

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780323

研究課題名(和文) 針刺行動欠損個体の遺伝学的解析と刺さないミツバチ品種の作出

研究課題名(英文) Genetic analysis of attacking deletion strain and development of sting-less honeybee selective breeding

研究代表者

高橋 純一 (TAKAHASHI, Junichi)

京都産業大学・総合生命科学部・准教授

研究者番号：40530027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：日本では、明治以降からセイヨウミツバチが定期的に輸入されている。本研究において国内で繁殖しているセイヨウミツバチ群の中から見つけた針刺行動欠損個体の遺伝学的解析を行った。通常系統と針刺行動欠損個体の系統の間でミトコンドリアDNAの4つの遺伝子領域の解析を行ったところ、50以上のハプロタイプが国内で飼養されているセイヨウミツバチから見つかった。これらのハプロタイプについて、攻撃行動との関連性を見たところ、C2ハプロタイプが針刺行動欠損系統の群のみで確認された。これらの結果から、両系統の識別にミトコンドリアDNAの解析が効果的であること、針刺行動欠損は、母系遺伝する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The apicultural honeybee *Apis mellifera* L. has been introduced for about hundred years in Japan. We sequenced the COI, COII, ND5 and LrRNA regions of mitochondrial genes from both attacking deletion strain and normal strain collected through Japan. About 50 different haplotypes have been reported for the mtDNA region of honeybees in Japan. This study detected attacking deletion strain, which we consisted haplotype C2. These results suggested that PCR product only was distinguished from normal European honeybee haplotype(C1). In addition PCR-RFLP and sequencing of the mtDNA region increased the reliability of diagnostic when found attacking deletion strain from Japan.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学、環境農学

キーワード：養蜂学

1. 研究開始当初の背景

人間は古来よりさまざまな野生の動物類を家畜化し、利用してきた。昆虫ではミツバチとカイコがその代表である。欧州・中東地域においてセイヨウミツバチを飼養する養蜂様式は、カイコと同じように数千年の歴史を持っている。日本では、明治以降イタリア原産のセイヨウミツバチを輸入し、それを飼養する様式が一般的となっている。現在は主にオーストラリアで大量増殖されたセイヨウミツバチ群を輸入し、ハチミツなどの養蜂生産物の生産や花粉交配に利用している。両種ともに現在でも主要な家畜動物であるが、カイコとミツバチでは品種の多様性という点で大きく状況が異なっている。中国原産のカイコは、古来より様々な国で多様な品種が開発されている。一方ミツバチは、ヨーロッパ原産のセイヨウミツバチ数亜種が世界各地で養蜂種として利用されているに過ぎず、有用品種と言えるような系統の作出には現在まで成功していない。ミツバチで有用品種を開発する場合、カイコと異なり数多くの問題がある。その理由の主なものとして、社会性昆虫であるミツバチの繁殖個体は、巣内にいる数万の個体のうち1匹の女王蜂のみである。その女王蜂は春先に羽化し、一生に一度だけ交尾を行うが、地上から数十メートル上空でしか交尾行動を示さないため、実験室内で自由に交配させることができない。また女王蜂は一度に数十匹もの雄と交配し、その精子をランダムに受精に使用している。ミツバチのこのような繁殖習性は、特定の時期に特定の雄蜂のみと交配させることが不可能であり、他の家畜動物のように家系解析から有用形質に関連する遺伝子を解析し、それを選抜育種していくことが難しいため、品種開発は困難であった。過去には、養蜂が盛んなブラジルでセイヨウミツバチを対象に新しい品種の開発が試みられたことがある。ブラジルの気候に合わせるため、アフリカ産の高温耐性とヨーロッパ産の蜂蜜生産性の両方の性質を併せ持つ品種作成を目的に亜種間交雑が行われたが、その雑種個体は当初の期待とは大きく異なり、攻撃性が非常に高く飼養に適さなかったため、その試みは失敗に終わっている(Hepburn and Radloff 1998)。ミツバチの繁殖生態が特殊であること以外にも、ミツバチにおける遺伝学的知見の不足と繁殖制御に関する技術開発の遅れも一つの要因として指摘されている(佐々木 1994; 吉田 1994)。しかし2006年にはミツバチの全ゲノム解析が終了し、さらに研究者らの研究グループにより1個体の雄蜂から採取した微量精子のみを利用した人工授精法を確立したことにより、家系情報を利用した選抜育種への利用が最近になって理論上は可能な状況になってきたと言える(Nomura et al., 2009)。ミツバチの特徴の中でも働き蜂による毒針を使った防衛行動は、野生で生育する場合には天敵から巣の仲間を守る上で重要な形質

