全国ホタル研究会誌，(46)：29-41，(2013)

ゲンジボタルの遺伝子解析による人為的放流か自然発生かの判別法

木村 和裕・日和 佳政・草桶 秀夫*（福井県福井市）

1．はじめに

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，近年の急激な環境変化に伴い減少している．ゲンジボタルは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きている．しかしながら，ホタルの正しい地域特性を理解せず，人為的かつ大規模な移出入による自然個体群の遺伝子撹乱が危惧されている．このような現状から，各地域の個体群の遺伝的類縁関係を調べることや，地域集団内の遺伝的集団構造を解明することは，地域固有のホタルを保護する観点からも重要となっている（日和ら，2008，2009）．

我々のこれまでの研究で，図１に示すように，ゲンジボタルはND5遺伝子領域の塩基配列（塩基配列法と呼ぶ）から地理的に独立した８つの遺伝的グループに判別できることを明らかにしてきた（日和ら，2001，2008）．また，ND5遺伝子領域をPCR（遺伝子合成法と呼ぶ）によって増幅し，その遺伝子断片のアガロースゲル電気泳動分析によって７つの遺伝的グループに分けられることを明らかにしている．表１には，これらの２つの判別法とその遺伝的グループの地域名を示す．これらの方法は，移植されたゲンジボタルが他のどの場所から移植されたのかを類推するのに有用である．特に，塩基配列法は，ゲンジボタルの遺伝的グループを判別できるばかりでなく，地域間の類縁関係を明らかにすることが可能で

表１．ゲンジボタルの遺伝的グループの判別法

	基配列法による遺伝的グループ	遺伝子合成法による遺伝的グループ	地　域　名
東日本	グループ１	グループ①	本州東日本：東北地域
	グループ２	グループ②	本州東日本：関東・甲信越地域
西日本	グループ３	グループ③	本州西日本：北陸，中国地域
	グループ４		本州西日本：近畿，中国地域
	グループ５	グループ④	本州西日本：東海・甲信越および四国地域
南九州	グループ６	グループ⑤	南九州地域：九州山地と霧島山との間
	グループ７	グループ⑥	南九州地域：霧島山より南側
北九州	グループ８	グループ⑦	北九州地域：九州山地より北側

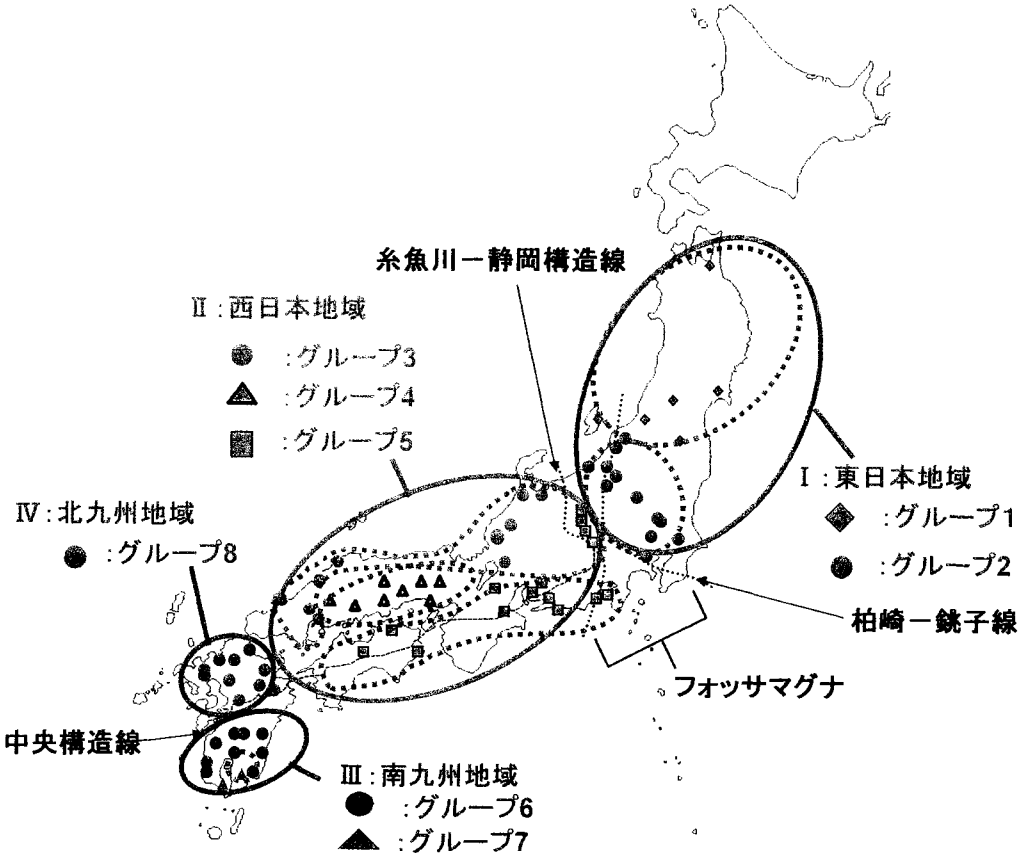


図１．ゲンジボタルのND5遺伝子の塩基配列に基づくハプロタイプの遺伝的グループ

ある．

本研究では，塩基配列法によるゲンジボタルの遺伝子解析により，人為的な放流（以下の文章では移植を放流と呼ぶ）が行われていると考えられるゲンジボタルが，どのような場所から放流したかを類推することを試みた．

