

# *Phytophthora capsici* の遊走子の運動に関する研究 V

各種緩衝液中における遊泳異常と前・後鞭毛の働き\*

宮田善雄・桂 琦一

YOSHIO MIYATA and KIICHI KATSURA: Movements of zoospores of *Phytophthora capsici* V. Abnormal swimming of zoospores in some buffer solutions and the functions of anterior and posterior flagella

**摘要** 各種緩衝液中において、*Phytophthora capsici* Leon. の遊走子が示す異常遊泳を、暗視野照明下において観察し、遊泳における前・後鞭毛の働きを推定した。

Sørensen 緩衝液〔緩衝液(B)/遊走子けんたく液( $\phi$ )=3/1〕の場合、pH 5.5 において、遊走子は蛇行型遊泳をなし、次第にその程度が激しくなり、終には円運動を起こした。pH 8.0 においては、遊走子は正常と同じ捻転直進をなし、最後には不整円運動を行なうようになった。これらは、pH 5.5 において後鞭毛に対する阻害がより強く、pH 8.0 においては前鞭毛への阻害がより先に起こったためであろう。Michaelis 緩衝液(B/ $\phi$ =2/2)の場合、概して、遊泳阻害は Sørensen より強く起こった。pH 5.5 において、遊走子は静止後も前鞭毛の振動を永く残し、比較的大きな振巾をもつ波動運動が容易に観察された。また、pH 5.5, 6.5 において、前鞭毛遊走子を、pH 8.0 においては、後鞭毛遊走子を多数認めることができた。前者は捻転力を失って円運動を、後者は不完全捻転にもとづく不整円運動を行なった。McIlvaine 緩衝液の場合、B/ $\phi$ =1/3 において遊泳は最も活発で、いずれの pH 値においても捻転直進を認めた。遊泳速度は脱イオン水中に比べてかなり遅いが、捻転回数はむしろ増加した。

以上の観察より推定される遊走子の遊泳方法は次のようである。遊走子は体の後端に2本の鞭毛を有し、1本はそのまま後方へ、他の1本は体側に沿って前方へ伸びる。後鞭毛は全体が比較的小さな振巾で波動するのに対し、前鞭毛は体側に接しない先端の部分でのみ波動し、その振巾はかなり大きい。これらの波動は平面的であるが、両者において、波動面は必ずしも一致しない。この波動が遊走子の推進作用をもつものらしい。形態的に、鞭毛は体の一側にあるにもかかわらず、遊走子が直進し得るのは、遊走子が捻転することによる。この捻転は主として後鞭毛の働きであり、前鞭毛は体のバランスを保つことにより捻転を円滑にする補助的役割を有するものと推察される。

## I 緒 言

植物疫病菌遊走子が、植物体根部に対して示す走性、すなわち、方向性ある積極的遊泳行動は、本病が雨後、急激かつ広域に発生をみる主たる要因である。筆者らはこの走性現象について研究を進めてきたが<sup>7,8,9,10)</sup>、そのメカニズムを追求する段階に至り、まず、方向性を獲得する以前の行動、つまり、正常時の遊泳行動のメカニズムについて知ることの必要性を痛感した。

本病菌の如き2鞭毛遊走子の運動のメカニズムに関する報告は非常に少ない<sup>1,2,3,13,14)</sup>。それは、この種の遊走子の行動の複雑さに起因するようで、せいぜい、

メチセルローズ溶液などを用いて遊泳速度を低下させることにより、観察を幾分容易にすることが行なわれてきた<sup>14)</sup>。筆者らはここで観点を變えて、なんらかの方法により鞭毛運動に異常を起させ、その異常行動より正常行動を推測し得るのではないかと考えた。遊泳異常を起こさせる方法は種々考えられるが、以前、他の目的で、遊走子を緩衝液中で泳がせた場合、特異的行動を示すことを観察していたので、まず、数種の緩衝液を選出して、その中で起こる遊泳異常を詳細に観察してみた。そのうち、とくに3種の緩衝液中における独特の遊泳異常行動と、それから推測される前・後鞭毛の遊泳における機能の相違は、多くの興味ある問

\* 京都府立大学農学部植物病理学研究室(業績第74号)

Laboratory of Phytopathology, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan (Contribution No. 74)

