

ミトコンドリア DNA からみたニホンミツバチの起源

高橋 純一, 吉田 忠晴

現在の日本列島にはニホンミツバチ *Apis cerana japonica* とセイヨウミツバチ *A. mellifera* の2種類のミツバチをみることができる。セイヨウミツバチは明治の初期にアメリカから養蜂種として導入された、本来日本には生息していなかった外来のミツバチである。一方のニホンミツバチは東アジアに広く分布しているトウヨウミツバチの一亜種である。トウヨウミツバチは、Ruttner (1988) による形態形質を用いた多変量解析法によれば、インドから

東南アジアの熱帯地域に生息しているインド亜種 *A. cerana indica*, 東アジアに生息している基亜種 *A. cerana cerana*, ヒマラヤ山脈地域に生息する *A. cerana himalaya*, そして日本列島にのみ生息する日本亜種 *A. cerana japonica* の4亜種に分けられる (図1)。

ニホンミツバチの起源仮説

日本列島に生息しているこのニホンミツバチは、いつ、どのようにやって来て固有亜種とし

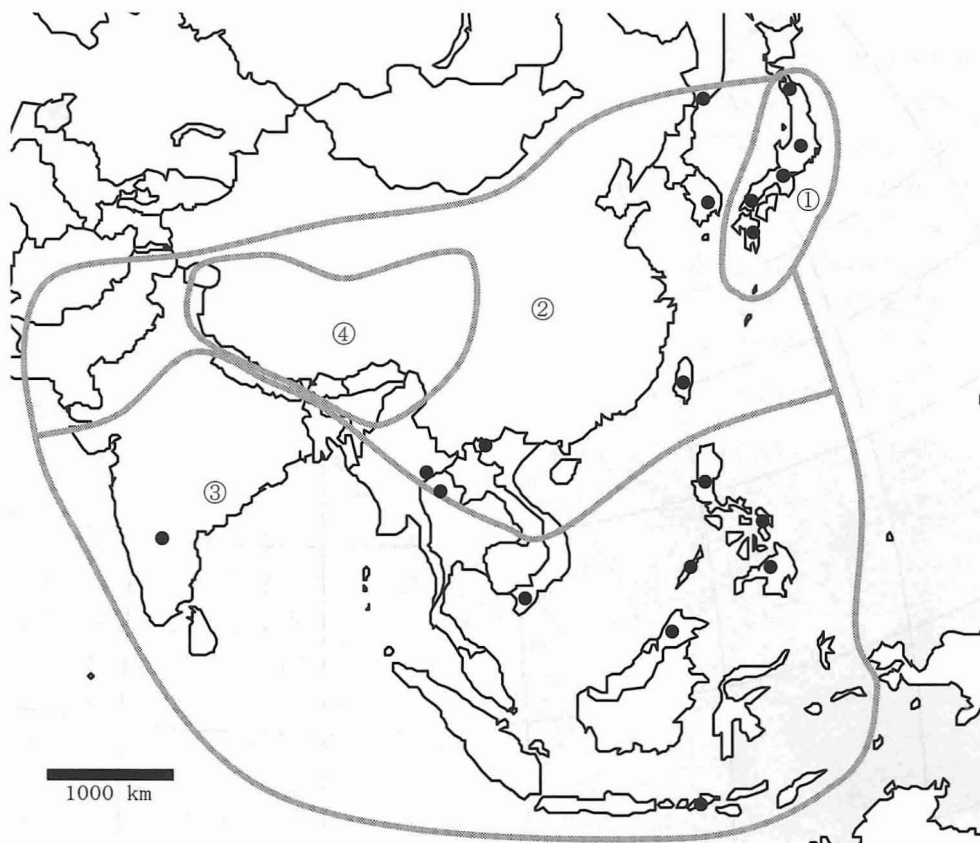


図1 トウヨウミツバチの分布。①日本亜種 (ニホンミツバチ), ②基亜種, ③インド亜種, ④ヒマラヤ亜種。サンプル採集場所を●で示した。

ての集団を形成したのであろうか。ミツバチなどの社会性のハチの出現については、おおよそ一億年前に琥珀に閉じ込められた働きアリの化石が見つかっており、この時期にはすでに高度な社会性が確立していたと推定されている。ミツバチの化石記録はこれより新しく、日本では壱岐島からおおよそ 2000 万年前の時代の地層からミツバチの化石（図 2）が見ついている（Fujiyama, 1970）ことから、すでにこの時代には日本にもミツバチの祖先種が生息していたようである。

