

# ホタル科におけるルシフェラーゼの 遺伝子重複に関する研究

Study on the duplicated luciferase genes in the family Lampyridae.

名古屋大学大学院生命農学研究科  
応用分子生命科学専攻  
バイオモデリング講座  
分子機能モデリング研究分野

別所学

2017年3月

|   |        |
|---|--------|
| 要旨  | - 4 -  |
| ABSTRACT  | - 6 -  |
| 第 1 章 諸言  | - 8 -  |
| 第 2 章 動かないステージにおける緑色の発光を担うルシフェラーゼ                       | - 11 - |
| 2-1. 背景   | - 11 - |
| 2-2. 結果と考察  | - 14 - |
| 2-2-1. ヒメボタルの生物発光                                       | - 14 - |
| 2-2-2. 蛹の形態と生物発光  | - 16 - |
| 2-2-3. ヒメボタルにおける <i>LpLuc2</i> の単離                      | - 17 - |
| 2-2-4. 異種発現した <i>LpLuc1</i> および <i>LpLuc2</i> の精製       | - 22 - |
| 2-2-5. ルシフェラーゼの生化学的性質                                   | - 23 - |
| 2-2-6. <i>LpLuc1</i> および <i>LpLuc2</i> の発光スペクトル         | - 25 - |
| 2-2-7. ライフサイクル中の <i>LpLuc1</i> および <i>LpLuc2</i> の遺伝子発現 | - 28 - |
| 2-3. 材料および実験方法  | - 31 - |
| 2-3-2. <i>LpLuc2</i> の分子クローニング                          | - 31 - |
| 2-3-3. 大腸菌におけるルシフェラーゼの異種発現                              | - 33 - |
| 2-3-4. 速度論的解析   | - 34 - |
| 2-3-5. 発光スペクトルの測定                                       | - 34 - |
| 2-3-6. ルシフェラーゼの半定量的 RT-PCR                              | - 35 - |
| 2-3-7. アラインメントと分子系統解析                                   | - 36 - |
| 第 3 章 ホタル科における 2 つのルシフェラーゼの普遍性                          | - 39 - |
| 3-1. 背景   | - 39 - |
| 3-2. 結果と考察  | - 42 - |
| 3-2-1. ヤエヤママドボタルの生物発光                                   | - 42 - |
| 3-2-2. 二つのルシフェラーゼと発光スペクトル                               | - 45 - |
| 3-2-3. ルシフェラーゼ遺伝子の時空間的発現変動                              | - 49 - |
| 3-2-4. <i>PatLuc1</i> と <i>PatLuc2</i> の系統的位置付け         | - 53 - |
| 3-3. 材料および実験方法  | - 55 - |
| 3-3-1. 材料の採取地と飼育方法                                      | - 55 - |

|                                       |                   |
|---------------------------------------|-------------------|
| 3-3-2. 生物発光の撮影方法                      | - 56 -            |
| 3-3-3. 遺伝子のクローニング                     | - 56 -            |
| 3-3-4. プラスミド構築およびタンパク質の発現および精製        | - 60 -            |
| 3-3-5. 天然のルシフェラーゼの抽出                  | - 61 -            |
| 3-3-6. 生物発光スペクトルの測定                   | - 62 -            |
| 3-3-7. 組換えタンパク質の発光スペクトルの測定            | - 63 -            |
| 3-3-8. 半定量的 RT-PCR 分析                 | - 63 -            |
| 3-3-9. アラインメントと分子系統解析                 | - 64 -            |
| <br>第 4 章 総合考察                        | <br><b>- 65 -</b> |
| 4-1. ルシフェラーゼの遺伝子重複による進化               | - 65 -            |
| 4-2. 今後の Luc2 の探索法・研究法について            | - 67 -            |
| 4-3. ヤエヤママドボタル雌成虫での Luc2 の発現とネオテニーの進化 | - 68 -            |
| <br>参考文献                              | <br><b>- 70 -</b> |
| <br>謝辞                                | <br><b>- 74 -</b> |

## 要旨

ホタルは発光酵素ルシフェラーゼを 1 つだけ持つと考えられていたが、最近の研究からゲンジボタルやヘイケボタルは 2 つのルシフェラーゼを持つことが明らかとなった。これらのルシフェラーゼ Luc1 と Luc2 は、分子系統解析からホタル科の共通祖先で遺伝子重複を起こしたことが示唆されている。しかし、新しく見つかったルシフェラーゼのグループである Luc2 の普遍性や性質、その生理・生態学的な役割についてはほとんど分かっていない。

本論文では、第 2 章では、Luc2 の発光色に焦点を当て、Luc2 の性質や遺伝子の発現パターンを調べ、生態学的な役割と関連付けて考察した。Luc1 の発光色は緑から黄色まで様々である。ゲンジボタルやヘイケボタルの成虫は発光を求愛シグナルとして使うが、これには発光色が重要であり、これらのホタルでは一般に、視覚の感受性が同種の発光色に適応していることが知られている。すなわち、Luc1 の発光スペクトルと視覚受容スペクトルが一致している。今回、ホタルの仲間のうちもっとも黄色く光るグループであるヒメボタルを用いて、Luc1 と Luc2 の発光色が大きく異なることを見出した。このことから、ホタルは自身の Luc2 による発光を見ていないことが示唆された。さらに、遺伝子発現パターンを調べることで、Luc2 は動けないステージである卵や前蛹、蛹の時期に発現していることが明らかとなった。これらのことは、Luc2 は動けないステージにおける防御として、他の生物に対する警告シグナルとしての役割を持つことを示唆している。

また、第 3 章では、これまでに Luc2 が見つかったホタル亜科とは遠縁な

マドボタル亜科のホタルでも *Luc2* が存在すること、さらに、*Luc1* と *Luc2* の遺伝子発現パターンがホタル亜科と大まかに一貫していることを見出した。現在、ホタル科は6つの亜科から構成されている。分子系統解析から、ホタル亜科+ミナミボタル亜科+クシヒゲボタル亜科とマドボタル亜科+*Photurinae* 亜科+*Amydetinae* 亜科の2つの大きなグループがホタルの進化の初期に分岐したことが示唆されている。本論文では、*Luc2* が調べられたホタル亜科とは系統的に離れているマドボタル亜科のヤエヤママドボタルにも *Luc2* が存在することを見出した。さらに、ヤエヤママドボタルの *Luc1* と *Luc2* の遺伝子発現パターンがホタル亜科のそれらと同様に、*Luc1* は幼虫～成虫の発光器で、*Luc2* は動かないステージの全身で発現していることを発見した。

第4章では、本研究成果と過去の知見を俯瞰し、総合考察を行った。分子系統解析と遺伝子発現パターンの共通性から、*Luc1* と *Luc2* はホタル科の共通祖先で遺伝子重複を起こした後、*subfunctionalization* により、異なる遺伝子発現パターンを獲得したという仮説が浮かび上がった。つまり、*Luc1* の幼虫～成虫における発光器での発現と、*Luc2* の動かないステージにおける全身での発現がそれぞれ獲得されたというものである。これを支持する傍証はいくつかあるが、まだ調べられていない亜科からの *Luc2* の発見とその発現パターンの比較を行うことで、今後この仮説を検証していく必要がある。

# Abstract

Firefly was thought to have only one enzyme, luciferase, involved in the luminescent reaction, but a recent research has revealed that *Luciola cruciata* and *Luciola lateralis* have two luciferases. Molecular phylogenetic analyses suggested that these luciferases, Luc1 and Luc2, have been undergone gene duplication in the common ancestor of firefly (family Lampyridae). However, little is known about the generality, enzymatic properties, gene expression patterns and ecological roles of Luc2, a group of newly found luciferases.

This thesis is composed of four chapters. In the first chapter, I will give brief introductions of bioluminescence in firefly and backgrounds on genetically duplicated luciferases.

In Chapter 2, focusing on the luminescent color of Luc2, I investigated the enzymatic character of Luc2 and the gene expression patterns. The luminescence color of Luc1 varies from green to yellow. As adults of *L. cruciata* and *L. lateralis* use luminescence as a mating signal, the luminescent color is tuned for their visual sensitivity. That is, the luminescence spectrum of Luc1 and the visual acceptance spectrum are nearly identical. Here, I found that the luminescent colors of Luc1 and Luc2 of *Luciola parvula*, which emits the one of the most red-shifted colors among firefly species, were quite different, suggesting that Luc2 does not play an intraspecific role. Furthermore, *Luc2* was expressed at the immobile stages, such as eggs, prepupae and pupae. These facts may indicate that Luc2 plays an interspecific role such as a warning signal to potential

predators in the immovable stages.

In Chapter 3, I found that the *Luc2* was present in the subfamily Lampyridae distantly related to Luciolinae. Furthermore, the gene expression patterns of *Luc1* and *Luc2* were roughly consistent with those of Luciolinae. Recent molecular phylogenetic analyses suggested that the family Lampyridae was split into two large groups, subfamilies of Luciolinae + Otoretinae + Psilocladinae and subfamilies of Lampyrinae + Photurinae + Amydetinae. Here, I found that *Pyrocoelia atripennis* (subfamily Lampyrinae) possesses both *Luc1* and *Luc2*. In addition, the gene expression pattern of *Luc1* was in lanterns of larvae, prepupae, both sexes of pupae and adults, whereas that of *Luc2* was in eggs and bodies of prepupae, both sexes of pupae, and female adult.

In Chapter 4, I discussed on the evolution of duplicated luciferases based on my results and previous findings, and referred to some relevant questions should be revealed in the future. Based on the molecular phylogenetic analysis and the gene expression patterns, I hypothesized that *Luc1* and *Luc2* genes obtained different expression patterns after gene duplication in the common ancestor of Lampyridae. In other words, the expression of *Luc1* in the lantern of larvae, prepupae, pupae and adults and that of *Luc2* in the whole body of immobile stages were settled, respectively. Although there are several supporting evidences, further studies on exploring generality of duplicated luciferase genes and comparing gene expression patterns are necessary to verify the hypothesis.

## 第1章 諸言

「新奇形質」すなわち我々を驚かせる目新しい形質がどのように進化してきたのか。ダーウィンにより提唱された自然選択のメカニズムは、その後の生態学や遺伝学の発展とともに広く支持されるようになってきた。そして、ワトソンとクリックによる DNA 構造の解明以降の分子生物学により、生物がどのように漸進的に変遷していくかについて多くの知見が蓄積されている。しかし、一方で、祖先集団にはない全く新しい形質を獲得した生物がどのように進化したかについて、また分子レベルの進化がどのように表現型の進化に結びつくのかなどの諸問題については解決していない。

新機能の獲得メカニズムの一つに遺伝子重複が挙げられる。既存の遺伝子が、トランスポゾンや相同組み替えの異常など、何らかの機構により同じコピーをもつことによりその遺伝子に掛かる選択圧が緩くなり片方あるいは両方が変化しやすくなる現象である。その結果、新機能の獲得 *neofunctionalization* や発現制御の分担 *subfunctionalization* が生じる (Force et al., 1999)。このように遺伝的な冗長性を獲得することで、生物は多様なそして奇抜な形質を進化させてきた。その最たる例として生物発光が挙げられる。

生物発光は、生物が生化学反応により生み出す光のことで、様々な分類群で見られる (Herring, 1987)。発光生物のほとんどは海洋に生息しているが、最も研究が進んでいるのは陸生昆虫のホタルだろう。発光性甲虫はホタル科、フェンゴデス科、コメツキムシ科が知られており、これらの発光の分子機構は共通である (Gruber et al., 1996; Wood et al., 1989)。すなわち、いずれの種も ATP,  $Mg^{2+}$ ,



O<sub>2</sub> 存在下のもと、相同性の高い酵素ルシフェラーゼを用いて、発光基質 D-ルシフェリンを酸化させ発光している (Harvey, 1917; White et al., 1971)。

当研究室ではこれまでに、ルシフェラーゼの進化的起源に迫る研究がなされてきた。甲虫ルシフェラーゼは、発光反応の触媒の他に脂肪酸 CoA リガーゼとしての機能をもつ (Oba et al., 2003)。そして、ルシフェラーゼと相同性の高い非発光性甲虫の CoA リガーゼに変異を導入することで発光活性を獲得することに成功した (Oba et al., 2009)。また、ホタルはゲノム中にルシフェラーゼに相同な遺伝子を多く持つことも示されている (Oba et al., 2006; Day et al., 2009)。これらのことから、ホタルは neofunctionalization すなわち遺伝子重複した CoA リガーゼの一つが突然変異により発光活性を獲得し、発光能力を進化させたことが推測される。

ところが、2010 年に当研究室での研究によりゲンジボタル *Luciola cruciata* が 2 つのルシフェラーゼを持つことが明らかとなった (Oba et al., 2010)。これらのアミノ酸配列の相同性は 59% と低く、分子系統解析の結果、一方は既知ルシフェラーゼのグループとは離れていることがわかった。そこで、従来知られていたルシフェラーゼを *Luc1*、新しく見つかったものを *Luc2* と命名した。また、過去の文献を遡ると北米産ホタル *Photuris pennsylvanica* から *Ppe1* と *Ppe2* の二つがクローニングされおり (Kutuzova et al., 1997)、それぞれ *Luc1* と *Luc2* と相同な遺伝子であることが示唆された。当時の研究では、種同定の困難な *Photuris* 属を複数個体用いていたことや、本種が他種のホタルを食べるという習性を持つ (Lloyd, 1984) ことから *P. pennsylvanica* が生来的にルシフェラーゼを 2 つ持つことについては、その後証明されてこなかった。一方で、我々はヘイケボタル *Luciola*

*lateralis* でも *Luc2* を持つこと、またそれぞれの遺伝子では発現パターンが異なることを見出した。すなわち、*Luc1* は幼虫、蛹、成虫の発光器で発現しており、*Luc2* は卵や蛹そしてメス成虫の卵巣で発現していることが明らかにした (Oba et al., 2013)。

遺伝子発現パターン以外に、生化学的な性質でも *Luc1* と *Luc2* は異なっている。ホタルルシフェラーゼすなわち *Luc1* には、ほかの甲虫ルシフェラーゼとは異なり、pH に依存して発光スペクトルがシフトすること (pH 感受性) が知られている (Seliger & MacElroy, 1964)。ところが *Luc2* はいずれもこのような pH 感受性を持たない (Oba et al., 2013)。また、ルシフェリンや ATP に対する  $K_m$  値も共通して *Luc2* の方が *Luc1* よりも低い (Oba et al., 2013)。しかし、なぜホタルがルシフェラーゼを 2 つ持つのかについては詳しくわかっていない。

本研究ではホタル科における遺伝子重複を起こしたルシフェラーゼについて、生物学的観点と進化的観点から分子生物学、生化学的手法により研究を行った。第 2 章では、ヒメボタルの発光色に着目し、多様な発光色をとる *Luc1* とは対照的に *Luc2* の発光色は緑色である可能性について述べる。第 3 章では、2 つのルシフェラーゼの存在やその遺伝子発現パターンがホタル科において広く保存されているかについて述べる。最後に第 4 章に総合考察として、遺伝子重複により生じたルシフェラーゼとそれに伴うホタルの進化について考察した。

## 第2章 動かないステージにおける緑色の発光を担

### うルシフェラーゼ

#### 2-1. 背景

ホタル科 Lampyridae は、世界で約 2,200 種からなり、知られている限りすべての種は少なくとも幼虫段階で発光する (Branham, 2010)。ホタルの生物発光は、ホタルルシフェラーゼによって ATP、 $Mg^{2+}$  および  $O_2$  の存在下で D-ルシフェリンの酸化反応が触媒されることによって生み出される (White et al., 1971)。ホタルルシフェラーゼの遺伝子は、北米産ホタル *Photinus pyralis* から初めて分離され、現在、ホタルルシフェラーゼ遺伝子は 25 種以上から単離されている (de Wet et al., 1985; Branchini et al., 2016 and references there in)。基本的に単一種からは一つのルシフェラーゼ遺伝子 (Luc1) が単離されたが、ルシフェラーゼのアイソタイプ遺伝子 (Luc2) は 3 種のみから同定された。北米産ホタル *Photuris pennsylvanica* (Ye et al., 1997) と日本産のゲンジボタル *Luciola cruciata* (Oba et al., 2010) およびヘイケボタル *Luciola lateralis* (Oba et al., 2013) である。最近の我々の研究により、これらの遺伝子は発現のタイミングに違いがあることがわかった。すなわち、ゲンジボタルとヘイケボタルの *Luc1* が幼虫と蛹、成虫において発光器で発現していたのに対し、*Luc2* は卵と蛹の全身において発現していることが明らかとなった (Oba et al., 2010, 2013)。

ホタルにおける発光の役割と発光色には関連がある。夜行性のホタル成虫の発光器からの生物発光は、種内での求愛コミュニケーションにおいて重要な役割を果たすことが知られている。これらのホタルは種によって緑色から黄色ま

で、様々な発光色を示す。また、これらの視覚感受スペクトルは、同種の発光器からの発光スペクトルに最適化されている (Eguchi et al., 1984; Lall et al., 1980)。一方で、求愛シグナルに発光を使わない種であるミナミボタル属 *Drilaster* やヒゲボタル属 *Stenocladius* (大場, 2004; Kawashima et al., 2003) は、フェロモンを用いており、これらの種の成虫は発光器が全くあるいはほとんど退縮しているが、幼虫の発光器は健在で緑色に発光する (Oba et al., 2012)。そして、幼虫の発光器からの生物発光の役割は警告であると考えられている (Branham & Greenfield, 1996; Lewis, 2016)。しかし、卵と蛹の薄暗い持続的な発光の役割はこれまで論じられてこなかった。

日本産のホタルであるヒメボタル *Luciola parvula* KIESENWETTER 1874 は、ゲンジボタルおよびヘイケボタルと同じく、ホタル亜科 *Luciolinae* に属する (Kawashima et al., 2003)。ヒメボタル成虫の発光色は黄色であり、これはホタルの中で最も長波長側にシフトした色の 1 つである (Ohmiya et al., 1995; Oba et al., 2011; Eguchi et al., 1984; Seliger & McElroy, 1964; Biggley et al., 1967)。成虫発光器からクローニングされた *Luc1* 遺伝子は、リコンビナントタンパク質として発現・精製され性質が調べられた結果、黄色の発光を示すことが報告されている (Ohmiya et al., 1995)。この発光スペクトルはヒメボタルの発光器からのものとほぼ一致する (Ohmiya et al., 1995)。また、網膜電図記録 (ERG) による実験結果は、ヒメボタルの複眼の視覚感度が、同種の発光シグナルを検出するために最適化されていることを示していた (Eguchi et al., 1984)。

本章では、もっとも長波長側の発光スペクトルを示すホタルの仲間の一つであるヒメボタルから *Luc2* 遺伝子の単離について報告する。組換えタンパク質の

発光色は緑色であり、これは、ヒメボタルの視覚感度に対応しておらず種内コミュニケーションとは別の役割をもつことが考えられる。そして、この遺伝子は、動かない発生ステージ、すなわち卵、前蛹および蛹で主に発現していた。

## 2-2. 結果と考察

### 2-2-1. ヒメボタルの生物発光

ヒメボタルの幼虫、蛹、成虫の発光器は黄色の発光色を示し、前蛹（前蛹の定義は 2-3-1 で述べる）および蛹の体は緑色に光っていた（図 2-1A,C）。前蛹の頭側および蛹の頭側の発光スペクトルの最大値は、それぞれ 540 nm および 541 nm であった（図 2-1B,D）。図 1B の 560-600 nm に見られる小さな肩は、おそらく、幼虫発光器からの弱い黄色光の影響だと考えられる。前蛹になる前の終齢幼虫の生物発光は、肉眼やカメラによる観察では検出できなかった（図 2-2）。蛹の発光器の生物発光スペクトルの最大値は 561 nm であった（図 2-1D）。また、CCD カメラによる卵からの弱い発光を検出したが、発光強度が微弱であったためにスペクトルを測定することができなかった。成虫の雌雄において、発光器以外の体の発光は観察されなかった。

