

## *Rhizobium fredii* USDA191 の過酸化水素感受性と カタラーゼ, ペルオキシダーゼ活性について

大和田琢二・三浦 賢紀・南 里栄  
白川 雪香・井川 香子・佐藤 哲也

(受理：1998年5月18日)

Correlation between the sensitivity of *Rhizobium fredii* USDA191  
to hydrogen peroxide and the activities of catalase and peroxidase

Takuji OHWADA, Takanori MIURA, Rie MINAMI,  
Yukika SHIRAKAWA, Keiko IGAWA, and Tetsuya SATO

### 摘 要

根粒菌群 (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*) の過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) 感受性は他の好気性或いは通性嫌気性の細菌群 (*Pseudomonas*, *Escherichia*, *Proteus*, *Serratia*, *Bacillus*, *Micrococcus*) に比べて相対的に高く、中でも *R. fredii* の  $H_2O_2$  感受性は窮めて高かった。根粒菌群のカタラーゼ活性は他の細菌群に比べて相対的に低く、根粒菌群の高い  $H_2O_2$  感受性の原因であると考えられたが、*R. fredii* のペルオキシダーゼ活性は根粒菌群の中でも低い傾向が見られたことから、*R. fredii* の高い  $H_2O_2$  感受性の一つの原因である可能性が示唆された。

キーワード：根粒菌, 過酸化水素 ( $H_2O_2$ ), カタラーゼ, ペルオキシダーゼ

### 緒 言

根粒菌は Rhizobiaceae 科に属するグラム陰性の好気性細菌で、マメ科植物の根に侵入して宿主根に瘤 (根粒) を形成する。根粒では、空気中の分子状窒素ガス ( $N_2$ ) を還元してアンモニアにする、いわゆる生物窒素固定が行われている。工業的には窒素肥料製造のための工業的窒素固定 (化学的固定) が行われているが、その総量は年間でおよそ5,400万トンと推定されており、生物窒素固定 (年間およそ1億数千万トン) には及ばない。また、生物窒素固定は化学的固定のように化石エネルギーを消費する必要

がなく、それに付随して発生する環境汚染も生じない、いわゆるクリーンエネルギーである。

根粒菌は酵母エキス培地で増殖の速いグループと遅いグループに分けられ、それぞれ *Rhizobium* 属、*Bradyrhizobium* 属に分類されている<sup>1-3)</sup>。また、一般に比較的高い宿主特異性を有しており、前者には、*R. leguminosarum* (宿主植物：エンドウ、クローバー、インゲン)、*R. meliloti* (宿主植物：アルファルファ)、*R. fredii* (宿主植物：ダイズ)、後者には、*B. japonicum* (ダイズ) などが知られている。根粒菌は土壌中では一般にフリーリビング細胞として存在しているが、根粒中ではバクテロイドと呼ばれる器官

へと変形あるいは肥大化して顕著な窒素固定活性を発現する<sup>3)</sup>。この過程には大量の ATP が必要とされるため酸化的リン酸化反応によって補われている。その一方で、生物窒素固定反応にはニトロゲナーゼが関与し、この酵素は酸素によって失活するため、根粒内ではレグヘモグロビンにより酸素濃度が巧妙に調節されている。従って根粒内には酸素分圧が低い、強い還元状態が生じており、それを維持するために活性酸素( $H_2O_2$ ,  $\cdot O_2^-$ ,  $\cdot OH$ )が生じやすい<sup>4,5)</sup>。例えば、レグヘモグロビンの自己酸化反応によって活性酸素が生じると考えられている<sup>6,7)</sup>。また、尿酸をアラントインに変換する尿酸オキシダーゼの反応を経て  $H_2O_2$  の生産される系も知られている<sup>8)</sup>。活性酸素は細胞に大きな傷害をもたらすため<sup>9,10)</sup>、細胞内には活性酸素に対する防御機構が存在すると考えられ、植物由来のアスコルビン酸-グルタチオンの反応系やスーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、ペルオキシダーゼがその役割を担っていることが報告されている<sup>11)</sup>。しかし、根粒菌の活性酸素防御機構並びにその感受性に関してはほとんど知られていない。本報では、*R. fredii* を中心に根粒菌(*Rhizobium* 属)の  $H_2O_2$  に対する感受性を他の細菌群と比較するとともに、それに係る酵素系を調べた。その結果、1) 根粒菌は  $H_2O_2$  に対して相対的に高い感受性を有しており、中でも *R. fredii* の感受性は最も高いこと、2) 根粒菌の  $H_2O_2$  感受性は一般にカタラーゼ活性に依存していること、3) *R. fredii* の高い感受性の原因の一つは低いペルオキシダーゼ活性に由来している可能性のあることが明らかになったので報告する。

