

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19510012  
 研究課題名 (和文) 干潟土壌プロテアーゼに焦点化した干潟生態系の基盤形成に係わる研究  
 研究課題名 (英文) Studies on the formation of basic ground of tideland ecosystem from the viewpoints of sediment protease activities.  
 研究代表者  
 中村 健一 (NAKAMURA KENICHI)  
 県立広島大学・生命環境学部・教授  
 研究者番号：50094694

研究成果の概要 (和文)：微生物は干潟土壌において酵素分泌を行い、物質浄化や一次生産者への栄養塩提供などの役割を担っている。分泌酵素の中でもとりわけプロテアーゼは、干潟生態系における窒素循環サイクルの形成に重要な機能を果たしていることが知られている。本研究において賀茂川河口干潟 22 箇所の地点でプロテアーゼ活性の測定がなされた。コンターマップ表示により、活性の高い領域はハクセンシオマネキ棲息及びホンダワラの繁茂領域と一致していることが明らかになった。さらに統計的な解析により干潟内のプロテアーゼ活性は底質の有機炭素及び窒素量と相関があることが示された。実際にタンパク質気質として血清アルブミンを土壌に負荷した結果、ATP バイオマス増加なしにプロテアーゼ活性の著しい誘導が生じた。電気泳動的解析の結果、タンパク質負荷により明確なプロテアーゼバンドが生じることが明らかになった。以上の結果タンパク質負荷により、特定の微生物によるプロテアーゼ分泌が干潟土壌系内に引き起こされる事実が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：In tideland sediments, microorganisms secrete extracellular enzymes, which support waste purification and nutrient supplementation to plants and phytoplankton. Among the secreted enzymes, proteases are known to play essential roles in nitrogen cycling in coastal ecosystems. In this study, the protease activities of sediments were assayed at 22 sites in the Kamo River Estuary Tideland. The contour map of the activities showed spots of high activity located in two habitat areas for *Uca lactea* and *Sargassum fulvellum*. Moreover, statistical analysis indicated that the protease activity was correlated with the concentrations of organic carbon and nitrogen in the tideland sediments. Actually, loading of sediments with serum albumin as a protein substrate induced marked enhancement of protease activities without increasing of ATP biomass. Electrophoretic analysis clearly revealed the presence of protease bands induced by protein loading. These results suggest that protein loading stimulates the secretion of proteases by certain microorganisms.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2008年度 | 600,000   | 180,000 | 780,000   |
| 2009年度 | 700,000   | 210,000 | 910,000   |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：環境動態解析

科研費の分科・細目：環境学・2001

キーワード：(1) 河口干潟 (2) プロテアーゼ (3) 有機物質負荷 (4) 窒素代謝循環  
(5) 干潟生態系 (6) 電気泳動法

## 1. 研究開始当初の背景

Mayer の報告にもあるように、生態系を保持する上でプロテアーゼは、系内に生じた生物の死骸及び排出物中のタンパク質を、ペプチドやアミノ酸に加水分解活性を有し、生態系窒素循環の初期過程を担う上で最も重要な酵素の一つである。一方干潟は、稚魚の養育のみならず、豊かな海洋水産資源を育むべく栄養塩の産生が、海洋生態系内で最も活発な領域である。こうした栄養塩の産生は、細菌、菌類、原生生物底質微生物が分泌するプロテアーゼ等の酵素による代謝活性によって担われている。

干潟生態系の基盤形成を担う底質微生物による代謝活性分布調査等の基本的な研究は、国内外においてほとんどなされていない状況にある。この理由としては、土壌プロテアーゼの簡易測定法や電気泳動法によるプロテアーゼ分析法が確立されていないことが挙げられる。一方我々は、既に先行研究において底質土壌のプロテアーゼ活性分析法や電気泳動法によるプロテアーゼ分離分析法を既に確立している。

本研究課題は、我々のプロテアーゼ活性測定に拘わる技術を積極的に導入し3年間に亘る精力的な研究によって遂行された。

## 2. 研究の目的

豊かな干潟の保全・構築を行うためには生態系の基盤となる物質代謝・循環機能の視点から把握し、現地における代謝活性の動態と特性に関する情報を得ることが重要である。本研究は、干潟内での有機物質生産に重要な一次生産者の必須窒素栄養塩の産生の初期課程において最も重要なタンパク質の分解活性に注目し、底質プロテアーゼが干潟内にもどのように分布しているかを明らかにすることを第一の目的として設定した。さらに、干潟底質プロテアーゼの特性や活性変動を引き起こす環境要因を十分に検討することも干潟の窒素循環機能を知る上で重要な情報提供になると考えた。以上の問題意識を踏まえ、具体的な研究内容を以下のように設定した。

