

Slow-growing と fast-growing ダイズ根粒菌の 単糖利用性の比較について

佐藤 哲也・菅原 四郎*

(受理: 1986年11月29日)

Comparison of monosaccharides utilization between slow-growing
and fast-growing soybean rhizobia

Tetsuya SATO and Shiro SUGAWARA

摘 要

7株の slow-growing (SG) および 4株の fast-growing ダイズ根粒菌 (FG) の増殖における単糖類の影響を調べた。

全体的傾向として SG はペントースの利用性が比較的高くヘキソースの利用性は非常に低かった。それに対し FG はペントースおよびヘキソースとも利用性が高かった。しかしいずれの菌株もこれらの利用性に若干の差異が認められた。

SG のペントース利用性に関して、詳しく調べると、OUG 115, OUG 117 および AHU 1130 はリボースを炭素源とした時増殖が他に比し非常に遅かった。特に OUG 107 はむしろリボースにより完全に生育が阻害される現象が認められ、またキシロースの利用性も低かった。OUG 117 はアラビノースを炭素源とした時、増殖速度は比較的早い、最大増殖量は低く、他の約 1/2 であった。

FG である USDA 194 はキシロース、J 10 はアラビノースの利用性が他の FG 株に比べ非常に低かった。

緒 言

根粒菌の糖代謝に関して、近年いくつかの報告がなされている。

TUZIMURA ら¹⁾ は *Rhizobium japonicum* は Embden-Myerhoff-Parnas (EMP) および Tri-carboxylic acid サイクルを有していることを示唆した。これらの代謝系は生物界に広く存在するが微生物の中には Entner-Dondoroff 経路 (ED) を有して

いるものも知られている²⁾。KATZNELSON と ZAGALLO³⁾ は *R. phaseoli* と *R. meliloti* が ED によりピルビン酸を生成することを明らかにした。また EMP を主要な代謝系としていない *R. trifolii* の変異株が存在していることも明らかにされた⁴⁾。これらの報告にも示されたように根粒菌の糖代謝はきわめて多様であると考えられる。根粒菌が宿主の根細胞に感染、増殖し根粒を形成する過程で宿主の光合成産物の供給を受ける。マメ科植物根あるいは根粒中にはグルコース、フ

* 帯広畜産大学農産化学科

Department of Agricultural Chemistry, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido, Japan.

ラクトース、シュクロースなどの糖類に加えミオイノシトール、ピニトールなどの環状糖アルコールの存在が報告されている^{5,6,7)}。

炭水化物利用性と根粒形成、窒素固定能の関係について報告されている。Streeter⁸⁾は培養中菌体内にトレハロースが蓄積され、この状態では窒素固定能が低下すると述べている。

同一種に分類される根粒菌にも多数の菌株が存在し、その菌株の違いにより宿主への感染能、根粒形成能および窒素固定能に差異があり実用上の有効菌株を識別、同定するのは困難である。

著者らは有効菌の迅速な、かつ確実な選抜を目的としてこれら菌株の同定手段の検討を行ってきた。この報告では slow-growing (SG) および fast-growing (FG) ダイズ根粒菌を用い、これらの糖類(ペントースおよびヘキソース) 利用性の比較について述べる。

実験方法

使用菌株 ダイズ根粒菌株 OUG 107, OUG 110, OUG 112, OUG 115, OUG 117, S 32 および J 10 は十勝農協連農産化学研究所より, AHU 1130 は北大応用菌学教室より, また USDA 191, USDA 193 および USDA 194 は農業環境技術研究所 沢田泰男氏を通じて分譲されたものを用いた。

菌株の培養 菌株の保存には YEM 寒天培地、炭素源の利用性試験には一部改良した YEM-HM 培地⁹⁾を用いた。この実験において各種糖液を濾過滅菌を行わない上記試験管中の滅菌培地に 0.5% となるように添加した。これにあらかじめ 3 日間前培養した菌を各試験管に 2×10^8 cells 接種し 30°C で振盪培養を行なった。増殖量は OD₅₆₀ で調べた。

