

土壌に存在する糖質分解酵素の種類とその起源

岩本 徹¹・垣原登志子²・江崎次夫¹・全 権雨³

Type and origin of carbohydrate-degrading enzymes in the soil

Tohru Iwamoto, Toshiko Kakiharai¹, Tsugio Ezaki and Kun-Woo Chun²

Abstract: Since it is made to be the index which clarifies biological activity or metabolism activity of the general soil, type and quantity of the carbohydrate-degrading enzymes were measured on several organisms and the soil. The high and active β -*N*-acetylglucosaminidase was included for mold, mushroom, cogongrass, Japanese black pine seed and root black pine. In addition, the high activities of the enzyme also existed in the soil in which cogongrass and black pine grew. Therefore, β -*N*-acetylglucosaminidase existing in the soil is considered with the enzyme in which mold, mushrooms or plants produce intermingles. Then, biological activity and metabolism activity seem to be generally high for the soil of which this enzymatic activity is high. In the growth soil of cogongrass and black pine, the principal enzyme was the β -glucosidase, and the especially high value in the enzyme except for the β -*N*-acetylglucosaminidase was shown. This enzyme also existed for the myceria of *Aspergillus* and fruit body of mushroom. Because the β -glucosidase was few for the root of the cogongrass and black pine the β -glucosidase of the soil in which cogongrass and black pine, grew derive from other source. Therefore, there is the high possibility that the mold which lives in the soil accumulates β -glucosidase in this soil.

1 はじめに

森林土壌には植物、昆虫あるいは微生物の遺体など、多様な生物の遺体とそれを分解する微生物が存在し、その結果、土壌にはさまざまな加水分解酵素が蓄積し、土壌の物質代謝を活発なものとしている^{10, 15}。森林土壌の大きな特徴は水田や畑地と異なり、原形をとどめる生物遺体が多く、遺体を分解する酵素の種類も多いことである。

森林土壌に存在する高分子物質はそれぞれに特異性を持つ酵素によって分解され、水溶性となり、生物体に取り込まれ、その生命の活動に必要なエネルギー源あるいは体構成成分の原料として利用される。そのため、酵素の基質特異性という性質を利用すると、土壌の微生物の活性測定では解明しえない土壌有機物の各構成成分ごとの分解速度が明らかになり、土壌の代謝活性が推定できる可能性がある。

たとえば、セルラーゼや β -グルコシダーゼを測定してセルロース量を、プロテアーゼを測定してタンパク質量を推察できるという報告¹⁶や、土壌酵素の α -グルコシダーゼ活性を測定すれば、その土壌の微生物活性が推定できるという報告⁴もある。

森林の植物を構成する糖質にはセルロース、ヘミセルロース、デンプンがあり、昆虫の甲殻を構成する糖質にはキチンがあり、これらの高分子物質は遺体の蓄積として森林土壌に存在している¹⁰。これらの糖質を分解する酵素は植物、動物あるいは微生物によって、基質の量に応じて生産され、結果的に土壌に蓄積することになる。そのため、これらの土壌酵素の種類と量を測定することにより、土壌の生物学的特徴を解明できる可能性がある。

このような考えのもとに、これらの糖質を分解する酵素を微生物、植物およびそれが関係する土壌について分析して土壌酵素に対する貢献度を調査し、最終的には、森林土

壌の代謝活性を調査することを目的として本研究を行なった。

2 実験材料と方法

2.1 材料

試料土壌はクロマツが生育しているポットとチガヤが生育している野原から採取した。地表から10~15cm深の土壌を採取し、これを径2mmのふるいにかけて試料とした。キノコは市販のものを使用し、クロマツ種子は松山市の北東部の海岸林で採取した。クロマツの根はポットで生育させた2年生の苗木から採り、チガヤの根は野原のチガヤから採取した。

