

ナメクジウオ Brachyury エンハンサー活性と  
脊索動物の進化

富永 斉

博士（理学）

総合研究大学院大学  
生命科学研究科  
基礎生物学専攻

平成30（2018）年度

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

富永 斉

博士（理学）

総合研究大学院大学

生命科学研究科

基礎生物学専攻

平成30（2018）年度

# 目次

1. 序論	
1-1. 左右相称動物のボディプラン研究史	1
1-2. 脊索動物の特異的ボディプラン	2
1-3. 脊索動物の系統的位置	2
1-4. 動物界および脊索動物門における <i>Brachyury</i> 遺伝子の保存性とその機能	3
1-5. エンハンサーと遺伝子発現の進化	4
1-6. エンハンサー研究の概略と <i>Brachyury</i> エンハンサーにおける現在の知見	5
1-7. 脊索動物門におけるナメクジウオの系統的位置	7
1-8. 結果の概略	9
2. <i>Bra1</i> と <i>Bra2</i> の類似性及びナメクジウオ系統における保存性	
2-1. 緒言	11
2-2. 材料と方法	12
2-3. 結果	12
2-4. 考察	16
3. ナメクジウオ胚における <i>Brachyury</i> 上流領域の転写調節機能	
3-1. 緒言	17
3-2. 材料と方法	18
3-3. 結果	19
3-4. 考察	20
4. カタユウレイボヤ胚におけるナメクジウオ <i>Brachyury</i> エンハンサーの転写調節機能	
4-1. 緒言	22
4-2. 材料と方法	22
4-3. 結果	25
4-4. 考察	27
5. 総括	
5-1. フロリダナメクジウオ <i>Brachyury</i> のエンハンサー構成	31
5-2. 脊索動物の <i>Brachyury</i> エンハンサーの進化	32
6. 参考文献	35
7. 付録	
7-1. プライマー表	42
7-2. データ表	44
8. 図	47

## 略語表

<i>Bra1</i>	: <i>Brachyury1</i>
<i>Bra2</i>	: <i>Brachyury2</i>
<i>BfBra1</i>	: <i>Branchiostoma floridae Brachyury1</i>
<i>BfBra2</i>	: <i>Branchiostoma floridae Brachyury2</i>
<i>CiBra</i>	: <i>Ciona intestinalis Brachyury</i>
CMFSW	: Calcium-Magnesium Free Sea Water
HCR	: Highly Conserved Region
LacZ	: $\beta$ -galactosidase
MOPS	: 3-( <i>N</i> -morpholino)propanesulfonic acid
NLS	: Nuclear Localization Signal
PBS	: Phosphate Buffered Salts
PBS-T	: PBS+Tween20
UCR	: Upper Conserved Region
X-Gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

# 1. 序論

## 1-1. 左右相称動物のボディプラン研究史

動物界の各分類群は、それぞれの分類群を特徴づける諸構造、ボディプランを持つ。まず動物界は、器官構造を持たない海綿動物と、筋、神経などの器官系を持つ真正後生動物に分類することができる。さらに、真正後生動物は二胚葉性の腔腸動物と、三胚葉性からなる体と明瞭な前後軸、それに伴う中枢神経系や管状の消化器官を進化させた左右相称動物に分類される(Telford et al, 2015)。左右相称動物は、古くから互いの類似性を指摘され、18世紀には既に脊椎動物と節足動物、環形動物の間で形態学的な比較が行われていた(Sedgwick, 1884)。20世紀後半に分子生物学が導入されて以降、ホメオティック遺伝子による前後軸決定機構に端を発する遺伝子レベルでの類似性も注目され、発生遺伝学的な視点から進化を解明しようとする進化発生学(Evo-Devo)分野の研究が急速に進展した(De Robertis, 2008)。また、各種発生遺伝子の配列や発現様式および機能が詳細に調べられたことで、発生を制御する遺伝的機構には左右相称動物間で類似性が存在することも明らかになった(Shubin et al., 2009)。

## 1-2. 脊索動物の特異的ボディプラン

このように、左右相称動物のボディプランの類似性が体系的に説明できるようになってきた一方で、未だに説明が困難な問題も存在する。例えば、脊索動物固有の器官である脊索は、脊索動物門以外のどの動物にも類似した器官が見られない。また、中枢神経系が背側に存在することは背腹軸の反転で説明できるものの(De Robertis and Sasai, 1996)、なぜ管状の神経管を形成するようになったかは説明できていない。また、体の両側に整然と並ぶ中胚葉原基（体節）も、他の動物群には見られない特徴である（図 1）。

## 1-3. 脊索動物の系統的位置

20 世紀後半以降、分子系統学が発展したことにより、形態的類似性に依らない客観的な系統分類が可能になった。その結果、左右相称動物の系統は冠輪動物、脱皮動物、後口動物の大分類に分けられた。脊索動物はこのうち後口動物に含まれ、姉妹群に、棘皮動物と半索動物を合わせた水腔動物とよばれるグループを持つ(Telford et al., 2015)（図 2）。後口動物という分類は、それより以前から提唱されていた分類群であり、体の器官を作る最初の形態形成運動である原腸陥入が、肛門付近から行われるという特徴によって定義されていた(Huxley, 1875)。最近では、背腹軸形成に Nodal 因子が関わるなどの分子発生的な類似性も知

られるようになった(Lapraz et al., 2015)が、やはりこの水腔動物も脊索や神経管を持たない上に、体節も持たない(Sabrina et al., 2013, Gonzalez et al., 2018, Lacalli, 1996, Kevin et al., 2000)。そのため、脊索動物固有のボディプランの成立過程を知るためには、脊索動物固有の発生メカニズムを知ることが鍵となる。

#### 1-4. 動物界および脊索動物門における *Brachyury* 遺伝子の保存性とその機能

*Brachyury* はネズミの短尾突然変異(*T*)から見つかった遺伝子である(Chesley, 1935)。この遺伝子は、最初は劣性変異体として記載され、ヘテロ接合体では尾が短くなることから見つかった。ホモ接合体は胎児期に体幹部中胚葉の形成不全をきたし、胚性致死となる(Bernhard, 1995)。これらの表現型は、ゼブラフィッシュの *Brachyury* ホモログである *notail* と、*Brachyury* の二重変異体でも確認されている(Martin et al., 2008)。脊椎動物における *Brachyury* の発現パターンとしては、まず原口や原条で発現し、その後体幹部後方の未分化な体幹前駆体での発現が維持される。また脊索では、原腸胚期に原腸の背側で発現が開始され、脊索として分化した後も長期間発現を続ける(Latinkic et al., 1997)。尾索動物においては、*Brachyury* は原口全体での発現は見られないが、脊索を形成する細胞系譜で発現が見られる(図3)。尾索動物においてこの発現をアンチセンスモルフオリノヌクレオチド(MO)を用いてノックダウンすると、脊索は正しく形成さ

れない(Satou, et al., 2001)。その一方、mRNA のインジェクションによって過剰発現させると、異所的に脊索が形成される(Takahashi et al., 1999a)。これらの事実から、*Brachyury* は脊索の分化・維持に特に重要な遺伝子であると考えられる。

一方で *Brachyury* は脊索動物のみならず動物界に広く保存された遺伝子であり、その共通した役割は原腸陥入における細胞運動と胚葉分化である(Gross, et al., 2001, Singer et al., 1996, Yasuoka et al., 2016)。これらの発現と機能は脊索動物における原口でのものと同様であると思われるが(Satoh et al., 2000, Yamada et al., 2010)、脊索での発現は当然ながら脊索動物にしか見られない。このため、脊索動物では、胚葉分化に機能していた *Brachyury* が何らかの理由で機能変化を起こし、それが脊索という新規形質を獲得する鍵となった可能性がある。

## 1-5. エンハンサーと遺伝子発現の進化

ジャコブとモノーが大腸菌における Lac オペロンを発見して以降(Jacob & Monod, 1961)、遺伝子発現を制御するゲノム領域であるエンハンサーが、生物機能において重要な役割を果たしているという考えが広まった。このアイデアはやがて多細胞生物の発生といった高次生命現象にもあてはめられ、動物の発生過程で機能するエンハンサーを探索する研究が進んだ。その結果、様々な動物から、多くのエンハンサーが発見された(Irimia et al., 2012)。また、エンハン



サーが遺伝子のコーディング領域と比較して単純な配列であることや、一つの遺伝子に対して多数のエンハンサーが存在することなどから、コーディング領域よりもエンハンサーの進化が動物の進化に重要な役割を果たしたと考えられるようになった(Averof et al., 1996)。 *Brachyury* 発現の進化においても、脊索での発現を誘導する新たなエンハンサーの獲得が起こったと考えられる。すなわち、脊索動物の祖先の段階では、原口周辺での *Brachyury* 発現を誘導する一次的なエンハンサーのみが存在していたところに、新たに原腸背側で発現を誘導する二次的なエンハンサーが獲得され、それが脊索の進化の鍵となったと理解されている。

#### 1-6. エンハンサー研究の概略と *Brachyury* エンハンサーにおける現在の知見

エンハンサーの機能を探るうえで、レポーターアッセイは有効な研究手法である。これは、基本プロモーター (basal promoter) を含む遺伝子上流領域に、*GFP* や *LacZ* といった発現場所の特定が容易なレポーター遺伝子を繋ぎ、上流領域のエンハンサー活性を調べるというものである。基本プロモーターを介して繋ぐことにより、イントロンや下流領域のエンハンサー活性を調べることができる。この手法は、ゲノム上のエンハンサーの所在や機能を調べるために用いることができる(Kvon, 2015)。

これまで、脊索動物の *Brachyury* エンハンサーの研究は、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエル、マボヤ、カタユレイボヤで行われてきた。マボヤやカタユレイボヤといった尾索動物では、上流領域に脊索での発現を誘導するエンハンサーが存在する。尾索動物の脊索は、背側原口に存在する細胞に由来するので、*Brachyury* の発現は特定の細胞系譜にしか見られないが、この発現を誘導するエンハンサーは *Brachyury* 遺伝子上流領域に存在する (Corbo et al., 1997, Matsumoto et al., 2007)。脊椎動物ではより複雑な制御を受けており、アフリカツメガエルの *Brachyury* の上流 2.1 kbp は発生初期には原口全体での発現を誘導するが、原腸陥入が開始すると、脊索以外の原腸腹側での発現を制御するようになる (Latinkic et al., 1997, Lerchner et al., 2000)。この発現の変化がなぜ起こるかは分かっていないが、この領域には初期に原口周辺で発現を制御するエンハンサーと、より後期に原口腹側での発現を制御するエンハンサーの二つが存在する可能性もある。また、ゼブラフィッシュでは、上流領域に二種類のエンハンサーが存在し、それぞれ原口腹側と原口背側での発現を制御していることがわかっている (Harvey et al., 2010)。この原口腹側は、将来側方中胚葉 (体節+側板) に発生する部位であり、原口腹側は脊索に発生する部位である (図 4)。これらのことから、脊椎動物の *Brachyury* エンハンサーは、少なくとも原口、側方中胚葉、脊索の発現を制御する三種類が存在するものと考えられる。

それでは、このエンハンサーの組み合わせは脊椎動物固有のものなのだろうか、それとも脊索動物の祖先の段階で既にあったものなのだろうか？脊椎動物のエンハンサーセットを祖先的であると仮定した場合、先述した様な一次的エンハンサー+二次的エンハンサーに基づくモデルのみでは脊索動物の進化を説明しきれず、脊索動物の進化過程はもう少し複雑なものであった可能性が出てくる。それを調べるためには、Olfactores（脊椎動物+尾索動物）の姉妹群にあたる基部的脊索動物であるナメクジウオのエンハンサー構造の所見が必要となる。しかしながら、ナメクジウオの *Brachyury* エンハンサーの構造は今のところ知られていない。

#### 1-7. 脊索動物門におけるナメクジウオの系統的位置

脊索動物門には三つの亜門が存在する、すなわち、頭索動物亜門、尾索動物亜門、脊椎動物亜門である。系統関係で言えば、まず頭索動物が最初に分岐し、その後、尾索動物と脊椎動物が分岐したことが分子系統学の研究から示唆されている (Putnam et al., 2008)。すなわち、頭索動物亜門に属するナメクジウオの仲間が脊索動物の中で最初に分岐したということになる。ナメクジウオの形態的特徴としては、終生筋肉の特徴を併せ持つ脊索が残存すること (Annona et al., 2015) と、吻端から尾端まで筋節が連続して並ぶことが挙げられる。これらの特

徴は、カサイミラスやピカイアといったカンブリア紀の化石種からも窺える (Morris et al., 2012)。ただし、より厳密に言えば、尾索動物との共有派生形質である困鰓腔を失っていることや、咽頭領域が前方に限局していること、そして鰓孔に付属器官を有していること、さらに頭部感覚器官らしき触覚を持っていることから、これらの化石種は既に脊椎動物の前段階に達していると思われる。このことは、現生のナメクジウオ類は、この群がほかの脊索動物から分岐した当時の姿を現在も留めていることを示唆する。

ナメクジウオ類はフロリダナメクジウオ (*Branchiostoma floridae*) と、その同属他種である *Branchiostoma belcheri* のゲノムが解読されており (Putnam et al., 2008)、両種ともゲノム上に向き合って並んだ二つの *Brachyury* 遺伝子を持つことが分かっている (Inoue et al., 2017) (図 5)。以下、この二つの遺伝子を *Bra1*, *Bra2* と表記し、特に *B. floridae* のものは *BfBra1*, *BfBra2* と表記する。これらの *Brachyury* 遺伝子は、脊椎動物同様、まず原口周辺で発現が見られるが、その後、原腸背側に発現領域が拡大し、この部分から脊索と体節が形成される。発生が進むと、*Brachyury* 発現は脊索と後方の体幹前駆体 (または尾芽) に限局されるが、体幹前駆体から形成されて間もない体節も *Brachyury* を発現する (Holland et al., 1995, Terazawa et al., 1997)。ナメクジウオは側板中胚葉を持たないが、脊椎動物において側板から発生する臓側中胚葉も体節から発生するため、このナメク

ジウオの体節での発現は脊椎動物における体節+側板中胚葉の発現に相当すると思われる(Mansfield et al., 2015)。ただし、*BfBra1* と *BfBra2* はコーディング配列の相同性が非常に高いため、*in situ* hybridization からは発現箇所の違いは分かっていない(Holland et al., 1995)。

## 1-8. 結果の概要

本研究では、ナメクジウオゲノムに存在する二つの *Brachyury* 遺伝子のエンハンサー機能解析を行った。まず *B. floridae* の二つの *Brachyury* 遺伝子の周辺配列を比較したところ、上流に保存性の高いピークがみられる領域が見つかった。

次に、*B. floridae* と *B. belcheri* の *Brachyury* 周辺配列において種間比較を行ったところ、コーディング領域のみならず、両遺伝子上流、イントロン、下流の各領域に保存された配列が多数存在することがわかった。