結果および考察

根粒菌は生育速度から slow-grower (SG) と fast-grower (FG) に分けられている¹⁰⁾。この実験に用いられた OUG 107, OUG 110, OUG 112, OUG 115, OUG 117, S 32 および AHU 1130 は前者に, J 10, USDA 191, USDA 193 および USDA 194 は後者に属する。これら菌株の増殖速度を示す場合、寒天培地上でのコロニーサイズ^{11,12)}あるいは分裂速度^{13,14)}で示す方法がとられている。しかしこれらのデータのみでは正確な各炭素源の利用性を示すことには不十分と考えられる。そこでこれら菌株の各ペントースおよ

びヘキソースを唯一の炭素源とする培地で増殖させ、それらの利用性の違いを生育曲線を用い詳細に比較検討した。

ペントース利用性 本実験に用いたダイズ根粒菌は全体的にペントースを良く利用したが菌株により誘導期の長さ、増殖速度(対数増殖期の勾配)および最大増殖量(定常期の OD 値)に差異が認められた。

SG および FG のペントース利用性をそれぞれ Fig. 1 および Fig. 2 に示した。SG のうち OUG 110, OUG 112 および S 32 はアラビノース、キシロースおよびリボースを用い約 20 時間程度の誘導期の後に比較的急速に増殖、高い最大増殖量が得られた。AHU 1130 および OUG 115 はアラビノースおよびキシロースは前述の菌株と同様であるがリボースの利用性が低かった(速度および最大増殖量共)。OUG 117 はキシロースを良く利用したがアラビノース培地での増殖速度はこれらと同様であるが最大増殖量は他の場合の 1/2 であり 60 時間後に定常期となった。リボースの利用性は著しく低かった。OUG 107 は最も特徴的な生育曲線を示した。すなわちアラビノースを良く利用したがキシロースの場合誘導期が 30 時間以上と長く増殖速度も遅かった。またリボースを炭素源とした場合、生育阻害が認められた。これらはリボースを除きいずれも 40~60 時間で定常期に達した。

FG 根粒菌はペントースを炭素源とした時 SG 根粒菌より若干誘導期が短かく増殖速度も早い (Fig. 2)。しかしこれら 4 菌株間で生育曲線には差異が認められた。USDA の 3 株は特に生育が早く約 40 時間後定常期に達した。USDA 191 および 193 はすべてのペントースできわめて類似した生育を示したが、J 10 はアラビノースを用いた時、速度も最大増殖量も他の約 1/2 であった。USDA 194 のキシロース利用性はきわめて低かった。

SG はラムノースをほとんど利用しないが、FG である J 10 は他のペントースの場合と比べ誘導期は長い(約 40 時間)もののその後の利用性は高かった。USDA の 3 株を含め他の FG については目下検討中である。

ヘキソースの利用性 Fig. 3 に示されたようにすべての SG 根粒菌はいずれのヘキソースの利用性もきわめて低かった。しかしペントーの場合と異なり 80 時間後も同じ速度で増殖し続けていた。FG 根粒菌によるヘキソースの利用性はいずれの炭素源を用いた場合

