

日本海溝から単離された深海酵母 *Cryptococcus* sp. N6 株 の銅耐性に関する研究

阿部 文快*¹ 水越 正*² 三浦 健*²
宇佐美 論*² 井上 明*¹ 堀越 弘毅*¹

駿河湾松崎沖、日本海溝宮古沖及び伊豆小笠原海溝鳥島海山における「しんかい2000」及び「しんかい6500」の調査潜航で取得された底泥試料から深海酵母の単離を試みた。その結果、13株の酵母菌が取得され、特に日本海溝から単離されたN6株は、非常に毒性が強い硫酸銅を10mM含むYPD培地中でも良好に生育したことから、いわゆる銅耐性酵母であることが判明した。18S rDNAの部分塩基配列を決定したところ、N6株は*Cryptococcus albidus*と非常に近縁であることがわかった。原子吸光法により菌体内に蓄積する銅を定量したところ、細胞内部にはほとんど銅が取り込まれていないことが分かった。このことは、N6株が銅イオンの浸入をブロックする機構を持つことあるいは、菌体内に浸入した銅イオンを積極的に排除する機構を有している可能性を示唆している。

本研究において取得されたN6株の銅耐性機構を詳細に検討することは、酵母菌を実験モデルとした真核生物一般の細胞への重金属の影響を知る上でも有効であり、のみならず汚染土壌からの銅の除去という環境浄化への応用としても期待が集まる。

キーワード：日本海溝宮古沖、銅耐性酵母、*Cryptococcus* sp. N6

Characterization of copper tolerant deep-sea yeast *Cryptococcus* sp. N6 isolated from the Japan Trench

Fumiyoshi ABE*³ Tadashi MIZUKOSHI*⁴ Takeshi MIURA*⁴
Ron USAMI*⁴ Akira INOUE*³ Koki HORIKOSHI*³

Thirteen deep-sea yeast strains were isolated from mud samples of Suruga bay, the Izu-Ogasawara Trench and the Japan Trench. Strain N6 was found to be extremely tolerant to high concentration of copper sulfate (CuSO_4). Molecular analysis of 18S rDNA indicates that the strain N6 belongs to *Cryptococcus* genus. The strain N6 can grow on YPD agar containing 10mM CuSO_4 , while IFO0378, a type strain of *Cryptococcus albidus*, never grow in the presence of 10mM CuSO_4 . Cellular amount of CuSO_4 analyzed by atomic absorption was very low when cells were incubated in the presence high concentration of CuSO_4 . The result suggests that copper tolerance of the strain N6 may be ascribed to protection of copper incursion or extrusion of

* 1 海洋科学技術センター深海環境フロンティア

* 2 東洋大学工学部応用化学科

* 3 The DEEPSTAR Group, Japan Marine Science and Technology Center

* 4 Department of Applied chemistry, Faculty of Engineering, Toyo University

copper from the cytoplasm.

Analysis of the mechanism of copper tolerant in the strain N6 may be able to answer a question why heavy metal is so toxic to organisms. The analysis could be applied to bio-absorption; heavy metal in natural environments might be eliminated using the yeast.

Keywords : The Japan Trench, Copper tolerant yeast, *Cryptococcus* sp. N6

1. はじめに

深海は低温、暗黒そして高水圧にさらされたいわゆる極限環境であり、そこに棲む生物は陸上の生物にない特質を持つものとして期待され、現在、この領域の研究には基礎のみならず応用的側面からも多大なる興味を寄せられている。これまでのところ深海底からは好圧性 (Yayanos *et al.*, 1979), 好熱性 (Ruby and Jannasch, 1982) あるいは好冷性 (Hamamoto and Horikoshi, 1991) などの特徴的な性質をもつ細菌また有機溶媒に耐性のあるもの (Moriya and Horikoshi, 1993a) や石油を分解する微生物 (Moriya and Horikoshi, 1993b) が多数分離されている。しかしながら、これまで深海微生物の研究は主として原核生物すなわち細菌類を中心として行われており、真核生物の代表とも言える酵母菌に関する報告は極めて乏しい。そこで、本研究では深海微生物の生態、さらには深海環境を理解するための一つの切り口として深海酵母に着目し、「しんかい2000」及び「しんかい6500」によって採取された底泥試料から酵母菌を分離して、それらの諸性質を明らかにする試みを行った。

酵母菌とは単細胞で生活する期間が長く、細胞が出芽と呼ばれる形式で増殖する菌類の総称である。分類学的にみると、真菌類の四つの綱のうちの三つの綱すなわち、子の菌類、担子菌類及び不完全菌類にわたって所属し、系統発生的にみても非常に複雑といえる。この微生物は酒や醤油などの醸造などに関わっていることのみならず生化学あるいは遺伝学などの研究分野でもよく用いられる実験材料として知られている。酵母菌の分離源は多岐に渡り、植物の花や葉、動物の皮膚や内臓、昆虫、甲殻類、土壌、大気、河川あるいは海洋などがあげられるが、陸上に比べ海洋からの分離例はあまり多くない (山里, 1986)。そのひとつの理由として、そもそも深海に棲む酵母菌の密度が極めて小さい上 (van Uden and Fell, 1968), 分離用培地等の検討が十分になされていないことが考えられる。そこでまず始めに、深海底泥試料からより多くの酵母菌を分離するための方法について検討した。次いで、得られた全ての菌株に対し、形態的及び生理生化学的な指標をもとにした解析を行い、属種の同定

