

マウス神経幹細胞 **Radial glial cell** の維持と
姉妹細胞の非対称性を生む **Notch** の活性化機構

間瀬 俊

目次

要旨	1
はじめに	3
略語表	4
第一部	5
1. 序論	6
i. マウス大脳背側の神経幹細胞と神経発生	6
ii. Notch シグナル経路の発生における重要性	7
iii. <i>Notch1</i> 及び <i>Notch2</i> の大脳背側の発生における重要性	9
iv. 本研究の目的	10
2. 対象と手法	11
i. 実験動物	11
ii. 免疫染色法	12
iii. 細胞周期離脱率の計測	13
iv. 統計検定	14
v. 単細胞トランスクリプトーム分析	14
3. 結果	15
i. 神経発生初期における <i>Notch1</i> と <i>Notch2</i> の神経幹細胞の維持と分化への影響	15
ii. 神経発生後期における <i>Notch1</i> と <i>Notch2</i> による RGC の未分化性維持への寄与	23
iii. <i>Notch2</i> の発現レベルが神経発生中期から増加する	27
4. 考察	30
i. 神経発生中期までは <i>Notch1</i> がシグナル伝達の中心的役割を果たす	30
ii. <i>Notch3</i> は神経発生初期に部分的な活性を持つ可能性がある	30
iii. 神経発生後期には <i>Notch1,2</i> が RGC の維持に同等に寄与する	31
iv. Notch シグナル経路とそのほかのシグナル経路の相互作用	32
第二部	34
5. 序論	35
i. 姉妹細胞の形態と運命の非対称性	35
ii. RGC の姉妹細胞における非対称な Notch の活性化メカニズム	35
iii. 本研究の目的	38
6. 対象と手法	39
i. 実験動物	39
ii. 免疫染色法	39
iii. Airyscan による超解像度顕微鏡撮影	40
iv. 大脳背側原基スライス培養法	40
v. 遺伝子発現ベクター	41
vi. mRNA <i>in situ</i> hybridization	43
vii. 子宮内電気穿孔法	43
viii. 全胚培養と電気穿孔法	44
ix. タモキシフェン依存的な遺伝子ノックアウト	44
x. 統計検定	44
7. 結果	45

i.	姉妹細胞間の Notch 活性化の非対称性は分裂後に短期間で形成される	45
ii.	活性化型 NICD が radial fiber に存在する	47
iii.	Dll1 は VZ より基底膜側でシグナル伝達の活性を持つ	53
iv.	VZ より基底膜側の Dll1 は RGC の未分化性を維持できる	69
8.	考察	77
i.	本研究が提唱する RGC の姉妹細胞の運命決定モデル	77
ii.	活性化型 NICD の起源部位	78
iii.	マウス大脳背側の領域ごとのリガンドの細胞内分布	79
iv.	VZ より基底膜側での Notch シグナル伝達の必要性の検討	81
v.	姉妹細胞間でシグナル活性を非対称化するそのほかの仕組み	81
vi.	VZ 内側での Notch と Delta の相互作用	83
文献		85
謝辞		91

要旨

マウスの大脳背側の神経発生では、神経幹細胞が対称分裂で増殖し、その後非対称分裂によって神経細胞を生み出す。未分化性を維持しながら非対称分裂を継続するためには、その間途切れることなく神経幹細胞が周囲の細胞から Notch シグナルを受容する必要がある。神経幹細胞は *Notch1*, *Notch2*, *Notch3* の3つの Notch シグナルの受容体を発現するが、ホモログごとの役割は不明な点が多い。また、Notch は大脳背側の主なリガンド Delta-like1(Dll1)で活性化されるが、形態が異なる姉妹細胞間で、非対称に Notch が活性化される仕組みや、Notch シグナルの活性化部位については未だ定説がない。

第一部では、神経幹細胞で発現する Notch1 と Notch2 が主要な Notch シグナルの受容体であることを示した。本研究では発生期の大脳背側で特異的に *Notch1*, *Notch2* またはその両方の活性を失ったノックアウトマウスを作出し、*Notch1* および *Notch2* が神経幹細胞の維持と神経発生に与える影響を解析した。その結果、神経発生初期から中期にかけて神経幹細胞の維持に主要な役割を果たすのは *Notch1* であるが、神経発生後期には *Notch2* の発現が増加することで、両者が未分化性維持に同等の役割を発揮することを明らかにした。

第二部では、神経幹細胞が脳室帯より基底膜側で周辺の細胞から Notch シグナルを受容し得ることを示した。Notch はリガンドとの結合がトリガーとなって、酵素的な切断を受ける結果、活性化型の細胞内ドメインは主に核に移行し、転写因子として働く。古典的なモデルでは、Notch は脳室面に近い接着帯周辺で活性化されると考えられてきた。本研究では活性化型 Notch が脳室帯より基底膜側に伸びる神経幹細胞の放射状繊維に広く分布することを発見した。この活性化型 Notch は、Notch の切断酵素の活性を阻害すると消失した。一方、Dll1 は神経細胞へ分化する初期段階の細胞で強く発現し、野生型マウスでは脳室帯内の細胞質で主に観察される。*Notch1/2* ダブルノックアウトマウスを観察したところ、Dll1 が脳室帯内側の細胞膜と思われる領域に分布した。これは野生型マウスの神経前駆細胞では、母細胞から持ち越した Notch1 と Notch2 が同一細胞上の Dll1 を cis-inhibition することで、脳室帯内側に分布する Dll1 は Notch シグナル伝達への寄与が小さい可能性が示唆された。さらに *Notch1* ノックアウトマウスでは、脳室帯より基底膜側の神経前駆細胞で Dll1 が細胞膜と思われる領域に局在した。神経幹細胞の一部に *Notch1* を発現させると、この Dll1 の局在は隣接細胞から消失することから、野生型では神経前駆細胞に隣接する細胞の Notch の活性化 (*trans-activation*) に使われていることが示唆された。さらに、脳室帯より基底膜側で生じる Notch-Dll1 の *trans-activation* が、神経幹細胞の未分化性維持に十分であることも示した。これらのことから、脳室帯の Notch シグナルだけでなく、脳室帯から神経層へ移動する神経前駆細胞の Dll1 による Notch 活性化が、神経幹細胞の維持に重要であることが示唆された。

本研究は、第一部で *Notch1* および *Notch2* の発現量の経時変化が、大脳背側の神経幹細胞の未分化性維持に果たす役割を明らかにし、第二部では、新たな Notch 活性化空間を発見したことで、大脳背側の発生における Notch シグナルの動態と神経幹細胞の形態の機能的必然性を説明する新たな時空間的モデルを提示した。

キーワード：マウス神経発生、神経幹細胞、非対称分裂、Notch シグナル伝達、時空間的パターン

はじめに

本学位論文は第一部と第二部の二部構成である。

まず第一部では、*Notch1* と *Notch2* がマウス大脳背側の発生で神経幹細胞の維持に中心的な役割を果たすことを示した。*Notch1* は神経発生初期から後期まで活性を発揮する一方で、*Notch2* は中期以降に *Notch1* と同等の活性を発揮することを明らかにした。また、*Notch1* と *Notch2* を欠失させた大脳背側では神経幹細胞が完全に消失したことから、マウス大脳背側の発生では *Notch1* と *Notch2* が神経幹細胞の維持に必須であることが示された。第一部の研究成果は本学位論文の根拠論文として、*Neuroscience Research* 誌にて公表済みである。

次に第二部では、第一部で明らかにした、神経幹細胞を維持するために必須の *Notch1* と *Notch2* を介したシグナルが、主に大脳背側の脳室下帯から基底膜側で伝達される可能性を提案する。つまり、VZ より基底膜側で伝達される *Notch* シグナルを受容できる放射状繊維を母細胞から引き継ぐかどうかという形態的な非対称性によって、姉妹細胞の運命が非対称化されるというモデルを提案する。本研究では、脳室下帯に多く分布する神経前駆細胞がリガンド供給の主体となり、この細胞との接触頻度が、姉妹細胞間の *Notch* シグナルの活性化量を決定するという解釈を支持する。これまでの通説では、*Notch* シグナルは脳室帯の最も *apical* 側にある接着帯でやり取りされると考えられてきたが、本研究の結果はこの通説に疑問を投げかけるものである。第二部の研究結果は結論を確実にする実験の結果が得られ次第、公表する予定である。

略語表

E: Embryonic day

KO: knockout

KI: Knock in

DKO: double knockout

GFP: Green fluorescent protein

RGC: Radial glial cell

IPC: Intermediate progenitor cell (神経前駆細胞)

RF: Radial fiber (RGC の放射状繊維)

VZ: Ventricular zone (脳室帯)

oVZ: Outer ventricular zone

SVZ: Subventricular zone (脳室下帯)

SOP: Sensory organ precursor

Dll1: Delta-like 1

NICD: Notch intracellular domain

NECD: Notch extracellular domain

Notch1^{Δ/Δ}; Notch1^{ff}; Emx1-Cre^{KI/+}

Notch2^{Δ/Δ}; Notch2^{ff}; Emx1-Cre^{KI/+}

Notch1^{Δ/Δ}; Notch2^{Δ/Δ}; Notch1^{ff}; Notch2^{ff}; Emx1-Cre^{KI/+}

EP: electroporation

第一部

Notch1 と *Notch2* は協働して
マウス神経幹細胞 **Radial glia cell** を維持する

1. 序論

i. マウス大脳背側の神経幹細胞と神経発生

脊椎動物の大脳背側の発生期には、神経幹細胞としての性質を持つ神経上皮細胞が盛んに対称分裂を行うこと増殖期と、非対称分裂により神経細胞を生み出す神経産生期ある（図1）。

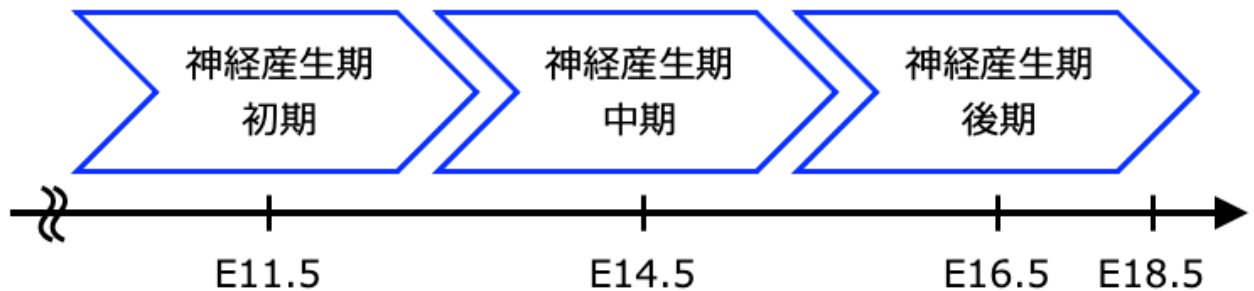


図1 マウス大脳背側の発生における各ステージの用語の定義

- 神経産生期初期：E11.5 を中心とした、神経幹細胞が非対称分裂によって神経細胞あるいは神経前駆細胞 (IPC)の産生を開始する時期
- 神経産生期中期：E14.5 を中心とした、神経産生の盛んな時期
- 神経産生期後期：E16.5 を中心として、神経産生が完了する E18.5 頃までの時期

神経上皮細胞は神経管の apical-basal 極性に沿って伸長した形態をしており、ventricular zone (VZ)にある細胞体から脳室面へと伸びる突起は apical process と呼ばれ、もう一方の基底膜へと伸びる突起は radial fiber と呼ばれる。神経上皮細胞の細胞分裂は脳室面で行われ、G1 期には細胞核が基底膜方向へと移動しながら S 期に入り、G2 期には再び脳室面へと移動して細胞分裂を行うというように、神経上皮細胞の細胞核は Interkinetic Nuclear Migration と呼ばれるダイナミックな振る舞いを見せる(Sauer, 1935)。神経細胞が生み出される神経産生期以降、神経上皮細胞は著しく伸長した形態をとり、Vimentin や Brain-lipid-binding protein (BLBP)などのグリアマーカーを発現することで Radial glia cell (RGC)と呼ばれるようになる(Aaku-Saraste et al., 1996; Anthony et al., 2004; Feng et al., 1994; Götz and Huttner, 2005; Hartfuss et al., 2001)。マウスの大脳背側に存在する RGC は、神経上皮細胞同様に未分化性を持ち脳室面で細胞分裂する（図2）。

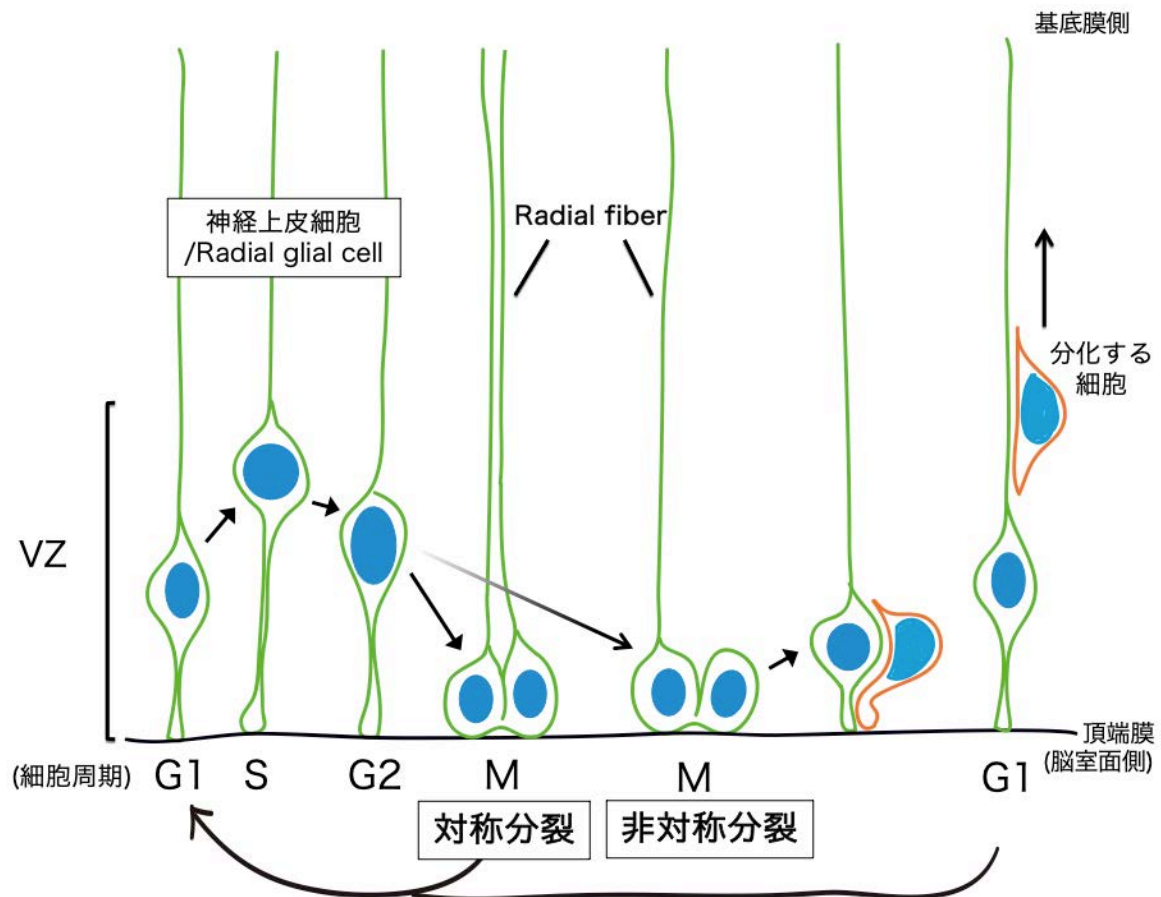


図2 細胞周期における神経上皮細胞およびRGCの細胞核の運動と細胞分裂

神経上皮細胞/RGC (緑色の細胞)の Interkinetic Nuclear Migration (INM)の様子。細胞周期 (G1 期～M 期)に対応する細胞核の脳室帯(VZ)における位置を示した (青: 細胞核)。神経上皮細胞/RGCはVZ内で細胞周期に応じて上下運動をする。対称分裂では、radial fiberを持つ神経上皮細胞/RGCが2つ生まれる。非対称分裂では、姉妹細胞のうち一方が radial fiberを受け継いでRGCとなり、もう一方は神経細胞へと分化しながら radial fiberを足場に基底膜側の神経板へ移動する。

ii. Notch シグナル経路の発生における重要性

Notch シグナル経路は脊椎動物の様々な発生過程において、幹細胞の増殖を調節するために不可欠な進化的に保存されたシグナル伝達経路の一つである(Andersson et al., 2011; Siebel and Lendahl, 2017)。

Notch とそのリガンドによる Notch シグナル伝達は、隣接する細胞同士の運命決定に寄与する接触性のシグナルとして知られている(Kopan and Ilagan, 2009)。Notchが隣接する細胞のリガンドと結合すると、隣接する細胞においては Mindbomb-1(Mib1)の働きによって Notch の細胞外ドメインを結合したまま Dll1 を endocytosis する(*trans*-endocytosis)。すると、Notch の活性化型細胞内ドメインが酵素的に切り離されて核内へ移行し、転写因子として *Hes1* などの未分化性の維持に働く遺伝子の発現を促進する (Kageyama et al., 2008; Pierfelice et al., 2011) (図3)。

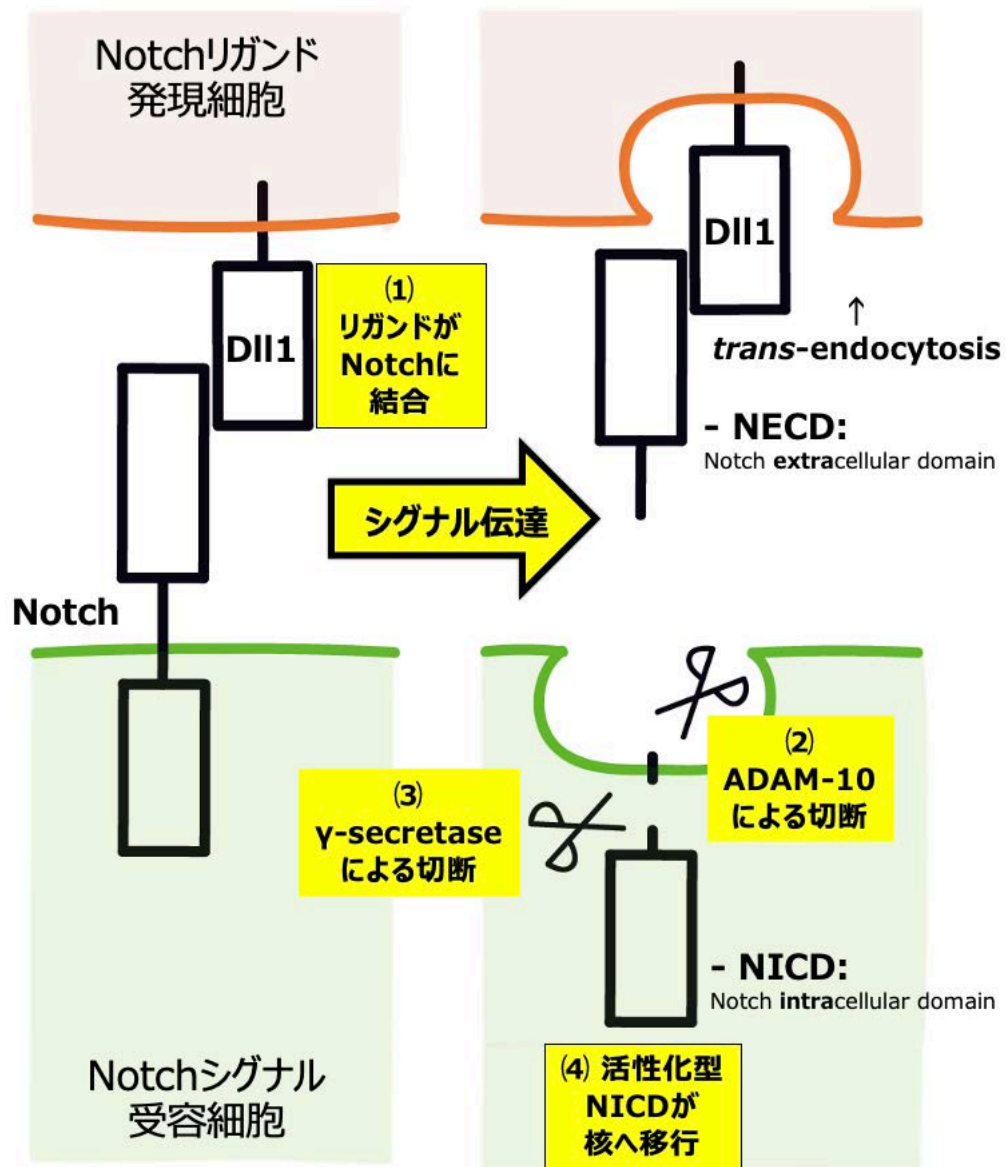


図3 Notch-Delta シグナル伝達における細胞内イベント

上の細胞が Notch リガンド(Dll1)を発現する細胞、下の細胞が Notch(受容体)を発現する細胞である。(1) 細胞膜上のリガンドが隣接する細胞の細胞膜上の Notch に結合すると、リガンドを発現する細胞が Notch の細胞外ドメイン(NECD)を *Trans*-endocytosis する。(2) リガンド依存的に NECD を失った Notch は ADAM-10 と、(3) γ -secretase によって酵素的に切断され、活性化された Notch の細胞内ドメイン(NICD)が核内へ移行する。(4) 活性化型 NICD は核内で転写因子として *Hes1/5* などの遺伝子発現を誘導することで細胞の未分化性を維持する。

また、Numb は Notch の細胞膜上における存在量を制御することで、Notch シグナルの伝達の頻度を制御していると考えられている (Rhyu et al., 1994; Uemura et al., 1989; Zhou et al., 2007)。

哺乳類には *Notch1*, *2*, *3* および *4* の 4 つの Notch ホモログが存在する(Kopan and Ilgan, 2009)。特に *Notch1* 及び *Notch2* がマウスの初期発生で重要であり、これらのノックアウト(KO)マウスでは発生初期に循環器系や体節の形成に異常が起こるほか、神経組織を中心に広範に細胞死や神経細胞の過形成が起こり、Embryonic day(E)10.5-11.5 の間に胎生致死となる(Conlon et al., 1995; Hamada et al., 1999; Krebs et al., 2003a, 2000; McCright et al., 2006, 2001; Radtke et al., 1999; Swiatek et al., 1994)。神経組織における Notch の主要なリガンドである *Delta-like1(Dll1)* についても、その KO マウスには同様の異常が生じる結果、E12 までに胎生致死となる(De Angelis et al., 1997)。一方で *Notch3* および *Notch4* の KO マウスでは、発生への影響が認められない(Krebs et al., 2003b, 2000)。

iii. *Notch1* 及び *Notch2* の大脳背側の発生における重要性

発生期のマウス大脳背側では *Notch1*, *Notch2*, および *Notch3* が発現している(Higuchi et al., 1995; Irvin et al., 2001; Lindsell et al., 1996; Yoon et al., 2004)。

Notch1 と *Dll1* は神経産生の始まる E9~10 頃から発現し(Bettenhausen et al., 1995; Weinmaster et al., 1991)、それぞれ *Notch1* は神経幹細胞で、*Dll1* は神経細胞へ分化する初期段階の細胞で強く発現する(D. Kawaguchi et al., 2008; Nelson et al., 2006)。神経幹細胞の維持において *Notch1* は重要な役割を果たしており、*Notch1* KO マウスでは E10.5 までに神経上皮細胞/RGC が早期に分化し、神経幹細胞としての機能が消失する(Gaiano et al., 2000; Hitoshi et al., 2002; Luis et al., 1997; Yang et al., 2004; Yoon et al., 2004)。 *Notch2* KO マウスでも、E10 頃に神経細胞の細胞死が誘導されるため、神経発生への寄与が示唆されている(Hamada et al., 1999)。一方で *Notch3* の KO マウスは神経幹細胞の維持に影響を与えない(Krebs et al., 2003b)。さらに、Notch シグナル経路を構成する中心的な遺伝子である *Dll1*, *Mib1* の KO マウスや(D. Kawaguchi et al., 2008; Koo et al., 2005)、未分化性維持に寄与する転写因子である *Hes1*, *Hes3*, *Hes5* の KO マウスでも(Hatakeyama et al., 2004; Ishibashi, 1995; Ohtsuka, 1999)、神経幹細胞が分化・消失してしまう phenotype が、*Notch1* KO マウスの phenocopy のように現れる。これらのことから、RGC が神経幹細胞として維持されるためには、*Dll1* を発現する細胞が神経幹細胞の *Notch1* を活性化することが、神経幹細胞の維持に不可欠であることがわかっている。

一方で、*Notch1* および *Notch2* KO マウスはそれぞれ発生初期に胎生致死となるなどの理由から、神経産生期の神経幹細胞における *Notch1* と *Notch2* の表現型解析は十分になされていなかった。

iv. 本研究の目的

Notch1 と *Notch2* はマウス発生において、Notch シグナルの伝達のために重要な役割を果たす主要な受容体であるが、この2つのサブタイプごとの機能的な違いが、脳の発生過程における RGC の維持にどのような影響を与えているのかは未だ解明されていない。そこで本研究では、*Notch1* 及び *Notch2* を神経発生前期(E9.5)から大脳背側で特異的に KO することで、2つの遺伝子が神経産生期を通じて RGC の未分化性維持に果たす役割の解明を試みた。

2. 対象と手法

i. 実験動物

1) マウスの取扱い

すべてのマウス実験は、理化学研究所生命機能科学研究センターの「動物実験取扱規則」に準拠して実施した。マウスの妊娠時期は交配翌日の午前中にプラグを観察し、観察された日の正午を Embryonic day 0.5 (E0.5) と定義した。なお、使用した胎児の性別は本研究では調べていない。第一部の実験は全て C57BL/6J バックグラウンドのマウスを用いた。

2) 遺伝子改変マウス

本研究の第一部で使用した遺伝子改変マウスは次の表 1 の通りである。

表 1 第一部で使用した遺伝子改変マウス系統と PCR による遺伝子型判定に用いた Oligo DNA 配列

遺伝子型 (出典)	遺伝子型判定用 PCR プライマー
<i>Notch1</i> ^{flox/flox} (Morimoto et al., 2012)	Notch1-F: TGGCCTGCCTGTCTGGAACAACAGTTCAGG Notch1-R: ACTGTCAGTCAAGCCAGTTCAGGGCACATGG
<i>Notch2</i> ^{flox/flox} (McCright et al., 2006)	Notch2-F: AGATAGGAAGCAGCTCAGCTCACAGCCTGC Notch2-R: TTGTATTATAACGCTAAACGTGCACTGGAG
<i>Emx1-Cre</i> ^{KI} (Guo et al., 2000)	Emx1-F: GCCACTGGAGGGTCTGAAAA Cre-F, OIMR1084: GCGGTCTGGCAGTAAAAACTATC Cre-R OIMR1085: GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT
<i>CAG-CAT-GFP</i> (Kawamoto et al., 2000)	GFP-F: GCAAGGGCGAGGAGCTGTTC
<i>Hes1-d2-EGFP</i> ^{Tg/+} (Ohtsuka et al., 2006)	GFP-R: GGTCTTGTAGTTGCCGTCGTCC

3) マウスの掛け合わせ

Notch1 および *Notch2* のシングルノックアウト、およびダブルノックアウトマウスは、Cre-loxP システム (Robinson and Sauer, 1998) に基づいて、大脳背側で E9.5 頃から Cre を発現する *Emx1-Cre*^{KI} 系統 (Guo et al., 2000) と、*floxed-Notch1* または *floxed-Notch2* マウス系統 (McCright et al., 2001; Yang et al., 2004) を交配して下記のように作出した。*Notch1*^{flox/flox}; *Emx1-Cre*^{KI/+} マウス (以下、*Notch1*^{Δ/Δ}) は、*Notch1*^{flox/flox} マウスと *Notch1*^{flox/+}; *Emx1-Cre*^{KI/+} マウスを交配することで作出した。*Notch2*^{flox/flox}; *Emx1-Cre*^{KI/+} マウス (以下、*Notch2*^{Δ/Δ}) は、*Notch2*^{flox/flox} マウスと *Notch2*^{flox/+}; *Emx1-Cre*^{KI/+} マウスを交配して作出した。*Notch1*^{flox/flox};

*Notch2^{flox/flox}; Emx1-Cre^{KI/+}*マウス（以下、*Notch1^{Δ/Δ}; Notch2^{Δ/Δ}*）は、*Notch1^{flox/+}; Notch2^{flox/+}*マウスと *Notch1^{flox/+}; Notch2^{flox/+}; Emx1-Cre^{KI/+}*マウスを交配して作出した。図 7, 8 の実験で E18.5 における Cre 発現細胞を可視化するために、Cre 依存的に GFP を発現する *CAG-CAT-EGFP* マウス(Kawamoto et al., 2000)を *Notch1^{flox/+}; Notch2^{flox/+}; Emx1-Cre^{KI/+}*マウスと交配してヘテロ接合体を得て、その子孫を交配させることで、表 2 に示す必要な各遺伝子型を得た。

表 2 第一部で使用した遺伝子改変マウスの遺伝子型表記と遺伝子型

遺伝子型表記	遺伝子型
<i>Notch1^{+/Δ}; Notch2^{+/Δ}</i>	<i>Notch1^{+flox}; Notch2^{+flox}; Emx1-Cre^{KI/+}</i>
<i>Notch1^{Δ/Δ}</i>	<i>Notch1^{flox/flox}; Notch2^{+/+}; Emx1-Cre^{KI/+}</i>
<i>Notch2^{Δ/Δ}</i>	<i>Notch1^{+/+}; Notch2^{flox/flox}; Emx1-Cre^{KI/+}</i>
<i>Notch1^{Δ/Δ}; Notch2^{Δ/Δ}</i>	<i>Notch1^{flox/flox}; Notch2^{flox/flox}; Emx1-Cre^{KI/+}</i>
<i>Notch1^{+/Δ}; Notch2^{+/Δ}; GFP</i>	<i>Notch1^{+flox}; Notch2^{+flox}; Emx1-Cre^{KI/+}; CAG-CAT-GFP^{+/-}</i>
<i>Notch1^{Δ/Δ}; GFP</i>	<i>Notch1^{flox/flox}; Notch2^{+/+}; Emx1-Cre^{KI/+}; CAG-CAT-GFP^{+/-}</i>
<i>Notch2^{Δ/Δ}; GFP</i>	<i>Notch1^{+/+}; Notch2^{flox/flox}; Emx1-Cre^{KI/+}; CAG-CAT-GFP^{+/-}</i>
<i>Notch1^{+/Δ}; Notch2^{Δ/Δ}; GFP</i>	<i>Notch1^{+flox}; Notch2^{flox/flox}; Emx1-Cre^{KI/+}; CAG-CAT-GFP^{+/-}</i>
<i>Notch1^{Δ/Δ}; Notch2^{+/Δ}; GFP</i>	<i>Notch1^{Δ/Δ}; Notch2^{+flox}; Emx1-Cre^{KI/+}; CAG-CAT-GFP^{+/-}</i>
<i>Notch1^{Δ/Δ}; Notch2^{Δ/Δ}; GFP</i>	<i>Notch1^{flox/flox}; Notch2^{flox/flox}; Emx1-Cre^{KI/+}; CAG-CAT-GFP^{+/-}</i>

ii. 免疫染色法

頸椎脱臼で安楽死させた妊娠マウスの子宮を開腹してマウス胎仔の脳組織を摘出し、これを 1% Paraformaldehyde (PFA)/0.1M Phosphate buffer (PB, pH 7.4)溶液中で 2 時間 4 度または一晩固定した。固定後の脳組織は PFA のクエンチングのために、0.1M Glycine (Nacalai) /PB の 4 度の溶液中で処理し、25% Sucrose (Nacalai) /0.1M PB 溶液で 6 時間から一晩置換し、Tissue-Tek O.C.T. compound (#45833, サクラファインテックジャパン)内に凍結包埋した。次に、クライオスタット (#CM30505S, Leica Microsystems)の庫内・試料台を-14℃に設定し、凍結包埋サンプルを 10-16μm 厚に薄切し、この切片をスライドガラス(SUPER FROST 76x 26mm, 松浪硝子)に貼付け乾燥させた。

次に、切片の周りを PAP Pen (PAP Pen Super-Liquid Blocker Mini, 大道産業) を用いて撥水性の囲みを描き、PBST (0.1% Tween/リン酸緩衝生理食塩水 PBS(-), pH 7.4)にこのスライドガラスを浸すことで O.C.T. compound を溶出させ、Blocking Buffer (10% w/v BSA + 0.1% Tween + 0.2% Triton X-100 in PBS(-), pH 7.4)を添加して室温で静置した。1 時間後アスピレーターで Blocking Buffer を取り除き、直ちに一次抗体（表 3）を Blocking buffer で希釈した溶液を添加して一晩 4℃で静置した。過剰な抗体は PBST で洗浄した。蛍光標識されていない一次抗体に対しては、一次抗体の動物種の IgG を認識する蛍光標識二次抗体を Blocking Buffer で希釈し添加して、30 分間室温で反応させた。過剰な抗体は PBST で洗浄し、封入剤 (Aqueous Mounting Medium-PermaFluor, Thermo scientific または, Prolong Diamond antifade mountant, Invitrogen)を切片に乗せてカバーガラス(Neo カバーガラス 24x60mm 厚さ 0.12~0.17mm, 松浪硝子)で封入した。サンプルの蛍光は共焦点顕微鏡(LSM880, Zeiss または、FV1000, Olympus)で撮像した。

表 3 第一部で使用した抗体一覧

抗原	製品名	希釈率
Tbr2	Anti-Tbr2, AlexaFluor 660 labeled rat monoclonal antibody, clone Dan11mag, 50-4875-82, Thermo Fisher Scientific	1:1000
Sox2	Anti-Sox2, AlexaFluor 488 labeled rat monoclonal antibody, clone Btjce, 53-9811-82, Thermo Fisher Scientific	1:1000
Ki67	Anti-Ki67, Rabbit monoclonal antibody, clone SP6, MA5-14520, Thermo Fisher Scientific	1:1000
EGFP	Anti-EGFP, Goat poly clonal antibody, ab5450, Abcam	1:1000
DAPI	D9542, MERCK	1:1000
Goat IgG	AlexaFluor488 labeled, Donkey anti-Goat IgG antibody, 705-545-153, Jackson ImmunoResearch)	1:500
Rabbit IgG	AlexaFluor647 labeled, Donkey anti-Rabbit IgG antibody, 711-605-152, Jackson ImmunoResearch)	1:500

iii. 細胞周期離脱率の計測

細胞周期離脱率とは、細胞分裂後に次の細胞分裂へ入るまでの時間内に、細胞周期を脱して分化する細胞の割合を意味する(Chenn and Walsh, 2002)。

増殖細胞を標識するために、E11.5 の妊娠マウスに EdU (1mg/体重 25g, #A10044, Thermo Fisher Scientific)を腹腔内投与した。1 度の細胞周期での EdU の取り込み率を計測するため、E11.5 頃の細胞周期の長さが約 8.1 時間であることを考慮して(Takahashi et al., 1995)、EdU 投与後 12 時間で胎仔大脳を固定した。

EdU を取り込んだ細胞は、Click-iT® EdU イメージングキット (Alex Fluor 555 dye, #C10338, Thermo Fisher Scientific) のメーカープロトコルに従って検出した。細胞周期が回転している細胞は Ki67 抗体による免疫染色で検出した。

