

# カリヤサムライコマユバチに寄生された アワヨトウ幼虫の血漿の富栄養化と血漿量の関係

中 松 豊

## 緒 言

チョウ目などの幼虫（寄主）に寄生する寄生蜂（ハチ）の中には、寄生後も寄主を殺さず生かしたまま寄生するハチが存在する。このハチの仲間をコイノビオントと呼ぶ。コイノビオントは寄生後も寄主を成長・発育させ増大する栄養分を利用するハチで、寄主を生理的に制御することが知られている（Tanaka et al., 1992; Adamo et al., 1997）。*Heliothis virescens* が *Campoletis sonorensis* に寄生されると血漿成分であるトレハロース量が増加する（Vinson, 1990）。この現象はカリヤサムライコマユバチに寄生されたアワヨトウでも見られ、それを誘発する要因はカリヤサムライコマユバチが寄生の際、卵とともに寄主体内に注入する毒液とポリドナウイルスであることが明らかになっている（Nakamatsu et al., 2001）。

ハチ幼虫の寄主体内の捕食については、カリヤサムライコマユバチの1齢幼虫は寄主の体液、2齢幼虫は寄主の体液に加えて脂肪体を捕食することが知られている（Nakamatsu et al., 2002; Tanaka et al., 2006）。カリヤサムライコマユバチの2齢幼虫は寄主から脱出する寸前に3齢幼虫へと脱皮するので（Nakamatsu et al., 2006）、寄主体内で血漿を捕食するのは1齢幼虫と2齢幼虫だけである。前述のように血漿成分については、毒液やポリドナウイルスによって、富栄養化した血漿を寄生バチの幼虫が捕食しているが、血漿量の増減およびそれをもたらす要因についてはこれまで言及されていない。

そこで本研究ではアワヨトウ・カリヤサムライコマユバチの寄主寄生蜂系を使い、被寄生寄主や毒液とポリドナウイルス注入個体の血漿量の変化を経時的

に測定し、ハチの寄生や毒液、ポリドナウイルスが寄主の血漿量に及ぼす影響を調べた。また、血漿中の脂質量の経時変化や血漿量がハチ幼虫の脱出に及ぼす影響を調べることで、寄主血漿の富栄養化と血漿量の関係も検討した。

## 材料と方法

### 1 供試虫

寄主アワヨトウ *Mythimna separata* は鹿児島県鹿屋市で採集した個体を、名古屋大学で継代飼育し、一部を皇學館大学に移して気温25℃、16時間明期8時間暗期の長日条件下で飼育した。餌は幼虫にシルクメイト L4M（日本農産工業（株））、成虫に10%ショ糖溶液を与え、ともにプラスチックの容器内で飼育した。

寄生蜂カリヤサムライコマユバチ *Cotesia kariyai* も寄主アワヨトウ同様に鹿児島県鹿屋市で採集した個体を、名古屋大学で継代飼育し、一部を皇學館大学に移して気温25℃、16時間明期8時間暗期の長日条件下で飼育した。ハチは寄主アワヨトウの5齢幼虫に産卵させ、その後被寄生寄主はシルクメイト L4M、羽化したハチ成虫は10%ショ糖溶液を与えて育てた。

### 2 毒液とカリックス液のアワヨトウ幼虫への人工注入

カリックス液(C)はポリドナウイルスを含む液で、カリヤサムライコマユバチ卵巣のカリックス部で生成される。カリックス液および毒液(V)は以下の方法で供試した。羽化後2日目の雌成虫の腹部を生理食塩水(0.9%NaCl水溶液)を入れたペトリシャーレ内で解剖し、卵巣と毒のうをピンセットでそれぞれつまみ別々の容器に移した。カリックス液を抽出するために、卵巣を生理食塩水中でピンセットを用いて細かい破片になるまで壊し、遠心分離器を用いて800gで10分間遠心分離した後、上澄み液を採取した。この動作を3回繰り返した後12000gで10分間遠心分離を行い、その沈殿に1/3雌バチ等量になるよう生理食塩水を加えて調節した。毒液は12000gで10分間遠心分離した後、上澄みを採取し1/3雌バチ等量になるよう生理食塩水を加えて調節した。

