

## 根粒菌の増殖と代謝系に及ぼす ヒドロキシリシンの影響

大和田琢二・井川 香子・佐藤 哲也

(受理：1997年11月30日)

Effects of hydroxylysine on the growth and metabolism of  
*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*.

Takuji OHWADA, Keiko IGAWA,  
and Tetsuya SATO

### 摘 要

根粒菌 *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* の増殖はヒドロキシリシン (Hyl) によって強く抑制され、 $100\mu\text{M}$  で50%の抑制効果が見られた。この効果は細菌の増殖層によらなかった。またこの時、2次元蛋白質電気泳動の結果から、細胞内の蛋白質合成の多くが抑制されたが、新たに合成される蛋白質も見られた。酵素蛋白質の活性染色パターン解析並びにその活性測定の結果から、Hyl によって、窒素固定の反応過程に重要なグルタミン酸の生合成に関連した酵素系の活性が高まったことから、Hyl が根粒菌のフリーリビング細胞から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。

キーワード : *Rhizobium*, バクテロイド, ヒドロキシリシン (Hyl), グルタミン酸, 窒素固定

### 緒 言

根粒菌は Rhizobiaceae 科に属し、マメ科植物の根に侵入して根粒を形成する好気性グラム陰性細菌である。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) 2)</sup>。根粒菌は一般に比較的高い宿主特異性を有しており、前者には、*Rhizobium leguminosarum* (宿主：エンドウ、クローバー、インゲン)、*R. meliloti* (宿主：アルファルファ)、*R. fredii* (宿主：ダイズ)、後者には、*Bradyrhizobium*

*japonicum* (宿主：ダイズ) などが知られている。根粒菌のもう一つの特徴は、根粒中で共生型バクテロイドになって、顕著な窒素固定活性を発現することである。この時、根粒菌の細胞 (フリーリビング細胞) 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、増殖機能を喪失すると考えられていた。しかし、培地を適度に希釈するとバクテロイドの増殖が再開されたことから<sup>3)</sup>、バクテロイドは増殖機能を喪失するのではなく増殖を抑制する化合物の存在が示唆され、スベルミジン等のポリアミンにその効果が認められた<sup>4)</sup>。

著者らは、根粒菌（フリーリビング）が宿主植物に感染し、バクテロイドと呼ばれる一つの器官へと分化する過程で細胞が増殖を停止することに興味を持ち、根粒あるいは宿主の幼根中に含まれる成分と菌の増殖との関係を調べた。その結果、ヒドロキシリシン(Hyl)にフリーリビング細胞とバクテロイドの両方に強い増殖抑制効果が見られた。増殖の抑制効果はグラム陰性菌、中でも *Rhizobium* 属に対して強く作用し、*Bradyrhizobium* 属やグラム陽性菌に対しては相対的に弱かった<sup>6)</sup>。また、増殖の抑制に伴って細胞の肥大化が生じ、バクテロイド様の細胞が見られた。Hyl は、リシンの炭素の 5 位がヒドロキシ化されたリシン誘導体で、ゼラチン、コラーゲン、細菌細胞壁等に存在していると考えられているが、根粒や宿主の幼根中には遊離型の Hyl が 1 g あたり 0.5  $\mu\text{mol}$  前後含まれていることが明らかになり、Hyl は根粒や幼根中で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。

本報では、Hyl 存在下におけるフリーリビング細胞内の蛋白質について、2次元蛋白質電気泳動法を用いて調べるとともに、酵素蛋白質の活性染色パターン解析並びにその活性測定を行った。その結果、Hyl によって、バクテロイドの窒素固定の反応過程に重要なグルタミン酸の生合成に関連した酵素系の活性の高揚が認められたので報告する。

