

# 疫病菌卵胞子の成熟から発芽に至る細胞内変化

とくに核とその他の細胞オルガネラの行方に関する新しい考察

宮田善雄・松村康弘

YOSHIO MIYATA and YASUHIRO MATSUMURA

Intracellular differentiations of *Phytophthora* oospore  
from maturation to germination

— A new aspect of the whereabouts of nuclei and other cell organelle —

**要旨：**クリ疫病菌 *Phytophthora castaneae* KATSURA et UCHIDA CCT 691 の卵胞子の成熟から発芽に至る過程の細胞内変化を、サカマキガイ法により裸出した卵胞子を用いて調べた。卵胞子の成熟に伴う細胞の透明化は、細胞質の大部分が多数の液胞により占められてしまうためであるが、ベンツピレン蛍光染色性が高く、この液胞群は、りん脂質に富む構造であると思われる。一方、液胞間隙に残された細胞質は、崩壊しつつ、次第に中央に押しやられ、大きな集塊を形成するようになる。この濃縮域は、内容的には、無定形の粗雑な物質のように見える集塊と、オスミウム濃染性の均一な脂質様物質の集塊から成っている。発芽始動と共に、まず、細胞壁内層の全域にわたる崩壊が起こり、その近辺から、ひも状あるいは繊維状の各種膜系の生成がみられると共に、液胞域からは、ミトコンドリアなどの細胞ミクロオルガネラ類が、あぶり出しのように、いっせいに出現しはじめる。ここで、中央の濃縮域において、核様構造体が分割しながら分散しつつある状態を示すとみられる像が観察される。この濃縮域の様相は、光学顕微鏡下における、ギムザ染色で赤紫色を呈する粒子、アクリジンオレンジ染色で黄緑色蛍光を示す粒子、あるいは、エシジウムブロマイド染色で鮮明な赤黄色蛍光を発する粒子の変化とよく一致することから、核の行動を示しているものと考えられる。以上のことから、卵胞子の成熟とは、各細胞内オルガネラが、その膜系を消失して、それぞれの部品に仕分けられ、濃縮保存されている状態ということができ、発芽の始動とは、それらが再び組立てられて、膜系が復活再生し、機能しはじめた状態と考えられる。すなわち、卵胞子の中であって、多数の核は、単に濃縮と分散を行なっているにすぎないことが考えられ、現在、定説となりつつある Brasier らの仮説、核はひとつを残して他は消失するとする考え方、とは根本的に異なることになる。

## 結 言

蔵精器と接合した蔵卵器の内部に形成される卵胞子は、菌類における有性器官と考えられ、古くより、多くの研究者の関心を集めてきたが、その核心において

は、未だ不明の点が少なくない。卵胞子において  $2n$  世代を迎えるとされていた従来の考え方<sup>1)</sup>が、たちまちにして、卵胞子形成期にのみ  $n$  世代が存在するとする考え方<sup>2)</sup>におきかわるなどは、このことを端的に示している。また、最近、卵胞子の成熟から発芽に至る

詳細な微細構造の変化に関する報告<sup>3,4,5)</sup>がなされたが成熟期にある卵胞子の構造、とくに核の状態については、ほとんど言及されていないのが現状である。この卵胞子研究の困難さは、一般に、卵胞子が容易に形成されないこと、また、形成されても培養に長期間を要することのほか、卵胞子が、蔵卵器壁に包まれている上、極めて厚い細胞壁を有しているために、染色その他、細胞学的処置がむづかしく、内部観察が容易でないことにある。最近、著者らは、極めて卵胞子形成の良好な菌種 *Phytophthora castaneae* を得て、その安定した多量形成培養法<sup>14)</sup>を検討し、さらに、水路に生息する巻貝の一種、サカマキガイなどの消化作用を利用して、卵胞子を裸出する方法<sup>14)</sup>を開発して、卵胞子に関する研究に着手した。ここに報告するのは、卵胞子の成熟から発芽に至る過程における、細胞内ミクロオルガネラの変化に関する観察結果であり、これらのオルガネラ、とくに、核の行方について、新しい考え方を含んでいる。

#### 材料ならびに方法

供試菌として、クリ疫病菌 *Phytophthora castaneae* KATSURA et UCHIDA (著者保存菌 No. CCT 691) を選び、とくに、卵胞子形成のよい単遊走子分離菌株 No.6 を用いた。卵胞子の多量形成培養法は、前報<sup>12,13)</sup>に詳しい。なお、培地としては、透明V-8ジュース培地 (CV-8M)、すなわち、市販のV-8ジュース (Campbell製, 233ml) に3gのCaCO<sub>3</sub>を添加して、スターラーで1時間攪拌し、その遠沈(3000rpm, 15分)上清液に、脱イオン水を加えて、1ℓとしたものを用いた。

卵胞子は菌体ごと4℃に冷蔵し、供試するに際して、ミキサー (トミー製ラボラトリーエマレーション, 最大回転で60秒) で粉砕したのち、サカマキガイ *Physa acuta* に給餌して、卵胞子を裸出させた。サカマキガイ法については、別報<sup>14)</sup>に詳しく報告した。裸出させた卵胞子は、脱イオン水で洗浄後、そのまま、あるいは、催芽処理 (28℃蛍光照明付定温器, 水浸24~48時間) を行なって観察試料とした。

光学顕微鏡観察においては、ギムザ染色は、ほぼ常法通りであり、スライドガラス上に、ポリリジンにて固着させた卵胞子を、1N塩酸で30分間加水分解のち、ギムザ染色液 (メルク社製, 20倍に稀釈) にて、約2時間染色し、0.2Mりん酸緩衝液 (PH 6.8) で脱色洗浄して観察した。また、蛍光染色は、ベンツピレン (7.5mg/ml, 0.75カフェイン水溶液)、アクリジンオレンジ (50mg/ml 水溶液) およびエシジウム

ブロマイド (1mg/ml水溶液) を用い、ニコン倒立型蛍光顕微鏡 (EF型) により観察した。なお、フィルター組合せは、ベンツピレンの場合はUV系 (主波長365nm)、アクリジンオレンジとエシジウムブロマイドの場合はB系 (主波長495nm) を用いた。

電子顕微鏡観察においては、試料を、ほぼ常法通り2.5%グルタルアルデヒドと1%四酸化オスミウムにて二重固定ののち、エタノールシリーズにて脱水し、Spurr樹脂包埋し、ガラスナイフで超薄切片をつくり、酢酸鉛染色ののち、日本電子100B型電子顕微鏡にて観察した。

