

遺伝子解析技術を用いたゲンジボタルの地域集団構造の解明



所属名：社団法人建設コンサルタンツ協会
中電技術コンサルタント株式会社
発表者：増本 育子

1. はじめに

遺伝子解析は、野生生物保全や水産資源管理などにおいて、積極的に活用されるようになってきた技術である。本技術により、集団構造の推定（親子関係や隣接する集団との近縁の度合いの把握など）や、外部形態では種類が判別できない卵や体毛からの種の同定などが出来るようになり、精度の高い保全対策が実施できるようになりつつある。

建設コンサルタントにおいても、事業に伴う希少生物保全対策の検討などにおいて、本技術が活用されるようになってきた。

今回は、遺伝子解析技術を活用してゲンジボタルの集団構造を解析した研究事例を用いて、遺伝子技術の概要を紹介する。

2. 紹介する研究事例の概要

下関市豊田町は山口県の西部に位置し、ゲンジボタルの生息・発生地として古くから有名な町である。特に木屋川とその支川に生息するゲンジボタルは、1958年に「木屋川・音信川ゲンジボタル発生地」として天然記念物に指定されており、現在は重要な観光資源となっている。

ところで、全国のゲンジボタルについてミトコンドリアDNAを分析したSuzuki et al. (2002)によると、ゲンジボタルは大きく東日本、西日本、九州という3つのグループに分類できることが示されている。さらに、豊田地域は西日本グループと九州グループが混在する地域であり、加えて、九州グループの一つであるが他の地域では見られない「L型（以下「豊田型」と記載する）」というハプロタイプを持つ個体が生息することが明らかになっている。

以上を受けて本業務は、豊田地域内を流れる木屋川水系と粟野川水系に分布するゲンジボタルについて遺伝子分析を行い、豊田地域内のゲンジボタルの遺伝学的集団構造を明らかにすることを目的として実施した。

3. 実験材料と方法

実験材料として、木屋川水系および粟野川水系の本川および支川数地点からゲンジボタル幼虫を採集した。なお、分析には各地点から採集した個体のうち5個体を用いた（採集個体が5個体以下のものは全て分析に用いた）。

本業務では、豊田地域内という狭い地域に分布する集団を分析対象としているため、より精度が高いと思われる塩基配列データを用いた分析を行った。サンプルから total DNAを抽出し、既報のプライマーを用いてCO 遺伝子部分領域をPCR法により増幅した。PCR反応の設定や反応液の組成等についてはSuzuki et al. (2002)を参考にした。得られた増幅産物は、精製後、シーケンス反応を行い、塩基配列を決定した。

また、決定した塩基配列(629bp)については、GenBank に登録されているゲンジボタルの各ハプロタイプの塩基配列データを用いてアライメントを行った。その後、系統解析プログラムMega ver.3を使用し、Jukes-Cantorの遺伝距離を用いた近隣結合法(NJ法)により系統樹の作成を行った。

4. 分析結果および考察

木屋川水系6地点および栗野川水系6地点の合計12地点から採集した111個体のうち、49個体のゲンジボタル幼虫について、CO 遺伝子部分領域629塩基対の塩基配列を決定した。この629塩基対のうち48の部位において塩基置換が確認され、合計31種類のハプロタイプが得られた。

図1にJukes-Cantorの遺伝距離を用い、NJ法により作成した系統樹を示す。

その結果、分析に用いた49個体はSuzuki et al. (2002)で示された西日本グループ(16個体)と九州グループ(33個体)とに明瞭に区別することができた。

