

発生生物学研究室 Laboratory of Developmental Biology

研究員 (PI) Hisato Kondoh, Ph.D.

研究員 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。研究室としては、研究のまとめの段階にあり、研究成果の刊行に努めている。

2. 本年度の研究成果

(1) Sox2 遺伝子を、前腸の上皮に限定して欠損させると、消化器から呼吸器への転換がおきる

FoxA2-Cre を用いて、内胚葉由来の前腸上皮に限定して、マウス胚の *Sox2* 遺伝子を欠失させた。その胚では、転写因子 NKX2.1 を発現する気管・気管支の上皮の管が咽頭と胃をつなぎ、その中点から一対の気管支を生じていた。その中点と胃を繋ぐ部分の管は、第3の気管支としての性質を持っていた。上皮が作る管組織を取り囲む間充織 (SOX2 を発現しない) が、間接的に変化するかどうかを調べた。その結果、食道の間充織に特徴的な *Wnt4* の発現が失われ、呼吸器系に特徴的な *Tbx4* や *Hoxb6* が発現されていた。この結果から、食道の前駆体である前腸の上皮で転写因子 SOX2 の発現を失わせると、食道が、SOX2 の発現のない間充織を含めて、気管と気管支からなる呼吸器系の組織に変わることが明らかになった。多くの組織の発生において、間充織からのシグナルの効果によって上皮の性質が変化する例が多数知られている。しかし、本研究は、上皮の性質が間充織の性質を決定する具体例を示し、相互作用は双方向であることを明らかにした。

(2) エンハンサーD1 による、神経管と神経堤での Sox2 遺伝子の発現制御は、転写因子 SOX2 と ZIC2 の協同作用に依存している

転写因子 SOX2 は、さまざまな前駆体細胞の状態を制御しており、それらの発生段階に応じて異なったエンハンサーが *Sox2* 遺伝子を制御している。エピプラストから神経系が発生する初期段階では、頭部では N2 エンハンサーが、また体幹部から尾部にかけては N1 エンハンサーが、神経系への発生能を付与する第1段階での SOX2 発現をもたらしている。第2段階の、神経系前駆体に対応した SOX2 の発現を担うエンハンサーの1つが、D1 エンハンサーであると考えられている。D1 エンハンサーは神経堤でも活性をもち、最近注目されている神経堤での SOX2 の制御機能にも関わると予想される。そこで、D1 エンハンサーを活性化する転写因子を解析した。エンハンサーの配列への変異の導入の効果、エンハンサー配列への転写因子の結合の解析を組み合わせ、D1 エンハンサーが、SOX2 自身と ZIC2 という2つの転写因子の組み合わせで活性化されることを明らかにした。つまり、中枢神経系を特徴付ける転写制御には、SOX2 の自己活性化と、これまでも神経系の制御の中核をなすと考えられていた ZIC2 の協同作用が関わっている。

(3) エピプラスト幹細胞の集塊培養に細胞外基質を付加することによって、内胚葉を生み出す原腸陥入を模倣できる

消化管上皮等の前駆体は、転写因子 FOXA2 と SOX17 の共発現によって特徴付けられる。ES 細胞等から内胚葉の性質を持った細胞集団を生み出すことは、人為的なプロトコルによって実現可能であったが、胚発生のプロセスを再現したものではなかった。FOXA2 と共に EGFP を発現するエピプラスト幹細胞を用いて、次の培養操作を行った。エピプラスト幹細胞を浮遊集塊培養して、体細胞への発生の準備段階にシフトした上で、それを細胞外基質 (特に Laminin) に富んだ Matrigel の中で培養した。その条件下で、エピプラスト幹細胞は原腸陥入

