

# 発生生物学研究室 Laboratory of Developmental Biology

教授 近藤寿人 Prof. Hisato KONDOH, Ph.D

助教 寺元万智子 Assist. Prof. Machiko TERAMOTO, Ph.D.

## 1. 研究概要

細胞・組織をタンパク質の動態システムとして成立させる転写因子制御を研究している。

細胞が分化・発生というプロセスを経ることによって、一定の構造と機能を持った細胞に成熟し、恒常性を維持するためには、細胞間および細胞内シグナル伝達と、転写因子による遺伝子発現制御が重要である。核における遺伝子発現が特定の細胞状態や機能を規定し、その状態や機能が核にフィードバックされて遺伝子発現を制御する。このようなフィードバック制御を担う、細胞間・細胞内シグナル伝達と、転写因子の作用機構を解明し、それらがタンパク質の動態システムとして細胞・組織を成立させる原理を明らかにする。

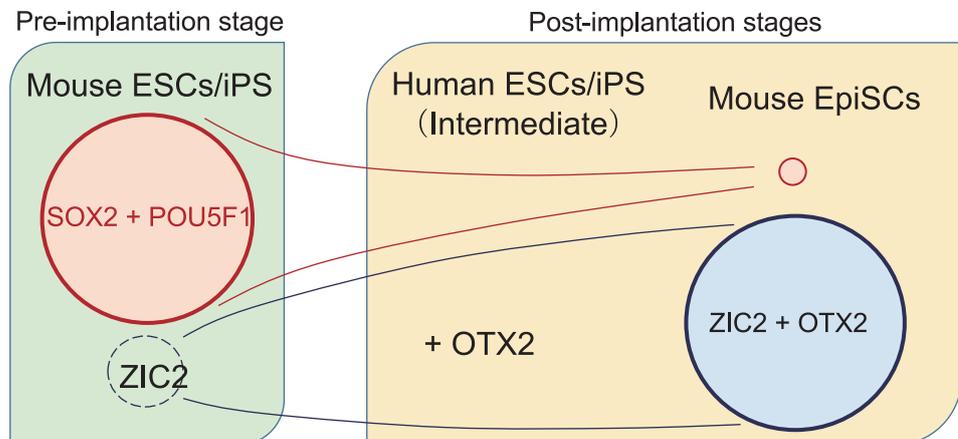
## 2. 本年度の研究成果

(1) エピプラスト幹細胞の遺伝子制御ネットワークが明らかにした、着床前と着床後に対応する多能性幹細胞の間で見られる制御機構の大きな変化

マウスのエピプラストから直接に樹立されたエピプラスト幹細胞(EpiSC)は、エピプラストの状態をよく反映している。私たちは以前の研究で、エピプラスト幹細胞では、5つの転写因子が主要な遺伝子制御機能を果たしていることを示した(引用文献③)。ZIC2, OTX2, SOX2, POU5F1, そしてPOU3F1である。これらの転写因子は、エピプラスト状態を決定しているだけでなく、エピプラストに始まる多様な体細胞系列の発生をも制御していると考えられた。そこで、これらの転写因子がエピプラスト幹細胞のゲノム配列の数万箇所に結合する際に、それらの結合部位が実際にはどの位置にあるのか、またこれらの転写因子が、どのような遺伝子群を調節しているのか、そしてどのような転写因子の組み合わせが、エピプラスト状態を決定するのに主要な役割を果たしているのかを調べた。着床前胚に対応する多能性幹細胞であるマウスの胚性幹細胞(ESC)ではSOX2-POU5F1の転写因子ペアが中心的な制御機能を果たしている。このSOX2-POU5F1ペアが、エピプラスト幹細胞でどのような機能を果たしているかという点にも注目した。これらの研究目的のために、転写因子と結合したDNA配列を、転写因子との複合体として抽出してそのDNA配列群を決定した(ChIP-seq法: chromatin immunoprecipitation-sequencing)。通常の抗体による免疫沈降に代えて、ビオチン化転写因子と結合DNAの複合体をストレプトアビジンとの結合によって抽出する方法を採用して、シグナル/ノイズ比の高い解析を実施することができた。2つの転写因子が隣接したDNA配列に結合して協同的に作用する場合には、これらの転写因子の結合部位がゲノム上の多くの箇所で重なる。

この研究によって、エピプラスト幹細胞の状態を決定する転写因子ペアが、SOX2-POU5F1ではなく、ZIC2-OTX2であることが明らかになった。幾つかの初期胚に由来する多能性幹細胞での転写因子結合部位を詳細にわたって比較した結果、SOX2-POU5F1が主要な制御機能を発揮するのは、着床前胚

The SOX2-POU5F1 (OCT3/4) TF pair exerts its major regulatory functions only during pre-implantation stages but is replaced by the ZIC2-OTX2 TF pair in the epiblast of post-implantation stages.



