豆科植物根瘤のラクトフラビン

辻 村 克 良 (東京大學農學部農藝化學科)

昭和 25 年 2 月 25 日 受理

Lactoflavin in the Root-Nodules of Leguminous Plants.

By Katura TUZIMURA (Dep. of Agric. Chem., Fac. of Agric., Univ. of Tokyo)

筆者は豆科植物根瘤のヘミン蛋白(根瘤ヘモグロビン)の研究中、それが根瘤の呼吸機構の一部であることを想像して、根瘤の呼吸を CO で阻害する実験を試みた所、豫期に反して阻害の程度が著しくない事實に出合った。そこで根瘤ヘモグロビンを通らない呼吸経路を考へねばならなくなった。他方根瘤の浸出液が緑色螢光を呈することを認めたので、ラクトフラビン或は黄色呼吸酵素が存在して、直接分子狀酸素と反應して呼吸促進をするのではないかと想像し、その定量を試みた。

主として大豆根瘤を材料とした。そのラクトフラビン含量は生體 100g 中平均 3.6mg (乾物 100g 中 14.6 mg) あり、葉の 6 倍、根の 20 倍であつた。この含量は動植物組織の中でも極めて多いものに屬する。即ちラクトフラビンに富む組織の例をあげれば、生體 100g 中牛肝臓 1~3mg、牛腎臓 1.6mg、等の値が知られており、綠葉ではミツバ葉 0.35 mg、ホウレンソウ葉肉 0.55mg である¹⁾。

根瘤のラクトフラビンの大部分は遊離型であつて、蛋白又は磷酸と結合したものではなかつた。

なほ根瘤中の螢光物質がラクトフラビンであるという identification は特に行われなかつたが、原理を異にするラクトフラビン螢光法とルミフラビン螢光法の測定値がよく一致するから間違いないものと思う。

ラクトフラビンの定量法

ラクトフラビンの定量は藤田秋治氏の方法^{1,2)}に従い主としてラクトフラビン螢光法により、又ルミフラビン螢光法を併用した。

ラクトフラビン螢光法：試料の 0.25N H₂SO₄ による浸出、酸性白土によるラクトフラビンの吸着並びにそのピリジン醋酸混合液による溶出及び標準ラクトフラビンとの紫外線照射による螢光比較よりなり、豫め既知量のラクトフラビンを加えた添加実験を平行して行い、それによつて回収率を求めて補正を行うのである。添加されたラクトフラビンの回収率は 60~80% ということであるが、筆者の場合には 40~50% であつた。酸性白土の性質によるものと思われる。酸性白土は市販の品を磁製皿で 1 時間灼熱し、除湿器中に貯藏したものを用いた。標準ラクトフラビンとしては、ワカモト會社製純結晶(融點 282°) を 4 mg % に溶かしたものを原液とし、褐色瓶に入れて冷蔵庫に貯え、1~2 週間毎に之を薄めて 50% の標準液を作つた。

植物組織の浸出の際タカジアスターゼで處理することは根瘤では効果が認められなかつたから、この操作を省いた。根瘤のラクトフラビンの大部分が遊離型で汁液に存在するのであるから當然である。但し菌體、葉及び根の場合にはタカジアスターゼ處理を行つた。この場合には試料に水を加えて 80° に 15 分間熱し、硫酸を加えて pH 4.5 となし、0.6% になるやうにタカジアスターゼを加えて 45° で 1 時間作用せしめ、硫酸を加えて 0.25 N ならしめ、80° に 5 分間加熱して酵素を破壊し、遠心分離して上澄液を取つた。タカジアスターゼは豫め 6 % に溶し pH 4.5 で酸性白土で處理してラクトフラビンが存在するならば除かれるようにした。

ルミフラビン螢光法：試料の 0.25 N 硫酸による浸出、アルカリ性で光分解、酸性でクロロフォルムによるルミフラビンの抽出及び標準ルミフラビンとの螢光比較よりなり、既知量のラクトフラビンの添加実験を行うことはラクトフラビン螢光法と同じである。この方法はラクトフラビンの回収率は高いが(90% 以上)、操作はやりにくい。乾燥根瘤の場合は 0.25 N 硫酸浸出液に直ちにこの方法を適用したが、生根瘤の場合には粘質物の爲にクロロフォルムを加えた際にエマルジョンとなり、2 層に分かれ難いので、ラクトフラビン螢光法の如く酸性白土でラクトフラビンを吸着せしめ、ピリジン醋酸混合液で溶出したものに就て光分解を行つた。この場合には勿論添加したラクトフラビンの回収率は小くなつたが光分解、クロロフォルム抽出の操作による損失は少かつた。

實驗結果

1) 根瘤の全ラクトフラビン：畑から掘取つた根から根瘤を取り、よく水洗した後、新鮮物を用いた場合に

は、根瘤 2g を乳針で磨碎し、0.25 N 硫酸を加えて 100cc に満し、80° 15 に分間加熱し、振盪浸出した後遠心分離して上澄液をラクトフラビン定量に供した。