細胞周期離脱率は、E11.5 のマウス大脳背側の単位面積に存在する全ての EdU 陽性細胞に対する、EdU 陽性かつ Ki67 陰性の細胞数で計算した。

iv. 統計検定

統計分析は Prism 8 (GraphPad Software) または Excel (Microsoft) を用いて行った。はじめに Shapiro-Wilk 検定 ($\alpha=0.05$) を用いて正規分布の検定を行った。非正規分布していると判定されたデータについては、ノンパラメトリック検定に続いて、2 つ以上のデータ群を比較するために、Dunn's test を用いた Kruskal-Wallis 検定を行った。正規分布していると判定されたデータについては、2 つ以上のデータ群間の比較のために、Tukey の多重比較検定を用いたパラメトリックな One-way ANOVA を行った。比較による有意性は、グラフ上にアスタリスクで次のように表した; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ および**** $P < 0.0001$ 。

v. 単細胞トランスクリプトーム分析

図 06 の実験は呉泉博士が実施し、データを提供いただいた。E14.5 マウスから *Hes1* 陽性の神経幹細胞を単離するために、*Hes1-d2-EGFP^{Tg/+}* マウスの大脳皮質を摘出し、0.05 % Trypsin / Hanks' balanced salt solution (HBSS (-)) 中で 37 °C で 10 分間処理した。遠心分離器を使用して 1000 g で 5 分間遠心した後、細胞を 0.375 % BSA/HBSS(-) で 15~20 回穏やかにピペッティングして再懸濁した。懸濁細胞を 35 μ m フィルター (Falcon) で濾過し、Sorting bugger (20 ng/ml human-basic FGF (Peprotech) 、1x B27 RA(-) (Gibco) 、Dulbecco's Modified Eagle Medium F12+GlutaMax (Gibco)) に懸濁して 130 μ m ソーティングチップ (SONY、LE-C3113) を装備したセルソーター (SH800、SONY) で細胞をソーティングした。ソーティング後、Countess または Countess II (Invitrogen) を用いて細胞数を計数した。収集した細胞は直ちに 10X-Genomics Chromium (10X Genomics, Pleasanton, CA) に導入した。単一細胞の cDNA ライブラリーは、メーカープロトコルに従って Chromium 3'v2 プラットフォームを用いて調製した。

次に、バイオインフォマティクス解析を実施した。得られた配列データを mm10 にマッピングし、cellranger 2.0.2 (10X GENOMICS) を用いて各遺伝子のカウント数と細胞数を計算した。3 個以下の細胞で発現する遺伝子と、200 個以下の遺伝子しか発現していない細胞を除外し、Seurat(2.3.4)で解析した。

3. 結果

i. 神経発生初期における *Notch1* と *Notch2* の神経幹細胞の維持と分化への影響

はじめに、マウス大脳背側における神経発生期初期から中期(E11.5～E13.5)にかけて、*Notch1* および *Notch2* が RGC の未分化性と神経発生に与える影響を調べた。そのために E9.5 から大脳背側で Cre を発現する *Emx1-Cre* 系統を用いて、大脳背側特異的に *Notch1*, *Notch2* またはその両方を KO した *Notch1^{Δ/Δ}*, *Notch2^{Δ/Δ}*, *Notch1^{Δ/Δ}; Notch2^{Δ/Δ}* マウスをそれぞれ作出し、*Notch1* および *Notch2* のヘテロ接合体をコントロールとして比較した（遺伝子型は 2-i-(3)を参照）。

1) *Notch1* の欠失は神経分化を誘導するが、*Notch2* の欠失は影響を与えない

まず、*Notch1^{Δ/Δ}* マウスと *Notch2^{Δ/Δ}* マウスの大脳背側における RGC と分化細胞の割合を調べるために、単位面積当たりの未分化マーカー Sox2 陽性の神経上皮細胞/RGC と、分化にコミットした細胞のマーカーである Tbr2 陽性の IPC を計数した。その結果、E11.5 および E13.5 の両時期において、*Notch2^{Δ/Δ}* では Sox2 および Tbr2 陽性の両細胞数に変化が見られなかったのに対し、*Notch1^{Δ/Δ}* では Sox2 陽性の細胞数が減少した(図 4A-D)。

2) *Notch1* と *Notch2* を同時に欠失させると RGC の未分化性に相乗的な影響が生じる

次に、*Notch1^{Δ/Δ}; Notch2^{Δ/Δ}* マウスでも同様に Sox2 陽性細胞と Tbr2 陽性細胞を計数したところ、E11.5 では Sox2 陽性の細胞数の減少と同時に Tbr2 陽性の細胞数が劇的に増加した(図 4A,C)。また、E11.5 において細胞分裂後に細胞周期から離脱する細胞の割合は、*Notch1^{Δ/Δ}* と *Notch1^{Δ/Δ}; Notch2^{Δ/Δ}* マウスで大幅に増加した(図 5A, B)。E13.5 では Sox2 陽性の細胞数が *Notch1^{Δ/Δ}; Notch2^{Δ/Δ}* マウスで大幅に減少し、この減少率は *Notch1^{Δ/Δ}* より有意に大きかった(図 4B,D)。

これらのことから、*Notch1* だけでなく *Notch2* も同時に欠失させた場合には、*Notch1* 単独の欠失と比較して相乗的に大きな影響が RGC の未分化性維持と神経発生に生じることがわかった。

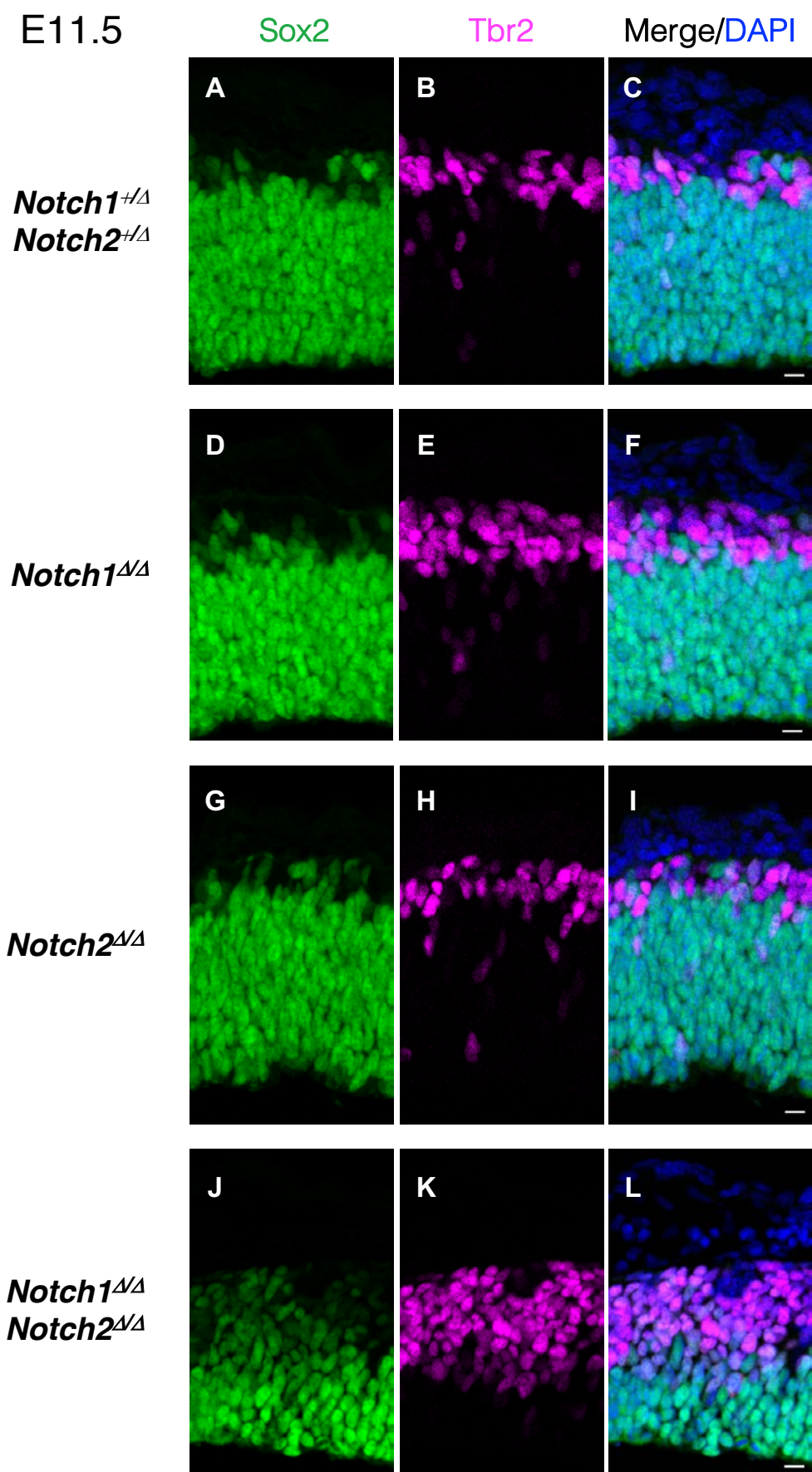


図4 *Notch1* のノックアウトにより神経幹細胞の分化が誘導される (続く)

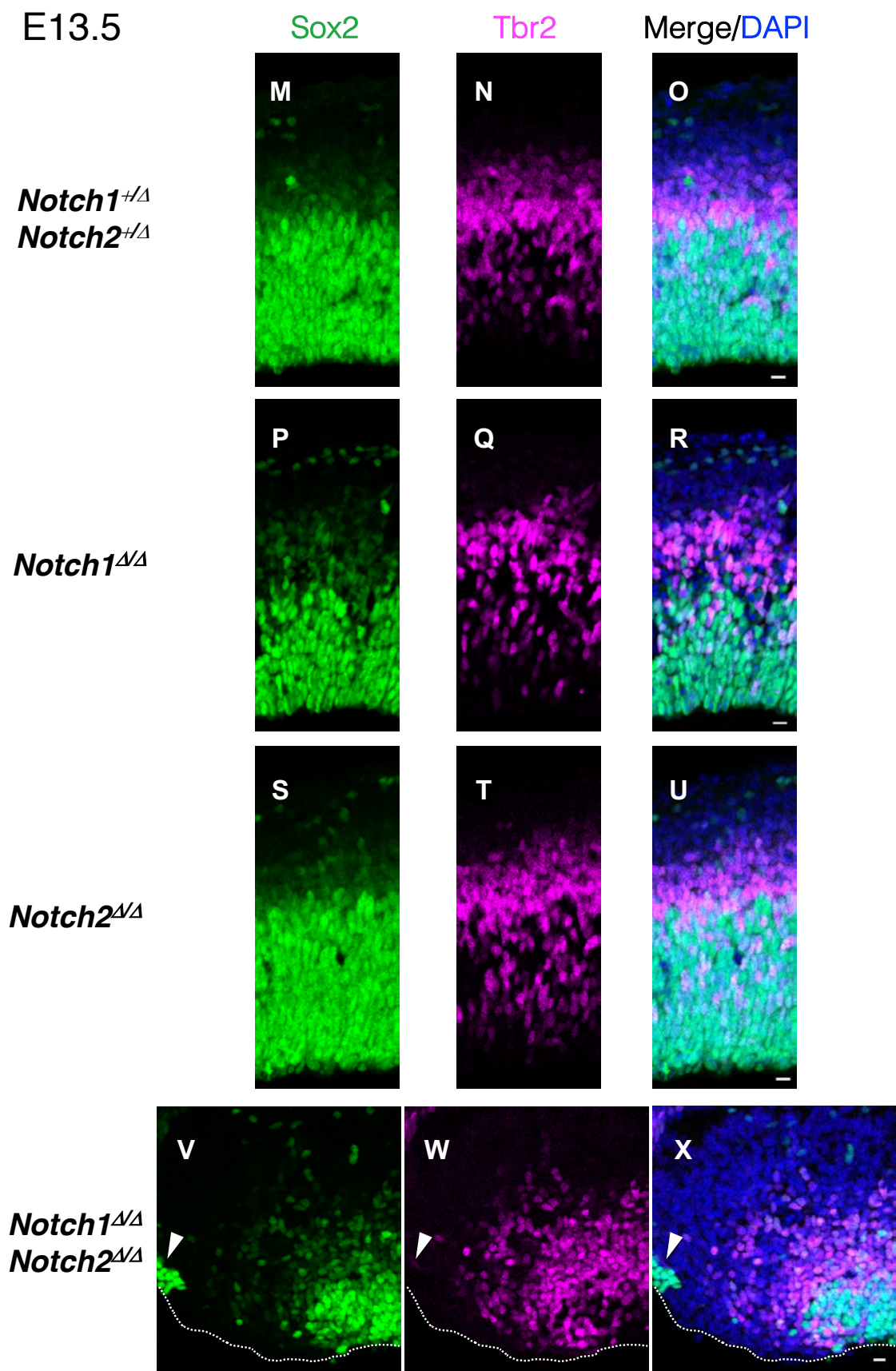


図4 *Notch1* のノックアウトにより神経幹細胞の分化が誘導される (続く)

Y E11.5

Z E13.5

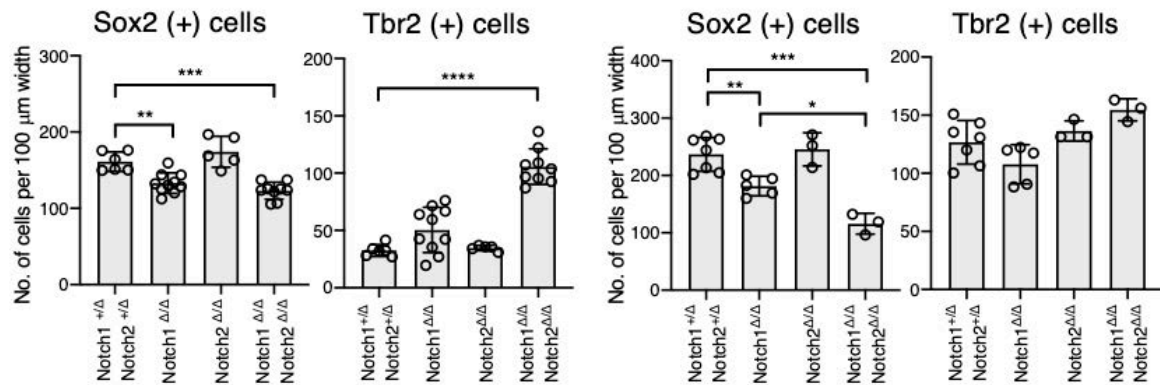


図4 *Notch1* のノックアウトにより神経幹細胞の分化が誘導される (続き)

神経発生期の早期から中期における *Notch1*, *Notch2* の単独 KO、およびダブルノックアウトによる RGC 維持への影響を調べた。

(A-L) E11.5, (M-X) E13.5 のマウス大脳背側の免疫染色画像。Sox2 (緑)、Tbr2 (マゼンタ)、および DAPI (青) の染色像を示した。免疫染色画像は、本研究の全ての画像で脳室面側を底部にした。

(A-C, M-O) *Notch1*^{+/Δ}; *Notch2*^{+/Δ}, (D-F, P-R) *Notch1*^{Δ/Δ}, (G-I, S-U) *Notch2*^{Δ/Δ}, (J-L, V-X) *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} マウス。E13.5 の *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} では脳室面の上皮構造 (白点線, V-X) が崩壊して湾曲し、Sox2 陽性細胞の消失した VZ に Tbr2 陽性細胞が侵入した (W)。白矢印は *Emx1-Cre* が発現していない medial-dorsal の RGC を示す。スケールバーは 10 μm。

(Y) ダブルヘテロ接合体 *Notch1*^{+/Δ}; *Notch2*^{+/Δ} をコントロールとして、*Notch1*^{Δ/Δ}, *Notch2*^{Δ/Δ}, および *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} マウスの、E11.5 における大脳背側の 100 μm 幅あたりの Sox2 陽性細胞数 (左) および Tbr2 陽性細胞数 (右)。*Notch1*^{+/Δ}; *Notch2*^{+/Δ} では Sox2 = 161.2 ± 12.6 細胞、Tbr2 = 32.5 ± 5.2 細胞 (n=6) ; *Notch1*^{Δ/Δ} では Sox2 = 133 ± 13.4 細胞、Tbr2 = 50.5 ± 19.7 細胞 (n=10) ; *Notch2*^{Δ/Δ} では Sox2 = 174.1 ± 20.3 細胞、Tbr2 = 34.7 ± 2.3 細胞 (n=5) ; *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} では Sox2 = 123.0 ± 11.1 細胞、Tbr2 = 105.6 ± 15.5 細胞 (n=9)。妊娠マウス計 10 匹から全ての胚を得た。

(Z) ダブルヘテロ接合体 *Notch1*^{+/Δ}; *Notch2*^{+/Δ} をコントロールとして、*Notch1*^{Δ/Δ}, *Notch2*^{Δ/Δ}, および *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} マウスの、E13.5 における大脳背側の 100 μm 幅あたりの Sox2 陽性細胞数 (左) および Tbr2 陽性細胞数 (右)。*Notch1*^{+/Δ}; *Notch2*^{+/Δ} では Sox2 = 236.8 ± 29.3 細胞、Tbr2 = 126.7 ± 18.7 細胞 (n=7) ; *Notch1*^{Δ/Δ} では Sox2 = 181.5 ± 17.1 細胞、Tbr2 = 136.4 ± 8.6 細胞 (n=3) ; *Notch2*^{Δ/Δ} では Sox2 = 245.7 ± 28.9 細胞、Tbr2 = 107.7 ± 16.8 細胞 (n=5) ; *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} では Sox2 = 115.8 ± 18.2 細胞、Tbr2 = 154.6 ± 9.5 細胞 (n=3)。妊娠マウス計 5 匹から全ての胚を得た。値は平均値 ± S.D. を示す。多重比較のための Tukey's correction および、one-way ANOVA を用いて計算した統計的有意性を次のように示した ; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 および ****P < 0.0001。

E11.5

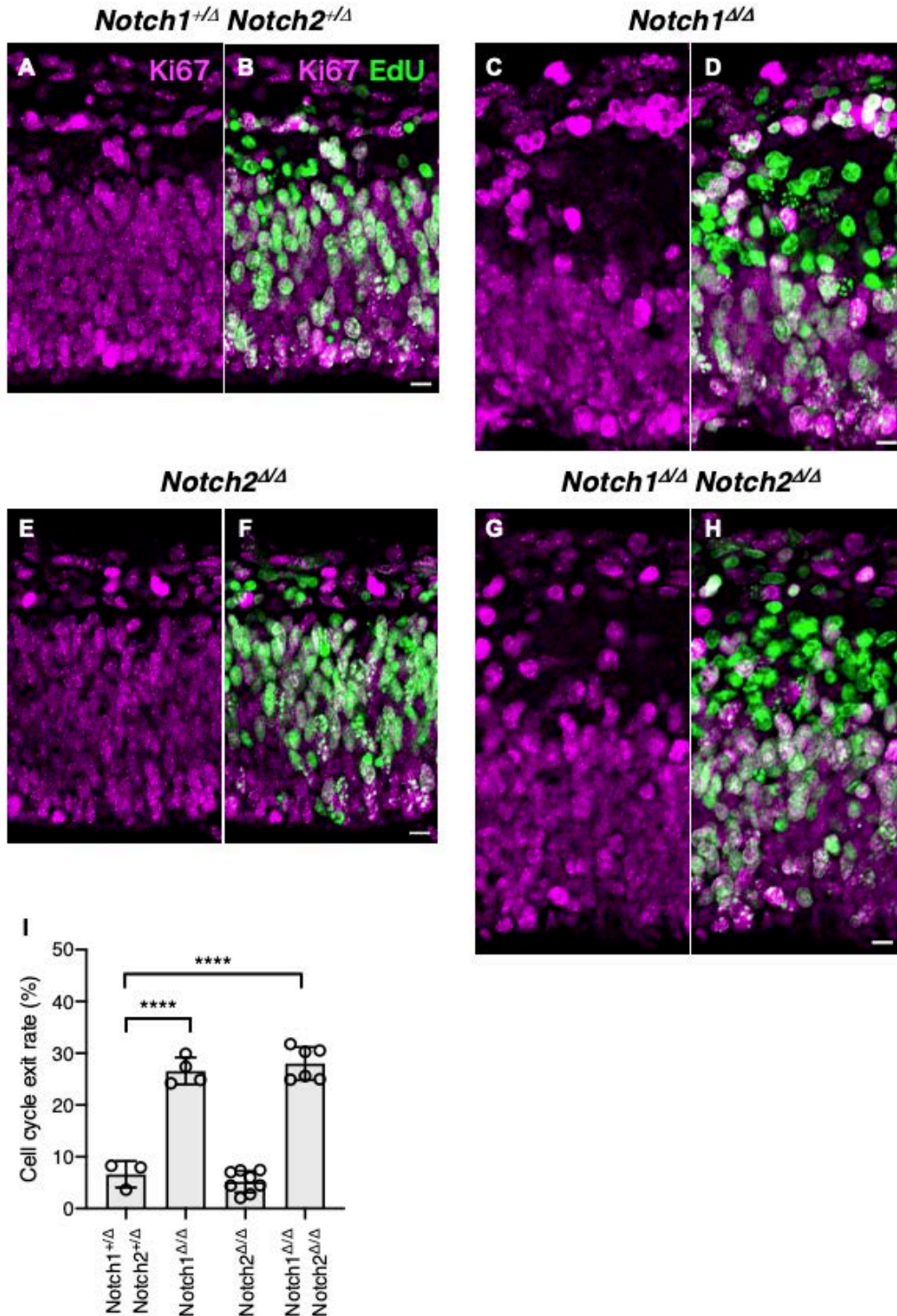


図5 神経発生初期のRGCおよびIPCの細胞周期離脱率

(A-H) EdU投与12時間後のE11.5のマウス大脳背側におけるKi67 (A,C,E,G:マゼンタ)、EdU (B,D,F,H: 緑)の二重染色画像。(A-B) *Notch1*^{+/Δ}; *Notch2*^{+/Δ}, (C-D) *Notch1*^{Δ/Δ}, (E-F) *Notch2*^{Δ/Δ}, (G-H) *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ}マウス。スケールバーは10 μm。
(I) ダブルヘテロ接合体 *Notch1*^{+/Δ}; *Notch2*^{+/Δ} をコントロールとして、*Notch1*^{Δ/Δ}, *Notch2*^{Δ/Δ}, および *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} マウス大脳背側の細胞周期離脱率。*Notch1*^{+/Δ}; *Notch2*^{+/Δ} では 6.6 ± 2.6% (n=3) ; *Notch1*^{Δ/Δ} では 26.6 ± 2.6% (n=4) ; *Notch2*^{Δ/Δ} では 5.2 ± 2.1% (n=8) ; *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} では 28.0 ± 3.2% (n=6) 。妊娠マウス計9匹から全ての胎児を得た。値は平均値 ± S.D.を示す。多重比較のためのTukey's correctionおよび、one-way ANOVAを用いて計算した統計的有意性を次のように示した; ****P < 0.0001。

3) RGC と IPC の両増殖細胞の比率の変化

Notch1^{Δ/Δ} および *Notch1^{Δ/Δ}; Notch2^{Δ/Δ}* マウスでは神経細胞への分化が亢進していることが明らかになったが、増殖細胞が分布する領域へも影響が生じているか否かを調べた。リン酸化ヒストン H3 (PH3) による染色で同定できる分裂期の細胞について、apical surface で細胞分裂をする細胞は RGC であり、apical surface から離れた領域で細胞分裂する細胞は IPC であると考えられる。

大脳背側の単位面積当たりの PH3 陽性の分裂期の RGC または IPC の細胞数を、各遺伝子型で調べた。E11.5 では *Notch1^{Δ/Δ}; Notch2^{Δ/Δ}* マウスにおいて IPC の数が増加しており、神経発生初期に早期に分化誘導されていることが確認された(図 6A, C)。続いて E13.5 では、*Notch1^{Δ/Δ}; Notch2^{Δ/Δ}* マウスの RGC が大幅に減少しており、RGC と IPC を合計した細胞数もコントロールと比較して減少しており、増殖細胞の大部分が早期に分化したことが示された(図 6B, D)。また、*Notch1^{Δ/Δ}* マウスは E13.5 で IPC が有意に増加しており(図 6B, D)、RGC の IPC への分化が示唆された。一方で、*Notch2^{Δ/Δ}* は E11.5 と E13.5 の両時期においてコントロールと比較して変化を示さなかった。

以上より、神経産生期の初期から中期にかけては、*Notch1* が存在することで RGC の未分化性が維持されること、また、*Notch2* が失われても、*Notch1* の活性だけでほぼ RGC が維持されるが、*Notch1* が存在しない場合には *Notch2* が部分的に *Notch1* の機能を補うことで RGC の未分化性を維持することがわかった。

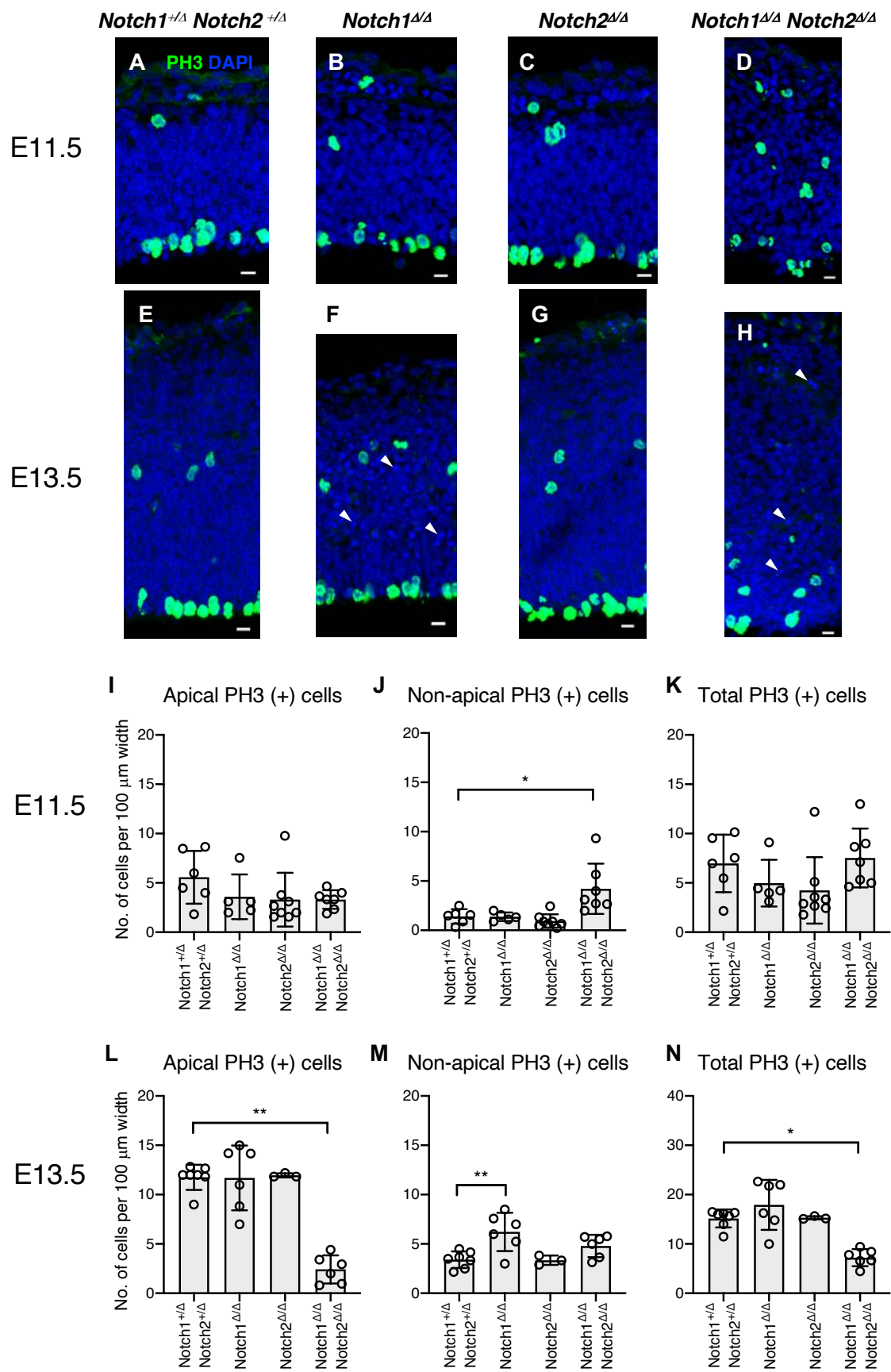


図6 *Notch1* および *Notch2* の KO による神経産生期初期から中期のマウス大脳背側における分裂細胞の分布 (続く)

図6 *Notch1* および *Notch2* の KO による神経産生期初期から中期のマウス大脳背側における分裂細胞の分布 (続き)

(A-H) A-D) E11.5 および E-H) E13.5 の、(A,E) *Notch1*^{+/-}; *Notch2*^{+/-}, (B,F) *Notch1*^{Δ/Δ}, (C,G) *Notch2*^{Δ/Δ}, (D,H) *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} マウスの大脳背側の免疫染色画像。リン酸化ヒストン 3 (PH3、緑) および DAPI (青) を示した。スケールバーは 10 μm。E11.5, E13.5 の両時期で、脳室面で分裂している PH3(+)細胞は RGC であり、SVZ で分裂している PH3(+)細胞は IPC である。*Notch1*^{Δ/Δ} および *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} では細胞死が観察され (白矢頭)、これは *Notch1* が欠失した大脳背側で細胞死が生じる報告と一致している (Mason et al., 2006; Hashimoto-Torii et al., 2008)。

(I-N) I-K) E11.5 および L-N) E13.5 の各マウス大脳背側の 100 μm 幅あたりの PH3 陽性の RGC(I, L)、IPC の細胞数(J,M)と、それらの合計数(K,N)。

(I-K) E11.5 の *Notch1*^{+/-}; *Notch2*^{+/-} では PH3 陽性の RGC=5.6±2.7 細胞、PH3 陽性の IPC=1.4±0.7 細胞、PH3 陽性の全細胞=7.0±2.9 細胞 (n=6) ; *Notch1*^{Δ/Δ} では PH3 陽性の RGC=3.6±2.3 細胞、PH3 陽性の IPC=1.4±0.4 細胞、PH3 陽性の全細胞=5.0±2.4 細胞(n=5) ; *Notch2*^{Δ/Δ} では PH3 陽性の RGC=3.3±2.7 細胞、PH3 陽性の IPC=0.9±0.7 細胞、PH3 陽性の全細胞=4.2±3.4 細胞(n=8) ; *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} では PH3 陽性の RGC=3.3±0.9 細胞、PH3 陽性の IPC=4.2±2.6 細胞、PH3 陽性の全細胞=7.5±3.0 細胞 (n=7) 。妊娠マウス計 10 匹から全ての胚を得た。

(L-N) E13.5 での PH3 陽性の細胞数。*Notch1*^{+/-}; *Notch2*^{+/-} では PH3 陽性の RGC=11.8±1.3 細胞、PH3 陽性の IPC=3.4±0.8 細胞、PH3 陽性の全細胞=15.2±1.8 細胞 (n=7) ; *Notch1*^{Δ/Δ} では PH3 陽性の RGC=11.7±3.3 細胞、PH3 陽性の IPC=6.2±1.9 細胞、PH3 陽性の全細胞=17.9±5.1 細胞(n=6) ; *Notch2*^{Δ/Δ} では PH3 陽性の RGC=12.0±0.2 細胞、PH3 陽性の IPC=3.3±0.5 細胞、PH3 陽性の全細胞=15.3±0.3 細胞(n=3) ; *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} では PH3 陽性の RGC=2.4±1.4 細胞、PH3 陽性の IPC=4.8±1.1 細胞、PH3 陽性の全細胞=7.2±1.7 細胞 (n=6)。妊娠マウス計 7 匹から全ての胚を得た。値は平均値±S.D.を示す。PH3 陽性の IPC については多重比較のための Tukey's correction および one-way ANOVA、PH3 陽性の RGC と全細胞については多重比較のための Dunn's comparison および Kruskal-Wallis 検定を用いて計算した統計的有意性を次のように示した ; *P < 0.05、**P < 0.01。

ii. 神経発生後期における *Notch1* と *Notch2* による RGC の未分化性維持への寄与

ここまでは *Notch1* および *Notch2* が RGC に与える影響を神経産生期初期から中期にかけて見てきた。次に、神経産生期を通じての RGC への影響を明らかにするために、神経発生が完了する E18.5 における(Lui et al., 2011)、*Notch1* および *Notch2* のアレルの存在量ごとに、神経発生後期まで維持された RGC の細胞数を調べることにした。この時、*Emx1-Cre* の発現によって *Notch1* および *Notch2* が KO された領域を同定するために、*Notch1*^{Δ/Δ} マウスと *Notch2*^{Δ/Δ} マウスをそれぞれ *CAG-CAT-GFP* マウスと交配することで(Kawamoto et al., 2000)、Cre 陽性細胞を GFP で可視化し (図 7, 8A-F)、E18.5 大脳背側の体性感覚野の冠状切片 1 枚の VZ 内側に存在する、全 Sox2 陽性細胞数を計数し、各遺伝子型で比較した。

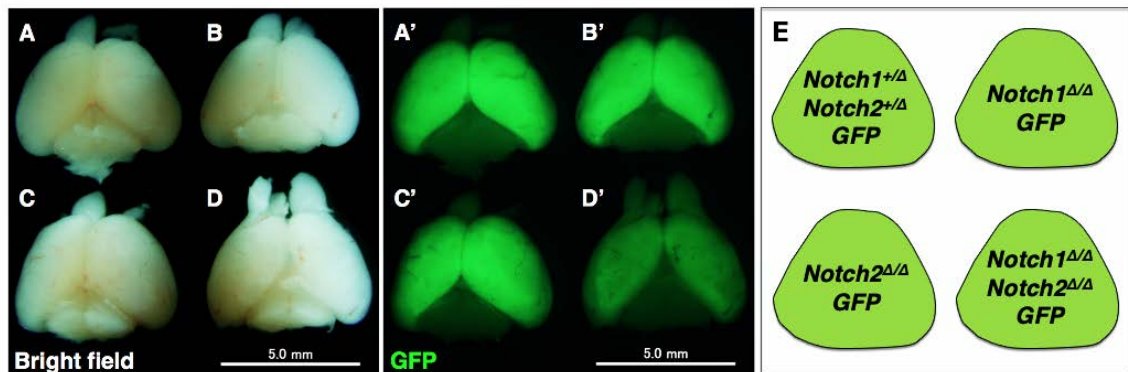


図 7 E18.5 における *Notch1*, *Notch2* の大脳背側特異的ノックアウトマウスの脳組織明視野での各遺伝子型マウスの大脳と(A-D)、GFP の緑色蛍光(A'-D')。遺伝子型は(A, A') *Notch1*^{+/Δ}; *Notch2*^{+/Δ}; GFP、(B, B') *Notch1*^{Δ/Δ}; GFP、(C, C') *Notch2*^{Δ/Δ}; GFP、(D, D') *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ}; GFP。スケールバーは 5 ミリメートル。(E) A-D'における各図中の脳サンプルの位置と遺伝子型を模式的に表した。

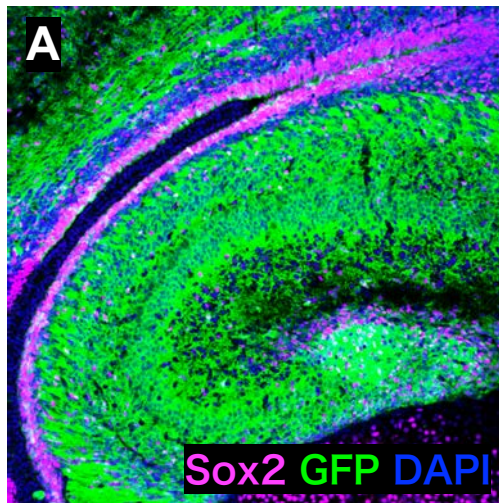
まず、コントロールとしてのダブルヘテロ接合体マウス(*Notch1*^{+/Δ}; *Notch2*^{+/Δ}; *Emx1-Cre*^{KI/+})の Sox2 陽性 RGC の細胞数と比較して(1,180±157 細胞)、*Notch1*^{Δ/Δ} マウスでは Sox2 陽性細胞の有意な減少は認められなかったが (1,094±138 細胞)、一方で *Notch2*^{Δ/Δ} マウスでは減少傾向が認められた (929±264 細胞) (図 8B,C,G)。これらのことは、神経発生中期までとは対照的に、*Notch2* による Notch シグナルの伝達活性が、*Notch1* によるものと同等以上のレベルまで増加していることを示唆した。