と類似の変化を示した。まず、SOX17 を発現するが E-cadherin の発現を失った細胞が、Matrigel が占める空間に移動した。原腸陥入の模倣である。次いで、その集団は SOX17 と E-cadherin を共発現する、私塾した内胚葉の管に発生した。エピプラスト幹細胞から出発するこの培養操作を用いて、内胚葉の発生過程を、in vitro で研究できる。以上の過程で、SOX17 発現細胞は GATA4 発現細胞（心筋前駆体）の一部から派生した。これらの細胞系列の発生過程での関係が示唆された。

(4) ヘッジホッグシグナルが欠損した鳥類胚では、口腔外胚葉から異所的な下垂体原基を発生し、それらが更に異所的な水晶体を生む

SOX2 と PAX6 の転写因子ペアは、水晶体発生第 1 段階で作用する。これらの転写因子の発現があれば、水晶体以外の組織であっても、条件が整えば水晶体に発生する可能性がある。口腔外胚葉の最後端に発生する下垂体原基（ラトケ嚢）は、SOX2 と PAX6 のペアを発現する胚組織の例である。ヘッジホッグシグナルが欠損した変異体 (*Talpid*) ウズラの胚の頭部を調べると、口腔外胚葉近辺で小さな水晶体が発生することがわかったので、その詳細を検討した。*Talpid* 変異体では、ラトケ嚢以外の場所で、口腔外胚葉由来の異所的な下垂体原基（転写因子 LHX3 を発現）を生じていた。*Talpid* 変異体では、しかし、それらの下垂体原基での LHX3 の発現は維持されず、その代わりに水晶体発生第 2 段階で作用する転写因子 PROX1 が発現されて水晶体に変化することが明らかになった。したがって、ヘッジホッグシグナルは、下垂体原基の発生において、2 つの制御機能を持つ。まず、異所的な原基の発生を抑制すること、第 2 に、原基の LHX3 の発現を維持することである。

3. Research projects and annual reports

We have investigated how transcription factors (TFs) regulate developmental processes under the influence of the inflow of various external signals involving cell-cell or cell-substrate interactions. Our group is in the concluding phase, and publications of our achievements are underway.

This year's accomplishments

1) The absence of SOX2 in the anterior foregut alters the esophagus into trachea and bronchi in both epithelial and mesenchymal components. (doi:10.1242/bio.048728).

In the anterior foregut (AFG) of mouse embryos, the transcription factor SOX2 is expressed in the epithelia of the esophagus and proximal branches of respiratory organs comprising the trachea and bronchi, whereas NKX2.1 is expressed only in the epithelia of respiratory organs. We produced mouse embryos with AFG-specific SOX2 deficiency. In the absence of SOX2 expression, a single NKX2.1-expressing epithelial tube connected the pharynx and the stomach, and a pair of bronchi developed in the middle of the tube. Expression patterns of NKX2.1 and SOX9 revealed that the anterior and posterior halves of SOX2-deficient AFG epithelial tubes assumed the characteristics of the trachea and bronchus, respectively. In addition, we found that mesenchymal tissues surrounding the SOX2-deficient NKX2.1-expressing epithelial tube changed to those surrounding the trachea and bronchi in the anterior and posterior halves, as indicated by the arrangement of smooth muscle cells and SOX9-expressing cells and by the expression of *Wnt4* (esophagus specific), *Tbx4*

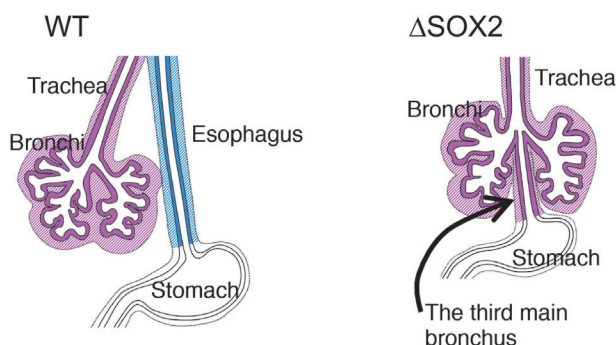


Figure 1. The loss of SOX2 in the epithelial tissues alters the esophageal characters of the anterior foregut into trachea and bronchi in both epithelial and mesenchymal components.