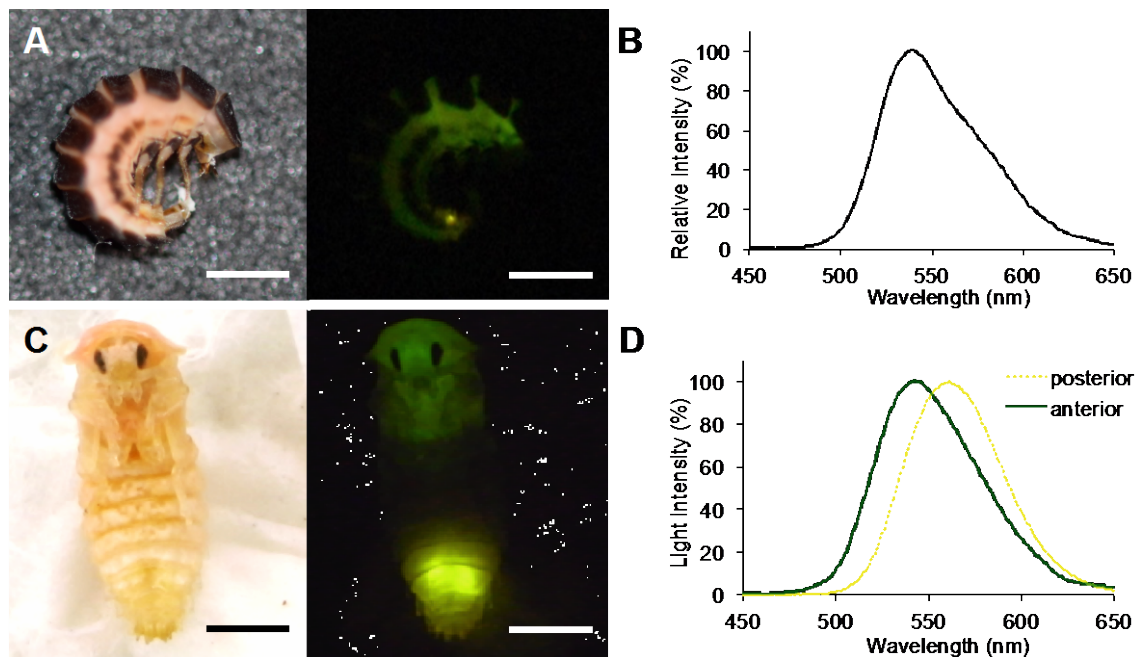


図 2-1 ヒメボタルの生物発光と発光スペクトル

(A) 前蛹の発光。幼虫型の点状発光器が黄色く発光しており、また、色素沈着していない部位全身でから緑色の発光が見える。(B) 前蛹の発光スペクトル。ピークは 540 nm だが、長波長側に肩が見える。(C) ヒメボタルメス蛹。中期。腹部第 6-7 節に成虫型の発光器ができており黄色く発光する。頭側は緑色に発光する。(D) 蛹の発光スペクトル。頭側と尾側の発光スペクトルはそれぞれ 541 nm と 561 nm であった。スケールバーは 2 mm。

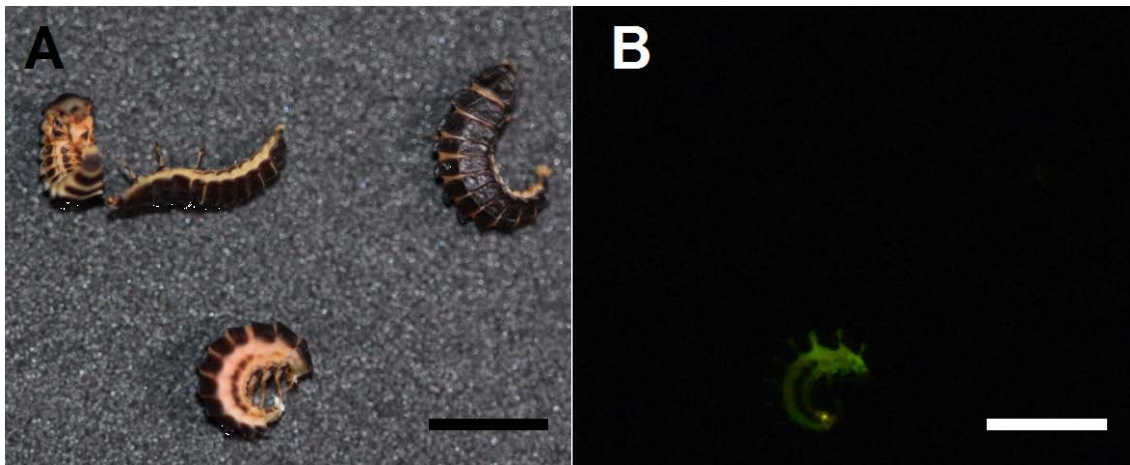


図 2-2 幼虫と前蛹の生物発光

上段の 3 匹の幼虫は光を発しないのに対して、前蛹は生物発光を示す。前蛹は動かないが、前蛹以前の幼虫は活発に動き回る。スケールバーは 5 mm。

#### 2-2-2. 蛹の形態と生物発光

蛹の期間は飼育条件下で約 11 日間であった。ヒメボタルの蛹の性別は形態学的に区別した。メスの蛹は体が大きく、オスの複眼がより発達しており、腹部第 8 節は雌雄で形が異なる (図 2-3)。

初期の蛹 (蛹化後第 1-2 日目) では、全身が緑色に持続的に発光した (図 2-2)。注目すべきことに、メス蛹においてのみ頭側に黄色の発光が見られた (オス蛹では見られなかった) (図 2-3)。中期以降の蛹 (4 日目から羽化まで) では、頭側に緑色の持続的な発光が観察された。これらの蛹全体からの薄暗い発光は物理刺激の影響を受けなかった。一方で、幼虫型および成虫型発光器からの黄色の発光は、物理刺激に応じて明滅した。



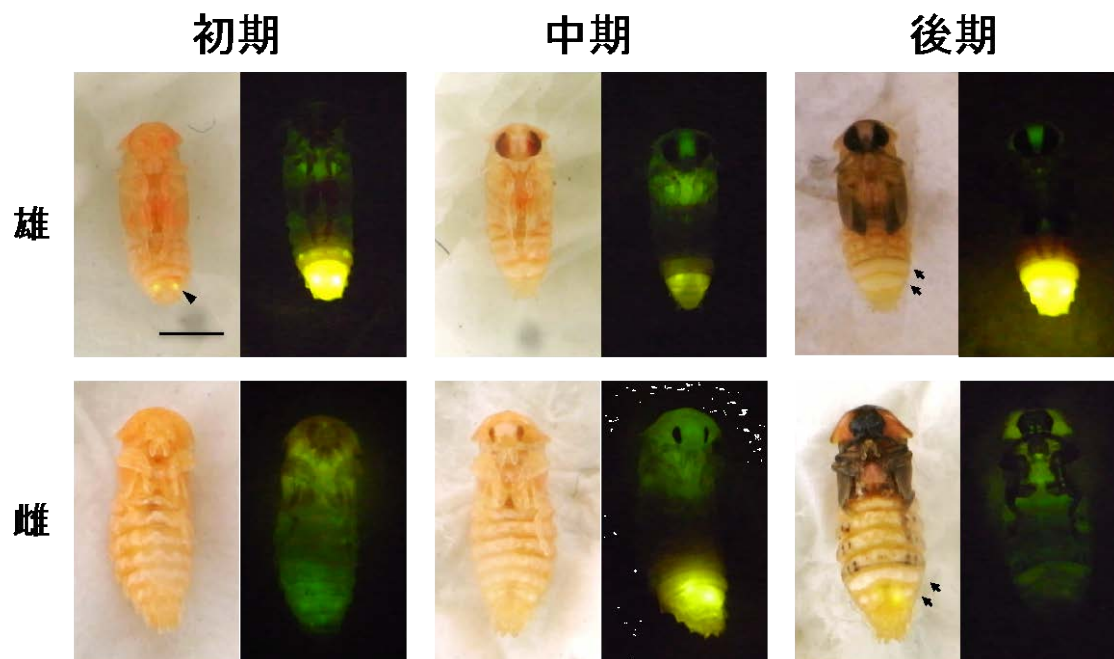


図 2-3 蛹の形態と発光パターンの遷移

上段がオス蛹、下段がメス蛹。左から順に蛹の初期（1-2 日目）、中期（4-7 日目）、後期（7-11 日目）。矢頭は幼虫型発光器を示し、矢印は成虫型発光器を示す。スケールバーは 2 mm。

### 2-2-3. ヒメボタルにおける LpLuc2 の単離

我々は、RT-PCR および RACE 法を用いてヒメボタルの蛹からコード領域配列（CDS）を含む *Luc2* タイプのルシフェラーゼの cDNA を単離し、これを LpLuc2 と命名した。CDS から推定された LpLuc2 の一次構造は 544 アミノ酸からなり（図 2-4）、分子量および等電点の理論値はそれぞれ 60,079 および 8.14 であった。PST1 predictor (<http://mendel.imp.ac.at/pts1/>) によって、LpLuc2 の C 末端配列（-SKL）は、他のルシフェラーゼやルシフェラーゼ様タンパク質と同様にペルオキシソーム移行シグナルを持つことが予測された（ $P=3.0e-04$ ）。AMP 結合ドメインの推定モチーフ配列は、他のホタルルシフェラーゼと同様に保存されており、また、ホタルルシフェリンと相互作用すると考えられるアミノ酸残基も保存され

ていた（図 2-4）。これらの結果は、LpLuc2 が CoA リガーゼのメンバーであり、ルシフェラーゼの触媒機能を有することを示唆している。

LpLuc2 のアミノ酸配列は、LpLuc1 と 55% の一致度を、ヘイケボタルの LILuc2 およびゲンジボタルの LcLuc2 とそれぞれ 77% および 78% の一致度を示した（図 2-4、表 2-1）。甲虫ルシフェラーゼのホモログ遺伝子を用いた分子系統解析により、LpLuc2 がホタル亜科の Luc2 タイプルのシフェラーゼのクレードに属することが示された（図 2-5）。

ルシフェラーゼの発光色を決定するメカニズムについては、まだはっきりとわかっていない。ルシフェリンアナログを取り込んだルシフェラーゼの結晶構造解析（Nakatsu et al., 2006）から、ルシフェリンと直接相互作用するアミノ酸材が決定された（図 2-4 でアミノ酸の下に点で示した）。LpLuc1 と LpLuc2 の間の違いが L/I289 に挙げられるが、他種のルシフェラーゼのアミノ酸配列とそれらの発光色からは、緑色あるいは黄色を決定つけるような相関関係は見られない。ルシフェラーゼのアミノ酸アライメントから発光色や pH 感受性を決定するメカニズムを決めるには、より幅広いルシフェラーゼの情報が必要であると考えられる。

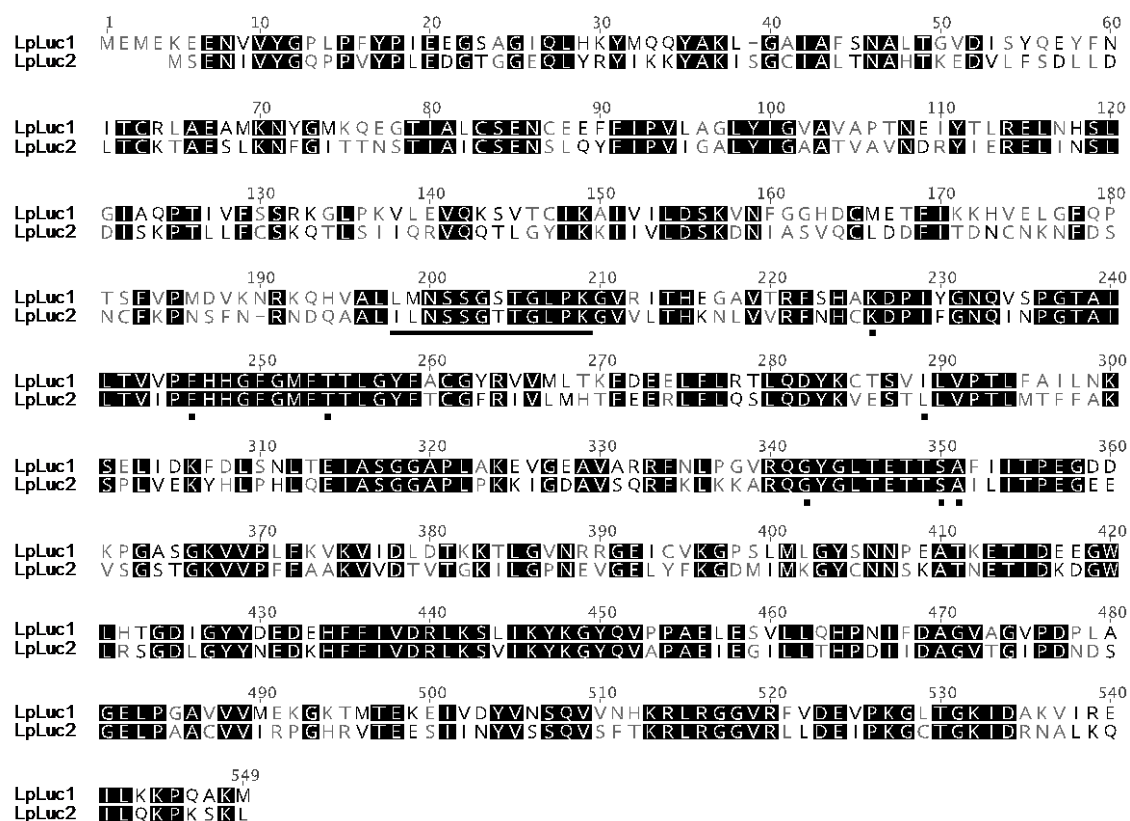


図 2-4 LpLuc1 および LpLuc2 のアミノ酸配列アラインメント

同一のアミノ酸残基は黒でハイライトし、Blosum62 スコア行列に従った類似のアミノ酸残基は黒で、他は灰色で示した。黒い下線は、Prosites (<http://www.expasy.ch/prosite/>) によって予測された AMP 結合ドメインを示す。ホタルルシフェリンと相互作用するのに重要と考えられる 7 つのアミノ酸残基を黒点で示した。配列上の数字は、アミノ酸残基の位置を指す。

表 2-1. Luc1 と Luc2 のアミノ酸の一致率 (%)

|                                      | Ppy | Ppe1 | LpLuc1 | LcLuc1 | LlLuc1 | LcLuc2 | LlLuc2 | LpLuc2 | Accession No. |
|--------------------------------------|-----|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------------|
| <i>Photinus pyralis</i> Ppy          | 100 |      |        |        |        |        |        |        | (BAF48390)    |
| <i>Photuris pennsylvanica</i> Ppe1   | 69  | 100  |        |        |        |        |        |        | (BAA05006)    |
| <i>Luciola parvula</i> LpLuc1        | 67  | 60   | 100    |        |        |        |        |        | (BAL46511)    |
| <i>Luciola cruciata</i> LcLuc1       | 67  | 61   | 80     | 100    |        |        |        |        | (BAE80731)    |
| <i>Luciola lateralis</i> LlLuc1      | 68  | 61   | 81     | 94     | 100    |        |        |        | (BAL46510)    |
| <i>Luciola cruciata</i> LcLuc2       | 62  | 58   | 56     | 58     | 60     | 100    |        |        | (BAJ83485)    |
| <i>Luciola lateralis</i> LlLuc2      | 62  | 59   | 56     | 57     | 59     | 89     | 100    |        | (BAM76586)    |
| <b><i>Luciola parvula</i> LpLuc2</b> | 59  | 56   | 55     | 57     | 57     | 78     | 77     | 100    | (AB812879)    |
| <i>Photuris pennsylvanica</i> Ppe2   | 59  | 56   | 54     | 56     | 56     | 69     | 68     | 67     | (Q27757)      |

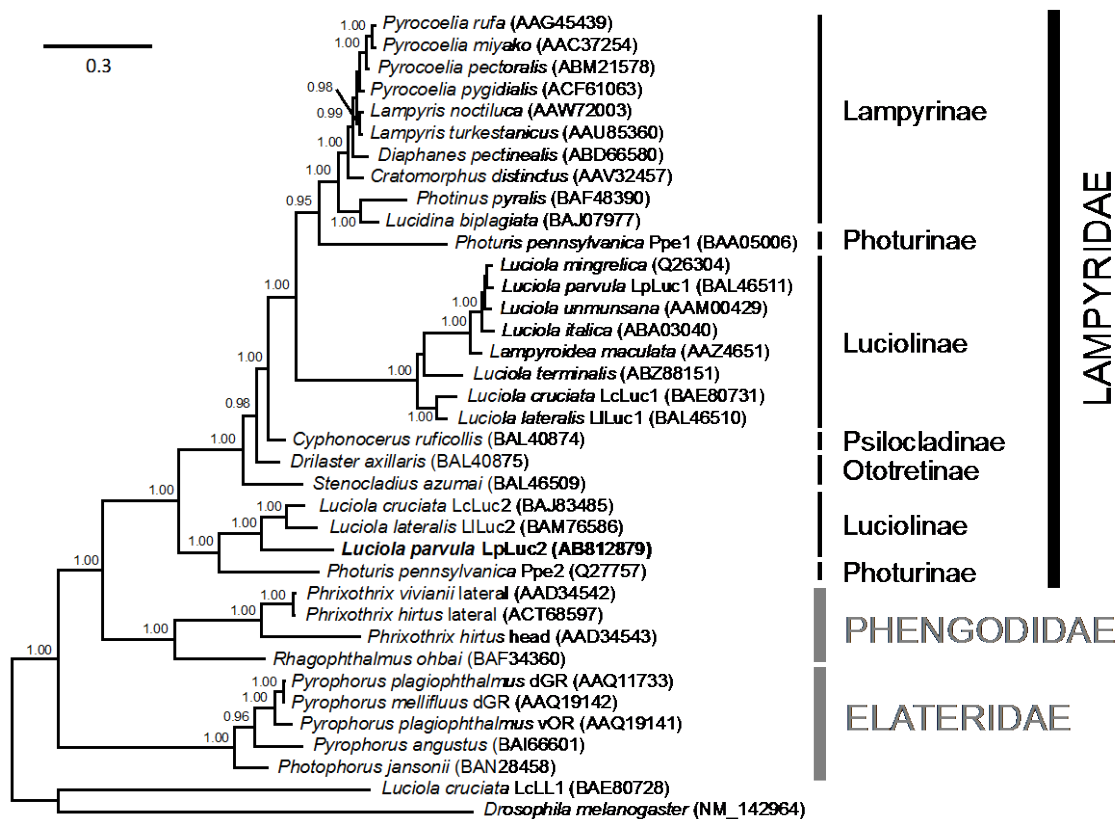


図 2-5 甲虫ルシフェラーゼのベイズ系統樹

各節の数値は事後確率 (<0.9 は示していない)。GenBank アクセッション番号はカッコ内に示した。

#### 2-2-4. 異種発現した LpLuc1 および LpLuc2 の精製

His タグ-ZZ ドメインを融合させた LpLuc1 および LpLuc2 の組換えタンパク質を、大腸菌を用いて発現させ、Ni キレートアフィニティークロマトグラフィーと PreScission protease によるカラム内消化を用いて精製した。精製した LpLuc1 および LpLuc2 の収量は、100 ml の大腸菌培養液からそれぞれ 2.16 mg および 0.66 mg であった。さらに、精製した LpLuc1 および LpLuc2 を SDS-PAGE に供し、それぞれ 62.7 kDa および 60.1 kDa の相対分子量を示した。SDS-PAGE 分析(図 2-6)から算出された LpLuc1 および LpLuc2 の純度はそれぞれ 86% および 82% であった。

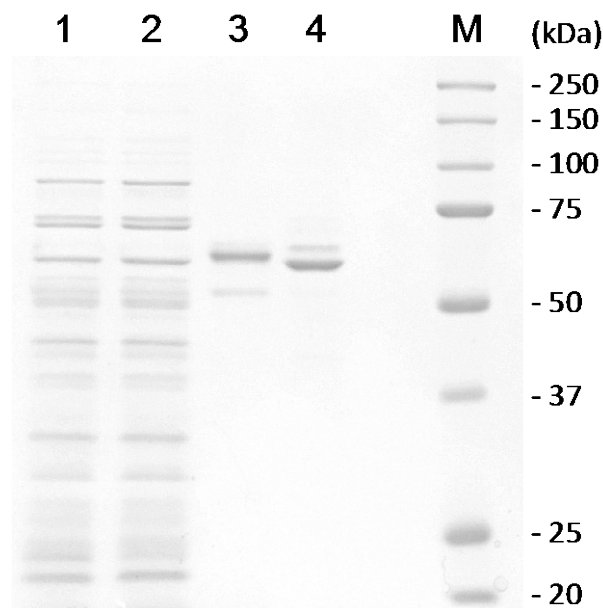


図 2-6 組換えルシフェラーゼの SDS-PAGE

レーン 1、pCold-ZZ-P-LpLuc1/BL21 の粗抽出物。レーン 2、pCold-ZZ-P-LpLuc2/BL21 の粗抽出物。レーン 3、1  $\mu$ g の精製 LpLuc1。レーン 4、1  $\mu$ g の精製 LpLuc2。レーン M、タンパク質サイズマーカー (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)。タンパク質のバンドは CBB により染色した。

#### 2-2-5. ルシフェラーゼの生化学的性質

精製ルシフェラーゼを用いて、ルシフェラーゼの基質に対する親和性をミカエリス・メンテンプロットにより算出した（図 2-7）。ホタルルシフェリンについては、LpLuc1 および LpLuc2 の  $K_m$  値はそれぞれ  $18.0\ \mu\text{M}$  および  $2.44\ \mu\text{M}$  であった（表 2-2）。また ATP の  $K_m$  値はそれぞれ  $428\ \mu\text{M}$  および  $123\ \mu\text{M}$  であった（表 2-2）。

