

土壌酵素について

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	早野, 恒一
巻/号	44巻10号
掲載ページ	p. 395-402
発行年月	1973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



総 説

土 壤 酵 素 につ い て

早 野 恒 一*

1. はじめに

土壌は生体組織と似たような代謝機能を有している。土壌には数億の細菌をはじめ、糸状菌、藻類、原生動物や植物根系が共存しており、それらは土壌中の有機物や無機物を分解したり合成したりしている。これらの生物による物質変換はすべて細胞内および細胞外に存在する酵素によって営まれている。

土壌酵素研究の目的は、土壌中の生化学的物質変換の定量的、合理的な把握から、その法則性を明らかにすることにある。脱窒や窒素固定のような酸化還元酵素系による反応は、対応する土壌微生物の質的、量的な把握によっても、それらの物質変換に一定の洞察を加えることも可能である。しかしながら、細胞外酵素の活性は粘土や腐植物質の影響を受けるという土壌酵素特有の問題があり、さらに、土壌中に存在する酵素のすべてが微生物起原であるという確証のないことや、場合によっては無機触媒に由来する物質変換の存在することなども考えると、土壌微生物研究とは別の土壌酵素研究の存在意義も生じる。これらの研究は互いに補い合いながら発展していく関係にあると考える。

2. 土 壤 酵 素 研 究 の 歴 史

土壌酵素の研究は 1899 年に WOOD が土壌中に peroxidase 活性の存在を指摘した時点にさがる。酵素が最初に発見されたのは 1897 年、BUCHNER が“zymase”の存在を指摘した時点であるから、土壌酵素研究の端緒は割合に早かったといえる。しかしながら、その後の発展はどうか。第 1 表に既知の全酵素と土壌酵素の数を年代別に比較してみた。これは研究の発展の一側面にすぎないが、土壌酵素の研究が生体組織や一般微生物分野の酵素の研究にくらべて遅れた状態にあることを示している。また第 1 表は土壌酵素の研究が急速に発展したのは 1950 年代であることも示している。最近では 40 種内外の酵素が土壌においても知られているが、比

第 1 表 酵素の発見件数（積算数）の比較

年	生体組織微生物 ^a	土 壤 ^b
1930 まで	80	3
1940 〃	—	5
1947 〃	200	—
1950 〃	—	7
1962 〃	880	21
1966 〃	—	32 ^c
1968 〃	1300	—

a. BARMAN (1969)¹⁾

b. 仁王・若尾 (1969)²⁾

c. SKUJINS (1967)³⁾

較的よく研究されている酵素は 10 種類位である。

わが国の土壌酵素研究者は非常に少なく、歴史的にみても 10 人に満たない。日本における土壌酵素研究の始まりは大杉 (1922)⁴⁾ の catalase の研究であろう。その後、1950 年代に永田・松田ら⁵⁾ が saccharase 活性を、1960 年代には青峰・小林ら^{6,7)} が数種の加水分解酵素の活性におよぼす粘土鉱物の影響を、田辺・石沢ら⁸⁾ が urease 活性の研究を行ってきた。

3. 土 壤 酵 素 活 性 測 定 に 際 し て の 一 般 的 注 意

酵素はある特定の化学反応だけを触媒する性質をもつタンパク質分子である。タンパク質としての性質上、加熱、強酸、強アルカリ処理および毒物の添加により変性したり失活したりする。

土壌酵素は種類によっては、土壌試料を乾燥したり、さまざまな処理をすると、その活性は相当な影響を受けて再現性のある結果を得ることがしばしば困難になる。第 3 表にみられるように dehydrogenase 活性は風乾すると相当に減少するが、saccharase 活性は風乾状態で土壌を 1 年間保存する間に 15~20% 減少するのみであり、β-glucosidase 活性はほとんど減少しない。このように保存や風乾の影響は、酵素や土壌の種類によって異なるので、目的とする酵素活性についてその安定性を検討しておく必要がある。採集した土壌は微生物の分析の場合と同様にできるだけ早く分析することが望ましい。

測定法の面からみると、土壌酵素活性とは静菌剤を加

* 農業技術研究所化学部（東京都北区西ヶ原 2-1-7）

昭和 47 年 12 月 19 日受理

日本土壌肥科学雑誌 第 44 巻 第 10 号 p. 395~402 (1973)

えるかまたはγ線照射をほどこした土壤に、一定量の基質を加え、一定条件下でインキュベーションを行ない、単位時間あたりに生成した反応産物、または基質の減少を測定した結果を指している。土壤酵素活性の測定に際しては、インキュベーションに長時間を要するので、細胞の増殖や目的とする酵素タンパクの合成が起こらないようにしておくことが重要である。そのために静菌を目的として、トルエンが比較的よく用いられている。HOFFMANN ら^{11,12)}は通常、10g の土壤に 1~2ml のトルエンを加えた後、基質を加えてインキュベーションしている。BECK ら⁸⁾によれば、土壤試料中の微生物生育阻害に必要なトルエンの量は最低 20% は必要である。一般にグラム陽性菌はグラム陰性菌にくらべてトルエンに対する抵抗性が高い。JACKSON ら¹⁴⁾によれば *Escherichia coli* は 2.5~5% トルエンの存在によって完全に死ぬばかりでなく、β-glucosidase のような細胞内酵素の活性が透過性の変化によって発現するらしい。