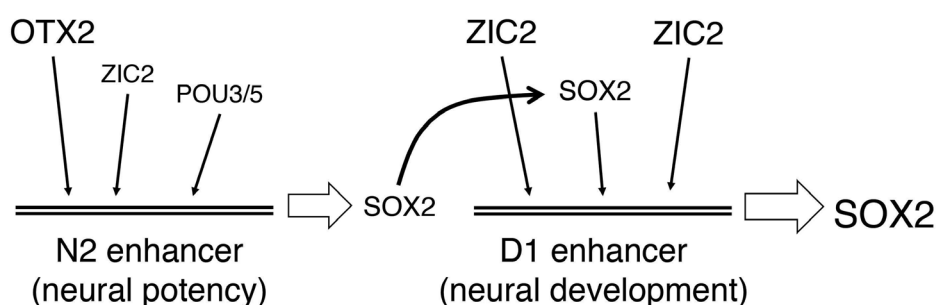
(respiratory organ specific), and *Hoxb6* (distal bronchus specific). The impact of mesenchyme-derived signaling on the early stage of AFG epithelial specification has been indicated. Our study demonstrated an opposite trend where epithelial tissue specification causes concordant changes in mesenchymal tissues, indicating a reciprocity of epithelial-mesenchymal interactions.

2) *Sox2* gene regulation via the D1 enhancer in embryonic neural tube and neural crest by the combined action of SOX2 and ZIC2. (doi: 10.1111/gtc.12753).

The transcription factor (TF) SOX2 regulates various stem cells and tissue progenitors via functional interactions with cell type-specific partner TFs that co-bind to enhancer sequences. In order to characterize the partner TFs of SOX2 in neural progenitors, we investigated the regulation of the D1 enhancer of the *Sox2* gene, which is activated in the embryonic neural tube (NT) and neural crest (NC), using chicken embryo electroporation. We determined SOX2 and ZIC2 as the major D1 enhancer-activating TFs. Binding of these TFs to the D1 enhancer sequence was confirmed by chromatin immunoprecipitation analysis. The combination of SOX2 and ZIC2 TFs activated the enhancer in both the NT and NC. These results indicate that SOX2 and ZIC2, which have been known to play major regulatory roles in neural progenitors, do functionally cooperate. In addition, the recently demonstrated SOX2 expression during the NC development is accounted for at least partly by the D1 enhancer activity.

Figure 2

Sox2 gene enhancers regulating different stages of neural development

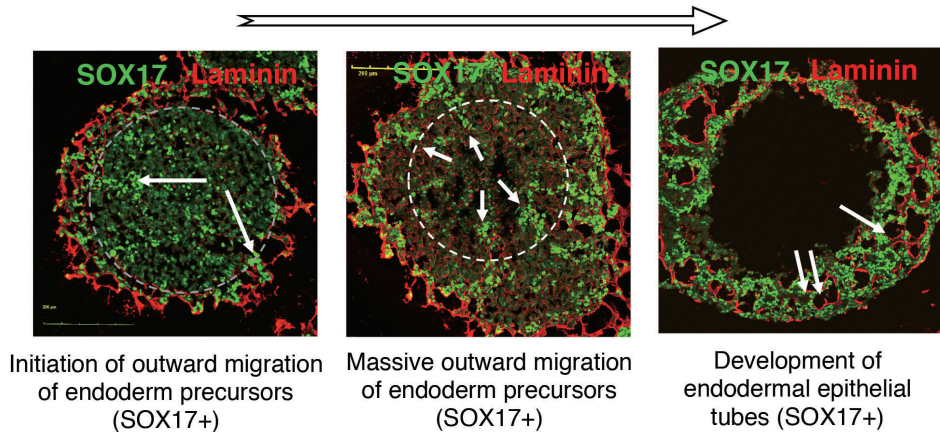


3) Modeling early stages of endoderm development in epiblast stem cell aggregates with supply of extracellular matrices. (doi: 10.1111/dgd.12663).