２．方法

2.1 実験サンプル

長野県の５地域25個体，滋賀県の１地域８個体，茨木県の13地域36個体，および石川県の10地域28個体から合計97個体のゲンジボタルを採集し，遺伝子解析に用いた．表２に採集地域を示す．

2.2 塩基配列法による地域固有のゲンジボタルの遺伝的判別法

我々のこれまでの研究（日和ら，2009，2010）で，地域固有のゲンジボタルをPCRによって増幅し，その遺伝子断片を７つの遺伝的グループに帰属できることを述べてきたが，ゲンジボタルが人為的放流によってどこから移植されたかについては，この遺伝子合成法によっては明らかにできない．そこで，移植されたゲンジボタルが他のどの場所から移植されたのかを類推するには，移植されたゲンジボタルのミトコンドリア内のND5遺伝子の塩基配列を全国約130か所から調べたND5遺伝子の配列と比較することが必要である．すなわち，約130か所から得られるハプロタイプの分子系統樹を作成し，その分子系統樹から移植されたゲンジボタルのハプロタイプが他の地域のハプロタイプと一致するかどうか，または，最も

表２．本研究で用いたゲンジボタルの採集地

No.	県名	個体数(合計)	採 取 地 域 名
1	長野	２５	(1)池田町北安曇野郡花見，(2)塩尻市田川（みどり湖の下），(3)伊那市御園，(4)松本市女鳥羽川，(5)下伊那郡高森町天白峡
2	滋賀	8	守山市三宅町 守山市ほたるの森資料館のホタル河川
3	茨城	３６	(1)水戸市桜川 榎戸橋，(2)常陸太田市金砂郷町 山田川支流，(3)常陸大宮市 緒川本流と支流の合流点，(4)鹿島市山之上谷津田の流れ，(5)常陸太田市南西部 里川支流，(6)常陸太田市南東部 茂宮川，(7)笠間市 桜川上流域，(8)水戸市 上国井町水戸内の水路，(9)つくば市 逆川支流，(10)久慈郡大子町高田滝の上の小川，(11)久慈郡大子町池田仁ヶ崎沢，(12)東茨城郡城里町 岩船川，(13)北茨城市花園川
4	石川	２８	(1)能登島 南，(2)能登島 長崎，(3)能登島 野崎，(4)能登島 無関，(5)能登島 島別所，(6)能登島 須曽，(7)能登島 向田，(8)能登島 半浦，(9)七尾市 大田，(10)七尾市 田鶴浜

