

Phytophthora capsici LEON. の遊走子の運動に関する研究 VI

遊走子の遊泳と小遊走子のう形成*

宮田 善雄・桂 琦一・卜部 貞男

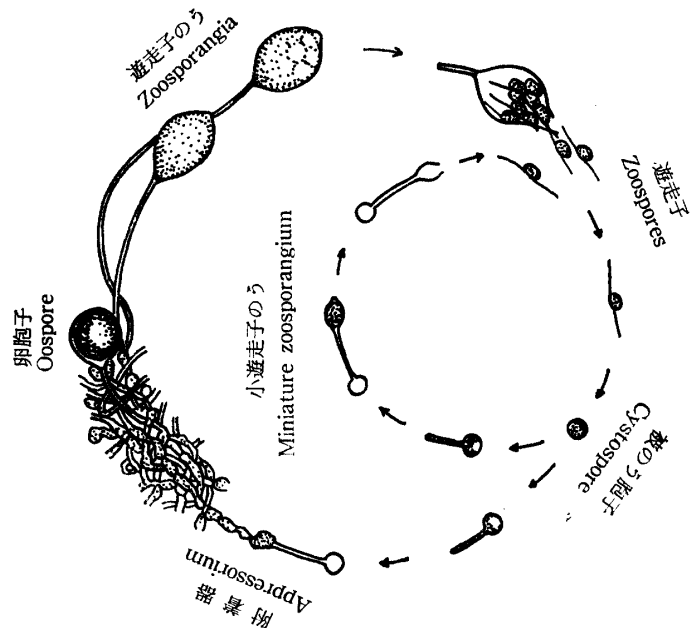
YOSHIO MIYATA, KIICHI KATSURA and SADAU URABE: Movements of zoospores of *Phytophthora capsici* LEON. VI. The relationship between swimming activity of zoospores and formation of miniature zoosporangia

要旨: 遊走子のうより遊出した *Phytophthora capsici* の遊走子は遊泳後被のうするに至る。被のう胞子はその後発芽し適当な条件下で小遊走子のうを形成する。常法により作製した遊走子けんたく液を、そのまま 20°C に保つと遊走子は最高 9 時間遊泳を続けるが、その遊走子を一定時間毎に取出して 32°C に移し速やかに被のうさせ、12 時間後小遊走子のう形成率を測定したところ、遊泳直後のものでは 72% であったのに対し、8 時間遊泳のものでは約 8% に低下した。遊走子を 32°C に移す前に 36°C で 15 分間処理すると発芽管の伸長にはほとんど影響なく、小遊走子のうの形成のみを抑制できるので、この処理を行なった場合の発芽管長を、そのピークに達する 6 時間後に比較したが、発芽管は遊泳時間に関係なくほぼ一定の伸びを示した。以上の結果より、遊走子の遊泳に使用されるエネルギー源は発芽管伸長に要するそれと異なるものであり、かつ、その遊泳エネルギー源となる物質の存在が、発芽管伸長の代謝活動を抑制して、小遊走子のう形成への代謝変化を誘起するのではないかと考える。その物質としてはある種のリン脂質を想定している。

I. 緒 言

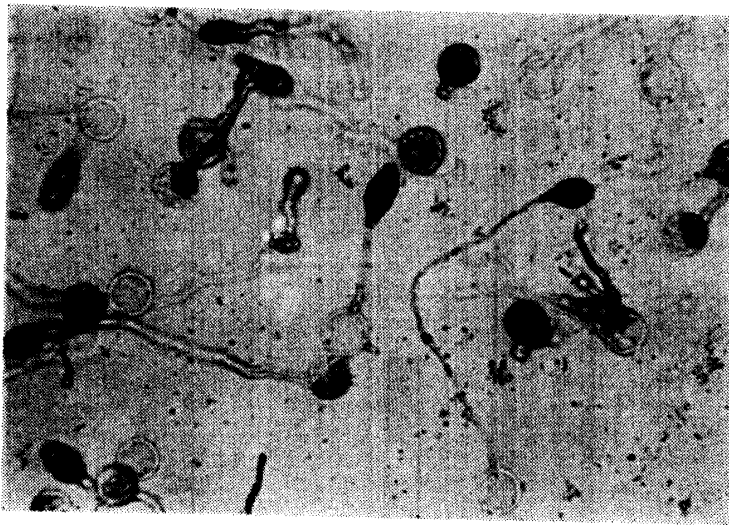
Phytophthora 属菌に起因する蔬菜・果樹・花卉類の病害が近年次第に重要視されつつある。本病の急激なる伝染蔓延が、本菌の生活史中に生ずる遊走子によることは云うまでもないが、著者らは今までナス科・ウリ科植物を侵害する *Phytophthora capsici* を用いて、この遊走子の遊泳行動、とくに走性行動に関して研究を進めてきた。ところが、その研究途上、遊走子の遊泳と、その後の小遊走子のう形成の間に密接な関係があるという興味ある現象に気付いた。このことは遊走子の遊泳に使われるエネルギー源が菌の伸長におけるそれと異なるものであるということ想起させ、今後の遊走子の運動の研究遂行上、有意義な示唆を与えてくれると共に、遊走子のう形成、ひいては、現代生物学上の重要課題である形態形成 (Morphogenesis) の機構解明の上に、新たなパターンを提供するように考えられるのでここに報告することにした。なお、本研

