

土壌中の養分利用性と微生物による酵素生産との関係

資源配分モデルを中心に

誌名	土と微生物
ISSN	09122184
著者名	藤田,一輝 諸,人誌 大塚,重人 長岡,一成 國頭,恭
発行元	土壌微生物研究会
巻/号	73巻1号
巻号補足	
掲載ページ	p. 10-23
発行年月	2019年4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

土壌中の養分利用性と微生物による酵素生産との関係： 資源配分モデルを中心に

藤田一輝¹・諸 人誌²・大塚重人^{3,4}・長岡一成⁵・國頭 恭^{1*}

¹ 信州大学理学部理学科物質循環学コース, 〒390-8621 長野県松本市旭 3-1-1

² 長野県農業試験場, 〒382-0072 長野県須坂市大字小河原 492

³ 東京大学大学院農学生命科学研究科, 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

⁴ 東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構, 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

⁵ 農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター, 〒062-8555 北海道札幌市豊平区羊ヶ丘 1

The relationship between nutrient availability and microbial enzyme synthesis in soils: an emphasis on resource allocation model

Kazuki Fujita¹, Hitoshi Moro², Shigeto Otsuka^{3,4}, Kazunari Nagaoka⁵ and Takashi Kunito^{1*}

¹Department of Environmental Sciences, Faculty of Science, Shinshu University, 3-1-1 Asahi, Matsumoto 390-8621, Japan

²Nagano Agricultural Experiment Station, 492 Ogawara, Suzaka 382-0072, Japan

³Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

⁴Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

⁵Hokkaido Agricultural Research Center, NARO, 1 Hitsujigaoka, Toyohira-ku, Sapporo 062-8555, Japan

Key words: resource allocation, extracellular enzymes, nutrients, stoichiometry

1. 背 景

微生物にとって必須な元素である炭素、窒素およびリンは、土壌中でその多くが高分子の有機物に含まれて存在しているため、微生物は直接利用することができない。そこで微生物はこれら元素を獲得するため、多様な有機物分解酵素を生産し細胞外へ分泌している^{5,20)}。この細胞外酵素の活性は、植物リターや土壌有機物の分解速度と強い相関を持つことが報告されている^{22,97,98,118)}。細胞外へ分泌された酵素の一部は、粘土鉱物や腐植物質に吸着することで長期にわたって土壌中に残存し、活性を維持することが知られている²¹⁾。本稿では、微生物細胞表面に位置する酵素（エクトエンザイム）と、土壌粒子に吸着して存在する酵素をあわせて細胞外酵素として扱う。なお細胞外酵素と細胞内酵素の活性を厳密に区別して測定する方法は確立されていないため⁷⁵⁾、得られる測定値には両者の活性が含まれるが、とくに細胞外で機能することが予想される酵素に関しては、土壌酵素活性と細胞外酵素活性を同義に扱う場合が多い。また土壌酵素活性は、基質が十分にある条件で測定されるため、実際の土壌中での活性では

なく酵素量に相当するものである¹²⁰⁾。土壌酵素の種類や特性については他の文献を参照されたい^{46,47,54,55,57)}。

微生物は細胞外酵素の生産により必要な養分を獲得できるが、他方、細胞外へ分泌する酵素を構成している成分に加え、酵素の生産と細胞外への分泌に用いる代謝エネルギーといったコストもかかる⁷⁾。例えば、微生物は取り込んだ炭素と窒素の1～5%を細胞外酵素生産に消費するとされている^{7,21)}。このため微生物は「経済法則」に従い、細胞外酵素生産に伴う費用と効果とのバランスをとる必要がある^{4,7)}。この必要性から、微生物は細胞外に基質が無い場合でも常に低レベルで細胞外酵素を生産・分泌し、もし基質が流入して、この基底レベルで生産した細胞外酵素により生じた分解産物を感知すると、酵素生産を増加させる。そして基質が無くなると、再び酵素生産を基底レベルまで下げるといった調節を行っている^{26,119)}。

微生物による細胞外酵素生産の調節機構は、特定の微生物種を用いた室内実験において詳細に研究されてきたが、土壌中の微生物群集全体において、養分利用性に応じて細胞外酵素生産がどのように調節されているのかについての理解は不十分である。これまでの研究により、土壌中の養分利用性や基質の量が酵素活性に影響を与えることは判明しているが⁴³⁾、その関係は土壌によって異なり一般性のある結論は得られていない。

例えば、土壌中のホスファターゼ活性とリン濃度との関係については古くから多くの研究がされてきたが、一致した結

2018 年 12 月 20 日受付 2019 年 1 月 21 日受理

* Corresponding author.

E-mail: kunito@shinshu-u.ac.jp

果は得られていない。ホスファターゼ活性との正の相関が無機態リン濃度^{11,58,86,92,113)}や有機態リン濃度^{11,24,50,58,63,92,115)}との間にみられたという報告がある一方で、負の相関が無機態リン濃度^{24,28,87,124)}や全リン濃度⁶⁾との間にみられたとする報告もある。さらには、ホスファターゼ活性は無機態リン濃度^{19,45,63,105)}や有機態リン濃度⁴⁵⁾と有意な相関を示さなかったという報告もある。ホスファターゼ活性とリン濃度に正の相関がある場合は、ホスファターゼ活性が高いため分解産物である無機態リンが増加した、あるいは基質となる有機態リンが多いためホスファターゼが多く生産されたと解釈されることが多い。また負の相関がある場合は、リン濃度が高いため、ホスファターゼ生産が抑制されたと推察されている。

仮に土壤中の酵素生産と養分利用性との関係が定常状態に近い状態であるとするならば、前述した経済法則に従い、酵素活性と養分利用性との間には負の相関がみられることが予想される。しかしながら、先述したようにリン濃度とホスファターゼ活性との間に負の相関が得られない場合も多くあるため、Fatemi *et al.*³³⁾は、ホスファターゼ活性をリン利用性の指標として用いることに疑問を呈している。このような研究間での不一致には、いくつかの理由が考えられる。例えば、土壤中の有機物が多くリン濃度が高いほど微生物バイオマスが高くなり、仮に単位バイオマス当たりのホスファターゼ生産量が低くても、ホスファターゼ活性とリン濃度に正の相関が得られる可能性がある。一方 Olander and Vitousek⁸⁰⁾は、ホスファターゼ生産がリンではなく窒素や炭素などによって調節されている可能性や、細胞外で長期にわたり残存しているホスファターゼが多いため、基質濃度とホスファターゼ活性の関連がみえにくくなっている可能性を示唆している。また Weedon *et al.*¹²¹⁾は土壤中の基質量の影響を指摘している。基質が多く存在する場合には酵素を多く生産するほど分解産物が多く生成されるので、分解産物と酵素活性との間には正の相関がみられるが、基質が少ない場合には、酵素を多く生産しても得られる分解産物は少ないため、分解産物と酵素活性との間には負の相関が生じることがある。

本稿では、いまだ不明な点が多い、土壤中における微生物群集の酵素生産と養分利用性との関係を、細胞外酵素生産の「資源配分モデル」を中心に概説する。本稿での解析には、筆者らの過去のデータ^{38-40,67,74)}を供した。これらのデータには、風乾土を再湿潤させ1週間培養した試料と、冷蔵あるいは冷凍保存した試料の値が含まれている。風乾土を再湿潤した場合には、もとの湿潤土よりも酵素活性は低下するものの⁵⁹⁾、酵素活性の比と養分濃度との関係においては、試料の保存法による有意な影響は認められなかった^{38,39)}。また風乾土を再湿潤させ1週間培養した場合、培養期間中、酵素活性比はほぼ一定の値を示した^{38,39)}。そこで、これらデータを一括して解析に用いた。なお本稿では、可給態養分濃度とは、抽出法等により測定した、植物の成長や養分吸収量と相関を示す養分濃度を指すのに対し、養分利用性とは真に生物が利用できる養分量を意味する。Beegle¹³⁾とHedley⁴⁸⁾も指摘しているように、可給態養分濃度はあくまでも養分利用性と相関を示すだけであって、その絶対値が利用可能な養分量に相

当するわけではない。例えば、同じ可給態リン酸濃度の測定に使われるトルオーグ法とブレイ法でも得られる値には大きな違いがあり、同一の土壤試料でもブレイ法の方が数倍高い値を示すことが知られている^{38,74)}。

2. 細胞外酵素生産における資源配分モデル

Sinsabaugh and Moorhead⁹⁸⁾は、炭素・窒素・リンの獲得に関わる細胞外酵素活性の比が、微生物の養分要求性や環境中の養分利用性を反映するとした「細胞外酵素生産における資源配分モデル」を提唱した。この資源配分モデルによると、微生物は自らの生産性を最大化させるために、環境中の養分利用性に応じて、炭素・窒素・リンの獲得に関わる細胞外酵素生産に資源を配分する(図1)^{96,98,100)}。例えば土壤中でのリン利用性が低い場合は微生物のリン要求性が高まるため、炭素獲得酵素や窒素獲得酵素よりもリン獲得酵素の生産に、より多くの資源を投資する。その結果、リン獲得酵素活性の炭素獲得酵素活性に対する比(リン獲得酵素活性/炭素獲得酵素活性比)と窒素獲得酵素活性に対する比(リン獲得酵素活性/窒素獲得酵素活性比)は増加することになる。

2つの酵素活性の比を用いた場合は炭素・窒素・リン全てを同時に評価できない(例えばリン獲得と炭素獲得に関わるそれぞれの酵素活性の比を用いた場合は、リンと炭素の相対的な利用性評価しかできない)。そこで、三者の獲得に関わる酵素の関係を同時に評価する方法として、Moorhead *et al.*⁷⁰⁾によりベクトル解析法が考案された(図2)。この解析法ではx軸を炭素獲得酵素活性/リン獲得酵素活性比、y軸を炭素獲得酵素活性/窒素獲得酵素活性比として用いることで、原点と座標点のベクトル長は炭素と他の養分の相対的な欠乏程度を示し、ベクトル長が大きいほど炭素制限であることを意味する。またベクトルの角度(θ)は相対的な養分制限の程度を示しており、 θ が大きいほどリン制限、小さいほど窒素制限であることを表す。炭素・窒素・リンの獲得に関わる細胞外酵素活性の比は、土壤¹⁰¹⁾あるいは土壤と河川底質を合わせたデータ¹⁰²⁾においてほぼ1:1:1になることが経験的に知られている。このためこの比を基準にし、 θ が 45° 以上で微生物はリン制限、 45° 以下で窒素制限と解釈される場合もあるが、三者の関係が1:1:1から大きく外れる試料も多く存在することから^{101,102)}、その解釈には慎重を要する。またこの結果はMUB(4-methyl-umbelliferone)基質を用いた酵素活性測定によるものであり、他の基質(例えばp-ニトロフェノール基質)を用いた場合にも成立するかどうかは不明である。

