

遺伝子から見たヒメボタルの変異と分化

日和 佳政*・馬場 弘孝*・草桶 秀夫 (福井県福井)

はじめに

ヒメボタル *Hotaria parvula* は北海道を除く本州から四国, 屋久島を含む九州に分布する陸生のホタルである。このホタルは体長が約 8 mm で発光間隔が 0.9 秒の大型と体長が約 6 mm で発光間隔が 0.5 秒の小型の 2 生態型が知られており, これらの 2 生態型はそれぞれ棲み分けをしている (大場, 2000)。さらに, メスは後翅が退化して飛翔することができない (大場, 1993)。これらの生態的, 形態的特徴から, 分布が広がり難く, 地理的な隔離などが起こりやすいため, 種内において大きな遺伝的変異が起きているものと考えられる。ヒメボタルの各個体群間の遺伝的類縁関係を調査した研究報告は, 酵素の電気泳動により遺伝的多型を検出するアロザイム解析が行われており, 大型と小型の 2 生態型に遺伝的分化が生じていると報告されている (Suzuki *et al.*, 1993)。また, 大型と小型の各個体群間の遺伝的距離は, 亜種レベルの分化程度を示すとされている (佐藤, 1998)。

そこで, 我々は塩基配列レベルでの個体群間の変異と分化という点に着目し, これまでゲンジボタル *Luciola cucuiata* とヘイケボタル *Luciola lateralis* について解析を行ってきたミトコンドリア ND5 遺伝子の塩基配列を用い, ヒメボタルの

地域個体群について遺伝的類縁関係を調査した。また, 解析に用いたヒメボタルの体長と体幅について計測を行い, 体の大きさと遺伝的分化の関連性について調査したので, その概要を紹介する。

材料と方法

解析に用いたヒメボタルは, 全国ホタル研究会会員の方々から提供されたものと, 当研究室で採集したものをを用いた。DNA 解析には, 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) 遺伝子を PCR によって増幅し, Dye terminator 法によって塩基配列を決定した。決定された塩基配列は Mukai らの方法 (Mukai *et al.*, 1997) によってハプロタイプ別に分類した。

分子系統解析は MEGA2 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis software (Kumar *et al.*, 2001) を用いて行った。分子系統樹は, 遺伝的距離として, Jukes-Cantor distance と Tamura-Nei distance 用い, UPGMA 法および近隣結合法によって作成した。系統樹の信頼性は, 1000 回繰り返しによるブートストラップテストによって評価した。

また, 解析に用いた各個体について, 体幅と体長を計測し, 体幅に対する体長の関係を調査した。

結 果

1. 分子系統解析

現在までに、全国28地域44個体について900bpの塩基配列を決定した。決定された塩基配列を解析した結果、28個のハプロタイプが認められた。また、各ハプロタイプ間の最大置換率は11.4%となり、種間レベルの変異が起きていることが明らかとなった。これはゲンジボタルやヘイケボタルに比べると3倍以上の大きな置換率である。

各ハプロタイプの塩基組成はA、Tに偏っており、塩基置換頻度はコドンの第3ポジションに偏っていた。また、ハプロタイプ間の塩基置換は、トランジション変異がトランスバージョン変異より多く認められた。これらの結果から、Kumar *et al.* (1993) の遺伝的距離選択のガイドランに基づき、遺伝的距離として Jukes-Cantor distance および Tamura-Nei distance を用い、系統樹を作成した。系統樹はJukes-Cantor distance および Tamura-Nei distance ちらを用いた場合でも、ほぼ同様の樹形が得られた。

UPGMA法と近隣結合法の系統樹では、系統樹の根元部分でやや分岐の様子が違っていた。しかし、この部分のブートストラップ値が低いことや、進化距離が比較的短いことなどを判断すると、分岐の真相は明らかではないと考えられる。

図1に近隣結合法で得られた、ヒメボタルの系統樹を示す。図1からヒメボタルは各個体群間の遺伝的距離が非常に大きく、遺伝的分化が著しく起きていることがわかる。また、系統樹の中に長崎県対馬に生息するヒメボタルとは別種のツシマヒメボタル *Hotaria tsushman* が含まれる。分岐点の信頼性が低いことから、分化についての詳しいことは定かではないが、ツシマヒメボタルのND5遺伝ヒメボタルに非常に近子の塩基配列は、