トルエンは酵素に対して必ずしも無毒なものではない。第3表にみられるように、トルエンの酵素活性におよぼす影響は酵素の種類によって異なる。特に細胞内酵素とみなされる peroxidase では阻害度が非常に大きい。

4. 各種土壤酵素活性の比較

第4表にいくつかの土壤酵素活性を比較した。それぞれの研究者によって測定条件や活性の表示は一様ではないが、活性の表示を著者が国際酵素委員会で定められた表示法、すなわち unit (μmole/min.) に換算して掲載した。このような操作によってはじめて各酵素間の活性の大小を比較することが可能となる。

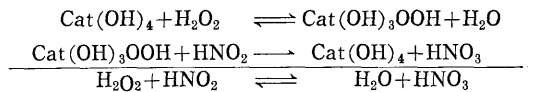
第5表でまづ明らかなことは土壤の catalase 活性が他の酵素活性にくらべて圧倒的に高いことである。土壤中の catalase 活性には無機触媒に由来する活性も関与しており、JOHNSON ら²⁴⁾によればオートクレーブ処理により 66% が失活し、0.02 M NaN₃ で 70% が失活することから、残余の 30~34% の活性が無機触媒に由来す

第3表 酵素活性に及ぼす静菌剤の影響*

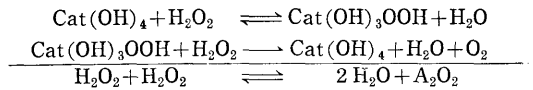
酵 素	静 菌 剤	濃 度 (%)	相 対 活 性
Tryptophanase ⁴⁾	なし (水)	—	1.15
	トルエン	43	0.95
Peroxidase ⁵⁾	なし (水)	—	23
	トルエン	0.5	1.5
Urease ⁶⁾	なし (水)	—	13.6~14.2
	トルエン	1.2	7.6~ 7.9
	フェノール	0.06	12.8~13.2
	チモール	0.12	5.8~ 6.1
	クロロフォルム	1.2	1.3~ 2.5

* Tryptophanase および Peroxidase は抽出した酵素に関するデータ。Urease の場合は土壤試料を用いて研究。各酵素間で活性の大小を比較できない。

る活性であるとみなしている。無機触媒に由来する分を差引いたとしても catalase 活性は他の酵素活性にくらべて約 1,000 倍以上も活性が高い。第5表で各種酵素のターンオーバー数を比較した。この表から明らかなように catalase のターンオーバー数は他の酵素のそれにくらべて平均して 1000 倍近くも高い。おそらく、土壤中で catalase 活性が高いのは、catalase のタンパク量が多いのではなく、むしろ、ターンオーバー数が高いことに由来するものと考えられる。catalase は過酸化水素の酸化還元反応を触媒するばかりでなく、メタノール、エタノールなどのアルコール類やギ酸、さらには亜硝酸などを電子供与体として利用する結果、たとえば亜硝酸の場合では、次のような作用機作によって亜硝酸から硝酸への化学変化をも引き起こしうる²⁵⁾。



ここで cat(OH)₃OOH は complex I と名づけられている。H₂O₂ のみの場合は次のような作用機作で反応が進む。



第2表 酵素活性におよぼす保存の影響

酵 素	土 壤	pH	保 存 状 態	保 存 温 度 (°C)	相 対 活 性				
					0 日	21 日	77 日	163 日	385 日
Dehydrogenase*	SiL	6.6	風乾	20	47	37	16	—	—
〃	〃	〃	原土	20	100	97	69	—	—
〃	〃	〃	原土	4	89	94	71	—	—
〃	〃	〃	原土	-20	103	108	86	—	—
Saccharase**	Cl	—	風乾	室温	8.3	—	—	7.3	6.3
β-Glucosidase**	Cl	—	風乾	室温	3.0	—	—	3.1	2.8