ルシフェリンの LpLuc2 の  $K_m$  値は LpLuc1 の約 10 倍であった。これは、ホタルルシフェラーゼの他の Luc1 および Luc2 の場合と一貫している（表 2-2）。北米産ホタル *P. pennsylvanica* の蛹について、頭側のルシフェリン含量が発光器を含む尾側の約 10 倍であることが報告されている（Strause et al, 1979）。ヘイケボタルを用いた実験でも同様な結果が得られている。Luc2 の低い  $K_m$  値すなわちルシフェリンに対する高い親和性は、蛹において発光器以外での全身のルシフェリン濃度が低いことに適応した結果だと考えられる。また、様々なホタルの Luc1 に比べ、Luc2 の発光スペクトルの多様性は極めて低い（表 2-2）。これは、Luc2 間のアミノ酸の類似性が Luc1 間のアミノ酸の類似性よりも低いという事実と対照的である（表 2-1）。Luc1 と Luc2 における種間タンパク質変異の比較構造および生化学的研究とともに、他のホタル科からの Luc2 のさらなる同定は、pH 感受性/非感受性および発光色決定の分子機構を解明するのに役立つだろう。

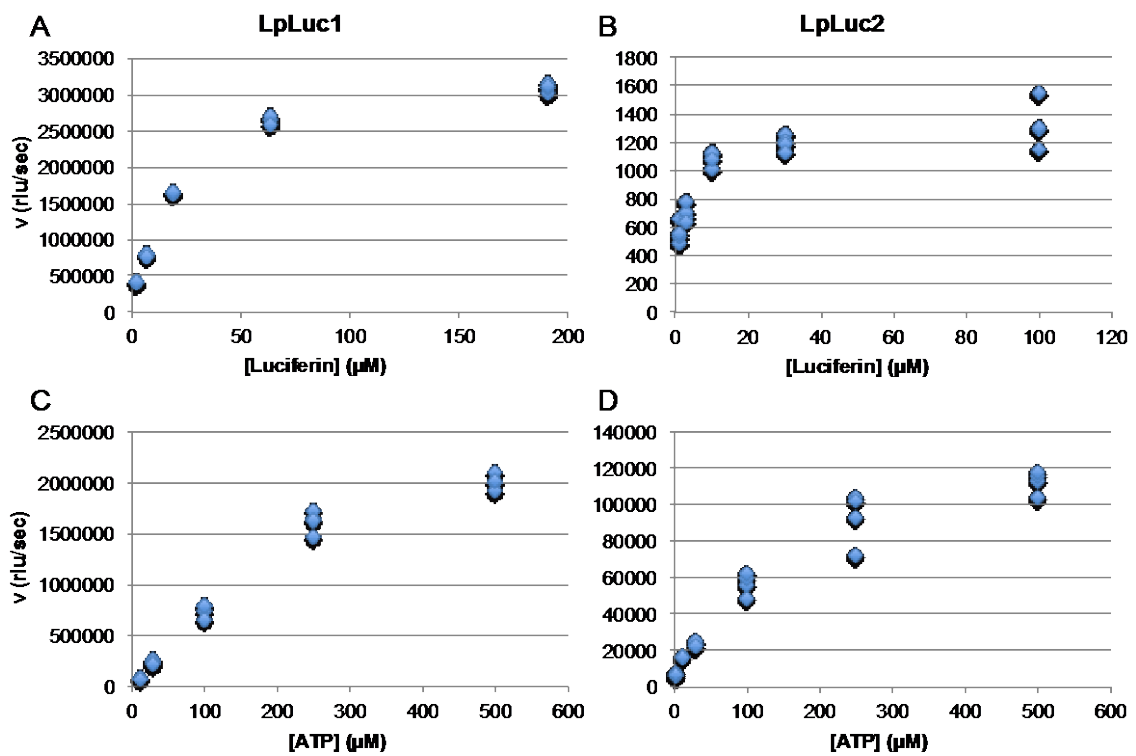


図 2-7 ミカエリス・メンテンプロット

ルシフェリンに対する LpLuc1 (A) と LpLuc2 (B) および ATP に対する LpLuc1 (C) と LpLuc2 (D) について基質濃度 (横軸) と反応速度  $v$  (縦軸) をプロットした。発光量 (rlu) は基質の消費量に対応するので、単位時間あたりの発光量が反応速度 ( $v$ ) として解釈できる。



表 2-2 ルシフェラーゼの比較

| luciferase | AA  | Mw     | pI   | I <sub>max</sub><br>(nm) | K <sub>m</sub> (μM) at pH7.5-8.0 |                  | reference             |
|------------|-----|--------|------|--------------------------|----------------------------------|------------------|-----------------------|
|            |     |        |      |                          | Luciferin                        | ATP              |                       |
| LpLuc2     | 544 | 60 078 | 7.97 | 538                      | 2.44                             | 123              | This study            |
| LcLuc2     | 544 | 59 949 | 8.39 | 543                      | 0.811                            | 21.5             | Oba et al. 2010       |
| LlLuc2     | 544 | 60 209 | 8.74 | 539                      | 32.2                             | 32.3             | Oba et al. 2013       |
| Ppe2       | 545 | 60 649 | 8.40 | 538                      | ~10 <sup>0</sup>                 | ~10 <sup>1</sup> | Kutuzova et al., 1996 |
| LpLuc1     | 548 | 60 353 | 6.40 | 559                      | 18                               | 428              | This study            |
| LcLuc1     | 548 | 59 904 | 6.74 | 554                      | 14.3                             | 106              | Oba et al. 2010       |
| LlLuc1     | 548 | 60 094 | 6.50 | 550                      | 78.9                             | 220              | Oba et al. 2013       |
| Ppe1       | 552 | 60 970 | 7.55 | 558                      | ~10 <sup>2</sup>                 | ~10 <sup>2</sup> | Kutuzova et al., 1996 |

(AA) アミノ酸の数、(Mw) 分子量、(pI) 等電点、(I<sub>max</sub>) 発光スペクトルの極大波長。

#### 2-2-6. LpLuc1 および LpLuc2 の発光スペクトル

精製した LpLuc1 および LpLuc2 の発光スペクトルを 3 つの pH 条件下においてホタルルシフェリン、ATP、CoA および Mg<sup>2+</sup> の存在下で測定した (図 2-8、表 2-2)。LpLuc1 の発光波長の極大は、中性～塩基性条件 (pH 7.5 および 8.0) では 561 nm であったが、酸性条件 (pH 6.0) では 600 nm であった。一方で LpLuc2 の発光波長の極大は、いずれの pH 条件に置いても 538 nm であった。これらの結果は、Luc1 および Luc2 がそれぞれ pH 感受性および非感受性であるという過去の報告と一致する。

LpLuc1 および LpLuc2 の *in vitro* の発光色は、蛹の発光器および頭側からの *in vivo* の発光色とそれぞれよく一致する。LpLuc1 と LpLuc2 の発光スペクトルの極大値が大きく異なるため (23 nm)、蛹の全身と発光器の発光色の差は写真と肉眼でも非常に明瞭であった (図 2-1)。注目すべきことにメス蛹の頭側が蛹初

期に黄色の生物発光を発していた（図 2-3）。これは頭側の **LpLuc1** の一時的な発現によって説明することができる。しかし、メス性蛹における **Luc1** および **Luc2** 遺伝子の局在化に関するさらなる実験は、本種の追加供給が困難であったため半定量的 RT-PCR によって実験することができなかった。そこで、蛹化第 1 日目のヘイケボタルを用いて RT-PCR を行った。しかし予想とは外れ、**LlLuc1** の転写物は、頭部からも胸部からも検出されなかった（図 2-9）。したがって、**Luc1** は、メス蛹初期の頭側の発光に関与しない可能性がある。ヒメボタルにおける蛹初期の頭側における **LpLuc1** の発現の可能性は完全に否定されたわけではなく、黄色の発光の根底にある機構は未知のままである。未同定の蛍光物質や色素によるフィルター効果が関与する可能性も排除できない。第 3 章で触れるが（3-2-3）、興味深いことに系統的に離れたヤエヤママドボタルのメス蛹の初期では頭側に **Luc1** の発現が認められた。

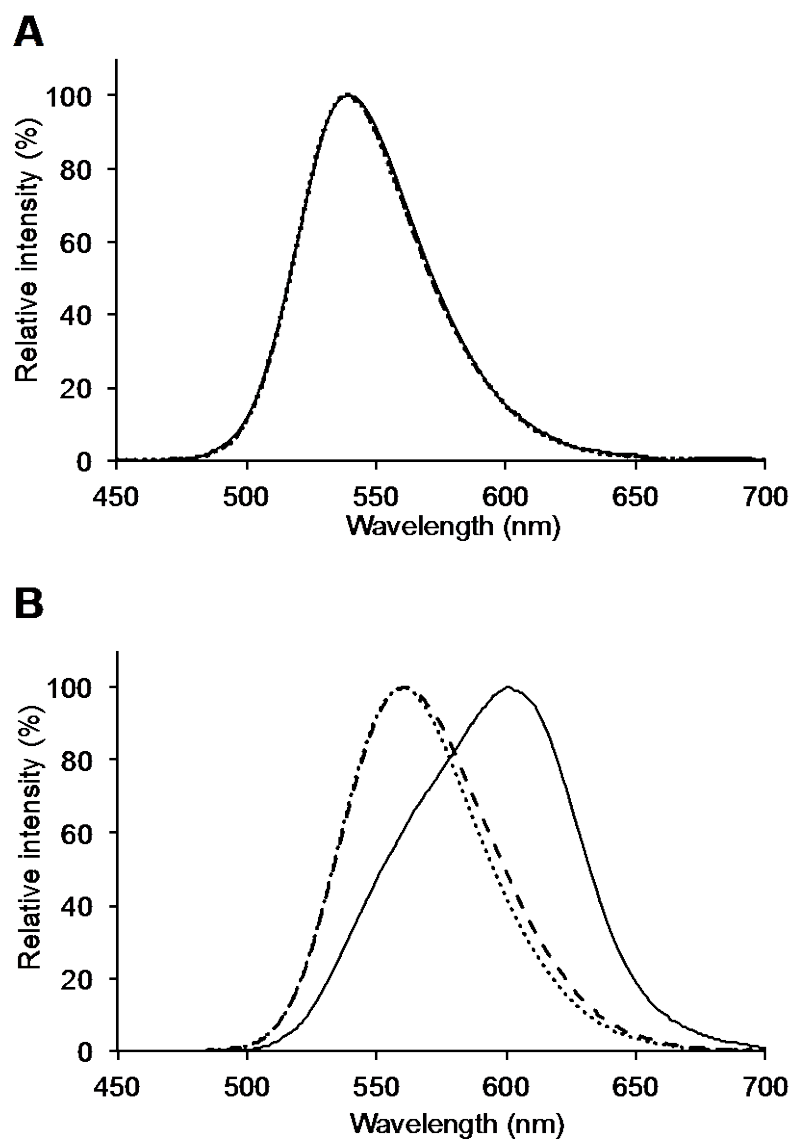


図 2-8 LpLuc1 (A) および LpLuc2 (B) の *in vitro* 生物発光スペクトル  
実線、破線、点線はそれぞれ pH 6.0、pH 7.5、pH 9.0 の条件下で測定した。

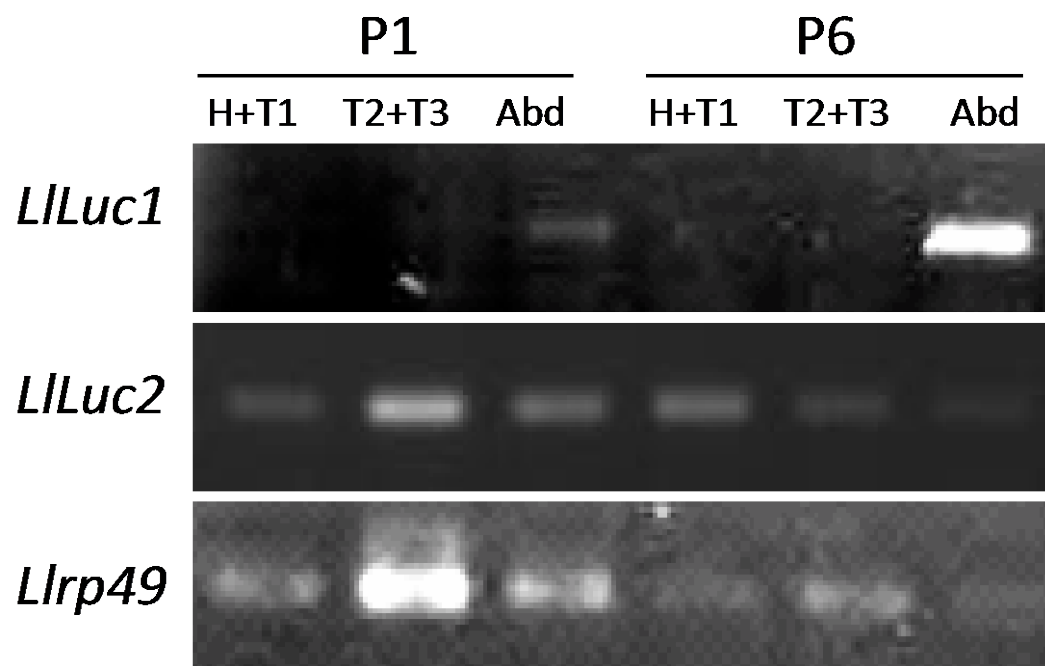


図 2-9 *LlLuc1* および *LlLuc2* の半定量的 RT-PCR

(P1) 蛹化の 1 日後、(P6) 蛹化の 6 日後、(H+T1) 頭部および前胸、(T2+T3) 中・後胸、(Abd) 発光器を含む腹部。*Llrp49* 遺伝子を内部標準として用いた。

#### 2-2-7. ライフサイクル中の *LpLuc1* および *LpLuc2* の遺伝子発現

*LpLuc1* および *LpLuc2* の転写レベルを半定量 RT-PCR によって、ヒメボタルの卵、幼虫、前蛹、メス蛹、オス成虫、メス成虫の間で比較した。その結果、*LpLuc1* は幼虫、蛹、成虫で発現しており、オス成虫では特に高い発現を示した(図 2-10)。*LpLuc2* は、卵および前蛹において発現しており、特に蛹およびメス成虫において高発現していた。本実験条件下では、*LpLuc1* の卵での発現、*LpLuc2* の幼虫およびオス成虫における発現は認められなかった。

緑色の薄暗い生物発光が、前蛹の着色していない部分(図 2-1A)から観察されたが、前蛹でない幼虫からは観察されなかった(図 2-2)。これは半定量的 RT-PCR の結果と一致しており、*LpLuc2* は前蛹で発現していたが、幼虫では発現

していなかった（図 2-10）。そこで、ヘイケボタルの前蛹を観察したところ、体側の分泌腺および腹側の色素沈着していない部分から緑色の薄暗い光を放射することを見出した。前蛹は、卵や蛹のように動き回らない。したがって、これらの結果は、*Luc2* が *Luciola* 属のホタルにおける動かない発生段階で使用されることを示唆している。*LpLuc2* はメス成虫でも発現していたが（図 2-10）、ヘイケボタルでは *LlLuc2* が主に卵巣で発現しているので、ヒメボタルでも卵巣で発現していると考えられている（Oba et al., 2013）。ヒメボタルおよびヘイケボタルのいずれにおいてもメス成虫では全身の発光が観察されなかったので、*Luc2* の発現は、メス成虫の生物発光に関与しないと考えられる。

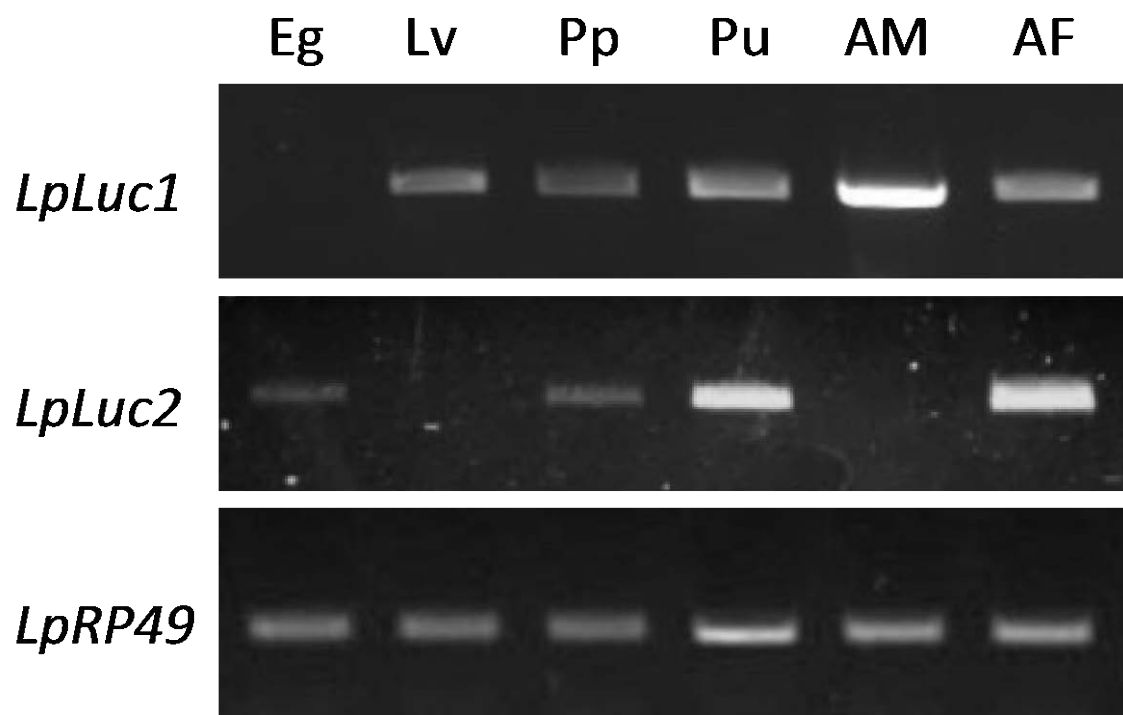


図 2-10 *LpLuc1* および *LpLuc2* の半定量的 RT-PCR

（Eg）卵、（Lv）幼虫、（Pp）前蛹、（Pu）メス蛹、（AM）オス成虫、（AF）メス成虫。*LpRP49*は、内部標準として用いた。

#### 2-2-8. Luc2 による発光の生態学的な役割についての考察

網膜電図分析 (ERG) によって、ヒメボタル成虫の複眼における視覚感受スペクトルが、発光器からの自身の生物発光によく一致していることを示している (Eguchi et al., 1984)。LpLuc2 ( $\lambda_{\text{max}} = 538\text{nm}$ ) の発光スペクトルは LpLuc1 の発光スペクトル ( $\lambda_{\text{max}} = 560\text{nm}$ ) とは大きく異なり、ヒメボタル自身の視覚は Luc2 の発光に適応していない。したがって、Luc2 による発光の役割は、種内コミュニケーションではない可能性がある。ホタルは一般に、潜在的な捕食者に警告するために、ルシブファジンやベタインなどの毒素や忌避物質を保有することが知られている (Eisner et al., 1978; Meinwald et al., 1979; González et al., 1999; Tyler et al., 2008)。したがって、動けない発生ステージにおいて Luc2 により生み出された緑色の発光は、捕食者に向けた警告の役割を果たすかもしれない。

## 2-3. 材料および実験方法

### 2-3-1. 生体サンプルの採取地と飼育方法、撮影方法

2013 年 2 月に名古屋大学東山キャンパス内の森に設置した餌トラップを用いて採集したヒメボタルの終齢幼虫から成虫を飼育した。各幼虫を室温 (15~25°C) において湿らせた紙とミズゴケを入れたプラスチック容器に入れ飼育した。餌には淡水性巻貝であるサカマキガイ *Physa acuta* を与えた。本論文に置いて、「前蛹」とは終齢幼虫が蛹化の直前 (ヘイケボタルやヒメボタルでは 1~2 週間程度) に不活性になるすなわち動かなくなる状態のことを指す。また、2013 年 5 月には上記と同じ場所で雌雄の成虫を手で採取し、これらを交配させ、得られた卵を本研究に使用した。前蛹および蛹の生物発光は、Nikon D5300 デジタルカメラ (Nikon, Tokyo, Japan) を用いて、ISO 12,800、F/4.5、露光時間 30 sec の条件で撮影した。蛹の形態変化および生物発光のパターンは、毎日深夜 24 時に撮影した。蛹の生物発光は、GR デジタル II カメラ (Richo, Tokyo, Japan) で撮影し、撮影条件は ISO 400、F/2.4 および露光時間 180 sec であった。