アワヨトウへの注入は、カリックス液1 $\mu$ lと毒液1 $\mu$ lの計2 $\mu$ lの混合液

(1/3 雌バチ等量)をマイクロキャピラリーを使って腹脚の先端から注入した。

### 3 アワヨトウ幼虫血漿中の脂質濃度の測定

アワヨトウ血漿中の脂質濃度の測定はバニリンーリン酸試薬を用いた比色分析により行った (Zöllner and Kirsch, 1962, Stone and Mordue, 1980). 24 時間ごとに被寄生寄主幼虫, CV 注入幼虫および未寄生寄主幼虫から  $5\mu\text{l}$  の血漿を採取し,  $1\text{mM}$  のフェニールチオ尿素と  $500\mu\text{l}$  の硫酸を加えて10分間  $100^\circ\text{C}$  で煮沸し, その後室温に移して冷却した. この試料  $50\mu\text{l}$  をバニリンーリン酸試薬 ( $13\text{mM}$  バニリン- $14\text{M}$  リン酸)に加え, すばやく混ぜて30分間室温に放置した. その後分光光度計を使い, 吸光度  $547\text{nm}$  で測定した. なお検量線はコレステロールを使って作成し定量分析に用いた.

### 4 アワヨトウ幼虫の体重と血漿量の測定

被寄生寄主幼虫, CV 注入幼虫および未寄生寄主幼虫の体重は電子天秤を使い24時間ごとに測定した.

被寄生寄主幼虫, CV 注入幼虫および未寄生寄主幼虫の血漿量の測定は Weinberg(1980) の方法に従い測定した.  $4\mu\text{l}$  の  $0.5\%$  アマランス色素 ( $\text{C}_{20}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{Na}_3\text{O}_{10}\text{S}_3$ , 分子量604.48) をそれぞれのアワヨトウ幼虫の腹脚からマイクロキャピラリーで注入し, 3~5分後腹脚の先端を切って血漿を保冷剤上のパラフィルムに滴下させ集めた. この血漿  $20\mu\text{l}$  に  $0.5\%$  SDS-PBS を  $980\mu\text{l}$  加え, 分光光度計 (吸光度  $515\text{nm}$ ) で定量分析を行った.

### 5 寄主の手術と血漿量の調節

5 齢 0 日目のアワヨトウ幼虫にカリヤサムライコマユバチを寄生させ, 10 日後に実験を行った. ハチが脱出する前にアワヨトウ幼虫の腹脚の先をはさみで切断し, 腹部に手の指で圧力をかけ出来る限り体液を流出させた. その後腹脚を糸で縛り止血させたのち, プラスチック容器内でハチ幼虫が脱出するまでの時間を測定した. また手術や糸による結紮の影響を見るために, 寄生10日目のアワヨトウの腹脚の先をはさみで切断し, 体液を流出させることなく糸で縛っ

た対照区と、手術をせず腹脚の先を糸で縛った対照区を設けハチ幼虫が脱出するまでの時間を比較検討した。

## 結 果

### 1 被寄生寄主および CV 注入幼虫における血漿中の脂質濃度

被寄生寄主の血漿中の脂質濃度は、寄生後3日目から6日目までは未寄生寄主に比べ高い値を示したが、9日目以降急激に脂質濃度が上昇する未寄生寄主に比べ低い値を示した (Fig. 1)。一方、CV 注入幼虫の血漿中の脂質濃度は注入後3日目から8日目まで未寄生寄主に比べ高い濃度を維持した (Fig. 1)。その後9日目から10日目にかけて未寄生寄主よりも濃度は低くなったが、4～5mg/ml と高濃度を維持した (Fig. 1)。

