

DNA フィンガープリント法による ミツバチの血縁構造と精子利用の解析

佐藤 俊幸

意外に知られていないことに、ミツバチ女王の多回交尾がある。女王は1回しか交尾しないと思っている(信じている)方が多いが、セイヨウミツバチの女王は、7から17匹の雄(平均約8個体)と交尾することが報告されている(Taber, 1955; Taber and Wendel, 1958; Gary, 1963; Adams et al., 1977; Kerr et al., 1980)。交尾したすべての雄の精子が受精に使われれば、コロニーには父親の異なるワーカーが混在することになる。膜翅目昆虫の場合、未受精卵(染色体の数が n の単数体)はオス、受精卵(染色体の数が $2n$ の倍数体)はメスとなる。単数体のオスがつくる精子は、組み替えや染色体の再配分が起こらないので、すべて遺伝的に同一である。したがって、同父姉妹同士の染色体は、父親由来の半分は1の確率で共通であり($1/2 \times 1 = 1/2$)、母親由来の半分は1対の相同染色体のどちらを受け継ぐかによって $1/2$ の確率で共通である($1/2 \times 1/2 = 1/4$)。よって、同父姉妹間の遺伝的血縁度は、平均して $1/2 + 1/4 = 3/4$ と期待される。これに対し、異父姉妹間の場合、父親から受け継ぐ染色体は、父親間に血縁がなければ確率1で全く異なるため($1/2 \times 0 = 0$)、血縁度は平均して $0 + 1/4 = 1/4$ と期待される。このように血縁度が大きく異なる同父・異父姉妹のワーカー間で血縁認知がなされ、共同の度合が違うのかといった問題は、なぜミツバチで社会性が進化し、維持されているのか、その要因を考える上で重要な問題である。

ミツバチに限らず個体間の血縁解析には、何らかの遺伝的マーカーが必要である。そのような遺伝的マーカーとしては、これまで酵素多型

や突然変異による体色の違いの利用が試みられてきた(Laidlaw and Page, 1984など)。しかしながら、前者の方法では父親鑑定できる個体がある特定の遺伝子型を持つ個体に限られたり、後者の方法では父親判定が突然変異による体色変化にもとづくため、体色の違いが個体識別に与える影響や、突然変異の系統を用いるため、果たしてその結果がそのまま自然のコロニーにあてはめられるのか、といった問題があった。

近年、Jeffreys et al. (1985) がヒトで多様な多型性を示すミニサテライト DNA を発見し、それをプローブとしたザサンハイブリダイゼーションにより個体間の血縁判定が可能となった(DNA フィンガープリント法)。最近マスコミの報道にもしばしば登場するように、このような DNA 鑑定は、ヒトの犯罪捜査や父子判定などで、司法的にも利用されている。これまでミツバチで行った DNA フィンガープリントには、合成したオリゴヌクレオチド(GATA)4をプローブとした Moritz et al. (1991)、MI3 フェージをプローブとした Blanchetot (1991)、また、PCR法によりランダムに増幅した DNA の多型を解析したものとしては Fondrk et al. (1993) があった。本研究で用いたプローブは、専修大の増子恵一氏がツヤクシケアリの DNA からクローニングしたもので、チミンが多数連続した配列を持つ。同じ膜翅目のアリから得られた DNA をプローブとすることによって、血縁解析に有効な DNA フィンガープリントが得られることが期待される。

本研究では、アリから得られた DNA (pMy 7) をプローブとした DNA フィンガープリン

トを開発し、ミツバチ・コロニー内の血縁構造と女王の精子利用パターンを解析した。

材料と方法

1) 巣内血縁構造の解析

1992年と1993年の春に埼玉県熊谷養蜂場より購入し、東京都府中市の東京農工大学構内で繁殖させたセイヨウミツバチ *Apis mellifera* のコロニーから、月別にオス（存在する場合）と外勤に出ているワーカーを採集し、 -20°C で冷凍保存した。個体毎に頭部から約 $2\mu\text{g}$ のDNAが抽出でき、それらを制限酵素 *Hae* IIIで切断した。1%アガロース・ゲル電気泳動により断片を分離し、アルカリ変性により一本鎖にした後ナイロン膜にトランスファーした。ツヤクシケアリから得られたプローブ *pMy* 7 (^{32}P で標識)をハイブリダイズさせ、オートラジオグラフィを行った。当初制限酵素 *Hinf* Iによる切断も行ったが、結果的に多型を示すバンド数が少なかったため、以後のDNAサンプルでは *Hae* IIIのみを使用した。

