

植物プランクトンにおける環境応答解析 ——環境応答生物学研究室における10年間の研究——

都 筑 幹 夫*

1. はじめに

受精や発生、あるいは細胞の働きや代謝、遺伝子発現など、生命の活動はその一つ一つが基本プログラムをもとにして行われている。しかし、体外から受ける刺激（すなわち環境）によって、そのプログラムは歪んだりその歪みを修復したりする。プログラムへの影響は体外だけでなく、癌やホルモン異常など、生体内の”環境”で影響を受ける場合もある。こうした生体内外の刺激（“環境”）によって修復できないほどにプログラムが歪むとその生物の生存が脅かされたり、子孫が残せなくなったりする(図1)。その刺激が体外からのもので、人為的かつ歪みが大きい場合には、“環境問題”となる。

生命の基本プログラムを実行する主体すなわち機能分子は主としてタンパク質であり、その機能分子を形成するための鋳型は核酸に組み込まれている。そのため、生命を知り、その知識を人類の生存に役立てていくには、基本プログラムとその歪みの修復能力について、すなわちタンパク質や核酸がどう影響を受けるのかについての分子レベルでの理解が大切であろう。生体外の環境のうち、ある刺激は体の表面で遮られて体内の恒常性は保たれるが、ある刺激は体内まで伝わり、機能分子の周辺環境に影響を及ぼし、生命活動の基本プログラムに影響を受ける。その機能分子の周辺環境を“ミクロの環境”とし、生体外の環境を“マクロの環境”とすれば、“環境問題”は“マクロの環境”であり、問題となる環境因子によって生じる“ミクロの環境”を理解することによって、はじめて生物の“環境”影響を本質から理解できるのではなからうか(図2)。

環境応答生物学研究室では、水界の一次生産者であり、環境の影響を受けやすい植物プランクトンを対象に、マクロとミクロの両面から“環境”影響と元になる基本プログラムについて解析を行ってきた。研究室創設から10年を経たこともあり、またこれまでに発表した論文は英文でしかもそれぞれが断片的でもあるため、これまでの研究成果を日本語でまとめてみることにした。研究室に多くの学生を抱え、その多様な興味やアイデアを満たすために、そして筆者自らの多様な興味のために、研究室内では一見かけ離れた感のある研究テーマが並行して行われている。ここでは既に発表した成果のうちの一部を紹介したい。

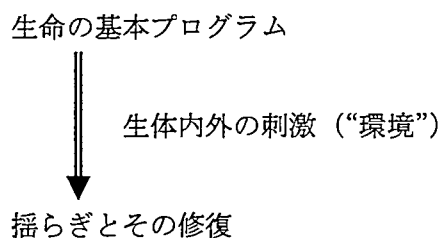


図1 生命現象に及ぼす環境の影響

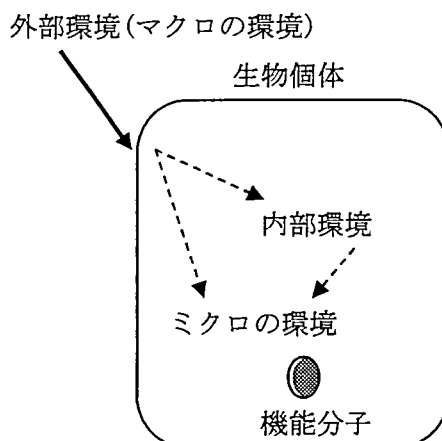


図2 生物に及ぼすさまざまな“環境”

