



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	祖先型遺伝子の再現による環境適応進化の解析
Author(s)	嶺井, 隆平; Minei, Ryuhei; 大森, 聡 他
Citation	低温科学, 83, 211-219
Issue Date	2025-03-29
DOI	https://doi.org/10.14943/lowtemsci.83.211
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94803
Type	departmental bulletin paper
File Information	20_p211-219_LT83.pdf



祖先型遺伝子の再現による環境適応進化の解析

嶺井 隆平¹⁾, 大森 聡¹⁾, 土方 敦司²⁾, 土屋 裕子³⁾, 白井 剛¹⁾

2024 年 11 月 17 日受付, 2024 年 12 月 12 日受理

最尤法・ベイズ推定法などの分子系統樹推定法により祖先型遺伝子・タンパク質の配列が再現できる。これは生物の環境適応進化を実験室で検証する機会を提供する。この方法によりルシフェラーゼの発光色進化やミオグロビンの海洋再適応進化を解析した結果、化石からは得られない生化学・分子生物学的データによる進化仮説の検証が可能となった。

Analyses of evolutionary environmental adaptation by resurrecting ancestral genes

Ryuhei Minei¹, Satoshi Ohmori¹, Atsushi Hijikata²,
Yuko Tsuchiya³, Tsuyoshi Shirai¹

The methods for molecular phylogeny inference, such as maximum likelihood or Bayes inference, can provide the sequences of ancestral genes/proteins. This approach makes it possible to examine the environmental adaptations of organisms in laboratory. The evolution of luminescence color from firefly luciferases and marine re-adaptation of myoglobins were examined with this method, and the biochemical and molecular biological data, for which fossil samples could not provide, successfully verified the hypotheses of evolution.

キーワード：祖先型タンパク質, 分子進化, 分子系統樹
Ancestral protein, molecular evolution, molecular phylogeny

1. はじめに

地球は46億年の歴史の中で大きな環境変動を何度も経験し、その表面で様々な生物種が栄枯盛衰を繰り返してきたとされる。この生物種の変遷を研究するための最有力の試料は化石であるが、状態の良い化石の数は限られており、大部分の化石試料は不完全であったり大きく損傷していることから、恣意性の高い従来の解釈が新しい

化石試料の発見により覆されることは頻繁に起こる。

例えば、カナダのバージェス頁岩から採取された化石に基づく *Hallucigenia* (ハルキゲニア、腹面に7対の棘状の脚を、背面に7本の触手をもつ細長い葉足動物) の初期復元図は、現存生物のボディプランからかけ離れていたことから、カンブリア爆発の象徴として注目を集めたが (Morris 1977)、その後爪のある化石の発見により体の背腹 (上下) 軸が入り替わり (Ramsköld 1991)、眼の痕跡のあ

連絡先
白井 剛
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部
〒526-0829 滋賀県長浜市田村町 1266
Tel: 0749-64-8117
Email: t_shirai@nagahama-i-bio.ac.jp

- 1) 長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部
Department of Bioscience, Nagahama Institute of Bioscience and Technology, Nagahama, JAPAN
- 2) 東京薬科大学・生命科学部
School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, Hachioji, JAPAN
- 3) 国立研究開発法人産業技術総合研究所・人工知能研究センター
Artificial Intelligence Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tokyo, JAPAN

る化石の発見により前後軸も訂正された (Smith and Caron 2015). 結果として, *Hallucigenia* はカギムシなど現存する有爪動物につながる生物と解釈されるようになった. このように, 残念ながら化石から得られる情報は完全ではなく, 特に生化学的・分子生物学的なデータを得ることは困難である.

近年では高速シーケンサを利用した化石DNAの解析により, 古代生物の遺伝子の直接解読の成功例も多数報告されている. 例として, Svante Pääbo博士らは, およそ4万年前のものと推定されるネアンデルタール人骨から抽出されたDNAから全ゲノム配列を決定した (Green et al. 2010). このゲノム情報は, *Homo sapiens* (ヒト) と *Homo neanderthalensis* (ネアンデルタール人) の交雑と寒冷環境への適応を示し, その研究は2022年ノーベル生理学・医学賞につながった.

ただし化石中でDNAは徐々に分解されるので, 現状この方法ではおよそ100万年前 (1 Ma = Million years ago, megaannum, 以降この表記を用いる) まで遡ることが限界である. 現時点で最古の化石DNA解析例は, シベリア凍土から発見された *Mammuthus primigenius* (ケナガマンモス) 遺骸の臼歯から採取されたものである (van der Valk et al. 2021). この例では低温状態で保存されていたことが幸いしたと考えられるので, 今後化石DNAで1 Maの壁を越えるのは容易ではないように思われる. しかし, この限界を超えることを可能にする方法の一つとしてデータサイエンスがある.

2. 最尤法・MCMCベイズ法による祖先配列の推定

DNAの塩基配列やタンパク質のアミノ酸配列を解読し分子系統樹を推定することで, 生物進化の歴史をある程度まで定量的に解析することが可能になった. 配列情報に基づく分子系統樹推定法は数多く提案されており, 主として配列間の距離に基づく距離法 (distance method) と, 主として残基置換過程に基づく形質状態法 (character state method) に大別される (Nei and Kumar 2000).

前者の距離法としては非加重結合法 (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA法), 近隣結合法 (neighbor joining method, NJ法) などが代表的である. 後者の形質状態法には, 最大節約法 (maximum parsimony method, MP法), 最尤法 (maximum likelihood method, ML法), ベイズ推定法 (Bayesian inference method, BI法) などがある.

