

セイヨウミツバチの攻撃的な働き蜂の 脳から同定された Kakugo ウイルス

藤幸 知子, 竹内 秀明, 久保 健雄

ミツバチの攻撃行動について

「ミツバチ科学」の読者の方々には、ミツバチの生活の詳しい紹介は不必要と思われるが、私たちの研究の狙いをご理解いただくために、まずは私たちが注目しているミツバチの生物学的特徴について簡単に述べさせていただきます。ミツバチでは、雌が女王蜂（生殖カースト）と働き蜂（労働カースト）にカースト分化する。また働き蜂は、羽化後の日齢に応じて巣の掃除や育児等の巣内の仕事から、門番を経て、花の蜜や花粉の採集といった巣外の仕事に携わる（齢差分業）(Winston, 1987; Breed, et al., 1990). 私たちは 1993 年から、こうしたミツバチの社会性行動を支える脳の分子的メカニズムを探るために、セイヨウミツバチ (*Apis mellifera* L.) を用いて、脳の領野（脳の部域）選択的に発現する遺伝子や、脳で行動選択的に発現する遺伝子の網羅的な同定と解析を進めてきた (Kamikouchi, et al., 1998; Kamikouchi, et al., 2000; Takeuchi, et al. 2001; Takeuchi, et al., 2002; Sawata, et al., 2002; Park, et al., 2003; Takeuchi, et al, 2004). 今回は、働き蜂の攻撃行動に注目して行なった研究について、特に本誌で紹介したい。なお、ミツバチの脳で高次中枢（キノコ体）特異的に発現する遺伝子の解析結果の一部については、2001 年に、竹内らが本誌ですでに紹介しているのでご参照いただくと幸いである (竹内ら, 2001).

最初にミツバチの攻撃行動がどのようなものか復習してみたい。ハチ類の進化については諸説あるが、一説によると、最初はキバチやハバチのような単独性で植物食の仲間から出発し、

やがて肉食の寄生蜂が出現した際に、宿主を麻酔するために産卵管が針として用いられるようになったとされている。次いで、アシナガバチやスズメバチのような社会性狩りバチや、花の蜜や花粉に全ての食料を依存する植物食のハナバチが出現したとされている (坂上, 1983). 現在のミツバチは、最も高度な社会性を獲得したハチ類として、コロニーを形成し、同じ巣の中で共同して幼虫や蛹を育てるとともに、花粉や花の蜜を加工したハチミツを食料として貯えるという食料戦略をとっている。

巣に貯えられたハチミツに加えて、巣で育てられる幼虫や蛹は、スズメバチや熊など、ミツバチの天敵にとっては栄養価の高い食料になるので、外敵からコロニーを守るためにミツバチは高い攻撃性を有している。この攻撃役を担うのは働き蜂である。働き蜂は自分自身の子孫を残さず、女王蜂が産む子供（働き蜂にとっては妹）の世話をするので、その行動は全般的に「利他的」であるが、中でも攻撃行動は特に「利他的」である。セイヨウミツバチでは、働き蜂の針は外敵に刺さると毒腺とともに働き蜂の体から脱落するためにその個体は早晚死亡するというように、働き蜂が死と引き換えに仲間を守るからである (Dade, 1962; Wilson, 1999). 私たちは、この攻撃性がコロニーの特定の働き蜂（門番蜂）に分配されている点に注目し、ミツバチの攻撃行動に関わる遺伝子候補として、攻撃性が高い門番蜂の脳で特異的に発現する遺伝子を検索することにした。攻撃性を司る脳の分子的メカニズムについては、ミツバチに限らず動物一般について、現在なお明らかではない。攻撃行動がコロニー内の一部の個体によって分業さ

れるという、社会性昆虫の特徴を利用したアプローチ法により、ミツバチひいては動物一般の攻撃性の分子的基盤について、何らかの手掛かりを得ることを期待したのである。この研究の大部分は、今年の2月に、米国のウイルス学雑誌 (Journal of Virology) に出版されているが (Fujiyuki, et al., 2004), 原著論文をご覧いただける機会は少ないと思うので、ここでは、研究の展開と結果をわかりやすく説明したい。