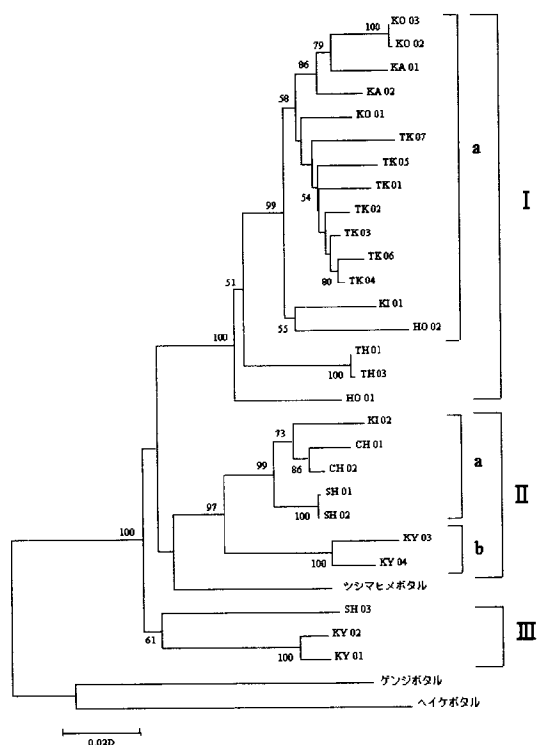


図1. ミトコンドリアND5遺伝子に基づくヒメボタルの分子系統樹

* 外群はヘイケボタルとゲンジボタルを用いた。Dは進化距離を示し、分岐点の数字はブートストラップ値を示す。ハプロタイプの記号はTH：東北、KA：関東、KO：甲信越、TK：東海、HO：北陸、KI：近畿、CH：中国、SH：四国、KY：九州のそれぞれの地域を示す。記号の後の数字は、その地域のハプロタイプ番号である。

いということが示された。さらに、この系統樹で60%以上の比較的高い信頼性のある分岐は16ヶ所で認められるが、系統樹の樹形と、クレード間の遺伝的距離から判断すると、各個体群がいくつかのグループに分割していることが分かる。ここでは大きく分けて3つのグループに分けることが妥当であると考えられた。そこで、この3つのグループをグループI、グループII、そしてグループIIIとして取り扱うこととした。また、各グループ内にやや独立性の高いクレードが認められることから、グループI内のa、グループII内のaとbについて、以下の議論で

はサブグループとして扱うこととした。

これらのグループの地理的分布を図2に示した。図2を見ると、グループⅠが東北から近畿地方までの地域、グループⅡは中国地方そして四国西部から九州南部にいたる地域、そしてグループⅢが九