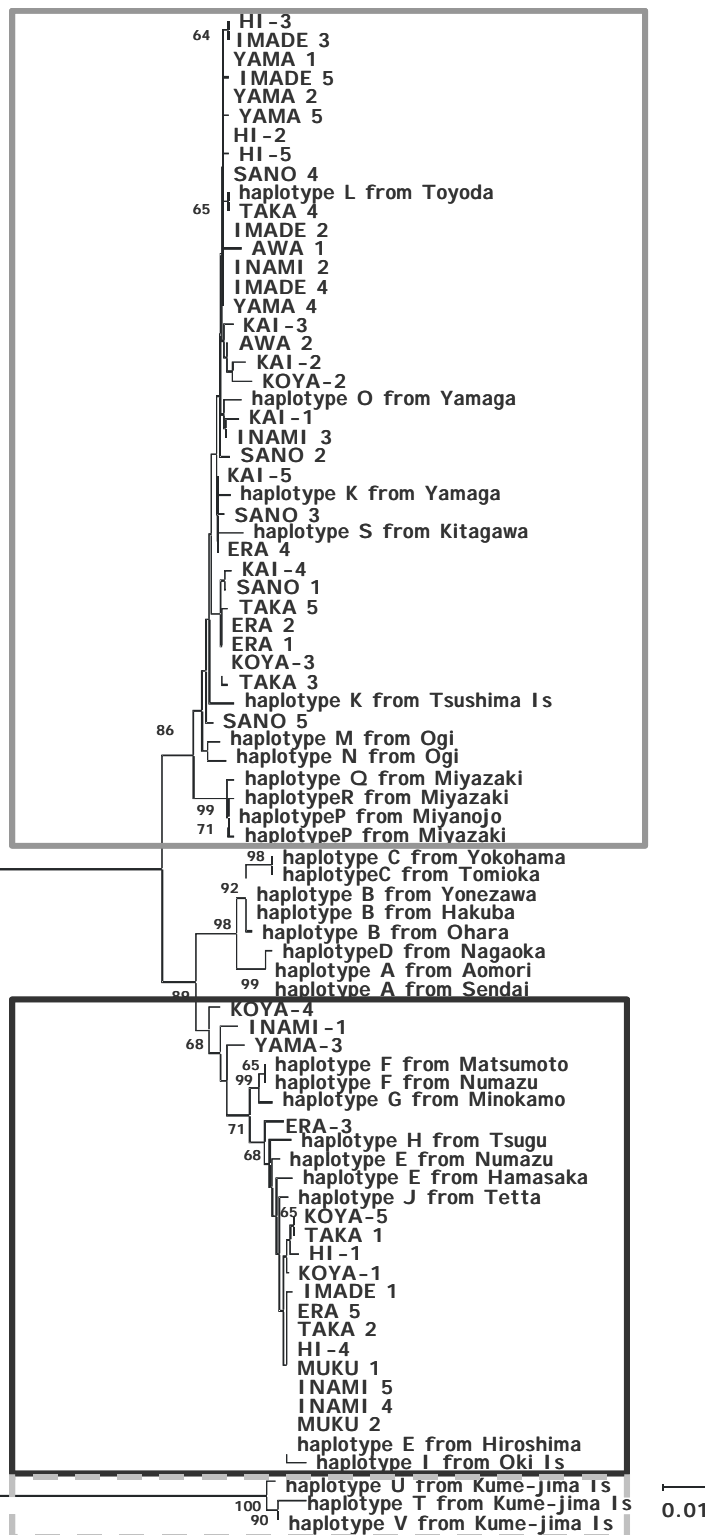


図1 Jukes-Cantor を用いて作成した、ゲンジボタルの系統樹

□: 九州グループ、 □: 西日本グループ、
 □: 対照グループ

AWA: 栗野、ERA: 江良、HI: 日野、IMADE: 今出、INAMI: 稲見、
 KAI: 開作、KOYA: 木屋、MUKU: 壱路子、SANO: 佐野、TAKA: 鷹子、
 YAMA: 山田。

4.1 豊田地域内におけるゲンジボタルの西日本グループと九州グループの分布状況

各地点における西日本グループと九州グループの出現頻度を図2に示す。

塩基配列から推定した系統樹から、豊田地域を流れる2水系(木屋川水系と粟野川水系)には、西日本グループおよび九州グループの2グループに属する集団が同一水系内にそれぞれ分布していることが明らかになった。5個体を分析した地点に限ると、どちらかのグループだけが出現する地点は粟野川水系の開作と佐野の2地点だけであり、木屋川水系では全ての地点において2グループが混在していた。なお、山田、木屋地点においては、過去にゲンジボタル幼虫の放流実績が確認されている。