攻撃的な働き蜂の脳で発現する遺伝子の検索と、Kakugo ウイルスの同定

最初に行なったのは、ミツバチの働き蜂を、攻撃性を指標に選別することであった。いろいろと試した結果、門番蜂にオオスズメバチ (ミツバチの天敵) を囿として糸で吊るして提示すると、オオスズメバチに飛びかかってくるものがいたので、これらを攻撃性が高い蜂 (攻撃蜂) として採集した。一方、巣の中の巣板の上にいる働き蜂にオオスズメバチを提示すると、一部の蜂が逃げまどう傾向があったので、これらを逃避蜂として採集した。私たちににとってはそもそも、囿のオオスズメバチを常に入手するのが困難であったが、幸いにも、小野正人先生 (玉川大学農学部) がご供与下さることになり、今日に至るまで、共同研究をさせていただいている。さらには、J. Virol. 誌の掲載誌の表紙や、私たちの研究成果が新聞報道された際には、小野先生が撮影された「天敵オオスズメバチを攻撃するセイヨウミツバチの門番蜂」の素晴らしい写真を使わせていただいた (図 1)。

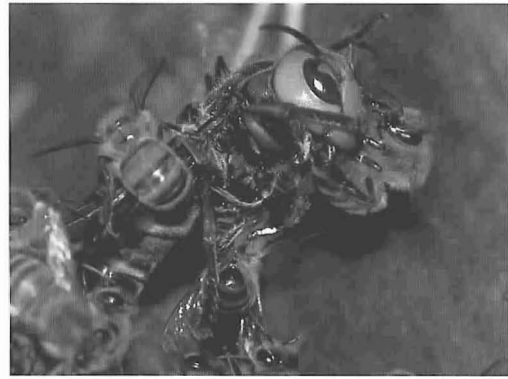


図1 オオスズメバチを攻撃するミツバチ
(撮影: 小野正人)

それぞれ約 100 匹程度の攻撃蜂と逃避蜂の脳から RNA を抽出し、differential display 法により、逃避蜂に比べて、攻撃蜂の脳に特異的に存在する RNA を検索した。Differential display 法は、複数のサンプルについて、いずれかのサンプルに選択的に存在する (発現している) RNA を同定する方法である (Liang and Pardee, 1992)。この方法については、2001 年の総説でも紹介させていただいたので詳細は省略するが (竹内ら, 2001), 逆転写反応と PCR (ポリメラーゼ鎖反応) 法、そしてシーケンスゲル電気泳動を組み合わせることで、片方のサンプルのみに存在する RNA を検索できる。例えば、攻撃蜂の脳で特異的に存在する RNA は、攻撃蜂のレーンに特異的に検出されるバンドとして同定される。攻撃蜂のレーンに選択的に検出された複数のバンドの内、差が最も明瞭だったものについて、ゲルから切り出し、そこに含まれる cDNA をサブクローニングした結果、1 つの

| Kakugo タンパク質 | キャプシドタンパク質 | ヘリカーゼ (%) | プロテアーゼ (%) | RNA 依存 RNA ポリメラーゼ (%) |
|----------------------|------------|-----------|------------|-----------------------|
| サックブルードウイルス (ミツバチ) | | 36 | 29 | 37 |
| スキドクガピコルナ様ウイルス (ガ) | | 24 | 22 | 28 |
| 伝染性軟化病ウイルス (カイコ) | | 23 | 22 | 26 |
| A 型肝炎ウイルス (ヒト) | | 29 | 28 | 28 |
| 口蹄疫ウイルス (ウシ) | | 30 | 18 | 26 |
| ポリオウイルス (ヒト) | | 25 | 23 | 24 |
| 急性蜂麻痺病ウイルス (ミツバチ) | | 23 | 25 | 29 |
| ショウジョウバエ C ウイルス (ハエ) | | 20 | 23 | 30 |

図2 Kakugo RNA のコードするタンパク質と他のピコルナ (様) ウイルスのタンパク質と相同性の比較
各酵素ドメインにおける Kakugo タンパク質と他種ウイルスタンパク質との相同性を % で示す。
各ウイルスの宿主をウイルス名に続けて () 内に示す。

遺伝子が同定され、私たちはそれを *Kakugo* (覚悟) と命名した (Fujiyuki, et al., 2004). 名称は、恰も「覚悟」ができていような攻撃蜂から同定されたことによる。

