

課題名 4RFd-1202 在来マルハナバチによる環境調和型ポリネーション様式の確立に関する研究

課題代表者名 高橋 純一（京都産業大学総合生命科学部生命資源環境学科動物分子生態学研究室准教授）

研究実施期間 平成24～26年度

累計予算額 11,400千円（うち26年度3,800千円）
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード マルハナバチ、花粉交配、在来種、育種モデル、BLUP、特定外来種、生物多様性、農業、北海道、環境保全、トマト(5～10個以下程度)

研究体制

- (1) 有用在来種の室内増殖方法の確立と遺伝子解析に関する研究(京都産業大学)
(2) 育種モデルの確立に関する研究(大阪府立大学)

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

セイヨウオオマルハナバチは、トマトハウスで授粉昆虫として広く利用されている。しかし、逃げ出した一部の個体が北海道全域や寒冷地で帰化し、生態系に影響を与えるため外来生物法により使用が制限されている。生産現場では、今後使用が全面的に禁止になるとトマト生産に大きな影響を受けるため、代替資材の開発が期待されている。そこで、在来マルハナバチを授粉用生物資材として開発し、生態系保全と農業の両立を研究目的とする。エゾオオマルハナバチの飼育データや遺伝子情報を元にマルハナバチ用に改良した育種モデルBLUP法を利用して、繁殖能力の高い系統の選抜を行う。選抜した系統の中からトマトハウスでの訪花試験により、授粉能力が高い系統を選抜育種により作出する。また、エゾオオマルハナバチにおける安定的かつ効率性の高い累代飼育方法を開発し、トマト生産で利用できる授粉用生物資材を開発し、特定外来種セイヨウオオマルハナバチの帰化問題の解決に寄与する(図1)。



図1 セイヨウオオマルハナバチ問題の概要

2. 研究開発目的

在来マルハナバチは、現在実用化されているセイヨウオオマルハナバチと比べて、累代飼育に関連する技術の未確立であることや個体間の変異が大きいため形質の安定化が不十分である。例えば、①室内での女王蜂の交尾成功率の低さ、②女王蜂の産卵能力に起因するコロニー間での個体数(働き蜂)の変異が大きい、③累代飼育個体の休眠期間中の高い死亡率、④累代飼育個体(F1以降)の低い営巣成功率、⑤野生種(1世代目)の病原微生物の高い浸潤率等のため繁殖成功率が低く、野生世代は飼育することができても、次世代や次々世代と世代を重ねるごとに飼育可能数が減少し、長期に安定的にシステムを維持できない。⑥また、飼育下でのコロニーの大きさ(働き蜂の数)が、セイヨウオオマルハナバチほど安定していない。コロニー大きさが小さい巣をハウスに導入した場合、働き蜂の訪花活動が低く、十分な授粉効果が得られない。これらの問題を解決できなければ、実用化が困難であると考えられる。

そこで本研究では、トマトの授粉用生物資材として利用できる在来マルハナバチの開発について、現在問題となっている安定生産の阻害要因であるコロニーの営巣成功率と交尾率の向上に加えて、コロニーサイズを大きくする選抜育種技術を確立する必要がある。確立した技術をもとにトマトハウスでの授粉試験から授粉能力の高いシステムを作出する。累代飼育およびトマト生産に適した形質を改良する事で、このエゾオオマルハナバチを実用化できると考えている。

今回の申請課題では、在来種による基盤技術の確立により、環境に配慮した授粉様式の確立の過程で在来マルハナバチの実用化が求められており、その実現により外来種の完全規制による生物多様性の保全が実現するための基礎研究となるようにする。

3. 研究開発の方法

(1) 有用在来種の室内増殖方法の確立と遺伝子解析に関する研究

本研究では、北海道に広く分布する在来3種のマルハナバチを新規ポリネーター候補とし、遺伝子情報に基づくDNA育種法による開発を行う。北海道在来のマルハナバチをポリネーター用の生物資材として開発することで、外来種の帰化問題の解決を試みる。DNA育種法を用いた選抜育種により在来種を生物資材として開発する予定である。北海道で広範に分布する3種の在来マルハナバチを実験室内で飼育し、基礎集団を作出する。その集団に対して選抜に必要な女王の産卵数に関する遺伝変異を推定し、マイクロサテライトDNA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に基づき、実験室内で累代飼育による系統選抜を実施し、コロニーサイズの大きな系統を選抜し、在来種の実用化を試みる。さらに今回作出した系統については、改良効果を評価するためにトマトハウスで試験的に授粉試験を行い、セイヨウオオマルハナバチとの能力についても比較試験を行った。アドバイザーボード会合および中間評価時に指摘されていたエゾオオマルハナバチの実用化後における遺伝子汚染リスク評価については、追加実験を行った(図2)。

(2) 育種モデルの確立に関する研究

BLUP法(best linear unbiased prediction)は、家畜の育種において、個体の育種価を推定するために広く用いられている。BLUP法の特徴は、飼育で得られた個体の形質データから、環境要因を除いて遺伝的要因だけを取り出すことで、個体の育種価を推定できることにある。

農業植物の受粉に広く用いられているマルハナバチ類においても、BLUP法を利用して受粉効率を高めることが期待されるが、そのためには解決しなければならない課題がある。マルハナバチ類では、雌は受精卵から発生するが、雄は未受精卵から発生する半数倍数性の性決定システムのため、他の家畜動物とは遺伝子の伝達様式が異なるので、よく使われているBLUPモデルを適用することはできない。また、マルハナバチ類のように雌が複数の雄と交尾する生物では、個体の正確な血縁関係が分からないので、それに基づいたBLUP法は用いること



図2 研究計画の流れ

ができず、複数の父親を仮想的に1頭の雄で代表させるための相加的血縁行列（以下、A行列と表記）の計算アルゴリズムが必要となる。

ハチ類での育種へのBLUP法による選抜の導入は、ドイツの研究グループによって試みられている。彼らは、BLUP法の計算に必要なA行列の計算に際して、ハチ類に固有の性決定ならびに繁殖様式から生じる問題を解決するために、いくつかの仮定を設けることを提案している。しかし、それらの仮定は、ミツバチのような大規模な養蜂場で数千から数万群といった大飼育集団を対象としたものであり、1つの試験場や研究機関が実施する小規模なマルハナバチ類の選抜計画には妥当なものではない。

そこで我々は、マルハナバチ類の生態的特性に合わせて小規模な飼育集団にも適用できるA行列の計算法を開発することを試みた。また、飼育実験で得られた結果をもとにしたマルハナバチの育種へのBLUP法の適用について、数値例を用いてモデル解析を行った。

また、実際に育種を行うにあたって、近交弱勢の効果は無視できない。そこで、ある程度外部個体群との交流がある状態での選抜育種を行った際に、近交係数と育種価がどのように変動するかをシミュレーションによって推定した(図2)。

4. 結果および考察

(1) 有用在来種の室内増殖方法の確立と遺伝子解析に関する研究

本研究では、北海道在来のマルハナバチを代替受粉用昆虫として開発することにより、外来種の導入を全面的に制限が可能な状態にすることで、外来種問題の解決の一端となることを目的として研究を行った。北海道に分布する3種の在来マルハナバチで飼育試験をしたところ、エゾオオマルハナバチが最も飼育成功率が高く、次世代個体の産出成功率も高いことがわかった。さらに飼育方法に関しても既存の方法を変更することで増殖可能であり、累代飼育技術の確立に成功した。

実用化の問題点としては、コロニーサイズが小さいことが検出された。そこで今回エゾオオマルハナバチを候補種に選定し、室内飼育による累代増殖技術の開発、系統の遺伝学的解析、サブテーマ(2)との融合によるコロニーサイズの巨大化を目的とした系統選抜およびトマトハウスでの訪花実験を行った。マイクロサテライトDNAマーカーを開発し、11種のマーカーによりコロニーサイズの大型化系統の早期選抜育種が可能であることから、ポリネーションに必要な大きなサイズのコロニーへの選抜は、遺伝情報をもとにしたBLUP育種により可能であることを初めて示される結果を得た。またトマトハウスでの訪花試験により、セイヨウオオマルハナバチと比較して訪花能力は同等以上であることが示唆される結果を初めて得ることができた。これらの結果から、エゾオオマルハナバチは、系統選抜により実用可能な代替在来種である実証データを初めて得ることができた。

遺伝子汚染については、ハプロタイプ間はずべて1塩基置換が見られた。個体群間におけるメジャーハプロタイプの頻度には大きな差が見られなかった。マイナーハプロタイプは、地域間で特徴的なタイプが一部見られたが、これはサンプリング数の偏りによるものか、あるいは実際の個体群間の分化を示しているのか確定できなかった。これには追加サンプルの解析が必要になる。これらの結果からは、仮にエゾオオマルハナバチが実用化され、一部の個体が野生個体と交配した場合であっても大きな影響にはならないことが示唆される結果となった。

(2) 育種モデルの確立に関する研究

本研究によって、マルハナバチ類の育種にもBLUP法は十分に適用できることが明らかになった。BLUP法による選抜は、すでに多くの家畜動物の育種に導入され、目覚ましい成果を上げてきたが、この選抜法は集団の近交度を上昇させる可能性があることが指摘されている。とくに、遺伝率の低い形質を選抜の対象としたとき、家系(family)の情報に大きなウェイトが置かれるため、近交度の急激な上昇を招くことが分かっている。マルハナバチ類において、近交度の上昇は生産性に大きなダメージを与える可能性がある。マルハナバチ類では、半倍数性の性決定に加えて、性決定遺伝子(CSD)が性決定にかかわっている。通常、雌はCSD遺伝子座がヘテロ接合になっているが、ホモ接合となった場合には二倍体の雄となることが知られている。二倍体の雄は、発育初期に死亡するか、あるいは発育しても不妊である。近交度が上昇すると、CSD遺伝子座のホモ接合化が進み、通常はワーカーとして発育するはずの雌の大半が二倍体雄となり、コロニーサイズの小型化を招くが、増殖においては致命的な結果となった。

しかし、本研究によって、不完全な繁殖隔離下で近交係数の上昇を抑制しながらも、実用に耐える程度の形質選抜は可能である可能性が示された。現実的には、マルハナバチ類の選抜飼育は、ある程度の遺伝子流入がある状況で行われる可能性が高いと思われる。極端に近親交配が続けられる状況を避けるように注意すれば、実用的な育種は十分に可能であると考えられた。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

これまで飼育および授粉試験が困難であった北海道産在来マルハナバチの中から候補種の選抜を行い、エゾオオマルハナバチにおいて累代飼育方法を確立した。さらにサブテーマ(2)で開発したBLUP育種モデルを使った方法により、DNA情報をもとに選抜育種を行い、コロニーサイズの大型の(産卵能力の高い)系統が選抜可能であることを実証した。BLUPによるDNA育種は、昆虫でも初めての成功結果である。さらに実践試験として、増殖したエゾオオマルハナバチを利用してトマトハウス内での訪花行動調査を行い、授粉能力があることを初めて確認した。またセイヨウオオマルハナバチとの比較試験でも同等の能力があることを初めて確認することができた。今回の研究成果により、代替種として在来種をBLUPモデルによる育種でコロニーサイズの大型化を行えば、実用化が可能であることを初めて実験的に示すことができた。

エゾオオマルハナバチの実用化後を想定した遺伝子汚染リスク評価を行った。仮にエゾオオマルハナバチが実用化され、一部の個体が野生個体と交配した場合であっても地域個体群の遺伝子構造に大きな影響にはならないことが示唆される結果を得た。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

2014年3月に一般財団法人自然環境研究センターで開催されたマルハナバチ利用方針検討会で本研究成果である北海道在来マルハナバチ種の実用化までの予定計画を提示し、外来生物法におけるセイヨウオオマルハナバチの取扱いに関する政策判定に貢献した。当会には、オブザーバーとして環境省および農水省も参加して議論が行われた。

また、2014年11月には、北海道庁農政部、ホクレン農業協同組合連合会、JA北海道が参加し、北海道庁で開催されたエゾオオマルハナバチの実用化に向けた検討会において、本研究成果のエゾオオマルハナバチの実用化に関する研究成果を提示し、特定外来種セイヨウオオマルハナバチの利用規制と在来種への転換を進めるための準備体制の策定に貢献した。

<行政が活用することが見込まれる成果>

エゾオオマルハナバチがトマト授粉に利用できることが今回初めて科学的データをもとに示すことができた。この結果により、北海道庁農政局では、エゾオオマルハナバチ利用普及検討会の協議会(仮称)を設立し、特定外来種であるセイヨウオオマルハナバチの完全規制とエゾオオマルハナバチの普及に向けた生産現場との連携体制をJA、ホクレン、生産者団体の関係機関と調整を行うための準備協議会の設立準備を進めることに活用されることが見込まれる。

6. 研究成果の主な発表状況(別添.報告書作成要領参照)

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) T. NOMURA and J. TAKAHASHI: Heredity, 109, 261-268 (2012)
“Effective population size in eusocial Hymenoptera with worker-produced males.”
- 2) 高橋純一: 環境と健康、2月号、12-22 (2014)
「日本におけるミツバチの減少原因について - 本当にミツバチたちは消えたのか-」

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 中村純、高橋純一、木村澄、佐々木正己: 現代化学、12月号、67-68 (2013)
「ネオニコチノイドに関する山田論文の問題点について」
- 2) 高橋純一、竹内実、松本耕三、野村哲郎: 京都産業大学先端科学技術研究所所報、第12巻、9-68 (2013)
「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」
- 3) 野村哲郎、高橋純一、竹内剛: 京都産業大学先端科学技術研究所所報、第12巻、45-58 (2013)
「ハチ類の育種へのBLUP法による選抜の導入」
- 4) 野村哲郎、高橋純一、竹内剛: 京都産業大学先端科学技術研究所所報、第13巻:17-23 (2014)
「不完全な繁殖隔離下におけるハチ類の選抜育種の効率の評価」

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 野村哲郎、高橋純一:第72回日本昆虫学会(2012)
「BLUP法を用いた選抜計画のミツバチ育種への導入」
- 2) 高橋純一:第73回日本昆虫学会(2013)
「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」
- 3) 高橋純一、竹内剛、中川修二郎、手塚俊行、野村哲郎:日本昆虫学会近畿支部会(2014)
「エゾオオマルハナバチの室内飼育コロニーによるトマト訪花試験」
- 4) 竹内剛、清拓哉、高橋純一:第59回日本応用動物昆虫学会大会(2015)
「授粉用昆虫としてのエゾオオマルハナバチの適正」

7. 研究者略歴

課題代表者:高橋 純一

玉川大学大学院農学研究科博士後期課程修了、農学博士、現在、京都産業大学総合生命科学部准教授および京都産業大学ミツバチ産業科学研究センター研究員(兼任)

研究分担者

- 1) 竹内 剛 (サブテーマ2担当)

京都大学大学院理学研究科修了、理学博士、現在、大阪府立大学大学院生命環境科学科研究員

4RFd-1202 在来マルハナバチによる環境調和型ポリネーション様式の確立に関する研究

(1) 有用在来種の室内増殖方法の確立と遺伝子解析に関する研究

京都産業大学総合生命科学部・高橋 純一

平成24(開始年度)～26年度累計予算額：11,400千円

(うち、平成26年度予算額：3,800千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

トマトハウスの受粉用昆虫として1991年に国内にセイヨウオオマルハナバチが輸入されると、ハウスから逃げ出した一部の個体の帰化による在来生態系への影響が問題となり、2006年に特定外来種に指定された。その後、新規就農者は、本種の利用を制限されている。しかしながら、特定外来生物法による使用制限だけではセイヨウオオマルハナバチの帰化への抑制効果は低く、特に北海道においては、ほぼ全域で分布が確認されるようになった。その結果、北海道では生物多様性の保全だけでなく農業生産でも大きな問題となっている。

本研究では、北海道在来のマルハナバチを代替受粉用昆虫として開発することにより、外来種の導入を全面的に制限が可能な状態にすることで、外来種問題の解決の一端となることを目的として研究を行った。北海道に分布する3種の在来マルハナバチで飼育試験をしたところ、エゾオオマルハナバチが最も飼育成功率が高く、次世代個体の産出成功率も高いことがわかった。さらに飼育方法に関しても既存の方法を変更することで増殖可能であることがわかった。実用化の問題点としては、コロニーサイズが小さいことが検出された。そこで今回エゾオオマルハナバチを候補種に選定し、室内飼育による累代増殖技術の開発、系統の遺伝学的解析、サブテーマ(2)との融合によるコロニーサイズの巨大化を目的とした系統選抜およびトマトハウスでの訪花実験を行った。その結果、累代飼育技術の確立に成功し、ポリネーションに必要な大きなサイズのコロニーへの選抜は、遺伝情報をもとにしたBLUP育種により可能であることが初めて示される結果を得た(表(2)-4参照)。またトマトハウスでの訪花試験により、セイヨウオオマルハナバチと比較して訪花能力は同等以上であることが示唆される結果を初めて得ることができた。これらの結果から、エゾオオマルハナバチは、系統選抜により実用可能な代替在来種である実証データを初めて得ることができた。

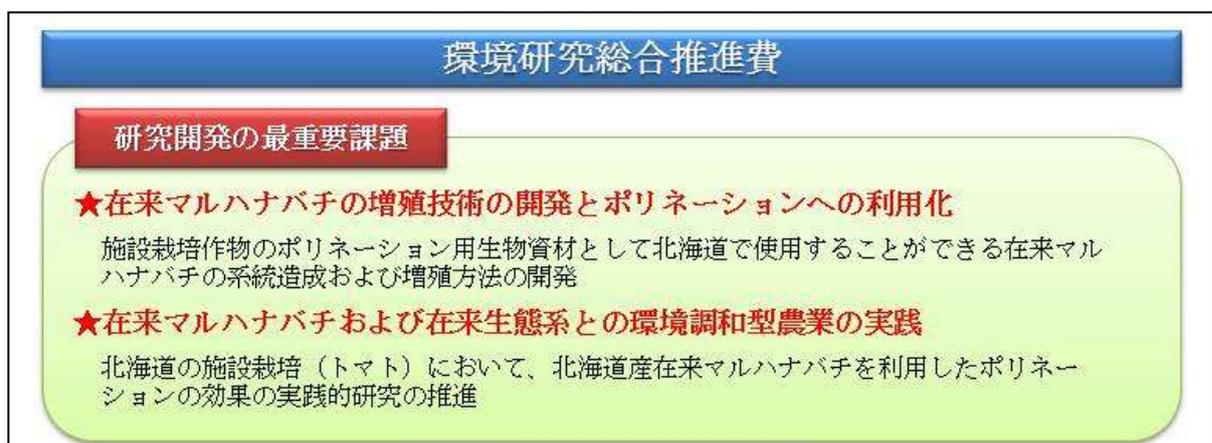
[キーワード]

マルハナバチ、特定外来種、花粉交配、環境保全型農業、生態系の保全

1. はじめに

トマト生産現場におけるセイヨウオオマルハナバチの導入は、それまで行われていたホルモン剤（植物成長調整剤）散布による授粉（単為結果）作業という重労働からトマト生産者を解放することができた。その結果、国内におけるトマト生産量および品質の向上などの多くのメリットをもたらしている。しかし、外来種であるセイヨウオオマルハナバチが野外に逃亡・帰化し、在来マルハナバチ類と在来植物の減少による在来生態系に与える影響が確認されたことから、2006年に特定外来生物に指定され、以後その利用に厳しい制限がかけられている。しかしながら、使用制限による減少効果は低く、特に北海道では、セイヨウオオマルハナバチはほぼ全域で帰化が確認されている。そのため今後、生物多様性および生態系の保護の視点からセイヨウオオマルハナバチの使用については、全面禁止の厳しい制限が加えられる可能性が高い。現在北海道は、夏秋トマトの一大生産地となっている。授粉作業の効率化の面からは、セイヨウオオマルハナバチ以外の選択肢がないため、使用制限は新規トマト生産者の参入を困難なものとする1つの理由となっている。その他にも既存のトマト生産者は、野生化・定着問題に起因する「心理的」な使いにくさや、今後の全面禁止措置を懸念して設備投資の抑制もあり、潜在的にはさらなる生産拡大が可能であるにもかかわらず、それを困難なものとしている。このことから、生物多様性および生態系の保全に配慮した新しいトマト授粉用生物資材の開発が喫緊の課題となっている（図(1)-1）。

現在わが国でトマト授粉用に流通しているマルハナバチには、セイヨウオオマルハナバチの他にクロマルハナバチがある。クロマルハナバチは、在来種であるが本州以南にしか生息していないため、北海道では国内外来種となることから同様の理由で使用することができない。これらの多くは、国外の工場で増殖されているため、輸送コストがかかるのみならず、注文から農家に届くまで1週間近くかかることから（国産は翌日ないし翌々日）、必要なときにすぐ入手することができず、花粉交配に間に合わない場合がある。また、海外からの長期輸送や、空港のコンテナヤードでの積み替え待機中の低温・高温暴露等により、マルハナバチはダメージを受けやすく、その結果、安定した品質の維持が困難で、最もよい状態でトマト生産農家に供給することは容易でない。また、国外で生産された場合、在来マルハナバチや野生の他のハチ類に感染する病原微生物が持ち込まれることが懸念されており、過去にダニ類の侵入が確認されている。海外でも、輸入されたハチに随伴していた病原体が、野生のハチ類に感染し、個体数が減少していることも報告されている。これらのことから、国内で在来マルハナバチを増殖する技術の確立が強く求められている。



図(1)-1 研究計画

また、現在本州以南のトマトハウスでは、在来種クロマルハナバチの増殖技術が確立し、市販されている。しかし、セイヨウオオマルハナバチと比較すると、ハウス内で定着が失敗する確率が高く、ハウスに貼られている紫外線除去フィルムにより色覚に影響を受け飛翔して授粉することができない、花の状態や種類によっては訪花しない等の欠点をもつことから、本州での普及も頭打ちで、ホルモン剤との併用が普通となっている。そのため、労働コストの削減および生産量の増産には、別の在来マルハナバチの実用化が求められている。今回の研究対象はエゾオオマルハナバチであるが、本州以南にはエゾオオマルハナバチの別亜種オオマルハナバチが分布している。エゾオオマルハナバチの実用化研究で得られた知見と技術は、その後の展開として、本州以南で使用できるオオマルハナバチの実用化に向けて非常に重要な研究成果となることが期待できる（図(1)-1および(1)-2）。



