

特集2

1億年前のホタルの光を再現 遺伝子の進化を計算科学で検証



おおば ゆういち
大場 裕一
中部大学 応用生物学部 教授
2017年よりCREST主たる共同研究者

人は古くから光る生物に魅了されてきた。近年では発光メカニズムを解明し、生命科学のさまざまな研究にも活用が進んでいる。しかし、生物がどのようにして発光能力を身につけたのかは不明なままだ。この進化の過程を解明しようと挑んでいるのは、中部大学応用生物学部環境生物科学科の大場裕一教授だ。発光生物の代表格であるホタルの発光に関わる酵素に着目し、遺伝子工学と計算科学を駆使して1億年前のホタルが発していた光を現代に再現した。

明滅でコミュニケーション 研究ツールとしての利用も

幻想的な光を放つホタルは、初夏の風物詩として古くから親しまれてきた(図1)。熱帯から温帯にかけて雨の多い地域に広く分布しており、日本には約50種、世界では約2000種のホタルが生息している。発光色や明滅パターンはさまざま。卵の時から光り、成虫になっても光るものは半分程度だ。一般にホタルの発光は個体間コミュニケーションをとるためとさ

れ、成虫であれば求愛行動、幼虫であれば毒があることを敵に警告していると考えられている。

成虫の場合にはホタルの腹部にある発光器で、ルシフェリンと呼ばれる発光物質と酵素のルシフェラーゼが化学反応して光る(図2)。何色に光るホタルでもルシフェリンは世界共通で持っており、ルシフェラーゼが発光色を決めていることがこれまでの研究で明らかになっている。また発光のエネルギー効率がとても良く、熱エネルギーがほとんど出ないため「冷光」と

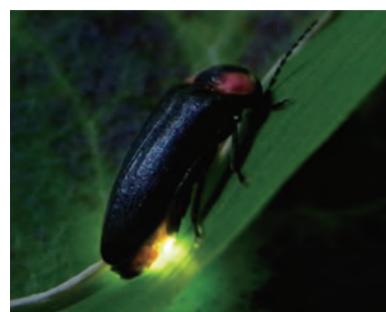


図1 南西諸島を除く日本、朝鮮半島、中国東北部、東シベリア、サハリン、千島列島と広く分布するヘイケボタル。オスは飛びながらメスを探している時に黄緑色に発光して雌雄間でコミュニケーションを取る。発光パターンには2種類あることが確認されており、北海道では発光間隔が約1秒だが、本州以南では約0.5秒と異なっている。

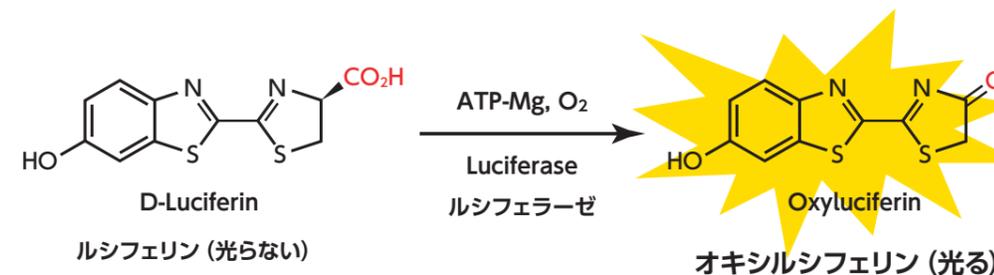


図2 ホタルの発光反応は、ルシフェラーゼという酵素がルシフェリンを酸化する過程で生じるエネルギーの一部が光として放出される現象だ。

もいう。近年では発光のメカニズムを利用した解析ツールが開発され、生命科学の研究にも広く利用されている。発光物質の光の強さや色を自在にコントロールできれば、より使い勝手のいい研究ツールの開発にもつながる。

