

Phytophthora capsici の遊走子嚢における 遊走子放出の原動力としての微小管の関与

宮 田 善 雄*

YOSHIO MIYATA

Possibility of the microtubule action on the zoospore release from
Phytophthora capsici zoosporangium

要旨 一般に疫病菌 (*Phytophthora*) の遊走子嚢から遊走子が放出される間接発芽は、その原動力が膨圧によると考えられている。しかし、遊走子塊がすべて放出された後でも、残存する顆粒が引続き放出される現象が観察されるなど、膨圧説には納得できない面がある。その上、グルコースやサッカロースと異なり、代謝されにくい糖であるソルビットや2-デオキシグルコースの場合、明らかに高張液中において遊走子の放出が認められ、膨圧説の根拠にも疑問を生じた。また、各種代謝阻害剤を用いた実験から、間接発芽は新たな mRNA によるたんぱく合成と多量の呼吸エネルギー消費を伴う活発な細胞活動であることが予想され、かつ、微小管阻害剤、とくにビンブラステン阻害を強く受けることから、微小管の関与も考えられた。実際、走査型および透過型電子顕微鏡観察により、遊走子嚢細胞壁内面と遊走子細胞膜との間に微小管ないしはその関連構造からなると思われる紐状網目構造体の存在が認められ、さらに、ブタ脳たんぱくのチューブリン分画を抗原とした FITC 蛍光抗体法により、それらの構造体の存在する位置に強い蛍光を確認できた。以上のことより、遊走子嚢の間接発芽には微小管メカノケミカル系が関与している可能性が高いと思われる。

緒 言

疫病菌遊走子嚢の間接発芽(遊走子型発芽)は、まず嚢内における細胞質の遊走子への分割と、引続きこる遊走子の放出の2段階に分かれる。前段階の分割については、すでに前報^{26,27)}において詳しく報告した。さて、分割した遊走子は遊走子嚢の先端にある乳頭突起を突き破って飛び出してゆくが、その原動力については、古くから膨圧によるものと考えられている¹²⁾。その論拠は、グルコースやサッカロースなどの糖類や一般塩類の高張液中で間接発芽のみられなくなることである。最近、Gisi ら^{6~8)}は、種々の塩類や糖類の水ポテンシャルと間接発芽の関係を調べ、また、放出される遊走子が放出嚢に包まれている電子顕微鏡像を示

して、遊走子の放出が水ポテンシャルの差によって生ずる内圧によるとし、膨圧説を支持する報告を行なった。しかし、この遊走子の放出現象を顕微鏡下に観察するとき、単なる膨圧説では納得できない様々の場面に出会う。後述する残存顆粒の放出もそのひとつである。そこで、膨圧以外の原動力すなわち、鞭毛運動、アメーバ運動あるいは微小管・微小繊維による細胞運動等の関与の可能性について検討することにした。各種代謝あるいは機能阻害剤を用いた観察実験、走査型・透過型電子顕微鏡を用いた微小管関連構造体の観察およびブタ脳チューブリンを抗原として蛍光抗体法による検出実験などを行ない、間接発芽における放出の原動力としての微小管ないしはその関連構造の存在を示す幾つかの結果を得たので、ここに報告する。

* 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, Shimogamo, Kyoto Japan.

昭和56年7月13日受理

本研究に際して、当研究室正子 朔教授、真子伸生氏（現愛知県農業試験場）、大杉 武氏（現大阪大学医学部大学院）、田中裕美氏（現近畿大学農学部 助手）の協力を得た。また、広島放射線影響研究所鈴木和男氏、本学農学部伊吹文男助教授ならびに土井裕司助手には有益な御教示を賜わった。ここに記して謝意を表する。

材料ならびに方法

供試菌は *Phytophthora capsici*（京都府大植病研保存菌 N0.002）である。実験に必要な遊走子嚢は紙蓋平面培養法²¹⁾により得た。また、遊走子嚢の発芽方法、間接発芽率および遊走子型発芽指数の求め方などは前報²⁷⁾と同様である。ただし、阻害剤や糖類の検液は、処理濃度の2倍容の水溶液をつくり、試験に際して、等量の遊走子嚢懸濁液と混合する方法をとった。また、水に溶けにくい試薬の場合は、あらかじめ少量のエタノールに溶解した上、水と混和した。なお、この時に用いたエタノール量では、遊走子嚢の発芽などに何らの影響も及ぼさないことを確かめた。遊走子嚢の原形質分離は、ニュートラルレッド染色法によった。発芽管長の測定には、遊走子を強振して強制的に被囊させた被囊胞子を用いた。また、管長は写真撮影し、そのネガフィルムを投影して、カリパノメーターで測定した。

現象の動的観察のための顕微鏡映画撮影は、ニコン顕微鏡にミノルタオートパック D10 カメラを取付けた装置²⁵⁾を用いた。走査型電子顕微鏡観察にあたっては、試料はエタノールシリーズにより脱水し、酢酸アミルに透徹後、臨界点乾燥（日立 HCP-1 型）し、後述する両面テープ法で切断後、金蒸着（日立イオンコーター IB-3）して、観察（日立 SEM 310）した。透過型電子顕微鏡観察の場合も、試料はエタノールシリーズで脱水後、プロピレンオキシドを経て、Spurr

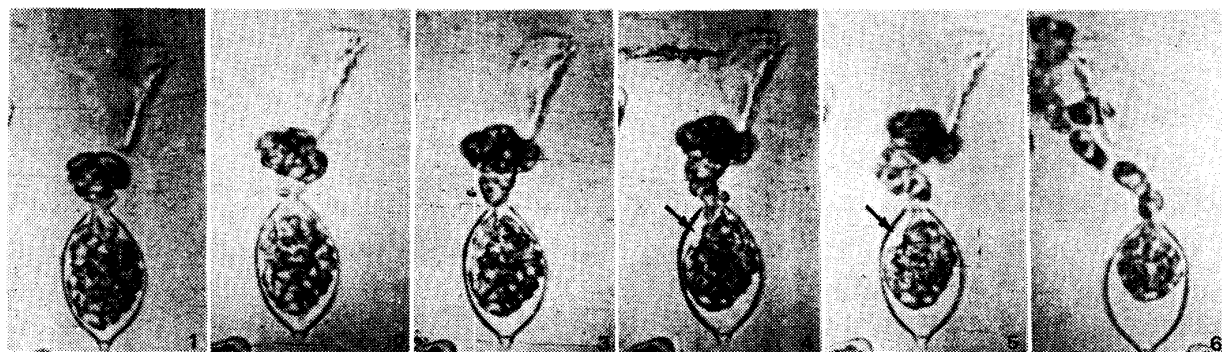
樹脂に包埋し、超薄切片（LKB 1000, ガラスナイフ）として、観察（日本電子 100 B）した。以上、一般的な方法について述べたが、個々の実験に用いた試薬や、その他の特殊な方法については、各実験の項のはじめに詳しく述べることにする。

観察ならびに実験結果

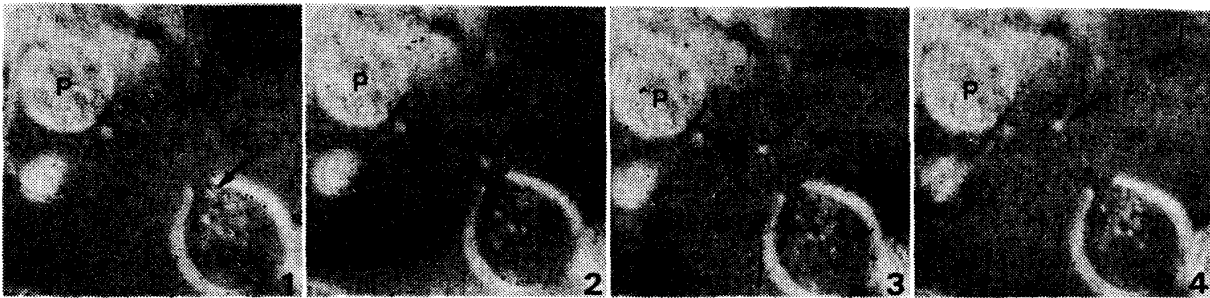
1. 放出現象の観察

i) 遊走子型発芽における放出

遊走子がどのようにして嚢中より放出されるかを高速度顕微鏡映画撮影を行ない解析した。遊走子嚢の内部において、遊走子への分割が完了し、個々の遊走子が明瞭に区別されるようになった頃、突然、遊走子は、乳頭突起との間の境界膜を破って、乳頭突起内に突入し、そのまま細胞壁をつらぬいて外部へ放出される（写真1）。遊走子は極く短時間、放出嚢に包まれたまま、開口部に集塊をなしている（写真2, 3, 4）が、やがて放出嚢を破って周囲に四散する（写真5, 6）。嚢内にあった遊走子はその後も引続き1個ずつ放出されて、自由に泳ぎ去ってゆく。ここで注目されることは、放出される遊走子の順序が定まっていることである。嚢内にあって遊走子塊はランダムな集まりのように見えるが、実際は序列が存在し、それに従って放出される。このため集塊は全体として少しずつ位置をずらして回転する。時には、放出された遊走子が、互いに細い原形質糸によりつながっているように見えることもある。この配列は、恐らく遊走子嚢の細胞質が菌糸状態にあったときの順序であろう。このことは、遊走子嚢はいわゆる多核体ではあるが、細胞質内に核やミクロオルガネラが漫然と存在するのではなくて、個々の核の支配するミクロオルガネラの量はもちろん、領域の配置まで明確に定まっていることを意味し、ただ細胞膜によって境界が仕切られていないだけである。