これらの結果をもとに、ナメクジウオ胚を用いて *Brachyury* 周辺領域の *LacZ* レポーターアッセイを行ったところ、脊索や体節での *LacZ* 発現が観察されたが、異所的な発現も多く観察され、結果を正確に解釈することが困難であった。そこで、*LacZ* を発現させる宿主側の系として、カタユレイボヤ胚を使用することにした。カタユレイボヤ胚は、ナメクジウオと比較して、レ

ポーターアッセイにおいて異所的な発現が少なく、また胚構造が単純であるため、発現する細胞の特定が容易であった。そこで、カタユレイボヤ胚で同様の解析を行ったところ、両遺伝子上流領域は筋肉、下流領域では脊索での発現を誘導した。興味深いことに、イントロン領域では、両遺伝子の発現に差異が見られた。*BfBra1*のイントロンが脊索での発現を誘導したのに対し、*BfBra2*のイントロンは原口での発現を誘導した。この結果から、ナメクジウオにおいても、原口、側方中胚葉、脊索の三種類の *Brachyury* エンハンサーが存在することが示唆された。また、*BfBra1* と *BfBra2* では発現領域の分化が起こっており、*BfBra2* の発現がより祖先的な姿を留めているのに対し、*BfBra1* はより脊索での発現に特化した機能分化を起こしている可能性が示唆された。

## 2. *Bra1* と *Bra2* の類似性及びナメクジウオ系統における保存性

### 2-1. 緒言

*Brachyury* は T-box ファミリーに属する転写因子である。転写因子全般に共通する基本的な構造としては、DNA 配列を認識して相互作用を行う DNA 結合ドメインと、転写装置を誘引するアクチベータードメインからなる (Latchman, 1997)。T-box ファミリーに属する遺伝子では、T-box ドメインを DNA 結合ドメインとして持つ (Val, et al., 2002)。ナメクジウオ *Brachyury* においては、翻訳開始部位から約 50 アミノ酸残基あたりから、300 アミノ酸ほどの T-box ドメインが存在する。フロリダナメクジウオの二つの *Brachyury* 遺伝子は互いによく似た配列を持っており、配列がどの程度類似しているのか定量的に調べた。その後、二つの遺伝子の周辺のノンコーディング配列の類似性を調べることにより、上流領域に強く保存された配列が存在することが明らかになった。また、フロリダナメクジウオと同属の *Branchiostoma belcheri* のゲノム配列と比較することにより、両遺伝子の周辺に多くのエンハンサー領域が存在することが示唆された。

## 2-2. 材料と方法

### コーディング領域およびゲノムの配列

フロリダナメクジウオのゲノム配列は、Branchiostoma\_floridae\_v2.assembly の Scaffold 65 を用いた。コーディング領域 (CDS) は、このゲノム領域上にアノテートされていたものを用いた。*Branchiostoma belcheri* のゲノムは、Branchiostoma.belcheri\_HapV2(v7h2) (Shengfeng et al., 2014) の Scaffold45 を用いた。

### 配列比較プログラム

コーディング領域及び上流配列のヌクレオチドの比較は、ApE プログラムを用いた。タンパク質のアミノ酸配列の比較には、Clustal W を用いた。また、*BfBra1* と *BfBra2* 周辺のゲノム領域比較には VISTA プログラム (<http://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml>) を用いた。

## 2-3. 結果

### *BfBra1* と *BfBra2* の配列比較

フロリダナメクジウオの *BfBra1* および *BfBra2* の互いの保存性を調べるため、まずコーディング領域の配列比較を行った。その結果、ヌクレオチドで 90%近



い配列の類似性が見られた。アミノ酸配列では、450 近くあるアミノ酸の 92% が一致している。この差異のおよそ半数近くは N 末端に集中しており、この領域を除けば 95%の一致となる (図 6,7)。この非常に高い相同性は、この遺伝子がナメクジウオの系統で比較的最近になってから分岐したことを示唆するものである。これは、井上らの解析 (Inoue, et al., 2017)からも支持されている。配列をさらに詳しく比較してみると、ヌクレオチド、アミノ酸共に T-box ドメインとアクチベータードメインの境界付近に最も多くの変異が蓄積していた。ヌクレオチドにおいては、エクソン 4 に T-box ドメインとアクチベータードメインの境界が存在するが、その周囲のエクソン 3, 4, 5 に点変異や欠失が多くみられ、この領域ではヌクレオチドで 34% (204 bp 中 69bp)、アミノ酸で 17% (87 aa 中 15 aa)に及ぶ相違が見られた。特に T-box ドメインの外側に位置するエクソン 5 で変異が多く、ヌクレオチドでは 59bp 中 23bp (39%)、アミノ酸では 18 残基中 7 残基 (39%)の変異が見られた。一方、T-box 内部のエクソン 3 では、144 bp 中 33 bp (23%)、アミノ酸では 48 残基中 7 残基 (15%)と比較的少なかった。ドメイン境界部での変異率が高い反面、高変異部位以降のアクチベータードメインではヌクレオチド、アミノ酸共に変異は少なく、3' 端付近を除けばヌクレオチドでも 550 bp 中 3 か所しか変異が存在せず、この領域はアミノ酸レベルで 100%一致する (図 7)。

以上から、二つの *Brachyury* 遺伝子はドメイン境界部に多くの差異が存在することがわかった。これは、ドメイン境界部が機能的に重要ではない単なる“繋ぎ目”としての役割しか持たないため、変異が蓄積しやすいためであると考えられる。

### *BfBra1* と *BfBra2* 周辺のノンコーディング領域の比較

フロリダナメクジウオの *BfBra1* と *BfBra2* において、ノンコーディング配列も含めたゲノム周辺の領域を、VISTA プログラムを用いて比較した (図 8A)。この図では、横軸がゲノム領域、縦軸が配列の保存性の強さを表す。この解析から、二つの遺伝子のすぐ上流に強く保存された配列が存在することがわかった (図 8A)。この配列は、両遺伝子の翻訳開始部位から 500 bp ほど上流から始まる、600 bp ほどの長さの配列であり、ノンコーディング配列であるにも関わらず 97% もの配列の一致が見られる。以降この配列を HCR (Highly Conserved Region) と呼ぶ。HCR の塩基配列から転写調節因子が結合しそうな配列を探索したところ、Snail や MyoD の結合領域を含む E-box や、T-box ドメインの予測結合配列が見つかった (図 9)。E-box ドメインを含む E-box ファミリー遺伝子は、筋組織の発生に関わるとされており (Perry, 2000)、アフリカツメガエルでは側方中胚葉での発現が見られる。また、T-box ファミリーの *Tbx6* が体節で発現することが知られている。これらのことから、HCR と側方中胚葉での発現との

関連が考えられる。また、両遺伝子のより上流 (*BfBra1* の上流 3kbp、*BfBra2* の上流 4.5 kbp) にも 200 bp ほどの保存された配列が見られる (図 8A)。こちらも 97% と高い一致率を示している (194/200)。この配列を UCR (Upper Conserved Region) と呼ぶことにする。

### 種間比較

最後に、フロリダナメクジウオと同属の近縁種である *B. belcheri* の *Brachyury* 周辺配列と比較した (図 8B)。*B. belcheri* にもフロリダナメクジウオと同様に二つの *Brachyury* 遺伝子が存在し、この二つの遺伝子の分岐は両種に分岐に先立っていることが示されている (Inoue et al., 2017)。VISTA プログラムによって二種の *Brachyury* 周辺配列を比較したところ、*BfBra1* と *BfBra2* を比較した時より多数の保存配列が見つかった。フロリダナメクジウオの *BfBra1* と *BfBra2* の上流にある保存領域は、*B. belcheri* にも存在していた。しかし、両種の比較からは、上流のみならず、イントロン領域や下流領域にも保存配列が見つかっており、遺伝子周辺のあらゆる領域にエンハンサーが存在している可能性を示唆している。また、イントロン領域の保存性は、*Bra1* より *Bra2* の方が高度であった。このことから、*Bra1* と比較して *Bra2* のエンハンサーの機能の方がより保存性が高い可能性がある。

## 2-4. 考察

*BfBra1* と *BfBra2* は、コーディング領域においては高い保存性を持つことが明らかになった。一方で周辺配列はコーディング領域と比べると保存性が低かった。これは、コーディング配列は適応的に重要であるため、自然淘汰によって配列が保存され続けたためと考えられる。一方でノンコーディング領域はそれほど重要ではなかったため、変異が蓄積したと考えられる。しかしながら、*BfBra1* と *BfBra2* の上流からは高度に保存された領域も見つかった。このことから、*BfBra1* と *BfBra2* は一部に共通した転写調節機構を共有しており、それがこれらの遺伝子が機能する上で重要であることを示唆する。

フロリダナメクジウオと *Branchiostoma belcheri* の種間ゲノム配列比較からは、*BfBra1* と *BfBra2* の周辺配列比較で見られたものより多くの保存配列が見つかった。このことから、ナメクジウオの二つの *Brachyury* 遺伝子は、互いに異なるエンハンサーを多く持つことが示唆される。

### 3. ナメクジウオ胚における *Brachyury* 上流領域の 転写調節機能

#### 3-1. 緒言

前章の配列比較で明らかになった予測エンハンサー配列の転写調節機能を調べるため、フロリダナメクジウオ胚を用いて *LacZ* レポーターアッセイを行った。その際、*LacZ* レポータープラスミドとして pPD1.27 (Fire et al., 1990) を用いた。このプラスミドがコードする *LacZ* タンパク質には核移行シグナルが付加されており、*LacZ* を発現している細胞を個別に見分けることができる。なおこのプラスミドは、改変を加えない場合、ナメクジウオでは *LacZ* 発現を誘導しないことが示されている (Yu et al., 2004)。この pPD1.27 に、二つある *Brachyury* 遺伝子のそれぞれの上流領域 5~6 kbp を組み込み、インジェクションによる遺伝子導入後に発生させた個体を固定したあと、 $\beta$ -ガラクトシドピラノース (X-Gal) を用いて染色することにより、*LacZ* 発現の所在を調べることにした。

ナメクジウオは、海中の浮遊藻類を餌とするため、人工環境下での飼育維持が難しい (Bertrand et al., 2011)。また、胚へのコンストラクトの導入は通常顕微注入によって行われるが、ナメクジウオの卵は壊れやすいため、顕微注入も困難で

ある。そこで、フロリダナメクジウオの飼育系を維持しており、実際に顕微注入実験を行っている、中国の厦門大学の李光先生の研究室を訪問し、実験を行った。

実験の結果、ナメクジウオの両遺伝子の上流領域は脊索や体節、体幹前駆体（尾芽）での *LacZ* 発現を誘導することがわかった。しかし、ナメクジウオのレポーターアッセイ系は、表皮や神経管、消化器系といった本来 *Brachyury* が発現しない領域における異所的な発現が多く、またスポット状の発現となるため、改善の余地があることが明らかになった。

### 3-2. 材料と方法

#### コンストラクト作製

*LacZ* 発現プラスミド pPD1.27 に *BfBra1* *BfBra2* の上流領域を繋いだコンストラクトを作製した。クローニングの際は in fusion(TaKaRa)と下記のプライマー（7. 付録、プライマー表）を用い、翻訳開始コドン(ATG)より上流を *LacZ* コーディング配列に繋いだ(図 10)。

#### マイクロインジェクション

厦門大学で繁殖されているフロリダナメクジウオを用いた。20%グリセロールと 5 mg/ml のテキサスレッドを DNA 溶液に加えたものをマイクロインジェクション溶液とし、DNA の終濃度が 800 ng/ $\mu$ l となるよう調整した。シャーレ

に 0.25 mg/ml のポリリジン溶液でコートしたスライドガラスを静置し、その上に海水と未受精卵を乗せて実体顕微鏡下でインジェクションを行った。インジェクション後すぐに精子懸濁液で媒性した後、飼育海水を入れ替えて 26~28°C で発生させた。

### 固定と発色

目的の発生ステージに達した個体を、1 ml のウェルに集め、500 $\mu$ l の 1%グルタルアルデヒド海水で 30 分固定した。その後 500 $\mu$ l の PBS-T で 10 分ずつ 4 回洗い、PBS-T を完全に取り除いてから 500 $\mu$ l の染色液( )を入れて 37 °Cで一晩発色させた。染色後は PBS-T で 10 分ずつ 3 回洗った後、4%パラホルムアルデヒドを含んだ MOPS バッファで 40 分固定した。その後一度 PBS-T で洗った後、染色液中で 4°Cで保存した。

## 3-3. 結果

### 発現様態

前述の通り、ナメクジウオの *LacZ* レポーターの発現は異所的なものが多い。しかし、胚を様々な角度から観察することにより、脊索や体節などでシグナルを発現した個体を見つけることができたため、その数を数えた (図 11)。*BfBra2* 上流 5.7 kbp のコンストラクトを注入した個体群から、脊索、体節、尾芽での発現

が見られた個体を例示する (図 11B)。

### **BfBra2** 上流領域

*BfBra2* 上流コンストラクトを注入したナメクジウオ胚では、中期神経胚の段階で、脊索および体節、体軸前駆体の領域で *LacZ* シグナルが見られた。その中では体節での発現が最も多く、脊索での発現が最も少なかった。体節でシグナルを発現した個体数は脊索の場合よりも三倍多かった。一方で *in situ* hybridization による観察からは *Brachyury* 発現が見られなかった、内胚葉や表皮といった組織での異所的な *LacZ* 発現も多く見られた。(図 11B, C)

### **BfBra1** 上流領域

*BfBra2* と同様に 800ng/μl で *BfBra1* 上流コンストラクトの発現パターンも調べた。*BfBra1* 上流の発現パターンは *BfBra2* 上流と概ね同様であったが、異所的な発現がわずかに多い、脊索での発現が少ないという傾向が見られた (図 11C)。

## **3-4. 考察**

ナメクジウオでのレポーターアッセイによって、二つの *Brachyury* 遺伝子の上流に同様の発現誘導能力があることが示された。このことは、二遺伝子間で保存されたエンハンサー構造が存在することや、両遺伝子とも周辺領域が種を超



えて保存されていることと相まって、両遺伝子とも偽遺伝子化せずに機能を保っている可能性を示唆している。また、ナメクジウオ *Brachyury* 上流領域は、脊索、側方中胚葉、原口（体軸幹細胞）の三領域での発現を誘導することが示唆された。この結果からは、これらの発現が単一のエンハンサーによるものなのか、それともこのコンストラクトには複数のエンハンサーが含まれているのかは明らかでない。また、フロリダナメクジウオと *B. belcheri* の配列比較から、下流領域やイントロン領域にもエンハンサーが存在する可能性がある。しかし、ナメクジウオのレポーターアッセイ系は異所的な発現が多く、脊索などの本来 *Brachyury* が発現する場所であっても、正確なシグナルであるか不明瞭である。尾索動物胚では異所的な発現は少ないため、この現象はナメクジウオに特異的なものであると考えられる (Takahashi et al., 1999b)。そのため、さらなる実験の前に、実験系の改善が必要であった。

