

① 自然教育園におけるゲンジボタルの 発光行動と遺伝子解析

大場信義*・鈴木浩文**

Flashing behavior and mitochondrial DNA analyses of the firefly,
Luciola cruciata in the Institute for Nature Study

Nobuyoshi Ohba*, Hirobumi Suzuki**

はじめに

東京のホタル退行曲線については、品田（1974）が各種の文献を基にその経過の全貌をまとめて報告した。江戸時代は高田落合・王子石神井川・谷中宗林寺など江戸市中にもホタルの名所があったという。江戸川・九段・牛ヶ淵でも見られた。しかし、明治時代終わりごろからホタルは少なくなり、昭和5～10年にはほぼ山手線の外側まで退行したとされている。その後も急速に後退し、現在では都心部からほとんど姿を消してしまった。

こうした中、都心に残された自然教育園で40年間の観察記録がまとめられた（矢野，2018）。都内に残された緑地に、毎年ゲンジボタルが自然発生することはまさに現代の奇跡である。自然教育園内には流程約240m、川幅0～2mの水系に沿って湿地が残されており、こうした中で園内のゲンジボタル生息数の継続的な発生状況のモニタリングが1978年より開始され、2017年まで40年間継続された。

1987年以降ゲンジボタルは激減し、著者の一人である大場は1988年12月に環境調査、翌1989年6月21日には環境整備にアドバイスを求められて現地調査を行った。生態観察は目視により実施した結果、オスの飛翔発光間隔が東日本型のゲンジボタルに比較すると大変短く、西日本型である可能性が高いことを矢野氏に伝えた。このことは現存するゲンジボタルのルーツに関わることであり、矢野氏も非常に強い関心を持つに至った。しかし、その後はこの問題を解決する機会がないまま2017年6月17日に至って、矢野氏の強い思いと要請があり、生態調査および発光パターンと遺伝子解析を行う機会に恵まれた。

*大場蛍研究所, OHBA Firefly Institute

**日本ホタルの会, Japan Fireflies Society

自然教育園の概要

自然教育園とは、東京都港区白金台五丁目に存在する国立科学博物館附属の自然緑地である。もともと江戸時代に下屋敷などに使われた土地ではあるが、あまり人の手を入れていない状態が長く保たれたことで、人口密集地となる以前の東京都区内の自然の姿を残す貴重な場所となっている。自然教育園は、大都市「東京」の中心部にあって今なお豊かな自然が残る都会の中のオアシスともいえる貴重な森林緑地であり、コナラ・ケヤキ・ミズキなどの落葉樹、スダジイ・カシ類・マツ類などの常緑樹が広がり、ススキやヨシの草はら、池や小川などがある。約 20 ヘクタールの園内では 2014 年現在、1473 種の植物、約 2130 種の昆虫、約 130 種の鳥類の記録が残されている（国立科学博物館附属自然教育園, 2014）。

自然教育園のゲンジボタル保護・増殖計画

1988 年以前にはゲンジボタルが多く発生していたが、次第に減少し、その原因究明と保護増殖計画が検討された。そうしたなかで矢野氏は、1988 年 9 月 3 日には横須賀市博物館附属馬堀自然教育園に来園し、また、1988 年 12 月 21 日、1989 年 6 月 21 日には、大場も自然教育園を訪問し、自然教育園の活動に協力するようになった。その後事業は中断していたが、2017 年 6 月 17 日には矢野氏の要請もあり、調査することになった。

西日本と東日本のゲンジボタル

ゲンジボタルの発光の様子は、中部山岳地帯を境に西日本と東日本で異なっている。図 1 には、典型的な西日本（京都府京都市清滝）と東日本（千葉県いすみ市、旧夷隅郡大原町）の発光パターンを示す。これは、オスが集団で飛びながらメスを探しているときに安定してみられるものである。西日本では、発光のピークの間隔は 1.7 秒、発光の持続時間は 1.2 秒、消光時間は 0.5 秒である（図 1 A）。これに対して東日本では、発光間隔は 4.8 秒、発光の持続時間は 4 秒、消光時間は 0.8 秒である（図 1 B）。このように、西日本での点滅周期は約 2 秒、東日本では約 4 秒と異なっていることが知られている（大場, 1989; 2004; 2009）。大場はこれまでの調査結果から自然教育園のゲンジボタルには西日本型（2 秒型）が混在することを指摘していた。