Differential display 法で同定された *Kakugo* の cDNA は断片であったため、全長の *Kakugo* cDNA を同定し、どのようなタンパク質がコードされるか調べたところ、予想外なことに、*Kakugo* cDNA は色々なピコルナ様ウイルスのタンパク質と相同なタンパク質をコードすることがわかった (図 2). ウイルスゲノムにコードされるタンパク質は、ウイルス粒子の生成に必要な複数のタンパク質を、一つの大きな前駆体タンパク質 (ポリプロテイン) の部分構造 (ドメイン) として含むという特殊な構造をしている。これらのドメインとしては、ウイルス粒子を構成するキャプシドタンパク質、ウイルスゲノムの複製に必要なヘリカーゼとポリメラーゼ、そしてこれらのドメインを切断するプロテアーゼがある (図 2, 3). *Kakugo* RNA のコードするタンパク質には、これらのタンパク質ドメインがすべて備わっていた。ピコルナ様ウイルスはゲノムとして DNA ではなく RNA を持つので、宿主のゲノム DNA 中に挿入され

ることはない。実際、*Kakugo* RNA に対応する DNA も、ミツバチゲノム中には見いだされなかった (Fujiyuki, et al., 2004). このことは、*Kakugo* RNA はミツバチのゲノムにコードされるものではなく、新規なピコルナ様ウイルス (*Kakugo* ウイルス) のゲノム RNA そのものであって、攻撃蜂の脳は、選択的にこのウイルスに感染していた可能性を示唆している。同じピコルナ様ウイルスに属するウイルスとしては、ミツバチのサックブルードウイルスや、ヒトの A 型肝炎ウイルス、ポリオ (小児麻痺) ウイルス、ウシの口蹄疫ウイルスなどがあるが、さらに詳細な系統解析の結果、*Kakugo* ウイルスは昆虫ピコルナ様ウイルスに属する新種のウイルスであることがわかった (図 4). 昆虫ピコルナ様ウイルスは、その名の通り昆虫に感染するが、ヒトを含めた哺乳類への感染は知られていない。

Kakugo RNA がウイルスゲノムと考えられたため、ウイルスとしての性状解析を、東京大学大学院医学系研究科の野本明男教授、大岡静衣助手 (微生物学) と共同で進めた。詳細な説明は省略するが、*Kakugo* RNA が検出される働き蜂の組織の粗抽出液をショ糖密度勾配遠心

