

学 位 論 文
Doctor's Thesis

ショウジョウバエを用いた軸索ガイダンスおよび神経突起成長における
低分子量Gタンパク質Rac1とCdc42の機能解析

(Distinct functions of Rac1 and Cdc42 during axon guidance and
growth cone morphogenesis in *Drosophila*)

松浦良太

Ryouta Matsuura

指導教官

田中英明教授

熊本大学大学院医学研究科神経分化学講座

2003年 3月

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文題名：ショウジョウバエを用いた軸索ガイダンスおよび神経突起成長
における低分子量Gタンパク質Rac1とCdc42の機能解析
(Distinct functions of Rac1 and Cdc42 during axon guidance
and growth cone morphogenesis in *Drosophila*)

著者名： 松浦良太 (Ryouta Matsuura)

指導教官名： 神経分化学担当教授 田中英明

審査委員名： 形態形成学担当教授 嶋村健児
 初期発生学担当教授 永渕昭良
 細胞情報薬理学担当教授 中西宏之
 幹細胞制御分野学担当教授 糸 昭苑

2003年3月

【目次】

| | |
|----------|-----|
| 要旨 | 3 |
| 発表論文リスト | 4 |
| 謝辞 | 5 |
| 訳語、略語一覧 | 6 |
| 研究の背景と目的 | 7 |
| 実験方法 | 1 2 |
| 実験結果 | 2 0 |
| 考察 | 3 2 |
| 結語 | 4 0 |
| 参考文献 | 4 1 |
| 図の説明 | 5 1 |
| Figures | 6 4 |

【要旨】

Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパクは細胞骨格の構築、特にアクチンフィラメントの制御に関して重要な分子群と考えられている。ショウジョウバエの、正中線における軸索ガイダンスおよび成長円錐の形態に関して Rac1 と Cdc42 の機能的な違いを検討するために、Rac1 と Cdc42 の活性化型、不活性化型を最終分裂後の神経細胞に発現させてそれらの効果を観察した。

私は正中線の交差に関する軸索ガイダンスにおいて、Rac1 と Cdc42 は異なった機能を持つことを示した。Cdc42 の活性化と Rac1 の不活性化は、本来正中線を交差しない軸索が正中線を交差する表現型を示し、*roundabout* 変異体の表現型と似ていた。そして、Cdc42 の活性化の効果は Robo 受容体の活性化によって軽減されるが、Rac1 の不活性化の効果は Robo 受容体の活性化の影響を受けなかった。また、Cdc42 の活性化と Rac1 の不活性化によって正中線を交差する軸索は Robo タンパクを発現していた。

これらの結果は、Rac1 と Cdc42 は Robo 受容体によって開始される下流の現象に関して異なった機能を持ち、また、正確な Slit-Robo シグナリングには Rac1 と Cdc42 の適切な活性が必要であることを示している。

次に成長円錐の形態形成における Rac1 と Cdc42 の機能的な違いを見出すために、胚の初代培養系を確立し、神経突起の形態を詳細に観察した。私は、Rac1 と Cdc42 の活性化は特に成長円錐の形態やその中のアクチンフィラメントに異なった効果を及ぼすことを示した。Rac1 と Cdc42 の活性化は大きな成長円錐と長い糸状仮足を生じさせるが、Cdc42 のほうが Rac1 よりその効果が強かった。しかしながら Rac1 の活性化は糸状仮足に太いアクチンフィラメントの形成を引き起こした。さらにサイトカラシン D に対する反応性は Rac1 と Cdc42 の間で明らかに異なり、サイトカラシン D の添加に対して、Cdc42 を活性化した場合にのみ神経突起は長くなった。

これらの結果は、Cdc42 は成長円錐においてアクチンフィラメントの制御に特に関与し、一方、Rac1 はそれ以外の機能にも関与していることを示唆している。

【発表論文リスト】

1. Distinct functions of Rac1 and Cdc42 during axon guidance and growth cone morphogenesis in *Drosophila*

Ryouta Matsuura, Hideaki Tanaka and Masahiro J. Go

European Journal of Neuroscience (2004) 19 21-31

2. Axonal growth of the spinal cord interneurons expressing a homophilic adhesion molecule SC1 ectopically.

Fujii T, Funahashi J, Matsuura R, Izaki T, Nakamura H, Mikawa T, Tanaka H.

Neuroscience Research (2000) 38 175-181

3. Notchシグナリングの神経突起成長における機能

郷 正博 松浦良太

実験医学 (2001) 19 463-467 羊土社

【謝辞】

熊本大学大学院医学研究科神経分化学（現 熊本大学大学院医学薬学研究部神経分化学）田中英明教授には、修士課程、博士課程にわたってご指導していただき感謝しています。そしてショウジョウバエを用いた本研究をするにあたって一緒に研究を進めながら、ご指導、助言して頂いただけでなく、出来の悪い私に真剣に接して頂き、また私を鼓舞してここまで導いてくださった郷 正博博士には心より感謝しています。

また岡藤辰也博士、栗山 正博士、源島 龍君には私のまじめな話からくだらない話まで根気よく付き合っただきありがとうございました。そして技官の坂本輝子さんには私が神経分化に在籍している間、多面にわたって支えていただきありがとうございました。また実験補佐員の上田裕乃さん（旧姓 野田）、小田直美さん（旧姓 吉村）には何かとお世話になりありがとうございました。研究室の皆さんに心より感謝いたします。

最後に、あまり実家に帰りたがらない私を陰で強く支えてくださった両親に本当に心から感謝いたします。ありがとうございました。

【訳語、略語一覧】

Rho (Ras homologous member)

Rac (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)

Cdc42 (cell division cycle 42)

robo (roundabout)

GTP (guanosine 5-triphosphate グアノシン5-三リン酸)

GDP (guanosine 5-diphosphate グアノシン5-二リン酸)

グアニンヌクレオチド交換促進因子 (guanine nucleotide exchange factor : GEF)

GTP 加水分解促進タンパク質 (GTP activating protein : GAP)

糸状仮足 (filopodia)

葉状仮足 (lamellipodia)

最終分裂後の神経細胞 (post-mitotic neurons)

長軸に沿った神経束 (longitudinal tract)

交連神経束 (commissure)

恒常的活性化型 (constitutive active form) …活性化型と表現している

ドミナントネガティブ型 (dominant negative form) …不活性化型と表現している

Cytochalasin D (CyD)

Polyethyleneimine (PEI)

【研究の背景と目的】

神経発生は、細胞分化、軸索成長、標的認識、シナプス形成などの段階からなる。軸索成長期には、軸索先端の成長円錐が標的に向かって正しい経路を探索しながら伸長することによって神経回路が形成される。この探索過程では、様々な軸索ガイダンス分子からのシグナルは成長円錐上の受容体を介して、最終的には成長円錐の細胞骨格の再編成を制御し、結果として軸索走行を支配していると考えられる (Fig.1)。

この神経細胞の先端におけるシグナル伝達は、核にシグナルが到達して標的遺伝子の転写が促進されるという通常の場合とは異なり、最終的には細胞骨格の制御に収束する。このことは、軸索成長に関与する多くの受容体からのシグナル伝達経路のかなりの部分が共通であることを意味する。Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパク (Rho family small GTPase) であるRho, Rac, Cdc42はそのシグナル伝達経路を担う分子群と考えられている。

Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパクは細胞外からの刺激を特にアクチン細胞骨格に伝達する細胞内スイッチ分子として働いている (Fig.2) (Tapon and Hall 1998, Van Aest and D' Souza-Shorey 1997, Hall 1998)。GTP結合型の活性化型、GDP結合型の不活性化型の間でそのコンフォメーションを変換することにより上流からのシグナルを下流に伝達している。これらの分子の活性調節に関わる制御分子としてグアニンヌクレオチド交換促進因子 (guanine nucleotide exchange factor : GEF)、GTP加水分解促進タンパク質 (GTP activating protein : GAP) が知られている。GEFは低分子量GTP結合タンパクの不活性化型から活性化型への変換を促進し、GAPは活性化型から不活性化型への変換を促進する。

Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパクであるRho、Rac1、Cdc42の細胞骨格制御に関する解析は哺乳類の線維芽細胞を用いて行われてきた。Rhoは細胞外リガンド（リゾホスファチジン酸 : lysophosphatidic acid : LPA）などによって活性化され、活性化Rhoによって収縮系のアクチン-ミオシンフィラメント（ストレスファイバー）やそれに付随する接着班（focal adhesion）が形成されることが示された。Racは様々なアゴニスト（血小板由来成長因子やインスリンなど）によって活性化され、細胞辺縁のアクチンフィラメントの網目状ネットワークを形成させ、lamellipodia（葉状仮足）やラッフリングを生じさせることが示された。さらに、Cdc42が活性化されると細胞表面にアクチンフィラメントの豊富な突起状のfilopodia（糸状仮足）が形成されることが示された。これらの発見はRhoファミリー低分子量GTP結合タンパクが細胞表面の受容体とアクチン細胞骨格を連結する重要な制御因子であることを示している（Hall 1998）。

さらに神経突起形成のモデル系としてよく利用される培養細胞、N1E-115神経芽細胞腫細胞やPC-12褐色細胞腫細胞を用いた研究において、神経突起や成長円錐の形態制御にもRhoファミリー低分子量GTP結合タンパクが関与していることが明らかになってきている。

N1E-115細胞、PC-12細胞では、ボツリヌスC3毒素によるRhoの不活性化は、神経突起の伸長を誘導し、LPAによるRhoの活性化によって引き起こされた成長円錐、神経突起の退縮を阻害する。また恒常的活性化型（constitutive active form）のRhoの導入は神経突起の退縮を誘導することから、神経突起の退縮にはRhoの活性化が必要であることが示された（Jalink et al 1994）。

一方、RacとCdc42はそれぞれ成長円錐における葉状突起、糸状突起の形成を制御し、RacとCdc42の活性化が神経突起の伸長に必要であることが示された。N1E-155細胞で

は、ムスカリン性アセチルコリン受容体を介してRacとCdc42が活性化され、神経突起が伸長する。アセチルコリンによってLPAによる神経突起の退縮が阻害され、Rac、Cdc42の不活性化によってC3毒素による神経突起の伸長は阻害される。従って、神経突起の伸長、退縮はRac、Cdc42の経路とRhoの経路が互いに拮抗していると考えられた (Kozma et al 1997)。

Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパクの神経突起成長に関する機能について、培養細胞だけでなく、生体や外殖体の培養系 (explant culture) を用いた解析もまた行われてきた。生体を用いた最初の解析はショウジョウバエ胚を用いて行われた。ショウジョウバエの胚の感覚神経に恒常的活性化型Rac、またはドミナントネガティブ型Racを発現させると、樹状突起の伸長には影響と与えずに、軸索の伸長のみに影響を与えた。一方、Cdc42の場合は、樹状突起の伸長、軸索の伸長に影響を与えた (Luo et al. 1994)。そして、恒常的活性化型Racを発現させたトランスジェニックマウスのプルキンエ細胞を用いた解析に関しても同様の結果が得られた (Luo et al. 1996)。

以上のような結果は、Rac、Rho、Cdc42がそれぞれアクチン細胞骨格制御に関して異なった機能を有し、軸索成長期の神経発生に関してそれぞれ特異的な役割、もしくは共通の役割を担っていることを示唆している。さらにショウジョウバエや、線虫の変異体を用いた解析によって、ますますRhoファミリー低分子量GTP結合タンパクの軸索成長に関する機能的重要性の認識は高まっている (Awasaki et al 2000、Bateman et al 2000、Liebl et al 2000、Newsome et al 2000、Hakeda-Suzuki et al 2002、Ng et al 2002、Lundquist et al 2001)。

いくつかの例外的な報告はあるが (Jin & Strittmatter 1997、Kuhn et al 1999、Vastrik et al 1999)、様々な研究から一般的には、軸索誘引因子はRacやCdc42を活性

化することによって軸索の伸長を促進し、一方軸索反発因子はRhoを活性化することによって成長円錐の退縮を引き起こし、軸索の伸長を阻害すると考えられている (Dickson 2001)。

ショウジョウバエ胚の中樞神経系の正中線における軸索ガイダンスに関して、Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパクは重要な役割を果たしていることが示されてきた (Bashaw et al 2001、 Hakeda-Suzuki et al 2002)。Racメンバーの変異体 (*rac1 rac2 mtl*) では正中線における軸索ガイダンスに異常が生じた。また、正中線の軸索ガイダンスに関して、軸索反発因子Slitの受容体であるRoboの細胞内ドメインに結合してそのシグナルを伝達する分子群と、運動ニューロンの軸索伸長に関して、Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパクと協調的に機能する分子群には共通性があった。

しかしながら、低分子量GTP結合タンパク間、特にRacとCdc42の機能的な相違については不明な部分も多い (Gallo and Letourneau 1998、 Luo 2000、 Dickson 2001)。

本研究は、Rac1、Cdc42の軸索ガイダンスや軸索成長における機能的差異を明らかにすることを目的に、遺伝学的な手法を用いることのできるショウジョウバエを用いて行った。Rac1、Cdc42の恒常的活性化型およびドミナントネガティブ型タンパクをすべての post-mitotic neurons に発現させ、その効果を胚の中樞神経系の正中線交差の軸索ガイダンスや培養した神経細胞の成長円錐の形態変化に注目して観察することによって、両者の機能的差違、関連を見い出そうとした。その結果、中樞神経系の軸索の正中線交差を制御しているSlit-Roboシグナリングによっておこる下流の現象に関してRac1とCdc42が異なった機能を持つことを明らかにした。また、培養した神経細胞の成長円錐では、Cdc42、Rac1はアクチンフィラメントの制御に関して異なった機能を持ち、そしてCdc42はRac1に比べてより特異的にその制御に機能し、Rac1はその制御以外の機能も有

している可能性を示唆する結果を得た。

【実験方法】

1. ショウジョウバエの系統と遺伝学

ショウジョウバエの初代培養、そして掛け合わせは特に記述がない限り25℃で行った。*roundabout*対立遺伝子 (*robo*²⁵⁷⁰) と *slit*対立遺伝子 (*slit*^{JG107}) はC. S. Goodman博士 (Renovis, Inc. and University of California, Berkeley) とS. Artavanis-Tsakonas 博士 (Harvard University) からそれぞれ頂いた。すべての最終分裂後の神経細胞に特異的な GAL4 ドライバーである *elav*-GAL4 は Van Vactor 博士 (Harvard University) から頂いた。UAS 系統である UAS-Rac1V12.1、UAS-Rac1N17.12、UAS-Cdc42V12.2、UAS-Cdc42N17.3 は、Van Vactor 博士から頂いた。UAS-RhoAV14 と UAS-Robo(YF) は 西田育巧博士 (名古屋大学) と C. S. Goodman 博士からそれぞれ頂いた。本来の系統より強い表現型を示す UAS 系統を得るために P 因子挿入を転移酵素 ($\Delta 23$) によって移動させた。Rac1N17.12-10 と Cdc42N17.3-17 はその方法で得た。

2. 胚の中樞神経系の可視化

中樞神経系が完成する stage 16-17 まで発生させた胚をメッシュに採卵し、水道水、DIW で洗浄後、50% ブリーチ/PBS に 60-90 秒浸して卵殻を取り除いた。よく洗浄した後、胚を 4% PFA (paraformaldehyde) : n-Heptane = 1 : 1 の固定液の入ったバイアルの中に入れ、1 時間激しく震盪して固定した。固定後、水層の PFA を取り除き、メタノールを加え、再び震盪して卵黄膜を取り除いた。メタノール層に沈んだ胚を回収後、

75%、50%、25%のメタノール/PBS溶液に浸して徐々に水和した。得られた胚をブロッキング溶液（1%BSA 0.4%TritonX-100/PBS）中で4℃において6時間ゆっくりと振盪しながらブロッキングした。その後、目的に応じてモノクローナル抗体、1D4（抗FasII抗体）、BP102、13C9（抗Robo抗体）、14C9（抗Robo3抗体）の抗体溶液のなかで4℃、12時間以上インキュベーションした。続いて、抗マウスIgG-biotin（1:100）（Southern Biotechnology, Birmingham, AL）、Streptoavidin-HRP（1:100）（Jackson, West Grove, PA）の中でそれぞれ2時間ずつ室温でインキュベーションした。インキュベーションの後にはブロッキング溶液で15分、3回室温で洗った。最後に0.5 mg/ml DAB、0.03% and H₂O₂溶液の中でHRPによる反応を行った。染色後の胚は必要に応じて解剖し、60%グリセロール、1% n-propyl gallate/ PBSを用いてスライドガラスにマウントした。

胚のステージは Campos-Ortega、Hartenstein (Campos-Ortega & Hartenstein, 1985)に従った。また、モノクローナル抗体1D4はC. S. Goodmanから頂き、モノクローナル抗体BP102、13C9、14C9は The Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa, Iowa, IA) から手に入れた。

3. 胚の神経細胞の初代培養

3-1 基質（polyethyleneimine）コートしたカバーガラスの準備

12mm（MATSUMAMI MICRO COVER GLASS）のカバーガラスを10分間煮沸し、100%エタノールに入れ、エタノールをガスバーナーの種火で取り除いて滅菌した。50

μl の 0.2% polyethyleneimine/(ホウ酸緩衝液) をカバーガラスにのせた後、3時間以上 37°Cでインキュベーションしてpolyethyleneimineをコートした。

3-2 M3(BF)培養液の準備

胚の初代培養を行うためにM3(BF)培養液を調整した (Cross and Sang, 1978)。

以下の試薬を800ml程度の超純水に完全に溶かした。

MgSO₄ · 7H₂O (4.4 g)

K glutamate · H₂O (8.88 g)

Na glutamate · H₂O (7.28 g)

NaH₂PO₄ · 2H₂O (0.88 g)

glucose (10 g)

oxaloacetic acid (0.25 g)

bis-Tris (1.05 g)

tissu-culture Yeastlate (Difco) (1.0 g)

完全に溶けたことを確認して以下のアミノ酸等を溶かした。

L-aspartic acid (0.30 g)

L-threonine (0.50 g)

L-serine (0.35 g)

L-asparagine · H₂O (0.34 g)

L-glutamine (0.60 g)

L-proline (0.40 g)
glycine (0.50g)
L-alanine (1.5 g)
L-valine (0.40 g)
L-methionine (0.25 g)
L-isoleucine (0.25 g)
L-leucine (0.40 g)
L-tyrosine (0.25 g)
L-phenylalanine (0.25 g)
 β -alanine (0.25 g)
L-histidine (0.55 g)
L-tryptophan (0.10 g)
L-arginine (0.50 g)
L-lysine HCl (0.85 g)
L-cysteine HCl · H₂O (0.22 g)
L-choline chloride (0.05 g)

