

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650142

研究課題名(和文)「光らない」ホタルーなぜ弱く光るのか？おしりに目はあるのか？

研究課題名(英文)"non-luminous" firefly: why glow dimly? eyes on the tail?

研究代表者

大場 裕一 (Oba, Yuichi)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：40332704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：成虫になるとほとんど光らなくなるオバボタルやノハラボタルに着目し、その発光が弱い理由を研究した。特に、尾端で光を受容している可能性を考えて実験を行ったが、ポジティブな成果は得られなかった。光受容器の発現量が極めて低いか、我々が考えていた以外のタイプの光受容遺伝子が関わっていたのかもしれない。一方、ヘイケボタルの網羅的遺伝子解析から、思いがけず発光器で光受容に関係していると考えられる遺伝子の特異的発現が示唆され、おしりでみずからの光をモニターしている可能性がでてきた。この結果をオバボタルやノハラボタルにフィードバックできるだろう。

研究成果の概要(英文)：We focused on the dim glow of the "non-luminous" fireflies, such as *Lucidina biplagiata* and *Pyropyga* sp. We expected that these species possess photoreceptor(s) on the lantern to detect their own dim glow, but molecular analyses did not strongly support the hypothesis. We think probably the expression level of the photoreceptor is very low, or another unknown photoreceptor gene is expressed.

Apart from the studies above mentioned, we performed transcriptomic analysis of nocturnal firefly, *Luciola lateralis*, and the results showed that possible photoreceptor gene is predominantly expressed in lantern. Same analysis can be applied to the "non-lumious" firefly species.

研究分野：発光生物学

キーワード：生物発光 ホタル 光受容

1. 研究開始当初の背景

成虫になると発光しないと考えられていたノハラボタル (*Pyropyga* sp., 正確な種は不明) の成虫において、微弱な発光が認められた。同じく成虫は発光しないオバボタル (*Lucidina biplagiata*) において、RT-PCR による予備的な実験から尾端にも光受容タンパク質遺伝子が発現している可能性が示唆された。これらのことから、弱く発光するホタルにおいて尾端でみずからの発光の光受容の可能性が示唆された。しかし、こうした報告はこれまではなく、また全く予想外であるため、萌芽的な研究を計画した。

なお、チョウにおいて尾端に視物質があることが以前に報告されていたが、その際には光受容体の遺伝子発現などは確認されていない。

一方、発光生物においては、発光器あるいはその近傍で視物質が分布していることがいくつかの生物種で知られるようになってきている。たとえば、クモヒトデ、発光サメ (クロハラカラスザメ)、イカのなかま、などである。これらの例は、発光生物が自らの発光強度を視物質によってモニタリングしている可能性を強く示唆する結果であり、発光生物の研究においては新しい展開が期待される分野である。それが、発光生物の代表とも言えるホタルの仲間で見つければそのインパクトは大きい。

昼行性のホタルがわずかに光る意義については、その光の強さの程度に応じてさまざまな考察がなされてきた。たとえば、ムネクリイロボタル (*Cyphonocerus ruficollis*) では、雌雄コミュニケーションにおいて光と匂い (フェロモン) を併用し、とくに近距離での交信に光を使っているだろうと言われてきた。一方、ほとんど発光が認められないオバボタルなどにおいては、雌雄コミュニケーションは匂いのみで行われていると考えられてきた。当初の申請者の予想では、これらのごく弱く発光する種における発光の意義は、(チョウがそうであるように) 交尾に至る際の最終確認、もしくは交尾の成立を補助する確認の意味があると考えた。

2. 研究の目的

ホタルの尾端で発現する光受容遺伝子の特定と、その意義の解明を目的とした。これにより、弱く光るホタルの発光の意義について明らかにすることを期待した。きっかけは、昼行性のホタルにおいて RT-PCR で予備的な実験を行ったところ光受容体の発現が尾端でわずかに検出されたことにあるが、その後、研究の対象を昼行性ホタルからホタル全般に拡張して研究を進めることとした。

