

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450072

研究課題名(和文) 土壌中でのペプチド態窒素の存在状態とその由来に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the status and origin of proteineous materials in soil

研究代表者

青山 正和 (Aoyama, Masakazu)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：60150950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチド態窒素の土壌中での存在状態とその起源に関して研究を行った。土壌を比重および団粒サイズにより分画し、赤外線吸収スペクトル測定により解析を行うと、ペプチド態窒素は主にシルト・粘土粒子と結合した形態で存在した。また、アルカリ抽出と三次元蛍光スペクトル測定により、ペプチド態窒素は主に非腐植物質画分に含まれ、大部分は腐植物質と結合していないと推定された。さらに、土壌中での有機物分解過程で抽出されるタンパク質量と微生物バイオマスとの間に有意な正相関が認められ、抽出されるタンパク質の一部が細菌の菌体外酵素であると同定されたことから、ペプチド態窒素の給源が土壌微生物である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to characterize the proteineous materials in soil and to elucidate the origin of the proteinous materials. When soils were fractionated by specific gravity and aggregate-size and analyzed by infrared absorption spectroscopy, proteineous materials were mainly present as mineral-associated forms. Alkaline extraction and three-dimensional excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy indicated that the proteineous materials in soil were mostly not bound to humic substances. The amounts of proteins extracted during the decomposition process of organic matter in the soil showed a significant positive correlation with the soil microbial biomass. In addition, parts of the extracted proteins were identified as a bacterial extracellular enzyme. These results suggested that a major source of proteineous materials in soil was extracellular proteins produced by soil microorganisms.

研究分野：土壌学

キーワード：土壌有機物 タンパク質 土壌微生物 赤外線吸収スペクトル 三次元蛍光スペクトル

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

窒素は、植物が最も多く必要とする養分元素である。植物が吸収する窒素のほとんどは無機態窒素であるが、土壌中の窒素の大部分は有機態として存在している。固体 ^{15}N -NMR を用いた研究から、土壌有機態窒素のほとんどがペプチドもしくはタンパク質の形態であるペプチド態として存在することが示されている。土壌中のペプチド態窒素の供給源は、主に植物遺体等に含まれるタンパク質であるが、土壌中では微生物によって分解され、ペプチドもしくはタンパク質と多糖からなる細胞外高分子化合物 (EPS) や細胞外酵素などのペプチド態窒素に富んだ微生物代謝産物に変化し、これらは粘土鉱物に吸着されるとともに、 $250\mu\text{m}$ より小さな団粒であるマイクロ団粒の内部に存在していると推定される。また、植物遺体の分解過程では、増殖する糸状菌の菌糸や生成する EPS がマイクロ団粒を結合して $250\mu\text{m}$ より大きな団粒であるマクロ団粒を形成すると考えられる (青山 2010)。このように、土壌中のペプチド態窒素は単一の物質ではなく、多様な形態で存在していることが窺える。しかしながら、これまでのところ、土壌中のペプチド態窒素の存在状態についての詳細な研究は国内外ともに行われてきていない。

2. 研究の目的

本研究では土壌中のペプチド態窒素を団粒分画と比重分画を組み合わせた物理分画法によって分画し、物理分画画分に存在するペプチド態窒素を無機物共存下での拡散反射フーリエ変換赤外線吸収 (DRIFT) スペクトル測定により解析するとともに、アルカリ抽出物の分画ならびに三次元蛍光スペクトル測定と DRIFT スペクトル測定によって土壌中のペプチド態窒素の存在状態を解析しようとする。さらに、近年、発達が著しいタンパク質のアミノ酸配列解析技術を適用することによって土壌中のペプチド態窒素の由来を明らかにしようとする。

3. 研究の方法

1) 比重分画によるペプチド態窒素の解析

土壌は、ワタミファーム瀬棚農場内の有機栽培を行っている畑地 (M50Y9、M100Y9、M50Y15) から採取した (褐色森林土)。有機栽培畑地の M に続く数字は厩肥施用量 (Mg ha^{-1})、Y に続く数字は有機栽培の年数を表す。また、対照として、農場に隣接した 15 年以上、化学肥料の施肥も有機物の施用も行われていない草地 (M0) から土壌を採取した。土壌は、各圃場もしくは草地を 3 区画に分け、各区画の 4 ヶ所の表層 (0~15 cm) から採取し、区画ごとにひとまとめにした。実験には、風乾後に 2mm の篩を通した後に用いた。