数時間攪拌後、適量の超純粋にCaCl₂ · 2H₂O (1.0 g) を溶かしたものを加え、さらに1 N NaOHを加えてpH6.75に合わせた。超純水を加えて1リットルにメスアップした後、0.22 μ mのフィルターを用いて濾過滅菌した。使用直前に、10%非働化ウシ胎児血清 (heat-inactivated fetal bovine serum : HIFBS) 、0.03g/l penicillin G、0.1g/l streptomycin sulfate を加えた。

3-3 プレーティング

25℃で発生させた3-5時間卵をメッシュ（100 μ m Cell strainer, FALCON）に採卵し、水道水、DIWで洗浄後、50%ブリーチ/PBSに60-90秒浸して卵殻を取り除いた。クリーンベンチ内で、メッシュに入っている卵を70%エタノールに浸して2-3分間滅菌し、薬匙を使って、70%エタノールに浸した滅菌済みのメッシュに卵を移した。再び2-3分滅菌した後、滅菌水で卵を洗浄し、10%HIFBSを含んだM3(BF)培地の入った2cmシャーレに卵の入ったメッシュを静かに入れた。卵を小さな薬匙を使ってすくい出し、エッペンドルフチューブに移した。ホモゲナイザー(loose-fitting homogenizer)を使って卵を丁寧に破碎し、ピペットマンで懸濁後、胚の残骸を取り除くために懸濁液をメッシュで濾過しながら50mlチューブに移し、5mlの培養液を加えた。遠心分離（400g×5分）と培養液への懸濁を3回繰り返して細胞を洗浄した。洗浄後、適量の培養液に細胞を懸濁し、シャーレの中に並べたpolyethyleneimine をコートしたカバーガラスにゆっくりと乗せた。その後30分から1時間程度静置して細胞がカバーガラスに接着したところでゆっくりと培養液をシャーレに加えた。培養は25℃のインキュベーターの中で行った（Fig.3）。

4. 神経細胞の可視化

4-1 抗HRP抗体を用いた神経細胞の可視化

培養開始後2.5日に神経細胞を培養しているカバーガラスをPBSで1-2分間の洗浄を3回行った。4% Paraformaldehyde/PBS (4%PFA)を用いて30分、4℃で固定した。再び

PBSで1-2分間の洗浄を3回行い、0.5%BSA, 0.05% Saponin/PBSを用いて30分間のブロッキングを室温で行った。ブロッキングの後、一次抗体にウサギ抗HRP抗体 (1:300)、二次抗体に抗ウサギIgG-RITC (1:300) (Southern Biotechnology) の中で、それぞれ室温で1時間ずつインキュベーションした。神経細胞を可視化したのち、蛍光顕微鏡 (Nikon ECLIPSE E600) で観察した。

4-2 抗Synaptotagmin抗体を用いた初代培養した神経細胞の成長円錐の可視化

4-1と同様に固定、ブロッキングした後、一次抗体として抗Synaptotagmin抗体であるDSY2 (H. Bellen博士 (Baylor College of Medicine) より頂いた。)、二次抗体として抗ウサギIgG-RITC (1:300) を用いて、神経細胞の成長円錐を可視化し、蛍光顕微鏡で観察した。

4-3 Phalloidin-RITCを用いたアクチンフィラメントの可視化

培養開始後2.5日に神経細胞を4%PFAを用いて2-3時間、4℃で固定後、0.5%BSA, 0.05% Saponin/PBSを用いて15分間のブロッキングを室温で行った。Phalloidin-RITC (Molecular Probes, Eugene, OR) (1:50/PBS)を作用させて神経細胞のアクチンフィラメントを可視化し、蛍光顕微鏡で観察した。

5. Cytochalacin Dを培養した神経細胞に作用させる

Dimethyl sulfoxide (DMSO)にCytochalacin D (Sigma) を溶解させ1mg/ml Cytochalacin D ストック溶液を作製した。このストック溶液をM3(BF)培養液に添加し、適切な最終濃度に希釈した。Cytochalacin Dの添加は、培養開始後12時間の神経細胞が培養されているカバーガラスをCytochalacin Dを含んだM3(BF)培養液に移すことで行った。コントロールにはDMSOのみを溶かしたM3(BF)培養液を用いた。Latrunculin Aに関してもCytochalacin Dと同様に行った。

6. 神経細胞の形態に関する表現型の定量化

神経細胞の形態に関する表現型の定量化にはマッキントッシュコンピュータ上で、パブリックドメインソフトのNIH imageを用いて行った。(U. S. National Institutes of Health が開発。インターネットを介して<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/> から入手できる。) 表現型の解析には神経突起の長さ、葉状突起の数や幅、糸状仮足の数や長さに注目し、それらを定量した。

神経突起の長さの定量では、初代培養した神経細胞の蛍光顕微鏡像 (ECLIPS E600, Nikon, Japan) をランダムにCCDカメラ (C5810, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) で20-40枚取り込み、画像1枚あたり最も長い3本の神経突起の長さを測り、(n=)60-120本の神経突起の長さの平均を測定した。葉状突起の数や幅の定量では、顕微鏡画像から神経細胞のクラスターを20個選び出し、5 μ m、7.5 μ m、10 μ m以上の幅をもつ葉状突起の総数を数えた。糸状突起の数や長さの定量では、顕微鏡画像か

ら神経細胞のクラスターを20個選び出し、その中で7.5 μm 以上の幅をもつ葉状突起に付随している糸状突起に注目し、5 μm 、7.5 μm 、10 μm 以上の長さもつ糸状突起の総数を数えた。

【実験結果】

ショウジョウバエ胚の中枢神経系の軸索ガイダンスに関して、Rac1 とCdc42は異なった機能を持つ

軸索成長期において、Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパクは、軸索ガイダンス分子から成長円錐内のアクチン細胞骨格制御に至るシグナル伝達経路を担う分子だと考えられている (Luo 2000)。ショウジョウバエ胚の中枢神経系において、Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパクは、正中線での軸索ガイダンスに機能していることが示されてきた (Bashaw et al 2001、Hakeda-Suzuki et al 2002)。しかしながら、Rac1、Cdc42の機能的相違、関連はあまり示されていない。そこで我々は、ステージ16/17のショウジョウバエ胚の中枢神経系の正中線交差に関する軸索ガイダンスに注目してRac1、Cdc42の機能解析を試みた (Fig.5)。ショウジョウバエ胚のステージ16/17は、神経回路がほぼ完成しているステージである。

神経線維を可視化するために、モノクローナル抗体BP102、1D4 (抗fasciclin II 抗体) を用いた。BP102は中枢神経系の全ての神経線維を染色するので、特徴的な梯子状の構造を観察することができる (Fig.5 A)。また、1D4は長軸に沿った神経束 (longitudinal tracts) のサブセットを染色し、交連神経束 (commissure) は染色しない。したがって、1D4を用いて染色すると正中線の両側に3本の神経線維束を観察することができる (Fig.5 F)。

神経線維の正中線交差に関するRac1の活性化、不活性化、Cdc42の活性化、不活性化

の効果を調べるために、elav-GAL4ドライバーを用いたUAS-GAL4システム利用した (Fig.4) (Brand & Perrimon, 1993)。それぞれの恒常的活性化型 (以降、活性化型を表記)、ドミナントネガティブ型 (以降、不活性化型と表記) をすべての最終分裂を終えた神経細胞 (post-mitotic neurons) に発現させ、神経束を抗体染色によって可視化してそれらの軸索ガイダンスにおける効果の違いを観察、検討した。

Cdc42の活性化型 (Cdc42V12.2) を発現させてCdc42を活性化したときは、本来正中線を交差しない1D4陽性軸索の多くが正中線を交差したために (Fig.5 I 矢印)、長軸に沿った神経束に多くの間隙が生じた (Fig.5 I 矢頭)。この効果はBP102を用いて全ての軸索を染色したときにも確認でき (Fig.5 D)、野生型に比べて太くなった交連神経束 (Fig.5 D 矢印) や細くなった長軸に沿った神経束 (Fig.5 D 矢頭) が観察された。一方、不活性化型Cdc42 (Cdc42N17.3-17) を発現させてCdc42不活性化したときは、基本的にほとんど正常であり (Fig.5 E J)、1D4陽性のもっとも外側の神経束に時々間隙が存在する程度であった。

またRac1の活性化型 (Rac1V12.1) を発現させてRac1を活性化したときは、1D4陽性軸索のなかに時々正中線を交差するものが存在した (Fig.5 G)。それらの軸索は本来交連神経束が存在する場所において正中線を交差していた (Fig.5 G 矢頭)。しかしながら、Cdc42を活性化した場合に比べるとその頻度は低く、実際、BP102による染色によると、中枢神経系全体の構造としてはその表現型はほとんど正常であった (Fig.5 B)。一方、不活性化型Rac1 (Rac1N17.3-17) を発現させてRac1を不活性化すると、1D4陽性軸索の多くが正中線を交差するとともに (Fig.5 H 矢印)、長軸に沿った神経束に多くの間隙が生じた (Fig.5 H 矢頭)。BP102の染色では、野生型に比べて、交連神経束が太くなり (Fig.5 C 矢印)、長軸に沿った神経束が細くなっているのが観察された (Fig.5 C

矢頭)。また中枢神経系の幅が野生型に比べて狭くなっていた (Fig.5 C H)。

以上の結果から、本来正中線を交差しない軸索を交差させるという点で、Rac1の不活性化とCdc42の活性化は類似した効果を発揮することが示された。またRac1の活性化もまた同様の効果を示すけれども、Rac1の不活性化やCdc42の活性化に比べて、その効果は弱く、表現型の様子も異なるのでRac1の不活性化やCdc42の活性化とは違った効果を示していると考えられる。

Rac1の不活性化とCdc42の活性化によって引き起こされた中枢神経系における表現型は*robo* (*roundabout*) 変異体の表現型に共通していた。Roboは長軸に沿った神経束に発現する受容体であり、そのリガンドはSlitである。ショウジョウバエ胚の中枢神経系では、Slitは正中線のグリア細胞から分泌される軸索反発性因子であり、Roboを発現する軸索は正中線を交差することができない。したがって*robo*変異体ではSlitに対する感受性が失われるために、本来正中線を交差しない軸索が正中線を交差するようになる。その結果、交連神経束が太くなり、長軸に沿った神経束が細くなる (Kidd et al 1998、Kidd et al 1999)。

そこで、Rac1の不活性化とCdc42の活性化によって引き起こされた表現型と*robo*変異体の表現型、さらに*slit*変異体の表現型を比較した。25℃で発生させた胚の中で、Rac1の不活性化とCdc42の活性化のより強い表現型持つ胚を観察した。また29℃において発生させた胚では表現型が強くなる頻度はさらに高まり、そのような胚を観察した (Fig.6 A B F G)。

Rac1の不活性化とCdc42の活性化によって引き起こされたより強い表現型では、交連神経束はさらに太くなり (Fig.6 A B 矢印)、長軸に沿った神経束はさらに細くなって

いた (Fig.6 A B 矢頭)。この表現型は*robo*変異体の表現型に類似していた (Fig.6 E)。さらに、1D4陽性軸索を観察すると、Cdc42を強く活性化した場合には、正中線の両側にある長軸に沿った神経束間の幅が狭まり、一部正中線上で融合する (Fig.6 G) 表現型が観察された。この表現型は*slit*変異体の表現型に類似していた (Fig.6 J)。またRac1を強く不活性化した場合には、一部の軸索の伸長が抑制された (Fig. 6 F)。この表現型は、Rac1、Rac2、Mtlの三重変異体の表現型によく一致している (Hakeda-Suzuki et al., 2002)。この結果は、Rac1N17 (Rac1N17.3-17)の強制発現が、Rac1、Rac2、Mtlに共通のGEFの機能を阻害することで、Rac1だけではなくRac2、Mtlに対してもドミナントネガティブに機能している可能性を示唆している。

Rac1の活性化とCdc42の活性化を同時に行うと軸索伸長が著しく阻害され、また細胞体が染色されそれらの配置もでたらめに見えた (Fig.6 I)。これは両者を同時に活性化することによって、発現したタンパクの細胞内での分配や細胞移動などの細胞レベルでの活動が乱れてしまったと考えられる。またRac1の不活性化とCdc42の活性化を同時に行うと、ほとんどRac1の不活性化のみの表現型と同じ表現型を示した (Fig.6 H)。また、他のRhoファミリー低分子量GTP結合タンパクであるRhoを活性化活性化したときもまた余分な軸索が正中線を交差して、野生型に比べて長軸に沿った神経束が細くなり (Fig.6 D 矢頭)、交連神経束が太くなることを見つけた (Fig.6 D)。

中枢神経系の軸索ガイダンスにおいて、Rac1の不活性化、Cdc42の活性化が、*robo*変異体の表現型と類似した表現型を引き起こすことから、Rac1、Cdc42とRoboとの機能的関連が存在するのではないかと考え、その検討を行った。

Roboは膜貫通型の受容体であり、その細胞内ドメインに結合するAbl (abelson) キナー

ぜ、Ena (Enabled) がその軸索反発活性を調節していると考えられている (Bashaw et al 2000)。Ablによってリン酸化されるRoboの細胞内ドメインのチロシンをフェニルアラニンに変換した変異体Robo (Robo(YF)) はRoboシグナリングにおいて、活性化型変異体として機能する。したがって、UAS-GAL4システムによって全てのpost-mitotic neuronsに発現させるとRoboシグナリングの活性化によって本来正中線を交差する神経束が交差しなくなり長軸に沿った神経束のみになる (Fig.7 A)。

このRoboの活性化型変異体 (Robo(YF)) を用いて、RoboシグナリングとRac1、Cdc42との機能的関連を検討した。

活性化型Roboをpost-mitotic neuronsに発現させると、交連神経のない表現型を示す (Fig.7 A)。しかしながら、予想外なことに少数ではあるけれども、本来正中線を交差しない1D4陽性軸索のなかに正中線をこえる軸索が観察された (Fig.7 E 矢印)。この結果はRoboが強く活性化されると、本来、長軸に沿った神経束を構成する軸索でさえも少数ながら正中線を交差することがありうることを示している。

次に、Roboを活性化した遺伝的背景でRac1を活性化 (Fig.7 B F)、Rac1を不活性化 (Fig.7 C G)、Cdc42を活性化 (Fig.7 D H) したときの表現型を観察、比較した。

Rac1を活性化した場合、BP102抗体染色ではわずかに正中線を交差する軸索が存在するもののRobo(YF)の表現型によく類似している (Fig.7 B F)。一方、Rac1を不活性化、Cdc42を活性化した場合にはRobo(YF)単独やRac1の活性化の表現型とは明らかに異なる表現型が観察された。

Rac1を不活性化したときのBP102染色では、交連神経 (Fig.7 C 矢印) や細くなった長軸に沿った神経束 (Fig.7 C 矢頭) が観察された。そして中枢神経系の幅はRobo(YF)、野生型に比べて狭くなっていた (Fig.7 C)。また1D4染色では、正中線を交差する軸

索が観察された (Fig.7 G 矢印)。Cdc42を活性化したときにおいてもRac1を不活性化したときと同様に交連神経が現れ、長軸に沿った神経束に間隙が生じた (Fig.7 D 矢頭)。

以上の結果は、Rac1の不活性化やCdc42の活性化がRoboの活性化に対してドミナントであることを示している。さらに、Rac1の不活性化はRoboの活性化に対してほぼ完全にドミナントであった (Table.1)。この結果は、Rac1が不活性化されているとRoboの活性化シグナルは伝達されないことを示唆している。

次に、Rac1の活性化、Rac1の不活性化、Cdc42の活性化によって生じる、正中線を交差する軸索がRoboタンパクを発現しているのかどうかを調べた。またRacの三重変異体 (Rac1 Rac2 Mtl) においてRoboタンパク陽性の軸索のガイダンスを観察した。

野生型ではRobo、Robo3タンパクを発現している軸索は正中線を交差せず、長軸に沿った神経束を形成する (Fig.8 A F)。またRac1を活性化した場合にはほとんど野生型と同様の表現型を示した (Fig.8 B G)。しかしながら、Rac1を不活性化した場合、Cdc42を活性化した場合には、正中線を交差する軸索にRobo、Robo3タンパクが発現していた (Fig.8 C D H I 矢印)。この結果は、本来正中線を交差しないRobo、Robo3タンパクを発現している軸索が、Rac1を不活性化やCdc42の活性化によって正中線を交差していることを示している。この結果はRoboシグナリングの正常な伝達には、Rac1、Cdc42の適切な活性が必要であることを意味している。また、Racの三重変異体の場合においてもRobo、Robo3タンパクは正中線を交差する軸索に発現しており、Rac1の不活性化のRobo、Robo3タンパクの発現パターンにたいへんよく似ている (Fig.8 E J)。この結果もまたRoboシグナリングの正常な伝達にはRac1の活性化が必要であることを意味している。

Roboの活性化とRac1の不活性化、Roboの活性化とCdc42の活性化との遺伝的相互作用の結果から、Roboの下流においてRac1、Cdc42が機能していることが示唆された。そこで、*robo*の変異体、*slit*の変異体との遺伝的相互作用を1D4陽性軸索に関するもまた調べた。

*robo*を1コピー減少させた変異体 (*robo* heterozygote mutant) (Fig.9 B) や *slit* を1コピー減少させた変異体 (*slit* heterozygote mutant) (Fig.9 D) では1D4陽性軸索の軸索ガイダンスはほとんど正常である。しかしながら、それぞれの遺伝的背景においてCdc42を活性化させるとその表現型はどちらの場合においても増強された。長軸に沿った神経束の間隙の数は増加し (Fig.9 C E 矢印)、中枢神経系の幅が狭くなった。長軸に沿った神経束の間隙、特に左右両側が間隙になっている神経束に注目して定量するとCdc42の活性化では20%の間隙が存在したが、*robo*を1コピー減少させるとそれが39%に、*slit* を1コピー減少させるとそれが34%に増加した (Fig.9 F)。この結果は、Cdc42の活性化について、Robo、Slitとの間に遺伝的相互作用があることを示している。しかしながら、Rac1の不活性化とRobo、Slitの間には明確な遺伝的相互作用は確認できなかった。

以上の結果から、Rac1、Cdc42はRoboの下流で機能しているだけでなく、異なった方法で機能している可能性が示唆された。

胚の神経細胞の初代培養系の確立

私はCdc42の活性化とRac1の不活性化が中枢神経系の軸索ガイダンスにおいて類似した効果を示すことを見出しが、これは予期していなかった結果であった。というのは成