興味深いことに、ダブルヘテロ接合体マウスと比較して、*Notch1* または *Notch2* のいずれかのアレルを 1 つだけ持つマウス (*Notch1*^{+/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} および *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{+/Δ}) では、Sox2 陽性の RGC の細胞数が著しく減少しており、その減少は同等なレベルであった (図 8D,E,G)。また、*Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} マウスでは Sox2 陽性の RGC が完全に消失していた (図 8F)。したがって、統計的比較が可能な 6 つの遺伝子型で表現型を比較した時、表

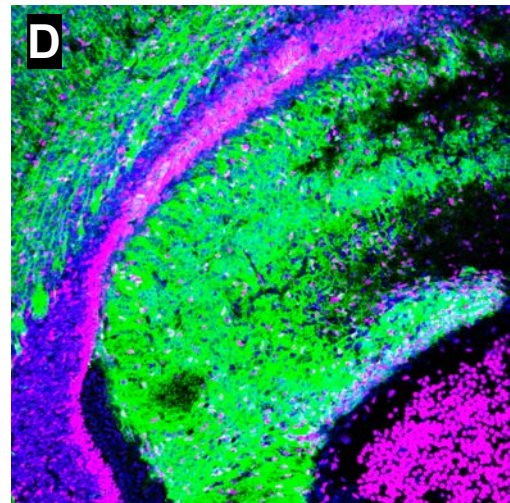
現型の重症度は *Notch1* および *Notch2* のアレル数の合計に依存しており、アレル数 2 つよりアレル数 1 つの方が重篤で、アレル数 0 が最も表現型が大きかった。

これらのことは、*Notch1* および *Notch2* が RGC を維持するためのシグナル活性は、神経発生初期段階ではその差が大きかったことと対照的に(図 4)、後期においてはシグナル活性または発現レベルが同等であることが示唆される。また、E18.5 において、Sox2 陽性 RGC 数は *Notch1* および *Notch2* の遺伝子数の合計に依存することが示唆された。この結果は同時に、control として 2 種類の *Notch* 遺伝子の両方のアレルがそろったマウス (*Notch1*^{+/+}; *Notch2*^{+/+}; *Emx1-Cre*^{KI/-}) をコントロールとして使うべきであったことを意味している。しかし、本研究でおこなった掛け合わせから得られた大量の産仔数からさえ、この遺伝子型のマウス個体をコントロールとして統計的検定に使うには不十分な個体数しか得られなかった (2 個体)。参考値としてそれら 2 個体の Sox2 陽性細胞数を挙げると、それぞれ 1,482 と 1,386 であり、ダブルヘテロ接合体マウス、*Notch1*^{Δ/Δ} マウス、および *Notch2*^{Δ/Δ} マウスの 3 つの遺伝子型より多い傾向が見られた。この数値は統計的検定には利用できないが、Sox2 陽性 RGC 数から推測できる未分化性の維持が、*Notch1* および *Notch2* の合計遺伝子数に依存することと矛盾しない。

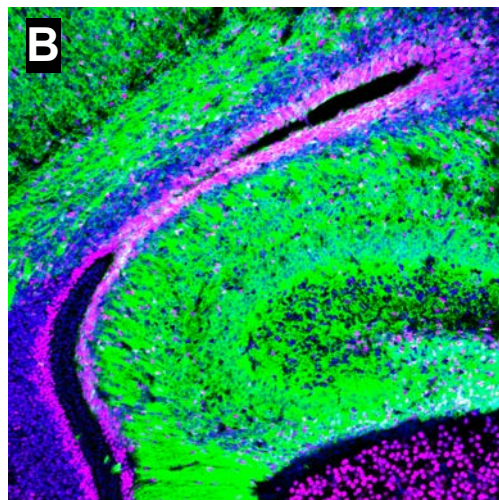
E18.5 *Notch1*^{+/-} *Notch2*^{+/-} GFP



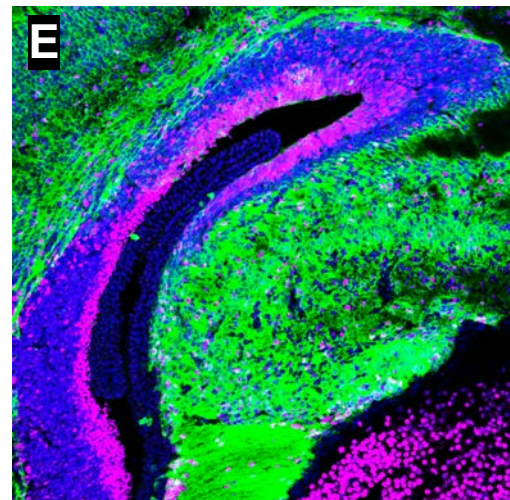
Notch1^{+/-} *Notch2*^{Δ/Δ} GFP



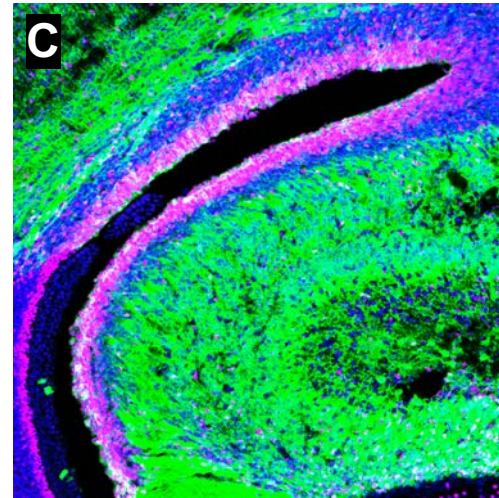
Notch1^{+/+} *Notch2*^{Δ/Δ} GFP



Notch1^{Δ/Δ} *Notch2*^{+/-} GFP



Notch1^{Δ/Δ} *Notch2*^{+/+} GFP



Notch1^{Δ/Δ} *Notch2*^{Δ/Δ} GFP

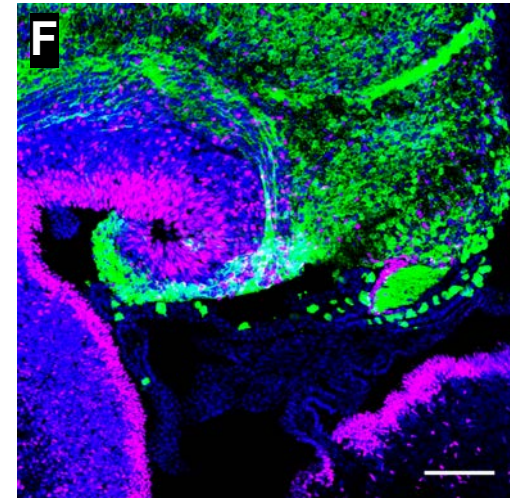


図 8 神経発生後期までの RGC の維持数に対する *Notch1* と *Notch2* のアレル数の影響

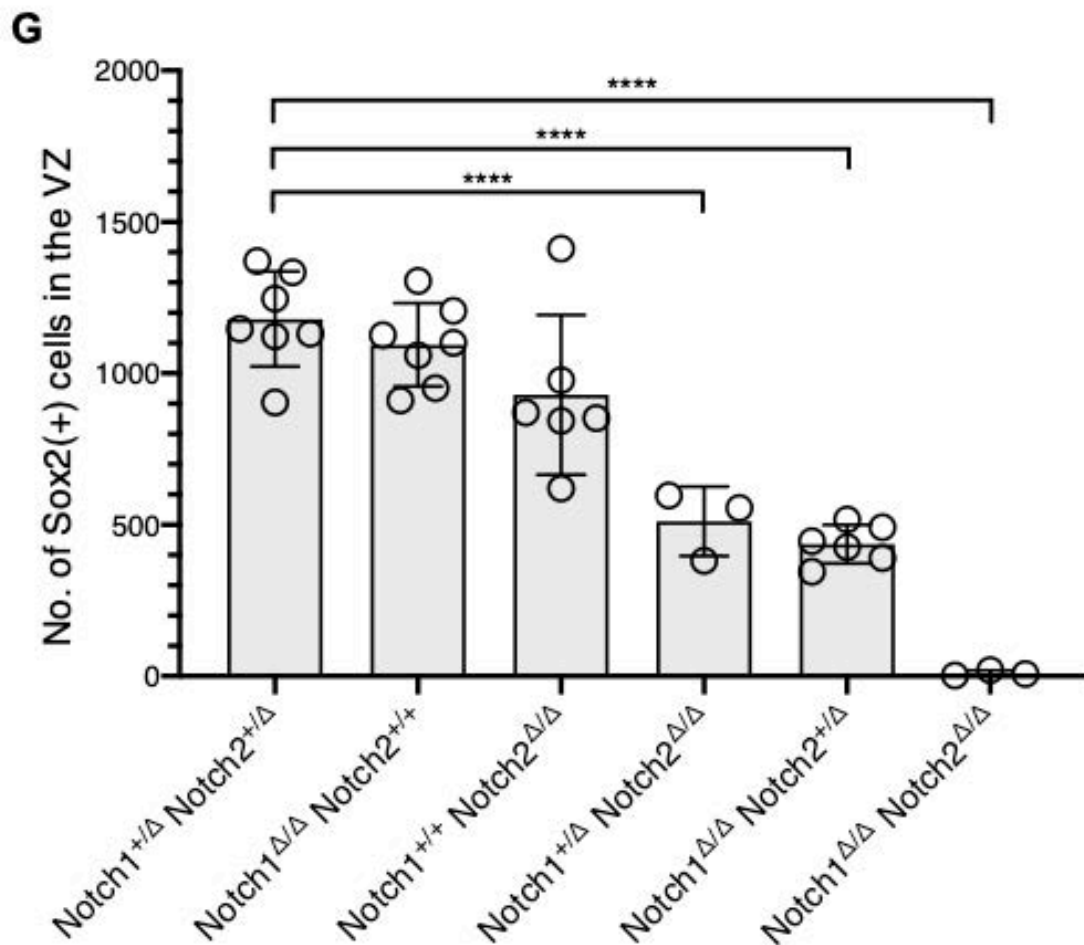


図8 神経発生後期までの RGC の維持数に対する *Notch1* と *Notch2* のアレル数の影響

(A-F) E18.5 の各遺伝子型マウスの海馬領域を含む大脳背側の免疫染色画像。 *Emx1-Cre* の発現領域は、GFP 陽性細胞および/または Notch の抗体染色で定義した。 Sox2 (マゼンタ) および DAPI (青色) を示した。(A) *Notch1*^{+/Δ}; *Notch2*^{+/Δ}; GFP, (B) *Notch1*^{Δ/Δ}; GFP, (C) *Notch2*^{Δ/Δ}; GFP, (D) *Notch1*^{+/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ}; GFP, (E) *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{+/Δ}; GFP, (F) *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ}; GFP。 *Emx1-Cre* の発現領域の脳室面の全長は、 *Notch1* および *Notch2* 遺伝子のアレル数の減少に従って短縮していた。スケールバーは 100 μm。

(G) E18.5 のダブルヘテロ接合体 *Notch1*^{+/Δ}; *Notch2*^{+/Δ} をコントロールとして、各マウス大脳背側の冠状断面の VZ に存在する Sox2 陽性細胞数を比較した。

Notch1^{+/Δ}; *Notch2*^{+/Δ}; GFP では 1,180 ± 157 細胞 (n=7) ; *Notch1*^{Δ/Δ}; GFP では 1,094 ± 138 細胞 (n=7) ; *Notch2*^{Δ/Δ}; GFP では 929 ± 264 細胞 (n=6) ; *Notch1*^{+/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ}; GFP では 511 ± 114 細胞 (n=3) ; *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{+/Δ}; GFP では 436 ± 63 細胞 (n=6) ; *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ}; GFP では 10.2 ± 9.3 細胞 (n=3) 。妊娠マウス計 7 匹から全ての胚を得た。値は平均値 ± S.D. を示す。多重比較のための Tukey's correction および one-way ANOVA を用いて計算した統計的有意性を次のように示した ; ****P < 0.0001。

iii. *Notch2* の発現レベルが神経発生中期から増加する

ここまで RGC の未分化性維持に対して、*Notch1* は神経発生の初期から中期で中心的な役割を果たし、*Notch2* は後期にかけて *Notch1* と同等の Notch シグナル活性を発揮するようになることが示唆された。このような経時変化が生じる背景を明らかにするために、神経発生における RGC の *Notch1* および *Notch2* の発現レベルの時間的変化を調べることにした。この時、RGC で発現しているもう 1 つの Notch homolog である *Notch3* もあわせて解析した (Dang et al., 2006; Irvin et al., 2001; Lindsell et al., 1996)。ここからは呉泉博士に実験データを提供いただいた。

Hes1-d2-EGFP^{Tg/+} マウス (Ohtsuka et al., 2006) を使用して得られた RGC の single cell transcriptome の研究データを活用し (Wu et al., 2020)、E11.5, E14.5, E16.5 の大脳背側の *Hes1* 陽性の RGC における *Notch1,2,3* の発現レベルを解析した。t-SNE 解析の中では各ステージの RGC はおおまかにクラスタリングされていたが (図 9A)、E14.5 および E16.5 では *d2-EGFP* の分解が不完全な細胞が *Hes1* 陰性の細胞として選別されてきたため (図 9B)、*Hes1*, *Sox2*, *Pax6* の全てが陽性である細胞を RGC として解析した。

まず、E11.5 では RGC の大部分が *Notch1* を発現しており (64.6%)、E14.5 (78.3%)、E16.5 (81.5%) では増加傾向を示した (図 9C)。RGC における *Notch1* の平均発現レベルも、E11.5 と比較して E14.5 (1:1.43) と E16.5 (1:1.78) では有意に増加した (図 9F, I)。

一方で *Notch1* とは対照的に、*Notch2* を発現する RGC の割合は E11.5 では限られているものの (12.8%)、E14.5 では急激に増加し (27.6%)、さらに E16.5 ではその集団が拡大した (44.9%) (図 9D)。RGC における *Notch2* の平均発現レベルも、E11.5 と比較して E14.5 では有意に増加し、さらに E14.5 と比較して E16.5 でも有意に増加した (図 9G, J)。一方で *Notch3* は E11.5 で一部の RGC が発現していたものの、E14.5 および E16.5 ではその集団が劇的に減少した (図 9E, H)。

これらの結果から、神経産生期の RGC における *Notch1* および *Notch2* の mRNA の発現が時間の経過とともに上昇し、特に初期にはほぼ存在しなかった *Notch2* の mRNA の発現が後期にかけて顕著に上昇することが示された。

以上の結果より、神経発生の初期には *Notch1* が RGC の維持に中心的な役割を果たすこと、および *Notch2* の発現が後期にかけて急激に上昇することで、*Notch1* と *Notch2* が *Sox2* 陽性の RGC を維持するために同等のシグナル活性を発揮することが示唆された。

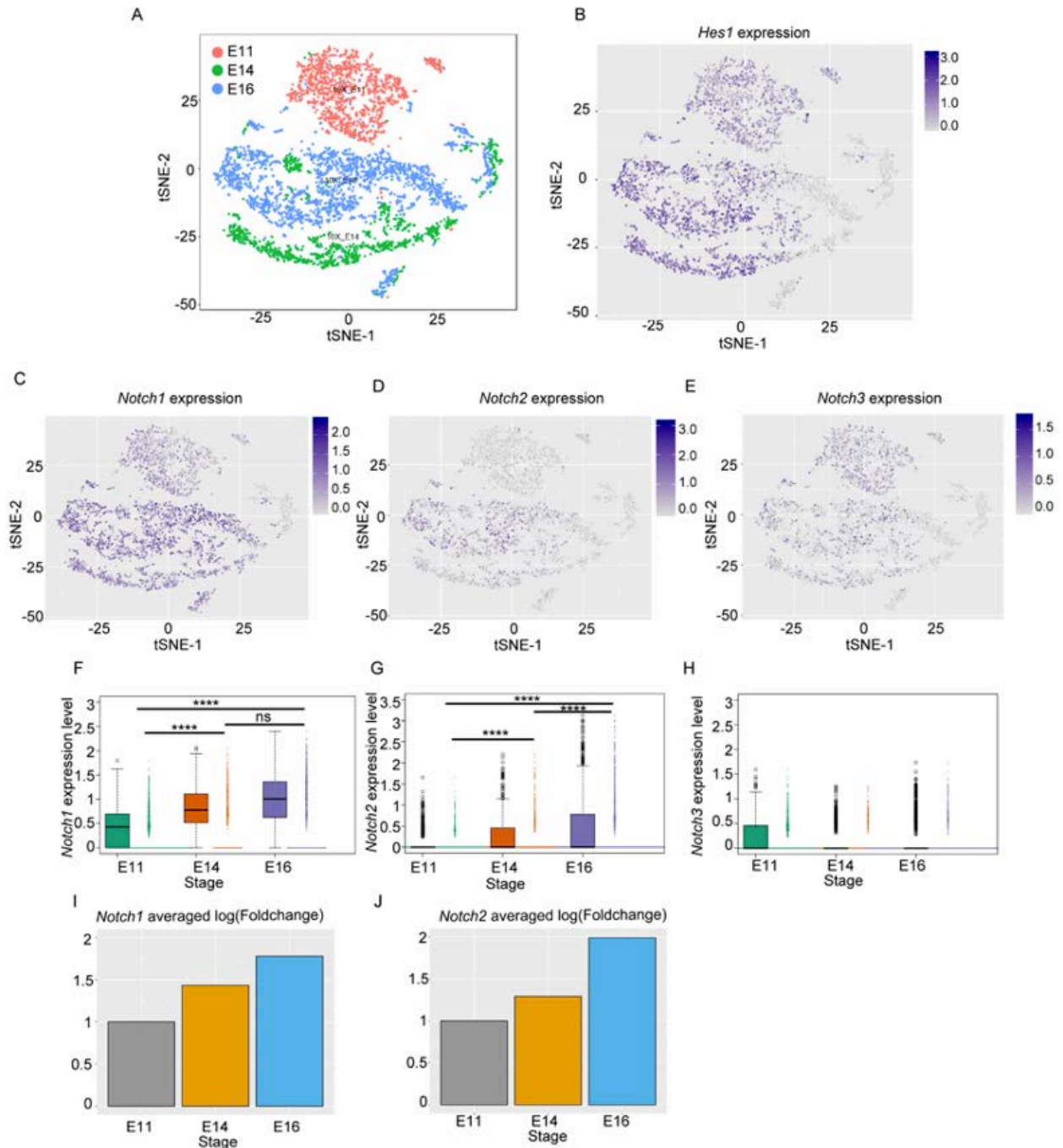


図9 神経産生期初期から後期における RGC の *Notch1*, *Notch2* および *Notch3* の単細胞トランスクリプトーム解析

(A)単細胞トランスクリプトーム解析の結果を、神経産生期のステージごとに色分けした t-SNE (t-Distributed stochastic neighbor embedding) によりプロットした。

(B-E) t-SNE で示された遺伝子 (*Hes1*, *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*) ごとの発現レベル。紫色は高発現、グレーは低発現を示す。遺伝子の raw count 数は総遺伝子数で正規化し、スケールファクター (10,000) を乗じて対数変換した。*Notch1* または *Notch2* を発現する細胞の割合は、*Notch1* では 64.6% (E11.5) 、78.3% (E14.5) および 81.5% (E16.5) であり、*Notch2* では 12.8% (E11.5) 、27.6% (E14.5) および 44.9% (E16.5) であった。

(F-H) 各単細胞における遺伝子 (*Notch1*, *Notch2*, *Notch3*) の発現レベルの定量化データ。データは、box-whiskers (左) と bee swarm プロット (右) で示した。箱ひげ図は、最大値

(外れ値を除外)、第三四分位から第一四分位まで、中央値と最小値(外れ値を除外)で示した。外れ値は第三四分位または第一四分位からの四分位間の範囲より 1.5 倍大きい小さいものと定義し、箱ひげの外側に点としてプロットした。t-SNE 分析により *Hes1*, *Pax6*, *Sox2* の全てが陽性である細胞を RGC として定義した。各ステージの RGC 数は E11.5 では 1,322, E14.5 では 729, E16.5 では 1,165 細胞であった。各ステージにおける *Notch1* または *Notch2* の平均発現レベルを、E11.5 対 E14.5、E11.5 対 E16.5 および E14.5 対 E16.5 の間でそれぞれ比較した。*Notch1* および *Notch2* が異なるステージで RGC において異なる発現レベルを示すかどうかを検定するために、ノンパラメトリックな Wilcoxon signed-rank 検定を用いて統計的有意性を計算し、p value を Bonferroni correction で調整して次のように示した；**** P<0.0001、および ns は有意ではないことを意味する。

(I, J) E11.5、E14.5 および E16.5 における *Notch1*(I)および *Notch2*(J)の平均発現レベルの相対比を、F-H で示したデータから計算した。*Notch1* については 1.43(E11.5 対 E14.5)、1.78(E11.5 対 E16.5)、*Notch2* については 1.29(E11.5 対 E14.5)、および 1.99(E11.5 対 E16.5)であった。

4. 考察

本研究では神経発生期の RGC を維持するために、*Notch1* と *Notch2* が協働して作用することを示した。以下で、RGC の未分化性維持に与える *Notch1,2* の役割について考察する。

i. 神経発生中期までは *Notch1* がシグナル伝達の中心的役割を果たす

まず神経発生中期までにかけては、RGC を維持するための Notch シグナルの担い手として、*Notch1* が *Notch2* よりも中心的な役割を果たすことを示した。このことは、*Notch1* KO マウスでは神経分化が亢進することを示した先行研究と一致している(Yang et al., 2004)。さらに、E13.5 の *Notch1^{Δ/Δ}; Notch2^{Δ/Δ}* マウスでは RGC の大部分が分化し (図 4V-X)、*Notch1* または *Notch2* 単独の KO より重篤な表現型となった (図 4P-U)。 *Notch1^{Δ/Δ}; Notch2^{Δ/Δ}* マウスで相乗的な影響が見られたことは、*Notch2* は *Notch1* と比べて弱いながらも神経幹細胞の未分化性維持をになう Notch シグナルの受容体として、機能的に働くことを示した。以上のことから、*Notch1* と *Notch2* がマウス大脳背側の神経発生期に RGC 維持のために重要な役割を持つことが示された。

また、本研究では探究しきれなかったが、1つの可能性として *Notch1^{Δ/Δ}* マウスでは *Notch2* の発現レベルが代償的に亢進することで、*Notch1* の欠損による Notch シグナル活性の総量の低下を補償していることが考えられる。これが正しい場合、*Notch1^{Δ/Δ}; Notch2^{Δ/Δ}* マウスで観察される表現型は、*Notch1* の欠失と、*Notch2* の代償的な発現上昇の二要素を合計したものとなると考えられる。よって、*Notch1* と *Notch2* のうち一方の遺伝子が欠損した場合に、もう一方の遺伝子あるいは *Notch3* の発現が上昇して Notch の不足分を補うのか、それはどのようなフィードバックが関係するのかわかるとは不明である。この謎は、RGC が自身の Notch シグナルの受容量を制御する仕組みを解明するために、今後検証されるべき興味深い課題の1つである。

ii. *Notch3* は神経発生初期に部分的な活性を持つ可能性がある

先行研究では、*Notch3* KO マウスは *Notch1* KO マウスと比較して、発生初期に有意な表現型を示さないことが報告されていたことから(Krebs et al., 2003b)、本研究では *Notch1* および *Notch2* に着目して解析を行った。一方で、*Notch3* が神経発生初期に一部の RGC に低いレベルで発現していることが示された (図 9E, H)。第二部で示す通り、大脳背側の発生期の主要な Notch リガンドである *Dll1* を *Emx1-Cre* によって KO した場合、E11.5 相当の時点で Sox2 陽性の RGC がほぼ完全に消失し (図 19F, F')、これは *Notch1^{Δ/Δ}; Notch2^{Δ/Δ}* マウスより重篤な表現型である (図 4J-L)。したがって、E11.5 で認められた *Notch3* の低いレベルの

発現は、*Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} マウスで RGC の維持に部分的に寄与していると考えられる。このことは、特に神経発生初期までの期間については、*Notch1*, 2, 3 の三遺伝子が協調的に機能して RGC を維持していることを示唆した。

iii. 神経発生後期には *Notch1,2* が RGC の維持に同等に寄与する

神経発生後期までの間に、*Notch2* が *Notch1* と同等の Notch シグナル活性を発揮するようになることが示唆された。*Notch2* の役割のこのような経時変化は、*Notch2* の活性が極めて低い初期状態から、後期にかけて上昇したことに起因すると考えられ、それは次の 2 つの実験結果に裏付けられる。

第一に、単細胞トランスクリプトームの結果から、*Notch2* の mRNA を発現する RGC の割合が小さく (12.8%)、かつその発現レベルがほぼ null の状態から、E14.5 以降には一定の集団で発現が認められるレベルまで増加していた (図 9G, J)。第二に、E18.5 の Notch シグナル活性を評価した結果、VZ に存在する Sox2 陽性細胞を維持するための *Notch2* のシグナル活性は *Notch1* と同等であった。なぜなら E18.5 における Sox2 陽性の細胞数が、*Notch* アレルが 1 つのみのマウス 2 種で同等であったことから (*Notch1*^{+/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} および *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{+/Δ}, 図 8G)、*Notch1* および *Notch2* のアレルの数に依存した用量依存的な表現型が観察されており、少なくとも E18.5 の段階では 2 つの Notch のアイソタイプの違いに依存した表現型とはならなかったためである (図 8G)。

神経産生期を通じた、神経幹細胞の未分化性維持への *Notch1* と *Notch2* の寄与度を図示すると下図のようになる (図 10)。

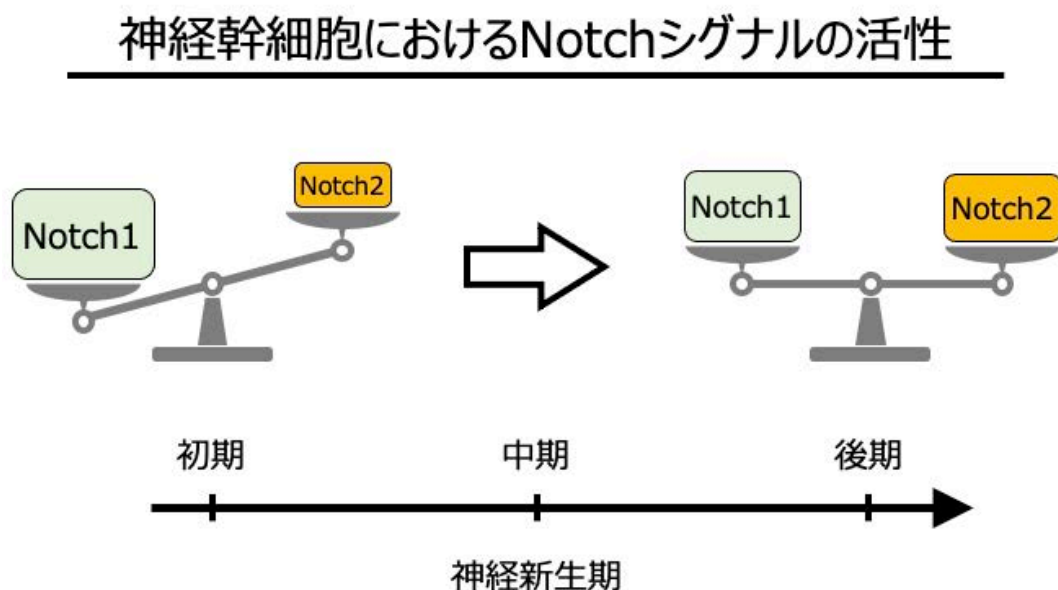


図 10 神経幹細胞の Notch シグナル活性に対する *Notch1* と *Notch2* の寄与度の経時変化

一方で、*Notch1* と *Notch2* による RGC の未分化性維持への貢献を議論する上では、*Notch1* と *Notch2* のそれぞれの細胞内ドメインの Notch シグナル活性に差があることにも注意を払わねばならない(Shimizu et al., 2002)。しかしこれを考慮したとしても、*Notch2* は *Notch1* より細胞膜への移行効率が強くシグナルを受容しやすく(Liu et al., 2013)、かつ *Notch2* は Dll1 との結合親和性が *Notch1* より高いことから(Kakuda et al., 2020)、E16.5 における RGC の *Notch2* の発現レベルが *Notch1* と比べて小さかったものの (図 9G)、神経発生後期の野生型マウスの *Notch2* は *Notch1* と同等の Notch シグナル活性を持つものと推論した。

iv. Notch シグナル経路とそのほかのシグナル経路の相互作用

Notch シグナル経路の下流においては、*Hes1*, *Hes3*, *Hes5* をはじめとした様々な転写因子が神経幹細胞の維持に重要な役割を果たしている(Hatakeyama et al., 2004)。これらの *Hes* 遺伝子は、Notch シグナル経路だけでなく、BMP/SMAD, SHH, JAK/STAT など多様なシグナル伝達タンパク経路からの入力を統合することで、神経幹細胞の性質を決定する極めて重要な役割を果たしている(Andersson et al., 2011)。本研究で明らかになった *Notch1* と *Notch2* のシグナル活性の経時変化が、空間的・時間的にシグナル活性の異なる他のシグナル伝達経路とどのように統合されることで、神経幹細胞の増殖と神経発生、グリオジェネシス、そして成体マウスにおける quiescence などの運命決定に寄与しているかどうかという点は、今後取り組むべき興味深い課題である。

本研究では、神経幹細胞の増殖期と神経発生中期までの時期には *Notch1* が Notch シグナルの主要な担い手であるのに対し、*Notch2* は神経発生後期に活性を発揮することを明らかにした。成体マウス的大脑腹側の SVZ では、*Notch2* は休止状態の幹細胞を維持する役割を担い、*Notch1* は主にその活性化のために機能するが(Engler et al., 2018)、本研究で観察されたような大脑背側の VZ の RGC が、時間の経過とともに *Notch2* のシグナル活性に依存していく様子が、大脑腹側の SVZ でも同様に観察されるのかどうかは、今後検討される必要がある。

第二部

**Radial glial cell は VZ より基底膜側の
神経前駆細胞から Notch シグナルを受容する**

5. 序論

i. 姉妹細胞の形態と運命の非対称性

脊椎動物の神経発生では、apical-basal 極性に沿って著しく伸長した Radial glial cell (RGC)が脳室面で細胞分裂する際、娘細胞の形態面においても細胞運命の決定においても、非対称な分裂を行うことで機能的に異なる 2 つの娘細胞を産み出す(Miyata et al., 2001; Noctor et al., 2001) (図 2)。この分裂では、apical 面は娘細胞の両方に分配されるのに対して、radial fiber は一方の娘細胞だけが受け継ぐ。Radial fiber を元の RGC から受け継いだ娘細胞が RGC として再び未分化性を維持する一方、radial fiber を受け継がなかった娘細胞は神経細胞などへ分化することが他の動物種の神経組織でも共通して観察されている(Alexandre et al., 2010; Das and Storey, 2012; Dong et al., 2012; Konno et al., 2008; Shitamukai et al., 2011)。

これらの観察結果から、細胞分裂時に娘細胞へと分配される細胞の構造上の特徴が、その後の非対称な運命決定に対して何らかのバイアスを与えていることが推察されるが、その機序については未だ定説と呼べるものがない。

ii. RGC の姉妹細胞における非対称な Notch の活性化メカニズム

発生において種々の組織に分布する幹細胞は固有のニッチを形成し、その空間内で自身の増殖、維持や、分化細胞の供給を行う。1 つの幹細胞から生まれた姉妹細胞が、ほぼ同一の周辺環境の中にいながら、内的または外的シグナルに従って非対称に細胞運命が決定される仕組みは、広く、生物学者の関心事である(Hsu and Fuchs, 2012; Scadden, 2006; Schofield, 1978)。多種のシグナル経路の中でも、進化的によく保存された Notch シグナル経路は、様々な発生過程において幹細胞を維持し、かつ姉妹細胞間で二値的な運命決定を左右する代表的なシグナル伝達経路の一つである (Couturier et al., 2012; Dong et al., 2012; Ohlstein and Spradling, 2007)。Notch シグナルは隣接する細胞間における細胞接触依存性に伝達される。Notch が隣接する細胞のリガンドによって活性化されると、Notch intracellular domain (NICD)が酵素的に切断されて核移行し、未分化性を維持するための転写活性化因子として機能する(図 3) (Bray, 2016; Kopan and Ilagan, 2009)。活性化型 NICD は細胞内での絶対量が極めて少なく、かつ核へ速やかに移行するため(Shimizu et al., 2000; Tokunaga et al., 2004)、活性化型 NICD の核以外における細胞内分布は不明であり、このことが Notch の活性化機構の解明の障害となっている。

Notch シグナル経路が RGC の姉妹細胞間で非対称に活性化される仕組みについて、想定される 3 つの仮説を概説する。

1) 側方抑制によるランダムな運命決定

Notch シグナル伝達は隣接する細胞間で双方向的に行われる。この時、なんらかの理由によって Notch の活性化レベルが低下してリガンドを発現した細胞が、隣接する細胞の Notch を活性化して未分化状態を維持させることを側方抑制 (lateral-inhibition) と呼ぶ。隣接した姉妹細胞の間に、初期状態で活性化されている Notch の相対量が仮に等価であったとしても、自然に発生するゆらぎの影響によって、その後のシグナル伝達の方方向性に微小な偏りが生じる。すると、この微小な差は側方抑制によって増幅されるため、ゆらぎの中でランダムに選ばれた細胞でより強く Notch が活性化される結果、シグナルをやりとりしあった細胞間で異なる細胞運命が獲得される(Barton and Fendrik, 2013; Collier et al., 1996; Heitzler and Simpson, 1991; Shimojo et al., 2008)。しかし RGC の姉妹細胞の場合、非対称分裂によって radial fiber の有無という特徴的な形態の違いと細胞運命に強い相関があるため、ゆらぎに起因するランダムな運命決定以外にも異なるメカニズムが関与している可能性が高い。

2) Notch シグナル制御因子の非対称な分配による運命決定

ショウジョウバエの外感覚器前駆細胞(SOP)の細胞分裂をモデルとした系では、細胞分裂時に細胞の極性に従って分配される Numb が姉妹細胞に非対称に受け継がれ、Numb が Notch の細胞膜上の存在量を低下させることで、Notch の活性化が姉妹細胞間で非対称になることが知られている(Rhyu et al., 1994; Shen and Temple, 2002)。この知見を基礎とし、マウスの RGC の細胞分裂においても Numb の分配の非対称性が注目された。しかし、RGC を分散培養した系では姉妹細胞間で Numb が非対称に分配され、その後の細胞の運命決定にも相関がみられたものの(Shen et al., 2002)、脳組織内の RGC では分裂期の Numb の非対称な分配は確認されなかった(Rašin et al., 2007)。

その後、Radial glia の細胞分裂において非対称に分配されうる Numb 以外の因子の探索が行われた。例えば、細胞の apical-basal の極性の形成に関わる Par3 や、Dll1 および Dll1 の活性を制御する Mind-bomb1(Mib1)が注目され、これらに GFP(Green Fluorescent Protein)を融合したタンパクを Radial glia で強制発現させ、細胞分裂時の分配の様子と細胞運命が解析された。その結果、それら融合タンパクが分化する細胞へ多く分配されるという報告が続いた(Alexandre et al., 2010; Dong et al., 2012; Kawaguchi et al., 2013)。Mind-bomb については、ゼブラフィッシュの神経前駆細胞の非対称分裂において、蛍光標識した Mind-bomb が分化する運命の細胞へ非対称に分配されること、および極性因子 Par3 の阻害により Mind-bomb が等分配された場合には細胞運命も対称となった(Dong et al., 2012; Kressmann et al., 2015)。Mib1 は中心体のサテライトタンパクと動態を共にするため(Tozer et al., 2017)、姉妹細胞における新旧中心体の非対称分配との相関が強く示唆されている。

