

フルオログラフィによる根粒菌の水素回収系の判定

池 田 順 一

(東北農業試験場)

Detection of Uptake-hydrogenase Activity of *Bradyrhizobium* by Fluorography.

Jun-ichi IKEDA

(Tohoku National Agricultural Experiment Station)

1 は じ め に

窒素固定は、根粒菌がマメ科植物と共生して起こす反応で、宿主植物への窒素養分の供給に大きな役割を果たしている。しかし、窒素が固定される際に水素が発生し、これによって窒素固定のエネルギーの一部 (25%) が失われる。

ダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) のうち一部の菌株は、水素回収系という酵素系を有し、窒素固定の際発生した水素を酸化して、エネルギーに還元する。これにより、窒素固定の効率が高まり、ダイズの収量が増加することが報告されている³⁾。したがって、宿主植物の収量を向上させるには、水素回収系を持つ菌の選抜が必要である。そのためには、多数の根粒菌株について水素回収系のスクリーニングを行う必要があり、迅速・簡便な判定法が求められている。しかし、水素回収系の判定には、従来法では、長い時間がかかり、また、煩雑であった。筆者は、以前、液体培養した根粒菌の水素回収系の有無を水素の放射性同位元素であるトリチウムの取り込みを指標にして、簡便・迅速に判定する方法を開発した¹⁾。

本研究では、同じ原理を用いて、平板上のコロニーについて判定する方法の開発を試みた。トリチウムの放射線はエネルギーが低く、直接フィルムを感光させるのは難しいため、フルオログラフィという手法を用いた。フルオログラフィとは、放射線を光に変え、それによりフィルムを感光させる手法のことである。ここでは、フルオログラフィによる水素回収系の判定法について報告する。

2 試 験 方 法

(1) 実験装置

実験には、放射性水素ガスの発生装置と捕集装置を用いた。図1に発生装置を示した。これは、水銀をつめた管の上を二重ゴム栓で封をした構造である。原理は、水素化ほう素ナトリウムが酸性条件下で分解し、水素を発生することを利用したものである。ここに、1 mlあたり200MBq (5.4mCi) の放射能を持つ20%の水素化ほう素ナトリウムのアルカリ溶液0.05mlを二重ゴム栓を通して加え、さらに、1規定塩酸0.1mlを加えて放射性水素ガスを発生させた。0.05mlの水素化ほう素ナトリウム溶液から約20mlの水素ガスが発生した。

次に、使用済みの水素ガスの捕集装置を図2に示した。

これは、トリチウムを含む使用済みのガスを吸引して、その中の水素ガスをパラジウム石綿で酸化し、できた水を硫酸で捕集するというものである。この装置の水素捕集の能力をガスクロマトグラフィにより調べたが、パラジウム石綿を通った後の気相からは、水素は検出されなかった。