現在のホタルが当たり前持っているルシフェラーゼだが、いつのようにして光る機能を獲得したのかは解明されていない。中部大学応用生物学部環境生物科学科の大場裕一教授は子どもの頃から昆虫好きで、大学生の時に発光生物の研究を始め以来、ミミズ、キノコ、魚と光る生き物全てを研究対象としてきた。生物発光は両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類などでは見られないが、魚類や菌類では普通に見られる現象だという。「発光機能の獲得は、それぞれの種が進化する中で独立に起こったと考えられています。生物全体で考えれば何度も起こっているのです。昆虫のホタルでその進化の過程を解明することは、学術的に非常に興味深いテーマです」と研究の動機を語る。

モデル生物によく似た配列 異なる役割担う酵素が進化

ルシフェラーゼの起源を求めて、大場さんは光らない昆虫の遺伝子からルシフェラーゼの塩基配列によく似た遺伝子を探し始めた。そのひとつが、2000年代初めにDNAの全塩基配列を解読されていたモデル生物のショウジョウバエだ。DNAを調べたところ、ホタルのルシフェラーゼの遺伝情報とよく似た塩基配列が見つ

かった。発見当時は機能が不明だったが、脂肪酸の代謝に関わる脂肪酸アシルCoA合成酵素(ACS)をつくる遺伝子で、光る機能とは全く異なる役割を担っているとわかった。

大場さんは当時をこう振り返る。「この酵素のままでは当然光りませんが、かなり近い配列を持っていました。ACSが進化してルシフェラーゼの起源になった可能性は高いと思いました。ACSのアミノ酸を改変して、ルシフェリンが光るようになるか試してみました」。ACSは約550個のアミノ酸が連なってできたたんぱく質だ。1つずつ別のアミノ酸に変えていくとすると、膨大な実験を行わなければならない。アミノ酸の一部が変わってルシフェリンが光るようになったのなら、変化するのはルシフェリンと結合する部位だと考えた。

ルシフェリンとルシフェラーゼが結合したときの立体構造から、ACSの変換候補のアミノ酸を7つに絞った。さらに7つのうち4つはルシフェラーゼと同じアミノ酸だったため、残った3つが最終候補となった。実際にACSのアミノ酸を1つずつ変えていったところ、大場さんの予想通り光ったのだ。現在のホタルに比べれば極めて弱い光だったが、大場さんはルシフェラーゼの起原がACSであることを証明した。

独学で先祖推定も確認持てず 「餅は餅屋」専門家に協力依頼

生物が持つ遺伝子はアデニン、グアニン、チミン、シトシンの4つの塩基

によって記されている。生物の遺伝子はランダムに変異が起こり、塩基配列は時間とともに変化していく。そのため2種類の生物の塩基配列を比較すると、その差異から両者がいつ分岐して、それぞれの種へと進化していったのかを知ることができる。

大場さんも現存する複数種のホタルの遺伝子配列を利用して、ACSからルシフェラーゼを生産するに至る遺伝子進化の過程を解明しようと試みた。「情報生物学を独学で学び、自分なりに先祖を推定してみたものの、得られた結果が正しいのか確認が持てませんでした。餅は餅屋のことわざの通り、先祖推定の専門家との共同研究が必要だと痛感しました」と当時を振り返る。面識はなかったが、論文を頼りに長浜バイオ大学フロンティアバイオサイエンス学科の白井剛教授に思い切って協力依頼のメールを送った。

名古屋大学で情報生物学を学んだ白井さんは、たんぱく質の構造解析に取り組む一方で、アナゴの粘膜に含まれるガレクチンというたんぱく質の先祖遺伝子推定などにも取り組んでいた。「先祖遺伝子の推定は科学的には重要な研究ですが、一般の方々には意義が伝わりにくいと感じていました。大場さんの研究はホタルがなぜ光るようになったのかという明確でわかりやすいものでしたから、広く訴える力があると感じました」と話を聞いた時の印象を語る。白井さんはすぐに大場さんからの依頼を受けることに決め、10年ほど前から共同研究が始まった。

