

脳構築における神経細胞の極性形成と維持機構の解明

高野 哲也

(Department of Cell Biology, Duke University Medical School)

はじめに

ヒトは日々どのようにして考え、学習し、行動するのだろうか。その動作原理は、少なくとも脳内の神経細胞が生み出す情報の受容、統合、伝達という一方向性の情報処理システムにあると言えるだろう。そのため、神経細胞は類稀な高度に極性化した形態を示す。神経細胞は通常1本の軸索と複数の樹状突起を形成する。樹状突起は神経伝達物質受容体を介して受け取ったシグナルを電気信号に変え、そして軸索はその電気信号を遠く離れた他の神経細胞へと伝達する(図1)。この一方向性の情報伝達システムはあらゆる種において保存され、軸索と樹状突起はその機能を果たすために、それぞれ特殊化した形態と構造を発達させていく。例えば、軸索はその先端にシナプス小胞を蓄積したシナプス終末を、樹状突起はシナプス終末から放出される神経伝達物質の受容体が濃縮したシナプス後膜を有するようになる。さらに、軸索と樹状突起はその形態のみならず、構成するタンパク質成分にも違いがあることが知られている。したがって、一つの神経細胞内に軸索と樹状突起という構造的にも機能的にも異なる特殊化した2つの領域をもつことにより、脳内では複雑な神経回路網が構築され、膨大な情報のやり取りが遂行される。しかしながら、神経細胞が極性を獲得、維持していく過程には、依然として解決されていない基本的な疑問が残っている。どのような分子メカニズムによって軸索もしくは樹状突起が形成されるのだろうか。また、どうして複数ある神経突起のうち1本のみが軸索としての性質を獲

得するのだろうか。本稿では神経細胞の極性形成を制御する分子機構について、筆者らのこれまでの研究成果を中心に概説する。

1. 神経細胞が極性を獲得する過程

神経細胞の極性形成に関する研究は、古くから培養神経細胞が用いられている¹⁾。培養神経細胞が極性を獲得する過程は、主に5つのステージに分類される(図2)²⁾。培養神経細胞は培養後すぐに細胞の辺縁にラメリポディア(葉状仮足)を形成する(ステージ1)。培養開始後12時間以内で細胞体から4~5本の短い未成熟な神経突起が伸長する(ステージ2)。この未成熟な神経突起は、その形態及びタンパク質構成において互いにほぼ等価であり、ダイナミックな伸長と退縮を繰り返す。培養1.5日目~3日目に、互いに区別のつかなかった神経突起のうち1本のみが急速に伸長し、軸索としての性質を有するようになる(ステージ3)。この時期に初めて形態上の極性が観察されるようになる。培養4日目~7日目には、残りの神経突起が伸長して樹状突起としての性質を獲得していく(ステージ4)。その後、軸索と樹状突起のさらなる成熟と神経細胞間でシナプスが形成される(ステージ5)。したがって、神経細胞が極性を獲得する最初の段階は、未成熟な神経突起から軸索への運命決定となる。この軸索への運命決定は複数本の未成熟な神経突起の中から無作為に1本のみが選択されることから“ストカスティックモデル”と提唱されている^{3)~5)}。

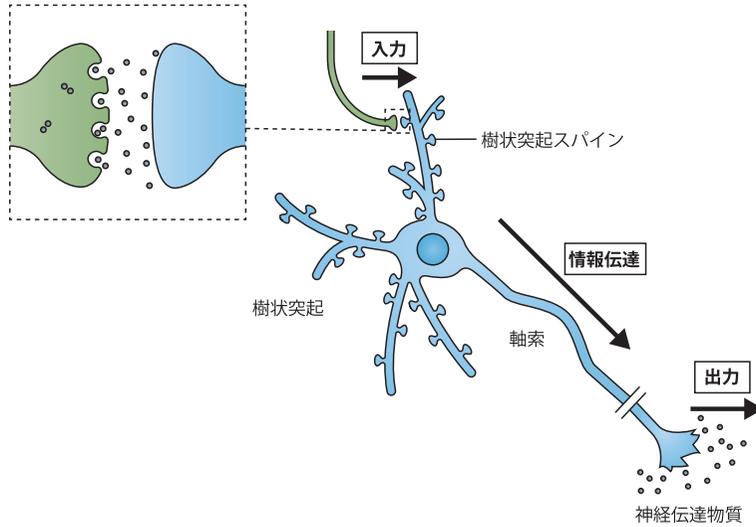


図1 神経細胞の極性

神経細胞は樹状突起スパインにおいて他の神経細胞から情報を入力し、その情報は活動電位となって細胞体から軸索方向に伝達され、軸索末端で情報の出力を行う。(文献5)より改変・転載)