2.2 グリコシダーゼ活性の測定

選択した酵素は α 、 β -ガラクトシダーゼ、 α 、 β -グルコシダーゼ、 α 、 β -マンノシダーゼおよび β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼであり、これに対応する p -ニトロフェニル誘導体を基質として活性を測定し比較した。これらの酵素をまとめてあらわすときにはグリコシダーゼという。

アスペルギルスとストレプトミセスのグリコシダーゼ活性は、それぞれの菌株の培養液を用いて測定した²。キノコ子実体、クロマツ種子、クロマツの根およびチガヤの根の酵素活性は試料の10倍量の0.05M, pH6.0, リン酸緩衝液(標準緩衝液)で抽出した抽出液を用いて測定した。培養液あるいは抽出液0.5ml, 緩衝液0.5mlおよび1mM p -ニトロフェニルグリコシド溶液1.0mlからなる反応液を40°Cで1時間反応させた後、0.1M炭酸ナトリウム溶液3.0mlを加え、遊離した p -ニトロフェノールを430nmで比色定量した。

土壌の酵素活性は土壌試料0.2gを2.0mlの1mM p -ニトロフェニルグリコシド溶液にけん濁して、40°Cで1時間反応させた後、0.1M炭酸ナトリウム溶液3.0mlを加えて濾過しその濾液を比色して求めた。

酵素活性は抽出液の場合は1mlの酵素により1時間に遊離した p -ニトロフェノール1nmolを1ユニットとし、土壌の酵素活性は1g試料が1時間に遊離した p -ニトロフェノール量1nmolをユニットとして表示した。

¹愛媛大学農学部教授, Professor, Faculty of Agriculture, Ehime University, 3-5-7 Tarumi, Matsuyama-shi, Ehime, 790-8566 Japan

²愛媛大学農学部, Faculty of Agriculture, Ehime University, 3-5-7 Tarumi, Matsuyama-shi, Ehime, 790-8566 Japan

³江原大学校 山林科学 大学教授, Professor, College of Forest Science, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701 Korea

3 実験結果

森林土壌に含まれる糖質には、デンプンやセルロースなどのグルコースを含む多糖、ガラクトースあるいはマンノースを含むヘミセルロースおよびN-アセチルグルコサミンを含むキチン関連糖があり、これを分解する酵素はガラクトシダーゼ (Galaseと略)、グルコシダーゼ (Glcase)、マンノシダーゼ (Manase) あるいは β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (GlcNAcase) である。

これらの酵素が存在するということは、その酵素に対する基質がそこに存在するということである⁹⁾。そこで、これらの酵素の種類と量を酵素の起源と考えられる糸状菌、キノコ、チガヤ、クロマツ種子およびクロマツの根について測定し、それに関連する土壌の酵素と比較して、土壌酵素の起源とその役割あるいは基質量などを推察した。

3.1 糸状菌が生産するグリコシダーゼ

森林土壌の分解酵素を生産する微生物として糸状菌があげられるので⁹⁾、糸状菌としてアスペルギルス属とストレプトミセス属の1株を選択し、それぞれの株が生産するグリコシダーゼの種類と活性を測定した。

