

Phytophthora capsici 遊走子嚢の遊走子分割過程 における β -シトステロールの動向

宮田善雄・大杉 武・正子 朔

YOSHIO MIYATA, TAKESHI OSUGI, and HAJIME MASAGO

Movements of β -sitosterol during the zoospore division in
Phytophthora capsici zoosporangium.

要旨: *Phytophthora capsici* の遊走子嚢の遊走子型発芽（間接発芽の1形態）は、遊走子への分割が先行する。この過程は、ゴルジ体由来の小胞群が、発達して割腔胞となり、並列融合して割腔が形成され、遊走子への分割が完了するのであるが、この分割には、 β -シトステロールなどの植物ステロールの存在が必要である。 β -(23, 24- 3 H)シトステロールを用いた電顕オートラジオグラフィにより、菌体内に取込まれた β -シトステロールは、核やミトコンドリアなど、種々のマイクロオルガネラに広く分布するが、分割過程の進行とともに、割腔胞、さらには遊走子細胞膜の、それぞれ生体膜上にも、かなりの頻度で存在するようになる。 β -(4- 14 C)シトステロールを用いた蔗糖密度勾配遠心分離法による、細胞オルガネラ分画のトレーサー実験においても、遊走子分割過程の進行とともに、ゴルジ分画や、割腔胞が含まれると考えられるリゾーム分画においては、ステロールが減少し、逆に、遊走子細胞膜分画において、著しいステロールの増大することがわかった。これらのことから、菌体内に取込まれたステロールは、ゴルジ体から割腔胞を経由して、直接、遊走子細胞膜の構築材料として、重要な働きをなしているものと考えられる。

緒 言

Phytophthora capsici をキュウリジュース培地の遠沈上清液で培養すると、遊走子嚢は多量に形成されるにもかかわらず、遊走子型発芽（間接発芽の1形態、遊走子への分割に続いて放出が起こる場合をいう）がみられない。この異常な遊走子嚢の微細構造^{18,19)}や、遊走子分割の不能の原因が、ステロールの欠除にあること¹⁸⁾については、すでに報告した。ステロールが遊走子嚢の間接発芽に及ぼす影響に関する報告は、他にも認められる³⁹⁾が、いずれも若干の記述に止まっている。今回は、菌体内に取込まれたステロールの動向について、電顕オートラジオグラフィと、蔗糖密度勾配遠心分離法による細胞オルガネラ分画におけるトレーサー実験を行なった結果、ステロールが、ゴルジ体より、割腔胞を経由して、直接、遊走子細胞膜に至り、

重要な構築材料として用いられていることを示唆する知見を得たので、ここに報告する。

材料ならびに方法

供試菌は *Phytophthora capsici* (京都府大植病研保存菌 No. 002) である。基本培地としては、キュウリジュース遠沈上清液¹⁷⁾または、アスパラギン・グルコース培地¹⁾を用いた。ステロールは市販の β -シトステロール（半井化学）を用い、その添加方法はアセトン・Tween 80 法²⁰⁾によった。菌体乾重、遊走子嚢形成量および遊走子型発芽指数などの測定法も前報に同じである。

ラジオアイソトープラベルしたステロールは、いずれも、日本放射性同位元素協会を通じて購入した。 β -[22, 23(n)- 3 H]シトステロール、比放射能 55Ci/m mol, 放射能濃度 1 μ Ci/ml, および、 β -[4- 14 C]

京都府立大学農学部植物病理学研究室

Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan.

昭和55年7月28日受理

シトステロール, 比放射能 54m Ci/m mol, 放射能濃度 95 μ Ci/ml の2種である。

電顕オートラジオグラフィの場合, 2 μ Ci/ml の³H- β -シトステロールを含む培地で菌体を培養し, 紙蓋平面培養法^{10,17)}により遊走子嚢を形成させた。なお, 培地には, ラジオアイソトープラベルされていない β -シトステロールを 0.1mg/ml になるよう添加してある。得られた遊走子嚢は, 直ちに, あるいは 20°C に15~30分間保って遊走子への分割が適度に行なわれた頃, 2.5% グルタルアルデヒド (1/15M りん酸緩衝液 pH 6.8, 0.2 M 蔗糖にて等張化) と 1% 四酸化オスミウム水溶液により 2重固定し, 緩衝液で軽く洗ったのち, 寒天に封入, 小片 (直径 1 mm, 長さ 1.2 mm) とした。脱水は, ヘキシレングリコールシリーズによった。脱水後, Spurr 樹脂³⁴⁾に包埋した。包埋試料は, ウルトラミクロトームを用いて, 超薄切片となし, コロジオンコーティングした銅メッシュ²⁸⁾上にすくい上げ, 酢酸鉛または酢酸ウラン染色後, 風乾した。乳剤は, サクラ NR-H₂ を用い, 4倍量の水を加えて稀釈し, ループ法¹⁶⁾により被膜した。冷蔵庫内に 1~3 カ月保ち, 超微粒子現象法²⁸⁾により, 現象・定着, 電子顕微鏡 (日本電子100B型) 観察した。

蔗糖密度勾配遠心分離による細胞分画は次のようにして行なった。 β - (4-¹⁴C) シトステロールを, 0.08 μ Ci/ml 与えて培養し, 形成させた遊走子嚢を, 遠沈 (600G, 5分) により集め, 0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2, 0.25M 蔗糖添加) に懸濁し, 氷冷下で, ポッター型ガラスホモジナイザーを用いて破碎して, 細胞破碎液を得た。さらに, 2度の遠沈 (2,000 G, 5分および 20,000G, 30分) 処理により, 粗細胞オルガネラ分画とした。この分画を濃度 45% 蔗糖液の上に積み, 超遠心分離 (90,000G, 60分) を行なって, 上部分画を分取した。これを, 蔗糖密度勾配遠心管 (下から 42, 37, 33 および 28%) の上層に積み, 90,000 G, 120 分の超遠心分離を行ない, 底部より上層部まで 6 分画に分けて採取した (第 2 図参照)。各分画のたんぱく量は, 分光光度計 (日立ダブルビーム P-312) による OD₂₈₀ の測定値を, 牛血清アルブミン量に換算して求めた。また, 放射活性は, バイアルに各分画 0.2 ml と脱イオン水 0.8 ml をとり, シンチレーターカクテル (トルエン: トリトン X-100 = 2 : 1, 0.5% PPO, 0.002% POPOP) 9 ml を加えてよく混和し, 液体シンチレーションスペクトロメーター (パッカード TRI-CAPB) により測定した。これらの方法は, カラスムギ細胞に関する Leonard (1973)¹⁵⁾ の方法に準拠し, さらに, ゴルジ体やリソゾームを対象とした

