

# 主論文

セロトニン-Rho シグナル伝達経路による  
線虫 *C. elegans* の神経軸索再生制御

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

アラム タニムル

## 目次

要旨	3
序論	5
材料と方法	7
結果	13
考察	23
謝辞	30
参考文献	31
図表	41
副論文	77

## 要旨

多くの無脊椎動物の神経や哺乳動物の末梢神経は、損傷を受けた神経軸索を再生する能力を持つ。近年、線虫 *Caenorhabditis elegans* (以下 *C. elegans*) が、神経軸索再生のモデルとして有用であることが明らかとなっている。線虫において軸索再生に関わる因子として同定されたもののいくつかは、哺乳動物においても軸索再生に関与することが報告されている。このことは、軸索再生制御機構が種を越えて保存されていることを示唆している。しかし、その分子メカニズムの詳細については、未だ不明の部分が多い。本研究では、*C. elegans* のセロトニン (5-HT) 合成酵素 *tph-1* 遺伝子に着目し、その軸索再生における機能について解析した。その結果、軸索切断を受けた非セロトニン産生性神経において、低酸素誘導因子 HIF-1 が *tph-1* の遺伝子発現を誘導することにより、軸索再生を促進する 5-HT が異所的に産生されることを見出した。さらに、5-HT はセロトニン受容体のひとつである SER-7 を介して、自己分泌的に軸索再生を制御することも明らかになった。

SER-7 から始まるシグナルは、 $G\alpha_{12}$  の線虫ホモログである GPA-12 と、Rho グアニンヌクレオチド交換因子 (RhoGEF) の線虫ホモログである RHGF-1 を介して低分子量 G タンパク質 RhoA の線虫ホモログである RHO-1 を活性化することで軸索再生を制御していた。さらに RHO-1 はジアシルグリセロールの分解酵素である DGK-1 を活性化することで軸索再生を制御していた。さらに RHO-1 はジアシルグリセロールの分解酵素である DGK-1 を活性化することで

軸索再生を制御していた。さらに **RHO-1** はジアシルグリセロールの分解酵素である **DGK-1** を抑制することで、ジアシルグリセロール (**DAG**) の量を増加させ軸索再生を促進していた。*gpa-12* 変異体の再生率低下の表現型は、*dgk-1* 変異および **RhoGAP p190** の線虫ホモログ *rga-5* の欠損変異によって抑圧された。しかし、*ser-7* 変異体の再生率低下についてはそれらの変異により有意な抑圧が見られなかった、このことから、**SER-7** の下流には上述の **GPA-1 - RhoA** 経路以外にもうひとつ別の経路が存在し、それも軸索再生に必要なのではないかと考え、その因子を探索した。その結果、**SER-7** 経路の下流にはサイクリック **AMP** (**cAMP**) 経路も存在していることを見出した。さらに、*ser-7* 変異体の再生率低下は、**cAMP** 経路と **GPA-1 - RhoA** 経路の両方を同時に活性化することにより抑圧された。以上の結果から、切断神経で **HIF-1** 依存的に産生された **5-HT** のシグナルは、**RhoA** 経路と **cAMP** 経路の両方を活性化することで軸索再生を制御することが明らかとなった。

## 序論

多くの無脊椎動物の神経や哺乳動物の末梢神経は、損傷を受けた軸索を再生する能力を持つ。損傷した神経軸索の再生の有無と程度は、細胞が内在的に持つ再生能と細胞外の環境要因によって決定される。細胞内在性の再生シグナルは再生の成否に多大な影響を及ぼすが、その再生能のレベルを決める変動要因についてはほとんど分かっていない。近年、線虫 *Caenorhabditis elegans* (以下 *C. elegans*) が神経軸索再生のモデルとして有用であることが明らかとなった (文献 1、2)。さらに最近の研究において、線虫の軸索再生に必要な因子の探索が行われた。Chen ら (文献 3) は *C. elegans* の変異体を用いたスクリーニングを行い、Nix ら (文献 4) は RNAi を用いたスクリーニングを行なった。その結果、軸索再生を促進または阻害する線虫の因子が数多く同定された。同定された因子のうちのいくつかは、これまでに哺乳動物において軸索再生に関与することが報告されたシグナル伝達因子のホモログであった。このことは、軸索再生を制御するシグナル伝達経路が種を越えて保存されていることを示唆している。

*tph-1* 遺伝子は 5-HT の合成に関与する酵素をコードしており (文献 5)、軸索再生を正に制御する遺伝子のひとつとして同定されている (文献 3)。しかし、それがどのようなメカニズムで神経軸索を制御しているかについては分かっていなかった。そこで本研究では、*C. elegans* の *tph-1* 遺伝子について、その軸索再生における機能を詳細に解析した。その結果、軸索切断を受けた非セロト

ニン産生性神経において、低酸素誘導因子 HIF-1 が *tph-1* の遺伝子発現を誘導することにより、軸索再生を促進する 5-HT が産生されることを見出した。さらに、5-HT はセロトニン受容体である SER-7 を介して自己分泌的に軸索再生を制御することも明らかとなった。SER-7 の下流で  $G\alpha_{12}$  と RhoGEF のホモログ *rhogf-1* が機能しており、それが低分子量 G タンパク質 RhoA を活性化すること、また活性化した RhoA はジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) を抑制し、ジアシルグリセロール (DAG) の量を増加させることで神経軸索再生を促進することも明らかにした。また、SER-7 は RhoA の経路とは別に、cAMP シグナル伝達経路も活性化することで神経軸索再生を促進していた。以上の結果から、HIF-1 は軸索切断依存的に 5-HT の合成を誘導し、それにより産生された 5-HT が SER-7 を介して 2 つのシグナル経路を活性化することにより、軸索再生が促進されることが明らかとなった。

## 材料と方法

### 線虫の飼育

本研究で用いた線虫は表 1 の通りである。線虫はすべて **nematode growth medium** (NGM) に大腸菌を適量塗ったものを用いた (文献 1)。

### プラスミド

**Punc-25::tph-1** は cDNA ライブラリーから PCR によって単離した **tph-1** cDNA を pSC325 ベクターに挿入することにより作製した。**Psrh-142::tph-1** は

**Psrh-142::nls-cre** プラスミド (Cori Bargmann 博士より分与) の NLS-Cre cDNA 領域を **tph-1** cDNA 断片で置き換えることで作製した。**Punc-25::nls-cre** は pSC325 ベクターに NLS-Cre cDNA (Addgene) を挿入することにより作製した。

**Punc-47::mcherry** は pOKU64 プラスミド (**Punc-47::gfp**, 森郁恵博士より分与) の gfp DNA を mCherry cDNA (DNA2.0) に置き換えることにより作製した。

**Punc-25::ser-7** と **Pmec-7::ser-7** は PCR によって cDNA ライブラリーから単離した **ser-7** cDNA を pSC325 及び pPD52.102 ベクターのそれぞれに挿入することで作製した。**Punc-25::rho-1** は貝渕弘三博士から分与された **rho-1** cDNA を pSC325 に挿入することにより作製した。**Punc-25::rho-1** (G14V) と

**Punc-25::rho-1** (T19N) は **Punc-25::rho-1** を鋳型としてオリゴヌクレオチドを用いた PCR によって作製し、変異は DNA シーケンサーで確認した。

**Punc-25::rga-5gap** は **rga-5** cDNA の GAP ドメイン を 5'-gtcagcATGAAGAACAAGTGCAACTCATGATC-3' と

5'-ccatGGCCCGATAATTATCCACGTCATAG-3' を用いた PCR 法により cDNA ライブラリーから単離し、pSC325 に挿入することにより作製した。

*Punc-25::rga-5gap* (K1223A) は *Punc-25::rga-5gap* を鋳型としてオリゴヌクレオチドを用いた PCR 法により作製し、変異を DNA シークエンサーによって確認した。 *Punc-25::pde-4* は cDNA ライブラリーから単離した *pde-4* cDNA を pSC325 に挿入することで作製した。 GAL4 DBD-*RHO-1* (G14V) , GAL4 DBD-*RHO-1* (T19N) , GAL4 DBD-*CED-10* (G12V) 及び GAL4 DBD-*CDC-42* (G12V) のプラスミドはいずれも貝渕弘三博士から分与された。 GAL4 AD-*RGA-5* の GAP ドメインは *rga-5gap* cDNA を pACTII ベクターに挿入することで作製した。 . The *Pmyo-2::dsred-monomer* プラスミドは文献 59 の通りに作製した。

## 遺伝子導入体

線虫への遺伝子導入は文献 62 の通りに行った。

以下にインジェクションした各プラスミドを示す。

*Punc-25::rga-5gap* (50 ng ml<sup>-1</sup>)、*Punc-25::rga-5gap* (K1223A) (50 ng ml<sup>-1</sup>)、*Punc-25::rho-1* (G14V) (5 ng ml<sup>-1</sup>)、*Punc-25::rho-1* (T19N) (5 ng ml<sup>-1</sup>)、*Punc-25::ser-7* (50 ng ml<sup>-1</sup>)、*Pmec-7::ser-7* (5 ng ml<sup>-1</sup>)、*Punc-25::pde-4* (50 ng ml<sup>-1</sup>)、*Punc-25::tph-1* (50 ng ml<sup>-1</sup>)、*Psrh-142::tph-1* (50 ng ml<sup>-1</sup>)、*Punc-25::nls-cre* (50 ng ml<sup>-1</sup>) 及び *Punc-47::mcherry* (100 ng ml<sup>-1</sup>)

上述のプラスミドは、それぞれ *kmEx1301* [*Punc-25::rga-5gap* + *Pmyo-2::dsred-monomer*]、*kmEx1312* [*Punc-25::rga-5gap* (K1223A) +

*P<sub>myo-2</sub>::dsred-monomer*], *kmEx1302* [*P<sub>unc-25</sub>::rho-1* (G14V) +  
*P<sub>myo-2</sub>::dsred-monomer*], *kmEx1303* [*P<sub>unc-25</sub>::rho-1* (T19N) +  
*P<sub>myo-2</sub>::dsred-monomer*], *kmEx1304* [*P<sub>unc-25</sub>::ser-7* + *P<sub>myo-2</sub>::dsred-monomer*],  
*kmEx1305* [*P<sub>mec-7</sub>::ser-7* + *P<sub>myo-2</sub>::dsred-monomer*], *kmEx1306* [*P<sub>unc-25</sub>::pde-4*  
+ *P<sub>myo-2</sub>::dsred-monomer*], *kmEx1307* [*P<sub>unc-25</sub>::tph-1* +  
*P<sub>myo-2</sub>::dsred-monomer*], *kmEx1311* [*P<sub>srh-142</sub>::tph-1* + *P<sub>myo-2</sub>::dsred-monomer*],  
*kmEx1308* [*P<sub>unc-25</sub>::nls-cre* + *P<sub>myo-2</sub>::dsred-monomer*] および *kmEx1309*  
[*P<sub>unc-47</sub>::mcherry* + *P<sub>myo-2</sub>::dsred-monomer*] の作成に使用した。 *kyEx4057*  
[*P<sub>ceh-2</sub>::nls-cre*], *kyEx4077* [*P<sub>srh-142</sub>::nls-cre*], *kyEx4107* [*P<sub>egl-6</sub>::nls-cre*]  
および *kySi56* [floxed *tph-1* genomic rescue] は Cori Bargmann 博士から分与さ  
れた。 *otIs197*, *zdis13*, *wpls36* および *wdEx848* は CGC から入手した。

#### 酵母ツーハイブリッド法

GAL4 DBD-*RHO-1* (G14V, T19N) 、 GAL4 DBD-CED-10 G12V) 、 GAL4  
DBD-CDC-42 (G12V) 及び GAL4 AD-*RGA-5* (GAP domain) プラスミド  
を 酵母 PJ69-4A 株にそれぞれトランスフォーメーションし、 SC-Leu-Trp プ  
レートで育てた。形質転換株は SC-Leu-Trp-His プレートで 30 °C で 4 日飼育  
することでアッセイした。 .

#### 神経軸索切断

20°Cで飼育した若い成虫期の線虫を用いて、以下の通りに神経軸索切断を行った。若い成虫期の雌雄同体の線虫を 20mM のアジ化ナトリウムの入った M9 バッファーで麻酔し、その個体を 2%アガロースパッド上に置き、カバーガラスをかけた。D 型運動神経は GFP で可視化し、蛍光顕微鏡で観察した。主に後部の腹側から背側にかけて伸びる軸索を選択し、(株) フォトニックインスツルメンツ の 440-nm マイクロポイントレーザー照射システムを用いて軸索切断を行った。切断後、線虫を NGM プレートに回収し、約 24 時間後に再生率を蛍光顕微鏡で観察した。D 型運動神経の再生の評価については、成長円錐を形成した場合と基部の軸索で枝分かれのある場合を“再生した”と判定し、軸索切断 24 時間後も切断直後と基部の軸索に変化がない場合を“再生していない”と判定した。各遺伝子型に対して最低でも 50 本の軸索を切断し、各個体 1 本から 3 本の軸索を切断した。PLM 神経についても上記のシステムを用いて、GFP で可視化した神経軸索を蛍光顕微鏡で観察し、尾部から頭部に向かって伸びる軸索を切断した。軸索切断 24 時間後に切断部から最も伸びた軸索の先端までの長さを測定した。

## 薬剤処理

セロトニン (5-HT) とフォルスコリンはそれぞれ (株) 和光純薬と Focus Biomolecules 製のものを使用した。セロトニン処理では、6.5mM 5-HT を加えた NGM プレートで線虫を 1 世代以上飼育した。軸索切断後もセロトニンを加えたプレートで線虫を飼育し、24 時間後の軸索再生を評価した。フォルスコリン処理では、100  $\mu$  M フォルスコリンを加えた M9 バッファーで 20°C、12 時間線

虫を培養した。その後、軸索切断を行い、通常どおり NGM プレートで 24 時間飼育後、軸索再生を評価した。

### 免疫蛍光染色

5-HT 免疫蛍光染色は文献 5 に記載された通りに行った。具体的には、D 型運動神経または PLM 神経の軸索を切断した線虫を 4% フォルムアルデヒドの入ったリン酸バッファー (PBS) で 4°C で一晩処理し、その後 PBS で 3 回洗浄した。その後、5%  $\beta$ -メルカプトエタノールと 1% Triton-X-100 で 24 時間処理した。その後、PBS で洗浄後、100 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM  $\text{CaCl}_2$  and 5 mg ml<sup>-1</sup> コラゲナーゼ (和光純薬、034-10533) で線虫をホモジェナイズした。ホモジェナイズ後、Can Get Signal Immunostain (東洋紡) でラットの抗セロトニン抗体 (Chemicon, Cat. No. MAB352) を 100 倍に希釈し、一次抗体として使用した。二次抗体には、Can Get Signal Immunostain (東洋紡) で 200 倍に希釈したニワトリ由来の抗ラット Alexa 594 結合抗体 (Molecular probes) を用いた。

### 顕微鏡観察

通常の蛍光観察には Zeiss Plan-APOCHROMAT の Hamamatsu 3CCD の付いた Zeiss Axioplan II 蛍光顕微鏡 100 倍対物レンズあるいは Keyence BZ-X700 蛍光顕微鏡の 100 倍対物レンズを用いた。共焦点顕微鏡による観察は Olympus FV500 および FV1000 の 60 倍対物レンズあるいは 100 倍対物レンズを用いた。

## GFP 発現の定量化

GFP 発現の定量化は ImageJ (NIH) を用いた。具体的には、軸索切断を受けた D 型運動神経または PLM 神経の細胞体における GFP の蛍光強度 ( $I_s$ ) を測定した。さらに蛍光強度の値を細胞体の面積で割った値 ( $I_{sa}$ ) を割り出した。バックグラウンドの蛍光強度も同様に測定した ( $I_b$ )。この値を細胞体の面積で割った値 ( $I_{ba}$ ) を割り出した。 $I_{sa}$  から  $I_{ba}$  を引いた値を  $I_{ra}$  とした。D 型運動神経の場合、 $I_{ra}$  が 7 以上を発現していると評価した。同様に PLM 感覚神経の場合、 $I_{ra}$  が 4 以上を発現していると評価した。

## 結果

### セロトニン (5-HT) は軸索再生に必要である

軸索の傷害は細胞に対するストレスのひとつに位置付けられる。これまでの研究から、ある種のストレスに対する応答では、適切な生理的および行動学的な変化を誘導するために神経伝達物質が用いられることがわかっている（文献 6–8）。*C. elegans* でも、5-HT は様々なストレス応答の調節に関わっている（文献 9、10）。しかしながら、神経系においてどのような特異的ストレスが 5-HT を介したシグナル伝達を引き起こすかについてはほとんどわかっていない。興味深いことに、2011 年に Chen ら（文献 3）は軸索再生が異常となる変異体の網羅的スクリーニングを行い、感覚神経の軸索再生に関わる遺伝子を複数同定した（文献 3）。しかし、そこで同定された遺伝子の大半はそれ以上の解析がなされておらず、作用機序が不明のものが多い。今回の研究では、その中の一つに含まれていた *tph-1* 遺伝子に着目した。*tph-1* 遺伝子は 5-HT の合成に必要なトリプトファンヒドロキシ化酵素をコードしている（図 1）。まず、本研究では *tph-1* 遺伝子の機能欠損変異 (*mg280*) が、グルタミン酸作動性の posterior lateral microtubule (PLM) 感覚神経において軸索再生の低下を引き起こすことを確認した（図 2、3 および表 2）。また、GABA 作動性の D 型運動神経においても *tph-1* 遺伝子の *mg280* 変異と *n4622* 変異が軸索再生率の低下を引き起こすことを見出した（図 4 および表 3）。この *tph-1* 変異体の軸索再生率低下の表現型は、外部からの 5-HT の投与によってレスキューされた。これらの結果から、

5-HT は複数の種類の軸索再生に普遍的に必要なことが示唆された。次に、軸索再生に必要な 5-HT を産生する神経の探索を行った。その際、それぞれの神経で産生されるセロトニンレベルが通常範囲を超えないようにするため、Flavell らによって作製された、特定の神経で *tph-1* 遺伝子を欠損させるシステムを用いた (文献 11)。具体的には、イントロンやエキソン、プロモーター領域を含む flox された *tph-1* 遺伝子 1 コピーを 4 番染色体 (LGIV) の一部に挿入したものを *tph-1(mg280)* 変異体に導入した系統を使用した (図 5a)。まず、挿入された *tph-1* 遺伝子が *tph-1* 変異による軸索再生低下をレスキューすることを確認した (図 6 および表 3)。次に、この系統に対して特定の神経で Cre リコンビナーゼを発現させることにより (図 5b)、5-HT を産生する ADF、NSM、HSN 神経 (文献 5) あるいは D 型運動神経において *tph-1* 遺伝子をそれぞれ特異的にノックアウトした。その結果、ADF、NSM、HSN において Cre を発現させた場合には、いずれも *tph-1* 遺伝子によるレスキュー能が消失することはなかった (図 6 および表 3)。一方で、D 型運動神経で Cre を発現させた場合、*tph-1* 遺伝子によるレスキューはみられなくなった (図 6 および表 3)。これらの結果は、D 型運動神経における軸索再生には D 型運動神経での 5-HT の産生が必要であることを示している。このことを確認するために、*unc-25* プロモーターを用いて D 型運動神経特異的に *tph-1* 遺伝子を *tph-1* 変異体において発現させた。その結果、D 型運動神経における *tph-1* の発現は *tph-1* 変異による軸索再生低下の表現型をレスキューした (図 4 および表 3)。一方、*srh-142* プロモーターによって ADF 神経特異的に *tph-1* を発現させても *tph-1* 変異による軸索再生率低下

はレスキューされなかった (図 4 および表 3)。これらの結果から、*TPH-1* は損傷した軸索の再生を細胞自律的に促進することが明らかとなった。

### HIF-1 は損傷した神経において 5-HT の発現を誘導する

D 型運動神経は通常 GABA を産生する神経であり、5-HT を産生に関わる因子の発現は報告されていなかったため (文献 5、12–14)、D 型運動神経が軸索再生の際に 5-HT の産生酵素を必要とするという遺伝学的結果は予想外であった。そのため、軸索の切断・再生時に、D 型運動神経において本当に *tph-1* 遺伝子の発現および 5-HT の産生が起きているかについて検討した。まず、軸索切断前と軸索切断後の D 型運動神経における *P<sub>tph-1</sub>::gfp* の発現パターンを調べた。最初に、このレポーターを持つ線虫において神経非切断時の GFP の発現を調べたところ、以前の報告 (文献 5、12–14) どおり ADF と NSM 神経で発現しており (図 7)、D 型運動神経での発現は観察されなかった (図 8、9)。それに対し、軸索を切断した D 型運動神経では強い GFP の発現が確認された (図 8、9)。この発現は軸索切断 30 分後から現れ、24 時間後にはみられなくなった (データは示さない)。したがって、軸索切断は D 型運動神経において一過的に *P<sub>tph-1</sub>::gfp* の遺伝子発現を誘導したと考えられる。また、本当に 5-HT の産生が起きているかどうか、免疫蛍光染色によって確認したところ、コントロールと比較して軸索切断後に有意な 5-HT の蓄積が確認された (図 10)。このことから、軸索を切断された D 型運動神経は *TPH-1* の発現および 5-HT の産生をしていることが示唆された。このとき、一つの可能性として D 型運動神経が軸索切断により GABA 作動性の性質を失ってセロトニン作動性神経に異分化した可能性が考え

られた。しかし、GABA の輸送小胞のマーカである UNC-47 のプロモーター活性を *Punc-47::mcherry* で確認したところ、その発現レベルは軸索切断後も一定であった (図 8)。従って、軸索切断後も GABA 作動神経は GABA を産生する神経としての特徴を保持しており、GABA 作動性の性質を失ってセロトニン作動性神経に異分化したのではないと考えられる。さらに、通常はセロトニンを産生しない、グルタミン酸作動性の感覚神経である PLM 神経においても、軸索切断による 5-HT の蓄積と *Ptph-1::gfp* の発現誘導がそれぞれ確認された (図 11-13) (文献 15)。これらの結果から、通常は「非セロトニン産生神経」である複数のタイプの神経が、軸索切断によって一過的にセロトニンを合成する能力を獲得できることが示された。次に、軸索切断による *tph-1* 遺伝子の異所的な発現誘導が、どのような転写因子によって行われるかを調べた。興味深いことに、*tph-1* プロモーター領域には HIF-1 の結合サイトである hypoxia response elements (HREs) が存在している (文献 16)。HIF-1 は低酸素に応答した遺伝子発現に関わる bHLH-PAS ドメインを持つ転写因子である (文献 17)。実際に、これまでの研究により線虫において低酸素刺激により HIF-1 が *tph-1* のプロモーター領域に結合し、セロトニン合成が引き起こされることが示されている (文献 16)。そこで、HIF-1 が軸索切断による *tph-1* の発現に関与するか検討した。その結果、*hif-1 (ia4)* 変異は線虫の頭部における *Ptph-1::gfp* の発現には影響を与えなかったが (図 7)、軸索を切断した D 型運動神経において *Ptph-1::gfp* の発現を顕著に低下させた (図 8、9)。このことから、軸索切断による *tph-1* の遺伝子発現は HIF-1 に依存することが明らかとなった。さらに、PLM 感覚神経における *Ptph-1::gfp* の発現も *hif-1* 変異によって低下した (図 11、

12)。従って、損傷した神経における 5-HT の発現に HIF-1 が必要であることが示唆された。

一般に、HIF-1 は低酸素によって活性化する（文献 16、17）ことから、軸索再生においても低酸素が HIF-1 を介して軸索再生を促進する可能性が推測された。通常、HIF-1 は E3 ユビキチンリガーゼである VHL-1 (von Hippel–Lindau tumour suppressor protein) によって分解されている（文献 18）。その分解は、まず EGL-9 によって特定のプロリンがヒドロキシル化されることから始まる（文献 18）。VHL-1 は HIF-1 のヒドロキシル化されたプロリンを認識し、ユビキチン化プロテアソーム系によって HIF-1 を分解させる（文献 19）。低酸素状態は HIF-1 のヒドロキシル化を阻害することで HIF-1 を安定化させ、標的遺伝子の転写発現を制御する（文献 19、20）。従って、HIF-1 の分解を阻害して HIF-1 を安定化させることは、低酸素状態によって HIF-1 に起こる変化を模倣することになる。そこで、D 型運動神経において HIF-1 を安定化させた時の *tph-1* の遺伝子発現を調べた。その際、*vhl-1(ok161)*変異と HIF-1 の安定化 LXXLAP モチーフのプロリンがアラニンに置換されることで HIF-1 が安定化する HIF-1(P621A) をそれぞれ用いた（文献 18、21）。まず、*P<sub>tph-1::gfp</sub>* を持つ野生型の線虫で、通常の酸素レベルにおける GFP の発現を見たところ、ADF と NSM 神経では GFP の発現がみられたものの、glutamatergic sensory amphid sensory neuron, single cilia, designation G (ASG) 神経では GFP の発現はほとんど見られなかった（図 14）。一方、*vhl-1* 変異体または HIF-1(P621A) の多量発現体では、文献 16 で報告されたとおり通常の酸素レベルでも ASG 神経において GFP の発現が見られた（図 14）。一方 D 型運動神経では、*vhl-1* 変異ま

たは HIF-1(P621A) の多量発現によっても *Ptph-1::gfp* の発現は誘導されなかった (図 15)。これらの結果は、軸索切断時の HIF-1 の活性化機構は低酸素が誘導する HIF-1 の安定化機構とは異なることを示唆している。次に、HIF-1 が軸索再生に必要なかを検討した。その結果、*hif-1(ia4)* 変異と *hif-1(ok2564)* 変異はどちらも D 型運動神経の軸索再生率を顕著に低下させ、またこの低下は 5-HT 処理によってレスキューされた (図 16)。この結果は、HIF-1 が 5-HT の合成を介して軸索再生を制御することを支持している。さらに、*hif-1(ia4)* 変異は PLM 感覚神経においても軸索再生長の低下を引き起こした (図 17 および表 3)。これらの結果から、HIF-1 は軸索再生に必要なことが示された。

### **SER-7 は GPA-12 と RHGF-1 を介して軸索再生を制御する**

5-HT は G タンパク質共役受容体を介して様々な現象を制御する (文献 22)。SER-7 は線虫の 5-HT 受容体の一つとして知られているため、まず SER-7 が軸索再生に関与するかを検討した。その結果、*ser-7* 変異である *tm1325* と *tm1548* が軸索再生の低下を引き起こすことを見出した (図 18 および表 3)。一方、別の 5-HT 受容体である SER-1 の *ok345* 変異では軸索再生率の低下は見られなかった。従って、SER-7 が軸索再生に必要な 5-HT 受容体であることが明らかとなった。次に、SER-7 が細胞自律的に軸索再生を制御するかを検討するために、*ser-7(tm1325)* において *unc-25* または *mec-7* プロモーターの下流で *ser-7* を発現させた時の軸索再生率を検討した。その結果、D 型運動神経の軸索再生低下は *unc-25* プロモーターの下流で *ser-7* を発現させた場合にレスキューされたが、*mec-7* プロモーターの下流で *ser-7* を発現させた場合にはレスキューされな

かった (図 18 および表 3)。これらの結果は SER-7 が細胞自律的に軸索再生を制御することを示唆している。なお、*ser-7* 変異体において 5-HT 処理を行っても、*ser-7* 変異体の軸索再生率低下の有意なレスキューは見られなかった (図 18 および表 3)。次に、SER-7 の下流で軸索再生を制御する因子について探索した。SER-7 は線虫において三量体 G タンパク質  $G_{12}$  の  $\alpha$  サブユニットである GPA-12 と共役して機能することが知られている (図 19) (文献 23)。そこで、*gpa-12 (pk322)* 変異と *gpa-12 (gk766855)* 変異について調べたところ、これらの変異を持つ系統では軸索再生率が顕著に低下した (図 18 および表 3)。さらに、*ser-7* と *gpa-12* が同一経路で軸索再生を制御するかを検討したところ、*ser-7 (tm1325); gpa-12 (pk322)* 二重変異体では単独変異体と同程度に軸索再生率が低下していた (図 18 および表 3)。このことから、SER-7 と GPA-12 は同一経路で軸索再生を制御することが明らかとなった。哺乳動物では、RhoGEF である LARG が G タンパク質調節ドメイン (RGS) を介して  $G_{\alpha 12}$  と結合することが知られている (文献 24)。LARG の線虫ホモログである RHGF-1 (図 20) は GPA-12 と結合し、コリン作動性の運動神経のシナプスにおいて神経伝達物質の放出を制御することが知られている (文献 25、26)。これらのことから、軸索再生において GPA-12 の下流で RHGF-1 が機能する可能性が考えられた (図 19)。実際に、*rhgf-1 (ok880)* 変異と *rhgf-1 (gk217)* 変異体での軸索再生率を調べたところ、野生型と比べて顕著な低下が観察された (図 21 および表 3)。これらのことから、SER-7 は GPA-12 と RHGF-1 を介して軸索再生を制御することが示唆された。

## RHO-1 は DGK-1 を抑制することで軸索再生を制御する

Rho タンパク質の活性は自身の GTP 結合型と GDP 結合型のサイクリングによって制御されている。さらに、Rho タンパク質は他のタンパク質によってもその活性が制御されている（文献 27）。例えば、GTPase 活性を促進して Rho を不活性化する GAP や、GTP との結合を促進して Rho を活性化するグアニンヌクレオチド交換因子（GEF）などがこれにあたる。線虫の RhoA ホモログである RHO-1 も GTP 結合型の活性型と GDP 結合型の不活性型の 2 つの状態をとる。まず、RHGF-1 が RHO-1 に対する RhoGEF として機能することで軸索再生を制御することを確認するために、G14V 置換によって RHO-1 を恒常的に GTP 結合型とした RHO-1(G14V)を *unc-25* プロモーターの下流で発現させて軸索再生への効果を調べた。その結果、*rhgf-1* 変異体の軸索再生率の低下は RHO-1 (G14V) の発現によって抑圧された（図 21 および表 3）。一方、RHO-1 を GDP 結合型とする RHO-1 (T19N)を発現させた場合には抑圧されなかった。次に、軸索再生を制御する GAP を探索した。最近、Nix らにより行われた網羅的スクリーニングにおいて、RhoGAP の線虫ホモログである *rga-5* 遺伝子が軸索再生を抑制する因子の 1 つとして同定されている（文献 28）。RGA-5 は哺乳動物の p190 RhoGAP のホモログであり、N 末に GTP binding domain (GBD)、C 末に GAP domain を持つ（図 22）。p190 RhoGAP の GAP ドメインは RhoA に特異的な GAP 活性を持つため（文献 29）、RGA-5 が RHO-1 特異的な GAP であると予想した。これを検討するため、酵母ツーハイブリッドアッセイにより RGA-5 の GAP ドメイン（1118–1341 アミノ酸）と RHO-1 (G14V:活性型と T19N:不活性型) との結合を検討した。その結果、RGA-5 の GAP ドメインは