材料と方法

発光パターン映像の記録方法

撮影機材には一眼レフカメラ Sony a7S を用いた。ISO 400000 の感度で、静止写真および動画を記録した。

発光パターン映像の解析方法

動画録画したデータは、AVI ファイル形式のムービーに変換した後、タイムラプス・イメージ解析ソフトウェア（TiLIA）にて解析した（Konno et al., 2016）。このソフトウェアは、AVI 形式のム

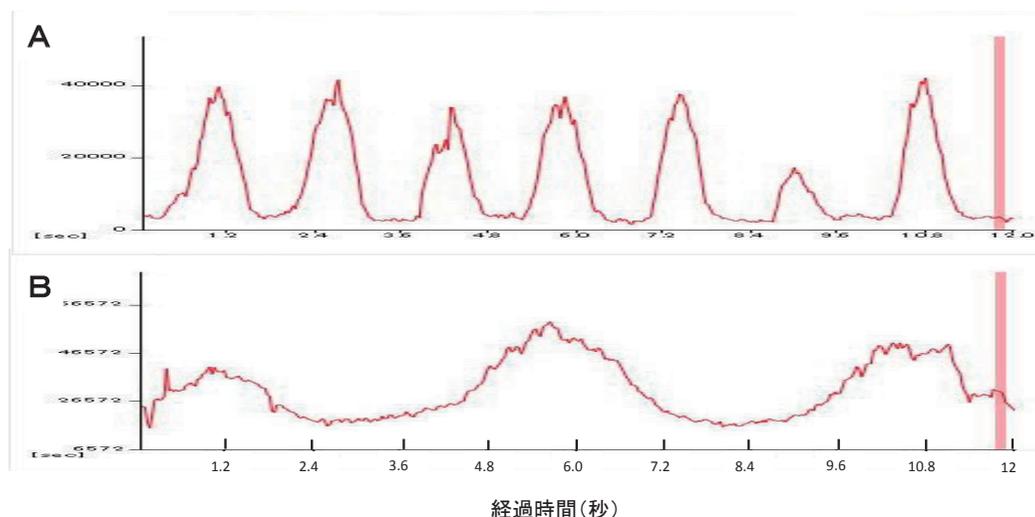


図1 ゲンジボタル（オス成虫）の発光パターン

横軸は時間（秒），縦軸は発光強度を示す。A：京都府京都市産。発光のピークの間隔は1.7秒，発光の持続時間は1.2秒，消光時間は0.5秒。B：千葉県いすみ市産。発光のピーク間隔は4.8秒，発光の持続時間は4秒，消光時間は0.8秒。

ービーを読み込み，コマ送りで発光体をマニュアルで追跡し，発光体の光強度を経時的に数値化することができる。以下のサイトからダウンロードできる (<https://drive.google.com/drive/folders/0B2o7FRVs2VohMmx2QzBVX3ZDeDA>)。

ミトコンドリアDNAの解析方法

解析には，1989年6月21日に採集したオス成虫1個体（-20℃保存），2017年6月20日に採集したオス成虫2個体（エタノール保存），2018年6月2日に採集したオス成虫2個体（エタノール保存）を用いた。これらの個体は，発光パターンの解析に用いた個体と同一ではない。

1個体につき脚2本から，QIAamp DNA mini kit（QIAGEN社）を用いて，取り扱い説明書のプロトコル（組織からのゲノムDNAの抽出）に従い，DNAを抽出した。抽出したDNAから，PCR（polymerase chain reaction）によって，ミトコンドリアのcytochrome oxidase II（CO II）遺伝子領域を増幅した（Suzuki et al., 2002）。増幅には次のプライマーを用いた。TL2-J-3037:5'-ATGGCAGATTAGTGCAATGG-3' および TK-N-3785:5'-GTTTAAGAGACCAGTACTTG-3'（Simon et al., 1993）。増幅したCO II 遺伝子のPCR産物は，PCRに用いたプライマーと同じプライマーを用いて，BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit および Genetic analyzer 3130xl（ABI社）を使用してダイレクトシーケンスを行い，塩基配列を決定した。