### 2-3-2. LpLuc2 の分子クローニング

TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Whatman, MA, USA) を用いて、蛹化後第 2 日目のメス蛹の全身から total RNA 68 µg を抽出し、RNeasy kit (QIAGEN, Hilden, Germany) に付属のスピンカラムを用いて精製した。相補的 DNA (cDNA) は、SuperScript III (Thermo Fisher Scientific) を用いて合成した。縮重プライマー LH1 および LH3 を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行い、反応産物を鋳型としてさらに縮重プライマー LH2 および LH4 を用いた degenerated PCR を行った。

次いで、PCR 増幅産物（約 700 bp）を pGEM-T Easy ベクター（Promega, Madison, WI, USA）にサブクローニングし、*AluI* 制限酵素消化断片パターンに基づいてスクリーニングした後、4 つの独立したクローンの配列を決定した。BLAST 検索（<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>）により、これら 2 つのクローンはゲンジボタルのルシフェラーゼ様遺伝子 *LcLL1* および *LcLL2* と相同であることが示された (Oba et al., 2006)。また、1 つのクローンは *LpLuc1* であり、残りの 1 つのクローンは *LcLuc2*（ゲンジボタルの *Luc2*）と相同であり、かつ、ヨーロッパ産ホタル *Luciola italica*（GenBank アクセッション番号, ACH87787）のゲノム断片の推定ルシフェラーゼと 99% の類似性を示した。*Luc2* 遺伝子の CDS をクローニングするために、Smart RACE cDNA 増幅キット（Clontech, Palo Alto, CA, USA）を用いて、cDNA の 5' 末端および 3' 末端の増幅を、内部の既知配列に基づいて設計された遺伝子特異的プライマーを用いて増幅した。RACE 反応産物をシーケンスし、得られた配列から新たに設計した遺伝子特異的プライマーを用いて、PrimeSTAR Max DNA ポリメラーゼ（Takara, Shiga, Japan）を用いて、*Luc2* 遺伝子の CDS を含むクローンを増幅した。BigDye terminator kit（Thermo Fisher Scientific）および ABI Prism 3130 Genetic Analyzer（Thermo Fisher Scientific）を用いて塩基配列を決定した。この遺伝子を *LpLuc2* と名付け、GenBank に登録した（アクセッション番号は AB812879）。Geneious v9.1.2（Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand）を用いてアミノ酸配列から分子量および等電点（pI）を計算した。プライマー配列および温度条件の詳細は表 2-3 に記載した。



### 2-3-3. 大腸菌におけるルシフェラーゼの異種発現

*LpLuc1* および *LpLuc2* のコーディング配列を、特異的プライマーセット（表 2-3）と PrimeSTAR Max DNA ポリメラーゼを用いた PCR によって増幅した。PCR 産物を XhoI と XbaI で消化し発現用ベクター pCold-ZZ-P-X (Inouye & Sahara, 2009) のマルチクローニングサイトに挿入し、それぞれの発現プラスミド pCold-ZZ-P-LpLuc1 および pCold-ZZ-P-LpLuc2 を得た。これらのプラスミドをシーケンスし、操作の過程で望まない変異が生じなかったことを確認した。これらのタンパク質発現用プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) pLysS (Promega) に形質転換し、それぞれ pCold-ZZ-P-LpLuc1/BL21 および pCold-ZZ-P-LpLuc2/BL21 を得た。大腸菌の培養は、100 ml の Terrific broth (0.1 mM リン酸カリウム (pH 7.0)、1.2% トリプトン、2.4% 酵母抽出物、0.5% (v/v) グリセロール) を用い 37°C、250 rpm で培養し、OD = 0.4-0.5 の時点で 0.2 mM の IPTG を加えタンパク質の発現を誘導後 15°C、250 rpm で培養した。回収した細胞を 5 ml の抽出バッファー (50 mM Tris-HCl、400 mM NaCl、pH 7.0) で懸濁し、超音波により破碎し、4°C、10,000 g で 5 min 遠心分離した。得られた上清を回収後、さらに 2 回沈殿を超音波処理し、タンパク質溶液を回収した。粗抽出物を Ni キレートアフィニティーカラムに供し、PreScission Protease (GE-Healthcare Bio-Science, Piscataway, NJ, USA) を用いて N 末端領域の ZZ ドメインをカラム内で消化し分離した。純度を調べるために、10% ポリアクリルアミド分離ゲルを用いて SDS-PAGE による分析を行った。ゲルをクイック CBB (Wako, Osaka, Japan) で染色した。染色像を ImageJ ソフトウェア (rsb.info.nih.gov) により解析し純度を求めた。また、吸光度測定により、精製した LpLuc1 および LpLuc2 溶液の濃度を決定した。モル吸光係数

$\epsilon$  をアミノ酸組成に基づいて計算し、それぞれ 36,300 および 36,800 mol/ml/cm とした。

#### 2-3-4. 速度論的解析

Lineweaver-Burk プロットを使用して  $K_m$  値を決定するために、種々の濃度のホタルルシフェリン (1~1,000  $\mu\text{M}$ ) および ATP (10~1,000  $\mu\text{M}$ ) を使用した。反応溶液 100  $\mu\text{l}$  の組成は D-ルシフェリンカリウム塩 (>98%純度、Wako) および ATP (Oriental Yeast, Tokyo, Japan)、 $\text{MgCl}_2$  (5 mM)、精製したルシフェラーゼ 0.1 nmol を含む 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) である。発光反応は 25°C で行い、ホタルルシフェリンおよび ATP、 $\text{MgCl}_2$  を含む 50  $\mu\text{l}$  の緩衝液を 50  $\mu\text{l}$  の酵素溶液にインジェクトすることによって開始した。ルシフェリンおよび ATP の濃度は、吸光度によって決定した。D-ルシフェリンのエナンチオマー過剰率はキラルカラム分析により決定し、その値は 99.6%以上であった。発光強度  $I_{\text{max}}$  値は Centro LB960 ルミノメーター (Berthold, Bad Wildbad, Germany) を用いて 0.5 sec 間隔で 20 sec 測定した。

#### 2-3-5. 発光スペクトルの測定

上述のように、前蛹全身、蛹中期の頭側と発光器を用いて、生体内の生物発光スペクトルを測定した。蛹の頭側を測定するために、発光器をアルミホイルで覆い隠し。発光器を測定するために、蛹の頭側も同様に覆い隠した。これらを石英キュベットに入れ、励起光源を消した状態で FP-777W 蛍光分光光度計 (Jasco, Tokyo, Japan) を用いて発光スペクトルを測定した。データの補正は行

っていない。

酵素反応溶液は、精製組換えルシフェラーゼ (0.1~2 nmol)、100 mM 緩衝液 (MES-NaOH、pH 5.5; Tris-HCl、pH 7.5; グリシン-NaOH、pH 9.0)、50  $\mu$ M ホタルルシフェリン、250  $\mu$ M ATP および 2.5 mM の  $\text{MgCl}_2$  を含む。In vitro の発光スペクトルは、励起光源を消した状態で、22°C で FP-777W 蛍光分光光度計で測定した。発光強度が低い場合、スペクトルデータを繰り返し (1~5 回) 記録し、積算してノイズを低減させた。

#### 2-3-6. ルシフェラーゼの半定量的 RT-PCR

卵および幼虫、前蛹、成体のオスおよびメスの全身から total RNA を抽出した。cDNA を上記のように合成した。ヒメボタルのリボソームタンパク質 *Lprp49* 遺伝子 (GenBank アクセッション番号 LC159303) の部分配列は、縮重プライマー fireflyrp49-f1 および fireflyrp49-r3 を用いて PCR を行い、増幅した断片をサブクローニングした。*LpLuc1*、*LpLuc2* および *Lprp49* の逆転写 PCR (RT-PCR) は、遺伝子特異的プライマーセットを用いて GoTaq DNA ポリメラーゼ (Promega) を用いて行った。この実験では、*LpLuc1*、*LpLuc2* および *Lprp49* の PCR 条件はプラトー効果が回避されていることを確認している。cDNA の発現レベルは、以前の分析に従って *Lprp49* の PCR 増幅に基づいて標準化された (Oba et al., 2006, 2010, 2013)。プライマー配列および温度条件の詳細は表 2-3 に記載した。

ヘイケボタルの RT-PCR には過去に当研究室で合成された cDNA を用いた。蛹化第 2 日目と 6 日目のメス蛹を、頭部と前胸 (H+T1)、中後胸 (H2+H3) そして発光器を含む腹部 (Abd) の 3 つに分け、それぞれから total RNA を抽出した。

上記と同様に cDNA を合成し、特異的プライマーを用いて *LlLuc1*、*LlLuc2* および *Llrrp49* の PCR を行なった。プライマー配列および温度条件の詳細は表 2-3 に記載した。

#### 2-3-7. アラインメントと分子系統解析

甲虫ルシフェラーゼおよびそのホモログのアミノ酸配列を、BLOSUM62 マトリックスを用いて Geneious alignment tool のデフォルトパラメーターを用いてアラインメントを行った。ベイズ推定には、Protest 2.4 (Abascal et al., 2005) プログラムとベイズ情報量基準 (Bayesian Information Criterion: BIC) に基づいて LG+G モデル (G = 1.03) をベストヒットモデルとして選択した。Geneious の MrBayes 3.2.6 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) プラグインを用いて系統樹を作成した。設定はデフォルトの値を使い、4 つの独立な鎖 (1,100,000 世代の推定を行い、最初の 100,000 世代は破棄した) で推定した系統樹のコンセンサスを採用した。

表 2-3 プライマーリスト

| プライマー名   | 配列 (5' - 3')   | 備考                                       |
|--|--|--|
| <b><i>LpLuc2</i> のクローニング<sup>a, b, c</sup></b> |  |  |
| LH1  | GGWWCHACYGGNYTNCNAA                                  | 甲虫ルシフェラーゼ用縮重プライマー                        |
| LH2  | ACYGGNYTNCNNAARGGNGT                                 | 甲虫ルシフェラーゼ用縮重プライマー                        |
| LH3  | ACYTGRTANCCYTTRTAYTT                                 | 甲虫ルシフェラーゼ用縮重プライマー                        |
| LH4  | TGRTANCCYTTRTAYTTDAT                                 | 甲虫ルシフェラーゼ用縮重プライマー                        |
| LPL2-RACE1                                     | CCAAAAATGGGATCCTTGCAATGG                             | <i>LpLuc2</i> の RACE-PCR 用               |
| LPL2-RACE2                                     | GTGGTGAAACGGAATGACGG                                 | <i>LpLuc2</i> の RACE-PCR 用               |
| LPL2-RACE3                                     | GACAAAGATGGCTGGTTGCG                                 | <i>LpLuc2</i> の RACE-PCR 用               |
| LPL2-RACE4                                     | CAGGCGATCTGGGTTATTACAATG                             | <i>LpLuc2</i> の RACE-PCR 用               |
| AUAP   | GGCCACGCGTCGACTAGTAC                                 | <i>LpLuc2</i> の RACE-PCR 用               |
| Anchor Primer                                  | CTACTACTACTAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGI<br>IGGGIIGGGIIG | <i>LpLuc2</i> の RACE-PCR 用               |
| LpLuc2-5UTR                                    | GAGTTCTAACTCAGACTTTATAC                              | 全長クローニング用                                |
| LpLuc2-3UTR                                    | CTATACATTCGAGTCATGTAAAAAC                            | 全長クローニング用                                |
| <b>タンパク質発現用プラスミド<sup>c</sup></b>               |  |  |
| pCold-ZZ-P-LpLuc1-f                            | CTGCTCGAGATGGAAATGGAAAGGAGG                          | pCold-ZZ-P-LpLuc1 作成用                    |
| pCold-ZZ-P-LpLuc1-r                            | GTCTCTAGATTACATCTTGGCTTGTGG                          | pCold-ZZ-P-LpLuc1 作成用                    |
| pCold-ZZ-P-LpLuc2-f                            | CTGCTCGAGATGAGTGAAAATATTGTTTACGG                     | pCold-ZZ-P-LpLuc2 作成用                    |
| pCold-ZZ-P-LpLuc2-r                            | GTGTCTAGATTATAATTTACTCTTTGGCTTCTG                    | pCold-ZZ-P-LpLuc2 作成用                    |
| <b><i>LpRP49</i> のクローニング<sup>d</sup></b>       |  |  |
| fireflyRP49-f1                                 | RGGWCAATACYTRATGCC                                   | ホタル <i>ribosomal protein 49</i> 用縮重プライマー |
| fireflyRP49-r3                                 | RCGMAGACGTGCATGTCC                                   | ホタル <i>ribosomal protein 49</i> 用縮重プライマー |

# 半定量 RT-PCR <sup>e, f</sup>

|            |                         |                             |
|------------|-------------------------|-----------------------------|
| LpLuc1-sqf | ACATGTCGTTTAGCTGAGGC    | <i>LpLuc1</i> の半定量 RT-PCR 用 |
| LpLuc1-sqr | ACGGATTCCAGTTCAGCAGG    | <i>LpLuc1</i> の半定量 RT-PCR 用 |
| LpLuc2-sqf | ATGAGTGAAAATATTGTTTACG  | <i>LpLuc2</i> の半定量 RT-PCR 用 |
| LpLuc2-sqr | TAATTTACTCTTTGGCTTCTG   | <i>LpLuc2</i> の半定量 RT-PCR 用 |
| LpRP49-sqf | GCCAAATATTGGTTATGGCTCC  | <i>Lprp49</i> の半定量 RT-PCR 用 |
| LpRP49-sqr | CGAATAGAAAGTTGAGCAGCACG | <i>Lprp49</i> の半定量 RT-PCR 用 |

W = A + T, R = A + G, M = A + C, K = T + G, Y = T + C, S = G + C, H = A + C + T, B = G + C + T, V = A + G + C, D = A + G + T, N = A + G + C + T。  
 温度条件は以下の通り。<sup>a</sup>ルシフェラーゼホモログの増幅、95°C (5 min)、{95°C (30 sec)、44°C (1 min)、72°C (1 min)} 35 サイクル、72°C (5 min)。<sup>b</sup>*LpLuc2* の RACE-PCR、95°C (5 min)、{95°C (30 sec)、58°C (1 min)、72°C (2 min)} 30 サイクル、72°C (7 min)。<sup>c</sup>*LpLuc2* の全長クローニング、96°C (2 min)、{98°C (10 sec)、55°C (15 sec)、72°C (30 sec)} 30 サイクル、72°C (5 min)。<sup>d</sup>*Lprp49* の degenerated PCR、95°C (5 min)、{95°C (30 sec)、45°C (30 sec)、72°C (1 min)} 5 サイクル、{95°C (30 sec)、50°C (30 sec)、72°C (1 min)} 10 サイクル、{95°C (30 sec)、55°C (30 sec)、72°C (1 min)} 30 サイクル、72°C (7 min)。<sup>e</sup>*LpLuc1* と *LpLuc2* の半定量 PCR、95°C (5 min)、{95°C (20 sec)、55°C (20 sec)、72°C (2 min)} 27 サイクル、72°C (7 min)。<sup>f</sup>*Lprp49* の半定量 PCR、95°C (5 min)、{95°C (20 sec)、55°C (20 sec)、72°C (40 sec)} 25 サイクル、72°C (7 min)。

## 第3章 ホタル科における2つのルシフェラーゼの普遍性

### 3-1. 背景

ホタルルシフェラーゼ遺伝子は、北アメリカのホタル *Photinus pyralis* の発光器から初めて単離されて以来、ホタル科における全ての亜科から単離されている。ホタル科は、ホタル亜科 (Luciolinae)、マドボタル亜科 (Lampyrinae)、Photurinae 亜科、ミナミボタル亜科 (Ototretinae)、Amydetinae 亜科、クシヒゲボタル亜科 (Psilocladinae) の6亜科からなるが、このオルソログ遺伝子はこれら全ての分類を網羅する25種以上から単離されている。これらのオルソログ遺伝子は *Luc1* と呼ばれ、パラログ遺伝子である *Luc2* (Oba et al., 2013) と区別されている。*Luc2* 遺伝子は、*Photuris pennsylvanica* (Photurinae 亜科) (Ye et al., 1997) およびホタル亜科に属する3種 (ゲンジボタル *Luciola cruciata*、ヘイケボタル *Luciola lateralis* およびヒメボタル *Luciola parvula*、ホタル亜科) から単離されている。

ホタルルシフェラーゼ遺伝子の遺伝子重複はホタル科が多様化する前に起こったことが示唆されているが (Oba et al., 2010)、現存するホタルにおける2つのルシフェラーゼの存在と性質は十分に調べられていない。縮重プライマーを用いたルシフェラーゼおよびルシフェラーゼ様遺伝子のゲノム PCR により、*Luc2* に類似する遺伝子断片が5種のホタルにから見つかった。その5種にはホタル亜科の *Luciola italica* と *Lampyroidea maculata*、Photurinae 亜科の *Photuris congener* と *Photuris* sp.そしてマドボタル亜科の *Lamprohiza splendidula* が挙げられる (Day

et al., 2009)。また、Viviani らにより、マドボタル亜科におけるルシフェラーゼアイソタイプの存在が、*Aspisoma lineatum* においても生化学的に示唆された。*A. lineatum* の幼虫脂肪体から抽出されたルシフェラーゼの発光スペクトルは、発光器から抽出されたルシフェラーゼのスペクトルより約 10 nm 短く、ウェスタンブロットティングにより、脂肪体に局在するアイソフォームの方が発光器に局在するものよりも分子量がわずかに小さいことが示された (Viviani et al., 2008a; Tonolli et al., 2011)。Illumina RNA シークエンシング解析により、タイ王国に生息するホタル亜科の *Luciola aquatilis* における *Luc1* および *Luc2* 遺伝子の両方の存在が示された (Vongsangnak et al., 2016)。しかし、*Pyrocoelia* 属、*Photinus* 属、*Phausis* 属などのマドボタル亜科を用いたトランスクリプトーム解析では、*Luc2* 遺伝子の存在は示されなかった (Martin et al., 2015; Sander & Hall, 2015; Fallon et al., 2016)。したがって、*Luc2* 遺伝子の CDS の単離は、ホタル亜科および Photurinae 亜科の種からのみ報告されている。

*Luc1* と *Luc2* は、発光スペクトルの pH 感受性および発光色の多様性という点で生化学的特徴が異なっている。すなわち、*Luc1* は発光スペクトルの pH 感受性を持ち、酸性条件下で発光スペクトルがより長い波長にシフトする。一方、*Luc2* の発光スペクトルは pH 条件の変化によってシフトしない (pH 非感受性)。*Luc2* のこの性質はコメツキムシ科 (Elateridae) およびフェンゴデス科 (Phengodidae) のルシフェラーゼと類似している。*Luc1* は中性で緑色から黄色までの広範囲の発光色を示すが、既知の *Luc2* は全て緑色の発光色を示す。

*Luc1* および *Luc2* の遺伝子発現パターンはホタル亜科においてのみ調べられている。本論文第 3 章を含め、ホタル亜科を用いた我々のこれまでの研究から、



*Luc1* が幼虫・蛹および成虫の発光器で発現しており、一方で、*Luc2* は卵・前蛹・蛹そしてメ成虫で発現していることが一貫して示された。これらの発現パターンの情報と *in vivo* および *in vitro* の発光スペクトルの一致から、*Luc1* は幼虫・前蛹・蛹および成虫の発光器で発現していて発光器における発光を担っていること、また、*Luc2* は卵・前蛹・蛹で発現しており、発光器によらない薄暗い発光を担っていることが示唆された。非発光器による発光は、マドボタル亜科の *A. lineatum* と *Cratomorphus* sp., *Lampyris noctiluca* においても記録されている。これらの観察は、マドボタル亜科における *Luc2* の存在を示唆している。

本章では、ホタル科において2つのルシフェラーゼの存在と性質の普遍性を探るため、マドボタル亜科に属するヤエヤママドボタル（別名 オオシママドボタル）*Pyrocoelia atripennis* Lewis 1896 を用いた。マドボタル亜科はホタル科における大きなグループである。マドボタル亜科は *Photurinae* 亜科や *Amydetinae* 亜科と近縁であるが、ホタル科における別の大きなグループであるホタル亜科とは遠縁であることが分子系統解析によって示唆されている。沖縄の八重山諸島には、日本固有のヤエヤママドボタルが豊富に分布しており、我々は実験室でこの種の飼育システムを確立することに成功した。これにより、すべての発生ステージにおける生体内の生物発光の観察と遺伝子発現パターンの解析が可能となった。本章では、ヤエヤママドボタルにおける *Luc1* および *Luc2* の単離および性質評価を報告し、マドボタル亜科におけるルシフェラーゼの二重性とその進化について議論する。

