

ステロール欠培地で培養した *Phytophthora capsici* の異常遊走子嚢の細胞化学的電子顕微鏡観察

宮田 善雄・正子 朔

YOSHIO MIYATA and HAJIME MASAGO

Cytochemical observations on abnormal zoosporangium of
Phytophthora capsici cultured in the medium without sterol.

要旨: *Phytophthora capsici* において、ステロール欠培地で培養した菌体上に形成される遊走子嚢は、ステロールを含む培地で培養した場合の遊走子嚢のように、遊走子が分化して発芽する遊走子型発芽（間接発芽）はみられず、プロトプラスト全体が外部に放出されて、プロトプラスト型発芽を示す。細胞の微細構造的には、前者は後者と異なり、ゴルジ装置は貧弱で、ラメラや小胞構造が発達しておらず、また、がらくた胞と名付けた内部に小胞構造の充満した大小の胞嚢の存在することが特徴である。細胞化学的方法により、がらくた胞内の小胞群には、酸性フォスファターゼやチアミンピロフォスファターゼ活性が認められ、ゴルジ装置の断片もしくはそれに由来するものである可能性が高い。したがって、遊走子の膜形成に関与するゴルジ装置の一部またはそれに由来する構造が、なんらかの原因で胞嚢中に取込まれたために、遊走子への分化が阻害されたものと推察することができるが、ステロールとの関連性についてはまだ明らかでない。

I 緒 言

ウリ科・ナス科作物を侵害する植物疫病菌 *Phytophthora capsici* は、遊走子嚢の形成が容易であり、遊走子嚢やそれから生ずる遊走子を用いた研究の材料として好適である。本菌の培養には、キュウリジュース培地がすぐれている⁵⁾が、その遠沈上清液を用いた場合は、遊走子嚢は多量に形成されても、その遊走子嚢は正常な遊走子型発芽（間接発芽）がみられず、したがって遊走子を得ることができない⁶⁾。その後の研究により、遠沈残渣中に含まれるステロール類が、遊走子型発芽に重要な役割をはたしていることが明らかとなった⁷⁾。それらについては別に詳しく報告することにしてはいるが、このステロール欠培地で培養した菌体上に形成された異常遊走子嚢は、微細構造的にも、正常な遊走子嚢と異なる点が認められた。すなわち、ゴルジ装置とくにゴルジ小胞の発達が極めて貧弱であり、また、単位膜に包まれ、内部に様々の小胞群を充満した胞嚢（がらくた胞）が存在することである⁸⁾。

このがらくた胞内の小胞群は、形態的にゴルジ装置に由来するものであろうと推察したが、それを裏づけるために、細胞化学的に酸性フォスファターゼとチアミンピロフォスファターゼ活性の存在を調べてみた。ここにその結果を報告する。

II 材料ならびに方法

供試菌は前報と同様、*P. capsici*（本研究室保存菌 No. 002）であり、キュウリジュース遠沈上清液培地の作成法⁵⁾、菌体培養法ならびに遊走子嚢形成培養法⁵⁾については、すでに報告済みであるので省略する。なお、ステロールとしては、市販の β -シトステロール（半井化学）を用い、適量のアセトンで稀釈し、培地 1 ml 当り 0.05 mg となるように添加した。この際、アセトンは培地量の 1% 以下になるように留意し、1 時間以上送風蒸発させた上、オートクレーブ滅菌処理（121°C, 15 分間）を行なった。

電子顕微鏡は日本電子製 100B 型を用いた。試料の作成法は前報⁸⁾と同様である。細胞化学的方法による

酸性フォスファターゼおよびチアミンピロフォスファターゼ活性の検出は、それぞれ Gomori (1950)¹⁾ と Novikoff (1961)⁸⁾ に順じ、その処理方法は水平 (1971)⁷⁾ によった。