昼行性ホタルが弱く光る意義については、野外調査で行動を観察しようと考えていたが、後述するようにその生息地が水没したこ

とによりデータが得られていない。

3. 研究の方法

すでに明らかになっている2つのオプシン遺伝子の部位特異的発現を解析する。さらにその遺伝子の発現パターン (日周変動、光に対する影響、雌雄差) を調べる。材料にはオバボタルとノハラボタルの野外個体、ならびに比較のために飼育可能なヘイケボタルを用いる。

昼行性ホタルの調査は、埼玉県三郷市の江戸川河川敷で観察を行う予定であったが、後述のように大雨による生息地水没により十分なデータが得られていない。

4. 研究成果

(1) すでにホタルで存在が知られている長波長オプシンと紫外線オプシンの2つを候補としてオバボタル *Lucidina biplagiata* およびノハラボタル *Pyropyga* sp. を用いて探索を繰り返したが、尾端でそれらが発現している明確な証拠は得られなかった。このことは、発現量が極めて低いか、想定していなかった光受容遺伝子が関わっている可能性を示唆する。

(2) ノハラボタルは、2014年6月の生息地 (埼玉県三郷市江戸川河川敷) が大雨の影響で一週間以上も水没し、ほとんど材料を得ることができなくなったことは予想外であった。当初予測されていた微弱発光の日周変動については、そのため十分な結果が得られなかった。

大雨による生息地水没の影響は大きく (写真)、水没は一度だけであったがその後この場所ではノハラボタルは認められていない。おそらくちょうど幼虫が蛹になる重要な時期に浸水したため集団が打撃を受けたのであろう。



(3) 一方、ヘイケボタルは飼育系を確立していたため、実験室内で安定した供給ができるようになったので、これを用いて網羅的な遺伝子解析を行ったところ、我々が当初考えていた遺伝子 (長波長オプシンと紫外線オプ

新)とは異なるタイプの光受容遺伝子が発光器特異的に発現している可能性が示唆されるデータが得られた。この遺伝子の機能についてはショウジョウバエなどのモデル昆虫でも明らかになっていないため、本当に光受容に関わっているのかは未だ不明であるが、当初の目的を明らかにするための極めて重要なターゲット遺伝子が見つかったと言える。

(4) ノハラボタルの採集地がほぼ全滅となったため、その他の場所でも調査を行った。ノハラボタルの情報が必要であったため、産業総合研究所つくばとの共同によりノハラボタル専用のウェブサイト PyropygaHome (<https://staff.aist.go.jp/t-fukatsu/PyropygaHome.html>: ノハラボタル研究会: トップページの写真)を開設し、全国からノハラボタルの生息情報を収集した。そのおかげで、いくつかの新生息地を確認し国際学会で発表した (Oba et al., 2014)。ただし、いずれの生息地も個体数が少なく、実験に使うだけの十分な数は得られなかった。しかし、今後も周辺をモニターすれば、個体数の多い生息地を見つげられるかもしれない。



(5) 光らないホタルの調査も行った。ノハラボタルと同じマドボタル亜科の多くは琉球地方に分布するものが多いことから、琉球列島におけるマドボタル属の調査を行い、その地理的分布と地史についての成果が得られたので、これを論文として発表した (Osozawa et al. 2015)。

ノハラボタルの行動については水没以前の観察記録が多少とれたのみであった。これまでに分かったことを以下に列挙する。なお、捕獲の際には捕虫網によるスウィーピングにより行った。

- 成虫は主に葦の葉に止まって、その周囲を頻りに飛翔している。葦のない場所で見つかったことは殆どない。
- 葦でも、水辺にごく近いところに生えている場所ではノハラボタルは見られない。
- 交尾している個体は野外では観察できていない。捕獲して同じ容器に入れておくとたちまち交尾に至るので、匂いもしくは視覚による認識が雌雄コミュニケーションにおいて重要である可能性が

