

氏 名 石橋 みなか

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1245 号

学位授与の日付 平成 21 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Evolution of Highly Conserved Non-coding Sequences in  
ParaHox Clusters and their Function

論文審査委員 主 査 教授 五條堀 孝  
教授 城石 俊彦  
准教授 高野 敏行  
准教授 平田 たつみ  
准教授 池尾 一穂  
教授 西賀 秀俊（首都大学東京）

## 論文内容の要旨

Cis-regulatory element is a functional unit controlling gene expression spatially and temporarily. Acquisition, retention and/or loss of cis-regulatory elements during evolution can alter gene expression patterns. Especially cis-element of transcription factors expressed in developmental process, as typified by tool-kit genes, would be key to understand evolutionary novelty emerged through vertebrate evolution.

ParaHox genes are tool-kit genes that are controlling anterior-posterior body axis determination in vertebrates. ParaHox genes play important roles for digestive gut differentiation in both vertebrates and invertebrates. The ParaHox gene clusters consist of three class of homeobox containing genes, Gsh1/2, Pdx1 and Cdx1/2/4. There are four ParaHox clusters in mammalian genome, most likely as a consequence of two round whole genome duplications. Despite their importance in development, cis-regulatory mechanisms of ParaHox gene clusters, particularly Gsh genes that functions in segmented anterior brain in vertebrates, have not been studied well. Our analysis and previous studies suggested that evolutionarily conserved sequences in ParaHox non-coding regions are strong candidates as tissue specific cis-regulatory elements. In this study, to search for cis-regulatory elements in ParaHox gene clusters, comparative genomics were conducted by using diverse species of vertebrates. Furthermore cis-regulatory candidates were functionally tested by transgenic mice experiments to clarify their enhancer activities.

I operated genomic sequences comparison of the vertebrate Gsh1-Pdx1-Cdx2 cluster. Multiple conserved non-coding sequences are identified in ParaHox clusters by this analysis and they were termed as CNSPs. The 1012bp CNSP#1, the most evolutionarily conserved element within Gsh1-Pdx1-Cdx2 cluster, showed the highly reproducible reporter gene expression pattern in central nervous system that was similar to endogenous mRNA expression pattern of Gsh1 gene.

Another highly conserved sequences among vertebrates were found in the paralogous Gsh2 gene cluster, too. One of the conserved sequences termed CNSG2#2/#4 was found in similar relative position to Gsh gene coding region. The 1246bp CNSG2#2/#4 drove lacZ expression largely similar to Gsh2 endogenous expression in anterior brain.

Interestingly expression pattern of CNSG2#2/#4 was more similar to that of CNSP#1 than its neighboring Gsh2 gene. This prompted me to search for any sequence similarity between CNSP#1 and

CNSG2#2/#4, and then I found approximately 200bp conserved core sequences between these elements. Based on the synteny and phylogenetic relationship between these clusters, I conclude that CNSP#1 and CNSG2#2/#4 were generated by whole genome duplication event at ancestral vertebrate era and core homologous 200bp sequence have been preserved for some functional reason. Paralogous conservation between CNSP#1 and CNSG2#2/#4 strongly suggested that core conserved 200bp element already existed in the ancestral primitive vertebrate. If we assume that core sequence is directly related to the cis-regulatory function in segmented anterior brain, we could suppose that the ancestral primitive vertebrate already had segmented brain. Function of the shared 200bp element between CNSP#1 and CNSG2#2/#4 should be tested in the future, that will not only clarify its biological function in extant vertebrates but also give a hint to understand the timing of emergence of evolutionary novelty in ancestral vertebrates.

#### 論文の審査結果の要旨

ParaHox 遺伝子群は、脊椎動物の体制において前後軸の決定を制御するのに重要な役割を果たすことが知られている。ParaHox 遺伝子群はクラスターを構成し、homeobox ドメインを含む 3 種類の遺伝子 Gsh1/2、Pdx1、Cdx1/2/4 から成り立っている。これらの遺伝子の転写の発現調節の進化的変化が脊椎動物の体制や形態の進化に大きく影響したことが予想されることから、ParaHox 遺伝子クラスターにおける cis エlement を同定して、その進化的な過程を解明することは重要なことである。

このため、石橋さんは脊椎動物の ParaHox 遺伝子クラスターから cis エlement を同定して、その進化的な過程を明らかにする目的で、脊椎動物の全ゲノムが解読されている生物種に注目して ParaHox クラスターのゲノム領域の比較解析を行った。その結果、このクラスター内において、Gsh1-Pdx1-Cdx2 と Gsh2 の近くの非コード領域に非常によく保存された領域をそれぞれ 1 つずつ計 2 つを発見し、それらを CNSP#1 と CNSG2#2/#4 と名付けた。

次に、これらが実際に cis エlement としてエンハンサー活性をもつかどうかを調べるため、トランスジェニックマウスを作成して、Gsh1 と Gsh2 の発現パターンと比較したところ、2 つとも内在的な mRNA の発現パターンと非常に類似するレポーター遺伝子の発現パターンを示すことを明らかにした。このことから、石橋さんが発見した非コード領域の 2 つの進化的に保存された部分は、cis エlement である可能性が高いことがわかった。また、これらの 2 つの領域はゲノム重複に由来する 2 つの ParaHox 遺伝子クラスターに配列相同性を持ちながら存在することから、それらは脊椎動物の共通祖先においてすでに保持されていたことを意味することを指摘した。さらに、石橋さんは、これら 2 つのエンハンサーに共通して存在するコア配列が約 200bp からなっていることを見つけ、神経発生に重要な転写因子の結合領域を含むことを推定した。このように、本研究では、ゲノム比較を通して非コード領域の保存配列を同定し、その機能解析と分子進化解析を結び付けることによって、cis エlement の進化過程と機能分化の関連を見ることができると可能性を端的に示したものである。

以上のことから、石橋さんの本研究と学位論文は学位を授与するに十分に値すると判断した。