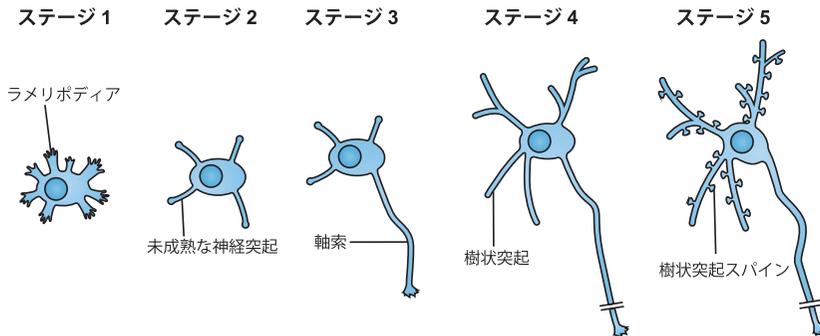


図2 海馬培養神経細胞の極性形成過程

海馬培養神経細胞の極性過程は5つのステージに分けられる(詳しくは本文参照)。ステージ1: 培養開始後6時間、ステージ2: 培養開始後12時間前後、ステージ3: 培養開始後1.5~3日、ステージ4: 培養開始後5~7日、ステージ5: 培養開始後7日以降。(文献5)より改変・転載)

II. 細胞内小胞輸送制御による軸索と樹状突起の形成機構

軸索や樹状突起の形成は微小管やアクチンフィラメントなどの細胞骨格の再構成が重要な役割を果たしており、その分子機構もこれまでに数多く同定されてきた^{4)~7)}。それに加えて、軸索や樹状突

起の形成には神経突起の細胞膜表面積を拡大する必要があり、この表面積の拡張には細胞内小胞輸送によるダイナミックな細胞膜成分の供給が必須となる。細胞膜成分は細胞膜から初期エンドソームを介してリサイクリングエンドソームに運び込まれると、リサイクリングエンドソームはその細胞膜成分を神経突起へと送り出す。非神経細胞に

においてリサイクリングエンドソーム輸送は低分子重量 GTP 結合タンパク質 Rab11 によって制御されている。一方で、神経細胞においては細胞内小胞輸送がどのようにして制御されているのか、その詳細な分子機構は不明のままであった。

Lemur kinase 1 (LMTK1 / 別名 Apoptosis-associated tyrosine kinase 1, AATYK1) は、脳で高発現する機能未知の神経細胞特異的リン酸化酵素である。LMTK1 という名前の由来はその独特の分子構造からなる。LMTK1 は N 末側にセリン・スレオニンキナーゼ領域と C 末側に 1000 アミノ酸残基程のロングテール領域を有することから、尾の長いキツネザル (lemur) に因んで、このような愛らしい名前が付けられた。これまでに、Cdk5 (サイクリン依存性タンパク質キナーゼ 5)-p35 の結合分子として LMTK1 が単離され、LMTK1 の Ser34 が Cdk5-p35 によってリン酸化されることが報告された⁸⁾⁹⁾。筆者らは非神経細胞を用いた実験により、Cdk5-p35 によるリン酸化依存的に LMTK1 は Rab11 陽性リサイクリングエンドソームに局在し、リサイクリングエンドソームの輸送と形成を抑制していることを示した¹⁰⁾。したがって、LMTK1 は細胞内小胞輸送を制御する新たな因子として同定され、LMTK1 を中心とする一連の神経細胞特異的な細胞内小胞輸送システムが軸索・樹状突起の形成に必須となる細胞膜成分の供給を制御していると推測された¹⁰⁾。

神経細胞の発生時期における LMTK1 の発現量を調べたところ、LMTK1 は軸索形成期から樹状突起形成期にかけて発現が増加し、Ser34 がリン酸化されていた。また、このリン酸化 LMTK1 は主に細胞体と神経突起の先端部で増加していた。そこで、リン酸化 LMTK1 による軸索と樹状突起の形成に対する影響を検討したところ、非リン酸化型 LMTK1 (S34A) において軸索と樹状突起の過形成が観察された。また、この非リン酸化型 LMTK1 による軸索と樹状突起の過形成は、Rab11 の発現抑制や不活性型 Rab11 との共発現によって解消されたことから、Cdk5-p35 によるリン酸化 LMTK1 は Rab11 の上流で軸索と樹状突起の形成を制御していることが明らかとなった。

