

ダイズ根粒における炭素代謝と窒素代謝の相互関連

岡山大学図書
978915

- 1986 -

菅 沼 教 生

報告番号	伊第 1893 号
------	-----------

目 次

緒論	----- 1
第1章　ダイズ根粒における炭素代謝と窒素固定との関連	
序論	----- 6
材料及び方法	----- 8
結果	----- 12
考察	----- 16
要約	----- 20
図表	----- 21
第2章　ダイズ根粒のミトコンドリアの活性と窒素固定能との 関連	
序論	----- 35
材料及び方法	----- 37
結果	----- 39
考察	----- 42
要約	----- 45
図表	----- 46
第3章　レグヘモグロビン存在下でのミトコンドリアの呼吸と ダイズ根粒組織内における炭素代謝の分布	
序論	----- 59
材料及び方法	----- 61
結果	----- 64
考察	----- 66
要約	----- 69
図表	----- 70
結　論	----- 81
謝　辞	----- 84
引用文献	----- 85

略 号

ADH, LDH, ALDH, FDH, GAPDH, PDH, ICDH, α KGDH, MDH, ME, G6PDH, 6PGDH, ICL, MS, PEPC ; Table 1 に記載。

GDH ; glutamate dehydrogenase

GOGAT ; glutamate synthase

GS ; glutamine synthetase

β HBDH ; β -hydroxybutyrate dehydrogenase

PDC ; pyruvate decarboxylase

NADPH-Cyt c reductase ; NADPH-cytochrome c reductase

Cyt oxi ; cytochrome c oxidase

AAT ; aspartate aminotransferase

DTT ; dithiothreitol

EDTA ; ethylenediaminetetraacetic acid

Tris ; tris(hydroxymethyl)aminomethan

BSA ; bovine serum albumin

RCR ; respiratory control ratio

結 論

高等植物の根系をとりまく土壌中には、多種多様の土壌微生物が生息している。しかも、「大地は微生物の宝庫」といわれるように、その数は驚くべき数字になる。服部（１）は、土の種類やそれがおかれている条件によってもちがうが、１グラムの土には、およそ１千万から１億個の細菌、細菌の数十分の一程度の糸状菌、数万個のアメーバ等の原生動物が生息していると述べている。一般に、高等植物に対する外部環境といえ、水分、光、温度といった無機物的あるいは非生物的な側面が主に論じられてきたが、高等植物の根系をとりまくこのように膨大な数の土壌微生物、いわば生物的環境も植物生育にとって無視することはできない。

高等植物と微生物の関係は、地球上の物質循環における生産者とそれに対する分解者という間接的な関係にとどまらず植物の根圏において直接的な関係を確立している。なかでも、細菌または放線菌の感染によって形成される根粒と糸状菌の感染によって形成される菌根では、微生物が植物体内にまで侵入し共存するいわゆる共生関係が成立している。このよう共生関係が進化途上のどの時期に成立したのかは不明であるが、高等植物が微生物的環境に適応して生じた形態であり、植物生育と密接に関わっていることは十分予想される。

菌根は、無機養分、特にリンの吸収に関与しており、種々の園芸作物を含め広範囲の植物群に認められる（２）。一方、根粒はマメ科植物と一部の非マメ科植物にしか見られない特殊なものである。しかしながら、根粒は、植物生育のための窒素源として空気中に多量に存在する窒素ガスを固定、同化することができる。大部分の高等植物は、生育に必要な窒素を硝酸あるいはアンモニアのような窒素化合物の形でしか吸収同化することができないことを考えれば、根粒による窒素固定作用は極めて特殊な機能だと言える。このような特殊な機能を園芸作物の栽培に有効に利用していくことはできないだろうか。

マメ科植物の根粒が空気中の窒素を固定し利用していることが明らかとなったのは、１９世紀の後半である。しかし、すでにローマ時代にヨーロッパでは、マメ科植物は土地を肥沃にするということが知られていたらしい。当時ヨーロッパでは、一定期間土地を休閑することによって地力の減退を防ぐ三圃式農業が一般

化していた。その後、休閑のかわりにクローバー、ダイズ、エンドウ、ベッチ、ルーサン、ルービンなどのマメ科作物の栽培を行い、麦などの穀類あるいは根菜類との輪作に発展していった。マメ科作物が輪作体系の中で重要な位置を占めたのは、家畜の飼料となるという点もあったが、マメ科作物を栽培することによって地力の消耗を防ぐというねらいがあったようである（3）。わが国でも、種々の近世の農書の中に、ダイズ、アズキはムギ作との二毛作にしたという記述がみられる（4）。また、いろいろな作物との輪作体系の中にダイズ、アズキは必ず含まれている（5）。わが国では古くは、地力の維持という考え方よりも、ダイズ、アズキは日本人の食生活と密接な関係にあったことが輪作に組み入れられた主な要因であったと思われる。しかし、江戸時代の『農業全書』の中には、「田畑を肥やす苗肥（緑肥）には緑豆がいちばんよく、小豆、ごまがその次である。大豆やそらまめもよい。」という記述があり（6）、マメ科作物が商品価値としてだけでなく、地力の維持としての役割も有していたことが想像される。このように、マメ科植物の共生窒素固定作用は古くから農業技術として利用されてきた。

ところが、窒素肥料が工業的に生産されるようになって、マメ科植物を地力維持のために積極的に利用するという技術は衰退してしまった。窒素は多くの場合、作物生産の制限要因であり、人為的に窒素をコントロールすることにより作物生産は飛躍的に進歩したといっても過言ではない。しかし、工業的に空気中の窒素を固定し肥料として利用するためには、単に固定反応に高温、高圧の人工的なエネルギーを必要とするだけでなく、設備、輸送といった方面にも多大の化石エネルギーを必要とするため、今日のエネルギー問題の一つに上げられることになった。その点、生物による窒素固定系は太陽エネルギーに依存し、しかも必要な部位に窒素を調節しながら供給することが可能な効率的な系である。したがって、このような生物特有の機能を作物生産に応用していくことは今後の重要な課題といえる。とりわけマメ科植物以外の植物に窒素固定能を付与させる試みは、魅力あるテーマである。

マメ科植物と根粒菌の共生関係は、植物側と菌側の双方の遺伝的要因が関与していると言われている（7）。例えば、ダイズのなかには共生を行うことができない系統が知られている。これは、根粒形成すなわち窒素固定ができない点を除けば通常のダイズと同じ性質を現し、共生能を支配する遺伝子が植物側に存在す

ることを示している。一方、根粒菌の突然変異株にも根粒を形成することができないもの、さらに根粒が形成されても窒素固定能を示さないものが認められ、共生能の支配に菌側の遺伝子も関与していることを示している。マメ科以外の植物に根粒菌を感染させ根粒形成、窒素固定能発現までのプロセスを獲得させるためには、マメ科植物と根粒菌のそれぞれの共生に関わる要因を明らかにしていく必要がある。特に、マメ科植物と根粒菌との間にみられる宿主特異性がどのような要因によって決定されるのかは重要な問題である。

従来、窒素固定能は根粒菌が植物に感染し根粒を形成してはじめて発現すると考えられてきたが、Holsten ら（８）は、ダイズ根粒菌とダイズの根の培養細胞を共存させても根粒は形成されないが、窒素固定能が発現することを示した。その後、Phillips（９）は、ダイズに対しては根粒形成能を示さないカウビーの根粒菌のある系統がダイズの培養細胞との共存によって窒素固定能を発現することを見いだした。さらに、小麦、ナタネ、タバコ、ニンジンなどの非マメ科植物の培養細胞を用いても同様なことが可能であることが明らかとなった（１０、１１、１２）。これらの結果は、窒素固定能の発現に関しては宿主植物との特異性は見られず、マメ科以外の植物も根粒菌に対して窒素固定能発現の機能を有していることを示唆している。また、感染に関しては、Plazinski ら（１３）が根粒形成能を失った根粒菌の突然変異株に、根毛のカーリング（curling）能に関与する遺伝子の領域をIncQ multicopy vector(pKT 230)を用いて導入した菌を、イネ、トウモロコシ、ソルガム、コムギの４種類の単子葉植物に接種したところ、イネとトウモロコシでは根毛のカーリングが見られたと報告した。最近、根粒菌の共生にかかわる遺伝子の解析は進んでおり（１４）、マメ科以外の植物に根粒を形成させることは可能かもしれない。しかし、宿主植物側の解析はほとんど行われていない。

一方、遺伝子工学の進歩にともなって、窒素固定能を菌との共生にたよらず窒素固定遺伝子を直接植物細胞内へもちこんで、窒素固定酵素群を生産させようという考えが生まれている。これは、窒素固定遺伝子を分離し、ベクターを用いて植物の培養細胞あるいはプロトプラストに導入し、植物体を再生し植物自身に窒素固定能を獲得させようとする方法である。すでに、窒素固定能を持たない大腸菌のような原核生物では、Klebsiella のもつ窒素固定遺伝子を導入し発現させる

ことに成功した例が報告されている(7)。ところが、高等植物の場合には、ベクターとして何を用いるのか、導入された窒素固定遺伝子が果して発現するのか、また、発現したとしても継代維持できるのかといった多くの問題が残されている。酵母のような真核生物のなかへ導入することには成功しても発現されておらず(15)、真核生物の複雑さを物語っている。また、根粒の感染細胞のプロトプラストを分離し、他種植物との細胞融合によって窒素固定系を導入しようとする考えもあるが、成功した報告は見ることができない。

もし、微生物との共生にたよらず高等植物自身が空中窒素を固定することが可能であるとすれば、農業上多大の効果をもたらすことが期待される。しかし、単に窒素固定遺伝子を導入しただけで発現させることが可能なのか、はなはだ疑問である。例えば、窒素固定反応の直接の担い手であるニトロゲナーゼは酸素によって破壊されてしまう。そのために空気中で窒素固定を行う生物は、窒素固定部位から酸素を除去するために種々の戦略を用いている。その生物が嫌氣的に代謝を行うことができるなら戦略は単純であるが、生長のために酸素を必要とするものは、酸素を利用し、かつニトロゲナーゼに害を与えないという相矛盾するものを満足させるような戦略をとらなければならない。好気性微生物であるアゾバクターは、呼吸を高めることによって酸素レベルを減少させ、ニトロゲナーゼを酸素による破壊から防御している。また、光合成を行うラン藻の一種であるアナバナは、窒素固定のために光合成の酸素発生能を失ったヘテロシストと呼ばれる特殊化した細胞を形成する(16)。マメ科植物の根粒では、レグヘモグロビンと呼ばれる高等動物血球中のヘモグロビンによく似たヘムタンパクが、その役割を担っているといわれている。単離したバクテロイドの窒素固定能は、レグヘモグロビンの共存によって著しく促進されることから、レグヘモグロビンは遊離酸素が高濃度で蓄積するのを妨げると同時にバクテロイドに必要な酸素を提供していると考えられている(17)。また、窒素固定反応は炭素代謝系、アンモニア同化系とも深く関わっている(18)。このように、窒素固定反応は高度に特殊化した機能、代謝変動と密接に関連しており、窒素固定遺伝子が導入できたとしても効率的な窒素固定系が確立できるのかどうか不明である。

今後、窒素固定系を作物生産に利用していくためには、窒素固定反応に必要な種々の生理的環境及び代謝機能もまた明らかにしていく必要がある。特に、共生

窒素固定系においては、窒素固定のためのエネルギーを宿主植物の生産する光合成産物に依存しており、窒素固定反応に関連した炭素代謝を明らかにすることは作物の生産性を考えるうえでも重要である。1分子の窒素ガスから2分子のアンモニアを生成するニトロゲナーゼの反応には、8個の電子と16分子のATP という多大な還元力とエネルギーを必要とするが(19)、これらが根粒内のどのような炭素代謝経路から供給されるのか明確ではない。また、生成されたアンモニアは炭素化合物と結合して速やかに同化されなければならないが、受容体となる炭素化合物がどのような炭素代謝系によるものかについても不明である。

本研究は、ダイズ根粒内において、窒素固定能発現にともない宿主植物の炭素代謝とミトコンドリアの活性がどのように変動し、窒素固定反応といかに関連しているのかを明らかにするものである。

第1章 ダイズ根粒における炭素代謝と窒素固定との関連

序 論

共生窒素固定系は、宿主植物と微生物の相互作用によって成立する。炭素代謝は、窒素固定反応に必要な還元力とエネルギーを供給する点、また、生成されたアンモニアを同化するための炭素骨格を供給するという点で、窒素固定と密接に関わっていると予想される。しかしながら、宿主植物と微生物のそれぞれの炭素代謝については不明な点が多くある。

ダイズ(20、21、22)やいんげん豆(23)から単離したバクテロイドの窒素固定能と呼吸は、有機酸、アルコール、アルデヒド、グルコースなどの多様な炭素化合物によって促進される。これらの炭素化合物のなかで、根粒組織内が嫌氣的であることから、嫌氣的代謝の生成産物に特に注意が払われてきた(22、24、25)。田島とLaRue(24)は、ダイズ根粒内には発酵による生成物であるアルデヒドとエタノールが存在し、これらの生成に関与する酵素が根粒のサイトゾルに存在すると報告した。さらに、PetersonとLaRue(26)は、ダイズ根粒バクテロイドのアルデヒド脱水素酵素による反応が窒素固定のための還元力を供給することを示唆した。これらの結果は、根粒の宿主細胞で生成されたエタノール発酵の代謝産物が、バクテロイドの窒素固定と呼吸のための炭素源としてバクテロイドに供給されることを示している。

また、De Vriesら(25)は、エンドウ根粒において、 CO_2 暗固定反応の産物であるリンゴ酸が蓄積されること、さらに、ジカルボン酸は単離したバクテロイドに速やかに吸収されることを見いだした。これらの結果から、彼らは酸素不足によって誘導される CO_2 暗固定反応の生成産物である有機酸が、バクテロイドの窒素固定反応に必要な炭素源であろうと述べている。

一方、好気条件下で働くと考えられるイソクエン酸脱水素酵素もマメ科植物根粒の窒素同化にとって重要であると言われている(18、27)。決定的な証拠は不足しているが、エンドウ(28)、アルファルファ(29)の根粒では、イソクエン酸脱水素酵素が関与する反応が窒素固定のための還元力を供給するという報告がある。

このように、バクテロイドの窒素固定反応に必要な炭素源となる炭素化合物は何であり、それが宿主植物のどのような炭素代謝経路によるものか明確ではない。本研究では、窒素固定能発現に伴って、宿主植物細胞とバクテロイドにおける炭素代謝に関わる酵素の活性は変動するであろうという予想のもとに、酵素活性の経時的変動、根と根粒、また、バクテロイドと純粋培養した根粒菌との間の酵素活性の違いを調べた。さらに、炭素代謝酵素の細胞内局在性、根粒の窒素固定能に及ぼす酵素阻害剤の影響についても検討した。

材料及び方法

1) 材料

表面殺菌したダイズ (*Glycine max* ; A62-1) の種子を、*Rhizobium japonicum* strain 009の懸濁液に一晩浸漬し、バーミキュライトに播種した。一週間後、実生は田島と山本 (30) の水耕法 (培養液組成 : KH_2PO_4 21.96, KCl 152.6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 213.7, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.25, H_3BO_3 0.25, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 48 mg/l, pH 6.5) に従って、温室で生育させた。

Rhizobium japonicum は、マニトール、酵母、寒天培地 (K_2HPO_4 0.7, KH_2PO_4 0.3, NaCl 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1, マニトール 10, 寒天 10, 酵母エキス 1.0 g/l, pH 7.0) で培養した。培地は月に一度更新し、更新後3週間経ったものを純粋培養した根粒菌として用いた。

2) 植物組織の粗酵素液の調整法

根または根粒を、0.5mM EDTAを含む0.05M Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5) 中で、新鮮重の30%相当のpolyclar AT とともに、ガラスホモジナイザーを用いて摩砕した。PEPCの活性を測定する場合には、摩砕液に5mM のDTT を加えた。摩砕した液を16,000xgで30分間遠心した後、2層のミラークロスでろ過し、得られたろ液を粗酵素液として用いた。

3) 宿主植物細胞画分とバクテロイド画分の調整法

田島とLaRue (24) の方法に従って、好気条件下で5週令の植物の根粒から調整した。根粒を0.3M sucrose, 5mM DTT, 1mM MgCl_2 , 0.4mM EDTAを含む0.2Mのカリウムリン酸緩衝液 (pH 7.5) 中で、新鮮重の30%相当のpolyclar AT とともに乳鉢で摩砕し、摩砕した液を4層のガーゼでこした。ろ液を5,000xg で10分間遠心し、得られた上清を宿主植物画分とし、沈殿をバクテロイド画分とした。なお、沈殿は摩砕液で2度洗浄してから用いた。

4) バクテロイドと純粋培養した根粒菌の粗酵素液の調整法

バクテロイドは上述の方法で調整したものを、純粋培養した根粒菌は、16,000xgで10分間遠心して得られた沈殿をバクテロイドの調整に用いた摩砕液で2度洗浄したものを、それぞれの沈殿を20mlの摩砕液に懸濁させ、BRANSON

model W-200P超音波処理器で、90W、15 秒間処理を30秒おきに10回施した。処理後、16,000xgで30分間遠心し得られた上清を酵素液として用いた。

5) バクテロイドの精製法

バクテロイドは、Ching ら (31) の段階的ショ糖密度勾配法により精製した。10 g の根粒を20mlの0.3M sucrose, 5mM Mg-acetate, 0.2M Na-ascorbate を含む0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中で、3 g のpolyclar AT とともに乳鉢で摩砕した。摩砕した液は4層のガーゼでろ過し、ろ液を200xg で10分間遠心した。得られた上清5mlを0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.5) を含む57%(w/v) sucrose 7ml, 52%(w/v) sucrose 10ml, 50%(w/v) sucrose 10ml, 45%(w/v) sucrose 7ml から成る段階的密度勾配に静かにのせ、日立 (Hitachi) PRS27-2 水平ロータを用い、日立 (Hitachi) 55P-72 超遠心機で100,000xg で4時間遠心した。遠心後、ISCO model 185 Density Gradient Fractionatorを用いて、1 mlずつ分注した。Ching ら (31) が示したmature bacteroids, transforming bacteria, bacteria の各画分をそれぞれ集め、0.05M Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5) に懸濁し、上述の方法で超音波処理を施し酵素標品を得た。

6) 細胞内小器官の分画法

9 g の根粒を、10mlの0.4M sucrose, 20mM DTT, 10mM KCl, 1mM MgCl₂, 10mM EDTA, 10mg/ml BSA を含む0.1M Tricine-KOH緩衝液 (pH 7.8) 中で2.7gのpolyclar AT とともに乳鉢で摩砕した。摩砕した液を6層のガーゼでろ過し、得られたろ液4mlを0.1M Tricine (pH 7.8) を含む 2.0 M sucrose 3ml の上に形成された32mlの 2.0 M - 1.0 M sucrose の直線的密度勾配の上に静かにのせた。日立 (Hitachi) PRS27-2 水平ロータを用い、日立 (Hitachi) 55P-72 超遠心機で25,000rpm で4時間遠心を行った。遠心後、ISCO model 185 Density Gradient Fractionatorを用いて、1 mlずつ分注した。分注した各画分を酵素活性の測定に用いた。

7) アセチレン還元能の測定法

種々の令の植物体から分離した根粒を50mlの三角フラスコに入れ、酸素21%, アルゴン79%の混合ガスで置換した。分圧が10%になるようにアセチレンガスをシリンジで注入し、30°C で30分間インキュベートした後、生成したエチレンをUnibeads Aカラムを取り付けたガスクロマトグラフィー (日本電子) で測定した。

分離した根粒のアセチレン還元能に及ぼす酵素阻害剤の影響は、Houwaard (32)の方法によって調べた。5週令の植物体から分離した根粒100mg (4-5個)をカミソリで半分に切り、34.5mlのバイアルに入れた。それらの根粒は、2.5mM MgCl₂, 0.1M sucrose, 酵素阻害剤を含む0.05M Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4) に浸漬した。気相部分を酸素で置換し、分圧が10%になるようにアセチレンガスをシリンジで注入した後、215 ストロークス/分、25°C でインキュベートした。一定時間後、0.5ml のガスサンプルを抜き取り生成したエチレンをガスクロマトグラフィーで測定した。

8) 酵素活性の測定法

以下に示す酵素は、括弧内の文献の方法により測定した。アルコール脱水素酵素; ADH (33)、乳酸脱水素酵素; LDH (34)、アルデヒド脱水素酵素; ALDH (26)、ギ酸脱水素酵素; FDH (33)、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素; GAPDH (33)、イソクエン酸脱水素酵素; ICDH (33)、 α ケトグルタル酸脱水素酵素; α KGDH (35)、リンゴ酸酵素; ME (36)、グルコース6リン酸脱水素酵素; G6PDH (33)、6ホスホグルコン酸脱水素酵素; 6PGDH (33)、イソシトレートリアーゼ; ICL (37)、マレートシンターゼ; MS (38)、ホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼ; PEPC (39)、グルタミンシンテターゼ; GS (40)、 β ハイドロキシブチレート脱水素酵素; β HBDH (41)、フマラーゼ (42)、トリオースホスフェートイソメラーゼ; (43)、カタラーゼ; (44)。

ビルビン酸脱水素酵素; PDH の活性は、 α ケトグルタル酸のかわりにビルビン酸を用い、 α KGDHと同様な方法で測定した。リンゴ酸脱水素酵素; MDH は、NawaとAsahi (45)の方法からTriton X-100を除いた反応液で測定した。グルタミン酸脱水素酵素; GDH とグルタメートシンターゼ; GOGAT は以下に示す組成の反応液中で、A₃₄₀の減少を測定した。GDH ; 100 μ moles Tris-HCl (pH 8.0), 50 μ moles NH₄Cl, 0.25 μ moles NADH, 2 μ moles α -ketoglutarate: 全容量3ml, GOGAT ; 100 μ moles Tris-HCl (pH 7.5), 10 μ moles L-glutamine, 0.25 μ moles NADH, 2 μ moles α -ketoglutarate: 全容量3ml。なお、超音波処理をしないで β HBDHの活性を測定する場合には、最初に酵素液を10% Triton x-100 0.4mlとともに2分間インキュベートした後、300 μ moles Tris-HCl (pH 8.0), 9 μ moles Mg

Cl_2 , $3.6 \mu\text{moles}$ NAD, $60 \mu\text{moles}$ Na-DL- β -hydroxybutyrate を加え全容量 3 ml で、 A_{340} の増加を測定した。すべての酵素活性は、日立 (Hiatchi) 200-20 分光光度計を用いて、 30°C で測定した。

9) 糖度とタンパク質の定量法

糖度は、屈折糖度計を用いて測定した。タンパク質は、BSA を標準タンパク質として、Lowry ら (46) の方法で測定した。なお、摩砕液中に DTT が含まれている場合には、Lowry らの改良法 (47) を用いた。

結 果

1) 根粒組織の炭素代謝酵素活性と窒素固定能との相関

Fig. 1は、1982年6月から8月にかけて、名古屋大学の圃場の温室で生育させたダイズの植物体の新鮮重、根粒の新鮮重とアセチレン還元能の経時的変化を示したものである。植物体は播種後10週間生長を続け、その後、落葉、子実の乾燥により新鮮重は減少した。一本の植物に形成された根粒も7週目までは植物の生長とともに増加したが、その後は変化がみられなかった。この間の根粒のアセチレン還元能をみると、根粒新鮮重当りの活性は根粒形成の初期にすでに最高値の40%程度あり、開花期に最も高くなり、その後徐々に減少した。一方、植物体当りの活性は、根粒新鮮重の増加とともに上昇し、根粒の増加が見られなくなった7週目以降減少した。

