

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

第1節 目的

これまで、種子および根の分泌物あるいは抽出物による、根粒菌の増殖および根粒形成能や窒素固定能に対する影響について多くの研究が行なわれている。例えば、根粒菌(*R. leguminosarum* bv. *phaseoli*)は宿種であるインゲンマメ種子の周辺で著しく増殖することが報告されており⁸⁶⁾、その一方で種子の種類によっては根粒菌の根におけるコロニゼーションの頻度が著しく低く、根粒が形成されにくい場合があることが報告されている⁸⁷⁾。前章まで、Hylの培地への添加によって根粒菌の増殖および生理活性に著しい影響が見られたことを報告したが、実際の根圏でのHylの役割を知ることは、根粒菌の有効性を高めるために重要と考えられる。本章では、宿主根周辺におけるHylの存在と根粒菌の接種によるHyl含量の変化、あるいはHylによる根粒形成および窒素固定活性への影響を調べるとともに、Hyl存在下での根粒菌の感染過程を観察し、根圏でのHylの役割について検討を加えた。

第2節 実験材料および実験方法

2.1 使用菌株および種子

接種菌には、*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676、*R. leguminosarum* bv. *trifolii* USDA2053、*S. fredii* USDA191、あるいは*B. japonicum* OUG117を使用した。宿主には、インゲンマメ種子[*P. vulgaris* (L.) cv. Taishoukintoki, cv. Himetebou、あるいは cv. Yukitebou]、ダイズ種子[*G. max* (L.) Merr. cv. Kitamusume]、あるいはクローバー種子[*T. pratense* (L.) cv. Start]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 を使用した。

2.3 菌の増殖測定

菌の増殖測定は、第2章第2節と同様の方法で行った。

2.4 インゲンマメ種子エタノール抽出液 (seed extract : SE)の調製

1) インゲンマメ SE の調製⁸⁸⁾

インゲンマメ [*P. vulgaris* (L.) cv. Taishoukintoki] の種子 1,000 粒を水洗後、滅菌蒸留水で 2 回すすぎ、0.01 N の塩酸に 15 分間浸した後、滅菌蒸留水で十分水洗した。種子を 1,000 ml の 50% エタノール (種子 1 粒につき 1 ml の割合) に浸し、37℃、100 rpm で 12 時間振とう抽出した。上澄液を 250 ml 容の遠沈管 (6 本) に移し、10,000 rpm で 15 分間遠心分離した後、ろ紙で吸引ろ過して沈殿を取り除いた。ろ過溶液をエバポレーターを用いて約 10 倍濃度 (約 100 ml) になるまで濃縮し、フィルター (ナルゲン社製 ; ポアサイズ 0.2 μ m) で除菌して 4℃ (長期保存の場合は -80℃) で保存した。

2) インゲンマメ SE 存在下の増殖測定

菌の前培養は、第2章第2節と同様の方法で行った。本培養は、あらかじめ 5 ml の培地の入った試験管 (13 mm ϕ \times 150 mm) に上記のように調製した SE 溶液を 50 μ l 添加し、さらに 1 mM の Hyl を加えた後、0.1 ml の前培養菌液を加えて 30℃、100 strokes / min で往復振とう培養した。菌の増殖は、OD_{660 nm} の吸光値で測定した。

2.5 植物組織中あるいは根圏のアミノ酸およびその他のアミノ化合物の分析

1) 種子および実生の浸出液あるいは根の抽出液の調製⁸⁸⁾

第2章第2節の栽培時と同様に表面殺菌したダイズ種子 [*G. max* (L.) Merr cv. Kitamusume]、インゲンマメ種子 [*P. vulgaris* (L.) cv. Taishoukintoki]、あるいはクローバー種子 [*T. pratense* (L.) cv. Start] をあらかじめ滅菌したシャーレに入れ、種子1粒につき1 ml (クローバー種子は4粒につき1 ml) の滅菌蒸留水あるいは第2章第2節と同じ手順で調製した菌の懸濁液 (10^6 cells / ml) を加え、アルミホイルで光を遮断してグロースチャンバー内 (明期 14 時間、22°C、暗期 10 時間、16°C) に静置した。18 時間後、無菌的に培養液を 1 ml 採取して種子の浸出液とした。また、それらをさらに 30 時間培養した後、それぞれに 4 ml / seed (クローバー種子の場合は 4 ml / 4 seed) の滅菌蒸留水を無菌的に加えて培養し、4 日後の培養液を実生浸出液とした。種子の幼根を採取し、0.2 N の過塩素酸でアミノ酸 およびその他のアミノ化合物を抽出した後、炭酸カリウムで pH 4.0 から pH 6.0 に調整し、これを幼根抽出液とした。各浸出液および抽出液はフィルター (ミリポア社製、ポアサイズ $0.2 \mu\text{m}$) でろ過し、HPLC 分析試料として用いた。

2) 根粒中のアミノ酸およびその他のアミノ化合物の抽出

根粒中のアミノ酸 およびその他のアミノ化合物の抽出は、第2章第2節と同じ手順で行った。

3) 宿主植物体中のアミノ酸その他のアミノ化合物の抽出

第2章第2節と同じ手順で栽培した宿主植物体の各組織 (根、茎、葉) 1.0 g に対し、0.3 g の海砂および 2 ml の 0.2N 過塩素酸を加えて乳鉢中で破碎し、4°C、12,000 rpm で 15 分間、遠心分離した。上澄液を 1.5 ml 容のチューブに移し、乳鉢中に残った試料に 1 ml の蒸留水を加えて 4°C、12,000 rpm で 15 分間、遠心分離した。それぞれの上澄液を合わせ、硝酸カリウムを加えて pH 4.0 から pH 6.0 に調整した。生じ

た過塩素酸カリウムの沈殿を 4℃、12,000 rpm で 15 分間、遠心分離する操作で除去し、-80℃で保存した。使用時には、自然解凍した試料を再び 4℃、12,000 rpm で 15 分間遠心分離した後に、上澄液をフィルター(ミリポア社製、ポアサイズ 0.45 μ m)でろ過して HPLC 分析試料として用いた。

4) 各浸出液あるいは抽出液のアミノ酸分析

調製したサンプル中のアミノ酸およびその他のアミノ化合物は、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 New8000 シリーズ S、AA pak Li⁺カラム)で分析した。

2.6 根粒数、根粒乾燥重量およびアセチレン還元活性(ARA)測定⁸⁹⁾

第 2 章第 2 節と同じ手順で栽培した接種後 40 から 50 日目の宿主植物体の根部を洗浄し、1,000 ml 容のガラスポットに入れた後、ポットにゴム栓付きの蓋をしてパラフィルムで密閉した。ゴム栓からシリンジを用いて各ポット内の空気を 100 ml (ポット内の空気量の 10%)抜き、同量のアセチレンガスを注入した後、30℃で 1 時間インキュベートした。ポット内から 1 ml の空気をシリンジで抜き取り、ガスクロマトグラフィー(日立社製、K53、検出器:FID、カラム:PORAPAK N50~80 mesh、カラム温度:50℃、インジェクション温度:150℃、流速:30 ml/min)でエチレン生成量を分析した。植物体をポットから取り出し、根粒数を計測した後、根粒を分離してデシケーターで一晩乾燥させ、重量を測定した。

2.7 GFP (Green Fluorescent Protein)遺伝子挿入菌株の作成と感染過程の観察

1) プラスミド

蛍光タンパク質(GFP)がコードされた遺伝子を持つプラスミド pTB93F(8.0 kb)⁹⁰⁾は、Dr. Gage (Department of Biological Sciences, Stanford University, Stanford)より譲渡された。その他、実験に使用した菌株およびプラスミドを Table 7

Table 7. Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Strains		
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> USDA2676		This lab
<i>Escherichia coli</i> pRK2013	Km ^r	This lab
<i>Escherichia coli</i> DH1		90
Plasmid		
pTB93F	ptrp-GFP-S65T ¹⁾ in pMB393. Sp ^r Cm ^r	90

1) GFP which contains threonine in place of serine at amino acid residue of 65.

に示した。

2) 根粒菌への GFP 遺伝子の挿入⁹¹⁻⁹³⁾

pTB93F をエレクトロポレーションを用いて *Escherichia coli* DH1 に挿入し、これを供与菌として用いた。*E. coli* pRK2013 (ヘルパープラスミド) および *E. coli* DH1(pTB93F) は、カナマイシン (50 $\mu\text{g} / \text{ml}$) あるいはスペクチノマイシン (100 $\mu\text{g} / \text{ml}$) をそれぞれ含む 3 ml の LB 培地 [10 g Bacto tryptone, 10 g NaCl, 5 g yeast extract (pH 7.5)] で各 2 本ずつ 30°C、100 strokes / min で一晩、往復振とう培養した。また、受容菌には *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 を用い、3 ml の TY 培地 [3 g yeast extract, 0.872 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 g Bacto tryptone (pH 6.8)] で各 2 本ずつ 30°C、100 strokes / min で一晩往復振とう培養した。1.5 ml 容のチューブに 100 μl の *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 の培養菌液および各 40 μl の両 *E. coli* の培養菌液を入れ、4°C、10,000 rpm で 1 分間遠心分離し、上澄液を除去した。ペレットを 1 ml の滅菌蒸留水に懸濁し、4°C、10,000 rpm で 1 分間遠心分離して上澄液を除去する操作を 2 回繰り返した後、ペレットを約 50 μl の滅菌蒸留水に懸濁した。TY 寒天培地上にマス目入り滅菌済フィルター (ミリポア製ニトロセルロースフィルター、13 mm ϕ 、ポアサイズ 0.45 μm) を無菌的に載せ、4 マス分に 50 μl の混合菌液をしみ込ませて 25°C で一晩インキュベートし、メーティングした。*E. coli* DH1 (pTB93F)、*E. coli* pRK2013、あるいは *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 のみの懸濁液についても同様の操作を行い、ネガティブコントロールとして用いた。メーティング後、フィルターごと細胞を切り出し、それぞれを 1 ml の滅菌蒸留水の入ったチューブに入れてフィルター上の細胞を懸濁した後、フィルターを取り除いた。それぞれの懸濁液は滅菌蒸留水で適当な細胞濃度 (10 倍から 10^5 倍) に希釈し、この 100 μl をスペクチノマイシン (200 $\mu\text{g} / \text{ml}$) およびクロラムフェニコール (150 $\mu\text{g} / \text{ml}$) を含む選択培地 (最少培地) [1.35 g sodium succinate, 1.1 g sodium glutamate, 0.22 g K_2HPO_4 , 0.1 g MgSO_4 , 0.22 g FeCl_3 ,

0.44 CaCl₂, 0.0001 g thiamine-HCl, 0.0002 g biotin / L distilled water (pH 7.0)] に塗布した後、25℃で3日から5日間インキュベートした。ネガティブコントロールのコロニーが出現しないのを確認し、形質転換した根粒菌のコロニーを適量のカナマイシン、およびクロラムフェニコールを含む上記最少培地に単離し、GFP 変異株とした。増殖させた GFP 変異株は以下で示す条件で蛍光を発色した。

