

マメ科根粒菌によるビタミンB12活性物質の生成と根粒着生植物体中のビタミンB12活性物質の存在

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者名	吉田,重方
発行元	日本土壌肥料学会
巻/号	69巻5号
掲載ページ	p. 435-444
発行年月	1998年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



マメ科根粒菌によるビタミン B₁₂ 活性物質の生成と 根粒着生植物体中のビタミン B₁₂ 活性物質の存在

吉田 重方*

キーワード マメ科根粒菌, ビタミン B₁₂, 根粒着生, マメ科植物, バイオアッセイ

1. はじめに

ビタミン B₁₂ は悪性貧血に対して薬理的効果を示す物質であり Smith と Folkers^{1,2)} らによってほとんど同時期に肝臓エキスから結晶として取り出された。

ビタミン B₁₂ が動物や多くの微生物の生長に不可欠であることは周知のことであり、また、ビタミン B₁₂ の生成はごく一部の細菌やカビによってのみ行われ、その中でも *Streptomyces* 属のものが比較的多量のビタミン B₁₂ を生成し、ビタミン B₁₂ の微生物的生産にも応用されている²⁾。

これに反して、高等植物にはビタミン B₁₂ の生成能がなく、さらに、その要求性や植物体における集積を報じたものはごく少数存在するにすぎない^{3-6,23,24)}。しかしながら、ビタミン B₁₂ の生成能をもつことが知られている根粒菌^{7,8)} が植物組織の一部とみなされる根粒内に生息する根粒着生マメ科植物では、その他の植物体に比べてビタミン B₁₂ が生成集積しやすい条件にあると推察される。事実、マメ科根粒内における高濃度のビタミン B₁₂ の集積を認めた報告^{9,10)} はあるが、マメ科植物のビタミン B₁₂ と根粒の着生との関連に注目した研究は少ない¹¹⁾。

そこで、本報では根粒菌によるビタミン B₁₂ の生成能を調べるとともに、根粒を着生した、あるいは非着生のマメ科植物体におけるビタミン B₁₂ 活性物質の存在様相について調査した。

なお、本研究ではビタミン B₁₂ をユーグレナを用いたバイオアッセイ法^{12,13)} によって測定した。測定値にはビタミン B₁₂ 以外に同様の生物活性を示す物質も含まれるため、ここではビタミン B₁₂ 活性物質として表示した。

2. 実験材料および実験方法

1) ビタミン B₁₂ 活性物質の測定

(1) ユーグレナによるビタミン B₁₂ 活性物質の定量法

既知量のビタミン B₁₂ を添加した第 1 表に示す組成のユーグレナ培養基本培地 10 mL を小型試験管 (径 0.6 cm) に分注し、オートクレイブ処理によって滅菌した。このものに、あらかじめビタミン B₁₂ を含む寒天スラント培地で前培養しておいたユーグレナを 1 白金耳植えつけ、30°C、120 時間、人工照度連続照明下で傾斜させて静置培養した。

培養終了後、濁度 (OD, 620 nm) によりユーグレナの生長量を測定した。被検液中のビタミン B₁₂ 活性物質 (以下、B₁₂ 活性物質) の定量は、既知量のビタミン B₁₂ を添加したときに得られるユーグレナの生育量とビタミン B₁₂ の代わりに少量の被検液を加えたときの生育量を対比させることによって行った。

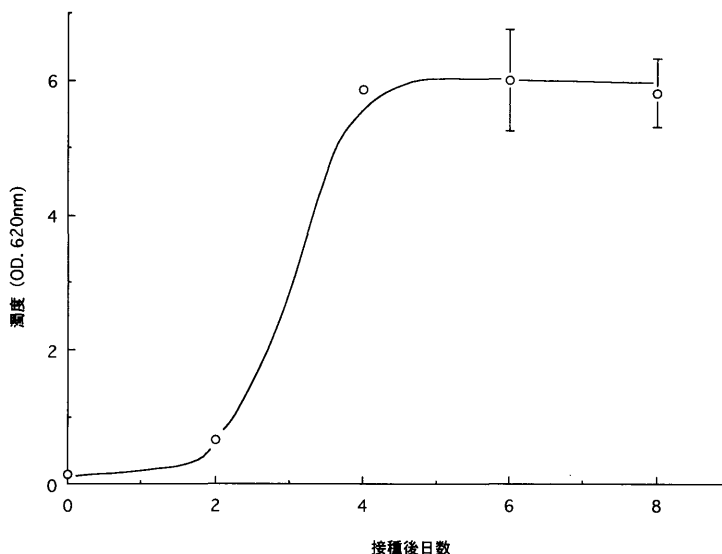
第 1 図はビタミン B₁₂ を培地に添加 (添加濃度: 0.1×10^{-6} mg L⁻¹) したときのユーグレナの増殖の状況を示す。なお、培養は 1 処理につき 3 試験管を用い、その平均値および標準偏差を図示した。

本条件下では培養 4 日間 (96 時間) 以後、ユーグレナの増殖は定常状態となったため、定量用の増殖曲線は培養時間を 120 時間として作成した。なお、上記の検定曲線は実験のたびごとに作成したが、その 1 例を第 2 図に示す。

(2) ペーパークロマトグラフィーによる B₁₂ 活性物質の同定

根粒菌接種前の根粒菌培地、根粒菌を培養したのちの菌培養上澄液およびビタミン B₁₂ 溶液の一定量を、それぞれ濾紙 (2 cm × 40 cm, 東洋濾紙 No. 51) にスポットしたのち展開した。展開濾紙はよく風乾したのち Rf 値に従って 10 等分に細断し、それらを第 1 表に示す 10 mL のユーグレナ培地の入った小型試験管に加え、オー

* 名古屋大学農学部附属農場 (470-0151 愛知県愛知郡東郷町諸輪畑尻 94)
1997 年 8 月 21 日受付・1998 年 11 月 20 日受理
日本土壤肥科学雑誌 第 69 巻 第 5 号 p. 435~444 (1998)



第1図 ユーグレナの増殖推移
 ビタミン B₁₂ 添加濃度: $0.1 \times 10^{-6} \text{ mg L}^{-1}$.