## 結 果

### I 卵胞子の成熟過程における細胞内変化

蔵卵器の細胞質の中に、最初の卵胞子壁 (外層) が構築されることにより、卵胞子は明確に区別される。この外層の形成されてゆく過程は、前報<sup>13)</sup>に詳しく報告したので、ここでは省略する。この外層形成の頃には、細胞質中には多種多数のミクロオルガネラ、すなわち、核、ミトコンドリア、小胞体 (ER)、脂質顆粒などのほか、卵胞子に特有のリソゾーム様顆粒、好オスミウム胞などが存在し、活発な細胞活動下にある様相を示しているが、やがて、成熟に近づくにつれて、これらのオルガネラ類は、後二者を残して、次第に姿を消し、やがて、細胞質はほとんど無構造状態に近い幾つかの部分にわかれて成熟に達する。

#### 1) 細胞壁内層の形成

最初に形成される細胞壁外層の内側に、引続いて内層の形成が始まる。図版I-1は、四酸化オスミウム固定した卵胞子の光学顕微鏡写真であるが、オスミウムにより均一に黒く染った細胞質の周囲に、白く厚い細胞壁内層が明瞭に識別される。この部分を電子顕微鏡観察すると、図版IIに見られるように、電子密度の高い外層と、電子密度の低い内層に明確に区別されているのがわかる。さらに、外層は、ほぼ同じ厚さの2層に区別され、最外層の表面には小さい凸凹が観察される。これに対して、内層は、外層に近い部分に、やや濃色の沈着物様のものの存在を認めるものの、概して、全体にわたって均一で無構造である。外層は厚さがおよそ0.2μmであるのに比べて、内層は1.8μmにも達し、10倍に近い厚さを有する。この内層の発達する頃から、細胞の染色性や樹脂の浸透が極度に低下することから、物質の透過性を抑制して、卵胞子に耐性を与える働きは、外層よりも、内層にあると推察される。

## 2) 細胞ミクロオルガネラの変化

蔵卵器,あるいは,若い卵胞子の細胞質は,多種多数のミクロオルガネラによって充満され,活発な細胞活動が行なわれている様相にあった<sup>18)</sup>。しかし,やがて卵胞子壁外層が完成する頃より,ミクロオルガネラは次第に姿を消しはじめる。コルジ体や小胞体はかなり早くから消失し,比較的遅くまで残っていたミトコンドリアも,やがて,クリステが膨潤したり,減少を示し,終には外膜から崩壊するように消失する。核も比較的早い時期に核膜から消失を起すものと思われる。

消失するオルガネラとは逆に,増大する特有のオルガネラがある。若い卵胞子において,好オスミウム胞と名付けた胞囊<sup>18)</sup>がそのひとつである。一般には脂質と考えられており,著者らもあまり異論はないが,実際の証明はなされていない。最初は明らかに膜に包まれた胞囊であるが,次第に融合して,中央部が集積する頃は巨大な油滴状塊をなしている(図版III-4)。もうひとつの発達するオルガネラは,若い卵胞子において,リソゾーム様胞囊と呼んでいるもの<sup>18)</sup>である。その内部で脂質様顆粒が消化されてゆく経過は前報で詳しく述べたので省略する。この胞囊は,Beakes<sup>8)</sup>がDense-body vesicleと名付けているものに相当し,また,内部に縞模様の結晶構造がみられることから,Finger print vesicle<sup>9,16)</sup>と呼ばれることも多い。これらの胞囊も,次第に融合発達しながら,内部はほとんど無構造となり,細胞の大部分を占める巨大な液胞群となる(図版II-1, 2, 3)。光学顕微鏡下で,成熟した卵胞子の内部がほとんど透明に見えるのは,この液胞群のためであろう。りん脂質との親和性の高いペンツピレン<sup>11)</sup>で染色し,蛍光顕微鏡観察すると,これらの液胞群は,鮮やかな青色蛍光を呈することから,この液胞はりん脂質に富むものと考えられる。

## II 発芽始動期における細胞内変化

発芽過程にみられる顕著な変化は,卵胞子細胞壁内層の消失と,各種膜系の形成およびミクロオルガネラの出現である。光学顕微鏡レベルにおいても,この細胞壁内層の消失は容易に観察され,発芽管を認めるまでもなく,発芽始動に入ったと判断され,細胞の染色性や物質透過能が急激に増大する。

### 1) 細胞壁内層の消失

卵胞子の発芽は,まず,細胞壁内層の崩壊から始まる。内層はほぼ全域が同時に崩壊に入る。崩壊の進んだところでは,電子密度の高い粗雑な顆粒の蓄積が認められ(図版VI-2),また,崩壊の進んでいないところでも,繊維状の変性が観察されるようになる。こ

の崩壊には,やはり分解酵素類が働いているものと思われるが,その詳細は全く不明である。なお,図版VI-3のように,崩壊しつつある内層に接して,小胞の認められることがあるが,出現頻度が少ないので,内層の崩壊とは無関係と思われる。なお,図版VI-3, 4のように,崩壊しつつある内層に隣接して,ひも状あるいは繊維状膜構造の形成が認められ,内層の崩壊は膜系の復活と結びついている可能性が考えられる。

### 2) 細胞ミクロオルガネラの再生

ほとんど無構造状態にあった成熟卵胞子の内部に,あたかも,あぶり出しや写真の現像を見るかのように種々の膜系やミクロオルガネラが出現してくる。とくに,オルガネラの再生は,液胞群の附近から起こる傾向がある。図版V-1は左上に液胞群があり,隣接して,種々の小胞が生じはじめている。V-2は,下方に液胞群があり,その上に生じた小胞は,明らかに二重の生体膜で包まれているのがわかる。V-3, 4図は,液胞附近で形成されつつあるミトコンドリアのようである。ミトコンドリアはまだ未熟で,内外膜の区別も明瞭でなく,クリステの発達も悪いが,同時に多数のミトコンドリアが形成されてゆく様子がうかがえる。なお,図版V-3の右隅に細胞壁内層が見えるがその内縁に小胞体様の膜系の発達が明らかに認められる。

### 3) 核様構造の再生と分散

種々の膜系やミクロオルガネラが再生されつつある細胞質の中央で,図版VI-1のような像が観察された。オスミウム濃染部分は,前述の好オスミウム胞に由来する油滴様顆粒であるが,その内部より,二重膜に包まれた胞囊がちぎれながら飛出している様相に見える。胞囊の内部は繊維状物質で粗に充満されており,その中央にひとつずつ濃い部分がある。図版VI-2は,この胞囊が,さらに分割されながら,細胞内に拡散してゆく過程のようである。図版III-1の全体像にも,この胞囊が多数観察され,また,中央の油滴様顆粒には,内部に区分された空洞がみられるが,胞囊の飛び出した跡であろう。この胞囊が何であるか,正確にはわからないが,包んでいる二重膜には,ところどころにぎれが認められる点は核膜に似ており,内部が繊維質に富み,オスミウム染色性の高い部分は核小体に類似することなどから,核である可能性が高い。

光学顕微鏡レベルにおける種々の核染色を行なって,核の動向を比較検討した。図版VII-1はギムザ染色によるものである。(1)発芽始動直後の卵胞子では,細胞の中央に赤紫色に染った大きな核がみられる。さらに,(2)発芽始動が進むと,多数の小さな核が一様に

