

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) 胚の神経系原基の成立における転写因子 SOX2 と ZIC2 の機能的な協同作用

転写因子 SOX2 は、神経系原基の成立と維持において中心的な役割を果たすが、SOX2 の機能は協同して働くパートナー因子に依存していることから、神経系原基において SOX2 がどの因子をパートナーとするのかは重要な課題である。これを明らかにするために、Sox2 遺伝子の発現を、胚発生の早期から、そして神経系全体で制御する D1 エンハンサーが受ける転写制御を研究した。

440 塩基対の長さを持つ D1 エンハンサーを A から E までの 5 領域に分けて、それぞれ単独、あるいは組み合わせてエンハンサー活性を検討した。それらの領域を tkEGFP レポーターにつなげてニワトリ胚に electroporation によって導入し、それらの領域領域の組み合わせが持つエンハンサー活性を評価した。その結果、中心に位置する CD 領域の組み合わせが、神経系原基における D1 エンハンサーの活性を担っていることがわかった。

CD 領域に様々な変異を導入してエンハンサー活性への影響を調べた結果、2 箇所の SOX 因子結合配列と 1 箇所の ZIC 因子結合配列の変異が、エンハンサー活性を著しく低下させた。また、D1 エンハンサー活性は、SOX2 と ZIC2 の組み合わせによって活性化された。これらの結果から、神経系原基の制御においては、SOX2 のパートナー因子のひとつが ZIC2 であることが示唆された。またこれらの因子の組み合わせが Sox2 遺伝子の自己制御にも関わっていると考えられる。

(2) 前部中内胚葉に依存した脳の前駆体の発生の制御を、鳥類胚のライブイメージングで解析

平坦な円板状のエピブラストから発しする鳥類胚の脳は、脳の初期発生の解析に最適のモデルであるが、個々の細胞の振る舞いに関するライブイメージングデータがなかったために、その解析は進んでいなかった。本研究ではまず、ステージ 4 のニワトリ胚のエピブラスト細胞をランダムに選んで分散した輝点として蛍光標識して、脳の発生運命地図を作成した。それぞれの脳領域に、どの範囲に分布するエピブラスト細胞が収束するのかを解析した。その結果、脳の前駆体はこれまで考えられていたよりもはるかに広い領域のエピブラストに分布していた。前脳、中脳、後脳の前駆体は、エピブラストの前部の中央よりから中部の側部にかけて、その順番で配置されていた。

他の胚からとったノードを宿主胚の前半部に移植すると、第 2 の不完全な脳組織が形成される。この過程を解析するために、mCherry を発現するウズラ胚のノードを、分散して EGFP で標識されたニワトリ胚のエピブラストの前半の様々な場所に移植した。移植されたノードは、前部中内胚葉 (AME) に発生するとともに、その周囲にある宿主のエピブラスト (脳の前駆体) を集合させた。その結果、集合した脳の前駆体自体が持っていた脳領域特異性を反映した、部分的な脳組織がその場で発生した。AME が持つ周囲の脳前駆体を集合させる活性は、BMP アンタゴニストである Noggin を分泌する COS 細胞の移植で模倣することができた。

(3) 内胚葉での SOX2 の発現が、前部前腸から食道への発生を、上皮と間充織の双方にもたらす

転写因子 SOX2 は内胚葉の前側で発現され、その領域は前部前腸をへて食道と呼吸器系の上皮に発生する。SOX2 の制御機能が前部前腸の発生にどのように関わるのかを明らかにするために、内胚葉特異的に *Sox2* 遺伝子を破壊した。その結果、食道と呼吸器系の分離が起こらず、前部前腸から咽頭と胃をつなぐ 1 本の管が発生し、その中間部から 1 対の気管支が分岐した。SOX2 の発現がない前部前腸由来の管の上皮は、すべてが呼吸器に特異的な NKX2.1 を発現した。さらに SOX9 の発現パターンからは、咽頭と胃をつなぐ管の上皮の前側は気管の性質を持ち、そして後側（胃側）は気管支の性質を持つことがわかった。

食道を取り囲む間充織は *Wnt4* を発現する一方、気管/気管支を取り囲む間充織は SOX9 と *Tbx5* を発現するので明確に区別できる。SOX2 の発現を失った前部前腸を取り囲む間充織は、全長にわたって気管/気管支の性質を示した。したがって、SOX2 の発現の有無によって変化する上皮に同調して、間充織も食道タイプか気管/気管支タイプかを選んで発生することが明らかになった。