2) 女王の精子利用パターンの解析

1993年の春に熊谷養蜂場から購入した1群を分巢させ増やしたコロニーを材料とした。交尾飛行後、約4カ月経過した女王の連続した産卵と産卵した育房を記録した。卵が孵化した後、2~3日齢になった幼虫及びそれらの女王のDNAを個体別に抽出し、DNAフィンガープリントを行った。父親の違いの判定には、母親由来のバンドを除いた、父親由来と考えられるバンドを用いて解析を行った。

結果と考察

1. 巣内血縁構造の解析

まず、コロニー内のワーカー間の血縁関係の解析に、DNAフィンガープリント法の適用を試みた結果について述べる (Sato and Obara, 1996)。

図1にフィンガープリントの結果の1例を示す。両側のレーンは分子量のサイズ・マーカーで、下にいくほど分子量が小さいDNA断片

を現す。個体ごとのDNAサンプルは、左から女王とその娘バチ、右端が血縁関係のない他のコロニーの娘バチである。すべての個体に共通な、多型性のないバンドもみられるが、ここで注目したいのは、個体により持っていたり持っていなかったりする、多型性を示すバンドである。女王のレーンの横に矢印で結んだ二本のバンドは、他の女王の娘にはみられないが、この女王の娘にはどちらか一方のバンドがみられる。このことは、それら二本のバンド (=DNA断片、すなわち任意の遺伝子) は一對の相同染色体の各々に分離しているDNA断片を表し、減数分裂の過程でどちらか一方が娘に伝わっていることを示している。下向きの矢印で示したのは女王にみられないバンドで、1, 3, 5のワーカーに共通してみられる。これらのバンドは父親由来で、これらのワーカーは同父姉妹であることを示唆している。同様に上向きの矢印で示したバンドを共有していることから、2と7のワーカーは同父姉妹であることが示唆される。

図2は女王とその息子(雄蜂)のDNAフィンガープリントの1例である。この写真から分かるように、息子のもつバンドはすべて女王も持っている。このことは、息子はすべて未受精卵から発生したことを示す。矢印で結んだバンドは先と同様に一對の相同染色体の各々に分離しているDNA断片を現し、息子にはどちらか一方が伝わっている。分子量2.0kbから23.1kbの範囲のフィンガープリントのバンドの数は、メスの方がオスより約2倍ほど多いことも分かった(表1)。このことは、単数倍数性の性決定様式により、メスの染色体数が倍数($2n$)であるのに対し雄のそれが単数(n)であることと対応している。以上のことは、DNAフィンガープリントで検出しているバンドに関し、異型接合性が高いことも示唆している。すなわち、この方法の検出力の高さも保証しているものと考えられる。

次に、個体間のバンド共有率に基づき、個体間の平均血縁度の推定を行った(表2: Reeve et al., 1992)。同じコロニーのワーカー間の平

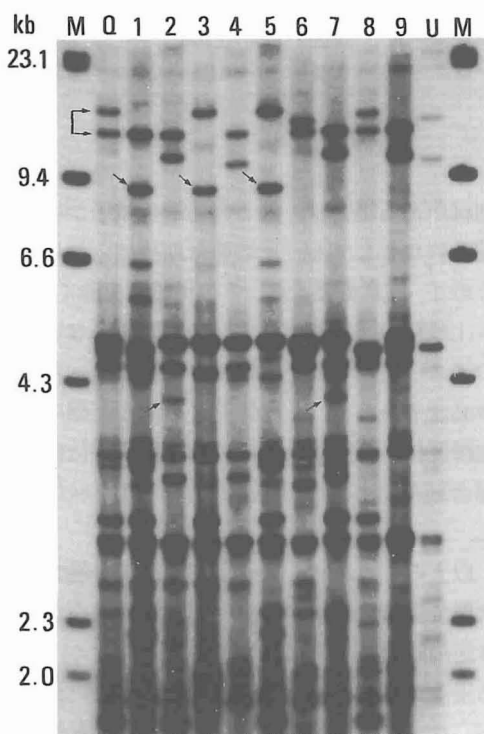


図1 女王(Q)とその娘(1から9)及び他のコロニーのワーカー(U)のDNAフィンガープリント。両端は分子量のサイズ・マーカー。矢印で結んだ2本のバンドは、対立遺伝子の関係にあると考えられる。斜め上向き、あるいは斜め下向きの矢印は、それぞれ同じ父親からメンデル遺伝したと考えられる同じ分子量のバンド。