## 4.カタユウレイボヤ胚におけるナメクジウオ *Brachyury*エンハンサーの転写調節機能

### 4-1. 緒言

ナメクジウオのレポーターアッセイ系における問題点を改善するため、ホストの系としてナメクジウオの代わりにカタユウレイボヤ(*Ciona intestinalis* (Type A))胚を用いることにした。カタユウレイボヤ胚は脊索動物のボディプランを単純化した構造を持ち、ナメクジウオ胚との比較が可能である(図12)。カタユウレイボヤ胚はDNAをエレクトロポレーション法によって導入することで、一度に多量の遺伝子導入個体を得ることができる。また、胚における細胞数が少なく、またナメクジウオと比較して異所的な発現は少ないため、発現箇所の解析が容易である。加えて、異所的な発現が少ないという利点もある。

### 4-2. 材料と方法

#### カタユウレイボヤの入手

実験に用いたカタユウレイボヤは、蒲郡で採集したものと、NBRPカタユウレイボヤプロジェクトにおいて、舞鶴もしくは三崎で養殖され、提供されたものを使用した。

## コンストラクト作製

前章と同様の方法でコンストラクトを作製した。pPD1.27 プラスミドは、改変を加えなければ、カタユウレイボヤでも特異的な *LacZ* 発現を誘導しないことが示されている (Takahashi, et al., 1999b)。下流領域やイントロン領域においては、ナメクジウオ *Brachyury* 由来の基本プロモーターが含まれていないため、カタユウレイボヤ *Brachyury* (*CiBra*) の基本プロモーターを含んだ *LacZ* コンストラクトを使用した。この領域のみではカタユウレイボヤ胚では *LacZ* 発現は見られない (Corbo et al., 1997)。なお、このコンストラクトから作られる *LacZ* タンパク質は核移行シグナルを持たない (図 14)。また、*CiBra* 基本プロモーターには、間充織での異所的な発現を誘導する傾向が見られるため (Corbo et al., 1997)、これらのコンストラクトから得られた *LacZ* 発現のうち、間充織で見られたものは異所的な発現とみなした。

## コリオン処理と人工授精

成体のカタユウレイボヤから精子と卵を混ざらないようにそれぞれ剖出し、別々のシャーレに集めた。カタユウレイボヤは雌雄同体であり、自家不和合性を持つが、十分な卵を得るには複数個体から卵を集める必要があるため、精子の混入による予期しない受精に注意しながら集めた。その後、卵を遠沈管に集め、コリオン剥液でコリオンが剥けるまで 18~20°C で処理した (5~15 分)。剥液は卵

本体にもダメージを与えるため、最長で 15 分の処理とした。その後、遠沈管中で海水によって 3~5 回洗浄した後、精子懸濁液を加えて受精させた。

### エレクトロポレーション

エレクトロポレーションを行う際は、海水は電気伝導率が高すぎるため、浸透圧を維持したまま塩濃度を下げるため、マンニトール海水を使用した。受精卵をマンニトール海水で一回洗浄した後、4 mm 幅のエレクトロポレーション用キュベットに卵懸濁マンニトール海水 300  $\mu$ l+420  $\mu$ l マンニトール海水+1  $\mu$ g/ $\mu$ l DNA 80  $\mu$ l の割合で入れ、エレクトロポレーション装置(GENE PULSER II (BIO RAD))にセットし、50 V, 225  $\mu$ F の電流をかけた。その後、懸濁液ごと海水を張ったシャーレに入れ、18 °Cで飼育した。

### 固定、発色

目的のステージまで発生させた胚は 1%グルタルアルデヒド in CMFSW (カルシウム、マグネシウムフリー海水) で固定し、200  $\mu$ l の PBS-T で 2 回洗った。その後 200 $\mu$ l の染色液で一回洗い、200  $\mu$ l の発色液で 37 °C 30 分~24 時間発色させた。発色させた標本は染色液で二回洗い、染色液中で 4°Cで保存した。

### 4-3. 結果

#### 上流領域

カタユウレイボヤでナメクジウオ *BfBra1* -3 kbp と *BfBra2* -2k bp によるレポーター *LacZ* の発現を観察したところ、どちらも筋肉での発現が見られた(図 13B, C)。*BfBra2* の上流 2 kbp では頭頸部の間充織でも *LacZ* 発現が見られた。*BfBra2* -2 kbp では尾部の先端の筋肉にも発現が見られたのに対し、*BfBra1* -3kbp では見られなかった。これは、ホヤにおける筋肉細胞の系譜である B 系統と A 系統および b 系統の差異を反映していると思われる(Hudson & Yasuo, 2008)。また、この二つの領域は HCR を含んでいるが、この領域を含まない *BfBra1* -0.5 kbp では筋肉での発現が見られなかったため、この領域に筋肉での発現を誘導する機能があると思われる(図 13D)。さらに上流を含むより長い配列では、筋肉での発現に変化はなかった。しかし、*BfBra2* 上流領域では、UCR 配列を含まないものでは間充織での *LacZ* 発現が見られるが、UCR 配列を含むものではこの発現が消失する様子が見られた。また、*BfBra1* 上流領域においても、UCR 近傍の配列を削ると間充織での *LacZ* 発現が見られるようになる(図 13D)。これらのことから、UCR 配列には何らかのリプレッサー機能があることが考えられる。

#### 下流領域

ホヤの実験においては、二つの遺伝子の下流領域におけるエンハンサー活性

も調べた。この領域は、フロリダナメクジウオと *B. belcheri* との配列比較から、エンハンサーの存在が示唆されている。*BfBra1* と *BfBra2* の下流 3 kbp を *CiBra* 基本プロモーターに繋いだコンストラクトは、どちらもカタユウレイボヤにおいて神経胚期以降で脊索での発現を誘導した (図 15)。

### イントロン領域

下流領域同様、イントロン領域も *CiBra* 基本プロモーターを利用することで、カタユウレイボヤにおけるレポーターアッセイを行った。この領域は、上流、下流と異なり、二つの遺伝子の間で *LacZ* 発現に明瞭な差が見られた。*BfBra1* のイントロン領域においては、イントロン 5, 6 は特異的な発現を誘導しなかったが、イントロン 1, 2, 3, 4 は神経胚期以降に脊索での発現を誘導した (図 16A)。これに対し、*BfBra2* ではすべてのイントロンが脊索と筋肉の両方での発現を誘導しており、この活性は特にイントロン 3, 4, 5 で強かった (図 16B)。尾索動物の脊索と筋肉は共に原口周辺領域から発生する組織であるため、これらの領域はより早い発生ステージにおいても発現誘導活性を持っているのではないかと考え、原腸胚期において *BfBra2* のイントロン領域の転写調節機能を観察した。その結果、イントロン 3, 5 は原腸胚期においても原口を取り囲む領域で *LacZ* 発現を誘導することがわかった。この発現はナメクジウオにおける初期の原口周辺での発現を反映していると考えられる (図 17)。

## 結果のまとめ

ナメクジウオの *Brachyury* の周辺領域は、カタユレイボヤの胚ではどちらの遺伝子でも上流は筋肉、下流は脊索で発現を誘導するが、イントロン領域の転写調節機能には両遺伝子間で差異があり、*BfBra1* のイントロン領域は脊索での発現を誘導するのに対して、*BfBra2* のイントロン領域は原口での発現を誘導した (図 18)。

### 4-4. 考察

ホヤの胚は脊索動物のボディプランを単純化したものと考えられ、脊索や側方中胚葉 (筋肉) といったナメクジウオと類似した構造を持つ。一方で、尾索動物にはナメクジウオに存在する体節構造や、体節や脊索を生み出す体幹前駆体が存在しない上に、肛後尾も持たない (Conklin, 1905, Hotta et al, 2007)。従って、体幹部と尾部の境界が明瞭でない。また、ナメクジウオの体節は前方のおおよそ 3 体節と、それ以降の体節は分化メカニズムが異なることがわかっている (Bertrand et al., 2011)。そのため、ホヤでの実験結果をナメクジウオに当て嵌めて解釈するためには、これらの組織間の対応関係を考慮する必要がある。加えて、ナメクジウオの脊索は、尾索動物や脊椎動物と異なって筋組織としての特徴も有しており (Suzuki et al., 2000)、転写調節機構が尾索動物と異なっている可能性

もある。

ナメクジウオの前後の体節の違いについては、その境界部がどこにあるかという問題もある。形態形成運動においては、8 体節前後で腸体腔式から裂体腔式に変化するとされる一方で、形成されるタイミングにおいては、前方の 3 体節程度（前方体節）が一斉に形成されたあと、それ以降の体節（後方体節）は体幹前駆体から順次形成されるという様式を取る (Beaster-Jones et al., 2008)。そして、この時間的境界線は、FGF 依存性/非依存性という分化メカニズムの境界にも対応する (Bertrand et al., 2011b)。この形態形成過程と分化メカニズムのずれを明確に説明することは難しいが、原腸が十分大きい前方と、原腸が細長くなった後方では形態形成方式が異なって見える可能性がある。また、脊椎動物とナメクジウオでは、尾部体節もそれ以前の体節とは異なる分化メカニズムを持つとされる (Bertrand et al., 2011a, Row, et al., 2016, Goto et al., 2017)。

側方中胚葉の対応関係の解釈に関しては、ナメクジウオの前方体節が脊椎動物の頭部中胚葉に相当するという仮説がある (Onai et al., 2015)。脊椎動物の頭部に相当する部分が尾索動物のどこにあたるかは難しい問題であるが、一つの解釈として尾索動物幼生の所謂「頭部」が相当するとも考えられる。尾索動物頭部は前後軸で脳胞と同じレベルで存在している点で脊椎動物頭部と類似している。また、ホヤの筋肉は、ナメクジウオや脊椎動物の未分節中胚葉と同様、*Tbx6*



や *Mox* を発現する (Belgacem et al., 2011, Minguillon et al., 2002, Takatori et al., 2004, Imai et al., 2006)。これらの遺伝子発現は、脊椎動物頭部やナメクジウオの前方体節には見られないものである。この解釈に基づけば、ナメクジウオの前方体節はカタユレイボヤ幼生における頭部間充織に相当すると考えられる。カタユレイボヤのこの領域は、筋肉での発現を制御する *BfBra1* および *BfBra2* の上流領域によって *LacZ* 発現が誘導されたが、UCR 領域によって発現は抑制されることが確認されている。ナメクジウオでは、前方、後方の体節で共に上流領域によって *Brachyury* 発現が制御されるが、後方体節では一部のエンハンサー機能が抑制されているのかもしれない。

頭索動物や脊椎動物では、肛門の後方まで体幹部の形成が続き、尾部を形成する。脊椎動物においては、前方の体幹にある体節が発生過程の早い段階で内胚葉や脊索と分岐するのに対し、尾部の体節は体幹部の体節が形成された後、尾芽間充織から形成される。この尾芽間充織は尾芽の上皮組織から脱上皮化運動によって間充織化し、その後神経管と分岐するため、体幹部から遅れて分化することになる (Row, et al., 2016, Goto et al., 2017)。ホヤの筋肉では、B 系統筋肉と呼ばれる筋肉が、母性因子によって 64 細胞期までには分化運命が決定するのに対し、b 系統筋肉や A 系統筋肉の分化は神経胚期を待たねばならない (Hudson and Yasuo, 2008)。また、これらの筋細胞は上皮や神経管に細胞系譜が近いことから

も、この筋肉の分化過程は脊椎動物の尾部体節によく似ているといえる。このことは、ホヤの後方筋肉での *LacZ* 発現は、ナメクジウオの尾部体節での *Brachyury* 発現を模していることを示唆する。この解釈に従えば、ナメクジウオの尾部での *Brachyury* 発現は *BfBra2* によるものであると考えられる。

両遺伝子上流領域がホヤでは筋肉のみで発現を示したのに対し、ナメクジウオでは同じ領域が脊索や体幹前駆体での発現を示した。体幹前駆体は体節の前駆体でもあり、ナメクジウオでは *Brachyury* が未分節中胚葉で発現することと整合性がある。一方で、ホヤでは脊索での発現を示さなかったこの領域がナメクジウオの脊索で発現を示したのは、ナメクジウオの脊索が筋組織としての特徴を持っていることと関連している可能性が考えられる。

## 5. 総括

### 5-1. フロリダナメクジウオ *Brachyury* のエンハンサー構成

本研究から、フロリダナメクジウオ *Brachyury* のエンハンサー構造が見えてきた。二つの *Brachyury* 遺伝子上流領域は、カタユレイボヤにおいて、筋肉での発現を誘導した。ただし、尾芽に相当すると思われる a 系統および B 系統の筋肉は *BfBra2* 上流でのみ発現がみられた。下流領域は両遺伝子において、ともに脊索での発現を誘導した。これらの二領域では発現が類似していたのに対し、イントロン領域では 2 遺伝子間で大きく異なり、*BfBra1* では脊索での発現を誘導したのに対し、*BfBra2* では原口での発現を誘導した。ホヤで見られた発現部位は、筋肉を体節と解釈した場合、ナメクジウオのほぼすべての *Brachyury* 発現領域を模していると考えられる。

以上の結果から、*BfBra2* のエンハンサーのみでナメクジウオの *Brachyury* 発現領域のほぼ全域を誘導できることがわかる (図 18A)。このことから、*BfBra2* が祖先的な *Brachyury* 遺伝子であり、*BfBra1* は遺伝子倍化後に何らかの機能分化を起こしている可能性が示唆される。特に *BfBra2* で原口での発現を誘導していたイントロン領域が *BfBra1* では脊索での発現を誘導する機能に変化していたが、これは *Bra1* における二次的な進化であると考えられる (図 18B)。

## 5-2. 脊索動物の *Brachyury* エンハンサーの進化

本研究から、ナメクジウオ *Brachyury* の発現は、原口、脊索、側方中胚葉でそれぞれ異なるエンハンサーによって制御されていることが示唆された。また、尾芽領域の側方中胚葉では、より前方のものとは異なる機構によって制御されている可能性が示唆された。以上の結果は、脊索における *Brachyury* 発現が、原口での発現が変化したものではなく、新たな発現領域が獲得されたか、原口以外の独立した発現領域が変化したものである可能性を示している。また、同じ中胚葉とされる領域の中でも、側方中胚葉は脊索とは異なる制御を受けるようである。これは、脊椎動物において脊索と側方中胚葉での発現を制御するエンハンサーが異なっていることと一致する。従って、脊椎動物において脊索と側方中胚葉の *Brachyury* エンハンサーが異なっていることは、ナメクジウオとの共有派生形質であると思われる。また、ナメクジウオからも原口での発現のみを独立に誘導するエンハンサーが見つかったが、このことは、脊椎動物とナメクジウオは、*Brachyury* 発現を制御するために基本的に同様のエンハンサーセットを持つことを示唆する。