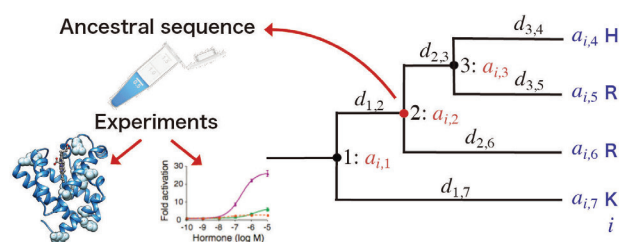


図1：祖先配列の推定 右の系統樹で $a_{i,4-7}$ が現存配列, $a_{i,1-3}$ が祖先配列の残基にあたる. $a_{i,4-7}$ と進化距離 $d_{s(j),j}$ から最大尤度 (ML法) または最大事後確率 (BI法) をもつ $a_{i,1-3}$ を推定する.

Figure 1: Prediction of ancestral sequence The $a_{i,4-7}$ in the phylogeny on right are the extant residues, and $a_{i,1-3}$ are ancestral residues. The methods predict $a_{i,1-3}$ with maximum likelihood (ML method) or posterior probability (BI method) from $a_{i,4-7}$ and $d_{s(j),j}$.

代表的な形質状態法の1つであるML法は, 現存配列のアラインメント A から, 尤度 $L(A|T)$ を最大化する (つまり結果として A が実現する確率を最大にする) 系統樹 T を探索する方法である (Felsenstein 1981). 尤度 $L(A|T)$ は残基置換確率と進化距離から計算され, 系統樹 T 内のノード j の親ノード $s(j)$ における配列サイト i の残基 $a_{i,s(j)}$ がブランチ $s(j) \rightarrow j$ の進化距離 $d_{s(j),j}$ の間にノード j の残基 $a_{i,j}$ に置換される確率を $p\{a_{i,s(j)}, a_{i,j}, d_{s(j),j}\}$ として以下のように定義される.

$$L(A|T) = \prod_{i,j} p\{a_{i,s(j)}, a_{i,j}, d_{s(j),j}\}$$

つまりこの過程で計算される系統樹 T のモデルは祖先型配列 $\{a_{i,j}; j \notin \text{現存ノード}\}$ を含むので, 系統樹推定の過程で祖先配列が再現されることになる (MP法やBI法など他の形質状態法も同様である). ただし, $L(A|T)$ を最大にする T を解析的に求める方法は知られていないので, 何らかの経験的なアルゴリズムが必要になる.

近年多用される方法は, ベイズ更新により系統樹モデルを経験的に順次改良するBI法である. この方法では, ベイズの定理により定義される以下の式で, 事後確率 $L(T|A)$ を最大化する系統樹 T を探索する. 以下の式では簡単のため各系統樹の事前確率は一様分布すると仮定しており, その場合は $L(A|T_k)$ は式で求められる系統樹 T_k の尤度に等しい.

$$L(T|A) = L(A|T) / \sum_k L(A|T_k)$$

ただしこの方法でも, 上式右辺の分母をすべての可能な系統樹 T_k について計算することは事実上不可能である

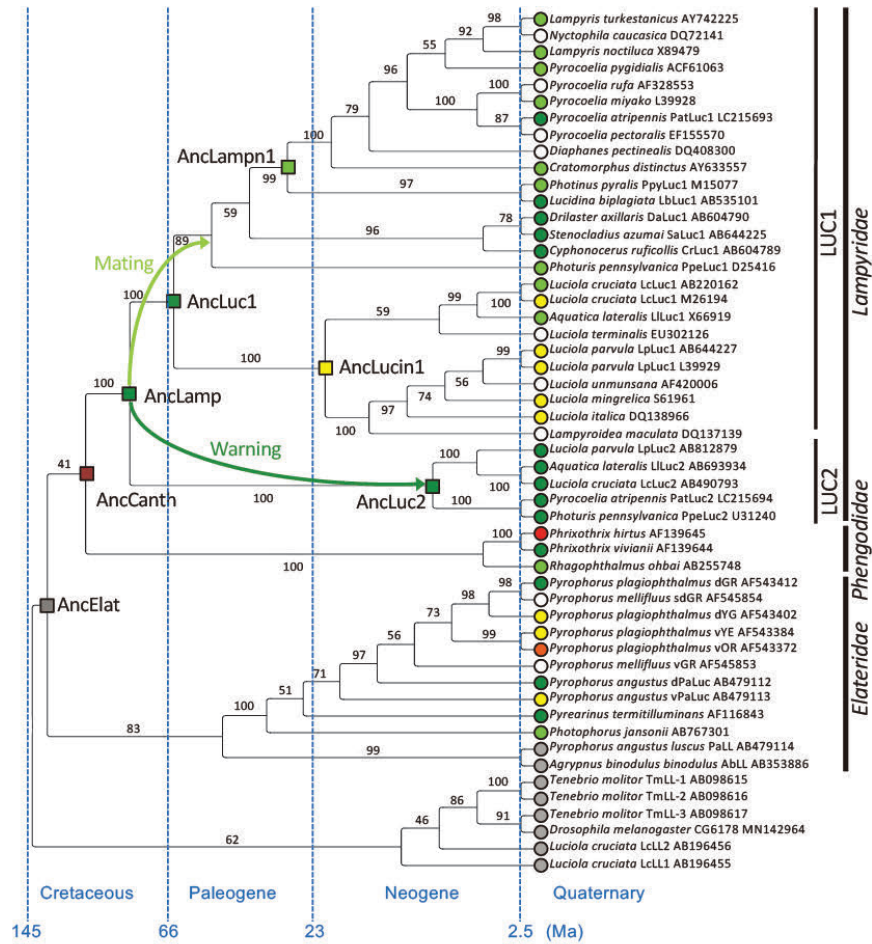


図2：ルシフェラーゼの分子系統樹 リーフ(末端)ノードに生物種名と発光色(丸印)を示している。枝上の数値はブートストラップ値である。AncLampなどの名称は再現された内部ノードと発光色(四角)を示している。この系統樹は無根系統樹であり、青色で示した時代区分(Ma)は目安である。

