

ポーラログラフ電極法によるダイズ根粒菌Hup型の判定

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	南沢, 究 任, 清美 山野, 稔
巻/号	59巻2号
掲載ページ	p. 200-202
発行年月	1988年4月

ポーラログラフ電極法によるダイズ 根粒菌 Hup 型の判定

南沢 究*・任 清美*・山野 稔*

キーワード ダイズ根粒菌, ヒドロゲナーゼ, ポーラログラフ, 水素細菌

1. 緒言

Uptake hydrogenase 系 (Hup 系) は根粒菌の明確な形質であり, ダイズ群・カウピー群・エンドウ群の根粒菌に見出されている¹⁾. とくに, Hup 系を持つダイズ根粒バクテロイドは, ニトロゲナーゼの生成する分子状水素を再酸化することにより, 窒素固定系の効率化に貢献しているものと考えられている^{2,3)}. 根粒菌の Hup 系の有無 (Hup 型) を判定する際, 形成された根粒の水素発生速度とアセチレン還元速度をガスクロマトグラフにより測定して求めたエネルギー利用相対効率 (RE) がよく用いられているが^{4,5)}, この方法は Hup 系による水素のとりこみを直接調べているのではなく, あくまでもニトロゲナーゼによる水素の生成と Hup 系による水素のとりこみの取支を調べているので, Hup 型の判定を誤る可能性がある. そこで, ニトロゲナーゼによる水素生成を止めた状態で, Hup 系による水素のとりこみを感度のよいポーラログラフ電極法で検討してみたところ, 共生状態でも単生状態でも迅速にダイズ根粒菌の Hup 型が明確に判定できたので, ここに報告する.

2. 電極装置

電極は, 白金と銀からなるポーラログラフ電極 YSI 5331 (Yellow Springs Instrument Co., Inc.) を用いた. 第 1 図に示したような内容積 1.5 ml のキューベット (木屋製作所) に電極を差し込み, ウォータージャケットにより温度を 30°C に保った. キューベット内の被検液はマグネティックスターラーを用い一定速度で攪拌した. 各電極には第 2 図に示した回路をそれぞれ接続し, 2ベ

ンレコーダーで記録した. 水素測定用電極⁶⁾は, 白金側を陽極に ($\text{H}_2 \rightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$), 銀側を陰極に ($\text{AgCl} + \text{e}^- \rightarrow \text{Ag} + \text{Cl}^-$) した. 2 M 塩酸中で極性を逆にして通電することによって, 銀表面をあらかじめ塩化銀にしておいた. 洗浄した電極の先端に塩化カリウム半飽和水溶液を滴下し, テフロンメンブレン (YSI 5775) を張りキューベットに装着した. 酸素測定用電極は, 白金側を陰極に ($1/2\text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$), 銀側を陽極に ($\text{Ag} + \text{Cl}^- \rightarrow \text{AgCl} + \text{e}^-$) した. アンモニア水を含ませた脱脂綿で拭くことにより銀表面に付着している塩化銀を除き, 水素測定用電極と同様にメンブレンを張った. この装置によって, 10 μM の水素で約 0.5 mV, 245 μM の酸素で約 5 mV の出力が得られた.

3. 実験方法

1) 根粒ホモジネートの調製

根粒菌を接種して滅菌パーミキュライトで栽培したダイズ³⁾または茨城大学農学部圃場 (淡色黒ボク土) で栽培したダイズ (農林 2 号) より根粒をとり, 30°C で空気を飽和させたリン酸緩衝液 (2.5 mM 塩化マグネシウムを含む 50 mM リン酸緩衝液, pH 7.0) を加え乳鉢と乳棒で十分すりつぶし, 四重のガーゼでろ過し, そのろ液を測定に供した.

2) 単生根粒菌の Hup 系の誘導

Hup 系の誘導は MAIER ら⁷⁾の方法に準じて行った. ダイズ根粒菌を YEM 液体培地で 4 日間 30°C で培養し, その培養液 0.1 ml を H_2 -uptake 寒天培地⁸⁾のスラントにまいた. 5 日間 30°C で培養したのち, 1 スラントにつき 10 ml のリン酸緩衝液 (上記と同じ組成) で菌体を洗い出し, 十分懸濁し, 30 ml 容の血清バイアルに 5 ml 入れた. ゴム栓で密閉し, 気相を N_2 84%, H_2 10%, CO_2 5%, O_2 1% とし, 21 時間 30°C で誘導後, バイアルの気相を N_2 98.3%, H_2 0.7%, O_2 1.0% とし, その菌体懸濁液を測定に供した.