分画法^{9, 26)}を参照して組立てたものである。

結 果

1. 遊走子嚢の分割期における微細構造の変化

分割前の遊走子嚢の微細構造については, すでに詳しく報告¹⁸⁾した。分割期に入ると, 遊走子嚢の細胞内に著しい変化が起こる。鞭毛の形成と, 脂肪質顆粒の変成は, とともに, 大きな変化のひとつであるが, ここでは, 遊走子の分割と直接結びついた, 割腔胞 (cleavage vesicle) の形成と, その融合の過程についてのみ述べることにする。

分割期に入ると, 多数の胞嚢中に, 割腔となるべき胞嚢 (割腔胞) が明瞭に区別されてくる。すなわち, 形態的特徴として, 糸くず様内容物の出現である。(図版 I-1)。この糸くず様内容物は, 割腔が形成された後も, その内部に認められる。割腔胞は, 各細胞核に対して, 最も遠心的な位置, つまり, 遊走子の細胞膜の形成されるべき位置に, 次第に集合し, 並列し, 相互に融合を起し (I-2, 3), 割腔が形づくられてゆく。割腔の内部には, しばしば小管構造が観察されるようになる (I-5)。この小管構造は, その後に起こる遊走子の放出と関連している可能性があるが, このことについては別に詳しく報告する予定である。また, 割腔内には, 鞭毛が認められることが多い (I-4)。このような胞嚢をとくに鞭毛胞 (acrosomal vesicle)⁶⁾と呼んで区別される場合もあるが, ことさらその必要はない。割腔は遊走子に対して明らかに外部に相当する場所であり, 外部器官である鞭毛は, はじめから外部に向かって形成されていることを意味している。割腔の両側の膜は, そのまま遊走子の細胞膜となるが, 次第に裏打ちされるように, その厚さを増す (I-3)。この故に, 遊走子の細胞膜は, 他の胞嚢の膜に比べて, 物理的にも強度の高いものとなっているようである。なお, 割腔の横にみられる, 縞模様の小胞 (I-5) は parastrosome⁴⁰⁾と呼ばれる。この小胞は遊走子となって後も, その細胞膜の周辺に観察¹⁹⁾されることが多いが, その役割は不明である。割腔が完全に融合して遊走子の分割は完了するが, この分割に, 前報¹⁸⁾で述べたように, ステロールが必須である。菌体内に取込まれたステロールの所在と動向を知ることが, このステロールの機能を知る上で重要であるが, そのための方法のひとつとして, ラジオアイソトープを用いたトレーサー実験が適している。このトレーサー実験を行なうに先立ち, まず, ステロールの必要量や取込み時間などについて調べてみた。

2. β -シトステロールの投与量と遊走子型発芽能

アスパラギン・グルコース培地に、 β -シトステロールを種々の濃度で添加して培養し、菌体生育量、遊走子囊形成量および遊走子型発芽能について調べた。その結果（第1図）菌体生育量（乾重）や遊走子囊形成数は、ステロールの濃度が高いと、若干増大する傾向はあるが、ステロールの添加量によって、ほとんど影響されることがないことを示している。それに対して、遊走子型発芽指数は β -シトステロールの添加量によって著しく左右されるようである。すなわち、 β -シトステロールの添加量が0.8~1.6 $\mu\text{g/ml}$ では、遊走子型発芽指数はほとんど0に等しいが、それ以後は、ステロールの増加と共に漸増し、12.5 $\mu\text{g/ml}$ 附近から急激に上昇して、50 $\mu\text{g/ml}$ 附近でピークに達し、それ以上ステロール量が増加しても、指数はほぼ一定となる。この結果から、遊走子型発芽能力の高い遊走子囊を得るためには、培地に50 $\mu\text{g/ml}$ 程度の β -シトステロールを添加するのが最も良いことになる。

3. 菌体内に取込まれた β -シトステロールの電顕オートラジオグラフィ

i) 写真乳剤の塗布と微粒子現像状態

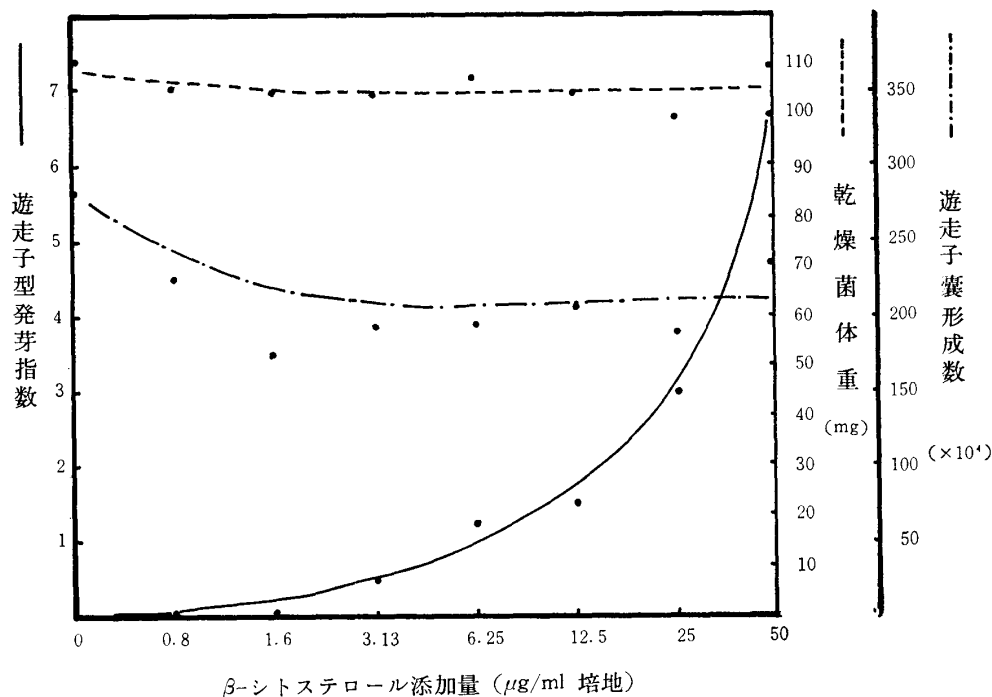
試料への乳剤の塗布方法に、主としてループ法とタッチング法がある^{16, 21)}。この両者を試みたが、技術上の問題もあるが、タッチング法は試料をそこなうことが多くまた、乳剤の広がり方も不均一であった。これに対し、ループ法は、銀粒子の分布は比較的均一で、