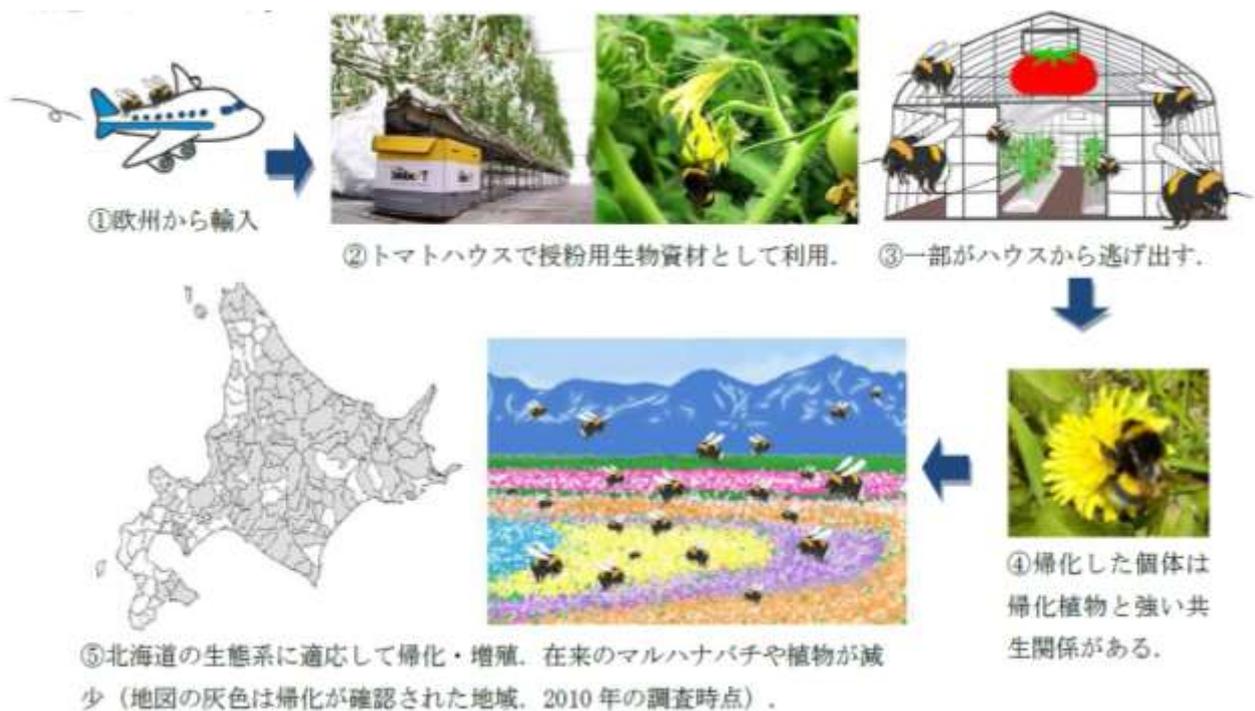
図(1)-2 研究実施体制

2. 研究開発目的

わが国における農作物の授粉は、ほとんどがセイヨウミツバチ等の授粉生物資材が利用されている。しかし、トマトなどの花蜜を分泌しない植物にはミツバチが訪花しないため、代替授粉用生物資材としてヨーロッパ原産のセイヨウオオマルハナバチが輸入されている。セイヨウオオマルハナバチは、従来使われてきた単為結果を促すホルモン剤に替わる新たな授粉用生物資材として1991年に輸入が開始され、トマトの品質向上やホルモン処理にかかる労働力の削減により、生産量の増加とコスト削減など多大な恩恵をもたらした。また、ハウス（栽培施設）内に昆虫を入れるため化学農薬の使用が制限され、これがわが国における総合的害虫管理技術（Integrated Pest Management: IPM）、生物農薬利用、減農薬栽培への取り組みの強いきっかけとなり、消費者にと

っても安心できる農作物生産の先駆けとなった。しかし、セイヨウオオマルハナバチは、野外へ逃亡した個体が帰化し、在来生物や生態系に大きな影響を与えることが問題とされてきた。そこで、2005年6月から施行された「特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律」において、指定第三次指定種として2006年7月に特定外来生物に指定し、飼育・保管・運搬などを規制するとともに、園芸農家にはハウス（施設）外への逸脱防止のための適切な施設の整備と管理の義務付けを行った。その結果、トマト生産農家の新規参入者数や生産量の増加は当初予測されていたよりも伸び悩んでいる。さらに外来生物法の施行後もセイヨウオオマルハナバチは分布を拡大させ、生態系に影響を与えているため早急な対策が必要である。セイヨウオオマルハナバチの帰化問題で見られる自然保護と農業生産の両立は、21世紀の持続可能な社会を形成する上でも大きな課題となっている。さらに世界的な規模で発生した原因不明のミツバチ大量死は、授粉用ミツバチの不足問題を引き起こし、農作物の安定生産にも大きな影響を及ぼしたことから、ミツバチに代わる代替授粉生物資材の確立は重要な課題となっている。そのような状況の中、マルハナバチはミツバチに代わる代替授粉用生物資材としても大きく注目されており、生態系の影響が少ない在来マルハナバチの国内での実用化は、社会的・国民的観点から見ても非常に重要であると考えられる。

今回候補種としたエゾオオマルハナバチ、エゾトラマルハナバチ、エゾナガマルハナバチは、北海道固有のマルハナバチで北海道全域に普通種として分布している。セイヨウオオマルハナバチと近縁で類似した送粉生態を持つことからセイヨウオオマルハナバチに替わる花粉媒介昆虫の候補種として期待されている。我々のグループは、在来マルハナバチ類を対象にこれまで行ってきた一連の研究成果により、今回この在来種3種をトマト授粉における新規生物資材の候補種として研究計画を立案した。この3種が候補となる理由としては、①北海道に生息する他の在来種と比較して野生種の1世代のみであるが飼育成功率が高い、②野外巣の調査によれば、繁殖能力に関係する形質（コロニーサイズ）に変異が大きく、選抜による育種効果が期待できる、③野外の路地栽培においてトマトの花に対して授粉行動が発現する、④セイヨウオオマルハナバチに比べて性質が温和であるため農家の刺傷被害のおそれが少ない、⑤別亜種が本州やアジアに分布しているため、将来的に同じ手法でこれらの亜種の増殖が可能である等があげられる。一方、これら3種の在来マルハナバチをトマト授粉に利用する場合の問題点としては、現在実用化されているセイヨウオオマルハナバチやクロマルハナバチと比べて、累代飼育に関連する技術の未確立であることや個体間の変異が大きいため形質の安定化が不十分である。例えば、①室内での女王蜂の交尾成功率の低さ、②女王蜂の産卵能力に起因するコロニー間での個体数（働き蜂）の変異が大きい、③累代飼育個体の休眠期間中の高い死亡率、④累代飼育個体（F1以降）の低い営巣成功率、⑤野生種（1世代目）の病原微生物の高い浸潤率等のため繁殖成功率が低く、野生世代は飼育することができても、次世代や次々世代と世代を重ねるごとに飼育可能数が減少し、長期に安定的に系統を維持できない。⑥また、飼育下でのコロニーの大きさ（働き蜂の数）が、セイヨウオオマルハナバチやクロマルハナバチほど安定していない（働き蜂数：セイヨウオオマルハナバチは120匹前後、クロマルハナバチは60～70匹前後であるが、これら3種は20～100匹と種およびコロニー間の変異が大きい）。コロニー大きさが小さい巣をハウスに導入した場合、働き蜂の訪花活動が低く、十分な授粉効果が得られない。これらの問題を解決できなければ、現在流通している2種類と同等の商品サイズ・品質のものを継続的に生産することができないと考えられる。



図(1)-3 セイヨウオオマルハナバチ問題の概要

そこで、トマトの授粉用生物資材として利用できる在来マルハナバチの開発について、現在問題となっている安定生産の阻害要因であるコロニーの営巣成功率と交尾率の向上に加えて、コロニーサイズを大きくする選抜育種技術を確立する必要がある。確立した技術をもとにトマトハウスでの授粉試験から授粉能力の高い系統を作出する。累代飼育およびトマト生産に適した形質を改良する事で、このエゾオオマルハナバチを実用化することができると考えている。

今回の申請課題では、在来種による基盤技術の確立により、環境に配慮した授粉様式の確立の過程で在来マルハナバチの実用化が求められており、その実現により外来種の完全規制による生物多様性の保全が実現するための基礎研究とする（図(1)-3）。

3. 研究開発方法

(1) 有用在来種の室内増殖方法の確立と遺伝子解析に関する研究

選抜のための基礎集団の作成

選抜により十分な遺伝的改良量を得るためには、基礎集団（選抜開始時の集団）に多量の遺伝変異が含まれる必要がある。そこで、春に北海道の広域にてエゾトラマルハナバチ、エゾオオマルハナバチ、エゾオオマルハナバチの女王蜂を採集し（図(1)-4）、女王蜂を専用の飼育用巣箱に導入して営巣試験を行った（図(1)-5）。営巣試験は、女王蜂の営巣（産卵）成功率、働き蜂の羽化までの成功率、次世代の繁殖個体（新女王蜂やオス蜂）の羽化成功率を測定・比較し、在来3種の中から候補種の選定をおこなった。

候補種が決まったら飼育条件下で成熟した巣のうち、働き蜂の個体数が平均よりも高い営巣規模の大きなもの上位のコロニーを予備選抜し、そこから次世代の新女王蜂と雄蜂を取り出して人

工授精法により交尾させた後、人工休眠処理を行い3～6ヶ月程度の休眠処理を行った。2世代目以降は、飼育下で人工繁殖・休眠処理をおこなった個体を利用した。野外のマルハナバチ類では、新女王蜂と雄蜂が秋に交尾し、交尾後の新女王蜂は翌年の春季まで休眠する。しかし、本研究においては、既存の女王蜂の休眠を短縮して周年飼育する技術を用いて、次世代の巣の創設を早めることが可能か検証をした。この方法によって、予備選抜を1～2世代（約半年間）にわたって実施し、系統造成のための基礎集団を作出することができるか、さらに選抜をするときに使用することができる形質の評価を行った。



在来種の中から 候補となる3種を選出した。



図(1)-4 在来マルハナバチの中から代替候補3種の選定



図(1)-5 野生種の捕獲から飼育までの流れ

(2) 在来マルハナバチの繁殖成功率に影響を及ぼす病原微生物の浸潤状況調査

欧米では在来マルハナバチが、外来花蜂類に随伴して持ち込まれた外来性の病原体の感染により大量死が起こり、大きな影響を受けている。そこで国内に生息するマルハナバチ3種におけるノゼマ微胞子虫*N. bombi*の寄生状況を調べるため候補種のエゾオオマルハナバチ、オオマルハナバチと外来種のセイヨウオオマルハナバチを対象種として浸潤状況について遺伝子検査を行った。捕獲は、2012年から2013年にかけて訪花中の個体を捕虫網により女王蜂または働き蜂を採集した。

採集した個体は、PCR法を利用して寄生の有無を判別するため、採集後、直ちに99%エタノールの液浸標本とし、DNA抽出実験まで冷蔵保存した。オオマルハナバチは、長野県諏訪市および長野市で採集した40個体を使用した。エゾオオマルハナバチは、北海道札幌市、釧路市、浜中町、根室市、中標津町、利尻島から各10個体ずつ採集し、合計60個体を使用した。セイヨウオオマルハナバチは、北海道札幌市、帯広市、釧路市、浜中町、根室市、中標津町から各20個体ずつ採集し、合計120個体を使用した。成虫の腹部を解剖用ハサミで開腹し、腸および卵巣組織を摘出し、それを試料としてDNAの抽出を行った。

これらの試料はDNeasy blood & Tissue kit (QIAGEN)を使用した。抽出の方法は、キットに添付されているプロトコールに従った。DNA抽出溶液は、PCR実験に使用するまで -20°C で保存した。*N. apis*および*N. bombi*の検出には、PCR診断用に開発されたSSU rRNAプライマーを使用した。コントロールとして、マルハナバチの核DNAのlong wave rhodopsin (*LWRh*)領域を増幅するプライマーを使用した。実験に使用したプライマーの配列は表(1)-1に示した。PCRは、1サンプルあたり全量20 μl で行った。反応液の組成はTakara Ex Taq ポリメラーゼ (5 units/ μl)を0.1 μl 使用し、添付の100 μM の2.5mM dNTP mixを1.6 μl 、10X緩衝液を2 μl 、100 μM の各プライマーを0.02 μl 、鋳型DNA溶液(約50 ng/ μl)を3 μl 加えて、滅菌水で20 μl とした。PCR反応は、プログラムサーマルサイクラー (TaKaRa)を用いた。*N. bombi*のプライマーは、 94°C で30秒、 50°C で30秒、 72°C で1分間のサイクルを35回繰り返した後、 72°C で5分間の伸長反応を行った。*LWRh*は、 94°C で1分間、 46°C で1分間、 72°C で1分間のサイクルを35回繰り返した後、 72°C で5分間の伸長反応を行った。ノゼマ判定の陽性コントロールには、名古屋大学の門脇准教授から提供された*N. apis*に感染したセイヨウミツバチから抽出したDNAサンプルを使用した。増幅したDNAは、アガロースゲル電気泳動法で分離してエチジウムブロマイド溶液(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で染色し、UV照射下で増幅を確認した。陽性を示したDNAサンプルは、シーケンス解析まで -20°C で保存した。

PCR診断法により*N. bombi*に陽性反応を示したサンプルのうち、宿主ごとに各地域から1個体を選択し、そのDNAをもとにシーケンス解析を行った。解析した遺伝子領域は、16S rDNAと23S rDNA間のinternal transcribed spacer (ITS)領域を含んだ部分配列を使用した。実験に使用したプライマーの配列は、表(1)-1に示した。PCR条件は、前述と同じとした。PCR産物をExoSAP-IT (GEヘルスケアサイエンス)で精製後、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ)を用いた。サイクルシーケンスの条件は、キットに添付されているプロトコールに従った。反応サンプルは、ジェネテックアナライザー3500 (アプライドバイオシステムズ)により塩基配列を決定し、GenBank (DDBJ)を利用したBLASTの相同性検索によって遺伝子型の解析を行った。

表(1)-1 PCR診断法およびシーケンス解析で使用したプライマー

名前	遺伝子	配列 (5' to 3')	PCR product
Nbombi-SSU-Jf1	rRNA small subunit (SSU)	CCATGCATGTTTTGAAGATTATTAT	323bp
Nbombi-SSU-Jr-1		CATATATTTTAAAATATGAAACAATAA	
LWRhF	Long wave rhodopsin (LWRh)	AATTGCTATTAYGARACNTGGT	700bp
LWRhR		ATATGGAGTCCANGCCATRAACCA	
ITS-f2	rRNA internal transcribe spacer region	GATATAAGTCGTAACATGGTTGCT	114-122 bp
ITS-r2		CATCGTTATGGTATCCTATTGATC	

(3) エゾオオマルハナバチの大量増殖を目的とした飼育コロニーにおける死亡要因の調査

本研究でも問題となっている初期コロニーの高い死滅要因を解明するために、病原微生物の感染状況を調査して死亡要因の解明を試みた。調査の対象種は、セイヨウオオマルハナバチと在来種で本研究の候補種であるエゾオオマルハナバチとした。マルハナバチは、春に北海道で訪花中の個体を捕虫網により女王蜂または働き蜂を採集し、室内飼育中に死亡した個体を使用した。検体は、解剖による寄生種の顕微鏡観察とPCRによる遺伝子判定を併用した。PCR関連試験の方法は、①に準拠している。分析対象には、マルハナバチでも判別法が確立されている病原微生物の縮翅病、ノゼマ病、ポリプダニ、原虫、寄生性の双翅目、膜翅目、センチウとした。マルハナバチは、北海道の札幌市、旭川市、帯広市、釧路市、浜中町、根室市、中標津町で総計258個体とした。

(4) エゾオオマルハナバチにおけるDNAマイクロサテライトマーカーの試験

基礎集団の造成過程において、各コロニーの女王蜂と働き蜂を対象として、マイクロサテライトDNAマーカーによる遺伝子型解析を行った。遺伝子解析に先立ち120個のマイクロサテライトDNAマーカーがエゾオオマルハナバチの系統選抜育種の遺伝子型情報として適用可能かどうかPCRテストを行った。

DNA抽出にはセイヨウオオマルハナバチが分布していない奥尻島のエゾオオマルハナバチの20個体と、コントロールとして帰化しているセイヨウオオマルハナバチを20個体とした。DNA抽出は胸部飛翔筋から約200mgを摘出して使用した。DNA抽出キットQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN社製)を用いて抽出した。抽出方法は、1.5mlマイクロチューブにサンプルを入れ、ホモジナイザーを用いてすり潰した。1.5mlマイクロチューブにATL buffer 180 μ lを加え、さらにProteinase K溶液を20 μ l加えた。ボルテックスミキサーを用いて10秒攪拌し、数秒間スピンドウンした。その後インキュベーター(55 $^{\circ}$ C)で1日培養した。培養後AL buffer 200 μ lを加え10秒攪拌し、数秒間スピンドウン後インキュベーター(70 $^{\circ}$ C)で10分間培養した。培養後、99% エタノール200 μ lを加え、30秒間攪拌し、数秒間スピンドウンした。QIAamp spin columnを2ml collection tube に立て、マイクロチューブ内の全ての溶液をspin columnの外側に溶液が漏れないよう2回に分け入れた。蓋を閉め、遠心機で4 $^{\circ}$ C 8000rpm 1分間の条件で遠心した。遠心後collection tubeの中の液を捨て、キムタオルの上で軽く叩き水滴をできる限り取った。spin columnの水滴を取ったcollection tubeに立て、500 μ lのAW1 bufferを加えた。蓋を閉め、8000rpmで1分間の条件で遠心した。遠心後同様にキムタオルで水滴を取った後、500 μ lのAW2 bufferを加え、15000rpmで3分間の条件で遠心した。遠心後collection tube

の中の溶液を捨て、何も加えずに空の状態にして15000rpmで1分間の条件で遠心した。遠心後 collection tubeは捨て、spin columnを新しい1.5mlマイクロチューブに立て20 μ lのAE bufferを加え1分間室温で放置しDNAを溶出した。8000rpmで1分間の条件で遠心してDNAを回収し、フリーザ(-25 $^{\circ}$ C)で保存した。PCR反応での特異性や安定性を向上させる事を目的として、QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN社製)で抽出したDNAを鋳型とし、各プライマー63種のアニーリング温度条件の最適化を行った。TaKaRa PCR Thermal Cycler Diceのグラジエント機能を用いてグラジエントPCRを行った。PCR産物をアガロース電気泳動により確認し、設定温度と照らし合わせることで、各プライマーの最適アニーリング温度を決定した。各プライマーに対して0.2mlのチューブを使用して12サンプルを用意した。1サンプル当たりの反応液量は、DNA溶液0.31 μ l、プライマー各0.15 μ l、10 \times Taq Buffer 1.50 μ l、dNTP Mixture 1.20 μ l、TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ社製) 0.08 μ lおよび滅菌蒸留水 11.60 μ lを混合し全体で15 μ lとしたものを反応溶液とした。各試薬の反応液量と濃度は表1-1に示してある。各試薬の反応温度条件は、94 $^{\circ}$ Cで3分間の熱変性後、94 $^{\circ}$ Cで30秒間、各プライマー当たり※12種類の温度(40, 41, 42, 44, 46.4, 48.8, 51.2, 53.6, 56, 58, 59, 60 $^{\circ}$ C)で30秒間、72 $^{\circ}$ Cで30秒間を35サイクル繰り返し、72 $^{\circ}$ Cで7分間の伸長反応を行った。100mlの1 \times TBE溶液に対して1.2gのアガロース(Genetics社製)を加えた1.2%アガロースゲルを作成し、1 μ lのMidori Green Direct (Genetics社製)と5 μ lのグラジエントPCR産物をピペティングした合計6 μ lをアプライした。その後100V、15分の条件で電気泳動を行い、紫外線照射撮影した電気泳動図から最も鮮明なバンドを選別し、設定温度と照らし合わせ、各プライマーに対して理想の温度を決定した。グラジエントPCRにより決定した最適温度条件下で、DNAマイクロサテライト領域を増幅させた。PCR増幅産物の多型を解析するため、各プライマーに20個体ずつ自動電気泳動装置QIAxcel (QIAGEN)を用いて行い、PCR増幅産物のサイズの測定を行った。

(5) エゾオオマルハナバチとセイヨウオオマルハナバチの判別プライマーの試験

セイヨウオオマルハナバチと近縁であるエゾオオマルハナバチは、導入直後から種間交雑の可能性が問題となっている。そこで、その影響を明らかにするために両種を識別できるPCR用の判別プライマーの開発を行った。DNA抽出には、セイヨウオオマルハナバチが分布していない奥尻島のエゾオオマルハナバチと、コントロールとして帰化しているセイヨウオオマルハナバチとした。念のため外部形態の同定の他にミトコンドリアDNAを使用して膜翅目DNAバーコーディング用COIの部分配列を増幅するプライマーを使用した。シークエンス解析の結果は、DDBJによる相同性検索を行い種同定を行った。シークエンス方法は、前述に準拠した。判別プライマーの設計には、①で利用したLWRhのシークエンス解析結果から得られた配列をもとにPrimer3で設計を行った。設計したプライマーは、アニーリング温度条件の最適化をTaKaRa PCR Thermal Cycler Diceのグラジエント機能を用いてグラジエントPCRを行った。各プライマーに対して0.2mlのチューブを使用して12サンプルを用意した。1サンプル当たりの反応液量は、DNA溶液0.31 μ l、プライマー各0.15 μ l、5 \times Buffer 1.50 μ l、dNTP Mixture 1.2 μ l、Primer Star (タカラバイオ社製) 0.1 μ lおよび滅菌蒸留水で全体を20 μ lとしたものを反応溶液とした。各試薬の反応液量と濃度は表1-1に示してある。各試薬の反応温度条件は、94 $^{\circ}$ Cで3分間の熱変性後、94 $^{\circ}$ Cで30秒間、各プライマー当たり※12種類の温度(40, 41, 42, 44, 46.4, 48.8, 51.2, 53.6, 56, 58, 59, 60 $^{\circ}$ C)で30秒間、72 $^{\circ}$ Cで30秒間を35サイクル繰り返し、72 $^{\circ}$ Cで7分間の伸長反応を行った。各プライマーに対して理想の温度を決定す

