

D-アミノ酸の土壤中分布とその窒素代謝における意義

甲斐秀昭*・河口定生**・丸本卓哉**

1. 緒言

窒素の窒素については、古くから今日に至るまで多くの研究がある。このことは、一面で作物生産に対する窒素の重要性を示すとともに、他面では、この分野において今日なお多くの未解決の問題が残されていることを示すものと考えられる。

とくに、地力窒素の給源とその本質に関する問題は、窒素の窒素代謝や地力問題の解明上、きわめて重要かつ興味ある課題である。

筆者らは、従来、地力窒素の化学的特性やその発現機作について研究を進めているが、その研究過程で、窒素から無機化して出て来る窒素の給源の化学的形態は主としてアミノ酸態窒素であること、またその際、窒素の乾燥や機械的破碎、あるいは地温上昇が伴う場合は、アミノ糖態窒素の関与もまた顕著であること、さらに、窒素のアミノ酸組成には著しい特徴のあることなどを明らかにした。

このような結果から、窒素中における窒素の有機化・無機化過程には、窒素中の種々の物質代謝に関与して生成・死滅を繰り返している微生物の菌体、とりわけその細胞壁部分が重要でしかも特徴的な役割を演じていることを見出し、これら微生物菌体あるいはその代謝産物の地力窒素の給源としての意義を考究して来た。本報は、その概要である。

2. 窒素有機態窒素の無機化過程の化学的特性

種々の窒素についてその窒素有機態窒素の無機化過程における化学的形態別窒素の変化をみると、いくつかの共通した特徴が見出される。いま、九州大学附属農場水田窒素について得られた結果¹⁾を例に挙げて述べる。

窒素に加熱乾燥処理（以下、加熱処理と称す）を繰り返さない、可分解性有機物*の大部分を減耗させた窒素を調製し、その窒素と無処理の窒素（以下、対

照区窒素と称す）とについて有機態窒素の化学的形態別画分（BREMNER法²⁾の変動を比較検討することにより、窒素の可分解性有機態窒素の化学的特性を推定した。

九州大学附属農場水田窒素（有機連用、作土）は、全窒素含量：246 mg N/100 g 乾土、全炭素含量：2308 mg C/100 g 乾土、C/N比：10.0、土性：軽塩土、主要粘土鉱物：メタハロイサイトである。まず、窒素を加熱処理（80°C、5時間）した後、畑状態（最大容水量の60%）、あるいは湛水状態（最大容水量の120%）で2週間、それぞれ30°Cあるいは40°Cでインキュベートした。この操作を10回繰り返した。

その結果、窒素中の有機態窒素は19~36%、有機態炭素は12~24%が無機化された。無機化された部分についてみると、そのC/N比は4~10であった（第1表）。一般にインキュベーション法でみた場合、窒素有機物中無機化する部分のC/N比は4~8である。

また、これらの窒素を6規定塩酸で加水分解し、各窒素画分について上述の窒素処理に伴う変化をみると、酸可溶性有機態窒素画分の減少が大きいのに対し、酸不溶性有機態窒素画分の減少はわずかであった（第2表）。このことから、無機化する窒素のほとんどは酸可溶性窒素画分中にあることがわかる。

さらに、酸可溶性有機態窒素の各画分は加熱処理により無機化が促進され、著しく減少した。無機化が促進された窒素に対する各画分の寄与率は、 α -アミノ態窒素が43~60%、アミノ糖態窒素が10~16%、酸加水分解性アンモニア態窒素が1~16%、未同定態窒素が17~30%であった。このように、各窒素画分のうち、可分解性有機態窒素に対しては α -アミノ態窒素の占

* 窒素有機物は、通常、微生物によって分解されにくい、窒素の乾燥、温度上昇、反応変換などが契機となって分解されやすくなる部分がある。著者らの研究室では、従来、このような窒素有機物を易分解性有機物と称している。しかし、易分解性有機物といえ、一般には糖類やタンパク質など微生物に分解されやすい有機物を指す。したがって、このような意味の違いによる混乱や誤解を避けるため、ここでは、従来用いている易分解性有機物の代りに可分解性有機物という表現を用いることとする。

* 九州大学

** 九州大学（現在 山口大学）

土と微生物 第18号、27-41（1976）

第1表 培養前後の土壌の窒素および炭素含量

処 理	培 養 条 件	全窒素	無機態窒素	固定態窒素	有機態窒素	有機態炭素	C/N
原 土	—	245.8	9.7	6.3	229.8	2308	10.0
対 照 区	湛 水 状 態						
	30°C	213.6	0.7	6.2	206.7	2219	10.7
	地温上昇処理区	40°C	207.6	0.9	5.8	200.9	2164
熱 乾 処 理 区	30°C	207.4	34.4	15.6	158.6	1823	11.5
対 照 区	畑 状 態						
	30°C	245.7	24.8	5.2	215.7	2168	10.1
	地温上昇処理区	40°C	238.5	30.6	6.5	201.4	2099
熱 乾 処 理 区	30°C	235.4	36.1	14.1	185.2	2026	10.9

(九州大学付属農場水田作土, mg N または C/100 g 乾土)

第2表 培養前後の土壌の化学的形態別窒素含量

処 理	有機態窒素	酸 不 溶 性 窒 素	酸 可 溶 性 窒 素	酸 可 溶 性 窒 素			未 同 定 窒 素
				アンモニア態窒素	アミノ糖態窒素	α-アミノ態窒素	
原 土	229.8 (100)	52.3 (22.8)	177.5 (77.2)	32.2 (14.0)	16.5 (7.2)	80.6 (35.1)	48.2 (21.0)
湛 水 状 態							
対 照 区	206.7 (100)	47.1 (22.8)	159.6 (77.2)	28.6 (13.8)	19.2 (9.3)	83.5 (40.4)	28.3 (13.7)
地温上昇処理区	200.9 (100)	48.1 (23.9)	152.8 (76.1)	26.0 (12.9)	21.3 (10.6)	80.3 (40.0)	25.2 (12.5)
熱 乾 処 理 区	158.6 (100)	47.1 (29.7)	111.5 (70.3)	20.9 (13.2)	14.3 (9.0)	62.6 (39.5)	13.7 (8.6)
畑 状 態							
対 照 区	215.7 (100)	51.9 (24.1)	163.8 (75.9)	34.7 (16.1)	22.1 (10.2)	86.2 (40.0)	20.8 (9.6)
地温上昇処理区	201.4 (100)	51.2 (25.4)	150.2 (74.6)	28.5 (14.2)	23.3 (11.6)	80.1 (39.8)	18.3 (9.1)
熱 乾 処 理 区	185.2 (100)	50.2 (27.1)	135.0 (72.9)	34.2 (18.5)	17.1 (9.2)	68.2 (36.8)	15.5 (8.4)

