生分解性フィルム原料藻 *Phaeocystis* sp.への
高塩耐性誘導の試み

高知工科大学大学院

環境システムコース

1045004　田中宣秀

生分解性フィルム原料藻 *Phaeocystis* sp.への高塩耐性誘導の試み

高知工科大学大学院
環境システムコース
1045004 田中　宣秀

【 要旨 】

プラスチック製品は軽量で強固、耐久性・透明性があり、水・ガス・電気を通さないなどの特性のためオールマイティーの如く使用されてきた。しかしその特性が近年深刻な問題を引き起こしている。産業廃棄物として排出されたプラスチックのゴミ公害、不完全な焼却処分によるダイオキシンの発生そして可塑剤などの化学物質による環境ホルモン問題などがあげられる。またプラスチックは化石資源である石油から製造される。石油が枯渇の危機を迎えつつある現代において代替素材の開発が急がれている。

このような時代背景のもと、従来のプラスチックが持つ特性を損なわず、自然界での物質循環に取り込まれ、微生物による分解を受けるよう設計された生分解性プラスチックの開発が行われてきた。その結果βオキシ酸系化合物やデンプン、セルロースそしてキトサンなどの生物由来高分子による生分解性プラスチックが試作され、その一部はすでに製品化されている。しかしながら近未来に起こりうるであろう世界的な人口爆発やそれに伴う食料危機を考慮するとデンプンのような食料は食料として利用すべきであろう。

そこで新規の生分解性プラスチック原料として着目した微細藻類は太陽光をエネルギー源として光合成により少量の無機栄養塩、CO_2そして水のみで生育する。また微細藻類には細胞外被に寒天状の多糖を分泌する種が多く見られる。そこでこれらの微細藻類を基材とした生分解性プラスチックの開発に着手した。その結果海産ハプト藻の *Phaeocystis* sp.と廃パルプを混合して乾燥後、加熱加圧することでフィルム様シートとすることに成功しつつある。

フィルム様シート原料藻の *Phaeocystis* sp.を効率的に大量培養するためには天日開放培養が効果的である。この場合他の微生物が混入しても生育できないような環境下で生育可能な変異株を作り出す必要がある。*Phaeocystis* sp.は海産の単細胞藻であるのでこれに更に高い塩耐性を導入することで他の微生物を排除した天日開放培養が可能となると考えた。高塩耐性の誘導法にはコリン酸化酵素遺伝子や *bbc1* 遺伝子などの遺伝子導入が挙げられる。しかしこれらの遺伝子を導入した変異株が既存の生態系に及ぼす影響を考慮して変異を誘導した高塩耐性株の取得を検討した。高塩濃度海水での馴化、紫外線照射そして

変異原物質の Ethyl methanesulfonate（EMS；**メタンスルホン酸エチル**）、Methyl methanesulfonate（MMS；**メタンスルホン酸メチル**）**そして** *N*-Methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine（MNNG；**ニトロソグアニジン**）**を使用した高塩耐性誘導の結果** 1.5 **倍海水までの生育が確認できた。**

【 緒言 】

プラスチックは「高分子物質を主原料として人工的に有用な形状に成型された固体である。ただし、繊維、ゴム、塗料、接着剤などは除外される。」と JIS K 6900 で 定義されている。

プラスチックの歴史は 1935 年塩化ビニルの発見に端を発する。その後ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリスチレン、ポリカーボネート、アクリル樹脂そしてメラミン樹脂など多くのプラスチック材料が開発されて従来の天然素材に置き換わり日常生活を便利なものにした。プラスチックはいまや日常生活に欠かすことのできない材料の 1 つとなった。天然材料は風化や微生物による分解を受け易い。しかしプラスチック製品は天然材料とは異なり化学的に極めて安定な化合物と言える。その優れた安定性のため劣化はするものの自然界で微生物に分解されにくく物質循環されない。

国内で排出される一般廃棄物の約 15%がプラスチックであり、産業廃棄物として排出されるプラスチックと合わせると実に年間 900 万 t にのぼる。廃棄プラスチックのうち約 10%は再利用されるが残りの約 90%は埋め立てや焼却されている。しかし埋め立て跡地は地盤が安定せず再開発が困難であり、プラスチックを焼却する際に生じる高温による焼却炉の損傷、不完全な燃焼によるダイオキシンの発生、また燃焼時に発生する CO_2 による地球温暖化の促進などの問題が発生している。石油化学産業の発展に伴い高品質のプラスチックが全世界で年間約 1.5 億 t 生産され、国内で生産されるプラスチック材料は 1,000 万 t を超える。全世界で生産される年間約 1.5 億 t のプラスチックを全量焼却するとポリエチレン換算で約 4.7 億 t の CO_2 が発生する。しかし焼却する際に石油由来の燃料を使用するため実際は 10-15 億 t の CO_2 が発生することとなる。それだけではない、製造過程で添加される可塑剤などの化学物質による生物のホルモン代謝異常、いわゆる環境ホルモンも問題視されている。

このような問題を解決するため従来のプラスチックが持つ特性を損なわず、自然界での物質循環に取り込まれ、微生物による分解を受けるように設計された生分解性プラスチックの開発が行われてきた。現在試作されている生分解性プラスチックの多くはβオキシ酸系化合物やデンプン、セルロース、キトサン、プルランそしてカードランなどの各種多糖類が原料であり、一部が製品化されている。しかし生物から高純度のプラスチック原料を調製せねばならずエネルギーコストが高い製品となってしまう。またジャガイモ、トウモロコシ、デンプンなどは近未来に起こりうる人口爆発や食料危機を考慮して食料・家畜飼料として使用すべきである。

新規の生分解性プラスチック原材料を(1)食料として利用されていない、(2)

安価である、(3)大量に生産できる、という条件で検討した。その結果光合成微生物である微細藻類に着目した。

微細藻類は太陽光をエネルギー源として光合成により少量の無機塩、CO_2、水のみで増殖する。微細藻類には細胞表面に寒天状の多糖を分泌する種が数多く見られる。この細胞周辺に外被として多糖を分泌する微細藻類を利用して藻体を含んだまま生分解性プラスチック様の基材の開発に着手した。その結果、沖縄沿岸部で採取された海産ハプト藻 *Phaeocystis* sp.と廃パルプを混合して乾燥、加熱加圧することでフィルム様シートの作製に成功しつつある。

Figure 1　*Phaeocystis* sp.の顕微鏡写真
（×600、外被多糖（矢印）を見やすくするために墨汁を入れて撮影した）

そこで *Phaeocystis* sp.を大量に培養する手法を模索した。一般に微生物を大量培養するための培養装置は密閉タンクと天日開放池に大別できる。

密閉タンクによる培養は酵母やバクテリアなどで行われている。一般にこれらは従属栄養生物である。殺菌したタンク内に生育に必要な有機物をいれて pH、温度、必要とあれば通気をおこない至適条件を人工的に作りだして大量培養を行う。

天日開放池による培養は微細藻類で行われている。一部を除き微細藻類は光独立栄養である。先にも述べたが太陽光をエネルギー源として光合成により少量の無機塩、CO_2、水のみで増殖する。世界各地で行われている藻類の商業的大量培養施設をみると大半が天日開放池である。天日開放池を用いる利点として(1)設営が容易、(2)設営コストが低い、(3)拡張が容易、(4)太陽光が光源などが挙げられる。またこのような培養施設を建設するには（1）一年を通しての日照時間が長い、（2）降雨日数が少ない、（3）広大な敷地を有する沿岸地域が望ましい。これらの条件に適した地域はイスラエル、西オーストラリア、バハ・カルフォルニアそしてハワイなどがあり、単細胞緑藻 *Dunaliella* や藍藻

Spirulina などの商業的培養施設が稼働している。

しかしながら天日開放池での培養では他の微生物による汚染、コンタミネーションが容易に発生するためその防止策を講じる必要がある。*Dunaliella* や *Spirulina* などの有価藻類のみを効率的に増殖させるためには至適 pH の調整や CO_2 ガスの吹き込みを行い常に優勢を保たせている。しかし完全にコンタミネーションを防ぐことができないのが現状である。

そこで *Phaeocystis* sp.を他の生物が生育不可能な環境でも生育できるように改良することで問題を解決することとした。そのような環境としては熱水、強酸性、強アルカリ性、飽和食塩水、高濃度環境汚染物質そして超高圧などが挙げられる。*Phaeocystis* sp.は海産性単細胞藻類であるため高濃度海水中での順応性を誘導するのが最善と思われる。

また先に述べた天日開放池で商業培養を行っている地域は淡水の確保が難しく多くの海水淡水化プラントが稼働している。これらの施設から排出される廃濃厚海水は生態系に影響を及ぼさぬよう通常濃度の海水と混合されて海に戻されている。この廃濃厚海水を利用すれば高濃度海水環境を作り出すのに要する費用やエネルギーコストを節約することが可能となるであろう。

以上のことから生分解性プラスチック様フィルム原料藻 *Phaeocystis* sp.への高塩耐性の誘導を試みた。

【 材料 】

採取

ハプト藻 *Phaeocystis* はハプト植物綱プリムネシウム属に属する。今回研究に用いた *Phaeocystis* sp.は沖縄県糸満市米須海岸でプランクトンネットを使用して採取された。

培養

Phaeocystis sp.は 500ml バッフル付マイヤーフラスコに Provasoli's ES-enrichment Seawater medium（PES；Provasoli の栄養塩強化海水培地： 7 ページ参照）を 300ml 加えて初期濃度 10^5cells/ml で接種しレシプロシェーカー（TB-98, 高崎科学器械）にて回転数 120rpm で終日振盪培養した。培養条件は特に記載がないかぎり次の通りである；光源に白色蛍光灯を使用、照度は 3,000lx、室温は 25℃、明期 16 時間：暗期 8 時間で人工的に昼夜を設定した。

Provasoli's ES-enrichment Seawater stock solution

（PESs；Provasoli の栄養塩強化海水）

$NaNO_3$	350mg
β-グリセロリン酸ナトリウム	50mg
Vitamin B_{12}	10μg
チアミン塩酸塩	500μg
ビオチン	5μg
トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン	500mg
Fe（as EDTA; 1:1 molar）*	25ml
P-II metals**	25ml
純水	50ml

* Fe（as EDTA; 1:1 molar）

$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	70.2mg
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	66 mg
純水	100 ml

** P-II metals

H_3BO_3	114 mg
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	4.9 mg
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	16.9 mg
$ZnCl_2$	1 mg
$CoCl_2 \cdot 6H_20$	0.41mg
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg
純水	100 ml

