

平成30年 9月 7日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293063

研究課題名(和文) C.エレガンスをモデルとした神経軸索再生制御

研究課題名(英文) Regulation of axon regeneration in C. elegans

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) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：線虫C. elegansにおいて、損傷を受けた神経の再生開始はSVH-1がc-Met様受容体チロシンキナーゼSVH-2を介してJNK MAPキナーゼ経路を活性化することにより促進される。本研究では、コラーゲンにより活性化される受容体チロシンキナーゼSVH-4が、SVH-2-JNK経路の上流で機能することを示した。我々はまた、SVH-1が細胞外マトリックス構成因子FBL-1を制御することで幼虫の成長を調節することも見出した。さらに、HIF-1を介したセロトニンシグナルの活性化が、RhoAおよびcAMP経路の両方を活性化することによって軸索再生を促進することも示した。

研究成果の概要(英文)：In a nematode Caenorhabditis elegans, initiation of axon regeneration in injured neuron is positively regulated by SVH-1, which activates a JNK MAP kinase cascade via a c-Met-like receptor tyrosine kinase SVH-2. In this study, we demonstrated that SVH-4, a receptor tyrosine kinase that is activated by collagen, acts upstream of the SVH-2-JNK pathway. We also found that SVH-1 controls larval growth via an extracellular matrix component FBL-1. Furthermore, we showed that HIF-1-mediated activation of 5-HT signaling promotes axon regeneration by activating both the RhoA and cAMP pathways.

研究分野：分子生物学

キーワード：C. elegans 細胞内シグナル伝達 軸索再生

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と言える。

神経細胞は、基本的に切断された軸索を修復・再生する能力を持っている。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」の両方が存在することが示唆されており、それに関わる因子も複数同定されている。しかし、培養細胞を用いた解析系は *in vivo* での神経切断・再生過程を忠実に反映しているとは言えないため、本当に関与するかどうか知るためには個体レベルでの検討が必要となる。しかし、哺乳動物個体での軸索再生の解析は高度な技術と経験が必要であり、しかも手間と時間が掛かるため、実際にそこまで解析できている因子はごく僅かである。

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観察される現象である。我々はこれまでに線虫 *C.エレガンス* の JNK 型 MAP キナーゼ経路 (JNK 経路) が、個体レベルで軸索再生を正に制御することを報告した。また上記の研究過程において、網羅的 RNA 干渉スクリーニングにより、JNK 経路上で軸索再生を正に制御する因子の候補として、92 個の遺伝子 (*svh* 遺伝子) を同定した。そのうち、SVH-1 は増殖因子である HGF に類似したドメインを持つ分泌タンパク質であり、受容体型チロシンキナーゼ *c-Met* のホモログ SVH-2 を介して JNK 経路を活性化すること、また SVH-3 がアナンダミド調節を介して神経軸索再生を制御することなどを報告してきた。これらのことから、同じスクリーニングで同定された残り 89 個の遺伝子についても、SVH-1~3 と同様に JNK 経路の上流、あるいは下流で機能することにより *C.エレガンス* の軸索再生を正に制御することが期待される。しかし、それらについては本研究開始時

点ではほとんど解析されていなかった。また、上述の SVH-1 は哺乳動物の HGF だけではなく、線維素溶解性プロテアーゼであるプラスミノゲンにも類似しているが、その進化的な意味は不明であった。さらに遺伝学的な解析から、SVH-1 は神経軸索再生以外にも生育に必要な何らかの役割を持つと推測されたが、それについても詳細は判明していなかった。

一方、これまでの他研究者らによる網羅的解析の結果から、線虫においていくつかの神経伝達物質やホルモンが神経軸索再生を制御する可能性が示唆されていた。しかし、その上流および下流で機能する因子の詳細については明らかではなかった。

2. 研究の目的

上述の状況を踏まえ、本研究では (1) 軸索再生を制御する細胞内シグナル伝達因子の解明 (2) SVH-1 の制御機構の解析 (3) 神経ホルモンによる軸索再生シグナル制御 の3つのサブテーマを遂行した。それにより、軸索再生を制御する細胞内シグナル伝達経路の詳細を解明すると同時に、外部環境シグナルが SVH-1 を制御する機構とその理由を探り、さらに神経ホルモンが軸索再生を制御する仕組みとその意義についての理解を目指した。