また、フリーズエッチング法は、日本電子製のフリーズエッチング装置を用い、平野ら (1971)²⁾ および日本電子の装置取扱説明書に準じて行なった。試料は 2.7% グルタルアルデヒド液 (生理的食塩水、大塚製薬) にて固定後、20% グリセリン液 (生理的食塩水) に 12 時間浸漬し、遠沈にて集めたペレットを、試料ホルダーに充填し、液体窒素で直ちに凍結したのち、装置に固定して切削した。白金パラジウムによるシャドウイングとカーボン蒸着後、漂白洗剤ハイター (花王石鹼) にて剥離し、グリッドですくい上げて検鏡した。なお、フリーズエッチング法による膜系を主とした観察結果は別に詳しく報告するつもりであるが、本法を行なうに際し、本学農学部土壌学研究室の米林甲陽講師の懇切なる技術的指導を得た。ここに記して謝意を表する。

III 観察結果

電子顕微鏡を用いて観察した遊走子嚢の微細構造は、ステロールを添加した培地で培養した。正常な遊走子嚢においても、ステロール欠培地で培養した異常遊走子嚢においても、基本的には差異はなく、一般に、厚い細胞壁に包まれた多核体で、クリステのよく発達したミトコンドリアに富み、電子密度の高い脂質顆粒を含み、大小様々の胞嚢で満たされ、小胞体がそれらの間をぬって走り、鞭毛が所々散見される。胞嚢の多くは、細胞化学的方法により、酸性フォスファターゼ (以下 ACPase と略す)、とチアミンピロフォスファターゼ (以下 TPPase と略す) の活性が認められ、一応、ライソゾームあるいはファゴゾームであると判断される (写真 7, 8)。ライソゾームの数や酵素活性の程度において、異常遊走子嚢は正常なものとはほとんど変わり認められない。正常な遊走子嚢において、写真 1, 2 にみられるように、主として核の近傍に、小胞の集団が認められるが、これは異常遊走子嚢中にはほとんど存在しない。この小胞集団はゴルジ装置を中心として形成されている。これらの状態はフリーズエッチング法による微細構造像においてもよく認められるところである (写真 3, 4)。一方、異常遊走子嚢において、がらくた胞と名付けた多数の小胞群

を内蔵した胞嚢が認められ、時には写真 5 のように極めて大きく発達したものがみられることも多い。この胞嚢は正常な遊走子嚢ではほとんど認められない。このがらくた胞内に充満している小胞について、筆者らは、ゴルジ装置に由来する断片であると推察した⁹⁾ が、それを傍証するために、細胞化学的方法による ACPase と TPPase の存在を調べてみることにしたのであるが、その結果、がらくた胞内を埋める小胞群には、顕著な酵素活性が認められ (写真 11, 12) 同時に、ゴルジ装置においても同様に酵素活性が確認され、一応、これらの小胞群がゴルジ装置に由来するものである可能性は高いと言えよう。なお、これらの酵素活性が単位膜上のみ存在するような胞嚢や、構造的に明瞭ではなく、酵素反応陽性の微小部位の存在も認められた。

IV 考察

ステロールを含む培地中で培養した菌体上に生ずる正常な遊走子嚢と、ステロール欠培地で培養した場合に生ずる異常な遊走子嚢において最も特徴的な現象は、前報⁹⁾ において述べたように、前者が 20°C 内外の水中で、十数分の間に、細胞内に割腔が生じ、20 個前後の遊走子が分化して、乳頭突起部より放出される (遊走子型発芽) のに対し、後者は遊走子への分化が起らず、全体が 1 個のプロトプラストとして外部へ放出される (プロトプラスト型発芽*) ことである。一方、両遊走子嚢の微細構造の相違は、前報および本報の結果において述べたように、ゴルジ装置の発達程度と、がらくた胞の存在である。この現象面と構造面を結びつける、ひとつの推論として、『正常な遊走子嚢では、ゴルジ装置の働きによって、膜形成が進行し、遊走子への分化が起り、典型的な遊走子型発芽が行なわれるのに対し、異常遊走子嚢では、何らかの原因により、ゴルジ装置が部分的に未発達で、ときには空胞中に取込まれて、がらくた胞となり、そのために原形質は遊走子に分化しないままに外部に放出され、プロトプラスト型発芽となるのであろう』と考えた。がらくた胞内に認められる小胞群がゴルジ装置に由来することは、細胞化学的に ACPase および TPPase の活性が認められることから一応の傍証を得たと考える。また、甲状腺摘出手術をほどこしたラットの下垂体前葉の甲状腺刺戟ホルモン分泌細胞において認められる変形ゴルジ装置¹⁰⁾ や、単離したゴルジ装