第1図 遊走子嚢の間接発芽における遊走子放出現象の経時変化（8 mm 顕微鏡映画フィルムから）。遊走子は秩序正しく放出される。開口部付近に空白部（矢印）がみられるが、下からの膨圧により押出されているとすると説明し難い。



第2図 遊走子嚢のプロトプラスト型発芽後における顆内残存顆粒の放出現象：嚢内残存顆粒のひとつを矢印で示す。プロトプラスト (P) はすでに放出されてしまっているのに、およそ 118.8 $\mu\text{m}/\text{sec}$ の速さで顆粒の放出が続く。

遊走子嚢内での原形質流動が整然としていることや、割腔胞の配列が混乱なく行なわれるのもこの秩序を示している。普通、このように順序正しく遊走子はすべて放出されるが、時には、2~3個の遊走子が出遅れて嚢内に残されることもある。遊走子は嚢内を駆けめぐっているが、たまたま乳頭突起の開口部に近づくと飛び出すように放出される。これが遊走子の走性や鞭毛運動により自ら飛び出したのではないことは、発芽開始から1分以上も経過すると、たとえ遊泳力は衰えていなくとも、もはや飛び出すことはなく、嚢内を泳ぎまわり、ついには被嚢する。

ii) プロトプラスト型発芽の場合

プロトプラスト型発芽は前報²⁷⁾のように、ステロール欠培地で培養された異常な遊走子嚢の特徴ではあるが、正常な遊走子嚢の場合でも、カバーガラスをかけて検鏡していると、その中央部付近は酸素不足となるためであろう、しばしば遊走子の分割が進行せず、1~2個の大きなプロトプラストのまま放出されてくることがある。この際のプロトプラストは、あたかもボルボックスのように、周囲に多数の鞭毛をもち、水中を回転しながらゆっくりと泳ぐ。このような好ましからぬ環境下で放出されるプロトプラストは、遊走子嚢内に大小様々の顆粒を残すことが多い。これらの顆粒はブラウン運動に近い微振動を行なっているが、この顆粒もまた、先の出遅れた遊走子と同様に、開口部に近づくと早い速度で放り出される。この放出も時間が経つにつれて次第に弱まり、ついには、顆粒は嚢内でブラウン運動を行なうのみとなる。第2図は顆粒の放出過程を示しており、顆粒(矢印)は、0.16秒の間に約 19 μm 移動した。つまり、118.8 $\mu\text{m}/\text{sec}$ の速さで放出されたことになり、通常の遊走子の遊泳速度に近い速さである。この現象は鞭毛運動はもちろん、膨圧によっても説明はむづかしい。

2. 膨圧説の再検討

i) 遊走子嚢と遊走子の細胞浸透圧の測定

サッカロースおよびグルコースの0.1から0.5モルまで5段階の濃度溶液をつくり、遊走子嚢については、遊走子型発芽指数と原形質分離率を、遊走子については、細胞の破裂率と収縮胞の脈動数を測定した。なお、遊走子の細胞破裂率は、20°C、1時間後にフォルモール・カルシウム固定¹⁷⁾を行ない、その時の未破裂細胞数とはじめの細胞数の比を百分率で表わしたものであり、また、収縮胞^{23,24)}の脈動数は運動停止直後の遊走子の収縮胞の1分間当りの脈動数を実測した。

その結果は第1表に示す。遊走子嚢の遊走子型発芽指数は0.2モルでは4.7、0.3モルでは0となり、原形質分離率は0.1モルで0、0.2モルで4.2%を示す。また、遊走子の細胞破裂率は、0.1モルで19.9%を示すが、0.2モルになると急激に3.9%に落ち、その後はほぼ横ばい状態を示すことから、一応0.2モル付近に境界が存在すると思われる。また、収縮胞の脈動も、0.2モルを越えたところでほとんど認められなくなる。以上を総合して、本菌細胞は0.2~0.25モルの糖液と等しい浸透圧を有するものと判断される。

ii) 各種糖類溶液の濃度が遊走子嚢に及ぼす影響

先の実験から本菌細胞の浸透圧は、0.2~0.25モル

第1表 各種濃度の糖溶液中における遊走子嚢・遊走子の反応

検定項目	糖濃度(モル)					
	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
遊走子嚢						
遊走子型発芽指数 ²⁸⁾ **	0	0	0	4.7	7.4	9.1
原形質分離率(%)*	74.7	36.8	12.0	4.2	0	0
遊走子						
細胞破裂率(%)*	1.6	2.0	3.3	3.9	19.9	70.3
収縮胞脈動数(回/min)*	-	-	-	+	5.4	6.3

* サッカロース ** グルコース

第2表 遊走子嚢の間接発芽に及ぼす糖類の影響

糖 類	濃度 (モル)	原形質 分離	遊走子 分離	間接発芽 割合 (%)	遊走子型 発芽指数
脱イオン水	—	—	+++	76.7	6.29
グルコース	0.5	++	±	0.9	0.01
	0.25	±	++	44.0	0.04
	0.125	—	+++	77.1	5.22
フラクトース	0.5	++	±	0.0	0.04
	0.25	±	+++	48.9	1.06
	0.125	—	+++	66.5	4.44
マンニット	0.5	++	+	12.2	0.07
	0.25	±	+++	79.2	6.59
	0.125	—	+++	69.4	8.65
ソルビット	0.5	++	—	22.2	0.38
	0.25	±	+++	67.5	6.65
	0.125	—	+++	77.5	7.51
3-0-メチル グルコース	0.5	+	+	1.3	0.31
	0.25	±	++	61.0	2.82
	0.125	—	+++	74.2	4.83
2-デオキシ グルコース	0.5	++	+	24.5	0.49
	0.25	±	++	83.1	5.07
	0.125	—	++	85.2	5.66

の範囲にある。そこで、次に、膨圧説の根拠である高張液条件下で間接発芽を実際に抑制するかどうかの確認実験を行なった。糖としては単糖類のみを用いた。グルコース、フラクトースのほか、栄養源として利用されにくい糖であるマンニットとソルビット、および、ほとんど利用されることのない3-0-メチルグルコースと2-デオキシグルコースの6種を選んだ。等張液濃度は0.25モルとし高張液、低張液はそれぞれ0.5モルおよび0.125モルとした。結果は、間接発芽率および遊走子型発芽指数のほか、原形質分離程度と遊走子への分割の有無についても調査した(第2表)。

いずれの糖においても、0.125モルでは原形質分離はみられず、0.25モルを境として、0.5モル側で顕著な分離を起こすことから、0.5モルでは、いずれの糖も等しく高張液となっていることを示している。そこで、間接発芽率をみると、グルコース、フラクトースでは、0.125モルで70%前後、0.25モルで50%弱の値を示したのに対し、0.5モルでは明らかに発芽が認められず、ここまでの結果は、間接発芽は膨圧によるものとする従来の説明¹²⁾に一致する。ところが、マンニット、ソルビット、2-デオキシグルコースにおいては、0.25モルにおいても、対照区(脱イオン水中)と同様

の発芽率を示し、さらに、0.5モルの高張液中においては、それぞれ12.2、22.2および24.2%もの発芽がみられ、遊走子型発芽指数が示すように、明らかに遊走子による発芽が認められた。

