

昭和基地周辺土壌のホスファターゼ活性

Phosphatase activity in soils in the vicinity of Syowa Station

佐藤 修司 [1]; 栗原 広成 [2]; 高野 淑識 [3]; 金子 竹男 [4]; 小林 憲正 [5]

Shuji Sato[1]; Hironari Kurihara[2]; Yoshinori Takano[3]; Takeo Kaneko[4]; Kensei Kobayashi[5]

[1] 横浜国大・工・物質工; [2] 横浜国大・院工・先端物質工学; [3] 北大・理・地惑システム科学; [4] 横浜国大院工; [5] 横浜国大・院工

[1] Materials Science and Chemical Engineering, Yokohama National Univ.; [2] Dept. of Chem. and Biochem., Yokohama National Univ.; [3] Earth and Planetary Sys. Sci., Hokkaido Univ.; [4] Dep. Chem. Biot., Yokohama Natl. Univ.; [5] Dept. Chem. Biotech., Yokohama Natl. Univ.

近年、大気圏、極域、地殻深部などの極限的な環境から盛んな生命活動が報告され、地球生命圏の知見が広がりつつある。この極限的環境には地下生物圏、海底熱水系、高層大気、寒冷環境が挙げられ、このような生物圏フロンティアの探査法として培養法、代謝測定法、直接観察法、有機物測定法、安定同位体比がある。我々は生物探査のバイオマーカーとして生体分子であるアミノ酸、脂質、アミノ酸の光化学的活性に加えて酵素活性に注目している。ホスファターゼとはリン酸エステルを加水分解する酵素で、このリン酸エステルとは核酸や細胞膜の構成分子として不可欠であり、このためホスファターゼも地球生物にとって普遍的なものである。またホスファターゼは他の酵素に比べ頑丈で安定に存在しているため測定しやすい。そこで本研究では極限環境生命圏活動を評価するバイオマーカーとしてホスファターゼ活性に注目し、南極大陸昭和基地周辺の土壌試料中ホスファターゼ活性を測定する事により寒冷かつ乾燥した極限環境下での生命圏分布を考察することを目的とした。

土壌試料は南極昭和基地周辺の8地点で採取した。土壌中のホスファターゼ活性の測定には基質としてp-ニトロフェニルリン酸を用いた吸光度法を用いた。土壌試料にpH6.5、pH8.0に調整した修飾ユニバーサル緩衝液、p-ニトロフェニルリン酸を加え、1時間37℃でインキュベートした後CaCl₂-NaOHを加え反応を停止させた。その後遠心分離機にかけ0.2 μm PTFEで濾過した後、波長410nmで吸光度を測定した。吸光度変化を測定することにより、p-ニトロフェニルの生成率を求め酵素活性値とした。pH6.5およびpH8.0での測定値をそれぞれ酸性ホスファターゼ、アルカリホスファターゼの活性とした。

酵素のキャラクタリゼーションのため、土壌からの酵素抽出をおこなった。土壌試料にpH9.0 Tris-HCl緩衝液を加えて1時間攪拌し酵素を抽出した。抽出液の酵素活性測定には4-メチルウンベリフェリルリン酸を基質とした蛍光光度法を用いた。土壌抽出液を10⁶ ~ 80⁶で1時間インキュベートしたのち、pH 8.0基質溶液を混合、反応させて蛍光波長451 nm、励起波長362 nmでの蛍光強度変化を測定することにより、生成する4-メチルウンベリフェロンの生成率を求めアルカリホスファターゼ酵素活性値とした。

以前の研究からホスファターゼ活性は生菌数密度、アミノ酸濃度などのパラメータと比較し微生物活動の指標となりうる事が示唆されている。今回はその分析方法を南極昭和基地周辺土壌試料に適用し酵素活性が検出されたことから本測定法が適用可能であることが確認された。一般土壌、E.coli由来アルカリホスファターゼ溶液、南極土壌抽出液の酵素活性温度依存性を調べたところ3つのサンプルのいずれも温度の上昇に伴い活性値が増加し、高温域では酵素が熱により失活して活性値が減少した。活性値は0.9 ~ 26.1 nmol / min / g-soilであり、大学内土壌のおよそ37 nmol / min / g-soilと比較すると低い値となった。これは南極という極限環境では、一般的生物環境と比べて微生物活動が限られているからである。またペンギンの生息地から採取された土壌は他の南極土壌より著しく高い活性を示した。南極でも動物の活動域では微生物活動もまた盛んであることがわかった。この土壌抽出液は40℃付近に活性極大が存在し、E.coli由来ALPの50 ~ 60℃と比較してより低い温度域に至適温度が存在しており、このことは植物由来ではなく動物由来の酵素の特徴である。