示唆される。複眼は(ゲンジボタルなどに比べると)あまり大きくないが、近くと素早く飛翔して逃げるので視覚は悪くないようである。

- 調査不足のため統計的に確かであるとは言いきれないが、午前中の方が活発に活動しているように思われる。発光との関わりでは早朝や日没前後なども詳しく調査する必要があるが、日没前後に関してはほとんど捕獲することができない。その間どこに移動しているのかは不明である。
- 人工飼育実験により、雌雄とも砂糖水を好んで吸蜜することがわかった。本種の由来と考えられる北米でも複数の種のホタルにおいて吸蜜が報告されている。一方、日本のホタルではあまりその例が知られていない。

(6) ホタルといえば多くの人がゲンジボタルやヘイケボタルのような夜に点滅しながら光る種類を想像するが、ここで取り扱ったように、実はかなりの種類が昼行性で成虫になっても光らないかほとんど発光しない。こうしたことは一般に知られておらず、生物多様性の観点から注目されることの多いホタルのごく一面しか世の中では知られていないことを意味している。研究代表者は、こうしたホタルの本当の姿を求めて研究をしてきたが、一般に向けてこうした点にも興味を向けたいと思っている。そのため、小学生・中学生に向けて発光生物の一般書を書き、また一般おとな向けにも一般書を書いた。業績には入っていないが、発光生物の図鑑(『光る生き物(DVD付き)』(学研, 2015)の総監修も行い、ホタルやその他の発光生物に関する教育・啓蒙にも貢献した。また、一般向けならびに中高生向けに何度も講演会などを開いた。

なお、著書『ホタルの光は、なぜだらけ』は、第60回青少年読書感想文全国コンクールの課題図書(中学生の部)に選ばれ、科学の面白さや発光生物を研究することの意義などについて広く普及することができた。全国の中学生がこの本を読み、多くの感想文をかいてくれたことで、その効果の手応えを感じている。なお、読書感想文コンクールの最高賞である内閣総理大臣賞は松山市の中学生がこの本を読んで受賞した。

また、著書『光るいきもの 海のいきもの』は、第48回夏休みの本に選定されている。本書では、さらに低学年に向けて写真を多用して発光生物の生物学的面白さに言及した。発光生物の生き生きとした発光する姿を撮影できるようになったのは、カメラの感度が近年ひじょうに良くなったことが関係している。この本では、プロのカメラマンとの共同によりそれが実現できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計6件)

1. Osozawa, S., Oba, Y., Kwon, H-Y., Wakabayashi, J. (2015) Vicariance of *Pyrocoelia* fireflies (Coleoptera: Lampyridae) in the Ryukyu islands, Japan. *Biological Journal of the Linnean Society* 116, 412-422. (査読あり)
2. Oba, Y., Ôhira, H., Murase, Y., Moriyama, A., Kumazawa, Y. (2015) DNA barcoding of Japanese click beetles (Coleoptera, Elateridae). *PLoS ONE* 10: e0116612. (査読あり)
3. Oba, Y., Furuhashi, M., Bessho, M., Sagawa, S., Ikeya, H., Inouye, S. (2013) Bioluminescence of a firefly pupa: involvement of a luciferase isotype in the dim glow of pupae and eggs in the Japanese firefly, *Luciola lateralis*. *Photochem. Photobiol. Sci.* 12, 854-863. (査読あり)
4. Osozawa, S., Su, Z-H., Oba, Y., Yagi, T., Watanabe, Y., Wakabayashi, J. (2013) Vicariant speciation due to 1.55 Ma isolation of the Ryukyu islands, Japan, based on geological and GenBank data. *Entomol. Sci.* 16, 267-277. (査読あり)
5. Oba, Y., Yoshida, N., Kanie, S., Ojika, M., Inouye, S. (2013) Biosynthesis of firefly luciferin in adult lantern: Decarboxylation of L-cysteine is a key step for benzothiazole ring formation in firefly luciferin synthesis. *PLoS ONE* 8: e84023

(査読あり)

6. Ito, Y., Harigai, A., Nakata, M., Hosoya, T., Araya, K., Oba, Y., Ito, A., Ohde, T., Yaginuma, T., Niimi, T. (2013) The role of doublesex in the evolution of exaggerated horns in the Japanese rhinoceros beetle. *EMBO Rep.* 14, 561-567. (査読あり)

〔学会発表〕(計9件)