Endoderm precursors expressing *FoxA2* and *Sox17* develop from the epiblast through the gastrulation process. To investigate this process, we established an EpiSC line i22, in which enhanced green fluorescent protein is coexpressed with *Foxa2*. Culturing i22 EpiSCs as aggregates for a few days was sufficient to initiate *Foxa2* expression, and further culturing of the aggregates in Matrigel promoted the sequential activation of transcription factor genes involved in endoderm precursor development, e.g., *Eomes*, *Gsc*, and *Sox17*. In aggregation culture of i22 cells for 3 days, all cells expressed *POU5F1*, *SOX2*, and E-cadherin, whereas expression of *GATA4* and *SOX17* was also activated moderately in dispersed cells, suggesting priming of these cells to endodermal development. Embedding the aggregates in Matrigel for further 3 days elicited migration of the cells into the lumen of laminin-rich matrices, in which *FOXA2* and *SOX17* were expressed at a high level with the concomitant loss of E-cadherin. Prolonged culturing of the aggregates generated three segregating cell populations found in post-gastrulation stage embryos: (1) definitive endoderm co-expressing high

SOX17, GATA4, and E-cadherin, (2) mesodermal cells expressing a low level of GATA4 and lacking E-cadherin, and (3) primed epiblast cells expressing POU5F1, SOX2 without E-cadherin. Thus, aggregation of EpiSCs followed by embedding of aggregates in the laminin-rich matrix models the gastrulation-dependent endoderm precursor development.

Figure 3
In vitro model of endoderm-producing gastrulation

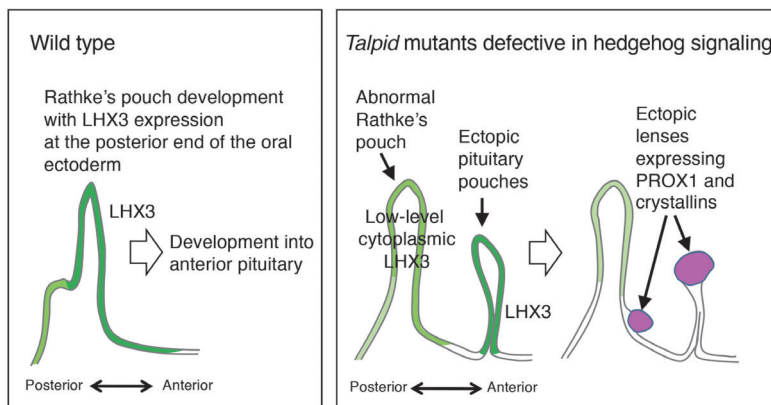


4) The formation of multiple pituitary pouches from the oral ectoderm causes ectopic lens development in hedgehog signaling-defective avian embryos (doi: 10.1002/dvdy.222)

Hedgehog signaling has various regulatory functions in tissue morphogenesis and differentiation. To investigate its involvement in anterior pituitary precursor development and the lens precursor potential for anterior pituitary precursors, we investigated *Talpid* mutant Japanese quail embryos, in which hedgehog signaling is defective. *Talpid* mutants develop multiple pituitary precursor-like pouches from the oral ectoderm (OE). The ectopic pituitary pouches initially expressed the pituitary-associated transcription factor (TF) LHX3 similarly to Rathke's pouch, the genuine pituitary precursor. The pouches coexpressed the TFs SOX2 and PAX6, a signature of lens developmental potential. Most *Talpid* mutant pituitary pouches downregulated LHX3 expression and activated the lens-essential TF

PROX1, leading to the development of small lens tissues. We concluded that hedgehog signaling in normal embryos regulates the development of Rathke's pouch in two steps. First, by confining Rathke's pouch development in a low hedgehog signaling region of the OE. Second, by sustaining LHX3 activity to promote anterior pituitary development, while inhibiting ectopic lens development.