## 3-2. 結果と考察

### 3-2-1. ヤエヤママドボタルの生物発光

実験室での飼育条件下で、生活環のすべての発生段階で生物発光が観察された。腹部第 8 節の幼生発光器と腹部第 6、7 節の腹部の成虫発光器から明滅する発光が観察された（図 1）。卵、前蛹、蛹、およびメス成虫では発光器によらない非着色部位において、持続的なぼんやりとした発光が観察された（図 3-1）。

メス成虫の発光器によらない生物発光は、冷却 CCD カメラ（charged coupling device カメラ）（図 3-2）によって検出することができたが、微弱であったためデジタルカメラでの撮影はできなかった。これらの結果は、ヤエヤママドボタルで観察されたメス成虫の非発光器の発光を除いて、ホタル亜科から得られた我々の以前の観察結果と一致する。マドボタル亜科のいくつかの種（*A. lineatum*、*Cratomorphus* および *L. noctiluca*）では幼虫の発光器によらない発光が報告されているが、ヤエヤママドボタルでは肉眼または CCD カメラでは検出されなかった（CCD カメラでの露光時間は 3 時間まで行った）。

すべてのステージおよび部分において観察された発光色は緑色であった（ $\lambda_{\max} = 541 \sim 551 \text{ nm}$ 、図 3-1）。蛹の頭側および尾側の発光スペクトルはほぼ同一であった（図 3-1）。これらの結果は、ステージ間および蛹の部位によって 2 つの異なる発光色を示すヘイケボタルやヒメボタルの観察結果とは対照的である。

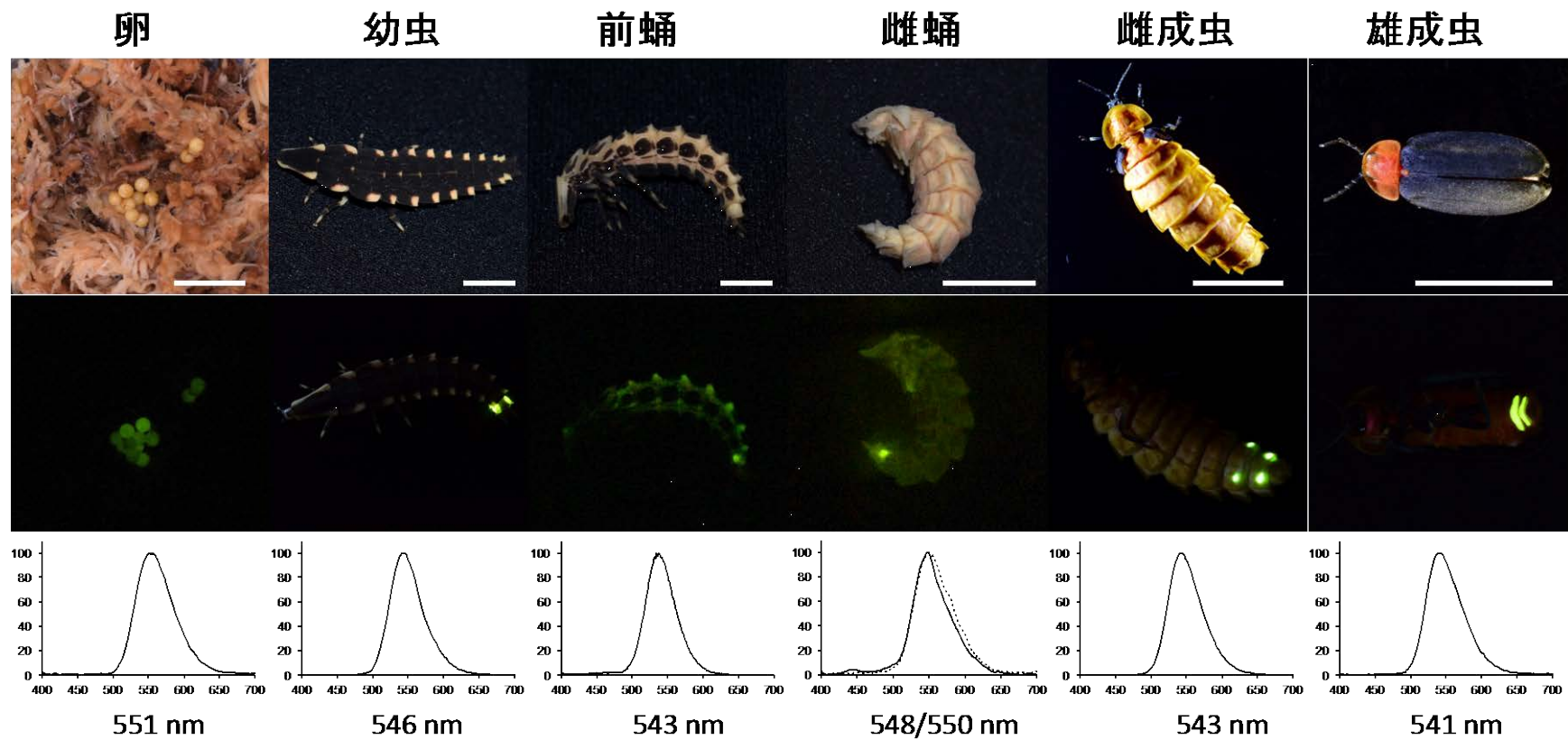


図 3-1 ヤエヤママドボタルの形態と生物発光

蛹の発光スペクトルは、頭側と尾側に分けて測定したが、ほぼ一致した。スケールバーは 10 mm。



図 3-2 メス成虫の発光（CCD カメラで撮影、白黒）  
腹部の体節がはっきりわかり、また、胸部も発光している。

表 3-1 PatLuc1 と PatLuc2 の発光スペクトルの比較

| Luciferase |      | pH 5.9        | pH 7.7      | pH 9.1       |
|------------|------|---------------|-------------|--------------|
| PatLuc1    | 発光強度 | 0.477 (0.19%) | 254 (100%)  | 48.3 (19.0%) |
|            | 最大波長 | 570 nm        | 547 nm      | 545 nm       |
| PatLuc2    | 発光強度 | 3.73 (13.5%)  | 27.6 (100%) | 14.3 (51.9%) |
|            | 最大波長 | 547 nm        | 547 nm      | 550 nm       |

相対発光強度（％）はそれぞれの酵素で中性（pH 7.7）条件下での強度を基準として計算した。

### 3-2-2. 二つのルシフェラーゼと発光スペクトル

RT-PCR 法および RACE 法を用いてヤエヤママドボタルのオス成虫 1 匹からおよび 1 匹のメス成虫から生まれた卵から完全長の CDS を含む 2 つの異なるホタルルシフェラーゼ遺伝子を単離し、それぞれ PatLuc1 および PatLuc2 と命名した。これらの遺伝子は、それぞれ 548 および 545 個のアミノ酸からなるタンパク質をコードし、互いに 57.7% のアミノ酸一致率を示した。大腸菌で発現させた組換えタンパク質を Ni キレートアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製し、続いて ZZ ドメインおよび His タグを除去し、発光スペクトルの測定に使用した。中性条件下で、PatLuc1 および PatLuc2 は同じ緑色光 ( $\lambda_{\text{max}} = 547\text{nm}$ 、表 3-1 および図 3-2) を放出した。両方のルシフェラーゼにおいて発光活性は中性条件下 (pH 7.8) で最も高かった (表 3-1)。酸性条件下では、PatLuc1 の発光スペクトルは長波長側へシフトしたが ( $\lambda_{\text{max}} = 570\text{nm}$ 、図 3-3A)、PatLuc2 のスペクトルはシフトしなかった (図 3-3B)。これは、Luc1 が pH 感受性ルシフェラーゼであり、Luc2 が pH 非感受性ルシフェラーゼであるという以前の知見と一致する。Viviani らは、pH 感受性であるホタルの Luc1 と pH 非感受性であるコメツキムシ科およびフェンゴデス科のルシフェラーゼとの間のアミノ酸配列の比較に基づいて、pH 感受性と pH 非感受性のルシフェラーゼとの間で異なる保存配列を提示した (Viviani et al., 2008b)。しかし、それらのアミノ酸は全て、ホタルの Luc1 と Luc2 との間で保存されていた (図 3-4,3-5B)。また、Koksharov と Ugarova は、R534 は pH 非感受性ルシフェラーゼにおいて特異的に保存されている (図 3-4,3-5C) が、変異導入実験の結果から、この位置の違いは pH 感受性ルシフェラーゼと pH 非感受性ルシフェラーゼとの間の差異ではないと強調した (Koksharov

& Ugarova, 2013)。我々のアライメントは、ゲンジボタルおよびヘイケボタルの pH 非感受性 Luc2 が相同座位で T530 を示したことから、Koksharov らの結論を支持する（図 3-4,3-5A）。我々のアライメント解析から、pH 感受性ルシフェラーゼにおいて保存されている残基は F176 であり、pH 非感受性ルシフェラーゼにおけるものは Y/F30 および Y/F148 であった。

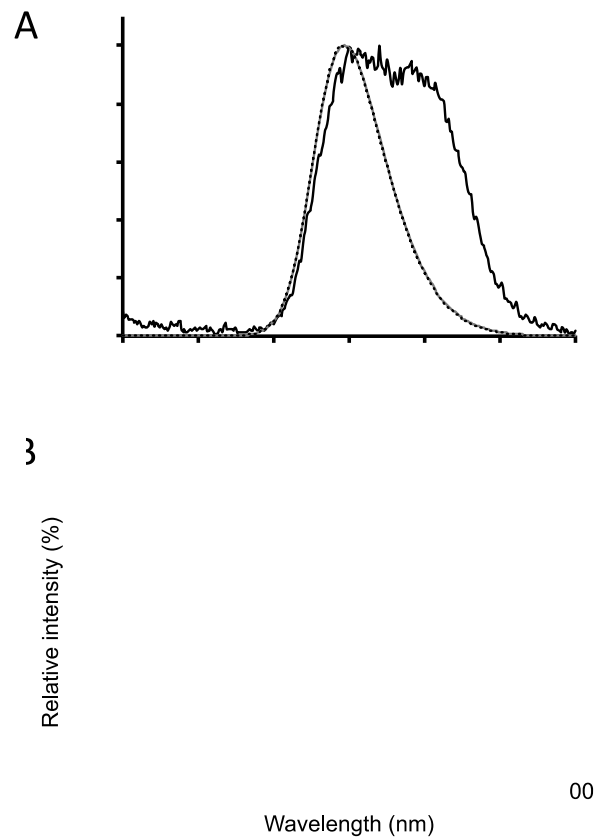


図 3-3 発光スペクトルの比較

PatLuc1 (A) と PatLuc2 (B) の *in vitro* の発光スペクトル。黒線、灰色線、点線はそれぞれ pH 5.9、pH 7.5、pH 9.1 のバッファー中で測定したもの。(C) 黒線、オス成虫発光器から取り出した発光細胞の発光スペクトル。灰色線、幼虫発光器の酵素粗抽出物の発光スペクトル (pH 7.0)。リコンビナント PatLuc1 の発光スペクトル (pH 7.8)。

|   |              |                          |                         |                 |           |                     |                    |          |                    |          |
|---|--------------|--------------------------|-------------------------|-----------------|-----------|---------------------|--------------------|----------|--------------------|----------|
|   | 1            | 10                       | 20                      | 30              | 40        | 50                  | 60                 | 70       | 80                 | 90       |
| Photinus pyralis (BAF48390)               | MEDAKNIKKGPA | YPLEDCIAGEQLHKAMKRYALVPG | IAIIDAHI                | EVNI            | IYAEY     | MSVRLAEAMKRYGLNI    | NHKIVVCS           | ENSLQI   | IMP                |          |
| Cratomorphus distinctus (AAV32457)        | MEEDKNIMYGPA | FSPLEEGTAGEQLHKAMKRYA    | PGTIAFTA                | AHVEVNV         | TYAEYF    | EMACRLAETAMKRYGLGLD | HRAIVACS           | ENLQFFMP |                    |          |
| Photinus pennsylvanicus Pp1 (BAA05006)    | MSIENN       | ILIGPP                   | YVPLEEGTAGEQLHRAISRY    | AAVPGT          | LAVTDVHTE | LEVTYKEFLDV         | TCRAEAMKNYGLGLQHT  | SVCS     | ENLQFFMP           |          |
| Pyrocoelia atripennis PatLuc1             | MEDDSK       | IMHGP                    | PIYPLDCLAGEQLHKAMKRYAGV | PGTIAI          | IDAHLVNI  | IYSEY               | MSRCLAEIMKRYGLCLQH | IAVCS    | ENSLQI             | IMP      |
| Luciola parvula l1 uc1 (BAL46511)         | MEMEKEEN     | VYVGPL                   | FVPIEEGS                | AGILQHKYMOQYAKL | GA        | IAFSKALT            | GVDSI              | SYOEYFNI | TCRLAEAMKNYGLGLQHT | SVCS     |
| Luciola lateralis LLuc1 (BAL46510)        | MCNMEND      | CNIYVGP                  | FVPIECGS                | AGAQLRKYMRYAKL  | GA        | IAFTNALT            | GVDTY              | YACYLK   | SCCLGKALKNYGLVVDGR | IALCS    |
| Luciola cruciata LCuc1 (BAE80731)         | MCNMEND      | CNIYVGP                  | FVPIEECS                | AGTQLRKYMRYAKL  | GA        | IAFTNALT            | GVDTY              | YAEVLK   | SCCLGKALKNYGLVVDGR | IALCS    |
| Drilaster axillaris (BAL40875)            | MNVK         | ENNVYVGP                 | PAS                     | FVYVDP          | GTAG      | GBRLHKLTL           | YVAGL              | PQT      | AFCT               | DAHTEF   |
| Pyrocoelia atripennis PatLuc2             | VEHEN        | ILGPG                    | FVPIAD                  | GTAGEQ          | MDALKE    | YAKIAGC             | IALTGHT            | KENVLY   | EDIFK              | VTCLANSL |
| Photinus pennsylvanicus Pp2 (Q27757)      | VEDKNI       | LYGPE                    | FHPL                    | ADCLAGEQ        | MDALKE    | YAKIAGC             | IALTGHT            | KENVLY   | EDIFK              | VTCLANSL |
| Luciola parvula LpLuc1 (AB812879)         | MSEN         | IYVGP                    | FVYVPLE                 | DTGGEQ          | LYRYIK    | VAKISGC             | IALTAHTE           | KEDVLY   | FSDLLDL            | TLCTAE   |
| Luciola lateralis LLuc1 (BAL46510)        | VLAGL        | I                        | GVGVA                   | PTNFI           | Y         | ITLREL              | VHSLG              | ISKPT    | I                  | VFS      |
| Luciola cruciata LCuc1 (BAE80731)         | VLAGL        | I                        | GVGVA                   | PTNFI           | Y         | ITLREL              | VHSLG              | ISKPT    | I                  | VFS      |
| Drilaster axillaris (BAL40875)            | VLAGL        | I                        | GVGVA                   | PTNFI           | Y         | ITLREL              | VHSLG              | ISKPT    | I                  | VFS      |
| Pyrocoelia atripennis PatLuc2             | VLAGL        | I                        | GVGVA                   | PTNFI           | Y         | ITLREL              | VHSLG              | ISKPT    | I                  | VFS      |
| Photinus pyralis (BAF48390)               | VLAGL        | I                        | GVGVA                   | PTNFI           | Y         | ITLREL              | VHSLG              | ISKPT    | I                  | VFS      |
| Cratomorphus distinctus (AAV32457)        | VLAGL        | I                        | GVGVA                   | PTNFI           | Y         | ITLREL              | VHSLG              | ISKPT    | I                  | VFS      |
| Photinus pennsylvanicus Pp1 (BAA05006)    | VLAGL        | I                        | GVGVA                   | PTNFI           | Y         | ITLREL              | VHSLG              | ISKPT    | I                  | VFS      |
| Pyrocoelia atripennis PatLuc1             | VLAGL        | I                        | GVGVA                   | PTNFI           | Y         | ITLREL              | VHSLG              | ISKPT    | I                  | VFS      |
| Luciola parvula LpLuc1 (BAL46511)         | VLAGL        | I                        | GVGVA                   | PTNFI           | Y         | ITLREL              | VHSLG              | ISKPT    | I                  | VFS      |
| Luciola lateralis LLuc1 (BAL46510)        | VLAGL        | I                        | GVGVA                   | PTNFI           | Y         | ITLREL              | VHSLG              | ISKPT    | I                  | VFS      |
| Luciola cruciata LCuc1 (BAE80731)         | VLAGL        | I                        | GVGVA                   | PTNFI           | Y         | ITLREL              | VHSLG              | ISKPT    | I                  | VFS      |
| Drilaster axillaris (BAL40875)            | VLAGL        | I                        | GVGVA                   | PTNFI           | Y         | ITLREL              | VHSLG              | ISKPT    | I                  | VFS      |
| Pyrocoelia atripennis PatLuc2             | VLAGL        | I                        | GVGVA                   | PTNFI           | Y         | ITLREL              | VHSLG              | ISKPT    | I                  | VFS      |
| Photinus pennsylvanicus Pp2 (Q27757)      | VLAGL        | I                        | GVGVA                   | PTNFI           | Y         | ITLREL              | VHSLG              | ISKPT    | I                  | VFS      |
| Luciola parvula LpLuc2 (AB812879)         | VLAGL        | I                        | GVGVA                   | PTNFI           | Y         | ITLREL              | VHSLG              | ISKPT    | I                  | VFS      |
| Luciola cruciata LCuc1 (BAE80731)         | VLAGL        | I                        | GVGVA                   | PTNFI           | Y         | ITLREL              | VHSLG              | ISKPT    | I                  | VFS      |
| Luciola lateralis LLuc2 (BAL75586)        | VLAGL        | I                        | GVGVA                   | PTNFI           | Y         | ITLREL              | VHSLG              | ISKPT    | I                  | VFS      |
| Rhagophthalmus ohbai (BAF34360)           | VLAGL        | I                        | GVGVA                   | PTNFI           | Y         | ITLREL              | VHSLG              | ISKPT    | I                  | VFS      |
| Rhagophthalmus plagiophthalmus (AF543413) | VLAGL        | I                        | GVGVA                   | PTNFI           | Y         | ITLREL              | VHSLG              | ISKPT    | I                  | VFS      |
| Photinus pyralis (BAF48390)               | FDRDK        | IALIVN                   | SSGS                    | IGL             | PKCV      | ALPHRIAC            | VNF                | SHARD    | PI                 | GNQI     |
| Cratomorphus distinctus (AAV32457)        | FDRDK        | IALIVN                   | SSGS                    | IGL             | PKCV      | ALPHRIAC            | VNF                | SHARD    | PI                 | GNQI     |
| Photinus pennsylvanicus Pp1 (BAA05006)    | FDRDK        | IALIVN                   | SSGS                    | IGL             | PKCV      | ALPHRIAC            | VNF                | SHARD    | PI                 | GNQI     |
| Pyrocoelia atripennis PatLuc1             | FDRDK        | IALIVN                   | SSGS                    | IGL             | PKCV      | ALPHRIAC            | VNF                | SHARD    | PI                 | GNQI     |
| Luciola parvula LpLuc1 (BAL46511)         | FDRDK        | IALIVN                   | SSGS                    | IGL             | PKCV      | ALPHRIAC            | VNF                | SHARD    | PI                 | GNQI     |
| Luciola lateralis LLuc1 (BAL46510)        | FDRDK        | IALIVN                   | SSGS                    | IGL             | PKCV      | ALPHRIAC            | VNF                | SHARD    | PI                 | GNQI     |
| Luciola cruciata LCuc1 (BAE80731)         | FDRDK        | IALIVN                   | SSGS                    | IGL             | PKCV      | ALPHRIAC            | VNF                | SHARD    | PI                 | GNQI     |
| Drilaster axillaris (BAL40875)            | FDRDK        | IALIVN                   | SSGS                    | IGL             | PKCV      | ALPHRIAC            | VNF                | SHARD    | PI                 | GNQI     |
| Pyrocoelia atripennis PatLuc2             | FDRDK        | IALIVN                   | SSGS                    | IGL             | PKCV      | ALPHRIAC            | VNF                | SHARD    | PI                 | GNQI     |
| Photinus pennsylvanicus Pp2 (Q27757)      | FDRDK        | IALIVN                   | SSGS                    | IGL             | PKCV      | ALPHRIAC            | VNF                | SHARD    | PI                 | GNQI     |
| Luciola parvula LpLuc2 (AB812879)         | FDRDK        | IALIVN                   | SSGS                    | IGL             | PKCV      | ALPHRIAC            | VNF                | SHARD    | PI                 | GNQI     |
| Luciola lateralis LLuc2 (BAL75586)        | FDRDK        | IALIVN                   | SSGS                    | IGL             | PKCV      | ALPHRIAC            | VNF                | SHARD    | PI                 | GNQI     |
| Rhagophthalmus ohbai (BAF34360)           | FDRDK        | IALIVN                   | SSGS                    | IGL             | PKCV      | ALPHRIAC            | VNF                | SHARD    | PI                 | GNQI     |
| Rhagophthalmus plagiophthalmus (AF543413) | FDRDK        | IALIVN                   | SSGS                    | IGL             | PKCV      | ALPHRIAC            | VNF                | SHARD    | PI                 | GNQI     |
| Photinus pyralis (BAF48390)               | DYKIQ        | SAL                      | I                       | VPTI            | FS        | FAKSTI              | IDK                | VDI      | S                  | VI       |
| Cratomorphus distinctus (AAV32457)        | DYKIQ        | SAL                      | I                       | VPTI            | FS        | FAKSTI              | IDK                | VDI      | S                  | VI       |
| Photinus pennsylvanicus Pp1 (BAA05006)    | DYKIQ        | SAL                      | I                       | VPTI            | FS        | FAKSTI              | IDK                | VDI      | S                  | VI       |
| Pyrocoelia atripennis PatLuc1             | DYKIQ        | SAL                      | I                       | VPTI            | FS        | FAKSTI              | IDK                | VDI      | S                  | VI       |
| Luciola parvula LpLuc1 (BAL46511)         | DYKIQ        | SAL                      | I                       | VPTI            | FS        | FAKSTI              | IDK                | VDI      | S                  | VI       |
| Luciola lateralis LLuc1 (BAL46510)        | DYKIQ        | SAL                      | I                       | VPTI            | FS        | FAKSTI              | IDK                | VDI      | S                  | VI       |
| Luciola cruciata LCuc1 (BAE80731)         | DYKIQ        | SAL                      | I                       | VPTI            | FS        | FAKSTI              | IDK                | VDI      | S                  | VI       |
| Drilaster axillaris (BAL40875)            | DYKIQ        | SAL                      | I                       | VPTI            | FS        | FAKSTI              | IDK                | VDI      | S                  | VI       |
| Pyrocoelia atripennis PatLuc2             | DYKIQ        | SAL                      | I                       | VPTI            | FS        | FAKSTI              | IDK                | VDI      | S                  | VI       |
| Photinus pennsylvanicus Pp2 (Q27757)      | DYKIQ        | SAL                      | I                       | VPTI            | FS        | FAKSTI              | IDK                | VDI      | S                  | VI       |
| Luciola parvula LpLuc2 (AB812879)         | DYKIQ        | SAL                      | I                       | VPTI            | FS        | FAKSTI              | IDK                | VDI      | S                  | VI       |
| Luciola lateralis LLuc2 (BAL75586)        | DYKIQ        | SAL                      | I                       | VPTI            | FS        | FAKSTI              | IDK                | VDI      | S                  | VI       |
| Rhagophthalmus ohbai (BAF34360)           | DYKIQ        | SAL                      | I                       | VPTI            | FS        | FAKSTI              | IDK                | VDI      | S                  | VI       |
| Rhagophthalmus plagiophthalmus (AF543413) | DYKIQ        | SAL                      | I                       | VPTI            | FS        | FAKSTI              | IDK                | VDI      | S                  | VI       |
| Photinus pyralis (BAF48390)               | VVDL         | DTG                      | KT                      | LG              | NV        | RG                  | EL                 | CV       | RG                 | PM       |
| Cratomorphus distinctus (AAV32457)        | VVDL         | DTG                      | KT                      | LG              | NV        | RG                  | EL                 | CV       | RG                 | PM       |
| Photinus pennsylvanicus Pp1 (BAA05006)    | VVDL         | DTG                      | KT                      | LG              | NV        | RG                  | EL                 | CV       | RG                 | PM       |
| Pyrocoelia atripennis PatLuc1             | VVDL         | DTG                      | KT                      | LG              | NV        | RG                  | EL                 | CV       | RG                 | PM       |
| Luciola parvula LpLuc1 (BAL46511)         | VVDL         | DTG                      | KT                      | LG              | NV        | RG                  | EL                 | CV       | RG                 | PM       |
| Luciola lateralis LLuc1 (BAL46510)        | VVDL         | DTG                      | KT                      | LG              | NV        | RG                  | EL                 | CV       | RG                 | PM       |
| Luciola cruciata LCuc1 (BAE80731)         | VVDL         | DTG                      | KT                      | LG              | NV        | RG                  | EL                 | CV       | RG                 | PM       |
| Drilaster axillaris (BAL40875)            | VVDL         | DTG                      | KT                      | LG              | NV        | RG                  | EL                 | CV       | RG                 | PM       |
| Pyrocoelia atripennis PatLuc2             | VVDL         | DTG                      | KT                      | LG              | NV        | RG                  | EL                 | CV       | RG                 | PM       |
| Photinus pennsylvanicus Pp2 (Q27757)      | VVDL         | DTG                      | KT                      | LG              | NV        | RG                  | EL                 | CV       | RG                 | PM       |
| Luciola parvula LpLuc2 (AB812879)         | VVDL         | DTG                      | KT                      | LG              | NV        | RG                  | EL                 | CV       | RG                 | PM       |
| Luciola lateralis LLuc2 (BAL75586)        | VVDL         | DTG                      | KT                      | LG              | NV        | RG                  | EL                 | CV       | RG                 | PM       |
| Rhagophthalmus ohbai (BAF34360)           | VVDL         | DTG                      | KT                      | LG              | NV        | RG                  | EL                 | CV       | RG                 | PM       |
| Rhagophthalmus plagiophthalmus (AF543413) | VVDL         | DTG                      | KT                      | LG              | NV        | RG                  | EL                 | CV       | RG                 | PM       |
| Photinus pyralis (BAF48390)               | AGVAG        | L                        | PDD                     | AG              | L         | PA                  | AV                 | VV       | L                  | E        |
| Cratomorphus distinctus (AAV32457)        | AGVAG        | L                        | PDD                     | AG              | L         | PA                  | AV                 | VV       | L                  | E        |
| Photinus pennsylvanicus Pp1 (BAA05006)    | AGVAG        | L                        | PDD                     | AG              | L         | PA                  | AV                 | VV       | L                  | E        |
| Pyrocoelia atripennis PatLuc1             | AGVAG        | L                        | PDD                     | AG              | L         | PA                  | AV                 | VV       | L                  | E        |
| Luciola parvula LpLuc1 (BAL46511)         | AGVAG        | L                        | PDD                     | AG              | L         | PA                  | AV                 | VV       | L                  | E        |
| Luciola lateralis LLuc1 (BAL46510)        | AGVAG        | L                        | PDD                     | AG              | L         | PA                  | AV                 | VV       | L                  | E        |
| Luciola cruciata LCuc1 (BAE80731)         | AGVAG        | L                        | PDD                     | AG              | L         | PA                  | AV                 | VV       | L                  | E        |
| Drilaster axillaris (BAL40875)            | AGVAG        | L                        | PDD                     | AG              | L         | PA                  | AV                 | VV       | L                  | E        |
| Pyrocoelia atripennis PatLuc2             | AGVAG        | L                        | PDD                     | AG              | L         | PA                  | AV                 | VV       | L                  | E        |
| Photinus pennsylvanicus Pp2 (Q27757)      | AGVAG        | L                        | PDD                     | AG              | L         | PA                  | AV                 | VV       | L                  | E        |
| Luciola parvula LpLuc2 (AB812879)         | AGVAG        | L                        | PDD                     | AG              | L         | PA                  | AV                 | VV       | L                  | E        |
| Luciola lateralis LLuc2 (BAL75586)        | AGVAG        | L                        | PDD                     | AG              | L         | PA                  | AV                 | VV       | L                  | E        |
| Rhagophthalmus ohbai (BAF34360)           | AGVAG        | L                        | PDD                     | AG              | L         | PA                  | AV                 | VV       | L                  | E        |
| Rhagophthalmus plagiophthalmus (AF543413) | AGVAG        | L                        | PDD                     | AG              | L         | PA                  | AV                 | VV       | L                  | E        |

