

# 遺伝子解析による移植されたゲンジボタルの移植元判別法

日和 佳政・大畑 優紀子・草桶 秀夫・井口 豊・三石 暉弥

全国ホタル研究会誌 43: 27-32 (2010)

## Identification of the native habitats of alien populations of the Genji firefly *Luciola cruciata* by DNA analysis

Yoshimasa Hiyori, Yukiko Ohata, Hideo Kusaoke, Yutaka Iguchi and Teruya Mitsuishi

Zenkoku Hotaru Kenkyukai-shi, 43: 27-32 (2010)

Correspondence:

Yutaka Iguchi

Laboratory of Biology

Yamashita-cho 1-10-6, Okaya City, Nagano Prefecture, 394-0005, Japan

bio.iguchi@gmail.com

問い合わせ：

井口 豊

〒394-0005 長野県岡谷市山下町 1-10-6 生物科学研究所

bio.iguchi@gmail.com

訂正

	(誤)	→	(正)
p. 27 右段 13 行目	ム6つ		6つ
p. 32 右段 22 行目	Gene Diversity snd		Gene Diversity and
p. 32 右段 25 行目	Lampuridae		Lampyridae

# 遺伝子解析による移植されたゲンジボタルの 移植元判別法

日和 佳政\*・大畑 優紀子\*・草桶 秀夫\* (福井県福井市)・  
井口 豊\*\* (長野県岡谷市)・三石 暉弥\*\*\* (長野県長野市)

## 1. はじめに

ゲンジボタル *Luciola cruciata* は、北海道を除く本州から九州に生息する体長 10~20mm の水生のホタルである。ゲンジボタルの発光間隔は、フォッサマグナを境界に東日本では約 4 秒であるのに対し、西日本では約 2 秒という特徴をもつ (大場, 1988)。ゲンジボタルは、昔から夏の風物詩として親しまれてきたが、近年の急激な環境の悪化に伴い減少しつつあるが、豊かな里山のシンボルとして取り上げられ、地方自治団体や保護団体によって盛んに保護活動が行われている。しかしながら、一方では人為的かつ大規模な移出入が行われ、自然個体群の遺伝子攪乱を引き起こし、遺伝的多様性の減少が危惧される (日和ら, 2008)。このような現状から、地域集団内の遺伝的集団構造を解明するとともに、地域固有のホタルの遺伝子を保護することが重要となっている。

我々のこれまでの研究 (吉川ら, 2001; 草桶ら, 2005) で、ミトコンドリア内の ND5 子遺伝の解析から、ゲンジボタルは東日本グループ、西日本グループ、北九州グループ、および南九州グループの 4 つの地理的に独立したハプロタイプグループ (遺伝的グループ) に分かれること

が見出されている。さらに、東日本グループは 2 つのサブグループ、西日本グループは 3 つのサブグループ、南九州グループは 2 つのサブグループに分かれ、サブグループを含めると 8 つの遺伝的グループに分かれることが見出されている (図 1)。昨年度、本研究大会でこれらの 8 つの遺伝的グループは、地理的に独立した場所に分布することを明らかにしている。また、Suzuki *et al.* (2002) はミトコンドリア内のチトクロームオキシダーゼ II 遺伝子の解析からハプロタイプを 6 つのグループに分けている。

本研究では、実際に移植された実例をあげ、遺伝子解析によってどのような場所からゲンジボタルが移植されたのか、移植元の判別法について検討した。また、今後移植についてどのように扱うべきかについても、遺伝子レベルからの移植の指針について考察する。

## 2. 遺伝子解析による移植元判別法

### 2.1 移入元がわかっている場合：塩基配列決定法

40 数年前に滋賀県守山市から長野県辰野町松尾峡に移植されたゲンジボタル 10 個体と松尾峡から数 km 離れた辰野町鴻の田に自然発生しているゲンジボタル 5 個