Figure 2: Molecular phylogeny of luciferases The species name and fluorescent color (circle) of extant luciferases are shown on the leaf nodes. The numbers on branches indicate bootstrap probabilities. The names and fluorescent color (square) on the internal nodes show the resurrected ancestral luciferases. This phylogeny is unrooted, and the ages shown in blue (Ma) are not accurate.

ので、通常はマルコフ連鎖モンテカルロ法 (Markov chain Monte Carlo method, MCMC法) と組み合わせることで経験的に推定する。なんらかの方法 (例えば計算が高速なNJ法で系統樹のトポロジー $\{s(j)\}$ とブランチ長 $\{d_{s(j),j}\}$ を求め、MP法で祖先型配列 $\{a_{i,j}\}$ を求めるなど) で初期系統樹モデル $L(A|T_0)$ を求める。その後パラメータを若干変更した系統樹 T_1 を作成し、同様に $L(A|T_1)$ を計算する。両者を比較し、 $L(A|T_1) > L(A|T_0)$ であれば必ず、そうでない場合は一定の低い確率で系統樹 T_1 を採用する。これを $L(A|T_n)$ が収束するまで繰り返し、 T_n を順次更新する。収束したのち、不安定であることの多い初期系統樹を除いて、一定の期間の $\{T_n\}$ を採用し集計することで、上記式の分母が推定される。

この方法では、 $\{T_n\}$ 群の統計により祖先配列 $\{a_{i,j}; j \notin \text{現存ノード}\}$ を含む系統樹パラメータは事後確率の分布とし

て求められる。通常は、各サイトで最大事後確率をもつ残基を選択することで祖先型配列を構成する。推定された祖先型配列を合成しさまざまな実験を施すことで、化石からは再現不可能な様々な情報を得ることができる (図1)。以下、この方法をホタルの発光色進化と哺乳類の海洋再適応進化の解析に応用した例について解説する。

3. ホタルの発光波長の進化

Lampyridae (ホタル科) の甲虫は、およそ100 Maに出現したとされる。これは、腹部末端に発光器と思われる体節を持つ甲虫が閉じ込められた琥珀化石の発見に基づいている (Kazantsev 2015)。現存するホタルは赤から緑までの幅広い発光色を示すが (図2)、この祖先ホタルが何色に

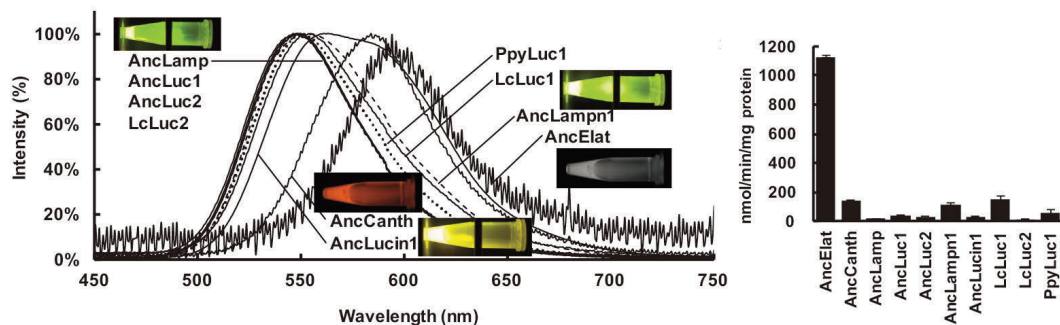


図3：祖先型ルシフェラーゼの発光スペクトル 波長(横軸)ごとの発光強度を最大100%として示している。AncLamp ~ AncElatは再現された祖先型, LcLuc1, LcLuc2, PpyLuc1はそれぞれ現存するゲンジボタル*Luciola cruciata*のLUC1, LUC2, *Pyrocoelia pygidialis*のLUC1のスペクトルを示す。

Figure 3: Fluorescent spectrum of ancestral luciferases The horizontal axis shows intensities of fluorescent light scaled maximum values as 100%. AncLamp~AncElat are resurrected ancestral luciferases, and LcLuc1, LcLuc2, and PpyLuc1 are extant *Luciola cruciata* LUC1, LUC2, and *Pyrocoelia pygidialis* LUC1.