図 3-4 甲虫ルシフェラーゼにおける全長アミノ酸配列アラインメント

本論文で配列を決定したヒメボタルとヤエヤママドボタルの Luc1 および Luc2 を含めたアラインメントを示した。上段が Luc1 (pH 感受性)、中段が Luc2 (pH 非感受性)、下段がフェンゴデス科およびコメツキムシ科のルシフェラーゼ (pH 非感受性)。本文中で議論したアミノ酸座位について灰色でハイライトしている。



| Luciferase | Accession No. | A |   |   | B |   |   |   |   |   |   |   |   |   | C |   | Position                  |                |
|------------|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---------------------------|----------------|
|            |               | 1 | 1 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 4 | 5 | 3 | 6 |                           |                |
|            |               | 0 | 8 | 6 | 3 | 0 | 0 | 2 | 4 | 1 | 8 | 5 | 4 |   |   |   |                           |                |
| PpyLuc     | BAF48390      | H | I | P | N | A | G | C | F | L | G | F | S | A |   |   | Lampyridae<br>Luc1        | pH-sensitive   |
| PatLuc1    |               | H | V | P | N | A | G | C | F | L | G | F | S | S |   |   |                           |                |
| CdLuc      | AAV32457      | H | V | P | N | A | G | C | F | L | G | F | S | S |   |   |                           |                |
| Ppe1       | BAA05006      | H | I | P | N | T | A | C | F | L | S | F | S | T |   |   |                           |                |
| LcLuc1     | BAE80731      | R | T | P | N | A | G | C | F | L | G | F | S | G |   |   |                           |                |
| LlLuc1     | BAL46510      | R | A | P | N | A | G | C | F | L | G | F | S | G |   |   |                           |                |
| DaLuc1     | BAL40875      | H | V | P | N | A | G | C | F | L | G | F | S | S |   |   | Lampyridae<br>Luc2        | pH-insensitive |
| PatLuc2    |               | Y | Y | D | N | P | S | C | F | L | S | F | S | R |   |   |                           |                |
| Ppe2       | Q27757        | F | Y | D | N | A | G | C | F | L | G | F | S | R |   |   |                           |                |
| LcLuc2     | BAJ83485      | Y | Y | D | N | A | G | C | F | L | G | F | S | T |   |   |                           |                |
| LlLuc2     | BAM76586      | Y | F | D | N | A | G | C | F | L | G | F | S | T |   |   | Phengodidae<br>Elateridae |                |
| RohLuc     | BAM76586      | Y | F | E | T | S | A | V | L | I | A | L | E | R |   |   |                           |                |
| PplaLuc    | AF543413      | F | F | D | T | T | A | V | L | I | A | L | E | R |   |   |                           |                |

図 3-5 pH 感受性-非感受性ルシフェラーゼの間で注目すべきアミノ酸座位  
 図 3-4 から抜粋。(A) pH 感受性と非感受性ルシフェラーゼの間で異なって保存されているアミノ酸座位。(B) Viviani らが提示した pH 感受性に重要なアミノ酸座位。(C) Ugarova らが pH 非感受性ルシフェラーゼにのみ保存されていると記述したアミノ酸座位。Position 番号は図 3-4 に従い LcLuc1 と LlLuc1 の最初の M を基準にした。

### 3-2-3. ルシフェラーゼ遺伝子の時空間的発現変動

*PatLuc1* および *PatLuc2* の遺伝子発現レベルをすべての発生段階で半定量的 RT-PCR 法により比較した。ハウスキーピング遺伝子であるリボソームタンパク質 49 (rp49) を定量化の内部標準に使用した。結果は、*PatLuc1* は発光器をもつ幼虫、前蛹、蛹および成虫で発現しており (図 3-6A)、*PatLuc2* は卵、前蛹、雌雄の蛹そしてメス成虫で発現していた (図 3-6A)。

遺伝子発現パターンの空間的分布を蛹の雌雄でさらに調べた。結果は、*PatLuc1* が、雌雄の蛹において発光器を含む部分で主に発現していることを示した (図 3-6B-D)。オス蛹の発光器を含まない腹部において *PatLuc1* の発現がわずかに検出されたが (図 3-6B)、これはおそらく解剖の際に腹腔組織中の発光細胞の破片がコンタミネーションしてしまったことが原因だと考えられる。*PatLuc1* がメス

蛹の胸部にわずかに発現していたことは特筆すべきである（図 3-6C）。これは、ヒメボタルのメスの蛹初期において胸部に、Luc1 に起因すると考えられる黄色の発光を示したという観察（2-2-6）と矛盾しない。

メス成虫では、PatLuc2 は発光器を含まない他の全身及び卵巣で発現していた（図 3-6D）。この結果は、CCD カメラによって検出された、メス成虫の胸部を含んだ全身の発光の観察結果と一貫している（図 3-2）。ファーブルは彼の著書『ファーブル昆虫記（Souvenirs Entomologiques）』において、*L. noctiluca*（マドボタル亜科）のメス成虫の全身発光について、卵巣からの発光が透けて見えていると述べていた（Fabre, 1907）。我々の発見は、彼の観察を分子生物学的メカニズムから補足している。つまり、メス成虫の発光器によらない発光は、卵巣だけでなく他の部分においても Luc2 の発現によって引き起こされることを示唆している。

リコンビナント PatLuc1 の *in vitro* の発光スペクトル（ $\lambda_{\text{max}} = 547 \text{ nm}$ 、中性条件下、図 3-3）は、生体の発光器からの発光スペクトルとはわずかに異なっていた。オス成虫の発光器からの発光スペクトルは 541 nm にピークを有していた（図 3-1）。しかし、解剖によりクチクラおよび脂肪体を取り除いた光胞細胞の発光スペクトル、および幼虫の発光器から抽出された天然のルシフェラーゼを含む酵素粗抽出物から得られた発光スペクトルは、リコンビナント PatLuc1 のものとよく一致している（図 3-3C）。この酵素粗抽出物の発光スペクトルは pH 感受性を示し、これは PatLuc1 が発光器で使用されていることを示唆している。これらの結果に基づいて、発光器からの生物発光は Luc1 によって生み出されると考えられるが、生物発光スペクトルはいくつかの要因によってシフトする可能性がある。

る。発光組織に隣接するクチクラの吸光度は、290nm にピークをもつが、400-700nm では吸収を持たなかった。これは、発光に対するフィルター効果が起こりにくいことを示している。

PatLuc1 および PatLuc2 の遺伝子発現パターンはホタル亜科の Luc1 および Luc2 のものと類似していた。Luc1 は幼虫、蛹、成虫の発光器で発現し、Luc2 は卵、前蛹、蛹などの動かないステージで発現していた。メス成虫の発光器でない部分での PatLuc2 の発現は例外的と思われるが、マドボタルのメス成虫が羽のない太った腹部を有し、「運動性が低い」という事実を考慮すると合理的である。まとめると、これらの知見は、Luc1 および Luc2 の両方の機能的役割が Lampyridae において基本的に保存され得ることを示唆する。

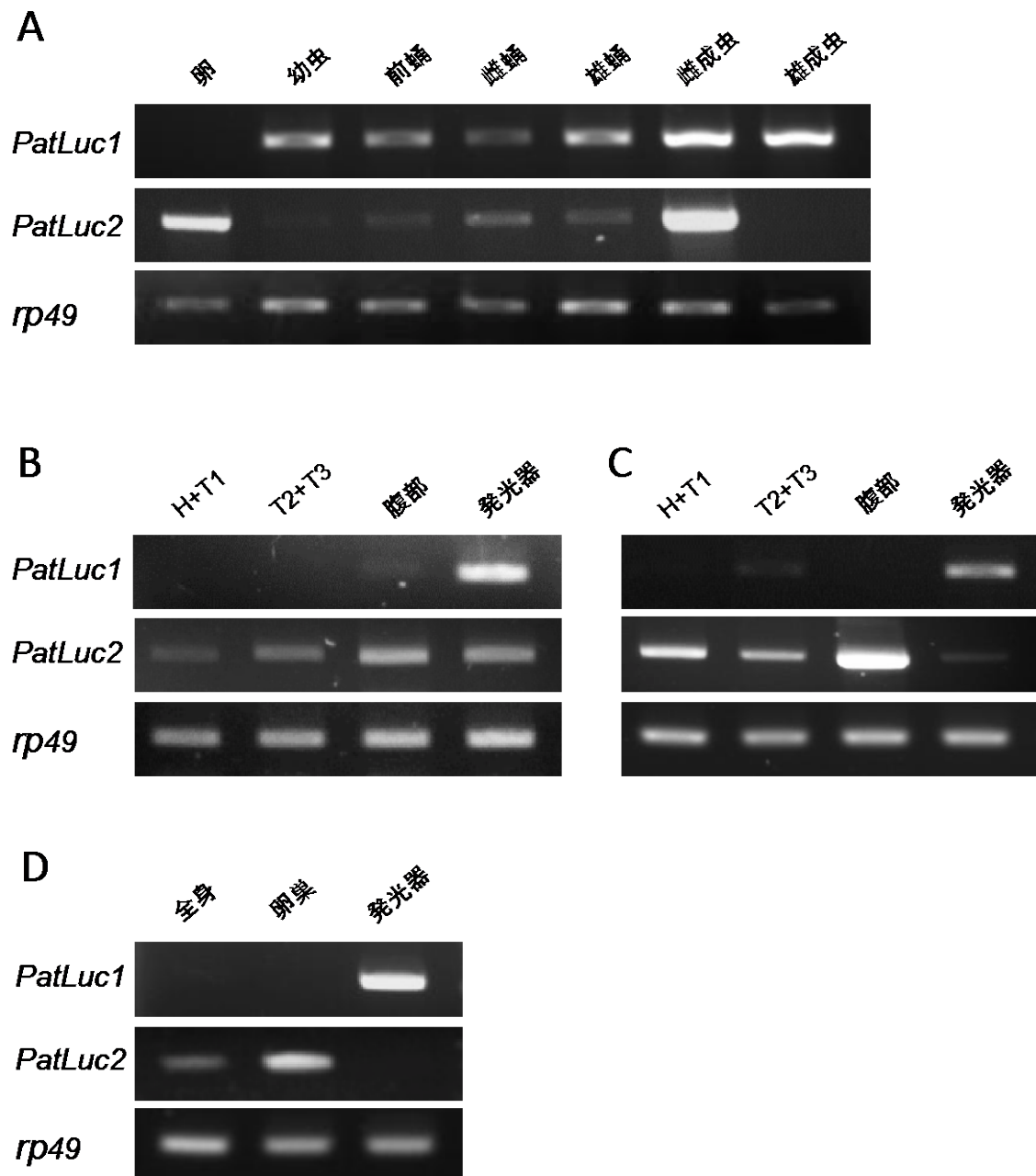


図 3-6 異なる発生ステージ (A) およびオス蛹 (B)、メス性蛹 (C)、メス成虫 (D) の異なる部位間での遺伝子発現量の比較  
 蛹や雌成虫の腹部は発光器を含まない。雌成虫の「全身」は、卵巣と発光器を覗いたものである。リボソームタンパク質の遺伝子 *rp49* を内部標準として用いた。

#### 3-2-4. PatLuc1 と PatLuc2 の系統的位置付け

甲虫ルシフェラーゼとそれらの相同なタンパク質のアミノ酸配列に基づいて系統樹を作成し、PatLuc1 と PatLuc2 の進化を推測した (図 3-7)。解析結果は、PatLuc1 がマドボタルの他のルシフェラーゼに姉妹クレードとして配置され、*Phausis reticulata* 以外のマドボタル亜科の Luc1 との単系統性を示した (図 3-7)。PatLuc2 は Ppe2 ともつとも近縁であり、ホタル亜科の Luc2 と単系統性を示した。マドボタル亜科と Photurinae 亜科は近縁であるらしいので、PatLuc2 と Ppe2 の近縁な関係は合理的であると思われる。これらの結果は、PatLuc1 および PatLuc2 が、それぞれ Luc1 および Luc2 のグループであることを示唆している。