(1) 豊栄養海域に望む干潟内のプロテアーゼ活性分布測定

(2) 生物棲息及び有機物質分布とプロテアーゼとの相関性の検討

(3) 相関性から把握される事項に関する室内

実験による検証。

(4) 微生物より分泌されるプロテアーゼの電気泳動的分離分析

## 3. 研究の方法

(1) 対象地と採土：対象となる干潟は、竹原市賀茂川河口干潟に設定した。ハクセンシオマネキ、ナメクジウオ、カブトガニ等の希少種が棲息する豊かな生物相に恵まれ、瀬戸内海の安芸灘に臨んでいる。成層期に表層 22 箇所の底質土壌を採取して試料とした。

(2) プロテアーゼ活性測定：プロテアーゼ総活性の測定は底質土壌に対し 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1% TritonX-100 を含む可溶化溶液で抽出した後、10 分間 35kHz 下で超音波処理を行い、遠心分離操作を用いて上澄み液を試料とした Levy らの方法 (アゾカゼイン法) に従い 25°C、24hr の反応を行って測定した。

得られた活性値は MicroAVS を用いてコンターマップを作成した。

(3) 電気泳動によるプロテアーゼ分析：底質土壌に対し、Laemmli 法によるタンパク質可溶化溶液で処理を行った後 Heussen and Dowdle 法を用いて分析を行った。

(4) 底質土壌の有機炭素・有機窒素量の定量：測定対象とする試料は、あらかじめ 105°C で 4 時間加熱し、水分を取り除いた後 JM1000CN CN コーダーを用いて測定した。

(5) 干潟内動植物分布測定：干潟外形、干潟内の動植物棲息領域は GPS を用いて歩行経路をログにて記録し、ソニー社の NavinYou ソフト地図の上に展開した。

## 4. 研究成果

(1) 多種の生物種がそれぞれの棲息領域を確保し、また塩濃度や干潟土壌を形成する粒径など多様な環境条件を示す干潟内において、プロテアーゼ活性分布状況を知ることはプロテアーゼの生態的意義を知る上で重要な知見が得られることが期待される。そこで本課題は、干潟内でのプロテアーゼ活性分布を明らかにすることから開始した。特にこの研究には、土壌より効率的にプロテアーゼを回収することが技術的に必要となる。この問題については、TritonX-100 を含む溶液中で超音波処理するプロテアーゼ抽出法を開発することで対処することができた。この抽出法とアゾカゼイン法を用い、成層期である夏季 (7 月) の賀茂川河口干潟 (東部) 内 22 採

土地点の土壤プロテアーゼ総活性を測定した。さらに干潟内のプロテアーゼ総活性分布を視覚的に把握するために、得られた全地点のプロテアーゼ活性値を基に、AVS 可視化ソフト (Micro AVS Ver.11, ㈱KGT) を用いてプロテアーゼ総活性分布のコンターマップを作製した。

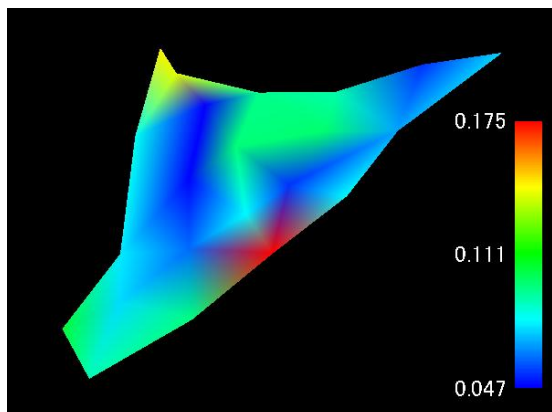


Fig.1 賀茂川河口干潟のプロテアーゼ活性

Fig.1 は、以上の過程を経て得られた賀茂川河口干潟 (東部) における土壤プロテアーゼ総活性の干潟内分布である。干潟内においても活性値は約4倍の違いがあることが示された。さらに同一干潟内の生物棲息分布の調査結果と対応させることにより、ハクセンシオマネキが棲息する河口付近及びホンダワラが繁茂する低潮海岸線付近は総活性値が最も高い領域であることが示された。また、