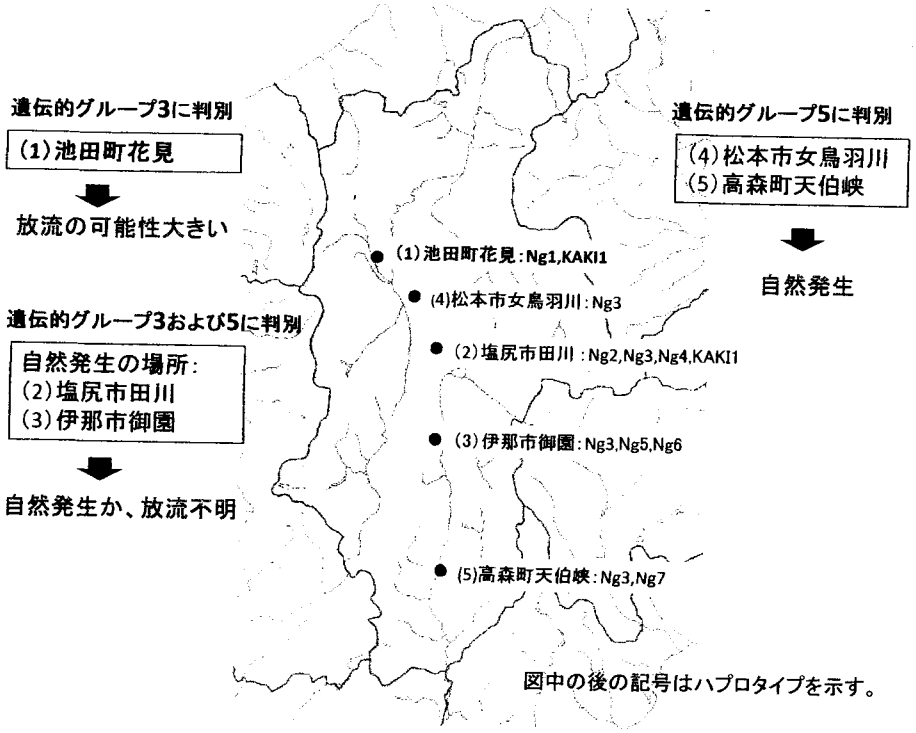
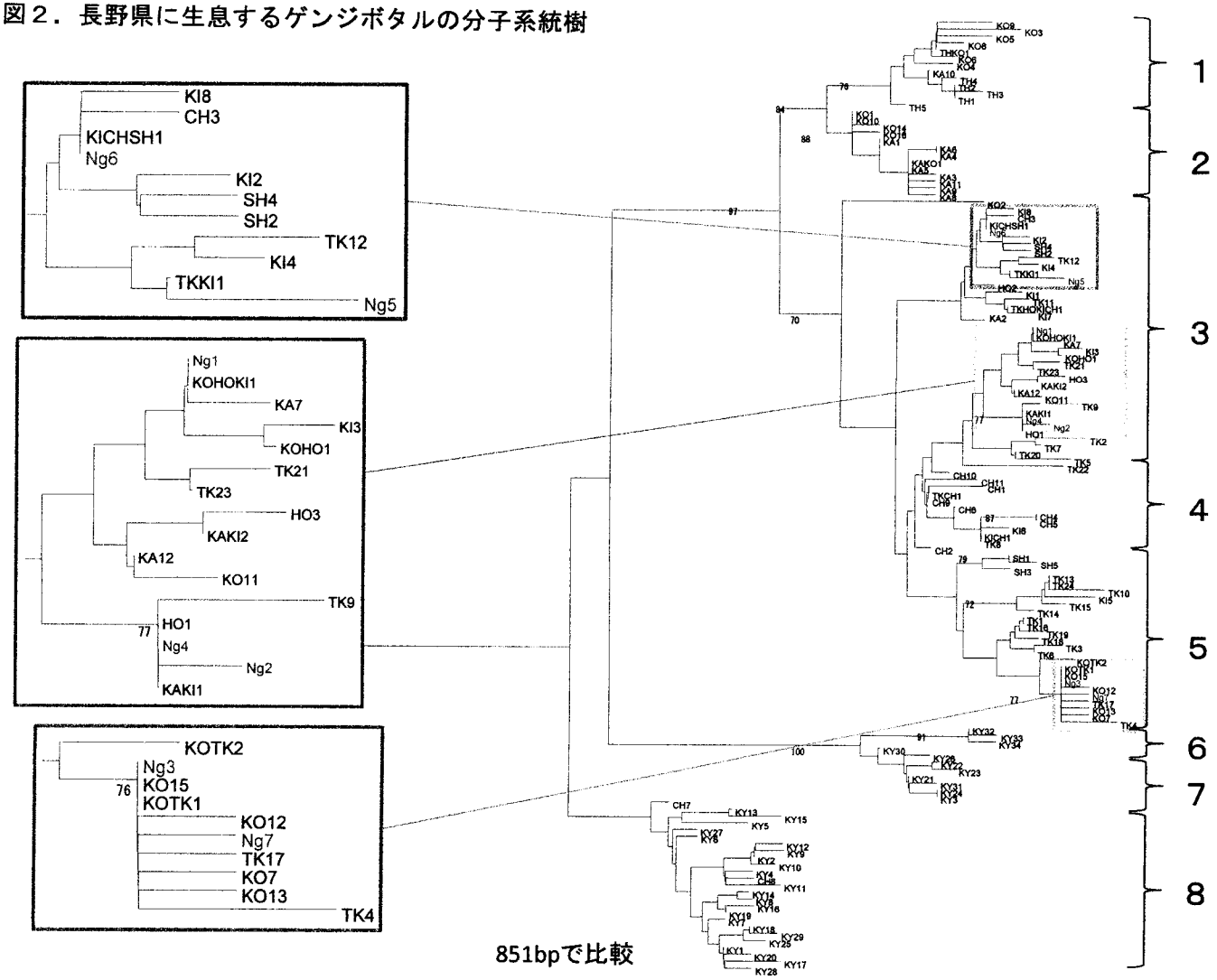


図３．分子系統樹から見た長野県ゲンジボタルの遺伝的グループの判別と類縁関係

近い類縁関係を示すかどうかを調べた．ハプロタイプとは，２つのゲンジボタルの塩基配列を比較した場合，２つの塩基配列に１個以上の異なる配列を示した場合，これらの２つの塩基配列をハプロタイプと呼ぶ．

３．結果と考察

図２．長野県に生息するゲンジボタルの分子系統樹



3.1 長野県と他地域とのゲンジボタルの類縁関係

長野県に生息する５地域25個体（各地域５個体）について，これまで我々が調べた全国のゲンジボタル約130か所から約300個体とのND5遺伝子の851bpの塩基配列に基づく約130のハプロタイプを比較することによって，長野県と他地域のホタルとの類縁関係を調べた．その結果，７個の新規なハプロタイプが見出された．これらの新規ハプロタイプは，５つが遺伝的グループ３であり，１つが遺伝的グループ５に判別された（図２）．遺伝的グループ３に判別された５つのハプロタイプのうち４つは，遺伝的グループ５に判別された地域と同じ場所からも見出された（表３）．しかしながら，池田町花見から見出された新規なハプロタイプNg1は，遺伝的グループ３にのみに判別された（表３，図３）．これまでの我々の研究で，長野県地域のホタルから見出されいる遺伝的グループは，おもにグループ５であったが，本研究によって新規なハプロタイプ７つのうち４つのハプロタイ