題を含んでいるようであるから、ここに報告することにした。なお、本論文は文部省科学研究費の一部によって行ったもので、ここに深謝の意を表す。また本論文の一部はすでに1967年度日本植物病理学会総会において報告を行なったものである。

## II 材料ならびに方法

供試菌は本研究室保存の *Phytophthora capsici* Leon. 第65号菌であり、遊走子けんだく液作成法なども前報<sup>10)</sup>と同様である。

緩衝液としては、Sørensen, Michaelis および McIlvaine 緩衝液の3種を用いた(第1表)<sup>17)</sup>。選出の理

第1表 供試緩衝液(Buffer)の組成

緩 衝 液	組 成*
Sørensen りん酸緩衝液	M/15 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ M/15 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
McIlvaine 緩 衝 液	M/5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ M/10 くえん酸 (Citric acid)
Michaelis 緩 衝 液	M/7 バルビタールナトリウム (Barbital Sodium) M/7 酢酸ナトリウム (Sodium Acetate) 8.5% NaCl, N/10 HCl

\* それぞれ適当量<sup>17)</sup>混合して、pH 5.5, 6.5, 7.5, 8.0 に調整して供試した。

由は、これらが一般によく用いられるものであり、いずれも pH 5~8 の広い pH 域をとり得て比較に便利であると共に、遊走子の行動に対して、それぞれ独特の作用を有しているらしいことを認めたからである。

緩衝液中における遊走子( $\phi$ の記号で表わす)の行動の観察は次のようにして行なった。ミニセルスライドグラス<sup>17)</sup>のセル(直径10mm, 深さ1.5mm)中に、毛管スポイト(先端口径1mm)を用いて、緩衝液と遊走子けんだく液をそれぞれ所定量滴下、よく混合した。混合比は種々であるが、例えば、緩衝液3滴に対し、遊走子けんだく液1滴の場合( $B/\phi=3/1$ と表わす)、緩衝液2滴、脱イオン水1滴、遊走子けんだく液1滴の場合( $B/\phi=2/2$ )、緩衝液1滴、脱イオン水2滴、遊走子けんだく液1滴の場合( $B/\phi=1/3$ )などがあり、いずれも遊走子濃度が一定になるよう留意した。このミニセルを顕微鏡のステージに載せ、暗視野照明により観察した<sup>8,9)</sup>。遊泳行動の特徴をとらえるために、遊走子の遊泳軌跡の写真撮影を併用した。フィルムはネオパン SSS (ASA 200) を使用した。