GTP 型 RHO-1 には結合したが、GDP 結合型 RHO-1 には結合しなかった (図 23)。また Rho/Rac ファミリーに属する別の低分子量 G タンパク質である CDC-42 と CED-10 の GTP 結合型にも結合しなかった。これらのことから、RGA-5 の GAP ドメインは GTP 結合型の RHO-1 に特異的に結合することが明らかとなった。次に、RGA-5 が軸索再生に関与するかを検討した。まず、RGA-5 の GAP ドメインが欠失した *rga-5 (ok2241)* 変異体を調べたが、その軸索再生率は野生型と有意な差は見られなかった (図 24 および表 3)。そこで次に、RGA-5 の GAP ドメインを野生型の D 型運動神経で多量発現したところ、軸索再生の顕著な阻害が生じた (図 24、26 および表 3)。p190 RhoGAP の GAP 活性には 1331 番目のリジン残基が必須であることがわかっている (図 25) (文献 29、30)。そこで、RGA-5 の GAP ドメインがその GAP 活性を介して神経軸索再生率の低下を引き起こしているかどうか調べるために、p190 RhoGAP の 1331 番目のリジンに相当する RGA-5 の 1223 番目のリジンをアラニンに置換した変異型の RGA-5 GAP ドメインを野生型の線虫で発現させたところ、RGA-5 の軸索再生への阻害効果は見られなかった (図 24 および表 3)。これらの結果から、RGA-5 GAP ドメインは RHO-1 を GDP 型にすることで軸索再生を負に制御することが示唆された。さらに、軸索再生における *rhgf-1* と *rga-5* の遺伝学的関係についても検討した。*rhgf-1 (ok880)* 変異体に *rga-5 (ok2241)* 変異を導入したところ、*rhgf-1* 変異による軸索再生率の低下が抑圧された (図 24 および表 3)。このことから、RHO-1 は GEF がないときでも弱く活性化でき、そのために GAP の欠損が GEF の欠損による再生率の低下を抑圧できるのだと考えられる。次に、軸索再生における RHO-1 の下流因子についても検討した。これまでの研究から、

哺乳動物の RhoA は DAG キナーゼである DGK に結合し、その機能を阻害することがわかっている（文献 31、32）。DAG キナーゼは、細胞膜に結合したセカンドメッセンジャーである DAG をリン酸化してフォスファチジン酸に変換することにより、DAG 量を抑制する（文献 33、34）。このことから、RhoA は DGK を介して DAG の量的制御を行うとされている（文献 31）。線虫では、RHO-1 が DGK  $\theta$  のホモログ DGK-1 に結合する（文献 35）。従って、軸索再生において RHO-1 のターゲットは DGK-1 ではないかと推測された（図 19）。もし RHO-1 が軸索再生において DGK-1 を負に制御するのであれば、RHO-1 の不活性化を誘導するような変異による軸索再生率の低下は、*dgk-1* 変異の導入により抑圧できると考えられる。実際に、*dgk-1 (ok1462)* 欠損変異は、*rhgf-1 (ok880)* 変異体や RGA-5 の GAP ドメインを多量発現した個体における軸索再生率の低下を抑圧した（図 24 及び表 3）。これらの結果から、軸索再生において RHO-1 は DGK-1 を阻害することで、DAG の量を増加させ軸索再生を制御することが示唆された（図 19）。

### SER-7 は cAMP 経路を介して軸索再生を制御する

もし SER-7-GPA-12 経路が RHO-1 の上流で機能することで軸索再生を制御するのであれば、*ser-7* 変異体や *gpa-12* 変異体の軸索再生率低下は *rga-5* または *dgk-1* 変異で抑圧されることが期待される。実際に、*gpa-12* 変異体で見られる軸索再生率の低下については、*rga-5 (ok2241)* 変異および *dgk-1 (ok1462)* 変異によりそれぞれ抑圧された（図 27 及び表 3）。ところが、*ser-7* 変異体の軸索再生率の低下は、これらの変異で抑圧されなかった（図 27 及び表 3）。この

ことから、SER-7の下流にはGPA-12-RHO-1経路に加えて、別の神経軸索再生促進経路が存在しているのではないかと推測された。これまでの研究から、5-HT受容体であるSER-7は三量体Gタンパク質Gasの線虫ホモログGSA-1とも共役することが報告されている(図28)(文献23、36)。そこで、軸索再生においてSER-7の下流でGSA-1経路が機能している可能性を検討した。Gasはアデニル酸シクラーゼと共役しているため、もしGas経路が神経軸索再生に関与するならば、細胞内のcAMPレベルを調節すると推測された。また以前の研究から、感覚神経での軸索再生にはcAMPが必要であることが報告されていた(文献37)。そこで、cAMPのフォスホジエステラーゼであるPDE-4を切断神経であるD型運動神経で多量発現することでそのcAMPレベルを低下させたところ、軸索再生率が有意に低下した(図29及び表3)。さらに、アデニル酸シクラーゼをコードするacy-1遺伝子の機能欠損変異によっても軸索再生率の低下が生じた(図29及び表3)。これらの結果から、cAMPの産生がD型運動神経の軸索再生に必要であることが確認できた。軸索再生においてSER-7とACY-1が同一経路で機能する可能性を検討するために、*ser-7(tm1325); acy-1(nu329)*二重変異体の軸索再生率を調べたところ、*ser-7; acy-1*二重変異体の再生率は単独変異体の再生率と同程度であった(図29及び表3)。このことから、SER-7とGSA-1-cAMP経路は同一経路で軸索再生を制御することが示唆された。軸索再生においてSER-7はGPA-12とGSA-1の両方を制御するため(図28)(文献23)、軸索再生ではこれらの経路の両方が活性化することが必要なのではないかと考え、その可能性について検討した。もしこの仮説が正しければ、*ser-7*変異体においてGSA-1経路とGPA-12経路の両方を活性化することで、

*ser-7* 変異による軸索再生低下を抑圧できるはずである。そこで、アデニル酸シクラーゼを活性化して cAMP レベルを上昇させる薬剤であるフォルスコリンを用いた（文献 37、38）。まず、*ser-7 (tm1325)* 変異体でフォルスコリン処理を行なったところ、その軸索再生率低下は抑圧されなかった（図 29 及び表 3）。しかし *ser-7; rga-5* 二重変異体においてフォルスコリン処理を行った場合には、*ser-7* 変異による軸索再生率低下が抑圧された（図 29 及び表 3）。これらの結果から、SER-7 は GPA-12 と GSA-1 の両方を活性化することで軸索再生を制御することが明らかとなった。

## 考察

### 軸索切断依存的に起こる 5-HT の産生

神経伝達物質である 5-HT は全身、中枢、抹消の様々な神経系において機能し、その最も重要な機能はシナプス間におけるシグナル伝達であることがわかっている。しかしながら、5-HT は神経突起の成長といったその他の生命現象も制御することが知られている（文献 39、40）。このことから、5-HT は神経における細胞内構造の制御においても重要な役割を果たすことがわかる（文献 41、42）。線虫では 5-HT はストレス応答の他に化学走性、学習及び記憶といった認知行動の調節にも関わるということが知られている（文献 10、13、16）。本研究では、線虫の非セロトニン産生性神経が軸索切断を受けると 5-HT を合成し、軸索再生を引き起こすことが新たに示された。この作用は軸索損傷を受けた神経において合成された 5-HT が SER-7 受容体を介して細胞自律的に行うと考えられる。一般的に、一つの神経は 1 種類ないしは複数の神経伝達物質を合成・分泌するが（文献 43）、それらは一度決まってしまうと変わることはないとされている。しかし例外として、ある種の神経では特定の刺激が神経伝達物質のスイッチングを引き起こすことが報告されている（文献 44、45）。哺乳動物では leukemia inhibitory factor (LIF) や ciliary neurotrophic factor (CNF) が 発生途中の抹消の交感神経の分化を制御することで、ノルアドレナリン産生性からコリン産生性へ性質を変える（文献 46、47）。また、海馬顆粒細胞の 2 つの神経伝達物質であるグルタミンと GABA のバランスも発生後に変化しうることがわかってきた（文献 48）。最近の Dulcis らの報告によると（文献 49）、光周期による刺激に応答してドーパミンやソマトスタチンのスイッチングがみられることが

わかってきた。これらの研究の大部分は様々な種類の神経細胞が混在した集団を用いて行われているため、混在している未分化の細胞が新たに分化した可能性は排除できていないものの、いずれも神経細胞が産生する神経伝達物質が状況によってダイナミックに変わりうる可能性を示唆している。本研究では、通常は決してセロトニンを産生しない線虫の **GABA** 作動性運動神経またはグルタミン酸作動性感覚神経が、軸索切断によって **HIF-1** 依存的に **5-HT** を産生することを示した (図 30)。このことは、神経伝達物質のスイッチングが制御可能であることを示す新規の例である。以前の研究において、低酸素刺激はグルタミン酸作動性 **ASG** 神経において **HIF-1** 依存的に **5-HT** の合成を誘導することが報告されている (文献 16、50)。しかしながら、低酸素状態を模倣する **HIF-1** の安定化を誘導した場合、**ASG** 神経では *tph-1* の遺伝子発現が誘導されるが、**D** 型運動神経や **PLM** 感覚神経では誘導されなかった。従って、軸索切断による **HIF-1** 依存的な *tph-1* の遺伝子発現は、低酸素によって誘導される **HIF-1** の安定化とは別の機構によって引き起こされていると考えられる。哺乳動物の脊髄損傷では、**HIF-1** はその他の因子と同様に遺伝子発現及び安定化が起きる (文献 51、52)。従って、軸索切断の **HIF-1** の活性化は種を越えて保存されているといえる。さらに別の研究では、**HIF-1** によって脊椎動物の脳の特定の領域における **5-HT** の合成が促進される報告もあることから (文献 53)、神経において軸索再生と **5-HT** 合成が共役するプロセスは動物種間で保存されていることが示唆される。そのため、脊椎動物においても軸索切断が **5-HT** やその他の神経伝達物質の合成を引き起こすかを検討することは興味深い。現在のところ、軸索切

断後に起こる HIF-1 依存的な *tph-1* の転写誘導の詳細なメカニズムについては不明であるので、今後の研究による解明を期待したい。

### 神経軸索再生における 5-HT の下流経路

5-HT の生物学的作用は G タンパク質共役受容体によって伝達される (文献 22)。本研究では、5-HT 受容体である SER-7 が  $G\alpha_{12}$  経路と Gas 経路の両方を活性化することで自己分泌的に軸索再生を制御することを明らかにした。先行研究から、 $G\alpha_{12}$  や Gas の下流では DAG および cAMP がそれぞれ機能していることが明らかとなっている (文献 54–57)。哺乳動物の  $G\alpha_{12}$  経路では、RGS を持つ RhoGEF が RhoA を活性化する。このことは線虫の運動神経においても同様であることが確認されている (文献 26)。RhoGEF をコードする *rhgf-1* の変異や、RhoGAP である RGA-5 の多量発現によって軸索再生率が低下することから、 $G\alpha_{12}$  の下流の Rho シグナルも軸索再生に関わることがわかる。さらに、*gpa-12* の変異による軸索再生率の低下は Rho シグナルの活性化によって抑圧されることも明らかとなった。従って、 $G\alpha_{12}$  – RhoGEF - RhoA 経路が線虫の軸索再生を制御することが示唆された (図 31)。この結果と一致する知見として、GPA-12 と RHGF-1 が運動神経で発現しており、かつ相互作用することが報告されている (文献 25)。線虫では活性化した RHO-1 が DGK-1 に結合し、その機能を抑制することで DAG の量を増加させる (文献 35)。DAG の量が増加した場合、DAG は PKC の線虫ホモログである TPA-1 を活性化し、TPA-1 は JNK 型 MAPK 経路の MAPKKK である MLK-1 のリン酸を引き起こす (文献 58)。これらの結果は、 $G\alpha_{12}$  経路が DAG の量を増加させることで、

JNK 型 MAPK 経路を活性化することを示唆する。一方、Gas 経路はアデニル酸シクラーゼを活性化して cAMP の合成を引き起こす。cAMP は以前から軸索切断により上昇し、軸索再生を促進する重要なシグナルであることがわかっていた（文献 37）が、その産生機序についてはわかっていなかった。よって本研究結果は、産生機序の少なくとも一つの仕組みを明らかにしたものであると言える。cAMP の標的のひとつはプロテインキナーゼ A (PKA) であるが、先行研究から PKA は軸索切断に応答して活性化し、転写因子 ETS-4 のリン酸化を介して、JNK 型 MAPK 経路の上流で機能する成長因子受容体 SVH-2 の転写誘導を引き起こすことが明らかとなっている（図 31）（文献 59、60）。従って、Gas 経路は svh-2 遺伝子の転写を誘導することで JNK 経路の活性化を促進すると考えられる。これらのことから、軸索再生において 5-HT は  $G\alpha_{12}$  経路と Gas 経路の両方を活性化するが、いずれも JNK 型 MAPK 経路の活性化に寄与すると思われる。ただし、cAMP の低下による軸索再生率低下は svh-2 遺伝子の発現だけでは抑圧できない（文献 60）ことから、5-HT は cAMP 上昇を介して別の未知のシグナル伝達経路も制御していると推測される。その経路の同定については今後の課題である。

## おわりに

今回の研究により、線虫において軸索切断が HIF-1 依存的に 5-HT の異所的産生を誘導すること、また産生された 5-HT が自己分泌的に SER-7 を介して  $G\alpha_{12}$  経路と Gas 経路の両方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。哺乳動物において、発生後の神経系における軸索再生不良は多

くの疾患の原因となっていることから、神経の伸長時の 5-HT シグナルの多様な役割を解明することはセロトニンを用いた新規の神経再生治療薬の開発に繋がることが期待される。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、実験材料の提供を頂いた Cori Bargmann 博士、貝淵弘三博士、森郁恵博士、Caenorhabditis Genetic Center (CGC) , National Bio-Resource Project 及び *C. elegans* Knockout Consortium に感謝を申し上げます。CGC からご提供頂いた線虫のストレインの一部は NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD10440) によって支援されました。また、本研究は文部科学省と内藤財団の研究資金が使用されました。本研究を行うにあたり、約 6 年にわたる継続的なご指導をして下さった松本邦弘名誉教授と久本直毅教授に感謝いたします。さらに、研究生活を支えてくださった家族や友人にこの場をお借りしてお礼を申し上げます。

## 参考文献

1. Yanik, M. F., Cinar, H., Cinar, H.N., Chisholm, A.D., Jin, Y. & Ben-Yakar, A.  
Neurosurgery: functional regeneration after laser axotomy.  
Nature 432, 822 (2004).
2. Hammarlund, M. & Jin, Y.  
Axon regeneration in *C. elegans*.  
Curr. Opin. Neurobiol. 27, 199–207 (2014).
3. Chen, L., Wang, Z., Ghosh-Roy, A., Hubert, T., Yan, D., O'Rourke, S.,  
Bowerman, B., Wu, Z., Jin, Y. & Chisholm, A.D.  
Axon regeneration pathways identified by systematic genetic screening in *C. elegans*.  
Neuron 71, 1043–1057 (2011).
4. Nix, P., Hammarlund, M., Hauth, L., Lachnit, M., Jorgensen, E.M.& Bastiani,  
M.  
Axon regeneration genes identified by RNAi screening in *C. elegans*.  
J. Neurosci. 34, 629–645 (2014).
5. Sze, J. Y., Victor, M., Loer, C., Shi, Y. & Ruvkun, G.  
Food and metabolic signalling defects in a *Caenorhabditis elegans*  
serotonin-synthesis mutant.  
Nature 403, 560–564 (2000).
6. de Kloet, E. R., Joels, M. & Holsboer, F.  
Stress and the brain: from adaptation to disease.  
Nat. Rev. Neurosci. 6, 463–475 (2005).
7. McEwen, B. S.  
Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the  
brain.

- Physiol. Rev. 87, 873–904 (2007).
8. Joels, M. & Baram, T. Z.  
The neuro-symphony of stress.  
Nat. Rev. Neurosci. 10, 459–466 (2009).
  9. Chang, A. J., Chronis, D. S., Karow, D. S., Marletta, M. A. & Bargmann, C. I.  
A distributed chemosensory circuit for oxygen preference in *C. elegans*.  
PLoS Biol. 4, e274 (2006).
  10. Liang, B., Moussaif, M., Kuan, C. J., Gargus, J. J. & Sze, J. Y.  
Serotonin targets the DAF-16/FOXO signaling pathway to modulate stress responses.  
Cell Metab. 4, 429–440 (2006).
  11. Flavell, S. W., Pokala, N., Macosko, E.Z., Albrecht, D.R., Larsch, J. & Bargmann, C.I.  
Serotonin and the neuropeptide PDF initiate and extend opposing behavioral states in *C. elegans*.  
Cell 154, 1023–1035 (2013).
  12. Rand, J. B. & Nonet, M. L.  
Synaptic transmission.  
*C. elegans* II. (eds Riddle, D. L. *et al.*) 611–643 (Cold spring Harbor Laboratory Press, 1997).
  13. Chase, D. L. & Koelle, M. R.  
Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans*.  
The *C. elegans* research community, WormBook,  
doi/10.1895/wormbook.1.132.1, <http://www.wormbook.org> (2007).
  14. Jorgensen, E. M.  
GABA.  
The *C. elegans* Research Community, WormBook,

doi/10.1895/wormbook.1.14.1, <http://www.wormbook.org> (2005).

15. Lee, R. Y. N., Sawin, E. R., Chalfie, M., Horvitz, H. R. & Avery, L.  
EAT-4, a homolog of a mammalian sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter, is necessary for glutamatergic neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*.  
J. Neurosci. 19, 159–167 (1999).
16. Pocock, R. & Hobert, O.  
Hypoxia activates a latent circuit for processing gustatory information in *C. elegans*.  
Nat. Neurosci. 13, 610–614 (2010).
17. Jiang, H., Guo, R. & Powell-Coffman, J. A.  
The *Caenorhabditis elegans hif-1* gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia.  
Proc. Natl Acad. Sci. USA 98, 7916–7921 (2001).
18. Epstein, A. C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J. & Ratcliffe, P.J.  
*C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation.  
Cell 107, 43–54 (2001).
19. Bishop, T., Lau, K.W., Epstein, A.C., Kim, S.K., Jiang, M., O'Rourke, D., Pugh, C.W., Gleadle, J.M., Taylor, M.S., Hodgkin, J. & Ratcliffe, P.J.  
Genetic analysis of pathways regulated by the von Hippel-Lindau tumor suppressor in *Caenorhabditis elegans*.  
PLoS Biol. 2, e289 (2004).
20. Shen, C., Nettleton, D., Jiang, M., Kim, S. K. & Powell-Coffman, J. A. Roles

- of the HIF-1 hypoxia-inducible factor during hypoxia response in *Caenorhabditis elegans*.  
J. Biol. Chem. 280, 20580–20588 (2005).
21. Pocock, R. & Hobert, O.  
Oxygen levels affect axon guidance and neuronal migration in *Caenorhabditis elegans*.  
Nat. Neurosci. 11, 894–900 (2008).
22. Hoyer, D., Hannon, J. P. & Martin, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors.  
Pharmacol. Biochem. Behav. 71, 533–554 (2002).
23. Song, B. & Avery, L.  
Serotonin activates overall feeding by activating two separate neural pathways in *Caenorhabditis elegans*.  
J. Neurosci. 32, 1920–1931 (2012).
24. Suzuki, N., Nakamura, S., Mano, H. & Kozasa, T.  
 $G\alpha_{12}$  activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF.  
Proc. Natl Acad. Sci. USA 100, 733–738 (2003).
25. Yau, D.M., Yokoyama, N., Goshima, Y., Siddiqui, Z.K., Siddiqui, S.S. & Kozasa, T.  
Identification and molecular characterization of the  $G\alpha_{12}$ -Rho guanine nucleotide exchange factor pathway in *Caenorhabditis elegans*.  
Proc. Natl Acad. Sci. USA 100, 14748–14753 (2003).
26. Hiley, E., McMullan, R. & Nurrish, S. J.  
The  $G\alpha_{12}$ -RGS RhoGEF-RhoA signalling pathway regulates neuromodulator release in *C. elegans*.  
EMBO J. 25, 5884–5895 (2006).

27. Bos, J. L., Rehmann, H. & Wittinghofer, A.  
GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins.  
Cell 129, 865–877 (2007).
28. Hammarlund, M., Nix, P., Hauth, L., Jorgensen, E. M. & Bastiani, M.  
Axon regeneration requires a conserved MAP kinase pathway.  
Science 323, 802–806 (2009).
29. Ridley, A. J. Self, A.J., Kasmi, F., Paterson, H.F., Hall, A., Marshall, C.J. & Ellis, C.  
Rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo.  
EMBO J. 12, 5151–5160 (1993).
30. Wolf, R. M., Draghi, N., Liang, X., Dai, C., Uhrbom, L., Eklöf, C., Westermark, B., Holland, E.C. & Resh, M.D.  
p190RhoGAP can act to inhibit PDGF-induced gliomas in mice: a putative tumor suppressor encoded on human chromosome 19q13.3.  
Genes Dev. 17, 476–487 (2003).
31. Houssa, B., de Widt, J., Kranenburg, O., Moolenaar, W. H. & van Blitterswijk, W. J.  
Diacylglycerol kinase  $\gamma$  binds to and is negatively regulated by active RhoA. J. Biol. Chem. 274, 6820–6822 (1999).
32. Los, A. P., Vinke, F. P., de Widt, J., Divecha, N. & van Blitterswijk, W. J.  
Structure-activity relationship of diacylglycerol kinase  $\gamma$ .  
Biochim. Biophys. Acta. 1636, 169–174 (2004).
33. van Blitterswijk, W. J. & Houssa, B.  
Properties and functions of diacylglycerol kinase.  
Cell Signal. 12, 595–605 (2000).

34. Luo, B., Prescott, S. M. & Topham, M. K.  
Diacylglycerol kinase  $\alpha$  regulates phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase I  
a by a novel mechanism.  
Cell Signal. 16, 891–897 (2004).
35. McMullan, R., Hiley, E., Morrison, P. & Nurrish, S. J.  
Rho is a presynaptic activator of neuromodulator release at pre-existing  
synapses in *C. elegans*.  
Gene Dev 20, 65–76 (2005).
36. Hobson, R. J., Geng, J., Gray, A. D. & Komuniecki, R. W.  
SER-7b, a constitutively active  $G_{\alpha s}$  coupled 5-HT<sub>7</sub>-like receptor expressed  
in the *Caenorhabditis elegans* M4 pharyngeal motoneuron.  
J. Neurochem. 87, 22–29 (2003).
37. Ghosh-Roy, A., Wu, Z., Goncharov, A., Jin, Y. & Chisholm, A. D.  
Calcium and cyclic AMP promote axonal regeneration in *Caenorhabditis  
elegans* and require DLK-1 kinase.  
J. Neurosci. 30, 3175–3183 (2010).
38. Seamon, K. B., Padgett, W. & Daly, J. W.  
Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and  
in intact cells.  
Proc. Natl Acad. Sci. USA 78, 3363–3367 (1981).
39. Trakhtenberg, E. F. & Goldberg, J. L.  
The role of serotonin in axon and dendrite growth.  
Int. Rev. Neurobiol. 106, 105–126 (2012).
40. Rojas, P. S., Neira, D., Munoz, M., Lavandero, S. & Fielder, J. L.  
Serotonin (5-HT) regulates neurite outgrowth through 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub>  
receptors in cultured hippocampal neurons.

- J. Neurosci. Res. 92, 1000–1009 (2014).
41. Hydon, P. G., McCobb, D. P. & Kater, S. B.  
Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons.  
Science 226, 561–564 (1984).
42. Kvachnina, E. Liu, **G.**, Dityatev, A., Renner, U., Dumuis, A., Richter, D.W., Dityateva, **G.**, Schachner, M., Voyno-Yasenetskaya, T.A. & Ponimaskin, E.G.  
5-HT<sub>7</sub> receptor is coupled to G $\alpha$  subunits of heterotrimeric G12-protein to regulate gene transcription and neuronal morphology.  
J. Neurosci. 25, 7821–7830 (2005).
43. Burnstock, G.  
Cotransmission.  
Curr. Opin. Pharmacol 4, 47–52 (2004).
44. Potter, D. D., Landis, S. C., Matsumoto, S. G. & Furshpan, E. J.  
Synaptic functions in rat sympathetic neurons in microcultures. II. Adrenergic/cholinergic dual status and plasticity.  
J. Neurosci. 6, 1080–1098 (1986).
45. Spitzer, N. C.  
Neurotransmitter switching? No surprise.  
Neuron 86, 1131–1144 (2015).
46. Saadat, S., Sendtner, M. & Rohrer, H.  
Ciliary neurotrophic factor induces cholinergic differentiation of rat sympathetic neurons in culture.  
J. Cell Biol. 108, 1807–1816 (1989).
47. Yamamori, T., Fukada, K., Aebbersold, R., Korsching, S., Fann, M.J. & Patterson, P.H.

- The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor.  
Science 246, 1412–1416 (1989).
48. Gutie ´ rrez, R.  
The dual glutamatergic-GABAergic phenotype of hippocampal granule cells.  
Trends Neurosci. 28, 297–303 (2005).
49. Dulcis, D., Jamshidi, P., Leutgeb, S. & Spitzer, N. C.  
Neurotransmitter switching in the adult brain regulates behavior.  
Science 340, 449–453 (2013).
50. Serrano-Saiz, E., Poole, R.J., Felton, T., Zhang, F., De La Cruz, E.D. & Hobert, O.  
Modular control of glutamatergic neuronal identity in *C. elegans* by distinct homeodomain proteins.  
Cell 155, 659–673 (2013).
51. Ju, Y., He, M. & Mao, B.  
Sequential changes of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in experimental spinal cord injury and its significance.  
Clin. J. Traumatol 5, 103–106 (2002).
52. Xiaowei, H., Ninghui, Z., Wei, X., Yiping, T. & Linfeng, X.  
The experimental study of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and its target genes in spinal cord injury.  
Spinal Cord 44, 35–43 (2006).
53. Poncet, L., Denoroy, L., Daimaz, Y. & Pequignot, J. M.  
Activity of tryptophan hydroxylase and content of indolamines in discrete brain regions after a long-term hypoxic exposure in the rat.  
Brain Res. 765, 122–128 (1997).

54. Berger, A. J., Hart, A. C. & Kaplan, J. M.  
G $\alpha$ s-induced neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*.  
J. Neurosci. 18, 2871–2880 (1998).
55. Korwagen, H.C., van der Linden, A.M. & Plasterk, R.H.A.  
G protein hyperactivation of the *Caenorhabditis elegans* adenylyl cyclase  
SGS-1 induces neuronal degeneration.  
EMBO J. 17, 5059–5065 (1998).
56. van der Linden, A.M., Moorman, C., Cuppen, E., Korwagen, H. C. & Plasterk,  
R.H.A.  
Hyperactivation of the G $_{12}$ -mediated signaling pathway in *Caenorhabditis*  
*elegans* induces a developmental growth arrest via protein kinase C.  
Curr. Biol. 13, 516–521 (2003).
57. Schade, M. A., Reynolds, N. K., Dollins, C. M. & Miller, K. G.  
Mutations that rescue the paralysis of *Caenorhabditis elegans ric-8*  
(synembryn) mutants activate the G $\alpha$ s pathway and define a third major  
branch of the synaptic signaling network.  
Genetics 169, 631–649 (2005).
58. Pastuhov, S.I., Fujiki, K., Nix, P., Kanao, S., Bastiani, M., Matsumoto, K. &  
Hisamoto, N.  
Endocannabinoid-G $\alpha$  signalling inhibits axon regeneration in  
*Caenorhabditis elegans* by antagonizing Gq $\alpha$ -PKC-JNK signalling.  
Nat. Commun. 3, e1136 (2012).
59. Li, C., Hisamoto, N., Nix, P., Kanao, S., Mizuno, T., Bastiani, M. & Matsumoto,  
K.  
The growth factor SVH-1 regulates axon regeneration in *C. elegans* via the  
JNK MAPK cascade.  
Nat. Neurosci. 15, 551–557 (2012).

60. 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.  
PLoS Genet. 11, e1005603 (2015).
61. Brenner, S.  
The genetics of *Caenorhabditis elegans*.  
Genetics 77, 71–94 (1974) .
62. Mello, C. C., Kramer, J. M., Stinchcomb, D. & Ambros, V.  
Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences.  
EMBO J. 10, 3959–3970 (1991).
63. Clark, S. G. & Chiu, C.  
*C. elegans* ZAG-1, a Zn-finger-homeodomain protein, regulates axonal development and neuronal differentiation.  
Development 130, 3781–3794 (2003).
64. Firnhaber, C. & Hammarlund, M.  
Neuron-specific RNAi in *C. elegans* and its use in a screen for essential genes required for GABA neuron function.  
PLoS Genet. 9, e1003921 (2013).
65. Smith, C. J., O'Brien, T., Chatzigeorgiou, M., Spencer, W.C., Feingold-Link, E., Husson, S.J., Hori, S., Mitani, S., Gottschalk, A., Schafer, W.R. & Miller, D.M. 3rd.  
Sensory neuron fates are distinguished by a transcriptional switch that regulates dendrite branch stabilization.  
Neuron 79, 266–280 (2013).