## 実験方法

### 1. 菌株、培地及び培養

菌株には *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* USDA2370, 2443; bv. *trifolii* USDA2053, 2145; bv. *phaseoli* USDA2667, 2676; *R. meliloti* USDA1021, 1025; *R. fredii* USDA191, 206; *Bradyrhizobium japonicum* S32; *Pseudomonas fluorescens* AHU1719; *Escherichia coli* B; *Proteus vulgaris* AHU1144; *Serratia marcescens* AHU1488; *Bacillus subtilis* AHU1390; *Micrococcus* spp. の計17菌株を用いた。*Rhizobium* 属10株は Van Berkum 博士 (Agricultural Research Service,

USDA, Beltsville, MD) から供与された。*Bradyrhizobium* は北海道十勝農業協同組合連合会 (北海道帯広市) から、その他の菌株は北海道大学農学部応用菌学講座からそれぞれ供与された。

根粒菌の保存培地にはマンニトールを炭素源とする YEM 培地<sup>12)</sup>、その他の菌株には LB 或いは TY 培地<sup>13)</sup> を用いた。培養用培地は、*B. japonicum* に YEM-HM 培地<sup>12)</sup> を用いた以外、すべて TY 培地を用い、30°C で振盪培養 (100 ストローク/分) した。菌の増殖は菌液の濁度を吸光度計 (660nm) で測定した。

### 2. 無細胞抽出液の調製と蛋白質の定量<sup>14)</sup>

培養菌液を 10,000rpm, 4°C で10分間の遠心分離により集菌した後、菌体を 50mM リン酸緩衝液 (KPB: 50mM リン酸二水素カリウム 8.5ml, 50mM リン酸水素二カリウム 91.5ml, pH 7.8) を用いて3回洗浄した。洗浄後、少量の 50mM KPB に懸濁して超音波処理 (200W, 2分間×8回) により菌を破碎し酵素を抽出した後、19,000rpm, 4°C で60分間遠心し、上清液を無細胞抽出液とした。試料中の蛋白質含量は BIO-RAD PROTEIN ASSAY (Bio-Rad Lab.) を用いて 595nm の吸光値から定量した。標準蛋白質には牛血清アルブミン (BSA) を用いた。

### 3. 酵素活性測定

A) カタラーゼ<sup>15)</sup>: 30%  $H_2O_2$  5 $\mu$ l, 蒸留水 2.645ml, 0.5M KPB (pH 7.0) 0.3ml を石英セル中で混合し、25°C で3分間温度平衡させた後、試料の 50 $\mu$ l を混合し、240nm の吸光値の変化を測定した。酵素活性は  $H_2O_2$  のモル吸光係数 ( $0.0436\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) から求めた。

B) ペルオキシダーゼ: 以下の電子供与体を用いた場合の酵素活性について測定した。

1) NADH: 0.5M KP (pH 7.0) 0.3ml, 0.2M EDTA 30 $\mu$ l, NADH (24mg/ml) 30 $\mu$ l, 30mM  $H_2O_2$  40 $\mu$ l, 蒸留水 2.55ml をセル中で混合し、25°C, 3分間インキュベートした。その後、試料の 50 $\mu$ l を添加し、340nm の吸光値を測定した。NADH のモル吸光係数  $6.22\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  から計算した。

2) Glutathione (GSH)<sup>16)</sup>: 0.5M KPB (pH 7.0) 0.3ml, 0.2M EDTA 15 $\mu$ l, 20mM GSH 0.3ml, GSH reductase (200U/0.8ml) 6 $\mu$ l, NADPH (14mg/ml) 30 $\mu$ l, 20mM cumene hydroxyperoxide 30 $\mu$ l, 蒸留水 2.27ml をセル中で混合し、25°C, 3分間インキュ

ペートした後、試料の50 $\mu$ lを添加し、340nmの吸光値を測定した。

3) *o*-Dianisidine<sup>17)</sup>: 0.5M KPB (pH 7.0) 0.3ml, 30mM *o*-dianisidine 10 $\mu$ l, 30mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 $\mu$ l, 蒸留水2.39mlをセル中で混合し、25°Cで3分間インキュベートした後、試料の100 $\mu$ lを添加し、460nmの吸光値を測定した。尚、*o*-dianisidineのモル吸光係数11.3 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>から計算した。