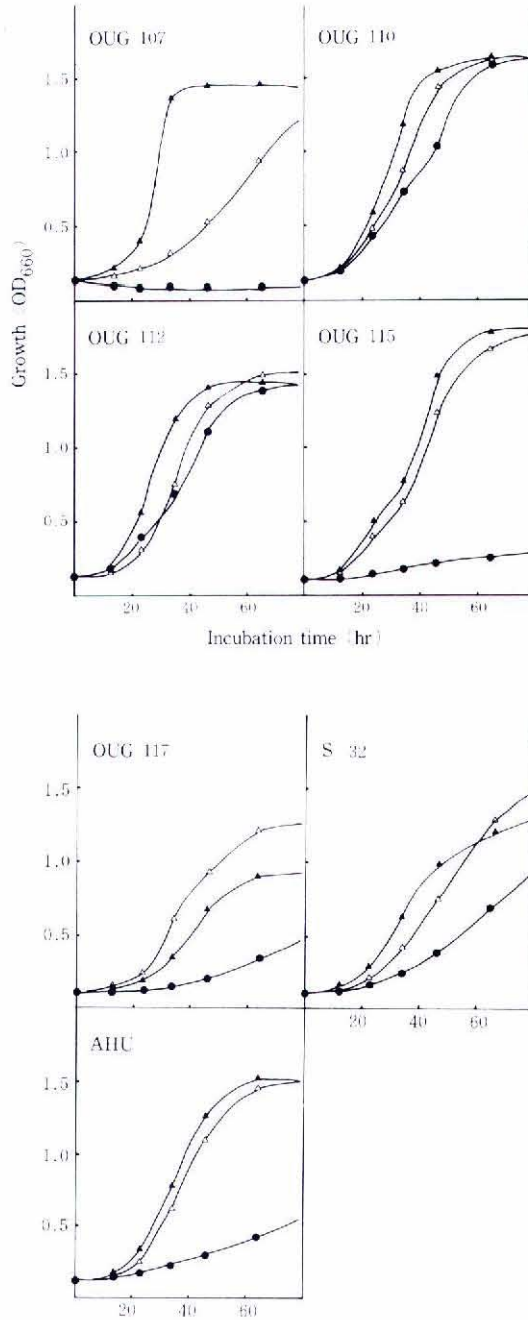


Fig. 1 Growth characteristics of SG soybean rhizobia on pentoses as a sole carbon source. Rhizobia were grown in liquid media containing ribose (●), xylose (△) and arabinose (▲).

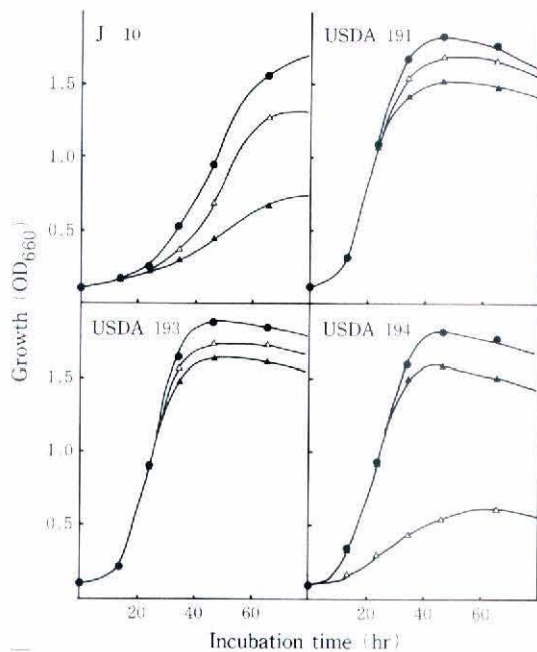


Fig. 2 Growth characteristics of FG soybean rhizobia on pentoses as a sole carbon source. Rhizobia were grown in liquid media containing ribose (●), xylose (△) and arabinose (▲).

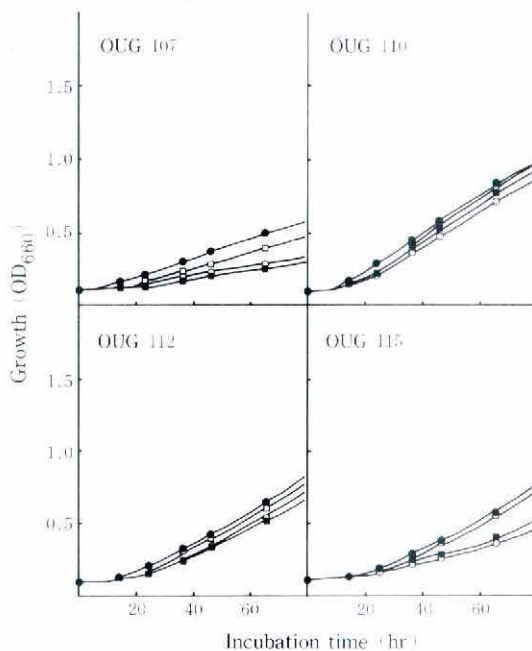


Fig. 3 Growth characteristics of SG soybean rhizobia on hexoses as a sole carbon source. Rhizobia were grown in liquid media containing fructose (●), glucose (○), galactose (□) and mannose (■).