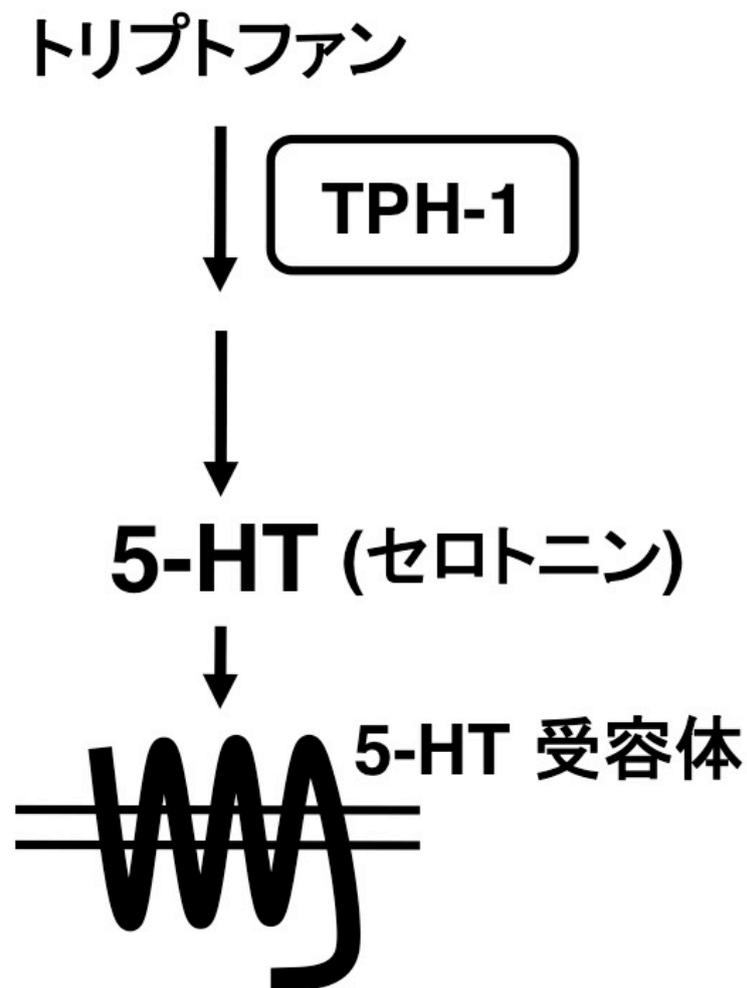


図 1. 5-HT 合成と 5-HT 受容体からなる経路の模式図

5-HT (セロトニン) は TPH-1 によってトリプトファンから合成される。

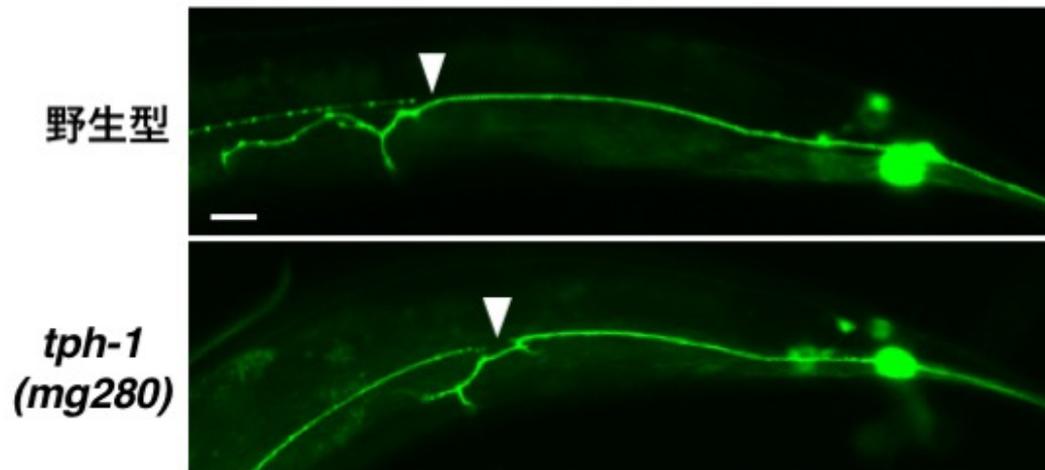


図 2. PLM 神経における神経軸索再生の写真

野生型と *tph-1* 変異体における軸索切断24時間後のPLM神経の代表的な写真。

矢尻は切断場所を示す。スケールバーは20  $\mu\text{m}$ 。

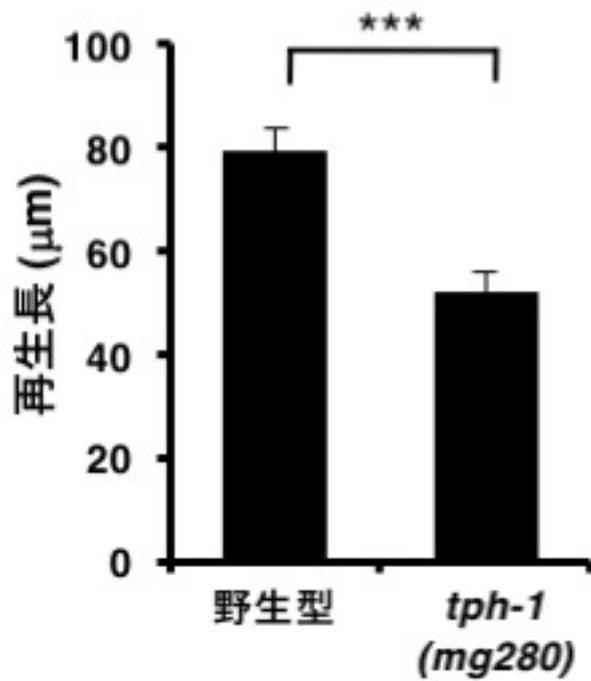


図 3. PLM 神経の再生長のグラフ

軸索を切断して24時間後のPLM神経において、切断後に伸長した軸索の長さが示されている。エラーバーは標準誤差を示す。\*\*\*P<0.001。

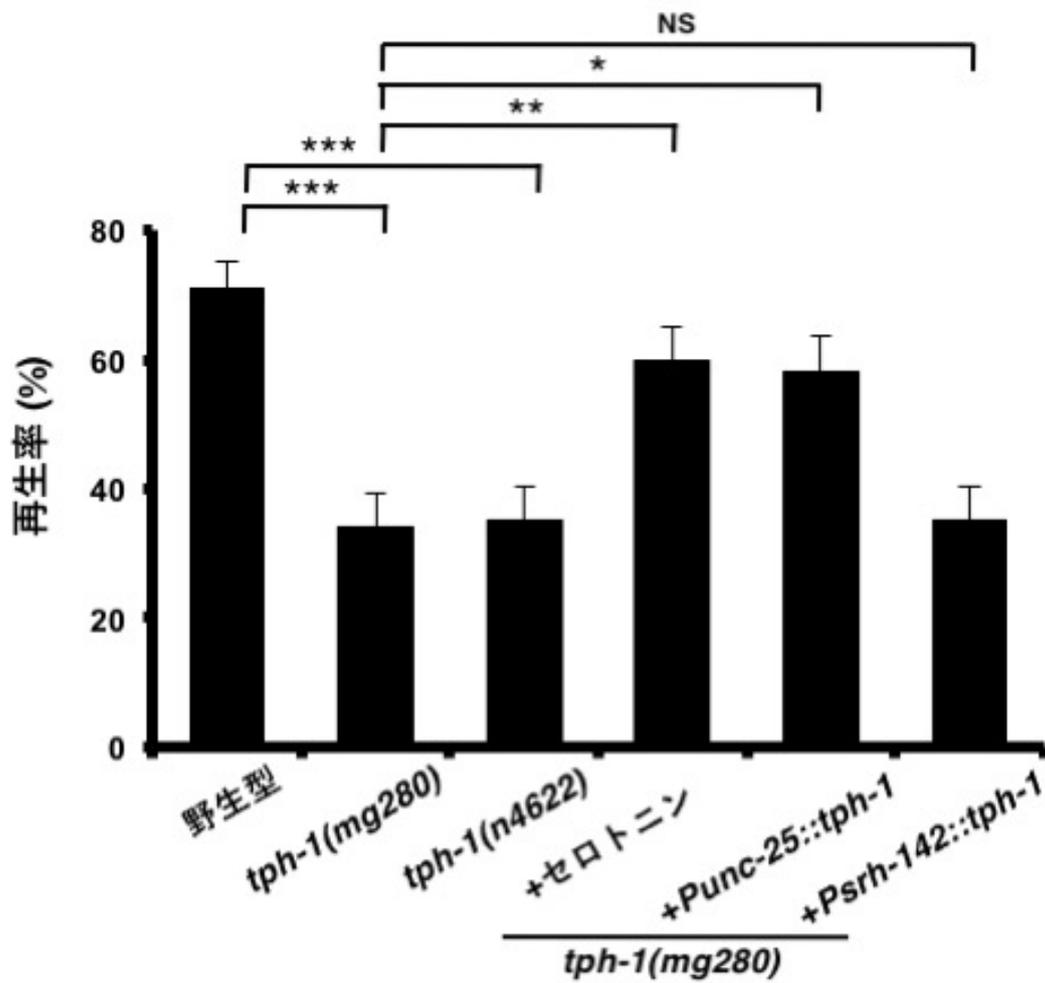


図4. D型運動神経における軸索再生

軸索切断24時間後に再生を開始した軸索の割合が示されている。エラーバーは95% 信頼区間を示す。\*\*\* $P < 0.001$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\* $P < 0.05$ 、NS : 有意差なし。

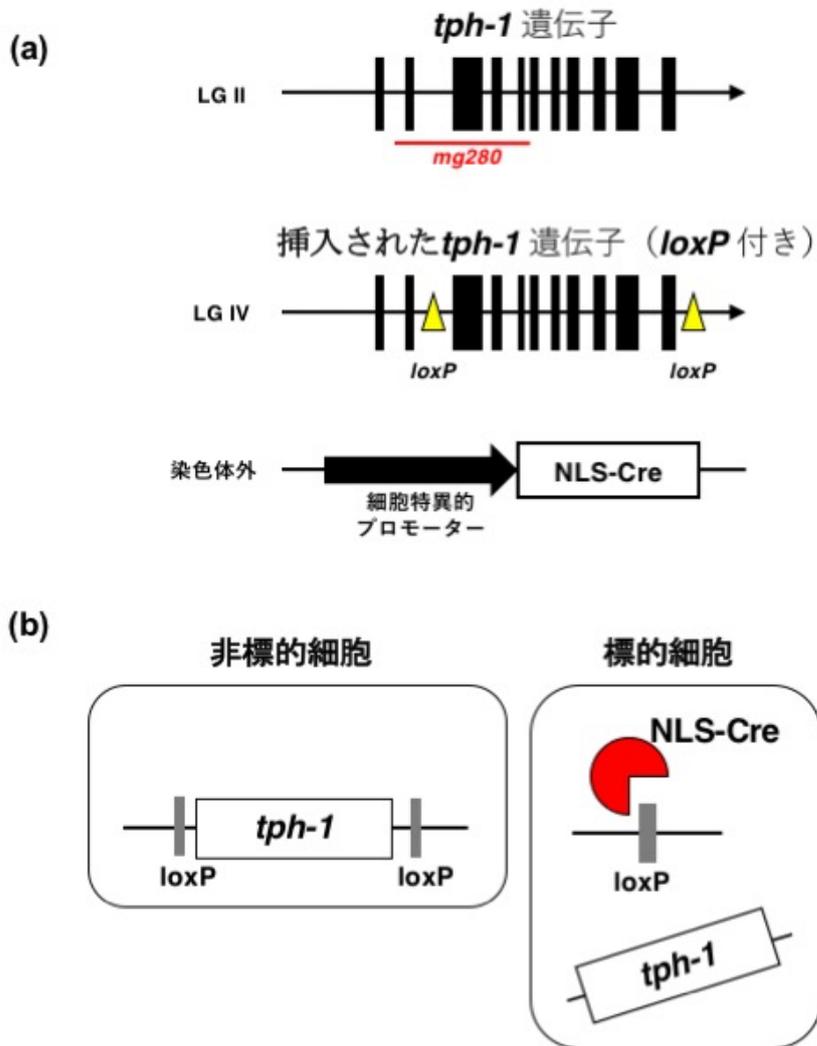


図 5. Cre-lox システムを用いた細胞特異的な *tph-1* 遺伝子欠損

(a) *tph-1(mg280); In[floxed *tph-1*]; Ex[P::*nls-Cre*]* の遺伝子構造。ゲノム上の本来の *tph-1* 遺伝子は *mg280* 変異により欠損している。それとは別に、LGIV に *loxP* 配列を含んだ *tph-1* 遺伝子が挿入されている。また、染色体外因子として、細胞特異的プロモーターの下流に NLS-Cre を繋いだ遺伝子を導入してある。

(b) NLS-Cre による標的細胞特異的な *tph-1* 欠損の模式図。NLS-Cre が発現している細胞だけで *tph-1* が欠損する。

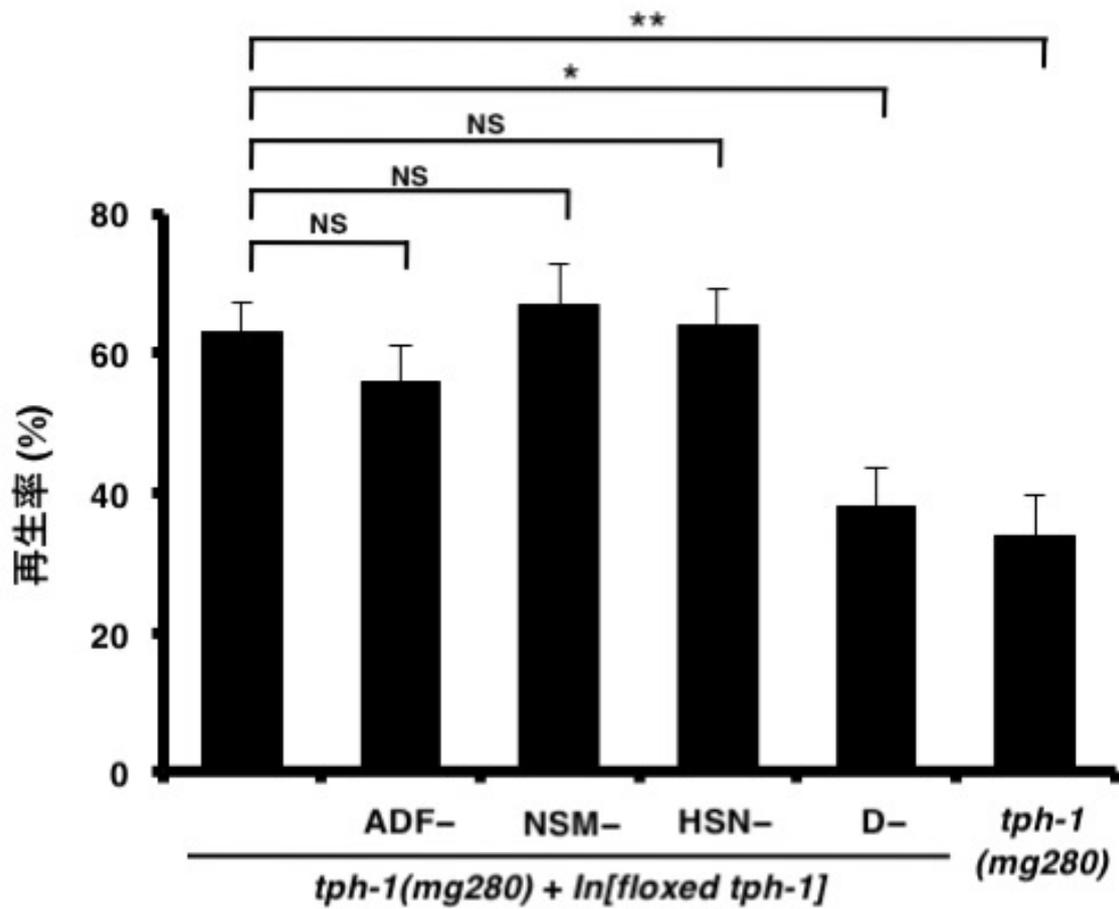
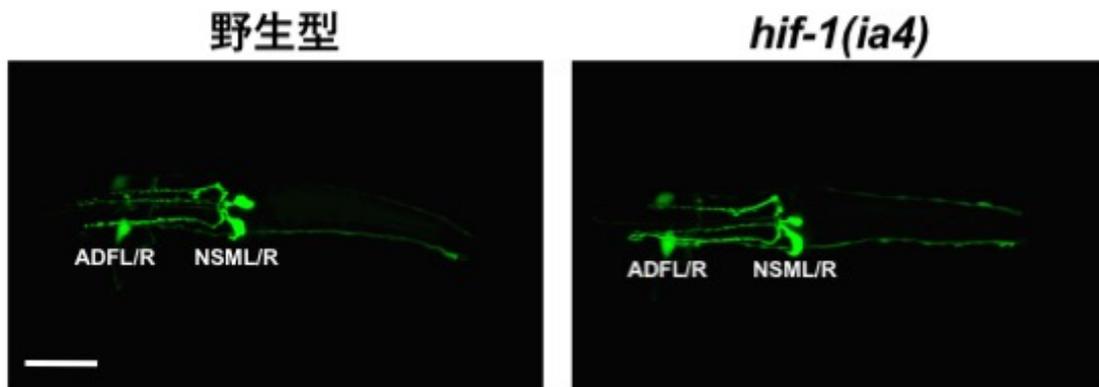


図 6. D型運動神経における軸索再生

軸索切断24時間後に再生を開始した軸索の割合が示されている。エラーバーは95% 信頼区間を示す。\*\* $P < 0.01$ 、\* $P < 0.05$ 、NS : 有意差なし。



**図7. 頭部における *Ptp-1::gfp* の発現**

野生型と *hif-1* 変異体の NSM と ADF 神経での *Ptp-1::gfp* の発現が示されている。右側が頭部先端。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。

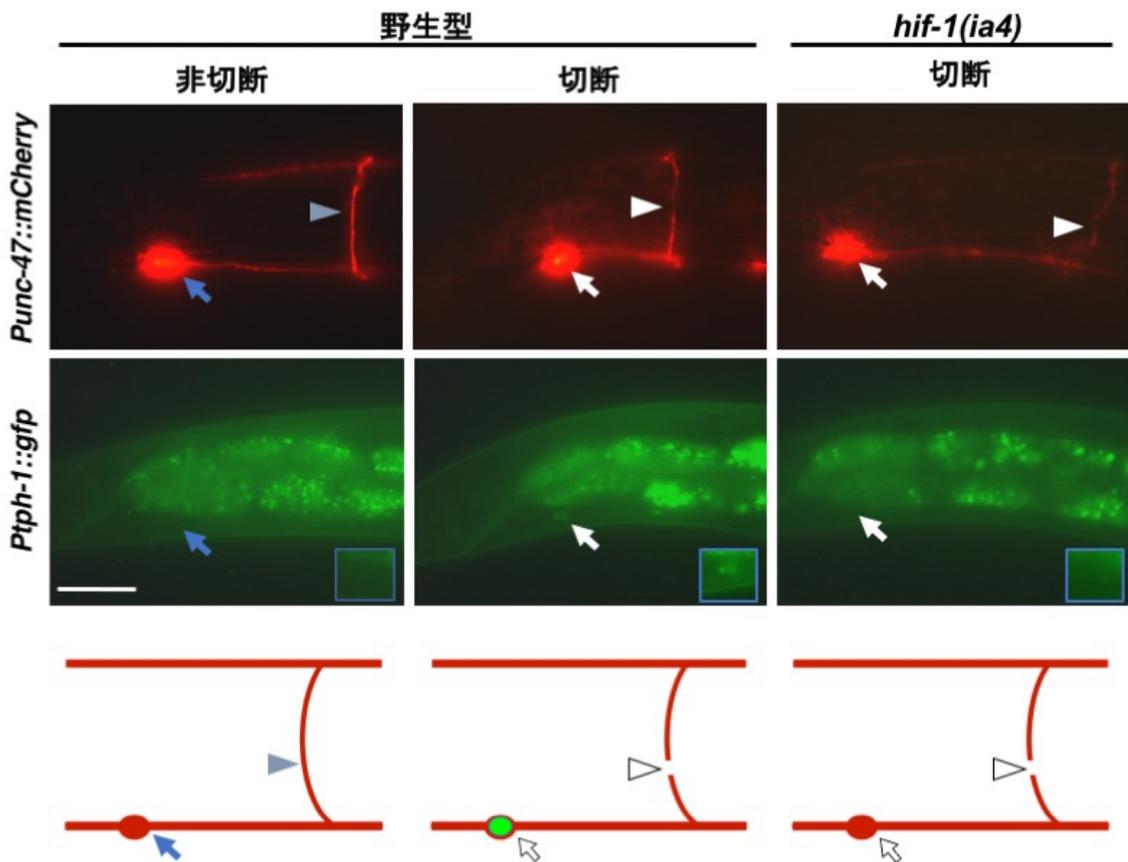


図8. 軸索切断後のD型運動神経における *Ptp-1::gfp* の発現

軸索切断30分後のD型運動神経における蛍光が示されている。一番下のパネルはD型運動神経の略式図である。矢尻は軸索と矢印は細胞体を示している（レーザー切断あり:白 レーザー切断なし:青） D型運動神経は *unc-47* プロモーター下の *mCherry* で可視化されている。細胞体は青い四角形で拡大されている。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。

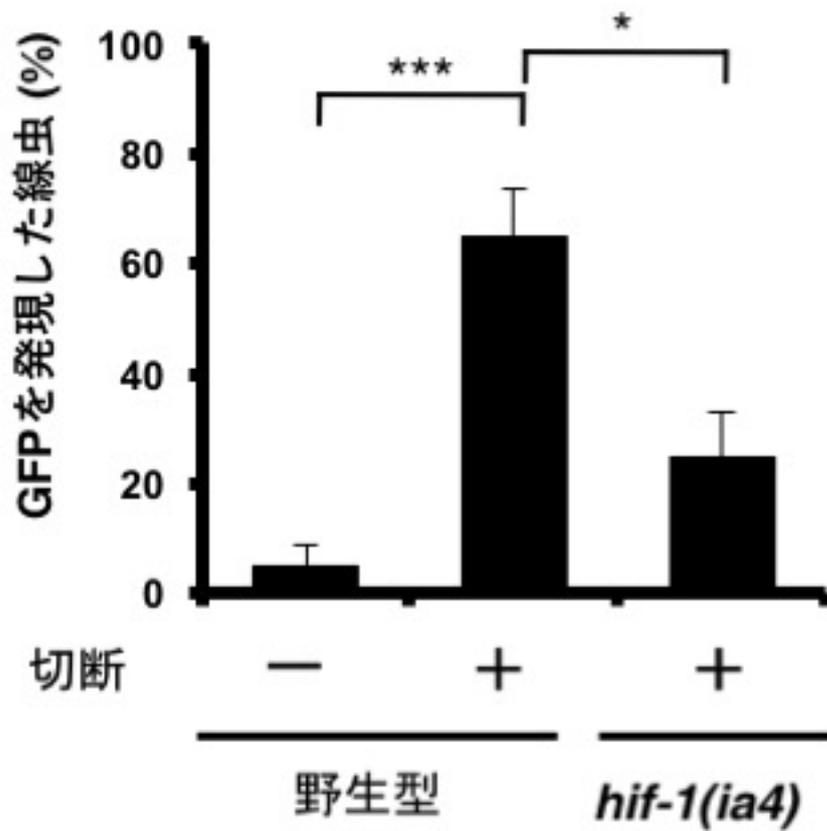


図9. *tph-1*発現を発現した個体の割合

材料と方法に示した通りに軸索切断あり (+) となし (-) の場合のD型運動神経における *P<sub>tph-1::gfp</sub>* の発現を検討した。20本の神経がそれぞれの条件で検討された。エラーバーは95% 信頼区間を示す。\*\*\* $P < 0.001$ 、\* $P < 0.05$ 。

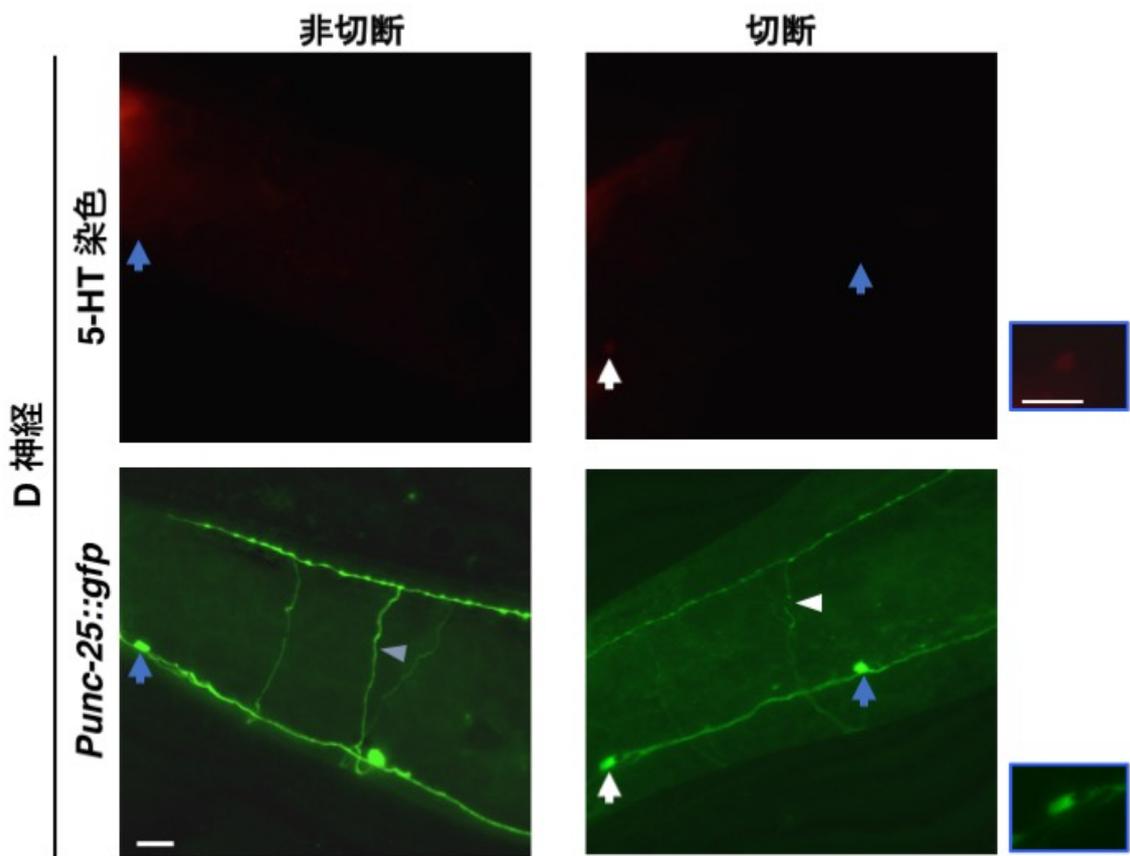


図10. D型運動神経における軸索切断30分後の5-HT の産生

抗 5-HT 抗体を用いた免疫蛍光染色（上段）と GFP の蛍光（下段）をそれぞれ示す。矢尻は軸索を、矢印は細胞体を示している。白はレーザー切断あり、青はレーザー切断なしを示している。GFP は *unc-25* プロモーターを用いて D 型運動神経で発現させている。右のパネルで拡大された細胞体が示されている。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。

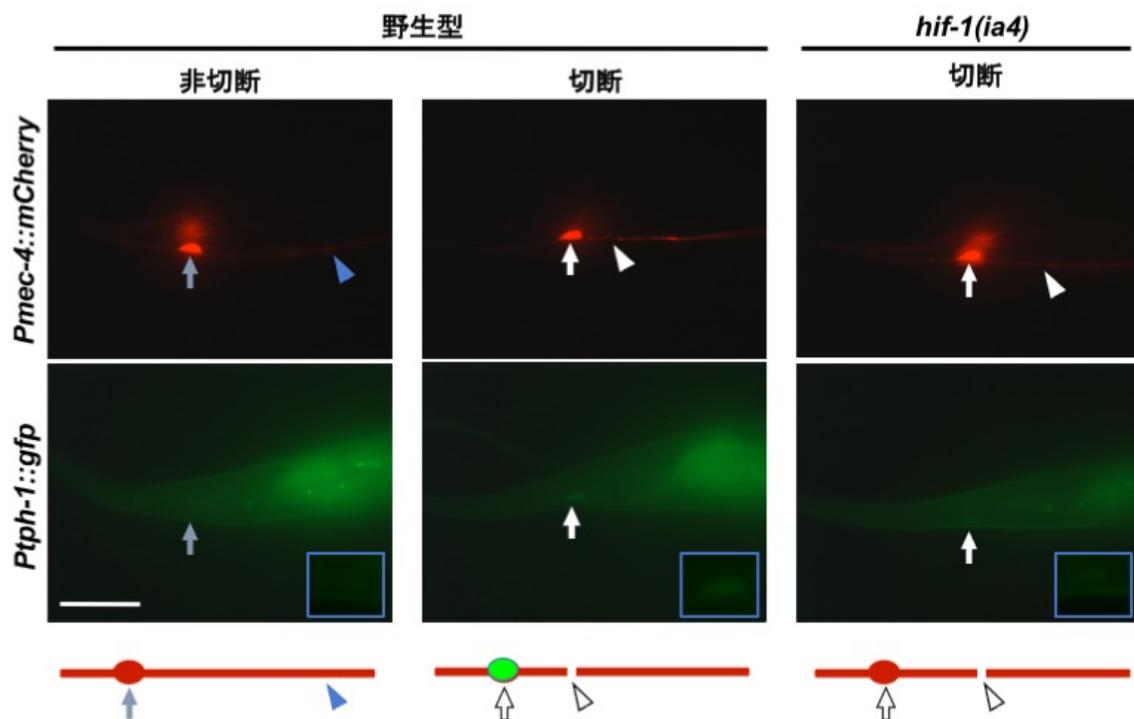


図11. PLM感覚神経における軸索切断後の*Ptph-1::gfp* の発現

PLM感覚神経における軸索切断30分後の*Ptph-1::gfp* の発現が示されている。一番下のパネルにはPLM感覚神経の概略図が示されている。矢尻は軸索を、矢印は細胞体を示している。白はレーザー切断あり、青はレーザー切断なしを示している。PLM感覚神経は*mec-4* プロモーター下のmCherryで可視化されている。細胞体は青い四角形で拡大されているスケールバーは20  $\mu\text{m}$ 。

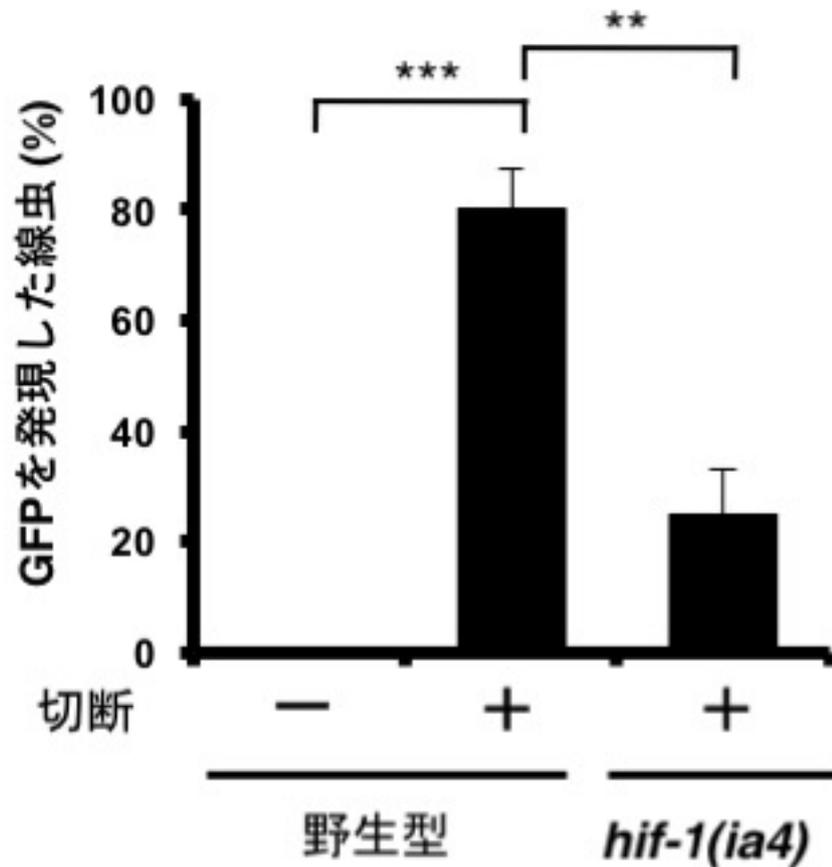


図12. *tph-1*を発現する個体の割合

レーザー切断あり (+) とレーザー切断なし (-) の場合の PLM 感覚神経における *Ptph-1::gfp* の発現がそれぞれ示されている。20本の軸索に対してそれぞれの条件でアッセイを行なった。エラーバーは95%信頼区間を示す。

\*\*\* $P < 0.001$ 、\*\* $P < 0.01$ 。

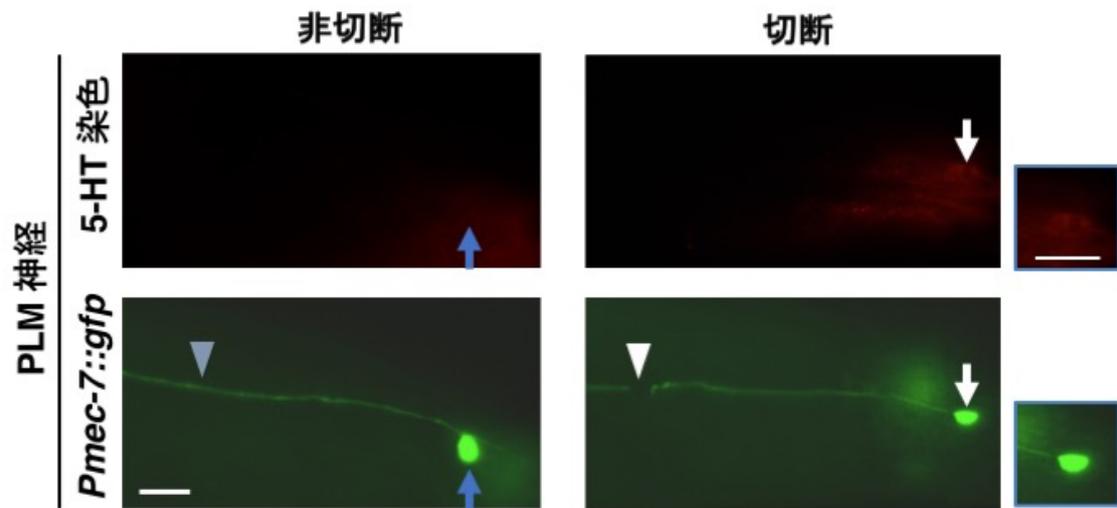


図13. PLM感覚神経における軸索切断30分後の5-HT の産生

抗 5-HT 抗体を用いた免疫蛍光染色（上段）と GFP の蛍光（下段）をそれぞれ示す。矢尻は軸索を、矢印は細胞体を示している。白はレーザー切断あり、青はレーザー切断なしを示している。GFP は *mec-7* プロモーターを用いて PLM 感覚神経で発現させている。右のパネルで拡大された細胞体が見られている。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。

