電気泳動法的手法による 干潟底泥に存在するプロテアーゼの分析

中村 健一

県立広島大学生命環境学部環境科学科
(〒734-8558 広島県広島市南区宇品東1-1-71)

[平成18年 9 月 8 日受理]

Development of an Electrophoretic Method to Analyze Proteases in Tideland Sediments

Ken-ichi NAKAMURA

Department of Environmental Sciences, Faculty of Life and Environmental Sciences,
Prefectural University of Hiroshima
(1-1-17 Ujinahigashi, Minami, Hiroshima, Hiroshima 734-8558)

[Received September 8, 2006]

Summary

We present here an electrophoretic method to analyze proteases involved in tideland sediments based on a modified method reported by Heussen and Dowdle. The method revealed at least five proteases with different molecular masses in the tideland sediments from the Rokkaku River in Saga City. These proteases are selectively distributed in the soil fraction, but not in the tideland seawater. The electrophoretic analysis showed that there were marked differences in the protease patterns obtained from the sediments of various estuary tidelands; the Kamo River in Takehara City, the Enko River in Hiroshima City, and the Rokkaku River in Saga City. These results suggested that the proteases secreted from microorganisms into the tideland sediments are significantly influenced by the microorganism species and also environmental conditions that surround the tidal flats.

Moreover, we have found that the activities of the proteases revealed in an electrophoretic gel were quantitatively analyzed using image editing software.

Key words: Protease, Marine, Sediment, Electrophoresis, Enzyme

1. はじめに

海水浄化作用、食物連鎖の基盤となる栄養塩類の産生、及び動植物の枯死や排泄物に由来する有機成分の分解など、数多くの代謝反応が干潟において活発に営まれ、干潟内の生態環境が維持されている。これらの生態

環境の基盤形成に関わる基本的な代謝活性の多くは、干潟底泥に生息する細菌、菌類、原生生物、線虫などのいわゆる微生物、あるいはそれら微生物から分泌された酵素活性によって担われている¹⁻³⁾。

微生物による代謝活性、とりわけタンパク質加水分解活性は、デトリタス中、あるいは生物遺骸から放出され

るタンパク質をペプチドやアミノ酸に分解する反応であり、干潟、及び海洋生態系に果たす役割は極めて重要であると考えられる。実際に、Keil らを始めとした多くの研究者は、海域や干潟に生息する従属栄養生物にとって、アミノ酸が主要な窒素栄養源であることを報告⁴⁶⁾している。さらに Bidle ら⁷⁾は、タンパク質を加水分解する酵素、すなわちプロテアーゼに対する活性阻害剤の添加が、珪藻類の壊死から可溶化される珪素の循環過程を阻害し、海域の一次生産者である珪藻類の生育に悪影響を与えることを報告した。さらに我々は、干潟底泥へのタンパク質の添加が、微生物総量の指標となる ATP バイオマスの増加を伴わない状態で、リン酸塩の供給に深く関わるフォスファターゼ活性の著しい活性増加 (500~600%) を引き起こすことを報告⁹⁾するとともに、添加されたタンパク質が泥質プロテアーゼにより加水分解作用を受け、ペプチドに分解されていることを明らかにした⁹⁾。

以上の事実は、干潟底泥内に存在するプロテアーゼの動態を探ることは、干潟、及び海洋生態系に関与する物質代謝の基礎的事象を理解するうえで重要であることを明確に示している。しかしながら今まで、底泥を含めた生態環境内のプロテアーゼに関わる研究は、人工基質を添加した総プロテアーゼ活性測定に限定され、個々のプロテアーゼの分布、及び種類に関する研究例は皆無である。したがって、例えばある干潟底泥内に、何種類のプロテアーゼが存在して分解活性が担われているのか、あるいは干潟底泥間のプロテアーゼが同一であるのかという基本的な問いには全く答えることができない。

我々はこれらの疑問に対して答えるべく、プロテアーゼ分析法の開発について検討を進めてきた。その結果、底泥中に複数のプロテアーゼが存在することを初めて検出することに成功した。以下分析方法の紹介と併せ、複数の干潟泥質へ適用した結果についても報告する。

