

## シンポジウム

### リン可給性をめぐる土壌微生物群集

國頭 恭<sup>1\*</sup>・諸 人誌<sup>2</sup>・藤田一輝<sup>3</sup>・美世一守<sup>4,5</sup>・  
長岡一成<sup>6</sup>・大塚重人<sup>5,7</sup>

<sup>1</sup> 信州大学理学部理学科物質循環学コース, 〒390-8621 長野県松本市旭 3-1-1

<sup>2</sup> 長野県農業試験場, 〒382-0072 長野県須坂市大字小河原 492

<sup>3</sup> 北海道立総合研究機構 農業研究本部 中央農業試験場, 〒069-1395 北海道夕張郡長沼町東 6 線北 15 号

<sup>4</sup> 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻, 〒113-0032 東京都文京区弥生 2-11-16

<sup>5</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻, 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

<sup>6</sup> 農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター, 〒062-8555 北海道札幌市豊平区羊ヶ丘 1

<sup>7</sup> 東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構, 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

### Microorganisms enhancing phosphorus availability in arable soils

Takashi Kunito<sup>1\*</sup>, Hitoshi Moro<sup>2</sup>, Kazuki Fujita<sup>3</sup>, Kazumori Mise<sup>4,5</sup>,  
Kazunari Nagaoka<sup>6</sup>, Shigeto Otsuka<sup>5,7</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental Sciences, Faculty of Science, Shinshu University, 3-1-1 Asahi, Matsumoto 390-8621, Japan

<sup>2</sup>Nagano Agricultural Experiment Station, 492 Ogawara, Suzaka 382-0072, Japan

<sup>3</sup>Central Agricultural Experiment Station, Agricultural Research Department, Hokkaido Research Organization,  
Higashi-6, Kita-15, Naganuma, Hokkaido 069-1395, Japan

<sup>4</sup>Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 2-11-16 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan

<sup>5</sup>Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo,  
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

<sup>6</sup>Hokkaido Agricultural Research Center, NARO, 1 Hitsujiogaoka, Toyohira-ku, Sapporo 062-8555, Japan

<sup>7</sup>Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

**Key words:** legacy phosphorus, phosphorus availability, phosphorus-solubilizing microorganisms, phosphatase, microbial biomass

## 1. 背景

2008 年、中国がリン鉱石の輸出に高い関税をかけたことから中国のリン鉱石輸出が実質的に停止し、世界でのリン鉱石の価格が約 8 倍に高騰した<sup>18)</sup>。これを契機にリン資源枯渇の懸念が高まり<sup>23,35,137)</sup>、リン資源が 50 年から 100 年で枯渇するという予測も報告された<sup>19)</sup>。現在まで、リン鉱石の埋蔵量と質が不明なため、その可採年数には一致した見解は得られていない<sup>18)</sup>。

年々、不純物の少ない高品質のリン鉱石の採掘比率は低減しており、また世界最大の埋蔵量をもつモロッコのリン鉱石は、カドミウムや放射性物質を多く含んでいる<sup>98)</sup>。このような低品質のリン鉱石の精製と不純物の処理にはコストがかかるうえ<sup>120)</sup>、新たなリン鉱石の開発にも莫大な投資が必要なため、今後リンの価格は上昇していくと予想される<sup>98)</sup>。また、リン酸肥料の価格上昇に加え、農地へのリン酸の過剰

施用による湖沼や沿岸域の富栄養化<sup>112)</sup>や作物の病害発生の助長<sup>38)</sup>といった問題も生じている。

このような背景から、リン酸の減肥とともに、「legacy P」<sup>150)</sup>と呼ばれる農地に蓄積したリン酸の有効化に関する研究が盛んに行われている<sup>76,150)</sup>。特に日本では、リン酸施用量から作物吸収量を差し引いたリン酸肥料の過剰量が、世界的に見ても極めて高く、農地に大量のリン酸が蓄積している<sup>79,113)</sup>。西ヨーロッパでは、リン酸施用量は 1970 年代後半をピークに減少しているにもかかわらず、作物のリン酸吸収量はその後も増加・安定化しているため、それまでに農地に蓄積したリン酸が有効化したと考えられている<sup>117)</sup>。このような legacy P の有効化に関する研究はこれまで、日本の畑地<sup>144)</sup>や水田<sup>57)</sup>でもなされてきたが、2008 年のリン鉱石価格の高騰以降、世界的に再燃したというのが実状であろう。ただし現在の研究の特徴として、既往の研究ではあまり対象とされてこなかった有機態リンが注目されていることが挙げられる<sup>34,123)</sup>。例えば、日本の黒ボク土畑土壌において化学肥料のみを施用した場合でも、有機態リンの蓄積は、無機態リンに比べれば少ないものの、無視できない量である(図 1)。水田ではリンの利用効率は高いため<sup>90)</sup>、ここではリン利用

2019 年 7 月 4 日受付 2019 年 8 月 4 日受理

\* Corresponding author.

E-mail: kunito@shinshu-u.ac.jp

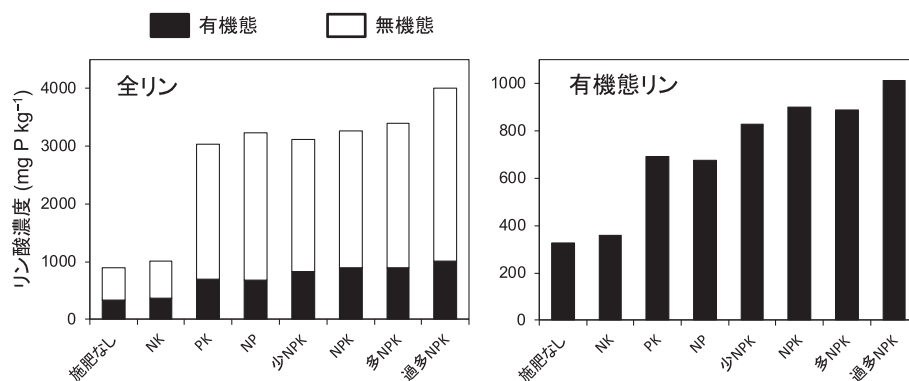


図1 長野県野菜花き試験場の三要素連用圃場（黒ボク土）において、70年間の化学肥料施用がもたらしたリン蓄積。右図では、有機態リンの結果だけを拡大して表示した。なおこの連用圃場では、生育した作物は全て除去している。Moro *et al.*<sup>83)</sup> のデータを基に作図。

効率が低い黒ボク土の畑地に蓄積したリン酸の可給化に焦点を当てる。

Zhu *et al.*<sup>159)</sup> は、農地に蓄積したリン酸を可給化する微生物や資材などを「phosphorus activators」と呼んでいる。これらには、アーバスキュラー菌根菌、リン溶解菌、ホスファターゼ、微生物バイオマスリン、有機酸等の有機物施用、土壤の還元化、ポリマルチによる加温などが含まれる<sup>89,113,159)</sup>。アーバスキュラー菌根菌は、リン肥沃度の高い土壤では効果を発現しにくいものの、土壤中のリン酸の可給化には有望であり<sup>113)</sup>、多くの研究が行われている。ここでは研究例の乏しい、あるいはその有用性が明瞭ではない、リン溶解菌、ホスファターゼ、微生物バイオマスリン、土壤の還元化について、関連する基礎的情報を紹介する。

## 2. リン溶解菌

リン溶解菌は、アルミニウムや鉄、カルシウムと結合した難溶性リン酸塩を溶解したり、粘土鉱物や、鉄とアルミニウムの酸化物・水酸化物・オキシ水酸化物（これ以降は単に酸化物と呼ぶ）に吸着したリン酸を脱着させたりする<sup>43)</sup>。なお、通常の酸性土壤中ではリン酸鉄やリン酸アルミニウムよりも、鉄酸化物やアルミニウム酸化物に吸着したリン酸の方が多い<sup>47)</sup>。リン溶解菌によるリン酸放出は、主に酸性化と有機酸の生産・分泌による<sup>148)</sup>。有機酸によるリン酸放出は、酸化物に吸着していたリン酸の配位子交換による脱着と、金属とのキレート化による、カルシウムや鉄、アルミニウムのリン酸塩の溶解に由来する<sup>107)</sup>。リン溶解菌は、リン酸鉄やリン酸アルミニウムよりも、リン酸カルシウムをよく溶解することが知られている<sup>40,96)</sup>。これは、リン酸カルシウムは酸性化のみでも溶解可能だが、リン酸鉄やリン酸アルミニウムの溶解には、酸性化に加え、金属のキレート化も必要であることによる<sup>148)</sup>。

多様な細菌がリン溶解能を持つことが知られており、分泌される有機酸としてはグルコン酸や2-ケトグルコン酸の報告例が多い<sup>47)</sup>。他方、リン溶解真菌としては *Aspergillus* 属、*Penicillium* 属、*Mucor* 属がよく分離され<sup>47)</sup>、分泌する有機酸

としてはクエン酸、シュウ酸、グルコン酸がよく知られている<sup>47)</sup>。概して、土壤中ではリン溶解細菌の方がリン溶解真菌よりも数が多いものの、溶解能は真菌の方が高い<sup>40,47,148)</sup>。そのため、リン溶解真菌には、比較的容易に溶解できるリン酸カルシウムだけでなく、難溶性のリン酸アルミニウムやリン酸鉄も溶解できるものが多いが、細菌ではリン酸アルミニウムやリン酸鉄を溶解できるものは少ない<sup>96)</sup>。

有機酸のリン溶解能には、そのカルボキシ基の数が重要である<sup>148)</sup>。またカルボキシ基が同数である場合には、カルボキシ基が結合している炭素にヒドロキシ基が結合した $\alpha$ -ヒドロキシ酸構造をもつ有機酸の方がリン溶解能は高いとされている<sup>148)</sup>。多くのリン溶解真菌が生産するクエン酸はカルボキシ基を3つ持つ $\alpha$ -ヒドロキシ酸であり、またシュウ酸はカルボキシ基を2つ持つ。他方、多くのリン溶解細菌が生産するグルコン酸はカルボキシ基を1つしか持たない $\alpha$ -ヒドロキシ酸で、2-ケトグルコン酸もカルボキシ基を1つしか持たない。このような化学的特性から、クエン酸とシュウ酸はリン溶解能が高く、グルコン酸はそれよりは低い<sup>47,148)</sup>。グルコン酸は $Al^{3+}$ とキレート化する能力は高いものの、 $Ca^{2+}$ や $Fe^{3+}$ とのキレート化能は低いこと<sup>149)</sup>、また2-ケトグルコン酸によるリン溶解は主に酸性化によるが、クエン酸やシュウ酸の場合は主にキレート化によることが報告されている<sup>28)</sup>。

これまでリン溶解菌は、土壤中の無機態リン酸の放出に関して主に研究されてきた。しかし、有機酸を分泌するリン溶解菌は、有機態リンの分解にも重要な役割を果たしている<sup>107)</sup>。有機酸により、酸化物等に吸着していた有機態リンが脱着することで、酵素による有機態リンの分解が促進される<sup>47,109)</sup>。またアルミニウムや鉄、カルシウムが架橋して低分子の有機物が集合した土壤有機物は、有機酸がこれら金属を除去することで分散し、酵素による有機態リンの分解が促進される<sup>16)</sup>。

土壤中でのリン溶解菌の重要性を評価することは難しい。しかし、リン欠乏土壤ではリン溶解細菌の割合が高く、またその多様性は低いことが報告されており<sup>71)</sup>、特に一部のリン溶解菌がリン欠乏土壤でリン溶解に重要な役割を果たしていることが示唆されている。近年、いくつかのグラム陰性細