図1と2に示したように、アスペルギルス株は β -N-アセチルグルコサミニダーゼに加えて、 α -ガラクトシダーゼと β -グルコシダーゼを生産した。

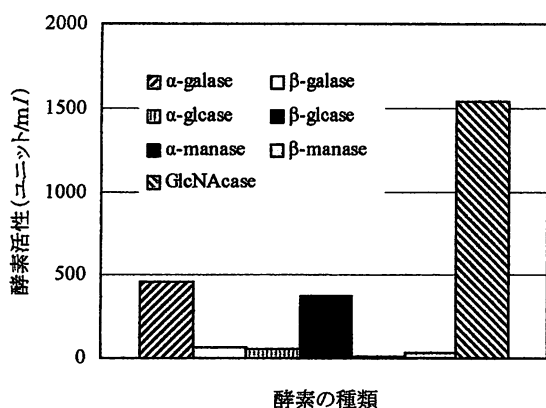


図1: *Aspergillus* のグリコシダーゼ活性

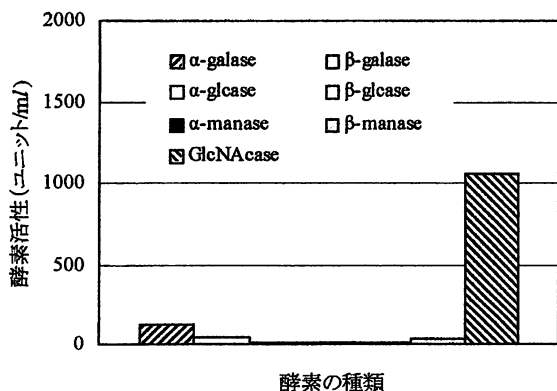


図2: *Streptomyces* のグリコシダーゼ活性

一方、ストレプトミセス株は β -N-アセチルグルコサミニダーゼを主に生産し、その他のグリコシダーゼをほとんど生産しなかった。アスペルギルスの方がストレプトミセスよりも多くの分解酵素を生産することが明らかになった。

3.2 キノコの子実体に存在するグリコシダーゼ

キノコは森林で生育するカビの仲間であり、子実体を形成する前の菌糸は土壌に張り巡らせている。従ってキノコが生産する酵素も土壌酵素の一部として測定に関わってくる可能性がある。そこで、天然のヒラタケを採取し、その菌糸に存在するグリコシダーゼの種類と活性を測定した。

ヒラタケの子実体には高い活性の β -N-アセチルグルコサミニダーゼと β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性の約1/2と1/3程度の活性をもつ β -グルコシダーゼと β -マンノシダーゼが認められた (図3)

キノコとアスペルギルスの生産するグリコシダーゼを較べると β -N-アセチルグルコサミニダーゼと β -グルコシターゼが共通して生産される。次に、キノコにおいて高い値を示した β -N-アセチルグルコサミニダーゼがキノコに普遍的なものかどうかを調査した。

図4に示したように、いずれのキノコも本酵素を生産することが明らかとなり、キノコが土壌に接触するような条件では、キノコの β -N-アセチルグルコサミニダーゼが土壌の β -N-アセチルグルコサミニダーゼに寄与している可能性がある。ところで、本来の実験とは異なるが、この酵素が必要となった場合、キノコは簡単に手に入る原料であり、調製の簡単な酵素源になることも分かった。

図1から図4に示したように、糸状菌やキノコの酵素のグリコシターゼ活性は試料ごとに、かなりばらつきがあり、生産する酵素の必要性に差があることが推察されるが、その中で、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼはすべての試料で生産が認められ、活性も定量した分解酵素の中ではもっとも高いという結果が得られた。糸状菌もキノコも本酵素の基質となる物質を細胞壁に含んでいるので、細胞壁の新生に本酵素を必要とすることは当然であるが、それに加えて、カビと放線菌は環境に存在するキチン誘導体を消化・分解するために本酵素を生産すると考えられる。