るために自動電気泳動装置QIAxcel (QIAGEN)を用いた。次に判別能力の判定を行った。

(6) 累代飼育選抜方法の改良

現在大量増殖に使用されている木製巣箱には、繰返し使用することで病原性微生物が次世代にまで伝播するため衛生上の問題がある。例えば、餌や排泄物で汚染（カビ等が発生）しやすい。滅菌消毒液の使用は、木材の劣化や薬剤残留を引き起こす。暗室内で上部からしか見えないのでデータの収集が難しい。そこで、本研究において改良型アクリル製巣箱による飼育試験を行った。次にミツバチおよびマウスで使用されている人工受精用精子保存液がマルハナバチの人工受精に使用できるのか調査した。マルハナバチ女王蜂への影響を調べるため、ミツバチ用人工受精器をマルハナバチ用に改良し、女王蜂の受精嚢内に保存液を1 μ L注入して、女王蜂の生存日数を調査した。そして同じように雄蜂から解剖して精子を取り出し、保存溶液と等量で混合し、液体窒素中で保存した。約120日後に取り出し、顕微鏡かで精子の生存率を確認した。

(7) マルチプレックPCRによる遺伝子型判定法の確立

産卵能力を事前に特定するため1度のPCRにより複数遺伝子座の遺伝子型判定方法を確立することを目的に行った。DNA抽出にはエゾオオマルハナバチの20個体とした。DNA抽出は、エゾオオマルハナバチ成虫の胸部飛翔筋から約200mgを摘出して使用した。DNA抽出キットQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて抽出した。抽出方法は、1.5mlマイクロチューブにサンプルを入れ、ホモジナイザーを用いてすり潰した。1.5mlマイクロチューブにATL buffer 180 μ lを加え、さらにProteinase K溶液を20 μ l加えた。ボルテックスミキサーを用いて10秒攪拌し、数秒間スピンドウンした。その後インキュベーター(55 $^{\circ}$ C)で1日培養した。培養後AL buffer 200 μ lを加え10秒攪拌し、数秒間スピンドウン後インキュベーター(70 $^{\circ}$ C)で10分間培養した。培養後、99 % エタノール200 μ lを加え、30秒間攪拌し、数秒間スピンドウンした。QIAamp spin columnを2ml collection tube に立て、マイクロチューブ内の全ての溶液をspin columnの外側に溶液が漏れないよう2回に分け入れた。蓋を閉め、遠心機で4 $^{\circ}$ C 8000rpm 1分間の条件で遠心した。遠心後collection tubeの中の液を捨て、キムタオルの上で軽く叩き水滴をできる限り取った。spin columnの水滴を取ったcollection tubeに立て、500 μ lのAW1 bufferを加えた。蓋を閉め、8000rpmで1分間の条件で遠心した。遠心後同様にキムタオルで水滴を取った後、500 μ lのAW2 bufferを加え、15000rpmで3分間の条件で遠心した。遠心後collection tubeの中の溶液を捨て、何も加えずに空の状態にして15000rpmで1分間の条件で遠心した。遠心後collection tubeは捨て、spin columnを新しい1.5mlマイクロチューブに立て20 μ lのAE bufferを加え1分間室温で放置しDNAを溶出した。8000rpmで1分間の条件で遠心してDNAを回収し、フリーザ(-25 $^{\circ}$ C)で保存した。57種プライマーのアニーリング温度条件の最適化を行った。TaKaRa PCR Thermal Cycler Diceのグラジエント機能を用いてグラジエントPCRを行った。PCR産物をアガロース電気泳動により確認し、設定温度と照らし合わせることで、各プライマーの最適アニーリング温度を決定した。各プライマーに対して0.2ml のチューブを使用して12サンプルを用意した。1サンプル当たりの反応液量は、DNA溶液0.2 μ l、各プライマーを0.15 μ l、2 \times MightyAmp Buffer (Mg²⁺, dNTP plus) を7.5 μ l、MightyAmp DNA polymerase (1.25 U/ μ l) (Takara) を0.6 μ lおよび滅菌蒸留水を混合し全体で15 μ lとしたものを反応溶液とした。PCR実験に使用した57種類のプライマーの配列は、表(1)-2に示した。プライマーはPCRによる増幅サイズが重複しないこと、プライマー

ダイマーの形成可能性しないこと、 T_m 値が類似していること等を考慮して、前年度のデータから多型頻度が高いアレル座のプライマーから順に増幅が干渉しない組み合わせを対戦形式で組み合わせを設計し、PCRによる試験を行った。PCRの温度条件は、98 °Cで2分間の熱変性後、98 °Cで10秒間、12種類の温度(40、41、42、44、46、48、51、53、56、58、59、60 °C)で15秒間、68 °Cで30秒間を35サイクル繰り返し、68 °Cで5分間の伸長反応を行った。100mlの1×TBE溶液に対して1.2gのアガロース(Genetics)を加えた1.2%アガロースゲルを作成し、1 μ lのMidori Green Direct(Genetics)と5 μ lのグラジエントPCR産物をピペティングした合計6 μ lをアプライした。その後100V、15分の条件で電気泳動を行い、紫外線照射撮影した電気泳動図からバンドの有無を確認した。次に自動電気泳動装置QIAxcel (QIAGEN)を用いて行き、PCR増幅産物のサイズの簡易測定と最もバンドが鮮明に増幅されているアニーリング温度条件を決定した。その後、蛍光プライマーを利用して最適な条件でPCRを行い、ABI 3130xl Genetic Analyzer (Life technologies) による遺伝子型判定を行った。

表(1)-2 マルチプレックPCR試験に使用したDNAマイクロサテライトプライマー

アレル座	Primer sequence(5'-3')	サイズ範囲 (bp)	T_m (°C)
BTMS0057	F-TGCTTGAACCGAAATAGAGGG	96-126	60
	R-CACCGGCATTTTACACACCA		
BTMS0060	F-CGACCACCGGCGCTCCC	215-314	60
	R-CCTTCGTCATCGGCACGCAC		
BTMS0065	F-CATTAACGCGATCGTAGCCG	212-242	50
	R-TAACGAACAGCCGGTGAGAT		
BTMS0035	F-CGACGTCGAAGAAAATTGTG	232-272	60
	R-GCGAGATTTCCAGACACGA		
BTMS0036	F-TTCAACGCACTCTGTAGTCG	200-248	57
	R-CACCGGACTTCGTAATCCAC		
BTMS0044	F-AGGATCGAGAGAACGAGCTG	273-297	60
	R-AGGCCTTGGGAGAGTTCC		
BTMS0045	F-GAAATCCCCACGAAATACG	236-287	60
	R-GCGGATACAGTTTCGAGCAT		
BTMS0047	F-TATAGGGTGACCCAGAGTGC	124-148	60
	R-CCACAAACAGAGCACGAAAGT		
BTMS0048	F-TTCGCGTTTCATTCTGCCAT	144-172	57
	R-TGAAGCGTATTGAAGCGACG		
BTMS0062	F-CTGTCGCATTATTCGCGGTT	259-299	60
	R-CTGGGCGTGATTCGATGAAC		
BTMS0063	F-GTATCATGCTTTGCCGCACT	121-134	60
	R-GGTAGACAATGGAACACGGG		
BTMS0066	F-CATGATGACACCACCAACG	120-174	60
	R-TTAACGCCCAATGCCTTTCC		
BTMS0082	F-TCGCGATCTTGGTGATAATGA	381-402	60
	R-TCAGACAGAACTGTGGAAAAC		
BTMS0113	F-GGGGATGAACGTCGGTTAGA	336-375	57
	R-ATCGTCGAGTTGGGTGGAAA		
BTMS0064	F-AAGCAGCGAAACAGAAGCTC	253-293	57
	R-CGGCATCGCCTTCTCTTTT		

BTMS0043	F-GCCCAAAGATCGTGTCGTAT R-CTCGCGTTTTCTCCTAGTGG	138–175	50
BTMS0124	F-CGCCGTAATGTAACTCC R-ACTCAATCCAAACGCCACC	242–324	54
BTMS0059	F-GGCTAGGAAAGATTAGCACTACC R-AGTTCGACAGACCAAGCTGT	341–361	60
BTMS0125	F-TTCGGTGGTAAAAGGAAAGCG R-CAGAAGGAGCGTTAGGACACAAAC	101–135	54
BTMS0061	F-CCGAGGATCTCTAGTAGCCG R-AGCGCATGCTATTACGATCT	209–264	60
BTMS0071	F-CGCGTAAATTATTCCCCTCCC R-CCATCTCGCGCAGAATGTTT	213–240	57
BTMS0109	F-AGTACCACCGAATCGAGAC R-TCGTATTTCTCCACCGAACGA	134–178	55
BTMS0126	F-GGTGATCGCTTAAAGCTC R-GCCAACTACGTTCAATATCG	164–190	50
BTMS0132	F-TCTGTCTCGTTAGACGCATACG R-GGAGCAACAAACCCTGAAAGC	103–135	57
BTMS0136	F-GCATTTCGGGTATTGCGTCTTTAG R-CGTTTATCTGCTTCTCTCGTTCG	155–185	51
BTMS0141	F-CCACATCCTCCAACCTCCTTTC R-GCGAGAGAATGAATGGTAGAACCG	91–173	54
BTMS0152	F-ACTTTTATTGTCGGTCTTG R-GGGATATAGTGAACCAGAAA	166–200	52
BTMS0139	F-CGCTCGCTCAGAAAACCTTCC R-CGACGAGAAAAAATCGGTCTCAAG	124–156	55
BTMS0069	F-GATGCGAGATAAAGCGTCGG R-GACAAAGCAGCCATCTCCAC	198–254	55
BTMS0133	F-CCACTCATACGCATTTGTGAAG R-GGACTGAAATTGCCACTATAAGC	114–146	51
BTMS0127	F-TGACTCTCGACGATTACG R-ACGCTTAAACTCGCATCG	207–237	51
BTMS0148	F-CTCTTTTGTCTCGTGTCT R-TGCATAAAATGTTACAGTGC	213–267	52
BTMS0128	F-GATTTCCGATTCAGCCCTGC R-TTATGCGACGATTCCCCTGG	179–208	55
BTMS0153	F-ATTTCTGATGACCGACTAAA R-TATTCCTGATCAGCGTTAAG	241–273	52
BTMS0150	F-CATTTCCCATTTCTTAATCT R-CTGCAATTGACGTATTGTAA	223–249	51
BT11	F-AAGAGAGAGACAGAGAGAGATAGGG R-GCGTTTTGACGATTAGATTAGAGCC	128–140	52
BT28	F-TTGCTGACGTTGCTGTGACTGAGG R-TCCTCTGTGTGTTCTTACTTGGC	181–196	53
BL01	F-GCGTCGAGAACTATCTAGGAGAG R-CGAAGATTCCCAAAACTGCC	111–117	52
BL08	F-ATGTTGCAGCACCTTCGTGG R-AATTAAGGCGTGCGCTCGC	142–148	53
BM5	F-TGCACCAGCAGTGCACGTTA	268–274	60*

	R-ACAGCTGTTGGTATCGAGCAAAGG		
BM7	F-TGGGAATGTGCAATGGAGGACTGT	159-165	60*
	R-ACGCTCGCGAGACTTCGACA		
BM12	F-CGAGGCGTTTCAGCCTGGGG	233-239	60*
	R-TTGCGAAACTCCGGCACCGA		
BA3	F-AGGCAACGTCGGAAGGGGGT	221-225	48
	R-GTACACGCAGCCTGCAGACGA		
BA9	F-AGCAGCGCGAGAAGGGGAGA	110-126	48
	R-GCCACCCTCCTGTAAGCCGGA		
BA12	F-ACGCGCTCTTTATTTCCGCGA	158-168	60
	R-AACGACCACTACCAGCGGGC		
B10	GTGTAACCTTCTCTCGACAG	188-217	52
	GGGAGATGGATATAGATGAG		
B11	GCAACGAAACTCGAAATCG	143-168	52
	GTTCATCCAAGTTTCATCCG		
B126	GCTTGCTGGTGAATTGTGC	150-184	57
	CGATTCTCTCGTGTACTCC		
B131	GATCGCCTATCTCTTCTCGG	117-131	54
	GAGGCGCTGTCGAGCTC		
B100	CGTCCTCGTATCGGGCTAAC	146-178/130-138*	58
	CGTGGAACGTCGTGACG		
B96	GGGAGAGAAAGACCAAG	230-248/228-240*	52
	GATCGTAATGACTCGATATG		
B119	GATCGTGCTAGAAAAGGAAG	130-136/158-182*	52
	CCACAGTGCAAAGTTTCTG		
B121	GAACATGTGGAACGACGG	160-170/162-163*	52
	GAACAATCGATATGTCACCG		
B132	GAAATTCGTGCGGAGGG	151-183/154-168*	58
	CAGAGAACTACCTAGTGCTACGC		
B116	GAATCAGGAGGCGCACG	172-176	58
	CGCAGCCTAAGCCACG		
B118	CCTAAGTCGCTATATCTTCG	201-223	58
	GAAACACGTATCTACATCTACAG		
B101	CGACTGTCGCGGTCTAAG	-	58
	GATCGCTATGTCAACAGCAG		

(8) 糞からのDNA抽出方法の確立

女王蜂の産卵能力を遺伝子型判定するために営巣初期の女王蜂の糞からDNA抽出方法を確立するための試験を行った。これにより非致死的な手法で早期の遺伝子型判定が可能となる。約1mm³の糞塊をスワブでふき取るように拭い、採集した（図(1)-6）。

スワブの先端部分を解剖用ハサミで切断し、100μlのExtraction Bufferを入った1.5mlチューブに入れて溶出させた。Extraction Bufferは事前に60℃で加温しておいた。Proteinase K (20 mg/ml)を1μlチューブに添加した。60℃で15分間インキュベートした後、98℃で2分間処理し、室温まで温度を下げた。室温で試料が落ちる程度に軽く遠心し、上清を新しいチュ



図(1)-6. 初期巣.

ープに写し、それをExtraction Buffer 抽出液（PCRの鋳型DNA）として使用した。糞からのDNAによるPCR反応を確認するため抽出したDNAを鋳型とし、PCRを行った。PCRには、MightyAmp® Genotyping Kit（Takara）を使用した。PCRの反応液条件は、DNA溶液を8段階の希釈系列(0.1μl、0.2μl、0.4μl、0.6μl、0.8μl、1.0μl、1.5μl、2.0μl)とした。各プライマーを0.15μl、2×MightyAmp Buffer（Mg²⁺、dNTP plus）を7.5μl、MightyAmp DNA polymerase（1.25 U/μl）を0.6μlおよび滅菌蒸留水を混合し全体で15μlとしたものを反応溶液とした。実験に使用した8種類のプライマーの配列は、表(1)-3に示した。

表(1)–3 使用した蛍光プライマー

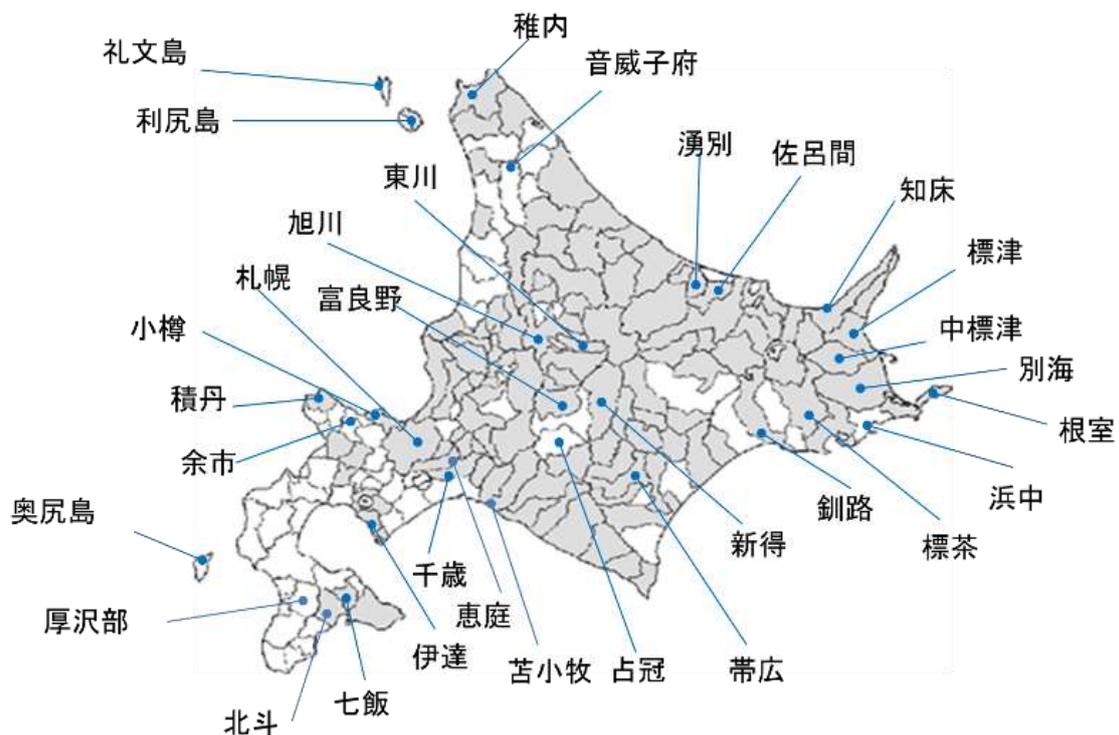
プライマー名	配列(5'-3')	蛍光色素
B11F	GCAACGAAACTCGAAATCG	VIC
B11R	G TTCATCCAAGTTTCATCCG	
B96F	GGGAGAGAAAGACCAAG	NED
B96R	GATCGTAATGACTCGATATG	
B119F	GATCGTGCTAGAAAAGGAAG	PET
B119R	CCACAGTGCAAAGTTTCTG	
B126F	GCTTGCTGGTGAATTGTGC	FAM
B126R	CGATTCTCTCGTGTACTCC	
BTMS0045F	GAAATTCCCCACGAAATACG	PET
BTMS0045R	GCGGATACAGTTTCGAGCAT	
BTMS0062F	CTGTGCGATTATTCGCGGTT	FAM
BTMS0062R	CTGGGCGTGATTTCGATGAAC	
BTMS0065F	CATTAACGCGATCGTAGCCG	VIC
BTMS0065R	TAACGAACAGCCGGTGAGAT	
BTMS0125F	TTCGGTGGTAAAAGGAAAGCG	FAM
BTMS0125R	CAGAAGGAGCGTTAGGACACAAAC	

反応温度条件は、98℃で2分間の熱変性後、98℃で10秒間、55℃で15秒間、68℃で30秒間を35サイクル繰り返し、68℃で5分間の伸長反応を行った。100mlの1×TBE溶液に対して1.2gのアガロース(Genetics)を加えた1.2%アガロースゲルを作成し、1μlのMidori Green Direct（Genetics）と5μlのグラジエントPCR産物をピペティングした合計6μlをアプライした。その後100V、15分の条件で電気泳動を行い、紫外線照射撮影した電気泳動図からバンドの有無を確認した。次に自動電気泳動装置QIAXcel (QIAGEN)を用いて行い、PCR増幅産物のサイズの簡易測定と最もバンドが鮮明に増幅されているDNA濃度条件を決定した。その後、蛍光プライマーを利用して同じ条件でPCRを行い、自動シーケンサーABI 3130xl Genetic Analyzer（Life technologies）による最適DNA抽出濃度を決定した。

(9) 遺伝子汚染リスク評価

アドバイザーボード会合および中間評価時に指摘されていたエゾオオマルハナバチの実用化後における遺伝子汚染リスク評価について竹内を主として高橋の補佐として追加実験を行った。エゾオオマルハナバチにおける地域間の遺伝的多様度の分析には、膜翅目DNAバーコーディング用ミトコンドリアDNAのCOI部分配列を解析することにした。北海道の32か所からエゾオオマルハ

ナバチ成虫を捕獲し、DNA抽出までエタノールで保存した（図(1)-7）。DNAの抽出は、前述の実験の方法と同じようにした。PCRの1サンプル当たりの反応液量は、DNA溶液3.0 μ l、2種のプライマー（50 μ M）0.03 μ l、10 \times Ex *Taq* Buffer 1.5 μ l、dNTP Mixture 1.2 μ l、Ex *Taq* polymerase（タカラバイオ社製）を0.075 μ lおよび滅菌蒸留水で全体を15 μ lとしたものを反応溶液とした。実験に使用したプライマーの配列は、表(1)-4に示した。反応温度条件は、94 $^{\circ}$ Cで3分間の熱変性後、94 $^{\circ}$ Cで30秒間、※12種類の温度(40、41、42、44、46、48、51、53、56、58、59、60 $^{\circ}$ C)で60秒間、72 $^{\circ}$ Cで60秒間を35サイクル繰り返し、72 $^{\circ}$ Cで5分間の伸長反応を行った。PCR産物は、アガロースゲル電気泳動法で分離してMidorigreen溶液（0.5 μ g/ml）で染色し、UV 照射下で増幅を確認した。アニーリング温度は、増幅が確認されたサンプルの中で最も高い温度条件とした。その条件でPCR増幅したサンプルは、シーケンス解析まで-20 $^{\circ}$ C で保存した。シーケンス解析は、PCR 産物をExoSAP-IT（岩井化学）で精製後、BigDye $^{\circ}$ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ）を用いた。サイクルシーケンスの条件は、キットに添付されているプロトコールに従った。反応サンプルは、ABI 3130xl Genetic Analyzer（Life technologies）により塩基配列を決定した。シーケンス解析の結果は、遺伝子解析用ソフトウェアGenetyx(ジェネティクス)によるアライメントを行った。



図(1)-7 採集地点

表(1)-4 プライマー配列

Primer name	Sequence (5' to 3')
LCOHym	TATCAACCAATCATAAAGATATTGG
NancyShort	CCCGGTAAAATTTAAAATATAAAC