括弧内の数値は有機態窒素に対する各画分の窒素の割合を示す。

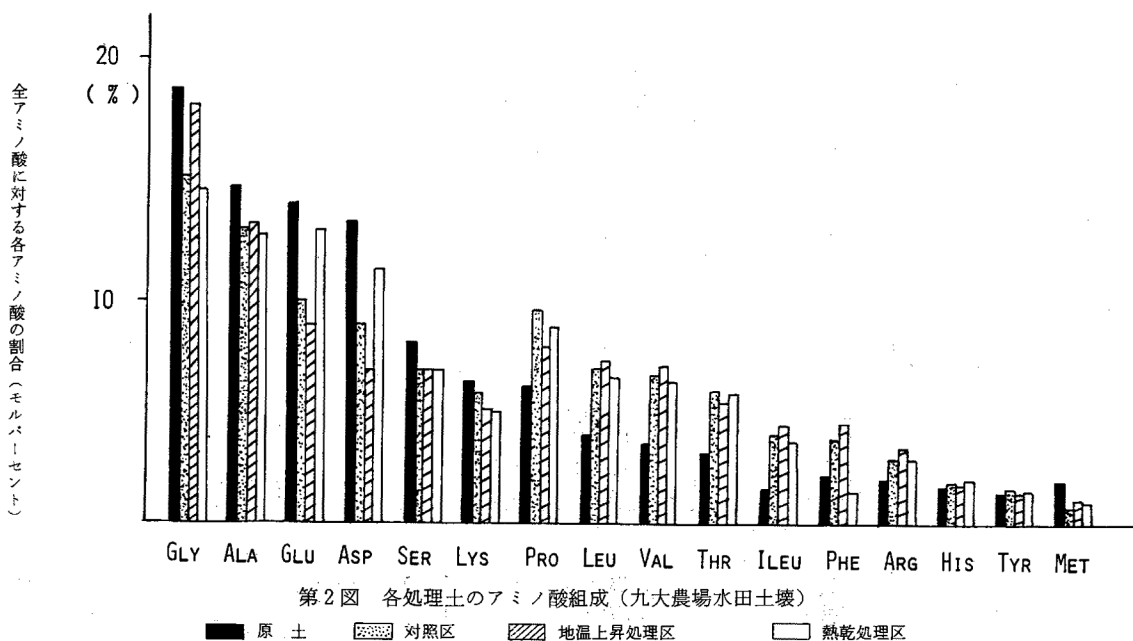
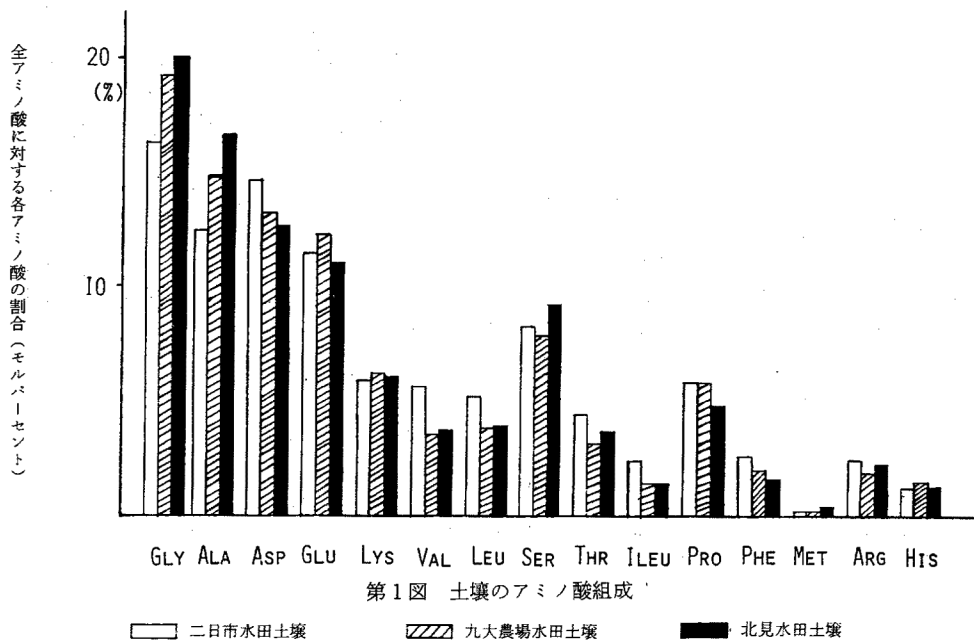
(九州大学付属農場水田作土, mg N/100 g 乾土)

める割合が最も大きい。また、アミノ糖態窒素は、そのまでは無機化され難いが、熱乾処理により無機化が促進される。このようなα-アミノ態窒素とアミノ糖態窒素を合わせると、可分解性有機態窒素の53~75%に達する。なお、本来これら両画分に入るべき有機態窒素の一部は、酸加水分解中に変化してアンモニア態窒素画分あるいは未同定態窒素画分に入って行く可能性があることを考慮すれば、両者の寄与率は実際には上記の数値よりさらに大きいものと考えられる。

つぎに、土壌の酸加水分解物についてそのアミノ酸組成を調べると、第1図に例示するように、そのアミ

ノ酸組成は土壌の種類の違いにかかわらずきわめてよく類似している。一般にGly, Alaの含量が著しく高く、ついでGlu, Aspが多く、これらに続いてSer, Lys, Pro, Val, およびLeuの順になっている。このようなアミノ酸組成は、通常の動植物組織のアミノ酸組成とは異なり、微生物、とくにその細胞壁物質や生体膜構造タンパク質のアミノ酸組成³⁻⁵⁾に非常によく似た傾向を示している。

さらに、土壌有機態窒素の無機化に際し、とくに熱乾処理や地温上昇により無機化が促進された場合には、概してGly, Ala, GluあるいはAspの減少割合が



その他のアミノ酸に比べて著しく大きい(第2図)。これらのアミノ酸は微生物細胞壁の主要な構成アミノ酸である。とくに, Gly, Ala, Glu は後で述べるように微生物細胞壁の主要な構成成分であるムコペプチドを構成するアミノ酸であり, また, Ala は同じく微生物細胞壁の構成成分であるタイロ酸の中にも含まれてい

る。

以上のように, 土壌有機態窒素をその化学的特性からみると, 土壌中における窒素の有機化・無機化過程において微生物菌体構成物質, なかんずく, 細胞壁物質の関わり合いの大きいことが推測される。

そこで, この点を明らかにするために, 以下のいく

つかの実験を試みた。

3. 土壤中における植物体および微生物体の分解に伴う窒素の化学的形態変化の特徴

3-1 ^{14}C -ライグラスの分解に伴うアミノ酸・アミノ糖組成の変化

$^{14}\text{CO}_2$ で栽培したライグラスを風乾粉碎し、その 400 mg を乾土 10 g 相当の湿潤細土または砂に添加し、それぞれ最大容水量の 50% の水分で 30°C にインキュベートした。6 か月後に 6 規定塩酸を用いて加水分解し、アミノ酸自動分析計およびアントラセンフロセセルを用いたシンチレーションカウンターでアミノ酸・アミノ糖の定量と各画分の ^{14}C 活性の測定を行

なった⁶⁾。

その結果は、第 3 表に示すように ^{14}C カウント数からみれば、砂および土壌の場合とも添加ライグラスのほぼ 75% が CO_2 として無機化し、約 25% が残留したことを示している。また、残留したライグラス炭素のうち、22~23% がアミノ態として存在することが認められた。アミノ態- ^{14}C の量にはインキュベートの前後でほとんど変化はないが、質的には著しく変化していることが、そのアミノ酸・アミノ糖組成の変化から明らかに示される。

