

Rhizobium fredii USDA191 の過酸化水素耐性変異株の 根粒形成及び窒素固定機能について

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)

The nodulation efficiency of hydrogen
peroxide-tolerant mutants of *Rhizobium fredii* USDA191

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

摘 要

過酸化水素感受性と根粒形成機能との関係を調べるため、過酸化水素に対する感受性の高い *Rhizobium fredii* USDA191 の過酸化水素耐性変異株をトランスポゾン (Tn5) による変異操作により得た (M1~4 株)。これらの変異株の cell-free extract を抗原としたロケットライン免疫電気泳動では親株との明確な差異は認められなかったが、いくつかの変異株の菌体内の NAD⁺ ペルオキシダーゼ活性は、親株に比べ、過酸化水素によって高まる傾向があった。特に M3には、調べた5種類すべてのペルオキシダーゼ (NAD⁺ peroxidase, *p*-phenylenediamine peroxidase, *o*-dianisidine peroxidase, glutathione peroxidase and 3,3'-diaminobenzidine peroxidase) に活性が認められ、根粒重量及びアセチレン還元能 (窒素固定能) が親株よりも高まったことから、過酸化水素に対する菌の感受性は根粒形成に重要な影響を及ぼすとともに、過酸化水素に対する耐性を賦与することにより、有効な根粒菌の育種の可能性が示唆された。

キーワード：根粒菌、過酸化水素 (H₂O₂)、トランスポゾン (Tn5)、ペルオキシダーゼ、
根粒形成

緒 言

根粒内での窒素固定過程は酸化的リン酸化反応によって供給される ATP が多量に要求される過程である。その一方で、ニトロゲナーゼの酸素に対する感受性は極めて高い^{1,2)}。そのため、根粒内の遊離酸素

レベルを調節するために特別なメカニズムが必要となる³⁾。外界の酸素濃度の変化に応じて一定の低酸素分圧を積極的に維持できるように、ダイズやエンドウの根粒では根粒の内皮層が酸素拡散を防いでいることが報告されている^{4,5)}。また、感染細胞の細胞質に存在するレグヘモグロビンは、酸素に対して高い

親和性を持つとともに解離しやすい性質を持っているため、バクテロイドへの酸素の拡散を厳密にコントロールすることによって、ニトロゲナーゼを酸素から防御するとともに、窒素固定過程に必要な ATP 生産を促していると考えられている^{6,7)}。

ところで、大気中に存在する酸素分子は基底状態 ($^3\text{O}_2$) で存在しており、三重項である特異な電子配置を持つため、反応性は低い⁸⁾。そのため、多くの好気性生物は酸素分子から水分子への四電子還元を利用してエネルギーを獲得しているが、その水分子還元過程でいくつかの中間代謝産物を生じる。これらはさきわめて反応性が高く、活性酸素と呼ばれる。基底状態の酸素分子は一電子還元を受けスーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$) となり、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD; EC 1.15.1.1) による不均化反応で過酸化水素を生じる^{9,10)}。また、さらに反応性の高いヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) や一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) は、 $\cdot\text{O}_2^-$ と過酸化水素の相互作用によって生じ^{11,12)}、これらの活性酸素は、糖¹³⁾、タンパク質¹⁴⁾、核酸¹⁵⁾、および脂質¹⁶⁾などの細胞成分を酸化し、細胞に酸素障害を与える。根粒内では酸素濃度の調節がレグヘモグロビンで行われているため、レグヘモグロビンの自動酸化により $\cdot\text{O}_2^-$ が生産され¹⁷⁾、また過酸化水素の作用により $\cdot\text{OH}$ が生産されていると考えられている¹⁸⁾。そのため、これら活性酸素に対する防御機構が存在していると考えられ、 $\cdot\text{O}_2^-$ に対しては SOD^{19,20)}、過酸化水素に対してはカタラーゼ (EC 1.11.1.6)^{21,22)}、ペルオキシダーゼ^{23,24)}、あるいはアスコルビン酸-グルタチオンサイクル^{25,26)}の存在が報告されている。

このように、活性酸素は根粒菌の窒素固定過程だけでなく、菌の生存にとっても大きな影響を与えていると考えられる。著者らの研究で、根粒菌群はその他の好気性及び通性嫌気性の細菌群に比べて過酸化水素に対して相対的に高い感受性を示し、中でも *R. fredii* USDA191 の過酸化水素感受性は最も高いことが明らかになった²⁷⁾。そこで、*R. fredii* USDA191 の過酸化水素耐性変異株をトランスポゾン (Tn5) を用いて作成し、得られた変異株の根粒形成能および窒素固定能について親株と比較、検討したので報告する。

