

根粒菌の増殖および根粒形成における

ヒドロキシリシンの役割

1999

岩手大学大学院  
連合農学研究科  
生物資源科学専攻  
(帯広畜産大学)

佐々木 香子

目次

第1章 根粒菌の増殖および根粒形成における  
ヒドロキシシリシンの役割

第2章 根粒菌の増殖および根粒形成における  
ヒドロキシシリシンの役割

第3章 根粒菌の増殖および根粒形成における  
ヒドロキシシリシンの役割

第4章 根粒菌の増殖および根粒形成における  
ヒドロキシシリシンの役割

根粒菌の増殖および根粒形成における  
ヒドロキシシリシンの役割

第5章 根粒菌の増殖および根粒形成における  
ヒドロキシシリシンの役割

第6章 根粒菌の増殖および根粒形成における  
ヒドロキシシリシンの役割

第7章 根粒菌の増殖および根粒形成における  
ヒドロキシシリシンの役割

第8章 根粒菌の増殖および根粒形成における  
ヒドロキシシリシンの役割

第9章 根粒菌の増殖および根粒形成における  
ヒドロキシシリシンの役割

第10章 根粒菌の増殖および根粒形成における  
ヒドロキシシリシンの役割

第11章 根粒菌の増殖および根粒形成における  
ヒドロキシシリシンの役割

第12章 根粒菌の増殖および根粒形成における  
ヒドロキシシリシンの役割

岩手大学大学院  
連合農学研究科  
生物資源科学専攻  
(帯広畜産大学)  
佐々木 香子

## 目次

第1章 緒言	1
略語集	10
第2章 根粒菌の増殖および細胞内代謝におよぼす ヒドロキシリシンの影響	11
第1節 目的	11
第2節 実験材料および方法	11
第3節 実験結果	24
3.1 根粒菌の増殖におけるヒドロキシリシンの影響	24
3.2 増殖抑制効果におけるヒドロキシリシンと その類似化合物の比較	27
3.3 ヒドロキシリシンの細胞内への取り込み	28
3.4 DNA, RNA およびタンパク質合成における ヒドロキシリシンの影響	29
3.5 細胞内代謝関連酵素に与えるヒドロキシリシンの影響	29
第4節 考察	31
第5節 要約	51
第3章 バクテロイドへの分化におけるヒドロキシリシンの役割	52
第1節 目的	52
第2節 実験材料および方法	52
第3節 実験結果	55
3.1 バクテロイドの増殖におけるヒドロキシリシンの影響	55
3.2 細胞のバクテロイドへの形態変化における ヒドロキシリシンの影響	55

3.3	ヒドロキシリシン存在下での	
	polyhydroxybutyrate (PHB)含量の変化	56
第4節	考察	56
第5節	要約	63
第4章	宿主植物根圏のヒドロキシリシン含量と、根粒形成、窒素固定活性、	
	および宿主植物の生育に与えるヒドロキシリシンの影響	64
第1節	目的	64
第2節	実験材料および方法	64
第3節	実験結果	70
3.1	ヒドロキシリシンによる増殖抑制効果と	
	それに与える種子抽出液 (seed extract : SE)の影響	70
3.2	宿主種子および実生浸出液あるいは根抽出液におけるヒドロキシリ	
	シン含量と、接種によるヒドロキシリシン含量の変化	71
3.3	根粒形成、窒素固定活性、および宿主植物体の生育におよぼす	
	ヒドロキシリシンの影響	72
3.4	根粒菌の宿主への感染におよぼすヒドロキシリシンの影響	74
第4節	考察	74
第5節	要約	94
第5章	総括	95
第6章	参考文献	98
	謝辞	105

## 第1章 緒言

地球上の生物圏は、動物、植物、および微生物によって構成されており、それぞれが役目を果たしながら共存している。中でも微生物は、生物圏で生活している私たち人間にとって密接な関係にある。食物連鎖の流れにおいて、有機物質の生産者の主体は植物であり、また消費者の多くは動物、そして最終的な有機物の分解者は微生物である。微生物は広く分布しており、豊富な種類、多様な生理機能や高い増殖能および代謝能は、自然界において多大な役割を担っている。特に微生物の持つ代謝能の多様性は、地球上の有機物や無機物の分解あるいは再生に大きく貢献している。例えば、植物の持つ有機物質(セルロース、リグニンなど)の大部分は微生物の分解作用によって無機化され、生物圏で再活用される。このような微生物の代謝は自然環境の浄化に役立っており、我々が営む農業にも密接に関係している。