菌で、グルコースをグルコン酸に変換するグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子 *gcd* と、グルコースデヒドロゲナーゼの補酵素ピロロキノリンキノン (PQQ) の生合成遺伝子が、リン溶解に関わる遺伝子として同定された<sup>110)</sup>。*Pseudomonas* 属のリン溶解能はグルコン酸と 2-ケトグルコン酸の生産によるが、グルコン酸を 2-ケトグルコン酸へ変換するグルコン酸デヒドロゲナーゼの遺伝子 *gad* を欠損した株や、PQQ の生合成に関わる *pqqA* や *pqqB* を 2 コピー持つ株があり、そのような特徴に即して株間でリン溶解能が異なる可能性が示されている<sup>77)</sup>。またオオムギ根圏のメタゲノムより調製したフォスミドライブラリーを大腸菌で発現させ、リン溶解能を指標としてスクリーニングしたところ、得られた 6 クロームはいずれもグルコン酸を生産した<sup>15)</sup>。*Pseudomonas putida* では培地中のリン酸濃度が低い場合、*gcd* と *pqq* オペロンの発現が増加し、グルコースデヒドロゲナーゼ活性と PQQ 生産が増す<sup>2)</sup>。このような知見にもとづき、グルコン酸合成に関わる遺伝子は、土壌中でのリン溶解菌の役割の評価に利用されるようになった<sup>5,9)</sup>。例えば、無機態リン酸濃度の高い土壌のメタゲノムでは、*gcd* の相対的存在量が多いこと<sup>6)</sup>、PQQ の生合成遺伝子 *pqqC* のコピー数は土壌 pH と正の相関を示すこと<sup>158)</sup>、土壌にリン酸を多量に施用すると *pqqC* のコピー数が低下することが報告されている<sup>68)</sup>。現在、これらの研究において対象とされているリン溶解に関わる遺伝子は一部のリン溶解細菌のみが保有するため、土壌中でのリン溶解菌の働きを包括的に評価するには、他のリン溶解細菌や真菌が持つリン溶解に関わる遺伝子についての情報も必要である。

### 3. ホスファターゼ

微生物は高分子の有機態リンを直接細胞内に取り込むこと

が困難なため、細胞外に多様なホスファターゼを分泌し、生成した無機態リン酸を取り込んでいる<sup>42)</sup>。植物や微生物遺体に含まれる、核酸やリン脂質といったリン酸ジエステルはホスホジエステラーゼによってリン酸モノエステルに変換され、これがさらにホスホモノエステラーゼによって加水分解され、無機態リン酸が生成し<sup>87)</sup>、再び植物や微生物に取り込まれる。リン酸ジエステルは分解しやすく<sup>121,132)</sup>、ホスホモノエステラーゼによるリン酸モノエステルの分解が律速段階となるため、有機態リンの総無機化速度は、ホスホモノエステラーゼ活性と正の相関を示す場合がある<sup>10)</sup>。このホスホモノエステラーゼの代表格が酸性ホスファターゼとアルカリホスファターゼである<sup>87)</sup>。また、植物種子中のリン化合物の主体であるフィチン酸 (*myo*-イノシトールヘキサキスリン酸, IP<sub>6</sub>)<sup>118)</sup> およびその代謝物は土壌中の主要な有機態リンであるため<sup>12)</sup>、ホスホモノエステラーゼの一種である、フィチン酸分解酵素フィターゼも、土壌中の有機態リン分解に重要な役割を果たしている。

#### 3.1 アルカリホスファターゼ

アルカリホスファターゼはアルカリ性土壌で、酸性ホスファターゼは酸性土壌で優占している<sup>87)</sup>。またイギリスの土壌のメタゲノムでは、pH が約 8 の土壌では、pH が約 4 の土壌と比較し、アルカリホスファターゼ遺伝子のコピー数と多様性が高いことが報告されている<sup>66)</sup>。一方、日本の畑土壌は酸性であるため、アルカリホスファターゼについてはあまり評価がなされていなかった。そこで、わが国の代表的な畑土壌である黒ボク土についてアルカリホスファターゼの重要性を評価するため、土壌を pH ごとにグループ分けし、アルカリホスファターゼ活性と酸性ホスファターゼ活性との比を算出した (図 2)。なお土壌酵素活性の測定値は、酵素量を反映したものである<sup>141)</sup>。予想通り、森林土壌ではアルカ

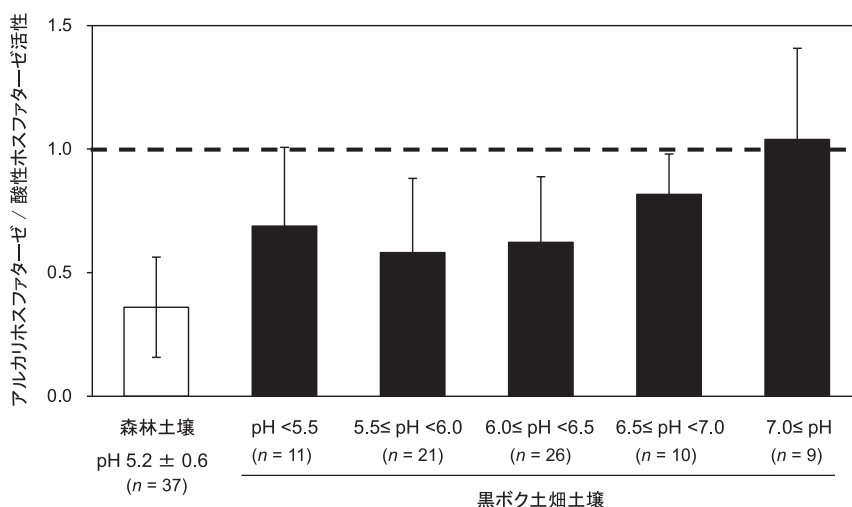


図 2 黒ボク土畑土壌 (n=77) と森林土壌 (n=37) における、アルカリホスファターゼ活性と酸性ホスファターゼ活性との比。アルカリホスファターゼは pH 11 の緩衝液を、酸性ホスファターゼは pH 6.5 の緩衝液を用いて測定した。点線より高い場合は、アルカリホスファターゼの方が酸性ホスファターゼよりも多く存在していることを意味する。エラーバーは標準偏差を示す。Fujita *et al.*<sup>29)</sup>, Mise *et al.*<sup>78)</sup> および未発表データを基に作図。



リホスファターゼ活性と酸性ホスファターゼ活性との比は低値を示したが、pH7以上の畑土壌ではアルカリホスファターゼの方が多く、またそれ以下のpHの畑土壌でもアルカリホスファターゼは比較的多く存在していた。さらに炭素と窒素を黒ボク土畑土壌に添加しリン欠乏の状態にしたところ、酸性ホスファターゼよりもアルカリホスファターゼの生産がよく誘導された(図3)。これらの結果より、黒ボク土畑土壌では、アルカリホスファターゼも重要な働きを持つことが示唆される。酸性であるにもかかわらずアルカリホスファターゼが比較的多く存在するのは、石灰施用により、アルカリ性の微小部位が存在するためかもしれない。またpHが4以下の森林土壌のメタゲノムにおいても、酸性ホスファターゼ遺伝子よりもアルカリホスファターゼ遺伝子の方が多いといった報告例がある<sup>6)</sup>。以上のことから、酸性土壌であっても、アルカリホスファターゼがリン循環に役割を果たしている可能性もある。

土壌中のアルカリホスファターゼは、主に細菌が生産・分泌している<sup>87)</sup>。細菌のアルカリホスファターゼにはPhoA, PhoD, PhoXの3タイプがある。これらアルカリホスファターゼをコードしている遺伝子(それぞれ*phoA*, *phoD*, *phoX*)は、多くの細菌において、リンが枯渇したときに発現するPhoレギュロン遺伝子群に含まれており、その生産は無機態リン酸濃度によって調節されている<sup>82,138,155)</sup>。3タイプのアルカリホスファターゼ遺伝子の中では、メタゲノム解析により、土壌では*phoD*が最も多く、約半分の細菌が持つっており、*phoA*が最少であることが報告されている<sup>94)</sup>。同様にイギリスのpHが約8の土壌で、*phoD*を持つ細菌は56%、*phoX*は47%、*phoA*は20%であると推定されている<sup>66)</sup>。また*phoD*は、ア-

キアと真菌にも見つかった<sup>103)</sup>。真菌では系統的に離れたいくつかの種が*phoD*を保有しているため、進化の早い段階に獲得したと考えられている<sup>36)</sup>。

細菌の中にはまれに*phoD*と*phoX*, *phoA*の3タイプとも持つものもいるが、多くは1タイプのみか2タイプ持ち、2タイプ持つ場合は、*phoD*と*phoA*の組み合わせか、*phoD*と*phoX*の組み合わせである<sup>65,157)</sup>。*phoX*と*phoA*を両方持つ細菌はほとんどいないため、PhoXとPhoAは機能的に同等であると予想されている<sup>157)</sup>。海洋細菌では、PhoA, PhoD, PhoXのいずれにおいても、細胞内で働くものと細胞外で働くものがあり、特にPhoXでは細胞外で働くものが多いが、PhoAとPhoDは細胞内で働くものも多い<sup>69)</sup>。グリセロリン酸やアデノシンリン酸など一部の有機態リンを直接細胞内に取り込める細菌が知られているため、海洋では細胞内でこれら有機態リンを分解している細菌が多い可能性がある<sup>69,147)</sup>。他方、土壌メタゲノム解析で得られた*phoD*の大部分は、細胞外酵素遺伝子であることが示唆されている<sup>94)</sup>。

アルカリホスファターゼの中で最もよく研究され、かつ土壌中での存在量が最も多いのがPhoDである。これまでに解読された細菌ゲノムの中では、*phoD*遺伝子を持つ細菌の多くは1コピーのみ持つが、9コピー持つものもある<sup>103)</sup>。またPhoDはホスホジエステラーゼ活性も持つことが知られている<sup>51,152)</sup>。なおPhoAもホスホジエステラーゼ活性を持つが、その活性は極めて低い<sup>101)</sup>。土壌中の*phoD*に関する研究は、特にSakurai *et al.*<sup>115)</sup>が*phoD*を増幅するプライマーALPSを設計して以降、急速に進展した。このプライマーでは、*Alphaproteobacteria*の配列が多く増幅される特徴がある<sup>103)</sup>。この他にも*phoD*用のプライマーが、Ragot *et al.*<sup>105)</sup>とBergkemper *et al.*<sup>5)</sup>によって設計されている。なお、他の遺伝子のプライマーにも共通して言えることであるが、得られた結果を解釈する際は、プライマーバイアスに留意する必要がある。

日本の黒ボク土畑土壌の*phoD*保有細菌群集の組成は、pHと可給態リン酸濃度の影響を受け、他の土壌よりも*Alphaproteobacteria*由来の*phoD*が多いことが報告されている<sup>78)</sup>。*phoD*保有細菌群集の組成に対するリン酸濃度とpHの影響は、他の多くの研究でも見いだされている<sup>13,103-105,126,145)</sup>。

土壌中のアルカリホスファターゼ活性と、*phoD*遺伝子のコピー数やメタゲノムデータに基づく相対的存在量との関係を調べた研究では、正の相関が見られる場合<sup>1,13,25,70)</sup>と、見られない場合<sup>105,145)</sup>とがある。また畑土壌で、*phoD*遺伝子のコピー数はアルカリホスファターゼ活性と正の相関を示したものの、*phoD*転写量は、アルカリホスファターゼ活性や*phoD*遺伝子のコピー数とは有意な相関を示さなかったとの報告もある<sup>25)</sup>。このように研究間で一致した結果が得られない一因として、アルカリホスファターゼが生産・分泌されてから、細胞外で長期間残存し、活性を維持していることが考えられる<sup>11)</sup>。