(10) トマトハウスでの授粉試験

前年度から人工増殖により作成していたエゾオオマルハナバチのコロニーを利用してトマトハウスでの授粉試験による能力評価を行った。試験には、北海道農政局、ホクレン苫小牧、JA平取町等の協力を得て行った。2014年8月に北海道平取町にあるトマト生産者の約100坪のトマトハウスで行った（図(1)-8）。



図(1)-8 試験で利用した北海道平取町のトマトハウス（左上）、ハウスの内部（右上）、ハウスの見取り図（左下）、ビデオカメラでの調査の様子（右中；数値は花の数を示す）、トマトの花（右下）

試験方法は、紫外線カットフィルムが張られたハウス内での活動能力について観察調査を行った。観察調査の方法は、目視での観察方法と6台のビデオカメラを設置して録画し（図(1)-8）、後で動画を解析した。次に巣箱への定位飛行能力、帰巣能力の試験を行った。次にハウス内でトマトの花を認識できるかどうかの有無について観察による調査を行った（図(1)-8）。その後、ト

マトの花へのバイトマークの付着率からハウス内におけるトマトの花への探索能力について観察記録から測定した。最後にセイヨウオオマルハナバチとの訪花能力について比較試験を行った。訪花能力には、花上滞在時間と訪花頻度について記録をした。花上滞在時間については、1個の花あたりの花粉収集に要する時間を観察により測定した。訪花頻度については、単位時間あたりの訪花数について観察記録を行った。

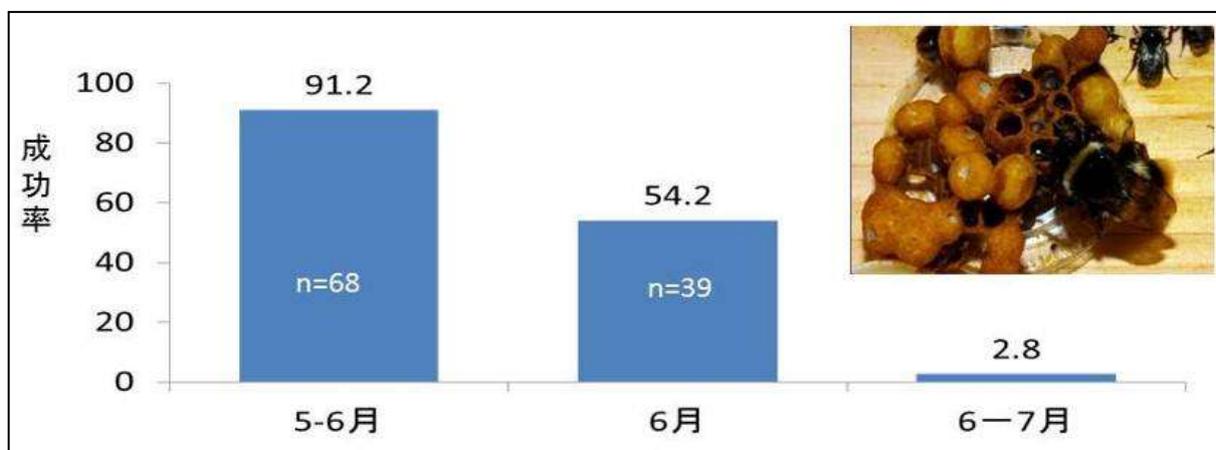
最後にセイヨウオオマルハナバチとの訪花能力について比較試験を行った。訪花能力には、花上滞在時間と訪花頻度について記録をした。花上滞在時間については、1個の花あたりの花粉収集に要する時間を観察により測定した。訪花頻度については、単位時間あたりの訪花数について観察記録を行った。

4. 結果および考察

(1) 有用在来種の室内増殖方法の確立と遺伝子解析に関する研究

飼育実験による候補種の選定と選抜形質の探索

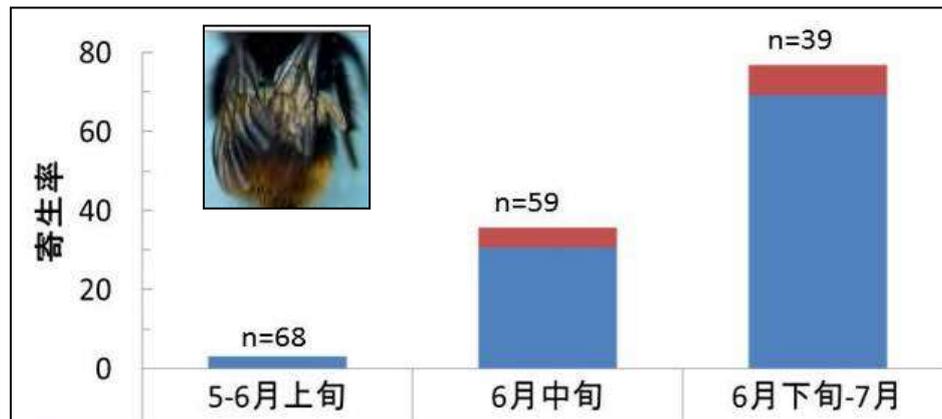
野外から捕獲してきたマルハナバチの女王蜂は、自然状態であれば数ヶ月間の屋外での活動期間がある。この屋外で活動する期間の中で、どの時期に捕獲した女王蜂の営巣成功率が高いのか確認を行い、選抜育種に使用する母集団の捕獲時期の統一を行い、捕獲時期が営巣成功率に影響を及ぼさないようにするための調査を行った（図(1)-9）。



図(1)-9 女王蜂の営巣成功率と採集時期の関係

その結果、休眠あけ直後（5~6月上旬）の女王蜂の方が、有意に成功率が高いことがわかった。これは、早期に捕獲した個体は、自然下での営巣・産卵経験がないため営巣成功率が高い可能性があるかと推測された。

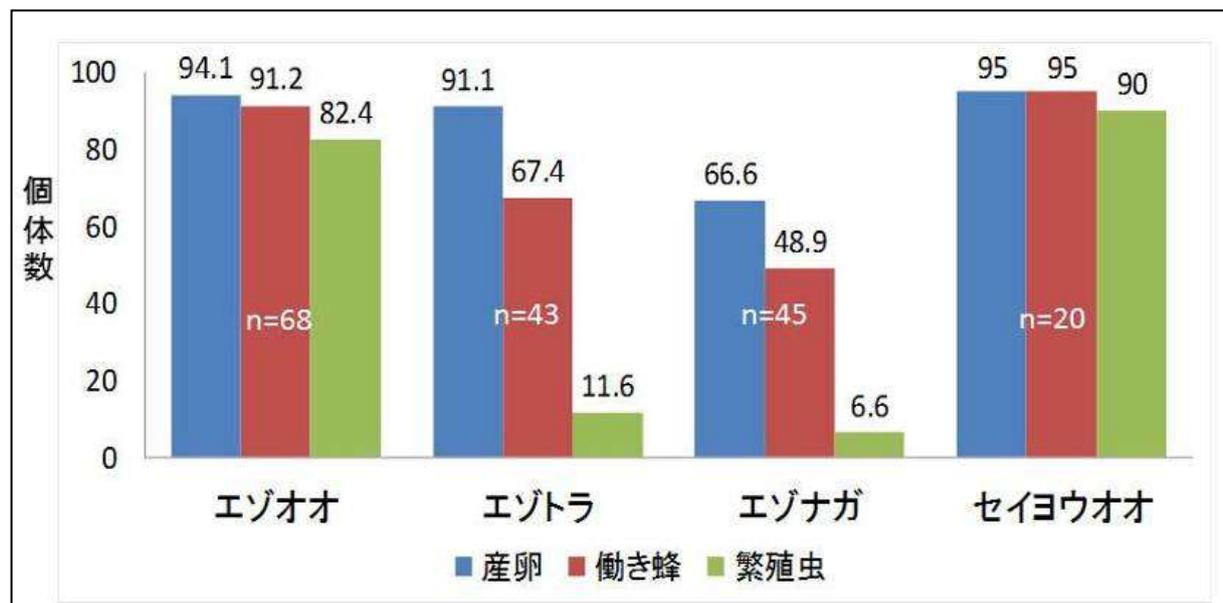
次に野生のマルハナバチは、多種類の内部寄生者による寄生を受けていることが知られている。寄生による影響として、女王蜂の不妊化が報告されているため、採集時期を3つに分けて寄生率を調べた結果を（図(1)-10）に示した。早期に捕獲した女王蜂のほうが、マルハナバチタマセンチュウおよび寄生蜂の一種の寄生率は低い結果となった。



図(1)-10 女王蜂の寄生率と採集時期の関係

これらの結果により基礎集団にする女王蜂は、早期に休眠から開けた個体がよいと判断することができたため、以後の実験には早期に捕獲した個体を使用することにした。

本研究では、北海道産在来種のエゾトラマルハナバチ、エゾマガマルハナバチ、エゾオオマルハナバチの3種を候補種として、営巣成功率（造巣と産卵）、働き蜂や次世代の女王蜂および雄蜂の産出成功率とその数について比較実験を行った結果を図(1)-11に示した。比較として、セイヨウオオマルハナバチを利用した。



図(1)-11 候補在来種の飼育成功率（産卵から繁殖個体まで）。エゾオオ（エゾオオマルハナバチ）、エゾトラ（エゾトラマルハナバチ）、エゾナガ（エゾナガマルハナバチ）、セイヨウオオ（セイヨウオオマルハナバチ）を示す。産卵は飼育女王蜂の産卵成功率、働き蜂は飼育コロニーの働き蜂羽化成功率、繁殖虫は、飼育コロニーの新女王蜂または雄蜂羽化の成功率を示す

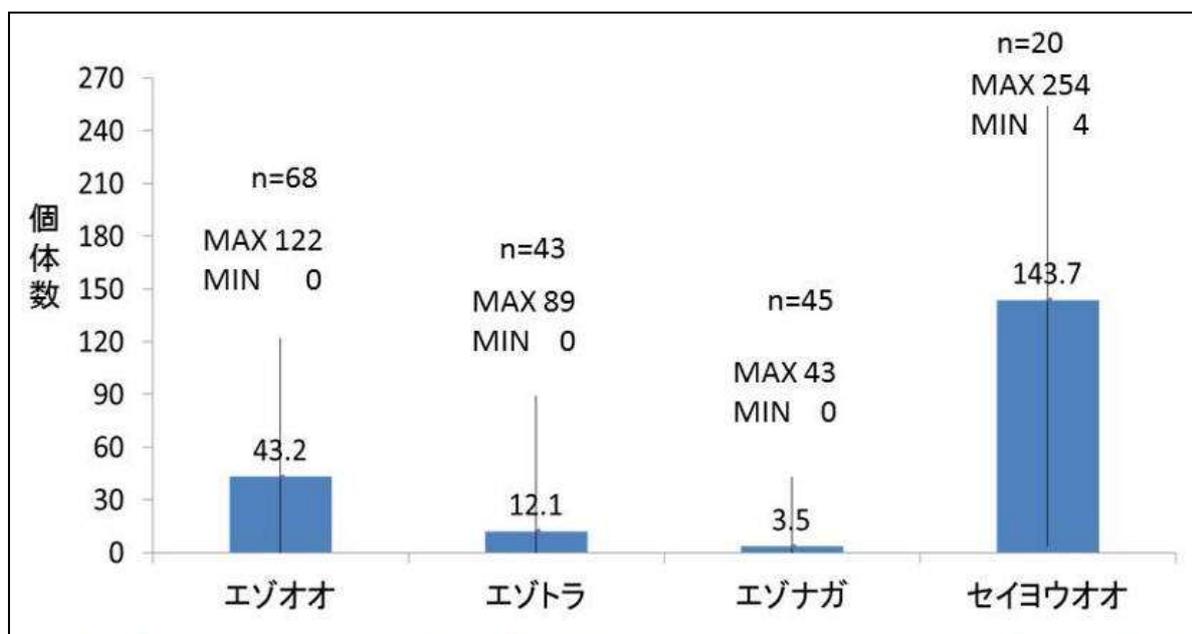
3種の間で営巣成功率が高かったのは、順にエゾオオマルハナバチ、エゾトラマルハナバチ、エ

ゾマガマルハナバチとなった。女王蜂の営巣成功率は、エゾオオマルハナバチとエゾトラマルハナバチは、90%以上となった。エゾナガマルハナバチの女王蜂の営巣成功率は、他の2種に比べて約67%と低い結果となった(図(1)-11)。

働き蜂の産出成功率は、エゾオオマルハナバチ、エゾトラマルハナバチ、エゾマガマルハナバチの順となった。エゾオオマルハナバチは、約91%と産卵成功率とほぼ一緒であった。エゾトラマルハナバチは、約67%と産卵成功率に比べて低くなった。エゾナガマルハナバチは、約49%と同様に産卵成功率から大きく低下した結果となった(図(1)-11)。

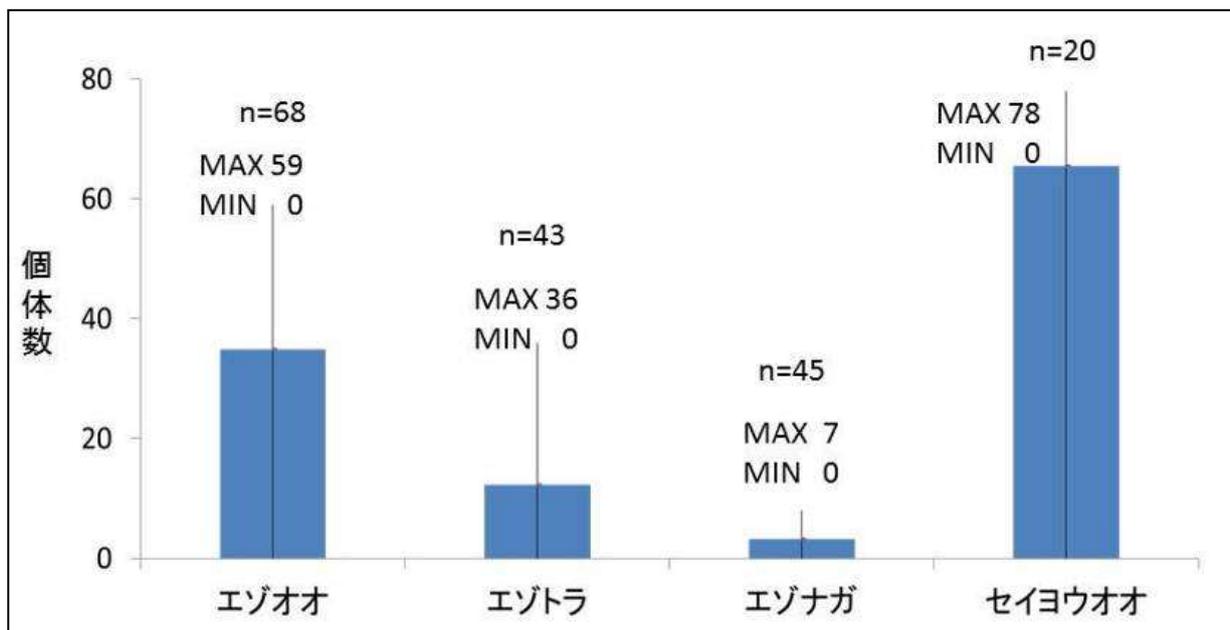
繁殖虫（次世代の女王蜂と雄蜂）の産出成功率は、エゾオオマルハナバチ、エゾトラマルハナバチ、エゾマガマルハナバチの順となった。エゾオオマルハナバチは、約82%と産卵成功率から若干低下した。エゾトラマルハナバチとエゾナガマルハナバチは、それぞれ約12%と約7%と極端に低下した結果となった(図(1)-11)。

働き蜂の産出数は、エゾオオマルハナバチ、エゾトラマルハナバチ、エゾマガマルハナバチの順となった（図(1)-12）。エゾオオマルハナバチは、平均43.2個体となった。エゾトラマルハナバチは、平均12.1個体となった。エゾナガマルハナバチは、平均3.5個体となった。最大数は、エゾオオマルハナバチの122個体であった。エゾトラマルハナバチは、最大89個体、エゾナガマルハナバチは、最大43個体であった。産卵成功率とほぼ一緒であった。比較のために飼育したセイヨウオオマルハナバチは、148.7個体、最大254個体となった。エゾオオマルハナバチおよびエゾトラマルハナバチは、働き蜂の産出数は、ポリネーション用として考えた場合、許容範囲内ではあるが、セイヨウオオマルハナバチと比較して低いので、働き蜂の数（コロニーサイズ）の改良が必要であると考えられた。



図(1)-12 候補在来種の働き蜂産出数. エゾオオ（エゾオオマルハナバチ）、エゾトラ（エゾトラマルハナバチ）、エゾナガ（エゾナガマルハナバチ）、セイヨウオオ（セイヨウオオマルハナバチ）を示す

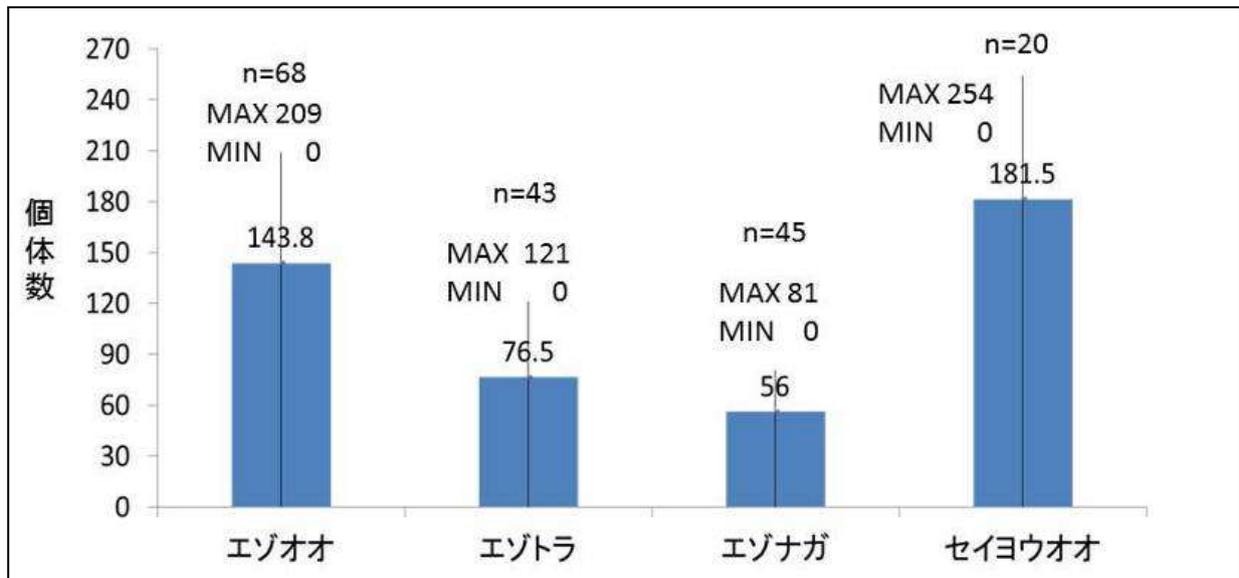
新女王蜂の産出数は、エゾオオマルハナバチ、エゾトラマルハナバチ、エゾマガマルハナバチの順となった（図(1)-13）。エゾオオマルハナバチは、平均34.8個体となった。エゾトラマルハナバチは、平均12.2個体となった。エゾナガマルハナバチは、平均3.2個体となった。最大数は、エゾオオマルハナバチの65.4個体であった。エゾトラマルハナバチは、最大59個体、エゾナガマルハナバチは、最大36個体であった。比較のために飼育したセイヨウオオマルハナバチは、最大78個体となった。エゾオオマルハナバチの新女王蜂の産出数は、人工増殖を行う場合、許容範囲内ではあるが、セイヨウオオマルハナバチと比較して低いので、新女王蜂を増やすような系統の改良が必要であると考えられた。



図(1)-13 候補在来種の新女王蜂産出数。エゾオオ（エゾオオマルハナバチ）、エゾトラ（エゾトラマルハナバチ）、エゾナガ（エゾナガマルハナバチ）、セイヨウオオ（セイヨウオオマルハナバチ）を示す

雄蜂の産出数は、エゾオオマルハナバチ、エゾトラマルハナバチ、エゾマガマルハナバチの順となった（図(1)-14）。エゾオオマルハナバチは、平均143.8個体となった。エゾオオマルハナバチは、平均143.8個体となった。エゾトラマルハナバチは、平均76.5個体となった。エゾナガマルハナバチは、平均56個体となった。最大数は、エゾオオマルハナバチの209個体であった。エゾトラマルハナバチは、最大121個体、エゾナガマルハナバチは、最大81個体であった。比較のために飼育したセイヨウオオマルハナバチは、平均181.5個体、最大254個体となった。雄蜂の産出数は、新女王蜂の産出数と比較して3種ともに多い傾向があることがわかった。

エゾオオマルハナバチは、人工増殖を行う場合、セイヨウオオマルハナバチと比較してもほとんど差がないためエゾオオマルハナバチに関しては、すでに十分な雄蜂生産数を確保していると考えられた。



図(1)-14 候補在来種の雄蜂産出数. エゾオオ (エゾオオマルハナバチ)、エゾトラ (エゾトラマルハナバチ)、エゾナガ (エゾナガマルハナバチ)、セイヨウオオ (セイヨウオオマルハナバチ) を示す

これらの飼育試験の結果を4段階の評価 (◎、○、▲、×) でまとめた (表(1)-5)。営巣成功率 (造巣および産卵) は、3種類とも可能であったが、エゾナガマルハナバチの成功率は低かった。働き蜂の産出数は、エゾオオマルハナバチは高いが他の2種は低かった。繁殖個体である新女王蜂および雄蜂の生産数は、ゾオオマルハナバチは高かったが、他の2種は低い結果となった。候補種3種の中では、エゾオオマルハナバチが第一候補、エゾトラマルハナバチが第二候補となった。エゾナガマルハナバチを系統造成し、ポリネーション用に利用することは、困難であると予測された。