これまでニホンミツバチの起源についてはいくつかの仮説があり、自然分布と人為分布の 2 つに大別できる（佐々木, 1999）。自然分布説では、日本がまだユーラシア大陸と陸橋を形成していた氷期の時期に分布を広げてきたという説である。日本列島に進入する経路には、フィリピン、台湾から沖縄諸島を經由して北上する経路、朝鮮半島から九州に入る経路、そしてロシアのサハリンから北海道を經由して南下する経路の 3 つの進入経路が考えられている（図 3）。現在のニホンミツバチの祖先集団はこれらのルートから単独あるいは複合して氷期の時期に一度あるいは何回かにわたって分布を広げたという説である。

一方の人為分布説では、日本列島が大陸と離れた最終氷期以降に、朝鮮および中国からトウヨウミツバチの群が持ち込まれ、それらがニホンミツバチの祖先集団になったという説である。



図 2 2000 万年前のミツバチの化石。長崎県壱岐島で採集されたもの。藤山家徳氏撮影。

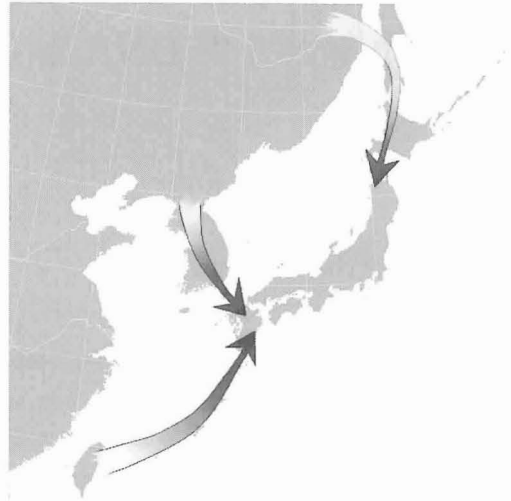


図 3 ニホンミツバチの祖先種が最終氷期以前に日本列島に侵入してきた場合に想定される移入経路

分子生物学的検証

これまでニホンミツバチの起源に関する仮説を検証することのできるデータとしては、形態形質を用いた比較解析によるものしかなかった（Ruttner, 1988）。しかしながら最近の分子生物学的手法の発展により制限酵素を用いた DNA の断片解析や塩基配列のデータから、生物種の系統関係や集団の遺伝構造に関する研究が盛んになり、トウヨウミツバチでもこのような研究をおこなうことが可能になった。

Smith (1991) は制限酵素を使ったミトコンドリア DNA の断片長の多型解析によりニホンミツバチはタイの集団と遺伝的に近いことを明らかにした。その後 Deowonish et al. (1996) は同様の方法でさらにサンプル数を増やして、韓国、台湾、フィリピン、ベトナム、タイ、ネパールのトウヨウミツバチグループとニホンミツバチの 5 集団（東京、京都、山口、熊本、対馬）について解析を行い、日本集団は台湾、フィリピンなどの南方系集団よりも韓国、ベトナム、タイ、ネパールなどの大陸系集団と遺伝的類似性が高いことを示した。そしてその中では、興味深いことに、対馬集団はその他の日本集団よりも韓国集団と類似性が高いことが示唆された。

その後さらに Smith and Hagen (1996) お

よび Smith et al. (2000) により広範囲にわたるトウヨウミツバチの分布域からのサンプリングが行われ、ミトコンドリア DNA の tRNA leu と COII 領域の間に挟まれている非コード (D-loop) 領域の塩基配列の比較を行ったところ、トウヨウミツバチの集団は大きく 4 つの集団を形成していることが明らかになった。

しかしながら、これらのデータではニホンミツバチの起源に関する問題に明確な結論を出すことは難しかった。なぜなら、日本とその近隣集団の解析したサンプル数が少ないことと見つかった塩基配列の変異パターン (ハプロタイプ) が少ないためニホンミツバチの集団が単一祖先集団を起源とするものなのか、あるいは複数の祖先集団を持つのかどうか明らかではなかったためである。

中国、韓国、ロシア (沿海州)、台湾などの極東アジアの集団は、ニホンミツバチの起源を考えるうえで重要な地域である。これらの地域の集団と日本各地の集団とのミトコンドリア DNA の変異を比較することによりニホンミツバチの集団の遺伝的背景や過去の進入経路を明らかにすることができる。そこで、今回、私たちは、ミトコンドリア DNA の塩基配列の解析を行いニホンミツバチと極東アジア集団との系統関係から日本への進入経路およびその時期について考察してみた。