3. 研究の方法

(1) 軸索再生を制御する細胞内シグナル伝達因子の解明 については、未解析の *svh* 遺伝子を中心に、遺伝学および分子生物学的解析を行った。(2) SVH-1 の制御機構の解析 については、*svh-1* 変異体の表現型について解析すると同時に、様々な生物において SVH-1 類似遺伝子の探索を行い、解析した。(3) 神経ホルモンによる軸索再生シグナル制御 については、神経伝達物質 / ホルモン的一种であるセロトニンに着目して研究を進めた。

4. 研究成果

(1) 軸索再生を制御する細胞内シグナル伝達因子の解明

本研究では、*svh* 遺伝子として同定された遺伝子のうち、SVH-4 および SVH-6 について主に解析を行った。SVH-4 は受容体型チロシンキナーゼであり、哺乳動物の受容体型チロシンキナーゼである Dischoidin receptor (DDR) のホモログであった。哺乳動物の DDR はコラーゲンに結合することで活性化されることから、線虫においても同様ではないかと考え、タイプ IV コラーゲンをコードする *emb-9* について、神経軸索再生への関与を検討した。

その結果、*emb-9* 遺伝子の変異によって神経軸索再生が低下することを見出した。その表現型は *svh-4* 欠損変異によりエンハンスされなかったこと、さらに *emb-9* 遺伝子の変異による神経軸索再生率の低下は、SVH-4 を多量発現させることで抑圧できたことから、EMB-9 が SVH-4 と同一経路かつ上流で機能することが明らかとなった。SVH-4 が切断神経軸索のどの部位で機能するか知る目的で、SVH-4::GFP 融合遺伝子を作成して神経で発現させたところ、非切断時には軸索に沿って特徴的なドット状の局在を示した。さらに神経切断後には神経軸索の先端に速やかに蓄積すること、また成長円錐が形成されるとその先端によく局在することが判明した。これらのことから、SVH-4 は EMB-9 により活性化し、切断神経軸索の先端および成長円錐に局在して機能することにより、神経軸索再生を制御することが示唆された。この成果については、PLoS Genetics 誌に論文として報告した。

*svh-6* は N 端にアクチン結合ドメインを持つタンパク質をコードする。遺伝学的解析から、*svh-6* は *svh-2* の上流かつ切断神経で機能することを見出した。また、生化学的解析から SVH-6 は自己リン酸化された SVH-2 の細胞質ドメインに結合することも判明した。さらに、SVH-6 の持つアクチン結合ドメインは神経軸索再生に対して必要ではなく、むしろ抑制的な役割を持つことも見出した。これらのことから、SVH-6 はアクチンに結合している状態では不活性であるが、軸索を切断すると何らかの機序によりアクチンから外れ、リン酸化された SVH-2 の細胞質ドメインに結合することで、SVH-2 を介した神経軸索再生を促進しているのではないかと考えられる。

## (2) SVH-1 の制御機構の解析

脊椎動物では、肝細胞増殖因子(HGF)と線維素溶解性プロテアーゼのプラスミノゲンは構造およびアミノ酸配列が酷似していることから、共通の祖先遺伝子から進化したと考えられている。しかし、HGFに相当する遺伝子が無脊椎動物で同定されていなかったことから、HGFの祖先は何か、またプロテアーゼに類似しているにも関わらずなぜ増殖因子としての機能を持つに至ったのか、その進化的経緯は不明であった。我々は、線虫のSVH-1がHGF受容体のホモログであるSVH-2を介して神経軸索再生を制御していたことから、SVH-1がHGFの祖先遺伝子であると想定し、類似した遺伝子が他の無脊椎動物に存在するかどうか、既知のゲノムデータを用いて検討した。その結果、節足動物や軟体動物、さらに棘皮動物や原索動物にもSVH-1に類似した遺伝子が存在することが判明した。同様に、SVH-2遺伝子も無脊椎動物で広く保存され