実験方法

1. 菌株および培地

菌株には Dr. Van Berkum (Agricultural Research Service, USDA, Beltsville, MD) から供与された *Rhizobium fredii* USDA191 と *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2667 を使用した。また、過酸化水素耐性変異株の作成には鹿児島大学理学部生物学科から分譲された *Escherichia coli* S17-1 (pSUP5011) を用いた。根粒菌の保存用培地には YEM 寒天培地²⁷⁾、過酸化水素耐性変異株には MM 寒天培地²⁸⁾ (コハク酸ナトリウム六水和物 2.25 g, グルタミン酸ナトリウム一水和物 1.21 g, リン酸水素二カリウム 0.22 g, チアミン塩酸塩 0.1 mg, ビオチン 0.2 mg, 硫酸マグネシウム七水和物 0.21 g, クエン酸鉄 0.41 g, 塩化カルシウム二水和物 0.58 g, 寒天 15.0 g/L (蒸留水) pH 6.8) に 0.0005% 過酸化水素を加えて用いた。培養培地には TY 培地²⁹⁾ を用いて 30°C で振盪培養 (100 ストローク/分) し、660 nm の菌液の濁度の変化から増殖を測定した。

2. 植物栽培条件

Glycine max (L.) Merr. cv. Suzuhime あるいは *Phaseolus vulgaris* (L.) cv. Himetebou の種子を 80% エタノールと 10% 次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌した後、無窒素栽培用培地である Norris & Date 氏液³⁰⁾を加えたパーミキュライトに播種した。各種子には 10^6 cells/ml に希釈した *R. fredii* USDA191 あるいは *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2667 接種菌液を 1 粒あたり 1 ml ずつ、それぞれ接種し、20,000 lux のグロースチャンバー内 (明期: 14 時間, 22°C, 暗期: 10 時間, 16°C) で 50 日間栽培した。

3. 過酸化水素含量の測定^{19,31)}

0.5 g (fresh weight) の幼根 (5 日齢) あるいは根粒 (50 日齢) を活性炭 0.7 g および 5% TCA 7 ml を加えて破砕し、4 枚のさらしでろ過した後、18,000 × g, 10 分間, 4°C で遠心分離した。上澄みをミリポアフィルター (ポアサイズ 0.45 μm) でろ過し、その 100 μl に 100 mM KPB (pH 8.4) 1.9 ml を混合した後、20°C で 10 分間インキュベートした。さらに 1 ml の colorimetric reagent [0.6 mM 4- (2-pyridylazo) resorcinol (disodium salt) と 0.6 mM potassium titanium oxalate の 1:1 混合溶液] を加えて 45°C で

60分間インキュベートした後、508nmで吸光測定した。ブランクにはカタラーゼ溶液 $3\mu\text{l}$ ($1\text{mg}/\text{ml}$)を加えた。スタンダードには市販の過酸化水素 (30%)を使用した。

4. 過酸化水素耐性変異株の調製

受容菌 (*R. fredii* USDA191) と供与菌 (*E. coli* S17-1 (pSUP5011)) の培養菌液をそれぞれ $100\mu\text{l}$ ずつチューブに入れ、 $5,000\times\text{g}$ 、1分間、 4°C で遠心分離して上澄みを除去した後、ペレットを滅菌水 1ml に懸濁して遠心分離する操作で2回洗浄した。ペレットを滅菌水 $100\mu\text{l}$ で懸濁し、その $50\mu\text{l}$ を TY 寒天培地に置いたフィルター (ADVANTEC, $0.45\mu\text{m}$) に滴下して 25°C で24時間インキュベートしメーティングを行った。滅菌水 1ml にフィルター上の菌を懸濁し、その $100\mu\text{l}$ を MM 寒天培地に塗布して 25°C で4~5日間インキュベートした後、サイズの大きいコロニーを過酸化水素耐性変異株として単離した。尚、*E. coli* S17-1 (pSUP5011)の培養液並びに MM 寒天培地には、各々 $30(\mu\text{g}/\text{ml})$ 、 $100(\mu\text{g}/\text{ml})$ のカナマイシンを添加した。