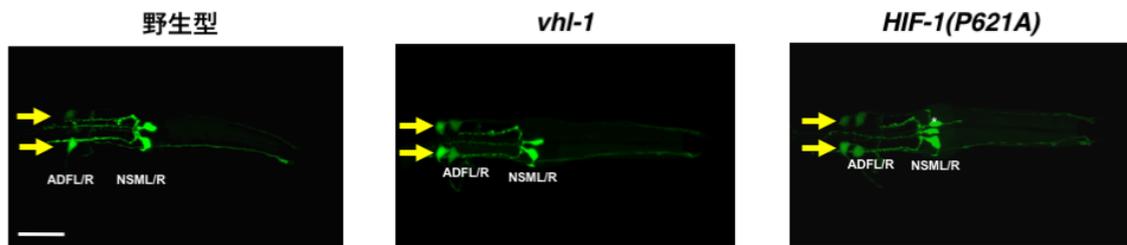


図14. HIF-1の安定化による*Ptp-1::gfp* 発現

頭部における *Ptp-1::GFP* の発現が示されている。ASG 神経の位置を黄色い矢印で示した。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。

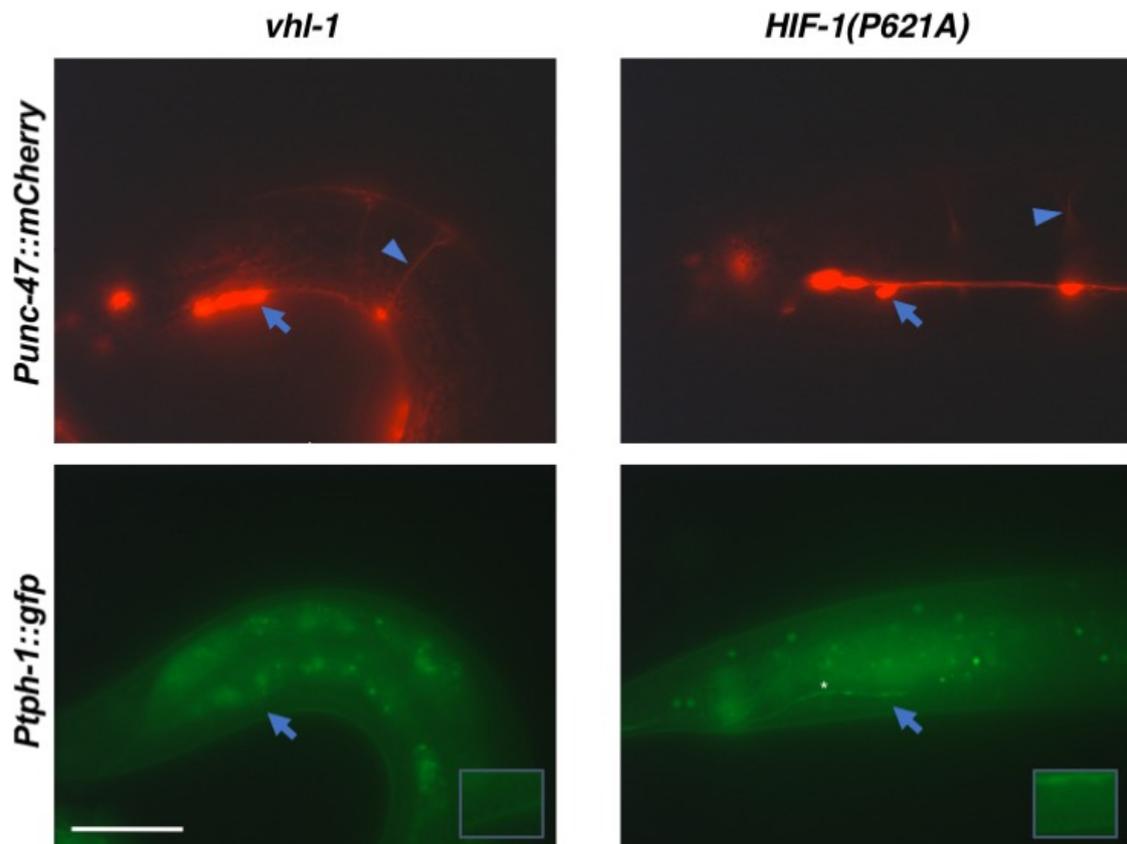


図15. HIF-1の安定化による*Ptp-1::gfp* 発現

D型運動神経における GFPの発現が示されている。D型運動神経は*unc-47* プロモーター下のmCherryで可視化している。青い矢尻と矢印はそれぞれD型運動神経の軸索と細胞体を示している。青い四角形でD型運動神経の細胞体の拡大写真が示されている。アスタリスクはHIF-1(P621A) による異所的発現を示している。スケールバーは20  $\mu\text{m}$ 。

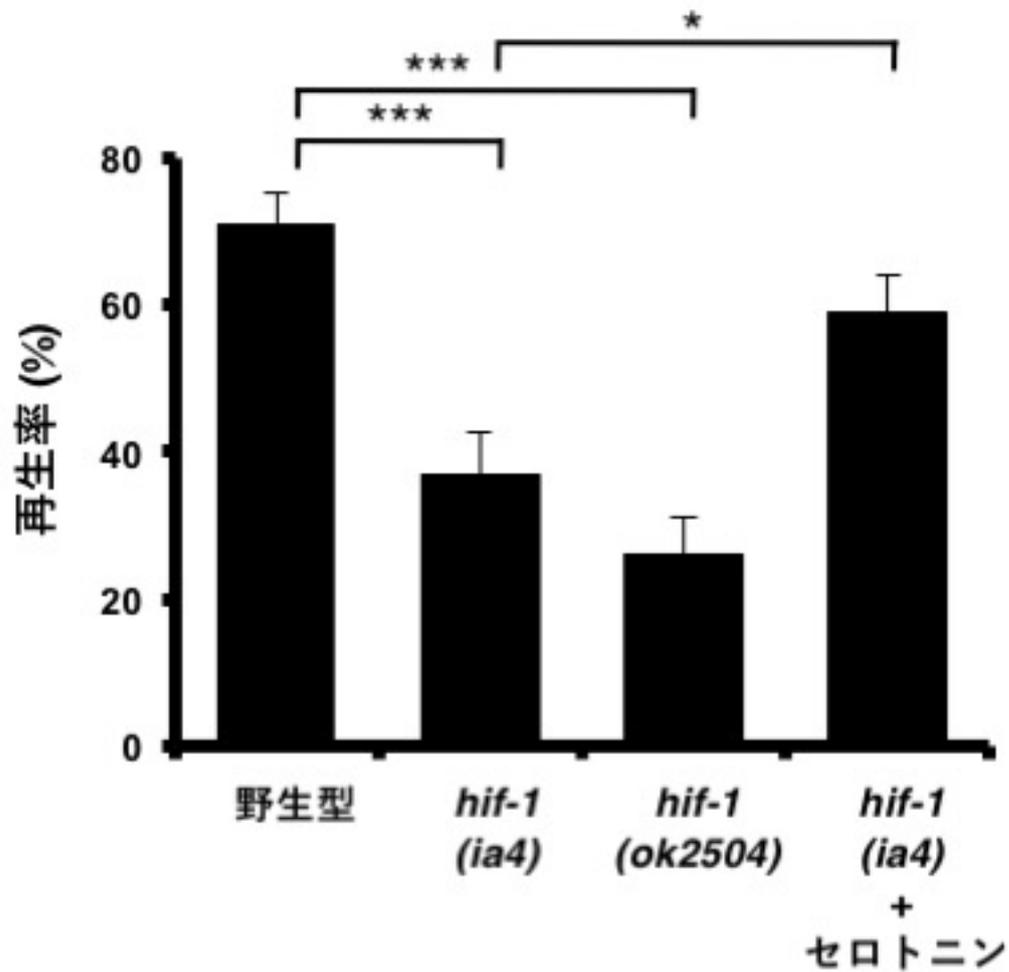


図 16. D 型運動神経における軸索再生

軸索切断24時間後に再生を開始した軸索の割合が示されている。エラーバーは95% 信頼区間を示す。\*\*\* $P < 0.001$ 、\* $P < 0.05$ 。

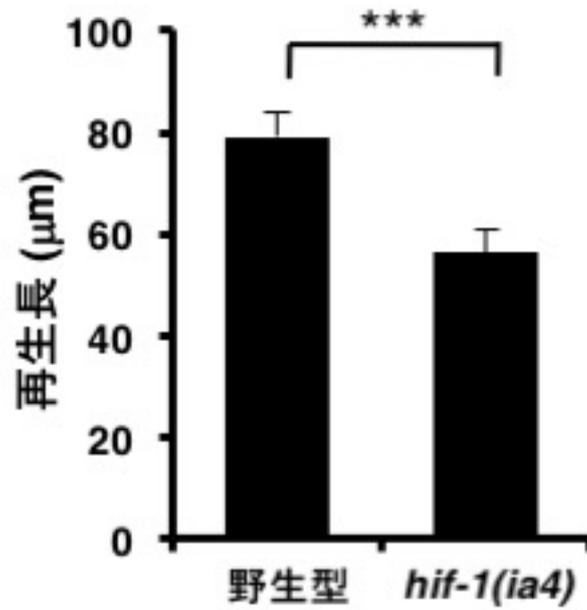


図 17. PLM 神経の再生長のグラフ

軸索を切断して24時間後のPLM神経において、切断後に伸長した軸索の長さが示されている。エラーバーは標準誤差を示す。\*\*\*P<0.001。

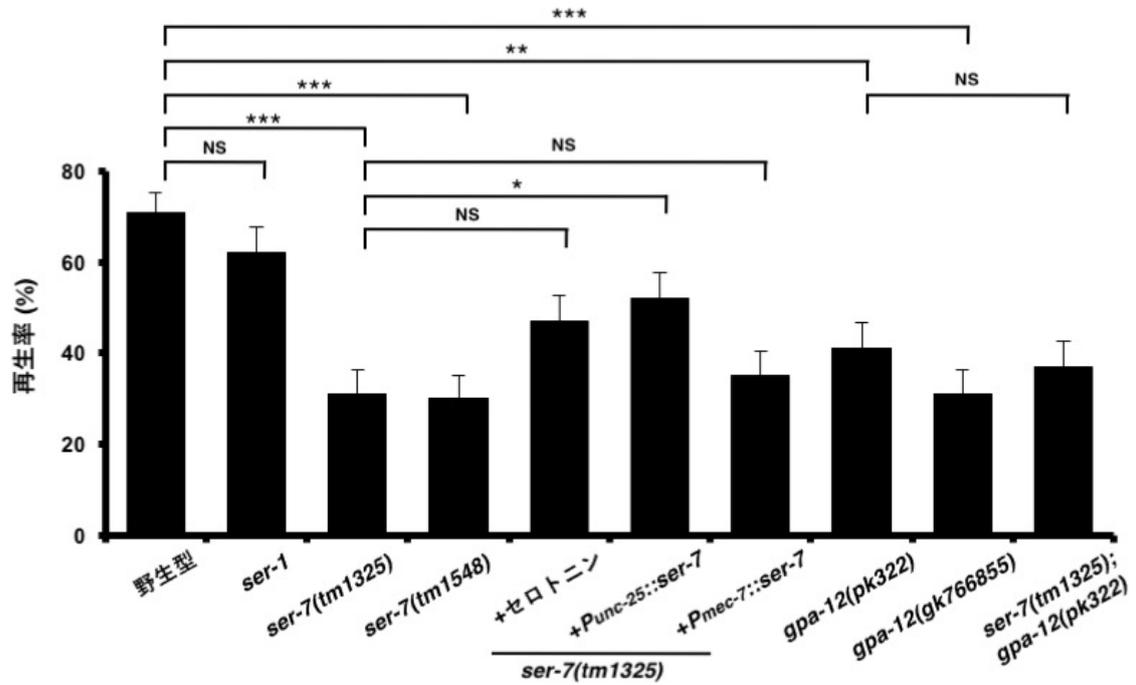


図 18. D 型運動神経における軸索再生

軸索切断24時間後に再生を開始した軸索の割合が示されている。エラーバーは95% 信頼区間を示す。\*\*\* $P < 0.001$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\* $P < 0.05$ 、NS : 有意差なし。

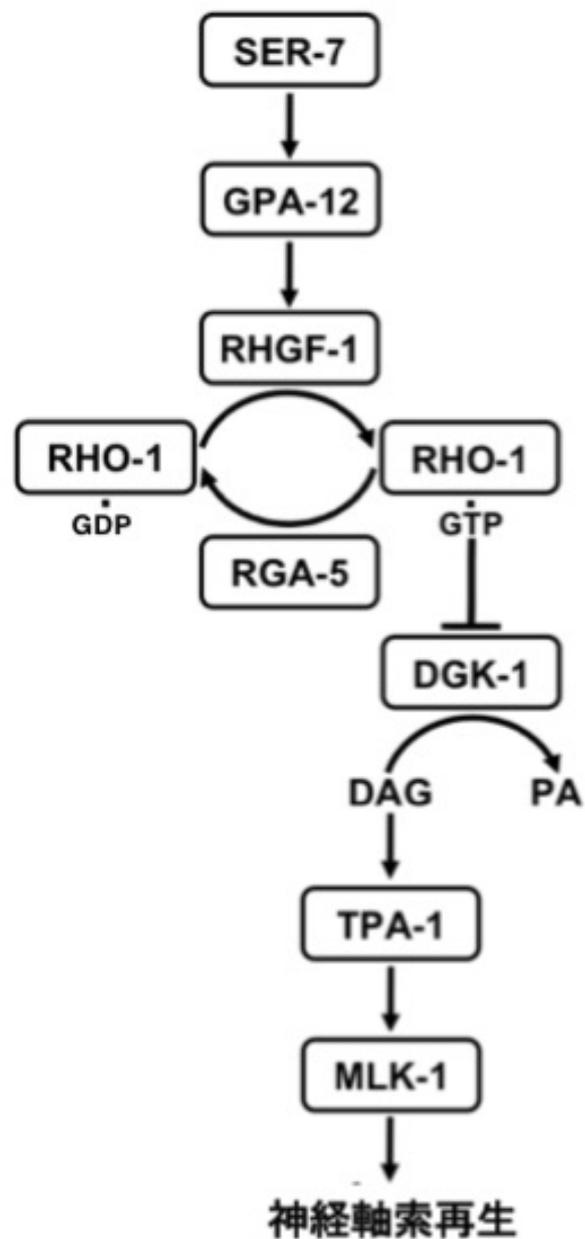


図19. SER-7 シグナル伝達経路

SER-7 はGPA-12-RHGF-1-RHO-1経路を活性化する。活性化したRHO-1 は DGK-1を阻害し、DAG の量を増加させる。DAGはTPA-1を介してJNKシグナル伝達経路のMAPKKKであるMLK-1を活性化する。

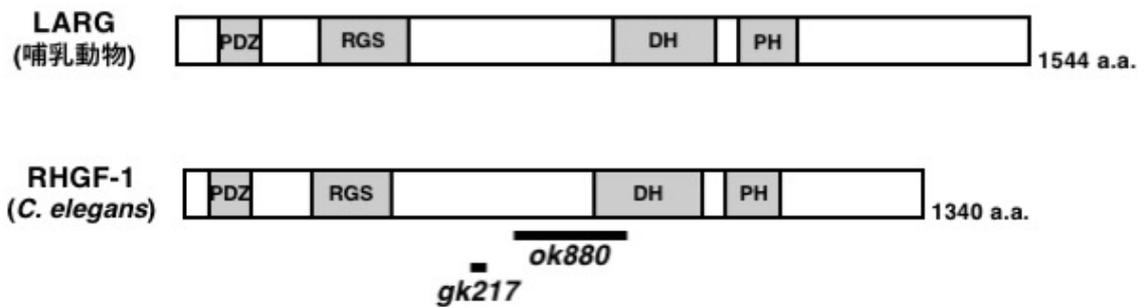


図20. RHGF-1の構造

RHGF-1とそのヒトホモログの模式図が示されている。以下にドメイン名を示す: PDZ ドメイン (PDZ)、regulator of G protein signaling ドメイン (RGS)、Dbl homology ドメイン (DH)、Pleckstrin homology ドメイン (PH)。下部の太い線で示した部分は *rhgf-1(ok880)* 変異と *rhgf-1(gk217)* 変異で欠損した領域である。

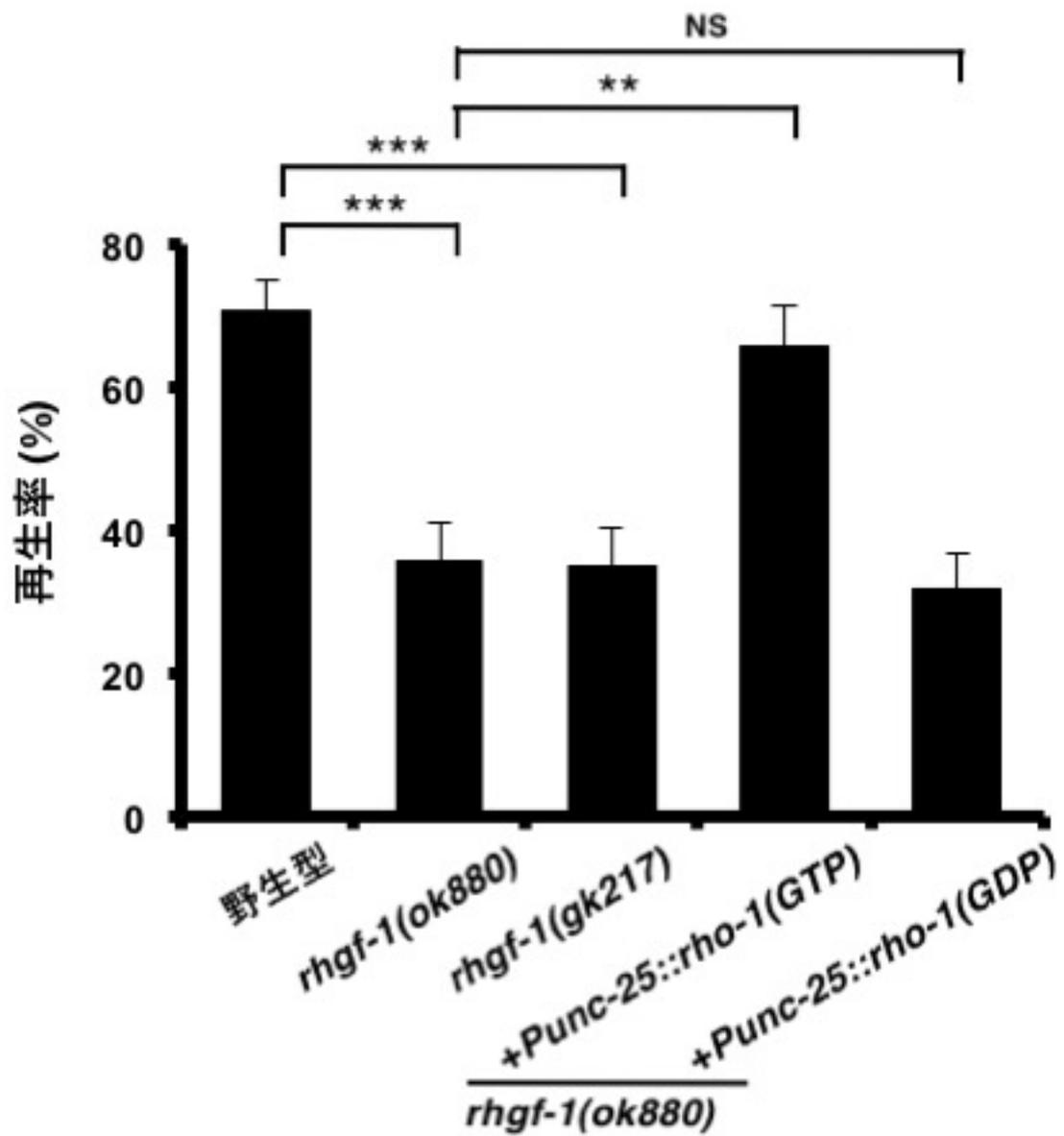


図 21. D 型運動神経における軸索再生

軸索切断24時間後に再生を開始した軸索の割合が示されている。エラーバーは95% 信頼区間を示す。\*\*\* $P < 0.001$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\* $P < 0.05$ 、NS : 有意差なし。



図22. RGA-5の構造

RGA-5とそのヒトホモログの模式図が示されている。以下にドメインを示す:  
 GTP 結合ドメイン (GBD)、Rho GAP ドメイン (GAP)。下部の太い線は  
*rga-5(ok2241)* 変異によって欠損した領域を示す。

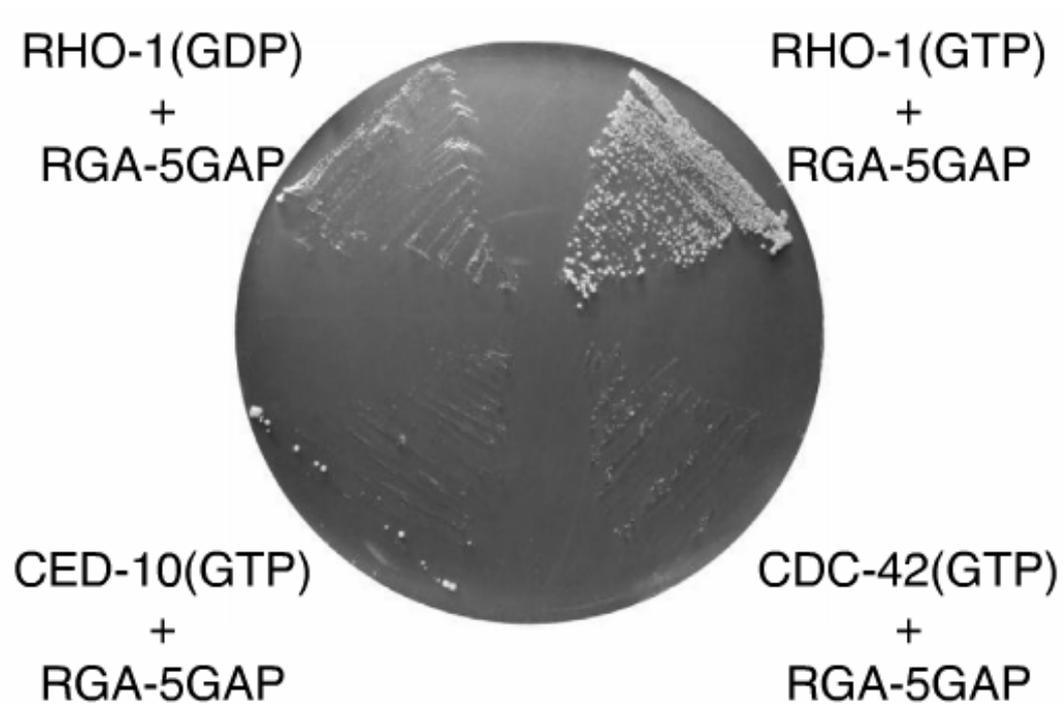


図23. RGA-5のRHO-1との酵母ツーハイブリッドアッセイ

GAL4 DBD-RHO-1 (T19N) (GDP), GAL4 DBD-RHO-1 (G14V) (GTP), GAL4 DBD-CED-10 (G14V) (GTP), GAL4 DBD-CDC-42 (G14V) (GTP), and GAL4 AD-RGA-5 (GAP domain) を用いてレポーター株である PJ69-4A を形質転換し、図に示すような組み合わせでアッセイした。

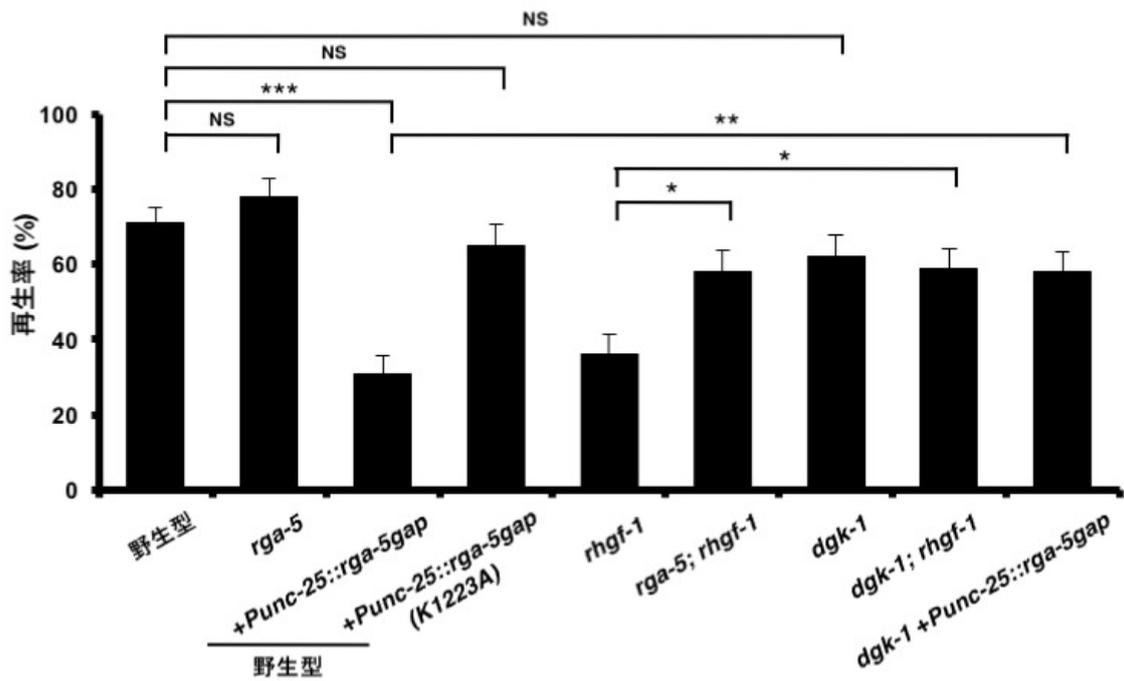


図 24. D 型運動神経における軸索再生

軸索切断24時間後に再生を開始した軸索の割合が示されている。エラーバーは95% 信頼区間を示す。\*\*\* $P < 0.001$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\* $P < 0.05$ 、NS : 有意差なし。

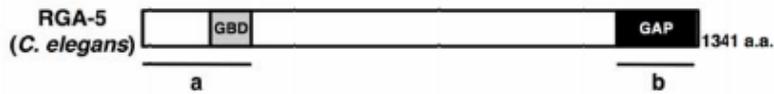


図 25. 哺乳動物の p190 RhoGAP と 線虫 RGA-5 のアミノ酸比較

(a) GTP結合ドメイン (GBD) を含むN端領域、および (b) GAPドメインを示す。同一または類似的なアミノ酸基はそれぞれ黒と灰色で示されている。点線はGBDドメインを示している。アスタリスクはGAP活性に必要な保存されたリジン残基を示している。スケールバーは20  $\mu\text{m}$ 。

野生型

野生型  
+ *Punc-25::rga-5gap*

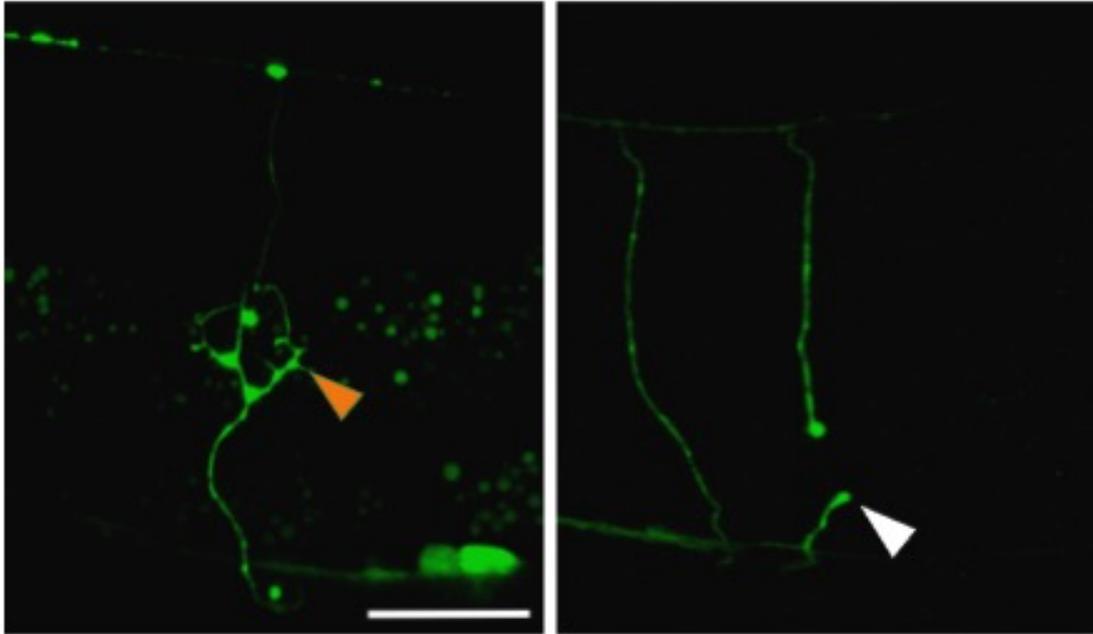


図26. 野生型と野生型にRGA-5 GAPドメインを多量発現したときのD型運動神経における軸索再生

赤い矢尻は野生型において再生した軸索の成長円錐を示している。白い矢尻はRGA-5のGAPドメインを過剰発現したときの再生しなかった基部の軸索を示している。スケールバーは20  $\mu\text{m}$ 。

