

第3章 バクテロイドへの分化における ヒドロキシシリシンの役割

第1節 目的

土壤中に生息している根粒菌はフリーリビング細胞（単生菌）の状態、桿状である。しかし、宿主植物に感染して根の表皮細胞を肥大化させ、根粒を形成した後、その感染細胞内でバクテロイドと呼ばれる特殊な細胞に形態変化し、窒素固定能を有するようになる。バクテロイドの増殖に関しては、これまで、ポリアミンの一つであるスペルミジンが増殖抑制効果を持っていることが報告されているが^{39, 41)}、アミノ化合物がバクテロイドの増殖や形態変化に与える影響に関する報告はない。本章ではバクテロイドの増殖に与える Hyl の影響を調べるとともに、フリーリビング細胞からバクテロイドへの分化における Hyl の役割を明らかにすることを目的とした。

第2節 実験材料および方法

2.1 使用菌株および種子

接種菌には *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676、宿主にはインゲンマメ種子 [*Phaseolus vulgaris* (L.) cv. Taishoukintoki] を用いた。

2.2 使用培地

菌株の保存には第2章 第2節で示した組成の YEM 培地を、培養には MM、あるいは10倍希釈したバクテロイド用 YEM 培地 [0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.8 g K_2HPO_4 , 0.2 g KH_2PO_4 , 0.1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 g mannitol, 1.0 g yeast extract, 0.1 g NaCl / L distilled water (pH6.8)] を使用した。

2.3 植物栽培

接種菌には *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676、宿主はインゲンマメ [*P. vulgaris* (L.) cv. Taishoukintoki] を用い、菌液の調製および接種栽培は、第2章第2節と同じ方法で行った。

2.4 バクテロイドの増殖測定

1) バクテロイド懸濁液の調製

第2章第2節の手順で接種栽培した宿主植物体から、形成された根粒 (約 0.1 g) を採取した。根粒を滅菌蒸留水で十分に洗浄した後、70%エタノールで洗浄し、滅菌蒸留水で2回水洗いした。さらに10%の次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌した後、滅菌蒸留水で十分水洗いした。この根粒をあらかじめ2 mlの1%塩化ナトリウムを入れて滅菌した試験管 (10 mm ϕ \times 90 mm) に移し、ガラス棒で破碎した。1分間静置した後、上清を1.5 ml容のチューブに移してバクテロイド懸濁液とした。

2) 平板培養法による増殖測定

MMあるいはバクテロイド用 YEM 培地 (10倍希釈) に Hyl を終濃度 1 mM の濃度で添加し、1.5%寒天を加えた後、オートクレーブで15分間加熱して寒天を溶解した。これらの培地を滅菌済のプラスチックシャーレに約 30 ml ずつ無菌的に注ぎ入れ、寒天が固まるまで静置した。この寒天培地に、上記のように調製したバクテロイド懸濁液の 50 μ l あるいは 100 μ l を塗布し、30 $^{\circ}$ Cで12日間培養し、その間のコロニー形成状況を経時的に観察した。

3) 菌液濁度法による増殖測定

あらかじめ5 mlのMMを入れて滅菌した試験管 (13 mm ϕ \times 150 mm) に、終濃度 1 mM の Hyl を無菌的に添加し、上記のように調製したバクテロイド懸濁液の 0.1 ml を入れ、100 strokes / min、30 $^{\circ}$ Cで往復振とう培養した。菌の増殖は菌液の OD₆₆₀ nm の吸光値で測定した。

2.5 バクテロイドおよびフリーリビング細胞の形態観察

フリーリビング細胞の *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 を、MM に懸濁して対数増殖中期まで前培養した。また、インゲンマメ (*P. vulgaris* (L.) cv. Taishoukintoki) の種子を表面殺菌し、第 2 章第 2 節のように調製した同菌株の懸濁液を接種した後、第 2 章第 2 節と同条件で 50 日間栽培し、根に着生した根粒から前述のようにバクテロイド懸濁液を調製した。あらかじめ 5 ml の MM を入れて滅菌した試験管に、1 mM の終濃度で Hyl を無菌的に添加し、0.1 ml のフリーリビング細胞の前培養菌液、あるいはバクテロイド懸濁液を加えて培養した。培養した各細胞は、一般固定染色法(フクシン染色)により染色した後、光学顕微鏡(10×100 倍)で観察した。