第1表 ユーグレナ基本培地組成 (mg L^{-1})

(NH ₄) ₂ PO ₄	1.6	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	40.0
K-citrate · H ₂ O	0.4	MnSO ₄ · H ₂ O	12.0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.4	CoSO ₄ · 7 H ₂ O	10.0
Na-butyrate	4.0	ZnCl ₂	1.6
CaCl ₂	0.2	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	2.0
Casamino acids	1.0	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.6
pH 6.0~6.2		ビタミン B ₁₂	0.2

トクレイブ処理によって滅菌した。このものに1白金耳のユーグレナを植えつけ、1)-(1)に記した方法によって生育量を測定し、B₁₂ 活性物質量の分布を調べた。なお、使用した展開溶媒の組成は *n*-ブタノール、酢酸、水 (5:1:2) である。

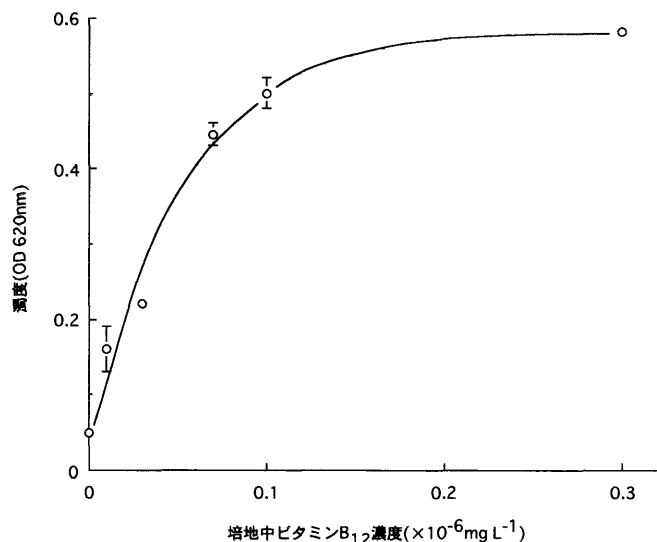
2) 根粒菌によるビタミン B₁₂ 活性物質の生成

(1) 根粒菌の培養と培養液中の B₁₂ 活性物質の定量
 10 mg L⁻¹ の塩化コバルト (CoCl₂ · 6 H₂O として) を含む 30 mL の根粒菌培養用酵母エキス-マニトール (YM) 培地¹⁴⁾ を大型試験管 (径 2.4 cm) に分注し、オートクレイブ処理 (120°C, 15 分間) によって滅菌した。このものにあらかじめ寒天スラント YM 培地で培養した 1 白金耳の各根粒菌株を接種し、30°C, 7 日間振とう培養した。培養後、遠沈により菌体を除去して得た上澄液をビタミン B₁₂ 活性物質 (以下、B₁₂ 活性物質と記す) の測定用被検液とした。その一部 (0.2~1.0

mL) を 1) に示すユーグレナを用いた生物検定法に供した。本試験に供試した根粒菌株はこれまでに本研究室でそれぞれの宿主植物の根粒より分離・保存したものであり、その数株は IBP Rhizobium Catalogue¹⁵⁾ に登録保存されたものを用いた。また、それら菌株の生理的特性の一部はすでに報告した¹⁶⁾。なお、図中の菌株番号は当研究室の菌株保存番号を示す。

3) 植物根溢液中および根からの B₁₂ 活性物質の分泌調査

(1) インゲン植物の根溢液中の B₁₂ 活性物質の調査
 無窒素培地¹⁶⁾ およびその培地に硝酸ナトリウムを用いて NO₃-N として 50 mg L⁻¹ の窒素を加えた含窒素培地を 1/2000 a ポットに入れ、子葉展開期のインゲン幼植物 (品種、尺五寸, 3 個体/ポット) を 3 週間、水耕栽培に供することによって、根粒を着生したインゲンと根粒を着生しないインゲンを作った。なお、根粒菌接種は水耕移植時に根部を菌懸濁液に浸漬することによって行った。その後、両植物体の地上部を根際より切り取り、その切り口にゴム管を連結し 24 時間 (1 昼夜) 根を培養し続けることによって溢液を試験管に採取した。その溢液の一部を B₁₂ 活性物質検定用被検液として、上記のユーグレナ法にかけた。その他の詳細は各実験結果の項に記す。



第2図 ユーグレナの増殖に及ぼす培地中ビタミン B₁₂ 濃度の影響
培養時間：120 時間。

(2) 寒天培地に培養した白クローバおよびアルファルファ根からの B₁₂ 活性物質の分泌調査

滅菌した窒素フリーの無機寒天培地（寒天濃度 10 g L⁻¹）¹⁶⁾ を入れた試験管内で根粒菌を接種（白クローバには No. 103 株，アルファルファには No. 202 株）あるいは無接種のクローバ種子およびアルファルファ種子を播種し，約一か月間人工照度下で栽培した。その後，植物体をピンセットで取り除き，オートクレイブで滅菌した。寒天が固化する直前まで放冷したのち培地に 1 白金耳のユーグレナを接種し，試験管ミキサーで内容物をよく混和したのち傾斜させて固化させた。そのように処理したユーグレナ接種試験管を 120 時間培養し，その増殖状況から B₁₂ 活性物質の分泌を比較した。