しかし留意すべき点としては、これらの研究で観察された融合タンパクは、内在性のタンパクと比べて過剰量が発現していることである。RGCの分裂において、細胞中で不要なタンパクは分化する娘細胞に分配されることが報告されており(Moore et al., 2015)、上述の因子が細胞本来のタンパク量で同様の現象が観察されること、加えてこれら融合タンパクが内在性タンパクと機能的に同等であることは検証される必要がある。

3) リガンドへの accessibility の違いによる運命決定

周囲にリガンドを発現する細胞が存在すれば、RGCは実質的にいずれの細胞領域でも Notch シグナルを受容する可能性がある。その中でも主な細胞領域として、脳室面近傍にある Adherens Junction (AJ)と、Intermediate progenitor cell (IPC)の存在する Subventricular zone (SVZ) 付近の2つが考えられる。

(a) Adherens junction における Notch シグナル

Radial Glia は apical process 先端にある AJ で周囲の細胞と強固に接触し、この AJ の周辺には Notch1 が分布する(Hatakeyama et al., 2014)。AJ が破壊されると Radial glia による神経産生が損なわれることから(Gänzler-Odenthal and Redies, 1998; Hatakeyama et al., 2014; Rašin et al., 2007)、Notch シグナルが AJ で伝達されと考えられている。

しかし RGC の非対称分裂では両姉妹細胞が同様に AJ を受け継ぐため(Shitamukai et al., 2011)、AJ 付近での Notch シグナルのみに注目した場合、姉妹細胞間で非対称に Notch シグナルが活性化される現象の説明ができない。radial fiber を持たずに分化する娘細胞が基底膜側への移動に先立って AJ を失うのは、非対称分裂後に Neurogenin2 のような分化マーカーを発現する 2~4 時間後よりさらに後であるため(Ochiai et al., 2009)、それまでの間に Notch シグナルが radial fiber を持つ娘細胞へ多く伝達されることを説明するためには、別のメカニズムが必要である。

(b) Subventricular zone における Notch シグナル

SVZ に分布する IPC が *Dll1* を強く発現し(A. Kawaguchi et al., 2008)、*Dll1* を含む糸状突起を radial fiber に接触させていることや(Nelson et al., 2013)、VZ より基底膜側の細胞のリガンド活性が RGC の維持に影響を与えることが報告されている(Wang et al., 2016; Yoon et al., 2008)。また、ショウジョウバエの Sensory organ precursor (SOP)は、Delta を発現する細胞が長い糸状仮足を伸ばし、数細胞分の距離を隔てた細胞の Notch を活性化できることや(Cohen et al., 2010; De Joussineau et al., 2003; Rajan et al., 2009)、basal-lateral な細胞膜での Notch シグナル伝達のエビデンスが報告されている(Trylinski and Mazouni, 2017)。これらのことから、

SVZ 周辺でリガンドを発現する IPC が Notch シグナル伝達の担い手となり、radial fiber を持つ娘細胞の *Notch1* が非対称に活性化されるとする仮説が成り立つ。

iii. 本研究の目的

マウス神経幹細胞の非対称分裂では、radial fiber という構造体が一方の娘細胞に引き継がれ、radial fiber を引き継いだ細胞が新たな RGC となり未分化性を維持する。本研究では、細胞分裂時に生じる構造上の非対称性が、姉妹細胞において自己複製と神経分化の2つの運命決定に影響を与える仕組みを明らかにすることを目的とした。そのために、特に *Notch1* の活性化が生じる細胞領域に着目し、Radial glia の姉妹細胞で非対称に *Notch1* が活性化される仕組みの解明を目指した。

6. 対象と手法

i. 実験動物

1) 野生型マウス

図 11-14 の実験で使用した野生型マウスは、理化学研究所 BDR で繁殖させている ICR(CD1)妊娠マウスを使用した。

2) 遺伝子改変マウス

本研究の第二部で使用した遺伝子改変マウスは表 4 の通りである

表 4 第二部で使用した遺伝子改変マウス系統と遺伝子型判定に用いた Oligo DNA 配列

遺伝子型 (出典)	遺伝子型判定用 PCR プライマー
<i>Notch1</i> ^{flox/flox} (Morimoto et al., 2012)	Notch1-F: TGGCCTGCCTGTCTGGAACAACAGTTCAGG Notch1-R: ACTGTCAGTCAAGCCAGTTCAGGGCACATGG
<i>Notch2</i> ^{flox/flox} (McCrigh et al., 2006)	Notch2-F: AGATAGGAAGCAGCTCAGCTCACAGCCTGC Notch2-R: TTGTATTATAACGCTAAACGTGCACTGGAG
<i>Emx1-Cre</i> ^{K1} (Guo et al., 2000)	Emx1-F: GCCACTGGAGGGTCTGAAAA Cre-F, OIMR1084: GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC Cre-R OIMR1085: GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT
<i>Dll1</i> ^{flox/flox} (Hozumi et al., 2004)	Dll1-F: CACACCTCCTACTTACCTGA Dll1-R: GAGAGTACTGGATGGAGCAAG
<i>Nestin-CreERT2</i> (Imayoshi et al., 2006)	Cre C-F: CGATTGATTTACGGCGCTAAGG ERT2-R: ACTGAAGGGTCTGGTAGGATC

3) フェレット胎仔

Marshall BioResources (筑波) から 10-24 ヶ月齢の妊娠フェレットを購入し、胎生 36 日目のフェレット胎仔を氷温で安楽死させて大脳を得た。

ii. 免疫染色法

大脳切片の免疫染色法は第一部に記載した通りである。使用した抗体は表 5 の通りである。活性化型 NICD を染色する場合は、切片を HistoVT One (#06380-05、Nacalai) に浸漬し、高圧蒸気滅菌器(#STH245FC、アドバンテック東洋)を 70 度 20 分に設定して抗原賦活化処理を施した。

表 5 第二部で使用した抗体一覧

抗原	製品名	希釈率
活性化型 NICD	Anti-cleaved NICD, rabbit monoclonal antibody, clone D3B8, #4147S, Cell Signaling	1:1000

Nestin	Anti-Nestin, mouse monoclonal antibody, clone rat-401, #MAB353, Millipore	1:1000
Tbr2	Anti-Tbr2, eFluor450 labeled rat monoclonal antibody, clone Dan11mag, 48-4875-82, eBioscience	1:1000
Tbr2	Anti-Tbr2, eFluor488 labeled rat monoclonal antibody, clone Dan11mag, 53-4875-82, eBioscience	1:1000
Notch1 intracellular	Anti-Notch1 intracellular domain, rabbit monoclonal antibody, clone EP1238Y, NB-110-57273, Cell Signaling	1:1000
Notch1 extracellular	Anti-Notch1 extracellular domain, rat monoclonal antibody, clone 22E5, AG-30B-0051, Adipogen	1:200
Notch2	Anti-Notch2 intracellular domain, rabbit monoclonal antibody, clone D76A6, #5732, Cell Signaling	1:1000
Dll1	Anti-Dll1, sheep polyclonal antibody, #AF5026, R&D	1:500
Lamp1	Anti-Lamp1, eFluor660 labeled, rat monoclonal antibody, clone 1D4B, 50-1071-82, Thermo Fisher Scientific	1:1000
Sox2	Anti-Sox2, eFluor570 labeled rat monoclonal antibody, clone Btjce, 41-9811, eBioscience	1:1000
Pax6	Anti-Pax6, Rabbit polyclonal antibody, PRB-278P, Covance	1:1000
EGFP	Anti-EGFP, Goat poly clonal antibody, ab5450, Abcam	1:1000
DAPI	D9542, MERCK	1:1000
Goat IgG	AlexaFluor488 labeled, Donkey anti-Goat IgG antibody, 705-545-153, Jackson ImmunoResearch	1:500
Rabbit IgG	Cyanin3 labeled, Donkey anti-Rabbit IgG antibody, 711-165-152, Jackson ImmunoResearch	1:500
Rabbit IgG	AlexaFluor647 labeled, Donkey anti-Rabbit IgG antibody, 711-605-152, Jackson ImmunoResearch	1:500
Rat IgG	Dylight 549 labeled, Donkey anti Rat IgG, 712-505-153, Jackson ImmunoResearch	1:500
Mouse IgG	AlexaFluor647 labeled, Donkey anti-mouse IgG antibody, 715-605-151, Jackson ImmunoResearch	1:500

iii. Airyscan による超解像度顕微鏡撮影

2つ以上の抗原の共局在性を確認した際は、共焦点レーザー顕微鏡 LSM880 with Airyscan (Zeiss)を用いて超解像度顕微鏡像を取得した（図 12D-G および図 14）。

iv. 大脳背側原基スライス培養法

マウス胎仔の大脳背側の組織スライスを培養する方法は先行研究を参考にした (Konno et al., 2008; Miyata et al., 2001; Shitamukai et al., 2011)。その方法を以下に概説する。

摘出した脳組織は、酸素を通気した氷温培地(DMEM/F-12 Ham (#D2906, Sigma Aldrich), 100U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン (#09367-34, Nacalai) 含有) 内で、その大脳皮質原基を眼科用ディスポーザブルナイフ (Ophthalmic microsurgical Knife, #8065923001 Alcon)を使って切り出し、さらに冠状方向に 0.5~1.0mm 幅にスライスした。このスライスを

再構成用緩衝液(#635-00791, 新田ゼラチン)を含む Type I-A コラーゲン(Cellmatrix Type I-A, #637-00653, 新田ゼラチン)に馴染ませて、φ30mm の 0.4um holes セルカルチャーインサート (Millicell-CM Low Height Culture Plate Insert, #PICM0RG50, Millipore)上に切断面を水平にして並べ、φ40mm のガラスボトムディッシュ(GWSt-5040, Willco Wells)に移して 37°C, 5%CO₂ インキュベーター(Napco)内に静置した。10 分後、培養用の栄養培地(1.5mg/ml DMEM/F-12 に B27 supplement (1:50, #12587-010, Gibco), N2 supplement with Transferrin (Apo) (1:100, #141-09041, Wako)、5% FBS (v/v, #631105, Clontech), 5% Horse serum (v/v, #26050-070, Gibco), 100U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン(#09367-34, Nacalai)を添加)を 1ml 添加し、再度インキュベーター内で 1 時間以上保温し、脳組織スライスを氷温状態から回復させた。

大脳スライスには 0.5% ジメチルスルホキシド(DMSO, #D4540, Sigma Aldrich)または 50mM GI254023X (ADAM-10 阻害剤, APEX BIO, #A4436, 0.5% DMSO 含)を添加した培養培地 1ml で任意の時間培養した。

v. 遺伝子発現ベクター

本研究に使用した発現ベクターの作成方法は下記の通り。PCR による増幅は KOD plus ver.2(Toyobo)を使用し、PCR 断片と発現ベクターの ligation には in Fusion-HD (Takara)を用いてサブクローニングした。PCR により増幅した配列部分は sequencing により mutation が入っていないことを確認した。発現ベクターは全て EndoFree Plasmid Maxi Kit(QIAGEN)または endotoxin-free NucleoBond Xtra Midi EF kit (Macherey–Nagel)で、メーカープロトコルにしたがって調製した。各発現ベクターの名称に続いて、括弧書きでマウス子宮内電気穿孔法の実験使用時の最終濃度を示した。

1) pCAG-flox-GFP-mem (0.2 mg/ml)

pEGFP-C1 (Clontech)の CMV エンハンサー領域(制限酵素 AseI-NheI)に、CAG ハイブリッドプロモーター(Niwa et al., 1991)を挿入した発現ベクター(pCAG-EGFP-C1)を下向敦範博士より分与頂いた。細胞膜移行シグナルは、KRas4B GTPase の poly basic/ Farnesylation シグナル配列 (アミノ酸配列 : KMSKDGGKKKKSKTKCVIM) を EGFP の C 末端側に挿入した (pCAG-memGFP) 。さらに、NheI site に Floxed-STOP カセット(loxP-stop-loxP)を挿入した。

2) pCAG-Cre (0.01 mg/ml)

pCAG-GFP-C1 の GFP を Cre (yeast Cre recombinase) に置換したものを下向敦範博士より分与頂いた。

3) pCAG-memGFP-IRES2-Notch1 (0.1 mg/ml)

pCAG-memGFP の GFP の C 末端側に、IRES2(Clontech)および *Notch1* の coding sequence を挿入した。*Notch1* の R23(AGA)と C24(TGC)の間に 3xHA tag を挿入した。

IRES2: 5'-

```
CCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGT  
GCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGA  
AACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAAT  
GCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAAC  
AACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTG  
CGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACG  
TTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGG  
GGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCA  
CATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGG  
ACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACC-3'
```

3xHA: 5'- AGA-

```
CTTCCCCCAGGCTTGAGATACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTatcTACCCATACGACGT  
CCCAGACTACGCTatcTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCT-TGC-3'
```

4) pCAX-HyperPiggybase (0.2 mg/ml)

分裂に伴う plasmid の希薄化の影響を小さくするために、トランスポゾンによってゲノムに expression vector を組み込むことができる Hyper Piggybac system を活用した(Yusa et al., 2011)。Piggybac transposase を発現するベクターとして、pCAX-hyPBBase を使用した(Fujita et al., 2020)。

5) pLR5-NeuroD1-Dll1-3xHA-3'UTR (1.0 mg/ml)

ゲノムに組み込む plasmid の backbone は pLR5-PB vector を使用して発現ベクターを構築した(Cadiñanos and Bradley, 2007)。*NeuroD1* のプロモーター領域(4,972bp)は、内在性の *NeuroD1* promoter(5'- ATCCAATAGCTTTGAGCAAT...ATACAGGAAGTGGAAC-3')を PCR で増幅して BamHI サイトに挿入した(pLR5-NeuroD1)。*Dll1* の Stop codon を除いた Coding sequence に 3xHA tag を付加し、さらに *Dll1* mRNA の 3'UTR 領域を繋げて、BamHI-SpeI 領域に挿入した(図 18E)。

6) pLR5-pNeuroD1-RFP (0.5 mg/ml)

pLR5-NeuroD1 の BamHI 領域に 3xNLS-GS linker-mCherry (Clontech)および mem-mCherry を挿入した。

3xNLS-GS linker: 5'-

```
ATGGTGGACCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTAGATCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTAGATC  
CAAAAAAGAAGAGAAAGGTAGGCGGCGGAGGATCGGGTGGTAGTGGTGGTTCAGGAGG  
AGGA-3'
```

vi. mRNA in situ hybridization

マウス脳の in situ hybridization は下郡智美教授の研究室のプロトコルに準じた (Shimogori et al., 2010; Shimogori and Seth, 2015)。以下でその方法を概説する。

4%PFA/30% sucrose/0.1MPB で一晩固定した大脳組織を RNase free の実験環境下でクライオスタット (#CM30505S, Leica Microsystems) で 25 μ m の厚さに薄切し、切片を Superflost plus (#48311-703, 日本ジェネティクス) にマウントした。切片を再度 4%PFA で 15 分間室温で固定し、Protease K (Roche) で 30 分間 37°C で処理したのち、非放射性色素の Digoxigenin (DIG, Roche) で標識した *DIII* の 3'UTR のアンチセンス RNA プローブ (配列は下記) で 70°C で一晩ハイブリダイゼーションした。過剰なプローブを洗浄後、1% 子羊血清/TBST で blocking を施し、アルカリフォスファターゼを結合した DIG 抗体で発色させた。発色画像は MVX10 with DP71 digital microscope camera (Olympus) で撮像した。

DIII 3'UTR probe: 5'-

```
gctgtgctgctgtggtggtctgcgtccggctgaagctacagaacaccagcctccacctgaaccctgtgggggagagacagaacatgaacaac  
ctagccaattgccagcgcgagaaggacgttctgttagcatcattggggctaccagatcaagaacaccaacaagaaggcggactttcacggggac  
catggagccgagaagagcagctttaagggtccgatacccccactgtggactataacctcgttcgagacctcaaggagatgaagccacggtcaggga  
tacacacagcaaacgtgacaccaagtgccagtcacagagctctgcaggagaagagaagatcgccccaacacttaggggtggggagattcctgac  
agaaaaaggccagagctgtctactctacttcaaaggacaccaagtaccagtcgggtgtatgttctgtctgcagaaaaggatgagtgtgtatagcgact  
gaggtgtaagatggaagcgatgtggcaaaattccatttcttaataaaattccaaggatatagccccgatgaatgctgctgagagaggaaggga  
gaggaaaccagggaactgctgctgagaaccagggtcaggcgaagctggttctctcagagtagcagaggcgcccgacactgccagcctaggcttt  
ggctgccgctggactgctgctg -3'
```

vii. 子宮内電気穿孔法

マウス胎仔大脳背側の VZ に存在する RGC へ発現ベクターをトランスフェクションする方法として、子宮内電気穿孔法 (in utero electroporation) を用いた (Konno et al., 2008; Tabata and Nakajima, 2001)。その方法を以下に概説する。

妊娠 12 または 13 日目のマウスを小動物実験用簡易吸入麻酔装置 (#KN-1071, 夏目製作所) を用いてイソフルランを使用して麻酔した。開腹して子宮を露出させ、37 度の生理食塩水 (大塚製薬) で開腹部を加温しながら、0.01% Fastgreen FCF (Wako) で加色した発現ベクターを含む DNA 溶液 (~3.0mg/ml in PBS) を、先端を研磨したガラスキャピラリー (Drummond Scientific Company) で吸い込み、DNA 溶液を胎仔の右脳の脳室へ 0.5~1 μ l 吹き入れた。DNA 溶液注入後 2 分ほど静置し、 ϕ 5mm の電極 (Biorads) のプラス端を大脳背側に、マイナス端を反対側面の下顎に当て、Pulse Generator (CUY21 EDIT II, BEX) により電気パルス (100mA, 50V, 5x 50msec pulse in 5sec) を与えた。この一連の操作を複数の胎仔に終えたあとで子宮を腹腔内に戻し、夏目糸付縫合針 (針: 外科用角針 強弯 No.1 17mm, 糸: 黒ブレードシルク No.5-0 50cm, 夏目製作所) で開腹部を縫合した。

viii. 全胚培養と電気穿孔法

E9.5 のマウス胎仔を胎盤と羊膜を付着させたまま 37 度の生理食塩水中で摘出した (Kulkeaw et al., 2009)。電極チャンバー内の生理食塩水中で、発現ベクターを含む DNA 溶液を右脳室に注入し、Pulse Generator (CUY21 EDIT II, BEX) で電気パルス (80mA, 60V, 5x 50msec pulse in 5sec) を与えた。マウス胚は 100% retired rat IC serum (Charles river) に、2mg/ml の D-(+)-glucose (#16806-25, Nacalai) と 100U/ml 100U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン (#09367-34, Nacalai) を添加した培地 1.5ml を入れた培養ボトル中で、Whole Embryo Culture System (#10-0310, Ikemoto Scientific Technology) で 37 度で 20rpm で穏やかに攪拌しながら培養した。はじめの 24 時間のガス流量は 60% O₂, 75cc/min、次の 24 時間は 90% O₂, 75cc/min で培養した (Kulkeaw et al., 2009)。培地は 24 時間ごとに交換した。

ix. タモキシフェン依存的な遺伝子ノックアウト

4-OH tamoxifen (#5648, Sigma Aldrich) をピーナッツオイル (#P2144, Sigma Aldrich) に溶解し、*CreERT2* を発現する E12.5, E13.5, E14.5 の妊娠マウスに 2mg / pregnant mouse で腹腔内投与して、ターゲットの遺伝子をノックアウトした。

x. 統計検定

統計分析は Excel (Microsoft) を用いて行った。はじめに F 検定 ($\alpha=0.05$) によって等分散性を検定した。その後、不等分散と推定されたデータセットについては Welch's t-test を行い、等分散と推定されたデータセットについては Student's t-test を行った。比較による有意性は、グラフ上にアスタリスクで次のように表した; *P < 0.05。

7. 結果

i. 姉妹細胞間の Notch 活性化の非対称性は分裂後に短期間で形成される

はじめに、神経幹細胞 Radial glial cell (RGC)の姉妹細胞において、Notch が非対称に活性化されるまでのタイムスケールを調べた。

E13.5 のマウス大脳背側に GFP を外来性に発現させて、3 時間後に固定することで姉妹細胞を識別した (図 11A)。次に活性化型 NICD を検出する断端抗体を用いて、核内の活性化型 NICD を染色した。姉妹細胞の Radial fiber を持つ娘細胞と持たない娘細胞を識別し、(図 11B)、それぞれの核内の活性化型 NICD のシグナル量を計測した。姉妹細胞間で核内の活性化型 NICD のシグナル量を比較し、シグナルが大きい娘細胞のシグナル量を、シグナルが弱い娘細胞のシグナル量で除すことで、核内の活性化型 NICD の姉妹細胞におけるシグナル比を得た。36 の姉妹細胞のペアから得たシグナル比を、Radial fiber を持たない娘細胞が他方より強いシグナルを持つ姉妹細胞のペアと、Radial fiber を持つ娘細胞がより強いシグナルを示す姉妹細胞のペアをプロットした結果 (n=36)、姉妹細胞の脳室面からの距離の重心が 13 μ m 以上の姉妹細胞では、全て Radial fiber を持つ娘細胞が核内により多くの活性化型 NICD を有した (図 11C)。

RGC の姉妹細胞は、非対称分裂後 3 時間以内には脳室面から 30 μ m 以内に滞在する (Ochiai et al., 2009)。このことから、RGC の姉妹細胞における Notch 活性化の非対称性は、姉妹細胞がおおよそ 1 細胞分の距離を基底膜側に移動する、つまり分化する娘細胞が apical process を失う以前の、細胞分裂後の遅くとも 3 時間以内に形成されることが示唆された。

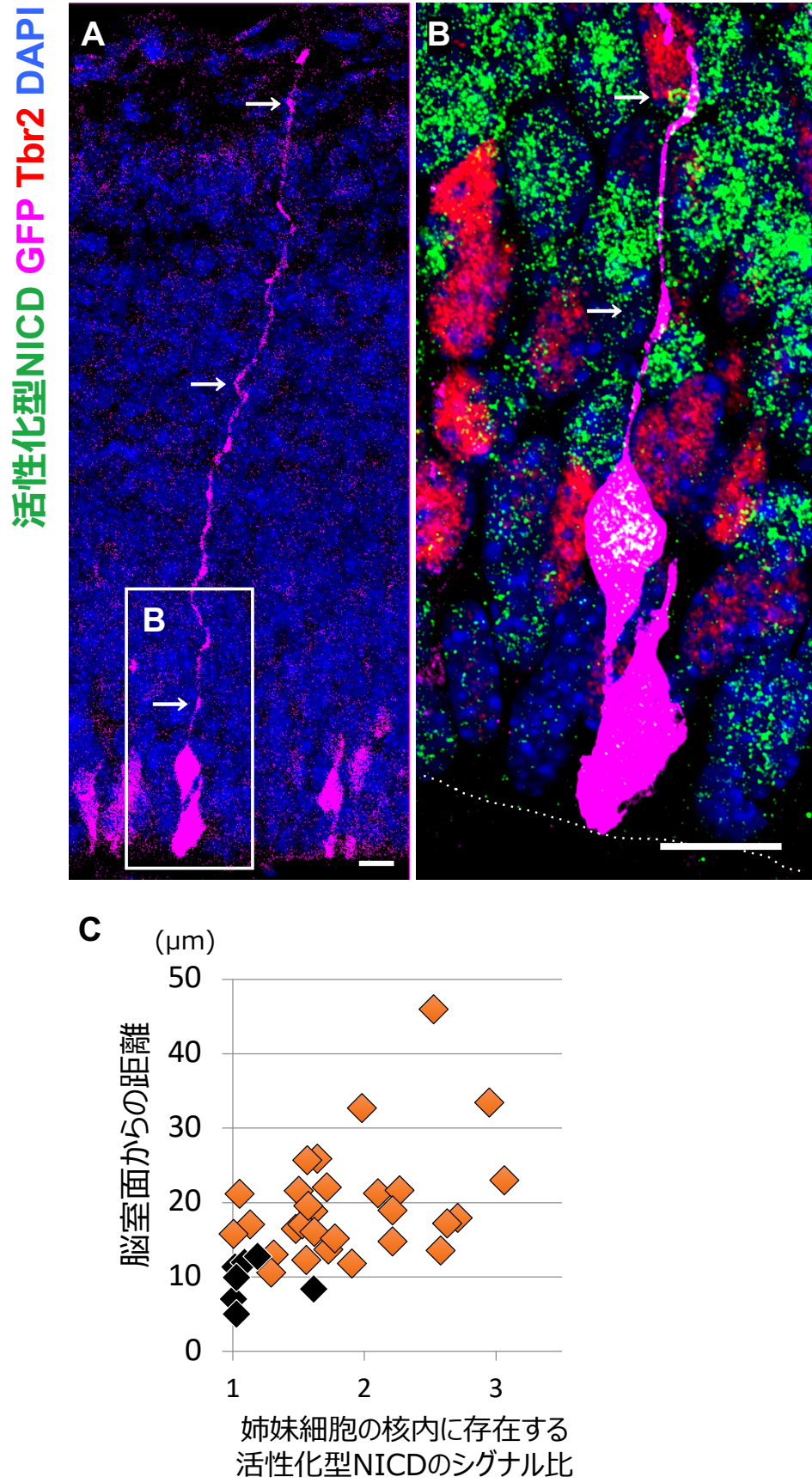


図 1 1 RGC の姉妹細胞は脳室面から 1 細胞分移動する前に Notch が非対称に活性化する

図 1 1 RGC の姉妹細胞は脳室面から 1 細胞分移動する前に Notch が非対称に活性化する
E13.5 野生型マウス大脳背側の RGC の姉妹細胞間で、核内の活性化型 NICD のシグナル量を比較した。

(A, B) E13.5 マウス大脳背側に、GFP を発現するベクターを電気穿孔法で導入した 3 時間後の免疫染色画像。GFP の発現が連続的に見られる 2 細胞を姉妹細胞として識別した。

DAPI(青)、GFP (マゼンタ) および、活性化型 NICD (緑)、Tbr2 (赤) を示した。白矢印は Radial fiber を示す。スケールバーは 10 μ m。

(B) A の白四角で囲われた領域の拡大画像。Radial fiber を持つ娘細胞の核内に、活性化型 NICD の強いシグナルが検出された。一方で Radial fiber を持たない娘細胞では、核内に活性化型 NICD のシグナルがほぼ認められなかった。白点線は脳室面を示す。

(C) 姉妹細胞の核内に存在する活性化型 NICD のシグナル比 (シグナルが強い娘細胞/シグナルが弱い娘細胞) を横軸に、姉妹細胞の脳室面からの距離の重心の位置を縦軸に示した。黒の菱形 (◆) は Radial fiber を持たない娘細胞の方が核内のシグナルの強い姉妹細胞のペアを、オレンジの菱形 (◆) は Radial fiber を持つ娘細胞の方が核内のシグナルの強い姉妹細胞のペアを示す。脳室面から 13 μ m 以上離れた姉妹細胞の全てのペアで、Radial fiber を持つ娘細胞の核内により多くの活性化型 NICD が検出された (n=36)。

ii. 活性化型 NICD が radial fiber に存在する

Notch1 の活性化産物である活性化型 NICD は RGC の核移行後には確認されてきたが、一方で、RGC の核移行前の活性化型 NICD の分布は報告がなかった。本研究ではまず、活性化型 NICD の RGC の核以外における細胞内分布を確認することとした。

E14.5 の野生型マウス大脳切片を抗原賦活化処理し、活性化型 NICD の断端を検出するモノクローナル抗体で染色した結果、核以外では Nestin 陽性の radial fiber 上でシグナルが観察された(図 12A-G)。同様の染色像はマウス胎仔に限らず、E36 のフェレット胎仔でも radial fiber と思われる繊維状の染色像が共通に観察された(図 12H)。

活性化型 NICD が RGC の核以外では radial fiber に存在することが発見されたが、これまでに報告がない染色像であることから、次にこのシグナルの真正性を検証した。

まず、Notch1 を KO した組織で fiber 状のシグナルが消失するか否かを確認した。それには Notch1 のコンディショナルノックアウトマウス(Notch1^{fllox/fllox})を、Emx1 遺伝子座に Cre をノックインした大脳背側特異的に Cre を発現する Emx1-Cre^{KI/+}マウス系統を掛け合わせ、大脳背側特異的に Notch1 を KO した(Notch1^{Δ/Δ}, 図 12 I, J)。その結果 radial fiber と思われる繊維状の活性化型 NICD のシグナルが、Notch1 が KO された領域のみで消失した(図 12J, 白点線の上方)。

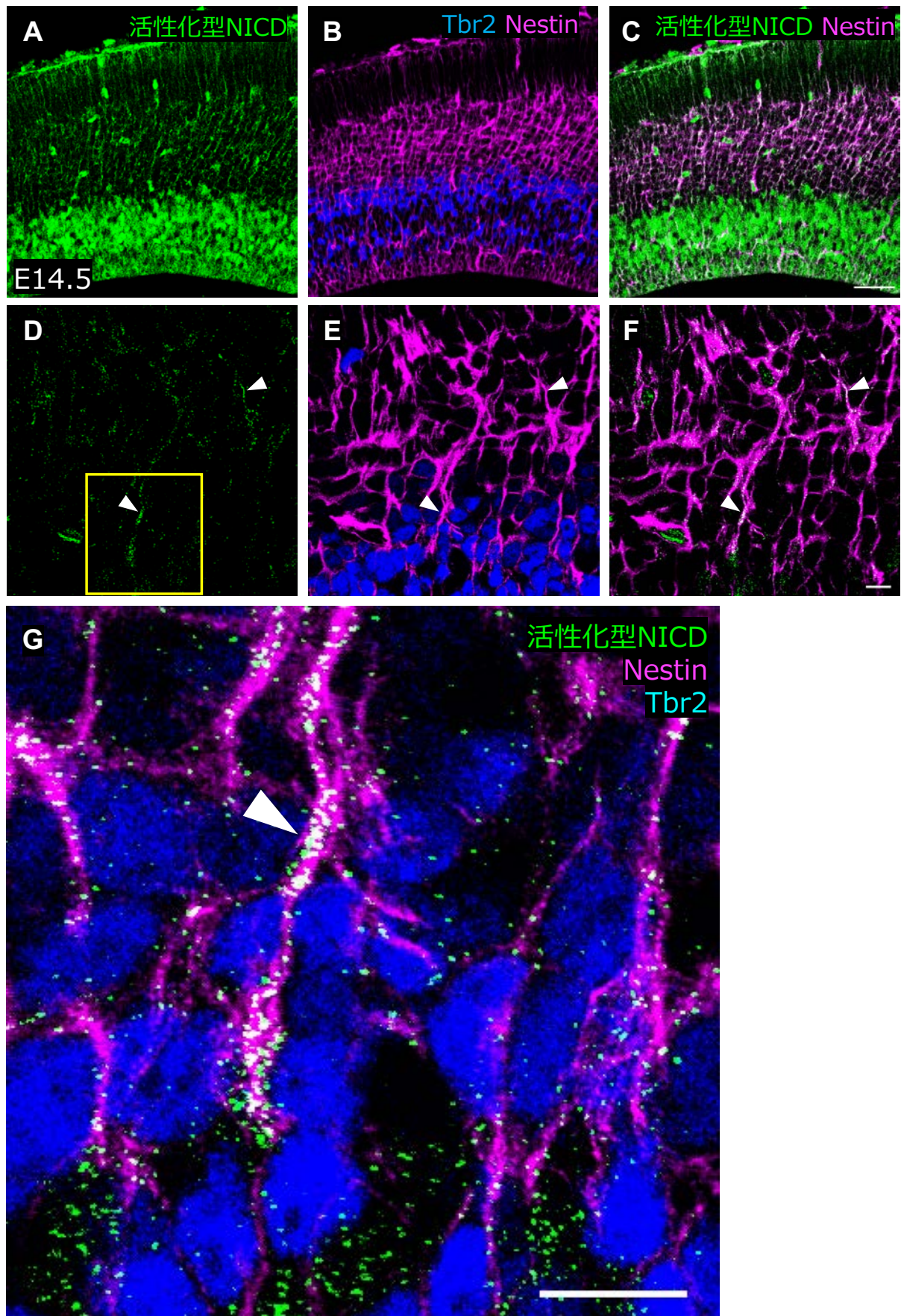


図 1 2 活性化型 Notch1 が RGC の radial fiber に分布する (続く)

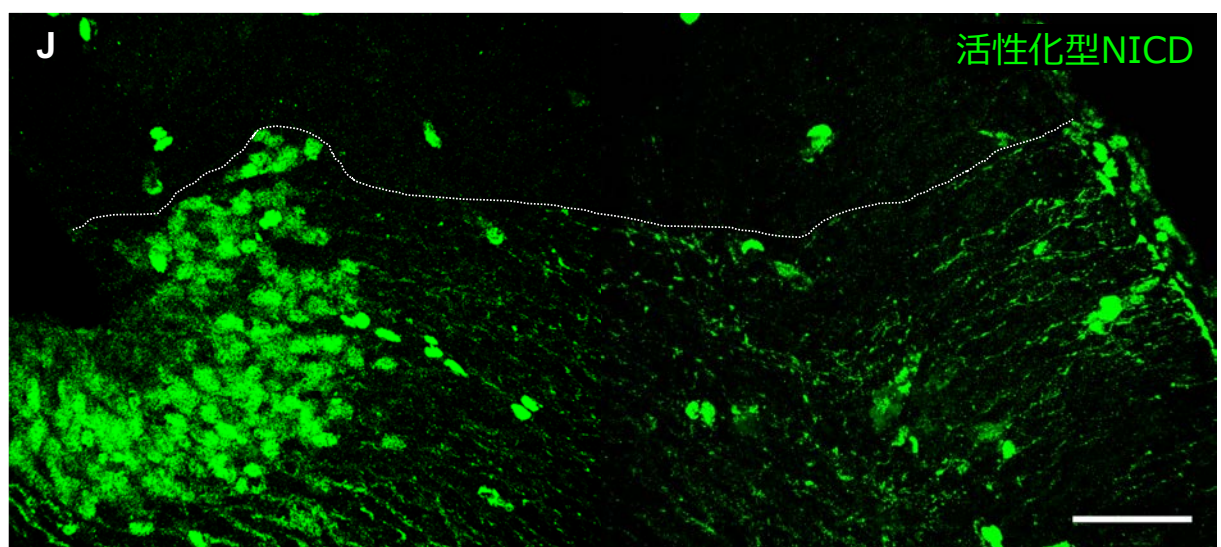
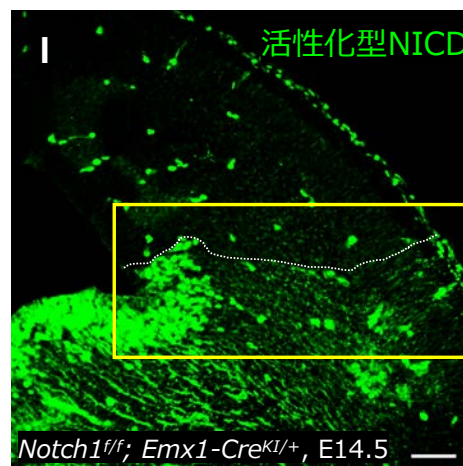
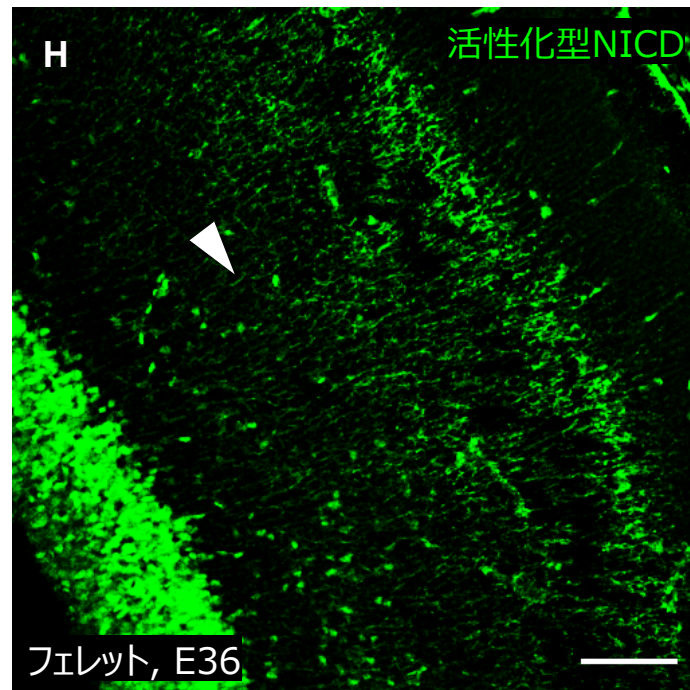


