

《報告》

ヘイケボタル黒化型系統×野生型 F1 成虫の形態, 発光, および受光に関する研究

大場裕一<sup>1)</sup>・池谷治義<sup>2)</sup>・川野敬介<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 中部大学応用生物学部環境生物科学科, 〒487-8501 春日井市松本町 1200

<sup>2)</sup> 桐蔭学園高等学校, 〒225-8502 神奈川県横浜市青葉区鉄町 1614

<sup>3)</sup> 豊田ホタルの里ミュージアム, 〒750-0441 山口県下関市豊田町大字中村 50-3

はじめに

全ゲノム配列が解読されているヘイケボタル *Aquatica lateralis* (Motschulsky, 1854) の累代飼育系統 Ikeya-Y90 は, 形態, 色彩, 行動の点において野生個体との明確な違いは見られない (Fallon *et al.*, 2018). 池谷は, その系統の中から体全体が黒化した黒化型オス 1 個体を見つけ, それを野生型メスと交配して得られた F1 (全て野生型と同様に前胸背の側方が淡赤色) 同士を掛け合わせることで, 黒化型系統を得た (池谷, 2016). その黒化型系統の成虫について形態を詳しく調べたところ, 前胸背全体の黒化以外にも, 歩脚の黒化, 発光器クチクラの黒ずみ, 発光器面積の減少, さらに複眼表面クチクラの強い黒化が確認された (川野ら, 2022).

今回, Ikeya-Y90 の黒化型系統と野生型系統を掛け合わせた F1 個体を先の黒化型個体 (川野ら, 2022) と同様に形態や発光について詳細に調査したので報告する. さらに, メス 1 個体のみ黒化型と野生型のモザイクと思われる個体が得られたので, それについても合わせて報告する.

材料および方法

F1 個体は, 黒化型オスと野生型メス, それぞれ未交尾成虫 1 個体ずつを, 産卵床として湿らせた園芸用ミズゴケ 20 g を入れた容量 860 mL の透明ケースに入れ, 交尾・産卵させることによって得た. 145 個体の 1 齢幼虫が孵化し, そのうち 132 個体が終齢幼虫になり, 119 個体が羽化して成虫になった. いずれの成虫個体も, 雌雄とも野生型と変わらない色彩と発光器に見えたが (図 1), メスの 1 個体のみ, 前胸背板の左側側方全体と右側側方の一部の部分的黒化, 腹部第 6 節の腹面の黒化, および黒化型に見られる発光器クチクラの黒ずみが観察された (図 2).

成虫の形態や発光に関する調査の内容は以下の通りで, すべて川野ら (2022) に準じた.

**外部及び内部の形態の観察, 組織形態の観察:** F1 個体の外部形態を生時及びエタノール固定標本を用いて実体顕微鏡で観察した. 観察したのは F1 個体のオス 16 個体であった. さらに, エタノール固定標本を用いてより詳細な外部形態を観察するために走査型電子顕微鏡を用いた観察と組織切片による観察を各 1 個体を用いて実施したが, その方法や機材は川野ら (2022) に準じた.

**クチクラ標本の作成と発光スペクトルの測定:** 前胸背板, 発光器, および複眼のクチクラ標本の作成法は先行論文 (川野ら, 2022) に準じた. 実際に解剖に使用したのは, 図 3 にある野生型および F1 それぞれ 2 個体のうちの左側の個体である. 方法を簡略に説明すると, 冷凍保存してあった個体を解凍後, ピンセットで組織部分を切り取り, 内部の軟組織をピンセットと面相筆を用いて水で洗いながら除去した. クチクラ組織の撮影は, 乾燥による濁りや変色を避けるため水に濡れた状態で, 調製後すぐに行った. 発光スペクトルの測定法も先行論文 (川野ら, 2022) に準じた. 簡略に説明すると, 冷凍してあった個体を解凍しながら, 発光している発光器部分に腹側から分光器 (FLAME S, オーシャンインサイト社) に接続した透過プロー