塩基配列を基に，6つの制限酵素（*Ase* I, *Rsa* I, *Mva* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Hpa* II）の切断サイトを確認し，ハプロタイプを決定した。なお，ハプロタイプの名称は，Suzuki et al. (2002) によった。

系統樹の作成には、Suzuki et al. (2002) によって報告されているゲンジボタルの CO II 遺伝子の塩基配列に、今回の自然教育園でのデータを付け加えて行った。使用したソフトウェアは、MEGA ver.6 (Tamura et al., 2013) で、p-distance を用いて、平均距離法 (UPGMA, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) による系統樹を作成した。

結 果

生息状況と発光パターンの映像解析

1989年：都心部にある自然教育園は、天空が人工照明の反射により照度が高く、特に曇天時は懐中電灯が無いなかでも明るかった。ホタルは樹木が被い茂った暗い環境に集まり発光していた。残念ながら、目視観察のみであったために、観察記録の数量的なデータは持ち合わせていない。

2017年：28年後の2017年6月17日に同一場所で観察した。湿地、水路は草で被われ、また樹木が被い1989年時点と比較して暗い環境となっていた(図2, 3, 4)。樹木や下草が繁茂して飛翔空間が狭まり今後の環境整備を必要としている。観察当日は発生個体数が極端に少なく、飛翔活動が短く写真撮影(動画と静止画)の記録は困難を極めた。飛翔個体数はわずか数個体であったが、静止画と動画撮影は辛うじて記録に成功し貴重なデータとなった。

図5は、ゲンジボタル(オス成虫)の飛翔軌跡の写真で、飛びながら発光している状態が軌跡として写っている。軌跡が途切れているところが、消光している状態となる。目視観察から、これは西日本型の発光パターンと判断された。図6は、図5とは別の個体の動画録画したデータをタイムラプス解析した結果である。発光のピークの間隔は1.7秒、発光の持続時間は1.1秒、消光時間は0.6秒であった。このように発光間隔は約2秒と短く、西日本型の発光パターンを示していた。

ミトコンドリア DNA 解析

表1には、ミトコンドリア CO II 遺伝子の塩基配列を基に制限酵素の切断サイトから決定したハプロタイプを示している。1989年採集の1個体はE型、2017年採集の2個体はE型とC型、2018年採集の2個体はC型であった。表2は、Suzuki et al. (2002) のデータを基に、全国におけるゲンジボタル CO II 遺伝子のハプロタイプを示しており、この分布図(図7)をみると、E型は主に西日本に分布し、C型は関東に分布していることが分かる。この結果から、自然教育園には、関東と西日本を中心に分布するハプロタイプが混在していることが分かった。

図8の系統樹は、Suzuki et al. (2002) の系統樹に自然教育園のデータを付け加えたものである。大きく3つの系統(東日本系統、西日本系統、九州系統)があり、東日本系統の中には更に東北と関東の2系統、西日本系統の中には中部と西日本の2系統、九州系統には北九州と南九州の2系統が認められている。この系統樹の中で、自然教育園の1989年採集のE型は西日本の系統に、2017年採集のE型は中部の系統に、他のC型は関東の系統に、それぞれ含まれていた。