2.6 細胞内ポリヒドロキシ酪酸(PHB)の定量⁸²⁾

フリーリビング細胞を MM で前培養した後、あらかじめ 200 ml の MM を入れた 500 ml 容の三角フラスコに 4 ml の前培養菌液を入れ、30℃、150 rpm で旋回振とう培養した。培養菌液を 4℃、10 分間、8,000 rpm で遠心分離して上澄液を除き、沈殿を 30 ml の PBS で洗浄した。洗浄後の菌液を 4℃、8,000 rpm で 10 分間遠心分離して上澄液を除いた後、沈殿を 4 ml の上記と同じ緩衝液に懸濁してスクリーューキャップ付きのガラスチューブに移し、4℃、8,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上澄液を除き、キャップをはずしたチューブをドライバス上に置き、沈殿を 100℃ で 1 時間、乾燥させた。乾燥後、1 ml の濃硫酸を加え、再びキャップをして 90℃ で 30 分間、ドライバス上で処理し、PHB をクロトン酸に解重合した。冷却後、0.05% の H_3PO_4 で希釈し、フィルター(ミリポア社製、ポアサイズ 0.45 μm)でろ過して試料とした。これらの試料中のクロトン酸の含量を高速液体クロマトグラフィー(JASCO 社製、イオン交換樹脂：日立カスタム #2618, 溶離液：0.05% H_3PO_4 , Flow rate : 0.3 ml / min)で分析定量し、細胞内の PHB 含量を求めた。

第3節 実験結果

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

R. leguminosarum bv. *phaseoli* USDA2676 を宿主植物であるインゲンマメ (*P. vulgaris* (L.) cv. Taishoukintoki) の種子に接種し、得られた根粒からバクテロイドを分離した。得られたバクテロイドを、1 mM あるいは 5 mM の Hyl を加えた寒天 MM 上で培養し、形成されたコロニーの観察によって増殖速度を比較した (Fig. 14)。Hyl 無添加の培地では、培養開始から 6 日目からコロニー形成が確認されたが、Hyl を 1 mM 以上の濃度で加えた培地ではコロニーの形成は認められず、強く抑制されていた。次に 1 mM の Hyl を添加した液体 MM を用い、同菌株のバクテロイドの増殖を調べ、同時に同菌株のフリーリビング細胞の増殖を同条件で測定し、バクテロイドの増殖と比較した (Fig. 15)。フリーリビング細胞の増殖は、Hyl 無添加では短い誘導期の後増殖を開始し、測定開始から 3 日から 4 日間で定常期となった。また、Hyl を添加した場合は 3 日間増殖が停止し、その後回復して測定開始から約 10 日後にはコントロールの約 70% まで増殖した。一方バクテロイドでは、Hyl 無添加の場合、測定開始 3 日後から増殖が始まり、10 日後にはフリーリビング細胞と同程度まで増殖したが、Hyl を添加した培地では、測定した少なくとも 10 日目までは増殖する傾向が全く認められなかった。

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

R. leguminosarum bv. *phaseoli* USDA2676 のフリーリビング細胞あるいは宿主植物根粒から分離したバクテロイドを Hyl 存在下あるいは非存在下で培養し、細胞の形態を一般染色法 (フクシン染色) で観察した (Fig. 16)。このとき、培養開始直後の菌体の長さは、フリーリビング細胞では $1\mu\text{m}\sim 2\mu\text{m}$ であった (Fig. 16A)。Hyl を加えていない培地でフリーリビング細胞を培養した場合、培養開始後 2 日から 8

日の間、菌体の長さに変化は認められず、約 $1\mu\text{m}$ ~ $2\mu\text{m}$ で一定していた(Fig. 16B)。しかし、 1 mM のHylを加えて培養した場合には、6日から8日の間に長さが $3\mu\text{m}$ ~ $4\mu\text{m}$ に達した細胞が多く見られ、Y字型に分岐した細胞もいくつか認められた(Fig. 16C)。一方、バクテロイドの形態観察では、培養開始直後の細胞の長さは $3\mu\text{m}$ ~ $4\mu\text{m}$ であり、いくつかのY字型に分岐した細胞が観察された(Fig. 16D)。Hylを加えない培地で培養して2日後から9日の間、細胞の長さは次第に短くなり、9日後には $1\mu\text{m}$ ~ $2\mu\text{m}$ 程度になった(Fig. 16E)。しかし、 1 mM のHylを添加した場合、9日後でも長さは $3\mu\text{m}$ ~ $4\mu\text{m}$ に維持されていた(Fig. 16F)。