興味深いことに、shRNA を用いた LMTK1 の発現抑制や LMTK1 欠損マウス由来の神経細胞においても、軸索と樹状突起の過剰な発達が観察された¹¹⁾¹²⁾。さらに、LMTK1 欠損マウス由来の神経細胞では野生型に比べて Rab11 の活性が高く、そして神経突起先端部へのリサイクリングエンドソームの過度な輸送が認められた。これらの結果より、Cdk5-LMTK1-Rab11 というシグナル伝達経路が、細胞膜成分の供給を介して軸索及び樹状突起の形成を制御する新たなシグナル伝達経路であることが示された (図 3)¹¹⁾¹²⁾。

III. 1本の軸索と複数の樹状突起への運命決定を制御する負のフィードバックシグナル

どのようにして共通の未成熟な神経突起から 1本の軸索と複数の樹状突起への運命決定が制御されているのだろうか。これは、長年ものあいだ神経極性の分野のみならず、神経発生の分野においても重大な問題とされてきた。何故ならば、発生段階において神経細胞の軸索は樹状突起に先行して形成されるが、神経細胞の極性が崩れると、驚くべきことに複数本の軸索が形成されるためである¹³⁾¹⁴⁾。即ち、軸索への運命決定後でさえも、全ての神経突起は本質的に軸索としての機能を獲得する性質を保持している。この不必要な軸索形成を抑制する分子機構を説明する最も有力な仮説として“負の(ネガティブ)フィードバックシグナル”が提唱されている³⁾⁵⁾。この負のフィードバックシグナルは、形成中の軸索末端部から全ての未成熟な神経突起へと広範囲に伝わり、不要な軸索形成を遠隔的に抑制すると考えられている³⁾⁵⁾。これは世界的にも最も支持された仮説であったが、シグナル分子の時空間的な細胞内動態を解析する必要があるため、細胞全体にシグナル分子の影響を反映するこれまでの薬理学・遺伝学的手法では、このモデルを検証することは困難とされてきた。そのため、1本だけの軸索の形成とその維持を制御する負のフィードバックシグナルが実際に存在するのか、存在するとすれば一体どのような分子メカニズムなのか、これらの解答はこれまで得

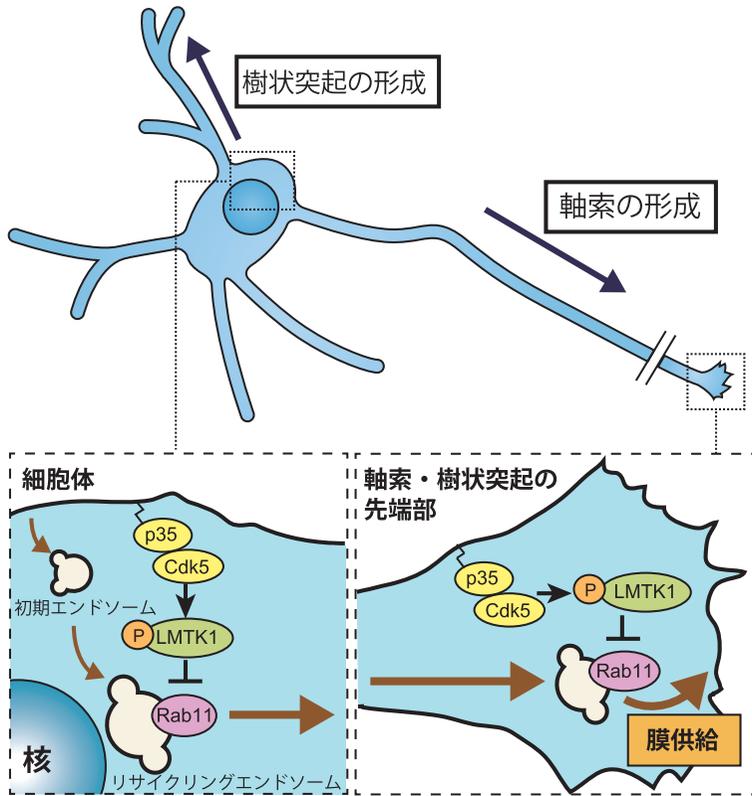


図3 Cdk5-p35/LMTK1/Rab11経路は細胞内小胞輸送を介して軸索と樹状突起の形成を制御する
LMTK1はCdk5-p35によるリン酸化依存的にRab11の活性を抑制することで、軸索と樹状突起の形成に必須となる細胞膜成分の供給を制御する。