## 実験方法

### 1. 菌株及び培地

菌株には Dr. Van Berkum (Agricultural Research Service, USDA, Beltsville, MD) から供与された *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676 を使用した。菌株保存培地には YEM 寒天培地 (5.0 g マンニトール, 0.5 g リン酸二カリウム, 0.3 g 炭酸カルシウム, 0.2 g 硫酸マグネシウム七水和物, 0.1 g 塩化ナトリウム, 0.6 g 酵母エキス, 15.0 g 寒天/L(蒸留水) pH6.8)、培養用培地には最少培地 (10 g マンニトール, 0.01 g 硫酸鉄七水和物, 0.15 g 塩化カルシウム二水和物, 0.1 g 硫酸マグネシウム七水和物, 0.6 g 硝酸ナトリウム, 0.3 g リン酸一カリウム, 0.6 g リン酸二カリウム, 0.5 mg ビオチン, 0.1 mg チアミン塩酸塩/L(蒸留水) pH6.8) をそれぞれ用い

た。根粒菌（フリーリビング細胞）は 30°C で震盪培養 (100 ストローク/分) し、660nm の菌液の濁度の変化から増殖を測定した。

### 2. 無細胞抽出液の調製と蛋白質の定量<sup>7,8)</sup>

根粒菌を 5ml の最少培地で前培養した後、あらかじめ 200ml の最少培地を入れた 500ml 容の三角フラスコに移して 30°C, 150rpm で旋回培養した。菌を 4°C, 10 分間, 10,000rpm で遠心分離する操作により集菌し、緩衝液 (50mM リン酸一カリウム一水酸化ナトリウム, 0.15M 塩化ナトリウム, pH7.6、あるいは、PBS : 3.03 g リン酸二ナトリウム 12 水和物, 0.7 g リン酸一カリウム, 6.8 g 塩化ナトリウム, pH7.0) に懸濁し、4°C, 10 分間, 16,000rpm で遠心する操作で試料を 2 回洗浄した。菌を同じ組成の緩衝液 1ml に再懸濁した後、超音波処理 (200W, 2 分間  $\times$  8 回) で菌を破碎し、4°C, 1 時間, 19,000rpm で遠心した上澄み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 の吸光値で測定した。標準曲線は牛血清アルブミン (BSA) を用いた。

### 3. 酵素活性測定

A) NADP 依存型グルコース-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>9)</sup> を部分的に改変して行った。反応混合液 [蒸留水 1.74ml, 1M トリス緩衝液 (pH8.5) 0.15ml, 0.05mM 塩化マグネシウム 0.6ml, 10mM NADP 0.06ml, 50mM G6P (or 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 の試料を入れて活性測定を開始した。活性は 340nm の吸光値の変化から測定した。

B) NAD 依存型 G6PDH 及び 6PGDH : Vassily らの方法<sup>9)</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 0.6ml, 10mM NAD 0.06ml, 50mM G6P (or 6PG) 0.3ml] を用いた。活性は A と同様に測定した。

C) イソクエン酸脱水素酵素 (ICDH) : Saroso らの方法<sup>9,10)</sup> に従って測定した。反応混合液 [蒸留水 1.55ml, 0.35M HEPES (pH7.8) 0.5ml, 0.1M 硫酸マンガン 0.05ml, 0.1M 硫酸マグネシウム 0.05ml, 10mM NADP 0.1ml, 0.1M イソクエン酸三ナトリウム 0.5ml] を用いた。活性は A と同様に測定した。

D) NAD 依存型リンゴ酸脱水素酵素 (MDH) : Mackay らの方法<sup>11)</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(pH8.5)0.12 ml, 0.5mM 塩化カリウム0.05ml, 0.05mM 塩化マンガ ン0.01ml, 10mM NAD 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, 6,000g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。

E) ED 酵素 (6-ホスホグルコン酸ヒドラーゼ, ホスホ-2-ケト-3-デオキシグルコン酸アルドラーゼ) : Lessie らの方法<sup>12)</sup>を部分的に改変して行った。反応混合液 [蒸留水0.25ml, 1M トリス緩衝液 (pH8.5)0.1ml, 0.1Mメルカプトエタノール0.05ml, 50mM 6PG 0.05ml] 及び試料0.05mlを用いた。活性はDと同様に測定した。

