

B-6. 陸域生態系の二酸化炭素動態の評価と予測モデリングに関する研究

(3) 土壤生物機能のモデル化と定量的評価

③ 固体有機炭素の分解に関わる土壤セルロース分解系の役割の定量的評価

研究代表者 農業環境技術研究所 地球環境研究チーム 袴田共之

農林水産省 農業環境技術研究所 環境資源部

土壤管理科土壤上席室

早野恒一 (現所属 静岡大学農学部)

高橋義明

土壤化学研究室

上村順子

旧土壤有機物研究室

竹中 眞 (現所属 北海道農試)

平成8～10年度予算額 7,546千円

(平成10年度予算額 2,501千円)

【要旨】地球温暖化が土壤有機物分解の微生物性におよぼす影響を予測するために、本研究では国内の北緯25度から45度にかけてのさまざまな農耕地生態系の土壤について、セルラーゼ活性の温度に関する特性等を調べ、非腐植性有機物(セルロース)の分解におよぼす温暖化の影響の予測を試みた。3年間の成績を解析した結果は以下のとおり。土壤のセルラーゼ活性の最適温度、 $f(y)$ は試料採取地域の年平均気温、 $y$ と相関( $r=0.602^{**}$ )し、両者の間には $f(y)=0.21y+58.3$ の一次回帰の関係があった。土壤セルラーゼの比活性をバイオマス当たりの活性に近似する指標として用いると、30℃で測定した土壤セルラーゼの比活性は年平均気温と相関しなかったが、試料採取地域の年平均気温における比活性は年平均気温と相関した。土壤のセルラーゼ活性の温度感受性の尺度として測定した $Q_{10}$ は年平均気温、土壤pHおよびC含量等とは相関しなかったが測定温度の影響を受け、低温ほど大きな値をとる傾向があった。年平均気温と土壤のCおよびN含量との間の相関係数はそれぞれ、-0.314および-0.389\*であったが、非黒ボク土に限定するとCは-0.712\*\*\*、Nは-0.634\*\*でそれぞれ有意に負の相関性を示した。

【キーワード】耕地生態系、土壤生物機能、セルロース分解、土壤セルラーゼ、土壤有機物

1. 序

植物は光合成作用によって二酸化炭素中の炭素をブドウ糖のポリマーに変換する。その中の $\alpha$ -結合のポリマーは人類の食料として寄与するが、 $\beta$ -結合のポリマー(セルロース)は植物の形態の保持に寄与している。地球上でのセルロースの年間の生産量は約 $10^{11}$ トンと試算されており、土壤生態系におけるセルロース分解酵素系は植物残体が腐植化していくうえで欠くことのできない過程である。セルロースCの無機化はセルロースからグルコースへの消化過程とグルコースから二酸化炭素への酸化過程によって成り立っているが、通常、酸化過程は消化過程よりも速度定数が大きいため消化過程が律速段階とみられている。セルロース分解酵素は植物残体中のセルロースCが二酸化炭素として大気中に放出される代謝過程の初段階で働く点で鍵を握る酵素である。地球温暖化による有機物の分解促進の懸念される折り、土壤中のセルロース分解酵素系の温度に関する特性等については早急に研究を実施することが必要である。

## 2. 研究目的

地球温暖化が混合生物系としての土壌微生物相やその作用に影響をおよぼすことが懸念されているが、その実態に関する情報は乏しい。セルロースは植物体炭素の主成分の一つであり、年間の生産量（約  $10^{11}$  トン）に見合う量のセルロースが植物遺体として土壌を含む様々な生態系に供給されている。セルラーゼはセルロースの分解を触媒する酵素で土壌中にも普遍的に存在し、微生物によって作られる。生物は一般に環境に適応するが、土壌のセルロース分解菌にも温度環境に適応した結果として、温度特性に関わる地域的な微生物フロラがし、それが酵素活性に反映されることは十分に予想されることである。

セルロースの分解は天然セルロースを分解する C1 酵素とセルロース断片を分解する C<sub>x</sub> 酵素の存在が指摘されてきたが、一方では、両者の分解能を示す酵素の存在も指摘されている<sup>1)</sup>。土壌セルラーゼ活性の測定には従来、カルボキシメチルセルロースが広く用いられ、生じた還元糖をソモギー・ネルソン法によって定量して評価されてきた<sup>2)</sup>。しかし、分析試薬の一つであるネルソン試薬には砒素が含まれており、最近では利用しずらくなってきた。土壌セルラーゼ活性測定用の基質として p-ニトロフェニル-β-セロビオシドの利用が簡便法として提案されている<sup>3)</sup>。しかし、この基質によって検出される土壌セルラーゼの実体が未だよく解明されていない。そこで本研究ではまず、カルボキシメチルセルロースと p-ニトロフェニル-β-セロビオシドで検出される土壌セルラーゼの異同を比較検討し、次いで、p-ニトロフェニル-β-セロビオシドを基質として北緯 25 度から 45 度にかけてのさまざまな農耕地生態系の土壌についてセルラーゼの温度に関する特性を調べ、年平均気温との関連で得られた結果を解析した。