である。また、一度刺すと自らは死亡してしまう究極ともいえる利他的性質は、社会性行動の進化学的な側面からみても非常に興味深い性質の一つである。しかし家畜動物としてミツバチを見た場合、刺針行動は養蜂生産物を生産する養蜂従事者や花粉交配に利用する農業生産者にとって危険な性質であり、取扱いを困難にさせている主要因でもあるため、有害形質と見なすことができる。もし仮に針の無い、あるいは刺さないようなミツバチがいれば、養蜂および農業上非常に有用な品種となることが予想される。これまでもミツバチを対象に多くの研究者や養蜂家らが、性質が温和で刺さないようなミツバチの品種系統の開発を試みているが、上記のような理由のため今日至るまで成功していない。突然変異体は、新しい品種の作成や未知の遺伝子機能を解析する際に有用な研究材料である。ミツバチにおける突然変異体は、ショウジョウバエやカイコに比べると少なく、これまで数例の報告があるのみである(Laidlaw et al., 1953; Woyke 1973など)。研究者は、ミツバチにおける様々な表現型突然変異体と思われる系統を収集している過程で、働き蜂が針刺行動を示さない(刺さない)系統を見つけることができた。このミツバチ群は、針刺器官も毒もあるが、働き蜂らは、巣を故意に刺激したり、天敵に攻撃されても針を使って刺す行動を示すことがなく、温和な性質をしている。その他の行動に関しては、正常個体との違いは現在確認されていないが、体色に若干変異が確認されている。正常の働き蜂は腹部に黒色のバンド模様が見られるが、この変異体は黒色のバンド模様が腹部末端を残して消失し、黄色が強く現れる傾向があった。腹部の黒色バンド模様と針刺行動の消失の関係は、現在のところ不明であるが、バンド模様は天敵に対する警告色であることを考えると、攻撃性と警告色との形質の間には、何らかの共進化(連鎖)メカニズムがあるのかもしれないことが予想される。

2. 研究の目的

ミツバチは、蜂蜜をはじめとするさまざまな養蜂生産物やハウス栽培作物の受粉用昆虫として世界中で利用されている有用昆虫である。しかしミツバチは天敵から巣の仲間を守るために毒針を使った防衛行動をとることが飼育や管理を困難にさせている。このミツバチの防衛行動には、遺伝的変異にもとづいた攻撃性の相違が見られるが、基本的にはどの系統も刺針行動を示す。今回、行動観察実験中に発見した刺針行動を示さない(刺さない)ミツバチ変異体を対象に大規模ジェノタイピングにより刺針行動に關与する行動制御遺伝子群の単離を行い、これらの遺伝子をマーカーとした選抜育種法により刺さないミツバチ系統を作成することを試みる。

3. 研究の方法

今回発見した刺さないミツバチ群を対象に1個体雄蜂の精子を利用した人工授精法による交配を行い、基礎集団(群)を20群程度作出する。そしてこの群に対して親子回帰およびきょうだい(sib)解析によって、BLUP選抜に必要な攻撃性に関する遺伝変異(遺伝率)を推定する。これと並行して、ミトコンドリアDNA、マイクロサテライトDNAとSNPマーカー等を利用してDNAマーカーとして利用できる遺伝子座を探索する。検出されたマーカー遺伝子座によって説明される遺伝変異の大きさを推定した上で、マーカー情報とBLUP法から得られる予測育種価への最適な重み付け値を算出し、両者を組み合わせた選抜指数を作成する。この選抜指数に基づき、10世代(約2年)程度の選抜を実施し、攻撃行動を完全に欠損した系統を作成する。また両系統(通常および針刺行動欠損系統)の識別可能なDNAマーカーの作成を行う。

4. 研究成果

セイヨウミツバチは、ハチミツ生産をはじめとする各種養蜂生産物(ローヤルゼリー、プロポリス、蜂蠟等)や栽培作物(イチゴ、メロン、スイカ、ウメ等)の授粉用昆虫として世界中で利用されている貴重な養蜂種である。ミツバチの行動的特徴として、天敵からの攻撃に対して、巣の仲間を守る防衛行動をとる。この行動は、時として管理者である養蜂家や受粉時には農家に対して衛生上の問題となり、これが飼育管理を困難にさせている理由の1つであった。このミツバチの防衛行動は、経験上から系統(遺伝的変異)に由来する攻撃性(防衛行動)の相違があることは、古くから認識されているが、基本的にはどのような系統も刺針行動を示す。今回、行動観察実験中に確認した刺針行動を示さない(温順な)ミツバチ系統の変異体を対象に遺伝学的解析と純系の選抜を試みた。223種類のDNAマイクロサテライトマーカーを利用したジェノタイピングにより刺針行動に関与する遺伝子座の単離を行い、12種の遺伝子座で高い相関関係を確認することができた。これらの遺伝子座をDNAマーカーとした選抜育種法により、温順なミツバチ系統の固定を目的に1個体の雄蜂の精子を利用した人工授精法による交配方法を確立し、基礎集団(群)を20群程度作出することができた。この群に対して、繰り返し交配を進め、攻撃性に関する遺伝変異(遺伝率)を推定した。さらに高い遺伝率を示すことから、DNAマーカー情報をもとに選択交配をすすめ、10世代(2年)の選抜育種を実施することができた。温順なミツバチ系統を作出することに成功した。