また、2水系間にゲンジボタルの交流を物理的に阻害するような地理的特長は存在しないため、放流された幼虫が周辺地域に広がった可能性も否定できない。

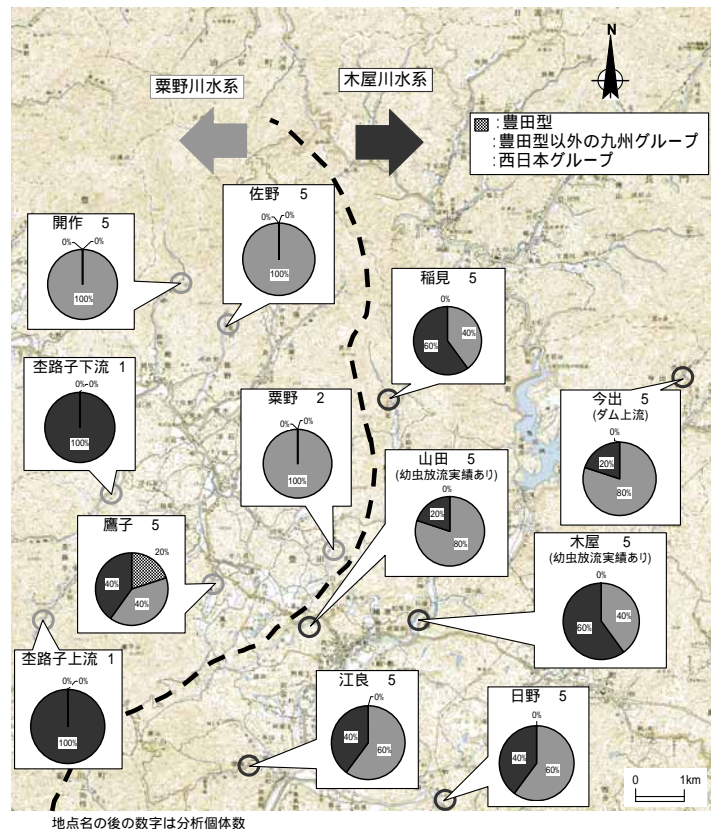


図2. 分析個体のRFLPハプロタイプ別出現頻度

4.2 西日本グループと九州グループの遺伝的多様性

豊田地域周辺は、遺伝的に異なる西日本グループと九州グループのどちらかが分布域を拡大している境界地域である可能性が高いと考えられる。このような解釈について検討を行うため、両グループの遺伝的多様性について検討を行った結果を表1に示す。なお、ハプロタイプの区別が不明瞭な、KOYA-4、YAMA-3、およびINAMI-1については分析から除外した。

表1. 九州グループおよび西日本グループのハプロタイプ多様度(Hd)および塩基多様度(Pi)

	個体数	置換部位	ハプロタイプ数	ハプロタイプ多様度(Hd)	分散(V(Hd))	塩基多様度(Pi)	分散(V(Pi))
全個体	49	48	31	0.953	0.018	0.02284	0.00205
九州グループ	33	25	22	0.938	0.033	0.00502	0.00058
西日本グループ	13	8	6	0.718	0.128	0.00265	0.00069

検討の結果、九州グループは西日本グループに比較してハプロタイプ多様度、塩基多様度とも高い値を示し、遺伝的多様性が高いことが明らかとなった。特に塩基多様度は2倍近い値を示していることから、豊田地域周辺に分布する西日本集団は九州集団よりも小さいと推定される。さらに、2水系に分布する九州グループの個体数も、西日本グループの個体数の倍以上であることから、両グループの境界の中心は、東側に位置する可能性が示唆された。

4.3 豊田型の分布状況

分析の結果、RFLP ハプロタイプが豊田型を示した個体は、分析に用いた49 個体のうち粟野川水系鷹子川から得られた1 個体のみであった。この1 個体はGenBankから引用したL型のハプロタイプの塩基配列と完全に一致していた。Suzuki et al. (2002)がゲンジボタル幼虫を採集した河川が、豊田地域内のどこであるのか確認出来ていないが、Suzuki et al. (2002)が10個体分析した中で豊田型を示す個体は1個体だけであったことや、本研究においても分析した49個体のうち1個体 (図2.「TAKA4」)しか検出されていないことを考えると、豊田型は希少なハプロタイプであると考えられた。

以上のことから、豊田地域は「豊田型」という希少なハプロタイプが存在する地域であり、ゲンジボタルの遺伝的多様性を保全するために非常に重要な保全地域であると考えられた。

5. 今後の展望

新・生物多様性国家戦略(平成14年)の制定を受け、生物の遺伝子レベルでの多様性の保全が注目されつつある。

最初に述べたとおり、遺伝子レベルでの情報は、希少生物の保全を行う上で重要なポイントとなっていることから、今後とも、遺伝子解析技術を用いた環境保全や自然再生に積極的に取り組みたいと考えている。

参考文献

- ・ Suzuki, H. ・ Sato, Y. ・ Ohba, N. 2002 , Gene Diversity and Geographic Differentiation in Mitochondrial DNA of the Geneji Firefly, *Luciola cruciata* (Coleoptera:Lampyridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*,22(2):293-205 .
- ・ 日和住政・草桶秀夫2004 , ホタルの分子系統樹から見た地理的分布と遺伝的文化 . 昆虫DNA 研究会ニュースレター, No.1:24-32 .
- ・ 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 . *Jpn.J.Ent. (N.S.)*, 4(4): 117-127 .
- ・ Kumar,S.,Tamura, K., Jakobsen, I.B. and Nei,M. 2001, MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State Univ., Tempe, Arizona, USA.
- ・ Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. and Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.