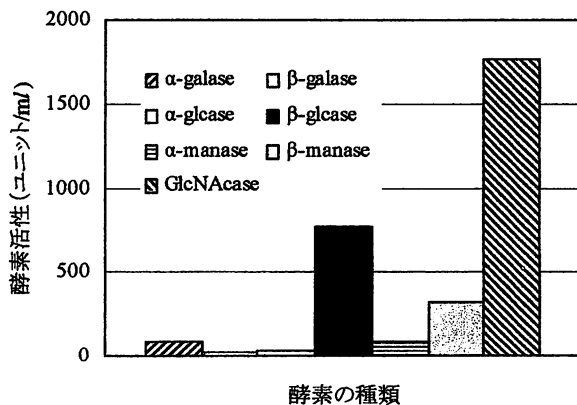


図3: ヒラタケのグリコシダーゼ活性

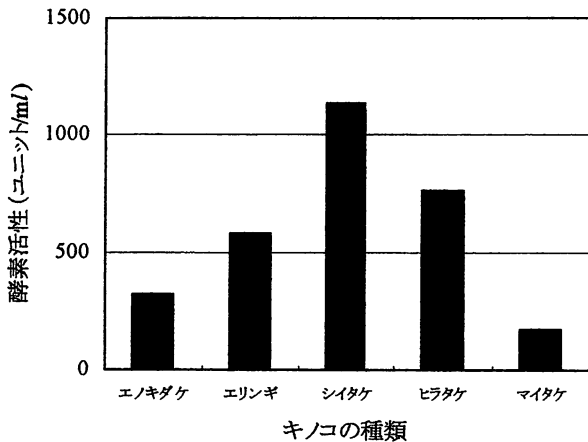


図4: キノコの β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性

3.3 チガヤの根に存在するグリコシダーゼ

森林土壌を試料として酵素活性を測定するときには、必ず植物の根が混入してくる。従って、植物が根から分泌する酵素にはどのようなものがあるかを判別することも土壌酵素を扱うときに重要である。そこで、チガヤを植物試料の一例としてその根に存在するグリコシダーゼ活性を測定した。

今まで測定した試料と異なり、チガヤの根にはグルコシダーゼ以外の酵素が顕著に認められた。(図5)この実験で観察された酵素は、チガヤの根に含まれるヘミセルロース類の代謝のために存在していると考えられる。

次に、チガヤに由来する酵素がどの程度、まわりの土壌に反映されているかを明らかにするために、チガヤが生育している土壌に存在するグリコシダーゼ活性を測定し、その結果を図6に示した。

チガヤ生育土壌のグリコシダーゼパターンはチガヤの根のグリコシダーゼパターンと全く異なり、チガヤの根において非常に低い活性であった β -グルコシダーゼ活性が土壌では突出して高い値を示した。この結果から、土壌の酵素活性がチガヤの根に由来する割合は低いと考えられる。

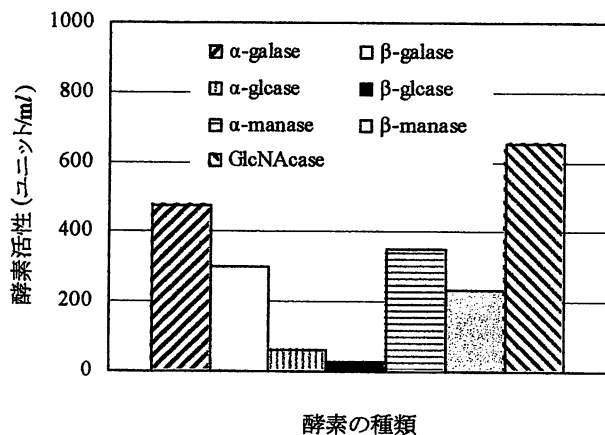


図5: チガヤの根のグリコシダーゼ活性

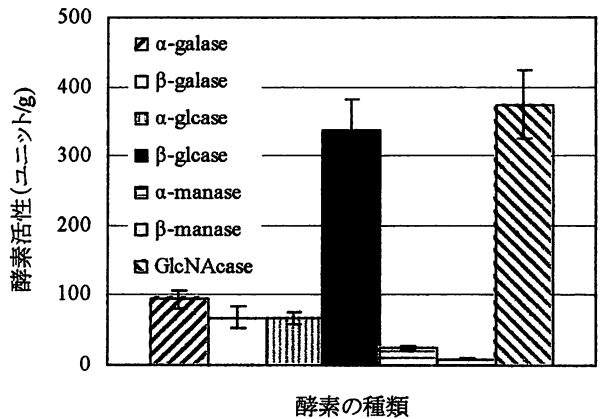


図6: チガヤ生育土壌のグルコシダーゼ活性

3.4 クロマツの根と土壌のグリコシダーゼ活性

クロマツの管理を容易にするためには、クロマツの生理状態を知ることは重要である。クロマツの生理状態を知る手がかりを得るために、クロマツの根と種子のグリコシダーゼ活性およびクロマツが生育している土壌のグリコシダーゼ活性を測定し、その結果を図7に示した。