その一方で、ゼブラフィッシュでは脊索と側方中胚葉での発現を誘導するエンハンサーがどちらも上流領域に存在したのに対して、ナメクジウオでは側方中胚葉が上流領域、脊索が下流領域と、それぞれ異なる領域に存在した。また、

アフリカツメガエルでは原口での発現を誘導するエンハンサーが上流領域に存在したのに対し、ナメクジウオではこのエンハンサーはイントロン領域に存在した。尾索動物においても、脊索での発現を誘導するエンハンサーは上流にある。このように、各動物群において *Brachyury* の発現領域は類似しているが、そのエンハンサーの位置は大きく異なっている (Sato et al., 2012)。

このことから、脊索動物の *Brachyury* エンハンサーは、一見機能が似ているように見ても、独自に進化しているのかもしれない。今回の研究からも、ナメクジウオの *BfBra1* イントロンは、*BfBra2* と分岐する前は原口での発現を制御していたが、遺伝子倍化後に脊索での発現を制御するように変化したことが示唆されている。一方で、上流領域が側方中胚葉で発現を制御する点は脊椎動物と頭索動物で類似していた。この点においては頭索動物と脊椎動物で共通したエンハンサーを用いている可能性もある。

いずれにせよ、脊椎動物や尾索動物では、イントロンや下流領域のエンハンサー活性に関する情報が不足しており、ナメクジウオとの比較のためには、さらなる研究が必要となる。また、脊索動物以外の動物、例えば脊索動物の姉妹群にあたる半索動物や棘皮動物では *Brachyury* エンハンサーの構造や機能は全く知られていない。これらの動物でも、原口以外に口器外胚葉や口器内胚葉で *Brachyury* が発現している (Rottinger et al, 2012)。今後これらの発現と脊索動物

の各 *Brachyury* 発現制御機構の比較検討も重要となるであろう。

## 6. 参考文献

- Annona, G., Holland, N. D., & D'Aniello, S. (2015). Evolution of the notochord. *EvoDevo*. 6:30.
- Averof, M., Dawes, R., & Ferrier, D. (1996). Diversification of arthropod Hox genes as a paradigm for the evolution of gene functions. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 7, 539–551.
- Beaster-Jones, L., Kaltenbach, S. L., Koop, D., Yuan, S., Chastain, R., & Holland, L. Z. (2008). Expression of somite segmentation genes in amphioxus: A clock without a wavefront? *Development Genes and Evolution*. 218, 599–611.
- Bernhard, G. H. (1995). The mouse *Brachyury(T)* gene. *Seminars in Developmental Biology*. 6, 385–394.
- Belgacem, M. R., Marie-line E., Escriva, h., & Bertrand, S. (2011). Amphioxus Tbx6/16 and Tbx20 embryonic expression patterns reveal ancestral functions in chordates. *Gene Expression Patterns*. 11, 239–243.
- Bertrand, S., Camasses, A., Somorjai, I., Belgacem, M. R., Chabrol, O., Escande, ML., Pontarotti, P., & Escriva, H. (2011a). Amphioxus FGF signaling predicts the acquisition of vertebrate morphological traits. *PNAS*. 108, 9160–9165
- Bertrand, S., & Escriva, H. (2011b). Evolutionary crossroads in developmental biology: amphioxus. *Development*. 138, 4819–4830.
- Chesley, P. (1935). Development of the short-tailed mutant in the house mouse. *Journal of Experimental Zoology*. 70, 429–459.
- Chiba, S., Jiang, D., Satoh, N., & Smith, W. C. (2009). brachyury null mutant-induced defects in juvenile ascidian endodermal organs. *Development*. 136, 35–39.
- Conklin, E. G. (1905). The Organization and Cell-Lineage of the Ascidian Egg. *Science*. 23, 340–344.

- Corbo, J. C., Levine, M., & Zeller, R. W. (1997). Characterization of a notochord-specific enhancer from the Brachyury promoter region of the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Development*. *124*, 589–602.
- De Robertis, E. M. (2008). Evo-Devo: Variations on Ancestral Themes. *Cell*. *132*, 185–195.
- De Robertis, E. M., & Sasai, Y. (1996). A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature*. *380*, 37–40.
- Fire A., Susan W. H., & Dixon, D. (1990) A modular set of lacZ fusion vectors for studying gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*. *93*, 189–198.
- Gonzalez, P., Jiang, J. Z., & Lowe, C. J. (2018). The development and metamorphosis of the indirect developing acorn worm *Schizocardium californicum* (Enteropneusta: Spengelidae). *Frontiers in Zoology*. *15*: 26.
- Goto, H., Kimmey, S. C., Row, R. H., Matus, D. Q., & Martin, B. L. (2017). FGF and canonical Wnt signaling cooperate to induce paraxial mesoderm from tailbud neuromesodermal progenitors through regulation of a two-step epithelial to mesenchymal transition. *Development*. *144*, 1412–1424.
- Gross, J. M., & McClay, D. R. (2001). The role of Brachyury (T) during gastrulation movements in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Developmental Biology*. *239*, 132–147.
- Harvey, S. A., Tumpel, S., Dubrulle, J., Schier, A. F., & Smith, J. C. (2010). no tail integrates two modes of mesoderm induction. *Development*. *137*, 1127–1135.
- Holland, P. W., Koschorz, B., Holland, L. Z., & Herrmann, B. G. (1995). Conservation of Brachyury (T) genes in amphioxus and vertebrates: developmental and evolutionary implications. *Development*. *121*, 4283–4291.
- Hotta, K., Mitsuhashi, K., Takahashi, H., Inaba, K., Oka, K., Gojobori, T., & Ikeo, K. (2007). A web-based interactive developmental table for the Ascidian *Ciona intestinalis*, including 3D real-image embryo reconstructions: I. From fertilized egg to hatching larva. *Developmental Dynamics*. *236*, 1790–1805.



- Hudson, C., & Yasuo, H. (2008). Similarity and diversity in mechanisms of muscle fate induction between ascidian species. *Biology of the Cell*. 100, 265–277.
- Huxley, T.H. (1875). On the Classification of the Animal Kingdom. *The American Naturalist*. 9: 65–70.
- Imai, K. S., Levine, M., Satoh, N., & Satou, Y. (2006). Regulatory blueprint for a chordate embryo. *Science*. 312, 1183–1187.
- Inoue, J., Yasuoka, Y., Takahashi, H., & Satoh, N. (2017). The chordate ancestor possessed a single copy of the Brachyury gene for notochord acquisition. *Zoological Letters*. 3: 4.
- Irimia, M., Royo, J. L., Burguera, D., Maeso, I., Gómez-Skarmeta, J. L., & Fernandez, G. J. (2012). Comparative genomics of the Hedgehog loci in chordates and the origins of Shh regulatory novelties. *Scientific Reports*. 2: 433.
- Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*. 3, 318–356.
- Kevin J. Peterson, César Arenas-Mena, & Davidson, E. H. (2000). The A/P axis in echinoderm ontogeny and evolution: evidence from fossils and molecules. *Evolution & Development*. 2, 93–101.
- Kvon, E. Z. (2015). Using transgenic reporter assays to functionally characterize enhancers in animals. *Genomics*. 106, 185–192.
- Lacalli, T. C. (1996). Mesodermal pattern and pattern repeats in the starfish bipinnaria larva, and related patterns in other deuterostome larvae and chordates. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 351, 1737–1758.
- Lapraz, F., Haillet, E., & Lepage, T. (2015). A deuterostome origin of the Spemann organiser suggested by Nodal and ADMPs functions in Echinoderms. *Nature Communications*. 6: 8483.
- Latchman, D. S. (1997). Transcription factors: An overview. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 29, 1305–1312.

- Latinkic, B. V., Umbhauer, M., Neal, K. A., Lerchner, W., Smith, J. C., & Cunliffe, V. (1997). The *Xenopus* Brachyury promoter is activated by FGF and low concentrations of activin and suppressed by high concentrations of activin and by paired-type homeodomain proteins. *Genes & Development*. *11*, 3265–3276.
- Lerchner, W., Latinkic, B. V., Remacle, J. E., Huylebroeck, D., & Smith, J. C. (2000). Region-specific activation of the *Xenopus* brachyury promoter involves active repression in ectoderm and endoderm: a study using transgenic frog embryos. *Development*. *127*, 2729–2739.
- Mansfield, J. H., Haller, E., Holland, N. D., & Brent, A. E. (2015). Development of somites and their derivatives in amphioxus, and implications for the evolution of vertebrate somites. *EvoDevo*. *6*: 21.
- Martin, B. L., & Kimelman, D. (2008). Regulation of Canonical Wnt Signaling by Brachyury Is Essential for Posterior Mesoderm Formation. *Developmental Cell*. *15*, 121–133.
- Matsumoto J., Kumano G., & Nishida H. (2007). Direct activation by Ets and Zic is required for initial expression of the Brachyury gene in the ascidian notochord. *Developmental Biology*. *306*, 870–882.
- Minguillón, C., & Fernández, G. J. (2002). The single amphioxus *Mox* gene: Insights into the functional evolution of *mox* genes, somites, and the asymmetry of amphioxus somitogenesis. *Developmental Biology*. *246*, 455–465.
- Morris, S. C., & Caron, J. B. (2012). *Pikaia gracilens* Walcott, a stem-group chordate from the Middle Cambrian of British Columbia. *Biological Reviews*. *87*, 480–512.
- Onai, T., Aramaki, T., Inomata, H., Hirai, T., & Kuratani, S. (2015). Ancestral mesodermal reorganization and evolution of the vertebrate head. *Zoological Letters*. *1*: 29.
- Perry, R. L. S. (2000). Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation, *Front. Biosci*. *5*, 750–767.

- Putnam, N. H., Butts, T., Ferrier, D. E. K., Furlong, R. F., Hellsten, U., Kawashima, T., & Rokhsar, D. S. (2008). The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature*. *453*, 1064–1071.
- Rottinger, E., & Lowe, C. J. (2012). Evolutionary crossroads in developmental biology: hemichordates. *Development*. *139*: 2463–2475.
- Row, R. H., Tsotras, S. R., Goto, H., & Martin, B. L. (2016). The zebrafish tailbud contains two independent populations of midline progenitor cells that maintain long-term germ layer plasticity and differentiate in response to local signaling cues. *Development*. *143*, 244–254.
- Sabrina Kaul-Strehlow, S., & Stach, T. (2013). A detailed description of the development of the hemichordate *Saccoglossus kowalevskii* using SEM, TEM, Histology and 3D-reconstructions. *Frontiers in Zoology*. *10*: 53.
- Satoh, G., Harada, Y., & Satoh, N. (2000). The expression of nonchordate deuterostome *Brachyury* genes in the ascidian *Ciona* embryo can promote the differentiation of extra notochord cells. *Mechanisms of Development*. *96*, 155–163.
- Satoh, N., Tagawa, K., & Takahashi, H. (2012). How was the notochord born? *Evolution and Development*. *14*, 56–7.
- Satou, Y., Imai, K. S., & Satoh, N. (2001). Action of morpholinos in *Ciona* embryos. *Genesis*. *30*, 03–106.
- Schubert, M., Holland, L. Z., Stokes, M. D., & Holland, N. D. (2001). Three amphioxus Wnt genes (*AmphiWnt3*, *AmphiWnt5*, and *AmphiWnt6*) associated with the tail bud: The evolution of somitogenesis in chordates. *Developmental Biology*. *240*, 262–273.
- Sedgwick, A. (1884). On the origin of segmentation and some other morphological questions. *Journal of Cell Science*. *s2-24*: 43–82.
- Shengfeng, H., Zelin C., Xinyu Y., Ting Y., Guangrui H., Qingyu Y., Pontarotti, P. A., Hongchen Z., Jie L., Ping Y., Ruihua W., Rui L., Xin T., Ting D., Yiquan W., Guang L., Qiujin Z., Sisi Z., Leiming Y., Shaochun Y., Yonggui ., Fenfang W., Meiling D.,

- Shangwu C., & Anlong X. (2014) Decelerated genome evolution in modern vertebrates revealed by analysis of multiple lancelet genomes. *Nature Communications*. 5: 5896.
- Shubin, N., Tabin, C., & Carroll, S. (2009). Deep homology and the origins of evolutionary novelty. *Nature*. 457, 818–823.
- Singer, J. B., Harbecke, R., Kusch, T., Reuter, R., & Lengyel, J. A. (1996). *Drosophila* brachyenteron regulates gene activity and morphogenesis in the gut. *Development*. 122, 3707–3718.
- Suzuki, M. M., & Satoh, N. (2000). Genes expressed in the amphioxus notochord revealed by EST analysis. *Developmental Biology*. 224, 168–177.
- Takahashi, H., Hotta, K., Erives, A., Di Gregorio, A., Robert W. Z., Levine, M., & Satoh, N. (1999a). Brachyury downstream notochord differentiation in the ascidian embryo. *Genes & Development*. 13, 1519–1523.
- Takahashi, H., Mitani, Y., Satoh, G., & Satoh, N. (1999b). Evolutionary alterations of the minimal promoter for notochord-specific Brachyury expression in ascidian embryos. *Development*. 126, 3725–3734.
- Takatori, N., Hotta, K., Mochizuki, Y., Satoh, G., Mitani, Y., Satoh, N., Satou, Y., & Takahashi, H. (2004). T-box genes in the Ascidian *Ciona intestinalis*: Characterization of cDNAs and spatial expression. *Developmental Dynamics*. 230, 743–753.
- Telford, M. J., Budd, G. E., & Philippe, H. (2015). Phylogenomic insights into animal evolution. *Current Biology*. 25, 876–887.
- Terazawa, K., & Satoh, N. (1997). Formation of the chordamesoderm in the amphioxus embryo: Analysis with Brachyury and fork head/HNF-3 genes. *Development Genes and Evolution*. 207, 1–11.
- Val, W., & Conlon, F. L. (2002). The T-box family. *Genome Biology*. 3, :reviews3008.1–3008.7

- Yamada, A., Martindale, M. Q., Fukui, A., & Tochinai, S. (2010). Highly conserved functions of the Brachyury gene on morphogenetic movements: Insight from the early-diverging phylum Ctenophora. *Developmental Biology*. 339, 212–222.
- Yasuoka, Y., Shinzato, C., & Satoh, N. (2016). The Mesoderm-Forming Gene brachyury Regulates Ectoderm-Endoderm Demarcation in the Coral *Acropora digitifera*. *Current Biology*. 26, 2885–2892.
- Yu, J. K., Holland, N. D., & Holland, L. Z. (2004). Tissue-specific expression of FoxD reporter constructs in amphioxus embryos. *Developmental Biology*. 274, 452–461.