農作物は窒素、リン酸、カリウムの3要素を大量に吸収するが、これらの3要素は土壌の供給力が小さいため、施肥された条件で不足分が補われており、作物生産における重要な制限因子になっている<sup>1)</sup>。窒素は大気中で分子の状態が存在し、常温では化学的に不活性で化合物になりにくいことから、そのままの状態では植物が利用できないため、アンモニアや硝酸、あるいはアミノ酸に合成されて利用される。Haber と Bosch (1910) は工業的に大気中の窒素を固定してアンモニアを合成する方法を確立した。しかし、この方法では 500℃で数百気圧という条件が必要であり、大量の化石エネルギーが消費されると同時に大気中に炭酸ガスが放出される。つまり、工業的に合成された窒素肥料の使用が、地球の限られた資源を枯渇させるとともに、地球温暖化の要因の一つとなっている。一方、現在の農業では、作物の増収の目的で窒素肥料が土壌に投与されているが、窒素肥料を含めたさまざまな化学肥料の過剰投与は環境汚染の原因となるばかりでなく、土地自身の地力を低下させることが問題となっている<sup>1)</sup>。また、施用された化学肥料は、炭酸ガスよりはる

かに熱吸収係数の高い亜酸化窒素となり、大気中に放出される<sup>2)</sup>ことから、化学肥料、特に窒素肥料の施用を軽減し、作物の収量を向上させる方法を確立することが望まれる。

自然界における微生物の最も重要な役割の一つは、窒素などの無機物の代謝作用である。中でも土壌微生物は、自然界の物質循環に大きく貢献している。例えば、動物の遺体や排泄物は微生物的分解によってアンモニアとなり、好気的環境では硝酸に酸化される。硝酸は硝酸還元能を持つ微生物によって亜硝酸、アンモニアに還元された後、アミノ酸に合成され、タンパク質や他の含窒素化合物に合成される。その一方で、土壌の硝酸は微生物の脱窒作用によって窒素ガスとして大気中に放出される。大気中の窒素ガスは、その固定能を有する土壌微生物の働きによって固定され、アミノ酸やタンパク質に合成される。この微生物の働きが窒素固定作用であり、植物根圏の土壌に生息する細菌、放線菌、ラン藻類などの原核生物によって行われる。好気性細菌の *Azotobacter* 属菌や嫌気性細菌の *Clostridium* 属菌、ラン藻の一種である *Nostoc* (ネンジュモ) 属菌、あるいは *Anabaena* 属菌は大気中の窒素を非共生的に固定する窒素固定菌である。これに対し、共生的に窒素固定を行う菌がいくつか存在しており、中でもより重要なものとして、マメ科植物に共生する根粒菌が挙げられる。マメ科作物を植えることで、土地の肥沃度が高まることが古くから経験的に知られていたが、現在では、根粒菌がその宿主であるマメ科植物と共生し、形成した根粒内で大気中の窒素を固定する機作が明らかになっている。根粒菌による窒素固定作用で生成されたアンモニアは、グルタミンやアスパラギンなどのアミノ酸、あるいはウレイドの形となり、宿主植物に転流される。すなわち固定された窒素は、宿主植物によって、直ちに窒素固定作用の反応系からそれらの窒素含有化合物の合成に用いられる。そのため、固定産物の蓄積による反応の抑制が起こりにくく、次々と窒素固定が進む。根粒菌とマメ科植物は、エネルギー供給と窒素固定を効率的に行い得る経路が確立した共生系と言える。さらに、この根粒菌