根粒の窒素固定能と炭素代謝酵素の活性の相関を調べるため、まず6週令の植物の根粒の主要な炭素代謝経路の酵素活性を測定した。Table 1 には、発酵、エムデンマイヤーホフバルナス経路、トリカルボン酸サイクル、ペントースリン酸経路、グリオキシル酸経路、CO₂ 暗固定反応に関わる酵素の活性を示してある。NAD-ADH, NAD-GAPDH, NADH-MDH, PEPCが高い活性を有し、なかでもNADH-MDHの活性は特に高かった。また、NADP-ICDH, NADP-MDH, NADP-G6PDH, NADP-6PGDH も比較的高い活性を示した。

そこで、Table 1 に示す酵素のうち活性の高かったものと重要であると予想される酵素、さらに、アンモニア同化に関係するGDH, GOGAT, GSの活性の経時的変化を調べた (Fig. 2)。Fig.1 に示したアセチレン還元能の経時的変化と比較すると、5週目のピークは必ずしも一致しないが、アセチレン還元能の高かった3週から8週目まではADH, GAPDH, ICDH, G6PDH, 6PGDH, MDH, ME, PEPC, GS の活性も高く、アセチレン還元能の減少とともにこれらの酵素の活性も減少した。一方、ALDHとGOGAT は初期には活性が低く、10週目まで増加し続け、その後減少した。また、GDH は他の酵素と異なり、初期に高くその後減少傾向にあった。以上のように、アセチレン還元能と特に強い相関を持つ酵素はみられなかった。

2) 根と根粒の炭素代謝酵素活性の比較

Table 2 に示すように、根に比べ根粒ではADH, GAPDH, PEPCが著しく高い活性

を示した。ICDHとMDHの活性は、根粒の方がわずかに高かった。ペントースリン酸経路の酵素であるG6PDHの活性は根粒の方が高く、逆に、6PGDHは根の方が高かった。また、ALDHは根粒にしか活性が認められなかった。つぎに、これらの酵素が根粒の宿主植物細胞あるいはバクテロイドの何れに存在するのかを明らかにするため、それぞれの画分に分け酵素活性を測定した (Table 3)。ADHとPEPCは上清に特に高く、これらの酵素が宿主植物細胞に局在することを示している。GAPDH, ICDH, MDHは、バクテロイド画分の方が高かった。しかし、ペントースリン酸経路の酵素は上清の方が高かった。また、ALDHの活性はバクテロイドにしか見られず、根粒の粗酵素液では検出できなかったNAD-ALDHの活性も認められた。

3) バクテロイドと純粋培養した根粒菌の炭素代謝酵素活性の比較

ADHとNAD-ALDHの活性は、両者にほとんど差がみられなかった (Table 4)。しかしながら、NADP-ALDH, GAPDH, MDHの活性は、バクテロイドの方が高かった。逆に、ICDHとG6PDHは、純粋培養した根粒菌の方が高い活性を示した。6PGDHの活性はバクテロイドのみにみられ、純粋培養した根粒菌には検出されなかった。バクテロイドのMDHの活性は極めて高かったが、ここで用いたバクテロイド画分は根粒摩砕液の5,000xgの沈殿としたため、植物の細胞のオルガネラ、例えば、ミトコンドリアなどの混入によるものも含まれていると予想される。そこで、バクテロイドを精製し、同様の検討を行った。Fig.3は、Chingら(31)の段階的シヨ糖密度勾配法によって得られたプロフィールを示している。Chingらが述べているように、密度の違いによって、菌はmature bacteroids, transforming bacteria, bacteriaの3種の状態に分けられたが、彼らの結果と異なり菌の大部分はmature bacteroid画分に集まった。なお、最初のピークは植物のオルガネラを示す。得られた菌の3種の状態について種々の酵素の活性を測定したところ、NAD-MDH, G6PDH, 6PGDHを除くすべての酵素の活性は、mature bacteroidsで最も高く、transforming bacteria, bacteriaの順に低下した (Table 5)。NAD-MDHの活性は全く逆にbacteriaで最も高くなり、G6PDHと6PGDHの活性には明瞭な違いは認められなかった。懸濁液が異なるために、粗バクテロイドに比べ全体的に活性が低下しているが、にもかかわらずNAD-MDHの活性は純粋培養した根粒菌よりも高かった。したがって、バクテロイドは根粒菌よりも高いMDH活性を有していることが確認された。

4) 炭素代謝酵素の細胞内局在性

炭素代謝酵素の細胞内局在性をさらに検討するため、連続ショ糖密度勾配法により細胞内小器官を分離し、酵素活性を測定した。それぞれのオルガネラのマーカー酵素の活性から、ミトコンドリアはフラクションナンバー14、プラスチッドは21、バクテロイドは26番目に出現した (Fig. 4)。しかしながら、カタラーゼは明確なピークが見られず、本実験ではインタクトなパーオキシゾームは得られなかった。ADH, ICDH (Fig. 5)、GAPDH, G6PDH, 6PGDH (Fig. 6) は、フラクションナンバー6番以降には活性の明確なピークを検出することはできなかった。したがって、これらの酵素は細胞質に存在すると考えられる。MDH は、ミトコンドリアとプラスチッドに相当するところに認められ、これら二つのオルガネラに存在することを示している。なお、この実験では超音波処理あるいはデタージェント処理を行っていないので、バクテロイドに存在する酵素の活性は現れていない。したがって、Table 3 に示されたバクテロイドのADH, GAPDH, ICDH, G6PDH, 6PGDH の活性には、オルガネラ由来のものは含まれていないと判断することができる。

5) 分離根粒のアセチレン還元能に及ぼす酵素阻害剤の影響

根粒内の炭素代謝経路と窒素固定能との関連をさらに検討するため、分離した根粒に種々の酵素阻害剤を与え、アセチレン還元能がどのように変化するかを調べた。Fig.7 には、分離根粒に炭素源としてシュクロースを与えた場合と与えない場合のアセチレン還元能の経時的変化を示した。アセチレン還元能は両者ともに時間の経過とともに増加したが、増加率は減少傾向にあった。しかし、シュクロースの添加によりアセチレン還元能は明らかに促進され、シュクロースは根粒内で代謝され窒素固定のための炭素源として利用されたと推測される。そこで、シュクロースを加えたものに、解糖系の阻害剤としてヨード酢酸とフッ化ナトリウム、トリカルボン酸回路の阻害剤としてマロン酸とフルオロ酢酸を与えた (Table 6)。解糖系の阻害剤は、両者ともに阻害作用を示した。ところが、トリカルボン酸回路の阻害剤のうち、フルオロ酢酸は影響がみられず、マロン酸は抑制作用が認められたが、明瞭ではなかった。次ぎに、ADH, PEPC, ALDH の阻害剤として、ピラゾール (24)、グリオキサリルサルファイト (48)、6シアノプリン (26) をそれぞれ加えて影響を調べた (Fig. 8)。ピラゾールは100mM、

グリオキサルビスアルファイトは20mM、6シアノブリンは10mMで明らかな抑制作用が認められた。

考 察

ダイズ根粒と根の粗酵素液の炭素代謝酵素の活性を比較した結果から、根粒では根に比べ、解糖系、エタノール発酵、 CO_2 暗固定反応が著しく活発であると予想される (Table 2)。さらに、ADH と PEPC は宿主植物細胞に局在することから (Table 3)、根粒に転流された光合成産物は、宿主植物細胞内で、主にエタノール発酵経路と CO_2 暗固定反応によって代謝されと考えられる。一方、バクテロイドは、純粹培養した根粒菌に比べ高い NADP-ALDH と NADH-MDH 活性を有した (Table 4 と 5)。この結果は、エタノール発酵の代謝産物であるアセトアルデヒドあるいはエタノール、と CO_2 暗固定反応の生成物であるリンゴ酸がバクテロイドに供給され则认为するならば、よく符合する。また、分離根粒のアセチレン還元能が解糖系、ADH, PEPC, ALDH のそれぞれの阻害剤によって抑制されたことは (Table 6 と Fig. 8)、エタノール発酵と CO_2 暗固定反応とバクテロイドの窒素固定能との関連を裏付けるものである。

バクテロイドの炭素源に関しては、糖、有機酸、嫌氣的代謝産物など種々の物質について、最近の総説 (18、49、50、51、52) のなかで様々な点から検討が行われている。これらの物質の中で、バクテロイドはコハク酸やリンゴ酸の能動輸送系を有する点 (53)、さらに、有機酸能動輸送系欠損の根粒菌ミュータントを接種すると窒素固定能を示さない根粒が形成される (54、55、56) が、各種糖類を利用できないミュータントは窒素固定能を保持した根粒を形成する (57、58) 点から、有機酸が最も有力視されている。本実験では、分離根粒のアセチレン還元能は、PEPC の阻害剤であるグリオキサリブサルファイトによって抑制された (Fig. 8) が、TCA サイクルの阻害剤によっては抑制されなかった (Table 6)。したがって、 CO_2 暗固定反応によって生成されたリンゴ酸が、バクテロイドの窒素固定のための炭素源として利用されと考えられる。最近、King ら (59) は、 $^{14}\text{CO}_2$ を利用した実験によって、ダイズ根粒における CO_2 暗固定反応はバクテロイドのニトロゲナーゼ活性のための炭素源を供給することを示唆した。しかしながら、Reibach と Streeter (60) または Kouchi と Nakaji (61) による ^{14}C または ^{13}C トレーサー実験によって、根粒内では TCA サイクルの中間代謝物もラベルされることが示された。また、バクテロイドは TCA

サイクルを有しており（62、63）、第2章で示すようにダイズ根粒のミトコンドリアは、根と同様な酸化リン酸化能を有していた。これらの結果は、ダイズ根粒内では、バクテロイドとミトコンドリアのTCA サイクルが作働していることを示している。本実験では、TCA サイクルの阻害剤は分離根粒のアセチレン還元能を抑制しなかった（Table 6）ので、両者のTCA サイクルは窒素固定反応と直接には関連していないと考えられる。しかし、阻害剤が目的の部位に到達しているかどうか確かめる必要がある。KouchiとNakaji（61）は、ダイズ根粒内には有機酸のプールが少なくとも2つあり、植物サイトゾルに存在すると思われるプールは固定した窒素の同化のための炭素骨格として利用されていることを示唆した。したがって、宿主植物側のTCA サイクルはバクテロイドの炭素源供給としての役割は小さいと思われる。

CO_2 暗固定反応によって生成されたリンゴ酸がすべてバクテロイドに供給されるのかどうかは、今後さらに検討する必要がある。固定された窒素をアスパラギンの形で植物に輸送するアルファアルファとアラントインの形で輸送するダイズなどとは、 CO_2 暗固定反応の役割が異なることが報告されている（64）。 CO_2 暗固定反応によって生成されたリンゴ酸が炭素骨格として利用されるのか、あるいは、バクテロイドの炭素源として利用されるのかは、固定された窒素の輸送形態と密接に関連していると予想される。

LaRue ら（22、24、26）は、一連の研究の中で、根粒内にはエタノールとアセトアルデヒド、そして、それらの生成に関わる酵素系が存在すること、さらに、単離したバクテロイドのアセチレン還元能がアルコール類、アセトアルデヒド類によって促進されることから、根粒内の嫌機的代謝の重要性を指摘した。しかし、一方で、100% O_2 処理によって根粒のニトロゲナーゼ活性は低下するにもかかわらず、それに伴う CO_2 放出の減少に見合うほどエタノールは蓄積されないことから、エタノールはバクテロイドの主要な炭素源ではないと述べている（49）。本実験では、ADH とALDHの阻害剤が根粒のアセチレン還元能を抑制した（Fig. 8）ことから、エタノール発酵もまた窒素固定能と密接な関係にあると考えられる。Fig. 8に示された阻害剤のうち、ピラゾールは、抑制効果があらわれるのにかなりの高濃度を要した。粗酵素液では、1 mMのピラゾールによってADH 活性は82%抑制された。また、バクテロイドのNADP-ALDH 活性は純粋培養した根粒

菌の活性よりも高かったのに対し、バクテロイドと純粋培養した根粒菌のADH 活性には差が見られなかった (Table 4)。これらのことから、エタノールよりもむしろアセトアルデヒドの方がバクテロイドの炭素源としては重要だと思われる。

Hensonら (29) はアルファルファ根粒の宿主植物細胞のICDHの活性が高いことから、また、KurzとLaRue (28) はエンドウ根粒バクテロイドのICDHの活性と窒素固定能が強く相関することから、ICDHが窒素固定能と結びついていることを示唆した。しかしながら、本実験では、宿主植物細胞のNADP-ICDH の活性は、Hensonらの値の6分の1程度であった。また、根粒とバクテロイドのICDHの活性は、それぞれ根と純粋培養した根粒菌のそれに比べ特に高いということはなく (Table 2 と 4)、これらの結果からは、ICDHが窒素固定能と関連しているとは考えにくい。

Laing ら (65) とTajimaとYamamoto (66) は、それぞれルービンとダイズの根粒において、放射性同位体を用いてペントースリン酸経路が作用していることを示した。本実験では、G6PDH と6PGDH の活性はバクテロイドよりも宿主植物で高く (Table 3)、アラントインの前駆体となるリボース5リン酸の供給と関わっていると推測される。アラントインの合成過程には、プロプラスチッド、パーオキシゾームなど種々のオルガネラが関与していることが明らかにされたが (42)、G6PDH, 6PGDHをはじめ3種類の酵素はいずれも細胞質に局在した (Fig. 5 と 6)。バクテロイドも活性は低いもののG6PDH と6PGDH の活性を有しており、純粋培養した根粒菌には6PGDH の活性が検出できなかった (Table 4) ことから、バクテロイド内での炭素代謝過程にもペントースリン酸経路が関与していると考えられる。

Ching ら (31) は、ダイズ根粒内には、窒素固定能の異なるmature bacteroids, transforming bacteria, bacteriaの3種類の状態が存在することを報告した。3種類の状態の菌を同様な方法で分離して酵素活性を比較したところ、大部分の酵素は β HBDHの活性と相関を示したが、NADH-MDH, G6PDH, 6PGDHの活性は異なった (Table 5)。Ching らもチトクロームオキシダーゼの活性はbacteriaで最も高くなっており、これら3種類の状態の菌の代謝は異なっていると思われる。NADP-ALDH の活性はmature bacteroids で最も高く、NADH-MDHの活性はbacteria で最も高いことから、mature bacteroids, transforming bacteria, bac-

teria では、それぞれ異なった炭素源を利用していると考えられる。

以上のことから、ダイズ根粒の宿主植物細胞ではエタノール発酵とCO₂ 暗固定反応が特異的に活発であり、それぞれの代謝産物であるアセトアルデヒドとリンゴ酸がバクテロイドの窒素固定能のための炭素源として利用されると推測される。

要 約

ダイズ根粒内の窒素固定能と関連した炭素代謝経路を明らかにするため、根粒の炭素代謝酵素の活性とアセチレン還元能との相関、根粒と根、あるいは、バクテロイドと純粋培養した根粒菌との酵素活性の比較、分離根粒のアセチレン還元能に及ぼす酵素阻害剤の影響について検討した。その結果、以下の点が明らかになった。

- 1) 根粒のアセチレン還元能と炭素代謝酵素の活性の経時的変化を比較したところ、特に強い相関を示す酵素は見いだせなかった。
- 2) ADH, GAPDH, PEPCは、根に比べ根粒で特に高い活性を示した。ADH とPEPCは根粒の宿主植物細胞に局在した。
- 3) バクテロイドのNADP-ALDH, GAPDH, MDH の活性は、純粋培養した根粒菌のそれよりも高かった。
- 4) シュクロースの添加により促進された分離根粒のアセチレン還元能は、解糖系の阻害剤によって抑制されたが、トリカルボン酸サイクルの阻害剤では抑制されなかった。また、ADH, PEPC, ALDH の阻害剤も抑制作用を示した。

これらの結果から、ダイズ根粒内の宿主植物細胞ではエタノール発酵とCO₂ 暗固定反応が活発であり、これらの経路で生成されたアセトアルデヒドとリンゴ酸がバクテロイドの窒素固定反応のための炭素源として利用されると考えた。

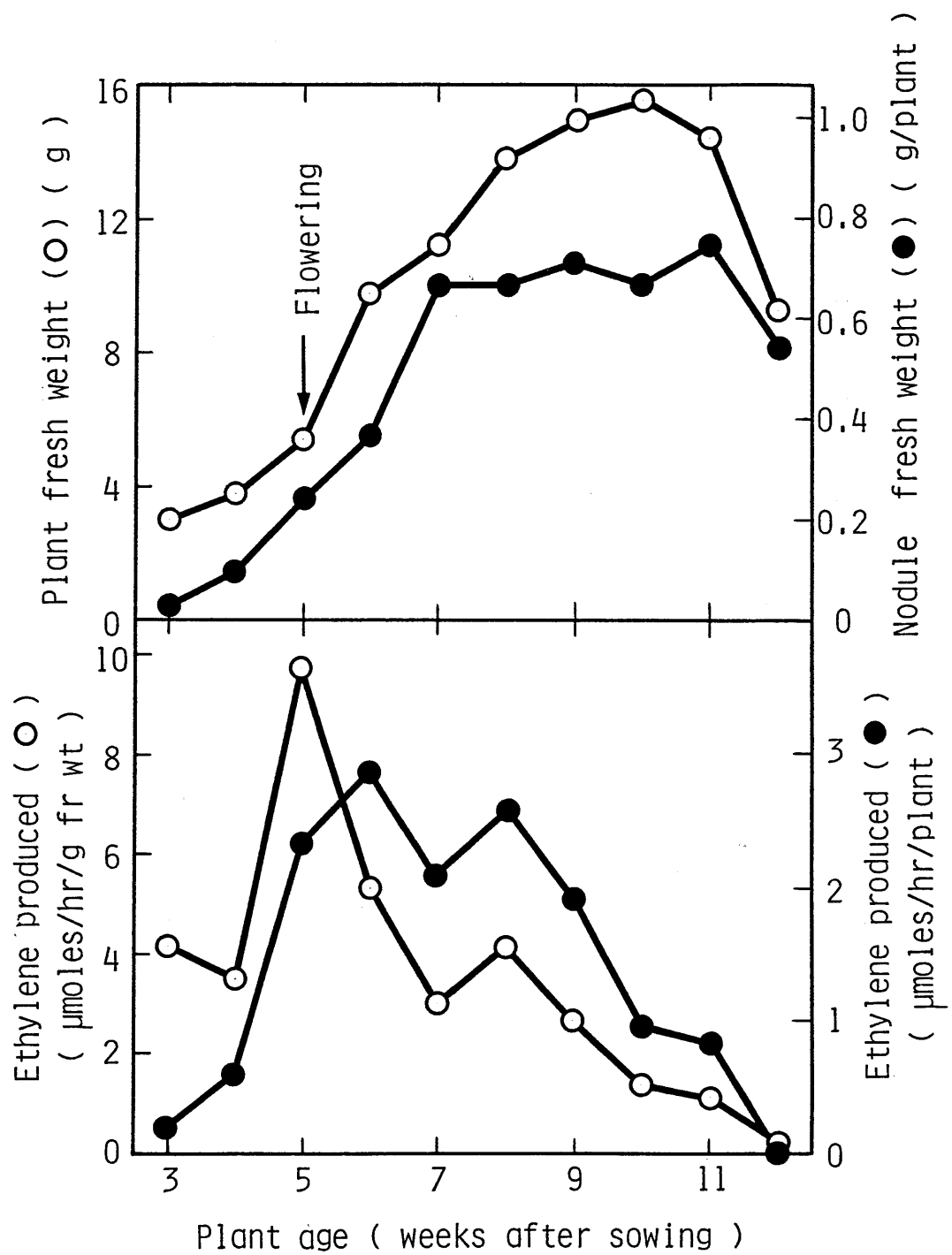


Fig. 1 Changes in plant growth, nodule growth and acetylene reduction activity during plant development.

Table 1 Activities of enzymes of carbon metabolism in crude extracts
from soybean nodules.

Enzyme	Activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$)
Alcohol dehydrogenase NAD (ADH) NADP	0.290 0.001
Lactate dehydrogenase NAD (LDH) NADP	ND ND
Aldehyde dehydrogenase NAD (ALDH) NADP	ND 0.005
Formate dehydrogenase NAD (FDH) NADP	ND ND
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase NAD (GAPDH) NADP	0.725 0.002
Pyruvate dehydrogenase NAD (PDH) NADP	ND ND
Isocitrate dehydrogenase NAD (ICDH) NADP	ND 0.054
α -Ketoglutarate dehydrogenase NAD (α KGDH) NADP	ND ND
Malate dehydrogenase NADH (MDH) NADPH	4.330 0.029
Malic enzyme NAD (ME) NADP	ND 0.007
Glucose-6-phosphate dehydrogenase NAD (G6PDH) NADP	ND 0.031
6-Phosphogluconate dehydrogenase NAD (6PGDH) NADP	0.014 0.051
Isocitrate lyase (ICL)	0.002
Malate synthase (MS)	0.017
Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC)	0.346

Most enzyme activities are expressed as μmoles pyridine nucleotide oxidized or reduced per mg protein per min. Specific activities of isocitrate lyase and malate synthase are expressed as μmoles of glyoxylate formed and as μmoles acetyl-CoA utilized per mg protein per min, respectively. ND: not detected.

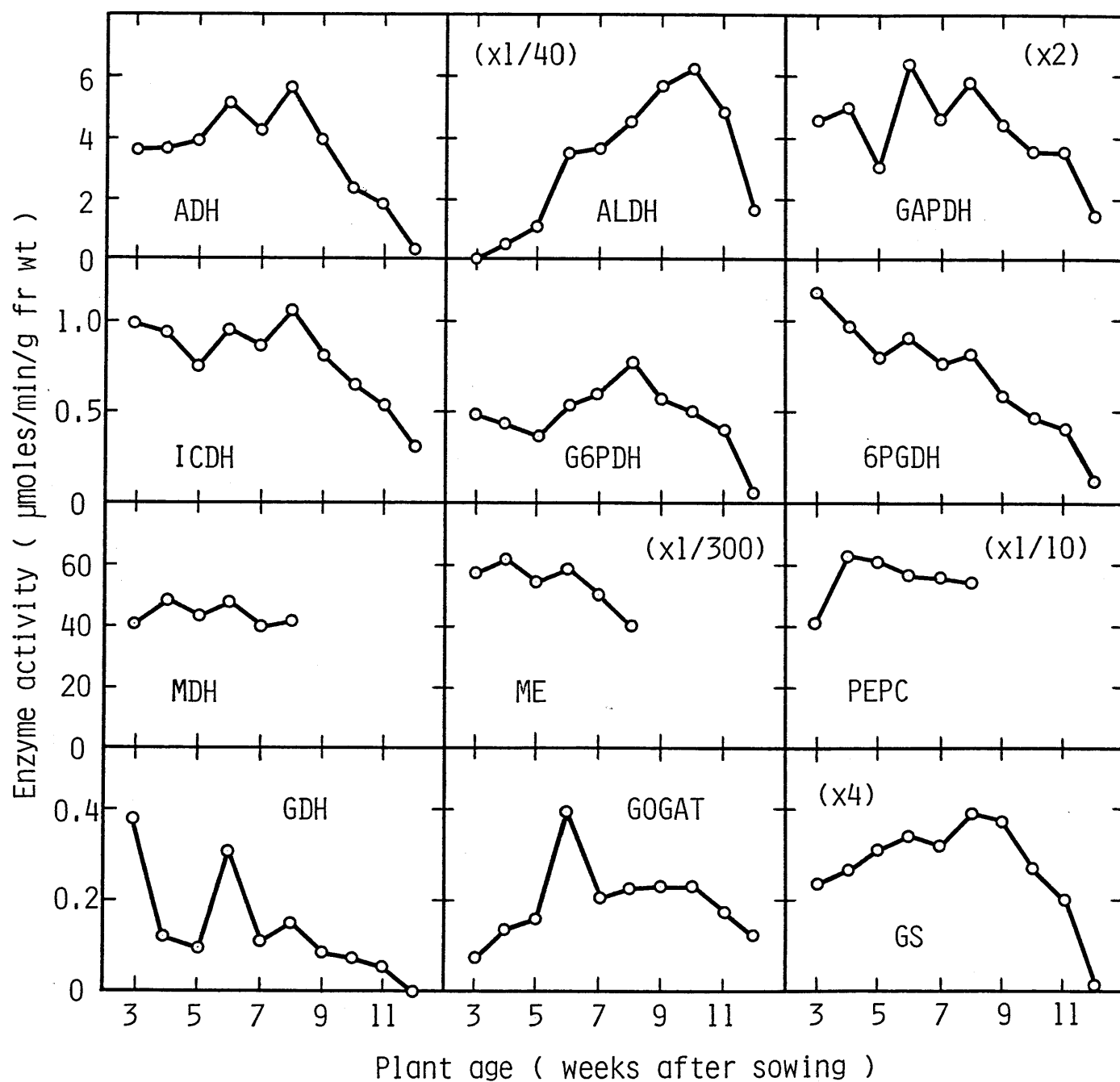


Fig. 2 Changes in enzyme activities of nodule crude extracts during plant development.