を試みた。

取得された深海酵母に関する研究を行っていた際、興味深い事にある種の重金属に非常に強い耐性を持つ株が見出された。重金属による汚染を含めて、環境汚染は古くから新しい問題であり、現在それらをいかにして汚染区域から除去するか、さらには工業廃水等の処理についても大きな問題として取り上げられている。わが国における重金属汚染の例としては、銅による足尾銅山鉱毒事件 (1890年頃)、メチル水銀による水俣病 (1950年代)、カドミウムによるイタイイタイ病 (1940年頃) があげられる。そして、いずれの公害においても河川に廃水が流入し、鉱毒の被害が非常に広範囲に渡り、人体への深刻な影響が取りざたされた。重金属が及ぼす生物への影響を知ること、あるいは汚染土壌の浄化という目的から、重金属耐性を持つ細菌類が数多く取得されている。海洋は一般に陸水と比べ重金属濃度が高く、銅、ニッケルなどは陸水の10倍、ウランにいたっては約100倍も含んでおり、深海土壌では場所によってさらにその100倍という極めて高濃度で存在していることが知られている (堀部, 1970)。したがって、深海は新規の重金属耐性微生物を取得するための宝庫といっても過言ではない。このような微生物について研究する際、酵母菌を材料として用いることは、同じ真核生物である我々人間に対する重金属の影響を知る上で非常に有利であるものと考えられる。

そこで、本研究では、取得された深海酵母について重金属、特に銅耐性に関する解析を行うと共に菌の増殖に対する圧力の影響などについての検討を行った。

2. 実験方法

2.1 試料及び酵母菌の単離

「しんかい2000」及び「しんかい6500」潜航において、柱状採泥によって深海底泥を取得した。我々の潜航と、底泥分与を受けた研究者らの潜航を併せて以下に記す。

しんかい2000 ; DIVE819 (駿河湾松崎沖, 34°43.08N, 138°35.83E, 1935m)

しんかい6500 ; DIVE272 (日本海溝宮古沖, 40°06.

670N, 144°11.077E, 6370m), DIVE273 (日本海溝宮古沖, 40°06.297N, 144°11.183E, 6379m), DIVE274 (日本海溝宮古沖, 40°09.375N, 144°10.911E, 6048m), DIVE275 (日本海溝宮古沖, 40°09.759N, 144°02.173E, 4505m), DIVE277 (日本海溝宮古沖, 40°07.862N, 144°11.383E, 6455m), DIVE369 (伊豆小笠原海溝鳥島海山, 30°54.932N, 141°49.271E, 4050m)

採取された底泥試料約0.1gをYPD (1% yeast extract, 2% bactopectone, 2% glucose) 寒天培地に直接塗布し, 8℃で2週間培養を行った。なお, これらの培地には, 細菌類の増殖を抑えるためにペニシリン及びストレプトマイシンを各50 µg/ml添加した。次いで, 15℃で2週間, 26℃で2週間の培養を行い, 寒天培地で形成されたコロニーを単離した。単離した酵母菌は培養液に終濃度15%グリセロールを添加し-80℃で冷凍保存した。

2.2 深海酵母菌の属・種の同定

単離した酵母菌の分類についてはThe Yeasts: a taxonomic study, 第3版, (Kreger-van Rij 編, 1984) の分類体系に準じた。また, 18S rDNA の塩基配列は全DNAを常法に従って抽出して行った。

2.3 銅耐性試験

取得された酵母菌株の生育に及ぼす銅イオンの影響を調べた。銅イオンはCuSO₄として, 終濃度1, 10, 25, 50mMとなるようオートクレーブ後のYPD寒天培地に添加した。これらの培地に酵母菌を穿刺し, 26℃で4日間培養した後, 形成されたコロニーの直径(mm)を測定し, これを銅耐性の目安とした。さらに, CuSO₄の影響の詳細な検討を行うために, 液体培養によるCuSO₄の影響を調べた。対数増殖期中期の細胞を1, 10, 20及び50mM CuSO₄存在下で培養し, トーマ氏血球計数器を用いて菌体数を算定した。

3. 結 果

3.1 深海酵母の取得

深海底は水温が2℃前後という低温環境であることから, 培養は底泥試料を寒天培地に塗布して, 8℃で行った。しかしながら, 8℃, 2週間程度の培養では酵母菌のコロニーは形成されなかった。そこで引き続き, 15℃, 26℃で段階的に温度を上げて培養を行ったところ, 多数のコロニーが出現した。取得された13株の酵母菌の全コロニーを図1に示す(N1~N13)。なお, 培養中にプレート上での酵母菌の増殖と共に糸状菌類(いわゆる

