

ゲンジボタルの分布境界付近に見られるミトコンドリア ND5 遺伝子と発光行動

静岡県立掛川西高等学校
自然科学部 2 年 富田敦幹 他 5 名

1. 研究背景

ゲンジボタル (*Luciola cruciata*) は古くから発光周期によって岐阜県岐阜市北部を基準とする 2 秒型 (西日本型) と山梨県甲府市北部を基準とする 4 秒型 (東日本型) に分けられると考えられてきた (文献 1・図 1-1)。また、2000 年になって遺伝子の解析が進み、ミトコンドリア DNA 解析から大きく 4 つのグループに分けられると考えられている (文献 2・図 1-2)。文献 2、3 の研究はほぼ同じ結果を示している。



図1-1 発光周期の分布図 (文献1より)

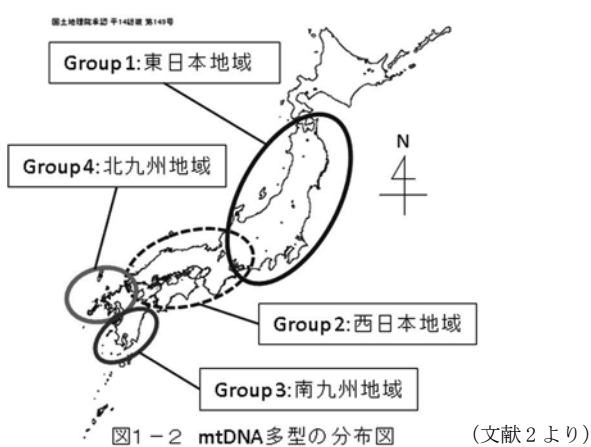


図1-2 mtDNA多型の分布図 (文献2より)

私たちの住む静岡県西部地域で見られるゲンジボタルは4秒周期でありながら、ミトコンドリア DNA は Group 2 に分類されると考えられてきた。しかし、ミトコンドリア DNA については静岡県中部から東部地域が未調査地となっていて詳細がわからない状況が続いていた。

文献 3 によればミトコンドリア ND5 遺伝子分布に見られる境界は静岡—神奈川県境だとされているが、2016 年までの私たちの研究で、伊豆半島まで Group 1 が広がっていることを確認している。発光周期については 1995 年から 1998 年にかけて静岡県立池新田高校で詳しく調査されたものが残っている (文献 4・図 1-3)。これによると 2 秒発光周期と 4 秒発光周期の境界は木曾川付近に存在し、愛知県中部から静岡県の富士市まで 4 秒周期型が分布するとされている。また、池新田高校の調査 (文献 4) には沼津市以東の地域は含まれていない。

図 1-3 で調査が行われた中部地方西部地域は、吉川ら (文献 3) の調査によって Group 2 のミトコンドリア多型の分布域であることが分かっていた。これを踏まえると池新田高校の調査は、一つの遺伝子型グループが複数タイプの発光周期を持っている可能性を示唆するものだった。そこで私達はミトコンドリア DNA の分布境界といえる静岡県東部で、発光周期とミトコンドリア DNA の分布に違いが見られるかどうかということに興味を持ち、静岡県西部地域と東部地域のミトコンドリア ND5 遺伝子の解析と発光周期の計測を始めた。