均血縁度は2つのコロニーでそれぞれ0.395と0.288と低く、Laidlaw and Page (1984), Moritz (1986), Haberl and Moritz (1994)らの研究結果と同程度の値を示した。ちなみに、女王が多数のオスと交尾し、異なるオスの精子を受精の際均等に使う傾向がある場合、交尾したオスの数が多いほど、ワーカー間の平均血縁度は0.25、すなわち異父姉妹間のそれに近づくはずである。今回得られたような低い平均血縁度の値は、セイヨウミツバチの女王が多数のオスと交尾し、それら父親の精子はある父親由来の精子に偏らず、卵を受精させる際均等に使われる傾向があることを示唆する。

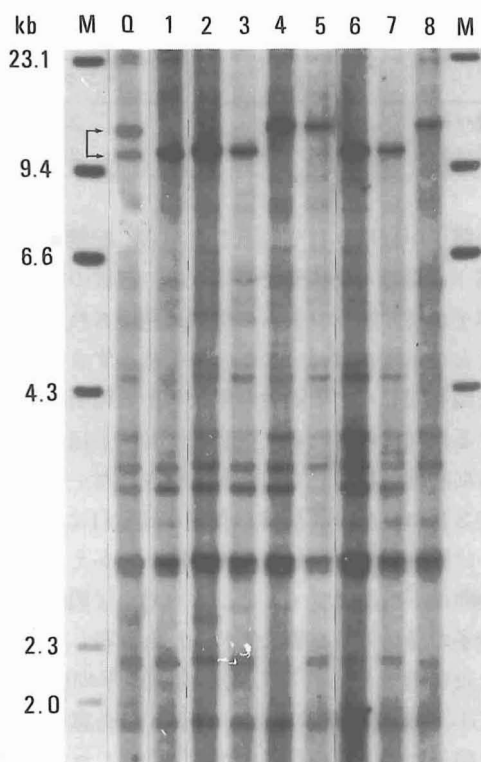


図2 女王(Q)とその息子(1から8)のDNAフィンガープリント。両端は分子量のサイズ・マーカー。矢印で結んだ2本のバンドは、対立遺伝子の関係にあると考えられ、息子にはどちらか一方のみ伝わっている。息子にみられるバンドは全て女王にもみられ、雄は未受精卵から単為発生することを示す。

2. 精子利用

次に、女王の連続した産卵と産卵した巣部屋を記録し、卵が孵化して幼虫(2~3日齢)になってからDNAを抽出し、フィンガープリントにより女王の精子利用パターンを解析した結果について述べる(Sasaki et al., 1995)。図3aは、父親由来のバンド共有率にもとづき、群平均法によりクラスター分析を行った例のひとつである。この場合バンド・パターンの類似性から、AからF6つのクラスターが識別でき、したがってAからF6つの父系があると推測された。また、図3bに示すように、連続した産卵において異なる父親由来の精子が使われており、また1か月ほど経ってからも同じ父親由来

表1 DNA フィンガープリントにおける雄と雌のバンド数

	バンド数		
	平均値	標準偏差	サンプル数
雌バチ	13.7	3.7	32
雄バチ	6.2	1.0	21

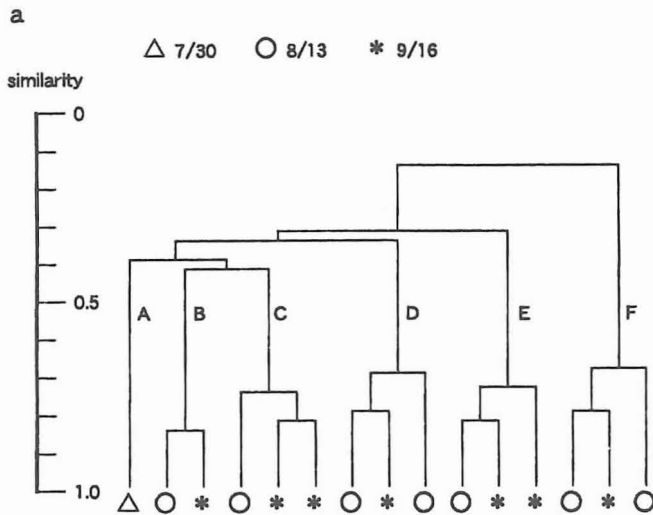
の精子が利用されていることから、貯精囊中の精子は混ざった状態で維持され、複数の父親の精子が長期間ランダムに受精に利用されていることが示唆された。また、図4に示すように、父親を同じくする幼虫が巣板のある場所に集中する傾向はみられず、空間的にも精子はランダムに利用されていることが示唆された。また、表3には、A、B2個体の女王が同じ日に、あるいは観察期間を通して産んだ卵からかえった幼虫間の平均血縁度 (r) と、すべての父親由来の精子が受精の際均等に使われたと仮定して推定した父親数から計算した幼虫間の平均血縁度 (G) の期待値を示した。女王Aは有意に偏った精子の使い方をしてしたが、交尾した雄間に