4) Diaminobenzidine<sup>18)</sup>: 0.5M KPB (pH 7.2) 0.3ml, 30mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 $\mu$ l, 150mM 3,3-diaminobenzidine 10 $\mu$ l, 蒸留水2.39mlをセル中で混合し、25°Cで3分間インキュベートした後、試料の100 $\mu$ lを添加し、482nmでの吸光値の変化から活性を計算した。

5) *p*-Phenylenediamine<sup>19)</sup>: 0.5M KPB (pH 7.0) 0.3ml, 50mM *p*-phenylenediamine 30 $\mu$ l, 30mM H<sub>2</sub>O 200 $\mu$ lをセル中で混合し、25°Cで3分間インキュベートした後、試料の100 $\mu$ lを添加し、485nmの吸光値の変化から活性を計算した。尚、*p*-phenylenediamineのモル吸光係数1.545mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>から計算した。

#### C) NAD<sup>+</sup>依存型脱水素酵素

1) グルコース6リン酸脱水素酵素(G6PDH)及び6ホスホグルコン酸脱水素酵素(6PGDH): Vassily

らの方法<sup>20)</sup>を部分的に改変して行った。反応混合液に蒸留水1.59ml, 0.5Mリン酸緩衝液(pH7.6)0.3ml, 0.05mM塩化マグネシウム0.5ml, 10mM NAD<sup>+</sup>0.06ml, 50mM G6P(或いは6PG)0.3mlを石英セルに入れて混合し、3分間温度平衡させた後、0.15mlの試料を入れて測定を開始した。酵素活性は340nmの吸光値の変化から測定した。

2) リンゴ酸脱水素酵素(MDH): Mackayらの方法<sup>21)</sup>に従って測定した。反応混合液[蒸留水0.31ml, 1mMトリス緩衝液(pH 8.5)0.12ml, 0.5mM塩化カリウム0.05ml, 0.05mM塩化マンガン0.01ml, 10mM NAD<sup>+</sup>0.01ml, 0.2mM L-リンゴ酸0.05ml]及び試料0.05mlを30°C, 20分間インキュベート後、0.5mlの0.1%2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを加え、室温で10分間インキュベートした。そして、2mlの2N水酸化ナトリウムを加え、4°C, 5分間、6,000 $\times$ gで遠心分離した後、上澄みの吸光値(580或いは450nm)を測定した。

## 実験結果及び考察

### 1. *R. fredii* USDA191のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性

根粒菌群11株及びその他の細菌群6株について、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.6mM)存在下における増殖を調べ、24時間

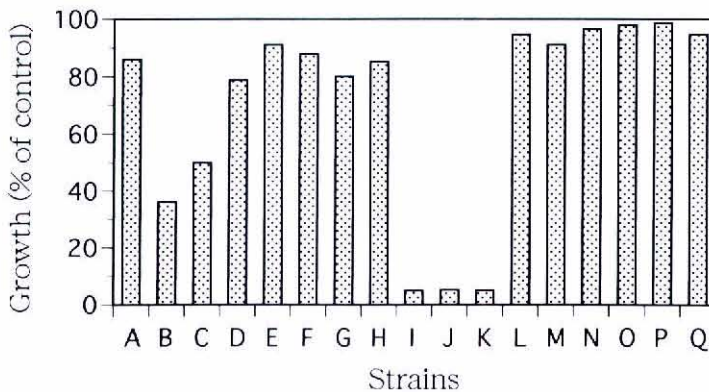


Fig. 1 Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the growth of root nodule and other genus of bacteria.

Growth was measured at 24 h (96 h for *Bradyrhizobium* strain) after the inoculation and shown as the ratio of the growth in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.6mM) to that in the absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A) *R. leguminosarum* bv. *viciae* USDA2370, B) *R. leguminosarum* bv. *viciae* USDA2443, C) *R. leguminosarum* bv. *trifolii* USDA2053, D) *R. leguminosarum* bv. *trifolii* USDA2145, E) *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2667, F) *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676, G) *R. meliloti* USDA1021, H) *R. meliloti* USDA1025, I) *R. fredii* USDA191, J) *R. fredii* USDA206, K) *B. japonicum* S32, L) *P. fluorescens* AHU1719, M) *E. coli* B, N) *P. vulgaris* AHU1144, O) *S. marcescens* AHU1488, P) *B. subtilis* AHU1390, Q) *Micrococcus* spp.