* 前報では原形質型発芽としたが、プロトプラスト型発芽と呼ぶ方がより適格であるように思える。従って、英名も protoplast-type germination と訂正したい。

置の細胞分画像の形態⁴⁾が、がらくた胞内の小胞群に酷似していることも、それを裏づけるようである。

ゴルジ装置の機能としては、分泌顆粒の産生がよく知られている¹⁰⁾。正常な遊走子囊中に多数認められるライソゾームも恐らくこのゴルジ装置から産生されたものであり、これは異常遊走子囊中の発達程度の低いゴルジ装置でも充分産生可能なのであろう。ただし、ライソゾームのように、粗面小胞体の一端から直接機械転されるとする説もあるようである⁹⁾。一方、ゴルジ装置は、分泌顆粒ばかりでなく、メラニン細胞のメラニン顆粒や、精子の尖体あるいは卵細胞の卵黄顆粒など様々の顆粒の産生に関与していることも知られ、さらに、多糖類の合成機能を有することも次第に明らかになってきた⁴⁾。従って、遊走子の分化に必要な細胞膜の形成もゴルジ装置に由来する可能性は十分に考えられるが、なによりも直接的証明が必要である。同時にがらくた胞内の小胞群がゴルジ装置に由来するものであることは一応証明できたものの、それが遊走子への分化機構の欠除とどのように結びつくかはなにもわかっていない。いずれにしてもゴルジ装置に由来する小胞群が、がらくた胞内に取込まれる機構は、一種の自己捕食作用と考えられるが、これがステロール欠培

養の遊走子囊に特徴的とも言えることは、ステロールの機能との関連性と共に極めて興味深い現象である。

引用文献

- 1) Gomori, G. (1950): *Stain Technol.* 25: 81—85.
- 2) 平野 正・鷲岳 宏 (1971): *細胞* 3(3): 31—41.
- 3) Kurosumi, K. and N. Baba (1969): *Gumma Symp. Endocr.* 6: 197—210.
- 4) 黒住一昌 (1970): *細胞* 2(10): 2—14.
- 5) 宮田善雄・桂 琦一・室川嗣夫 (1970): *京府大学報・農* 22: 27—30.
- 6) ——— (1972): *京府大学報・農* 24: 33—36.
- 7) 水平敏知 (1971): *電子顕微鏡*, 医歯薬出版, 東京.
- 8) Novikoff, A. B. and S. Goldfischer (1961): *Proc. Nat. Acad. Sci.* 47: 802—810.
- 9) 小川和朗・斉藤多久馬・馬屋原 宏 (1970): *細胞* 2(4): 2—13.
- 10) 鈴木郁男 (1970): *細胞* 2(10): 15—27.