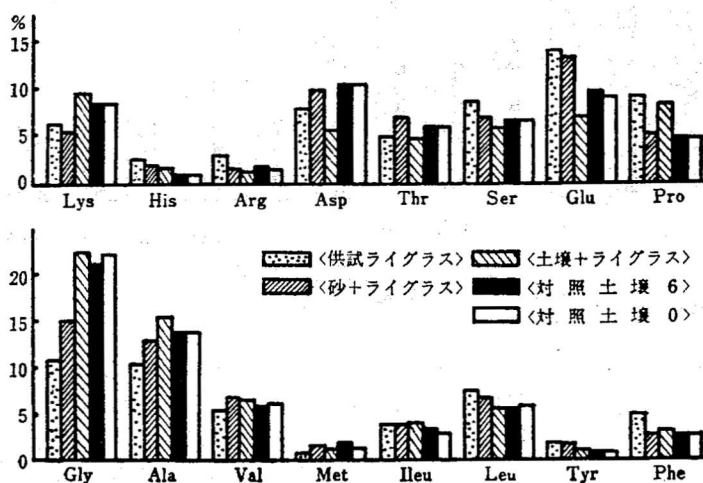
すなわち、第 3 図にみるように、供試ライグラスのアミノ酸組成は Glu が著しく多く、つぎに Gly, Ala, Pro, Ser および Asp が多い。しかるに、ライグラスを添加した砂と土壌、および対照土壌（原土および 6 か

第 3 表 <供試ライグラス>、<砂+ライグラス> および <土壌+ライグラス> の ^{14}C カウント数

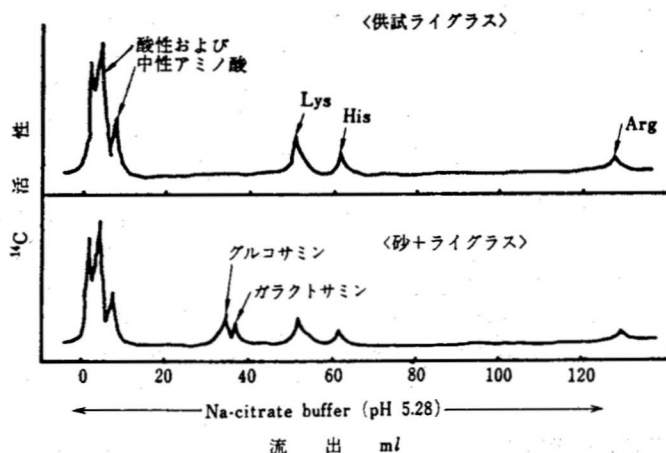
試験区	全カウント数 ($\times 10^4$ cpm)	アミノ化合物 カウント数 ⁽¹⁾ ($\times 10^4$ cpm)	アミノ化合物 (μmol)
<供試ライグラス> ⁽²⁾	231.0 (100.0)	12.9 (5.6)	121.0
<砂+ライグラス> ⁽³⁾	56.7 (100.0)	12.5 (22.0)	132.7
<土壌+ライグラス> ⁽⁴⁾	58.5 (100.0)	13.5 (23.1)	500.0

() 内の数字は、各区の全カウント数を 100 とした割合

- (1) アミノ酸+アミノ糖
- (2) 400 mg ライグラス
- (3) 10 g 砂+400 mg ライグラス
- (4) 10 g 土壌+400 mg ライグラス



第 3 図 ライグラス添加試験における各処理区のアミノ酸組成 (モルパーセント)



第4図 〈供試ライグラス〉および〈砂+ライグラス〉の amino 糖の ^{14}C 活性

月インキュベートしたもの)においては、いずれも Gly, Ala が最も多く、この両者を合わせると全アミノ酸量の約 1/3 にも達する。ついで、Glu, Asp, Lys, が続き、Ser, Thr および Leu の順に少なくなっている。このことは、6 か月のインキュベーション期間に土壤微生物の作用を通して添加ライグラス自身のアミノ酸組成は組み換えられ、土壤固有のアミノ酸組成に変わっていくことを示している。そして、このような土壤のアミノ酸組成は、前述のように、微生物細胞壁のアミノ酸組成に近似している。

さらに、第4図に示されるように、供試ライグラス中には認められなかったアミノ糖化合物(グルコサミンおよびガラクトサミン)がライグラスを添加した砂および土壤ではかなりの量で認められた。このことは、添加したライグラスの分解過程において、アミノ糖化合物が土壤微生物により新たに合成されたことを示している。一般に土壤中には、アミノ糖態窒素が有機態窒素の6~12%程度含まれている。このようなアミノ糖化合物は、微生物細胞壁の主要な構成要素の一つである(第6図参照)。

3-2 土壤中における ^{15}N の有機化・無機化過程にみられる形態別 ^{15}N 画分の消長

窒素源として ^{15}N でラベルした硝酸カリウムまたは硫酸アンモニウム、炭素源としてグルコースまたはセルロースをそれぞれ土壤に添加し、窒素を一たん有機化させた後、その再無機化過程における ^{15}N -形態別画分の動態を追跡した。また、 ^{15}N でラベルした硫酸アンモニウムを用いて砂耕栽培した稲ワラの土壤中における分解に伴う ^{15}N の動態を調べた⁷⁾。ここでは、硝酸カリウムとグルコースを用いた例⁸⁾を挙げる。

^{15}N -硝酸カリウムとグルコースをそれぞれ乾土 100 g 当たり N として 20 mg, C として 640 mg (すなわち C/N 比として 32) を湿润細土(以下、原土と称す)に加え、最大容水量の 60% の水分状態で 30°C 、3 日間インキュベートした。一たん土壤を蒸留水で洗滌した後(以下、調製土と称す)、それを三つに分け、それぞれ無処理、風乾処理あるいは熱乾処理し、原土の懸濁液をイノキュラムとして加えてから再び最大容水量の 60% の水分状態に戻し、 30°C で 6 週間インキュベートした。経時的に各処理土中の無機態窒素および有機態窒素を各種形態別に分画定量するとともに、その中の ^{15}N の存在比を測定した。

調製土中の添加 ^{15}N -硝酸カリウムから新たに生成した有機態窒素(以下、有機化窒素と称す)は、もともと土壤中に存在していた有機態窒素(以下、土壤窒素と称す)に比べて α -アミノ態窒素は同程度ないしはわずかに多く、アミノ糖態窒素はやや少なく、未同定態窒素はやや多い傾向がみられた。

有機化窒素は土壤窒素に比べてはるかに分解されやすい。6 週間のインキュベーション期間中の無機化率でみると、無処理区<風乾処理区<熱乾処理区の順に無機化量は増大するが、いずれの処理区とも、それぞれ有機化窒素は土壤窒素の 4~5 倍の無機化率を示した(第4表)。

また、風乾処理や熱乾処理によって無機化が促進される割合を各形態別窒素画分についてみると、第5表のとおりである。すなわち、風乾処理によって土壤窒素は α -アミノ態窒素画分の無機化が著しく促進されるのに対し、有機化窒素ではアミノ糖態および未同定態窒素画分の無機化促進が大きい。熱乾処理ではいずれの窒素画分も無機化が著しく促進されるが、とりわ