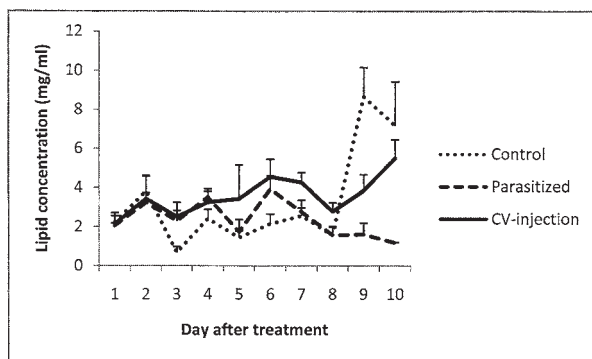


Fig. 1 Concentration of lipid in the hemolymph of parasitized and venom plus calyx fluid-injected and control *Mythimna separata* larvae. Vertical bars indicate standard deviations.

### 2 アフヨトウ幼虫の体重と血漿量

被寄生寄主の体重の変化は寄生後6日目までは CV 注入幼虫や未寄生寄主と比較しても差は認められなかったが、7日目以降体重増加が抑制された (Fig. 2)。CV 注入幼虫は CV を注入してから8日目までは未寄生寄主とほぼ同様の体重変化を示したが、9日目に未寄生寄主の体重増加が強く抑制されたのに対し、CV 注入幼虫の体重増加は変化なく、抑制されることがなかった (Fig. 2)。

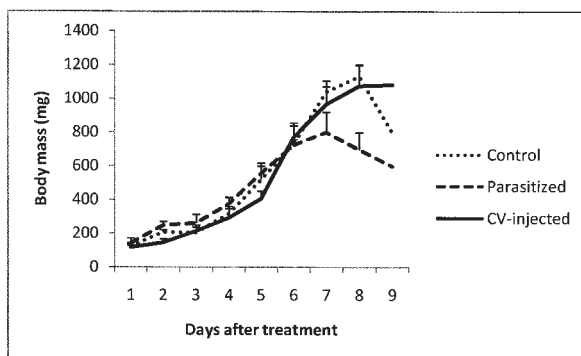


Fig. 2 Change of the larval wet weight of parasitized and venom plus calyx fluid-injected and control *Mythimna separata* larvae. Vertical bars indicate standard deviations.

被寄生寄主の血漿量の変化は、寄生後3日目までは未寄生寄主と差はなかったが、4日目から6日目にかけて増加した (Fig. 3)。しかし8日目以降は減少し、血漿量の増加が抑制された。一方 CV 注入幼虫は注入後6日目までは未寄生寄主と比較して差がなかったが、6日目から8日目にかけて大幅に増加した (Fig. 3)。特に注入後8日目は未寄生寄主と比較して2.3倍、被寄生寄主と比較して4.3倍の血漿量を示した。

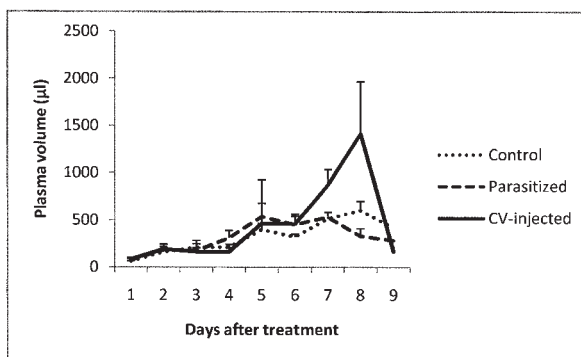


Fig. 3 Hemolymph volume of parasitised and venom plus calyx fluid-injected and control *Mythimna separata* larvae. Vertical bars indicate standard deviations.