2. 実験方法

2. 1 干潟からの底泥採土と試料の調製

有明海に臨む佐賀県佐賀市六角川河口干潟、広島県竹原市賀茂川河口干潟、及び広島市内の海田湾に開口する猿俣川河口干潟を対象とし、それぞれ6月の大潮期の干潟干出時に、表層から1~3 cm 間の部分の底泥を採取した後、1 mm のナイロンメッシュ篩を通過した土壌を対象として以下のように試料を調製した。すなわち、分析対象とした湿重量0.5gの干潟底泥に、電気泳動用試料緩衝液 (0.125 M Tris-HCl, pH 6.5, 50 mM Dithiothreitol, 12% Glycerol, 2% Sodium lauryl sulfate (SDS), 0.0001% Bromophenol blue) を0.5ml 添加し、遠心分離用サンプルカップ内で充分に攪拌した後、34kHz 超音波処理 (Us-1, Asone Co., Osaka city, Japan) を10min 行っ

た。終了後ステンレスの針で攪拌・混合を繰り返した後、再び超音波処理を10min 行い、プロテアーゼを可溶化した。なお超音波処理間は試料外部の槽内に碎片した氷を加え、温度が20℃ 以上に上昇しないようにした。次にサンプルカップを直接6,000×g の遠心分離にかけ、得られた上澄み液をプロテアーゼの分析用試料として以下の実験に用いた。

2. 2 プロテアーゼの電気泳動的分析

土壌試料中のプロテアーゼを解析する目的で、生化学分野においてタンパク質分離・分析の汎用手段となっている Laemmli¹⁰⁾ の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) と Heussen と Dowdle のプロテアーゼ再活性化法¹¹⁾ を組み合わせ、以下のように改変して分析法を確立した。すなわちスラブ型電気泳動装置 (Atto ラピタスミニスラブ AE-6500) 用の厚さ1 mm のガラス平板対 (8×9 cm) 内に、終濃度が0.15% (w/v) ゼラチン、10% (w/v) Acrylamide, 0.375 M Tris-HCl (pH 8.5), 6.3 % Glycerol, 0.1% SDS になるように混合した電気泳動分離ゲルを作成した。分離ゲルが完全に重合した後、Acrylamide の終濃度を3.25% (w/v) とした濃縮ゲルを作成した。次に、泳動用緩衝液 (0.1% SDS, 25 mM Tris, 0.19 M Glycine) を装置下部に満たした電気泳動槽に、ゲルを含むガラス平板対を取り付けた。上部にも同泳動用緩衝液を満たした後、ゲル上に作成した試料溝に、底泥より前章の方法で調製した試料を通常20 µl 添加後、20mA の定電流で約2時間電気泳動を行った。

電気泳動後、プロテアーゼの再活性化は Heussen と Dowdle の方法¹¹⁾ を参考にして、ゲルからタンパク質変性剤 SDS を取り除く目的で、泳動後のゲルを0.5% の TritonX-100 で2回の液交換をしながら2時間振盪した後、プロテアーゼ再活性化溶液 (50 mM Glycine, pH 8.5) に浸して1時間振盪した。次に、液交換を行い24℃ 下で18時間静置した後、タンパク質染色液 (0.0001% Amido black, 30% Ethanol, 7% Acetic acid) にゲルを浸して、ゼラチンの染色を2時間振盪しながら行った後、非特異的にゲルに吸着した Amido black を脱色液 (30% Ethanol, 7% Acetate) で取り除いた。プロテアーゼの存在は、ゼラチン染色による青色のゲル中に、プロテアーゼが作用してゼラチンを分解・消失することによって生じた青白色のバンドを検出することによって行った。

試料中の底泥に含まれるタンパク質分析は、ゼラチンを含まないゲルを用いて同様に SDS-PAGE を行った後、銀染色法 (銀染色試薬第一, 生化学工業社) で染色を行った。

最終的に得られたプロテアーゼパターンは、デジタル

ルカメラで撮影後、画像ファイルをパソコンに取り込み、ゲル画像解析ソフト (Gel-pro, Media Cybernetics 社) を用いて、必要に応じ、画像処理、プロテアーゼ活性の定量的解析、及びプロテアーゼバンドの移動距離測定を行った。