3.3 ヒドロキシリシン存在下での polyhydroxybutyrate (PHB)含量の変化

Hyl存在下で培養した *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 のフリーリビング細胞について、バクテロイドのマーカ物質である PHB の含量の変化を調べた(Fig.17)。Hyl を加えないで培養した場合、細胞内の PHB 含量は培養開始から2日後に $0.2\text{ mg crotonic acid/mg dry weight of cell}$ 程度まで増加したが、その後次第に減少し、10日後には培養開始直後の含量と同程度まで減少した。一方、Hyl存在下で培養した細胞では、培養開始後2日目から PHB 含量が増加し始め、10日後にはコントロールの約3.5倍 ($0.38\text{ mg crotonic acid / mg dry weight of cell}$)まで増加した。

第4節 考察

4.1 バクテロイドの増殖に与えるヒドロキシリシンの影響

根粒菌のフリーリビング細胞の再分離には、酵母エキス-マンニトール培地(YEM)が広く用いられる。この培地はバクテロイドのコロニー形成率が非常に低いとされていたが⁸³⁾、その後ダイズ根粒菌のバクテロイドが10倍希釈のYEM培地で高いコ

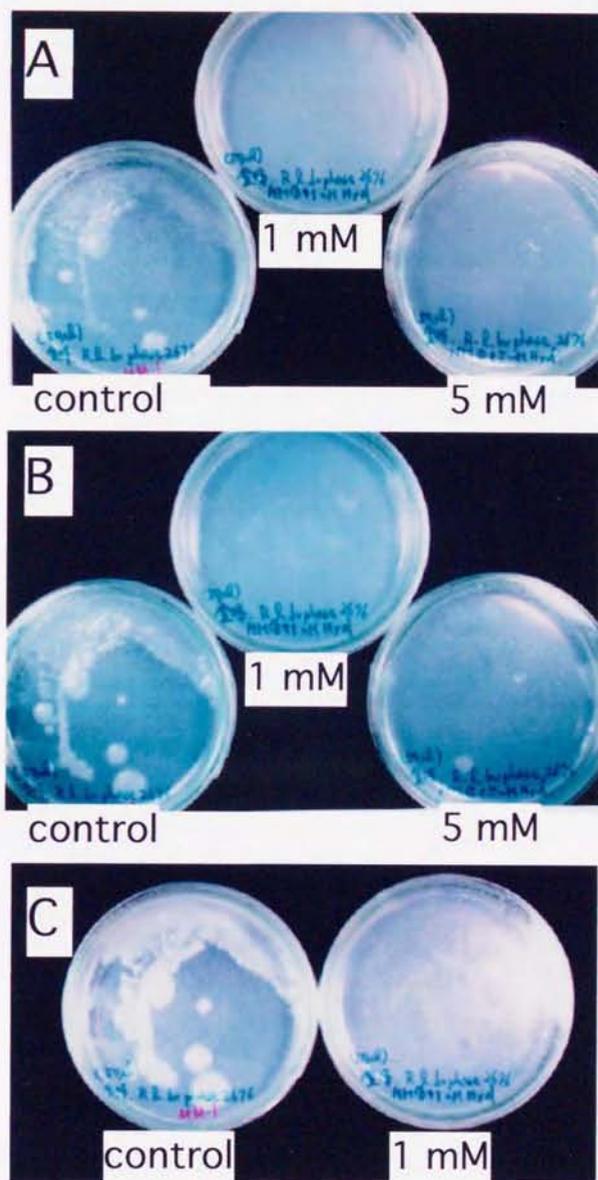


Fig. 14. Effect of Hyl on the growth of bacteroids of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676.

Bacteroid cultures were prepared as described in Materials and Methods, and incubated on the plate of minimal medium with Hyl (1 mM, 5 mM) for (A) 6 d, (B) 9 d, or (C) 12 d.