長野県野菜花き試験場の有機物・三要素連用圃場において、アルカリホスファターゼ活性と*phoD*の多様性との間に有意な負の相関が見られた(図4)。同様の関係は、他の畑土壌<sup>13,14,26,70)</sup>や草地土壌<sup>130)</sup>でも報告されている。これらの研

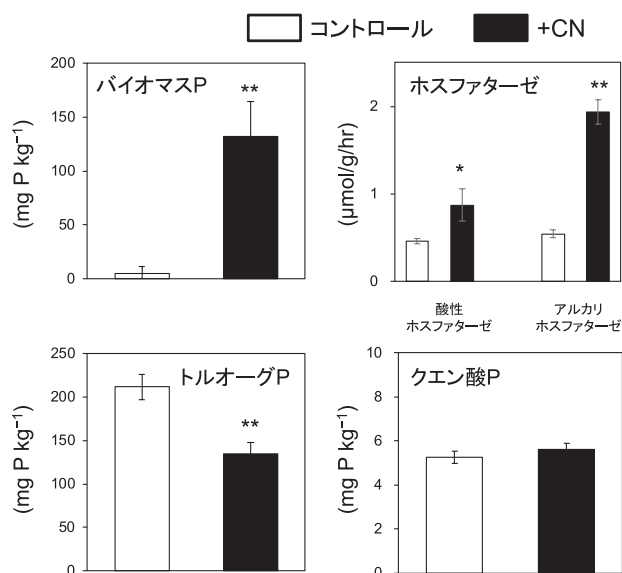


図3 長野県野菜花き試験場より採取した黒ボク土への炭素・窒素添加が、微生物バイオマスリン、ホスファターゼ活性、可給態リン(トルオーグ法およびクエン酸抽出法)濃度に与える影響。炭素源としてセルロース、窒素源として硝酸アンモニウムを添加し、140日間培養した。エラーバーは標準偏差を示す。\*, t検定で $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ 。齋藤ら(未発表データ)を基に作図。

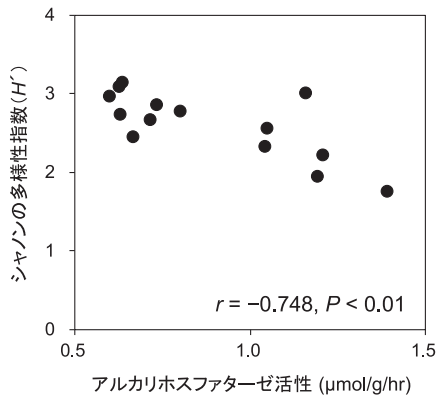


図4 長野県野菜花き試験場の有機物・三要素連用圃場におけるアルカリホスファターゼ活性と *phoD* 多様性との関係。*phoD* の多様性は、Sakurai *et al.*<sup>115)</sup> のプライマーを用いた *phoD* の DGGE 解析のバンドパターンから算出したシャノンの多様性指数により示している。諸・長岡（未発表データ）を基に作図。

究では *phoD* の転写については調べられていないものの、アルカリホスファターゼ活性が高いときは、特定の細菌が大量に生産している可能性を示唆している。Tan *et al.*<sup>130)</sup> は、リン酸無施用土壤では特定の *phoD* 遺伝子型が選抜され、多量のアルカリホスファターゼを生産したと推察している。また Morrison *et al.*<sup>84)</sup> は、土壤中のリン濃度が低いとそもそも微生物全体の種数が減るため、リン関連遺伝子の多様性も低下する可能性を指摘している。他方、水田土壤においては、リン酸無施用により *phoD* の多様性が増加したという報告もある<sup>145)</sup>。

様々な土地利用形態の土壤を用いた研究において、*phoD* 保有菌の組成はどの土壤でも似通っているが、*phoX* の場合は採取地点によって大きく変動すること、また、*phoD* の組成は可給態リン酸濃度により影響されるのに対し *phoX* の組成は有機態炭素含量に影響されることが報告されている<sup>105)</sup>。*phoX* についても、上述した *phoD* と同様に、相対的存在量やコピー数が、アルカリホスファターゼ活性と正の相関を示す場合<sup>1)</sup> と示さない場合<sup>105)</sup> とがあることが報告されている。

### 3.2 酸性ホスファターゼ

土壤中の酸性ホスファターゼは、真菌、細菌、植物由来である<sup>87)</sup>。細菌の酸性ホスファターゼは、多様な基質を分解できるため、non-specific acid phosphatase (NSAP) と呼ばれ<sup>111)</sup>、主にグラム陰性細菌が生産している<sup>95)</sup>。アルカリホスファターゼとは異なり、細菌の酸性ホスファターゼ生産は、リン酸濃度で調節されないものが多い<sup>111)</sup>。酸性ホスファターゼは酸性土壤で多いが<sup>87)</sup>、細菌の酸性ホスファターゼ遺伝子のコピー数は、酸性とアルカリ性の土壤間で大きく変わらない<sup>66)</sup>。これは、酸性土壤では、細菌よりも真菌の酸性ホスファターゼ生産の寄与が大きいためかもしれない。

細菌の酸性ホスファターゼはクラス A, B, C に大別され、クラス B と C は植物の酸性ホスファターゼと似通った構造をしているが、クラス A は全く異なる構造を持つ<sup>32,33,111)</sup>。なおアーキアは、これらとは異なった酸性ホスファターゼを有する<sup>33)</sup>。細菌によっては、クラス A と B, あるいはクラ

ス B と C の 2 つの酸性ホスファターゼ遺伝子を持つものもいるため、同じ酸性ホスファターゼでもクラスごとに役割が異なる可能性が指摘されている<sup>111)</sup>。環境中ではクラス A と C が多く存在し、特に酸性土壤ではクラス A が多い<sup>95)</sup>。クラス A は pH 8 と pH 4 の土壤のいずれにおいても多く存在し、20-50% 程度の細菌が保有しているが、クラス B と C は 10% 以下の細菌しか保有していないことが報告されている<sup>66)</sup>。

Bergkemper *et al.*<sup>5)</sup> と Fraser *et al.*<sup>27)</sup> は酸性ホスファターゼのクラス A のプライマーを設計し、Gaiero *et al.*<sup>32)</sup> はクラス B と C のプライマーを設計した。しかしこのクラス C のプライマーでは、一部の細菌の配列しか増幅できない<sup>32)</sup>。Fraser *et al.*<sup>27)</sup> によると、ダイズ畑の非根圏土壤では、クラス A の酸性ホスファターゼ遺伝子 (*phoC*) のコピー数は酸性ホスファターゼ活性と正の相関を示し、両者とも可給態リン酸濃度の増加に伴い低下したが、根圏土壤ではそのような関係は見られなかった。

真菌も酸性ホスファターゼを生産・分泌するが、その多くはフィターゼのグループに属する。例えば *Aspergillus oryzae* が保有する、細胞外へ分泌する酸性ホスファターゼの遺伝子数は 13 であるが、その大半は、後述するヒスチジン酸性ホスファターゼである<sup>73)</sup>。

### 3.3 フィターゼ

イノシトールヘキサキスリン酸の立体異性体の中で、植物が生産するのは *myo*-イノシトールヘキサキスリン酸 (フィチン酸) だけである<sup>134)</sup>。このフィチン酸 (IP<sub>6</sub>) からリン酸を 1 つ以上遊離させる酵素をフィターゼという。フィターゼのグループ分けには 3 つのやり方がある<sup>48)</sup>。一つ目は国際生化学分子生物学連合の命名委員会 (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) が定めた名称で、IP<sub>6</sub> から最初にリン酸基を切り離す位置を 1D-ナンバリングで示した数字で表し、3-フィターゼ、5-フィターゼ、6-フィターゼ (1L-ナンバリングを用いたかつての名称は 4-フィターゼ) と呼ぶ。なお、これら以外の位置で最初にリン酸基を切り離すフィターゼも存在する<sup>58)</sup>。二つ目は、至適 pH により酸性フィターゼとアルカリフィターゼに区別するやり方である。アルカリフィターゼの大部分は、後述する β-プロペラフィターゼである。三つ目は酵素の構造や触媒機構で分けるやり方で、ヒスチジン酸性ホスファターゼ、β-プロペラフィターゼ、パープル酸性ホスファターゼ、システインホスファターゼ (あるいはプロテインチロシンホスファターゼとも呼ばれる) の 4 つに大別される。なお、ヒスチジン酸性ホスファターゼ、パープル酸性ホスファターゼ、システインホスファターゼには、活性部位は保存されているにもかかわらずフィターゼ活性を持つものと持たないものの両方が含まれるため、フィターゼ活性を持つもののみ、例えばヒスチジン酸性フィターゼとして区別する場合もある<sup>86)</sup>。

上述した 3 種類のフィターゼのグループ分けの間では、完全な対応はとれていない。例えば同じヒスチジン酸性ホスファターゼでも、3-フィターゼと 6-フィターゼが含まれる<sup>37)</sup>。

またアルカリフィターゼの多くはβ-プロペラフィターゼであるが<sup>153)</sup>、植物由来のアルカリフィターゼはヒスチジン酸性ホスファターゼである<sup>74)</sup>。

ヒスチジン酸性ホスファターゼとパープル酸性ホスファターゼは真菌・細菌・植物・動物で、β-プロペラフィターゼとシステインホスファターゼは細菌で見ついている<sup>86)</sup>。細菌のフィターゼはPhoレギュロンに属していないものが多く、リン獲得だけでなく、ストレス応答や植物病原性と関連しているものもある<sup>39)</sup>。他方、真菌ではPhoレギュロンに属し、リン酸濃度に応じて生産が調節されているものが多い<sup>39,44)</sup>。

フィターゼには、多様なリン酸モノエステルを分解できるものと、フィチン酸分解に特化したものがあり<sup>85)</sup>、前者は概ねフィチン酸をmyo-イノシトールモノリン酸(IP<sub>1</sub>)まで分解できるが、後者は最大でもmyo-イノシトールトリリン酸(IP<sub>3</sub>)やmyo-イノシトールビスリン酸(IP<sub>2</sub>)までしか分解できない<sup>58)</sup>。大まかな傾向としては、ヒスチジン酸性ホスファターゼとシステインホスファターゼはフィチン酸をIP<sub>1</sub>まで分解し、β-プロペラフィターゼはIP<sub>3</sub>まで、パープル酸性ホスファターゼはIP<sub>4</sub>(myo-イノシトールテトラキスリン酸)まで分解する<sup>37,39,75)</sup>。いずれのフィターゼもIP<sub>1</sub>は分解できないため、酸性ホスファターゼやアルカリホスファターゼがIP<sub>1</sub>をイノシトールとリン酸に加水分解する<sup>134)</sup>。なお酸性ホスファターゼとアルカリホスファターゼはフィチン酸を分解できないものの、それ以外のmyo-イノシトールリン酸は、IP<sub>1</sub>に限らず分解できる<sup>87)</sup>。多くのフィターゼでは、活性部位に結合したmyo-イノシトールリン酸からリン酸基を1つ切り離すたびに基質がフィターゼから外れ、複数のリン酸基を同時に加水分解するフィターゼはまれである<sup>58)</sup>。またリン酸基の数が減るほどフィターゼによる分解は遅くなるため、フィターゼによる分解だけでは、低次にリン酸化したIP<sub>3</sub>やIP<sub>2</sub>が多く残存する<sup>58)</sup>。しかし、リン酸基の多いmyo-イノシトールリン酸ほど土壌粒子に強く結合してフィターゼや酸性・アルカリホスファターゼによる分解を受けにくいこと<sup>134)</sup>、またもともと土壌に流入するのは植物由来のIP<sub>6</sub>であるため、土壌中ではIP<sub>6</sub>が最も多く存在し、リン酸基数が少ないイノシトールリン酸ほど存在量が少なくなる<sup>134)</sup>。

