

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

第1節 目的

根粒菌の増殖は、根粒中あるいは宿主植物根圏に存在するさまざまな物質によって影響を受けている³⁰⁻³²⁾。例えば、L-システインのようなアミノ酸が *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti* の増殖を抑制することが報告されている⁴⁷⁾。根圏に存在する物質の根粒菌の増殖に対する影響を調べ、宿主であるマメ科植物根への有効な根粒形成、あるいはより効率的な窒素固定活性の発現が成立する条件の設定が、重要な課題と考えられる。しかしこれまで、根粒菌の増殖に抑制効果を示す根粒中のアミノ酸およびその他のアミノ化合物についての研究は、ほとんどなされていない。本章では根粒中に含まれるアミノ酸およびその他のアミノ化合物、特にヒドロキシリシン(以下 HyI)に着目し、根粒菌の増殖への影響を調べるとともに、根粒菌の代謝関連酵素の活性におよぼす影響について検討した。

第2節 実験材料および方法

2.1 使用菌株および植物種子

使用した菌株は、Table 2 に列挙した。そのうち、*Rhizobium* 属菌および *Sinorhizobium* 属菌は Dr. van Berkum (Agricultural Research Service, USDA, Beltsville, MD) より、*Bradyrhizobium japonicum* は十勝農協連農産化学研究所より、*Absidia corymbifera* は帯広日本甜菜製糖株式会社より、またそれ以外の菌株は北海道大学農学部応用菌学研究室より分譲された。インゲンマメ [*Phaseolus vulgaris* (L.) cv. Taishoukintoki]、およびダイズ [*G. max* (L.) Merr. cv. Kitamusume] の種子は、十勝農協連農産化学研究所より恵与された。

Table 2. Strains used in this study

Root nodule bacteria

Rhizobium leguminosarum bv. *phaseoli* USDA2676, 2667

Rhizobium leguminosarum bv. *trifolii* USDA2053

Rhizobium leguminosarum bv. *viciae* USDA2370

Sinorhizobium fredii USDA191, 192, 194, 201, 206

Sinorhizobium meliloti USDA1021, 1025, 1107

Bradyrhizobium japonicum OUG117, JIR33, J109

Other bacterium

Bacillus subtilis AHU1390

Yeasts

Candida utilis AHU3259

Hansenula anomala AHU4041

Molds

Rhizopus javanicus AHU6566

Absidia corymbifera IFO8084

Mucor racemosus AHU6018

Mucor japonicus AHU6052

Penicillium notatum AHU8036

Aspergillus oryzae

2.2 使用培地

1) 保存培地

根粒菌には YEM 寒天培地 [0.5 g K_2HPO_4 , 0.3 g $CaCO_3$, 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g NaCl, 5 g mannitol, 0.6 g yeast extract, 15 g agar / L distilled water (pH 6.8)]、その他の細菌類には LB 寒天培地 [10 g Bacto tryptone, 10 g NaCl, 5 g yeast extract, 15 g agar / L distilled water, pH 7.5]、酵母およびカビには PDA 寒天培地 (栄研化学社製、Potato Dextrose Agar) [200 g バレイショデンプン、20 g ブドウ糖、15 g agar / L distilled water, pH 5.6 ± 0.2] を保存培地として用いた。それぞれの培地は加熱して寒天を溶解し、約 10 ml ずつ培養用試験管に分注した後、 $120^\circ C$ で 20 分間、オートクレーブ ($1.2 \text{ kg} / \text{cm}^2$, $120^\circ C$ 、15 分間) を用いて加圧滅菌した。

2) 培養培地

根粒菌の培養には YEM-HM 液体培地⁵³⁾ [0.25 g Na_2SO_4 , 0.32 g NH_4Cl , 0.013 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.18 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.316 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 0.004 g $FeCl_3$, 0.5 g yeast extract, 5 g mannitol, 1.1 g 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid (MES), 1.3 g *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-ethanesulfonic acid (HEPES) / L distilled water, pH 6.8]、TY 液体培地 [3 g yeast extract, 0.872 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 5 g Bacto tryptone / L distilled water, pH 6.8]、あるいは最少培地 (minimal medium : MM)⁵⁴⁾ [10 g mannitol, 0.01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.15 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.6 g $NaNO_3$, 0.3 g KH_2PO_4 , 0.6 g K_2HPO_4 , 0.5 mg biotin, 0.1 mg thiamine-HCl / L distilled water, pH 7.0] を用いて培養した。その他の細菌の培養には LB 培地 [10 g Bacto tryptone, 10 g NaCl, 5 g yeast extract / L distilled water, pH 7.5]、あるいは細菌用最少培地 (M9 培地) [2 g NH_4Cl , 12 g Na_2HPO_4 , 6 g KH_2PO_4 , 10 g NaCl / L distilled water あるいは 4 g glucose, 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.03 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2 ml 1 mM $FeCl_3$ / L distilled water をそれぞれ滅菌

し、冷却後に等量混合した培地、pH 7.5]を用いた。酵母の培養にはYM 液体培地 [10 g glucose, 3 g malt extract, 5 g polypeptone / L distilled water, pH 6.2]、あるいは酵母用最少培地 (グルコース無機塩培地) [20 g glucose, 2.0 g NaCl, 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1 g K_2HPO_4 / L distilled water, pH 7.0] を用いた。調製した各培地は、オートクレーブで 20 分間滅菌した。

2.3 菌の増殖測定

前培養は、試験管 (13 mm ϕ \times 150 mm) に調製した 5 ml の液体培地に、保存培地より菌を接種した後、30 $^{\circ}\text{C}$ 、100 strokes / min の往復振とう培養により、対数増殖中期から後期 (OD660 nm の吸光値で 1.0 前後) まで増殖させた。本培養は、2 つの実験系で行った。一つは、あらかじめ目的の濃度のアミノ酸およびその他のアミノ化合物を加えた 5 ml の培地を試験管 (13 mm ϕ \times 150 mm) に入れ、0.1 ml の前培養溶液を加えて開始した。他方は、5 ml の液体培地に 0.1 ml の前培養溶液を加えて培養を開始し、18 時間後、あるいは 25 時間後の培養溶液に、それぞれ終濃度 1 mM になるように Hyl を添加して培養を続けた。各培養は、30 $^{\circ}\text{C}$ 、100 strokes / min の往復振とうで行った。菌の増殖は、菌液の OD660 nm の吸光値で測定した。

2.4 植物の栽培

1) 接種菌液の調製

接種する菌は 30 $^{\circ}\text{C}$ 、100 strokes / min の往復振とう培養により対数増殖後期まで培養し、滅菌処理したリン酸緩衝化生理食塩水 (phosphate buffered saline : PBS) [0.7 g KH_2PO_4 , 6.8 g NaCl, 2.4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ / L distilled water (pH 7.0)] に懸濁して、OD660 nm の吸光値で 1.3 (10^9 cells / ml) に調製した。これをさらに PBS で 10^3 倍に希釈して 10^6 cells / ml に調製し、接種菌液として使用した。

2) 接種栽培条件

300 ml 容のガラスポットを使用する場合、上端から 1 cm の高さまでパーミキュライトを詰め、調製した無窒素植物栽培用液体培地 (Norris-Date 氏液)⁵⁵⁾を 100 ml (容器の 1/3 量) 注ぎ入れた後、アルミホイルで蓋をした。シードバッグを用いた場合、種子を置く位置に穴を開け、上記の Norris-Date 氏液を 20 ml 注いだ後、アルミホイルで全体を包んだ。これらをオートクレーブで滅菌し、室温まで放熱させてから使用した。種子は 70%のエタノールで 2 分間洗浄後、滅菌蒸留水で 3 回から 5 回洗浄し、さらに 10%の次亜塩素酸ナトリウムを加えて殺菌した後、滅菌蒸留水で洗浄した。表面殺菌した種子を 1 ポットあるいはシードバッグ 1 枚につき 3 個ずつ置き、上記のように調製した菌液を種子 1 個につき 1 ml (10^6 cells)ずつ接種し、容器全体をアルミホイルで覆った。これらをグロースチャンバー内 (明期 14 時間、22℃、暗期 10 時間、16℃)に静置し、発芽時にアルミホイルをはずして生育の悪いものを間引きした。栽培中は必要に応じて滅菌蒸留水を適当量 (約 10 ml) 与え、接種後 20 日目に Norris-Date 氏液(ガラスポットには 50 ml、シードバッグには 10 ml) を補給した。

2.5 根粒中のアミノ酸およびその他のアミノ化合物の抽出

前述のように栽培した宿主植物根の根粒(約 0.1 g)を 1.5 ml 容のチューブに入れ、0.3 ml の 1N 過塩素酸を加えて破碎し、4℃、12,000 rpm で 2 分間遠心分離した。上澄液を新しい 1.5 ml 容のチューブに移し、残った沈殿に 0.3 ml の 1N 過塩素酸を加えて再懸濁した後、4℃、12,000 rpm で 2 分間、遠心分離した。それぞれの上澄み液を合わせた後、2N 水酸化カリウムで pH 4.0 から pH 6.0 に調整し、4℃、12,000 rpm で 1 分間、遠心分離した。上澄液を新しい 1.5 ml 容のチューブに移し、滅菌蒸留水で液量を 1 ml に調整し、-80℃で 10 分間凍結した。10 分後に自然解凍し、生じた過塩素酸カリウムの沈殿を 4℃、12,000 rpm で 2 分間、遠心分離して除去し

た。上澄液をフィルター(ミリポア社製、ポアサイズ $0.45\mu\text{m}$)でろ過して HPLC 分析試料として用いた。

2.6 細胞中および培地中のヒドロキシリシン含量の測定

あらかじめ終濃度 1 mM の Hyl を加えた MM で *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 を培養し、対数増殖中期 (OD_{660nm} の吸光値で 0.8 から 1.0)まで増殖が回復した菌液 (10 ml)を 25 ml 容のプラスチックチューブに入れ、 4°C 、 $15,000\text{ rpm}$ で 5 分間遠心分離した。上澄液はフィルター(ミリポア社製、ポアサイズ $0.2\mu\text{m}$)でろ過した後、 -20°C で保存した。ペレットを 1 ml の MM に懸濁し、 1.5 ml 容のチューブに移して 4°C 、 $12,000\text{ rpm}$ で 5 分間遠心分離した後、さらに 2 回この操作を繰り返す、細胞表層に付着した Hyl をできるだけ除去した。 0.2 ml の 1 N 過塩素酸を加えてペレットを懸濁し、チューブを水中 (0°C)に置いて 15 分間静置した後、 2.6 N の水酸化カリウム (0.6 M の炭酸水素カリウムを含む) で $\text{pH } 4.0$ から $\text{pH } 6.0$ の間に調整して、 -20°C で凍結させた。解凍後、生じた過塩素酸カリウムの沈殿を 4°C 、 $12,000\text{ rpm}$ で 5 分間遠心分離して取り除き、上澄液はフィルターろ過した後、新しい 1.5 ml 容のチューブに移して -20°C で保存した。各サンプルの Hyl 含量は、高速液体クロマトグラフィー (日本分光社製、アミノ酸分析システム New 8,000 シリーズ S、AA pak Li^+ カラム)で分析した。