の窒素固定能力を利用することで、環境保全の効果が期待される。

次に、上記の根粒菌の中で、マメ科植物に共生する根粒菌を中心に述べる。根粒菌は Rhizobiaceae 科に属するグラム陰性の好気性土壌菌として知られ、宿主であるマメ科植物に根粒を形成して窒素を固定する。以前、根粒菌は全て *Rhizobium* 属とされ、その中で感染する宿主域にしたがって分類されていた。例えば *R. japonicum* はダイズ、*R. leguminosarum* はエンドウ、*R. meliloti* はアルファルファを宿主として有効根粒を形成する根粒菌と分類されていた。しかし異なるマメ科植物との間で不規則な交差感染が数多く見いだされたため、それまでの宿主特異性に基づいた分類の決定に混乱が生じた。その後、Jordan と Allen により、根粒菌を培地上での増殖が速い菌株 (FG: Fast Grower) と増殖が遅い菌株 (SG: Slow Grower) の大きく 2 群に分けることが提唱された<sup>3-8)</sup>。現在では yeast extract-mannitol (YEM) 寒天培地で増殖が速く、酸産生を行う菌が *Rhizobium* 属、増殖が遅く、アルカリ産生を行う菌が *Bradyrhizobium* 属と分類されている。また、その後の研究により、根粒形成や窒素固定に関与する遺伝子が前者ではプラスミド上に、後者では染色体上に存在することが判明した。さらに近年、これまで *Rhizobium* 属とされていた菌株のうち、*R. fuakuii* が *Mesorhizobium* 属<sup>9)</sup>、および *R. fredii* と *R. meliloti* が *Sinorhizobium* 属<sup>10)</sup>に改められた。Table 1 に現在分類されている菌株と対応する代表的な宿主を示した。*Rhizobium* 属には *R. lupini* がルーピン、*R. tropici* および *R. etli* がインゲンマメ、*R. loti* がミヤコグサを宿主に持つ菌株として分類されている。この他、代表的な *Rhizobium* 属としては *R. leguminosarum* が挙げられ、これについてはその数値分類<sup>11)</sup>、DNA 相同性<sup>12)</sup>、2次元電気泳動によるタンパク質スポットのパターン<sup>13)</sup>、血清学、細胞外多糖の組成<sup>14)</sup>、あるいはプラスミドによる感染性の転換頻度<sup>15)</sup>に基づいて、さらに 3 つの biovars (bvs.)に分けられている。すなわち、*R. leguminosarum* bv. *phaseoli*、bv. *trifolii*、および bv. *viceae* であり、それぞれの宿主はインゲンマメ、クローバー、およびエンドウとされている。また、

Table 1. Species of root nodule bacteria of the family Rhizobiaceae

Strain	Host plant
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum, Vicia</i>
<i>Rhizobium lupini</i>	<i>Lupinus</i>
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>Rhizobium loti</i>	<i>Lotus</i>
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	<i>Astragalus</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Glycine</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine</i>

ダイズを宿主とする菌は主に *B. japonicum* であるが、北京種のツルマメやダイズから分離された菌群<sup>16)</sup>は、宿主への交差感染<sup>16)</sup>、プラスミド上の窒素固定遺伝子(*nif* gene)あるいは根粒形成遺伝子(*nod* gene)の存在<sup>17)</sup>、抗生物質感受性、耐塩性やリトマスミルクの変性などの知見に基づく結果から、*R. fredii* として命名された<sup>8)</sup>。現在では *Sinorhizobium fredii* として *Rhizobium* 属とは区別されており、*B. japonicum* とともにダイズ根粒菌として分類されている。このような分類にも見られるように、一般的に根粒菌は宿主植物に対して選択性を持っている。根粒菌が特定の宿主と共生する過程は、何らかの因子によって調節されていることが十分考えられるが、その決定的な因子についてはまだ不明の部分が多い。

根粒菌が宿主に供給する窒素は、ダイズ根粒菌では植物体総窒素の約 80%、インゲンマメ根粒菌では植物体総窒素の約 35%と考えられている。そのため、マメ科植物の種子をあらかじめ対応する、より有効な根粒菌と接種栽培することで窒素肥料の施用量の軽減と増収が期待できる。根粒菌の接種で得られる利点は、①宿主根における窒素固定作用が十分に進行する、②宿主根における有効根粒の形成が速くなる、③根圏における他の種の根粒菌との競合に強くなる、④農薬や化学肥料などの土壤に与えられる物質、あるいは土壤に含まれている化学物質からの影響を受けにくくなる、⑤土壤中での生存と増殖力が大きくなる、などが挙げられる<sup>18)</sup>。このような根粒菌の接種による利点を向上させるためには、根粒形成に影響をおよぼす物質、根粒菌の感染に対する植物体の応答、あるいは外部環境の変化による根粒菌への影響を十分研究することで、その能力をより高めることが重要と考えられる。

根粒菌が宿主植物の根に感染して有効根粒を形成する過程は、大きく 5 つの段階に分けることができる。つまり、①宿主植物から分泌されるフラボノイドやアミノ酸などの誘因物質による根粒菌の宿主根圏への誘導、あるいはレクチンの作用による菌体の宿主植物根の表面への接着、②根粒菌の増殖開始、および宿主植物由来のフラボノイドあるいはイソフラボノイドなどによる根粒菌の共生遺伝子の発現、③