3. 結果と考察

3. 1 干潟底泥に存在するプロテアーゼの検出

河川、及び海域から負荷された有機物に対する干潟微生物の活発な加水分解反応、とりわけタンパク質分解活性は、海域や干潟生態系における物質循環を担う重要な反応として Mayer¹²⁾を始め、多くの研究者により活性測定がなされてきた。しかしながら測定は人工基質を用いた総プロテアーゼ活性測定に限定され、例えば干潟間の底泥に存在するプロテアーゼの種類数、あるいは個々のプロテアーゼの活性分布比較など、プロテアーゼの種類と干潟環境に関する重要な情報についてはほとんど得られていない現状である。これは、底泥内に存在する個々のプロテアーゼの分離・分析手法が確立されていないことに起因している。

本研究は、体組織、体液中のプロテアーゼの分離・検出に用いられている Heussen と Dowdle の方法¹³⁾を応用し、干潟底泥中のプロテアーゼ分析法を確立することを目的としてなされた。方法においては、ゲルに添加するゼラチン濃度を原法の0.1%から0.15%に増加し、ゲル中のプロテアーゼ活性による消化された部分と非消化部分の対比を明確にした。さらに Glycine を含む再活性化溶液の温度を従来の37℃に変え、自然環境で発現する底泥プロテアーゼを考慮して24℃に設定する一方、原法の3～5時間の反応時間を18時間とし、プロテアーゼによりゲル中のタンパク質の一種であるゼラチンの消化が十分に施された後に検出を行うことにした。

さらに分析においては特に、底泥から効果的にプロテアーゼを抽出する方法についての検討が重要な課題であった。この問題解決には、タンパク質の一種であるアルブミンを干潟底泥に添加した場合、表面活性剤の一種である SDS 存在下での超音波処理により、泥質粒子に吸着したアルブミンがほぼ100%可溶化されるという先行研究の結果⁹⁾が有効な情報となった。その結果を踏まえ、高濃度の SDS を含むタンパク質処理液を土壌に添加し、十分な時間の超音波処理を行って土壌からのプロテアーゼを可溶化した後、遠心分離を行い、得られた上澄み液を分析試料とした。

Fig. 1 のレーン P は、以上の検討を踏まえたプロテアーゼ分析法を、実際に佐賀市六角川河口泥質試料に適用して得られたプロテアーゼパターンである。一様に濃い青色に染色されたゼラチンを含むゲル上に、実線の矢

印で示した4種類の明確な青白色を呈するバンドと、点線の矢印で示したわずかに白いバンドが存在することが明らかになった。この青白色バンドが生ずる理由は、Heussen と Dowdle の報告¹³⁾によれば、試料中の各プロテアーゼが SDS-PAGE の原理により、分子量にしたがって移動度が異なる位置に分離された後、再活性化処理によってプロテアーゼ活性を回復し、プロテアーゼに接触しているゲル中のゼラチンを消化することに基づいている。その結果、ゼラチン染色操作に対して消化されたゼラチン部分は反応せずし、青白色を呈することになり、プロテアーゼの位置が同定できる。以上のことから、対象とした六角川河口干潟底泥には、移動度の少ない位置に一種類 (T)、そして移動度中位部分に矢印で示した4種類、併せて少なくとも5種類の分子量の異なるプロテアーゼが存在することが明らかになった。原理から予想されることではあるが、本検出法はプロテアーゼの分離としてタンパク質変性剤である SDS 存在下での電気泳動を行っているため、同定されたプロテアーゼは、変性後の再活性化処理で活性を回復したプロテアーゼに限定される。したがって、本研究で明らかになったプロテアーゼ以外にも、プロテアーゼが干潟底泥には存在する可能性が残されている。

Fig. 1 Detection of proteases and staining of proteins in sediments from estuary tidelands

Sediment samples of the lanes (P, W, S2 and P2) were from the Rokkaku River in Saga City of the Saga prefecture. Those of lanes T and H were from the estuary tidelands of the Kamo River in Takehara City, and from the Enko River in Hiroshima City, respectively. Lane S indicates the protease detection of seawater from the tideland of the Kamo River. Protease detection (S, P, W, T, H). Protein staining (S2, P2)