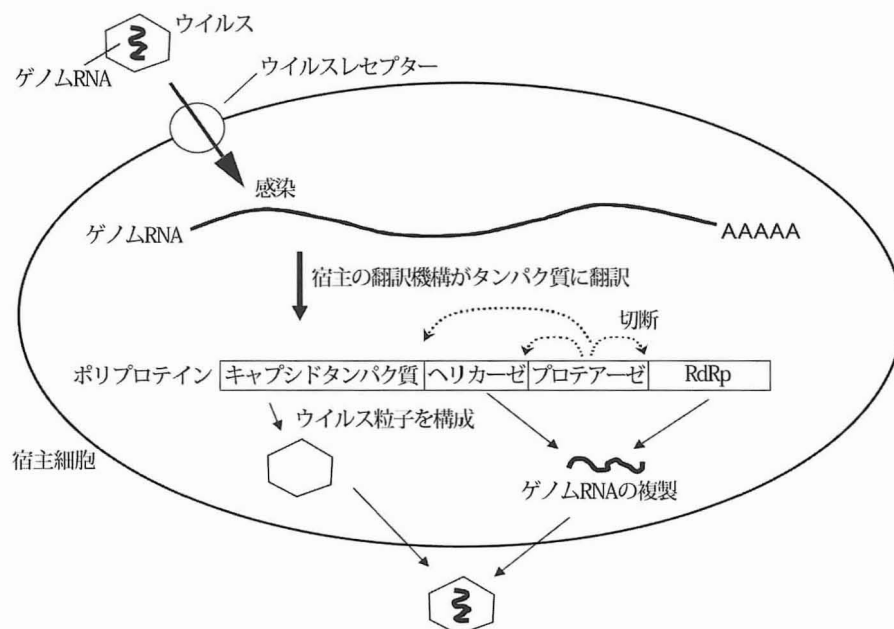


図 3 ピコルナ様ウイルスのゲノム RNA やポリプロテインの構造と複製過程
RdRp; RNA 依存 RNA ポリメラーゼ

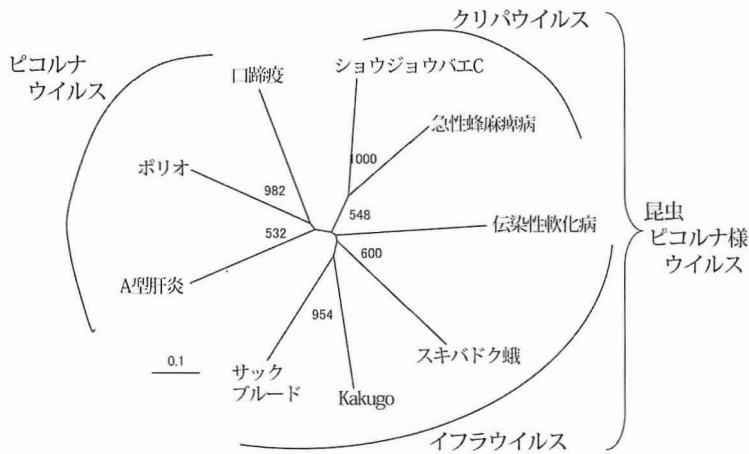


図4 Kakugo ウイルスとその他のピコルナ様ウイルスの分子系統樹
各ウイルスの RdRp ドメインのアミノ酸配列データにもとづき、近隣結合法によって作成したもの。各分岐点における数値はブートストラップ値を示す。枝の長さはアミノ酸置換数の推定値に比例している。

にかけたところ、遊離の *Kakugo* RNA の他に、ウイルス粒子の大きさに相当する画分からも *Kakugo* RNA が回収されたことから、*Kakugo* RNA が、ウイルス粒子中にゲノム RNA として存在することが示唆された。さらに、*Kakugo* ウイルスの感染性を調べる目的で、*Kakugo* ウイルスに感染した働き蜂の組織粗抽出液を、非感染の働き蜂の腹部に接種したところ、実験群では3日後に顕著な *Kakugo* RNA 量の上昇が見られた(図5)。一方、対照実験として、非感染個体の組織粗抽出液や緩衝液を注射した場合には、*Kakugo* RNA 量の増大は認められなかった。このことは、*Kakugo* RNA が確かに感染性因子の構成要素であることを示している(Fujiyuki, et al., 2004)。

次に *Kakugo* ウイルスが働き蜂の攻撃行動とどの程度、関連しているか調べる目的で、働き蜂を育児蜂、攻撃蜂、逃避蜂、採餌蜂に分けて採集し、それぞれの脳での *Kakugo* RNA の存在量を比較したところ、攻撃蜂に特異的に検出された(図6)。また、攻撃蜂の体の中では、脳に強く検出され、胸部や腹部では検出されなかった。このことは、*Kakugo* ウイルスの感染と、働き蜂の攻撃行動が密接に関連していることを示している(Fujiyuki, et al., 2004)。実際に攻撃行動を示した働き蜂のどのくらいの割合合

いの個体が *Kakugo* ウイルスに感染しているかは不明であるが、これまで本能的行動とされていた働き蜂の攻撃行動にウイルス感染が影響する可能性が初めて指摘された点で、本研究は学術的意義をもつと思われる。

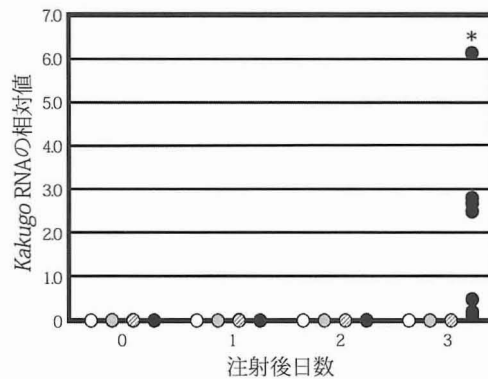


図5 *Kakugo* ウイルスの感染性

採餌蜂の頭部に攻撃蜂由来細胞粗抽出液(黒)、採餌蜂由来細胞粗抽出液(斜線)、バッファー(灰)を注入し、接種後、それぞれの日数後にミツバチを回収した。また、無処理(白)の個体を同時に回収した。回収した個体の頭部における *Kakugo* RNA の量をアクチン mRNA 量で補正した値を相対値として示した。*; 他のサンプルと有意差があることを示す ($p < 0.05$)。