## 7. 付録

### 7-1. プライマー表

上流領域

Product Name	Primer Name	Sequence (5'→3')
pPD1.27_LacZ vector	pPD1.27_F	ATGACTGCTCCAAAGAAGAAG
pPD1.27 + BfBra-3kbp	pPD1.27_R	TGAGCTCGGTACCCGGGATC
BfBra1 -3kbp	Bra1_-3k_F	CGGGTACCGAGCTCACTATGTA <del>CTACTATCAT</del> CGTCAG
BfBra1 -0.5, -1, -2, -3kbp	Bra1_upstream_R	CTTTGGAGCAGTCATCTCGTTGTTGACGCTGGTCT
BfBra1 -2kbp	Bra1_-2k_F	CGGGTACCGAGCTCACTGTAAGACATCCAGGATAA <del>CTTG</del>
BfBra1 -1kbp	Bra1_-1k_F	CGGGTACCGAGCTCAACTTCAGCTGATTATCCGGCACTT
BfBra2 -2kbp	Bra2_-2k_F	CGGGTACCGAGCTCACTGGTAGTACATGAAATCAAGGAG
BfBra2 -1kbp	Bra2_-1k_F	CGGGTACCGAGCTCATGCGCAATAAAGACCACAATAGCG
BfBra1 -3kbp ~ -5.5kbp	Bra1_-5.5kbp_F	CGGGTACCGAGCTCATGTTTACAAACTGCTAGTCAATAA
BfBra1 -3kbp ~ -5.5kbp	Bra1_-3kbp_R	TTTCTCGGATATCTGACGATGATA
pPD1.27 + BfBra-3kbp	Bra1_-3k_vectF	CAGATATCCGAGAAAGGTATATAG
BfBra1 -0.5kbp	Bra1_HCRdeletion_F	CGGGTACCGAGCTCAACAGAAAATTTCA <del>TACATTATTTATAA</del> CAGTTACAGCTTCTT
BfBra2 -5.7kbp	Bra2_-5.7kbp_F	CGGGTACCGAGCTCAATGTGGAATGTCGGGCGATAGATT
BfBra2 -1, -2, -5.7kbp	Bra2_upstream_R	CTTTGGAGCAGTCATGGTGCACGGTACGGCTGAAGTATC

下流及びイントロン領域

Product Name	Primer Name	Sequence (5'→3')
pSP1.72 <i>CiBra</i> basal promoter > <i>LacZ</i> vector	<i>CiBra</i> _promotor_F	GGAGCTCCACCGCGGCTGTATAAACTGCACCCGAGTGT
	pSP1.72_R	TGAGCTCGGTACCCGCTTCAGCTGCTCGAGTTCTATAGT
<i>BfBra2</i> downstream	<i>Bra2</i> _downstream_F	CGGGTACCGAGCTCACCATGACCATGCCGTCCATGTAAA
	<i>Bra2</i> _downstream_R	CCGCGGTGGAGCTCCTCACCAATGGTTTCTGACAAGTT
<i>BfBra1</i> downstream	<i>Bra1</i> _downstream_F	CGGGTACCGAGCTCAGAACGAGGTCAAACAAACGTCAAT
	<i>Bra1</i> _downstream_R	CCGCGGTGGAGCTCCCTATGACTCCACCATCGCTCTAA
<i>BfBra1</i> , <i>Bra2</i> intron1	Common_intron1_F	CGGGTACCGAGCTCAGACCGAGCGGGACCTGAA
	Common_intron1_R	CCGCGGTGGAGCTCCACCTTCAGCACGGGGAACAT
<i>BfBra1</i> , <i>Bra2</i> intron2	Common_intron2_F	CGGGTACCGAGCTCACAAGGTCAAACCTACCAACAAACT
<i>BfBra1</i> intron2	<i>Bra1</i> _intron2_R	CCGCGGTGGAGCTCCGCTGACCATGCGCTGGTTAT
<i>BfBra2</i> intron2	<i>Bra2</i> _intron2_R	CCGCGGTGGAGCTCCTGTGCAGGCTGTTCAAGATTATCT
<i>BfBra1</i> intron3	<i>Bra1</i> _intron3_F	CGGGTACCGAGCTCAGCAGTTACGGCGTACCAGAATGAA
	<i>Bra1</i> _intron3_R	CCGCGGTGGAGCTCCGAAAGCCTTGCGAAAGGGTTATA
<i>BfBra2</i> intron3	<i>Bra2</i> _intron3_F	CGGGTACCGAGCTCACACATTCGCCGAGACACAGTTCAT
	<i>Bra2</i> _intron3_R	CCGCGGTGGAGCTCCAACGGGTTGTGCTTGATCTTCAAA
<i>BfBra1</i> intron4	<i>Bra1</i> _intron4_F	CGGGTACCGAGCTCATAACCTTTTCGCCAAGGCTTTCTT
	<i>Bra1</i> _intron4_R	CCGCGGTGGAGCTCCTCCATTCCGTCCTTCCCATCACTT
<i>BfBra2</i> intron4	<i>Bra2</i> _intron4_F	CGGGTACCGAGCTCAAAAAGCCTTCCTTGACGCTAAAGAA
	<i>Bra2</i> -intron4_R	CCGCGGTGGAGCTCCGCGAACGGGTTGTGCTTGAT
<i>BfBra1</i> intron5	<i>Bra1</i> _intron5_F	CGGGTACCGAGCTCAGGAAGATTTGCAAGATCAACCACAAT
<i>BfBra2</i> intron5	<i>Bra2</i> _intron5_F	CGGGTACCGAGCTCAGAGTGGACATGACGACTTGACTGA
<i>BfBra1</i> , <i>Bra2</i> intron5	Common_intron5_R	CCGCGGTGGAGCTCCGGGCAGATGGGGCCTGTA
<i>BfBra1</i> , <i>Bra2</i> intron6	Common_intron6_F	CGGGTACCGAGCTCACCGCACCCGTACCAGAGA
<i>BfBra1</i> intron6	<i>Bra1</i> _intron6_R	CCGCGGTGGAGCTCCCATGGCTGACATGGACAGCATGTT
<i>BfBra2</i> intron6	<i>Bra2</i> _intron6_R	CCGCGGTGGAGCTCCCATGGCTGACATGGACAGCATGTT

## 7-2. データ集計

### ナメクジウオでの実験結果

図 10C

	No signal	somite	notochord	tailbud	ectopic
100 ng/ $\mu$ l	68	26	8	9	14
500 ng/ $\mu$ l	97	15	30	0	53
1000 ng/ $\mu$ l	60	30	9	16	50

図 11A

	No signal	somite	notochord	Tailbud	ectopic
Early Neurula	20	30	17	15	6
Mid Neurula	60	30	9	16	50
Late Neurula	50	27	24	5	50

図 11B

	No signal	somite	notochord	Tailbud	Ectopic
	42	20	1	11	63



カタユウレイボヤでの実験結果

	Muscle	No signal
<i>BfBral</i> -3kbp 8h	139	160
<i>BfBral</i> -3kbp 12h	78	203
<i>BfBra2</i> -2kbp 8h	205	223
<i>BfBra2</i> -2kbp 12h	130	232

	No signal	Notochord
<i>BfBral</i> +3kbp 7h	39	24
<i>BfBral</i> +3kbp 11h	30	34
<i>BfBra2</i> +3kbp 7h	91	9
<i>BfBra2</i> +3kbp 11h	82	18

7h	No signal	Notochord	Muscle	Noto + Mus	Ectopic
<i>BfBral</i> intron1	9	7	0	0	1
<i>BfBral</i> intron2	29	35	1	2	2
<i>BfBral</i> intron3	150	53	0	1	0
<i>BfBral</i> intron4	25	24	0	2	1
<i>BfBral</i> intron5	140	0	0	2	1
<i>BfBral</i> intron6	86	0	0	0	0

11h	No signal	Notochord	Muscle	Noto + Mus	Ectopic
<i>BfBral</i> intron1	35	41	6	5	3
<i>BfBral</i> intron2	74	72	2	5	8
<i>BfBral</i> intron3	19	24	5	4	4
<i>BfBral</i> intron4	29	46	0	0	3
<i>BfBral</i> intron5	46	6	1	3	2
<i>BfBral</i> intron6	38	2	4	1	2

7h	Notochord	Muscle	Both	No signal
<i>BfBra2</i> intron1	29	91	32	32
<i>BfBra2</i> intron2	30	13	46	39
<i>BfBra2</i> intron3	0	89	28	0
<i>BfBra2</i> intron4	1	70	134	1
<i>BfBra2</i> intron5	0	154	15	0
<i>BfBra2</i> intron6	2	210	19	37

11h	Notochord	Muscle	Both	No signal
<i>BfBra2</i> intron1	17	65	24	53
<i>BfBra2</i> intron2	15	34	15	66
<i>BfBra2</i> intron3	0	107	0	0
<i>BfBra2</i> intron4	46	22	48	15
<i>BfBra2</i> intron5	24	52	15	35
<i>BfBra2</i> intron6	17	241	19	107

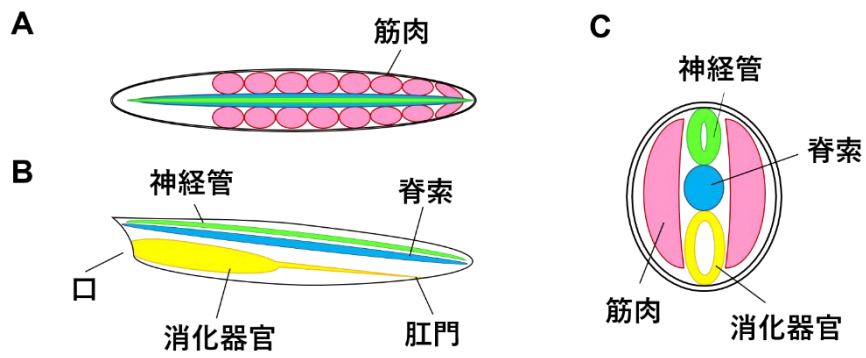


図1 脊索動物のボディプランの模式図

A, 背側、B, 左側、C, 断面図。

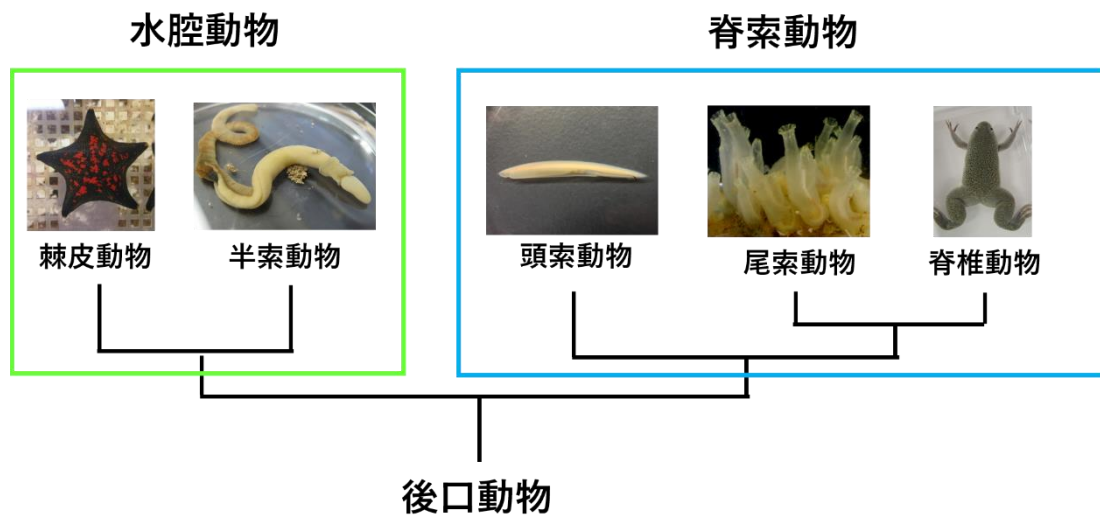
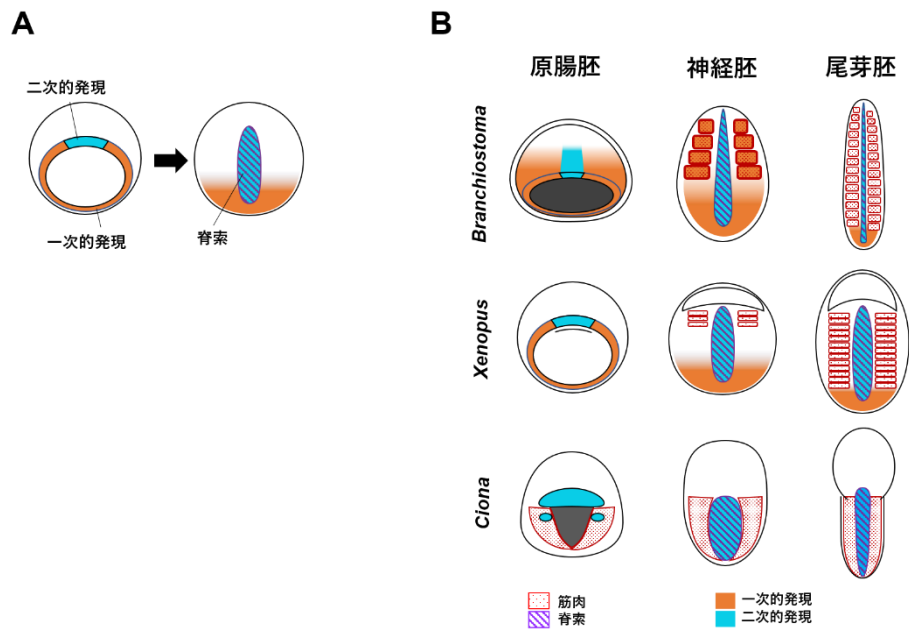


図2 後口動物の系統樹



### 図3 脊索動物の *Brachyury* 発現

(A)：脊索動物各門の *Brachyury* 発現の模式図。原口周辺での発現は、将来脊索になる二次的な発現と、原口周辺の一時的な発現に分かれる。(B)：頭索動物と脊椎動物、および尾索動物の *Brachyury* 発現の模式図。尾索動物では一次的な発現は見られない。