干潟間隙水 (S2) 及び底泥 (P2) 試料中に存在するタンパク質を、ゼラチンを含まない通常の Laemmli 法¹⁰⁾による SDS-PAGE で分離し、タンパク質の高感度検出法として用いられている銀染色法で分析した (レーン S2, P2)。しかしながら泥質土壌分画 (レーン P2) の高分子量領域には、矢印 (T) で示されたプロテアーゼに相当する位置に、黒く染色されたタンパク質の存在が示されているものの、移動度中間部分の括弧で括られた 4 種類のプロテアーゼ活性バンドに相当する位置には、明確なタンパク質の存在を検出することはできなかった。この事実から、銀染色検出限界以下 (通常数 10ng >) の極微量のプロテアーゼタンパク質が、高いプロテアーゼ活性をゲル上に示していることが明らかになった。

3. 2 プロテアーゼの干潟底泥内分布

Fig. 1 レーン S は、干潟底泥を含む海水を遠心分離することによって得られた上澄み液の分画、すなわち海水分画に等量の電気泳動用試料緩衝液を加え、含まれるプロテアーゼを同様の方法で解析した結果である。白いバンドの出現は全く見られず、干潟底泥におけるタンパク質分解活性は、海水部分にはほとんど存在しないことが明らかになった。一方、レーン W は、干潟底泥を遠心分離して得られた沈殿を人工海水で懸濁し、再び遠心分離操作を 3 度行って得た底泥土壌のプロテアーゼを分析した結果である。その結果、無処理の干潟底泥を対象としたレーン P とほぼ同様の位置に同程度の青白色バンドが検出され、干潟底泥に存在するプロテアーゼは、洗浄後も土壌分画に存在していることが明らかになった。土壌酵素の多くが、微生物から体外に分泌され、腐葉土・酵素複合体を形成して存在する^{13,14)}という知見と併せて考察すると、この結果から、干潟微生物によって体外に分泌されたプロテアーゼは、干潟の砂土もしくは泥粒子に固く結合していることが示唆された。

3. 3 プロテアーゼパターンの干潟間比較

次に、干潟におけるプロテアーゼの役割や干潟の環境状態とプロテアーゼの関係を明らかにする目的で、六角川河口干潟底泥に検出されたプロテアーゼパターンが、環境条件の異なる他干潟とはどの程度異なるかについて検討を行った。そこで、広島県竹原市賀茂川河口干潟、及び広島市内の海田湾に開口する猿俣川河口干潟の底泥についても、同様のプロテアーゼ分析を行った。その結果、賀茂川河口干潟 (Fig. 1 レーン T) においては、移動度の大きい位置を含め、少なくとも 2 種類のプロテアーゼ活性バンドの存在が見いだされ、六角川河口干潟とは分子量において明確に異なるプロテアーゼが存在することが明らかになった。さらに興味あることに、猿俣川河口干潟底泥 (レーン H) の場合は他二カ所とは全く

異なり、移動度の低い分子量の大きな領域に高いプロテアーゼ活性の存在が認められるものの、プロテアーゼバンドはスメアーな状態であり、特定の鮮明なバンドの存在を見いだすことができなかった。この結果は、多種類のプロテアーゼ同士が活性を保ちつつ、相互に消化と会合を示して多型体として存在していることを示唆している。

対象とした 3 干潟の中で、六角川河口と賀茂川河口の干潟は甲殻類をはじめ生物層が多様であり、吉田の分類基準¹⁵⁾、及び我々の提唱した ATP バイオマス値とフォスファターゼ活性測定による干潟環境類型化指数による判定¹⁶⁾では豊栄養海域に属する干潟として分類されたのに対し、猿俣川河口干潟は、マクロベントスの生息を見いだすことができなかった。さらに、この猿俣川河口干潟は、ATP バイオマス値とフォスファターゼ活性測定予備実験の結果、底泥の総窒素、総リン酸、さらには強熱減量測定による有機物含有量が著しく高く、腐栄養海域に属する干潟と判定¹⁶⁾され、他の二カ所の干潟とは著しく異なる環境であった。したがって猿俣川河口で観察されたゲル上部のスメアーなプロテアーゼ活性バンドは、汚染された干潟の特性とも推定され、プロテアーゼパターン解析が、環境汚染の新たな指標となる可能性を示している。さらに、三カ所の干潟底泥のプロテアーゼパターンの違いは、上記の環境類型の差違と併せ、地理的違いによる生息微生物種の違いや、底泥がおかれた生態環境を微妙に反映していると思われる。実際に、同じ河口干潟においても、河川が流入し常時冠水している箇所と、干潮時に干出する箇所では、本法で分析された底泥プロテアーゼパターンにおいて明らかに異なる結果が得られている (未発表)。現在、さらに多くの干潟を対象とし、底泥のプロテアーゼパターンの特性と干潟の生態的環境との関連性について検討を進めている。