図1. ヘイケボタルIkeya-Y90系統の野生型（左）と黒化型（中央）、F1（右）のオス成虫のエタノール固定標本。

1. 腹面；2. 背面；3. 左側面。 ※スケールは1mm

ブを近づけてスペクトルを測定。測定ノイズを軽減するため、同一個体で3回の測定結果を取得した値を平均し、最大値を100%に換算してグラフ化した。

**発光強度：**F1 個体のオス 16 個体を用いて発光強度を計測した。発光強度の計測機材や方法、計測値、計測時間については川野ら（2022）に準じた。

### 結果および考察

**外部及び内部の形態の観察、組織形態の観察：**F1 個体の外部形態は一見したところ、野生型との差は認められなかった。特に、黒化型にみられた歩脚の黒化も、F1 では確認されなかった（図 1, 3A）。また、野生型に見られる前胸側方と腹部第 6 節発光器周囲の淡赤色（池谷, 2016）は、腹面から観察した野生型と F1 個体とでも違いは認められなかった（図 1, 3A）。他には、上翅に密生する毛の色や下翅の翅脈、腹部や胸部の形状等実体顕微鏡で観察したが、顕著な違いは見いだせなかった。さらに詳しく観察するために走査型

電子顕微鏡により頭部、触角、前脚、前胸背、腹部第5、6節（発光器）を撮影、観察したが（図4-1, 4-2）、野生型との違いは見いだせなかった。発光器の形状についても比較したが、野生型との違いは見いだせなかったが、発光器表面のクチクラの形状を比較すると野生型がコブ状なのに対して、F1 個体は皺状になっていた（図4-2）。この特徴は、黒化型と同様であったものの、走査型電子顕微鏡による各1 個体の観察しかできていないため、この野生型との違いと黒化型との共通性については判断できなかった。

さらに、連続組織切片を観察し、F1 個体を野生型と黒化型と比較したところ、F1 個体は野生型と違いが見いだせず、前胸背のクチクラは透明化しており（正中の黒紋部分以外）、複眼のクチクラも黒化型のような黒化は認められず野生型と同じで透明化していた（図5-1）。さらに、発光器（腹部第5・6節腹面）を比較しても野生型との違いは見いだせなかった（図5-2）。

**クチクラの透明化度と発光スペクトル：**前胸背板の内部組織を除去し、クチクラの黒化を観察したところ、野生型とF1 個体に違いは認められず、どちらも側方のクチクラが透明化していた（図3B）。黒化型では、前胸背板側方のクチクラも正中と同程度の強い黒化が認められている（川野ら, 2022）。内部組織を除去した発光器クチクラについても、野生型とF1 個体で透明度の違いは認められなかった（図3C）。黒化型の発光器クチクラでは顕著な黒ずみが認められている（川野ら, 2022）。

冷凍個体を解凍した時の発光器からの光のスペクトルを測定したところ、スペクトル形状および極大波長は完全に一致していた（極大波長は、野生型とF1 共に 554-556 nm：図6）。なお、野生型と黒化型では発



図2. モザイク個体と思われるメス個体。  
1. 背面；2. 腹面。

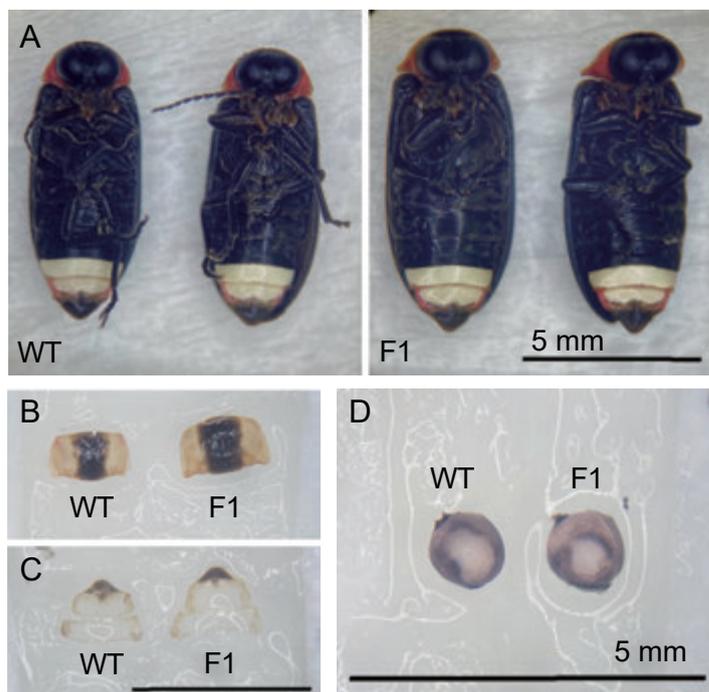


図3. (A)ヘイケボタルIkeya-Y90の野生個体 (WT) とF1個体 (F1) の腹面（それぞれ2個体）。(B) 前胸背板のクチクラ組織。(C) 発光器のクチクラ組織。上半分が腹部第6節、下半分が腹部第5節。