5. 無細胞抽出液の調製とタンパク質の定量³²⁾

前培養した根粒菌をあらかじめ 200ml の培地を入れた 500ml 容の三角フラスコに移して 30°C 、 150rpm で巡回培養した後、菌を 4°C 、10分間、 $10,000\text{rpm}$ で遠心分離する操作によって集菌した。その後、ペルオキシダーゼの活性測定には 50mM リン酸カリウム緩衝液 ($\text{pH}7.8$ 、 10^{-4}M EDTA を含む)、電気泳動にはリン酸緩衝液 (リン酸二ナトリウム 12水和物 2.4g 、リン酸一カリウム 0.7g 、塩化ナトリウム $6.8\text{g}/\text{L}$ 、 $\text{pH}7.0$) に懸濁し、 4°C 、10分間、 $16,000\text{rpm}$ 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、 $19,000\text{rpm}$ で遠心した上澄みを無細胞抽出液とした。試料中のタンパク質含量は、BIO-RAD PROTEIN ASSAY (Bio-Rad) を用いて、 595nm の吸光値から測定した。標準曲線は牛血清アルブミン (BSA) を用いた。

6. ロケットライン免疫電気泳動³³⁾

58°C に保持したライン用抗原 ($2\text{mg}/\text{ml}$) と 2% アガロース [ペロナール塩酸緩衝液 {バルビタール塩 17g 、 1N HCl $23\text{ml}/\text{L}$ (蒸留水) $\text{pH}8.6$ } 50ml 、蒸留水 50ml 、寒天 2g 、アジ化ナトリウム 0.1g] を

等量混合し、 1.5mm の厚さになるようにガラスプレートに流した。冷却後、 $4\times 60\text{mm}$ のラインにカットし、Fig. 1の1の位置に乗せ、その端から 3cm ずらしてガラスプレートを置き、その部分に 2.8ml の 1% アガロースを流した。冷却後、Fig. 1の2のオープンスペースに *R. fredii* USDA191 の抗血清を 7% 含むアガロースを流した。出来上がったプレートにウェルをあげ、無細胞抽出液 ($5\text{mg}/\text{ml}$) を注入し、2倍希釈したペロナール塩酸緩衝液を用いて、 4°C 、 $1\text{mA}/\text{cm}$ で16時間電気泳動した。電気泳動終了後、ゲルを 0.85% 生理食塩水で3日間洗浄し、 0.5% ニグロシン溶液で染色した後、 2% 酢酸で脱色した³⁴⁾。

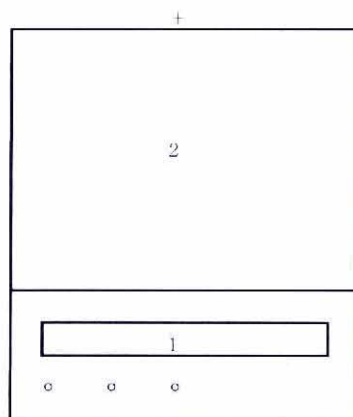


Fig. 1 Rocket line immunoelectrophoresis.

7. ペルオキシダーゼ活性測定

前報で述べられた方法に従って5種類の電子供与体を用いて酵素活性を測定した²⁷⁾。簡略すると、1) NADH: 0.5M KPB ($\text{pH}7.0$) 0.3ml 、 0.2M EDTA $30\mu\text{l}$ 、NADH ($14\text{mg}/\text{ml}$) $30\mu\text{l}$ 、 30mM H_2O_2 $40\mu\text{l}$ 、蒸留水 2.55ml 、試料 $50\mu\text{l}$ の反応液で 340nm の吸光値を測定した (NADH のモル吸光係数 $6.22\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ; 2) Glutathione (GSH): 0.5M KPB ($\text{pH}7.0$) 0.3ml 、 0.2M EDTA $15\mu\text{l}$ 、 20mM GSH 0.3ml 、GSH reductase ($200\text{U}/0.8\text{ml}$) $6\mu\text{l}$ 、NADPH ($14\text{mg}/\text{ml}$) $30\mu\text{l}$ 、 20mM cumene hydroxyperoxide $30\mu\text{l}$ 、蒸留水 2.27ml 、試料 $50\mu\text{l}$ の反応液で 340nm の吸光値を測定した ; 3) *o*-Dianisidine: 0.5M KPB ($\text{pH}7.0$) 0.3ml 、 30mM *o*-dianisidine $10\mu\text{l}$ 、 30mM H_2O_2 $200\mu\text{l}$ 、蒸留水 2.39ml 、試料 $100\mu\text{l}$ の反応液で 460nm

の吸光値を測定した (*o*-dianisidine のモル吸光係数 $11.3\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ; 4) Diaminobenzidine : 0.5M KPB (pH 7.2) 0.3ml, 30mM H_2O_2 200 μl , 150mM 3,3-diaminobenzidine 10 μl , 蒸留水2.39ml, 試料 100 μl の反応液で482nm の吸光値を測定した ; 5) *p*-Phenylenediamine : 0.5M KPB (pH 7.0) 0.3ml, 50mM *p*-phenylenediamine 30 μl , 30mM H_2O_2 200 μl , 試料100 μl の反応液で485nm の吸光値測定した (*p*-phenylenediamine のモル吸光係数 $1.545\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。

