

立正大学熊谷キャンパス近辺のゲンジボタルの分布と遺伝的な地域固有性

小 林 拳 大* 椎 名 章 裕* 松 本 響*
 小谷野 郁 弥* 山 口 裕 也* 小 柴 清**
 小 柴 捷 子** 杉 田 義 勝** 関 根 一 希*

キーワード：水生昆虫、DNA、遺伝子移入、外来生物、分子系統地理

1. はじめに

国内では様々な外来生物の侵入と拡大が生じており、その原因の一つとして、人為的な生物の放流が挙げられる。埼玉県内においても、オオクチバスやブルーギルといった外来生物が孤立散在するようなため池に生息しており、明らかに放流があったと考えられる事例が認められる (Maezono and Miyashita 2003)。また、国外からの外来生物に限らず、東日本の日本海側にのみ分布するはずのキタノアカヒレタビラが埼玉県中部で見つかり、自然分布から外れての放流が示唆される。自然分布から外れての放流は、地理的な原因などによって妨げられていた生殖的隔離を破り、近縁種や近縁個体群との交雑といった遺伝子移入を引き起こし、遺伝的な地域固有性が失われてしまうこともある。

ゲンジボタル *Luciola cruciata* は日本固有種であり、本州、四国および九州の山地帯から低地帯にかけての河川や農業水路といった流水環境に生息が認められる。幼虫は流水中に生息し、カワニナやタニシ等の水棲巻貝類を餌とし、地域ごとに羽化期間に変異はあるものの、成虫は5月下旬から7月中旬の間に認められる。先行研究において、ミトコンドリアDNAのCO II やND5領域の遺伝子解析により、ゲンジボタルには、地域ごとに生じた明瞭な遺伝的分化が認められる (吉川ほか 2001; Suzuki et al. 2002)。どちらの遺伝子領域においても、本州内で東日本系統と西日本系統といった大きく2つの系統グループが認められることは共通する。しかしながら、人為的な水辺環境の開発によって縮小した個体群への危惧、あるいはホタル祭りなどの地域イベントなどで、他地域の個体を放流したために、様々な地域で遺伝子移入が引き起こされている (鈴木ほか 2001; 日和ほか 2010)。例えば、東京都のゲンジボタルは、東日本系統の分布範

囲であるものの、都内各地で放流が行われたために、西日本系統が多く生息することが報告されている (鈴木ほか 2001, 2009)。

埼玉県熊谷市柴や千代といった旧江南町では、在来のゲンジボタルの生息が確認されており、1970年代から生息環境が悪化し、個体数が減少した。1983年度から生活排水設備が整い、生息環境が改善されたことにより、再びホタルが確認されるようになった。この時を機に、町ぐるみで保全活動が続けられてきた (現在のNPO法人熊谷市ほたるを保護する会へと至る)。しかし、1998年と1999年に旧江南町由来のゲンジボタルが飼育されていたとされる板橋区のホタル飼育施設から数万個体の幼虫を受け取り、放流したことがある。近年では、ホタルの個体数は増加し、熊谷市千代では毎年6月はじめに「こうなんホタル祭り」が開催されており、2018年で10回目の開催となった。

また、埼玉県内各地においても、飼育個体の放流が行なわれており、埼玉県産のゲンジボタルだけでなく、西日本に起源する個体が放流されることがある (埼玉県 2018)。このような背景から、本研究では、これまでにおける埼玉県内のゲンジボタルの生息地を整理するとともに、立正大学熊谷キャンパス近辺のゲンジボタルの分布を明らかにした。また、これらの遺伝的な地域固有性は保たれているのかを明らかにするため、遺伝子解析を実施した。

2. 調査方法

(1) 埼玉県および熊谷キャンパス近辺におけるゲンジボタルの分布・個体数調査

埼玉県内におけるゲンジボタルの生息地については、吉越ほか (1998) においてまとめられている (埼玉県

* 立正大学地球環境科学部

** NPO法人熊谷市ほたるを保護する会

2018)。これらは旧地名で書かれた文献リストであるため、ここでは新地名に修正したリストを作成し、代表的な地点から地図にプロットした。また、bing検索エンジンおよびGoogle検索エンジンを用いて、埼玉県各市町名とゲンジボタルを検索ワードとして、行政のホームページ等書かれたゲンジボタルの放流の記録や報告について調べた。

2018年5月24日から6月21日にかけて、立正大学熊谷キャンパス周辺を流れる河川である和田吉野川や和田川、および和田吉野川に流入する水路においてゲンジボタルの分布調査を目視により実施した。これまでに生息が知られていた熊谷市千代については毎日、柴や上新田においては、およそ4日に一度の頻度で個体数調査を実施しており、日没後30分～2時間に同じ調査地を一定の速度で歩きながら個体数をカウントする踏査法を用いた。2018年5月29日の19:30～21:00に、熊谷市千代および柴において、調査区を1～8まで細分し、環境生物学実習を履修する学生全員(33名)で個体数調査を実施した。基本的に水路沿いの歩道を歩きながら個体数をカウントする踏査法の調査を実施したが、水路沿いの歩道がなく、近場までのアプローチが難しい地点4と地点5、および周囲に歩道が設置されていない地点8では定点法を用いた。定点法では、約1分間に個体数をカウントする調査を3回繰り返し、もっとも多い個体数をその地点の個体数データとした。また、調査区1～8の順で移動し、往復したため、調査区8以外は時間を変えて2度のデータを収集した。履修生には、あらかじめ調査方法と調査用紙への記入を指示したが、明らかに指示と違いのある記入があった場合には、調査データから除外した。

