

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21658095

研究課題名（和文）性決定遺伝子情報を利用したミツバチ近交系の作出に関する研究

研究課題名（英文）Creation of Honeybee inbred lines using information of sex determination genes.

研究代表者

木村 澄 (KIMURA KIYOSHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・家畜育種繁殖研究領域・主任研究員

研究者番号：30399422

研究成果の概要（和文）：

ミツバチの近交系統を作成するために、性決定遺伝子 *csd* の簡便な対立遺伝子の検査法を開発し、各コロニーの対立遺伝子数を求めた。またコンピューターシミュレーションにより、*csd* 遺伝子型情報に基づき、近交を回避した交配による *csd* 近傍および *csd* に連鎖していない遺伝子の近交度を求めた。これらの成果により、ミツバチの近交系作成のための基礎的な情報が得られた。

研究成果の概要（英文）：

In order to breed inbred lines of honey bees, a simple and easy procedure to obtain allele numbers of the sex determination gene(*csd*)was developed, and actual allele numbers of honey bee colonies were estimated. In addition, by computer simulation, inbreeding coefficients of genes, which were linked with/without *csd* were estimated when avoiding inbred using information of *csd*. Basic information towards making inbred lines of honeybees was obtained.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,300,000 | 0 | 1,300,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 0 | 900,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 270,000 | 3,370,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・育種

キーワード：セイヨウミツバチ、ニホンミツバチ、性決定遺伝子、コンピューターシミュレーション、ホモ化

1. 研究開始当初の背景

セイヨウミツバチは、蜂蜜などの生産物のみならず、施設栽培の花粉媒介昆虫として広汎に利用されている重要な農業昆虫である。また行動・記憶のモデル動物としての評価が高まっている。そのため、全ゲノムを解読すべき昆虫と認められ、アメリカ農務省・わが国の畜草研などによって全ゲノムが解読された。全ゲノムが解読された昆虫は少なく、ミツバチは比較ゲノムの対象としても重要性が高まっている。しかし、ミツバチの大きな問題の一つは、遺伝的バックグラウンドのはっきりした“系統”が存在していないことである。このためにセイヨウミツバチの遺伝的改良は進んでおらず、またモデル昆虫としての価値を大幅に低めている。

ミツバチは、半数体(雌)/2倍体(雌)の繁殖様式を持つ生物で、かつ単一遺伝子である性決定遺伝子(compound sex determiner :csd)による性決定機構のために、近交退化が起きやすく、近交系を作出することが困難である(csd 遺伝子がホモになると通常生まれない2倍体雄が生まれ、それらは働きバチによって淘汰され、コロニーのフィットネスを低下する)。しかし、2006年に、csd 遺伝子が単離され、遺伝子配列が明らかになり、その構造・発現が解明されつつある。そのため繁殖に供する前に、生殖個体である女王や雄のcsd 遺伝子の遺伝子型を調べることが可能になった。ゆえに、理論上ではcsd 遺伝子のホモ化を避けた交配が可能となり、csd 遺伝子のホモ化によって生ずる近交退化を回避できる可能性が生まれてきた。

1980年代にはセイヨウミツバチの系統作出のための育種理論に関する多くの研究がなされた。しかし、当時これらの理論研究が実用化されることはなかった。その最大の理由として、これらの理論には近親交配による適応度の低下が考慮されていなかったことがあげられる。系統作出を実際に行っても近交退化のために系統を維持できなかったため、数少ない実際の系統作出はほとんど頓挫している。

csd 遺伝子を用いた系統作出法が完成すれば、遺伝的に斉一な系統を用いて、蜂蜜の生産や花粉媒介昆虫として改良すべき形質における遺伝領域の探索が容易になり、優れた遺伝的特性を持つミツバチの育種改良が期待できる。特にミツバチの場合、他の家畜と異なり、遺伝的改良が進んでいないために、量的形質のみならず、少数の遺伝子で支配された形質も改良の対象となるので、遺伝領域の探索は有意義である。また、ゲノム情報と有用形質との関連を明らかにすることにより、害虫を含めた他の農業関連昆虫との比較ゲノム研究など、様々な領域での応用が期待

できる。

2. 研究の目的

背景で述べたように、科学的・技術的発展により、今まで難しかったミツバチにおける近交系作出の可能性が生まれてきた。そこで本研究では、csd 遺伝子情報を取り込んで近交系作出を行うための集団遺伝学的研究を行い、近交系作出に必要な遺伝的特性を明らかにし、実際にパイロットミツバチ近交系の作出を行うことを目的とする。