究における遊走子と小遊走子のうの位置を明らかにするために、本菌の生活史の概略と小遊走子のうの写真を付した(第 1, 2 図)。



第 1 図 *Phytophthora capsici* の生活史 (life cycle)

* 京都府立大学農学部植物病理学研究室(業績第79号) 本研究は文部省科学研究費の一部で行なった。記して感謝の意を表す。
Laboratory of Phytopathology, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan.
昭和43年7月31日受理



第2図 小遊走子のう
Miniature zoosporangia

II. 材料ならびに方法

Phytophthora capsici Leon. No. 65 を供試した。また、遊走子のうのとり方、遊走子けんたく液の作成方法などはいずれも著者らの一連の研究において共通である。遊走子けんたく液の濃度は光電比色計(島津スペクトロニック20)を用いて前報⁷⁾に述べた方法により決定した。本研究を通じて、遊走子の被のうから小遊走子のう形成に至る過程の観察測定は、穴あきスライドグラス(Micro-cell glass slide)⁸⁾を用いて行なった。36°C を除くすべての温度処理は電気恒温器内において行ない、36°C は小型電気恒温槽上に浮べた金属箱内をその温度に調節して使用した。被のう胞子の発芽管長の測定は、顕微鏡(ニコン製、三眼鏡筒)の

写真撮影用ファインダーの像をスリガラス上に結ばせ、それを硫酸紙に写し、さらに写真用引伸器で拡大投影して、キルビメーターで実測し換算して実長を求める方法を採用した。本法は簡単でかなり精度が高く、本研究同様一般の胞子発芽管長測定のほか、花粉管など彎曲したものの顕微鏡的測定に便利であると思う。

III. 結 果

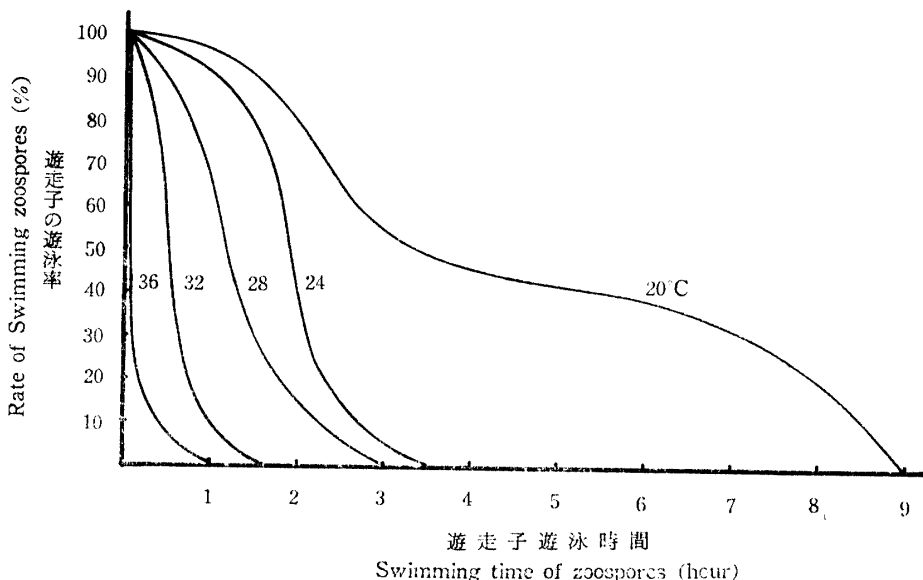
(1) 遊走子の遊泳時間と温度

まず、種々の温度(20, 24, 28, 32 および36°C)における遊走子の遊泳時間を求めた。遊泳中の遊走子数を測定することは困難であるから、一定時間おきに被のう胞子の数を測定して被のう率を求め、遊泳率(%)=100-被のう率(%)により遊走子の遊泳率を算出した。その結果(第3図)、本実験の範囲内では、20°C において遊走子の遊泳は最も長く、ほぼ9時間継続された。遊泳時間は温度の高くなるに従って短縮され、36°C では大部分の遊走子が30分以内で遊泳を停止した。