人工海水 980mlに PESs20mlを加えて 1N HCl にて pH7.8 に調整する

【 操作と結果 】

細胞濃度の測定

細胞濃度を計測する手法としては血球計算盤でのカウント、Packed cell volume （PCV；細胞容積測定）、Optical density（OD；濁度）などがある。しかし今回のように検体数が膨大で検体あたりの絶対量が少量な場合、血球計算盤によるカウントでは時間がかかり PCV はある程度の細胞濃度がなければ測定できない。そこでマイクロプレートリーダーを用いて OD を測定した。

方法は次の通りである；対数期にある *Phaeocystis* sp.を細胞濃度が 10^5-10^8cells/ml となるように希釈調整する。各濃度の *Phaeocystis* sp.を 96well マイクロプレートに 100μl/well ずつ分注する。30 分間放置して *Phaeocystis* sp.を完全に沈降させた後マイクロプレートリーダー（Benchmark Microplate Reader, Bio-Rad）で吸光度を測定した（Flow diagram 1）。

Flow diagram 1　マイクロプレートリーダーによる細胞濃度の測定

対数期にある *Phaeocystis* sp.
↓
細胞濃度が 10^5-10^8cells/ml となるように希釈調整する
↓
96well マイクロプレートに 100μl/well ずつ分注する
↓30 分間放置する
マイクロプレートリーダーで吸光度を測定する

マイクロプレートリーダーの測定原理は単色光フィルターを用いた分光光度計と同じである。使用した機器（Benchmark Microplate Reader, Bio-Rad）では測定波長を校正するためリファレンス波長を同時に設定しなければならない。今回用いた単色光フィルターは 340nm、405nm、415nm、450nm、570nm そして 655nm の 6 種類である。測定波長とリファレンス波長の組み合わせは 6×5 通りとなる。

すべての組み合わせで測定した結果、測定波長 λ_M=450nm、リファレンス波長 λ_R=415nm のとき（1）式で表される関係が導かれた。

$$細胞濃度（\times 10^5\ cells/ml）=169.1\times（A_S-A_0）\quad（1）$$

このとき、A_S=Phaeocystis sp.の吸光度、A_0=ブランクの吸光度である。

以降の実験操作において特に記載がないかぎり細胞濃度は（1）式にて算出した。

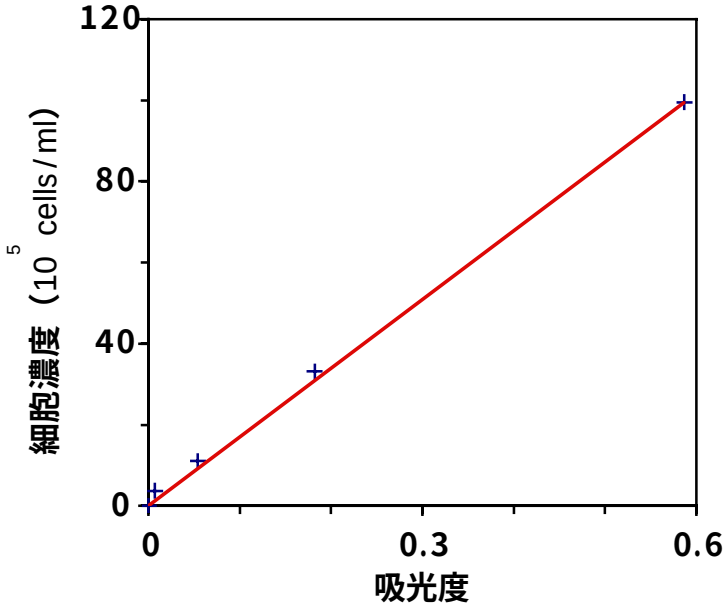


Figure 2　*Phaeocystis* sp.の細胞濃度と吸光度の相関性

高塩耐性の誘導

高塩耐性を誘導する手法としては遺伝子組み替え、例えばコリン酸化酵素遺伝子や *bbc*1 遺伝子などの導入を挙げることができる。これらの遺伝子は *Phaeocystis* sp.に存在するという報告はなされていない。仮にこれらの遺伝子を導入しても発現する確率は非常に低い。また高塩耐性遺伝子を導入された *Phaeocystis* sp.変異株が既存の生態系に及ぼす影響も無視できない。

そこで高塩濃度海水への馴化、紫外線照射、変異原物質などで突然変異をおこし高塩耐性を誘導することとした。

1. 高塩濃度海水への馴化による高塩耐性の誘導

高塩濃度海水への馴化は PES に含まれる無機塩・ビタミン類および海水の塩分量を通常の 1.5-3 倍まで高めたものを使用した。

方法は次の通りである；対数期にある *Phaeocystis* sp.を遠心（8,000×g、3 分）、古い培地を取り除き新鮮な PES-3PES に再懸濁する。吸光度が 0.1 となるよう希釈調整後、50ml マイヤーフラスコで振盪培養した。培養期間は 2 週間で細胞濃度測定と細胞の状態観察を行った（Flow diagram 2）

結果を Figure 3a-f に示す。マイクロプレートの周縁部で測定結果に大きなばらつきが見られた。おそらく中心部よりも乾燥速度が早いため測定値にばらつきが生じたものと推測される。そこでマイクロプレート周縁部の測定値を棄却した残り 60 サンプルで標準偏差を求めた。

1.5PES と 2PES で良好な結果が得られた。2.1PES は僅かだが増殖が見られたが、2.2PES 以上の高塩濃度では増殖しなかった。同時に顕微鏡で細胞の状態と長径を計測した（Table 1）。1.5PES で培養した *Phaeocystis* sp.の細胞は張りがあり葉緑体も大きくはっきりとしている。しかし塩濃度が高まるにつれて葉緑体の退色・減退が観察された。2.3PES 以上では収縮した細胞が至る所で観察され良好な細胞の割合が激減した。2.9PES 以上ではすべての細胞で葉緑体の完全な退色・減退と細胞の収縮が観察された。

Flow diagram 2　高塩濃度海水への馴化による高塩耐性の誘導

対数期にある *Phaeocystis* sp.

↓遠心（8,000×g , 3 分）

培地　　藻体

↓PES-3PES を加える

吸光度が 0.1 となるように再懸濁する

↓

50ml マイヤーフラスコで振盪培養する

Table 1　高塩濃度海水で馴化した *Phaeocystis* sp.の細胞長径（μm）

1.5 PES	5.8±0.57	(n=100)
2 PES	4.7±0.58	(n=100)
2.1 PES	4.1±0.45	(n=100)
2.2 PES	4.0±0.42	(n=100)
2.3 PES	3.9±0.41	(n=100)
2.4 PES	3.6±0.36	(n=100)
2.5 PES	3.3±0.21	(n=100)
2.6 PES	3.2±0.18	(n=100)
2.7 PES	3.1±0.16	(n=100)
2.8 PES	3.1±0.23	(n=100)
2.9 PES	3.1±0.17	(n=100)
3 PES	3.2±0.13	(n=100)

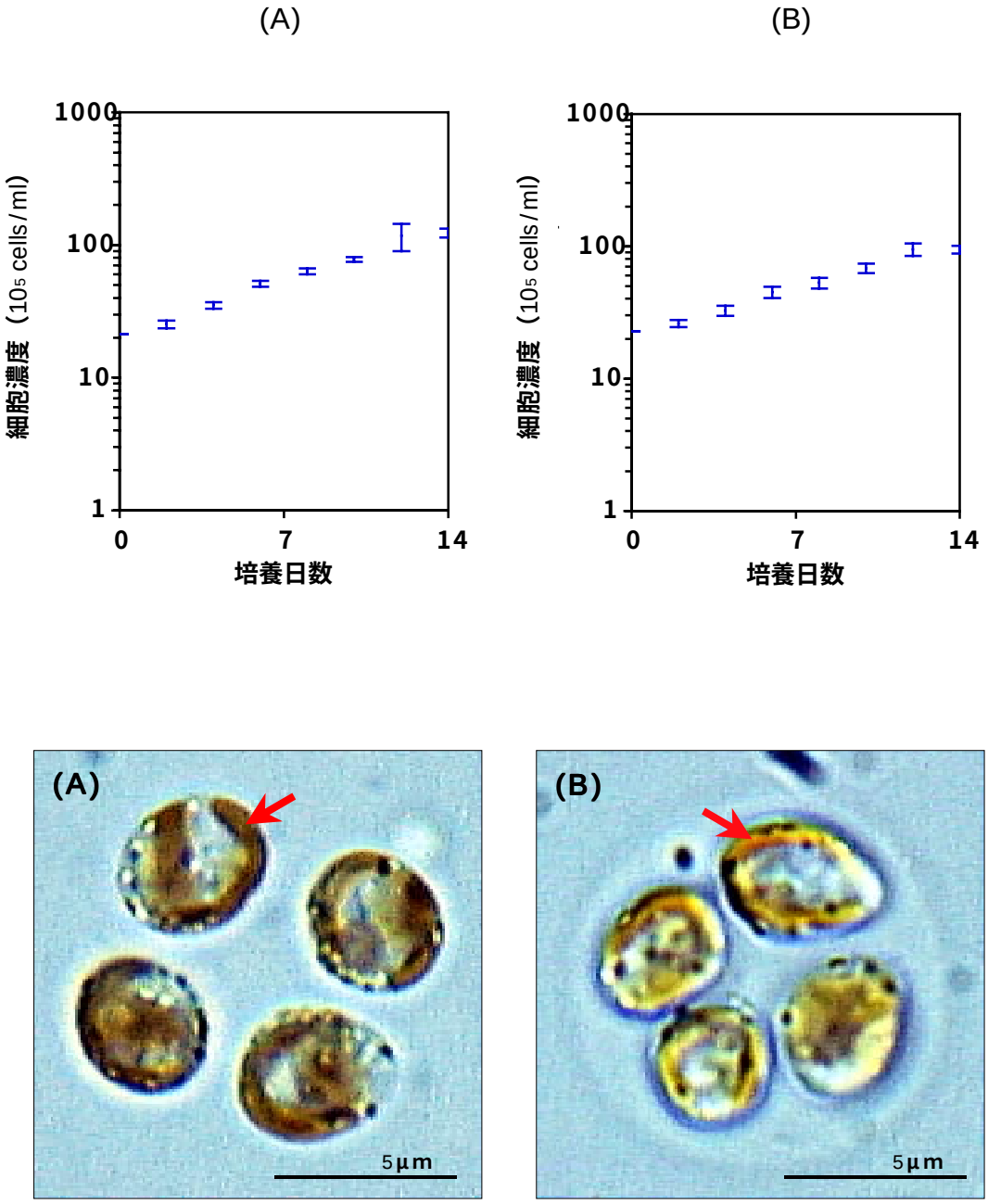


Figure 3a　高塩濃度海水で馴化した *Phaeocystis* sp.の増殖曲線と細胞の様子（A）：1.5PES（B）：2PES
（×1,000、図中の矢印は葉緑体）