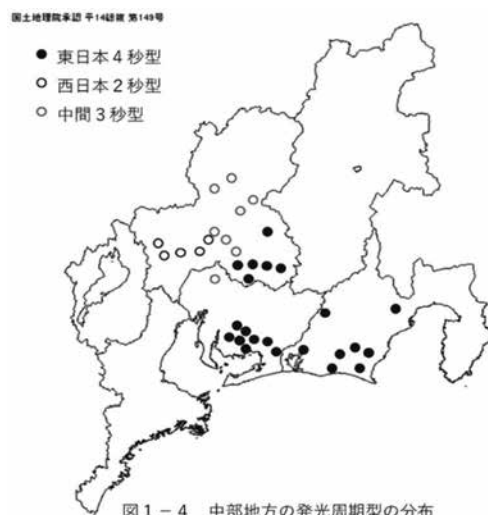


図1-4 中部地方の発光周期型の分布

図1-3 中部地方の発光周期型の分布

2. 実験方法

先輩から引き継いだものも合わせて、以下の17地点でゲンジボタルの調査を行った(図2-1)。ND5多型の解析には合計58サンプル、発光周期は合わせて94データをとった。ミトコンドリアDNAの解析は2015年から行っていたが、2016年からDNAの抽出方法を変更したことで良好な結果が得られ始めたため、2016年以降は解析数が増えている。発光周期の観測は単にゲンジボタルを捕獲するよりも難しく時間がかかるため、観測地点が少ない。なお、菊川市内は条例によりゲンジボタルが保護されているため、許可を得て採集している。その他の場所でも、十分な個体数が確認された場所でのみ採集した。

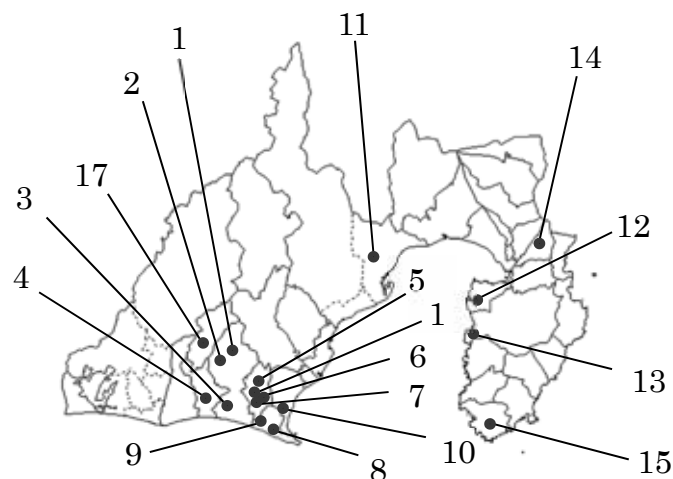


図2-1 ゲンジボタルの採集地点と発光周期の調査地点

(1) ミトコンドリアDNAの解析

採集したゲンジボタルの胸筋をDNA増幅のサンプルとして使用した。DNA抽出にはUniversAll™ Extraction buffer II (Yeastern Biotech Co. Ltd 社)を用いた。DNAはPCR法によって増幅した。プライマーは参考文献4に示されたものを使用した。表2-2の組成でPCR溶液を製作し、サーマルサイクラーを表2-3の条件で作動させ、DNAを増幅した。

使用したプライマー：

(F)5'-TAATTCGTTTTAATTTTTGTTTTAG-3'

(R)5'-AAAATAAAATAAACCTTTAAACTATTAT-3'

PCR 溶液	1本あたりの組成
滅菌水	25 $\mu\ell$
Quick Taq® HS DyeMix	22 $\mu\ell$
F Rプライマー	2 $\mu\ell$
DNA抽出液	1 $\mu\ell$
合計	50 $\mu\ell$

表2-2 PCR溶液の組成

PCR温度サイクル			①⇒(②~④)×35⇒⑤
①	温度(°C)	時間(秒)	PCR反応
①	94	120	熱変性-全DNAを一本鎖にする
②	98	30	熱変性-全DNAを一本鎖にする
③	57	30	アニーリング-変性したDNAにプライマーが結合する
④	68	60	伸長反応-DNAポリメラーゼにより目的のDNAを複製する
⑤	68	420	残りの伸長反応を行う

表2-3 PCRの温度条件

増幅されたDNA溶液3 $\mu\ell$ を使ってアガロースゲル電気泳動を行い、DNAの増幅を確認できた試料に対してdNTP, primer 断片除去試薬(EXO SAP IT®)で処理し、余剰なプライマーやdNTPを分解した。その後、Macrogen社に送付し、シーケンシングを依頼した。

(2) 発光周期の計測

ゲンジボタルの発光周期は1995年、池新田高校により詳しく調査されているが、静岡県中部から岐阜県までの範囲であり、私たちがミトコンドリアND5遺伝子の調査を行った伊豆半島は含まれていない。伊豆半島は2016年までの研究により、静岡県中部とは異なるミトコンドリアND5遺伝子を持っていることがわかっていった。研究目標である発光周期とミトコンドリアND5遺伝子の比較を行うには伊豆半島のゲンジボタルの発光周期データが必要であると判断し、2017年からゲンジボタルの発生時期に伊豆半島の4ヶ所に行き、発光データを収集した。