の状態（マウス胚性幹細胞）に限られており、着床後胚の状態に対応するヒトの胚性幹細胞やマウスのエピブラスト幹細胞では、SOX2-POU5F1 の転写因子ペア自体が形成されなくなり、制御機能が ZIC2-OTX2 ペアに取って代わられることがわかった。転写因子ペアによる遺伝子制御は、このように着床の前後で劇的に変化する。この転写因子ペアの交替は、着床前にすでに、ZIC2 の結合によって準備されており、着床後に OTX2 の発現が上昇するのに伴って ZIC2-OTX2 のペアが形成されて遺伝子発現制御を主導するようになると考えられる。

## (2) 内胚葉の領域化への転写因子 SOX2 の関与

内胚葉が成立すると、転写因子 SOX2 を発現する前側の領域が前腸に発生する。SOX2 が内胚葉の領域化にどのように関わっているのかを調べるために、内胚葉で Tamoxifen 依存的に Cre 組み換え酵素を発現する *FoxA2-CreER* と、*floxed Sox2* を併せ持つマウス系統を作成し、前腸から食道と気管が分岐する前の発生段階で Tamoxifen を作用させることによって、内胚葉組織の *Sox2* 遺伝子を欠落させた。その結果、咽頭から胃までをつなぐ 1 本の管が発生し、その中間点から一対の気管支が伸び出していた。この管の内面は、食道が重層上皮であるのに対して、気管に特徴的な円柱上皮を持ち、また、気管に固有の転写因子 NKX2.1 を発現していた。この結果から、前腸上皮において、食道を決定する SOX2 と気管を決定する NKX2.1 が拮抗しており、SOX2 の発現がなくなると食道に相当する上皮が全て NKX2.1 を発現して気管化したものと結論された。

この遺伝子操作では、前腸組織の中で、SOX2 を発現する上皮に限定して *Sox2* 遺伝子を不活性化したのであったが、食道上皮が気管上皮に変化するに合わせて、その周囲の間充織組織も気管のものに変化した。例えば、食道から気管に変化した上皮の管を取り巻く間充織組織が、気管系の間充織に特異的な転写因子 TBX4 を発現していた。これまで、間充織の特性がそれに隣接する上皮の特異性を決定するプロセスが強調されてきたが、前腸の発生においては逆に、転写因子による上皮の特異化が間充織の特性をもたらしていた。

## 3. Research projects and annual reports

We investigated how transcription factors (TFs) regulate developmental processes via binding to regulatory sequences of their target genes at the genome-wide scale and via intercellular signaling pathways. We achieved the following major results during 2017.

### (1) Distinct regulations among pluripotent stem cells

The epiblast formed after embryonic implantation represents the founding tissue for all somatic lineage derivations and is modeled in mouse pluripotent epiblast stem cell (EpiSC) lines adapted in serum-free culture conditions. In a previous study, we identified five major TFs that regulate the epiblast cell state and their somatic cell derivation, i.e., ZIC2, OTX2, SOX2, POU5F1, and POU3F1, including the SOX2-POU5F1 pair, considered to be involved in the regulation of pluripotency states. To elucidate the regulatory function of the TFs, we performed chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq) over the entire genome sequence. This enabled us to determine the binding sites of the TFs and to identify the group of genes regulated by these TFs as well as the TF combination that plays a major role in the regulation of EpiSC-specific genes. The central regulatory function of the SOX2-POU5F1 pair in mouse embryonic stem cells (ESCs) is well established. Therefore, we compared the action of this TF pair in EpiSCs with that in mouse ESCs. We used biotinylated TFs to pull down TF-DNA complexes using streptavidine instead of conventional antibody-dependent pulldown, allowing analysis with a high signal-to-noise ratio. If two TFs cooperate by binding to adjacent DNA sequences, an overlap of ChIP-seq peaks of these TFs is detected.

We identified ZIC2-OTX2 as the major TF pair that regulates the EpiSC state and not SOX2-POU5F1 despite a high expression level of SOX2 and POU5F1 in these cells. Comparison of the TF-binding sites in EpiSCs with those in mouse and human ESCs indicated the following. Pluripotent stem cells differ in the major acting TF pairs. The SOX2-POU5F1 pair exerts its major regulatory function only during preimplantation stages, represented by mouse ESCs. The SOX2-POU5F1 pairing is largely lost in

pluripotent stem cells of human ESCs and mouse EpiSCs and is superseded by the ZIC2–OTX2 pair in EpiSCs. This transition is primed by the binding of ZIC2 at the preimplantation stage and is manifested by the activation of OTX2 expression.