### 3.3.1 β-プロペラフィターゼ

フィターゼの中で、環境中で最も多く存在するのがβ-プロペラフィターゼである。β-プロペラフィターゼは多様な細菌で見つかり、土壌と水系の両方において、β-プロペラフィターゼがフィチン酸分解において主要な役割を果たしていると考えられている<sup>48,67)</sup>。土壌細菌のうちフィターゼ遺伝子を持つものは10%以下という報告がある一方<sup>66)</sup>、海洋細菌の約40%はβ-プロペラフィターゼ遺伝子を持つという報告もある<sup>67)</sup>。なお*Pseudomonas*属や*Xanthomonas*属細菌の中には、β-プロペラフィターゼ、ヒスチジン酸性ホスファターゼ、システインホスファターゼの3つの遺伝子を持つものや、β-プロペラフィターゼとヒスチジン酸性ホスファターゼの2つの遺伝子を持つものがある<sup>48,67)</sup>。

β-プロペラフィターゼの基質はフリーのフィチン酸ではなく、フィチン酸とカルシウムの複合体である<sup>97)</sup>。β-プロペラフィターゼの活性部位は負に帯電しており、同じ負に帯電した、フリーのフィチン酸は活性部位に結合できず分解されないが、フィチン酸とカルシウムの複合体は正に帯電しているため、活性部位と結合でき分解可能となる<sup>97)</sup>。アルカリフィターゼであるβ-プロペラフィターゼのこのような基質特異性は、フィチン酸カルシウムが多いアルカリ性の環境におけるフィチン酸分解に適していると考えられる。また植物体中のフィチン酸をリン源として利用できることから、ある種の細菌では、β-プロペラフィターゼは植物病原性に関与している<sup>86)</sup>。

### 3.3.2 ヒスチジン酸性ホスファターゼ

ヒスチジン酸性ホスファターゼは幅広い生物種で生産されているが、真核生物と原核生物では、活性部位のモチーフ以外のアミノ酸配列は似ていない<sup>86)</sup>。フィターゼ活性を有するヒスチジン酸性ホスファターゼの中でも、フィチン酸分解を主とするものと、フィチン酸以外にも多様な基質を分解できるものがある。この相違は、前者は活性部位が正に帯電しており、負に帯電したフィチン酸が結合するのに適しているが、後者は活性部位の荷電が中性で、多様な基質と結合できることによる<sup>86)</sup>。ヒスチジン酸性ホスファターゼには、ホスホジエステラーゼ活性も持つものがある<sup>97)</sup>。

### 3.3.3 パープル酸性ホスファターゼとシステインホスファターゼ

β-プロペラフィターゼやヒスチジン酸性ホスファターゼと比較すると、パープル酸性ホスファターゼとシステインホスファターゼに関する情報は少ない。パープル酸性ホスファターゼは主に植物で見つかり、真菌や細菌でも見られる<sup>86)</sup>。概して、パープル酸性ホスファターゼのフィターゼ活性は低く、フィチン酸を徐々に分解し安定的にリン酸を供給できるため、種子の発芽に適していると考えられる<sup>86)</sup>。システインホスファターゼが初めて見つかったのはルーメン中の嫌気性細菌であったが<sup>86)</sup>、その後、好気性細菌からも見つかり<sup>48)</sup>。

### 3.3.4 土壌中のフィターゼ

メタゲノム解析より推定された、フィターゼ遺伝子を持つ細菌の割合は、pHが約4の土壌とpHが約8の土壌で大差なく、両者とも10%以下である<sup>66)</sup>。Yao *et al.*<sup>154)</sup>によると、リン酸を施用した熱帯林土壌としない土壌のメタゲノムを比較したところ、フィターゼ生産菌の組成は同等であったが、リン酸施用により、フィターゼ遺伝子の相対的存在量が低下した。このため、リン欠乏土壌では、フィターゼ分解能を持つ細菌の方が有利に存在できると推察されている<sup>154)</sup>。また環境中のフィターゼ遺伝子の組成やコピー数を調べるため、各種プライマーが設計されている。ただし、ヒスチジン酸性フィターゼのみ、様々な細菌が持つ配列を増幅できるプライマーが設計できたが<sup>5)</sup>、β-プロペラフィターゼとパープル酸性ホスファターゼ用に設計されたプライマーでは、限定された配列しか増幅することができない<sup>5,116)</sup>。

日本の土壌での研究では、黒ボク土畑土壌で、β-プロペラフィ



ターゼ遺伝子をもつフィチン酸分解菌として *Sphingomonas* 属と *Caulobacter* 属細菌が多く分離でき<sup>41)</sup>、また褐色低地土畑土壌で分離されたフィチン酸分解菌のほとんどが *Burkholderia* 属細菌であることが報告されている<sup>136)</sup>。チリの黒ボク土草土壌では、 $\beta$ -プロペラフィターゼ遺伝子を持つ *Bacillus* 属と *Paenibacillus* 属細菌が分離され<sup>49)</sup>、またフィチン酸を添加すると、ライグラスの根圏では *Bacillus* 属の  $\beta$ -プロペラフィターゼ遺伝子のコピー数は減少したものの、発現量は増大した<sup>50)</sup>。Stout *et al.*<sup>122)</sup> は、河川底質では、農地からリンが多く流入する地点で、 $\beta$ -プロペラフィターゼ遺伝子のコピー数が多いことを見いだした。興味深いことに、森林土壌から作製したメタゲノムライブラリーから、現在知られている4つのグループ（ヒスチジン酸性ホスファターゼ、 $\beta$ -プロペラフィターゼ、パープル酸性ホスファターゼ、システインホスファターゼ）とは全く異なる、細菌由来のいくつもの新規なフィターゼ遺伝子が得られている<sup>139)</sup>。これらの研究が進展することで、土壌中の微生物によるフィチン酸分解の全体像について、理解が深化することが期待される。

現在まで、土壌中のフィターゼ活性を測定する方法は確立されていない<sup>88)</sup>。Berry *et al.*<sup>7,8)</sup> は、*myo*-イノシトールペンタキスリン酸 (IP<sub>5</sub>) に発色団をつけた基質の利用を提案しているが、分解産物の標品がないため、自身でこの基質をフィターゼで分解し調製する必要がある。また、アリルアミダーゼによって、基質のイノシトールリン酸部分とは別の部位が加水分解されるおそれがあり、予備実験で事前に確認する必要があること、基質の安定性から pH が 4.2 から 6.0 の範囲でしか測定できない等の問題がある<sup>8)</sup>。

#### 4. 微生物バイオマスリン

微生物遺体が他の微生物に利用される際、微生物遺体の炭素は、新たな菌体炭素に変換されるだけでなくエネルギー獲得のためにも利用されるため、微生物バイオマス中の炭素に対してリンが過剰となり土壌中に放出される<sup>60)</sup>。このため、微生物バイオマスの代謝回転に伴い、植物にリンを徐々に供給することになる<sup>129)</sup>。このような理由から、微生物は短期的にはリン酸をめぐって植物と競合するものの、長期的には微生物バイオマスリンは植物に利用可能であるとされている<sup>108)</sup>。また微生物は、必要とする以上に有機態リンを無機化する場合が多いため、微生物バイオマスリンが大きいほどリンの供給量は大きくなる<sup>146)</sup>。実際、特にリン酸濃度の低い土壌において、微生物バイオマスリンと可給態リン酸濃度との間に有意な正の相関があることや<sup>17)</sup>、微生物バイオマスリンが、可給態リン酸濃度よりも、作物のリン酸取り込み量と強い相関を示すことが報告されている<sup>3)</sup>。また Sugito *et al.*<sup>125)</sup> と杉戸<sup>124)</sup> は、リン酸濃度の低い土壌に加え、黒ボク土のようにリン酸固定能の高い土壌でも、微生物バイオマスリンが、可給態リン酸濃度よりも、作物のリン酸取り込み量をよく反映することを見いだした。

微生物バイオマスはリン酸を取り込むことで、土壌にリン酸が固定化されるのを防ぐ働きも持つ<sup>46,108,119,124)</sup>。さらには

リン溶解菌のように難利用性リン酸を可給化したり、有機態リンを無機化したりすることで<sup>108,119,128)</sup>、作物が多くのリン酸を利用できるようにし、土壌にリン酸が蓄積するのを抑制することができる<sup>46,109)</sup>。特に微生物のリン要求性が高いときには、リン酸固定能の高い土壌でも微生物はリン酸を取り込み<sup>99,100)</sup>、また難利用性リンも利用できる<sup>46)</sup>。そこで、リン酸固定能の高い黒ボク土畑土壌に炭素と窒素を添加し、相対的にリン欠乏の状態（微生物のリン要求性の高い状態）にすることで、土壌中のリンを微生物に取り込ませることができるか、検討した（図3）。その結果、微生物バイオマスリンは大幅に増加したが、可給態リン酸の指標であるトルオーグリンは有意に低下した。なお植物に利用されやすいクエン酸抽出リンには変化は見られなかった。このように、炭素・窒素添加により黒ボク土畑土壌中の微生物バイオマスリンを高めることは可能であったが、この増加した微生物バイオマスリンを可給態リンのプールとして作物生産に活かすには、リン欠乏の時期を作物生育期とずらす必要がある。また、炭素・窒素添加によって微生物バイオマスリンは高くなったものの、可給態リン酸濃度は低下しており、果たしてこのような状態での微生物バイオマスリンがリン酸肥沃度の指標となるのか否かについてはさらに検討する必要がある。この実験と同様に、土壌に易分解性炭素や窒素等を加えることで微生物バイオマスリンが増加し、また可給態リン酸濃度は低下するものの、難利用性リン酸濃度も低下したことが報告されている<sup>21,126,143,151)</sup>。微生物バイオマスリンを増加させ作物生産に活かそうとする場合、増加させた微生物バイオマスからリン酸を放出させる時期と、作物がリン酸を必要とする時期とを一致させる必要がある<sup>119)</sup>。添加した炭素が消費されると微生物バイオマスは低下してリン酸が放出され、植物に利用可能になると考えられるものの<sup>20,119)</sup>、微生物バイオマスから放出されたリンは難利用性へと変化していく<sup>62)</sup>。特に黒ボク土ではこの速度が極めて速いため<sup>60)</sup>、微生物バイオマスからのリン放出時期を作物のリン要求時期と一致させることが不可欠である。

#### 5. 土壌の還元化

水田の湛水期に可給態リン酸濃度が増加することはよく知られた現象であり<sup>63,64)</sup>、それは主に、鉄酸化物が還元溶解することで吸着していたリン酸が放出されることによる<sup>91)</sup>。また無機態リン酸に加え、有機態リンも土壌の還元化によって放出され、分解されやすくなる可能性がある。海洋底質を用いた実験で、フィチン酸を加えて嫌氣的に培養すると、好氣的に培養した場合と比較し、添加したフィチン酸は速やかに、かつ多く分解した<sup>127)</sup>。土壌中でフィチン酸が安定に存在するのは、フィチン酸自体が難分解性ではなく、鉱物に強く結合しているためであると考えられている<sup>10,72,93)</sup>。酸性土壌では、無機態リン酸の場合と同様<sup>146)</sup>、多くのフィチン酸は、鉄やアルミニウムの塩として沈殿するよりも、主に鉄やアルミニウムの酸化物に吸着して存在している<sup>12)</sup>。この際、フィチン酸の6つのリン酸基のうち4つが酸化物への