発光間隔の計測については、雌を探していると考えられる雄の飛翔しているときの明滅間隔を計測

した。実際の計測にはラップタイム機能のついたストップウォッチを用いて手動計測を行った。ストップウォッチを押すタイミングは計測に個人差が出にくいよう、「発光が弱くなり始めた瞬間」を起点とする方法をとった（図2－4）。また、飛翔ごとに0.2℃目盛の水銀温度計を用いて胸高の気温を測定した。

データの正確性を高めるため、1 飛翔中に発光の間隔が5 回以上確認できたデータのみを採用した。計測した時刻、気温、発光間隔のデータをコンピュータに入力し、1 飛翔中の発光データから最小値と最大値を除いて平均したものをその飛翔の発光周期とした。

以上の方法は 1995 年からの池新田高校の方法にならっている

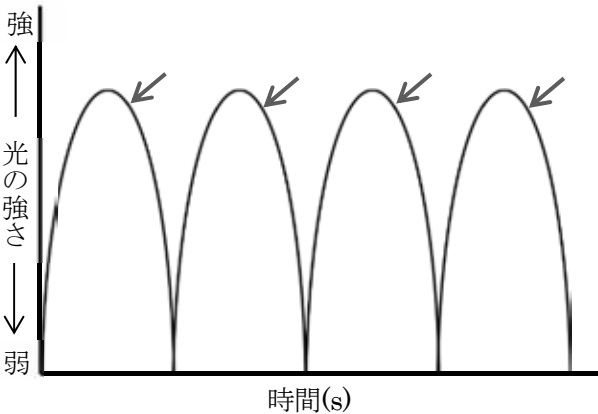


図2－4 発光周期の計測タイミング

3 結果

(1) ミトコンドリア DNA ND5 遺伝子多型の分布

得られた塩基配列データから SNP だけを抜き出し、ある 17 カ所に見られる SNP を、類似したものをまとめて比較すると図3－1 のように分けられた。この結果から、大きく A,B,C の3つの系統に分けられることが推定できる。この3つの系統のうち A と B の系統は SNP の差異が4 塩基のみであり、これらは近い系統であることが分かる。この3つの系統を文献の塩基配列データと比較してみると、A と B は共に Group 2、C は Group 1 と判別できた。

私たちの解析したデータを地図上にまとめると図3－2 のようになった。Group 2 の系統と判別できた個体を●で、Group 1 の個体を▲で表している。静岡県内でも伊豆半島には関東・東北と同じ Group 1 が、静岡県東部を境界として、中部・西部には西日本・東海と同じ Group 2 が生息していることがわかった。

	81	121	213	216	227	246	317	359	399	402	442	480	510	575	600	654	678	数
A	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	T	16
A－1A	C	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	T	T	T	A	T	T	3
A－1B	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	C	T	1
A－1C	C	C	G	C	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	C	2
A－1D	C	C	G	T	C	G	C	T	A	C	C	T	T	T	A	T	T	2
B	T	T	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	A	T	T	12
B－1	T	T	G	C	C	G	C	T	G	C	T	C	T	T	A	T	T	3
B－2	T	C	G	C	C	G	C	T	G	C	C	C	T	T	G	T	T	7
C	T	T	A	T	T	A	T	C	A	T	T	T	C	C	A	T	T	6
C－1	T	T	A	T	T	A	T	T	A	T	T	T	C	C	A	T	T	2
C－2A	T	T	G	T	T	A	T	T	A	T	T	T	C	C	A	T	T	3
C－2B	T	T	A	T	T	G	T	T	A	T	T	T	C	C	A	T	T	1

図3－1 系統と塩基の違い



図3-2 調査したゲンジボタルのND5遺伝子多型分布

(2) 発光周期パターンの分布

縦軸に対数軸で発光周期を、横軸に気温を示すと図3-3のようになる。観測したデータを気温と発光周期の片対数グラフに表した。「1994・1995年静岡県篠ヶ谷川」、「1997年滋賀県黒田川」のデータはそれぞれ4秒型発光と2秒型発光の指標として文献4、5から引用した。