3) GFP 変異株を用いた感染過程の観察

インゲンマメ種子 [*P. vulgaris* (L.) cv. Yukitebou] をシードバッグを用いて第 2 章 2.4 と同じ手順で接種せずに栽培し、発芽後(栽培開始後 4 日から 5 日) に上記の GFP 変異株(10⁶ cells / ml) を接種した。主根より 2 cm から 3 cm 部分の側根を切り取り、光学および蛍光顕微鏡で観察した。顕微鏡は、オリンパス社製システム生物顕微鏡 BHS、落射蛍光顕微鏡 BHS-RFK / BHT-RFK、落射蛍光装置 BH2-RFK(励起フィルター : BP490、吸収フィルター : 20B-460-W、補助励起フィルター : EY455)あるいは倒立型システム顕微鏡 1×70、倒立型落射蛍光顕微鏡装置 1×-FLA(励起フィルター : BP470-490、吸収フィルター : BA515IF, U-MNIBA)を用いた。

第 3 節 実験結果

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

MM に 0.1 mM、1 mM、あるいは 10 mM の Hyl を加え、*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 あるいは *B. japonicum* OUG117 の増殖に与える影響を比較した(Fig. 18)。*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 の場合、1 mM Hyl 存在下では増殖が強く抑制され、0.1 mM 程度の Hyl 濃度でも培養開始から約 30 時間は増殖する傾向が見られなかった(Fig. 18A)。一方、*B. japonicum* OUG117 の場合

は、1 mM の Hyl 存在下ではコントロールとほぼ同程度の増殖が見られたが、10 mM の Hyl 濃度では少なくとも 240 時間まで増殖が著しく抑制された(Fig. 18B)。

MM に 1 mM の Hyl とともに、インゲンマメ種子 [*P. vulgaris* (L.) cv. Taishoukintoki] のエタノール抽出液 (seed extract : SE) を加えたときの *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 増殖を測定し、SE あるいは Hyl のみを加えたときの増殖と比較した(Fig. 19)。SE のみを加えた場合、菌の増殖速度はコントロールよりも速くなり、40 時間後の OD_{660nm} の吸光値で 2.0 に達した。また、Hyl と SE を共存させた場合、Hyl のみの添加で見られたような強い増殖抑制は全く認められず、コントロール以上の増殖速度となり、100 時間後の吸光値は 2.0 に達した。

3. 2 宿主種子および実生浸出液あるいは根抽出液中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

ダイズ品種キタムスメ- *B. japonicum* OUG117 あるいはインゲンマメ品種大正金時-*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 の組み合わせで接種した時の、種子浸出液、幼根抽出液、あるいは根粒抽出液中の Hyl 含量を HPLC で分析した結果を Table 8 に示した。ダイズ種子浸出液(接種後 18 時間目)の Hyl 含量は、15.2 nmol / seed であったのが、144 時間後の実生浸出液では 4.8 nmol / seed まで減少した。インゲンマメ種子の場合、種子浸出液では 7.3 nmol / seed であったのが実生浸出液では 21.6 nmol / seed まで増加した。幼根抽出液中の Hyl 含量は、ダイズでは 0.44 μ mol / g wet weight であり、インゲンマメでは 0.24 μ mol / g wet weight であった。根粒中の Hyl 含量は宿主植物体の栽培日数によって違いが見られ、70 時間目の根粒中の含量が最も多く、それぞれ 0.76、0.41 μ mol / g wet weight であった。

宿主にダイズ [*G. max* (L.) Merr. cv. Kitamusume]、クローバー [*Trifolium pratense* (L.) cv. Start]、あるいはインゲンマメ [*P. vulgaris* (L.) cv.

Taishoukintoki]の種子、接種菌株に *B. japonicum* OUG117、*S. fredii* USDA191、*R. leguminosarum* bv. *trifolii* USDA2053 あるいは *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 を用い、Table 9 で示したように全ての組み合わせで接種したときの種子浸出液、あるいは幼根抽出液中の Hyl 含量を調べた(Fig. 20)。無接種の場合、18時間後の種子浸出液中の Hyl 含量は、全ての種子において5.2 から 13 nmol / seed であり、接種による変化はほとんど見られなかった(Fig. 20A)。一方、実生浸出液では、宿主に対応する菌株を接種したときに、非対応菌株を接種した場合に比べて Hyl 含量が低い傾向が見られた(Fig. 20B)。ダイズに対応菌株である *B. japonicum* OUG117 あるいは *S. fredii* USDA191 を接種した場合には、それぞれ 4.8 nmol、1.6 nmol (無接種の 39%、13%)であったが、非対応菌株の *R. leguminosarum* bv. *trifolii* あるいは bv. *phaseoli* を接種した場合にはそれぞれ 18.1 nmol、16.8 nmol であり、無接種の 1.5 倍、1.4 倍に増加した。クローバーに *R. leguminosarum* bv. *trifolii* USDA2053 を接種した場合は 3.4 nmol (無接種の 70%)に減少し、一方 *B. japonicum*、*S. fredii*、あるいは *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* を接種した場合、Hyl 含量はそれぞれ 12.4 nmol、38.2 nmol、49.6 nmol (無接種の 2.6 倍、8 倍、10.3 倍)であり、著しく増加した。また、インゲンマメに *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 を接種した場合の Hyl 含量は、*R. leguminosarum* bv. *trifolii* を接種した場合と同程度であったが、*B. japonicum* あるいは *S. fredii* を接種した場合に増加が認められた。また、幼根抽出液中の Hyl 含量は、接種、無接種に関わらず Hyl 含量に大きな変化は見られなかった(Fig. 20C)。

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

終濃度 0.1 mM あるいは 1 mM の Hyl を含む Norris and Date 氏液を用い、接種あるいは無接種で栽培したインゲンマメ [*P. vulgaris* (L.) cv. Yukitebou]の培地中

の Hyl 含量を HPLC で測定した(Fig. 21)。その結果、接種・無接種にかかわらず、培地中の Hyl は栽培日数とともに減少し、栽培開始から 21 日後には 0 に近い値まで減少した。

0.1 mM あるいは 1 mM の Hyl 存在下で接種栽培したダイズ [*G. max* (L.) Merr. cv. Kitamusume] あるいはインゲンマメ [*P. vulgaris* (L.) cv. Taishoukintoki] の、形成根粒数、根粒重量、あるいはアセチレン還元活性(ニトロゲナーゼ活性 : ARA) を調べ(Fig. 22)、また同条件で栽培した宿主植物根の形態を示した(Fig. 23)。宿主植物根における根粒形成数は、0.1 mM の Hyl を添加した場合、ダイズではコントロールの約 2/3 に、インゲンマメでは約 1/2 に減少した。また 1 mM の Hyl 存在下では、両菌株ともほとんど根粒は形成されなかった(Fig. 22)。またその時の根粒重量は、0.1 mM の Hyl の存在下では、ダイズでコントロールの約 85%、インゲンマメでは約 50% に減少し、1 mM の Hyl 存在下ではほとんど 0 に近い値であった(Fig. 22A, B)。これらの植物体を用いて ARA を調べたところ、0.1 mM の Hyl 存在下ではそれぞれコントロールの 78%、60%、1 mM では 22%、14% であった(Fig. 22C)。ダイズ、およびインゲンマメの根を観察したところ、いずれも添加した Hyl の濃度の増加に従って根の伸長が著しく抑制されるとともに根粒形成が抑制され、1 mM の Hyl 存在下では植物体の葉は黄変し、根が細くなった(Fig. 23)。同条件で栽培したインゲンマメの根の根毛を拡大して観察した(Fig. 24)。Hyl 無添加で栽培した場合、側根は正常に伸長していたが(Fig. 24A)、Hyl を加えて栽培した場合には著しく側根の伸長が抑制されていた(Fig. 24B)。

Hyl 存在下での無接種あるいは接種した植物体の生長を経時的に観察した。無接種の場合、栽培開始後 7 日目では Hyl の添加により根の伸長に遅れが生じ(Fig. 25A, D)、11 日目、38 日目も根の生育が著しく抑制されていた(それぞれ Fig. 25B, E, C, F)。また、接種した場合、栽培開始後 7 日目には大きな差は見られなかった(Fig. 26A, D)が、11 日目に比較した場合、Hyl 存在下では根の伸長が遅れ(Fig. 26B, E)、

38 日目はコントロールに比べて根の伸長が強く抑制されていた(Fig. 26C, F)。

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

蛍光タンパク質がコードされたプラスミド pTB93F を接合伝達法により *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 に挿入し、菌の宿主植物への感染段階を観察した(Figs. 29, 30)。挿入したプラスミドの遺伝子地図を Fig. 27 に示した。この菌は蛍光顕微鏡で観察した場合、菌体が黄緑色の強い蛍光を発した(Fig. 28)。この菌を接種したインゲン[*P. vulgaris* (L.) cv. Yukitebou]を、Hyl 非存在下および存在下で栽培し、根の表面、および根粒を光学顕微鏡で観察するとともに、同じ視野を蛍光顕微鏡で観察した(Figs. 29, 30)。Hyl 非存在下で接種栽培した植物体では、まず菌が根の表面に集まっているのが観察され(Fig. 29A, E)、その後感染糸を通じて入り込み(Fig. 29B, F)、形成された根粒中でも蛍光がはっきりと観察された (Fig. 29C, G および D, H)。また、Hyl 存在下と非存在下で接種した場合を比較すると、Hyl 非存在下では根粒中で菌が集まっているのがいくつか観察されたが(Fig. 30A, B)、Hyl 存在下では根粒も小さく、蛍光発色は認められなかった(Fig. 30C, D)。

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効果における種子抽出液の影響

Fig. 18 の増殖試験の結果、*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 の増殖は 0.1 mM 程度の Hyl で十分に影響し、*B. japonicum* OUG117 が 10 mM の濃度で増殖が抑制された結果と比較すると Hyl に対する感受性は相対的に高かった。このような Hyl の増殖抑制作用に対する、宿主種子由来の物質による影響を明らかにするため、インゲンマメ[*P. vulgaris* (L.) cv. Taishoukintoki]のエタノール抽出液(SE)を Hyl とともに培地に添加して調べた(Fig. 19)。その結果、Hyl のみの添加で見られた強い増殖抑制効果は全く認められず、最終的に菌液の吸光値が control よ

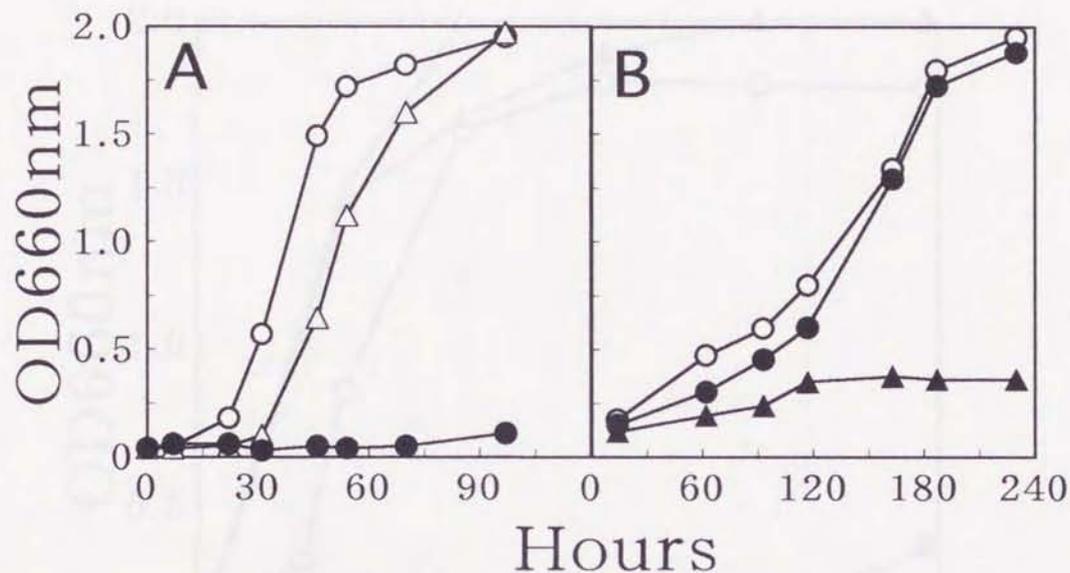


Fig. 18. Effects of Hyl on the growth of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 and *B. japonicum* OUG117.