長円錐の形態形成に関してCdc42とRac1の機能はそれほど異なっていると考えられていなかったからである。それゆえ私は、成長円錐の形態形成に関してRac1とCdc42との間の機能的な違いを検討しようとした。その目的のために、私は適切な遺伝的背景の下で神経突起の形成を詳細に観察するための初代培養系を用いた。初代培養系では、基質としてpolyethyleneimine (PEI) を用いた。polyethyleneimineを用いると特に神経細胞が豊富に接着し、それらの形態の観察ができた。この系では、中枢神経特異的なモノクローナル抗体BP102によって大部分の細胞が染色された (Fig.3 B)。また、中枢神経系の長軸に沿った神経束のサブセットを染色するモノクローナル抗体1D4によっても細胞が染色された。この結果から、この初代培養系において生存する神経細胞の大部分は中枢神経系由来であると考えられた。

この初代培養系における野生型の神経突起成長を把握するために、抗HRP抗体による免疫組織化学染色によって神経細胞を可視化して、経時的にその形態変化を観察した (Fig.10)。培養開始後約3時間で神経突起が伸長し始め、細胞体 (Fig.10 A 長い矢印)、神経突起 (Fig.10 A 短い矢印)、その先端の成長円錐様構造 (Fig.10 A 矢頭) を確認した。培養開始後約12時間経過すると細胞体が近い距離にある神経突起はお互いに連結し始め (Fig.10 B 矢印)、約24時間経過すると神経突起は連結し始める (Fig.10 C 短い矢印) と同時に形態が複雑になった (Fig.10 C 長い矢印)。培養開始後約60時間経過すると神経突起はさらにお互いに連結し (Fig.10 D 短い矢印)、網目のようになった (長い矢印)。60時間以降は少しずつ複雑になっていった。以上の観察から神経突起の形態の観察はすべて培養開始後約60時間で行った。

in vitroにおいてRac1とCdc42は成長円錐の形態形成に関して異なった機能を持つ

私は恒常的活性化型Rac1（活性化型Rac1）、恒常的活性化型Cdc42（活性化型Cdc42）をそれぞれpost-mitotic neuronsに発現させると神経の形態が明らかに変化するところを見つけた（Fig.11）。どちらの場合においても神経突起の長さが短くなり（Fig.11 B C、Fig.12 A）、その先端に大きな成長円錐様の構造が生じた（Fig.11 E F 矢頭）。これらの成長円錐様構造は野生型に比べるとかなり大きく、細く長い糸状突起が数多く付随していた（Fig.11 E F *）。特にCdc42を活性化した場合は、Rac1を活性化した場合に比較して、神経突起の先端により大きな葉状突起、より長い糸状突起が生じた（Fig.12 B C）。

Rac1、Cdc42の活性化が神経突起の形態に与える効果を観察できたので、次にそれぞれの不活性化が与える効果を観察しようとした。しかしながら明らかな形態的な変化は観察できなかった。PEIのコーティングの濃度を下げると、Rac1を不活性化したときに神経突起の長さが野生型に比べて長くなる傾向があることをが分かったが、Cdc42を不活性化した時にはそのような効果は見られなかった（Fig.12 A）。成長円錐の形態に関しては、Rac1の不活性化、Cdc42の活性化の両方の場合において大きな形態変化は見られなかった。これはPEIの基質としての接着性が強く、Rac1の不活性化やCdc42の不活性化によって生じる形態変化が起こりにくいためではないかと考えられる。なお、PEIのコーティングの濃度を下げることによってRac1の活性化、Cdc42の活性化によって生じる特徴的な構造に大きな変化はなかった。

初代培養系においてRac1の活性化とCdc42の活性化が神経突起の先端に特徴的な構造を引き起こすことを見出したが、これはRac1の活性化、Cdc42の活性化によって神経突起の先端の細胞骨格に何らかの変化が起きた結果であると考えた。したがって私は、Phalloidin-RITCを用いてRac1の活性化、Cdc42の活性化によって生じた成長円錐様構造の中のアクチンフィラメントの局在について観察しようとした (Fig.13)。その結果、両者にはアクチンフィラメントの局在に関して大きな違いがあることを見つけた。

Rac1を活性化した場合にはアクチンフィラメントの強く鋭いシグナルは成長円錐の糸状突起に存在し、成長円錐の中心部分 (central domain) にはあまり強いシグナルは存在しなかった。そのために成長円錐の周辺部分 (peripheral domain) と中心部分 (central domain) のシグナルの強度に大きな差が生じていた (Fig.13 E *)。一方、Cdc42を活性化した場合、野生型の場合では成長円錐の中心部分と周辺部分のシグナルの強度に大きな差はなく均一であった (Fig.13 F 矢頭)。

この観察はRac1とCdc42が成長円錐のアクチンフィラメントの重合に関して異なった機能を持っている事を示唆している。また、Rac1の方がCdc42に比べて成長円錐の糸状突起にアクチンフィラメントの重合を強く促進できることが分かった。したがって、Rac1の活性化、Cdc42の活性化はともに神経突起の先端に成長円錐様の構造を引き起こすけれどもアクチンフィラメントのレベルでは異なった構造を引き起こしていることが示された。

Rac1の活性化、Cdc42の活性化が成長円錐において異なったアクチンフィラメントの重合パターンを引き起こすことから、私は、アクチンの重合阻害剤であるCytochalasin Dに対する反応性もまた異なっているのではないかと考えた。そこで初代培養した神経細胞

にCytochalasin Dを添加して、それが神経突起の形態に与える効果を観察した。

Cytochalasin Dの添加によって、野生型、Rac1の活性化、Cdc42の活性化のすべての場合において神経突起の形態はより単純になった (Fig.14 D E F)。神経突起の分岐、突起は減少し、またRac1の活性化、Cdc42の活性化によって生じた特徴的な構造も消失した (Fig.14 E F 矢頭)。この結果は、Rac1の活性化やCdc42の活性化が確かにアクチンフィラメントの重合を促進し、そのことによって神経突起の先端に特徴的な成長円錐様構造が生じたことを示している。

しかしながら意外な事にCytochalasin Dの添加の実験から、神経突起形成に関してRac1とCdc42に機能的な違いがある事が明らかになった。野生型の神経細胞やRac1を活性化した神経細胞の神経突起の平均の長さは、Cytochalasin Dを添加しなかった場合に比較してほとんど差が無かったのに対して、Cdc42を活性化した神経細胞の神経突起の平均の長さはCytochalasin Dの濃度が0.1 μ g/ml以下のときにCytochalasin Dの濃度依存的により長くなっていた (Fig.15 A)。この傾向をさらに確かめるために別のアクチン重合阻害剤であるLatrunculin Aを用いた場合に関してもほぼ同じ傾向が確認できた (Fig.15 B)。

この観察は、Cdc42の活性化によって神経突起の先端の成長円錐にアクチンフィラメントの強い重合が起こった結果、神経突起の伸長が抑制されている事を示唆している。一方、Rac1の活性化は成長円錐においてアクチンフィラメントの重合を強く促進する機能だけでなく、その他の機能も持っているためにCdc42を活性化した場合のように神経突起の長さが回復しなかったのではないかと考えられる。

次に私は、Rac1の活性化やCdc42の活性化によって生じた神経突起の先端の構造が *in*

*vivo*における軸索先端の成長円錐に相当する構造であることを確かめるために、シナプス小胞の膜タンパクであるシナプトタグミンに対する抗体を用いて初代培養した神経細胞を抗体染色した (Littleton et al 1993)。

野生型の神経細胞では神経突起の先端 (Fig.16 A D 矢頭)、神経突起に沿って存在するバリコース領域 (Fig.16 D *) にドット状にシグナルが観察された。バリコースのない神経突起 (Fig.16 A D 短い矢印) や細胞体 (Fig.16 A D 長い矢印) ではシグナルは観察されなかった。Rac1を活性化した神経細胞、Cdc42を活性化した神経細胞ではそれらの神経突起の先端に生じた成長円錐様構造に強いシグナルが観察された (Fig.16 E F 矢頭)。この結果は、これらの構造が *in vivo*における軸索先端の構造に相当していることを示している。

【考察】

ショウジョウバエ胚の正中線の軸索ガイダンスにおいてRac1とCdc42は異なった機能を持つ

Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパク、Rho、Rac、Cdc42は細胞骨格、特にアクチンフィラメントの編成、再編成を制御する重要な分子として知られている。これらの分子群の機能は多岐にわたり、その一つとして神経細胞の軸索先端の成長円錐における機能が注目されている。何故なら、成長円錐における細胞骨格制御は軸索ガイダンスの制御に直結すると考えられているからである。そこで私は、ショウジョウバエの中枢神経系の正中線交差における軸索ガイダンスに注目してRhoファミリー低分子量GTP結合タンパクの機能解析を行った。

ショウジョウバエでは中枢神経系の正中線において、Netrinは軸索誘因因子、Slitは軸索反発因子として知られている (Bashaw & Goodman 1999、 Brose et al 1999、 Kidd et al 1999)。中枢神経系の軸索の成長円錐上に発現するRobo受容体が細胞内チロシンキナーゼであるAbelson tyrosine kinase (Abl) やその基質であるEnabled (Ena) を介してそのシグナルを伝達し、成長円錐の退縮を引き起こす事が示されている (Bashaw et al 2000)。胚の運動ニューロンの軸索ガイダンスにおいてもまたAblとEnaがRac1とともに機能している事が示されている (Kaufmann et al 1998、 Wills et al 1999)。これらの報告は、Slit-Roboシグナリングの下流において他のRhoファミリー低分子量GTP結合タンパクがAblやEnaとともに機能している可能性を示している。実際、強いSlit-Roboシグナリングの存在下において、本来正中線を交差しない軸索の正中線交差を引き起こす

事が示されている (Bashaw et al 2001)。脊椎動物や線虫においてもまたRobo受容体が機能的にNetrin受容体であるUNC-40/DCCと相互作用し、Rac1とCdc42の両方がそのシグナルの中で機能している事が示されている (Stein & Tessier-Lavigne 2001、Shekarabi & Kennedy 2002、Yu et al 2002、Gitai et al 2003)。

そこで私は、軸索成長期におけるRac1とCdc42の機能の違いを調べるために、中枢神経系の正中線交差の軸索ガイダンスに注目した。すべてのpost-mitotic neuronsにおいてCdc42を活性化させたり、Rac1の不活性化させたりすると多くの軸索が正中線を交差するという類似した効果が現れるのを私は見つけた (Fig.1-5、Table 1)。また、私が観察したRac1の不活性化による軸索の正中線交差の表現型はRacメンバーの変異体 (*rac1* *rac2* *mtl* 三重変異体) の表現型によく一致していた (Hakeda-Suzuki et al., 2002)。一方、神経細胞においてRac1を不活性化しても、余分な正中線交差は起こらないという報告もなされていた (Fritz & VanBerkum 2002)。この報告と私が観察した結果は一致しなかった。その理由は、私がRac1の不活性化のUAS系統としてより強い系統

(Rac1N17.12-10) を用いたためであると考えられる。Racメンバーの変異体の表現型の報告、神経細胞においてRac1を不活性化しても、余分な正中線交差は起こらないという表現型の報告から、Racメンバーの三重変異体において観察される本来正中線を交差しない軸索が正中線を交差するという表現型は、軸索のガイダンスの異常によって引き起こされたものではなく、神経細胞の分化の異常や、神経細胞以外の細胞の異常によって引き起こされたものである可能性が考えられた。しかしながら私は、すべてのpost-mitotic neuronsにおいてRac1を強く不活性化すると正中線を交差する本来正中線を交差しない神経束が生じることを観察した。この観察から、Racメンバーの三重変異体の表現型は本当に軸索のガイダンスの異常によって引き起こされたものであると考えられる。

私は、Rac1の不活性化やCdc42の活性化に比べるとその頻度は低いけれども、Rac1を活性化した場合においてもまた正中線を交差する余分な神経束が生じることを見つけた (Fig. 5 G)。この観察は、以前の報告にも一致する (Fritz & VanBerkum 2002)。しかしながら、Rac1の活性化と不活性化の表現型には違いがあるようであった。Rac1の活性化の場合には、本来交連神経の神経束が存在する場所だけで少数の軸索が正中線を交差しているようであり、長軸に沿った神経束に間隙は無かった (Fig.5 B G, Fig.7 B F)。さらに、長軸に沿った神経束の間の幅は決して狭くはなっていなかった。これらの表現型の違いから、細胞レベルではRac1の不活性化と活性化の神経細胞に与える効果は異なっていると考えられる。私はまた、RhoAの活性化 (RhoAV14) もまた、余分な軸索の正中線交差を引き起こすことを見つけた (Fig.6 D)。この観察は、以前にも報告されている (Bashaw et al 2001、Fritz & VanBerkum 2002)。また、RhoAの不活性化が正中線を交差する余分な軸索を引き起こすことも報告されている (Fritz & VanBerkum 2002)。これらの観察から、適切なレベルのRac1とRhoAの活性化が中枢神経系の正中線における軸索ガイダンスに不可欠である事を証明している。この観点から考察すると、野生型の胚では決して正中線を交差しないFasII陽性の軸索がSlit-Robo シグナリングが強く活性化されたときに、稀にはあるけれども正中線を交差することは興味深いことである (Fig.7 E)。もしかしたらRac1やRhoAの適切な活性が失われているのかもしれない。

Cdc42の活性化とRac1の不活性化の効果は少なくとも部分的にRoboシグナリングの活性化に対してドミナントであった (Fig.7、Table 1)。これらの結果はCdc42とRac1の両方がSlit-Roboシグナリングによって引き起こされる下流の現象に関して機能していることを示している。Cdc42の活性化とRac1の不活性化によって引き起こされる正中線に

おける表現型はよく似ているけれどもその効果は細胞レベルでは異なっていると考えられる。roboのヘテロ接合体、slitとのヘテロ接合体との遺伝的相互作用において、Rac1の不活性化はRoboシグナリングの活性化においてほとんど影響を受けないのに対して、Cdc42の活性化では明らかに増強するからである (Fig.9)。これらの結果は、Cdc42の活性化はRoboシグナリングの活性化を相殺し、そしてRac1の不活性化はRoboシグナリングの活性化をシグナル経路のいくつかのポイントで阻害している事を示唆している。

Cdc42の活性化、Rac1の活性化の場合は、正中線を交差する軸索の成長円錐は正常に比べて大きくそして長い糸状突起を持っている可能性がある (Fig.6、Fig.7)。まず、Cdc42の活性化、Rac1の活性化はアクチンの重合を促進すると考えられている。また Profilinは単量体アクチンに結合しアクチンフィラメントの矢じり端 (barbed end) においてアクチンの集合を促進すると考えられており、神経芽細胞腫 (neuroblastoma) ではProfilinのドミナントネガティブ型は軸索成長を阻害すること (Suetsugu et al 1998)、ショウジョウバエではProfilinの機能喪失によって運動神経軸索が標的に達する前に止まること (Wills et al 1999) こと、そしてCdc42の活性化やRac1の活性化によって引き起こされるショウジョウバエの正中線交差の表現型はProfilinを1コピーの減少させることによって抑制されることもまた報告されている (Fritz & VanBerkum 2002)。これらの報告から、ショウジョウバエの中枢神経系では、Rac1の活性化やCdc42の活性化は、Profilinを介してアクチンの重合を制御し、正常に比べて大きくそして長い糸状突起を持つ成長円錐を生じさせ、そして軸索成長を促進し、その結果として軸索の正中線交差を引き起こしているのかもしれない。この可能性を考慮にすると、ゼブラフィッシュのRobo2の変異体において網膜神経節細胞 (retinal ganglion cells) の成長円錐がより大きく複雑になっていることは興味深い報告である (Hutson & Chien 2002)。

Rac1の不活性化によってかなり強い軸索の正中線交差の表現型が現れるのはなぜだろうか。アクチン束形成におけるRac1の不活性化の阻害効果によって、もしくは成長円錐におけるアクチンフィラメントのレトログレードフローにおけるRac1の不活性化の阻害効果によって、軸索成長が制御不能になっているのかもしれない (Bradke & Dotti 1999)。Rac1の活性のない状態では成長円錐におけるエンドサイトーシスが正常に機能しないために、軸索の退縮が起こらないという報告がある。その報告では反発因子作用によってRac1の活性は一時的に低下するが、成長円錐が崩壊している間に回復するらしい (Jurney et al 2002)。また、RacとRhoとの拮抗的な相互作用のような、Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパクの間でのクロストークがSlit-Roboシグナリングにおいていくつかの役割を果たしている可能性があるとも考えられる。

軸索ガイダンスにおける細胞骨格形成の制御においてRhoファミリー低分子量GTP結合タンパクの機能的な重要性はよく検討されているけれども、それぞれの低分子量GTP結合タンパクの正確な役割はいくらか複雑である (Gallo & Letourneau 1998、Luo 2000、Dickson 2001)。最近の提案では、軸索誘因因子がRacとCdc42を活性化し、一方軸索反発因子がRhoを活性化していると考えられている (Dickson 2001)。例えば、Eph受容体がRhoを活性化し、そしてRacを不活性化して成長円錐の退縮を引き起こしていることが報告されている (Schmucker & Zipursky 2001、Wahl et al 2000)。ショウジョウバエの運動神経の軸索ガイダンスにおけるPlexin Bシグナリングにおいても同じである (Hu et al 2001)。私の結果はこの一般的な見解とは矛盾しているようである。しかしながら私は、それぞれの低分子量GTP結合タンパクやほかの機能的に関連する分子は複雑に相関しているので最終的な結果は状況依存的な様式で変わりうるという可能性があると考えている (Kuhn et al 1999)。実際、ドミナントネガティブ型のRac1の発現が、可溶

性のSema3Aに対する反応において、成長円錐の崩壊を阻害しているという報告がある (Jin & Strittmatter 1997、Kuhn et al 1999、Vastrik et al 1999)。これらの観察は、Rac1は軸索の退縮に必要であり、おそらくそれはRac1がSema3Aによって引き起こされる成長円錐の崩壊に伴って起こるエンドサイトーシスに関して不可欠な役割を果たしているからであろう (Jurney et al 2002)。Rac1はアクチンフィラメントの重合促進による軸索成長とエンドサイトーシスの促進による成長円錐の崩壊の両方の機能を担い、そのバランスが上流の因子によって時間的、領域的に調節されているのかもしれない。

Rac1の不活性化が恒常的活性化型Robo受容体の効果に対してほとんど完全にドミナントであったという観察はまた、Rac1の活性はRoboの活性化シグナルの伝達に必要である、すなわち正中線における軸索の退縮に必要である (Fig.7 C G、Table 1) ということを示唆している。私はまたSlit-Roboシグナリングが脊椎動物の神経細胞の移動過程において、Cdc42を不活性化し、そしてRacを活性化しているということや、Cdc42の活性化がSlitの反発的な効果を阻害しているという報告も興味深いと考えている (Wong et al., 2001)。

in vitroにおいてRac1とCdc42は成長円錐の形態形成に関して異なった機能を持つ

私は正中線における軸索ガイダンスに関して、Rac1とCdc42との間に機能的な違いを観察した。ショウジョウバエではwing hairや筋細胞の発生においてRhoファミリー低分子量GTP結合タンパク間での機能的な違いが証明されてきたけれども (Van Aelst & D'Souza-Schorey 1997)、成長円錐の形態形成におけるRac1とCdc42の機能的な違い