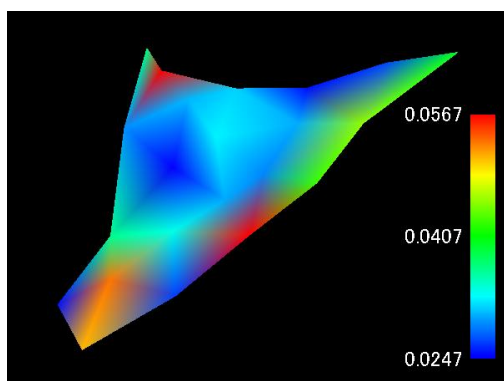


Fig.2 賀茂川河口干潟の有機窒素分布

コアマモが繁茂する干潟先端部付近及び干潟内陸部の一部にも総活性値の比較的に高い領域が存在した。一方、生物相が希薄な干潟内陸部、アマモが繁茂する低潮海岸線付近及びアオサが繁茂する河川岸領域は、総活性値が低い領域であることが示された。こうした分布パターンは、既に中村が報告したフォスファターゼ活性分布パターンとは著しく異なることが明らかになった。

(2) プロテアーゼ活性が干潟基盤形成にどのような役割を果たしているかを知るため

には、同一干潟内における活性の差異がどのような要因によって引き起こされるのかについて明らかにすることが重要な問題となる。そこで、干潟土壤に堆積している有機窒素量の干潟内分布及びプロテアーゼ総活性との関連性について検討した。すなわち、各採土地点の土壤の有機窒素量を CN コーダーで測定し、得られた測定値について AVS 可視化ソフトを用いてプロテアーゼ活性と同様に有機窒素量のコンターマップを作製した。

Fig.2 の結果から明らかなように、有機窒素量分布パターンとプロテアーゼ活性分布パターンには一定の類似性が認められた。さらに測定地点 22 箇所におけるプロテアーゼ総活性と有機窒素量の間には 0.4887 の相関性が認められた。一方有機炭素との間には 0.5065 となった。これらの値は統計検定により、いずれも  $< 0.05$  の危険率で有意な相関が得られることが示された。

(3) 前項の結果、干潟内のプロテアーゼ総活性は土壤に堆積している有機物量の影響を受けている可能性が示された。プロテアーゼ活性と有機物の関連性を明らかにするためには、干潟土壤に有機物が負荷された場合のプロテアーゼ活性変動を検討することが重要となる。そこで次に、採土地点 15 の土壤を対象にタンパク質 (牛血清アルブミン)、糖質 (可溶性デンプン)、脂質 (オレイン酸) をそれぞれ 0.2% (w/v) 含む基質溶液を添加し、好気及び嫌気的環境下 (アルゴンを含む密閉溶液中) で 24 時間振盪した後、プロテアーゼの分析を行った。その結果、好気及び嫌気的環境下ともにタンパク質 (牛血清アルブミン) を土壤に負荷した場合において、プロテアーゼ総活性は増加することが明らかになった (Fig.3)。特に、好気的環境下でのタン