分散して存在する。やがて、(3)発芽管が伸長し、細胞質と共に核は移動して、終には、(4)発芽管の先端に形成された遊走子嚢の核となる。図版VII-2は、エシジウムプロマイド染色したものである。本剤は、DNAの共役剤で、特異的に2本鎖の間に入り込むとされており、核は黄赤色蛍光を発生して観察される。この黄赤色蛍光顆粒の動向も、さきのギムザ染色の場合と同様であり、また、アクリジンオレンジの場合も、全く同じ動向が観察された。これらのことから、成熟卵胞子の中央にある濃縮域では、核成分が濃縮されて存在し、発芽始動と共に、再び、個々の核に分割されて、細胞質中に分散されてゆく可能性が、光学顕微鏡と電子顕微鏡の両面から示唆されるわけである。

### 考 察

成熟した卵胞子をサカマキガイ法<sup>12)</sup>で裸出することにより、固定・脱水・包埋などの細胞処理が比較的容易となったばかりでなく、卵胞子の発芽も促進して、従来、極めて困難であった成熟期から発芽始動期の細胞内変化を、かなり詳細に観察することができた。これらは、*Saprolegnia* を用いて、卵胞子の形成から発芽に至る過程の微細構造変化について詳細な観察を行なった Beakes らの報告<sup>3,4,5,6)</sup>においても、大きな？マークを付して(文献<sup>5)</sup> 213頁, Fig. 3) ほとんど言及されていない時期のものにあたる。著者らは、これらの知見をもとに、いくつかの推論を立てたが、それらは従来の考え方と相当異なる面を含んでいる。

#### i) 卵胞子の細胞壁内層の意義

卵胞子の厚い細胞壁の大部分は、内層からなっている。確かに、この内層の発達と共に、卵胞子の物質透過能は極端に低下するので、卵胞子の耐久力を高める意義を有していることはほぼ疑いない。しかし、単にそれだけであるなら、発芽の際に、内層が全域にわたって同時に崩壊を起こす必要があるか。さび病菌の胞子のように、発芽管を伸ばすべきところだけ溶解すればよいはずである<sup>10)</sup>。そこで、考えられるのが、この内層が単なる細胞壁というより、細胞が活動状態にもどる上で重要な構成成分あるいはエネルギー源として用いられている可能性である。Bartnicki-Garcia<sup>2)</sup> らの分析によれば、卵胞子壁のみが、菌糸、遊走子嚢あるいは被囊胞子の細胞壁と大きく異なり、多量のたんぱく質と脂質を含んでいるという。また、著者らの観察においても、崩壊しつつある内層に隣接して、多数のひも状あるいは繊維状の膜系の生成が認められることなどが、それを示唆している。

#### ii) 液胞群の役割

卵胞子は成熟に達すると多数の液胞群により細胞質の大部分が占拠されるが、この液胞群は植物細胞などでみられる膨圧の維持や代謝産物の貯蔵所としての役割をはたす液胞とはかなり異なる存在であると考えられる。事実、この液胞群は、高いベンツピレン染色性から判断しても、多量のりん脂質を含んでいる可能性がある。脂質のほかにたんぱく質も含まれているとする報告<sup>9)</sup>もある。また、発芽始動期に入ると、この液胞の周辺部から、ミトコンドリアや、その他のマイクロオルガネラ類が、一斉に再生されることから、この液胞群は、マイクロオルガネラの膜部品の収納倉庫としての役割をもつものではないかと考える。

#### iii) 核の行方

疫病菌の生活環においては、その大部分がn世代であり、卵胞子が形成される段階で、蔵卵器と蔵精器の核が融合して2n世代となるとする考え方が長く支持されていた<sup>1)</sup>。しかし、近年、Brasier<sup>7,8)</sup>らは強烈なコットンブルー染色法により、蔵卵器、蔵精器から卵胞子の形成に至る過程の核変化を詳細に追跡し、蔵卵器蔵精器において多数認められる核が、いずれも幾つかの小部分に分かれる像を得て、これらを染色体と考え、ここにおいて減数分裂が起こると判断し、また、卵胞子の成熟する過程において、多数の核が姿を消失し、1~2個の核を残すのみとなることから、蔵卵器および蔵精器に由来する選ばれたひとつずつの核がここに合して、2n核となると推察し、疫病菌の生活環の大部分は2n世代であるとする説<sup>9)</sup>を立てた。最新の疫病に関する総説集において、Hemmes<sup>9)</sup>らも、卵胞子の内部で、蔵精器に由来するひとつの核と融合核を形成し得た核を残して、他はすべて消失すると述べている。著者らの観察においても、確かに成熟した卵胞子においては、中央にひとつの核を残すことが認められる。ただし、この残された核は、図版VIIにみられるように、通常の核にくらべて、あまりにも巨大である。1つの核が膨潤したと考えるにすれば、その染色性は少しも稀薄とはなっていない。そこで、この中央の核は、多くの核の核成分、すなわち、DNAの濃縮集合体であるという考えが浮かんだ。しかも、電子顕微鏡観察において見出された像(図版VI)は、これらを核であるとするれば、確かに、同時的に分割(分裂ではない)しながら、分散している状態とみなされ、卵胞子において、核は成熟とともに集合濃縮され、発芽始動とともに、再び個々の核となって分散してゆく考え方を示唆している。この方が、多数の核からエリート核を選び出す技術や、このエリート核が2分裂しながら、はじめの核数に達する制御機構を考えるより、

はるかに容易である。ただし、核相の交代については今のところ、ほとんど説明がつかない。著者らは、別に異株性の *P. melonis* を用いて、対峙現象の方向から核相の問題も追究中であり、また、卵胞子の DNA の定量も進めているので、次の機会には、さらに明確にし得るものと思う。いずれにしても、卵胞子とは細胞の休眠状態のひとつのパターンであろう。そこでは細胞活動をささえていた各種の膜系や酵素類が、分解され、部品に仕分けられ、いつでも組立て可能な状態で収納保管されており、その結果、細胞は不利な環境下でも、ストレスを受けずに耐久し、好適な環境の到来と共に、直ちに、各種の細胞オルガネラを再編成して、対応をはかれるのではないだろうか。

