

氏 名 富永 齊

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2089 号

学位授与の日付 平成 31年 3 月 22日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 ナメクジウオ *Brachyury* エンハンサー活性と脊索動物の進化

論文審査委員 主 査 教授 高田 慎治
教授 上野 直人
教授 新美 輝幸
教授 澤田 均 名古屋大学
大学院理学研究科

(Form 3)

Summary of Doctoral Thesis

Tominaga, Hitoshi

Title **Amphioxus *Brachyury* enhancer activity and chordate evolution**
(ナメクジウオ *Brachyury* エンハンサー活性と脊索動物の進化)

Phylum chordate has specific body plan, such as neural tube, somite, and notochord. Among them, notochord is the most important organ that induce neural tube and somite morphogenesis. Notochord is a rod like organ that is made of vacuolar cells, and no other phyla have similar organs. This indicates that notochord acquisition must have been the key event of chordate evolution. In notochord development, a transcription factor *Brachyury* has an important role. This gene is known as a mesodermal marker in vertebrate, and a key regulator of notochord differentiation in not only vertebrates but also urochordate ascidian. In vertebrates, *Brachyury* is first expressed around blastopore, and in later stages, the expression segregates into notochord and tail bud. On the other hand, this gene is also found in non-chordate animal and they express in blastopore. This indicates that chordate acquired new *Brachyury* expression region, and that triggered the evolution of notochord and chordate body plan.

Enhancer mutation is known to alter gene expression pattern, suggesting that gain of new *Brachyury* enhancer brought new expression sites and notochord in chordate ancestors. Some vertebrates are known to upregulate *Brachyury* expression by distinct enhancers in blastopore and notochord. The question is how vertebrate ancestors evolved these enhancers. The answer lays in the basal chordate, amphioxus. Amphioxus is known to express *Brachyury* in blastopore, notochord and developing somite. Although the expression pattern is similar to vertebrate, there was no knowledge of amphioxus *Brachyury* enhancer constitution.

Amphioxus *Branchiostoma floridae* have two *Brachyury* genes in the genome, namely, *BfBra1* and *BfBra2*. These two genes are very similar to each other with 90 % identity at the

(Form 3)

nucleotide level, and 95 % at the amino acid level, which in turn indicates that these two genes duplicated in recent time, and it occurred in amphioxus lineage. In this study, I investigated the enhancer constitution of these two genes. VISTA analysis revealed that these two genes have conserved non-coding sequences in upstream regions. In addition, a comparison of a sequences surrounding *Brachyury* of two closely related species *Branchiostoma floridae* and *Branchiostoma belcheri* revealed that there are many conserved sequences around *Brachyury* genes, suggesting that these regions have enhancer activities.

To evaluate amphioxus *Brachyury* enhancer activities, I employed *in vivo* reporter assay. I cloned upstream regions of *BfBra1* and *BfBra2* from *B. floridae* genome, then I flanked them to *LacZ* reporter gene. At first, I examined transcriptional activity of these constructs in amphioxus. Although I confirmed *LacZ* expression in notochord, somite and tail bud with both constructs, some non-specific signals were observed. Therefore, I attempted to test these constructs in ascidian *Ciona intestinalis* (Type A) which had a simple chordate body plan at larval stages. Ascidiars express innate *Brachyury* only in notochord (dorsal blastopore), but upstream regions of both *Brachyury* genes from the amphioxus upregulated *LacZ* expression in muscle cells of ascidians. I also examined other enhancer regions which are downstream and intron regions of *BfBra1* and *BfBra2*. As these regions do not include innate basal promoters, I inserted *Ciona intestinalis* *Brachyury* basal promoter between amphioxus genome fragments and *LacZ* gene. As results, downstream regions of both genes upregulated *LacZ* expression in notochord, and *BfBra1* intron regions also upregulated in notochord, *BfBra2* intron regions upregulated in blastopore.

As a summary, given that ascidian muscle is a homologous tissue of amphioxus somite, I speculate that these identified regions cover all amphioxus *Brachyury* expressing regions revealed by *in situ* hybridization and demonstrated that the enhancers are located in a dispersed manner. Especially, in amphioxus *Brachyury* genes, I identified for the first time a blastopore-specific enhancer and also two distinct enhancers for notochord and lateral mesoderm in later development. Furthermore, amphioxus sub-functionalized the enhancers of *Brachyury* genes in their lineage upon gene duplication because *BfBra2* has all of three types of enhancers, while *BfBra1* altered

(Form 3)

the blastopore enhancer that exists in intron to notochord enhancer. This study revealed that amphioxus has complex enhancer constitution as much as vertebrate to support *Brachyury* expression in blastopore, lateral mesoderm, and notochord. This indicates that in the early stage of chordate evolution, amphioxus invented this complex gene regulatory mechanism, which is shared by other vertebrates to develop their specific body plan.