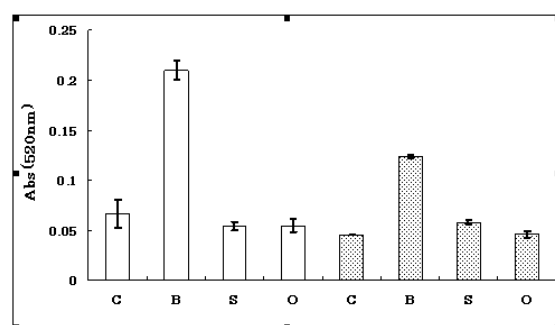


Fig.3 各有機物負荷による土壤プロテアーゼの変化

C: Control, B: タンパク質, S: 糖質, O: 脂質 n=3. 白: 好気環境, 灰: 嫌気環境

パク質負荷は、プロテアーゼ総活性を約 3.2 倍に増加させることが明らかになった。一方、糖質及び脂質の負荷の場合、有意なプロテア

ーゼ総活性の増加は認められなかった。

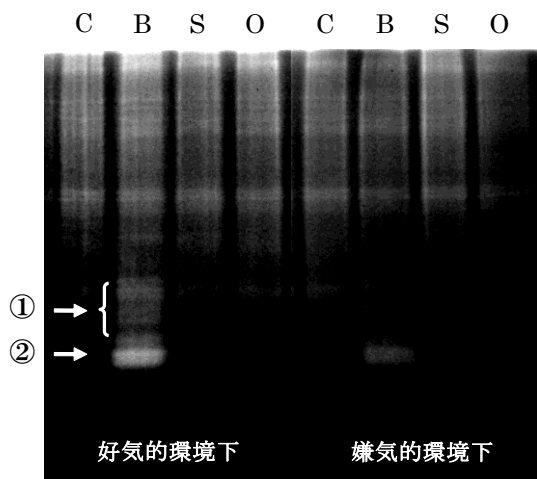


Fig. 4 上記負荷試料中のプロテアーゼ電気泳動パターン解析

(4) 次に、タンパク質負荷によるプロテアーゼ総活性の増加と連動したプロテアーゼ種を特定するために、負荷後の土壌からプロテアーゼを可溶化し電気泳動的手法で分析した。その結果、好气的環境下でタンパク質を負荷した場合において、Fig.4 中の矢印で示したように、新たに分泌されたプロテアーゼ及び活性化が著しく誘導されるプロテアーゼ種の存在が示された。さらに、タンパク質負荷によるプロテアーゼ活性の増加と土壌微生物総量の関連性を調べるために、各処理条件下における土壌中のATPバイオマスの測定を行った。その結果、有機物負荷によるATPバイオマスの著しい変化は示されなかった。すなわち、好气的環境下でのタンパク質負荷は、プロテアーゼ活性を約3.2倍に増加させたが、同条件下でのATPバイオマスは約1.1倍の増加であった。この結果は、タンパク質負荷によるプロテアーゼ活性増加は、特定の微生物個体当りのプロテアーゼ分泌量増加に伴う可能性を示唆している。

2004年中村らは、好气的環境下でのタンパク質負荷により、ATPバイオマスはほとんど増加しないものの、土壌フォスファターゼ活性が著しく誘導されることを報告した。以上のことを踏まえると、干潟内の活性分布が大きく異なるフォスファターゼの活性誘導効果と同様に、干潟内のプロテアーゼ活性は土壌に堆積しているタンパク質に支配されていることが明らかになった。さらに効果的な活性増加は好气的条件において発揮されることが明らかになった。

(5) 賀茂川河口干潟において明らかにした「有機物負荷によりプロテアーゼ活性が誘導される」という実験結果を受け、さらに極

度に汚染された環境下にある広島市内を貫流する猿俣川の河岸底質を対象に、土壌の特性とプロテアーゼ活性の関連、及び電気泳動法を用いたプロテアーゼの分離・分析を行った。その結果溶存態リン酸、アンモニア値及び硫化水素値から総合的に判断し最も汚染度の高いと判断された2地点において、プロテアーゼ活性は必ずしも有機物含有量とは比例しない事実を明らかにすることができた。すなわち、強熱減量の結果から汚染の進んでいる当該2地点では、土壌中の有機物含有量は他地点に比較し、有意に高いもののプロテアーゼ活性は他地点と同程度の値を示した。

この結果は、プロテアーゼ活性は土壌の嫌气的環境、あるいは共存物質の存在によってプロテアーゼ活性が阻害されている可能性を示している。したがって干潟生態系の環境保全において窒素循環機能活性を高めるためには好气的環境を保障すると同時に重金属等の阻害物質の除去が必須であることが示された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

① Morita, M., M. Kitamura, Nakajima, A. Susilo, E. S., Takemura, A., Okuno, M.

Regulation of sperm flagellar motility activation and chemotaxis caused by egg-derived substance(s) in sea cucumber sperm, Cell Motility and the Cytoskeleton, 査読有, Vol. 68, 2009, 2002-2015

② 16名 奥野誠(1番目), 中村健一(8番目) 宇宙環境下における生殖・継世代研究の展開-IV 宇宙利用シンポジウム報告書, 査読無, 日本学術会議, 2008, 259-261

〔学会発表〕(計6件)

① Naito, C., Takase, M., Imai, Y., Nakamura, K., Detection and biochemical properties of proteolytic enzymes secreted by microalgae 9th International Phycological Congress, 2009, August 4, Tokyo

② 中村健一, 中尾陽介, 内藤佳奈子, 賀茂川河口干潟を対象とした底質プロテアーゼ分析とその生化学的特性 日本水環境学会, 2009, 3月, 山口大学

③ 内藤佳奈子, 高瀬真希, 今井一郎, 中村健一, 藻類産生プロテアーゼの検出と生化学的特性 日本藻類学会第33大会, 2009, 3月, 琉球大学

④ 増山悦子, 中村健一, キウイフルーツに存在する高分子量プロテアーゼの電気泳動による解析 第59回日本家政学会大会, 2008, 5月, 長良川国際会議

⑤ 中村健一, 村田貴拓, 内藤千佳子, 広島県帝釈峡内神龍湖における微細藻類の増殖に

対する鉄キレート物質の影響 藻類学会第  
32回大会, 2008, 3月, 東京海洋大

⑥ Naito, K., Imai, I., Takase, M.,  
Nakamura, K., Iron utilization and bio-  
chemical properties of red tide-causing  
microalgae WFC2008 5th. 2008, February,  
Yokohama

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 健一 (NAKAMURA KENICHI)  
県立広島大学・生命環境学部・教授  
研究者番号: 50094694

### (2) 研究分担者

奥野 誠 (OKUNO MAKOTO)  
東京大大学院・総合文化研究科・准教授  
研究者番号: 40143325