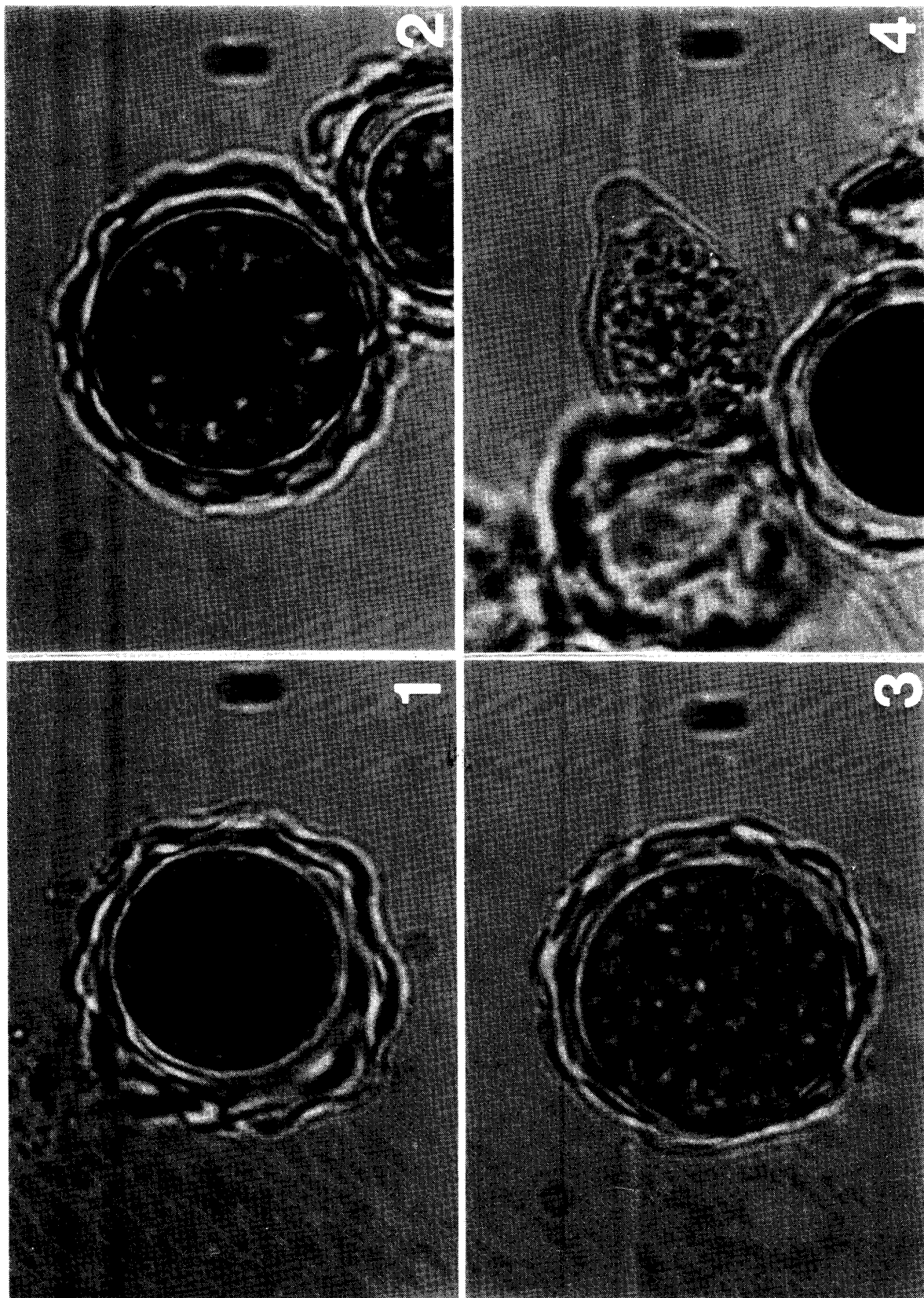
### 引用文献

- 1) Alexopoulos, C.J. (1952) *Introductory Mycology* John Wiley & Sons, (New York), P.158.
- 2) Bartnicki-Garcia, S. and D.E. Hemmes (1975) in *The fungal spore*, ed. by D.J. Weber and W.M. Hess, John Wiley and Sons (New York): 593-641.
- 3) Beakes, G.W. (1980) *Can. J. Bot.* 58: 182-194.
- 4) — (1980) *Ibid.* 58: 195-208.
- 5) — (1980) *Ibid.* 58: 209-227.
- 6) — (1980) *Ibid.* 58: 228-240.
- 7) Brasier, C.M. and E. Sansome (1975) *Trans. Br. mycol. Soc.* 65 (1): 49-65.
- 8) — and C. Brasier (1978) *Ibid.* 70(8): 297-302.
- 9) Hemmes, D.E. (1983) in *Phytophthora* ed. by Erwin, D.C. et al., *The American Phytopathol. Soc. (St. Paul)* P. 32.
- 10) Hess, W.M. and D.J. Weber (1975) in *The fungal spore*, ed. by D.J. Weber and W.M. Hess, John Wiley and Sons (New York): 643-714.
- 11) Lison, L. (1962) *組織化学および細胞化学, 理論と方法*, 今泉正訳, 白水社 (東京) p.438
- 12) 宮田善雄・小田桐幸彦 (1982) *京府大学報・農* 34: 28-34.
- 13) —・— (1982) 同上 34: 35-45.
- 14) —・高野仁孝 (1983) *日菌学報* (投稿中)
- 15) —・松村康弘 (1983) *日本菌学会大会講要集*: 25
- 16) Traquair, J.A. and W.E. McKeen (1980) *Mycologia* 72: 378-394.