資源配分モデルに基づき、細胞外酵素活性の比(化学量論)は、とくに生態学の分野を中心に、環境中の養分利用性や微生物の養分状態を表わす指標としてしばしば用いられてきた^{32,51,71)}。しかしながら、細胞外酵素活性の化学量論が実際の環境中で本当に養分利用性を反映しているのか、また微生物が細胞外酵素を生産する際の養分利用性とは一体どのような形態あるいは存在状態の養分のことを意味するのか、といった基礎的な情報すら不足していた。例えば河川底質にお

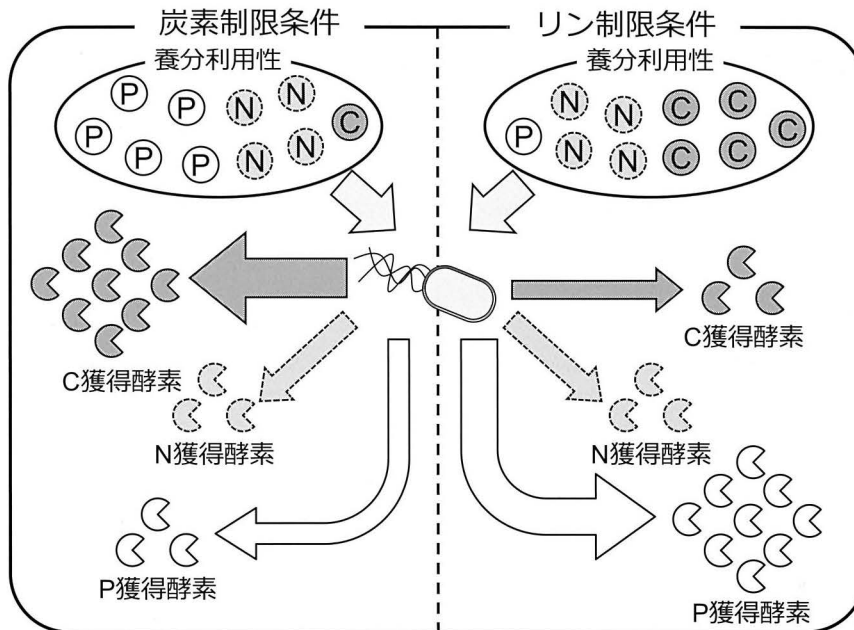


図1 炭素制限条件下とリン制限条件下での微生物の酵素生産における資源配分。炭素利用性が低い場合は微生物の炭素要求性が高まるため、窒素獲得酵素やリン獲得酵素よりも炭素獲得酵素を多く生産するが、リン利用性が低い場合は、炭素獲得酵素や窒素獲得酵素よりもリン獲得酵素を多く生産する。

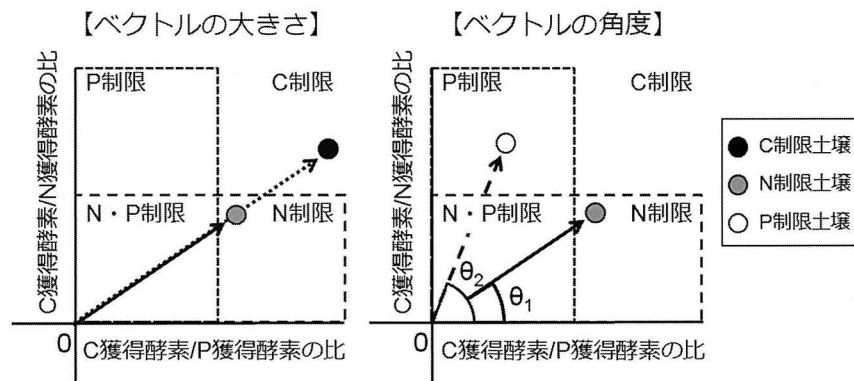


図2 酵素化学量論を用いたベクトル解析法⁷⁰⁾。(左)炭素利用性が低い(炭素制限条件下にある)場合、微生物は炭素獲得酵素生産に資源を多く配分する(相対的に炭素獲得酵素を多く生産する)ため、ベクトル長は大きくなる。(右)リン利用性が低い(リン制限条件下にある)場合、微生物は窒素獲得酵素よりもリン獲得酵素の生産に資源を多く配分する(相対的にリン獲得酵素を多く生産する)ため、x軸の値は小さくy軸の値は大きくなる。他方、窒素利用性が低い場合、リン獲得酵素よりも窒素獲得酵素の生産に資源を多く配分する(相対的に窒素獲得酵素を多く生産する)ため、x軸の値は大きくy軸の値は小さくなる。すなわち、 θ (原点と座標点のベクトルがx軸となす角度)が小さいほど窒素制限(θ_1)、大きいほどリン制限(θ_2)であることを表す。

いて、炭素獲得酵素活性/リン獲得酵素活性比と全炭素濃度/全リン濃度比との間、また炭素獲得酵素活性/窒素獲得酵素活性比と全炭素濃度/全窒素濃度比との間には明瞭な関係はみつかっていない¹⁰³⁾。これは、底質中のリンや窒素の全濃度のみ測定し利用性を考慮しなかったことによる可能性があるが、細胞外酵素活性の化学量論と養分利用性との関連性は詳細には研究されてこなかった。しかし後述するように、最近になってようやく、細胞外酵素活性の化学量論と土壌中の養分の存在状態との関係が明らかになりつつある^{38,39,74)}。

3. リン獲得酵素

これまでリン獲得酵素として最も多く測定されてきたのは、ホスホノエステラーゼに属する酸性ホスファターゼとアルカリホスファターゼである。通常、酸性ホスファターゼはpH 6.5、アルカリホスファターゼはpH 11で測定される¹¹⁰⁾。アルカリホスファターゼは主として細菌が生産し、酸性ホスファターゼは菌類・細菌・植物が生産することが知られている⁷⁵⁾。なお本稿の解析に供したホスファターゼ活性のデータ^{38,40,67,74)}は、基質として用いたp-ニトロフェニルリン酸

の加水分解により生じた *p*-ニトロフェノールを定量したものである。測定に用いた水酸化ナトリウムと塩化カルシウムを含んだ溶液により、*p*-ニトロフェノールは土壌からほぼ全量回収できることが報告されている¹¹¹⁾。

熱帯雨林土壌において、リン添加によりリン獲得酵素活性/炭素獲得酵素活性比が低下したことから、細胞外酵素の資源配分モデルは土壌中のリン利用性を反映していると考えられた¹¹⁶⁾。また過去の報告を統合・解析したメタ解析において土壌中ホスファターゼ活性はリン添加で減少しており⁶⁴⁾、資源配分モデルと一致した結果となっている。

3.1 アルカリホスファターゼ

アルカリホスファターゼと酸性ホスファターゼ活性を比較した場合、アルカリホスファターゼはアルカリ性の土壌で卓越し、酸性ホスファターゼは酸性の土壌で卓越することが知られている⁷⁵⁾。日本の畑土壌の多くは弱酸性であり、酸性ホスファターゼの至適 pH 6.5 とほぼ同じであるため、概して酸性ホスファターゼ活性の方がアルカリホスファターゼ活性よりも高値を示す^{38,67)}。しかし、おそらく石灰施用の影響で、アルカリホスファターゼ活性が酸性ホスファターゼ活性と同等あるいはむしろ高い畑土壌も存在する^{67,74)}。また pH 3.8 という酸性の森林土壌においても、メタゲノム解析により、酸性ホスファターゼよりもアルカリホスファターゼをコードする遺伝子の方が高頻度で存在することが報告されている¹⁵⁾。

日本各地から採取した畑土壌において、炭素獲得酵素である β -D-グルコシダーゼ活性に対するアルカリホスファターゼ活性の比を、改変した Hedley の逐次抽出法⁴⁹⁾ による幾つもの抽出画分や、トルオーグ法やブレイ第二法（準法）による可給態リン酸濃度（本稿では、利用性の高い無機態リンを可給態リン酸と表現する）と比較した。その結果、畑土壌では、この酵素活性比はいずれの可給態リン酸濃度とも有意な

負の相関を示したが、とくにトルオーグリン酸濃度との相関が最も強かった（図 3 (a)）。またいずれの有機態リン画分濃度に対しても強い負の相関を示さず^{38,74)}、これは可給態リン酸濃度と pH を考慮した場合でも同様であった。この結果より、可給態リン酸濃度の低い畑土壌では、微生物がアルカリホスファターゼ生産に優先的に資源を配分していることが示唆された。他方、森林土壌では、可給態リン酸濃度が低いときにアルカリホスファターゼ活性/ β -D-グルコシダーゼ活性比が高い傾向はみられたが、有意な負の相関は得られなかった（図 3 (b)）。森林土壌で有意な相関がみられなかった理由として、森林土壌の pH が低いため、アルカリホスファターゼの生産量が低かったことが挙げられる³⁸⁾。また酸性の森林土壌では菌類が優占しているが¹⁷⁾、菌類はアルカリホスファターゼをあまり生産しないこと⁷⁵⁾ も一因と考えられる。

3.2 酸性ホスファターゼ

アルカリホスファターゼとは対照的に、酸性ホスファターゼ活性の β -D-グルコシダーゼ活性に対する比は、森林土壌では水抽出リン酸や炭酸水素ナトリウム抽出リン酸という可給態リン酸濃度と有意な負の相関を示したが、畑土壌ではこのような関係は認められなかった（図 4）。またいずれの有機態リン画分濃度の影響も認められず^{38,74)}、これは可給態リン酸濃度と pH を考慮した場合でも同様であった。解析に用いた畑土壌の pH は酸性ホスファターゼの至適 pH と近いいため、畑土壌で酵素活性比と可給態リン酸濃度との間に関連が認められなかったのは pH の直接的な影響ではなく、微生物群集組成の違いによるのかもしれない。菌類が優占した森林土壌と比較すると、畑土壌では、酸性ホスファターゼ生産への細菌の寄与が大きいと予測されるが、土壌中に遍在している細菌の酸性ホスファターゼのクラス A と C は共に、その発現へのリン利用性の影響は小さいとされている^{78,89)}。また