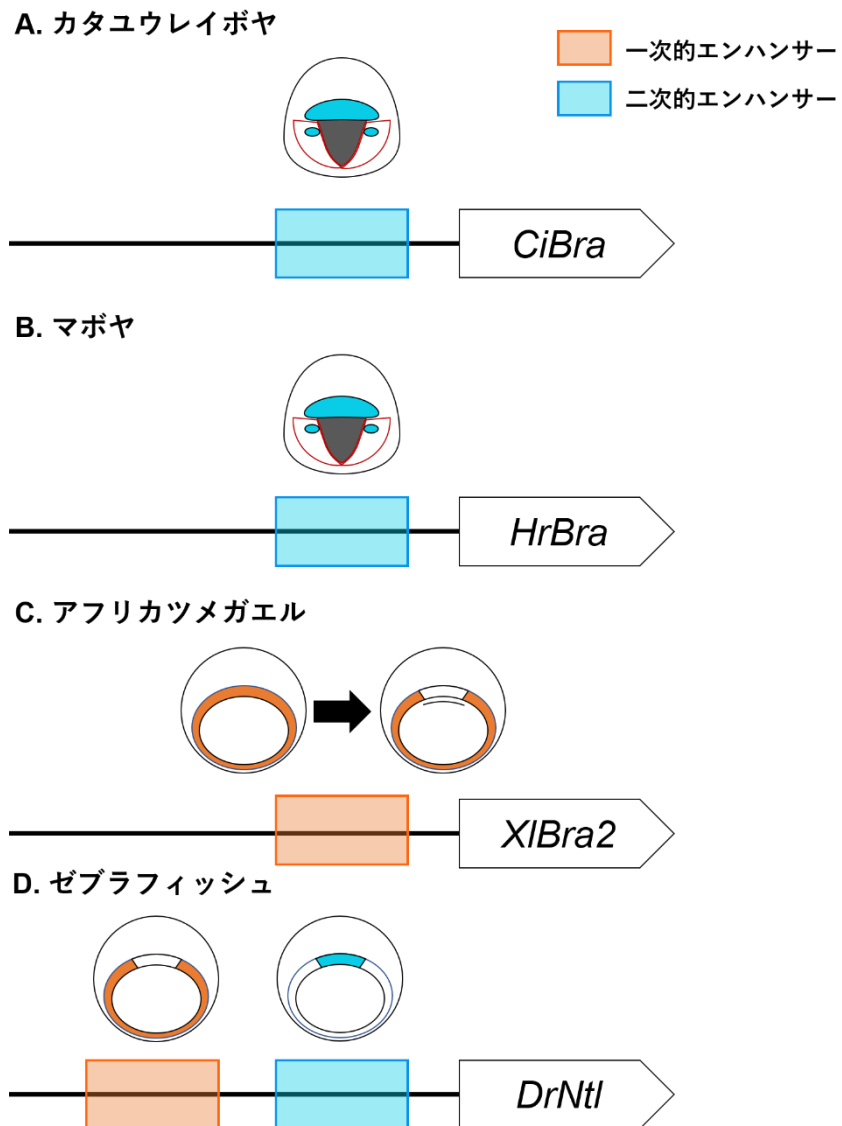


図4 脊索動物各種のエンハンサー構成

尾索動物では上流に脊索での *Brachyury* 発現を誘導するエンハンサーが見られるが (A)(B)、アフリカツメガエルでは原口周辺での発現を制御するエンハンサーが存在し (C)、ゼブラフィッシュでは脊索と側方中胚葉での *Brachyury* エンハンサーは分かれている (C)(D)。

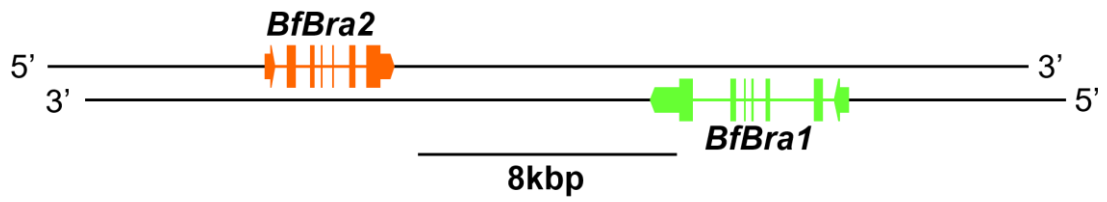


図5 フロリダメクジウオの *Brachyury* 遺伝子構造

二つの *Brachyury* 遺伝子 *BfBra1* と *BfBra2* が 8kbp ほどの間隔を挟んで向かいあって存在している。

```

BfBra1  MSSAETMKQPTAASPDQFSVSHLLSAVESEISAGSEKGDPTERDLKITLEEKPLWDFNA
BfBra2  -----MKQTPDQFSVSHLLSAVESEISAGSEKGDPTERDLKVTLGEKPLWEKFKS
          ***** ** ***** **

BfBra1  LTNEMIVTKNGRRMFPVLKVNVSGLDPNAMYSFLLDFTAADNHRWKYVNGEWVPGGKPEP
BfBra2  LTNEMIVTKSGRRMFPVLKVNVSGLDPNAMYSFLLDFTAADNHRWKYVNGEWVPGGKPEP
          *****

BfBra1  SVPSCVYIHPDSPNFGAHWMKSPVSFSKVKLTNKLNGGGQQIMLNSLHKYEPRLHIKVG
BfBra2  SVPSCVYIHPDSPNFGAHWMKSPVSFSKVKLTNKLNGGGQQIMLNSLHKYEPRIHIVKVG
          ***** ** **

BfBra1  GPDNQRMVSTHTFPETQFIAVTAYQNEEITALKIKYNPFAKAFLDAKERSDGKDGMEDLQ
BfBra2  GPDNQRTLSTHTFAETQFIAVTAYQNEELTALKIKHNPFAKAFLDAKERNDTKSGHDDL
          ***** ** * **

BfBra1  DQPQY-SQLGGWFLPGTGPICPPNPHQFAPSLGLPSHGCDRYSTLRNHRSAYPHPYQR
BfBra2  DQQPQFSQLGGWFLPGTGPICPPNPHQFAPSLGLPSHGCDRYSTLRNHRSAYPHPYQR
          ** *****

BfBra1  SSPPTNYGHDTAASLPMMPTHDNWSGLPVSTHNMLSMSAMPHTTTSTHAQYPNLWSVSNN
BfBra2  SSPPTNYGHDTAASLPMMPTHDNWSGLPVSTHNMLSMSAMPHTTTSTHAQYPNLWSVSNN
          *****

BfBra1  NLTPTHAQTHMSGTMGTGLPHQFLRTTAPAPYHSIPTCTVPTTASSSPVYHDSHEVSST
BfBra2  NLTPTHAQTHMSGTMGTGLPHQFLRTTAPAPYHSIPTCTVPTTASSSPVYHDSHEVSST
          *****

BfBra1  DSGYGHSTTPAPQTRITSNWSPMTPPSL
BfBra2  DSGYGHSTTPAPQTRITSNWSPMTMPSM
          ***** **

```

図6 二つの *Brachyury* 遺伝子の配列比較

フロリダナメクジウオの二つの *Brachyury* 遺伝子 (*BfBra1* と *BfBra2*) のアミノ酸配列比較。この二つの遺伝子のアミノ酸配列は92%一致している。茶色の部分が T-box ドメインを示す。



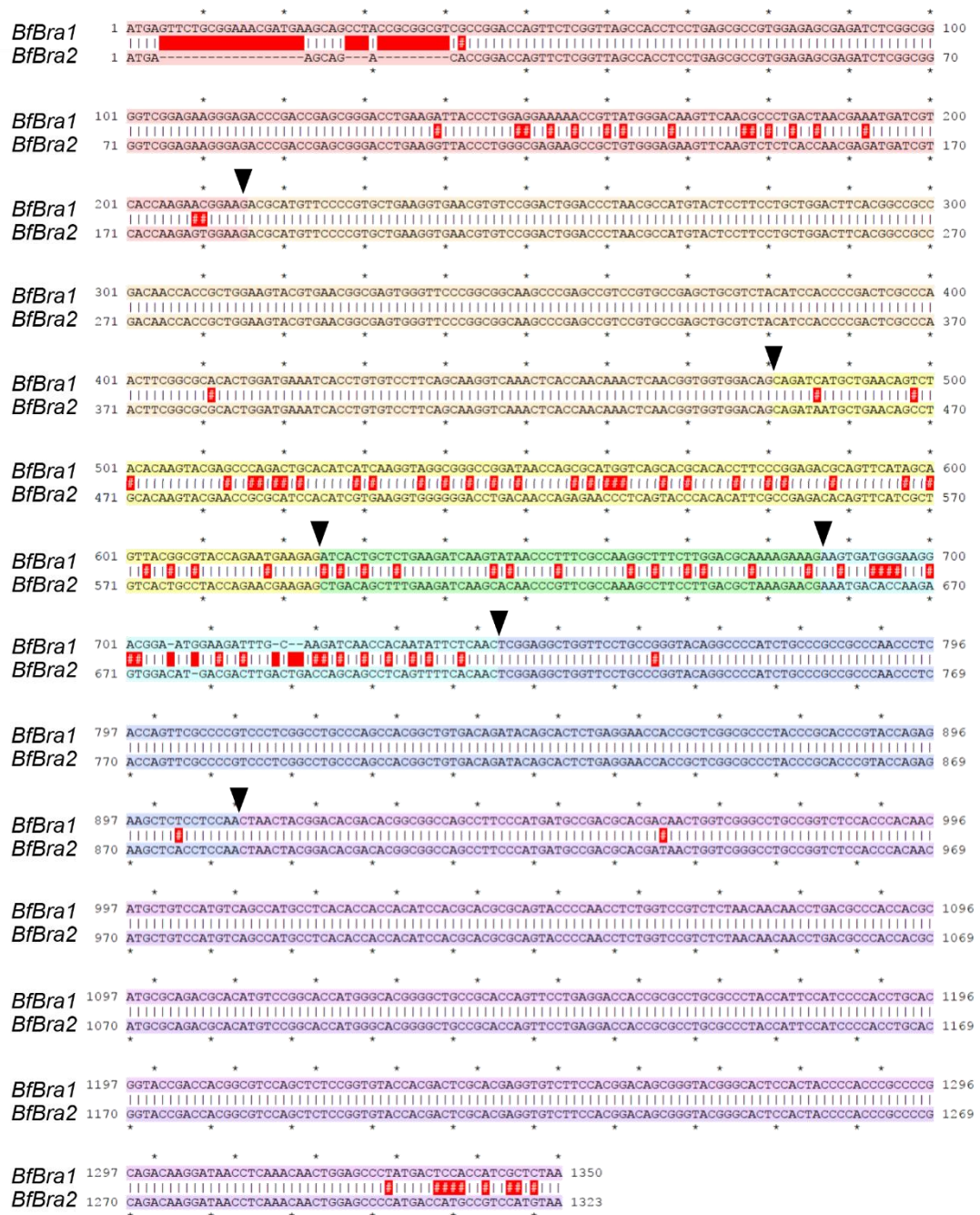


図7 二つの *Brachyury* 遺伝子の配列比較

BfBra1 と BfBra2 の塩基配列比較。90%の一致が見られた。赤色がミスマッチ配列を示す。イントロンごとに色分けして示してあり、各イントロンの境界部は矢頭で示した。

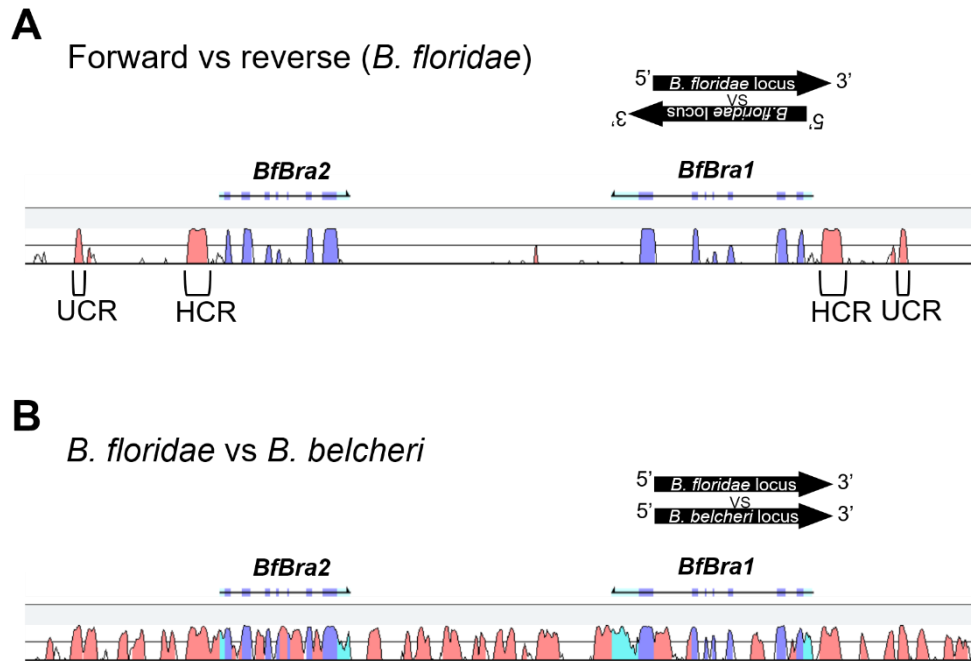


図8 VISTAによる配列比較

*B. floridae* の二つの *Brachyury* 遺伝子周辺領域の比較(A)と *B. floridae* と *B. belcheri* の同じ領域の比較(B)。横軸はゲノム領域を現し、縦のピークが近傍領域の相同性を現す。二種間では広範に亘って保存された領域が見られるが、2 遺伝子間では上流領域に保存された領域 (HCR と UCR) が見られるのみである。青がコーディング領域、空色が UTR 領域、赤色が非転写領域を現す。

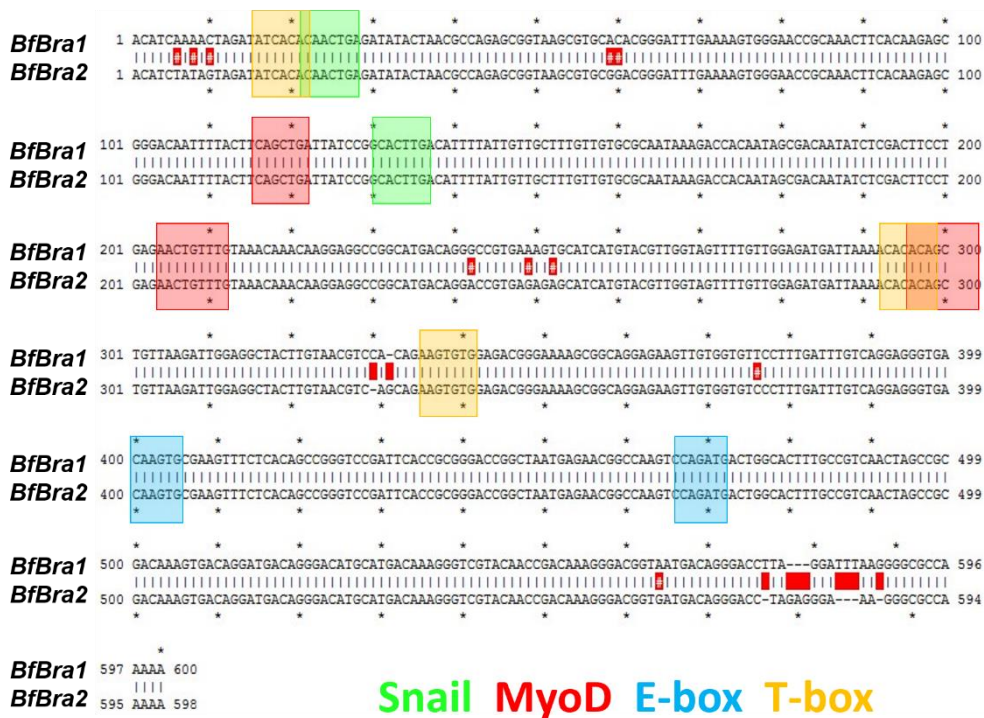


図9 *B. floridae*における *BfBra1* と *BfBra2* の上流保存領域(HCR)の結合タンパク質の予測  
*BfBra1* と *BfBra2* の上流領域の保存された領域(HCR)の配列比較。ミスマッチ配列は赤色で示した。また、保存された領域から見つかった転写調節因子の予測結合配列を四角で囲い、それぞれに結合すると予測される因子を下部に示した。