Figure 4



4. 論文, 著書など

原著論文

Teramoto M, Sugawara R, Minegishi K, et al. The absence of SOX2 in the anterior foregut alters the esophagus into trachea and bronchi in both epithelial and mesenchymal components. *Biol Open*. 2020;9(2):bio048728. doi:10.1242/bio.048728

Iida H, Furukawa Y, Teramoto M, et al. Sox2 gene regulation via the D1 enhancer in embryonic neural tube and neural crest by the combined action of SOX2 and ZIC2. *Genes Cells*. 2020;25(4):242-256. doi:10.1111/gtc.12753

Inamori S, Fujii M, Satake S, et al. Modeling early stages of endoderm development in epiblast stem cell aggregates with supply of extracellular matrices. *Dev Growth Differ*. 2020;62(4):243-259. doi:10.1111/dgd.12663

5. 学会発表など

Hideaki Iida, Masanori Uchikawa, Hisato Kondoh. "Possible Sox2 autoregulation involving POU partner factors in the establishment of embryonic neural primordia." 52nd Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biologists in conjunction with Asia-Pacific Developmental Biology Network. May 2019, Osaka.

Machiko Teramoto, Ryo Sugawara, Atsushi Kuroiwa, Yasuo Ishii, Hisato Kondoh. Endodermal SOX2 expression determines the esophagus character of the anterior foregut in both epithelial and mesenchymal components." 52nd Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biologists in conjunction with Asia-Pacific Developmental Biology Network. May 2019, Osaka.

Hisato Kondoh, Koya Yoshihi, Hideaki Iida, Machiko Teramoto, Kagayaki Kato. "A new fate map and anterior mesendoderm-dependent regulation of brain precursor development determined via live imaging of avian embryos." 52nd Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biologists in conjunction with Asia-Pacific Developmental Biology Network. May 2019, Osaka.

Hisato Kondoh. "Changing SOX partners during the developmental progression of stem cells." Vth International SOX Research Conference. Sept-Oct, 2019, L'Isle-sur-la-Sorgue, France.

渡邊優作, 中村香絵, 三上智之, 近藤寿人 「光褪色後蛍光回復法 (FRAP) による神経幹細胞内の SOX2 のパートナー転写因子との相互作用の解析」 第 42 回日本分子生物学会年会 2019 年 12 月 福岡

飯田 英明, 内川 昌則, 近藤 寿人 「単一エンハンサー内での SOX2-ZIC2、SOX2-PAX3 の 2 つの転写因子相互作用によって、Sox2 遺伝子が神経系と神経堤で活性化される」 第 42 回日本分子生物学会年会 2019 年 12 月 福岡

Mai Fujii, Sachiko Inamori, Machiko Teramoto, Hideaki Iida, Hisato Kondoh "Modeling node-proximal gastrulation in epiblast stem cells." 第 42 回日本分子生物学会年会 2019 年 12 月 福岡

寺元 万智子, 菅原 諒, 黒岩 厚, 石井 泰雄, 近藤 寿人 「食道上皮での SOX2 発現が失われると、上皮だけでなく間充織までも気管と気管支に変わる」 第 42 回日本分子生物学会年会 2019 年 12 月 福岡

Hisato Kondoh, Koya Yoshihi, Machiko Teramoto, Hideaki Iida, Kagayaki Kato. "A new live imaging technique of avian embryos determining a revised fate map and mesendoderm-dependent gathering of brain precursors." 第 42 回日本分子生物学会年会 2019 年 12 月 福岡

6. その他特記事項

1) 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ブ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：2017-2020 年度（4 年）

科学研究費補助金 若手研究者 課題名：内胚葉から食道領域が間充織とともに作り出される機構 研究代表者：寺元万智子、取得年度：2019-2020 年度（2 年）

2) 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

JST さきがけ「多細胞」領域 アドバイザー

JT 生命誌研究館顧問

International SOX Research Conference Steering Board