2.7 DNA, RNA およびタンパク質合成量の測定

R. leguminosarum bv. *phaseoli* USDA2676 を、あらかじめ 20 ml の最少培地を入れて滅菌した三角フラスコに懸濁し、 30°C 、 150 rpm で旋回振とう培養して OD_{660 nm} の吸光値で 1.0 まで増殖させた。この培養菌液を、 200 ml の最少培地を入れて滅菌した 500 ml 容の三角フラスコに 50 ml ずつ無菌的に分注した。あらかじめ濃度調整したラジオアイソトープ (^{14}C -leucine ; 0.0185 MBq / ml , ^{14}C -

uracil ; 0.0037 MBq / ml,あるいは ^3H -thymine ; 0.0185 Mq / ml)を入れた各試験管(10 mm ϕ \times 90 mm)に、各 1 ml の培養菌液を入れて混合し、30°C で 5 分間、正確にインキュベートした後、1 ml の 10% トリクロロ酢酸 (TCA)を加え、氷中 (0°C) で 30 分間静置した^{56,57)}。ろ過装置にフィルター(ミリポア社製 ; ポアサイズ 0.45 μ m)を装着して 1 ml の試料を吸引ろ過した後、1 ml の 0.85% 塩化ナトリウムでフィルターを 15 回洗浄した。あらかじめ 0.5 ml のメチルセロソルブを入れたシンチレーションバイアルに菌をフィルターとともに浸して溶解し、10 ml のアクアゾールシンチラントを加えた後、液体シンチレーションカウンター (Packard 社製、TRI-CARB4640)で TCA 酸不溶画分の放射活性を測定した。

2.8 酵素活性測定および電気泳動

1) 無細胞抽出液の調製^{58,59)}

根粒菌を 5 ml の MM で前培養し、あらかじめ 200 ml の MM を入れた 500 ml 容の三角フラスコに移して 30°C、150 rpm で旋回振とう培養した。この本培養菌液を、4°C、10,000 rpm で 10 分間、遠心分離して集菌した。ペレットを PBS に懸濁し、4°C、16,000 rpm で 10 分間、遠心分離する操作で 2 回洗浄した。さらにペレットを PBS に懸濁し、10 ml 容の遠沈管に移した後に、4°C、19,000 rpm で 10 分間、遠心分離して上澄液を除去した。沈殿にごく少量 (0.5 ml から 1 ml)の PBS を加えて再懸濁した後、超音波処理 (200W, 2 分間 \times 8 回)によって細胞を破壊し、4°C、19,000 rpm で 1 時間、遠心分離して得られた上澄液を無細胞抽出液とした。無細胞抽出液中のタンパク質含量は、Bradford の方法により、Protein Assay (Bio-Rad 社製)を使用して 595 nm の吸光値から測定した。なお、標準タンパク質としてウシ血清アルブミン (BSA)を用いた。無細胞抽出液の保存は、PBS でタンパク質含量を 5 mg / ml に調整した後、-80°C で凍結保存した。

2) 酵素活性の測定

無細胞抽出液における各酵素の活性は、Table 3 に示した組成の反応混合液をそれぞれ調製し、以下の手順で測定した。補酵素は測定直前に調製し、それ以外の試薬はあらかじめ調製して冷蔵保存した。

a. Alanine dehydrogenase(ADH)^{60, 61)}

反応混合液 1 および 0.1 ml の無細胞抽出液を石英セルに入れて素早く混合し、3 分間放置して温度平衡させた後、0.1 ml の 0.3 M 塩化アンモニウムを加えて反応を開始した。活性は OD340 nm の吸光値を測定し、1 分間当たりの吸光値の変化により求めた。

b. NAD⁺ および NADP⁺ 依存型 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) あるいは NAD⁺ および NADP⁺ 依存型 6-phospho-gluconate dehydrogenase (6PGDH)

Vassily らの方法⁵⁸⁾を一部改変して行った。NADP⁺ 依存型 G6PDH および 6PGDH は反応混合液 2 を、NAD⁺ 依存型 G6PDH および 6PGDH は反応混合液 3 を石英セルに入れて混合し、3 分間放置して温度平衡させた後、0.15 ml の無細胞抽出液を加えて反応測定を開始した。活性は、OD340 nm の吸光値を 3 分間、30 秒間隔で経時的に測定して、1 分間当たりの吸光値の変化より求めた。

c. Isocitrate dehydrogenase (IDH)

Saroso らの方法^{62, 63)}に従って測定した。反応混合液 4 を石英セルに入れて混合し、3 分間放置して温度平衡させた後、0.25 ml の無細胞抽出液を加えて反応測定を開始した。活性は b と同様に求めた。

d. NAD⁺ 依存型 malic enzyme (Malate dehydrogenase ; oxaloacetate-decarboxylating)

Mackey らの方法⁶⁴⁾に従い、リンゴ酸 (L-malate) から生成するピルビン酸の量を 2, 4 ジニトロフェニルヒドラジン (2, 4 dinitrophenylhydrazine) を使用し、比

色定量して測定した。反応混合液 5 および 0.05 ml の無細胞抽出液を試験管に入れて混合し、30℃、20 分間インキュベートした後、0.5 ml の 0.1% 2, 4 ジニトロフェニルヒドラジン (2N 塩酸で調製) を加え、1.5 ml 容のチューブに移し、4℃、12,000 rpm で 5 分間遠心分離した後、OD450 nm の吸光値を測定して活性を求めた。

e. ED enzyme (Entner- Doudoroff enzymes : 6-phosphogluconate dehydratase and phospho-2-keto-3-deoxygluconate aldolase)

Lessie らの方法⁶⁵⁾を一部改変して行った。反応混合液 6 および 0.05 ml の無細胞抽出液を試験管に入れて混合し、30℃、20 分間インキュベートした後、0.5 ml の 0.1% 2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン(2N 水酸化ナトリウムで調製)を加えて 1.5 ml 容のチューブに移し、4℃、5 分間、12,000×g で遠心分離した。上澄液を石英セルに移し、OD450 nm の吸光値を測定して活性を求めた。

f. NADPH 依存型 glutamate synthase(GOGAT)⁶⁶⁻⁷⁰⁾

Macia and Ethan の方法⁶⁶⁾を一部改変して行った。反応混合液 7 を石英セルに入れ、50 μl の無細胞抽出液を加えて混合し、3 分間放置して温度平衡させた後、150 μl の 50 mM L-glutamine を加えて反応を測定した。活性は OD340 nm の吸光値を測定して求めた。

g. NADPH 依存型 glutamate dehydrogenase(GDH)

Macia and Ethan の方法⁶⁶⁾を一部改変して行った。反応混合液 8 を石英セルに入れ、50 μl の無細胞抽出液を加えて混合し、3 分間放置して温度平衡させた後、500 μl の 300 mM NH₄Cl を加えて反応を測定した。活性は OD340 nm の吸光値を測定して求めた。

3) 電気泳動

a. Native polyacrylamide gel electrophoresis (native PAGE)

Davis の方法⁷¹⁾に従い、7.5% ネイティブゲルを用いて行った。組成は Table 4 に示した。作成したゲルは、Table 4 に示したトリスグリシン緩衝液 (TGB)の 10 倍

Table 3. The solutions for the measurement of enzyme activities

Solution 1 (ADH)	
150 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6)	1.0 ml
6 mM NADH	0.05 ml
150 mM Pyruvate	0.1 ml
H ₂ O	1.65 ml
	<hr/> 3.0 ml
Solution 2 (NADP ⁺ -G6PDH or NADP ⁺ -6PGDH)	
1 M Tris-HCl buffer (pH 8.5)	0.15 ml
50 μM MgCl ₂	0.6 ml
10 mM NADP ⁺	0.06 ml
50 mM G6P (6PG)	0.3 ml
H ₂ O	1.74 ml
	<hr/> 3.0 ml
Solution 3 (NAD ⁺ -G6PDH or NAD ⁺ -6PGDH)	
500 mM K ⁺ phosphate buffer (pH 8.5)	0.3 ml
50 μM MgCl ₂	0.6 ml
10 mM NAD ⁺	0.06 ml
50 mM G6P (6PG)	0.3 ml
H ₂ O	1.59 ml
	<hr/> 3.0 ml
Solution 4 (IDH)	
350 mM HEPES	0.5 ml
100 mM MgSO ₄	0.05 ml
100 mM MnSO ₄	0.05 ml
10 mM NADP ⁺	0.1 ml
100 mM Trisodium isocitrate	0.5 ml
H ₂ O	1.55 ml
	<hr/> 3.0 ml

Solution 5 (malic enzyme)

1 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5)	0.015 ml
500 μ M KCl	0.05 ml
50 mM MnCl ₂	0.01 ml
10 mM NAD ⁺	0.01 ml
0.2 mM L-Malate	0.05 ml
H ₂ O	0.315 ml
	<hr/>
	3.0 ml

Solution 6 (ED enzyme)

1 M Tris-HCl buffer (pH 8.5)	0.1 ml
100 mM Mercaptoethanol	0.05 ml
50 mM 6PG	0.05 ml
H ₂ O	0.25 ml
	<hr/>
	3.0 ml

Solution 7 (GDH)

1 M Tris-HCl buffer (pH 8.5)	0.15 ml
500 μ M MgCl ₂	0.6 ml
10 mM NADPH	6 μ l
50 mM 2-Ketoglutarate	0.3 ml
H ₂ O	1.744 ml
	<hr/>
	3.0 ml

Solution 8 (GOGAT)

1 M KH ₂ PO ₄ buffer (pH 7.6)	0.3 ml
500 μ M MgCl ₂	0.6 ml
50 mM 2-Ketoglutarate	0.3 ml
H ₂ O	1.25 ml
	<hr/>
	3.0 ml

希釈した溶液(pH 8.3)を泳動用緩衝液として用い、ラビダス・ミニスラブ電気泳動装置(ATTO社製AE-6450型)を使用して、スラブゲル1枚につき4℃、9mAの定電流で約2時間、電気泳動した。無細胞抽出液中のタンパク質含量は、1コーム当たり50 μ gに調製した。

b. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

根粒菌の無細胞抽出液のタンパク質の電気泳動は、ラビダス・ミニスラブ電気泳動装置(ATTO社製、AE-6450型)を用い、Table 4で示した組成の12% SDSゲルを使用して行った。試料は試料溶液[12 ml 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 20 ml 10% SDS, 10 ml glycerol, 5 ml mercaptoethanol]を混合し、100℃で5分間煮沸した。調製した試料は、pH 8.3のTGBストック溶液を2倍希釈した溶液にSDSを終濃度が0.1%になるように加えて使用し、スラブゲル1枚につき15 mAの定電流、4℃で約2時間電気泳動を行った。分子量マーカーはElectro-Phoresis Calibration KIT (Pharmacia社製)を使用した。無細胞抽出液を含む試料溶液のタンパク質含量は、1コーム当たり50 μ gに調製した。泳動したタンパク質は後に述べるCBB G-250溶液^{72, 73)}を用いて染色した。

c. 2-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE)⁷⁴⁾

1次元目の等電点電気泳動は、レクタゲルをTable 4の組成で調製し、約4時間光重合させて作成した。タンパク質含量は、1コーム当たり50 μ gに調製し、4℃、200Vで2時間電気泳動後、さらに400Vで1時間電気泳動した。