吸着に関わっている場合が多く、同時に4つの結合を切るとは難しいため安定に吸着・存在している<sup>12)</sup>。しかし土壌を湛水すると鉄酸化物は還元溶解するため、吸着していたフィチン酸が放出され、ホスファターゼによって分解されやすくなる。他方、かなり酸性の土壌では、フィチン酸は鉄やアルミニウムの塩として沈殿している<sup>12)</sup>。フィターゼはフィチン酸の鉄塩を直接分解することはできないが<sup>75,131)</sup>、上述した鉄酸化物に吸着したフィチン酸と同様、湛水すると、おそらく鉄が還元されてフィチン酸と解離することで、フィチン酸は分解されるようになる<sup>31,140)</sup>。しかし、一度溶出したフィチン酸が $\text{Fe}^{2+}$ と結合して再沈殿する可能性もある<sup>134)</sup>。

還元的な環境においてもフィチン酸が多く蓄積している事例もあるため、特に酸性土壌では、還元化自体よりも、還元化に伴うpHの上昇が、フィチン酸分解促進の主因であるとの指摘もある<sup>106)</sup>。鉄やアルミニウム酸化物に吸着したフィチン酸は、pHが上昇すると、脱着しやすくなる<sup>72,93)</sup>。また、アルカリ性の土壌では、フィチン酸の分解性は高いことが報告されている<sup>22)</sup>。土壌中では腐植物質に結合した状態で存在するフィチン酸も多くあり<sup>12,45,134)</sup>、これらはpHの上昇により、腐植物質に結合した状態で溶出し、分解性が増す可能性も示唆されている<sup>106)</sup>。湛水に伴うフィチン酸分解の促進には、土壌の還元化とpH上昇のいずれか一方が効くというよりは、両者が共に影響していると考えられ、その寄与が土壌によって異なる可能性がある。

黒ボク土畑土壌において、湛水還元化が可給態リン酸濃度に及ぼす影響を、培養実験により評価したところ、トルオーグ法では有意差は見られなかったものの、ブレイ第二法では有意に増加した(未発表データ)。可給態リン酸の両評価法による差異は、鉄酸化物の還元溶解により溶出した後にアルミニウム酸化物に再吸着したリン酸を、抽出できるか否かによると考えられる。ブレイ法の抽出液に含まれるフッ化物イオンは、アルミニウムと複合体を形成しやすく、アルミニウムに結合したリン酸を抽出しやすいという特徴を持つ<sup>24,52)</sup>。そのため、トルオーグ法では評価できなかった、放出後にアルミニウムと結合したリン酸がブレイ第二法では評価できたものと推察される。しかしブレイ第二法で評価した場合でも、期待に反し、湛水還元化による可給態リン酸の増加量はあまり大きくなかった(未発表データ)。これは、黒ボク土ではもともとアロフェンやアルミニウム腐植複合体のアルミニウムに結合したリン酸が多いため、還元してもリン酸の溶出量は少ないことによる<sup>59,89,114)</sup>と推察される。

また予想に反し、湛水培養により鉄溶出の増加が観察されない黒ボク土も存在した(未発表データ)。これは、鉄酸化物が還元溶解した後に、放出された鉄が再沈殿したことによると考えられる。還元状態で鉄酸化物が溶解すると吸着していたリン酸が放出されるが、溶出した鉄が再び沈殿してリン酸を吸着する場合がある<sup>28)</sup>。土壌が還元化しても鉄とリン酸の両方の溶出が低い場合には、ビビアナイト $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ が生成している可能性がある<sup>142)</sup>。Zachara *et al.*<sup>156)</sup>とTrolard and Bourrie<sup>133)</sup>によると、鉄酸化物が鉄還元菌によって還元されるとき、液相のリン酸濃度が低い場合は

$\text{Fe(II)-Fe(III)}$ 水酸化物であるグリーンラストが、リン酸濃度が高い場合はビビアナイトが多く生成する。水田土壌では、湛水中にビビアナイトが生成することが確認されているが<sup>92)</sup>、生成したビビアナイトは、落水以降 $\text{Fe}^{2+}$ イオンの活量が低減するため、徐々に溶解する<sup>92)</sup>。湛水土壌における鉄還元菌のリン動態への影響は大きく、その意味では鉄還元菌もリン可給化に関わる微生物と言えよう。

黒ボク土畑土壌において、還元化が有機態リンの動態に与える影響は、無機態リン酸の場合よりも顕著であり、鉄やアルミニウム酸化物に吸着した有機態リンは大幅に低下した(未発表データ)。上述したように、鉄やアルミニウム酸化物に吸着した状態の有機態リンはホスファターゼによる分解に耐性を示すため、この結果は還元化による有機態リン分解性の上昇を示唆している。また改変したHedleyの逐次抽出法<sup>61)</sup>の濃塩酸で抽出できる画分の有機態リンは、還元化により大幅に増加した(未発表データ)。この画分に含まれる粒子状有機態リンは易分解性とされており<sup>83)</sup>、土壌の還元化により有機態リンの生物利用性が増大した可能性がある。ここで示唆された、土壌還元化による有機態リン分解性の増大は、古川・川口<sup>31)</sup>の結果と類似している。古川・川口<sup>31)</sup>の研究では、湛水した水田土壌において、ブレイ第二法による可給態リン酸濃度の増加の20-70%が有機態リンの分解によると推定されている。

畑土壌の還元化によるリン可給性の向上は、通常の畑で実施するのは困難であり、畑の水田化や土壌還元消毒<sup>81)</sup>以外の状況では起こりそうにないと思われる。しかし畑地においても嫌氣的な微小部位は存在し、Ehがかなり低い状態のみ進行する鉄の還元も起こりうる<sup>55,56)</sup>。実際、Keilweil *et al.*<sup>56)</sup>は、好氣的な畑土壌において、嫌氣的部位が全体の2~9%を占め、鉄やマンガンの還元溶解が起こっていることを観察している。この研究ではリンの測定は行われていないが、微視的には、鉄の還元溶解によりリンが溶出している可能性もある。畑土壌において、土壌還元化によりリン可給化を図るには、土壌全体を還元化するのではなく、一定期間、還元化した微小部位を増加させるアプローチを探ることが現実的であるのかもしれない。

## 6. おわりに

土壌のリン可給化の観点から、リン溶解菌、ホスファターゼ、微生物バイオマスリン、土壌の還元化についての基礎的情報を概観した。上述したように、いずれにおいてもいまだに基礎的な知見が不足しているのが現状である。現時点では、畑地に蓄積したリン酸の可給化に、これらを実用的に利用することは極めて難しい。しかし、いずれも実際に土壌中で重要な役割を果たしており、その理解の深化は、農地に蓄積したリンの可給化を進めるうえで必須である。またそれぞれの項目が密接に関連しているため、複数の項目にまたがった研究が望まれる。例えば土壌中のフィチン酸の分解性を高めるには、フィターゼだけではなく、フィチン酸を土壌粒子から放出させ分解性を高める要因(有機酸、pH、Ehなど)



についての研究も必要である。実際、リン酸濃度の低い畑土壌にフィチン酸を添加すると、根圏の土壌メタゲノム解析では、アルカリホスファターゼに加え、クエン酸・リング酸合成に関わる遺伝子の相対的存在量も増加することが報告されている<sup>135)</sup>。また同じフィターゼでも、土壌中のフィチン酸分解に関わるものもあれば、植物病原性に関わるものもあるため、注意が必要である。現在、窒素循環に関わる微生物や遺伝子組成についての研究が大きく進展しているのに対し、土壌中におけるリン関連遺伝子の種類や存在量が、リン循環や可給性に与える影響については十分には理解されていない。この理由として、リン循環では、同じプロセスでも様々な遺伝子が関与するという複雑さが挙げられる。また、無機態リン酸を含め、土壌中に存在する多くのリン化合物が土壌に強く吸着するため抽出率が低く、かつリンの化学種や存在形態自体の分析も難しいことから、リンの形態変化やその速度を評価することが困難であることも挙げられる。今後、リン循環の微生物学的側面と化学的側面の両方向からの研究の展開が望まれる。

畑地にリン酸が過剰に蓄積している場合、最初に採用するアプローチとしては、上述した手法よりも、リン減肥が最も現実的である<sup>90)</sup>。この際問題となるのが、可給態リン酸の評価法である。日本の水田で5年間リン酸を施用しなかった場合、ブレイ第二法により推定した可給態リン酸濃度と水稻のリン酸取り込み量との関係は変化しなかった<sup>57)</sup>。しかし海外の畑地では、可給態リン酸濃度が同じでも、収量が異なることが報告されている<sup>112)</sup>。またリン減肥の際は、可給態リン酸濃度を、より一層精確に評価することが必要になる。日本では可給態リン酸の評価には、トルオーグ法やブレイ第二法がよく使われるが、いずれの方法が適しているのかについては意見が一致していない。例えば、黒ボク土ではトルオーグ法はリン酸肥沃度の指標としては適していないという報告<sup>124)</sup>がある一方、黒ボク土を含め酸性土壌ではトルオーグ法が適している<sup>53)</sup>、あるいは、リン酸を施用していない、もしくは減肥した黒ボク土畑土壌では、トルオーグ法が適しているといった報告もある<sup>54)</sup>。またアルカリ性土壌に適しているとされ、日本ではあまり使われていないオルセン法も、酸性土壌でも利用可能であるという報告や<sup>4,24,52)</sup>、アルミニウム腐植複合体と結合したリン酸を抽出するため、黒ボク土では過大評価となるため適していない<sup>80)</sup>との報告もある。さらに重要な点として、リン減肥の際には、リン可給性に有機態リンが無視しえない役割を果たす可能性があるにもかかわらず、トルオーグ法やブレイ第二法を用いた評価では、有機態リンは考慮されないことが挙げられる。黒ボク土畑土壌を対象とした研究において、抽出法により、有機態リンのホスファターゼによる分解性は大きく異なることが報告されている<sup>102)</sup>。このため、リン減肥の際に、有機態リンを評価する必要があるのか、もしあるならどのように評価すべきか、といった点も検討する必要がある。武田<sup>128)</sup>は、リン酸肥沃度の評価に、トルオーグ法やブレイ法といった化学的方法以外に、生物指標である微生物バイオマスリンを含めることを提案している。また同じく生物指標として、酵素の資源配

分モデルもリン酸肥沃度の指標として利用できる可能性がある<sup>30)</sup>。リン酸肥沃度評価におけるこれら生物指標の有用性も、今後さらに検証する必要がある。

## 要 旨

2008年のリン価格の高騰以降、農地に蓄積した「legacy P」の有効化を試みる研究が多くされている。このlegacy Pの有効化は、リン資源枯渇の問題だけでなく、湖沼の富栄養化や植物病害を抑制する上でも重要である。土壌のリンの可給化に寄与する因子としては、アーバスキュラー菌根菌が最もよく研究されているが、ここでは効果が明瞭でない、あるいはあまり研究されていない、リン溶解菌、ホスファターゼ、微生物バイオマスリン、土壌の還元化に関する基礎的情報を提供した。いずれも、いまだ基礎的な知見すら不足しており、すぐに実用的に利用することは困難である。しかし、実際に土壌中で重要な役割を果たしており、農地に蓄積したリンの可給性を規定する仕組みを理解するうえでも、これらに関する理解の深化は不可欠である。またlegacy Pを有効利用するためにリン減肥をする際は、これまでよりもさらに精確なリン可給性の評価が必要となる。その場合、化学的評価法だけでなく、微生物バイオマスリンや土壌酵素の資源配分モデルといった生物指標の利用も有用である可能性があり、今後検証する必要がある。