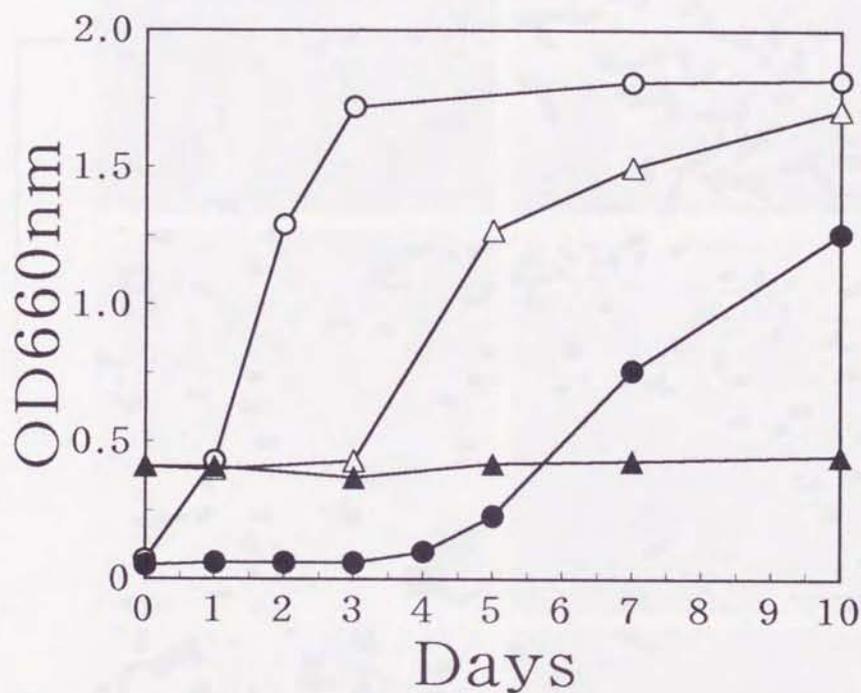


Fig. 15. Effects of Hyl on the growth of free-living cells and bacteroids of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676.

One-tenth ml of free-living cells (circles, 48-h-old cultures) or the bacteroid suspensions (triangles) of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 was transferred to 5 ml of minimal medium with (●, ▲) or without (○, △) Hyl (1 mM) at 0 day and incubated at 30°C aerobically.