カビ)が繁殖し, それらによってプレートが一面覆われてしまう程になり, 酵母菌の分離が困難になった。そこで, 酵母菌の単離は糸状菌類の増殖が顕著になる前に行った。

3.2 深海酵母の増殖に及ぼす圧力の影響

圧力環境は深海の特徴の一つであり, 現在, 加圧下における生命維持機構の解明に注目が集まっている。そこで, 今回取得された深海酵母の増殖に及ぼす圧力の影響を調べるため, 加圧培養を試みた。YPD培地中, 24℃で9時間程度の培養を行ったところ, 幾つかの菌株においては加圧下でも常圧とほぼ同様に増殖することが分かった。各菌株の比増殖速度(Td⁻¹)と圧力の関係を図2に示す。

3.3 深海酵母の増殖に及ぼす銅の影響及び銅耐性酵母 *Cryptococcus* sp. N6株の取得

深海底泥から取得された酵母菌株の生育に及ぼす銅の影響を調べるため, CuSO₄を含むYPD寒天培地で増殖させた酵母菌のコロニーの直径を測定し, これを銅耐性の簡便な尺度とした。図3に幾つかの代表的な菌株についてCuSO₄濃度と培養4日後のコロニーの直径との関係を示す。その結果, ほとんどの菌株についてCuSO₄が存在することによって増殖が阻害されるのに対し, 10mM CuSO₄という猛毒条件下でも極めて良好に増殖し, むしろ生育が促進される菌株が見出された。この菌株は日本海溝から取得されたN6株であり, 18S rDNAの塩基配列による分類学的解析から*Cryptococcus*属に分類された。したがって以後の実験では, 銅に対して著しい耐性をもつこのN6株を銅耐性酵母として用いた。なお, この菌株について同じ濃度の塩化銅(CuCl₂)にも耐性を持つことが確認された。

次にYPD培地で液体培養を行い, 対数増殖期中期のN6株にCuSO₄を添加し, その後の菌の増殖を調べた。その結果, 1mM CuSO₄存在下では銅イオンを含まない対照と比べ, 菌の増殖速度に変化はみられなかった(図4)。一方, 10mM CuSO₄を添加した場合, その直後に若干の不応期(ラグタイム)があるものの, その後良好に増殖することが分かった。さらに高濃度の20mM及び50mM CuSO₄を添加した場合, 増殖は確認されなかったことから, 10mMが増殖の上限であるものとした。しかしながら, その後の調べで寒天培地に添加するCuSO₄の濃度を1mMずつ上げながら継代培養を行うことによって, 3カ月後には50mMのCuSO₄を含む培地でもコロ