用いたサンプル数は、左から(0日後) = 3, 5, 4, 5; 1日後 = 6, 8, 8, 8; 2日後 = 3, 3, 3, 2; 3日後 = 6, 7, 6, 8匹。

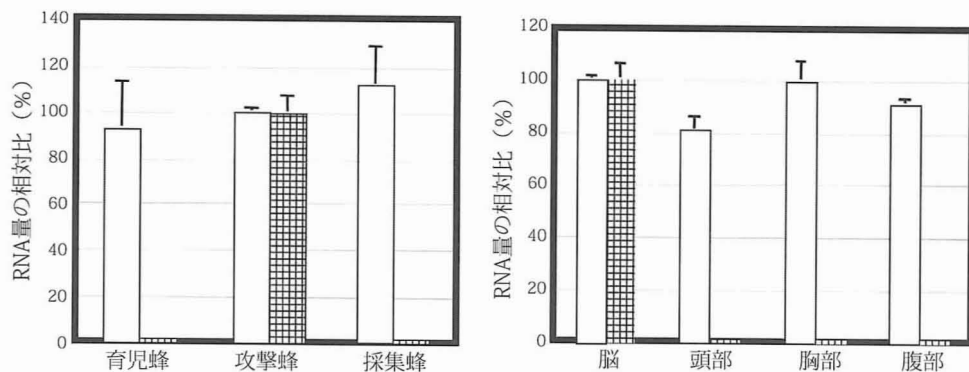


図6 Kakugo ウイルスの分布

(A) 攻撃蜂での RNA 量を 100% とし、脳内の相対的な *Kakugo* RNA 量を行動別に比較した。(B) 脳での RNA 量を 100% とし、攻撃蜂の体内の相対的な RNA 量を比較した。格子は *Kakugo* RNA、無地はアクチン mRNA 量を示す。

ウイルス感染と攻撃行動の関連に関する考察

現在のところ、*Kakugo* ウイルスの感染がミツバチの攻撃行動とどのように関わるかは不明である。最も面白い可能性の一つは、ウイルス感染が、働き蜂の攻撃行動を誘発するというものである。これまでの実験結果では、*Kakugo* ウイルスが感染していないコロニーでも門番蜂の攻撃行動は観察されているので(藤幸ら, 未発表), *Kakugo* ウイルスの感染が攻撃行動の発動に必須なわけではないのだろう。むしろウイルス感染は、元々攻撃性が低い働き蜂に攻撃性を賦与し、門番蜂の割合を増やしている可能性が考えられる。もう一つの可能性は、*Kakugo* ウイルスは元々、非常に低いレベルで普通のコロニーにも感染しており、働き蜂が分業し、門番蜂になる過程で *Kakugo* ウイルスの増殖に適当な生理条件がもたらされ、脳で *Kakugo* ウイルスが増殖するというものである。いずれにしても攻撃蜂の捨て身の攻撃行動は、自身の死と引き換えに、コロニーからウイルスを排除する作用をもつ可能性があり、ウイルスと宿主の機能的相互作用を考える上で興味深い。なお、ごく最近、ダニによって媒介される deformed wing virus (縮れた翅になるミツバチの病気の、推定上の原因ウイルス)の cDNA の塩基配列が database に登録され、

Kakugo ウイルスとごく近縁のウイルスであることが判明しているが (Fujiyuki, et al., 2004), *Kakugo* ウイルスとの関連については現在のところ、不明である。

ウイルス感染が動物の行動を変える例としては、狂犬病ウイルス (攻撃的になる) やカイコの核多核体病ウイルス (高い枝に登って死亡する) などがあるが (Moore, 2002), 既知の例がいずれも病理的な作用と思われるのに対して、*Kakugo* ウイルスの感染は本能的な攻撃行動に関連する可能性が示された点で興味深い。小児麻痺の原因ウイルスであるポリオウイルスは、感染した運動神経を破壊することで麻痺を起こさせる (野本, 1999)。このことから類推すると、*Kakugo* ウイルスが攻撃性に関連するメカニズムの一つとして、*Kakugo* ウイルスが感染する神経細胞は元々、攻撃性の抑制に働く神経であり、これを *Kakugo* ウイルスが破壊することで、感染個体の攻撃性を高めるという仮説が考えられる。