表３．長野県と他地域とのゲンジボタルのハプロタイプの類縁関係

新規ﾊﾌﾟﾛﾀｲﾌﾟ	採集地	近縁なﾊﾌﾟﾛﾀｲﾌﾟ	近縁な地域名	遺伝的ｸﾞﾙｰﾌﾟ	発生源
Ng1	池田町花見	KOHOKI1	長野県上伊那郡辰野町 滋賀県坂田郡伊吹町 福井県福井市清水町 福井県今立郡池田町	3	不明
Ng2	塩尻市田川	Ng4		3	
Ng3	塩尻市田川 伊那市御園 高森町天拍峡	KOTK1	長野県長野市松代 長野県志賀高原 長野県志賀高原石ノ湯 長野県長野市芋井 長野県下水内郡栄村 静岡県志太郡岡部町 静岡県藤枝市滝ノ谷	5	自然発生
		KO15	長野県長野市芋井		
Ng4	塩尻市田川	HO1	富山県高岡市本保 富山県富山市古洞 石川県江沼郡山中町 福井県今立郡池田町	3	自然発生
		KAKI1	滋賀県甲賀郡土山町 神奈川県小田原市飯田岡		
Ng5	伊那市御園	TKKI1	滋賀県守山市三宅町 三重県度会郡玉城町	3	自然発生
Ng6	伊那市御園	KICHSH1	滋賀県坂田郡伊吹町 兵庫県多加郡加美町 兵庫県多加郡八千代町 岡山県苫田郡鏡野町 岡山県勝田郡勝北町 徳島県徳島市入田町	3	自然発生
Ng7	高森町天拍峡	Ng3		5	自然発生

プの見つかった地域のホタルは，遺伝的グループ５の他に，グループ３が混在していることが見い出された．これらの結果から，グループ５に判別された地域ばかりでなく，グループ５とグループ３とが共存する地域のホタルもまた，自然発生しているホタルであると推測された（図３）．しかしながら，池田町花見から見出された新規なハプロタイプNg1は，この地域周辺である長野県辰野町松尾峡のハプロタイプと近縁であり，遺伝的グループ３に判別された（表３）．松尾峡のゲンジボタルは，40数年前に守山から移植されたが，今も自然発生している松尾峡周辺のゲンジボタルと交雑することなく，定着していることがわかっている（日和ら，2010）．このことを考えると，池田町花見のゲンジボタルも人為的放流の可能性が高い．池田町花見のゲンジボタルについては，人為的放流が行われたのか，または，本来自然発生しているグループ３のホタルであるのか，今後，さらに，検討することが必要である．

3.2 滋賀県守山市ほたるの森資料館ビオトープと他地域とのゲンジボタルの類縁関係

長野県の場合と同様に，滋賀県守山市ほたるの森資料館のビオトープに生息するゲンジボタル８個体について，ND5遺伝子の682bpの塩基配列に基づき，他地域とのハプロタイプの類縁関係を調べた．その結果，これらの８個体は，それぞれ新規なハプロタイプを示した．解析したゲンジボタルは，いずれも遺伝的に第３グループに同定された（図４）．サンプル８個体のうち７個体は，守山周辺地域の滋賀県地域と近い類縁関係が得られた（図５）．したがって，これらのサンプルは，守山地域のものであるか，または，守山周辺の地域から放流した可能性が高いと考えられる．サンプル８個体のうち，１個体は，長野県辰野町および福井県池田町と清水町のホタルと類縁関係を示した．長野県辰野町のゲンジボタルは，40～50年前守山から辰野町に放流されたことが分かっている．このことを考えると，