なお、遊走子の鞭毛の長さの測定は、0.75%酢酸アンモニウム中において遊走子の崩壊を促し、鞭毛を裸

出させて暗視野照明下で写真撮影し、投影法により実測した。

## III 結 果

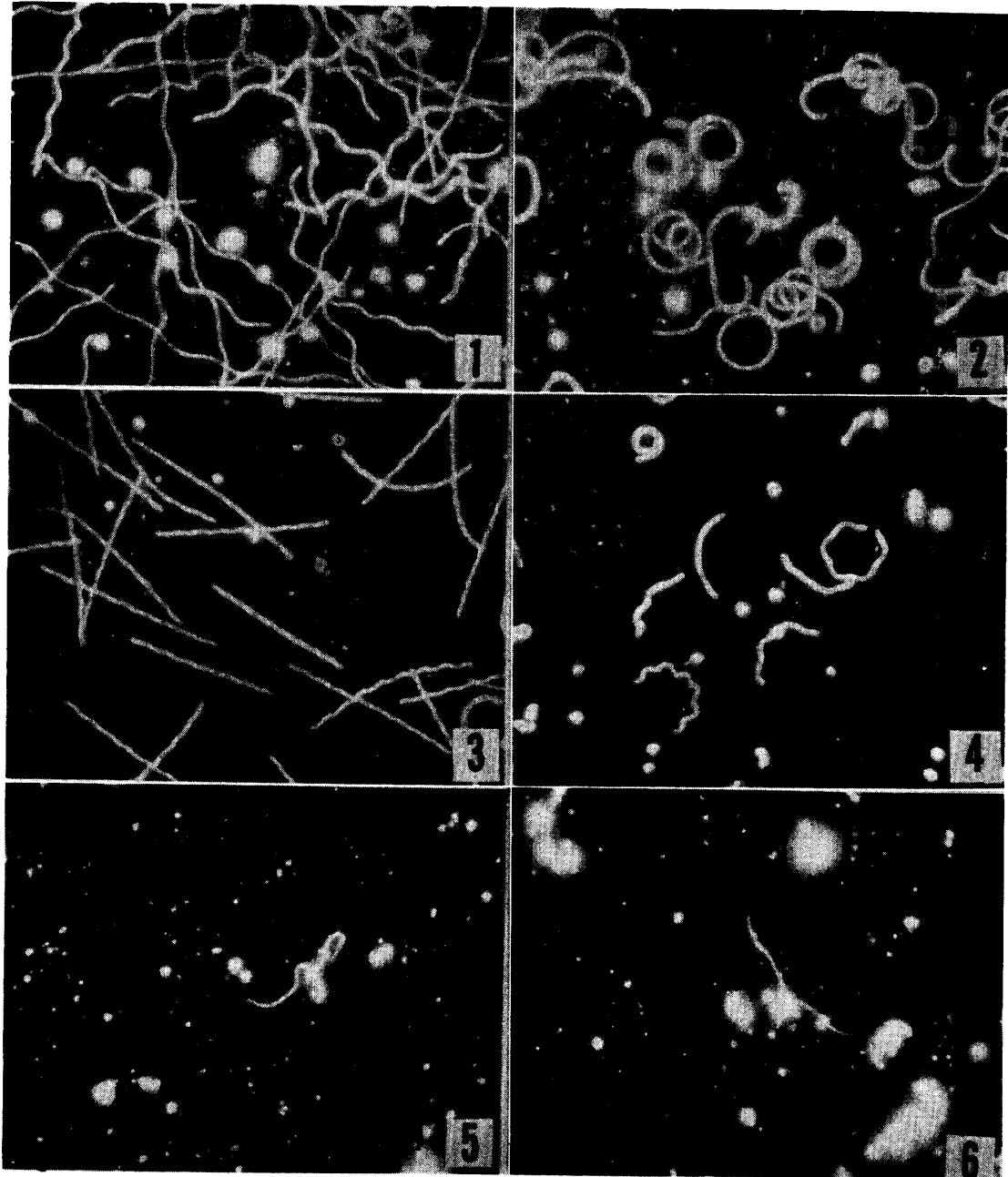
### (1) Sørensen りん酸緩衝液中における遊走子の行動

遊走子の遊泳は緩衝液の濃度によって著しい影響を受けた。例えば、pH 5.5において、混合比  $B/\phi=3/1$  の場合、遊走子はかなり活発な遊泳をするが、 $B/\phi=2/2$ となると、遊泳が緩慢となり、 $B/\phi=1/3$ においては強い遊泳阻害が認められ、1/7 ではほとんど瞬間的に静止した。稀釈がさらに進んで、1/16になると再び遊泳力がわずかに回復し、1/20-25 においてようやく正常に近い活発な遊泳に復帰した。逆に、 $B/\phi=9/1$ では遊泳阻害が増大した。この傾向は pH 8.0においても程度の差はあるが、ほぼ同様に認められた。この程度の稀釈では pH 値の変化はほとんど起こらないので、上記現象は、pH の影響ではなく、構成する化学物質の濃度によるものであろう。この阻害と阻害の起こる中間濃度において、遊走子は緩衝液の種類と pH 値に特徴的な遊泳異常を示した。

混合比を  $B/\phi=3/1$  とすると、pH 5.5の場合、遊走子は最初捻転しつつ蛇行型の遊泳(第1図, 1)をなすが、次第に、激しい蛇行を示すようになり、終には、捻転力を失なって円運動を行なうようになった(第1図, 2)。この円運動は比較的大半径の急速回転で、多くが右廻りである。pH 6.5の場合もほぼ同じであるが、遊泳速度がやや劣っていた。pH 7.5の場合、最初、捻転直進しているが、のち、やや蛇行を呈するようになり、小半径の円運動が多数認められるようになった。pH 8.0の場合、遊泳速度は遅いが、正常に近い捻転直進(第1図, 3)をなし、のち、不