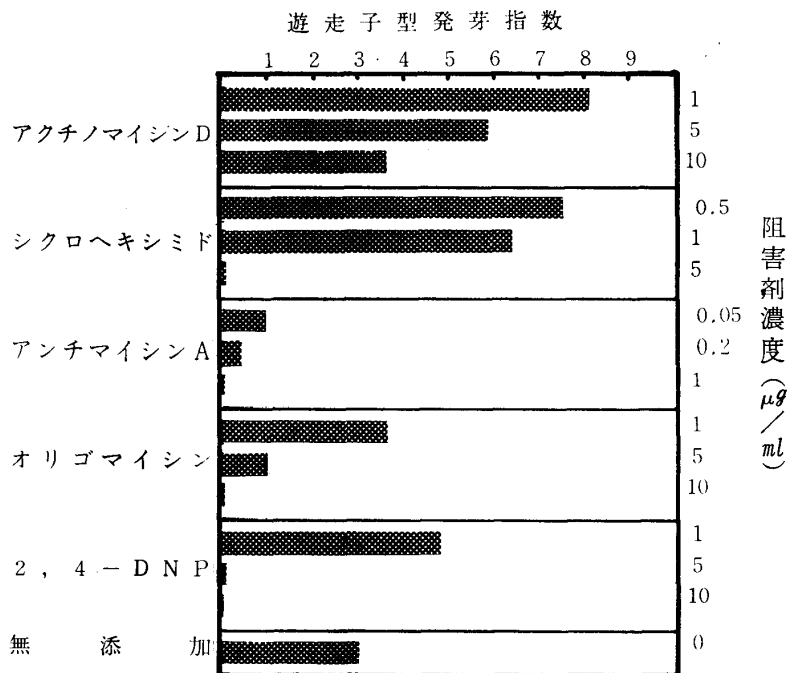
iii) 各種糖類の濃度が被嚢胞子の発芽率および発芽管長に及ぼす影響

これらの糖類が、単に膨圧としての物理的影響を与えているばかりでなく、直接、菌の代謝生理に影響していることが考えられるので、被嚢胞子の発芽管発芽(直接発芽)を対象として、その影響を調べた。先の実験と同様に、6種類の糖の0.125、0.25および0.5モル溶液中に被嚢胞子(遊走子を強振被嚢させたもの)を懸濁し、28°Cに6時間保って、その発芽率と発芽管長を測定した(第3表)。

0.125および0.25モルの溶液では、グルコースやフラクトースにおいて、発芽管長は180 μmほどに達し、対照区より37%ほど長くなっている。このことは、これらの糖が代謝され生長に利用されたことを示している。マンニットやソルビットにおいてもその傾向がある。それに対し、3-0-メチルグルコースでは伸長抑制がみられる。0.5モル溶液になると、グルコースでも、ほぼ対照区と同じ伸びを示し、フラクトース、マンニット、ソルビット、メチルグルコースでは伸長抑制がさらに強まり、デオキシグルコースでは発芽管長はわずかに23 μmに止まった。発芽率においてもほぼ同様の傾向がみられた。これらの結果は、供試した各種の糖のうち、グルコースやフラクトースは、栄養源として代謝利用され、マンニットやソルビットも若干その傾向があり、3-0-メチルグルコースは利用されず、2-デオキシグルコースは逆に代謝抑制が起こること、また、糖の濃度の上昇は、いずれの糖においても、菌に対して阻害的に働く傾向があることなどを意味して

第3表 各種糖濃度と被嚢胞子の発芽

糖の種類	発芽管長 μm (発芽率%)		
	濃度 0.125モル	濃度 0.25モル	濃度 0.5モル
グルコース	183(99.1)	176(98.4)	129(91.2)
フラクトース	180(98.9)	181(98.1)	95(39.4)
マンニット	159(98.7)	142(96.4)	81(39.0)
ソルビット	150(97.5)	140(97.1)	92(65.9)
3-0-メチル グルコース	133(98.0)	128(91.7)	83(55.9)
2-デオキシ グルコース	62(95.8)	60(90.5)	23(27.8)
脱イオン水	133(94.9)		



第3図 呼吸阻害剤の遊走子型発芽に及ぼす影響

いるものと思われる。

以上のことから、遊走子嚢の間接発芽に対する糖とその濃度の影響は、膨圧への物理的作用と、栄養的効果と、それらによって引き起こされる代謝変化、少なくともこの3種の複合作用の結果として表われてくるものであり、この視点から、高張液中で間接発芽が強く抑制されるのは、代謝されやすい糖の場合であったことは、糖のもたらす物理作用というより、むしろ、代謝に及ぼす作用、すなわち、一種の異化物質抑制 (Catabolite repression) が働いたのではないだろうか。

3. 間接発芽に対する阻害剤試験

i) 特異的代謝阻害剤の場合

各種代謝阻害剤を用いて、間接発芽時に働く代謝系の推察を試みた。阻害剤としては、RNA合成阻害剤アクチノマイシンD、たんぱく合成阻害剤シクロヘキシミド、および呼吸阻害剤としてアンチマイシンA、オリゴマイシン、2-4-ジニトロフェノール (2,4-DNP) を用いた。

それぞれの阻害剤が遊走子型発芽に及ぼす影響は第3図に示す通りである。アクチノマイシンDの阻害作用はあまり強くないが、濃度の上昇と共に明らかに阻害の高まる傾向がみられた。シクロヘキシミドにおいては、とくに5 µg/mlで著しい阻害が認められた。呼吸阻害剤の作用はとくに大きく、アンチマイシンAでは1 µg/ml、オリゴマイシン、2,4-DNPでは10 µg/mlで遊走子型発芽はほぼ完全に阻止された。なお、オリ

ゴマイシン 10 µg/mlで遊走子型発芽はほぼ完全に阻害されているが、間接発芽はかなり認められた。これはプロトプラスト型発芽が行なわれたため、オリゴマイシンは遊走子の放出より、遊走子への分割を強く阻害する作用のあることを示している。

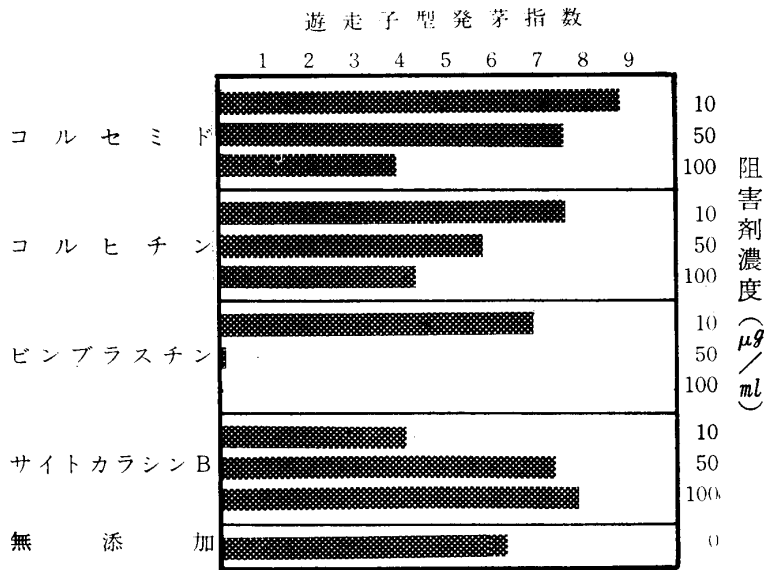
これらのことから、遊走子嚢の間接発芽は、新しいたんぱく合成と、多量のATP消費をともなう活発な代謝活動を必要としていることがうかがえる。

ii) 微小管・微小繊維阻害剤の場合

遊走子嚢の間接発芽が、単なる膨圧によるものでないとするれば、遊走子嚢の内部に、なんらかの押し出し作用を備えた機関が必要である。細胞の運動に関与する機構としては微小管と微小繊維が考えられる。そこで、微小管阻害剤としてコルヒチン、コルセミドおよびビンブラスチン、微小繊維阻害剤として、サイトカラシンBを用い、その阻害作用を、遊走子嚢の遊走子への分割、遊走子型発芽および、遊走子の遊泳速度や形態に関して調査した (第4表および第4図)。

その結果、ビンブラスチンは最も顕著な阻害を示し、125 µg/mlで遊走子への分割と遊走子の放出をほぼ完全に抑制した。コルセミドとコルヒチンは、濃度の上昇と共に阻害の高まる傾向を示しているが、作用はビンブラスチンほど強くなかった。ただし、発芽処理後30分の判定では、コルセミド、コルヒチン共にかなりの阻害が認められるが、其後に抑制が緩和される傾向にある。

これらの阻害剤は遊走子の遊泳にも影響を及ぼし、



第4図 微小管・微小繊維阻害剤の遊走子嚢遊走子型発芽に及ぼす影響

遊泳速度の低下と形態的な変化を起こさせ、遊走子は先端の尖った長型を呈した。これらの微小管阻害剤の作用が、鞭毛よりも遊走子の形に強く表われたことは、鞭毛を構成している微小管はかなり安定な状態にあるのに対し、遊走子を形づくる微小管は不安定で、阻害剤の作用を受けやすいことを示しているようである。

一方、サイトカラシンBは、遊走子の分割にも、遊走子型発芽にもほとんど阻害を示さなかった。遊走子の遊泳に対しても、速度がやや遅くなる程度で、泳ぎ方も形態もほぼ正常に近かった。ただし、プロトプラスト型発芽がかなり目立って観察された。

4. 遊走子嚢周辺割腔における微細構造

i) 細胞壁内接網目構造体 (走査型電子顕微鏡観察)
遊走子嚢の遊走子の放出に、押し出し機構が存在するとすれば、これまでの観察から、遊走子嚢細胞壁内面と遊走子細胞膜との間、つまり、周辺割腔部にあるはずである。その部分の観察を行なうため、次のような方法で遊走子嚢を切断した。まず、遊走子嚢を前述の方法で臨界点乾燥した。次に、試料台に貼った両面テープ (約3mm角) の上に、この乾燥遊走子嚢を均一にふりかけ、粘着部分全面に広げたのち、余分の遊走子嚢を吹飛ばし、同形の両面テープを貼ったもうひと