皮層細胞の肥大化および分裂、根毛のカーリングの誘導、④着生した根粒菌の感染系を介する植物組織の内部への侵入、⑤感染系の進行の停止、および感染系の先端部からの根粒菌の放出と増殖、⑥根粒菌のバクテロイドへの形態変化と窒素固定の開始である<sup>19)</sup>。このような根粒の形成過程において、根粒菌は他属間および同属種間や同種菌株間、あるいは根粒菌以外の微生物との競合、水分含量、温度変化、pH、酸素分圧、イオン、浸透圧、あるいは化学物質などの土壤中の非生物的因子や外部環境の変化にさらされている。根粒菌はこれらの変化に対し、細胞内代謝の調節などにより巧みに適応して生存を維持していると考えられる。しかしその一方で、根粒菌の増殖が宿主によって制御されていることが Djordjevic らによって提唱されている<sup>20)</sup>。一般的に、植物体が微生物の感染に対して防御反応を示すことが知られており<sup>21)</sup>、マメ科植物においても、根粒菌が宿主に感染した後、宿主根が根粒菌の増殖抑制物質を生産して、根圏(および根粒内)での根粒菌の増殖を制御している可能性がある。また、根粒の形成によって宿主の生育が促進される反面、過剰に根粒が形成された場合、宿主植物体は窒素固定反応に多大なエネルギーを消費する。そのため、根粒菌の感染および増殖を促進あるいは抑制することで、根粒の形成を適度に調節するメカニズムが植物側に備わっていることは十分に考えられる。例えば、*Bradyrhizobium* 属の宿主根圏での世代時間は、培地中よりも極端に短縮されることが報告されており<sup>22, 23)</sup>、これは宿主根から分泌される物質に、根粒菌の増殖を促進する物質が含まれていることが示唆される<sup>24)</sup>。また、ダイズの種子や根から分泌されるジェニステインのようなイソフラボン<sup>25)</sup>は、*Bradyrhizobium* 属の根粒形成を誘導することが明らかになっている<sup>26-28)</sup>。このような促進的な影響の一方で、抑制的な作用もある。例えば、クローバー(*Trifolium pratense*)の種子浸出液中のフラボノイドは、根粒形成遺伝子(*nod gene*)の誘導活性には影響しないが、*R. leguminosarum* bv. *trifolii* の増殖を抑制することが報告されている<sup>29)</sup>。また、植物の生育を調節する物質として知られるエチレンは、アルファルファへの根粒菌の

接種によって放出量が増加すること、またエチレンを外部から加えた場合に根粒形成が抑制されることが報告されている<sup>30-33)</sup>。しかし、宿主による根粒菌の増殖や根粒形成、あるいは窒素固定における調節は複雑なメカニズムであり、未だ十分な理解は得られていない。

一般的に、根粒菌がマメ科植物に感染して根粒形成する過程において、根粒菌の増殖は根粒内で停止し、フリーリビング(単生菌)からバクテロイドと呼ばれる形態に変化した後、共生的に窒素固定を営むことが知られている<sup>34-37)</sup>。すなわち、根に感染した根粒菌は宿主根の表皮細胞内で増殖するが、根粒が熟成するに従って、増殖能の著しく低いバクテロイドへと形態変化するのである。Suttonらは、根粒が発達し始めてから10日から12日目までは、バクテロイド総数の約25%から45%が分裂していたが、その後13日から19日目では、全体の2%から4%程度しか分裂していないことを報告した<sup>37)</sup>。しかしながら、ダイズ根粒菌のバクテロイドをYEM液体培地で培養した場合、同菌株のフリーリビング細胞よりは遅いものの、明らかに増殖能を有していることが報告されている<sup>38)</sup>。また小沢らは、10倍希釈したYEM培地を用いた場合、バクテロイドのコロニー形成が著しく改善されると報告した<sup>39)</sup>。これらの報告から、根粒内においてバクテロイドは増殖能を失っているのではなく、何らかの物質の存在によって増殖が抑制されていると考えられる。例えば、根粒中に存在するスペルミジンのようなポリアミンがバクテロイドの増殖を抑制すること<sup>40)</sup>、さらにダイズ根粒中のスペルミジンの濃度がバクテロイドの増殖の停止期間を延長させることが報告されている<sup>41)</sup>。

ところで、細菌の増殖はタンパク質やアミノ酸およびその他のアミノ化合物の影響を受けることが知られている。そのため、ここで根粒菌以外の微生物の増殖について、アミノ酸およびその他のアミノ化合物による影響についての報告をいくつか述べる。細菌の胞子の発芽およびその形成過程はアミノ酸によって誘導され、特にL-アラニンはほとんどの細菌の胞子発芽に要求されるアミノ酸であることが知られ