(D) 複眼のクチクラ組織。内部組織の除去が不十分であるため周辺部が黒く見えるが、個眼が正面から写っている中央部は野生個体もF1個体も同等に透明に見えるのがわかる。

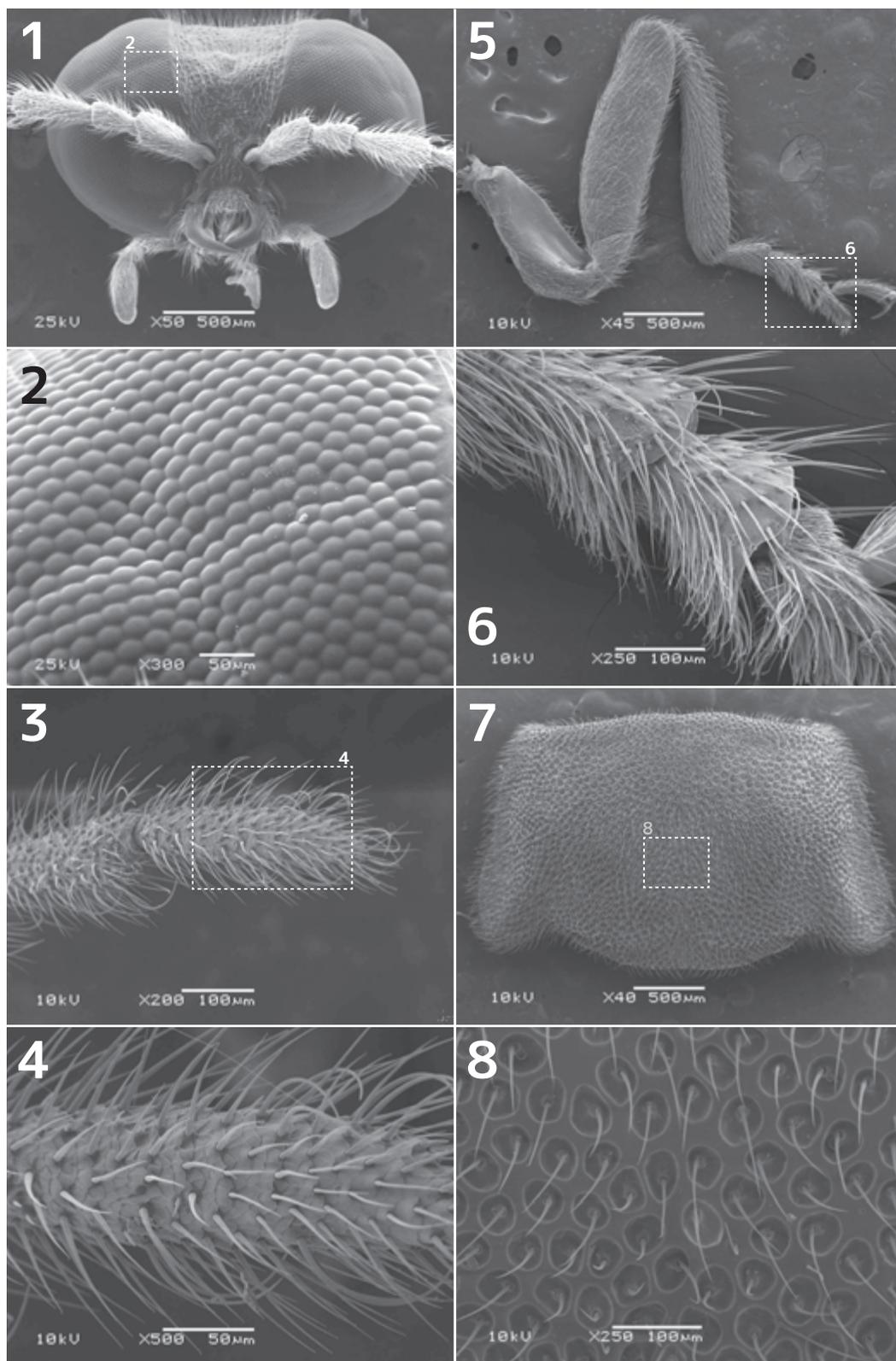


図4-1. ヘイケボタルIkeya-Y90系統のF1個体の走査型電子顕微鏡写真  
1. 頭部前面； 2. 複眼（拡大位置は1に示す）； 3. 触角末端節； 4. 触角末端節（拡大位置は3に示す）； 5. 右前脚； 6. 右前脚のふ節下面（拡大位置は5に示す）； 7. 前胸背板； 8. 前胸背板の正中（拡大位置は7に示す）。