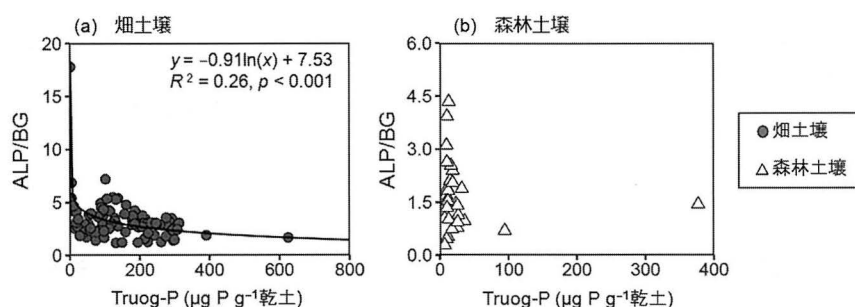


図3 アルカリホスファターゼ活性の β -D-グルコシダーゼ活性に対する比 (ALP/BG) と可給態リン酸濃度との関係。(a) 畑土壌における ALP/BG 比とトルオーグ法による可給態リン酸 (Truog-P) 濃度との関係 ($n = 101$)。この関係はスピアマンの順位相関でも有意であった ($r = -0.223$, $p < 0.05$)。pH を説明変数に加えたステップワイズ重回帰分析の結果は、 $\text{ALP/BG} = 1.00 \times \text{pH} - 0.95 \times \ln(\text{Truog-P}) + 1.45$ (adjusted $R^2 = 0.35$, $P < 0.001$; $n = 101$) であった。また酵素活性比が最大のデータと Truog-P 濃度が最大のデータの外れ値 2 つを除いて解析しても有意であった ($R^2 = 0.09$, $p < 0.01$; $n = 99$)。外れ値 2 つを除いたデータの重回帰分析の結果は、 $\text{ALP/BG} = 0.58 \times \text{pH} - 0.44 \times \ln(\text{Truog-P}) + 1.58$ (adjusted $R^2 = 0.16$, $p < 0.001$; $n = 99$) であった。(b) 森林土壌における ALP/BG 比と Truog-P 濃度との関係 ($n = 29$)。文献 38, 40, 67, 74 のデータをもとに解析した。

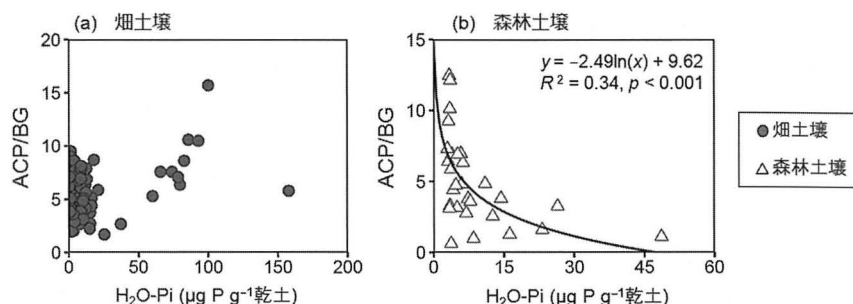


図4 (a) 畑土壌 ($n=77$) と (b) 森林土壌 ($n=29$) における酸性ホスファターゼ活性の β -D-グルコシダーゼ活性に対する比 (ACP/BG) と水抽出法による可給態リン酸 ($H_2O\text{-}Pi$) 濃度との関係。森林土壌では、 $Truog\text{-}P$ 濃度とは有意な相関を示さなかった。pH を説明変数に加えたステップワイズ重回帰分析の結果は、 $ACP/BG = 1.69 \times pH - 2.78 \times \ln(H_2O\text{-}Pi) + 1.36$ (adjusted $R^2 = 0.40, P < 0.001; n = 29$) であった。文献 38, 67, 74 のデータをもとに解析した。

Spohn and Kuzyakov¹⁰⁷⁾ は、畑土壌において、酸性ホスファターゼ生産菌のリン利用性への応答は、アルカリホスファターゼ生産菌よりも小さく、リン施肥によりアルカリホスファターゼ活性は下がるが酸性ホスファターゼ活性は変化しないことを報告している。

しかしながら、もともと同一の土壌を異なる施肥条件で管理した圃場から採取した土壌試料⁷⁴⁾ や、同じ水田で経時的に採取した試料⁶¹⁾ では、酸性ホスファターゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比と可給態リン酸濃度との間に有意な負の相関があることが報告されている。このため可給態リン酸濃度以外の土壌特性が類似した土壌では、森林土壌以外でも、酸性ホスファターゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比がリン利用性を反映している可能性がある。この点については、さらに多くの試料を用いた解析により検討する必要がある。

アルカリホスファターゼおよび酸性ホスファターゼの生産は、土壌中のリン利用性に応じて調節されていることが示唆されたが、図3と4の決定係数からも分かるように、アルカリホスファターゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比と酸性ホスファターゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比の変動のうち、可給態リン酸濃度で説明できる割合は半分未満である。すなわち、アルカリホスファターゼと酸性ホスファターゼ生産の調節には、リン利用性以外の因子も関わっている。Fujita *et al.*³⁸⁾ はアルカリホスファターゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比と酸性ホスファターゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比は、pH や土壌型によっても影響を受けることを見いだした。また本稿のデータセットにおいても、畑土壌のアルカリホスファターゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比と森林土壌の酸性ホスファターゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比の両者とも、重回帰分析により、可給態リン酸濃度と pH の両方により影響されることが示唆された(図3と4の説明文を参照)。さらにホスファターゼが、リン獲得のためだけではなく、炭素獲得のためにも生産されているという考えもある^{27,106,108)}。実際にいくつかの微生物では、リンが枯渇したときに発現することが知られている *Pho* レギュロン遺伝子群(ホスファターゼ遺伝子も含まれる)は、炭素カタボライト抑制によっても発現が調節されている⁹¹⁾。しかし Fujita *et al.*³⁸⁾ および本稿のデータセット

による解析では、ホスファターゼ生産に最も大きく影響するのは可給態リン酸濃度と pH であり、他の因子の影響は相対的に小さいと推察される。

4. 窒素獲得酵素

細胞外酵素生産における資源配分モデルに基づく、リン獲得酵素と同様に、窒素獲得酵素の生産は窒素富化により抑制されると考えられる。しかしながら、有機態窒素化合物の無機化は窒素獲得だけではなくエネルギー獲得とも関連している^{66,80)}。さらに基質特異性が低く様々なリン化合物を分解できるホスファターゼとは異なり、各有機態窒素化合物は各々別の窒素獲得酵素により分解されるため⁹⁹⁾、土壌中の窒素利用性と窒素獲得酵素活性との関係は不明瞭であるとされている^{5,95,127)}。また窒素獲得酵素活性に対する窒素添加の影響を調査したメタ解析では、窒素獲得酵素の種類によってその応答は異なることが示されている^{25,53)}。本節では、4種の窒素獲得酵素の活性と窒素利用性との関係をまとめる。

4.1 プロテアーゼ

プロテアーゼはタンパク質分解に関わる酵素であり、古くから窒素獲得酵素の代表格として測定されてきた。Fujita *et al.*³⁹⁾ は、異なる施肥条件で管理した長期連用圃場において、プロテアーゼ活性の β -D-グルコシダーゼ活性に対する比と13種の窒素利用性の指標(交換性の無機態窒素やリン酸緩衝液抽出性有機態窒素、畑状態および湛水状態において保温静置法により測定した無機化可能な有機態窒素など)とを比較した。その結果、資源配分モデルによる予測とは逆に、プロテアーゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比はいくつかの窒素利用性の指標と正の相関を示した。プロテアーゼ生産が資源配分モデルで説明できなかった理由として、プロテアーゼが窒素以外の養分獲得のためにも生産されていることが挙げられる。土壌中のプロテアーゼ活性は窒素制限で増加するが¹⁰⁴⁾、細菌^{3,122)} と菌類^{79,123)} においてその生産は、窒素制限に加え炭素やイオウ制限によっても誘導される。しかし土壌中でのプロテアーゼ活性が、どの養分制限に最もよく応答する

のかについては、一致した結果は得られていない。Sims and Wander⁹⁴⁾ は、土壤中のプロテアーゼは炭素獲得よりも、窒素とイオウ獲得のために主に生産されると報告した。一方 Vranova *et al.*¹¹⁷⁾ は、土壤中のプロテアーゼは窒素よりも炭素獲得のために主に生産されていると述べ、また Geisseler and Horwath⁴¹⁾ は窒素と炭素の両方の獲得のために生産されているとした。この不一致は、優占している微生物のプロテアーゼ生産の調節機構が土壌間で異なることによるのかもしれない。例えば多くの菌類が有機態窒素化合物を窒素源としてだけではなく炭素源としても利用する一方、酵母 *Saccharomyces* spp. は主に窒素源として使うことが知られている¹²³⁾。

4.2 N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ

N-アセチル-β-グルコサミニダーゼは、菌類の細胞壁や昆虫の外皮などの主成分であるキチンから N-アセチルグルコサミンを切り離す酵素である¹⁴⁾。N-アセチル-β-グルコサミニダーゼは、アミノペプチダーゼの一種であるロイシンアミノペプチダーゼと活性を合計することで、窒素獲得酵素として用いられることが多い^{101,102)}。Sinsabaugh *et al.*¹⁰³⁾ は河川底質において、β-D-グルコシダーゼ活性の、N-アセチル-β-グルコサミニダーゼとロイシンアミノペプチダーゼ活性の和に対する比 [β-D-グルコシダーゼ活性/(N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ+ロイシンアミノペプチダーゼ)] が全炭素/全窒素の比ときわめて弱いながらも有意な負の相関があることを示した。しかしながらこれまで、β-D-グルコシダーゼ活性/(N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ+ロイシンアミノペプチダーゼ) 比と窒素利用性との関連を詳細に調べた研究例は見当たらない。

異なる施肥条件で管理した長期連用圃場において、N-アセチル-β-グルコサミニダーゼの β-D-グルコシダーゼ活性に対する比と 13 種の窒素利用性の指標とを比較したところ、N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ/β-D-グルコシダーゼ活性比は窒素利用性が低いほど増加する傾向はみられたものの、その関係は有意ではなかった³⁹⁾。温帯林土壌¹²⁸⁾ や熱帯雨林土壌⁷²⁾ においても、N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ/β-D-グルコシダーゼ活性比に対する窒素添加による有意な影

響は認められなかった。資源配分モデルにより N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ活性が明瞭に説明できなかった理由として、pH の影響が考えられる。様々な生態系から採取した土壌において、N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ活性は、pH の低下に伴い増加することが示されている¹⁰¹⁾。Fujita *et al.*³⁹⁾ においても、重回帰分析により pH の影響を考慮すると、N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ/β-D-グルコシダーゼ活性比に対する窒素利用性の有意な負の影響が認められ、資源配分モデルと一致した。しかし、土壌中で N-アセチル-β-グルコサミニダーゼは窒素だけではなく、炭素獲得のためにも生産されている可能性もある^{12,72)}。実際、少なくとも一部の微生物では、N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ生産は、炭素カタボライト抑制により調節されている^{56,82)}。以上の知見より、土壌中の N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ活性は窒素利用性を反映している可能性はあるものの、土壌 pH などの他の要因の影響の方が大きいと考えられる。