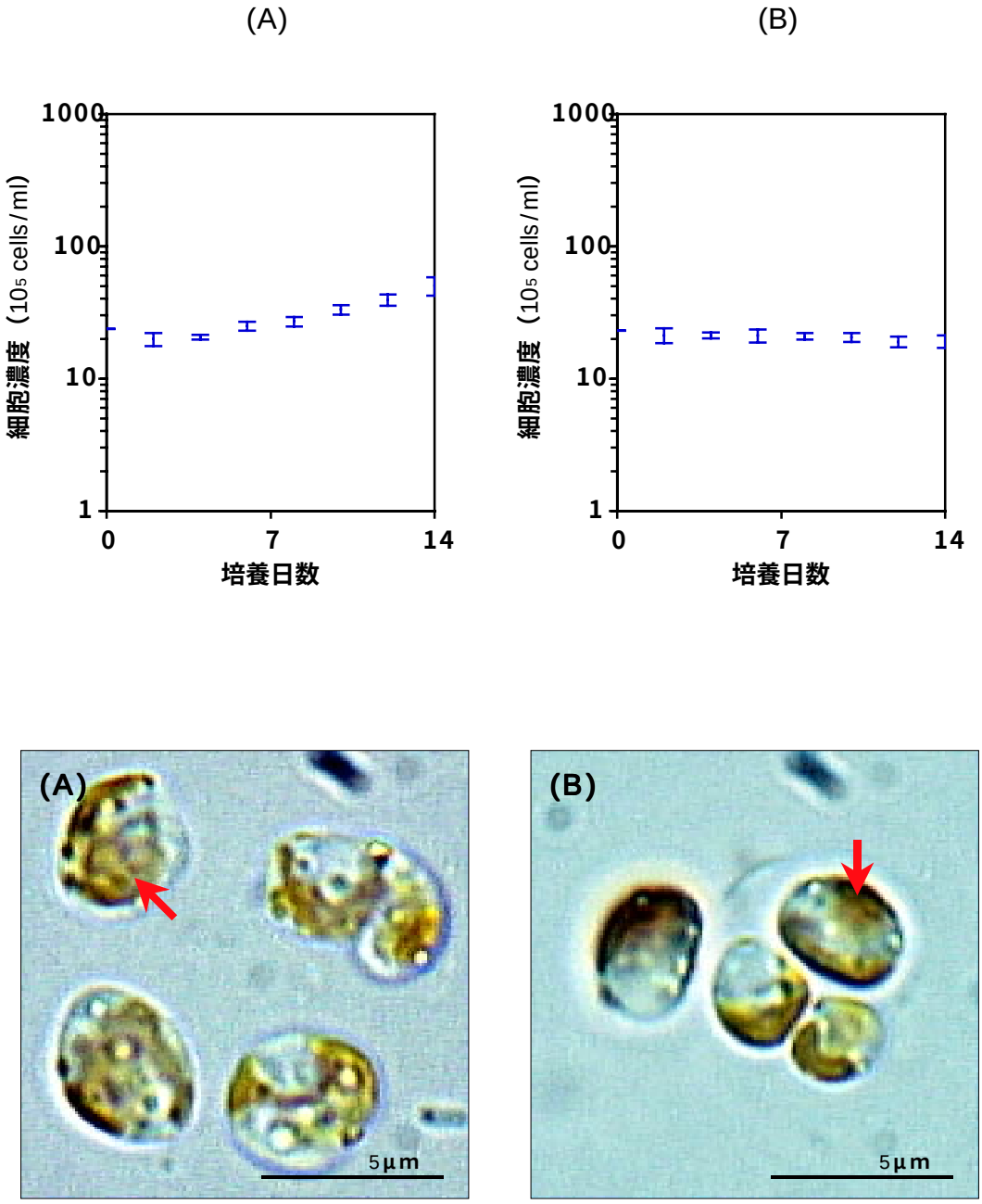


Figure 3b　高塩濃度海水で馴化した *Phaeocystis* sp.の増殖曲線と細胞の様子（A）：2.1PES（B）：2.2PES（×1,000、図中の矢印は葉緑体）

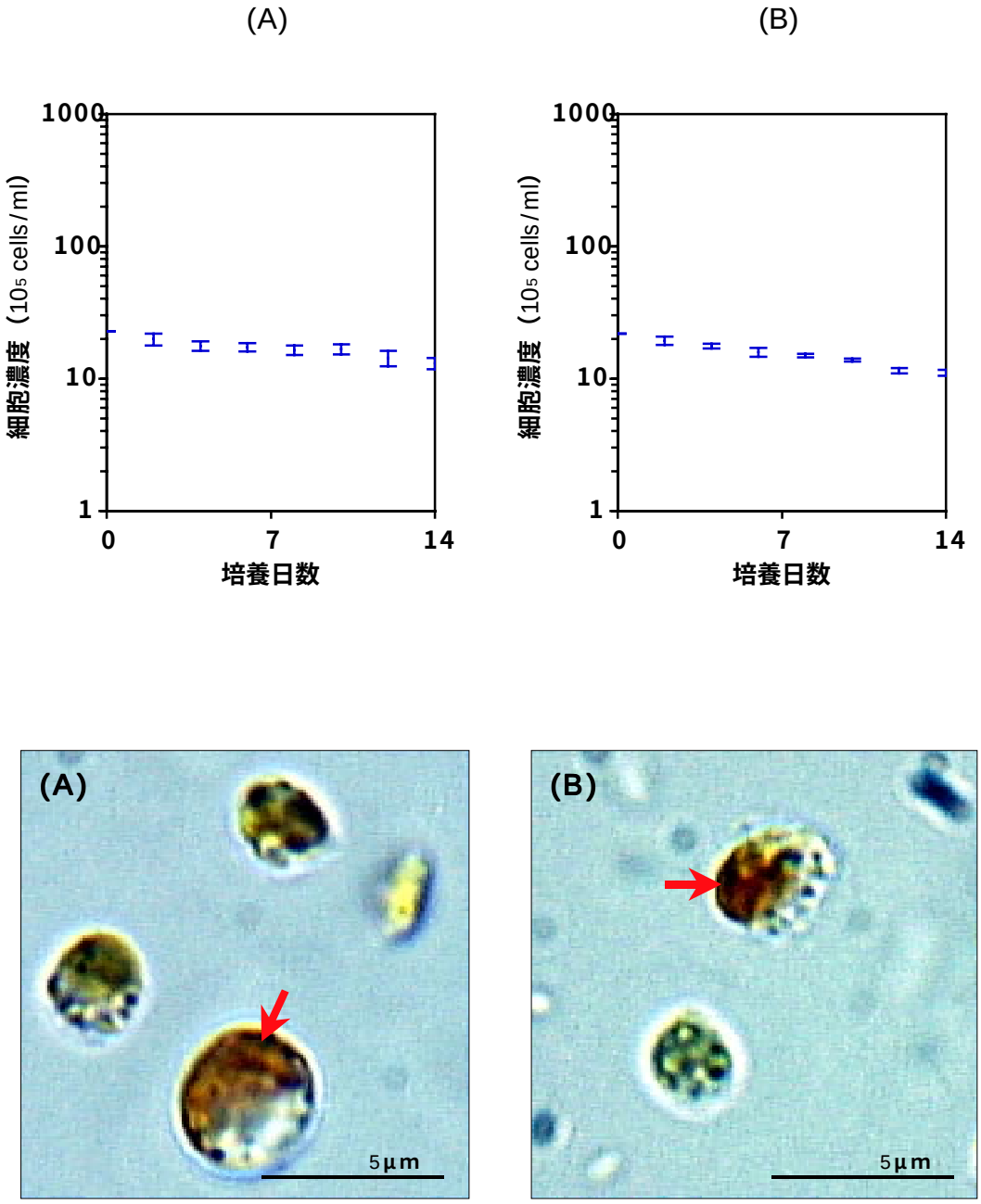


Figure 3c　高塩濃度海水で馴化した *Phaeocystis* sp.の増殖曲線と細胞の様子（A）：2.3PES（B）：2.4PES（×1,000、図中の矢印は葉緑体）

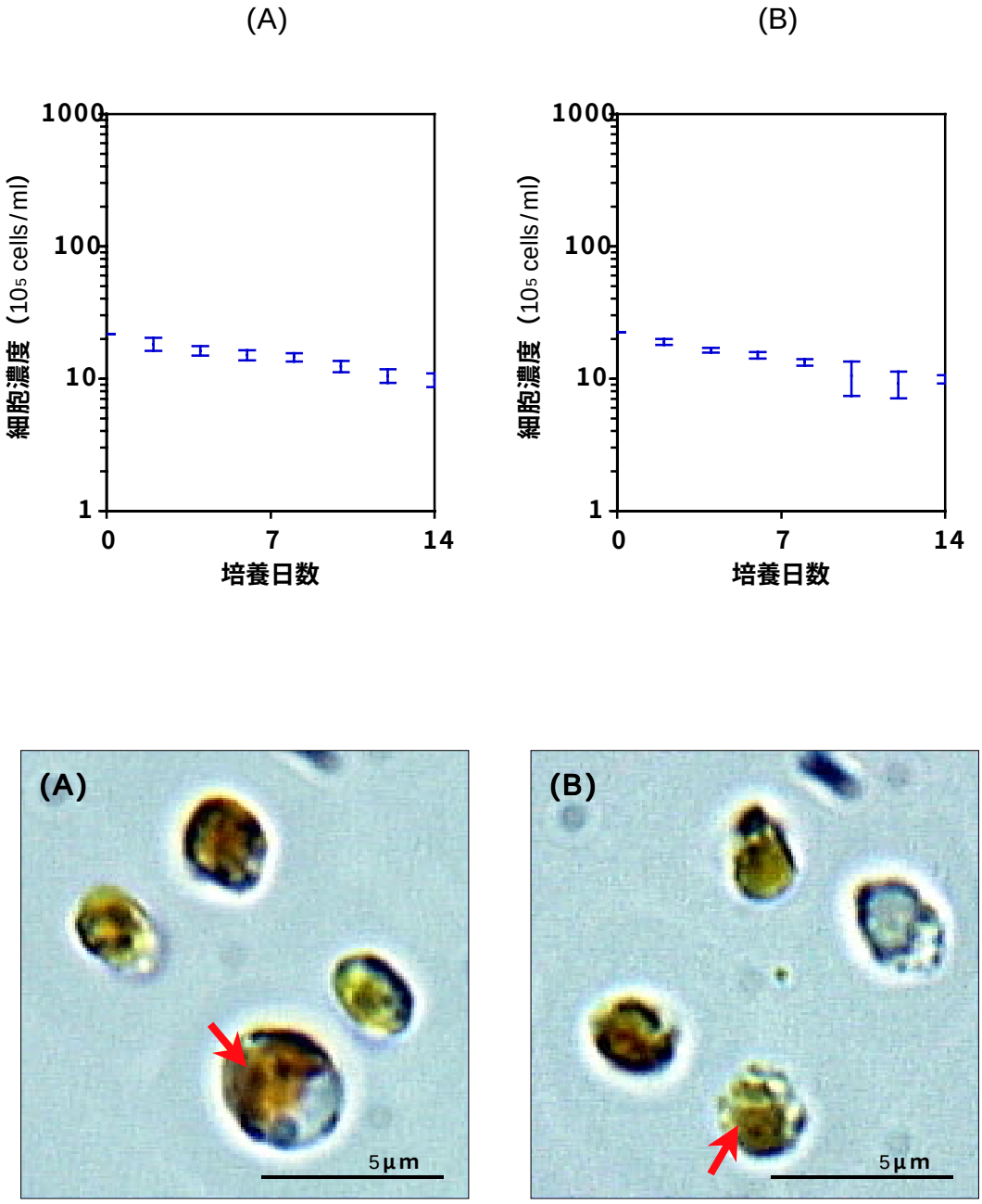


Figure 3d　高塩濃度海水で馴化した *Phaeocystis* sp.の増殖曲線と細胞の様子（A）：2.5PES（B）：2.6PES（×1,000、図中の矢印は葉緑体）