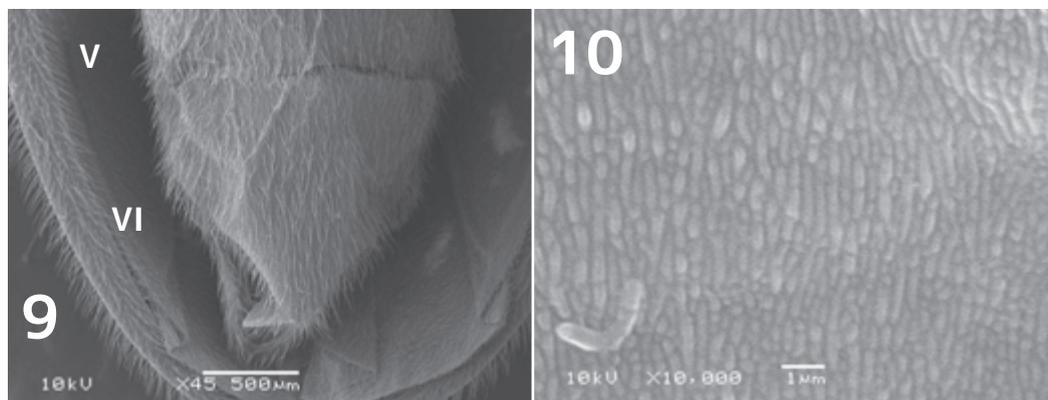


図4-2. ヘイケボタルIkeya-Y90系統のF1個体の走査型電子顕微鏡写真  
9. 発光器（腹部第5,6節）；10. 発光器の表面（正中付近）。

光スペクトルの極大波長に僅かな違いが認められている（川野ら,2022）。

複眼クチクラについても、野生型と F1 個体との間に違いは認められず、どちらでも複眼クチクラは透明であることが確かめられた（内部組織の除去が不完全であったため、図 3D において周囲に黒っぽい部分が見えるが、複眼を正面から捉えた中心部の画像から、どちらも同様に透明度が高いことがわかる）。

**発光強度:** 計測の結果、60 秒間の平均発光強度（平均±S.E.）は、F1 個体では  $15.68 \pm 1.12$  (N=16) であった。この値は、川野ら (2022) による野生型の  $10.30 \pm 2.09$  (N=11) と比べて有意な差が認められ (マンホイットニーの U 検定,  $P=0.006$ )、黒化型の  $1.85 \pm 0.58$  (N=10) と比べても有意な差が認められた (マンホイットニーの U 検定,  $P=0.000012$ )。なお、最大発光強度（平均±S.E.）は  $45.75 \pm 10.03$  (最大値: 71) で、発光計測回数の平均は  $51.7/60$  と非常に活発に発光していた (野生型 29.9/60, 黒化型が 14.6/60 (川野ら,2022))。ただし、本種のオスでは体長と発光強度にやや相関があることが知られているが (川野, 2014)、計測した個体の体長 (平均±S.D.) は  $8.69 \pm 0.51$  mm と川野ら (2022) で発光強度を計測した野生型が  $8.67 \pm 0.48$  mm, 黒化型が  $9.10 \pm 0.56$  mm であったので、体長に大きな差は認められなかったが、F1 個体は野生型、黒化型に比べて顕著に光が強く、活発に発光することがわかった。この違いは肉眼による観察でも明らかで、黒化型や野生型に比べて明らかに光が強く、活発に発光していた (図 7)。ただし、それ以外の行動的な顕著な違いは特に見いだせなかった。

以上より、野生型と F1 個体には、外部形態、組織形態のみならず、各組織のクチクラ黒化度合いにおいても差がないことが確かめられたが、非常に光が強く、活発に発光することが明らかになった。ただし、これが野生型と普遍的な違いなのか、飼育の過程による栄養状態等の違いによる影響なのかについてはわからなかった。