第4表 土壤窒素および有機化窒素の無機化率と乾燥処理効果

	無処理区	風乾処理区	熱乾処理区
土壤窒素	3.4	5.9	10.7
有機化窒素	14.0	28.0	36.0

(無機化率, %)

け土壤窒素では α -アミノ態および酸加水分解性アンモニア態窒素画分, 有機化窒素ではアミノ糖態, 未同定態および酸加水分解性アンモニア態窒素画分の無機化促進が著しかった。

3-3 添加菌体の分解過程の化学的特性

液体培地を用いて種々の微生物を大量培養して調製した菌体(以下, 生菌体と称す), およびそれらを超音波処理して調製した菌体細胞質部分あるいは細胞壁部分を, 砂と粘土から調製した人工土壤または種々の実際の土壤に添加し, 最大容水量の60%の水分状態で30°Cにインキュベートした。そして, 経時的にその炭素あるいは窒素の無機化速度, 無機化率, 形態別窒素画分の消長, アミノ酸組成の変化, 無機化に及ぼす乾燥処理あるいは破碎処理の影響などを調べた⁹⁾。

たとえば, 主要粘土鉱物の種類を異にする3種の土壤(第6表)に *Aspergillus niger* の乾燥菌体を乾土100g当たり500mg(Nとして20mgに相当)加え, 水分を最大容水量の60%に調節し, 30°Cでインキュベートした。

初期(0~3週)の窒素無機化速度は, 富山土壤(ハロサイト質)>飯田土壤(アロフェン質)>諫早土壤(モンモリロナイト質)の順であった。添加菌体の無機化は, 富山土壤では5週目, 飯田および諫早土壤では7週目にはほぼ落つき, それ以後の無機化量は僅少であった。最終無機化率(12週間)は, 富山土壤48.0%, 諫早土壤42.0%, 飯田土壤41.5%であった。また, 12週

目に各土壤を熱乾処理して, 土壤中の可分解性有機物の集積状況を検した。その結果は, 第7表に示すように添加菌体由来して土壤中に新たに集積した可分解性有機態窒素の量は, 富山土壤>諫早土壤>飯田土壤の順であった。

これらの結果から, 添加菌体由来する新たな土壤有機物中の可分解性有機物の集積率は, もともとあった土壤有機物中の可分解性有機物の集積率よりはるかに高いことが示された。このことは, 前項までに述べてきたことをさらに確認するものである。また, 新たに集積する可分解性有機物の集積率とその無機化速度は, 土壤に含有される粘土鉱物の種類によって異なることが推察された。

ついで, *Bacillus subtilis*, *Arthrobacter simplex*などの生菌体, 細胞質物質および細胞壁物質を人工土壤に加えて上記と同様の方法でインキュベートした。第8表に示す結果から明らかなように, 菌体が分解する場合, その細胞壁物質は細胞質物質に比べて無機化は遅く, 無機化率も低い。そのため, 細胞壁物質の一部は土壤中に残留するが, 土壤が乾燥処理を受けるとその無機化が促進され, いわゆる可分解性有機物の給源の一部になっていることが推察された。また, 細胞質物質は, それが土壤中に存在していても, それ自身は乾燥処理によって無機化が促進されないことが示された。しかし, このようなタンパク質物質も, それがたん粘土に吸着されれば乾燥処理効果を示すことは, 細胞質物質や種々のタンパク質を用いた他の実験で確認している¹⁰⁾。

さらに, *A. simplex*, *B. subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*などの微生物の細胞壁物質を粘土鉱物の異なる数種の土壤に加えてインキュベートし, その分解過程における可分解性有機物の集積に及ぼす粘土やリグニンの影響を調べた。その結果(第9表), 粘土やリグニンは細胞壁物質の分解に伴う可分解性有機物の集積に有利に働くが, その効果は, 粘土の質的ならびに

第5表 土壤窒素および有機化窒素の形態別窒素画分の無機化に及ぼす乾燥処理の影響

処 理		酸不溶性窒素	酸 可 溶 性 窒 素			
			アンモニア態窒素	アミノ糖態窒素	α -アミノ態窒素	未同定態窒素
風乾処理区	土壤窒素	153	-169	30	363	112
	有機化窒素	100	-443	200	127	300
熱乾処理区	土壤化窒素	133	603	187	342	204
	有機化窒素	137	323	320	143	309

(無機化指数, すなわち, 無処理区の各画分の無機化率を100とした場合の指数)

第6表 供試土壌の理化学性

土 壤	土 性	粘土含量	全 炭 素 (乾土当たり)	全 窒 素 (乾土当たり)	CEC (me/100 g 乾土)	主 要 物 粘 土 鉱 物
富山県農試水田土壌	SL	9.6	2.34	0.18	7.3	ハロイサイト
長崎県諫早水田土壌	LiC	44.2	1.51	0.16	32.6	モンモリロナイト
大分県飯田水田土壌	CL	24.5	7.31	0.61	29.4	アロフェン

第7表 12週目における各区の可分解性窒素量

土 壤	有 機 態 窒 素 (1)	2週間の無機化量		可分解性 窒 素 量 (3)-(2)	可分解性窒素 集 積 率 (%) $\frac{(3)-(2)}{(1)} \times 100$
		対 照 (2)	熱乾処理 (3)		
(A) 菌体無添加区					
富 山 (H)	171.8	0.1	3.6	3.5	2.0
諫 早 (M)	150.4	0	5.4	5.4	3.6
飯 田 (A)	598.3	1.2	6.0	4.8	0.8
(B) 菌体添加区					
富 山 (H)	182.2	1.4	5.8	4.4	2.4 (0.4)*
諫 早 (M)	162.3	1.5	7.6	6.1	3.8 (0.2)*
飯 田 (A)	610.3	2.5	7.7	5.2	0.9 (0.1)*
(B-A) 菌体に由来する部分					
富 山 (H)	10.4	1.3	2.2	0.9	8.7
諫 早 (M)	11.9	1.5	2.2	0.7	5.9
飯 田 (A)	13.0	1.3	1.7	0.4	3.1

(*) 内の数値は (B) の菌体添加による可分解性窒素集積率の増加率を示す、すなわち (B)-(A) の値

第8表 微生物の生菌体、細胞質物質および細胞壁物質の無機化と熱乾処理効果

(mg N/100 g 人工土壌*)

		添加窒素量	処 理 区	無 機 化 窒 素 量	処 理 効 果	処 理 効 果 率** (%)
<i>B. subtilis</i>	生 菌 体	47.2	対 照 熱 乾	22.6 24.3	1.7	3.6
	細胞質物質	56.4	対 照 熱 乾	31.0 29.1	-1.9	-
	細胞壁物質	65.3	対 照 熱 乾	24.6 28.7	4.1	6.3