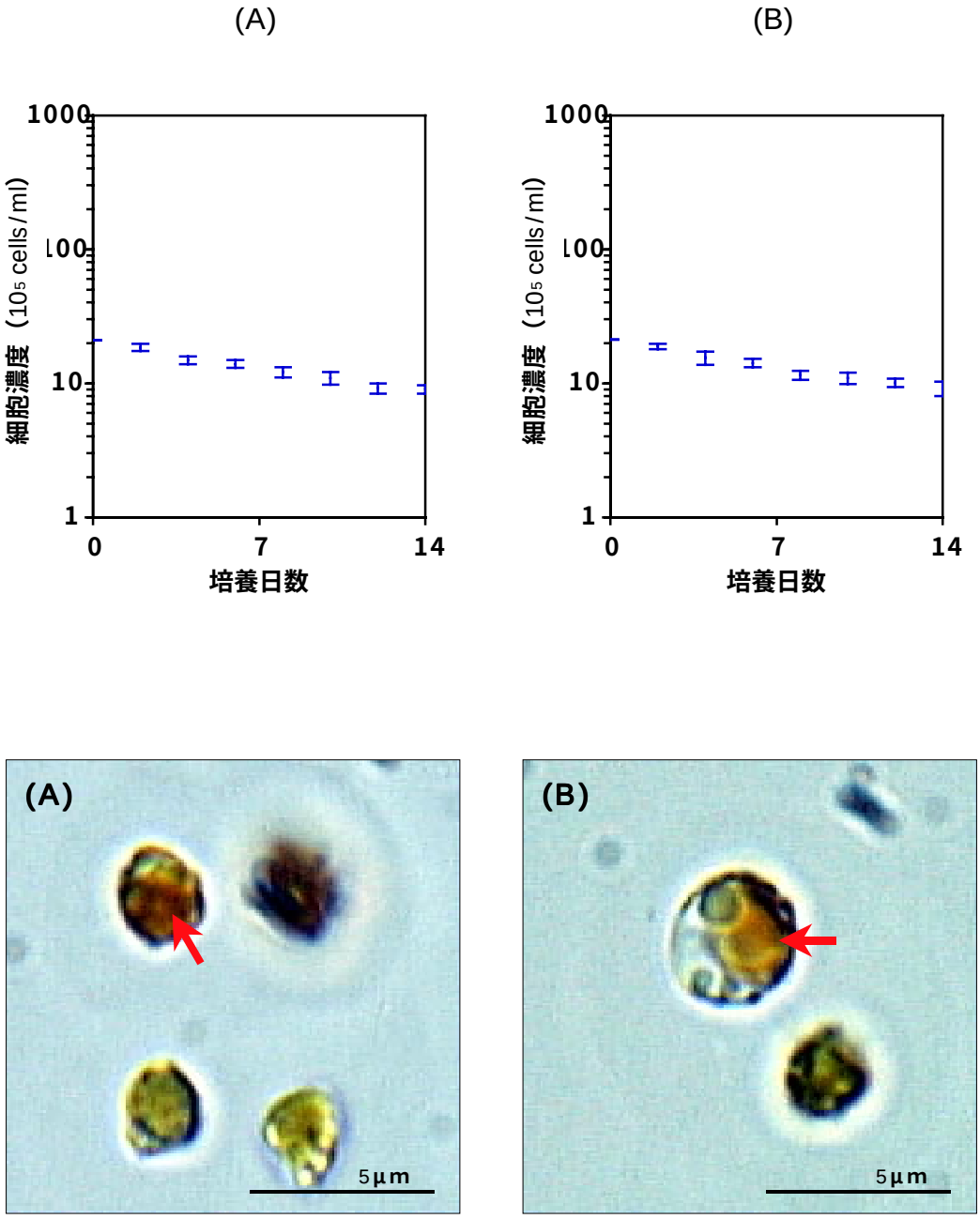


Figure 3e　高塩濃度海水で馴化した *Phaeocystis* sp.の増殖曲線と細胞の様子（A）：2.7PES（B）：2.8PES（×1,000、図中の矢印は葉緑体）

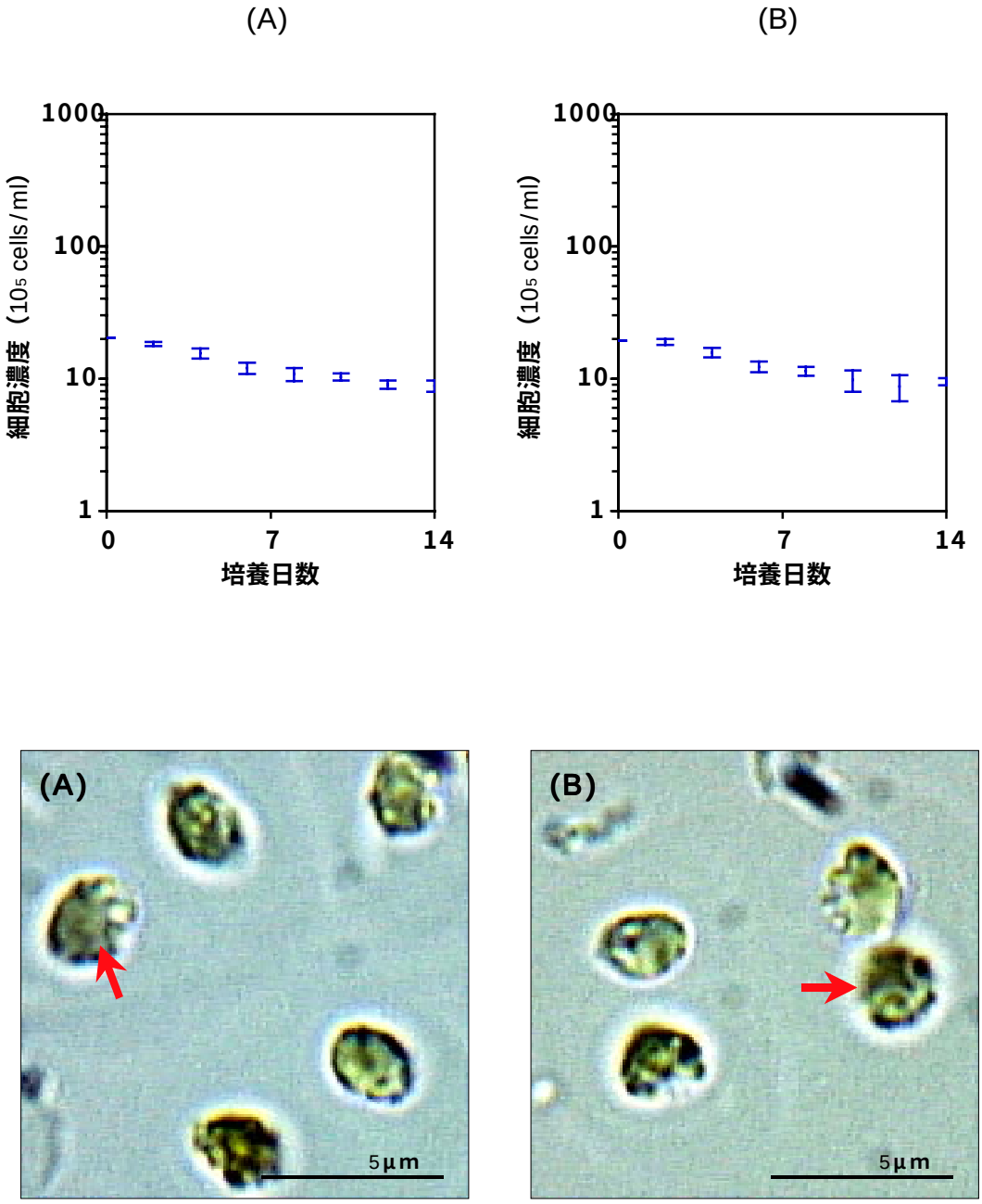


Figure 3f　高塩濃度海水で馴化した *Phaeocystis* sp.の増殖曲線と細胞の様子（A）：2.9PES（B）：3PES（×1,000、図中の矢印は葉緑体）