8. アセチレン還元活性 (窒素固定活性) の測定

接種後50日目の植物体を密閉したフラスコに入れ、30°Cで1時間インキュベートした。10%アセチレンを注入して30°C, 2時間インキュベートした後、1 ml をサンプリングした。アセチレン還元活性の測定は、ガスクロマトグラフィー (日立 K53, 検出器 : FID, カラム : PORAPAK N 50~80mesh, カラム温度 : 50°C, インジェクション温度 : 150°C, キャリアガス : N_2 , 流速 : 30ml/min) を使用した。

実験結果及び考察

1. 宿主植物の幼根及び根粒中の過酸化水素含量

ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr. cv. Suzuhime) の幼根中の過酸化水素 (H_2O_2) 含量は0.21 ($\mu\text{mol/g}$ fresh weight), 根粒中では0.51 ($\mu\text{mol/g}$ fresh weight) で、これらはおおまかに0.2及び0.5mM 程度の過酸化水素含量に相当すると考えられた (Table)。著者らの研究で、*R. fredii* USDA191 の培養後24時間の増殖は、0.6mM 程度の過酸化水素によって過酸化水素無添加の場合のおよそ5%にまで抑制される

ことが明らかになっており²⁷⁾, *R. fredii* が根 (幼根) に感染し、根粒を形成していく過程で過酸化水素の影響を強く受けていることが推察された。比較のためにインゲン (*Phaseolus vulgaris* (L.) cv. Himetebou) の幼根及び根粒中の過酸化水素含量も Table に示したが、ダイズとの間に大きな差は認められなかったことから、Table に示された過酸化水素含量は宿主及び根粒中に含まれている過酸化水素含量のおおまかな目安の数値に値すると考えられた。

2. 過酸化水素耐性変異株の調製

R. fredii USDA191 の DNA にトランスポゾン (Tn5) をランダムに挿入することによって、4 株の過酸化水素耐性変異株 (M1~4) を単離した。M1~M4 の過酸化水素存在下における増殖の結果を Fig. 2 に示した。0.6mM の過酸化水素を含む培地において、親株の増殖は約24時間強く抑制され、その後回復した。一方、得られた過酸化水素耐性変異株 (M1, M2, M3, 及び M4 株) は、0.6mM の過酸化水素が存在していてもほとんど影響を受けずに増殖を開始した (Fig. 2)。親株の増殖回復後の速度と大きな差は見られなかったが、M1~M4 では過酸化水素存在下でも増殖の停止期がほとんどないことから、これらの変異株は過酸化水素に対する抵抗性が高まっていると考えられた。

3. ロケットライン免疫電気泳動

親株の無細胞抽出液をライン抗原とし、過酸化水素耐性変異株 (M1~M4) についてロケットライン免疫電気泳動を行った (Fig. 3)。過酸化水素非存在下 (コントロール) において、親株のロケット状の沈降線のピークは M2 よりも大きく、M1 と M4 より

Table H_2O_2 contents in radicles and nodules formed on *Glycine max* (L.) Merr. cv. Suzuhime with *Rhizobium fredii* USDA191 and *Phaseolus vulgaris* (L.) cv. Himetebou with *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA2667

Plants	Bacteria	H ₂ O ₂ contents*	
		Radicles	Nodules
(μmol/g fresh weight)			
<i>Glycine max</i> (L.) Merr. cv. Suzuhime	<i>R. fredii</i> USDA191	0.21	0.51
<i>Phaseolus vulgaris</i> (L.) cv. Himetebou	<i>R. l. bv. phaseoli</i> USDA2667	0.27	0.66

* H_2O_2 contents in radicles and nodules were measured at 5 and 50 d after the inoculation, respectively.