図2 自然教育園のゲンジボタル生息環境
湿地，水路は草で被われている。



図3 自然教育園のゲンジボタル生息環境
樹木や下草が繁茂し飛翔空間が狭まっている。



図4 自然教育園のゲンジボタル生息環境



図5 自然教育園のゲンジボタル（オス成虫）の飛翔軌跡
発光軌跡は短く西日本型と判断される。

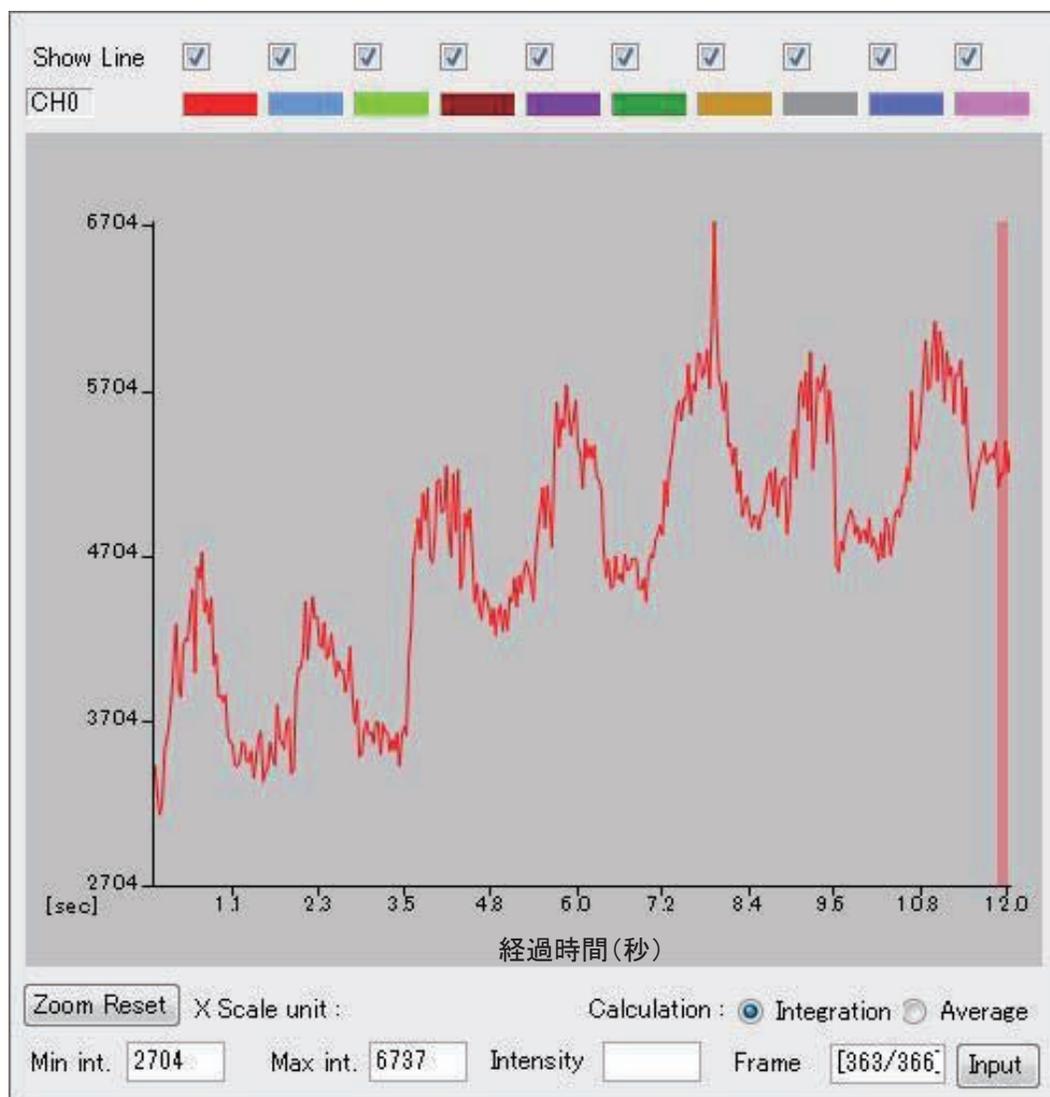