2. 紫外線照射による高塩耐性変異株の作出

2.1 ReproSet を用いた高塩耐性変異株の作出

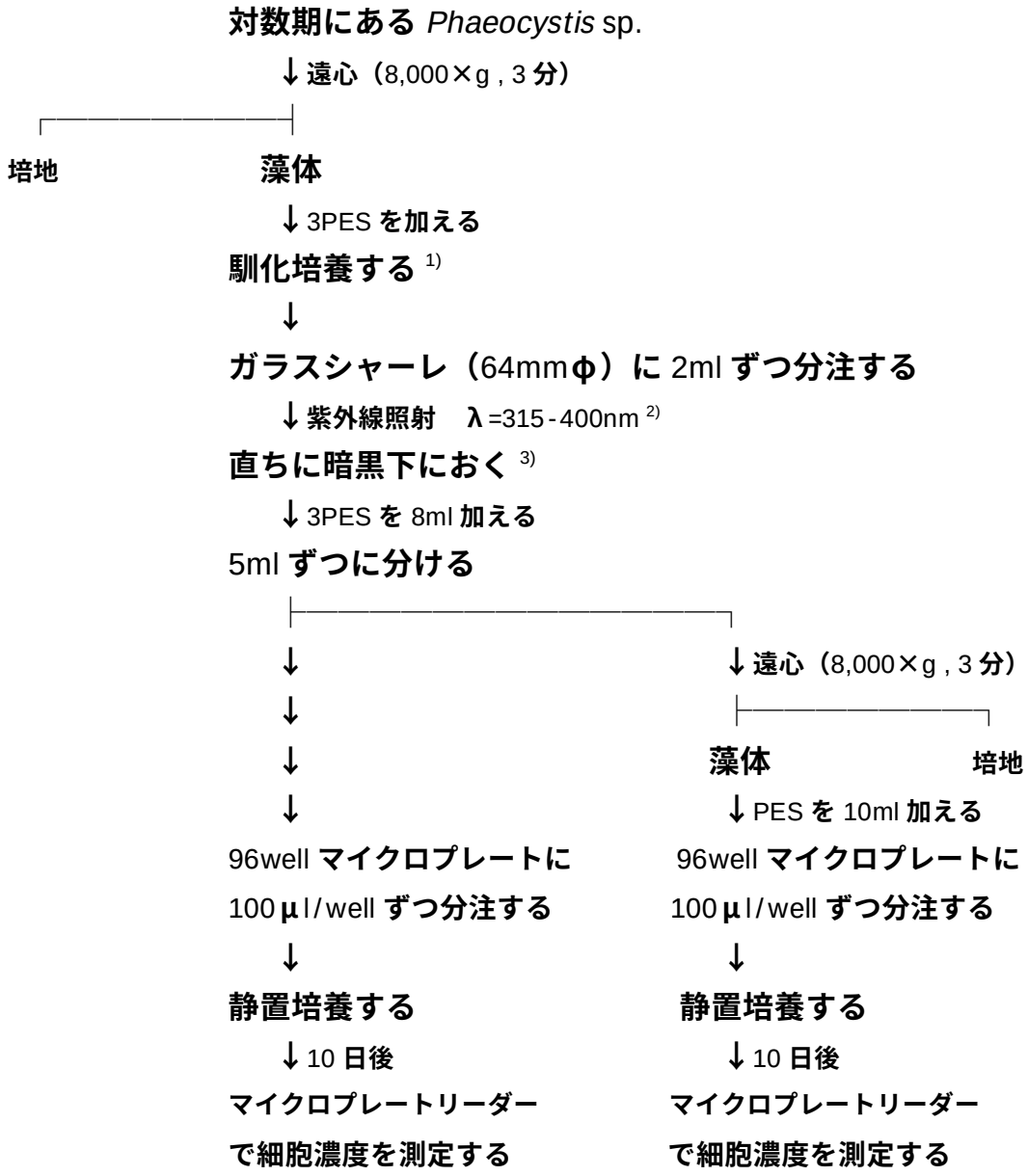
紫外線照射による高塩耐性変異株の作出は高塩濃度海水への馴化と平行して行った。

始めに 3PES での馴化期間と紫外線照射時間について検討した。方法は次の通りである；対数期にある *Phaeocystis* sp.を遠心（8,000×g、3 分）、古い培地を取り除き新鮮な 3PES に再懸濁する。0.5-7 日間の馴化培養後ガラスシャーレに 2ml ずつ分注する。紫外線照射は ReproSet（λ=315-400nm, amersham pharmacia biotech）にて 0.5-60 分間行った。照射後直ちに暗黒下（12 ・ 24 時間）に置く。暗期終了後 3PES を加えて 10ml として二分する。一方を 96well マイクロプレートに 100μl/well ずつ分注する。残りは遠心（8,000×g、3 分）、3PES を取り除き新鮮な PES を等容加えて 100μl/well ずつ分注して静置培養した。培養期間は 10 日間で最終日に細胞濃度を測定した（Flow diagram 3a）。

その結果馴化培養 2 日目あたりから退色が確認され、4 日目には完全に退色して白色となった。よって 3PES での馴化期間は最長 2 日間とした。この時点で 3 日目以降のサンプルは廃棄した。0.5-2 日間の馴化培養を終えた *Phaeocystis* sp.は紫外線照射を 0.5-60 分間行った。3PES で培養したグループはまったく増殖しなかった。しかし照射後 PES で培養したグループは 60 分間の照射にもかかわらず生存していた。3PES で培養したグループが死滅した原因は紫外線照射ではなく高塩濃度と推測した。

紫外線照射により損傷を受けた DNA は可視光により損傷部位を修復してしまう。これを光修復と呼ぶ。この光修復を防ぐため照射後直ちに 12 時間あるいは 24 時間の暗期とした。その結果 12 時間の増殖が良好であった。今後の操作において暗期を 12 時間とした。

Flow diagram 3a　ReproSet を用いた高塩耐性変異株の作出



1) 馴化培養の期間は 0.5-7 日間である。

2) 光源からシャーレまでの距離は約 15cm、照射時間は 0.5-60 分間である。

3) 12 時間と 24 時間で行った。

2.2 NTFM-20 を用いた高塩耐性変異株の作出

60 分間の紫外線照射にもかかわらず生存していたのでより短波長の紫外線光源（High Performance Ultraviolet Transilluminator NTFM-20, UVP；λ=302nm）を用いた。また培地により十分な紫外線が藻体まで到達していないと考え *Phaeocystis* sp.をメンブレンフィルターに載せてから紫外線照射を行った。

方法は次の通りである；対数期にある *Phaeocystis* sp.5ml をメンブレンフィルターに緩く吸引しながら載せる。直ちに 1.5%寒天平板培地（以下 PES Agar と略す）にフィルターごと載せて NTFM-20 にて 10-600 秒間紫外線を照射した。照射後直ちに暗黒下に置く。暗期終了後フィルター上の Phaeocystis sp. をかきとり PES30ml に再懸濁して振盪を行った。培養期間は 20 日間で最終日に成長の有無を培養物の色調で確認した。（Flow diagram 3b）

その結果 10-600 秒間の紫外線照射を行ったところすべてにおいて PES での生育が確認できた。とりわけ 600 秒＞300 秒＞180 秒の順で生育が良好であった。これら生育の良好であった 3 株をそれぞれ UM180 株、UM300 株、UM600 株とした。

UM180 株、UM300 株、UM600 株をそれぞれ PES、1.5PES、2PES で静置培養して増殖速度を測定した。

方法は次の通りである；UM180 株、UM300 株、UM600 株を遠心（8,000×g、3 分）、古い培地を取り除き新鮮な PES-2PES10ml に再懸濁する。96well マイクロプレートに 100μl/well ずつ分注して静置培養を行った。培養期間は 8 日間で細胞濃度を測定した（Flow diagram 3c）。

その結果 302nm で紫外線照射したサンプルのなかでとりわけ UM180 株、UM300 株、UM600 株は生長がよかったことから突然変異が起こったのではないかと推測したが 2PES では生育不可能であった（Figure 4a-c）。

この段階で *Phaeocystis* sp.が高塩濃度海水で馴化しなくても 1.5PES で十分生育することが判明した。よってこれ以降の検討はすべて 1.5PES で培養した株で行った。

Flow diagram 3b　NTFM-20 を用いた高塩耐性変異株の作出-1

対数期にある *Phaeocystis* sp.5ml

↓メンブレンフィルター[1)]で緩く吸引濾過

培地　　藻体

↓

PES Agar にフィルターごと載せる

↓紫外線照射　λ=302nm[2)]

直ちに暗黒下におく

↓

フィルター上の *Phaeocystis* sp.をかきとる

↓50ml マイヤーフラスコに PES を 30ml 加える

かきとった *Phaeocystis* sp.を懸濁する

↓

振盪培養する

↓20 日後

色調による生長の確認

1) ADVANTEC MIXED CELLULOSE ESTER MEMBRANE FILTER(Poresize:1.0 μm, Diamater:47mm)

