様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　６ 年　　６ 月 １６ 日現在

機関番号：３２６８９
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2019～2023
課題番号：１９Ｈ０３２００

研究課題名（和文）生物界に存在する発光タンパク質の進化と発光機構のインベントリー創出

研究課題名（英文）Building Inventory of Evolution and Luminescent Mechanisms of Bioluminescent Proteins

研究代表者

由良　敬（YURA, Kei）

早稲田大学・理工学術院・教授（任期付）

研究者番号：５０２５２２２６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,300,000円

研究成果の概要（和文）：当該研究は、発光生物とその発光タンパク質および発光低分子のデータベースを構築するとともに、新たな発光タンパク質や発光生物を見出し、それらの情報を統合することで発光機構の進化を明らかにすることを目標とした。その結果、発光生物と発光タンパク質を集積したデータベースBioHiKRを構築することができた。さらにホタルイカの部分ゲノム塩基配列を決定し、発光タンパク質を新規に推定することができた。また千葉県館山湾に生育するシリス科の生物が緑色に発光することを新規に見出した。同時にウミホタルのゲノム塩基配列決定を開始し、ミトコンドリアゲノムの配列決定を完了し、核ゲノム塩基配列決定に取りかかることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究では、発光タンパク質全体の進化を明らかにするためのデータ収集を実現し、データベースとして公開することで、発光生物および発光タンパク質の包括的理解をもたらすための基盤構築ができた。この基盤は発光生物の進化を理解することの助けになるとともに、発光タンパク質のバイオテクノロジーへの応用の道も拓くことにつながる。自ら発光するタンパク質を利用すれば、光が届かない生体深部で起こっている現象も解析することができるようになる。発光輝度を高める変異を見出すことで、実験道具としての発光タンパク質の開発にあらたな道を拓くことができる。

研究成果の概要（英文）：This research project aimed to elucidate the evolution of bioluminescent mechanisms by building a database of luciferases and luciferins with other related data and by identifying new bioluminescent organisms/proteins. As a result, the project has launched BioHiKR, an integrated database of bioluminescent proteins and ligands with organisms. Along with the database, the project partially determined the genome sequence of Watasenia scintillans and newly identified amino acid sequences of different types of luciferases in the genome. In addition, the project discovered new bioluminescent organisms at Tateyama, Chiba, which emitted green light, rare event for marine organism. This project also initiated genome sequencing of Vargula hilgendorfii to identify enzymes for luciferin biosynthetic pathway.

研究分野：生物物理学

キーワード：発光タンパク質　分子進化　データベース　ゲノム塩基配列

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

生物発光（生物がヒトの可視光を放射する現象）は、古くから人類の興味をひいてきた。ホタルの発光は、この昆虫がヒトのそばにいたために古くから知られているが、ホタル以外にも、特に海洋生物には発光するものが非常に多い。その仕組みおよび進化的意義は、多くの科学者によって、19 世紀以降調べられてきた。そのため、生物発光の起源と機構の解明をめざした研究は、生物学研究全体を突き進めることとなった。たとえば、酵素反応の生化学的測定は、発光タンパク質（ルシフェラーゼ）において初めて行われた。これら過去の研究の成果として、生物系統上離れている生物種に発光機構が存在し、発光機構に関与するタンパク質は共通祖先由来の場合もあれば、独立に進化した場合もあることがわかってきている。魚類の発光では、魚類そのものではなく共生細菌が発光している場合も多数存在し、共生により発光機構を獲得することで、生存に有利なことがあったと推定されている。発光に必要な低分子を自ら代謝している場合と、食物から摂取している場合があることも、すでに推定されている。これらの知見は各論として重要であるが、生物発光現象の総論としての研究には、なかなかつながっていないのが現状である。つまり、以下にあげる総論的な問いに答えることは、未だにできてない。

・生物が視覚をもっていなかった時代に、発光機構が生物界に固定したのはなぜか？
・発光低分子と発光タンパク質は、どのようにして歩調を合わせて進化したのか？
・発光タンパク質が独立に何回も進化してきた分子基盤は何か？

そこで本研究は、これらの問いに対する回答に一歩でも近づくことを目標とする。

２．研究の目的

本研究では、計算生物学の手法に立脚して、

・生物が利用している発光タンパク質と発光低分子が何種類あるのかを明らかにし、
・様々な生物における発光低分子の由来を明らかにし、
・発光タンパク質の発光機構を明らかにしたうえで、
・それぞれの発光タンパク質がどのように進化したのかを明らかにする