Table 2 Comparison of enzyme activities between nodule and root extracts.

Enzyme	Activity ($\mu\text{mol/min/mg protein}$)	
	Nodules	Roots
NAD-ADH	0.288	0.045
NADP-ALDH	0.001	ND
NAD-GAPDH	0.827	0.027
NADP-ICDH	0.078	0.056
NADH-MDH	6.567	5.612
NADP-G6PDH	0.058	0.011
NADP-6PGDH	0.064	0.121
PEPC	0.446	0.085

Enzyme activities are expressed as $\mu\text{moles pyridine nucleotide oxidized or reduced per mg protein per min.}$ ND: not detected.

Table 3 Enzyme localization in soybean nodules.

Enzyme	Activity ($\mu\text{mol/min/mg protein}$)	
	Supernatant	Bacteroids
NAD-ADH	0.419	0.006
NAD-ALDH	ND	0.033
NADP-ALDH	ND	0.054
NAD-GAPDH	1.174	2.563
NADP-ICDH	0.055	0.331
NADH-MDH	4.027	12.474
NADP-G6PDH	0.049	0.017
NADP-6PGDH	0.055	0.017
PEPC	0.473	ND

Enzyme activities are expressed as $\mu\text{moles pyridine nucleotide oxidized or reduced per mg protein per min.}$ ND: not detected.

Table 4 Comparison of enzyme activities between the free living bacteria, R. japonicum, and the bacteroids isolated from soybean nodules.

Enzyme	Activity ($\mu\text{mol/min/mg protein}$)	
	Bacteroids	Free living bacteria
NAD-ADH	0.006	0.008
NAD-ALDH	0.033	0.035
NADP-ALDH	0.054	0.014
NAD-GAPDH	2.563	1.056
NADP-ICDH	0.331	0.693
NADH-MDH	12.474	0.089
NADP-G6PDH	0.017	0.039
NADP-6PGDH	0.017	ND

Enzyme activities are expressed as $\mu\text{moles pyridine nucleotide oxidized or reduced per mg protein per min.}$ ND: not detected.

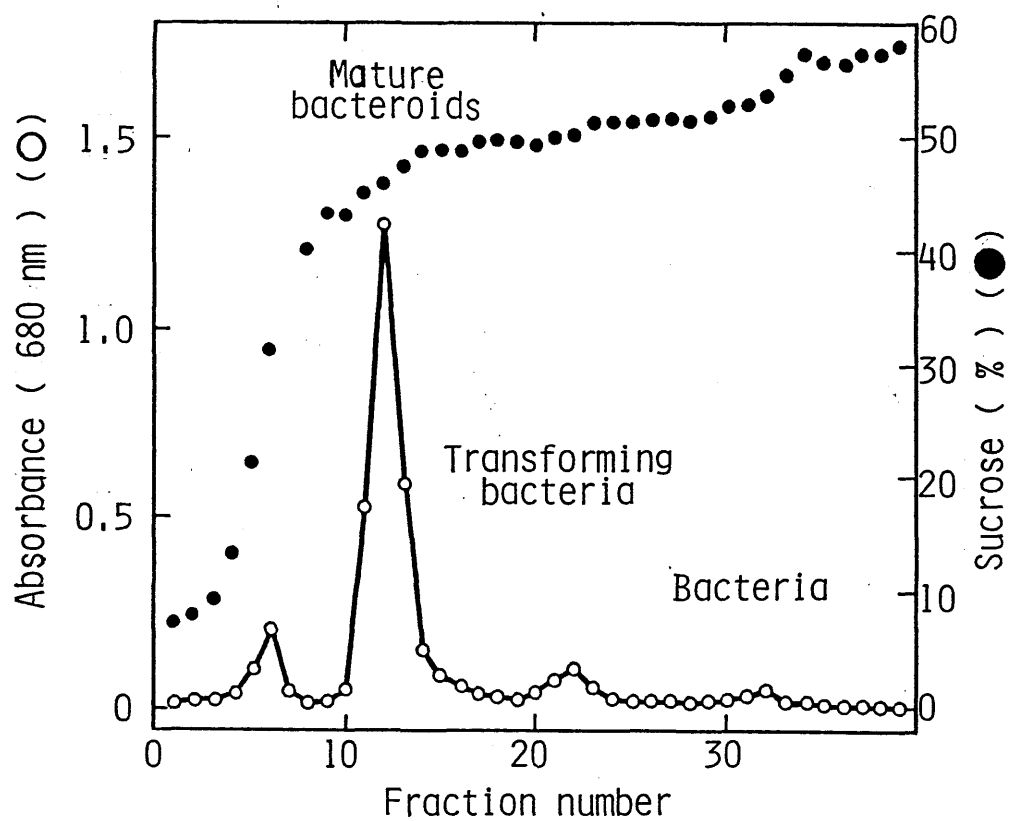


Fig. 3 Discontinuous sucrose density gradient separation of bacteroids from soybean nodules.

Table 5 Enzyme activities of mature bacteroids, transforming bacteria and bacteria obtained from soybean nodules by a stepwise sucrose density gradient centrifugation.

Enzyme	Activity ($\mu\text{mol/min/mg protein}$)		
	Mature Bacteroids	Transforming Bacteria	Bacteria
NAD- β HBDH	0.015	0.011	0.006
NAD-ALDH	0.009	0.001	0.001
NADP-ALDH	0.031	0.020	0.011
NAD-GAPDH	0.885	0.246	0.137
NADP-ICDH	0.082	0.032	0.021
NADH-MDH	0.559	0.794	2.572
NADPH-MDH	0.278	0.188	0.145
NADP-G6PDH	0.003	0.001	0.003
NADP-6PGDH	0.002	ND	0.006

Enzyme activities are expressed as $\mu\text{moles pyridine nucleotide oxidized or reduced per mg protein per min.}$ ND: not detected.

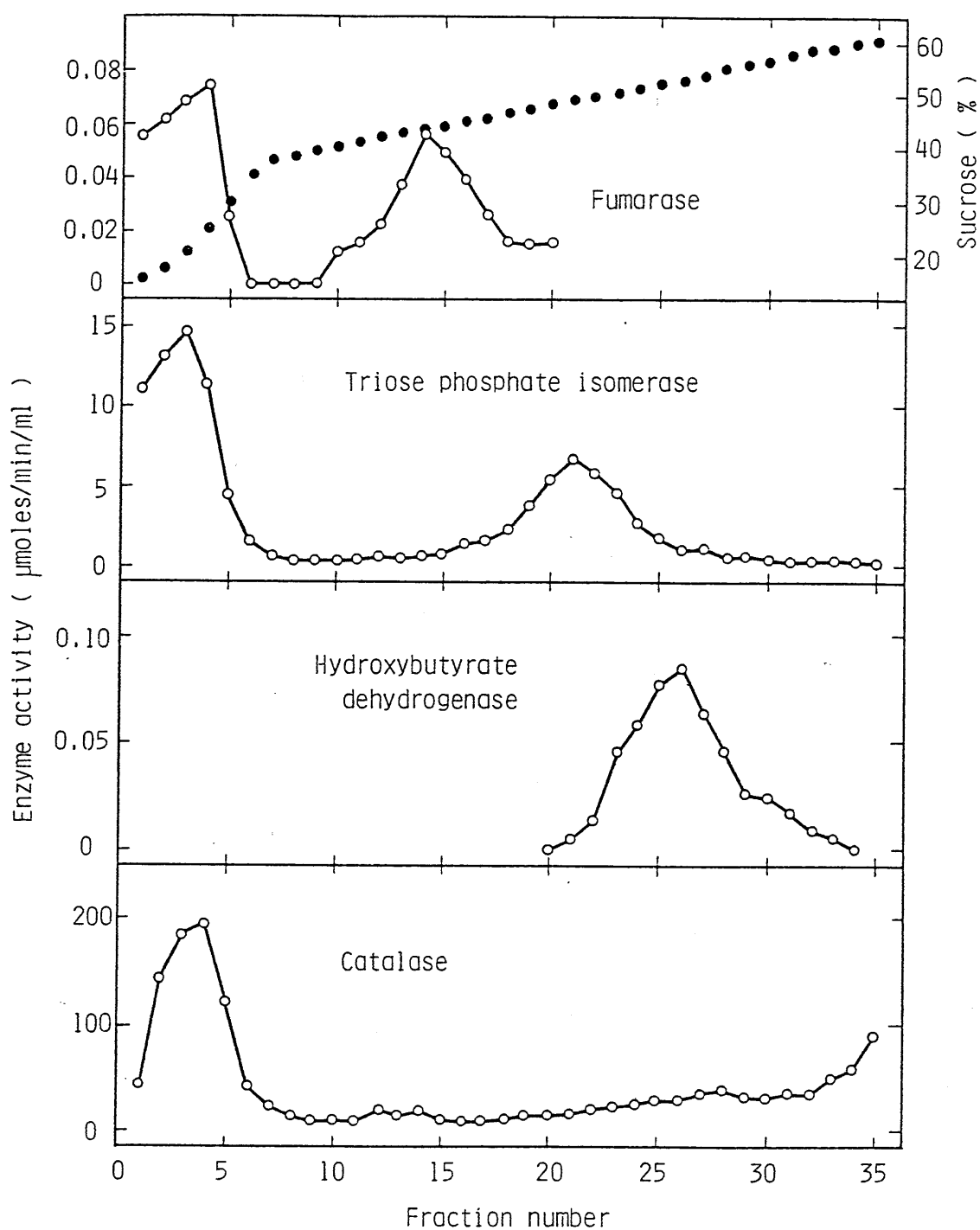


Fig. 4 Distribution of marker enzymes for mitochondria, proplastids, bacteroids, and peroxisomes of soybean nodules following sucrose density gradient centrifugation.

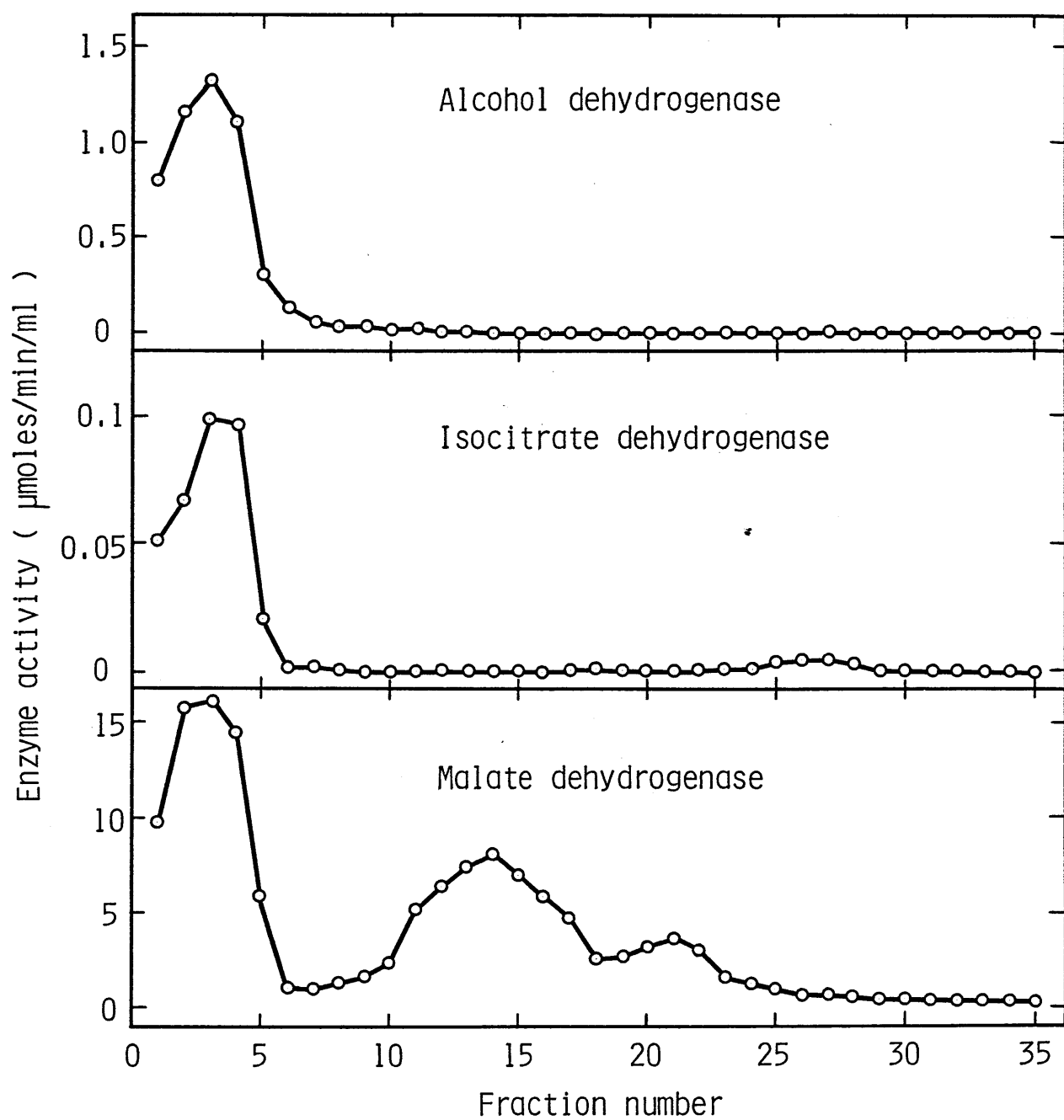


Fig. 5 Distribution of alcohol dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase of soybean nodules following sucrose density gradient centrifugation.

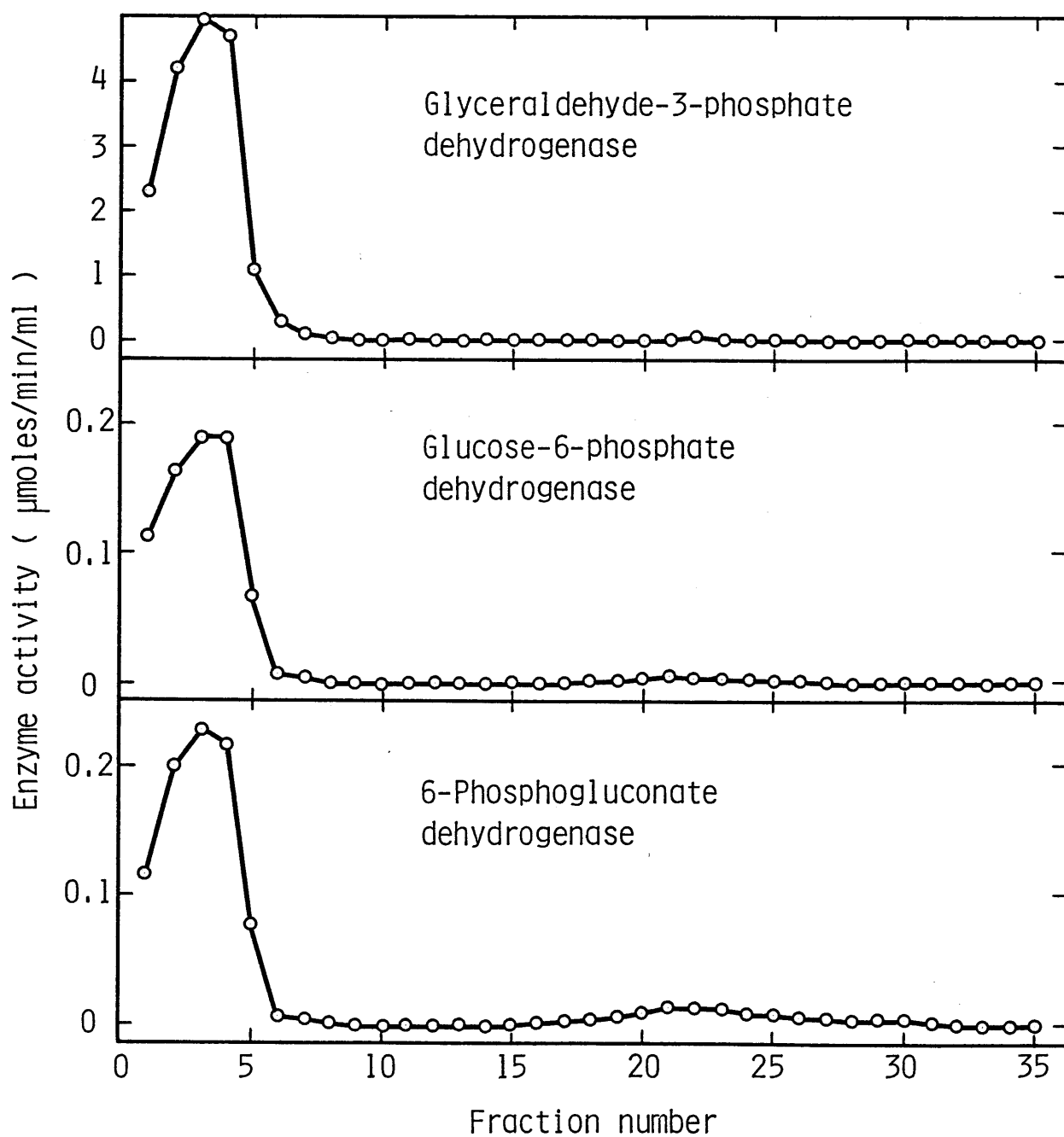


Fig. 6 Distribution of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of soybean nodules following sucrose density gradient centrifugation.

Table 6 Effects of metabolic inhibitors on the acetylene reducing activity of detached soybean nodules.

Treatment	Acetylene reduction ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ produced /4h/g fresh weight)	% control
Control	11.93 \pm 2.34	100
Iodoacetate (5mM)	1.80 \pm 0.71	15
Sodium fluoride (40mM)	8.63 \pm 0.48	72
Malonate (40mM)	9.38 \pm 3.06	78
Fluoroacetic acid (40mM)	12.55 \pm 3.61	105

The reaction mixture consisted of 0.05M Tris-HCl buffer (pH 7.4), 2.5mM MgCl_2 , 0.1M sucrose and respective inhibitors indicated. The values are the means of three determinations \pm standard deviations which are expressed as $\mu\text{moles ethylene}$ produced per g fresh weight for 4 h-incubation.

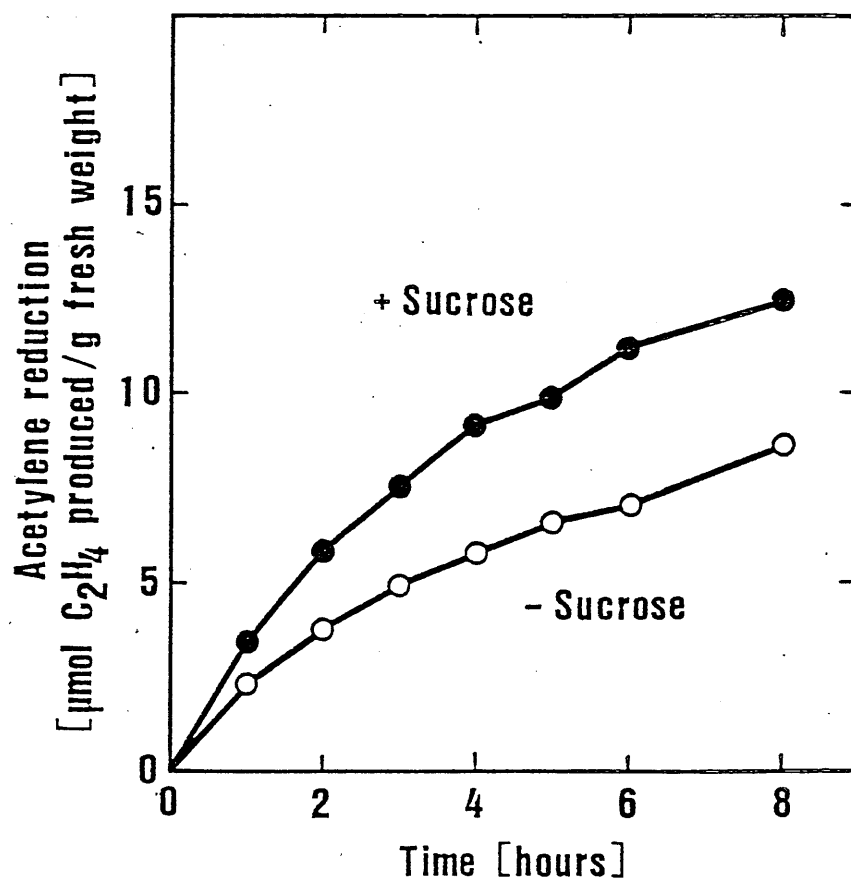


Fig. 7 Acetylene reduction of detached soybean nodules with or without 100mM sucrose.

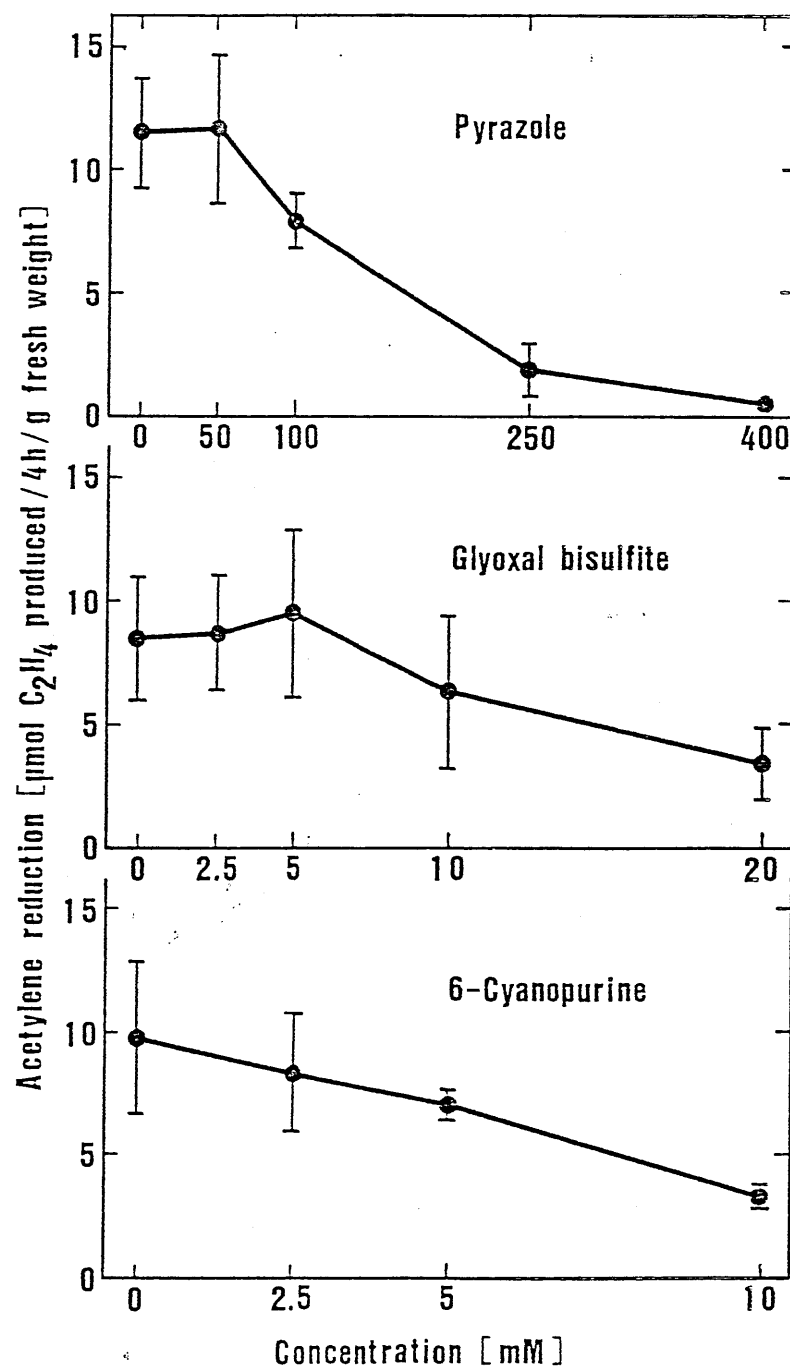


Fig. 8 Effects of enzyme inhibitors on the acetylene reducing activity of detached soybean nodules. The values are the means of three or nine determinations and each bar represents standard deviation.