2) 光源からシャーレまでの距離は約 1cm、照射時間は 10-600 秒間である。

Flow diagram 3c　NTFM-20 を用いた高塩耐性変異株の作出-2

UM180, UM300, UM600 10ml

↓遠心（8,000×g , 3 分）

培地　　藻体

↓PES-2PES を 10ml 加える

マイクロプレートに 100μl/well ずつ分注する

↓

静置培養する

↓

マイクロプレートリーダーで細胞濃度を測定する

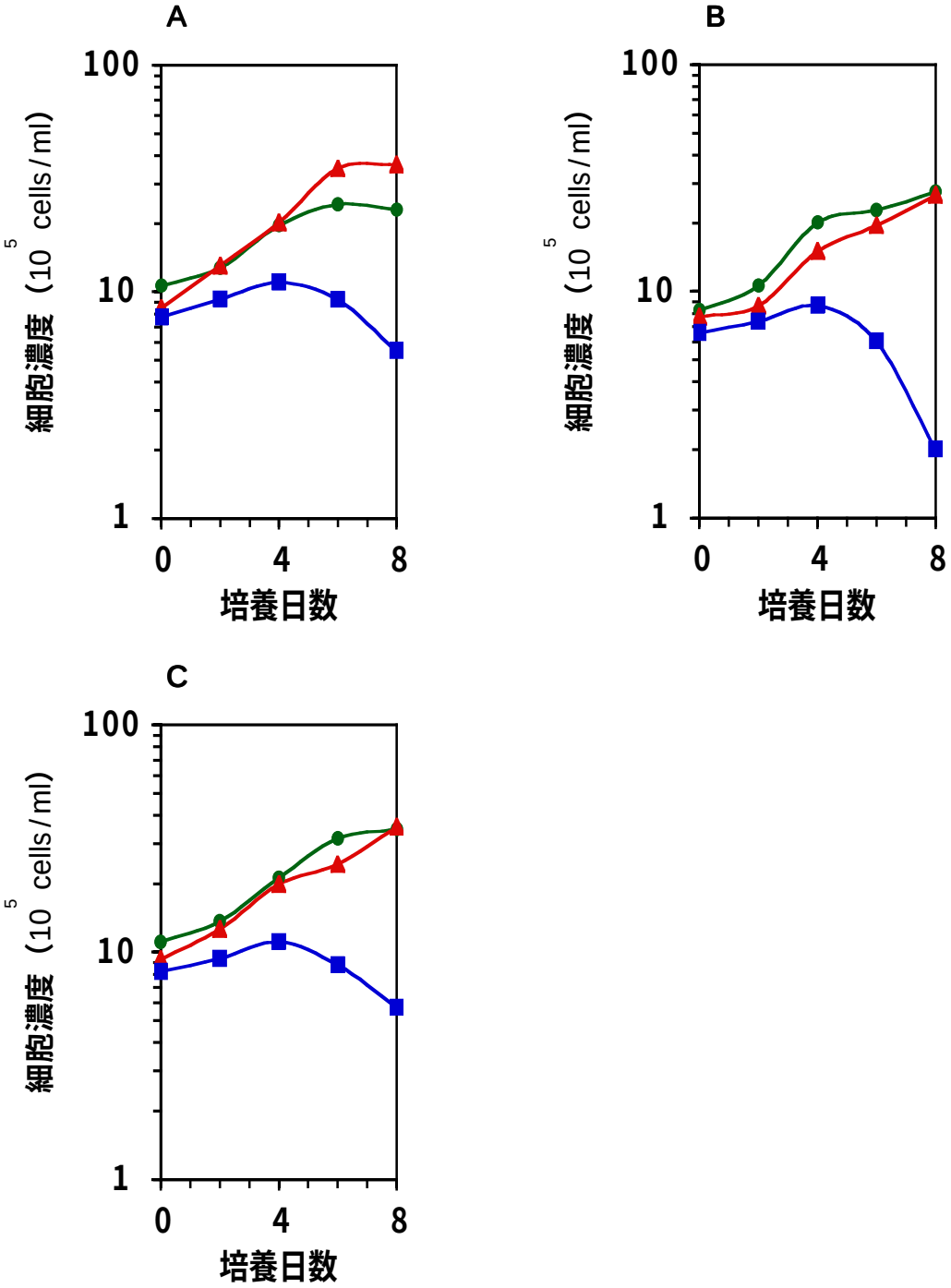


Figure 4 紫外線照射により得た UM180 株（A）、UM300 株（B）、UM600 株（C）を PES（●）、1.5PES（▲）、2PES（■）で培養したときの増殖曲線

2.3 GL-15 を用いた高塩耐性変異株の作出

更に短波長の紫外線光源として殺菌灯（GL-15, NEC；λ=240-260nm）を用いて 1-90 分間照射した。

方法は次の通りである；1.5PES で培養した対数期にある *Phaeocystis* sp.5ml をメンブレンフィルターに緩く吸引しながら載せる。直ちに 1.5PES Agar にフィルターごと載せて GL-15 にて 1-90 分間紫外線を照射した。照射終了後直ちに *Phaeocystis* sp.が PES Agar と接するようにフィルターを裏返し暗黒下（12 時間）に置く。暗期終了後静置培養した（Flow diagram 3d）。

その結果 1 分間の紫外線照射ではコントロールと大差なく生長した。3 分間を越えると生存率は激減した。生存率は 3 分で約 20%、10 分で 10%以下となった。30 分以上の照射ではすべて死滅した。これらのことより殺菌灯を用いた紫外線照射は 3 分とした。

方法は次の通りである；1.5PES で培養した対数期にある *Phaeocystis* sp.5ml をメンブレンフィルターに緩く吸引しながら載せる。直ちに 3PES Agar にフィルターごと載せて GL-15 にて 3 分間紫外線を照射した。照射終了後直ちに *Phaeocystis* sp.が 3PES Agar と接するようにフィルターを裏返し暗黒下に置く。暗期終了後静置培養した（Flow diagram 3e）。

約 200 プレートを用いて高塩耐性株のセレクションを行った。しかし高塩耐性変異株は得られなかった。

Flow diagram 3d　GL-15 を用いた高塩耐性変異株の作出-1

1.5PES で培養した対数期にある *Phaeocystis* sp.5ml

↓メンブレンフィルター [1)]で緩く吸引濾過

培地　　藻体

↓

1.5PES Agar にフィルターごと載せる

↓紫外線照射　λ=240-260nm [2)]

藻体が 1.5PES Agar と接するようフィルターを裏返す [3)]

↓

直ちに暗黒下におく

↓

静置培養

1) ADVANTEC MIXED CELLULOSE ESTER MEMBRANE FILTER（Poresize:1.0μm, Diamater:47mm）

2) 光源からシャーレまでの距離は約 50cm、照射時間は 1-90 分間である。

3) 藻体を乾燥から防ぐために行った。

Flow diagram 3e　GL-15 を用いた高塩耐性変異株の作出-2

1.5PES で培養した対数期にある *Phaeocystis* sp.5ml

↓メンブレンフィルターで緩く吸引濾過

培地　　藻体

↓

3PES Agar にフィルター [1)]を載せる

↓紫外線照射　λ=240-260nm [2)]

藻体が 3PES Agar と接するようフィルターを裏返す [3)]

↓

直ちに暗黒下におく

↓

静置培養する

1) 光源からシャーレまでの距離は約 50cm、照射時間は 3 分間である。

2.4 VL-6C を用いた高塩耐性変異株の作出

一度におよそ 1,000 サンプルを紫外線照射しようとするとメンブレンフィルターに載せてから照射を行っていては時間も手間もかかりすぎる。そこでマイクロプレートを用いて紫外線照射を行った。培地による紫外線の吸収を考慮して 20μl/well で照射を行い暗期解除後に 3PES を加えて 100μl/well とした。また紫外線光源も更に短波長（VL-6C, VILVER LOURMAT；λ=254nm）を用いた。方法は次の通りである；1.5PES で培養した対数期にある *Phaeocystis* sp.2ml を遠心（8,000×g、3 分）、古い培地を取り除き 2ml の新鮮な 3PES に再懸濁する。96well マイクロプレートに 20μl/well ずつ分注して VL-6C にて 3 分間紫外線を照射した。照射終了後直ちに暗黒下に置く。暗期終了後静置培養した。培養期間は 10 日間で最終日に細胞濃度を測定した（Flow diagram 3f）。

約 10,000 サンプルに対して高塩耐性のセレクションを行ったが生長したサンプルはなかった。

Flow diagram 3f　VL-6C を用いた高塩耐性変異株の作出

1.5PES で培養した対数期にある *Phaeocystis* sp.2ml

↓遠心（8,000×g , 3 分）

培地　　藻体

↓3PES を 2ml 加える

96well マイクロプレートに 20μl/well ずつ分注する

↓紫外線照射　λ=254nm [1)]

直ちに暗黒下におく

↓　3PES を 80μl/well 加える

静置培養する

↓10 日後

マイクロプレートリーダーで細胞濃度を測定する

1) 光源からの距離は約 1cm、照射時間は 3-7 分間である。

3. 変異原物質による高塩耐性の誘導

変異原物質には亜硝酸、ヒドロキシルアミン、アルキル化剤そしてアクリジン誘導体などがある。一般に亜硝酸やヒドロキシルアミンは *Escherichia coli*（*E.coli*；大腸菌）などの原核生物に対しては非常に有用な変異誘発剤である。しかし *Phaeocystis* sp.のような真核生物には反応に必要な化学的条件を作りにくいとされている（Malacinski, G.M. and Freifelder, D. 1998）。

本研究においてはアルキル化剤である Ethyl methanesulfonate（EMS；メタンスルホン酸エチル）、Methyl methanesulfonate（MMS；メタンスルホン酸メチル）そして *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine（MNNG；ニトロソグアニジン）を使用した。方法は Dolling, J.A.らが酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて行った操作方法を一部改編した（Dolling, J.A. *et al.* 1999）。

方法は次の通りである；1.5PES で培養した対数期にある *Phaeocystis* sp.を遠心（8,000×g、3 分）、古い培地を取り除き 20mM Phosphate buffer solution（pH=7.0、塩濃度 4.5%）（PBS；リン酸緩衝液）9.9ml に再懸濁する。それを 50ml マイヤーフラスコにとり Dimethyl sulfoxide（DMSO；ジメチルスルホキシド）に溶解した変異原物質を 0.1ml 添加して 24 時間の振盪を行う。振盪終了後に遠心（8,000×g、3 分）、変異原物質が入った 20mM PBS を取り除き 10%(w/v)$Na_2S_2O_3$･$5H_2O$（塩濃度 4.5%）10ml にて変異原物質を中和・無毒化する。5-10 分間室温にて放置した後遠心（8,000×g、3 分）、10%(w/v)$Na_2S_2O_3$･$5H_2O$（塩濃度 4.5%）を取り除き 20mM PBS（pH=7.0、塩濃度 4.5%）10ml にて *Phaeocystis* sp.を洗浄する。5-10 分間室温にて放置した後遠心（8,000×g、3 分）、20mM PBS（pH=7.0、塩濃度 4.5%）を取り除く。この操作を 2 回繰り返した後、新鮮な 3PES10ml に再懸濁する。96well マイクロプレートに 100μl/well ずつ分注して静置培養した。培養期間は 10 日間で最終日にマイクロプレートリーダーで吸光度を測定して生存率を算出した。（Flow diagram 4）。

Phaeocystis sp.の初期濃度は吸光値が 0.2 となるように調整した。コントロールは変異原物質を添加せずに同様の操作を行った。生存率は(2)式にて算出した；

$$\text{生存率}(\%) = (A_S - A_0) / (A_C - A_0) \times 100 \qquad (2)$$

このとき、A_S=*Phaeocystis* sp.の吸光値、A_C=コントロールの吸光値、A_0=ブランクの吸光値である。

まず始めに操作方法の正確性を確認すべくコントロールと空試験で行った。

コントロールと空試験それぞれの生存率において有意差検定を実施した。検定法は Student's *t*-test と Welch's *t*-test である。その結果両群間に有意差は見いだされなかった。

変異原物質を添加して同様の操作を行った。変異原物質の添加濃度は終濃度で EMS と MMS が 0.1mM-300mM、MNNG が 1μM-1mM とした。変異原物質は DMSO に溶解、DMSO の終濃度は 1%である。

その結果を Figure 5 に示す。EMS は 0.1-10mM までの生存率にかなりのばらつきが見られた。とりわけ 1-3mM 添加したときの生存率が 100%を超える値となった。EMS が 10mM 以上存在すると *Phaeocystis* sp.の生存率は有意に減少した。MMS も EMS と同様の傾向が見られた。しかし MMS が 3mM 以上存在すると *Phaeocystis* sp.の生存率は有意に減少した。MNNG の場合 30μM まではコントロールとの間に有意差は見いだされなかった。MNNG が 30μM 以上存在すると生存率が有意に減少した。変異原物質をどれくらい添加すれば突然変異株がもっとも多く取得できるか未知である。そこで生存率が 20%となる濃度を変異原物質による処理濃度に設定することとした。言い換えれば 80% Lethal concentration (LC_{80}；80%致死濃度)である。Figure 5 より各変異原物質の LC_{80} は EMS が 30mM、MMS が 20mM そして MNNG が 150μM であった。この濃度でそれぞれ約 10,000 プレート処理したが 3PES はおろか 2PES で生育する変異株の取得にも至らなかった。