## 3. 研究方法

国内の北緯 25 度から 45 度にかけてさまざまな農耕地生態系の表層から夏季に土壌試料を採取した（表 1）。採取地点と試料は以下の通り：石垣（暗赤色土草地、暗赤色土サトウキビ畑、黄色土草地、黄色土サトウキビ畑、黄色土水田）、徳之島（暗赤色土草地、暗赤色土サトウキビ畑、黄色土草地、黄色土サトウキビ畑、灰色低地土水田）、鹿児島（黒ボク土草地、黒ボク土甘藷畑、黒ボク土茶園、シラス土水田）、筑後（灰色低地土小麦畑、灰色低地土無機連用水田、灰色低地土有機連用水田）、茨城（灰色低地土水田、黒ボク土水田）、札幌（黒色火山性土北野水田、灰色低地土長沼水田、黒ボク土草地、黒ボク土トウモロコシ畑）、浜頓別（灰色台地土草地、褐色森林土草地、褐色森林土トウモロコシ畑、豊富褐色火山性土草地、美深灰色低地土水田）。土壌のセルラーゼ活性の測定は p-ニトロフェニル-β-セロビオシドを基質とする金沢(1988)の方法によった<sup>3)</sup>。不溶性基質に対するセルラーゼ活性の性質を調べるために、一部の土壌試料については土壌からリン酸緩衝液（pH7）によりセルラーゼ酵素を抽出して基質特異性や分子量サイズの検討に供した<sup>4)</sup>。セルラーゼ活性の最適温度はアレニウスプロットの交点から求めた（図 1）。一部の土壌についてはセルラーゼ活性の局在性を調べるために、湿潤土試料を 2mm メッシュのふるいにかかけ、上に残った画分から有機性の細片を手で選別し、それぞれの画分のセルラーゼ活性および微生物密度を計測した<sup>5)</sup>。

#### 4. 実験結果および考察

黒ボク土茶園および暗赤色土草地の試料では土壌セルラーゼ活性の最適 pH は 4.5～5.0 にあった (図 2)。したがって以後の活性の測定には pH5.0 の酢酸緩衝液を用いた。

石垣黄色土サトウキビ畑と徳之島暗赤色土草地の試料について土壌セルラーゼの局在性を調べた。土壌中で有機性細片は乾重で全体の 1%内外にすぎないが、セルラーゼ活性の 15～30%がこの画分に局在していた (図 3)。また、2mm 以下の画分中のカルボキシメチルセルロース分解菌数は石垣黄色土サトウキビ畑および徳之島暗赤色土草地で、それぞれ、 $3.5 \times 10^5$  cfu/g および  $3.9 \times 10^5$  cfu/g 乾重であり、有機性細片では、それぞれ、 $5.1 \times 10^6$  cfu/g および  $1.2 \times 10^6$  cfu/g 乾重と 1 オーダー高かった。このことは有機性細片がセルラーゼ活性の重要な局在部位であることを示した。有機性細片はリターや残根等から成り立っており、セルロースはそれらの主成分と判断される。それらはセルロース分解菌の主要な生息部位であったと推測される。しかし全体としては 2mm 以下の画分が最も活性の存在割合が高かった (図 3)、以後の実験は 2mm 以下の画分を用いて行った。

黒ボク土茶園土壌と暗赤色土草地土壌の 2mm 以下の画分からセルラーゼを抽出して、一連のセルラーゼ基質に対する分解性を調べた。いずれの土壌抽出液の p-ニトロフェニル- $\beta$ -セロビオシド分解性も基質濃度が 0.2mM よりも高くなると反応を阻害する傾向場みられた (図 4)。p-ニトロフェニル- $\beta$ -セロビオシドに対するミカエリス定数 ( $K_m$ ) は黒ボク土茶園土壌と暗赤色土草地土壌で、それぞれ、 $0.047 \pm 0.016$  M および  $0.105 \pm 0.023$  mM であった。土壌セルラーゼに対する一連の基質の分解性を最大速度 ( $V_{max}$ ) で比較した (図 5)。最も分解性の高い基質はカルボキシメチルセルロースで p-ニトロフェニル- $\beta$ -セロビオシドがこれに次いだ。いずれの抽出液セルラーゼも高分子基質を分解した。可溶性基質に比べて不溶性基質の分解性は低く、また、ミカエリス定数も大きかった。

土壌抽出液セルラーゼは固体高分子基質のアビセルも可溶性高分子基質のカルボキシメチルセルロースも低分子可溶性基質の p-ニトロフェニル- $\beta$ -セロビオシドも分解したが、同一のセルラーゼが分解しているかどうかを明らかにするために、阻害試験を実施した。すなわち、セルラーゼ抽出液と p-ニトロフェニル- $\beta$ -セロビオシドの反応系にアビセルやカルボキシメチルセルロースを添加して p-ニトロフェニル- $\beta$ -セロビオシドの遊離反応に阻害があるか否かを調べた。実験の結果はアビセルは p-ニトロフェニル- $\beta$ -セロビオシドの分解を阻害するが、カルボキシメチルセルロースは阻害しないことを示した (図 6)。このことは p-ニトロフェニル- $\beta$ -セロビオシド分解性セルラーゼにカルボキシメチルセルロースは相互作用しないことを示唆している。アビセルによる p-ニトロフェニル- $\beta$ -セロビオシド分解性セルラーゼ活性の阻害は拮抗モードであった。このことはアビセルは p-ニトロフェニル- $\beta$ -セロビオシド分解性セルラーゼによっても分解されうることを示している (図 7)。

