

粘菌アメーバの核分裂, および接合に  
ともなる形態変化

三宅美緒\*

お茶の水女子大学 理学部 生物学科

Morphological observations on the cell division  
and the conjugation of myxamoebae  
of *Physarum polycephalum*

Mio Miyake\*

Department of Biology, Faculty of Science,  
Ochanomizu University, Tokyo  
(Received September 10, 1979)

Résumé

The life cycle of a myxomycete, *Physarum polycephalum*, is composed of two distinct vegetative phases, haploid myxamoeba and diploid plasmodium.

It has been reported that diploid nuclei of plasmodia undergo endomitosis, in which nuclear membrane remains intact throughout mitosis and no centriole is observed.

Because no report has been presented on the mitosis of myxamoebae, the author observed the mitosis by light and electron microscope. From these observations, it was found that haploid nuclei of myxamoebae showed astral type of mitosis with centrioles at the poles and nuclear membrane broke down during prophase.

緒 言

真性粘菌 *Physarum polycephalum* の生活史には, 単相で単核のアメーバと複相で多核の変形体がある (Fig. 1)。アメーバ (myxamoeba) とは, 胞子から発芽したアメーバ状の配偶子のことであり, これは水中にはいると鞭毛を出し, 遊走子となる。ア

\* 現在: 横浜市立大学 医学部 細菌学教室

\* Present address: Department of Bacteriology, Yokohama City University, School of Medicine.

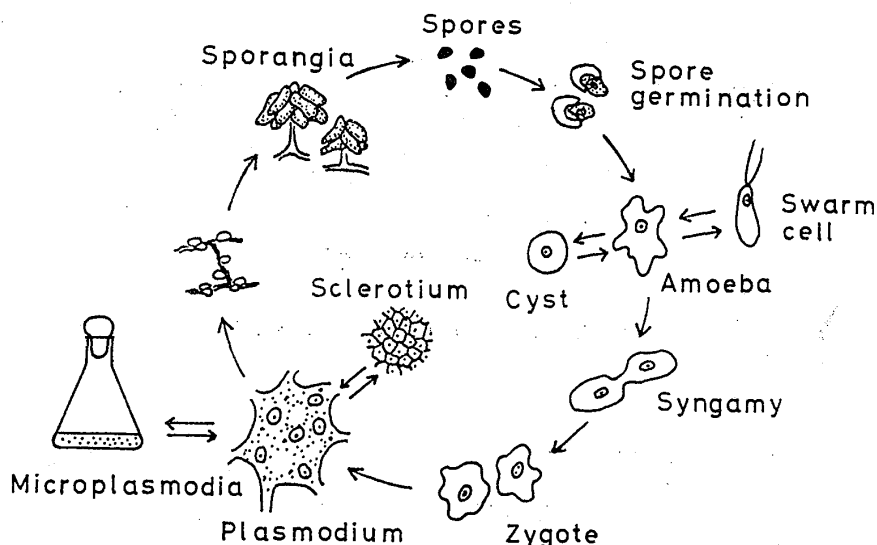


Fig. 1. The life cycle of *Physarum polycephalum*.

アメーバが接合すると、接合子が生じる。接合子内では、核分裂は起こるが細胞質分裂は起こらないので、多核になり、接合子どうしの融合も起こり、細胞構造をもたない多核の原形質塊、すなわち変形体 (plasmodium) ができる。

変形体は、これまで形態学的に多く研究されていて、1968年、Guttesら<sup>3)</sup>により、変形体の核分裂について、1977年、Lordら<sup>2)</sup>により変形体の核分裂にともなう仁の形態変化について、それぞれ微細構造が報告された。又、特に変形体の核分裂時の核内の微小管の形成中心 (microtubule organizing center) に関しては1972年、SakaiとShigenaga<sup>3)</sup>、1973年、Tanaka<sup>4)</sup>が報告している。以上の報告は、変形体では核分裂の際、核膜が消失しない核内有糸分裂で、中心体 (centrosome) が分裂に関与しないことを示している。