4) 植物体中の B₁₂ 活性物質の調査

(1) 根粒着生植物と非根粒着生植物の B₁₂ 活性物質量の比較

ルービンの栽培歴のない圃場より採取した土壌を充填したポットに表面殺菌したルービン種子を接種し，その根粒着生の有無からルービン根粒菌の土着を前もって確認した。その土壌を用いてルービン植物体を根粒菌 (No. 402) を接種あるいは無接種条件下で開花期まで 1/2000 a ポットを用いて栽培した。これら植物は地上部と地下部に分け，通風乾燥 (85°C, 1 日間) させたのちミルで乾燥粉末とした。それら乾燥粉末試料 1 g につき 50 mL の蒸留水を加え，100°C, 30 分間，煮沸抽

出した。B₁₂ 活性物質量は上記の抽出上澄液を被検液として 1) に示すユーグレナを用いた生物検定法によって調査した。植物体中における B₁₂ 活性物質量は乾物当たりのビタミン B₁₂ (シアノコバラミン) 相当量として示した。

(2) 各種根粒着生マメ科植物体中の B₁₂ 活性物質の分布調査

圃場に生育する 6 種のマメ科植物を開花盛期に掘り取り，よく水洗したのち地上部，根部および根粒部に分けた。上記と同様の方法により調整した乾燥粉末試料から B₁₂ 活性物質を抽出し，上記のユーグレナを用いた生物検定法により定量し，表示した。

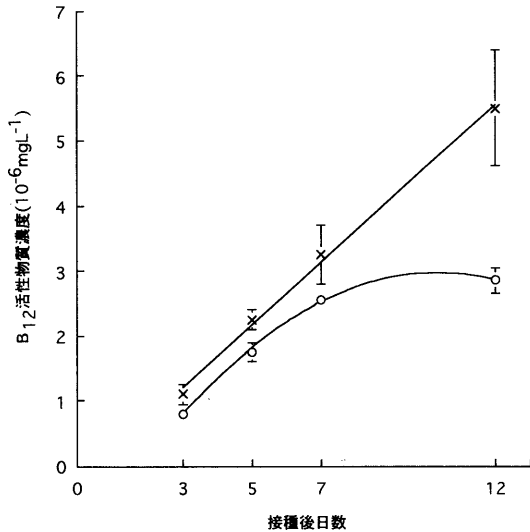
(3) 生育に伴う根粒中の B₁₂ 活性物質の変動調査

無窒素培養液を用いてダイズを砂耕栽培し，ダイズの生育段階に対応させて 5 回根粒を採取した。根粒からの B₁₂ 物質の抽出・定量は上記と同じ方法によった。

3. 実験結果および考察

1) 各種根粒菌による B₁₂ 活性物質の生成

ダイズ根粒菌 (No. 001) およびアルファルファ根粒菌 (No. 202) を根粒菌培養用培地で培養し，培養液中に分泌してくる B₁₂ 活性物質を調べた結果を第 3 図に示す。図より明らかなように，接種 3 日後の根粒菌は明らかに B₁₂ 活性物質を生成し，その後急激に B₁₂ 活性物質が培地に集積しはじめた。なかでも，アルファルファ菌



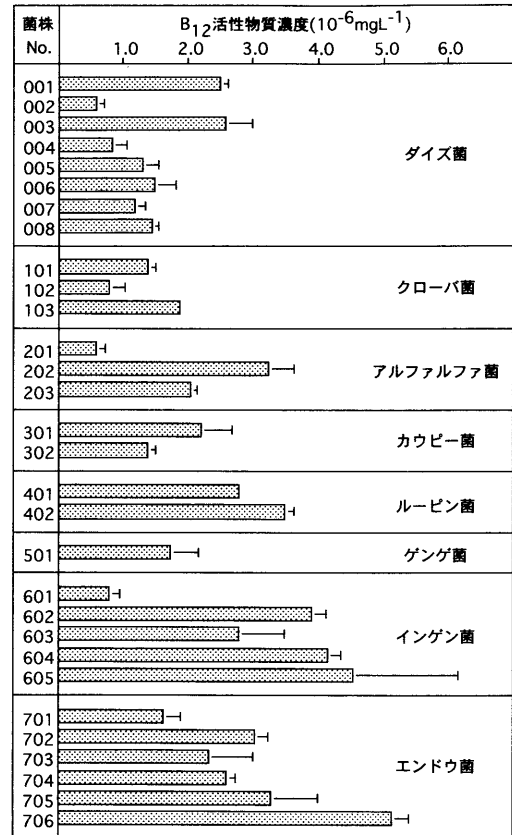
第3図 ダイズおよびアルファルファ根粒菌による B₁₂ 活性物質の生成

○：ダイズ根粒菌 No. 001, ×：アルファルファ根粒菌 No. 202.

は培養日数の経過に伴って直線的に B₁₂ 活性物質を多量に集積し、同菌の B₁₂ 物質の生成集積能は供試したダイズ菌よりも高かった。しかしながら、B₁₂ 活性物質の生成集積能が根粒菌種で差異があるか否かに関しては、多数の根粒菌株の生成集積能を比較調査したのち判断すべきである。第4図は当研究室保存の30株の根粒菌の B₁₂ 活性物質の生成集積能を比較したものであるが、必ずしも根粒菌種と B₁₂ 活性物質の生成集積能の間には明確な関係は認められなかった。しかし、概して B₁₂ 活性物質の生成集積能の高い菌株がインゲン菌やエンドウ菌に多く存在しダイズ菌には少ない傾向にあった。一方、根粒菌による B₁₂ 活性物質の生成集積はその他の菌代謝産物と同様に培地の要因によって変動するものと考えられる。その中でもビタミン B₁₂ がコバルトを含む化合物であることから、培地へのコバルト添加量が B₁₂ 活性物質の生成集積に大きく影響するものと推察される。