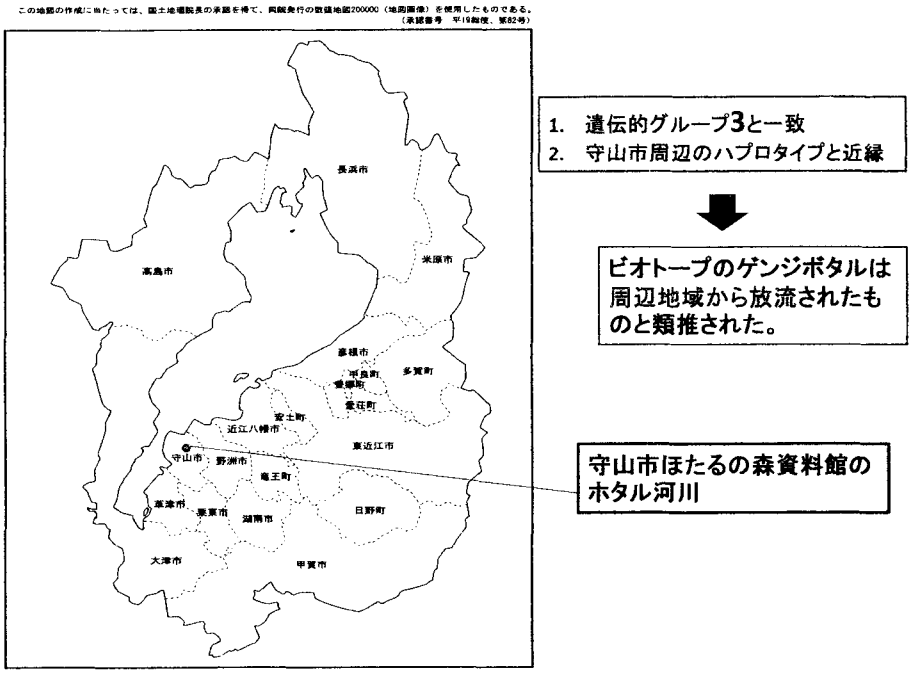


図５．分子系統樹から見た滋賀県守山市ビオトープゲンジボタルの遺伝的グループの判別と類縁関係