は明らかではなかった。これを明らかにするために私は、神経突起の形態を詳細に観察するための胚の神経細胞の初代培養を行った。初代培養では、成長円錐のアクチンフィラメントの観察が容易であり、正確な薬理的な研究を行うことができる。*in vitro*では神経細胞は*in vivo*よりも長い期間、接着性の基質上で神経突起を伸ばす事が可能である。したがって、ある特定の分子の活性化や不活性化の効果を誇張して、詳細に観察できる。

私は、Rac1もしくはCdc42の活性化が*in vitro*において神経突起形成において成長円錐の形態とその中のアクチンフィラメントに関して、類似しているけれども異なった効果を持っている事を示した (Fig.11、Fig.12、Fig.13)。神経突起の伸長を抑制するような効果は予想していなかったけれども (Luo 2000)、Rac1、もしくはCdc42の活性化の結果は脊椎動物における以前の発見と一致していた (Kuhn et al 1998、Brown et al., 2000)。私はまたCytochalasin Dの添加に対する反応に関して、Rac1とCdc42との間に明らかな違いを見つけた (Fig.14、Fig.15)。Cytochalasin Dの添加によってCdc42の活性化の場合に関してのみ神経突起の長さを濃度依存的に長くなった。この事は、Cdc42の活性化は成長円錐において過剰なアクチンフィラメントの形成の結果として神経突起が短くなっている事を示唆している。我々はまたRac1の不活性化によって神経突起が長くなることを見つけた (Fig.12 A)。おそらくこれは神経突起の先端におけるアクチン束に対する抑制的な効果のためだと考えられる。これらの観察は、軸索は糸状突起が無いときでさえも伸長できるという考えに一致している (Chien et al 1993)。すなわち、成長円錐におけるアクチンフィラメントの脱重合は結果として軸索成長を促進しうることがある (Bradke & Dotti 1999)。この観点から、Cytochalasin D添加の結果は、Cdc42が成長円錐においてアクチンフィラメントの制御に特異的に関与し、一方、Rac1は、膜輸送のような付加的な機能に関与していることを示唆している (Van Aelst &

D'Souza-Schorey, 1997; Journey et al., 2002)。代わりに、成長円錐の周辺領域においてRac1が生じるアクチン束は、周辺領域のアクチンフィラメントが微小管がその領域に入ってくることを阻害することが示されてきたように (Zhou et al., 2002)、低濃度の Cytochalasin Dの存在下でさえ軸索の成長を阻害しているのかもしれない。

Rac1もしくはCdc42が in vivoですべてのpost-mitotic neuronsで活性化されたとき、私は運動神経の成長円錐はその目的地に達する前に頻繁に止まる事を見つけた (Fig.17 Supplemental figure-1)。私は、Cdc42が活性化されたとき、ショウジョウバエにおいてLBD (lateral bipolar dendrite cell)と呼ばれる感覚神経の成長円錐が野生型のコントロールに比べてより形態変化に富んだ糸状突起を持つことを確認した (Kim et al 2002)。私はまた、Rac1が活性化されたときもまたLBDはより大きな葉状突起を持つ事を見つけた (Fig.17 Supplemental figure-1)。これらの観察は、私が in vitro で観察した神経突起の長さに対する効果そして成長円錐の形態に対する効果は in vivo においても同様にみられる事を示している。また、Cdc42によって引き起こされる大きな成長円錐はアフリカツメガエルにおいてCdc42を過剰発現させた網膜神経節細胞が野生型のコントロールより複雑な成長円錐の形態を示すことにも一致している (Ruchhoeft et al 1999)。

【結語】

本研究では、Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパクであるRho、Rac、Cdc42のうち、主にRac、Cdc42との軸索成長に関する機能的な違いを明らかにしようとした。その目的のために、ショウジョウバエの遺伝学的な手法を用いてすべてのpost-mitotic neuronsにそれらの変異体タンパクを発現させたうえで、in vivoでは正中線における軸索ガイダンスに注目して、in vitroには初代培養した神経細胞の形態変化に注目して解析を行った。

Rac1の不活性とCdc42の活性化は正中線の軸索ガイダンスに関して類似した効果を持ち、本来正中線を交差しない軸索の正中線交差を引き起こした。またRac1の不活性とCdc42の活性化はともにRoboの活性化に対してドミナントであったが、特にRac1の不活性化はほとんど完全にドミナントであった。これらの観察から、Rac1とCdc42はRobo受容体によって開始される下流の現象に関して異なった機能を持ち、また、正確なSlit-RoboシグナリングにはRac1とCdc42の適切な活性が必要であることが示唆された。

初代培養系を用いた解析では、Rac1の活性化とCdc42の活性化は、ともに神経突起の先端に大きな成長円錐状の構造を引き起こすけれども、phalloidin染色の染色パターンの違い、サイトカラシンDに対する反応性の違いから、アクチンフィラメントレベルでは異なった構造であることが明らかになった。また、軸索成長に関して、Cdc42は成長円錐におけるアクチンフィラメントの制御に特異的に関与しているのに対し、Rac1はそれ以外の機能を有している可能性が示唆された。

【参考文献】

Awasaki, T., Saito, M., Sone, M., Suzuki, E., Sakai, R., Ito, K. & Hama, C. (2000) The *Drosophila* trio plays an essential role in patterning of axons by regulating their directional extension. *Neuron*, **26**, 119-131.

Bashaw, G.J. & Goodman, C.S. (1999) Chimeric axon guidance receptors: the cytoplasmic domains of slit and netrin receptors specify attraction versus repulsion. *Cell*, **97**, 917-926.

Bashaw, G.J., Hu, H., Nobes, C.D. & Goodman, C.S. (2001) A novel Dbl family RhoGEF promotes Rho-dependent axon attraction to the central nervous system midline in *Drosophila* and overcomes Robo repulsion. *J Cell Biol.*, **155**, 1117-1122.

Bashaw, G.J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T. & Goodman, C.S. (2000) Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor. *Cell*, **101**, 703-715.

Bateman, J., Shu, H. & Van Vactor, D. (2000) The guanine nucleotide exchange factor trio mediates axonal development in the *Drosophila* embryo. *Neuron*, **26**, 93-106.

Bradke, F. & Dotti, C.G. (1999) The role of local actin instability in axon formation. *Science*, **283**, 1931-1934.

Brand, A.H. & Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, **118**, 401-415.

Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M. & Kidd, T. (1999) Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell*, **96**, 795-806.

Brown, M.D., Cornejo, B.J., Kuhn, T.B. & Bamberg, J.R. (2000) Cdc42 stimulates neurite outgrowth and formation of growth cone filopodia and lamellipodia. *J. Neurobiol.*, **43**, 352-364.

Campos-Ortega, J.A. & Hartenstein, V. (1985) *The embryonic development of Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag, Berlin.

Chien, C.B., Rosenthal, D.E., Harris, W.A. & Holt, C.E. (1993) Navigational errors made by growth cones without filopodia in the embryonic *Xenopus* brain. *Neuron*, **11**, 237-251.

Cross, D.P. & Sang, J.H. (1978) Cell culture of individual *Drosophila* embryos. I. Development of wild-type cultures. *J Embryol Exp Morphol.*, **45**, 161-172.

Dickson, B.J. (2001) Rho GTPases in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol.*, **11**, 103-110.

Fritz, J.L. & VanBerkum, M.F.A. (2002) Regulation of Rho family GTPases is required to prevent axons from crossing the midline. *Dev. Biol.*, **252**, 46-58.

Gallo, G. & Letourneau, P.C. (1998) Axon guidance: GTPases help axons reach their targets. *Curr Biol.*, **8**, R80-82.

Gitai, Z., Yu, T.W., Lundquist, E.A., Tessier-Lavigne, M. & Bargmann, C.I. (2003) The netrin receptor UNC-40/DCC stimulates axon attraction and outgrowth through enabled and, in parallel, Rac and UNC-115/AbLIM. *Neuron*, **37**, 53-65.

Hakeda-Suzuki, S., Ng, J., Tzu, J., Dietzl, G., Sun, Y., Harms, M., Nardine, T., Luo, L. & Dickson, B.J. (2002) Rac function and regulation during *Drosophila* development. *Nature*, **416**, 438-442.

Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**, 509-514.

Hu, H., Marton, T.F. & Goodman, C.S. (2001) Plexin B mediates axon guidance in *Drosophila* by simultaneously inhibiting active Rac and enhancing RhoA signaling. *Neuron*, **32**, 39-51.

Hutson, L.D. & Chien, C.B. (2002) Pathfinding and error correction by retinal axons: the role of *astray/robo2*. *Neuron*, **33**, 205-217.

Jalink, K., van, Corven E.J., Hengeveld, T., Morii, N., Narumiya, S., Moolenaar, W.H. (1994) Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell Biol.*, **126**, 801-810.

Jin, Z. & Strittmatter, S.M. (1997) Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *J Neurosci.*, **17**, 6256-6263.

Jurney, W.M., Gallo, G., Letourneau, P.C. & McLoon, S.C. (2002) Rac1-mediated endocytosis during ephrin-A2- and semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *J Neurosci.*, **22**, 6019-6028.

Kaufmann, N., Wills, Z.P. & Van Vactor, D. (1998) *Drosophila* Rac1 controls motor axon guidance. *Development*, **125**, 453-461.

Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K.J., Fetter, R.D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., Tear, G. (1998) Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell.*, **92**, 205-215.

Kidd, T., Bland, K.S. & Goodman, C.S. (1999) Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell*, **96**, 785-794.

Kim, M.D., Kolodziej, P. & Chiba, A. (2002) Growth cone pathfinding and filopodial dynamics are mediated separately by Cdc42 activation. *J Neurosci.*, **22**, 1794-1806.

Kozma R, Sarnar S, Ahmed S, Lim L. (1997) Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 1201-1211

Kuhn, T.B., Brown, M.D. & Bamberg, J.R. (1998) Rac1-dependent actin filament organization in growth cones is necessary for beta1-integrin-mediated advance but not for growth on poly-D-lysine. *J. Neurobiol.*, **37**, 524-540.

Kuhn, T.B., Brown, M.D., Wilcox, C.L., Raper, J.A. & Bamburg, J.R. (1999) Myelin and collapsin-1 induce motor neuron growth cone collapse through different pathways: inhibition of collapse by opposing mutants of rac1. *J Neurosci.*, **19**, 1965-1975.

Kuhn, T.B., Meberg, P.J., Brown, M.D., Bernstein, B.W., Minamide, L.S., Jensen, J.R., Okada, K., Soda, E.A. & Bamburg, J.R. (2000) Regulating actin dynamics in neuronal growth cones by ADF/cofilin and rho family GTPases. *J. Neurobiol.*, **44**, 126-144.

Liebl, E.C., Forsthoefel, D.J., Franco, L.S., Sample, S.H., Hess, J.E., Cowger, J.A., Chandler, M.P., Shupert, A.M. & Seeger, M.A. (2000) Dosage-sensitive, reciprocal genetic interactions between the Abl tyrosine kinase and the putative GEF trio reveal trio's role in axon pathfinding. *Neuron*, **26**, 107-118.

Littleton, J.T., Bellen, H.J. & Perin, M.S. (1993) Expression of synaptotagmin in *Drosophila* reveals transport and localization of synaptic vesicles to the synapse. *Development*, **118**, 1077-1088.

Lundquist, E.A., Reddien, P.W., Hartweg, E., Horvitz, H.R., Bargmann, C.I. (2001) Three *C. elegans* Rac proteins and several alternative Rac regulators control axon guidance, cell migration and apoptotic cell phagocytosis. *Development*. **128**, 4475-4488.

Luo, L., Liao, Y.J., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1996) Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature*, **379**, 837-840.

Luo, L. (2000) Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.*, **1**, 173-180.

Luo, L., Liao, Y.J., Jan, L.Y. & Jan, Y.N. (1994) Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev.*, **8**, 1787-1802.

Newsome, T.P., Schmidt, S., Dietzl, G., Keleman, K., Asling, B., Debant, A. & Dickson, B.J. (2000) Trio combines with dock to regulate Pak activity during photoreceptor axon pathfinding in *Drosophila*. *Cell*, **101**, 283-294.

Ng, J., Nardine, T., Harms, M., Tzu, J., Goldstein, A., Sun, Y., Dietzl, G., Dickson, B.J. & Luo, L. (2002) Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. *Nature*, **416**, 442-447.

Ruchhoeft, M.L., Ohnuma, S., McNeill, L., Holt, C.E. & Harris, W.A. (1999) The neuronal architecture of *Xenopus* retinal ganglion cells is sculpted by rho-family GTPases in vivo. *J Neurosci.*, **19**, 8454-8463.

Schmucker, D. & Zipursky, S.L. (2001) Signaling downstream of Eph receptors and ephrin ligands. *Cell*, **105**, 701-704.

Shekarabi, M. & Kennedy, T.E. (2002) The netrin-1 receptor DCC promotes filopodia formation and cell spreading by activating Cdc42 and Rac1. *Mol. Cell. Neurosci.*, **19**, 1-17.

☞ Simpson, J.H., Bland, K.S., Fetter, R.D. & Goodman, C.S. (2000) Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: a combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell*, **103**, 1019-1032.

Stein, E. & Tessier-Lavigne, M. (2001) Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science*, **291**, 1928-1938.

☞ Tapon, N. & Hall, A. (1997) Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.*, **9**, 86-92.

Van Aelst, L. & D'Souza-Schorey, C. (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.*, **11**, 2295-2322.

Vastrik, I., Eickholt, B.J., Walsh, F.S., Ridley, A. & Doherty, P. (1999) Sema3A-induced growth-cone collapse is mediated by Rac1 amino acids 17-32. *Curr Biol.*, **9**, 991-998.

Wahl, S., Barth, H., Ciossek, T., Aktories, K. & Mueller, B.K. (2000) Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *J Cell Biol.*, **149**, 263-270.

Wills, Z., Bateman, J., Korey, C.A., Comer, A. & Van Vactor, D. (1999) The tyrosine kinase Abl and its substrate enabled collaborate with the receptor phosphatase Dlar to control motor axon guidance. *Neuron*, **22**, 301-312.

Wong, K., Ren, X.R., Huang, Y.Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S.M., Mei, L., Wu, J.Y., Xiong, W.C. & Rao, Y. (2001) Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell*, **107**, 209-221.

Yu, T.W., Hao, J.C., Lim, W., Tessier-Lavigne, M. & Bargmann, C.I. (2002) Shared receptors in axon guidance: SAX-3/Robo signals via UNC-34/Enabled and a Netrin-independent UNC-40/DCC function. *Nature Neurosci.*, **5**, 1147-1154.

Zhou, F.Q., Waterman-Storer, C.M. & Cohan, C.S. (2002) Focal loss of actin bundles causes microtubule redistribution and growth cone turning. *J Cell Biol.*, 157, 839-849

【図の説明】

Fig.1

成長円錐状上の受容体が受け取ったリガンド刺激は細胞骨格の編成再編成の制御、特にアクチンの重合、脱重合へと収束してゆく

軸索成長期には、軸索はその先端の成長円錐が伸長方向を探索しながら正しい標的に向かって伸長する。その探索過程では、成長円錐の周りの環境に存在する軸索ガイダンス分子（リガンド）は成長円錐上の受容体に結合する（*）。例として、Slitリガンドに対するRobo受容体、Netrinリガンドに対するDCC受容体、Ephrinリガンドに対するEph受容体などがある。そのようなリガンド刺激は成長円錐内の下流の様々な分子を介しながら統合され、最終的にはアクチンの重合、あるいは脱重合を制御している（矢印）。アクチンの重合が促進される領域では成長円錐の構造が安定化し（☆）、脱重合が促進される領域では部分的に崩壊する（★）。結果として、アクチンの重合が促進された領域の存在する方向に軸索は伸長する。

様々なリガンド刺激が最終的にはアクチンの重合、脱重合に収束してゆくという事は、そのシグナル伝達の下流に共通の因子が存在している事を意味している（#）。本研究ではこのような共通の因子の候補としてRhoファミリー低分子量GTP結合タンパク、Rac、Cdc42に注目し、軸索ガイダンスや神経突起形成におけるそれらの機能を調べた。

Fig.2

Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパクは分子スイッチとして機能する

Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパクは、GTP結合型の活性化状態、GDP結合型の

不活性化状態を行き来することによって、細胞外からの刺激をアクチン細胞骨格に伝達する分子スイッチとして機能している。

Guanine nucleotide exchange factor (GEF) は、GDP結合型のRho GTPaseに作用してGDP-GTP 交換反応を促進し、Rho GTPaseを活性化状態にする。活性化状態になったRho GTPaseは下流のエフェクターと結合できるようになり、シグナルが伝達される。反対に、GTP activating protein (GAP) は、GTP結合型のRho GTPaseに作用して内在性のRho GTPaseのGTP加水分解活性を高めることによって、Rho GTPaseを不活性化状態にする。

Fig.3

UAS-GAL4 システムを用いてすべてのpost-mitotic neuronsに目的の変異タンパクを発現させる

GAL4は酵母由来の転写因子で、標的DNA配列 UASに特異的に結合し下流遺伝子を発現する。ショウジョウバエには、P因子ベクターを用いてゲノムに挿入したあるエンハンサーの支配下にあるGAL4遺伝子をもつGAL4系統や、P因子ベクターを用いてゲノムに挿入した特定のプロモーターの下流につないだGAL4遺伝子をもつGAL4系統がある。これらのGAL4系統を解析したい遺伝子をUASにつないだ組換えDNAをもつ系統に掛け合わせると、次の世代では、GAL4遺伝子の発現パターンに従って、目的の遺伝子を発現させることができる。

本研究では最終分裂を終えたすべての神経細胞 (post-mitotic neurons) に発現するElavのプロモーターの下流にGAL4遺伝子をもつGAL4系統 (elav-GAL4と表記) を利用して、Rho GTP結合タンパクの活性化型変異タンパクや不活性化型変異タンパクをそれらの

神経細胞に発現させた。

Rho GTP結合タンパクの場合、活性化型（恒常的活性化型）はRho GTP結合タンパクの加水分解活性を阻害する事によって上流からのシグナルがないのにも関わらず活性化状態を維持している変異タンパクである。一方、不活性化型（ドミナントネガティブ型）は、GEFに結合して内在性のRho GTP結合タンパクの機能を阻害し、それ自身は機能しない変異タンパクである。