第2章 ダイズ根粒のミトコンドリアの活性と窒素固定能との関連

序 論

根粒細胞内には、多量のバクテロイドと酸素と強く結合するレグヘモグロビンが含まれている。そのために、根粒細胞内の遊離の溶存酸素濃度はおよそ10nMという極めて低レベルに保たれている(17、67)。根粒の炭素代謝酵素の活性を調べると、根粒では根に比べエタノール発酵が活発で、その代謝産物がバクテロイドの炭素源になり得ることが明らかになった(24)。このような低酸素分圧の下で、バクテロイドのニトロゲナーゼは酸素による破壊から防御される一方、ニトロゲナーゼ反応に必要なエネルギーをレグヘモグロビンに結合した酸素が関与する酸化反応に依存している(17)。

ところが、エネルギー生産のために酸素を必要とする根粒内のミトコンドリアの機能と窒素固定能との関連に関しては、これまでほとんど調べられていない。ミトコンドリアが、バクテロイドのように、レグヘモグロビンに結合した酸素を利用できるのかも不明である。電子顕微鏡観察によれば、ミトコンドリアはレグヘモグロビンの存在する感染細胞内でも、最も酸素濃度が高いと思われる細胞膜の周辺に位置しているといわれている(67、68)。また、MueckeとWiskich(69)は、ダイズ根粒から調整したミトコンドリアは比較的低い呼吸調節率を示したと報告した。

バクテロイドは、転流されてきた炭素化合物を窒素固定反応によって消費するが、宿主植物細胞は固定された窒素化合物を同化する。また、根粒の生長のために炭素源を必要とする。宿主植物細胞において、同化、生長に必要なエネルギーの産出にミトコンドリアは関わっていると予想される。また、ミトコンドリアはエネルギー生産だけでなく、種々の物質の生合成反応の前駆体を供給するという役割も担っている。根粒内アンモニア同化過程においては、グルタミン酸あるいはグルタミンが重要である(18、70)が、これらのアミノ酸の骨格はトリカルボン酸サイクルの α ケトグルタル酸である。したがって、ミトコンドリアも窒素固定反応と密接な関係にあると思われる。

本実験では、ダイズ根粒からバクテロイドが混入しないようにミトコンドリア

を単離し、その呼吸活性について根のミトコンドリアと比較した。また、植物の令による活性の違いを調べ、窒素固定能との関連を検討した。

材 料 及 び 方 法

1) 材料

前章と同様に、ダイズ (*Glycine max*; A62-1) と *Rhizobium japonicum* strain 009 を用いた。なお、植物令による違いを調べる実験では、令による違いを明確にするため、主根の基部に形成された根粒だけを材料として用いた。

2) ミトコンドリアの調整法

根粒または根を、新鮮重の4倍量の0.5M sucrose, 1%(w/v)Na-isoascorbate, 10mM EDTA, 0.1%(w/v)BSA を含む0.05M Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5) 中で、新鮮重の30%相当のpolyclar AT とともに、カミソリで細かくきざんだ後、乳鉢で摩砕した。摩砕した液は4層のガーゼでろ過し、1,000xg で10分間遠心した。得られた上清を10,000xgで15分間遠心した後、その沈殿を洗浄液 (0.05M Tris-HCl緩衝液 pH 7.5, 0.4M sucrose, 0.1%(w/v)BSA) に懸濁し、再び同様に1,000xg で10分間、10,000xgで15分間の遠心を行った。最終的に得られた沈殿を粗ミトコンドリアとした。

ミトコンドリアの精製は、Jackson ら (71) の方法に従った。5mlの洗浄液に懸濁させた粗ミトコンドリアを、12mlの45%Percoll と12mlの21%Percoll 溶液から成る2層の密度勾配の上に静かにのせた。なお、おのおののPercoll 溶液は、10mM Tris, 0.25M sucrose, 0.1%(w/v)BSAを含み、pH7.5 に調整した。アングルローターを用い、7,500xg で30分間遠心した後、45%と21%Percoll の間層をバスツールピペットで回収し、洗浄液で2度洗ったものを精製ミトコンドリアとした。

ミトコンドリアの重さの変化を調べる実験においては、13mlの45%Percoll、14mlの33%Percoll、12mlの21%Percoll 溶液から成る3層の密度勾配に5mlの粗ミトコンドリア画分をのせ、7,500xg で30分間遠心した。遠心後、底から1mlずつ分注し酵素活性を測定した。

3) 呼吸活性の測定法

ミトコンドリアの酸素吸収能は、クラーク型酸素電極 (Yanaco製) を用いて25℃で測定した。反応液2.8ml には、20mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2), 0.4M mannitol, 0.5mM EDTA, 5mM MgCl₂, 0.1%(w/v)BSA を含み、ミトコンドリア画分

を0.1ml 加えた。基質は、コハク酸、リンゴ酸の場合は最終濃度が7mMになるように、NADHの場合は1.7mM になるように添加した。また、令による違いを調べる実験では、リンゴ酸濃度を30mMとした。25℃における溶存酸素濃度は237 μ Mとし、125nmoles のADP 添加によりADP/O 比と呼吸調節率をもとめた。

4) 根粒または根のサイトゾル画分の調整法

根粒または根のサイトゾル画分は、TajimaとLaRue (24)の方法に従って調整した。1gの根粒または根を、0.3M sucrose, 5mM DTT, 1mM MgCl₂, 0.4mM EDTAを含む0.2Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)中で、0.3gのpolyclar ATとともに乳鉢で摩砕した。摩砕した液を4層のガーゼでろ過した後、16,000xgで30分間遠心した。得られた上清をサイトゾル画分とし、酵素活性の測定、レグヘモグロビンの定量に用いた。

5) 酵素活性の測定法

酵素の活性は分光光度計を用いて30℃で測定した。 β ハイドロキシブチレート脱水素酵素; β HBDH、アルコール脱水素酵素; ADH、フマラーゼ、カタラーゼ、ホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼ; PEPCは前章に明示した方法を用いた。以下に示す酵素は括弧内の文献に示された方法によった。NADPH-チトクロームcレダクターゼ(72)、ビルビン酸デカルボキシラーゼ; PDC (73)、リンゴ酸脱水素酵素; MDH (45)、チトクロームcオキシダーゼ; Cyt oxi (45)、リンゴ酸酵素; ME (74)、グルタミン酸脱水素酵素; GDH (75)、アスパラギン酸転移酵素; AAT (76)。イソクエン酸脱水素酵素; ICDHの活性は、50mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.6), 10mM MgCl₂, 0.5mM NAD, 1.7mM KCN, 0.02% Triton X-100, 4mM isocitrateから成る反応液中で、A₃₄₀の増加を測定した。

6) アセチレン還元能の測定法とレグヘモグロビンとタンパク質の定量法

アセチレン還元能は分離した根粒を用い、前章の方法で測定した。レグヘモグロビンは、サンプルと等量の0.2N NaOH 中に4.2Mピリジンを混合した後、フェリシアン化カリウムまたはディチオナイトを少量加え、フェリシアン化カリウムを加えたものを対照に、A₅₅₆とA₅₃₉を測定し求めた(77)。タンパク質の定量には、Lowryの改良法を用いた(47)。

結 果

1) ミトコンドリアの精製

粗ミトコンドリア画分とPercoll 密度勾配によって得られた精製ミトコンドリアについて、純度を調べるために種々のオルガネラのマーカー酵素の活性を測定した (Table 7)。精製ミトコンドリアには、粗ミトコンドリアのフマラーゼ活性の55%が認められた。バクテロイドのマーカー酵素である β HBDHの活性は非常に小さく、Percoll 密度勾配によって大部分のバクテロイドは除くことができた。しかしながら、小胞体のマーカー酵素であるNADPH-チトクローム c レダクターゼの活性は粗ミトコンドリアの40%、パーオキシゾームのマーカー酵素であるカタラーゼの活性は26%が精製ミトコンドリアに認められた。したがって、本実験で用いた方法では、小胞体とパーオキシゾームは完全に取り除くことはできなかったが、フマラーゼの回収率よりも低い値であった。

2) 根粒と根のミトコンドリアの呼吸活性の比較

まず、根粒と根のサイトゾルの炭素代謝系のちがいを、ADH, PDC, PEPCの活性から調べた (Table 8)。根粒では、ADH, PDC, PEPCの活性はすべて根よりも高く、エタノール発酵とCO₂ 暗固定反応が活発であると推測される。このように、嫌氣的代謝が活発である根粒と好氣的代謝が優勢であると思われる根から、それぞれミトコンドリアを単離し、その呼吸活性を比較した。

根粒のミトコンドリアの酸素吸収能は、コハク酸、リンゴ酸を基質とした場合には、根のミトコンドリアよりも約2倍高かった (Table 9)。NADHを与えた場合には逆に根のミトコンドリアの酸素吸収能の方が高かったが、標準偏差が大きく、調整のたびにかなりちがいが見られた。ADP/O 比と呼吸調節率は、すべて根粒ミトコンドリアの方が高い値を示した。ミトコンドリアの酵素について同様に根粒と根を比較すると、ICDHの活性にはあまりちがいが見られなかったが、フマラーゼ、MDH、チトクローム c オキシダーゼは根粒ミトコンドリアの方が約2倍高い活性を示した (Table 10)。

根粒ミトコンドリアの酸素吸収能に対する青酸の影響を調べたところ、1 mM青酸によって酸素吸収能は95%抑制された (Fig. 9)。

3) 根粒ミトコンドリアの植物令によるちがいと窒素固定能との関連

Fig. 10 には、分離根粒のアセチレン還元能、レグヘモグロビンの含量と回収されたミトコンドリアタンパク質量の経時的変化を示した。アセチレン還元能は時間の経過とともに増加し、播種後6週間で最大となり、その後急激に減少した。レグヘモグロビン含量もアセチレン還元能と同様に増加したが、6週以降はアセチレン還元能ほど減少しなかった。一方、種々の植物令の根粒から回収されたミトコンドリアのタンパク質量は、令によってあまり大きく変動はしなかったが、時間の経過とともにやや減少傾向にあった。

コハク酸とリンゴ酸を基質として与えたときの酸素吸収能、ADP/O 比、呼吸調節率の変化を、それぞれFig. 11 とFig. 12 に示した。リンゴ酸を与えたときの呼吸調節率を除き、他のすべての値は植物の令によってほとんど異ならなかった。リンゴ酸添加時の呼吸調節率は、5週間で升高くなり、9週間になって減少した。なお、NADHを添加した場合は、コハク酸の場合と同様ほとんど変化しなかった。

ミトコンドリアのMEとICDHの活性も、生育期間を通じほとんど変化が見られなかった (Fig. 13)。MDH の活性は3週目に急激に上昇し、その後徐々に低下した。また、チトクローム c オキシダーゼは令によって活性がかなり変動したが、6週目に最も高くなった。

以上のように、ミトコンドリアの呼吸活性と窒素固定能との間には、強い相関が認められなかった。

4) ミトコンドリアの密度の変動

これまでの実験では、大部分のミトコンドリアは45% Percoll と21% Percoll の間層にバンドを形成したが、45% Percoll と21% Percoll の間に33% Percoll の層を加えて遠心したところ、45%と33% Percoll の間層 (バンド I) および33%と21% Percoll の間層近辺 (バンド II) にフマラーゼの活性ピークが認められた (Fig. 14)。3週令の根粒では、フマラーゼの活性はバンド IIの方が高かったのに対し、5週令の根粒では、バンド Iの方が高かった。また、7週令になると全体的に活性は低下したが、バンド Iの方が高かった (Fig. 15)。フラクションナンバー7、8番をバンド Iとし、12、13番をバンド IIとして、それぞれ、ミトコンドリアを回収し、呼吸活性と酵素活性を比較した。酸素吸収能は、コハク酸、リンゴ酸に対し、ともにバンド IIの方が高かった (Table 11)。しかし、ADP/O 比、呼吸調節率には大きなちがいはみられなかった。また、ミトコンドリ

アの呼吸系に関わる酵素（フマラーゼ、ME、ICDH、MDH、チトクローム c オキシダーゼ）とアンモニア同化に関わる酵素（GDH、AAT）の活性を比較したが、両者はほとんど同様の活性を示した（Table 12）。

考 察

PDC と ADH の活性のちがいから、根ではエタノール発酵は行われていないが、根粒では活発であると推測される (Table 8)。さらに、根粒組織中にはエタノールとアセトアルデヒドが存在した (24) ことから、単に酵素の活性が高いだけでなく、根粒ではエタノール発酵が実際に作働していると判断される。ところが、このような嫌氣的代謝が活発な根粒のミトコンドリアの酸素吸収能、ADP/O 比、呼吸調節率は、根のミトコンドリアよりもむしろ高い値を示した (Table 9 と 10)。Muecke と Wiskich (69) は、ダイズ根粒から呼吸調節能を有するミトコンドリアを最初に単離した。しかし、彼らの単離したミトコンドリアのコハク酸を基質としたときの ADP/O 比は 0.9 から 1.15、リンゴ酸の場合は 1.55 から 1.95 と比較的的低く、これが根粒ミトコンドリアの特徴なのか、あるいは、単離方法に問題があるのかは明確にされていない。本実験では、コハク酸の場合も、リンゴ酸の場合も、彼らの値よりもともに高かった。また、本実験で得られた根粒ミトコンドリアの呼吸活性は、最近報告されたハウレンソウ葉のミトコンドリアについての結果 (71、72、78) に非常に近い。したがって、根粒では、嫌氣的代謝が活発であるにもかかわらず、ミトコンドリアも酸化的リン酸化を行うのに十分な機能を保持しているといえる。

Lambers (79) は、硝酸で育てた植物とアンモニアで育てた植物では、根の呼吸に占める青酸耐性呼吸の割合が異なることを示した。しかしながら、本実験で得られた根粒ミトコンドリアの呼吸は、KCN によって 95% 抑制され (Fig. 9)、青酸耐性呼吸と窒素固定能との関連は考えられなかった。

根粒のアセチレン還元能とレグヘモグロビンの含量は、生育期間を通してダイナミックに変動した (Fig. 10)。したがって、令によって、根粒細胞内の炭素代謝系、微環境、例えば、酸素分圧もまた変化していると推測される。ところが、根粒ミトコンドリアの総タンパク質量また呼吸活性は、2、3 の値を除いて、令によるちがいはほとんど見られなかった (Fig. 10, 11, 12 と 13)。このような結果は、ミトコンドリアは感染細胞内で最も酸素分圧が高いと思われる細胞膜の周辺に位置し作用している (67) という考えを支持するように思われる。しかしながら、実際の細胞内でのミトコンドリアの活性はどのように調節されている

のか、また、バクテロイドのようにレグヘモグロビンによって、酸素吸収を支えられているのかといった点は、今後さらに検討する必要がある。

Morohashi ら (80) は、ピーナッツ種子の発芽時に、子葉中に密度の異なる2つのタイプのミトコンドリアが存在することを報告している。ダイズ根粒にも、重いミトコンドリア (バンド I) と軽いミトコンドリア (バンド II) が存在した (Fig. 14)。両者のフマラーゼの比活性が同じであることから (Table 12)、3週令と5週令の根粒では、重いミトコンドリアと軽いミトコンドリアの量に変化していると考えられる (Fig. 15)。したがって、このミトコンドリアの変化は、窒素固定能と関連があると予想される。WernerとMorschel (81) は、ダイズ根粒組織の電子顕微鏡観察の結果、感染細胞内には特徴的に大きなミトコンドリアがプラスチッドに近接して存在することを示した。ミトコンドリアの密度の違いは、このような形態的な違いと一致するかもしれない。Fletcher (82) は、放射性同位体を用いた実験から、ミトコンドリアには呼吸型のミトコンドリア (respiratory mitochondria) とアスパラギン酸の合成に関わる合成型のミトコンドリア (synthetic mitochondria) の機能的に全く異なったタイプのミトコンドリアが、植物細胞に存在することを示唆した。しかし、本実験で得られた2つのミトコンドリアは、バンド IIの方がやや高い酸素吸収能を示した (Table 11) が、アスパラギン酸転移酵素を含めほとんどの酵素の活性は両者に大差なく (Table 12)、機能的な違いは認められなかった。

単離したミトコンドリアの呼吸活性には令による違いはみられなかったが、細胞内でのミトコンドリアの呼吸活性は、様々な物質によって調節されていると思われる。根粒では、 CO_2 暗固定反応が活発である (83)。その反応によって生成されたオキサロ酢酸とリンゴ酸は、アスパラギン酸の炭素骨格になるだけでなく、バクテロイドの窒素固定のための炭素源、さらには、ミトコンドリアのトリカルボン酸サイクルの基質にもなり得る (84)。ダイズ根粒から単離したミトコンドリアは、リンゴ酸酵素を有し (Fig. 13)、リンゴ酸をピルビン酸にすることによって代謝することができる。実際に、単離したミトコンドリアはリンゴ酸を代謝することができた (Table 9)。したがって、解糖系で生成されたピルビン酸がエタノール発酵経路によって代謝されても、 CO_2 暗固定反応によって生成されたリンゴ酸がミトコンドリアに供給されればTCA サイクルは作働すること

ができる。PetersonとEvans（85）は、ダイズ根粒サイトゾルのピルビン酸キナーゼの活性は、アンモニアによって抑制されることを報告している。もし、ピルビン酸キナーゼが抑制されれば、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの基質であるホスホエノールピルビン酸が蓄積され、 CO_2 暗固定反応が促進されるであろう。これらのことから、窒素固定反応によって生成されたアンモニアが蓄積すると CO_2 暗固定反応によるリンゴ酸の生成がより活発になり、そのリンゴ酸を利用してミトコンドリアのTCA サイクルは、アンモニアを同化するためのエネルギー、グルタミン酸の炭素骨格である α -ケトグルタル酸を供給することが可能である。

以上述べてきたように、根粒内はエタノール発酵が活発であるにもかかわらず、ダイズ根粒のミトコンドリアは好氣的代謝を行っている根と同等の酸化的リン酸化能を有していることが明らかになった。

要 約

嫌氣的代謝が行われていると思われるダイズ根粒内におけるミトコンドリアの呼吸活性と窒素固定能との関連を明らかにするため、好氣的代謝を行っている根のミトコンドリアと呼吸活性を比較し、さらに、植物令による違いを調べた。その結果、以下の点が明らかになった。

1) 45% Percoll と 21% Percoll の 2 層密度勾配によって、粗ミトコンドリア画分から大部分のバクテロイドを除くことができた。

2) 根粒のミトコンドリアの酸素吸収能、ADP/O 比、呼吸調節率は、根のミトコンドリアに比べ、いずれも高かった。また、フマラーゼ、MDH、チトクローム c オキシダーゼの活性も高かった。

3) 根粒ミトコンドリアの酸素吸収能は、1 mM KCN によって 95% 抑制された。

4) 分離根粒のアセチレン還元能とレグヘモグロビンの含量は、生育期間を通し、ダイナミックに変動したが、根粒ミトコンドリアの呼吸活性はほとんど変化しなかった。リンゴ酸添加時の呼吸調節率、MDH、チトクローム c オキシダーゼの活性は、変動したが、アセチレン還元能と強い相関は認められなかった。

5) ダイズ根粒中には、重いミトコンドリアと軽いミトコンドリアが存在した。3 週令の根粒には軽いミトコンドリアが多く、5 週令の根粒では重いミトコンドリアが多かった。しかし、両者のタンパク当たりの呼吸活性、酵素活性には大きな違いはみられなかった。

以上の結果から、嫌氣的な根粒細胞内でのミトコンドリアの呼吸調節を、アンモニア同化との関連から考察した。

Table 7 Marker enzyme activities recovered in the crude mitochondrial fraction and in the purified mitochondrial fraction after Percoll discontinuous gradient centrifugation.

Fraction	Fumarase ($\mu\text{mol/min}$)	βHBDH ($\mu\text{mol/min}$)	NADPH-Cyt <i>c</i> reductase ($\mu\text{mol/min}$)	Catalase (mmol/min)
Crude mitochondria	0.594	0.035	0.064	0.234
Purified mitochondria	0.327	0.0005	0.026	0.062

Enzyme activities are expressed as μmoles or mmoles of substrates metabolized per min per fraction.

Table 8 Enzyme activities for ethanol fermentation and CO₂ dark
fixation of nodule and root cytosol fraction.

Enzyme	Activity			
	$\mu\text{mol/min/mg protein}$		$\mu\text{mol/min/g fr wt}$	
	Nodule	Root	Nodule	Root
Alcohol dehydrogenase	0.538	0.185	7.638	0.360
Pyruvate decarboxylase	0.161	0.000	2.288	0.000
Phosphoenolpyruvate carboxylase	0.497	0.240	7.064	0.466

Table 9 Oxidative and phosphorylative activities of the purified mitochondria
from the nodules and roots.

Fraction	Substrate	Respiratory rate	ADP/O	RCR
Nodule mitochondria	Succinate	178 \pm 49	1.24 \pm 0.18	1.87 \pm 0.27
	Malate	56 \pm 13	2.20 \pm 0.19	3.82 \pm 0.95
	NADH	90 \pm 33	1.15 \pm 0.29	1.51 \pm 0.10
Root mitochondria	Succinate	84 \pm 32	1.09 \pm 0.18	1.49 \pm 0.13
	Malate	33 \pm 21	1.92 \pm 0.26	2.60 \pm 0.62
	NADH	211 \pm 124	0.87 \pm 0.60	1.26 \pm 0.16

Respiratory rates refer to state 3 respiration and were expressed as nmoles O₂
absorbed per min per mg mitochondrial protein. Values are the averages \pm standard
deviations of at least 3 experiments.

Table 10 Enzyme activities of the mitochondria purified from
nodules or roots.

Enzyme	Specific activity	
	Nodule mitochondria	Root mitochondria
Isocitrate dehydrogenase	0.085	0.097
Fumarase	0.202	0.137
Malate dehydrogenase	2.583	0.815
Cytochrome c oxidase	0.634	0.321

Specific activities are expressed as μ moles per min per mg mitochondrial protein.