図 1 2 活性化型 Notch1 が RGC の radial fiber に分布する (続く)

図 1 2 活性化型 Notch1 が RGC の radial fiber に分布する (続き)

(A-C) E14.5 の野生型マウス的大脑背側における、(A, D) 活性化型 NICD (緑)、(B, E) Nestin (マゼンタ) と Tbr2 (青)、(C, F) 活性化型 NICD (緑) と Nestin (マゼンタ) の免疫染色画像。スケールバーは 50 μ m。

(D-F) SVZ 周辺の高倍率画像。(D) 活性化型 NICD (緑) と Tbr2 (青)、(E) Nestin (マゼンタ) と Tbr2、(F) 活性化型 NICD と Nestin のそれぞれの重ね合わせ画像。(G) D の画像内の黄四角で囲まれた領域の超解像度顕微鏡画像。活性化型 NICD が Nestin 陽性の RGC の RF 上に分布する (白矢頭)。スケールバーは 10 μ m。

(G) SVZ の活性化型 NICD (緑) と Nestin (マゼンタ)、Tbr2 (青) 染色を重ね合わせた超解像顕微鏡画像。活性化型 NICD が Nestin 陽性の radial fiber に連続して分布した (白矢頭)。スケールバーは 10 μ m。

(H) E36 フェレット大脑背側における、活性化型 NICD の免疫染色画像。VZ より基底膜側に活性化型 NICD のシグナルが見られた (白矢頭)。スケールバーは 100 μ m。

(I, J) E14.5 の *Notch1*^{Δ/Δ} マウス的大脑背側における、活性化型 NICD の免疫染色画像。(J) I の画像内の黄四角で囲まれた領域の高倍率画像。Emx1-Cre の発現する境界 (白点線) を境に、背側で活性化型 NICD のシグナルが消失した。スケールバーは 100 μ m。

さらに、Notch 活性化に必須の ADAM-10 の酵素活性を阻害した際に、VZ より基底膜側の活性化型 NICD のシグナルが消失するか否かを確認した(図 13A)。野生型のマウス大脑背側の組織スライスに、ADAM-10 阻害剤 (GI254023X) を 6 時間暴露させたところ、VZ より基底膜側の活性化型 NICD のシグナルが消失した(図 13C)。続いて ADAM-10 阻害剤を取り除くと、60 分以内に再度 VZ より基底膜側で活性化型 NICD のシグナルが回復したことから(図 13D)、VZ より基底膜側で観察される活性化型 NICD のシグナルが、Notch1 の活性化の有無に依存していることが確認された。

以上の結果から、RGC の radial fiber 上に分布する活性化型 NICD は間違いなく Notch1 の活性化産物を検出しており、このことは RGC の radial fiber 上で Notch1 の活性化が生じていることを強く示唆した。

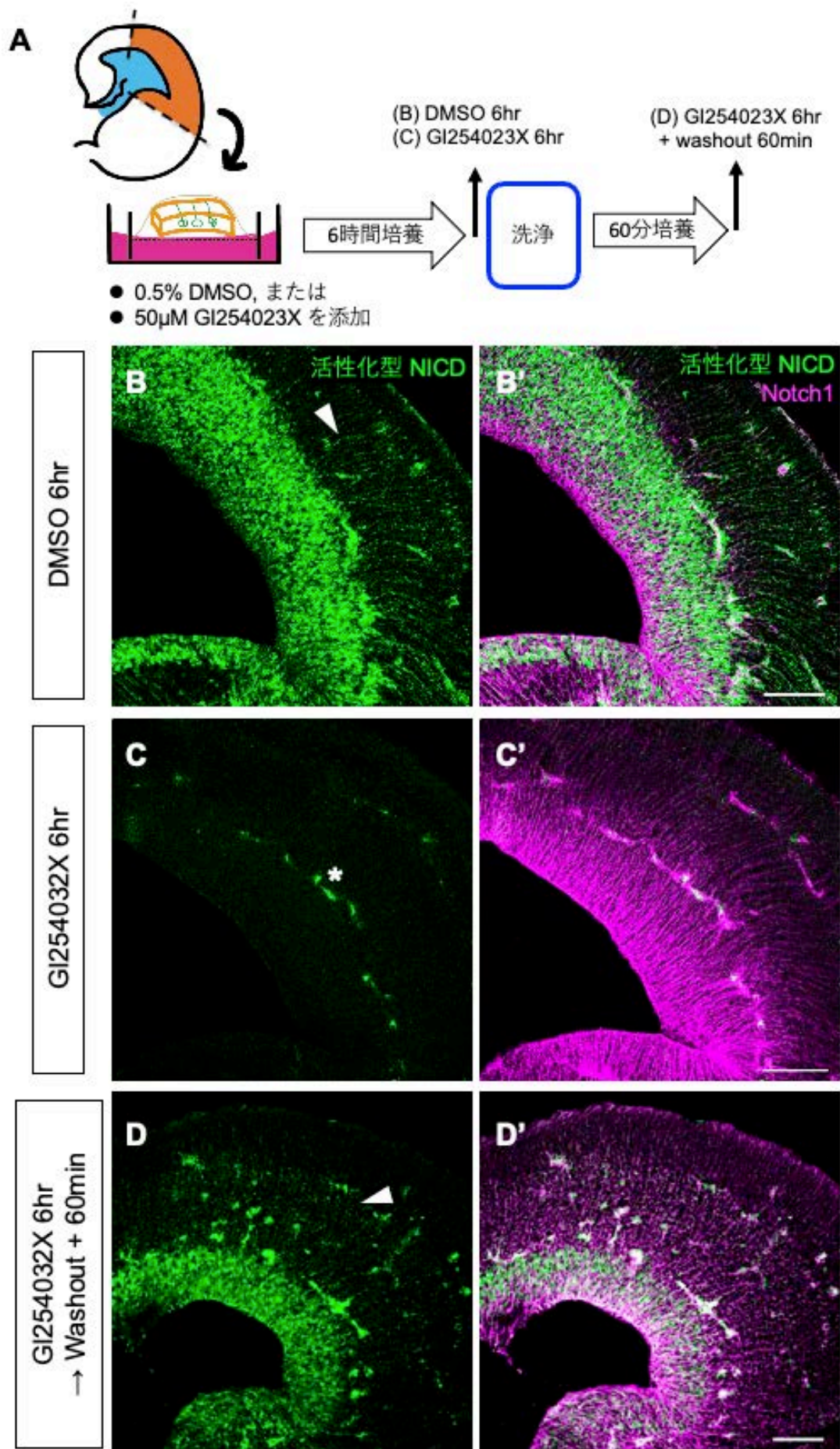


図 1 3 Notch 活性化阻害により活性化型 NICD が消失する (続く)

図 1 3 Notch 活性化阻害により活性化型 NICD が消失する (続き)

(A, A') Notch1 の活性化を阻害後に回復の開始する領域を調べるための実験スキーム。E14.5 野生型マウス的大脑背側原基の組織スライスを、0.5% DMSO または ADAM 阻害剤 (50 μ M GI254023X) 存在下で透過膜上にて培養した。6 時間後に (B, B') DMSO を添加した組織スライスと (C, C') ADAM 阻害剤を添加した組織スライスをサンプリングし、(D, D') ADAM 阻害剤を添加した組織スライスは PBS で 3 回液交換して阻害剤を取り除いた後、60 分後にサンプリングした。

(B-E) 活性化型 NICD (緑) と、(B'-E') Notch1 (マゼンタ) を重ね合わせた免疫染色画像。スケールバーは 100 μ m。

(B, B') 0.5% DMSO を添加して 6 時間後の大腦背側の組織スライス。活性化型 NICD が再度 VZ と VZ より基底膜側 (白矢頭) に分布した。

(C, C') ADAM 阻害剤を添加して 6 時間後の大腦背側の組織スライス。Notch1 は組織全体で発現しているが、活性化型 NICD は血管内皮細胞と思われる領域(*)にのみ限定して検出された。

(D, D') ADAM 阻害剤を添加して 6 時間後に阻害剤を取り除き、さらに 60 分間培養した大腦背側の組織スライス。活性化型 NICD が再度 VZ と VZ より基底膜側 (白矢頭) に分布した。

iii. Dll1 は VZ より基底膜側でシグナル伝達の活性を持つ

Radial fiber に活性化型 NICD が分布することから(図 12)、Notch1 の活性化が RGC の radial fiber 上で生じる可能性が示唆された。一方で、マウス大脳背側の発生期における主要なリガンドである *Dll1* は、VZ で mRNA が強く発現しているものの(Campos et al., 2001; A. Kawaguchi et al., 2008)、抗体染色によって検出される Dll1 タンパクの分布は VZ 内側に限定して細胞質中に確認される場合や(Nelson et al., 2013)、VZ より基底膜側でも広く検出される場合が報告されている(D. Kawaguchi et al., 2008)。これらのことから *Dll1* の発現とタンパクの細胞内局在の詳細を明らかにすることが、実質的なシグナル伝達細胞が分布する領域を同定することを試みた。

1) VZ 中では Dll1 の一部がライソソームに分布する

本研究における実験手技では、E12.5 の野生型マウス大脳背側における Dll1 タンパクは VZ~SVZ 主に点状に検出され、細胞膜と思われる領域の連続したシグナルは限定的であった(図 14B, 15 B, B')。次に Dll1 の点状の局在がどのような性質のものであるかを調べた。その結果一部の Dll1 が、活性型に限らず細胞内ドメインを持つ全ての形態と等しく反応する抗体で検出された Notch1 の細胞内ドメイン(NICD)、およびライソソームマーカーである Lamp1 と共局在することがわかった(図 14A-D)。Dll1 は隣接する細胞の発現する Notch の細胞外ドメイン(NECD)をエンドサイトーシスすることで Notch を活性化するが(*trans-activation*, 図 3, 14E)、Dll1 が NICD と共局在した場合には、同一細胞内の Notch と Dll1 間で生じる *cis-inhibition* である可能性が考えられる(De Celis and Bray, 2000; Del Álamo et al., 2011; Klein et al., 1997; Sprinzak et al., 2011, 2010)(図 14F)。点状に染色される Dll1 の内、NICD と Lamp1 と共局在しないものも多く確認されたが、VZ 内側に存在する一定数の Dll1 は *cis-inhibition* の結果、分解系で不活化されている可能性が示唆された(考察を参照)。

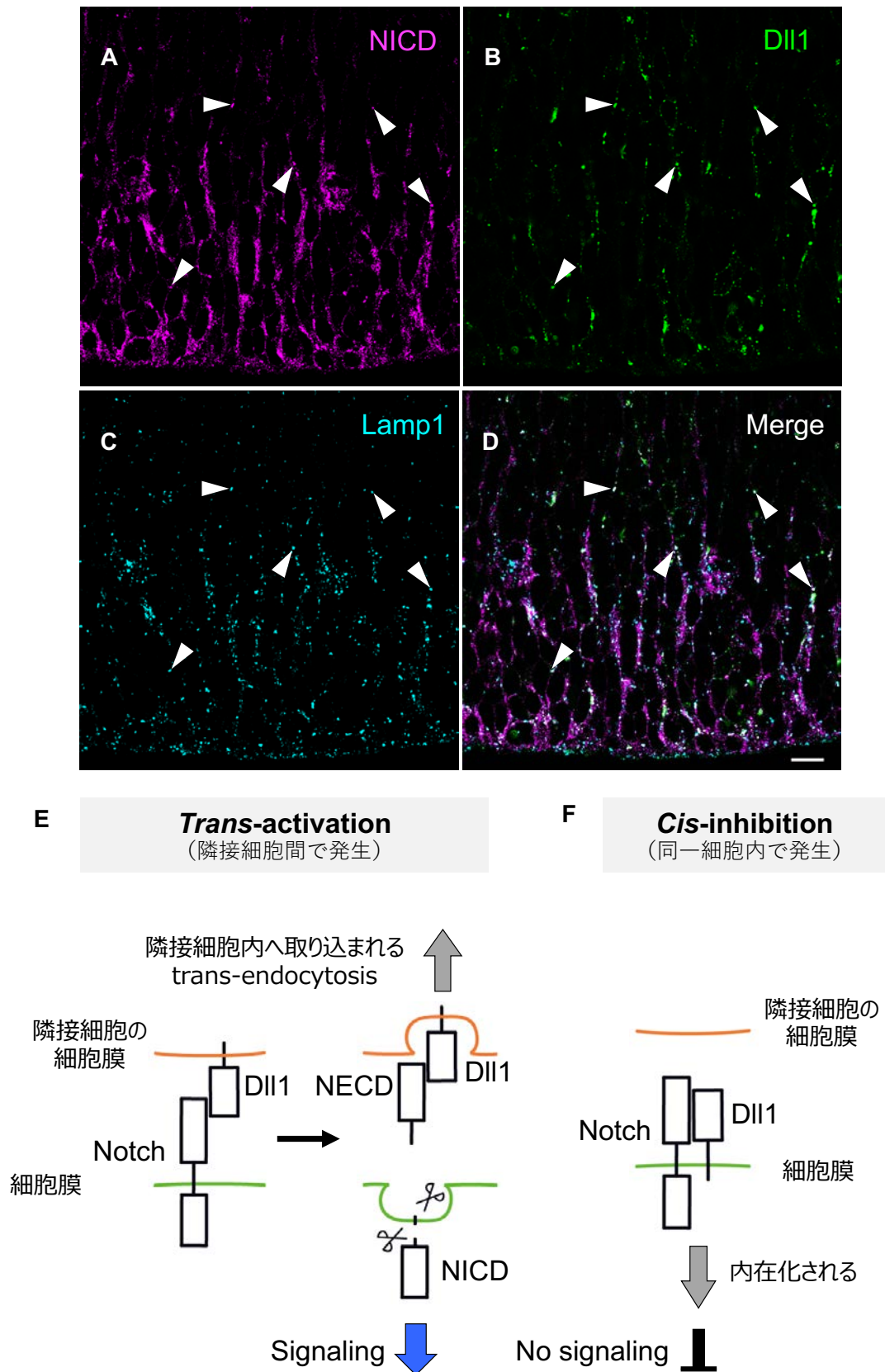


図 1 4 DII1 の一部は VZ 内で Notch1 の細胞内ドメインと Lamp1 と共局在する (続く)

図 1 4 Dll1 の一部は VZ 内で Notch1 の細胞内ドメインと Lamp1 と共局在する (続き)
(A-D) E12.5 のマウス大脳背側の VZ における(A) 活性化に限らず細胞内ドメインを持つ全ての形態に等しく反応する抗体で検出された Notch1 intracellular domain (NICD), (B) Dll1, (C) Lamp1(ライソソーム) 、および(D)それらの重ね合わせの免疫染色画像 (Merge)。白矢頭は Notch1, Dll1, Lamp1 の共局在を示す。スケールバーは 10um。
(E-F) E) *Trans-activation* と、F) *Cis-inhibition* の模式図。オレンジ色がリガンド(Dll1)発現細胞の細胞膜を、緑色が Notch 発現細胞の細胞膜を示す。(E)隣接細胞の発現する Dll1 が Notch に結合すると、リガンド発現細胞が Dll1 と結合した Notch extracellular domain (NECD)を *trans-endocytosis* する。これがトリガーとなって ADAM-10 と γ -secretase が Notch を酵素的に切断し、活性化型の Notch intracellular domain (活性化型 NICD)が核移行しシグナル伝達する。リガンド発現細胞に *Trans-endocytosis* された NECD と Dll1 は分解される。
(F) Notch に同一細胞上の Dll1 が結合すると、Notch と Dll1 の両方が細胞質中に内在化される結果、これらはいずれもシグナル伝達に寄与しない。Notch と Dll1 の *cis-interaction* は、ゴルジ体・小胞体・細胞膜などで生じると考えられる。

2) VZ 中では Dll1 が Notch1 と Notch2 によって細胞質中に内在化される

図 14 の結果から、Dll1 が同一細胞内の Notch と結合 (*cis*-inhibition) することでライソソームへ移行している可能性が示唆された。先行研究では、Notch が Delta の endocytosis に積極的に寄与しており、Notch のノックダウンによって Delta が細胞膜に蓄積することがゼブラフィッシュを用いた先行研究で報告されている(Matsuda and Chitnis, 2009)。

そこでマウス大脳背側において、*Dll1* の主要な相互作用対象である *Notch1* 及び *Notch2* が同一細胞内に存在しない場合に、Dll1 が細胞膜に表出するか否かを調べた。そのために *Notch1*^{Δ/Δ} マウスと *Notch2*^{Δ/Δ} マウス大脳背側の Dll1 を観察したところ、E12.5 の野生型マウスでは主に Dll1 は細胞質と思われる領域に分布するのに対して(図 15B'), *Notch1*^{Δ/Δ} および *Notch2*^{Δ/Δ} マウスでは、SVZ 周辺の細胞の細胞膜と思われる領域に Dll1 が連続的な分布を示した(図 15E', H')。 *Notch1*^{Δ/Δ} マウスの SVZ 周辺で Dll1 が蓄積している細胞が IPC であるかを確認するために、IPC で発現開始する *NeuroD1* のプロモーター領域を使用して(図 18D を参照)、IPC 特異的に膜移行型の赤色蛍光タンパク (memRFP) を発現するベクター (pNeuroD1-memRFP) を E12.5 の *Notch1*^{Δ/Δ} マウスに電気穿孔法で導入し、E14.5 で Dll1 と Tbr2 と共に免疫染色を行った。その結果、memRFP を発現する IPC の細胞質だけでなく、細胞膜にも Dll1 が連続的に分布していた(図 15R, 白矢頭)。さらに *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} マウスでは、VZ より基底膜側だけでなく、VZ 内側で *Dll1* を発現する細胞の細胞膜と思われる領域にも、Dll1 が連続して分布した(図 15K')。

これらの結果から、*Notch1* および *Notch2* が正常に存在する野生型マウス胎仔において、大脳背側の VZ で *Dll1* を発現した細胞では、周辺細胞の Notch1 あるいは Notch2 と結合してシグナル伝達を行う (*trans*-activation)、あるいは、同一細胞内の Notch1 及び Notch2 が Dll1 と相互作用が存在した (*cis*-inhibition) 結果、Dll1 が細胞質中に内在化されている可能性が示された。

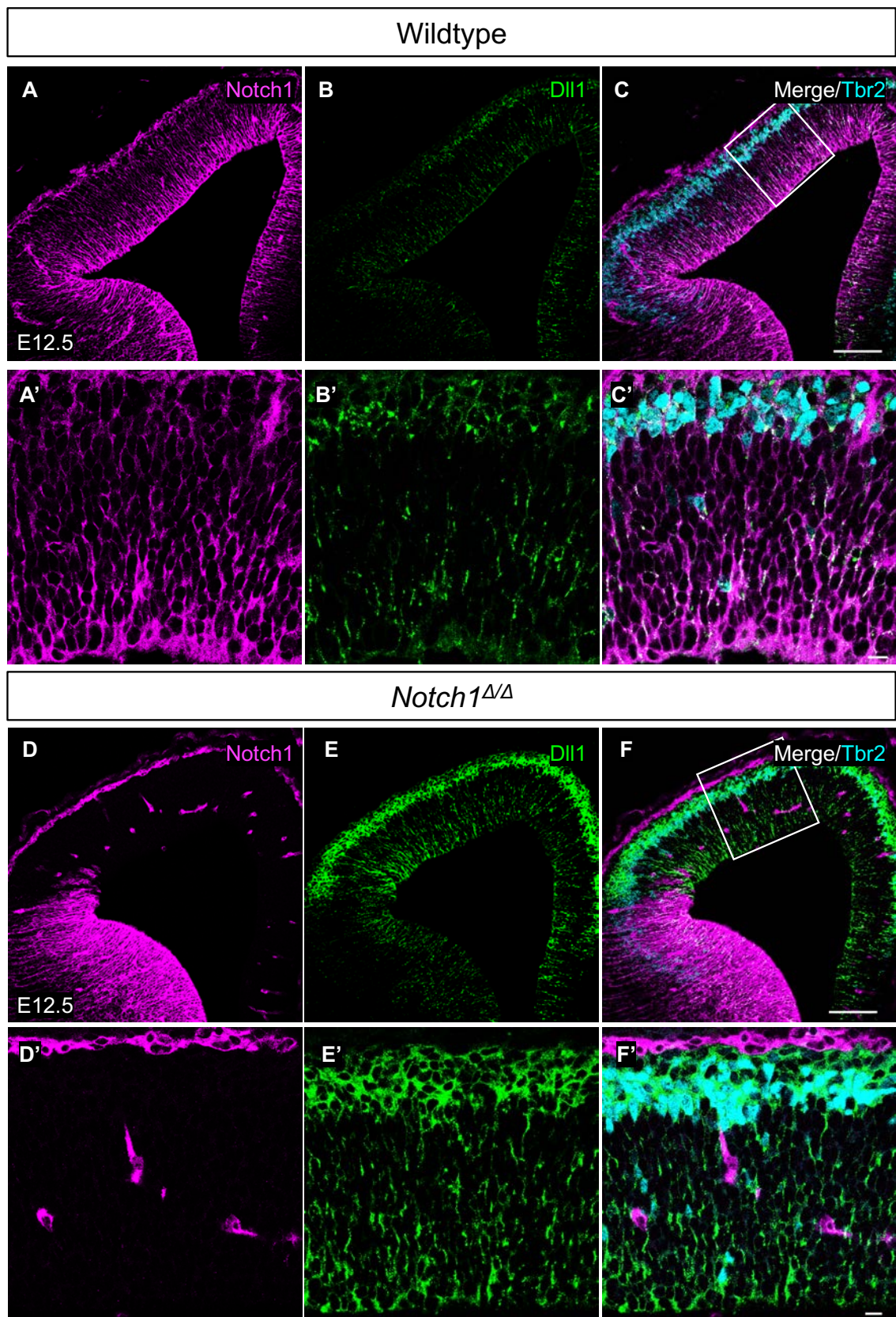


図 1 5 *Notch1*^{Δ/Δ} および *Notch2*^{Δ/Δ} マウスでは DII1 が VZ より基底側で、*Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} マウスでは VZ 内側でも細胞膜と思われる領域に連続的な分布を示す (続く)

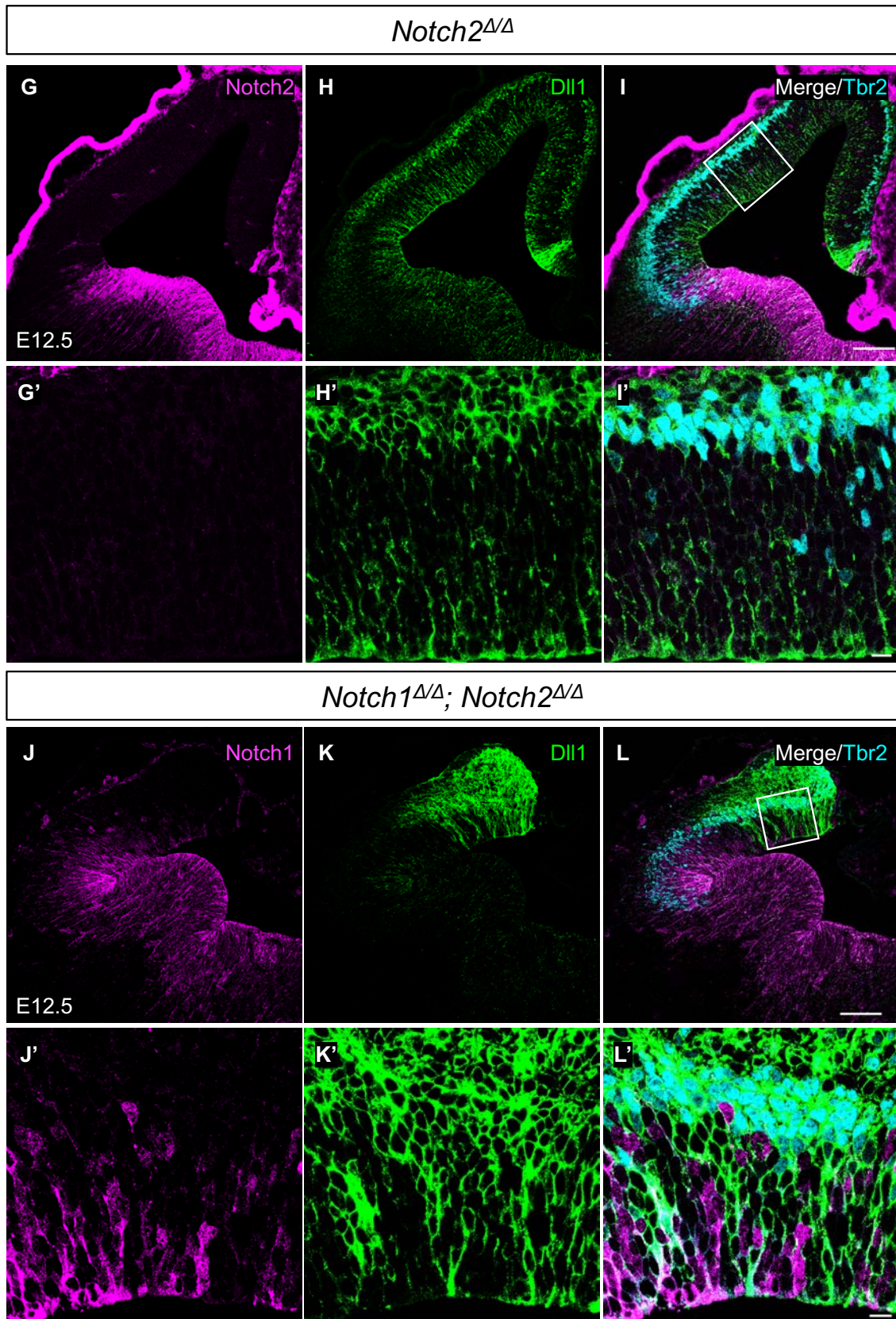


図15 *Notch1*^{Δ/Δ} および *Notch2*^{Δ/Δ} マウスでは DII1 が VZ より基底側で、*Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} マウスでは VZ 内側でも細胞膜と思われる領域に連続的な分布を示す (続く)

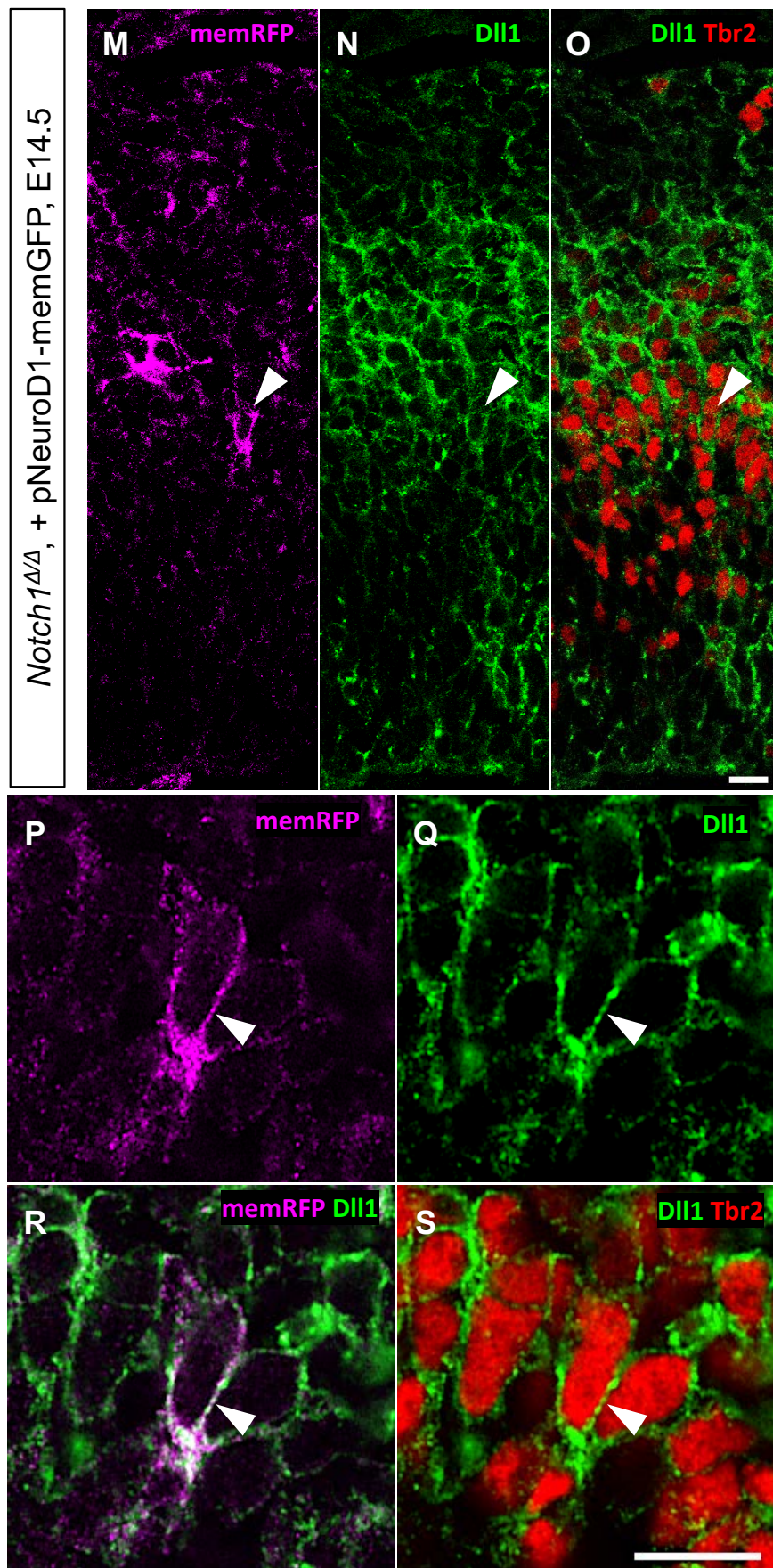


図 1 5 *Notch1*^{Δ/Δ} および *Notch2*^{Δ/Δ} マウスでは Dll1 が VZ より基底側で、*Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} マウスでは VZ 内側でも細胞膜と思われる領域に連続的な分布を示す (続く)

図 15 *Notch1*^{Δ/Δ} および *Notch2*^{Δ/Δ} マウスでは Dll1 が VZ より基底側で、*Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} マウスでは VZ 内側でも細胞膜と思われる領域に連続的な分布を示す (続き) (A-C') E12.5 の Wildtype, (D-F') *Notch1*^{Δ/Δ}, (G-I') *Notch2*^{Δ/Δ}, (J-L') *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} マウス大脳背側の免疫染色画像。スケールバーは 100 μm。

A'-C'はCの、D'-F'はFの、G'-I'はIの、J'-L'はLの、白四角で囲われた領域の高倍率画像。スケールバーは 10 μm。

(A, A', D, D', J, J') Notch1 intracellular domain (マゼンタ), (G, G') Notch2 intracellular domain 1 (マゼンタ), (B, B', E, E', H, H', K, K') Dll1 (緑), (C, C', F, F', L, L') Notch1 intracellular domain, Dll1, Tbr2 (シアン) の重ね合わせ画像、(I, I') Notch2 intracellular domain, Dll1, Tbr2 の重ね合わせ画像。*Notch1*^{Δ/Δ} または *Notch2*^{Δ/Δ} の VZ より基底膜側では、Dll1 が細胞膜と思われる領域と思われる領域に連続的な分布を示した (E', H')。 *Notch1*^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} マウスでは RGC が残存する *Emx1-Cre* の発現境界部分を観察したため、Notch1 がモザイク状に発現している (J')。 *Notch1* が発現していない細胞では、VZ 内外問わず Dll1 が連続的な分布を示した (K')。 *Notch1* 発現細胞と *Dll1* 発現細胞は相補的な発現パターンを示した (L')。

(M-S) E12.5 の *Notch1*^{Δ/Δ} マウス大脳背側に、*NeuroD1* プロモーター制御下で膜移行型の赤色蛍光タンパク(memRFP)を発現するベクターを電気穿孔法で導入し、E14.5 でサンプリングした免疫染色画像。(M, P) memRFP (マゼンタ)、(N, Q) Dll1 (緑)、(O, S) Dll1 (緑) と Tbr2 (赤) の重ね合わせ、(R) 膜移行型 RFP (マゼンタ) と Dll1 (緑) の重ね合わせ。SVZ 周辺の Tbr2 陽性の IPC の細胞膜 (白矢頭) と細胞質に Dll1 が分布した。スケールバーは 10 μm。

3) Notch1-Dll1 の相互作用を阻害すると Dll1 が VZ より基底膜側の細胞膜と思われる領域に連続的に分布する

次に、Notch1, Notch2 による *cis*-inhibition による細胞質中への内在化を逃れて、Dll1 を細胞膜に提示してシグナル伝達可能になる細胞が、神経発生初期から後期までの間に分布する領域を調べることにした。

Notch1^{Δ/Δ}; *Notch2*^{Δ/Δ} マウスでは神経発生早期に RGC が分化して枯渇するため、神経発生初期から後期まで発現が持続する *Notch1* について (第一部) (Mase et al., 2020)、神経発生の初期(E10.5)から後期(E16.5)までの *Notch1*^{Δ/Δ} マウスの表現型を確認した。

まず E10.5 の野生型マウスでは、Dll1 は一部の細胞でのみ細胞膜と思われる領域に分布するが (図 16C)、*Notch1*^{Δ/Δ} マウスでは VZ の細胞の大部分で Dll1 が細胞膜と思われる領域に連続して分布した (図 16F)。これは E10.5 頃までの神経上皮細胞/RGC のほとんどが Dll1 を発現していることを示唆するが、このことはこの時期の神経上皮細胞/RGC が *Dll1* を発現し、隣り合う細胞同士が *mutual-activation* によって互いに Notch を活性化し合うという知見と一致している(Kageyama et al., 2008; Shimojo et al., 2008)。

次に、盛んな神経発生の開始する E11.5 での Dll1 の分布を調べた。野生型マウスでは大部分の Dll1 が細胞質と思われる領域に分布したが(図 16I)、*Notch1*^{Δ/Δ} マウスでは SVZ とそれより基底膜側で顕著に Dll1 が細胞膜と思われる領域に連続して分布した (図 16L)。これは前述した E12.5 の *Notch1*^{Δ/Δ} マウスの表現型と同様である(図 15E')。次に、E11.5 と同様の

Dll1 の分布が、*Notch1*^{ΔΔ} マウスで E14.5 及び E16.5 でも共通して観察されたが、Dll1 が細胞膜と思われる領域に連続的に分布する細胞は、Tbr2 を発現する IPC の存在する SVZ か、SVZ より基底膜側で顕著に確認された(図 16R, X)。

また、*Notch1*^{ΔΔ} マウスの SVZ から基底膜側の細胞で Dll1 のタンパク量が増大したが、*in situ* hybridization により *Dll1* mRNA の発現パターンを確認したところ、コントロールとした *Notch1*^{+Δ} マウスと同様に、VZ 内側で高く VZ より基底膜側では低い発現パターンを示し、特筆して *Dll1* mRNA の発現上昇は認められなかった(図 16Y, Z)。このことは *Notch1*^{ΔΔ} マウスで Dll1 タンパクが蓄積する理由は、Notch シグナルの減少などによる分化促進の結果とは考えにくく、Notch-Dll1 の相互作用による Dll1 タンパクの *trans*-activation, *cis*-inhibition の両方に起因する endocytosis や、タンパク分解の変化等の翻訳後修飾による影響が最も可能性が高いと考えられる。