(4) ヘッジホッグシグナル伝達に欠損を持つ鳥類胚では、口腔外胚葉から複数の下垂体原基の嚢組織が発生し、それらから異所的な水晶体が発生する。

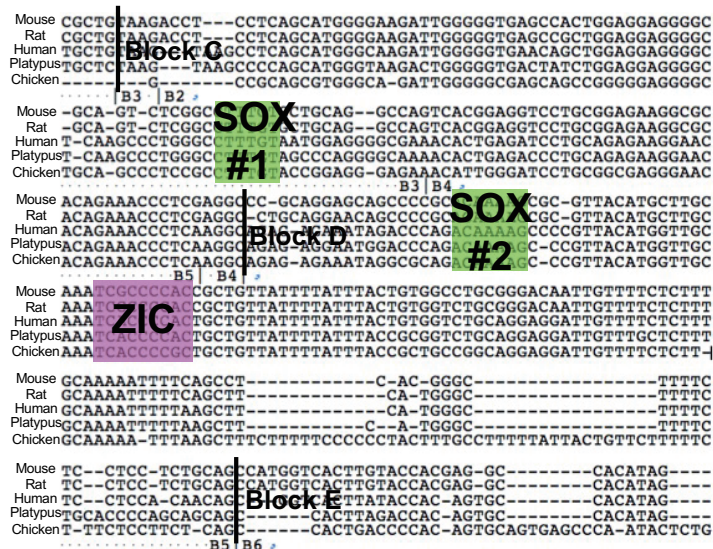
ヘッジホッグシグナルは、組織の形態形成や分化に関わる多様な制御機能を発揮する。ヘッジホッグシグナルが下垂体原基の発生にどのように関わり、そして下垂体原基が潜在的に持つ水晶体発生能にどのように関わるのかを明らかにするために、ヘッジホッグシグナル伝達に欠損を持つウズラ変異体 (*Talpid* 変異体) のホモ接合体胚における下垂体原基の発生を解析した。*Talpid* 変異体では、通常の下垂体原基（ラトケ嚢）に加えて、下垂体原基に固有の LHX3 を発現する嚢構造を複数、口腔上皮から発生していた。これらの LHX3 を発現する嚢構造（ラトケ嚢を含む）の一部が SOX2 と PAX6 を共発現し始める（水晶体前駆体状態）のに続いて、LHX3 の発現低下と PROX1 の活性化が起こり、クリスタリンのセットを発現する小さな水晶体組織の発生が開始された。したがって、ヘッジホッグシグナルは下垂体原基の発生の 2 つの段階に関わっている。第 1 に、ラトケ嚢の発生を、通常ではヘッジホッグシグナルが低い 1 カ所に限定すること。第 2 に、LHX3 の発現を維持することによって下垂体原基から水晶体への発生を抑制することである。

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 2018.

(1) Possible functional cooperation between SOX2 and ZIC2 in the establishment of embryonic neural primordia

The TF SOX2 plays a central role in the development and maintenance of neural primordia. Because the function of SOX2 relies on interacting partner TFs, it is important to determine which TFs cooperate with



SOX2 as the partner factor in neural primordia. To address this problem, we investigated the *Sox2* D1 enhancer, because D1 enhancer is activated at an early stage of neural development, and its activity uniquely covers the entire neural primordium, in contrast to other CNS region-specific enhancers of *Sox2*.

We divided the D1 enhancer sequence of ~440 bp, which is conserved across the amniotes, into the blocks A to E, and assessed the enhancer activity of the blocks using ptkEGFP reporter, which was electroporated into chicken embryos or transfected in neural stem cell lines. We found that the centrally located blocks C and D in combination bear the major regulatory function of the D1 enhancer.

Mutational analysis of the block C + D sequence indicated that two SOX binding sequences and a ZIC binding sequence are involved in the D1 enhancer activation. In addition, the D1 enhancer was activated by the combination of SOX2 and ZIC2, suggesting that the novel pair of TFs, SOX2 and ZIC2 plays important roles in the regulation of neural stem cells, including *Sox2* autoregulation.

(2) Anterior mesendoderm-dependent regulation of brain precursor development determined via live imaging of avian embryos

The early regulatory processes of brain development in avian embryos remain poorly understood, because of the lack of live-cell imaging data. To establish a fate map for each embryonic brain portion, EGFP was expressed in a randomly selected cells of stage 4 chicken embryo epiblast. The resulting EGFP-expressing cells were followed to trace the origin of the cells contributing to different brain portions. The results indicated that brain precursors were more widely distributed in the epiblast than previously believed and the precursors of the forebrain, midbrain, and hindbrain were regionally arranged from the antero-central to the medio-lateral portions of the epiblast in order.

Grafting an exogenous node into an anterior position of the host embryo led to the development of a secondary and imperfect brain structure. To investigate this process, mCherry-expressing quail nodes were transplanted at various anterior positions of chicken embryos, where the epiblast cells were randomly labeled with EGFP. The grafted node developed into the anterior mesendoderm (AME), followed by local gathering of host head precursors surrounding the graft-derived AME, which in turn led to the development of a secondary brain portion that reflected the regional specificity of the gathered head precursors. The AME's head precursor-gathering activity was mimicked by grafting COS cells secreting BMP antagonist Noggin.