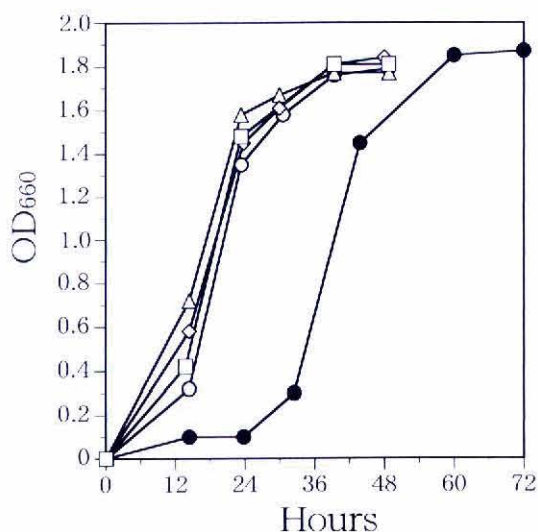


Fig. 2 Effect of H_2O_2 on the growth of wild and H_2O_2 -tolerant mutants of *R. fredii* USDA191. Wild (●) or H_2O_2 -tolerant mutants (○, M1; △, M2; ◇, M3; □, M4) were grown aerobically in TY medium in the presence of 0.6mM H_2O_2 .

も小さかったが、これは抗原量の差に基づいていると考えられた。生じた薄い沈降線のうち、親株と変異株、或いは変異株どうしの間で微妙な差異が見られるが、全体的にこれらの間では大きな差異は認められなかった (Fig. 3A, B)。一般に、この免疫電気泳動法では細胞の大きな変化を把握することはできるが、点変異 (point mutation) のような微細な変異に伴った表現型の変化は反映されにくいと考えられる。従って、一般にトランスポゾン (Tn5) の DNA 中への挿入箇所は 1 箇所程度と少ないので、得られた変異株 (M1~M4) の表現型は、親株と比べて、目的とする過酸化水素耐性にかかわる変異以外には大きな変化は生じていないと考えられた。

4. ペルオキシダーゼ活性

著者らの以前の研究で、根粒菌群とその他の細菌群の過酸化水素に対する感受性を比較した結果、根粒菌群はその他の細菌群に比べて相対的に過酸化水素に対する感受性が高く、中でも *R. fredii* USDA191 は根粒菌群の中で最も高い感受性を有していることが明らかになり、その高い感受性は、低いカタラーゼ並びにペルオキシダーゼ活性に依存している可能性が示唆された²⁷⁾。Figure 4 に過酸化水素耐性変異

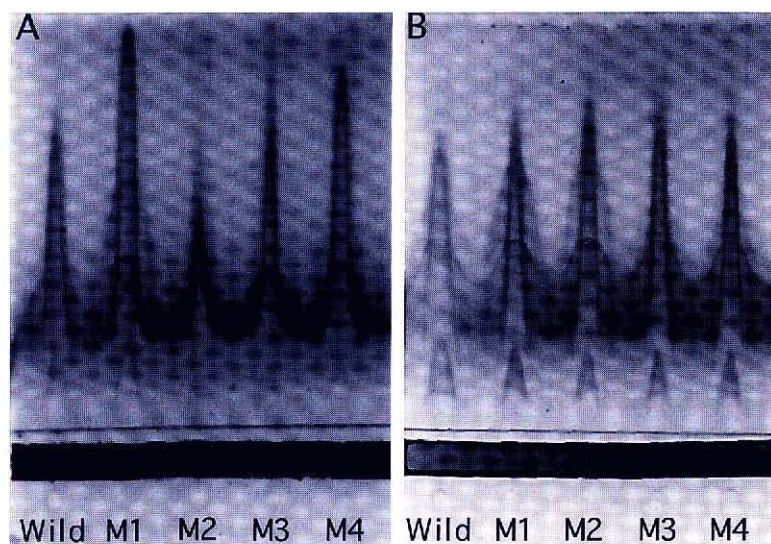


Fig. 3 Rocket line immunoelectrophoresis of wild and H_2O_2 -tolerant mutants (M1, M2, M3 and M4) of *R. fredii* USDA191.

A) control, B) +0.6mM H_2O_2

株 (M1~M4) のペルオキシダーゼ活性を示した。5種類の電子供与体(NADH, *p*-phenylenediamine, *o*-dianisidine, glutathione (GSH), 3,3'-diaminobenzidine)を用いて活性を測定したが、NADHと*p*-phenylenediamineを電子供与体とした場合のペルオキシダーゼ活性は、すべての菌においてペルオキシダーゼ活性総量の90%以上を占めていたことから、Fig. 4にはこの2つの活性値を示した。その結果、*p*-phenylenediamine ペルオキシダーゼ活性は、親株及び変異株全てにおいてペルオキシダーゼ活性総量の10~20%程度であり、また、M1で過酸化水素処理後の活性の増加が見られたが、その値は、親株及び他の変異株の過酸化水素存在における活性値と大きな差異が認められなかった(Fig. 4B)。一方、NAD⁺ペルオキシダーゼは主要酵素であると考えられ、親株のNAD⁺ペルオキシダーゼの活性値は過酸化水素の存在下でも大きな変化は見られなかったが、M1、M2及びM4では過酸化水素処理で1.7~3.5倍の増

