

特集：糖鎖機能の多層性と神経 sugar code

軸索ガイダンスにおけるヘパラン硫酸の役割

稲 谷 大

軸索ガイダンスにおけるヘパラン硫酸の役割は、ヘパラン硫酸を合成する酵素をコードする遺伝子に対する遺伝子改変動物を作成することで明らかになってきた。我々は、ヘパラン硫酸の合成に不可欠な酵素である Ext1 の遺伝子に対するコンディショナルノックアウトマウスを作成し解析した。作成されたマウスの脳には、正中線を越える三つの大きな交連線維である脳梁、海馬交連、前交連のガイダンス異常がみられ、視神経と脊髄背側交連神経にも正中線で軸索投射異常がみられた。ガイダンス分子である Slit, Netrin-1, Semaphorin-5A が軸索の受容体を介して作用する際に、軸索に発現するヘパラン硫酸が co-receptor として働き、そのシグナリングを増幅させていると考えられる。

1. はじめに

哺乳類の複雑な中枢神経組織が構築される過程は、大きく分けて四つのステップに分類される。まず、神経管から大脳、中脳、小脳などの中枢神経組織のコンパートメントが形作られる過程 (patterning)、その後、それぞれの神経組織から神経幹細胞が細胞分裂を繰り返し、神経細胞やグリア細胞への分化が進み、新たに作られた細胞がしかるべき場所へ遊走していく過程 (neurogenesis)、そして、神経細胞がターゲットとなる神経細胞へ軸索を投射して神経回路が形成される過程 (axon guidance)、最後に、シナプスが形成され (synaptogenesis)、中枢神経組織が構築されていくのである。

これらのステップのうち、軸索ガイダンスにおいて、ヘパラン硫酸プロテオグリカン「投射する軸索はターゲットとする細胞から分泌される因子の濃度勾配に従って導かれる」という 19 世紀末にカハールが提唱した概念「ニューロトロピズム仮説」に関わる重要な分子の一つであると考えられてきた。ヘパラン硫酸糖鎖がさまざまな分子と結合

することが生化学実験によって確認されていることや、中枢神経組織の細胞外マトリックスを構成したり、軸索の表面にも発現したりすることから、ターゲットとなる細胞から分泌された軸索ガイダンス分子の濃度勾配を形成したり、ガイダンス分子が軸索の受容体に結合するのを修飾したりする作用があると考えられてきた (図 1)。しかし、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割が実際の哺乳類の中枢神経組織で証明されたのは、21 世紀に入ってヘパラン硫酸の合成経路が明らかとなり、その合成酵素のノックアウトマウスが作成され、その表現型が明らかになってからのことである。本総説では、我々が取り組んできたヘパラン硫酸合成酵素 Ext1 のコンディショナルノックアウトマウスの研究を中心にヘパラン硫酸の軸索ガイダンスの役割についての最新の知見を紹介したい。

2. ヘパラン硫酸プロテオグリカンの生合成

ヘパラン硫酸は、グルクロン酸と N-アセチルグルコサミンの二糖の繰り返し構造による基本糖鎖が、局所的に硫酸化されたグリコサミノグリカン糖鎖である。生体内では、タンパク質 (コアタンパク質) と共有結合して、ヘパラン硫酸プロテオグリカンとして発現している。ヘパラン硫酸プロテオグリカンは大きく分けて、シンデカン、グリピカン、パルカン、アグリンの四つに分類される。そのうち、シンデカンとグリピカンは細胞表面に発現しているプロテオグリカンで、シンデカンのコアタンパク質には膜

熊本大学医学部附属病院眼科 (〒860-8556 熊本市本荘 1-1-1)

The role of heparan sulfate in axon guidance

Masaru Inatani (Department of Ophthalmology and Visual Science, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences, 1-1-1 Honjo Kumamoto 860-8556, Japan)