州北部から四国東部にいたる地域に分布している。各グループのサブグループについては、解析した地域が少ないこともあり、明確な地理的分布の違いが見出されなかった。

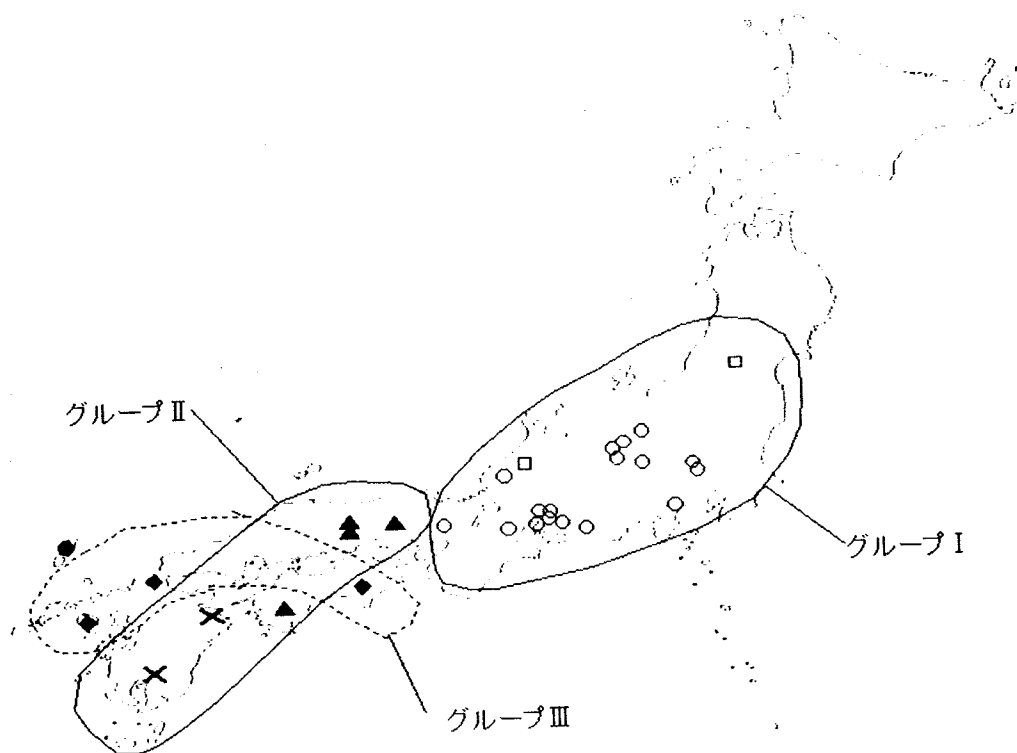


図2. 系統樹から得られたグループの地理的区分

シンボル：グループⅠは□，サブグループⅠaは○，サブグループⅡaは▲，サブグループⅡbは×，グループⅢは◆，ツシマヒメボタルは●で示した。

2. 体の大きさと遺伝的分化との関連性

分子系統解析に用いた各地域のヒメボタルの体幅と体長を測定した結果、最小の個体は、神奈川県小田原市のサンプルで、体幅2.5mm、体長5.2mmであった。また最大の個体は、長野県山ノ内町のサンプルで、体幅3.4mm、体長9.4mmであり、体長で差が6mmと外部形態からも、種内において大きな変異があることがわかった。図3は体幅と体長の関係を示した散布図で、各点は図中にある一次式に近似した。図3を見ると各点は連続的に分布

しており、大型と小型の個体が明確に分かれるような傾向は見られなかった。この結果は、大場（2000）のヒメボタルの全胸背板の幅と長さの測定の結果と一致している。そこで、分子系統樹からグループ分けした各ハプロタイプグループについて、体の大きさと、ハプロタイプグループがどのような関係にあるのかを調査した。図4は系統樹のグループⅠとグループⅡの各個体群について、それぞれ分けてグラフに示したものである。グラフからわかるように、グループⅠ、Ⅱと

も連続して分布しており、体の大きさととの遺伝的関連性は見出せなかった。さらに、グループⅠおよびⅡについてそれぞれのサブグループに対して同様に検討したが、どちらも明確な違いが見出されなかった。

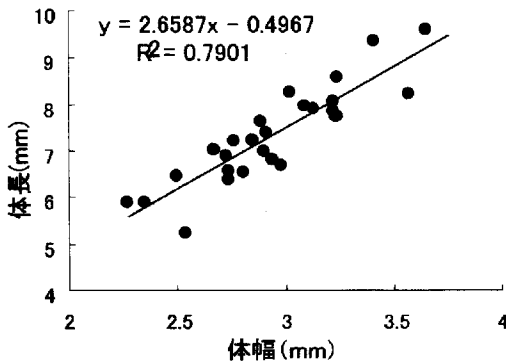


図3. ヒメボタルの体幅と体長の関係

考 察

ヒメボタルの系統解析から言える特徴としては、グループⅡ、Ⅲは系統樹の根元付近から遺伝的分化が始まっている一方、グループⅠは根元からの距離が長い。したがってヒメボタルの分布はまず西日本から始まり、その後グループⅠが東日本方面へ分布を広げたと考えられる。また個体群間の遺伝的変異が著しいことから、現在ND5遺伝子を用いた系統解析の結果について妥当性を評価するため、16SrRNA遺伝子の850bpについても解析をはじめている。現在までにわかっているだけで、16SrRNA遺伝子についても、地理的に離れた個体群間で最大5%程度の置換率が認められた。また、これらの結果から、ホタルのND5遺伝子の進化速度は蝶などの他の昆虫に比べ、非常に早いことがわかってきた。