クロマツの根は2年生のポットのクロマツから採取し、土壌はその苗木が生育しているポットの土壌を用いた。クロマツの根には β -N-アセチルグルコサミニダーゼに加えて、活性の低い α および β -ガラクトシダーゼが認められた。クロマツの根のグリコシダーゼパターンをチガヤの根のパターンと比較すると、 α と β -グルコシダーゼ活性が低いという点が類似していた。

次に、クロマツが育っている土壌のグリコシダーゼ活性を測定し、その結果を図8に示した。クロマツの根には認められなかった β -グルコシダーゼが β -N-アセチルグルコサミニダーゼの約40%程度の活性で認められた。チガヤの場合と同じように、根では低かった β -グルコシダーゼが土壌中では高くなるという傾向がみられた。そのため、少なくともこの試料土壌のグルコシダーゼは根由来でないと推察した。

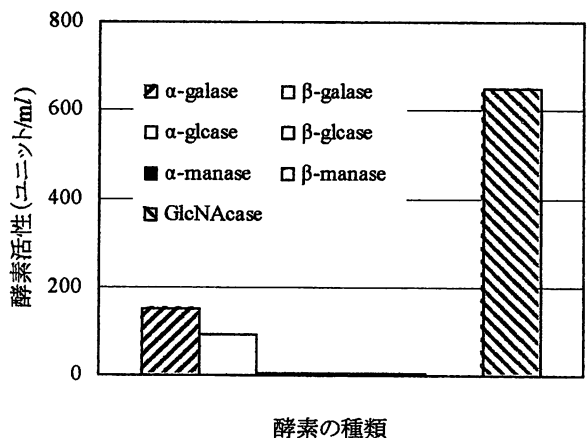


図7: クロマツの根のグリコシダーゼ活性

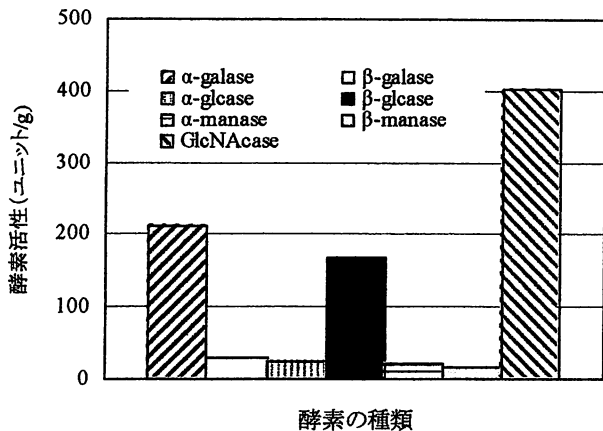


図8: クロマツ生育土壌のグリコシダーゼ活性

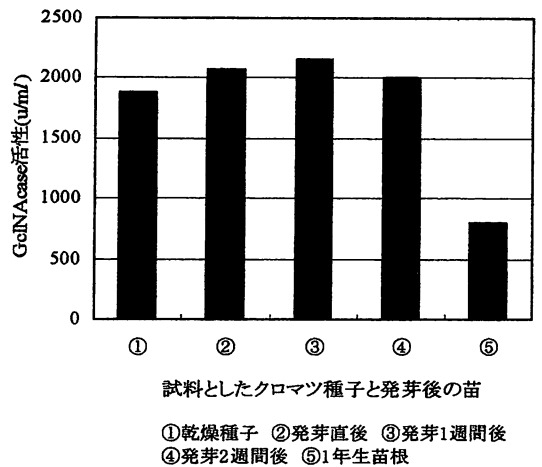


図10: 生育過程のクロマツ苗のβ-N-アセチルグルコサミニダーゼ活性

3.5 クロマツ種子のグリコシダーゼ活性

土壌に播種した植物の種子は水和されたときや発芽の際には、種子中に存在する酵素が可溶性となり土壌に流れ出る。クロマツを例にとり種子中の酵素の種類と活性を測定した。

図9に示したように、クロマツの種子においてもβ-N-アセチルグルコサミニダーゼが最も高く、さらに、αとβ-ガラクトシダーゼが次に続いた。この種子は今まで述べてきた試料のいずれとも少しずつ異なり独特のパターンであった。

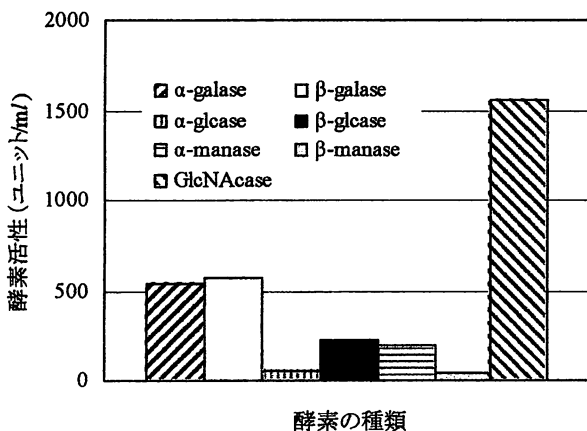


図9: クロマツ種子のグリコシダーゼ活性

3.6 種子と発芽苗のβ-N-アセチルグルコサミニダーゼ

発芽前のクロマツ種子、発芽直後と発芽数日後のクロマツ苗および1年生のマツの根のβ-N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を測定して、クロマツの成長度合いとβ-N-アセチルグルコサミニダーゼの関係を図10に示した。

