

轴突导向分子及受体结构与功能进展

张勇^{1),2)} 陈淳²⁾ 徐晋麟¹⁾ 顾建新^{2)*}

(¹⁾上海交通大学生物科学技术系, 上海 200240; (²⁾复旦大学基础医学院基因研究中心, 上海 200032)

摘要 在神经发育过程中, 轴突导向分子引导轴突选择正确途径, 从而成功到达靶区. 近年有关轴突导向分子及其受体的研究进展迅速, 主要介绍了 Netrin-DCC 和 UNC5, semaphorin neuropilins 和 plexins, Slit-robo, Eph 受体酪氨酸激酶及其配体的结构和功能.

关键词 轴突导向分子, Netrin-DCC 和 UNC5, semaphorin neuropilin 和 plexins, slit-robo

学科分类号 Q593

10¹²个神经元通过 10¹⁵个精确的突触连接形成高度特异的功能回路, 从而构成了有功能的大脑. 这种精确回路的形成通过两种机制实现: 即早期不依赖神经元活性的机制和后期与神经元活性有关的机制, 本文仅讨论前者, 即生长锥早期连接的建立.

生长锥表达的受体使它们可以“阅读”大量的分子, 发现和识别正确的靶分子后沿着适当的通道横跨一定的距离, 使最初的连接精确化为高度特异的功能回路. 此过程称生长锥延伸的引导 (growth cone guidance), 又称轴突引导 (axon guidance). 至少有四种不同的机制参与此过程: 接触介导的吸引 (contact-dependent attraction)、接触介导的排斥 (contact-dependent repulsion)、化学吸引 (chemoattraction) 和化学排斥 (chemorepulsion). 引导的信号可以产生正效应 (吸引), 也可以产生负效应 (排斥). 信号分子可以位于细胞表面或是细胞外基质, 即短程作用 (接触介导), 也可以是扩散的, 即建立起长程的梯度 (化学扩散). 虽然这些定义暗示不同的机制, 但实际上这些机制的差异是很模糊的. 一个分泌型的分子可能因被细胞外基质吸附而以接触介导的方式起作用; 同一分子在生长锥处于不同状态时 (第二信使的水平不同) 所起的作用也可能不同 (吸引或排斥).

分布于轴突以外在神经发育过程中引导轴突选择正确途径以到达靶区的分子, 称为轴突导向分子. 本文主要介绍已发现的四类重要的轴突导向分子和相应受体.

1 Netrin-DCC 和 UNC5

1974年, Brenner 等在筛选细胞和轴突迁移发

生突变的无脊椎动物线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 文库时, 发现了三个基因 *UNC-5* (uncoordinated)、*UNC-6* 和 *UNC-40*. 随后的研究表明它们参与神经上皮细胞和轴突沿背腹轴的迁移, 其中 *UNC-6* 编码指导生长锥延伸的蛋白; *UNC-5* 和 *UNC-40* 是其受体. 在果蝇中也发现了 *UNC-6* 的同源分子 *netrin-A* 和 *netrin-B*, 后来在脊椎动物中也发现了 *UNC-6* 的同源分子: *netrin-1*、*netrin-2* (鸡)、*NTN2L* (*netrin-2 like*, 人) 和 *netrin-3* (小鼠)^[1]. 这些分子构成了 *netrin* 家族, 此家族均含 3 个保守的 EGF (epidermal growth factor) 样重复序列和多个半胱氨酸残基, 其 N 端与层粘连蛋白 (laminin) 的 V 和 VI 结构域同源.

体外实验表明 *netrin* 家族在轴突生长过程中既引起吸引作用又有排斥作用. 在不同的神经元中, *netrin* 的作用决定于它的受体, 在同一神经元中则决定于内源 cAMP 的水平. 线虫、果蝇和脊椎动物的一些证据表明 *netrin* 在体内也参与轴突引导过程.

线虫中的 *UNC40*、果蝇中的 *Fra* (*frazzled*) 和哺乳动物中的 *DCC* (*deleted in colorectal cancer*) 是同源分子, 它们组成 *DCC* 家族. 它们的胞外段均有 4 个免疫球蛋白结构域 (Ig) 和 6 个 FN (*fibronectin*) III 样结构域, 但胞内段同源性较少, 且无明显的信号传导结构域. 此家族被鉴定为介导 *netrin* 吸引功能的受体或受体的一部分.

线虫的 *UNC5* 被鉴定为介导 *netrin* 排斥功能的

* 通讯联系人.