一方、アメーバに関しては、形態学的研究はあまり進んでいず、*P. polycephalum*での報告はない。

そこで、本研究では、*P. polycephalum*のアメーバの核分裂に伴う微細構造の変化を観察し、核分裂の様式を変形体の核分裂と比較検討してみることにした。

又、アメーバと接合子の内部形態の比較も試みた。

## 材料と方法

### (1) アメーバの培養

*Physarum polycephalum*の配偶子であるアメーバは、我々の研究室で、胞子から発芽させ分離した株 (strain), J, F を用いた。

アメーバは、24°C、暗所において、*Aerobacter aerogenes*との二員培養により継代培養している<sup>5)</sup>。

実験に際しては、保存株からかき取ったアメーバを、前日よりバクテリアを増殖さ

せたバクテリア用液体培養液\*<sup>1</sup>中に、約  $1.6 \times 10^7$  cells/ml の濃度で懸濁し、この懸濁液を 0.1 ml ずつ、内径 9 cm のシャーレ内の寒天培地\*<sup>2</sup>上にまいた。アメーバを培地表面に均一にまき広げた後、24°C、暗所で培養した。4~5日後、0.025 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 中にかきとり、2,000~3,000 rpm で遠心して\*<sup>3</sup>、沈殿させたアメーバを以下の実験に用いた。

#### (2) アメーバの接合法

当研究室では、アメーバの J 株と F 株が、異なる接合型であることが確かめられているので、接合の実験にこの 2 株を用いた。「(1) アメーバの培養」に述べられている方法で、J、F それぞれを寒天培地上にふやしたものをかきとって、ともに無菌水中に懸濁し、この懸濁液を 0.1 ml ずつ無栄養寒天上にまいて (Fig. 2)、一定期間経過したものをかきとって観察に用いた。

#### (3) 光学顕微鏡用標本の作成

アメーバの核分裂 (mitosis) を光学顕微鏡で観察するために、フォルゲン染色を行った。固定は、グルタールアルデヒド 0.75%\*<sup>4</sup>を用いて 1 時間行い、その後 1 N 塩酸で 5 分間加水分解し、シッフの試薬に 1 時間浸した後、亜硫酸水で数分間ずつ数回洗浄し、最後に蒸留水で洗って観察に用いた。

#### (4) 電子顕微鏡用標本の作成

固定は、グルタールアルデヒド 2%\*<sup>5</sup>に 30 分間浸すことを 2 回くり返し、その後四酸化オスミウム (OsO<sub>4</sub>) 1%\*<sup>6</sup>に一晚浸した。脱水は、エタノール 50, 70, 80% をそれぞれ 3 分、90, 95% をそれぞれ 5 分、100% を 30 分ずつ 2 回、酸化プロピレンを 10 分ずつ 2 回行い、その後、酸化プロピレンと樹脂 (エボン 812) を同量ずつ混ぜたものに 2 時間浸し、それを樹脂のみに移して、一晚放置した。最後にカプセルに入れた樹脂の中に沈めて 45°C で一日、60°C で 2 日以上放置すると、包埋が完了した。

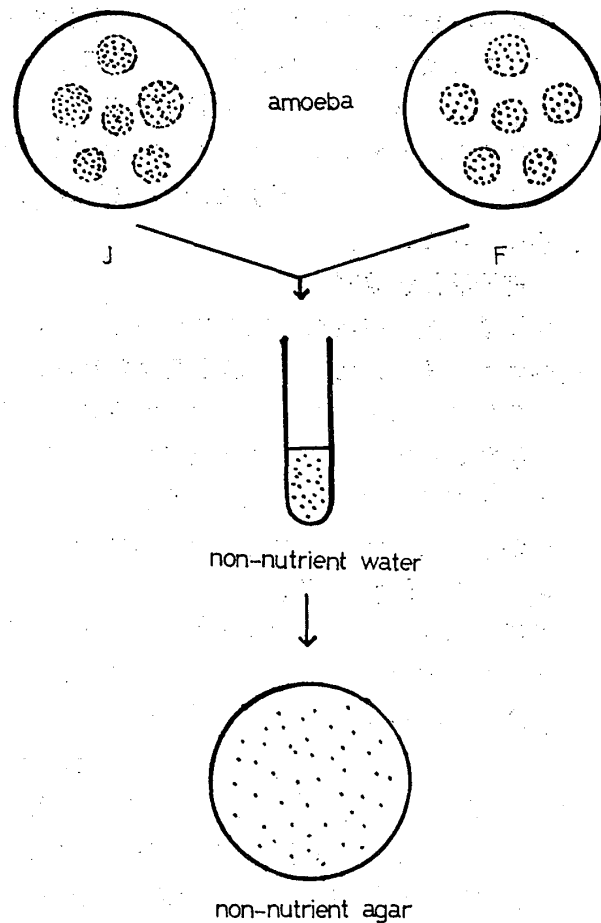


Fig. 2. The method of conjugation.

\*<sup>1</sup> 組成: glucose 0.5%, yeast extract 0.05%, Difco-bactopeptone 0.5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.225%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.15%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%.