第3図および第4図の試験では、上記の点を考慮して、コバルト添加培地 (CoCl₂ · 7H₂O として 10 mg L⁻¹) を使用したが、培地中コバルト濃度を増減させ、120時間培養した後の B₁₂ 活性物質の生成集積濃度を第5図に示す。

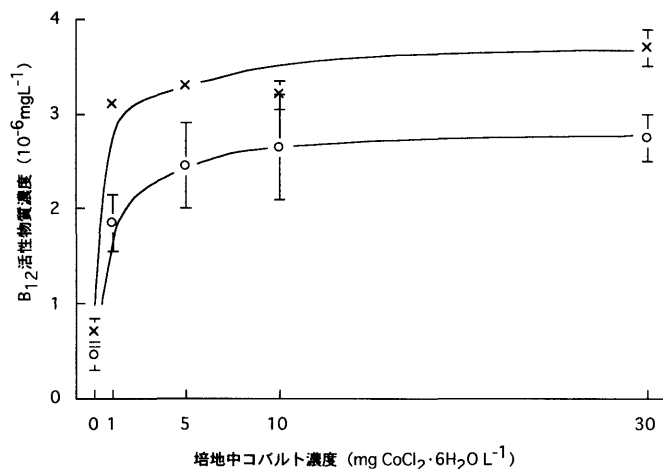
これより明らかなように B₁₂ 活性物質の生成集積量は培地中のコバルト濃度によって著しく影響をうけ、その濃度が 1 mg L⁻¹ 以下では急激に減少した。上にも記し



第4図 各種根粒菌による B₁₂ 活性物質の生成集積能

たように、第3図および第4図の試験では上記の濃度以上のコバルトが培地に添加されているため、培地中のコバルト濃度が B₁₂ 活性物質の生成集積の制御因子として働いていないといえる。

培地中の化合態窒素濃度はマメ科植物の根粒着生や窒素固定能を抑制¹⁷⁻¹⁹⁾し、また、培養根粒菌による IAA 生成集積を顕著に抑制すること¹⁶⁾は周知のことであるが、B₁₂ 活性物質の生成集積に対する化合態窒素の影響については未だ明らかでない。そこで、窒素源として酵母エキスを含む根粒菌培地に、さらに硝酸態窒素濃度 (NO₃-N) が 50 および 250 mg L⁻¹ となるように硝酸ナトリウムを加えて根粒菌を7日間振とう培養し、生成集積する B₁₂ 活性物質量を調査した結果が第2表である。培地中の硝酸態窒素濃度の上昇は根粒菌による B₁₂ 活性物質の生成集積をやや促進する傾向を示し、根粒菌による IAA の生成集積の場合と異なり、抑制的に作用することはなかった。また、第2表に示す根粒菌の増殖度合



第5図 根粒菌による B₁₂ 活性物質の生成集積におよぼす培地中コバルト濃度の影響
○：ダイズ菌 No. 001, ×：アルファルファ菌 No. 202. 注：培養時間 120 時間。

第2表 根粒菌による B₁₂ 活性物質の生成集積におよぼす培地中硝酸態窒素濃度の影響

培養液中の窒素濃度 (mg L ⁻¹)	B ₁₂ 活性物質量 (10 ⁻⁶ mg L ⁻¹)	根粒菌の増殖量 (OD. 620 μm)
NO ₃ -N 0	2.4 ± 0.2	0.415 ± 0.012
50	2.8 ± 0.3	0.415 ± 0.056
250	3.3 ± 0.7	0.420 ± 0.010

注) 供試菌株：アルファルファ根粒菌 No. 202.

いから、硝酸態窒素の添加に伴う B₁₂ 活性物質の促進が根粒菌の増殖を介して働いているとはみなし難い。

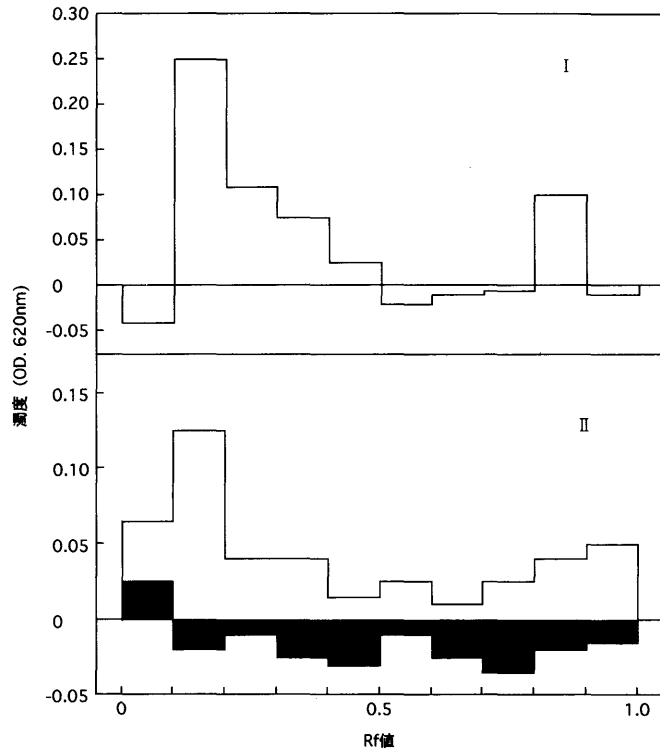
これまでの試験では、B₁₂ 活性物質の生成集積を根粒菌培養上澄液を直接ユーグレナ培地に加えて調査した。実験に供したユーグレナはビタミン B₁₂ 検定用 (ATCC 10616) のものであり、ビタミン B₁₂ 以外に同様の活性を示す物質によっても反応する。そのような物質が根粒菌の培養に用いた基本培地に混在しないという証拠はない。したがって、根粒菌の培養上澄液中にユーグレナの生育を促す作用のある物質が存在したとしても、そのすべてが根粒菌の代謝生成によるものとみなすことができず、また、それらの活性がビタミン B₁₂ によるものか、あるいはそれ以外の同様の活性を示す物質によるものかについては判定できない。

