

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03002

研究課題名(和文) ホタルの全ゲノム情報と人工飼育ホタルを用いた、昆虫の新奇形質獲得メカニズムの解明

研究課題名(英文) Postgenomic study on the bioluminescent traits on firefly using whole-genome data of Heike firefly strain

研究代表者

大場 裕一 (Oba, Yuichi)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：40332704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、我々の研究によって全ゲノム解読(Fallon, Oba et al., 2018, eLife)されたヘイケボタルのさまざまな発光現象に関わる新奇形質に焦点を当てて研究を行った。ホタルルシフェラーゼの祖先配列復元の結果、1億年前のホタルの発光を試験管内で再現することに成功した。また、ヘイケボタルの発光パターンを解析した結果、点滅に含まれる「またたき」の意義を明らかにした。pupalRNAiの結果、その発光パターンがdoublesex遺伝子に制御される脳の働きに依存していることが示唆された。黒化変異体の責任遺伝子の解明をゲノムリシーケンスによって行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は2つのプレスリリースを行い、国内新聞各紙、科学雑誌、ウェブマガジン、テレビ番組、ラジオ番組、海外のメディアなどに大きく紹介された。また、一般書籍や科学雑誌の特集号などでも紹介され、広く国民に対する説明責任を果たすことができた。また、国際学会での成果発表や英文総説の執筆も行い、科学コミュニティーに対しても広く成果を知らしめた。ホタルの生態と進化を明らかにしたことで、光を使った生物間のコミュニケーション様式の基本的理解や、新規酵素が出現するメカニズムなど、生物進化の基本原則の理解に貢献した。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to examine the bioluminescent traits on firefly using Heike firefly strain.

Ancestral sequence reconstruction of firefly luciferase genes revealed that the common ancestral firefly appeared about 100 million years ago emitted green light. Analysis of the flash patterns of Heike firefly showed that male recognizes the flicker intensity in female flash. PupalRNAi showed the flash pattern is regulated by neuronal control under the signal cascade of doublesex gene. Genome resequencing was performed to identify the responsible gene for lack mutant in Heike firefly.

研究分野：発光生物学

キーワード：生物発光 ポストゲノム ルシフェラーゼ RNAi 光コミュニケーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2018年、我々(研究代表者大場と研究分担者重信を含む)は、マサチューセッツ工科大学ほかとの国際共同研究によりホタル2種とヒカリコメツキ1種の全ゲノム解読を報告した(Fallon, Oba, Shigenobu et al., 2018. *eLife*)。ここでは、我々が近交系統として確立し維持しているヘイケボタルのIkeya-Y90系統が含まれている。世界において系統維持されているホタル近交系はおそらくこれが唯一であろう。そこで、このヘイケボタルを中心としたポストゲノム研究を推進することを本研究課題とした。

2. 研究の目的

ホタルの仲間(ホタル科 Lampyridae)は現在世界に2,200種が記録されているが、それがどのように進化し多様化したのかについてはほとんど分かっていない。我々は、ホタル全ゲノムの解読を機に、これを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ホタルの発光を司っているのは発光酵素ルシフェラーゼである。その起源と進化を知るために、祖先配列復元(Ancestral Sequence Reconstruction)を行って1億年前にホタルが地球上に現れた時のルシフェラーゼ配列を現代に蘇らせた。また、ヘイケボタルの複雑な発光パターンの生態学的意義を明らかにするために、点滅パターンのビデオレコーディングとその分析を行った。そこで明らかになった知見に基づいて、さまざまな発光パターンを生成するLED装置を作成し、オス成虫の誘引実験を行った。また、こうした発光形質や点滅パターンの遺伝的背景を探るために、RNAiやゲノムリシーケンスを行った。