ミトコンドリア DNA による系統解析

今回、ミトコンドリア DNA の塩基配列の解析には日本各地の 14 地域 (青森、福島、東京、新潟、長野、石川、三重、京都、山口、福岡、熊本、鹿児島、対馬、奄美大島) からと台湾、韓国、中国、ロシア、ベトナム、タイ、ミャンマー、インドから採集した個体を使用した (図 1)。ニホンミツバチを含むトウヨウミツバチの DNA 解析には、ミトコンドリア DNA 内の tRNA leu から COII 遺伝子までの領域を Garnery et al. (1991) によって設計された E2 及び H2 プライマーを用いて PCR 法によって増幅し、その約 310bp の配列から分子系統樹を作成した。系統樹作成にあたって今回解析

したサンプルとこれまで報告されているフィリピン (De la Rua et al., 2000) とマレーシア (Takahashi et al., 2002) のトウヨウミツバチの相同遺伝子配列を解析に加えた。ミツバチはこの領域の間に非コード遺伝子を含んでいるため、他の遺伝子領域よりも塩基配列の置換率が高く、種内変異の調査に有用であると考えられている (Garnery et al., 1991)。

系統解析は、CLUSTAL W (Thompson, 1994) でアライメントし、ギャップは除外した。遺伝的距離は木村の 2 変数法 (Kimura, 1980) で算出し、近隣結合 (Neighbor-joining, NJ) 法 (Saitou and Nei 1984) によって分子系統樹を作成した。系統樹の信頼性は、1,000 回繰返しによるブートストラップテストによって評価をおこなった。外群としてインドのサンプル *A. cerana indica* を使用した。

トウヨウミツバチの遺伝的変異

私たちが今回解析した 22 地域の 93 サンプルのから配列の異なる 10 のハプロタイプが見つかった (表 1)。また非コード領域は地域間で多様な変異が確認された。特に台湾のサンプルは Smith and Hagen (1996) の結果と同様でフィリピンでも見つかっている特徴的な短い配列のものであった。今回日本からのサンプルの間では 3 つのハプロタイプが見つかった。このうち対馬と奄美大島の集団が固有のハプロタイプ (Japan 3 と Japan 4) を持っていた。一方本州および九州で見つかったハプロタイプはすべて同じタイプ (Japan 1) のものであり変異は見られなかった。これまでに報告されているもの (Japan 2) を加えると全部で 4 つのハプロタイプがニホンミツバチから見られた (図 4)。そしてベトナム、韓国、タイではそれぞれ 2 つのハプロタイプが見つかった。一方でインド、台湾、ロシアの集団内のサンプル間には変異は見られなかった (表 1)。

トウヨウミツバチのミトコンドリア DNA tRNA leu-COII 間の遺伝子配列による系統解析の結果、本グループは大きく 2 つのグループを形成した (図 5)。一つがボルネオ島 (マレー

表1 トウヨウミツバチのミトコンドリアDNA tRNA leu-COII 間のハプロタイプ地域性

地域	ハプロタイプ (n)
青森県弘前市	Japan 1(5)
福島県郡山市	Japan 1(5)
茨城県筑波市	Japan 1(5)
東京都町田市	Japan 1(5)
長野県長野市	Japan 1(5)
新潟県上越市	Japan 1(5)
石川県	Japan 1(5)
京都府宇治市	Japan 1(5)
三重県伊勢市	Japan 1(5)
山口県山口市	Japan 1(5)
福岡県博多市	Japan 1(5)
熊本県八代市	Japan 1(5)
鹿児島県都宮之城市	Japan 1(5)
対馬比田勝	Japan 1(4), Japan 3(1)
奄美大島宇検村	Japan 1(4), Japan 4(1)
韓国, 南原市	Japan 1(3), Korea (2)
ロシア, 沿海州	Russian (2)
台湾, 基隆市	Taiwan (3)
中国, 昆明	China (2)
タイ, チェンマイ	Thailand(1), Japan 1(2)
ベトナム, ライチャウ	Vietnam(2), Japan 1(1)
ミャンマー	Myammer(1)
インド, バンガロール	India(1)
マレーシア,	
サバ州ボルネオ島*	1Tenom 1, Borneo 2
フィリピン	
ミンダナオ島*2	2Ce1
ピサヤ島*2	Ce2
パラワン島*2	Ce3
ルソン島*2	Ce4

*1 のハプロタイプは Takahashi et al. (2002) を使用した。*2 のハプロタイプは De la Rua et al. (2000) を使用した。

シア) とフィリピン諸島からなる東南アジアの島嶼グループで、もう一つがベトナム, タイ, ミャンマー, 台湾, 中国, 韓国, ロシア, 日本からなる東アジア大陸集団のグループである。この集団の中で最もよく見られるハプロタイプ (Japan 1) は, 東アジア大陸で普通にみられるハプロタイプで, 現在見つかっているトウヨウミツバチでの祖先型ハプロタイプになっていると考えられている (Smith et al., 2002)。