土壌試料 10g に比重 1.6g kg^{-1} の KI 溶液 30mL を加え、緩やかな振とう処理と超音波処理により Free POM 画分 (fPOM)、Occluded POM 画分 (oPOM) を分離した。さらに、残渣を 0.053

mm の篩を通過しない Heavy POM 画分 (hPOM) と通過する有機・無機複合体画分 (MAOM) に分画した。各画分は、pH 8 の 6%次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) 溶液により有機物を酸化分解し、処理前後の DRIFT スペクトルを測定した後、差スペクトルとして NaClO により酸化分解された有機物の赤外線吸収スペクトルを取得した。

2) 団粒中のペプチド態窒素の解析

土壌は、弘前大学農学生命科学部生物共生教育研究センター藤崎農場内の畑圃場 (褐色低地土) および農学生命科学部学内畑圃場 (黒ボク土) の表層 (0~15 cm) から採取し、5 mm の篩を通した後に風乾して以下の分画と分析に用いた。

乾土 40 g 相当量の土壌を、1 mm と 0.25 mm の篩を装着した土壌団粒分析器の篩に乗せ、毎分 30 往復、振幅 3.8 cm の条件で、水槽中で 10 分間振とうした。0.25 mm の篩を通過した懸濁液は、さらに 0.053 mm の篩を通過させた。0.053 mm の篩を通過した懸濁液は、一夜静置後にサイホンで上澄みを除き、沈降物を集めた。各団粒は、 40°C の通風乾燥器内で乾燥した後、前述の方法で比重分画を行い、赤外線吸収スペクトルの測定を行った。ただし、比重分画には、KI 溶液ではなく、ポリタングステン酸ナトリウム溶液を重液として用いた。

3) 土壌のアルカリ抽出物中のペプチド態窒素の解析

弘前大学農学生命科学部生物共生教育研究センター藤崎農場内の畑圃場 (褐色低地土) および岩手大学農学部付属農場内のリンゴ園土壌 (黒ボク土) の表層 (0~15 cm) から採取し、2 mm の篩を通した後に風乾した土壌を供試した。炭素 500 mg 相当量の土壌に、0.1 M NaOH 水溶液 150mL を加えて 24 時間抽出し、HCl で pH 1.0 に調節して沈殿物を得た。これに 7M 尿素を含む 0.1 M NaOH 水溶液に溶解して 16 時間後に、再度 HCl で pH 1.0 として沈殿を得た。上澄みは、DAX-8 樹脂カラムに吸着させた後に 0.1 M NaOH 水溶液で溶出し、DAX-8 吸着画分および非吸着画分を得た。各画分について、pH 8.0 の 0.05 M リン酸緩衝液に溶解 (5mg L^{-1}) し、三次元蛍光スペクトルの測定を行った。また、各画分について高速サイズ排除クロマトグラフィーにより分子量分布を推定するとともに、凍結乾燥試料について DRIFT スペクトルを測定した。

4) 土壌微生物が生産するタンパク質の解析

弘前大学農学生命科学部生物共生教育研究センター藤崎農場内のクリ園土壌 (褐色低地土) を湿潤状態で 2 mm の篩に通して供試した。乾土 20 g 相当量の土壌に 0.5 g のクローバー粉末もしくはオーチャードグラス粉末を加えて 25°C で 6 週間インキュベートした。0、1、2、4 および 6 週間経過後に、市販のタンパク質抽出キット (NoviPure Soil Protein Extraction Kit) を用いてタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) で分離し、ク

マシーブリリアントブルー染色によりタンパク質バンドを検出した。土壌から抽出されたタンパク質の量は、既知濃度のマーカーと比較して推定した。さらに、タンパク質同定のためにタンパク質バンドを切り出し、トリプシンでゲル内消化した。得られたペプチドを、イオントラップ質量分析計 (LC-MS/MS) に直接結合された逆相 HPLC を用いて分析した。同じ土壌について、クロロホルムくん蒸-抽出法によって微生物バイオマス炭素量を測定した。