* Ross (1971)⁹⁾, 原土の 20°C, 0 日目を 100% とした相対活性

** HOFFMANN (1959)¹⁰⁾, 0 日目を 8.3 および 3.0 とした相対活性

第4表 各種土壤酵素活性の比較

酵 素	反 応 式	土 壤	測 定 条 件	活 性 ミリ unit/g soil	
Dehydrogenase	$XH_2 + A \rightarrow X + AH_2$		30°C, pH 7.6	0.51~2.83	Ross ⁹⁾
Catalase	$2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$	{ポドゾル ピート	20°C ? 20°C ?	40,200~214,000 143,000~795,000	KUPREVICH & SHCHERBAKOVA ¹⁸⁾
Polyphenoloxidase	$Diphenol + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow$ Quinone + H ₂ O	{ポドゾル ピート	— — — —	20.4~41.1 79.7~37.5	〃
Phosphatase	Phosphateester + H ₂ O → ROH + PO ₄ ...		37°C, pH 6.5	27.5~98.5	TABATABAI & BREMNER ¹⁹⁾
Saccharase	Saccharose + H ₂ O → glucose + fructose	{ポドゾル ピート 黄色土	37°C, pH 4.5~5.5 30°C, pH 5.5	15~97 82~715 3.8~7.2	KUPREVICH & SHCHERBAKOVA ¹⁸⁾ 永田・松田 ⁵⁾
β-Glucosidase	Glu-OR + H ₂ O → Glucose + ROH	{畑 林地	30°C, pH 4.8	10~15 32	早野・塩島 ²⁰⁾
Urease	$CO-(NH_2)_2 + H_2O \rightarrow$ CO ₂ + 2 NH ₃	{畑(北本) 林地(北本)	{40°C, pH 6.7 30°C*, pH 6.7 40°C 30°C*	18.0 13.4 51.0 38.0	田辺・石沢 ⁸⁾
Protease	$\begin{array}{c} R \\ \\ -NH-CH-CO-NH-CH-CO- \\ \qquad \qquad \\ \qquad \qquad \qquad R' \\ \\ R \\ \\ +H_2O \rightarrow -NH-CH-COOH \\ \\ +NH_2-CH \cdot CO- \dots \\ \\ R' \end{array}$		40°C pH 8.1 30°C*, pH 8.1 40°C, pH 8.1	36~238 22~147 2.5~27.7	LADD & BUTLER ²¹⁾
Arylsulfatase	phenolsulfate + H ₂ O → phenol + sulfate		37°C, pH 5.8	0.24~6.88	TABATABAI & BREMNER ²²⁾

* 原報の活性におよぼす温度の影響のグラフから換算した。

第5表 酵素のターンオーバー数¹⁶⁾

酵 素	ターオーバー (秒 ⁻¹)*
Acetylcholinesterase	10 ³
Chymotrypsin	10 ² ~10 ³
Trypsin	10 ² ~10 ³
Ribonuclease	10 ²
Papain	10
Carboxypeptidase	10 ²
Myosin ATPase	10 ²
Kinase	10 ³
Urease	10 ⁴
Fumarase	10 ³
Aldolase	10 ²
Enolase	10 ²
Carbonic anhydrase	10 ⁴ ~10 ⁵
Transaminase	10 ³
Dehydrogenase	10 ³
Catalase	10 ⁷
Peroxidase	10

* 酵素 1 分子が単位時間当たり基質を反応産物に変換する数

KUPREVICH²⁶⁾ は林地および草地土壤が耕地土壤にくらべて酵素が高いことを指摘している。第4表からも urease および β-glucosidase は耕地にくらべて林地土壤での活性が高いことが確認できる。第5表のデータは泥炭土壤が鈹質土壤にくらべて酵素活性が高いことも示している。このように林地や泥炭地で活性が高い現象について、KUPREVICH²⁶⁾ は有機物含量、特に草本植物の根の密度と相関性があると推察している。

土壤酵素活性は生体組織や微生物細胞にくらべてそのレベルが非常に低い。著者^{27,28)}が *Agrobacterium tumefaciens* について調べた結果によれば、β-glucosidase が 3.7 unit/g dry cell (30°C), glucoside 3-de-hydrogenase で 24.5 unit/g dry cell (20°C) であったのにくらべると第5表の β-glucosidase, dehydrogenase のレベルがいかに低いかかわかる。しかしながら、このことは土壤酵素が決して無意味な存在であるということではない。北本畑土壤の urease 活性、13.4×10⁻³unit/g soil がどのような意味をもつか、面積当たりに換算し

て具体的に検討してみよう。換算基準を作土 20cm, 平均固相率 25%, 固相の比重を 1 とし、20°C, pH 5.3 における活性を田辺ら⁹⁾ のデータから計算すると 36.5 unit/a となる。これは尿素が十分に存在するときには 1a の畑で 3.2 kg の尿素を 1 日で分解する力に相当する。

5. 酵素におよぼす粘土鉱物の影響

粘土鉱物がタンパク質を吸着する現象は ENSMINGER ら (1939)²⁹⁾ によって初めて明らかにされた。彼らはモンモリロナイトがアルブメン (Albumen) やゼラチンを吸着し、吸着した部分の層間が拡張することを X 線回折によって明らかにした。カオリンによる lysozyme の吸着は McLAREN ら (1954)³⁰⁾ によって研究された。すなわち、その吸着は 2~3 分以内で完了すること、lysozyme の吸着量はカオリンの表面積と大むね対応すること、lysozyme 中に含まれる陽イオングループの数はカオリンの交換容量にほぼ等しいことを明らかにした。

粘土に吸着した基質を酵素作用を受ける。ENSMINGER ら (1942)³¹⁾ はベントナイトに吸着したアルブメンやヘモグロビンが pepsin や pancreatin によって加水分解されることを見ている。McLAREN (1954)³²⁾ もカオリンに吸着した熱変性 lysozyme が chymotrypsin によって加水分解することを報告している。

粘土に吸着したタンパク質の加水分解は吸着状態の酵素によって進行する。McLAREN ら (1956)³³⁾ は chymotrypsin による熱変性 lysozyme の加水分解は、おもに酵素-基質-カオリン複合体を形成することによって進行し、溶液状態の酵素によって進行するのではないと報告している。McLAREN ら (1957)³⁷⁾ はさらに、カオリンに吸着した熱変性 lysozyme に対する chymotrypsin の作用をカオリン不在の場合と比較し、粘土吸着型の反応系では溶液系にくらべて反応の至適 pH がアルカリ側へシフトすること、それは界面近傍と液相の水素イオン濃度の相異に由来することを指摘している。