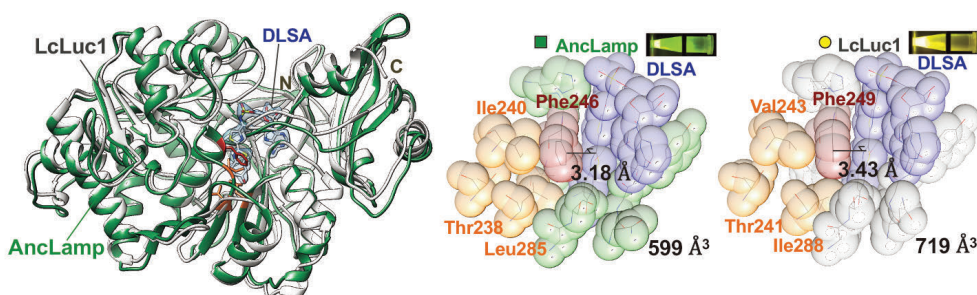
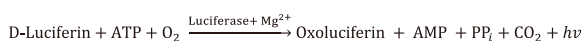


図4：祖先型ルシフェラーゼAncLampの立体構造 (左) AncLamp (緑色, PDBコード 6K4C) と*Luciola cruciata*のLUC1 (LcLuc1, 白色, PDBコード 2D1S)の立体構造の重ね合わせ(RMSD 1.64 Å)をリボンモデルで示している。(右)活性部位付近の構造。反応中間体アナログ(DLSA)を青, 保存されたPhe残基を赤, 置換されたアミノ酸を橙色の空間充填モデルで示し, Phe-DLSAの距離(Å)と基質結合キャビティーの体積(Å³)を示している。

Figure 4: Three dimensional structure of AncLamp (Left) Superposed structures of AncLamp (green, PDB code 6K4C) and LUC1 of *Luciola cruciata* (LcLuc1, white, PDB code 2D1S) in ribbon models with 1.64 Å RMSD. (Right) Structures of catalytic centers. The reaction intermediate analogue (DLSA), conserved Phe residue, and replaced residues are shown in space-filling models in blue, red, and orange, respectively. The distances between Phe and DLSA (Å) and the volume of substrate-binding cavities (Å³) are indicated.

発光していたかを化石から知ることはできない。ホタルの発光は以下の式のように、酵素ルシフェラーゼによるD-ルシフェリンのオキシルシフェリンへの酸化反応で発生し、それぞれのホタル生物種の発光スペクトルは、試験管内でこれらの分子のみで再現可能である。



そこで、祖先型ルシフェラーゼの配列をML法で推定し、主要な祖先配列を合成し発光スペクトルの測定を含む各種の実験を行った (Oba et al. 2020)。図2の系統樹で*Lampyridae*ルシフェラーゼのルートはAncLampに相当し、この祖先型は深緑色に発光することが示された (図3)。AncLamp以前の*Elateridae* (コメツキムシ科) との共通祖先AncElatからは発光がほぼ認められず、*Phengodidae* (フェンゴデス科) との共通祖先AncCanthでは弱い赤色であった

ことから、緑色発光は*Lampyridae*の成立前後に獲得されたと推測される。ただし、AncLampのノードは*Lampyridae*ルシフェラーゼの主要なパラログであるLUC1とLUC2の遺伝子重複に相当し、遺伝子重複と*Lampyridae*成立との厳密な前後関係は不明である (図2)。AncLamp直後のLUC1・LUC2パラログの祖先型AncLuc1・AncLuc2は緑色発光を維持していたが、AncLuc1系統はその後黄緑 (AncLampn1) ~ 黄色 (AncLucin1) に長波長シフトしたのに対し、AncLuc2系統は現在に至るまで緑色を維持していた。

祖先ホタルの発光色が何色であったかについて、緑色であったとする説が唱えられている (Martin et al. 2017)。一般的にホタルの発光は交尾時にオスがメスを惹きつけるためのmating display (求愛信号) の役割をする認識されているが、実際は多くのホタルは卵・幼虫・蛹も発光する。成虫以外の発光は捕食者に対する警告信号warning display (警告信号) であり、これが発光の本来の機能であり、

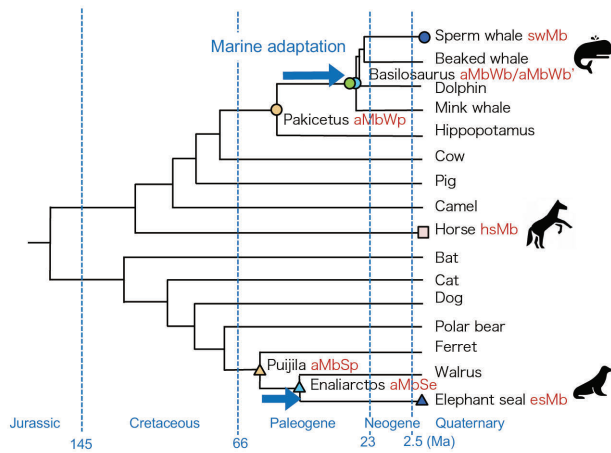


図5：ミオグロビンの分子系統樹 この系統樹は省略されており、リーフ（末端）ノードは生物種をまとめて代表的な種を一般名で示している。丸印と三角印で示した内部ノードは再現された祖先型ミオグロビンを示しており、aMbWpなどの分子名称を赤色で示している（クジラ類祖先*Basilosaurus*については、2つの対立する進化系統仮説にもとづいて2種類の配列aMbWbとaMbWb'を再現した）。青色矢印は海洋再適応が起こった枝を示している。swMb, esMb, hsMbは現存するマッコウクジラ、ゾウアザラシ、ウマのミオグロビンである。この系統樹は年代推定された有根系統樹であり、時代区分(Ma)を青色で示している。

Figure 5: Molecular phylogeny of myoglobins This phylogeny is simplified, and the species at leaf nodes are indicated by representative species in common name. The squares and circles at internal nodes indicate the resurrected ancestral myoglobins, and the names of molecule, such as aMbWp, are shown in red (two different sequences aMbWb and aMbWb' were resurrected for *Basilosaurus* based on two controversial phylogenetic hypotheses). The blue arrows indicate the marine adaptation branches. swMb, esMb, and hsMb are extant myoglobins of sperm whale, elephant seal, and horse, respectively. This phylogeny is rooted and estimated ages are shown in blue (Ma).