グラフから、静岡県中部、西部の地域のデータ（地点1, 2, 3, 5, 16, 17）のゲンジボタルは4秒型発光周期であることが確認できる。また、伊豆半島の静岡県田方郡函南町(14)、静岡県沼津市戸田(12)のゲンジボタルは、静岡県中部・西部と同じく4秒型発光周期であることが確認できる。ところが同じ伊豆半島の静岡県伊豆市土肥(13)、静岡県賀茂郡南伊豆町(15)のゲンジボタルでは明らかに4秒より長い周期(以後6秒型発光周期と表記)が観察される。このことから伊豆半島では4秒型発光周期のゲンジボタルと6秒型発光周期のゲンジボタルが混生していることが分かる。

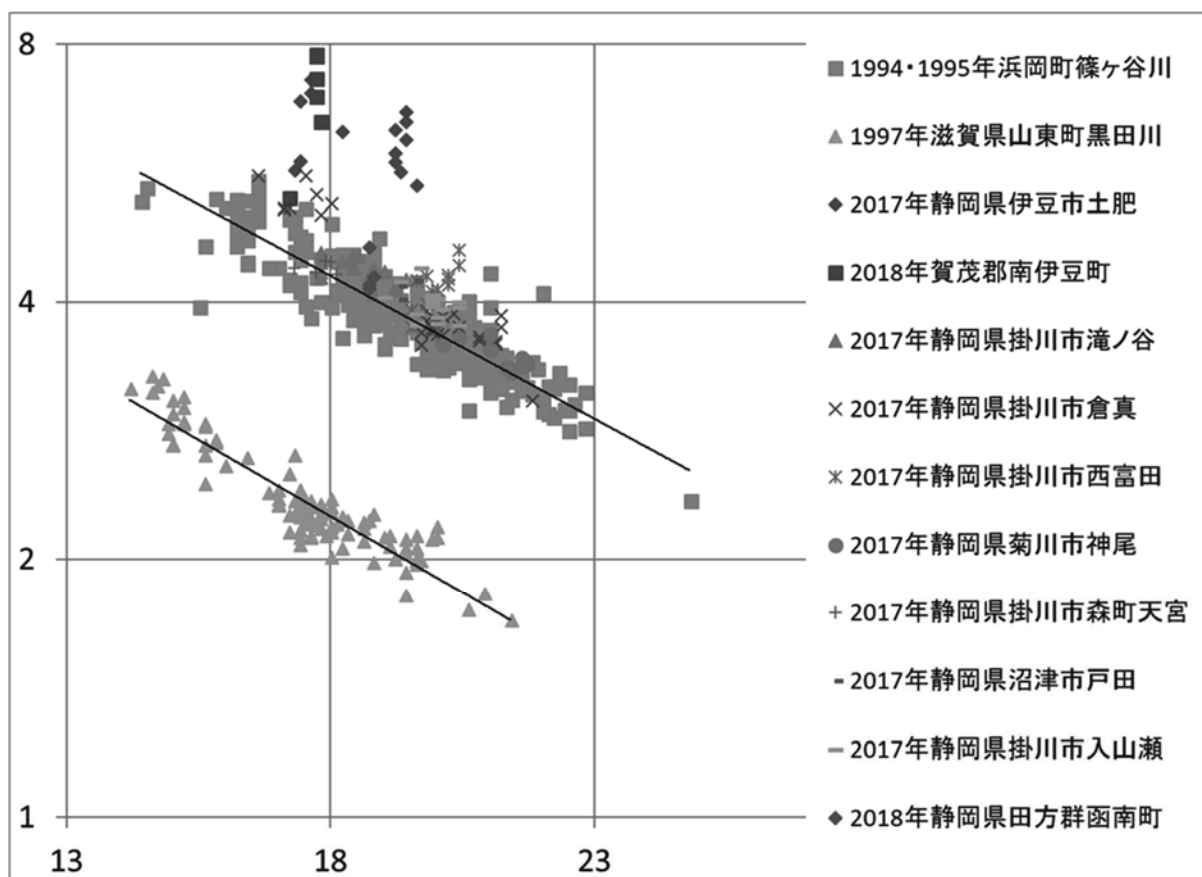


図3-3 調査したゲンジボタルの発光周期と気温の関係

4 考察

今回の調査の結果から、ND 5 遺伝子多型、発光周期型の分布を比較した（図 4－1、図 4－2）。



図 4－1 静岡県の ND 5 遺伝子多型分布

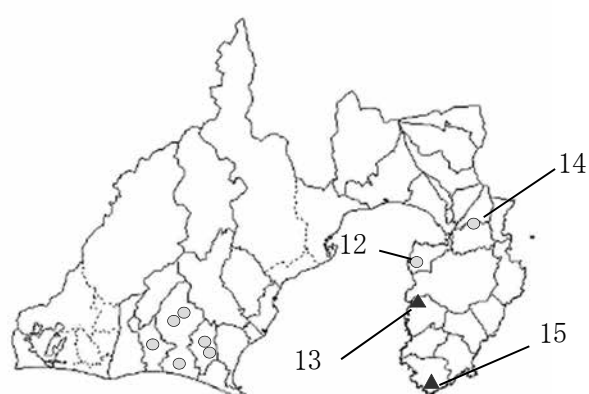


図 4－2 静岡県の発光周期型の分布

図 4－1 から、ミトコンドリア ND 5 遺伝子多型の Group 2 と Group 1 の分布境界は、静岡県の中部地域に位置していることがわかる。また、図 4－2 から、発光周期の 4 秒型と 6 秒型の分布境界域は伊豆半島の中腹部にあることがわかった。これらの分布境界は異なっていることが確認できる。

また、発光周期の違いでは 4 秒型に分類されるゲンジボタルのほとんどが Group 2 のミトコンドリア ND 5 遺伝子を持っていた。しかし、戸田(12)と函南(14)のゲンジボタルは 4 秒型の発光周期を持ちながら、Group 1 のミトコンドリア ND 5 遺伝子を持っていた。同じ Group 1 に属した静岡県沼津市戸田(12)、函南(14)と、静岡県伊豆市土肥(13)、南伊豆町(15)のゲンジボタルはそれぞれ異なる発光周期を持っていることになる。