Table 1. Total Lactoflavin Content

Samples	Moisture content (%)	Lactoflavin (mg)		Method of determination	Reference
		in 100g fresh substance	in 100g dry matter		
Soybean nodules a	69.6	3.36	11.1	Lumiflavin-fluorescence method	"Kimusume"; from plants in bloom
" b ₁	67.0	4.50	13.6	Lactoflavin-fluorescence method	"Tya-Kotubu"; from plants in bloom
" b ₂	72.0	3.96	14.1	"	"
" d ₁	—	2.56	—	"	"Tya-Kotubu"; from young plants
" d ₂	79.7	3.71	18.3	"	"
" "	"	3.22	15.9	Lumiflavin-fluorescence method	"
Peanut nodules	—	—	9.6	Lactoflavin-fluorescence method	from plants in bloom
Wild vetch nodules	—	—	6.3	"	from young plants
Pea nodules	—	—	6.7	"	
Soybean leaves	—	—	2.4	"	"Kimusume"; from plants in bloom
Soybean root	—	—	0.75	"	"

別に新鮮物中の水分を定量して、それにより乾物中のラクトフラビンを計算した。乾燥試料を用いた場合は、根瘤を 80° で乾燥し、乳鉢で粉碎して、除湿器中に貯えた。風乾状態の根瘤には夏は黴が生えるから、乾燥しておかねばならない。葉及び根は風乾試料を用いた。

第 1 表に示されるように、根瘤の全ラクトフラビン含量は大豆では平均して生體量中 3.6mg %, 乾物中 14.6 mg % であつた。これに反して根にはごく僅少のラクトフラビンが存在したにすぎない。葉はラクトフラビンに富む組織であるが、根瘤に較べれば 1/6 にすぎなかつた。ラクトフラビン螢光法とルミフラビン螢光法の値はよく一致し、定量された物質がラクトフラビンに相違ないことを示している。

大豆以外の根瘤殊に豌豆及び鳥野豌豆（ザートウィッケンの野生品種）のラクトフラビン含量は大豆より少い値がえられた。實驗例がまだ少いが、大豆と豌豆、ヴェッチの類とは根瘤の性状が異なるので、ラクトフラビン含量の異なることもありうることである。

2) 根瘤内に於けるラクトフラビンの分布 大豆の生の根瘤に水を加えて乳鉢で磨碎し、布で搾り、濾液を遠心分離すると搾粕、沈澱、及び搾汁の 3 つに分れる。搾粕は根瘤の細胞壁であり、沈澱は殆ど細菌である。搾汁は根瘤細胞の原形質及び細胞液の溶液であつて、その固形物の 10% 内外は灰分である。三者の割合は植物の種類、根瘤の若さ等によつて異なるが、2, 3 の例をあげると、次の如くである。

Table 2. Percentage Distribution of Dry Matter of Nodules

	Soybean I	Soybean II	Soybean III	Wild vetch I	Wild vetch II
Pressed cake	23.4%	27.6%	35.4%	28%	24.9%
Bacteria	42.0	43.9	33.2	18	15.3
Pressed juice	34.6	28.5	31.4	54	59.7

大豆の新鮮な根瘤 6.71g にリンゲル氏液を加えて、上記の如くして搾粕、菌體及び搾汁に分けた。搾粕は繊維ばかりであるから棄て、98cc えられた搾汁は 100cc に充してラクトフラビンの定量に供し、菌體にはリンゲ

ル氏液約 60cc 加えて 15 分間振盪して遠心分離し、沈澱にリンゲル氏液を加えて 100cc に充し、ラクトフラビン定量に供した。結果は根瘤乾物 100g 當りにして、右の如くであつた。

ラクトフラビンの大部分は搾汁部分に現われ、菌體には少かつた。

菌體のリンゲル氏液による洗滌を繰返すと、ラクトフラビンは更に浸出せられた。

このように菌體のラクトフラビンは菌が生きていても、リンゲル氏液又は水で容易に浸出されることが解つたから、根瘤を磨碎して 3 部分に分けるに當つて、できるだけ少量の水を加え手早く操作して、菌體のラクトフラビンが溶けて出るのが少いように試みた。即ち大豆の新鮮根瘤 8.96g に水約 45cc 加えて前記のようにして 3 部分に分けた。前の定量より

Table 3. Distribution of Lactoflavin in the Soybean Nodules

	Lactoflavin per dry matter (mg %)	Percent distribution of dry matter (%)	Lactoflavin per the total dry matter of nodules (mg %)	Percent distribution of lactoflavin (%)
Bacteria	4.86	42.0	2.04	16.7
Pressed juice	29.5	34.6	10.2	83.3
Pressed cake	—	23.4	—	—
Total	—	100	12.24	100

このように全ラクトフラビ

ンの 16.7% が菌體に、83.3% が搾汁に見出された。但し操作中に相當量のラクトフラビンが菌體から浸出されるのを防げなかつたと考えなければならないから、この値には大きな意味はない。生きた根瘤中では菌體内に分布するラクトフラビンの割合はもつと多いのであろう。上記の菌體のラクトフラビンは溶け出しやすく、もう一度水を加えて振盪浸出すると、菌體乾物に對して 4.85 mg から 2.04 mg % に減少した。