\*<sup>2</sup> 液体培養液 (\*<sup>1</sup>) に寒天 2% を加える。

\*<sup>3</sup> 国産卓上遠心機を使用し、30秒以下の遠心をくりかえし、バクテリアを取り除いた。

\*<sup>4, 5, 6</sup> 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶かしたもの。

切片は、SORVALL PORTER-BLUM MT-1 型ウルトラミクロトームを用いて、ガラスナイフで切り、厚さ 60~150 m $\mu$  (干渉色: silver~gold) のものを、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色した。電子顕微鏡は、日立 HS-7D 型を使用し、加速電圧 50 kV で撮影した。

## 結 果

### (1) アメーバの核分裂

#### 光学顕微鏡観察

アメーバをフォイルゲン染色し、核分裂の順序に従って並べたものが Fig. 3 である。中間期の核は中央に仁が 1 個、その周囲にクロマチンがある。分裂が進むにつれて、仁が拡散し、クロマチンが凝縮しはじめ、その形が棒状になる。やがてアメーバ全体が伸長するとともに、クロマチン全体が 2 つの部分に分かれ、両極へ移動していく。それにつれて、アメーバ側面からくびれがはいり、2 分され、それぞれ中間期の核の状態になっていく。

#### 電子顕微鏡観察

中間期の核は核内に 1 個の仁があり、その周辺にクロマチンが散在している (Fig. 4)。核外に中心子 (centriole) が 1 個見られるが、これは中心体 (centrosome) 1 対を構成する 2 個の中心子のうちの 1 個が観察されたものと思われる。

分裂前期にはいと、仁が拡散しはじめ、核膜の 1ヶ所に変化が見られ、その付近に中心子が 4 個見られる (Fig. 5)。

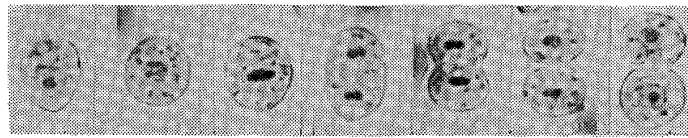
仁がすべて拡散し、中心体が 2 対できあがると、それぞれの中心体は互いに距離をもってくる (Fig. 6, 7)。

核膜が消失すると、クロマチンが縦に並び、クロマチンからは、両極へ紡錘糸が走っているのが見られる (Fig. 8)。両極には、中心体が位置する (Fig. 8, 9)。

### (2) 接合子の形成

アメーバの J 株と F 株を混合して培養したものを 1 日ごとにかきとって、光学顕微鏡で観察した結果が Fig. 10 である。横軸は培養日数で、縦軸は 1 枚のシャーレにまいたアメーバを 1 ml 蒸留水中に懸濁したときの“アメーバ数”(接合子の数も含む)を示す。接合子が生じ、その数がある程度ふえると、“アメーバ数”は急激に減少する。アメーバの混合培養後 2 日目からは、接合子に原形質流動の見られるものがあり、4 日目には黄色い色素が現われた。原形質流動は、変形体の特徴を示すものなので、その前の減少のゆるやかな時期を観察すれば、接合子の初期の様子が見られると予測し、J, F 株混合培養後 1~2 日目のシャーレからかきとったものを電子顕微鏡で観察した。

Fig. 11 に示すように、ちょうどアメーバ 2 個程の大きさで、核が 2 個存在するものが観察された。2 核の間には、中心子が 4 個見られる。



interphase    prophase    metaphase    anaphase    telophase

Fig. 3. Mitosis of myxamoeba.

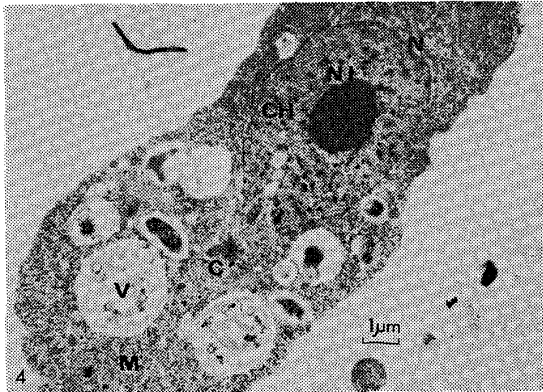


Fig. 4. Myxamoeba: interphase. C: centriole, CH: chromatin, M: mitochondria, N: nucleus, NI: nucleolus, V: food vacuole.