カルボキシメチルセルロースを分解するセルラーゼと p-ニトロフェニル- $\beta$ -セロビオシドを分解するセルラーゼの分子量を評価するためにゲル浸透クロマトグラフィーを行った (図 8)。カルボキシメチルセルロースを基質としてセルラーゼ活性を検出すると 30-25kDa 当たりに主なピークがみられた (図 8-a)。p-ニトロフェニル- $\beta$ -セロビオシドを基質として活性を追跡すると素通り画分に検出された (図 8-b)。アビセルの場

合は主として素通り画分に検出され、一部はカルボキシメチルセルロースを分解するセルラーゼと類似な画分に検出された(図8-c)。これらの結果は p-ニトロフェニル-β-セロビオシドで検出されるセルラーゼの一部はカルボキシメチルセルロースを分解するセルラーゼとは異なり、アビセルを分解するセルラーゼと同一でありうることを示唆した。

供試土壌の C・N 含量、pH およびセルロース分解に関わる諸特性を分析し、年平均気温や昨年データのデータを含めた 26 点の土壌の諸特性間の相関を表 2 に示した。

30°C で測定した土壌セルラーゼ活性は年平均気温と有意に負相関 ( $r=-0.619^{***}$ ) し(図 9) たが、試料採取地点の気温で評価した土壌セルラーゼ活性とは相関しなかった ( $r=0.279$ )。年平均気温と土壌の C および N 含量との間の相関係数はそれぞれ、-0.314 および -0.389\* であったが、非黒ボク土 19 点に限定すると C は  $0.712^{***}$ 、N は  $0.634^{**}$  でそれぞれ有意に負の相関性を示した(図 10, 11)。このことは供試土壌では高温環境下の土壌が低温環境下の土壌よりも有機物含量が低い傾向にあることを示している。このような傾向は森林土壌ですでに明らかにされているが<sup>6)</sup>、日本の北緯 25~45 度にかけての耕地土壌においても類似の傾向のあることが本研究によって確認できた。日本列島内で温暖化が低緯度地域からの緩やかな北上をもたらすとすれば、図 10 の回帰直線式、 $f(x)=-0.12x + 4.0$  から環境温度が 1°C 上昇すると土壌有機物 C 含量は 0.12% 減少することが予測される。

本研究では土壌セルラーゼの比活性を土壌の C 含量当たりの酵素活性で表示したが、ここではこの比活性をバイオマス当たりの活性に近似する指標として用いた。年平均気温は 30°C で測定した土壌セルラーゼの比活性と相関しなかったが、試料採取地点の気温で評価した土壌セルラーゼの比活性 ( $r=-0.680^{***}$ ) は年平均気温と相関した(図 12)。年平均気温が 30°C で測定した土壌セルラーゼ活性と有意に負相関 ( $r=-0.619^{***}$ ) した(図 9) はセルロース分解菌を含むバイオマス存在量が高温下では低いためとみられる。年平均気温が 30°C で測定した土壌セルラーゼの比活性と相関しなかったことはセルロース分解菌を含む単位バイオマス当たりの活性には温度環境は影響しないことを意味している。現環境温度で評価した土壌セルラーゼの比活性 ( $r=-0.680^{***}$ ) が年平均気温と相関したことは、単位セルロース分解菌当たりの活動度に地域性があるのは環境温度が強く影響しているためであることを示している。

土壌セルラーゼ活性の最適温度は年平均気温 ( $r=0.602^{**}$ ) (図 13) と相関した。このことは土壌セルラーゼにも温度特性に関する地域性のあることを示している。両者の間には  $f(x)=0.25x+57.8$  の一次回帰の関係があった。この回帰式から環境温度が 1°C 上昇するとセルラーゼ活性の最適温度は 0.25°C すると予測された。しかしながら、採取地点の気温が同じでも試料間で変動は大きい場合や、年平均気温 8.3°C の札幌でも最適温度が 66.7°C を示す事例や、年平均気温 23.8°C の石垣でも 63.7°C を示す事例等があった。環境中の微生物には好熱菌 (Thermophile) や好冷菌 (Psychrophile) の存在が好中温菌 (Mesophile) とともに知られている<sup>7)</sup>。しかしながら、得られた結果によれば、年平均気温が低い温度環境ならば、存在する微生物の大部分が好冷菌で構成されるという関係にはなかったのであろう。

温度感受性の尺度としての  $Q_{10}$  は年平均気温(図 14) や他の諸特性とは相関しなかったが、測定温度の影響を受け、低温程大きな値をとる傾向があった(図 15)。