ていることを確認した。これらのことから、SVH-1およびSVH-2が種を超えて保存されていることが明らかとなった。

我々は、*svh-1* を完全に欠損すると致死性を示す一方、*svh-2* を完全に欠損しても致死性を示さないことを見出していた。このことから、SVH-1 は SVH-2 を介した神経軸索再生制御以外にも何らかの役割を持つと考えられた。そこで、*svh-1* 欠損変異体の致死の表現型を詳しく調べたところ、幼虫期において咽頭筋が動かなくなること、摂食できなくなり、致死にいたることが判明した。線虫 SVH-1 は機能的なプロテアーゼドメインを持っているが、哺乳動物 HGF のプロテアーゼ様ドメインはプロテアーゼ活性に必要な残基が変異しており、プロテアーゼ活性がないことがわかっている。そこでプロテアーゼ活性が重要ではないかと考え、その必要性について検討したところ、プロテアーゼ活性を持たなくした SVH-1 は軸索再生の表現型はレスキューするが、幼虫致死の表現型はレスキューできないことが判明した。このことから、SVH-1 は増殖因子としての活性とは別に、プロテアーゼ活性を介して幼虫の生育を制御していることが明らかとなった。そこで SVH-1 が細胞外マトリクス(ECM)を制御しているのではないかと考え、いくつかの ECM タンパク質の局在を調べたところ、*svh-1* 欠損変異体では ECM タンパク質のひとつであるフィビュリンの線虫ホモログ FBL-1 の咽頭筋への異常な蓄積を引き起こすことを見出した。また *svh-1* 変異体の幼虫期での生育停止の表現型は、*fbl-1* 遺伝子の欠損により部分的に抑圧された。以上の結果から、SVH-1 は増殖因子および細胞外マトリクスを制御するプロテアーゼという2つの異なる機能を持った因子であること、また進化的に HGF とプラスミノゲンの祖先型に相当する可能性が示唆された。この成果については、Cell Reports 誌に論文として報告した。

## (3) 神経ホルモンによる軸索再生シグナル制御

これまでの他研究者による網羅的スクリーニング研究から、線虫の神経軸索再生には複数の神経伝達物質やホルモンの合成が必要であることを示唆する結果が報告されていた。しかし、それが神経軸索再生においてどのようなメカニズムで機能するかについてはほとんどわかっていなかった。そこで本研究では、神経伝達物質/ホルモンの一種であるセロトニンに着目し、これが神経軸索再生を促進する機構の詳細について解析した。まず、神経軸索再生に必要なセロトニンがどこで産生されているかについて、セロトニン合成酵素である *tph-1* の変異体を用いたレスキュー実験で調べたと

ころ、通常の状態ではセロトニンを産生する神経は関与せず、意外なことに通常はセロトニンを産生しないはずの軸索切断神経において必要であることが判明した。さらなる解析から、*tph-1* は軸索が切断された神経において一過的に発現誘導され、実際にセロトニンも合成されることも見出した。また、軸索切断による *tph-1* の発現誘導は、転写因子 HIF-1 に依存して行われていた。産生されたセロトニンは、切断神経自身にあるセロトニン受容体 SER-7 を介して三量体 G タンパク質 GPA-12 を活性化する。活性化した GPA-12 は RhoGEF である RHGF-1 を介して低分子量 G タンパク質 Rho を活性化し、これがさらにジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) を抑制することで、ジアシルグリセロール (DAG) 量を増大させる。DAG は JNK MAPK 経路を活性化することにより神経軸索再生を促進する。なお、SER-7 は上記の経路とは別に cAMP 合成経路も活性化しており、それら 2 つの経路の両方が軸索再生には必要であった。以上の結果から、切断神経での HIF-1 によるセロトニン産生が、Rho と cAMP の両方の経路を活性化することで神経軸索再生を促進することが明らかとなった。この成果については、Nature Communications 誌に論文として報告した。

#### 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 8 件、全て査読あり)

Alam T, Maruyama H, Li C, Pastuhov SI, Nix P, Bastiani M, Hisamoto N, Matsumoto K.

Axotomy-induced HIF/serotonin signaling axis promotes axon regeneration in *C. elegans*.

**Nature Commun. 7, 10388 (2016).**

doi:10.1038/ncomms10388

Hisamoto N., Nagamori Y, Pastuhov SI, Matsumoto K.

Regulation of axon regeneration by collagen activation of DDR and Met-like RTKs signaling.

**PLoS Genet. 12, e1006475(2016).**

doi: 10.1371/journal.pgen.1006475.

Pastuhov SI, Fujiki K, Tsuge A, Asai K, Ishikawa S, Hirose K, Matsumoto K, Hisamoto N.

The core molecular machinery used for engulfment of apoptotic cells regulates the JNK pathway mediating axon regeneration in *Caenorhabditis elegans*.

**J. Neurosci. 36, 9710-21 (2016).**

doi: 10.1523/JNEUROSCI.0453-16.2016.