今回実験に使用した通常の系統と針刺行動欠損個体の系統の間でミトコンドリアDNAの4つの遺伝子領域の解析を行ったところ、

50以上のハプロタイプが国内で飼養されているセイヨウミツバチから見つかった。これらのハプロタイプについて、攻撃行動との関連性を見たところ、C2ハプロタイプが針刺行動欠損系統の群のみで確認された。これらの結果から、両系統の識別にミトコンドリアDNAがマーカーとして効果的であること、針刺行動欠損は、母系遺伝する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

高橋純一、日本におけるミツバチの減少原因について 本本当にミツバチたちは消えたのか、環境と健康、査読無、2巻、2014、33-44

中村純、高橋純一、木村澄、佐々木正己、ネオニコチノイドに関する山田論文の問題点について、現代化学、査読無、12巻、2014、67-68

岡田大地、鷹野由里子、田中美子、佐々木一馬、棚橋靖行、高橋純一、佐倉正明、竹内実、京都産業大学先端科学技術研究所所報、査読無、12巻、2013、33-44

野村哲郎、高橋純一、竹内剛、ハチ類の育種へのBLUP法による選抜の導入、京都産業大学先端科学技術研究所所報、査読無、12巻、2013、45-57

高橋純一、竹内実、松卒耕三、野村哲郎、ミツバチおよびマルハナバチにおける微胞子虫の浸潤状況、京都産業大学先端科学技術研究所所報、査読無、12巻、2013、59-68

[学会発表](計16件)

高橋純一、高橋稜一、境良明、山村辰美、中村雅雄、荒木静也第、対馬に侵入したツマアカスズメバチの帰化状況と遺伝構造について、58回日本応用動物昆虫学会高知大会、2014年3月25日、高知市

高橋純一、高橋稜一、岩口健太郎、里見優、原田レオナ、荒木静也、境良朗、山村辰美、佐護哲也、対馬に侵入したツマアカスズメバチの分布および生態について、第61回日本生態学会広島大会、2014年3月17日、広島市

高橋純一、アピタミンとミツバチの病気について、鹿児島県養蜂協会、2014年3月13日、鹿児島市

高橋純一、ミツバチとハチミツについて、京都府立須知高等学校、2014年2月26日、船井郡

高橋純一、アピタミンとミツバチの病気について、和歌山県養蜂協会、2014年2月24日、白浜町

高橋純一、2013年度のミツバチ研究成果について、四国地区養蜂研会、2014年1月25

日、徳島市

高橋純一、ニホンミツバチとツマアカスズメバチについて、対馬市ニホンミツバチ部会、2013年12月20日、対馬市

高橋純一、ミツバチの生態、京都府私立中学校高等学校理科研究会、2013年11月16日、京都市

高橋純一、高橋稜一、岩口健太郎、里見優、原田レオナ、境良朗、山村辰美、対馬における外来種ツマアカスズメバチの帰化と被害について、第68回日本衛生動物学会西日本支部例会、2013年10月26日、福井市

高橋純一、ミツバチ病原性微生物の浸潤状況、熊本県養蜂協会、2013年10月7日、熊本市

高橋純一、昆虫のDNA抽出とPCR実験、島根県立浜田高等学校、2013年9月21日、浜田市

高橋純一、小原真美、野村哲郎、ミツバチおよびマルハナバチにおける病原性微生物の浸潤状況について、日本昆虫学会第73回札幌大会、2013年9月16日、札幌市

高橋純一、ミツバチの生態と生産物、社団法人ふくい農林水産支援センター、2013年8月20日、福井市

高橋純一、ミツバチの病害虫対策とハチミツの効能、第40回京都府はちみつ品評会、2013年8月2日、舞鶴市

高橋純一、ニホンミツバチは病気にかからない？-その原因と対策-、日本みつばち講習会、2013年6月20日、諏訪市

高橋純一、ミツバチ研究の最前線 社会性昆虫の不思議を探る、公益財団法人体質研究会、2013年4月20日、京都市

〔図書〕(計1件)

木村澄、中村純、高橋純一、今城欣一、羽佐田康幸、養蜂家向け養蜂マニュアル III 優良系統の作出を目指して、みつばち協議会、2014、pp47

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 純一 (TAKAHASHI, Junichi)

京都産業大学・総合生命科学部・准教授

研究者番号： 40530027