Kakugo ウイルスの、ヒトおよびミツバチにおける病原性について

先述したように、*Kakugo* ウイルスが属する昆虫ピコルナ様ウイルスには哺乳類への感染性が知られているものは今のところ存在しない。新聞報道 (読売新聞平成 16 年 3 月 5 日付) で、*Kakugo* ウイルスがヒト A 型肝炎ウイルスと塩

基配列上の類似性があることが短く報じられたため、ミツバチが産生するローヤルゼリーやハチミツを食べるとA型肝炎になるのではないかと危惧された読者から筆者のところへ2件、「ミツバチ科学」には5件のお問い合わせをいただいたそうだが、その懸念は恐らくは杞憂であろう。確かに、Kakugo ウイルスが属する昆虫ピコルナ様ウイルスはヒトA型肝炎ウイルスと同じ仲間(ピコルナ様ウイルス)に分類されるが(図4)、これは遺伝子の塩基配列や構造が似ているためであり、同じ仲間には、病原性も性質も異なる様々なウイルスが含まれている。Kakugo ウイルスは、ミツバチや哺乳類への病原性を指標として単離された訳ではなく、研究の過程で偶然、同定されたウイルスである。また、Kakugo ウイルスが最近、ミツバチに顕著に伝播しているという訳でもない。これまでにローヤルゼリーやハチミツを感染源とした病原性ウイルスの報告例が全くないことを考えると、Kakugo ウイルスはミツバチに感染する多くのウイルスと同様に、ヒトにとっては無毒であり、また、古くからミツバチに感染しているウイルスの一つなのであろう。

一方で、病的なものであれ、生理的なものであれ、Kakugo ウイルスがミツバチの攻撃性に関わるとすると、様々な展望が拓けてくる。特に、北米では現在、攻撃性が非常に高いアフリカ蜂化ミツバチ(キラードビー)の勢力の拡大が深刻な問題になっており(Guzman-Novoa, et al., 1994)、米国が現在、ミツバチのゲノム計画を推進する主な動機の一つが、アフリカ蜂化ミツバチの問題への対処法の開発とされている。仮に、アフリカ蜂化ミツバチにおいてKakugo ウイルスの感染が頻繁に見られるようであれば、Kakugo ウイルスの駆除がアフリカ蜂化ミツバチへの対処法として浮かび上がってくる。また、Huntらは、遺伝学的な解析から、独自に働き蜂の攻撃性に関わる遺伝子座を同定しており、これらの遺伝子と、Kakugo ウイルスの感染への感受性との関連も興味深い(Hunt, et al., 1998; Lobo, et al., 2003)。Kakugo ウイルスの今後の研究が、学術的にも産業的にも意

義深いものになることを期待したい。

謝辞

本文でも述べたように、本研究は玉川大学農学部 小野正人助教授、同ミツバチ科学研究施設 佐々木哲彦助教授、東京大学大学院医学系研究科 野本明男教授、大岡静衣助手との共同研究として行なわれました。また本研究は一部、生物系特定産業技術研究支援センター、文部科学省、(財)テルモ科学技術振興財団、内藤記念科学振興財団からの研究助成によって行ないました。この場をお借りして深く感謝申し上げます。最後に、「ミツバチ科学」誌上で私どもの研究を紹介させていただく機会を下さった中村純先生に、深甚なる感謝の意を表します。

(〒113-0033 文京区本郷 7-3-1

東京大学大学院理学系研究科)