Tel: 021-64041900-2694, E-mail: zhangyong-1@yahoo.com

收稿日期: 2000-06-20, 接受日期: 2000-09-28

受体或受体的一部分. UNC5 在脊椎动物中的同源分子 UNC-5H1 (UNC-5 homologue 1)、UNC-5H2 和 UNC-5H3 也可结合 netrin, 故它们可能是 netrin 受体的候选分子.

2 Semaphorin-neuropilins 和 plexins

Semaphorin 是一类分泌或跨膜蛋白家族, 它们都含有 Sema 结构域, 此结构域是一个较大的细胞外基质结构域, 长约 550 个氨基酸, 其中含有一些保守的丝氨酸残基. 根据所含结构域不同, semaphorin 命名委员会将之分为 8 类. 至今为止, semaphorin 家族在脊椎动物中至少有 19 个成员, 在非脊椎动物中至少有 3 个成员, 在病毒中至少有 2 个成员^[2]. Semaphorin 家族在介导轴突生长过程中主要起排斥作用, 也有 semaphorin 在体外起吸引作用的报道, 如 Sema3A 在激活 cAMP 和 cGMP 途径时, 其功能由排斥变为吸引; Sema3C 对皮层轴突起吸引作用^[3,4]. 对 semaphorin 3A 的基因敲除小鼠胚胎形成的分析进一步证实 Semaphorin 在轴突生长过程中的导向作用, 但令人奇怪的是新生的基因敲除小鼠神经发育却是正常的. 直到最近才证实 semaphorin 3A 敲除小鼠早期的神经发育异常在 15.5 d 后得到了修复, 这说明发育早期至少存在一种修复轴突延伸错误的机制^[5].

1997 年 Neuropilin 1 (NP-1, 又称 A5)、Neuropilin 2 (NP-2) 被鉴定为 semaphorin 的受体. NP-1、NP-2 均可与 3 型 semaphorin 以高亲和力结合, 其中 Sema3A 只能与 NP-1 结合, Sema3B、Sema3C、Sema3F 可与 NP-1 和 NP-2 结合^[6,7]. Neuropilin 家族在脊椎动物中高度保守, 其胞外段均有 3 个不同的结构域, 分别称为 a1/a2、b1/b2 和 c. a1/a2 又称 CUB 结构域 (complement-binding protein homology), 此结构域在补体分子 C1r 和 C1s、骨形成蛋白 1 和一些金属蛋白酶中也存在. b1/b2 结构域与凝血因子 V 和 VIII 有相似模块. 在 c 结构域的中部含有 MAM 结构域 (meprin, A5, μ), 此结构域在酪氨酸磷酸酶 Mu、Meprin (一种金属内切肽酶) 也存在. Neuropilin 家族的胞内段很短, 只有约 40 个氨基酸, 没有可识别的结构域. 其中 CUB 结构域是 Sema 结构域的结合位点, 跨膜区和胞内区对 NP-1 传导 semaphorin 的信号不是必需的, 但近膜的 MAM 结构域很重要.

Plexins 家族是一类较大的跨膜蛋白, 其胞外丝氨酸丰富区与 Met 受体酪氨酸激酶 (receptor

tyrosine kinase, RTK) 同源, 其胞外段也含有约 500 个氨基酸的 Sema 结构域; Plexins 的胞内段较长且较保守, 但无可识别的结构域. Plexins 家族在果蝇中至少有 2 个成员, 在线虫中至少有 2 个, 在脊椎动物中至少有 9 个. 果蝇的 PlexinA 是 Sema1a 和 Sema1b 的受体^[8]. 在脊椎动物中, PlexinB1 (Sep) 是 Sema4D 的受体, PlexinC1 (Vespr) 是 Sema7A 的受体, 分泌性的 3 型 semaphorin (如 semaphorin3A) 不直接与 Plexin 结合, 而是与 Plexin 和 Neuropilin 形成的复合物结合^[9,10].

3 Slit-robo

1993 年, Seeger 等在筛选果蝇中线穿过发生突变的个体文库时发现 robo (roundabout) 基因. robo 在果蝇胚胎时期就在径向轴突 (longitudinal axon) 中表达, 介导轴突的排斥引导作用^[11]. 线虫中 robo 的同源分子 Sax-3 (sensory axon defect) 作用与 robo 相似^[12]. 在脊椎动物中也发现 3 个 robo 的同源分子, 称 robo-1、robo-2、rig-1. 这些同源分子构成 Robo 家族, 都是跨膜蛋白, 胞外段有 5 个 Ig 结构域和 3 个 FN III 结构域; 胞内段较大, 有潜在的酪氨酸磷酸化位点和脯氨酸丰富区.