## 引用文献

- 1) Acuña JJ, Durán P, Lagos LM, Ogram A, Mora ML, Jorquera MA (2016) Bacterial alkaline phosphomonoesterase in the rhizospheres of plants grown in Chilean extreme environments. *Biol. Fertil. Soils*, **52**, 763–773
- 2) An R, Moe LA (2016) Regulation of pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase activity in the model rhizosphere-dwelling bacterium *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 4955–4964
- 3) Ayaga G, Todd A, Brookes PC (2006) Enhanced biological cycling of phosphorus increases its availability to crops in low-input sub-Saharan farming systems. *Soil Biol. Biochem.*, **38**, 81–90
- 4) Beegle D (2005) Assessing soil phosphorus for crop production by soil testing. *In Phosphorus: Agriculture and the Environment*, (Ed.) JT Sims, AN Sharpley, pp. 123–143, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin
- 5) Bergkemper F, Kublik S, Lang F, Krüger J, Vestergaard G, Schloter M, Schulz S (2016a) Novel oligonucleotide primers reveal a high diversity of microbes which drive phosphorus turnover in soil. *J. Microbiol. Meth.*, **125**, 91–97
- 6) Bergkemper F, Schöler A, Engel M, Lang F, Krüger J, Schloter M, Schulz S (2016b) Phosphorus depletion in forest soils shapes bacterial communities towards phosphorus recycling systems. *Environ. Microbiol.*, **18**, 1988–2000
- 7) Berry DF, Shang C, Zelazny LW (2009) Measurement of phytase activity in soil using a chromophoric tethered phytic acid probe. *Soil Biol. Biochem.*, **41**, 192–200

- 8) Berry DF, Walker HL, Harich K, Shang C (2011) Assessing phytase activity in forested and agricultural soils using TInsP<sub>5</sub> as a substrate analog. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **75**, 880–889
- 9) Bi QF, Zheng BX, Lin XY, Li KJ, Liu XP, Hao XL, Zhang H, Zhang JB, Jaisi DP, Zhu YG (2018) The microbial cycling of phosphorus on long-term fertilized soil: Insights from phosphate oxygen isotope ratios. *Chem. Geol.*, **483**, 56–64
- 10) Bünemann EK (2015) Assessment of gross and net mineralization rates of soil organic phosphorus—A review. *Soil Biol. Biochem.*, **89**, 82–98
- 11) Burns RG, DeForest JL, Marxsen J, Sinsabaugh RL, Stromberger ME, Wallenstein MD, Weintraub MN, Zoppini A (2013) Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biol. Biochem.*, **58**, 216–234
- 12) Celi L, Barberis E (2005) Abiotic stabilization of organic phosphorus in the environment. In *Organic Phosphorus in the Environment*, (Ed.) BL Turner, E Frossard, DS Baldwin, pp. 113–132, CABI Publishing, Wallingford, UK
- 13) Chen X, Jiang N, Condrón LM, Dunfield KE, Chen Z, Wang J, Chen L (2019) Impact of long-term phosphorus fertilizer inputs on bacterial *phoD* gene community in a maize field, Northeast China. *Sci. Total Environ.*, **669**, 1011–1018
- 14) Chhabra S, Brazil D, Morrissey J, Burke J, O’Gara F, Dowling DN (2013a) Fertilization management affects the alkaline phosphatase bacterial community in barley rhizosphere soil. *Biol. Fertil. Soils*, **49**, 31–39
- 15) Chhabra S, Brazil D, Morrissey J, Burke JI, O’Gara F, Dowling DN (2013b) Characterization of mineral phosphate solubilization traits from a barley rhizosphere soil functional metagenome. *MicrobiologyOpen*, **2**, 717–724
- 16) Clarholm M, Skjellberg U, Rosling A (2015) Organic acid induced release of nutrients from metal-stabilized soil organic matter—The unbutton model. *Soil Biol. Biochem.*, **84**, 168–176
- 17) Colvan SR, Syers JK, O’Donnell AG (2001) Effect of long-term fertilizer use on acid and alkaline phosphomonoesterase and phosphodiesterase activities in managed grassland. *Biol. Fertil. Soils*, **34**, 258–263
- 18) Cordell D, White S (2014) Life’s bottleneck: sustaining the world’s phosphorus for a food secure future. *Annu. Rev. Environ. Resour.*, **39**, 161–188
- 19) Cordell D, Drangert J-O, White S (2009) The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environ. Change*, **19**, 292–305
- 20) Damon PM, Bowden B, Rose T, Rengel Z (2014) Crop residue contributions to phosphorus pools in agricultural soils: A review. *Soil Biol. Biochem.*, **74**, 127–137
- 21) Ding L, Wu J, Xiao H, Zhou P, Syers JK (2012) Mobilisation of inorganic phosphorus induced by rice straw in aggregates of a highly weathered upland soil. *J. Sci. Food Agric.*, **92**, 1073–1079
- 22) Doolette AL, Smernik RJ, Dougherty WJ (2010) Rapid decomposition of phytate applied to a calcareous soil demonstrated by a solution <sup>31</sup>P NMR study. *Eur. J. Soil Sci.*, **61**, 563–575
- 23) Elser J, Bennett E (2011) A broken biogeochemical cycle. *Nature*, **478**, 29–31
- 24) Fixen PE, Grove JH (1990) Testing soils for phosphorus. In *Soil Testing and Plant Analysis*, 3rd ed., (Ed.) RL Westerman, pp. 141–180, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin
- 25) Fraser TD, Lynch DH, Bent E, Entz MH, Dunfield KE (2015a) Soil bacterial *phoD* gene abundance and expression in response to applied phosphorus and long-term management. *Soil Biol. Biochem.*, **88**, 137–147
- 26) Fraser T, Lynch DH, Entz MH, Dunfield KE (2015b) Linking alkaline phosphatase activity with bacterial *phoD* gene abundance in soil from a long-term management trial. *Geoderma*, **257–258**, 115–122
- 27) Fraser TD, Lynch DH, Gaiero J, Khosla K, Dunfield KE (2017) Quantification of bacterial non-specific acid (*phoC*) and alkaline (*phoD*) phosphatase genes in bulk and rhizosphere soil from organically managed soybean fields. *Appl. Soil Ecol.*, **111**, 48–56
- 28) Frossard E, Brossard M, Hedley MJ, Metherell A (1995) Reactions controlling the cycling of P in soils. In *Phosphorus in the Global Environment*, (Ed.) H Tiessen, pp. 107–137, John Wiley & Sons, Chichester
- 29) Fujita K, Kunito T, Moro H, Toda H, Otsuka S, Nagaoka K (2017) Microbial resource allocation for phosphatase synthesis reflects the availability of inorganic phosphorus across various soils. *Biogeochemistry*, **136**, 325–339
- 30) 藤田一輝・諸人誌・大塚重人・長岡一成・國頭恭 (2019) 土壌中の養分利用性と微生物による酵素生産との関係：資源配分モデルを中心に、土と微生物, **73**, 10–23
- 31) 古川秀顕・川口桂三郎 (1969) 湛水による易溶リン増加に対する有機リンの寄与, 土肥誌, **40**, 141–148
- 32) Gaiero JR, Bent E, Fraser TD, Condrón LM, Dunfield KE (2018) Validating novel oligonucleotide primers targeting three classes of bacterial non-specific acid phosphatase genes in grassland soils. *Plant Soil*, **427**, 39–51
- 33) Gandhi NU, Chandra SB (2012) A comparative analysis of three classes of bacterial non-specific acid phosphatases and archaeal phosphoesterases: evolutionary perspective. *Acta Inform. Med.*, **20**, 167–173
- 34) George TS, Giles CD, Menezes-Blackburn D, Condrón LM, Gama-Rodrigues AC, Jaisi D, Lang F, Neal AL, Stutter MI, Almeida DS, Bol R, Cabugao KG, Celi L, Cotner JB, Feng G, Goll DS, Hallama M, Krueger J, Plassard C, Rosling A, Darch T, Fraser T, Giesler R, Richardson AE, Tamburini F, Shand CA, Lumsdon DG, Zhang H, Blackwell MSA, Wearing C, Mezeli MM, Almås ÅR, Audette Y, Bertrand I, Beyhaut E, Boitt G, Bradshaw N, Brearley CA, Bruulsema TW, Ciais P, Cozzolino V, Duran PC, Mora ML, de Menezes AB, Dodd RJ, Dunfield K, Engl C, Frazão JJ, Garland G, González Jiménez JL, Graca J, Granger SJ, Harrison AF, Heuck C, Hou EQ, Johnes PJ, Kaiser K, Kjær HA, Klumpp E, Lamb AL, Macintosh KA, Mackay EB, McGrath J, McIntyre C, McLaren T, Mészáros E, Missong A, Mooshammer M, Negrón CP, Nelson LA, Pfahler V, Poblete-Grant P, Randall M, Seguel A, Seth K, Smith AC, Smits MM, Sobarzo JA, Spohn M, Tawarayama K, Tibbett M, Voroney P, Wallander H, Wang L, Wasaki J, Haygarth PM (2018) Organic phosphorus in the terrestrial environment: a perspective on the state of the art and future priorities. *Plant Soil*, **427**, 191–208
- 35) Gilbert N (2009) The disappearing nutrient. *Nature*, **461**, 716–718
- 36) Gomes-Vieira AL, Wideman JG, Paes-Vieira L, Gomes SL, Richards TA, Meyer-Fernandes JR (2018) Evolutionary conservation of a core fungal phosphate homeostasis pathway coupled to development in *Blastocladiella emersonii*. *Fungal Genet. Biol.*, **115**, 20–32
- 37) Gontia-Mishra I, Tiwari S (2013) Molecular characterization and comparative phylogenetic analysis of phytases from fungi with their prospective applications. *Food Technol. Biotechnol.*,