(2) 被のう胞子の発芽と温度

次に、被のう胞子の発芽と温度の関係を調べてみた。遊走子をそのまま各温度に保ったのでは遊泳時間が異なるので、まず、32°C に45分間保って、すべての遊走子を強制被のうさせたのち、各温度区に移し、2時間後および6時間後に発芽率を測定した。

結果は第1表に示すように、20~32°C ではいずれ



第3図 温度と遊走子の遊泳時間
Swimming time of zoospores in different temperature

第1表 温度と被のう胞子の発芽率

経過 時間	温 度 (°C)				
	20	24	28	32	36
発芽率 (%)	2hr 71.1	69.6	73.0	69.6	40.2
	6 84.7	87.9	88.4	88.4	57.1

も良好に発芽して、2時間後で70%前後、6時間後で85~90%の発芽率を示したのに対し、10°C および36°C では、かなりの発芽阻害が起こり、6時間後においても、60%前後の発芽率にとどまった。なお、発芽率は20°C から32°C までほとんど変わらないが、その後の発芽管の伸びは28°C において最も良好のようであった。

(3) 小遊走子のう形成と温度

小遊走子のう形成適温を調べるために、まず、遊走子を32°C、45分間処理することにより強制的に被のうさせた後、20、24、28、32、34および36°Cの各温度に移し、12、18、24および30時間後に、その小遊走子のう形成率を測定した。小遊走子のう形成率は発芽した被のう胞子数に対する百分率として求めた。その結果を第2表に示す。小遊走子のう形成は32°Cが

第2表 温度と小遊走子のう形成率(%)

時 間 (h.)	温 度 (°C)					
	20	24	28	32	34	36
12	3.1	29.7	51.2	53.1	18.6	0
18	10.8	41.5	70.0	81.9	27.6	0
24	23.4	49.2	81.4	89.7	38.8	0
30	25.0	51.9	84.0	92.1	41.7	0

$$\text{小遊走子形成率(\%)} = \frac{\text{小遊走子のう数}}{\text{発芽被のう胞子数}} \times 100$$

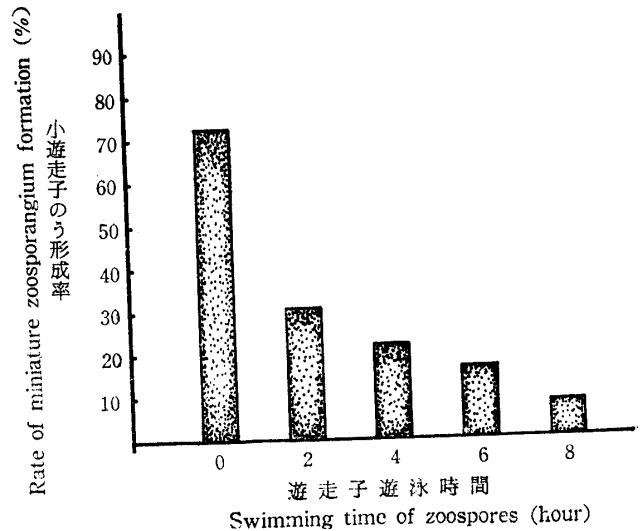
最も良好で、次に28°Cがよく、それより高い温度の場合も低い温度の場合もいずれも漸次形成率は低下し、36°Cでは全く形成をみなかった。なお、小遊走子のうを形成した場合、発芽管の長さは短かく、逆に、小遊走子のうを形成しなかったものでは、発芽管を長く伸ばしている傾向がみられた。

(4) 遊走子の遊泳時間と小遊走子のう形成

長時間遊泳した遊走子の被のう胞子は、小遊走子のう形成が少ない傾向にあることを、以前の観察において認めていたのであるが、それを明確にすべく次の実験を行なった。遊走子のうより遊出する遊走子量は20°Cにおいて約1時間後ピークに達する。この時、ティッシュペーパー4枚にて濾過し、遊走子けんだく液を得るが、この時を一応、遊走子の遊走0時間と定め、