* 生命科学部 環境生命科学科 環境応答生物学研究室

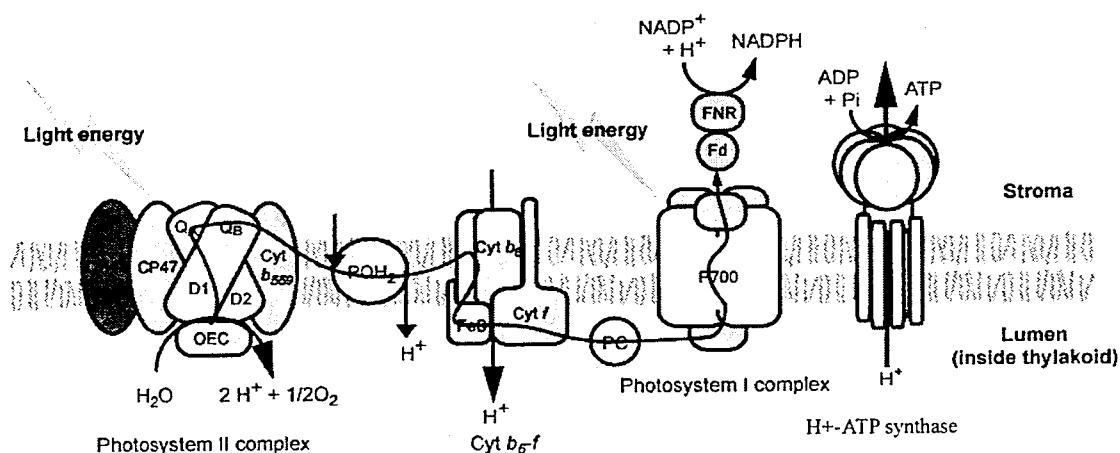


図3 チラコイド膜における4つのタンパク質複合体と電子伝達。

この図では灰色で薄くチラコイドの脂質二重層が描かれている。左から光化学系 II (水分解酵素を含む)、シトクロム b_6-f 、光化学系 I、ATP 合成酵素。

2. 光化学系タンパク質複合体に及ぼす酸性脂質の影響

光合成における光エネルギーから酸化還元反応への変換、すなわち物理エネルギーから化学エネルギーへの変換はチラコイド膜に存在する二つの光化学系タンパク質複合体で行われる(図3)。そのチラコイド膜は中性の糖脂質を主成分とし、少量の酸性脂質、スルフォキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) とホスファチジルグリセロール (PG) からなる(図4)。主成分の中性糖脂質が欠損すれば膜自身が縮小し、そこに存在する膜タンパク質の量に影響が出るのは予想される。しかし、わずかしかな存在しない酸性脂質が膜タンパク質に影響を持つなどと想像する人はほとんどいなかったであろう。単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* に紫外線を照射し、室温クロロフィル蛍光の変化した細胞の中から SQDG 欠損変異株が見つかり(1)、光化学系 II 活性が 60%程度まで低下していることが明らかとなった(2)。

一方、アメリカの Benning らの報告では光合成細菌 *Rhodobacter* とシアノバクテリア *Synechococcus* sp.

PCC7942 の SQDG 欠損株が光合成低下を示さなかった(3)ことから、異なる結果となっていた。クラミドモナスは通常の培養では核相は半数体で有性生殖を行えることから、戻し交配による四分子分析を行って、光化学系 II 活性の低下と SQDG 欠損とが直接関係していることを示した(4)。SQDG 欠損変異株に SQDG を添加すると、光化学系 II 活性は野生株とほぼ同じ程度まで回復した。また、DCMU などの光化学系 II 活性の阻害剤に対する感受性にも関係し

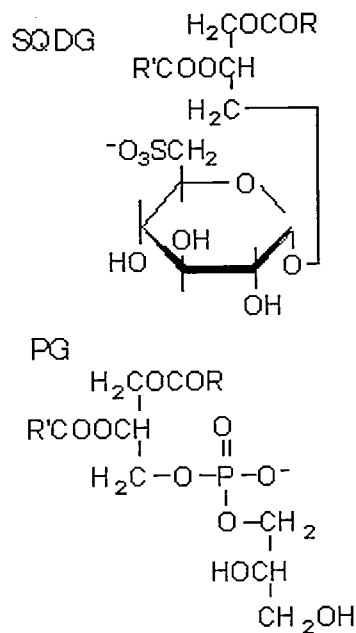


図4 チラコイド膜に存在する2つの酸性脂質

植物プランクトンにおける環境応答解析

ていることが明らかになった(4)。さらに、単離チラコイド膜で活性測定が可能となり、SQDG 添加で活性増加が確認できた。このことから、クラミドモナスでは、ある遺伝子の変異により SQDG が欠損すると、光化学系 II タンパク質複合体のチラコイド膜中での構造が微妙に変化し、光化学系 II 活性が低下するのである。生体膜を構成する脂質が、機能分子に膜としての場を提供するだけでなく、膜たんぱく質の活性保持に関与するという事実が明らかになった。