Flow diagram 4　変異原物質による高塩耐性の誘導

対数期にある *Phaeocystis* sp.10ml

↓**遠心**（8,000×g , 3 **分**）

培地　　**藻体**

↓20mM PBS（pH=7.0 , Salinity 4.5%）*を 9.9ml **加える**

↓Mutagen（in DMSO）*を 0.1ml **添加する**

振　盪（24 **時間**）

↓**遠心**（8,000×g , 3 **分**）

Mutagen in 20mM PBS　　**藻体**

↓10%(w/v) $Na_2S_2O_3$・$5H_2O$(Salinity 4.5%)*を 10ml **加える**

中和・無毒化する

↓**遠心**（8,000×g , 3 **分**）

10%(w/v) $Na_2S_2O_3$・$5H_2O$　　**藻体**

↓20mM PBS（pH=7.0 , Salinity 4.5%）*

↓を 10ml **加える**

洗浄する

↓**遠心**（8,000×g , 3 **分間**）

2 **回繰り返す**

20mM PBS　　**藻体**

↓1.5PES を 10ml **加える**

再懸濁する

↓

96well **マイクロプレートに** 100μl/well **ずつ分注する**

↓10 **日後**

マイクロプレートリーダーにて吸光度を測定する

↓

生存率を算出

*空試験では人工海水を使用して同様の操作を行った。

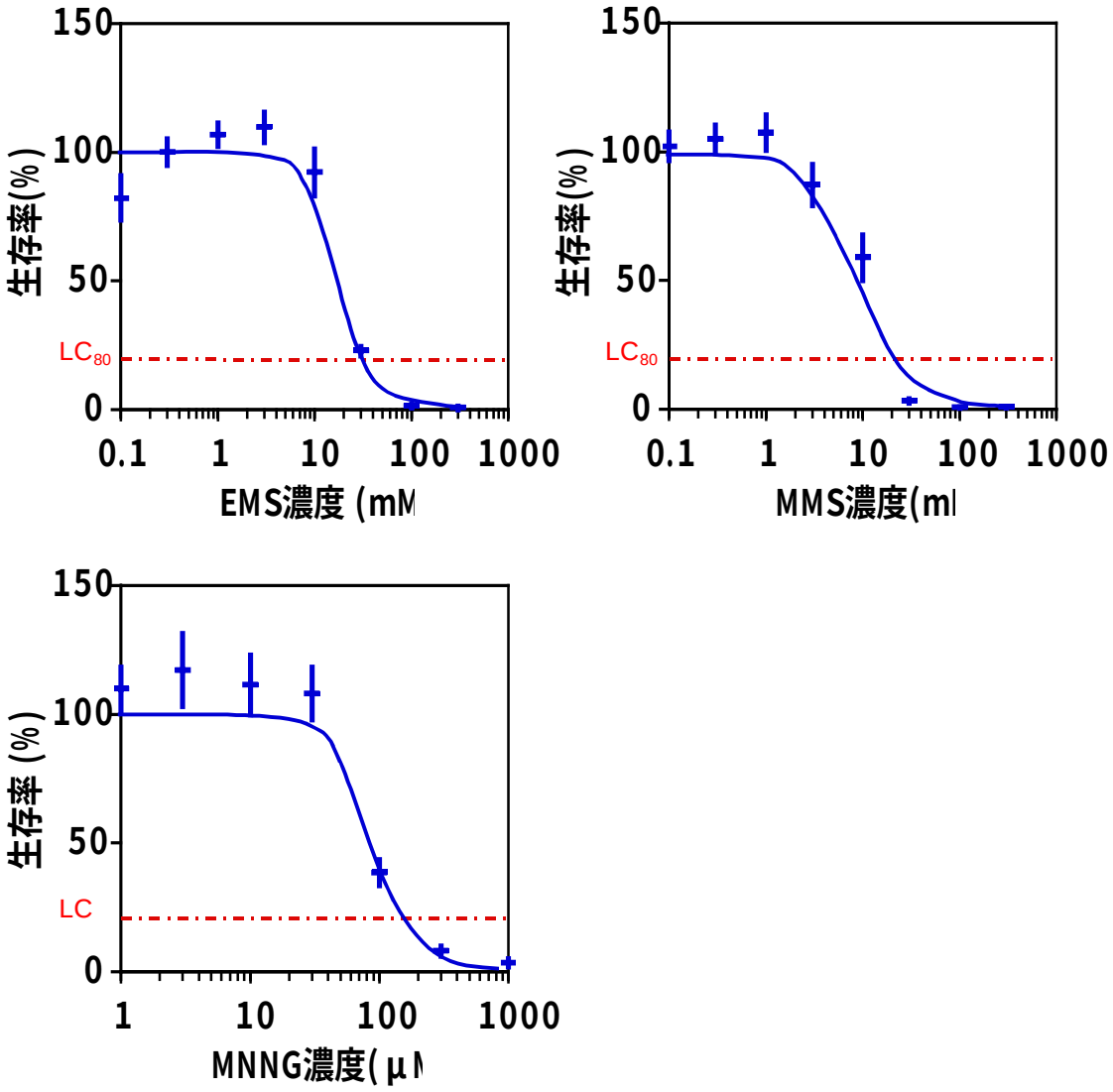


Figure 5　アルキル化剤を添加したときの *Phaeocystis* sp.の生存率

【 考察 】

一般に植物は浸透圧に関係する溶質を細胞質や液胞内で合成する速度調節を細胞膜に存在する膨圧検出器で行っている。この合成速度はかなり遅いが極端な浸透圧下や浸透圧が変化しやすい環境に置かれた植物が膨圧を調節するのには重要である。例えば極めて高い塩濃度で生育する植物は膨圧を維持するため細胞内の溶質濃度を非常に高く保つ。これは Na^+や K^+が高濃度に蓄積されることで生命維持に必須な酵素の活性に影響を及ぼすのを防ぐためである。植物は適合溶質と呼ばれる特殊な有機化合物をつくる。適合溶質にはポリヒドロキシ化合物（グリセロール、マンニトール、ソルビトール、オノニトールそしてトレハロース）、アミノ酸のプロリンそしてアミノ酸の N-メチル化誘導体であるグリシンベタインなどが知られている。これらの適合溶質は細胞内に高濃度(0.5M)存在していても細胞の代謝には影響を及ぼすことはない(Alberts, B. *et al*. 1991)。

単細胞緑藻 *Dunaliella* はイスラエルの死海、アメリカのグレートソルト・レイクそして西オーストラリアのピンク・レイクなどに生息する。その生息環境は一般の生物が生存することができない飽和塩湖である。しかし *Dunaliella* は細胞内に適合溶質として乾燥重量あたり 80%のグリセロールを蓄積する。同時に折りたたまれた細胞膜を伸縮して細胞容積を変えることで急激な浸透圧変化に対応する。これにより 0.5M から 3M までの広範囲の塩濃度でも生育することが可能である(Ben-Amotz, A. and Avron, M. 1980)。

本研究において *Phaeocystis* sp.への高塩耐性誘導を目的として高塩濃度海水への馴化、紫外線照射そして変異原物質を用いて実験を行った。

高塩濃度海水への馴化による高塩耐性の誘導で海水の 1.5 倍の塩濃度で生育する *Phaeocystis* sp.変異株を取得した。しかし 2 倍以上の塩濃度では塩濃度と比例して葉緑体の収縮・減退・退色が確認された。*Phaeocystis* sp.を含む光合成生物は太陽光エネルギーを葉緑体内で電気化学エネルギーに転換して生命活動に利用している。その葉緑体が退色・減退することは生命活動の停止を意味する。単細胞紅藻の *Porphyridium* や *Rhodella* は塩濃度の変動に対して順応性を示す。これらの単細胞紅藻は海岸の岩肌、マングローブ林の砂地や汽水域などに広く分布する。その分布域は潮間帯上部にあるため干潮時には天日にさらされる、また岩肌では潮だまりができる。このような環境下で生育しているため遺伝情報に塩耐性がエンコードされていると推測されている。一方 *Phaeocystis* sp.は沿岸部に分布しており赤潮の原因藻の一種とされている（Bode, A. *et al*. 2002, Chen, Y.Q. *et al*. 2002, Madhupratap, M. *et al*. 2000）。その生育環境において乾燥や急激な塩濃度の変動は皆無である。推測

するに *Phaeocystis* sp.は進化の過程で *Porphyridium* や *Rhodella* が持つのと同じ塩耐性を取得した。しかし生育環境に変動が少ないことからその遺伝情報が発現することはなかった。今回 1.5PES で馴化したことがトリガーとなりそれが発現したのであろう。

紫外線照射による高塩耐性の誘導は波長 315-400nm、302nm、240-260nm そして 254nm で行った。しかしどの紫外線光源においても 1.5PES 以上で生育する *Phaeocystis* sp.変異株の取得には至らなかった。*Phaeocystis* sp.が生産する外被多糖により大半の紫外線が吸収されたためかもしれない。紫外線による突然変異のメカニズムは次の通りである；紫外線照射を受けると DNA 鎖中の隣接しているピリミジン残基内の 5-6 位の二重結合が外れて 5 位、6 位どうしで結合してシクロブタン環を形成しシクロブタン型二量体となる。または隣接するピリミジン残基内の 6-4 位で結合して(6-4)光生成物となる。その結果二本鎖構造がゆがめられる。1,000J/m^2以下の低線量の紫外線照射による DNA 損傷は 80-90%がシクロブタンピリミジン二量体である。とりわけチミン二量体が多い。照射線量の増加にともない(6-4)光生成物の割合が多くなる。50,000J/m^2ではチミン二量体と(6-4)光生成物の割合が等しくなる。中でもチミン-シトシン(6-4)光生成物の生成が多くなる（Drake, J.W. 1970, 石川辰夫 1985, Malacinski, G.M. and Freifelder, D. 1998, 八木孝司・武部啓 1993, Stanier, R.Y. et al. 1986, Tamarin, R.H. 1988, Willett, K.L. *et al*. 2001）。