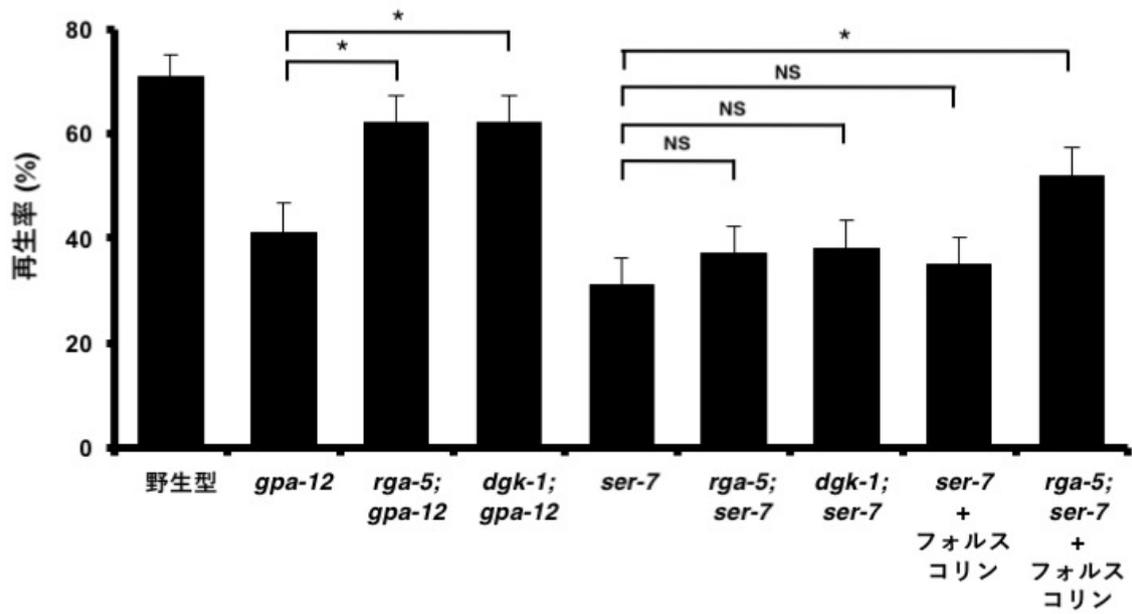


図 27. D 型運動神経における軸索再生

軸索切断24時間後に再生を開始した軸索の割合が示されている。エラーバーは95% 信頼区間を示す。\* $P < 0.05$ 、NS : 有意差なし。

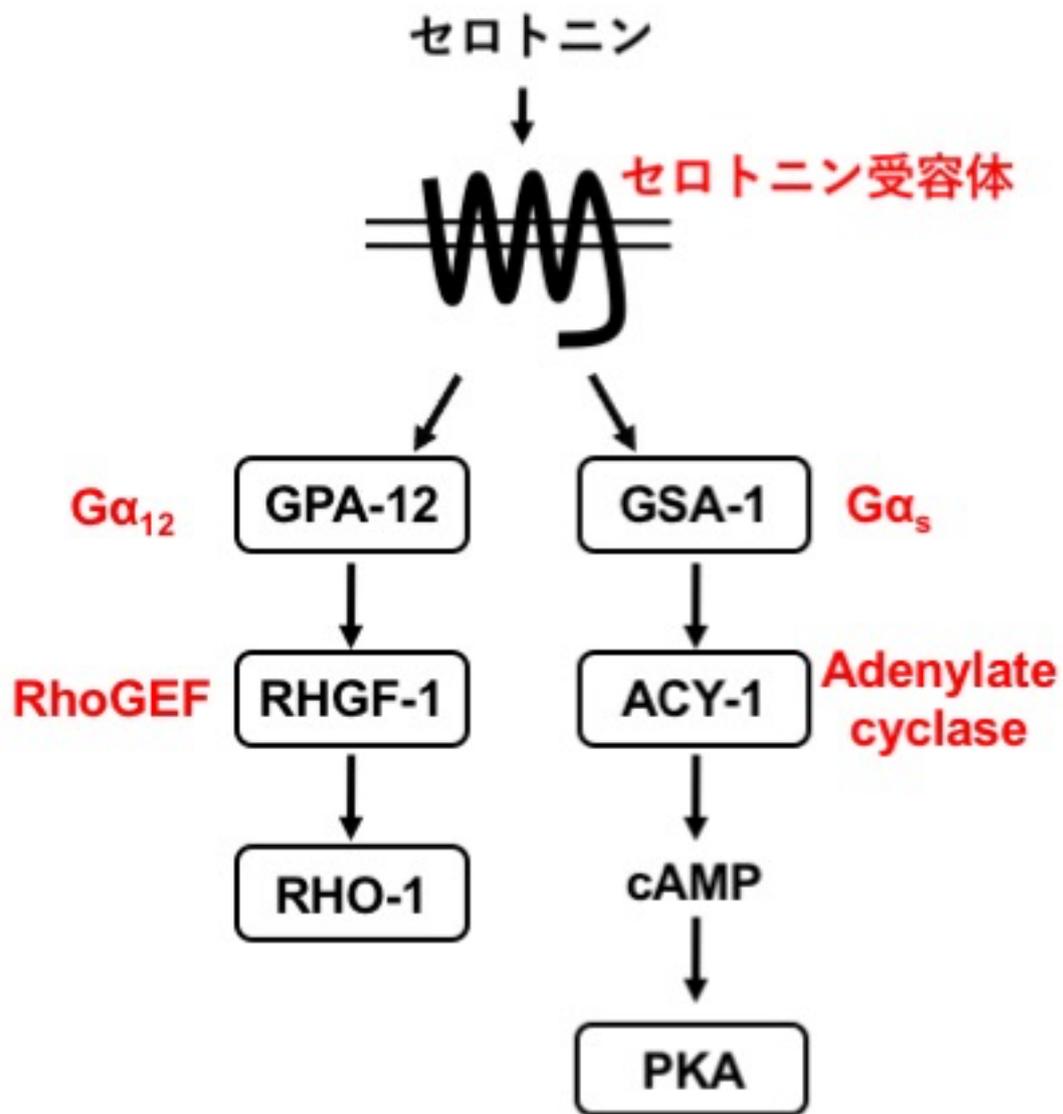


図28. SER-7シグナル伝達経路

SER-7は GPA-12-RHGF-1-RHO-1 経路と GSA-1-ACY-1-PKA 経路の両方を活性化する。

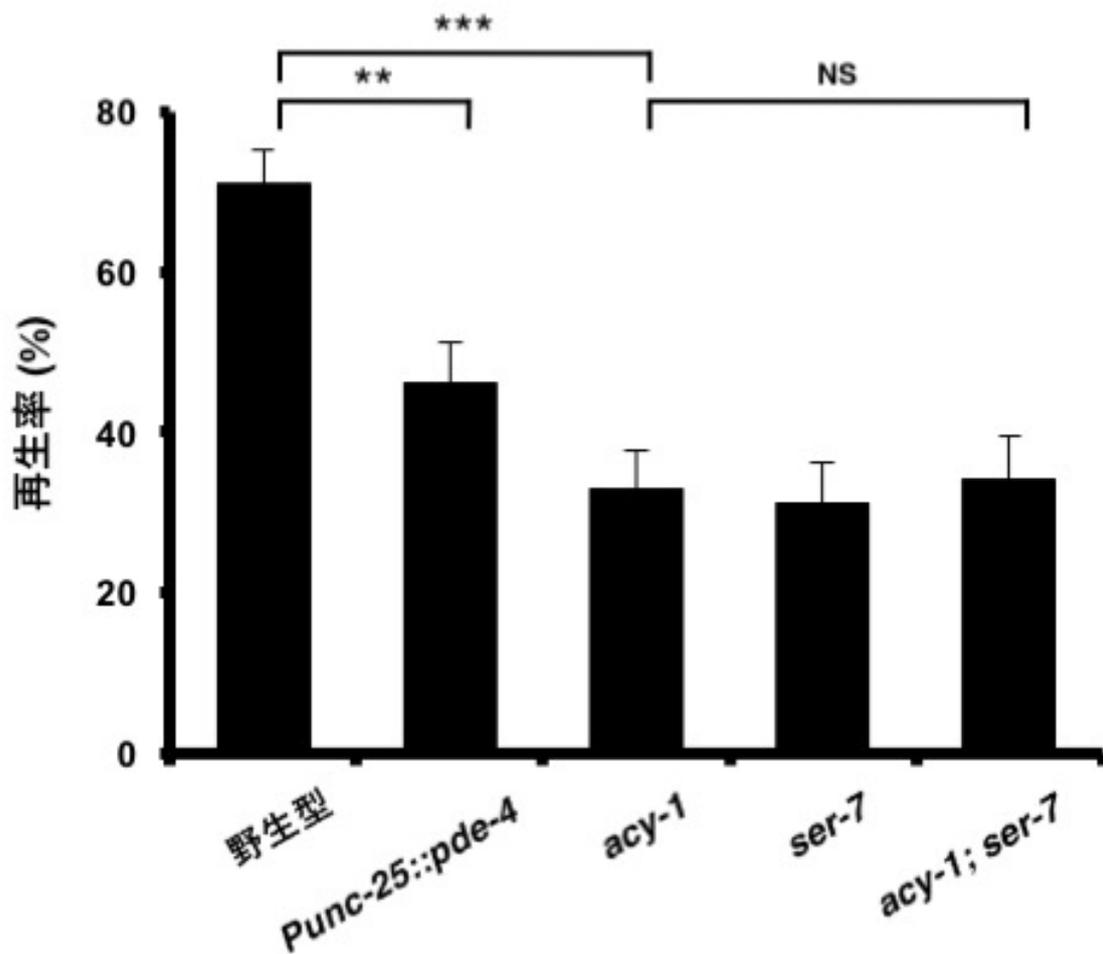


図 29. D型運動神経における軸索再生

軸索切断24時間後に再生を開始した軸索の割合が示されている。エラーバーは95% 信頼区間を示す。\*\*\* $P < 0.001$ 、\*\* $P < 0.01$ 、NS：有意差なし。

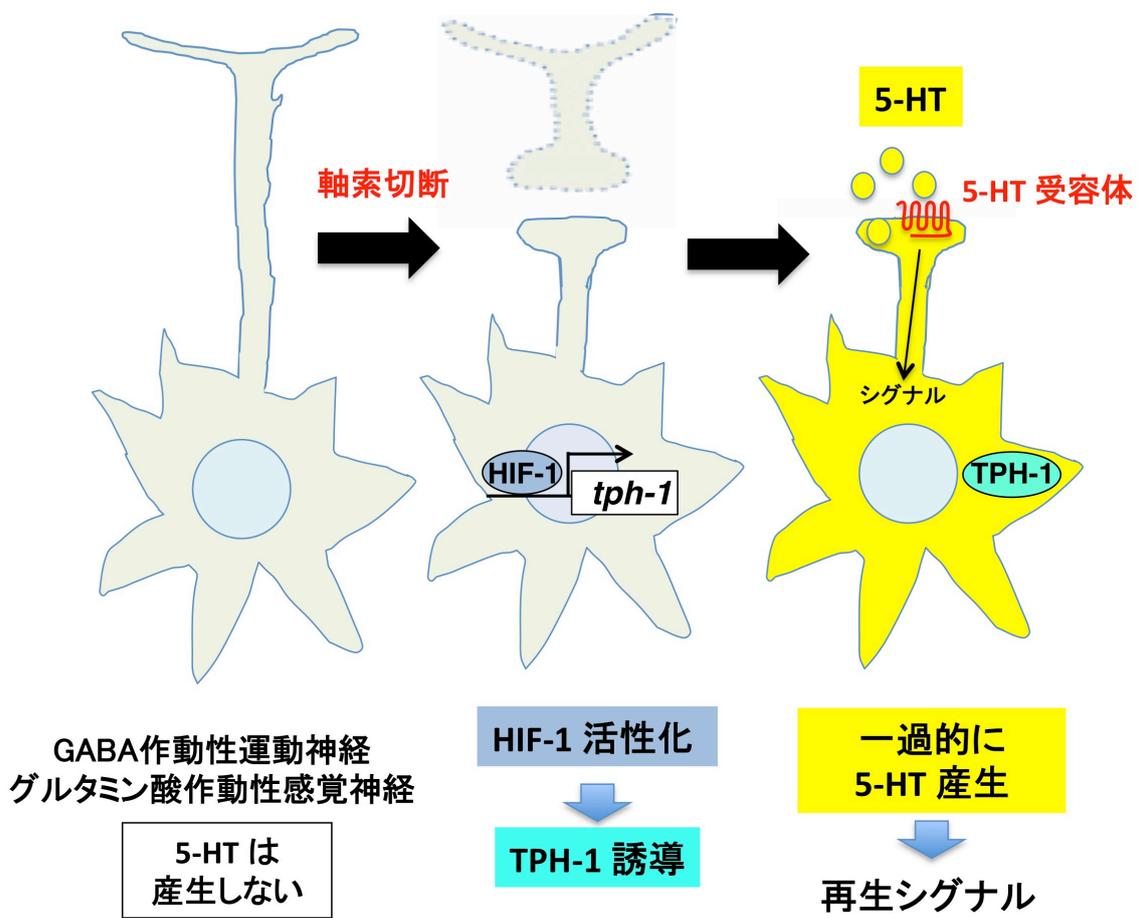


図 30. 神経軸索切断によるセロトニン産生誘導の模式図

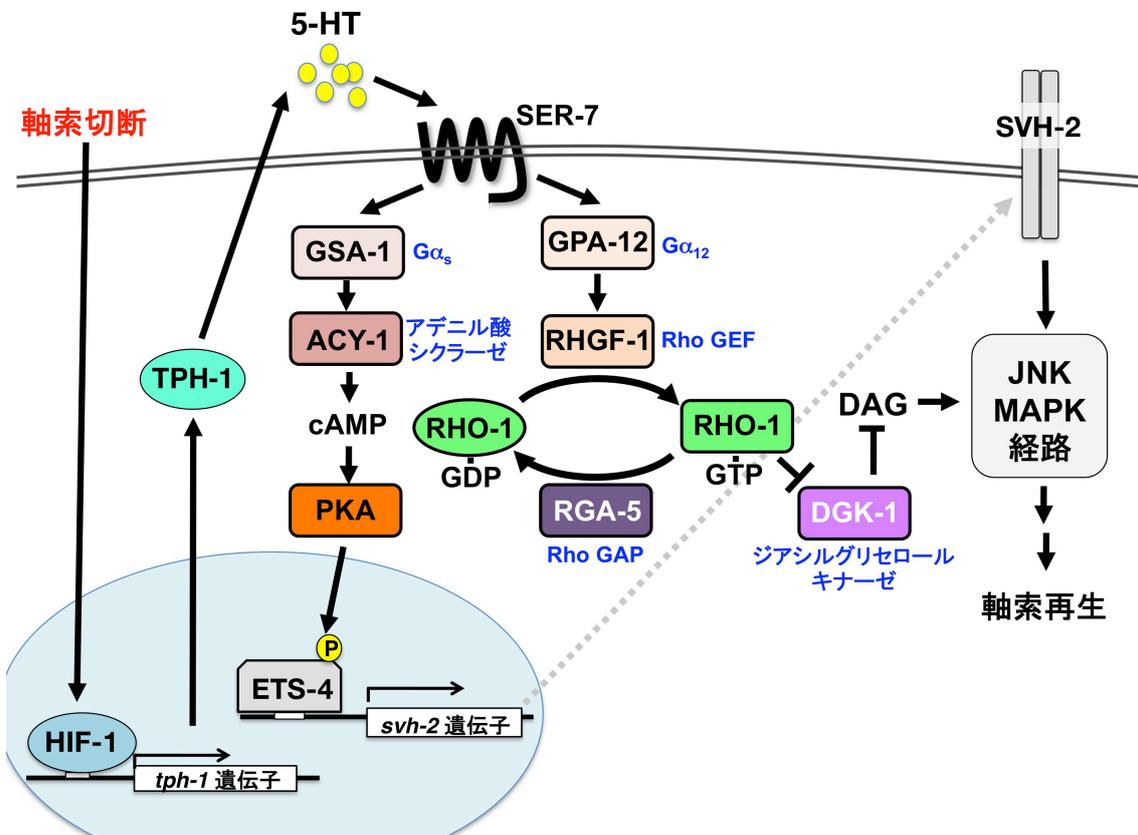


図 31. HIF-1-セロトニンシグナルによる神経軸索再生制御の模式図

表 1. 実験に用いた線虫系統

系統名	遺伝子型
KU1343	<i>muls32 II</i> .
KU1344	<i>tph-1(mg280) muls32 II</i> .
KU501	<i>juls76 II</i> .
KU1317	<i>tph-1(mg280) juls76 II</i> .
KU1329	<i>tph-1(n4622) juls76 II</i> .
KU1319	<i>tph-1(mg280) juls76 II; kmEx1307</i> .
KU1330	<i>tph-1(mg280) juls76 II; kmEx1310</i> .
KU1331	<i>tph-1(mg280) juls76 II; kmEx1311</i> .
KU1320	<i>tph-1(mg280) juls76 II; kySi56</i> .
KU1321	<i>tph-1(mg280) juls76 II; kySi56; kyEx4077</i> .
KU1322	<i>tph-1(mg280) juls76 II; kySi56; kyEx4057</i> .
KU1323	<i>tph-1(mg280) juls76 II; kySi56; kyEx4107</i> .
KU1324	<i>tph-1(mg280) juls76 II; kySi56; kmEx1308</i> .
KU1325	<i>zdls13 IV; kmEx1309</i>
KU1326	<i>zdls13 IV; hif-1(ia4) V; kmEx1309</i>
KU1345	<i>wpls36 I; zdls13 IV</i> .
KU1346	<i>wpls36 I; zdls13 IV; hif-1(ia4) V</i> .
KU1327	<i>juls76 II; hif-1(ia4) V</i> .
KU1332	<i>juls76 II; hif-1(ok2564) V</i> .
KU1347	<i>muls32 II; hif-1(ia4) V</i> .
KU1313	<i>juls76 II; ser-1(ok345)X</i> .
KU1314	<i>juls76 II; ser-7(tm1325)X</i> .
KU1333	<i>juls76 II; ser-7(tm1548)X</i> .
KU1315	<i>juls76 II; ser-7(tm1325)X; kmEx1304</i> .
KU1316	<i>juls76 II; ser-7(tm1325)X; kmEx1305</i> .
KU1310	<i>juls76 II; gpa-12(pk322)X</i> .
KU1334	<i>juls76 II; gpa-12(gk766855)X</i> .
KU1335	<i>juls76 II; ser-7(tm1325) gpa-12(pk322)X</i> .
KU1303	<i>juls76 II; rhgf-1(ok880)X</i> .

KU1336 *juls76 II; rhgf-1 (gk217)X.*  
KU1304 *juls76 II; rhgf-1 (ok880)X; kmEx1302.*  
KU1305 *juls76 II; rhgf-1 (ok880)X; kmEx1303.*  
KU1301 *juls76 II; rga-5(ok2241)IV.*  
KU1302 *juls76 II; kmEx1301.*  
KU1337 *juls76 II; kmEx1312.*  
KU1306 *juls76 II; rga-5(ok2241)IV; rhgf-1 (ok880)X.*  
KU1307 *juls76 II; dgk-1 (ok1462)X.*  
KU1308 *juls76 II; dgk-1 (ok1462) rhgf-1 (ok880)X.*  
KU1309 *juls76 II; dgk-1 (ok1462)X; kmEx1301.*  
KU1311 *juls76 II; rga-5(ok2241)IV; gpa-12 (pk322)X.*  
KU1312 *juls76 II; gpa-12 (pk322) dgk-1 (ok1462)X.*  
KU1338 *juls76 II; rga-5(ok2241)IV; ser-7 (tm1325)X.*  
KU1339 *juls76 II; ser-7 (tm1325) dgk-1 (ok1462)X.*  
KU1340 *juls76 II; kmEx1306.*  
KU1341 *juls76 II; acy-1 (nu329) III.*  
KU1342 *juls76 II; acy-1 (nu329) III; ser-7 (tm1325)X.*  
KU1328 *zdls13 IV; wdEx848.*  
KU1348 *zdls13 IV; hif-1 (ia4) V; wdEx848.*  
KU1349 *wpls36 I; zdls13 IV; vhl-1 (ok161) X.*  
KU1350 *wpls36 I; zdls13 otls197 IV.*

---

表 2. PLM 神経の再生長

系統名	遺伝子型	虫の数	軸索 の数	再生長 ( $\mu\text{m} \pm$ SEM)	P 値
KU1343	<i>muls32</i>	32	32	79.2 $\pm$ 4.6	-
KU1344	<i>tph-1(mg280) muls32</i>	30	30	51.8 $\pm$ 4.1	<0.001
KU1347	<i>hif-1(ia4); muls32</i>	30	30	56.2 $\pm$ 4.7	<0.001

表 3. D 型運動神経の再生率

系統名	遺伝子型	虫の 数	軸索 の数	再生数 (%)	P 値
KU501	<i>juls76</i>	58	78	55 (71%)	-
KU1317	<i>tph-1 (mg280) juls76</i>	25	53	18 (34%)	<0.001
KU1329	<i>tph-1 (n4622) juls76</i>	26	52	18 (35%)	<0.001
KU1317	<i>tph-1 (mg280) juls76 + serotonin</i>	29	60	36 (60%)	0.0081 <sup>e</sup>
KU1319	<i>tph-1 (mg280) juls76; Punc-25::tph-1</i>	23	52	30 (58%)	0.019 <sup>e</sup>
KU1330	<i>tph-1 (mg280) juls76; Pmec-7::tph-1</i>	27	52	25 (48%)	0.17 <sup>e</sup>
KU1331	<i>tph-1 (mg280) juls76; Psrh-142::tph-1</i>	24	51	18 (35%)	1.0 <sup>e</sup>
KU1320	<i>tph-1 (mg280) juls76; floxed tph-1</i>	28	59	37 (63%)	0.0027 <sup>e</sup>
KU1321	<i>tph-1 (mg280) juls76; floxed tph-1; Psrh-142::nls-cre</i>	23	50	28 (56%)	0.56 <sup>f</sup>
KU1322	<i>tph-1 (mg280) juls76; floxed tph-1; Pceh-2::nls-cre</i>	24	52	35 (67%)	0.69 <sup>f</sup>
KU1323	<i>tph-1 (mg280) juls76; floxed tph-1; Pegl-6::nls-cre</i>	24	50	32 (64%)	1.0 <sup>f</sup>
KU1324	<i>tph-1 (mg280) juls76; floxed tph-1; Punc-25::nls-cre</i>	24	50	19 (38%)	0.013 <sup>f</sup>
KU1327	<i>hif-1 (ia4); juls76</i>	24	51	19 (37%)	<0.001
KU1332	<i>hif-1 (ok2564); juls76</i>	28	50	13 (26%)	<0.001
KU1327	<i>hif-1 (ia4); juls76 + serotonin</i>	31	64	38 (59%)	0.024 <sup>g</sup>
KU1313	<i>ser-1; juls76</i>	27	50	31 (62%)	0.34
KU1314	<i>ser-7 (tm1325); juls76</i>	34	52	16 (31%)	<0.001
KU1333	<i>ser-7 (tm1548); juls76</i>	30	53	16 (30%)	<0.001
KU1314	<i>ser-7 (tm1325); juls76 + serotonin</i>	26	55	26 (47%)	0.11 <sup>d</sup>
KU1315	<i>ser-7 (tm1325); juls76; Punc-25::ser-7</i>	21	52	27 (52%)	0.046 <sup>d</sup>
KU1316	<i>ser-7 (tm1325); juls76; Pmec-7::ser-7</i>	25	52	18 (35%)	0.84 <sup>d</sup>
KU1310	<i>gpa-12 (pk322); juls76</i>	33	51	21 (41%)	0.0017
KU1334	<i>gpa-12 (gk766855); juls76</i>	30	52	16 (31%)	<0.001
KU1335	<i>ser-7 (tm1325) gpa-12 (pk322); juls76</i>	22	51	19 (37%)	0.84 <sup>c</sup>
KU1303	<i>rhgf-1 (ok880); juls76</i>	30	55	20 (36%)	<0.001

KU1336	<i>rhgf-1 (gk217); juls76</i>	29	52	18 (35%)	<0.001
KU1304	<i>rhgf-1 (ok880); juls76; Punc-25::rho-1 (G14V)</i>	32	50	33 (66%)	0.0033 <sup>a</sup>
KU1305	<i>rhgf-1 (ok880); juls76; Punc-25::rho-1 (T19N)</i>	29	63	20 (32%)	0.70 <sup>a</sup>
KU1301	<i>rga-5; juls76</i>	25	50	39 (78%)	0.41
KU1302	<i>juls76; Punc-25::rga-5gap</i>	33	59	18 (31%)	<0.001
KU1337	<i>juls76; Punc-25::rga-5gap (K1223A)</i>	24	52	34 (65%)	0.57
KU1306	<i>rga-5; rhgf-1 (ok880); juls76</i>	35	50	29 (58%)	0.032 <sup>a</sup>
KU1307	<i>dgk-1; juls76</i>	28	50	31 (62%)	0.34
KU1308	<i>dgk-1 rhgf-1 (ok880); juls76</i>	36	61	36 (59%)	0.017 <sup>a</sup>
KU1309	<i>dgk-1; juls76; Punc-25::rga-5gap</i>	29	59	34 (58%)	0.0052 <sup>b</sup>
KU1311	<i>rga-5; gpa-12 (pk322); juls76</i>	29	60	37 (62%)	0.037 <sup>c</sup>
KU1312	<i>gpa-12 (pk322) dgk-1; juls76</i>	33	60	37 (62%)	0.037 <sup>c</sup>
KU1338	<i>rga-5; ser-7 (tm1325); juls76</i>	32	59	22 (37%)	0.55 <sup>d</sup>
KU1339	<i>ser-7 (tm1325) dgk-1; juls76</i>	27	52	20 (38%)	0.54 <sup>d</sup>
KU1314	<i>ser-7 (tm1325); juls76 +forskolin</i>	30	62	22 (35%)	0.69 <sup>d</sup>
KU1338	<i>rga-5; ser-7 (tm1325); juls76 +forskolin</i>	26	62	32 (52%)	0.036 <sup>d</sup>
KU1340	<i>juls76; Punc-25::pde-4</i>	31	61	28 (46%)	0.0051
KU1341	<i>acy-1; juls76</i>	32	64	21 (33%)	<0.001
KU1342	<i>acy-1; ser-7 (tm1325); juls76</i>	22	50	17 (34%)	1.0 <sup>h</sup>

(コントロール)

a: KU1303, b: KU1302, c: KU1310, d: KU1314, e: KU1317, f: KU1320, g: KU1327, h: KU1341

## 副論文

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

(軸索切断によって誘導された HIF–セロトニン  
シグナル軸は線虫の神経軸索再生を制御する)

ARTICLE

Received 7 Apr 2015 | Accepted 5 Dec 2015 | Published 21 Jan 2016

DOI: 10.1038/ncomms10388

OPEN

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

Tanimul Alam<sup>1,\*</sup>, Hiroki Maruyama<sup>1,\*</sup>, Chun Li<sup>1</sup>, Strahil Iv. Pastuhov<sup>1</sup>, Paola Nix<sup>2</sup>, Michael Bastiani<sup>2</sup>, Naoki Hisamoto<sup>1</sup> & Kunihiro Matsumoto<sup>1</sup>

The molecular mechanisms underlying the ability of axons to regenerate after injury remain poorly understood. Here we show that in *Caenorhabditis elegans*, axotomy induces ectopic expression of serotonin (5-HT) in axotomized non-serotonergic neurons via HIF-1, a hypoxia-inducible transcription factor, and that 5-HT subsequently promotes axon regeneration by autocrine signalling through the SER-7 5-HT receptor. Furthermore, we identify the *rhgf-1* and *rga-5* genes, encoding homologues of RhoGEF and RhoGAP, respectively, as regulators of axon regeneration. We demonstrate that one pathway initiated by SER-7 acts upstream of the *C. elegans* RhoA homolog RHO-1 in neuron regeneration, which functions via G12 $\alpha$  and RHGF-1. In this pathway, RHO-1 inhibits diacylglycerol kinase, resulting in an increase in diacylglycerol. SER-7 also promotes axon regeneration by activating the cyclic AMP (cAMP) signalling pathway. Thus, HIF-1-mediated activation of 5-HT signalling promotes axon regeneration by activating both the RhoA and cAMP pathways.

<sup>1</sup>Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan. <sup>2</sup>Department of Biology, University of Utah, 257 South 1400 East, Salt Lake City, Utah 84112-0840, USA. \* These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to N.H. (email: i45556a@cc.nagoya-u.ac.jp) or to K.M. (email: g44177a@nucc.cc.nagoya-u.ac.jp).

An axon's ability to regenerate after injury depends on both its intrinsic growth capacity and the external environment. Most invertebrate neurons, as well as neurons in the mammalian peripheral nervous system are able to regenerate. Although intrinsic regeneration signals can influence regenerative success, the variables determining a neuron's intrinsic regrowth capacity remain poorly defined at the molecular level. The nematode *Caenorhabditis elegans* has recently emerged as a tractable genetic model for studying neuron regenerative processes<sup>1,2</sup>. Two recent screens have identified candidate genes that may be involved in axon regeneration: Chen *et al.*<sup>3</sup> screened a collection of mutants of *C. elegans*, and Nix *et al.*<sup>4</sup> screened using an RNA interference (RNAi) library. The candidate genes identified include those encoding both growth-promoting and growth-inhibiting factors. Several of these genes have been implicated previously in regeneration and others define new and conserved pathways of interest.

In the present study, we investigate the roles of the *tph-1* and *rga-5* genes in the regulation of axon regeneration. The *tph-1* and *rga-5* genes were identified as candidate genes in a screen of mutants and by an RNAi screen, respectively<sup>3,4</sup>. The *tph-1* gene encodes an enzyme involved in 5-HT biosynthesis<sup>5</sup>, while the *rga-5* gene encodes a homolog of the mammalian p190 Rho GTPase-activating protein. We show that the hypoxia-inducible transcription factor (HIF-1) induces expression of the *tph-1* gene in axotomized neurons, which are not serotonergic. 5-HT subsequently promotes axon regeneration by signalling through the serotonin receptor SER-7. We further demonstrate that the RhoA signalling pathway is important for neuronal regeneration via its ability to inhibit diacylglycerol (DAG) kinase, thus increasing DAG concentrations. These two effects are linked, as *C. elegans* RhoA is activated by SER-7 and by G12 $\alpha$  through RhoGEF encoded by the *rhgf-1* gene. SER-7 is also required for axon regeneration via its ability to activate the cyclic AMP (cAMP) signalling pathway. Thus, HIF-1-mediated activation of 5-HT synthesis and consequent autocrine signalling promotes the neuron regenerative response by activating two separate signalling pathways.