図6 自然教育園のゲンジボタル（オス成虫）の発光パターン

発光のピークの間隔は1.7秒、発光の持続時間は1.1秒、消光時間は0.6秒。発光間隔は約2秒と短く、西日本型と判断される。

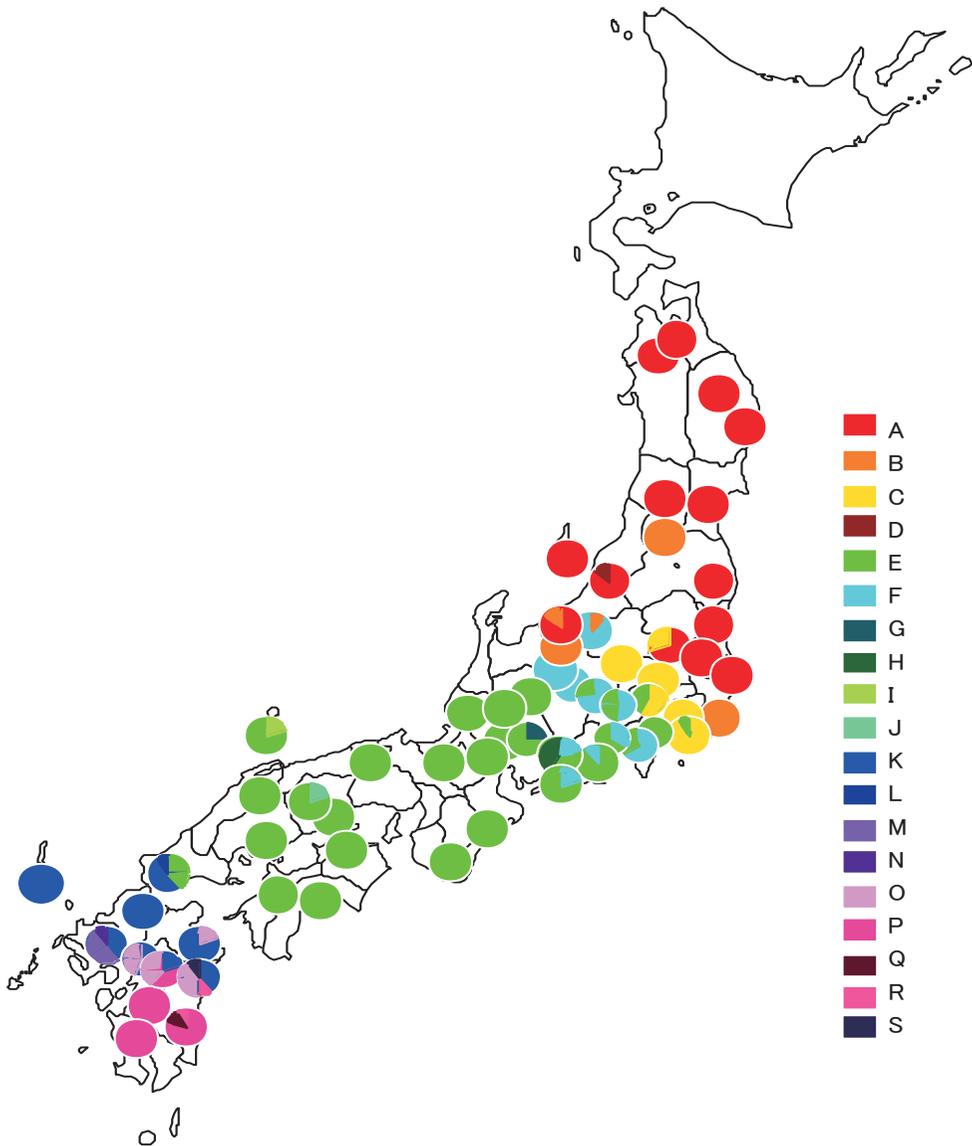


図7 ゲンジボタルにおけるミトコンドリア CO II 遺伝子のハプロタイプ (A ~ S 型) の分布
Suzuki et al. (2002) のデータを基に作成.