现已证明 Slit 是 robo 的配体. Slit 是一个较大的细胞外基质蛋白 (约 190 ku), 有 4 个亮氨酸丰富区, 随后是连续的 EGF 样重复序列. 果蝇和线虫中各有一种 Slit 基因, 而人和鼠各有 3 种 Slit 同源基因. 最近的一系列研究表明, Slit 的主要功能可能是直接控制轴突的导向, 它至少有两种不同的作用: a. 通过果蝇胚胎的突变体表型分析表明 Slit 对径向轴突和连接轴突有排斥作用; 脊椎动物的 Slit 对培养的嗅球轴突、海马轴突和脊椎运动轴突均有化学排斥作用; b. Slit 可促进轴突分枝以便侧支轴突的生长. Slit 作为配体与轴突受体 robo 结合介导轴突排斥性的导向作用 (图 1)^[13~16]. 更令人兴奋的是饶毅等报道 Slit 蛋白排斥一些神经前体细胞的迁移, 这些神经细胞可从端脑的前侧区 (the anterior subventricular zone, SVZa) 迁移到嗅球. 此结果提供了可扩散分子通过浓度梯度指导神经细胞迁移的直接证据, 被认为是发育生物学的里程碑性突破^[17]. 最近又有报道: Slit 及其受体在视觉神经系统中的不同分布表明, Slit2 通过短程的排斥作用对视网膜神经节细胞轴突定位起非常重要的作用^[18].

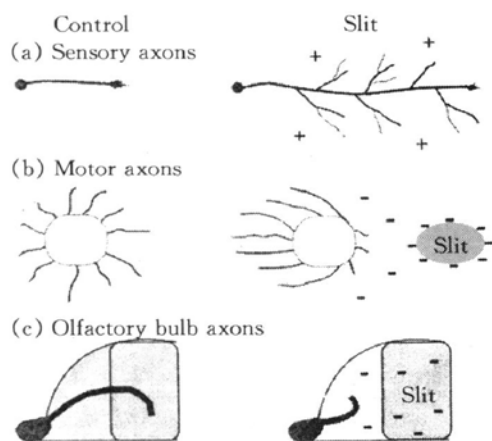


Fig. 1 Slit activities^[19]

图 1 Slit 的活性^[19]

(a) Slit 促使 DRG 的轴突分枝; (b) Slit 排斥来自脊髓的运动神经元; (c) Slit 使嗅球投射的轴突方向改变。

4 Eph 受体酪氨酸激酶及其配体

Eph 受体是受体酪氨酸激酶家族中最大的一个亚族。从 1987 年第一个 Eph 受体被识别到现在, 已发现近 20 个该家庭成员。根据序列和配体的不同, Eph 受体又可分为 EphA 和 EphB 受体两类。Eph 受体家族的胞外段有一个 Ig 样结构域 (同源性较低) 和两个 FN III 重复序列, 胞内区有一个催化的酪氨酸激酶结构域。自 1994 年 Eph 配体 (ephrin) 首次被发现, 至今已有 13 个 ephrin 基因被克隆。Ephrin 可分为两类, 以 G-PI (glycosyl-phosphatidyl inositol) 锚定位点结合于细胞表面的称为 ephrin-A; 以跨膜区结合于细胞表面的称为 ephrin-B。除了部分 Eph 受体可结合两种配体, 一般 EphA 结合 ephrin-A, EphB 结合 ephrin-B。

Eph 受体及其配体在神经发育中轴突导向作用的研究引人注目。1995 年 Bonhoeffer 等利用双向电泳找到了一个分子质量为 25 ku 蛋白质, 将它命名为抑制性轴突导向信号 (repulsive axon guidance signal, RAGS)。RAGS 是 Eph 配体的一个成员 (ephrin-A5), 其 mRNA 在顶盖呈前部至后部浓度递增梯度分布。Cheng 等又发现 Eph 配体的另一成员 ELF-1 (ephrin-A2) 与 RAGS 在顶盖有相同的梯度分布, 并且其可能的一种受体 Mek4 (EphA3) 的 mRNA 在视网膜上也有互补的梯度分布, 即鼻侧至颞侧浓度递增。Ephrin-A2 and -A5 的基因敲除实验表明: 当其中一个基因敲除, 则出现轻度投射异常, 若二者都被敲除时, 视网膜投射的前后方向几乎消失, 证明了 ephrins 在视网膜中影响投射