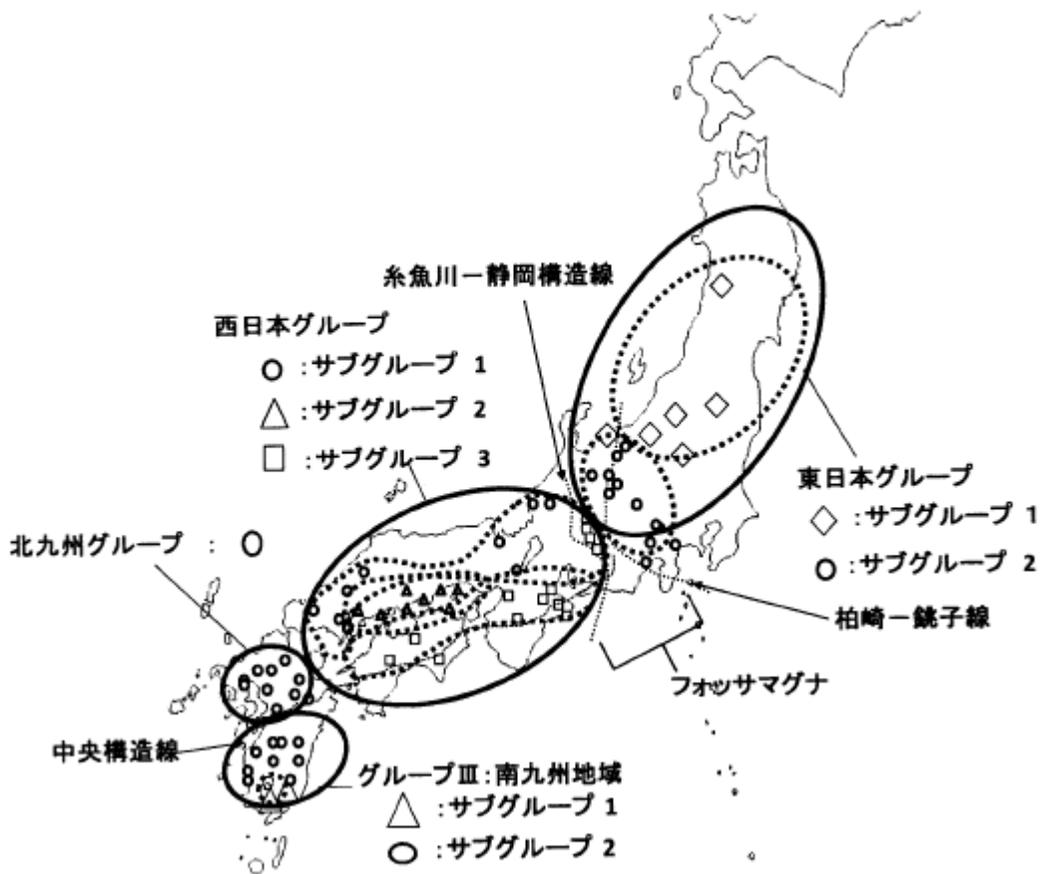


図 1. 8つの遺伝的グループの地理的分布

体を用いて、常法（吉川ら，2001）に従い、ND5 遺伝子（850bp）の塩基配列を決定した。これらの地域の塩基配列とすでに塩基配列を決定している移植元である滋賀県守山市のゲンジボタルの塩基配列に基づき、ハプロタイプの分子系統樹を作成した。

分子系統解析は、ND5 遺伝子領域の塩基配列を吉川ら（2001）の方法を用いて解読し、分子系統解析ソフト MEGA 4.0 を用いて行った。系統関係の推定は、遺伝子バンクに登録されている配列に本解析で解読された塩基配列を加え、近隣結合法を用いて分子系統樹を作成した。

## 2.2 移植元がわかっていない場合:

### (1) 塩基配列決定法

長野県松本市上高地に移植されたとの情報が出たゲンジボタル6個体を常法（吉川ら，2001）に基づき、ND5 遺伝子（850bp）の塩基配列を決定した。次に、上高地のゲンジボタルのハプロタイプと上高地周辺のこれまで塩基配列を決定しているゲンジボタルのハプロタイプについて分子系統樹を作成した。分子系統解析は、移植元がわかっている場合と同様な方法で行った。

### (2) 遺伝子合成法

塩基配列決定法は、労力を要し、実験取り扱いに時間を要する。そこで、以下に述べるとおり、遺伝子合成法が塩基配列決定法に比べ簡便である。本研究に用いた遺伝子は、ミトコンドリアDNAの

NADHデヒドロゲナーゼサブユニット5 (ND5) 遺伝子領域の一部 (850bp) で、この遺伝子のうち標準的な塩基配列をもつDNAプライマーを作成した (草桶ら, 2009)。プライマーとは、8つのグループに対し特異的な塩基配列をもつND5遺伝子を合成するための20~30塩基からなる短いDNAをいう。昨年度の本研究会で、7種類のプライマーとゲンジボタルDNAを用い、DNA合成 (PCR反応) を行うと、8つの遺伝的グループに特有のDNA合成物 (PCR産物という) が得られることを報告している (日和ら, 2009)。これらのPCR産物の種類から、移植されたホタルが8つのグループのうちどのグループに属するのかを判別する。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 移植元がわかっている場合