第4表 微小管・微小繊維阻害剤が遊走子嚢・遊走子に及ぼす影響

微小管・微小繊維阻害剤	濃度 (μg/ml)	遊走子嚢			遊走子	
		遊走子分割	遊走子型発芽 30分後	90分後	遊泳速度	形態
コルセミド	250	++	—	++	正常に近し	異常(長型)
	125	++	+	++	//	//
	62.5	+++	++	+++	//	//
コルヒチン	250	++	+	+++	正常に近し	異常(先尖長型)
	125	+++	+	+++	//	//
	62.5	+++	++	+++	//	ほぼ正常
ビンブラスチン	250	—	—	—	—	—
	125	—	—	±	—	—
	62.5	+	+	++	やや遅し	異常(先尖長型)
サイトカラシンB	250	+++	++	+++	やや遅し	ほぼ正常 (プロトプラスト型多し)
	125	+++	+	+++	//	//
	62.5	+++	+++	+++	ほぼ正常	//
無処理	0	+++	+++	+++	正常	正常

つの試料台を上から重ね、軽く押えたのち、両側にひきはがす。この後、金蒸着を行ない、走査型電子顕微鏡により観察する。この方法を両面テープ切断法と呼んでいる。

乾燥した遊走子嚢は、図版 I-1 のような形をしており、先端の孔は間接発芽により遊走子が放出された乳頭突起の開口部である。遊走子嚢の外壁はなめらかで、繊維状のわずかな起伏がみられる。両面テープ法で切断すると、図版 I-2, 3 のように、遊走子嚢は細胞壁のやわらかい部分で裂開が起こる。未発芽遊走子嚢の場合は、破れた細胞の中に細胞質塊があり、細胞壁の内側は観察できないことも多いが、時には、細胞質が飛出して、内面が観察可能となることもある。一方、間接発芽で空になった遊走子嚢の場合は、観察は比較的容易である。図版 II-1 はほぼ正中面で割れた遊走子嚢であるが、その細胞壁内面に、乳頭突起の方向に収斂するように見える紐状の網目構造が観察された。

ii) トリプシンによる網目構造体の消化実験

この紐状構造が、細胞壁を構成する多糖類からなるものではなく、予想している微小管などの収縮性たんぱく質からなるものとするれば、少なくとも、たんぱく質分解酵素により分解されるはずである。そこで、トリプシン消化実験を行なった。0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0, 0.01 M CaCl_2) にトリプシン (子牛脾臓, Sigma T8003) を 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう溶解し、間接発芽させたのちの遊走子嚢を懸濁して、28°C で 1 時間振盪処理したのち、前述の方法で切断観察した。

その結果、図版 II-3, 4 に示すように、遊走子嚢内壁の網目構造は消失し、内壁にはうろこ状の粗雑な壁面のみが観察された。この遊走子嚢には開口した乳頭突起が認められ、明らかに空の遊走子嚢であったことを示している。このように、空の遊走子嚢では、トリプシンは容易に嚢内に入り、消化作用を発揮することができるが、未開口のものでは消化は行なわれず、細胞壁内面には網目構造体が残っていることになる。明らかに開口した乳頭突起をもつと確認できた試料は極めて少ないが、それらはすべて網目構造体が消失していた。これらのことから、網目構造体は、少なくとも、たんぱく質から成るものと考えられる。

iii) 周辺割腔内微小管様構造体 (透過型電子顕微鏡観察)

前報²⁸⁾に述べたように、遊走子への分割は、割腔胞の融合によって形成される割腔の形成と裏腹の関係にある。この割腔のうち、細胞壁と細胞質との間に生ずるものをとくに周辺割腔と呼んでいる。この周辺割腔部を詳しく観察すると、その内部を走る微小管が認め

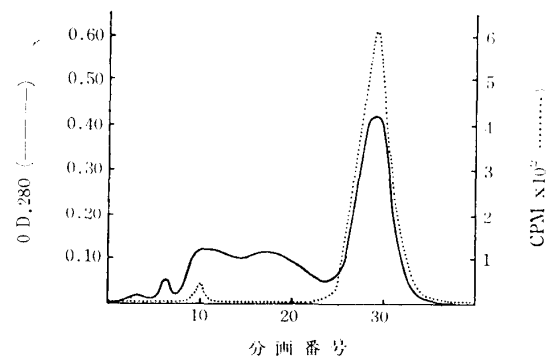
られた (図版 III-1, 2, 3)。この微小管は、鞭毛微小管 (本菌の場合、実測値 22.5 nm) に比べて、はるかに細く、9.3~9.5 nm であった。それらは、ランダムに分散していることもあるが、数十本集まって束になっていることもあった (図版 III-3)。また、この他に、大小様々の小胞・小管状構造の集団 (図版 III-4, 5) が認められた。小胞の直径は 30~60 nm、小管は 18.5 nm 程度であった。また、結晶様構造 (図版 III-6) も存在し、これは、4.5 nm の微粒子からなる微小繊維の集合体のように見えた。

5. 遊走子嚢におけるチューブリン様物質の検出

i) 遊走子嚢内コルヒチン結合たんぱく

これまでの結果から、遊走子嚢の周辺割腔内に存在する微小管様構造が、間接発芽における遊走子の押し機構に関与している可能性が高まってきた。もし、これらが微小管であるとする、チューブリンたんぱくでできており、コルヒチンと特異的に強く結合するはずである。そこで、菌体よりたんぱくを抽出し、コルヒチン結合能を調べることにした。遊走子嚢を遠沈により集めて PMSG 緩衝液³³⁾に懸濁し、ポッター型ホモジナイザーを用い、氷冷下でホモジナイズし、超遠心 (100,000 G, 60分) 上清部をとり、粗たんぱく液を得た。この液 2 ml に ^{14}C -コルヒチン (10⁴ cpm/ml) を添加して、セファデックス G-100 カラム (直径 25 mm, 長さ 350 mm) に重層し、PKMg 緩衝液⁵⁾により展開し、フラクションコレクターで 1 ml ずつ分取しながら OD280 および液体シンチレーションカウンターによる放射能測定を行なった。

結果は第 5 図に示すように、分画番号 26~33 に高いたんぱくのピークがあり、放射活性のピークと完全に一致した。このことは、たんぱく分画内にコルヒチン結合能の高いたんぱく、つまり、チューブリンないし



第 5 図 ^{14}C -コルヒチンを結合させた遊走子嚢可溶性たんぱくの Sephadex G100 カラムクロマトグラフィー

第5表 間接発芽の原動力は何か？

原 動 力	否 定	肯 定
鞭 毛 運 動	無鞭毛プロトプラストの放出	
ア メ ー バ 運 動	プロトプラスト型発芽後の残存顆粒の放出	
膨 圧	代謝されにくい糖では高張液中で発芽する	グルコースやフラクトースの高張液で発芽しない
収縮性たんぱく (マイクロチューブルス)		ピンブラスチン阻害, 残存顆粒の放出, 内壁網目構造体, 周辺割腔内微小管様構造体, チューブリン蛍光抗体法

はそれに近いたんぱく質を含んでいることを意味する。

ii) ブタ脳チューブリン分画を抗原として蛍光抗体法による微小管存在部位の検定

哺乳類の脳は、他の組織に比べ、多量のチューブリンを含有している¹⁶⁾。そこで、ブタ脳より、先の菌体と同じ方法で、たんぱくを抽出し、同様にして、コルヒチン結合たんぱくに相当する分画を集めて凍結保存した。このたんぱく液 1 ml (たんぱく質 1 mg/ml) に、等量の Freund のコンプリートアジュバンドを混ぜ、よく乳化させ、その全量を、雌うさぎの附足、および背皮下部に注射した。3 週間後、ブースターを行ない、さらに 1 週間後、耳静脈より採血し、血清を得た。抗体価はおよそ 640 であった。ポリリジン処理¹⁷⁾したスライドグラスに遊走子嚢を固着させ、顕微鏡観察しながら適当な時期に、2.5% グルタルアルデヒド固定液を滴下して固定した。その後、生理的食塩水でよく洗い、血清を滴下し、37°C 定温器に保って反応させた。1 時間後、生理的食塩水で十分に洗浄し、次いで、蛍光物質 FITC で標識したヤギ抗ウサギ γ グロブリン (Hyland 製, F/P 率, 6.7 μg/ml, たんぱく濃度 18.0 mg/ml) の処理を行なった。生理的食塩水で十分に洗浄ののち、無蛍光グリセリンで封じ、落射型蛍光顕微鏡 (ニコン EFA) により観察した。