このことは高緯度地域ではセルロース分解作用が相対的に温暖化の影響を大きく受けうることを示唆した。

## 5. 引用文献

- 1)岡田源太郎：セルラーゼ. 化学と生物, 23, 14-23 (1985)
- 2)Roberge M.R.:Methodology of soil enzyme measurment and extraction. Soil Enzymes, ed by Burns R. G. Academic Press, 341-370(1978)
- 3) 金沢晋二郎：土壌中のセルラーゼ活性の敏速測定法. 日土肥講要, 34, 57(1988)
- 4) 早野恒一：土壌酵素活性の測定. 「新編土壌微生物実験法」(土壌微生物研究会編), 養賢堂, p366-376 (1992)
- 5) 新田恒雄：土壌糸状菌の計数, 分離, 同定. 「新編土壌微生物実験法」(土壌微生物研究会編), 養賢堂, p62-73 (1992)
- 6)岩田進午：土のはなし, 科学全書 17, 大月書店, (1985)
- 7)Ingraham, J. L.: Temperature relationships. The Bacteria, vol.4, ed.by Gunsalus and Atanier , Academic Press, 265-296(1962 )

## [研究発表の状況]

### 学会講演発表

早野恒一・上村順子・浅野健治：九州・沖縄地域におけるセルラーゼ活性の温度に関連した特性について.日土肥講要, 43, 33 (1997)

早野恒一・上村順子・浅野健治：カルボキシメチルセルロースおよび p-ニトロフェニル- $\beta$ -セロビオシドで測定される土壌セルラーゼ活性の比較. 日土肥講要, 44, 292(1998)

竹中 真・早野恒一：土壌有機物の分解特性の二次反応速度式による評価. 日土肥講要, 44, 34 (1998)

Hayano, K., Kamimura, Y. and Asano, K.: Quantitative estimation of cellulolytic enzyme system in soil and its relation to global climate warming. Summaries of 16th World Congress of Soil Science, 2 501(1998 ).

Kamimura, Y. and Hayano, K.: The property of protease extracted from tea field soil, Summaries of 16th World Congress of Soil Science, 2 750(1998 ).

## 論文

Asakawa, S., Akagawa-Matsushita, M., Koga, Y. and Hayano, K.: Communities of methanogenic bacteria in paddy field soils with long-term application of organic matter. Soil Biology and Biochemistry, 30 299-303 (1998)

表1. 供試土壌の採取地点および性質

採取地点	年平均気温	C (%)	N (%)	pH	セルラーゼ活性
石垣, 暗赤色土草地	23.8	3.92	0.346	7.13	3.1
石垣, 黄色土サトウキビ畑		0.62	0.058	6.36	0.38
石垣, 暗赤色土サトウキビ		0.33	0.025	4.71	0.75
石垣, 黄色土草地		0.63	0.051	4.75	0.67
石垣, 黄色土水田		0.69	0.076	5.65	0.41
徳之島, 暗赤色土サトウキビ	21.2	0.97	0.117	5.97	1.13
徳之島, 暗赤色土草地		1.64	0.185	4.8	1.39
徳之島, 黄色土サトウキビ		0.345	0.066	4.71	0.63
徳之島, 黄色土草地		0.956	0.084	4.61	1.79
徳之島, 灰色低地土水田		1.54	0.14	5.3	1.11
鹿児島, シラス水田	17.3	1.15	0.104	5.35	0.71
鹿児島, 黒ボク土草地		6.98	0.349	5.58	1.04
鹿児島, 黒ボク土甘藷畑		11.03	0.467	5.51	0.71
鹿児島, 黒ボク土茶園		9.35	0.665	3.4	3.58
筑後, 灰色低地土水田 (無)	16	2.08	0.16	5.8	1.6
筑後, 灰色低地土水田 (有)		2.19	0.171	5.77	2.17
筑後, 灰色低地土水田 (小)		3.43	0.209	5.73	1.41
茨城, 黒ボク土, 水田	13.3	2.3	0.21	5.8	1.3
灰色低地土, 水田		2.4	0.26	6.6	1.97
札幌黒色火山性土水田 (北野)	8.3	4.2	0.274		2.98
札幌灰色低地土水田 (長沼)		2.12	0.156	5.9	1.97
札幌黒ボク土トウモロコシ畑		3.78	0.262	4.82	3.21
札幌黒ボク土草地		4.05	0.313	5.1	5.66
浜頓別灰色台地土草地	5.3	3.69	0.269	5.62	4.69
浜頓別褐色森林土草地		3.62	0.263	5.45	3.03
浜頓褐色森林土トウモロコシ畑		3.29	0.237	6.72	1.76
豊富草褐色火山性土草地		4.33	0.299	5.5	2.8
美深灰色低地土水田		3.35	0.308	5.62	2.9