乳剤膜も薄く、細胞の微細構造をかなり鮮明に保ち得た（図版II-1, 2）。電顕レベルのオートラジオグラムで最も重要なことは、銀の結晶の発達を、できるだけ小さいうちに止めることであるが、超微粒子現像法²²⁾により、銀の微粒子状態は非常に良好であった（II-1, 2, 3）。この現像法において、はじめの塩化金処理がとくに重要であり、この処理を省略すると、銀粒子はひも状に発達した（II-4, 5）。このようにひも状となると、放射線源の位置を正確に知ることができなくなる。なお、銀粒子は独特のしま模様があり、他の粒子や汚点とは明確に区別された（II-3）。

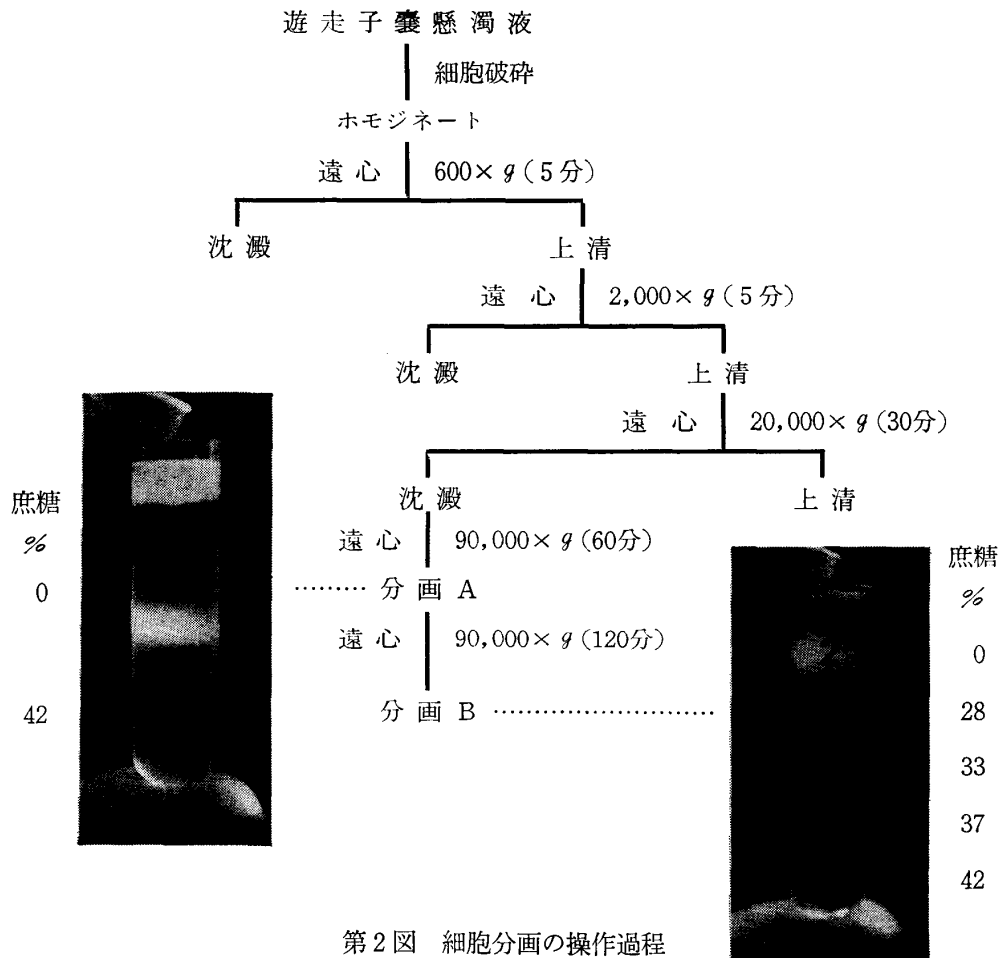
ii) 遊走子分割前の β -シトステロールの分布

はじめに、遊走子分割の開始される前の遊走子囊について調べた。銀粒子は、各種細胞オルガネラに広く分布を示していた（図版III）。III-1は中央に核があり、その核膜上および核小体と思われる電子密度の高い部分に銀粒子が認められた。III-2は割腔胞であるが、その膜上に銀粒子が存在している。III-3, 4はミトコンドリアで、銀粒子は内部に認められるが、クリステ膜上に位置すると考えられる。III-5はフィンガープリントと呼ばれる胞囊で、脂質成分を含むと考えられ、ステロールは内部に存在している。その他のオルガネラにも銀粒子は認められたが、多くの場合、膜上に存在していた（III-6）。ごくまれではあるが、細胞壁にも銀粒子が認められることもあった。

iii) 遊走子分割期における β -シトステロールの分布



第1図 β -シトステロールの添加量と *P. capsici* の菌体生育



遊走子への分割が進行している細胞においても、銀粒子は未分割細胞と同様、各種のオルガネラに広く分布していた。さらに、割腔胞や融合した割腔膜上、および、完成された遊走子細胞膜上にも銀粒子の存在が認められた(図版Ⅳ)。とくにⅣ-2のように、膜上に多数並んで存在することは、初期の段階ではみられなかったことであり、この時期に入って、ステロールの局在性が高まったことを示しているようである。Ⅳ-4は割腔胞で、鞭毛の断面像がみられる。また、Ⅳ-5も、融合しつつある割腔胞であるが、いずれも、その膜上に銀粒子が認められた。Ⅳ-6は完成した遊走子の細胞膜であるが、その膜上にも銀粒子が存在していた。

以上のことから、ステロールは、細胞壁を通して取込まれ、ゴルジ小胞に由来する割腔胞を経由して、遊走子細胞膜へ移行し、その構成要素として組込まれているものと判断されるが、このことを別の手段により確かめるため、次に蔗糖密度勾配遠心分離法による細胞オルガネラ分画について、分割過程を追って、 β -シトステロールの分布と動向を調べてみることにした。

4. 細胞分画法による β -シトステロールの追跡

i) 蔗糖密度勾配遠心細胞分画の検定

電顕レベルオートラジオグラフィーにおけると同様の方法で、 β -4- ^{14}C -シトステロール(0.08 $\mu\text{Ci/ml}$)を与えて培養し、形成させた遊走子囊を3等分し、直ちにホモジナイズするものと、20°Cに保って約15分後の遊走子分割期と、約30分後の放出開始期に、いずれも検鏡しながら適当な時期にホモジナイズするものに分け、前述の方法にて、細胞オルガネラ分画を得た(第2図)。

各分画について、イノシン酸ジフォスファターゼ(IDPase)活性および酸性フォスファターゼ(ACPase)活性⁹⁾を調べた。各細胞分画0.5mlに、基質として、それぞれ3.33mMのp-ニトロフェニルりん酸2ナトリウムとイノシン酸ジフォスフェート(Na塩)を含む36.7mMトリス塩酸緩衝液(それぞれpH 5.5および6.0)0.5mlを添加して、38°Cの温浴中にて60分間反応させた上、2.5%モリブデン酸ナトリウムを含む2.5N硫酸で反応を停止させ、さらに1.0mlの脱イオン水と3%NaHSO₄を含む1%メトール液で還元の上、25°Cに15分間保ち、遊離した無機りん酸を分光光