その点を検証するためペーパー・クロマトグラフィーと生物検定を組み合わせ以下の試験を行った。すなわち、根粒菌培養基本培地、その培地に根粒菌を植え付けたのちの菌培養上澄液およびビタミン B₁₂ 溶液を濾紙に

スポットして展開したのち、展開部分の濾紙細片に含まれている B₁₂ 活性をユーグレナ法によって調査した。なお、試験に供した溶媒系を用いた場合、ビタミン B₁₂ の Rf 値は 0.1 の位置にくるとされているが²⁰⁾、その値は当然のことながら展開操作中の温度や展開距離等によっても変動する。第6図に示すようにビタミン B₁₂ 試薬をスポットしたとき、B₁₂ 活性は 0.1~0.2 を中心に Rf 値に高いピークがみられる。ほぼ同様の結果は根粒菌培養上澄液においても認められたが、ビタミン B₁₂ 試薬、根粒菌培養上澄液ともに Rf 値の高い位置にも活性を示す部位が存在した。この活性はビタミン B₁₂ 試薬を供試した場合にも出現したことから、クロマト展開中あるいはその後の滅菌処理によって新たにビタミン B₁₂ から生成した物質 (Artifact) によるものと推察できる。また、根粒菌接種前の根粒菌培養基本培地を用いた場合、上記のビタミン B₁₂ の場合ほど明確な B₁₂ 活性は認められなかった。さらに、根粒菌を培養しない培養基本培地を用いた場合には上記の2者でみうけられた活性は出現しなかった。これらのことから、根粒菌培養上澄液で検出される B₁₂ 活性の主体は根粒菌の生成したビタミン B₁₂ 活性物質に由来するものと推察される。

2) マメ科植物体中の B₁₂ 活性物質の存在

高等植物はビタミン B₁₂ を生成しないとされているが、根粒を着生したマメ科植物では B₁₂ 活性物質を生成する能力をもつ根粒菌と共生関係にある。したがって、高等植物のなかでもマメ科植物は B₁₂ 活性物質を最も集積しやすい条件下にあるといえよう。事実、根粒中に



第6図 ビタミンB₁₂および根粒菌培養液中のB₁₂活性のヒストグラム
I: ビタミンB₁₂, II: □根粒菌培養上澄液, ■根粒菌培養基本培地, 供試菌: ダイズ菌 No. 001.

B₁₂物質が存在することを示した報告⁸⁻¹⁰⁾もあり, その推察の妥当性がうかがえる。しかし, 根粒着生の有無とB₁₂活性物質の集積との関係については未だ明らかではない。

そこで, インゲン根の溢液中のB₁₂活性物質を調査した。その結果, 第3表より明らかなように, 根粒を着生した無窒素区のインゲン根の溢液中のB₁₂活性物質濃度は根粒無着生の窒素施用区のものに比べて5倍程度高く, また同区の溢液量は窒素施用区のもの約1/2程度であったにもかかわらず全溢液中B₁₂活性物質量は約2倍程度高かった。その原因は, 根粒内で根粒菌がB₁₂活性物質を生成し, そのものが溢液中に移行したことによるものと考えられる。根粒菌がB₁₂活性物質を生成する能力をもつことは前項において認めており, 本試験のインゲン培養中にもインゲン根粒菌によるB₁₂活性物質が生じていると考えられる。しかし, 本試験では根粒菌以外の微生物の存在を排除した条件下で行ったものではない。したがって, 上記の培養液中でB₁₂活性物質が生成集積したとしても, それが根粒菌によるものと単純に結論づけ

第3表 インゲンの根溢液中のB₁₂活性物質濃度および全溢液中含量

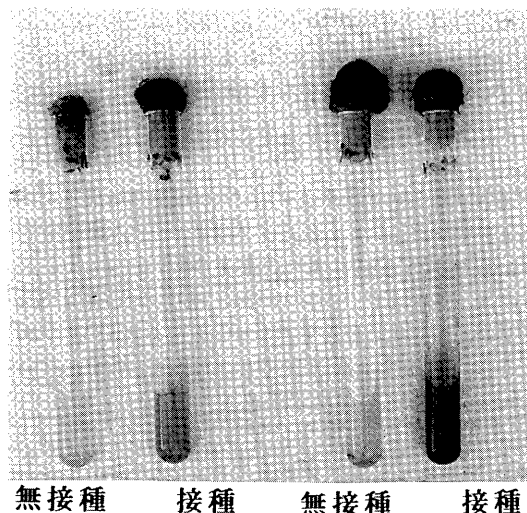
	着生根粒の有無	B ₁₂ 活性物質濃度 (10 ⁻⁶ mg L ⁻¹)	B ₁₂ 活性物質含量* (10 ⁻⁶ mg)
無窒素区	有	1.06±0.03	5.4
窒素施用区	無	0.20±0.04	2.1