One-tenth ml of forty-eight-hour-old cultures of (A) *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 or (B) *B. japonicum* OUG117 were transferred to 5 ml of minimal medium containing 0 mM (○), 0.1 mM (△), 1.0 mM (●) or 10 mM (▲) Hyl and incubated at 30°C aerobically.

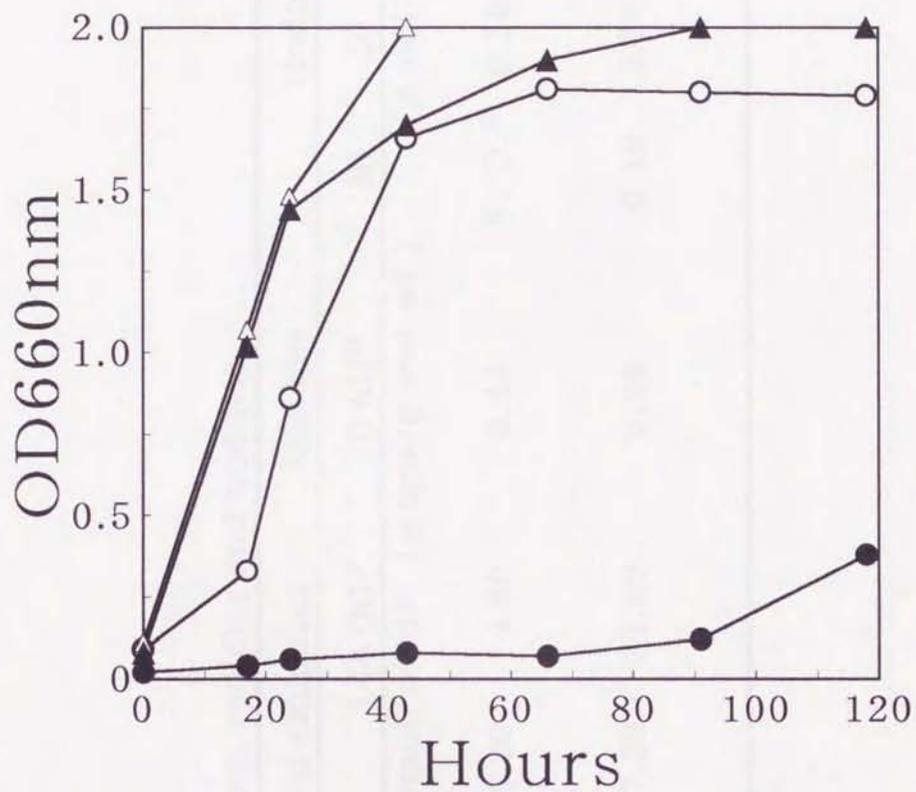


Fig. 19. Effect of seed extracts (SE) of *P. vulgaris* (L.) cv. Taishoukintoki on the growth of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 in the presence of Hyl.

The cells were grown in MM containing Hyl (1mM) (●), $\times 0.1$ strength SE (Δ), or both of them (\blacktriangle). The growth without additives was shown as open circles.

Table 8. Hyl contents in the seed exudates, radicles and nodules

Host plant	Strain	Seed exudates		Radicles		Nodules				
		18	144 (h) ¹⁾	10 (d) ¹⁾	30	50	70	90		
		(nmol/seed) (μ mol/g wet wt.)							(nmol/g wet wt.)	
<i>G. max</i> (L.) Merr. cv. Kitamusume	<i>B. japonicum</i> OUG117	15.20	4.80	0.44	N. D. ²⁾	0.38	0.76	0.33		
<i>P. vulgaris</i> (L.) cv. Taishoukintoki	<i>R. I. bv. phaseoli</i> USDA2676	7.30	21.60	0.24	0.19	0.26	0.41	0.23		

1) periods (days or hours) after the inoculation.

2) not determined.

Table 9. Host plants used in this study

Host plant	Corresponding strain
<i>Glycine max</i> (L.) Merr. cv. Kitamusume	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> OUG117 <i>Sinorhizobium fredii</i> USDA191
<i>Phaseolus vulgaris</i> (L.) cv. Taishoukintoki	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> USDA2676
<i>Trifolium pratense</i> (L.) cv. Start	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> USDA2053

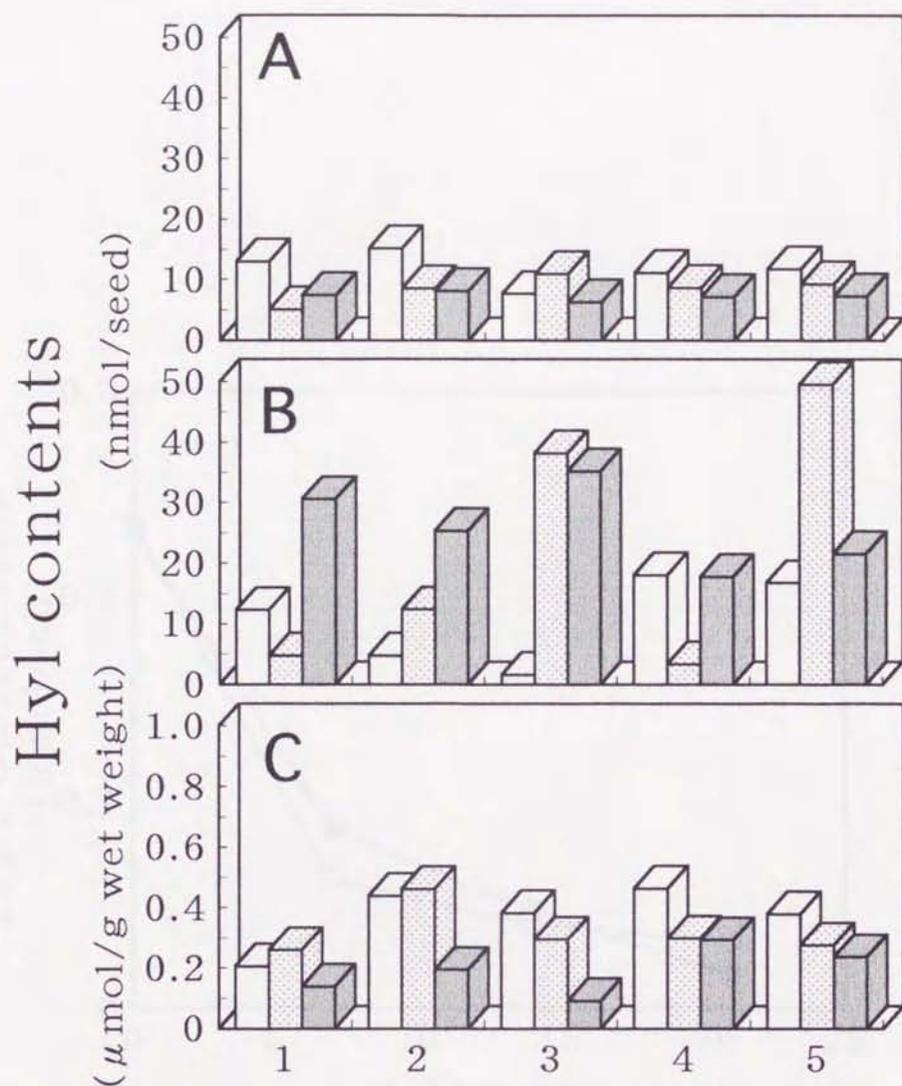


Fig. 20. Hyl contents in the seed (seedling) exudates and root extracts of *G. max* (L.) Merr. cv. Kitamusume, *T. pratense* (L.) cv. Start, and *P. vulgaris* (L.) cv. Taishoukintoki.

G. max (L.) Merr. cv. Kitamusume (white bar), *T. pratense* (L.) cv. Start (dotted bar), or *P. vulgaris* (L.) cv. Taishoukintoki (black bar) was inoculated with *B. japonicum* OUG117 (lane 2), *S. fredii* USDA191 (lane 3), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* USDA2053 (lane 4), or *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 (lane 5), respectively, or without cells (lane 1). The seeds were soaked for (A) 18 h, (B) 144 h, or (C) 10 d, and Hyl contents in the seed (seedling) exudates and ten-day-old roots were measured by HPLC as described in Materials and Methods. Results are means from three determinants with three measurements for each experiment.

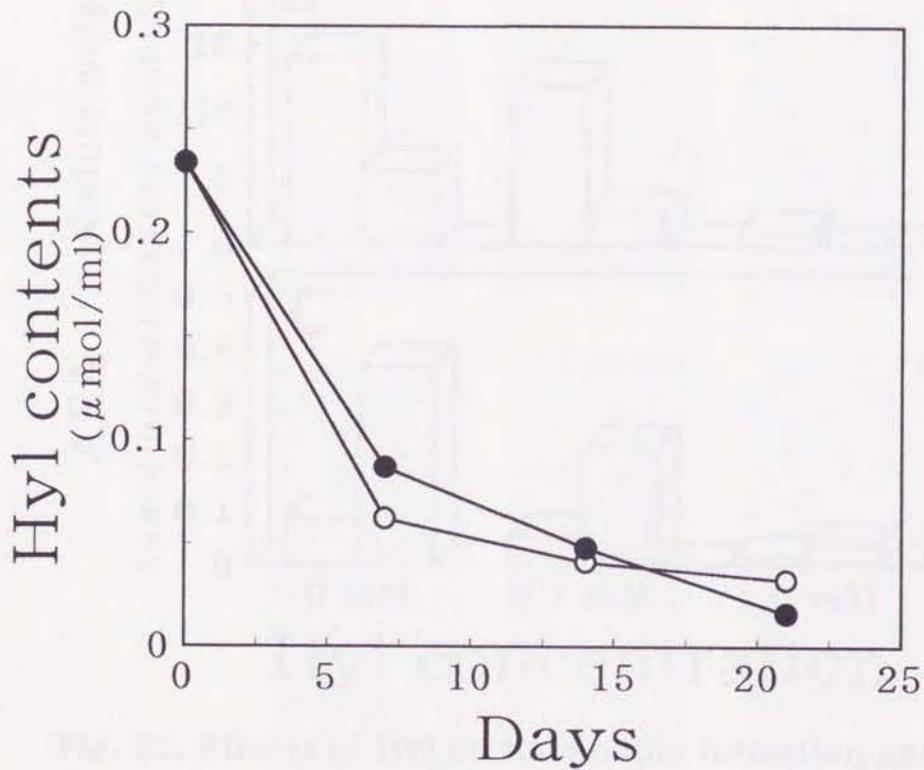


Fig. 21. Hyl contents in the medium of *P. vulgaris* (L.) cv. Yukitebou.