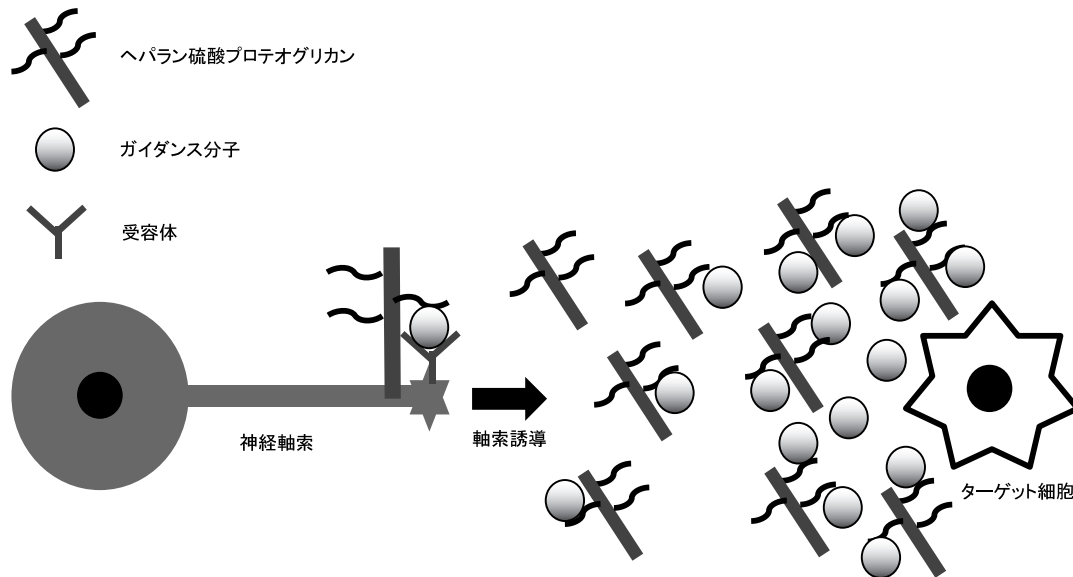


図1 ヘパラン硫酸プロテオグリカンの軸索ガイダンスにおける役割のイメージ

ターゲットとなる神経細胞から分泌されるガイダンス分子は細胞外マトリックスを構成するヘパラン硫酸プロテオグリカンと結合し、濃度勾配が形成される。その濃度勾配に従って、軸索が誘導される。細胞表面に発現するヘパラン硫酸は、ガイダンス分子と受容体との結合を修飾する。

貫通ドメインがあり、グリピカンのコアタンパク質は、糖化ホスファチジルイノシトール (GPI) を介して細胞膜と結合している。シンデカンは4種類、グリピカンは6種類のコアタンパク質があり、それぞれシンデカンファミリーとグリピカンファミリーを構成している。一方、パールカンとアグリンは、細胞外に分泌され細胞外マトリックスとなるプロテオグリカンである。このように、ヘパラン硫酸に結合するコアタンパク質は複数種存在し、しかも、その糖鎖の局所的な硫酸化は、さまざまな硫酸転移酵素 (N-アセチル/N-硫酸転移酵素, C5 エピ化酵素, 6-O 硫酸転移酵素, 2-O 硫酸転移酵素, 3-O 硫酸転移酵素など) に担われており、こうして多彩な糖タンパク質群が構成される (図2)。

3. コアタンパク質の遺伝子欠損マウス

ヘパラン硫酸プロテオグリカンと軸索ガイダンスとの関連を検証するために、過去にヘパラン硫酸の投与やヘパラン硫酸を化学的に分解する実験が行われ、ゴキブリの肢発生でのバイオニアクソンの投射が障害されたり¹⁾、両生類の視神経投射が障害されたりする現象^{2,3)}が報告された。しかし一方で、さまざまなヘパラン硫酸プロテオグリカンのノックアウトマウスが作成され、運動神経の神経筋接合部のシナプス形成がアグリンのノックアウトマウスで欠損⁴⁾、パールカンのノックアウトマウスでアセチルコリンエステラーゼの局在が消失⁵⁾という大きな表現型が報告されたが、予想していたような脳組織内のガイダンスに著しい障害が生じるなどの異常はみられなかった。この意外な

ほどに軸索ガイダンスの異常がみられなかった理由の一つとして、脳組織では様々な種類のヘパラン硫酸プロテオグリカンが発現しており、一つのコアタンパク質の遺伝子欠損マウスを作成しても他のコアタンパク質のヘパラン硫酸プロテオグリカンが代償しているためという可能性が考えられた。もう一つの理由として、ヘパラン硫酸プロテオグリカンと結合する軸索ガイダンス分子の多くが、コアタンパク質よりもむしろヘパラン硫酸糖鎖と結合することが知られているため、軸索ガイダンスに対する役割を知るためにはヘパラン硫酸を欠損させたノックアウトマウスを作成すべきだったのかもしれない。この問題を解決するために、ヘパラン硫酸の合成においてキーとなる酵素をコードする遺伝子を欠損させることによって、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの糖鎖を根こそぎ欠損させたマウスを作成し、その表現型を解析する研究が行われた。

4. *Ext1* 遺伝子

ヒトの遺伝性多発性外骨腫 (hereditary multiple exostosis) は、四肢の長い骨に頻繁に骨腫瘍が発生する常染色体優性遺伝の疾患である。この疾患患者のゲノムから、*EXT1* と *EXT2* とよばれる遺伝子の変異がみつかり、これらの遺伝子は、がん抑制遺伝子として考えられていた。実はその後、*EXT1* がヘパラン硫酸欠損細胞株のヘパラン硫酸合成能を回復させることや⁶⁾、*EXT2* がウシ血清から精製されたヘパラン硫酸合成酵素として同定された⁷⁾ことから、*EXT1* と *EXT2* がヘパラン硫酸の合成に重要な酵素をコードする遺伝子であることが明らかになったのである。