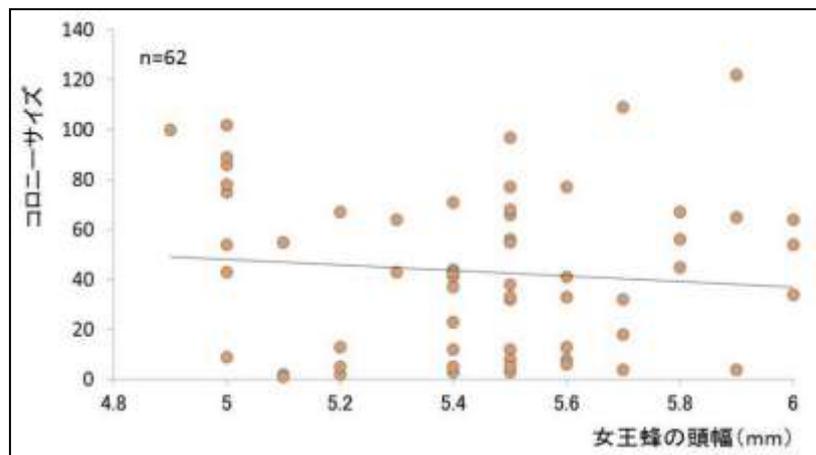
表(1)-5 候補在来種の評価一覧

項目	種 類		
	エゾオオマルハナバチ	エゾトラマルハナバチ	エゾナガマルハナバチ
営巣成功率	◎	◎	▲
働き蜂数	◎	○	×
繁殖個体生産数	◎	▲	×

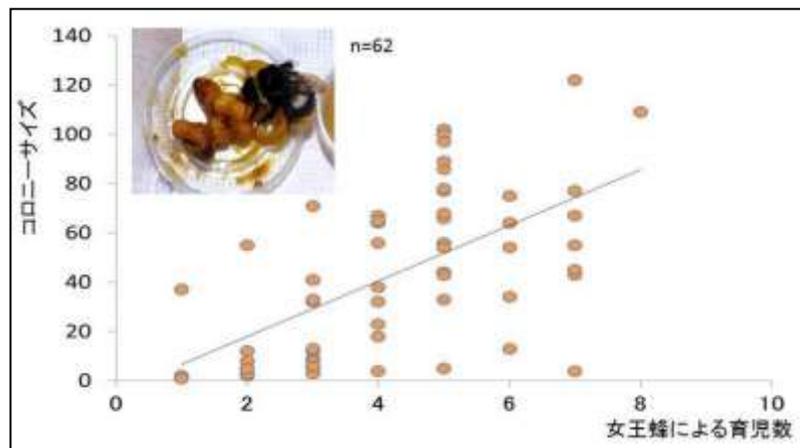
次に第1位候補種のエゾオオマルハナバチの女王蜂を対象に、選抜するとき簡易および迅速に評価するための候補形質の探索を行った。まず初めに、ポリネーションに重要な働き蜂の数 (これをコロニーサイズとする) が、女王蜂のサイズに影響を受けるのか否かについて関係性の解析を試みた。女王蜂の形質は、大きさと産卵数に関係性があると仮定し、女王蜂の頭幅と働き蜂の産出数について分析をした結果を示した (図(1)-15)。

女王蜂の大きさとコロニーサイズ (働き蜂数) には、相関関係は見られなかった。女王蜂の体サイズと産卵能力には、関連性がないことがわかった。基本的に女王蜂の平均的なサイズであれば産卵能力には、大きな問題はないこともわかった。次の候補形質として、女王蜂が単独で行う産卵数および育児数とコロニーサイズの関係性の解析を試みた。女王蜂の産卵数および育児能力

の関する形質が、コロニーサイズに関係性があると仮定し、女王蜂が単独で育児をしたときの働き蜂の生産数と最終的な働き蜂の産出数について分析をした結果を示した（図(1)-16）。



図(1)-15 女王蜂の体サイズとコロニーサイズ



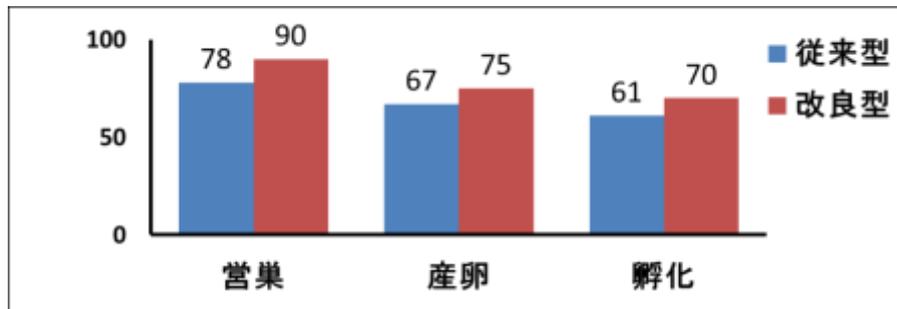
図(1)-16 女王蜂の育児数とコロニーサイズ

女王蜂による育児数とコロニーサイズ（働き蜂数）には、正の相関関係が見られた。女王蜂の育児数とコロニーサイズには関連性があるため、早期選抜の指標に使えることがわかった。これらの結果から、コロニーサイズを迅速かつ簡易的に使用することのできる選抜指標として利用することとした。

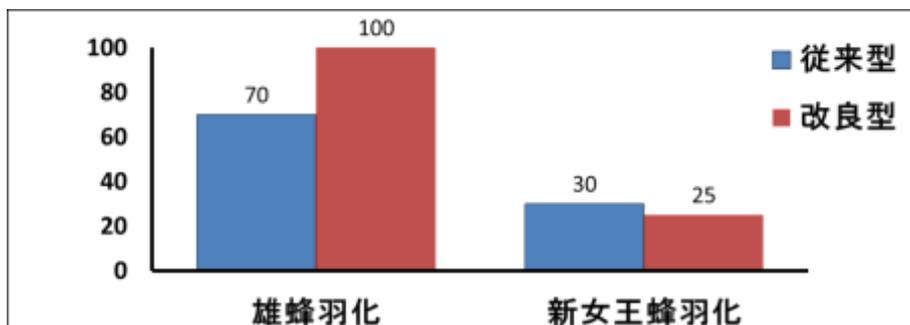
(2) 累代飼育選抜方法の改良

アクリル製の巣箱による飼育試験の結果を図(1)-17に示した。比較飼育試験の結果、従来型よりも改良型の巣箱が営巣、産卵、ふ化の成功率が高くなる傾向が見られた。繁殖個体の雄蜂と新女王蜂の生産数の比較試験をしたところ、雄蜂では改良型が生産数の増加が確認されたが、新女王蜂では変化は見られなかった（図(1)-18）。飼育試験の結果からは、利点を総合的にまとめると、①多孔体構造のため汚染が低減する。②カビや病気の発生が抑制された。③アクリル製であることから消毒液の使用が可能であり残留が少ない。④病気の伝播抑制につながる。⑤透明であるため全方面からの観察が可能である。⑥また生分解性素材であるため農家単位での処分も可能であ

る。⑦さらに野外で在来マルハナバチの営巣場所の提供（保護）にも使用できるといった新規巣箱の開発に成功した（図(1)-19）。



図(1)-17 小型アクリル製改良型巣箱における営巣成功率



図(1)-18 大型アクリル製改良型巣箱における繁殖個体の生産成功率



図(1)-19 改良型アクリル製巣箱（小型と大型）

次にミツバチおよびマウスで使用されている人工受精用精子保存液を使用して、マルハナバチ女王蜂の受精嚢内に保存液を注入して生存日数を調査したところ、ミツバチ用の保存液で生存率が約50%以下であった（表(1)-6）。この結果から、ミツバチ用の保存液をマルハナバチ用に改良する必要があることが示唆された。さらに精子を液体窒素中で保存溶液を使用して保管し、120日後に取り出し、生存率を確認したところ、生存率は約40%以下となったため、長期保存の場合には、ミツバチ用の保存液をベースとして、マルハナバチ用に改良することが必要であることが分かった（表(1)-7）。

表(1)-6 人工受精用精子保存液による女王蜂の生存日数

人工受精用精子注入 溶液	女王蜂の生存率（7日後）	
	クロマルハナバチ	セイヨウミツバチ
ミツバチ人工受精用 緩衝液	50% (n = 4)	100% (n = 20)
マウス用精子保存液	25% (n = 4)	10% (n = 20)

表(1)-7 人工受精用精子保存液によるマルハナバチ精子の生存率

精子保存用液	精子生存率（120日後）	
	クロマルハナバチ	セイヨウミツバチ
ミツバチ人工受精用 緩衝液	36% (n = 3)	44% (n = 3)
マウス用精子保存液	13% (n = 3)	19% (n = 3)

(3) 在来マルハナバチの繁殖成功率に影響を及ぼす病原微生物の浸潤状況調査

国内に生息する3種のマルハナバチから220個体をPCR診断法により解析したところ、*N. bombi* に陽性を示したサンプルは、セイヨウオオマルハナバチのみであった。オオマルハナバチおよびエゾオオマルハナバチからは、*N. bombi* の寄生を示すPCR産物の増幅は認められなかった。これらの結果は、表(1)-8にまとめて示した。セイヨウオオマルハナバチは、採集した全地域の個体から*N. bombi* が検出された。調査したセイヨウオオマルハナバチ全体における*N. bombi* の感染率は、7.5% (9/120)であった。また、コントロールとして利用した*LWRh* は、すべてのDNAサンプルで増幅が確認された。シーケンス解析の結果、セイヨウオオマルハナバチで*N. bombi*感染が陽性になった6個体から、それぞれ118塩基を決定することができた。この配列を同じようにBLAST検索したところ、イギリスのセイヨウオオマルハナバチから単離された、*N. bombi* のうちD3タイプの遺伝子型(DQ267533)と100%一致した。

表(1)-8 国内に生息する3種のマルハナバチにおける*Nosema bombi*の寄生状況

地域		種類		
		セイヨウオオマルハナバチ	エゾオオマルハナバチ	オオマルハナバチ
北海道	札幌市	10% (2/20)	0% (0/10)	-
	帯広市	5% (1/20)	-	-
	釧路市	10% (2/20)	0% (0/10)	-
	浜中町	5% (2/20)	0% (0/10)	-
	根室市	5% (1/20)	0% (0/10)	-
	中標津町	10% (2/20)	0% (0/10)	-
	利尻町	-	0% (0/10)	-
長野県	諏訪市	-	-	0% (0/20)
	長野市	-	-	0% (0/20)
合計		7.5% (9/120)	0% (0/60)	0% (0/40)

括弧内は、分析した個体数のうち寄生が確認された個体数を示している。

今回初めて国内における在来種および農業分野で生物資材として利用されているマルハナバチ類の微胞子虫の浸潤状況をPCR 診断法で、さらに系統をシーケンス解析により明らかにすることができた。

本調査により、国内で帰化したセイヨウオオマルハナバチに*N. bombi* が寄生していることがはじめて確認された。今回、在来マルハナバチ類から*N. bombi* は検出されなかったが、その原因は、寄生率が低いことや、今回解析した個体数が少ないことによると推測された。マルハナバチに寄生する*N. bombi* は、日本を除いたマルハナバチ類の分布域全域で確認されている。

今後、調査地域や解析個体数および種数を増やせば本種の寄生個体を発見する可能性は高いと思われる。本調査によるセイヨウオオマルハナバチの結果は、過去に日本に持ち込まれたセイヨウオオマルハナバチのコロニーから*Nosema* 様の寄生が報告されているが、それを支持する結果となった。花粉交配用に大量に海外から輸入されたセイヨウオオマルハナバチのコロニーから一部の女王蜂が逃げ出し、北海道において帰化が急速に進んでいる状況にある。既に地域によっては、セイヨウオオマルハナバチが優占種となっている所も数多く見られる。今回単離された*N. bombi* のシーケンス解析の結果からは、イギリスのセイヨウオオマルハナバチに寄生していた*N. bombi* と同じ遺伝子型であることがわかった。在来マルハナバチ類で検出されなかったが、野生化したセイヨウオオマルハナバチの分布域全てで寄生が確認された。

これらの結果を総合的に判断すると、国内で帰化したセイヨウオオマルハナバチに寄生している*N. bombi* の起源は、原産国の欧州から輸入されたセイヨウオオマルハナバチのコロニーに随伴して持ち込まれ、その後国内で逃げ出した個体に付随して寄生が拡大した可能性が高いと予測された。本調査では、在来のオオマルハナバチおよびエゾオオマルハナバチからは、*N. bombi* の寄生は確認されなかった。しかし、*N. bombi* は、マルハナバチ類での宿主範囲が広いためセイヨウオオマルハナバチと同亜属である2 種は、水平感染により伝播する可能性がある。今回の調査では、在来マルハナバチ2種からは、*N. bombi*の感染個体は見つかっていないが、分布している可能性が高いと思われる。また、海外から持ち込まれた*N. bombi* 系統には、在来マルハナバチ類は抵抗性を持っていない可能性もあるため、今後も定期的に浸潤状況の調査とともに在来マルハナバチへの感染実験による影響を調べる必要があると思われる。

近年欧州およびアメリカ大陸では、ミツバチやマルハナバチの輸出入に随伴する形でノゼマをはじめとする病原性微生物類が分布を広げていることが指摘されている。本来分布していなかった地域に新たな病原性微生物が侵入すると、抵抗性を持たない在来生物に甚大な被害をもたらすことが過去に多数報告されている。ミツバチやマルハナバチでも同様に、これまで存在しなかった病原体が侵入すると、それが大量死の原因になることも危惧されている。実際に海外では、ミツバチやマルハナバチにおいて、外来のウイルスや寄生性ダニ類の浸潤による大量死が大きな問題となっている。

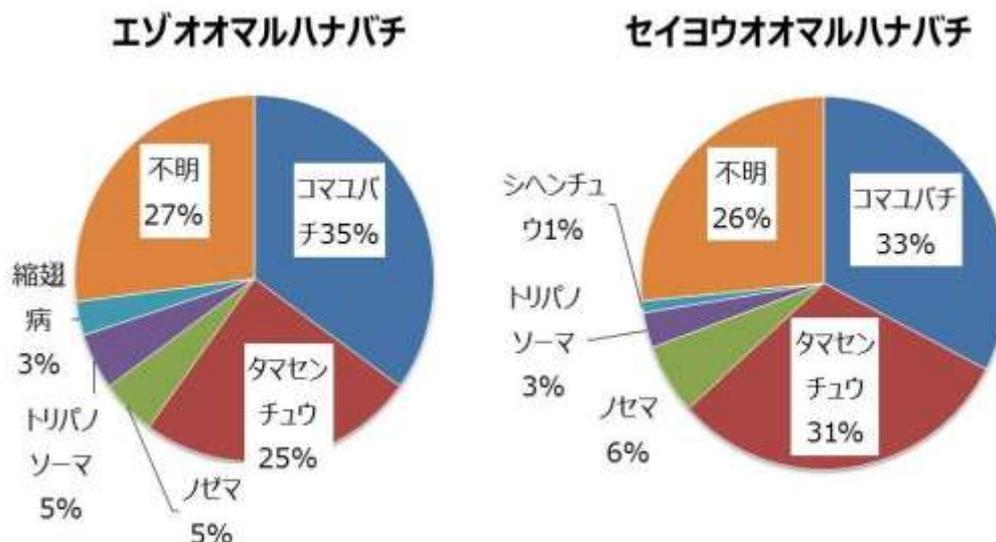
今回国内で見つかったミツバチのノゼマ病は、大量死を引き起こすような系統ではなかったが、非意図的に強病原性型のノゼマが侵入する可能性もある。実際に2008 年には、オーストラリアからの輸入ミツバチから本種が検出されている。国内でノゼマ病による大量死を防ぐためにも、今後も継続してミツバチおよびマルハナバチ類における浸潤調査を行いながら、防御体制を構築していく必要があることが示唆される結果を得た。

(4) エゾオオマルハナバチの大量増殖を目的とした飼育コロニーにおける死亡要因の調査

飼育実験中に死亡したエゾオオマルハナバチ女王蜂の死亡要因の調査結果を図(1)-20に示した。セイヨウオオマルハナバチは、コマユバチが33%、タマセンチュウが31%、ノゼマが6%、トリパノソーマが3%、シヘンチュウが1%、不明が26%であった。エゾオオマルハナバチでは、コマユバチが35%、タマセンチュウが25%、ノゼマが5%、トリパノソーマが5%、縮翅病が1%、不明が27%であった。今回マルハナバチで確認されたノゼマも、本来はマルハナバチ類を宿主としていなかった*N. ceranae*の寄生であった。

本来新型と言われている*N. ceranae*は、中国原産のトウヨウミツバチを宿主としていたが、セイヨウミツバチの輸出入に伴って世界各地に分散していったと考えられている。北海道にはニホンミツバチが生息していないため、セイヨウミツバチ群から在来マルハナバチに水平感染した可能性が高いことが示唆された。今回の調査により、在来マルハナバチの初期コロニーの死滅要因の解明を試みた結果、少なくとも80%を超えるエゾオオマルハナバチコロニーは、病原微生物の感染により死亡している可能性が高いことがわかった。特にこれまで注目されていなかった新規病原体が海外からもたらされた可能性が高く、海外から輸入されたミツバチから、在来のマルハナバチに浸潤していることが示唆される結果を得た。人の経済活動と輸送手段の発達により、人やさまざまな物が国境を越えているため、新しい病害虫が侵入するリスクも当然以前よりも高くなっている。

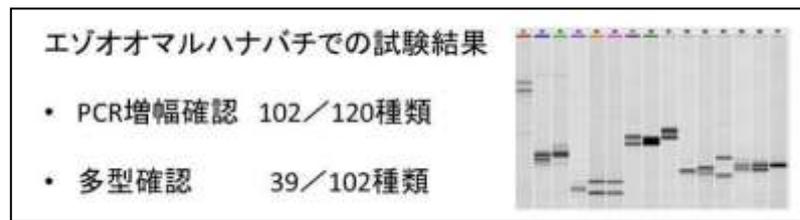
マルハナバチは、自然環境の保全や農業にとって欠かすことのできない生物である以上、今後新たな病原体が海外から侵入するリスクに対して防衛計画を構築する必要がある。病原微生物の海外からの持ち込みを注意深く監視することで、国内における感染拡大による大量死や減少を未然に防ぐことができると思われる。



図(1)-20 飼育下のマルハナバチコロニーの死亡要因

(5) マイクロサテライトDNAマーカーの開発

エゾオオマルハナバチからDNAライブラリーを作成し、多型解析に利用できるマイクロサテライトDNAマーカーの探索・開発を行った。自動電気泳動装置QIAxcelにより分析した結果を示した(図(1)-21)。



図(1)-21 マイクロサテライトDNAの解析結果

PCRの増幅は120種類のうち102種で成功した。さらにこの102種類の中から、多型を示す遺伝子座の探索を行ったところ、39種類で多型が存在することがわかった（高橋ら、投稿中）。

(6) エゾオオマルハナバチにおけるDNAマイクロサテライトマーカーの試験

マルハナバチ各種で開発されたマイクロサテライトDNAマーカーの各遺伝子座の解析結果を表(1)-9に示した。表では、エゾオオマルハナバチでPCR増幅に成功し、グラジエントPCRにより決定したアニーリングの最適温度とアレルサイズ範囲を示している。これらの結果から、合計63種類のマイクロサテライトDNAマーカーを試験した結果、57個のマイクロサテライトDNAマーカーが適用できることが示された。

表(1)-9 エゾオオマルハナバチにおけるマイクロサテライトDNAプライマーの増幅結果

アレル座	Primer sequence(5'-3')	サイズ範囲 (bp)	Tm (°C)	エゾオオ マルハナ バチでの 増幅
BTMS0057	F-TGCTTGAACCGAAATAGAGGG	96-126	60	+
	R-CACCGGCATTTTACACACCA			
BTMS0060	F-CGACCACCGGCGCTCCC	215-314	60	+
	R-CCTTCGTCATCGGCACGCAC			
BTMS0065	F-CATTAACGCGATCGTAGCCG	212-242	50	+
	R-TAACGAACAGCCGGTGAGAT			
BTMS0035	F-CGACGTCGAAGAAAATTGTG	232-272	60	+
	R-GCGAGATTTCCAGACACGA			
BTMS0036	F-TTCAACGCACTCTGTAGTCG	200-248	57	+
	R-CACCGGACTTCGTAATCCAC			
BTMS0044	F-AGGATCGAGAGAACGAGCTG	273-297	60	+
	R-AGGCCTTGGGAGAGTTCG			
BTMS0045	F-GAAATTCCCCACGAAATACG	236-287	60	+
	R-GCGGATACAGTTTCGAGCAT			
BTMS0047	F-TATAGGGTGACCCAGAGTGC	124-148	60	+
	R-CCACAAACAGAGCACGAAAGT			
BTMS0048	F-TTCGCGTTTCATTCTGCCAT	144-172	57	+
	R-TGAAGCGTATTGAAGCGACG			
BTMS0062	F-CTGTCGCATTATTCGCGGTT	259-299	60	+
	R-CTGGGCGTGATTTCGATGAAC			
BTMS0063	F-GTATCATGCTTTGCCGCACT	121-134	60	+