P. vulgaris (L.) cv. Yukitebou was inoculated with (●) or without (○) *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676, and grown in Norris and Date solution containing 1 mM Hyl.

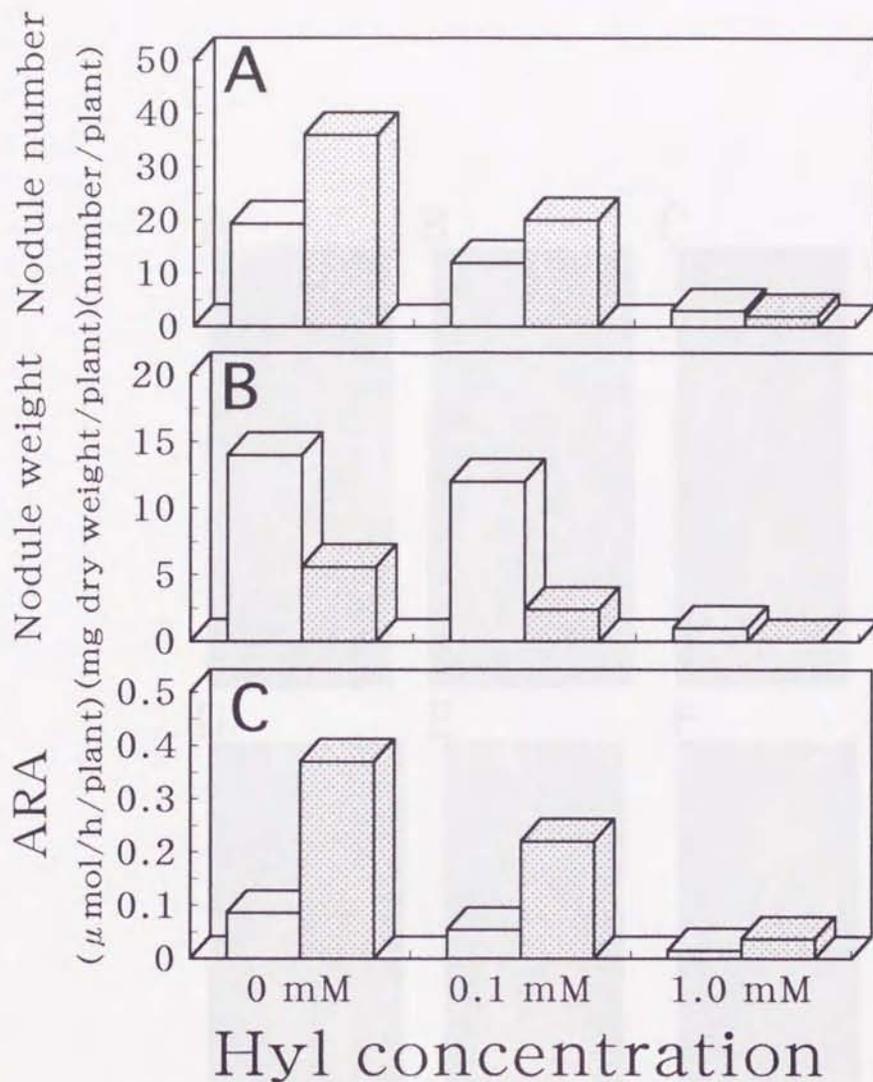


Fig. 22. Effects of Hyl on the nodule formation and nitrogen fixation activity in nodules of *G. max* (L.) Merr. cv. Kitamusume inoculated with *B. japonicum* OUG117 and *P. vulgaris* (L.) cv. Taishoukintoki inoculated with *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676.

The seeds of the host plants [*G. max* (L.) Merr. cv. Kitamusume (white bar) or *P. vulgaris* (L.) cv. Taishoukintoki (dotted bar)] were inoculated with 10^6 cells (*B. japonicum* OUG117 or *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676, respectively) per seed as described in Materials and Methods, and the plants were grown in vermiculite which was moistened with Norris and Date solution containing 0 mM, 0.1 mM, or 1 mM Hyl. (A) nodule number (number per plant), (B) nodule weight (mg dry weight per plant) and (C) acetylene reduction activity (ARA) of 50-day-old plants were determined as described in Materials and Methods. Each data represents the mean of three measurements.

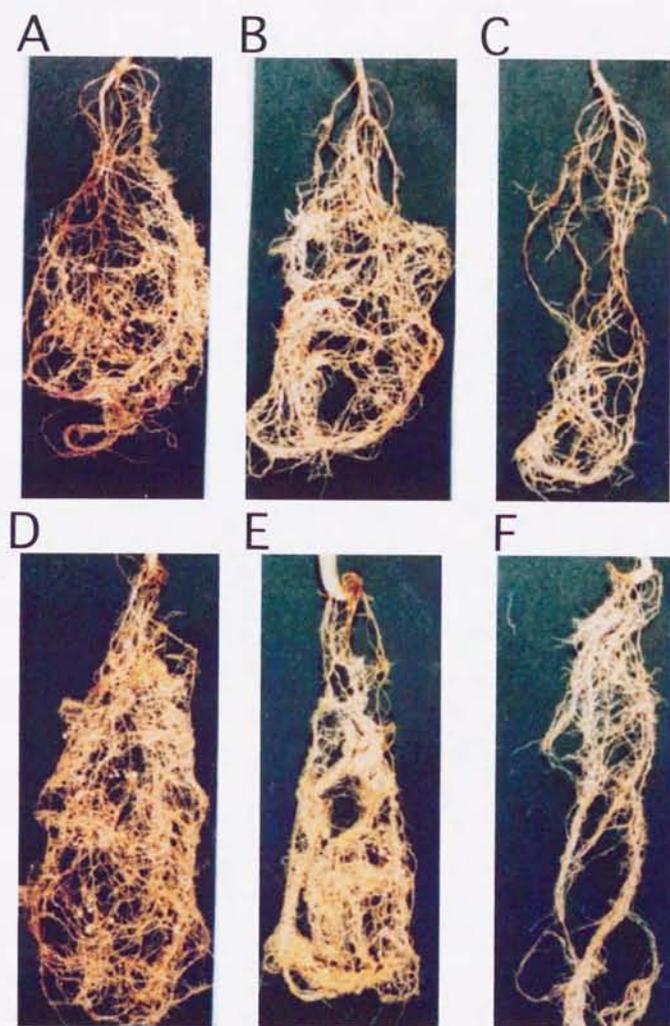


Fig. 23. Effects of Hyl on the growth of the roots and nodulation of *G. max* (L.) Merr. cv. Kitamusume inoculated with *B. japonicum* OUG117 and *P. vulgaris* (L.) cv. Taishoukintoki inoculated with *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676.

Seeds of the host plants [*G. max* (L.) Merr. cv. Kitamusume (A, B and C) and *P. vulgaris* (L.) cv. Taishoukintoki (D, E and F)] were surface sterilized and inoculated with *B. japonicum* OUG117 and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 cells, respectively, as described in Materials and Methods. The plants were grown in vermiculite which was moistened with Norris and Date solution containing (A, D) 0 mM, (B, E) 0.1 mM, or (C, F) 1 mM Hyl.

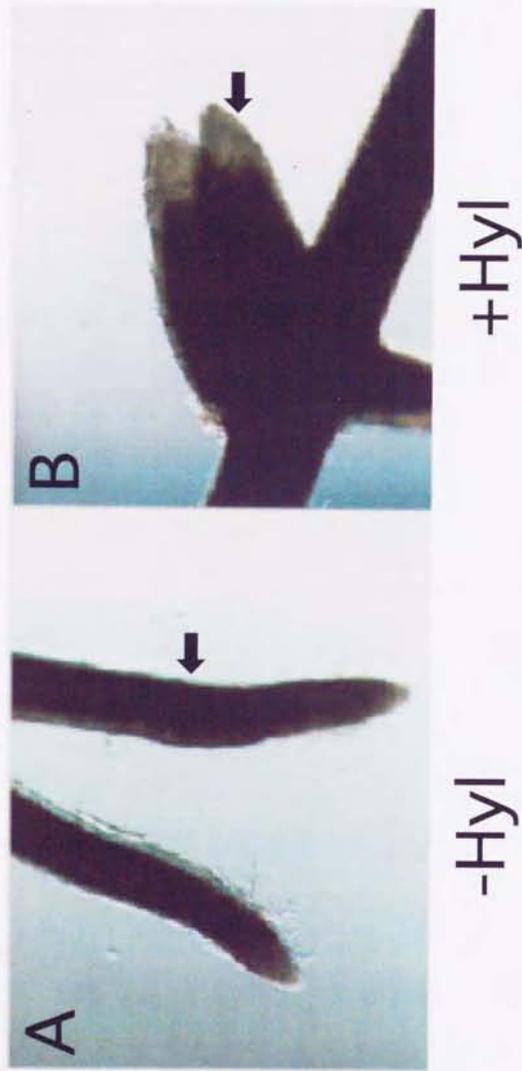


Fig. 24. Effect of Hyl on the elongation of the root hair of *P. vulgaris* (L.) cv. Yukitebou without the inoculation.

Seeds of the host plant [*P. vulgaris* (L.) cv. Yukitebou] were surface sterilized and grown in the seed bag which was moistened with Norris and Date solution (A) without or (B) with 1 mM Hyl. The arrows show the root hair.

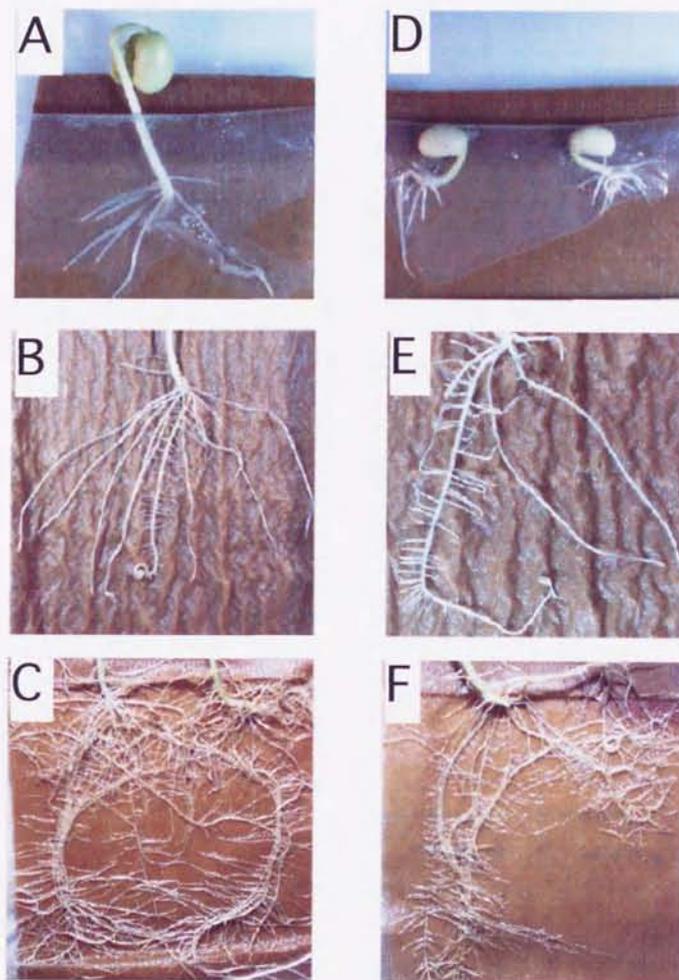


Fig. 25. Effect of Hyl on the elongation of the root of *P. vulgaris* (L.) cv. Yukitebou without the inoculation.