* 溢液中B₁₂活性物質濃度×溢液量。

溢液量: 無窒素区 5.1 mL±2.5 mL/ポット (3個体),

: 窒素施用区 10.6 mL±5.5 mL/ポット (3個体),

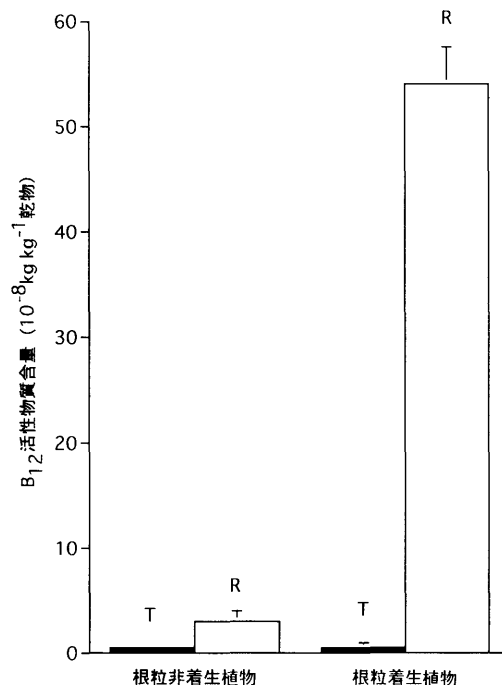
ることは早計である。その点を検証するために滅菌寒天培地で白クローバとアルファルファを根粒菌を接種, あるいは無接種下で栽培し, その後, 植物体を取り除いた培地にユーグレナを植え付けた。その結果, 写真1に示すように, ユーグレナの増殖は両植物区ともに根粒菌接種区の培地においてのみ認められた。このことは, マメ科植物の根圏においても根粒菌がB₁₂活性物質を生成していること, および植物根からはB₁₂活性物質を分泌していないことを示唆する。



アルファアルファ シロクロバ

写真1 根粒菌の無接種および接種下で栽培した寒天培地におけるユーグレナの生育状況

ついで、着生根粒の有無と植物体における B₁₂ 活性物質の集積との関係調べるために、ルービンの根粒着生植物と根粒非着生植物の地上部、および地下部の B₁₂ 活性物質含量を比較検討した。その結果、第7図に示すように、地上部の B₁₂ 活性物質は両植物ともほとんど検出されなかった。地下部より地上部に転流する根液中に B₁₂ 活性物質が存在することをインゲンを用いた試験において認めた(第3表)が、地上部に B₁₂ 活性物質が検出し難い程度にしか存在しないという本結果は上記のものと矛盾するように見える。この点に関しては不明であるが、地上部において B₁₂ 活性物質の分解機構が働いたか、あるいは地際より茎切断という人為的行為が地下部からの B₁₂ 活性物質の移動を促したかのどちらかであると推察できる。後者とよく似た現象は地上部を切除した根粒非着生ダイズ根の溢液中のアラントインの移動において観察されている²¹⁾が、B₁₂ 活性物質についても同様であるのか、また、上記のいずれが主体的に働いているのかは現在のところ不明である。一方、これとは逆に、両植物の地下部の B₁₂ 活性物質含量は地上部に比べて著しく高く、しかも、根粒着生植物の地下部の B₁₂ 活性物質含量は根粒非着生植物のものに比べて約12倍高かった。したがって、高等植物のなかでも、根粒菌と共生関係にあるマメ科植物が根粒非着生マメ科植物や他科の非共生植物に比べて B₁₂ 活性物質が集積しやすい環境条件



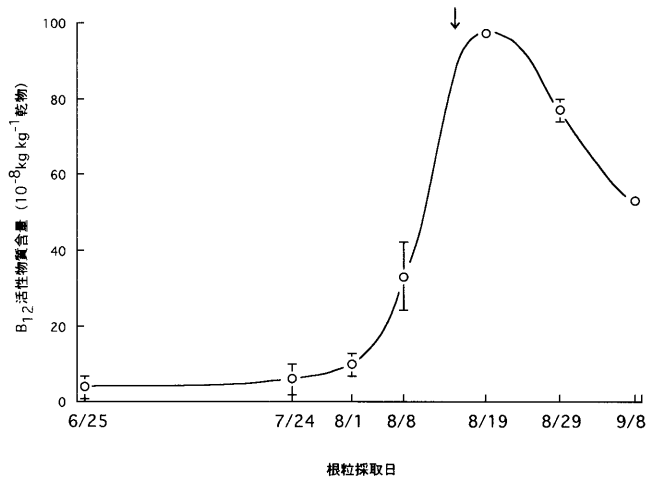
第7図 ルービン植物体の B₁₂ 活性物質含量におよぼす根粒着生の影響

T: 地上部, R: 地下部.

下にあるとする前出の推察は妥当であった。

これに関連して、6種の根粒着生植物体の地下部を、さらに根部と根粒部分け、各部位に集積する B₁₂ 活性物質含量を測定した。その結果、第4表に示すように、B₁₂ 活性物質含量はいずれの植物においても根粒部において最も高濃度に含まれ、根部では根粒部のほぼ1/10~1/70程度であった。また、地上部における B₁₂ 物質の集積量はルービンの場合(第7図)と同じように著しく少なく、その値は根粒部のほぼ1/100~1/600であった。一方、植物種によっても根粒部の B₁₂ 物質の濃度が著しく異なっており、あたかも B₁₂ 物質の集積に関して種間差異が存在するようにみうけられた。しかし、本試験では植物齢を考慮せずに調査したため、種間差異を論ずる場合にはさらに詳細な検討を必要とする。

第8図は無窒素培養液を用いて砂耕栽培したダイズから経時的に根粒を採取し、その根粒に集積している B₁₂ 活性物質含量を調査した結果である。これより明らかに、根粒中の B₁₂ 活性物質含量は根粒の採取時期、いかえれば植物の生育段階によって著しく異なり、根粒の着生初期には低く、そののち漸次増加し、結実期頃に最大となる。その後、生育が進むにつれて低下しはじ



第 8 図 ダイズ根粒における B₁₂ 活性物質含量の経時変化
↓: 開花盛期.