* 砂 (0.25~0.50 mm) 80%+粘土 20%

** $\frac{\text{処理効果}}{\text{添加窒素量}} \times 100 (\%)$

量的違いによって異なることが明らかにされた。

さらにまた、*B. subtilis*の菌体およびその細胞壁物質を供試し、その分解過程ならびにその熱乾処理による無機化促進における窒素の形態別画分およびアミノ酸組成の変化について分析を試みた。その結果、菌体自身の分解過程においては、その細胞質物質の無機化はきわめて速やかで、無機化される有機態窒素画分は大部分が α -アミノ態窒素画分であり、アミノ糖態窒素画分はほとんど分解されない。しかし、一たん熱乾処理を受けると、分解の緩徐な細胞壁物質の無機化が促進されるようになる。その際、無機化が促進される窒素画分は主としてアミノ糖態および α -アミノ態窒素画分であって、とくにアミノ糖化合物の無機化促進が著しい。また、処理によって無機化が促進される α -アミノ態窒素画分中のアミノ酸の種類についてみると、その組成は細胞壁物質のペプチド化合物のアミノ酸組成とほぼ同じで、無機化量の多い順に示すと、Ala, Glu> Asp, Gly, Lys, Val> Ileu, Leu, Ser, Thr, Arg などのようになることが明らかにされた。

以上述べて来た種々の実験結果から、つぎのように考察される。すなわち、土壌にはたえず植物の残根、茎葉残渣、根の分泌物、動物の遺体および排泄物や、肥料として施用される有機物が入ってくる。

これらの有機物の分解過程で、窒素についてみる限り、その大部分は一たん微生物菌体あるいはその代謝産物となる。施用された無機質肥料窒素の一部も有機化されて菌体窒素となる。

このような微生物菌体窒素が分解される過程で、細胞質部分は細胞壁部分より分解されやすい。したがって、細胞質部分、その主体をなすタンパク質はそのままでは分解が速く、それが安定化して土壌窒素として残存するためには、おそらく土壌中の無機または有機のコロイドとの結合が必要であると思われる。

一方、細胞壁物質は、その構造から分解は比較的遅く、そのままの形態でも土壌中に残存しうるが、それが土壌の無機または有機コロイドと結合することによ

りさらに安定化し、土壌窒素として存在する。

しかし、このように一たん安定化した窒素化合物も、土壌の乾燥、機械的破碎、地温上昇などによってその分解が促進され、土壌からの無機態窒素の供給に寄与していると考えられる。

4. 土壌中における D-アミノ酸の分布およびその動態と土壌有機態窒素に対する微生物細胞壁物質の寄与

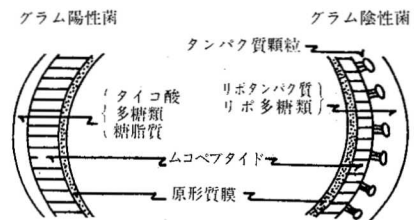
以上の研究結果に基づき、微生物の細胞壁に特異的に存在するといわれるD-アミノ酸に着目し、そのD-アミノ酸の土壌中における分布と、窒素の有機化・無機化過程におけるD-アミノ酸の動態を明らかにすることによって、土壌有機態窒素に対する微生物細胞壁物質の寄与を解明しようと試みた。

4-1 微生物細胞壁中のD-アミノ酸

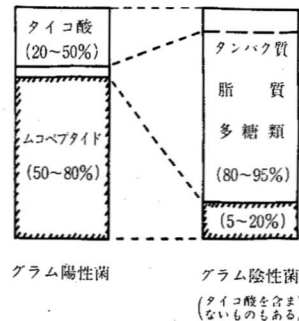
通常の動植物タンパク質にはD-アミノ酸は存在しない。しかし、細菌の細胞壁¹¹⁾、莢膜物質およびペプチド性抗生物質¹²⁾には、D-アミノ酸がかなりの割合で存在することが報告されている。

第5図および第6図に示すように、ムコペプチド

(1) 細菌細胞壁の構造



(2) 細菌細胞壁の構成成分

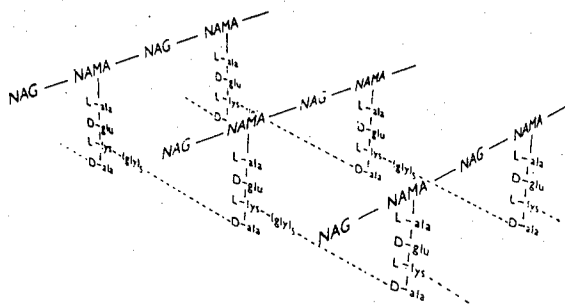


第5図 細菌細胞壁の構造¹⁷⁾と構成成分¹⁸⁾(模式図)

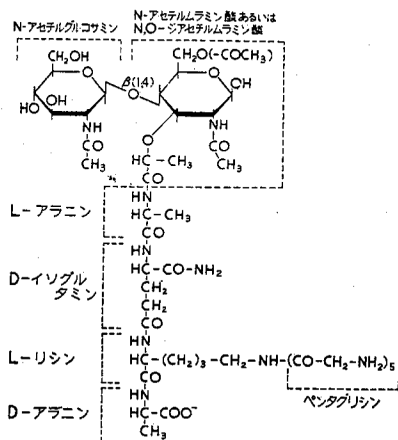
第9表 菌体細胞壁部分の添加による可分解性有機物の集積

土 壤	可分解性有機物の集積率(%)	
	可分解性炭素	可分解性窒素
モンモリン系	22.1	12.5
カオリン系	20.6	7.0
アロフェン系	19.5	5.9
砂	4.7	2.0
砂+リグニン	—	13.3

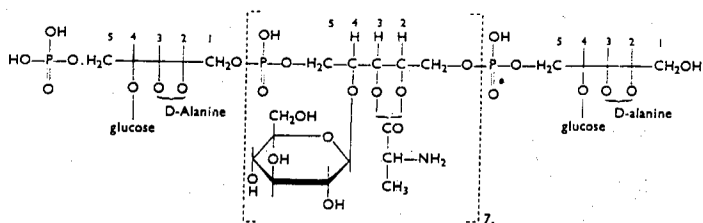
1. ムコペプチド
 (1) ムコペプチドの網目構造



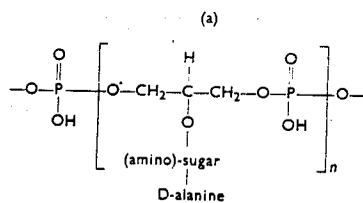
(2) ムコペプチドの単位構造の一例 (*Staphylococcus aureus*)



2. タイコ酸
 (1) Ribitol 型

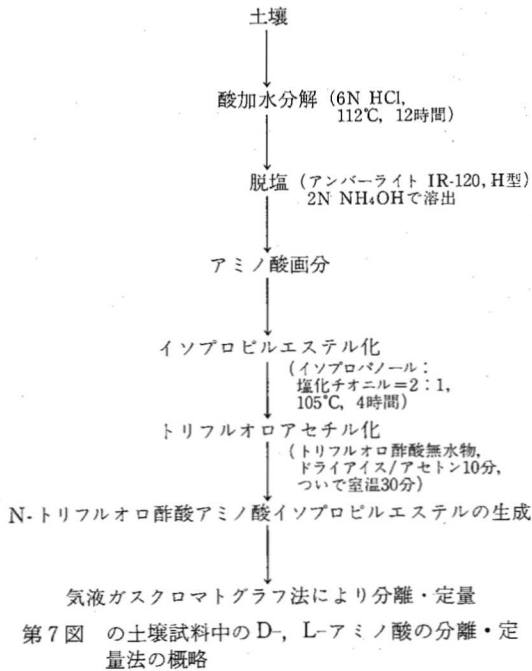


(2) Glycerol 型



第6図 細菌細胞壁のムコペプチドとタイコ酸¹⁹⁾

は三次元的網目構造をもち、細菌細胞壁の骨格的役割をなす物質である。このムコペプチドと、グラム陽性菌の細胞壁中にとくに多いタイコ酸に、D-アミノ酸 (D-Ala および D-Glu) が含まれているのである。