Summary

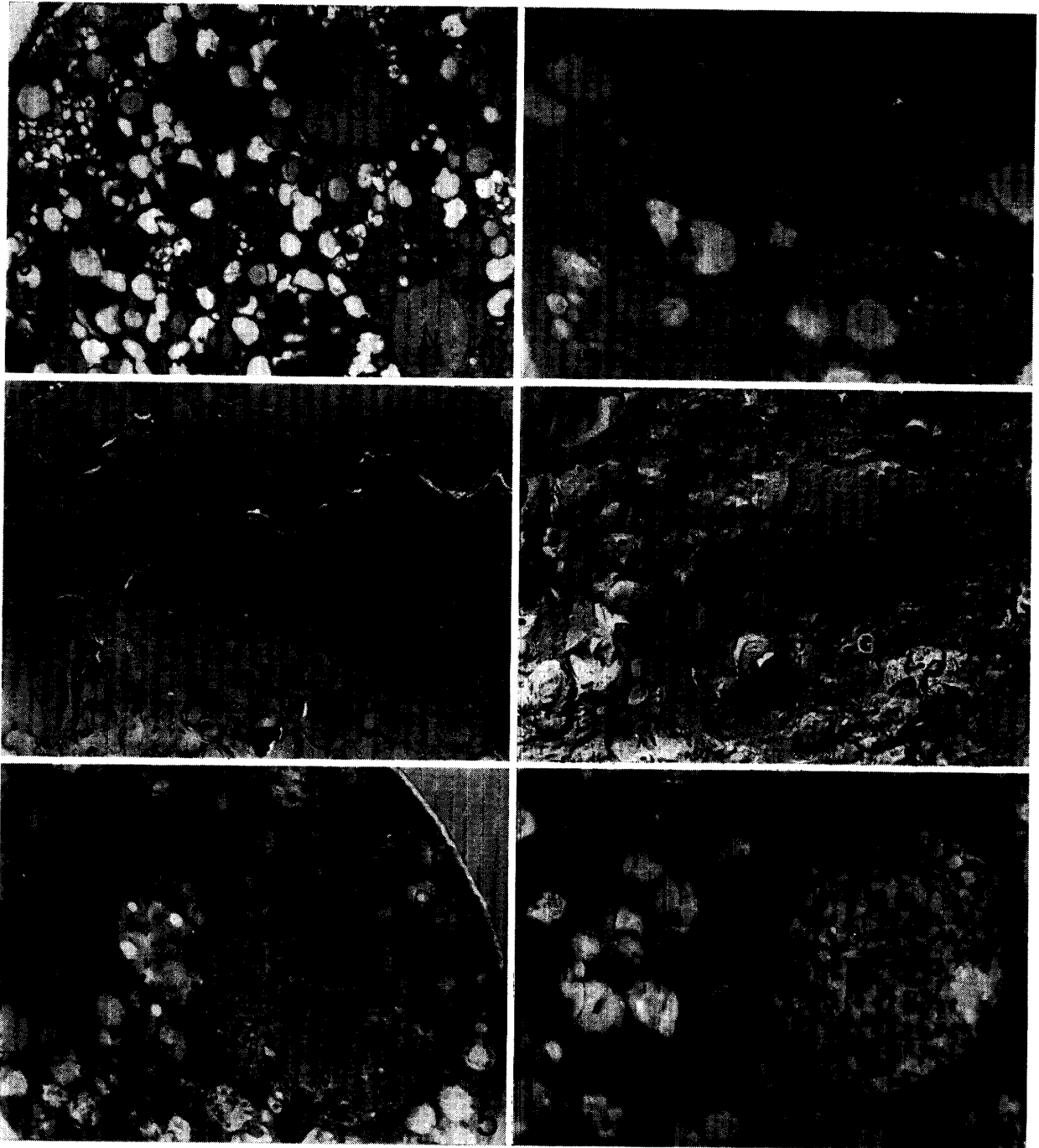
Phytophthora capsici grown in a sterol-less medium produced abnormal zoosporangia which were not capable of liberating zoospores at the time of germination apparently due to failure of cell division of zoosporangia into zoospores.

Fine structural comparisons between the normal zoosporangia cultured in a medium containing sterols such as β -sitosterol and the abnormal one revealed that there was little difference on main cellular organella i. e. nuclei, endoplasmic reticulla, lipid bodies, lysosomes, phagosomes and flagella. Significant differences, however, appeared to lie on the lack of well-developed Golgi apparatus with association of numerous small vesicles and on the existence of the peculiar vacuoles (proposed as

"rabbish vacuoles" in previous paper) containing numerous vesicles and granules in abnormal zoosporangia. The vesicles in this vacuole are probably originated from Golgi apparatus because cytochemical examinations indicated clear existence of acid phosphatase and thiamine pyrophosphatase activities in the vesicles.

The above observations that the failure of abnormal zoosporangia to differentiate into zoospores was characterized with the concomitant existence of rabbish vacuoles presumably originated from Golgi apparatus may indicate that the plasma membranes of zoospores is derived from the vesicles of Golgi apparatus.