表2 ワーカー間の平均血縁度 (推定値)

	平均値	標準偏差	サンプル数
コロニー A	0.395	0.144	36
コロニー B	0.288	0.254	55

血縁がある場合は、たとえ各雄の精子が均等に使われたとしても、rの値は期待値より高くなるので、注意を要する。その可能性を除くには、人工授精の技術を用いて、血縁関係のない複数のオスの精子を女王に授精させるといった工夫が必要であろう。一方女王Bの産んだ卵の平均血縁度は、交尾した各雄の精子を均等に使った場合期待される値と統計的に有意差がなかった。

以上のことから、精子は交尾後十分混ざった状態で受精に利用され、父親が同じ幼虫がある特定の時期に一齐に発生することではなく、その結果コロニー内の平均血縁度が低く保たれる一方、ワーカー間の遺伝的多様性も保証されてい



b

		Fathers					
		A	B	C	D	E	F
7/30	1	○					
	1				○		
	3						○
	4		○				
8/13	5				○		
	6			○			
	7						○
	9				○		
	1			○			
9/16	2				○		
	3					○	
	5						○
	6		○				
	7					○	
	8			○			

図3 (a) ワーカーの父親由来バンド共有率に基づいたクラスター解析。バンドの類似度からAからF6つの父親の存在が推定される (b) 産卵された順番と父系。異なる父親の精子が、ランダムに受精に使われることを示唆。また、同じ父親の精子は長期にわたって使用されることも分かる

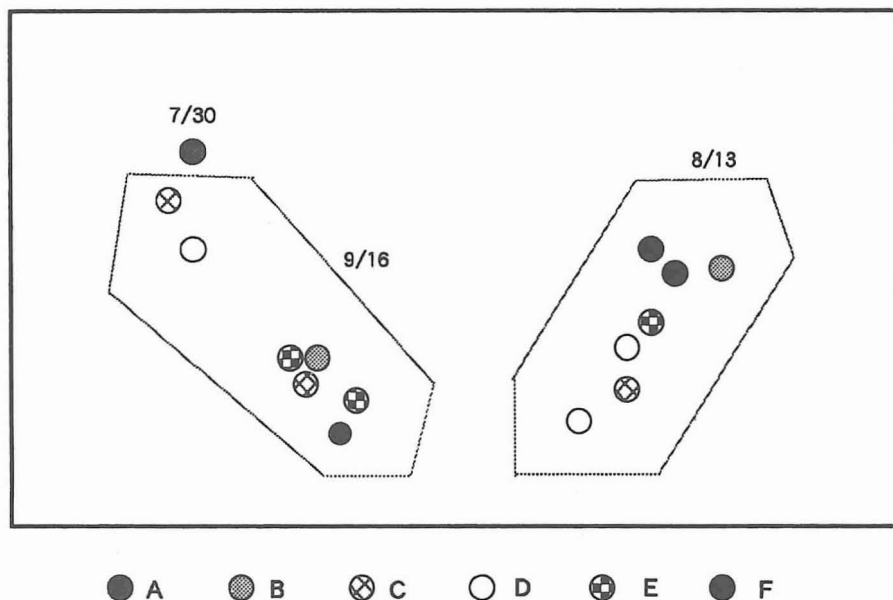


図4 巣板上でのブルードの父系の分布

AからFの父親由来の精子は、受精の際空間的にもランダムに使用されていることを示唆している

ることが示唆された。

女王の多回交尾の進化の適応的意義については、(1) コロニーの遺伝的多様性を増加させることにより、コロニーの採餌効率などを増加させるためのコロニー・レベルの選択圧による (Page, 1980) という説、(2) コロニー内の平均血縁度を下げることによりワーカー同士結託する可能性を減らし、コロニーをより安定にするという説 (Pamilo, 1991)、(3) あるいは、コロニー内の平均血縁度を下げることにより、女王が生産する繁殖虫の性比をめぐるワーカーとの対立に勝つための女王側の戦略 (Queller, 1993) といった説がある。今回の結果は従来の