これらのことから、SVZ が形成される E11.5 以降、*Notch1*^{ΔΔ} マウスにおいて Dll1 が細胞膜に効率的に分布可能な細胞は、IPC 以降の分化段階にあることが示唆された。すなわち、*Notch1,2* 共に存在する野生型マウスでは、Dll1 は VZ 内側では *Notch1,2* により細胞質中に内在化されており、Dll1 を表出してシグナル伝達が可能な細胞は、IPC よりさらに進んだ分化段階の細胞であると推定された。

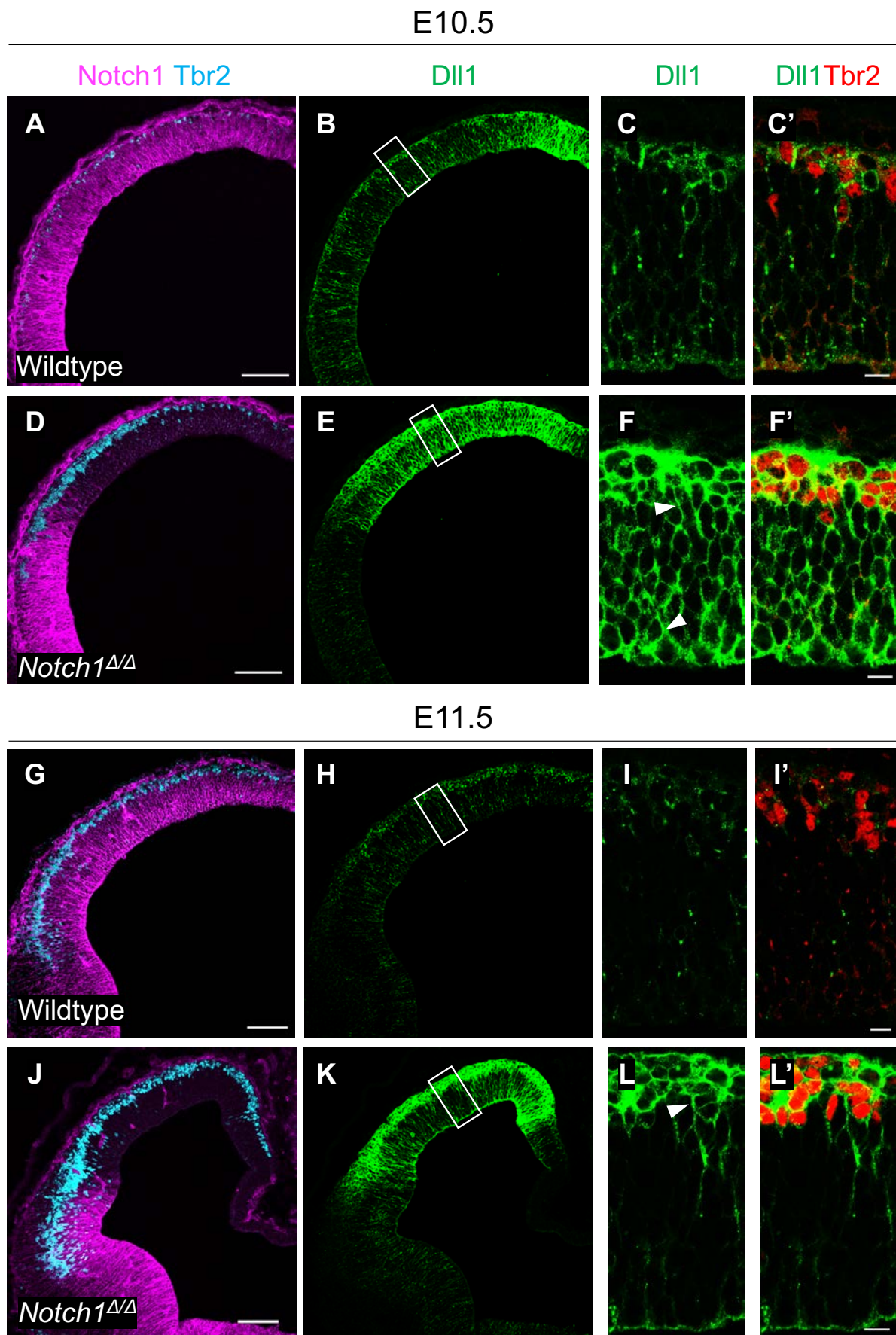


図 1 6 *Notch1*^{Δ/Δ}マウスでは Dll1 が細胞膜と思われる領域で連続的に分布する (続く)

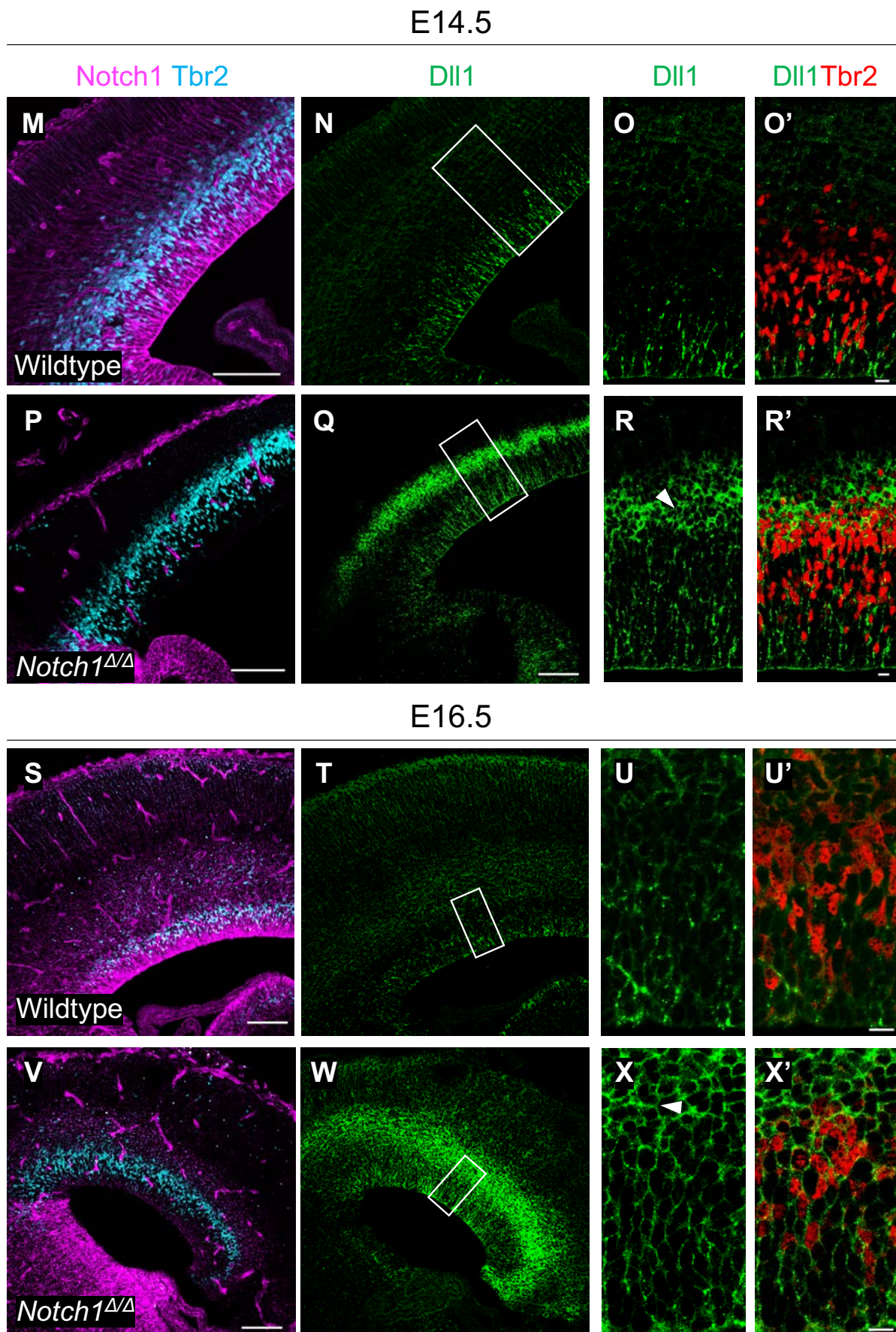


図 1 6 *Notch1*^{Δ/Δ}マウスでは Dll1 が細胞膜と思われる領域で連続的に分布する (続く)

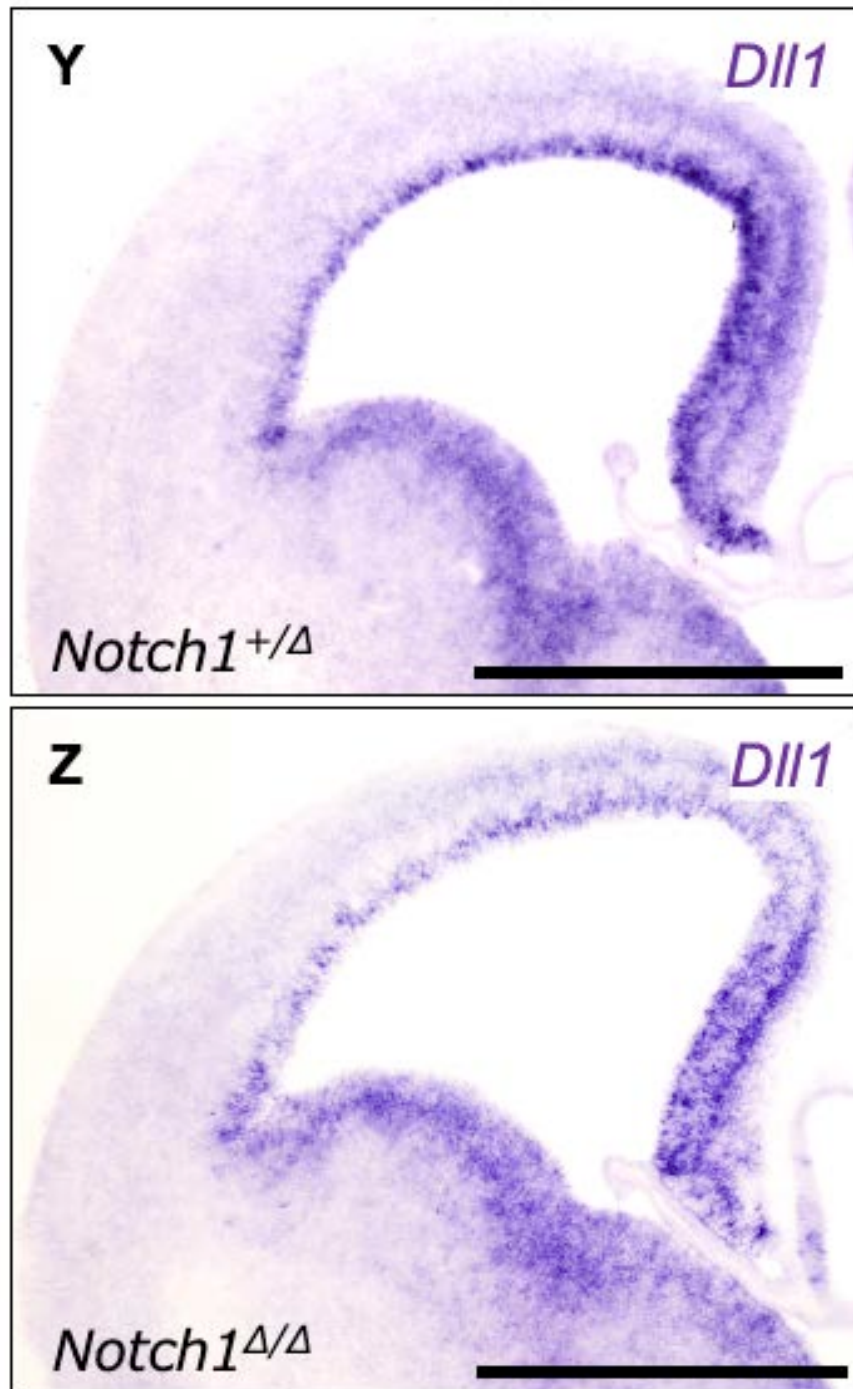


図 16 *Notch1*^{Δ/Δ}マウスでは *Dll1* が細胞膜と思われる領域で連続的に分布する (続き)
 (A-C', G-I', M-O', S-U') 野生型マウス, (D-F', J-L', P-R', V-X') *Notch1*^{Δ/Δ} マウス 大脳背側の免疫染色画像。Notch1 intracellular domain はマゼンタ、Tbr2 はシアンまたは赤、*Dll1* は緑で示した。
 (A-F') は E10.5, (G-L') は E11.5, (M-R', Y, Z) は E14.5, (S-X') は E16.5 のマウス大脳背側。スケールバーは A,D,G,J,M,P,Q,S,V は 100 μm, C',F',I',L',O',R',U',X' は 10 μm。
 E10.5 では *Dll1* が VZ 全体で、E11.5, E14.5, E16.5 では VZ より基底膜側の細胞で顕著に、*Dll1* が細胞膜と思われる領域で連続的に分布する (白矢頭)。
 (Y, Z) E14.5 の *Notch1*^{+/Δ} マウス (Y) と *Notch1*^{Δ/Δ} マウス (Z) の大脳背側における、*Dll1* mRNA の in situ hybridization 画像。*Notch1*^{Δ/Δ} マウスの VZ より基底膜側での *Dll1* mRNA の発現上昇は認められなかった。スケールバーは 1mm。

4) VZ より基底膜側に蓄積する Dll1 は Notch1 と *trans-interaction* することで消失する

次に、SVZ とそれより基底膜側の細胞群の細胞膜に表出する Dll1 が、シグナル伝達に寄与可能であるかを明らかにするために、隣接する細胞の Notch1、主に RGC の radial fiber に発現する Notch1 との間で相互作用が可能であるか否かを調べた。

E14.5 の *Notch1*^{Δ/Δ} マウスは、野生型 (図 17A, 16N) とは異なり、大脳背側の SVZ およびそれより基底膜側に位置する細胞群に Dll1 がすでに強く分布している (図 17B, 16Q)。E13.5 の *Notch1*^{Δ/Δ} マウスの大脳背側で、*Notch1* 発現ベクターを電気穿孔法により導入することで主に RGC が *Notch1* を発現させた場合 (図 17C, E-K)、その 1 日後には、RGC から生じた姉妹細胞 (*Notch1* を強く発現) で SVZ に到達するのは極一部であり、ほとんどの姉妹細胞は SVZ に到達していないと考えられる。つまり、その時点で SVZ およびそれより基底膜側の細胞と接触できるのは、*Notch1* を発現させた RGC がほとんどであるはずである。したがって、この実験条件で、SVZ およびその基底膜側の細胞群の Dll1 が消失した場合、RGC に強制発現した *Notch1* との *trans-endocytosis* によって Dll1 が分解されたと解釈される。これを検証するために、*Notch1* を電気穿孔法で E13.5 マウスの大脳背側に発現させると (図 17E-K)、*Notch1* が遺伝子導入された領域では、SVZ 周辺に存在していた Dll1 が劇的に減少した (図 17G, K)。このことから、SVZ およびその外側の細胞に蓄積していた Dll1 は、周囲の細胞の *Notch1* と *trans-interaction* による相互作用が可能であることが示された。

次に、*trans-activation* のみが可能な細胞における Dll1 の局在を調べることで、*Notch1*^{Δ/Δ} マウスの SVZ より基底膜側の細胞で Dll1 が細胞膜と思われる領域に蓄積する主因が、*trans-activation* の欠如、あるいは *cis-inhibition* の欠如のいずれであるかを調べた。図 17E-K の実験では、大脳背側の全ての細胞で *Notch1* を KO し、その内の一部の細胞に *Notch1* を強制発現した。その反対の状況、すなわち、極一部の RGC のみで *Notch1* を KO させた場合を作出した。これにより、それらの *Notch1* KO 細胞では、*cis-inhibition* に必要な *Notch1* が存在しない一方で、その細胞をとりまく周囲の細胞には、*trans-activation* に働く *Notch1* が豊富に存在する (図 17D, L, N)。 *Notch1* KO マウス大脳背側の SVZ およびその基底膜側の細胞では *trans-activation* と *cis-inhibition* のいずれも生じない状況とは異なり (図 17B)、一部の RGC でのみ *Notch1* を KO した細胞では、*cis-inhibition* が起きないので Dll1 が細胞膜に表出するはずであるが、周囲の細胞が発現する *Notch1* と *trans-interaction* を行うことができるので、*trans-endocytosis* を経て Dll1 が細胞質中に内在化されるはずである (図 17D)。この仮説が正しいかどうかを検証するため、*Notch1*^{flox/flox} マウスに少量の Cre を発現させることで、一部の細胞でのみ *Notch1* を KO した (図 17L-O)。そして、大脳背側 *Notch1* KO マウスでは、Dll1 が細胞膜と思われる領域に強く分布する SVZ およびその外側の領域に着目して、まばらに存在する *Notch1*^{Δ/Δ} 細胞の Dll1 の細胞内局在を観察したところ、Dll1 は

細胞質中に内在化され、細胞表面と思われる領域には分布を示さなかった(図 17N, 黄矢頭)。
すなわち、上述した仮説は妥当であり(図 17D)、周囲に相互作用可能な Notch1 が存在する場合には、VZ より基底膜側に存在する *Notch1* KO 細胞でも、DII1 は細胞膜に蓄積せず、細胞質中に内在化されることが示された。

これらの結果から、野生型マウスの SVZ より基底膜側の細胞膜と思われる領域で DII1 が検出されない理由は、DII1 が周囲の細胞の Notch1 を *trans*-endocytosis することで、DII1 提示細胞内に DII1 が取り込まれ、分解されているためである可能性が示唆された。

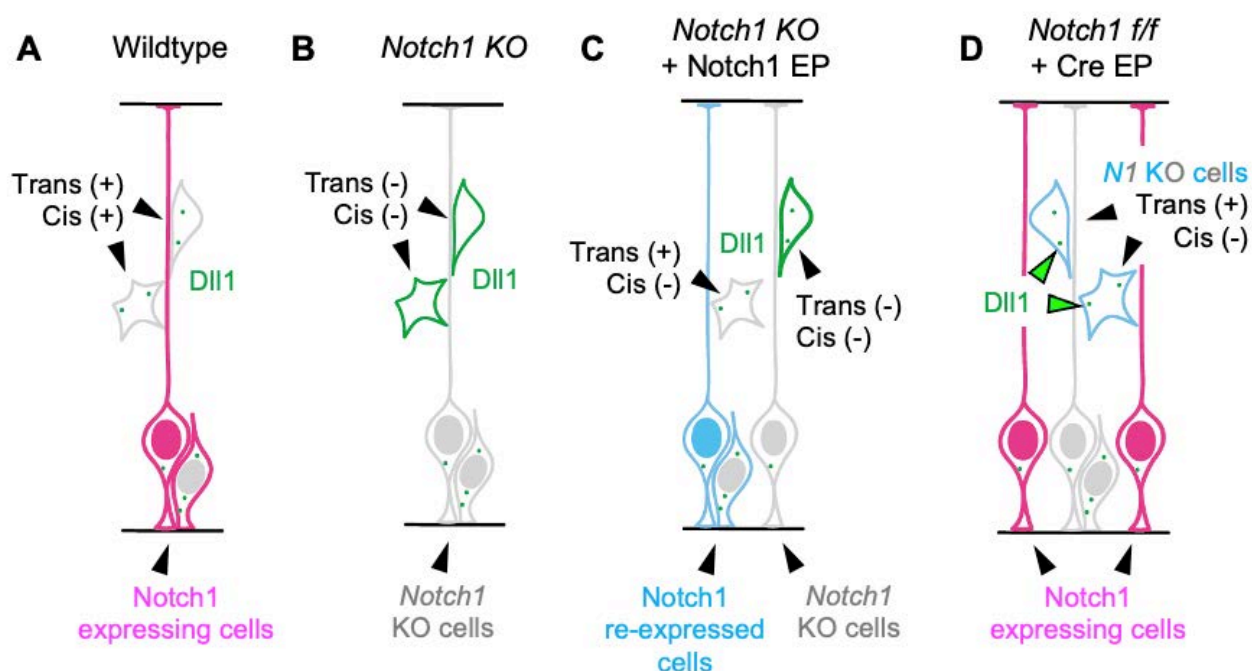


図 17 Notch1 と DII1 の *trans*-interaction が存在する場合は *Notch1* KO 細胞の細胞膜と思われる領域に DII1 が蓄積しない (続く)

Notch1^{ΔΔ}マウス
+ pCAG-memGFP-IRES2-Notch1

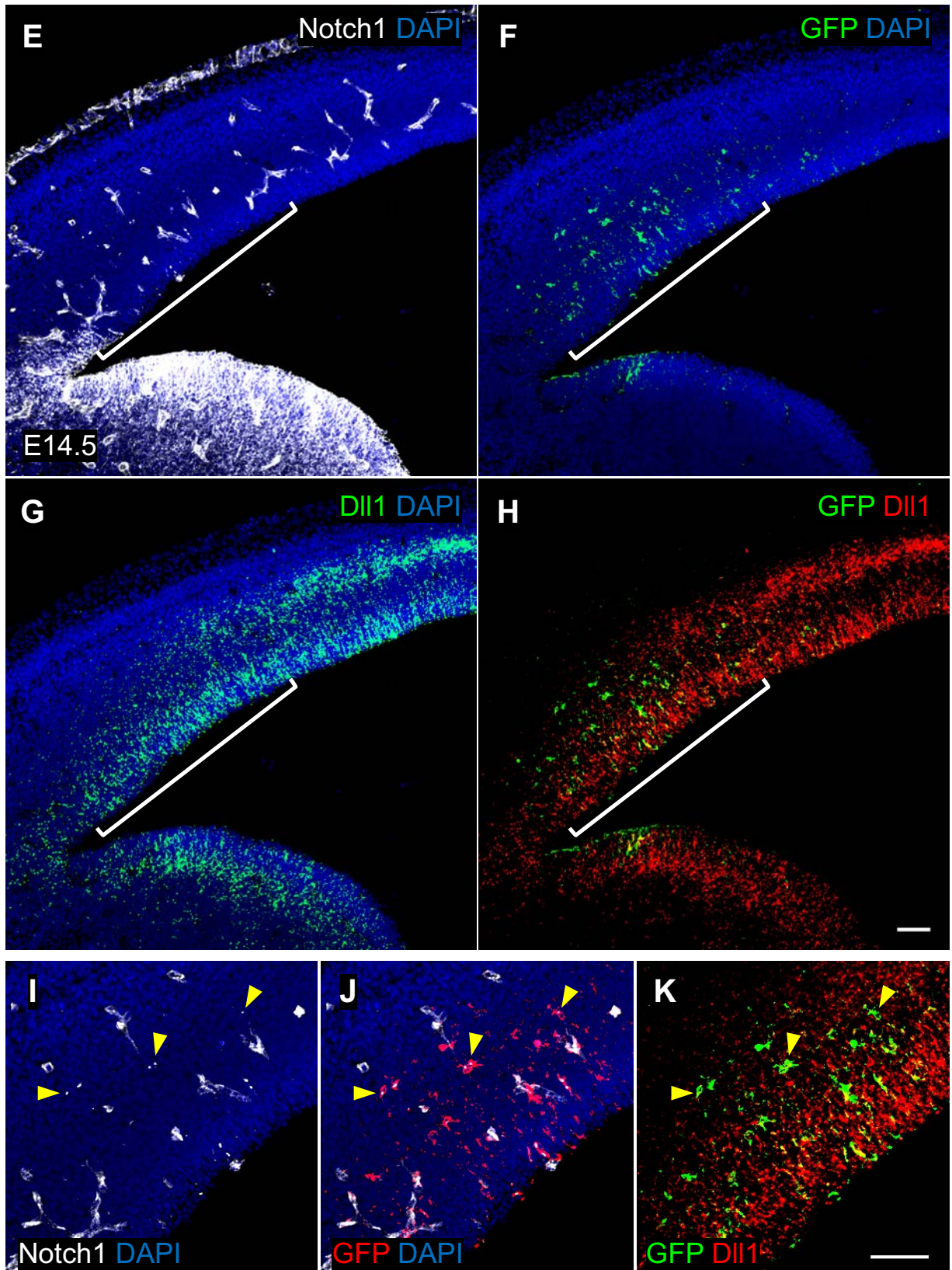


図 17 *Notch1* と *Dll1* の *trans-interaction* が存在する場合は *Notch1* KO 細胞の細胞膜と思われる領域に *Dll1* が蓄積しない (続く)

Notch1^{flx/flx}マウス
+ pCAG-Cre & pCAG-flox-memGFP

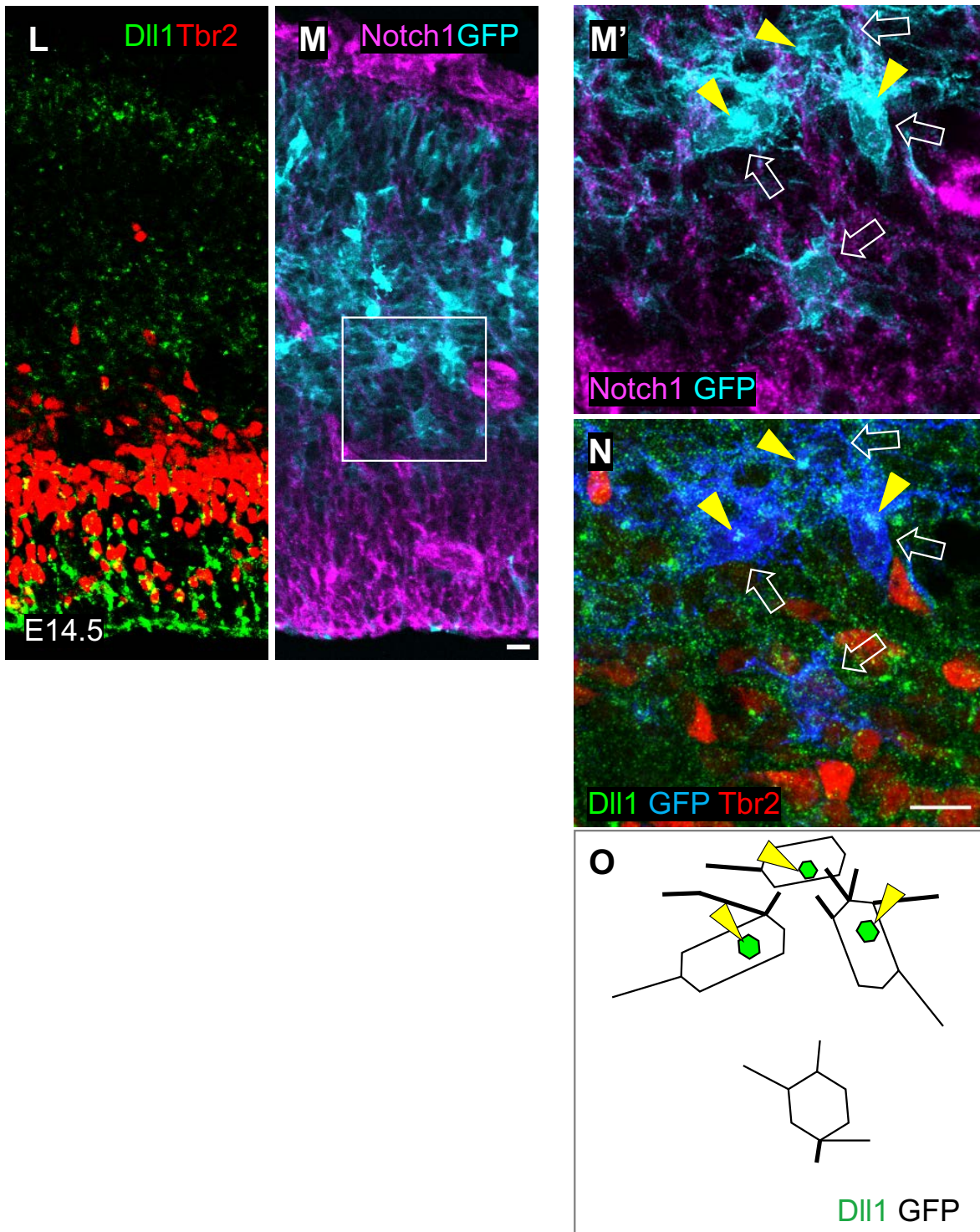


図 1 7 Notch1 と Dll1 の *trans-interaction* が存在する場合は *Notch1* KO 細胞の細胞膜と思われる領域に Dll1 が蓄積しない (続く)

図 17 Notch1 と Dll1 の *trans*-interaction が存在する場合は *Notch1* KO 細胞の細胞膜と思われる領域に Dll1 が蓄積しない (続き)

(A-D) Notch1-Dll1 の *trans* (異なる細胞間) または *cis* (同一の細胞内) での相互作用が存在するケースごとの Dll1 の細胞内分布の解釈を図示した。緑は Dll1、マゼンタは Notch1、シアンは Notch1 および膜移行型 GFP を外来性に発現させた細胞を意味する。

(A) 野生型マウスの VZ より基底膜側の細胞の Dll1 は、自身の Notch1 との *cis*-interaction と、周囲の radial fiber 上の Notch1 との *trans*-interaction が存在することで細胞質に内在化される (図 16. 野生型マウス参照)。

(B) *Notch1*^{Δ/Δ} マウスの VZ より基底膜側の細胞の Dll1 は、Notch1 との相互作用が *trans*, *cis* 共に存在しない場合に細胞質への内在化が阻害される (図 16. *Notch1*^{Δ/Δ} マウス参照)。

(C) *Notch1*^{Δ/Δ} マウスの VZ より基底膜側の細胞で Dll1 が析出するが、一部の RGC で Notch1 を外来的に発現させると、その細胞の radial fiber と接触可能な VZ 外の細胞は *trans*-interaction が可能なため Dll1 が細胞質に内在化される (A, B)。

(D) *Notch1* を一部の RGC で KO すると、その子孫細胞では *cis*-interaction が生じない一方で、周囲の野生型の RGC の Notch1 とは *trans*-interaction が可能なため、*Notch1* が KO された細胞 (シアン) でも Dll1 が細胞質に内在化される (C-E)。

(E-K) E13.5 の *Notch1*^{Δ/Δ} マウスの大脳背側に、Notch1 および GFP を発現するベクターを遺伝子導入した、1 日経過後の免疫染色画像 (E14.5)。白ブラケットで示した領域で外来遺伝子が発現した。(E, I) は NICD (白) と DAPI (青)、(F) は GFP (緑) と DAPI (青)、(G) は Dll1 (緑) と DAPI (青)、(H, K) は Dll1 (赤) と GFP (緑) のそれぞれ重ね合わせ画像。(I-K) 外来遺伝子が発現した領域の拡大画像。(J) は Notch1 (白) と GFP (赤) の重ね合わせ画像。Notch1 を外来性に発現させた細胞 (黄矢頭) の分布する領域では、VZ より基底膜側の Dll1 の蓄積が消失し、*Notch1*^{Δ/Δ} マウスの表現型がレスキューされた。スケールバーは 50 μm。

(L-O) E12.5 の *Notch1*^{fllox/fllox} マウスの大脳背側に Cre と Cre 依存的に GFP を発現させた、E14.5 時点の免疫染色画像。(L) は Dll1 (緑) と Tbr2 (赤)、(M, M') は Notch1 (マゼンタ) と GFP (水色) の重ね合わせ画像。(M', N) M の画像内の白四角で囲った領域の高倍率画像。(N) は Dll1 (緑) と GFP (青) と Tbr2 (赤) の重ね合わせ画像。スケールバーは 10 μm。

Notch1 が KO された細胞 (白矢印) では、Dll1 は主に細胞質にあり、かつ膜移行型 GFP とともに共局在することから小胞体と思われる構造内に存在する (黄矢頭)。スケールバーは 10 μm。

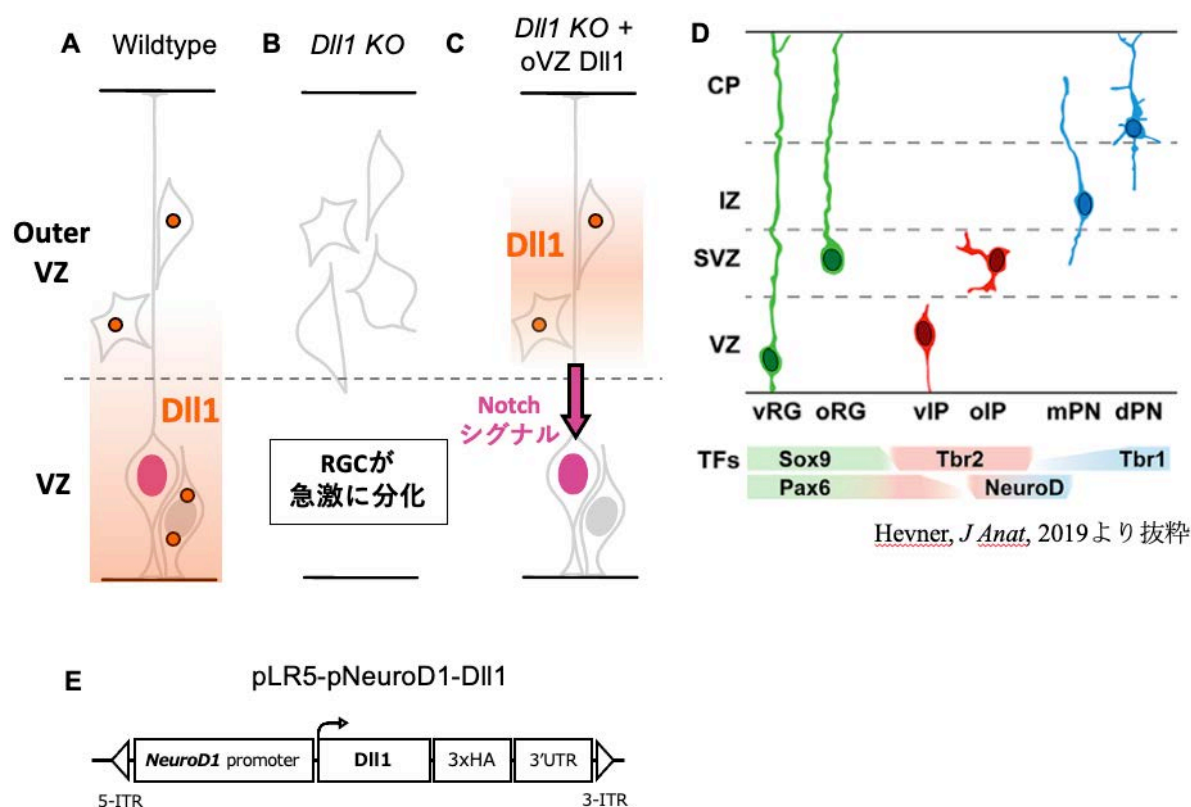
(O) N の画像における GFP 陽性細胞の形態と Dll1 の局在の模式図。膜移行型 GFP (黒) と Dll1 (緑) を示した。細胞質に内在化した Dll1 を黄矢頭で指した。

iv. VZ より基底膜側の Dll1 は RGC の未分化性を維持できる

これまでの結果から、SVZ および、SVZ の基底膜側の細胞が RGC との Notch シグナル伝達に寄与していることが示唆されたため、これらの細胞の Dll1 が実際に RGC の維持に十分なシグナル伝達が可能であるか否かを最後に検討した。

野生型マウスでは Dll1 タンパクが VZ 内側の細胞で発現して RGC が維持される一方 (図 18A)、*Dll1* KO マウスでは Notch シグナル活性が無いため RGC が急激に神経分化する (図 18B)。もし Dll1 を IPC で限局的に発現させた場合に、IPC が十分な Notch シグナルの活性を発揮できるなら、VZ 内側に *Dll1* 発現細胞が無くても RGC が維持されると考えた (図 18C)。

そこで、VZ より基底膜側で生じる Notch シグナルが RGC を維持できるか、その十分性を検証するために、IPC から migrating neuron の分化段階で発現する *NeuroD1* に着目し (Hevner, 2019; Hevner et al., 2006; Huang et al., 2000; A. Kawaguchi et al., 2008; Yokota et al., 2007) (図 18D)、*NeuroD1* promoter 制御下で *Dll1* を発現させる pNeuroD1-Dll1 発現ベクターを作成した (図 18E)。この *Dll1* 発現ベクターを *Dll1* KO マウスに導入することで、下記のレスキュー実験を行った。



Hevner, *J Anat*, 2019より抜粋

図 18 VZ より基底膜側での *Dll1* の発現が RGC の未分化性維持に寄与することを分析する実験スキーム

(A-C) *Dll1* の発現位置と RGC の維持の関係を調べる実験スキーム。Wildtype では *Dll1* が VZ 内側で強く発現してシグナル伝達が生じるが(A, オレンジ色の領域)、*Dll1* KO マウスではシグナル伝達が起こらないため全ての RGC が分化する(B)。一方、*Dll1* KO マウスの VZ より基底膜側で外来性に *Dll1* を発現させた時に(オレンジ色の領域)、VZ より基底膜側で生じる Notch シグナル伝達が RGC の維持に十分であれば、RGC が維持されるはずである(C)。(D) マウス大脳背側の細胞種ごとの形態・分布領域および発現する代表的な転写因子(TFs)。Hevner, *J Anat*, 2019 より抜粋した。IZ: intermediate zone, CP: cortical plate, vRG: ventricular radial glia, oRG: outer radial glia, vIP: ventricular intermediate neurogenic progenitor, oIP: outer intermediate neurogenic progenitor, mPN: migrating projection neuron, dPN: differentiating projection neuron.