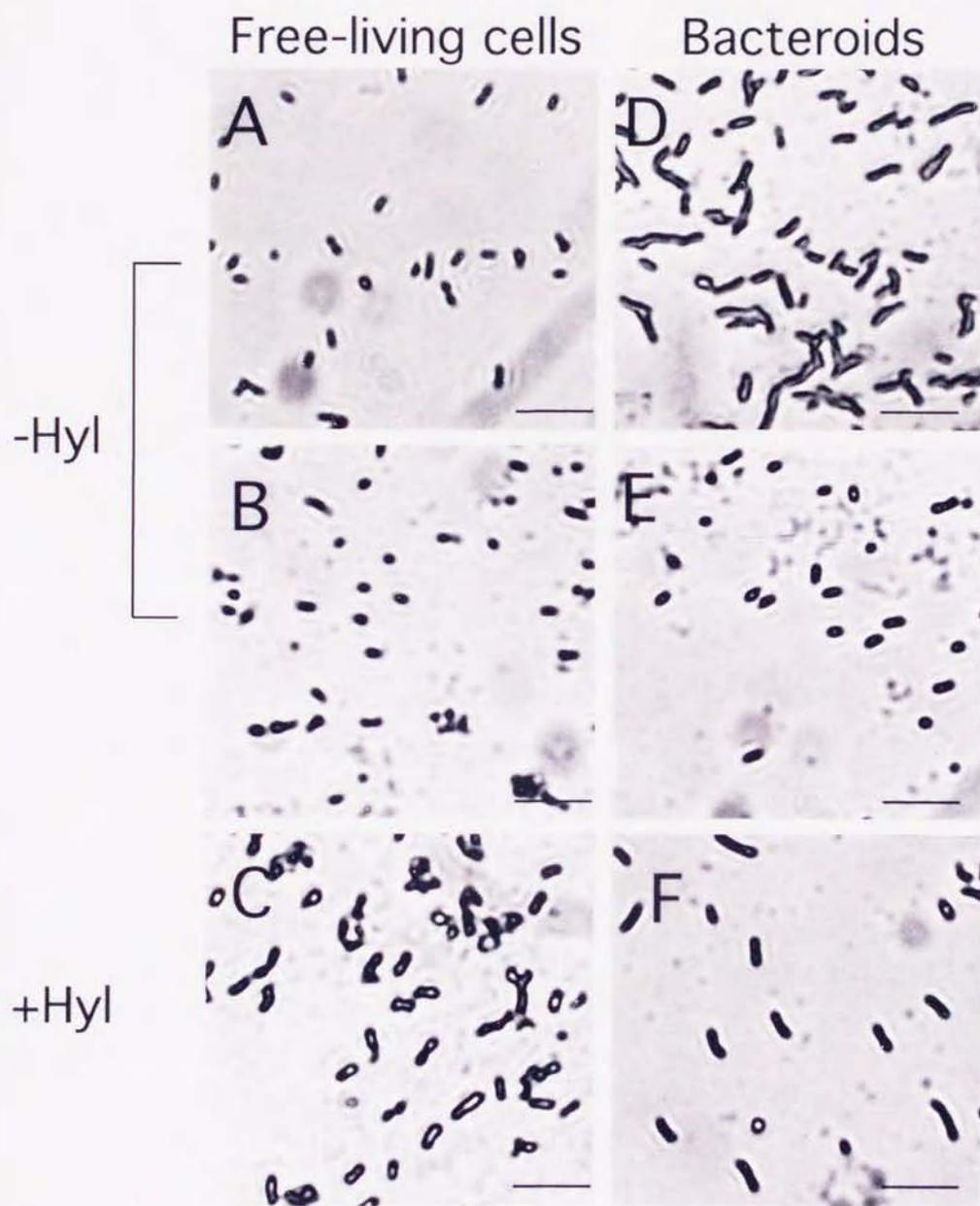


Fig. 16. Light micrographs of free-living cells (A, B and C) and bacteroids (D, E and F) of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 incubated in minimal medium with (C, F) or without (A, B, D and E) Hyl (1 mM) at 30°C aerobically.

Free-living or bacteroid cultures were prepared as described in Material and Methods, and after staining by Fuchsin, the cells were observed by microscope (1,000×). Bars, 10 μm (all panels). Incubation periods ; A and D : 1d, B and C : 8d, E and F : 9d.

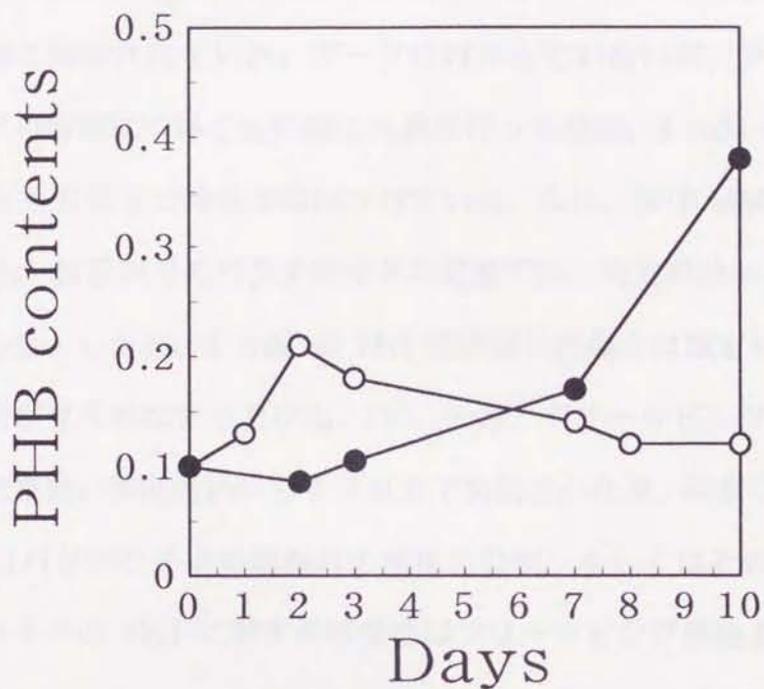


Fig. 17. Effects of Hyl on PHB contents in *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 incubated in minimal medium with (●) or without (○) Hyl (1 mM).

The cultures of free-living cells were prepared as described in Fig. 15. A portion of the culture was withdrawn after addition of Hyl at zero day and PHB contents in the cells were measured as described in Materials and Methods. PHB contents were expressed as mg of crotonic acid per mg dry weight of cell.