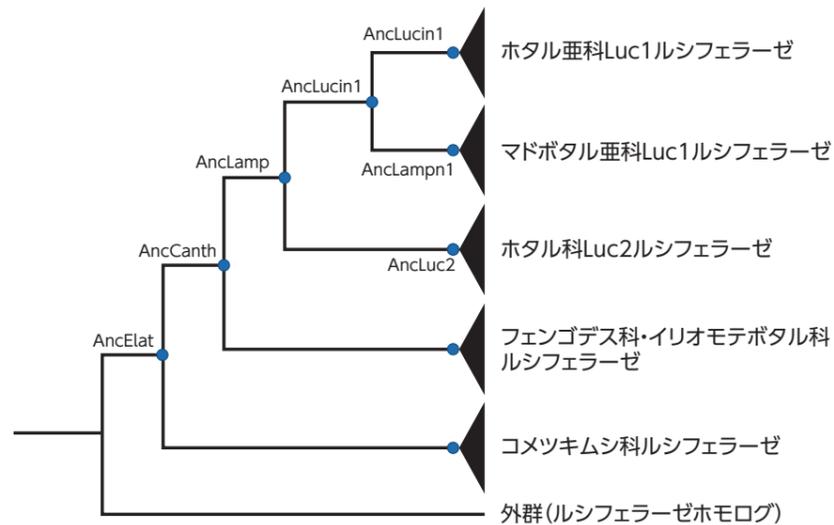


図3 大場さんたちが作成したホタルとその仲間についての系統樹の略図。白井さんは青色で示した7カ所の分岐点で、ルシフェラーゼの先祖遺伝子を推定した。

「もっともらしさ」積み重ね 分子系統樹から先祖を推定

白井さんが大場さんに提案した先祖推定の手法の1つが「最尤法」だ。遺伝子配列からいつ種が分岐したかを表す分子系統樹を基に、過去の生物が持っていた遺伝子を推定していく。最尤法そのものは「最ももらしいこと」を統計学の計算から導く手法だ。例えば、結果とその前段階を見比べた時、なるべくしてなった結果であれば尤度が高いといい、意外な結果だという場合には尤度が低いということになる。

先祖推定の最尤法ではこの尤度が高い条件を積み重ねて、何世代も前の配列を推定していく。「現在に至るまでに多くの種が生まれては淘汰されているので、現存している種の情報のみから、過去の配列を100%正確に推定するのは不可能です。しかし分子系統樹が詳しくなればなるほど、より正確な推定もできるようになります」と白井さんは先祖推定の難しさを説明する。

そこで、ホタルの発光を研究している鹿児島大学工学部理学系の加藤太一郎助教の協力も得て、できるだけ詳しい分子系統樹の作成に取り掛かった。約30種類のホタルに加え、一

般的にホタルと呼ばれるホタル科の近縁に当たるオオメボタル科、コメツキムシ科、ホタルモドキ科なども集めて解析し、系統樹に反映した。幸運なことに日本にはほぼすべての亜科のホタルが分布していたため、地域的にはほぼ日本に限定されているが、種のバリエーションは均等かつ十分になったという。

さらに、大場さんは基礎生物学研究所や米国マサチューセッツ工科大学と行った共同研究で、日本産のヘイケボタルとアメリカ産のフォティヌス・ピラリスというホタルの全ゲノムを解読した。生息域がかなり離れており、約1億500万年前に分岐したとされる両種がLuc1、Luc2という2種類のルシフェラーゼの遺伝子を共通して持っていることを明らかにした。Luc1は幼虫と成虫の発光器で使われ、Luc2は卵とさなぎの体全体に発現しており、それぞれ使い分けられていることもわかった。

ホタル科でも比較的遠縁の2種に共通する性質ならば、多くの種が同様に2種類のルシフェ



参考画像:ミャンマーから発見された約1億年前のホタルの琥珀化石。尾端に発光器があるのがわかるが、当然ながらその発光の色は化石には残っていない。(画像提供:モスクワ昆虫センター・カザンチェフ博士)