Fig.4

初代培養系の確立

(A) 胚の初代培養系のスキーム。この初代培養系では神経母細胞（neuroblast）が生じる3-5時間胚から神経細胞を得た。遺伝的に均一の場合は、ある程度の量の胚をエッペンドルフチューブに集め、ホモゲナイザーで胚を破碎し、胚の残骸を取り除いた後、polyethyleneimineコートしたカバーガラス上にプレATINGした。場合によっては、細くしたガラス管を用いてひとつひとつ胚をピペッティングによって破碎した。

神経細胞がカバーガラスに接着し、神経突起が伸長したときには、神経突起の長さやその先端の構造（葉状突起、糸状突起など）に注目して観察した。

中枢神経系のサブセットや運動ニューロンを認識する抗体1D4（抗FasII抗体）（B）や中枢神経系特異的抗体である1D4（C）を用いて培養した細胞を染色すると大部分の細胞が染色され、細胞体や神経突起が観察された。これは、この初代培養系では中枢神経系由来の神経細胞が豊富に接着していることを意味している。

Fig.5

胚の中枢神経系における軸索ガイダンスに関するRac1とCdc42の機能

1D4、BP102によるstage16胚の免疫組織化学染色によって中枢神経系軸索を染色した。左側が前側そして右側が後側である。

(A)野生型。梯子状の中枢神経系(CNS)の軸索の骨組み(scaffold)がBP102によって染色される。(C)Rac1V12.1、(I)Cdc42N17.3-17を強制発現させたCNSがほぼ正常であるのに対して、(E)Rac1N17.12-10、(G)Cdc42V12.2を強制発現させたCNSは交連神経が太くなり(矢頭)、長軸に沿った神経束が細くなった(矢印)。以上のBP102によるCNSのpathfindingの比較からRac1の不活性化とCdc42の活性化は類似した効果を示し、中心線を越える軸索を増加させることが見いだされた。

(B)野生型。中心線を挟んで両側に、3本の長軸に沿った神経束のサブセットが1D4によって染色される。(D)Rac1V12.1、(E)Rac1N17.12-10、(F)Cdc42V12.2を強制発現させると中心線を越える軸索が生じるのに対して(矢頭)、(J)Cdc42N17.3-17の強制発現では生じない。さらに(D)、(F)、(H)を比較すると(D)Rac1V12.1を強制発現させた1D4-positive axonは最も正常に近く、(F)Rac1N17.12-10を強制発現させた軸索は最も伸長が悪く、(H)Cdc42V12.2を強制発現させた軸索は最も中心線を越える軸索が多い。

以上の1D4による染色パターンとBP102の染色パターンを考慮すると、Rac1の活性化は、CNS軸索のsubsetのレベルではpathfindingを乱だすもののCNS全体レベルでのpathfindingにはほとんど影響を与えないのに対して、Rac1の不活性化、Cdc42の活性化はCNS軸索のsubsetのレベルではやや異なった効果を示すものの、CNS全体のレベルでのpathfindingには類似した効果を示すことが見いだされた。Scale barは25 μ m。

Fig.6

中枢神経系におけるRac1の不活性化とCdc42の活性化の表現型は*robo*変異体や*slit*の変異体の表現型に類似する

モノクローナル抗体1D4、BP102によるstage16胚の免疫組織化学染色によって中枢神経系軸索を染色した。左側が前側そして右側が後側である。

(A)Cdc42V12.2の強制発現。1D4を使って染色している。中心線上に集まる神経線維(矢頭)や中心線に向かう神経線維(矢印)が存在する。(B)Cdc42V12.2の強制発現。

BP102を使って染色している。長軸に沿った神経束は非常に細くなり(矢頭)、神経線維はCNSの中心線上で塊状になる(短い矢印)。(この表現型は*slit mutant*の表現型に近い。)

(C)Cdc42V12.2とRac1V12.1の同時強制発現。1D4を使って染色している。中枢神経系軸索のpathfindingは完全に乱れている。CNSを出てもなく止まっている運動神経の先端が観察される(矢頭)。(D)Rac1N17.12-10の強制発現。神経線維の伸長が悪く、止まっている神経線維が存在する(矢頭)。(E)*slit*変異体。(F)*robo*変異体。交連神経の神経束が太くなっている(矢頭)。Scale barは25 μ m。

Fig.7

Rac1の不活性化やCdc42の活性化はRoboシグナリングの活性化に対してドミナントである

モノクローナル抗体BP102 (A-D)、1D4 (E-H) を用いてstage16胚の中枢神経系の軸索を染色して可視化した。Robo受容体の活性化型 (Robo(YF)) をpost-mitotic neuronsに発現させた。Robo(YF)に加えて、Rac1V12.1 (B)(F)、Rac1N17.12-10

(C)(G)、Cdc42V12.2 (D)(H)を発現させた。(A)(E) Roboシグナリングの活性化の結果、交連神経の神経束の無い表現型を生じた。長軸に沿った神経束間の幅は広がった。1D4陽性軸索がたまに正中線を交差しているのが観察された (E 矢印)。これは野生型のコントロールでは決して見られなかった。(B)(F)強いRoboシグナリングの活性化のもとでRac1が活性化するとそれぞれのセグメントにおいて少数の軸索が正中線を交差しているようだった (矢印)。(C)(G) Rac1の不活性化はRoboシグナリングに対してほとんど完全にドミナントであった。そのため、多くのBP102陽性軸索、1D4陽性軸索正中線を交差した (矢印)。長軸に沿った神経束にはしばしば間隙が存在していた (矢印)。長軸に沿った神経束間は明らかに狭くなっていた。この表現型はRac1の不活性化単独によって起こる表現型とほぼ同じである。(D)(H) Cdc42の活性化もまたRoboシグナリングの活性化に対してドミナントであるので、多くの軸索、特に1D4陽性軸索が正中線を交差するのを見つけた。また長軸に沿った神経束に多くの間隙が観察された (矢頭)。しかしながら、一般的にCdc42の活性化の効果はRoboシグナリングの活性化によっていくらか抑制されているようであった。(D)において、軸索成長の一般的な阻害が観察されたけれどもBP102染色パターンは理解を誤らせるかもしれない。というのは軸索の先端に近い領域はBP102によって染色されないからである。Scale bar は25 μ m。

Fig.8

Roboタンパク、Robo3タンパクは正中線を交差する、本来正中線を交差しない軸索に発現する

Stage16胚の中樞神経系をモノクローナル抗体13C9 (抗Robo抗体) (A-E)、14C9 (抗Robo3抗体) (F-J) を用いて染色した。(A)(F)野生型のコントロール。(B-E、G-

H) すべてのpost-mitotic neuronsにそれぞれRac1V12.1(B)(G)、Rac1N17.12-10(C)(H)、Cdc42V12.1(D)(I)を発現させた。(E)(J) *Rac1(Rac1J10)*、*Rac2(Rac2Δ)*、*Mtl(MtlΔ)*の三重変異体。

(A)(F)野生型のコントロールではRoboタンパク、Robo3タンパクを発現する軸索は正中線を交差せず、長軸に沿った神経束を形成する。(B)(G) Rac1を活性化させてもRoboタンパク、Robo3タンパクを発現する軸索はほとんど正中線を交差しない。その他の場合において(C-E、H-J)はRoboタンパク、Robo3タンパクを発現しているにもかかわらず余分な軸索が正中線を交差しているのが観察された。この結果は、中枢神経系の軸索ガイダンスにおいてRoboシグナリングが正常に機能するためにはRacやCdc42の適切な活性が必要である事を示唆している。Scale barは25 μm。

Fig.9

Cdc42の活性化による抗FasII陽性軸索の正中線交差の表現型は*robo*もしくは*slit*を1 copy減少させることで増強する

モノクローナル抗体1D4 (A-E) を用いてStage16胚の軸索を可視化した。

(B、D) *robo²⁵⁷⁰* (B) や *slit^{F107}* (D)のヘテロ接合体では1D4陽性の長軸に沿った神経束の間隙はない。(C、E)しかしながらそれぞれの遺伝的背景の下ですべてのpost-mitotic neuronsにCdc42V12.2を発現させると、Cdc42V12.2の表現型に比べてより多くの軸索が正中線を交差したので、セグメント間での軸に沿った神経束の間隙がしばしば観察された(C、E 矢頭)。両側の軸に沿った神経束の幅は明らかに狭くなっていた。Scale barは25 μm。

結果を(F)に要約した。それぞれの場合の遺伝型は最も左のカラムに記述している。

1D4を用いて染色し、完全に間隙になっているセグメントの数を数えた (C、E 矢頭)。

(C、E 矢頭)。 *robo*や*slit*のヘテロ接合体の遺伝的背景を持つことによって間隙の割合は増加した。

Fig.10

初代培養系におけるショウジョウバエ神経突起成長の経時的観察

抗HRP抗体による免疫組織化学染色によって神経細胞を可視化している。(A) 3 h。

神経突起が伸長し始める。神経突起の先端に成長円錐 (矢頭)、軸索 (短い矢印)、細胞体 (長い矢印) が観察される。(B) 12 h。細胞体が近い距離にある神経突起はお互いに連結し始める (矢印)。(C) 24 h 神経突起は連結し始める (短い矢印) と同時に形態が複雑になってゆく (長い矢印)。(D) 60 h。神経突起はさらにお互いに連結し (短い矢印)、網目のようになってゆく (長い矢印)。60 h以降は少しずつ複雑になってゆく。

Scale bar は全て50 μ m。

Fig.11

初代培養系における神経突起の形態に関するRac1の活性化、Cdc42の活性化の効果

抗HRP抗体による免疫組織化学染色によって神経細胞を可視化している。(D)(E)(F)はそれぞれ(A)(B)(C)の拡大。細胞体 (長い矢印)、神経突起 (短い矢印)、成長円錐様構造 (矢頭) が観察される。(A)(D) 野生型。(B)(E) Rac1V12.1 を強制発現。野生型に比べて神経突起が短く、神経突起の先端の成長円錐様構造が大きい(矢頭)。成長円錐様構造のさらに遠位部には仮足様突起の構造が存在する(*)。(C)(F)Cdc42V12.2を強制発現。

Rac1V12.1 と同様に野生型に比べて神経突起は短く、その先端に大きな成長円錐様構造が存在する(矢頭)。Rac1V12.1に比べて、仮足様突起の構造はより多く、長い傾向がある(*) (fig.3, fig.5) 。 Scale bar は50 μ m。

Fig.12

神経突起の形態に関するRac1、Cdc42の効果の定量

Rac1、Cdc42の神経突起の形態に与える効果を、神経突起の長さ、葉状突起様成長円錐の数、糸状突起の数に注目して定量した。(A)では、すべてのpost-mitotic neuronsにRac1V12.1、Cdc42V12.2、Rac1N17.12-10、Cdc42N17.3-17を発現させている。また基質であるpolyethyleneimineの濃度は右半分のカラムの実験の方が左半分のカラムの実験に比べて低い。Student's t-testを野生型のコントロールに比較して行った。Rac1V12 (n=120)、Cdc42V12 (n=120)、Rac1N17 (n=60) では $p < 0.0001$ (*) であり、Cdc42N17.3-17 (n=60) では $p = 0.074$ であった。(B)それぞれの遺伝型に関して、細胞クラスター20個あたりの、5、7.5、10 μ m以上の幅を持つ成長円錐の総数を数えた。(C)それぞれの遺伝型に関して、細胞クラスター20個から7.5 μ m以上の幅を持つ成長円錐を選び、それに付随する5、7.5、10 μ m以上の長さの糸状突起の総数を数えた。

Cdc42の活性化はRac1の不活性化より効果的に大きな成長円錐や長い糸状突起を引き起こす事が示された。

Fig.13

Rac1あるいはCdc42を活性化させた神経細胞の初代培養系におけるPhalloidin

染色

(D)(E)(F)はそれぞれ(A)(B)(C)の拡大。(A)(B)(C)細胞体(長い矢印)、神経突起(短い矢印)、成長円錐様構造(矢頭)が観察される。(D)野生型。神経突起上に粒状にシグナルが観察される。(E) Rac1V12.1を強制発現。葉状突起上の太く短い仮足様突起に強いシグナルが観察される(*)。(F)Cdc42V12.2を強制発現。葉状突起から長い鋭い仮足様突起にかけて一様のシグナルが観察される(*)。以上の観察からRac1V12.1、Cdc42V12.2の強制発現はお互いに異なったアクチン線維の重合を制御し、異なった神経突起の先端の構造の形成を引き起こすと考えられる。Scale barは25 μ m。

Fig.14

初代培養系における神経突起の形態に関するCytochalasin Dの効果

培養開始後12hにCytochalasin D(CyD)を添加し、2.5 dに抗HRP抗体による免疫組織化学染色を行った。(A)(D)WT, (B)(E)Rac1V12.1を強制発現, (C)(F)Cdc42V12.2を強制発現。(A)(D)WT。CyDを添加すると神経突起の構造は単純化するが長さは変化しない。(B)(E)Rac1V12.1を強制発現。CyDを添加すると神経突起の構造は単純化し、葉状突起、仮足様突起は消失する。CyDを加えない場合と比較すると長さに変化は少ない。(C)(F)Cdc42V12.2を強制発現。CyDを添加すると神経突起の構造は単純化し(矢印)、葉状突起、仮足様突起は消失する(矢頭)。CyDを加えない場合と比較すると神経突起は長い。以上の結果からCyD添加に対する形態変化に差違があることが明らかになった。

Rac1、Cdc42の機能獲得型の過剰発現させた神経突起形態の差違はアクチン線維の重合

に依存した形態の差違であることが示唆された。

Scale bar は50 μ m。

Fig.15

神経突起の長さの変化に関するCytochalasin DおよびLatrunculin Aの効果の定

量

初代培養系においてCytochalasin DおよびLatrunculin Aが神経突起の長さに与える効果を定量した。(A) Cdc42の強い活性の存在下ではCytochalasin Dの濃度が0.1 μ g/ml以下のときにCytochalasin Dの濃度の増加に伴って神経突起の長さが長くなる傾向があった。Latrunculin Aに関しても同様の傾向があった (B)。

Student's t-testはCytochalasin Dの濃度が0 μ g/mlと0.1 μ g/mlとき(A)、Latrunculin Aの濃度が0 μ g/mlと0.1 μ g/mlとき(B)の神経突起の長さの差に関して行った。Cytochalasin Dを作用させた場合 (A)、Cdc42V12 (n=120) では $p < 0.0001$ 、Rac1V12 (n=120) では $p = 0.025$ 、WT (n=60) では $p = 0.32$ であり、Latrunculin Aを作用させた場合 (B)、Cdc42V12 (n=120) では $p < 0.0001$ であった。

Fig.16

胚の初代培養におけるシナプスタンパク質Synaptotagminの免疫組織化学

(A)(C)(E)は位相差顕微鏡像、(B)(D)(F)はそれぞれ(A)(C)(E)に対応する抗Synaptotagmin抗体によって染色された蛍光像である。(A)(B)WT。神経突起の先端にシグナルがあり (矢頭)、先端以外の領域 (短い矢印) や細胞体 (長い矢印) にはシグナ

ルがない。従って、先端部分は成長円錐、先端以外の領域は軸索と考えられる。また粒状のシグナルのある領域(*)はvaricosityと考えられる。(D)Rac1V12.1や(F)Cdc42V12.2を強制発現させて生じる葉状突起様構造にシグナルがある(矢頭)。従ってこの領域は軸索先端の成長円錐であると考えられる。Scale barは50 μ m。

Fig.17 Supplemental figure-1

Rac1が活性化すると運動ニューロンの軸索は標的に達する前に止まる。

stage16/17胚の最も背側の筋肉を神経支配する運動ニューロンの軸索を、モノクローナル抗体1D4を用いて染色した。上が背側、左が前側である。(A)野生型。写真内の4本の軸索はすべて標的の筋肉に達している(矢頭)。(B)UAS-GAL4システムを利用してすべてのpost-mitotic neuronsにRac1の活性化型を発現させてRac1を活性化した。写真内の4本の軸索のうち両端の2本は標的の筋肉に達しているが、真ん中の2本はその前に途中でとまっている(矢頭)。(B)のような表現型はCdc42を活性化した場合においても同様に観察された。

Fig.17 Supplemental figure-2

Rac1が活性化されるとLBDはより大きな葉状突起をもつようになる。

stage16/17胚のLBD (lateral bipolar dendrite cells) を、モノクローナル抗体1D4を用いて染色した。矢印は細胞体を指し示している。上が前側、左が腹側である。(A)(A')野生型。(B)(B')UAS-GAL4システムを利用してすべてのpost-mitotic neuronsにRac1の活性化型を発現させてRac1を活性化した。背側方向に伸長する軸索に野生型では見られないような葉状突起が生じている(矢頭)。

Table 1

中枢神経系の正中線を交差に関して、Cdc42の活性化とRac1の不活性化の効果の 定量

正中線交差に関して、Cdc42の活性化とRac1の不活性化の結果を定量し要約した。
最も左側のカラムに記述しているのが、すべてのpost-mitotic neuronsに発現させたコン
ストラクトである。

(A) 正中線を交差している余分な軸索の数は、stage16胚において明らかに正中線を
交差している1D4陽性軸索の数を数えた。(B) Stage16胚においてBP102によって染色
された胚の交連神経の数を数えた。交連神経は、なし (absent)、野生型より細い
(thin)、野生型と同等 (WT)、野生型より太い (thick) の範疇に分類した。