変異原物質による高塩耐性の誘導はアルキル化剤である EMS、MMS そして MNNG を用いても 2PES 以上で生育する *Phaeocystis* sp.変異株の取得には至らなかった。アルキル化剤による突然変異のメカニズムは次の通りである；アルキル化剤は DNA の多くの部位をアルキル化する。アルキル化剤は他にニトロサミン、*N*-メチル-*N*-ニトロソ尿素そしてエタンスルホン酸エチルなどがある。変異誘発という観点で最も重要なのは、プリン-ピリミジンの水素結合に関与する酸素にアルキル基（メチル基やエチル基）を付加することである。その結果 *O*-6-アルキルグアニジンや *O*-4-アルキルチミンが作られて正常な水素結合ができなくなる。よってアデニン-チミン塩基対がグアニン-シトシン塩基対に、グアニン-シトシン塩基対がアデニン-チミン塩基対にトランジションする。またアルキル化剤は DNA 鎖中のプリン環を多段階反応によって除去する。この反応はプリン環のアルキル化に始まりプリン-デオキシリボース結合の加水分解で終了する。その結果 DNA 鎖中に間隙が生ずる。仮にアルキル化剤によってアデニンが除去されたとする。DNA の複製・修復が開始されると修復酵素はこの間隙を相補してアデニン、チミン、グアニンそしてシトシンのいずれかを自由に挿入する。挿入される塩基がアデニンであれば DNA

鎖は回復、チミンまたはシトシンであればトランスバージョンそしてグアニンであればトランジションが発生する（Drake, J.W. 1970, 石川辰夫 1985, Malacinski, G.M. and Freifelder, D. 1998, 関口睦夫 1993, Stanier, R.Y. *et al.* 1986, Tamarin, R.H. 1988）。

MNNG の LC_{80} がμM オーダーであったのに対して EMS と MMS の LC_{80} は mM オーダーであった。確かに EMS や MMS と比較して MNNG は強力な変異原物質である。近年 *Phaeocystis* に関する興味深い調査結果が Prospero, L.M. らなどによって報告された（Prospero, L.M. *et al.* 1995, Smith Jr, W.O. and DiTullio, G.R. 1995, Tuener, S.M. *et al.* 1995, 1996, van Duly, F.C. *et al.* 1998, Noordkamp, D.J.B. *et al.* 2000, Wolfe, G.V. *et al.* 2000）。*Phaeocystis pouchetii* が Dimethylsulfide（DMS；ジメチルスルフィド）とその前駆体である Dimethylsulfoniopropionate（DMSP；ジメチルスルフォニオプロピオネート）の主要な発生源であるとするものである。地球全体での硫黄化合物の循環を考える上で特に海洋からの生物起源による硫黄の放出量が比較的多いことが最近注目されている。海水中の硫酸イオンは植物プランクトンに取り込まれ体内で DMS に還元される。生理作用により排出された DMS は難溶性・揮発性であるため海水から大気へ放出される。そして海洋大気中に放出された DMS は OH ラジカルと反応し SO_2 及びメタンスルホン酸に酸化され、さらに硫酸に酸化される。最終的に生成された硫酸は蒸気圧が小さく大気中で粒子化し雲の生成に必要な凝結核となる。着目すべきはアルキル化剤である DMS を *Phaeocystis pouchetii* が細胞内に蓄積して正常に生息しうる点である。DMS の変異原性は EMS や MMS とほぼ同じであり EMS と MMS の LC_{80} が高くなったものと推測される。

植物中でグリシンベタインは二段階の反応により合成される。第一段階としてコリンが Choline monooxygenase（CMO；コリンモノオキシゲナーゼ）によってベタインアルデヒドとなる。第二段階でベタインアルデヒドが Betaine aldehyde dehydrogenase（BADH；ベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ）によりグリシンベタインが合成される。*E.coli* などの微生物でも二段階の反応によってグリシンベタインが合成される。植物と異なるのは第一段階に使用される酵素が CMO ではなく Choline dehydrogenase（CDH；コリンデヒドロゲナーゼ）である。この酵素は *bet*A 遺伝子により発現する。土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* は Choline oxidase（COD；コリンオキシダーゼ）により植物や他の微生物が二つの酵素で行う反応を一つの酵素で触媒することができる。COD を発現する *codA* 遺伝子を導入した *Alabidopsis* では高いベタイン蓄積能とそれに伴う耐塩性や低温耐性、高温耐性、強光耐性の向上が観察

された（Sakamoto, A. and Murata, N. 2000）。しかし得られた塩耐性は 200mM までであって、本研究で目標とした 3M 以上には程遠い。

また海産単細胞緑藻 *Chlamydomonas* sp. W-80 株からは耐塩性への関与が注目される *bbc*1 遺伝子が見つかっている（Tanaka, S. *et al*. 2001）。この遺伝子を導入した *E.coli* は本来持ちえなかった塩耐性を発現した。この *bbc1* 遺伝子に関してはまだ発現系が解明されておらず現在研究が進められている。

本研究は海産単細胞藻類 *Phaeocystis* sp.を高塩濃度海水による馴化、紫外線照射そして変異原物質により突然変異を人為的に引き起こし、一般の生物が生育不可能な塩濃度でも生育できる変異株の取得を目的に行われた。その結果今回検討した手法では海水の 1.5 倍までしか生育しなかった。しかし *Phaeocystis* sp.はおそらく塩耐性をつかさどる遺伝子を持っていると推測されるので今後の研究の展開が期待される。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、絶えず懇切な御指導と御助言を賜りました高知工科大学物質環境システム工学科教授の向畑恭男先生に深く感謝の意を表します。

本研究を進めるうえで、有益な御助言を頂いた榎本恵一教授ならびに大濱武教授、有賀修助教授、佐塚正樹講師そして大阪教育大学助手の生田享介先生に深く感謝の意を表します。

本研究を進めるうえで絶えず御協力を頂いた高知工科大学大学院の森川彰氏、石川香織氏、江村英人氏、岡花直人氏そして山下志津香氏に深く感謝の意を表します。ならびに環境生物工学研究室の卒業生そして在籍する諸氏に感謝し厚く御礼申し上げます。

本研究に用いた *Phaeocystis* sp.を沖縄諸島で採取するにあたり、有益な御指導と御助言を頂いた筑波大学名誉教授の千原光雄先生ならびに山形大学教授の原慶明先生に深く感謝の意を表します。

最後に、右も左もわからぬ地に共に越してきたにもかかわらず、常に精神的に支えてくれた最愛なる妻 恵に心から感謝いたします。

引用文献

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. 1991. Molecular Biology of The Cell. Second Edition. Garland Publishing, Inc., New York.

Ben-Amotz, A. and Avron, M. 1980. Glycerol, β-carotene and dry algal meal production by commercial cultivation of *Dunaliella*. Algal Biomass: 603-610.

Bode, A., Castro, C.G., Doval, M.D. and Varela, M. 2002. New and regenerated production and ammonium regeneration in the western Bbansfield Strait region (Antarctica) during phytoplankton bloom conditions in summer. Deep-Sea Research II 49:787-804.

Chen, Y.Q., Wang, N., Zhang, P., Zhou, H. and Qu, L.H. 2002. Molecular evidence identifies bloom-forming *Phaeocystis* (Plymnesiophyta) from coastal waters of southeast China as *Phaeocystis globosa*. Biochemical Systematics and Ecology 30:15-22.

Dolling, J.A., Boreham, D.R., Brown, D.L., Raaphorts G.P., and Mitchel, R.E.J. 1999. Cisplatin-modification of DNA repair and ionizing radiation lethality in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Mutation Research 433:127-136.

Dreak, J.W. 1970. The Molecular of Basis of Mutation. Holden-Day, Inc., California.

石川辰夫 1985. 4 **遺伝情報の保存と突然変異**. **柳田友道（編）**. **X 遺伝 微生物科学** 5. **学会出版センター**, **東京**.

Madhupratap, M., Sawant, S. and Gauns, M. 2000. A first report on a bloom of the marine prymnesiophycean, *Phaeocystis globosa* from the Arabian Sea. Oceanologica Acta. 23:83-90.

Malacinski, G.M. and Freifelder, D. 1998. Essentials of Molecular Biology. Third Edition. Jones and Bartlett Publishers, Inc., Sudbery.

Noordkamp, D.J.B., Gieskes, W.W.C., Gottschal, J.C., Forney, L.J. and van Rijssel, M. 2000. Acrylate in Phaeocystis colonies dose not affect the surrounding bacteria. Journal of Sea Research 43:287-296.

Prosphero, L.M., Savoie, D.L., Arimoto, R., Olafsson, H and Hjartarson, H. 1995. Sources of aerosol nitrate and non-sea-salt sulfate in the Iceland region. The Science of the Total Environment. 160-161:181-191.

Sakamoto, A. and Murata, N. 2000. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. Journal of Experimental Botany. 51:81-88.

関口睦夫 1993. 4・1 **紫外線による** DNA **損傷の修復**. **日本生化学学会（編）**. **核酸 Ⅳ 遺伝子の複製と発現**. **新生化学実験講座** 2. **東京化学同人**, **東京**.

Smith Jr, W.O. and DiTullio, G.R. 1995. Relationship between dimethylsulfide and phytoplankton pigment concentrations in the Ross Sea, Antarctica. Deep Sea Research Ⅰ 42:873-892.

Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L., Painter P.R. 1986. The Microbial World. Fifth Edition. Prentice-Hall, Inc., New Jersey.

Tamarin, R.H. 1988. Principles of Genetics. Second Edition. Willard Grand Press/PWS Publishers, Inc., Boston.

Tanaka, S., Ikeda, K. and Miyasaki, H. 2000. Enhanced tolerance against salt-stress and freezing-stress of *Escherichia coli* cells expressing algal *bbc1* gene. Current Microbiology 42:173-177.

Turner, S.M., Malin, G., Nightingale, P.D. and Liss, P.S. 1996. Seasonal varietion of dimethyl sulphide in the North Sea and an assessment of fluxes to the atmosphere. Marine Chemistry 54:254-262.

Turner, S.M. , Nightingale, P.D., Broadgate, W. and Liss, P.S. 1995. The distribution of dimethyl sulphide and dimethylsulphoniopropionate in Antarctic

waters and sea ice. Deep Sea Research II: Topical Studies in Oceanography. 42:1059-1080.

van Duyl, F.C., Gieskes, W.W.C., Kop, A.J. and Lewis, W.E. 1998. Biological control of short-term variation in the concentration of DMSP and DMS during a *Phaeocystis* spring bloom. Journal of Sea Research 40:221-231.

Willett, K.L., Lienesch, L.A. and Di Giulo, R.T. 2001. No detectable DNA excision repair in UV-exposed hepatocytes from two catfish species. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 128:349-358.

Wolfe, G.V., Levasseur, M., Cantin, G. and Michaud, S. 2000. DMSP and DMS dynamics and microzooplankton grazing in the Labrador Sea: application of the dilution technique. Deep Sea Research I: Oceanographic Research Papers. 47:2243-2264.

八木孝司・武部啓 1993. 4・2 **アルキル化** DNA **の修復酵素**. **日本生化学学会（編）**.**核酸 IV 遺伝子の複製と発現**. **新生化学実験講座** 2. **東京化学同人**, **東京**.