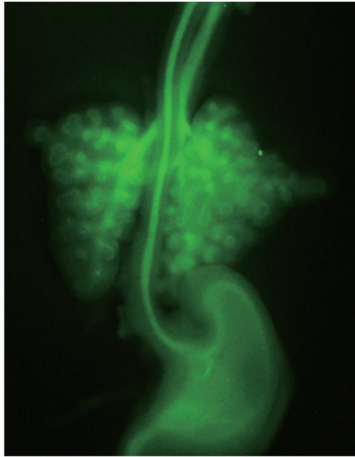
Our results indicate that node-derived AME provides a center for the gathering of brain precursors in the epiblast by inhibiting BMP signaling, which comprises the initial step of head morphogenesis.

(3) Endodermal SOX2 expression determines the esophagus character of the anterior foregut in both epithelial and mesenchymal components

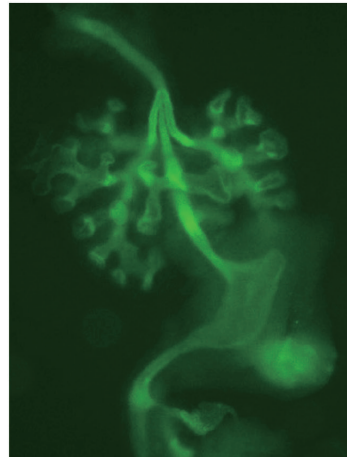
The TF SOX2 is expressed in the anterior endoderm and its derivative anterior foregut (AFG) epithelium, which further develops into the epithelia of esophagus and respiratory system. We investigated the consequence of endoderm-specific *Sox2* inactivation to clarify how SOX2 function is involved in the AFG development. The SOX2-less AFG epithelium developed into a single epithelial tube connecting the pharynx and stomach, from the middle of which a pair of bronchi branched out, as examined at E11~12.5. The SOX2-less AFG epithelium expressed trachea/bronchi-characteristic NKX2.1, indicating the change of esophagus to trachea/bronchus. SOX9 expression level in the epithelia varies depending on the region of the respiratory system: low from the trachea to proximal bronchi, and high in the distal bronchi. SOX2-less AFG epithelial tube from the pharynx to the middle was low in SOX9 expression, while its expression level increased toward the stomach, indicating that anterior and posterior halves of SOX2-less AFG epithelium developed as those of trachea and bronchi, respectively.

E12~13

Wild type



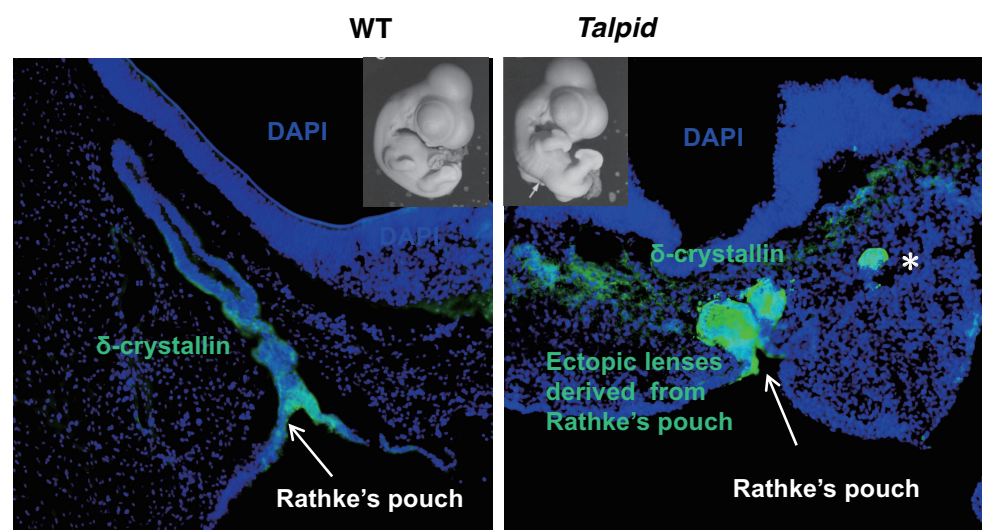
SOX2-less alimentary tract lacking esophagus



The mesenchymal tissues surrounding the esophagus and trachea/bronchi are clearly distinguished, e.g., the former expresses *Wnt4*, whereas the latter expresses SOX9 and *Tbx5*. The mesenchyme associated with SOX2-less AGF showed all characteristic of trachea/bronchi, indicating that the absence of SOX2 in the developing AFG epithelium also caused an overt change in the surrounding mesenchyme. Thus, endodermal SOX2 expression determines the esophagus character of the AFG in both epithelial and mesenchymal components.