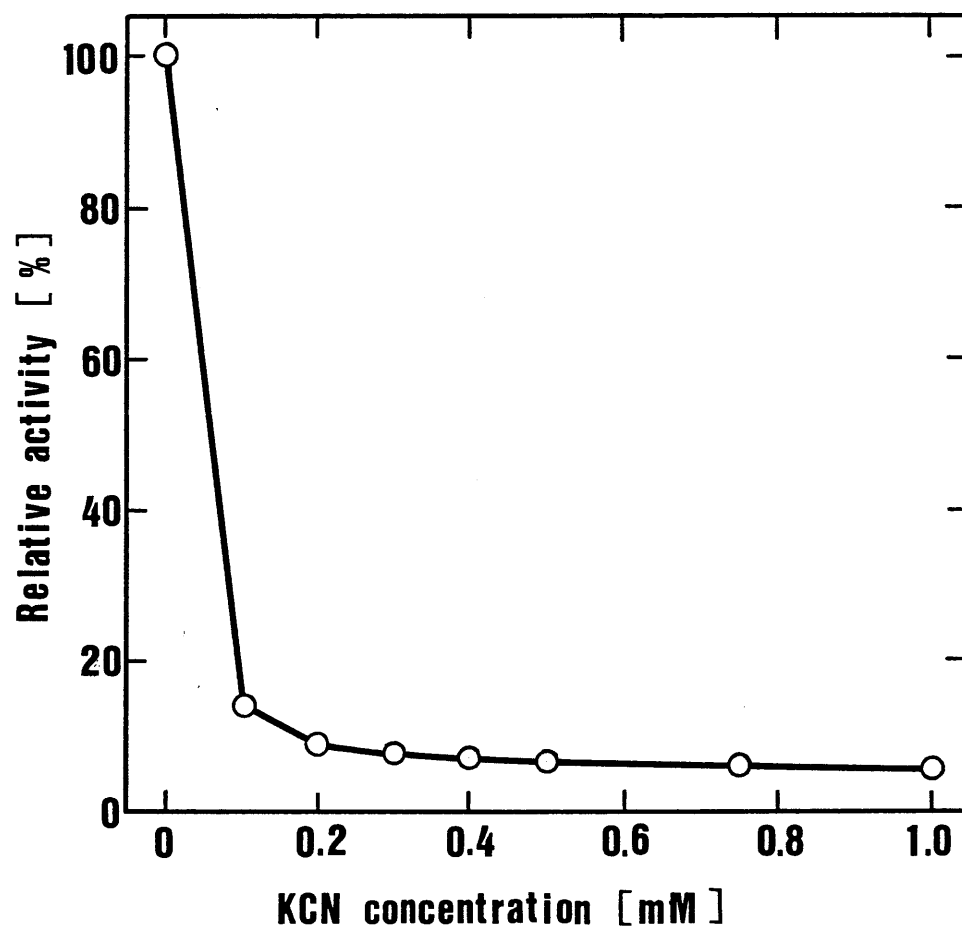


Fig. 9 Effect of KCN on the respiration with succinate as a substrate of mitochondria isolated from soybean nodules.

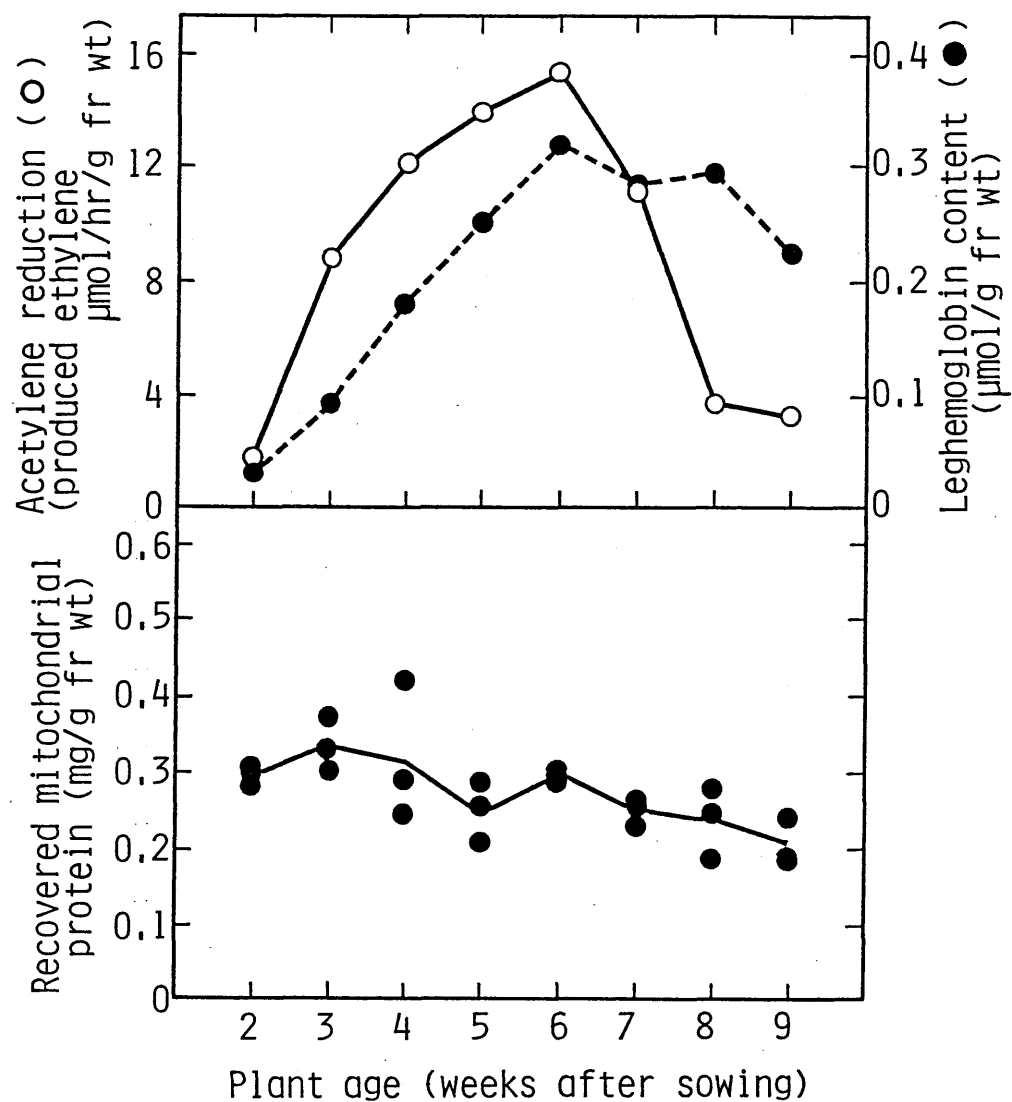


Fig. 10 Acetylene reduction activity by detached nodules, leghemoglobin content in the nodule and recovered mitochondrial protein at different stages of nodule development.

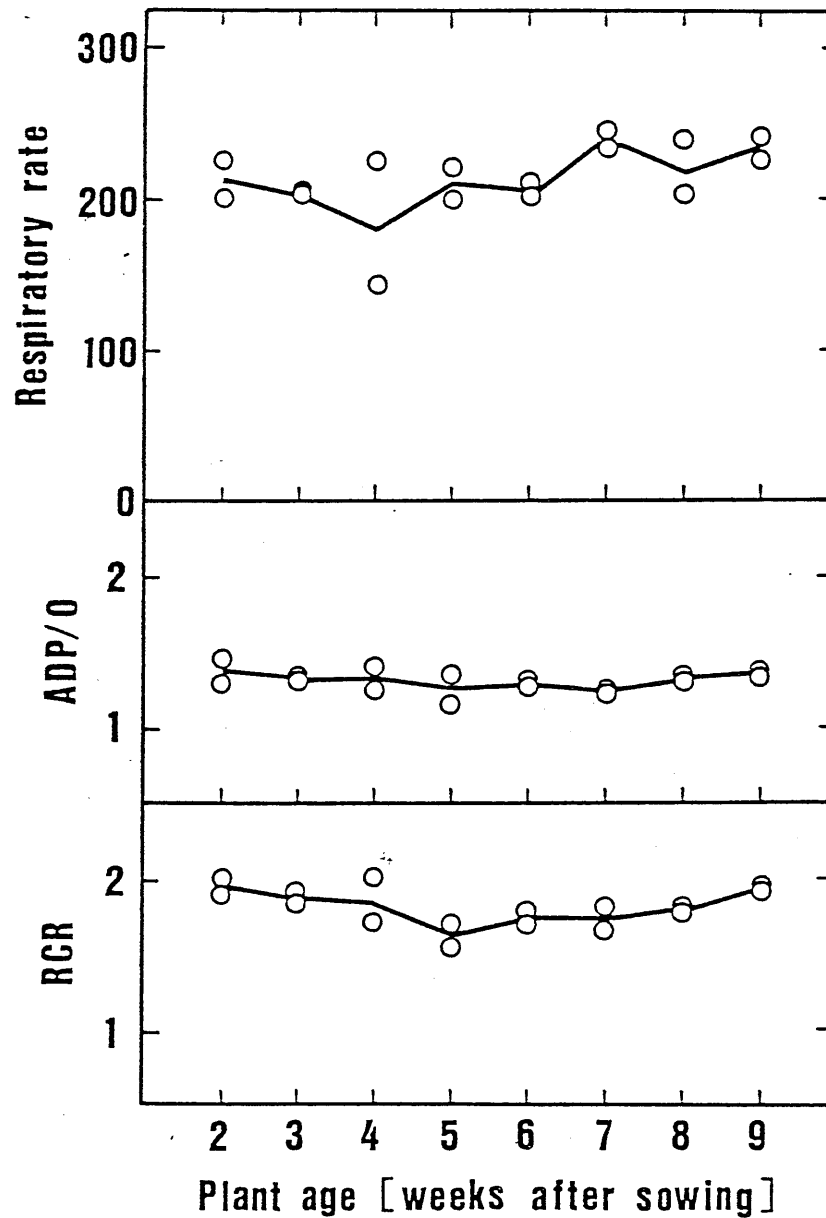


Fig. 11 Oxidative and phosphorylative activities in the mitochondria prepared from nodules at different stages of plant development with succinate as a substrate. Respiratory rates are expressed as nmoles O_2 absorbed per min per mg mitochondrial protein.

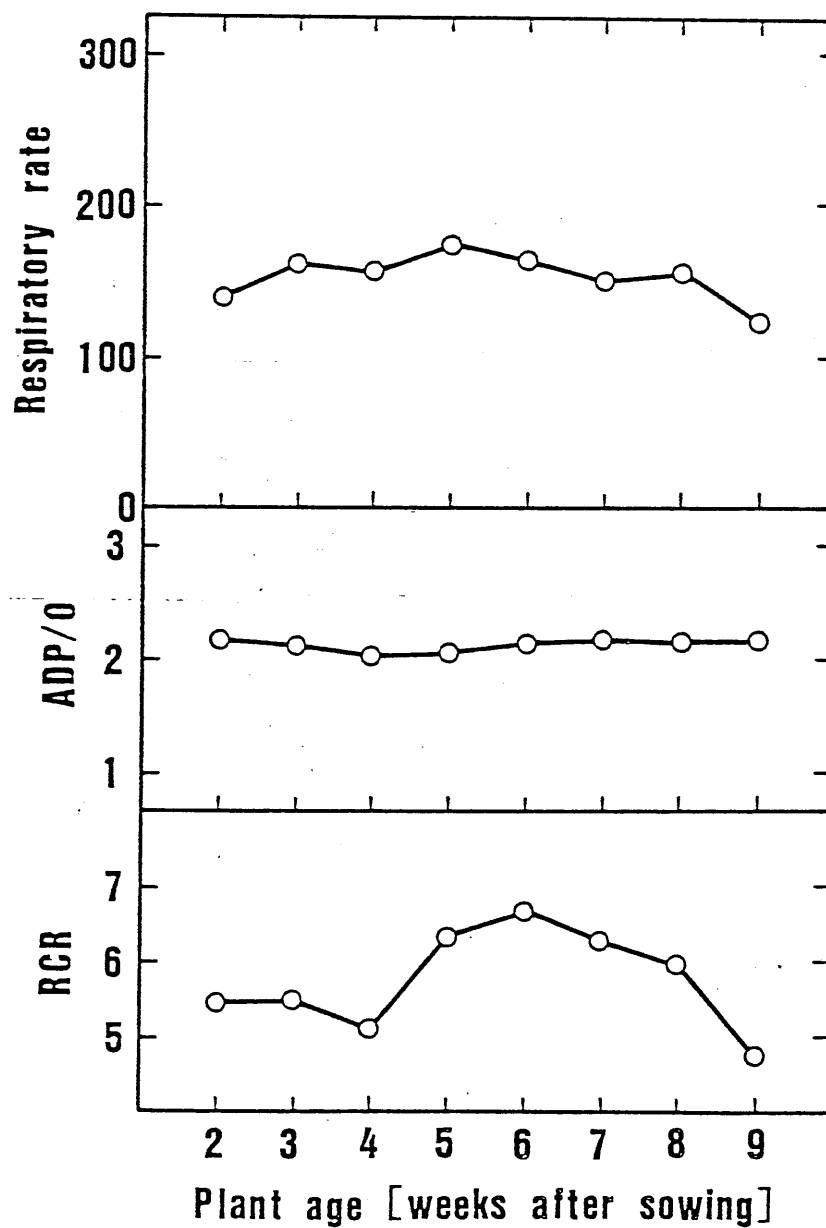


Fig. 12 Oxidative and phosphorylative activities with malate as a substrate of the mitochondria prepared from nodules at different stages of plant development. Respiratory rates are expressed as nmoles O₂ absorbed per min per mg mitochondrial protein.

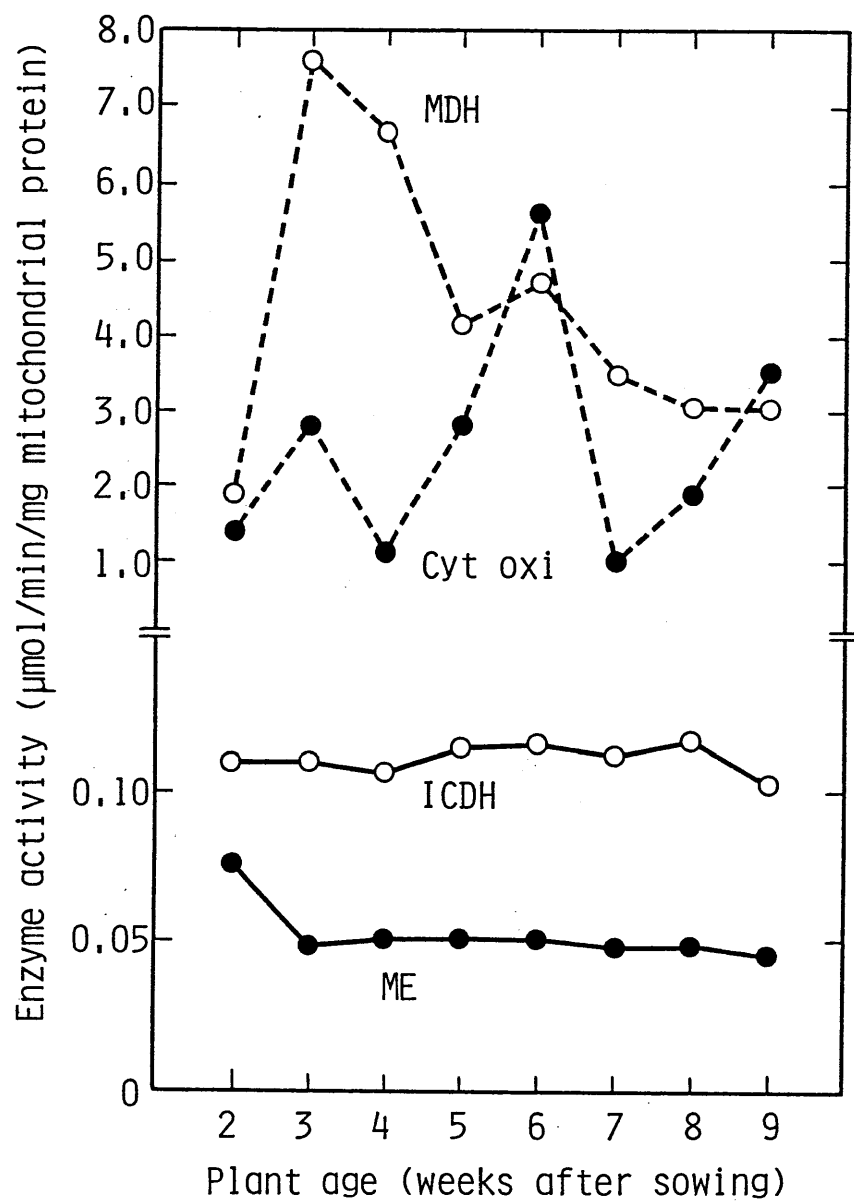


Fig. 13 Enzyme activities of mitochondria prepared from nodules at different stages of plant development.

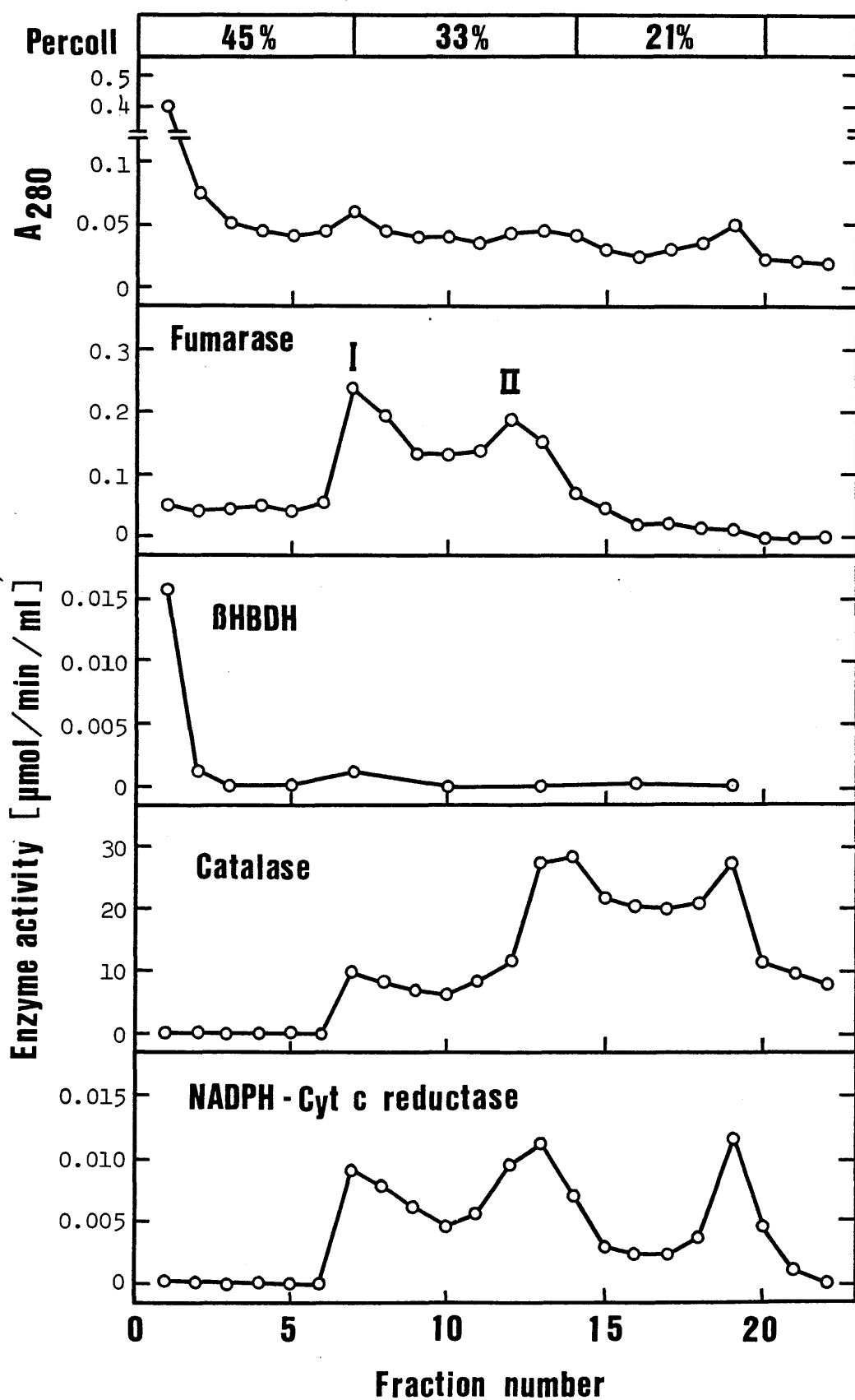


Fig. 14 Distribution of marker enzymes for mitochondria, bacteroids, peroxisomes and endoplasmic reticulum of soybean nodules following Percoll discontinuous gradient centrifugation.

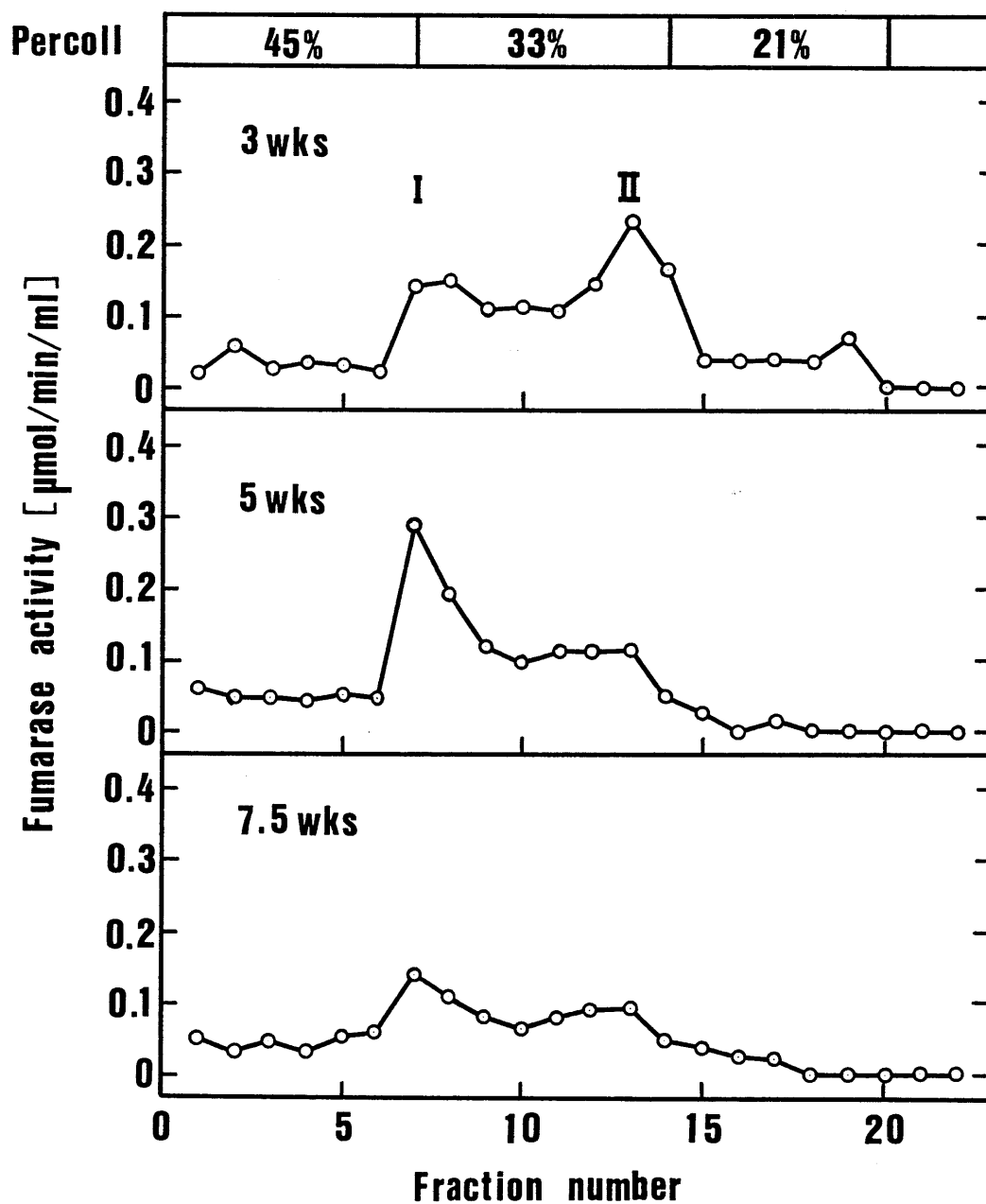


Fig. 15 Distribution of fumarase of soybean nodules at different stages after Percoll discontinuous gradient centrifugation.