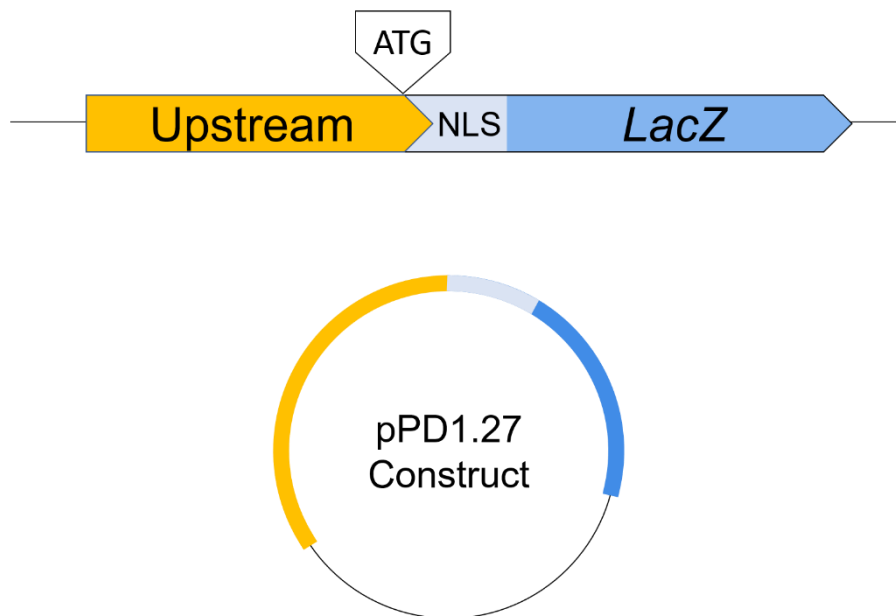


図 10 上流 *LacZ* レポーターコンストラクトの概略図

pPD1.27 を骨格として、*BfBra1* と *BfBra2* の上流領域を *LacZ* 遺伝子に繋いだコンストラクトを作製した。このコンストラクトの *LacZ* は核以降シグナルを有している。また、上流領域は翻訳開始点までを含んでおり、*BfBra1* もしくは *BfBra2* の 5'UTR 領域及び基本プロモーターを含んでいると考えられる。

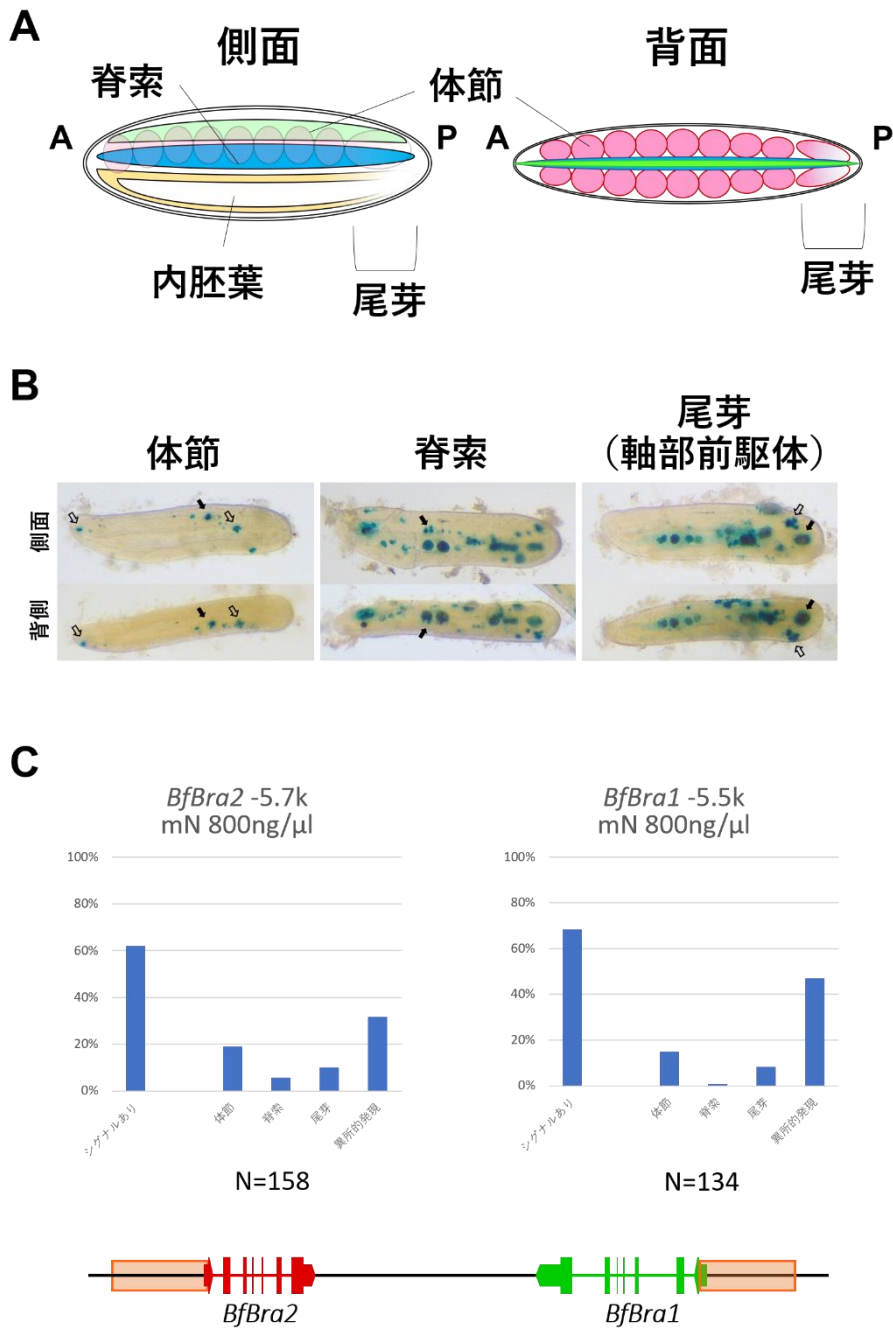


図 11 ナメクジウオ胚構造の模式図および発現例

ナメクジウオの神経胚では、脊索の両脇に体節が並んでおり、後方には尾芽領域が存在する(A)。 *BfBra2* 上流領域を含んだ *LacZ* コンストラクトを注入した胚は、スポット状のシグナルを発現した。黒い矢印が signal、白い矢印が異所的な発現を示す(B)。 *BfBra1* と *BfBra2* はいずれも体節、脊索、尾芽での発現を示したが、異所的な発現も多く見られた(C)。 mN: 中期神経胚期 (mid Neurula)。

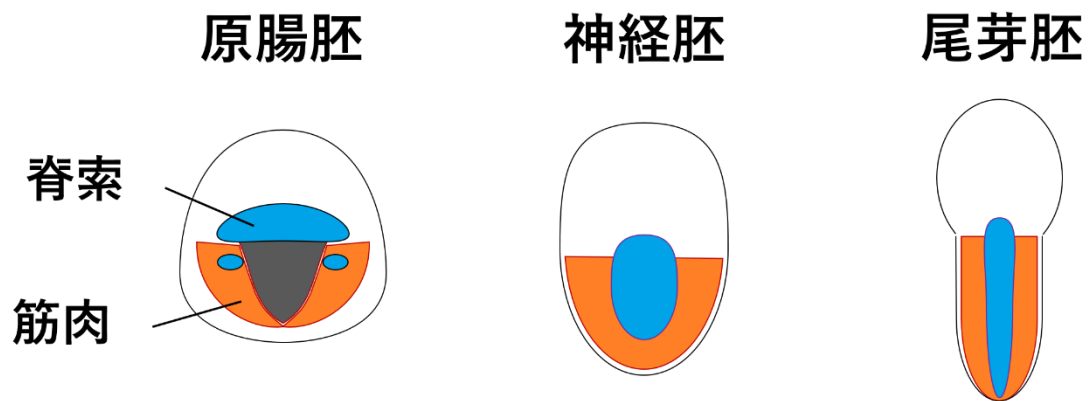


図 12 カタユウレイボヤ胚の模式図  
 青色が脊索細胞、オレンジ色が筋肉細胞を示す。

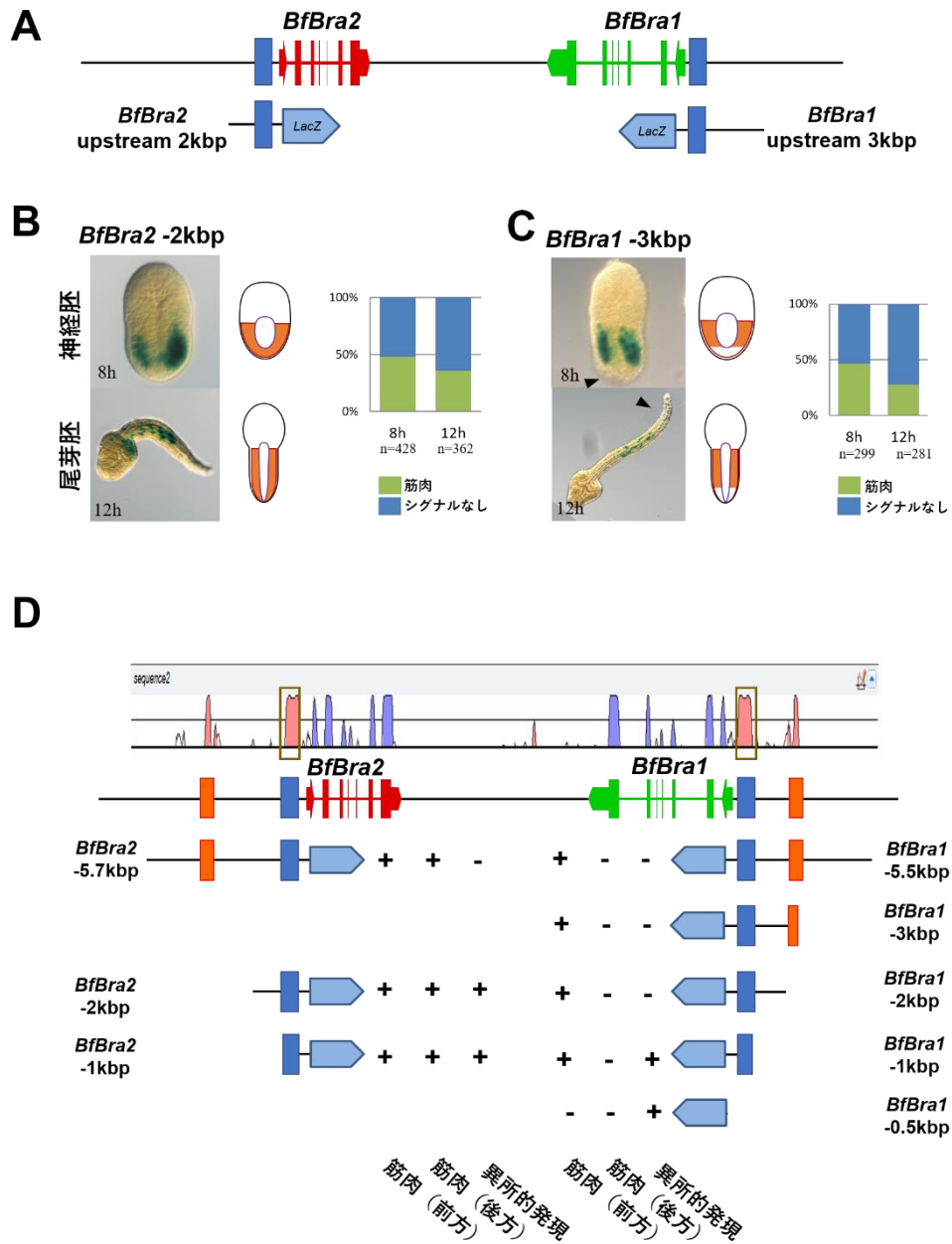


図13 カタウレイボヤを用いたナメクジウオ *Brachyury* エンハンサーの機能解析  
ゲノム上における HCR の位置とコンストラクトの構成(A)。二つのナメクジウオ *Brachyury* 遺伝子では、上流領域はともに筋肉での発現を誘導したが(B, C)、*BfBra2* 上流領域が尾部先端の筋肉で *LacZ* 発現を誘導したのに対して、*BfBra1* 上流領域は尾部先端部での発現は誘導しなかった(C)。より長い領域や短い領域でも同様の実験を行った(D)。

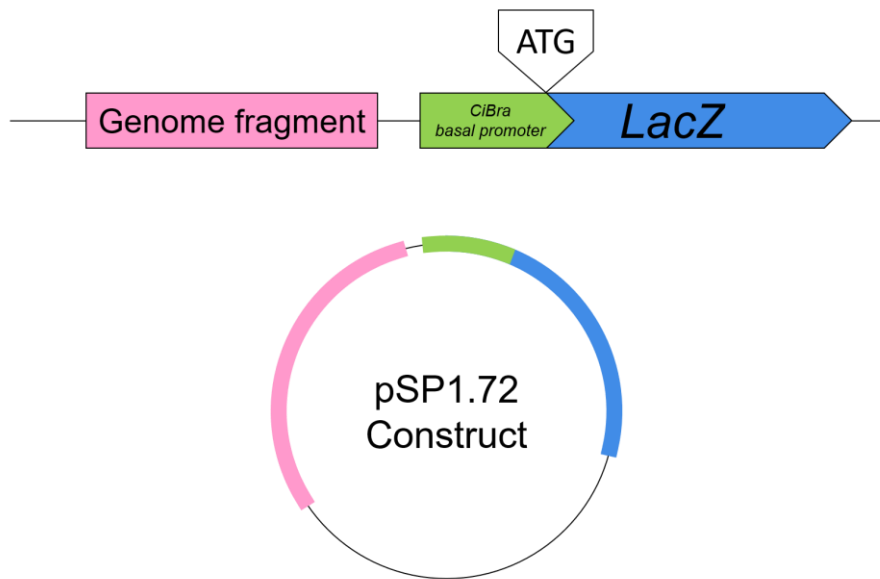


図 14 *CiBra* 基本プロモーターを用いた *LacZ* コンストラクトの概略

下流領域とイントロン領域の発現制御機能を調べるために作成したコンストラクト。基本プロモーターとして、*CiBra* 基本プロモーター（*CiBra* の翻訳開始部位から 74 bp 上流まで）を *LacZ* の翻訳開始点に繋いだものを用いた。