長野県辰野町松尾峡のゲンジボタルは、これまで1960年ごろから数回にわたって滋賀県守山市から長野県辰野町松尾峡にゲンジボタルが移入されていることが知られている (井口, 2003)。著者らのこれまでの研究によって、守山市から移植された辰野町松尾峡のゲンジボタルは、西日本グループのうち移植元 (守山市) と同じサブグループ3に帰属されることを見出している (日和ら, 2007)。これらの結果は、滋賀県守山市から長野県辰野町に移入されたゲンジボタルは、その地域に自然発生しているゲンジボタル (図2. 西日本グループのサブグループ1) とは遺伝的にも異なり、現在もその地域に定着し自然交配によって世代交代が続けられていることを示唆している。

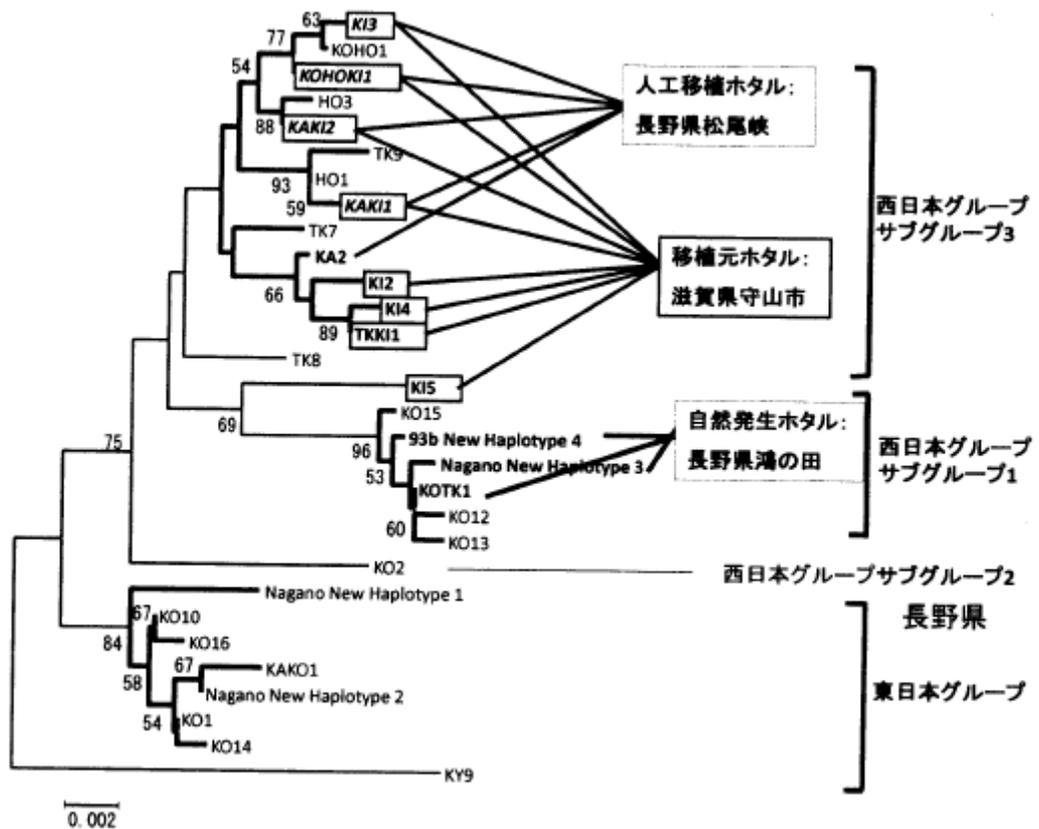


図2. 長野県松尾峡に移植されたゲンジボタルと松尾峡周辺 (長野県鴻の田) の自然分布のゲンジボタルとの遺伝的類縁関係を示す系統樹

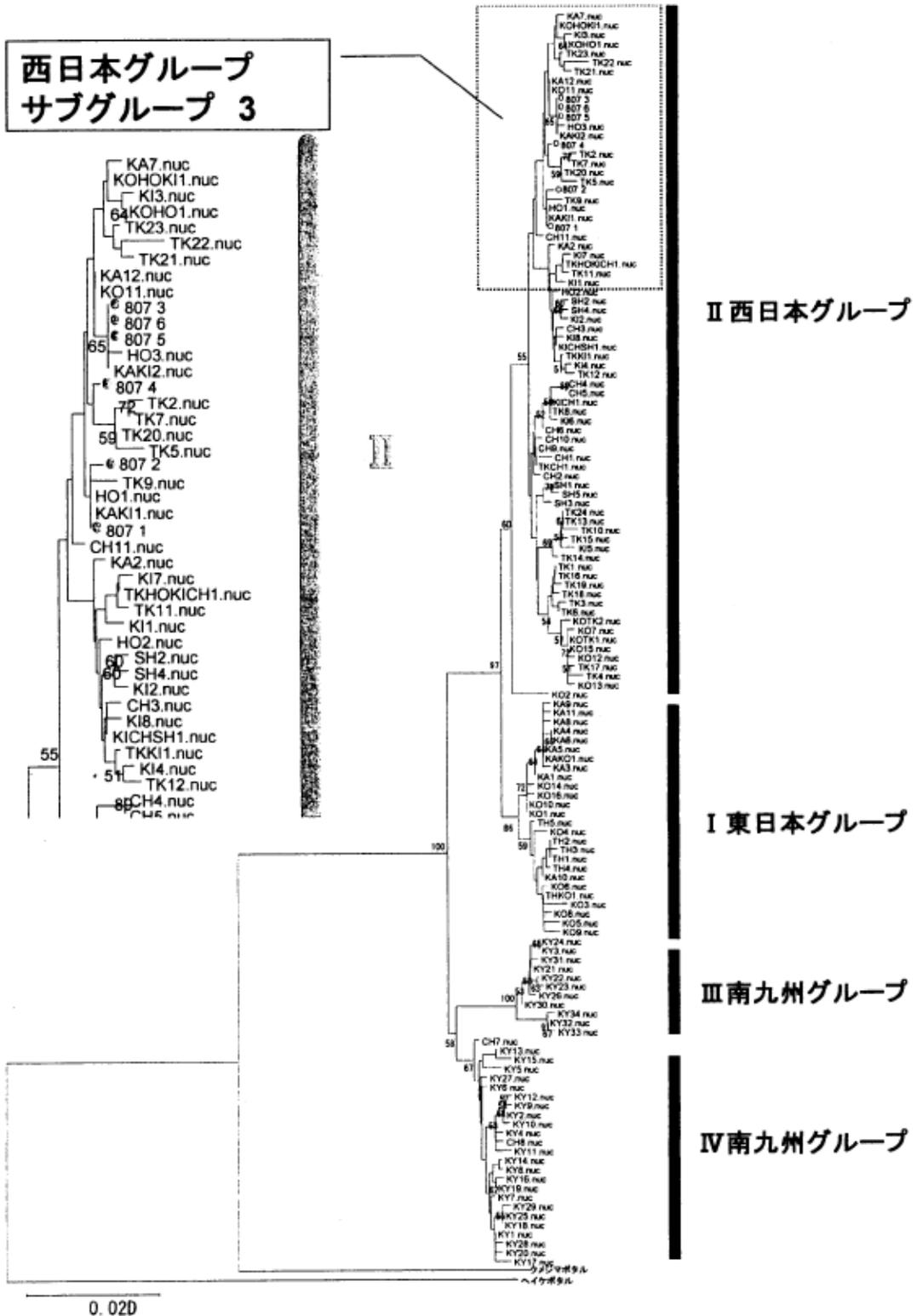


図3. 長野県松本市安曇野上高地から採集されたゲンジボタルと長野県を中心とする上高地周辺のゲンジボタルとの類縁関係を示す分子系統樹。●印は、上高地のゲンジボタルを用いてND5遺伝子の塩基配列から得られたハプロタイプ

松尾峡の場合、幼虫の生息する水系が閉鎖系であることから、40 数年経過しても長野県松尾峡周辺に自然発生しているゲンジボタルとの交雑が起きなかったものと考えられる。このように、移植元が分かっている場合、移植元と移植先の両方のゲンジボタルの遺伝子解析によって、移植されたホタルがその場所に定着しているかどうかを判別することができる。

### 3.2 移植元がわかっていない場合

長野県上高地に移植されたゲンジボタルは、どのような場所から移植されたのか不明である。このような場合にも、移植元がわかっている場合と同様に、塩基配列決定法による遺伝子解析を行った。その結果、これらの配列の遺伝的類縁関係を示す系統樹を図3に示した。上高地のゲンジボタルの6個体から6つのハプロタイプが見出された。そのうち新規な2つのハプロタイプが得られた。4つのハプロタイプは、神奈川県、滋賀県、富山県、石川県、東京都、そして京都府に生息するゲンジボタルと同じ配列をもつ