Table 11 Oxidative and phosphorylative activities of two mitochondrial fractions isolated from soybean nodules.

Fraction	substrate	Respiratory rate	ADP/O	RCR
Band I	succinate	179	1.28	2.13
	malate	155	1.89	5.14
Band II	succinate	289	1.22	1.94
	malate	195	1.98	5.01

Respiratory rates refer to state 3 respiration and were expressed as nmoles O₂ absorbed per min per mg mitochondrial protein. Band I and band II mitochondria were collected after Percoll discontinuous gradient centrifugation shown Fig. 14.

Table 12 Enzyme activities of two mitochondrial fractions isolated from soybean nodules

Enzyme	Activity (μ mol/min/mg protein)	
	Band I	Band II
Fumarase	0.449	0.454
ME	0.015	0.017
ICDH	0.069	0.069
MDH	16.442	22.658
Cyt oxi	0.157	0.167
GDH(NAD)	0.069	0.076
(NADH)	0.575	0.591
AAT	0.167	0.202

Band I and band II mitochondria were collected after Percoll discontinuous gradient centrifugation shown in Fig. 14.

第3章 レグヘモグロビン存在下でのミトコンドリアの呼吸と ダイズ根粒組織内における炭素代謝の分布

序 論

根粒内に多量に存在するレグヘモグロビンは、バクテロイドあるいは宿主植物細胞の代謝に重大な影響を与えている。レグヘモグロビンは酸素との親和性が高いため、根粒細胞内の遊離酸素濃度は極めて低く保たれている(17)。低酸素分圧のもとでは、単離されたダイズ根粒のバクテロイドの有機酸の分解は非常に緩やかで、乳酸や酢酸が蓄積される(86)。ところが、低酸素分圧下でも、レグヘモグロビンが共存すると、バクテロイドのアセチレン還元能は著しく高まると同時に有機酸の分解も促進される(86)。レグヘモグロビン共存によるバクテロイドのアセチレン還元能の促進効果は、バクテロイドの酸素吸収能の促進効果に比べるとはるかに大きいことから、バクテロイドにニトロゲナーゼ活性によって効率的な呼吸系と効率的でない呼吸系が存在するといわれている(87)。一方、宿主植物細胞では嫌氣的代謝が活発であり(24、25)、しかも、バクテロイドはそれらの生成産物を窒素固定のための炭素源として利用することができる(22)。

私たちはダイズ根粒から、RawsthorneとLaRue (88)はカウビー根粒から、それぞれ、ミトコンドリアを単離し呼吸活性を測定したところ、いずれも、ダイズ根粒の場合には根のミトコンドリアと、カウビー根粒の場合には下胚軸のミトコンドリアと、同等の酸化リン酸化能を有していることが明らかになった。しかし、嫌氣的な根粒内でミトコンドリアがどの程度機能しているのかは不明である。また、ミトコンドリアの呼吸にレグヘモグロビンが関与しているのかも調べられていない。

レグヘモグロビンは、感染細胞内の植物サイトゾルとベリバクテロイド膜とバクテロイド膜にかこまれた領域の両方に存在すると考えられている(17)。したがって、ミトコンドリアはレグヘモグロビンと接触する機会があり、ミトコンドリアの呼吸にレグヘモグロビンが貢献しているかもしれない。また、根粒内の中心部分には、根粒菌の侵入していない、そして、レグヘモグロビンが存在して

いない非感染細胞が見られる（８９）。感染細胞と非感染細胞とでは、ミトコンドリアの呼吸活性も炭素代謝も異なると予想される。ダイズのようなウレイドを固定窒素の輸送形態とする植物では、アラントイン形成の最終段階に非感染細胞が重要な役割を果たしていると言われている（９０）。

本実験では、気相を用いた実験において、ダイズ根粒ミトコンドリアの呼吸に及ぼすレグヘモグロビンの影響を調べた。そして、ダイズ根粒から皮層組織、感染細胞、非感染細胞を分離し、それぞれの炭素代謝酵素の活性を比較し、ダイズ根粒における炭素代謝とミトコンドリアの呼吸活性の組織細胞分布を考察した。

材料及び方法

1) 材料

ダイズ (*Glycine max* : T202) と *Rhizobium japonicum* strain 009 を用い、第1章に示された方法で、愛知教育大学の温室において、植物を生育させ根粒を形成させた。

2) ミトコンドリアの単離法

第2章に示された方法に従って、6週令の植物の根粒からミトコンドリアを単離した。なお、Percoll の密度勾配は17mlの45%Percoll と14mlの21%Percoll からなり、8mlの粗ミトコンドリア画分をのせた。ダイズ下胚軸のミトコンドリアは、根粒ミトコンドリアと同様な方法で単離した。

3) バクテロイドの単離法

ミトコンドリアの単離法と同様な方法で根粒を摩砕した後、200xg で10分間遠心し、上清を5,000xg で10分間遠心した。得られた沈殿を洗浄液に懸濁させ、再び、200xg, 10分間、5,000xg, 10分間の遠心を行った。最終的に得られた沈殿を5mlの洗浄液に懸濁させ、15mlの45%Percoll の上にのせ、7,500xg で30分間遠心した。遠心管の底に溶液を数ml残し、洗浄液を加え、5,000xg, 10分間の遠心によって得られた沈殿をバクテロイド画分とした。バクテロイドの乾物重は、90℃で3日間乾燥させた後求めた。

4) レグヘモグロビンの調整法

200gの根粒を4倍量の1 mM EDTAを含む0.1Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 中で、60g の Polyclar AT とともに乳鉢で摩砕した。摩砕した液を4層のガーゼでろ過し、ろ液を10,000xgで30分間遠心した。得られた上清に55%飽和になるように硫酸を加え、30分間放置後、10,000xgで30分間遠心した。その上清に80%飽和になるように硫酸を加え、同様な操作を行い、得られた沈殿を1 mM EDTAを含む50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.4) に懸濁させた。これを、同じ緩衝液中で1晩透析し、翌日100,000xg で30分間遠心した。上清をUK-10 膜 (TOYO) を用い濃縮し、あらかじめ1 mM EDTAを含む50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡状態にしたSephacryl S200 (Pharmacia) カラム (2.5x65cm) に通した。明るい赤色画分を集め、再び濃縮し、レグヘモグロビンとした。2価レグヘモグロビンはハイドロサルファイ

トを、3価レグヘモグロ빈はフェリシアン化カリウムを、それぞれ加え、50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) で平衡状態にしたSephadex G-15 に通して、得た。これらの操作は、4℃で行った。レグヘモグロ빈の濃度は、ビリジンを加えヘモクロームを形成させてもとめた(91)。

5) 酸素吸収能の測定法

35mlのバイアルに反応液(10mMリン酸カリウム緩衝液 pH 7.4, 0.3M mannitol, 5mM MgCl₂, 0.1%(w/v)BSA, 50mM succinate) 1.9mlを加え、血清キャップで密閉した。レグヘモグロ빈は最終濃度が0.2mM になるように、ADP は10mMになるように添加した。気相を窒素ガスで置換した後、バクテロイドまたはミトコンドリア懸濁液を0.1ml マイクロシリンジを用いて加えた。酸素ガスを1%になるように注入し、反応を開始した。ゼロ時間、そして、一定時間後に気相から0.5ml のガスサンプルを抜き取り、酸素濃度をモレキュラーシーブ5Aを充填したガラスカラム(2m)を取り付けたガスクロマトグラフィー熱伝導度検出器(Hitachi 263-50)を用いて測定した。バイアルは、150 ストロークス/分、25℃でインキュベートした。

6) 電子顕微鏡観察

Percoll 密度勾配法によって精製したミトコンドリアの沈殿に冷した100mM リン酸緩衝液(pH 7.4)を含む4%グルタルアルデハイドを加え、2時間固定した。リン酸緩衝液で洗浄した後、1%オスミウムテトラオキシドでさらに1.5時間固定した。エタノールとアセトンで脱水した後、Quetol 812に包埋した。ミクロトームで超薄切片を作製し、uranyl acetateとlead citrateで染色した後、JEM-100B電子顕微鏡を用いて観察した。

7) 根粒の組織観察

半分に切った根粒を、FAA (ホルマリン:氷酢酸:70% エタノール=1:1:18)で、減圧吸引しながら約1時間固定した。エタノールで脱水後、A solution(GMA+BP0)(アクリトロン)液を5℃で24時間減圧吸引し浸透させた。再度同じ操作を繰り返し、包埋液(A solution:B solution(SY-5)=20:1)(アクリトロン)に包埋した。染色は、ヘマトキシリンとファーストグリーンの二重染色を行った。

8) 感染細胞、非感染細胞、皮層組織の単離法

播種後6.5 週の植物体から、直径3 - 5 mmの根粒を取りよく洗った後、カミソリで厚さ約1 mmのスライスにした。50mlの三角フラスコに根粒スライス1 gに対し10mlの酵素液（0.1%(w/v) Pectolyase Y-23(seishin), 5%(w/v) Hemicellulase (sigma), 0.65M mannitol, 0.5%(w/v) 硫酸デキストランカリウム, 5mM MgSO₄, pH 6.0) を加え、減圧処理後、暗所で、30℃で4時間インキュベートした。最初の1時間は、180 ストロークス/分で、後の3時間は、90ストロークス/分で水平方向に振動させた。4時間のインキュベーションの後、三角フラスコを手で振動させた。酵素液を100 μ mのナイロンメッシュに通し、ろ液を100xg で5分間遠心し遊離細胞を集めた。遊離細胞は、0.65M mannitol (pH 6.0) で10回洗浄した後、32 μ m のナイロンメッシュを用いて感染細胞と非感染細胞に分離した。ナイロンメッシュを通過できない細胞すなわち感染細胞を100xg、5分、通過した細胞すなわち非感染細胞を170xg、15分の遠心によって集めた。

皮層組織は、4時間のインキュベーション後の部分崩壊した根粒スライスから得た。根粒スライスを新しい酵素液に浸漬し、さらに、1.5 時間、180 ストロークス/分でインキュベートした後、肉眼で赤い組織が見えないリング状の皮層組織を選び取った。粗酵素液を抽出する前に0.65M mannitol (pH 6.0) でよく洗浄した。

9) 粗酵素液の調整法

よく洗浄したリング状の皮層組織を摩砕液（0.3M sucrose, 0.2Mリン酸カリウム緩衝液 pH 7.5, 0.4mM EDTA, 5mM DTT, 1mM MgCl₂）中で、新鮮重の30%相当のPolyclar AT とともに乳鉢で摩砕した。摩砕した液を4層のガーゼでろ過し、ろ液を16,000xgで30分間遠心した。単離した感染細胞または非感染細胞は、摩砕液とPolyclar AT とともにガラスホモジナイザーで10回程度上下動させることによって破壊した。摩砕した液を同様に、16,000xgで30分間遠心した。遠心後得られた上清をそれぞれ粗酵素液として用いた。

10) 酵素活性の測定法

酵素活性は分光光度計を用いて、30℃で測定した。アルコール脱水素酵素:ADH とホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼ:PEPCは第1章に、ビルビン酸デカルボキシラーゼ:PDC は第2章に示した方法によった。ウリカーゼは尿酸の分解速度を測定した(30)。タンパク質はLowry らの改良法を用いた(47)。

結 果

1) レグヘモグロビン存在下でのバクテロイドの呼吸

バクテロイドの呼吸は、2価レグヘモグロビンを与えることによって促進された (Fig. 16)。しかしながら、3価レグヘモグロビンは、ほとんど影響を示さなかった。バクテロイドの呼吸は、レグヘモグロビンの存在の有無にかかわらず時間の経過とともに増加したが、2価レグヘモグロビン添加区は60分以降急激に減少した。これは、バイアル中の酸素が消費され尽くされたためである。

2) レグヘモグロビン存在下でのミトコンドリアの呼吸

ADP 無添加区でもADP 添加区でも、ともに、2価レグヘモグロビンによってダイズ根粒ミトコンドリアの呼吸は促進された (Fig. 17 と18)。ADP 無添加区では、呼吸は時間の経過とともにほぼ直線的に増加したが (Fig. 17)、ADP 添加区では、レグヘモグロビンの存在の有無にかかわらず30分以降の呼吸の増加率は低下した (Fig. 18)。3価レグヘモグロビンでは、対照区と違いが認められなかった (Fig. 19)。また、ダイズ実生の下胚軸から単離したミトコンドリアの呼吸も、同様に2価レグヘモグロビンによって促進された (Fig. 20)。測定系のミトコンドリアタンパク質の量を変えてレグヘモグロビンの影響を調べたところ、レグヘモグロビンを添加し無い場合には、ミトコンドリアのタンパク質を増加させるとバイアル当りの酸素吸収能は増加したが、タンパク質当りの活性にすると逆に減少した (Table 13)。レグヘモグロビンによる呼吸促進は、タンパク質量が少ない場合には明確ではないが、呼吸抑制がみられるタンパク質量が2 mg 以上の場合顕著であった。

3) 電子顕微鏡観察

根粒ミトコンドリアの呼吸は2価レグヘモグロビンによって促進されたが、それがバクテロイドの混入によるものかどうか確かめるために、精製ミトコンドリア画分を電子顕微鏡で観察した。大部分はミトコンドリアで、バクテロイドの存在はほとんど認められなかった (Fig. 21)。しかし、ミトコンドリア以外に、不定形の細かい粒子の集合体や、球状の全体的に電子密度が高いパーオキシゾームと思われるものの混入が認められた。本実験で単離したミトコンドリアは、クリステがよく発達していた。また、濃く染色されたミトコンドリアと染色の程度

が前者程明確でないミトコンドリアの2種類がみられた。

4) 根粒組織の観察

Fig. 22 には、ダイズ根粒の断面図を示した。根粒は根粒菌の感染をうけた中心組織と感染が認められない皮層組織からなる。さらに、中心組織には、大きさの異なる非感染細胞が存在した。非感染細胞は、感染細胞に比べると、大きさは約半分であった (Table 14)。また、数は感染細胞を1とすると0.5の割合で存在した。

5) 感染細胞、非感染細胞、皮層組織の酵素の活性

32 μ m のナイロンメッシュを用いて分離した感染細胞と非感染細胞、そして、酵素処理後に残ったリング状の皮層組織を Fig. 23 に示した。本実験で用いた方法では、新鮮重 1 g の根粒から、乾物重で 75mg の遊離細胞が得られた。顕微鏡観察によれば、両者には、多少非感染細胞あるいは感染細胞の混入が認められた。感染細胞と非感染細胞の密度の違いを利用して、Percoll 密度勾配による遠心分離も試みたが、明確に分離することはできなかった。ADH, PDC, PEPC の活性は、皮層組織と非感染細胞で同程度高く、感染細胞の活性よりも約 2 倍程度高かった (Table 15)。ウリカーゼの活性は、皮層組織では低く、非感染細胞で最も高かった。

考 察

これまでに、嫌氣的に単離したダイズ根粒バクテロイド（87、92、93）の酸素吸収能と窒素固定能が、低酸素分圧下でレグヘモグロビンによって促進されることが報告されている。本実験では、好氣的条件下で単離したダイズ根粒バクテロイド（従ってニトロゲナーゼは失活していると思われる）でも、従来の報告と同様にレグヘモグロビンによる酸素吸収の促進が認められた（Fig. 16）。このような条件のもとでは、ダイズ根粒から単離したミトコンドリアの酸素吸収能もレグヘモグロビンによって促進された（Fig. 17と18）。レグヘモグロビンによる酸素吸収の促進効果は、バクテロイドの場合も（87）、ミトコンドリアの場合も（Table 13）、供試したサンプル量によって変動するので効果の違いを一概に比較することはできないが、本実験の結果では、バクテロイドでは約1.6倍、ミトコンドリアでは約1.4倍とよく似ていた。しかし、バクテロイドの場合にはインキュベーションの時間が長くなるにつれて直線的に増加した（Fig. 16）のに対し、ADP添加区のミトコンドリアの酸素吸収はレグヘモグロビンの有無にかかわらず30分以降増加率が減少した（Fig. 18）。これは、ADP無添加区ではほぼ直線的に増加した（Fig. 17）ことから、生成されたATPによって呼吸が抑制されたと考えられる。

電子顕微鏡観察の結果によれば、本実験で用いたミトコンドリア画分にはバクテロイドの混入はほとんど認められず（Fig. 21）、ミトコンドリア画分のレグヘモグロビンによる酸素吸収の促進効果はバクテロイドによるものではないと判断される。また、ダイズの下胚軸から単離したミトコンドリアでも同様な促進効果が認められた（Fig. 20）ことから、レグヘモグロビンによるミトコンドリアの促進効果は、ダイズ根粒ミトコンドリアに特異的な反応ではないと考えられる。ミトコンドリアのレグヘモグロビンによる促進効果は、ミトコンドリアタンパク質の量が少ない場合には明確ではなかったが、増加すると顕著であった（Table 13）ことから、ミトコンドリアにレグヘモグロビンに特異的なオキシダーゼが存在するのではなく、気相からの酸素供給が著しく制限された場合に、レグヘモグロビンに結合した酸素はミトコンドリアに供給されるようになると考えられる。

感染細胞、非感染細胞、そして、皮層組織のADHとPEPCの活性を比較すると、

感染細胞よりもむしろ非感染細胞、皮層組織の方が同程度に高い活性を示した (Table 15)。したがって、根粒組織内は細胞によって、好氣的代謝と嫌氣的代謝が明確に分布するということではなく、全体的に嫌氣的な状態にさらされていると思われる。Witty ら (94) は、微小電極を用いて根粒内の酸素濃度の変化を測定し、酸素バリアーが存在することを示唆した。また、根粒の周りの酸素濃度を増加させると、根粒の酸素吸収能と窒素固定能が増加する (95、96) ことから、根粒組織内への酸素の供給は空気中では制限されていると予想される。これらの結果から、根粒組織内ではミトコンドリアはレグヘモグロビンが存在する感染細胞で機能していると推測される。Newcomb ら (97) は、感染細胞と非感染細胞とでは、感染細胞の方が単位サイトプラズム当り、容積で4倍、数で3倍ミトコンドリアが多いことを、電顕観察により報告している。この結果は、感染細胞でミトコンドリアはより活発であることを裏付けているように思われる。

ダイズ根粒バクテロイドには、酸素との親和性が非常に高いオキシダーゼによる呼吸経路と比較的小さいオキシダーゼによる呼吸経路が存在し (17)、酸素との親和性が高い呼吸経路はATP 生産効率が高くニトロゲナーゼ活性に有効であると言われている (98)。RawsthorneとLaRue (99) は気相を用いない実験において、カウビー根粒ミトコンドリアのオキシダーゼの酸素に対する K_m を測定した結果、約100 nMと算出し、低酸素分圧の下ではミトコンドリアの呼吸、エネルギー生産は著しく抑制されていると示唆した。しかし、気相を用いた本実験では、レグヘモグロビンによってミトコンドリアの呼吸は促進された (Fig. 17 と 18)。ミトコンドリアは感染細胞内の細胞膜の近くに位置する (67、68) ことから、感染細胞内でも比較的酸素濃度が高いと思われる部位で、サイトゾルのレグヘモグロビンの助けを借りて呼吸を維持していると考えられる。しかし、根粒細胞でのミトコンドリアの活性は、好気条件下でのミトコンドリアの活性よりは低いと思われる。なぜならば、根粒組織への酸素の供給は制限されており、また、レグヘモグロビンを添加しても低濃度のミトコンドリアを用いて得られた酸素吸収能にまで達しなかった (Table 13) からである。

感染細胞、非感染細胞、皮層組織のPEPCの活性 (Table 15) はいずれも根粒の粗酵素液の活性 (第1章) よりも低かった。これは、長時間を要する遊離細胞の単離操作の過程で活性が低下したのかもしれない。Christeller ら (100) は、

ルービン根粒のPEPCの活性はg新鮮重当りでは、皮層組織よりも、バクテロイドを含んだ組織の方が、約5倍程度高いことを報告している。本実験では、非感染細胞がタンパク質当りの活性で最も高い活性を示した（Table 15）。Hanks ら（101）は、リンゴ酸脱水素酵素の活性は、ダイズ根粒の感染細胞よりも非感染細胞の方が高いことを示した。したがって、CO₂ 暗固定反応によるリンゴ酸の生成に非感染細胞が重要な役割を果たしていると推測される。

ウレイド代謝にとって重要なウリカーゼの活性は、非感染細胞で最も高い活性を示した（Table 15）。Hanks ら（101）は、ウリカーゼの活性はタンパク質当りで、非感染細胞が感染細胞よりも約10倍高いことを示したが、本実験では約2倍程度であった（Table 15）。Shelp ら（102）も、カウビー根粒で、同様に約2倍非感染細胞が高いことを報告した。感染細胞と非感染細胞をより明確に分離し、さらに検討する必要がある。

以上、述べてきたように、根粒組織を構成するすべての細胞は、嫌氣的代謝の活性を有し、ミトコンドリアはレグヘモグロビンによって、感染細胞内でより活発に機能していると考えられる。感染細胞では、アンモニア同化のための炭素骨格、ウレイド合成のためのエネルギーがミトコンドリアによって供給されると予想される。

要 約

アルコール生産が活発なダイズ根粒において、ミトコンドリアはどの様に呼吸活性を維持しているのかを明らかにするため、ミトコンドリアの呼吸に及ぼすレグヘモグロビンの影響と、ダイズ根粒内の細胞による嫌氣的代謝と好氣的代謝のコンパートメントについて検討した。その結果、以下の点が明らかになった。

1) 気相を用いた実験において、ダイズ根粒から単離したミトコンドリアの酸素吸収能は、バクテロイドと同様に2価レグヘモグロビンによって促進された。

2) ダイズ実生の下胚軸から単離したミトコンドリアでも、レグヘモグロビンによる酸素吸収の促進がみられた。

3) レグヘモグロビンによるダイズ根粒ミトコンドリアの呼吸の促進効果は、用いたミトコンドリアのタンパク質の量が少ない場合には明確ではなく、2 mg以上用いた場合に顕著であった。

4) 感染細胞、非感染細胞、皮層組織のADH, PDC, PEPCの活性は、感染細胞よりも非感染細胞、皮層組織の方が高かった。ウリカーゼの活性は、皮層組織では低く、非感染細胞で最も高かった。

以上の結果より、ダイズ根粒のミトコンドリアは、主に、感染細胞内でレグヘモグロビンの助けを借りて、呼吸活性を維持していると考えた。

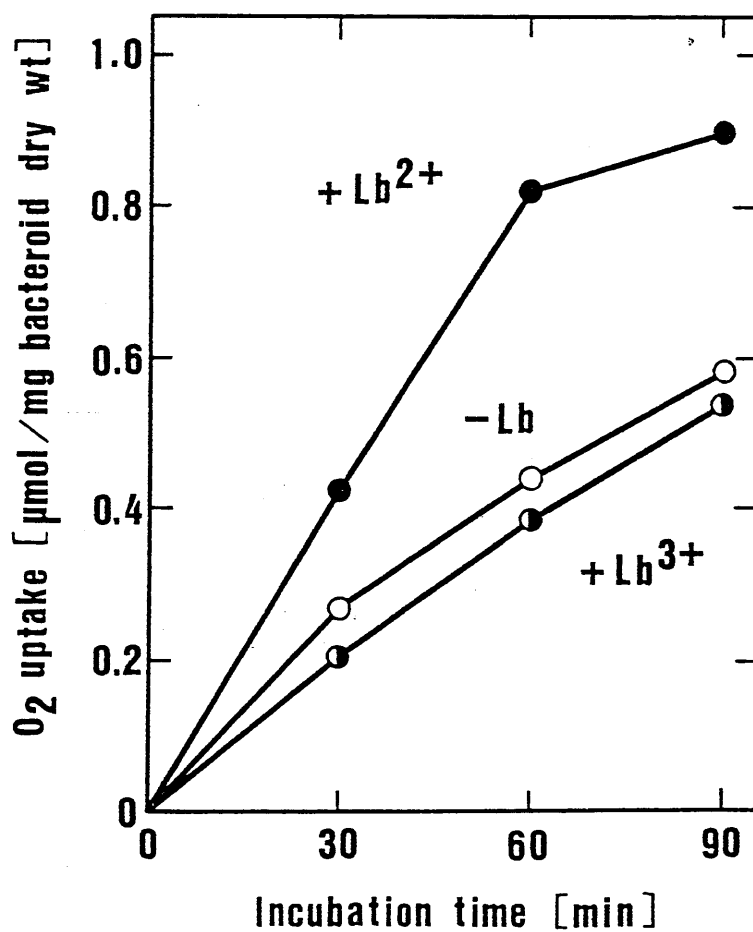


Fig. 16 Effects of ferrous-oxy leghemoglobin (Lb²⁺) and ferric leghemoglobin (Lb³⁺) on the oxygen uptake by the bacteroids isolated aerobically from soybean nodules. The 16.3 mg dry weight of bacteroids were injected into the reaction vial.