もともとクロマツの種子中にはβ-N-アセチルグルコサミニダーゼが存在している。最も活発な生育をしている発芽直後の根には高い酵素活性が認められ、1年未満の若い苗の間は強い活性が持続した。苗全体の酵素活性に較べると、根の活性は低くなった。

種子、発芽苗および1年生のマツの根の酵素活性を直接比較することはできないが、本酵素はいずれの生育過程においても存在し、何らかの生理的役割を果たしていると推察される。

4 考察

田畑のように作物を生産する土壌では、作物の収量と品質を向上させるために、物理的、化学的および生物的な性質に一定の水準維持が求められ、物理的、化学的性質については測定する方法と基準値が設定されている。これに対して、生物性すなわち微生物の活動の程度をあらわす指標については、土壌の性質に大きな影響を与えるにもかかわらず、測定法あるいは基準値は確立されていない。そのため、田畑の土壌の生物学的な特徴を把握するために、従来の微生物計測法に加えて土壌に存在する酵素の種類と活性を測定する試みがなされている⁴⁾⁶⁾

一方、材木生産や森林管理の点から森林土壌の管理も重要であり、土壌微生物の活動状態の把握も重要となる。一般に、土壌微生物の測定は土壌を試料として特定の培地で培養し、そこに生育してきた微生物の数を計測する方法がとられている。しかし、田畑の土壌に較べて、森林の土壌には原形をとどめる生物遺体が多く、結果的に遺体を餌とする微生物の種類も数多いと考えられる。そのため、田畑の土壌以上に森林土壌の微生物特徴は把握しにくい側面がある。

そこで、森林土壌においても土壌に存在する特定の酵素活性を測定して、その土壌の全体的活動状態や有機物の量を推定する試みもなされている¹⁰⁾。

我々は菌根菌によるクロマツの成長促進作用を検討している過程で、菌根菌やクロマツが共通してβ-N-アセチルグルコサミニダーゼを生産することを見いだした。さらに、土壌中にもこの酵素が存在していることを確認した。そこで、この応用として、土壌の酵素活性を測定することによって、その土壌の特徴を明らかにすることが可能かどうかを調査することにした。