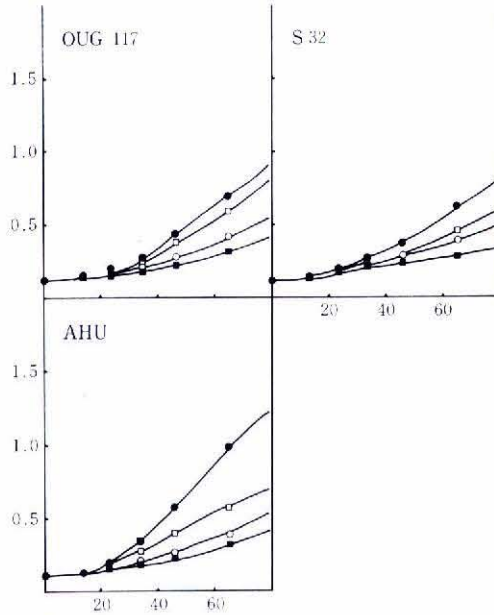


Fig. 3

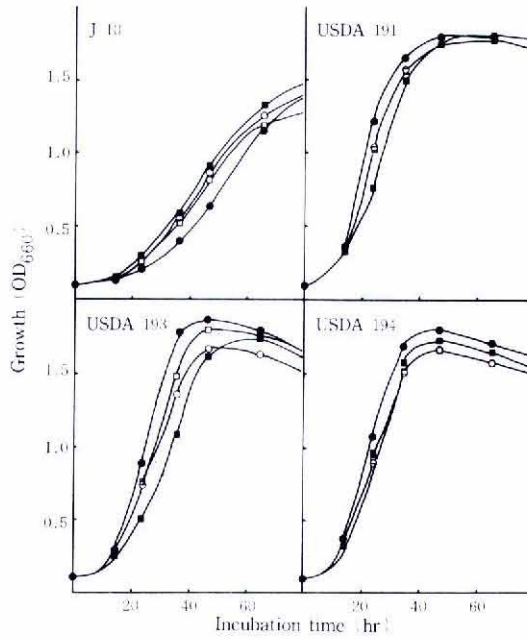


Fig. 4 Growth characteristics of FG soybean rhizobia on hexoses as a sole carbon source. Rhizobia were grown in liquid media containing fructose (●), glucose (○), galactose (□) and mannose (■).

においても SG の場合と著しい差異が認められた (Fig 4)。すなわち 4 種類のヘキソース培地中では例外なく誘導期が 15 時間程度と短く、速度も早かった。これらはいずれも 40 時間前後で定常期に達した。ただ J 10 のみは他の 3 株と比べ若干増殖速度が遅かった。

1984 年版 Bergey の分類書¹⁰⁾ では SG ダイズ根粒菌を *Bradyrhizobium japonicum* としている。また SCHOLLA と ELKAN は¹⁵⁾ は USDA 191 など中国で分離された FG ダイズ根粒菌を *Rhizobium fredii* と命名することを提唱した。本実験に用いた J 10 はマンニトールの利用率も SG と比べ非常に高く、糖の利用率その他の性質から *R. fredii* に分類するのが適当かも知れない。

著者らはこれまで主として SG すなわち *B. japonicum* の菌株の詳細な比較を行ってきた。S 32 は宿主特異性であり¹⁶⁾、AHU 1130 は根粒形成する (Nod⁺) が無効菌である。OUG 115 と OUG 117 はきわめて類似した性質を有しているが¹⁷⁾、感染能には著しい差異がある¹⁸⁾。これらはここで示されたように炭素源の利用率にも若干差異が認められた。しかし宿主に対する反応の違いを説明するには不十分である。

このように炭素源の利用率に差異が有することは代謝能の違いが存在することを意味すると考えられる。

DILWORTH ら¹⁹⁾ は *R. leguminosarum* においてアラビノースは 2-ケトグルタレートを経て代謝されるがアラビノースの代謝能を欠く変異株はアラボネートデヒドロゲナーゼを欠くためアラボネートを蓄積すると報告した。STOWER と ELKAN は²⁰⁾ は cowpea 根粒菌の炭水化物代謝の key 酵素を検索した結果 ED および EMP 経路の酵素は存在するが、Pentose-phosphate 経路に欠くことを示した。GLENN ら²¹⁾ は *R. leguminosarum* の各酵素量は添加した炭素源の違いにより異なり、EMP は存在しないと述べている。