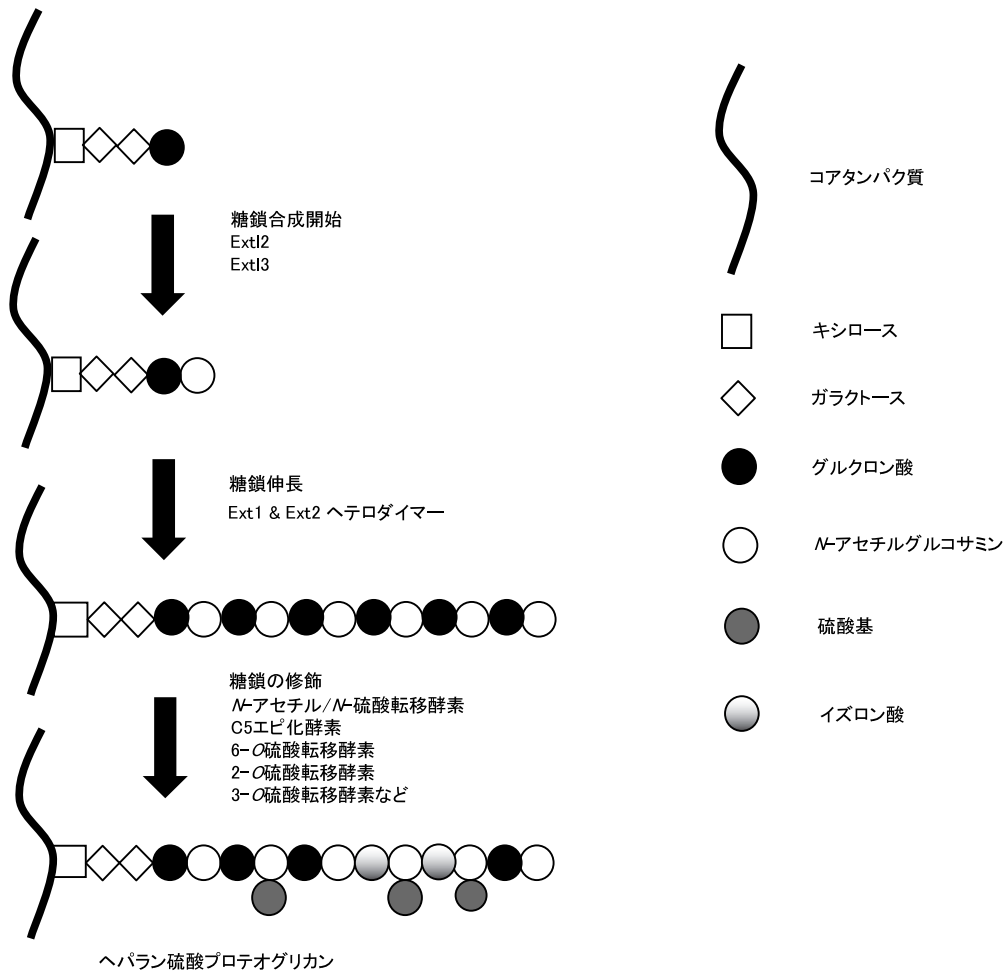


図2 ヘパラン硫酸の合成経路

コアタンパク質のセリン残基に四糖構造が結合したあと、Ext12とExt13とがN-アセチルグルコサミンを結合させ、それからExt1とExt2とのヘテロダイマー形成によって、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸を交互に結合し糖鎖が延長される。その後、さまざまな酵素群によって、糖鎖が硫酸化されたり、修飾を受けたりする。

しかも、ゴルジ体でExt1とExt2との二量体が形成されることが、ヘパラン硫酸糖鎖の基本構造であるグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンの二糖繰り返し構造を伸長させる必要条件であることが明らかとなり^{8,9)}、さらに、Ext1のノックアウトマウスでは、胎生期の原腸形成時期に致死であり、ヘパラン硫酸が合成されないことが確認された¹⁰⁾。

そこで我々は、発生段階の中枢神経組織選択的にExt1を欠損させるコンディショナルノックアウトマウスを作成して、脳組織の解析を行った。Ext1のexon 1の両端をloxP遺伝子で修飾したExt1^{lox}アリルを有するマウスを作成し、Nestin-promoterによるCreトランスジェニックマウスと交配させ、脳の表現型を解析した。Nestinは神経幹細胞に発現する中間径フィラメントであり、Nestin-promoterによって、マウス胎生期9.5日目にはCre酵素が脳の神経細胞で発現し、loxPで修飾された遺伝子を欠損させることができる。