第2表 Sørensen 緩衝液中における遊走子の行動

pH	混 合 比 ( $B/\phi$ )		
	3/1	2/2	1/3
5.5	遊泳活発 蛇行直進のち 円運動	遊泳活発 蛇行直進のち 円運動	遊泳阻害強し
6.5	遊泳やや低下 蛇行直進のち 円運動	同 左	遊泳阻害強し
7.5	遊泳やや低下 捻転直進やや蛇行 のち小円運動増加	同 左	遊泳阻害かなりあり 不整円運動
8.0	遊泳さらに低下 捻転直進のち 不整円運動	同 左	捻転直進 (前鞭毛の短縮著しい)



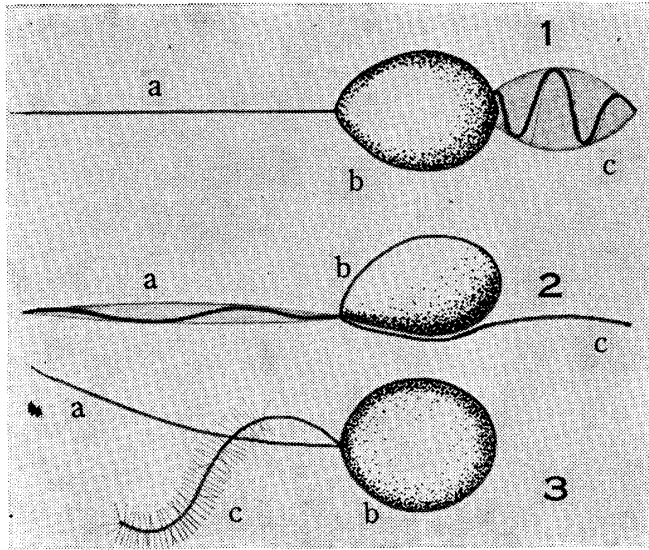
第 1 図

1. 蛇行直進型軌跡 2. 円運動軌跡 3. 捻転直進型軌跡 4. 不整円運動型軌跡  
5, 6. 0.75%酢酸アンモニウム中における鞭毛の裸出

整円運動となった(第1図, 4).  $B/\phi=2/2$  においても傾向はほとんど同じと云える(第2表). 上記の捻転直進, 蛇行前進, 円運動, 不整円運動については考察の項において解析する.

(2) Michaelis 緩衝液中における遊走子の行動  
概して遊泳障害が強い.  $B/\phi=3/1$  の場合, いずれの pH においても瞬間的に静止した. しかし, 興味あることは, 数分後, 鞭毛の振動が復活することで, pH 6.5 では, 10~15分後, ほとんどの遊走子が, ゆるやかに捻転直進するまでに回復した.  $B/\phi=2/2$  の場合も遊泳障害強く, 間もなく静止に至った. pH 5.5

では円運動する遊走子が多数みられたが, 後鞭毛を失い前鞭毛のみとなった遊走子(前鞭毛遊走子, 略して  $af\phi$ )であった. pH 6.5 では, 円運動と不整円運動をする遊走子が共にみられたが, 多くの場合前者は前鞭毛遊走子であり, 後者は後鞭毛遊走子( $pf\phi$ )であった. pH 8.0 においては不整円運動をなす後鞭毛遊走子はかなり認められた.  $B/\phi=1/3$  の場合, pH 5.5 では, ほとんどが捻転力を失い, 円運動を行なった. pH 6.5 では捻転力を若干有し, ゆるやかに直進するものもあるが, 多くは円運動を示した. 不整円運動をするものもわずかに認められた. pH 8.0 においては



第1図 遊走子の遊泳模式図

- 1: 遊泳中の遊走子背面, 2: 遊泳中の遊走子の側面
- 3: 静止直後の遊走子
- a: 後鞭毛, b: 本体, c: 前鞭毛.