ラーゼを持っている可能性が高い。大場さんたちはLuc1、Luc2の遺伝情報も加味し、詳細な分子系統樹を作成した(図3)。白井さんは系統樹を基にホタルが出現する前の1億2000万年前までさかのぼって、7カ所の分岐点におけるルシフェラーゼの先祖遺伝子を推定することに成功した。

長年の夢がかなった緑色の光 古代の1シーンがよみがえる

白井さんが推定した1億年前の塩基配列を基に、大場さんは化学合成

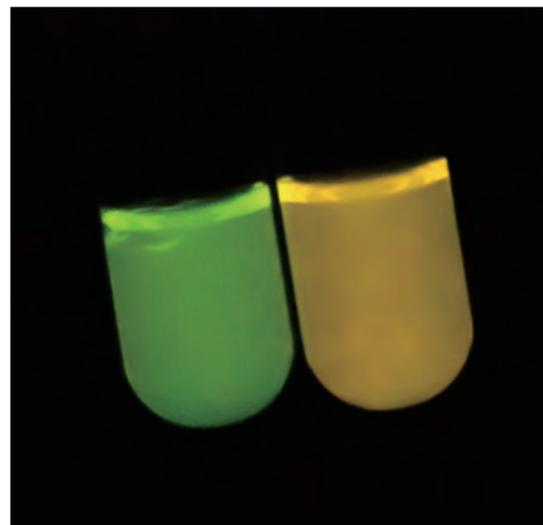


図4 試験管内で再現したホタルの光。現在のゲンジボタルの発光色(右)と先祖種のホタルの発光色(左)を比べると、先祖種のホタルの光は緑色が濃いことがわかる。

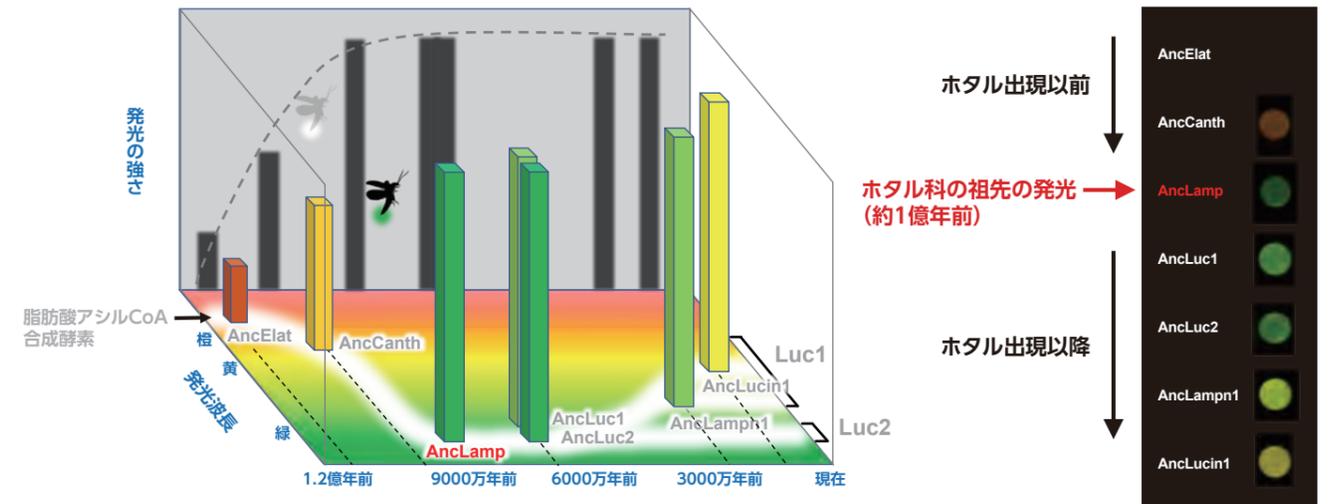


図5 地球上にホタルが現れる1億年より前に、その先祖は赤色に弱く発光するようになっていたが、約1億年前に最初のホタルが現れたときには強く緑色に発光するよう進化が起こり、さらにさまざまな発光色を持つホタルに分かれて進化していったと考えられる。