(E) *Dll1* を VZ より基底膜側で発現させるための *Dll1* 発現ベクター。脳室面との接触をもたない IPC 以降で発現が開始する *NeuroD1* promoter によって、*Dll1* が VZ より基底膜側で発現する。Piggybac system によって *Dll1* の発現ベクターをゲノムに組み込み、細胞分裂によってベクター濃度が希釈される影響を軽減する。3'UTR: 3' untranslated region, ITR: inverted terminal repeat.

1) VZ より基底膜側の Dll1 によって神経発生前期の RGC が維持される

まず神経発生初期(E11.5 頃まで)に、IPC のみで *Dll1* を発現させた場合に RGC の未分化性が維持されるか否かを調べた。

そのために *Dll1^{flox/flox}* マウスと *Emx1-Cre^{KI/+}* マウスを掛け合わせて、大脳背側特異的に E9.5 頃から *Dll1* を KO するマウス(*Dll1^{flox/flox}; Emx1-Cre^{KI/+}*)を作出した。このマウスの E9.5 で片側の大脳背側半球に pNeuroD1-Dll1 発現ベクターを電気穿孔法により導入し、全胚培養によって 48 時間培養した(図 19A)。まず、*Emx1-Cre* が発現しない大脳腹側領域では、*Dll1* が通常通り発現するため Sox2 陽性細胞が維持された一方で、*Dll1* が KO された大脳背側半球では上皮構造が崩壊して脳室側に大きくせりだし、この領域では Sox2 を発現する RGC がほぼ消滅して、RGC から生じた Tbr2 を発現する多数の細胞が不定形に広がった (図 19B'-D')。次に、pNeuroD1-Dll1 により *Dll1* を IPC でのみ発現させた大脳背側半球では、*Dll1* が VZ ではほぼ確認されないものの、Sox2 陽性の RGC が維持され、RGC で構成される VZ と、Tbr2 陽性の IPC で構成される SVZ が、明瞭に区別できる組織構造を維持した(図 19B''-D'')。このことは VZ より基底膜側で IPC の供給する Notch シグナルが、RGC を維持するのに十分であることを示唆した。

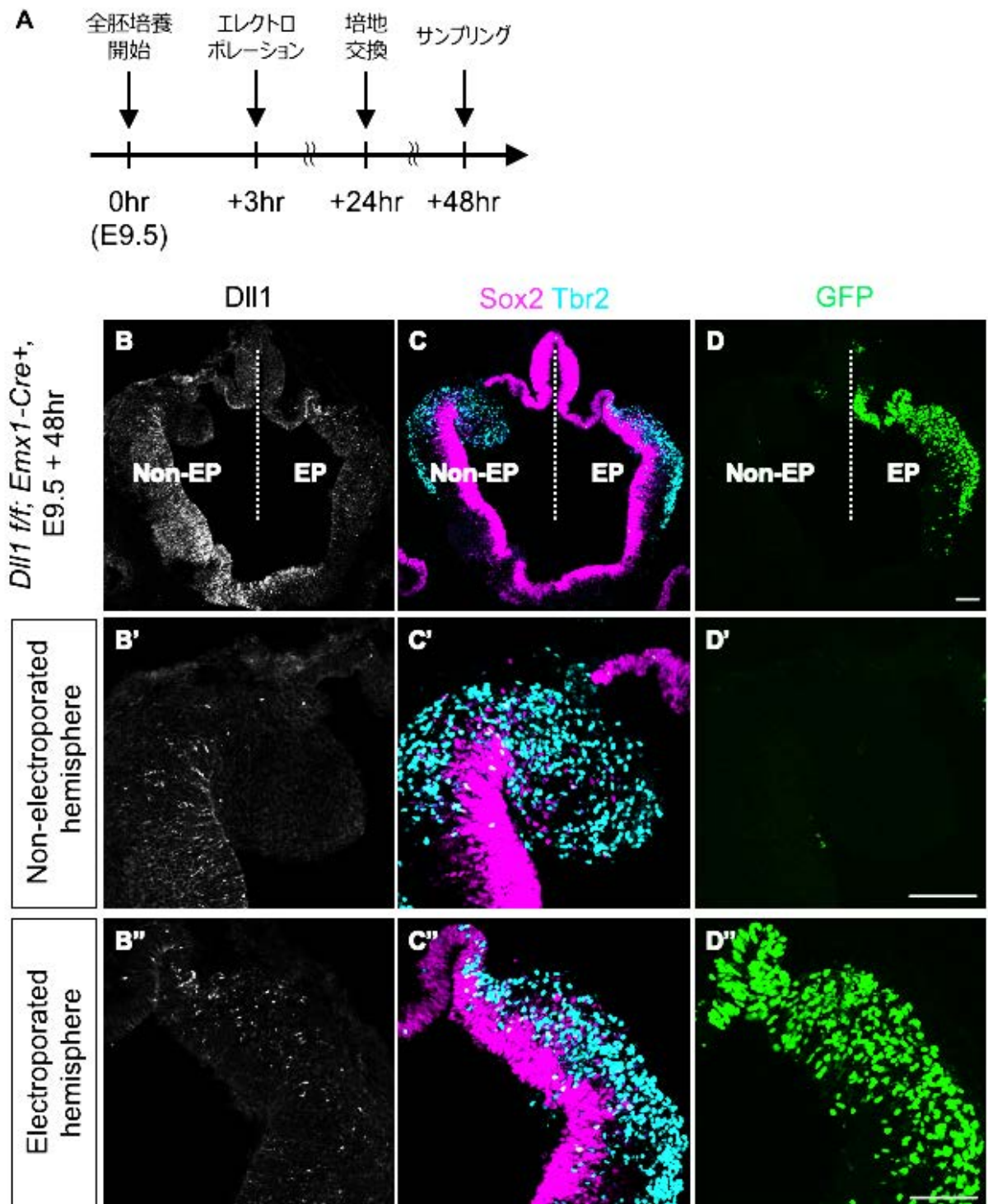


図1-9 神経発生前期においてVZより基底膜側でのDll1の発現によりRGCが維持される
 (A) Dll1 KOマウスを全胚培養によってE9.5から48時間培養する実験スキーム。培養開始後2時間で右半球にpNeuroD1-Dll1発現ベクターを電気穿孔法により遺伝子導入した。24時間後に培地を交換し、48時間後にサンプルングした。
 (B-D'') E9.5から2日間全胚培養したDll1 KO ($Dll1^{f/f}; Emx1-Cre^{KI/+}$)マウスの、(B, B', B'')Dll1, (C, C', C'') Sox2 (マゼンタ) と Tbr2 (シアン), (D, D', D'') GFPの免疫染色画像。B', C', D'はEmx1-Creを用いてDll1をKOした半球(Non-electroporated hemisphere: Non-EP)では、Emx1 promoterの発現する大脳背側でDll1がKOされる。B'', C'', D''は内在性のDll1をKOし、電気穿孔法によりDll1をVZより基底膜側で発現させた半球(Electroporated hemisphere: EP)。

電気穿孔法により遺伝子導入されなかった側の半球(Non-EP)において、*Emx1-Cre* が発現しない大脳腹側領域では、*Dll1* が通常通り発現するため Sox2 陽性細胞が残存した一方、大脳背側の Sox2 陽性の細胞はほぼ消失して脳室面が崩壊し、Sox2 陽性細胞より生じた Tbr2 が神経管の両側に不定形に広がった(C')。一方で *Dll1* を VZ より基底膜側で発現させた半球(EP)では VZ の Sox2 陽性細胞層と VZ より基底膜側の Tbr2 陽性細胞層がほぼ正常に形成された(C'')。スケールバーは 100 μ m。

2) VZ より基底膜側の *Dll1* によって神経発生中期から後期の RGC が維持される

前項で観察した E11.5 までのステージでは、初期の IPC が apical process を持つ場合も多い。そのためより後期のステージで、apical process を持たない SVZ より基底膜側で *Dll1* を発現させた場合にも、RGC の未分化性が維持されるか否かを次に確認した。

神経発生中期以降 (E12.5 以降) に *Dll1* がノックアウトされるように、Nestin 陽性の RGC で Tamoxifen 依存的に Cre を発現する *Nestin-CreERT2* マウスを *Dll1^{lox/lox}* マウスと掛け合わせ、*Dll1* のコンディショナル KO マウスを作出した (*Dll1^{lox/lox}; Nestin-CreERT2*)。このマウスの E12.5 で、片側の大脳背側半球に pNeuroD1-*Dll1* 発現ベクターを電気穿孔法により導入し、同時に Tamoxifen の腹腔内投与により内在性の *Dll1* をノックアウトした。すべての RGC で *Dll1* のノックアウトが確実になされるよう、E13.5, E14.5 でも継続的に Tamoxifen を腹腔内投与し、E15.5 で表現型を解析した(図 20A)。

まず、遺伝子導入された細胞の同定用のコントロールベクター (pLR5-NeuroD1-RFP-NLS) のみを導入したマウスでは、電気穿孔法を未実施の大脳背側半球(contralateral hemisphere, 図 20B)と、実施した大脳背側半球(Electroporated hemisphere, 図 20C)の両方で Pax6 陽性の RGC の大部分が消失し、維持された Pax6 陽性の RGC の単位面積あたりの数に差は見られなかった(図 20F, control)。

次に、pNeuroD1-*Dll1* 発現ベクターを遺伝子導入したマウスでは、電気穿孔法を未実施の大脳背側半球では *Dll1* の KO によって大部分の Pax6 陽性細胞が消失したものの(図 20D)、実施した大脳背側半球ではより多くの Pax6 陽性細胞が維持された(図 20E, *Dll1*-EP, * $p<0.018$)。Tamoxifen 腹腔内投与による *Dll1* のノックアウト効率は各個体間差が生じるため、個体ごとに contralateral hemisphere の Pax6 陽性細胞数で electroporated hemisphere の Pax6 陽性細胞数を除すことで Tamoxifen 濃度による影響を標準化した比をとり、この比をコントロールベクターのみの群と pNeuroD1-*Dll1* 発現ベクターを導入した群とで比較した。その結果、*Dll1* を発現させた群で有意に Pax6 陽性の細胞が維持された (図 20G, * $p<0.044$)。

これらのことから、VZ より基底膜側に存在する IPC が発現する *Dll1* は、RGC を維持するために十分であることが示唆された。

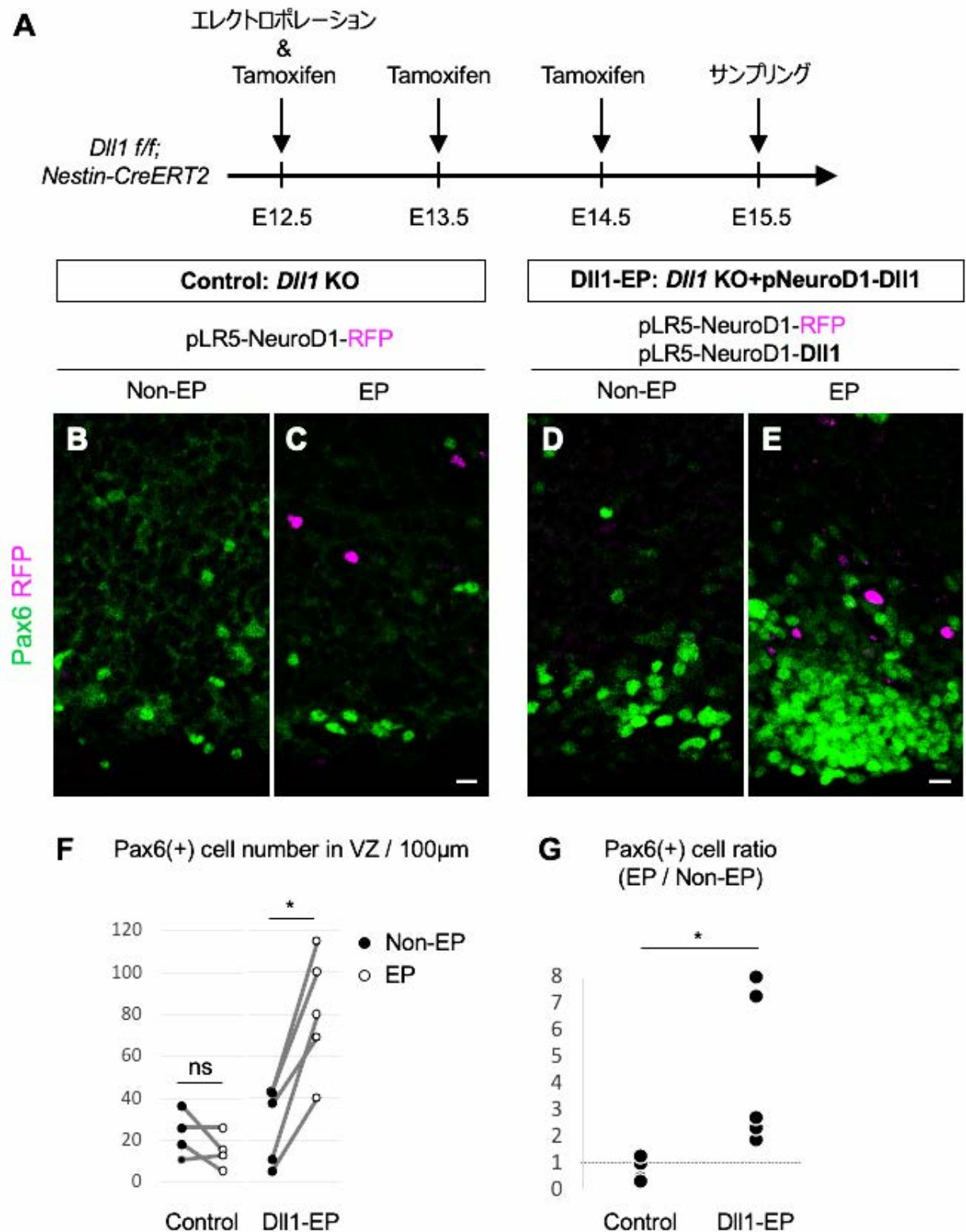


図 20 神経発生中期において VZ より基底膜側での *Dll1* の発現により RGC が維持される (A) Tamoxifen 依存的に活性化する *Nestin-CreERT2* を用いて、*Dll1* を KO するマウス (*Dll1*^{f/f}; *Nestin-CreERT2*) を使った実験スキーム。E12.5 で片半球に電気穿孔法を施し、E12.5, E13.5, E14.5 で妊娠マウスの腹腔内に Tamoxifen 2mg ずつを投与して *Dll1* をロックアウトして E15.5 でサンプリングした。

(B, C) *Dll1* をノックアウトしたマウスにおける電気穿孔法実施のコントロール実験。分化した細胞で発現する *NeuroD1* promoter で RFP (赤色蛍光タンパク) を発現した半球では、VZ より基底膜側に RFP を発現する細胞が散在する(C)。電気穿孔法を実施した半球(以下、EP とする)と(C)、その反対側の電気穿孔法を実施していない半球(Non-electroporated hemisphere. 以下、Non-EP とする) (B)共に、*Dll1* の KO により Pax6 陽性の RGC が VZ にほぼ存在しない。スケールバーは 10 μ m。

(D, E) *Dll1* をノックアウトしたマウスに、*NeuroD1* promoter を用いて *Dll1* transgene を VZ より基底膜側で発現させた (*Dll1*-EP)。電気穿孔法を実施した半球(E)では VZ より基底膜側に核移行型 RFP を発現する細胞が散在し、VZ には Pax6 陽性の細胞が多数存在する一方、その反対半球 (D)にはほとんど存在しない。スケールバーは 10 μ m。

(F) 脳室面から 50 μ m 以内に存在する Pax6 陽性の細胞数 (個/100 μ m 幅)。白丸は電気穿孔法を実施した半球(EP)、黒丸はその反対半球(Non-EP)の Pax6 陽性の細胞数で、同一の脳のデータを線で結んだ。左側が *Dll1* KO マウスで(control)、右側が *Dll1* KO マウスに *Dll1* transgene を VZ より基底膜側で発現させたサンプル (*Dll1*-EP)。Control の Non-EP は 23.0 $\pm$ 11.3(平均値 $\pm$ s.d., n=4), EP は 14.8 $\pm$ 8.7 (n=4)。P value = 0.29 (Welch's t-test)。ns は not-significant を示す。*Dll1*-EP 実験の Non-EP は 29.3 $\pm$ 18.3(n=5), EP は 78.9 $\pm$ 29.0(n=5)。P value = 0.018 (Welch's t-test) で、*Dll1* を発現させた実験の control では Non-EP 側の *Dll1* の発現により有意に Pax6 陽性細胞が回復した。

(G) F で計数した、電気穿孔法を実施した半球(EP)とその反対半球(Non-EP)の Pax6 陽性細胞数の比(EP/Non-EP)をプロットした。Control は 0.73 $\pm$ 0.47(平均値 $\pm$ s.d., n=4), *Dll1*-EP は 4.44 $\pm$ 2.95(s.d., n=5)。P value = 0.044 (Student's t-test) で、有意に Pax6 陽性細胞がレスキューされた。

8. 考察

i. 本研究が提唱する RGC の姉妹細胞の運命決定モデル

本研究では、trans-interaction 可能な Dll1 が VZ より基底膜側に存在し、かつ活性化型 NICD が radial fiber に分布することを示し、さらに VZ より基底膜側の Notch シグナルによって RGC の未分化性が維持できることが示唆された。これらの結果から、VZ より基底膜側の IPC の発現する Dll1 が、radial fiber 上の Notch1 を活性化するという可能性が示唆された。このことから本研究では、RGC の姉妹細胞の内、Notch シグナルのアンテナの役割を果たす radial fiber を受け継いだ娘細胞が、RGC として未分化性を維持するというモデルを提唱する (図 21)。

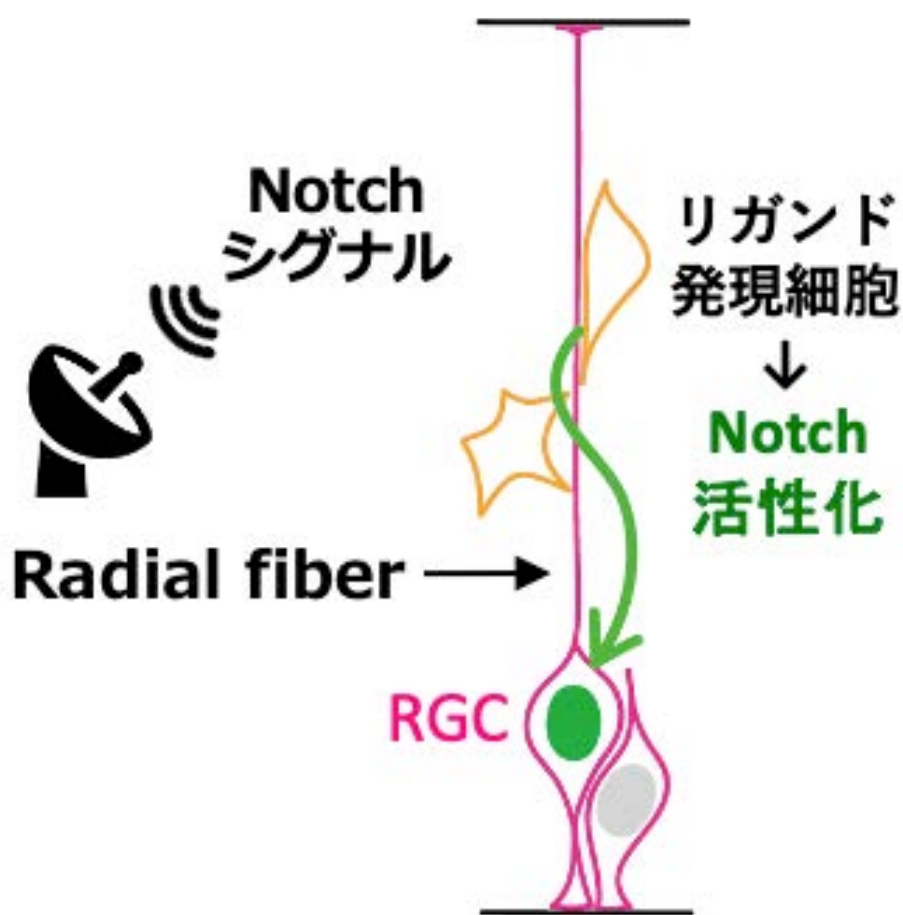


図 2 1 Radial fiber が Notch シグナルを受容するアンテナとして機能する

RGC が非対称分裂後に、radial fiber を受け継いだ娘細胞では、VZ より基底膜側に分布するリガンド発現細胞が、RF の Notch を活性化することで未分化性が維持される。一方、Notch シグナルを受容するためのアンテナを持たない娘細胞では Notch が活性化されない。

ii. 活性化型 NICD の起源部位

本研究では活性化型 NICD が RGC の核だけでなく、radial fiber にも豊富に存在することを初めて明らかにした。一方で、Radial fiber が実質的な Notch シグナルの受容領域であることを示すためには、radial fiber で生成された活性化型 NICD の核移行を、直接的あるいは間接的な方法で検証する必要がある。

その方法の 1 つとして、Photoconvertible な蛍光タンパクで NICD を標識し、radial fiber に由来する NICD が核移行することを検証する方法が挙げられる。先行研究では *in vitro* でのロゼット型培養環境で、apical 側に存在した NICD を photoconversion し、これが核移行することが観察されている(Hatakeyama et al., 2014)。*in vitro* では SVZ が十分に形成されないため、RGC の構造や周辺細胞の分布を *in vivo* の状態に近づけて確認するためには、大脳背側の組織中で同様の実験を実施する必要がある。

この際に注意しなければならない点としては、NICD を標識するために蛍光タンパクを融合することが、NICD の転写因子としての機能へ影響を及ぼす可能性である。他のタンパクと複合体を形成する NICD は、複数のドメイン・モチーフから構成されており、単純なカルボキシ末端への蛍光タンパクの融合では、NICD の機能が阻害されることが確認されている（当研究室の未発表データ）。そのため、NICD の転写制御因子としての機能を維持したまま蛍光標識する方法を開発する必要がある。

また、本研究では ADAM-10 を阻害して Notch の活性化を停止させたのちに、いずれの領域から活性化型 NICD の産生が開始するかの検証も試みた。検証の中では 1 例だけ、VZ より基底膜側でのみ活性化型 NICD が確認された大脳スライスがあったがその再現性は得られておらず、そのほかの検体は、活性化型 NICD が RGC に全く存在しないか、VZ の RGC の核と radial fiber に回復していたかのいずれかであった。したがって、免疫染色によるスナップショット的なアプローチによって、核移行前の活性化型 NICD の起源を明らかにすることは難しいと考えられる。その理由としては 2 点考えられ、1 点目は大脳背側組織スライスからの ADAM-10 阻害剤の洗い流しが十分になされないと活性化型 NICD の回復が見られない一方で、Notch2 ではリガンドによる刺激から活性化型 NICD の核移行までが 15 分以内に完了することからも(Shimizu et al., 2000)、洗い出しに時間を要した場合は VZ の細胞核での活性化型 NICD の回復が完了してしまうと考えられること。2 点目は、一定の免疫染色条件が整わねば活性化型 NICD の核以外での分布は観察が難しいことである。活性化型 NICD は、微小管を介した輸送などにより高速で核移行している可能性が考えられるが、その輸送機構は不明であるため、上述したように蛍光標識した NICD をトラッキングすることが、現在考える有効な手段の 1 つであると考ええる。

一方で、VZ 内側の細胞膜に Dll1 が存在することを示した報告もあることから (Hatakeyama et al., 2014)、VZ 内側でも一定量のシグナル伝達は存在していることが想定される。今後の研究では、VZ 内外における Notch シグナルの量比を比較することができれば、RGC の姉妹細胞で Notch1 の活性化レベルが非対称化することへの寄与率を示すことができる可能性がある。

iii. マウス大脳背側の領域ごとのリガンドの細胞内分布

1) VZ 内側における Dll1 の細胞内局在

Notch1 extracellular domain (NECD) と Dll1 の共局在は、リガンド提示細胞による *trans*-endocytosis の結果としての degradation (Andersson et al., 2011; Nichols et al., 2007)、またはゴルジ体などにおける *cis*-inhibition による degradation の 2 つの可能性が考えられる (Geffers et al., 2007; Sakamoto et al., 2002; Sprinzak et al., 2010)。本研究では、VZ 内側で観察される Dll1 の一部が、Notch1 intracellular domain (NICD) と Lamp1 と共局在することを示した (図 14)。これは Dll1 との結合ドメインである NECD を含む Notch1 全長を内包していると考えられ、*cis*-inhibition 後に分解系へと移行した Notch-Delta の結合産物である可能性が考えられる。このことは、VZ 内側で分化初期の細胞が発現する Dll1 は、同一細胞内の Notch1/2 による *cis*-inhibition により細胞質中に内在化されやすく、シグナル伝達に寄与しづらい可能性を示唆した。

今後は VZ および SVZ に存在する各種細胞が発現する Dll1 が、*trans*-activation に寄与する状態にあるか、*cis*-inhibition により内在化され分解系に移行しているかを明らかにするために、全体の Dll1 の内、ゴルジ体、小胞体、各種エンドソームなどに分布する Dll1 の割合を分析する必要がある。先行研究では、mRNA レベルでは RGC も少量の *Dll1* を発現しているが (A. Kawaguchi et al., 2008)、タンパクレベルでは Tbr2 陽性の IPC の apical process に多数の Dll1 が存在することが報告されている (Nelson et al., 2013)。そのため本研究で観察した VZ 内側の Dll1 も、主に IPC の apical process が所持するものと推測したが、今後は RGC または分化にコミットした細胞のうち、*trans*-activation 可能な Dll1 を細胞膜に提示している細胞と、*cis*-inhibition により大部分の Dll1 が内在化されている細胞の種類や割合を分析する必要がある。

その一方で、Dll1 が AJ の近傍の細胞膜に分布することが電子顕微鏡による観察で報告されている (Hatakeyama et al., 2014)。今後の研究の中では、1 つの細胞内で発現する Dll1 タンパクの全体量に占める、*trans*-activation 可能な細胞膜の Dll1 と、*cis*-inhibition により細胞質中に内在化されている Dll1 の割合を、非対称分裂後の経時的な分化軸の中で解析するこ

とで、組織中で Dll1 を発現する細胞のうち、いずれの細胞が実際にシグナル伝達に寄与する細胞であるかを明らかにするヒントになると考える。

2) VZ より基底膜側における Dll1 の細胞膜上の分布

Notch シグナルの提供細胞と受容細胞は、細胞自身の持つ Notch/Delta の存在比によって明確に区分される(Bray, 2016; Sprinzak et al., 2010)。分化にコミットした細胞が継続的に Delta を発現し、自身の持つ Notch の大半を *cis*-inhibition により阻害した結果として、シグナル提供細胞としての役割を果たすと考えられる。本研究では *Notch1/2* KO マウスで、Dll1 が細胞膜と思われる領域に連続的に分布することを確認した。今後これが細胞膜に表出した Dll1 であるか否かを明らかにするためには、 β -catenin などの細胞膜マーカーとの共局在性を確認する他、エンドサイトーシスを一過性に阻害した大脳スライスに蛍光標識した Dll1 抗体を暴露させることで、Dll1 の全タンパクのうち、細胞表面に存在する Dll1 の割合を分析する必要がある。今後これらの追加分析を進めることで、RGC の非対称分裂後に分化にコミットした娘細胞において、Dll1 の細胞膜への表出効率が高まるタイミングが、Dll1 が同一細胞内の Notch1/2 による *cis*-inhibition から逃れ、IPC として SVZ に達した以降である可能性を検証する。

図 17E-K の実験結果から、*Notch1* を KO した IPC では、周囲に Notch1 が存在する場合に Dll1 が細胞膜に蓄積しないことが示唆され、Dll1 が細胞膜に観察されづらい理由は、周囲の Notch1 との *trans*-interaction が存在するためであると推論される。ただし図 17 L-O の実験では、transgene の導入による Cre の発現後、*Notch1* が KO されて細胞内の Notch1 タンパク量がゼロとなるまでの間に、KO 後に残存していた Notch1 による *cis*-inhibition の結果として Dll1 が蓄積していない可能性も考えられる。そのため *cis*-inhibition による影響を確実に排したエビデンスの構築のためには、速やかにターゲットタンパクを分解できる発色団支援光不活性化(Chromophore-assisted light inactivation)などを用いて(Jay, 1988; Takemoto et al., 2013)、分裂直後の娘細胞で速やかに Notch1 タンパクを分解させた場合にも、IPC で Dll1 の膜表出が見られないことを確認する方法が 1 つ考えられる。

図 20 で *Dll1* KO マウスに *Dll1* を外来性に発現させた IPC の細胞数は、SVZ に存在する IPC の細胞数と比較して明らかに少数であるにもかかわらず、VZ で一定数の RGC が維持された。このことは SVZ に存在する IPC が、数細胞分の距離を隔てた位置にある radial fiber に接触して、広範囲の RGC に Notch シグナルを提供できることを示唆している。すなわち、RGC の非対称分裂で radial fiber を受け継いだ娘細胞は、SVZ に存在する多数の IPC から Notch シグナルを受容できることで、未分化性を維持できることを示唆する。

図 20 の結果で注意せねばならない点は、*Dll1* KO マウスに外来性に *Dll1* を発現させた場合にも組織構造がやや異常となっており、VZ より基底側でのみ発現すべき *Dll1* が、VZ でも観察される領域が散見された。これは外来性の *Dll1* が RGC の維持に寄与する前に Tamoxifen による *Dll1* の KO が誘導され、RGC の急激な分化が始まったためである可能性が考えられる。今後、*Dll1* の発現領域を限定してより精度の高い実験系で分析するためには、例えば外来性の *Dll1* の発現を E11.5 から開始し、Tamoxifen による *Dll1* の KO は、外来性の *Dll1* を発現する IPC が SVZ に到達した後の E12.5 頃から開始するなどの工夫が必要である。加えて、外来性に発現させた *Dll1* が、IPC に内在性に存在する *Dll1* より過剰量が発現し、過大なシグナル活性を発揮している可能性も考えられる。そのため *NeuroD1* promoter と内在性の *Dll1* promoter の発現レベルを比較するほか、*Dll1* KO マウスの内在性の *Dll1* promoter を *NeuroD1* promoter に置換した場合にも、RGC が維持されるか否かを確認する必要がある。

iv. VZ より基底膜側での Notch シグナル伝達の必要性の検討

本研究では、RGC の未分化性維持に対して、IPC が発現する *Dll1* の十分性が示唆された (図 19,20)。一方で、VZ より基底膜側で生じる Notch シグナルによる RGC の未分化性維持に対する必要性を検証するためには、Radial fiber における Notch シグナル伝達のみを阻害したときに、RGC の未分化性がどの程度影響を受けるかを調べる必要がある。

そのための方法としては、発色団支援光不活性化(Chromophore-assisted light inactivation) などを用いて IPC 特異的に *Dll1* を分解できる変異マウスを作出し(Jay, 1988; Takemoto et al., 2013)、IPC 特異的に *Dll1* を分解した場合の RGC の未分化性維持への影響や、RGC の姉妹細胞の運命決定がランダム化されるのかを調べる方法が考えられる。

v. 姉妹細胞間でシグナル活性を非対称化するそのほかの仕組み

本研究では RGC が自身の姉妹細胞以外の細胞から Notch シグナルを受容することで、未分化性が維持されるという仮説を支持した。一方で、RGC の非対称分裂により生まれた姉妹細胞間で、radial fiber の有無という形態の違いに依存して運命決定される仕組みとして、下記のような可能性も考えられる。

1) Notch 関連因子の非対称分配

姉妹細胞のうち分化する運命の細胞へ *Dll1*, *Mib1*, *Numb* などの Notch 関連因子が非対称に分配されることで、細胞分裂直後の初期状態で Notch の活性に姉妹細胞間で差が生じ

ることが、非対称分裂の仕組みであるという説も多く報告されてきた(Alexandre et al., 2010; Dong et al., 2012; Kawaguchi et al., 2013; Rhyu et al., 1994; Shen et al., 2002; Shen and Temple, 2002)。ゼブラフィッシュの神経前駆細胞の非対称分裂において、蛍光標識した Mind-bomb が分化する運命の細胞へ非対称に分配されること、加えて極性因子 Par3 の阻害により、Mind-bomb が等分配されて細胞運命も対称となることが知られている(Dong et al., 2012; Kressmann et al., 2015)。

特に Mib1 については、ニワトリの中心体のサテライトタンパクと動態を共にするため、姉妹細胞における新旧中心体の非対称分配との相関が強く示唆されている(Tozer et al., 2017)。また、マウス大脳背側の VZ より基底膜側に存在する outer RGC では、姉妹細胞の両方の Mib-1 の活性を阻害すると、outer RGC が未分化性を維持できなくなることが報告されている(Shitamukai et al., 2011)。これは姉妹細胞間、つまり同一クローン内で生じる Notch シグナル伝達が、一方の娘細胞の未分化性に寄与するという仮説を支持する。一方で、ニワトリの Mib1 は Dll1 の endocytosis を促進することで、同一細胞の細胞膜上の Notch を Dll1 が cis-inhibition できなくなる結果、Mib1 発現細胞が Notch シグナルを受容できる状態になるという報告もある(Baek et al., 2018)。つまりマウス大脳背側の outer RGC の持つ Mib1 活性が、未分化性維持のために必要である可能性を示唆する。したがって、マウス大脳背側における RGC の未分化性維持が、周辺のリガンド提供細胞から受け取る Notch シグナルに依存するのか、あるいは姉妹細胞から受け取る Notch シグナルに依存するのかを今後明らかにするためには、分化する娘細胞でのみ Mib1 の活性を阻害した場合に、radial fiber を持つ娘細胞の未分化性にどのような影響が生じるのかを確認する必要がある。