捻転直進またはゆるやかに蛇行し、まもなく静止したが、前後鞭毛は共に残るものが多かった。これらの遊走子の行動の概要を第3表に示す。

(3) McIlvaine 緩衝液中における遊走子の行動

$B/\phi=3/1$  では、いずれの pH においても即時静止した。しかし、Michaelis 緩衝液の場合と同様に、間もなく鞭毛振動の復活がみられた。pH 5.5 では、ただ鞭毛振動のみが復活したが、pH 6.5 では、ゆるやかに捻転直進するものも現われ、pH 8.0 では、ほとんど全ての遊走子がゆるやかではあるが捻転直進力を回復した。 $B/\phi=2/2$  の場合、pH 5.5 においては、最初遊走子はゆるやかに捻転直進していたが、間もな

第3表 Michaelis 緩行液中における遊走子の行動

pH	混 合 比 (B/φ)		
	3/1	2/2	1/3
5.5	即時静止 鞭毛振動やや回復	間もなく静止 afφ*あり円運動	捻転力を失う 円運動
6.5	即時静止 鞭毛振動回復ゆるやかに捻転前進	間もなく静止 不整円運動認め afφ のちあり円運動	やや捻転力あり 蛇行前進および円運動 afφ, pfφ 共に認む
7.5	即時静止 鞭毛振動回復		蛇行前進
8.0	即時静止 鞭毛振動わずかに回復	蛇行直進 不整円運動認め (pfφ)	捻転直進または蛇行直進

\* afφ および pfφ については本文参照

く活発に活動しはじめた。pH 6.5, 7.5 および 8.0 では、いずれも遊走子は大部分直ちに静止した。わずかに遊泳するものも捻転ほとんどせず、ゆっくりと弧を描いて前進した。なお、ここでも若干の捻転力の復活がみられた。 $B/\phi=1/3$  の場合、いずれの pH においても、遊走子はかなり活発に捻転直進し、他の緩衝液の場合のような蛇行形はほとんど認められなかった。遊泳速度は pH 5.5 において最も速く、pH 値が高くなるに従い低下した。pH 7.5 および 8.0 にあつては、捻転直進する遊走子の前鞭毛が短縮していた。また pH 5.5 中においては afφ, pH 8.0 において pfφ をかなり認めることができた。なお、捻転直進における遊泳速度は明らかに脱イオン水中より劣るが、回転数は等しいか、または増加の傾向があり、pH 5.5 において、正常時の 2.06/sec に対し、2.59/sec を示した。

(4) 遊走子の遊泳体型と前・後鞭毛の働き

本菌遊走子は第1図の如き形態をとり、体の後端より2本の鞭毛を出す。そのうち1本はそのまま後方に伸び、他は体側に沿って前方に伸びる。前鞭毛は体側に接した部分より先の部分にて振動しているの、遊泳中は、2本の鞭毛がそれぞれ体の前後端より生じているように見える。鞭毛の波動は平面的であるが、波動面は前・後鞭毛において必ずしも一致しない。前鞭毛の振巾は後鞭毛に比し大きい。Michaelis 緩衝液 pH 5.5 ( $B/\phi=3/1$ ) 中において、この前鞭毛の波動状態がよく観察される。鞭毛が体の中心に位置しないにもかかわらず、遊走子が直進し得るのは、体が捻転

第4表 McIlvaine 緩衝液中における遊走子の行動

pH	混 合 比 (B/φ)		
	3/1	2/2	1/3
5.5	即時静止 鞭毛振動復活	捻転直進 速度遅しのち回復	捻転直進 速度速し afφ 認む
6.5	即時静止 鞭毛振動復活ゆるやかに捻転前進を認む	微動のち捻転直進回復速度	捻転直進 速度やや低下
7.5	即時静止 鞭毛振動復活捻転前進かなりあり	微動のち捻転直進回復前鞭毛縮少	捻転直進 速度やや低下
8.0	即時静止 鞭毛振動復活ほとんど捻転前進	微動のち捻転直進回復前鞭毛縮少	捻転直進 速度さらに低下 前鞭毛縮小, afφ 認む

afφ および pfφ については本文参照

しているからであるが、前述の各種緩衝液中における遊走子の様々の遊泳変化、とくに前鞭毛遊走子の円運動および後鞭毛遊走子の行動から推測して、捻転の原動力は後鞭毛にあるものと思われる。しかし、McIlvaine 緩衝液中でみられたように、たとえ短縮していても前鞭毛が附随している場合はスムーズな捻転直進が行なわれることより、前鞭毛は体のバランスを保つことにより捻転の補助的役割を担っているであろう。

#### IV 考 察

鞭毛性遊泳生物の緩衝液中における行動に関する研究は著者らが最初であろうと思われる。結果において述べた遊泳における前後鞭毛の機能、とくに後鞭毛の捻転作用については、他に報告をみないものであり、その推測の根拠は先に述べた緩衝液中における様々の異常遊泳の観察にもとづくものであるから、ここで異常遊泳のタイプについて解説する。