	R-GGTAGACAATGGAACACGGG			
BTMS0066	F-CATGATGACACCACCCAACG	120-174	60	+
	R-TTAACGCCCAATGCCTTTCC			
BTMS0082	F-TCGCGATCTTGGTGATAATGA	381-402	60	+
	R-TCAGACAGAACTGTGGAAAAC			
BTMS0083	F-CGACTCGTTCGAGCGAAATTA	288-324	60	-
	R-GTTTTTGCCAGGCTCCGAAT			
BTMS0114	F-CCATCCGTGATCTTATCGTCG	137-179	50	-
	R-GAAACGTTACGCGTTATTCGG			
BTMS0119	F-GTGCAGCTTCTCGAGGATA	334-372	60	-
	R-GCGCATGCATAAGTCTCGTT			
BTMS0056	F-GCGTCGACATCGCTAATCTG	271-297	60	-
	R-TCCGGCCGTAATTGGTAGAG			
BTMS0113	F-GGGGATGAACGTCGGTTAGA	336-375	57	+
	R-ATCGTCGAGTTGGGTGGAAA			
BTMS0064	F-AAGCAGCGAAACAGAAGCTC	253-293	57	+
	R-CGGCATCGCCTTCTTCTTTT			
BTMS0043	F-GCCCAAAGATCGTGTCTGAT	138-175	50	+
	R-CTCGCGTTTTCTCCTAGTGG			
BTMS0104	F-TCCTCTGTTTCAGCACACGAT	271-292	50	-
	R-TTCGAAGCCTCGATGTCGT			
BTMS0124	F-CGCCGTAATGTAACTCC	242-324	54	+
	R-ACTCAATCCAAACGCCACC			
BTMS0059	F-GGCTAGGAAAGATTAGCACTACC	341-361	60	+
	R-AGTTCGACAGACCAAGCTGT			
BTMS0125	F-TTCGGTGGTAAAAGGAAAGCG	101-135	54	+
	R-CAGAAGGAGCGTTAGGACACAAAC			
BTMS0061	F-CCGAGGATCTCTAGTAGCCG	209-264	60	+
	R-AGCGCATGCTATTACGATCT			
BTMS0071	F-CGCGTAAATTATTCCCCTCCC	213-240	57	+
	R-CCATCTCGCGCAGAATGTTT			
BTMS0109	F-AGCTACCACCGAATCGAGAC	134-178	55	+
	R-TCGTATTTCTCCACCGAACGA			
BTMS0126	F-GGTGATCGCTTAAAGCTC	164-190	50	+
	R-GCCAACTACGTTCAATATCG			
BTMS0132	F-TCTGTCCTCGTTAGACGCATACG	103-135	57	+
	R-GGAGCAACAAACCCTGAAAGC			
BTMS0136	F-GCATTCGGGTATTGCGTTCTTTAG	155-185	51	+
	R-CGTTTATCTGCTTCTCTCGTTTCG			
BTMS0141	F-CCACATCCTCCAACCTCCTTTC	91-173	54	+
	R-GCGAGAGAATGAATGGTAGAACCG			
BTMS0152	F-ACTTTTATTGTCGTTTCTTG	166-200	52	-
	R-GGGATATAGTGAACCAGAAA			
BTMS0139	F-CGCTCGCTCAGAAAACCTTCC	124-156	55	+
	R-CGACGAGAAAAAATCGGTCTCAAG			
BTMS0069	F-GATGCGAGATAAAGCGTCGG	198-254	55	+
	R-GACAAAGCAGCCATCTCCAC			

BTMS0133	F-CCACTCATACGCATTTGTGAAG R-GGACTGAAATTGCCACTATAAGC	114-146	51	+
BTMS0127	F-TGACTCTCGACGATTACG R-ACGCTTAAACTCGCATCG	207-237	51	+
BTMS0148	F-CTCTTTTGTTCCTCGTGTCT R-TGCATAAAAATGTTACAGTGC	213-267	52	+
BTMS0128	F-GATTTCCGATTCAGCCCTGC R-TTATGCGACGATTCCCCTGG	179-208	55	+
BTMS0153	F-ATTTCTGATGACCGACTAAA R-TATTCCTGATCAGCGTTAAG	241-273	52	+
BTMS0150	F-CATTTCCCATTCTTAATCT R-CTGCAATTGACGTATTGTAA	223-249	51	+
BT11	F-AAGAGAGAGACAGAGAGAGATAGGG R-GCGTTTTGACGATTAGATTAGAGCC	128-140	52	+
BT28	F-TTGCTGACGTTGCTGTGACTGAGG R-TCCTCTGTGTCTTCTTACTTGCC	181-196	53	+
BL01	F-GCGTCGAGAACTATCTAGGAGAG R-CGAAGATTCCCAAACCTGCG	111-117	52	+
BL08	F-ATGTTGCAGCACCTTCGTGG R-AATTAAGGCGTGCGCTCGC	142-148	53	+
BM5	F-TGCACCAGCAGTGCACGTTA R-ACAGCTGTTGGTATCGAGCAAAGG	268-274	60*	+
BM7	F-TGGGAATGTGCAATGGAGGACTGT R-ACGCTCGCGAGACTTCGACA	159-165	60*	+
BM12	F-CGAGGCGTTTCAGCCTGGGG R-TTGCGAAACTCCGGCACCGA	233-239	60*	+
BA3	F-AGGCAACGTCGGAAGGGGGT R-GTACACGCAGCCTGCAGACGA	221-225	48	+
BA9	F-AGCAGCGCGAGAAGGGGAGA R-GCCACCCTCCTGTAAGCCGGA	110-126	48	-
BA12	F-ACGCGCTCTTTATTTCCGCGA R-AACGACCACTACCAGCGGGC	158-168	60	+
B10	GTGTAACCTTCTCTCGACAG GGGAGATGGATATAGATGAG	188-217	52	+
B11	GCAACGAAACTCGAAATCG GTTTCATCCAAGTTTCATCCG	143-168	52	+
B126	GCTTGCTGGTGAATTGTGC CGATTCTCTCGTGTACTCC	150-184	57	+
B131	GATCGCCTATCTCTTCTCGG GAGGCGCTGTGAGCTC	117-131	54	+
B100	CGTCCTCGTATCGGGCTAAC CGTGGAACGTCGTGACG	146-178/130-138*	58	+
B96	GGGAGAGAAAGACCAAG GATCGTAATGACTCGATATG	230-248/228-240*	52	+
B119	GATCGTGCTAGAAAAGGAAG CCACAGTGCAAAGTTTCTG	130-136/158-182*	52	+
B121	GAACATGTGGAACGACGG	160-170/162-163*	52	+

	GAACAATCGATATGTCACCG			
B132	GAAATTCGTGCGGAGGG	151-183/154-168*	58	+
	CAGAGAACTACCTAGTGCTACGC			
B116	GAATCAGGAGGCGCACG	172-176	58	+
	CGCAGCCTAAGCCACG			
B118	CCTAAGTCGCTATATCTTCG	201-223	58	+
	GAAACACGTATCTACATCTACAG			
B101	CGACTGTCGCGGTCTAAG	-	58	+
	GATCGCTATGTCAACAGCAG			

プラス(+)は、エゾオオマルハナバチで使用可能なプライマー、マイナス(-)は解析またはPCR増幅ができなかったものを示している。

(7) エゾオオマルハナバチとセイヨウオオマルハナバチの判別プライマーの開発

外部形態およびミトコンドリアDNAの解析から同定したサンプルを使用した結果、PCRの増幅の有無およびPCR増幅産物長の違いで2種を識別できるプライマーの作成に成功した。プライマーの配列は、表(1)-10に示した。反応条件は、PrimeStar酵素(Takara)を使用し、プライマーのアニールリング温度は60°Cの3ステップ反応で、QIAXcel自動電気泳動装置による電気泳動で2種を識別できることが分かった。そのためこの条件下で多サンプル解析をしたところ100%の識別成功率を示した(表(1)-11)。このプライマーを使用することで、女王蜂の受精嚢(貯精嚢)内精子の分析による種間交雑の頻度推定や雑種個体の存在の有無の判定などに使用できることプライマーの作成に成功した。

表(1)-10 判別プライマー

名前	配列
LWRhBhsF1	F:TATGGACGATGACAATGATT
LWRhBtF1	F:TATGGACGATGACGATGATC
LWRhBhBtR1	R:ATTCTTCTCGTGGCAGCTA

表(1)-11 判別プライマーを用いた判別率

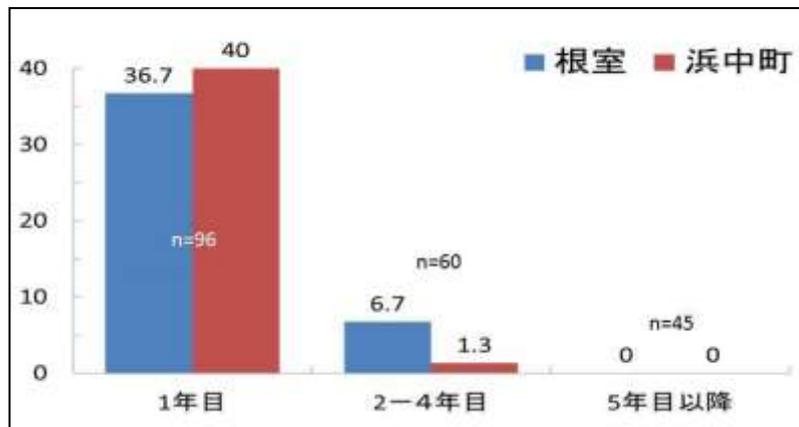
外部形態およびミトコンドリアDNA解析からの同定結果	新規PCRプライマーによる識別正答率
セイヨウオオマルハナバチ (n = 20)	100%
エゾオオマルハナバチ (n = 50)	100%

(8) 種間交雑の調査

セイヨウオオマルハナバチが導入された当初から在来マルハナバチとの種間交雑による問題が懸念されていた。種間交雑は、遺伝子汚染の問題や繁殖干渉による在来マルハナバチの不妊化個体の増加により、個体数の減少が危惧される。そこでアドバイザーからの指摘により交雑頻度の調査の追加実験を行った。

調査地は、根室市および浜中町とした。侵入直後は高い交雑頻度を示していたが、年数が経つにつれて種間交雑頻度は減少していた。これはおそらく、交雑のしやすい系統同士がいなくなっ

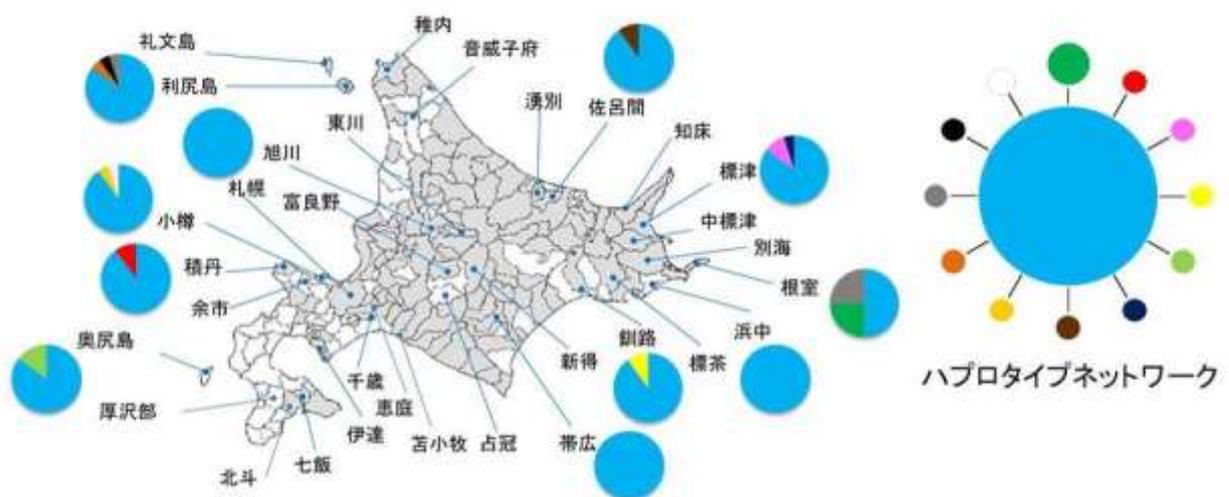
た結果、繁殖隔離が完全に進んだことが予測された。また、セイヨウオオマルハナバチのコロニーの働き蜂の遺伝子型を解析したが、交雑を示す個体は見つからなかった(図(1)-22)。



図(1)-22 種間交雑の頻度 (セイヨウオオマルハナバチの女王蜂×エゾオオマルハナバチの雄蜂)

(9) 遺伝的多様度への影響

今回32個体群中11個体群のエゾオオマルハナバチのミトコンドリアDNAのC01部分配列を決定することができた。その結果は、図(1)-23に示した。全部で12個のハプロタイプが見つかった。ハプロタイプ間にはすべて1塩基置換が見られた。個体群間におけるメジャーハプロタイプの頻度には大きな差が見られなかった。



図(1)-23 北海道の地域集団間のハプロタイプ頻度とハプロタイプネットワーク

マイナーハプロタイプは、地域間で特徴的なタイプが一部見られたが、これはサンプリング数の偏りによるものか、あるいは実際の個体群間の分化を示しているのか確定できなかつた。これには追加サンプルの解析が必要になる。これらの結果からは、仮にエゾオオマルハナバチが実用化され、一部の個体が野生個体と交配した場合であっても大きな影響にはならないことが示唆される結果となった。

(10) マルチプレックPCRによる遺伝子型判定法の確立

前年から試験をしたプライマーの中で増幅効率の良く、多型性の高かった57種類のプライマーの中から11個選別し、マルチプレックPCRによるハイスループット多型解析方法の確立をした。これにより11種類のプライマーは、2種類のセット1と2を作成することに成功した（表(1)-12および表(1)-13）。これにより、2回のPCRにより11個のアレル座を解析することができるようになり、遺伝子型解析の迅速化に成功した。以後はこの方法で遺伝子型を解析した。

表(1)-12 SET 1 の蛍光プライマーリスト

プライマー名	配列(5'-3')	蛍光色素
B11F	GCAACGAAACTCGAAATCG	VIC
B11R	GTTTCATCCAAGTTTCATCCG	
B96F	GGGAGAGAAAGACCAAG	NED
B96R	GATCGTAATGACTCGATATG	
B119F	GATCGTGCTAGAAAAGGAAG	PET
B119R	CCACAGTGCAAAGTTTCTG	

表(1)-13 SET2の蛍光プライマーリスト

プライマー名	配列(5'-3')	蛍光色素
BTMS0062F	CTGTCGCATTATTCGCGGTT	FAM
BTMS0062R	CTGGGCGTGATTTCGATGAAC	
BTMS0065F	CATTAACGCGATCGTAGCCG	VIC
BTMS0065R	TAACGAACAGCCGGTGAGAT	
BTMS0125F	TTCGGTGGTAAAAGGAAAGCG	FAM
BTMS0125R	CAGAAGGAGCGTTAGGACACAAAC	

(11) 糞からのDNA抽出方法の確立

糞から抽出したDNAを鋳型にしてPCRを行ったところ鋳型量により成功率に差がみられた（表(1)-14）。鋳型にするDNA量は、希釈系列(0.1 μ l、0.2 μ l、0.4 μ l、0.6 μ l、0.8 μ l、1.0 μ l、1.5 μ l、2.0 μ l)のうち量が多いほど成功率が上昇する傾向がみられた。最も成功率が85%以上の高くなったのは、0.6 μ lから1.5 μ lの間となった（表(1)-14）。0.1 μ lから0.4 μ lおよび2 μ lは、成功率が70%以下と低くなった。0.1 μ lから0.4 μ lは、DNAが単離できなかったこと、反対に2 μ lは、交雑物によるPCR阻害によるものと予測された。

表(1)-14 鋳型DNA量とPCR成功率

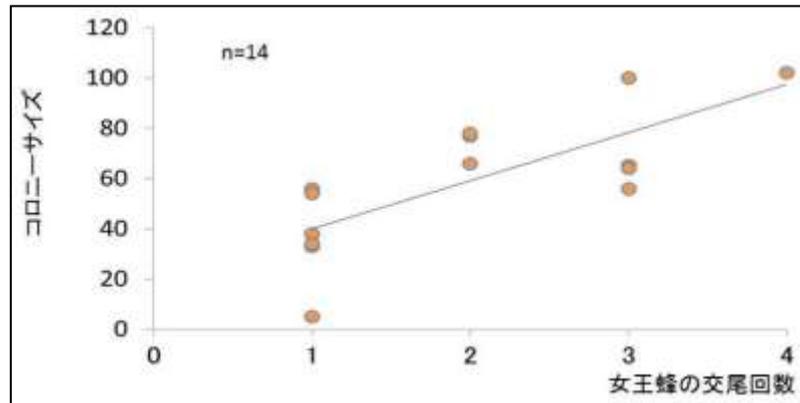
鋳型DNA量	0.1 μ l	0.2 μ l	0.4 μ l	0.6 μ l	0.8 μ l	1.0 μ l	1.5 μ l	2.0 μ l
成功率 (%)	50%	65%	65%	85%	85%	90%	90%	70%

(12) 女王蜂の交尾回数との相関形質

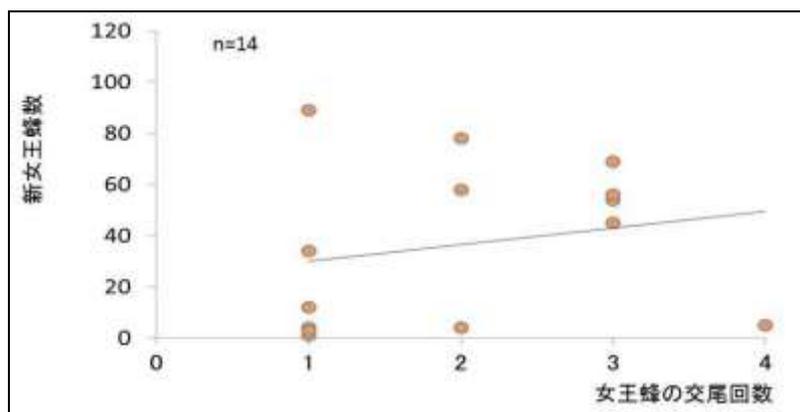
遺伝マーカーを利用した選抜育種をするために、女王蜂の交尾回数についてDNAマーカーを利用して解析し、コロニーサイズや繁殖個体の生産数の評価形質となるかどうか探索を行った。女王蜂の交尾回数とコロニーサイズについて解析した結果を示した（図(1)-24）。女王蜂の交尾回数

とコロニーサイズの間には、正の相関関係がある可能性が示唆された。ただし、調査個体数が少ないため、今後さらにサンプル数を増やす必要がある。

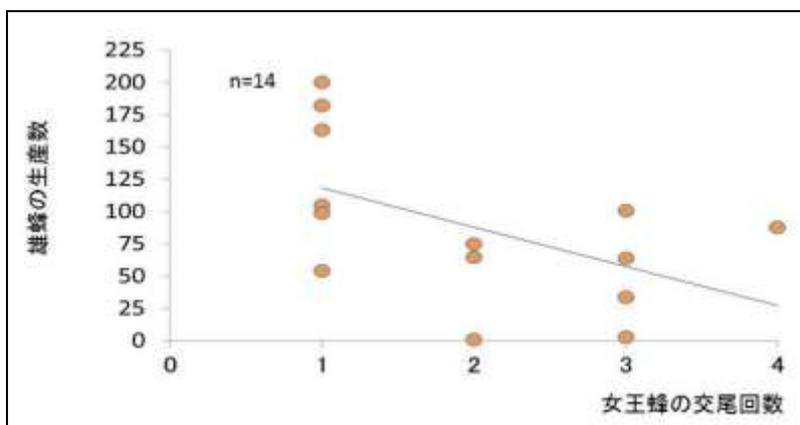
女王蜂の交尾回数と新女王蜂の生産数について解析した結果を示した（図(1)-25）。女王蜂の交尾回数と新女王蜂の生産数の間には、正の相関関係の可能性がないことが示唆された。ただし、調査個体数が少ないため、今後さらにサンプル数を増やす必要がある。



図(1)-24 女王蜂の交尾回数とコロニーサイズ



図(1)-25 女王蜂の交尾回数と新女王蜂生産数



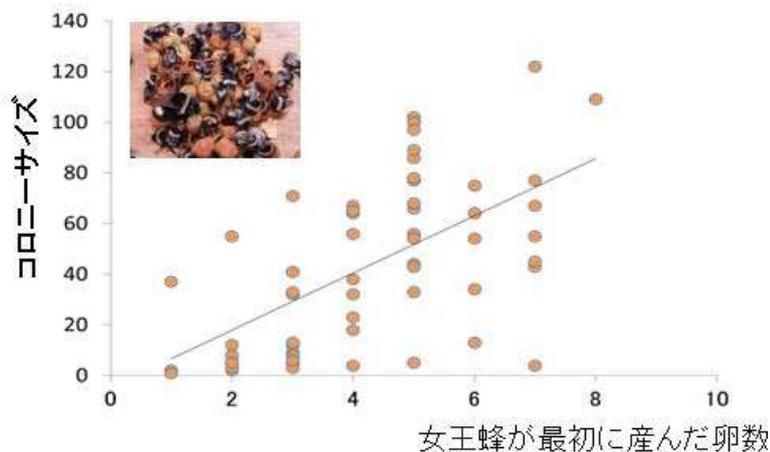
図(1)-26 女王蜂の交尾回数と雄蜂生産数

女王蜂の交尾回数と雄蜂の生産数について解析した結果を示した（図(1)-26）。女王蜂の交尾回数と雄蜂の生産数の間には、負の相関関係がある可能性が示唆された。ただし、調査個体数が少ないため、今後さらにサンプル数を増やす必要がある。

これらの結果から、女王蜂の交尾回数は、コロニーサイズ（働き蜂の生産数）と正の相関関係があることが示唆されたため、人工飼育下で複数の雄蜂との交配させることでコロニーサイズの大きくすることが可能であることがわかった。これは、特定の系統を選抜して多産系統を造成する以外の方法として、複婚をさせることによりある程度までコロニーサイズを大きくすることが可能であることが示唆される結果となった。また、雄蜂数は負の相関関係となる可能性があるため、ポリネーション用を使用する場合には、雄蜂よりもコロニーサイズが大きいことが重要であることから複婚させる方法を開発することが重要になることも示唆された。

(13) コロニーサイズ大型化への選抜育種

今回11種類のマイクロサテライトDNAマーカーにより女王蜂の産卵能力（数）を識別し、コロニーサイズの大型化選抜を行うための遺伝マーカーとして利用できることが明らかになった。最終的なコロニーサイズは、女王蜂が最初に産卵した卵数と正の相関を示し（図(1)-27）、遺伝率も高い値を示すことが今回初めて明らかになった（表(1)-15）。



図(1)-27 コロニーサイズと最初の産卵数

改良したBLUP法により飼育初期の女王蜂の糞からDNAを単離し、遺伝子型情報を利用することで、効率的な系統選抜（女王蜂の産卵能力が高い系統）を作出する方法を開発することができた。

表(1)-15 コロニーサイズの遺伝率

世代数	遺伝率	コロニーサイズ (範囲)
1	$h^2 = 1.06$	48.6 (14-131)
2	$h^2 = 0.42$	87.3 (31-127)
3	$h^2 = 0.24$	94.6 (30-129)