ことを目的とした。

３．研究の方法

本研究において、研究代表者および分担者はコンピュータによる情報解析のみ（ウエットな実験を実施しない）でこれら目的の達成を試みることとした。研究代表者は、今までに多くの実験研究者が蓄積してきた知識（論文など）が相当量に達しており、それらを「有機的」につなぐことで、種々の疑問に解答できると確信している。研究分担者は、今までに数多くのウェブデータベースを開発しており、その実力を本研究課題に適用する。生物学の問題に情報解析によるアプローチが可能であることを示すことができれば、生物学の様々な分野に情報解析（データサイエンス）が参入し、生物界の様々な現象の理解を、一段高いレベル（情報の有機的結合による理解）にもち上げることができるであろう。つまり、生物学に新しいアプローチを創造することができることになると考えた。

まず発光生物がもつ発光分子（タンパク質と低分子）を徹底的な文献検索で見いだし、発光生物と発光部位、発光タンパク質、発光低分子を接続したデータベースを作成する。分子の記載は、様々な公共データベースと接続し、タンパク質のアミノ酸配列や立体構造、発光分子の分子構造と直結させる。このデータベースの構築を通して、発光タンパク質が進化的に何種類に分類できるかを明らかにする。さらに、発光低分子が構造的に何種類に分類できるかも明らかにする。

発光タンパク質がゲノムにコードされていても、発光低分子が供給されなければそのゲノムをもつ生物は発光することができない。そこで発光低分子の供給源を明らかにする必要がある。今までに有機化学者が行った数多くの分子合成の研究には、発光低分子の合成系に関する研究も数多く含まれている。そこでこれらの研究にもとづき、推定されている発光低分子合成経路の情報と、生物がもつ酵素が触媒するすべての化学反応のデータ、発光生物のゲノム塩基配列から推定される全酵素のデータおよび、酵素の発現データをつきあわせ、発光生物がもつ酵素で発光低分子を合成できるかを推定する。

これらの情報に基づき、発光タンパク質の分子進化を再考する。

４．研究成果

（１）発光タンパク質のデータベース BioHiKR の開発

当初の研究計画に従い、徹底した文系検索を行い、発光タンパク質と発光低分子の情報を収集し、ウェブデータベースとして公開することができた（BioHiKR http://www.biohikr.life/）。発光する生物は、12 門にまたがる 118 科で見出されており、そのうちの 104 科は海棲生物であることがわかった。これらの生物が利用している発光タンパク質は、アミノ酸配列の一致度により 10 種類に分類することができた。またこれらのタンパク質が発光に利用する低分子は、その構造から 9 種類の異なる発光低分子を利用していることがわかった。つまりひとつの低分子が、

異なるタンパク質で共通に利用されていることがわかった。類似のアミノ酸配列をもつ発光タンパク質であっても、その発光機構が同時に進化してきたとは限らない場合も見つかった。類縁タンパク質による分子系統樹解析によって、発光する２種のタンパク質の間に、発光が見出されていないタンパク質が挟まっていることがあり、このことは、２種の発光タンパク質の発光機構が独立に進化したこと、あるいは間に挟まっているタンパク質の発光がまだ見出されていないことを、または発光に必要な低分子が供給されないために発光できないことを意味する。

　発光タンパク質のデータを集積することにより、発光生物の成育場所と発光波長に関連があることを見出した（図１）。いくつかの例外は存在するが、海棲生物の発光波長は450～500nmの青色であることが多く、陸棲性物の発光波長は550nmの緑色に集中する傾向にあった。トビイカは青色の発光器をもち、ホタルは緑色の発光器をもつことが知られているが、これは棲息場所の一般的な傾向を示していることがわかった。海水中と空気中における光の伝搬の違いにもとづく適応の結果このような違いが発生していることが推定された。