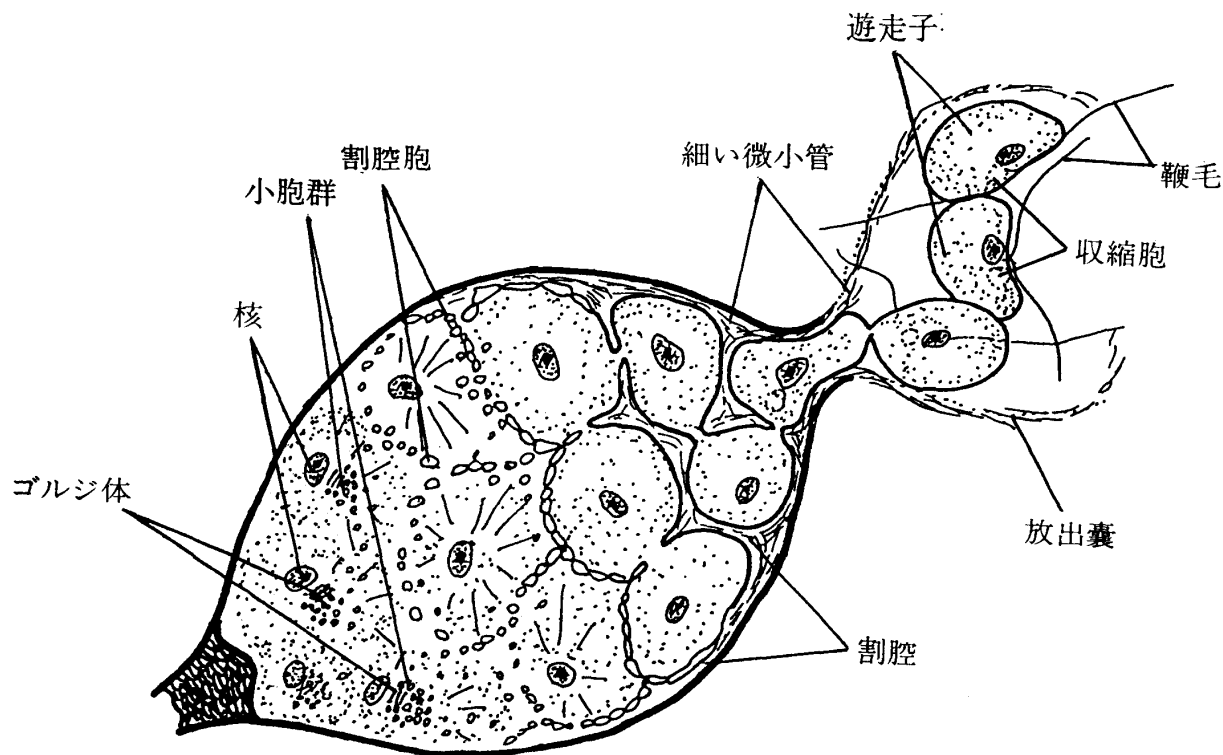
図版 N-1 は観察された遊走子嚢のうちのひとつであり、普通照明像にみられるように、遊走子はすでに放出され、遊走子嚢は空になっている。この遊走子嚢を紫外線照明下に観察すると、右の写真のように乳頭突起先端部に強い蛍光が認められ、抗原たんぱくと同じたんぱく成分から成る物質が乳頭突起の開口部に集積していることを示している。遊走子嚢内に蛍光が認められないのは、この物質が、乳頭突起開口部にあたかも栓をしたように集積したからであろう。隣に未発芽の遊走子嚢がみられるが、乳頭突起部やその他の部分

にもほとんど蛍光は認められない。図版 N-2 は遊走子の放出直後に固定されたものである。遊走子を包んでいる放出嚢の周囲に強い蛍光が認められる。また、下方に空になった遊走子嚢があるが、その内壁に沿って、やはり蛍光が観察された。とくに、遊走子嚢内壁においては、不明瞭ながら網目らしき構造も認められた。遊走子は染まらなかったが、鞭毛の基部付近によく染まる部分がみられた。鞭毛の毛基体のように思われる。破裂した遊走子は全体が比較的良好に染まった。また、被嚢しかけた遊走子は、その周囲が染まるようになる傾向があった。なお、抗血清を処理しなかった場合や、抗原を注射しなかった対照ウサギの血清で処理した場合は、上記のような蛍光は認められなかった。

考 察

遊走子嚢の間接発芽における遊走子放出の原動力として考えられるものは、遊走子の鞭毛運動と、細胞質のアメーバ運動、膨圧、および、微小管などの収縮性たんぱくによる押し出し機構である。このうち、前 2 者は自動的、後 2 者は他動的の原動力といえることができる。さて、これらの原動力について、これまでの実験や観察から得られた結果をもとにして、その肯否をまとめてみると、第 5 表のようになる。

鞭毛は、無鞭毛プロトプラストが、酷似した様相で放出されることから完全に否定されるし、アメーバ運動はプロトプラスト型発芽後の残存顆粒の放出現象によって否定することができる。ただし、遊走子の鞭毛はそれ自体一種の微小管運動であり放出時にはすでに活発に活動しているので、放出の補助的な力として働いていることは十分に考えられる。ただし、ラビリンチュラの滑走も、一種のアメーバ運動と考えるならば細胞膜上の特殊なすべり機構の存在が想定される点で、遊走子嚢の間接発芽も一種のアメーバ運動ということ



第6図 遊走子囊の遊走子型発芽における遊走子分割から放出に到る変化と諸マイクロオルガネラ

になるかもしれない。

膨圧については、結果の項でも詳しく述べたように、マンニトやソルビットのような代謝されにくい糖や、膜の透過実験においてしばしばグルコースのかわりに使用される代謝されない糖デオキシグルコースやメチルグルコースにおいては、高張液であるにもかかわらず、間接発芽が認められたことから、かなり否定的である。その上、特異的代謝阻害剤を用いた実験は、間接発芽現象が、mRNAの指令にもとづく新たなたんぱく合成を必要とし、多量のATP生産と消費をとまなう極めて活発な細胞活動であることを示唆していることも、膨圧に否定的材料と云えよう。

ところで、膨圧が間接発芽とくに遊走子の放出の原動力であるということについては、それほど確固たる論拠が展開されていたのではなく、糖や塩類の高張液中で発芽がみられなくなることが唯一の根拠であるように思われる。近年、Gisi (1977) は、各種塩類溶液中における *P. cactorum* の遊走子囊の間接発芽を詳しく調べ、食塩量の増加に伴って、間接発芽が抑制されること、および、同様のことが、各種の塩類溶液によってもみられ、それは、ほぼイオンの離液系列 (Lyotropic series) に一致することを示し、原形質分離やその復帰現象とも、おおよそ一致をみることから、間接発芽と外液浸透圧との関係を強調して膨圧説を支持する論文^{6~8)}を発表した。さらに加えて、形態的証

拠として、Lunningら (1976)¹⁸⁾によって、ベシクローゲン (vesiculogen) と名付けられた乳頭突起内の繊維性物質が、発芽の際に放出囊を形成し、遊走子はその内部へ流入することを指摘し、その時の放出囊の体積の変化が一定の表面積拡大率をもつことから、一種のプラスチック袋にたとえ、囊内の膨圧が維持されたまま、破裂を起こすまでに、少なくとも遊走子の70~80%が放出を完了すると説明した。彼らの報告は、形態的裏づけを添えた、唯一の理論的論述であるが、いくつかの問題点がある。例えば、間接発芽率 (この判定や算出方法に関する説明がないが、恐らく、空になった遊走子囊率であろう。その問題点はすでに指摘した²⁸⁾) が0となる浸透モル値 (0.15%, NaCl, 約50 Osmol) と、原形質分離・復帰を起こす浸透モル値 (約1.5%, 500 Osmol) との間に10倍ものひらきがあることやイオンの離液系列との関連性を強調しているものの、低い順位にある Mg^{++} において高い発芽抑制がみられることなど、いくつかの矛盾を内包している。また、細胞内圧に与える物理的影響のみを考慮に入れている点にも納得できない。実際、これらの塩類イオンは細胞の代謝活動に極めて鋭敏に、直接、間接の影響を与えることが多い。筆者が浸透圧調節に塩類を用いなかったのも、 Na^+ , K^+ , Ca^{++} あるいは Mg^{++} などのイオンの種類や濃度が、遊走子の遊泳行動に微妙な影響を与えることから、間接発芽に対する物理的

要因としてのみ解釈することが不可能と考えたからであり、また、前述のように代謝されない糖を用いたのもその理由からである。また、乳頭突起内の繊維性物質がベシクローゲンと同一のものであるとしても、それが放出嚢を直接構成することの証明はなく、単に放出嚢の膜が乳頭突起と連続している像を示しているだけである。さらに、それが一種のプラスチック袋のように遊走子塊を包み込んでいるので、嚢内の膨圧は維持されると説明するが、それはあくまで内圧の維持であって、遊走子塊がすべて放出されることの説明にはならない。少なくとも、最初の容積だけは残されるはずであり、その後は鞭毛力で泳出すると考えることにも無理がある。

