

17.	水田土壌のプロテアーゼ生産細菌の特性						
要約 水田土壌から分離したプロテアーゼ生産菌の大部分は、 <i>Bacillus</i> 属細菌に属し、これらが生産するプロテアーゼの作用特性は、可溶態土壌プロテアーゼの特性と一致した。よって <i>Bacillus</i> 属細菌が水田土壌中の主要な土壌プロテアーゼ生産菌群であると推定された。							
九州農業試験場 生産環境部 土壌微生物研究室						連絡先	096-242-1150
部会名	農業生態	専門	土壌	対象	稲類	分類	研究

#### 〔背景・ねらい〕

農耕地土壌において、有機態窒素の大部分を占める蛋白質の加水分解は、後続するアンモニア化や硝酸化と同様に、土壌中の貯蔵態窒素が植物や微生物に利用されていく上で重要なプロセスである。地力消耗型の温暖地帯では、本過程の律速酵素であるプロテアーゼの制御技術の確立が望まれるが、そのためには土壌プロテアーゼの主要な供給源である土壌細菌の単離と同定が重要である。

#### 〔成果の内容・特徴〕

- ① 筑後の水田圃場（堆肥連用区、化学肥料区、無肥料区）から、水稻生育期間（7月、8月、10月）に単離した411株のプロテアーゼ生産微生物の中では、*Bacillus* 属細菌（グラム＋、桿菌、芽胞＋）が常にこの菌の50%以上を占有していた（図1）。
- ② さらに選抜した強い菌体外プロテアーゼ生産能を有する菌は、殆どすべてが *Bacillus* 細菌であった。これらは卵型の芽胞を中央に有し、芽胞による栄養細胞の膨張がないグループI群の *Bacillus* に属し、種々の生理試験の結果 *B. subtilis*（15株）、*B. licheniformis*（4株）、*B. cereus*（10株）、*B. mycoides*（8株）、*B. megaterium*（3株）と推察された。
- ③ カゼイン分解能が高い菌の殆どが *B. subtilis*（8株）で、これらが生産する菌体外カゼイナーゼは中性型のセリンプロテアーゼであった（表1）。一方 *z*-Phe-Tyr-Leu 分解能は、*B. subtilis*（6株）、*B. cereus*（4株）、*B. mycoides*（3株）で高く、これらが生産する菌体外 *z*-Phe-Tyr-Leuase は、中性型の金属プロテアーゼであった（表1）。
- ④ これらの作用特性は、同時期に同圃場から抽出した可溶態土壌プロテアーゼの作用特性とほぼ一致しており、*Bacillus* 属細菌が水田土壌の主要な土壌プロテアーゼ生産菌群であることが示唆された（表2）。

#### 〔成果の活用面・留意点〕

本研究の成果は、土壌の有機態窒素代謝過程の解明に大きく寄与するとともに、これまでに *Bacillus* 属細菌に関して蓄積されてきた培養工学的手法や、遺伝子工学的手法等を導入することにより、土壌中の有機態窒素代謝の制御技術に結びつくものと考えられる。

[具体的データ]

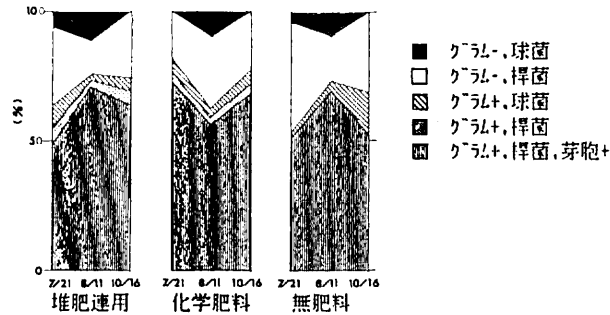


図 1 プロテアーゼ生産菌の変動

表 1 Bacillus 属細菌のプロテアーゼの作用特性

菌株番号★	基質	阻害剤 (1 mM) の効果							最適pH	
		EDTA	1,10P	pCMB	IAA	PMSF	DFP	3P		
<i>B.subtilis</i>	OMN-023	カゼイン	-	-	-	-	++	+	-	(8.0)
	NFR-208	カゼイン	-	-	-	-	++	+	-	(7.0)
	NFS-201	カゼイン	+	-	-	-	++	+	-	(8.5)
	NFN-205	カゼイン	-	-	-	-	++	+	-	(8.5)
	NFN-207	カゼイン	+	-	-	-	++	+	-	(8.5)
	NFN-209	カゼイン	+	-	-	-	+	-	-	(8.5)
	NFN-211	カゼイン	-	-	-	-	++	+	-	(8.5)
	NFN-212	カゼイン	+	-	-	-	++	+	-	(8.5)
	OMR-007	z-FTL	++	++	++	-	-	-	-	(8.5)
	OMR-017	z-FTL	++	++	++	+	-	-	+	(9.0)
	OMS-002	z-FTL	+	++	++	-	-	-	+	(8.5)
	OMS-015	z-FTL	++	++	++	-	-	-	-	(8.5)
OMS-205	z-FTL	++	++	++	-	-	-	-	(8.5)	
NFR-006	z-FTL	++	++	++	-	-	-	-	(8.5)	
<i>B.cereus</i>	OMR-015	z-FTL	++	++	++	-	-	-	-	(8.5)
	CFS-011	z-FTL	++	++	++	-	-	-	-	(8.5)
	CFS-006	z-FTL	-	++	++	+	-	-	-	(8.0)
NFR-016	z-FTL	++	++	++	-	-	-	-	(8.5)	
<i>B.mycoides</i>	OMN-319	z-FTL	+	++	++	+	-	-	-	(8.0)
	OMN-320	z-FTL	-	++	++	-	-	-	+	(8.0)
	NFR-017	z-FTL	++	++	++	-	-	-	-	(8.5)
<b>表2 土壌プロテアーゼの酵素特性</b>										
無肥料	z-FTL	+	+	+	-	+	-	-	(8.0)	*：菌体外酵素活性が特に高い菌株 EDTA：エチレンジアミン四酢酸 1,10P：1,10-フェントリン pCMB：p-カルボ安息香酸第二水銀 IAA：ヨード酢酸 PMSF：フッ化フェニルメチルソルホニル DFP：3-フェニルプロピオン酸 3P：3-フェニルプロピオン酸 Pep：ペプタチン 相対活性：0~30%、++：31~60%、+：61%~、-：z-Phe-Tyr-Leu
化学肥料	z-FTL	++	+	+	+	-	+	+	(8.5)	
堆肥連用	z-FTL	++	++	++	-	-	-	-	(8.5)	
堆肥連用	カゼイン	-	-	-	-	+	+	-	(8.5)	

[その他]

研究課題名：土壌のプロテアーゼ生産菌の特性の解明

予算区分：プロジェクト研究調整費

研究期間：平成4年度

研究担当者：渡邊克二，浅川 晋，早野恒一

既発表論文：土壤肥料学会春季九州支部会講要 p. 11 (1992)