3) 溶存水素・溶存酸素の測定

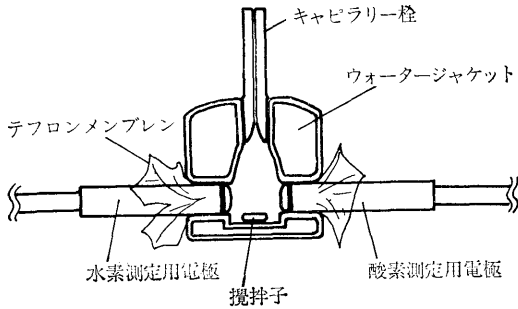
被検液を入れたキューベットに気泡の入らないようにキャピラリー栓 (第 1 図) をし, 水素を飽和させたリン酸緩衝液をマイクロシリンジで加えることによって, 水素のとりこみを調べた. 水素の拡散は速いので, 測定中キャピラリーに針を差し込んでおいた. 酸素のゼロ点はハイドロサルファイトナトリウムの水溶液をキューベットに加えて求めた.

4. 結果と考察

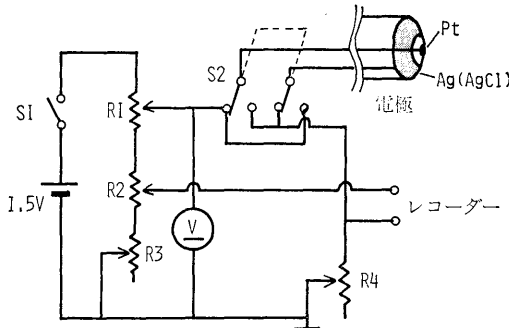
良好な状態に調整した水素測定用電極の検出限界は, 0.05 $\mu\text{M H}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ であった. Hup⁺ 型である A 1017 株形成根粒のホモジネートは明らかに水素をと

Kiwamu MINAMISAWA, Kiyomi NIN and Minoru YAMANO: Determination of Hup Phenotype of *Bradyrhizobium japonicum* by Amperometric Technique

* 茨城大学農学部 (300-03 茨城県稲敷郡阿見町阿見 3998)
昭和 62 年 9 月 10 日受理
日本土壤肥科学雑誌 第 59 巻 第 2 号 p. 200~202 (1988)

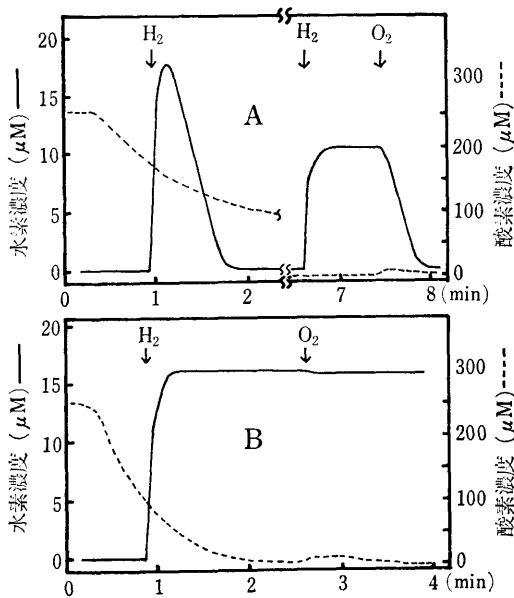


第1図 溶存水素・溶存酸素測定用キュベット



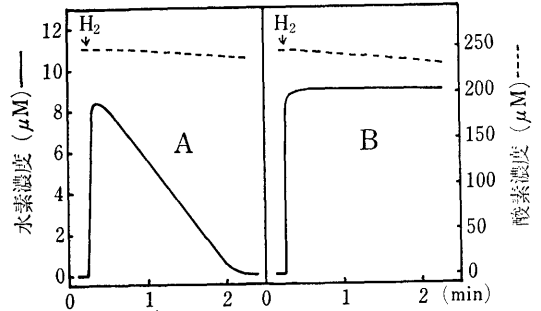
第2図 溶存水素・溶存酸素測定用電極配線図

R1, 5 k Ω 電圧調整 (0.6 V); R2, 500 Ω ゼロ点粗調整;
R3, 10 Ω ゼロ点微調整; R4, 500 k Ω 感度調整;
S1, メインスイッチ; S2, 極性切り換えスイッチ.