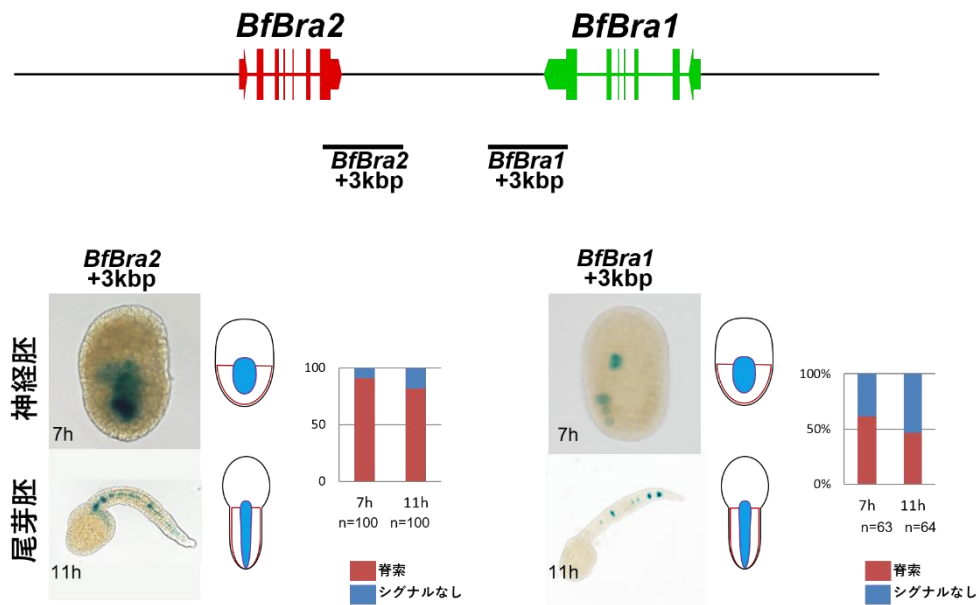
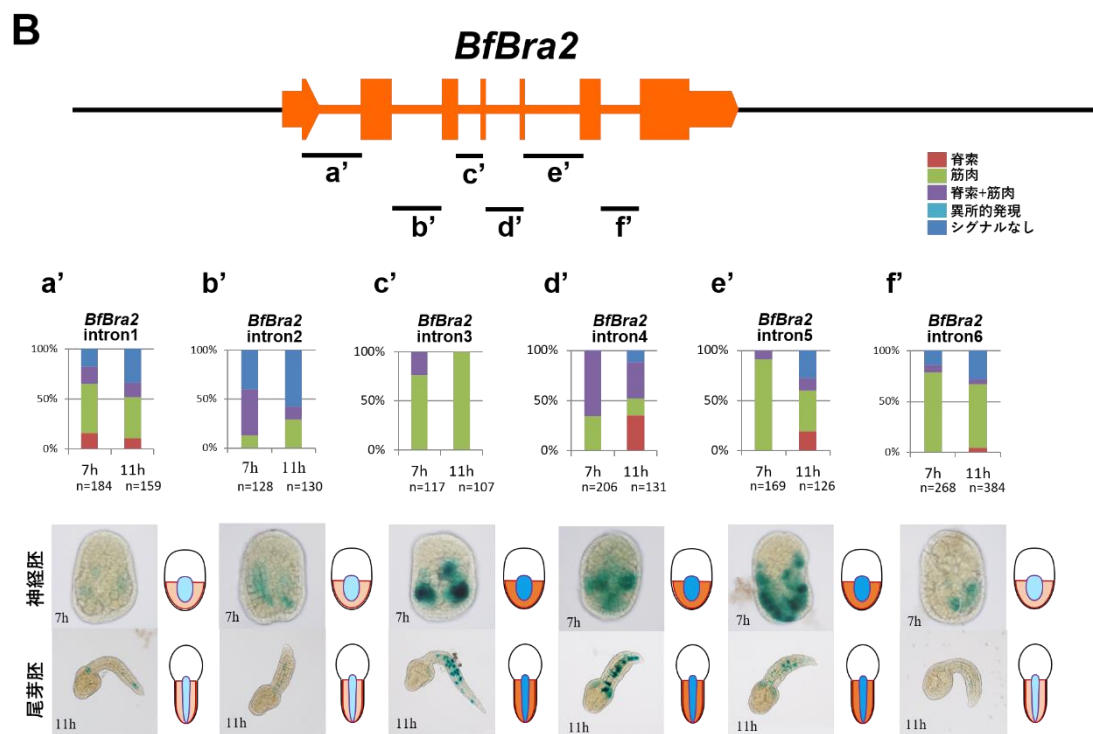
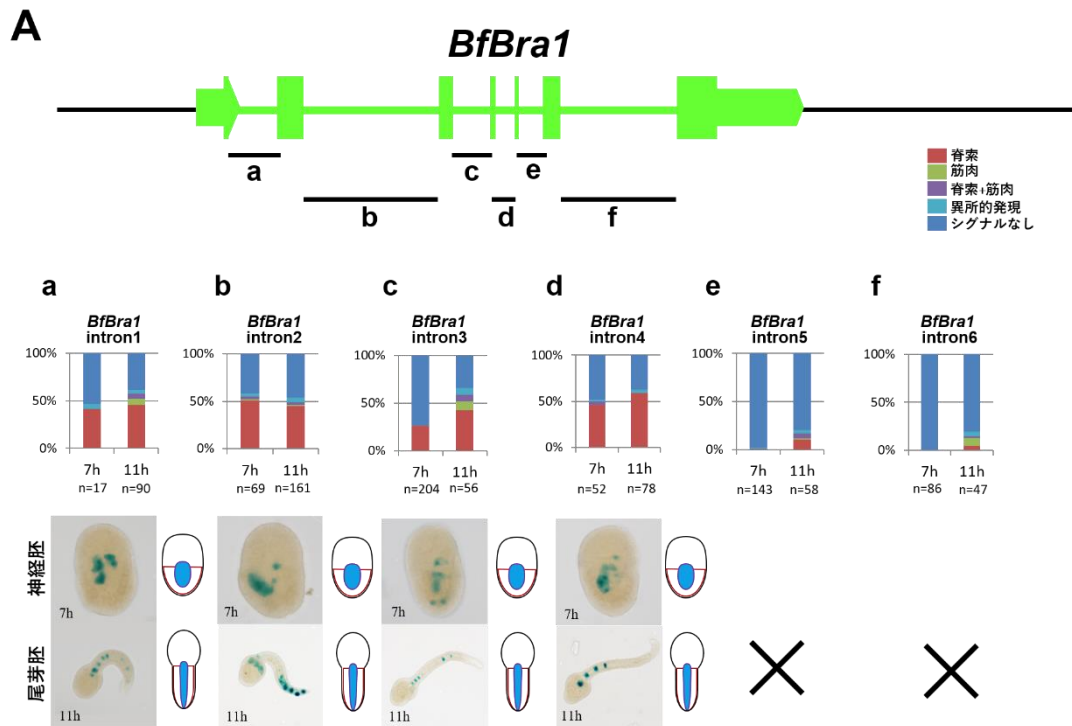


図 15 カタユレイボヤにおける *Brachyury* 下流領域のエンハンサー活性

*CiBra* 基本プロモーターを用いて、カタユレイボヤにおける *BfBra1* と *BfBra2* の下流領域の転写調節機能を調べた (A)。*BfBra1*, *BfBra2* とも下流領域は脊索での発現を誘導した (B)。



#### 図 16 *BfBra1* と *BfBra2* のイントロン領域における転写調節活性

*CiBra* 基本プロモーターを用いて、*BfBra1* と *BfBra2* の転写調節活性を調べた。*BfBra1* では、イントロン 1、2、3、4 の領域は脊索での *LacZ* 発現を誘導したが、イントロン 5、6 ではそのような活性は見られなかった(A)。一方 *BfBra2* からは脊索と筋肉の両方で転写を誘導する領域が見つかった。イントロン 4 は脊索と筋肉の両方に強い転写誘導活性があったが、イントロン 3 と 5 では筋肉で比較的強い発現を示した。イントロン 1, 2, 5 でも転写誘導活性が見られたが、比較的弱いシグナルであった(B)。

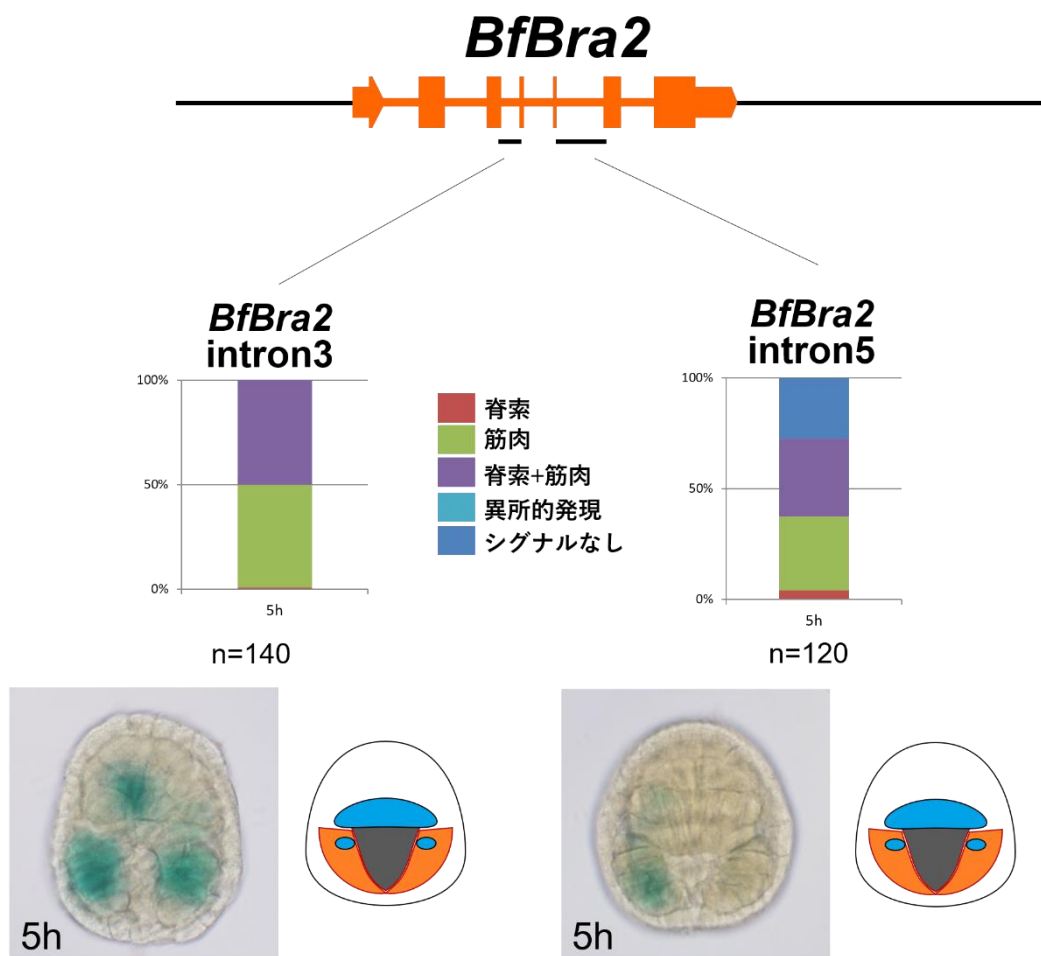


図 17 原腸胚期に原口周辺での発現を示した領域

*BfBra2* のイントロン 3 と 5 は発生初期に原口周辺で顕著な *LacZ* 発現を誘導した。

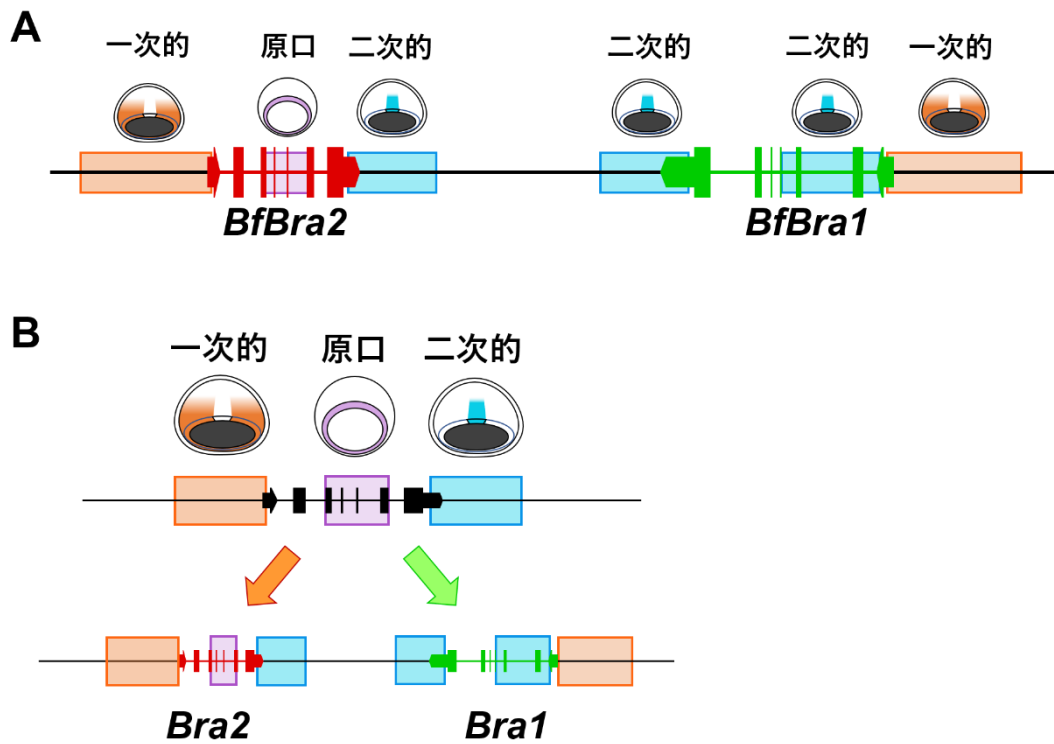


図 18 カタユレイボヤの実験から得られたナメクジウオ *Brachyury* のエンハンサーモデル

本実験から、ナメクジウオには一時的と二次的の発現を制御するエンハンサー以外にも、より初期で原口周辺の発現を制御するエンハンサーが存在する可能性が示唆された(A)。また、本研究から考えられる倍化過程の一仮説を示した(B)。