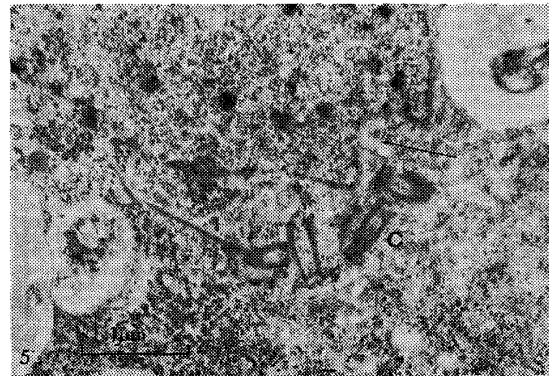
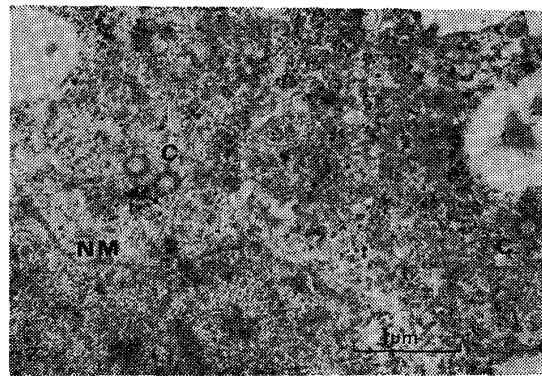
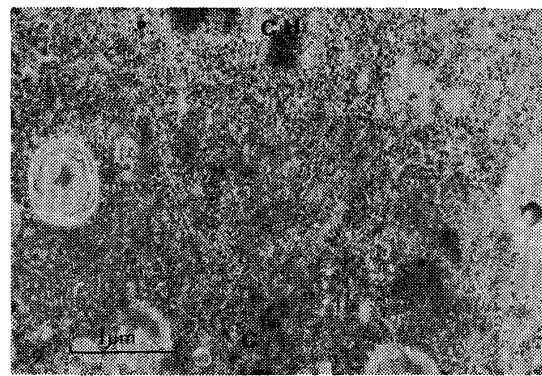
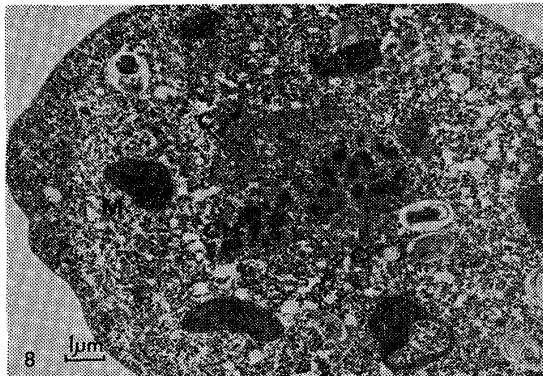


Fig. 5. Myxamoeba: prophase. Four centrioles (C) are visible near the nuclear membrane (arrow).



Figs. 6, 7. Myxamoeba: prophase. C: centrosome (centrioles), NM: nuclear membrane.



Figs. 8, 9. Myxamoeba: metaphase. Nuclear membrane has disappeared. Centrioles are visible at both poles. C: centrioles, CH: chromatin, M: mitochondria.