(2) ゲンジボタルの遺伝子解析

埼玉県熊谷市柴から千代を流れ荒川水系の和田吉野川へと注ぐ水路、および和田吉野川源流部近くの埼玉県熊谷市上新田において、2018年6月19日にゲンジボタルの成虫を採集した。また、熊谷市千代においては、2018年6月13日にも採集した。採集された個体はすぐに95%エタノールで固定された。実験室へ持ち帰った後、実体顕微鏡下で同定・解剖し、HotShot法(Truett et al. 2000)により後脚からDNA抽出を行なった。抽出されたDNAは、ミトコンドリアDNAのCOⅡ遺伝子を増幅するプライマー[フォワードプライマー: 5'-ATGGCAGATTAGTGCAATGG-3', リバースプライマー: 5'-GTTTAAGAGACCAGTACTTG-3' (Simon et al. 1994)]とND5遺伝子を増幅するプライマー[フォ

ワードプライマー: 5'-TAATTCGTTTTAATTTTTGTTTGTAG-3', リバースプライマー: 5'-AAAATAAAATAAACCTTTAACTATTAT-3' (吉川ほか 2001)]によって、それぞれPCR増幅された。PCR産物の精製にはExoSAP IT (Thermo Fisscher Scientific)を用いて行ない、BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisscher Scientific)によってシーケンス反応した後、ABI 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisscher Scientific)を用いて塩基配列を決定した。

シーケンス後の塩基配列と先行研究で明らかにされているゲンジボタルのCOⅡ遺伝子(GenBank Accession No. AB051166-AB051193) (Suzuki et al. 2002) とND5遺伝子(GenBank Accession No. AB052420-AB052550) (吉川ほか 2001)を用いて、それぞれClustal W (Larkin et al. 2007)によりアライメントを行なった。その後、MEGA 7 (Kumar et al. 2016)を解析ソフトとして、Kimura 2-parameter modelに基づいた近隣結合樹を作成した。各分岐の信頼性として、1,000回反復のブートストラップ法によって計算した。外群としてクメジマボタル *Luciola owadai*を用いた(COI: Genbank Accession No. AB051194- AB051196, ND5: AB436482, AB052551)。

また、COⅡ遺伝子については、Suzuki et al. (2002)でのRFLP法によるハプロタイプ分けに従い、6種類の制限酵素(*Ase*Ⅰ, *Hae*Ⅲ, *Hinf*Ⅰ, *Hpa*Ⅱ, *Mva*Ⅰ, および *Rsa*Ⅰ)の切断部位をシーケンス結果から特定し、これらの断片パターンからハプロタイプを特定した。

3. 結果

(1) 埼玉県および立正大学熊谷キャンパス周辺におけるゲンジボタル

これまでの埼玉県内におけるゲンジボタルの生息地の記録を表1および図1 aにまとめた。熊谷キャンパス周辺での生息地としては、旧江南町である御正新田や桶春からの報告があった。ゲンジボタルの放流については、さいたま市および入間郡三芳町のホームページにおいて記事が認められた。

本研究における目視による分布調査からは、和田吉野川本川からは認められていないものの、流入する和田川や水路においてゲンジボタルが認められた(図1 b)。ほたる祭りの開催地区である千代では数百もの個体が確認されており(図2 a)、千代と隣接した柴や上新田でも成虫は認められたが、比較的少ない傾向にあった(図2 b)。5月29日の熊谷市千代および柴における水路を

区画ごとに細分し、調査した結果ではどの区画においても成虫は確認された(図3)。

(2) 熊谷キャンパス近辺のゲンジボタルの遺伝的特性

熊谷市柴から13個体、千代から8個体、および上新田から1個体の計22個体のゲンジボタルの遺伝子解析を行ない、COⅡ遺伝子 650-bpとND5遺伝子 631-bpを特定した。その結果、COⅡ遺伝子およびND5遺伝子のどちら

の近隣結合樹でも、同一の2個体が東日本系統に含まれ、残りの20個体は西日本系統に含まれた(図4, 5)。東日本系統の2個体は、千代の1個体と上新田の1個体であり、柴の13個体と千代の残りの7個体は西日本系統であった。COⅡ遺伝子を6種類の制限酵素で切断した場合で分類するハプロタイプとしては、熊谷市で認められた東日本系統がハプロタイプCであり、西日本系統はハプロタイプEであった。