4. 研究成果

最尤法に基づいたホタルルシフェラーゼの祖先配列復元によりホタル科の共通祖先が持っていたルシフェラーゼのアミノ酸配列およびその前後の進化過程におけるルシフェラーゼのアミノ酸配計7遺伝子を復元することに成功した。これらの遺伝子産物を大腸菌にてリコンビナントタンパク質を作成し、ホタルルシフェリンとATPを加えることで発光反応の生化学的特性を調べた。その結果、1億年前のホタルの最初の祖先は深い緑色に発光していたことが試験管内で再現された(図1)。さらにそれ以前は、発光強度が弱くオレンジ~赤色のより長波長の光で光っていることがわかった。また、1億年以降は深い緑色よりもより長波長の黄緑色から黄色のさまざまな発光色へと進化したことがわかった。ホタルルシフェラーゼの祖先遺伝子であったアシル CoA 合成酵素活性についてこれら祖先遺伝子を調べたところ、進化の過程で発光活性の強化に伴ってアシル CoA 合成酵素活性が減少する触媒活性のトレードオフが観測された。1億年前のホタルルシフェラーゼにルシフェリンアナログが結合した結晶を作成しX線結晶構造解析を行った結果、ルシフェリンが結合するポケット内の立体的環境に変異が生じたことで発光色に変化が起こったことが示唆された。すなわちルシフェリン分子のベンゾチアゾール環に接するフェニルアラニン側鎖(Oba et al., 2020. *Science Advances*)

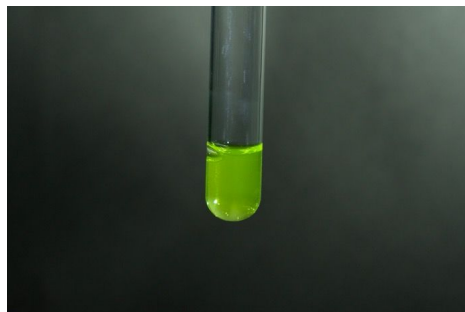


図1. 試験管内に再現された1億年前のホタルの光。

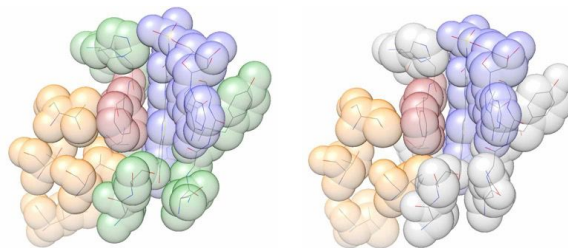


図2. 左は1億年前の祖先ルシフェラーゼの立体構造(ルシフェリン結合部位)青色が結合しているルシフェリン類縁体. 赤色のフェニルアラニン側鎖がその背後のイソロイシン側鎖に押されて接近している. 右は現生ホタル(ゲンジボタル)のルシフェラーゼ. フェニルアラニン側鎖の背後がバリン側鎖になっていてフェニルアラニンの押しが強い. この違いによって発光色に違いが生じていることがわかった.

ヘイケボタルのメス成虫は一回の点滅時間(flash duration)の中に細かい発光強度の振幅を含んでいる。我々はこれを「またたき flickering」と呼ぶが、これを録画し詳しく分析したところ、このようなまたたきを伴った点滅をするのは地上に着地したオスと交尾後のメスであることがわかった。一方、未交尾のメスの点滅は、一回の点滅時間が短く「またたき」が伴わない(図3)。そこで、点滅時間とまたたき強度をさまざまに変化させた発光パターンを生成するLED発光装置「電子ボタル」を作成し、オス成虫の誘引成功率を調べたところ、点滅時間が短く、かつ瞬き強度が弱い点滅パターンにのみオスが誘引されることがわかった。これは、オスの交尾対象である未交尾メスの点滅パターンに近く、すなわちオスは点滅時間とま

たたき強度の2パラメータを用いて相手を識別していることが明らかになった。一方、なぜオスと交尾後のメスがまたたきを伴った発光をするのかについては明らかにできなかったが、おそらく交尾後のメスは産卵までの間にオスのアプローチを受けて無駄なコストを消費させられることを避けるために静止オスに似たまたたきパターンで発光しているのだと考えることができる (Takatsu, Minami and Oba, 2023. *Scientific Reports*)。