最後の収縮性たんぱく説であるが、各種の代謝阻害剤試験や残存顆粒の放出現象などの間接的証拠のほか、直接的には、細胞壁内面の網目ひも状構造がある。これは細いものは、138 nm、太いところで475 nmほどあるが、平均160~170 nmである。これを、超薄切片像にみられる小胞・小管状構造と対比させると、例えば図版Ⅲ-3における微小管束は太いところで、154 nm、細いところで101 nm、またⅢ-4の小管束もさしわたし146 nmあり、さきのひも状構造の太さとはほぼ一致をみる。因みに、シャジクモの原形質流動の動原体は、その幅100~200 nmでほぼ同程度の太さである。これらの周辺割腔にみられた微細管、微小管、小胞ならびに結晶構造は、それぞれ太さは約10、18.5~20、36~50および4.5で、太さも形態も異なっているが、拡大するといずれも4.5 nmほどの微粒子から構成されているようである。この値は太陽虫軸足の微小管粒子と一致する。普通、微小管は、この粒子から成る繊維（プロトフィラメントと呼ぶ）が13本集まって形成され、太さが22.5~24 nmとなる。このような計算で本菌の場合を考えてみると、微細管は5本構成（10 nm）、微小管は10本構成、鞭毛の中心小管は13本、微小管ポケットの微小管は7本構成ということになる。問題は、プロトフィラメントが、このように自由な構成が可能かどうかということであるが、Tilneyら（1967）³⁷⁾は220Åから340Åへの微小管の変換モデルを提案し、Schmitt（1968）³⁵⁾は神経細胞の軸索流の速い流れの説明において、プロトフィラメントが、最も安定した13本構成の他に、5本構成などの可能性を挙げ、フィラメントの鎖と膜系オルガネラの滑り合いで流れが発生するとした。また、最近、重中ら（1979）³⁶⁾は太陽虫軸足において、微小管（23~28 nm）からマイクロチューブス（33~40 nm）へのリボン状よじれによる連鎖的遷移の可能性を指摘している。これ

を拡大解釈すれば、プロトフィラメントが平面的に配列して構成するリボンを考え、これをていねいに巻いて平面に置き中央からリボンを真上に引出すとき、リボンは直径の異なる連続した中空管を形づくる。ここまで自由であるかどうかは疑問としても、ともかく微小管はかなりの可変的柔軟性をもつと考えてよからう。

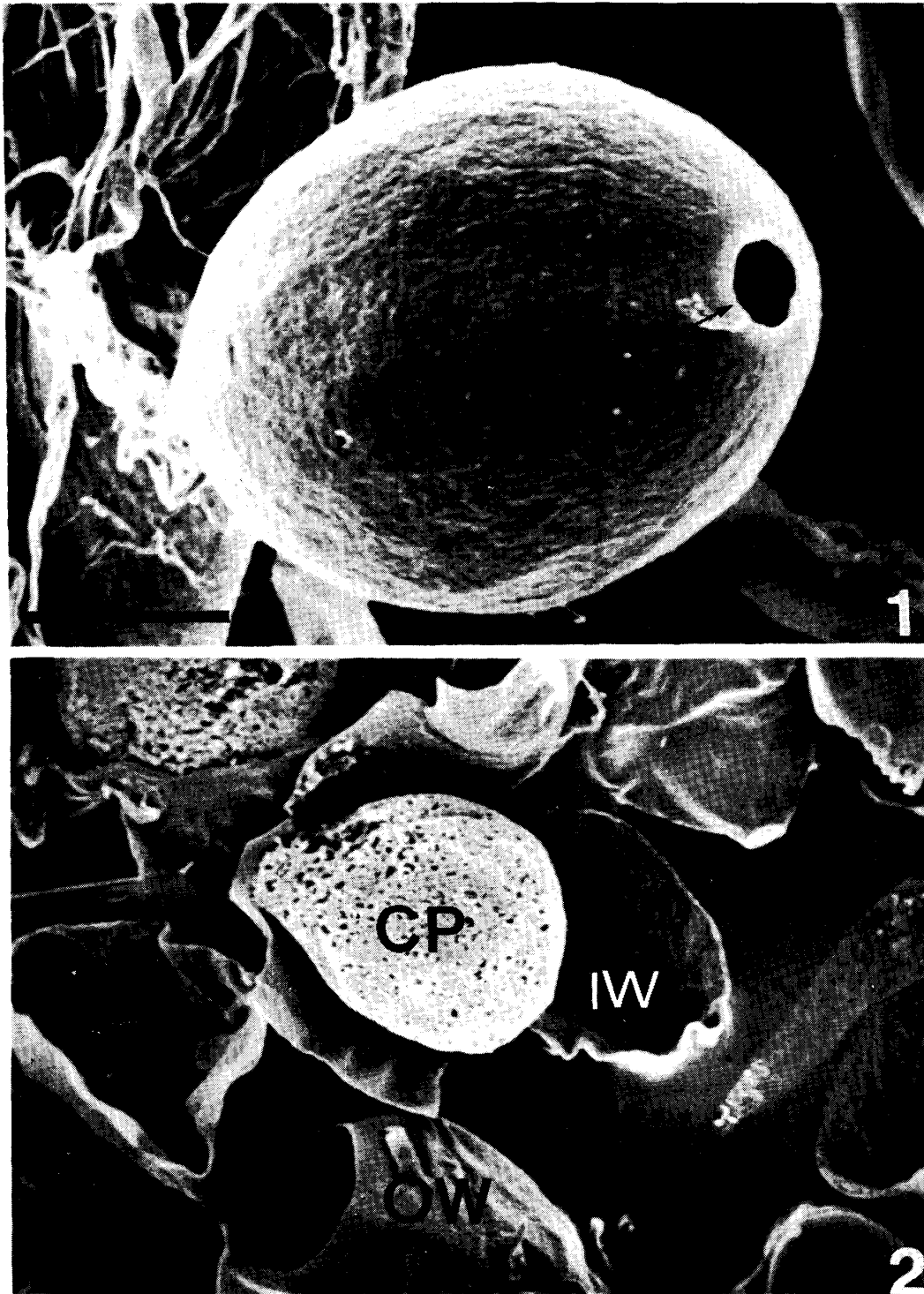
それでは、はたして、この粒子はチューブリンであるかどうか問題である。確かに細胞中にはチューブリン（コルヒチン結合たんぱく）は存在するようである。しかし、細胞内には、鞭毛をはじめ様々の微小管が存在する。唯一の証拠と云えるものは、ブタ脳チューブリン分画を抗原とした蛍光抗体法により、周辺割腔や放出遊走子塊など微細管、微小管の存在と一致する部分で、蛍光の認められたことである。しかしながら、結果の項でも述べたように、完全に純化したチューブリンを用いていないことから断定するまでには到らない。

これまでのすべての結果を統合的に判断して、遊走子嚢の間接発芽における遊走子の飛出し機構には、収縮性たんぱく繊維からなる微小管ないしはその関連構造が、原動力として関与している可能性は高いと云ってもよいだろう。最初、鞭毛にのみ存在する特殊な構造と思われていた微小管が、細胞分裂装置をはじめ、細胞質のあちこちで認められるようになり、細胞質（性）微小管と呼ばれるようになった。細胞骨格としての働き¹¹⁾のみならず細胞内の物質やオルガネラの輸送のような動きの原動力としての重要性が次々と指摘されつつある^{9,10,30,31)}。疫病菌の間接発芽の場合にも、これらが関与していると云っても、それほど唐突にも感ぜられないであろうが、ただし、細胞外での微小管の動的作用についての報告は見当たらない。この点に関しては、本菌と分類的に比較的近い位置にある粘菌類の一種ラビリンチュラ (*Labyrinthura*) は、隣接する細胞が相互に連絡して外形質からなる網目構造を形成し、それに沿って細胞が滑走運動をすることで知られているが、この外形質網の微細構造³²⁾に、本菌遊走子嚢の周辺割腔や、ピシウム³³⁾の放出管内の内壁に見られた管状構造と酷似する構造の存在が認められるのである。