- 51, 313–326
- 38) 後藤逸男 (2016) 園芸土壌のリン酸過剰がもたらす弊害とその対策, *肥料科学*, **38**, 49–78
  - 39) Greiner R (2007) Phytate-degrading enzymes: regulation of synthesis in microorganisms and plants. *In Inositol Phosphates: Linking Agriculture and the Environment*, (Ed.) BL Turner, AE Richardson, EJ Mullaney, pp. 78–96, CAB International, Wallingford
  - 40) Gyaneshwar P, Kumar GN, Parekh LJ, Poole PS (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil*, **245**, 83–93
  - 41) Hara S, Saito M (2016) Isolation of inositol hexaphosphate (IHP)-degrading bacteria from arbuscular mycorrhizal fungal hyphal compartments using a modified baiting method involving alginate beads containing IHP. *Microbes Environ.*, **31**, 234–243
  - 42) 早野恒一 (1997) 植物の窒素, リン栄養と微生物. *In 新・土の微生物 (2) 植物の生育と微生物*, 土壤微生物研究会編, pp. 133–165, 博友社, 東京
  - 43) He Z, Zhu J (1998) Microbial utilization and transformation of phosphate adsorbed by variable charge minerals. *Soil Biol. Biochem.*, **30**, 917–923
  - 44) Hill JE, Richardson AE (2007) Isolation and assessment of microorganisms that utilize phytate. *In Inositol Phosphates: Linking Agriculture and the Environment*, (Ed.) BL Turner, AE Richardson, EJ Mullaney, pp. 61–77, CAB International, Wallingford
  - 45) Hong J-K, Yamane I (1981) Distribution of inositol phosphate in the molecular size fractions of humic and fulvic acid fractions. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **27**, 295–303
  - 46) Jakobsen I, Leggett ME, Richardson AE (2005) Rhizosphere microorganisms and plant phosphorus uptake. *In Phosphorus: Agriculture and the Environment*, (Ed.) JT Sims, AN Sharpley, pp. 437–494, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin
  - 47) Jones DL, Oburger E (2011) Solubilization of phosphorus by soil microorganisms. *In Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling*, *Soil Biology* 26, (Ed.) EK Bünenmann, A Oberson, E Frossard, pp. 169–198, Springer-Verlag, Berlin
  - 48) Jorquera M, Martínez O, Maruyama F, Marschner P, Mora ML (2008) Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. *Microbes Environ.*, **23**, 182–191
  - 49) Jorquera MA, Crowley DE, Marschner P, Greiner R, Fernández MT, Romero D, Menezes-Blackburn D, Mora ML (2011) Identification of  $\beta$ -propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **75**, 163–172
  - 50) Jorquera MA, Saavedra N, Maruyama F, Richardson AE, Crowley DE, Catrila RC, Henriquez EJ, Mora ML (2013) Phytate addition to soil induces changes in the abundance and expression of *Bacillus*  $\beta$ -propeller phytase genes in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **83**, 352–360
  - 51) Kageyama H, Tripathi K, Rai AK, Cha-um S, Waditee-Sirisattha R, Takabe T (2011) An alkaline phosphatase/phosphodiesterase, PhoD, induced by salt stress and secreted out of the cells of *Aphanothece halophytica*, a halotolerant cyanobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 5178–5183
  - 52) Kamprath EJ, Watson ME (1980) Conventional soil and tissue tests for assessing the phosphorus status of soils. *In The Role of Phosphorus in Agriculture*, (Ed.) FE Khasawneh, EC Sample, EJ Kamprath, pp. 433–469, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin
  - 53) 加藤秀正 (1994) 酸性土壌におけるリン酸の動態. *In 低pH土壌と植物*, 日本土壤肥料学会編, pp. 123–154, 博友社, 東京
  - 54) Kato N, Zapata F, Fardeau JC (1995) The ability of chemical extraction methods to estimate plant-available soil P and a better understanding of P availability of fertilized Andosols by using isotopic methods. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **41**, 781–789
  - 55) Keiluweit M, Nico PS, Kleber M, Fendorf S (2016) Are oxygen limitations under recognized regulators of organic carbon turnover in upland soils? *Biogeochemistry*, **127**, 157–171
  - 56) Keiluweit M, Gee K, Denney A, Fendorf S (2018) Anoxic microsites in upland soils dominantly controlled by clay content. *Soil Biol. Biochem.*, **118**, 42–50
  - 57) 古賀野完爾 (1984) 寒地水田における蓄積リン酸の肥効と変動. *In 水田土壌とリン酸—供給力と施肥—*, 日本土壤肥料学会編, pp. 59–86, 博友社, 東京
  - 58) Konietzny U, Greiner R (2002) Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food Sci. Technol.*, **37**, 791–812
  - 59) 金野隆光・弘法健三 (1970) 透水条件下における水田土壌の物質変化 (第2報) 水田土壌のリン酸について. *土肥誌*, **41**, 225–229
  - 60) 河野憲治 (1996) 土壌バイオマス形成とリンのフロー. *土肥誌*, **67**, 716–725
  - 61) Kunito T, Tsunekawa M, Yoshida S, Park H-D, Toda H, Nagaoka K, Saeki K (2012) Soil properties affecting phosphorus forms and phosphatase activities in Japanese forest soils: Soil microorganisms may be limited by phosphorus. *Soil Sci.*, **177**, 39–46
  - 62) Kunito T, Hiruta N, Miyagishi Y, Sumi H, Moro H (2018a) Changes in phosphorus fractions caused by increased microbial activity in forest soil in a short-term incubation study. *Chem. Speciation Bioavail.*, **30**, 9–13
  - 63) Kunito T, Shiroma T, Moro H, Sumi H (2018b) Annual variation in soil enzyme activity in a paddy field: Soil temperature and nutrient availability are important for controlling enzyme activities. *Appl. Environ. Soil Sci.*, **2018**, 4093219
  - 64) Kyuma K (2004) *Paddy Soil Science*, Kyoto University Press, Kyoto, and Trans Pacific Press, Melbourne
  - 65) Lidbury IDEA, Murphy ARJ, Scanlan DJ, Bending GD, Jones AME, Moore JD, Goodall A, Hammond JP, Wellington EMH (2016) Comparative genomic, proteomic and exoproteomic analyses of three *Pseudomonas* strains reveals novel insights into the phosphorus scavenging capabilities of soil bacteria. *Environ. Microbiol.*, **18**, 3535–3549
  - 66) Lidbury IDEA, Fraser TD, Murphy ARJ, Scanlan DJ, Bending GD, Jones AME, Moore JD, Goodall A, Tibbett M, Hammond JP, Wellington EMH (2017) The ‘known’ genetic potential for microbial communities to degrade organic phosphorus is reduced in low-pH soils. *MicrobiologyOpen*, **6**, e474
  - 67) Lim BL, Yeung P, Cheng C, Hill JE (2007) Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *ISME J.*, **1**, 321–330
  - 68) Long XE, Yao H, Huang Y, Wei W, Zhu YG (2018) Phosphate



- levels influence the utilisation of rice rhizodeposition carbon and the phosphate-solubilising microbial community in a paddy soil. *Soil Biol. Biochem.*, **118**, 103–114
- 69) Luo H, Benner R, Long RA, Hu J (2009) Subcellular localization of marine bacterial alkaline phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 21219–21223
- 70) Luo G, Ling N, Nannipieri P, Chen H, Raza W, Wang M, Guo S, Shen Q (2017) Long-term fertilisation regimes affect the composition of the alkaline phosphomonoesterase encoding microbial community of a vertisol and its derivative soil fractions. *Biol. Fertil. Soils*, **53**, 375–388
- 71) Mander C, Wakelin S, Young S, Condrón L, O’Callaghan M (2012) Incidence and diversity of phosphate-solubilising bacteria are linked to phosphorus status in grassland soils. *Soil Biol. Biochem.*, **44**, 93–101
- 72) Martin M, Celi L, Barberis E (2004) Desorption and plant availability of *myo*-inositol hexaphosphate adsorbed on goethite. *Soil Sci.*, **169**, 115–124
- 73) Marui J, Tada S, Fukuoka M, Suzuki S, Hattori R, Wagu Y, Shiraiishi Y, Kitamoto N, Sugimoto T, Kusumoto K (2012) Comparison of acid phosphatase gene expression profiles in solid-state rice and soybean cultures of an *Aspergillus oryzae* strain with low acid phosphatase activity (KBN8048): implications for *miso* brewing. *Food Sci. Technol. Res.*, **18**, 83–90
- 74) Mehta BD, Jog SP, Johnson SC, Murthy PPN (2006) Lily pollen alkaline phytase is a histidine phosphatase similar to mammalian multiple inositol polyphosphate phosphatase (MINPP). *Phytochemistry*, **67**, 1874–1886
- 75) Menezes-Blackburn D, Jorquera MA, Greiner R, Gianfreda L, Mora ML (2013) Phytases and phytase-labile organic phosphorus in manures and soils. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, **43**, 916–954
- 76) Menezes-Blackburn D, Giles C, Darch T, George TS, Blackwell M, Stutter M, Shand C, Lumsdon D, Cooper P, Wendler R, Brown L, Almeida DS, Wearing C, Zhang H, Haygarth PM (2018) Opportunities for mobilizing recalcitrant phosphorus from agricultural soils: a review. *Plant Soil*, **427**, 5–16
- 77) Miller SH, Browne P, Prigent-Combaret C, Combes-Meynet E, Morrissey JP, O’Gara F (2010) Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol. Rep.*, **2**, 403–411
- 78) Mise K, Fujita K, Kunito T, Senoo K, Otsuka S (2018) Phosphorus-mineralizing communities reflect nutrient-rich characteristics in Japanese arable Andisols. *Microbes Environ.*, **33**, 282–289
- 79) Mishima S, Itahashi S, Kimura R, Inoue T (2003) Trends of phosphate fertilizer demand and phosphate balance in farmland soils in Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **49**, 39–45
- 80) 三宅正紀 (1984) 熱帯の水田におけるリン酸の肥効, *In* 水田土壌とリン酸—供給力と施肥—, 日本土壤肥料学会編, pp. 127–164, 博友社, 東京
- 81) 門馬法明 (2017) 土壌還元消毒の普及の現状と今後の展望, *土と微生物*, **71**, 24–28
- 82) Monds RD, Newell PD, Schwartzman JA, O’Toole GA (2006) Conservation of the Pho regulon in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 1910–1924
- 83) Moro H, Kunito T, Sato T (2015) Assessment of phosphorus bioavailability in cultivated Andisols from a long-term fertilization field experiment using chemical extractions and soil enzyme activities. *Arch. Agron. Soil Sci.*, **61**, 1107–1123
- 84) Morrison E, Newman S, Bae HS, He Z, Zhou J, Reddy KR, Ogram A (2016) Microbial genetic and enzymatic responses to an anthropogenic phosphorus gradient within a subtropical peatland. *Geoderma*, **268**, 119–127
- 85) Mullaney EJ, Ullah AHJ (2003) The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **312**, 179–184
- 86) Mullaney EJ, Ullah AHJ (2007) Phytases: attributes, catalytic mechanisms and applications. *In* Inositol Phosphates: Linking Agriculture and the Environment, (Ed.) BL Turner, AE Richardson, EJ Mullaney, pp. 97–110, CAB International, Wallingford
- 87) Nannipieri P, Giagnoni L, Landi L, Renella G (2011) Role of phosphatase enzymes in soil. *In* Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling, Soil Biology 26, (Ed.) EK Bünemann, A Oberson, E Frossard, pp. 215–243, Springer-Verlag, Berlin
- 88) Nannipieri P, Giagnoni L, Renella G, Puglisi E, Ceccanti B, Masciandaro G, Fornasier F, Moscatelli MC, Marinari S (2012) Soil enzymology: classical and molecular approaches. *Biol. Fertil. Soils*, **48**, 743–762
- 89) 南條正巳 (2010a) 黒ボク土壌に多量に蓄積したリン酸は利用可能か, *ペドロジスト*, **54**, 45–51
- 90) 南條正巳 (2010b) 土壌のリン, *In* 文化土壌学からみたリン, 日本土壤肥料学会編, pp. 129–146, 博友社, 東京
- 91) 南條正巳・高橋智紀・庄子貞雄 (1996) 還元剤を用いる水田土壌中の可給態リン含量の簡易測定法, *土肥誌*, **67**, 73–77
- 92) Nanzyo M, Onodera H, Hasegawa E, Ito K, Kanno H (2013) Formation and dissolution of vivianite in paddy field soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **77**, 1452–1459
- 93) Nash DM, Haygarth PM, Turner BL, Condrón LM, McDowell RW, Richardson AE, Watkins M, Heaven MW (2014) Using organic phosphorus to sustain pasture productivity: A perspective. *Geoderma*, **221–222**, 11–19
- 94) Neal AL, Rossmann M, Brearley C, Akkari E, Guyomar C, Clark IM, Allen E, Hirsch PR (2017) Land-use influences phosphatase gene microdiversity in soils. *Environ. Microbiol.*, **19**, 2740–2753
- 95) Neal AL, Blackwell M, Akkari E, Guyomar C, Clark I, Hirsch PR (2018) Phylogenetic distribution, biogeography and the effects of land management upon bacterial non-specific acid-phosphatase gene diversity and abundance. *Plant Soil*, **427**, 175–189
- 96) 西尾道徳・木村龍介 (1986) リン溶解菌とその農業利用の可能性, *土と微生物*, **28**, 31–40
- 97) Oh B-C, Choi W-C, Park S, Kim Y-O, Oh T-K (2004) Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 362–372
- 98) 大竹久夫・常田 聡 (2017) リン最前線—リサイクルはどこへ—, *再生と利用*, **42**, 6–12
- 99) Olander LP, Vitousek PM (2004) Biological and geochemical sinks for phosphorus in soil from a wet tropical forest. *Ecosystems*, **7**, 404–419
- 100) Olander LP, Vitousek PM (2005) Short-term controls over inorganic phosphorus during soil and ecosystem development. *Soil Biol. Biochem.*, **37**, 651–659
- 101) O’Brien PJ, Herschlag D (2001) Functional interrelationships in the alkaline phosphatase superfamily: phosphodiesterase activity of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Biochemistry*,