Fig.1

成長円錐上の受容体が受け取ったリガンド刺激は細胞骨格の編成、再編成の制御、特にアクチンの重合脱重合へと収束してゆく

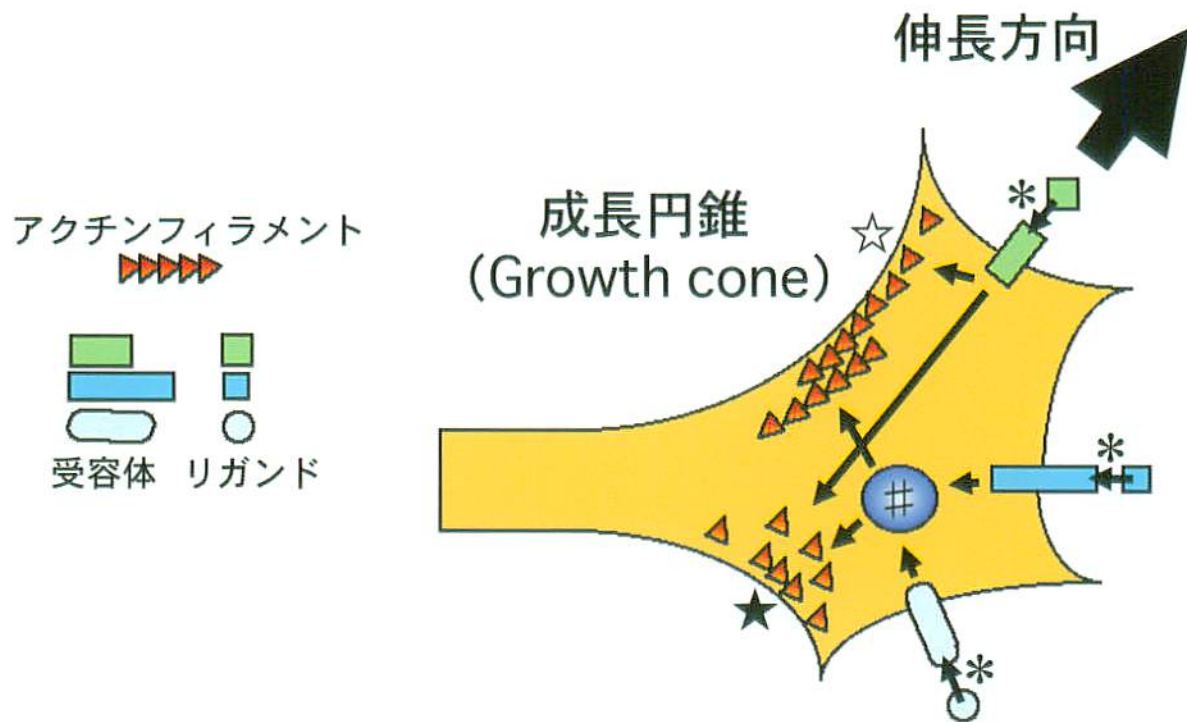


Fig.2

Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパクは分子スイッチとして機能する

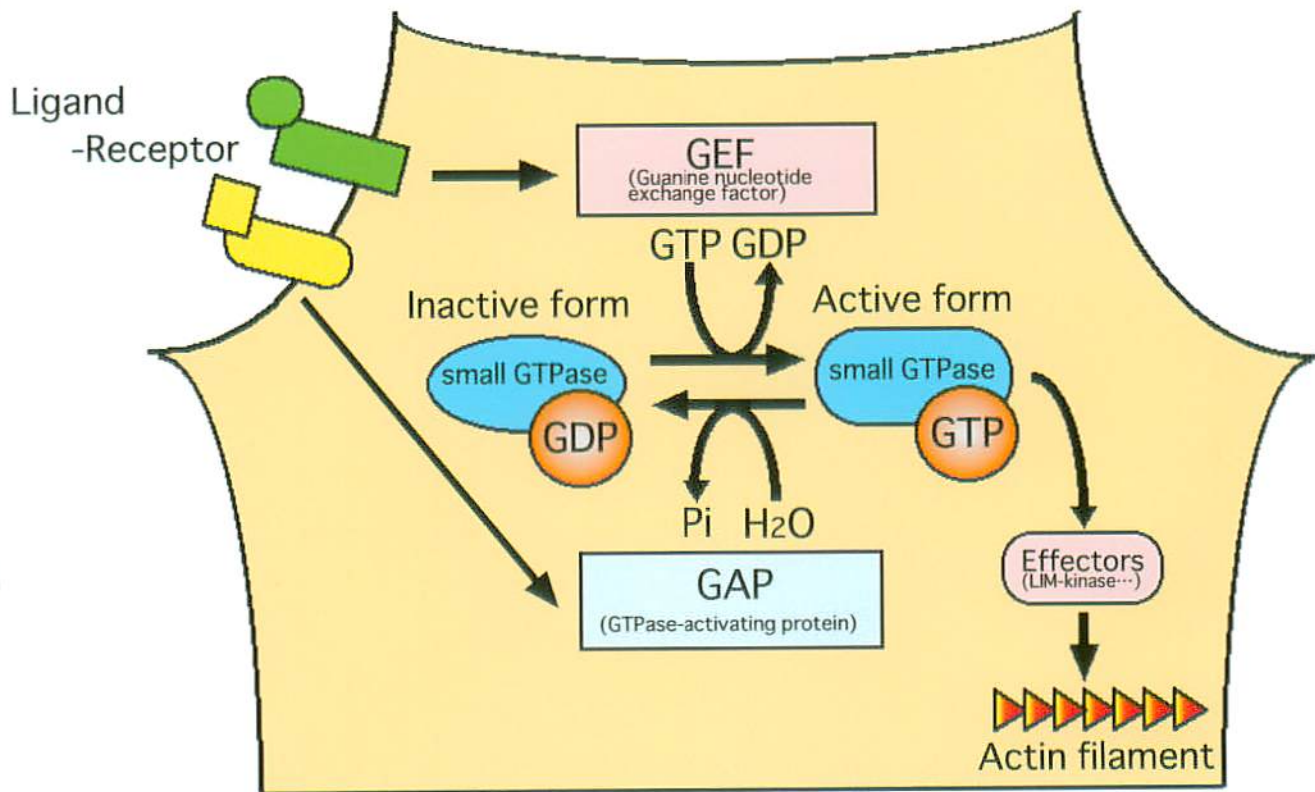
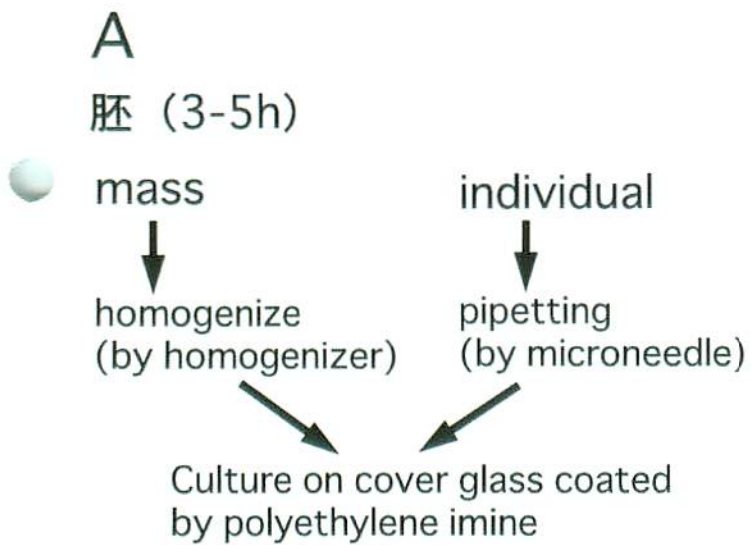


Fig.3

初代培養系



細胞が接着し、神経突起が伸長した場合

- ・ 神経突起の長さ
- ・ 先端の構造(葉状仮足、糸状仮足)

● などに注目して観察する

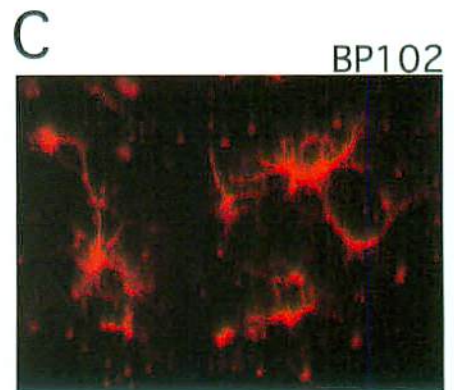
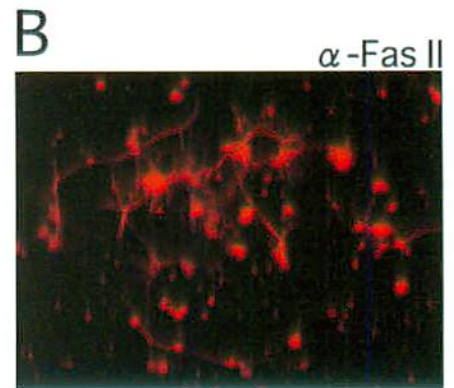