作成されたExt1コンディショナルノックアウトマウスは、生直後に死亡した。マウスの外観には奇形が無く、中枢神経組織の異常によって死亡したと考えられた。そのマウスの脳は、嗅球の欠損、大脳皮質の矮小化、小脳の低形成の三つの大きな形態異常を伴っていた(図3)。これらの異常と同様の異常が、ヘパラン硫酸に結合する成長因子の一つであるfibroblast growth factor 8 (FGF8)の変異マウスでも報告されており¹¹⁾、一連の研究によって、FGF8シグナリングがExt1コンディショナルノックアウトマウスで障害されていることが示された¹²⁾。

5. Ext1コンディショナルノックアウトマウスの軸索ガイダンス異常

Ext1コンディショナルノックアウトマウスの大脳皮質は、神経幹細胞の分裂が障害され、神経細胞の数が減少し矮小化していた。しかし、大脳皮質の層構造は障害されて

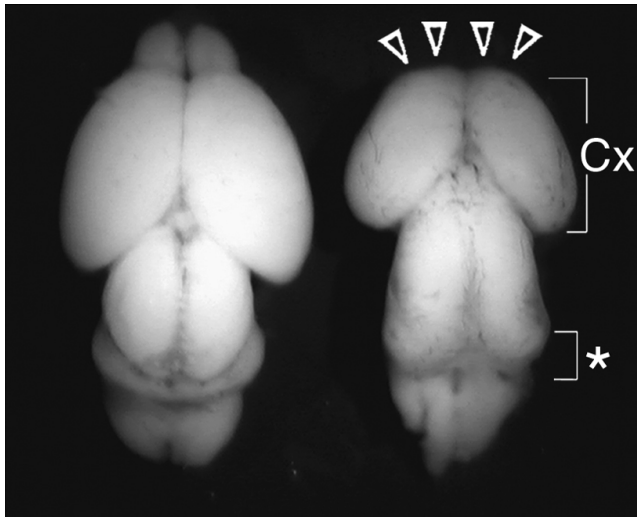


図3 *Ext1* コンディショナルノックアウトマウスの脳形態異常
ノックアウトマウス(右)では、嗅球の欠損(矢頭)、大脳皮質の矮小化(Cx)、小脳低形成(*)がみられた。使用許諾を得て、文献12から引用改変した。

おらず、神経細胞の分布は保たれていた。このことは、ヘパラン硫酸は神経幹細胞の分裂には重要だが、神経細胞の遊走にはあまり関係がないということを示唆するのかもしれない。最近報告されたグリピカン-1やパルカンのノックアウトマウスで有意に大脳皮質が小さいという表現型がみられるが^{13,14)}、大脳皮質の層構造は保たれているという結果と一致している。

層構造が保たれた *Ext1* コンディショナルノックアウトマウスの脳組織において、著しい軸索投射異常がみられた。哺乳類の脳には、正中線を越える交連線維として、脳梁と海馬交連と前交連があるが、これらの線維のガイダンスが完全に障害されていた。脳梁と前交連の軸索は、正中線を越えず、脳の腹側へ向かって誤った投射(図4)を示しており、海馬交連は形成されず海馬采周辺で軸索が迷走していた。これらの軸索投射異常は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンが軸索ガイダンスに不可欠な分子であることを証明している。

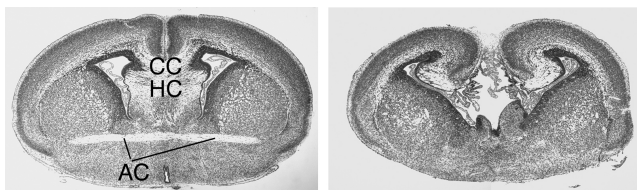


図4 *Ext1* コンディショナルノックアウトマウスの脳における軸索ガイダンス異常

ノックアウトマウス(右)では、野生型のマウス(左)にみられるような正中線を越える交連線維である脳梁(CC)、海馬交連(HC)、前交連(AC)の軸索ガイダンスがことごとく障害された。使用許諾を得て、文献12から引用改変した。

6. 視神経のガイダンスエラー

神経細胞を培養する際に広く用いられている無血清培養液である Neurobasal medium 中で大脳皮質細胞を培養し、その軸索伸長を観察すると、*Ext1* コンディショナルノックアウトマウスの神経細胞も野生型の神経細胞と全く変わらず軸索を伸長させる。交連線維の無形成は軸索の伸長の障害ではなく、軸索ガイダンスが障害されていることによると考えられた。我々は、このガイダンス異常のメカニズムを明らかにするために、脳よりシンプルな視神経の投射について研究した。視神経は、網膜にある網膜神経節細胞の軸索が網膜中央の視神経乳頭を集まり、眼球から出て、脳の外側膝状核へと投射する。網膜は、脳と分離したもう一つの中枢神経組織である一方、網膜神経節細胞とその軸索である視神経は視覚情報を脳へ伝えるという明解な役割の神経であるため、視神経を対象として軸索ガイダンスの分子メカニズムがこれまで明らかにされてきた^{15,16)}。さらに以前から、ヘパラン硫酸の外的投与や分解によって、両生類の視神経の投射が障害されることも報告されている。