粘土鉱物は明らかに酵素活性を阻害する。ENSMINGER ら (1942)³¹⁾ はベントナイトが pepsin や pancreatin などの protease によるアルブミンやヘモグロビンの加水分解を阻害することを報告している。粘土鉱物による酵素活性の阻害を詳細に検討したのは青峰らである。AOMINE ら (1964)⁶⁾ は protease, α -amylase, β -amylase, cellulase 活性におよぼすアロフェン、モンモリロナイト、ハロサイトの影響を検討した。その結果、粘土鉱物の阻害性は酵素や粘土の種類によって異なるが、全般的にはアロフェンの阻害効果が比較的大きく、酵素では β -amylase が顕著に阻害を受けることを報告して

いる。また、酵素の粘土への吸着は粘土の CEC と必ずしも一致しないことを指摘している。KOBAYASHI ら (1967)⁷⁾ の kinetics を用いた研究は粘土による阻害の内容をさらに詳しく明らかにしている。すなわち、アロフェン、モンモリロナイト存在下で protease, α -amylase のミカエリス定数 (K_m), 最大速度 (V_{max}) を測定し、粘土鉱物不在の場合と比較すると K_m , V_{max} はともに減少すること、つまり、これらの粘土鉱物は酵素-基質複合体の形成は助長するが、複合体から反応産物への変換は阻害することを明らかにした。これに対してアロフェンと β -amylase の系では、 K_m が増えて V_{max} が減少すること、その阻害のパターンは拮抗阻害と非拮抗阻害の性質を含んでいることを明らかにした。

6. 酵素におよぼす腐植酸の影響

最近の LADD らの一連の研究結果によれば、腐植酸も酵素活性を阻害することは明らかである。LADD ら (1970)³⁵⁾ の報告によれば、第 6 表に見られるように腐植酸によって数種類の protease 活性が阻害を受ける。このような腐植酸による阻害は陽イオンの存在で回復する。特に、二価陽イオンはその効果が大きい。腐植酸の陽イオン交換サイトに酵素タンパクが結合して阻害が起こる可能性を指摘している。この点を精査するために trypsin や carboxypeptidase をアセチル化した。このアセチル化 protease は腐植酸による阻害をほとんど受けなかった³⁶⁾。このことから protease のアミノ基が腐植酸のカルボキシル基に結合して阻害が起こると解釈している。LADD ら (1971)³⁷⁾ はさらに trypsin, pronase 活性の阻害効果はフルボ酸よりも腐植酸のほうが大きいと述べている。腐植酸についてもその分子量が問題であり、腐植酸を分画して 30,000 以上、30,000~10,000、10,000~1,000、の 3 画分では分子量の大きい画分のほうが、pronase 活性に対する阻害性が高いことを報告している。MATO ら (1971)³⁸⁾ もインドール酢酸酸化酵素活性が腐植酸によって阻害されることを報告している。その場合、腐植酸の調製方法が問題で、阻害の程度は水酸化ナトリウム抽出腐植酸 > ピロリン酸ナトリウム抽出腐植酸 > ニトリロ三酢酸ナトリウム抽出腐植酸の傾向があり、同一

第 6 表 腐植酸による Protease 活性の阻害

酵 素	相 対 活 性*
Pronase	45
Trypsin	27
Chymotrypsin	48
Carboxypeptidase	42

* 腐植酸無添加を 100 とした。
腐植酸添加は 10^{-4} ~ $10^{-5}M$

土壤試料でも抽出方法によって腐植酸の阻害性が異なることを示している。

酵素の種類によっては、腐植酸の存在によって酵素活性が促進される。LADD ら (1971)³⁵⁾によれば、papain の活性は腐植酸によって促進する。この促進は高分子腐植酸画分で顕著であり、陽イオンの添加によって抑制される。papain は等電点 pH 9 の塩基性タンパク質であるのに対して、腐植酸によって阻害を受けた protease はいずれも中性ないし酸性に等電点をもつタンパク質である点に注目しておきたい。

7. 酵素の存在状態

ひと口に土壤酵素といっても酵素の土壤中における可能な存在状態は様でない。生物細胞、組織内に存在する可能性もあるし、土壤中の生物の細胞外に存在する可能性もある。タンパク質やセルロースのような高分子物質などの加水分解酵素については、多くの微生物が“Exoenzyme”として細胞外に分泌することが知られており³⁶⁾、論理的にも細胞外に存在していなければ土壤中のこれら有機物の物質変換を説明することはむずかしい。それに対して、呼吸、脱窒、窒素固定のような複合酵素系による電子伝達作用は、それらが円滑に営まれるためには、基質や酵素および電子受容体あるいは供与体が濃縮された状態にあることが必要であるために、細胞外で働く可能性はきわめて少ないであろう。さらに、細胞外酵素に関しては6および7節で述べたように、その大部分が粘土鉱物や腐植酸と結合している可能性が非常に強い。