博士論文審査結果

Name in Full
氏 名 富永 斉

Title
論文題目 ナメクジウオ *Brachyury* エンハンサー活性と脊索動物の進化

脊索動物門は、脊索、神経管、側方中胚葉といった特徴的な構造を持つ。特に脊索は神経管や体節の形態形成に関わる重要な形質であり、他の動物門に類似の構造は見られない。このことは、脊索動物門において脊索形質の獲得が、脊索動物のボディプランの進化において重要であったことを示唆する。また、脊索の発生には転写因子 *Brachyury* が重要な働きを持つことが知られている。しかし、*Brachyury* の役割は脊索形成に特化したものではなく、もともと原腸形成に関連した役割を持っていたものが、脊索動物の進化の際に脊索形成に関わったものと考えられる。脊椎動物においては、*Brachyury* はまず原口周辺に発現し、その後その発現は脊索と尾芽に限局される。一方で、この遺伝子は脊索を持たない動物にも存在し、原腸胚期に原口周辺での発現が見られる。したがって、脊索動物の共通祖先において原口周辺での発現に加えて、新たな脊索での発現機能を獲得したことが脊索動物のボディプランの起源と進化に重要であったと考えられる。出願者、富永斉氏は祖先的な脊索動物である頭索動物ナメクジウオの *Brachyury* 発現制御機構に着目し、本学位論文の研究を行なった。

ナメクジウオの一種フロリダナメクジウオ (*Branchiostoma floridae*) は、ゲノム中に二つの *Brachyury* 遺伝子、*BfBra1* と *BfBra2* を持つ。これらの遺伝子は配列が非常に似ており、ナメクジウオの系統で独立に倍加したことが示されている。本研究では、VISTA プログラムを用いて、これら二つの遺伝子の発現調節機能を担うエンハンサー構造を検索し、上流領域に二つの遺伝子の間で保存された配列があることを明らかにした。また、フロリダナメクジウオとその近縁種である *Branchiostoma belcheri* におけるゲノム配列比較から、二つの遺伝子の周辺に多数の保存された配列が存在し、これらの領域が何らかのエンハンサー活性を持っている可能性を示唆した。

Brachyury エンハンサーの生体内での機能を調べるために、フロリダナメクジウオの *BfBra1* と *BfBra2* の上流領域をクローニングし、*LacZ* レポーター遺伝子に連結したプラスミドによるレポーターアッセイを行った。作製したレポーターコンストラクトをナメクジウオ卵に顕微注入して発現を検出したところ、脊索や体節、尾芽で発現が確認できたが、他部位での発現も多く検出され、有意な発現部位の同定が困難であると判断した。そこで、脊索動物のボディプランを単純化した構造を持つ尾索動物のカタユレイボヤをホストの胚として用いて同様の解析を行なった。その結果、カタユレイボヤ自身の *Brachyury* 遺伝子は原口背側から発生する脊索の系譜でのみ発現するが、*BfBra1* と *BfBra2* の上流領域はともにカタユレイボヤの筋肉で *LacZ* 発現を駆動した。さらに、カタユレイボヤを使ってさらに下流領域やイントロン領域に存在するエンハンサー活性も調べた結果、両遺伝子の下流領域はカタユレイボヤの脊索で *LacZ* 発現を駆動したが、イントロン領域で

は両遺伝子の間に差異が見られた。*BfBra1*のイントロン領域が脊索での*LacZ*発現を駆動したのに対し、*BfBra2*のイントロン領域は原腸胚期に原口周辺で*LacZ*発現を駆動した。これらの実験結果から、出願者は得られた*LacZ*発現領域はナメクジウオの*Brachyury*発現領域の全てを網羅していると結論づけた。

本研究において、出願者はナメクジウオ*Brachyury*の原口周辺、脊索、体節での発現を制御するエンハンサーを初めて明らかにした。また、*BfBra2*が三種類のエンハンサーをすべて持つのに対して、*BfBra1*はイントロン領域に存在する原口エンハンサーを脊索エンハンサーに変化させていたことから、この遺伝子は倍化後に機能分化を起こしたものと推察した。以上、ナメクジウオ*Brachyury*エンハンサー活性の解析から脊索動物の進化の道筋を提示した本研究は学位授与に相応しいと審査員全員が一致して判断した。

(備考)

1. 用紙の大きさは、日本工業規格 (JIS) A 4 縦型とする。
2. 1 行あたり 40 文字 (英文の場合は 80 文字)、1 ページ当たり 40 行で作成する。
3. 上マージン、下マージン、右マージンは 2 cm、左マージンは 2.5 cm とする。
4. タイトルと本文の間は、1 行空ける。
5. ページ番号は入れない。
6. 出願者 (申請者) が論文審査に合格し、博士号が授与された場合は、本紙を総合研究大学院大学リポジトリにおいて、インターネット公開する。

Note:

1. The sheets must be Japanese Industrial Standard (JIS) A4 vertical.
2. Each line shall have approximately 40 characters in Japanese or 80 characters in English, and each page shall have 40 lines.
3. The top, bottom, and right margins must be 2 cm and the left one must be 2.5 cm.
4. Single spacing is required between the title and the text.
5. There must be no page numbers.
6. If the applicant is conferred a doctoral degree, this paper will be published on the SOKENDAI Repository.