後の増殖 ( $OD_{600}$ ) を  $H_2O_2$  無添加条件下 (コントロール) における増殖 ( $OD_{600}$ ) のパーセントで示した (Fig. 1)。その結果, *Rhizobium fredii* の2株及び *Bradyrhizobium japonicum* S32 の増殖は  $H_2O_2$  の添加によってコントロールのおよそ5%に抑制された。しかし, その他の根粒菌群の増殖は *R. leguminosarum* bv. *viciae* USDA2443 がコントロールのおよそ36%, bv. *trifolii* USDA2053 が50%にそれぞれ抑制されたが, その他は79%以上の増殖を示した。これらの結果から, *R. fredii* (2株) と *B. japonicum* S32 は根粒菌群の中でも  $H_2O_2$  に対する感受性が高いと考えられた。一方, 根粒菌以外の菌群では, いずれもコントロールの90%以上の増殖を示した。

## 2. *R. fredii* USDA191 の表層構造と $H_2O_2$ 感受性

生体に及ぼす酸素毒の中で, 最も重要な反応の一つは, ラジカル連鎖反応により進行する非酵素的酸化反応である。このラジカル連鎖反応の過程で生成するペルオキシラジカルが, 膜の脂質や蛋白質の酸

化を引き起こし, 生体に重大な障害を与えることが知られている<sup>22,23</sup>。Hoffman と Krieg は, EDTA により細胞表層に傷害を受けた大腸菌は,  $H_2O_2$  に対する感受性が高まったことを報告している<sup>24</sup>。そのため,  $H_2O_2$  に対する *R. fredii* の高い感受性が細菌の表層構造に起因している可能性が考えられたことから, 根粒菌群の中で  $H_2O_2$  耐性が最も高かった *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2667,  $H_2O_2$  存在下でコントロールの約79%の増殖を示した *R. leguminosarum* bv. *trifolii* USDA2145, そして, 根粒菌以外の菌群から *P. fluorescens* AHU1719, *E. coli* B, *S. marcescens* AHU1488 を選び, 細胞を凍結融解処理した後の  $H_2O_2$  感受性を *R. fredii* USDA191 と比較した (Fig. 2)。ここで用いた *E. coli* B 株は, あらかじめ凍結融解に対して感受性の高いことがわかっているため, 凍結融解による細胞の傷害を評価するために用いた。実験結果は, *E. coli* B 株の  $H_2O_2$  に対する感受性が凍結融解処理により著し

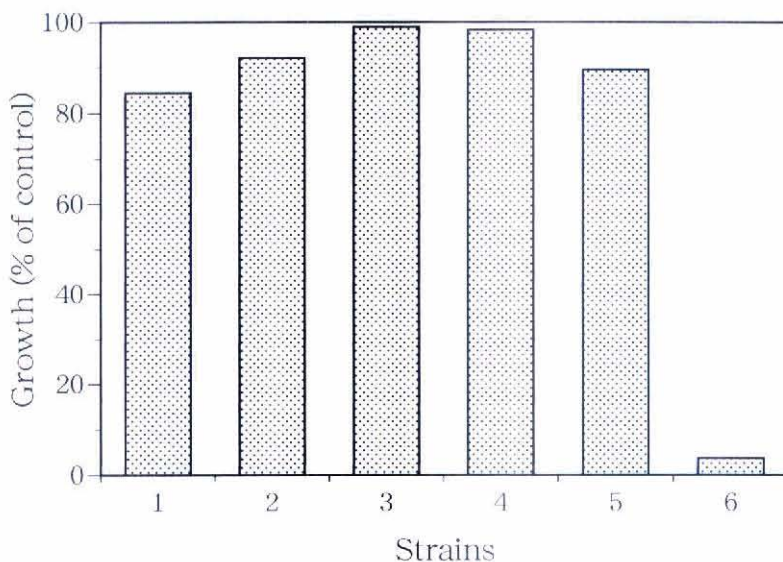


Fig. 2 Effect of  $H_2O_2$  on the growth of the cells pretreated with freeze-thaw in TY medium.

The cells in late log phase were pretreated with freeze-thaw ( $-80^{\circ}C$  and  $30^{\circ}C$ , each for 10 min, respectively) and grown in the same fresh medium (TY) in the presence of  $H_2O_2$ . Horizontal axis shows the ratio (%) of the growth of the cells which were pretreated with freeze-thaw to that of the cells which were not pretreated. 1) *R. leguminosarum* bv. *trifolii* USDA2145, 2) *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA 2667, 3) *R. fredii* USDA191, 4) *P. fluorescens* AHU1719, 5) *S. marcescens* AHU1488, 6) *E. coli* B.