4. 研究成果

1) 有機栽培土壌比重画分のペプチド態窒素の存在状態

厩肥の施用は、土壌の全炭素量と全窒素量を増加させた。全炭素量は 100 Mg ha^{-1} を施用した圃場 (M100Y9) より、 50 Mg ha^{-1} の厩肥を施用した圃場 (M50Y9 and M50Y15) において有意に多かった。しかし、全窒素量は、厩肥施用量および施用期間の影響を受けなかった。有機栽培の期間と厩肥施用量が増加するにつれて、fPOM、oPOM、hPOM の各画分の有機物量が増加した。C/N 比は、oPOM 画分で 44~62 と非常に高く、fPOM、hPOM、MAOM の順に低下した。また、oPOM 画分の C/N 比は有機栽培により低下する傾向がみられた。

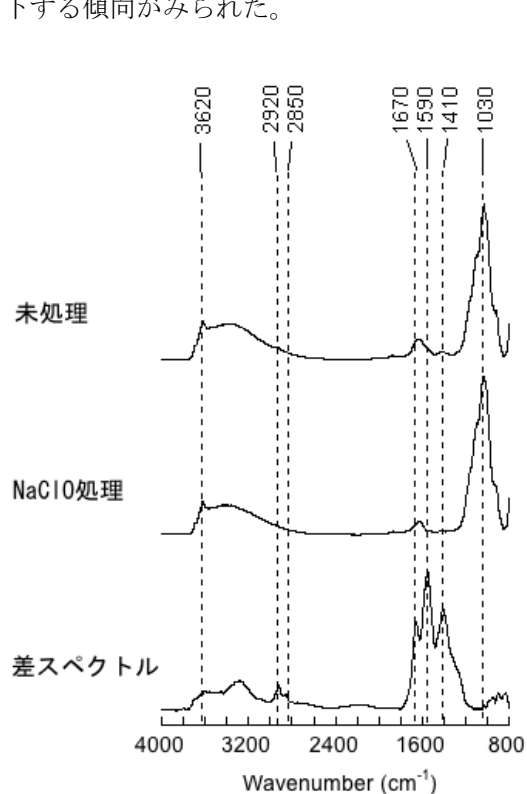


図1 未処理土壌と NaClO 処理土壌の DRIFT スペクトルとそれらの差スペクトルの例

比重画分の赤外線吸収スペクトル測定のために、NaClO 酸化処理を行なったが、処理により比重画分の有機物が完全に分解されたわけではなかった。NaClO 酸化処理による炭素分解率は、未分画土壌で 71%~74%、hPOM 画分で 67%~85%、MAOM 画分で 65%~72%であった。一

方、NaClO 酸化処理による窒素分解率は、未分画土壌で 83%~88%、hPOM 画分で 86%~97%、MAOM 画分で 85%~88%と炭素の場合よりかなり高く、ペプチド態窒素が NaClO によって分解されやすいことが認められた。したがって、NaClO で分解される有機物の C/N 比は、分解されない有機物のそれよりもかなり低かった。MAOM 画分の NaClO 分解有機物の C/N 比は 7.5~8.1 の値を示し、タンパク質の C/N 比を 4 と仮定すると、MAOM 画分の NaClO 分解有機物の約半分がタンパク質であると見積もられた。

NaClO 処理前後の試料の DRIFT スペクトルを測定すると、いずれも土壌鉱物の吸収ピークが認められた (図1)。 1030 cm^{-1} 付近の非常に強い吸収ピークは Si-O 伸縮振動に、 3620 cm^{-1} 付近の弱い吸収は粘土鉱物の O-H 伸縮振動に帰属された。一方、NaClO 処理前の試料では 2920 および 2850 cm^{-1} の脂肪族の吸収ピークが見られたが、処理後の試料で認められなくなった。NaClO 処理前後の試料の DRIFT スペクトルの差スペクトルを取得すると、有機物の吸収ピークが明瞭に認められ、NaClO で分解される有機物の赤外線吸収スペクトルを測定可能であることが示された。