第1表 発芽過程における各細胞分画の比放射活性の推移

分画番号	発芽過程	総たんぱく量* (mg)	放射活性** cpm ($\times 10^2$)	比放射活性 cpm/ μ g たんぱく	分 画 名
F-1	0	0.11	1.2	1.1	脂 質 顆 粒
	I	0.07	1.2	1.8	
	II	0.06	0.8	1.2	
F-2	0	0.62	5.7	0.9	ミ ク ロ ゾ ーム
	I	0.60	4.9	0.8	
	II	0.58	4.5	0.8	
F-3	0	0.27	5.5	2.0	ゴ ル ジ
	I	0.41	5.9	1.4	
	II	0.31	4.4	1.4	
F-4	0	0.35	6.4	1.8	リ ソ ゾ ーム
	I	0.31	5.2	1.7	
	II	0.35	5.2	1.5	
F-5	0	0.43	6.2	1.4	ミ ト コ ン ド リ ア
	I	0.32	5.0	1.6	
	II	0.48	6.1	1.3	
F-6	0	0.43	3.2	0.7	細 胞 膜
	I	0.30	4.1	1.3	
	II	0.22	3.4	1.6	

* OD₂₈₀ の測定値を牛血清アルブミン量として換算** β -(4-¹⁴C) シトステロール

0 : 遊走子分割前の遊走子嚢

I : 遊走子分割期の遊走子嚢

II : 放出を開始した遊走子嚢

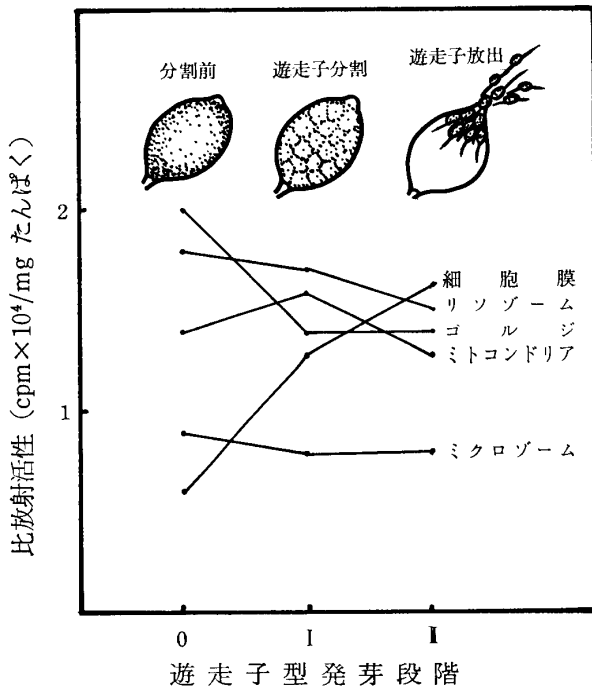
度計 (OD₂₈₀) により測定した。その結果、分画3はIDPase、分画4はACPaseの高い活性を示したので、分画3はゴルジ体、分画4はリソゾームに富む分画であると判断された。また、分画1は最上層に浮上した分画で、脂質の性質を示しており、分画6は電子顕微鏡によるネガティブ染色像から、大型の膜質を多量に含むことから、細胞膜に富む分画であると判断された。分画2および5については、Leonardら¹⁵⁾の詳細な研究から、それぞれミクロゾームおよびミトコンドリアに富む分画であると判断された。

ii) 細胞オルガネラにおける β -シトステロールの分布と動向

第1表は各細胞オルガネラ分画における総たんぱく量と、ラベルした β -シトステロールの存在量を示す放射活性である。総たんぱく量では、第1分画は他の分画に比べて少なく、第2分画は最も多かったが、他の4分画はいずれも量的にほぼ同じであった。また、分画2, 3, 4および5においては、分割過程とは無関係に、たんぱく量は常に一定の値を示していた。分画

1と分画6は分割過程の進行につれて、減少する傾向がみられた。

このたんぱく量で放射活性を除いた値、すなわち、比放射活性は、一応、オルガネラ膜当りのステロール量を表すと考えてよいが、発芽過程の進行にともなう比放射活性の変化を第3図に示した。ミクロゾーム分画における比放射活性は、発芽過程を通じてほぼ一定である。ミトコンドリア分画においても、若干の増減はあるが、ほぼ変化はないといえる。それに対して、ゴルジ体分画は発芽過程の進行につれて急激に減少し、また、リソゾーム分画（リソゾームと割腔胞はほぼ同大で、由来を同じと考えられ、恐らくこの分画内に割腔胞が含まれていると思われる）も明らかに下降を示している。それとは逆に、細胞膜分画では、比放射活性の急激な上昇が認められる。これらの結果も、 β -シトステロールが、ゴルジ体からリソゾームを含む胞囊群に移行し、すなわち遊走子の細胞膜へ至ることを示しているものと思われる。



第3図 遊走子型発芽段階と ^{14}C - β -シトステロールの増減

考 察

遊走子嚢の間接発芽の第1段階である遊走子への分割は、遊走子の細胞膜合成の過程である。この過程で重要な働きをもつ割腔胞の起源であるが、ゴルジ体周辺に見られる特徴的な小胞群の融合発達したものと考えられる。前述のステロール欠遊走子嚢¹⁸⁾や *Bremia* の分生胞子はいずれも間接発芽を行なうことができず、細胞内には、この小胞群が認められない。同じゴルジ体由来のものでも、リソゾーム²⁹⁾と呼ばれる分解酵素類を含む小胞とは明らかに異なるものであり、例えば ACPase はリソゾームの標識酵素となっているが、さきの小胞群や割腔胞にはこの反応は全くみられない。Grove ら (1970)⁴⁾によれば、本菌の属する卵菌類は細胞壁合成に関与する小胞もゴルジ由来であるという。このようにゴルジ体は各種の機能を有する小胞の形成に関与しているが、遊走子細胞膜のための小胞群形成時にはとくにステロールが必要であるということになる。

一般に、ステロールは細胞膜中にとくに高濃度に存在し²⁵⁾、脂質2分子層のりん脂質中であって、脂肪酸分子のメチル基とファンデスワールス力により、特異的に結合し、りん脂質層の液晶あるいはゲル状態における自由度の調節をする作用²⁵⁾をなしており、(Na-K) ATPase 活性の制御や、食作用 (phagocytosis) の活性化³⁷⁾はこれによって説明されている。しかし、本菌