次の疑問は、変異を起こした遺伝子を特定することと、光化学系 II タンパク質複合体がどのように構造変化を引き起こしているかという点、さらに、クラミドモナス以外の光合成生物でも SQDG が関与しているのかという点である。3つ目の問題を明らかにするため、相同組換えが可能なシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 を用いて、SQDG 合成に関わる遺伝子 *sqdB* を破壊し、SQDG 欠損変異株を作製した。単離に成功したポイントは SQDG を培地に加えることであった。すなわち *Synechocystis* sp. PCC6803 は生育そのものに SQDG を必要とする(5)。そして、培養液から SQDG を除くと、細胞中の SQDG 含量が減少するにつれて光化学系 II 活性が低下した(6)。しかし、Benning らと私たちとの間にまだ気がつかない手法の違いがあるかもしれない。そこで、*Synechococcus* sp. PCC7942 でも SQDG 欠損変異株を作製した。Benning らの結果のとおり、SQDG が光化学系 II にも生育にも必要でないことが明らかになった(6)。一方、最近 Benning らは、高等植物の *Arabidopsis* で SQDG が光合成活性に関与することを示した(7)。これらの結果を合わせると、光合成器官の進化の過程において、光合成細菌やある種のシアノバクテリアでは、光化学系 II タンパク質複合体は SQDG の影響を受けず、シアノバクテリアのある別の種になったところで SQDG の関与を受けるようになったと考えられる。そして、その関係は、シアノバクテリアが他の細胞に取り込まれて(いわゆる細胞内共生によって)葉緑体が成立した後も維持され、緑藻や高等植物でも SQDG が関与し続けているということになる(図5)。

実際、SQDG 合成酵素の遺伝子の系統解析を行ったところ、光合成細菌や PCC7942 のグループと PCC6803 や高等植物のグループとに分けられた(8)。すなわち、進化の過程で両グループに大きな変化が生じた可能性を示唆する。SQDG はイオウ(S)を含む化合物であるが、硫化水素や二酸化硫黄などは多くの生物にとって有毒である。一方、システインやメチオニンなどアミノ酸にも S は含まれており、必須の元素でもある。その点、SQDG は本来有毒でも必須でもなく、S の貯蔵の役割を持っていた

のではなかろうか。S を SQDG の形でチラコイド膜に蓄積するようになり、それがあつた時、光化学系 II に影響を及ぼすようになったのではないかと想像している。光化学系 II の構造は紅色硫黄細菌の光化学系と類似しており、光化学系 II の起源と考えられている。紅色硫黄細菌の光化学系における電子供与体が単体の S やその化合物であることを考えると、光化学系 II 自体に S との関わりがあるのは当然のような気がする。一方、葉緑体進化に目を向けると、PCC7942 (実際はその祖先)では SQDG の影響を受けなかったが、PCC6803 (の祖先)までの進化のある段階で SQDG の影響を受けるようになり、その後、SQDG の影響を受けるようになった方の細胞が細胞内共生によって葉緑体へと進