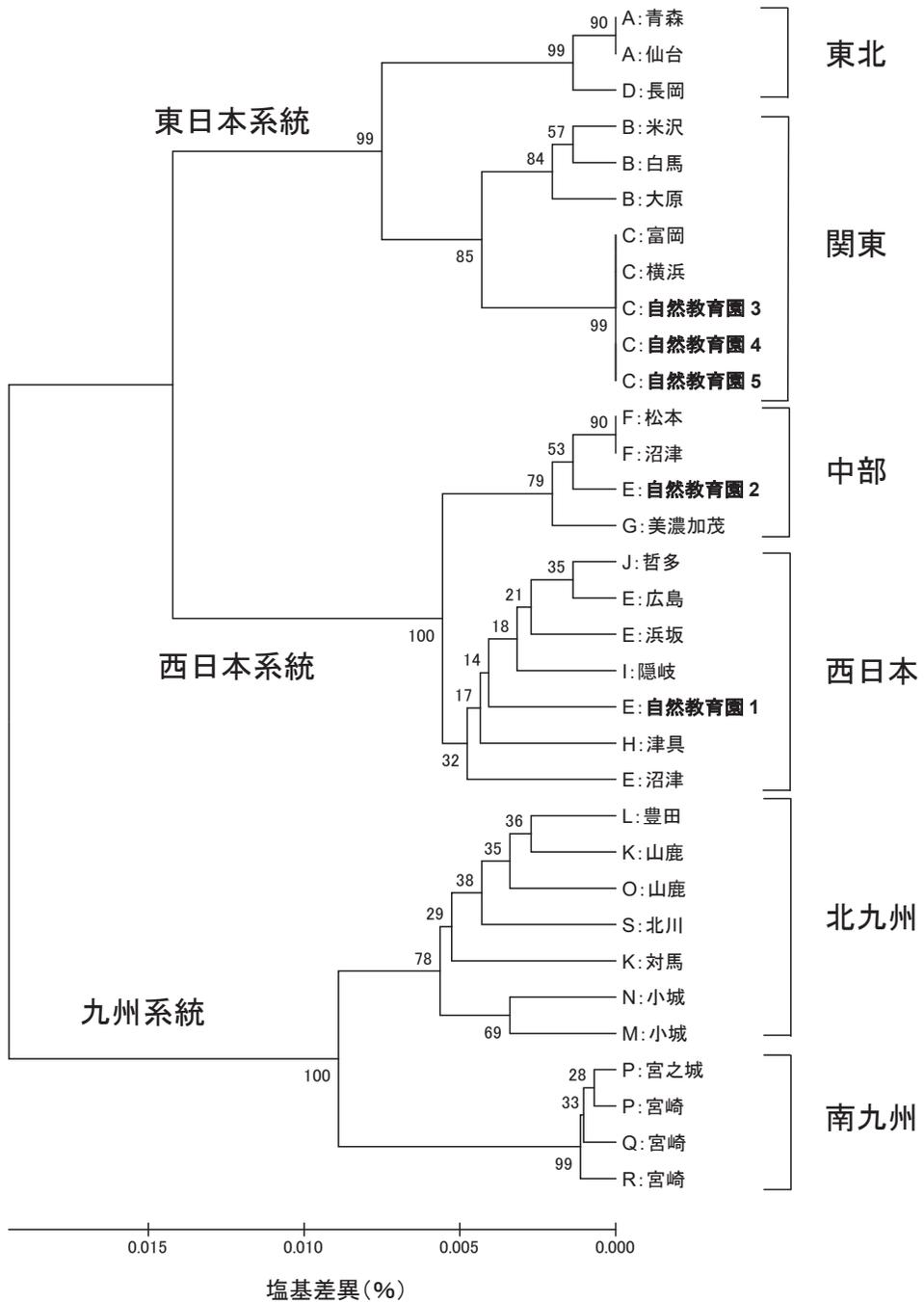


図8 ゲンジボタルにおけるミトコンドリア CO II 遺伝子ハプロタイプの平均距離法 (UPGMA) による系統樹
 系統樹の枝の先端には、A～Sまでのハプロタイプとその採集地が示してある。自然教育園のハプロタイプは関東地域、中部地域、西日本地域の系統にまたがって含まれている。

表1 ミトコンドリア CO II 遺伝子の塩基配列を基に6つの制限酵素の切断サイトから決定したハプロタイプ
各制限酵素におけるアルファベットの小文字表現による型およびその組み合わせによるハプロタイプ (アルファベットの太文字表現による型) は, Suzuki et al., (2002) の表記による。

個体番号	採集年	制限酵素						ハプロタイプ
		<i>Ase</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Mva</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Hpa</i> II	
自然教育園-1	1989	a	b	a	a	a	c	E
自然教育園-2	2017	a	b	a	a	a	c	E
自然教育園-3	2017	a	a	b	a	a	b	C
自然教育園-4	2018	a	a	b	a	a	b	C
自然教育園-5	2018	a	a	b	a	a	b	C