前后方向的作用^[20]。

轴突生长方向受到多种分子的调控, 这些分子在体内特定时间和特定部位表达, 通过轴突上相同或不同的信号转导系统协同作用, 共同引导轴突选择正确的生长途径, 成功地到达靶区并与其建立突触联系。随着分子生物学对神经科学的渗透, 将会有更多的轴突导向分子被发现, 从而对更多中枢神经的特异投射和不同神经回路的形成作出解释, 并将可能解决神经损伤、神经再生、神经系统疾病等重要临床问题。

参 考 文 献

- 1 Wang H, Copeland N G, Gilbert D J, *et al.* Netrin-3, a mouse homolog of human NTN2L, is highly expressed in sensory ganglia and shows differential binding to netrin receptors. *J Neurosci*, 1999, **19** (12): 4938~ 4947
- 2 Goodman C S, Kolodkin A L, Luo Y, *et al.* Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. *Cell*, 1999, **97** (5): 551~ 552
- 3 Song H, Ming G, He Z, *et al.* Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science*, 1998, **281** (5382): 1515~ 1518
- 4 Bagnard D, Lohrum M, Uziel D, *et al.* Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development*, 1998, **125** (24): 5043~ 5053
- 5 White F A, Behar O. The development and subsequent elimination of aberrant peripheral axon projections in Semaphorin3A null mutant mice. *Dev Biol*, 2000, **225** (1): 79~ 86
- 6 Kolodkin A L, Levengood D V, Rowe E G, *et al.* Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell*, 1997, **90** (4): 753~ 762
- 7 Chen H, Chedotal A, He Z, *et al.* Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron*, 1997, **19** (3): 547~ 559
- 8 Winberg M L, Noordermeer J N, Tamagnone L, *et al.* Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell*, 1998, **95** (7): 903~ 916
- 9 Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, *et al.* Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell*, 1999, **99** (1): 71~ 80
- 10 Takahashi T, Fournier A, Nakamura F, *et al.* Plexin/Neuropilin-1 complexes form functional semaphorin 3A receptor. *Cell*, 1999, **99** (1): 59~ 69
- 11 Kidd T, Brose K, Mitchell K J, *et al.* Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell*, 1998, **92** (2): 205~ 215
- 12 Zallen J A, Yi B A, Bargmann C I. The conserved immunoglobulin superfamily member SAX-3/Robo directs multiple aspects of axon guidance in *C. elegans*. *Cell*, 1998, **92** (2): 217~ 227
- 13 Wang K H, Brose K, Arnott D, *et al.* Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell*, 1999, **96** (6): 771~ 784

- 14 Kidd T, Bland K S, Goodman C S. Slit is the midline repellent for the Robo receptor in *Drosophila*. *Cell*, 1999, **96** (6): 785~ 794
- 15 Brose K, Bland K S, Wang K H, *et al.* Evolutionary conservation of the repulsive axon guidance function of slit proteins and of their interactions with Robo receptors. *Cell*, 1999, **96** (6): 795~ 806
- 16 Li H, Chen J, Wu W, *et al.* Vertebrate Slit, a ligand for the transmembrane protein Roundabout, is repellent for olfactory bulb axons. *Cell*, 1999, **96** (6): 807~ 818
- 17 Wu W, Wong K, Chen J H, *et al.* Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature*, 1999, **400** (6742): 331~ 336
- 18 Niclou S P, Jia L, Raper J A. Slit2 is a repellent for retinal ganglion cell axons. *J Neurosci*, 2000, **20** (13): 4962~ 4974
- 19 Zinn K, Sun Q. Slit branches out: a secreted protein mediates both attractive and repulsive axon guidance. *Cell*, 1999, **97** (1): 1~ 4
- 20 Feldheim D A, Kim Y I, Bergemann A D, *et al.* Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron*, 2000, **25** (3): 563 ~ 574

The Guidance Molecular of Axon and Its Receptor

ZHANG Yong, XU Jir-Lin

(Department of Biological Science and Technology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China);

CHEN Chun, GU Jiar-Xin*

(Gene Research Center, Fudan Medical Center, Shanghai 200032, China)

Abstract During the neuro development, the guidance molecular of axon and receptor direct the axon to choose the correct way and reach the target. The structure and function of Netrin-DCC and UNC5, Semaphorin-neuropilins and plexins, Slit-robo, Eph receptor-ligand were reviewed.

Key words the guidance molecular of axon and receptor, Netrin-DCC and UNC5, Semaphorin-neuropilins and plexins, Slit-robo, Eph receptor-ligand

* Corresponding author. Tel: 86-21-64041900-2694, E-mail: zhangyong-1@yahoo.com

Received: June 20, 2000 Accepted: September 28, 2000