られていなかった。

1) 軸索からの長距離 Ca^{2+} 伝搬が負のフィードバックシグナルを誘導する

神経細胞は神経栄養因子 (neurotrophin-3、NT-3) などの細胞外環境に応答して極性を獲得する¹⁵⁾。また、神経栄養因子の受容体 (TrkR) も形成中の軸索末端部へ選択に輸送され濃縮する¹⁶⁾。したがって、軸索末端部ではNT-3に応答した細胞内シグナルが増幅し、これが負のフィードバックシグナルを同時に発生させるものと推測された。そこで、神経細胞の極性化を制御する負のフィードバックシグナルが存在するのかを検討するために、マイクロペットにより単一の神経突起のみを刺激する局所刺激法を用いて、軸索末端

部だけにNT-3を刺激した。NT-3の局所的な刺激により、軸索伸張と同時に遠位の未成熟な神経突起が急速に退縮した。この結果は、形成中の軸索が全ての未成熟な神経突起の伸長を遠隔的に制御する負のフィードバックシグナルが実際に存在していることを示していた。次に、軸索でのNT-3に応答して細胞体又は未成熟な神経突起に向けて伝わるシグナル分子を探索した。先行研究により、NT-3はイノシトールトリスリン酸 (IP_3) を介した小胞体からの Ca^{2+} を産生し、この細胞内での Ca^{2+} の増加が神経細胞の極性化に必須であることが示されていた¹⁵⁾。そこで、極性形成中における Ca^{2+} 動態をライブイメージングにより詳細に解析したところ、軸索から細胞体に向けて高速で移動する長距離 Ca^{2+} 伝搬が観察された (図4)。さらに、この

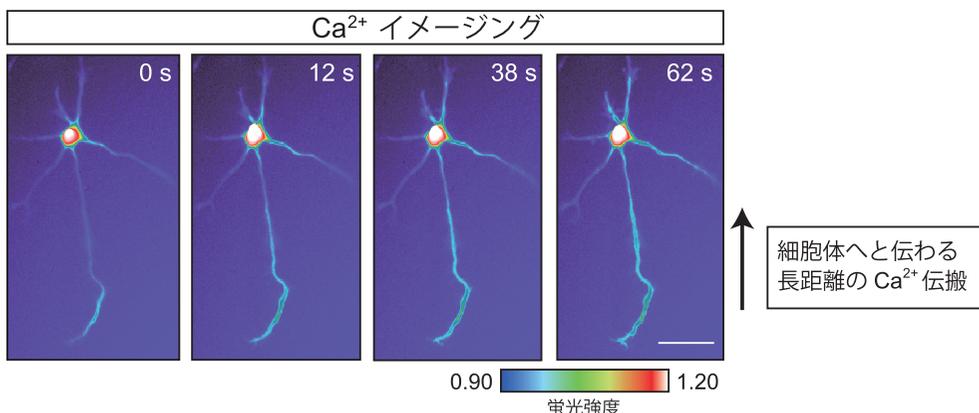


図4 神経細胞の極性形成中において長距離 Ca^{2+} 伝搬が発生する
マイクロピペットを用いて、形成中の軸索のみに NT-3 を刺激すると軸索から細胞体へと伝わる長距離 Ca^{2+} 伝搬が観察される。(文献 17) より改変・転載)

長距離 Ca^{2+} 伝搬は細胞体でカルシウム・カルモジュリン依存性キナーゼ I (CaMKI) を活性化し、CaMKI は未成熟な神経突起の伸長を制御していた。これらの結果により、神経細胞は 1 本のみの軸索の形成と、その維持を制御する負のフィードバックシグナルを有しており、この遠隔的な抑制機構は長距離 Ca^{2+} 伝搬によって誘導されていることが示唆された¹⁷⁾。

2) Rho-kinase は選択的に未成熟な神経突起に局在することで複数の軸索形成を抑制する

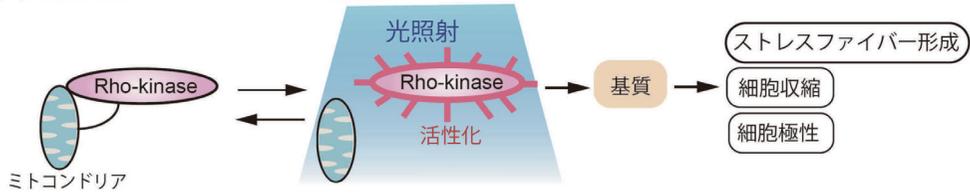
これまでに、Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質 RhoA とそのエフェクター分子 Rho-kinase は突起伸長を抑制することが報告されている⁵⁾。そのため、RhoA/Rho-kinase 経路が負のフィードバックシグナルに関与していることが想定された^{5)18)~20)}。そこで、軸索末端部での NT-3 の局所刺激によって RhoA が活性化するかを検討するために、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いたライブイメージングを行った。その結果、NT-3 に応答して細胞体で RhoA が活性化し、この RhoA の活性化は Ca^{2+} -CaMKI 依存的に誘導されていることが観察された。次に、この細胞体で活性化した RhoA/Rho-kinase 経路が極性形成を制御しているのかを直接的に評価するために、光依存的にミトコンドリアから遊離することで活性