考 察

自然教育園のゲンジボタルの生息状況を調査する中で、発光パターンの解析から西日本型が存在していると考えられた。一方、ミトコンドリア DNA 解析の結果からも、主に関東地域に分布する C 型のハプロタイプに加えて、主に中部または西日本地域に分布する E 型のハプロタイプが混在していることが分かった。このことは、かつて自然教育園に他地域（中部および西日本地域）からのゲンジボタルが導入されたことがあったという経緯を示しており、その遺伝子が現在まで引き続き存続しているということになる。

自然教育園は、江戸時代の高松藩主（香川県）の松平讃岐守頼重の下屋敷から明治時代の海軍・陸軍の火薬庫、大正時代の皇室の御料地の変遷を経て、戦後の 1949 年に自然教育園として開園している。矢野（2018）によれば、開園以降、他の地域からのホタルの導入は一切考えられない。しかし、江戸時代には薬草園が設けられ、四国からハマクサギやトラノオスズカケなどの植物が導入された記録が残っており、現在も成育している。当時、四国の故郷から植物同様にホタルも導入された可能性も考えられる。今回のミトコンドリア DNA 解析の結果は、関東の系統の他に、中部と西日本の系統が見られたが、それらが四国に由来するのかどうかは分からなかった。今後は、四国のサンプルを含む網羅的な比較によって明らかになると思われる。

ゲンジボタルの人為的な移殖に伴う遺伝的な攪乱の状況は、これまでいくつか報告されている（鈴木, 2009; 木村ほか, 2013）。遺伝子レベルでの生物の多様性や地域固有性が認識されるようになった現在において、ゲンジボタルの保護・保全・再生を考える上で、図7や図8に示した情報は重要であり、その結果を活かした施策が必要である。しかし、このことは、遺伝的な差異の認識がなかった時代における保全・再生の取り組みが、結果として遺伝子攪乱の状況を作ってしまったことを避けて非難しているわけではないと、私たちは考えている。ホタルは万葉集を始め、いろいろところで詩歌に詠まれている。また、江戸時代の献上ボタルの記録や、ホタル狩りの様子なども残されており、日本人の生活に深く関わってきたことは事実である（原, 1940; 南, 1961）。自然分布と一致しない遺伝的な攪乱の状況は、これまでの人間活動を反映したものであり、移入元を推定することによって、ホタルと人間との関わりや当時の生活の様子を解き明かす一面もあると考えられる。

自然教育園のゲンジボタルには西日本型および東日本型が混在している結果を得たが、DNA 解析

表2 全国におけるゲンジボタルのミトコンドリア CO II 遺伝子のハプロタイプと頻度
Suzuki et al. (2002) のデータを基に作成.