ニホンミツバチの起源

これまで報告されている研究と私たちが新たに加えたデータをもとにトウヨウミツバチの分子系統解析の現状とニホンミツバチの起源について述べてきた。トウヨウミツバチの22地域の3亜種について mtDNA tRNA leu と COII 遺伝子間の塩基配列の結果から, ニホンミツバチとトウヨウミツバチ集団との系統関係を示す分子系統樹を描くことができた。また日本各地における集団の地理的変異は極めて低いことがわかった。ニホンミツバチの祖先集団は, 朝鮮半島から対馬を経由して進入してきた単一集団であることが推測された。そして対馬集団は遺伝的に韓国集団よりもニホンミツバチのグループに近いことが明らかになった。

この結果は, 最近の地質学的調査によっても支持される。最終氷期に大陸と日本列島が海面

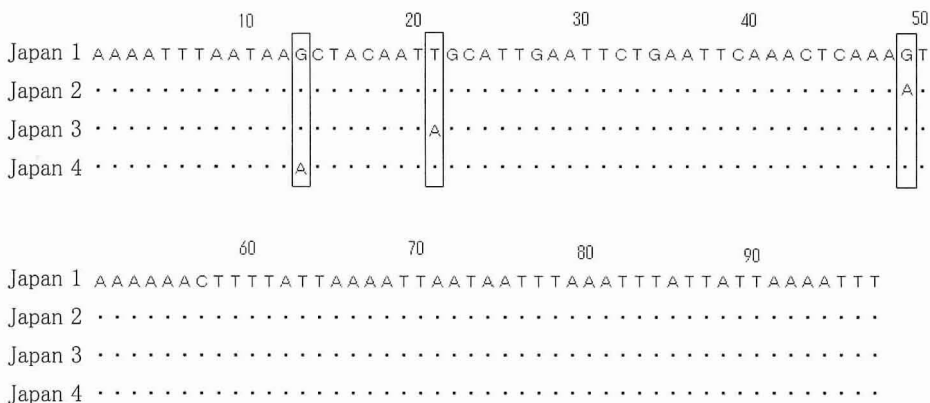


図4 ニホンミツバチで見つかった非コード領域の塩基配列。ドットは同じ塩基の配列を, 囲みはハプロタイプごとに異なる部分を示す。上記のうち岩手県で見つかった Japan2 は Smith and Hagen(1996)から引用した。

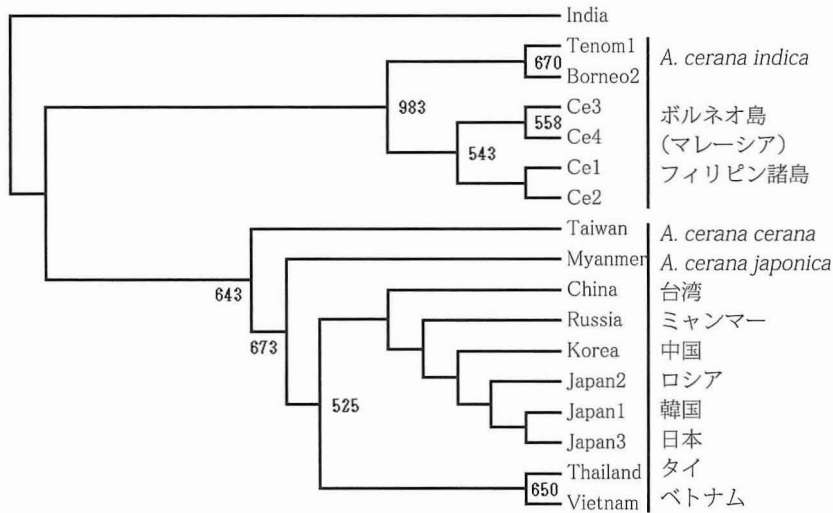


図5 ミトコンドリア DNA の tRNA leu-COII 間の配列による分子系統樹ニホンミツバチで見つかったハプロタイプはひとつのグループを形成していた。これらのハプロタイプは台湾やフィリピンよりも韓国，ロシア，中国のグループと系統的に近いことがわかる。

上昇によって分断された後も九州と対馬はたびたび陸橋を形成した可能性があったが，対馬と朝鮮半島の間では陸橋を形成することはなかったようである（多田，1998）。そのためこの両集団は少なくとも2万年以上の間ずっと遺伝的交流がないことになる。韓国と日本の両集団間の遺伝的距離をもとに Garnery et al. (1991) がセイヨウミツバチで算出した mtDNA の分子時計（100 万年あたり 2%）を適用すれば，ちょうど韓国と対馬および日本各地の集団の分岐年代は2万年前後と推定された。この結果は朝鮮半島と対馬が分断された年代とほぼ一致していた。さらに最近の形態学的な調