表 1 埼玉県内におけるゲンジボタルの生息地

合併後の地名	旧市町村名	引用文献
さいたま市	大宮市深作	斎藤 (1980)
東松山市	東松山市月田橋	岡崎 (1980)
坂戸市	坂戸市万年橋・長岡	岡崎 (1980)
川越市	川越市寺尾	岡崎 (1980)
狭山市	狭山市上宿	岡崎 (1980)
入間市	入間市宮寺・上谷ヶ貫・上小谷田・仏子／入岡市・寺竹	埼玉県 (1988)
日高市	日高市	斎藤 (1991)
	日高市高麗川橋・馬場・吹上・日向	岡崎 (1980)
飯能市	飯能市	飯能市史編集委員会 (1985)
	飯能市柏木・岩淵・下直竹・申淵・間野・苅生・深沢・虎秀・原市場・久林・戸丸・下中沢・上中沢・井上・長沢・中尾／名栗村新館	岡崎 (1980)
	飯能市阿須	高橋 (1990)
秩父市	秩父市堤平・棒ヶ沢／荒川村下郷・柴原	岡崎 (1980)
鳩山町	鳩山町日影	岡崎 (1980)
毛呂山町	毛呂山町大谷木	斎藤 (1978)
	毛呂山町阿諏訪	岡崎 (1980)
越生町	越生町成瀬・津久根・田代・小杉・大満	岡崎 (1980)
嵐山町	嵐山町・都幾川、槻川合流点・鎌形	岡崎 (1980)
小川町	小川町赤木	斎藤 (1978)
	小川町青山・下古寺・上古寺・小貝戸・落合・坂本・新井・新田・木呂子	岡崎 (1980)
寄居町	寄居町男会・富田	斎藤 (1981)
	寄居町五ノ坪・上原・三ヶ山・円良田・風布・下郷	岡崎 (1980)
熊谷市	江南町御正新田・桶春	岡崎 (1980)
深谷市	川本町川本・本田・畠山	岡崎 (1980)
久喜市	栗橋町	岡崎 (1980)
本庄市	児玉町矢納・下元田・稲沢・河内・小塚	岡崎 (1980)
美里町	美里町	岡崎 (1980)
神川町	神川町金銭神社	岡崎 (1980)
皆野町	皆野町三沢・小平	岡崎 (1980)
横瀬町	横瀬町宇根	福島・長島 (1987)
	横瀬町七番・苅米	岡崎 (1980)
小鹿野町	小鹿野町	岡崎 (1980)
	小鹿野町小森	斎藤 (1978)
ときがわ町	玉川村務ヶ谷戸・荒田・日影・村別所・村大野・村清水	岡崎 (1980)
東秩父村	東秩父村	岡崎 (1980)