報告とともに、それらの仮説が成り立つ基盤を与えるものと考えられる。それらの仮説を検証した実験的研究としては、Page et al. (1995) や Woyciechowski and Warakomska (1994) などがある。前者の研究では、コロニー内の遺伝的多様性が高いほど、コロニーが失敗する確率は下がることを示唆している。一方後者の研究は、ワーカーの遺伝的多様性とワーカーが集める花粉の種の多様性とは相関しないことを報告している。いずれにせよ、コロニー内の遺伝的多様性が進化する要因に関して、決定的な結論はでていないと考えられる。今後多回交尾の進化の適応的意義について、さらに実

表3 ワーカー間の平均血縁度: 推定値 (平均値±標準偏差; ()内はサンプル数) と、女王が交尾した各雄の精子が平等に使われた場合の期待値

	産卵日	推定値		期待値
女王A	8/13	0.437±0.097	(21)*	0.350
	9/16	0.484±0.117	(21)*	0.350
	7/30—9/16	0.469±0.126	(105)*	0.333
女王B	8/6	0.319±0.185	(15)	0.375
	7/13—8/21	0.253±0.154	(45)	0.321

*は推定値と期待値の間に t 検定で有意差 ($p < 0.05$) があった場合

証的な研究が蓄積される必要があるだろう。

最後につけ加えると、今回使用したツヤクシケアリ由来のプローブ (*pMy7*) を用いると、セイヨウミツバチ以外にニホンミツバチやマルハナバチ、アシナガバチの仲間 (小野, 川添, 五十嵐, 私信), ヤマアリやオオアリの仲間 (村上, 真田, 私信), ヒメバチの仲間 (大林, 私信) といった昆虫でも良好な DNA フィンガープリントが得られることが分かっている。このプローブは膜翅目昆虫全般に有効ではないかと期待される。

謝 辞

実験の御指導やプローブの使用などにおいて、松本忠夫教授 (東京大・教養学部) と増子恵一博士 (専修大・経営) に大変お世話になりました。深く感謝いたします。

(〒183 府中市幸町 3-5-8

東京農工大学農学部獣医学科)

引用文献

- Adams, J. E. D et al. 1977. *Genetics* 86:583-596.
- Blanchetot, A. 1991 *J. Heredity* 82:391-396.
- Fondrk, M. K., Page R. E. Jr. and Hunt G. J. 1993, *Naturwissenschaften* 80:226-231.
- Gary, N. E. 1963. *J. Apic. Res.* 2:3-9.
- Haberl, M. and R. F. A. Moritz. 1994. *Ins. Soc.* 41:263-272.
- Jeffreys, A. J. et. al. 1985. *Nature* 314:67-73.
- Kerr, W. E. et al. 1980. *Rev. Bras. Genet.* 111:339-344.
- Laidlaw, H. H. Jr. and Page R. B. Jr. 1984. *Genetics* 108:985-997.
- Moritz, R. F. A. 1986. *Experientia* 42:445-448.
- Moritz, R. F. A. et al. 1991. *Naturewissenschaften* 78:422-424.
- Page, R. E. 1980. *Genetics* 96:263-273.
- Page, R. E. et al. 1995. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 36:387-396.
- Pamilo, P. 1991. *Am. Nat.* 138:412-433.
- Queller D. C. 1993. *Am. Nat.* 142:346-351.
- Reeve, H. K., D. F. Westneat and D. C. Queller 1992. *Mol. Ecol.* 1:223-232.
- Sasaki, K., T. Satoh and Y. Obara. 1995. *Appl. Entomol. Zool.* 30:335-341.
- Satoh, T. and Y. Obara. 1996. *Appl. Entomol. Zool.* 31:148-w151.
- Taber, S. 1955. *J. Econ. Entomol.* 48:522-525.
- Taber, S and J. Wendel 1958. *J. Econ. Entomol.* 51:786-789.
- Woyciechowski, M. and Z. Warakomska. 1994. *J. Ethol.* 12:163-167.
- TOSHIYUKI, SATOH. Genetic structure and sperm utilization in European honeybee colonies: DNA fingerprinting Analysis. *Honeybee Science* (1996) 17(3):97-102. Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan.

To analyse intra-colonial genetic structure and how the spermatozoa derived from different males are used for fertilization by the multiply mated queens, the observations on their ovipositional behavior and the paternity determination of their offspring by DNA fingerprinting were carried out. It was shown that sperm from different males is used unpreferentially, resulting in the co-existence of workers fathered by different males, with low average relatedness in the colony.