図４．滋賀県守山市ビオトープに生息するゲンジボタルの分子系統樹

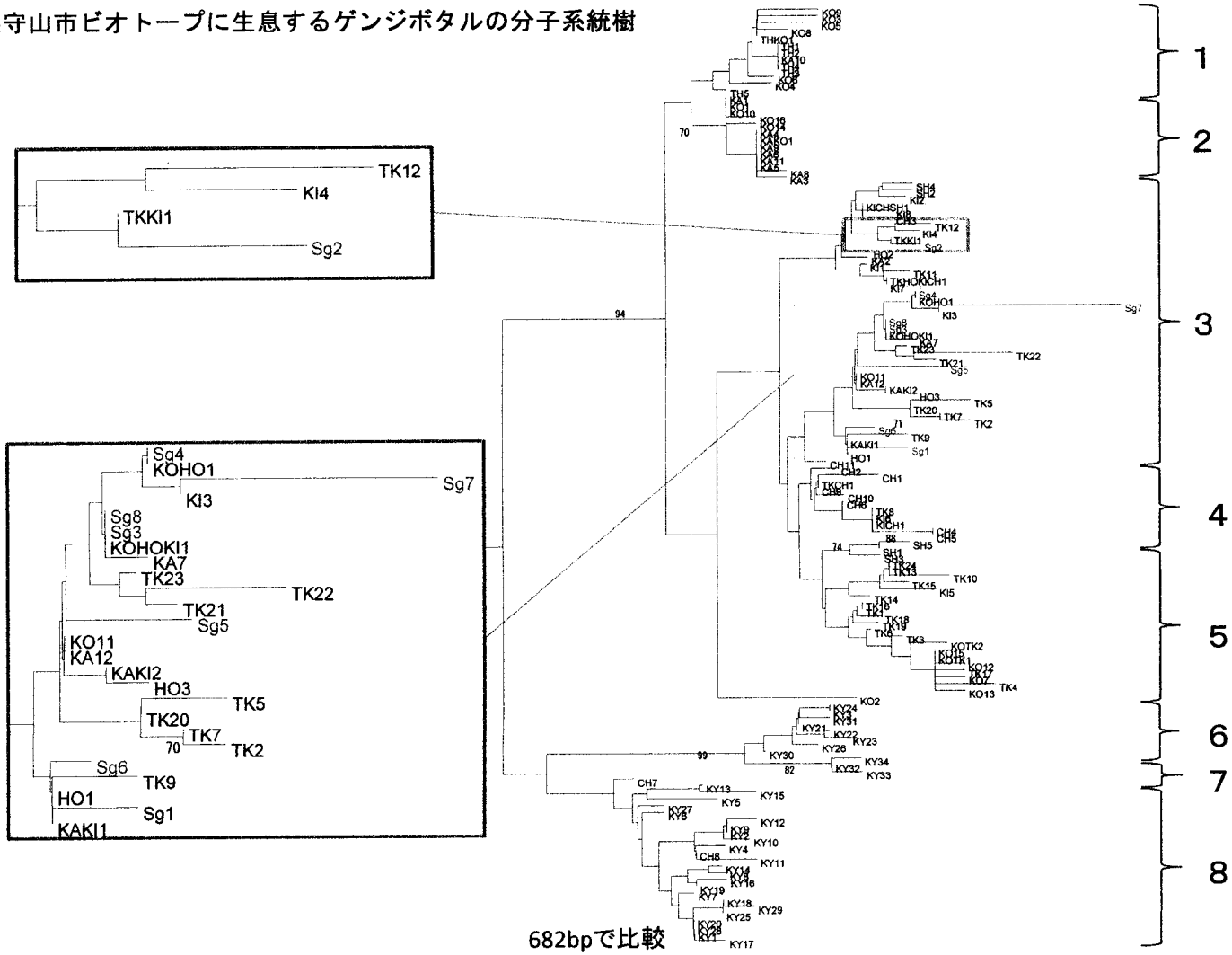
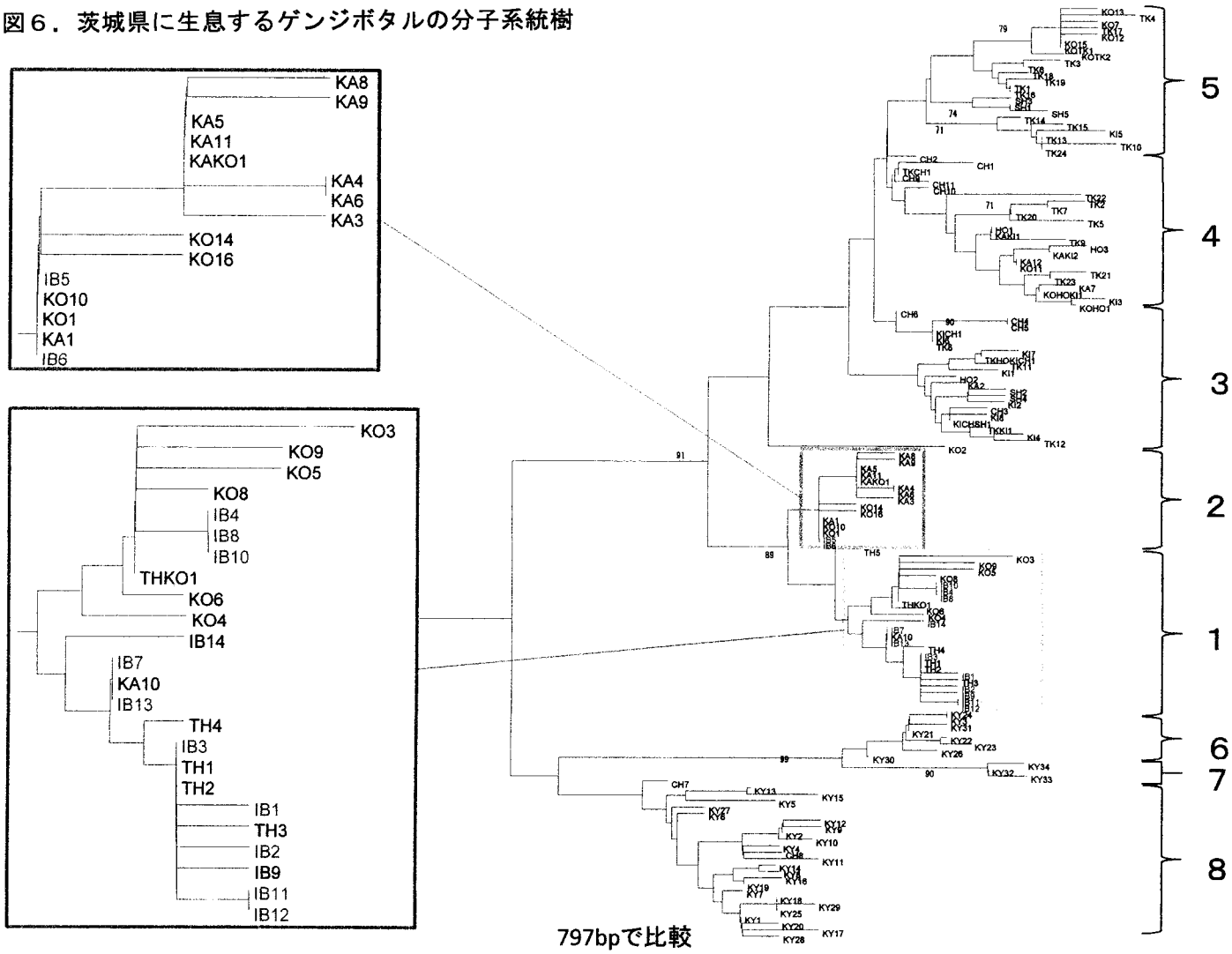