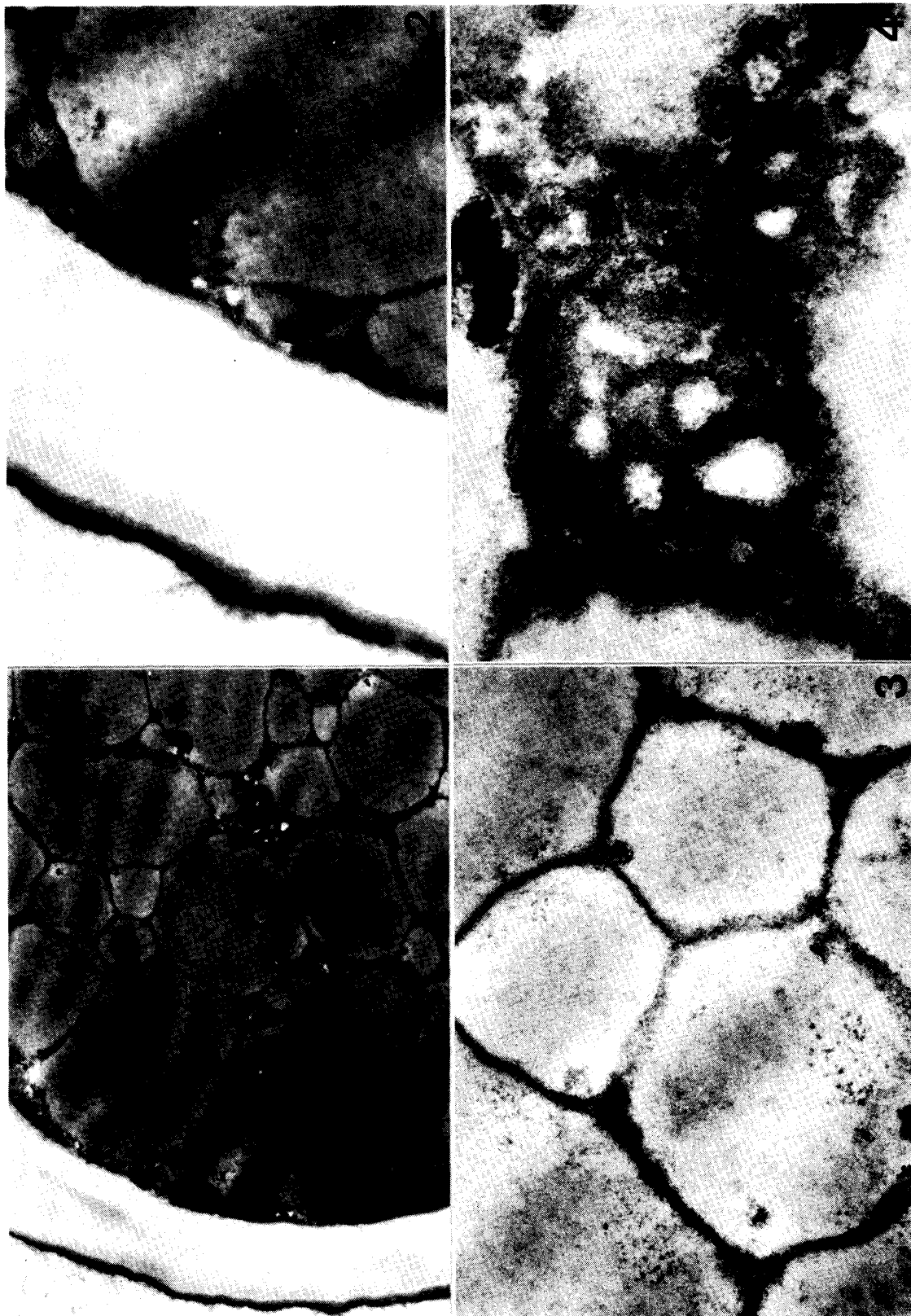
### Summary

The process from maturation to germination of *Phytophthora* oospores was examined using naked oospores made by the digestive action of Sakamaki-gai, *Physa acuta*. The cytoplasm became transparent with many vacuoles which were densely stained by benzopyrene, and were considered to be rich in phospholipids. On the other hand, the residuary cytoplasm collapsed was densely concentrated at the center. Because this condensed area produced a clear yellow green fluorescence by acridine orange staining, and developed a clear red yellow one after the treatment with the DNA conjugator ethidium bromide, it was considered to consist of nucleic

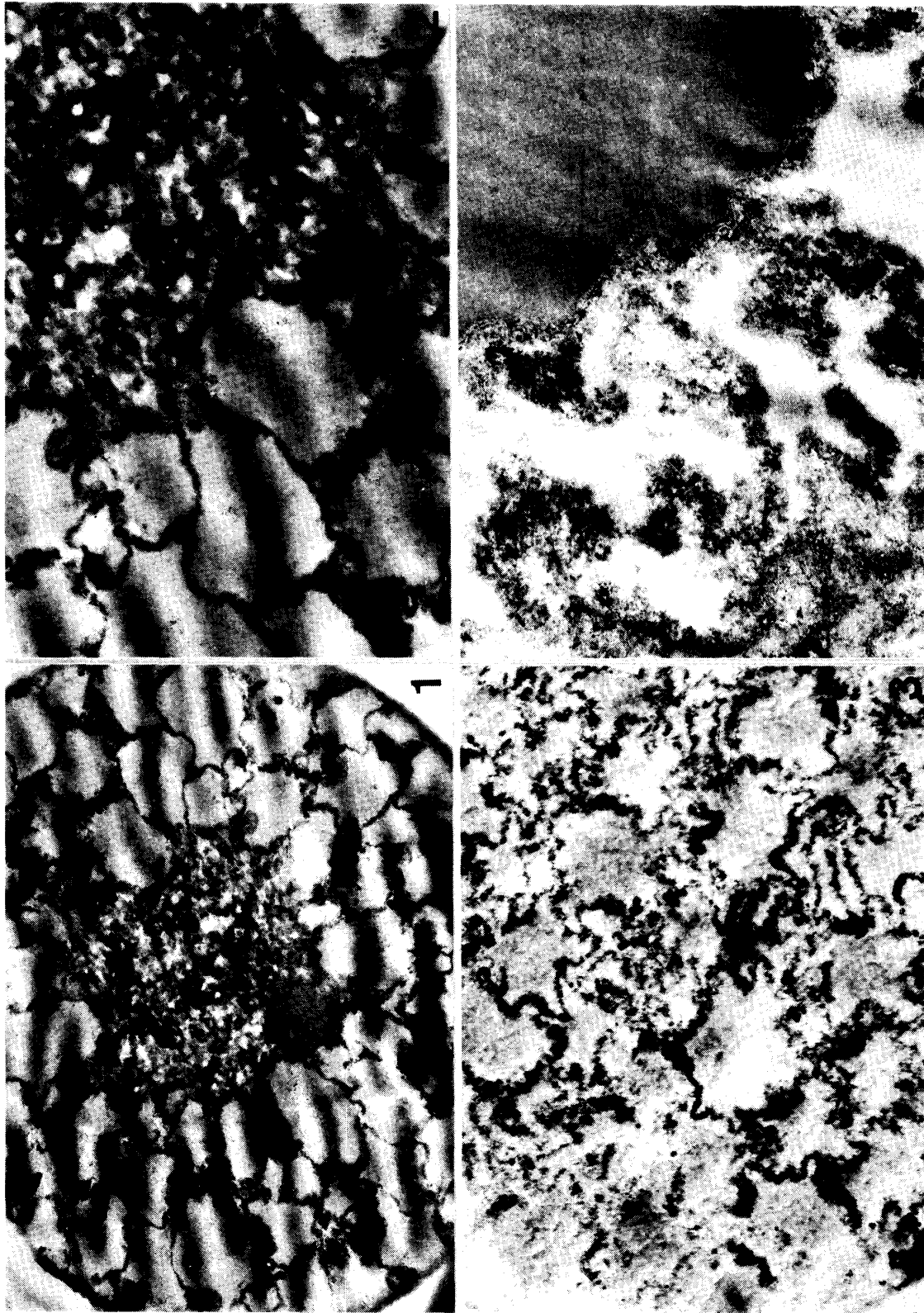
substance. At the time of germination, the inner layer of the cell wall was destroyed, linear systems of biomembrane reappeared at the neighborhood of it, and mitochondria and other cell organelle were regenerated in the vacuolar region. In addition, ultrastructural changes suggesting the division and dispersion of the nucleus-like structure were observed at the condensed region. This suggests that the multiple nuclei of the oospore simply aggregate and disperse during the maturation and germination of the oospore. Therefore, the generally accepted concept may be reexamined.