Seeds of the host plant [*P. vulgaris* (L.) cv. Yukitebou] were surface sterilized and grown without the inoculation in seed bag which was moistened with Norris and Date solution containing 0 mM (A, B, and C) or 1 mM (D, E, and F) Hyl for 7 d (A and D), 11 d (B and E), or 38 d (C and F).

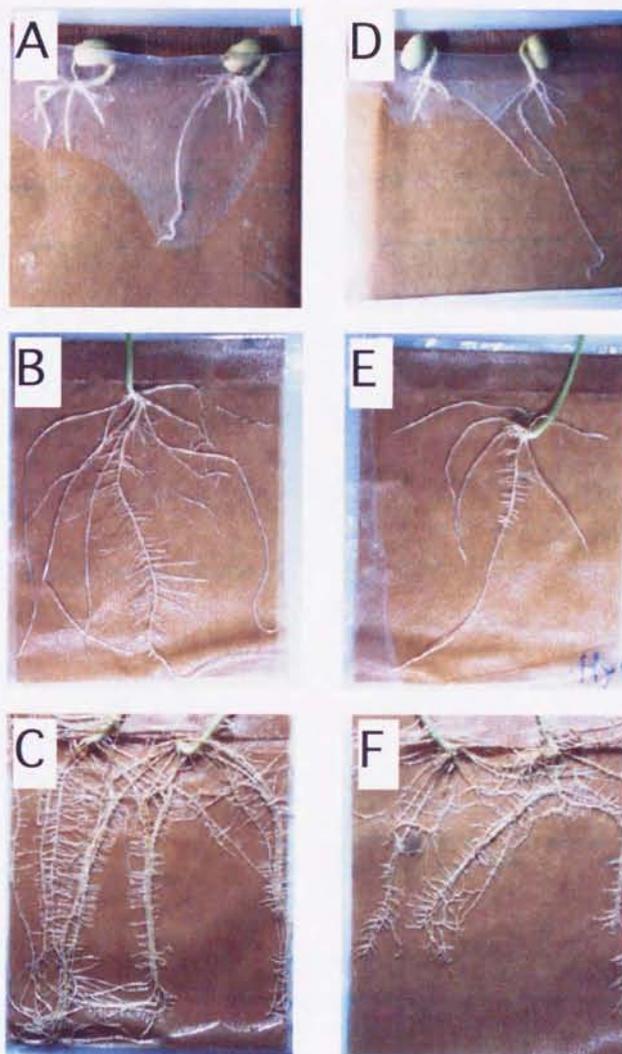


Fig. 26. Effect of Hyl on the elongation of the root of *P. vulgaris* (L.) cv. Yukitebou inoculated with *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676.

Seeds of the host plant [*P. vulgaris* (L.) cv. Yukitebou] were surface sterilized and inoculated with *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676. The plants were grown in the seed bag which was moistened with Norris and Date solution containing 0 mM (A, B, and C) or 1 mM (D, E, and F) Hyl for 7 d (A and D), 11 d (B and E) or 38 d (C and F).

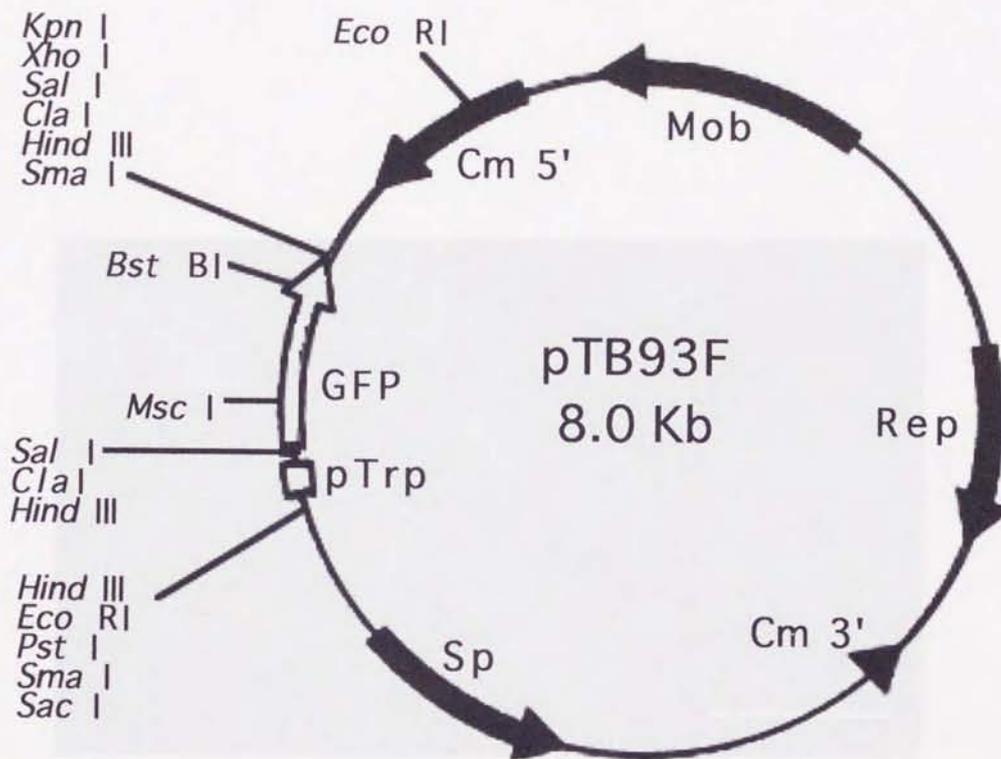


Fig. 27. Map of plasmid pTB93F, GFP expression plasmid.

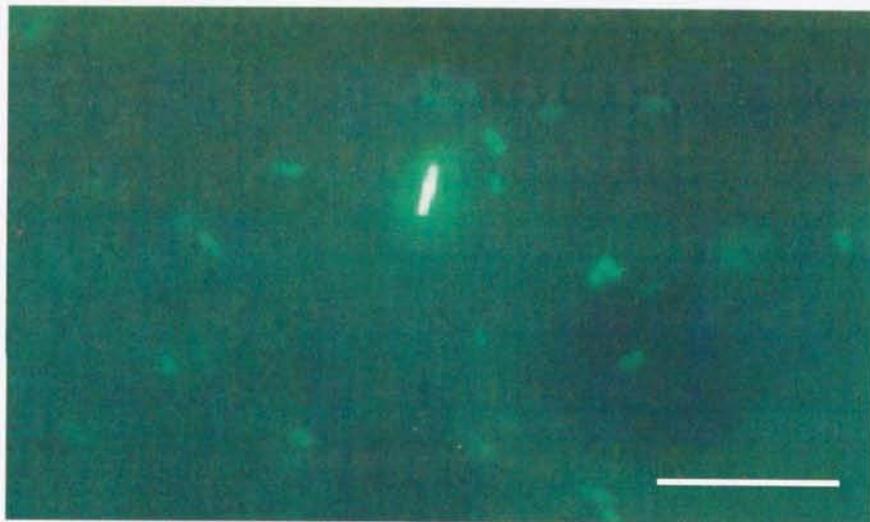


Fig. 28. Fluorescence microscopy of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676/pTB93F. Bar, 3 μ m.

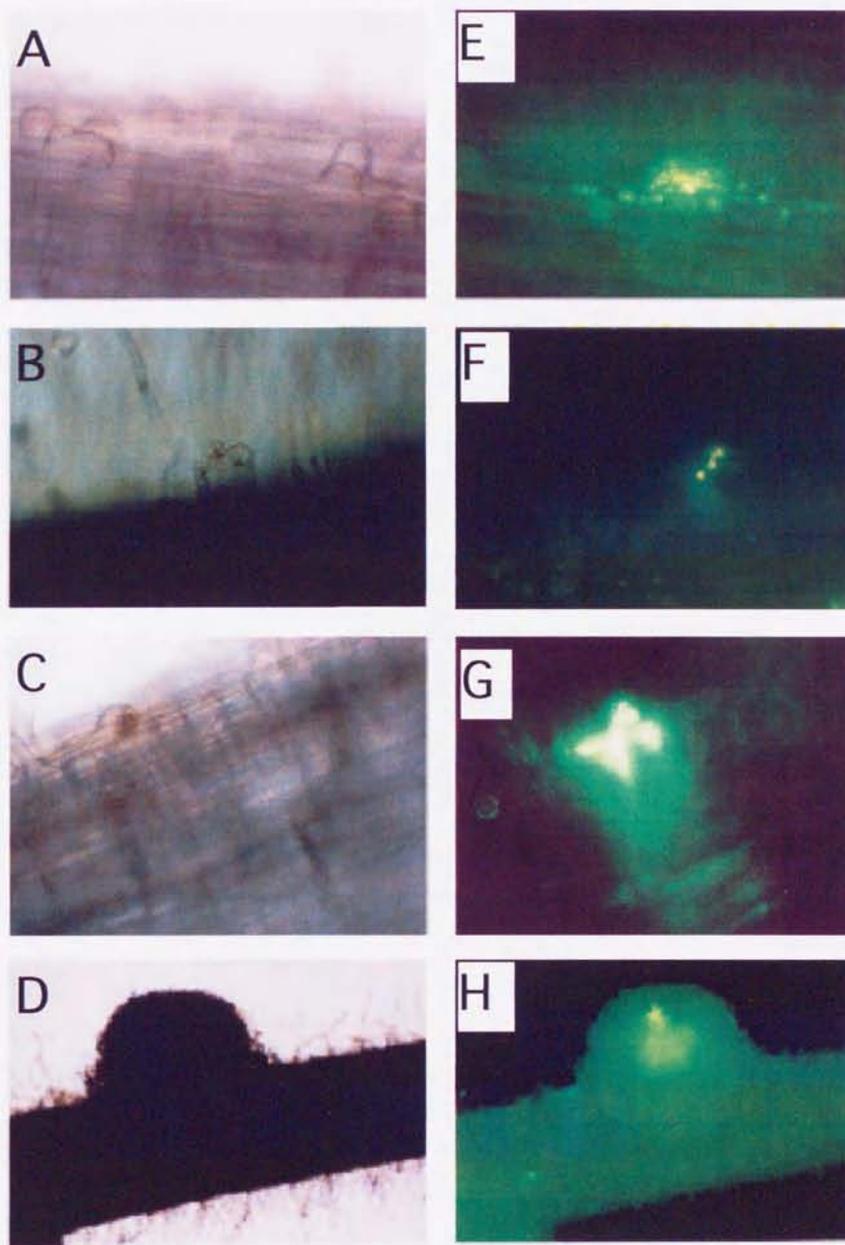


Fig. 29. Light and fluorescence microscopy of the root surface and nodule of *P. vulgaris* (L.) cv. Yukitebou inoculated with *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676/pTB93F.