夜間の視認性の高さから緑色が適していたとするのが祖先ルシフェラーゼ緑色仮説である。

*Lampyridae*では、遺伝子重複で成立したパラログのうちLUC2は主としてwarning display, LUC1はmating displayに関与する。再現された祖先型ルシフェラーゼAncLampの緑色発光はAncLuc2から現存するLUC2群までwarning display用として進化的に保存されており、LUC1はmating displayに転用され機能分化することで（おそらく交尾の際の種間識別のために）黄緑色や黄色に短波長シフトしたと考えると、祖先型再現の結果はこの仮説と非常に良く整合していた(図2)。

祖先型再現のもう一つの利点は、再現された分子の構造解析から進化の物理化学的根拠を得ることができる点にある (Konno et al. 2011)。祖先型ルシフェラーゼAncLampについてX線結晶解析実験を行い、2.1Å分解能の結晶構造を決定した (図4)。得られた構造は、現存する*Luciola*

cruciata (ゲンジボタル) のLUC1 (LcLuc1) とよく類似していた (Nakatsu et al. 2006)。構造解析は反応中間体アナログである5'-O-[N-(dehydrolyciferyl)- sulfamoyl]adenosine (DLSA) との複合体で行われたが、AncLampとLcLuc1で活性部位や基質結合部位のアミノ酸残基は基本的に保存されていた。

しかし、分子系統樹から推定される置換残基と結晶構造から、基質結合キャビティーの微妙な構造変化が明らかとなった。基質であるルシフェリンを芳香環スタッキングにより結合するPhe残基 (AncLampではPhe246, LcLuc1ではPhe249) は進化的に高度に保存されているが、この芳香環を裏側で支えている残基の置換 (AncLamp→LcLuc1でIle240→Val243およびLeu285→Ile288) により、Pheからルシフェリン芳香環への距離がLcLuc1でAncLampと比べて若干長くなっており、その結果として、基質結合キャビティーの体積も大きいことが示された。これによりキャビティー内での基質の運動は、AncLampでは比較的制限されていたことが示唆される。基質の熱振動は量子効率の低下を通じてエネルギー損失による発光波長の長波長シフトを引き起こすと想定されるので、この構造はAncLampの緑色から現存LUC1の黄緑色~黄色の発光色の変化が、少数のアミノ酸置換による基質結合キャビティーの構造変化によりもたらされたことを示唆している。

4. 哺乳類の潜水適応進化

脊椎動物は、昆虫 (480 Ma)・植物 (470 Ma) に約1億年遅れておよそ385 Maに陸上進出したとされる。その後陸上で進化した動物のうち、クジラ類 (鯨類) とアザラシ類 (鰭脚類) に代表されるいくつかの系統は、およそ50 Maに海洋に再進出した。これは白亜紀末期のK-Pg大量絶滅で*Mosasaurs* (モササウルス) などの大型海洋爬虫類が絶滅したことで、空白となったニッチに進出したものとされている。海洋再進出には多くの遺伝子の進化が必要であったと考えられるが、その一つが筋肉で酸素を貯蔵するミオグロビン (Mb) の進化である (McGowen et al. 2014)。これらの海洋再進出した動物はすでに鰓を失っているため海中では呼吸できないので、潜水前に海面で呼吸したO₂を大量に貯蔵する必要がある。そのため、これらの動物の筋肉には陸生哺乳類に比べて著しく高濃度にMbが溶解されている (Snyder 1983)。これらのMbは側鎖に正電荷を持つ塩基性アミノ酸 (Lys, Arg, His) の分子表面での頻度を上げて表面電荷Z_{Mb}を高くすることで、静電反発により高濃度での凝集を防いでいるとされる (Mirceta et al. 2013)。

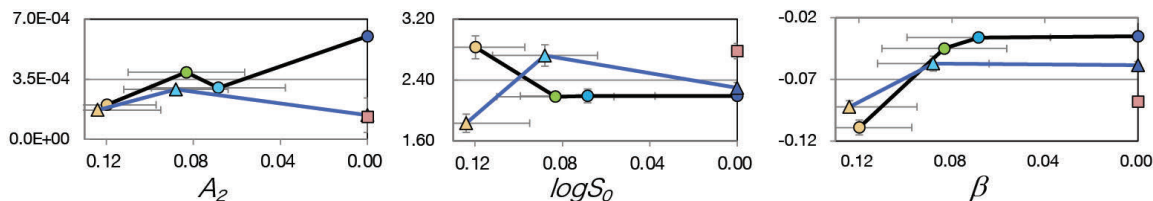


図6：祖先型ミオグロビンの分子間反発・溶解度・沈殿剤耐性 祖先型および現存ミオグロビンの分子間反発(左, A_2)・溶解度(中, $\log S_0$)・沈殿剤耐性(右, β)が現在を0とした進化距離(横軸)に対してプロットされている。各ミオグロビンを表す丸印と三角印は図5と同じである。

Figure 6: Intermolecular repulsion, solubility, precipitant resistance of ancestral myoglobins Intermolecular repulsion (left, A_2), solubility (middle, $\log S_0$) and precipitant resistance (right, β) of ancestral and extant myoglobins are plotted against molecular evolutionary distance (horizontal axis as present is 0). The squares and triangles are indicating the molecules as shown in Fig. 5.