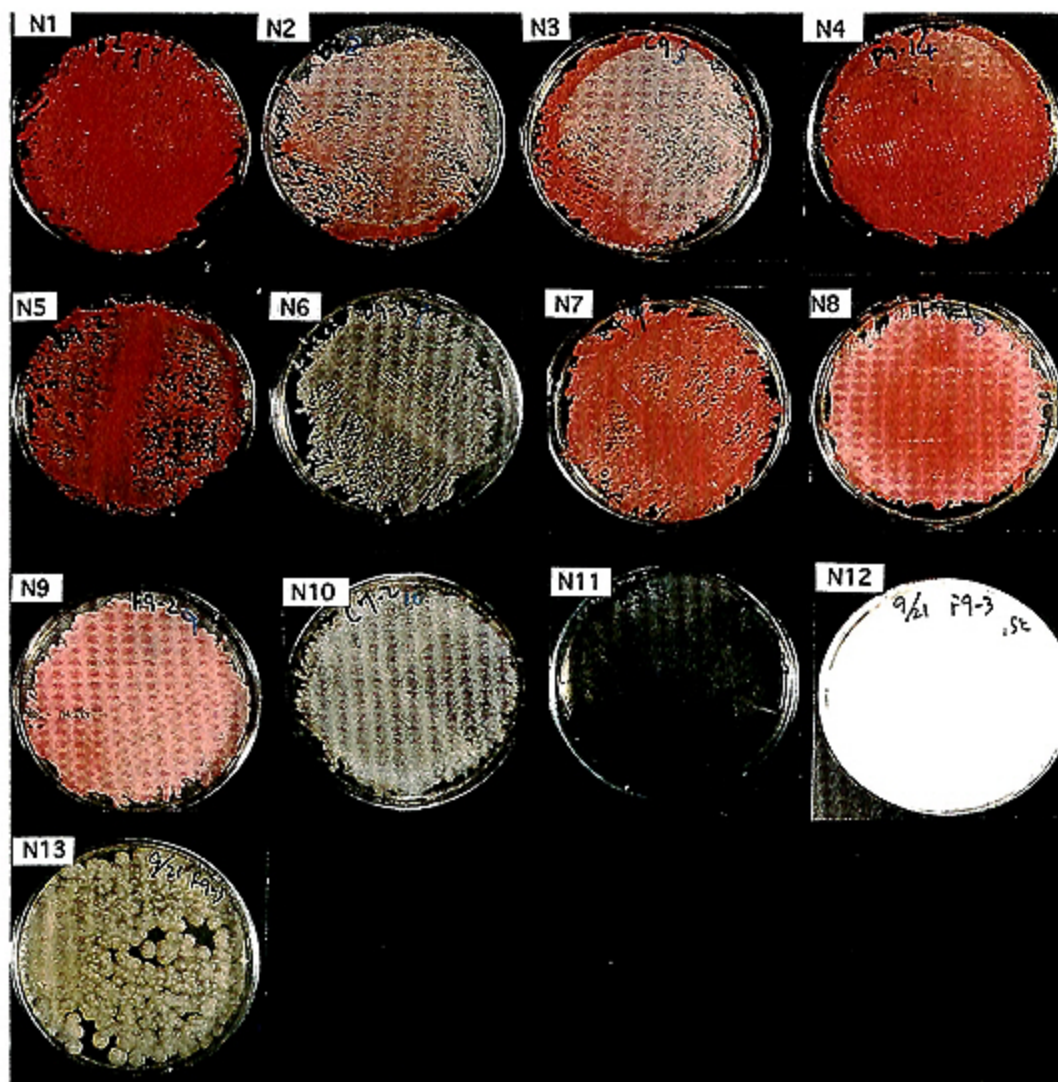


図1 深海底泥から取得された酵母菌コロニー
Fig. 1 Deep-sea yeasts isolated from mud samples

ニーを形成することが確認された。

興味深いことに、対照及び1mM CuSO_4 存在下において、最終到達細胞密度は共に約 6×10^8 cells/ml 程度であったのに対し、10mM CuSO_4 存在下では約 1×10^9 cells/ml とおよそ2倍になった (図4)。このとき細胞の大きさは幾分小さくなるが顕微鏡観察によって確認された。

3.4 N6株の菌体内における銅の蓄積と菌体内銅濃度の定量

対数増殖期中期のN6株に終濃度1, 10, 20及び50mMとなるように CuSO_4 を加えて培養し、経時的に集菌して菌体内に含まれる銅を原子吸光法によって測定した。図5に CuSO_4 投与後の菌体内に含まれる銅の量の経時的变化を示す。なお、このとき菌体内銅濃度を 10^8 個

の細胞を処理して得られた抽出液1mlあたりの濃度 (ppm) として表記した。その結果、 CuSO_4 を含まない培地中で増殖された菌体からはほとんど銅は検出されなかった (<1ppm)。一方、 CuSO_4 を投与した場合でも1mMあるいは10mM CuSO_4 存在下では菌体 10^8 細胞あたり7ppm以下と非常にわずかな量であることが分かった。ところが、20mM及び50mM CuSO_4 を投与した場合には、菌体 10^8 細胞あたりに含まれる銅の濃度は100~250ppmと極めて高濃度であることが判明した。

興味深いことに、比増殖速度と菌体内銅濃度には明らかな相関関係があり、図6に示すようにそれらは鏡像対称的な曲線を描いた。このことは、N6株において菌体内に銅が蓄積すると共に、菌の増殖が抑制されることを示しており、また逆に外液の CuSO_4 濃度が10mMまで