Seeds of the host plant [*P. vulgaris* (L.) cv. Yukitebou] were surface sterilized and inoculated with *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676/pTB93F cells. The plants were grown in the seed bag which was moistened with Norris and Date solution and viewed by light microscope (A, B, C, and D) or fluorescence microscope (E, F, G, and H).

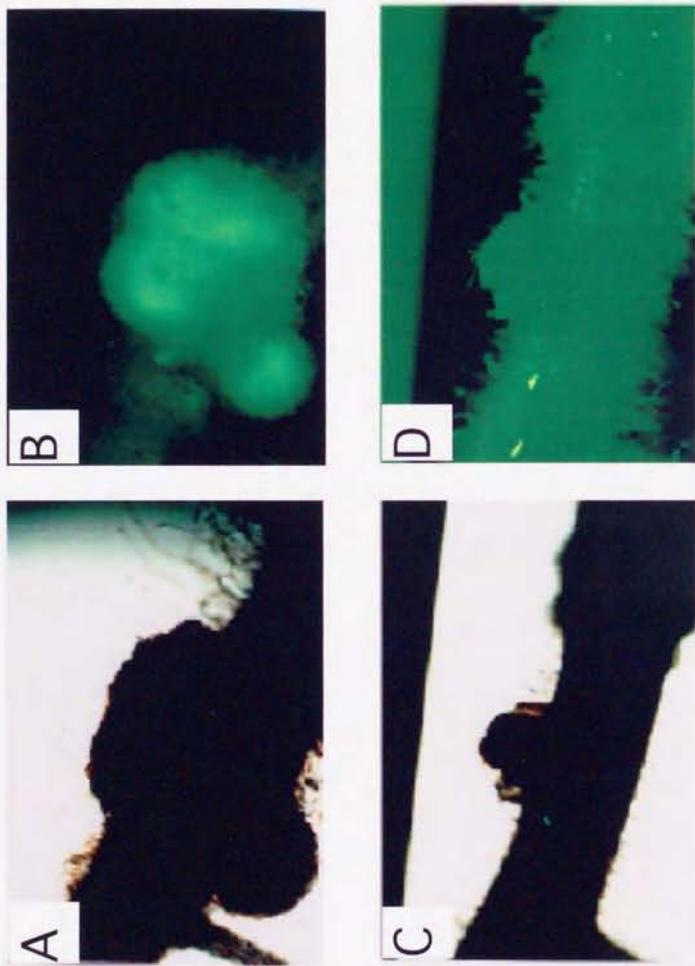


Fig. 30. Light and fluorescence microscopy of the root surface and nodule of *P. vulgaris* (L.) cv. Yukitebou inoculated with *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676/pTB93F.

Seeds of the host plant [*P. vulgaris* (L.) cv. Yukitebou] were surface sterilized and inoculated with *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676/pTB93F cells. The plants were grown in the seed bag which was moistened with Norris and Date solution without (A, B) or with (C, D) Hyl, and viewed by light microscope (A, C) or fluorescence microscope (B, D).

りも高くなるまで増殖した。インゲンマメ種子と同じ手法でダイズ種子のエタノール抽出液(soybean seed extract)を調製し、Hyl とともに培地に加えた場合も同様の結果であった(データは示していない)。前章でも述べたように、スペルミジンが、ダイズ根粒中のバクテロイドの増殖を抑制することが報告されているが、このスペルミジンの増殖抑制作用は、宿主からの分泌物として知られるイソフラボノイドのデイジーンによって阻害されることが明らかになっている^{40, 41)}。すなわち、宿主植物由来の分泌物には、根粒菌の生育の阻害あるいは促進に関わる物質が共存していると考えられる。本実験の結果から、宿主種子周辺では Hyl による根粒菌の増殖抑制作用が、宿主種子から分泌される物質によって調節されている可能性が示唆された。

4.2 宿主根圏におけるヒドロキシリシン含量とその根粒菌の接種による影響

マメ科植物は、その生育段階に応じてさまざまな物質を土壤に分泌しており、その種類は宿主植物によって異なる。例えば、インゲンマメの分泌物質中にはアミノ酸が著しく多く含まれる他、デオキシリボースの存在も認められている⁹⁴⁾。一方、ダイズでは炭水化物が多く含まれ、さらにその構成成分は品種間で差異があることが明らかにされている⁹⁵⁾。そのため、マメ科植物によって根圏に分泌されるアミノ酸およびその他のアミノ化合物のうち、Hyl 含量が植物や接種菌株の種類によって差異が生じる可能性が考えられた。Table 8 で示したように、根粒中の Hyl 含量は生育日数によって変化し、栽培開始後 70 日目に最も多く含まれており(それぞれ 0.41、0.76 $\mu\text{mol} / \text{g wet weight}$)、その後減少した。すなわち、根粒の発達とともに Hyl 含量が増加し、根粒の老化に伴って次第に減少すると考えられた。この結果から、根粒の発達時期における Hyl 含量の変化が、第 3 章で述べたような根粒中での根粒菌の分化に影響している可能性が示唆された。また、対応菌株を接種したインゲンあるいはダイズの実生および根粒抽出液中では、Hyl が 0.2 から 0.8 $\mu\text{mol} / \text{g wet}$

weight の間で含まれていた。この Hyl 含量はおよそ 0.2 mM から 0.8 mM の濃度に相当し、根粒菌(*Rhizobium* 属および *Sinorhizobium* 属)の増殖に影響をおよぼす濃度である。宿主植物にとって根粒菌の存在は有利であるにもかかわらず、宿主植物組織中の Hyl 含量が根粒菌の増殖を抑制する濃度で含まれているという結果は興味深い。しかしながら、種子浸出液中では、他の組織抽出液中よりも Hyl 含量は少なかったが、宿主と接種菌株の組み合わせによって増減する傾向が見られた。さらに、Table 9 に示した全ての組み合わせで接種した時、培養開始から 144 時間後の種子(実生)浸出液中では、非対応菌株を接種した場合の Hyl 含量が、対応菌株を接種した場合に比べて多い傾向が認められ、また、幼根抽出液中では接種によって Hyl 含量が高まった(Fig. 20)。これらの結果から、Hyl が宿主植物と根粒菌の間の共生における特異性を決定する要因の一つとして関与している可能性が示唆された。宿主植物から浸出される物質は、根粒菌の増殖やそのエネルギーの基質になることが報告されている^{96, 97)}。植物からの分泌物質の量およびその成分構成は、植物の種類その他、生育条件、根圏環境、あるいは生育段階に依存して変動しており、例えばアルファルファでは分泌物質中の炭水化物の含量が生育段階によって変動することが報告されている⁹⁸⁾。しかし、これらの変動のメカニズムに関する報告はほとんどない。Table 8 および Fig. 20 で示したように、宿主植物と根粒菌の組み合わせによって、種子(実生)浸出液の Hyl 含量が変動した。根抽出液中に存在する Hyl は明らかに根表面に浸出しており、また膜の浸透性が浸出作用に関与していることから、宿主根の膜浸透性の変動はこのような接種、あるいは接種菌の組み合わせに応答して起きるのかもしれない。本実験で分析された種子(実生)浸出液中の Hyl 濃度は、根粒菌の増殖を抑制するには低い濃度であった。しかし、根の表面で局所的に高い濃度で存在する可能性も考えられることから、Hyl は宿主植物根の表面で作用し、根粒菌の増殖を調節していることが示唆された。

4. 3 根粒形成、窒素固定、および宿主植物根の生育におよぼすヒドロキシリシンの影響

R. leguminosarum bv. *phaseoli* USDA2676 を接種、あるいは無接種のインゲンマメ種子に、Hyl を添加した Norris and Date 氏液を加えて栽培したとき、どちらの条件でも培地中の Hyl 含量は次第に減少し、栽培開始から約 20 日目でほとんど 0 に近い値となった(Fig. 21)。この結果から、培地に加えた Hyl が宿主植物の生育過程で根から植物体内へ取り込まれている可能性が考えられた。Hyl 存在下での植物の根粒形成あるいは窒素固定活性を、各対応菌を接種したダイズ、インゲンマメについて測定した結果、両宿主において、Hyl 存在下では根粒形成数、根粒乾燥重量、および窒素固定活性が著しく低い値であった(Fig. 22)。ところが、Fig. 18 の増殖試験の結果では、1 mM の Hyl 存在下での *B. japonicum* OUG117 の増殖は、コントロールとほぼ変わらなかった。また、データには示していないが、*Bradyrhizobium* 属菌の細胞中の *nodC-lacZ* の発現は、Hyl を添加しても抑制されなかった。これらの結果から、Hyl 存在下で根粒形成および窒素固定活性が抑制された原因について疑問が生じた。しかし、Fig. 23 で示したように、Fig. 22 で用いた菌株と宿主を同条件で接種栽培した場合の植物体の根の伸長が、Hyl によって著しく抑制されていた。また、無接種のインゲンマメ種子を Hyl 存在下で栽培した時、Hyl 非存在下で栽培した植物体の側根と比較して、伸長が著しく遅れていた(Fig. 23)。さらに、無接種あるいは接種のインゲンマメを Hyl 存在下で栽培し、経時的に観察した結果、接種・無接種に関わらず、7日目から11日目の間に根の伸長に遅れが生じていた(Figs. 24, 25)。これらの結果から、Hyl は植物体の根の生育に抑制的に作用し、それに応答して有効根粒の形成が抑制される可能性が示唆された。宿主根圏にはインゲンマメの根から多量のアミノ酸およびその他のアミノ化合物が分泌されることが知られており、またグルタミン酸のようないくつかのアミノ酸は、0.1 から 1.0%の濃度で

クローバーおよびアルファルファの根の伸長を抑制することが報告されている¹⁹⁾。しかしこれまで、Hyl による宿主植物根の伸長抑制については報告されていない。根の伸長抑制によって引き起こされる根粒形成の抑制のメカニズムは今後の課題である。