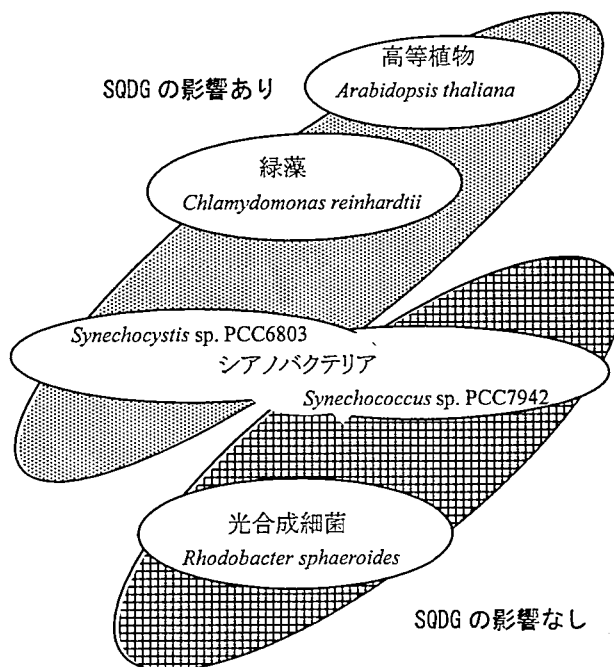


図5 光合成生物の進化と SQDG の関与の関係。

化したと想像される。シアノバクテリアの中で SQDG が関与する種を網羅できれば、細胞内共生が成立した種（の祖先）を絞りこむことが可能かもしれない（図5）。

また、上であげた3つの疑問のうち、タンパク質の構造変化の解析に関して、*C. reinhardtii* の光化学系 II では、SQDG 欠損の場合に熱安定性が低下すること(9)と、Z と呼ばれる D1 タンパク質中のチロシン残基から反応中心クロロフィルへの電子の供給が抑えられることが明らかになった(10)。

もう一つの酸性脂質 ホスファチジルグリセロール(PG)も膜タンパク質へ関与していることが分かってきた。*Synechocystis* sp. PCC6803 を用いて、PG 合成に関わる *cdsA* あるいは *pgsA* 遺伝子を破壊し、PG 欠損株を作製した。その結果、PG は生存に必須であることが判明した(11, 12)。培養時に PG 添加を止めると、PG 含量の低下に伴い、クロロフィルが減少し、光合成活性も低下した(11)。PG は光化学系 I の三量体化に(13)、光化学系 II においては *p*-benzoquinone への電子伝達に(12)、関与していることが明らかになっている。

3. シアノバクテリアにおける遺伝子発現調節

中嶋祐二氏は、微細藻類の液体培養を用いて CO₂ 固定システムの開発を行っている。その関連でバイオリクターにおける光エネルギーの効率的な利用には、集光色素量の少ない藻類株で行うことが有効であることを示した(14, 15)。また、光合成色素フィコシアニン含量の低い *Synechocystis* sp. PCC6714 の変異株 PD-1 を用いて、フィコシアニン含量の低下している原因を調べた。その結果、フィコシアニン遺伝子を含む *cpc* operon の転写開始点上流5塩基目が野生株では T であるのに対し、変異株では C であることを見出した(16)。この結果を確認するため、ルシフェラーゼ遺伝子上流に *cpc* operon のプロモーター領域をつないだレポーター遺伝子を作製して、*Synechococcus* sp. PCC7942 に導入した。その結果、上記の T を他の塩基に置き換えることにより発現量が 10~20% 程度に減少した。さらに、田中寛氏(東大分生研)らの協力を得て、*Synechococcus* sp. PCC7942 由来の RNA polymerase を用いて、*in vitro* 系で確認した(17)。大腸菌ではこの現象がみられないことから、RNA polymerase の生物間の違いが関係していると思われる(17)。実際、両種の RNA polymerase には構造上の違いが見い出される。

ところで、微細藻類は一般に光合成で生育するが、有機物質を利用して生育できるものも多い。しかし、シアノバクテリアは一般にグルコースを利用することはできず、光合成を行っている時にグルコースを与えると有害となる場合もある。その中で *Synechocystis* sp. PCC6803 はグルコースを利用した従属栄養的増殖が可能である。そのため、光合成の突然変異株が多く作られ、維持されている。ところが、この PCC6803 の従属栄養的増殖には時々光を照射すること(間欠光)が必要で、完全暗中には生育できないといわれてきた。また、その光は光合成とは関係なく、青色光が有効である(18)。そこで、照射した場合としない場合の違いを調べ、グルコース添加前の生育条件によっても照射の必要性が異なること、照射しない場合に生育が停止する時、培地中のグルコースが残っていることを見出した(19)。さらに、¹⁴C-グルコースは代謝されてグルタミン酸などに取り込まれるが、照射しないで増殖が停止する場合に、グルタミン酸のレベルが低下していた。そこで、解糖系の酵素活性とその遺伝子発現を調べたところ、fructose 1,6-bisphosphate aldolase をコードする遺伝子 *cfxA* などが間欠光照射により転写産物量が増加していることが明らかとなった(20)。