図版 I 卵胞子の成熟から発芽に至る細胞質の変化 (四酸化オスミウム染色)  
1 : 成熟期 2 : 発芽始動初期 3 : 発芽始動後期 4 : 遊走子嚢形成期

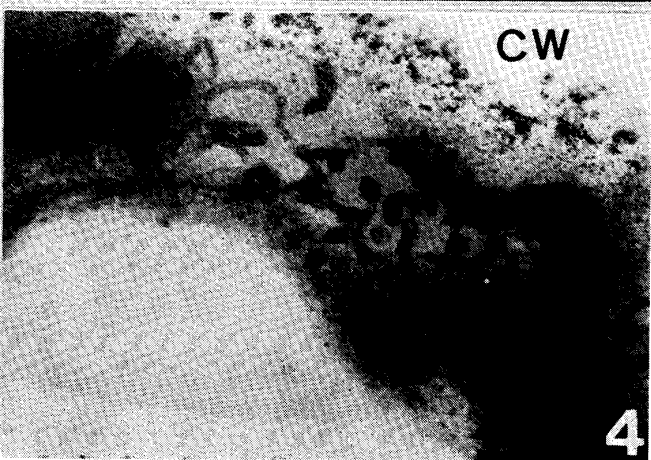
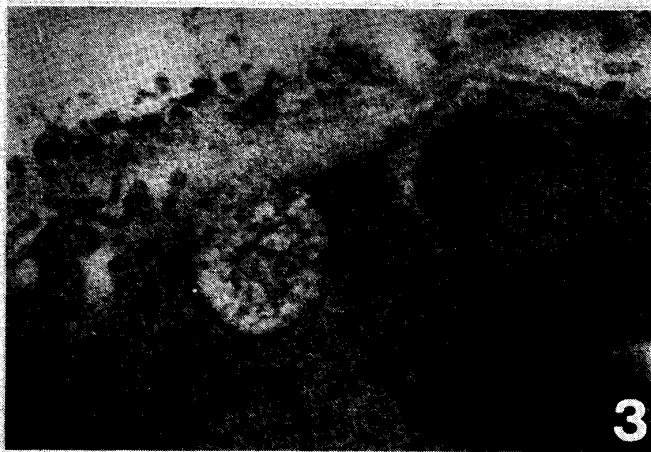
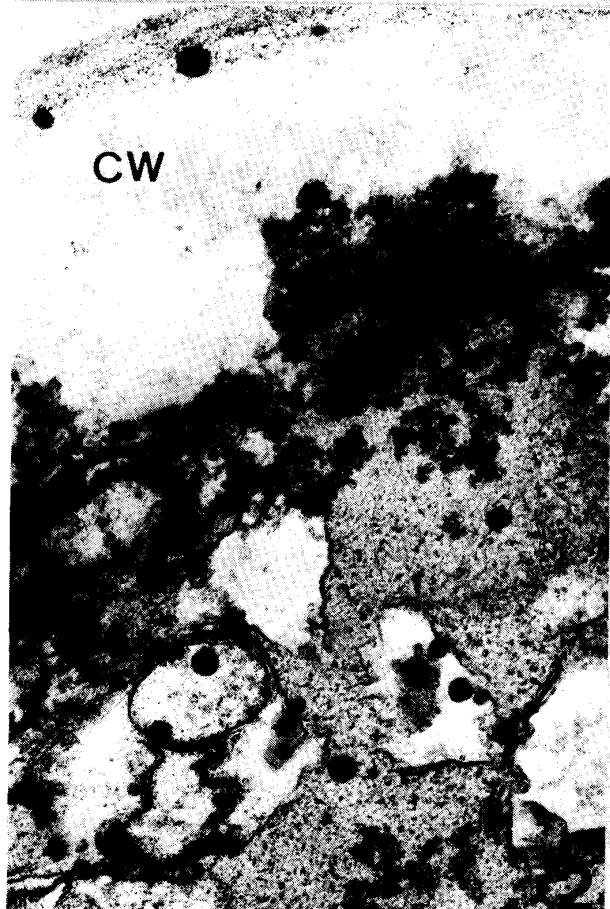
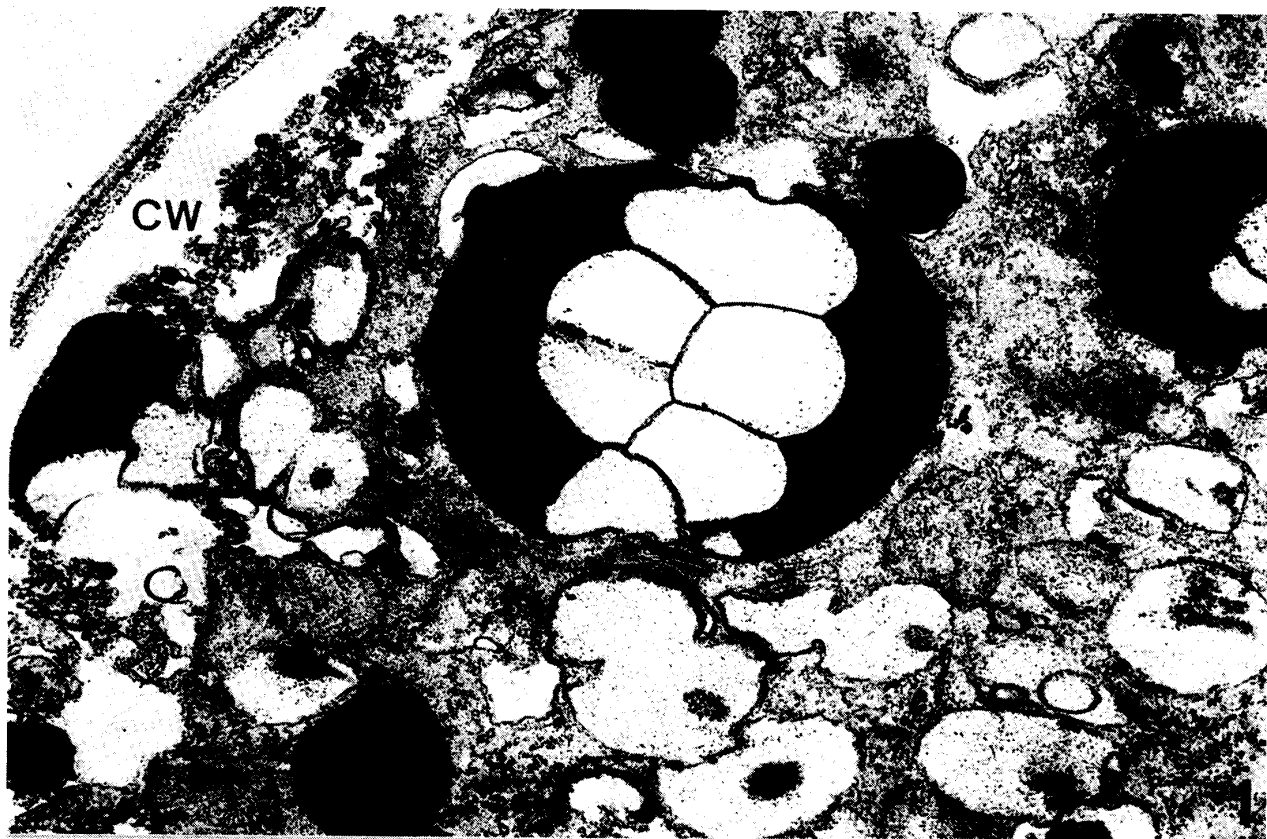