ている。細菌の孢子を形成する過程では、それを誘導促進する働きを持つアミノ酸が存在する。例えば、アラニン、アスパラギン、イソロイシン、あるいはセリンが *Bacillus subtilis* の孢子の発芽を、グルタミン酸あるいはグリシンが孢子の形成過程を誘導促進する。また、グリシン、リシンは *Saccharomyces cerevisiae* の子嚢孢子形成過程を誘導促進する<sup>42)</sup>。一方、菌の増殖に対して抑制的に働く化合物がある。その代表には抗生物質が挙げられ、その化学構造にはアミノ酸構造を含有するものが多く存在する。例えばアミノ酸誘導体の抗生物質であるアザセリンは、低濃度で *Escherichia coli* の増殖を阻害することが知られている<sup>43)</sup>。その他、マメ科植物であるササゲ(*Vigna unguiculata*)の種子から単離・精製された種子貯蔵オリゴマータンパク質であるヴィシリンが、植物病原カビの *Fusarium solani* や *F. oxysporum*、あるいは *Colletotrichum musae* の増殖を著しく抑制し、孢子や分生子の発芽を阻害することが報告されている<sup>44)</sup>。このように、根粒菌以外の微生物の増殖も、アミノ酸およびその他のアミノ化合物によって影響されている。このことから、アミノ酸およびその他のアミノ化合物が根粒菌の増殖や生理活性に対して影響することが示唆され、また上記で述べたような宿主植物による根粒菌の増殖などの調節に関与している可能性も考えられた。実際、根圏において、宿主根からはアミノ酸およびその他のアミノ化合物や糖類、あるいはビタミン類などの化学物質が土壌中へ分泌されている。例えば、インゲンマメ(*Phaseolus vulgaris*)の根分泌液中にはアミノ酸が多量に含まれていることが知られている<sup>19)</sup>。Van Egeraat は根の浸出液中に含まれるホモセリンにより増殖が促進することを報告した<sup>45, 46)</sup>。一方、Strijdom と Allen は、D-アラニンや D-ヒスチジンのような D 型アミノ酸、あるいは L-システインのような L 型アミノ酸の添加によって *Sinorhizobium meliloti* (アルファルファ根粒菌)の増殖が抑制されることを報告している<sup>47)</sup>。しかしながら、このようなアミノ酸およびその他のアミノ化合物による根粒菌の増殖抑制のメカニズムについてはほとんど知られていない。

根粒中のアミノ酸およびその他のアミノ化合物の成分分析を行ったところ、グルタミン酸、アラニン、アスパラギン酸、タウリン、そしてヒドロキシリシンが、全アミノ酸の中で比較的多く含まれていた。根粒中のアミノ酸およびその他のアミノ化合物のうち、ヒドロキシリシンは、必須アミノ酸であるリシンの第 5 位の炭素にヒドロキシル基が付加したリシン誘導體である。ヒドロキシリシンは一般的にはゼラチンやコラーゲン、または細菌細胞壁などに存在するアミノ化合物として知られており<sup>48, 49)</sup>、遊離ではほとんど見られない物質である。今まで、このヒドロキシリシンの根粒菌における役割は検討されておらず、菌の増殖に対する影響も報告されていない。根粒中のアミノ酸およびその他のアミノ化合物を培地に添加し、根粒菌の増殖に与える影響について調べたところ、ヒドロキシリシンを添加した時にのみ強い抑制効果が見られた。ヒドロキシリシンによる増殖抑制効果は、根粒菌、とくに fast grower である *Rhizobium* 属あるいは *Sinorhizobium* 属に顕著に認められ、また、同属菌のバクテロイドの増殖にも影響を示した<sup>50-52)</sup>。

以上の内容を背景として、本研究では根粒菌の増殖におけるヒドロキシリシンの抑制効果について、その作用機構を検討するとともに、フリーリビング細胞からバクテロイドへの形態変化、あるいは宿主植物根への根粒形成能とその窒素固定能に与えるヒドロキシリシンの影響を明らかにすることを目的とした。

## 略語集

ADH : alanine dehydrogenase

APS : ammonium peroxodisulfate

Bis : N, N'-methylenebisacrylamide

2D-PAGE : two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

CBB : coomassie brilliant blue

ED : Entner-Doudoroff pathway

G6PDH : glucose-6-phosphate dehydrogenase

Hyl: hydroxylysine

IDH : isocitrate dehydrogenase

MM : minimal medium

NAD<sup>+</sup> : nicotinamide adenine dinucleotide

NADP<sup>+</sup> : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NBT : nitro blue tetrazolium

PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis

PBS : phosphate buffered saline

6PGDH : 6-phosphogluconate dehydrogenase

PMS : phenazine methosulfate

SDS : sodium dodecyl sulfate

TCA : trichloroacetic acid

TEMED : N, N, N', N'-tetramethylenediamine

TGB : tris glycine buffer

YEM : yeast extract-mannitol medium