### 3 寄主の血漿量とカリヤサムライコマユバチ幼虫の脱出との関係

5 齢 0 日目のアワヨトウ幼虫にカリヤサムライコマユバチを寄生させ、10 日後に腹脚を切って人工的に流出させた血漿量は平均(±S.D)で $98.1(\pm 17.9) \mu\text{l}$ だった。その後この実験区のハチ幼虫の平均脱出時間(±S.D)は $6.6(\pm 3.0)$ 時間となり、腹脚切断し糸で結紮した個体や糸で結紮しただけの個体に比べて有意に早かった(表1)。

**Table 1** The acceleration of timing of the parasitoid emergence from the host.

	No. of host larvae used	Time for parasitoids emergence* (Means±S.D.)
Hemolymph leaked	22	$6.6 \pm 3.0$ a
Ligate and cut	20	$12.8 \pm 5.5$ b
Ligate only	16	$11.2 \pm 1.5$ b

\*Means followed by a different letter within a column are significantly different (P<0.01 Student's t-test).

## 考 察

ハチの寄生によって変化する寄主の血漿成分はトレハロースだけではない。*Aphidius ervi* に寄生された *Acyrtosiphon pisum* は血漿中のタンパク質、アミノ酸、アシルグリセロールが増加する (Pennacchio et al., 1995; Rahbe et al., 2002)。本実験においてもハチの寄生によって寄生後 3 日目から 6 日目あたりまで寄主の血漿中の脂質濃度が未寄生寄主に比べ上昇した。また、この被寄生寄主の血漿の脂質濃度の上昇はハチの毒液とポリドナウイルスによってもたらされることが示された。

アブラムシに寄生する *Aphidius ervi* は幼虫の皮膚や中腸を通して寄主の血漿を吸収する (Caccia et al., 2005)。一方カリヤサムライコマユバチ幼虫は皮膚や中腸からではなく Caudal vesicle を通して寄主の血漿を吸収している (Tanaka et al., 2006)。これらの摂食形態から考えると毒液やポリドナウイルスによる寄主血漿の富栄養化は、それらを餌としているハチ幼虫の成長・発育にとって有利に働くことは間違いない。

ハチ幼虫の成長・発育にとって寄主血漿の質的变化も重要だが、量的変化も

重要な要因となる。今回毒液と CV を注入した幼虫の 8 日目の血漿量は未寄生寄主のそれに比べ約 2.3 倍、被寄生寄主の 4.3 倍の量を示した。ハチ幼虫は毒液とポリドナウイルスを注入した寄主と被寄生寄主の血漿量の差分、約 1081.5  $\mu$ l を Caudal vesicle から吸収しているものと考えられる。

カリヤサムライコマユバチ幼虫は寄生後 10 日目になると、寄主アワヨトウの腹部側面の皮膚を破って外へ脱出し蛹へと変態する (Nakamatsu et al., 2001)。カリヤサムライコマユバチ幼虫が寄主体内から外へ脱出する方法は、大顎を寄主の皮膚（クチクラ）に突き立て頭を何回も前後に動かすことによって破き、スパイク状の皮膚をその穴に引っ掛け、蠕動運動しながら外へ脱出する (Nakamatsu et al., 2006)。大顎で寄主のクチクラを破る際ハチ幼虫は寄主のクチクラに対して圧力をかけなければならないが、寄主体腔中は血漿で満たされているため、足場になるような固定された組織や器官は存在しない。そのような状況で複数のカリヤサムライコマユバチ幼虫は寄主体内でフィブロインとセリシンを分泌し繭のような隔壁をつくり、これらが互いに密に接着することにより寄主体内に固定され足場になるので、寄主のクチクラに大顎を突き立て圧力をかけられるようになる (Nakamatsu et al., 2007)。しかし、寄主体腔中でこのような足場をつくるためにはハチの幼虫同士が相当に近接しなければならない。本実験において寄生 10 日目の被寄生寄主から人工的に血漿を流出させたところ、カリヤサムライコマユバチ幼虫が脱出するまでの時間が有意に短くなった。このことより、カリヤサムライコマユバチが寄主幼虫から脱出する際、個々のハチ幼虫が寄主の体液を一気に吸収すると、寄主の容積が小さくなり結果ハチ幼虫が近接する。そこでハチ幼虫はフィブロインやセリシンを分泌し足場をつくることにより、脱出行動が可能になると考えられる。また、そのとき毒液とポリドナウイルスによって富栄養化して容積の増加した血漿をハチ幼虫が摂食することで成長・発育のための栄養分を確保しているものと考えられる。