## Results

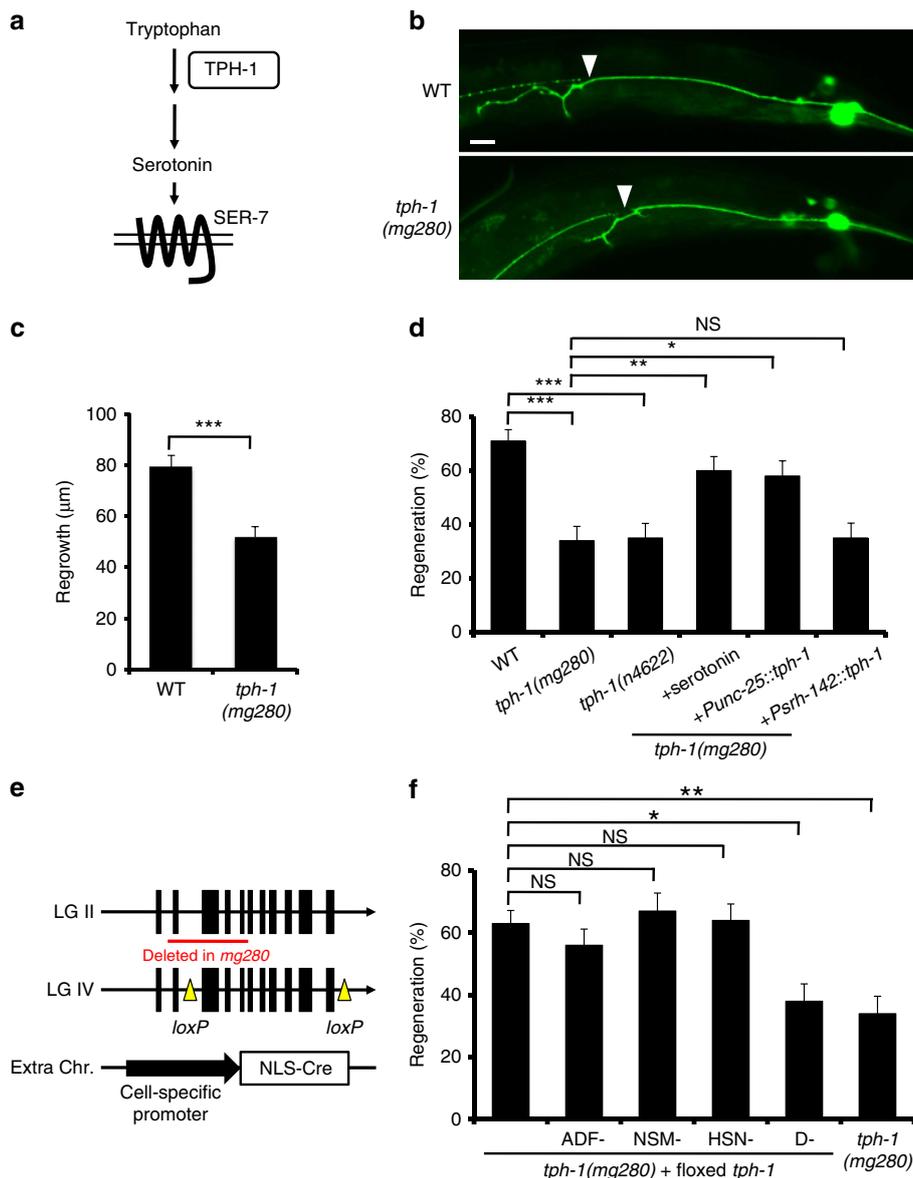
**5-HT is required for axon regeneration.** It has been suggested that axon injury may represent a type of cellular stress. In response to specific types of stress, neurotransmitters are deployed to effect the appropriate physiological and behavioural modifications<sup>6–8</sup>. In *C. elegans*, 5-HT modulates a variety of stress responses<sup>9,10</sup>. However, little is known about how specific types of stress induce 5-HT-mediated signal transduction in the nervous system. Interestingly, Chen *et al.*<sup>3</sup> recently carried out a systematic screen of mutants looking for defects in axon regeneration and identified *tph-1* among several genes that positively regulate axon regeneration in a glutaminergic touch sensory neuron<sup>3</sup>. The *tph-1* gene encodes tryptophan hydroxylase<sup>5</sup>, which is required for 5-HT biosynthesis (Fig. 1a). We confirmed that a loss-of-function mutation (*mg280*) of *tph-1* caused a defect in axon regeneration in touch sensory posterior lateral microtubule (PLM) neurons (Fig. 1b,c and Supplementary Table 1). Furthermore, the *mg280* and *n4622* mutations of *tph-1* were also defective in axon regeneration in GABA-releasing D-type motor neurons (Fig. 1d and Supplementary Table 2). Exogenous 5-HT treatment restored axon regeneration in *tph-1* mutants. These results suggest that 5-HT is generally required during axon regeneration.

We next searched for the 5-HT-producing neurons essential for axon regeneration. To match serotonin levels to the normal range for each neuron, we used a system recently developed by Flavell *et al.*<sup>11</sup> A single floxed copy of the *tph-1* gene, including

the promoter, exons and introns, was inserted into a defined location on chromosome IV (Fig. 1e). This inserted gene was able to rescue the *tph-1* defect in axon regeneration of D-type motor neurons (Fig. 1f and Supplementary Table 2). This was combined with cell-specific transgenes expressing Cre recombinase in amphid sensory neuron, dual cilia, designation F. (ADF), neurosecretory motor neuron (NSM) or hermaphrodite specific neuron (HSN) neurons, which are known to be 5-HT-producing neurons<sup>5</sup>, or in D-type neurons. This system allowed the excision of the inserted *tph-1* gene and elimination of 5-HT production in these individual neurons. We found that the *tph-1* defect was still rescued when Cre was expressed in ADF, NSM or HSN neurons (Fig. 1f and Supplementary Table 2). In contrast, the *tph-1* defect was not rescued when Cre was expressed in D-type motor neurons. Furthermore, expression of *tph-1* in ADF neurons by the *srh-142* promoter was unable to rescue the *tph-1* defect (Fig. 1d and Supplementary Table 2). These results suggest that axon regeneration in D-type motor neurons requires 5-HT production by D neurons. To confirm this, we ectopically expressed *tph-1* in D-type motor neurons in a *tph-1(mg280)* background using the *unc-25* promoter. We found that expression of *tph-1* in D neurons did indeed suppress the defect in axon regeneration of *tph-1* mutants (Fig. 1d and Supplementary Table 2). These results demonstrate that TPH-1 acts to promote regeneration of the damaged neuron in a cell-autonomous manner.

**HIF-1 upregulates 5-HT expression in injured neurons.** The identification of D-type neurons as the 5-HT-producing neurons essential for axon regeneration was unexpected, as D neurons are known to be GABAergic and the expression of 5-HT synthesis enzymes in these neurons has not been found<sup>5,12–14</sup>. We therefore addressed the possibility that axon severing might induce transcription of the *tph-1* gene in D-type neurons. To test this, we monitored expression of the *Ptph-1::gfp* transgene, which consists of the *tph-1* promoter driving the fluorescent protein green fluorescent protein (GFP). We found that expression of *tph-1* was altered in D-type neurons by axon injury. In control animals, *Ptph-1::gfp* was robustly expressed in the head of animals in the NSM and ADF neurons (Supplementary Fig. 1), and was not expressed in D neurons. However, after laser surgery of D-type neurons, *Ptph-1::gfp* expression was strongly upregulated in these neurons (Fig. 2a,b). This expression became visible at 30 min after surgery, and returned to undetectable levels by 24h. Thus, axon injury induces the transient expression of *Ptph-1::gfp* in severed D-type neurons. 5-HT immunofluorescence staining of animals treated with laser surgery also revealed induction of 5-HT expression, compared with control animals (Supplementary Fig. 2). Expression of *Punc-47::mcherry*, which reflects the expression of vesicular GABA transporter, was constant over this time period (Fig. 2a). Therefore, the severed GABAergic neurons still keep the GABAergic characteristics, and do not transdifferentiate into serotonergic, non-GABAergic neurons. Furthermore, axon severing also induced 5-HT and *Ptph-1::gfp* expression in PLM neurons (Supplementary Figs 2 and 3), which are glutamatergic, non-serotonergic touch sensory neurons<sup>15</sup>. Our results demonstrate that axotomized 'non-serotonergic' neurons temporarily gain the ability to synthesize serotonin in response to axon injury.

What determines expression of the ectopic *tph-1* gene in response to axon injury? Interestingly, the promoter region of the *tph-1* gene contains hypoxia response elements, which are binding sites for HIF-1 (ref. 16). The HIF-1 protein is a transcription factor containing a bHLH-PAS domain that mediates transcriptional responses to hypoxic stress<sup>17</sup>. Indeed, it has been demonstrated that HIF-1 binds to the *tph-1* promoter via hypoxia response elements to drive serotonin production

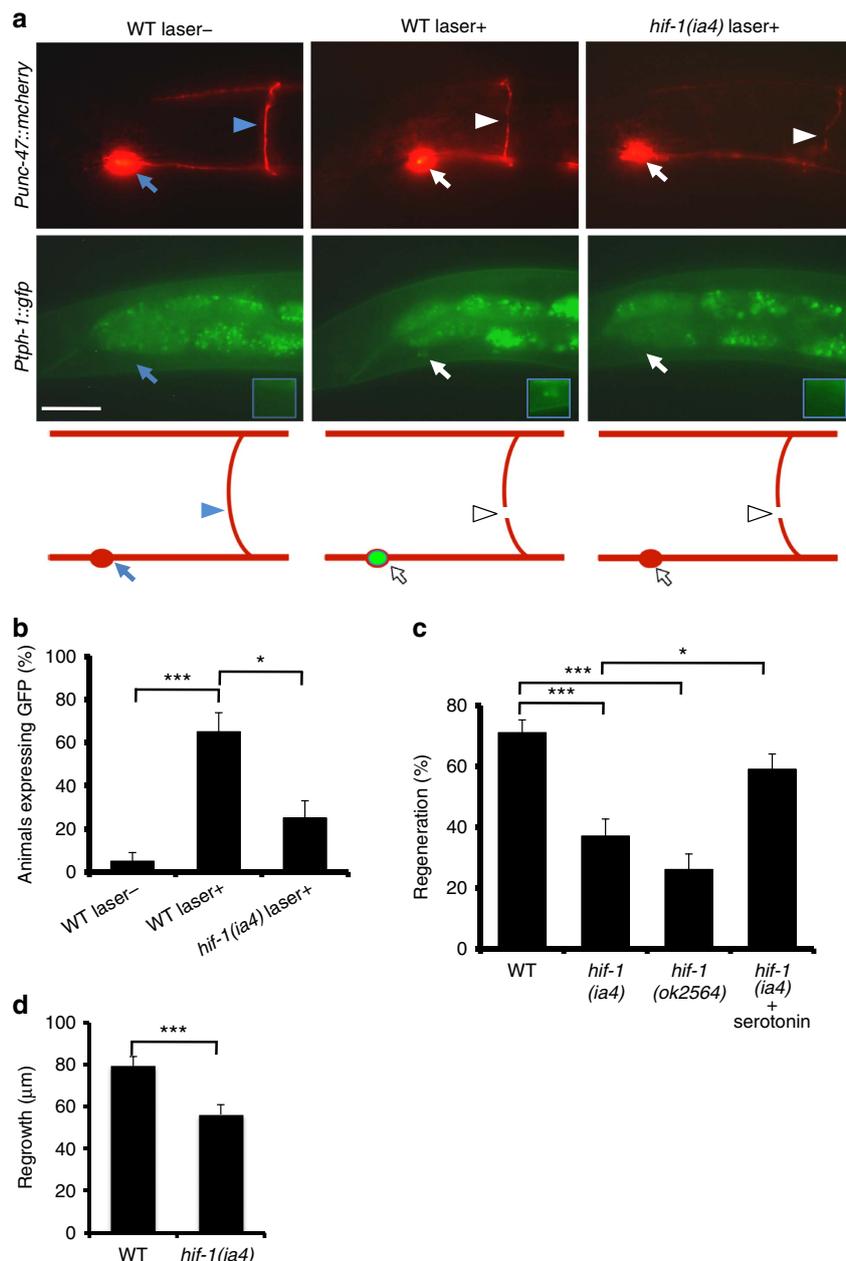


**Figure 1 | Serotonin activates axon regeneration.** (a) The synthesis of serotonin from tryptophan catalyzed by TPH-1. (b) Representative PLM sensory neurons in wild type and *tph-1* mutant animals 24 h after laser surgery. Arrowheads indicate cut sites. Scale bar = 20 µm. (c) Regeneration of PLM sensory neurons. Lengths of PLM regrowth at 24 h after laser surgery are shown. Error bars indicate s.e.m. \*\*\**P* < 0.001 (*n* ≥ 30; unpaired *t*-test, two-tailed and unequal variances). (d,f) Regeneration of D-type motor neurons. Percentages of axons that initiated regeneration 24 h after laser surgery are shown. Error bars indicate 95% CI. \*\*\**P* < 0.001; \*\**P* < 0.01; \**P* < 0.05; NS, not significant (Fisher’s exact test, two-tailed, *n* ≥ 50). (e) Cell-specific deletion of *tph-1* using a Cre-*loxP* recombination system. CI, confidence interval.

under hypoxic conditions in *C. elegans*<sup>16</sup>. We therefore examined whether HIF-1 is involved in *tph-1* expression in response to axon injury. The *hif-1(ia4)* mutation had no effect on expression of *Ptph-1::gfp* in the head of animals (Supplementary Fig. 1) but decreased its induction in response to laser surgery in D-type neurons (Fig. 2a,b), indicating that induction is dependent on HIF-1 function. In addition, expression of *Ptph-1::gfp* in PLM neurons following laser surgery decreased in *hif-1* mutants (Supplementary Fig. 3). Thus, HIF-1 is required for induction of 5-HT expression in injured neurons in response to axon injury.

These results raised the possibility that hypoxic stress might enhance axon regeneration. In normoxic conditions, HIF-1 is degraded through the E3 ubiquitin ligase VHL-1 (von Hippel-Lindau tumour suppressor protein)-dependent degradation pathway<sup>18</sup>. Degradation is initiated through hydroxylation of a specific proline residue in HIF-1 by the oxygen-dependent

prolyl 4-hydroxylase EGL-9 (ref. 18). VHL-1 recognizes the hydroxylated proline and targets HIF-1 for ubiquitin-mediated proteasomal degradation<sup>19</sup>. Hypoxic conditions inhibit the hydroxylation of HIF-1, stabilizing the protein and allowing it to transcriptionally regulate expression of its target genes<sup>19,20</sup>. Thus, stabilization of HIF-1 through removal of the HIF-1 degradatory pathway phenocopies the effects of hypoxia seen in neurons. We examined the effect of HIF-1 stabilization on *tph-1* expression in D-type motor neurons. For this purpose, we used *vhl-1(ok161)* mutants and a mutated form of HIF-1, HIF-1(P621A), in which the proline in the conserved LXXLAP motif required for degradation of HIF-1 has been altered to an alanine<sup>18,21</sup>. As observed previously<sup>16</sup>, the *vhl-1* mutation or expression of HIF-1(P621A) caused constitutive expression of *tph-1* in glutamatergic sensory amphid sensory neuron, single cilia, designation G. (ASG) neurons under



**Figure 2 | HIF-1 positively regulates axon regeneration.** (a) Induction of *Ptp-1::gfp* expression in D-type motor neurons 30 min after laser surgery is shown. A schematic representation of D-type motor neurons is shown on the bottom. Arrowheads and arrows indicate axons and cell bodies of D-type neurons with (white) or without (blue) laser surgery, respectively. D-type neurons are visualized by mCherry under control of the *unc-47* promoter. Cell bodies of D-type neurons are magnified (blue boxes). Scale bar = 20 μm. (b) Percentages of animals expressing *tp-1*. Induction of *Ptp-1::gfp* expression in D-type motor neurons with (+) or without (-) laser surgery was assayed as described in Methods section. Twenty neurons were examined for each condition. Error bars indicate 95% CI. \*\*\* $P < 0.001$ ; \* $P < 0.05$  (Fisher's exact test, two-tailed,  $n = 20$ ). (c) Regeneration of D-type motor neurons. Percentages of axons that initiated regeneration 24 h after laser surgery are shown. Error bars indicate 95% CI. \*\*\* $P < 0.001$ ; \* $P < 0.05$  (Fisher's exact test, two-tailed,  $n \geq 50$ ). (d) Regeneration of PLM sensory motor neurons. Lengths of PLM regrowth at 24 h after laser surgery are shown. Error bars indicate s.e.m. \*\*\* $P < 0.001$  ( $n \geq 30$ ; unpaired *t*-test, two-tailed, unequal variances). CI, confidence interval.

normoxic conditions (Supplementary Figs 1 and 4). Normally, *tp-1* is only weakly expressed under normoxic conditions in these neurons. However, we found that the *vhl-1* mutation or expression of HIF-1(P621A) failed to induce *Ptp-1::gfp* expression constitutively in D neurons (Supplementary Fig. 4). These results suggest that the mechanism that activates HIF-1 in response to axon injury is different from the HIF-1-stabilizing mechanism that is involved in the response to hypoxia.

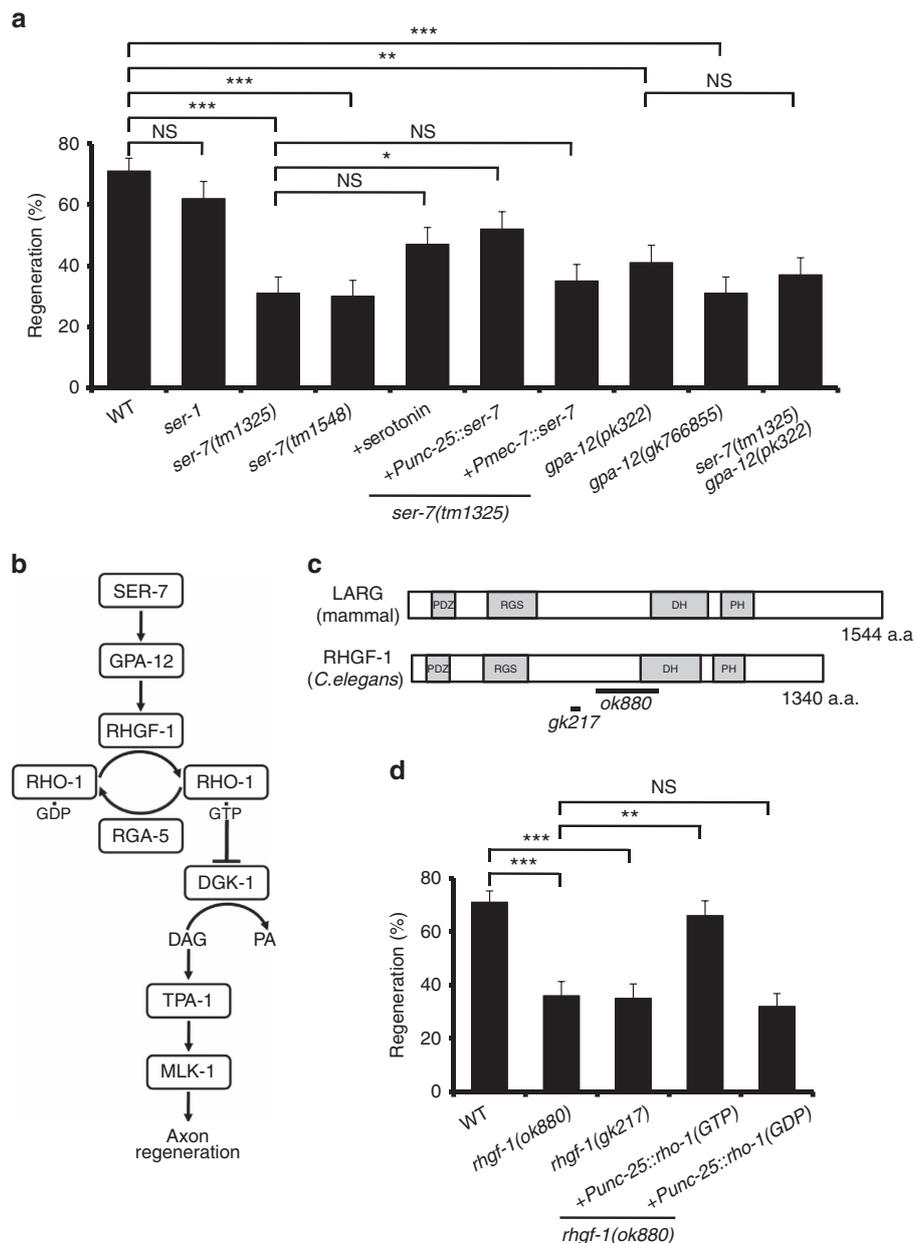
Next, we examined whether HIF-1 is required for 5-HT-driven axon regeneration. We found that the frequency of axon regeneration in D neurons was reduced significantly, in *hif-1(ia4)* and *hif-1(ok2564)* mutants, and was restored by exogenous 5-HT treatment (Fig. 2c and Supplementary Table 2). This is consistent with the possibility that HIF-1 regulates axon regeneration by driving 5-HT production. Furthermore, the *hif-1(ia4)* mutation was also defective in axon regeneration in PLM neurons following laser surgery (Fig. 2d and

Supplementary Table 1). These results suggest that HIF-1 is generally required during axon regeneration.

**SER-7 activates axon regeneration via GPA-12 and RHGF-1.** The biological effects of 5-HT are mediated through its interactions with G protein-coupled receptors<sup>22</sup>. Since SER-7 is one of the 5-HT receptors, we examined whether SER-7 participates in axon regeneration. We found that two mutations (*tm1325* and *tm1548*) in the *ser-7* gene caused defects in axon regeneration (Fig. 3a and Supplementary Table 2). In contrast to *ser-7*, the *ok345* null mutation of *ser-1* encoding another serotonin receptor had no effect on axon regeneration. Thus,

SER-7 plays a specific role in axon regeneration. To test whether SER-7 can act in a cell-autonomous manner, we expressed *ser-7* from the *unc-25* or *mec-7* promoters in *ser-7(tm1325)* mutants. The *ser-7* defect in axon regeneration was rescued by expression of *ser-7* in D-type motor neurons by the *unc-25* promoter but not by expression in sensory neurons by the *mec-7* promoter (Fig. 3a and Supplementary Table 2). These results demonstrate that SER-7 acts to promote regeneration in a cell-autonomous manner in the damaged neuron. Exogenous 5-HT treatment was unable to efficiently suppress the *ser-7* defect (Fig. 3a and Supplementary Table 2).

What functions downstream of SER-7 to regulate axon regeneration? SER-7 is coupled to GPA-12, a *C. elegans*



**Figure 3 | 5-HT-SER-7 signalling activates axon regeneration via GPA-12 and RHGF-1.** (a,d) Percentages of axons that initiated regeneration 24 h after laser surgery. Error bars indicate 95% CI. \*\*\**P* < 0.001; \*\**P* < 0.01; \**P* < 0.05; NS, not significant (Fisher’s exact test, two-tailed, *n* ≥ 50). (b) SER-7 signalling pathway. SER-7 activates the GPA-12-RHGF-1-RHO-1 pathway. Activation of RHO-1 inhibits DGK-1, leading to a stabilization of DAG levels. (c) Structure of RHGF-1. Schematic diagrams of RHGF-1 and its human counterpart are shown. Domains are shown as follows: a PDZ domain, a regulator of G protein signalling domain (RGS), a Dbl homology domain (DH) and a Pleckstrin homology domain (PH). The bold lines underneath indicate the extent of the deleted regions in the *rhgf-1(ok880)* and *rhgf-1(gk217)* mutants.

homologue of the  $\alpha$  subunit of the heterotrimeric G12 protein (Fig. 3b)<sup>23</sup>. We found that the *gpa-12(pk322)* and *gpa-12(gk766855)* mutations significantly reduced axon regeneration after axon injury (Fig. 3a and Supplementary Table 2). To further address whether *ser-7* and *gpa-12* function in the same pathway, we constructed *ser-7(tm1325); gpa-12(pk322)* double mutants. We found that the *gpa-12* mutation did not enhance the axon regeneration defect of *ser-7* mutants (Fig. 3a and Supplementary Table 2), suggesting that SER-7 and GPA-12 function in the same pathway.

In mammals, the RhoGEF LARG protein specifically interacts with G12 $\alpha$  via its regulator of G protein signalling (RGS) domain<sup>24</sup>. *C. elegans* RHGF-1, a homolog of mammalian LARG (Fig. 3c), binds to GPA-12 and acts as a regulator of neurotransmitter release at a subset of cholinergic motor synapses<sup>25,26</sup>. These observations raised the possibility that RHGF-1 may act downstream of GPA-12 in the axon regeneration pathway (Fig. 3b). Indeed, we found that the *rhgf-1(ok880)* and *rhgf-1(gk217)* mutants were defective in axon regeneration (Fig. 3d and Supplementary Table 2). Taken together, these results suggest that SER-7 activates axon regeneration through GPA-12 and RHGF-1.

**RHO-1 activates axon regeneration by inhibiting DGK-1.** The activity of Rho proteins is modulated by their cycling between the active GTP- and inactive GDP-bound states. Rho activity is further regulated by other proteins, including GAPs, which enhance GTP hydrolysis and the consequent inactivation of Rho, and guanine nucleotide exchange factors (GEFs), which promote the binding of GTP and, thus, activation of Rho<sup>27</sup>. RHO-1 also cycles between the GTP-bound active and the GDP-bound inactive forms. To confirm that RHGF-1 acts as a GEF for RHO-1 and to test if it thereby controls axon regeneration, we expressed a mutant RHO-1 that is locked in the GTP-bound state, RHO-1(G14V), in D-type motor neurons using the *unc-25* promoter. We found that expression of RHO-1(G14V) was able to suppress the *rhgf-1* defect in axon regeneration, whereas a GDP-bound RHO-1(T19N) expressed from the *unc-25* promoter was not (Fig. 3d and Supplementary Table 2).

What functions as a RhoGAP in the regulation of axon regeneration? One of the genes identified in our previous RNAi screen in  $\beta$ -spectrin mutant animals (*unc-70*; ref. 28) was *rga-5*, the product of which belongs to the Rho GTPase-activating protein (GAP) family<sup>4</sup>. RGA-5 has an N-terminal GTP binding domain (GBD) and a C-terminal GAP domain. RGA-5 displays strong homology across its GBD and GAP domains to the mammalian p190 RhoGAP (Fig. 4a and Supplementary Fig. 5). Since the GAP domain in p190 RhoGAP is specific for the Rho family of GTPases, particularly RhoA (ref. 29), we expected that RGA-5 would specifically act on RHO-1. To test this prediction, we performed yeast two-hybrid binding assays to test for interactions between RGA-5 and two RHO-1 variants that are locked in the GTP- and GDP-bound states (G14V and T19N, respectively). We found that the RGA-5 GAP domain (1118–1341 amino acids) specifically interacted with the GTP bound, but not GDP-bound version of RHO-1 (Fig. 4b), consistent with the property of GAP proteins to associate with the GTP-bound version of GTPases. The RGA-5 GAP domain failed to bind to GTP-bound CDC-42 or CED-10, two other Rho/Rac family members, demonstrating that the RGA-5-RHO-1 interaction is specific.

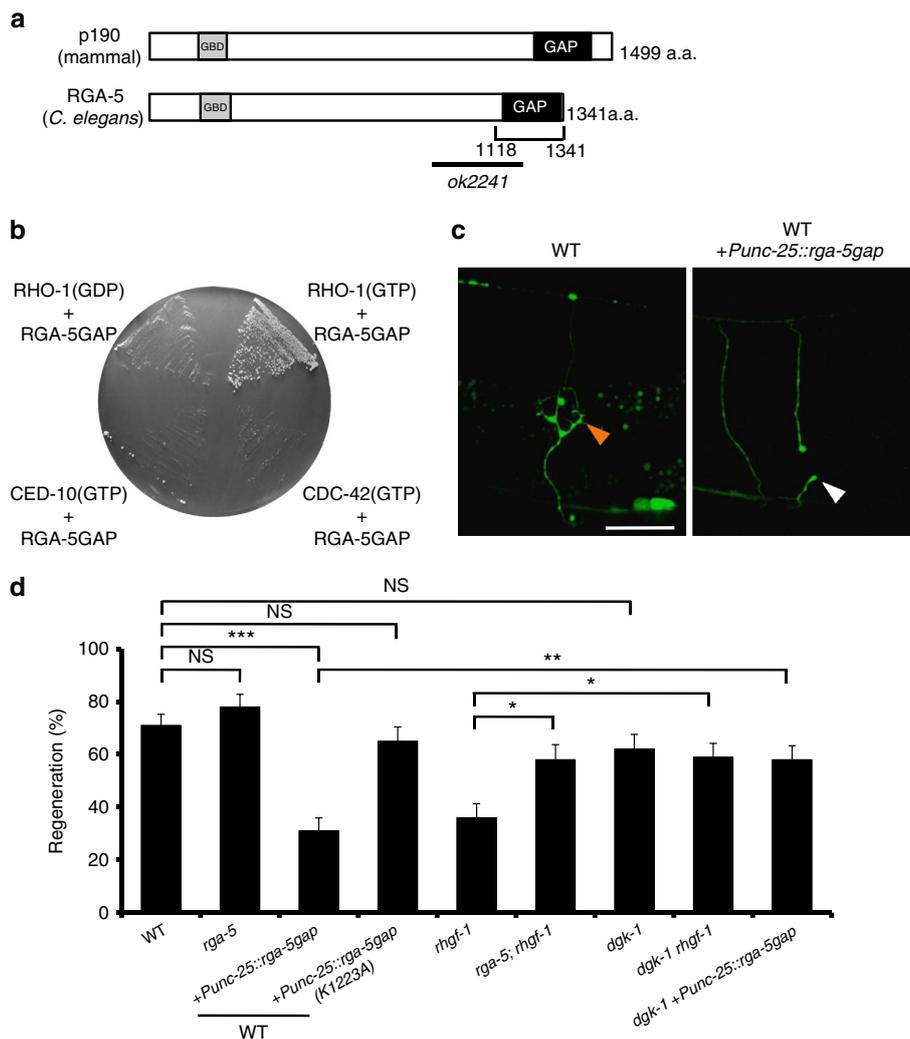
Next, we determined the function of RGA-5 in axon regeneration. First, we examined the *rga-5(ok2241)* mutation, which deletes the GAP domain in RGA-5 (Fig. 4a). After laser surgery, axons in *rga-5(ok2241)* mutant animals regenerated

normally. However, overexpression of the RGA-5 GAP domain reduced regeneration (Fig. 4c,d and Supplementary Table 2). It has been confirmed that the GAP domain of p190 RhoGAP possesses GAP activity and that the conserved Lys-1311 (Lys-1223 in RGA-5) residue is essential for this activity (Supplementary Fig. 5b)<sup>29,30</sup>. Overexpression of the mutant GAP(K1223A), in which the Lys-1223 in the RGA-5 GAP domain was mutated to alanine, did not cause reduced regeneration (Fig. 4d and Supplementary Table 2). These results suggest that the RGA-5 GAP domain stimulates the conversion of RHO-1 to the GDP-bound inactive form, resulting in the inhibition of axon regeneration. In this manner, RGA-5 acts as a potent inhibitor of axon regeneration. We further examined possible genetic interactions between *rga-5* and *rhgf-1*, and found that the *rga-5(ok2241)* mutation was able to suppress the *rhgf-1(ok880)* defect (Fig. 4d and Supplementary Table 2). This can be explained because RHO-1 can still be weakly activated in the absence of its GEF, thus concomitant loss of GAP affects the phenotype.

How does RHO-1 regulate axon regeneration? Mammalian RhoA has been shown to bind and inhibit the DAG kinase DGK $\theta$  (refs 31,32). DAG kinases remove DAG by phosphorylating the membrane-bound secondary messenger DAG, converting it to phosphatidic acid<sup>33,34</sup>, which implicates RhoA in regulating DAG levels<sup>31</sup>. In addition, *C. elegans* RHO-1 is able to bind to DGK-1, the *C. elegans* ortholog of DGK $\theta$  (ref. 35). Thus, DGK-1 is a possible target of negative regulation by RHO-1 (Fig. 3b). If RHO-1 modulates axon regeneration through the inhibition of DGK-1, then we would predict that a *dgk-1* loss-of-function mutation should suppress the regeneration defect by inactivation of RHO-1. As expected, we found that the *dgk-1(ok1462)* null mutation suppressed the defect caused by the *rhgf-1(ok880)* deletion mutation or overexpression of the RGA-5 GAP domain (Fig. 4d and Supplementary Table 2). Our results are most consistent with a signal transduction cascade involving activation of RHO-1, inhibition of DGK-1, and a consequent increase in DAG (Fig. 3b).

**SER-7 promotes axon regeneration via the cAMP pathway.** If the SER-7-GPA-12 pathway acts upstream of RHO-1 to promote axon regeneration, an *rga-5* or *dgk-1* mutation should suppress the defect in axon regeneration seen in *ser-7* and *gpa-12* mutants. As expected, the *rga-5(ok2241)* and *dgk-1(ok1462)* mutations were each able to suppress the *gpa-12* defect (Fig. 5a and Supplementary Table 2). However, in contrast to the *gpa-12* mutation, the *ser-7* defect was not suppressed by the *rga-5(ok2241)* or *dgk-1(ok1462)* mutation (Fig. 5a and Supplementary Table 2). These results suggest that another regulatory pathway exists downstream of SER-7, in addition to the GPA-12-RHO-1 pathway, that is required for axon regeneration.