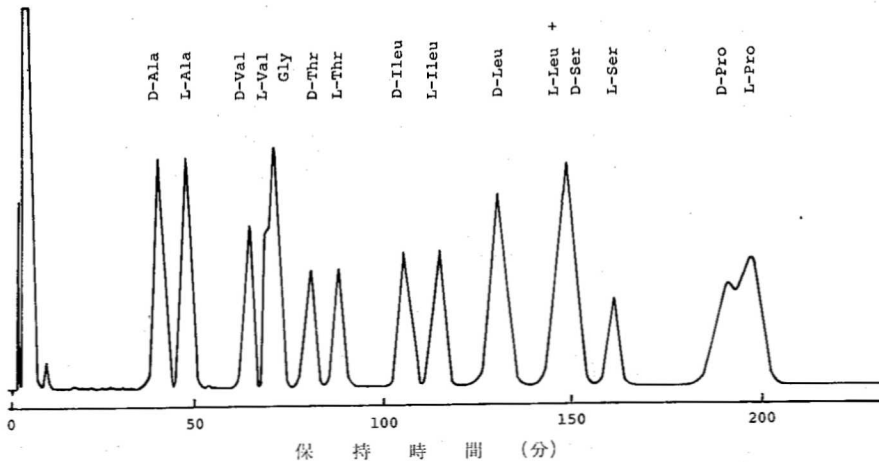


4-2 D-アミノ酸の定量法

D-アミノ酸の定量法としては、比旋光度法、D-アミノ酸酸化酵素法およびガスクロマトグラフ法など種々あるが¹³⁾、その中で精度および再現性がよく、微量の試料 ($3 \times 10^{-4} \sim 5 \times 10^{-3} \mu\text{mole}$ 程度) の定量ができるガスクロマトグラフ法を用いた。ガスクロマトグラフ法についても種々検討し、最終的にはPARRらの方法¹⁴⁾に基づき、一部改変して行なった。その概略は、第7図のとおりである。なお、本法で用いた固定相液体 (N-トリフルオロアセチル-L-バリル-L-バリンシクロヘキシルエステル、およびN-トリフルオロアセチル-L-フェニルアラニル-L-ロイシンシクロヘキシルエステル) は合成して使用した。第8図および第9図に、そのガスクロマトグラムの例を示した。

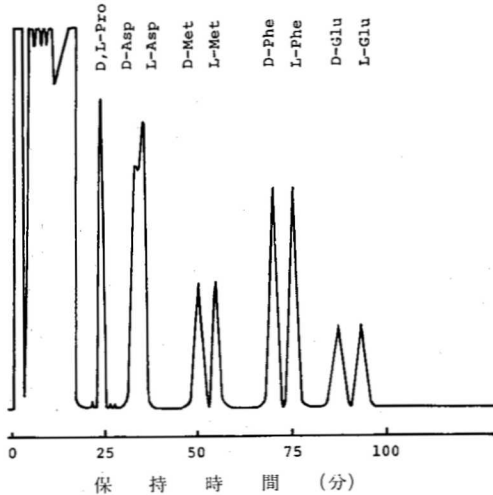
4-3 種々の土壤および生物体中のD-アミノ酸の分布

市販のタンパク質、単子葉・双子葉植物の地上部、シママミズ、および大量培養した数種の細菌、放線菌、糸状菌を供試し、それらの6規定塩酸加水分解物について前記の方法によりD-, L-アミノ酸の分割定量を行なった。なお、微生物については菌体全体のほかに、常法¹⁵⁾にしたがって調製した細胞壁およびムコペプチドについてそれぞれ測定した。



第8図 D-, L-アミノ酸(N-トリフルオロアセチルアミノ酸イソプロピルエステル)のガスクロマトグラム(その1)。カラム: ステンレス製キャピラリーカラム, 400フィート, N-トリフルオロアセチル-L-バリル-L-バリンシクロヘキシルエステルでコーティング, カラム温度: 110°C , Isothermal, 注入口温度: 250°C , 検出器: FID, キャリアーガス (He): 15.3 ml/min , 水素ガス: 2.2 kg/cm^2 , 空気: 2.0 kg/cm^2 。

得られた結果は第10表および第11表に示すように、カゼイン、ゼラチン、植物の茎葉、ミミズの体中にはD-アミノ酸は検出されなかった。微生物については、供試した糸状菌の菌体にはD-アミノ酸は認められなかった。これは、従来、糸状菌の細胞壁にはムコペプチドおよびタイコ酸の存在が認められていないことと符合する。しかし、放線菌および細菌には相当量



第9図 D-, L-アミノ酸 (N-トリフルオロアセチル-L-アミノ酸イソプロピルエステル) のガスクロマトグラム (その2)。カラム: ステンレス製キャピラリーカラム100フィート, N-トリフルオロアセチル-L-フェニルアラニル-L-ロイシンシクロヘキシルエステルでコーティング, カラム温度: 140°C, Isothermal, 注入口温度: 250°C, 検出器: FID, キャリアーガス (He): 4.6 ml/min, 水素ガス: 1.4 kg/cm², 空気: 2.0 kg/cm²。

のD-アミノ酸の存在することが確認された。存在が認められたD-アミノ酸はD-アラニン (D-Ala) とD-グルタミン酸 (D-Glu) であり, その他のアミノ酸についてはD-型の存在は認められなかった。また, 菌体内の分布については, 原形質にはD-アミノ酸の存在は認められず, 菌体全体く細胞壁くムコペプチドの順にD-Ala, D-Gluの存在割合は高かった。これらの結果から, D-Ala, D-Gluはムコペプチド中に高濃度に存在することが確認された。第6図に示したように, ムコペプチドは細菌細胞壁の基本骨格をなす袋状のヘテロポリマーであるが, そのペプチド鎖中にD-Ala, D-Gluが含有されている。なお, 放線菌細胞壁の化学構造については従来不明の点が多いが, D-Ala, D-Gluの分布からみれば, 細菌のそれにきわめて近いものであることが, 本実験の結果から推察された。

つぎに, 土壌については, その理化学的性質, 粘土鉱物の種類, 肥培管理, 地域, 水分環境等を異にする水田, 畑, および未耕土の表層土壌を供試してD-アミノ酸の分布を調べた。

その結果は, 第12表にみるように, D-Alaの存在比は8.8~17.7%, D-Gluの存在比は5.4~11.1%であった。このように, 土壌の種類や環境条件の違いにもかかわらず, いずれの土壌もD-アミノ酸の分布は比較的類似していた。これは, 土壌のアミノ酸およびアミノ糖化合物の組成が土壌間で差異が比較的小さく, 互いに近似していることと合致する。