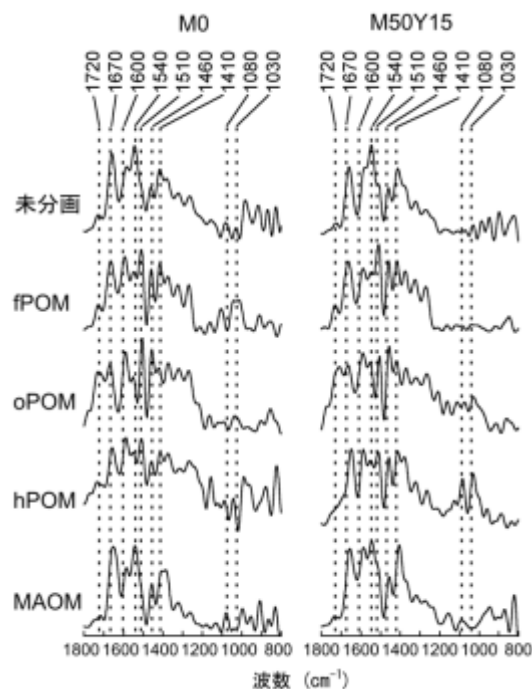


図2 有機物無施用 (M0) ならびに厩肥 50 Mg ha^{-1} を 15 年間施用 (M50Y15) した土壌の NaClO 分解有機物のデコンボリューション処理後の DRIFT スペクトル

未分画土壌およびすべての比重画分において、NaClO 分解有機物に脂肪族に由来する 2920 および 2850 cm^{-1} の吸収ピークが検出された。脂肪族ピークは oPOM 画分においてとくに強く、脂肪族化合物がこの画分に集積していることを窺わせた。

NaClO 分解有機物の赤外線吸収スペクトルをデコンボリューションすると、未分画土壤では、アミド基に由来する 1670 cm^{-1} 付近 (アミド I バンド) と 1540 cm^{-1} 付近 (アミド II バンド) の吸収ピークが最も目立ち、ついで 1600 cm^{-1} 付近の芳香族の C=C 伸縮振動に由来するピークが強く、1410 cm^{-1} 付近のカルボキレートシンメトリック伸縮振動に由来するピークも強かった。カルボキシ基の C=O 伸縮振動に由来する 1720 cm^{-1} 付近の吸収ピークおよび CH_2 基の C-H 非対称変角振動に由来する 1460 cm^{-1} 付近の吸収ピークも認められたが、それほど強くはなかった。リグニンの芳香族 C=C 振動に由来する 1510 cm^{-1} 付近の吸収ピークは比較的弱かった。しかし、多糖類由来の 1080 cm^{-1} 付近および 1030 cm^{-1} 付近の吸収ピークは Si-O 伸縮振動の非常に強いピークと重なるために、定量的な評価は難しかった。

fPOM 画分の NaClO 分解有機物は、リグニン由来の芳香族のピークが強く、MO より厩肥施用土壤において著しかった。また、アミドおよび脂肪酸由来の吸収ピークも比較的強かった。このように、fPOM 画分の NaClO 分解有機物は、植物遺体もしくは厩肥に由来するリグニンとタンパク質を多く含むことが認められた。

oPOM 画分の NaClO 分解有機物もリグニン由来の強いピークが認められたが、脂肪酸に由来するピークが非常に強く、この画分への脂肪酸化合物の集積が示唆された。

hPOM 画分の NaClO 分解有機物においては、fPOM および oPOM の両画分と比べてリグニン由来のピークは弱く、アミド由来のピークが強かった。したがって、この画分の有機物は oPOM の有機物よりリグニンが少なく、タンパク質が多くなっていることが認められた。

MAOM 画分の NaClO 分解有機物ではアミドの吸収ピークが顕著であったが、リグニン由来の吸収ピークは他の画分と比べて微弱であった。また、脂肪酸の吸収ピークも他の画分と比べて微弱であった。こうしたことから MAOM 画分の NaClO 分解有機物の主要構成成分はペプチド態成分であることが示唆された。

2) 土壤団粒内のペプチド態窒素の存在状態

土壤を団粒サイズによって分けると、有機物は、褐色低地土では 0.053~0.25 mm のマイクロ団粒に、黒ボク土では 0.25~1 mm のマクロ団粒にもっとも多く存在した。また、比重分画を行うと、いずれの土壤でも MAOM 画分に有機物が多く存在した。黒ボク土では、hPOM 画分にも多くの有機物が存在した。団粒中の有機物を比重分画すると、両土壤とも、軽比重の fPOM と oPOM は、大部分がマクロ団粒、とくに 1 mm より大きな団粒に集積していた。

