

学 位 論 文 題 名

Study on efficient recycling of phosphorus in
sewage sludge using secretory acid phosphatase

（酸性ホスファターゼを用いた
下水汚泥中リンの効率的リサイクルに関する研究）

学位論文内容の要旨

世界人口は爆発的な増加を続けており、それに伴い食糧不足も重大な問題となりつつある。作物生産のために必須となる元素の中でも特に、リンはその原料となるリン鉱石の枯渇が懸念されているため、限りあるリン資源を効率的に循環利用していかなければならない。下水汚泥は、廃棄物の中ではリンの含有率および発生量がともに高く、効率的に植物が吸収・利用できれば将来重要なリン資源となる可能性を持っている。しかし、植物が直接利用できない形態のリン化合物が多く含まれているため、下水汚泥に含まれるリンの利用効率は低い。これまでのところ、下水汚泥中に含まれるリンの効率的利用に関する研究はほとんど行われていない。

マメ科植物のルーピンは低リン耐性が強いことが知られている。ルーピンは根から大量の酸性ホスファターゼ(APase)および有機酸を分泌することにより、根圏の有機態リンや難溶性無機態リンから無機態リンを生成して吸収・利用することが知られている。そこで、本研究ではこの APase および有機酸の機能に着目し、これらを用いた下水汚泥中リンの効率的利用を目的として実施した。さらにルーピンは低リン条件に適応するためにクラスター根を発達させることからクラスター根による APase 分泌や下水汚泥中リン利用能についての検討も行い、以下の結果を得た。

1. 分泌性酸性ホスファターゼおよびクエン酸による下水汚泥からのリン溶出効果

下水汚泥中における APase の安定性を、高分子処理汚泥(HM 汚泥)と鉄・石灰処理汚泥(Fe-Ca 汚泥)で調査したところ、いずれの汚泥中においても酵素活性は低下し、特に Fe-Ca 汚泥中で活性の低下が顕著であった。このことより、汚泥中に含まれるリンや重金属の他に汚泥処理方法の違いが酵素の安定性に関与していることが示された。しかし、HM 汚泥においては、添加直後から 6 時間後までは 20%以上の活性を維持しており、APase が汚泥中の有機態リンに十分働く可能性が示された。

HM 汚泥に根分泌性 APase およびクエン酸を添加してその働きを調べた。分泌性 APase の添加量が増加するに従って、汚泥中の有機態リンの減少、および無機態リンの増加が認められ、クエン酸の添加量に比例して汚泥からの無機態リン溶出量が増加した。以上より、これらの分泌物が下水

汚泥からのリン放出に効果があることが示された。次に、分泌性 APase やクエン酸の機能をさらに詳しく分析するため、HM 汚泥中のリン化合物を分画、定量して様々なリン化合物組成の変化を調査した。APase は主に汚泥中の低分子可溶性有機態リンを加水分解して可溶性無機態リンを生成し、クエン酸は汚泥中の難溶性無機態リンから可溶性無機態リンを放出することが明らかになった。クエン酸には金属イオンと結合して難溶沈殿化している有機態リンを可溶化する働きも認められた。APase のみの添加では、生成した可溶性無機態リンの大部分が汚泥中の金属イオンと難溶性無機態リンを形成したためにリン放出効果は低かった。そこで、APase とクエン酸を同時に添加することにより、可溶性無機態リンの再沈殿化は防がれ、さらに汚泥中の金属イオンと結合して難溶化している有機態リンをクエン酸が可溶化し、それを APase が加水分解するという相乗効果が認められた。

2. 低リン条件下のルーピン根による酸性ホスファターゼ分泌および遺伝子発現

ルーピン根における APase 発現機構についての解析を行った。ルーピンは-P 条件下で根から APase を多量に分泌し、根における酵素活性が著しく増加することが明らかとなった。また、APase をコードする遺伝子 *LASAP2* も-P 条件で発現が高まった。これらは+P 条件ではほとんど誘導されず、APase の低リン特異的な応答性が示された。さらに、APase 分泌を時間経過と共に調べたところ、-P 条件の初期においては誘導されず、植物体内のリン濃度が著しく低下すると誘導されたことから、本酵素の分泌は外部のリン濃度よりも植物体内のリン濃度に依存することが示された。根における APase 誘導には、遺伝子発現、タンパク質発現、酵素分泌が密接に関わり合っており、植物が体内リン濃度を通じて低リンストレスを感知すると速やかに根で遺伝子が発現され、タンパク質が合成され、分泌されることが明らかとなった。