の遊走子への分割過程においては、ステロールの欠乏は、分割に関与する小胞群の形成を阻害するので、ステロールが細胞膜において、直接、構築材として重要な役割を果たしていることが考えられる。電顕レベルオートラジオグラフィーにおいても、割腔胞や遊走子細胞膜上に銀粒子の存在する頻度が高かったことは、ステロールが細胞膜の構築に関与している可能性が高いことを示していた。しかし、遊走子嚢へのラベルしたステロールの取込み量が少なく、さらに電顕試料包埋過程において、約2/3が流出する上、乳剤膜も、微細構造の観察を損なわないためには、むやみに厚くすることもできず、結果的に銀粒子密度は平均的 $17.2/\mu\text{m}^2$ 程度となり、細胞内におけるステロールの存在や移行を十分に追跡することはできなかった。

ステロールが、ゴルジ体を経由して、細胞膜に至る過程は、庶糖密度勾配遠心分離による細胞分画法によって得られた結果からも推察できる。ただし、この方法においても、得られた細胞オルガネラ分画は、いずれも、そのオルガネラが最も多く存在する分画であって、例えば本法で得たゴルジ分画は、加藤ら (1974)⁹⁾によれば、ラット肝細胞の場合、ガラクトシルトランスフェラーゼを標識酵素として検討したところ、36%が存在する分画であったという。今回用いた分画法は、カラスムギの細胞を用いた Leonard (1973)¹⁵⁾ の分画方法に順じ、ゴルジ体やリソゾームを得るための分画法^{9, 26)}により、若干の変更を加えたものである。その分画のオルガネラ構成について、Leonard らは、グルコース-6-フォスファターゼ、NADH-チトクロームC還元酵素 (ミクロゾーム分画)、IDPase (ゴルジ分画)、酸性フォスファターゼ (リソゾーム分画)、チトクロームオキシダーゼおよび ATPase-pH 6 (ミトコンドリア分画)、ATPase-pH 9 (細胞膜分画) などの酵素活性を詳しく検定しているため、一応、各分画はそれぞれの細胞オルガネラによって代表されているものと判断してよからう。

菌体におけるステロールの働きとしては *Achlya* の有性器官形成におけるアンテリジオールやオオゴニオールのようなホルモン作用³⁵⁾もあるが、本菌の場合は、量的にも、卵胞子形成³⁹⁾に比べて、50~100倍近い量を必要とするので、恐らく生体膜内で直接構築材として用いられている可能性が高い。ただし、外部より取込んだステロールが核の内部に認められること、および、ステロールの欠如が単なる機能障害でなく、小胞群や割腔胞などの細胞オルガネラの形成を阻害するので、ホルモンとして、核酸・たんぱく代謝に働きかけている可能性も否定できない。実際、哺乳動物におけ

るステロイドホルモンは、レセプターと結合して複合体をつくり、核内に至り、DNA に働きかけて、特定の mRNA の合成を促し、たんぱく質合成を導いて、標的臓器を活性化することが明らかとなった¹¹⁾。疫病菌はステロール合成系がないので、外部より、これを取込む必要がある。培地に与えたステロールは、懸濁状態にあり、菌体細胞壁に付着して徐々に取込まれるようである。細胞壁内に ³H-ステロールの存在を示す銀粒子が見られるのは、通過中のものであろう。ここにおいて、疎水性のステロールが、細胞に取込まれ、標的構造に達するのは、親水性物質ほど要易ではないだろう。恐らく、ステロール担送たんぱく^{3, 11, 23, 27)}が介在しているものと思われる。本研究でも明らかにしたように、ステロールは菌体内でエステル化されるので、担送たんぱくはエステラーゼ（アシルトランスフェラーゼ）である可能性もある。エステル化されて細胞オルガネラ間を輸送されたステロールは、最終的に細胞膜に至るが、このとき、再び遊離のステロールになることも考えられる²⁾。

細胞膜におけるステロールが非常に重要な意義を荷っていることが、最近明らかにされつつあるが、このステロールと遊走子嚢の遊走子分割との密接な関係は、単に植物病理学的重要性のみならず、ステロールが形態形成と、最も端的に結び付いた現象のひとつであり、細胞膜とステロールの関係を解くための好適の材料として、広く細胞生物学的意味においても、興味ある内容を包含しているものと云えるだろう。