4.3 L-アスパラギナーゼ

L-アスパラギナーゼは、L-アスパラギンや、ペプチド C 末端にある L-アスパラギンから、加水分解によりアンモニアを放出させる酵素である^{30,52)}。L-アスパラギナーゼ活性の β-D-グルコシダーゼ活性に対する比は、畑土壌や水田土壌において全窒素濃度と有意な負の相関を示した^{61,74)}。Fujita *et al.*³⁹⁾ によると、L-アスパラギナーゼ/β-D-グルコシダーゼ活性比は、交換性の無機態窒素やリン酸緩衝液抽出性有機態窒素などの濃度よりも、畑状態での保温静置法により測定された、潜在的に無機化可能な有機態窒素（本稿では可給態窒素と呼ぶ）濃度と有意な強い負の相関を示した。また未発表データをあわせて解析した場合でも同様に、両者に強い負の相関が得られた（図 5 (a)）。このことは土壌微生物が、可給態窒素濃度に応じて L-アスパラギナーゼを生産していることを示唆している。

この可給態窒素濃度と L-アスパラギナーゼ/β-D-グルコシダーゼ活性比との負の相関は、L-アスパラギナーゼの生産機構によると考えられる。*Saccharomyces cerevisiae* の細胞内 L-アスパラギナーゼは構成的に発現するものの、細胞外 L-ア

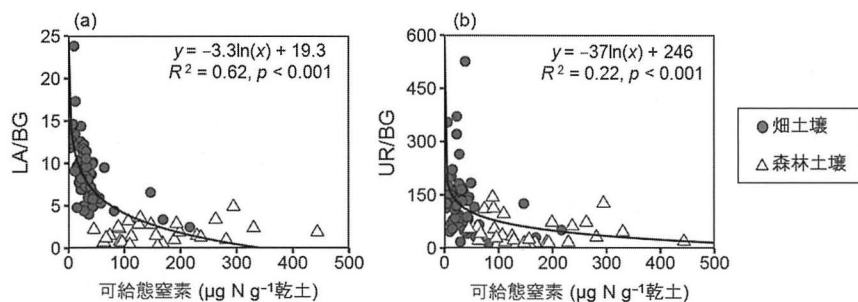


図5 窒素獲得酵素活性のβ-D-グルコシダーゼ活性に対する比と可給態窒素濃度との関係。(a) L-アスパラギナーゼ/β-D-グルコシダーゼ活性の比 (LA/BG) と、保温静置法により推定した可給態窒素濃度との関係。pH を説明変数に加えたステップワイズ重回帰分析の結果は、 $LA/BG = 1.38 \times pH - 2.73 \times \ln(\text{可給態 N}) + 8.74$ (adjusted $R^2 = 0.65$, $P < 0.001$; $n = 94$) であった。(b) ウレアーゼ/β-D-グルコシダーゼ活性の比 (UR/BG) と可給態窒素濃度との関係。文献 39 と 40 のデータをもとに解析した。

スパラギナーゼは *S. cerevisiae*²⁹⁾ および *Bacillus subtilis*³⁵⁾ において窒素制限により発現が促進され、 NH_4^+ やアミノ酸の添加によって発現が抑制されることが報告されている。また *B. licheniformis* では、L-アスパラギナーゼは炭素獲得のためではなく窒素獲得のために生産されることが示されている⁴⁴⁾。Atkinson and Fisher⁸⁾ は、*B. subtilis* において、炭素制限の状態や NH_4^+ あるいは NH_4^+ の供給源として優れた窒素化合物 (e.g., アルギニン, アスパラギン, グルタミン) の存在下では L-アスパラギナーゼ生産は抑制されたが、 NH_4^+ の供給源としては好ましくない窒素化合物 (e.g., アスパラギン酸, プロリン, グルタミン酸) の存在下では生産が増加したことを報告した。以上のことから、細胞外 L-アスパラギナーゼは主に窒素を獲得するために生産されており、またその生産は窒素利用性により制御されているため、図 5 (a) のような負の相関が得られたものと考えられる。このように、土壤微生物群集による L-アスパラギナーゼ生産は、土壤中の窒素利用性に依存すると考えられる。

L-アスパラギナーゼ活性は、土壤 pH が 4.5 ~ 7.0 の間では、土壤 pH と正の相関を示すことが報告されており³¹⁾、実際 Fujita *et al.*³⁹⁾ においても L-アスパラギナーゼ活性と L-アスパラギナーゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比の両者とも土壤 pH と有意な正の相関を示した。また重回帰分析により、L-アスパラギナーゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比は可給態窒素濃度と pH の両方の影響を受けることが示唆された (図 5 の説明文を参照)。このため、土壤中の L-アスパラギナーゼ活性は、窒素利用性ととも土壤 pH によっても影響を受けていると推察される。

4.4 ウレアーゼ

ウレアーゼは尿素をアンモニアと二酸化炭素に分解する酵素である。尿素は肥料としての使用に加え、核酸や一部のアミノ酸からの分解産物としても生成されるため⁶⁸⁾、自然環境中においても重要な有機態窒素化合物となっている。ウレアーゼ活性の β -D-グルコシダーゼ活性に対する比は、L-アスパラギナーゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比と同様、可給態窒素濃度と有意な負の相関を示した (図 5 (b))。この結果は、L-アスパラギナーゼの場合と同様、ウレアーゼ生産が窒素利用性を反映していることによるだろう。*B. subtilis* では、窒素利用性が高い場合にはウレアーゼの発現は抑制され、窒素制限の状態では生産が促進されることが知られている³⁴⁾。しかし、微生物の中には、ウレアーゼを構成的にしか発現しないものもいれば、窒素制限時に発現するもの、基質である尿素が存在するときのみ発現するものもある^{68,69)}。図 5 (b) で示したウレアーゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比と可給態窒素濃度との負の相関は、窒素制限時にウレアーゼを発現する菌が土壤中で優占していることを暗示している。McCarty *et al.*⁶⁵⁾ もまた、土壤への無機態窒素やアミノ酸の添加により、微生物のウレアーゼ生産が抑制されることを報告した。

ウレアーゼ活性は、土壤 pH が 4.5 ~ 7.0 の間では、土壤 pH と正の相関を示すことが報告されているが³¹⁾、Fujita *et al.*³⁹⁾ では、ウレアーゼ活性とウレアーゼ/ β -D-グルコシダー

ゼ活性比の両者とも土壤 pH と有意な相関を示さなかった。本稿のデータセットでは、重回帰分析においても土壤 pH の影響は認められなかったが、Fujita *et al.*³⁹⁾ では、ウレアーゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比は可給態窒素濃度と pH の両方の影響を受けることが示唆された。このため土壤中のウレアーゼ生産は、主に窒素利用性により調節されるが、土壤 pH の影響も受けるものと推察される。

これまで紹介した酵素とは異なり、ウレアーゼは基本的には細胞内で働く酵素とされている⁶⁹⁾。ただし、土壤中のウレアーゼ活性の約半分は細胞外に存在するウレアーゼに由来するという推定もある⁸³⁾。もともと酵素生産の資源配分モデルは細胞外に分泌される酵素を対象に提唱されたものであり⁹⁾、細胞内における酵素生産にも適応できるのか否かは今後の研究を待たねばならない。

4.5 窒素利用性に対する窒素獲得酵素間での応答の違い

先述したように、有機態窒素化合物は窒素源としてだけでなく炭素源ともなりうる。Averill⁹⁾ は、窒素獲得酵素が窒素獲得のためだけに生産されているとする EnzOpt モデルと、窒素と炭素の両方の獲得のために生産されているとする EnzMax モデルを考え、基質の炭素濃度/窒素濃度比と炭素獲得酵素/窒素獲得酵素の比との関係をシミュレーションした (図 6)。その結果、炭素利用性が高い場合 (すなわち窒素利用性が低い場合) は、両モデルとも同様の結果となるが、炭素利用性が低い場合 (すなわち窒素利用性が高い場合) には、EnzOpt モデルでは窒素獲得酵素を生産する必要が低いため、炭素獲得酵素/窒素獲得酵素の比は上昇する (図 5 の軸の表示の仕方においても、同様な関係になる)。他方 EnzMax モデルでは、窒素と炭素の両方の獲得のために窒素獲得酵素は生産されるため、炭素利用性が低いと炭素獲得酵素/窒素獲得酵素の比は一定になる (図 5 の軸の表示の仕方においては、窒素利用性が高くなるにつれ酵素活性比は低下するが、

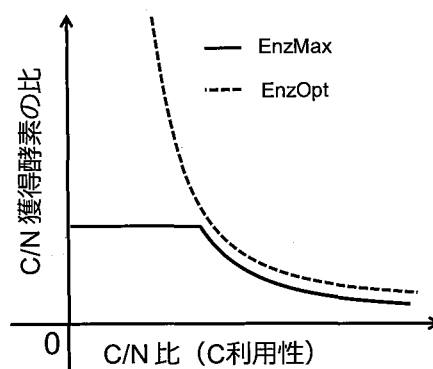


図 6 EnzMax モデルと EnzOpt モデルにおける、基質の炭素と窒素の濃度比 (C/N) と、炭素獲得酵素活性の窒素獲得酵素活性に対する比との関係⁹⁾。窒素獲得酵素が窒素獲得のためだけに生産されているとする EnzOpt モデルでは、炭素利用性が低い場合 (すなわち窒素利用性が高い場合) には窒素獲得酵素を生産する必要が低いため、炭素/窒素獲得酵素の比は上昇する。他方、窒素獲得酵素が窒素と炭素の両方の獲得のために生産されているとする EnzMax モデルでは、窒素利用性が低い場合でも炭素を獲得するために窒素獲得酵素は生産されるため、炭素/窒素獲得酵素の比は一定になる。

ある閾値を超えると一定になる)。L-アスパラギナーゼとウレアーゼの結果(図5)は、窒素利用性が高くなるにつれ窒素/炭素獲得酵素の比が低下しており、EnzOptモデルに類似した。このため、土壤中において両酵素が主に窒素獲得のために生産されていることが推察される。N-アセチル- β -グルコサミニダーゼの結果はEnzOptモデルとEnzMaxモデルのいずれと似通っているのかは判断できなかったが、プロテアーゼの結果はこれら両モデルとは全く異なった³⁹⁾。このため、土壤中で微生物が、プロテアーゼを主に窒素獲得のために生産しているとは考えにくい。