化する Rho-kinase の新規プローブ (LOVTRAP-Rho-kinase) を開発した (図 5A)。LOVTRAP-Rho-kinase を用いて、Rho-kinase を細胞体のみで光活性化させると、未成熟な神経突起のみが退縮し、驚くべきことに軸索伸長には影響が見られなかった (図 5B)。この結果は、細胞体で活性化した Rho-kinase は未成熟な神経突起に到達することで突起の伸長を制御し、一方で軸索ではその末端まで到達していない可能性が考えられた。そこで、この仮説を検証するために数理モデルを構築した (図 5C)。その結果、細胞体で活性化した Rho-kinase は拡散様式により選択的に短い神経突起のみに分布し、神経突起の軸索化を抑制していることが示された (図 5D-F)。実際に、未成熟な神経突起で Rho-kinase を局所的に不活性化させると、神経突起が急速に伸長し、複数本の軸索が形成された。これらの結果から、CaMKI 依存的に活性化した RhoA/Rho-kinase 経路は選択的に未成熟な神経突起に分布することで複数の軸索形成を抑制していることが示唆された¹⁷⁾。

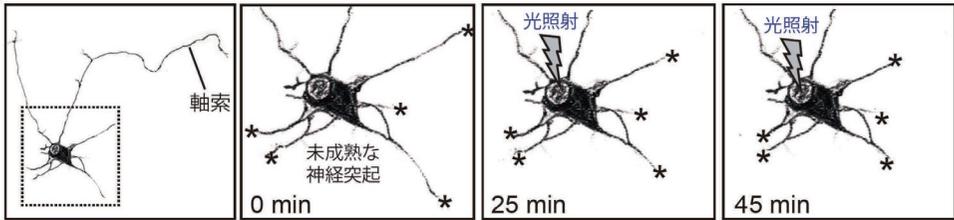
3) CaMKI の新規基質 GEF-H1 はリン酸化依存的に神経細胞の極性形成を制御する

CaMKI が RhoA/Rho-kinase 経路を活性化する仕組みを明らかにするため、新たなリン酸化プロテオミクス解析 (Kinase-interacting substrate