**捻転直進** 正常時の遊泳行動である。正確には Couch<sup>2)</sup> の云うようなラセン型前進であるが、暗視野照明による写真撮影すれば、第1図、3のような軌跡を示し、ほぼ直進と云い得るものである。

**蛇行前進** 後鞭毛の捻転力の低下にともない、遊走子は正常な捻転を行い得ず、回転軸にふれを生ずる。これはラセン状の遊泳となって現われ、暗視野写真では蛇行状を呈する(第1図、1)。

**円運動** 後鞭毛が捻転力を失なった場合に起こる。遊泳はスムーズである。円の大きさは主として前鞭毛の推進力に依存するが、後鞭毛に推進力の残っている場合も多く、円運動は大きくかつ急速である(第1図、2)。

**不整円運動** 上とは逆に、前鞭毛の補助力を失ない、かつ、後鞭毛の捻転力も弱まった場合に起こる。暗視野写真では第1図、4の如き軌跡を残す。

**前鞭毛遊走子** 前鞭毛のみを有する遊走子である。Michaelis 緩衝液 pH 5.5 あるいは6.5においてとくによく出現するが、概して酸性側において生ずる傾向がある。捻転力は全くなく、ゆるやかにスムーズな小半径円運動を行う。

**後鞭毛遊走子** 上とは逆に前鞭毛を失ない、後鞭毛のみとなった遊走子である。多くの場合、後鞭毛もかなり障害を受けているものと思われ、前述の不整円運動を行なう。ただし、まれに捻転直進も認められたことが、後鞭毛に捻転機能が存するとする主たる理由である。

前鞭毛遊走子および後鞭毛遊走子については、すでに Couch<sup>2)</sup> も報告している。彼によれば、前鞭毛遊走

子は捻転せず、後鞭毛遊走子は非常に不整的な捻転を行なうとする点は著者らの観察と一致するが、前鞭毛遊走子もまた直進に近い遊泳を示していることは、彼の用いた *Saprolegnia ferax* は体型的に中心の位置に鞭毛を生じているのではないかと思われる。このような観察にもかかわらず Couch<sup>2)</sup> は後鞭毛に捻転力が存在すると推測する段階には達していない。遊走子の遊泳に及ぼす鞭毛の機能については、この他に McKeen<sup>14)</sup> の報告があるが、遊走子の推進力は主として前鞭毛に存し、後鞭毛は単にかじ(rudder)の役割を持つにすぎないと述べているが、鞭毛の捻転力についてはふれていない。遊走子に関して最近に Fawcett<sup>3)</sup> Kole<sup>13)</sup> および Colhoun<sup>11)</sup> の総説があるが、それらがいずれも結論づけているように遊走子の運動に関する鞭毛の機能については現在ほとんどわかっていないということになる。鞭毛遊泳性生物の運動に関する研究のうち高等生物については、精子に関する研究が最も進んでいるようであるが、それとても細部については未明のことが多い<sup>15,16)</sup>。

近年の電子顕微鏡技術の進歩が生み出した多くの知見の中で、動植物界を通じて、多くの鞭毛がその基本的構造においてほとんど変わらないという事実がある<sup>3)</sup>。このことは、運動における鞭毛の機能もまた、基本的には同じであることを裏書きしているのであろうが、それならば、本論文で述べたような鞭毛における機能の分化はどこから生じてくるのであろうか。前・後鞭毛の構造上の相違、とくに外形的相違は、古くは染色法により、新たには電子顕微鏡の仕事により、詳細に判明されてきたが、機能上の分化を構造の分化によ

第5表 *Phytophthora capsici* の遊走子の前後鞭毛の比較

比較項目	前 鞭 毛	後 鞭 毛
形 態	Tinsel(ブラシ)型	Whiplash(ムチ)型
長 さ	約 22 $\mu$	約 24 $\mu$
着生位置	細胞後端	細胞後端
波 動	体に接しない先端部分	鞭毛全体が波動
振 巾	大	小
静止鞭毛	曲りやすい	直すぐ伸びている
ループ形成*	ループを形成する	ループを形成する
緩衝液に対する反応	塩基性側において障害をされやすい	酸性側において障害をされやすい
機 能	推進作用	推進作用
(推 定)	捻転補助作用	捻転作用