表2. 土壌の諸特性間の相関

相関係数	年平均 気温	C (%)	N (%)	pH	活性(1)	比活性(1)	活性(2)	比活性(2)	最適温度	Q10
年平均気温	1	-0.307	-0.391*	-0.151	-0.612***	0.175	0.172	0.672***	0.543**	-0.105
C (%)		1	0.929***	-0.125	0.324	-0.596**	0.244	-0.576**	-0.36	0.029
N (%)			1	-0.156	0.536**	-0.532**	-0.1	0.26	-0.326	-0.016
pH				1	-0.095	-0.302	-0.35	-0.274	-0.033	0.05
活性(1)					1	0.116	0.487**	-0.356	-0.09	0.103
比活性(1)						1	-0.114	0.767***	0.399*	0.031
活性(2)							1	0.145	0.430*	-0.136
比活性(2)								1	0.505**	-0.138
最適温度									1	0.186
Q10										1

活性(1) : 30°Cにおける活性 ; 比活性(1) : 30°Cにおける活性 / C % ;  
 活性(2) : 現環境温度における活性 ; 比活性(2) : 現環境温度における  
 活性 / C %

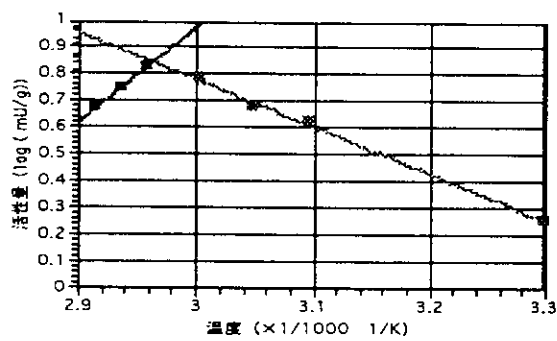


図1 p-ニトロフェニル-β-セロビオシド分解性活性に及ぼす温度の影響

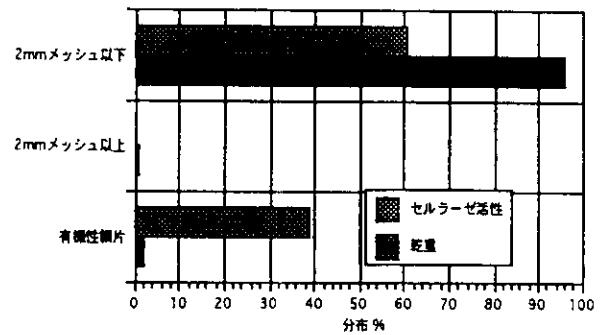


図3 土壌画分におけるセルラーゼ活性の局在性

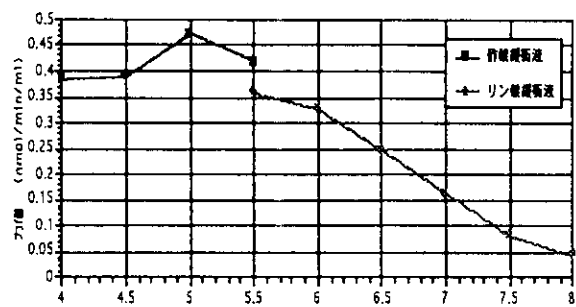
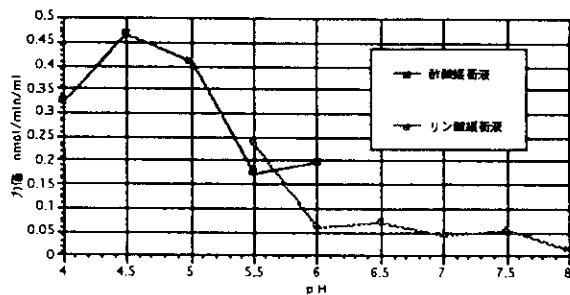