引用文献

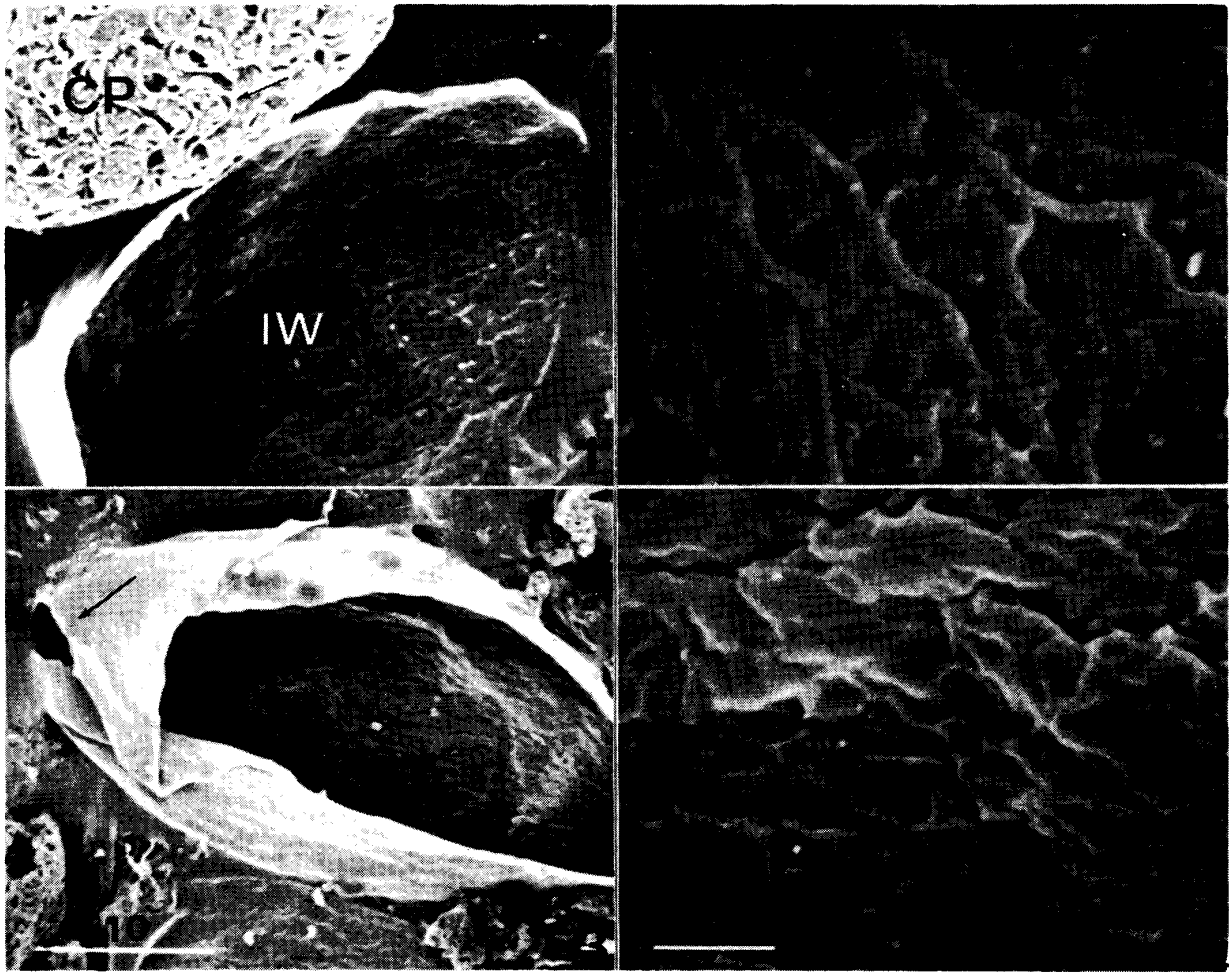
- 1) 新井孝夫 (1978) 代謝 15: 407-415.
- 2) 浅野 朗 (1974) 生体膜実験法 (蛋白質・核酸・酵素別冊): 297-315.
- 3) Chrambach, A., R. A. Reisford, M. Wyckoff and J. Zaccari (1967) *Analytical Biochem.* 20: 150-154.

- 4) Clarke, M., G. Schatten, D. Mazia and J. A. Spudich (1975). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72: 1758-1762.
- 5) Davidse, L. C. and W. Flach (1977) *J. Cell Biol.* 72: 174-193.
- 6) Gisi, U., J. J. Oertli and F. J. Schwinn (1977) *Phytopathol. Zeit.* 89: 261-284.
- 7) Gisi, U., D. E. Hemmes and G. A. Zentmyer (1979) *Experimental Mycol.* 3: 321-339.
- 8) Gisi, U., F. J. Schwinn and J. J. Oertli (1979) *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 72: 437-446.
- 9) Hepler, P.K. and B.A. Palevitz (1974) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 309-362.
- 10) Inoue, S. and H. Sato (1967) *J. Gen. Physiol.* 50: 259-264.
- 11) 石川春律 (1978) 代謝 15: 395-406.
- 12) 桂 琦一 (1971) 植物の疫病, 誠文堂新光社 (東京).
- 13) Katsura, K. and Y. Miyata (1971) Morphological and biochemical events in plant-parasite interaction. ed. by Akai, S. and S. Ouchi, *Phytopathol. Soc. Japan. Tokyo*: 107-128.
- 14) 菊谷之資 (1969) 化学と生物 7: 545-627.
- 15) 小山次郎・中村 享 (1972) 免疫化学・医化学実験法講座 4, 右田俊介編, 中山書院 (東京).
- 16) 黒田正則 (1977) 化学と生物 15: 571-572.
- 17) Lison, L. (1962) 組織化学および細胞化学, 今泉正訳, 白水社 (東京): 425-426.
- 18) Luuney, C.Z. and C.E. Bland (1976) *Platoplasma* 88: 85-100.
- 19) Margolis, R. L. and L. Wilson (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 3466-3470.
- 20) 増田 徹 (1972) 免疫化学・医化学実験法講座 4, 右田俊介編, 中山書院 (東京): 263-270.
- 21) 宮田善雄・桂 琦一・室川嗣夫 (1972) 京府大学学报・農22: 27-30.
- 22) 宮田善雄 (1970) 第3回土壌談話会テキスト: 8-12.
- 23) 宮田善雄・桂 琦一 (1970) 日植病報 37: 168.
- 24) 宮田善雄 (1972) 原生動物学雑誌 5: 17.
- 25) 宮田善雄 (1973) 関西病虫研報15: 88.
- 26) 宮田善雄・山岡直人・正子朔 (1977) 京府大学学报 農 29: 38-46.
- 27) Miyata Y. and H. Masago (1978) 3rd ICPP. Munchen Sec. III. Sess. 2, 78.
- 28) 宮田善雄・渡辺健三・正子 朔 (1981) 京府大学学报 農 32: 30-38.
- 29) 宮田善雄・大杉 武・正子 朔 (1981) 京府大学学报 農 32: 39-50.
- 30) Murphy, D. B. and L. G. Tilney (1974) *J. Cell Biol.* 61: 757-779.
- 31) Newcomb, E. H. (1969) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20: 253-288.
- 32) Perkins (1972) *Recent Advances in Aquatic Mycology*, Academic Press (N.Y.).
- 33) Satir, P. (1965) *J. Cell. Biol.* 26: 805-834.
- 34) Shelanski, M. L., F. Gaskin and C. R. Cantor (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci.* : 765-708.
- 35) Schmitt, F. O. (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 60: 1092-1101.
- 36) 重中義信・豊原 明・洲崎敏伸 (1979) 細胞生物学会講要集: 45.
- 37) Tilney, L.G. and K. R. Porter (1967) *J. Cell Biol.* 34: 327-343.
- 38) 臼井美津子・成山秀雄・松橋 直 (1972) 免疫化学医化学実験法講座 4, 右田俊介編, 中山書院 (東京): 47-50.
- 39) Wilson, L. (1970) *Biochemistry* 9: 4999-5007.