第 4 表 各種マメ科植物体の各部位における B₁₂ 活性物質含量

植物	B ₁₂ 活性物質濃度 (10 ⁻⁸ kg kg ⁻¹ 乾物)		
	根粒部	根部	地上部
ダイズ	30	3.0	0.24
カウビー	15	1.0	0.38
白クローバ	63	3.5	0.38
コモンベッチ	77	5.0	0.35
インゲン	50	4.0	0.56
アルファルファ	220	3.0	0.38
平均値	75	3.2	0.38
標準偏差	74	1.3	0.10

めた。この経時的変化はダイズの着生根粒による窒素固定能や根粒中のヘモグロビン含量の消長とよく似た経過を示した²²⁾。

このように根粒中の B₁₂ 活性物質含量が根粒の齢によって著しく異なるため、第 7 表の結果から根粒における B₁₂ 物質の集積に関し種間差異を論ずることは困難であった。

一方、近年、有機物を施用した土壤にビタミン B₁₂ が集積し、それらが各種野菜に吸収されること²³⁾、さらに水耕栽培したダイズにおいて培地中に添加したビタミン B₁₂ が効率よく地上部に吸収移行することを認めた報告がある²⁴⁾。これら野菜はベジタリアンと称される人達にとってビタミン B₁₂ の重要な給源となっているとされている。

動物性食品よりも植物性食品、とくに緑黄色野菜の摂

取がすすめられている現在、各種野菜中におけるビタミン B₁₂ の存在やその含有量の高低が野菜品質を評価する上での 1 基準となりうる可能性もある。それらの観点からすれば、ビタミン B₁₂ の含有量を 1 つの指標として品質評価の定まらない有機栽培野菜の科学的評価の一助となるものと考えられる。これらの点について今後、検討する予定である。

4. 要 約

マメ科根粒菌によるビタミン B₁₂ 活性物質の生成集積を調査するとともに、根粒着生に伴うマメ科植物体中および根域におけるビタミン B₁₂ 活性物質の集積状況をユグレナを用いたバイオアッセイ法を用いて検討した。その結果、以下のような結果を得た。

1) 根粒菌はいずれも B₁₂ 活性物質を生成する能力をもち、その生成集積濃度は培地中コバルト濃度の上昇に伴って高まった。また、培地中硝酸態窒素の存在は根粒菌による B₁₂ 活性物質の生成集積を抑制しなかった。

2) 根粒菌の生成する B₁₂ 活性物質の主体がビタミン B₁₂ であることをペーパークロマトグラフィーとユグレナ法を組み合わせた試験より明らかとなった。

3) インゲン根より得た溢液中に高濃度の B₁₂ 活性物質が含まれ、その濃度は根粒を着生した根溢液において顕著に高いことを見出した。また、根粒菌を接種して試験管培養したアルファルファ、白クローバの寒天培地に B₁₂ 活性物質の存在が確認され、根粒菌接種により培地中に B₁₂ 活性物質が分泌していることが明らかとなっ

た。

4) 根粒を着生したルーピン植物体には根粒非着生ルーピンに比べて高濃度の B₁₂ 活性物質を含有するが、その集積部位は主に地下部、とくに根粒部に局在することを認めた。

5) 同様の現象はルーピン以外の6種の根粒着生マメ科植物種においても認められること、および根粒部における B₁₂ 活性物質の集積は植物の生長に伴う根粒の齢の進行によっても大きく変動することを認めた。また、根部や地上部における B₁₂ 活性物質量はそれぞれ根粒部の 1/10~1/70、および 1/100~1/600 程度であった。

文 献

- 1) Goodwin, T. W.: ビタミンの生成, 石坂音治訳, p. 175, 共立出版, 東京 (1996)
- 2) 佐藤一精: 微生物におけるビタミン B₁₂ の生成とその生理的役割, 化学と生物, **18**, 742~743 (1980)
- 3) 原嶋亮三: 新牧草コンフリーとは, 鶏友, **11**, 46~50 (1965)
- 4) 吉田重方: 野草の利用に関する研究, 畜産の研究, 第3報 ロシアン・カンフリーの栄養的価値, **8**, 1083~1084 (1972)
- 5) 篠原 功・黒瀬 忍・原田 勇: 土壌および牧草の C とそのビタミン B₁₂ の関連, *J. Coll. Dairying*, **11**, 235~242 (1985)
- 6) Fries, L.: Vitamin B₁₂ in *Pisum sativum* (L). *Physiol. Plant.*, **15**, 566~571 (1962)
- 7) Burton, M. O. and Lockhead, A. G.: Production of vitamin B₁₂ by rhizobium species. *Can. J. Bot.*, **30**, 521~524 (1952)
- 8) Kliewer, M. and Evans, H. J.: B₁₂ coenzyme content of the soybean nodules from legumes, Alder and of *Rhizobium meliloti*. *Nature*, **194**, 108~109 (1962)
- 9) Kliewer, M. and Evans, H. J.: Identification of cobamide in nodules of symbionts and isolation of the B₁₂ coenzyme from *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.*, **38**, 55~59 (1963)
- 10) Kliewer, M. and Evans, H. J.: Cobamide coenzyme contents of soybean nodules and nitrogen fixing bacteria in relation to physiological condition. *ibid.*, **38**, 99~104 (1963)
- 11) Adams, J. F. and Kenedy, F. H.: Vitamin B₁₂ analogues in non-legume root nodules. *Nature*, **194**, 108~109 (1962)
- 12) 佐藤 裕: Euglena によるビタミン B₁₂ 定量法の研究 (I), Hutner 原法および新改良法, *ビタミン*, **6**, 200~201 (1953)
- 13) 日本化学会編: ビタミンの微生物定量法, 実験化学講座 25, 生物化学III, p. 280~307, 丸善, 東京 (1958)
- 14) 農林水産省農業技術研究所生物窒素固定の有効化微生物研究グループ: 根粒菌取り扱い技術及び有効根粒菌リスト, 農林水産業における自然エネルギーの効率的利用技術に関する総合研究報告書, p. 5~10 (1980)
- 15) Allen, O. N. and Hamolova, E.: IBP World Catalogue of Rhizobium Collections, ed. F. A. Skimmer, p. 103~104, International Biological Programm Central Office, London (1973)
- 16) 吉田重方・谷田沢道彦: 根粒菌による IAA の生成集積における種間差異と培地の条件について, *土肥誌*, **44**, 97~100 (1973)
- 17) 吉田重方・谷田沢道彦: 培地中化合態窒素の形態がダイズの根粒形成に及ぼす影響についての一考察, 同上, **38**, 21~24 (1967)
- 18) 吉田重方: ダイズの窒素栄養に及ぼす堆肥施用の影響, *日作紀*, **48**, 17~24 (1979)
- 19) Tee, T. A.: Environmental effects on nodulation and symbiotic nitrogen fixation; in *The Biology of Nitrogen Fixation*, ed. A. Quispel, North-Holland Publishing Company, p. 555~582, Oxford (1976)
- 20) 勝沼信彦: ビタミン B₁₂ および関連物質, クロマトグラフィーの実際, 成田耕造・村山孝夫編, p. 569, 廣川書店, 東京 (1964)
- 21) 石塚潤爾: 北海道の大豆の生育および子実タンパクの生成における可溶性窒素成分の栄養生理学的意義, 北海道農業試験場報告, No. 101, p. 51~121 (1972)
- 22) Virternen, A. L., Erkama, J. and Lincola, H.: On the relationship between nitrogen fixation and leghaemoglobin content of leguminous root nodules. *Acta Chem. Scand.*, **1**, 861~870 (1947)
- 23) Mozafar, A.: Enrichment of some B-vitamins in plants with application of organic fertilizers. *Plant Soil*, **167**, 305~311 (1994)
- 24) Mozafar, A. and Oertli, J. J.: Uptake of a microbially produced vitamin (B₁₂) by soybean roots. *ibid.*, **139**, 23~30 (1992)