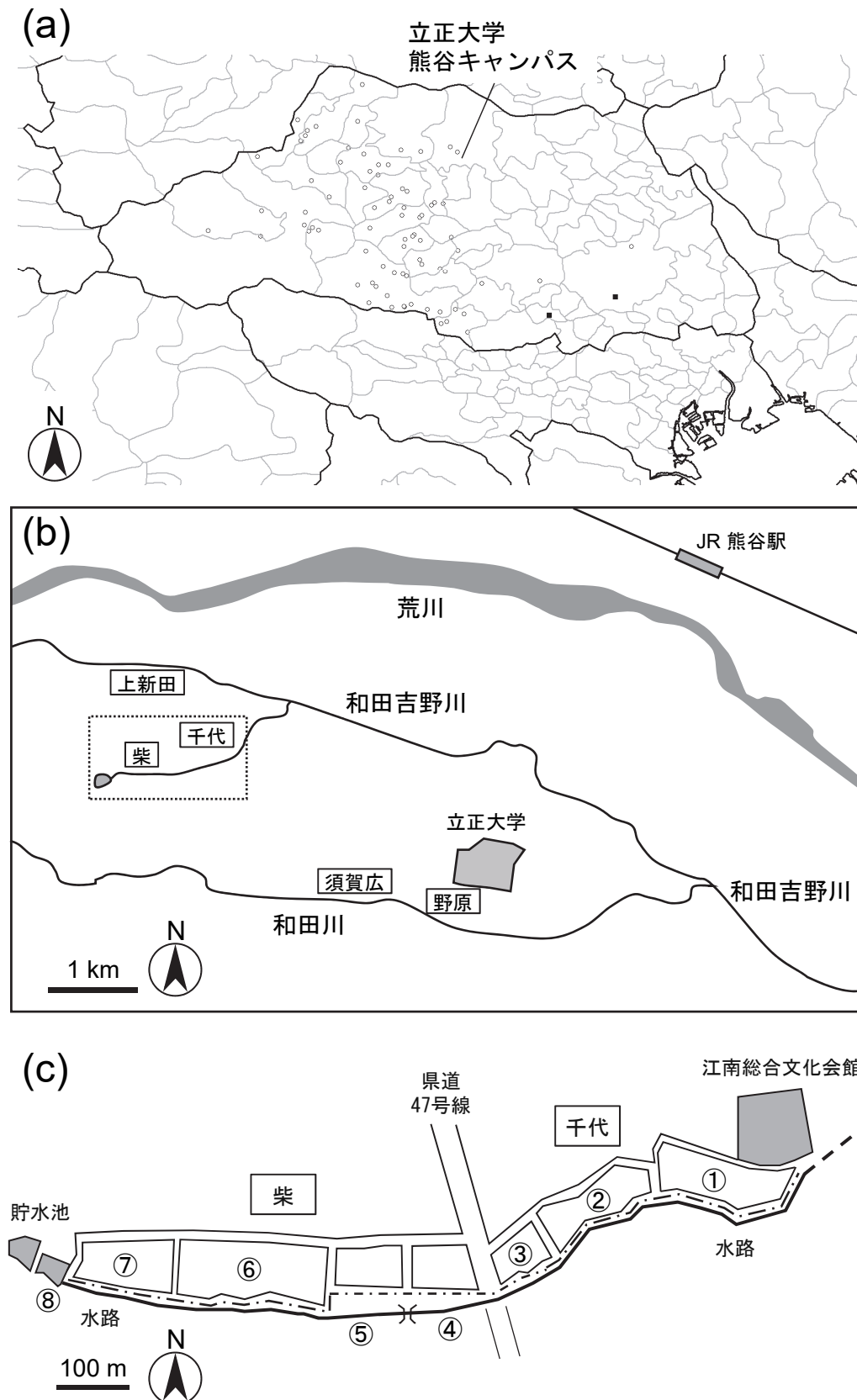


図1 ゲンジボタルの分布と調査地

(a) 埼玉県におけるゲンジボタルの生息地。生息情報のあった地点を白丸で示し、放流が公表されている市町については、役所の地点を黒四角で示す。(b) 立正大学熊谷キャンパス周辺のゲンジボタルの生息地。実線枠内に成虫の飛翔が認められた地域名を示す。破線部内の拡大を(c)に示す。(c) 熊谷市柴および千代を流れる水路。細分された個体数調査区を番号で示す。県道47号線を挟んで東側が千代、西側が柴。踏査法で歩いたルートを破線で示す。調査区4と5については、水路上の橋上から定点法により個体数をカウントし、下流側が調査区4、上流側を調査区5とした。