\* 遊走子のシスト時における鞭毛のループ形成 (著者未発表)

てのみ説明し得るとは考えられない。この解決は、ただ今後の研究に待つほかないが、最後に現在得られる知見をもとにして、前・後鞭毛の構造的機能的異同について第5表に列記してみた。

### 引用文献

- 1) Colhoun, J. (1966): The fungus spore, Butterworths, London, p.85-94.
- 2) Couch, J. N. (1941): Am. J. Botany **28**: 704-713.
- 3) Fawcett, D. W. (1961): The cell **2**, Academic Press, New York, p.217-297.
- 4) Ferris, V. R. (1954): Science **120**: 71-72.
- 5) Ferris, V. R. & H. H. Lyon (1954): Phytopathol. **44**: 487-488.
- 6) 桂琦一・原田賢之・村上道夫(1956): 日植病報**21**: 71-73.
- 7) 桂琦一・正子朔・宮田善雄(1966): 同上 **32**: 215-220.
- 8) 桂琦一・宮田善雄(1966): 京都府大学報・農**18**: 51-56.
- 9) 桂琦一・宮田善雄・宮越盈(1967): 日植病報**33**: 23-26.
- 10) 宮田善雄・桂琦一・宮越盈(1967): 関西病虫害研究会報 **9**: 56-61.
- 11) 桂琦一・宮田善雄(1967): 日植病報**33**: 73(講要).
- 12) Kole, A. P. & K. Horstra(1959): Proc. K. ned. Akad. Wet. Ser. C. **62**: 404-408.
- 13) Kole, A. P. (1965): The Fungi **1**, Academic Press, New York p.77-93.
- 14) McKeen, W. E. (1962): Can. J. Microbiol. **8**: 897-904.
- 15) 毛利秀雄(1967): 遺伝**21**: 23-27.
- 16) 毛利秀雄(1966): 化学と生物 **4**: 686-693.
- 17) 千谷晃一・近藤洋一(1958): 実験化学講座, 丸善東京**24**: 201-229.
- 18) Vujicic, R., J. A. Chapman & J. Colhoun(1965): Trans. Br. Mycol. Soc. **48**: 153-154.
- 19) Waterhouse, G. M. (1962): Trans. Br. Mycol. Soc. **45**: 1-20.

### Summary

Abnormal swimmings of zoospores of *Phytophthora capsici* Leon. were observed in some buffer solutions under the dark-field illumination, and assumption was made as to the functions of anterior and posterior flagella in swimming of zoospores.

In Sørensen phosphate buffer (buffer/zoospore suspension,  $B/\phi=3/1$ ), at pH 5.5, zoospores showed snakey movement(Fig. 1-1), and their rotation became gradually imparfect. Finally zoospores entered in a smooth circular swimming without rotating (Fig. 1-2). At pH 8.0, zoospores swam straightly with rotation at the beginning(Fig. 1-3), but the most of them showed irregular circular movement at the later stage (Fig. 1-4). These observation suggests that the posterior flagellum was functionally obstructed at pH 5.5, while the anterior flagellum lost its function before the posterior one at pH 8.0. The functional obstruction of zoospore swimming was better elucidated in Michaelis buffer( $B/\phi=2/2$ )than in Sørensen buffer. At pH 5.5, undulation of anterior flagellum with a large amplitude was observed just before the cease of spore movement. Many of anterior

flagellum-zoospores were recognized at pH 5.5 and 6.5, and posterior flagellum-zoospores at pH 8.0. The former swam smoothly in circle, but the later showed on irregular spiral path or unoven circle. In McIlvaine buffer ( $B/\phi=1/3$ ), zoospores swam straightly with rotation regardless of pH values. Swimming velocities were slower than normal, but the frequency of rotation was almost the same. From these observations the following assumption was made as to the mode.

The zoospores swim in a spiral path rotating on their axis. The two flagella are attached laterally, one projecting forward, the other backward. Each flagellum undulates in only one plane with respect to the zoospore. Both are active in propelling the spore. The spores rotate on their axis, and this rotation keeps the straight swimming of the spore even though the flagella are attached at one side of the cell. The posterior flagellum is mainly responsible for the rotation of spore, and the anterior one supports it by keeping the balance of body.