NaClO 分解画分の C/N 比は、fPOM と oPOM の両画分で高く (14~19)、MAOM 画分で低かった (5~12) が、hPOM 画分の値は団粒サイズによって大きく異なり、0.25~1 mm のマクロ団

粒で高く (23~24)、0.053~0.25 mm のマイクロ団粒で低かった (5)。

DRIFT スペクトルの測定から、団粒サイズによらず、fPOM 画分の NaClO 分解有機物は主に脂肪酸成分、ペプチド態成分、リグニンおよび多糖類からなり、fPOM 画分では芳香族成分とリグニンの比率が多いことが特徴的であった。一方、比重の高い hPOM 画分と MAOM 画分についてみると、黒ボク土では芳香族成分がかなり多く含まれることが認められたが、リグニンは量的に少なく、ペプチド態成分が多いことが認められた。とくに、MAOM 画分は、いずれのサイズの団粒においてもアミドの吸収ピークが強く (図 3)、ペプチド態成分が主にシルトおよび粘土の微細粒子に吸着されていることが認められた。

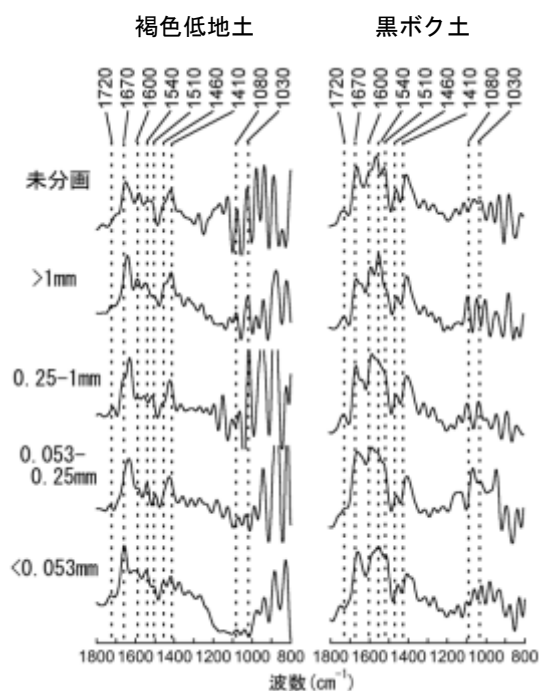


図 3 未分画土壤およびサイズの異なる団粒の MAOM 画分の NaClO 分解有機物のデコンボリューション処理後の DRIFT スペクトル

3) 土壤のアルカリ抽出物中のペプチド態窒素

土壤からのアルカリ抽出-酸沈殿物を 0.1 M NaOH/7 M 尿素に再溶解し、16 時間後に pH を 1.0 に調整すると、炭素として 16~45% が酸可溶となった。0.1 M NaOH のみに溶解して同様な操作を行った場合には 8~16% が酸可溶であり、7 M 尿素で処理することにより、酸可溶部分の割合が増加した。酸可溶画分の一部は、DAX-8 樹脂への吸着により回収可能であった。

高速サイズ排除クロマトグラフィーによって画分の分子サイズ調べると、酸可溶画分の分子サイズ分布はどの HA でも同様であり、黒ボク土 HA 以外では沈殿画分より分子サイズが小さいことが認められた。また、蛍光成分は、沈殿画分と酸可溶 DAX-8 吸着画分の両方に分配された。

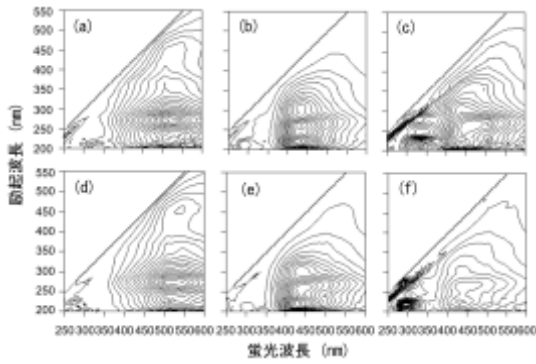


図4 アルカリ抽出物画分の三次元蛍光スペクトル

a 褐色低地土酸沈澱；b 褐色低地土 DAX-8 吸着；c 褐色低地土 DAX-8 非吸着；d 黒ボク土酸沈澱；e 黒ボク土 DAX-8 吸着；f 黒ボク土 DAX-8 非吸着