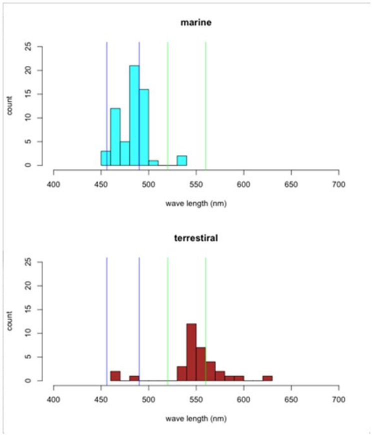

図１：発光生物の棲息場所と発光波長の関係

（２）ホタルイカの発光機構の推定

　ホタルイカは日本で発見されその学名である *Watasenia scintillans* は日本人によって命名された、日本にゆかりのある発光生物である。明治時代には、ホタルイカに３種類の発光器が存在することが報告されている。しかし、その発光に関与するタンパク質および低分子は当該研究を開始する時点で見出されていなかった。また、ホタルイカのオミックスデータは蓄積されていなかった。そこで、当初の研究計画（情報解析のみで発光機構を調べる）を変更し、自らの研究グループでデータを取得した。まずホタルイカのゲノムとトランスクリプトームデータを取得するために、富山県ホタルイカミュージアムからホタルイカ10体を供与いただき、ひとつの個体を解剖し、脳と発光器のある腕を分離し、各組織からＤＮＡとＲＮＡを抽出した。野生のホタルイカにはゲノム塩基配列に多様性がある可能性があり、複数の個体由来のＤＮＡが混ざると、データ解析が困難になる可能性が指摘されていたことより、１個体のみからの試料抽出を行った。その結果、1000億塩基のＤＮＡと100億塩基のＲＮＡを取得することができた。これらの塩基配列は短い断片で取得されていることから、計算機を用いてこれらの断片を接続し、全体像の取得を試みた。しかし染色体レベルのＤＮＡ配列を取得することはできなかった。データ取得ができなかったことの理由は明らかになっていないが、ホタルイカ個体内にも、高い多様性があることが推定された。

　ある程度の長さに接続ができたＤＮＡ配列とＲＮＡ配列を用いて、発光タンパク質の検索を行った。（１）で構築したデータベースに格納されている既知発光タンパク質と類縁のアミノ酸配列を検索したところ、ゲノム塩基配列に、トビイカの発光タンパク質であるシンプレクチンと類似のアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列を発見できた。また、発光器をもつ腕のＲＮＡ配列からもシンプレクチンと類似のアミノ酸配列をコードするＲＮＡ配列を発見できた。さらに脳のＲＮＡ配列からは、北米ホタルの発光タンパク質であるルシフェラーゼと類縁のアミノ酸配列をコードするＲＮＡ配列を見出すことができた。シンプレクチンの類縁タンパク質の立体構造を予測し、発光低分子との相互作用を推定したところ、複合体構造が問題なく構築できることがわかった。（１）で構築したデータベースより、ホタルのルシフェラーゼは緑色に、トビイカのシンプレクチンは青色に発光することがすでにわかっている。ホタルイカの表皮をよくしらべると、緑色と青色に発光する箇所があることがわかっていることより、それぞれのタンパク質がそれぞれの発色に関与することが示唆された。

　これらの成果は塩基配列データとともに、科学雑誌 Marine Biology の第 22 巻に発表した（Masa-aki Yoshida et al. (2020) Genomic and transcriptomic analyses of bioluminescence genes in the enope squid *Watasenia scintillans*, *Marine Biology*, 22, 760-771.)。

（３）新規発光生物の発見

　千葉県館山市に位置するお茶の水女子大学湾岸生物研究所において、海棲生物飼育用に利用している大型水槽が発光することを知り、2020年11月にその調査に赴いた。夜間の水槽から光を放っている画分を抽出し、光っている物体を選別した結果、発光物が1mm程度の海洋性生物であることがわかった。刺激を与えることで緑色の光を放つことから、当該生物が発光または蛍光しているか、当該生物に寄生する微生物が発光または蛍光していることが示唆された。多くのサンプルを取得することができたことから、当該生物の発光部位特定と、ゲノムデータの取得を行った。形態観察により、頭部に３本の触手を見出すことができた。また全体の構造からゴカイの一種であるシリス科の動物であることが推定された。シリス科には少なくとも 4 つの亜科が存在するが、いずれの亜科に分類されるかは明らかにできなかった。また電気刺激を与えることで緑色を呈することが明らかになった（図２）。個体を溶液中で強く震盪して電気刺激を与えても同

じ部位が緑色を呈することより、寄生している微生物ではなくシリスそのものが発光／蛍光していることが示唆された。

当該生物の種同定と発光／蛍光の分子機構を明らかにすることをめざして、ゲノム塩基配列の決定を試みた。個体をすりつぶした後に遠心分離し、沈殿画分からＤＮＡを抽出した。短鎖の塩基配列を読み取り計算機上でつなぎ合わせることで、ミトコンドリアのゲノム塩基配列を復元することができた。全長約 15210 塩基から構成されるミトコンドリアのゲノム塩基配列には、2 つの rRNA と 22 個の tRNA、および 13 個のタンパク質をコードする配列を見出すことができ、ほぼ完全長を再現することができた。他生物種のミトコンドリアゲノムと比較したところ、シリス科由来のミトコンドリアゲノム塩基配列に一番にていることがわかったことより、当該発光／蛍光生物はシリス科に属する可能性が高いことがわかった。シリス科のミトコンドリアゲノムは、遺伝子の配置が非常に多様になっていることがすでに報告されており、今回配列を決定した個体のミトコンドリアゲノムは、今までにない新規の遺伝子配置になっていることがわかった。核ゲノムの塩基配列を決定するだけの試料を得ることはできなかったが、断片配列を得られていることから、これらのデータの中から発光タンパク質と類縁のタンパク質を見いだせる可能性が残っている。