マウスの視神経は、眼球を出た後、視交叉とよばれる部位で正中線を越え、97%の視神経軸索は対側の脳へ投射し、網膜の腹耳側に分布する網膜神経節細胞からの軸索のみ(全体の3%)正中線を越えず、同側の脳へ投射することが知られている。*Ext1* コンディショナルノックアウトマウスの視神経の表現型を視交叉で観察したところ、対側の脳へ投射されず、視神経の大部分が、対側の眼から投射してきた視神経軸索に沿って、逆行性の誤った投射を示していた(図5)。ヘパラン硫酸の消失によって、視神経の軸索が脳へ投射する手がかりを失い、対側の眼球から投射してきた視神経軸索を手がかりにして、対側の視神経に沿った逆行性の投射異常が生じたと考えられた。実は、この特徴的な視神経ガイダンスエラーは、Slitと呼ばれるガイダンス分子のノックアウトマウスでも見られる表現型である¹⁷⁾。Slitは、軸索反発因子で、正中線のグリア細胞が産生する分泌タンパク質である。軸索に発現する受容体 Robo と結合し、軸索を反発させる作用を発揮する。さら

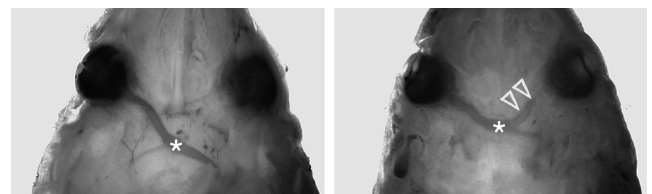


図5 *Ext1* コンディショナルノックアウトマウスの視神経軸索ガイダンス異常

ノックアウトマウス(右)の視神経は、野生型(左)の視神経と異なり、視交叉(*)を通過した後、対側から投射してきた視神経に沿って逆行性の異常な投射(矢頭)を示した。使用許諾を得て、文献12から引用改変した。

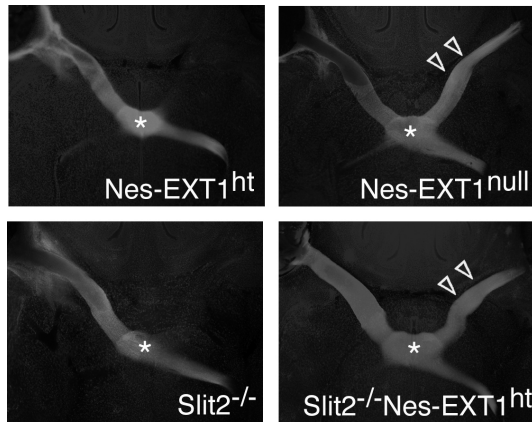


図6 *Ext1* が1アレル欠損した *Slit-2* ノックアウトマウスの視神経ガイダンス異常

Slit-2 ノックアウトマウス (*Slit2*^{-/-}) または *Ext1* ヘテロ欠損マウス (*Nes-EXT1*^{ht}) では正常な視交叉が形成されるが、*Ext1* が1アレル欠損した *Slit-2* ノックアウトマウス (*Slit2*^{-/-}*Nes-EXT1*^{ht}) では、ガイダンス異常 (矢頭) がみられる。＊は視交叉。使用許諾を得て、文献12から引用改変した。

に、生化学的な実験によると、Slit はヘパラン硫酸と結合する性質があり、軸索に発現するヘパラン硫酸が Slit と Robo との結合を3倍増強させる。細胞表面のヘパラン硫酸を酵素で分解すると、Slit の軸索反発作用が失われることが報告されている¹⁸⁾。しかし、Slit ファミリーのうち、*Slit-1* と *Slit-2* のダブルノックアウトマウスの視神経で軸索投射異常がみられるが、*Slit-1* または *Slit-2* それぞれのノックアウトマウスでは、ほとんど視神経の投射異常がみられない。そこで、*Slit-2* がホモで欠損し、*Slit-1* が正常なマウスの *Ext1* 遺伝子を1アレルだけ欠損させたところ、その個体の視神経の大部分が、*Ext1* コンディショナルノックアウトマウスと同様に、特徴的な視神経ガイダンスエラーを呈した (図6)。この結果は、マウスの個体発生において Slit による視神経ガイダンスにヘパラン硫酸が必要であることを示唆している¹²⁾。その後、ショウジョウバエのシンデカンホモログの変異によって Slit によるガイダンスが障害されたり^{19,20)}、*C. elegans* の軸索でヘパラン硫酸を修飾する酵素の遺伝子変異により Slit/Robo シグナリングが障害されたり²¹⁾、シンデカンに結合するヘパラン硫酸が Slit/Robo シグナリングを制御すること²²⁾、ゼブラフィッシュの *ext2* と *extl3* の変異によって Slit/Robo シグナリングが障害され、視神経の投射異常が生じること²³⁾ など、他の動物種の生体内でも同様にヘパラン硫酸と Slit/Robo シグナリングによる軸索ガイダンスとの関連が報告されている。