く高まっていることを示しており、細菌の表層が障害を受けていることが推察された。しかし、*R. fredii*をはじめ、調べた根粒菌及びその他の菌群において、凍結融解処理によっても H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による増殖阻害効果に有意な変化が見られなかったことから、*R. fredii* の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 高感受性の原因として、細菌の表層構造が関与している可能性は小さいと考えられた。

### 3. 根粒菌及びその他の細菌群の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 感受性とカタラーゼ活性

根粒菌群11株, その他の細菌群 6 株について, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度が0.6, 1.5, 5.9, 14.7, 29.4, 58.8, 或いは147 mM の条件でそれぞれの菌を培養し, 24時間以内 (*B. japonicum* は96時間以内) に増殖可能な H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の最大濃度 (mM) と, それぞれの菌株の対数後期から定常期初期におけるカタラーゼ活性を Fig. 3 に示した。まず, 根粒菌群とその他の菌群とを比較すると, *R. fredii* の2株と *Bradyrhizobium* S32 の増殖可能な最大 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度が0.6mM, その他の根粒菌群でも1.5 mM であるのに対して, 根粒菌以外の菌群では増殖可能な最大 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度が相対的に高く, 5.9mM

の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度でも H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 無添加の場合の50%以上の増殖を示した。中でも, *Bacillus* 及び *Micrococcus* は 150mM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下でも H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 無添加の場合の80%以上の増殖を示した。一方, カタラーゼ活性は, *R. fredii* USDA206 が0.9 (units per mg protein) で最も低く, 最高でも *R. meliloti* USDA1021 の 3.8 (units per mg protein) であったのに対して, 根粒菌以外の菌群の活性値は相対的に高く, 中でも *Bacillus* 及び *Micrococcus* の活性はそれぞれ 265.4 (units per mg protein), 893.3 (units per mg protein) を示した。また, これらの活性値は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の添加によって高まる傾向が見られ, 根粒菌群では, 1.1~4.6倍, その他の菌群でも, 1.1~1.6倍の増加を示したが, 根粒菌群の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 感受性はその他の菌群に比べて相対的に高いこと, 及び, 根粒菌群のカタラーゼ活性はその他の菌群に比べて相対的に低いことを表すとともに, 両者の間には有意な相関が見られたことから, 菌の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 感受性は菌体内のカタラーゼ活性に依存する傾向のあることが示唆された。しかし, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対して高い感受性を示した *R. fredii* の

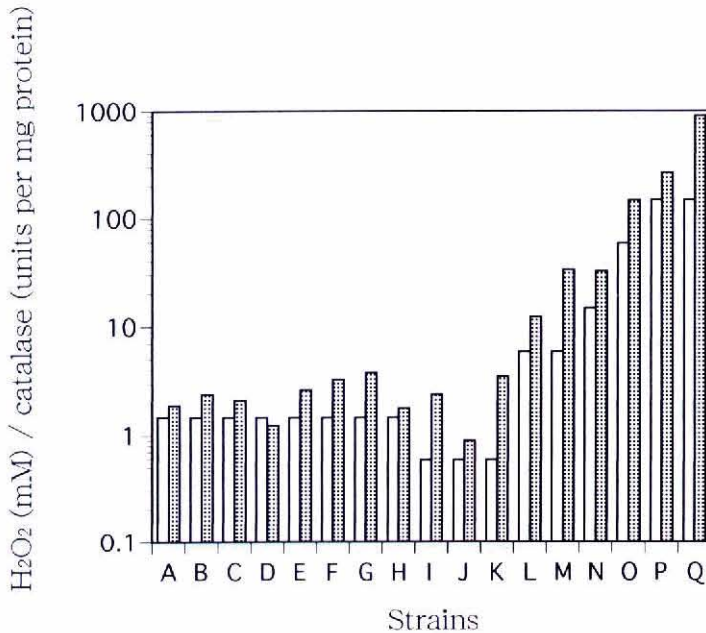


Fig. 3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensitivity and catalase activity in root nodule and other genus of bacteria.

The cells were incubated in TY medium (YEM-HM for *B. japonicum*) in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.6, 1.5, 5.9, 14.7, 29.4, 58.8, or 147mM). Ordinate shows both the maximum concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in which the cells were grown within 24 h (96 h for *B. japonicum*) as white bars and catalase activity in the cells in late log to early stationary phase as dotted bars.