引用文献

- Breed, M. D., G. E. Robinson and J. R. E. Page. 1990. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 27 (6): 395-401.
- Dade, H. A. 1962. *Anatomy and dissection of the honeybee*. IBRA, Cardiff. 164 pp.
- Fujiyuki, T., H. Takeuchi, M. Ono, S. Ohka, T. Sasaki, A. Nomoto, and T. Kubo. 2004. *J. Virol.* 78 (3): 1093-1100.
- Guzman-Novoa, E. and R. E. Page. 1994. *Am. Bee J.* 134: 101-106.
- Hunt, G. J., E. Guzman-Novoa, M. K. Fondrk and J. R. E. Page. 1998. *Genetics* 148 (3): 1203-1213.
- Kamikouchi, A., H. Takeuchi, M. Sawata, K. Ohashi, S. Natori and T. Kubo. 1998. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242 (1): 181-186.
- Kamikouchi, A., H. Takeuchi, M. Sawata, S. Natori, and T. Kubo. 2000. *J. Comp. Neurol.* 417 (4): 501-510.
- Liang, P. and A. B. Pardee. 1992. *Science* 257 (5072): 967-971.
- Lobo, N. F., L. Q. Ton, C. A. Hill, C. Emore, J. Romero-Severson, G. J. Hunt and F. H. Collins. 2003. *Genome Res.* 13 (12): 2588-2593.
- Moore, J. 2002. *Parasites and the behavior of animals*. Oxford Univ. Press, New York. 332 pp.
- 野本明男. 1999. *ピコルナウイルスと感染症*. 標準微生物学第7版(平松啓一・山西弘一編). pp. 418-425.
- Park, J. M., T. Kunieda and T. Kubo. 2003. *J. Biol. Chem.* 278 (20): 18689-18694.

- 坂上昭一. 1983. ミツバチの世界. 岩波書店, 東京. 221 pp.
- Sawata, M., D. Yoshino, H. Takeuchi, A. Kamikouchi, K. Ohashi and T. Kubo. 2002. RNA 8 (6): 772-785.
- 竹内秀明・上川内あづさ・鹿毛枝里子・久保健雄. 2001. ミツバチ科学 22 (3): 113-120.
- Takeuchi, H., E. Kage, M. Sawata, A. Kamikouchi, K. Ohashi, M. Ohara, T. Fujiyuki, T. Kunieda, K. Sekimizu, S. Natori and T. Kubo, T. 2001. Insect Mol. Biol. 10 (5): 487-494.
- Takeuchi, H., T. Fujiyuki, K. Shirai, Y. Matsuo, A. Kamikouchi, Y. Fujinawa, A. Kato, A. Tsujimoto and T. Kubo. 2002. FEBS Lett. 513 (2-3): 230-234.
- Takeuchi, H., A. Yasuda, Y. Yasuda-Kamatani, M. Sawata, Y. Matsuo, A. Kato, A. Tsujimoto, T. Nakajima and T. Kubo. 2004. Cell Tissue Res. 316 (2): 281-293.
- Wilson, E. O. 1999. 社会生物学 (合本版). 新思索社, 東京. 1341 pp.
- Winston, M. L. 1987. The biology of the honeybee, Harvard Univ. Press, Cambridge. 281 pp.

TOMOKO FUJIYUKI, HIDEAKI TAKEUCHI and TAKEO KUBO. Kakugo virus identified in the brain of the aggressive worker honeybee. *Honeybee Science* (2004) 25(4): 145-151. Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo. 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033 Japan.

Workers of the European honeybee (*Apis mellifera* L.) show altruistic aggressive behaviors to defend their colony from natural enemies, such as hornets. The molecular mechanism underlying the aggressiveness of the honeybees in the brain, however, remains mostly unknown. Recently we identified a novel RNA, termed *Kakugo*, that was detected exclusively in the brains of the honeybee workers that had attacked a giant hornet (*Vespa mandarinia japonica*). The nucleotide sequence of the *Kakugo* RNA had significant homology to those of RNA genomes of various picorna-like viruses, especially sacbrood virus, which infects the honeybees. *Kakugo* RNA in the tissue lysate of infected workers was separated at the same sedimentation coefficient with virion particle of picorna-like virus. Furthermore, when the tissue lysate of the infected workers was injected into non-infected workers, the *Kakugo* RNA was amplified *in vivo*. These results demonstrate that *Kakugo* RNA is a genome of a novel picorna-like virus (*Kakugo* virus). *Kakugo* RNA was detected in the brains of the aggressive workers but not in nurse bees or foragers, suggesting the brains of the aggressive workers are selectively infected by this novel virus. Here we summarize the process to identify *Kakugo* virus and discuss possible relation between *Kakugo* viral infection in the brain and the aggressive behavior of the honeybee workers. We also discuss possible pathogenicity of *Kakugo* virus and the future prospects of this study.