7. ヘパラン硫酸と Netrin-1 依存性軸索ガイダンス

脊髄背側にある交連神経の軸索は、脊髄の発生において、背側から腹側へ伸長し、腹側で正中線を越え、交連線

維を形成する。我々は、前述の *Nestin-promoter* で誘導される *Cre* トランスジェニックマウスを用いた中枢神経組織選択的 *Ext1* コンディショナルノックアウトマウスの脊髄を解析したところ、脊髄のヘパラン硫酸が欠損し、腹側の交連線維が低形成をきたしていることがわかった。一方、*Wnt1-promoter* で誘導される *Cre* トランスジェニックマウスを用いて、*Ext1*^{flax} マウスの *Ext1* を脊髄の交連神経選択的に欠損させたところ、軸索が投射していく脊髄腹側は、ヘパラン硫酸が存在する環境であるにもかかわらず、やはり腹側の交連線維の低形成をきたした (図7)²⁴⁾。この結果は、交連神経自身が発現するヘパラン硫酸が欠損すれば、軸索が投射する領域のヘパラン硫酸が存在しても、軸索投射異常が生じることを意味している。つまり、細胞自立的なヘパラン硫酸が軸索誘導に必要であることを生体内で示した結果である。また、この表現型は、軸索を誘引する分泌タンパク質である Netrin-1 の遺伝子欠損マウス²⁵⁾や軸索に発現する受容体である Dcc の遺伝子欠損マウス²⁶⁾でもみられるうえに、Netrin-1 はヘパラン硫酸と非常に強い結合能をもつ²⁷⁾ことから、Netrin-1 による軸索ガイダンスがヘパラン硫酸依存性であることが考えられた。脊髄背側部から採取したエクスプラントのヘパラン硫酸が欠損していると、Netrin-1/Dcc の下流シグナルが活性化されていないことが示された²⁴⁾。また、最近の報告として、ゼブラフィッシュのドーパミン作動性間脳脊髄路は、Netrin-1/Dcc による誘引と Slit/Robo による反発のバランスで軸索が正中線に対して平行に走行するように誘導される。その

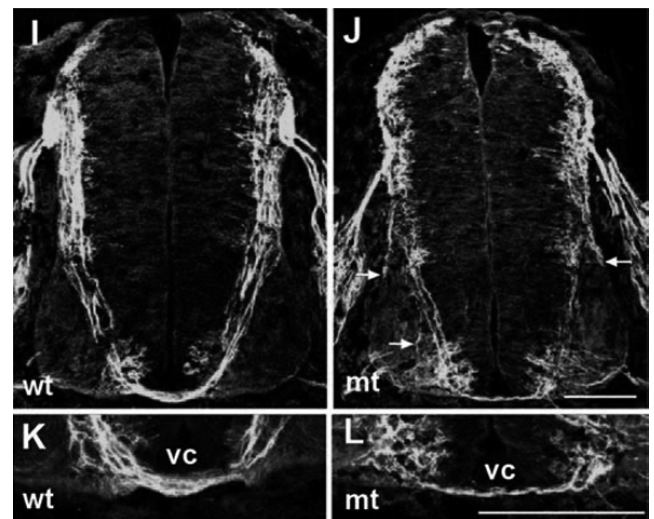


図7 脊髄背側交連神経のガイダンス異常

野生型 (I, K) の脊髄背側の交連神経の軸索は腹側で交差する。交連神経選択的にヘパラン硫酸を欠損させると (J, L)、軸索が異所性に迷入 (矢印) し、腹側の交連線維 (VC) が減少した。wt, 野生型; mt, *Wnt1-promoter* による *Ext1* コンディショナルノックアウトマウス。使用許諾を得て、文献24から引用した。