3. ルーピンクラスター根における APase 分泌が下水汚泥中リン利用能に及ぼす効果

ルーピン根における APase 発現能について分析を行った。APase の活性染色により、APase は-P 条件で根の全域から分泌されるが、特にクラスター根において大量に分泌されることが明らかとなった。さらに、*LASAP2* 遺伝子の発現はクラスター根で著しく高く、ルーピンクラスター根はリン欠乏条件における APase 分泌において重要な役割を担っていると考えられた。

次に、ルーピン根による HM 汚泥中リンの利用能を調査した。+P 条件の根や-P 条件の非クラスター根は汚泥中の難溶性リン化合物を利用できなかったが、クラスター根はこれを吸収・利用しており、クラスター根は下水汚泥中のリンを効率的に吸収することが明らかになった。

これらの結果から、APase が下水汚泥中の有機態リンを加水分解して、放出された無機態リンをクラスター根が吸収するという効率的利用が行われたことが示された。またクラスター根は APase と有機酸を同時に分泌しており、これらが相乗効果的に機能したと考えられる。

4. 土壌微生物がルーピンのクラスター根形成や養分吸収に及ぼす効果

クラスター根形成には様々な要因があり、その中でも微生物の関与が示唆されている。そこで、微生物とクラスター根の関係についてより詳細に調べた。無菌条件の低リン土壌でルーピンを生育させたところ、クラスター根の形成は認められたが小さく、数も少なく、非滅菌土壌で形成されるものとは著しく形状が異なった。また根全体においても形状の違いが見られ、根量は無菌区で著しく多かった。これよりクラスター根を含めたルーピン根の形成に土壌微生物が関与していることが

示された。無菌土壌における植物の生育や養分吸収は非滅菌土壌で育てた場合と比較して著しく低下しており、土壌微生物は根の形状の他に、根の機能や活性にも関わっていることが示唆された。

以上、本研究は下水汚泥に対する APase の働き、有機酸との相乗効果、ルーピンクラスター根における APase 高発現が下水汚泥からのリンの効率的吸収に果たす役割について明らかにし、下水汚泥中リンの効率的利用の可能性を示した。さらに、クラスター根形成における微生物の関与についても明らかにした。これらの知見は、低リン耐性の弱い植物や作物の根圏を制御することにより、限りあるリン資源を効率的に循環利用する対策を明らかにしたものである。今後、増加する人口に対応した持続的農業に貢献すると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 崎 満

副 査 教 授 波多野 隆 介

副 査 助教授 信 濃 卓 郎

学 位 論 文 題 名

Study on efficient recycling of phosphorus in sewage sludge using secretory acid phosphatase

(酸性ホスファターゼを用いた

下水汚泥中リンの効率的リサイクルに関する研究)

本論文は6章からなり図29、表5、総頁114からなる英語論文で、別に参考論文3編が付されている。

リンは作物生産のための必須元素であるが、枯渇が懸念されており、効率的に循環利用していかなければならない。下水汚泥は、植物が直接利用できないリン化合物が多く、リン栄養源としての利用効率は低い、リンの含有率および発生量がともに高く、将来重要なリン資源となる可能性を持っている。しかし、下水汚泥中に含まれるリンに関する研究はほとんど行われていない。

マメ科植物のルーピン(*Lupinus albus* L.)は、根から大量の酸性ホスファターゼ(APase)および有機酸を分泌することにより、根圏の有機態リンや難溶性無機態リンを可給化して吸収する。本研究は、これらの機能を用いた下水汚泥中リンの効率的利用を目的として実施した。さらにルーピンは低リン条件でクラスター根を発達させることからクラスター根による APase 分泌や下水汚泥中リン利用能についての検討を行い、以下の結果を得た。