(4) Development of multiple pituitary pouches from the oral ectoderm in hedgehog signaling-defective avian embryos causing ectopic lens development

Hedgehog signaling has versatile regulatory functions in tissue morphogenesis and differentiation. For the interest in its involvement in the pituitary precursor development and in the lens precursor potential of pituitary precursors, we investigated *Talpid* mutant Japanese quail embryos, which are defective in Hedgehog signaling. *Talpid* mutants developed multiple pituitary precursor-like pouches of variable sizes expressing the TF LHX3 from the oral ectoderm, in addition to normally positioned Rathke's pouch, which are collectively called pituitary pouches. Some parts of the pituitary pouches co-expressed TFs SOX2 and PAX6 in the nuclei, presumably primed for lens development, bulged out and activated TF PROX1 with concomitant loss of LHX3 expression. This was followed by the development of small lens tissues consisting of lens epithelium and lens fiber compartments and expressing all α -, β -, and δ -crystallins. Thus, hedgehog signaling acts on Rathke's pouch development in two different steps, first to confine Rathke's pouch development in the hedgehog signal-low area of oral ectoderm, and second to sustain LHX3 and to inhibit lens development from the pouch.



E4.5 quail embryos

4. 論文, 著書など

原著論文

Sugahara S, Fujimoto T, Kondoh H, Uchikawa M. (2018) Nasal and otic placode specific regulation of Sox2 involves both activation by Sox-Sall4 synergism and multiple repression mechanisms. *Dev Biol.* 433(1):61-74. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.11.005.

Kondoh H. (2018) Roles of ZIC2 in Regulation of Pluripotent Stem Cells. *Adv Exp Med Biol.* 1046:339-351. doi: 10.1007/978-981-10-7311-3_17.

Okamoto Y, Nishimura N, Matsuda K, Ranawakage DC, Kamachi Y, Kondoh H, Uchikawa M. (2018) Cooperation of Sall4 and Sox8 transcription factors in the regulation of the chicken Sox3 gene during otic placode development. *Dev Growth Differ.* 60(3):133-145. doi: 10.1111/dgd.12427.

5. 学会発表など

Hisato Kondoh. Mechanisms underlying lens transdifferentiation from neural retina and pituitary. Gordon Research Conference on Visual System Development. Il Ciocco, Italy, May 20-24 (2018). (Invited)

Koya Yoshihi, Kagayaki Kato, Hisato Kondoh. Live imaging of node graft and host cells to establish its role in head development. Joint Annual Meeting of 70th JSCB and 51st JSDB. Tokyo, Japan, June 5-8 (2018).

Hideaki Iida, Masanori Uchikawa, Hisato Kondoh. Regulation of a pan-neural Sox2 enhancer D1. Joint Annual Meeting of 70th JSCB and 51st JSDB. Tokyo, Japan, June 5-8 (2018).

Machiko Teramoto, Ryo Sugawara, Atsushi Kuroiwa, Yasuo Ishii, Hisato Kondoh. SOX2-dependent determination of tissue identities in the foregut. Joint Annual Meeting of 70th JSCB and 51st JSDB. Tokyo, Japan, June 5-8 (2018).

Hisato Kondoh. The pairing interaction dynamics of the transcription factor SOX2 with partner factors. International Symposium on "Proteins; from the Cradle to the Grave." Otsu, Japan. August 26-29 (2018). (Invited)

Hisato Kondoh. Mechanisms underlying lens transdifferentiation in neural retina cells and pituitary precursors. The 23rd Biennial Meeting of the International Society for Eye Research, Belfast, UK, September 9-13 (2018). (Invited)

Hisato Kondoh. A drastic change in the major regulatory TFs from SOX2-POU5F1 to ZIC2-OTX2 in the pluripotent stem cells representing preimplantation and post-implantation stages. EMBO WORKSHOP 2018 "Molecular Mechanisms of Regenerative and Developmental Biology." Singapore, November 11-13 (2018). (Invited)

飯田 英明、内川 昌則、近藤 寿人. D1エンハンサーによる、胚の中枢神経系と頭部神経堤におけるSox2発現の制御. 第41回日本分子生物学会年会. 横浜. 11月28-30日 (2018).

寺元 万智子、菅原 諒、黒岩 厚、石井 泰雄、近藤 寿人. 内胚葉で発現されるSOX2が前腸の上皮と間充織の双方を食道に発生させる. 第41回日本分子生物学会年会. 横浜. 11月28-30日 (2018).

近藤 寿人、中村 香絵、渡邊 優作、藤井 麻衣、稲森 祥子、飯田 英明. エピプラスト幹細胞を用いて、着床後に体細胞系列が生み出される機構を研究する. 第41回日本分子生物学会年会. 横浜. 11月28-30日 (2018).

6. その他特記事項

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

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