第3図 根粒ホモジェネートの水素とりこみ能

A, A1017 株形成根粒ホモジェネート (0.4 g 根粒/15 ml リン酸緩衝液); B, J501 株形成根粒ホモジェネート (1.0 g 根粒/15 ml リン酸緩衝液).

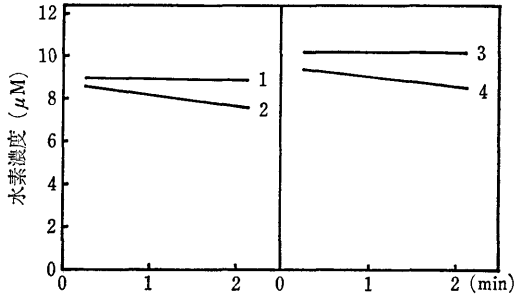


第4図 1個の根粒のホモジェネートの水素とりこみ能
A, A1017 株形成根粒1個 (25 mg 根粒/5 ml リン酸緩衝液); B, J501 株形成根粒1個 (50 mg 根粒/5 ml リン酸緩衝液).

りこんでおり (第3図A), 酸素を消費し切った状態では水素のとりこみは起らず, 酸素の溶存したリン酸緩衝液を加えると再び水素をとりこんだ. Hup 系の生理的最終電子受容体は分子状酸素である⁹⁾ ので, 観察された水素のとりこみが酸素依存性であることを調べることは, Hup 系によるものか否かを検討するのにある程度有効であると考えられる. 一方, Hup⁻ 型である J501 株形成根粒の場合 (第3図B), 水素のとりこみは全くみられなかった. 嫌氣的に調製した根粒ホモジェネートはニトロゲナーゼによる水素発生のため, このように明確な識別はできなかったが, 本法のように好氣的に根粒ホモジェネートを調製した場合でも, リン酸緩衝液 5 ml 当たり 0.5 g 以上の根粒を用いると, ニトロゲナーゼを完全に失活させることができない場合があった. 根粒ホモジェネートから遠心により調製したバクテロイドを用いても, 酸素消費が減ること以外は根粒ホモジェネートと全く同様の結果が得られた. また, 好氣的に調製したバクテロイドでもヒドロゲナーゼの活性は変化しないことが知られており^{9,10)}, 観察された Hup 系による水素とりこみ能はインタクトな根粒バクテロイドと同等であると考えられた.

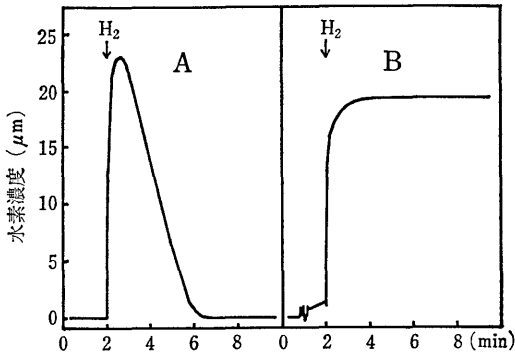
次に, 根粒1個からホモジェネートを調製してみたところ (第4図), 数十 mg の根粒1個でも Hup 型の判定ができることがわかった.

圃場ダイズの根粒を調べてみたところ, Hup⁻ 株形成根粒と思われるものでも酸素依存性の弱い水素とりこみ能を示した (第5図). 根粒を殺菌液 (0.2% オスバン液, 5% 過酸化水素) に10分間浸し, 蒸留水でよく洗浄し, 根粒ホモジェネートを調製すると, この微弱な水素とりこみも全く観察されなくなった. そこで, ダイズの生育している土壌の懸濁液と, 根粒に付着した土壌を



第5図 圃場ダイズ根粒ホモジェネートおよび土壤懸濁液の水素とりこみ能

1, 表面殺菌した根粒のホモジェネート (0.1 g 根粒/5 ml リン酸緩衝液); 2, 表面殺菌しない根粒のホモジェネート (0.1 g 根粒/5 ml リン酸緩衝液); 3, 土壤懸濁液 (0.22 g 土壤/5 ml 蒸留水); 4, 根粒洗浄液 (4 g 根粒/20 ml 蒸留水).