でDNAを再現した。大腸菌に合成したDNAを組み込んで先祖種のルシフェラーゼを作り出し、ルシフェリンと反応させたところ、深い緑色に光った(図4)。「この光は恐竜が闊歩していた白亜紀にホタルの先祖が放っていた光だと思うと、長年の夢がかなって本当にうれしかったです」と大場さんは当時の感動を語る。

光るかどうか最後まで心配だったという大場さんだが、緑色に光るのは想定内だったと打ち明ける。「緑色は夜行性動物にとって、一番見えやすい色なのです。あえて目立つように光り、自分はまずい、毒があるとアピールしていたのだと思います」と理由を説明する。その後も各系統の分岐点で推定した塩基配列から、ホタル出現以前は赤色や黄色の微弱な光を放っていたこと、ホタル出現以降は緑色から、黄緑色、黄色、橙色と発光色が進化してきたことを次々に明らかにしていった(図5)。

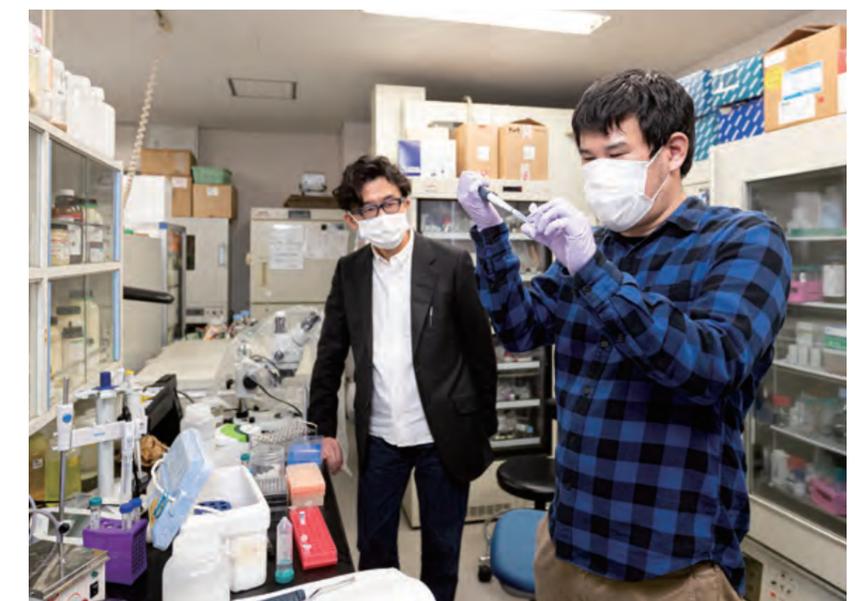
今回の推定には用いられなかったホタルの遺伝情報の解読が現在も続いている。「分子系統樹が詳細になるほど、推定の精度は高くなりますから、解読できた遺伝情報は順次加えています。今回明らかにした7カ所の分岐点にとどまらず、多くの先祖遺伝子を推定して、ルシフェラーゼの進化

をより詳しく調べたいですね」と大場さんは今後の展望を語る。詳細な進化の過程が明らかになれば、実際には起こらなかった進化をシミュレーションできるようにもなるだろう。さらには、これまでもアミノ酸をランダムに変えることでさまざまな色を発する発光試薬が開発されてきたが、進化を模倣した合理的な試薬デザインへの応用も期待できる。

白井さんも大場さんとの共同研究に大きな手応えを感じたという。「多くの人に先祖推定の意義や有効性が

伝わりました。最尤法は科学的に歴史をさかのぼり、再現や検証ができる強力なツールです。他の生物の進化の過程も解明していきたいです」と力強く語った。

これまでは化石でしか見ることでできなかった古代の生物。今回の成果はほんの一部ではあるものの、カラーで古代の1シーンをよみがえらせることに成功したといえるだろう。遺伝子工学と計算科学の融合による進化の検証はまだ始まったばかりだ。次なる検証結果に期待が高まる。



研究室でホタルの光を再現する様子