F) NADPH 依存型グルタミン酸シンターゼ (GS) : Marcia と Ethan の方法<sup>13)</sup>を部分的に改変して行った。反応混合液 [蒸留水1.6ml, 1M トリス緩衝液 (pH8.5) 0.15ml, 10mM NADPH 6 ml, 0.5mM 塩化マグネシウム0.6ml, 50mM 2-ケトグルタル酸 0.3ml] 及び0.05mlの試料を混合し, 3分間温度平衡後, 0.15mlの50mM L-グルタミンを加えて反応を測定した。活性は340nmの吸光値から測定した。

G) NADPH 依存型グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) : Marcia と Ethan の方法<sup>13)</sup>を部分的に改変して行った。反応混合液 [蒸留水1.24ml, 1M リンゴ酸緩衝液 (pH7.6) 0.3ml, 0.5mM 塩化マグネシウム0.6ml, 50mM 2-ケトグルタル酸0.3ml] 及び0.05mlの試料を混合し, 3分間温度平衡後, 0.5mlの0.3M 塩化アンモニウムを加えた。活性は340nmの吸光値から測定した。

#### 4. ザイモグラム

A) Davis らの方法<sup>14)</sup>に従い, 7.5%ゲルを用いて行った。分離ゲル [30.8% Duraacryl 5.07ml, 1.5M トリス緩衝液 (pH8.9)4.94ml, 蒸留水9.68ml, 2% TEMED (N, N, N', N'-テトラメチレンジアミン)0.35 ml, 10% APS (過硫酸アンモニウム)0.036ml], 濃縮ゲル [蒸留水2.5ml, 30%アクリルアミド及びN,Nメチレンビスアクリルアミド0.75ml, 2% TEMED

0.25ml, 1.4% APS 0.25ml, 1.5M トリス緩衝液 (pH6.8)1.25ml]を用いた。泳動用緩衝液にトリス-グリシン緩衝液 (pH8.3)を用いて, ラビダス・ミニスラブゲル電気泳動装置 (アトー社, AE-6450)で, スラブゲル1枚につき9mA でおよそ2時間電気泳動した。試料の蛋白質含量は1 コームあたり50mgに調製した。

B) 酵素活性染色<sup>15)</sup>: 泳動が終了したゲルを以下の染色液に入れ, 30°C, 2~4時間, 暗所でインキュベートした後, 1.5%酢酸で反応を停止した。

a) G6PDH: 0.1M トリス緩衝液 (pH7.5)100ml, 1M 塩化マグネシウム 1 ml, G6P 40mg, NAD (NADP) 15mg, NBT (ニトロブルーテトラゾリウム) 20mg, PMS (フェナジンメソ硫酸) 4mg.

b) GDH: 0.1M トリス緩衝液 (pH7.5) 100ml, グルタミン酸ナトリウム0.8g, NAD 30mg, NBT 20mg, PMS 4 mg, 10mM 塩化カルシウム0.2ml.

c) MDH: 0.1M トリス緩衝液 (pH7.5) 100ml, 1M DL-リンゴ酸 3 ml, NAD 30mg, NBT 20mg, PMS 4 mg.

#### 5. 2次元電気泳動及び蛋白質の染色

Patrick の方法<sup>16)</sup>に従って測定した。

a) 1次元目の泳動 (等電点電気泳動) には, レクタンゲル1枚に対して, 0.004%リボフラビン750 $\mu$ l, 100ml蒸留水中に30gアクリルアミド, 1.5gビスを溶解した溶液 (#315)800ml, 40%アンフォライン (pI: 3~10)300ml, 蒸留水 4 ml, 2% TEMED 169ml, 10% APS 6 mlでゲルを調製し, 約5時間光重合により固化させて作成した。試料の蛋白質含量は1 コームあたり50mgに調製し, 4°C, 200V で2時間電気泳動後, 更に400V で1時間電気泳動した。泳動後のゲルは平衡化溶液 [グリセロール3ml, 10% SDS 6.9ml, メルカプトエタノール1.5ml, 62.5mM トリス緩衝液 (pH 6.8) 18.6ml] 中で約30分間震盪した。ゲルを2次元電気泳動用分離ゲルの陰極側に1%アガロースで固定した後, 次の2次元電気泳動を行った。