塩基置換の数は分岐の時代が古くなればなるほど多くなる。塩基置換数をもとに作成された分子系統樹の枝の長さが長も古いこいということは、分岐した時代となる。このことからヒメボタルは、ゲンジボタルやヘイケボタルに比べると、

したがって、現在までに本研究において個体群間の体の大きさと、遺伝的分化との関連性は見出されてはいない。現在、さらに全国50地域以上のサンプルについて、分子系統解析と外部形態の測定を行っている。

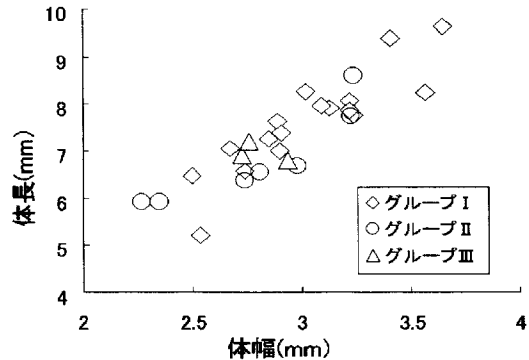


図4. ハプロタイプグループごとの体幅と体長との関係

かなり以前から各地域の環境に適応してきたものと判断できる。メスの後翅が退化していることから、生息地の隔離などが起り、分布拡散がゆっくり進んだため、その地域固有の遺伝的変異が蓄積され、個体群間の遺伝的変異が大きくなったと考えられる。

今回の解析では、外部形態と個体群間の遺伝的類縁関係の間には、関連性は見出されなかった。この点について、解析したサンプルが少ないため、は明確な結果が得られていないことも考えられるので、さらに解析を進めていく必要がある。

課 題

今後の課題として、まだ解析を行っていない地域の解析と、地史データなどをもとにして、ホタルのND5遺伝子の進化速度を求め、分岐年代を推定することが望まれる。また外部形態に加え、各地域の生息環境などの細かな生態的データや、核遺伝子を含めた、多くの遺伝子解析の結果も考慮に入れた検討が必要であると考えられる。そしてこれらのデータの蓄積により、環境と遺伝子のかかわりの中

から、進化のメカニズムを解明していきたいと考えている。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、サンプルをご提供いただいた、全国ホタル研究会会員の皆様、そして数々の助言をいただいた、日本進化学会会員の方々に深く感謝申し上げる。

引用文献

大場信義 2000, ヒメボタル2生態型の発光パターンと発光コミュニケーション. 横須賀市博研報(自然), (47):1-22.

Kumar, S. · K. Tamura · M. Nei 1993, MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analys, Version 1.01. The Pennsylvania State University, University Park, PA16802.

Kumar, S. · K. Tamura · I. B. Jakobsen · M. Nei 2001, MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.

佐藤安志 1998, アロザイムからみたホタルの遺伝的変異と種分化. 昆虫と自然,

33(7):19-25.

鈴木浩文・佐藤安志・藤山静雄・大場信義 1998, ヒメボタル2型の遺伝的分化. 全国ホタル研究会誌, (24):11-12.

鈴木浩文 1998, DNAレベルでみた日本産ホタルの系統進化. 昆虫と自然, 33(7):11-18.

Suzuki, H. · Y. Sato · S. Fujiyama · N. Ohba 1993, Genetic differentiation between ecological tow types of the Japanese firefly, *Hotaria parvula*: An electrophoretic analysis of allozymes. *Zool. Sci.*, 10:697-703.

中根猛彦・大場信義 1993. グリーンブックス73 ホタルの観察と飼育. ニューサイエンス社.

Mukai, T. · K. Naruse · T. Sato · A. Shima · M. Morisawa 1997, Multiregional introgressions inferred from the mitochondrial DNA phylogeny of a hybridizing species complex of gobiid fishes, genus *Tridentiger*. *Molecular Biology and Evolution*, 14:1258-1265.

* 福井工業大学大学院工学研究科応用理化学専攻バイオテクノロジー研究室