本研究からヘイケボタル黒化型系統における体全体の黒化形質は、これまで考えられてきたとおり (池谷, 2016)、潜性遺伝 (劣性遺伝) であることが強く示唆された。この結果は、今後この F1 同士を掛け合わせて得られる黒化型 F2 個体の全ゲノムリシーケンスによる黒化形質の責任遺伝子特定の際に重要な知見となるだろう。なお、F1 に 1 個体だけ現れたモザイク個体 (図 2) については、前胸側方の一部を除いて全体に黒化型の形質が見られ、発生時における何らかの原因により潜性の形質が顕在化したものと考えられる。

## 謝辞

電子顕微鏡の撮影に際しては山口大学理学部の機器分析センターと森福洋二氏にご協力頂き、組織切片は田中知美氏 (マリノリサーチ株式会社) に作成して頂いた。ここに記して御礼申し上げる。

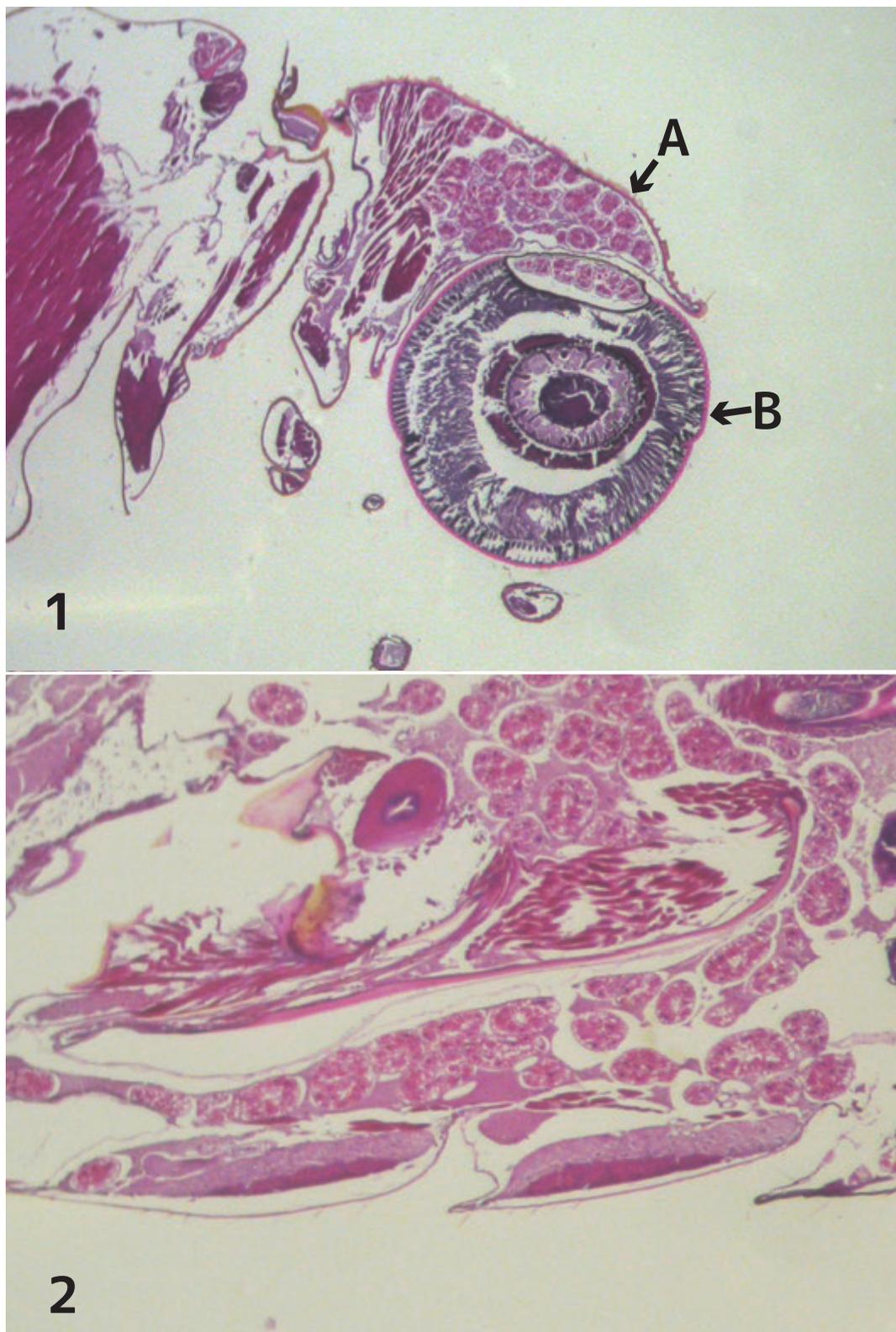


図5. ヘイケボタルIkeya-Y90系統のF1個体の頭部・前胸（1）と発光器（2）の組織切片  
複眼（A）と前胸背（B）のクチクラが黒化していない。さらに、発光細胞と反射細胞ともに野生  
型と同様であることがわかる。

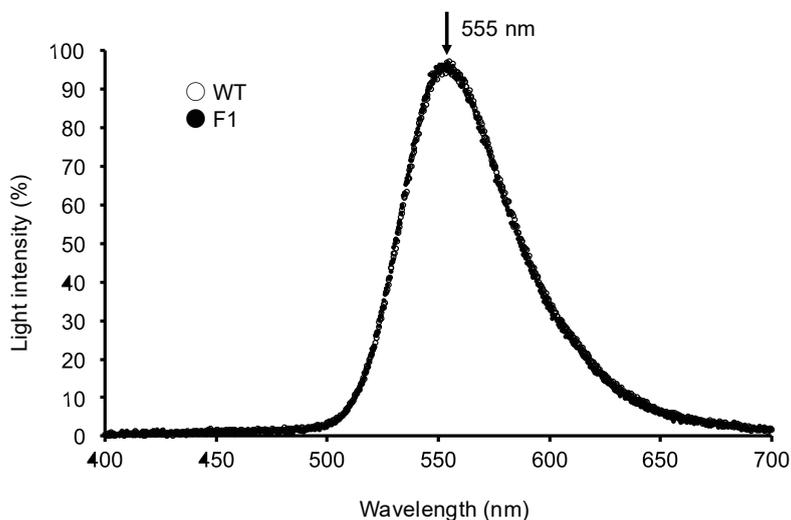


図6. ヘイケボタルIkeya-Y90解凍個体の発光スペクトル. 白丸は野生個体 (WT), 黒丸はF1個体 (F1). ピーク波長の中心値は共に555 nmである.