引用文献

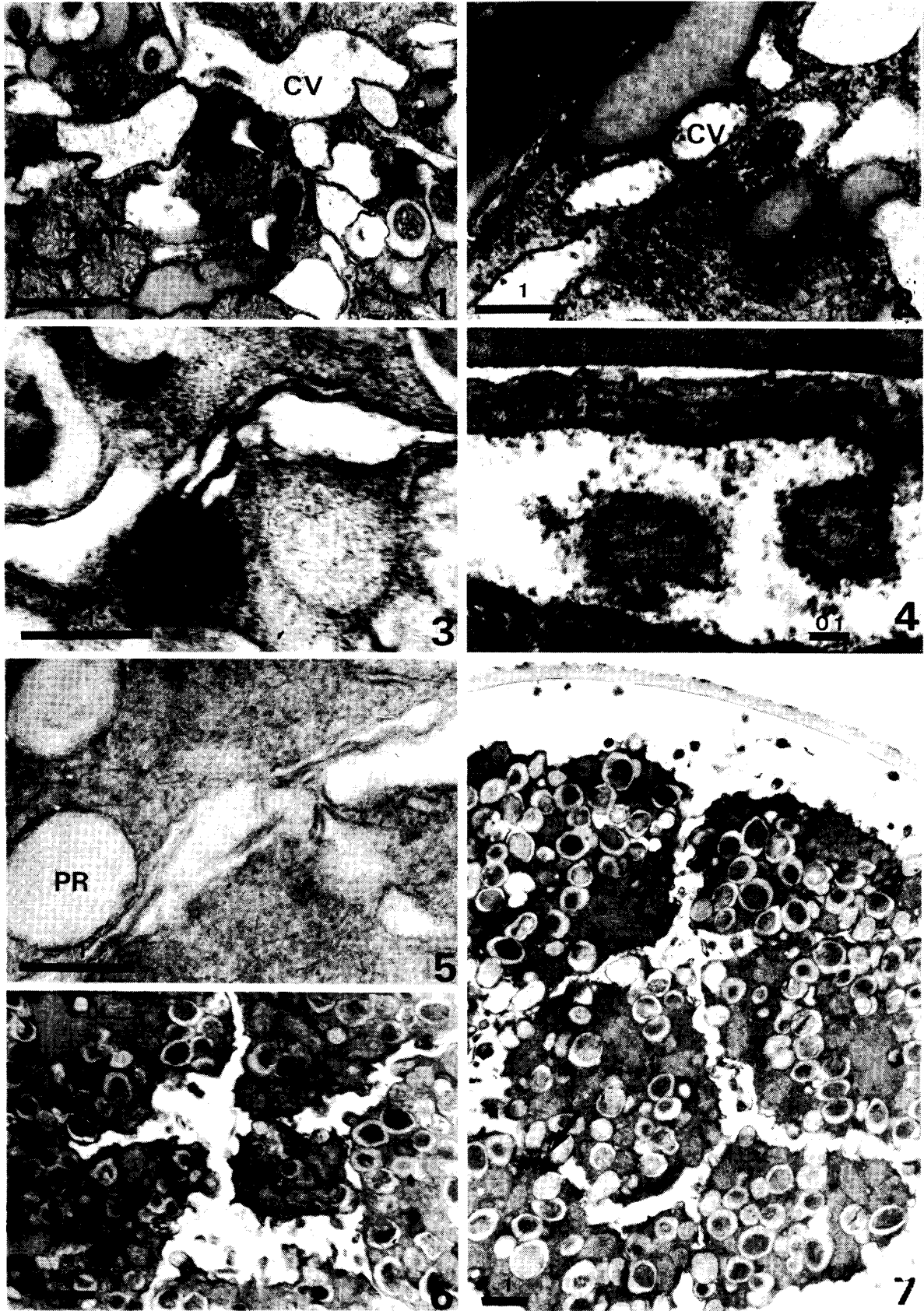
- 1) Bartnicki-Garcia, S., N. Nelson and E. Cota-Robles (1968) J. Bacteriol. 95 : 2399-2402.
- 2) Demel, R. A. and deKruyff, B. (1976) Biochem. Biophys. Acta 457 : 109-132.
- 3) Erickson, S. K., D. L. Meyer and R. G. Could (1978) J. Biol. Chem. 253 : 1817-1826.
- 4) Grove, S. N., C. E. Bracker and D. J. Borre (1968) Science 161 : 171-173.
- 5) Heiniger, H.-J., A. K. Kandutsch and H. W. Chen (1976) Nature 263 : 515-517.
- 6) Hohl, H. R. and S. T. Hamamoto (1976) Am. J. Bot. 54 : 1131-1139.
- 7) Karst, F. and F. Lacroute (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 59 : 370-376.
- 8) 石井象二郎(1970) 昆虫学への招待, 岩波書店(東京) : 30-36.
- 9) 加藤敬太郎・辻 宏(1974) 生体膜実験法(上), 別冊蛋白質・核酸・酵素, 共立出版(東京), 258-267.
- 10) 桂 琦一・宮田善雄・三谷隆彦(1968) 京都府大学報・農20 : 32-36.
- 11) Kenneth, W., M. C. Kan and F. U. Ritter (1972) Biochem. Biophys. Res. Comm. 48 : 423-429.
- 12) Knights, B. A. and C. G. Elliott (1976) Biochem. Biophys. Acta 441 : 341-346.
- 13) 黒岩常祥(1971) Radioisotopes 20 : 394-403.
- 14) 串田孫一(1971) 電子顕微鏡試料作成法, ニューサイエンス社(東京) : 145.
- 15) Leonard, R. T., D. Hansen and T. K. Hodges (1973) Plant Physiol. 51 : 749-754.
- 16) 松沢大樹(1969) ラジオオートグラフ, 朝倉書店(東京).
- 17) 宮田善雄・桂 琦一・室川嗣夫(1970) 京都府大学報・農22 : 27-30.
- 18) 宮田善雄・桂 琦一(1972) 京都府大学報・農24 : 33-36.
- 19) 宮田善雄・正子 朔(1975) 京都府大学報・農27 : 32-36.
- 20) 宮田善雄・渡辺健三・桂 琦一(1980) 京都府大学報・農32 : 30-38.
- 21) 水平敏知・内田和子(1969) Radioisotopes 18 : 338-343.
- 22) 水平敏知・内田和子(1969) Radioisotopes 18 : 402-421.
- 23) 水平敏知・内田和子(1969) Radioisotopes 18 : 473-484.
- 24) 水平敏知(1971) 電子顕微鏡, 医歯薬出版(東京).
- 25) Molleahauer, H. H., W. G. Whaley and J. H. Leech (1961) J. Ultrastr. Res. 5 : 193-200.
- 26) Noda, H., K. Wada and T. Saito (1979) J. Insect Physiol. 25 : 443-447.
- 27) Reisener, H. J. (1974) In The fungus spore., ed. by Weber, D. J. and W. M. Hess, John Wiley and Sons (N. Y.) : 165-185.
- 28) Richards, J. B. and F. W. Hemming (1972) Biochem. J. 128 : 1345-1352.
- 29) Ritter, M. C. and M. E. Dempsey (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70 : 265-269.
- 30) Robbins, W. E., J. N. Kaplanis, J. A. Svoboda and M. J. Tompson (1971) Ann. Rev. Entomology 16 : 53-72.
- 31) 佐藤佑尚(1979) 生化学51 : 1205-1225.

- 32) 佐藤 了 (1972) 細胞分画法, 岩波書店 (東京) (東京): 13-19.
- 33) Scallen, T. J., M. V. Srinantaiah, B. Seel-haram, E. Hansburg and K. L. Gavey (1974) Fed. Proc. 33 : 1733-1746.
- 34) Spurr, A. R. (1969) J. Ultrastr. Res. 26 : 31-43.
- 35) Sutherland, R. B. and P. A. Horgan (1977) J. Biol. Chem. 252 : 8812-8820.
- 36) 高橋泰常 (1964) 光電比色法, 各論 2, 南江堂 (東京): 13-19.
- 37) 武内 望 (1979) 化学と生物 17 : 566-567.
- 38) Whaley, W. G., M. Dauwalder and J. E. Kephart (1966) J. Ultrastr. Res. 15 : 169-180.
- 39) Henrix, J. W. (1970) Ann. Rev. Phytopathol. 8 : 111-130.
- 40) Williams, W. T. and R. K. Webster (1970) Can. J. Bot. 48 : 221-227.