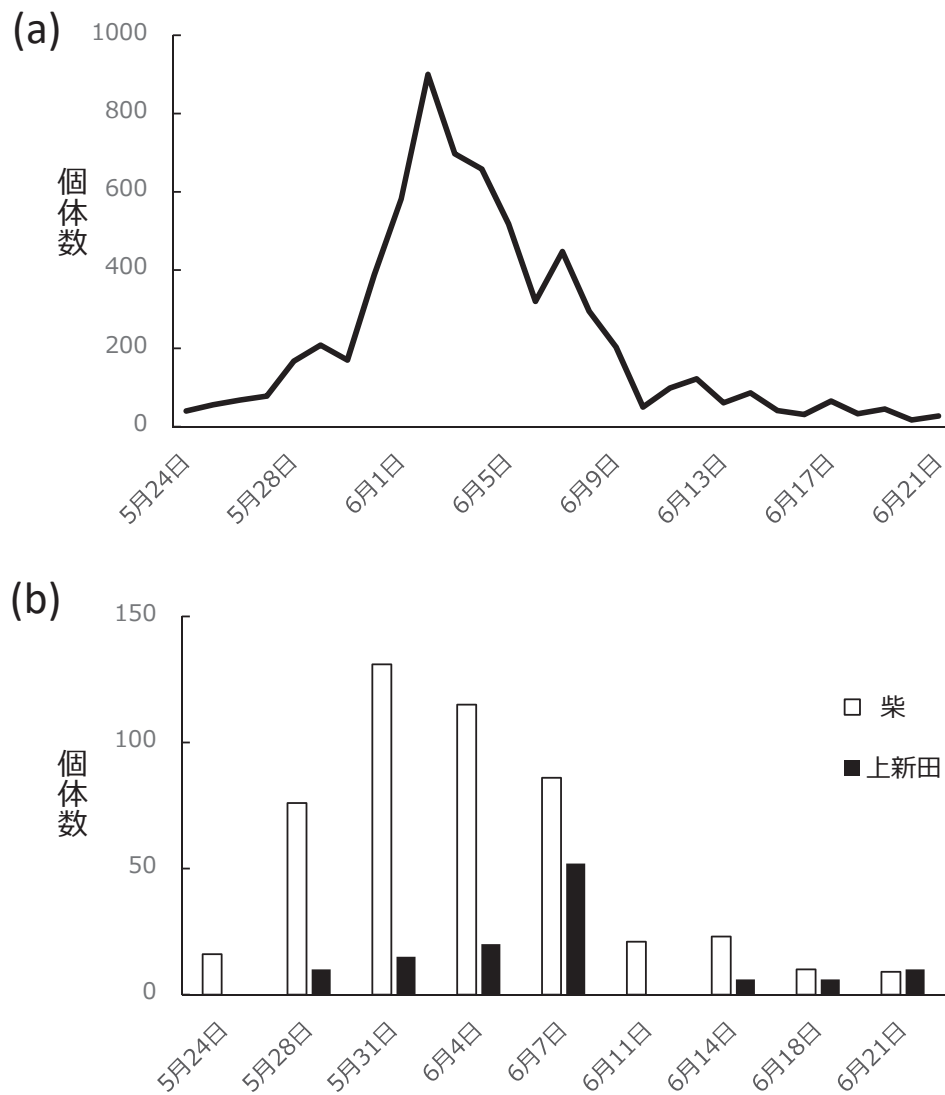


図2 羽化期間中のゲンジボタルの個体数
(a) 熊谷市千代における成虫個体数。(b) 熊谷市柴および上新田における成虫個体数。

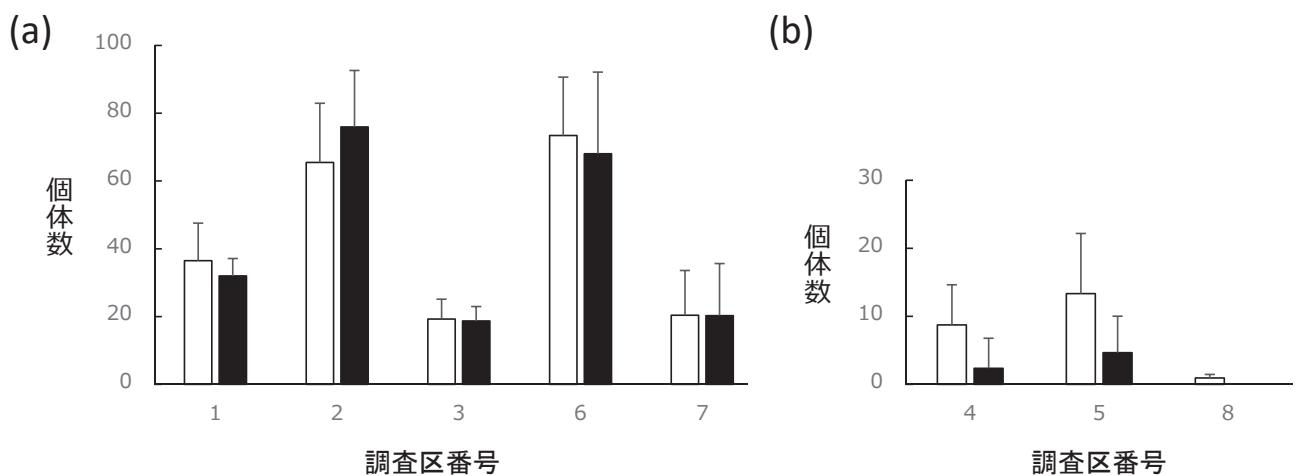


図3 熊谷市柴-千代を流れる水路の羽化個体数
(a) 踏査法によりカウントした個体数。(b) 定点法によりカウントした個体数。調査区番号は図1 cを参照。いずれも白色の棒グラフが往路、黒色が復路の個体数を示し、履修生のデータの平均値と標準偏差を示す。