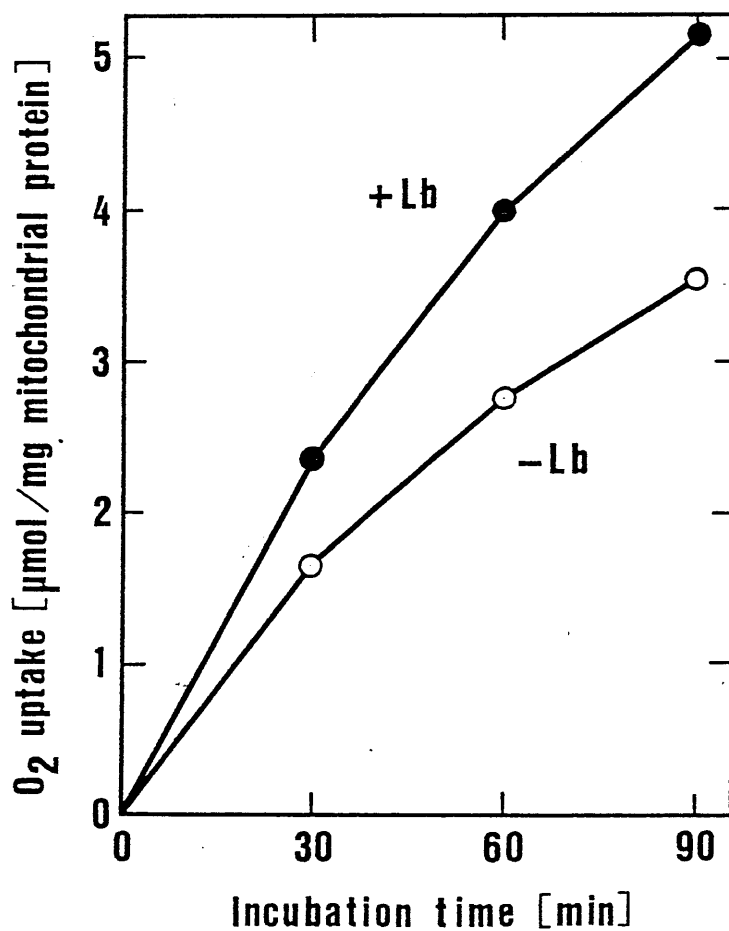


Fig. 17 Effect of oxyleghemoglobin on the oxygen uptake by mitochondria isolated from soybean nodules without ADP. The 2.11 mg mitochondrial protein was injected into the reaction vial.

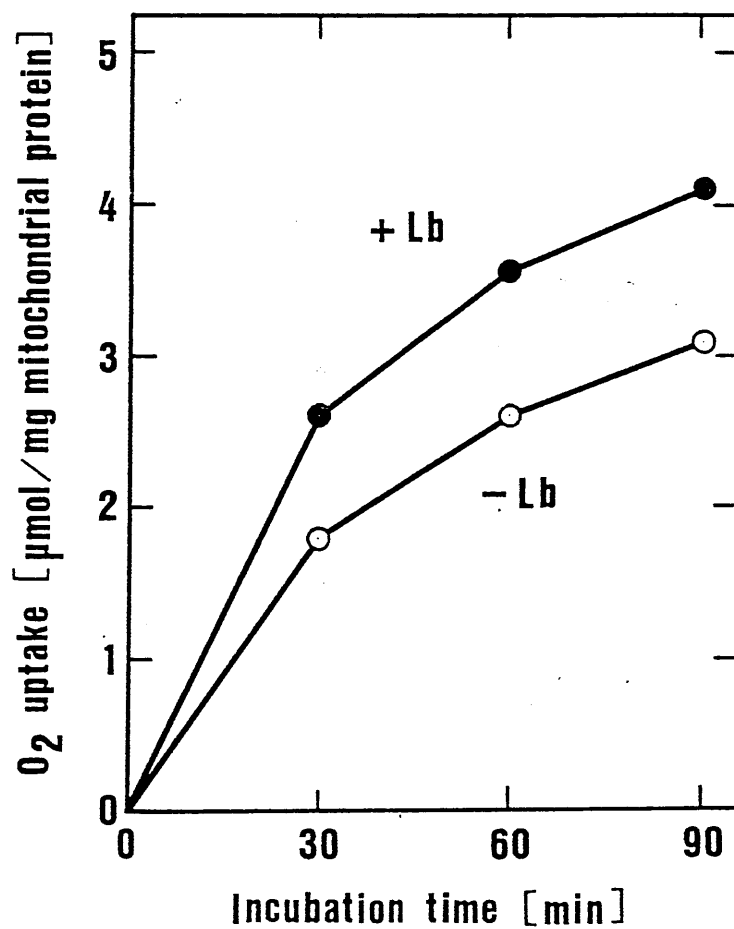


Fig. 18 Effect of oxyleghemoglobin on the oxygen uptake by mitochondria isolated from soybean nodules with 10 mM ADP. The 2.37 mg mitochondrial protein was injected into the reaction vial.

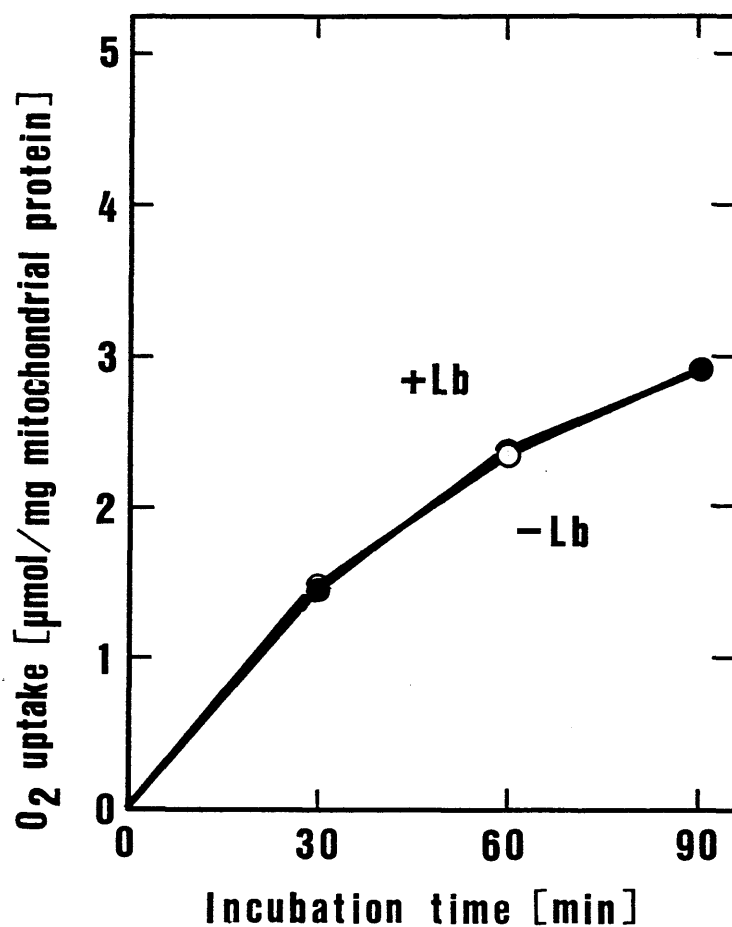


Fig. 19 Effect of ferric leghemoglobin on the oxygen uptake by mitochondria isolated from soybean nodules. The 2.57 mg mitochondrial protein was injected into the reaction vial and the assays were made with 10 mM ADP.

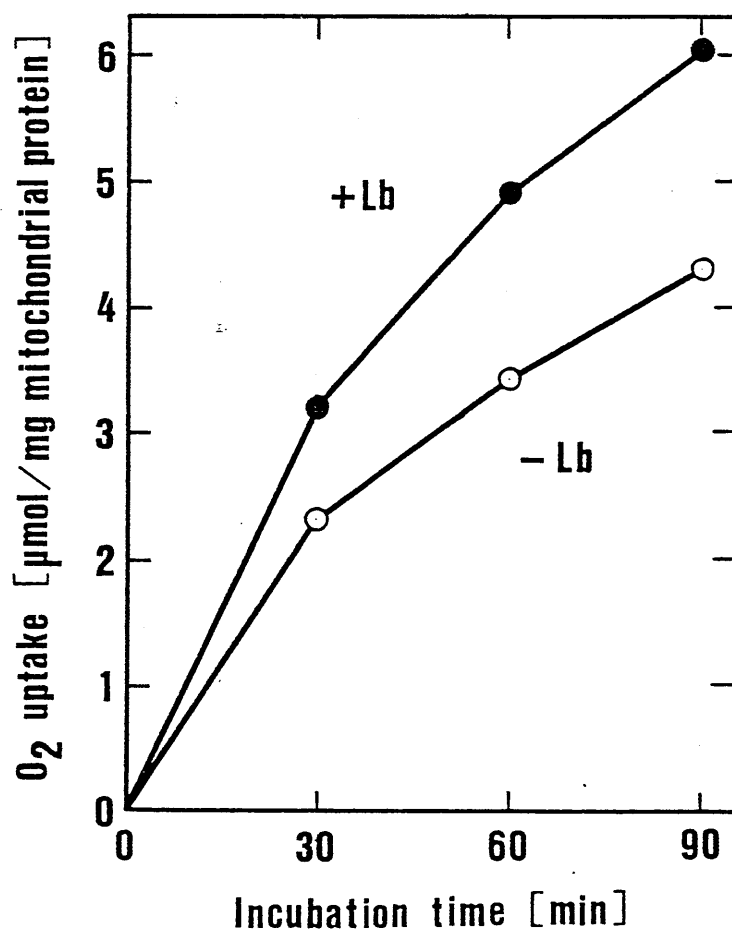


Fig. 20 Effect of oxyleghemoglobin on the oxygen uptake by hypocotyl mitochondria isolated from soybean seedlings. The 1.51 mg mitochondrial protein was injected into the reaction vial and the assays were made with 10 mM ADP.

Table 13 Effect of mitochondrial concentration on the oxygen uptake by mitochondria isolated from soybean nodules.

Mitochondria (mg protein/vial)	Oxygen uptake			
	nmol/min/vial		nmol/min/mg protein	
	-Lb	+Lb	-Lb	+Lb
0.59	73	81	123	138
1.25	93	106	74	85
2.02	111	157	55	78
2.37	141	205	59	86

The standard condition with 10 mM ADP was as given in the text except that the mitochondrial concentration was varied.

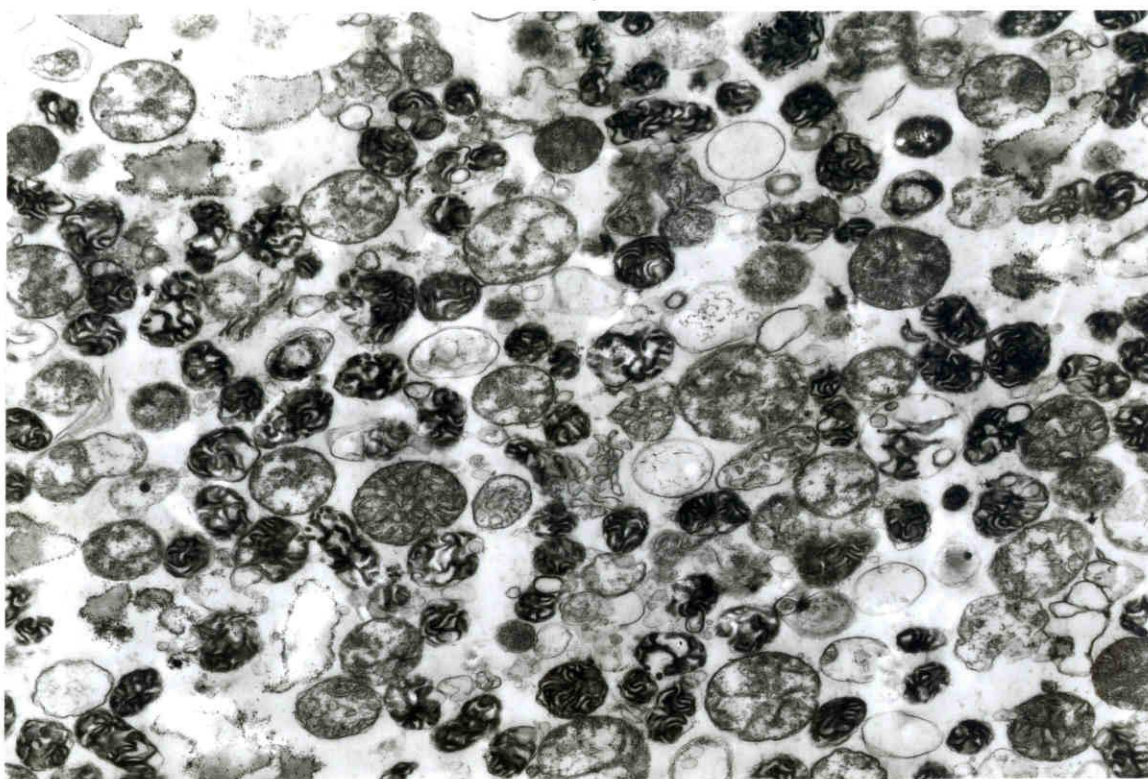


Fig. 21 Electron micrograph of the nodule mitochondrial fraction prepared by Percoll discontinuous gradient centrifugation. (X 14,000)

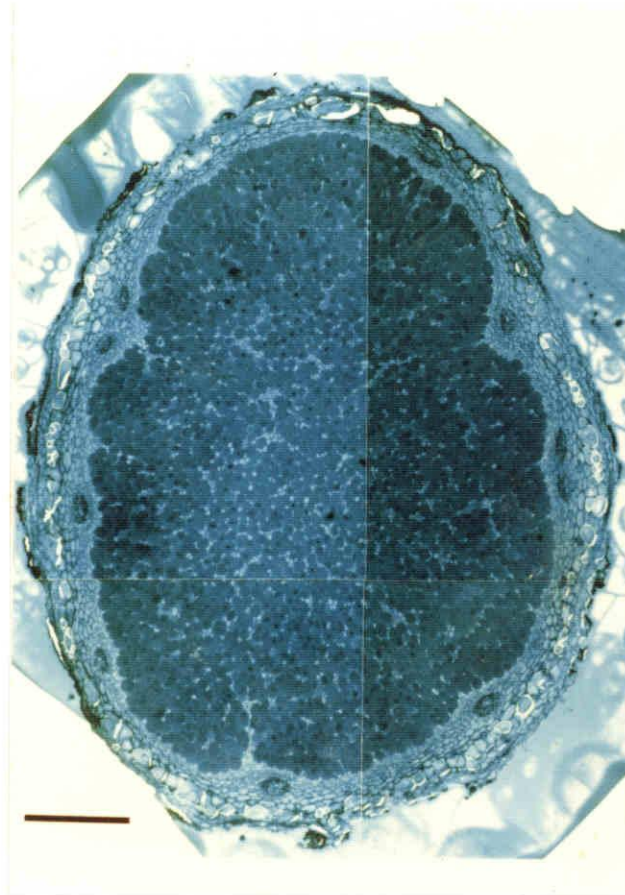


Fig. 22 Light micrograph of a longitudinal section of soybean nodule. Bar represents 0.5 mm.

Table 14 Cell size and cell number of the infected cell and the uninfected cell.

	Infected cell	Uninfected cell
	(average \pm standard deviation) μ m	
Cell size	54 \pm 14	22 \pm 7
	(minimum — maximum) μ m	
	30 - 110	10 - 50
	(ratio)	
Cell number	1	: 0.52

The measurements were made from the longitudinal section of soybean nodules shown in Fig. 22.

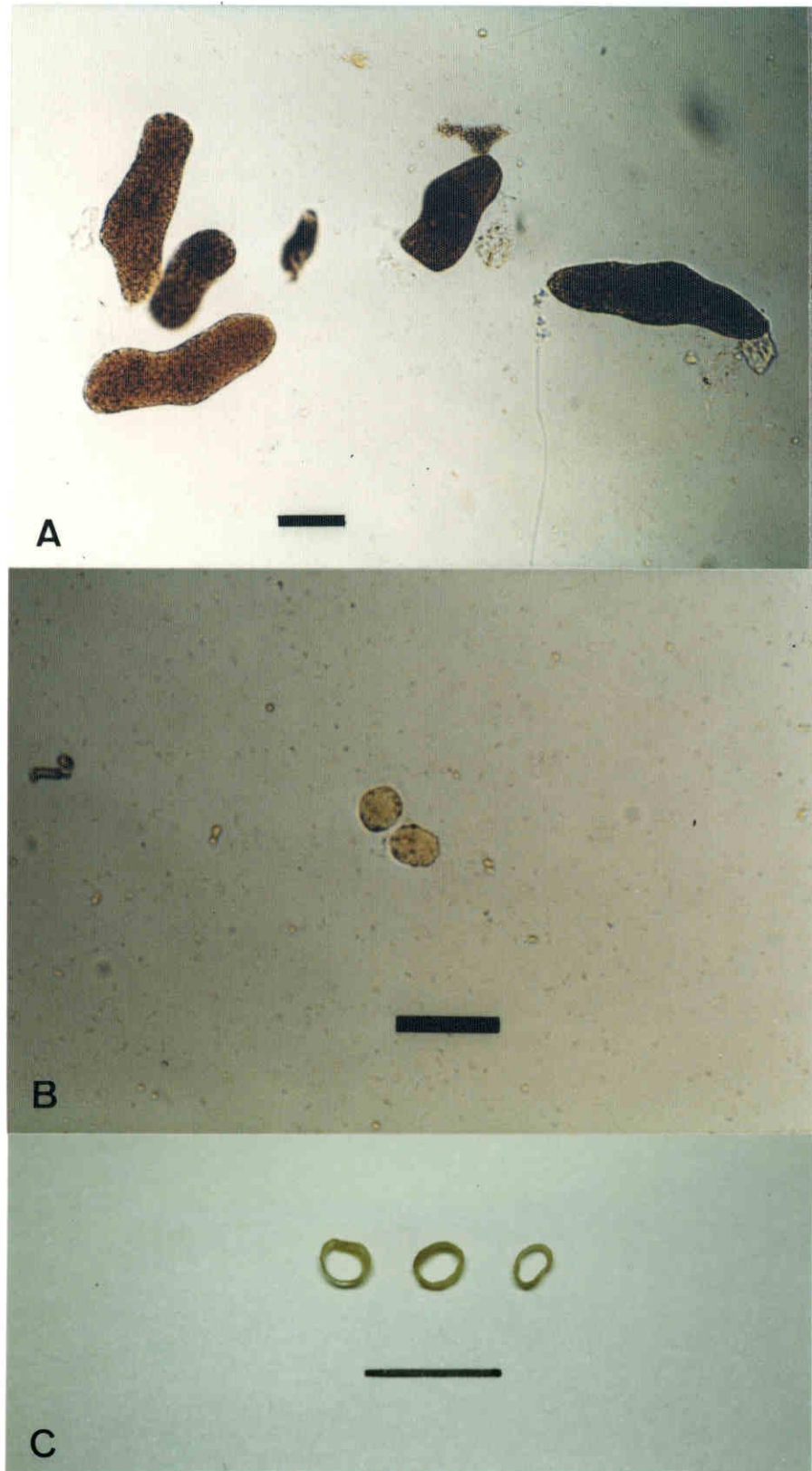


Fig. 23 Light micrographs of infected cells (A) and uninfected cells (B) prepared from soybean nodules by enzymatic maceration. The cortex tissue (C) remained even after 5.5h incubation with the enzyme solution. Bars represent 50 μm (A,B) and 1 cm (C).

Table 15 Enzyme activities in the infected cells, the uninfected cells and the cortex tissue prepared from soybean nodules.

Enzyme	Activity (μ mol/min/mg protein)		
	Infected cells	Uninfected cells	Cortex tissue
ADH	0.164 \pm 0.040	0.688 \pm 0.340	0.637 \pm 0.041
PDC	0.037 \pm 0.014	0.073 \pm 0.033	0.100 \pm 0.021
PEPC	0.068 \pm 0.012	0.183 \pm 0.122	0.110 \pm 0.028
Uricase	0.249 \pm 0.027	0.564 \pm 0.269	0.035 \pm 0.008

Each value is expressed as the mean of three separate determinations \pm standard deviation.