(14) トマトハウスでの授粉試験

紫外線カットフィルムが張られたハウス内で定位飛行ができるかどうか確認したところ、観察した全ての個体が定位飛行を行っていた。また、ハウス内を飛翔後に全ての個体が巣箱に戻ることができた。紫外線が減少した状態でも問題なく巣箱への出入りができることがわかった。次に、トマトの花に訪花するかどうか確認したところ、放飼開始から約5分後には訪花する個体を確認することができた(図(1)-28)。そこでバイトマークの付着率(図(1)-28)を測定したところ、2時間後にはすべての花を訪花することができた。これらの結果から、トマトハウス内で訪花活動できることが明らかになった。



図(1)-28 バイトマーク(左)と訪花しているエゾオオマルハナバチ(右)

最後に、セイヨウオオマルハナバチとの授粉能力の比較試験を行った。同じハウス内で同時に訪花し、混在下での観察調査を行ったところ、花上での滞在時間(1花あたりの訪花に要する時間)および訪花数(単位時間あたりの訪花数)を比較したが、両種の間で差は見られなかったことから、同等の授粉能力を有していることが示唆された(表(1)-16)。

表(1)-16 2種の訪花試験結果の比較

調査項目	エゾオオマルハナバチ	セイヨウオオマルハナバチ
花上滞在時間	6.2秒±3.5	5.8秒±2.5
訪花速度	9.1秒±1.8	10.1秒±3.0

(14) エゾオオマルハナバチによる授粉トマトの評価

授粉試験を行ったハウスで収穫されたトマトの品質を一部確認した。従来のマルハナバチによる授粉トマトと同様に高い品質を得ることができた(図(1)-29)。試験協力者の農家からもヒアリングしたところ、通常のマールハナバチ授粉によるトマトと比較しても問題ない品質であるとの評価を得ている。



図(1)-29 エゾオオマルハナバチ(左)とホルモン剤(右)のトマト。右には空洞果戸になっているが、エゾオオマルハナバチでは正常な果実を形成下した

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

これまで飼育および授粉試験が困難であった北海道産在来マルハナバチの中から候補種の選抜を行い、エゾオオマルハナバチにおいて累代飼育方法を確立した。さらにサブテーマ(2)で開発したBLUP育種モデルを使った方法により、DNA情報をもとに選抜育種を行い、コロニーサイズの大形の（産卵能力の高い）系統が選抜可能であることを実証した。BLUPによるDNA育種は、昆虫でも初めての成功結果である。さらに実践試験として、増殖したエゾオオマルハナバチを利用してトマトハウス内での訪花行動調査を行い、授粉能力があることを初めて確認した。またセイヨウオオマルハナバチとの比較試験でも同等の能力があることを初めて確認することができた。

これらの研究成果により、代替種として在来種をBLUPモデルによる育種でコロニーサイズの大形化を行えば、実用化が可能であることを初めて実験的に示すことができた。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

2014年3月に一般財団法人自然環境研究センターで開催されたマルハナバチ利用方針検討会で本研究成果である北海道在来マルハナバチ種の実用化までの予定計画を提示し、外来生物法におけるセイヨウオオマルハナバチの取扱いに関する政策判定に貢献した。当会には、オブザーバーとして環境省および農水省も参加して議論が行われた。

また、2014年11月には、北海道庁農政部、ホクレン農業協同組合連合会、JA北海道が参加し、北海道庁で開催されたエゾオオマルハナバチの実用化に向けた検討会において、本研究成果のエゾオオマルハナバチの実用化に関する研究成果を提示し、特定外来種セイヨウオオマルハナバチの利用規制と在来種への転換を進めるための準備体制の策定に貢献した。

<行政が活用することが見込まれる成果>

エゾオオマルハナバチがトマト授粉に利用できることが今回初めて科学的データをもとに示すことができた。この結果により、北海道庁農政局では、エゾオオマルハナバチ利用普及検討会の協議会（仮称）を設立し、特定外来種であるセイヨウオオマルハナバチの完全規制とエゾオオマルハナバチの普及に向けた生産現場との連携体制をJA、ホクレン、生産者団体の関係機関と調整を行うための準備協議会の設立準備を進めることに活用されることが見込まれる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

※雑誌名は正確に、欧文誌の場合は雑誌の正式な略称で記載すること（IF等の検索の際、支障をきたすため）。

<論文（査読あり）>

- 1) T. NOMURA and J. TAKAHASHI: Heredity, 109, 261-268 (2012)

“Effective population size in eusocial Hymenoptera with worker-produced males.”

- 2) 高橋純一：環境と健康、2月号、12-22 (2014)

「日本におけるミツバチの減少原因について - 本当にミツバチたちは消えたのか-」

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 中村純、高橋純一、木村澄、佐々木正己：現代化学、12月号、67-68 (2013)

「ネオニコチノイドに関する山田論文の問題点について」

- 2) 高橋純一、竹内実、松本耕三、野村哲郎：京都産業大学先端科学技術研究所所報、第12巻、9-68 (2013)

「ミツバチおよびマルハナバチにおける微孢子虫の浸潤状況」

- 3) 野村哲郎、高橋純一、竹内剛：京都産業大学先端科学技術研究所所報、第12巻、45-58 (2013)

「ハチ類の育種へのBLUP法による選抜の導入」

- 4) 野村哲郎、高橋純一、竹内剛：京都産業大学先端科学技術研究所所報、第13巻：17-23 (2014)

「不完全な繁殖隔離下におけるハチ類の選抜育種の効率の評価」

- 5) 高橋純一、竹内実、松本耕三、野村哲郎：京都産業大学先端科学技術研究所所報、第14巻、印刷中、(2015)

「マルハナバチおよびミツバチにおけるマルチプレックスPCR用マイクロサテライトDNAマーカーの開発」

- 6) 野村哲郎、高橋純一、竹内剛：京都産業大学先端科学技術研究所所報、第14巻、印刷中、(2015).

「ハチ類の系統維持のための交配様式」

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 野村哲郎、高橋純一：第72回日本昆虫学会(2012)

「BLUP法を用いた選抜計画のミツバチ育種への導入」

- 2) 高橋純一：第3回機能性健康食品研究会(2012)

「ミツバチ・マルハナバチの生態と大量死の原因について」

- 3) 高橋純一：平成24年度四国地区養蜂研究会(2012)

「授粉用ハチ類の病気対策と栄養管理」

- 4) 高橋純一：平成24年度東海地区養蜂研究会(2012)

「ミツバチ・マルハナバチ類の繁殖生態について」

- 5) 高橋純一：京都府私立中学校高等学校理科学研究会(2013)

「ミツバチ・マルハナバチの生態と環境保全」

- 6) 高橋純一：第73回日本昆虫学会(2013)

「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」

- 7) 高橋純一、竹内剛、中川修二郎、手塚俊行、野村哲郎：日本昆虫学会近畿支部会(2014)

「エゾオオマルハナバチの室内飼育コロニーによるトマト訪花試験」

- 8) 竹内剛、清拓哉、高橋純一：第59回日本応用動物昆虫学会大会(2015)

「授粉用昆虫としてのエゾオオマルハナバチの適正」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 大阪府立伯太高等学校におけるスーパーサイエンスパートナーシップ特別授業「社会性ハチ類の生態と機能利用について」（2012年6月21日、聴講者約50名）
- 2) 一般公開シンポジウム「ミツバチ・マルハナバチの大量死滅原因と農薬について」（主催：ファーム・エイド銀座ミツバチフォーラム、2012年7月21日、紙パルプ会館、観客約100名）にて講演
- 3) 一般公開シンポジウム「社会性ハチ類の生態と農業利用について」（主催：大阪市立自然史博物館自然史オープンセミナー、2012年9月22日、大阪市立自然史博物館、観客約100名）にて講演
- 4) 一般公開シンポジウム「ミツバチ・マルハナバチの生態と農業利用について」（主催：サイエンスカフェ、2012年10月8日、大阪府立伯太高等学校、観客約50名）にて講演
- 5) 一般公開シンポジウム「社会性ハチ類の生態と管理法について」（主催：名古屋学院大学ミツバチプロジェクト、2012年11月27日、名古屋学院大学、観客約30名）にて講演
- 6) 第29回いのちの科学フォーラム市民公開講座「21世紀の養蜂学—新しいハチをつくる—」（主催：公益財団法人体質研究会、2013年4月20日、稲嶺ホール、観客約100名）にて講演
- 7) 京都産業大学教養講座「社会性ハチ類の生態と生物多様性」（主催：京都産業大学、2013年6月29日、産業館、観客約100名）にて講演
- 8) 第40回京都府はちみつ品評会「授粉用ハチ類をどのように増やし、衛生管理をするのか」（主催：京都府養蜂組合、2013年8月2日、観客約30名）にて講演
- 9) 一般公開シンポジウム「ミツバチ・マルハナバチの農業利用」（主催：社団法人ふくい農林水産支援センター、2013年8月20日、観客約50名）にて講演
- 10) 島根県立浜田高等学校における特別授業「社会性ハチ類の生態とDNA抽出とPCR実験」（2012年9月21日、聴講者約50名）
- 11) 一般公開セミナー「社会性ハチ類の生態について」（主催：大阪府、2013年12月1日、観客約30名）にて講演
- 12) 京都府立須知高等学校における特別授業「ミツバチ・マルハナバチの生態と生物生産」(2014年5月29日、聴講者約50名)
- 13) 一般公開シンポジウム「ミツバチ・マルハナバチの農業利用」（主催：社団法人ふくい農林水産支援センター、2014年8月26日、観客約50名）にて講演
- 14) 一般公開シンポジウム「第1回全国学生養蜂サミット」（主催：名古屋学院大学、2014年10月13日、観客約100名）にてコメンテーターとして参加

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) NHK Eテレ モリゾー・キッコロ森へ行こうよ！（2013年5月4日、蜂の生態について紹介：番組の監修）
- 2) テレビ朝日 素敵な宇宙船地球号 鎌倉あじさい～生命の色38億年～（2013年7月21日、蜂の生態について紹介、5分ほど出演）
- 3) KTNテレビ長崎（2013年9月20日、蜂の生態について紹介、5分ほど出演）
- 4) 京都三条ラジオカフェ（2013年9月29日、蜂の生態について紹介、30分ほど出演）

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

特に記載すべき事項はない。

(2) 育種モデルの確立に関する研究

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 竹内 剛

平成24～26年度累計予算額：1,500千円（うち、平成26年度予算額：550千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

これまで実用化が困難であった在来マルハナバチの育種モデルとしてBLUP法による選抜モデルについて、統計遺伝学的手法に基づく選抜育種（BLUP選抜）を適用し、セイヨウオオマルハナバチの代替種として利用し得る高受粉能力を有する在来マルハナバチの系統を作出することを目的として企画した。現在、動物育種で開発されたBLUP 選抜法は、家畜育種において広く利用され、さらに一部の植物や魚類の育種にも利用され、BLUP 法による予測育種価に基づく選抜（BLUP選抜）は、経済形質の遺伝的改良に目覚ましい成果を上げてきたが、昆虫の育種への実際的な適用は本研究が世界初の試みである。しかしながら、ハチ類においては遺伝ならびに繁殖上の2つの特性、すなわち半倍数性の性決定様式および一妻多夫制の繁殖様式によって、BLUP 選抜の適用が他の家畜に比べて立ち遅れている。本研究では、マルハナバチに固有の遺伝ならびに繁殖上の特性を考慮に入れたBLUP 法の計算アルゴリズムを開発した。さらに、BLUP 選抜によるコロニーサイズの大きなエゾオオマルハナバチの系統の試験的作出に成功したことから、系統選抜に実用的であることを実証することができた。

[キーワード]

BLUP、マルハナバチ、育種価、遺伝率、統計遺伝学

1. はじめに

北海道には、日本で最もマルハナバチの種多様性が高い地域である。そのなかには多数の固有種も含まれており、これらの在来マルハナバチは北海道の固有の生態系において極めて重要なニッチを占めている。在来の動植物で構成される生態系を保全しながら、在来マルハナバチを用いた環境調和型のポリネーション事業を展開することが必要である。そのためには、道内に分布する在来マルハナバチのなかから新たにポリネーターとして好適な種を見出し、高受粉能力を有する系統を作出する必要がある。マルハナバチは、同一種内においても巣の規模や生態に地域個体群の内外で非常に大きな変異があり、その性質は一様ではない。在来マルハナバチの実用化・商品化のためには、このような変異を有効に利用し、巣の規模が大きく受粉活動を活発に行う高受粉能力を有する系統を選抜育種し、大量増殖や安定した供給を可能にする技術の開発が必要である。

2. 研究開発目的

家畜動物で実用化されているBLUP法による選抜育種を利用する。この手法による育種改良は、他の家畜動物（野乳類）での例では、正確で効率的な選抜が期待できるが、世界的にみても昆虫

では適用された例はなく、成功すれば画期的な手法となる。予備的な解析では、BLUPによる選抜は、マルハナバチの生態的な特性（半数倍数性の性決定システムや真社会性による世代交代）に合わせて改良すれば可能であることが示唆されている。遺伝子情報や飼育によるデータを元に繁殖能力や累代飼育に順化した系統を選抜する。これらの系統の中からトマトハウスでの授粉試験を行い、さらに授粉能力の高い系統を作出する。累代飼育およびトマト生産に適した形質を改良する事で、このエゾオオマルハナバチを実用化することができると考えている。

本研究では、北海道在来のマルハナバチをポリネーターとするため、その利用対象となる地域は北海道に限られる。北海道は、特に秋期に収穫されるトマトの生産量が全国で最も多く、過去にはそのポリネーションのために外来種セイヨウオオマルハナバチの利用が非常に盛んな地域であった。このことから、北海道におけるマルハナバチ需要は非常に高いものと想定される。セイヨウオオマルハナバチが特定外来生物に指定され、その利用のためには厳しい手続きが必須になったのに対し、本研究によって実用化が期待されるエゾオオマルハナバチのポリネーション利用にあたっては、農業従事者や市場関係者はこうした手続きを求められない。これらのことから、本研究の成果やその産物であるポリネーション用マルハナバチは、市場および施設栽培の農業の現場において大きな貢献を果たすものと期待される。

3. 研究開発方法

BLUP法（best linear unbiased prediction）は、家畜の育種において、個体の育種価を推定するために広く用いられている。BLUP法の特徴は、飼育で得られた個体の形質データから、環境要因を除いて遺伝的要因だけを取り出すことで、個体の育種価を推定できることにある。

農業植物の受粉に広く用いられているマルハナバチ類においても、BLUP法を利用して受粉効率を高めることが期待されるが、そのためには解決しなければならない課題がある。マルハナバチ類では、雌は受精卵から発生するが、雄は未受精卵から発生する半数倍数性の性決定システムのため、他の家畜動物とは遺伝子の伝達様式が異なるので、よく使われているBLUPモデルを適用することはできない。また、マルハナバチ類のように雌が複数の雄と交尾する生物では、個体の正確な血縁関係が分からないので、それに基づいたBLUP法は用いることができず、複数の父親を仮想的に1頭の雄で代表させるための相加的血縁行列（以下、A行列と表記）の計算アルゴリズムが必要となる。

ハチ類での育種へのBLUP法による選抜の導入は、ドイツの研究グループによって試みられている^{1,2,3)}。彼らは、BLUP法の計算に必要なA行列の計算に際して、ハチ類に固有の性決定ならびに繁殖様式から生じる問題を解決するために、いくつかの仮定を設けることを提案している¹⁾。しかし、それらの仮定は、ミツバチのような大規模な養蜂場で数千から数万群といった大飼育集団を対象としたものであり、1つの試験場や研究機関が実施する小規模なマルハナバチ類の選抜計画には妥当なものではない。

そこで我々は、マルハナバチ類の生態的特性に合わせて小規模な飼育集団にも適用できるA行列の計算法を開発することを試みた。また、飼育実験で得られた結果をもとにしたマルハナバチの育種へのBLUP法の適用について、数値例を用いてモデル解析を行った。

また、実際に育種を行うにあたって、近交弱勢の効果は無視できない。そこで、ある程度外部個体群との交流がある状態での選抜育種を行った際に、近交係数と育種価がどのように変動する

かをシミュレーションによって推定した。

(1) マルハナバチ類へのBLUP法の導入～平均A行列の計算法

はじめにマルハナバチ類にBLUP法を適用するために、複数の個体の形質についての観測値をベクトル \mathbf{y} で表わし、 \mathbf{y} に次のような線形モデルを当てはめてみた。

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\mathbf{b} + \mathbf{Z}\mathbf{u} - \mathbf{e} \quad (1)$$

ここで、 \mathbf{b} は女王蜂の捕獲地域や年次などの母数効果のベクトル、 \mathbf{u} は個体の育種価（変量効果）のベクトル、 \mathbf{e} は残差（変量効果）のベクトルであり、 \mathbf{X} と \mathbf{Z} はそれぞれ母数効果と育種価を観測値と関連づけるための既知の計画行列である

期待値 を E 、分散を Var で表わし、

$$\begin{aligned} E[\mathbf{y}, \mathbf{u}] &= [\mathbf{X}\mathbf{b}, \mathbf{0}] \\ \text{Var}[\mathbf{y}, \mathbf{u}] &= \begin{bmatrix} \mathbf{Z}\mathbf{A}\mathbf{Z}'\sigma_u^2 - \mathbf{R} & \mathbf{A}\sigma_u^2 \\ \mathbf{A}\sigma_u^2 & \mathbf{A}\sigma_u^2 \end{bmatrix} \end{aligned} \quad (2)$$

とする。ここで、 \mathbf{A} は観測値を持たない個体を含めて分析に取り入れられた全個体の間の相対的血縁行列、 \mathbf{R} は \mathbf{e} の分散共分散行列である。また、 σ_u^2 は育種価の分散（相対的遺伝分散）である。

Henderson(1988) は、 \mathbf{u} のBLUP ($\hat{\mathbf{u}}$) が、混合モデル方程式の解

$$\begin{bmatrix} \hat{\mathbf{b}} \\ \hat{\mathbf{u}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{X} & \mathbf{X}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{Z} \\ \mathbf{Z}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{X} & \mathbf{Z}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{Z} + \mathbf{A}^{-1}/\sigma_u^2 \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{y} \\ \mathbf{Z}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{y} \end{bmatrix} \quad (3)$$

によって得られることを示している。 $\hat{\mathbf{u}}$ は、線形モデル(1)と(2)の仮定の下での予測値の中で、最も予測誤差分散が小さく（最良）、しかもその期待値が真値 \mathbf{u} に一致する（不偏）ことが知られている。

本研究では、育種価のBLUPを与える式(3)に含まれるA行列（実際にはその逆行列 \mathbf{A}^{-1} ）の計算に際して、マルハナバチ類に固有の2つの問題が生じるため解決法について分析を試みた。

①マルハナバチ類では、雌（女王蜂とワーカー（働き蜂））は、受精卵から発生するが、雄は未受精卵から発生する半数倍数性の性決定システムのため、哺乳類やカイコなどの家畜動物とは遺伝子の伝達様式が異なる。しかし、半倍数性生物における遺伝子伝達は、哺乳類の性染色体（X染色体）上の遺伝子の伝達と同じ様式である。X染色体上の遺伝子に関するA行列とその逆行列の計算法は、すでに開発されているため⁴⁾、それを応用した。

②マルハナバチ類の繁殖様式は、自然状態では1匹の女王蜂が複数（通常1から5匹）の雄蜂と交尾する典型的な一妻多夫制（polyandry）である。また、本研究の対象種であるエゾオオマルハナバチにおいても、サブテマ(1)の研究結果により、女王蜂が複数の雄蜂と交尾することが明らかになっている。現在、カイコやミツバチの方法を応用して同様にマルハナバチでも人工授精の技術の確立をサブテマ(1)で行っており、交配を人為的にコントロールできるようになってきている。

しかし一般には、精液量を十分に確保するために複数の雄蜂由来の精液を混合して一匹の女王蜂に注入する方法が用いられている。この場合、自然交配と同様に生まれてきた雌の母親（女王蜂）は確定できるが、父親を確定することはできないという問題がある。この問題を解決するために平均A行列の適用を試みた。マルハナバチ類の育種においては、平均A行列を利用することと、DNAマーカーによる解析から父性判定における不確定性の問題が解決できるかどうか検討した。

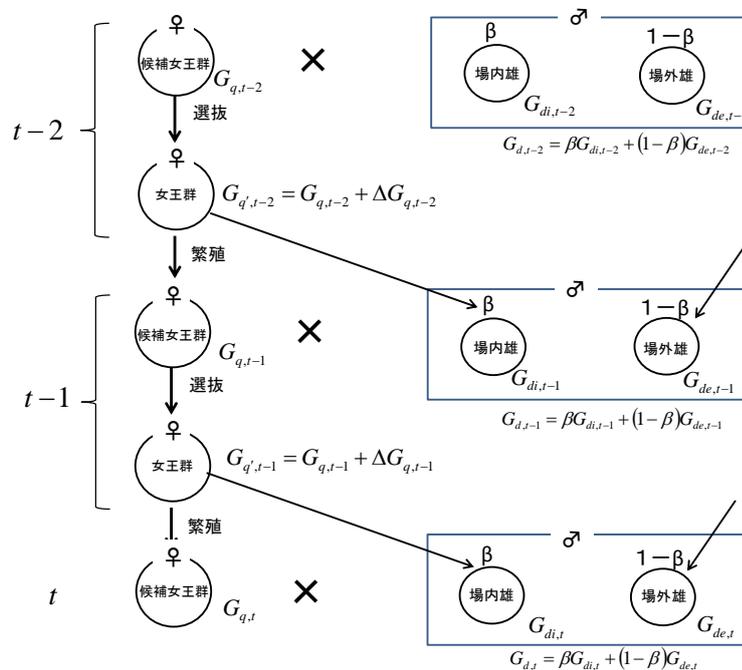
(2) 不完全な繁殖隔離下におけるハチ類の選抜育種の効率と近交弱勢の効果の評価

マルハナバチ類は商品化されて既に20年以上経過しているが、近代育種技術の導入については、他の家畜よりも遅れている。その最大の原因は、交配のコントロールが困難だったことにある。この点について、我々は(1)で人工授精技術を用いたBLUP法を開発しているが、経費や設備の問題から、人工授精を選抜試験において広範に利用することは簡単ではない。