Since the SER-7 5-HT receptor has also been reported to be coupled to GSA-1 Gs $\alpha$  (Fig. 5b)<sup>23,36</sup>, we hypothesized that an additional pathway of SER-7-mediated axon regeneration could involve the GSA-1 signalling pathway. Since Gs $\alpha$  is coupled to adenylyl cyclase, Gs $\alpha$  signalling can be monitored by intracellular cAMP levels. As observed previously<sup>37</sup>, axon regeneration was inhibited by overexpression of *pde-4*, which encodes a cAMP-phosphodiesterase and reduces intracellular cAMP levels (Fig. 5c and Supplementary Table 2). Furthermore, a loss-of-function mutation of *acy-1*, which encodes adenylyl cyclase, was defective in axon regeneration (Fig. 5c and Supplementary Table 2). These results suggest that activation of GSA-1 signalling is necessary to activate axon regeneration. To confirm that *ser-7* and *acy-1* function in the same pathway, we constructed *ser-7(tm1325); acy-1(nu329)* double mutants. The *ser-7* mutation did not



**Figure 4 | Effect of RhoGAP on axon regeneration.** (a) Structure of RGA-5. Schematic diagrams of RGA-5 and its human counterpart are shown. Domains are shown as follows: a GTP binding domain (GBD) and a Rho GAP domain (GAP). The bold line underneath indicates the extent of the deleted region in the *rga-5(ok2241)* mutant. (b) A two-hybrid assay for the interaction of RGA-5 with RHO-1. The reporter strain PJ69-4A was co-transformed with expression vectors encoding GAL4 DBD-RHO-1 (T19N) (GDP), GAL4 DBD-RHO-1 (G14V) (GTP), GAL4 DBD-CED-10 (G12V) (GTP), GAL4 DBD-CDC-42 (G12V) (GTP) and GAL4 AD-RGA-5 (GAP domain) as indicated. (c) Representative D-type motor neurons in wild-type animals and wild-type animals overexpressing RGA-5 GAP domain 24 h after laser surgery. In wild-type animals, severed axons have regenerated growth cones (orange arrowhead). In wild-type animals overexpressing the RGA-5 GAP domain, the proximal end of axon failed to regenerate (white arrowhead). Scale bar = 20  $\mu$ m. (d) Percentages of axons that initiated regeneration 24 h after laser surgery. Error bars indicate 95% CI. \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ; NS, not significant (Fisher’s exact test, two-tailed,  $n \geq 50$ ). CI, confidence interval.

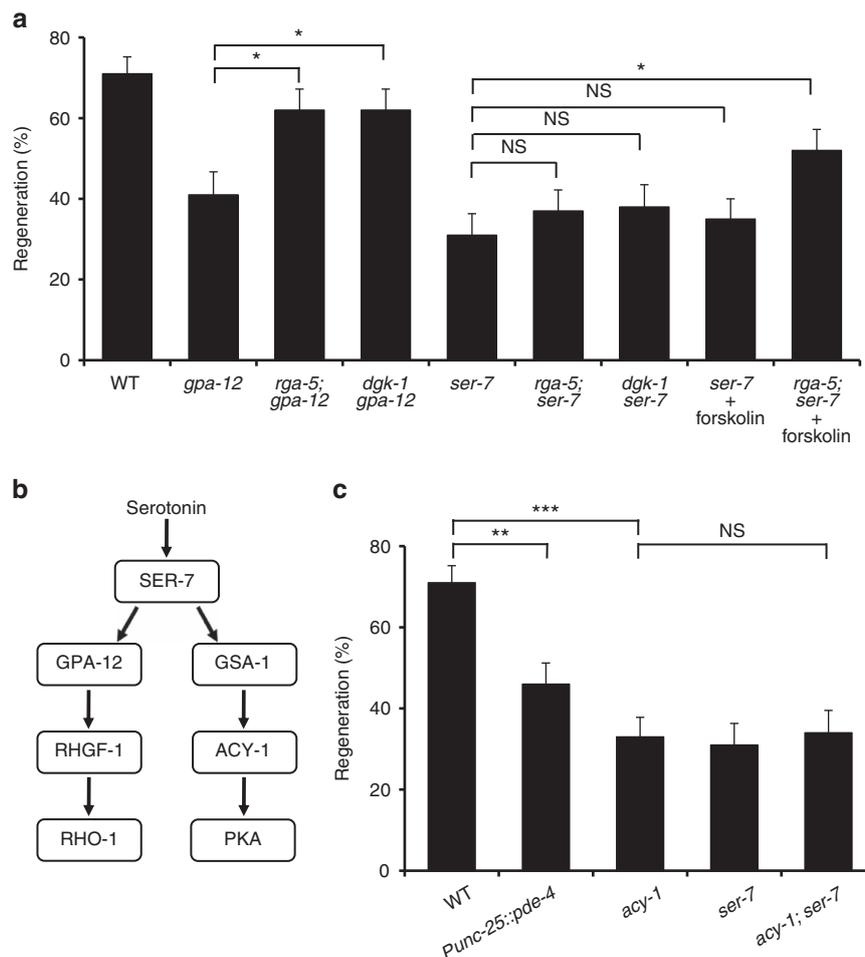
enhance the axon regeneration defect of *acy-1* mutants (Fig. 5c and Supplementary Table 2), supporting the possibility that SER-7 functions in the GSA-1 signalling pathway to activate axon regeneration.

Since SER-7 activates both GPA-12 and GSA-1 signalling pathways (Fig. 5b)<sup>23</sup>, we speculated that activation of both pathways are required for axon regeneration. If so, activation of the GSA-1 signalling pathway should suppress the *ser-7* defect in axon regeneration in a manner dependent on the activation of the GPA-12 signalling pathway. Treatment of animals with forskolin is expected to cause an increase in cAMP levels by activating adenylyl cyclase<sup>37,38</sup>. We found that forskolin treatment failed to suppress the single mutant *ser-7(tm1325)* defect in axon regeneration (Fig. 5a and Supplementary Table 2). However, forskolin treatment was able to suppress the axon regeneration defect in *ser-7; rga-5* double mutants, in which the GPA-12 signalling pathway is activated (Fig. 5a and Supplementary

Table 2). These results suggest that SER-7 activates GPA-12 and GSA-1, which act in concert to activate axon regeneration.

**Discussion**

The neurotransmitter 5-HT plays multiple roles in the enteric, peripheral and central nervous system, and its most prominent biological function is as a messenger transmitting signals from pre- to post-synaptic neurons. However, 5-HT has been reported to play other roles, such as the regulation of neurite growth<sup>39,40</sup>, suggesting that 5-HT also plays a prominent role in regulating the neuronal cytoarchitecture<sup>41,42</sup>. In *C. elegans*, 5-HT modulates cognitive behaviours such as chemosensation, learning and memory in addition to a variety of stress responses<sup>10,13,16</sup>. Here our results demonstrate that *C. elegans* 5-HT is synthesized in axotomized ‘non-serotonergic’ neurons and is required for axon regeneration. This effect is likely due to a direct action of 5-HT on



**Figure 5 | SER-7 promotes axon regeneration via the cAMP pathway. (a,c)** Percentages of axons that initiated regeneration 24 h after laser surgery. Error bars indicate 95% CI. \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ; NS, not significant (Fisher's exact test, two-tailed,  $n \geq 50$ ). **(b)** SER-7 signalling pathways. SER-7 activates both GPA-12-RHGF-1-RHO-1 and GSA-1-ACY-1-PKA pathways.

injured neurons through the SER-7 5-HT receptor, which activates axon regeneration in a cell-autonomous manner.

Neurons are known to be able to produce distinct sets of neurotransmitters<sup>43</sup>, and some studies have shown that certain stimuli can induce neurotransmitter switching<sup>44,45</sup>. In mammals, leukaemia inhibitory factor and ciliary neurotrophic factor have been shown to induce the differentiation of developing peripheral sympathetic neurons, which normally release noradrenaline, into cholinergic neurons<sup>46,47</sup>. Another study revealed that the balance of the two hippocampal granule cell neurotransmitters, glutamate and GABA, changes during post-embryonic development, as well as with seizures and long-term potentiation<sup>48</sup>. Recently, Dulcis *et al.*<sup>49</sup> reported that the neurotransmitters produced by hypothalamic neurons switch between dopamine and somatostatin in response to photoperiod stimuli. Although these studies were largely carried out using populations of neuronal cells that could include different types of cells such as reserve pool neurons, they indicate that neurotransmitter production varies dynamically in neurons. Our findings in *C. elegans* demonstrate that a single, differentiated GABAergic D-type motor neuron or glutamatergic PLM sensory neuron that is never serotonergic under standard laboratory conditions can be induced to produce 5-HT as a result of axotomy in a manner dependent on HIF-1. This represents a novel case in which a switch in neurotransmitter expression can be regulated. Hypoxia also stimulates expression of 5-HT via HIF-1 in glutamatergic

ASG neurons<sup>16,50</sup>. However, stabilization of HIF-1, which phenocopies the hypoxia-induced neuronal effects, is sufficient to induce *tph-1* expression in ASG neurons, but not in D or PLM neurons. Therefore, HIF-1-dependent *tph-1* expression in severed neurons is regulated by a mechanism different from the HIF-1-stabilizing mechanism.

In mammals, the expression and stability of HIF-1, as well as the expression of its target genes, are all increased after spinal cord injury<sup>51,52</sup>. Thus, activation of HIF-1 by axotomy may be conserved among animals. Furthermore, the HIF-induced upregulation of 5-HT in specific regions of the vertebrate brain<sup>53</sup> suggests that the mechanisms coupling axon regeneration and 5-HT signalling to produce an alteration in neuronal responses may be conserved among animals. Therefore, it would be interesting to know whether axotomy of vertebrate neurons also stimulates expression of 5-HT or other neurotransmitters that influence regeneration. The inability of axons to regenerate in the adult mammalian central nervous system is a major problem in a number of diseases, and understanding the multi-functional roles of 5-HT signalling on neurite growth may lead to the development of novel neuroregenerative therapies by targeting serotonin-regulated signalling pathways.

The biological effects of 5-HT are mediated through interactions with G protein-coupled receptors<sup>22</sup>. Here we have shown that the activated SER-7 5-HT receptor promotes axon

regeneration in injured neurons by activating G12 $\alpha$  and G $\alpha$  signalling pathways in a cell-autonomous manner. How do G12 $\alpha$  and G $\alpha$  signalling cascades activate axon regeneration? Several studies suggested that DAG and cAMP act downstream of the G12 $\alpha$  and G $\alpha$  cascades, respectively<sup>54–57</sup>. In mammals, G12 $\alpha$  activates an RGS-containing RhoGEF, which in turn activates RhoA. Several lines of evidence suggest that this pathway also acts within *C. elegans* motor neurons<sup>26</sup>. The axon regeneration pathway is regulated by both of these components acting in the G12 $\alpha$  pathway, as either a mutation in *rhgf-1* encoding the RGS-containing RhoGEF or inactivation of RHO-1 by RhoGAP RGA-5 inhibits axon regeneration. In addition, RHO-1 activation is able to suppress the defect in axon regeneration caused by the *gpa-12* mutation. Thus, the genetic data support a model in which the G12 $\alpha$ -RhoGEF-RhoA signalling pathway is conserved in the control of axon regeneration in *C. elegans*. Consistent with this, GPA-12 and RHGF-1 are both expressed in motor neurons and physically interact<sup>25</sup>. In *C. elegans*, activated RHO-1 causes an increase in DAG by directly binding to and inhibiting DGK-1 (ref. 35). High levels of DAG activate the PKC homolog TPA-1, leading to activation of the JNK pathway by phosphorylation of MLK-1 MAPKKK<sup>58</sup>. These results raise the possibility that the G12 $\alpha$  pathway activates axon regeneration by inducing an increase in DAG, resulting in the activation of the JNK pathway.

The G $\alpha$  cascade involves the activation of adenylyl cyclase by G $\alpha$ , and the consequent increase in cAMP production leads to the activation of PKA. Our recent results suggest that in response to axon injury, PKA upregulates transcription of the *svh-2* gene, which encodes a growth factor receptor functioning in the JNK pathway<sup>59,60</sup>. Thus, one effector of the G $\alpha$  pathway that stimulates axon regeneration is a transcription factor that activates transcription of the *svh-2* gene, resulting in activation of the JNK pathway. However, the G $\alpha$  pathway likely has additional targets. Taken together, these results suggest that the G12 $\alpha$  and G $\alpha$  pathways converge to activate the JNK pathway in axon regeneration.

## Methods

**C. elegans strains.** *C. elegans* strains used in this study are listed in Supplementary Table 3. All strains were maintained on nematode growth medium (NGM) plates and fed with bacteria of the OP50 strain, as described previously<sup>61</sup>.

**Plasmids.** *Punc-25::tph-1* was made by inserting the *tph-1* cDNA isolated from a cDNA library by PCR into the pSC325 vector. *Psrh-142::tph-1* was made by replacing an NLS-Cre cDNA fragment of *Psrh-142::nls-cre* plasmid<sup>11</sup> (Gift from Dr Cori Bargmann) with a *tph-1* cDNA fragment. *Punc-25::nls-cre* was generated by inserting NLS-Cre cDNA (Addgene) into the pSC325 vector. *Punc-47::mcherry* was generated by replacing the *gfp* DNA of the pOKU64 vector (*Punc-47::gfp*, a gift from Dr Ikue Mori) with the mCherry cDNA (DNA2.0). *Punc-25::ser-7* and *Pmec-7::ser-7* were made by inserting the *ser-7* cDNA isolated from a cDNA library by PCR into the pSC325 and pPD52.102 vectors, respectively. *Punc-25::rho-1* was generated by inserting the *rho-1* cDNA, provided from Dr Kozo Kaibuchi (Nagoya University, JAPAN), into the pSC325 vector. *Punc-25::rho-1 (G14V)* and *Punc-25::rho-1 (T19N)* were made by oligonucleotide-directed PCR using *Punc-25::rho-1* as a template and the mutations were verified by DNA sequencing. The *Punc-25::rga-5gap* plasmid contains the GAP domain of *rga-5* cDNA isolated from a cDNA library by PCR using oligonucleotides 5'-gtcagCATGAAGAA CAAAGTGCAACTCATGATC-3' and 5'-ccatGGCCCGATAATTATCCACG TCATAG-3', inserted into the pSC325 vector. The *Punc-25::rga-5gap(K1223A)* was made by oligonucleotide-directed PCR using *Punc-25::rga-5gap* as a template and the mutation was verified by DNA sequencing. *Punc-25::pde-4* was generated by inserting the *pde-4* cDNA isolated from a cDNA library into the pSC325 vector. The GAL4 DBD-RHO-1 (G14V), GAL4 DBD-RHO-1 (T19N), GAL4 DBD-CED-10 (G12V) and GAL4 DBD-CDC-42 (G12V) plasmids are also generous gifts from Dr Kozo Kaibuchi. The GAL4 AD-RGA-5 (GAP domain) plasmid was constructed by inserting the *rga-5gap* cDNA into the pACTII vector. The *Pmyo-2::dsred-monomer* plasmid has been described previously<sup>59</sup>.

**Transgenic animals.** Transgenic animals were obtained as described in ref. 62. *Punc-25::rga-5gap* (50 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>), *Punc-25::rga-5gap(K1223A)* (50 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>), *Punc-25::rho-1 (G14V)* (5 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>), *Punc-25::rho-1 (T19N)* (5 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>),

*Punc-25::ser-7* (50 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>), *Pmec-7::ser-7* (5 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>), *Punc-25::pde-4* (50 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>), *Punc-25::tph-1* (50 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>), *Psrh-142::tph-1* (50 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>), *Punc-25::nls-cre* (50 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>) and *Punc-47::mcherry* (100 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>) plasmids were used to generate *kmEx1301* [*Punc-25::rga-5gap* + *Pmyo-2::dsred-monomer*], *kmEx1312* [*Punc-25::rga-5gap(K1223A)* + *Pmyo-2::dsred-monomer*], *kmEx1302* [*Punc-25::rho-1 (G14V)* + *Pmyo-2::dsred-monomer*], *kmEx1303* [*Punc-25::rho-1 (T19N)* + *Pmyo-2::dsred-monomer*], *kmEx1304* [*Punc-25::ser-7* + *Pmyo-2::dsred-monomer*], *kmEx1305* [*Pmec-7::ser-7* + *Pmyo-2::dsred-monomer*], *kmEx1306* [*Punc-25::pde-4* + *Pmyo-2::dsred-monomer*], *kmEx1307* [*Punc-25::tph-1* + *Pmyo-2::dsred-monomer*], *kmEx1311* [*Psrh-142::tph-1* + *Pmyo-2::dsred-monomer*], *kmEx1308* [*Punc-25::nls-cre* + *Pmyo-2::dsred-monomer*] and *kmEx1309* [*Punc-47::mcherry* + *Pmyo-2::dsred-monomer*], respectively. The *kyEx4057* [*Pceh-2::nls-cre*], *kyEx4077* [*Psrh-142::nls-cre*], *kyEx4107* [*Pegl-6::nls-cre*] and *kySi56* [floxed *tph-1* genomic rescue] were generous gifts from Dr Cori Bargmann<sup>11</sup>. The *otIs197*, *zIs13*, *wIs36* and *wdEx848* transgenes<sup>63–65</sup> were obtained from CGC.

**Yeast two-hybrid assay.** GAL4 DBD-RHO-1(G14V, T19N), GAL4 DBD-CED-10 (G12V), GAL4 DBD-CDC-42 (G12V) and GAL4 AD-RGA-5 (GAP domain) plasmids were co-transformed into the *Saccharomyces cerevisiae* reporter strain PJ69-4A and allowed to grow on SC-Leu-Trp plates. Transformants grown on these plates were then streaked out onto SC-Leu-Trp-His plates and incubated at 30 °C for 4 days.

**Axotomy.** All animals were subjected to axotomy at the young adult stage at 20 °C. Young adult hermaphrodites were immobilized with 20 mM sodium azide in M9 buffer on 2% agarose pad under a cover slip. D-type motor neurons expressing GFP were imaged with a fluorescence microscope. Selected commissural axons, mainly posterior D-type neurons, were cut using a 440-nm MicroPoint ablation Laser System from Photonic Instruments. After surgery, animals were allowed to recover on an agar plate and remounted for fluorescent imaging ~24 h after surgery. For measurements of D neurons, imaged commissures that exhibited growth cones or small branches on the proximal fragment were counted as 'regenerated'. The proximal fragments that showed no change after 24 h were counted as 'no regeneration'. A minimum of 50 individuals with 1–3 axotomized commissures were observed for most experiments. For PLM touch neurons, extended process lengths were measured from maximum transparency projections of a single z-stack, by using the Keyence BZ-X700 analysis software.

**Drug experiments.** 5-HT and forskolin were obtained from Wako and Focus Biomolecules, respectively. For 5-HT treatment, worms were grown from egg to adult, up until axotomy, on NGM plates containing 6.5 mM 5-HT and OP50 *Escherichia coli*. After axotomy, the worms were plated on NGM plates containing 5-HT and OP50 *E. coli* for 24 h. For forskolin treatment, the mixed stages of worms were incubated with M9 buffer containing 100  $\mu$ M forskolin and heat-killed OP50 for 12 h at 20 °C, and the worms at young adult stage after the treatment were used.

**Immunofluorescence.** 5-HT immunofluorescence was essentially performed as described previously<sup>5</sup>. Briefly, the worms axotomized either D neurons or PLM neurons were fixed by 4% formaldehyde in PBS buffer at 4 °C for overnight, washed three times by PBS and then treated by PBS containing 5%  $\beta$ -mercaptoethanol and 1% Triton X-100 for 24 h. Then, the worms were washed by PBS and digested in 100 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 5 mg ml<sup>-1</sup> collagenase (Wako, 034-10533). After digestion, a rat anti-serotonin antibody (Chemicon, Cat. No. MAB352), 100X diluted with Can Get Signal Immunostain (TOYOBO), was used as the first antibody solution. A chicken anti-rat Alexa 594 (Molecular probes), 200X diluted with Can Get Signal Immunostain (TOYOBO), was used as the second antibody solution.

**Microscopy.** Standard fluorescence images of transgenic worms were observed and photographed, using either a Zeiss Plan-APOCHROMAT  $\times$  100 objective of a Zeiss Axioplan II fluorescence microscope with a Hamamatsu 3CCD camera, or a  $\times$  100 objective of a Keyence BZ-X700 all-in-one fluorescence microscope. Confocal fluorescence images were taken on an Olympus FV500 and FV1000 confocal laser scanning microscopes with  $\times$  60 and  $\times$  100 objectives.

**Quantification of GFP expression.** Expression of GFP fluorescence was quantified using the ImageJ program (NIH). The cell bodies of severed D or PLM neurons were outlined with closed polygons and the fluorescence intensities within these areas were determined ( $I_s$ ). Then  $I_s$  was divided by the area to derive intensity per area ( $I_{sa}$ ). To determine the background intensity of each cell, the same polygon was placed in an area neighbouring the cell body, fluorescence was measured ( $I_b$ ), and this was divided by area ( $I_{ba}$ ). The relative signal intensity per area ( $I_{ra}$ ) was calculated as  $I_{sa} - I_{ba}$ . Cells having  $I_{ra} > 7$  (for D neuron) or  $I_{ra} > 4$  (for PLM neuron) were categorized as 'expressed', respectively.

**Statistical analysis.** Statistical analyses were carried out as described previously<sup>58</sup>. Briefly, confidence intervals (95%) were calculated by the modified Wald method and two-tailed *P* values were calculated using Fisher's exact test (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>). The Welch's *t*-test was performed by using a *t*-test calculator (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/>).

## References

- Yanik, M. F. *et al.* Neurosurgery: functional regeneration after laser axotomy. *Nature* **432**, 822 (2004).
- Hammarlund, M. & Jin, Y. Axon regeneration in *C. elegans*. *Curr. Opin. Neurobiol.* **27**, 199–207 (2014).
- Chen, L. *et al.* Axon regeneration pathways identified by systematic genetic screening in *C. elegans*. *Neuron* **71**, 1043–1057 (2011).
- Nix, P. *et al.* Axon regeneration genes identified by RNAi screening in *C. elegans*. *J. Neurosci.* **34**, 629–645 (2014).
- Sze, J. Y., Victor, M., Loer, C., Shi, Y. & Ruvkun, G. Food and metabolic signalling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. *Nature* **403**, 560–564 (2000).
- de Kloet, E. R., Joels, M. & Holsboer, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 463–475 (2005).
- McEwen, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol. Rev.* **87**, 873–904 (2007).
- Joels, M. & Baram, T. Z. The neuro-symphony of stress. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 459–466 (2009).
- Chang, A. J., Chronis, D. S., Karow, D. S., Marletta, M. A. & Bargmann, C. I. A distributed chemosensory circuit for oxygen preference in *C. elegans*. *PLoS Biol.* **4**, e274 (2006).
- Liang, B., Moussaif, M., Kuan, C. J., Gargus, J. J. & Sze, J. Y. Serotonin targets the DAF-16/FOXO signaling pathway to modulate stress responses. *Cell Metab.* **4**, 429–440 (2006).
- Flavell, S. W. *et al.* Serotonin and the neuropeptide PDF initiate and extend opposing behavioral states in *C. elegans*. *Cell* **154**, 1023–1035 (2013).
- Rand, J. B. & Nonet, M. L. *Synaptic transmission in C. elegans II.* (eds Riddle, D. L. *et al.*) 611–643 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997).
- Chase, D. L. & Koelle, M. R. Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans*. The *C. elegans* research community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.132.1, <http://www.wormbook.org> (2007).
- Jorgensen, E. M. GABA. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.14.1, <http://www.wormbook.org> (2005).
- Lee, R. Y. N., Sawin, E. R., Chalfie, M., Horvitz, H. R. & Avery, L. EAT-4, a homolog of a mammalian sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter, is necessary for glutamatergic neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **19**, 159–167 (1999).
- Pocock, R. & Hobert, O. Hypoxia activates a latent circuit for processing gustatory information in *C. elegans*. *Nat. Neurosci.* **13**, 610–614 (2010).
- Jiang, H., Guo, R. & Powell-Coffman, J. A. The *Caenorhabditis elegans* *hif-1* gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 7916–7921 (2001).
- Epstein, A. C. *et al.* *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107**, 43–54 (2001).
- Bishop, T. *et al.* Genetic analysis of pathways regulated by the von Hippel-Lindau tumor suppressor in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol.* **2**, e289 (2004).
- Shen, C., Nettleton, D., Jiang, M., Kim, S. K. & Powell-Coffman, J. A. Roles of the HIF-1 hypoxia-inducible factor during hypoxia response in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **280**, 20580–20588 (2005).
- Pocock, R. & Hobert, O. Oxygen levels affect axon guidance and neuronal migration in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Neurosci.* **11**, 894–900 (2008).
- Hoyer, D., Hannon, J. P. & Martin, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **71**, 533–554 (2002).
- Song, B. & Avery, L. Serotonin activates overall feeding by activating two separate neural pathways in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **32**, 1920–1931 (2012).
- Suzuki, N., Nakamura, S., Mano, H. & Kozasa, T. G $\alpha$ 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 733–738 (2003).
- Yau, D. M. *et al.* Identification and molecular characterization of the G $\alpha$ 12-Rho guanine nucleotide exchange factor pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 14748–14753 (2003).
- Hiley, E., McMullan, R. & Nurrish, S. J. The G $\alpha$ 12-RGS RhoGEF-RhoA signalling pathway regulates neuromodulator release in *C. elegans*. *EMBO J.* **25**, 5884–5895 (2006).
- Bos, J. L., Rehmann, H. & Wittinghofer, A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**, 865–877 (2007).
- Hammarlund, M., Nix, P., Hauth, L., Jorgensen, E. M. & Bastiani, M. Axon regeneration requires a conserved MAP kinase pathway. *Science* **323**, 802–806 (2009).
- Ridley, A. J. *et al.* Rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *EMBO J.* **12**, 5151–5160 (1993).
- Wolf, R. M. *et al.* p190RhoGAP can act to inhibit PDGF-induced gliomas in mice: a putative tumor suppressor encoded on human chromosome 19q13.3. *Genes Dev.* **17**, 476–487 (2003).
- Houssa, B., de Widt, J., Kranenburg, O., Moolenaar, W. H. & van Blitterswijk, W. J. Diacylglycerol kinase  $\theta$  binds to and is negatively regulated by active RhoA. *J. Biol. Chem.* **274**, 6820–6822 (1999).
- Los, A. P., Vinke, F. P., de Widt, J., Divecha, N. & van Blitterswijk, W. J. Structure-activity relationship of diacylglycerol kinase  $\theta$ . *Biochim. Biophys. Acta.* **1636**, 169–174 (2004).
- van Blitterswijk, W. J. & Houssa, B. Properties and functions of diacylglycerol kinase. *Cell Signal.* **12**, 595–605 (2000).
- Luo, B., Prescott, S. M. & Topham, M. K. Diacylglycerol kinase  $\zeta$  regulates phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase  $1\alpha$  by a novel mechanism. *Cell Signal.* **16**, 891–897 (2004).
- McMullan, R., Hiley, E., Morrison, P. & Nurrish, S. J. Rho is a presynaptic activator of neuromodulator release at pre-existing synapses in *C. elegans*. *Gene Dev.* **20**, 65–76 (2005).
- Hobson, R. J., Geng, J., Gray, A. D. & Komuniecki, R. W. SER-7b, a constitutively active G $\alpha$ s coupled 5-HT $_7$ -like receptor expressed in the *Caenorhabditis elegans* M4 pharyngeal motorneuron. *J. Neurochem.* **87**, 22–29 (2003).
- Ghosh-Roy, A., Wu, Z., Goncharov, A., Jin, Y. & Chisholm, A. D. Calcium and cyclic AMP promote axonal regeneration in *Caenorhabditis elegans* and require DLK-1 kinase. *J. Neurosci.* **30**, 3175–3183 (2010).
- Seamon, K. B., Padgett, W. & Daly, J. W. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **78**, 3363–3367 (1981).
- Trakhtenberg, E. F. & Goldberg, J. L. The role of serotonin in axon and dendrite growth. *Int. Rev. Neurobiol.* **106**, 105–126 (2012).
- Rojas, P. S., Neira, D., Muñoz, M., Lavandero, S. & Fielder, J. L. Serotonin (5-HT) regulates neurite outgrowth through 5-HT $1A$  and 5-HT $7$  receptors in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* **92**, 1000–1009 (2014).
- Hydon, P. G., McCobb, D. P. & Kater, S. B. Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons. *Science* **226**, 561–564 (1984).
- Kvachina, E. *et al.* 5-HT $7$  receptor is coupled to G $\alpha$  subunits of heterotrimeric G12-protein to regulate gene transcription and neuronal morphology. *J. Neurosci.* **25**, 7821–7830 (2005).
- Burnstock, G. Cotransmission. *Curr. Opin. Pharmacol.* **4**, 47–52 (2004).
- Potter, D. D., Landis, S. C., Matsumoto, S. G. & Furchs, E. J. Synaptic functions in rat sympathetic neurons in microcultures. II. Adrenergic/cholinergic dual status and plasticity. *J. Neurosci.* **6**, 1080–1098 (1986).
- Spitzer, N. C. Neurotransmitter switching? No surprise. *Neuron* **86**, 1131–1144 (2015).
- Saadat, S., Sendtner, M. & Rohrer, H. Ciliary neurotrophic factor induces cholinergic differentiation of rat sympathetic neurons in culture. *J. Cell Biol.* **108**, 1807–1816 (1989).
- Yamamori, T. *et al.* The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor. *Science* **246**, 1412–1416 (1989).
- Gutiérrez, R. The dual glutamatergic-GABAergic phenotype of hippocampal granule cells. *Trends Neurosci.* **28**, 297–303 (2005).
- Dulcis, D., Jamshidi, P., Leutgeb, S. & Spitzer, N. C. Neurotransmitter switching in the adult brain regulates behavior. *Science* **340**, 449–453 (2013).
- Serrano-Saiz, E. *et al.* Modular control of glutamatergic neuronal identity in *C. elegans* by distinct homeodomain proteins. *Cell* **155**, 659–673 (2013).
- Ju, Y., He, M. & Mao, B. Sequential changes of hypoxia-inducible factor  $1\alpha$  in experimental spinal cord injury and its significance. *Clin. J. Traumatol.* **5**, 103–106 (2002).
- Xiao, H., Ninghui, Z., Wei, X., Yiping, T. & Linfeng, X. The experimental study of hypoxia-inducible factor- $1\alpha$  and its target genes in spinal cord injury. *Spinal Cord* **44**, 35–43 (2006).
- Poncet, L., Denoroy, L., Daimaz, Y. & Pequignot, J. M. Activity of tryptophan hydroxylase and content of indolamines in discrete brain regions after a long-term hypoxic exposure in the rat. *Brain Res.* **765**, 122–128 (1997).
- Berger, A. J., Hart, A. C. & Kaplan, J. M. G $\alpha$ s-induced neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **18**, 2871–2880 (1998).
- Korwagen, H. C., van der Linden, A. M. & Plasterk, R. H. A. G protein hyperactivation of the *Caenorhabditis elegans* adenylate cyclase SGS-1 induces neuronal degeneration. *EMBO J.* **17**, 5059–5065 (1998).
- van der Linden, A. M., Moorman, C., Cuppen, E., Korwagen, H. C. & Plasterk, R. H. A. Hyperactivation of the G12-mediated signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* induces a developmental growth arrest via protein kinase C. *Curr. Biol.* **13**, 516–521 (2003).
- Schade, M. A., Reynolds, N. K., Dollins, C. M. & Miller, K. G. Mutations that rescue the paralysis of *Caenorhabditis elegans* *ric-8* (synembryo) mutants

- activate the  $G\alpha s$  pathway and define a third major branch of the synaptic signaling network. *Genetics* **169**, 631–649 (2005).
58. Pastuhov, S. I. *et al.* Endocannabinoid- $G\alpha z$  signalling inhibits axon regeneration in *Caenorhabditis elegans* by antagonizing Gqz-PKC-JNK signalling. *Nat. Commun.* **3**, e1136 (2012).
59. Li, C. *et al.* The growth factor SVH-1 regulates axon regeneration in *C. elegans* via the JNK MAPK cascade. *Nat. Neurosci.* **15**, 551–557 (2012).
60. 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. *PLoS Genet.* **11**, e1005603 (2015).
61. Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71–94 (1974).
62. Mello, C. C., Kramer, J. M., Stinchcomb, D. & Ambros, V. Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.* **10**, 3959–3970 (1991).
63. Clark, S. G. & Chiu, C. *C. elegans* ZAG-1, a Zn-finger-homeodomain protein, regulates axonal development and neuronal differentiation. *Development* **130**, 3781–3794 (2003).
64. Firnhaber, C. & Hammarlund, M. Neuron-specific RNAi in *C. elegans* and its use in a screen for essential genes required for GABA neuron function. *PLoS Genet.* **9**, e1003921 (2013).
65. Smith, C. J. *et al.* Sensory neuron fates are distinguished by a transcriptional switch that regulates dendrite branch stabilization. *Neuron* **79**, 266–280 (2013).