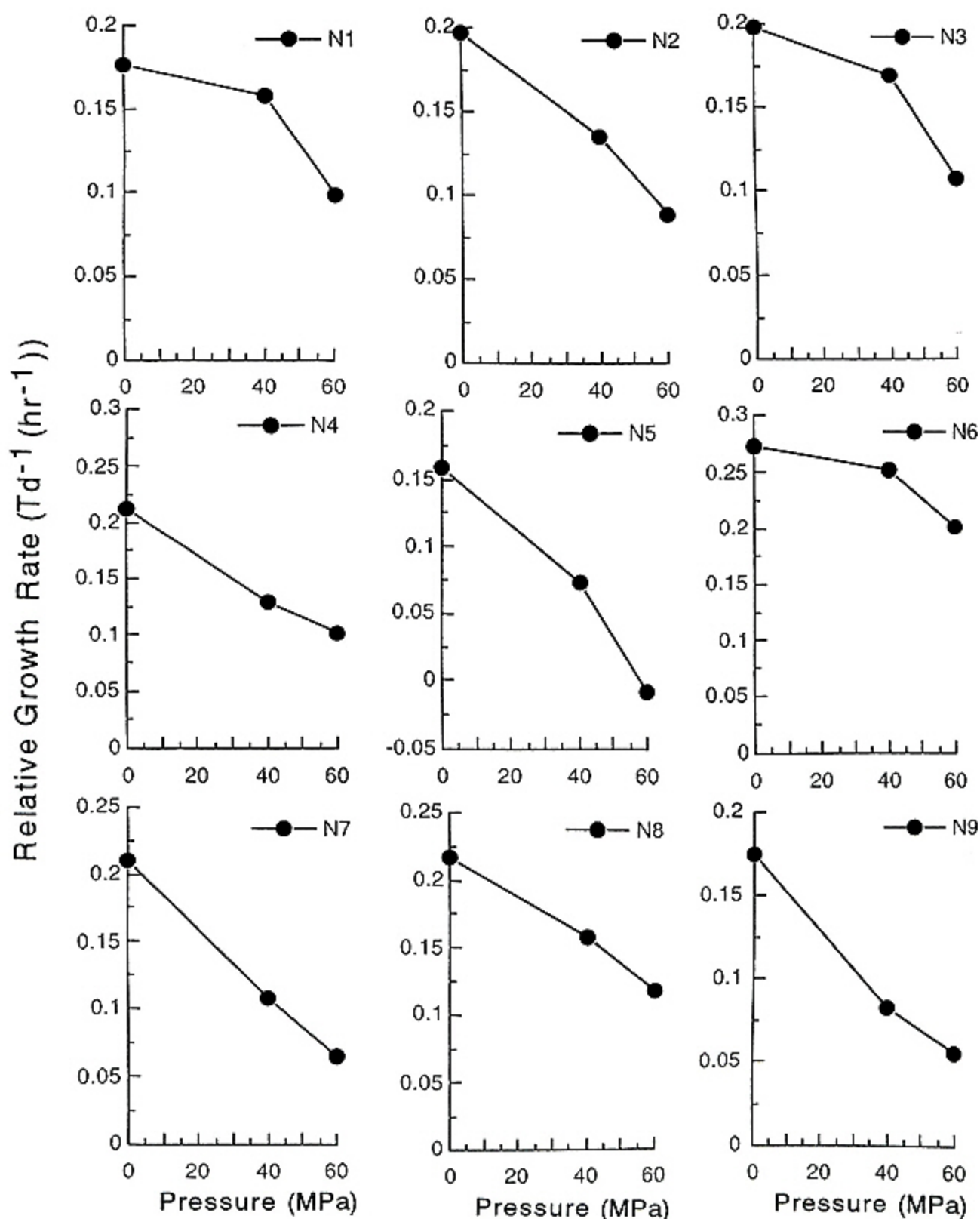


図2 深海酵母の増殖に及ぼす圧力の影響。それぞれの菌株をYPD培養液中で加圧培養し、比増殖速度($\text{Td}^{-1}(\text{hr}^{-1})$; 倍加時間の逆数)を求めた。

Fig. 2 The effect of hydrostatic pressure to growth of deep-sea yeasts. Cells were incubated in YPD broth under hydrostatic pressure.

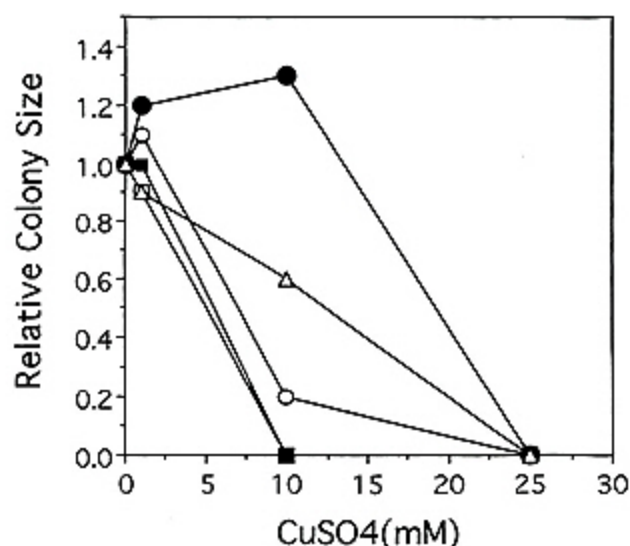


図3 深海酵母の増殖に及ぼす硫酸銅の影響。各濃度の硫酸銅を添加したYPD寒天培地に単離された深海酵母を穿刺し、形成されたコロニーの直径の相対値を示した。

Fig. 3 The effect of CuSO_4 to growth of deep-sea yeasts. The relative diameter of colony is shown. ○; N1, □; N2, ■; N3, ●; N6, △; N11