図2 鹿児島黒ボク土茶園 (左図) および石垣暗赤色土草地 (右図) のセルラーゼ活性-pH曲線

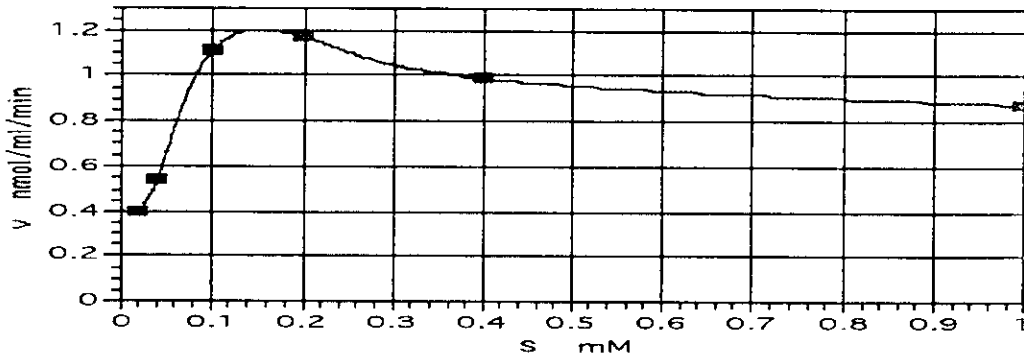


図4. 土壌抽出液のセルラーゼ活性におよぼす p-ニトロフェニル-β-セロビオシド濃度の影響

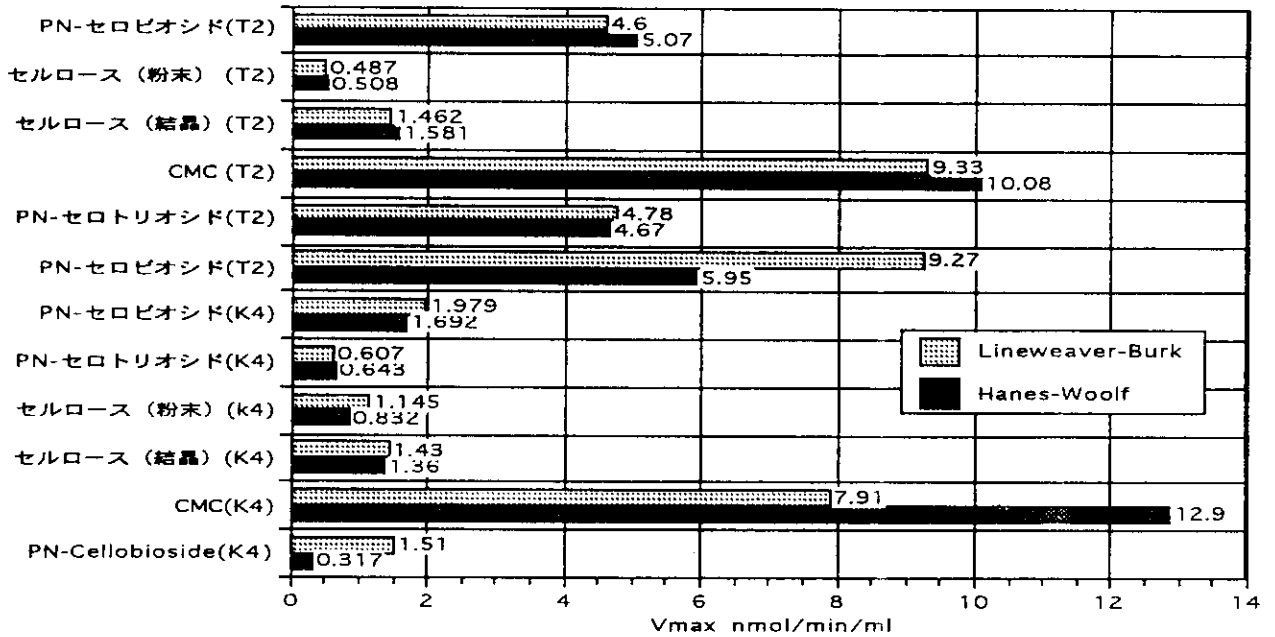


図5. 黒ボク土茶園の土壌抽出液による一連のセルラーゼ基質の分解性 (Vmax 値による比較)