2系統のガイダンス分子の作用には、ヘパラン硫酸が必要であることが明らかになっている²⁸⁾。

8. その他のガイダンス分子とヘパラン硫酸

Limbic forebrain と中脳をつなぐ線維路に存在する神経軸索の投射が、我々の中枢神経組織選択的 *Ext1* コンディショナルノックアウトマウスで障害されていることがわかった。この線維路の軸索は、セマフォリン 5A によって誘導されることが知られているが、セマフォリン 5A の thrombospondin repeat 領域は、コンドロイチン硫酸にもヘパラン硫酸にも結合し、ヘパラン硫酸と結合したときは軸索が誘引されるが、コンドロイチン硫酸と結合すると軸索が反発するという、発現する糖鎖によってまったく逆の作用を発揮することが明らかになった²⁹⁾。これは、神経組織の発生において、糖鎖の発現が変化することによって、軸索投射を生体が調節していることを反映しているのかもしれない。

Ephrin とその受容体 Eph とは、中枢神経組織の軸索ガイダンスに関して非常に重要な分子である。しかし、Ephrin/Eph による軸索ガイダンスとヘパラン硫酸との関連は明らかになっていない。Ephrin と Eph ファミリーの分子のうち、Ephrin-A3 のみがヘパラン硫酸と結合することが明らかになった³⁰⁾。ヘパラン硫酸が欠損すると、Ephrin-A3 による EphA 受容体の活性化が障害される。Ephrin-A3 のノックアウトマウスでは、海馬の神経細胞の樹状突起の棘突起の形成異常がみられる³¹⁾ことから、軸索ガイダンスよりはむしろ、Ephrin-A3 による棘突起形成に関連している可能性がある。

9. ヘパラン硫酸プロテオグリカンは神経軸索のアンテナ

以上のように、ヘパラン硫酸を合成する酵素の遺伝子欠損マウスを作成することによって、ヘパラン硫酸プロテオグリカンは軸索ガイダンスに不可欠な分子であることが明らかとなった。現在明らかになっている軸索ガイダンスにおける役割はいずれも、細胞表面に発現するヘパラン硫酸プロテオグリカンの、ガイダンス分子と受容体との結合を強め、その作用を増幅させる co-receptor としての役割である。このような役割は、FGF とその受容体と細胞表面に発現するヘパラン硫酸が 2:2:1 の割合で結合すると、受容体の構造が変化し、細胞内へのシグナルが活性化されるという結晶構造解析の結果から明らかにされている³²⁾。また、ヘパラン硫酸の硫酸を修飾させる酵素の一つ 6-O 硫酸転移酵素に対するノックアウトマウスで、*Ext1* コンディショナルノックアウトマウスと同様の視交叉形成異常がみられるが、2-O 硫酸転移酵素の欠損では、視交叉にわずかな投射異常しかみられないことが報告され³³⁾、特定の硫酸の部位に Slit/Robo シグナリングを増強させる作用が

あることが明らかになった。このようにガイダンス分子との結合は、ヘパラン硫酸の特定の硫酸修飾に依存しており、神経細胞は、その軸索投射の過程で、軸索に発現するヘパラン硫酸プロテオグリカンの硫酸修飾を変化させて、ガイダンス分子の作用を増強させたり減弱させたりして、ターゲットとなる細胞へ軸索を投射させていると考えられる。ヘパラン硫酸プロテオグリカンは、軸索に立てられたアンテナのようなものと言えるかもしれない。

10. おわりに

軸索投射の過程における神経軸索に発現するヘパラン硫酸の硫酸修飾の変化が、中枢神経組織の複雑な神経回路構築に極めて重要であると筆者は考えている。今後、ヘパラン硫酸の硫酸修飾に関わる分子群の解析が進められ、ガイダンス分子の制御機構がさらに明らかにされることに期待したい。