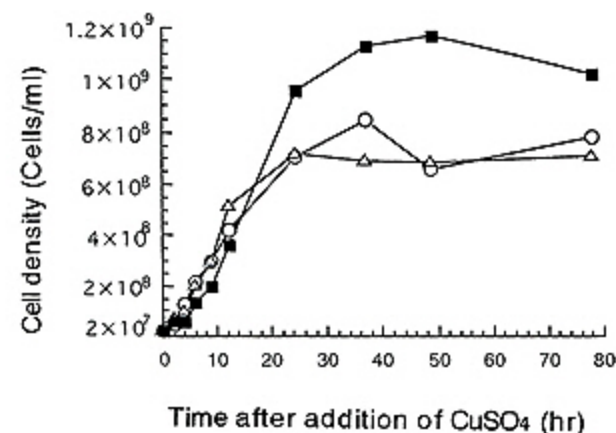


図4 N6株の増殖に及ぼす硫酸銅の影響。対数増殖期中期のN6培養液に CuSO_4 を添加し、その後の細胞増殖を調べた。○; 無添加, △; 1mM CuSO_4 , ■; 10mM CuSO_4

Fig. 4 The effect of CuSO_4 to growth of the strain N6. Cells were incubated in YPD broth in the presence of CuSO_4 . ○; no addition, △; 1mM CuSO_4 , ■; 10mM CuSO_4

なら菌体内銅濃度を低く保つことによってその生命活動を維持している可能性を強く示唆している。以上の結果は、N6株が10mMという高濃度 CuSO_4 存在下において(1)銅イオンの浸入をブロックするシステムを持つ事、(2)濃度勾配に従って菌体内に浸入した銅イオンを積極的に排除する機構を保持しているという2つの興味深い可能性の存在を示唆している。

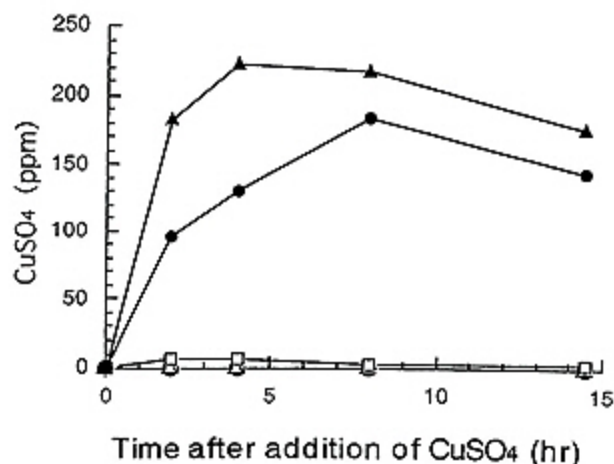


図5 硫酸銅投与後のN6菌体内銅濃度の経時的変化。対数増殖期中期のN6培養液に CuSO_4 を添加し、菌体内に含まれる銅を原子吸光法によって測定した。○; 無添加, △; 1mM CuSO_4 , □; 10mM CuSO_4 , ●; 20mM CuSO_4 , ▲; 50mM CuSO_4

Fig. 5 Changes in internal copper of the strain N6 after addition of CuSO_4 . ○; no addition, △; 1mM CuSO_4 , □; 10mM CuSO_4 , ●; 20mM CuSO_4 , ▲; 50mM CuSO_4

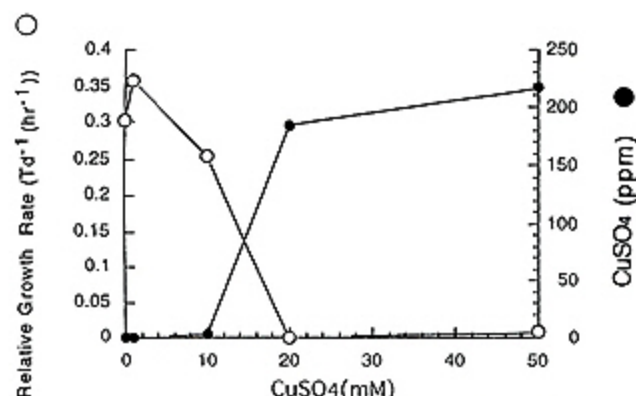


図6 比増殖速度とN6菌体内銅濃度の関係。各濃度の硫酸銅を含むYPD培養液中でN6株を培養し、比増殖速度と菌体内銅濃度を調べた。○; 比増殖速度($\text{Td}^{-1}(\text{hr}^{-1})$), ●; 細胞内銅濃度(ppm)

Fig. 6 Relationship between relative growth rate and the amount of internal copper in the strain N6. ○; Relative growth rate ($\text{Td}^{-1}(\text{hr}^{-1})$), ●; Internal copper (ppm)

一方で、20mMあるいは50mM CuSO_4 投与によって劇的に銅の菌体内濃度が上昇することが分かったが、このことは耐性機構の解明とは違った見方として外液からの銅の吸収(回収)という応用的利用法を考える上で、非常に重要な材料を提供している。これらについては後に議論を深めたい。