そこで、一般の養蜂施設を想定し、雄の隔離が不完全な場合の選抜育種の効率を評価する理論を開発する。同時に、近親交配の影響も評価する。

1) モデル

想定したモデルの概要を、図(2)-1に示す。毎世代、交配に使われる雄群の割合は、養蜂場内由来：養蜂場外由来 $=\beta:1-\beta$ とする。ここで β は隔離係数である⁵⁾。候補女王は、これらの雄群と自然交配するものとする。候補女王の中から各女王が属するコロニーの形質（コロニーサイズなど）に基づいて、上位の女王が選抜される。選抜された女王は次世代の候補女王と雄を生産する。(2)-1に、本報告で用いる記号とその定義を示しておく。



図(2)-1 想定したモデルの概要

表(2)-1 記号の定義

記号	定義
N_Q	選抜後の女王数
n	1女王が生産する候補女王数
de	1女王あたりの交配雄数（有効数）
β	隔離係数（養蜂場外由来の雄が占める割合）
F_t	第 t 世代の近交係数
ϕ_t	第 t 世代の女王間の共祖係数
$p = N_Q/nN_Q = 1/n$	選抜率
i	選抜強度
$V_{A,t} = (1 - F_t)V_{A,0}$	第 t 世代の相加的遺伝分散
V_E	環境分散
$h_t^2 = (1 - F_t)h_0^2 / (1 - F_t h_0^2)$	第 t 世代の遺伝率
$G_{q,t}$	第 t 世代の候補女王（選抜前）の育種価の平均値
$G_{q',t}$	第 t 世代の女王（選抜後）の育種価の平均値
$\Delta G_{q,t} = G_{q',t} - G_{q,t} = i\sqrt{V_{A,t}}h_t$	第 t 世代の選抜後と選抜前の女王の育種価の差
$G_{di,t}$	第 t 世代の養蜂場内由来の雄の育種価の平均値
$G_{de,t} = G_{d,0}$	第 t 世代の養蜂場外由来の雄の育種価の平均値
$G_{d,t} = \beta G_{di,t} + (1 - \beta)G_{de,t}$	第 t 世代の全雄の育種価の平均値

2) 近交係数

第 t 世代の近交係数（ F_t ）は、養蜂場外の雄が養蜂場内の個体と血縁関係を持たないと仮定すれば、次の二つの漸化式によって計算できる^{5,6}。

$$F_t = \beta \left[\frac{F_{t-1}}{2} + \frac{1}{2N_Q} \left(\frac{1+F_{t-2}}{2} \right) \right] + \left(1 - \frac{1}{N_Q} \right) \left(\frac{\phi_{t-2}}{2} \right)$$

$$\phi_t = \frac{F_t}{2} + \left(\frac{\beta}{2} \right)^2 \left(1 - \frac{1}{N_Q de} \right) \left[\frac{1+F_{t-2}}{2N_Q} + \left(1 - \frac{1}{N_Q} \right) \phi_{t-2} \right] + \frac{1}{4N_Q de} + \frac{1}{4} \left[\left(\frac{1+F_{t-1}}{2N_Q} \right) + \left(1 - \frac{1}{N_Q} \right) \phi_{t-1} \right]$$

3) 遺伝的改良量

遺伝的改良量の計算に当たっては、選抜のスタート時（第0世代）では養蜂場内外で選抜形質に差はないことと、養蜂場外の個体群の遺伝的形質は一定に保たれていることを仮定した。

これらの仮定の下で、第 t 世代の候補女王の育種価の平均値（ $G_{q,t}$ ）と雄の育種価の平均値（ $G_{d,t}$ ）は、

$$G_{q,t} = \frac{1}{2}G_{q,t-1} + G_{d,t-1}$$

$$G_{d,t} = \beta G_{d,t} + (1-\beta)G_{d,t} = \frac{\beta}{2}G_{q,t-1} + (1-\beta)G_{d,t} = \frac{\beta}{2}(G_{q,t-1} + \Delta G_{q,t-1}) + \frac{(1-\beta)}{2}G_{q,0}$$

として得られる。

4) 数値計算

数値計算においては、コロニーサイズを選抜対象とし、以下のパラメータを仮定した。

第0世代の集団平均： $G_{q,0} = 24$

第0世代の遺伝率： $h_0^2 = 0.3$

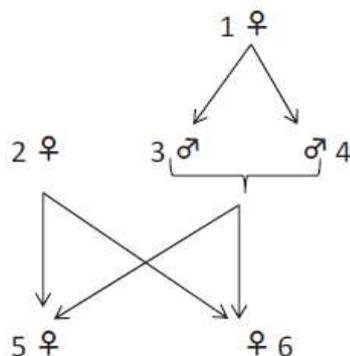
第0世代の相加的遺伝分散： $V_{A,0} = 60$

また、各世代の（選抜後の）女王数 $N_Q = 6$ 、各女王が生産する候補女王数は $n = 4$ とし、女王は1個体あたり $de = 10$ 個体の雄と交配するものとした。選抜率は $p = 1/4$ で、選抜強度は $i = 1.224$ となる⁶⁾。隔離係数として $\beta = 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0$ の5つの場合を想定し、10世代までの近交係数と集団平均（女王の育種価の平均）を計算した。

4. 結果および考察

(1) マルハナバチ類へのBLUP法の導入～平均A行列の計算法

サブテーマ(1)の分析から明らかになった一般的なエゾオオマルハナバチのコロニーの遺伝構造から家系図を作成した（図(2)-2）。

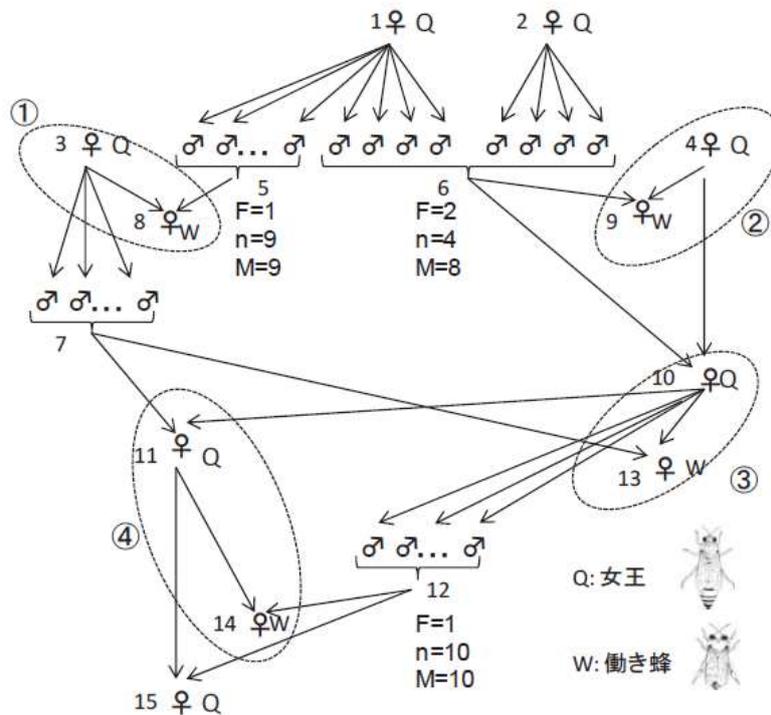


図(2)-2 \bar{A} の説明に用いる家系図

この図においては、雄蜂3と4は雌（女王蜂）1の単為生殖によって生まれ、雌2はこれらの雄蜂と交尾している。したがって、雌5と6の父親は特定できない。

この場合、図(2)-3に示す4つの場合が考えられる。

た、①、②、③および④は コロニー（巣）を示し、コロニー内の雌 8、9、13 および 14 は、多数のワーカーを1匹の平均 的なワーカー（average worker）で代表させたものである。



図(2)-6 計算に用いたエゾオオマルハナバチ集団の家系図

各コロニーの新女王蜂数と捕獲地は表(2)-3に示す。産卵数は、コロニー内のワーカーの効果（直接効果）と女王蜂がフェロモン分泌によるワーカーの産卵抑制効果（母性効果）の複合した形質である。そこで、母性効果モデルを作成した。

表(2)-3 各コロニーの新女王蜂生産数と捕獲した地域

コロニー	産卵数（週間あたり）	女王蜂の捕獲地
1	26	1（札幌）
2	21	2（帯広）
3	43	2（帯広）
4	39	1（札幌）

$$y = Xb + Z_d u_d + Z_m u_m + e$$

ここで、 y は産卵数のベクトル、 b は産地の効果のベクトル、 u_d は直接育種価ベクトル、 u_m は母性効果の育種価のベクトル、 X は産地の効果に関する既知の計画行列、 Z_d は直接効果に関する既知の計画行列、 Z_m は母性効果に関する既知の計画行列、 e は残差のベクトルである。ベクトル y 、計画行列 X 、 Z_d 、 Z_m は以下のとおりとなった。

$$\begin{aligned}
 \mathbf{y}' &= [25.5 \quad 21.0 \quad 43.2 \quad 38.6] & \mathbf{X}' &= \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 1 & 0 \end{bmatrix} \\
 \mathbf{Z}_d &= \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} \\
 \mathbf{Z}_m &= \begin{bmatrix} 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}
 \end{aligned}$$

遺伝的パラメータは、平成24年度のサブテーマ(2)および平成25年度のサブテーマ(1)で得られた値を用いた。直接遺伝率： $h_d^2 = 0.26$ 、母性遺伝率： $h_m^2 = 0.15$ 、遺伝相関： $r_G = -0.88$ 、表現型分散： $\sigma_p^2 = 580.8$ である。混合モデル方程式に代入すると、産地の効果の推定値 (BLUE) と育種価のBLUPを表(2)-4に示した。雌15は、次世代の女王蜂候補 (new queen) であり、産卵数の記録を持たないが、BLUP法ではその能力が育種価として予測することができた。

表(2)-4 産地の効果と育種価の推定値

産地	産地の効果	
1 (札幌)	31.7823	
2 (帯広)	32.2382	
個体	育種価	
	直接効果	母性効果
1	-1.2271	0.8533
2	-0.2409	0.1930
3	1.4207	-0.9753
4	1.9095	-1.6748
5	-0.6752	0.4679
6	-0.3971	0.2857
7	0.8008	-0.5291
8	-0.8892	0.5992
9	-1.5633	0.8684
10	2.1063	-1.5132
11	2.3082	-1.5899
12	1.0695	-0.7612
13	3.4909	-2.3816
14	3.1611	-2.1839
15	2.2241	-1.5565

(2) 不完全な繁殖隔離下におけるハチ類の選抜育種の効率と近交弱勢の効果の評価

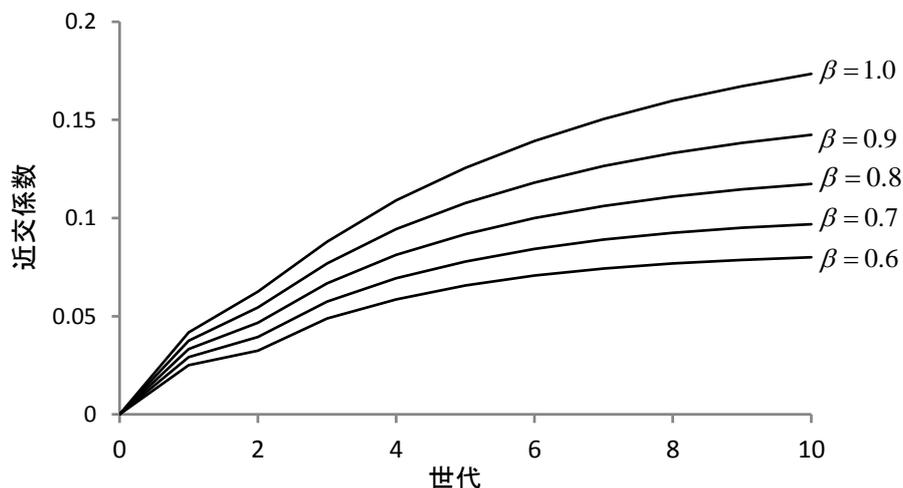
シミュレーションによって得られた、種々の隔離の程度における10世代目までの近交係数の変

化を図(2)-7に示す。養蜂場が場外の雄から完全に隔離されている場合 ($\beta = 1.0$) には、10世代目の近交係数は17%を超えたが、隔離が不完全になるにしたがって、近交係数は低く保たれた。 β が0.8のときには、10世代目の近交係数は12%程度に抑えられた。このように養蜂場外から毎世代雄を介した遺伝子の流入があることは、近交係数を低く保つうえで有効にはたらく。

第 t 世代の集団内の相加的遺伝分散 ($V_{A,t}$) は、集団の近交係数を用いて

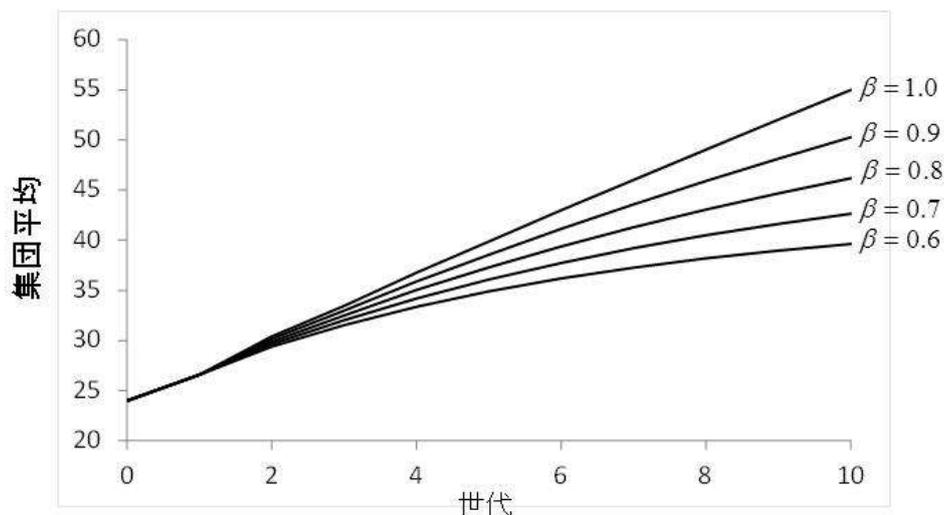
$$V_{A,T} = (1-F_t) V_{A,0}$$

と表すことができる。したがって、養蜂場の不完全な隔離は選抜群の相加的遺伝分散を高く保ち、世代の進行に伴う遺伝的改良量の低下を抑える働きを持つ。一方、養蜂場の隔離が不完全な場合には養蜂場外から雄を介して常に未改良の集団から遺伝子流入があるため、遺伝的改良量が減殺される。



図(2)-7 様々な隔離係数 (β) の下での近交係数の変化

隔離係数が0.6~1.0の場合の10世代目までの選抜形質の集団平均の変化を、図(2)-8に示した。養蜂場の隔離が不完全な場合 ($\beta < 1.0$) には、完全に隔離されている場合 ($\beta = 1.0$) よりも遺伝的改良量は低下する。しかし、 $\beta = 0.8$ 程度の隔離が可能な場合の10世代目までの累積改良量は22.2であり、これは完全な隔離が達成できた場合の累積改良量 (31.0) の約72%に相当する。このことから、養蜂場の隔離が不完全であっても、適切な選抜計画の下では、実用に耐える遺伝的改良が達成できる可能性を示唆している。同時に近交係数も低く保たれるため、近交弱勢の発現も抑えられると期待される。



図(2)-8 様々な隔離係数 (β) の下での選抜形質 (産卵速度) の集団平均の変化

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究によって、マルハナバチ類の育種にもBLUP法は十分に適用できることが明らかになった。BLUP法による選抜は、すでに多くの家畜動物の育種に導入され、目覚ましい成果を上げてきたが、この選抜法は集団の近交度を上昇させる可能性があることが指摘されている⁹⁾。とくに、遺伝率の低い形質を選抜の対象としたとき、家系 (family) の情報に大きなウェイトが置かれるため、近交度の急激な上昇を招くことが分かっている。マルハナバチ類において、近交度の上昇は生産性に大きなダメージを与える可能性がある。マルハナバチ類では、半倍数性の性決定に加えて、性決定遺伝子 (CSD) が性決定にかかわっている。通常、雌はCSD 遺伝子座がヘテロ接合になっているが、ホモ接合となった場合には二倍体の雄となることが知られている¹⁰⁾。二倍体の雄は、発育初期に死亡するか、あるいは発育しても不妊である。近交度が上昇すると、CSD 遺伝子座のホモ接合化が進み、通常はワーカーとして発育するはずの雌の大半が二倍体雄となり、コロニーサイズの小型化を招くが、増殖においては致命的な結果となる。

しかし、本研究によって、不完全な繁殖隔離下で近交係数の上昇を抑制しながらも、実用に耐える程度の形質選抜は可能である可能性が示された。現実的には、マルハナバチ類の選抜飼育は、養蜂場外からある程度の遺伝子流入がある状況で行われるだろう。極端に近親交配が続けられる状況を避けるように注意すれば、実用的な育種は十分に可能であると考えられる。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

サブテーマ(1)と同様である。

<行政が活用することが見込まれる成果>

サブテーマ(1)と同様である他に、絶滅が危惧されている昆虫を含めた多くの動物類にもBLUP

モデルを適用し、遺伝的多様性を維持しながら増殖させる応用生態学的利用も可能であることから、今後生物保全への利用が進むことで生物多様性の保全モデルの構築が可能になる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

特に記載すべき事項はない。

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 野村哲郎、高橋純一、竹内剛： 京都産業大学先端科学技術研究所所報、第12巻、45-58 (2013)
「ハチ類の育種へのBLUP法による選抜の導入」
- 2) 野村哲郎、高橋純一、竹内剛： 京都産業大学先端科学技術研究所所報、第13巻：17-23 (2014)
「不完全な繁殖隔離下におけるハチ類の選抜育種の効率の評価」
- 3) 野村哲郎、高橋純一、竹内剛： 京都産業大学先端科学技術研究所所報、第14巻、印刷中、(2015).
「ハチ類の系統維持のための交配様式」

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 竹内剛： やどりが、233:36-38 (2012)
「本誌230号を読んで～社会の成熟と知的好奇心～」

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 高橋純一、竹内剛、中川修二郎、手塚俊行、野村哲郎：日本昆虫学会近畿支部会 (2014)
「エゾオオマルハナバチの室内飼育コロニーによるトマト訪花試験」
- 2) 竹内剛、清拓哉、高橋純一：第59回日本応用動物昆虫学会大会 (2015)
「授粉用昆虫としてのエゾオオマルハナバチの適正」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 一般公開セミナー「三草山昆虫観察会」（主催：大阪みどりのトラスト協会、2013年6月16日、観客約50名）について講演
- 2) 一般公開セミナー「三草山昆虫観察会」（主催：大阪みどりのトラスト協会、2014年6月14日、観客約50名）について講演

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Bienefeld K, Reinhardt F, Pirchner F (1989) *Apidologie* 20: 439-450
- 2) Bienefeld K, Pirchner F (1990) *Apidologie* 21: 175-183
- 3) Bienefeld K, Ehrhardt K, Reinhardt F (1989) *Apidologie* 38: 77-85
- 4) Fernando RL, Grossman M (1990) *Ther Appl Genet* 80:75-80
- 5) Cornuet JM (1986) Bee genetics and breeding. In TE Rinderer (ed) pp. 235-254. Academic Press
- 6) Becker WA (1992) *Manual of Quantitative Genetics*
- 7) Perez-Enciso M, Fernando RL (1992) *Ther Appl Genet* 84:173-179
- 8) Henderson CR (1988) *J Anim Sci* 66:1614-1621
- 9) 野村哲郎 (2007) 変量効果の推定とBLUP法. 佐々木義之編著 pp. 285-314. 京都大学学術出版会
- 10) Woyke J (1986) Bee genetics and breeding. In TE Rinderer (ed) pp. 91-119. Academic Press

A Study on the Establishment of an Environmental Harmony Tape Pollination Style in the Native Bumblebees

Principal Investigator: Jun-ichi TAKAHASHI

Institution: Faculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University
Kitaku, Kyoto-City, Kyoto 605-8047, JAPAN
Tel: +81-75-705-3132 / Fax: +81-75-705-3132
E-mail: jit@cc.kyoto-su.ac.jp

Cooperated by: School of Life & Environmental Sciences, Osaka Prefecture University

[Abstract]

Key Words: Bumblebee, BLUP, Pollination, Invasive Species, Biodiversity

The European bumblebee *B. terrestris* was recently introduced in Japan for agricultural purposes and has now become naturalized. Today colonies of the species have been used for particularly tomato pollination in almost all parts of Japan and the pollination system coverage rate exceeded 70 percent. The naturalization of the non-native bumblebee *B. terrestris* has resulted in the general decline of native bumblebees and plants across Japan. The Hokkaido Island in Japan is one of the most important habitats for native bumblebees, as 10 of the 15 Japanese species, including the *B. hypocrita*, occur in this region.

We selected to the candidate species common bumblebee *B. hypocrita* from the 10 species of native bumblebees. The results of researches over three years, our group have established an artificial breeding system of native bumblebee. We also developed 150 polymorphic microsatellite loci for the bumblebee, *B. hypocrita*. These loci can be used to study parameters associated with genetic breeding systems, such as BLUP.

Selection on predicted breeding values by BLUP methodology (BLUP selection) has been widely practiced in animal breeding, leading to a remarkable genetic improvement in economic traits. However, the application of BLUP selection to bee breeding has not been as advanced as in other agricultural species due to two distinctive genetic and reproductive peculiarities in bumblebees, i.e., haplodiploid sex determination and polyandrous breeding system. In the present study, taking the two peculiarities into account, we developed a computing algorithm for BLUP in bee breeding. Application of BLUP selection was illustrated with a hypothetical bumblebee population.

We have succeeded in the production of large colony size varieties by BLUP model and breeding system that was developed. This bumblebee was found to be available for pollination of tomato flowers in green house. For example, pollination ability (pollen collection and tomato flower of detection) was found to be at least equivalent to the

existing *B. terrestris*. *B. hypocrita* is an important insect species in both natural ecosystems and agriculture. Accordingly, our results also may yield useful information with respect to the development of the environmentally friendly pollination technology.