2株のカタラーゼ活性値は、*R. fredii* USDA206は0.9 (units per mg protein) で菌群の中で最も低かったのに対し、*R. fredii* USDA191は2.4 (units per mg protein) で、これは根粒菌群全体の平均値(2.5)とほぼ同じ値であったことから、*R. fredii* USDA191株の $H_2O_2$ に対する高い感受性の原因には他の要因が介在している可能性が考えられた。

#### 4. *R. fredii* USDA191の $H_2O_2$ 感受性とペルオキシダーゼ活性

$H_2O_2$ の除去に関与する重要な酵素の一つであるペルオキシダーゼの活性について、*R. fredii* USDA191, 対照菌株として*R. leguminosarum* bv. *trifolii* USDA2145, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2667の計3株について5種類の電子供与体を用いて調べた (Fig. 4)。その結果、3菌株に共通して $NAD^+$ ペルオキシダーゼ活性が最も高く、5種類のペルオキシダーゼ活性総量の50%以上を占めた。また、それぞれのペルオキシダーゼ活性は $H_2O_2$ の添加により高まる傾向が見られたが、*R. fredii*の全ての酵素活性値は他の対照の2菌株よりも低く、主要酵素である $NAD^+$ ペルオキシダーゼ活性値は対照菌株の75%程度、 $H_2O_2$ が添加された条件では対照菌株の30~60%程度であった。また、GSH, *o*-dianisidine, diaminobenzidineの各ペルオキシダーゼ活性はほとんど見られなかった。これらの結果から、*R. fredii*のペルオキシダーゼ活性は対照菌株よりも低く、*R. fredii*が $H_2O_2$ 高感受性である原因の一つである可能性が示唆された。但し、これらのペルオキシダーゼ活性値はカタラーゼよりもかなり低く、そのおよそ100~300分の1程度であったが、測定に用いた試料は細胞の超音波処理後の上澄みから調製されているため、酵素の大半は細胞質由来であると考えられることから、ペリプラズム領域を含んだ細胞表層部に含まれる酵素は検出されにくいと考えられる。従って、 $H_2O_2$ の作用部位として重要と考えられる細胞表層部の酵素の存在及びその活性については今後検討を要すると考えられる。これらの実験結果は、各菌株間におけるペルオキシダーゼの相対的な活性値を示していると考えた方が妥当であるように思われる。

#### 5. *R. fredii* USDA191の $NAD^+$ 依存型脱水素酵素活性

ペルオキシダーゼの中で主要であると考えられる

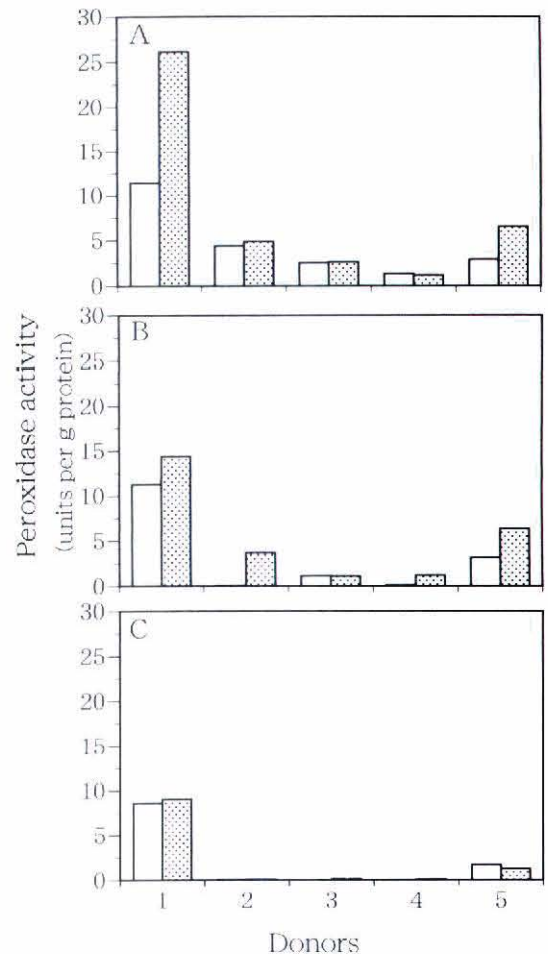


Fig. 4. Peroxidase activities in the cells grown with or without  $H_2O_2$ .

A) *R. leguminosarum* bv. *trifolii* USDA2145, B) *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2667, or C) *R. fredii* USDA191 was incubated in TY medium with (dotted bars) or without (white bars)  $H_2O_2$  (0.6mM). Peroxidase activities in the cells in late log to early stationary phase were plotted as ordinate.