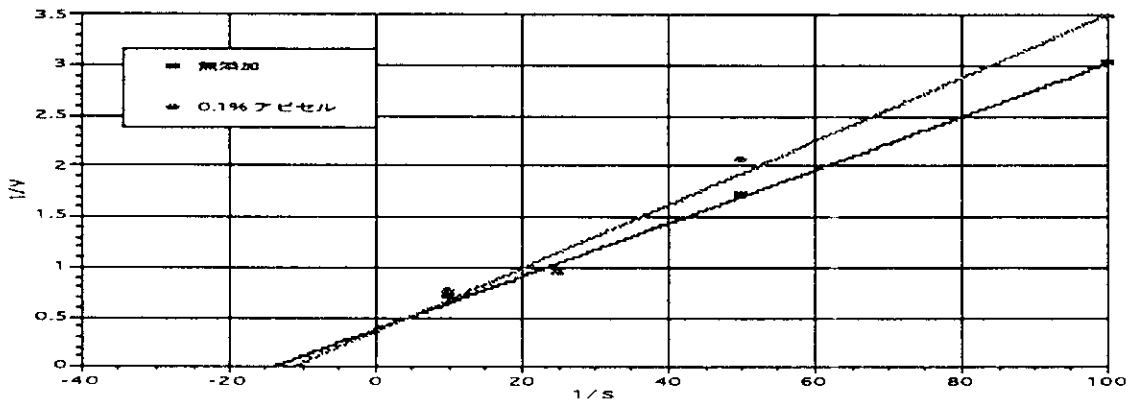


図7. 鹿児島茶園土壌抽出液セルラーゼによる 2mMp-ニトロフェニルセロビオシド分解に対するアビセルセルロースの阻害



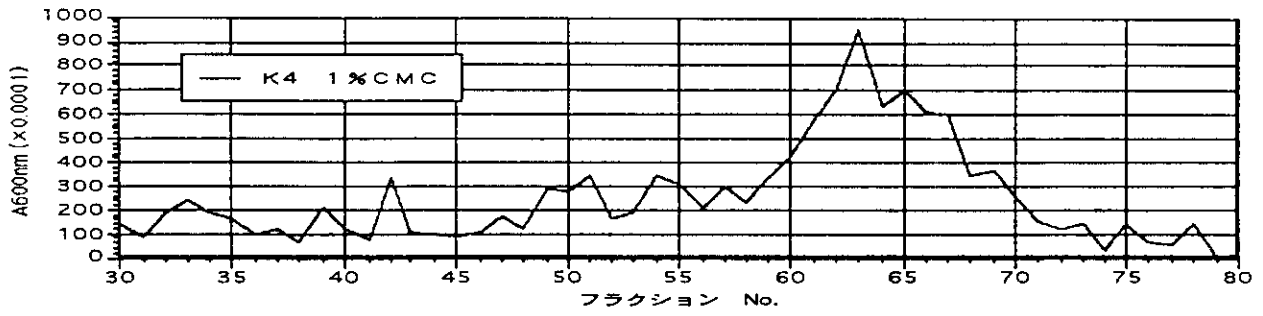


図 8-a. 鹿児島茶園土壌抽出液 CMC セルラーゼの G-100 ゲルクロマトパターン

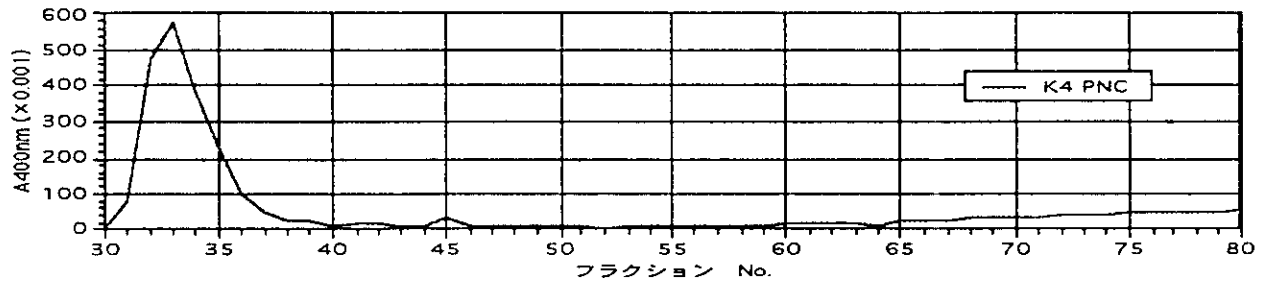


図 8-b. 鹿児島茶園土壌抽出液 PNC セルラーゼのゲルクロマトパターン

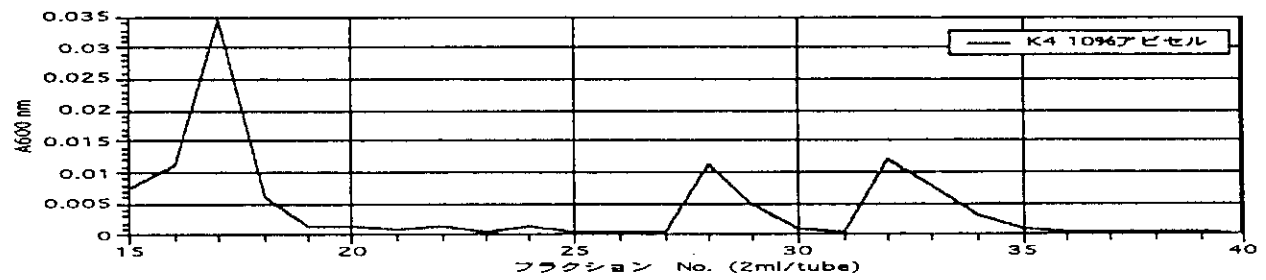


図 8-c. 鹿児島茶園土壌抽出液アビセルセルラーゼのゲルクロマトパターン

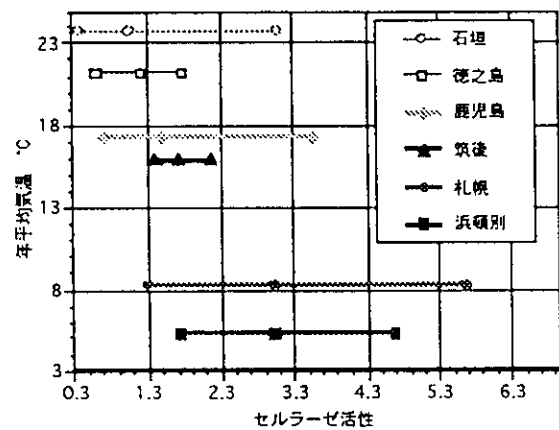


図 9. 土壌セルラーゼ活性と年平均気温との関係

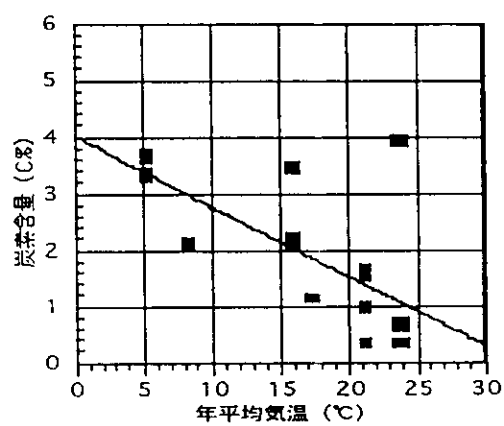


図 10. 年平均気温と土壌C含量との相関性 (非黒ボク土)