- 40, 5691–5699
- 102) Otani T, Ae N (1999) Extraction of organic phosphorus in Andosols by various methods. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **45**, 151–161
- 103) Ragot SA, Kertesz MA, Bünemann EK (2015) *phoD* alkaline phosphatase gene diversity in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 7281–7289
- 104) Ragot SA, Huguenin-Elie O, Kertesz MA, Frossard E, Bünemann EK (2016) Total and active microbial communities and *phoD* as affected by phosphorus depletion and pH in soil. *Plant Soil*, **408**, 15–30
- 105) Ragot SA, Kertesz MA, Mészáros É, Frossard E, Bünemann EK (2017) Soil *phoD* and *phoX* alkaline phosphatase gene diversity responds to multiple environmental factors. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **93**, fiw212
- 106) Reitzel K, Jensen HS, Turner BL, Jørgensen C (2018) Influence of pH and redox on mobilization of inositol hexakisphosphate from oligotrophic lake sediment. *Biogeochemistry*, **140**, 15–30
- 107) Richardson AE (2001) Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust. J. Plant Physiol.*, **28**, 897–906
- 108) Richardson AE, Simpson RJ (2011) Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiol.*, **156**, 989–996
- 109) Richardson AE, Lynch JP, Ryan PR, Delhaize E, Smith FA, Smith SE, Harvey PR, Ryan MH, Veneklaas EJ, Lambers H, Oberson A, Culvenor RA, Simpson RJ (2011) Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant Soil*, **349**, 121–156
- 110) Rodríguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y (2006) Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil*, **287**, 15–21
- 111) Rossolini GM, Schippa S, Riccio ML, Berlutti F, Macaskie LE, Thaller MC (1998) Bacterial nonspecific acid phosphohydrolases: physiology, evolution and use as tools in microbial biotechnology. *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**, 833–850
- 112) Rowe H, Withers PJA, Baas P, Chan NI, Doody D, Holiman J, Jacobs B, Li H, MacDonald GK, McDowell R, Sharpley AN, Shen J, Taheri W, Wallenstein M, Weintraub MN (2016) Integrating legacy soil phosphorus into sustainable nutrient management strategies for future food, bioenergy and water security. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.*, **104**, 393–412
- 113) 齋藤雅典 (2011) リン資源の枯渇と農業生産への有効利用, 遺伝, **65**, 32–38
- 114) 齋藤奏枝・松野更和・平井英明・加藤秀正・前田忠信 (2007) アロフェン質黒ボク土水田における有効態リン酸の周年変動と牛ふん堆肥連用の効果, 土肥誌, **78**, 283–289
- 115) Sakurai M, Wasaki J, Tomizawa Y, Shinano T, Osaki M (2008) Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **54**, 62–71
- 116) Sanguin H, Wilson NL, Kertesz MA (2016) Assessment of functional diversity and structure of phytate-hydrolysing bacterial community in *Lolium perenne* rhizosphere. *Plant Soil*, **401**, 151–167
- 117) Sattari SZ, Bouwman AF, Giller KE, van Ittersum MK (2012) Residual soil phosphorus as the missing piece in the global phosphorus crisis puzzle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 6348–6353
- 118) Shears SB, Turner BL (2007) Nomenclature and terminology of inositol phosphates: clarification and a glossary of terms. In *Inositol Phosphates: Linking Agriculture and the Environment*, (Ed.) BL Turner, AE Richardson, EJ Mullaney, pp. 1–6, CAB International, Wallingford
- 119) Simpson RJ, Oberson A, Culvenor RA, Ryan MH, Veneklaas EJ, Lambers H, Lynch JP, Ryan PR, Delhaize E, Smith FA, Smith SE, Harvey PR, Richardson AE (2011) Strategies and agronomic interventions to improve the phosphorus-use efficiency of farming systems. *Plant Soil*, **349**, 89–120
- 120) Smil V (2000) Phosphorus in the environment: natural flows and human interferences. *Annu. Rev. Energy Environ.*, **25**, 53–88
- 121) Stewart JWB, Tiessen H (1987) Dynamics of soil organic phosphorus. *Biogeochemistry*, **4**, 41–60
- 122) Stout LM, Nguyen TT, Jaisi DP (2016) Relationship of phytate, phytate-mineralizing bacteria, and beta-propeller phytase genes along a coastal tributary to the Chesapeake Bay. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **80**, 84–96
- 123) Stutter MI, Shand CA, George TS, Blackwell MSA, Bol R, MacKay RL, Richardson AE, Condron LM, Turner BL, Haygarth PM (2012) Recovering phosphorus from soil: A root solution? *Environ. Sci. Technol.*, **46**, 1977–1978
- 124) 杉戸智子 (2011) 黒ボク土壌でのリン酸肥沃度の再評価—土壤微生物バイオマスマリンは指標となるのか?—, 土と微生物, **65**, 34–40
- 125) Sugito T, Yoshida K, Takebe M, Shinano T, Toyota K (2010) Soil microbial biomass phosphorus as an indicator of phosphorus availability in a Gleyic Andosol. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **56**, 390–398
- 126) Sun Q, Qiu H, Hu Y, Wei X, Chen X, Ge T, Wu J, Su Y (2019) Cellulose and lignin regulate partitioning of soil phosphorus fractions and alkaline phosphomonoesterase encoding bacterial community in phosphorus-deficient soils. *Biol. Fertil Soils*, **55**, 31–42
- 127) Suzumura M, Kamatani A (1995) Mineralization of inositol hexaphosphate in aerobic and anaerobic marine sediments: Implications for the phosphorus cycle. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **59**, 1021–1026
- 128) 武田容枝 (2010) 土壌リンの存在形態と生物循環, 土と微生物, **64**, 25–32
- 129) Tamburini F, Pfahler V, Bünemann EK, Guelland K, Bernasconi SM, Frossard E (2012) Oxygen isotopes unravel the role of microorganisms in phosphate cycling in soils. *Environ. Sci. Technol.*, **46**, 5956–5962
- 130) Tan H, Barret M, Mooij MJ, Rice O, Morrissey JP, Dobson A, Griffiths B, O’Gara F (2013) Long-term phosphorus fertilisation increased the diversity of the total bacterial community and the *phoD* phosphorus mineraliser group in pasture soils. *Biol. Fertil. Soils*, **49**, 661–672
- 131) Tang J, Leung A, Leung C, Lim BL (2006) Hydrolysis of precipitated phytate by three distinct families of phytases. *Soil Biol. Biochem.*, **38**, 1316–1324
- 132) Tate KR (1984) The biological transformation of P in soil. *Plant Soil*, **76**, 245–256
- 133) Trolard F, Bourrié G (2008) Geochemistry of green rusts and fougérite: a reevaluation of Fe cycle in soils. *Adv. Agron.*, **99**, 227–288
- 134) Turner BL, Papházy MJ, Haygarth PM, McKelvie ID (2002) Inositol phosphates in the environment. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **357**, 449–469

- 135) Unno Y, Shinano T (2013) Metagenomic analysis of the rhizosphere soil microbiome with respect to phytic acid utilization. *Microbes Environ.*, **28**, 120–127
- 136) Unno Y, Okubo K, Wasaki J, Shinano T, Osaki M (2005) Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of Lupin analyzed by phytate utilization ability. *Environ. Microbiol.*, **7**, 396–404
- 137) Vaccari, D.A. (2009) 迫り来るリン資源の危機. 日経サイエンス, 2009年9月号, 88–93
- 138) Vershinina OA, Znamenskaya LV (2002) The Pho regulons of bacteria. *Microbiology*, **71**, 497–511
- 139) Villamizar GAC, Nacke H, Boehning M, Herz K, Daniel R (2019) Functional metagenomics reveals an overlooked diversity and novel features of soil-derived bacterial phosphatases and phytases. *mBio*, **10**, e01966–18
- 140) 和田秀徳・野中昌法・高井康雄 (1985) 湛水土壤の浸透水中に含まれる形態別リン含量の経時的変化. 土肥誌, **56**, 37–42
- 141) Wallenstein MD, Weintraub MN (2008) Emerging tools for measuring and modeling the *in situ* activity of soil extracellular enzymes. *Soil Biol. Biochem.*, **40**, 2098–2106
- 142) Walpersdorf E, Koch CB, Heiberg L, O'Connell DW, Kjaergaard C, Hansen HCB (2013) Does vivianite control phosphate solubility in anoxic meadow soils? *Geoderma*, **193–194**, 189–199
- 143) Wang Y, Hasbullah H, Setia R, Marschner P, Zhang F (2012) Potential soil P mobilisation capacity—method development and comparison of rhizosphere soil from different crops. *Plant Soil*, **354**, 259–267
- 144) Watanabe K, Hirata H (1998) Increase in phosphorus availability of upland Andosol under different fertilization conditions measured by isotopic techniques. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **44**, 471–476
- 145) Wei X, Hu Y, Razavi BS, Zhou J, Shen J, Nannipieri P, Wu J, Ge T (2019) Rare taxa of alkaline phosphomonoesterase-harboring microorganisms mediate soil phosphorus mineralization. *Soil Biol. Biochem.*, **131**, 62–70
- 146) Weihrauch C, Opp C (2018) Ecologically relevant phosphorus pools in soils and their dynamics: The story so far. *Geoderma*, **325**, 183–194
- 147) White AE (2009) New insights into bacterial acquisition of phosphorus in the surface ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 21013–21014
- 148) Whitelaw MA (2000) Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv. Agron.*, **69**, 99–151
- 149) Whitelaw MA, Harden TJ, Helyar KR (1999) Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol. Biochem.*, **31**, 655–665
- 150) Withers PJA, Sylvester-Bradley R, Jones DL, Healey JR, Talboys PJ (2014) Feed the crop not the soil: rethinking phosphorus management in the food chain. *Environ. Sci. Technol.*, **48**, 6523–6530
- 151) Wu J, Huang M, Xiao HA, Su YR, Tong CL, Huang DY, Syers JK (2007) Dynamics in microbial immobilization and transformations of phosphorus in highly weathered subtropical soil following organic amendments. *Plant Soil*, **290**, 333–342
- 152) Yamane K, Maruo B (1978) Alkaline phosphatase possessing alkaline phosphodiesterase activity and other phosphodiesterases in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **134**, 108–114
- 153) Yao M-Z, Zhang Y-H, Lu W-L, Hu M-Q, Wang W, Liang A-H (2011) Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.*, **112**, 1–14
- 154) Yao Q, Li Z, Song Y, Wright SJ, Guo X, Tringe SG, Tfaily MM, Paša-Tolić L, Hazen TC, Turner BL, Mayes MA, Pan C (2018) Community proteogenomics reveals the systemic impact of phosphorus availability on microbial functions in tropical soil. *Nat. Ecol. Evol.*, **2**, 499–509
- 155) Yuan Z-C, Zaheer R, Morton R, Finan TM (2006) Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 2686–2697
- 156) Zachara JM, Kukkadapu RK, Fredrickson JK, Gorby YA, Smith SC (2002) Biomineralization of poorly crystalline Fe(III) oxides by dissimilatory metal reducing bacteria (DMRB). *Geomicrobiol. J.*, **19**, 179–207
- 157) Zaheer R, Morton R, Proudfoot M, Yakunin A, Finan TM (2009) Genetic and biochemical properties of an alkaline phosphatase PhoX family protein found in many bacteria. *Environ. Microbiol.*, **11**, 1572–1587
- 158) Zheng BX, Zhang DP, Wang Y, Hao XL, Wadaan MAM, Hozzein WN, Peñuelas J, Zhu YG, Yang XR (2019) Responses to soil pH gradients of inorganic phosphate solubilizing bacteria community. *Sci. Rep.*, **9**, 25.
- 159) Zhu J, Li M, Whelan M (2018) Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. *Sci. Total Environ.*, **612**, 522–537