集団 (個体数)	ハプロタイプ (頻度)	集団 (個体数)	ハプロタイプ (頻度)
青森県 青森 (10)	A	岐阜県 美濃加茂 (8)	E (0.75), G (0.25)
青森県 弘前 (5)	A	岐阜県 高山 (10)	E
岩手県 盛岡 (10)	A	岐阜県 高鷲 (10)	E
岩手県 釜石 (6)	A	静岡県 沼津 (7)	E (0.29), F (0.71)
宮城県 仙台 (10)	A	静岡県 金谷 (9)	E (0.86), F (0.11)
山形県 山形 (4)	A	愛知県 豊橋 (10)	E (0.80), F (0.20)
山形県 米沢 (10)	B	愛知県 津具 (10)	E (0.40), F (0.20), H (0.40)
福島県 いわき (2)	A	三重県 尾鷲 (9)	E
栃木県 足利 (10)	A (0.70), C (0.30)	滋賀県 山東 (9)	E
群馬県 富岡 (10)	C	滋賀県 志賀 (3)	E
茨城県 御前山 (10)	A	兵庫県 浜坂 (10)	E
茨城県 つくば (9)	A	和歌山県 宮本 (2)	E
茨城県 潮来 (5)	A	島根県 隠岐 (10)	E (0.80), I (0.20)
埼玉県 嵐山 (10)	C	島根県 三刀屋 (9)	E
千葉県 大原 (8)	B	岡山県 哲多 (10)	E (0.80), J (0.20)
東京都 あきる野 (7)	C (0.57), E (0.43)	岡山県 岡山 (4)	E
神奈川県 横浜 (12)	C	広島県 安芸津 (4)	E
神奈川県 横須賀 (10)	C (0.90), E (0.10)	山口県 豊田 (10)	E (0.40), K (0.50), L (0.10)
神奈川県 箱根 (5)	E	香川県 塩江 (4)	E
新潟県 長岡 (7)	A (0.86), D (0.14)	愛媛県 面河 (10)	E
新潟県 糸魚川 (7)	A (0.86), B (0.14)	高知県 土佐山 (9)	E
新潟県 佐渡 (7)	A	佐賀県 小城 (10)	K (0.40), M (0.50), N (0.10)
山梨県 平瀬 (10)	E (0.50), F (0.50)	福岡県 小倉 (5)	K
山梨県 下部 (6)	E (0.67), F (0.33)	長崎県 対馬 (10)	K
長野県 松本 (10)	F	熊本県 山鹿 (9)	K (0.56), O (0.44)
長野県 茅野 (4)	E (0.25), F (0.75)	熊本県 旭志 (5)	K (0.20), O (0.40), P (0.40)
長野県 野沢温泉 (10)	B (0.10), F (0.90)	熊本県 人吉 (3)	P
長野県 大町 (8)	F	大分県 大分 (5)	K (0.80), O (0.20)
長野県 白馬 (9)	B	宮崎県 北川 (10)	K (0.40), O (0.40), R (0.10), S (0.10)
福井県 福井 (10)	E	宮崎県 宮崎 (10)	P (0.80), Q (0.10), R (0.10)
岐阜県 関 (10)	E	鹿児島県 宮之城 (9)	P
東京都 自然教育園 (5)	C (0.6), E (0.4)		

に供したサンプルが野外観察した同一個体の発光行動であるのか否かの確定はできていない。観察個体数が非常にわずかであり、個々に確認が出来なかったためである。しかし、東西の特徴（発光行動と遺伝子型）を備えたゲンジボタルが混在していることが明らかになった。西日本型と東日本型のハイブリッド形成があるのかどうかなど、2型の生殖的隔離機構については非常に大きな謎が残ったままであるが、今後は更に観察例を増やして上記の確認を行って行きたい。

謝 辞

本研究を進めるに当たり、自然教育園での野外調査および遺伝子解析のサンプル調達の便宜を図って頂いた矢野亮氏（国立科学博物館附属自然教育園名誉研究員）に感謝の意を表する。

引 用 文 献

- 原志免太郎. 1940. 螢. 実業之日本社, 216pp.
- 木村和裕・日和桂正・草桶秀夫. 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. 全国ホタル研究会誌 (46) : 29-41.
- 国立科学博物館附属自然教育園. 2014. 自然教育園ガイドブック. 30pp.
- Konno, J., Hatta-Ohashi, Y., Akiyoshi, R., Thancharoen, A., Silalom, S., Sakchoowong, W., Yiu, V., Ohba, N. & Suzuki, H. 2016. TiLIA: a software package for image analysis of firefly flash patterns. *Ecol. Evol.* 6: 3026-3031.
- 南喜市郎. 1961. ホタルの研究. 太田書店, 321pp.
- 大場信義. 1989. 西と東で異なるゲンジボタル. *昆虫と自然*, 24 (8) : 2-6.
- 大場信義. 2004. ホタル点滅の不思議—地球の奇跡—. 横須賀市自然人文博物館, 199pp.
- 大場信義. 2009. ホタルの不思議. どうぶつ社, 307pp.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 651-701.
- 品田 穰. 1974. 都市の自然史 人間と自然の関わり合い. 中央公論社, 200pp.
- Suzuki, H., Sato, Y. & Ohba, N. 2002. Gene diversity and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the Genji firefly, *Luciola cruciate* (Coleoptera: Lampyridae). *Mol. Phyl. Evol.* 22: 193-205.
- 鈴木浩文. 2009. ゲンジボタルにみる遺伝的多様性・固有性と人為的攪乱の状況—ホタル移植の三原則—. 月刊 海洋 / 号外 (51) : 21-30.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- 矢野 亮. 2018. 自然教育園におけるゲンジボタル 40 年間の観察記録. 自然教育園報告 (49) : 1-22.