さらに20°Cに保って2、4、6および8時間後にそれぞれ遊走子を取り出し、32°Cに移して、前項の結果より小遊走子のうの形成がほぼピークに達する18時間後に、小遊走子のう形成率を求めた。

この結果(第4図)、想定した通り、小遊走子のう



第4図 遊走子の遊泳時間と小遊走子のう形成
Formation of miniature zoosporangia correlated to the swimming time of zoospores

の形成は遊泳時間が長くなるに従って顕著な減少を示した。なお、同時に発芽管長の測定も行ない、それらが遊泳時間とほぼ無関係である結果も得たが、前述のように、小遊走子のうが形成されると発芽管長の伸びは停止するので、正確に発芽管伸長能力を測定比較するためには、なんらかの方法で小遊走子のうの形成のみを阻止する必要がある。

(5) 36°C 処理による被のう胞子の発芽と小遊走子のう形成

さきに、温度と小遊走子のう形成の関係を調べた際、36°Cでは小遊走子のうが全く形成されないことを知った。そこで、36°C処理が小遊走子のう形成能を主として阻害しているとすれば、その処理時間を充分に短くして、発芽管伸長能力にはほとんど影響を与えることなく、小遊走子のう形成のみを抑制することが可能ではないかと考えた。

遊走子けんだく液を36°Cに保ち、15、30、45および60分後に取出して直ちに32°Cに移し、それぞれ6時間後に被のう胞子の発芽率と、18時間後に小遊走子のう形成率を測定した。

結果は第3表の通りであり、小遊走子形成率は、無処理区が75%であったのに対し、36°Cによるわずか10分間の処理で約30%、15分処理で11.6%に、急激な

第3表 36°C 処理による被のう胞子の発芽と小遊走子のう形成

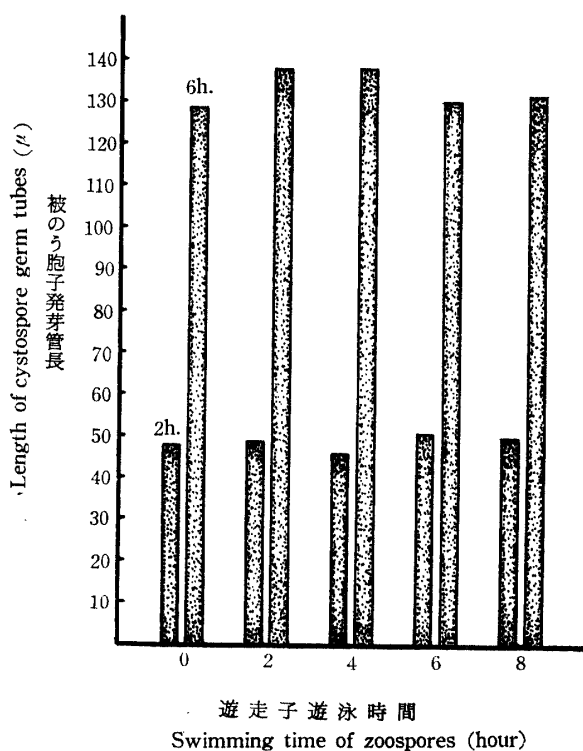
	処理時間(分)			
	10	15	30	45
発芽率(%)	86.2	84.6	77.1	61.0
小遊走子のう形成率(%)	29.5	11.6	10.2	9.9

低下を示し、それ以降は漸減の傾向を示した。一方、被のう胞子の発芽率は全般的に 36°C 処理により阻害される傾向があったが、15分間処理程度では無処理区とほとんど変わらず、80%以上の高率を維持した。以上のことより、さきの目的のために 36°C、15分間処理が有効であると考えられる。

(6) 遊走子の遊泳時間と被のう胞子の発芽管伸長

第4項と同様に 20°C において遊泳中の遊走子を2時間おきに取り出し、36°C、15分間処理により強制被のうさせ、直ちに 28°C に移し、2時間および6時間後に発芽管長を測定した。

その結果は第5図に示すようになり、2時間後、6時間後ともに発芽管は遊泳時間に関係なく、ほぼ等しい伸びを示した。また、6時間後の発芽管の長さはいずれも 130 μ 前後であり、これは熱処理を行なわない



第5図 36°C、15分処理した場合の遊走子の遊泳時間と被のう胞子の発芽管長
Length of germ tubes of cystospores in high temperature treatment of 36°C for 15 minutes