EnzOptモデルにより生産が表現できるL-アスパラギナーゼとウレアーゼは、 NH_4^+ やアミノ酸といった微生物が直接吸収可能な低分子窒素化合物を放出する酵素である。他方、EnzOptモデルに従わないプロテアーゼとN-アセチル- β -グルコサミニダーゼの分解産物は、微生物の取り込みが容易でなかったり、炭素を多く含むといった特徴をもつ有機態窒素化合物である。このためL-アスパラギナーゼとウレアーゼの方が、より窒素獲得酵素としての意味合いが強いものと思われる。

5. 細胞外酵素生産が反映する養分の形態・存在状態

土壤微生物によるリン獲得酵素の生産は、先述したように可給態リン酸濃度を反映しており、畑土壌のアルカリホスファターゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比と森林土壌の酸性ホスファターゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比はトルオーグリン酸濃度や水抽出リン酸濃度と有意な負の相関を示した(図3と4)。他方、窒素獲得酵素であるL-アスパラギナーゼとウレアーゼの生産は、利用性の高い交換性の無機態窒素濃度よりも、保温静置法により測定される、潜在的に無機化可能な可給態窒素濃度と強い負の相関を示した(図5)。このことは、窒素獲得酵素はリン獲得酵素とは異なり、既に土壤中に存在する利用性の高い養分(養分プール)よりも養分供給速度に依存することを暗示している。窒素獲得酵素の生産が、利用性の高い交換性無機態窒素濃度を反映しなかったのは、交換性無機態窒素がその時点での利用可能な窒素濃度を示しているにすぎず、窒素の供給速度を反映していないことによると推察される。Binkley and Vitousek¹⁸⁾によると、交換性の NH_4^+ や NO_3^- は土壤中において最も利用されやすい窒素形態ではあるものの、そのプールサイズでは生態系における窒素の需要は賄えず、生物の取り込みによって減少した交換性無機態窒素プールへ、土壤から迅速に無機態窒素が供給される必要がある。またSullivan *et al.*¹⁰⁹⁾は、微生物と植物における窒素取り込みに重要なのは、一時的に存在している利用性の高い窒素プール(すなわち、交換性無機態窒素)ではなく、窒素供給速度であることを指摘している。リン獲得酵素と窒素獲得酵素の生産を規定している養分の形態・存在状態が異なった理由として、両元素の土壤中での挙動の違いが考えられる。無機態リン酸は土壤粒子への吸着により土壤に保持されやすいため、可給態リン酸のプールサイズが生物へのリン供給を反映しているが、無機態窒素は生物への取り込み量が

多いことに加え溶脱や脱窒等により系外へ流出しやすいため、交換性無機態窒素のプールサイズよりも供給速度の方が微生物への窒素供給をよく反映した可能性がある。

6. 今後の課題と展望

6.1 用いる酵素の選択

有機態窒素化合物の分解には様々な酵素が関わっているため、窒素獲得酵素を1種類の酵素で代表させるのは不適切であるという批判^{76,77)}がある一方、類似の化合物の分解に関わる酵素間では活性に相関があるため1種類の酵素で代表させることができるという考え方もある⁷⁰⁾。前者の考え方から、窒素獲得酵素として、N-アセチル- β -グルコサミニダーゼとロイシニアミノペプチダーゼ活性の和がしばしば用いられている^{103,125)}。しかし本稿で紹介したように、通常窒素獲得酵素として扱われている酵素でも、窒素利用性を反映するものもあれば反映しないものもある。N-アセチル- β -グルコサミニダーゼに関しては、窒素利用性との相関はpHの影響を考慮したときにのみ見られる弱いものであり³⁹⁾、またロイシニアミノペプチダーゼについては窒素利用性との関係を詳細に調べた報告例は皆無である。またN-アセチル- β -グルコサミニダーゼ活性は土壤pHと正の相関、ロイシニアミノペプチダーゼ活性は負の相関と、pHに関しては正反対の関係を示す¹⁰¹⁾。Moorhead *et al.*⁷¹⁾は、N-アセチル- β -グルコサミニダーゼとロイシニアミノペプチダーゼ活性の和を用いることで土壤pHの影響を受けない微生物の窒素要求性の指標となるとしているが、この点については議論の余地があると思われる。各養分に対する微生物の要求性や土壤中での養分利用性を示す指標として、どの酵素を用いるのかについては、細心の注意を払う必要がある。

また土壤の養分利用性や微生物の養分要求性を評価するために酵素を選択する際には、土壤中における酵素基質の有無にも留意する必要がある。酵素生産には基質による誘導がきわめて大きく影響し^{41,42)}、もし基質が存在しなければ、仮にその酵素が対象とする養分が欠乏している場合でも酵素はあまり生産されない可能性がある¹¹⁹⁾。極端な例として、南極大陸では主な一次生産者はシアノバクテリアでセルロースはあまり存在しないため、炭素獲得酵素として β -D-グルコシダーゼを用いることは不適切である⁷¹⁾。

6.2 細胞外酵素生産を規定する要因

畑土壌におけるアルカリホスファターゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比と森林土壌における酸性ホスファターゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比は可給態リン酸濃度と有意な負の相関を(図3と4)、またL-アスパラギナーゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比とウレアーゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比は可給態窒素濃度と有意な負の相関を示したが(図5)、養分利用性により説明できた変動は、最大で、L-アスパラギナーゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比の62%であった。このことから、これら酵素活性の化学量論は養分利用性だけでは規定されないことが分かる。酵素活性の化学量論に影響を与える他の因

子として、土壌 pH が挙げられる。様々な酵素活性が土壌 pH と正あるいは負の相関を示すことが報告されており^{1,60,101)} 先述した 4 つの酵素活性比のいずれにおいても pH の影響が認められた。

微生物群集組成も、酵素活性の化学量論に影響する可能性がある。同一土壌において細菌と菌類の制限因子が異なる場合もあるため⁸⁸⁾、いずれのグループが主として酵素を生産するかで酵素活性の化学量論は変化しうる。またゲノム解析された細菌では、 β -D-グルコシダーゼ遺伝子を保有するものは 80%¹⁶⁾、アルカリホスファターゼ遺伝子の場合には約半分であった⁶²⁾。また菌類でもホスファターゼ遺伝子を持つ頻度は門によって大きく異なることが判明している¹¹⁴⁾。このようにこれら細胞外酵素の遺伝子は、全ての微生物種が保有しているわけではないため、これら酵素を生産する微生物の割合や群集組成は土壌間で変動しうる。仮に各微生物種における細胞外酵素生産の調節機構が同一でないとすれば、細胞外酵素活性の化学量論も当然異なるであろう。また最近、細菌の細胞外プロテアーゼ生産の調節にはクオラムセンシングも関与していることが示唆されており²³⁾、細胞外酵素活性の化学量論を規定する要因についてはいまだ理解が不十分である。

6.3 養分利用性の指標としての細胞外酵素化学量論の特性

土壌微生物の養分要求性を調べるには、本稿で紹介した細胞外酵素活性の化学量論と、養分添加実験^{2,59,73)}が主に使用されている。細胞外酵素活性の化学量論は可給態養分濃度に応じて漸移する一方(図 3~5)、養分添加実験では、微生物活性や増殖を制限している養分を添加したときのみ微生物の正の応答がみられるという特徴がある。養分添加実験では全か無かの結果になるため、土壌間での養分利用性を比較することは困難である。また例えばリン利用性がきわめて低い土壌でも、窒素が制限因子である場合には、リン添加に対して微生物が応答しない可能性もある。このため土壌中の養分利用性を評価する場合には、養分添加実験よりも細胞外酵素活性の化学量論の方が優れている可能性がある⁷⁴⁾。しかし細胞外酵素活性の化学量論では、微生物の養分要求性を相対的に評価することは可能だが、どの養分が制限因子であるかを厳密に評価することは困難である。

Rosinger *et al.*⁸⁸⁾ は、細胞外酵素活性の化学量論から推定した微生物の制限因子と、養分添加により推定した土壌呼吸や細菌・菌類増殖の制限因子とが、異なることを報告した。この結果は、微生物特性により、養分利用性に対する応答の感受性が異なる、あるいは応答するのにかかる時間が異なることを示唆している。細胞外酵素は、微生物により土壌中へ放出されてから 12 週間経った後もかなりの活性を示す場合もあるため⁹³⁾、短期的な微生物の養分要求性を反映しにくい特性をもつ。水田⁶¹⁾と畑地⁴⁰⁾で約 1 カ月の間隔で土壌を採取し、養分利用性と細胞外酵素活性の化学量論の経時変化を調べたところ、両者には有意な相関があった。このため細胞外酵素活性の化学量論は、1 カ月程度の期間の微生物の養分要求性を反映することは可能であろう。細胞外酵素活性の

化学量論が、さらに短期間での微生物の養分要求性を反映するのか否かは今後解明する必要がある。

畑地において作物のリンと窒素の取り込みが各々、アルカリホスファターゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比⁷⁴⁾と L-アスパラギナーゼ/ β -D-グルコシダーゼ活性比³⁹⁾と相関があることが報告されている。また植物と微生物の利用する土壌中の養分プールは同一と考えられている¹⁰⁹⁾。このため、微生物の生産する細胞外酵素活性の化学量論は、微生物だけでなく作物にとっての養分利用性も反映しているかもしれない。しかしながら、いまだにこの関係性を立証するには十分なデータはなく、さらなる研究が必要である。また農地以外の生態系においても適用可能か検証する必要がある。

細胞外酵素活性の化学量論を農地の養分利用性評価に使用した場合、可給態養分濃度と相関が得られないといった問題が生ずることが想定される。これは供試土壌の可給態養分濃度や酵素活性(比)の値の幅(最大値と最小値の差)が小さいことが一因であろう⁴⁰⁾。本稿で紹介した両者の関係は(図 3~5)、可給態養分濃度と活性比の範囲が広い条件で得られたものである。両者に相関が得られない場合、微生物と作物にとって、可給態養分濃度と細胞外酵素活性の化学量論のいずれが養分利用性をよく反映できるのかについての情報は皆無であり、今後の課題である。