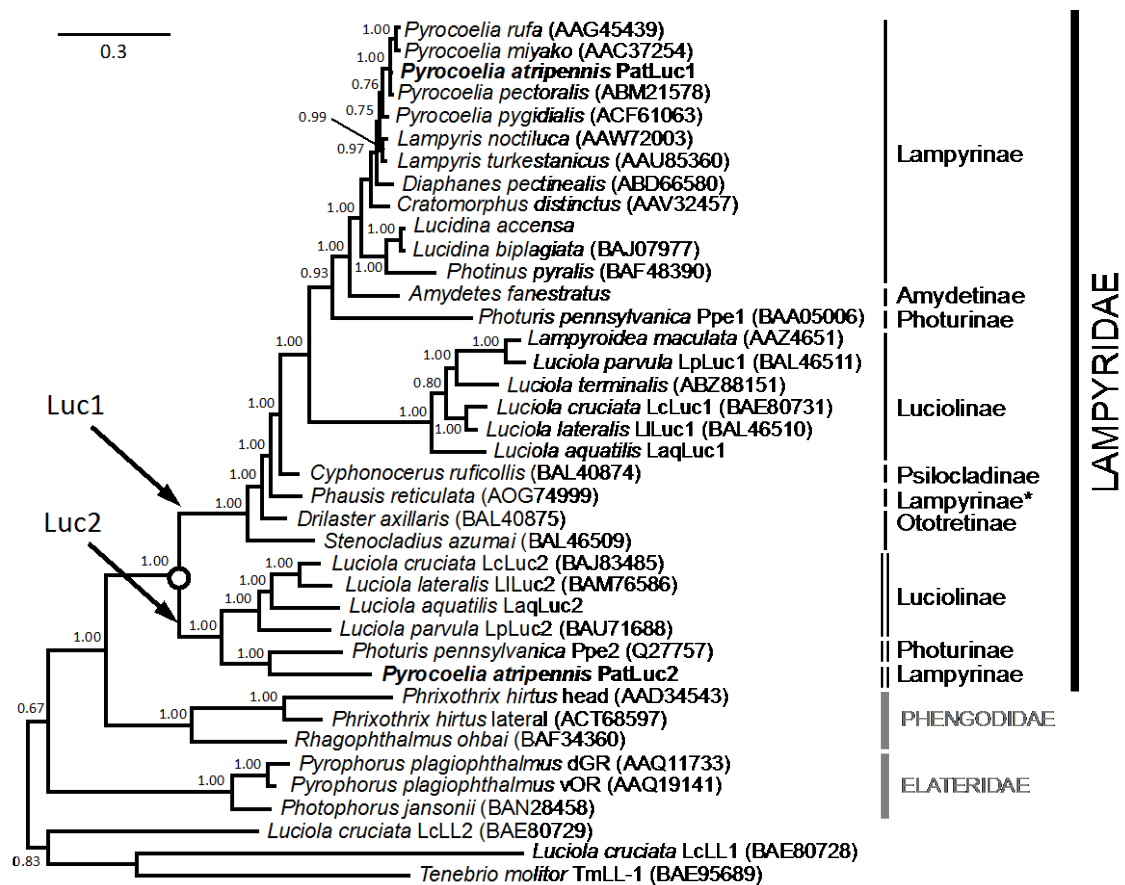


図 3-7 甲虫ルシフェラーゼの分子系統樹

*L. accensa* 由来のルシフェラーゼのアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列 (GenBank 登録番号、HV958882) から推定した。*A. fanestratus* (*A. vivianii*) および *L. aquatilis* 由来のルシフェラーゼのアミノ酸配列は Viviani et al., 2011 および Vongsangnak et al., 2016 から得た。GenBank に登録されているアクセッション番号はカッコ内に示した。白抜きの丸印の点で、ホタル科の共通祖先のルシフェラーゼが遺伝子重複を起こし、*Luc1* と *Luc2* に分岐した。

### 3-3. 材料および実験方法

#### 3-3-1. 材料の採取地と飼育方法

ヤエヤママドボタルの幼虫は、2015 年の 1 年間を通して、沖縄県八重山諸島の黒島、小浜島、西表島の森林にて手で採取した（表 3-2）。生体は湿らせた紙とミズゴケを入れたプラスチック容器に入れ、室温で飼育した（15-33℃）。冬期は 25℃に設定したヒーターを設置した。幼虫には淡水性巻貝のサカマキガイ *Physa acuta* およびインドヒラマキガイ *Indoplanorbis exustus* また、カタツムリを与えた。幼虫や蛹には湿度を保つことが重要だが、カビによる致死的な感染を避けるために、十分な換気を行った。成虫の雌雄を同じ容器に入れ、交尾後、産卵された卵は濡れた紙の上で静置した。

表 3-2 サンプル情報

| ステージ | 性別 | 部位             | 産地               | 齢         | 抽出日          | total RNA<br>(ng/uL) |
|------|----|----------------|------------------|-----------|--------------|----------------------|
| 成虫   | オス | 全身             | 西表               | –         | 2015. 10. 22 | 623. 51              |
|      | メス | 全身             | 黒島               | 成虫 2 日目   | 2016. 1. 28  | 1727. 19             |
|      |    | 体<br>卵巣<br>発光器 | (1) 西表<br>(2) 黒島 | 成虫 5 日目   | 2016. 1. 28  | 1523. 07             |
| 蛹    | オス | 全身             | 黒島               | 蛹 7 日目    | 2016. 1. 18  | 544. 27              |
|      |    | 頭部             |                  |           |              | 366. 94              |
|      |    | 胸部             | 黒島               | 蛹 7 日目    | 2016. 1. 29  | 495. 67              |
|      |    | 腹部             |                  |           |              | 590. 39              |
|      |    | 発光器            |                  |           |              | 354. 99              |
|      | メス | 全身             | 小浜               | 蛹 4 日目    | 2015. 10. 22 | 2912. 61             |
|      |    | 頭部             |                  |           |              | 412. 45              |
|      |    | 胸部             | 黒島               | 蛹 4 日目    | 2016. 1. 29  | 359. 52              |
|      |    | 腹部             |                  |           |              | 595. 18              |
|      |    | 発光器            |                  |           |              | 211. 63              |
| 前蛹   | メス | 全身             | 黒島               | 前蛹 4～5 日目 | 2016. 1. 22  | 1200. 27             |
| 幼虫   |    | 全身             | 黒島               | ~2.5 cm   | 2016. 1. 22  | 513. 91              |
| 無精卵  |    | 6 個            | 西表               | –         | 2015. 4. 8   | 121. 4               |

### 3-3-2. 生物発光の撮影方法

デジタルカメラ Nikon D5300 を使用して、各発生ステージおよびその生物発光を撮影した。

### 3-3-3. 遺伝子のクローニング



TRIzol を用いて、オス成虫および卵から total RNA を抽出し、SuperScript III を用いて cDNA を合成した。*Luc1* 遺伝子のクローニングは、既知の *Pyrocoelia* 属のルシフェラーゼ配列から設計した特異的プライマーPyrocoeliaLuc1-f1 および PyrocoeliaLuc1-r3 を、GoTaq ポリメラーゼを用いて逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) に使用した。RT-PCR 産物を、プライマーPyrocoeliaLuc1-f1 および PyrocoeliaLuc1-r4 を用いた nested PCR の鋳型として用いた。生成物を pGEM-T-Easy ベクターを用いてサブクローニングし、配列決定をした。*Luc2* 遺伝子のクローニングは、縮重プライマーLH1 および LH3 (Oba et al., 2006) を用いて PCR を行い、縮重プライマーLH2 および LH4 を用いた degenerated PCR の鋳型として使用した。さらに、生成物を縮重プライマーLH2 および LucUdig3 を用いた nested PCR のための鋳型として使用した。反応生成物を pGEM-T-Easy ベクターを用いてサブクローニングし、*AluI* 制限酵素による消化断片パターンからスクリーニングした。*Luc1* および *Luc2* 遺伝子の全長 ORF をクローニングするために、cDNA 末端の 5'および 3' RACE 法を、Smart RACE cDNA 増幅キットを用いて、内部部分配列に基づいて設計された遺伝子特異的プライマーを用いて行った。RACE 法産物の配列から設計した遺伝子特異的プライマーを用いて *Luc1* および *Luc2* 遺伝子の全長 ORF を含む配列を、PrimeSTAR Max DNA ポリメラーゼを用いて増幅した。BigDye terminator kit および ABI Prism 3130 genetic analyzerを用いて塩基配列を決定した。これらの遺伝子を *PatLuc1* および *PatLuc2* と名付け、また GenBank アクセッション番号はそれぞれ LC198320 および LC198321 である。Geneious v9.1.2 を用いて分子量および等電点 (pI) を計算した。抽出に用いたサンプルの情報を表 3-2 にまとめる。プライマー配列および

PCR の温度条件の詳細は表 3-3 示す。

ヤエヤママドボタルのリボソームタンパク質 *Patrp49* 遺伝子 (GenBank アクセス番号、LC198322) の部分配列は以下のように決定した。既知ホタル *rp49* 遺伝子の配列から設計した縮重プライマー *fireflyrp49-f1* および *fireflyrp49-r3* を用いて PCR を行い、増幅断片をサブクローニングし、上記と同様に配列を決定した。プライマー配列および PCR の温度条件の詳細は表 2-3 示す。

表 3-3 プライマーリスト

| プライマー名  | 配列 (5' - 3')                        | 備考                           |
|---|-------------------------------------|------------------------------|
| <b><i>PatLuc1</i> のクローニング<sup>a, b, c</sup></b> |                                     |                              |
| PyrocoeliaLuc1-f1                               | GGTTCAGGGACAATTGC                   | マドボタル属 Luc1 用プライマー           |
| PyrocoeliaLuc1-r3                               | TGCAGGAAGTTCACCGGC                  | マドボタル属 Luc1 用プライマー           |
| PyrocoeliaLuc1-r4                               | TTCTAATTCGGCAGGCGG                  | マドボタル属 Luc1 用プライマー           |
| PatLuc1-5RACE1                                  | GTAACCAAGTCCGTACCTC                 | <i>PatLuc1</i> の RACE-PCR 用  |
| PatLuc1-5RACE2                                  | ATAGTGCACCGCATACAGGC                | <i>PatLuc1</i> の RACE-PCR 用  |
| PatLuc1-3RACE3                                  | CCCAGAAGCAACAAATGC                  | <i>PatLuc1</i> の RACE-PCR 用  |
| PatLuc1-3RACE4                                  | GATGGATGGTTACACTCTGG                | <i>PatLuc1</i> の RACE-PCR 用  |
| PatLuc1-5f                                      | CTGGTTCCTGAGACACTAACGC              | 全長クローニング用                    |
| PatLuc1-3r                                      | GTGCACATCCCATTGTTAGC                | 全長クローニング用                    |
| <b><i>PatLuc2</i> のクローニング<sup>b, c, d</sup></b> |                                     |                              |
| LucUdig-r3                                      | TCWGT HARWCCRTANCCYTG               | Luc2 用縮重プライマー                |
| PatrLuc2-5RACE1                                 | GACACCTTTAGGCAGACC                  | <i>PatLuc2</i> の RACE-PCR 用  |
| PatrLuc2-5RACE2                                 | GGTGTGGTGGGATTGATTTG                | <i>PatLuc2</i> の RACE-PCR 用  |
| PatrLuc2-3RACE3                                 | GCTAGTTCGGACCGCTAATG                | <i>PatLuc2</i> の RACE-PCR 用  |
| PatrLuc2-3RACE4                                 | GAGATAGCATCAGGTGGAGC                | <i>PatLuc2</i> の RACE-PCR 用  |
| Patr-5f   | CGTGTGCAATTCGAGTGAAC                | 全長クローニング用                    |
| Part-3r   | CTGAAATATTCAAATGTCACTAATA           | 全長クローニング用                    |
| <b>タンパク質発現プラスミド<sup>e</sup></b>                 |                                     |                              |
| pCZP-PatLuc1-f                                  | CAGGGGCCGAATTCGAATGGAAGATGATAGTAA   | pCold-ZZ-P-PatLuc1 作成用       |
| pCZP-PatLuc1-r                                  | ACCTATCTAGACTGCAATTACAATTTGGATTTTGG | pCold-ZZ-P-PatLuc1 作成用       |
| Patr2-XhoI                                      | GGACTCGAGATGGAACACGAA               | pCold-ZZ-P-PatLuc2 作成用       |
| Patr2-XbaI                                      | GGGTCTAGAGTACACATTAATAAG            | pCold-ZZ-P-PatLuc2 作成用       |
| <b>半定量 RT-PCR<sup>f, g, h</sup></b>             |                                     |                              |
| PatLuc1-3RACE3                                  | CCCAGAAGCAACAAATGC                  | <i>PatLuc1</i> の半定量 RT-PCR 用 |
| PatLuc1-3r                                      | GTGCACATCCCATTGTTAGC                | <i>PatLuc1</i> の半定量 RT-PCR 用 |
| Patr-5f   | CGTGTGCAATTCGAGTGAAC                | <i>PatLuc2</i> の半定量 RT-PCR 用 |
| Patr-3r   | CTGAAATATTCAAATGTCACTAATA           | <i>PatLuc2</i> の半定量 RT-PCR 用 |
| PatRP49-f1                                      | ATGCCCAACATTGGTTACGG                | <i>Patrp49</i> の半定量 RT-PCR 用 |
| PatRP49-r1                                      | CGAATGGAAAGTTGGGCAGC                | <i>Patrp49</i> の半定量 RT-PCR 用 |

|            |                       |                              |
|------------|-----------------------|------------------------------|
| PatRP49-f2 | ACGGTTCCAATGCAAGAACAC | <i>Patrp49</i> の半定量 RT-PCR 用 |
| PatRP49-r2 | GAAAGTTGGGCAGCACGTTC  | <i>Patrp49</i> の半定量 RT-PCR 用 |

W = A + T, R = A + G, M = A + C, K = T + G, Y = T + C, S = G + C, H = A + C + T, B = G + C + T, V = A + G + C, D = A + G + T, N = A + G + C + T。  
 温度条件は以下の通り。<sup>a</sup>*PatLuc1* 内部断片の増幅、95°C (5 min)、{95°C (30 sec)、55°C (20–60 sec)、72°C (1.5–2.5 min)} 25–40 サイクル、72°C (7 min)。<sup>b</sup>RACE-PCR、95°C (5 min)、{95°C (30 sec)、53–56°C (1 min)、72°C (2 min)} 25 サイクル、72°C (7 min)。<sup>c</sup>*Luciferase* の全長クローニング、96°C (2 min)、{98°C (10 sec)、55°C (15 sec)、72°C (30 sec)} 30 サイクル、72°C (5 min)。<sup>d</sup>*PatLuc2* 内部断片の増幅、95°C (5 min)、{95°C (15–30 sec)、44°C (1 min)、72°C (1.1–2.5 min)} 25–35 サイクル、72°C (7 min)。<sup>e</sup>タンパク質発現用プラスミドの合成、96°C (2 min)、{98°C (10 sec)、55–58°C (15 sec)、72°C (30 sec)} 30 サイクル、72°C (5 min)。<sup>f</sup>*PatLuc1* の半定量 PCR、94°C (5 min)、{94°C (30 sec)、52°C (20 sec)、72°C (50 sec)} 25–30 サイクル、72°C (7 min)。<sup>g</sup>*PatLuc2* の半定量 PCR、94°C (5 min)、{94°C (30 sec)、52°C (20 sec)、72°C (2 min)} 30 サイクル、72°C (7 min) または 94°C (5 min)、{94°C (30 sec)、55°C (20 sec)、72°C (2 min)} 5 サイクル、{94°C (30 sec)、55°C (20 sec)、72°C (2 min)} 27–35 サイクル、72°C (7 min)。<sup>h</sup>*PatLuc2* の半定量 PCR、94°C (5 min)、{94°C (30 sec)、52°C (20 sec)、72°C (20 sec)} 30 サイクル、72°C (7 min) または 94°C (5 min)、{94°C (30 sec)、55°C (20 sec)、72°C (20 sec)} 5 サイクル、{94°C (30 sec)、55°C (20 sec)、72°C (20 sec)} 22 サイクル、72°C (7 min)。

#### 3-3-4. プラスミド構築およびタンパク質の発現および精製

特異的プライマーセットを有する PrimeSTAR Max DNA ポリメラーゼを用いて、*PatLuc1* および *PatLuc2* のコード領域を PCR により増幅した (表 3-2)。Gibson

assembly system (New England BioLab, MA, USA) を用いて、pCold-ZZ-P-X 発現ベクター (Inouye et al., 2009) に *PatLuc1* の PCR 産物を挿入した。*PatLuc2* の PCR 産物は、pCold-ZZ-P-X のマルチクローニングサイトの XhoI/XbaI 部位に挿入した。これにより、それぞれのタンパク質発現用プラスミド pCold-ZZ-P-PatLuc1 および pCold-ZZ-P-PatLuc2 が得られた。これらのプラスミドをシーケンスし、クローニング操作の過程で望まない変異が生じなかったことを確認した。発現プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) pLysS に形質転換し、それぞれ pCold-ZZ-P-PatLuc1/BL21 および pCold-ZZ-P-PatLuc2/BL21 を得た。これらの菌株を 0.2 mM IPTG を含む 100 ml の Terrific broth (0.1M リン酸カリウム、1.2% トリプトン、2.4% 酵母エキス、0.5% (v/v) グリセロール、pH 7.0) を 15°C, 250 rpm で震盪培養した。回収した細胞を 15 ml の抽出緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7.0) 中で超音波処理 (4°C, 50 W, 5 sec) を 3 回行い、17,400g で 10 分間遠心分離した。上清を 0.45 µm メンブレンフィルターでろ過し、Ni キレートカラムに組換えタンパク質を吸着させた。融合した ZZ ドメインおよび His-tag を除去するために、切断部位での消化を PreScission Protease を用いて、4°C で一晩消化反応を行った。1 ml の溶出緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7.0) でタグを除去したルシフェラーゼを溶出した。プライマー配列および PCR の温度条件の詳細は表 3-3 示す。

### 3-3-5. 天然のルシフェラーゼの抽出

幼虫の腹部第 8 節に位置する発光器を切断、凍結し使用まで -80°C で保存した。

幼虫発光器は 20 mM Tris-HCl (pH 7.8)、0.1 M NaCl を含有する抽出緩衝液中でホモジナイズし、17,400 g で 5 分間遠心分離し、上清を回収した。発光反応 200  $\mu$ l の組成は、ルシフェラーゼ抽出物 90  $\mu$ l、50 mM 緩衝液、4  $\mu$ M D-ルシフェリン、100  $\mu$ M ATP、5 mM  $\text{MgCl}_2$  である。発光スペクトルは FP-777W 蛍光分光光度計を用いて室温で励起光源をオフにして測定した（発光帯域幅 20 nm、走査速度 500 nm/min）。測定は、酸性（50 mM クエン酸 NaOH、pH 5.8）、中性（50 mM Tris-HCl、pH 7.0）、塩基性（50 mM Tris-HCl、pH 8.2）の 3 つの条件で行った。スペクトルデータは 5 回繰り返し記録し、複数の測定を平均した。

#### 3-3-6. 生物発光スペクトルの測定

凍結した成体雄を氷上で解凍し、発光器の発光スペクトルを測定した。さらに、発光器を解剖しクチクラや周辺の脂肪体を除去した発光細胞の発光スペクトルを測定した。発光器のクチクラを石英セルに入れ、透過スペクトルを分光計で測定した。幼虫の発光器からの連続な発光を誘発するために、神経伝達物質オクトパミン（10 mM）を用いて幼虫および成体雌を処理した。蛹の頭側の発光スペクトルを測定するために発光器をアルミニウム箔で覆い、また、発光器の発光を測定するために頭側をアルミニウム箔で覆った。発光スペクトルは、FP-777W 蛍光分光光度計を用いて室温で励起光源をオフにして測定した（発光帯域幅 20 nm、走査速度 500 nm/min）。スペクトルデータは、5 回以上繰り返し記録され、複数の測定にわたって平均化された。スペクトルの補正は行っていない。

### 3-3-7. 組換えタンパク質の発光スペクトルの測定

発光反応液 200  $\mu$ l の組成は、精製ルシフェラーゼ 50 ng、5  $\mu$ M D-ホタルルシフェリン、100  $\mu$ M ATP、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、および 50 mM の各種バッファーである。測定は、酸性 (50 mM クエン酸-NaOH、pH 5.9)、塩基性 (50 mM Tris-HCl、pH 9.5) および中性 (50 mM Tris-HCl、pH 7.7) 条件下で 5 回反復して行った。FP-777W 蛍光分光光度計を使用し、励起光源をオフにして発光帯域幅 20 nm、走査速度 500 nm/min、室温で行った。スペクトルは補正していない。

### 3-3-8. 半定量的 RT-PCR 分析

前述のように TRIzol を用いて、卵 (~10 個)、幼虫 (1 個体)、前蛹 (1 個体)、メス蛹 (2 個体)、オス蛹 (2 個体)、メス成虫 (2 個体)、オス成虫 (2 個体) から total RNA を抽出した。メス蛹およびオス蛹を頭部、胸部、腹部 (腹部第 1-5 節) および発光器 (腹部第 6-8 節) に解剖し、メス成虫を卵巣および発光器とそれらを除いた全身に分けそれぞれから前述のように RNA を抽出した (表 3-2)。また、上記と同様に逆転写を行った。

半定量的 RT-PCR は、Dice Gradient Thermal cycler (Takara) を用いて GoTaq DNA ポリメラーゼを用いて行った。温度条件は、94°C、5 分間に続いて 94°C、30 秒 ; 50~55°C、20~30 sec ; 72°C、20~120 sec を 25~45 サイクル行った。*Patrp49*、*PatLuc1* および *PatLuc2* の遺伝子特異的プライマーは、ゲノムを鋳型とした PCR 産物と区別できるようイントロンにまたがるように設計した。*Patrp49* は、遺伝子発現レベルを標準化するための内因性コントロールとして用いた。プライマー配列および PCR の温度条件の詳細は表 3-3 示す。