土壌の分解酵素で最も高いのはβ-N-アセチルグルコサミニダーゼであった。この酵素はカビ、放線菌、植物根あるいはクロマツ種子など測定した試料のほとんどで最も高い値を示し、そのいずれもがこの酵素を土壌に分泌・蓄積できる状態にあった。さらに、本酵素は植物種子¹¹⁾¹²⁾から植物体¹²⁾¹⁴⁾、微生物²⁵⁾⁷⁾、昆虫¹¹⁾¹³⁾など広い範囲の生物によって生産されるので、土壌にβ-N-アセチルグルコサミニダーゼが多いということはこの酵素を生産する生物が多く、分解される基質(カビ、昆虫など)も多いことを示している。従って、β-N-アセチルグルコサミニダーゼ活性の高低は、微生物も含めてそこに

存在する生物種に依存しているため、生物が多いほど、本酵素活性は高いと考えられる。そこで、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼを測定することにより、ある程度土壌の植物および微生物を含めた生物量と、それに伴う代謝活性が推察される可能性が見出された。今回の知見は埋め立て地や崩壊地などの土壌が植生に富む土壌に至る経路のある段階を予測する場合に役立つと考えられる。

植物由来の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼについては、この実験ではチガヤとクロマツしか対象としなかったが、その他の多くの植物に本酵素が存在していることが知られている^{1,8,14}。普通、植物には、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼの基質になるもの(キチン関連糖)は存在しないので、この酵素がなぜ生産されているのかは不明である。今回の実験では明らかにできなかったが、植物における本酵素の生理作用がさらに解明されれば、クロマツにおける本酵素の局在を調査することにより、そのマツの生理状態まで推察できるようになる可能性がある。

一方、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼに次いで、土壌に多く認められた β -グルコシダーゼは、チガヤとクロマツの根にはほとんど認められず、これらの植物が生育している土壌と対照的に少なかった。従って、土壌 β -グルコシダーゼに関しては植物の根由来のものは低いと考えた。金沢は森林土壌の β -グルコシダーゼは糸状菌に由来するだろうと推察し¹⁰、本実験においてもアスペルギルスとヒラタケが本酵素を生産することを観察しているため、土壌の β -グルコシダーゼはキノコを含めてカビが生産する酵素が主である可能性は高い。

その他の分解酵素のうち、 α -ガラクトシダーゼは突出して存在する試料はなかったが、広く認められた。本酵素についてはさらに、試料の数を多くして生産量を測定すれば、分布に関する一定の結論が得られる可能性はあるが、森林土壌の複雑さを考えると、その知見が利用される可能性については低いと考えられる。

β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼについて、今回は定量的な実験を行なったが、本酵素については組織化学的に染色して酵素の局在場所を明らかにすることが可能である³。加えて、最近本酵素の染色用基質として蛍光色素を組み込んだ化学物質が市販されている。これらの組織化学的方法を用いれば、土壌や植物組織あるいは微生物における β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼの存在場所が直接観察できるので、定量的な実験と組み合わせればさらに詳しい知見が得られる可能性が高い。そこで、本研究の結果を踏まえてすでに、組織的な実験にも取りかかっている。

5 総括

全体的な土壌の生物活性あるいは代謝活性を明らかにするため、糸状菌、キノコ、チガヤ、クロマツ種子およびクロマツの根およびそれらに関する土壌について、糖質分解酵素の種類と量を測定した。糸状菌、キノコ、チガヤ、クロマツ種子およびクロマツの根およびチガヤ生育土壌とクロマツ生育土壌には、いずれも高い活性の β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼが認められた。従って、土壌に存在する β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼは微生物、キノコ、植物あるいは昆虫などが生産する酵素が混在していると推察され、本酵素の多い土壌は全体的に生物の活動が活発と推察される。