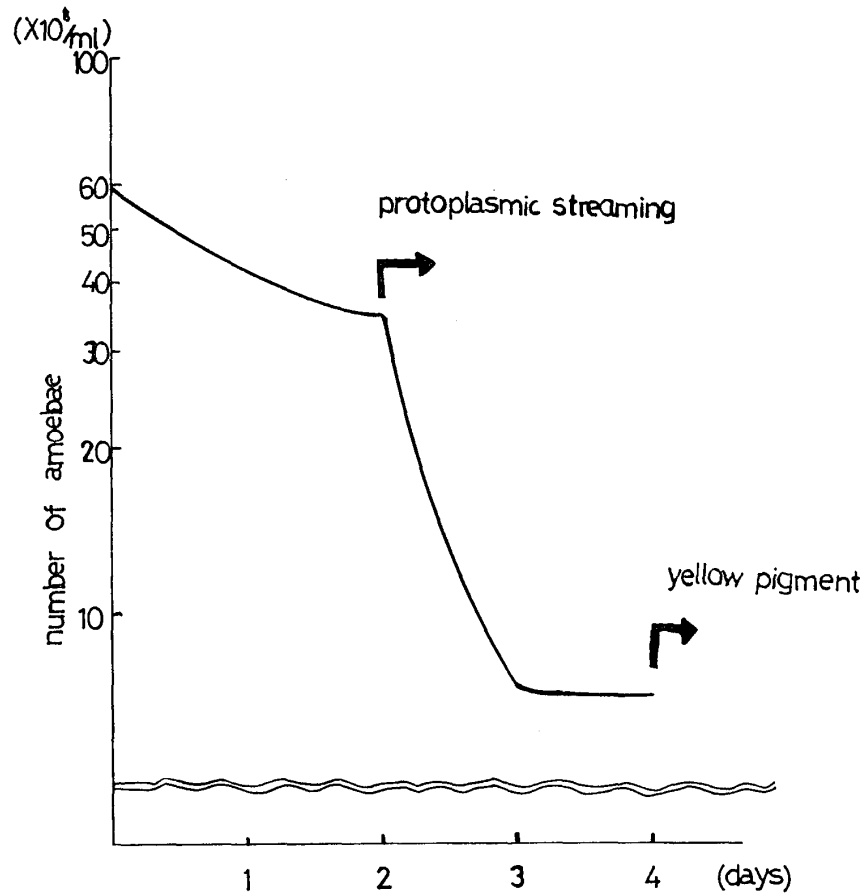


Fig. 10. Changes of the number of amoeba after mating.

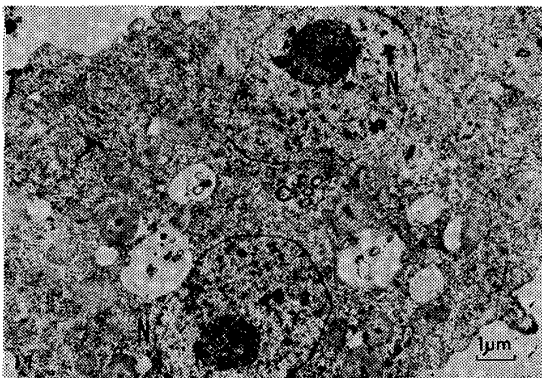


Fig. 11. Young plasmodium soon after the conjugation of myxamoebae. C: centrioles, N: nucleoli.

## 考 察

### (1) アメーバの核分裂

*Physarum polycephalum* のアメーバの核分裂の観察によって、分裂前期に核膜が消失し、中期において両極に中心体が位置し、そこからクロマチンへと紡錘糸が伸びることがわかった。この後、クロマチンが半数ずつ紡錘糸にそって両極へ移動するものと思われる。変形体では、核膜が分裂時に消失せず、中心体なしに分裂が起こるので<sup>1,2)</sup>、アメーバの核分裂の様式は、変形体のそれとは異なる。同

様の結果は、*P. flavicomum* (Aldrich, 1969年) でも報告されている<sup>6)</sup>。

又、本研究で、中心子の数が前期の初めに倍化することが明らかになった。これは、中心子の複製の結果と思われる。なお、中心子が2倍数存在する付近の核膜に変化が見られることから、中心子の形成に核膜が何らかのかかわりをもっていることが考えられる。

## (2) アメーバの接合にともなう形態変化

アメーバの接合の実験で、大きさがほぼアメーバ2個に相当し、核が2個存在するものが観察された (Fig. 11)。Fig. 3 のアメーバの分裂の光学顕微鏡観察では、2核が中間期の形態で存在するのは、細胞質分裂が完了した時点である。Fig. 11 の写真は2個の核が中間期の状態であり、それらが共通の細胞膜で囲まれているので、2個のアメーバが融合した状態を示すと考えられる。2核の間に見られる4個の中心子は2個のアメーバ由来か1個のアメーバ由来かは明白でないが、この後、2核が融合して複相になり、分裂して変形体になる過程で、これらの中心子が消失又は拡散することが推測される。今後、接合子の形態をさらに進めて研究することにより、アメーバから変形体へと変換していく過程—いいかえれば、半数体から2倍体へと変換していく過程をくわしく知ることであろう。

## 謝 辞

本研究を行なうにあたり、御指導をたまわったお茶の水女子大学生物学教室の太田次郎教授に感謝いたします。又、貴重な提案や批評をいただいたお茶の水女子大学生物学教室の遠山益助教授、弥益輝文助教授に感謝いたします。さらに、様々な援助をして下さったお茶の水女子大学生物学教室の谷口真知子助手に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Guttes, S., E. Guttes and R. A. Ellis: *J. Ultrastructure Res.*, 22, 508-529 (1968).
- 2) Lord, A., L. Nicole and J. G. Lafontaine: *J. Cell Sci.*, 23, 25-42 (1977).
- 3) Sakai, A. and M. Shigenaga: *Chromosoma (Berl.)*, 37, 101-116 (1972).
- 4) Tanaka, K.: *J. Cell Biol.*, 57, 220-224 (1973).
- 5) Wakasugi, M. and J. Ohta: *Bot. Mag. Tokyo*, 86, 299-308 (1973).
- 6) Aldrich, H. C.: *Amer. J. Bot.*, 56, 290-299 (1969).