Fig.4

UAS-GAL4システムを用いてすべてのpost-mitotic neuronsに
目的の変異タンパクを発現させる

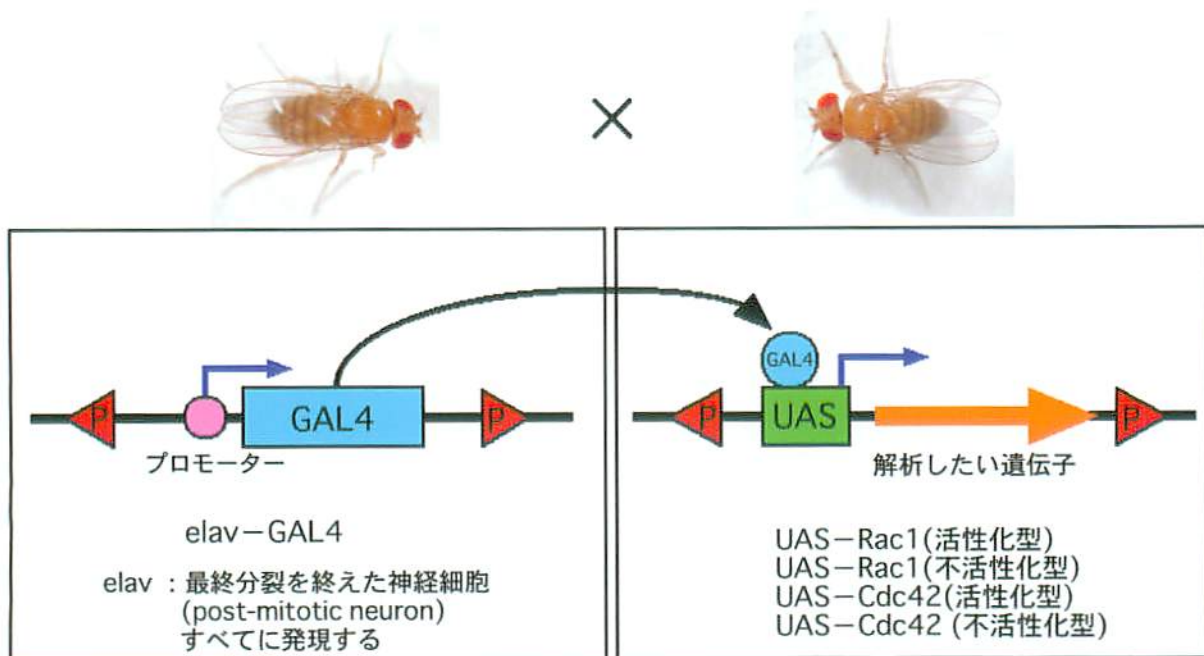


Fig.5

胚の中中枢神経系における軸索ガイダンスに関するRac1とCdc42の機能

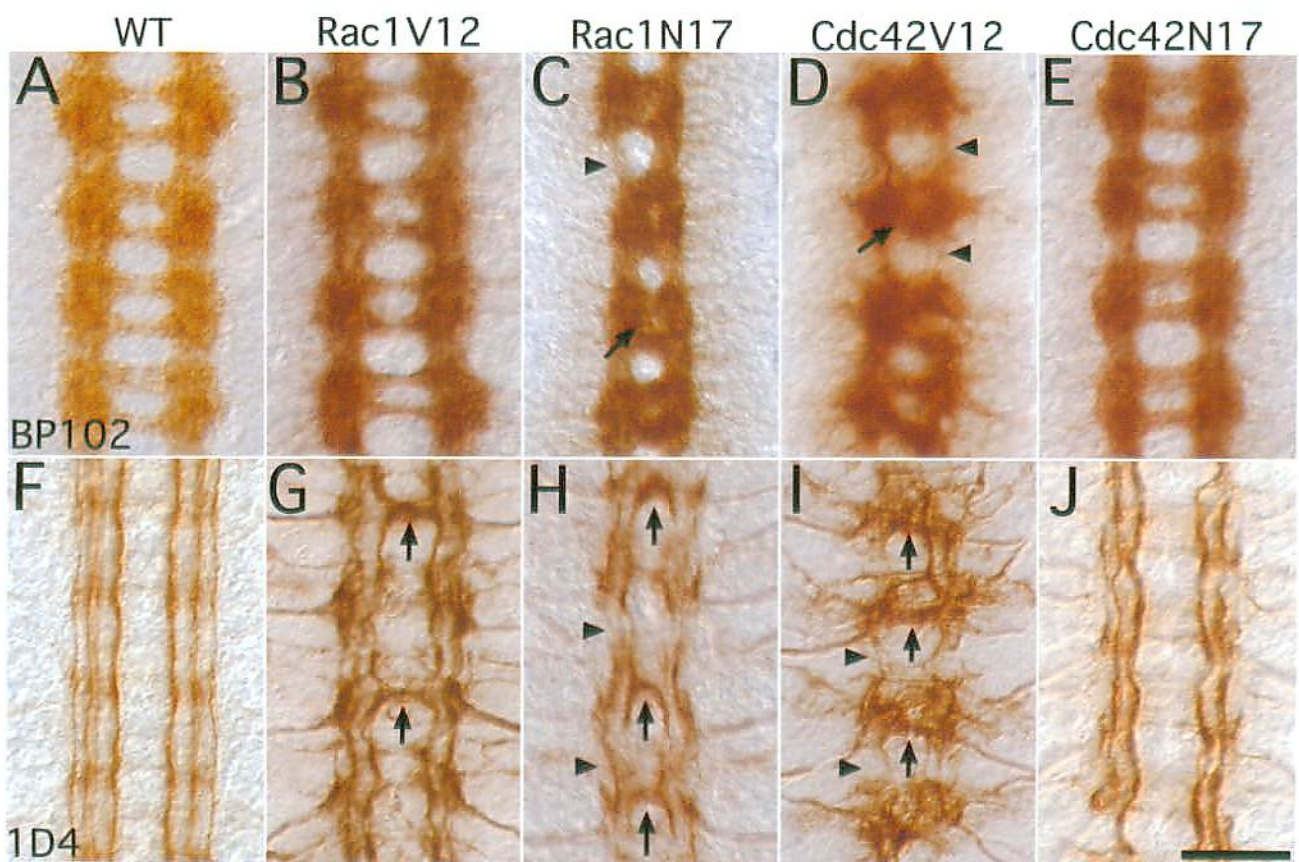


Fig.6

胚の中枢神経系におけるRac1の不活性化およびCdc42の活性化の表現型は*robo*変異体や*slit*変異体の表現型に類似する

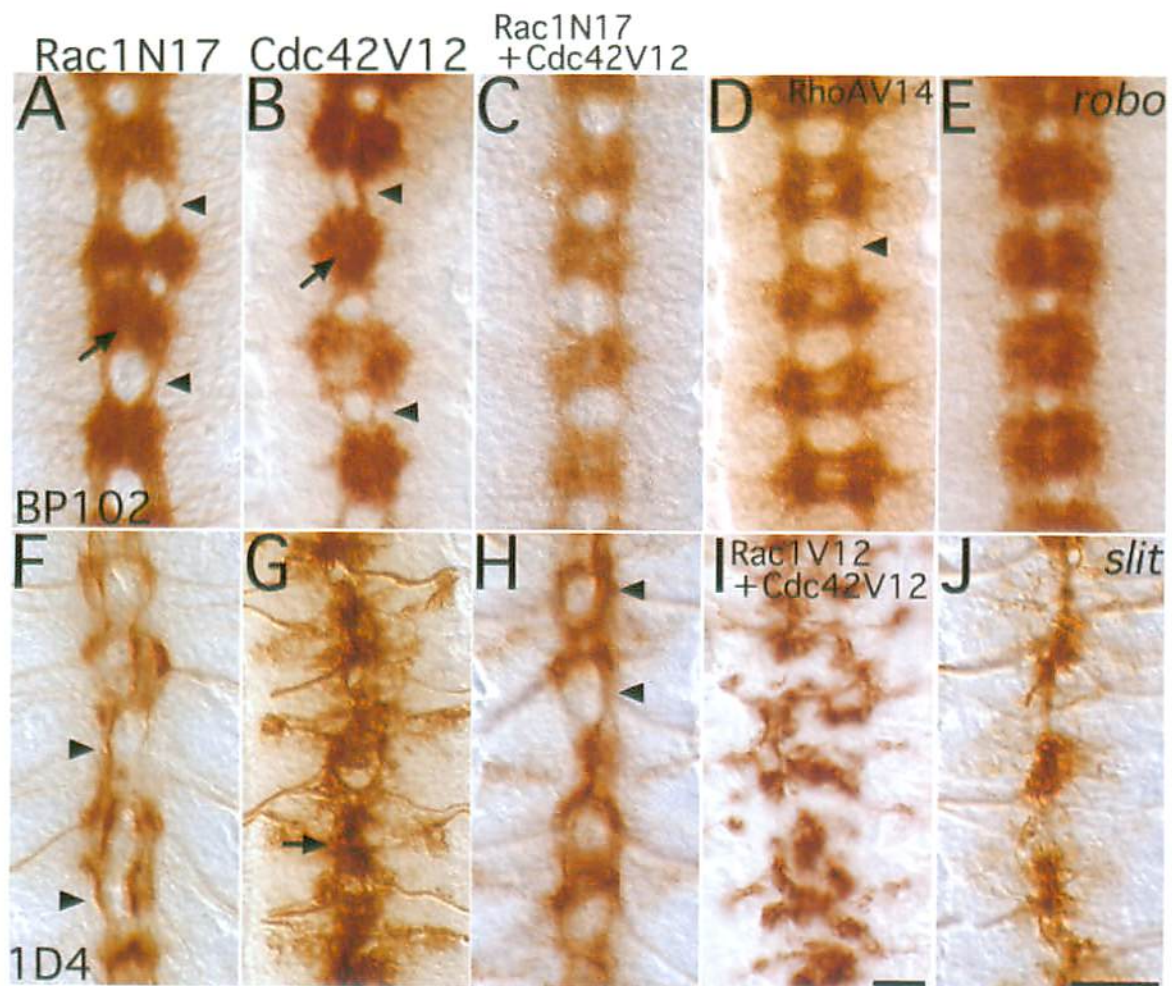


Fig.7

Rac1の不活性化やCdc42の活性化はRoboシグナリングの活性化に対してドミナントである

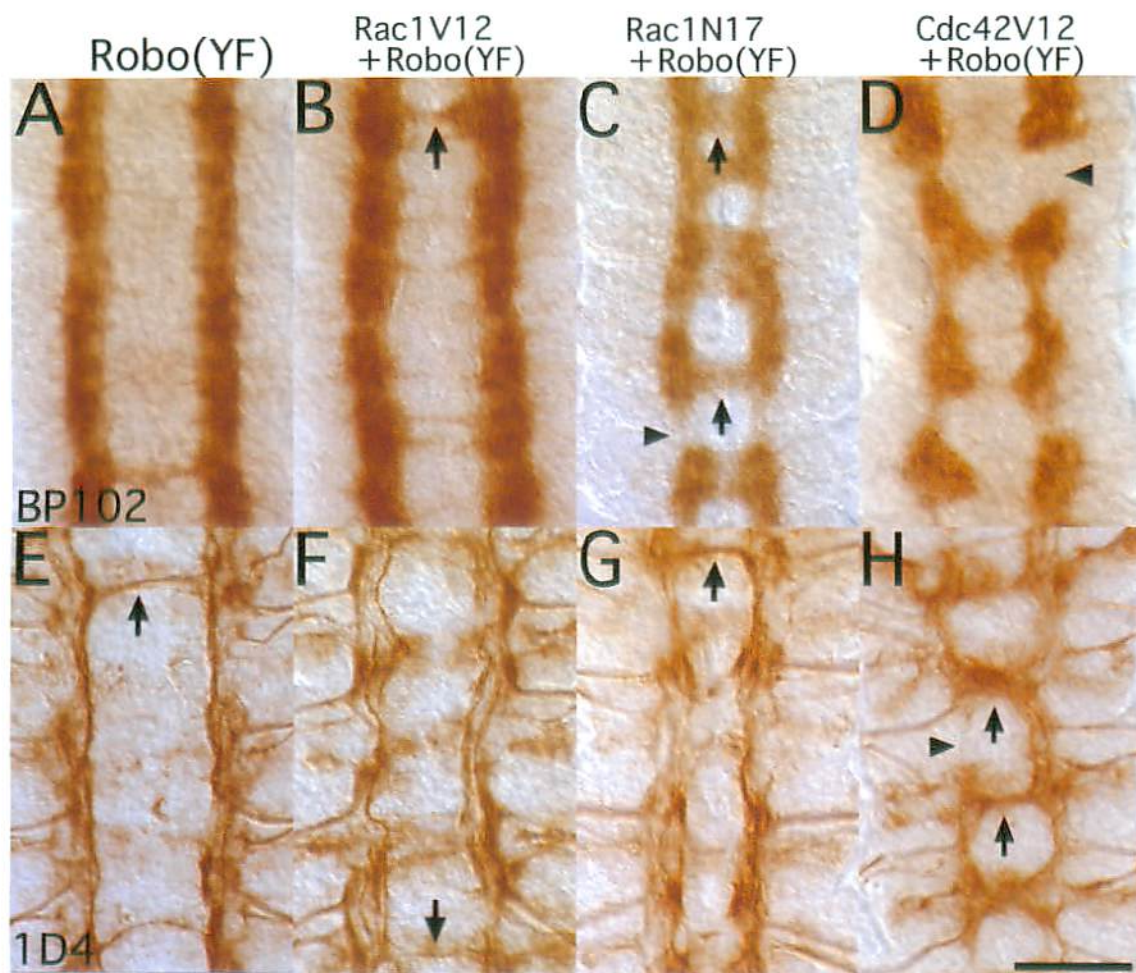


Fig.8

Roboタンパク、Robo3タンパクは正中線を交差する余分な軸索に発現している

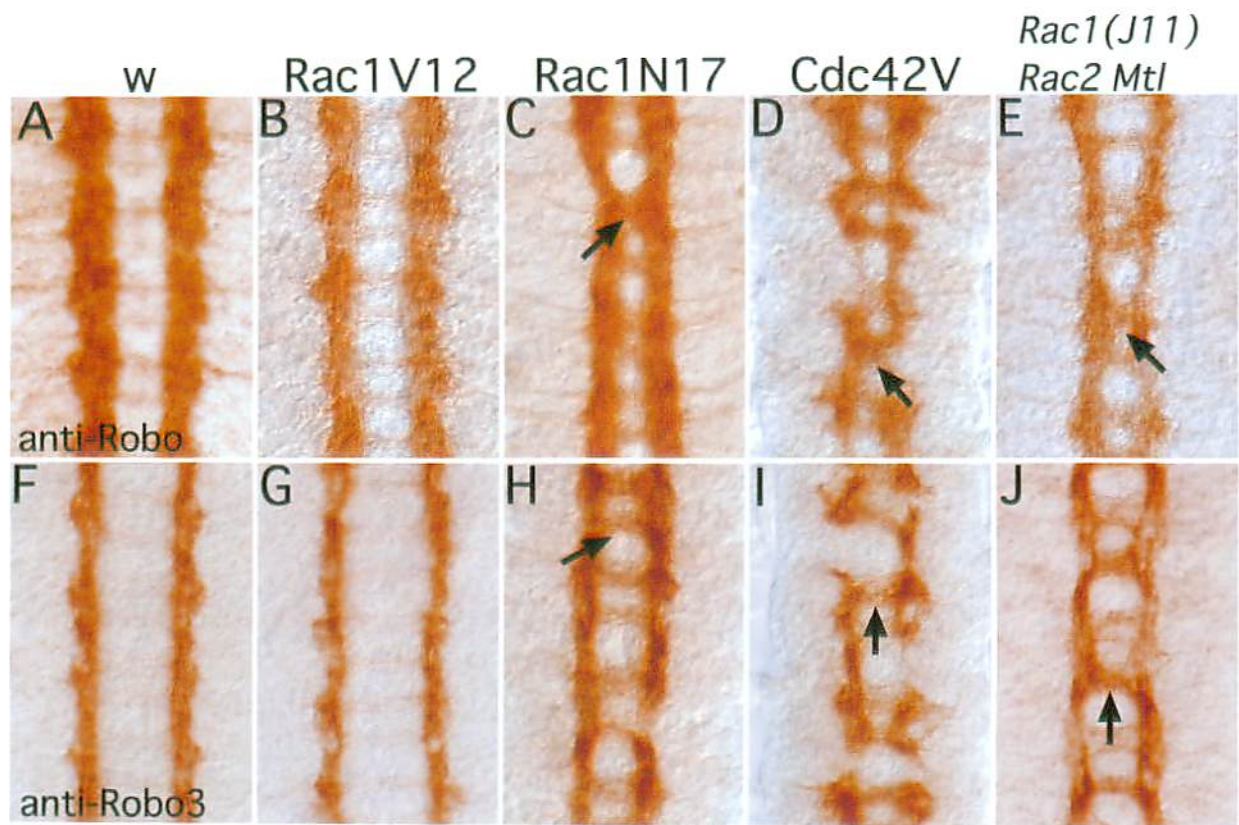
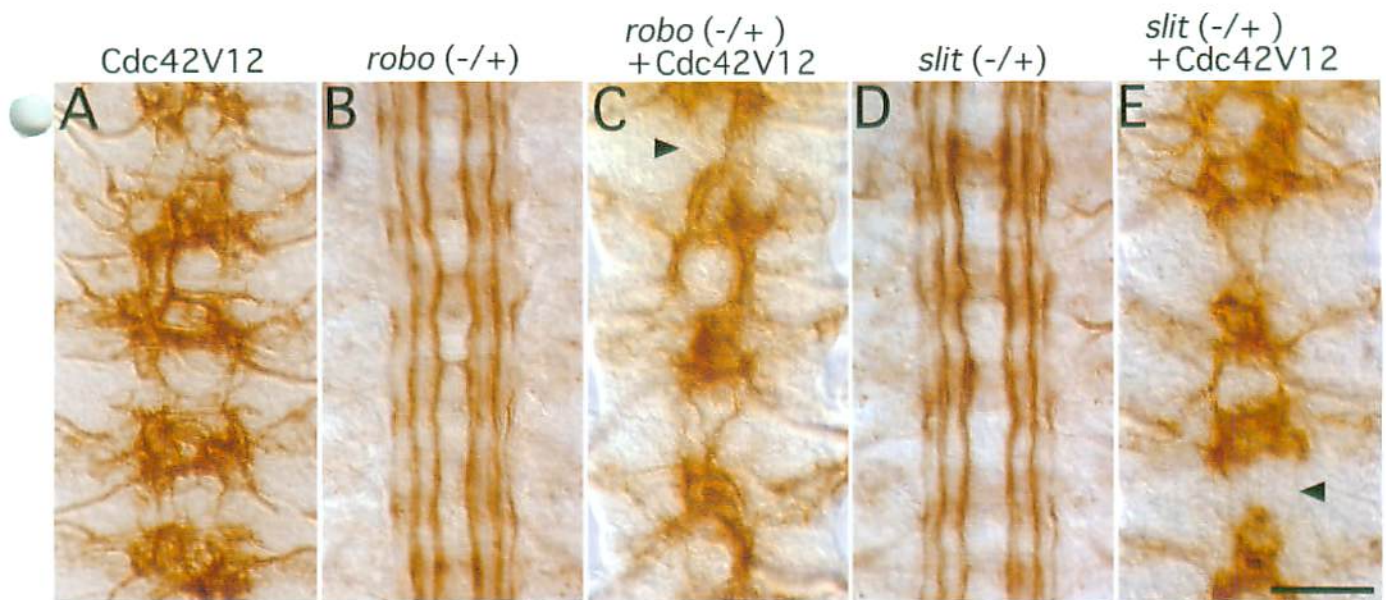


Fig.9

Cdc42の活性化による抗FasII 陽性軸索の正中線交差の表現型は
*robo*もしくは*slit*を1 copy減少させることで増強する



F

| | Segments | No intersegmental longitudinal tracts |
|--|----------|---------------------------------------|
| <i>+/+ ; Cdc42V12/elav</i> | 176 | 35 (20%) |
| <i>robo²⁵⁷⁰/+ ; +/elav</i> | 70 | 0 (0%) |
| <i>robo²⁵⁷⁰/+ ; Cdc42V12/elav</i> | 174 | 67 (39%) |
| <i>slit^{G107}/+ ; +/elav</i> | 72 | 0 (0%) |
| <i>slit^{G107}/+ ; Cdc42V12/elav</i> | 198 | 67 (34%) |

Stage 16-17 embryos stained with 1D4

Fig.10

初代培養系におけるショウジョウバエ神経突起成長の経時的観察

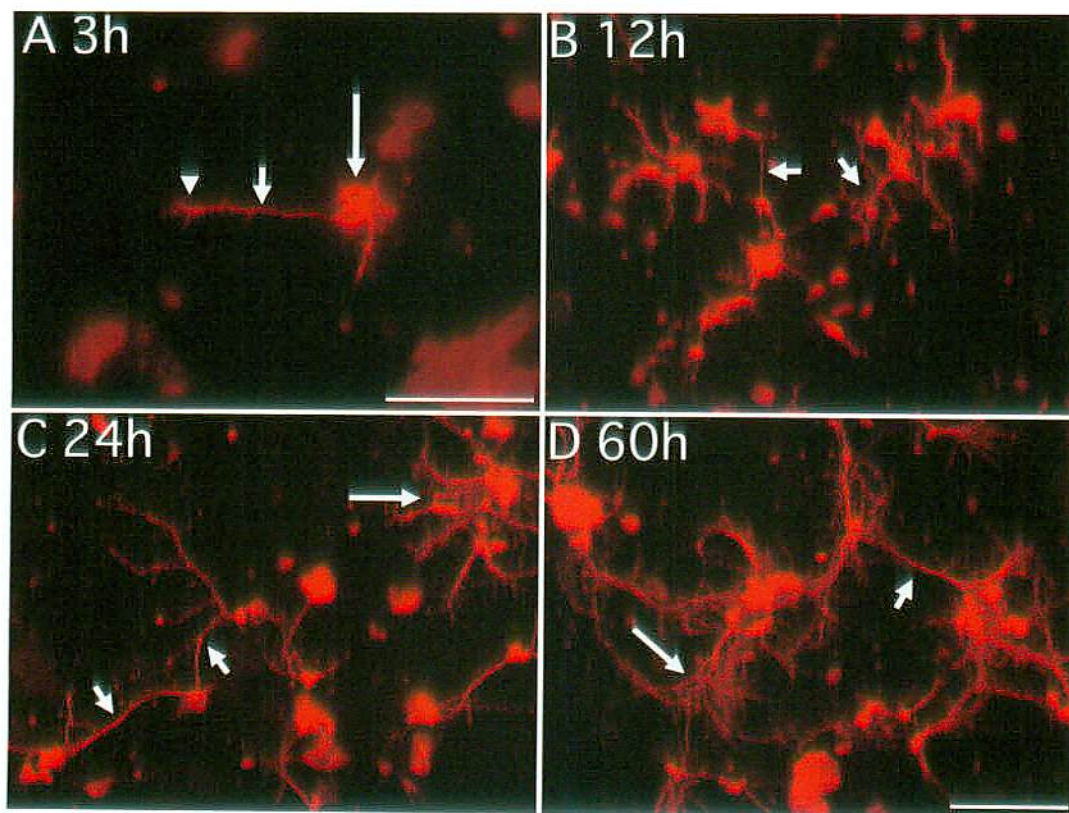


Fig.11

初代培養系における神経突起の形態に関するRac1の活性化、
Cdc42の活性化の効果

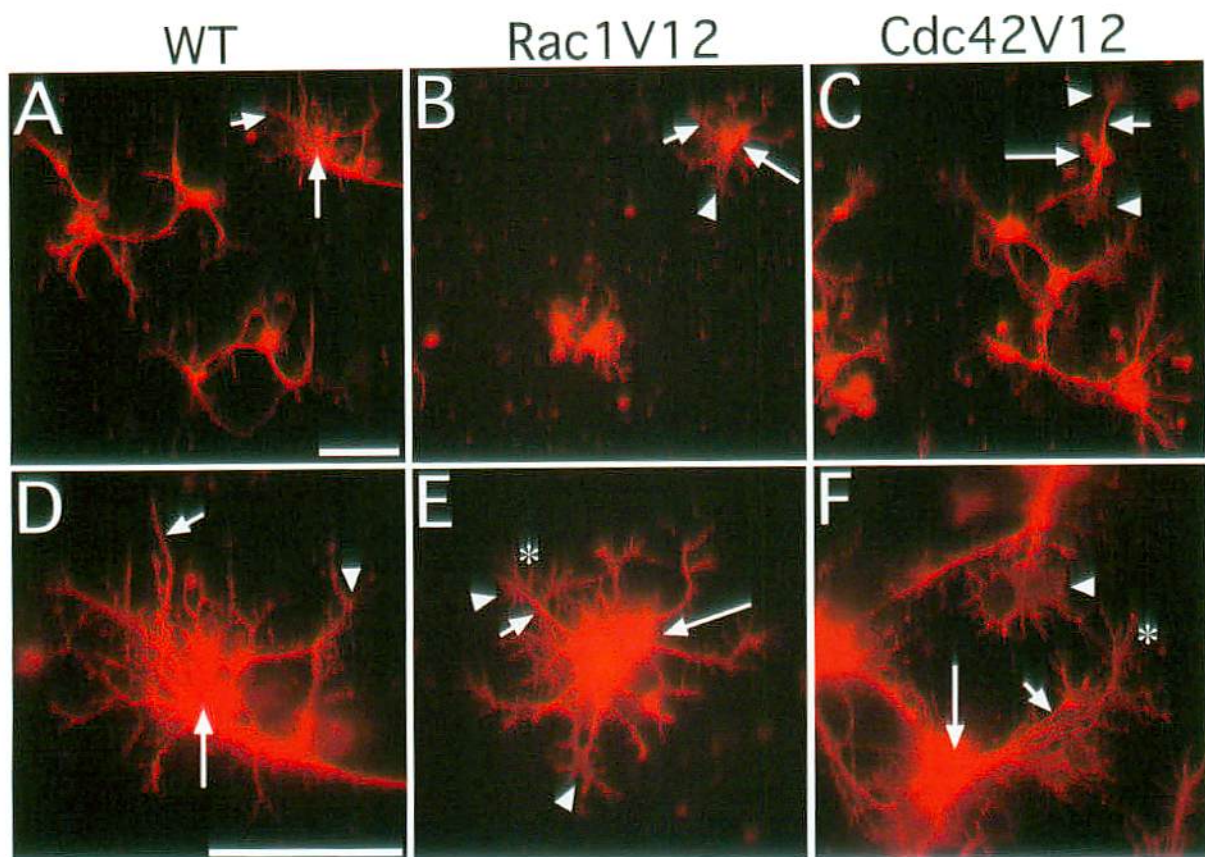


Fig.12

神経突起の形態に関するRac1、Cdc42の効果の定量

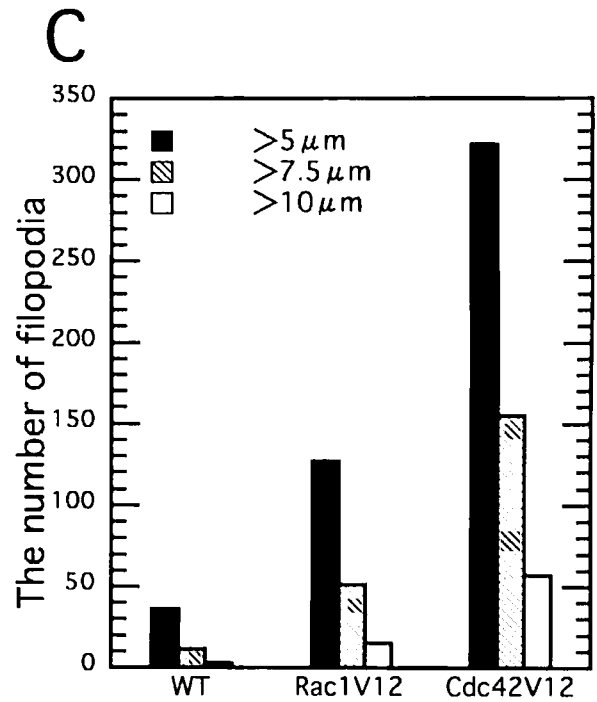
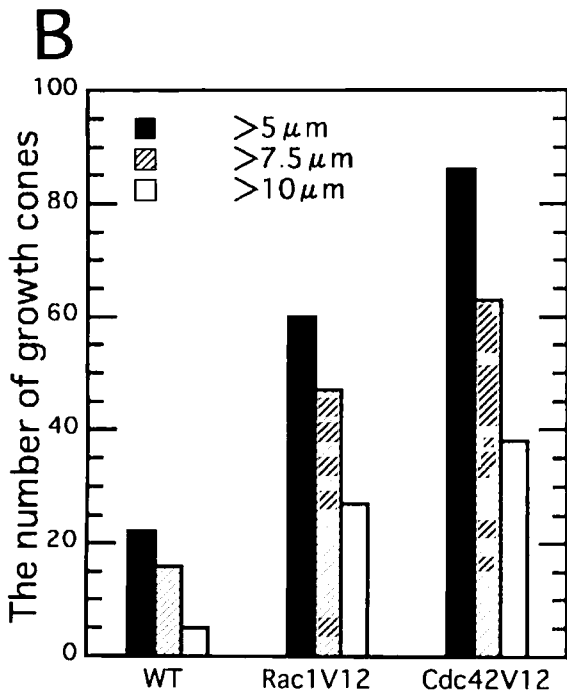
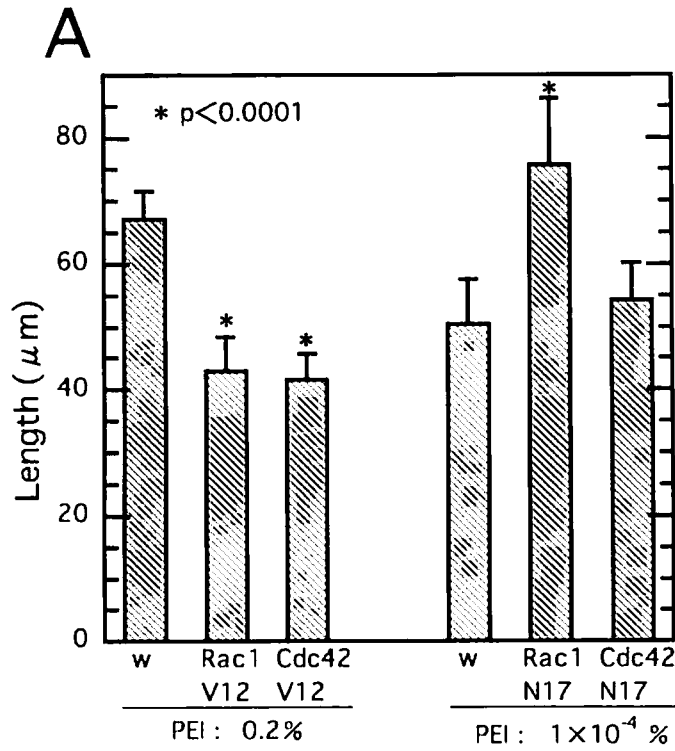