文 献

- 1) Wang, L. & Denburg, J.-L. (1992) *Neuron*, 8, 701-714.
- 2) Walz, A., McFarlane, S., Brickman, Y.-G., Nurcombe, V., Bartlett, P.-F., & Holt, C.-E. (1997) *Development*, 124, 2421-2430.
- 3) Irie, A., Yates, E.-A., Turnbull, J.-E., & Holt, C.-E. (2002) *Development*, 129, 61-70.
- 4) Gautam, M., Noakes, P.-G., Moscoso, L., Rupp, F., Scheller, R.-H., Merlie, J.-P., & Sanes, J.-R. (1996) *Cell*, 85, 525-535.
- 5) Arikawa-Hirasawa, E., Rossi, S.-G., Rotundo, R.-L., & Yamada, Y. (2002) *Nat. Neurosci.*, 5, 119-123.
- 6) McCormick, C., Leduc, Y., Martindale, D., Mattison, K., Esford, L.-E., Dyer, A.-P., & Tufaro, F. (1998) *Nat. Genet.*, 19, 158-161.
- 7) Lind, T., Tufaro, F., McCormick, C., Lindahl, U., & Lidholt, K. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 26265-26268.
- 8) McCormick, C., Duncan, G., Goutsos, K.-T., & Tufaro, F. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97, 668-673.
- 9) Senay, C., Lind, T., Muguruma, K., Tone, Y., Kitagawa, H., Sugahara, K., Lidholt, K., Lindahl, U., & Kusche-Gullberg, M. (2000) *EMBO. Rep.*, 1, 282-286.
- 10) Lin, X., Wei, G., Shi, Z., Dryer, L., Esko, J.-D., Wells, D.-E., & Matzuk, M.-M. (2000) *Dev. Biol.*, 224, 299-311.
- 11) Meyers, E.-N., Lewandoski, M., & Martin, G.-R. (1998) *Nat. Genet.*, 18, 136-141.
- 12) Inatani, M., Irie, F., Plump, A.-S., Tessier-Lavigne, M., & Yamaguchi, Y. (2003) *Science*, 302, 1044-1046.
- 13) Jen, Y.-H., Musacchio, M., & Lander, A.-D. (2009) *Neural Dev.*, 2009, 4, 33.
- 14) Girós, A., Morante, J., Gil-Sanz, C., Fairén, A., & Costell, M. (2007) *BMC. Dev. Biol.*, 7, 29.
- 15) Harada, T., Harada, C., & Parada, L.-F. (2007) *Genes Dev.*, 21, 367-378.
- 16) Inatani, M. (2005) *Naturwissenschaften*, 92, 549-561.
- 17) Plump, A.-S., Erskine, L., Sabatier, C., Brose, K., Epstein, C.-J., Goodman, C.-S., Mason, C.-A., & Tessier-Lavigne, M. (2002) *Neuron*, 33, 219-232.
- 18) Hu, H. (2001) *Nat. Neurosci.*, 4, 695-701.

- 19) Johnson, K.-G., Ghose, A., Epstein, E., Lincecum, J., O'Connor, M.-B., & Van Vactor, D. (2004) *Curr. Biol.*, **14**, 499–504.
 - 20) Steigemann, P., Molitor, A., Fellert, S., Jäckle, H., & Vorbrüggen, G. (2004) *Curr. Biol.*, **14**, 225–230.
 - 21) Bülow, H.-E. & Hobert, O. (2004) *Neuron*, **41**, 723–736.
 - 22) Rhiner, C., Gysi, S., Fröhli, E., Hengartner, M.-O., & Hajnal, A. (2005) *Development*, **132**, 4621–4633.
 - 23) Lee, J.-S., von der Hardt, S., Rusch, M.-A., Stringer, S.-E., Stickney, H.-L., Talbot, W.-S., Geisler, R., Nüsslein-Volhard, C., Selleck, S.-B., Chien, C.-B., & Roehl, H. (2004) *Neuron*, **44**, 947–960.
 - 24) Matsumoto, Y., Irie, F., Inatani, M., Tessier-Lavigne, M., & Yamaguchi, Y. (2007) *J. Neurosci.*, **27**, 4342–4350.
 - 25) Serafini, T., Colamarino, S.-A., Leonardo, E.-D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W.-C., & Tessier-Lavigne, M. (1996) *Cell*, **87**, 1001–1014.
 - 26) Fazeli, A., Dickinson, S.-L., Hermiston, M.-L., Tighe, R.-V., Steen, R.-G., Small, C.-G., Stoeckli, E.-T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., Simons, J., Bronson, R.-T., Gordon, J.-I., Tessier-Lavigne, M., & Weinberg, R.-A. (1997) *Nature*, **386**, 796–804.
 - 27) Serafini, T., Kennedy, T.-E., Galko, M.-J., Mirzayan, C., Jessell, T.-M., & Tessier-Lavigne, M. (1994) *Cell*, **78**, 409–424.
 - 28) Kasthuber, E., Kern, U., Bonkowsky, J.-L., Chien, C.-B., Driever, W., & Schweitzer, J. (2009) *J. Neurosci.*, **29**, 8914–8926.
 - 29) Kantor, D.-B., Chivatakarn, O., Peer, K.-L., Oster, S.-F., Inatani, M., Hansen, M.-J., Flanagan, J.-G., Yamaguchi, Y., Sretavan, D.-W., Giger, R.-J., & Kolodkin, A.-L. (2004) *Neuron*, **44**, 961–975.
 - 30) Irie, F., Okuno, M., Matsumoto, K., Pasquale, E.-B., & Yamaguchi, Y. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 12307–12312.
 - 31) Carmona, M.-A., Murai, K.-K., Wang, L., Roberts, A.-J., & Pasquale, E.-B. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 12524–12529.
 - 32) Pellegrini, L., Burke, D.-F., von Delft, F., Mulloy, B., & Blundell, T.-L. (2000) *Nature*, **407**, 1029–1034.
 - 33) Pratt, T., Conway, C.-D., Tian, N.-M., Price, D.-J., & Mason, J.-O. (2006) *J. Neurosci.*, **26**, 6911–6923.
-