PAULSON ら (1969)⁴⁰⁾は土壤中の urease の存在状態

についてユニークな研究結果を報告している。彼らは土壤中の urease 活性は次式のような回帰モデルで表わせるものとした。

$$Y = \alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4$$

- α : はじめに存在していた吸着 urease による活性
 $\beta_1 X_1$: 微生物細胞内の urease による活性 (β_1 は1細胞当たりの活性)
 $\beta_2 X_2$: 死細胞から遊離して粒子に吸着した urease の活性 (β_2 は1死細胞に由来する活性)
 $\beta_3 X_3$: 吸着によって失活した urease 活性 (β_3 は単位時間当たりの失活量, $\beta_3 < 0$)
 $\beta_4 X_4$: 生細胞から遊離して粒子に吸着した urease 活性 (β_4 は1生細胞が分泌した urease の活性)

実際には純粋培養における結果から $\beta_4 X_4$ は無視できるとした。そして、土壤 urease 活性と尿素分解菌数を経時的に測定して第7表のようなデータを作り、そのデータから重回帰分析により $\alpha, \beta_1, \beta_2, \beta_3$ の数値を算出して次式を得た。

$$Y = 0.1884 + 0.00954 X_1 + 0.00487 X_2 - 0.00041 X_3$$

これをもとにして第1図に見られるような結果を得た。第1図によれば、定常状態の土壤では79~89%の urease 活性が土壤コロイド吸着型酵素に由来することになる。ただし、この実験においては尿素分解性微生物の計数は生菌数の測定法に基づいているゆえに、尿素分解性微生物はすべて増殖能力のある細胞から成立っており、酵素活性はあるけれども増殖はしないという細胞(“おばあさん”状態の細胞)は存在しないことが前提となるであろう。

酵素が土壤中で有機物複合体として存在していることを最初に実証したのは BURNS ら (1972)⁴¹⁾である。彼らは0.25 M 塩化ナトリウム-0.013 M EDTA-0.06 M メルカ

第7表 Urease 活性と尿素分解菌数の経時的消長

窒素源	実験 I					実験 II				
	Y	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
NH ₄ ⁺	0.198	1.9	0.0	0.17	0	0.205	3.1	0.0	0.17	0
	0.198	2.0	0.0	6	11	0.209	1.7	0.0	6	14
	0.275	8.1	0.0	12	42	0.288	10.2	0.0	12	50
	0.517	35.6	0.0	18	173	0.532	37.0	0.0	18	192
	0.546	35.0	0.0	24	385	0.574	44.9	0.0	24	437
	0.571	39.8	0.0	36	834	0.553	28.9	15.9	36	880
	0.507	37.4	2.4	48	1,298	0.553	32.4	12.4	48	1,248
	0.484	25.0	14.8	72	2,047	0.484	23.7	21.1	72	1,922
	0.382	15.0	25.8	120	3,007	0.432	16.2	28.5	120	2,882
	0.362	12.7	27.2	168	3,672	0.378	14.6	30.2	168	3,624
	0.327	5.9	33.9	240	4,342	0.362	8.5	36.3	240	4,457

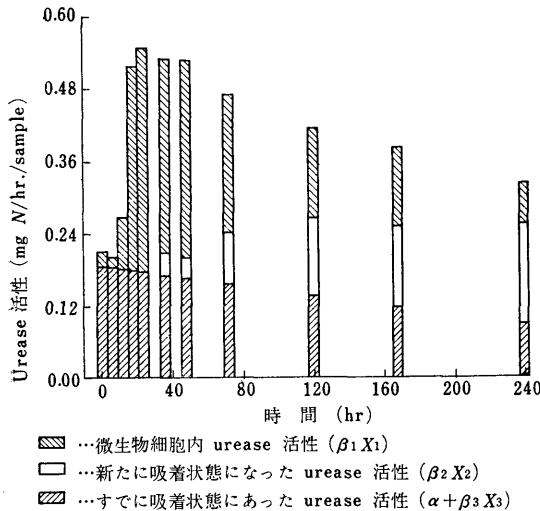
Y : urease 活性 (加水分解された尿素-Nmg/hr/sample)

X₁ : 尿素分解菌数, $\times 10^{-7}/g$ soil

X₂ : 尿素分解菌の減少数, $\times 10^{-7}/g$ soil

X₃ : インキュベーション時間 (hr)

X₄ : ある時間から次の時間に至るまでの積算尿素分解菌数 (number·hr) $\times 10^{-7}$



第 1 図 Urease 存在状態の経時的变化

プトエタノールの混合液によって土壤から urease 活性物質を抽出している。この抽出液を透析して得た沈殿物はもとの土壤の 20% に相当する urease 活性を有しており、X線回折的には粘土鉱物は含まれていない。この沈殿物に pronase (protease の一種) を加えても沈殿物の urease 活性が減少しないことから、有機物複合体として存在している酵素はゲル状の腐植物質におおわれているために安定性が高いものとみられる。このことは土壤に多量の pronase を加えても、その urease 活性がほとんど減少しないことから裏づけられる。ペントナイトに吸着した urease は pronase によって加水分解されるが、ペントナイト-urease-リグニン系に pronase を加えても urease 活性が低下しないことから、土壤中においては実際に粘土-酵素-有機物複合体として安定な状態で存在する可能性を指摘している。