加を示した。しかし、過酸化水素存在下におけるこれらの活性値は親株の活性値(約9 units/g protein)に近かった(Fig. 4A)。それに対して、M3のNAD⁺ペルオキシダーゼ活性は過酸化水素の有無に関わらず6.5~6.8 (units/g protein)程度であったが、*o*-dianisidine, GSH, 3,3'-diaminobenzidineのすべてにおいて活性が認められ、それらの合計値はペルオキシダーゼ活性総量の4.4% (過酸化水素非存在下)及び8.8% (過酸化水素存在下)を占めた。このように、過酸化水素耐性変異株のペルオキシダーゼ活性は過酸化水素によって誘導促進される可能性があり、中でもM3は調べた5種類のペルオキシダーゼのすべてで活性が認められた。尚、得られた菌株のカタラーゼ活性も測定したが、親株と変異株との間に活性の有意な差は認められなかった。

5. 過酸化水素耐性変異株の根粒形成とアセチレン還元能力(窒素固定能力)

そこで、*R. fredii* USDA191の過酸化水素耐性変異株を用いて、過酸化水素耐性と根粒形成との関係を明らかにすることを試みた。変異株(M1~M4)を宿主(*G. max* (L.) Merr. cv. Suzuhime)に接種し、50日後の根粒の数及び重量、アセチレン還元能力を測定した(Fig. 5)。その結果、M1、M2は植物1個体当りの根粒着生数が親株のそれぞれ4.1倍、1.9倍に増加したが、根粒重量は逆に親株の17% (M1)及び8% (M2)に減少し、結果的にアセチレン還元能力(ARA)も親株の27% (M1)及び13% (M2)に減少した(Fig. 5)。一方、M3の植物1個体当りの根粒数は親株の70%程度だったが、根粒重量は逆に高く、親株の1.4倍に増加し、ARAもおおよそ1.2倍に増加した。また、図には示していないが、植物体重量も親株が接種された時に比べおおよそ1.2倍に増加し、M3は親株よりも優れた根粒を形成したと考えられた。M4の根粒数、重量及びARAは親株と類似した値であった(Fig. 5)。

これまでの研究から、過酸化水素に対する耐性(感受性)は主にカタラーゼに依存しており、ペルオキシダーゼもそれに関わっていることが示唆されている²⁷⁾。従って、過酸化水素耐性変異株には高いカタラーゼ活性の発現が期待されたが、本実験で得られた変異株のカタラーゼ活性は親株との有意差が見られなかったことから、ペルオキシダーゼが過酸化水素耐性

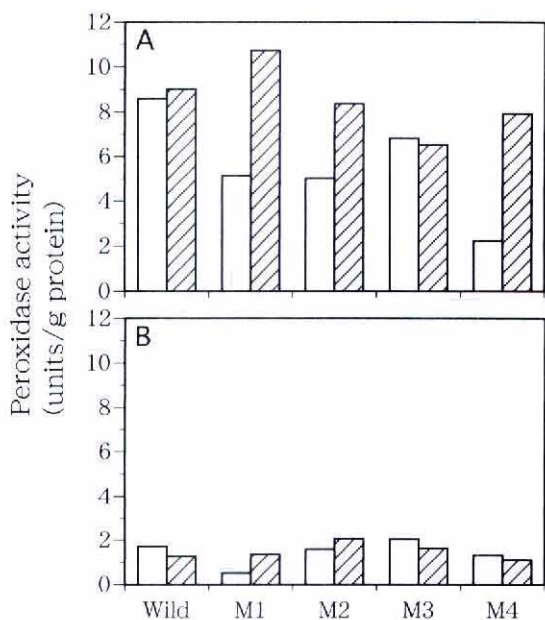


Fig. 4 Peroxidase activities in wild and H₂O₂-tolerant mutants (M1, M2, M3 and M4) of *R. fredii* USDA191 grown in TY medium with (striped bars) or without (white bars) H₂O₂ (0.6mM). A) NAD⁺ peroxidase, B) *p*-phenylenediamine peroxidase