### 3-3-9. アラインメントと分子系統解析

甲虫ルシフェラーゼおよびそのホモログのアミノ酸配列を、BLOSUM62 マトリックスを用いて **Geneious alignment tool** のデフォルトパラメーターを用いてアラインメントを行った。ベイズ推定には、**Protest 2.4** (Abascal et al., 2005) プログラムとベイズ情報量基準 (Bayesian Information Criterion : BIC) に基づいて LG モデル ( $G = 1.03$ ) をベストヒットモデルとして選択した。**Geneious** の **MrBayes 3.2.6** (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) プラグインを用いて系統樹を作成した。設定はデフォルトの値を使い、4 つの独立な鎖 (1,100,000 世代の推定を行い、最初の 100,000 世代は破棄した) で推定した系統樹のコンセンサスを採用した。



## 第4章 総合考察

### 4-1. ルシフェラーゼの遺伝子重複による進化

すでに報告したヘイケボタルを用いた *LlLuc1* と *LlLuc2* の発現パターンと遺伝子産物の生化学的性質に関する論文 (Oba et al., 2013) に加え、本論文で述べたヒメボタルそしてヤエヤママドボタルを用いた研究結果をもとに、本章ではホタル科におけるルシフェラーゼの進化について考察する。また、過去の知見と総合し、関連した現象について分子レベルでの説明がついていない未解決の問題や今後の展望についても述べる。

第2章では、発光器の発光色すなわち *Luc1* の発光色が長波長側に大きくシフトしたホタルにおいても、*Luc2* の発光色は緑色であることを確かめた。ホタルにおいて、生物発光はもともと幼虫における警告 (Sivinski, 1981; De Cock & Matthysen, 1999) から進化したと考えられている (Branham & Greenfield, 1996; Lewis, 2016)。昆虫の主な捕食者である脊椎動物において、明暗を知覚する視細胞である桿体細胞は緑色の光を受容する。したがって、*Luc1* を警告シグナルとしてのみ使うホタル、例えば成虫発光器がほとんど発達していないカタモンミナミボタル *Drilaster axillaris* や成虫発光器を持たないタテオビクシヒゲボタル *Stenocladius azumai* など (大場, 2004) では、捕食者の視覚に最適化するように緑色の発光色を示す (De Cock & Matthysen, 1999)。私は、*Luc2* の発光がこれらと同様に警告シグナルとしての役割を持ち、そのため発光色の多様性が小さく緑色に発光するのだと考えている。この仮説を確かめるためには、野外での生態学的な実験が必要であり、それらは今後の課題である。

第3章では、ホタル亜科以外で *Luc1* と *Luc2* の両遺伝子について初めて遺伝子発現パターンを調べた。その結果、二つのルシフェラーゼ遺伝子の発現パターンはホタル亜科と同様であった。すなわち、*Luc1* は発光器で発現しており、発光器をもつ全てのステージで発現していた。また、*Luc2* は発光器以外で発現しており、動かないステージで発現していた。これらのことから、ルシフェラーゼのパラログ遺伝子の発現パターンは、ホタル科において共通である可能性が高い。すなわち、ホタルルシフェラーゼが遺伝子重複を起こし各パラログ (*Luc1* と *Luc2*) の時空間的発現パターンのバリエーションが、ホタル科が多様化する前に固定している可能性が高い。この仮説は、遺伝子発現解析および分子系統解析の結果から支持される。これまでに調べられたホタル科の全ての種は幼虫の発光器から光を発し (Branham, 2010)、また、*Luc1* 遺伝子はホタル科のすべての亜科の種から単離されていること (de Wet et al., 1985; Branchini et al., 2016 and references there in) から、*Luc1* はすべてのホタルに普遍的に存在していると考えられる。一方、*Luc2* 遺伝子はホタル亜科、Photurinae 亜科およびマドボタル亜科の種のみから単離されているが、本研究と過去の研究を統合して考えると、ホタル科において *Luc2* も普遍的に存在している可能性がある。本研究において、*Luc2* が系統的に離れたホタル亜科とマドボタル亜科において、動かないステージである卵、前蛹、蛹で発現していた。このことから、逆に、これらの動かないステージでの発光はまだ調べられていない種の *Luc2* を暗示している。例えば、卵および全身の蛹における緑色の生物発光は以下のホタルで報告されている。ホタル亜科では、*Pygoluciola qingyu*、*Aquatica ficta*、*Abscondita terminalis*、*Abscondita anceyi*、*Abscondita chinensis*、Photurinae 亜科では *P. pennsylvanica*、ミナ

ミボタル亜科では *Stenocladus flavipennis*、そして、マドボタル亜科では *L. noctiluca*、*A. lineatum*、*Cratomorphus* sp.、*Pyrocoelia pectoralis*、*Lampyris* sp.である。特筆すべき点として、*A. lineatum* の脂肪体由来ルシフェラーゼ（発光器ではない）は、*A. lineatum* の非発光器の発光に関与することが示唆されている（Viviani et al., 2008a）。もちろん、*Luc2* の発現パターンの普遍性を調べるには、さらなる研究、特にミナミボタル亜科やクシヒゲボタル亜科を用いた研究が必要である。系統的に多様な種で、*Luc1* と *Luc2* の発現パターンや生化学的な性質を比較することで、遺伝子重複を起こしたルシフェラーゼがその後どのような進化を辿って行ったのかが明らかになるだろう。

#### 4-2. 今後の *Luc2* の探索法・研究法について

ホタルに限らず昆虫の多くは、野外では幼虫もしくは成虫でしか見つからないことがほとんどであり、卵や前蛹、蛹を得るためには、飼育が必要である場合が多い。このため、*Luc2* がこれまで見つかってこなかったと考えられる。今後、次世代シーケンサー（NGS）などによりトランスクリプトーム解析が行われたとしても、*Luc2* を発現していない幼虫や成虫を材料にしても *Luc2* はなかなか見つからないだろう。実際に、*Photinus* 属や *Pyrocoelia* 属、*Phausis* 属などの成虫を用いた NGS による解析では *Luc2* は見つかっていない。卵巣で *Luc2* が発現していることから、雌成虫を得ることができれば、NGS 解析により *Luc2* の有無はわかるかもしれない。

本論には記載していないが、予備的にミナミボタル亜科の幼虫の飼育を試みた。しかし、ヤスデを食べるという特殊な生態を持つため餌の確保や、根本的

な飼育の難しさから、飼育は失敗し、蛹を得ることはできなかった。ミナミボタル亜科のホタルの飼育方法の確立が、*Luc2* の普遍性を追求するための障壁であるのかもしれない。

#### 4-3. ヤエヤママドボタル雌成虫での *Luc2* の発現とネオテニーの進化

マドボタル亜科のヤエヤママドボタルの雌成虫は、ホタル亜科と異なり、全身の *Luc2* による発光が観察された。ヤエヤママドボタルは雌成虫が蛹のようなネオテニーを示し、翅が退縮し移動性に乏しい。このような発生学的な要因あるいは、生態学的な要求に応じるように、*PatLuc2* は蛹と同様に雌成虫の全身で発現していた。分子系統を用いたネオテニーの進化に関する研究では、ネオテニーは、マドボタル亜科の共通祖先とミナミボタル亜科の共通祖先でそれぞれ独立に獲得されたと推定されている (Bocakova et al., 2007)。すなわち、進化的には *Luc2* の動かないステージにおける発現パターンが決まったあとで、ネオテニーの進化が起きたことになる。したがって、ネオテニーを示す雌成虫での *Luc2* の発現という形質の進化は、i) 蛹の体づくりに関わる転写因子が *PatLuc2* の発現を調節しており、ネオテニックな雌成虫の体づくりの際のコオプシオンすなわち同様の調節機構が働いているというもの、もしくは ii) ネオテニーの進化の後に、動かないステージでの捕食圧が高まり、*Luc2* の発現が独立にリクルートされた、という二つの可能性が考えられる。ホタルを用いて *Luc2* の遺伝子発現の調節を明らかにし系統間で比較することは、分子レベルの進化が表現型レベルでの進化を説明する研究へと繋がる可能性を秘めている。今後、遺伝子重

複を起こしたルシフェラーゼの進化的研究と並行して、発現制御機構の解明や、発光器の Evo-Devo などを統合的に理解することによって「ホタルの発光形質の進化」という「新奇形質の進化プロセス」が明らかになるだろう。

## 参考文献

- Abascal, F., Zardoya, R., & Posada, D. (2005). ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 21(9), 2104-2105.
- Biggley, W. H., Lloyd, J. E., & Seliger, H. H. (1967). The spectral distribution of firefly light. II. The Journal of General Physiology, 50(6), 1681-1692.
- Branchini, B. R., Southworth, T. L., Salituro, L. J., Fontaine, D. M., & Oba, Y. (2016). Cloning of the blue ghost (*Phausis reticulata*) luciferase reveals a glowing source of green light. *Photochemistry and Photobiology*.
- Branham, M. (2010). 4.15 Lampyridae Latreille, 1817. *Handbook of zoology*, 4, 141-145.
- Branham, M. A., & Greenfield, M. D. (1996). Flashing males win mate success. *Nature*, 381(6585), 745-746.
- Day, J. C., Goodall, T. I., & Bailey, M. J. (2009). The evolution of the adenylate-forming protein family in beetles: multiple luciferase gene paralogues in fireflies and glow-worms. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50(1), 93-101.
- De Cock, R., & Matthysen, E. (1999). Aposematism and bioluminescence: experimental evidence from glow-worm larvae (Coleoptera: Lampyridae). *Evolutionary Ecology*, 13(7-8), 619-639.
- De Wet, J. R., Wood, K. V., Helinski, D. R., & DeLuca, M. (1985). Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(23), 7870-7873.
- Eguchi, E., Nemoto, A., Meyer-Rochow, V. B., & Ohba, N. (1984). A comparative study of spectral sensitivity curves in three diurnal and eight nocturnal species of Japanese fireflies. *Journal of Insect Physiology*, 30(8), 607-612.
- Eisner, T., Wiemer, D. F., Haynes, L. W., & Meinwald, J. (1978). Lucibufagins: defensive steroids from the fireflies *Photinus ignitus* and *P. marginellus* (Coleoptera: Lampyridae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(2), 905-908.
- Fallon, T. R. R., Li, F. S., Vicent, M. A., & Weng, J. K. (2016). Sulfoluciferin is biosynthesized by a specialized luciferin sulfotransferase in fireflies. *Biochemistry*. 55(24), 3341-3344.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L., & Postlethwait, J. (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*, 151(4), 1531-1545.
- González, A., Hare, J. F., & Eisner, T. (1999). Chemical egg defense in Photuris firefly “femmes fatales”. *Chemoecology*, 9(4), 177-185.
- Gruber, M., Kutuzova, G. D., & Wood, K. (1996). Cloning and expression of a Phengodes luciferase.

- Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons, in *Proceedings of the 9th International Symposium*. John Wiley & Sons, Chichester, 244-247.
- Harvey, E. N. (1917). What substance is the source of the light in the firefly? *Science*, 241-243.
- Herring, P. J. (1987). Systematic distribution of bioluminescence in living organisms. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 1(3), 147-163.
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754-755.
- Inouye, S., & Sahara, Y. (2009). Expression and purification of the calcium binding photoprotein mitrocomin using ZZ-domain as a soluble partner in *E. coli* cells. *Protein Expression and purification*, 66(1), 52-57.
- Kawashima, I., Suzuki, H., & Satô, M. (2003). A check-list of Japanese fireflies (Coleoptera, Lampyridae and Rhagophthalmidae). *Japanese Journal of Systematic Entomology*, 9(2), 241-261.
- Koksharov, M. I., & Ugarova, N. N. (2013). Strategy of mutual compensation of green and red mutants of firefly luciferase identifies a mutation of the highly conservative residue E457 with a strong red shift of bioluminescence. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 12(11), 2016-2027.
- Kutuzova, G. D., Hannah, R. R., & Wood, K. V. (1996). Bioluminescence color variation and kinetic behavior relationships among beetle luciferases. *Bioluminescence and Chemiluminescence*, 248-252.
- Lall, A. B., Seliger, H. H., Biggley, W. H., & Lloyd, J. E. (1980). Ecology of colors of firefly bioluminescence. *Science*, 210(4469), 560-562.
- Lewis, S. (2016). *Silent Sparks: The Wondrous World of Fireflies*. Princeton University Press.
- Lloyd, J. E. (1984). Occurrence of aggressive mimicry in fireflies. *Florida Entomologist*, 368-376.
- Martin, G. J., Lord, N. P., Branham, M. A., & Bybee, S. M. (2015). Review of the firefly visual system (Coleoptera: Lampyridae) and evolution of the opsin genes underlying color vision. *Organisms Diversity & Evolution*, 15(3), 513-526.
- Meinwald, J., Wiemer, D. F., & Eisner, T. (1979). Lucibufagins. 2. Esters of 12-oxo-2. beta., 5. beta., 11. alpha.-trihydroxybufalin, the major defensive steroids of the firefly *Photinus pyralis* (Coleoptera: Lampyridae). *Journal of the American Chemical Society*, 101(11), 3055-3060.
- 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*. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 12(5), 854-863.
- Oba, Y., Iida, K., & Inouye, S. (2009). Functional conversion of fatty acyl - CoA synthetase to firefly luciferase by site - directed mutagenesis: A key substitution responsible for luminescence activity. *FEBS Letters*, 583(12), 2004-2008.

- Oba, Y., Mori, N., Yoshida, M., & Inouye, S. (2010). Identification and characterization of a luciferase isotype in the Japanese firefly, *Luciola cruciata*, involving in the dim glow of firefly eggs. *Biochemistry*, 49(51), 10788-10795.
- Oba, Y., Ojika, M., & Inouye, S. (2003). Firefly luciferase is a bifunctional enzyme: ATP - dependent monooxygenase and a long chain fatty acyl - CoA synthetase. *FEBS Letters*, 540(1-3), 251-254.
- Oba, Y., Sato, M., Ohta, Y., & Inouye, S. (2006). Identification of paralogous genes of firefly luciferase in the Japanese firefly, *Luciola cruciata*. *Gene*, 368, 53-60.
- Oba, Y., Yoshida, M., Shintani, T., Furuhashi, M., & Inouye, S. (2012). Firefly luciferase genes from the subfamilies Psilocladinae and Otoretinae (Lampyridae, Coleoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 161(2), 110-116.
- Ohmiya, Y., Ohba, N., Toh, H., & Tsuji, F. I. (1995). Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the luciferases from the Japanese fireflies, *Pyrocoelia miyako* and *Hotaria parvula*. *Photochemistry and Photobiology*, 62(2), 309-313.
- Sander, S. E., & Hall, D. W. (2015). Variation in opsin genes correlates with signalling ecology in North American fireflies. *Molecular Ecology*, 24(18), 4679-4696.
- Seliger, H. H., & McElroy, W. D. (1964). The colors of firefly bioluminescence: enzyme configuration and species specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 52(1), 75-81.
- Sivinski, J. (1981). The nature and possible functions of luminescence in Coleoptera larvae. *The Coleopterists' Bulletin*, 167-179.
- Strause, L. G., DeLuca, M., & Case, J. F. (1979). Biochemical and morphological changes accompanying light organ development in the firefly, *Photuris pennsylvanica*. *Journal of Insect Physiology*, 25(4), 339-347.
- Tonolli, P. N., Okawachi, F. M., Abdalla, F. C., & Viviani, V. R. (2011). Bioluminescent fat body of larval *Aspisoma lineatum* (Coleoptera: Lampyridae) firefly: ontogenic precursor of lantern's photogenic tissue. *Annals of the Entomological Society of America*, 104(4), 761-767.
- Tyler, J., Mckinnon, W., Lord, G. A., & Hilton, P. J. (2008). A defensive steroidal pyrone in the Glow - worm *Lampyris noctiluca* L.(Coleoptera: Lampyridae). *Physiological Entomology*, 33(2), 167-170.
- Viviani, V. R., & Bechara, E. J. (1995). Bioluminescence of brazilian fireflies (Coleoptera: Lampyridae): spectral distribution and pH effect on luciferase - elicited colors. Comparison with elaterid and phengodid luciferases. *Photochemistry and Photobiology*, 62(3), 490-495.
- Viviani, V. R., Okawachi, F. M., Scorsato, V., & Abdalla, F. C. (2008a). CCD imaging of basal bioluminescence in larval fireflies: clues on the anatomic origin and evolution of bioluminescence. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7(4), 448-452.



- Viviani, V. R., Silva Neto, A. J., Arnoldi, F. G., Barbosa, J. A., & Ohmiya, Y. (2008b). The influence of the loop between residues 223 - 235 in beetle luciferase bioluminescence spectra: A Solvent gate for the active site of pH - sensitive luciferases. *Photochemistry and Photobiology*, 84(1), 138-144.
- Vongsangnak, W., Chumnannpuen, P., & Sriboonlert, A. (2016). Transcriptome analysis reveals candidate genes involved in luciferin metabolism in *Luciola aquatilis* (Coleoptera: Lampyridae). *PeerJ*, 4, e2534.
- White, E. H., Rapaport, E., Seliger, H. H., & Hopkins, T. A. (1971). The chemi-and bioluminescence of firefly luciferin: an efficient chemical production of electronically excited states. *Bioorganic Chemistry*, 1(1-2), 92-122.
- Wood, K. V., Lam, Y. A., Seliger, H. H., & McElroy, W. D. (1989). Complementary DNA coding click beetle luciferases can elicit bioluminescence of different colors. *Science*, 244(4905), 700.
- Ye, L., Buck, L. M., Schaeffer, H. J., & Leach, F. R. (1997). Cloning and sequencing of a cDNA for firefly luciferase from *Photuris pennsylvanica*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1339(1), 39-52.
- 大場信義. (2004). ホタル点滅の不思議. 横須賀市自然・人文博物館.

## 謝辞

本研究の遂行ならびに論文作成にあたり、ご指導を賜りました中部大学准教授 大場裕一博士に心より感謝を申し上げます。名古屋大学に大場博士が助教として在籍していた頃から 6 年間ものあいだ、丁寧にそして時には意見を衝突させながらも暖かく見守っていただけましたことを感謝いたします。他のどの教員とも異なる独特な人柄・研究姿勢・ライフスタイル・指導方針を長年近くで勉強させていただきましたが、大場博士の指導の元で私は、奇しくも名古屋大学が目指す「自由闊達」な環境において、研究生活を送ることができたと振り返ってしみじみと思います。実験手法に限らず、国際的なコネクションの形成、科学哲学や論文に対する哲学、野外調査や写真撮影技術・センス、プレゼンテーション、科学と社会のあり方について、様々なアウトリーチ活動など数え切れないほどのことを学ぶことができました。

名古屋大学教授 小鹿一博士には様々な助言および指導をいただきました。多面的な専門領域からの指摘により適切な表現方法を鍛えられました。生理活性物質科学研究分野に移動された後も、ご指導を継続していただいたことに感謝申し上げます。

貴重な昆虫標本を提供していただきました名古屋大学准教授 梶村恒博士、藤森憲臣修士、中井遼介学士、鈴木よしき修士に深く感謝いたします。

ホタルの飼育および分子生物学実験の分担をしていただきました小西花織学士に深く感謝いたします。

ヒメボタルの生態や採集について貴重なご助言を賜りました大場裕一博士、

大場由美子修士、藤森憲臣修士、平田秀彦氏、安田和代氏に感謝申し上げます。

博士後期課程において共に科学について意見を交換し切磋琢磨することができたのは、上野壮平修士、上原奏子修士、京卓志修士、池上花奈修士、蟹江秀星修士、富永斉修士、山田大地修士、小田春佳修士、斎藤恭紀修士、龍将士修士、吉田尚生修士、古橋麻奈修士、羽賀雅俊修士、大場由美子修士、佐川慎吾修士、岩井里佳修士、山田理紗修士、孫雨偉博士、内藤将志修士、Darrin T. Shultz 学士のおかげであり感謝申し上げます。

優秀な同期であり、ライバルであり、生活と心を支えていただきました妻の別所奏子氏には深く感謝申し上げます。

自然科学の幅広い教養を授けてくださった産業技術総合研究所研究部門長 近江谷克裕博士、名古屋大学教授 山本直之博士、産業技術総合研究所首席研究員 深津武馬博士、名古屋大学講師 近藤竜彦博士、名古屋大学特任助教 石川由希博士、遺伝学研究所助教 石川麻乃博士、名古屋大学特任助教 後藤寛貴博士、東京大学総合研究博物館助教 小藪大輔博士、国際農林水産業研究センター特任研究員 前野ウルド浩太郎博士、京都大学助教 越川滋行博士、名古屋大学教授 上川内あづさ博士に深く感謝申し上げます。

最後に研究室の先輩、同期、後輩、研究活動を通して巡り会えた多くの友人、そして両親には、研究生生活を続ける上で支えられてきました。ここに深く感謝いたします。