We also found that when the ZIC2–OTX2 pair gains major regulatory function, their binding regions are subjected to histone modifications H3K4me1 plus H3K27Ac, a signature for active enhancers, or H3K4me1 plus H3K27me3, a signature for poised enhancers. These histone markings may involve the interaction of ZIC2 with chromatin remodeling factors.

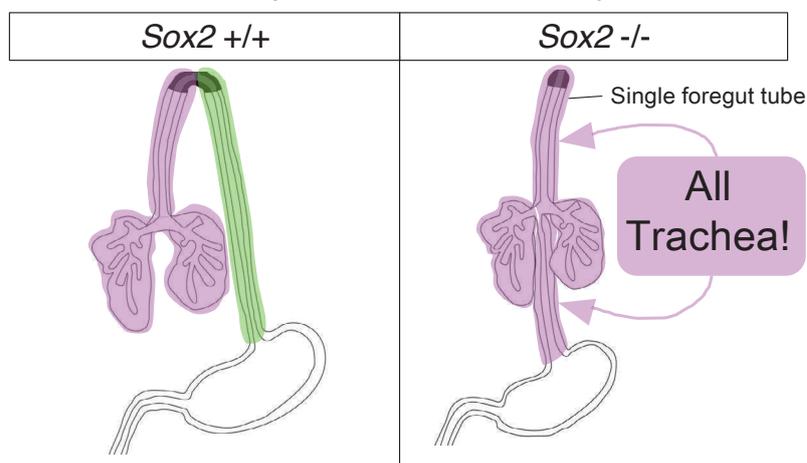
## (2) Endodermal regionalization via counteraction of TFs

The TF SOX2 is expressed in the anterior endoderm and its embryonic derivative, the foregut. We investigated how SOX2 regulates foregut development using conditional *Sox2*-KO mouse embryos in which *Sox2* is inactivated in the endoderm by *FoxA2*-CreER, which was activated by tamoxifen administration. *Sox2* inactivation in the endoderm resulted in the formation of a single foregut duct connecting the pharynx and stomach, in the middle of which a pair of bronchial tubes developed.

The foregut duct that developed from SOX2-less endoderm was made of columnar epithelium and expressed the trachea-characteristic TF NKX2.1, indicating the development of a trachea-like esophagus. Our results combined with a previous report stating that *Nkx2.1*-KO results in the development of a single foregut but with esophagus characteristics and expressing high SOX2 indicate that SOX2 and NKX2.1 counteract each other in the endoderm to support the development of the esophagus and trachea, respectively.

Although SOX2 was inactivated only in the epithelial component of the foregut tube, the

### Single foregut tube formed in the absence of SOX2 displayed trachea characteristics in both epithelium and mesenchyme



surrounding mesenchymal tissues also changed their characteristics to match those of the trachea. The mesenchyme surrounding the trachea-like esophagus expressed TF TBX4 at all axial levels, which is characteristic of the trachea and lung mesenchyme. This observation indicates that the tissue identity of the epithelial component impacts the surrounding mesenchyme to warrant the development of a functional organ.

## 4. 論文, 著書など

Kondoh H. Roles of ZIC2 in regulation of pluripotent stem cells. *Adv Exp Med Biol.* in press

Sugahara S, Fujimoto T, Kondoh H, Uchikawa M. Nasal and otic placode specific regulation of Sox2 involves both activation by Sox-Sall4 synergism and multiple repression mechanisms. *Dev Biol.* 433, 61-74. (2017). doi: 10.1016/j.ydbio.2017.11.005.

Uchikawa M, Nishimura N, Iwafuchi-Doi M, [Kondoh H](#). Enhancer analyses using chicken embryo electroporation. *Methods Mol Biol.* 1650, 191-202 (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-7216-6\_12.

Matsuda K, Mikami T, Oki S, Iida H, Andrabi M, Boss JM, Yamaguchi K, Shigenobu S, [Kondoh H](#). ChIP-seq analysis of genomic binding regions of five major transcription factors highlights a central role for ZIC2 in the mouse epiblast stem cell gene regulatory network. *Development* 144, 1948-1958 (2017). doi: 10.1242/dev.143479.

Sasado T, [Kondoh H](#), Furutani-Seiki M, Naruse K. Mutation in cpsf6/CFIm68 (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor Subunit 6) causes short 3'UTRs and disturbs gene expression in developing embryos, as revealed by an analysis of primordial germ cell migration using the medaka mutant naruto. *PLoS One.* 12, e0172467 (2017). doi: 10.1371/journal.pone.0172467.