4-4 菌体の分解に伴う化学的形態別窒素画分およびD-アミノ酸の消長

大量培着した *B. subtilis* の生菌体 (無処理区) およびその乾燥菌体 (熱乾処理区) を砂培地に添加し, 土

第10表 タンパク質, 高等植物およびミミズのD-アミノ酸の分布

試料	$\frac{D-Ala}{D, L-Ala} \times 100(\%)$	$\frac{D-Glu}{D, L-Glu} \times 100(\%)$	他のD-アミノ酸
タンパク質			
カゼイン	ND***	ND	ND
ゼラチン	ND	ND	ND
高等植物*			
トウモロコシ	ND	ND	ND
イネ	ND	ND	ND
トマト	ND	ND	ND
クローバ	ND	ND	ND
シマミミズ**	ND	ND	ND

* 地上部を使用

** 消化管を除去

*** 検出されず

第11表 土壤微生物菌体のD-アミノ酸の分布

菌種	画分	収量 (%)		D-Ala D, L-Ala × 100	D-Glu D, L-Glu × 100	他のD- アミノ酸
		乾物重	窒素			
糸状菌 <i>Aspergillus niger</i>	全細胞	100	100	ND*	ND	ND
	細胞壁	79	69	ND	ND	ND
<i>Rhizopus nigricans</i>	全細胞	100	100	ND	ND	ND
	細胞壁	32	28	ND	ND	ND
放線菌 <i>Streptomyces scabies</i>	全細胞	100	100	9.3	3.5	ND
	細胞壁	36	39	29.3	5.7	ND
	ムコペプチド	9	11	30.4	21.1	ND
<i>Streptomyces lawendulae</i>	全細胞	100	100	33.8	21.1	ND
	細胞壁	51	58	36.2	35.8	ND
	ムコペプチド	20	25	39.7	50.1	ND
細菌 <i>Bacillus subtilis</i>	全細胞	100	100	23.5	17.9	ND
	細胞壁	7	13	25.3	34.6	ND
	ムコペプチド	5	12	41.6	84.3	ND
<i>Micrococcus luteus</i>	全細胞	100	100	10.4	7.2	ND
	細胞壁	9	15	22.8	23.8	ND
	ムコペプチド	2	6	36.7	79.3	ND
<i>Corynebacterium fascians</i>	全細胞	100	100	5.5	4.0	ND
	細胞壁	9	15	43.9	60.4	ND
	ムコペプチド	7	14	38.0	91.6	ND

* 検出されず

第12表 土壤のD-アミノ酸の分布

供試土壌	D-Ala D, L-Ala × 100	D-Glu D, L-Glu × 100	他のD-アミノ酸
水田土壌			
二日市	8.8	5.4	ND**
二日市	9.7	—	—
富山	11.3	7.6	ND
九大農場	10.2	7.5	ND
諫早	9.8	7.7	ND
筑後	12.8	—	—
一万城	14.3	6.7	ND
羊ヶ丘	12.7	8.0	ND
青森0.0トン*/10a,年	10.5	7.5	ND
青森0.5トン*/10a,年	12.8	6.5	ND
青森1.0トン*/10a,年	12.6	6.3	ND
青森2.0トン*/10a,年	11.5	6.6	ND
畑土壌			
二日市	9.1	—	—
都城	16.8	—	—
飯田	12.8	10.4	ND
北本0.0トン/10a,年	13.7	9.0	ND
北本2.0トン/10a,年	13.3	11.1	ND
北本4.0トン/10a,年	13.0	8.8	ND
北本8.0トン/10a,年	12.4	9.8	ND
未耕地土壌			
神原	13.9	6.1	ND
都城	17.7	—	—

* 堆肥施用量

** 検出されず

第13表 *Bacillus subtilis* 菌体の分解に伴う各形態別窒素画分の変化と熱乾効果

(mg N/100 g 砂)

	無機態窒素	有機態窒素	酸性不溶性窒素	酸性可溶性窒素	アンモニウム態窒素	酸可溶性アミノ糖態窒素	α-アミノ態窒素	未同定態窒素
培養前	0.0	161.3	3.3	158.0	19.0	8.6	82.7	47.7
培養後*								
無処理区	64.9	96.4	3.9	92.5	44.9	8.5	18.3	20.8
熱乾処理区	69.8	91.5	3.5	88.0	30.4	2.4	12.3	42.9

* 2週間培養

第14表 *Bacillus subtilis* 菌体の分解に伴う D-アミノ酸の変化と熱乾効果

	$\frac{D-Glu}{D, L-Glu} \times 100$	$\frac{D-Ala}{D, L-Ala} \times 100$	他の D-アミノ酸
培養前			
(1)	17.4	23.1	ND*
培養後			
(2) 無処理区	17.5	13.6	ND
(3) 熱乾処理区	7.0	8.6	ND
(1)-(2)	-0.1	9.5	ND
(1)-(3)	10.4	14.5	ND
(2)-(3)	10.5	5.0	ND

* 検出されず

壤懸濁液をインキュラムとして添加した後、水分を最大含水量の60%に調節し、30°Cで2週間インキュベートした。それぞれを6規定塩酸で加水分解し、各形態別窒素画分とD-, L-アミノ酸の定量を行なった¹⁶⁾。

菌体の分解に伴う各形態別窒素画分の変化をみると(第13表)、無処理区ではα-アミノ態窒素画分の分解が最も大きく、ついで未同定態窒素画分である。アミノ糖態窒素画分はほとんど分解しなかった。しかし、熱乾処理により、アミノ糖態窒素画分はα-アミノ態窒素画分とともに分解が促進された。

一方、この分解過程におけるD-アミノ酸の変化をみると(第14表)、無処理区ではD-Gluには全く変化がみられないのに対し、D-Alaは著しく減少した。熱乾処理区ではD-GluとD-Alaはともに著しく減少した。また、それぞれについて無処理区と熱乾処理区の差をとってみると、そのD-Glu:D-Alaの比は2:1である。

これらの結果とムコペプチドおよびタイコ酸の化学的構造とを考え合わせると、つぎのことが明らかに指摘される。すなわち、乾燥処理を受けない場合は、細胞壁物質中のムコペプチドの分解はきわめて遅い

が、タイコ酸の分解は進む。しかし、乾燥処理を受けると、ムコペプチドの分解が促進される。

4-5 土壌の可分解性有機態窒素の分解に伴う各形態別窒素画分およびD-アミノ酸の消長

九州大学附属農場水田土壌(作土)に熱乾処理を加えた後インキュベートする操作を10回繰り返し行ない、土壌有機物の分解過程における化学的形態別窒素画分とD-アミノ酸の消長を無処理区と熱乾処理区について比較検討した。なお、無処理区については、インキュベート温度を30°Cと40°C(地温上昇区)で行なった。

形態別窒素画分の変化をみると、無機化窒素に対してはα-アミノ態窒素画分が最も大きく関与している。アミノ糖態窒素画分は、乾燥処理を受けない場合は無機化はきわめて遅いが、乾燥処理により無機化が著しく促進された。したがって、α-アミノ態とアミノ糖態窒素画分を合わせると、熱乾処理区の無機化窒素の大部分を占めるようになる(第15表)。

また、この分解過程におけるD-アミノ酸の変化をみると(第16表)、無処理区ではD-Ala、D-Gluとも増加した。このことは、形態別窒素画分の変化と合わせ考

第15表 熱乾効果および地温上昇効果による各形態別窒素画分の無機化促進
(mg N/100 g 乾土)