6.4 分子生物学的手法を用いた研究による展開

近年、アルカリホスファターゼやプロテアーゼ、 β -D-グルコシダーゼなどの酵素遺伝子を標的としたプライマーが設計されたことで^{10,81,84,90)}、酵素活性と酵素生産微生物の群集組成との関連を調査することが可能となった。とくにアルカリホスファターゼ生産細菌の群集組成に関する研究が盛んに行われており、*phoD* 遺伝子を保有する細菌群集組成がリン利用性と pH に影響されることが明らかになった^{67,85,112)}。また酵素活性と群集組成の関連については、Tan *et al.*¹¹²⁾ が、リン欠乏の土壌の方がアルカリホスファターゼ活性が高く、*phoD* 遺伝子の多様性が低いことを報告している。また Ragot *et al.*⁸⁵⁾ は、アルカリホスファターゼ活性は細菌群集組成と関連し、酸性ホスファターゼ活性は菌類群集組成と関連することを報告した。さらに土壌中のアルカリホスファターゼ活性と *phoD* の数との間に³⁶⁾、また酸性ホスファターゼ活性と酸性ホスファターゼの遺伝子 *phoC* の数との間に³⁷⁾、正の相関が得られている。

メタゲノム・メタプロテオーム解析により、リン添加実験をした熱帯雨林土壌において、リン欠乏区では、リン代謝に関わる様々なタンパク質(ホスファターゼやリンのトランスポーター等)の量やそれをコードする遺伝子の数が多く、とりわけフィターゼでその傾向が顕著であることが示された¹²⁶⁾。土壌中でのフィターゼ活性の測定法は確立されていないが⁷⁶⁾、その生産が資源配分モデルに適合する可能性もある。

7. おわりに

これまで細胞外酵素活性と養分利用性を測定した研究において、両者に正の相関や負の相関がみられるなど一致した結果が得られなかった。これら研究間の矛盾の多くは、細胞外酵素生産における資源配分モデルにより説明可能であると考えられる。リン獲得酵素と窒素獲得酵素のいずれもが可給態養分濃度に応じて微生物により生産されていると推察される。しかし一般に窒素獲得酵素として扱われている酵素でも、窒素利用性との関係は異なった。とりわけ土壌中でのL-アスパラギナーゼとウレアーゼの生産は主に窒素利用性により規定されていると考えられるが、プロテアーゼの場合は、主に窒素獲得のために生産されているとは考えにくい。

しかしながら、リン獲得酵素と窒素獲得酵素の生産は、資源配分モデルだけでは説明できない。Moorhead *et al.*⁷¹⁾ も指摘しているようにとくに土壌pHの影響は大きいので、pHの大きく異なる土壌を用いる場合には、養分利用性だけでなく、pHにも留意する必要がある。

Nannipieri *et al.*⁷²⁾ は、タンパク質のような有機態窒素化合物の無機化には様々な酵素が関わっているため、ある特定の酵素で有機態窒素の無機化は評価できないとしている。しかし上述したようにL-アスパラギナーゼとウレアーゼの生産がNH₄⁺の供給速度により規定されているとするならば、これら酵素を用いることで、土壌中における有機態窒素化合物の無機化が評価できる可能性がある。この点については、さらなる検証が必要である。

今後、多様な条件下の土壌において土壌特性、養分利用性、酵素活性、および酵素生産微生物の群集構造を同時に評価することで、微生物による細胞外酵素生産を規定する要因を詳細に把握することが可能となろう。また細胞外酵素活性の化学量論を、植物の養分利用性の指標としても利用できるのか否かを検証する必要がある。

要 旨

微生物が生産した、炭素・窒素・リンの獲得に関わる細胞外酵素活性の比が、微生物の養分要求性や環境中の養分利用性を反映するとした「細胞外酵素生産における資源配分モデル」という考え方があり、この資源配分モデルによると、微生物は自らの生産性を最大化させるために、環境中の養分利用性に応じて、炭素・窒素・リンの獲得に関わる細胞外酵素生産に資源を配分すると考えられる。土壌中における微生物群集による細胞外酵素生産と養分利用性との関係を資源配分モデルをもとに解析すると、リン獲得酵素では、畑土壌におけるアルカリホスファターゼの生産が、また森林土壌における酸性ホスファターゼの生産が、可給態リン酸濃度に応じて調節されていた。窒素獲得酵素としては、L-アスパラギナーゼとウレアーゼの生産が、交換性無機態窒素ではなく、潜在的に無機化可能な有機態窒素濃度により規定されていた。一方、通常窒素獲得酵素として扱われているプロテアーゼは、主に窒素獲得のためには生産されていないと推察された。ま

た細胞外酵素活性の化学量論を、土壌中の養分利用性の指標として使用する上での有用性や問題点などを議論した。

引用文献

- 1) Acosta-Martínez V, Tabatabai MA (2000) Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biol. Fertil. Soils*, **31**, 85–91
- 2) Aldén L, Demoling F, Bååth E (2001) Rapid method of determining factors limiting bacterial growth in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 1830–1838
- 3) Allison C, Macfarlane GT (1990) Regulation of protease production in *Clostridium sporogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3485–3490
- 4) Allison SD, Vitousek PM (2005) Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. *Soil Biol. Biochem.*, **37**, 937–944
- 5) Allison SD, Gartner TB, Holland K, Weintraub M, Sinsabaugh RL (2007a) Soil enzymes: linking proteomics and ecological processes. In *Manual of Environmental Microbiology*, 3rd ed., (Ed.) CJ Hurst, pp. 704–711, ASM Press, Washington, DC
- 6) Allison VJ, Condron LM, Peltzer DA, Richardson SJ, Turner BL (2007b) Changes in enzyme activities and soil microbial community composition along carbon and nutrient gradients at the Franz Josef chronosequence, New Zealand. *Soil Biol. Biochem.*, **39**, 1770–1781
- 7) Allison SD, Weintraub MN, Gartner TB, Waldrop MP (2011) Evolutionary-economic principles as regulators of soil enzyme production and ecosystem function. In *Soil Enzymology*, (Ed.) G Shukla, A Varma, pp. 229–243, Springer-Verlag, Berlin
- 8) Atkinson MR, Fisher SH (1991) Identification of genes and gene products whose expression is activated during nitrogen-limited growth in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **173**, 23–27
- 9) Averill C (2014) Divergence in plant and microbial allocation strategies explains continental patterns in microbial allocation and biogeochemical fluxes. *Ecol. Lett.*, **17**, 1202–1210
- 10) Bach H-J, Hartmann A, Schlöter M, Munch JC (2001) PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil. *J. Microbiol. Meth.*, **44**, 173–182
- 11) Baligar VC, Wright RJ, Smedley MD (1988) Acid phosphatase activity in soils of the Appalachian region. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **52**, 1612–1616
- 12) Bárta J, Šlajsová P, Tahovská K, Pícek T, Šantrůčková H (2014) Different temperature sensitivity and kinetics of soil enzymes indicate seasonal shifts in C, N and P nutrient stoichiometry in acid forest soil. *Biogeochemistry*, **117**, 525–537
- 13) Beegle D (2005) Assessing soil phosphorus for crop production by soil testing. In *Phosphorus: Agriculture and the Environment*, (Ed.) JT Sims, AN Sharpley, pp. 123–143, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin
- 14) Beier S, Bertilsson S (2013) Bacterial chitin degradation—mechanisms and ecophysiological strategies. *Front. Microbiol.*, **4**, 149
- 15) Bergkemper F, Schöler A, Engel M, Lang F, Krüger J, Schlöter M, Schulz S (2016) Phosphorus depletion in forest soils shapes bacterial communities towards phosphorus recycling systems. *Environ. Microbiol.*, **18**, 1988–2000