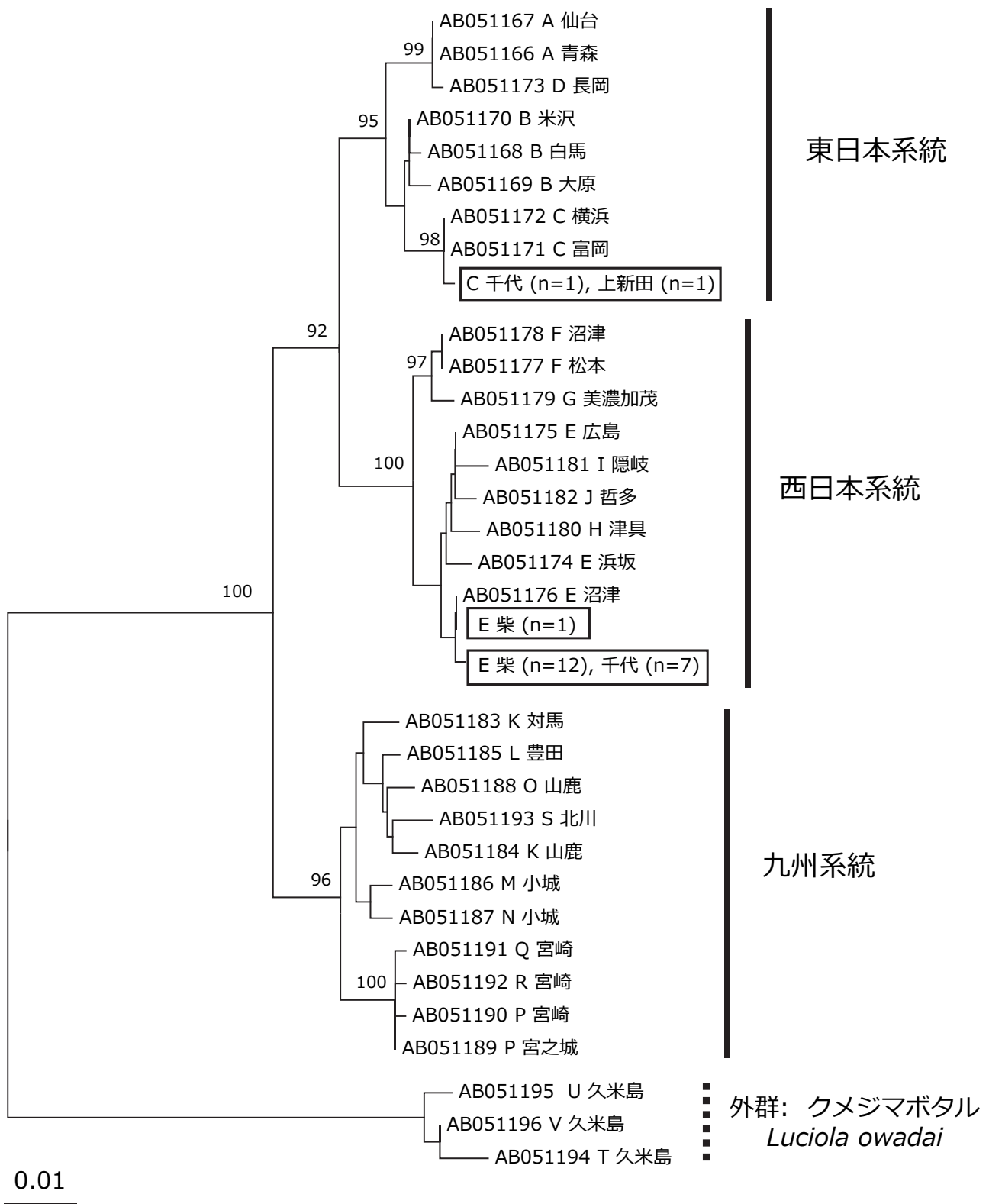


図4 ミトコンドリアCOⅡ遺伝子 650-bpに基づく近隣結合樹

今回解析された熊谷市のサンプルを囲み線で示す。括弧内の数字は個体数を示し、A-VのアルファベットはCOⅡの塩基配列を6種類の制限酵素で切断し、断片サイズによりパターン分けしたハプロタイプを示す。ノード上の数値はブートストラップ確率を示しており、90以下を省略する。