Pastuhov SI, Matsumoto K, Hisamoto N.  
Endocannabinoid signaling regulates regenerative axon navigation in *C. elegans* via the GPCRs NPR-19 and NPR-32.

**Genes to Cells 21, 696-705(2016).**

doi: 10.1111/gtc.12377.

Fukuzono T, Pastuhov SI, Fukushima O, Li C, Hattori A, Iemura S, Natsume T, Shibuya H, Hanafusa H, Matsumoto K, Hisamoto N.

The chaperone complex BAG2-HSC70 regulates localization of *C. elegans* Leucine-rich repeat kinase LRK-1 in the Golgi.

**Genes to Cells 21, 311-324(2016).**

doi: 10.1111/gtc.12338.

Li C, Hisamoto N, and Matsumoto K.

Axon regeneration is regulated by Ets-C/EBP transcription complexes generated by activation of the cAMP/Ca<sup>2+</sup>-p38 MAPK signaling pathways.

**PLoS Genetics. 11, e1005603 (2015).**

doi: 10.1371/journal.pgen.1005603.

Pastuhov SI, Hisamoto N., 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.

Hisamoto N, Li C, Yoshida M, Matsumoto K.

The *C. elegans* HGF/plasminogen-like protein SVH-1 has protease-dependent and -independent functions.

**Cell Reports 9, 1628-34 (2014).**

doi: 10.1016/j.celrep.2014.10.056.

[学会発表](計 24 件)

Pastuhov SI, Hisamoto N, Matsumoto K.

Engulfment machinery regulates axon regeneration via the JNK pathway.

Neuronal development, synaptic function & behavior *C. elegans* topic meeting 2016.

Nagoya, Japan, Jul. 27-30, 2016.

Alam T, Maruyama H, Li C, Pastuhov SI, Nix P, Bastiani M, Hisamoto N, Matsumoto K.

Axotomy-induced HIF-serotonin signalling axis promotes axon regeneration in *C. elegans*.

Neuronal development, synaptic function &

behavior *C. elegans* topic meeting 2016.  
Nagoya, Japan, Jul. 27-30, 2016.

Li C, Hisamoto N, Matsumoto K.  
Axon regeneration is regulated by  
Ets-C/EBP transcription complexes  
generated by activation of the cAMP-Ca<sup>2+</sup>  
signaling pathways.  
7<sup>th</sup> Asia-pacific *C. elegans* meeting, Beijing,  
China, Jun. 25-29, 2016.

Pastuhov SI, Hisamoto N, Matsumoto K.  
Engulfment machinery regulates axon  
regeneration via the JNK pathway.  
7<sup>th</sup> Asia-pacific *C. elegans* meeting, Beijing,  
China, Jun. 25-29, 2016.

Alam T, Maruyama H, Li C, Pastuhov SI,  
Nix P, Bastiani M, Hisamoto N, Matsumoto  
K.  
Axotomy-induced HIF-serotonin signaling  
axis promotes axon regeneration in *C.*  
*elegans*.  
7<sup>th</sup> Asia-pacific *C. elegans* meeting, Beijing,  
China, Jun. 25-29, 2016.

Pastuhov SI, Hisamoto N, Matsumoto K.  
Regulation of axon regeneration by  
axotomy-induced serotonin signaling,  
The 1<sup>st</sup> Indian *C. elegans* meeting, Mumbai,  
India, Jan. 28-Feb. 2, 2016.

Li C, Hisamoto N, Matsumoto K.  
Cyclic AMP and an Ets transcription factor  
are required for the transcriptional induction  
of *svh-2* by axon severing.  
20th International *C. elegans* Meeting, Los  
Angeles, USA, Jun. 24-28, 2015.

Alam T, Asai K, Hisamoto N, Matsumoto K.  
A tensin3 homolog SVH-6 regulates axon  
regeneration by stabilization of a MET-like  
receptor tyrosine kinase SVH-2  
20th International *C. elegans* Meeting, Los  
Angeles, USA, Jun. 24-28, 2015.

Choudhary B, Kamak M, Kumar M, Awasthi  
A, Fukuzono T, Li C, Nguyen K, Matsumoto  
K, Hisamoto N, Koushika S.  
UNC-16 regulates early steps of synaptic  
vesicle protein trafficking via LRK-1 and  
UNC-101.  
20th International *C. elegans* Meeting, Los  
Angeles, USA, Jun. 24-28, 2015.