処 理	無 機 化 量	酸 不 溶 性 窒 素	酸 可 溶 性 窒 素	酸 可 溶 性 窒 素			
				ア ン モ ニ ア 態 窒 素	ア ミ ノ 糖 態 窒 素	α-ア ミ ノ 態 窒 素	未 同 定 態 窒 素
熱 乾 効 果 ¹⁾							
湛 水 状 態	48.1 (100.0)	0.0 (0.0)	48.1 (100.0)	7.7 (16.0)	4.9 (10.2)	20.9 (43.5)	14.6 (30.4)
畑 状 態	30.5 (100.0)	1.7 (5.6)	28.8 (94.4)	0.5 (1.6)	5.0 (16.4)	18.0 (59.0)	5.3 (17.4)
地 温 上 昇 効 果 ²⁾							
湛 水 状 態	5.8 (100.0)	-1.0 (-17.2)	6.8 (117.2)	2.6 (44.8)	-2.1 (-36.2)	3.2 (55.2)	3.1 (53.4)
畑 状 態	14.3 (100.0)	0.7 (4.9)	13.6 (95.1)	6.2 (43.4)	-1.2 (-8.4)	6.1 (42.7)	2.5 (17.5)

1) 無処理区 (30°C) - 熱乾処理区 (30°C)

2) 無処理区 (30°C) - 地温上昇区 (40°C)

括弧内の数値は、熱乾効果または地温上昇効果により無機化が促進された土壌有機態窒素のうち、各画分の窒素が占める割合を示す。

第16表 熱乾処理および地温上昇による土壌のD-アミノ酸の存在割合の変化

処 理	$\frac{D\text{-アラニン}}{D, L\text{-アラニン}} \times 100$	$\frac{D\text{-グルタミン酸}}{D, L\text{-グルタミン酸}} \times 100$	他 の D-アミノ酸
原 土	10.2	7.5	ND*
無 処 理 区	14.6	14.3	ND
地 温 上 昇 区	11.6	9.1	ND
熱 乾 処 理 区	10.4	11.1	ND

* 検出されず

第17表 熱乾効果および地温上昇効果によるD-, L-アラニンおよびD-, L-グルタミン酸の分解量
(mg N/100 g 乾土)

無機化促進要因	ア ラ ニ ン			グ ル タ ミ ン 酸		
	D, L-型	D-型	L-型	D, L-型	D-型	L-型
地 温 上 昇 効 果	0.56	0.38	0.18	-2.24	0.20	-2.47
熱 乾 効 果	2.66	0.71	1.95	2.60	0.53	2.07

えると、土壌中の有機物分解過程に関与して生成・死滅した微生物菌体の細胞質部分は速やかに分解するが、細胞壁物質は分解が遅れ、土壌中に集積したことを示している。しかし、熱乾処理区および地温上昇区では、無処理区に比べてD-Ala, D-Gluともかなり減少した。このことは、熱乾効果または地温上昇効果によって細胞壁物質の分解が促進されたことを示している。

なお、本実験において、D-, L-Ala および D-, L-Glu に由来する無機化窒素量を測定値から計算すると、第17表のとおりである。

5. 要約および結語

土壌有機物の無機化・有機化過程は、作物養分を供給あるいは保持することにより、土壌の作物生産に対しきわめて重要な役割を果している。

このような無機化・有機化過程における化学的形態別窒素画分およびアミノ酸組成の変化、とくにその中のD-アミノ酸の消長を明らかにすることによって、土壌有機物の給源として微生物菌体の寄与の大きいことを解明した。

とりわけ、その細胞壁物質の寄与については、土壌

中における D-アミノ酸の分布とその動態から試算すると、土壤有機態窒素の約 20~60% は微生物細胞壁物質に由来するものと推定される。また、地温上昇効果および熱乾効果によって無機化が促進される窒素のそれぞれ約 50% および 20% は細胞壁物質に由来するものと推察される。このように、実際圃場における窒素の天然供給の場面で、微生物細胞壁物質の寄与はきわめて大きいものと考えられる。

以上のように、土壤の窒素代謝における微生物細胞壁物質の特微的な動態とその意義を明らかにした。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり終始懇篤な御指導を賜った九州大学名誉教授原田登五郎博士に深甚なる感謝の意を表す。また、懇切な御助言を頂いた九州大学山田芳雄教授に衷心より謝意を表す。さらに、本研究の一部について御協力くださった Z. AHMAD 氏・古川謙介氏・吉田堯氏に謝意を表す。

文 献

- 1) 河口定生・甲斐秀昭・原田登五郎：土肥講演要旨集, 20, 10 (1974)
- 2) BREMNER, J.M.: Method of Soil Analysis, Ed. by BLACK, C.A., American Society of Agronomy, Inc., Publisher, Madison, Wisconsin, U.S.A., p. 1238 (1965)
- 3) HUNGERER, K.D. and TIPPER, D.J.: *Biochemistry*, 8, 3577 (1969)
- 4) CROOK, E.M. and JOHNSTON, I.R.: *Biochem. J.*, 83, 325 (1962)
- 5) 小田琢三・佐藤 了・中尾 真編集：生体膜の生化学, 朝倉書店, p. 18 (1969)
- 6) 丸本卓哉・古川謙介・吉田 堯・甲斐秀昭・山田芳雄・原田登五郎：土肥誌, 45, 23 (1974)
- 7) 河口定生・甲斐秀昭・山田芳雄：土肥講演要旨集(九州支部・昭 51 春), 10 (1976)
- 8) KAI, H., AHMAD, Z. and HARADA, T.: *Soil Sci. Plant Nutr.*, 15, 207(1969), 15, 252(1969), 19, 275 (1973), 19, 287 (1973)
- 9) 丸本卓哉・甲斐秀昭・吉田 堯・原田登五郎：土肥誌, 45, 239 (1974), 45, 332 (1974), 45, 395 (1974)
- 10) 丸本卓哉・甲斐秀昭・吉田 堯・原田登五郎：土肥講演要旨集, 17, 79 (1971)
- 11) RICHMOND, M.H.: *Microorganisms, function, form and environment*, Edward Arnold Ltd., London, p. 11 (1971)
- 12) 金子武夫・芝 哲夫：タンパク質化学, I, p. 208, 共立出版 (1969)
- 13) 河口定生・甲斐秀昭・原田登五郎：土肥誌, 47, 243 (1976)
- 14) PARR, W., PLETESKI, J., YANG, C. and BAYER, E.: *J. Chromatog. Sci.*, 9, 141 (1971)
- 15) 小谷尚三・加藤慶二郎：蛋白質・核酸・酵素, 14, 606 (1969), 14, 670 (1969)
- 16) 河口定生・甲斐秀昭・山田芳雄・原田登五郎・丸本卓哉：土肥講演要旨集, 21, 17 (1975)
- 17) 木全弘治・鈴木 旺：多糖生化学, p. 563, 共立出版 (1970)
- 18) 矢内 顕・有馬 啓：生物と化学, 12, 674 (1974)
- 19) REYNOLDS, P.E.: *Biochemistry of Bacterial Growth*, Ed. by J. MANDELSTAM and K. MC QUILLEN, Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 79 (1970)