Rhizobial Production of Vitamin B₁₂ Active Substances and Their Localization in Some Leguminous Plants

Shigekata Yoshida

(Univ. Farm, Sch. Agric., Nagoya Univ.)

The purposes of this investigation are to clarify the production of vitamin B₁₂ active substances by rhizobia and to examine their localization in the plant parts of some legumes as related to their nodulation by the Euglena bioassay method.

The results obtained are as follows.

1. All of the rhizobia tested had the ability to produce B₁₂ active substances. However, no significant correlation existed among the species of rhizobia.

2. The production of active substances markedly increased with the increase of cobalt concentration in the culture medium. The *Rhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum* tested in this experiment required more than 1 mg L⁻¹ of cobalt chloride for the maximum production of B₁₂ active substances. The application of nitrate to rhizobial culture medium slightly enhanced the production of B₁₂ active substances.

3. The larger part of B₁₂ activity in the culture media of *R. meliloti* and *B. japonicum* was found to depend on cobalamin by paper chromatography.

4. A higher concentration of B₁₂ active substances was detected in the bleeding sap of nodulated kidney bean as compared to the non-nodulated one.

5. The concentration of B₁₂ active substances was higher in the underground part than in the aerial part, and the tendency was more clearly observed in nodulated lupin plants than in non-nodulated lupin plants.

6. The greater part of B₁₂ active substances in nodulated plants was present in the nodules of the leguminous species tested in this experiment. The concentration in the nodules was about 10 to 60 times higher than that in the root and about 100 to 700 times higher than that in the aerial parts. However, the concentration in soybean nodules fluctuated largely with the age of the plant.

Key words bioassay, leguminous plant, nodulation, rhizobium, vitamin B₁₂

(Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr., 69, 435-444, 1998)

書 評

地球環境工学シリーズ 4

清らかな水のためのサイエンス

—水質環境学—

水質環境学編集委員会 編著

A 5 判, 207 pp., 3,200 円 (内税・送料学会負担)
農業土木学会 (東京), 1998 年

日本人は昔からきれいな空気と良質な水はいつでも手に入ると考えてきた。しかし、水だけに限っても近年は窒素、リンなどによる河川、湖沼の水質汚濁や硝酸、トリクロエチレンなどによる地下水汚染によりきれいな水が必ずしも自由にならない状況となっている。そしてまた、これらの汚染物質の発生や動態が農業と深く関与していることは周知のとおりである。

本書は地球環境の中でも重要な水について、その水質の科学的知見を網羅したもので、以下のような章構成になっている。

I. 清らかな水のための序章, II. 水質環境の現状, III. 水質の変動現象, IV. 水質調査および水質分析, V. 集水域の水質環境—栄養塩類の挙動—, VI. 水質環境の解析とモデル, VII. 生態系モデルによる水質環境解析, VIII. 広域水質環境をめぐる課題。

内容的には I~IV 章が入門 (基礎) 編で、用語解説から始まって、河川、湖沼、農業用水、地下水、降水の水質実態や採水法、水質分析の実際が容易な文章で解説されている。また、V 章では、畑地や水田における窒素・リンの動態について、負荷量概念を用いて要領よくまとめられている。VI~VIII 章は応用編に当たり、ここでは汚濁物質の流れを解析するためのモデルを提示し、解析例をあげて解説している。著者らはこの基礎と応用という二つのレベルの異なる内容を一冊の本にまとめるのに悪戦苦闘したと書いているが、その苦勞は報われたと言って良いと思う。

本書は水質問題にこれから取り組もうとする人、水質環境についてさらに深く研究しようとする人のいずれの人たちにも非常に参考になる内容を含んでいる。是非一読をお薦めする。(千葉県農業試験場 松丸恒夫)