Summary

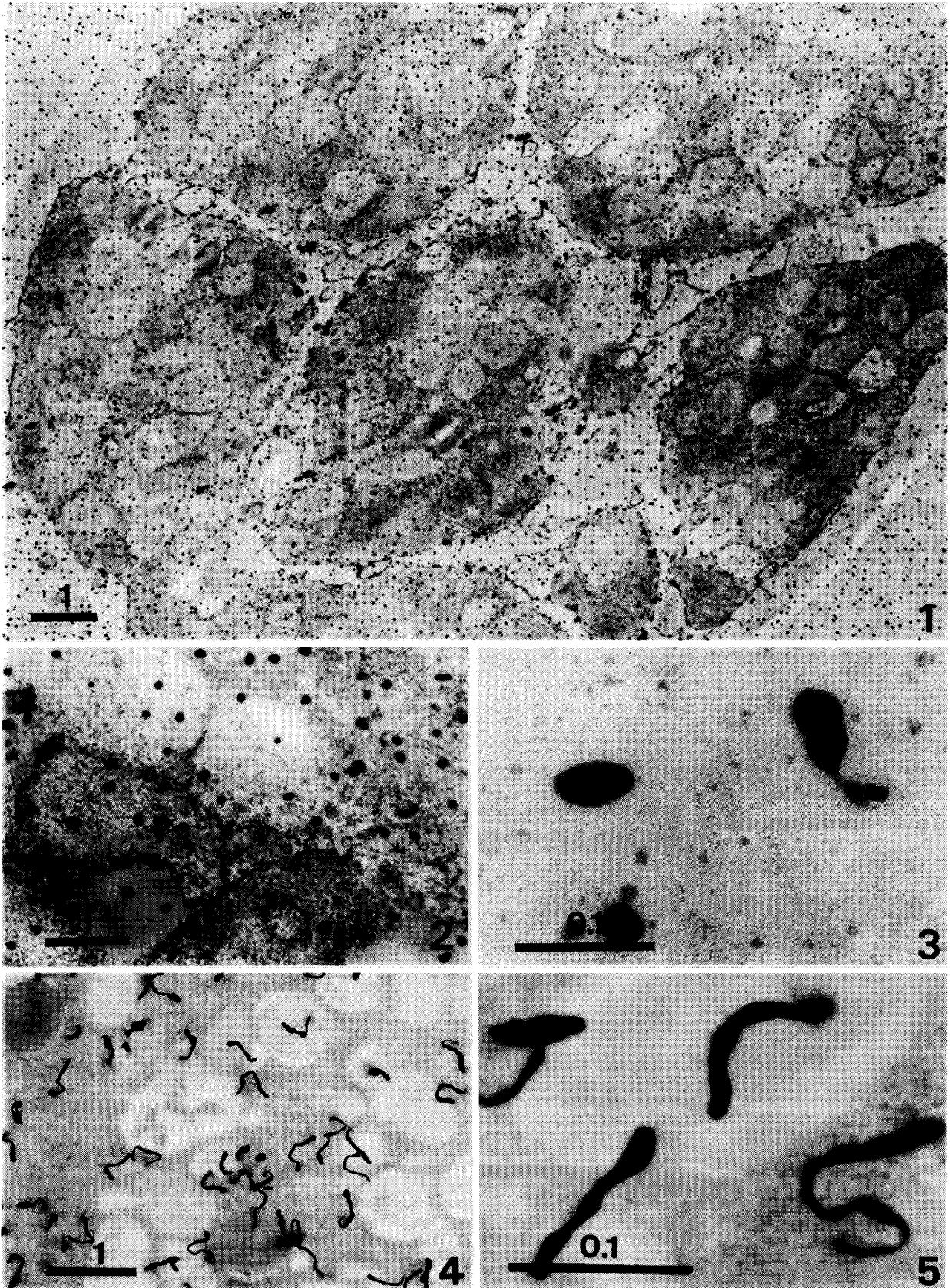
On the indirect germination of *Phytophthora capsici* zoosporangia, cell separation to the individual zoospores occurs firstly. Small vesicles possibly derived from Golgi apparatus gather and develop into cleavage vesicles. These vesicles line up centrifugally against each of the nuclei, and fuse each other to organize the cell membranes of zoospores. The electron microscopic autoradiogram showed that the radiolabeled sterols [β -(23, 24-³H) sitosterol] taken into the fungal cells were widely distributed on the microorganella, such as nuclei, mitochondria, lysosomes, liposomes and so on. On according with the progress of the separation to

zoospores, sterols were detected on the membranes of cleavage vesicles, cleavages and zoospores with relatively high frequency. In Golgi apparatus and lysosome fractions from sucrose density gradient centrifugation, sterols were reduced as the progress of cell separation. On the contrary, the concentration of sterols was gradually increased in the cell membrane fraction. These results suggest that the sterols move directly from cleavage vesicles originated in Golgi apparatus to zoospore membranes, and are utilized as one of the structural elements of the membranes.