4. 石灰化する海産性植物プランクトン“円石藻”の系統と円石形成

大気中 CO₂ 濃度の上昇は地球温暖化の原因の一つであり、CO₂ 濃度を安定化させることが人類生存に必須である。CO₂ を固定化する物理的、化学的方法が開発されつつあるが、その固定化にエネルギーが必要であり、そのエネルギーを地球外から到達する太陽光に求めなければ、いずれは二次三次の影響が生じる可能性があるだろう。その意味で、

植物プランクトンにおける環境応答解析

生物による CO₂ 固定、すなわち光合成や石灰化を十分理解し、その利用を図ることが大切である。

円石藻は、ハプト藻と呼ばれるクロロフィル *a* と *c* をもつ植物プランクトンの一群体で、細胞表面に円石と呼ばれる炭酸カルシウムの殻をもっている。沈殿して石灰岩を形成するため、炭素循環の点で生態学的に重要である。ハプト藻のリボソーム構成タンパク質 L27 が“葉緑体”（より正確には“色素体”）DNA にコードされていることを報告した(21)。ついで、CO₂ 固定酵素 rubisco の遺伝子を用いて分子系統解析を行い、円石などの形態を考慮してハプト藻の系統を明らかにした(22, 23)。また、その一種である *Pleurochrysis haptoneofera* の円石付着の程度をセルソータにより測定する系を構築した。それにより、円石形成速度は時間の単位で行われており、pH の低下処理によって円石を溶かした場合、円石の再形成がその 2 時間後には始まっていることを見出した(24)。また、円石には酸性多糖類が含まれているが、レクチン染色により、pH 低下処理では炭酸カルシウムのみが溶け、EDTA 処理により酸性多糖類が細胞から離脱することも明らかとなった(24)。すなわち、円石中の酸性多糖が、2 価カチオン—おそらく円石中のカルシウムとは別のカルシウム—を介して、細胞表面と繋がり、円石が固定されているものと思われる。なお、細胞から離脱した円石を用いて酸による溶解のしやすさを調べたところ、純粋な CaCO₃ に比べ、pH が 0.5~1 程度安定であることも明らかとなった(24)。

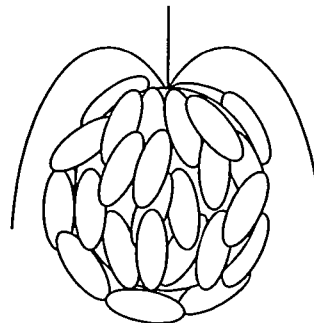


図6 細胞表面に円石（細胞表面の楕円体）を持つハプト藻の模式図。2本の鞭毛と1本のハプトネマをもつ。

5. 軟体サンゴのプロスタノイド合成解析

石灰化という点ではサンゴ礁は円石藻以上に生態系に大きな影響をもっている。軟体サンゴも造礁サンゴほどではないが、石灰化を行いながら群体を形成する。井口和男教授のグループでは軟体サンゴ *Clavularia viridis* がクラブロン(clavulone)と名づけた抗腫瘍性プロスタノイドを持つことを見出した(25)。しかし、軟体サンゴには共生藻 *Symbiodinium* が共生しているため、クラブロンをサンゴ本体が合成しているのか、共生藻が合成しているのかは不明であった。この問題を解決するため、まず少量でのクラブロン測定系を開発し(26)、群落全体に分散していることや石灰化していないポリプの花頭部分にも存在すること、海からサンプリングしてきてから水槽中に置いてもしばらくは保持されていることなどが明らかになった。次に、クラブロンのほとんどすべてが膜画分に存在することが判明したので、サンゴの膜画分と共生藻を互いに混入しないように単離した。クラブロンとその前駆体と予想されるアラキドン酸を測定したところ、共にサンゴの膜画分に含まれることが明らかとなった(27)。このことから、クラブロンは共生藻ではなく、サンゴ自らが合成していると考えられる。一方、エイコサペンタエン酸は共生藻に多く含まれていることも判明した。さらに共生藻の単離培養に成功し、渦鞭毛藻で知られているペリジニン色素と類似のノルカロチノイドも見出された(28)。