三次元蛍光スペクトルの測定から、アルカリ抽出-酸沈澱物のアルカリ性尿素溶液に溶解する成分のうち、DAX-8 吸着画分はフルボ酸様の蛍光を示したが、DAX-8 非吸着画分はタンパク質様の蛍光を示した。さらに、DRIFT スペクトルを測定すると、DAX-8 非吸着画分ではアミドおよび多糖類に由来する吸収ピークの強度が強いことが特徴的であった。

以上のように、土壌のアルカリ可溶・酸沈澱物にはペプチド態窒素が存在し、とくにアルカリ性高濃度尿素溶液に溶解し、酸で沈澱せず、DAX-8 樹脂にも吸着しない画分にペプチド態窒素が多く含まれていることが明らかになった。土壌のアルカリ抽出物のうち DAX-8 樹脂に吸着されない成分は主に非腐植物質であることから、土壌中のペプチド態窒素の多くが腐植物質と結合した状態では存在していないことを示唆する。

4) 土壌へのペプチド態窒素の給源としての微生物菌体外タンパク質

植物遺体を加えて培養した土壌から抽出したタンパク質の SDS-PAGE を行うと、インキュベーション期間および植物遺体の添加にかかわらず、タンパク質バンドは 60、45、32 および 16kDa の位置に現れた (図 5)。

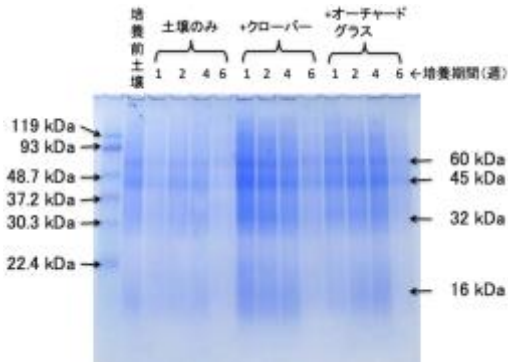


図5 土壌タンパク質抽出物の SDS-PAGE

マーカーバンドの濃度との比較から、土壌から抽出されたタンパク質の量は、30~240 mg kg⁻¹ の範囲と推定された。植物遺体の添加によるタンパク質量の増加は、クローバーの添加で最大約 200 mg kg⁻¹、オーチャードグラスの添加では約 100 mg kg⁻¹ であり、これは添加した植物遺体に含まれた窒素の 7~8% に相当した。

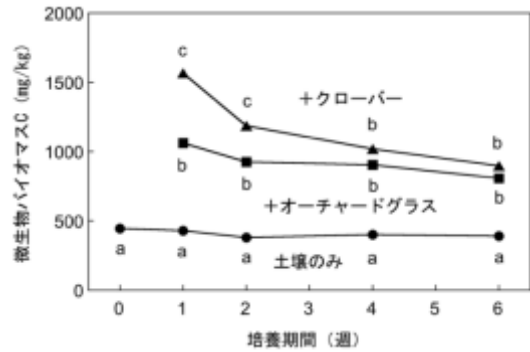


図6 培養中の微生物バイオマス炭素の推移 (図中のアルファベットは5%水準での有意差の有無を示し、同記号は有意差がないことを示す)

土壌微生物バイオマス炭素を測定すると、クローバー、オーチャードグラス、いずれの植物遺体を添加した場合にも微生物バイオマス炭素量は有意に増加し、増加量は C/N 比の高いオーチャードグラスより C/N 比の低いクローバーを添加したほうが多かった (図 6)。微生物バイオマス炭素と抽出タンパク質との相関をみると、両者には高い正相関が認められた (図 7)。