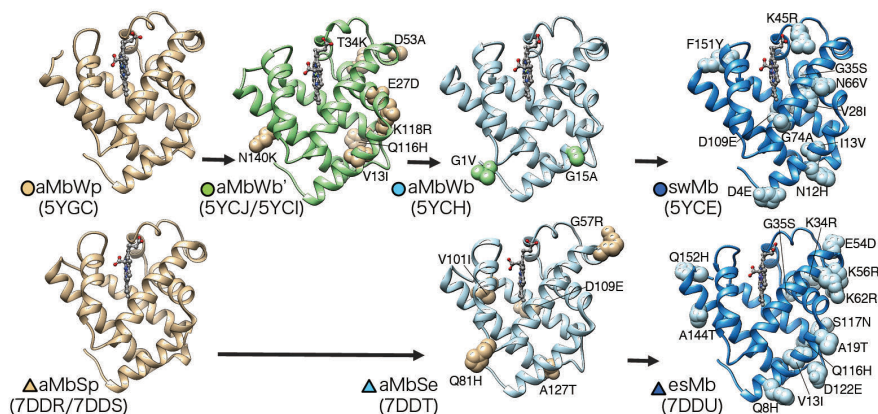


図7：祖先型ミオグロビンの立体構造 X線結晶解析により決定した祖先型および現存ミオグロビンの構造が進化順に示されている。置換された残基が空間充填モデルで、ヘム分子がボール&スティックモデルで示されている。括弧内はそれぞれの構造のPDBコードである。各ミオグロビンを示す丸印と三角印は図5と同様である。

Figure 7: Molecular structures of ancestral myoglobins The X-ray crystallographic structures of ancestral and extant myoglobins are shown in order of evolution. The replaced residues and heme moiety are shown in space-filling and ball & stick models, respectively. In parentheses are PDB code of each structure. The squares and triangles are indicating the molecules as shown in Fig. 5.

この説はシンプルで説得力があり広く受け入れられているが、実験的検証は十分になされていない。

化石試料から、クジラ類の陸上祖先はイヌに類似した四足動物*Packicetus* (パキケトゥス, aMbWp) であり、海洋再適応した初期クジラ類はイルカ様の鰭を持ち後脚の無い*Basilosaurus* (バシロサウルス, aMbWb) であるとされる。また、アザラシ類の陸上祖先はイタチ様のPuijila (プイジラ, aMbSp), 海洋再適応した初期アザラシ類は四足が鰭状になった*Enaliarctos* (エナリアークトス, aMbSe)と推定されている(括弧内のaMbWpなどは祖先型Mbの名称である)。そこで、これらの海洋最適前後の祖先型Mbを復元して、溶解度・安定性・分子間相互作用などを実験的に求めた(図5) (Isogai et al. 2018; Isogai et al. 2021; Isogai et al. 2022)。

上記の説によると、海洋再適応によってMb間の同族分子間反発が大きくなり、それによって溶解度が増大する

と期待される。そこで、Mb間の反発力を小角X線散乱(Small Angle X-ray Scattering; SAXS)により測定した(Kratky and Glatter 1982)。SAXSにより評価される第二ビリアル係数(A_2)は理想気体近似された分子間の斥力大きいほど正に大きくなる。さらに、溶解度をポリエチレングリコール(PEG)沈殿法により評価した。これは、一般的にタンパク質の溶解度は添加した沈殿剤濃度に依存して減少するので、PEGを徐々に添加しつつ溶存タンパク質濃度(縦軸)をPEG濃度(横軸)に対して一次近似することにより、縦軸切片から純水(PEG濃度0)に対する溶解度 $\log S_0$ 、傾きから沈殿剤耐性に相当する β を求める方法である(Kramer et al. 2012)。結果として、分子間斥力 A_2 はクジラ類では増加していたが、アザラシ類では大きな変化が認められなかった。また溶解度 $\log S_0$ も海洋再適応に従って増大する傾向は見られず、クジラ類においては陸上祖先のaMbWpが最も高いという、仮説とは整合しない結果が得られた(図6)。

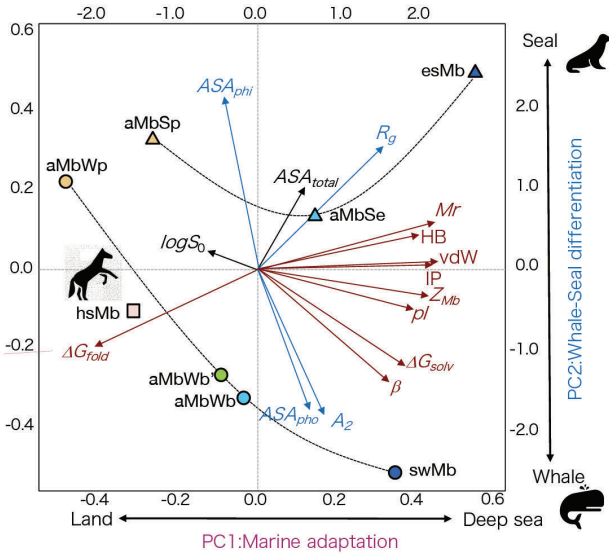


図8：ミオグロビン分子パラメータのPCA解析

祖先型および現存ミオグロビンが各種分子パラメータの主成分分析により第1 (横軸PC1, 海洋再適応軸) -第2 (縦軸PC2, クジラ-アザラシ差軸) 主成分軸にプロットされている。分子パラメータは、熱力学測定から得られたフォールド自由エネルギー (ΔG_{fold})・水和自由エネルギー (ΔG_{solv})、溶解度測定からの溶解度 ($\log S_0$)・沈殿剤耐性 (β)、SAXSによる分子間斥力 (A_2)、立体構造から評価された分子量 (Mr)・表面電荷 (Z_{Mb})・等電点 (pI)・分子表面積 (ASA_{total})・親水性分子表面積 (ASA_{phi})・疎水性分子表面積 (ASA_{pho})・回転半径 (R_g)・分子内ファンデルワールス相互作用数 (vdW)・分子内水素結合数 (HB)・分子内静電相互作用数 (IP)である。ベクトル (矢印) は各分子パラメータの主成分寄与率であり、海洋再適応軸 (赤)・クジラ-アザラシ差軸 (青)・その他 (黒) に分類されて示されている。各ミオグロビンを表す丸印と三角印は図5と同様であり、進化の順番に点線で結ばれている。