8. 土壤酵素の起原

土壤中に存在する微生物はたしかに多様な酵素活性を有しており、第 9 表に見られるように土壤中での存在量も多い。しかしながら、そのことによって土壤中の種々の酵素の大部分が微生物によって生産されたという論拠にはならない。土壤酵素の給原になりうるものとしては、微生物のほか動物や植物も土壤中には存在する。これらも生命現象の維持に関与する一連の酵素を有しているし、土壤中での存在量も決して無視できない (第 8 表)。

多くの研究者が土壤酵素活性と微生物との相関性を見いだそうと努めてきた。前節でふれた PAULSON らの研究結果⁴⁰⁾やそれ以前の CONRAD⁴⁴⁾の研究結果は土壤 urease が微生物起原である可能性が高いことを示している。

第 8 表 土壤中の生物量

	深さ, cm	存在量, kg/ha
細菌 ^a	0~15	1650~3850
糸状菌 ^a	0~15	1650
鞭毛虫類およびアメーバ ^a	0~15	165
セン虫 ^a	—	60~178
ミミズ ^a	—	502~711
植物根 (直径 1 mm 以下) ^b	0~10	1633
	10~20	631
	20~30	529
	30~40	280

a. RUSSELL⁴²⁾b. 小沢ら⁴³⁾

HOFFMANN ら (1966)⁴⁵⁾ は土壤の深さ別に saccharase 活性と細菌数を測定して、それらの消長が類似の傾向を示すことから土壤は saccharase 細菌起原のものであるとしている (第 9 表)。しかしながら、活性な植物根の消

第 9 表 Saccharase 活性と細菌数*

深さ, cm	細菌数, $\times 10^6/g$ 土壤	Saccharase の 相対活性
1~10	7.3	6.6
10~20	7.1	6.2
20~40	4.6	4.2

* HOFFMANN^{45, 1)}

長も類似の傾向を示す (第 8 表) ことから、微生物に由来するの植物根に由来するのかわかりにくい。細菌の存在量が多いことは第 8 表でも明らかである。多くの細菌が細胞外酵素を分泌することも既知の事実である³⁹⁾。したがって細菌が主要な土壤酵素の給原になりうる可能性は相当に高いけれども、いまだに明確な証明がなされていない。

酵素の種類によっては植物根に由来すると考えられるものすらある。KUPREVICH (1966)²⁶⁾ は saccharase の起原が高等植物であると主張している。その理由として、草本植物、特にイネ科の植物が密生している土壤はすべて活性が高いことを指摘している。さらに、土壤、植物、微生物の saccharase 活性を 20°C と 30°C で測定して、それぞれの Q_{10} を比較した (第 10 表)。 Q_{10} は活性化エネルギーに関連した数値で、これは酵素の起原によって固有の値をとりうるもので、これらと比較することはよい着想といえる。一連の saccharase の Q_{10} を比較すると、土壤と植物根の酵素の Q_{10} が近似していることから、土壤 saccharase は植物起原であるという結論をくだしている。しかしながら、このような実験は厳密には土壤から抽出した酵素と植物根から抽出した酵素を用いて比較する必要がある。土壤中に存在する粘土鉱物や腐植酸は酵素の K_m や V_{max} などの定数を変えうる因子であ

第 10 表 土壤、植物、微生物の Saccharase 相対活性と Q_{10}

試料	Saccharase 活性		Q_{10}
	20°C	30°C	
ポドソル土壤, イネ科, その他の草地	10.3	20.8	2.02
果樹園土壤	3.7	8.2	2.18
泥炭土	33.3	75.1	2.28
ペレニアルライグラス, 根	35.2	69.9	1.98
スムーズブロムグラス, 根	39.6	72.5	1.83
<i>Fusarium culmorum</i>	26.3	37.5	1.43
<i>Nigrospora oryzae</i>	378.3	582.2	1.54
<i>Bac. mesentericus</i>	30.6	37.6	1.23
<i>Actinomyces</i> sp.	0.9	1.1	1.20

ることは、6、7 節でふれたとおりである。田辺ら⁹⁾は水田土壤の urease 活性が林地や畑地土壤にくらべて低いことを指摘している。イネ科植物が密生していれば酵素活性が高いという説は普遍的ではない。

LADD (1972)⁴⁶⁾も抽出可能な protease は植物起原ではないかと考えている。彼は 2 種類の基質に対する土壤、抽出液、抽出した後の土壤および土壤から手で選り分けた植物残体部分の protease 活性を比較した (第 11 表)。2 種類の基質に対する抽出液の活性比が植物残体のそれと近似していることから、前述の可能性を指摘している。

KUPREVICH¹⁸⁾も SKUJINS³⁾も土壤中の酵素活性を評価する際に無機触媒の役割を除外するべきではないことを指摘している。実際に、catalase と同様な作用は鉄やマンガンの水酸化物も有している。土壤の示す catalase 活性の約 40% 近くが無機触媒に由来するとみなされている²³⁾。ランタン、セリウム、トリウムなどの水酸化物も生理的な濃度でグリセロリン酸の加水分解を促進する⁴⁷⁾。