b) 2次元目の泳動には, 分離ゲル [30.8% Duraacryl 7.82ml, 1.5M トリス緩衝液 (pH8.9) 4.94ml, 蒸留水6.73ml, 2% TEMED 0.35ml, 10% APS 0.036ml, 10% SDS 0.2ml], 濃縮ゲル [蒸留水2.5 ml, 30%アクリルアミド及びN,Nメチレンビスアクリルアミド0.75ml, 2% TEMED 0.25ml, 10% APS 0.035ml, 1.5M トリス緩衝液 (pH6.8) 1.25ml, 10

% SDS 0.05ml] を用いた。試料は試料溶液 [0.5M トリス緩衝液 (pH6.8)12ml, 10% SDS 20ml, グリセロール10ml, メルカプトエタノール 5 ml を蒸留水で100mlに調製した溶液] と1:1に混合し, 100°C, 5分間煮沸した。ラビダス・ミニスラブゲル電気泳動装置で, スラブゲル一枚につき15mA, 4°Cでおよそ2時間電気泳動した。試料の蛋白質含量は1コームあたり50mgに調製した。尚, 分子量マーカーに Electro-Phoresis Calibration KIT (Pharmacia Co.)を用いた。

c) 染色: 泳動が終了した蛋白質は2D-Silver Stain II Daiichi (Daiichi Pure Chemicals Co.)を用いてプロトコールに従って, 銀染色法により染色した。

## 実験結果及び考察

### 1. Hyl の増殖抑制効果

ヒドロキシリシン (Hyl) を終濃度0.1mM 或いは1 mM 含んだ最少培地における *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* の増殖を Fig. 1A に示した。Hyl を含まない条件では, およそ70時間程度

で対数期後期から定常期初期に移行するが, 0.1mM の Hyl が存在すると, 誘導期がおよそ20時間生じた後, 増殖が回復した。1mM では増殖が強く抑制され, 測定した少なくとも70時間は増殖が回復しなかった。但し, 培養開始後70時間以降は増殖が緩やかに回復したことから, 生菌数に与える影響は少ないと考えられた。根粒及び植物根には遊離型の Hyl が試料1g あたり0.5 $\mu$ mol 前後含まれており, これは遊離アミノ酸 (アミノ化合物) 総量のおよそ5%に相当する。従って, 植物組織内において, 根粒菌の増殖が Hyl によって抑制されている可能性が十分に考えられた。また, 根粒菌の増殖は, 細胞の増殖層によらず Hyl の添加後すみやかに抑制され, その効果は測定した間持続していた (Fig. 1B)。

図表には示していないが, たとえば, アミノ酸の1種, メチオニンのアナログであるエチオニンを培地に添加した場合は, 増殖速度は低下するが, Hyl で見られたような急激な増殖の停止は見られなかった。従って, エチオニンの場合のように, Hyl がリシンのアナログとして蛋白質中に取り込まれ, 増殖が維持できなくなる可能性は小さいと考えられた。また,