(1) csd 遺伝子の集団遺伝学的解析

csd のホモ化を避けるためには対立遺伝子の遺伝子型をあらかじめ知っておかなくてはならない。csd 遺伝子は長大で、対立遺伝子の型を決める簡便な検査システムがない。従来の方法では、実際に系統作出の現場では、操作が煩雑すぎる。そこで、簡便な方法でcsd 対立遺伝子型を決定する方法を考案する。

そして、開発した方法を用いてcsd 遺伝子の集団における情報を収集する。

(2) csd 遺伝子動態の育種理論的解析

閉鎖群から近交系を作出する過程でcsd 遺伝子を考慮に入れた場合、近交度の変化、遺伝子のホモ化のプロセスなどの情報を集団遺伝の理論およびコンピューターシミュレーションにより明らかにする。

(3) パイロット集団の作成

(1)、(2)の結果をふまえて、実際に近交系の作出をパイロット的に行い、実際のミツバチの産卵率の変化など適応度に関わるデータを収集する。これらのデータに基づき、フィールドにおける近交系作出の実用化について検討する。

3. 研究の方法

(1) ミツバチゲノムプロジェクトデータベースよりcsd 遺伝子の変異の多い領域周辺で、PCRプライマーを網羅的に設計し、PCR産物を制限酵素で切断するPCR-RFLP法によるcsd 遺伝子の簡便な多型検査法を開発する。

開発した方法で、同一コロニー内の雄の型と、働き蜂(雌)の型の比較から、各個体の対立遺伝子型を求め、コロニー内に対立遺伝子の頻度を求める。

(2) csd 遺伝子情報を組み込んだ際の閉鎖集団の交配法を考案し、それによる近交度の上昇を理論的に求めるとともに遺伝子ホモ化のプロセスを追うシミュレーションプログラムを開発する。

(3) 近交系の作出を、実際のセイヨウミツバチの集団においてパイロット的に行い、問題点を抽出する。

4. 研究成果

(1) ① 20 組プライマーセットを作成し、セイヨウミツバチゲノム DNA を鋳型に PCR 法で増幅を行った結果、そのうち 1 組のプライマーでコンスタントに同一サイズのバンドを増幅できた (図 1-1)。そこで、PCR 増幅物を複数の制限酵素で切断したところ、制限酵素 BglIII 及び ApoIII で多型を示した (図 1-2)。

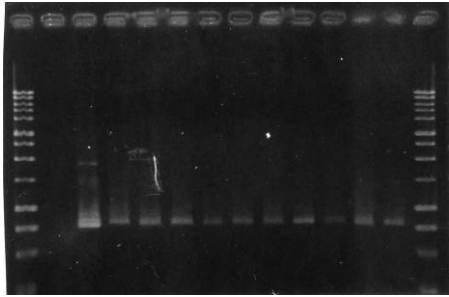


図 1-1 csd プライマーを用い PCR により均一なサイズのバンドが得られた。

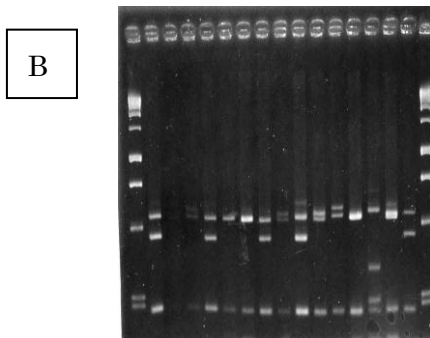
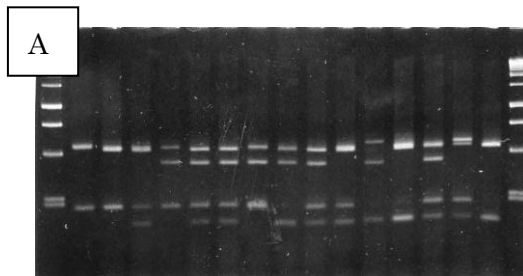


図 1-2 csd 遺伝子の PCR 増幅産物の制限酵素 ApoIII での切断した例 (A, B) csd の多型検出が可能になった。

次に、セイヨウミツバチ雄ゲノム DNA を上記プライマーで増幅し、DNA の塩基配列を比較したところ、RFLP 多型と塩基配列の型が一致したことから、この PCR-RFLP が csd 遺伝子座の対立遺伝子の簡便な検査法として有効であると考えられた。

このプライマーセットでニホンミツバチ

でも多型検出を試みたが DNA の増幅ができなかったため、新たにセイヨウミツバチプライマー周辺でプライマーを設計したところ、セイヨウミツバチと同様な多型検出が可能なプライマーが得られた。

② ①で開発した PCR-RFLP 法により、畜産草地研究所で飼養されているセイヨウミツバチ群 20 群で各コロニーの働き蜂 (女王とその女王が交尾した雄の RFLP 型を持つ) と雄 (女王の RFLP 型を持つ) を比較することでそのコロニーが持つ、対立遺伝子数を推定したところ、7 から 12 (最頻値は 10) であった。