等電点電気泳動後のゲルを平衡化溶液[3 ml glycerol, 6.9 ml 10% SDS, 1.5 ml mercaptoethanol, 18.6 ml 0.0625 M Tris-HCl buffer (pH 6.8)]に移し、約30分間振とうした。ゲルをSDS電気泳動法に従って約2時間泳動した。泳動後のゲル染色は、後に述べるCBB G-250、あるいは銀染色KITを用いて行った。

Table 4. Buffers and solutions for electrophoresis

Separate gel (acrylamide 12%)	Native	SDS
30.8% Duracryl ¹⁾	5.07 ml	7.82 ml
Tris buffer (pH8.9)	4.94 ml	4.94ml
Distilled water	9.68 ml	6.73 ml
2% TEMED ²⁾	0.35 ml	0.35 ml
10% APS ³⁾	0.036 ml	0.036 ml
10% SDS ⁴⁾		0.2 ml
Concentrate gel (acrylamide 4.5%)		
#315	0.75 ml	0.75 ml
Tris buffer (pH6.8)	1.25 ml	1.25 ml
Distilled water	2.5 ml	2.45 ml
2% TEMED	0.25 ml	0.25 ml
10% APS	0.035 ml	0.035 ml
10% SDS		0.05 ml

1) Millipore co. ; 30% acrylamide, 0.8% N, N'-methylene bisacrylamide

2) N, N, N', N'-tetramethylenediamine 3) ammoniumperoxodisulfate

4) sodiumdodecylsulfate

Isoelectric focusing gel

0.004% Riboflavin	0.75 ml
#315	0.8 ml
40% Ampholine (pI 3-10)	0.3 ml
Distilled water	3.976 ml
2% TEMED	0.169 ml
10% APS	0.006 ml

Tris-Glycine buffer (pH 8.3)	Tris	6.0 g
	Glycine	28.8 g (/L)
Tris buffer (pH 8.9)	Tris	18.1 g
	1N HCl	24 ml (/100 ml)
Tris buffer (pH 6.8)	Tris	5.98 g
	1N HCl	48 ml (/100 ml)
#315	Acrylamide	30 g
	Bis*	1.5 g (/100 ml)

*N, N'-methylenebisacrylamide

d. タンパク質の染色

0.4 g の CBB (Coomassie Brilliant Blue) G-250 を 60 ml の 60% 過塩素酸で溶解し、蒸留水で 1,000 ml に定容した溶液を用いてゲルを染色した。その後、ゲルを銀染色する場合は、染色液を捨て、脱色液 (methanol : acetic acid : distilled water = 3 : 1 : 6) に浸して 10 分間振とうし、脱色液を取り替えてもう一度この操作を繰り返した。脱色液を捨てた後、蒸留水を注いで一晩振とうして脱色させ、銀染色に用いた。銀染色は 2D-Silver Stain II "Daiichi" (Daiichi Pure Chemicals 社製) を用いて行った。

e. 酵素活性染色⁷⁵⁾

NAD⁺ および NADP⁺ 依存型 G6PDH、galactose DH、GDH、malate DH あるいは mannitol DH を用いた。それぞれの染色液の組成を Table 5 に示した。電気泳動したゲルをそれぞれの染色液に入れ、30℃で 2 時間から 4 時間、暗所でインキュベートし、1.5% 酢酸を加えることにより反応を停止させた。

第 3 節 実験結果

3.1 根粒菌の増殖におけるヒドロキシリシンの影響

Rhizobium leguminosarum bv. *phaseoli* USDA2676 あるいは *Sinorhizobium fredii* USDA191 を、宿主植物であるインゲンマメ [*Phaseolus vulgaris* (L.) Merr. cv. Kitamusume] あるいはダイズ [*Glycine max* (L.) cv. Kitamusume] の種子に接種して栽培し、50 日目に得られた根粒中のアミノ酸およびその他のアミノ化合物を抽出して、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析を行った (Fig. 1)。両宿主根粒中には、グルタミン酸が最も多く (それぞれ 4.5 および 0.7 $\mu\text{mol/g}$ wet weight)、次いでアラニン、アスパラギン酸、タウリン、Hyl がこの順に多く含まれていた。そこでマンニトールを炭素源とする MM に、これらのアミノ酸およびその他のアミノ

Table 5. Solutions for zymogram

G6P-DH (NAD ⁺ or NADP ⁺)	
0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)	100 ml
1 M MgCl ₂ · 6H ₂ O	1 ml
NAD ⁺ or NADP ⁺	15 mg
NBT	20 mg
PMS	4 mg
G6P or 6PG	40 mg
Galactose DH	
0.1 M Tris-HCl (pH 8.4)	100 ml
NAD ⁺	30 mg
NBT	20 mg
PMS	4 mg
Galactose	900 mg
Glutamate DH	
0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)	100 ml
NAD ⁺	30 mg
NBT	20 mg
PMS	4 mg
10 mM CaCl ₂	0.2 ml
Na-glutamate	800 mg]
Malate DH	
0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)	100 ml
NAD ⁺	30 mg
NBT	20 mg
PMS	4 mg
1M DL-Malate	3 ml
Mannitol DH	
0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)	100 ml
NADP ⁺	20 mg
NBT	30 mg
PMS	4 mg
Mannitol	40 mg

化合物をあらかじめ 10 mM となるように添加し、*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 の増殖に与える影響を比較した(Fig. 2)。培養開始後 70 時間目に比較すると、グルタミン酸、アラニン、アスパラギン酸、タウリンを添加した場合には、アミノ酸およびその他のアミノ化合物無添加の培地での増殖 (コントロール) の約 90% 以上の増殖を示した。一方、Hyl を添加した場合には増殖傾向が全く見られず、著しく抑制されていた。同条件での実験を、菌株として *Sinorhizobium fredii* USDA191、*S. meliloti* USDA1025、あるいは *R. leguminosarum* bv. *trifolii* を用いて行った結果、これらの根粒菌の増殖も Hyl の培地への添加によって強く抑制された(データは示していない)。10 mM の Hyl で顕著な増殖抑制効果が見られたことから、次に、MM に 0.1 mM, 0.3 mM あるいは 1 mM の Hyl を加え、*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 の増殖と Hyl 濃度の関係を調べた(Fig. 3)。1 mM の Hyl では、菌の増殖は著しく抑制され、培養開始から少なくとも約 100 時間目まで増殖が停止していた。また、0.3 mM の Hyl を添加した場合には培養開始後約 70 時間目まで増殖する傾向が見られず、0.1 mM 程度でも 30 時間までタイムラグが認められた。データは示していないが、同実験を *S. fredii* USDA191 について行った場合、0.1 mM の Hyl が存在すると、培養開始後 50 時間目にはコントロールの約 70%、0.3 mM の濃度では約 80 % まで増殖が抑制され、1 mM では *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 と同様に、著しい抑制効果が認められた。

MM に Hyl を 1 mM の終濃度であらかじめ添加し、増殖に与える影響を、fast grower である *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* 2 株、*R. leguminosarum* bv. *trifolii* 1 株、*S. meliloti* 3 株、あるいは *S. fredii* 5 株を用いて比較した(Fig. 4)。*Rhizobium* 属菌あるいは *S. meliloti* の増殖は、Hyl の添加によって強く抑制され、培養開始から 48 時間後の吸光値でコントロールの約 1% から 20% 程度であった。*S. fredii* の場合、USDA206 を除いて、Hyl の添加により少なくとも培養開始後約 74 時間までは増殖傾向が全く認められず、また USDA206 の場合も、培養開始後 90 時間目の増

殖はコントロールの約 30%程度であり、強く抑制されていた。次に、MM に 1 mM、あるいは 10 mM の Hyl を加え、slow grower である *Bradyrhizobium japonicum* 2 株の増殖を比較した。1 mM の Hyl を添加した場合、2 株とも培養開始から約 200 時間目までコントロールとほぼ同じ増殖速度を維持していたが、10 mM の Hyl の添加では約 120 時間まで増殖が停止していた(Fig. 4)。また、グルコース無機塩培地あるいは M9 培地に 1 mM、あるいは 10 mM の Hyl を加え、酵母 2 株 (*C. utilis* および *H. anomala*)あるいは 1 株の枯草菌 (*B. subtilis*)をそれぞれ培養し、その増殖を比較した。2 株の酵母の増殖は、いずれの濃度の Hyl を加えた場合も、培養開始から 30 時間後にはコントロールの約 80%以上の増殖が見られた。また枯草菌の増殖は、1 mM の濃度ではコントロールの約 80%以上、10 mM でも 60%以上の増殖が認められた(Fig. 4)。このように、枯草菌や酵母では、1 mM の Hyl 濃度では 80%以上、10 mM の濃度でも 60%から 95%の増殖が認められた。一方根粒菌では、*B. japonicum* の場合、1 mM の Hyl 濃度ではコントロールの 95%以上の増殖であったが、10 mM ではコントロールの約 15 から 30%程度に抑制され、また *Rhizobium* 属あるいは *Sinorhizobium* 属は 1 mM の Hyl の添加により、調べた 11 菌株のうち 8 菌株の増殖がコントロールの 10%以下であり、著しく抑制されていた。

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

MM にリシン(1 mM あるいは 10 mM)、あるいはメチルリシン(1 mM)を加えて *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 を培養したときの増殖を、Hyl (0.3 mM、あるいは 1 mM)を添加した場合の増殖と比較した(Fig. 5)。Hyl を添加した培地での増殖は、0.1 mM 程度の Hyl でも約 20 時間抑制されており、0.3 mM、1 mM の濃度では 70 時間以上の抑制効果が見られた(Fig. 5A)。一方、リシンあるいはメチルリシンを添加した場合には、1 mM の濃度でも増殖抑制効果は見られず、特にリシンについては 10 mM の濃度でも抑制効果は全く認められなかった(Fig. 5B, C)。Hyl

(1 mM)を含んだ MM に、リシン(0.1 mM あるいは 1 mM)を添加したときの *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 の増殖を、Hyl (1 mM)のみを加えた場合と比較した(Fig. 6A, B)。Hyl のみで見られた著しい増殖抑制は、いずれの濃度のリシンと共存させても変化せず、培養開始から 70 時間目まで十分に抑制されていた。

MM に 1 mM の Hyl あるいはエチオニンを加え、*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 の増殖を比較した(Fig. 7)。エチオニンを加えた場合、菌の増殖はコントロールよりも低下したが増殖は持続しており、培養開始後約 60 時間後にはコントロールの約 85%まで増殖した(Fig. 7B)。

3.3 ヒドロキシリシンの細胞内への取り込み

MM にあらかじめ、あるいは対数増殖期 (培養開始後 18 時間、あるいは 25 時間後)に 1 mM の Hyl を添加し、*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 の増殖を比較した(Fig. 8)。あらかじめ Hyl を加えた培地では、測定した 60 時間は常に増殖が抑制されていた。また対数増殖期に加えた場合では、菌の増殖相によらず Hyl を加えた直後に増殖が停止し、少なくとも測定した 60 時間目までは増殖が停止した時点の吸光値を維持していた。