4. 考 察

本研究では、深海底泥からの酵母菌の分離に際し、まず初めの段階としてそれらの取得方法について検討した。深海底は水温が2℃前後という低温環境であることから、当初、培養を8℃で行ったがコロニーは形成されなかった。その理由として、次に示す3つの可能性が考えられる。(1) 底泥中で酵母菌は孢子または休止期におかれており、増殖を開始できない状態にある。(2) 増殖開始までに2週間以上を要する。(3) 増殖速度が非常に遅く2週間程度では肉眼で見えるほどのコロニーを形成できない。(1)については、孢子の発芽の誘導にヒートショックなどの処理が有効かもしれない。また、(2)、(3)については培養日数を数週間～数カ月に延長することによりコロニーを得ることが可能と思われるが、この際、カビ等の繁殖を防ぐ工夫が必要となる。

増殖に対する塩(NaCl)濃度の影響を予備的に調べた結果、ほとんどの菌株は1～6%程度のNaClを含む培地上で良好に生育することが分かったが、増殖において絶対的にNaClを要求する株は存在しなかった。この点は、多くの海洋性細菌の生育がNaCl要求性である事と異なっている。したがって、今回取得された酵母菌に関しては、純然たる深海での進化を遂げた菌であるというよりは、むしろ元来は陸生の酵母菌が海洋に流れ込み、そこで生き残り深海底で生活戦略を広げて繁殖したのかもしれない。予備的な実験ではあるが、今回取得された菌株の多くのものが、YPD培地の栄養源を1/100程度まで希釈しても、非常に良好に生育する事を確認している。このように低栄養条件下でも増殖可能であるという事実は、これらの酵母菌が深海底のような栄養源の少ない環境に適応して生きていく上で有利に働くものと考えられる。

また、圧力環境は深海の特徴の一つであり、現在、加圧下における生命維持機構の解明に興味が続いている。この物理因子を生物がどのように認識し、それに適応しているのかを知ることは、深海微生物の生理、生態学を理解するうえで大変重要である。得られた菌株のうち、加圧条件下で特に良く増殖するいくつかの菌株は、高圧生物学における新たな実験材料、特に真核生物のモデル系として次なる研究の発展が期待される。今後はこの酵母がどのようにして圧力耐性を獲得しているかについても解析を行いたい。

日本海溝の深海底泥より分離されたN6株は10mMという非常に高濃度のCuSO₄に耐性があった。では、N6株どのような機構により耐性を獲得しているのだろうか。これまで、銅耐性微生物とその耐性機構に関する報告には

様々なものがある。大腸菌では、ある種のプラスミドが関与しており、Cu(II)がCu(I)に還元されることによって銅耐性を獲得している(Brown *et al.*, 1992)。また、出芽酵母である*Saccharomyces cerevisiae*でも銅耐性株が得られており、この株では大量のH₂Sの生成によりCu(II)を不溶性のCuSにして無毒化し、1mM程度の銅に対する耐性を獲得している(Ashida, 1965)。また、イネいもち病菌である*Pyricularia oryzae*でも銅耐性株が見出され、その菌糸は感受性株と比べやはりH₂Sの生成が著しい事が示されている(柳田, 1984)。一方、カビ類の*Penicillium ochro-chlorum*においては、Cu²⁺、Mn²⁺及び、Zn²⁺に耐性を示し、Ni²⁺やHg²⁺に感受性の高い菌株が見出されている(Okamoto *et al.*, 1977)。この菌では、菌糸が過剰のCu²⁺を取り込まない機構を持っていることが示されている。

N6株では10mM以下のCuSO₄存在下においては、細胞内の銅濃度が非常に低いレベルで保たれている事が明らかとなった。このことは、N6株が(1)細胞内への銅イオンの侵入をブロックしていること、または(2)細胞内に侵入した銅イオンを積極的に外へ排出していることを示唆している。したがって、Ashidaらが*S. cerevisiae*で示した銅イオン無毒化機構とは別の機構を有している可能性が高い。液体培養の結果を見る限りでは、20mM以上のCuSO₄存在下ではN6株は生存できず、しかもこの濃度のもとでは細胞内から大量の銅が検出された。したがって、20mM CuSO₄存在下では、前述の(1)、(2)の防御機構の限界を超え、細胞内に銅が蓄積したことが、細胞死への直接の引き金であると考えられる。なお、10mM CuSO₄存在下で培養したN6株の細胞の超薄切片を透過電子顕微鏡で観察結果からは、内部構造の変化は認められず、沈殿物も確認されなかった。このことから、H₂S産生による銅イオン(II)を無毒化する機構とは異なるものと考えられる。

ヒートショックや浸透圧を上げるショック等のストレスを細胞に加える事で誘導されるタンパク質の存在が多数報告されている。Cu²⁺が多量に存在する環境をストレスの一種として考えると、Cu²⁺の存在によって特異的に発現するタンパク質の存在が予想され、このタンパク質が銅耐性に関わっている可能性がある。さらに、細胞内の銅を積極的に排出する機構については、ATPエネルギー依存性のポンプの存在が示唆されているが、これについては今後、生化学あるいは分子生物学的なアプローチが必要となる。