場合とほとんど等しく、しかも、これが発芽管長の最大の伸びであると思われる。

(7) 遊走子けんたく液濃度と小遊走子のう形成

時間の経過と共に遊走子は漸次被のうするから、遊走子けんたく液の濃度は次第に薄くなっていく。この濃度低下が、小遊走子のう形成に影響を及ぼしている可能性があるため次の実験を行なった。

まず、遊走子けんたく液の濃度の経時変化を光電比色計を用いて測定した。その結果、最初 1ml 当り 1×10^5 個であった遊走子は、2、4、6時間後それぞれ 6.7×10^4 、 4.5×10^4 、 2.6×10^4 と漸減し、8時間後には 9.5×10^3 個となった。一方、遊走子けんたく液を種々の濃度に希釈して、それぞれの小遊走子のう形成率を求めた。その結果、1ml 当り 10^5 から 2.5×10^3 の濃度範囲では、いずれも 70~80% の高い形成率を維持し、さらに濃度が低くなると急激に低下した。すなわち、 1×10^3 で約 27%、 6×10^2 で約 18% となった。結局、遊走子の濃度は小遊走子のう形成に影響を与えるが、最初の濃度を 1ml 当り 10^5 個程度にしておけば、8時間遊泳後の濃度は約 10分の 1 に低下しているものの、この濃度範囲では、小遊走子のう形成にほとんど影響を与えないと考えてよからう。

IV. 考 察

被のう胞子の発芽管の先端に形成される小型の遊走子のう、すなわち、小遊走子のうに関する研究報告は非常に少ない。Waterhouse¹⁰⁾ が、miniature sporangium として記載しているのがおそらく最初であって、その後、小遊走子のうの存在については、幾らかの報告中に見られるが、いずれも若干の形態的記録にとどまるようである⁵⁾。

この小遊走子のうから再び遊走子が泳ぎ出すことは、ミズカビ類の多くにみられる diplanetism^{1,5,11)} とほぼ同じ現象であろうが、ミズカビ類では被のう胞子から直接遊走子が泳ぎ出すのに対し、本菌では発芽管の先端にレモン型の小遊走子のうを形成し、そこから遊走子となって遊出する。また、この二次遊走子は一次のそれとほとんど異なるところがない。すなわち、小遊走子のうは遊走子のうのままに簡素化されたモデルであり、加えて、小遊走子のうの形成が、遊走子の遊泳と密接な関係にあるとみられる傾向をつかみ、形態形成 (morphogenesis) 上の興味もあって、この研究となったことは緒言にも述べた通りである。

結果は予想通り、遊走子の遊泳時間が長くなると共に、小遊走子のうの形成は顕著に抑制されたのに対し、被のう胞子の発芽能力、発芽管伸長能力にはほとんど

影響のないことを確認した。そこで次のような仮説を立てた。

「遊走子の遊泳に使用されるエネルギー源は、発芽管伸長に要するそれと異なるものであり、その遊泳エネルギー源となる物質の存在が、発芽管伸長の代謝活動を抑制して、小遊走子の形成への代謝変化を誘起する」

一般に糸状菌の菌糸は解糖によりエネルギーを得ていることは周知の通りであり、胞子の発芽後の伸長もまた同様であろう。したがって、それと異なる物質としてはまずタンパク質と脂質が考えられるが、小さな遊走子が驚くほど活発な遊泳行動を示すことから、効率の高い脂質を用いている可能性が充分にある。事実、ほ乳類動物の精子の場合、内部基質としてリン脂質の一種、コリンプラズマロゲンが利用されているという報告があり、また、ウニ・ヒトデの精子においても、フォスファチジルエタノールアミンあるいはフォスファチジルコリンなどのリン脂質が呼吸に使われて遊泳のエネルギーを供給しているという幾つかの報告がある¹²⁾。著者らのその後の研究においても、主として薄層クロマトグラフィーによる分析から、フォスファチジルエタノールアミンおよびフォスファチジルコリンまたはそれらの近縁の物質が遊泳により消費されていると思われる結果⁹⁾を得ているが、それについては追って報告する予定である。