図版II 成熟した卵胞子の内部構造  
1 : 全景  
2 : 細胞壁内層の発達  
3 : リソゾーム様胞囊の発達  
4 : 細胞質濃縮域にみられる不定形の膜構造



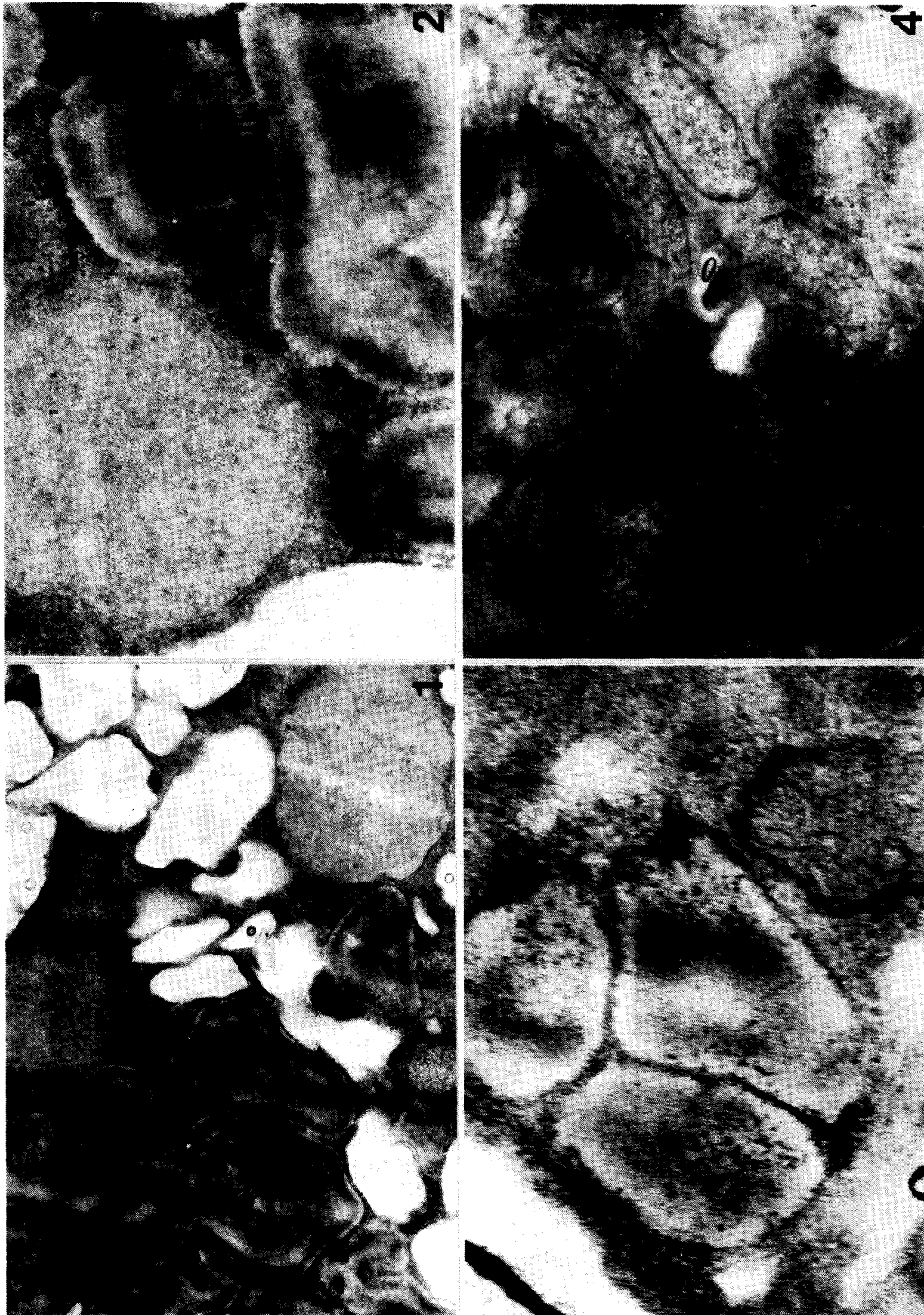
図版Ⅲ 成熟した卵胞子の内部構造  
 1：全景  
 2：周辺のリゾゾーム様胞嚢（液胞）群と細胞質の濃縮域  
 3：液胞群の膜は次第に崩壊する  
 4：細胞質濃縮域の油滴様顆粒（右上）