### Acknowledgements

We thank Dr Cori Bargmann, Dr Kozo Kaibuchi, Dr Ikue Mori, *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC), National Bio-Resource Project and *C. elegans* Knockout Consortium for materials. Some strains were provided by the CGC, which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD10440). This work was supported by grants

from the Ministry of Education, Culture and Science of Japan (to K.M. and N.H.), as well as from the Naito Foundation (to N.H.).

### Author contributions

T.A., H.M., N.H. and K.M. designed the experiments and analyzed data. T.A., H.M., C.L. and S.P. performed genetic and biological experiments. P.N. and M.B. identified *rga-5* and shared the information. T.A. and H.M. performed all of the other experiments. N.H. and K.M. wrote the manuscript.

### Additional information

**Supplementary Information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

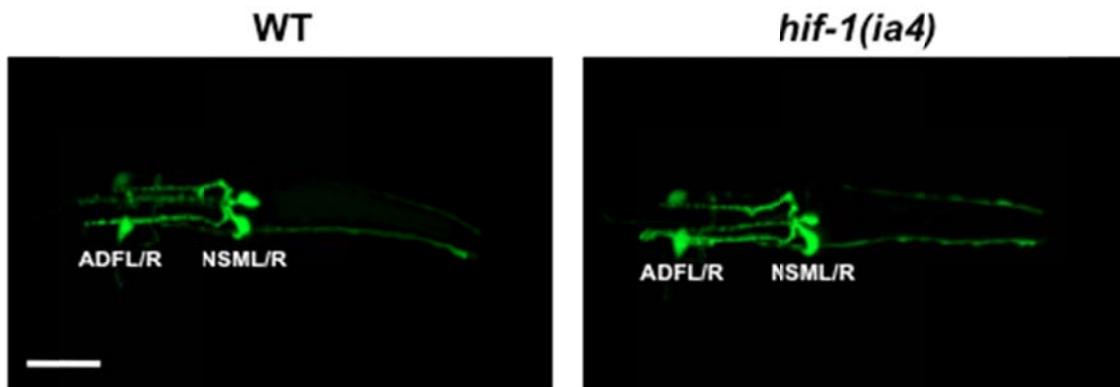
**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**Reprints and permission** information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

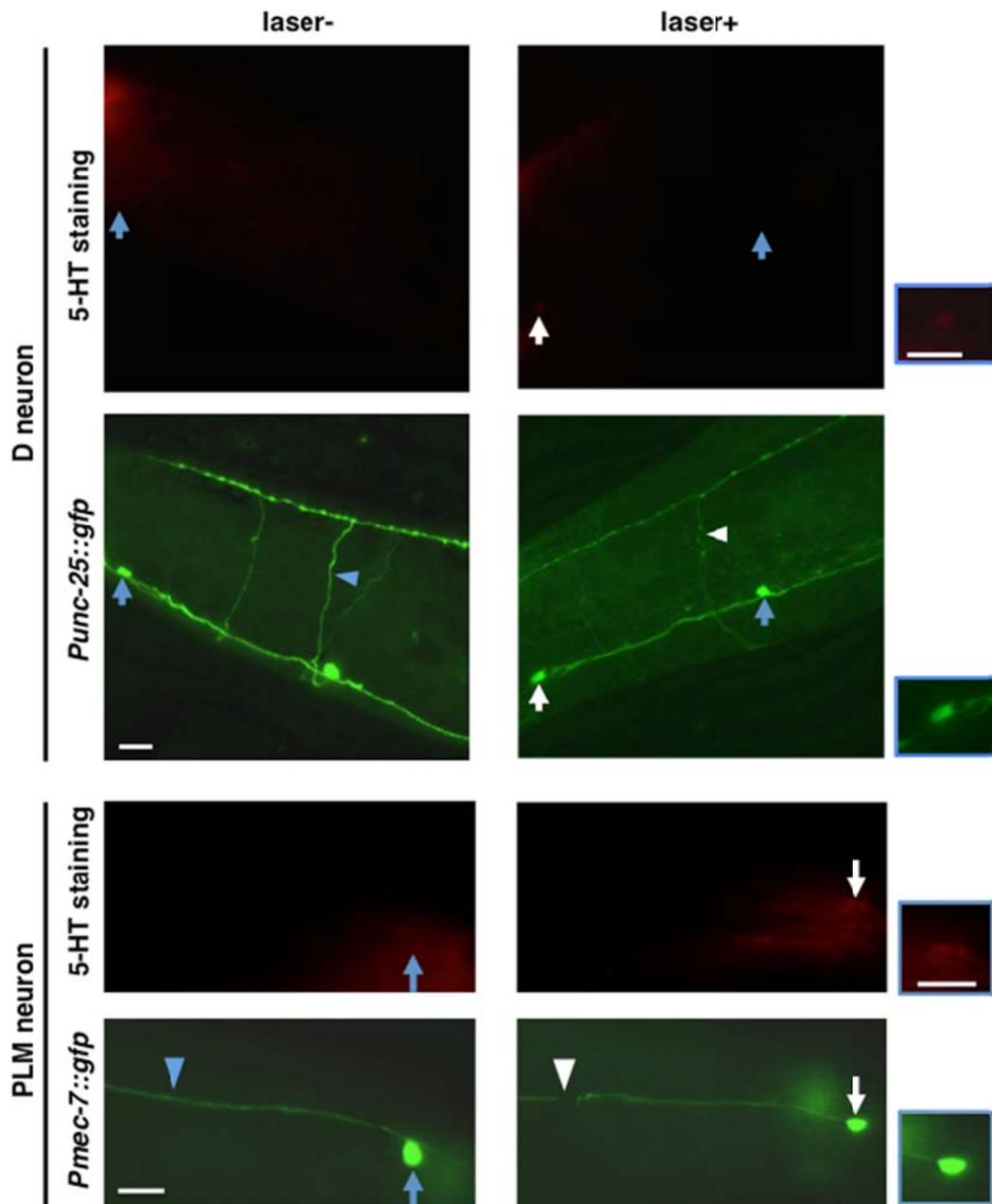
**How to cite this article:** Alam, T. *et al.* Axotomy-induced HIF-serotonin signalling axis promotes axon regeneration in *C. elegans*. *Nat. Commun.* **7**:10388 doi: 10.1038/ncomms10388 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

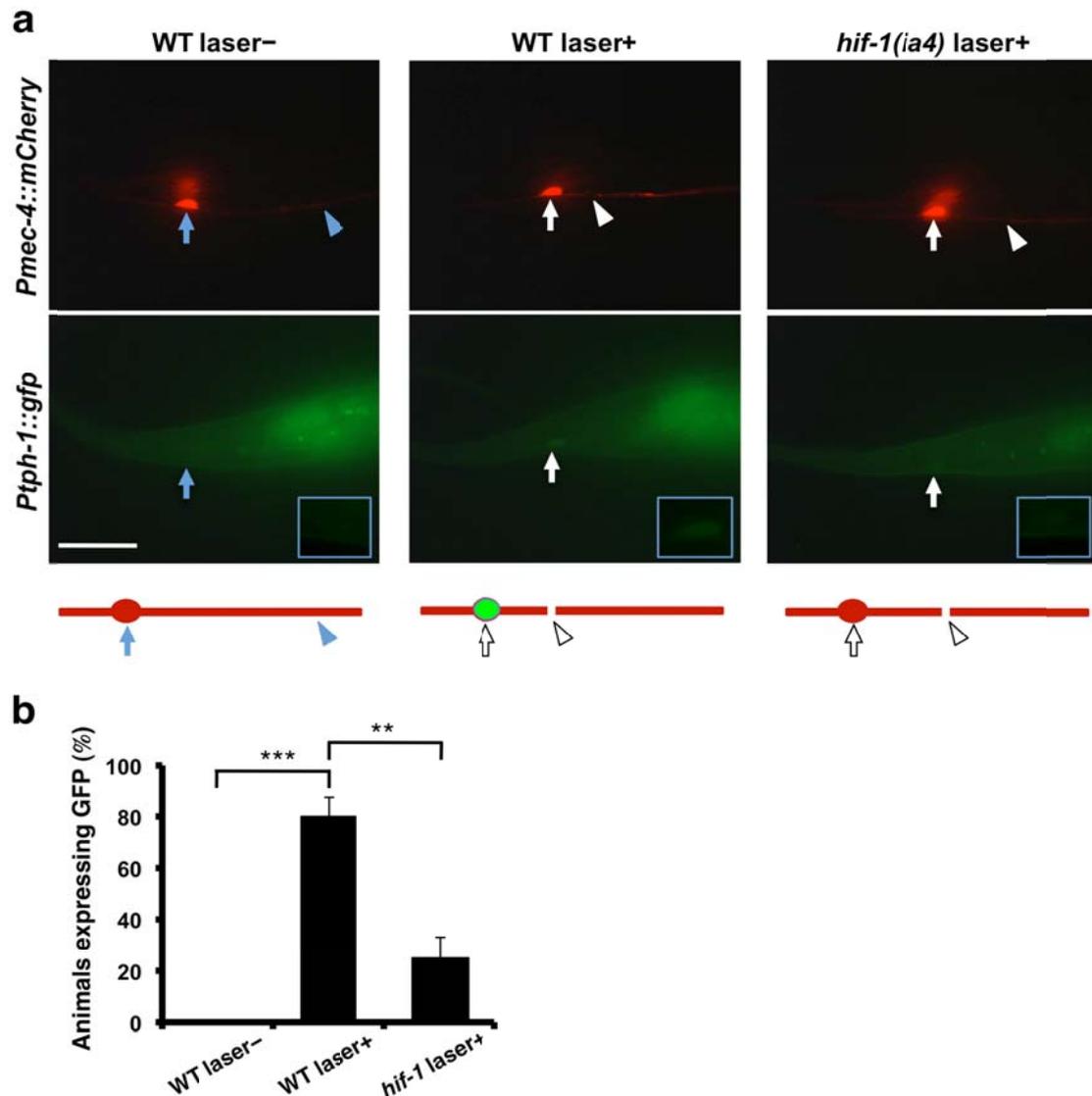


**Supplementary Figure 1: *Ptp-1::gfp* expression in the head of animals**  
*Ptp-1::gfp* was expressed in NSM and ADF neurons in wild-type and *hif-1* mutant animals. Anterior is left. Scale bar = 20  $\mu$ m.



**Supplementary Figure 2: 5-HT expression in D-type motor neurons and PLM sensory neurons following laser surgery**

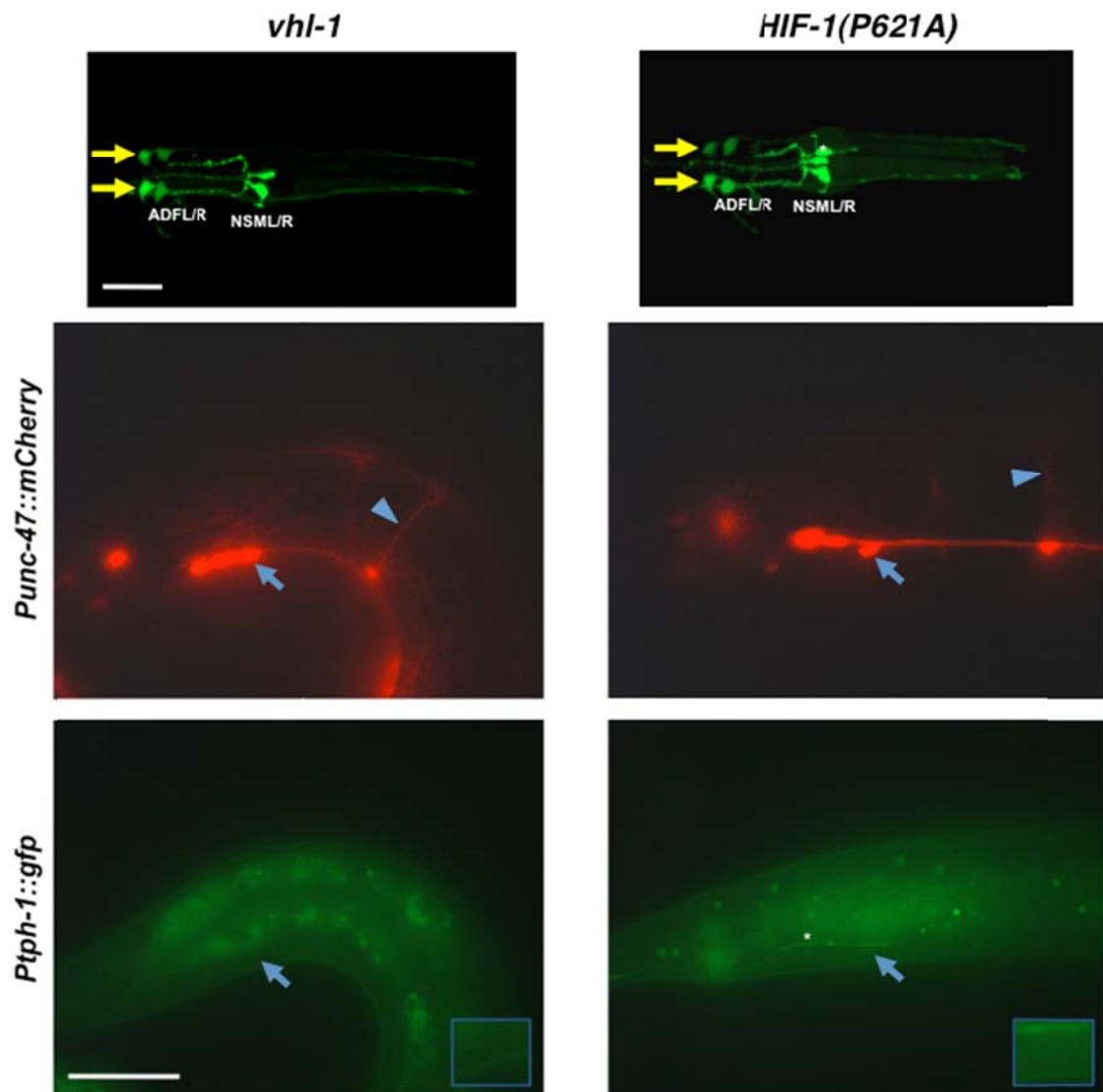
5-HT immunofluorescence in D-type motor neurons (row 1) and PLM neurons (row 3) 30 min after laser surgery is shown. Arrowheads and arrows indicate axons and cell bodies of D neurons and PLM neurons with (white) or without (blue) laser surgery, respectively. Both severed and unsevered PLM neurons within a same animal are shown. D neurons (row 2) and PLM neurons (row 4) are visualized by GFP under control of the *unc-25* promoter and *mec-7* promoter, respectively. Cell bodies of severed neurons are magnified (blue boxes). Scale bars = 20  $\mu$ m.



### Supplementary Figure 3: Induction of *PtpH-1::gfp* expression in PLM sensory neurons by laser surgery

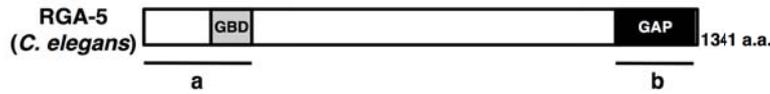
(a) Induction of *PtpH-1::gfp* expression in PLM sensory neurons by laser surgery. Expression of fluorescent proteins in PLM sensory neurons 30 min after laser surgery is shown. A schematic representation of PLM sensory neurons is shown on the bottom. Arrowheads and arrows indicate axons and cell bodies of PLM neurons with (white) or without (blue) laser surgery, respectively. PLM neurons are visualized by mCherry under control of the *mec-4* promoter. Cell bodies of PLM neurons are magnified (blue boxes). Scale bar = 20  $\mu$ m.

(b) Percentages of animals expressing *tpH-1*. Induction of *PtpH-1::gfp* expression in PLM sensory neurons with (+) or without (-) laser surgery was assayed as described in Methods. Twenty neurons were examined for each condition. Error bars indicate 95% CI. \*\*\* $P$ <0.001; \*\* $P$ <0.01 (Fisher's exact test, two-tailed,  $n \geq 50$ ).



**Supplementary Figure 4: Effect of HIF-1 stabilization on *Ptp-1::gfp* expression**

Expression of fluorescent proteins in ASG neurons and D-type motor neurons is shown. ASG neurons are indicated by yellow arrows. D neurons are visualized by mCherry under control of the *unc-47* promoter. Blue arrowheads and arrows indicate axons and cell bodies of D-type neurons, respectively. Cell bodies of D-type neurons are magnified (blue boxes). Asterisks indicate ectopic expression in MC and PHA neurons observed in HIF-1(P621A)-expressing animals. Scale bars = 20  $\mu$ m.



### a

#### GBD

```

RGA-5 1  NSSTSQTYSNSTKIKEINVIIVGVSGSEAVKGPSGVGKSLLCNRFVRPADEFHREHSSVLSQIDFCGS 69
p190 1  MMMARKQDVR IPTYNISVVGLSGTEKEKKGCGIGKSLCNRFVRPSADEFHLDHTSVLSTSDG-GG 66

RGA-5 70  PVINKDHWLYWGSRVLSNPESASNILIRVAEQTEFLDDETFETIAGCSKSENYCQRCCQTSLSQSRDKL 138
p190 67  RVVNDHFLYWGE--VSRLEDCECKMHIVEQTEFIDDQTFQPHRS-TALQPYIKRAAAKLASAEKL 135

RGA-5 139  NYIQKEQLGLESEFPQQLPNGKFNVDGFIACDISKPTSAHLHS--SHVLNIAKAISKTKKPVIIAFT 205
p190 136  NYFCTDQLGLEQDFEQKQMPDGKLLVDGFLGIDVSRGMNRFDDQLKFVSNLYNQLAKTKKPIVVVLT 204

RGA-5 206  KCDEASEECKKNYLNLFYSTKELHIMSHVPPVETSSVKVNVVEYLFSTLANLCLKSQ 263
p190 205  KCDEGVERYIRDAHTFALSCKNL-----QVVETSARSNVNVDLAFSTLVQL-IDKS 264

```

### b

#### GAP

```

RGA-5 1146 ANETLETLCSSPSQIPIYLEKCIQFIEQNGGFQEGLYRVPGNQTHLAEVEKRFLKYGEFDVSSFDTP 1214
p190 1236 FGVPLTTV-VTPEKPIPIPIERICIEYIE-ATGLSTEGYRVSGNKSEMSLQRQFDQDHNLDLAEKDF 1302

RGA-5 1215  *
p190 1303  *
RGA-5 1215  VHVAATALKSFFFSCLPESLIPTAYHLRWQIMMVSDDIKKIDGIRDALAILPVSNQKVLQYLVTHLTKV 1283
p190 1303  VNTVAGAMKSFFSELPDPLVPYNNQIDLVEAHKINDREQKLHALKEVLKFKPKENHEVFKYVISHLNKV 1371

RGA-5 1284  SCSPK-TVMNSNLSKVWTPTLFEPVFASYEELSSGIIAFQLALEMLTFN 1332
p190 1372  SHNNKVNLMTSENLSICFWPTLMRPDEFSTMDAL-TATRTYQTIIELFIQQ 1420

```

## Supplementary Figure 5: Comparisons of domains between mammalian p190 RhoGAP and *C. elegans* RGA-5

(a , b) The GTP binding (a) and GAP (b) domains are shown. Identical and similar residues are highlighted with black and gray shading, respectively. GBD domains are indicated by a dashed line. The conserved Lys residue essential for GAP activity is indicated by an asterisk.

Strain	Genotype	No. of animals	No. of axons	Regrowth ( $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$ )	P vs. control*
KU1343	<i>mu1s32</i>	32	32	79.2 $\pm$ 4.6	-
	<i>tph-1(mg280)</i>				
KU1344	<i>muls32</i>	30	30	51.8 $\pm$ 4.1	<0.001
	<i>hif-1(ia4);</i>				
KU1347	<i>muls32</i>	30	30	56.2 $\pm$ 4.7	<0.001

\* unpaired *t*-test, two-tailed, unequal variances.

### Supplementary Table 1: Raw data for genotypes tested by axotomy

Strain	Genotype	No. of animals	No. of axons	No. of regeneration	P vs. control*
KU501	<i>juls76</i>	58	78	55 (71%)	-
KU1317	<i>tph-1(mg280) juls76</i>	25	53	18 (34%)	<0.001
KU1329	<i>tph-1(n4622) juls76</i>	26	52	18 (35%)	<0.001
KU1317	<i>tph-1(mg280) juls76</i> + serotonin	29	60	36 (60%)	0.0081 <sup>e</sup>
KU1319	<i>tph-1(mg280) juls76; Punc-25::tph-1</i>	23	52	30 (58%)	0.019 <sup>e</sup>
KU1330	<i>tph-1(mg280) juls76; Pmec-7::tph-1</i>	27	52	25 (48%)	0.17 <sup>e</sup>
KU1331	<i>tph-1(mg280) juls76; Psrh-142::tph-1</i>	24	51	18 (35%)	1.0 <sup>e</sup>
KU1320	<i>tph-1(mg280) juls76; floxed tph-1</i> <i>tph-1(mg280) juls76; floxed tph-1;</i> <i>Psrh-142::nls-cre</i>	28	59	37 (63%)	0.0027 <sup>e</sup>
KU1321	<i>tph-1(mg280) juls76; floxed tph-1;</i> <i>Pceh-2::nls-cre</i>	23	50	28 (56%)	0.56 <sup>f</sup>
KU1322	<i>tph-1(mg280) juls76; floxed tph-1;</i> <i>Pegl-6::nls-cre</i>	24	52	35 (67%)	0.69 <sup>f</sup>
KU1323	<i>tph-1(mg280) juls76; floxed tph-1;</i> <i>Punc-25::nls-cre</i>	24	50	32 (64%)	1.0 <sup>f</sup>
KU1324	<i>hif-1(ia4); juls76</i>	24	50	19 (38%)	0.013 <sup>f</sup>
KU1327	<i>hif-1(ok2564); juls76</i>	24	51	19 (37%)	<0.001
KU1332	<i>hif-1(ia4); juls76</i> + serotonin	28	50	13 (26%)	<0.001
KU1327	<i>ser-1; juls76</i>	31	64	38 (59%)	0.024 <sup>g</sup>
KU1313	<i>ser-7(tm1325); juls76</i>	27	50	31 (62%)	0.34
KU1314	<i>ser-7(tm1548); juls76</i>	34	52	16 (31%)	<0.001
KU1333	<i>ser-7(tm1325); juls76</i> + serotonin	30	53	16 (30%)	<0.001
KU1314	<i>ser-7(tm1325); juls76</i>	26	55	26 (47%)	0.11 <sup>d</sup>
KU1315	<i>ser-7(tm1325); juls76; Punc-25::ser-7</i>	21	52	27 (52%)	0.046 <sup>d</sup>
KU1316	<i>ser-7(tm1325); juls76; Pmec-7::ser-7</i>	25	52	18 (35%)	0.84 <sup>d</sup>
KU1310	<i>gpa-12(pk322); juls76</i>	33	51	21 (41%)	0.0017
KU1334	<i>gpa-12(gk766855); juls76</i>	30	52	16 (31%)	<0.001
KU1335	<i>ser-7(tm1325) gpa-12(pk322); juls76</i>	22	51	19 (37%)	0.84 <sup>c</sup>
KU1303	<i>rhgf-1(ok880); juls76</i>	30	55	20 (36%)	<0.001
KU1336	<i>rhgf-1(gk217); juls76</i>	29	52	18 (35%)	<0.001
KU1304	<i>rhgf-1(ok880); juls76; Punc-25::rho-1(G14V)</i>	32	50	33 (66%)	0.0033 <sup>a</sup>
KU1305	<i>rhgf-1(ok880); juls76; Punc-25::rho-1(T19N)</i>	29	63	20 (32%)	0.70 <sup>a</sup>
KU1301	<i>rga-5; juls76</i>	25	50	39 (78%)	0.41
KU1302	<i>juls76; Punc-25::rga-5gap</i>	33	59	18 (31%)	<0.001
KU1337	<i>juls76; Punc-25::rga-5gap(K1223A)</i>	24	52	34 (65%)	0.57
KU1306	<i>rga-5; rhgf-1(ok880); juls76</i>	35	50	29 (58%)	0.032 <sup>a</sup>
KU1307	<i>dgk-1; juls76</i>	28	50	31 (62%)	0.34
KU1308	<i>dgk-1 rhgf-1(ok880); juls76</i>	36	61	36 (59%)	0.017 <sup>a</sup>
KU1309	<i>dgk-1; juls76; Punc-25::rga-5gap</i>	29	59	34 (58%)	0.0052 <sup>b</sup>
KU1311	<i>rga-5; gpa-12(pk322); juls76</i>	29	60	37 (62%)	0.037 <sup>c</sup>
KU1312	<i>gpa-12(pk322) dgk-1; juls76</i>	33	60	37 (62%)	0.037 <sup>c</sup>
KU1338	<i>rga-5; ser-7(tm1325); juls76</i>	32	59	22 (37%)	0.55 <sup>d</sup>
KU1339	<i>ser-7(tm1325) dgk-1; juls76</i>	27	52	20 (38%)	0.54 <sup>d</sup>
KU1314	<i>ser-7(tm1325); juls76</i> + forskolin	30	62	22 (35%)	0.69 <sup>d</sup>
KU1338	<i>rga-5; ser-7(tm1325); juls76</i> + forskolin	26	62	32 (52%)	0.036 <sup>d</sup>
KU1340	<i>juls76; Punc-25::pde-4</i>	31	61	28 (46%)	0.0051
KU1341	<i>acy-1; juls76</i>	32	64	21 (33%)	<0.001
KU1342	<i>acy-1; ser-7(tm1325); juls76</i>	22	50	17 (34%)	1.0 <sup>h</sup>

\*Fisher's exact test, two-tailed.

a: KU1303 as a control, b: KU1302 as a control, c: KU1310 as a control, d: KU1314 as a control,

e: KU1317 as a control, f: KU1320 as a control, g: KU1327 as a control, h: KU1341 as a control.

## Supplementary Table 2: Raw data for genotypes tested by axotomy

<b>Strain</b>	<b>Genotype</b>
KU1343	<i>muls32 II</i> .
KU1344	<i>tph-1(mg280) muls32 II</i> .
KU501	<i>juls76 II</i> .
KU1317	<i>tph-1(mg280) juls76 II</i> .
KU1329	<i>tph-1(n4622) juls76 II</i> .
KU1319	<i>tph-1(mg280) juls76 II; kmEx1307</i> .
KU1330	<i>tph-1(mg280) juls76 II; kmEx1310</i> .
KU1331	<i>tph-1(mg280) juls76 II; kmEx1311</i> .
KU1320	<i>tph-1(mg280) juls76 II; kySi56</i> .
KU1321	<i>tph-1(mg280) juls76 II; kySi56; kyEx4077</i> .
KU1322	<i>tph-1(mg280) juls76 II; kySi56; kyEx4057</i> .
KU1323	<i>tph-1(mg280) juls76 II; kySi56; kyEx4107</i> .
KU1324	<i>tph-1(mg280) juls76 II; kySi56; kmEx1308</i> .
KU1325	<i>zdls13 IV; kmEx1309</i>
KU1326	<i>zdls13 IV; hif-1(ia4) V; kmEx1309</i>
KU1345	<i>wpls36 I; zdls13 IV</i> .
KU1346	<i>wpls36 I; zdls13 IV; hif-1(ia4) V</i> .
KU1327	<i>juls76 II; hif-1(ia4) V</i> .
KU1332	<i>juls76 II; hif-1(ok2564) V</i> .
KU1347	<i>muls32 II ; hif-1(ia4) V</i> .
KU1313	<i>juls76 II; ser-1(ok345)X</i> .
KU1314	<i>juls76 II; ser-7(tm1325)X</i> .
KU1333	<i>juls76 II; ser-7(tm1548)X</i> .
KU1315	<i>juls76 II; ser-7(tm1325)X; kmEx1304</i> .
KU1316	<i>juls76 II; ser-7(tm1325)X; kmEx1305</i> .
KU1310	<i>juls76 II; gpa-12(pk322)X</i> .
KU1334	<i>juls76 II; gpa-12(gk766855)X</i> .
KU1335	<i>juls76 II; ser-7(tm1325) gpa-12(pk322)X</i> .
KU1303	<i>juls76 II; rhgf-1(ok880)X</i> .
KU1336	<i>juls76 II; rhgf-1(gk217)X</i> .
KU1304	<i>juls76 II; rhgf-1(ok880)X; kmEx1302</i> .
KU1305	<i>juls76 II; rhgf-1(ok880)X; kmEx1303</i> .
KU1301	<i>juls76 II; rga-5(ok2241)IV</i> .
KU1302	<i>juls76 II; kmEx1301</i> .
KU1337	<i>juls76 II; kmEx1312</i> .
KU1306	<i>juls76 II; rga-5(ok2241)IV; rhgf-1(ok880)X</i> .
KU1307	<i>juls76 II; dgk-1(ok1462)X</i> .
KU1308	<i>juls76 II; dgk-1(ok1462) rhgf-1(ok880)X</i> .
KU1309	<i>juls76 II; dgk-1(ok1462)X; kmEx1301</i> .
KU1311	<i>juls76 II; rga-5(ok2241)IV; gpa-12(pk322)X</i> .
KU1312	<i>juls76 II; gpa-12(pk322) dgk-1(ok1462)X</i> .
KU1338	<i>juls76 II; rga-5(ok2241)IV; ser-7(tm1325)X</i> .
KU1339	<i>juls76 II; ser-7(tm1325) dgk-1(ok1462)X</i> .
KU1340	<i>juls76 II; kmEx1306</i> .
KU1341	<i>juls76 II; acy-1(nu329) III</i> .
KU1342	<i>juls76 II; acy-1(nu329) III; ser-7(tm1325)X</i> .
KU1328	<i>zdls13 IV; wdEx848</i> .
KU1348	<i>zdls13 IV; hif-1(ia4) V; wdEx848</i> .
KU1349	<i>wpls36 I; zdls13 IV; vhl-1(ok161) X</i> .
KU1350	<i>wpls36 I; zdls13 otls197 IV</i> .

**Supplementary Table 3: Strains used in this study**