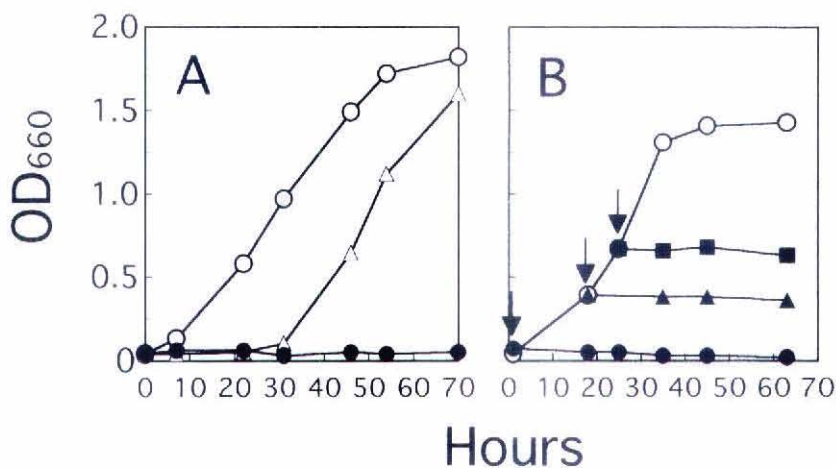


Figure 1. Effects of hydroxylysine (Hyl) on the growth of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676.

A) Forty eight hour old cultures (0.1 ml) were transferred to 5 ml of minimal medium containing Hyl (○, control; △, 0.1 mM; ●, 1 mM) at zero time and incubated at 30°C aerobically. B) Forty eight hour old cultures (0.1 ml) were transferred to 5 ml of minimal medium at zero time and Hyl (1 mM) was added at the point indicated by the arrows. ○, control; ●, zero time; ▲, 18 h, ■, 25 h.

リシン (D型, DL型) やメチルリシンでは増殖に影響を与えなかったことから, Hyl のヒドロキシル基が増殖抑制機構に関与している可能性が高いと考えられた。更に, RI でラベルしたチミン, ウラシル, 及びロイシンの培養細胞の DNA, RNA, 蛋白質中への取り込み実験の結果から, RNA と蛋白質合成が Hyl 添加後数分内に無添加の場合の30%程度にまで急激に抑制され, Hyl による増殖抑制メカニズムの1つである可能性が示唆されている。

## 2. 細胞内蛋白質の Hyl による影響

Figure 2 に, 対数増殖期中期の培地に Hyl (1mM) を添加した後の細胞内蛋白質の2次元電気泳動の結果を無添加の場合と比較した。その結果, Hyl 添加後に消失する蛋白質スポットと, 逆に新たに出現するスポットが見られた。蛋白質の分離が不十分な領域 (pI: 5~7) があるため, それらの数に関する正確な同定はできないが, 矢印で示されているように, 少なくとも消失するスポット (白抜き矢印) が6, 出現するスポット (黒矢印) が1つ確認された。これらの結果から, Hyl によって蛋白質合成が急激に減退する反面, 新たに合成される蛋白質の存在が明らかになり, Hyl によって細胞内の代謝系が大きな影響を受けていることが推察された。

## 3. ザイモグラム解析

細胞内の代表的な脱水素酵素系のうち3種類について, そのアイソザイムパターンを調べた。その結果, 全ての酵素で Hyl によるアイソザイムのバンドパターンに顕著な変化が見られた (Fig. 3)。グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) とリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) については, Hyl によって活性が増加するアイソザイムも見られたが (Fig. 3C), その他は減少していた (Fig. 3B, C, D)。一方, グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) では, 活性の高まった4種類のアイソザイムが確認された。これらの結果から, Hyl によって酵素のアイソザイムパターンが大きく変化するとともに, 活性の増加する酵素系と減少する酵素系の存在が示唆された。

## 4. 脱水素酵素及び関連酵素の活性

Table に, 脱水素酵素系を中心に, 関連する酵素系の Hyl 添加後の活性を無添加の場合と比較した。その結果, NAD 依存型の 6PGDH (6-ホスホグルコン酸脱水素酵素) 以外には全て有意な変化が見られ