MM にあらかじめ Hyl (1 mM)を加えて *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 を培養し、増殖を測定するとともに細胞内あるいは培養培地中の Hyl 含量を HPLC で分析した(Fig. 9)。菌の増殖は、培養開始から約 65 時間後まで抑制され、その後増殖を開始して、約 300 時間後には吸光値で約 1.0 まで増殖した(Fig. 9A)。その間 24 時間ごとに細胞および培地を回収してそれぞれの Hyl 含量を調べた結果、培地中の Hyl 含量は徐々に減少し、培養開始から 240 時間目にはおよそ 0 に近い値となった(Fig. 9B)。一方細胞内の Hyl 含量は菌の増殖が停止している間増加し続け、48 時間後に約 12 nmol/mg dry weight に達した後、菌の増殖回復に伴って減少した(Fig. 9C)。また、培養開始から 24 時間後に Hyl を加えた場合についての細胞内

および培養培地中の Hyl 含量を分析した(Fig. 10)。菌の増殖は Hyl を添加した直後に停止し、その時点での吸光値が維持されており(Fig. 10A)、その培地中の Hyl 含量は徐々に減少した(Fig. 10B)。また、細胞内の Hyl 含量は、培養開始から 24 時間後に培地に Hyl を添加した直後から 48 時間後まで急激に増加し、約 100 時間後に 3 nmol/mg dry weight に達した後、次第に減少して約 200 時間後には 0 に近い値となった。(Fig. 10C)。

3.4 DNA、RNA あるいはタンパク質合成におけるヒドロキシシリシンの影響

R. leguminosarum bv. *phaseoli* USDA2676 の対数増殖期に Hyl (1 mM)を加え、このときの ^3H -thymine、 ^{14}C -uracil、あるいは ^{14}C -leucine の細胞内取り込み量を酸不溶画分の放射活性を測定して調べた(Fig. 11)。 ^3H -thymine は Hyl の添加後 60 分まではコントロールの 70%から 80%の放射活性が認められたが、 ^{14}C -uracil および ^{14}C -leucine は、Hyl を添加した直後から著しく減少し、10 分後にはそれぞれコントロールの 22%、5%となった後、測定した 60 分後にはそれぞれコントロールの 15%、2%まで減少した。次に、*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 の対数増殖期に 1 mM の Hyl を加え、さらに 24 時間培養して得た細胞の無細胞抽出液(CFE)のタンパク質泳動パターンを、2次元電気泳動法を用いて比較した(Fig. 12)。その結果、コントロール(Hyl 無添加)に存在する多くのタンパク質スポット(Fig. 12A 黒矢印)が、Hyl を添加して培養した細胞のタンパク質パターン(Fig. 12B)において消失していた。一方、コントロールでは見られなかった新たなタンパク質スポット(Fig. 12B 白矢印)がいくつか出現していた。

3.5 細胞内代謝関連酵素に与えるヒドロキシシリシンの影響

1) 細胞内代謝酵素活性

前項と同一の試料を用いて、代謝関連酵素の NADP^+ および NAD^+ 依存型 G6PDH、

NADP⁺およびNAD⁺依存型 6PGDH、IDH、ED enzyme、malic enzyme、GDH、あるいは GOGAT の活性を測定した(Table 6)。Hyl を添加した場合、NADP⁺依存型 G6PDH の活性はコントロールの約 50%、NAD⁺依存型 G6PDH の活性はコントロールの約 33%程度となり、NADP⁺依存型 6PGDH の活性は 25%、IDH では約 50%に低下した。一方、ED enzyme および malic enzyme の活性はコントロールの活性の 80%から 85%の活性が見られ、調べた酵素の中では Hyl の影響が少なかった。また、GDH および GOGAT の活性は、それぞれコントロールの 1.9 倍、2.1 倍に増加していた。

2) ザイモグラムパターン

R. leguminosarum bv. *phaseoli* USDA2676 を代謝関連酵素活性のサンプルと同じ条件で培養した後、得られた無細胞抽出液の NAD⁺および NADP⁺依存型 G6PDH、galactose DH、GDH、malate DH、あるいは mannitol DH の活性染色によるザイモグラムパターンを比較した(Fig. 13)。

a. NAD⁺依存型 G6PDH (Fig. 13A)

共通に見られたバンドのうち、Rm 値の小さいバンド(←¹)の活性が、Hyl の添加で活性が高くなった。Rm 値の大きいバンド(←²)の活性はほとんど消失した。

b. NADP⁺依存型 G6PDH (Fig. 13B)

共通する多くのバンドが存在したが、Hyl を加えた場合、Rm 値の小さいバンド(←¹)は活性が高くなり、それより Rm 値の大きいバンド(←^{2, 3, 4})はコントロールよりも活性が低くなった。また、コントロールに見られなかった透明なバンド(←⁵)が認められた。

c. Galactose DH (Fig. 13C)

共通する多くのバンドのうち、5 つのバンド(←^{1, 2, 3, 5})の活性が低くなり、ほとんど消失したバンド(←^{3, 5})も見られた。またコントロールよりも活性が高くなったバンド(←⁴)も認められた。さらに新たに透明なバンド(←⁶)の出現も見られた。

d. GDH (Fig. 13D)

コントロールに存在していた Rm 値の小さいバンド($\leftarrow^{1,2,3,4}$)が Hyl の添加により活性が高くなり、さらに、コントロールで見られなかった透明なバンド(\leftarrow^5)の出現が認められた。

e. Malate DH (Fig. 13E)

多くの共通したバンドが出現し、Rm 値の小さいバンド($\leftarrow^{1,2}$)は活性が低くなった。また、Rm 値の大きい位置で新たな透明のバンド(\leftarrow^3)が出現した。

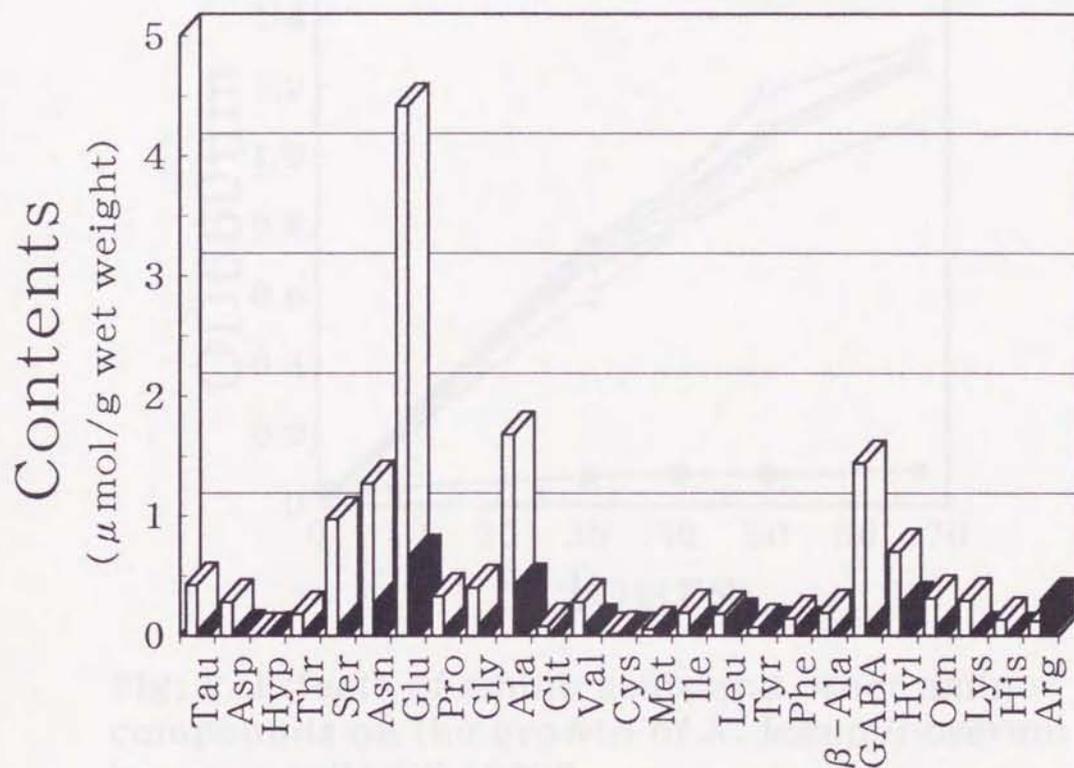
f. Mannitol DH (Fig. 13F)

共通に見られたバンドのうち、Rm 値の小さいバンド(\leftarrow^1)が Hyl の添加により活性が高くなった。また、コントロールで活性の高かったバンド(\leftarrow^3)の活性が著しく低下した。一方、コントロールで見られなかった透明なバンド($\leftarrow^{2,4}$)が認められた。

第4節 考察

4.1 ヒドロキシリシンによる根粒菌の増殖抑制作用

宿主植物根圏において、細菌の増殖はアミノ酸の影響を受ける場合がある。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^{45, 46)}。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⁴⁷⁾。しかしながら、それ以外に根粒菌の増殖を抑制するアミノ酸およびその他のアミノ化合物についての報告はあまり見受けられず、そ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。*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 あるいは *Sinorhizobium fredii* USDA191 を、それぞれインゲンマメ [*P. vulgaris* (L.)] あるいはダイズ [*G. max* (L.)] に接種して得た根粒中のアミノ酸および



Amino acids & other amino compounds

Fig. 1. Amino acids and other amino compounds in the nodules of *Glycine max* (L.) infected by *Sinorhizobium fredii* USDA191 (white bar) or *Phaseolus vulgaris* (L.) infected by *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 (black bar).

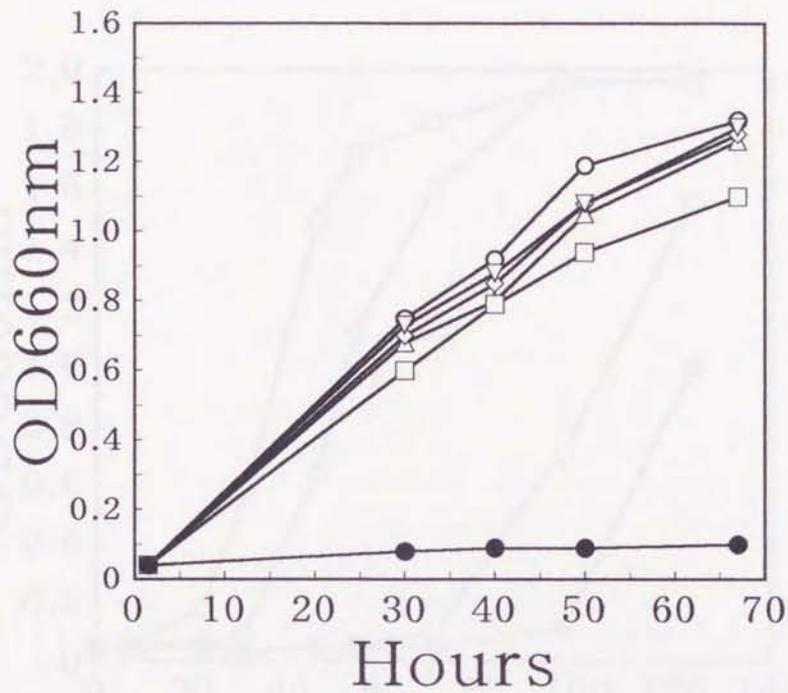


Fig. 2. Effects of amino acids and other amino compounds on the growth of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676.