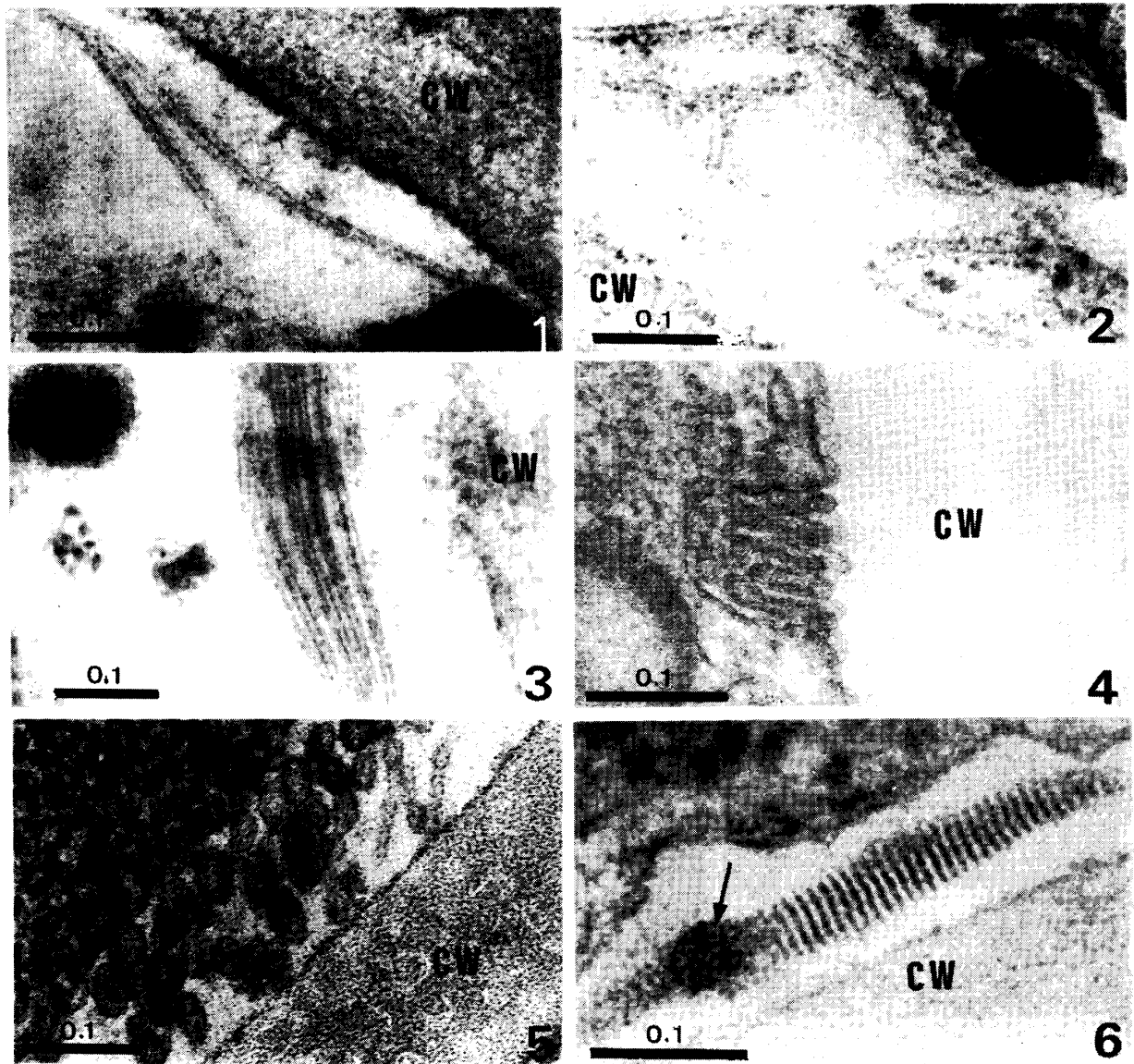
図版I 両面テープ 切断法

1. 間接発芽で空になった遊走子囊：乳頭突起の開口部（矢印）がそれを示している
2. 両面テープにより切断された遊走子囊：遊走子囊が切断されて、その内部が見える。細胞壁外面 (OW), 細胞壁内面 (IW) および飛出した細胞質 (CP)



図版Ⅱ 遊走子嚢内壁のひも状網目構造体とそのトリプシン処理による消失

- 1.2: 遊走子嚢を割断すると, その細胞壁の内面にひも状の網目構造が見える
- 3.4: トリプシン処理により網目構造は消失する。矢印は乳頭突起の開口部を示しており, トリプシンはここから入り, 作用したのであろう。



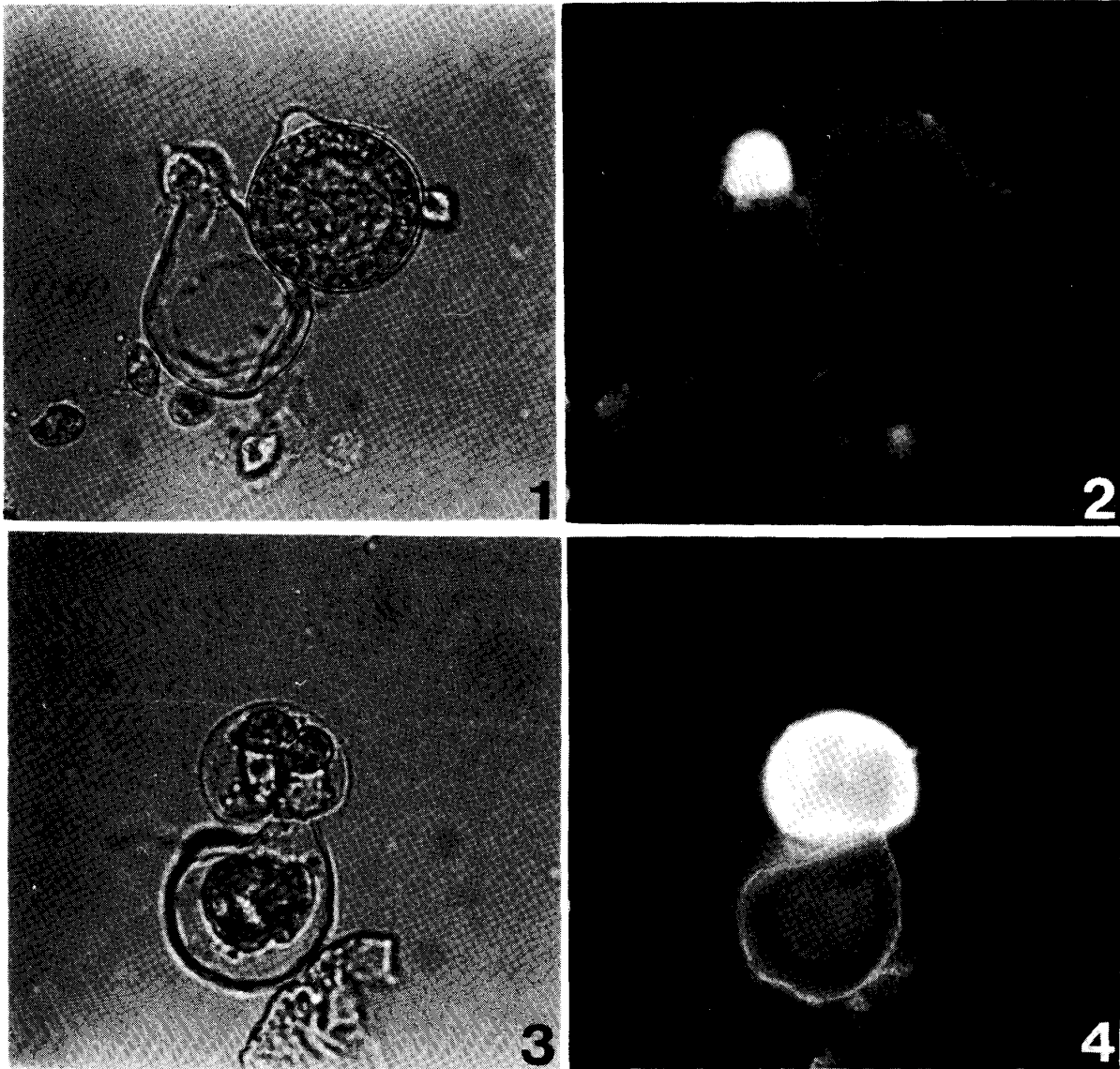
図版Ⅲ 遊走子囊の周辺割腔内における微細管・小管ならびに結晶状構造

1, 2, 3: 微細管構造

4: 小管構造の束

5: 管状構造の集合体

6: 結晶様構造 (矢印は 4.5 nm の繊維の束であることを示す)



図版Ⅳ ブタ脳チューブリン分画を抗原とした蛍光抗体法
(左：普通照明，右：紫外線照明)

1. 2：遊走子囊の開口部に強い蛍光が認められる。未発芽の場合
は蛍光はほとんどみられない
3. 4：まさに放出された直後の遊走子塊の周辺および遊走子囊内
壁部に蛍光が認められる

Summary

The motive forces of the indirect germination (the zoospore release from the zoosporangium) in *Phytophthora* is commonly explained by the turgor pressure generated in the sporangial cell. One of the most powerful evidences for this hypothesis is the perfect suppression of the germination in the hypertonic solutions of some carbohydrates, such as glucose, fructose, saccharose and so on.

But there were a few phenomena not to be easily explained by the hypothesis under the optical microscopic observations. For example, the small particles remained in the sporangial cell were continuously discharged after the indirect germination of the zoosporangium. As another mechanisms were presumed to operate in the zoospore release from the sporangium, several experiments were carried out in the physiological and morphological manners. Several results obtained against the turgor pressure are as follows: (1). Zoospores were fairly able to release in the hypertonic solutions of the non- or hardly metabolizable carbohydrates, such as mannitol, sorbitol, 2-deoxyglucose and so on. (2). Additionally, the experiments with the metabolic inhibitors, such as actinomycin D

(a mRNA synthetic inhibitor), cycloheximide (a protein synthetic one), antimycin, origomycin, 2,4-DNP (respiratory ones) suggested that the activation of the cell metabolism with the new mRNA-dependent protein synthesis and the high ATP consumption, was necessary to the zoospore release from the sporangium. (3). Binblastin (a microtubule inhibitor, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inhibited perfectly the zoospore release from the zoosporangium. (4). Microtubule-like structures and their bundles were also observed in the lateral cleavages (the sections between the inner surface of the cell wall and the cytoplasm of the sporangium) by the electron microscopy. (5). The fluorescent light was detected around the zoospore clod and the inner surface of the sporangial wall by the fluorescent-antibody technique. The tubulin fractions of the PMSG buffer soluble proteins of pig brain were used as the antigens. The existence of the microtubule or the related structures was probably indicated at the fluorescent positions.

The results possibly suggest that the mechanochemical forces of the microtubule systems is concerned to the zoospore release from the sporangium of this fungus.