査によっても対馬集団は韓国よりも日本集団に形態形質の類似性も高いことが示唆されている（高橋・吉田，2000）。これらの解析の結果から対馬，奄美大島および日本各地の集団は遺伝的にまとまったグループであった（図6）。しかし今回の調査では，ニホンミツバチの地域集団間の遺伝的変異については未解決のままである。

そこで現在私たちのグループは，ミトコンドリア DNA よりも変異が高いマイクロサテライト DNA 断片解析によるニホンミツバチを含めたトウヨウミツバチグループの系統関係及び集団の遺伝的変異について解析を進めているところである。今後，アジアの各地で同様の研究が進みデータが蓄積されれば，いずれトウヨウミツバチの生物地理学に関する諸問題が明らかになることが期待される。

謝辞

本論文を作成するにあたって光畑明子氏にお世話になった。またサンプル採集に協力いただいた K. S. Woo 教授（ソウル大学），広永輝彦氏（北海道大学），高木利幸氏（玉川大学），富沢章氏（石川県ふれあい昆虫館），養蜂家の福田道弘氏，野口耕治氏，大浦勝毅氏，竹谷源太郎氏，山中清氏にはこの場をかりてお礼を申し



図6 シャリンバイを訪れたニホンミツバチ鹿児島県宇検村湯湾（奄美大島）にて

上げる。

(〒194-8610 町田市玉川学園 6-1-1 玉川大学)

参考文献

- Deowanish, S., J. Nakamura, M. Matsuka, and K. Kimura. 1996. *Apidologie* 27: 407-13.
- De la Rua, P., U. E. Simon, A. C. Tilde, R. F. A. Moritz, and S. Fuchs. 2000. *Heredity* 84: 124-130.
- Fujiyama, I. 1970. *Mem. Nat. Sci. Mus.* 65-74.
- Garnery, L., Vautrin, D., Cournuet, J.-M. and Solignac, M. 1991. *Apidologie* 22: 87-92.
- Hepburn, R. H., D. R. Smith, S. E. Radloff, and G. W. Otis. 2001. *Apidologie* 32: 3-23.
- Kimura, K. 1980. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Ruttner, F. 1988. *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Springer-Verlag, Berlin. 284 pp.
- 佐々木正己. 1999. ニホンミツバチ-北限の *Apis cerana*-. 海游舎. 東京. 191 pp.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. *Mol. Biol. Evol.* 14: 1258-1265.
- Smith, D. R. and R. H. Hagen. 1996. *J. Kansas Entomol. Soc.* 69: 294-310.
- Smith, D.R., L. Villafuerte, G. W. Otis and M. R. Palmer. 2000. *Apidologie* 31: 265-279.
- 多田隆治. 1998. *遺伝* 52: 11-15.
- Takahashi, J., J. Nakamura, M. Sasaki, S. Tingek and S. Akimoto. 2002. *Apidologie* 33: 15-24.
- 高橋純一・吉田忠晴. 2002. *ミツバチ科学* 23: 115-120.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- 吉田忠晴. 2000. ニホンミツバチの飼育法と生態. 玉川大学出版部. 東京. 135 pp.

JUN-ICHI TAKAHASHI¹⁾ and TADAHARU YOSHIDA²⁾. The origin of Japanese honeybee *Apis cerana japonica* inferred from mitochondrial DNA. *Honeybee Science* (2003) 24(2): 71-76. 1) Faculty of Agriculture, Tamagawa University, and 2) Honeybee Science Research Center, Tamagawa University, Machida, Tokyo, 194-8610 Japan.

The geographic variation and origin of Japanese honey bees, *Apis cerana japonica* was studied using sequencing analysis of mitochondrial DNA of a region between tRNA leu and COII genes. We identified 3 haplotypes among the 52 individuals from 14 populations studied whereas there was no genetic variation among all samples in COII region. Although all of 12 Kyushu and Honshu mainland populations of *A. cerana japonica* have Japan 1 haplotype, 2 new haplotypes were from the remote island populations of Amami-Oshima (Japan 4) and Tsushima (Japan 3), respectively. These new haplotypes are different from reported haplotypes of the *A. cerana* group, therefore its origin might be the ancient type on widely distributed haplotype Japan 1. These result demonstrated that *A. cerana japonica* was origin from Korean peninsula by mtDNA analysis.