3. 4 プロテアーゼパターンの定量的解析

本研究により干潟底泥に存在するプロテアーゼを、電気泳動的手法により青色に染色されたゲル上に、青白色のバンドとして視覚的にとらえることに成功した。この場合、プロテアーゼ活性が高い場合は、基質であるゼラチンの消化がすみやかに進行することから、白色がより明確になると推定される。したがって、白色の程度から定量的にプロテアーゼの活性を比較検討できる可能性が期待できる。そこで次に、青白色の濃淡とプロテアーゼ活性量との間にどの程度の相関があるのかについて検討を行った。Fig. 2 A は、六角川河口干潟底泥から SDS を含む泳動用タンパク質処理溶液に可溶化された上澄み液分画を分析試料とし、それぞれ、2, 4, 10, 20 μ l 添加し、前述のプロテアーゼの電気泳動的分析を行った結果である。Fig. 1 で明らかになった点線矩形内の 3 種類の

プロテアーゼを対象とし、相当する部分を拡大した。添加量の増加に対応して白色部分が濃くなることから、それぞれのプロテアーゼバンドについて定性的に認められた。そこで次に、定量的な比較が可能かどうかを検討する目的でゲル画像解析ソフトを用い、Fig. 2A の黒白反転を行った後 (Fig. 2B)、バックグラウンドの平坦化処理を行い、各レーンの濃度を、グラフ表示した (Fig. 2C)。それぞれバンドに相当する部分がピークとして表示され、ピーク長を測定することで活性の程度が相対的に比較できる。Fig. 2D に、試料の添加量とピーク長の関係をグラフにプロットするとともに、回帰式とその相関係数を示した。各プロットはほぼ直線上に回帰され、その相関係数 r は、対象とした a, b, c のプロテアーゼに対してそれぞれ 0.998, 0.982, 0.988 となった。この結果、電気泳動法と画像解析ソフトを用い、泳動パターンを通し

て得られた各プロテアーゼの活性を定量的に比較検討できることがわかった。

4. まとめ

本研究により各干潟底泥中には、土砂、あるいはシルトに固く結合した、分子量の異なるプロテアーゼが複数存在することが明らかになった。一般にプロテアーゼは、反応機構上、セリンプロテアーゼ、チオールプロテアーゼ、あるいは金属プロテアーゼなどに分類されていることが知られている。本研究で明らかにした複数のプロテアーゼについて、各種プロテアーゼ阻害剤などを用いた研究により反応機構上の分類を進め、これら干潟底泥プロテアーゼの特性と環境との関わりをさらに明らかにしていきたいと考えている。なおこのプロテアーゼ分析

Fig. 2 Quantitative analysis of protease bands revealed on a gel using the present method

- (A) Active bands with protease activities detected by the present method. The number on each lane indicates the ratio of the sample volume applied on the gel ($20\mu\ell = 1$, lane C).
- (B) Monochrome reversing image of the dotted area in Fig. 2A.
- (C) Densitometric analysis of each band with protease activity in Fig. 2B.
- (D) Graphical plot of the relation between each peak height and the amount of sample used for the assay.