図６．茨城県に生息するゲンジボタルの分子系統樹



この１個体はもともと守山に生息しているホタルであると考えられる．

3.3 茨城県と他地域とのゲンジボタルの類縁関係

長野県の場合と同様に，茨城県の13地域36個体について，ND5遺伝子の797bpの塩基配列に基づき，他地域とのハプロタイプの類縁関係を調べた．その結果，これらの36個体のうち，新規な12のハプロタイプが14個体から見出され，12個体が遺伝的グループ１（本州東日本：東北地域）に，２個体が遺伝的グループ２（本州東日本：関東・甲信越地域）に判別された（図６）．これらのハプロタイプは，これまで調べた自然発生している周辺のゲンジボタルのハプロタイプと近縁であった（図７）．これらの結果から，今回調べたゲンジボタルはいずれも自然発生しているホタルであると考えられる．

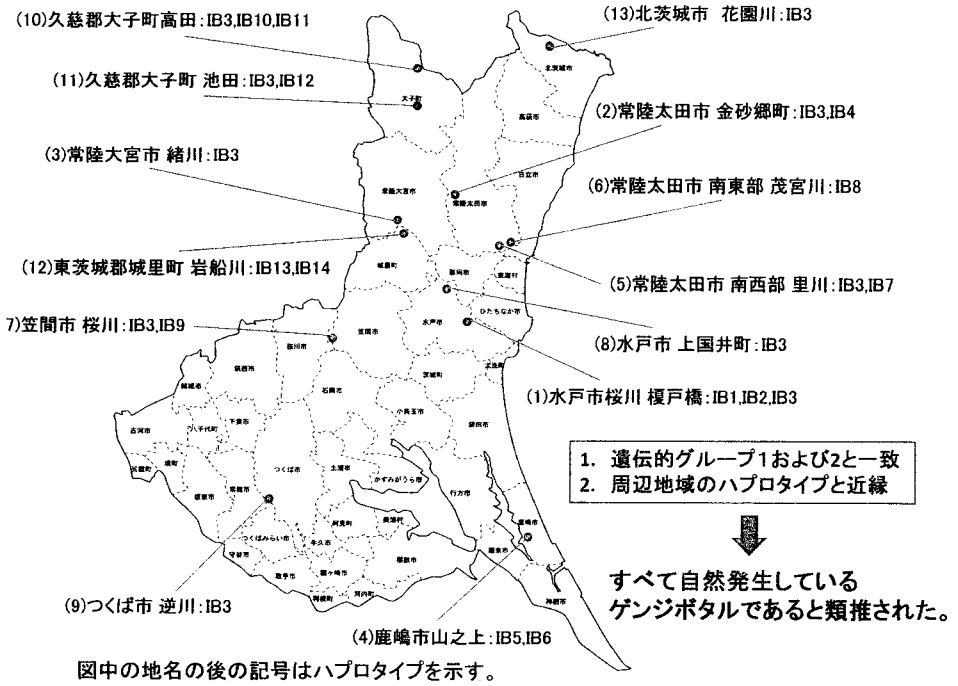


図７．分子系統樹から見た茨城県ゲンジボタルの遺伝的グループの判別と類縁関係

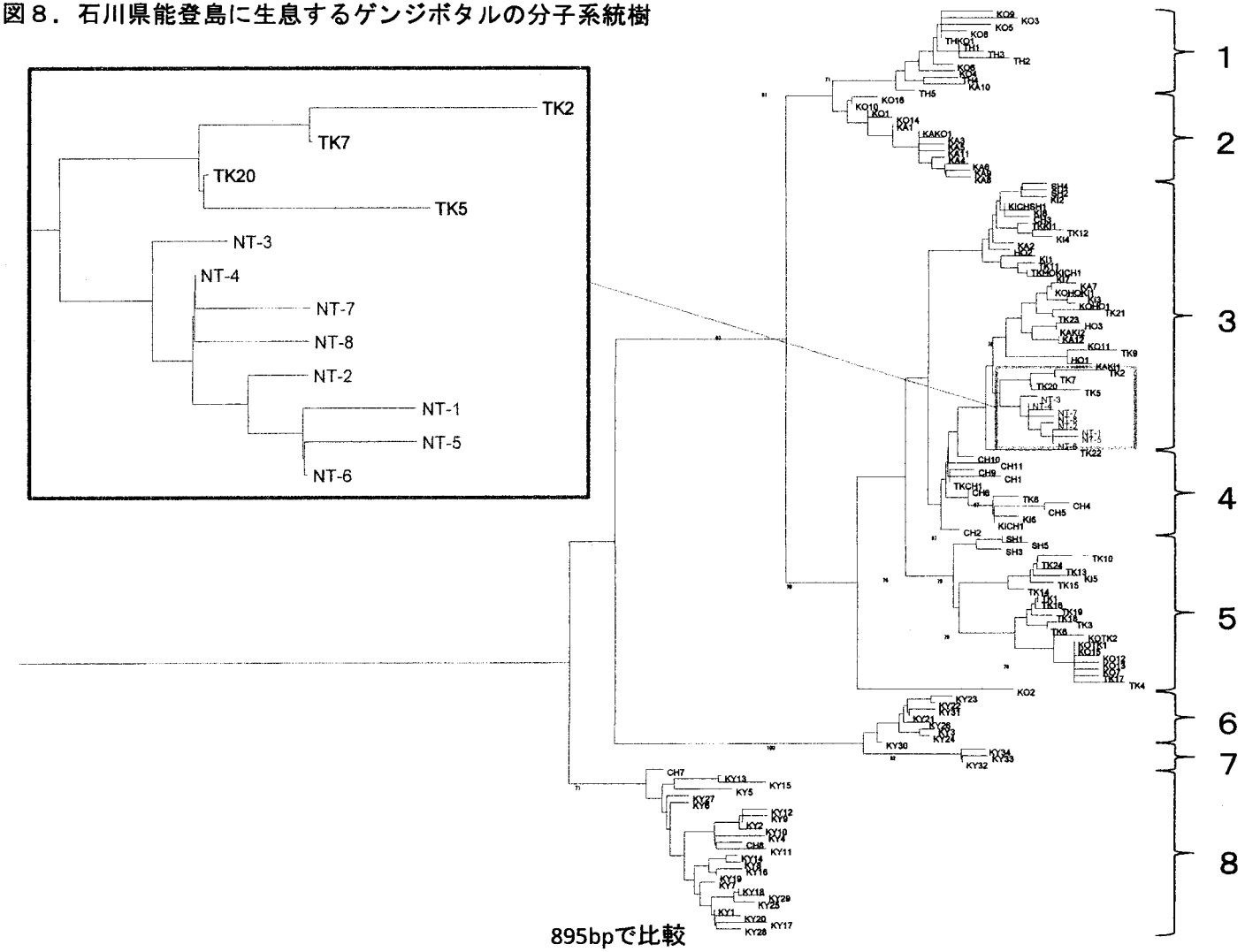
3.4 石川県と他地域とのゲンジボタルの類縁関係

長野県の場合と同様に，石川県では10地域28個体について，895bpのND5遺伝子の塩基配列に基づき，他地域とのハプロタイプの類縁関係を調べた．その結果，これらの28個体のうち，新規なハプロタイプが８個見出された（図８）．これらのハプロタイプは東海地方にみられるハプロタイプに近縁であり，遺伝的には第３グループに同定された．また，今回調べた個体のハプロタイプは，新規なハプロタイプであったが，全てこれまで調べた周辺地域のハプロタイプと近縁であった（図９）．これらの結果から，今回調べたゲンジボタルはこの地域有のもので，自然発生してい固るホタルであると考えられる．

４．結論

ND5遺伝子の塩基配列に基づき，新たに調べた地域のゲンジボタルが，人為的に放流が行われていないかどうかという観点から，ゲンジボタルの遺伝子解析を行った．その結果，以下の結論が得られた．