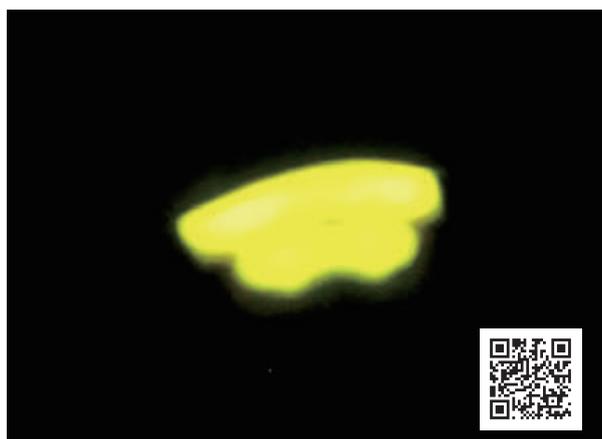


図7. ヘイケボタルF1個体の発光 (動画URL: <https://youtu.be/500bsgKAsWg>). 動画内でもっとも強く明滅した時の映像をキャプチャーした画像. ※QRコードは関連動画 (YouTube)

#### 引用文献

- Fallon T.R., Lower, S.E., Chang, C.-H., Bessho-Uehara, M. *et al.* (2018) Firefly genomes illuminate parallel origins of bioluminescence in beetles. *eLife*, 7: e36495.
- 池谷治義 (2016) ヘイケボタル *Luciola lateralis* の黒化個体. 豊田ホタルの里ミュージアム研究報告, (8): 175-177.
- 川野敬介 (2014) ヘイケボタルの発光強度の雌雄・体サイズの関係およびゲンジボタルとの比較. 豊田ホタルの里ミュージアム研究報告書, (6): 129-130.
- 川野敬介・ジョゼ・パイティオ・池谷治義・大場裕一 (2022) 黒化型ヘイケボタルの形態, 発光, および受光に関する研究. 豊田ホタルの里ミュージアム研究報告, (14): 1-14.