こうした発光形質そのものや発光パターンを司る遺伝子背景を探るために、飼育系統のヘイケボタル *Ikeya-Y90* を用いて *pupalRNAi* を試みた。その結果、RNAi の効果が顕著に現れた個体は少なかったが、*doublesex* 遺伝子の RNAi において、形態的には正常個体とは区別できないものの発光パターンに変化が生じている個体を得ることができた。このことは、発光パターンを制御する遺伝子が *doublesex* 遺伝子の支配する下流に存在し、それが脳の神経支配に関与していることが示唆された。

Ikeya-Y90 系統の継代中に突然現れた全身が全て黒い黒化個体が見つかり、その系統が確立された。この黒化は完全にメンデル遺伝子することが分かったので、その原因遺伝子の特定を試みた。まず、前胸の両側に赤い斑紋をもつ野生型個体と黒化系統の全ゲノムリシーケンスを行い比較したが、黒化型責任遺伝子を特定するには候補遺伝子が多すぎたため、野生型と黒化型の F2 を得て、そのゲノムリシーケンスを行うこととした。まず、得られた F1 個体の形態を詳しく調べたところ、野生型と全く区別できないことがわかった (川野、大場ら, 2022)。次に F2 黒化個体の形態を詳しく調べたところ、前胸クチクラが完全に黒化していること、本来透明である発光器クチクラがやや黒化していること、さらに本来透明であるはずの複眼クチクラも完全に黒化して光を通さなくなっていることを見出した (図4) (大場ら, 2023)。すなわち、本来どちらも透明であるはずのクチクラ組織において黒化型の黒化度合いに組織ごとの違いがあるとわかる。この原因を明らかにすれば、発光器クチクラが透明に進化した原因とプロセスの解明につながるだろう。

我々が2018年にホタル全ゲノム配列の解読を発表してから、いくつかのホタル種において全ゲノム解読の論文が発表された。これらの報告を総合して、2022年にホタルゲノムとその進化に関する総説を発表した (Oba and Schultz, 2023. *Current Opinion in Insect Science*)。またこれらの成果を含む単著2冊を出版した (大場, 2021, 2022)。

引用文献

原著論文

- Fallon, T.R., Lower, S.E., Chang, C.-H., Bessho-Uehara, M., Martin, G.J., Bewick, A.J., Behringer, M., Debat, H.J., Wong, I., Day, J.C., Suvorov, A., Silva, C.J., Stanger-Hall, K.F., Hall, D.W., Schmitz, R.J., Nelson, D.R., Lewis, S., Shigenobu, S., Bybee, S.M., Larracuent, A.M., Oba, Y., Weng, J.-K. (2018) Firefly genomes illuminate parallel origins of bioluminescence in beetles. *eLife* 7, e36495.
- Oba, Y., Konishi, K., Yano, D., Shibata, H., Kato, D. & Shirai, T. (2020) Resurrecting the ancient glow of the fireflies. *Sci. Adv.* 6, eabc5705.
- Takatsu, H., Minami, M., Oba, Y. (2023) Flickering flash signals and mate recognition in the Asian firefly, *Aquatica lateralis*. *Sci. Rep.* 13, 2415.

和文論文

- 川野敬介、ジョゼ・パイティオ、池谷治義、大場裕一 (2022) 黒化型ヘイケボタルの形態、発光、および受光に関する研究。豊田ホタルの里ミュージアム研究報告書 14, 1-14.
- 大場裕一、池谷治義、川野敬介 (2023) ヘイケボタル黒化型系統×野生型 F1 成虫の形態、発光、および受光に関する研究。豊田ホタルの里ミュージアム研究報告書 15, 99-105.