One-tenth ml of forty-eight-hour-old cultures was transferred to 5 ml of minimal medium containing alanine (Δ), aspartic acid (\square), taurine (\diamond), glutamic acid (∇), or Hyl (\bullet) and incubated at 30°C aerobically. The control was shown as open circles.

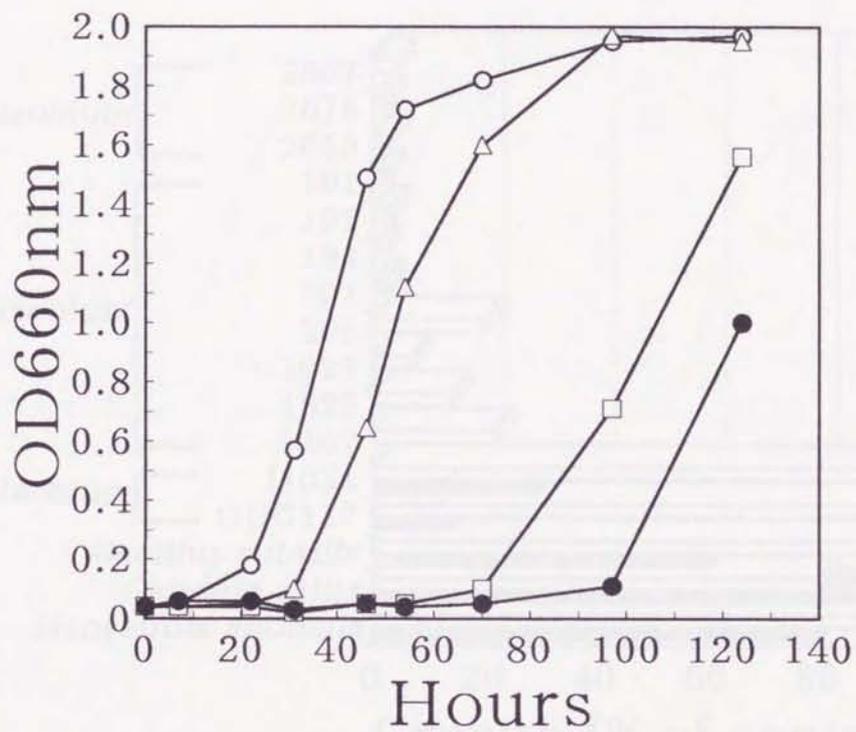


Fig. 3. Effects of Hyl on the growth of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676.

One-tenth ml of forty-eight-hour-old cultures was transferred to 5 ml of minimal medium containing Hyl of 0 mM (○), 0.1 mM (△), 0.3 mM (□), or 1 mM (●) and incubated at 30°C aerobically.

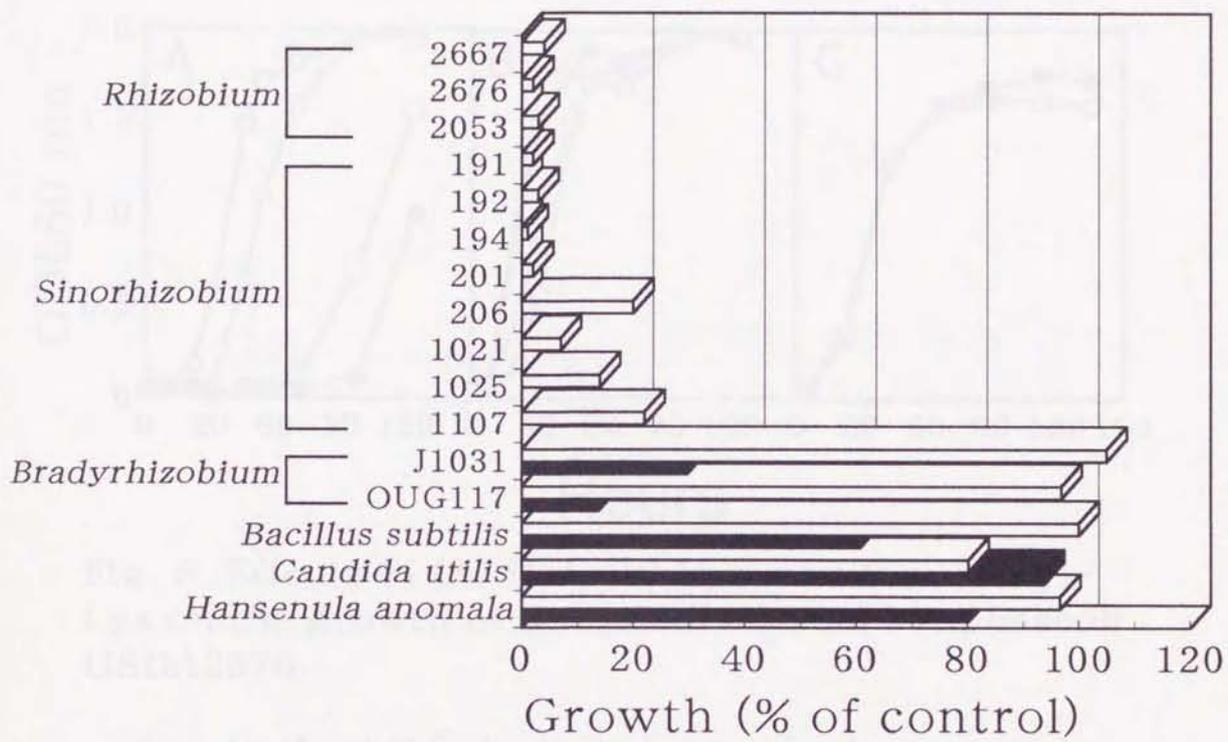


Fig. 4. Effects of 1 mM (white bar) or 10 mM (black bar) Hyl on the growth of root nodule bacteria (*Rhizobium*, *Sinorhizobium* and *Bradyrhizobium*), other bacterium and yeasts.

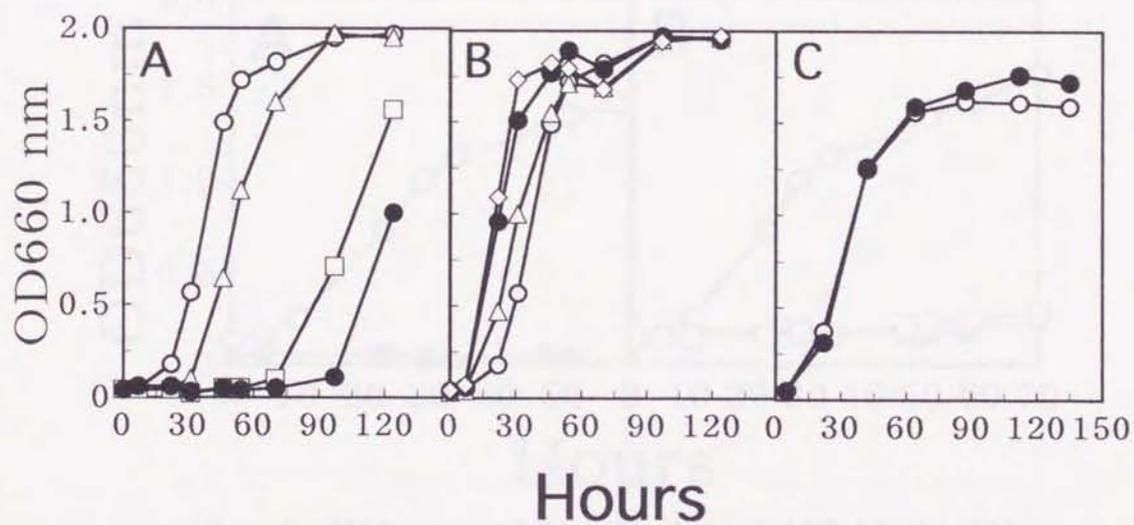


Fig. 5. Effects of (A) Hyl, (B) Lys, and (C) Methyl-Lys on the growth of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676.

One-tenth ml of forty-eight-hour-old cultures was transferred to 5 ml of minimal medium containing each amino compound of 0 mM (○), 0.1 mM (△), 0.3 mM (□), 1 mM (●), or 10 mM (◇) and incubated at 30°C aerobically.

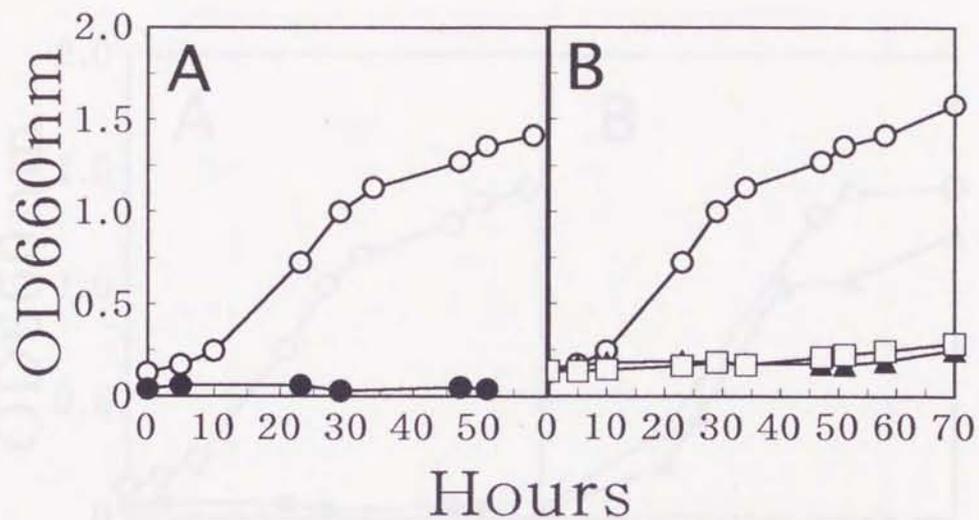


Fig. 6. Effects of (A) Hyl and (B) Hyl with Lys on the growth of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676.

One-tenth ml of forty-eight-hour-old cultures was transferred to 5 ml of minimal medium containing 1 mM Hyl (●), 1 mM Hyl with 0.1 mM Lys (▲), or 1 mM Hyl with 1 mM Lys (□) and incubated at 30°C aerobically. Growth of the control was shown as open circles.