Figure 8: PCA analysis of molecular parameters of myoglobins. The ancestral and extant myoglobins are plotted via PCA analysis on the 1st (horizontal “marine adaptation” axis) and 2nd (vertical “whale-seal differentiation” axis) principle axes plane. The molecular parameters are fold free energy difference (ΔG_{fold}), solvation free energy difference (ΔG_{solv}) from thermodynamics experiments, solubility ($\log S_0$), precipitant resistance (β) from solubility experiments, molecular repulsion (A_2) from SAXS experiments, and molecular weight (Mr), surface net charge (Z_{Mb}), isoelectric point (pI), molecular surface area (ASA_{total}), hydrophilic molecular surface area (ASA_{phi}), hydrophobic molecular surface area (ASA_{pho}), radius of gyration (R_g), intramolecular van der Waals (vdW), hydrogen bond (HB), electrostatic (IP) interactions evaluated from three dimensional structures. The overlaid vectors indicate the proportion of variances of each molecular parameter and assigned to 1st, 2nd, or other principal axes and colored in red, blue, or black, respectively. The squares and triangles are indicating the molecules as shown in Fig.5 and connected in order of evolution through dotted lines.

この結果を受けて、X線結晶構造解析や熱力学安定性解析などから各種の分子パラメータを測定し、海洋再適応と最も相関の高い要因を探索した。X線結晶構造解析により全ての祖先型Mbで主鎖構造は保存されていることが確認された (図7)。

これらの Mb の再現実験や立体構造から計算により得

られた分子パラメータの主成分分析 (Principle Component Analysis; PCA) を行った (図8) (Pearson 1901)。第1主成分軸 (PC1) に沿って陸上祖先種から現存海洋適応種が分布 (図8の点線で左から右) することから、この軸は海洋再適応軸に相当すると考えられる。また第2主成分軸 (PC2) に沿ってクジラ類とアザラシ類が分離することから、このクジラ-アザラシ差軸PC2は両者の海洋再適応メカニズムの違い (適応メカニズムの多様性) を示していると解釈できる。

海洋再適応軸PC1に主として寄与する (すなわち海洋再適応の主要因と推定される) パラメータの一つが表面電荷 Z_{Mb} であるので、定説通り表面電荷は海洋再適応と高く相関する (クジラ類ではaMbWpからswMbへの進化に伴って+0.1から+3.9へ、アザラシ類でも同様にaMbSpからesMbへの進化に伴って+1.92から+4.50へと明確に増加している)。しかし前述の通り、溶解度 $\log S_0$ と分子間斥力 A_2 の海洋再適応軸PC1への寄与は高くない。分子間斥力 A_2 はクジラ-アザラシ差軸PC2の主要な寄与因子であるので、確かにクジラ類の海洋最適には分子間反発が寄与しているが、アザラシ類においては同様の寄与は認められず、定説の同族分子間反発の重要性は一般には成立しないと考えられる。

一方で、沈殿剤耐性 (β) や分子内相互作用による安定化要因 (ΔG_{fold} , HB , IP など) が海洋再適応軸PC1に高く寄与していることが示された。細胞内は生化学実験で用いられる希薄緩衝水溶液と異なり、沈殿剤として機能しうる様々な生体高分子で満たされたクラウディング状態にあることから、Mbが高濃度の溶液状態を維持するためには、それらの沈殿剤との非同族分子間相互作用が重要であると考えられる (Phillip et al. 2009; Rivas and Minton 2016)。またタンパク質の沈殿は、部分的に変性したタンパク質が衝突し複合体を形成することで促進されると推定されることから、分子内相互作用の強化による構造の安定化は、沈殿の防止に寄与する (Dasmeh et al. 2013)。すなわち祖先型Mb再現の結果は、非同族分子である沈殿剤との相互作用およびMb分子内相互作用の強化が海洋再適応のより一般的な要因であることを示唆している。

5. おわりに

祖先タンパク質の分子系統樹による再現は、生物がどのように環境に適応してきたかを実験室で検証する機会を提供することができる。例として示したルシフェラーゼの発光色進化やミオグロビンの海洋再適応進化の解析は、化石からは得られない比較的明瞭な分子生物学的デー

タを提供した。

しかし、これらの例はこの方法の課題も同時に示している。ルシフェラーゼとミオグロビンは主として単量体で機能するタンパク質であるので、祖先型と表現型（実験データ）を容易に対応づけることができる。一方、多くのタンパク質は複数のサブユニットのヘテロ複合体として機能する。その場合、それぞれのサブユニットの分子系統樹の同期という問題が生じるので、祖先型ヘテロ複合体の再現実験は格段に困難になる。この課題を追求することが現在の主要な目的の一つである。