コロニー形成率を示すことが報告された³⁹⁾。予備実験では、寒天 MM でのバクテロイドのコロニー形成率が 10 倍希釈した YEM 培地と同程度であったため、本実験では 1 mM あるいは 5 mM の Hyl を添加した寒天 MM を用いて USDA2676 のバクテロイドのコロニー形成速度を比較した(Fig. 14)。その結果、1 mM あるいは 5 mM の Hyl を加えた培地ではコロニー形成が認められず、培養開始後少なくとも 12 日目までは強く抑制されていた。データには示していないが、クローバー根粒菌のバクテロイドの増殖についても同様に実験を行った結果、1 mM の Hyl で培養開始後少なくとも 6 日目まで増殖が抑制されていた。次に、液体 MM を用いて増殖測定した場合、Hyl 無添加でのバクテロイドの培養では、培養開始から 3 日間の遅滞期の後に増殖した。しかし、1 mM の Hyl を添加した場合は測定した 10 日目までは増殖する傾向が見られなかった(Fig. 15)。一方、フリーリビング細胞の増殖は、Hyl を添加した場合、測定開始から 4 日目まで抑制された後、回復した。これらの結果から、Hyl はバクテロイドの細胞数の増加を抑制、もしくはその維持に作用しており、バクテロイドの Hyl に対する感受性はフリーリビング細胞よりも高い可能性が考えられた。

4.2 バクテロイドおよびフリーリビング細胞の形態変化におけるヒドロキシシリシンの役割

一般的に液体培地でバクテロイドを培養した場合、細胞はもとのフリーリビング細胞にもどって増殖するとされている。したがって、Hyl がバクテロイドにおよぼす影響は、増殖抑制よりもフリーリビング細胞への脱分化を阻害している可能性が考えられた。そこで Hyl を加えた液体培地でのフリーリビング細胞およびバクテロイドの形態を観察した(Fig. 16)。その結果、Hyl 無添加の培地ではフリーリビング細胞の大きさに変化が見られなかったが、Hyl を添加した場合には、長さが約 2 倍以上になった細胞が認められ、また分岐が生じてバクテロイド様に変化した細胞も

存在した。一方、バクテロイドでは Hyl 無添加の場合、細胞の長さが次第に小さくなり、9 日目にはフリーリビング細胞と同程度の長さになった。また Hyl 存在下では、細胞数の増加が抑制され、細胞の長さはほとんど変化が認められずに維持されていた。さらに、バクテロイドのマーカ物質の一つとして知られている PHB について、Hyl 存在下で培養したフリーリビング細胞を用い、その PHB 含量の変化を Hyl 無添加の場合と比較した(Fig. 17)。その結果、Hyl 無添加では細胞内の PHB 含量は 0.1 から 0.2 (mg crotonic acid/mg dry weight of cell)の間であったが、Hyl を加えて培養した場合、培養開始から約 8 日目から著しく増加し、10 日目には 0.38 に達した。これは、Fig. 16 で細胞の長さに十分変化が認められた時期と一致している。

Urban と Dazzo は、コハク酸存在下で *R. leguminosarum* bv. *trifolii* の形態がバクテロイド様に変化したことを報告した⁸⁴⁾。また、Alicia らは、コハク酸の添加によって *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti* のフリーリビング細胞の増殖が抑制されるとともに、細胞のサイズが増加すると報告している⁸⁵⁾。しかしこれらの報告では、バクテロイドのマーカ物質である PHB 含量の細胞中における変化については述べられていない。また、Karr らは成熟根粒中から分離した *Rhizobium* (*Bradyrhizobium*) *japonicum* のバクテロイドの PHB 含量は、細胞乾重量の 40% から 45% (約 0.4 から 0.45 mg crotonic acid/ mg dry weight of cell に相当)であると報告している⁸²⁾。本実験の結果では、Hyl 存在下で培養したフリーリビング細胞が、バクテロイド様に形態変化するとともに、細胞内の PHB 含量がバクテロイドに含まれる量に十分近い値まで増加した。また、根粒中のバクテロイドでは、窒素固定活性とこれに関連した酵素活性が増加することが知られている。前章で述べたように、Hyl を添加してフリーリビング細胞を培養した場合、GDH および GOGAT などのアミノ酸生合成に関わる酵素活性が、約 1.9 倍、2.1 倍に増加した(Table 6)。これらの結果から、Hyl がフリーリビング細胞およびバクテロイドの増殖を抑制するだけでなく、両者間のダイナミックな形態および機能の変化にも関与しているこ

とが示唆された。

第5節 要約

R. leguminosarum bv. *phaseoli* USDA2676 のバクテロイドはフリーリビング細胞よりも Hyl に対して高い感受性を示した。また、Hyl を添加して培養すると、フリーリビング細胞の長さが増加する傾向が見られ、バクテロイド様の長さ(約 $5\mu\text{m}$)に達し、分岐した細胞が見られた。さらに、細胞内のポリヒドロキシ酪酸の含量の著しい増加が見られたことから、Hyl は根粒菌の増殖を抑制するとともに、バクテロイドへの分化に作用している可能性が示唆された。