さて、細胞内において、ある種の代謝によって生成された最終産物が、その系の第一酵素を不活化することにより、その代謝を抑制する現象は、いわゆるフィードバック阻害 (Feedback inhibition)^{9), 10)}としてほとんど定説となっている。著者らの仮説もこの理論にあてはめると一応の説明がつく。「旺盛な代謝によってある物質を蓄積した菌体細胞の一部である遊走子が被のうし、最初、その物質の合成をともなった菌糸生長の代謝系が始動して発芽をはじめますが、すでにその物質が多量に内在する場合は、合成系の第一酵素(アロステリックタンパク質であるとする)がアロステリック効果により阻害され、その代謝が停止し、かわって、小遊走子の形成を伴った別の代謝系が活動を開始する」と考えるわけである。フィードバック阻害に関連

したある種の酵素では、熱処理により阻害物質に対する親和性だけを失なわせて、常に酵素活性を正常にさせ得ることが明らかにされているから、36°C 15分処理により被のう胞子の発芽が順調で、小遊走子形成のみが抑制される現象を説明できるかも知れない。

以上、得られた知見から、思い切って、飛躍とも云えそうな仮説とその説明を述べた。それを裏づける実験的証拠にとぼしく、また、それ以外にも考察できないものでもない。すべては今後の問題である。しかし、もし、この仮説通りとすれば、さらに拡大解釈して、遊走子の形成の機構に新たな知見を与えるものであり、また多細胞系における形態形成のパターンが、単一細胞においても再現されていることは、形態形成における場の考え方と誘導因子の理論⁴⁾に新しい問題を提起することにもなり、植物病理学的にも、植物生理学的にも興味あることと云わねばならない。

引用文献

- 1) Alexopoulos, C. J. (1962): *Introductory Mycology*, John Wiley and Sons Inc., New York, London, p. 142 p.
- 2) 飯野徹雄・石津純一(1967): 現代の生物学(岩波) **3**: 209-249.
- 3) 今堀和友(1967): 科学, **37**: 67-72.
- 4) 林雄次郎(1966): 蛋白質核酸酵素, **11**: 924-928.
- 5) 桂 琦一(1961): 京都府大農植物病学研特報, **1**: 1-70.
- 6) 桂 琦一・正子 朔・宮田善雄(1966): 日植病報, **32**: 215-220.
- 7) 桂 琦一・宮田善雄・池上琢磨(1968): 坂本教授還暦記念論文集: 317-325.
- 8) 宮田善雄・桂 琦一(1968): 日植病報, **34**: 166-167.
- 9) 次田 皓(1968): 生物物理, **8**: 165-174.
- 10) Waterhouse, G. M. (1936): *Misc. Pub. Commonwealth Myc. Inst.* **12**: 1-120.
- 11) 山田・前川・江上・八杉編(1960): 岩波生物学辞典: 1003.
- 12) 吉田重雄(1967): 蛋白質核酸酵素, **12**: 1164-1178.

Summary

Miniature zoosporangia in *Pytophthora* are formed on the tips of germ tubes of cystospores (Fig. 1, 2). The close relationship between swimming activity of the zoospore and formation of the miniature zoosporangium was described in

this paper.

Zoospores of *Phytophthora capsici* Leon. No. 65 continue to swim for about 9 hours at 20°C (Fig. 3). Zoospores incubated at 20°C were transferred with 2 hour interval to 32°C, the optimum tem-

perature for sporangium formation. Zoospores incubated at this temperature encysted within 45 minutes, germinated and formed zoosporangia within 18 hours. The result is shown in Fig. 4. Zoospores encysted immediately, 2, 4, 6 and 8 hours after spouting formed the miniature zoosporangia at the rate of 72.1, 30.2, 21.9, 16.7 and 8.2% respectively. The formation of miniature zoosporangia from cystospores could therefore be negatively correlated to the swimming time of zoospores. An another experiment shows that formation of miniature zoosporangia is suppressed by a high temperature treatment at 36°C for 15 min., but germination of cystospores is hardly influenced by this treatment. Swimming zoospores in 20°C water were taken out with 2 hour intervals in the same manner as in the previous ex-

periment, incubated at 36°C for 15 min., and then transferred to the optimum temperature for spore germination, 28°C. The results (Fig. 5) shows that the maximum lengths of germ tubes of cystospores after 6 hour incubation were nearly equal irrespective of the differences in swimming time of zoospores.

These results could be accounted for by the following assumptions.

(1) The source of energy for swimming of zoospores is different from that for germination of cystospores. (2) Energy source remained from the swimming is involved in the shift of metabolic systems from pathway for the tube elongation to that for miniature zoosporangium formation. A preliminary experiment suggests that the energy source could be phospholipids.