これまでに発表されてきた研究では発光周期による分布とミトコンドリア遺伝子多型による分布はほぼ同じだろうと考えられていた。しかし、今回の調査結果から、発光周期とミトコンドリア DNA による分布は一致しないと考えべきだろう。また、今回伊豆半島南部で見られた 6 秒型については、これまで一部でその存在は知られてはいたものの、データとして存在を示したのはこの研究が初めてのようなのである。

現在私たちは 4 秒発光周期で Group 1 の多型を持つ伊豆半島の函南町、南伊豆町の個体群は交雑により生じた可能性があると考えている。ミトコンドリア DNA は母系遺伝であるため、母方からしか伝わらない。伊豆半島に 4 秒発光周期で Group 2 のオスが飛来し、交配により核 DNA の 4 秒型周期遺伝子だけを持ち込んだと仮定すれば、現在の分布を説明することが出来る。

いずれにせよ、発光周期に関わる遺伝子は同定されていないため、DNA から直接この仮説を証明することは難しい。間接的にはあるが SSR 遺伝子などを使って父方まで含めた遺伝子の状態を探っていくことが今後の課題である。

5 参考文献

1. 神田左京 ホタル (1935) (絶版)
2. Gene Diversity and Geographic Differentiation in Mitochondrial DNA of the Genji Firefly, *Luciola cruciata* (Coleoptera: Lampyridae) (2002)
3. ミトコンドリア ND 5 遺伝子の塩基配列から推定されたゲンジボタルの機内変種と分子系統
吉川貴浩・井出幸介・窪田康男・中村好宏・武部寛・草桶秀夫
4. ゲンジボタルの分布境界域を探るⅡ 静岡県池新田高校 自然科学部 (1995)
5. 理科研究 第 32 号 静岡県立池新田高校 理科教室 (1997)
6. mtDNA によるゲンジボタルの分布境界域Ⅳ 静岡県掛川西高校 自然科学部 (2016)