9. 土壤からの酵素の抽出

土壤中の細胞酵素の存在と役割が無視できないことはすでに明らかにした。このような細胞外酵素の存在状態や起原を明らかにするためには、土壤から酵素を抽出、精製して化学構造や物理化学的性質などを明らかにすることが必要となる。

第 11 巻 Benzoyloxycarbonyl (Z-) phenylalanyl leucine および N-benzoyl-L-arginine amide (BAA) に対する protease 活性比

酵素原	酵素活性*		活性 (Z-Phe-leu)
	Z-Phe-leu	BAA	活性 (BAA)
土壤	2.05	1.47	1.39
土壤抽出液	1.29	0.33	3.91
抽出後の土壤	1.44	1.18	1.22
植物残体	31.0	6.5	4.78

* 基質の分解, $\mu\text{mole/hr/g}$ 土壤または植物残体

土壤から最初に酵素を抽出して、結晶として分離したのは BRIGGS ら (1963)⁴⁵⁾である。彼らは森林表層土からリン酸緩衝液 (pH 6.0) で urease を抽出し、抽出液のアセトン沈殿物から urease 結晶を得ている。収量は 2.5 kg の土壤から 12 mg で、得られた結晶は超遠心分析の結果、3 種類の成分 (分子量 217,000, 131,000 および 42,000) を含むが、それぞれが urease 活性を示すかどうかは調べられていない。いずれにしても、土壤酵素で結晶標品を得た例は現在までにこれ以外にはない。MARTIN-SMITH (1963)⁴⁹⁾によれば、土壤からの尿酸分解酵素活性の緩衝液による抽出は、ホウ酸塩、トリス、リン酸塩の順で効率がよくなる。抽出の至適 pH は緩衝液によって異なるが、リン酸緩衝液の場合は 7.0 にある。CHALVIGNAC ら (1971)¹⁵⁾は森林マルチ土壤から希炭酸ナトリウム液によって tryptophane decarboxylase 活性を抽出し、その硫酸塩析画分を用いて、D-型には作用せず L-トリプトファンのみを基質とすることを明らかにした。田辺ら⁹⁾はリン酸緩衝液による urease 活性の抽出の場合に、抽出には至適 pH のほかに至適緩衝液濃度があることを指摘している。LADD ら (1972)⁴⁶⁾は畑地および草地土壤から 0.1 M トリス-ホウ酸緩衝液 (pH 8.1) で活性を抽出する場合、原土より風乾土のほうが抽出率が高いことを指摘している。塩化カルシウムの添加によって腐植物質から protease 活性を分離することが可能であるらしい。

10. 結 び

土壤酵素の研究には二通りの流れがある。一つは土壤酵素活性を土壤の生物活性のインデックスとして位置づける流儀で、細胞内酵素も細胞外酵素もすべて土壤酵素活性としてとらえる方向である。もう一つの流れは土壤酵素特有の問題は細胞外酵素にあるゆえに、土壤酵素研究の本質は細胞外酵素の研究にあるとする流儀である。土壤中には cellulase や protease のように高分子物質を加水分解する酵素が存在する。細胞質膜に物質の透過性に関する障壁が存在することを考えると、このような酵素は細胞外で働いていることが予測される。それに対して、呼吸、解糖、脱窒および窒素固定のような複合酵素系は細胞内で働いていることが予測される。しかしながら、大部分の土壤酵素はその存在状態がほとんど解明されていない。土壤酵素は粘土や腐植酸によって影響を受ける。腐植酸の影響については今後 kinetic な研究も加わることが望まれる。ある種の酵素活性については、その起原が植物である可能性が指摘されているように、土壤中の物質変換において酵素活性=微生物活性と安易

に結びつける前に、その起原を実証するべきである。土壌酵素は微生物細胞や生体組織にくらべて活性が非常に低い。そのためにインキュベーションに長時間を要したり、微生物生育の効果的な阻害処理の必要が生じたりする。これらはいずれも酵素反応に影響をおよぼさうる因子である。したがって、より改良された土壌酵素活性測定法を開発することも、未知の土壌酵素活性測定法の開発とともに今後の課題の一つとなる。