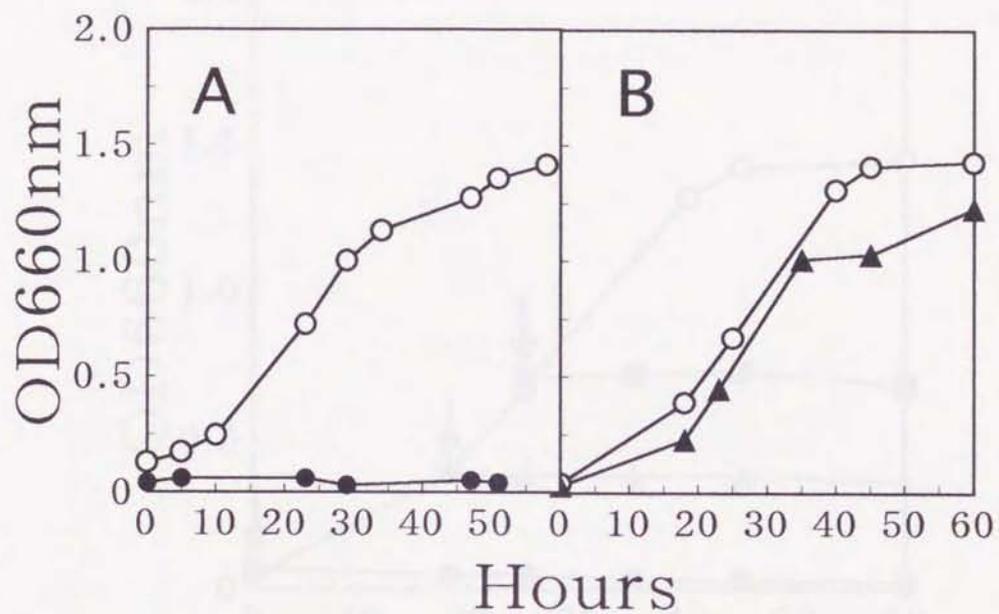


Fig. 7. Comparison of the effects between (A) Hyl and (B) ethionine on the growth of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676.

One tenth ml of forty-eight-hour-old cultures was transferred to 5 ml of minimal medium containing 1 mM Hyl (●) or 1 mM ethionine (▲) and incubated at 30°C aerobically. Growth of the control (without additives) was shown as open circles.

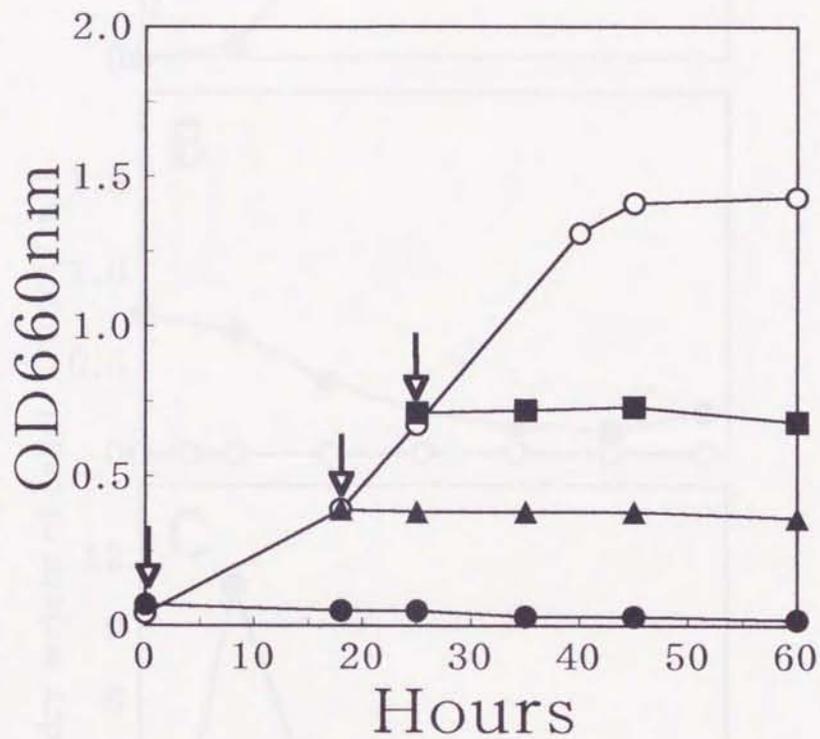


Fig. 8. Effects of Hyl (1 mM) on the growth of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 in minimal medium.

Hyl was added at the point indicated by the arrows (●; 0 h, ▲; 18 h, ■; 25 h). Growth of the control (without the addition of Hyl) was shown as open circles.

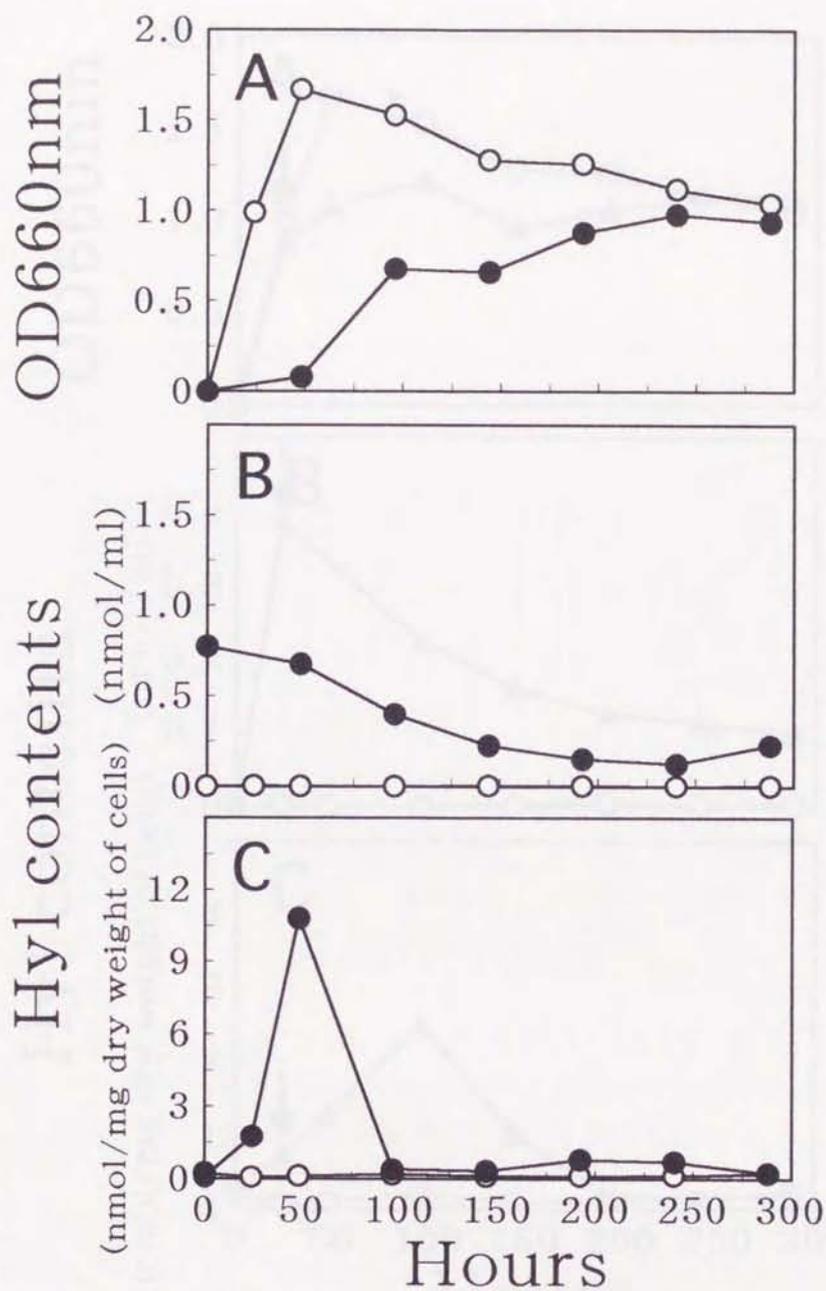


Fig. 9. Hyl contents in the cells of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 and in the medium.

R. leguminosarum bv. *phaseoli* USDA2676 was grown in minimal medium (A) containing 0 mM (○), or 1 mM (●) Hyl, and the Hyl contents in the medium (B) and cells (C) were measured by HPLC.

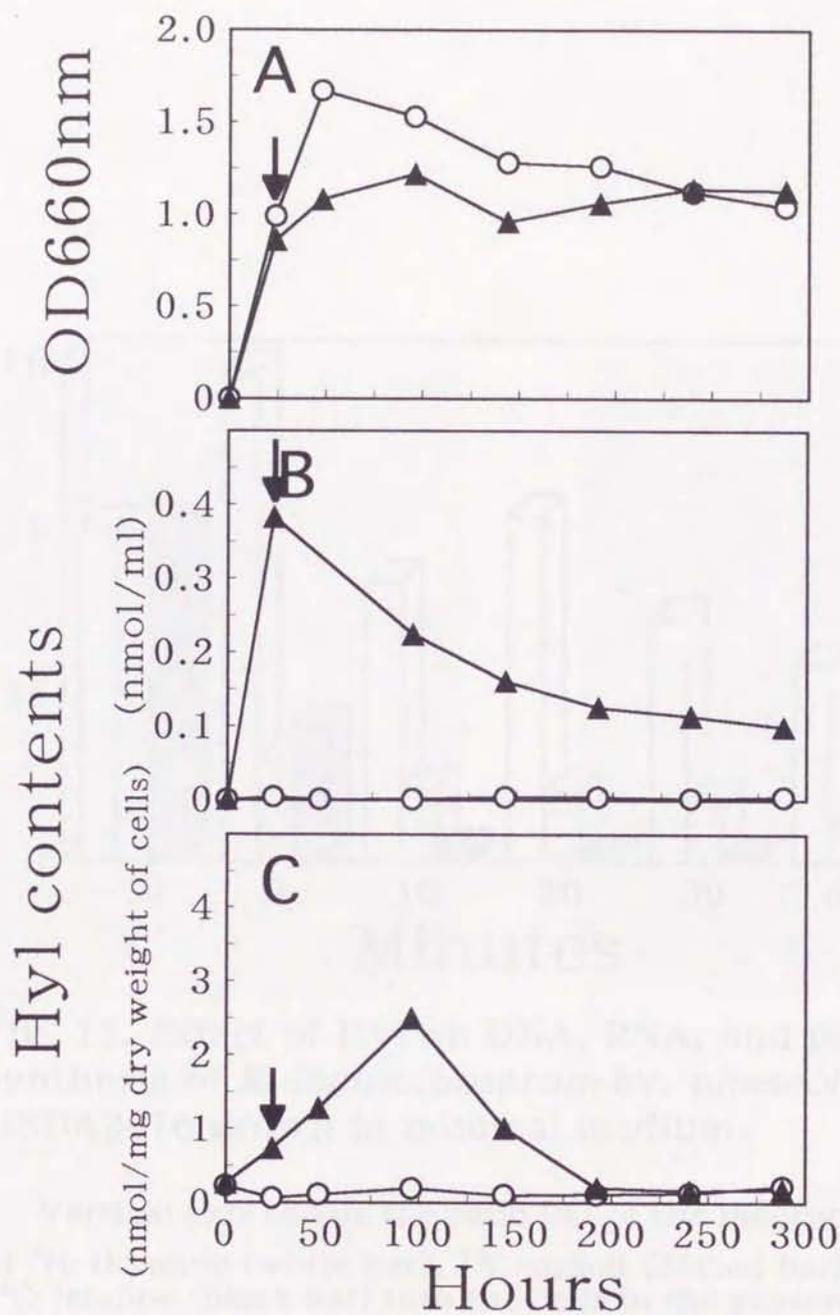


Fig. 10. Hyl contents in the cells of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 and in the medium.