PLATE I



1. 正常な遊走子嚢の微細構造

2. 核の近傍によく発達したゴルジ装置がみられる

3.4. フリーゼッチング法でみた正常な遊走子嚢の構造

5. 異常遊走子嚢の大型がらくた胞

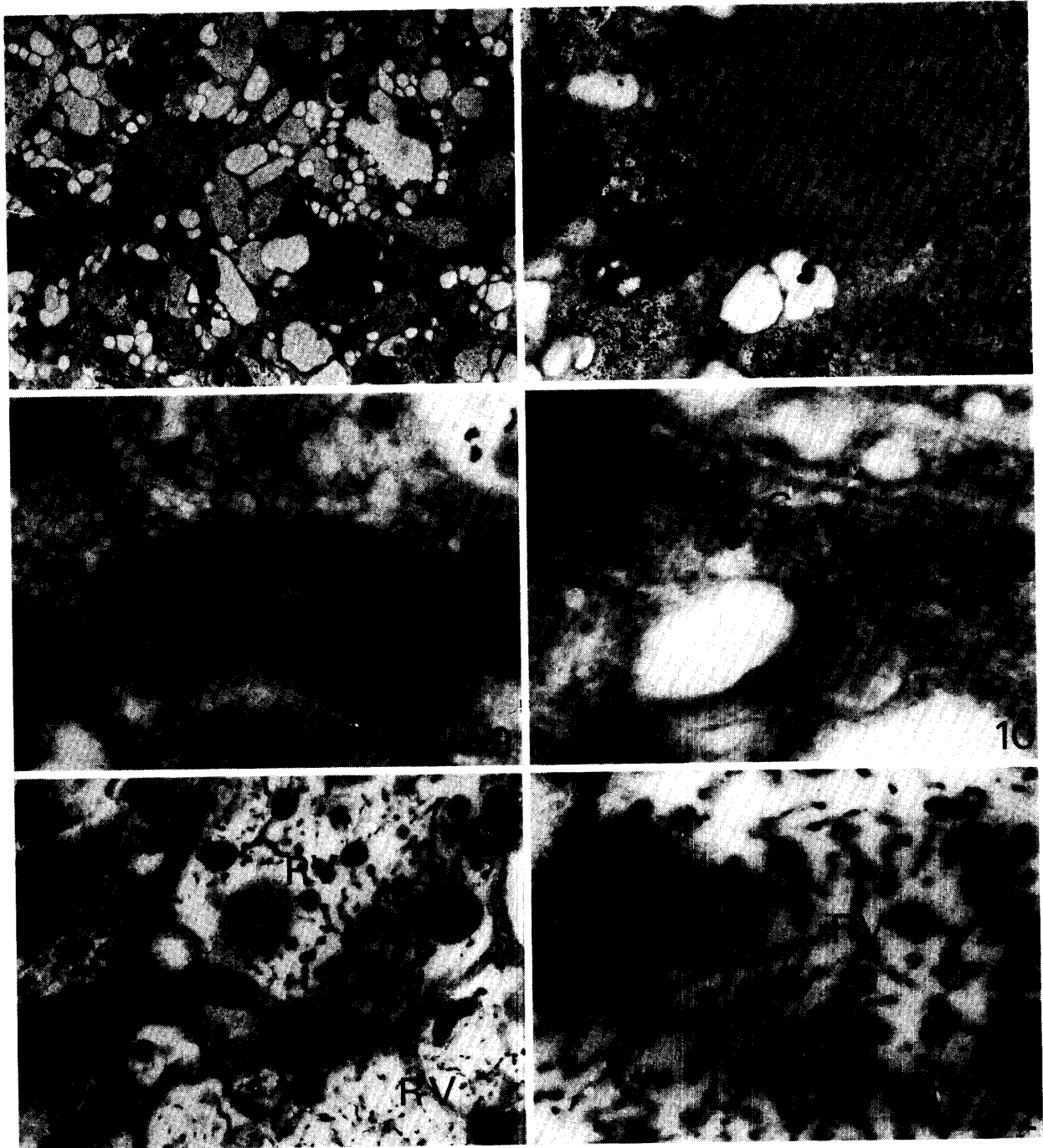
6. 異常遊走子嚢の小型がらくた胞

N：核

G：ゴルジ装置

RV：がらくた胞 (rabbish vacuole)

PLATE II



7. 正常な遊走子嚢における ACPase 活性 (黒点)

8. TPPase 活性を示したライソゾーム (L)

9. 正常な遊走子嚢におけるゴルジ装置のTPPase活性

10. 異常な遊走子嚢におけるゴルジ装置のACPase活性

11.12. がらくた胞内の小胞群とその ACPase 活性

N:核

G:ゴルジ装置

RV:がらくた胞 (rabbish vacuole)