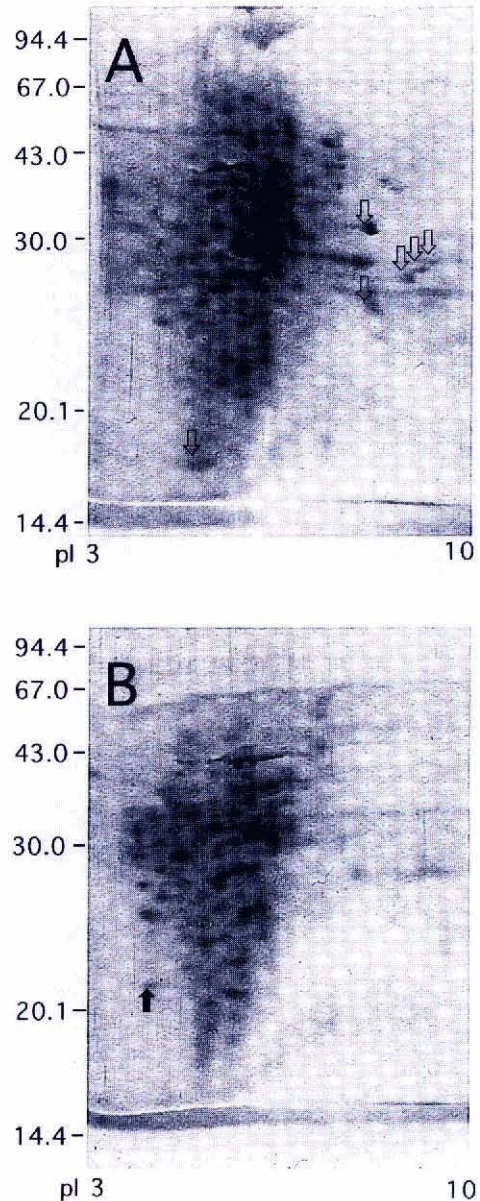


Figure 2. Two dimensional electrophoresis pattern of the cell-free extracts from *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676.

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

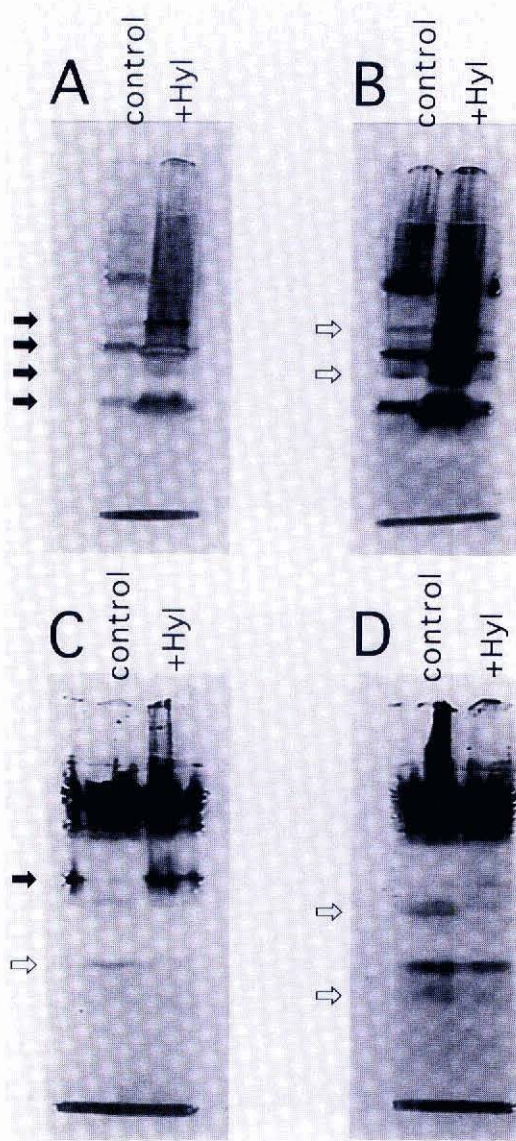


Figure 3. Enzyme activity staining of cell-free extracts from *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2676.