Clavularia 属の中で *Cl. viridis* 以外はプロスタノイドをもたない。そこで、リボソームの ITS 領域を基に系統解析を行った。その結果、*Cl. viridis* は他の種と別系統に分かれること、さらに、共生藻で作成した系統樹は宿主のサンゴと異なることが明らかとなった(29)。この結果は、プロスタノイドの合成がサンゴ自らによってなされていることと一致する。また、*Clavularia* 属の宿主とその共生藻の間には系統的な関係はないということの意味

することになり、軟体サンゴでは偶然出会った共生藻と共生関係を結んでいるといえるのではなからうか。生物有機化学研究室の水槽内では、別の種で短期間ではあるが、クラブラリア属の増殖培養が可能となっている。造礁サンゴに比べ成長は速い(30)。培養できるようになれば、今後生合成系の解析がより容易になる。

*Cl. viridis*がクラブロンをどのような目的で生合成し、保持しているのかはわからない。しかし、植物における二次代謝産物が、被食被害からの防御や昆虫の誘引など生物間相互作用に関する目的で多く用いられていることから、クラブロンも何らかの生物間関係でつくられているのかもしれない。

6. 植物プランクトンにおけるリンの利用とヒ素の影響

ヒ素は国内の温泉などに含まれるが、時として井戸水に含まれるなど社会問題となる。一方、バングラデッシュやインドなどでは飲料水に含まれ、人々の健康が脅かされている。ヒ素はまた半導体に用いられているため、半導体を含む電気製品が山野に放置されると環境中に放出される心配がある。そこで、貝瀬利一教授と共同で、植物プランクトンに及ぼすヒ素の影響を調べた。

単細胞性緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* はヒ素濃度が高いと増殖が抑えられ、その濃度はリン酸の影響を受ける。リンとヒ素は化学的性質が似ているため、生体内で拮抗的に反応する可能性が高い。例えば、リン酸 1mM 条件下では、ヒ素 0.5mM で生育に影響が現れ、1mM では生育できない。そこで、ランダムな遺伝子組換えが可能な *C. reinhardtii* を用いてヒ素の影響を解析した。まず、アルギニン要求株に argininosuccinate lyase 遺伝子 *ARG1* を導入して、ヒ素耐性株と感受性株を得た。感受性変異株の AS1 や AS3 はヒ素を細胞内に多く取り込んでしまい、一方、AS2 は、細胞内にあまりヒ素を取り込まないにもかかわらず感受性を示す。AS2 は細胞内のジメチルアルシン酸量が極端に低いことが明らかとなった(31, 32)。すなわち、AS2 では細胞内に入り込んだヒ素の無毒化が進まないと予想される。一方、得られた耐性変異株 13 株はほとんどすべて細胞内のリン含量が高く、取り込まれたヒ素量は低く抑えられていた(31-33)。耐性株の一つ AR3 では *PTB1* と名づけた、部分的にリン酸輸送体と相同性の高い遺伝子が破壊されていて、別のリン酸輸送体と相同性の高い遺伝子(*PTB2*)が常に発現していることが明らかとなった(34)。*PTB2* は高親和性リン酸輸送体の遺伝子と考えられ、*PTB1* はその発現抑制に関わる遺伝子と思われるが、まだその確証は得られていない。野生株ではリンが不足した時にはじめて発現する高親和性(すなわち低濃度のリン酸でも細胞内に取り込む)リン酸輸送体がリンの有無に関わらず発現しており、それによりリン含量が高まっていると考えられる。細胞内リン含量が高いことにより、ヒ素が細胞内に入り込んでもリンとの競合でヒ素による阻害が低く抑えられると理解される。*C. reinhardtii* 細胞では、リン酸が十分供給されている条件では、リンを 17-18 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ chl あるいは 1 細胞当たり 51-54 fmol まで蓄積し、ヒ素は野生株では 60 $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ chl あるいは 1 細胞当たり 0.2 fmol まで蓄積できる。これが野生株における生育の限界のようである。また、培養液中のリン酸とヒ素が 1:1 の分子比(例えば共に 1mM)で与えられると、リン酸 4~8 分子にヒ素 1 分子の割合で細胞内に取り込まれることも明らかとなった(33)。水界生態系におけるリンやヒ素の挙動を理解するには、クラミドモナス以外の植物プランクトンでも明らかにする必要がある。ヒ素の環境汚染の面のみでなく、リン資源の確保の面からもさらに発展させたいところである。なお、本研究の過程で、*C. reinhardtii* における高効率形質転換系も確立した(35)。