OUG 115 と OUG 117 を用いマンニトールを炭素源とした場合、炭水化物の代謝に関係する数種のデヒドロゲナーゼ量を比較した¹⁷⁾。いずれも NADP 依存型イソクエン酸デヒドロゲナーゼが他のデヒドロゲナーゼの約 10 倍量生成していることなど、それらの生成パターンは類似していた。これら 2 株は菌学的性質も非常に類似しているが感染能に大差がある¹⁸⁾。これまでのところ両者の感染能の差を証明する決定的な事実は見出されていない。これら 2 株に加えそれぞれ特徴の

あるこれら菌株について詳細な比較を行ない数値的 분류法を含め有効性との関連を迅速に見きわめる方法を検討中である。

参 考 文 献

- 1) TUZIMURA, K. and H. MEGURO, J. Biol. Chem., **47**, 391 (1960).
- 2) ENTNER, N. and M. DOUDOROFF, J. Biol. Chem., **196**, 853 (1952).
- 3) KATZNELSON, H. and A. C. ZAGALLO, Can. J. Microbiol., **3**, 879 (1957).
- 4) M.-DE-DRETS, G., A. ARIAS and M. R. DE CUTINELLA, Can. J. Microbiol., **20**, 605 (1974).
- 5) UCKER, S. D. and E. R. SIGNER, J. Bacteriol., **136**, 1197 (1978).
- 6) FINAN, T. M., J. M. WOOD and D. C. JORDAN, J. Bacteriol., **148**, 193 (1981).
- 7) STOWERS, M. D. and G. H. ELKAN, Arch. Microbiol., **137**, 3 (1984).
- 8) STREETER, J. G., J. Bacteriol., **164**, 78 (1985).
- 9) SATO, T. T. MATSUMOTO and S. SUGAWARA, Res. Bull. Obihiro Univ., **13**, 167 (1984).
- 10) JORDAN, D. C., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, **1**, 234 (1984).
- 11) JORDAN, D. C., Int. J. Syst. Bacteriol., **32**, 136 (1982).
- 12) SCHOLLA, M. H. and G. H. ELKAN, Int. J. Syst. Bacteriol., **34**, 484 (1984).
- 13) M.-DE-DRETS, G. and A. ARIAS, J. Bacteriol., **109**, 467 (1972).
- 14) M.-DE-DRETS, G., A. ARIAS and M. R. DE CUTINELLA, Can. J. Microbiol., **20**, 605 (1974).
- 15) SCHOLLA, M. H. and G. H. ELKAN, Int. J. Syst. Bacteriol., **34**, 484 (1984).
- 16) SATO, T. and S. SUGAWARA, Agric. Biol. Chem., **45**, 751 (1981).
- 17) SATO, T. and S. SUGAWARA, 投稿中.
- 18) SATO, T., T. KATO and S. SUGAWARA, 投稿中.

- 19) DILWORTH, M. J. A. ARIAS, I. A. MCKAY, S. SAROSO and A. R. GLENN, *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 2733 (1986).
- 20) STOWERS, M. D. and G. H. ELKAN, *Can. J. Microbiol.*, **29**, 398 (1983).
- 21) GLENN, A. R., A. I. MCKAY, R. ARWAS and J. D. DILWORTH, *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 239 (1984).

Summary

Effect of monosaccharides on growth of 7 strains of slow-growing (SG) and 4 strains of fast-growing soybean rhizobia (FG) were examined.

As a whole SG strains showed comparatively rapid growth on pentoses, but very low growth rate on hexoses as a sole carbon. On the contrary FG strains utilized pentoses as well as hexoses rapidly.

Each strain used here differed from the other in utilization of a few sugars. OUG 115, OUG 117 and AHU 1130 exhibited very slow growth on a ribose containing medium, and this sugar inhibited perfectly the growth of OUG 107.

Among the FG rhizobia growth of USDA 194 on xylose and J 10 on arabinose were limited to some extent.