銅耐性酵母を取得したことは、銅が真核生物一般に、

また人体へどのような影響を及ぼすのかを知る上で有効であり、その作用を解明するための重要な研究材料を得たと言える。また、汚染土壌の浄化を考えた場合、重金属耐性微生物が重金属の除去に役立つ可能性が大きい。今回、深海から銅耐性酵母が取得されたことは、それを担う微生物を探索する上で、深海が新しい分離源であることを示しており、またこの酵母菌を用いて土壌から効率的に銅を除去することが可能となるかもしれない。さらに、深海底における重金属の物質循環を考えると、微生物が重金属輸送系の中でどのように働いているかが問題となる。今回取得されたN6株が、深海における重金属の物質循環にどのように関わっているのか、生態学的知見を深める上で有効な糸口になるかもしれない。

一方、微生物を使って土壌から金属を回収する試みが行われている。鉱石から金属を溶出させ、回収させる、いわゆるバイオリーチング (bio-leaching) の問題も微生物の新しい利用という点で注目されている。現在実用的なものとしては、*Thiobacillus ferrooxidans*等の細菌を用いた溶出で、年間10億USドル相当以上の銅が土壌から回収されている (Holms and Debus, 1991)。N6株に20mMあるいは50mM CuSO₄投与をすることによって銅の菌体内濃度は上昇したが、このことはN6株が高濃度の銅を蓄積することを示している。したがって、N6株に銅を吸収させることによって、鉱石溶液から銅を回収するリーチングという、全く新しい応用的利用法が想起される。

このように、本研究は深海底における微生物生態を考える上でも、これまで見過ごされてきた酵母菌のような真核性の微生物に光を当てたこと、並びに銅耐性をもつ酵母菌を取得したことにより、重金属の影響や応用的利用について、これまでにない観点から検討する材料を与えたという点でその価値は大きい。今後は、取得された酵母菌の銅耐性機構、特に細胞内への銅イオンの侵入をブロックする、あるいは銅イオンを積極的に排出する機構の詳細な検討を行うことを通じて、酵母菌のみならず他の生物全般の銅耐性機構の理解を深めたい。また、汚染土壌からの銅の除去を目的とした環境浄化、及び深海における重金属の物質循環における微生物の位置づけという生態学的な観点からも、今後研究を進めて行きたい。

謝 辞

本研究を遂行するにあたって、深海底泥取得に際しては、2Kチームならびに6Kチームの皆様、また、深海環境フロンティア研究員、長濱統彦博士にはN6株の

18S rDNA塩基配列決定に際してご指導頂きましたこと、ここにお礼申し上げます。

引用文献

- Ashida, J. (1965) : Adaptation of fungi to metal toxicants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 3: 153-174.
- Brown, N. L., Rouch, D. A., and Lee, B. T. O. (1992) : Copper resistance determinants in bacteria. *Plasmid* 27 : 41-51.
- Hamamoto, T. and Horikoshi, K. (1991) : Characterization of an amylase from a psychrotrophic *Vibrio* isolated from a deep-sea mud sample. *FEMS Microbiol. Lett.* 84 : 79-84.
- Holms, D. S., Debus, K. A. (1991) : Mineral Bioprocessing. *The Minerals, Metals & Materials Society* pp. 57-78.
- Kreger-van Rij 編 (1984) : *The Yeasts: a taxonomic study*, 3rd. ed., Elsevier, Amsterdam pp. 1082.
- Moriya, K. and Horikoshi, K. (1993a) : A benzene-tolerant bacterium utilizing sulfur compounds isolated from deep sea. *J. Biotechnol. Bioeng.* 76: 397-399.
- Moriya, K. and Horikoshi, K. (1993b) : Isolation of a Benzene-Tolerant Bacterium and its Hydrocarbon Degradation. *J. Biotechnol. Bioeng.* 76: 168-173.
- Okamoto, K., Suzuki, M., Fukami, M., Toda, S. and Fuwa, K. (1977) : Uptake of Heavy Metals by a Copper-tolerant Fungus, *Penicillium ochro-chloron*, *Agric. Biol. Chem.* 41 : 17-22.
- Ruby, E. G. and Jannasch, H. W. (1982) : Physiological characteristics of *Thiomicrospira* sp. strain L-12 isolated from deep sea hydro thermal vents. *J. Bacteriol.* 149: 161-165.
- Van Uden, N. and Fell, J. W. (1968) : Marine yeasts. *Adv. Microbiol. of the Sea* 1: 167-201.
- Yayanos, A. A., Dietz, A. S. and Van Boxtel, R. (1979) : Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics. *Science* 205: 808-810.
- 堀部純男 編 (1970) : 海水の化学, 東海大学出版会, 東京 pp.330-350.
- 柳田友道 編 (1984) : 微生物化学4 学会出版センター, 東京 pp.525.
- 山里一英 編 (1986) : 微生物の分離法 R&D プランニング, 東京 pp. 910.

(原稿受理: 1998年7月6日)