R. leguminosarum bv. *phaseoli* USDA2676 was grown in minimal medium containing 0 mM (○), or 1 mM (●) Hyl which was added at 24 h after the incubation as shown by the arrows (A), and the Hyl contents in the medium (B) and cells (C) were measured by HPLC.

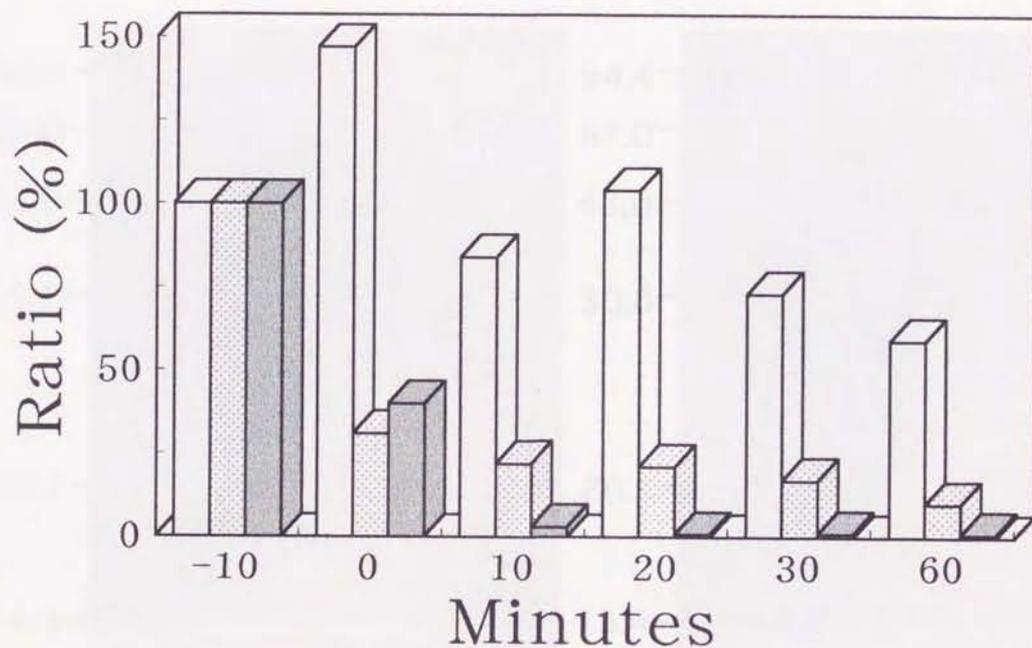


Fig. 11. Effect of Hyl on DNA, RNA, and protein synthesis of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 grown in minimal medium.

Vertical axis shows the ratio (%) of the incorporation of ³H-thymine (white bar), ¹⁴C-uracil (dotted bar), or ¹⁴C-leucine (black bar) into the cells in the presence of Hyl (1 mM) to that without the compound.

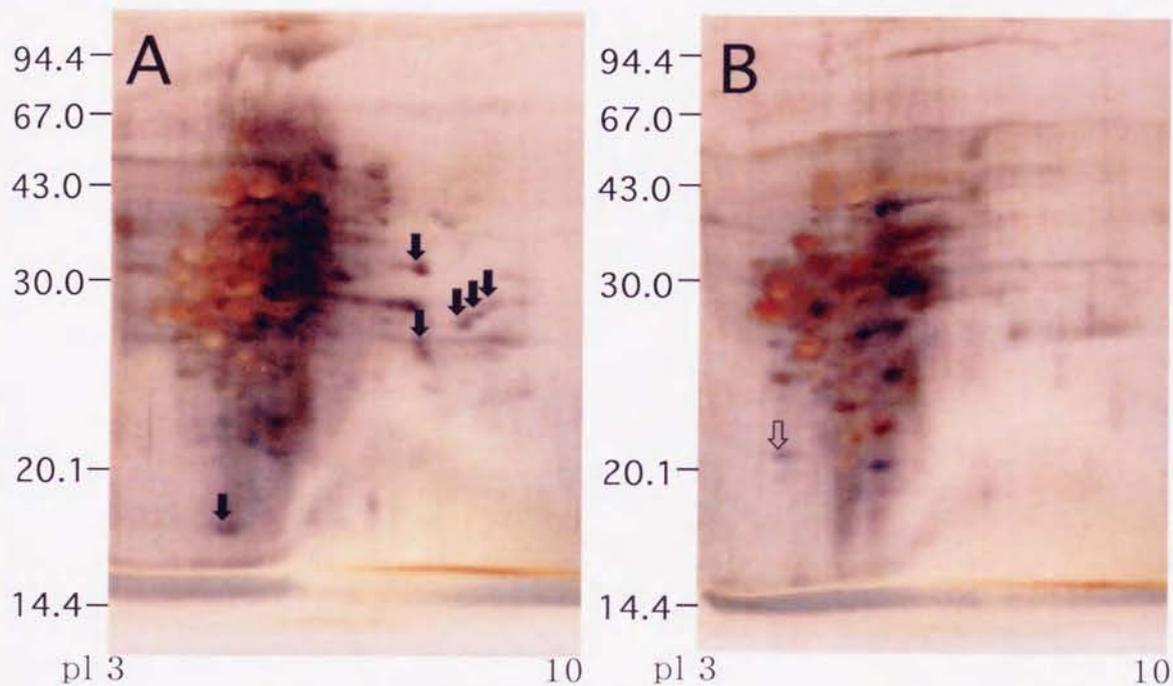


Fig. 12. Two dimensional electrophoresis pattern of the cell-free extracts from *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676.

R. leguminosarum bv. *phaseoli* USDA2676 cells were grown in minimal medium at 30°C aerobically and (A) 0 mM or (B) 1 mM Hyl was added in the middle log phase. After 24 h, cell-free extracts were prepared and 50 mg of protein were applied on gel as described in Materials and Methods. Silver stain was used to detect protein spots separated by electrophoresis. The arrows show the protein spots.

Table 6. Effects of Hyl on the enzyme activities in CFE prepared from *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676

Hyl	G6PDH ¹⁾		6PGDH ²⁾		Enzymes				
	NADP ⁺	NAD ⁺	NADP ⁺	NAD ⁺	IDH ³⁾	ED ⁴⁾	Malic	GDH ⁵⁾	GOGAT ⁶⁾
None	0.31	0.12	0.15	0.06	0.49	2.91	2.83	0.31	0.25
Addition (1 mM)	0.19	0.04	0.04	0.06	0.24	2.48	2.35	0.58	0.52

(units/mg protein)

1) glucose-6-phosphate dehydrogenase 2) 6-phospho-gluconate dehydrogenase 3) isocitrate dehydrogenase
 4) Entner-Doudoroff pathway : 6-phosphogluconate dehydratase and phospho-2-keto-3-deoxygluconate aldolase
 5) glutamate synthase 6) glutamate dehydrogenase

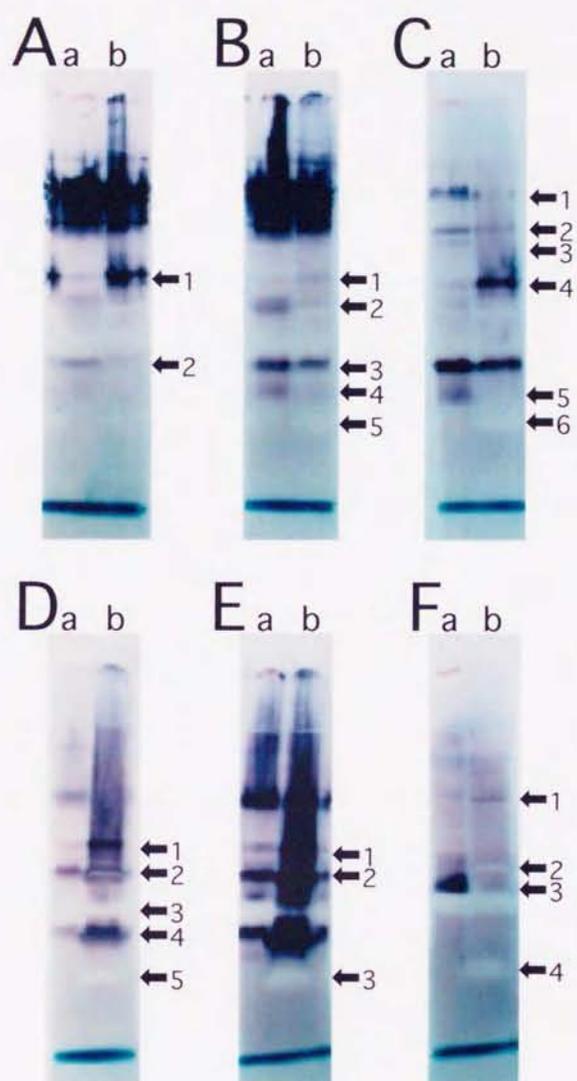


Fig. 13. Zymograms of the cell-free extracts from *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676.

R. leguminosarum bv. *phaseoli* USDA2676 cells were grown in minimal medium at 30°C aerobically and (a) 0 mM, or (b) 1 mM Hyl was added in the middle log phase. After 24 h, cell-free extracts were prepared and applied on gels as described in Materials and Methods.

Zymograms : (A) NAD⁺-dependent G6PDH, (B) NADP⁺-dependent G6PDH, (C) Galactose DH, (D) Glutamate DH, (E) Malate DH, or (F) Mannitol DH. The arrows show specific protein bands.