- 16) Berlemont R, Martiny AC (2013) Phylogenetic distribution of potential cellulases in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 1545–1554
- 17) Binkley D, Fisher RF (2013) Ecology and Management of Forest Soils, fourth edition, Wiley-Blackwell, Chichester
- 18) Binkley D, Vitousek P (1989) Soil nutrient availability. In *Plant Physiological Ecology: Field Methods and Instrumentation*, (Ed.) RW Pearcy, JR Ehleringer, HA Mooney, PW Rundel, pp. 75–96, Chapman and Hall, London
- 19) Bowles TM, Acosta-Martínez V, Calderón F, Jackson LE (2014) Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. *Soil Biol. Biochem.*, **68**, 252–262
- 20) Burns RG (1978) Enzyme activity in soil: some theoretical and practical considerations. In *Soil Enzymes*, (Ed.) RG Burns, pp. 295–340, Academic Press, London
- 21) Burns RG, DeForest JL, Marxsen J, Sinsabaugh RL, Stromberger ME, Wallenstein MD, Weintraub MN, Zoppini A (2013) Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biol. Biochem.*, **58**, 216–234
- 22) Carreiro MM, Sinsabaugh RL, Repert DA, Parkhurst DF (2000) Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition. *Ecology*, **81**, 2359–2365
- 23) Cezairliyan B, Ausubel FM (2017) Investment in secreted enzymes during nutrient-limited growth is utility dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E7796–E7802
- 24) Chapuis-Lardy L, Brossard M, Quiquampoix H (2001) Assessing organic phosphorus status of Cerrado oxisols (Brazil) using ³¹P-NMR spectroscopy and phosphomonoesterase activity measurement. *Can. J. Soil Sci.*, **81**, 591–601
- 25) Chen H, Li D, Zhao J, Xiao K, Wang K (2018) Effects of nitrogen addition on activities of soil nitrogen acquisition enzymes: A meta-analysis. *Agric. Ecosyst. Environ.*, **252**, 126–131
- 26) Chróst RJ (1990) Microbial ectoenzymes in aquatic environments. In *Aquatic Microbial Ecology: Biochemical and Molecular Approaches*, (Ed.) J Overbeck, RJ Chróst, pp. 47–78, Springer-Verlag, New York
- 27) Chróst RJ (1991) Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. In *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*, (Ed.) RJ Chróst, pp. 29–59, Springer, New York
- 28) Colvan SR, Syers JK, O'Donnell AG (2001) Effect of long-term fertilizer use on acid and alkaline phosphomonoesterase and phosphodiesterase activities in managed grassland. *Biol. Fertil. Soils*, **34**, 258–263
- 29) Dunlop PC, Roon RJ (1975) L-asparaginase of *Saccharomyces cerevisiae*: an extracellular enzyme. *J. Bacteriol.*, **122**, 1017–1024.
- 30) Dunlop PC, Meyer GM, Roon RJ (1980) Reactions of asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **255**, 1542–1546
- 31) Ekenler M, Tabatabai MA (2004) Arylamidase and amidohydrolases in soils as affected by liming and tillage systems. *Soil Till. Res.*, **77**, 157–168
- 32) Fanin N, Moorhead D, Bertrand I (2016) Eco-enzymatic stoichiometry and enzymatic vectors reveal differential C, N, P dynamics in decaying litter along a land-use gradient. *Biogeochemistry*, **129**, 21–36
- 33) Fatemi FR, Fernandez IJ, Simon KS, Dail DB (2016) Nitrogen and phosphorus regulation of soil enzyme activities in acid forest soils. *Soil Biol. Biochem.*, **98**, 171–179
- 34) Fisher SH, Sonenshein AL (1991) Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**, 107–135
- 35) Fisher SH, Wray LV Jr (2002) *Bacillus subtilis* 168 contains two differentially regulated genes encoding L-asparaginase. *J. Bacteriol.*, **184**, 2148–2154
- 36) Fraser TD, Lynch DH, Bent E, Entz MH, Dunfield KE (2015) Soil bacterial *phoD* gene abundance and expression in response to applied phosphorus and long-term management. *Soil Biol. Biochem.*, **88**, 137–147
- 37) Fraser TD, Lynch DH, Gaiero J, Khosla K, Dunfield KE (2017) Quantification of bacterial non-specific acid (*phoC*) and alkaline (*phoD*) phosphatase genes in bulk and rhizosphere soil from organically managed soybean fields. *Appl. Soil Ecol.*, **111**, 48–56
- 38) Fujita K, Kunito T, Moro H, Toda H, Otsuka S, Nagaoka K (2017) Microbial resource allocation for phosphatase synthesis reflects the availability of inorganic phosphorus across various soils. *Biogeochemistry*, **136**, 325–339
- 39) Fujita K, Kunito T, Matsushita J, Nakamura K, Moro H, Yoshida S, Toda H, Otsuka S, Nagaoka K (2018) Nitrogen supply rate regulates microbial resource allocation for synthesis of nitrogen-acquiring enzymes. *PLoS ONE*, **13**, e0202086
- 40) Fujita K, Miyabara Y, Kunito T (2019) Microbial biomass and ecoenzymatic stoichiometries vary in response to nutrient availability in an arable soil. *Eur. J. Soil Biol.*, **91**, 1–8
- 41) Geisseler D, Horwath WR (2008) Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. *Soil Biol. Biochem.*, **40**, 3040–3048
- 42) Geisseler D, Horwath WR (2009) Relationship between carbon and nitrogen availability and extracellular enzyme activities in soil. *Pedobiologia*, **53**, 87–98
- 43) Gianfreda L, Ruggiero P (2006) Enzyme activities in soil. In *Nucleic Acids and Proteins in Soil*, (Ed.) P Nannipieri, K Smalla, pp. 257–311, Springer-Verlag, Berlin
- 44) Golden KJ, Bernlohr RW (1985) Nitrogen catabolite repression of the L-asparaginase of *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.*, **164**, 938–940.
- 45) Harrison AF (1983) Relationship between intensity of phosphatase activity and physico-chemical properties in woodland soils. *Soil Biol. Biochem.*, **15**, 93–99
- 46) 早野恒一 (1997) 土の酵素, In 土の環境圏, 岩田進午・喜田大三 監修, pp. 229–233, フジ・テクノシステム, 東京
- 47) 早野恒一・都留信也・金沢晋二郎 (1981) 土壌酵素 2. 存在状態とその起原, 化学と生物, **19**, 330–334
- 48) Hedley MJ (2008) Techniques for assessing nutrient bioavailability in soils: current and future issues. In *Chemical Bioavailability in Terrestrial Environments (Developments in Soil Science Vol. 32)*, (Ed.) R Naidu, pp. 283–327, Elsevier, Amsterdam
- 49) Hedley HJ, Stewart JWB, Chauhan BS (1982) Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **46**, 970–976
- 50) Heilmann E, Leinweber P, Ollesch G, Meißner R (2005) Spatial variability of sequentially extracted P fractions in a silty loam.

- J. Plant Nutr. Soil Sci.*, **168**, 307–315
- 51) Hill BH, Elonen CM, Jicha TM, Bolgrien DW, Moffett MF (2010) Sediment microbial enzyme activity as an indicator of nutrient limitation in the great rivers of the Upper Mississippi River basin. *Biogeochemistry*, **97**, 195–209
 - 52) Howard JB, Carpenter FH (1972) L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. *J. Biol. Chem.*, **247**, 1020–1030
 - 53) Jian S, Li J, Chen J, Wang G, Mayes MA, Dzantor KE, Hui D, Luo Y (2016) Soil extracellular enzyme activities, soil carbon and nitrogen storage under nitrogen fertilization: A meta-analysis. *Soil Biol. Biochem.*, **101**, 32–43
 - 54) 金沢晋二郎 (1994) 土壌酵素, In 土壌生化学, pp. 52–72, 朝倉書店, 東京
 - 55) 金沢晋二郎・早野恒一・都留信也 (1981) 土壌酵素 1. 土壌の炭素・窒素・燐循環. 化学と生物, **19**, 235–242
 - 56) Keyhani NO, Roseman S (1999) Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1473**, 108–122
 - 57) 國頭 恭・唐澤敏彦 (2019) 土壌酵素と土壌の質, In 実践土壌学シリーズ3 土壌生化学, 犬伏和之 編, pp. 117–127, 朝倉書店, 東京
 - 58) Kunito T, Tsunekawa M, Yoshida S, Park H-D, Toda H, Nagaoka K, Saeki K (2012a) Soil properties affecting phosphorus forms and phosphatase activities in Japanese forest soils: Soil microorganisms may be limited by phosphorus. *Soil Sci.*, **177**, 39–46
 - 59) Kunito T, Tobitani T, Moro H, Toda H (2012b) Phosphorus limitation in microorganisms leads to high phosphomonoesterase activity in acid forest soils. *Pedobiologia*, **55**, 263–270
 - 60) Kunito T, Isomura I, Sumi H, Park H-D, Toda H, Otsuka S, Nagaoka K, Saeki K, Senoo K (2016) Aluminum and acidity suppress microbial activity and biomass in acidic forest soils. *Soil Biol. Biochem.*, **97**, 23–30
 - 61) Kunito T, Shiroma T, Moro H, Sumi H (2018) Annual variation in soil enzyme activity in a paddy field: soil temperature and nutrient availability are important for controlling enzyme activities. *Appl. Environ. Soil Sci.*, **2018**, 4093219
 - 62) Lidbury IDEA, Fraser TD, Murphy ARJ, Scanlan DJ, Bending GD, Jones AME, Moore JD, Goodall A, Tibbett M, Hammond JP, Wellington EMH (2017) The 'known' genetic potential for microbial communities to degrade organic phosphorus is reduced in low-pH soils. *MicrobiologyOpen*, **6**, e474
 - 63) Margalef O, Sardans J, Fernández-Martínez M, Molowny-Horas R, Janssens IA, Ciais P, Goll D, Richter A, Obersteiner M, Asensio D, Peñuelas J. (2017) Global patterns of phosphatase activity in natural soils. *Sci. Rep.*, **7**, 1337
 - 64) Marklein AR, Houlton BZ (2012) Nitrogen inputs accelerate phosphorus cycling rates across a wide variety of terrestrial ecosystems. *New Phytol.*, **193**, 696–704
 - 65) McCarty GW, Shogren DR, Bremner JM (1992) Regulation of urease production in soil by microbial assimilation of nitrogen. *Biol. Fertil. Soils*, **12**, 261–264
 - 66) McGill WB, Cole CV (1981) Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma*, **26**, 267–286.
 - 67) Mise K, Fujita K, Kunito T, Senoo K, Otsuka S (2018) Phosphorus-mineralizing communities reflect the nutrient-rich characteristics in Japanese arable Andisols. *Microbes Environ.*, **33**, 282–289
 - 68) Mobley HLT, Hausinger RP (1989) Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol. Rev.*, **53**, 85–108
 - 69) Mobley HLT, Island MD, Hausinger RP (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.*, **59**, 451–480
 - 70) Moorhead DL, Rinkes ZL, Sinsabaugh RL, Weintraub MN (2013) Dynamic relationships between microbial biomass, respiration, inorganic nutrients and enzyme activities: informing enzyme-based decomposition models. *Front. Microbiol.*, **4**, 223
 - 71) Moorhead DL, Sinsabaugh RL, Hill BH, Weintraub MN (2016) Vector analysis of ecoenzyme activities reveal constraints on coupled C, N and P dynamics. *Soil Biol. Biochem.*, **93**, 1–7
 - 72) Mori T, Imai N, Yokoyama D, Kitayama K (2018) Effects of nitrogen and phosphorus fertilization on the ratio of activities of carbon-acquiring to nitrogen-acquiring enzymes in a primary lowland tropical rainforest in Borneo, Malaysia. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **64**, 554–557
 - 73) Moro H, Kunito T, Saito T, Yaguchi N, Sato T (2014) Soil microorganisms are less susceptible than crop plants to potassium deficiency. *Arch. Agron. Soil Sci.*, **60**, 1807–1813
 - 74) Moro H, Kunito T, Sato T (2015) Assessment of phosphorus bioavailability in cultivated Andisols from a long-term fertilization field experiment using chemical extractions and soil enzyme activities. *Arch. Agron. Soil Sci.*, **61**, 1107–1123
 - 75) Nannipieri P, Giagnoni L, Landi L, Renella G (2011) Role of phosphatase enzymes in soil. In Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling, Soil Biology 26, (Ed.) EK Bütemann, A Oberson, E Frossard, pp. 215–243, Springer-Verlag, Berlin
 - 76) Nannipieri P, Giagnoni L, Renella G, Puglisi E, Ceccanti B, Masciandaro G, Fornasier F, Moscatelli MC, Marinari S (2012) Soil enzymology: classical and molecular approaches. *Biol. Fertil. Soils*, **48**, 743–762
 - 77) Nannipieri P, Trasar-Cepeda C, Dick RP (2018) Soil enzyme activity: a brief history and biochemistry as a basis for appropriate interpretations and meta-analysis. *Biol. Fertil. Soils*, **54**, 11–19
 - 78) Neal AL, Blackwell M, Akkari E, Guyomar C, Clark I, Hirsch PR (2018) Phylogenetic distribution, biogeography and the effects of land management upon bacterial non-specific acid-phosphatase gene diversity and abundance. *Plant Soil*, **427**, 175–189
 - 79) North MJ (1982) Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. *Microbiol. Rev.*, **46**, 308–340
 - 80) Olander LP, Vitousek PM (2000) Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. *Biogeochemistry*, **49**, 175–190
 - 81) Pathan SI, Ceccherini MT, Hansen MA, Giagnoni L, Ascher J, Arenella M, Sørensen SJ, Pietramellara G, Nannipieri P, Renella G (2015) Maize lines with different nitrogen use efficiency select bacterial communities with different β -glucosidase-encoding genes and glucosidase activity in the rhizosphere. *Biol. Fertil. Soils*, **51**, 995–1004
 - 82) Pócsi I, Pusztahelyi T, Bogáti MS, Szentirmai A (1993) The formation of N-acetyl- β -D-hexosaminidase is repressed by glucose in *Penicillium chrysogenum*. *J. Basic Microbiol.*, **33**, 259–267
 - 83) Qin S, Hu C, Wang Y, Li X, He X (2010) Tillage effects on intracellular and extracellular soil urease activities determined by an improved chloroform fumigation method. *Soil Sci.*, **175**,