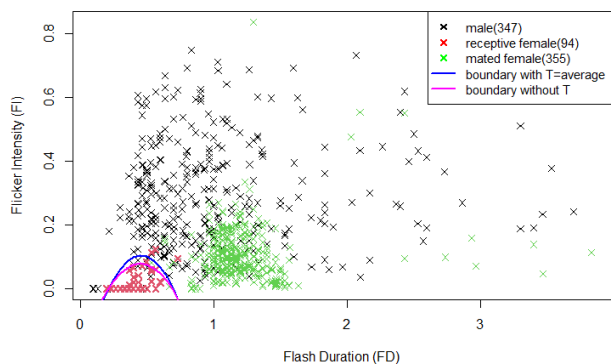


図3. 観測されたヘイケボタルのオス (黒x)、未交尾メス (赤x)、および交尾後メス (緑赤x) の発光パターン (発光時間FDとまたたき強度FI)。線は未交尾メスの境界領域を示す。

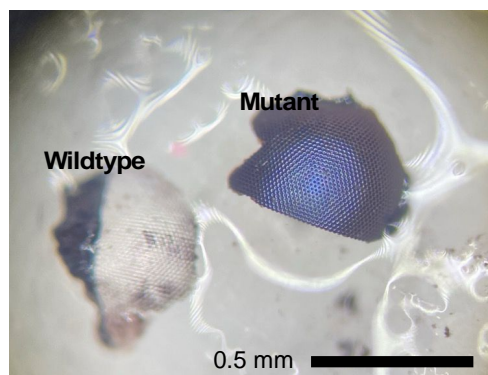


図4. F2黒化個体の複眼クチクラ (右) と野生型 (左)。野生型の左側の黒い部分は複眼間の頭部。

英文総説

Oba, Y. and Schultz, D.T. (2022) Firefly genomes illuminate the evolution of beetle bioluminescent system.
Cur. Opin. Insect Sci. 50, 100879.

和文総説

大場裕一 (2022) ホタルの光とその進化 . 昆虫と自然 2月号 Vol. 56, No.2. 10-13.

大場裕一 (2022) 総論 : ホタル研究のフロンティア . 特集・ホタル最近の話題 . 昆虫と自然 . Vol. 57, No. 7., pp. 2-4.

著書 (単著)

大場裕一 (2021) 『光る生き物の科学 発光生物学への招待』 日本評論社

大場裕一 (2022) 『世界の発光生物 分類・生態・発光メカニズム』 名古屋大学出版会

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 大場裕一、池谷治義、川野敬介	4. 巻 15
2. 論文標題 ヘイケボタル黒化型系統×野生型F1成虫の形態、発光、および受光に関する研究	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 豊田ボタルの里ミュージアム研究報告	6. 最初と最後の頁 99-105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 川野敬介、ジョゼ・バイティオ、池谷治義、大場裕一	4. 巻 14
2. 論文標題 黒化型ヘイケボタルの形態、発光、および受光に関する研究	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 豊田ボタルの里ミュージアム研究報告	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Oba Y., Konishi K., Yano D., Shibata H., Kato D., Shirai T.	4. 巻 6
2. 論文標題 Resurrecting the ancient glow of the fireflies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabc5705
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abc5705	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takatsu Hideo, Minami Mihoko, Oba Yuichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Flickering flash signals and mate recognition in the Asian firefly, <i>Aquatica lateralis</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-29552-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Oba Yuichi、Schultz Darrin T	4. 巻 50
2. 論文標題 Firefly genomes illuminate the evolution of beetle bioluminescent systems	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Opinion in Insect Science	6. 最初と最後の頁 100879 ~ 100879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cois.2022.100879	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3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yuichi Oba
2. 発表標題 Resurrecting the ancient glow
3. 学会等名 Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuichi Oba
2. 発表標題 Resurrecting the ancient glow
3. 学会等名 Firefly Symposium 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuichi Oba
2. 発表標題 Fireflies in Art and Science of Japan
3. 学会等名 International Symposium on Science and Technology for Global Environment and Future Generations (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 大場 裕一	4. 発行年 2022年
2. 出版社 名古屋大学出版会	5. 総ページ数 456
3. 書名 世界の発光生物	

1. 著者名 大場裕一	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本評論社	5. 総ページ数 218
3. 書名 光る生き物の科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	新美 輝幸 (Niimi Teruyuki) (00293712)	基礎生物学研究所・進化発生研究部門・教授 (63904)	
研究分担者	重信 秀治 (Shigenobu Shuji) (30399555)	基礎生物学研究所・超階層生物学センター・教授 (63904)	

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
---------	---------

米国	MIT			
----	-----	--	--	--