その他のアミノ化合物に関する HPLC の結果、Hyl がグルタミン酸、アラニン、アスパラギン酸、タウリンなどについて多く含まれることが判明した (Fig. 1)。MM に根粒中の含量が比較的多かったこれら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た場合、*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 の増殖は Hyl を添加して培養した菌体のみ、増殖が著しく抑制された (Fig. 2)。データには示していないが、セリンなどのヒドロキシル基を有するアミノ酸を含むいくつかのアミノ酸およびその他のアミノ化合物を添加した場合についても調べたが、Hyl のように顕著な増殖抑制効果は見られなかった。動物細胞では Hyl がコラーゲン^{48, 49)} やラットの肝臓⁷⁶⁾ に存在しており、またダイズやインゲンマメの根圏には、アミノ酸およびその他のアミノ化合物の存在が知られているが¹⁹⁾、Hyl の存在についてはこれまでに報告されていない。自然界では一般に結合型として存在すると考えられている Hyl が、遊離型として全アミノ酸およびその他のアミノ化合物の中で比較的多く存在していたことから、著者は Hyl が根圏において植物体あるいは根粒菌に何らかの影響をおよぼしている可能性を考えた。さらに他のアミノ酸は *Rhizobium* 属菌など生育の早い根粒菌の増殖にはほとんど影響が無かったのに対し、Hyl が著しい増殖抑制効果を示したことは、これらの根粒菌が根圏あるいは根粒内で Hyl の影響を受ける可能性が十分高いことを示唆している。しかし、Fig. 2 で用いた Hyl を含むアミノ酸およびその他のアミノ化合物は非常に高濃度 (10 mM) であり、根圏での予想値をはるかに上回る濃度である。そこで、Hyl 濃度を 0.1 mM ~ 1 mM に下げて培地に添加し、*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 の増殖に与える Hyl の影響を調べた結果、1 mM の濃度では著しい増殖抑制が認められ、0.1 mM 程度の濃度でもおよそ 30 時間の増殖の停止が認められた (Fig. 3)。これらの結果から、植物組織内あるいは根圏においても、Hyl が根粒菌の増殖に著しい抑制効果を示している可能性が考えられた。以下の実験では、十分な増殖抑制効果の見られる 1 mM の Hyl を基準に行った。

Fig. 4 では Hyl を添加した時の、根粒菌、枯草菌、あるいは酵母の増殖を比較した。1 mM の Hyl を添加した場合の、11 株の fast grower の根粒菌(*Rhizobium* 属、*Sinorhizobium* 属)の増殖を比較したところ、調べた菌株は全て強く抑制された。一方、2 株の slow grower の根粒菌(*Bradyrhizobium japonicum*)は 1 mM の濃度では抑制されず、10 mM の濃度でコントロールの 20%から 30%に抑制された。この結果は、*Rhizobium* 属、*Sinorhizobium* 属の増殖は、*Bradyrhizobium* 属と比較して、Hyl による増殖抑制効果を受け易いことを示している。fast grower の根粒菌は、マンニトールを含む寒天培地で生育が速く酸産生型、slow grower の根粒菌は生育が遅くアルカリ産生型であることが報告されており⁷⁷⁾、また分類学に関連した多くの研究により、さまざまな性質の違いがあることが知られている。本実験での結果から、両者の Hyl に対する感受性に差があることが明らかになった。さらに根粒菌以外の細菌や酵母の増殖に対する Hyl の影響を調べ、根粒菌の場合と比較したが(Fig. 4)、顕著な増殖抑制効果は認められなかった。結果は示していないが、真菌類に属する藻状菌のうち、*Rhizopus* 属や *Mucor* 属でも Hyl による増殖抑制効果が認められたが、この場合の Hyl 濃度は 5 mM から 10 mM であり、その効果は増殖の初期にのみ認められた。これらの結果から、Hyl の増殖抑制効果は根粒菌に強い効果があり、中でも *Rhizobium* 属や *Sinorhizobium* 属は Hyl に対する感受性が高い傾向にある可能性が考えられた。根粒中の Hyl 含量が、分析した全アミノ酸およびその他のアミノ化合物の中で比較的高かったこと、あるいは Hyl が根粒菌の増殖に強く影響した結果から、宿主植物の組織、根粒、あるいは根から分泌された Hyl による根粒菌の増殖に与える影響が根粒形成過程で重要と考えられる。緒言でも述べたように、宿主植物根から分泌される物質が根粒菌の増殖(あるいは根粒形成および窒素固定能)に影響していることが数多く報告されているが、それらの分泌物質の中で Hyl の存在およびその影響に関する研究報告はこれまでにない。これについては第 4 章で検討する。以下、この章では Hyl の増殖抑制機構についての考察につ

いて述べる。

4.2 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

Hyl はリシンがヒドロキシル化された構造を持つリシン誘導体であることから、リシンとその類似物質にも根粒菌の増殖に影響を与える可能性が考えられた。そのため、MM にリシン(1 mM、10 mM)、あるいはメチルリシンを加えたときの菌の増殖を Hyl の場合と比較した(Fig. 5)。その結果、リシンおよびメチルリシンをいずれの濃度で加えた場合も、コントロールと同じかそれ以上に増殖し、Hyl で見られたような増殖抑制効果は全く認められなかった。Hyl、リシン、あるいはメチルリシンの分子構造を比較すると、これら 3 種の物質の中で Hyl のみが炭素の第 5 位に水酸基を持っていることから、Hyl の増殖抑制機構には、その分子構造内の水酸基が関与している可能性が示唆された。また、タンパク質合成の過程で、リシンのかわりに Hyl が取り込まれ、細胞の生育を阻害している可能性がある。そのため、Hyl とともにリシンを共存させた場合の菌の増殖を、Hyl のみを加えた場合と比較したが、Hyl で見られた菌の増殖抑制効果はリシンによって影響されなかった(Fig. 6)。図には示していないが、根粒内で含量の多かったグルタミン酸、アラニンを Hyl と共存させた場合も調べたが、リシンと同様、Hyl の増殖抑制効果に影響はなかった。ところで、メチオニンのアナログであるエチオニンは、メチオニンの代わりに細胞内に取り込まれるが、その細胞の成長を維持しないことが知られている。そこでこのエチオニンを MM に加えた時の菌の増殖を、Hyl の場合と比較した(Fig. 7)。Hyl を加えた場合、菌の増殖は少なくとも 50 時間目までは増殖する傾向は見られなかったが、エチオニンを加えた場合、細胞はコントロールの約 85%程度に抑えられながらも増殖し続けた。これらの結果から、Hyl の増殖抑制機構は、エチオニンで知られているような、構造類似物質によるタンパク質合成時の取り込みにおける拮抗的な阻害ではないと考えられた。

4.3 ヒドロキシリシンの細胞内への取り込み

あらかじめ、あるいは対数増殖期に 1 mM の Hyl を加えたときの菌の増殖を調べた結果、菌の増殖時期に関わらず、Hyl を添加した直後に増殖が抑制された(Fig. 8)。図には培養開始から 60 時間目までの結果を示したが、さらに培養を続けると菌の増殖は回復した。また、Fig. 3 で示したように、Hyl の濃度が低いほど増殖は早い時期に回復していた。このような条件下において、培地中あるいは細胞内の Hyl 含量を HPLC で分析した(Figs. 9, 10)。その結果、どちらの条件下でも、培地中の Hyl 含量は培養時間とともに減少し、一方細胞内では、Hyl 添加直後から菌の増殖が抑制されている間は急激に増加し、菌の増殖の回復とともに次第に減少する傾向にあった。これらの結果から、Hyl は培地に添加した直後に細胞内に取り込まれ、菌体に影響をおよぼすことが示唆された。細胞内における Hyl の分解あるいは代謝に関わる酵素系の活性については明らかではなく、今後の課題の一つである。しかし、HPLC による Hyl 含量の分析では、明らかに細胞内および培地中の Hyl 含量が減少していた。そのため、細胞内に取り込まれた Hyl は分解あるいは代謝され、それに伴い、菌の増殖が回復すると考えられた。

4.4 DNA、RNA およびタンパク質の合成、あるいは代謝関連酵素におよぼすヒドロキシリシンの影響

菌の対数増殖期に 1 mM の Hyl を加えたときの、 ^3H -thymine、 ^{14}C -uracil、あるいは ^{14}C -leucine の取り込み量を測定した結果、 ^{14}C -uracil および ^{14}C -leucine の取り込み量が Hyl を添加した直後から著しく減少していたことから(Fig. 11)、Hyl は添加直後に細胞内に取り込まれ、それとともに RNA、およびタンパク質合成が阻害され、結果的に菌の増殖が抑制されたと考えられた。

上記と同条件で培養した菌の無細胞抽出液のタンパク質泳動パターンを 2 次元電気泳動法を用いて比較したところ、Hyl の添加により多くのスポットが消失し、同

時にコントロールには見られなかった新たなスポットが出現していた(Fig. 12)。前項で示したように、Hylによって増殖抑制されていた菌は、再び増殖能を回復する。そのため、これらの結果は、菌体内のタンパク質合成の多くが Hyl によって阻害を受け、増殖が抑制される反面、生体を維持するために新たなタンパク質を合成していることが示唆された。

以上の結果から、Hyl が細胞内のタンパク質合成に強くかかわっていると考えられたため、細胞内代謝関連酵素の活性に与える Hyl の影響を調べた。根粒菌は根粒内では宿主からコハク酸、リンゴ酸などの形で炭素源を供給されており、また人工培養時には通常マンニトールを利用しているため、これら炭素源の代謝に関連のある酵素の活性発現におよぼす Hyl の影響を調べた。ED 経路は *Pseudomonas* 属菌で初めて見出された経路であり⁷⁸⁾、ED 酵素は 6-ホスホグルコン酸からピルビン酸合成系の主要な酵素で、根粒菌にも存在することが報告されている⁷⁹⁻⁸¹⁾。実験の結果、Hyl がこれらの酵素活性には影響しないことが明らかになった。しかし、NADP⁺ および NAD⁺ 依存型 G6PDH、NADP⁺ 依存型 6PGDH、あるいは IDH の活性は低下したことから、Hyl は ED 以外の経路に影響を与える可能性が考えられた。一方、グルタミン酸の合成経路に関わる酵素 (GDH、あるいは GOGAT) の活性は 1.5 倍から 2 倍に著しく増加していた(Table 6)。さらに同条件で培養した菌の無細胞抽出液の活性染色によるザイモグラムの比較では、共通の位置に見られたバンドの多くはコントロールよりも活性が低かったが、逆に高くなったバンドや新しく出現したバンドもいくつか見られた(Fig. 13)。これらの結果は、Hyl が多くの酵素系に抑制的に影響し、根粒菌のタンパク質の合成が阻害されるため、菌の増殖が抑制されることを示している。Hyl 添加によるこれらのアイソザイムパターンの変化は複雑であり、今後の詳細な検討が不可欠と考えられる。

第5節 要約

R. leguminosarum bv. *phaseoli* USDA2676 および *S. fredii* USDA191 を接種して得られた根粒中のアミノ酸分析の結果、Hyl など 5 種のアミノ酸およびその他のアミノ化合物が多く含まれていた。これらのアミノ酸およびその他のアミノ化合物を加えた時の *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 の増殖は、Hyl を加えた場合にのみ強く抑制された。11 株の fast grower の根粒菌の増殖は 1 mM の Hyl で著しく抑制され、2 株の slow grower の根粒菌は 10 mM で抑制効果が見られたが、枯草菌や酵母では Hyl による影響がほとんど見られなかった。この Hyl に見られた作用は、リシンやメチルリシンには全く認められず、また Hyl とリシンが共存しても Hyl の増殖抑制効果は変わらなかった。さらにアナログ拮抗阻害で知られるエチオニンを加えた場合と比較しても作用に違いが見られたことから、Hyl の増殖抑制の作用機構が、アナログとしての拮抗的な阻害作用ではないことが明らかになった。

R. leguminosarum bv. *phaseoli* USDA2676 の増殖はその増殖時期によらず抑制され、同時に Hyl の細胞内への取り込みが見られた。また、Hyl 存在下で培養した細胞のラジオアイソトープの取り込み実験により、Hyl が RNA およびタンパク質の合成を阻害して菌の増殖を抑制している可能性が示唆された。これは無細胞抽出液を用いた PAGE の結果、多くのタンパク質スポットが消失し、同時に新たなスポットも出現したことから、生体内のタンパク質合成が Hyl によって著しく阻害されるとともに新規のタンパク質が合成されたことが確認された。また Hyl の添加により、細胞内の代謝関連酵素の活性と、ザイモグラムパターンに差異が生じたことから、Hyl は根粒菌の酵素系に影響を与えている可能性が示唆された。