結 論

本実験で得られた結果をまとめると、Fig. 24 に示されたスキームを考えることができる。根粒細胞に転流された光合成産物は、宿主植物のサイトゾルで解糖系を経て、エタノール発酵経路によってアセトアルデヒドとエタノールにまで分解される。また、一部は、 CO_2 暗固定反応によってリンゴ酸が形成される。これらの代謝系は、根粒を構成する感染細胞、非感染細胞、皮層細胞に一樣に存在するが、感染細胞よりも非感染細胞と皮層細胞の方が活発である。生成されたアセトアルデヒド、エタノール、リンゴ酸は、バクテロイドに取り込まれ分解され、生じたエネルギー、還元力がニトロゲナーゼに利用される。嫌氣的代謝が作働している根粒細胞でも、ミトコンドリアは感染細胞において、レグヘモグロビンによってバクテロイドと同様に酸素の供給を受けている。根粒組織への酸素の供給は制限されており、非感染細胞と皮層組織ではレグヘモグロビンが存在しないためミトコンドリアの呼吸は著しく制限されている。ミトコンドリアのTCA サイクルのための炭素源は、 CO_2 暗固定反応によって生成されたリンゴ酸が当てられる。アンモニア同化にとって重要な炭素骨格は、ミトコンドリアのTCA サイクルから供給されると考えられる。アラントインの前駆体であるプリンの合成に必要なエネルギーも、ミトコンドリアによって供給されると思われる。アラントインの合成には、感染細胞と非感染細胞の両方の細胞が関与している。

本研究は主に酵素の活性を中心に行ってきたが、今後はトレーサー等を用いてさらに代謝経路を明確にする必要がある。エタノール発酵経路と CO_2 暗固定反応がどのような割合で行われているのか、また、ミトコンドリアに利用される炭素源とバクテロイドに利用される炭素源は、量的にどの程度異なるかなど問題が残されている。また、バクテロイド内の代謝については、まだ不明な点が多くある。さらに、酵素活性の測定結果からは、エタノール発酵経路と CO_2 暗固定反応は、非感染細胞あるいは皮層細胞の方がより活発であり、ウレイド代謝と同様に、炭素代謝についても細胞による分業が行われている可能性がある。もし、そうであれば、根粒が形成される過程で、感染細胞と非感染細胞はどの様に決定されるのだろうか。

根粒菌は、植物にとって本来部外者である。この侵入者が植物細胞内で、植物

の生産した光合成産物を利用できるのはなぜであろう。また、植物は、根粒菌の固定した窒素を利用できるのはなぜであろう。根粒内の炭素と窒素代謝の詳細な研究が、このような共生窒素固定系の本質的な問題を解明する手がかりとなり、それによって、窒素固定系の有効利用の展望が開けるものと思われる。

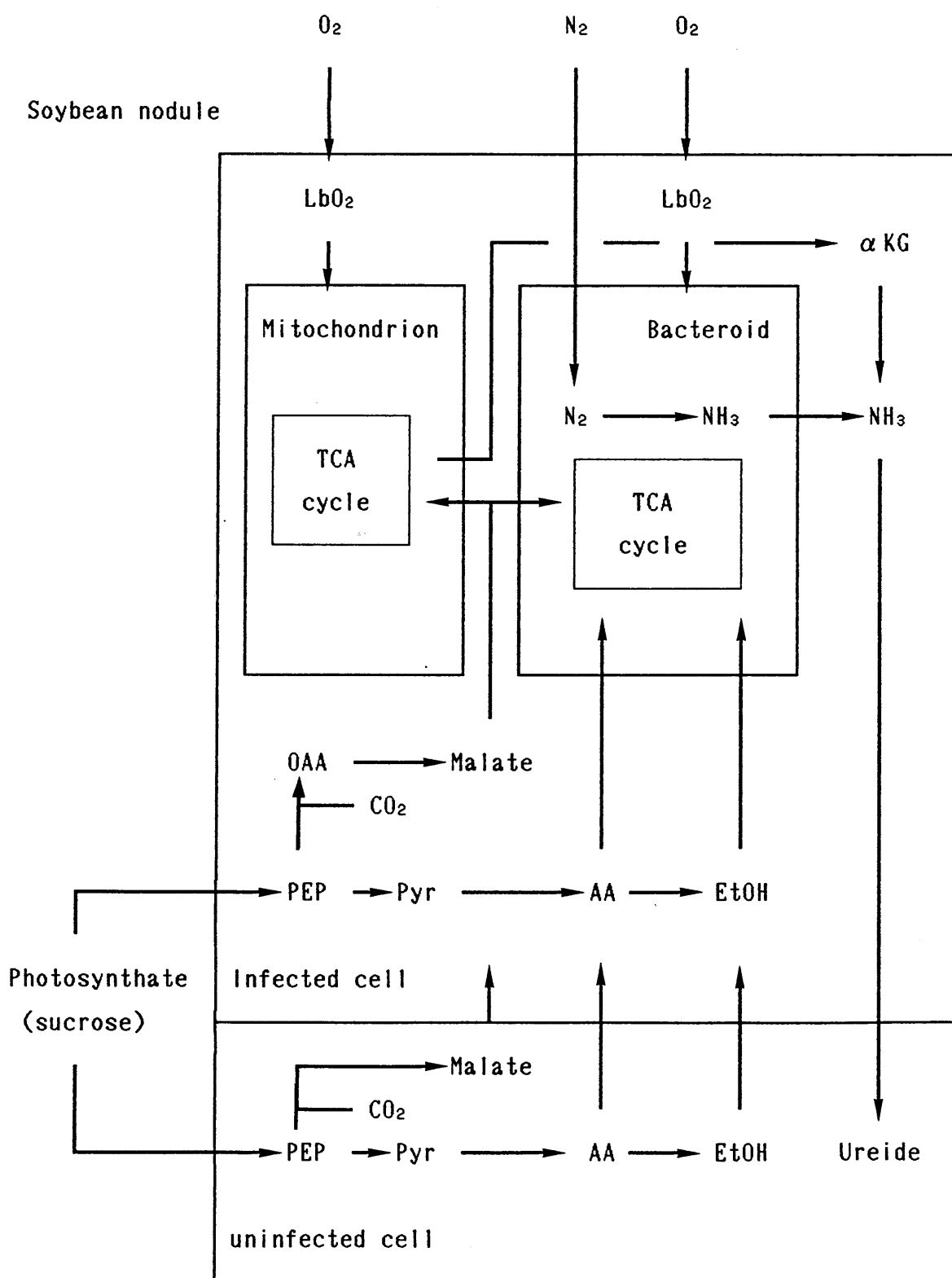


Fig. 24 Schematic diagram of carbon and nitrogen metabolism in soybean root nodules.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導頂いた名古屋大学農学部教授山本幸男先生に心から感謝いたします。また、ご助言、ご援助頂いた名古屋大学農学部手塚修文博士はじめ園芸学研究室の皆様に感謝の意を表します。

レグヘモグロビンの精製に関しては愛知教育大学生物学教室柳澤寛博士、電子顕微鏡観察は愛知教育大学生物学教室太田忠之博士にご援助頂きました。お礼申し上げます。また、愛知教育大学生物学教室鬼頭誠氏には実験に協力して頂き感謝します。

引用文献

- 1) 服部勉 (1972) 大地の微生物。pp.45-56. 岩波書店。
- 2) 石沢修一 (1977) 微生物と植物生育。植物をめぐる微生物的環境。博友社。pp.218-275.
- 3) 野口彌吉 (1969) 栽培原論。pp.247-256. 養賢堂。
- 4) 日本学士院編 (1980) 明治前日本農業技術史。pp.158-164. 井上書店、臨川書店。
- 5) 熊代幸雄 (1970) 比較農法論。東アジア伝統農法と西ヨーロッパ近代農法。pp.377-418. 御茶の水書房。
- 6) 宮崎安貞 (1978) 農業全書。日本農業全集第12巻。pp.91-104. 農山漁村文化協会。
- 7) 中村道徳 (1980) 生物窒素固定。学会出版センター。pp.189-192.
- 8) Holsten, R.D., R.C.Burns, R.W.F.Hardy and R.R.Hebert (1971) Establishment of symbiosis between Rhizobium and plant cells in vitro. Nature 232:173-176.
- 9) Phillips, D.A. (1974) Factors affecting the reduction of acetylene by Rhizobium - soybean cell associations in vitro. Plant Physiol. 53:67-72.
- 10) Child, J.J. (1975) Nitrogen fixation by a Rhizobium sp. in association with non-leguminous plant cell culture. Nature 253:350-351.
- 11) Scowcroft, W.R. and A.H.Gibson (1975) Nitrogen fixation by Rhizobium associated with tobacco and cowpea cell cultures. Nature 253:351-352.
- 12) Rango Rao, V. (1976) Nitrogenase activity in Rhizobium associated with leguminous and non-leguminous tissue cultures. Plant Sci.Lett. 6:77-83.
- 13) Plazinski, J., R.W.Innes and B.G.Rolfe (1985) Expression of Rhizobium trifolii early nodulation genes on maize and rice plants. J.Bacteriol. 163:812-815.

- 14) Evans, H.J., P.J. Bottomley and W.E. Newton. (1985) Nitrogen Fixation Research Progress. Martinus Nijhoff Publishers. pp.73-163.
- 15) Brill, W.J. (1981) 農業への微生物利用 (Agricultural microbiology)。サイエンス Vol.11, No.11. pp.116-127. 月経サイエンス。
- 16) Postgate, J. (1981) 窒素固定。庄野邦彦訳。朝倉書店。pp.25-35.
- 17) Appleby, C.A. (1984) Leghemoglobin and Rhizobium respiration. Ann.Rev.Plant Physiol. 35:443-478.
- 18) Rawsthorne, S., F.R. Minchin, R.J. Summerfield, C. Cookson and J. Coombs (1980) Carbon and nitrogen metabolism in legume root nodules. Phytochemistry 19:341-355.
- 19) Phillips, D.A. (1980) Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. Ann.Rev.Plant Physiol. 31:29-49.
- 20) Bergersen, F.J. and G.L. Turner (1967) Nitrogen fixation by the bacteroids fraction of breis of soybean root nodules. Biochim.Biophys.Acta 141:507-515.
- 21) Emerich, D.W., T. Ruiz-Argüeso, T.M. Ching and H.J. Evans (1979) Hydrogen-dependent nitrogenase activity and ATP formation in Rhizobium japonicum. J.Bacteriol. 137:153-160.
- 22) Peterson, J.B. and T.A. LaRue (1981) Utilization of aldehydes and alcohols by soybean bacteroids. Plant Physiol. 68:489-493.
- 23) Trinchant, J.C. and J. Rigaud (1979) Sur les substrats énergétiques utilisés, los de la réduction de C_2H_2 , par les bactéroïdes extraits des nodosités de Phaseolus vulgaris L. Physiol.Vég. 17:547-556.
- 24) Tajima, S. and T.A. LaRue (1982) Enzymes for acetaldehyde and ethanol formation in legume nodules. Plant Physiol. 70:388-392.
- 25) De Vries, G.E., P. In't Veld and J.W. Kijne (1980) Production of organic acids in Pisum sativum root nodules as a result of oxygen stress. Plant Sci.Lett. 20:115-123.
- 26) Peterson, J.B. and T.A. LaRue (1982) Soluble aldehyde dehydrogenase and metabolism of aldehydes by soybean bacteroids.

J.Bacteriol. 151:1473-1484.

27) Grimes, H. and P.F. Fottrell (1966) Enzymes involved in glutamate metabolism in legume root nodules. Nature 212:295-296.

28) Kurz, W.G.W. and T.A. LaRue (1977) Citric acid cycle enzymes and nitrogenase in nodules of Pisum sativum. Can.J.Microbiol. 23:1197-1200.

29) Henson, C.A., M. Collins and S.H. Duke (1982) Subcellular localization of enzymes of carbon and nitrogen metabolism in nodules of Medicago sativa. Plant Cell Physiol. 23:227-235.

30) Tajima, S. and Y. Yamamoto (1975) Enzymes of purine catabolism in soybean plants. Plant Cell Physiol. 16:271-282.

31) T.M. Ching, S. Hedtke and W. Newcomb (1977) Isolation of bacteria, transforming bacteria, and bacteroids from soybean nodules. Plant Physiol. 60:771-774.

32) Houwaard, F. (1979) Effect of ammonium chloride and methionine sulfoximine on the acetylene reduction of detached root nodules of peas (Pisum sativum). Appl. Environ. Microbiol. 37:73-79.

33) Miyata, H. and Y. Yamamoto (1969) Rhythms in respiratory metabolism of Lemna gibba G₃ under continuous illumination. Plant Cell Physiol. 10:875-889.

34) Neilands, J.B. (1955) Lactic dehydrogenase of herat muscle. In Methods in Enzymology. Vol.1. Edited by S.P. Colowick and N.O. Kaplan. pp.449-454. Academic Press.

35) Sanadi, D.R. (1969) α -Ketoglutarate dehydrogenase from pig heart. In Methods in Enzymology. Vol.13. Edited by J.M. Lowenstein. pp.52-55. Academic Press.

36) Ochoa, S. (1955) "Malic" enzyme. In Methods in Enzymology. Vol.1. Edited by S.P. Colowick and N.O. Kaplan. pp.739-753. Academic Press

37) Carpenter, W.D. and H. Beevers (1959) Distribution and properties of isocitritase in plants. Plant Physiol. 34:403-409.

- 38) Yamamoto, Y. and H. Beevers (1961) Purification and properties of malate synthetase from castor beans. *Biochim. Biophys. Acta* 48:20-25.
- 39) Holtum, J.A.M. and K. Winter (1982) Activity of enzymes of carbon metabolism during the induction of Crassulacean acid metabolism in Mesembryanthemum crystallinum L. *Planta* 155:8-16.
- 40) Elliott, W.H. (1955) Glutamine synthesis. In *Methods in Enzymology*. Vol.2. Edited by S.P. Colowick and N.O. Kaplan. pp.337-342. Academic Press.
- 41) Wong, P.P. and H.J. Evans (1971) Poly- β -hydroxybutyrate utilization by soybean (Glycine max Merr.) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. *Plant Physiol.* 47:750-755.
- 42) Boland, M.J., J.F. Hanks, P.H.S. Reynolds, D.G. Blevins, N.E. Tolbert and K.R. Schubert (1982) Subcellular organization of ureide biogenesis from glycolytic intermediates and ammonium in nitrogen-fixing soybean nodules. *Planta* 155:45-51.
- 43) Beisenherz, G. (1955) Triosephosphate isomerase from calf muscle. In *Methods in Enzymology*. Vol.1. Edited by S.P. Colowick and N.O. Kaplan. pp.387-391. Academic Press.
- 44) Abei, H. (1975) Catalase. In *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol.2. Edited by H.U. Bergmeyer. pp.673-684. Academic Press.
- 45) Nawa, Y. and T. Asahi (1971) Rapid development of mitochondria in pea cotyledons during the early stage of germination. *Plant Physiol.* 48:671-674.
- 46) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- 47) Bensadoun, A. and D. Weinstein (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* 70:241-250.
- 48) Mukerji, S.K. and S.F. Yang (1974) Phosphoenolpyruvate carboxylase from spinach leaf tissue. Inhibition by sulfite ion.

Plant Physiol. 53:829-834.

49) LaRue, T.A., J.B. Peterson and S. Tajima (1984) Carbon metabolism in the legume nodule. In Advances in Nitrogen Fixation Research. Edited by C. Veeger and W.E. Newton. pp.437-443. Nijhoff/Junk, The Hague, and PUDOC Wageningen.

50) Duke, S.H. and C.A. Henson (1985) Legume nodule carbon utilization in the synthesis of organic acids for the production of transport amides and amino acids. In Nitrogen Fixation and CO₂ Metabolism. Edited by P.W. Ludden and J.B. Burris. pp.293-302. Elsevier Science Publishing Co., Inc.

51) Streeter, J.G. and S.O. Salminen (1985) Carbon metabolism in legume nodules. In Nitrogen Fixation Research Progress. Edited by H.J. Evans, P.J. Bottomley and W.E. Newton. pp.277-284. Martinus Nijhoff Publishers.

52) 田島茂行 (1986) 根粒の代謝と窒素固定。日本土壤肥科学雑誌 57:319-327.

53) Reibach, P.H. and J.G. Streeter (1984) Evaluation of active versus passive uptake of metabolites by Rhizobium japonicum bacteroids. J. Bacteriol. 159:47-52.

54) Ronson, C.W., P. Lyttleton and J.G. Robertson (1981) C₄-dicarboxylate transport mutants of Rhizobium trifolii from ineffective nodules on Trifolium repens. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:4284-4288.

55) Glenn, A.R. and N.J. Brewin (1981) Succinate-resistant mutants of Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol. 126:237-241.

56) Finan, T.M., J.M. Wood and D.C. Jordan (1983) Symbiotic properties of C₄-dicarboxylic acid transport mutants of Rhizobium leguminosarum. J. Bacteriol. 154:1403-1413.

57) Ronson, C.W. and S.B. Primrose (1979) Carbohydrate metabolism in Rhizobium trifolii: Identification and symbiotic properties of

mutants. J.Gen.Microbiol. 112:77-88.

58) Glenn,A.R., I.A.Mckay, R.Arwas and M.J.Dilworth (1984) Sugar metabolism and the symbiotic properties of carbohydrate mutants of Rhizobium leguminosarum. J.Gen.Microbiol. 130:239-245.

59) King,B.J., D.B.Layzell and D.T.Canvin (1986) The role of dark carbon dioxide fixation in root nodules of soybean. Plant Physiol. 81:200-205.

60) Reibach,P.H. and J.G.Streeter (1983) Metabolism of ¹⁴C-labeled photosynthate and distribution of enzymes of glucose metabolism in soybean nodules. Plant Physiol. 72:634-640.

61) Kouchi,H. and K.Nakaji (1985) Utilization and metabolism of photoassimilated ¹³C in soybean roots and nodules. Soil Sci.Plant Nutr. 31:323-334.

62) Stovall,I. and M.Cole (1978) Organic acid metabolism by isolated Rhizobium japonicum bacteroids. Plant Physiol. 61:787-790.

63) Tajima,S., I.Kimura and H.Sasahara (1986) Succinate metabolism of isolated soybean nodule bacteroids at low oxygen concentration. Agric.Biol.Chem. 50:1009-1014.

64) Vance,C.P., K.L.M.Boylan, C.A.Maxwell, G.H.Heichel and L.L.Hardman (1985) Transport and partitioning of CO₂ fixed by root nodules of ureide and amide producing legumes. Plant Physiol. 78:774-778.

65) Laing,W.A., J.T.Christeller and W.D.Sutton (1979) Carbon dioxide fixation by lupin root nodules. II.Studies with ¹⁴C-labeled glucose, the pathway of glucose catabolism, and the effects of some treatments that inhibit nitrogen fixation. Plant Physiol. 63:450-454.

66) Tajima,S. and Y.Yamamoto (1984) Fluctuation of enzyme activities related to nitrogen fixation, C₆/C₁ ratio, and nicotinamide nucleotide content during soybean plant development. Soil Sci.Plant Nutr. 30:85-94.

67) Robertson,J.G. and K.J.F.Farnden (1980) Ultrastructure and

- metabolism of the developing legume root nodule. In *The Biochemistry of Plants*. Vol.5. Edited by B.J.Miflin. pp.65-113. Academic Press.
- 68) Goodchild, D.J. and F.J. Bergersen (1966) Electron microscopy of the infection and subsequent development of soybean nodule cells. *J. Bacteriol.* 92:204-213.
- 69) Muecke, P.S. and J.T. Wiskich (1969) Respiratory activity of mitochondria from legume root nodules. *Nature* 221:674-675.
- 70) Schramm, R.W. (1982) Carbon assimilation and flux connected with nitrogen fixation in legumes. *Isr. J. Bot.* 31:131-139.
- 71) Jackson, C., J.E. Dench, D.O. Hall and A.L. Moore (1979) Separation of mitochondria from contaminating subcellular structures utilizing silica sol gradient centrifugation. *Plant Physiol.* 64:150-153.
- 72) Nishimura, M., R. Douce and T. Akazawa (1982) Isolation and characterization of metabolically competent mitochondria from spinach leaf protoplasts. *Plant Physiol.* 69:916-920.
- 73) John, C.D. and H. Greenway (1976) Alcoholic fermentation and activity of some enzymes in rice roots under anaerobiosis. *Aust. J. Plant Physiol.* 3:325-336.
- 74) Macrae, A.R. (1971) Isolation and properties of a 'malic' enzyme from cauliflower bud mitochondria. *Biochem. J.* 122:495-501.
- 75) Yamaya, T., A. Oaks and H. Matsumoto (1984) Characteristics of glutamate dehydrogenase in mitochondria prepared from corn shoots. *Plant Physiol.* 76:1009-1013.
- 76) Murray, D.R. and I.R. Kennedy (1980) Changes in activities of enzymes of nitrogen metabolism in seedcoats and cotyledons during embryo development in pea seeds. *Plant Physiol.* 66:782-786.
- 77) Dilworth, M.J. (1980) Leghemoglobins. In *Methods in Enzymology*. Vol.69. Edited by A.S. Pietro. pp.812-823. Academic Press.
- 78) Bergman, A., P. Gardestrom and I. Ericson (1980) Methods to obtain a chlorophyll-free preparation of intact mitochondria from

apinach leaves. Plant Physiol. 66:442-445.

79) Lambers, H. (1980) The physiological significance of cyanide-resistant respiration in higher plants. Plant Cell Environ. 3:293-302.

80) Morohashi, Y., J.D. Bewley and E.C. Yeung (1981) Biogenesis of mitochondria in imbibed peanut cotyledons. II. Development of light and heavy mitochondria. Plant Physiol. 68:318-323.

81) Werner, D. and E. Morschel (1978) Differentiation of nodules of Glycine max. Ultrastructural studies of plant cells and bacteroids. Planta 141:169-177.

82) Fletcher, J.S. (1972) Heterogeneous population of mitochondria in higher plant cells. Nature 238:466-467.

83) Deroche, M.E., E. Carrayol and E. Jolivet (1983) Phosphoenolpyruvate carboxylase in legume nodules. Physiol. Vég. 21:1075-1081.

84) Gadai, P. (1983) Phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrogen fixation. Physiol. Vég. 21:1069-1074.

85) Peterson, J.B. and H.J. Evans (1978) Properties of pyruvate kinase from soybean nodule cytosol. Plant Physiol. 61:909-914.

86) Tajima, S., H. Sasahara, H. Kouchi, T. Yoneyama and J. Ishizuka (1985) Effects of oxygen concentration and leghemoglobin on organic acid degradation by isolated soybean nodule bacteroids. Agric. Biol. Chem. 49:3473-3479.

87) Wittenberg, J.B., F.J. Bergersen, C.A. Appleby and G.L. Turner (1974) Facilitated oxygen diffusion. The role of Leghemoglobin in nitrogen fixation by bacteroids isolated from soybean root nodules. J. Biol. Chem. 249:4057-4066.

88) Rawsthorne, S. and T.A. LaRue (1986) Preparation and properties of mitochondria from cowpea nodules. Plant Physiol. in press.

89) Selker, J.M.L. and E.H. Newcomb (1985) Spatial relationships between uninfected and infected cells in root nodules of soybean. Planta

165:446-454.

90) Newcomb, E.H. and S.R.Tandon (1981) Uninfected cells of soybean root nodules : ultrastructure suggests key role in ureide production. *Science* 212:1394-1396.

91) Appleby, C.A. and F.J.Bergersen (1980) Preparation and experimental use of leghemoglobin. In *Methods of Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. Edited by F.J.Bergersen. pp.315-335. John Wiley & Sons Ltd.

92) Bergersen, F.J., G.L.Turner and C.A.Appleby (1973) Studies of the physiological role of leghaemoglobin in soybean root nodules. *Biochim.Biophys.Acta* 292:271-282.

93) Uheda, E. and K.Syōno (1982) Effects of leghemoglobin components on nitrogen fixation and oxygen consumption. *Plant Cell Physiol.* 23:85-90.

94) Witty, J.F., L.Skøt and N.P.Revsbech (1985) Direct evidence for a variable barrier to diffusion into legume nodules. In *Nitrogen Fixation Research Progress*. Edited by H.J.Evans, P.J.Bottomley and W.E.Newton. pp.355. Martinus Nijhoff Publishers.

95) Bergersen, F.J. (1962) The effects of partial pressure of oxygen upon respiration and nitrogen fixation by soybean root nodules. *J.Gen.Microbiol.* 29:113-125.

96) Ralston, E.J. and J.Imsande (1982) Entry of oxygen and nitrogen into intact soybean nodules. *J.Exp.Bot.* 33:208-214.

97) Newcomb, E.H., S.R.Tandon and R.R.Kowal (1985) Ultrastructural specialization for ureide production in uninfected cells of soybean root nodules. *Protoplasma* 125:1-12.

98) Bergersen, F.J. and G.L.Turner (1975) Leghaemoglobin and the supply of O₂ to nitrogen-fixing root nodule bacteroids : Presence of two oxidase systems and ATP production at low free O₂ concentration. *J.Gen.Microbiol.* 91:345-354.

99) Rawsthorne, S. and T.A. LaRue (1986) Metabolism under microaerobic conditions of mitochondria from cowpea nodules.

Plant Physiol. in press.

100) Christeller, J.T., W.A. Laing and W.D. Sutton (1977) Carbon dioxide fixation by lupin root nodules. I. Characterization, association with phosphoenolpyruvate carboxylase, and correlation with nitrogen fixation during nodule development. Plant Physiol. 60:47-50.

101) Hanks, J.F., K. Schubert and N.E. Tolbert (1983) Isolation and characterization of infected and uninfected cells from soybean nodules. Role of uninfected cells in ureide synthesis. Plant Physiol. 71:869-873.

102) Shelp, B.J., C.A. Atkins, P.J. Storer and D.T. Canvin (1983) Cellular and subcellular organization of pathway of ammonia assimilation and ureide synthesis in nodules of cowpea (Vigna unguiculata L. Walp.). Arch. Biochem. Biophys. 224:429-441.

報 文 目 録

- 1) Norio Suganuma and Yukio Yamamoto (1986) Carbon metabolism related to nitrogen fixation in soybean root nodules.
Soil Sci.Plant Nutr. (in press)
- 2) Norio Suganuma and Yukio Yamamoto (1986) Respiratory metabolism of mitochondria in soybean root nodules.
Soil Sci.Plant Nutr. (in press)
- 3) Norio Suganuma, Makoto Kitou and Yukio Yamamoto (1986) Carbon metabolism in relation to cellular organization of soybean root nodules and respiration of mitochondria aided by leghemoglobin.
Plant Cell Physiol. (submitted for the publication)