Fig.13

Rac1あるいはCdc42を活性化させた神経細胞の初代培養系
におけるPhalloidin 染色

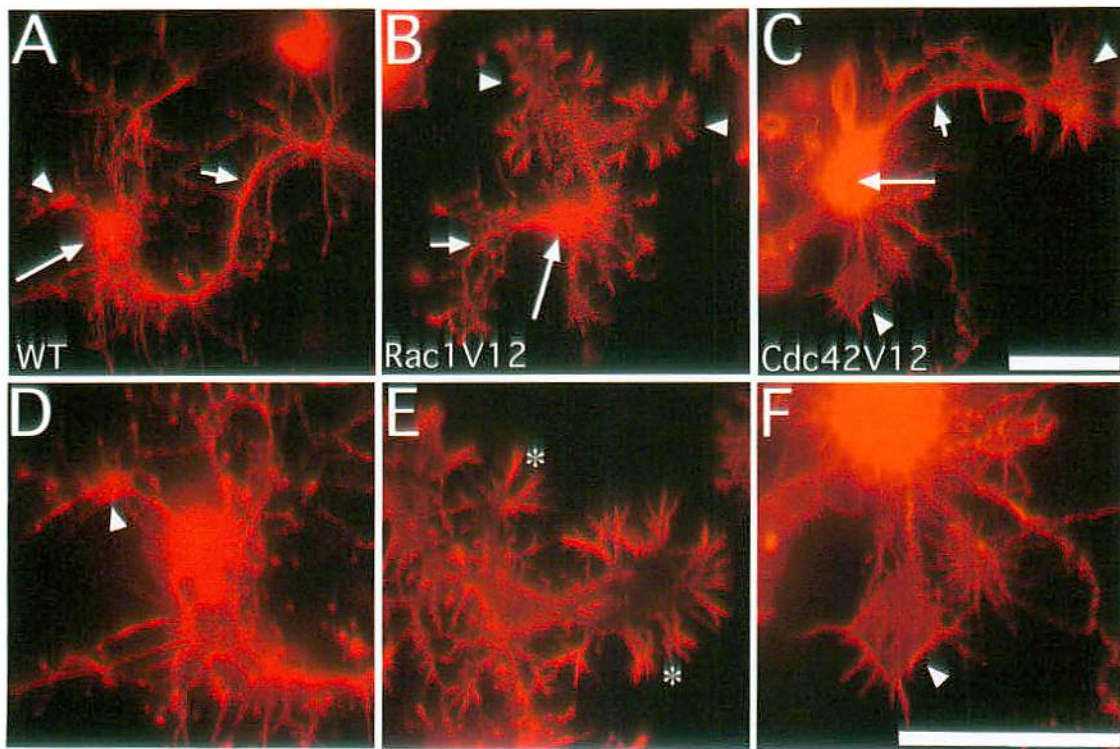


Fig.14

初代培養系における神経細胞の神経突起の形態に関する
Cytochalasin D の効果

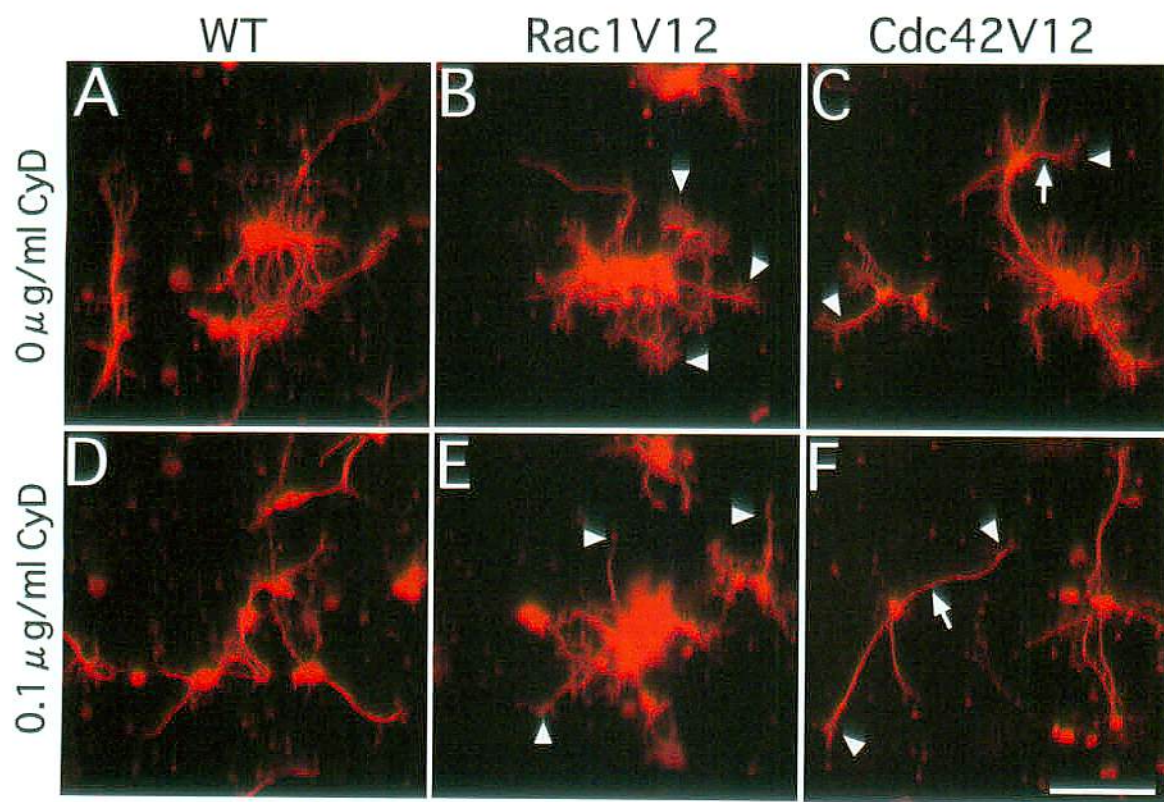


Fig.15

神経突起の長さの変化に関するCytochalasin Dおよび
Latrunculin A の効果の定量

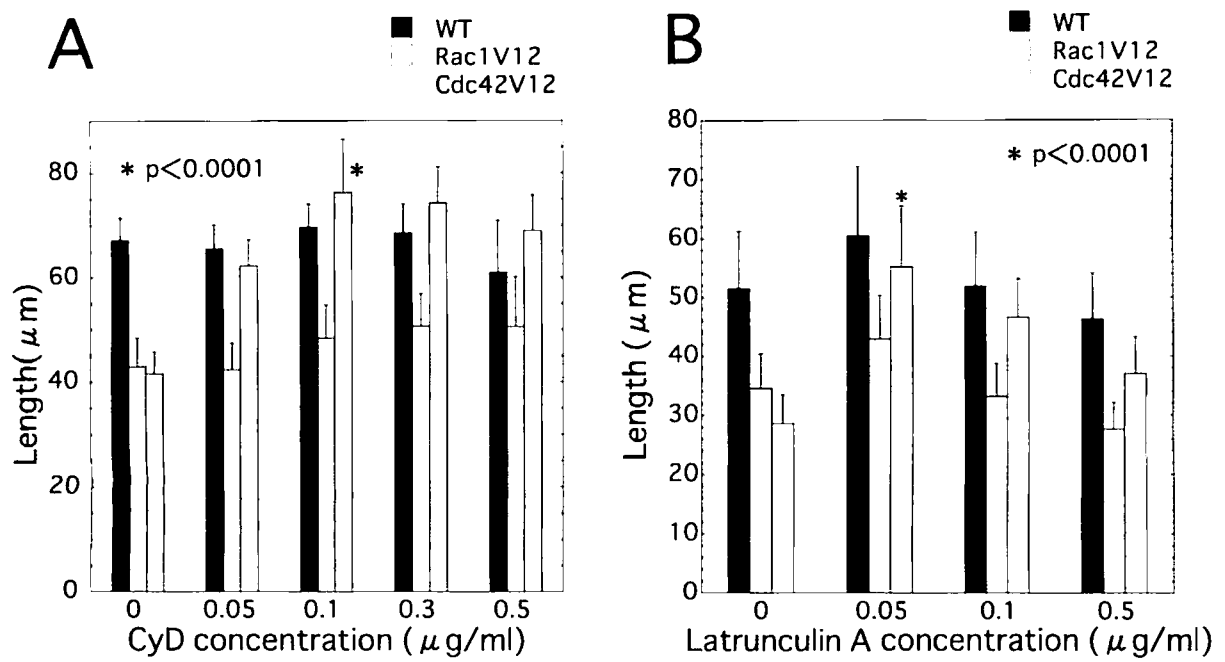


Fig.16

胚の初代培養系におけるシナプスタンパク Synaptotagmin
の免疫組織化学

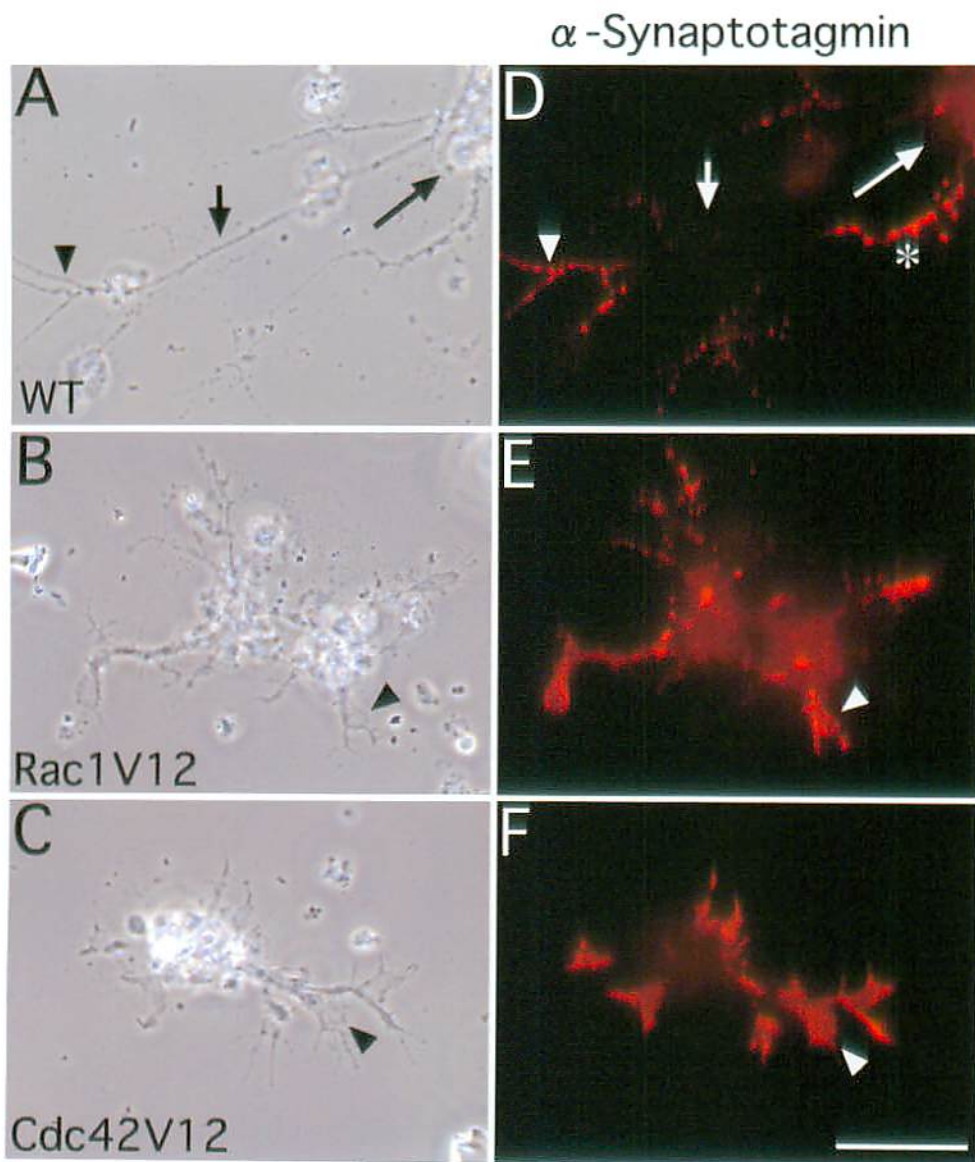


Fig.17 Supplemental figure-1

Rac1が活性化すると運動ニューロンの軸索は
標的に達する前に止まる

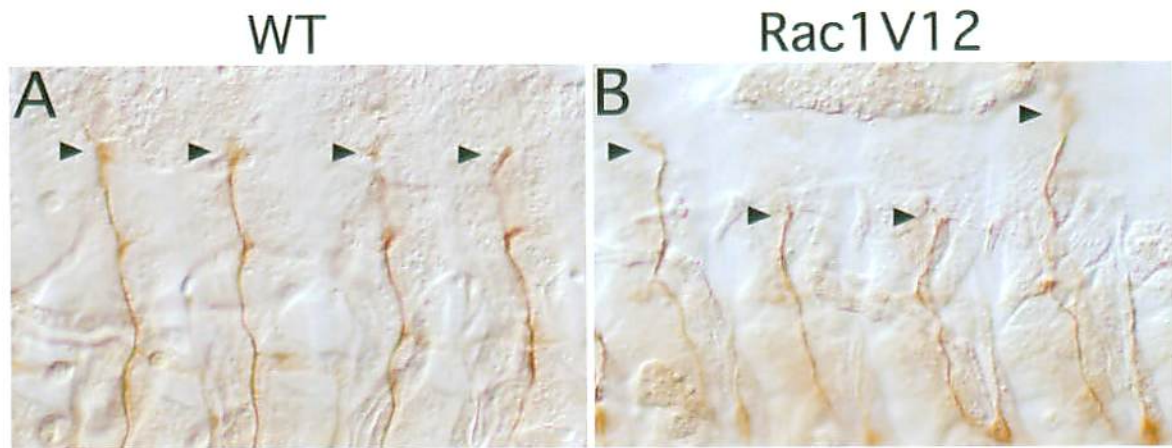


Fig.17 Supplemental figure-2

Rac1が活性化されるとLBDはより大きな葉状突起を
持つようになる

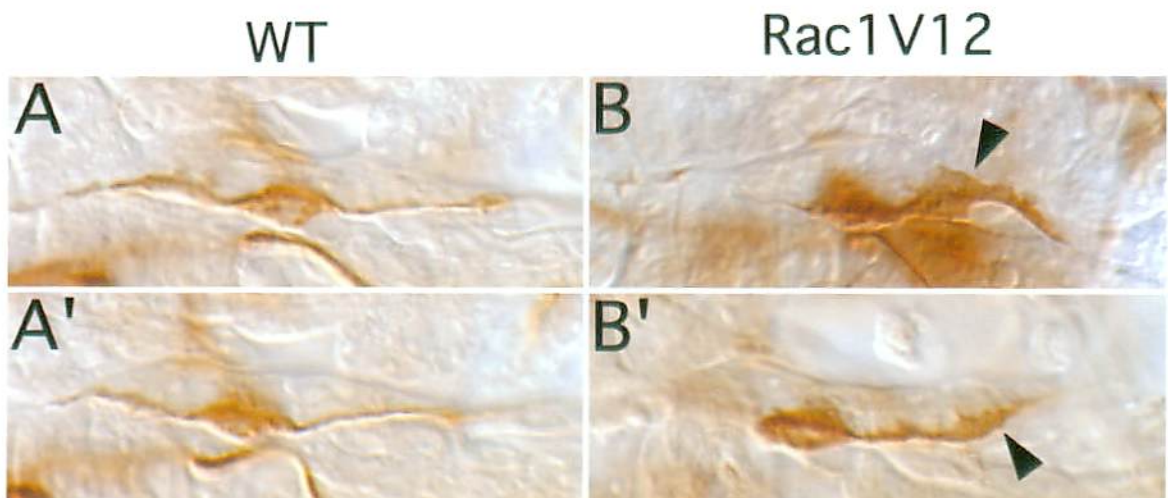


Table 1

中枢神経系の正中線交差に関するCdc42の活性化と
Rac1の不活性化の効果の定量化

A

| | Segments | Extra midline cross |
|---------------------|----------|------------------------|
| Rac1N17 | 114 | 117 (10 / 10 segments) |
| Rac1N17 + Robo(YF) | 114 | 97 (8.5 / 10 segments) |
| Cdc42V12 | 115 | 261 (23 / 10 segments) |
| Cdc42V12 + Robo(YF) | 105 | 94 (9.0 / 10 segments) |
| Rac1N17 + Cdc42V12 | 113 | 198 (18 / 10 segments) |

Stage 16-17 embryos stained with 1D4

B

| | Segments | Commissures | | | |
|---------------------|----------|-------------|------|------|-------|
| | | absent | thin | WT | thick |
| Rac1N17 + Robo(YF) | 116 | 25 % | 24 % | 19 % | 32 % |
| Cdc42V12 + Robo(YF) | 116 | 68 % | 23 % | 5 % | 4 % |

Stage 16-17 embryos stained with BP102