チガヤとクロマツの生育土壌で、特徴的な酵素は β -グルコシダーゼであり、 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ以外の酵素では特に高い値を示した。この酵素はアスペルギルスとキノ

コの子実体に多く認められた。チガヤとクロマツの根には β -グルコシダーゼが少なかったため、少なくともチガヤとクロマツの生育している土壌の β -グルコシダーゼはこれらの植物由来ではないと考えた。それ故、この土壌の β -グルコシダーゼはその土壌に住み着いたカビが蓄積した可能性が高い。 β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -グルコシダーゼ以外の酵素は試料によりばらつきがあり、定量性は認められなかった。

引用文献

- [1] Bahl, K.M., and Agrawal, L. (1968) : Glycosidases of *Phaseolus vulgaris*, *J. Biol. Chem.*, 243, 98-102.
- [2] Bahl, O.P., and L. Agrawal, K.M. (1969) : Glycosidases of *Aspergillus niger*, *J. Biol. Chem.*, 244, 2970-2978.
- [3] Hayashi, M. (1965) : Histochemical demonstration of *N*-acetylglucosaminidase employing naphthol AS-BI *N*-acetylglucosaminide as substrate, *J. Histochem. Cytochem.*, 13, 355-360.
- [4] 東田修司・山神正弘 (1996) : 畑土壌における微生物活性の指標としての土壌酵素の特徴, 北海道立農試集報, 71, 7-16.
- [5] 市川貴大・山口倫之・高橋輝昌・浅野義人 (2003) : 落葉広葉樹天然林のヒノキおよびスギによる人工林化が土壌微生物相および有機炭素の無機化特性に及ぼす影響, 森林立地, 45, 81-87.
- [6] 岩本 徹・加納 誠・佐々木 毅・稲岡 恵 (1976) : *Streptomyces* sp.によるExo β -*N*-Acetylglucosaminidaseの生産と分泌, 醗酵工学雑誌, 54, 316-322.
- [7] 岩本 徹・中井 誠・佐々木 毅・中 英幸 (1990) : 担子菌による β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼの生産とその生理作用, 醗酵工学会誌, 68, 107-115.
- [8] 岩本 徹・濱田康文・福岡裕幸・岡田俊明 (1996) : 発芽インゲンマメにおける β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼと*N,N*-ジアセチルキトビアーゼの分布と消長, 日本農芸化学会誌, 70, 173-175.
- [9] 金沢晋二郎・高井康雄 (1977) : 森林土壌のプロテアーゼと β -グリコシダーゼ, 土肥誌, 48, 534-539.
- [10] 金沢晋二郎 (1979) : 森林土壌の酵素活性, 化学と生物, 17, 500-502.
- [11] Kimura, S. (1974) : The β -*N*-acetylglucosaminidase of *Bombyx mori* L, *Comp. Biochem. Physiol.*, 49 B, 345-351.
- [12] Li, S. C., and Li, Y. T. (1970) : Studies on the Glycosidases of Jack Bean Meal, *J. Biol. Chem.*, 245, 5153-5160.
- [13] Mommensen, T.P. (1980) : Chitinase and β -*N*-acetylglucosaminidase from the digestive fluid of the spider, *Cupiennius salei*, *Biochim. Biophys. Acta*, 612, 361-372.
- [14] 中 英幸・岡 康司・岩本 徹・稲岡 恵 (1985) : つくし (*Equisetum arvense*) の胞子穂における β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼの存在, 日本農芸化学会誌, 59, 157-159.
- [15] 仁王以智夫 (1996) : 物質循環における土壌微生物の役割, 森林生態学 (岩坪五郎編) 文永堂出版, 154-188.
- [16] 瀧勝俊・加藤保 (1998) : 有機農業実践圃場における土壌の特徴, 愛知農試研報, 30, 79-87.

[受付 2005年6月10日, 受理2005年12月10日]