4.4 GFP 遺伝子挿入菌株を用いたヒドロキシリシン存在下での感染過程の観察

宿主植物根では菌の感染により誘導される、根の表層細胞の分裂、側根のカーリング、感染糸の伸長を経て根粒が形成される。これまで、これらの宿主根における根粒形成の各過程は多角的な手法で観察されており、例えばクローバーの根毛細胞壁の変化を交差偏光顕微鏡で観察する手法⁹⁹⁾が用いられている。しかし、根粒菌の感染において、菌体が宿主根の表面に着生し、感染糸を介して植物組織の内部へ侵入する過程や、根粒内における菌体細胞の分布の観察はきわめて困難である。これまで、根粒内の菌の分布において、蛍光抗体で標識した菌体や、GUS (β -glucuronidase) 遺伝子挿入変異株¹⁰⁰⁾を用いた観察などが行なわれている。本研究では、*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 の GFP 変異株を用い、Hyl の根粒形成過程におよぼす影響を観察した(Figs. 26-30)。この変異株は、Fig. 27 のように菌体が発光し、また根の表皮細胞の自家蛍光と明確に区別できることから、菌が根に侵入し、根粒形成するまでの各段階を観察する上ですぐれた手法であると考えられる。本実験での GFP 変異株を接種したインゲンマメの根および根粒の蛍光顕微鏡観察でも、根の表面での菌の集合や感染糸内での移動、および根粒中の集合が明確に観察されたことから、非常に有効な手法であると考えられた(Fig. 28)。Hyl 非存在下あるいは存在下で栽培した場合を比較すると、前者では根の表面に菌が局所的に集合しているのが観察され、一方、後者では Hyl 存在下では菌が全体的に少なく、まばらに存在していた(Fig. 29)。前述の Table 8 および Fig. 19 の結果で考察したように、宿主から浸出される Hyl の濃度が根の表面で局所的に高い濃度で存在す

ると仮定すると、本実験で観察された菌の集合した部分に高濃度の Hyl が存在し、菌の増殖を抑制している可能性が考えられた。また Hyl 存在下で栽培した場合、蛍光発色が認められない根粒が高頻度で観察された。これらの結果から、Hyl が根粒菌の増殖を抑制するとともに、菌が感染し、根粒形成する過程に影響していることが示唆された。今後、この GFP 変異株を用い、菌の感染あるいは根粒形成過程の観察を行い、Hyl の作用段階を明らかにすることが課題である。

5. 要約

Bradyrhizobium japonicum OUG117 と *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 の増殖は、ともに Hyl によって抑制されたが、前者の Hyl に対する感受性は後者よりも低かった。しかし、Hyl 存在下でそれぞれの菌株を接種したダイズ [*G. max* (L.) Merr.]、あるいはインゲンマメ [*P. vulgaris* (L.)] の根粒形成および窒素固定能力は、両者とも Hyl の添加により著しく抑制され、同時に宿主根の伸長における抑制効果が認められた。種子(実生)の浸出液中の Hyl 含量は、宿主に非対応菌株の接種によって増加し、また根抽出液中では接種によって増加する傾向が見られた。これらの結果から、Hyl が宿主植物の根の伸長、あるいは根の表面での根粒菌の増殖の調節に関与することにより、有意な共生関係を成立させている可能性が示唆された。

第5章 総括

本研究では、窒素循環における根粒菌の有用性と根粒菌の宿主特異性に基づいた分類について概説し、あわせて宿主根周辺物質における根粒菌の増殖や形態変化への影響に関する報告を中心に示した。それらを背景として、植物組織中における存在がほとんど知られていない遊離型アミノ化合物のヒドロキシリシン(Hyl)に着目し、Hyl の根粒菌の増殖抑制作用および形態変化あるいは窒素固定活性への影響と比較した。

第2章では根粒中のアミノ酸およびその他のアミノ化合物を分析し、根粒中の全アミノ酸およびその他のアミノ化合物のうち、比較的含量が多かった Hyl を培地に添加したときの根粒菌の増殖、および生理活性におよぼす影響について検討した。

根粒中のアミノ酸およびその他のアミノ化合物のうち、Hyl を培地に加えたとき、インゲンマメ根粒菌(*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676)を含む、多くの根粒菌の増殖が強く抑制された。このような Hyl による顕著な増殖抑制作用は、酵母や他の細菌には認められなかった。この結果から、Hyl は根粒菌の増殖を特異的に抑制する作用を持つことが明らかになった。

Hyl の構造類似物質であるリシンおよびメチルリシンを培地に添加した場合、インゲンマメ根粒菌の増殖は全く抑制されなかった。また、Hyl とリシンを共存させた場合においても、Hyl の増殖抑制効果は変化が認められなかった。さらに、タンパク合成時におけるメチオニンの取り込みをアナログとして拮抗阻害するエチオニンの根粒菌への作用は、Hyl の増殖抑制作用と異なっていた。そのため、Hyl の増殖抑制の作用機構が、アナログとしての拮抗的な作用ではないと推定した。

Hyl はインゲンマメ根粒菌の増殖時期の違いに関わらず、添加直後に細胞内に取り込まれ、根粒菌の増殖を抑制した。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ことが明らかになった。インゲンマメ根粒菌の無細胞抽出液の 2D-PAGE の結果、多くのタンパク質スポットが消失するとともに新たなスポットも出現することが判明した。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。これらの結果から、根粒菌のある種のタンパク質合成が Hyl によって著しく阻害されることが明らかになった。またその一方で、根粒菌は新規のタンパク質の合成を行っており、Hyl による根粒菌のバクテロイドへの分化におよぼす影響が示唆された。

第 3 章では、Hyl を添加したときのインゲンマメ根粒菌のバクテロイドへの影響を調べ、フリーリビング細胞への影響と比較した。

Hyl の添加により、インゲンマメ根粒菌のバクテロイドはフリーリビング細胞よりも顕著に増殖抑制された。バクテロイドは、Hyl に対してフリーリビングよりも高い感受性を示すと考えられた。

Hyl を添加して培養した場合の形態観察では、フリーリビング細胞の長さ(約 1 μ m)が 3 μ m~4 μ m に増加する傾向があり、同時に分岐した細胞もいくつか見られ、バクテロイド様に変化していた。一方、バクテロイドの長さは Hyl の添加により形態変化しなかった。さらに、Hyl の培地への添加によって、細胞内の PHB 含量の著しい増加が見られ、この増加した時期が、Hyl 添加培養による細胞の形態変化の時期と一致していた。すなわち、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関与している可能性が示唆された。

第 4 章では宿主植物の根周辺における Hyl の存在性を分析するとともに、根粒形成、窒素固定活性、および宿主植物の生育に与える Hyl の影響について調べた。さらに、GFP 変異株を用いて根粒菌の感染過程を観察し、根粒菌の根への着生から根粒形成の各段階における Hyl の影響について検討した。

ダイズ根粒菌である *Bradyrhizobium japonicum* は、インゲンマメ根粒菌の *R.*

leguminosarum bv. *phaseoli* USDA2676 の増殖と同様に Hyl の抑制作用を受けるが、前者の Hyl に対する感受性は後者よりも低かった。しかし、後者を SE および Hyl を共存させた培地で培養した場合、Hyl の増殖抑制効果は打ち消された。Hyl の増殖抑制効果が宿種由来の物質で調節されている可能性が示唆された。

対応菌株を接種した場合、宿主植物であるダイズ、クローバー、あるいはインゲンマメの実生浸出液中の Hyl 含量は、宿主に非対応菌株の接種によって増加し、また根抽出液中では、対応および非対応菌株に関わらず、接種によって増加する傾向が見られた。宿主植物体が根周辺の Hyl の量を調節し、非対応菌株の着生を制御している要因の一つである可能性が示唆された。

それぞれの対応菌株を接種したダイズ、あるいはインゲンマメの根粒形成および窒素固定能力は、両者とも Hyl の添加により著しく抑制され、同時に宿主根の伸長における抑制効果が認められた。これらの結果から、Hyl が根粒形成、窒素固定活性、あるいは宿主植物の根の伸長に影響をおよぼすことが明らかになった。

GFP 変異株を用いた根粒菌の感染過程の観察では、Hyl 存在下で接種栽培した場合、根粒菌が根の表面で分散するとともに根粒中にほとんど存在していない傾向が見られた。宿主植物体から分泌する Hyl が根の表面での根粒菌の増殖の調節に関与することにより、有意な共生関係を成立させている可能性が示唆された。

根粒菌が効率的な窒素固定能を有するバクテロイドへ分化することは、有効根粒形成に必須の条件である。Hyl が根粒菌のバクテロイドへの分化を誘導する可能性が示唆されたことは、in vitro での有効根粒形成の環境条件を検討する際、Hyl がモデルの構築に役立つと考えられる。すなわち、より有効な共生窒素固定研究を、in vivo の長期的な実験系ではなく短期的な実験系で行ない得る可能性があり、期待される。

第6章 参考文献

- 1) 十勝農業協同組合連合会：マメ科植物根粒菌技術研究史—日本における根粒菌培養機関としての立場と役割，およびその成果，3-6 (1997).
- 2) 陽 捷行：化学と生物，31，264-269 (1993).
- 3) Fred, B. B., and Baldwin, I. L. : *Mascosin studies in science*, Univ. Wiscosin Press, 5, (1932).
- 4) Gibbins, A. M. and Gregory, K. F. : *J. Bacteriol.*, 111, 129-141 (1972).
- 5) Godfrey, C. A. : *J. Gen. Microbiol.*, 72, 399-402 (1972).
- 6) Graham, P. H. : *J. Microbiol. Serol.*, 29, 281-291 (1963).
- 7) Jodan, D. C. and Allen, N. O. : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, eds. William and Wilkins, 261-264 (1974).
- 8) 蒲生 卓磨：農業および園芸，63，769-774 (1988).
- 9) Haukka, K., Lindstrom, K., and Young, J. P. W. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 419-426 (1998).
- 10) Chen, W. X., Yan, G. H., and Li, J. L. : *Inter. J. of Syst. Bacteriol.*, 42, 93-96 (1992).
- 11) Graham, P. H. : *J. Microbiol. Serol.*, 35, 511-517 (1964).
- 12) Heberlein, G. T., De Ley, J., and Tijtgat, R. : *J. Bacteriol.*, 94, 116-124 (1967).
- 13) Placinski, W. P., and Schmidt, E. L. : *J. Bacteriol.*, 145, 1025-1030 (1981).
- 14) Robertsen, B. K., Aman, P., Darvill, A. G., McNeil, M. , and Albersheim, P. : *Plant Physiol.*, 67, 389-400 (1981).

- 15) Johnson, A. W. B., Beynon, J. L., Buchanan - Wallaston, A. V., Setchell, A. M., Hirsch, P. R., and Beteringer, J. E. : *Nature*, 276, 634-636 (1978).
- 16) Keyser, H. H., Bohlool, B. B., Hn, T. S., and Weber, D. F. : *Science*, 215, 1631-1632 (1982).
- 17) Masterson, R. V., Rusell, P. R., and Atherly, A. G. : *J. Bacteriol.*, 152, 928-931 (1982).
- 18) 石沢 修一, 微生物と植物生育, 東京博友社, 190-191 (1977).
- 19) Todome, S. : *Soil and microorganism*, Hakuyusha, 186-189 (1981).
- 20) Djordjevic, M. A., Gabriel, D. W. and Rolfe, B. G. : *Ann. Rev. Phytopathol.*, 25, 145-168 (1987).
- 21) Sequiera, L. : *Ann. Rev. Microbiol.*, 37, 51-79 (1983).
- 22) Moawad, H. A., Ellis, W. R., and Schmidt, E. L. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 607-612 (1984).
- 23) Schmidt, E. L. : *Soil Sci.*, 118, 141-149 (1974).
- 24) Halverson, L. J., and Stacy, G. : *Plant Physiol.* 77, 621-625 (1985).
- 25) Porter, P. M., Banwart, W. L., and Hassett, J. J. : *Environ. Exp. Bot.*, 25, 229-232 (1985).
- 26) Long, S. R. : *Cell*, 56, 203-214 (1989).
- 27) Banfalvi, Z., Nieuwkoop, A., Schell, M., Besl, L. and Stacy, G. : *Mol. Gen. Genet.*, 214, 420-424 (1988).
- 28) Kosslak, R. M., Bookland, R., Barkei, J., Paaren, H. and Appelbaum, E. R. : *Proc. Natl. Sci. USA.*, 84, 7428-7432 (1987).
- 29) Janczarek, M., Urbanik-Sypniewska, T., and Skorupska, A. : *Microbiol. Res.*, 152, 93-98 (1997).