ハプロタイプを示した。以上の結果から、上高地のゲンジボタルは、移植元を特定できなかったが、京都から神奈川県にまたがる広い範囲の地域に生息する西日本グループのうちサブグループ3に帰属された。

塩基配列を決定する方法は、時間と労力とともに、実験取り扱いの熟練を要する。簡便な方法として、昨年度の本研究会で報告したが（日和ら，2009），8つの遺伝的グループを判別する遺伝子合成法を推奨する。遺伝子合成法は、移植元がわかっていないホタルの場合にも、8つのいずれかの地域に分類することが可能である。

### 3.3 遺伝的多様性と移植の問題

これまでの我々の研究において、遺伝的に人工移植が問題となるのはどのような範囲までであるかを明らかにする目的で、福井県の隣接する1級河川水系間におけるゲンジボタルの遺伝的多様性について調べた（日和ら，2008）。遺伝的多様性 (Genetic diversity) とは、集団、



図4. 九頭龍川、足羽川および日野川水系の位置的関係と遺伝的多様性

種,あるいは種グループの遺伝的変異の大きさを表すもので,ここでは,ゲンジボタル個体群内の個体間にみられる遺伝的変異の大きさを示している。九頭竜川,足羽川,および日野川の隣接する3つの河川水系で,それぞれ大きな遺伝的多様性を示すことが明らかとなった(図4)。特に,日野川と九頭竜川には含まれた足羽川は,これらの2つの河川の影響を受け,高い遺伝的多様性を示した。このことは,十数km離れた水系間でも遺伝的に多様性が認められ,地域固有の個体群の集団を形成していることを示している。したがって,十数km以上離れた所から移植を行うことは,遺伝子多様性という視点から見て,大きな問題である。

本研究会では,「ホタル類等,生物集団の新規・追加移植および環境変化に関する指針」を示している。その中で,対象地域と異なる水系(流域)より採取することは推奨しないと記述されている。この指針を踏まえ,本研究によって得られた結果から,以下のようなゲンジボタルの移植(放流)に関する指針を提案する。

1. 自然発生しているホタルと同一河川流域から移植する。
2. 自然発生している場所と移植先の場所との距離は,10km以内とする。
3. 自然発生している場所から山越えして移植しない。
4. ビオトープに移植する場合,他の場所への移植を繰り返さない。

以上述べたように,生態系の保全という観点から,ホタルの地域固有の遺伝的集団を保全することは,今後益々,重要になると考える。

#### 4. 引用文献

- 井口 豊 2003, 長野県辰野町松尾峡におけるゲンジボタル移入の歴史について. 全国ホタル研究会誌, (36):13-14.
- 大場信義 1988, ゲンジボタル. 文一総合出版.
- 草桶秀夫・日和佳政 2005, ホタルの発光と系統進化. 生物と化学, **43**:351-353.
- 日和佳政・水野剛志・草桶秀夫 2007, 人工移入によるゲンジボタルの地域個体群の遺伝的構造への影響. 全国ホタル研究会誌, (40):25-27.
- 日和佳政・佐久間慎介・柑子木郁也・草桶秀夫 2008, ゲンジボタルの遺伝的分化と多様性から見た移植の問題点. 全国ホタル研究会誌, (41):33-38.
- 日和佳政・佐久間慎介・柑子木郁也・草桶秀夫 2009, 遺伝子から見たゲンジボタルの遺伝的グループの判別. 全国ホタル研究会誌, (42):52-55.
- Suzuki H., Y. Sato and N. Ohba 2002, Gene Diversity and Geographic Differentiation in Mitochondrial DNA of the Genji Firefly, *Luciola cruciata* (Coleoptera: Lampyridae). *Molecular Phylogenetic Evolution*, **22**:193-205.
- 吉川貴浩・井出幸介・窪田康男・中村好宏・武部寛・草桶秀夫 2001, ミトコンドリア ND5 遺伝子の塩基配列から推定されたゲンジボタルの種内変異と分子系統. 昆虫ニューシリーズ, **4**:117-127.

---

\* 福井工業大学大学院・応用理化学専攻・生命科学分野

\*\* 生物科学研究所

\*\*\* 長野ホタルの会

## 補足説明

井口 豊 (生物科学研究所)

論文中の図2で、上高地のゲンジボタルの系統樹上の位置 (●) が分かりにくいと思われるので、ここに●で明示しておく。

ハプロタイプ 807-1 から 807-6 がそれである。

### 西日本グループ サブグループ 3