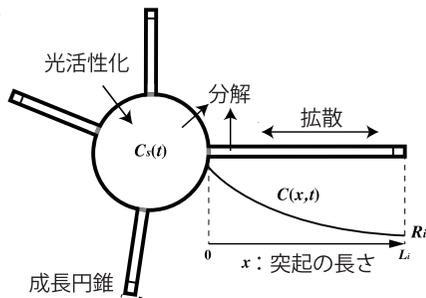
A 光活性型 Rho-Kinase の作動原理



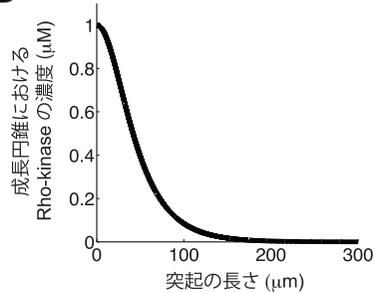
B



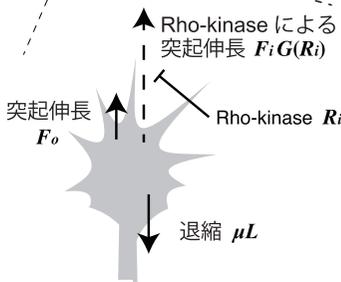
C



D



E



F

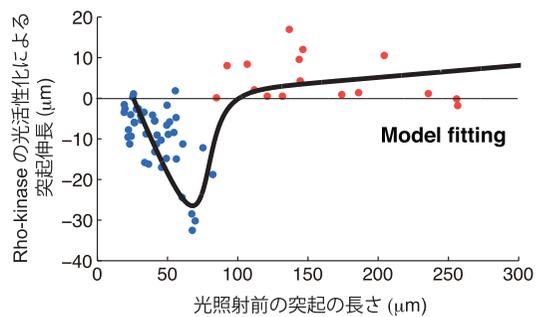


図5 光活性化 Rho-kinase は未成熟な神経突起の伸長を抑制する

(A) 光活性化 Rho-kinase (LOVTRAP-Rho-kinase) の作動原理。光照射前では Rho-kinase はミトコンドリアにトラップされるが、光照射により Rho-kinase はミトコンドリアから遊離し、適切な場所で基質を介して機能を果たす。(B) 細胞体で Rho-kinase を光活性化させると、未成熟な神経突起の退縮が誘導される。LOVTRAP-Rho-kinase を神経細胞に発現させ、細胞体だけに光照射を行った。(C) 1次元反応拡散モデル。(D) 神経突起の長さに依存した Rho-kinase の濃度勾配。短い未成熟な神経突起ほど Rho-kinase は多く局在し、約 100 μm を超える軸索末端部では Rho-kinase の局在は認められない。(E) Rho-kinase による神経突起の伸長力と退縮力。(F) Rho-kinase の光活性化前の軸索及び未成熟な神経突起の長さとお活性化 Rho-kinase による突起伸長の効果。未成熟な神経突起は、伸長力が高い(長い)神経突起ほど Rho-kinase による退縮力が強いが、軸索にはその影響は認められない。(文献 17) より改変・転載)

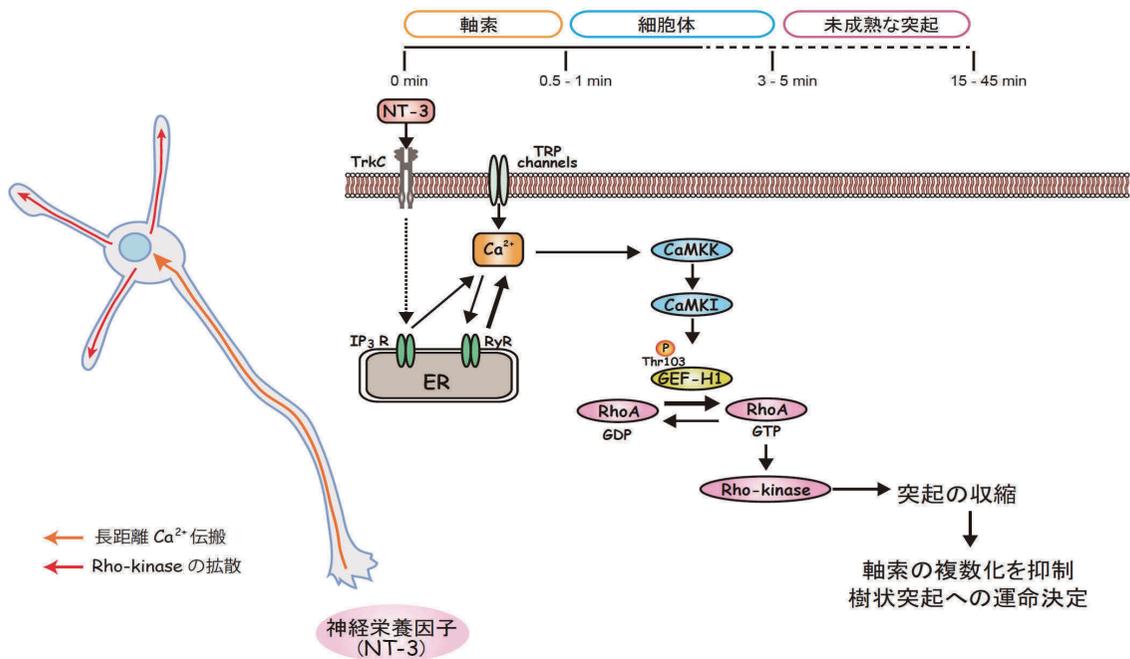


図6 1本だけの軸索と複数の樹状突起の形成を担う負のフィードバックシグナル

一度軸索への運命決定が起こると、形成中の軸索末端部から長距離 Ca^{2+} 伝播が発生する。この長距離 Ca^{2+} 伝播は細胞体に伝わると、CaMKI による GEF-H1 のリン酸化を誘導する。このリン酸化 GEF-H1 は RhoA/Rho-kinase 経路を活性化することで、Rho-kinase は選択的に未成熟な突起にて複数の軸索形成を抑制し、1本だけの軸索の形成・維持を制御する。神経細胞は、この負のフィードバックシグナルを用いることで、1本だけの軸索と複数の樹状突起の形成を正確に制御している。(文献17)より改変・転載)