- 568–572
- 84) Ragot SA, Kertesz MA, Bünemann EK (2015) *phoD* alkaline phosphatase gene diversity in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 7281–7289
 - 85) Ragot SA, Kertesz MA, Mészáros É, Frossard E, Bünemann EK (2017) Soil *phoD* and *phoX* alkaline phosphatase gene diversity responds to multiple environmental factors. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **93**, fiw212
 - 86) Redel Y, Rubio R, Godoy R, Borie F (2008) Phosphorus fractions and phosphatase activity in an Andisol under different forest ecosystems. *Geoderma*, **145**, 216–221
 - 87) Renz TE, Neufeldt H, Ayarza MA, da Silva JE, Zech W (1999) Acid monophosphatase: an indicator of phosphorus mineralization or of microbial activity? A case study from the Brazilian Cerrados. In *Sustainable Land Management for the Oxisols of the Latin American Savannas: Dynamics of Soil Organic Matter and Indicators of Soil Quality*, (Ed.) R Thomas, MA Ayarza, pp. 173–186, Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia
 - 88) Rosinger C, Rousk J, Sandén H (2019) Can enzymatic stoichiometry be used to determine growth-limiting nutrients for microorganisms?—A critical assessment in two subtropical soils. *Soil Biol. Biochem.*, **128**, 115–126
 - 89) Rossolini GM, Schippa S, Riccio ML, Berlutti F, Macaskie LE, Thaller MC (1998) Bacterial nonspecific acid phosphohydrolases: physiology, evolution and use as tools in microbial biotechnology. *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**, 833–850
 - 90) Sakurai M, Wasaki J, Tomizawa Y, Shinano T, Osaki M (2008) Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **54**, 62–71
 - 91) Santos-Beneit F (2015) The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Front. Microbiol.*, **6**, 402
 - 92) Satti P, Mazzarino MJ, Roselli L, Crego P (2007) Factors affecting soil P dynamics in temperate volcanic soils of southern Argentina. *Geoderma*, **139**, 229–240
 - 93) Schimel J, Becerra CA, Blankinship J (2017) Estimating decay dynamics for enzyme activities in soils from different ecosystems. *Soil Biol. Biochem.*, **114**, 5–11
 - 94) Sims GK, Wander MM (2002) Proteolytic activity under nitrogen or sulfur limitation. *Appl. Soil Ecol.*, **19**, 217–221
 - 95) Sinsabaugh RL (1994) Enzymic analysis of microbial pattern and process. *Biol. Fertil. Soils*, **17**, 69–74
 - 96) Sinsabaugh RL, Follstad Shah JJ (2012) Ecoenzymatic stoichiometry and ecological theory. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, **43**, 313–343
 - 97) Sinsabaugh RL, Linkins AE (1993) Statistical modeling of litter decomposition from integrated cellulase activity. *Ecology*, **74**, 1594–1597
 - 98) Sinsabaugh RL, Moorhead DL (1994) Resource allocation to extracellular enzyme production: a model for nitrogen and phosphorus control of litter decomposition. *Soil Biol. Biochem.*, **26**, 1305–1311
 - 99) Sinsabaugh RL, Antibus RK, Linkins AE, McLaugherty CA, Rayburn L, Repert D, Weiland T (1993) Wood decomposition: nitrogen and phosphorus dynamics in relation to extracellular enzyme activity. *Ecology*, **74**, 1586–1593
 - 100) Sinsabaugh RL, Carreiro MM, Alvarez S (2002) Enzyme and microbial dynamics of litter decomposition. In *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications*, (Ed.) RG Burns, RP Dick, pp. 249–265, Marcel Dekker, New York
 - 101) Sinsabaugh RL, Lauber CL, Weintraub MN, Ahmed B, Allison SD, Crenshaw C, Contosta AR, Cusack D, Frey S, Gallo ME, Gartner TB, Hobbie SE, Holland K, Keeler BL, Powers JS, Stursova M, Takacs-Vesbach C, Waldrop MP, Wallenstein MD, Zak DR, Zeglin LH (2008) Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecol. Lett.*, **11**, 1252–1264
 - 102) Sinsabaugh RL, Hill BH, Follstad Shah JJ (2009) Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. *Nature*, **462**, 795–798
 - 103) Sinsabaugh RL, Follstad Shah JJ, Hill BH, Elonen CM (2012) Ecoenzymatic stoichiometry of stream sediments with comparison to terrestrial soils. *Biogeochemistry*, **111**, 455–467
 - 104) Smith MS, Rice CW, Paul EA (1989) Metabolism of labeled organic nitrogen in soil: regulation by inorganic nitrogen. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **53**, 768–773
 - 105) Speir TW, Cowling JC (1991) Phosphatase activities of pasture plants and soils: relationship with plant productivity and soil P fertility indices. *Biol. Fertil. Soils*, **12**, 189–194
 - 106) Spohn M, Kuzyakov Y (2013a) Phosphorus mineralization can be driven by microbial need for carbon. *Soil Biol. Biochem.*, **61**, 69–75
 - 107) Spohn M, Kuzyakov Y (2013b) Distribution of microbial- and root-derived phosphatase activities in the rhizosphere depending on P availability and C allocation—Coupling soil zymography with ¹⁴C imaging. *Soil Biol. Biochem.*, **67**, 106–113
 - 108) Steenbergh AK, Bodelier PLE, Hoogveld HL, Slomp CP, Laanbroek HJ (2011) Phosphatases relieve carbon limitation of microbial activity in Baltic Sea sediments along a redox-gradient. *Limnol. Oceanogr.*, **56**, 2018–2026
 - 109) Sullivan BW, Alvarez-Clare S, Castle SC, Porder S, Reed SC, Schreeg L, Townsend AR, Cleveland CC (2014) Assessing nutrient limitation in complex forested ecosystems: alternatives to large-scale fertilization experiments. *Ecology*, **95**, 668–681
 - 110) Tabatabai MA (1994) Soil enzymes. In *Methods of Soil Analysis, Part 2, Microbiological and Biochemical Properties*, (Ed.) RW Weaver, S Angle, P Bottomley, D Bezdicsek, S Smith, MA Tabatabai, A Wollum, pp. 775–833, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin
 - 111) Tabatabai MA, Bremner JM (1969) Use of *p*-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.*, **1**, 301–307
 - 112) Tan H, Barret M, Mooij MJ, Rice O, Morrissey JP, Dobson A, Griffiths B, O’Gara F (2013) Long-term phosphorus fertilisation increased the diversity of the total bacterial community and the *phoD* phosphorus mineraliser group in pasture soils. *Biol. Fertil. Soils*, **49**, 661–672
 - 113) Trasar-Cepeda MC, Gil-Sotres F (1987) Phosphatase activity in acid high organic matter soils in Galicia (NW Spain). *Soil Biol. Biochem.*, **19**, 281–287
 - 114) Treseder KK, Lennon JT (2015) Fungal traits that drive ecosystem dynamics on land. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **79**, 243–262
 - 115) Turner BL, Haygarth PM (2005) Phosphatase activity in temperate pasture soils: potential regulation of labile organic phosphorus turnover by phosphodiesterase activity. *Sci. Total Environ.*, **344**, 27–36
 - 116) Turner BL, Wright SJ (2014) The response of microbial biomass and hydrolytic enzymes to a decade of nitrogen, phosphorus,

- and potassium addition in a lowland tropical rain forest. *Biogeochemistry*, **117**, 115–130
- 117) Vranova V, Rejsek K, Formanek P (2013) Proteolytic activity in soil: A review. *Appl. Soil Ecol.*, **70**, 23–32.
 - 118) Waldrop MP, Zak DR, Sinsabaugh RL, Gallo M, Lauber C (2004) Nitrogen deposition modifies soil carbon storage through changes in microbial enzymatic activity. *Ecol. Appl.*, **14**, 1172–1177
 - 119) Wallenstein MD, Burns RG (2011) Ecology of extracellular enzyme activities and organic matter degradation in soil: a complex community-driven process. In *Methods of Soil Enzymology*, (Ed.) RP Dick, pp. 35–55, Soil Science Society of America, Madison
 - 120) Wallenstein MD, Weintraub MN (2008) Emerging tools for measuring and modeling the *in situ* activity of soil extracellular enzymes. *Soil Biol. Biochem.*, **40**, 2098–2106
 - 121) Weedon JT, Aerts R, Kowalchuk GA, van Bodegom PM (2011) Enzymology under global change: organic nitrogen turnover in alpine and sub-Arctic soils. *Biochem. Soc. Trans.*, **39**, 309–314
 - 122) Whooley MA, O'Callaghan JA, McLoughlin AJ (1983) Effect of substrate on the regulation of exoprotease production by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 981–988
 - 123) Wiame J-M, Grenson M, Arst HN Jr (1985) Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Adv. Microb. Physiol.*, **26**, 1–88
 - 124) Wright AL, Reddy KR (2001) Phosphorus loading effects on extracellular enzyme activity in Everglades wetland soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **65**, 588–595
 - 125) Xu Z, Yu G, Zhang X, He N, Wang Q, Wang S, Wang R, Zhao N, Jia Y, Wang C (2017) Soil enzyme activity and stoichiometry along the North-South Transect in eastern China (NSTEC). *Soil Biol. Biochem.*, **104**, 152–163
 - 126) Yao Q, Li Z, Song Y, Wright SJ, Guo X, Tringe SG, Tfaily MM, Paša-Tolić L, Hazen TC, Turner BL, Mayes MA, Pan C (2018) Community proteogenomics reveals the systemic impact of phosphorus availability on microbial functions in tropical soil. *Nat. Ecol. Evol.*, **2**, 499–509
 - 127) Zechmeister-Boltenstern S, Keiblinger KM, Mooshammer M, Peñuelas J, Richter A, Sardans J, Wanek W (2015) The application of ecological stoichiometry to plant–microbial–soil organic matter transformations. *Ecol. Monogr.*, **85**, 133–155
 - 128) Zhou Z, Wang C, Jin Y (2017) Stoichiometric responses of soil microflora to nutrient additions for two temperate forest soils. *Biol. Fertil. Soils*, **53**, 397–406