7. おわりに

本研究室で進めている研究は、上記以外にも「下等植物における貯蔵多糖類の合成系」、「シアノバクテリアにおける脱水応答機構」、「脂質の不飽和化と光合成への影響」、「微細藻類を用いた CO₂ 固定システムの開発」、さらに「植物プランクトンにおける有機スズの影響」など、それぞれのテーマにこれまで複数の学生が研究し、少しずつ成果

植物プランクトンにおける環境応答解析

が得られている。論文発表したテーマもある。特に貯蔵多糖類に関しては、進化の面でたいへん興味深い結果が得られている。しかし、上にあげたテーマに比べて成果がまだ断片的であるため、さらに論文発表を行ってから、別の機会にまとめたいと思う。

植物プランクトンは水界生態系ではきわめて重要なものであり、人の健康にも関係するものの、その関係が直接見えるものではない。そのため、人の健康などに比べて社会からの関心は必ずしも高くはなく、産業にすぐに利用されるものはあまり多くない。また、純粋な自然科学としてとらえると、生物と環境あるいは生物間の関係は、私たちが想像する以上に複雑かつ多様である。その関係は個々の生物が環境の影響を受けて応答・順化し、さらに適応した結果である。そして、生物の進化もその中にある。それを深く理解し、自然を理解することが地球環境や地域の環境を守るための人類の知恵として重要なのではなからうか。

謝辞

研究室創設以来 10 年間、研究を支えてくださった研究室の教員はじめ学内の教職員、学生、さらに学外の多くの方々に感謝致します。今後とも、更なる発展にご協力をお願いする次第です。

文献

1. Sato, N., M. Tsuzuki, M. Matsuda, T. Ehara, T. Osafune, A. Kawaguchi: *Eur. J. Biochem.* 230: 987-993 (1995).
2. Sato, N., K. Sonoike, M. Tsuzuki, A. Kawaguchi: *Eur. J. Biochem.* 234: 16-23 (1995).
3. Benning, C.: *Ann. Rev. Plant Physiol. & Plant Mol. Biol.* 49: 53-75 (1998),
4. Minoda, A., N. Sato, H. Nozaki, K. Okada, H. Takahashi, K. Sonoike, M. Tsuzuki: *Eur. J. Biochem.* 269: 2353-2358 (2002).
5. 青木元秀、佐藤典裕、都筑幹夫: 日本植物生理学会 2001 年度年会、2001/3、福岡
6. Aoki, M., N. Sato, A. Meguro, M. Tsuzuki: *Eur. J. Biochem.* 271: 685-693 (2004).
7. Yu, B., C. Xu, C. Benning: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 5732-5737 (2002).
8. Sato, N., K. Sugimoto, A. Meguro, M. Tsuzuki: *DNA Research* 10: 229-237 (2003).
9. Sato, N., M. Aoki, Y. Maru, K. Sonoike, A. Minoda, M. Tsuzuki: *Planta* 217: 245-251 (2003).
10. Minoda, A., K. Sonoike, K. Okada, N. Sato, M. Tsuzuki: *FEBS Lett.* 553: 109-112 (2003).
11. Sato, N., M. Hagio, H. Wada, M. Tsuzuki: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 10655-10660 (2000).
12. Hagio, M., Z. Gombos, Z. Várkonyi, K. Masamoto, N. Sato, M. Tsuzuki, H. Wada: *Plant Physiol.* 124: 795-804 (2000).
13. Sato, N., K. Suda, M. Tsuzuki: *Biochim. Biophys. Acta* 1658: 235-243 (2004).
14. Nakajima, Y., M. Tsuzuki, R. Ueda: *J. Appl. Phycol.* 10: 447-452 (1999).
15. Nakajima, Y., M. Tsuzuki, R. Ueda: *J. Appl. Phycol.* 13: 95-101 (2001).
16. Nakajima, Y., S. Fujiwara, H. Sawai, M. Imashimizu, M. Tsuzuki: *Plant Cell Physiol.* 42: 992-998 (2001).
17. Imashimizu, M., S. Fujiwara, R. Tanigawa, K. Tanaka, T. Hirokawa, Y. Nakajima, J. Higo, M. Tsuzuki: *J. Bacteriol.* 185: 6477-6480 (2003).
18. Anderson, S.L., L. McIntosh: *J. Bacteriol.* 173: 2761-2767 (1991).
19. Okada, K., N. Makita, Y. Tabei, M. Tsuzuki: International Meeting on UV/Blue Light: Perception and Responses in Plants and Microorganisms, 2002/12, Okazaki, Japan