Pastuhov SI, Hisamoto N, Matsumoto K.  
Identification of endocannabinoid receptors  
regulating axon regeneration in *C. elegans*.  
6th international conference on  
Phospholipase A2 and Lipid Mediators

Tokyo, JAPAN, February 10-12, 2015.

Alam T, Fukuzono T, Pastuhov SI,  
Fukushima O, Li C, Hattori A, Hanafusa H,  
Matsumoto K, Hisamoto N.  
The Chaperone Complex  
BAG2-HSC70/HSP70 determines  
localization of *C. elegans* leucine-repeat  
kinase LRK-1 in the regulation of  
Axonal-Dendritic Polarity  
Society for Neuroscience, Washington,  
USA, November 15-19, 2014.

Li C, Hisamoto N, Matsumoto K.  
SVH-5 transcription factor regulates axon  
regeneration in *C. elegans* by activating the  
transcription of the *svh-2* gene encoding a  
receptor tyrosine kinase.  
*C. elegans* development, cell biology and  
gene expression meeting  
in association with The 6th Asia-Pacific  
*C. elegans* meeting  
Nara, Japan, July 15-19, 2014.

Pastuhov SI, Hisamoto N, Matsumoto K.  
Endocannabinoid AEA as injury signal in  
axon regeneration.  
2013 FASEB Summer Research  
Conference on Lysophospholipid and  
Other Related Mediators  
Niseko, Hokkaido, August 4-9, 2014.

柘植 杏菜, 久本 直毅, 松本 邦弘  
細胞死シグナルによる神経軸索再生の制御  
機構  
第39回日本分子生物学会年会、横浜、20  
16年11月30日

清水 達太, 久本 直毅, 松本 邦弘  
乳癌原因遺伝子 BRCA2 の線虫ホモログ  
BRC-2 は Rho-ROCK-MLC リン酸化経路  
で神経軸索再生を制御する  
第39回日本分子生物学会年会、横浜、20  
16年11月30日

パストゥホフ ストラヒル, 松本 邦弘, 久  
本 直毅  
インテグリンー Rac 貪食経路は JNK 経路  
を活性化し、線虫の神経軸索再生を促進す  
る  
第39回日本分子生物学会年会、横浜、20  
16年11月30日

アラム タニムル, 久本 直毅, 松本 邦弘  
Rho シグナル伝達経路はアクチン/ミオシ  
ン細胞骨格の再構成を介して線虫の神経軸  
索再生を制御する  
第39回日本分子生物学会年会、横浜、20  
16年11月30日

柘植 杏菜、久本 直毅、松本 邦弘  
トランスサイレチン様因子 TTR-11 による  
神経軸索再生の制御機構  
BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、  
第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 神戸  
ポートアイランド、2015 年 12 月 1 日-  
4 日

清水 達太、久本 直毅、松本 邦弘  
線虫の BRCA2 は Rho シグナル-MLC リン酸  
化経路で神経軸索再生を制御する  
BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、  
第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 神戸  
ポートアイランド、2015 年 12 月 1 日-  
4 日

久本 直毅、李 春、吉田 誠希、松本 邦  
弘  
線虫 HGF/プラスミノージェン様タンパク質  
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  
日本分子生物学会第 36 回年会、横浜、2  
014 年 11 月 24 日

加藤 優桂、久本 直毅、松本 邦弘  
糖鎖修飾因子群による神経軸索再生制御  
日本分子生物学会第 36 回年会、横浜、2  
014 年 11 月 25 日

丸山 裕生、アラム タニムル、Paola Nix、  
Michael Bastiani、久本 直毅、松本 邦  
弘  
セロトニン-Rho/cAMP シグナル伝達経路  
による神経軸索再生の制御機構  
日本分子生物学会第 36 回年会、横浜、2  
014 年 11 月 25 日

アラム タニムル、久本 直毅、松本 邦  
弘  
Rho シグナル伝達経路はミオシン軽鎖のリン  
酸化を介して線虫の神経軸索再生を制御  
する  
日本分子生物学会第 36 回年会、横浜、2  
014 年 11 月 25 日

パストゥホフ ストラヒル、久本 直毅、松  
本 邦弘  
Identification of two endocannabinoid  
receptors involved in regulation of axon  
regeneration in *C.elegans*.  
日本分子生物学会第 36 回年会、横浜、2  
014 年 11 月 25 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者 久本 直毅  
Hisamoto Naoki  
(博士 (理学))  
名古屋大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：80283456

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

(4) 研究協力者  
( )