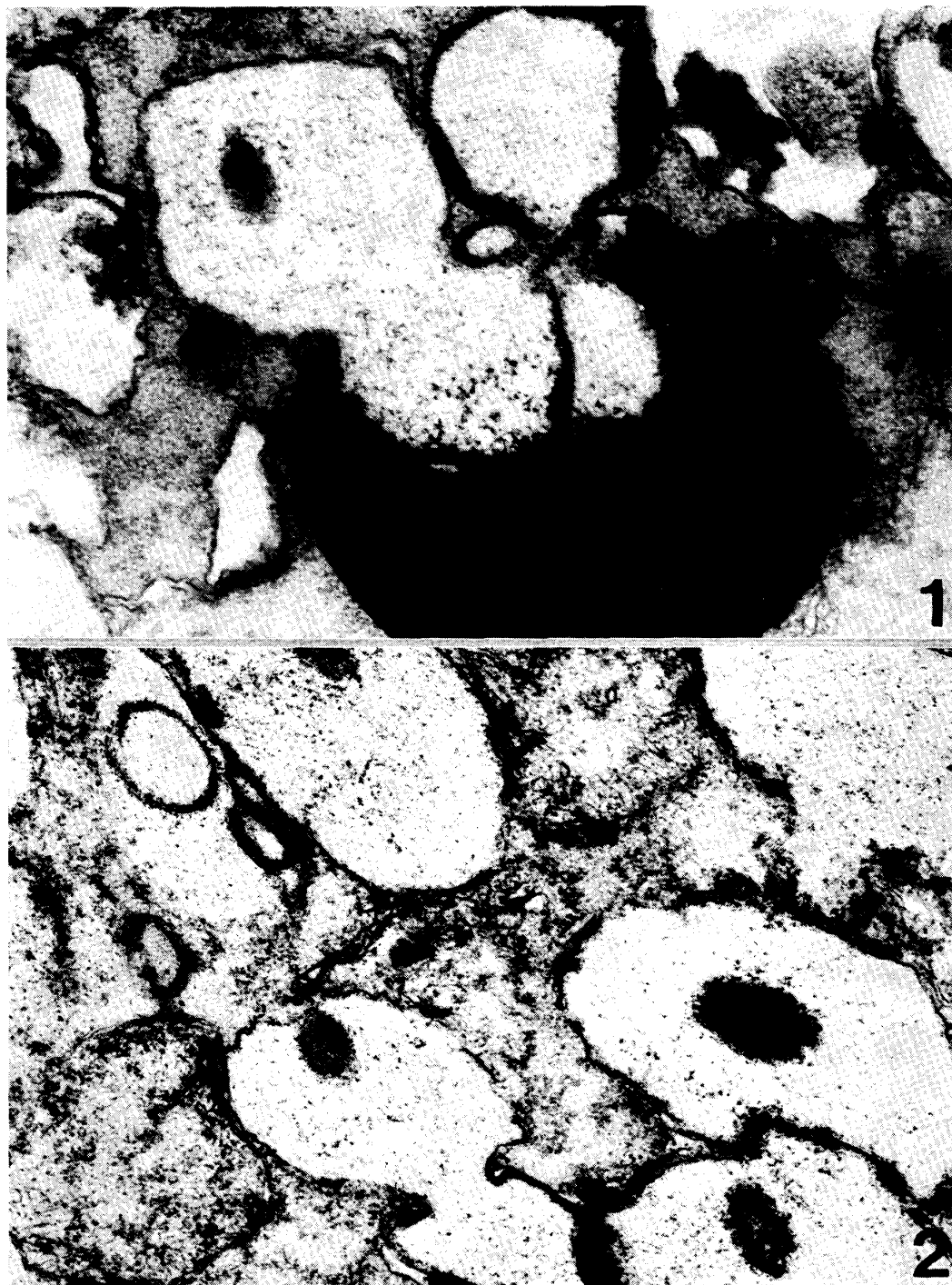


図版IV 発芽始動期における細胞壁内層の崩壊と各種膜系の再生

- 1 : 発芽始動期にある細胞の構造
- 2 : 細胞壁内層の崩壊
- 3 : 細胞壁内層に隣接した小胞
- 4 : 内層に隣接した部分におけるひも状膜構造

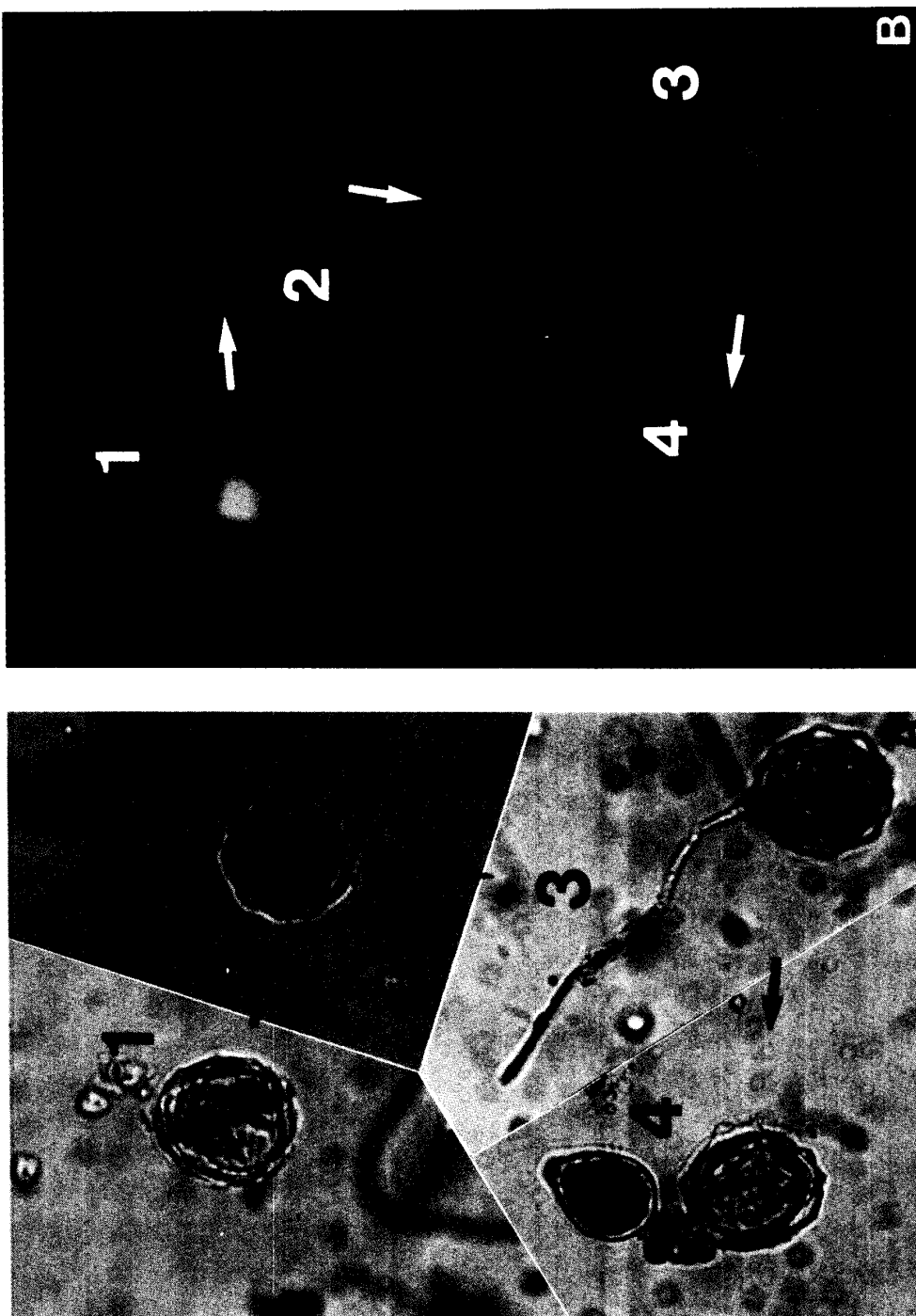


図版V 発芽始動期における各種膜系ならびに細胞オルガネラの再生  
無構造に近い液胞群の中に二重膜をもつ胞嚢が出現しはじめている。写真3, 4には形成  
されつつあるミコンドリアらしい像も見える



図版VI 核様構造の分割と分散

中央濃縮域の好オスミウム塊の中から核様構造体が分割しながら放出され細胞質中に分散してゆく様相に見える



図版VII 成熟卵胞子の発芽過程における核の動向  
A：ギムザ染色 B：エシジウムプロモイド染色  
(1) 発芽始動初期 (2) 発芽始動後期 (3) 発芽管伸長期 (4) 遊走子嚢形成期