Cell-free extracts were prepared and applied on gel as described in Fig. 2. The enzyme activities of (A) glutamate dehydrogenase (GDH), (B) malate dehydrogenase (MDH), (C) glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH: NAD型), and (D) G6PDH (NADP型) were stained as described in Materials and Methods.

た。すなわち、G6PDH (NADP 及び NAD 依存型)、6PGDH (NADP 依存型)、ICDH (イソクエン酸脱水素酵素)、ED (6-ホスホグルコン酸ヒドラターゼ、ホスホ-2-ケト-3-デオキシグルコン酸アルドラーゼ)、MDH については、Hyl 添加後に酵素活性の減少が見られ、それぞれコントロールの61%、33%、27%、49%、85%、83%に減少した。一方、GDH と GS (グルタミンシンターゼ) の活性は逆に増加しており、それぞれコントロールの187%、208%を示した (Table)。GDH は生体内ではグルタミン酸合成に偏っていると考えられているので、Hyl によって、細胞内のグルタミン酸合成系が活性化されている可能性が示唆された。

一般に、根粒菌による窒素固定は、ニトロゲナーゼによって固定されたアンモニアがグルタミンとして取り込まれ、さらに、アスパラギンやウレイドの形となって宿主植物に転流されると考えられている<sup>17)</sup>。この時、アンモニアの同化過程の主要な酵素として、グルタミンシンターゼとグルタミンシンターゼが考えられており、これらの濃度がバクテロイド中では低いが、宿主細胞中では高いことなどから、アンモニアの同化は宿主細胞で行われている可能性が報告されている<sup>18)</sup>。しかし、バクテロイドはフリーリビング細胞とは異なり、低分子が透過しやすい非常に弱い細胞膜で覆われているため<sup>19)</sup>、バクテロイドを宿主細胞の組織成分と分離し、調製する際に用いられる密度こう配遠心法のような過程で<sup>20)</sup>、細胞内の酵素含量は少なからぬ影響を受けることが十分に予測される。従って、生体内でのこれら酵素レベルについては慎重な検討を要すると考えられる。

私たちの以前の研究で、Hyl 存在下では、根粒菌のフリーリビング細胞の形態がバクテロイド様に肥大するとともに、バクテロイドのマーカ化合物の一つであるポリヒドロキシ酪酸の細胞内含量が顕著に増加することが明らかになっている。今、Hyl がフリーリビング細胞からバクテロイドへの分化に関与していると仮定したとき、グルタミン酸の供給が確保されることは、窒素固定過程において非常に有利であると考えられる。窒素固定過程に重要なグルタミン酸合成系酵素の活性が Hyl によって高まったことは、根粒菌細胞が宿主植物に感染し、根粒を形成する過程で、Hyl が根粒菌細胞の増殖を抑制する

Table Effects of Hyl on enzyme activities in the cell free extracts from *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*

Strain	Hyl	Enzymes								
		GDH	GS	MDH	G6PDH		6PGDH		IDH	ED
					NADP <sup>+</sup>	NAD <sup>+</sup>	NADP <sup>+</sup>	NAD <sup>+</sup>		
(units/mg protein)										
<i>R. l.</i> bv.	—	0.31	0.25	2.83	0.31	0.12	0.14	0.06	0.49	2.91
<i>phaseoli</i>	+	0.58	0.52	2.35	0.19	0.04	0.04	0.06	0.24	2.48

Abbreviations used; Hyl: hydroxylysine, GDH: glutamate dehydrogenase, GS: glutamate synthase, MDH: malate dehydrogenase, G6PDH: glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6PGDH: 6-phosphogluconate dehydrogenase, IDH: isocitrate dehydrogenase, ED: Entner-Doudoroff pathway enzyme, NADP: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NAD: nicotinamide adenine dinucleotide.