2) 姉妹細胞間の Notch と Delta の存在量の違い

VZ 内側に存在する細胞は、母細胞の発現する Notch タンパクをその細胞表面積に応じて受け継ぐ場合には、RF を持たない娘細胞に比べ、RF を受け継いだ娘細胞はその表面積の分だけ多くの Notch を持つ可能性がある。また、Notch シグナルの受容量はリガンド発現細胞との接触表面積に比例する(Shaya et al., 2017)。つまり、RGC の姉妹細胞間は分裂直後の初期状態で Notch の所持量が異なり、細胞膜表面に存在する Notch タンパクの存在量にしたがって運命決定される可能性がある。この可能性を検証するためには、Notch1 を過剰発現させた場合に RF を持たない娘細胞が未分化性を維持できるかを分析する方法が考えられる。これまでに試験的に実施した実験からは、Notch1 を過剰発現させた大脳背側では、コントロール群と比べてほぼ同数の Tbr2 陽性細胞が存在していた。したがって、radial fiber を受け継いだ娘細胞はもう一方の娘細胞と比較して初期状態での Notch のタンパク量の多いが、それだけではなく、SVZ 周辺のリガンド発現細胞との接触面積の違いが、RGC の非対称分裂に

より生まれた姉妹細胞間で、radial fiber の有無という形態の違いに依存して運命決定される仕組みの背景にあると考えられる。

vi. VZ 内側での Notch と Delta の相互作用

1) Notch と Delta を共発現する細胞同士による Notch の相互活性化

活性化型 NICD は分裂期開始前に CDK1/2 依存的に分解されるため (Carrieri et al., 2019)、RGC とその娘細胞は初期状態として *Dll1* を発現しやすい状態にある。また、神経発生初期の脳では、神経幹細胞内で *Hes1* の発現の振動と同期してその下流の *Dll1* が周期的に振動して発現しており (Shimojo et al., 2008)、神経幹細胞同士における Notch シグナル伝達 (**mutual-activation**, 相互活性化) が積極的に行われていることが知られている (Kageyama et al., 2008)。また、神経産生期の RGC でも同様に *Hes1* が振動していることから (Imayoshi et al., 2013)、一定の割合で *Dll1* が振動してタンパクが発現し、**mutual activation** が起きていると考えることが妥当である。

神経産生期には、神経幹細胞の姉妹細胞の RF の有無という、特徴的な細胞形態の違いに依存して非対称な運命決定がなされることから、神経産生期には上述の **mutual-activation** に加えて、IPC からの RF を介した Notch シグナルの入力が非対称な Notch 活性化に寄与している可能性が高い。つまり、RF を受け継いだ娘細胞が IPC から優先的に Notch シグナルを受容した場合、RF を受け継がなかった娘細胞は側方抑制を受けずにシグナル提供細胞へと分化しやすくなる結果、細胞形態に依存した Notch に非対称な活性化が成立することが推定される。本研究では今後、VZ における **mutual-activation** による Notch シグナルと、RF を介して VZ より基底膜側から伝達される Notch シグナルについて、RGC の姉妹細胞における非対称な Notch の活性化へのそれぞれの寄与度を分析する方法を検討していきたい。

また、E14 の RGC の集団の一部に *Dll1* を発現する細胞が存在することが単細胞トランスクリプトームから明らかにされており (A. Kawaguchi et al., 2008)、VZ 内側の細胞における Notch シグナル受容細胞と伝達細胞の内訳の経時的な変化を明らかにすることも興味深い課題の 1 つである。本研究では第一部で単細胞トランスクリプトームを実施しているが (図 9B-E)、今後の追加分析の中で、*Notch1/2* を発現する細胞と *Dll1* を発現する細胞の重複割合や、共発現する細胞内での互いの発現レベルの経時的な変化の有無を分析することで、発生ステージの進行に伴って、集団を構成する各種細胞内における主な Notch-Delta の相互作用の変遷を明らかにすることにつながると思う。これらの情報は、VZ における **cis-inhibition** や RGC 同士の **mutual-activation** の程度を明らかにすることへも貢献すると思う。

2) Cis-inhibition 依存的な Notch と Delta の分解

今回提唱したモデルでは、Dll1 のシグナル伝達活性は、VZ 内側では cis-inhibition より影響が大きいことで低く、VZ より基底側膜側では cis-inhibition の影響が小さくなることで強くなることで、RF を持つ娘細胞ほど多くの Notch シグナルを VZ より基底膜側で受容できると推定した。このモデルでは、*Dll1* の発現開始が VZ より基底膜側ではなく、VZ 内側で Dll1 が発現開始して cis-inhibition が機能する背景として考えられるのは、Notch の分解の一定割合が Dll1 依存的な可能性である。つまり、シグナル伝達細胞が trans-activation 可能な Dll1 を細胞膜に提示するために、*Dll1* が細胞分裂直後から早期に発現し、一定期間の内に Notch を cis-inhibition により分解しきることが必要である可能性が考えられる。

Cis-inhibition によって RGC 内で発現する Dll1 を多量の Notch が中和することのメリットは、RF がリガンド提供細胞となることを防ぐことができる点にあると考える。これによって、姉妹細胞のうち RF を持つ娘細胞が VZ 内で新たな RGC として確実に維持されることで、神経細胞が皮質板に到達するための足場である RF が失われることなく維持できる。

今後、Notch の分解に対する Dll1 の依存度、反対に Dll1 の分解に対する Dll1 の依存度を検証する方法としては、次の 2 つの方法が考えられる。

1 つ目は、trans-activation の影響を排除して、cis-inhibition による Notch の分解の影響を分析するために、野生型の神経幹細胞または *Dll1* KO の神経幹細胞をそれぞれ分散培養した場合に、一定時間内の Notch タンパクの減少量に変化があるかを調べる方法がある。もし Notch の分解が同一細胞内の Dll1 による cis-inhibition に依存する場合は、野生型では Dll1 の発現に伴って Notch1/2 が分解されながら分化し、反対に *Dll1* を KO した場合には Notch1/2 が残存したまま分化するはずである。

2 つ目は、*Notch1/2* を KO し、Notch-Delta の相互作用を無くした神経幹細胞を分散培養下で分化させた場合と、DAPT などの Notch 活性化阻害剤へ暴露させて Notch-Delta の相互作用に影響を与えずに分化させた場合で、細胞内の Dll1 の蓄積にどの程度の影響があるかを調べる方法が考えられる。もし Notch の分解が同一細胞内の Dll1 による cis-inhibition に依存する場合は、*Notch1/2* を KO した場合は Dll1 が蓄積しながら分化し、反対に DAPT 存在化では Dll1 が蓄積せずに分化するはずである。

文献

- Aaku-Saraste, E., Hellwig, A., Huttner, W.B., 1996. Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure - Remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Dev. Biol.* 180, 664–679. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0336>
- Alexandre, P., Reugels, A.M., Barker, D., Blanc, E., Clarke, J.D.W., 2010. Neurons derive from the more apical daughter in asymmetric divisions in the zebrafish neural tube. *Nat. Neurosci.* 13, 673–679. <https://doi.org/10.1038/nn.2547>
- Andersson, E.R., Sandberg, R., Lendahl, U., 2011. Notch signaling: Simplicity in design, versatility in function. *Development* 138, 3593–3612. <https://doi.org/10.1242/dev.063610>
- Anthony, T.E., Klein, C., Fishell, G., Heintz, N., 2004. Radial Glia Serve as Neuronal Progenitors in All Regions of the Central Nervous System has shown that they can be divided into multiple antigenically distinct subpopulations that differ in their cell cycle kinetics, with each subpopulation changing in a . *Neuron* 41, 881–890.
- Baek, C., Freem, L., Go, R., Sang, H., Morin, X., Tozer, S., Normale, E., 2018. Mib1 prevents Notch Cis - inhibition to defer differentiation and preserve neuroepithelial integrity during neural delamination.
- Barton, A., Fendrik, A.J., 2013. Sustained vs . oscillating expressions of Ngn2 , Dll1 and Hes1 : A model of neural differentiation of embryonic telencephalon. *J. Theor. Biol.* 328, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2013.03.004>
- Bettenhausen, B., Hrabe de Angelis, M., Simon, D., Guenet, J.L., Gossler, A., 1995. Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta. *Development* 121, 2407–2418.
- Bray, S.J., 2016. Notch signalling in context. *Nat. Publ. Gr.* 17, 722–735. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.94>
- Cadiñanos, J., Bradley, A., 2007. Generation of an inducible and optimized piggyBac transposon systemy. *Nucleic Acids Res.* 35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm446>
- Campos, L.S., Duarte, A.J., Branco, T., Henrique, D., 2001. mDll1 and mDll3 expression in the developing mouse brain: Role in the establishment of the early cortex. *J. Neurosci. Res.* 64, 590–598. <https://doi.org/10.1002/jnr.1111>
- Carrieri, F.A., Murray, P.J., Ditsova, D., Ferris, M.A., Davies, P., Dale, J.K., 2019. CDK 1 and CDK 2 regulate NICD 1 turnover and the periodicity of the segmentation clock . *EMBO Rep.* 20, 1–22. <https://doi.org/10.15252/embr.201846436>
- Chenn, A., Walsh, C.A., 2002. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* (80-.). 297, 365–369. <https://doi.org/10.1126/science.1074192>
- Cohen, M., Georgiou, M., Stevenson, N.L., Miodownik, M., Baum, B., 2010. Dynamic Filopodia Transmit Intermittent Delta-Notch Signaling to Drive Pattern Refinement during Lateral Inhibition. *Dev. Cell* 19, 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.06.006>
- Collier, J.R., Monk, N.A.M., Maini, P.K., Lewis, J.H., 1996. Pattern formation by lateral inhibition with feedback: A mathematical model of delta-notch intercellular signalling. *J. Theor. Biol.* 183, 429–446. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1996.0233>
- Conlon, R.A., Reaume, A.G., Rossant, J., 1995. Notch 1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* 121, 1533–1545.
- Couturier, L., Vodovar, N., Schweisguth, F., 2012. Endocytosis by Numb breaks Notch symmetry at cytokinesis. *Nat. Publ. Gr.* 14, 131–139. <https://doi.org/10.1038/ncb2419>
- Dang, L., Yoon, K., Wang, M., Gaiano, N., 2006. Notch3 signaling promotes radial glial/progenitor character in the mammalian telencephalon. *Dev. Neurosci.* 28, 58–69. <https://doi.org/10.1159/000090753>
- Das, R.M., Storey, K.G., 2012. scientific report. *EMBO Rep.* 13, 448–454. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.42>
- De Angelis, M.H., McIntyre, J., Gossler, A., 1997. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/386717a0>
- De Celis, J.F., Bray, S.J., 2000. The Abruptex domain of Notch regulates negative interactions between Notch, its ligands and Fringe. *Development* 127, 1291–1302.
- De Jossineau, C., Soulé, J., Martin, M., Anguille, C., Montcourrier, P., Alexandre, D., 2003. Delta-promoted filopodia mediate long-range lateral inhibition in Drosophila. *Nature* 426, 555–559. <https://doi.org/10.1038/nature02157>
- Del Álamo, D., Rouault, H., Schweisguth, F., 2011. Mechanism and significance of cis-inhibition in notch signalling. *Curr. Biol.* 21, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.10.034>

- Dong, Z., Yang, N., Yeo, S., Chitnis, A., Guo, S., 2012. Article Intralinear Directional Notch Signaling Regulates Self-Renewal and Differentiation of Asymmetrically Dividing Radial Glia. *Neuron* 74, 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.01.031>
- Engler, A., Rolando, C., Giachino, C., Saotome, I., Erni, A., Brien, C., Zhang, R., Zimmer-Strobl, U., Radtke, F., Artavanis-Tsakonas, S., Louvi, A., Taylor, V., 2018. Notch2 Signaling Maintains NSC Quiescence in the Murine Ventricular-Subventricular Zone. *Cell Rep.* 22, 992–1002. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.094>
- Feng, L., Hatten, M.E., Heintz, N., 1994. Brain lipid-binding protein (BLBP): A novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* 12, 895–908. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90341-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90341-7)
- Fujita, I., Shitamukai, A., Kusumoto, F., Mase, S., Suetsugu, T., Omori, A., Kato, K., Abe, T., Shioi, G., Konno, D., Matsuzaki, F., 2020. Endfoot regeneration restricts radial glial state and prevents translocation into the outer subventricular zone in early mammalian brain development. *Nat. Cell Biol.* 22, 26–37. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0436-9>
- Gaiano, N., Nye, J.S., Fishell, G., 2000. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* 26, 395–404. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81172-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81172-1)
- Gänzler-Odenthal, S.I.I., Redies, C., 1998. Blocking N-cadherin function disrupts the epithelial structure of differentiating neural tissue in the embryonic chicken brain. *J. Neurosci.* 18, 5415–5425. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-14-05415.1998>
- Geffers, I., Serth, K., Chapman, G., Jaekel, R., Schuster-Gossler, K., Cordes, R., Sparrow, D.B., Kremmer, E., Dunwoodie, S.L., Klein, T., Gossler, A., 2007. Divergent functions and distinct localization of the Notch ligands DLL1 and DLL3 in vivo. *J. Cell Biol.* 178, 465–476. <https://doi.org/10.1083/jcb.200702009>
- Götz, M., Huttner, W.B., 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrm1739>
- Guo, H., Hong, S., Jin, X.L., Chen, R.S., Avasthi, P.P., Tu, Y. Te, Ivanko, T.L., Li, Y., 2000. Specificity and efficiency of cre-mediated recombination in Emx1-cre knock-in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 661–665. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2870>
- Hamada, Y., Kadokawa, Y., Okabe, M., Ikawa, M., Coleman, J.R., Tsujimoto, Y., 1999. Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. *Development* 126, 3415–3424.
- Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., Götz, M., 2001. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev. Biol.* 229, 15–30. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9962>
- Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F., Kageyama, R., 2004. Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development* 131, 5539–5550. <https://doi.org/10.1242/dev.01436>
- Hatakeyama, J., Wakamatsu, Y., Nagafuchi, A., Kageyama, R., Shigemoto, R., 2014. Cadherin-based adhesions in the apical endfoot are required for active Notch signaling to control neurogenesis in vertebrates 1671–1682. <https://doi.org/10.1242/dev.102988>
- Heitzler, P., Simpson, P., 1991. The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* 64, 1083–1092. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90263-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90263-X)
- Hevner, R.F., 2019. Intermediate progenitors and Tbr2 in cortical development. *J. anat.* <https://doi.org/10.1111/joa.12939>
- Hevner, R.F., Hodge, R.D., Daza, R.A.M., Englund, C., 2006. Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: Conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus. *Neurosci. Res.* 55, 223–233. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2006.03.004>
- Higuchi, M., Kiyama, H., Hayakawa, T., Hamada, Y., Tsujimoto, Y., 1995. Differential expression of Notch1 and Notch2 in developing and adult mouse brain. *Mol. Brain Res.* 29, 263–272. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(94\)00257-F](https://doi.org/10.1016/0169-328X(94)00257-F)
- Hitoshi, S., Alexson, T., Tropepe, V., Donoviel, D., Elia, A.J., Nye, J.S., Conlon, R.A., Mak, T.W., Bernstein, A., Van Der Kooy, D., 2002. Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev.* 16, 846–858. <https://doi.org/10.1101/gad.975202>
- Hozumi, K., Negishi, N., Suzuki, D., Abe, N., Sotomaru, Y., Tamaoki, N., Mailhos, C., Ish-Horowicz, D., Habu, S., Owen, M.J., 2004. Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 5, 638–644. <https://doi.org/10.1038/ni1075>
- Hsu, Y., Fuchs, E., 2012. REVIEWS A family business : stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nat. Publ. Gr.* 13, 103–114. <https://doi.org/10.1038/nrm3272>

- Huang, H.-P., Liu, M., El-Hodiri, H.M., Chu, K., Jamrich, M., Tsai, M.-J., 2000. Regulation of the Pancreatic Islet-Specific Gene *BETA2* (neuroD) by Neurogenin 3. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3292–3307. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.9.3292-3307.2000>
- Imayoshi, I., Isomura, A., Harima, Y., Kawaguchi, K., Kori, H., Miyachi, H., Fujiwara, T., Ishidate, F., Kageyama, R., 2013. Oscillatory Control of Factors Determining Multipotency and Fate in Mouse Neural Progenitors 342, 1203–1208.
- Imayoshi, I., Ohtsuka, T., Metzger, D., Chambon, P., Kageyama, R., 2006. Temporal regulation of Cre recombinase activity in neural stem cells. *Genesis* 44, 233–238. <https://doi.org/10.1002/dvg.20212>
- Irvin, D.K., Zurcher, S.D., Nguyen, T., Weinmaster, G., Kornblum, H.I., 2001. Expression patterns of Notch1, Notch2, and Notch3 suggest multiple functional roles for the Notch-DSL signaling system during brain development. *J. Comp. Neurol.* 436, 167–181. <https://doi.org/10.1002/cne.1059>
- Ishibashi, M., 1995. Enhancer of split. *Genes Dev.* 1, 3136–3148. <https://doi.org/10.1111/j.0906-7590.2005.03957.x>
- Jay, D.G., 1988. Selective destruction of protein function by chromophore-assisted laser inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5454–5458. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.15.5454>
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H., Imayoshi, I., 2008. Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition. *Nat. Neurosci.* 11, 1247–1251. <https://doi.org/10.1038/nn.2208>
- Kakuda, S., Lopilato, R.K., Ito, A., Haltiwanger, R.S., 2020. Canonical Notch ligands and Fringes have distinct effects on NOTCH1 and NOTCH2. *J. Biol. Chem.* jbc.RA120.014407. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra120.014407>
- Kawaguchi, A., Ikawa, T., Kasukawa, T., Ueda, H.R., Kurimoto, K., Saitou, M., Matsuzaki, F., 2008. Single-cell gene profiling defines differential progenitor subclasses in mammalian neurogenesis. *Development* 135, 3113–3124. <https://doi.org/10.1242/dev.022616>
- Kawaguchi, D., Furutachi, S., Kawai, H., Hozumi, K., Gotoh, Y., 2013. Dll1 maintains quiescence of adult neural stem cells and segregates asymmetrically during mitosis. *Nat. Commun.* 4, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms2895>
- Kawaguchi, D., Yoshimatsu, T., Hozumi, K., Gotoh, Y., 2008. Selection of differentiating cells by different levels of delta-like 1 among neural precursor cells in the developing mouse telencephalon. *Development* 135, 3849–3858. <https://doi.org/10.1242/dev.024570>
- Kawamoto, S., Niwa, H., Tashiro, F., Sano, S., Kondoh, G., Takeda, J., Tabayashi, K., Miyazaki, J.I., 2000. A novel reporter mouse strain that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated recombination. *FEBS Lett.* 470, 263–268. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01338-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01338-7)
- Klein, T., Brennan, K., Martinez Arias, A., 1997. An intrinsic dominant negative activity of serrate that is modulated during wing development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 189, 123–134. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8564>
- Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T., Matsuzaki, F., 2008. Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat. Cell Biol.* 10, 93–101. <https://doi.org/10.1038/ncb1673>
- Koo, B.K., Lim, H.S., Song, R., Yoon, M.J., Yoon, K.J., Moon, J.S., Kim, Y.W., Kwon, M.C., Yoo, K.W., Kong, M.P., Lee, J., Chitnis, A.B., Kim, C.H., Kong, Y.Y., 2005. Mind bomb 1 is essential for generating functional Notch ligands to activate Notch. *Development* 132, 3459–3470. <https://doi.org/10.1242/dev.01922>
- Kopan, R., Ilagan, M.X.G., 2009. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell* 137, 216–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.045>
- Krebs, L.T., Iwai, N., Nonaka, S., Welsh, I.C., Lan, Y., Jiang, R., Saijoh, Y., O'Brien, T.P., Hamada, H., Gridley, T., 2003a. Notch signaling regulates left-right asymmetry determination by inducing Nodal expression. *Genes Dev.* 17, 1207–1212. <https://doi.org/10.1101/gad.1084703>
- Krebs, L.T., Xue, Y., Norton, C.R., Shutter, J.R., Maguire, M., Sundberg, J.P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R., Smith, G.H., Stark, K.L., Gridley, T., 2000. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev.* 14, 1343–1352. <https://doi.org/10.1101/gad.14.11.1343>
- Krebs, L.T., Xue, Y., Norton, C.R., Sundberg, J.P., Beatus, P., Lendahl, U., Joutel, A., Gridley, T., 2003b. Characterization of Notch3-Deficient Mice: Normal Embryonic Development and Absence of Genetic Interactions with a Notch1 Mutation. *Genesis* 37, 139–143. <https://doi.org/10.1002/gene.10241>
- Kressmann, S., Campos, C., Castanon, I., Fürthauer, M., González-gaitán, M., 2015. Directional Notch trafficking in Sara endosomes during asymmetric cell division in the spinal cord 17. <https://doi.org/10.1038/ncb3119>

- Kulkeaw, K., Mizuochi, C., Horio, Y., Osumi, N., Tsuji, K., Sugiyama, D., 2009. Application of whole mouse embryo culture system on stem cell research. *Stem Cell Rev. Reports* 5, 175–180. <https://doi.org/10.1007/s12015-009-9064-2>
- Lindsell, C.E., Boulter, J., DiSibio, G., Gossler, A., Weinmaster, G., 1996. Expression patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development. *Mol. Cell. Neurosci.* 8, 14–27. <https://doi.org/10.1006/mcne.1996.0040>
- Liu, Z., Chen, S., Boyle, S., Zhu, Y., Zhang, A., Piwnica-Worms, D.R., Ilagan, M.X.G., Kopan, R., 2013. The extracellular domain of notch2 increases its cell-surface abundance and ligand responsiveness during kidney development. *Dev. Cell* 25, 585–598. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.05.022>
- Lui, J.H., Hansen, D. V., Kriegstein, A.R., 2011. Development and evolution of the human neocortex. *Cell* 146, 18–36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.030>
- Luis, J., Pompa, D., Wakeham, A., Correia, K.M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R.J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T.W., Rossant, J., Conlon, R.A., 1997. Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* 124, 1139–1148.
- Mase, S., Shitamukai, A., Wu, Q., Morimoto, M., Gridley, T., Matsuzaki, F., 2020. Notch1 and Notch2 collaboratively maintain radial glial cells in mouse neurogenesis. *Neurosci. Res.* 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2020.11.007>
- Matsuda, M., Chitnis, A.B., 2009. Interaction with Notch determines endocytosis of specific Delta ligands in zebrafish neural tissue. *Development* 136, 197–206. <https://doi.org/10.1242/dev.027938>
- McCright, B., Gao, X., Shen, L., Lozier, J., Lan, Y., Maguire, M., Herzlinger, D., Weinmaster, G., Jiang, R., Gridley, T., 2001. Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch2 mutation. *Development* 128, 491–502.
- McCright, B., Lozier, J., Gridley, T., 2006. Generation of new Notch2 mutant alleles. *Genesis* 44, 29–33. <https://doi.org/10.1002/gene.20181>
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., Ogawa, M., 2001. Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31, 727–741. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00420-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00420-2)
- Moore, D.L., Pilz, G.A., Barral, Y., Jessberger, S., 2015. A mechanism for the segregation of age in mammalian neural stem cells. *Science* (80-.). 349, 1334–1338. <https://doi.org/doi:10.1126/science.aac9868>
- Morimoto, M., Nishinakamura, R., Saga, Y., Kopan, R., 2012. Different assemblies of Notch receptors coordinate the distribution of the major bronchial Clara , ciliated and neuroendocrine cells 4373, 4365–4373. <https://doi.org/10.1242/dev.083840>
- Nelson, B.R., Gumuscu, B., Hartman, B.H., Reh, T.A., 2006. Notch activity is downregulated just prior to retinal ganglion cell differentiation. *Dev. Neurosci.* 28, 128–141. <https://doi.org/10.1159/000090759>
- Nelson, B.R., Hodge, R.D., Bedogni, F., Hevner, R.F., 2013. Dynamic Interactions between Intermediate Neurogenic Progenitors and Radial Glia in Embryonic Mouse Neocortex : Potential Role in Dll1-Notch Signaling 33, 9122–9139. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0791-13.2013>
- Nichols, J.T., Miyamoto, A., Olsen, S.L., D'Souza, B., Yao, C., Weinmaster, G., 2007. DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. *J. Cell Biol.* 176, 445–458. <https://doi.org/10.1083/jcb.200609014>
- Niwa, H., Yamamura, K., Miyazaki, J., 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193–199. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90434-D](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90434-D)
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S., Kriegstein, A.R., 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409, 714–720. <https://doi.org/10.1038/35055553>
- Ochiai, W., Nakatani, S., Takahara, T., Kainuma, M., Masaoka, M., Minobe, S., Namihira, M., Nakashima, K., Sakakibara, A., Ogawa, M., Miyata, T., 2009. Periventricular notch activation and asymmetric Ngn2 and Tbr2 expression in pair-generated neocortical daughter cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 40, 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.10.007>
- Ohlstein, B., Spradling, A.C., 2007. Multipotent drosophila intestinal stem cells specify daughter cell fates by differential Notch signaling. *Science* (80-.). 315, 988–993.
- Ohtsuka, T., 1999. Hes1 and Hes5 as Notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J.* 18, 2196–2207. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.8.2196>
- Ohtsuka, T., Imayoshi, I., Shimojo, H., Nishi, E., Kageyama, R., McConnell, S.K., 2006. Visualization of embryonic neural stem cells using Hes promoters in transgenic mice. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 109–122. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.09.006>
- Pierfelice, T., Alberi, L., Gaiano, N., 2011. Notch in the Vertebrate Nervous System: An Old Dog with New Tricks. *Neuron* 69, 840–855. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.031>

- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., Van Meerwijk, J., MacDonald, H.R., Aguet, M., 1999. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10, 547–558. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80054-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80054-0)
- Rajan, A., Tien, A.C., Haueter, C.M., Schulze, K.L., Bellen, H.J., 2009. The Arp2/3 complex and WASp are required for apical trafficking of Delta into microvilli during cell fate specification of sensory organ precursors. *Nat. Cell Biol.* 11, 815–824. <https://doi.org/10.1038/ncb1888>
- Rašin, M.R., Gazula, V.R., Breunig, J.J., Kwan, K.Y., Johnson, M.B., Liu-Chen, S., Li, H.S., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Rakic, P., Šestan, N., 2007. Numb and Numbl are required for maintenance of cadherin-based adhesion and polarity of neural progenitors. *Nat. Neurosci.* 10, 819–827. <https://doi.org/10.1038/nn1924>
- Rhyu, M.S., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1994. Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* 76, 477–491. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90112-0)
- Robinson, C.R., Sauer, R.T., 1998. Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5929–5934. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.5929>
- Sakamoto, K., Ohara, O., Takagi, M., Takeda, S., Katsube, K. ichi, 2002. Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: A novel mechanism of Notch signal modification. *Dev. Biol.* 241, 313–326. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0517>
- Sauer, F.C., 1935. Mitosis in the neural tube. *J. Comp. Neurol.* 62, 377–405. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cne.900620207>
- Scadden, D.T., 2006. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441, 1075–1079. <https://doi.org/10.1038/nature04957>
- Schofield, R., 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7–25.
- Shaya, O., Binshtok, U., Hersch, M., Richardson, G.P., Chen, C.S., Sprinzak, D., 2017. Short Article Cell-Cell Contact Area Affects Notch Signaling and Short Article Cell-Cell Contact Area Affects Notch Signaling and Notch-Dependent Patterning. *Dev. Cell* 40, 505–511.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.02.009>
- Shen, Q., Temple, S., 2002. Creating asymmetric cell divisions by skewing endocytosis. *Sci. STKE* 2002, 1–5. <https://doi.org/10.1126/scisignal.1622002pe52>
- Shen, Q., Zhong, W., Jan, Y.N., Temple, S., 2002. Asymmetric Numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts. *Development* 129, 4843–4853.
- Shimizu, K., Chiba, S., Hosoya, N., Kumano, K., Saito, T., Kurokawa, M., Kanda, Y., Hamada, Y., Hirai, H., 2000. Binding of Delta1, Jagged1, and Jagged2 to Notch2 Rapidly Induces Cleavage, Nuclear Translocation, and Hyperphosphorylation of Notch2. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6913–6922. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.18.6913-6922.2000>
- Shimizu, K., Chiba, S., Saito, T., Kumano, K., Hirai, H., Shimizu, K., Chiba, S., Saito, T., Kumano, K., Hirai, H., Hamada, Y., 2002. Functional diversity among Notch1, Notch2, and Notch3 receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 775–779. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6528>
- Shimogori, T., Lee, D.A., Miranda-Angulo, A., Yang, Y., Wang, H., Jiang, L., Yoshida, A.C., Kataoka, A., Mashiko, H., Avetisyan, M., Qi, L., Qian, J., Blackshaw, S., 2010. A genomic atlas of mouse hypothalamic development. *Nat. Neurosci.* 13, 767–775. <https://doi.org/10.1038/nn.2545>
- Shimogori, T., Seth, B., 2015. Large-Scale ISH on Mouse Brain Sections for Systematic Gene Expression Analysis in Developing Mouse Diencephalon, 99th ed, In Situ Hybridization Methods. Springer Science+Business Media New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2303-8_10
- Shimojo, H., Ohtsuka, T., Kageyama, R., 2008. Oscillations in Notch Signaling Regulate Maintenance of Neural Progenitors. *Neuron* 58, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.02.014>
- Shitamukai, A., Konno, D., Matsuzaki, F., 2011. Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors. *J. Neurosci.* 31, 3683–3695. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4773-10.2011>
- Siebel, C., Lendahl, U., 2017. Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease. *Physiol. Rev.* 97, 1235–1294. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2017>
- Sprinzak, D., Lakhanpal, A., LeBon, L., Garcia-Ojalvo, J., Elowitz, M.B., 2011. Mutual inactivation of Notch receptors and ligands facilitates developmental patterning. *PLoS Comput. Biol.* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002069>
- Sprinzak, D., Lakhanpal, A., Lebon, L., Santat, L.A., Fontes, M.E., Anderson, G.A., Garcia-Ojalvo, J., Elowitz, M.B., 2010. Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states. *Nature* 465, 86–90. <https://doi.org/10.1038/nature08959>

- Swiatek, P.J., Lindsell, C.E., Del Amo, F.F., Weinmaster, G., Gridley, T., 1994. Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev.* 8, 707–719. <https://doi.org/10.1101/gad.8.6.707>
- Tabata, H., Nakajima, K., 2001. Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: Visualization of neuronal migration in the developing cortex. *Neuroscience* 103, 865–872. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00016-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00016-1)
- Takahashi, T., Nowakowski, R.S., Caviness, V.S., 1995. The Cell Cycle of the Pseudostratified Embryonic Murine Cerebral Wall. *J. Neurosci.* 15, 6046–6057.
- Takemoto, K., Matsuda, T., Sakai, N., Fu, D., Noda, M., Uchiyama, S., Kotera, I., Arai, Y., Horiuchi, M., Fukui, K., Ayabe, T., Inagaki, F., Suzuki, H., Nagai, T., 2013. SuperNova, a monomeric photosensitizing fluorescent protein for chromophore-assisted light inactivation. *Sci. Rep.* 3, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep02629>
- Tokunaga, A., Kohyama, J., Yoshida, T., Nakao, K., Sawamoto, K., Okano, H., 2004. Mapping spatio-temporal activation of Notch signaling during neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse brain. *J. Neurochem.* 90, 142–154. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02470.x>
- Tozer, S., Baek, C., Fischer, E., Gojame, R., Tozer, S., Baek, C., Fischer, E., Gojame, R., Morin, X., 2017. Differential Routing of Mindbomb1 via Centriolar Satellites Regulates Asymmetric Divisions of Neural Report Differential Routing of Mindbomb1 via Centriolar Satellites Regulates Asymmetric Divisions of Neural Progenitors. *Neuron* 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.042>
- Trylinski, M., Mazouni, K., 2017. Intra-lineage Fate Decisions Involve Activation of Notch Receptors Basal to the Midbody in Drosophila Sensory Organ Precursor Cells Article Intra-lineage Fate Decisions Involve Activation of Notch Receptors Basal to the Midbody in Drosophila Sensory Organ 2239–2247. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.030>
- Uemura, T., Shepherd, S., Ackerman, L., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1989. *numb*, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in Drosophila embryos. *Cell* 58, 349–360. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90849-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90849-0)
- Wang, X., Le, N., Denoth-lippuner, A., Barral, Y., Kroschewski, R., 2016. Asymmetric partitioning of transfected DNA during mammalian cell division 113. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606091113>
- Weinmaster, G., Roberts, V.J., Lemke, G., 1991. A homolog of Drosophila Notch expressed during mammalian development. *Development* 113, 199–205.
- Wu, Q., Shichino, Y., Abe, T., Suetsugu, T., Omori, A., Kiyonari, H., Iwasaki, S., Matsuzaki, F., 2020. Selective translation of epigenetic modifiers drives the developmental clock of neural stem cells. *BioRxiv*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2020.10.08.330852>
- Yang, X., Klein, R., Tian, X., Cheng, H.T., Kopan, R., Shen, J., 2004. Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway. *Dev. Biol.* 269, 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.01.014>
- Yokota, Y., Ring, C., Cheung, R., Pevny, L., Anton, E.S., 2007. Nap1-Regulated Neuronal Cytoskeletal Dynamics Is Essential for the Final Differentiation of Neurons in Cerebral Cortex. *Neuron* 54, 429–445. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.016>
- Yoon, K., Nery, S., Rutlin, M.L., Radtke, F., Fishell, G., Gaiano, N., 2004. Fibroblast growth factor receptor signaling promotes radial glial identity and interacts with Notch1 signaling in telencephalic progenitors. *J. Neurosci.* 24, 9497–9506. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0993-04.2004>
- Yoon, K.J., Koo, B.K., Im, S.K., Jeong, H.W., Ghim, J., Kwon, M. chul, Moon, J.S., Miyata, T., Kong, Y.Y., 2008. Mind Bomb 1-Expressing Intermediate Progenitors Generate Notch Signaling to Maintain Radial Glial Cells. *Neuron* 58, 519–531. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.018>
- Yusa, K., Zhou, L., Li, M.A., Bradley, A., Craig, N.L., 2011. A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1531–1536. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008322108>
- Zhou, Y., Atkins, J.B., Rompani, S.B., Bancescu, D.L., Petersen, P.H., Tang, H., Zou, K., Stewart, S.B., Zhong, W., 2007. The Mammalian Golgi Regulates Numb Signaling in Asymmetric Cell Division by Releasing ACBD3 during Mitosis. *Cell* 129, 163–178. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.037>

謝辞

本研究を進めるにあたり、研究に注力できる環境を提供くださった松崎文雄教授にはじめに深く感謝申し上げます。進展を得づらい難しい時期にも温かく叱咤激励いただいたことで、本研究に区切りをつけることができました。

下向敦範博士には、実験手法や統計の基礎から、日々の実験結果の解釈に至るまで、6年の長きにわたって、本質的なご指摘と議論を続けてくださったことへ、心より感謝申し上げます。呉泉博士には、根拠論文に重要な意味づけを与える実験結果を提供いただいたこと、心からお礼申し上げます。

理化学研究所 生命機能科学研究センターの森本充博士と、Maine Medical Center Research Institute の Thomas Gridley 博士には、本研究を進める上で必要不可欠な *Notch1* 及び *Notch2* ノックアウトマウスを提供いただいたことへ感謝申し上げます。

副指導教官を務めてくださいました、京都大学大学院生命科学研究科の松田道行教授及び北嶋智也教授には、折に触れて貴重なご助言をいただいたこと、お礼申し上げます。

京都大学を離れて理化学研究所での大学院生活を6年間過ごすにあたり、理化学研究所生命機能科学研究センターの、非対称細胞分裂研究チームの皆様には物心両面から支えていただきましたこと、この場を借りてお礼申し上げます。

本研究は理化学研究所 JRA 制度、及び RA 制度の支援を受けたことで遂行できましたこと、関係者の皆様へお礼申し上げます。

最後に、大学院修了まで惜しまぬ助力を与えてくれた両親と、本論文の執筆に至るまで長きにわたって励まし続けてくれた妻と愛犬のダビに、深い感謝の意を表して謝辞いたします。

2021年2月15日

間瀬 俊

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Shun Mase, Atsunori Shitamukai, Quan Wu, Mitsuru Morimoto, Thomas Gridley, and Fumio Matsuzaki,

Notch1 and Notch2 collaboratively maintain radial glial cells in mouse neurogenesis, *Neuroscience Research*, <https://doi.org/10.1016/j.neures.2020.11.007>, in press 2020