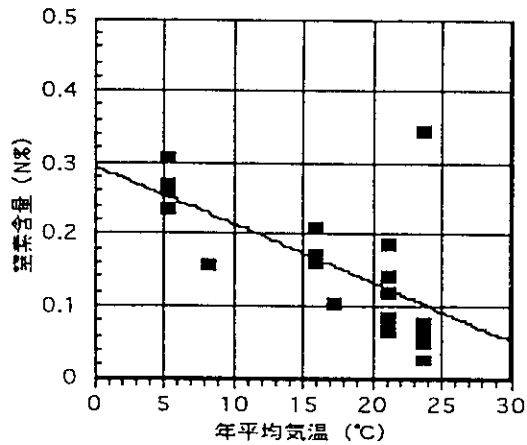


図 11. 年平均気温と土壌の N 含量との相関性非黒ボク土

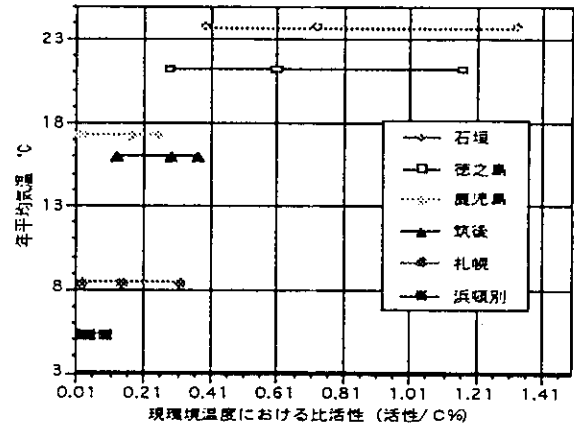


図 12. 年平均気温と現環境温度における土壌セルラーゼの比活性との関係  
左右の印は上限および下限、中央は平均値

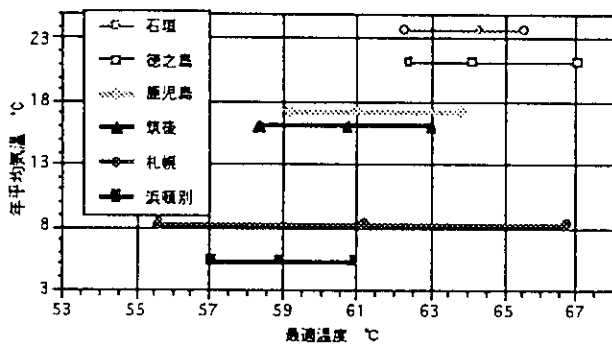


図 13. 土壌セルラーゼの最適温度（範囲および平均値）と年平均気温

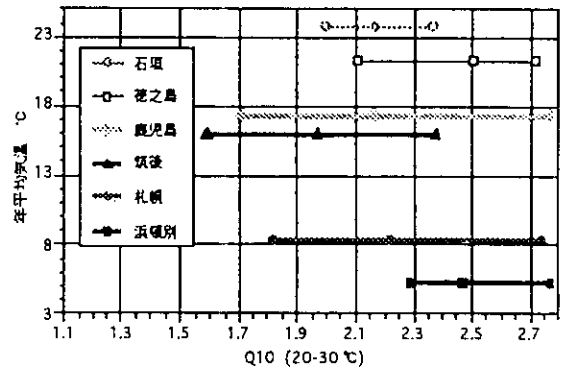


図 14. 土壌セルラーゼの Q10（範囲および平均値）と年平均気温

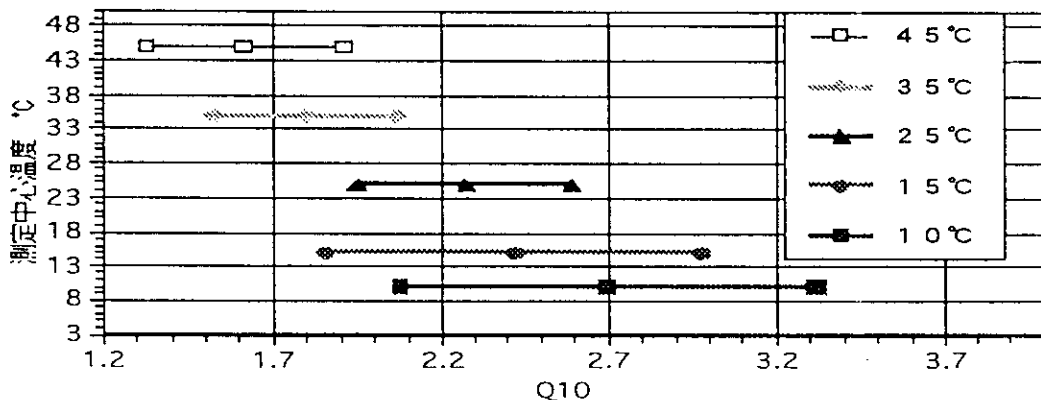


図 15. 土壌セルラーゼの Q10 と測定温度との関係