そこで現在、祖先型光合成複合体の再現を目的とした研究を進めている。光合成は数百種類のタンパク質が関与する生命にとって最重要の化学反応の1つであるが、それらのタンパク質の多くは1000 Ma（10億年）を超える進化の歴史を持ち、さらに巨大複合体(supramolecule)を形成するので、祖先型再現としては最難関の課題である。一方で、光合成複合体が地球規模の環境変動に適応して進化しユビキタスな光合成能力を獲得してきたメカニズムは、気候変動が大きな問題となっている現代に必要な情報であり、祖先型再現を現実的な問題に適用することができるテーマであるとも言える。近年の機械学習（AI）とそれに付随した大量データ（ビックデータ）処理技術の進展も、このテーマの追求を後押しする形となるので、祖先型光合成複合体再現が一連の研究の集大成となることを期待している。

ここで紹介した研究は磯貝泰弘博士（富山県立大）、今村比呂志博士（長浜バイオ大）、大場裕一博士（中京大）、加藤太一郎博士（鹿児島大）、墨智成博士（室蘭工業大）、常重アントニオ博士（法政大）らとの共同研究で、JSPS科研費JP23H04964, JP23K21721の助成を受けて実施したものであり、最後に感謝申し上げます。

参考文献

- Dasmeh, P., Serohijos, A.W., Kepp, K.P. and Shakhnovich, E.I. (2013) Positively selected sites in cetacean myoglobins contribute to protein stability. *PLoS Comput Biol* 9: e1002929.
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17: 368-376.
- Green, R.E., Krause, J., Briggs, A.W., Maricic, T., Stenzel, U., Kircher, M., et al. (2010) A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 328: 710-722.
- Isogai, Y., Imamura, H., Nakae, S., Sumi, T., Takahashi, K.I., Nakagawa, T., et al. (2018) Tracing whale myoglobin evolution by resurrecting ancient proteins. *Sci Rep* 8: 16883.
- Isogai, Y., Imamura, H., Nakae, S., Sumi, T., Takahashi, K.I. and Shirai, T. (2021) Common and unique strategies of myoglobin evolution for deep-sea adaptation of diving mammals. *iScience* 24: 102920.
- Isogai, Y., Imamura, H., Sumi, T. and Shirai, T. (2022) Improvement of Protein Solubility in Macromolecular Crowding during Myoglobin Evolution. *Biochemistry* 61: 1543-1547.
- Kazantsev, S. (2015) *Protoluciola albertalleni* gen.n., sp.n., a new Luciolinae firefly (Insecta: Coleoptera: Lampyridae) from Burmite amber. *Russian Entomological Journal* 24.
- Konno, A., Kitagawa, A., Watanabe, M., Ogawa, T. and Shirai, T. (2011) Tracing protein evolution through ancestral structures of fish galectin. *Structure* 19: 711-721.
- Kramer, R.M., Shende, V.R., Motl, N., Pace, C.N. and Scholtz, J.M. (2012) Toward a molecular understanding of protein solubility: increased negative surface charge correlates with increased solubility. *Biophys J* 102: 1907-1915.
- Kratky, O. and Glatter, O. (1982) Small angle x-ray scattering. Academic Press, London ;.
- Martin, G.J., Branham, M.A., Whiting, M.F. and Bybee, S.M. (2017) Total evidence phylogeny and the evolution of adult bioluminescence in fireflies (Coleoptera: Lampyridae). *Mol Phylogenet Evol* 107: 564-575.
- McGowen, M.R., Gatesy, J. and Wildman, D.E. (2014) Molecular evolution tracks macroevolutionary transitions in Cetacea. *Trends Ecol Evol* 29: 336-346.
- Mirceta, S., Signore, A.V., Burns, J.M., Cossins, A.R., Campbell, K.L. and Berenbrink, M. (2013) Evolution of mammalian diving capacity traced by myoglobin net surface charge. *Science* 340: 1234192.
- Morris, S. (1977) A new metazoan from the Cambrian Burgess Shale of British Columbia. *Palaeontology* 20: 623-640.
- Nakatsu, T., Ichiyama, S., Hiratake, J., Saldanha, A., Kobashi, N., Sakata, K., et al. (2006) Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature* 440: 372-376.
- Nei, M. and Kumar, S. (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.
- Oba, Y., Konishi, K., Yano, D., Shibata, H., Kato, D. and Shirai, T. (2020) Resurrecting the ancient glow of the fireflies. *Sci Adv* 6.
- Pearson, K. (1901) LIII. On lines and planes of closest fit to

- systems of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 2: 559-572.
- Phillip, Y., Sherman, E., Haran, G. and Schreiber, G. (2009) Common crowding agents have only a small effect on protein-protein interactions. *Biophys J* 97: 875-885.
- Ramsköld, L.X., H. (1991) New early Cambrian animal and onychophoran affinities of enigmatic metazoans. *Nature* 351: 225-228.
- Rivas, G. and Minton, A.P. (2016) Macromolecular Crowding In Vitro, In Vivo, and In Between. *Trends Biochem Sci* 41: 970-981.
- Smith, M.R. and Caron, J.B. (2015) Hallucigenia's head and the pharyngeal armature of early ecdysozoans. *Nature* 523: 75-78.
- Snyder, G.K. (1983) Respiratory adaptations in diving mammals. *Respir Physiol* 54: 269-294.
- van der Valk, T., Pecnerova, P., Diez-Del-Molino, D., Bergstrom, A., Oppenheimer, J., Hartmann, S., et al. (2021) Million-year-old DNA sheds light on the genomic history of mammoths. *Nature* 591: 265-269.