## 謝 辞

この研究において、絶えずアドバイスや実験機器を提供して下さった名古屋大学大学院生命農学研究科の田中利治教授に心より感謝の意を表する。また、

実験材料を提供して下さいだった農業生物資源研究所の立石剣博士にも心より感謝申しあげる。そしてアワヨトウやカリヤサムライコマユバチを飼育し提供してくれた皇學館大学教育学部生物学研究室の皆様にもお礼申しあげる。

## 参考文献

- Tanaka, T., Yagi, S., Nakamatsu, Y., 1992. Regulation of parasitoid sex allocation and host growth by *Cotesia* (*Apanteles*) *kariyai* (Hymenoptera: Braconidae). *Annals of the Entomological Society of America* 85, 310-316.
- Adamo, S.A., Linn, C.E., Beckage, N.E., 1997. Correlation between changes in host behaviour and octopamine levels in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, parasitized by the gregarious braconid wasp *Cotesia congregata*. *Journal of Experimental Biology* 200, 117-127.
- Cacciaa S., M.G. Leonardia, M. Casartellia, A. Grimaldib, M. de Eguileorb, F. Pennacchioc, B. Giordana, 2005. Nutrient absorption by *Aphidius ervi* larvae *Journal of Insect Physiology* 51, 1183-1192.
- Nakamatsu, Y., Gytoku, Y., Tanaka, T., 2001. The endoparasitoid *Cotesia kariyai* (Ck) regulates the growth and metabolic efficiency of *Pseudaletia separata* larvae by venom and Ck polydnavirus. *Journal of Insect Physiology* 47, 573-584.
- Nakamatsu, Y., Fujii, S., Tanaka, T., 2002. Larvae of an endoparasitoid, *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae), feed on the host fat body directly in the second stadium with the help of teratocytes. *Journal of Insect Physiology* 48, 1041-1052.
- Nakamatsu, Y., Tanaka, T., Harvey, J. A., 2006. The mechanism of the emergence of *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae) larvae from the host. *European Journal of Entomology* 103, 355-360.
- Nakamatsu Y., Tanaka T., Harvey J. A., 2007. *Cotesia kariyai* larvae

- need an anchor to emerge from the host *Pseudaletia separata*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 66, 1-8.
- Pennacchio F, Digilio MC, Tremblay E. 1995. Biochemical and metabolic alterations in *Acyrtosiphon pisum* parasitized by *Aphidius ervi*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 30, 351-67.
- Rahbé Y, Digilio MC, Febvay G, Guillaud J, Fanti P, et al. 2002. Metabolic and symbiotic interactions in amino acid pools of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, parasitized by the braconid *Aphidius ervi*. Journal of Insect Physiology. 48, 507-516.
- Stone, J. V., Mordue, A. J., 1980. Adipokinetic hormone IN: T. A. Miller (Ed) Neurohormonal techniques in insect, Springer, New York.
- Tanaka, T, Nakamatsu, Y., Harvey, J. A., 2006. Strategies during larval development of parasitoids in ensuring a suitable food resource (Review). Proceedings of Arthropodan Embryological Society of Japan 41, 11-19.
- Vinson, S.B., 1990. Physiological interactions between the host genus *Heliothis* and its guild of parasitoids. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 13, 63-81.
- Weinberg H. L., 1980. Hemolymph volume determination in the tomato fruitworm, *Heliothis zea*. Experientia 36, 548-549.
- Zölner N., Kirsch, K., 1962. Über die Quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) Mittels der Vielen Natürlichen Lipoiden (Allen Bekannten Plasmalipoiden) Gemeinsamen Sulfophosphovanillin-Reaktion. Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin 135, 545-561.