この対立遺伝子数の推定値は、既報の推定値と同程度であり、この簡便的な方法の有効性が裏付けられた (図 2)。

ニホンミツバチでも同様に csd 対立遺伝子数を求めた所 6 から 12 であった (図 3)。

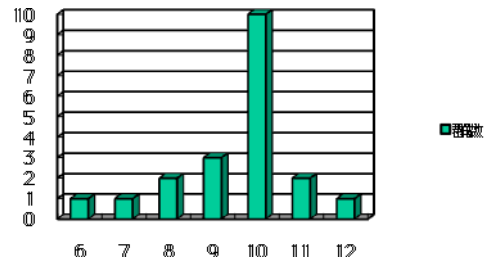


図 2 畜草研で飼養しているセイヨウミツバチ 20 群で csd 対立遺伝子数の調査

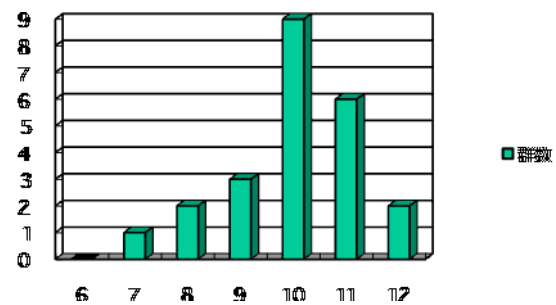


図 3 畜草研で飼養しているニホンミツバチ 18 群で csd 対立遺伝子数の調査

(2) csd 遺伝子を考慮した交配過程を追うシミュレーションプログラムを作成した。そのプログラムを用い、csd 遺伝子型情報に基づき、近交を回避した交配による csd 遺伝子近傍および csd 遺伝子に連鎖していない遺伝子の近交度を求めた。ミツバチの群数は 4 まで

たは8とし、最大近交回避交配または循環交配をモンテ・カルロ法によるコンピューターシミュレーションにより、50世代繰り返した。群数および交配法ごとに10000回反復し、各世代における近交係数、ホモ化の割合、対立遺伝子数等を算出した。各世代における近交係数とcsdに連鎖していない遺伝子におけるホモ化の割合はよく一致した。前期の世代において、最大近交回避交配は循環交配よりも近交係数が低く抑えられたものの、後期にはその値が逆転した。特に群数が小さい場合、早い世代に近交係数の逆転がみられた(図4)。csdとの連鎖が強いほど、ホモ化の程度が低く、また残存する対立遺伝子数が多くなる傾向にあった(図5)。

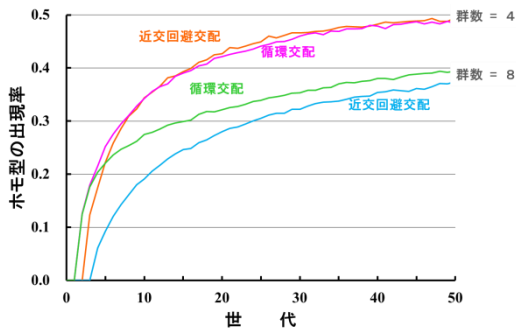


図4 csd 遺伝子におけるホモ型の出現率

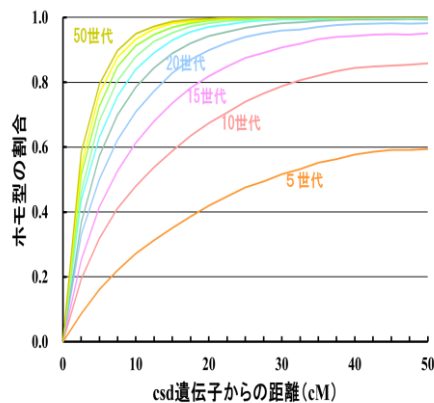


図5 csd 遺伝子に連鎖した遺伝子座のホモ型の割合
(近交回避交配、群数 = 8)

シミュレーションの結果から、csd 遺伝子にリンクしていなければ選抜の効果が期待できることが分かった。

(3) 人工授精技術を用いて、三元輪番交配によりセイヨウミツバチのパイロットシステムの作成を開始した。このパイロットシステムを使用してコンピューターシミュレーションによる近交度の上昇の理論値と実験値の乖離を検討する予定であったが、これらの群が例年に無い寒さにより冬越しができなかったため、試験を行うことができず、今後の課題として残った。

5. 主な発表論文等
[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村澄 (KIMURA KIYOSHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・家畜育種繁殖研究領域・主任研究員

研究者番号：30399422

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

佐藤正寛 (SATO MASAHIRO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・家畜育種繁殖研究領域・上席研究員

研究者番号：70370658