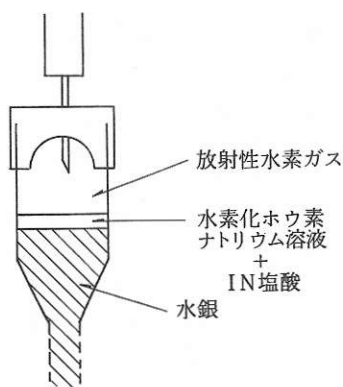


図1 水素発生装置

トリチウムを含む水素化ほう素ナトリウム溶液に、塩酸を加えて、放射性水素ガスを発生させた。発生したガスは二重ゴム栓を通して採取し、実験に用いた。

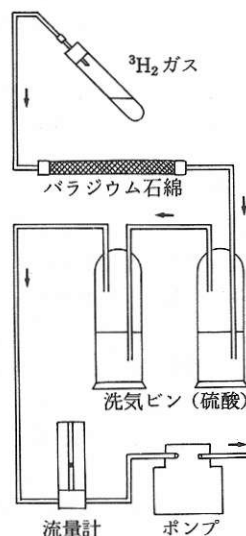


図2 水素発生装置

放射性水素ガスは吸引され、加熱したパラジウム石綿で酸化されて水になった後、硫酸に吸収される。

(2) 実験方法

実験に供試した菌株は、水素回収系を有するA1017と、水素回収系を持たないJ501の2菌株である。A1017は、十勝農協連農産化学研究所より、J501は、茨城大学の南沢博士より分譲を受けた。培地は、水素回収系誘導用の培地を用いた²⁾。2つの菌株を平板上に、白金耳で、図3・上のように菌株の名前となるよう植え付けた。これを1日から3日間培養した後、テドラーバッグという気密性の高い袋に入れ、袋の中の気相を酸素2%、窒素98%に置換した。さらにここへ、放射性水素ガスを40ml注入した。これは、低酸素分圧、水素存在下で、水素回収系が誘導されるためである。これを28℃で3日間培養した。未反応のガスを水素捕集装置で処理した後シャーレを取り出し、これにシンチレーター（放射線により発光する物質）を噴霧した。さらにここにX線フィルムを密着して乗せ、-20℃の冷凍庫内で1週間感光させた。トリチウムが取り込まれた部分ではシンチレーターがトリチウムの放射線により発光し、それによってフィルムが感光する。-20℃に冷凍したのは水になったトリチウムが拡散しないようするためと、フィルムの感度を上げるためである。

3 試験結果及び考察

得られたフィルムを現像したものを、図3・下に示した。下図の黒い部分は、上図の矢印で示した斜線の部分に相当する。このようにA1017の一部で感光がみられたが、他の部分は感光していなかった。また、J501では感光がみられなかった。この方法には、最低10日間とかなり長い実験時間を必要とした。また、水素回収系を持つ菌が必ずしも陽性を示すわけではなかった。感光しないものについて、一部を取って液体シンチレーションカウンターにより測定した結果、トリチウムの取り込みが見られた。フィルムに感光しないのは、取り込み量が少なかったためと考えられた。感度を上げるため、3種類のシンチレーターを試したが、X線フィルム像の改善はみられなかった。この方法をより正確、迅速に行うためには、X線フィルムに代わる、さらに感度の高い検出法が必要と考えられた。

4 ま と め

トリチウムを用いた、根粒菌の水素回収系の判定法の開

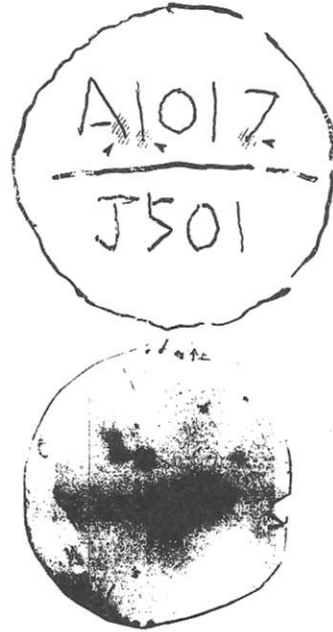


図3 上：植菌の状態 A1017（活性あり）とJ501（活性なし）を画線培養した。矢印は感光した部分を示す。

下：X線フィルム像。A1017の一部で感光している。

発を行った。トリチウムの検出にはフルオログラフィを用いた。しかし、水素回収系を有する菌株が、常に陽性を示すとは限らなかった。また測定には、長時間を必要とした。この方法をより確実なものにするためには、感度の高い検出法を検討することが必要であると考えられた。

引用文献

- 1) 池田 順一. 1992. トリチウムを用いた水素回収系の判定法. 土肥誌 63: 352-354.
- 2) Maier, R. J.; Campbell, N. E. R.; Hanus, F. J.; Simpson, F. B.; Russell S. A.; Evans H. J. 1978. Expression of hydrogenase activity in free-living *Rhizobium japonicum*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75: 3258-3267
- 3) 南沢 究, 有馬 泰紘, 田中 裕之, 熊沢喜久雄. 1985. 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