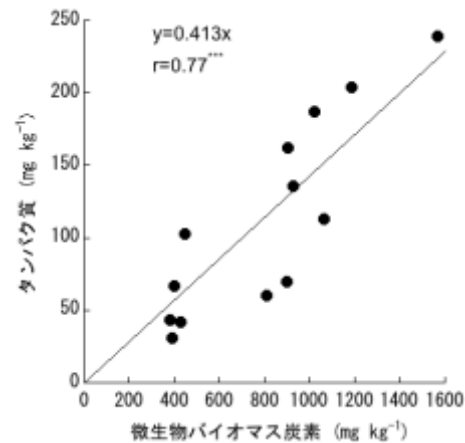


図7 微生物バイオマス炭素量とタンパク質量の関係

SDS-PAGE で検出されたタンパク質バンドについて LC-MS/MS によるタンパク質同定を行ったところ、60 kDa および 45 kDa のバンドが、*Pseudomonas* sp. の細胞外プロテアーゼを含んでいることが明らかになった。このように、土壌中での有機物分解において土壌微生物がかなりの量のタンパク質を生産してい

ることが認められ、生産されるタンパク質は微生物の細胞外タンパク質である可能性が示唆された。今後は、こうした土壤微生物由来のタンパク質の土壤中での無機物との相互作用や残存性について詳しく研究する必要があると考える。

<引用文献>

- ① 青山正和、土壤団粒—形成・崩壊のドラマと有機物利用、2010、1-173

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Cheng, W., Padre, A.T., Sato, C., Shiono, H., Hattori, S., Kajihara, A., Aoyama, M., Tawaraya, K. and Kumagai, K., Changes in the soil C and N contents, C decomposition and N mineralization potentials in a rice paddy after long-term application of inorganic fertilizers and organic matter. *Soil Science and Plant Nutrition*, 査読有, Vol. 62, 2016, 212-219
DOI: 10.1080/00380768.2016.1155169
- ② Aoyama, M., DRIFT spectroscopy combined with sodium hypochlorite oxidation reveals different organic matter characteristics in density-size fractions of organically managed soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 査読有, Vol 96, 2016, 317-327
DOI: 10.1139/cjss-2015-0076
- ③ Aoyama, M., Functional roles of soil organic matter. *Humic Substances Research*, 査読有, Vol. 12, 2015, 21-28
<http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-soil/jhss/publishing/hsr.html>
- ④ Aoyama, M., Separation of acid-soluble constituents of soil humic acids by dissolution in alkaline urea solution and precipitation with acid. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 査読有, Vol.2, 2015, 1-10
DOI: 10.1186/s40538-015-0041-5

[学会発表] (計7件)

- ① Aoyama, M., Characterization of organic matter in density-size fractions of soil aggregates by DRIFT spectroscopy combined with sodium

hypochlorite oxidation. ASA, CSSA and SSSA International Annual Meeting, 2016. 11. 9, Phoenix (USA)

- ② 青山正和、土壤団粒から分離した比重画分有機物の NaClO 酸化-DRIFT 法による性状解析、日本土壤肥料学会 2016 年度佐賀大会、2016. 9. 20、佐賀大学(佐賀県・佐賀市)
- ③ 青山正和、有機栽培土壤から分離した比重画分有機物の NaClO 酸化-DRIFT 法による性状解析、日本土壤肥料学会 2015 年度京都大会、2015. 9. 9、京都大学(京都府・京都市)
- ④ Aoyama, M., Characterization of organic matter in density-size fractions of organically managed soils by diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy combined with NaClO oxidation. ISMOM2015, 2015. 7. 6, Montreal (Canada)
- ⑤ 青山正和、土壤有機物の機能(第30回大会記念シンポジウム「環境中に存在する天然有機物研究の過去と未来」、日本腐植物質学会第30回講演会、2014. 11. 22、日本大学(神奈川県・藤沢市)
- ⑥ 青山正和：次亜塩素酸ナトリウム処理-拡散反射フーリエ変換赤外線吸収スペクトル測定による土壤有機物の性状解析。日本土壤肥料学会 2014 年度東京大会、2014. 9. 9、東京農工大学(東京都・府中市)
- ⑦ Aoyama, M., Separation of acid-soluble constituents from soil humic acids by dissolution in alkaline urea solution and precipitation with acid. The 17th Meeting of the International Humic Substances Society, 2014. 9. 2, Ioannina (Greece)

[図書] (計2件)

- ① 青山正和、農山漁村文化協会、農業技術体系・土壤施肥編、第1巻、追録第26号、2015、48の13の2-13
- ② 青山正和、農山漁村文化協会、最新農業技術 土壤施肥 vol. 7、2015、53-64

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青山正和 (Aoyama, Masakazu)
弘前大学・農学生命科学部・教授
研究者番号：60150950