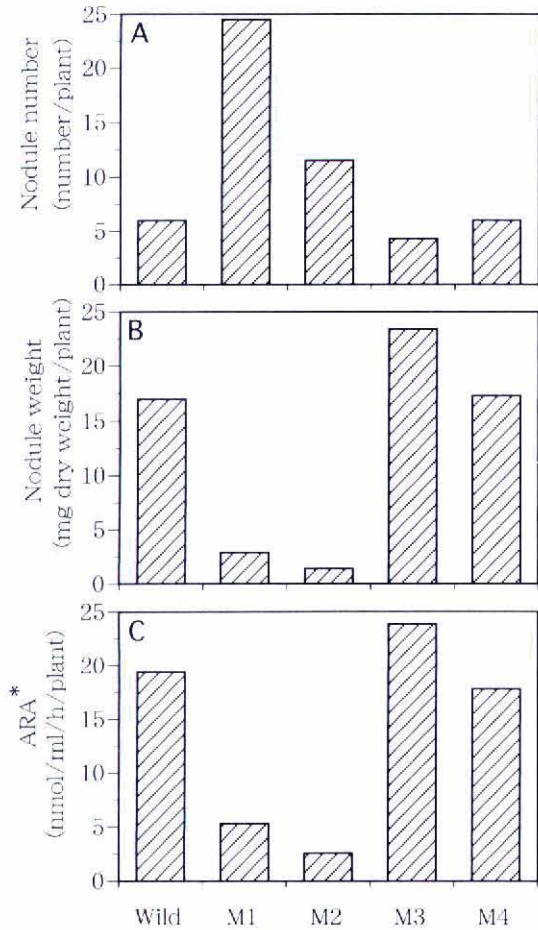


Fig. 5 Nodulation efficiency of wild and H_2O_2 -tolerant mutants (M1, M2, M3 and M4) of *R. fredii* USDA191 infected to *Glycine max* (L.) Merr. cv. Suzuhime. A) nodule number, B) nodule weight, C) acetylene reduction activity (ARA)

に関っている可能性が考えられた。しかし、細胞内のペルオキシダーゼ活性はカタラーゼよりもかなり低い傾向があり、また、過酸化水素の耐性機構には多くの複雑な適応機能が働いていると考えられることから²⁷⁾、得られた変異株の表現型を明らかにするとともに、それに関連した遺伝子の検索も重要であると考えられる。本実験により、過酸化水素が根粒形成に大きな影響を与えている可能性が示されるとともに、過酸化水素耐性をペルオキシダーゼあるいはカタラーゼの活性を高める等の方法によって菌に賦

与することによって、有効で優れた根粒菌の育種の可能性を示唆していると考えられる。

参考文献

- 1) Bergersen, F. J., Biochemistry of symbiotic nitrogen fixation in legume. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **22**, 121-140 (1971).
- 2) Eady, R. R., Smith, B. E., Cook, K. A. and Postgate, J. R., Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*: purification and properties of the component proteins. *Biochem. J.*, **128**, 655-675 (1972).
- 3) Layzell, D. B. and Hunt, S., Oxygen and the regulation of nitrogen fixation in legume nodules. *Physiol. Plant*, **80**, 322-327 (1990).
- 4) Tjepkema, J. D. and Yocum, C. S., Measurement of oxygen partial pressure within soybean nodules by oxygen microelectrodes. *Planta*, **119**, 351-360 (1974).
- 5) Witty, J. F., Skot, L. and Revsbech, N. P., Direct evidence for changes in the resistance of legume root nodules to O_2 diffusion. *J. Exp. Bot.*, **38**, 1129-1140 (1987).
- 6) Ueda, E. and Syono, K., Effect of leghemoglobin components on nitrogen fixation and oxygen consumption. *Plant Cell Physiol.*, **23**, 85-90 (1982).
- 7) Appleby, C. A., Leghemoglobin and Rhizobium respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**, 443-478 (1984).
- 8) 斉藤 烈, 松郷 誠一, 活性酸素の化学, 蛋白質 核酸 酵素, **33**, 2665-2677 (1988).
- 9) McCord, J. M. and Fridovich, I., Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055 (1969).
- 10) Fridovich, I., Superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem.*, **44**, 147-159 (1975).
- 11) Fridovich, I., The biology of oxygen radicals. *Science*, **201**, 875-880 (1978).
- 12) Elstner, E. F., Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **33**, 73-96 (1982).
- 13) 柏村直樹, 糖質と活性酸素, 蛋白質 核酸 酵