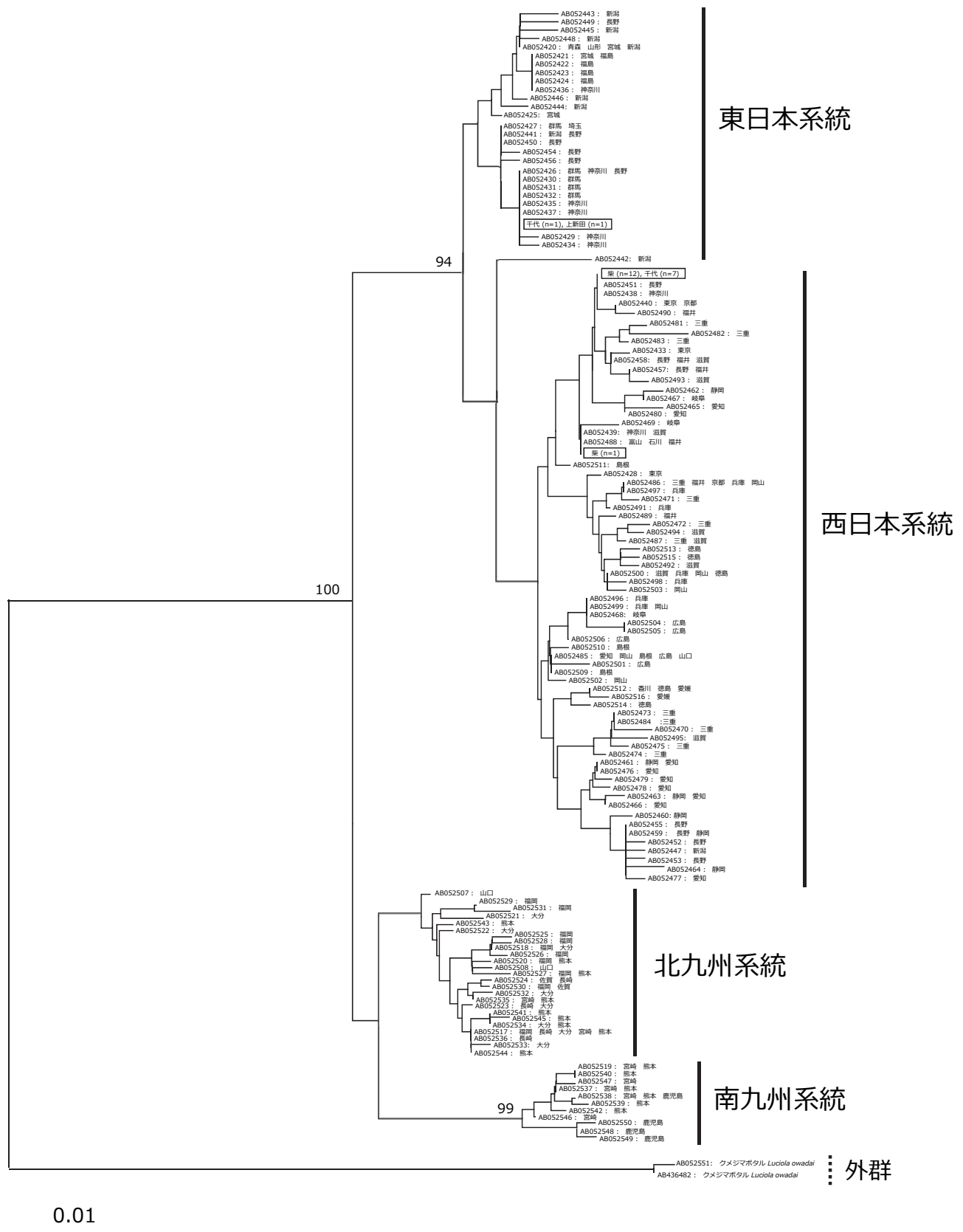


図5 ミトコンドリアND5遺伝子 631-bpに基づく近隣結合樹

今回解析された熊谷市のサンプルを囲み線で示す。括弧内の数字は個体数を示す。ノード上の数値はブートストラップ確率を示しており、90以下を省略する。

4. 考察

立正大学熊谷キャンパス近辺である熊谷市千代や柴、上新田といった旧江南町では多くのゲンジボタルが現在も生息していることが明らかになった。ゲンジボタルは埼玉県の山地帯から低地帯にかけて自然分布しており（埼玉県 2018）、旧江南町の個体群もその自然分布域に含まれている。1970年代に旧江南町のゲンジボタル個体群は縮小したが、その後の生活排水設備の整備などといった生息環境の改善により、現在までの個体数に増加したと考えられる。また、1998年と1999年にそれぞれ約3万もの幼虫個体が放流されており、放流によって個体数が急激に増加した可能性は高い。しかしながら、これまでの具体的な個体数データはなく、放流による個体数の変化については明らかではない。

本研究での遺伝子解析により、熊谷キャンパス近辺に生息する多くの個体は西日本系統の遺伝子をもつことが明らかとなった。埼玉県熊谷市は、東日本系統の分布域内であり、本来、西日本系統は分布していない地域である。先行研究においても、埼玉県西部に位置する比企郡嵐山町の10個体（1998年の採集個体）はCOⅡ遺伝子によって解析されており、入間郡越生町の3個体（2001年以前の採集個体）はND5遺伝子によって解析されているが、いずれも東日本系統であることが報告されている（吉川ほか 2001；Suzuki et al. 2002）。したがって、人為的な放流由来の西日本系統の個体が生息するようになった可能性が高い。

人為的な放流により、他地域からの系統が紛れ込んだ事例は、東京都や神奈川県、長野県辰野町などから知られる（鈴木ほか 2001, 2009；日和ほか 2010；後藤 2012）。東京都については、COⅡ遺伝子のハプロタイプ解析から明らかにされており、在来の東日本系統はハプロタイプCであるが、放流記録のある地点を中心に西日本系統のハプロタイプEやFが広範囲に認められる（鈴木ほか 2001, 2009）。熊谷市においては、東日本系統のハプロタイプCの他、西日本系統のハプロタイプEが多く認められたが、ハプロタイプFは認められなかった。また、長野県辰野町松尾峡においては、1960年頃から滋賀県守山市のゲンジボタルを複数回放流したことが報告されており（井口 2003）、松尾峡およびその周辺のゲンジボタルのND5遺伝子の解析により、在来のハプロタイプと滋賀県守山市由来のハプロタイプが認められている（日和ほか 2010）。熊谷市で認められた西日本系統は、長野県辰野町のサンプル（AB052451）や滋賀県のサンプルと近

縁であることから、熊谷市にもともと生息していた個体とは別の地域由来の個体が入り込んだと考えるのが妥当である。現在、熊谷市にもともと生息していた東日本系統の割合は低く、遺伝的な地域固有性は大きく崩れている状況にあると言える。

それでは、西日本系統個体が熊谷市へ侵入するに至った放流とは何なのか。旧江南町へ西日本系統個体が直接放流された可能性と、他地域に放流されたことが原因で西日本系統個体が旧江南町へ移動分散した可能性が考えられる。旧江南町では、1998年と1999年に計6万ほどの飼育個体が放流されたことがある。もともと旧江南町に生息していた個体を東京都板橋区の飼育施設〔板橋区ホタル生態環境館（旧ホタル飼育施設）、現在、閉館〕に移し、飼育によって増えた個体を再び放流したとされるが、東京都内である飼育施設において、西日本系統個体が紛れ込んでいた可能性が考えられる。放流された個体の中に、西日本系統個体が多く紛れ込んでいたため、現在の旧江南町のゲンジボタルの多くは西日本系統に大きく偏っているのかもしれない。

あるいは、埼玉県内においてゲンジボタルは、東京都から南北に連続的に分布が認められるため、東京都で定着した西日本系統個体が北方へ移動分散したのかもしれない。また、環境学習や地域イベントとして、飼育個体の放流が埼玉県内各地で行われており、関西地方などの個体群由来の個体が放流されることもある（埼玉県 2018）。さいたま市および入間郡三芳町の2地域では、行政のホームページによって放流が公にされていたが、その他の地域でも放流が行われた可能性は十分にある。西日本系統のゲンジボタルが旧江南町周辺に放流されたことで、西日本系統個体の旧江南町への侵入が容易となった可能性も考えられる。

