 (HANAFUSA, Hiroshi)

名古屋大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：00345844