謝辞 この総説を書きあげるに際し、適切なお意見と励ましをいただきました当研究室長、鈴木達彦博士をはじめ土壌1科の各位に感謝致します。

文 献

- 1) BARMAN, T.E. : Enzyme Handbook, 1, Springer-Verlag, p.2 (1969)
- 2) 仁王隆子・若尾紀夫 : 土壌微生物入門, 古坂澄石編, 共立全書, p.60 (1969)
- 3) SKUIJNS, J.J. : Soil Biochemistry, ed. McLAREN, A. D. and PETERSON, G.H., Marcel Dekker Inc., New York, p.371 (1967)
- 4) 大杉 繁 : 大原農研報, 2, 197 (1922)
- 5) 永田武雄・松田敬一郎 : 土肥誌, 26, 204 (1955)
- 6) AOMINE, S. and KOBAYASHI, Y. : *th. Intern. Congress Soil Sci.*, III, 697 (1964)
- 7) KOBAYASHI, Y. and AOMINE, S. : *Soil Sci. Plant Nutr.*, 13, 183 (1967)
- 8) 田辺市郎・石沢修一 : 農技研報B, 21, 158 (1969)
- 9) ROSS, D.J. : *Soil Biol. Biochem.*, 2, 55 (1970)
- 10) HOFFMANN, V.G. : *Z. Pflanzenernaehr. Dueng. Bodenk.*, 85, 97 (1959)
- 11) HOFFMANN, V.G. and DEDEKEN, M. : *Z. Pflanzenernaehr. Dueng. Bodenk.*, 108, 193 (1965)
- 12) HOFFMANN, G. and PALLAUF, J. : *Z. Pflanzenernaehr. Dueng. Bodenk.*, 110, 193 (1965)
- 13) BECK, T. and PESCHENRIEDER, H. : *Plant Soil*, 18, 346 (1963)
- 14) JACKSON, R.W. and DEMOSS, J.A. : *J. Bacteriol.*, 90, 1420 (1965)
- 15) CHALVIGNAC, M.A. and MAYAUDON, J. : *Plant Soil*, 34, 25 (1971)
- 16) BARTHA, R. and BODELEAU, L. : *Soil Biol. Biochem.*, 1, 139 (1969)
- 17) ROTINI, O.T. : *Am. Labor. Ferm. "Spallanzani"*, 3, 173 (1935)
- 18) KUPREVICH, V.F. and SHCHERBAKOVA, T.A. : *Soil Biochem.*, 2 ed. McLAREN, A.D. and SKUIJNS, J., Marcel Dekker, Inc., New York, p.167 (1971)
- 19) TABATABAI, M.A. and BREMNER, J.M. : *Soil Biol. Biochem.*, 1, 301 (1969)
- 20) 早野恒一・塩島光洲 : 未発表
- 21) LADD, J.N. and BUTLER, J.H.A. : *Soil Biol. Biochem.*, 4, 19 (1972)
- 22) TABATABAI, M.A. and BREMNER, J.M. : *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 34, 225 (1970)
- 23) JOHNSON, J.L. and TEMPLE, K.L. : *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 28, 207 (1964)
- 24) BERNHARD, S.A. : *The Structure and Function of Enzymes*, Benjamin, W.A., Inc., New York, p.16 (1968)
- 25) NICHOLLS, P. and SCHONBAUM, G.R. : *The Enzymes*, 8, ed. BOYER, P.D. et al., Academic Press, New York, p.147 (1963)
- 26) KUPREVICH, V.F. : 土壌酵素学, 技術会議調査資料 59, 農林水産技術会議事務局調査資料課 (1969)
- 27) HAYANO, K. and FUKUI, S. : *J. Bacteriol.*, 101, 692 (1970)
- 28) HAYANO, K. and FUKUI, S. : *J. Biol. Chem.*, 242, 3665 (1967)
- 29) ENSMINGER, L.E. and GIESEKING, J.E. : *Soil Sci.*, 48, 467 (1939)
- 30) McLAREN, A.D. : *J. Phys. Chem.*, 58, 129 (1954)
- 31) ENSMINGER, L.E. and GIESEKING, J.E. : *Soil Sci.*, 53, 205 (1942)
- 32) McLAREN, A.D. : *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 18, 170 (1954)
- 33) McLAREN, A.D. and ESTERMANN, E.F. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 61, 158 (1956)
- 34) McLAREN, A.D. and ESTERMANN, E.F. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 68, 157 (1957)
- 35) LADD, J.N. and BUTLER, J.H.A. : *Soil Biol. Biochem.*, 2, 33 (1970)
- 36) LADD, J.N. and BUTLER, J.H.A. : *Soil Biol. Biochem.*, 3, 157 (1971)
- 37) BUTLER, J.H.A. and LADD, J.N. : *Soil Biol. Biochem.*, 3, 249 (1971)
- 38) MATO, M.C., FÁBREGAS, R. and MÉNDEZ, J. : *Soil Biol. Biochem.*, 3, 285 (1971)
- 39) POLLOCK, M.R. : *The Bacteria IV* ed. GUNSALUS, I.C. and STANIER, Y., Academic Press, New York and London, p.121 (1962)
- 40) PAULSON, K.N. and KURTZ, L.T. : *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 33, 897 (1969)
- 41) BURNS, R.G., EL-SAYED, M.H. and McLAREN, A.D. : *Soil Biol. Biochem.*, 4, 107 (1972)
- 42) RUSSELL, E.J. : 土壌の世界, 高井康雄・西尾道徳訳, 講談社, p.98, p.120, p.128 (1971)
- 43) 小沢 昇・横田義鑑・斎藤庄治 : 土肥誌, 17, 413(1934)
- 44) CONRAD, J.P. : *Soil Sci.*, 54, 367 (1942)
- 45) HOFFMANN, E. : *Recent Progress in Microbiology*, VIII, ed. GIBBONS, N.E., p.216 (1962)
- 46) LADD, J.N. : *Soil Biol. Biochem.*, 4, 227 (1972)
- 47) BAMANN, E., FISCHLER, F. and TRAPMANN, H. : *Biochem. Z.*, 325, 413 (1954)
- 48) BRIGGS, M.H. and SEGAL, L. : *Life Sci.*, No.1, 69 (1963)
- 49) MARTIN-SMITH, M. : *Nature*, 197, 361 (1963)