之を要するに根瘤内にあつては、ラクトフラビンは菌體にも宿主細胞にも（恐らく原形質と液腔の兩方に）分布し、菌體の内外に自由に擴散しうるものと思われる。

なお菌體のラクトフラビンを定量する際には、タカヂアスターゼ處理が有效であつて、タカヂアスターゼを用いない場合には 35~40% 少い値しかえられなかつた。根瘤ではタカヂアスターゼ使用の有無に拘らず、同じ値がえられた。

Table 4. Effect of Taka-diestase Treatment on Lactoflavin Determination

3) 根瘤のラクトフラビンの形態：

生體内のラクトフラビンは遊離型、磷酸エステル型及び蛋白結合型の 3 種に區別される。これを分別定量するには、蛋白結合型は半透膜で透析されないことにより他の型から區別され、遊離型と磷酸エステル型とは、前者は水溶液からベンゼールアルコールによつて抽出されるが、後者は殆ど抽出されないことによつて區別される。

Treatment	Determined lactoflavin (mg % in dry matter)		
	Bacteria		Nodules
	before washing with water	after washing with water	
Treated with Taka-diestase	4.85	2.04	14.1
Not treated	3.37	1.21	14.3
Rate (%)	69.5	59.3	101.3

前記 2) の實驗に用いた搾汁 40cc (100cc 中ラクトフラビン 443γ) をとり、魚の浮囊に入れ、1.5 l の蒸溜水中に釣して、冷蔵庫に入れておき、48 時間後に取出して、内液と外液のラクトフラビンを定量した。搾汁のラクトフラビンの 78.0% が外液に移り、19.4% が内液に残つていて、損失は 2.6% であつた。即ちラクトフラビンの損失なしに透析しうる事が明かであつたから、次に別の試料を用いて搾汁を作り (100cc 中ラクトフラビン 196 γ を含む)、その 45cc 取つて、浮囊に入れ、水道水を掛流して 24 時間透析した。透析されずに残つたラクトフラビンは極めて少く定量不可能であつた。即ち大豆根瘤搾汁には蛋白質と結合したラクトフラビンが無いことが明かである。

若い内部が鮮紅色の大豆根瘤(品種茶小粒、遅播したもの)をとり、80° の水中に投じて酵素作用を防ぎ、磨碎

して搾汁を作った。その 100cc 中にラクトフラビン 130 γ を含んでいた。この 20 cc を取り、ベンゼールアルコールで数回抽出した。ラクトフラビンは悉く抽出せられ、残留するものは検出できなかった。又同じ試料をラクトフラビン螢光法のように處理して、ビリヂン醋酸水誘出液を作り (1cc 中ラクトフラビン 0.805 γ を含む) これをベンゼールアルコールで数回抽出した。完全に抽出された。よつて大豆根瘤搾汁にはラクトフラビン磷酸エステルも存在しないことが明かである。

考 察 及 び 要 約

以上を總括すれば、

- (1) 根瘤には多量のラクトフラビンが含まれる。
- (2) 根瘤のラクトフラビンの大部分は遊離のラクトフラビンである。搾汁には結合型は検出されなかつた。
- (3) 根瘤のラクトフラビンは宿主の細胞内に於て、寄生する根瘤菌の内部にも外部にも存在し、菌體內のものゝは容易に體外に出ることができる。

これらの事實からラクトフラビンの生理的役割を考察するに、ラクトフラビンが根瘤内の酸化還元電位に影響することは當然考えられ、好氣性細菌である根瘤菌が、宿主の細胞内に密集して生存するために必要なメカニズムの一部をなすものではないかと想像される。即ち細菌體內で還元されたラクトフラビンが體外に擴散して、そこで分子狀酸素か或は根瘤ヘモグロビンに結合した酸素と反應して酸化されるという形で根瘤菌の呼吸を助けるのではあるまいか。

終りにラクトフラビン定量法について助言を與えられた北研の松浦寛治氏及びラクトフラビン結晶を分與された科研の中山昭彦氏にお禮を申したい。なお本研究は文部省科學研究費 (根瘤の生化學的研究) 及び農林省委託研究費 (細菌による遊離窒素利用研究) によるものの一部である。

- 1) 藤田秋治： ビタミンの化學的定量法 (誠文堂新光社, 1948)
- 2) 藤田秋治, 大久保佐助： 醫學と生物學, 3, 91~99, (1943)

Summary

The root-nodules of leguminous plants were found to be extremely rich in lactoflavin content as compared with other parts of the plants. The average content was 14.6 mg % in dry matter (3.6 mg % in fresh tissue) for soybean nodules as shown in Table 1.

By careful preparation of the material, the lactoflavin was detectable both in cell-extract (mixture of protoplasm and cell-sap) and bacteria. But the lactoflavin in the bacteria easily disappeared on extraction with water or Ringer solution, the non-extractable part amounting only to 2.04 mg% of dry matter.

The most part of the lactoflavin in the nodules existed in free state. No phosphoric ester or proteid was found in the cell-extract of the nodules.