screening、KISS法)を用いてCaMKIの基質を網羅的に探索した。その結果、498ものリン酸化基質を同定した。その中でも、筆者らは唯一のRhoA特異的活性化因子 GEF-H1 に着目した。神経細胞をNT-3で処理すると、CaMKI依存的に GEF-H1 のThr103がリン酸化された。また、このThr103のリン酸化 GEF-H1 は細胞体でのRhoAの活性化を誘導していた。そこで、リン酸化 GEF-H1 の神経極性に対する影響を調べたところ、GEF-H1の野生型やリン酸化型変異体(T103E)では軸索伸長が抑制されたが、非リン酸化型変異体(T103A)では複数の軸索形成が観察された。さらに、生体内での極性形成について検討するために子宮内電気穿孔法を行ったところ、GEF-H1の発現抑制によって神経細胞の極性形成が阻害された。この効果は、野生型 GEF-H1 の発現で解消されたが、リン酸化型変異体及び非リン酸化型変異

体の発現では極性形成に回復は認められなかった。興味深いことに、リン酸化型変異体では軸索形成が抑制され、一方で非リン酸化型変異体では樹状突起の形成が抑制された。したがって、生体内においても GEF-H1 はリン酸化依存的に神経細胞の極性形成を制御しており、RhoAの局所的な活性化が神経細胞の極性形成に重要であることが示された。以上の結果から、一度軸索への運命決定が起こると、形成中の軸索末端部から長距離 Ca^{2+} 伝播が発生する。この長距離 Ca^{2+} 伝播は細胞体に伝わると、CaMKIによる GEF-H1 のリン酸化を誘導する。このリン酸化 GEF-H1 は RhoA/Rho-kinase 経路を活性化することで、Rho-kinase は選択的に未成熟な突起にて複数の軸索形成を抑制し、1本だけの軸索の形成・維持を制御していることが明らかとなった(図6)。神経細胞は、この負のフィードバックシグナルを用いることで、

複数の未成熟な神経突起の中から1本のみの軸索と複数の樹状突起への運命決定を正確に制御していることが示された¹⁷⁾。

おわりに

これまでに思考・記憶・感情など脳高次機能の動作原理とされる神経細胞の非常に合理的な形態形成に魅了され、それを制御する分子メカニズムを生化学・薬理学・分子生物学的手法を用いて探求してきた。1986年に“神経極性”という新たなフィールドが誕生して以来、極性形成の分子メカニズムに関する研究は、過去30年間で急速に増加し、現在でも枚挙に遑がない¹⁾³⁾⁵⁾。その一方で、これらの極性形成を制御する複雑なシグナルネットワークでさえも、どのようにして神経細胞は1本のみの軸索と複数の樹状突起を形成するのかという問いに十分に答えることはできなかった。本研究成果は、この問題を解決した初めての知見となる。本研究により、軸索への運命決定後に形成中の軸索から全ての未成熟な神経突起へと不必要な軸索形成を抑制することで樹状突起への運命決定を制御する負のフィードバックシグナルを同定し、その詳細な分子機構を明らかにした(図6)。生体内においても、神経細胞はこの負のフィードバックシグナルを用いることで神経回路網を極めて正確に構築していると考えられる。一方で、この神経回路網の破綻は、統合失調症や神経発達障害などの精神・神経疾患を引き起こすことから、正常な神経発達の全容解明はヒトの複雑な脳機能を理解するばかりでなく、神経疾患の病態解明や治療戦略の開発に貢献するものと考えられる。今後、“神経極性”を含むさまざまな観点からの研究がさらなる進展をみせ、いつの日か脳機能に重要な役割を果たす神経回路網の形成とその破綻により生じる精神・神経疾患の分子メカニズムの全容が解明されることを期待する。

謝辞

本稿でご紹介させて頂いた研究遂行にあたり、多大なるご指導を賜りました名古屋大学大学院医学系研究科・神経情報薬理学講座の貝淵弘三教授、首都大学東京理工学研究科・神経分子機能学研究室の久永眞市客員教授、並びに研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。また、多大なご助力を賜りました東北大学大学院・膜輸送機構解析分野の福田光則教授、京都大学・理論生物分野の本田直樹准教授、明海大学・総合教育センターの友村美根子教授に厚く御礼申し上げます。最後に、本稿執筆の機会を与えて下さいました日本神経化学会理事長の和田圭司先生、優秀賞・奨励賞選考委員会の先生方、並びに関係者の先生方に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Banker G. The Development of Neuronal Polarity: A Retrospective View. *J Neurosci*, 8, 1867-1873 (2018).
- 2) Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, 8, 1454-1468 (1988).
- 3) Arimura N, Kaibuchi K. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, 8, 194-205 (2007).
- 4) Namba T, Funahashi Y, Nakamuta S, Xu C, Takano T, Kaibuchi K. Extracellular and Intracellular Signaling for Neuronal Polarity. *Physiol Rev*, 95, 995-1024 (2015).
- 5) Takano T, Xu C, Funahashi Y, Namba T, Kaibuchi K. Neuronal polarization. *Development*, 142, 2088-2093 (2015).
- 6) Bradke F, Dotti CG. The role of local actin instability in axon formation. *Science*, 283, 1931-1934 (1999).
- 7) Witte H, Bradke F. The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Curr Opin Neurobiol*, 18, 479-487 (2008).