$NAD^+$ ペルオキシダーゼの電子供与体であるNADHの生成力について、*R. fredii* USDA191と対照菌株 (*R. leguminosarum* bv. *trifolii* USDA2145, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2667)とを比較するため、G6PDH, 6PGDH, MDHの $NAD^+$ 依存型の酵素活性について調べた (Table)。G6PDHと6PGDHの活性は $NAD^+$ よりも $NADP^+$ を用いた場

Table Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the activity of NAD<sup>+</sup>-dependent dehydrogenase in root nodule bacteria

Strains	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.6mM)	Enzymes <sup>1)</sup>		
		G6PDH	6PGDH	MDH
(units/mgprotein)				
<i>R. l. bv. trifolii</i> USDA2145	—	0.02	0.04	0.06
	+	0.01	0.02	0.08
<i>R. l. bv. phaseoli</i> USDA2667	—	0.01	(trace)	0.12
	+	0.02	(trace)	0.19
<i>R. fredii</i> USDA191	—	N.D. <sup>2)</sup>	N.D.	0.05
	+	N.D.	N.D.	0.03

1) G6PDH: glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6PGDH: 6-phosphogluconate dehydrogenase, MDH: malate dehydrogenase

2) Not detected

合の方が高い傾向が見られたが、NAD<sup>+</sup>依存型に関しては、調べた3種類の酵素活性はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の添加の有無に関らず、いずれも*R. fredii*が最も低く、G6PDH及び6PGDHの活性は見られなかった。この結果のみから結論づけることは困難だが、*R. fredii* USDA191のNADHの生成反応系が他の菌株に比べて相対的に低い傾向にある可能性が示唆され、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の除去に関与するNAD<sup>+</sup>ペルオキシダーゼが十分に機能できない可能性が考えられるかもしれない。

根粒菌群は好気性細菌に属しているが、好気性或いは通性嫌気性の菌群において、根粒菌群は相対的にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に対して高い感受性を持っていると考えられ、特に、*R. fredii*の感受性は高いと考えられた。カタラーゼ活性値とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性との間には相関が認められることと、図表には示していないが、カタラーゼの特異的な阻害剤であるアミノトリアゾールが培地中に存在するとH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に対する感受性が著しく高まったことから、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に対する感受性はカタラーゼ活性に依存していると考えられた。しかし、*R. fredii* USDA191株の場合のように、カタラーゼに加えて、ペルオキシダーゼもH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に対する感受性に影響を与えている可能性が示唆された。更に、大腸菌の場合、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の添加によりカタラーゼ活性が増加するとともに、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に対する抵抗性を獲得することが報告されているが、これにはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によって損傷を受けたDNAの修復機能が関与していると考えられていることから<sup>25)</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性にはDNAの修復能力も含まれると考えられる。また、*Treponema pallidum*では、

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に対する感受性の原因がDNAの傷害にあることが報告されている<sup>26)</sup>。このように、細菌のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性には多くの要因が複雑に関わっていると考えられ、それらを総合的に評価することは大切であると考えられる。

微好気性細菌の中にはカタラーゼ活性が見られない菌株が報告されている。例えば、*Spirillum volutans*はカタラーゼ活性を持たないことが知られ、その生育が0.29μM程度の極微量のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で阻害されることが報告されている<sup>27)</sup>。しかし、根粒菌群をそれ以外の菌群と比較した時、根粒菌群は好気性細菌であるにも関わらずカタラーゼ活性が相対的に低く、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に対する感受性が相対的に高い傾向が見られた。現在のところその意義は不明である。今後、植物との共生の立場から検討を加えて行くことが重要であろう。

## 参 考 文 献

- 1) Gibbins, A. M., and Gregory, K. F., Relatedness among *Rhizobium* and *Agrobacterium* species determined by three methods of nucleic acid hybridization. *J. Bacteriol.*, **111**, 129-141 (1972).
- 2) Godfrey, C. A., The carotenoid pigment and deoxyribonucleic acid base ratio of a *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.*, **72**, 399-402 (1972).
- 3) 東四郎, 小林不二夫, 根粒菌の根粒形成遺伝子の構造と機能. 日本農芸化学会誌, **67**, 1065-1069