図８．石川県能登島に生息するゲンジボタルの分子系統樹



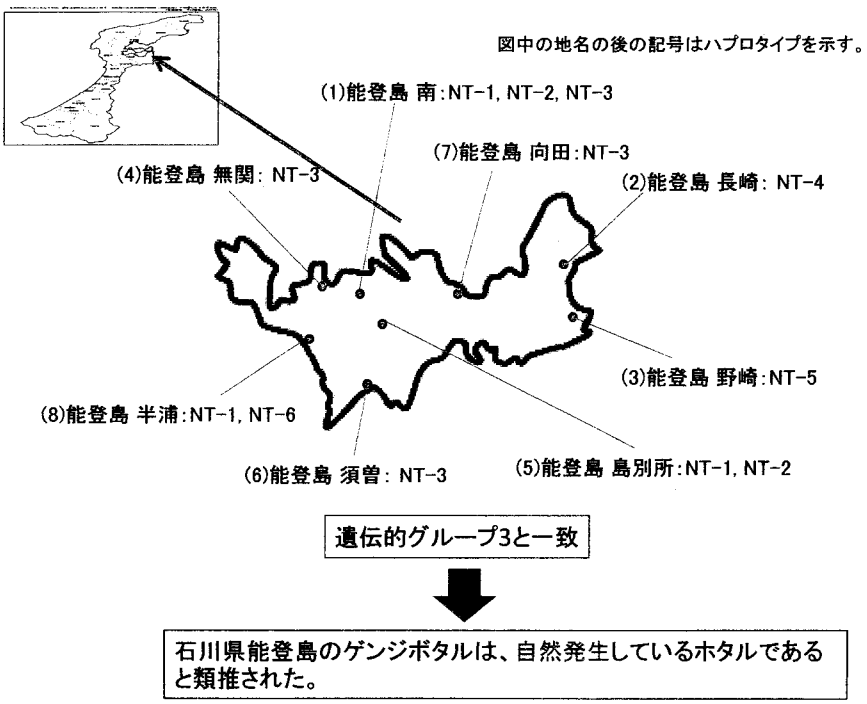


図９．分子系統樹から見た石川県能登島ゲンジボタルの遺伝的グループの判別と類縁関係

1．長野県の５地域のゲンジボタルのうち４地域のホタルは，自然発生しているものであると類推されたが，１地域のゲンジボタルは人為的に放流されたのか，自然発生しているものか，本研究では明らかにできなかった．しかし，この地域のゲンジボタルは，発光間隔が約２秒タイプの東日本タイプと約４秒タイプの西日本タイプが混在しており，遺伝的に見ても多様性の高い地域であり，更なる検討が必要である．

2．滋賀県守山市ほたるの森資料館ビオトープのゲンジボタルは，守山周辺地域から放流したものであると類推された．

3．茨城県の13地域のゲンジボタルは，すべてその地域に自然発生しているホタルであると類推された．

4．石川県の10地域のゲンジボタルは，いずれも自然発生しているホタルであると類推された．

以上のことから，本研究で行ったゲンジボタルの遺伝子解析法は，人為的に放流されたゲンジボタルがどのような場所から放流したのかを明らかにするのに有用であると考える．今後，本解析法が，遠く離れた場所からの人為的放流を防ぐための手段に利用されることが望まれる．

５．人為的放流の問題点と対策

ゲンジボタルは，本来生息しない地域に人為的に放流することによって，遺伝的な生物多様性がかく乱されることは，大きな問題である．今後，離れた場所から人為的にホタルを放流することは，避けるべきである．

これまでにも，本研究会を通じ，ゲンジボタルの移植（放流）に関する指針を提案してきたが，表４には人為的移植を実施する場合の指針をまとめた．特に，ゲンジボタルの移植に関する３大指針として

1．ホタルの移植は，自然発生しているホタルと同一の河川流域から行う．

2．ホタルの移植は，半径10km以内とする．

3．ホタルは山越えして移植しない．

を，これまでの本研究会で提案してきた（表４）．最近，人工飼育された幼虫や成虫を自然界に放流することが急増している．また，インターネット等の通信販売によってホタルの成虫や幼虫を容易に購入することが可能となっている．成虫や幼虫がどのような場所から採取されたものであるのか，または，どのような場所のホタルを人工飼育したのかを明確にし，指針に基づいてホタルの放流を行うことが求められる．

本研究会でも，「ホタル類など生物集団の新規・追加移植に関する指針」が提案されているが，その中で「対象地域と異なる水系（流域）より採取したものは，移植しない．」ことが盛り込まれている．今後，ホタルの生態系の保全という観点から，地域固有のホタルを守ることが重要であり，表４に示したルールに従い，人為的放流を行うことが求められる．

表４．ゲンジボタルの人為的移植（放流）の指針

1．ホタルの移植は，自然発生しているホタルと同一の河川流域から行う．
2．ホタルの移植は，半径10km以内とする．
3．ホタルは山越えして移植しない．
4．ビオトープで飼育されたホタルは，他の場所への移植を繰り返さない．
5．ビオトープは，きちんと管理し，ビオトープ内のゲンジボタルが自然界に広がらないように努める．
6．人工飼育されたホタルを自然界に移植（放流）する場合，人工飼育に用いたホタルの採取場所と移植場所とは，上記１から３に該当しなければならない．
7．業者から購入したホタルを移植する場合，そのホタルの採取場所を明確にし，６の場合と同じように，購入したホタルの採取場所と移植場所とは，上記１から３に該当しなければならない．
8．１から７に該当しない場合，または，すでに移植されている場合，その場所のホタルを自然発生しているホタルと交雑しないように，きちんと隔離し，管理する．

謝辞

本研究を行うにあたり，ゲンジボタルを御供与いただきました，全国ホタル研究会会員の翠川博之氏，陸生ホタル生態研究会の小俣軍平氏，もりやまホタルの森館長の竹内辰郎氏および旧副館長の山口幸江氏，および石川ホタルの会の加藤明宏氏に感謝申し上げます．

６．引用文献

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・大畑優紀子・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.

日和佳政・大畑優紀子・草桶秀夫・井口豊・三石暉弥（2010）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．全国ホタル研究会誌，(43)：27-32.

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