Iida H, Ishii Y, [Kondoh H](#). Intrinsic lens potential of neural retina inhibited by Notch signaling as the cause of lens transdifferentiation. *Dev Biol.* 421, 118-125 (2017). doi: 10.1016/j.ydbio.2016.11.004.

## 5. 学会発表など

Teramoto M, Sugawara R, Ishii Y, Kuroiwa A, Kondoh H. SOX2-dependent determination of tissue identity in the foregut. *ConBio2017, Kobe, 12.9* (2017)

Kondoh H, Matsuda K, Oki S, Shigenobu S. A drastic change in the major regulatory TFs from SOX2-POU5F1 to ZIC2-OTX2 in the pluripotent stem cells representing pre-implantation and post-implantation stages. *ConBio2017, Kobe, 12.8* (2017)

中村香絵, Boitet C, 吉水康矢, 飯田英明, 近藤寿人 エピプラスト幹細胞株から樹立された領域特性をもつ神経幹細胞株の解析 *ConBio2017 神戸 12.8* (2017)

稲森祥子, 石井泰雄, 近藤寿人 Foxa2 とともに nEGFP を発現するエピプラスト幹細胞を用いた、初期発生過程の研究 *ConBio2017 神戸 12.8* (2017)

吉水康矢, 近藤寿人 ヘンゼン結節は脊索前板の発生を介して、Otx2 を発現するエピプラストに頭部を形成させる *ConBio2017 神戸 12.8* (2017)

飯田英明, 内川昌則, 近藤寿人 Sox2 の神経系での発現を制御する D1 エンハンサーの解析 *ConBio2017 神戸 12.6* (2017)

Teramoto M, Sugawara R, Ishii Y, Kuroiwa A, Kondoh H. SOX2-dependent determination of tissue identity in the foregut. *ISDB 2017, Singapore, 6.20* (2017)

Kondoh H, Matsuda K, Oki S, Shigenobu S. Roles for ZIC2 in the regulation of epiblast stem cells and embryonic stem cells. *ISDB 2017, Singapore, 6.20* (2017)

Kondoh H, Yoshihi K. Embryonic region-dependent development and interactions of grafted Hensen's node with host tissues: reconsideration of organizer model. 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese society of Developmental Biologists. *Tokyo, 5.10* (2017)

Iida H, Ishii Y, Kondoh H. Intrinsic lens potential of neural retina inhibited by Notch signaling as the cause of "lens transdifferentiation". 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese society of Developmental Biologists. *Tokyo, 5.10* (2017)

Nakamura K, Boitet C, Satake S, Yoshihi K, Iida H, Ishii Y, Kondoh H. Establishment of neural progenitor cells lines with defined regional specificities from EpiSCs. 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese society of Developmental Biologists. *Tokyo, 5.10* (2017).

Inamori S, Ishii Y, Kondoh H. Establishment and use of a new epiblast stem cell line marking Foxa2 expression with GFP. 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese society of Developmental Biologists. *Tokyo, 5.10* (2017)

Teramoto M, Sugawara R, Ishii Y, Kuroiwa A, Kondoh H. SOX2-dependent determination of tissue identity in the foregut. 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese society of Developmental Biologists. *Tokyo, 5.10* (2017)

## 6. その他特記事項

### 研究の外部発信

Development 誌に発表した、多能性幹細胞の制御に関する新しい発見については、2017年5月31日にプレスリリースした。  
<https://kyodonewsprwire.jp/release/201705312273>、[http://www.kyoto-su.ac.jp/news/20170531\\_345\\_news.html](http://www.kyoto-su.ac.jp/news/20170531_345_news.html)

動物細胞内で特定のタンパク質をビオチン化するためのベクターpCAGGS-BLRP-BirA を米国 Emory 大学の Jeremy Boss と共同開発し、それを理研バイオリソースセンターDNA Bank に寄託した。(＃RDB15774)

### 外部資金

科学研究費補助金 基盤研究(B) 課題名：体細胞系列の選択的な発生をもたらすエピプラストの領域化と転写制御ネットワーク  
研究代表者：近藤寿人、取得年度：H29-32年（4年）

### 学外活動

近藤寿人

日本発生生物学会 Development Growth and Differentiation 副編集長

日本分子生物学会 Genes to Cells, Associate Editor

International Society of Differentiation, Board of Directors

ナショナルバイオリソースプロジェクト「ニワトリ・ウズラ」運営委員

理化学研究所 多細胞システム形成研究センター 運営委委員

大阪大学大学院生命機能研究科 招へい教授