20. 田部井陽介、岡田克彦、都筑幹夫、：第45回日本植物生理学会年会、2004/3、八王子
21. Fujiwara, S., M. Kawachi, I. Inouye, J. Someya: *Plant Mol. Biol.* 24: 253-257 (1994).
22. Fujiwara, S., M. Sawada, J. Someya, N. Minaka, M. Kawachi, I. Inouye: *J. Phycol.* 30: 863-871 (1994).
23. Fujiwara, S., M. Tsuzuki, M. Kawachi, N. Minaka, I. Inouye: *J. Phycol.* 37: 121-129 (2001).
24. Takahashi, J., S. Fujiwara, M. Kikyo, M. Tsuzuki: *Mar. Biotechnol.* 4: 94-101 (2002).
25. Kikuchi, H., Y. Tsukitani, K. Iguchi, Y. Yamada: *Tetrahedron Lett.* 24: 1549-1552 (1983).
26. 福永敦子、渡邊謹三、藤原祥子、井口和男、都筑幹夫：第3回マリンバイオテクノロジー学会、1999/5、筑波
27. Hashimoto, N., S. Fujiwara, K. Watanabe, K. Iguchi, M. Tsuzuki: *Lipids* 38: 981-987 (2003).
28. Suzuki, M., K. Watanabe, S. Fujiwara, T. Kurasawa, T. Wakabayashi, M. Tsuzuki, K. Iguchi, T. Yamori: *Chem. Pharm. Bull.* 51: 724-727 (2003).
29. Fujiwara, S., K. Yasui, K. Watanabe, T. Wakabayashi, M. Tsuzuki, K. Iguchi: *Mar. Biotechnol.* 5: 401-407 (2003).
30. 石川俊介、鈴木基哉、藤原祥子、渡邊謹三、井口和男、都筑幹夫：第7回マリンバイオテクノロジー学会、2004/6、札幌
31. Kaise, T., S. Fujiwara, M. Tsuzuki, T. Saitoh, C. Matsubara: *Appl. Organomet. Chem.* 13: 107-111 (1999).
32. Fujiwara, S., I. Kobayashi, S. Hoshino, T. Kaise, K. Shimogawara, H. Usuda, M. Tsuzuki: *Plant Cell Physiol.* 41: 77-83 (2000).
33. Kobayashi, I., S. Fujiwara, K. Shimogawara, C. Sakuma, Y. Shida, T. Kaise, H. Usuda, M. Tsuzuki: *Plant Cell Physiol.* (in press).
34. Kobayashi, I., S. Fujiwara, K. Shimogawara, T. Kaise, H. Usuda, M. Tsuzuki: *Plant Cell Physiol.* 44: 597-606 (2003).
35. Shimogawara, K., S. Fujiwara, A. Grossman, H. Usuda: *Genetics* 148: 1821-1828 (1998).