

食料生産における根粒菌の有効利用について

大和田 琢 二

生物資源化学科応用生物化学講座

1. 目 的

農業作物の生産性は窒素の供給量に大きく左右される。工業生産による窒素肥料は安価で大量に供給できるが、大量の化石エネルギーを要し環境汚染も伴うため必ずしも有効な方法とは言えない。それに対して根粒菌の窒素固定能力を利用した方法は自然エネルギーに依存した有効な方法と言える。根粒菌が圃場に接種されたときや宿主細胞内に侵入した時には大きな浸透圧ストレスを受けると考えられ、根粒菌の浸透圧調節機構の解明は根粒菌の宿主との共生環境を知り作物の生産性を向上させる上で重要な問題である。本研究では、菌株間の浸透圧調節機能の比較を行うとともに、浸透圧調節に関わる細胞内成分を明らかにして、根粒菌の浸透圧調節に関わる機構を明らかにすることを目的とした。

2. 方 法

十勝農協連農産化学研究所から分譲された *Rhizobium fredii* USDA 191, 192; *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* USDA 2443, bv *trifolii* USDA 2168, bv *phaseoli* USDA 2667; *Bradyrhizobium japonicum* S 32, J 1031, J109 菌株を使用した。培地は、根粒菌増殖用として一般に用いられている YEM-HM 培地或いは最少培地を用いて、30°C, 120 rpm で培養した。浸透圧ストレスは、対数増殖中期で終濃度 0.2 M あるいは 0.5 M の食塩の添加で菌に与えられた。トランスポゾンによる変異株作成時には、根粒菌や大腸菌増殖用として一般に用いられている LB 培地、TY 培地及び最少培地を用いた。

細胞抽出試料は、フィルター (0.45 μ m) で集菌し、沸騰浴中で熱水抽出した後、遠心した上澄みで調製した。アミノ酸の定量は Moore らの方法に基づいてニンヒドリンの 570 nm における比色定量により測定した。プロリンの定量については、R. S. Schweet の方法に基づき、塩酸-酢酸混合液中におけるニンヒドリンの 530 nm での比色定量で測定した。ベタイン(コリンを含む)の定量は R. Storol, RG. Wyn Jones らの方法に基づき、試料と沃素を反応させ、過剰の沃素を有機溶媒で除去した後、365 nm で比色定量した。陽イオンは原子吸光分析法によって定量した。また、ヌクレオチド、ペプチドおよび糖は HPLC (旭パック GS-320, NH 2 P-50) により分析した。

トランスポゾン (Tn 5) による変異株は次のように調製された。一晚培養した受容菌 (*Rhizobium fredii* USDA 191) 及び Tn 5 含有ベクター pSUP 5011 を保有した大腸菌 (*Escherichia coli* S17-1) を TY プレート上で 28°C で一晚培養した後、菌を滅菌水で洗浄して、最少培地プレート上で 25°C で 4 から 5 日間培養した。また、食塩 (終濃度 0.2 M) とペニシリン (1,000 U) を含んだ最少培地で

菌を培養し、浸透圧調節能力の低い(欠如した)細胞を濃縮し、最少培地プレートで培養した。次に、最少培地及び食塩(0.2 M)を含んだ最少培地の2種類のプレートに、各コロニーをそれぞれのプレート上の同じ位置に移植し、その増殖の速度(有無)から、目的とする変異株を選別した。

3. 結果及び考察

根粒菌の浸透圧調節機能を調べた。*Rhizobium fredii* USDA 191株の増殖速度は、0.2 M食塩の添加によって1/2に低下した。0.5 Mの食塩で、増殖は強く抑制された。本菌は最少培地でも十分に増殖したが、*R. leguminosarum*及び*Bradyrhizobium japonicum*の増殖は非常に弱かった。*R. fredii* USDA 192株は191株と同様に十分な浸透圧調節機能があったが、*R. leguminosarum*の浸透圧調節機能は弱く、特に、*bv viceae* USDA 2443と*bv trifolii* USDA 2168の2株は、食塩の添加で細胞が凝集、沈澱した。slow growth株に分類されている*Bradyrhizobium japonicum* 1031株は、食塩添加前後の世代時間比と食塩添加後の増殖遅滞期が*R. fredii*と類似しており、浸透圧調節能力が高いと考えられた。浸透圧調節の機能と根粒菌の分類(宿主特異性)若しくは根粒形成との間に関連がある可能性が示唆された。

YEM-HM培地或いは最少培地で増殖した*R. fredii* USDA 191株に0.2 Mの食塩を添加すると、いずれの培地条件においても、細胞内の K^+ 、 Na^+ 含量ともに増加したが、 Na^+ 含量は30分後までにその約80%が減少した。 Na^+ は一般に生体内の代謝系に害を与えやすいので細胞内に取り込まれても即排出される機構があると考えられた。また、 K^+ 含量も増加の後減少傾向を示し、蓄積の後に排出する機構が必要であると考えられた。 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} 含量には大きな変化は見られなかった。細胞内のアミノ酸及びベタイン(コリン含む)含量は、それぞれYEM-HM培地では食塩添加後に増加し、アミノ酸含量についてはその後減少した。しかし、最少培地においては、細胞内の両者の含量に大きな変化は見られなかった。また、グルタチオン含量は、食塩の添加直後に一時的に減少するが、培地組成によらずに全体としては大きな変化はなかった。充分量のアミノ酸やベタイン(コリンを含む)を含むYEM-HM培地でのみ細胞内含量の増加が見られるので、これらは主に培地中からの取り込みに依存していると考えられた。また、浸透圧調節に重要な物質の一つとして考えられているプロリン含量は非常に低く、食塩添加後も増加しなかったため、プロリンの培地中からの取り込み及び浸透圧ストレスによる合成促進の機構は低いと考えられた。菌体内アデニンヌクレオチド含量は、YEM-HM培地では0.2 Mの食塩で15分後にその合計量が顕著に増加し、120分後には減少した。一方、最少培地では食塩添加による顕著な増加は見られなかったが、時間と共に増加する傾向にあった。根粒における窒素固定には大量のエネルギー(ATP)を必要とするので、浸透圧ストレスを受けると考えられる根粒中で、ATP合成が高く維持されている可能性が示唆された。糖とペプチドの含量には大きな変化は見られなかったが、2種類のペプチドの顕著な存在が示唆された。トランスポゾンの挿入によって、浸透圧調節機能の低い変異株を得た。これらの変異株は0.2 Mの食塩を含んだ最少培地でもコロニーを形成できるが、そのコロニーは小さく、透明度の高いコロニーを形成する群と透明度は低く白く見えるコロニーを形成する群とに分けられた。変異株の細胞内成分の分析及びTn5挿入位置については検討中である。