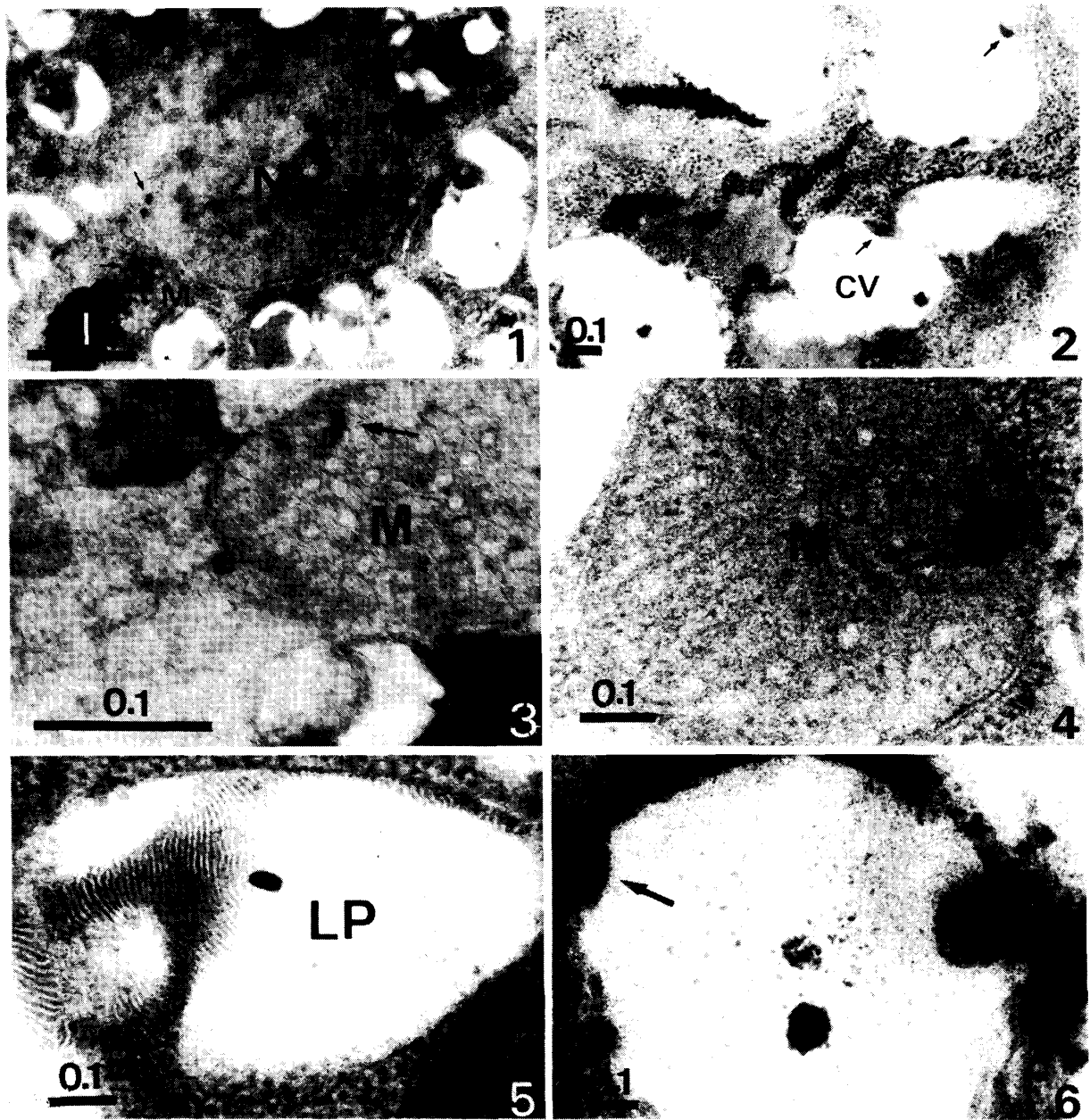
図版1. 遊走子分割期における割腔の発達

- 1, 2 : 割腔胞 (CV) が明確となり, しだいに並列する。
 3, 5 : 割腔胞は互いに融合する。割腔内を走る微小管がみえる。PR はパラストラゾーム
 4 : 鞭毛の落ち込んだ割腔 (鞭毛胞ともいう)。細胞膜は裏打ちされるように肥厚する。
 6, 7 : 割腔は完全に融合し, 遊走子への分割は完了する。
 長さを示す単位はいずれも $1\mu\text{m}$



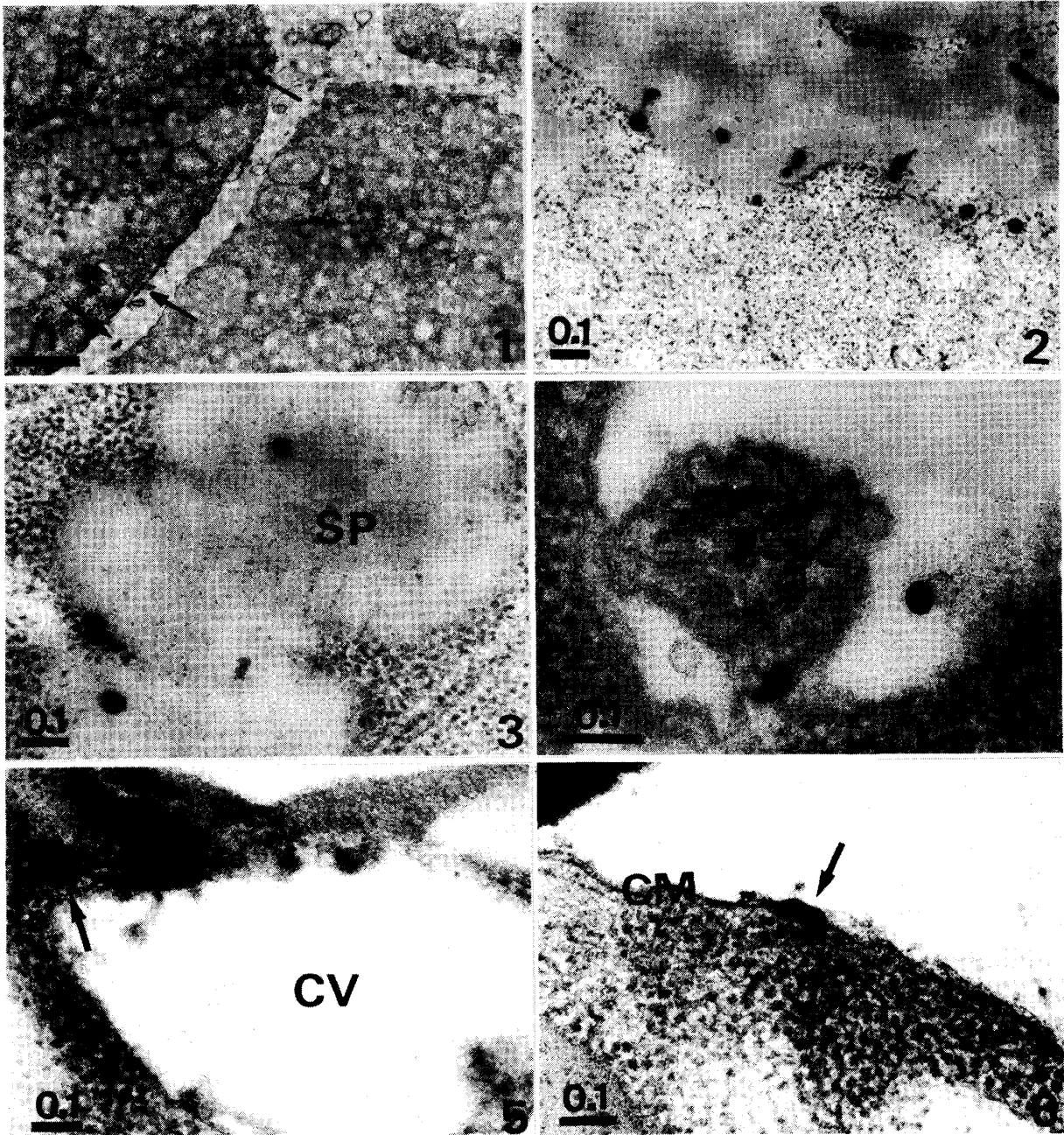
図版Ⅱ．電顕レベルラジオオートグラフィーにおける微粒子現像状態と銀粒子の密度

- 1, 2 : 水平法による微粒子現像。
- 3 : 拡大した銀粒子, 特徴のある濃淡のしま模様がある。
- 4, 5 : 普通現像法によるひも状銀粒子



図版Ⅲ．分割前の遊走子嚢における銀粒子の分布

- | | |
|-------------------|------------------------------|
| 1：核(N)とミトコンドリア(M) | 2：割腔胞(CV) |
| 3, 4：ミトコンドリア | 5：リポゾーム (LP, フィンガープリント胞ともいう) |
| 6：スフェロゾーム | |



図版Ⅳ．遊走子分割期の遊走子嚢における銀粒子の分布

- | | |
|-------------------------|------------------|
| 1, 2 : 割腔 | 3 : スフェロゾーム (SP) |
| 4 : 鞭毛胞 (割腔胞の一種), F は鞭毛 | 5 : 割腔胞 |
| 6 : 遊走子細胞膜 (CM) | |