とともに、バクテロイドへの形態変化に関する可能性を示唆しているように思われる。

### 参考文献

- 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).
- Godfrey, C. A., The carotenoid pigment and deoxyribonucleic acid base ratio of a *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.*, **72**, 399-402 (1972).
- Graham, P. H., Antigenic affinities of the root nodule bacteria of legumes. *J. Microbiol. Serol.*, **29**, 281-291 (1963).
- Ozawa, T., and Tsuji, T., Inhibition of *Bradyrhizobium* bacteroid cell growth on yeast extract-mannitol agar plates. *Jap. J. Soil Sci. Plant Nutr.*, **62**, 539-541 (1991).
- Ozawa, T., and Tsuji, T., A possible role for polyamines in the repression of growth of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids in soybean nodules. *Plant Cell Physiol.*, **34**, 899-904 (1993).
- Ohwada, T., Igawa, K., Sato, T., and Mikami, M., Inhibition of the growth of *Rhizobium* bacteria by hydroxylysine. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1355-1356 (1994).
- 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).
- Glenn, A. R., McKay, I. A., Arwas, R., and Dilworth, M. J., Sugar metabolism and the symbiotic properties of carbohydrate mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 239-245 (1984).
- Saroso, S., Glenn, A. R., and Dilworth, M. J., Carbon utilization by free-living and bacteroid forms of cowpea *Rhizobium* strain NGR234. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 1809-1814 (1984).
- Saroso, S., Dilworth, M. J., and Glenn, A. R., The use of activities of carbon enzymes as a probe for the carbon nutrition of snakebean nodule bacteroids. *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 243-249 (1986).
- 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).
- Lessie, T. G., and Whiteley, H. R., Properties of threonine deaminase from a bacterium able to use threonine as sole source of carbon. *J. Bacteriol.*, **100**, 878-889 (1969).
- Marcia, S. O., and Ethan, R. S., Ammonium assimilation in *Rhizobium meliloti*. *J.*

- Bacteriol.*, **143**, 1234-1240 (1980).
- 14) Davis, B. J., Disk electrophoresis-II methods and application to human serum protein. *NY. Acad. Sci.*, **121**, 404-427 (1964).
  - 15) Tanksley, S. D., and Orton, T. J., Isozymes in plant genetics and breeding, part A. Elsevier Science Publishers B. V., 481-489 (1983).
  - 16) Patrick, H. O., High resolution two dimensional electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021 (1975).
  - 17) Atkins, C. A., Metabolism and translocation of fixed nitrogen in the nodulated legume. *Plant and Soil*, **100**, 157-169 (1987).
  - 18) Brown, C. M., and Dilworth, M. J., Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacteroids. *J. Gen. Microbiol.*, **86**, 39-48 (1975).
  - 19) Sutton, W. D., and Patterson, A. D., The detergent sensitivity of *Rhizobium* bacteroids and bacteria. *Plant Sci. Lett.*, **16**, 377-385 (1979).
  - 20) Reibach, P. H., Mask, P. L., and Streeter, J. G., A rapid one-step method for the isolation of bacteroids from root nodules of soybean plants, utilizing self-generating Percoll gradients. *Can. J. Microbiol.*, **27**, 491-495 (1981).

living cells to bacteroids.

**Key words:** *Rhizobium*, bacteroid, hydroxylysine, glutamic acid, nitrogen fixation

### Summary

The high susceptibility to hydroxylysine (Hyl) was found in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* cells and the growth of the cells were repressed to 50% of the control in the presence of 100 $\mu$ M Hyl. The results of 2-dimensional electrophoresis of cell-free extracts showed that many protein spots disappeared after the addition of Hyl, although new spots appeared simultaneously. The activities of the enzymes concerning glutamate synthesis, which are important for the process of nitrogen fixation, were enhanced by the addition of Hyl, suggesting the possibility that Hyl plays a role in a dynamic change from free-

*Res. Bull. Obihiro Univ.*, **20** ( 1998 ) : 237~244