- 8) Honma N, Asada A, Takeshita S, Enomoto M, Yamakawa E, Tsutsumi K, Saito T, Satoh T, Itoh H, Kaziro Y, Kishimoto T, Hisanaga S. Apoptosis-associated tyrosine kinase is a Cdk5 activator p35 binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 310, 398-404 (2003).
- 9) Tsutsumi K, Takano T, Endo R, Fukuda M, Ohshima T, Tomomura M, Hisanaga S. Phosphorylation of AATYK1 by Cdk5 suppresses its tyrosine phosphorylation. *PLoS One*, 5, e10260 (2010).
- 10) Takano T, Tsutsumi K, Saito T, Asada A, Tomomura M, Fukuda M, Hisanaga S. AATYK1 A phosphorylation by Cdk5 regulates the recycling endosome pathway. *Genes Cells*, 15, 783-797 (2010).
- 11) Takano T, Tomomura M, Yoshioka N, Tsutsumi K, Terasawa Y, Saito T, Kawano H, Kamiguchi H, Fukuda M, Hisanaga S. LMTK1/AATYK1 is a novel regulator of axonal outgrowth that acts via Rab11 in a Cdk5-dependent manner. *J Neurosci*, 32, 6587-6599 (2012).
- 12) Takano T, Urushibara T, Yoshioka N, Saito T, Fukuda M, Tomomura M, Hisanaga S. LMTK1 regulates dendritic formation by regulating movement of Rab11A-positive endosomes. *Mol Biol Cell*, 25, 1755-1768 (2014).
- 13) Inagaki N, Chihara K, Arimura N, Menager C, Kawano Y, Matsuo N, Nishimura T, Amano M, Kaibuchi K. CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat Neurosci*, 4, 781-782 (2001).
- 14) Yoshimura T, Kawano Y, Arimura N, Kawabata S, Kikuchi A, Kaibuchi K. GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell*, 120, 137-149 (2005).
- 15) Nakamuta S, Funahashi Y, Namba T, Arimura N, Picciotto MR, Tokumitsu H, Soderling TR, Sakakibara A, Miyata T, Kamiguchi H, Kaibuchi K. Local application of neurotrophins specifies axons through inositol 1,4,5-trisphosphate, calcium, and Ca²⁺ /calmodulin-dependent protein kinases. *Sci Signal*, 4, ra76 (2011).
- 16) Arimura N, Kimura T, Nakamuta S, Taya S, Funahashi Y, Hattori A, Shimada A, Menager C, Kawabata S, Fujii K, Iwamatsu A, Segal RA, Fukuda M, Kaibuchi K. Anterograde transport of TrkB in axons is mediated by direct interaction with Slp1 and Rab27. *Dev Cell*, 16, 675-686 (2009).
- 17) Takano T, Wu M, Nakamuta S, Naoki H, Ishizawa N, Namba T, Watanabe T, Xu C, Hamaguchi T, Yura Y, Amano M, Hahn KM, Kaibuchi K. Discovery of long-range inhibitory signaling to ensure single axon formation. *Nat Commun*, 8, 33 (2017).
- 18) Da Silva JS, Medina M, Zuliani C, Di Nardo A, Witke W, Dotti CG. RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIA-mediated control of actin stability. *Journal Cell Biol*, 162, 1267-1279 (2003).
- 19) Gonzalez-Billault C, Munoz-Llancao P, Henriquez DR, Wojnacki J, Conde C, Caceres A. The role of small GTPases in neuronal morphogenesis and polarity. *Cytoskeleton*, 69, 464-485 (2012).
- 20) Xu C, Funahashi Y, Watanabe T, Takano T, Nakamuta S, Namba T, Kaibuchi K. Radial Glial Cell-Neuron Interaction Directs Axon Formation at the Opposite Side of the Neuron from the Contact Site. *J Neurosci*, 35, 14517-14532 (2015).