- 30) Ligeró, F., Lluch, C. and Olivares, J. : *J. Plant Physiol.*, 129, 461-467 (1987).
- 31) Ligeró, F., Lluch, C. and Olivares, J. : *J. Plant Physiol.*, 125, 361-365 (1986).
- 32) Hirsch, A. M., and Fang, Y. : *Plant Mol. Biol.*, 26, 5-9 (1994).
- 33) Caba, A. M., Recalde, L., and Ligeró, F. : *Plant Cell and Environ.*, 21, 87-93 (1998).
- 34) Almon, L. : *Zentralbl. Bakteriöl. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig.*, 1187, 289-297 (1933).
- 35) Bergersen, F. J. : *9th Int. Conger. Soil. Sci. Adelaide.*, 2, 49-63 (1968).
- 36) Calvert, H. E., Pence, M. K., Pierce, M., Malik, N. S. A., and Bauer, W. D. : *Can. J. Bot.*, 62, 2375-2384 (1984).
- 37) Sutton, W. D., Jepsen, N. M., and Shaw, B. D. : *Plant Physiol.*, 59, 741-744 (1977).
- 38) Sato, T., and Sugawara, S. : *Agric. Biol. Chem.*, 45, 751-753 (1981).
- 39) 小沢 隆司、辻 剛宏 : 日本土壤肥科学雑誌 62 卷 539-541 (1991).
- 40) Ozawa, T., and Tsuji, T. : *Soil. Sci. Plant Nutr.*, 38, 375-379 (1992).
- 41) Ozawa, T., and Tsuji, T. : *Plant Cell Physiol.*, 34, 899-904 (1993).
- 42) 柳田 友道 : 微生物学 3, 学会出版センター, 31-32 (1982).
- 43) 片桐 英郎 : 生化学講座 11 -微生物の生化学-, 共立出版, 312-313 (1964).
- 44) Gomes, V. M., Mosqueda, M-I, Blanco-Labra, A., Sales, M. P., Fernandes, K. V. S., Cordeiro, R. A., and Xavier-Filho, J. : *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4110-4115 (1997).
- 45) Van Egeraat, A. W. S. M. : *Plant Soil*, 42, 37-47 (1975).

- 46) Van Egeraat, A. W. S. M. : *Plant Soil*, 42, 367-379 (1975).
- 47) Strijdom, B. W., and Allen, O. N. : *Can. J. Microbiol.*, 12, 275-283 (1966).
- 48) Luigi, M., Karem, N-S., Marek, M., Milena, R. and Benedetto, de B. : *Biochimi. Biophys. Acta.*, 1156, 288-290 (1993).
- 49) Marek, M., Karem, N-S., Paolo, B., Antonio, O., and Luigi, M. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 192, 1281-1288 (1993).
- 50) Ohwada, T., Igawa, K., Sato, T., and Mikami, M. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1355-1356 (1994).
- 51) Igawa, K., Kikuchi, K. Sato, T., and Ohwada, T. : *Biosci. Biotech. Biochem.* 62, 1510-1514 (1998).
- 52) 大和田 琢二、井川 香子、佐藤 哲也 : 帯広畜産大学学術研究報告 23 卷 4号 237-244 (1998).
- 53) Michael, A. C. and Gerald, H. E. : *Antimicrob. Agents Chemother.*, Sept., 248-372 (1973).
- 54) Juan, J. I., Manuel, S-D., and David, W. E. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2587-2589 (1990).
- 55) Dye, M. : *Recent Advances in Biological Nitrogen Fixation.*, ed. Rao, S. N. S., Holmes and Meier Publishers Inc., New York, pp. 435-471 (1979).
- 56) Banfalvi, G., Slezarikova, V., Sedliakova, M., and Antoni, F. : *Eur. J. Biochem.*, 162, 305-309 (1987).
- 57) Nagai, K., Hendrickson, W., Balakrishnan, R., Yamaki, H., Boyd, D., and Schaechter, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 262-266 (1980).
- 58) Vassily, I. R., Ismael, H-L., and Esperanza, M-R. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2339-2342 (1994).

- 59) Glenn, A. R., Mckay, I. A., Arwas, R., and Dilworth, M. J. : *J. Gen. Microbiol.*, 130, 239-245 (1984).
- 60) Seppo, O. S. and John, G. S. : *Plant Physiol.*, 100, 597-604 (1992).
- 61) Dale, B. K., James, K. W., Fumiko, S., and David, W. E. : *Plant Physiol.*, 75, 1158-1162 (1984).
- 62) Saroso, S., Glenn, A. R., and Dilworth, M. J. : *J. Gen. Microbiol.*, 130, 1809-1814 (1984).
- 63) Saroso, S., Dilworth, M. J., and Glenn, A. R. : *J. Gen. Microbiol.*, 132, 243-249 (1986).
- 64) Mckey, I. A., Glenn, A. R., and Dilworth, M. J. : *J. Gen. Microbiol.*, 134, 1443-1440 (1988).
- 65) Lessie, T. G., and Whiteley, H. R. : *J. Bacteriol.*, 100, 878-889 (1969).
- 66) Marcia, S. O., and Ethan, R. S. : *J. Bacteriol.*, 143, 1234-1240 (1980).
- 67) Stanley, P., Richard, E. M., and Raimond, C. V. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 2922-2926 (1972).
- 68) Robeat, A. L. : *J. Bacteriol.*, 135, 114-123 (1978).
- 69) Robeat, A. L. : *J. Bacteriol.*, 141, 1209-1216 (1980).
- 70) Ludwig, R. A. and Signer, E. R. : *Nature*, 267, 245-248 (1977).
- 71) Davis, B. J. : *New York Acad. Sci.*, 121, 404-427 (1964).
- 72) Awdeh, J. L., Williamson, A. R., and Askonas, B. A. : *Nature*, 219, 66 (1968).
- 73) 堀尾 武一, 山下 仁平 : 蛋白質・酵素の基礎実験法, 南光堂, 293-294 (1981).
- 74) Patrick, H. O. : *J. Biol. Chem.*, 250, 4007-4021 (1975).

- 75) Tanksley, S. D., and Orton, T. J. : Isozyme, Elsevier science Publishers B. V., 481-489 (1983).
- 76) Hiles, R. A., and Henderson, L. V. : *J. Biol. Chem.*, 247, 646-651 (1972).
- 77) Elkan, G. H. : Ecology, Technology and Physiology Biological Nitrogen Fixation. ed. Alexander, P. M., 1-38 (1984).
- 78) Entner, N., and Doudoroff, M. : *IBC*, 196, 853-862 (1951).
- 79) Katznelson, H. : *Nature*, 26, 551-552 (1955).
- 80) JR, B. B. K., Hamilton, P. B., and Elkan, G. H. : *J. Bacteriol.*, 97, 1184-1191 (1969).
- 81) Nartinez-De Drets, G., and Arias, A. : *J. Bacteriol.* 109, 467-470 (1972).
- 82) Karr, D. B., Waters, J. K. and Emerich, D. W. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 1339-1344 (1983).
- 83) Sutton, W. D., Jepsen, N. M., and Shaw, B. D. : *Plant Physiol.*, 59, 741-744 (1977).
- 84) Urban, J. E., and Dazzo, F. B. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 219-226 (1982).
- 85) Alicia, E. G., Georges, L. T., and Frank, B. D. ; *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 947-1950 (1987).
- 86) Kato, K., Arima, Y., and Hirata, H. : *Soil Sci. Plant Nutr.*, 43, 275-283 (1997).
- 87) Kato, K., and Arima, Y. : Abstracts of 7th Annual Meeting for Plant-Microbe Interactions, Jpn. Soc. of Plant-Microbe Interactions, 92 (1997).
- 88) Barboar, W. M., Hattermann, O. R. , and Stacy, G. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2635-2639 (1991).

- 89) William, W. C., and Gary, A. S. : *Plant Physiol.*, 57, 820-823 (1976).
- 90) Gage, D. L., Bobo, T., and Long, S. R. : *J. Bacteriol.*, 178, 7159-7166 (1996).
- 91) Simon, R., O'Connell, M., Labes, M., and Puhler, A. : *Methods in Enzymology*, 118, 640-659 (1986).
- 92) Simon, R., Priefer, U., and Puhler, A. : *Biotechnology*, 1, 784-791 (1983).
- 93) Maria, L. G., and Francoise, M. R. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2687-2692 (1991).
- 94) Vancura, V. and Hanzlikova, A. : *Plant and Soil*, 36, 271 (1972).
- 95) Keeling, B. L. : *Phytopathol.*, 64, 1445 (1974).
- 96) Boulter, D., Jeremy, J. J., and Wilding, M. : *Plant and Soil*, 24, 121-127 (1966).
- 97) Lipton, D. S., Blancher, R. W., and Blevins, D. G. : *Plant Physiol.*, 85, 315-317 (1987).
- 98) Hamlen, R. A., Lukezic, F. L., and Bloom, J. R. : *Can. J. Plant Sci.*, 52, 633 (1972).
- 99) Dazzo, F. B., Orgambide, G. G., Philip-Hollingsworth, S., Hollingsworth, R. I., Ninke, K. O., and Salzwedel, J. L. : *J. Bacteriol.*, 178, 3621-3627 (1996).
- 100) Yuhashi, K., Minamizawa, K., Tobias, D., Kubota, M., and Akao, S. : *Soil Sci. Plant Nutr.*, 43, 473-478, (1997).

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇篤となる御指導と御鞭撻を賜りました帯広畜産大学畜産学部 佐藤哲也教授、岩手大学農学部 若尾紀夫教授、ならびに帯広畜産大学畜産学部 大和田琢二講師に謹んで深謝致します。また、本論文の審査を御快諾して下さり、適切な御助言を賜りました弘前大学農学生命科学部 武田潔教授、ならびに帯広畜産大学畜産学部 増田宏志教授に深甚なる感謝を表します。さらに、実験に御協力頂き、御指導を賜りました帯広畜産大学畜産学部 三上正幸教授、ならびに十勝農業組合連合会農産化学研究所の方々に深く感謝致します。

最後に、在学中、絶えず御指導と御高配賜りました帯広畜産大学畜産学部生物資源科学科の諸先生、ならびに実験に御協力頂き、心を支えて頂いた同生物機能開発研究室の先輩、同輩ならびに後輩諸氏にもこの場を借りて御礼申し上げます。