- 素, **33**, 3116-3126 (1988).
- 14) 中村和行, 活性酸素による酵素の失活, 蛋白質 核酸 酵素, **33**, 3074-3079 (1988).
 - 15) 長野哲雄, 広部雅昭, 活性酸素による核酸の損傷, 蛋白質 核酸 酵素, **33**, 3094-3101 (1988).
 - 16) 寺尾純二, 脂質, 蛋白質 核酸 酵素, **33**, 3060-3066 (1988).
 - 17) Puppo, A., Rigaud J. and Job, D., Role of superoxide anion in leghemoglobin autooxidation. *Plant Sci. Lett.*, **22**, 353-360 (1981).
 - 18) Puppo, A., and Halliwell, B., Generation of hydroxyl radicals by soybean nodule leghemoglobin. *Planta*, **173**, 405-410 (1988).
 - 19) Becana, M. Aparicio-Tejo, P., Irigoyen, J. J. and Sanchez-Diaz, M., Some enzymes of hydrogen peroxide metabolism in leaves and root nodules of *Medicago sativa*. *Plant Physiol.*, **82**, 1169-1171 (1986).
 - 20) Becana, M. Aparicio-Tejo, P. and Sanchez-Diaz, M., Nitrate and hydrogen peroxide metabolism in *Medicago sativa* nodules and possible effect on leghemoglobin function. *Physiol. Plant*, **72**, 755-761 (1988).
 - 21) Francis, A. J. and Alexander, M., Catalase activity and nitrogen fixation in legume root nodules. *Can. J. Microbiol.*, **18**, 861-864 (1972).
 - 22) Hanks, J. F., Schubert, K. and Tolbert, N. E., Isolation and characterization of infected and uninfected cells from soybean nodules. *Plant Physiol.*, **71**, 869-873 (1983).
 - 23) Moustafa, E., Peroxidase isozymes in root nodules of various leguminous plants. *Nature*, **199**, 1189 (1963).
 - 24) Puppo, A., Rigaud, J., Job, D., Ricard, J. and Zeba, B., Peroxidase content of soybean root nodules. *Biochem. Biophys. Acta.*, **614**, 303-312 (1980).
 - 25) Dalton, D. A., Langeberg, L. and Robbins, M., Purification and characterization of mono-dehydroascorbate reductase from soybean root nodules. *Arch. Biochem. Biophys.*, **292**, 281-286 (1992).
 - 26) Dalton, D. A., Baird, L. M., Langeberg, L., Taugher, C. Y., Anyan, W. R., Vance, C. P. and Sarath, G., Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) root nodules. *Plant Physiol.*, **102**, 481-489 (1993).
 - 27) 大和田琢二, 三浦賢紀, 南里栄, 白川雪香, 井川香子, 佐藤哲也, *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, 帯広畜産大学学術研究報告 **21** 巻 1 号, 17-25 (1988).
 - 28) Juan, J. L., Manuel, S.-D. and David, W. E., Carbon metabolism enzyme of *Rhizobium meliloti* cultures and bacteroids and their distribution within alfalfa nodules. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2587-2589 (1990).
 - 29) Beringer, J. E., R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*, **84**, 188-198 (1974).
 - 30) Dye, M., Function and maintenance of a *Rhizobium* collection. In N. S. Subba Rao (ed.), Recent advances in biological nitrogen fixation., Holmes and Meier Publishers. inc., New York. PP. 435-471 (1980).
 - 31) Patterson, B. D., Macrae, E. A. and Ferguson, I. B., Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV)., *Anal. Biochem.*, **139**, 487-492 (1984).
 - 32) 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).
 - 33) Kroll, J., A manual quantitative immunoelectrophoresis, methods and applications. *Scand. J. Immunol. Supplement*, **1**, 83-87 (1973).
 - 34) 松橋 直, 成内 秀雄, 臼井 美津子, 生化学実験法15免疫学実験入門, 学会出版センター, p. 81 (1981).

Summary

Since *Rhizobium fredii* USDA191 was sensitive to hydrogen peroxide (H_2O_2), H_2O_2 -tolerant mutants (M1, M2, M3 and M4) of this strain were constructed by using transposon (Tn5) to estimate the relationship between H_2O_2 sensitivity and nodulation efficiency. The profile of rocket line immuno electrophoresis showed that there was no significant difference between the wild type and the mutants. However, NAD^+ peroxidase activity of some mutants tended to increase in the presence of H_2O_2 as compared to wild type. All peroxidase activities tested (NAD^+ peroxidase, *p*-phenylenediamine peroxidase, *o*-dianisidine peroxidase, glutathione peroxidase and 3,3'-diaminobenzidine peroxidase) were found in M3 and the nodulation efficiency (nodule weight and acetylene reduction activity) of this mutant was higher than the wild type. These results suggest that H_2O_2 tolerance was an important factor in nodulation and the enhancement of H_2O_2 tolerance of root nodule bacteria leads to the improvement of nodulation efficiency.

Key words: *Rhizobium*, hydrogen peroxide (H_2O_2), transposon (Tn5), peroxidase, nodulation.