1. 分泌性酸性ホスファターゼおよびクエン酸による下水汚泥からのリン溶出効果

高分子処理汚泥(HM 汚泥)および鉄・石灰処理汚泥(Fe-Ca 汚泥)中における APase の安定性を調査したところ、酵素活性は低下し、汚泥中に含まれるリンや重金属、微生物が活性の低下に関与していることが示された。しかし、HM 汚泥中では、添加からしばらくの間は高い活性を維持しており、APase が汚泥中の有機態リンに十分働く可能性が示された。

HM 汚泥に根分泌性 APase およびクエン酸を添加し、汚泥中のリン化合物を分画、定量

した。**APase** は主に汚泥中の低分子可溶性有機態リンを加水分解し、クエン酸は汚泥中の難溶性無機態リンを可溶化した。以上より、これらの分泌物が下水汚泥からのリン放出に効果があることが明らかとなった。**APase** のみの添加では、生成した可溶性無機態リンの大部分が汚泥中の金属イオンと結合したためにリン放出効果は低かった。しかし、**APase** とクエン酸を同時に添加することにより、可溶性無機態リンの再沈殿化は防がれ、さらに汚泥中の金属イオンと結合して難溶化している有機態リンをクエン酸が可溶化し、それを**APase** が加水分解するという相乗効果が認められた。

2. 低リン条件下のルーピン根による酸性ホスファターゼ分泌および遺伝子発現

ルーピン根における **APase** 発現機構についての解析を行った。ルーピンは-P 条件下で根から **APase** を多量に分泌し、**APase** をコードする遺伝子 **LASAP2** も-P 条件で発現が高まった。これらは+P 条件ではほとんど誘導されず、**APase** 分泌の低リン特異的な応答性が示された。さらに、**APase** 分泌は植物体内のリン濃度が著しく低下すると誘導されたことから、その誘導は外部のリン濃度よりも植物体内のリン濃度に依存することが示された。根における **APase** 分泌には、遺伝子発現、タンパク質発現、酵素分泌が密接に関わり合っており、植物が体内リン濃度を通じて低リンストレスを感知すると速やかに誘導されることが明らかとなった。

3. ルーピンクラスター根における **APase** 分泌が下水汚泥中リン利用能に及ぼす効果

ルーピンクラスター根における **APase** 発現能および HM 汚泥中リンの利用能について分析を行った。**APase** は-P 条件で根の全域から分泌されるが、特にクラスター根において大量に分泌された。**LASAP2** 遺伝子の発現もクラスター根で著しく高かった。-P および+P 条件ともに非クラスター根は汚泥中の難溶性リン化合物をほとんど利用できなかったが、-P 条件のクラスター根は効率的に利用できることが明らかになった。これらの結果から、クラスター根から大量に分泌された **APase** が下水汚泥中の有機態リンを加水分解し、放出された無機態リンをクラスター根が効率的に吸収したことが示された。またクラスター根は **APase** と有機酸を同時に分泌しており、これらが相乗的に機能したと考えられる。

4. 土壌微生物がルーピンのクラスター根形成や養分吸収に及ぼす効果

クラスター根形成に微生物の関与が示唆されており、これらの関係について詳細に調べた。無菌条件の低リン土壌においてクラスター根の形成が認められたが小さく、数も少なく、非滅菌土壌で形成されるものとは著しく形状が異なった。また根全体においても形状の違いが見られた。これよりクラスター根を含めたルーピン根の形成への土壌微生物の関与が示された。無菌土壌における植物の生育や養分吸収は非滅菌土壌で育てた場合と比較して著しく低下しており、土壌微生物は根の形状の他に、根の養分吸収能にも関わっていることが示唆された。

以上、本研究により、下水汚泥に対する **APase** の働き、有機酸との相乗効果、ループインクラスター根の機能について初めて明らかにし、下水汚泥中リンの効率的利用の可能性を示した。これらの知見は学術的に高く評価されるとともに、低リン耐性の弱い作物の根圏を制御することにより、限りあるリン資源を効率的に循環利用していく上で有益な情報を提供するものである。よって審査員一同は、山村 卓也が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。