第6図 Hup系を誘導した単生ダイズ根粒菌の水素とりこみ能

A, A1017株; B, J501株.

蒸留水で洗浄した洗液の水素とりこみ能を調べてみたところ、土壤懸濁液の水素のとりこみはみられなかったが、根粒洗浄液は明らかに水素とりこみ能を示した。この結果は、水素を発生する根粒表面の近傍に水素細菌が生育していることを示唆しているものと考えられ、土耕ダイズ根粒を供試する際は殺菌洗浄操作が必要であることを示している。

第6図に Hup系を誘導した単生根粒菌の水素とりこみ能を示した。根粒ホモジェネートの場合と同様に、A1017株で水素のとりこみがみられ、J501株では水素とりこみ能を示さなかった。アセチレン還元法で調べたところ、この条件ではニトロゲナーゼは誘導されていなかった。

38菌株のダイズ根粒菌によって形成された根粒のRE測定⁴⁾とポーログラフ電極法による判定を同時に行っ

てみたところ、RE 40.9~90.6% になった 20 菌株が Hup⁻ 株、RE 96.2~100% になった 18 菌株が Hup⁺ 株となり、RE 測定のみでは判然としない RE 80~98% の値を示した根粒菌 7 菌株の Hup 型も本法より明確に判定することができた。

本法は、根粒 1 個でも単生根粒菌でも迅速に Hup 型の判定ができるので、土壤中での根粒菌の挙動の検討やダイズ菌以外の根粒菌の Hup 型の判定にも利用できるであろう。

謝 辞 電極の取り扱いについてご指導いただいた平松昭教授 (茨城大学農学部) および有益な助言をしていただいた相田徳二郎教授、浅見輝男教授、久保田正亜助教授 (茨城大学農学部) に深く感謝いたします。

文 献

- EVANS, H.J., PUROHIT, K., CANTRELL, M.A., EISENBERGER, G., RUSSELL, S.A., HANUS, F.J. and LEFO, J.E.: Hydrogen Losses and Hydrogenase in Nitrogen-fixing Organisms; *In Current Perspective in Nitrogen Fixation*, ed. A.H. GIBSON and W.E. NEWTON, p. 84~96, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1981)
- EMERICH, D.W., RUIZ-ARGÜESO, T., CHING, T.M. and EVANS, H.J.: Hydrogen-Dependent Nitrogenase Activity and ATP Formation in *Rhizobium japonicum* Bacteroids. *J. Bacteriol.*, **137**, 153~160 (1979)
- 南沢 究・有馬泰紘・田中裕之・熊沢喜久雄: 水素回収系を持つダイズ根粒菌の接種効果, 土肥誌, **56**, 292~299 (1985)
- 有馬泰紘・南沢 究・熊沢喜久雄: 空気中で水素発生を示さないダイズ根粒を形成する根粒菌の検索, 同上, **52**, 114~118 (1981)
- 吉田富男・土田祐子: シカクマメ根粒菌による共生窒素固定について, 同上, **58**, 410~413 (1987)
- WANG, R.T.: Amperometric Hydrogen Electrode. *Methods Enzymol.*, **69**, 409-413 (1980)
- MAIER, R.J., CAMPELL, N.E.R., HANUS, F.J., SIMPSON, F.B., RUSSELL, S.A. and EVANS, H.J.: Expression of Hydrogenase Activity in Free-Living *Rhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 3258~3262 (1978)
- MAIER, R. J., HANUS, F. J. and EVANS, H. J.: Regulation of hydrogenase in *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.*, **137**, 824~829 (1979)
- MCCRAE, R.E., HANUS, J. and EVANS, H.J.: Properties of the Hydrogenase System in *Rhizobium japonicum* Bacteroids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 384~390 (1978)
- RUIZ-ARGÜESO, T., EMERICH, D.W. and EVANS, H.J.: Characteristics of the H₂ Oxidizing System in Soybean Nodule Bacteroids. *Arch. Microbiol.*, **121**, 119~206 (1979)