しかし、旧江南町に放流された個体の一部が標本として残っているわけではなく、旧江南町に西日本系統が侵入する原因となった放流を特定することは困難である。ただし、埼玉県全域における遺伝的特性を比較し、熊谷市における遺伝的特性が異質なのか、あるいは同様なかを明らかにすることから推察することはできるだろう。埼玉県全域のゲンジボタルの遺伝的特性についてはまだ明らかにされておらず、今後の課題である。

謝辞

本研究は平成30年度立正大学研究推進・地域連携センター支援費5種による支援を頂いた。解析に用いたゲンジボタルの標本採集に関しては、熊谷市環境部環境政策

課を通して熊谷市長に許可を頂いた。個体数調査に関しては、環境生物学実習を履修する学生やSAの長谷川佑樹氏および酒井慈乃氏にご協力頂いた。また、NPO法人熊谷市はたるを保護する会の皆さまには研究全般においてご協力いただいた。心から感謝の意を申し上げます。

引用文献

- 福岡義一・長島武志 (1987) 武甲山の鞘翅目. 秩父武甲山総合調査報告書・自然編. 武甲山総合調査会, pp.308-367.
- 後藤好正 (2012) : 横浜市におけるゲンジボタルの明滅周期について～在来個体群と移入個体群の比較～. 全国ホタル研究会誌, **45**, 35-36.
- 飯能市史編集委員会 (1985) 飯能市史 資料編IX 飯能の自然・動物. 飯能市, 193pp.
- 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.
- 井口豊 (2003) : 長野県辰野町松尾峡におけるゲンジボタル移入の歴史について. 全国ホタル研究会誌, **36**, 13-14.
- 泉北斗・関根一希・小林建介 (2018) : 埼玉県川島町の農業水路におけるキタノアカヒレタビラ *Acheilognathus tabira tohokuensis* の採捕記録. 川博紀要, **18**, 17-20.
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura (2016) : MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, **33**, 1870-1874.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson and D.G. Higgins (2007) : Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**, 2947-2948.
- Maezono, Y. and T. Miyashita (2003) : Community-level impacts induced by introduced largemouth bass and bluegill in farm ponds in Japan. *Biol. Cons.*, **109**, 111-121.
- 岡崎成美 (1980) : 埼玉県内のゲンジボタルの分布. 埼玉生物, **20**, 52-54.
- 埼玉県 (1988) : 緑の森博物館環境調査報告書. 埼玉県委託調査, pp.149-155.
- 埼玉県 (2018) : 埼玉県レッドデータブック動物編 2018. 埼玉県環境部みどり自然課, 419pp.
- 斎藤良夫 (1978) : 埼玉県の甲虫. 埼玉県動物誌. 埼玉県教育委員会, pp.213-258.
- 斎藤良夫 (1980) : 深作沼動植物調査. 大宮市文化財調査報告, **14**, 66-74.
- 斎藤良夫 (1981) : 寄居町の甲虫類. 寄居町史資料集・寄居町の自然・動物編. 寄居町教育委員会町史編さん室, pp.87-103.
- 斎藤良夫 (1991) : 日高町史 自然史編. 日高町教育委員会, 530pp.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu and P. Flook (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.
- 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. 海洋 号外, **51**, 21-30.
- Suzuki, H., Y. Sato and N. Ohbaa (2002) : Gene diversity and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the Genji firefly, *Luciola cruciata* (Coleoptera : Lampyridae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, **22**, 193-205.
- 鈴木浩文・東京ホタル会議 (2001) : ホタルの保護・復元における移植の三原則 ―東京都におけるゲンジボタルの遺伝子調査の結果を踏まえて―. 全国ホタル研究会誌, **34**, 5-9.
- 高橋衛 (1990) : 加治丘陵自然環境調査報告書. 昆虫類. 鞘翅目. 入間市加治丘陵自然環境調査研究会, pp.355-363.
- Truett, G. E., P. Heeger, R. L. Mynatt, A. A. Truett, J. A. Walker and M. L. Warman (2000) : Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques*, **29**, 52-54.
- 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.*, **4**, 117-127.
- 吉越肇・小田博・竹内崇夫・西山明・小堀文彦・長畑直和・牧林功 (1998) 埼玉県の鞘翅目 (甲虫類). 埼玉県昆虫誌, **III**, pp.93-340.

Distribution and genetic local endemism of *Luciola cruciata* around Rissho University Kumagaya Campus

KOBAYASHI Kenta*, SHIINA Akihiro*, MATSUMOTO Hibiki*
KOYANO Fumiya*, YAMAGUCHI Yuya*, KOSHIBA Kiyoshi**
KOSHIBA Katsuko**, SUGITA Yoshikatsu**, SEKINE Kazuki*

* Faculty of Geo-Environmental Science, Rissho University
** Non-Profit Organization Association for Firefly in Kumagaya City

Key words: aquatic insects, DNA, introgression, invasive species, molecular phylogeography