図２：光を放つシリス科の動物

（４）ウミホタルの発光低分子合成系の探索

ウミホタルの発光は長く研究されており、発光タンパク質であるルシフェーラーゼはアミノ酸配列から立体構造まですでに明らかになっている。発光に必要な低分子ルシフェリンは、生体中にも存在するアルギニンとイソロイシン、トリプトファンそれぞれ一分子が共有結合することでできあがる分子であることもすでに明らかになっている。近年この分子はウミホタルが摂取しているのではなく自ら合成していることが明らかになった。つまり、自らのゲノムの中にこれらアミノ酸を結合する化学反応を触媒する酵素が存在することが強く示唆されたことになる。そこで核ゲノムの塩基配列より合成酵素を推定することを試みようとしたが、ウミホタルのゲノム塩基配列が未だに決定されていないことが明らかとなった。そのため、自らの研究室でゲノム塩基配列の決定を開始した。

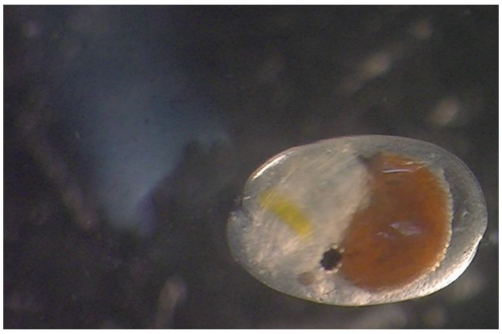

図３：タンパク質と低分子を吐きだして発光するウミホタル

2020 年 11 月 7 日と 2020 年 11 月 21 日、2023 年 9 月 15 日および 2023 年 10 月 6 日に千葉県館山市の館山湾でウミホタルを採取した。短鎖ＤＮＡ用の試料は 60 匹のウミホタルから抽出し、約 8580 億塩基の短鎖ＤＮＡを取得することができた。長鎖ＤＮＡ用の試料は 1622 匹の第２触覚から抽出した。これはウミホタルに寄生する真核生物のゲノムが混ざらないようにするための処置である。配列決定の結果、約 1800 億塩基の長鎖ＤＮＡを取得することができた。また、ＤＮＡの発現場所を明確にすることを目的にＲＮＡの取得も試み、約 80 億塩基のＲＮＡ配列を 30 匹のウミホタルから得ることができた。これらのデータからゲノムサイズを推定したところ、ウミホタルのゲノムはヒトゲノムと同程度の 30 億～33 億塩基対で構成されていることが推定された。またミトコンドリアのゲノム塩基配列を推定したところ、約 15900 塩基で構成されていることがわかり、過去に報告されたウミホタルのミトコンドリアゲノムと同じ長さであることがわかった。ただし 21 塩基の変異があることがわかり、ウミホタルのミトコンドリアがかなり多様になっていることが示唆された。今後核ゲノムのデータを取得し、基質合成酵素の探索を実施する。ゲノム塩基配列から酵素タンパク質の機能を推定する方法は、当該研究期間に開発ずみである。機械学習の手法を導入し、既知タンパク質アミノ酸配列と酵素番号（ＥＣ番号）との関係を学習することで、アミノ酸配列から酵素を推定する手法を開発した。ゲノム塩基配列からタンパク質のアミノ酸配列を取得することができれば、当該手法を適用して、アルギニン、イソロイシン、およびトリプトファンと相互作用する可能性がある酵素のアミノ酸配列を推定し、ルシフェリン合成酵素を絞り込む。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　0件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Yoshida Masa-aki、Imoto Junichi、Kawai Yuri、Funahashi Satomi、Minei Ryuhei、Akizuki Yuki、Ogura Atsushi、Nakabayashi Kazuhiko、Yura Kei、Ikeo Kazuho	４．巻 22
２．論文標題 Genomic and Transcriptomic Analyses of Bioluminescence Genes in the Enope Squid Watasenia scintillans	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Marine Biotechnology	６．最初と最後の頁 760～771
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10126-020-10001-8	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　1件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 舟橋 実里、鈴木 博文、由良 敬
２．発表標題 Evolutionary Analysis of Luciferase, Photoprotein and Luciferin
３．学会等名 第57回日本生物物理学会年会
４．発表年 2019年

１．発表者名 Kei Yura
２．発表標題 Genomic and transcriptomic analyses in the enope squid Watasenia scintillans and other bioluminescent marine species
３．学会等名 Challnege to new environmental science research by bio-DX using various advanced technologies（招待講演）（国際学会）
４．発表年 2020年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

BioHiKR: DB of bioluminescent proteins
http://www.biohikr.life/

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	鈴木　博文 (Suzuki Hirofumi) (60418572)	早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・次席研究員（研究院講師） (32689)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関