1. Oba, Y., Furuhashi, M., Bessho, M., Sagawa, S., Ikeya, H., Inouye, S. (2014) Luciferase isotype involving in the dim glow of pupae and eggs in the Japanese firefly, *Luciola lateralis*. 18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. 2014. 6. 23-28 (oral, 2014. 6. 27). (Uppsala, Sweden)
2. Kanie, S., Oba, Y., Yoshida, N., Ojika, M., Inouye, S. (2014) Biosynthetic components and decarboxylation from L-cysteine in firefly luciferin biosynthesis. 18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. 2014. 6. 23-28 (oral, 2014. 6. 24). (Marlene DeLuca Award) (Uppsala, Sweden)
3. Tanaka, Y., Kasuga, D., Oba, Y., Hase, S., Sato, K., Oba, Y., Sakakibara, Y. (2014) Genome sequence of the luminous mushroom *Mycena chlorophos* for searching fungal bioluminescence genes. Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. 2014. 6. 23-28 (oral, 2014. 6. 24). (Uppsala, Sweden)
4. Bessho, M., Oba, Y. (2014) Purification of a novel luciferase from luminous fish, *Parapriacanthus ransonneti*. Symposium

- on Bioluminescence and Chemiluminescence. 2014. 6. 23-28 (Poster). (Uppsala, Sweden)
5. Schultz, D.T., Oba, Y. (2014) DNA barcoding of Japan's bioluminescent organisms. Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. 2014. 6. 23-28 (Poster). (Uppsala, Sweden)
 6. Oba, Y., Bessho, M., Kanie, S. (2014) Evolution of firefly luciferase and biosynthetic origin of firefly luciferin. 2014 International Firefly Symposium. (2014. 8. 11-15) (oral, 2014. 8. 13) (Gainesville, Florida, USA)
 7. Oba, Y., Branham, M.A., Kawano, K., Fukatsu, T. (2014) *Pyropyga* sp.: first invasive alien firefly in Japan. 2014 International Firefly Symposium. (2014. 8. 11-15) (poster) (Gainesville, Florida, USA)
 8. 大場裕一 (2014) ホタルの発光メカニズムの進化: ルシフェリンはどこから来て、どのようにしてルシフェラーゼの基質になったのか? 農芸化学会 2013 年度大会シンポジウム 生命現象の鍵として働く化合物とその標的タンパク質の化学と生物(明治大学生田キャンパス/ 神奈川) 2014. 3. 30.
 9. 大場裕一 (2015) 発光する動物. 日本動物学会. 第 86 回新潟大会 (新潟 / 朱鷺メッセ) 2015. 9. 18.
- 〔図書〕(計 8 件)
1. 大場裕一 (2013) 『ホタルの光は、なぜだらけ』 くもん出版. 119 p. (単著)
 2. 西野嘉憲 (写真) ・大場裕一 (解説) (2013) 『光るキノコと夜の森』 岩波書店 . 82 p. (単著)
 3. 大場裕一 (2015) 『光るいきもの 陸のいきもの』 くもん出版 . 32 p. (単著)
 4. 大場裕一 (2015) 『光るいきもの 海のいきもの』 くもん出版 . 32 p. (単著)
 5. 大場裕一 (2015) 『光るいきもの キノコ』 くもん出版 . 32 p. (単著)
 6. 大場裕一 (2015) 『光る生きものはなぜ光る?』 文一総合出版 . 112 p. (単著)
 7. 大場裕一 (総監修) (2015) 『光る生き物 (DVD 付き)』 学研 . 128 p.
 8. 大場裕一 ・大澤省三 ・昆虫 DNA 研究会 【編】 『遺伝子から解き明かす昆虫の不思議な世界』 悠書館 . 652 p. (編集、分担執筆)
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
- 名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :
- 取得状況 (計 0 件)
- 名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :
- 〔その他〕
ホームページ等
- 6 . 研究組織

(1)研究代表者

大場裕一 (OBA, Yuichi) 名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号： 40332704

(2)研究分担者

青木摂之 (AOKI, Setsuyuki) 名古屋大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号： 30283469