- (1993).
- 4) Bergersen, F. J., Biochemistry of symbiotic nitrogen fixation in legume. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **22**, 121-140 (1971).
  - 5) Eady, R. R., Smith, B. E., Cook, K. A., and Postgate, J. R., Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*: purification and properties of component proteins. *Biochem. J.*, **128**, 655-675 (1972).
  - 6) Puppo, A., Rigaud, J., and Job, D., Role of superoxide anion in leghemoglobin autoxidation. *Plant Sci. Lett.*, **22**, 353-360(1981).
  - 7) Puppo, A., and Halliwell, B., Generation of hydroxyl radicals by soybean nodule leghemoglobin. *Planta* **173**, 405-410 (1988).
  - 8) Reynolds, P. H. S., Boland, M. J., Blevins, D. G., Randall, D. D., and Schubert, K. R., Ureide biogenesis in leguminous plants. *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 366-368 (1982).
  - 9) Yahya, K., James, A. I., Importance of Anaerobic Superoxide Dismutase Synthesis in Facilitating Outgrowth of *Escherichia coli* upon Entry into an Aerobic Habitat. *J. Bacteriol.*, **176**, 7653-7658 (1994).
  - 10) Naclerio, G., Baccigalupi, L., Caruso, C., Felice, M. D., and Ricca, E., *Bacillus subtilis* Vegetative Catalase Is an Extracellular Enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 4471-4473 (1995).
  - 11) Hassan, H. M., Fridovich, I., Regulation of the synthesis of catalase and peroxidase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **253**, 6445-6450 (1978).
  - 12) Michael, A. C., and Gerald, H. E., Transmissible resistance to penicillin G, neomycin, and chloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **4**, 248-253 (1973).
  - 13) Beringer, J. E., R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*, **84**, 188-198 (1974).
  - 14) Clara, R. W., and Knowles, R., Superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in ammonium-grown and nitrogen-fixing *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.*, **30**, 1222-1228 (1984).
  - 15) Anonymous., Worthington Enzyme Manual. Worthington Biochemical Corporation, Freehold, N. J. pp. 43-45 (1972).
  - 16) Sagisaka, S., Injures of cold acclimatized poplar twigs resulting from enzyme inactivation and substrate depression during frozen storage at ambient temperature for a long periods. *Plant Cell Physiol.*, **26**, 1135-1145 (1985).
  - 17) Claiborne, A., and Fridovich, I., Purification of the o-dianisidine from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.*, **254**, 4245-4252 (1979).
  - 18) Clara, R. W., and Knowles, R., Superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in ammonium-grown and nitrogen-fixing *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.*, **30**, 1222-1228 (1984).
  - 19) Page, W. J., Jackson, L., and Shivprasad, S., Sodium-dependent *Azotobacter chroococcum* strains are aeroadaptive, microaerophilic, nitrogen-fixing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2123-2128(1988).
  - 20) Vassily, I. R., Ismael, H. L., and Esperanza, M. R., Carbon metabolism enzymes of *Rhizobium tropici* cultures and bacteroids. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2339-2342 (1994).
  - 21) MacKay, I. A., Glenn, A. R., and Dilworth, M. J., C4-dicarboxylate metabolism in free-living and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum* MNF3841. *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 1443-1440 (1988).
  - 22) 二木鋭雄, 活性酸素の消去 B低分子化合物 1 アスコルビン酸・グルタチオン. 蛋白質 核酸 酵素, 第33巻16号, 2973-2978 (1988).
  - 23) 寺尾純二, 活性酸素の作用 D標的分子との反応性 1 脂質. 蛋白質 核酸 酵素, 第33巻16号, 3060-3066 (1988).
  - 24) Krieg, N. R., and Hoffman, P. S., Micro-aerophily and oxygen toxicity. *Ann. Rev. Microbiol.*, **40**, 107-130 (1986).
  - 25) Carlsson, J., and Carpenter, V. S., The *recA*



gene product is more important than catalase and superoxide dismutase in protecting *Escherichia coli* against hydrogen peroxide toxicity. J. Bacteriol., **142**, 319-321 (1980).

- 26) Steiner, B. M., Wong, G. H. W., Sutrave, P., Graves, S., Oxygen toxicity in *Treponema pallidum*: deoxyribonucleic acid single-stranded breakage induced by low doses of hydrogen peroxide. Can J. Microbiol., **30**, 1467-1476 (1984).
- 27) Padgett, P. J., Cover, W. H., Krieg, N. R., The microaerophile *Spirillum volutans*: cultivation on complex liquid and solid media. Appl. Environ. Microbiol., **43**, 469-477 (1982).

### Summary

Root nodule bacteria tested (*Rhizobium* and *Bradyrhizobium*) had a higher susceptibility to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) as compared to other genus of aerobic and facultative anaerobic bacteria (*Pseudomonas*, *Escherichia*, *Proteus*, *Serratia*, *Bacillus*, and *Micrococcus*). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> susceptibility of *R. fredii* was the highest among the root nodule bacteria tested. The catalase activities had a positive mutual correlation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance among the strains tested, indicating that the lower catalase activity was mainly responsible for higher susceptibility of root nodule bacteria to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. However, peroxidase activities in *R. fredii* were considerably low as compared to other root nodule bacteria tested, suggesting that the higher susceptibility of *R. fredii* to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was caused by both lower catalase and peroxidase activities.

**Key words:** *Rhizobium*, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), catalase, peroxidase