方法はタンパク質変性剤である SDS 存在下で電気泳動を行っているため、同定されたプロテアーゼは、変性後の再活性化処理で活性回復可能なプロテアーゼ種の同定・検出に限定される。併せて示された活性の程度は、必ずしも自然環境における活性をそのまま反映してはいないことについても留意する必要がある。しかしながら、ペプシン、プロメライン、トリプシン、プラスミン、アクチニジンを始め、我々が試みた範囲では多くのプロテアーゼが本法で検出・活性を示すことが明らかにされている（未発表）。また実際に複数のプロテアーゼが土壤中で検出されることに併せ、画像ソフトの活用により、同一バンドで示されるプロテアーゼ種の間では、相互に活性の定量的な比較検討が可能であることが示された。以上のことからこの電気泳動的手法によるプロテアーゼ分析法は、今後、干潟における物質循環や食物連鎖の基盤形成に重要な役割を持つとされている底泥のプロテアーゼと環境との関係を検討する上での有用な手段になると思われる。

近年、環境変異に対する土壤微生物種の集団的变化を探索手段として、PCR 法と電気泳動的 DNA 分析法を組み合わせた DGGE 法^{17,18)}（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法）が幅広く用いられている。しかしながら DGGE 法は、対象となる土壤中の遺伝集団の変化を知る手段としては有効であるものの、環境変化に応じてどのような酵素が生態系内で実際に発現され、代謝活性変動を遂げているのかについて具体的な情報は全く得ることはできない。したがって、本研究によって明らかにしたような干潟環境を担う特定の酵素の種類と活性量を活性パターンとして電気泳動的に表示できるいわゆる“土壤ザイモグラフィ法”とも称すべき手法と従来の DGGE 法と組み合わせることは、微生物の環境的変位の量的、質的变化の解析にとって極めて有用であると思われる。両方法の連携は、干潟のみならず土壤も含めた微生物における生態系の環境変異を探索の研究に対して大きな貢献をすることが期待される。

今後は存在の明らかになったプロテアーゼの Native な状態での存在様式の解明と併せてフォスファターゼやウレアーゼなど生態循環系の基盤形成を担う主要な微生物分泌酵素の土壤ザイモグラフィの開発を進め、干潟の環境変化と干潟の微生物代謝の活性変動との連関の解明にも応用していきたいと考えている。

謝 辞

本研究は、平成16～18年度学術振興会科学研究費基盤(C)及び平成16年度(財)河川管理財団からの河川整備基金助成事業研究費助成(16-1-4-27)によってなされた。

要 約

電気泳動法的手法を用い、干潟底泥に含まれるプロテアーゼをゼラチンゲル上に分離・分析する方法を確立した。その結果、佐賀県佐賀市六角川河口干潟土壤に分子量の異なる少なくとも5種類のプロテアーゼの存在を明らかにすることができた。また竹原市賀茂川河口干潟、及び広島市猿俣川河口干潟の底泥についても分析した結果、3カ所の干潟底泥はそれぞれ異なるプロテアーゼパターンを示すことがわかった。さらに、底泥を海水と土壤部分に分離して分析した結果、プロテアーゼは総て土壤部分に存在することが明らかになった。

次に、本分析法で、分離・分析された各プロテアーゼの活性を定量的に検討する可能性を検討した。その結果、電気泳動用画像処理ソフトを用いることにより、プロテアーゼパターンとしてゲル上に分析された個々のプロテアーゼ活性を、定量的に比較検討できることが明らかになった。

文 献

- 1) 栗原 康：干潟は甦るか、pp139-199,「干潟は生きている」,岩波新書(1980)
- 2) Meyer-Reil, L.-A.: Seasonal and spatial distribution of extracellular enzymatic activities and microbial incorporation of dissolved organic substrates in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1748-1755 (1987)
- 3) 大和田紘一：総論：海洋微生物研究の現状と展望, 月刊海洋, **23**, 5-9 (2000)
- 4) Palenik, B. and Morel, F.M.M.: Amino acid utilization by marine phytoplankton: A novel mechanism. *Limnol. Oceanogr.*, **35**, 260-269 (1990)
- 5) Keil, R.G.: Dissolved combined amino acids: Chemical form and utilization by marine bacteria. *Limnol. Oceanogr.*, **38**, 1256-1270 (1993)
- 6) Dauwe, B., Middelburg, J.J., Van Rijswijk, P., Sinke, J., Herman, P.M.J. and Heip, C.H.R.: Enzymatically hydrolyzable amino acids in North Sea sediments and their possible implication for sediment nutritional values. *J. Marine Res.*, **57**, 109-134 (1999)
- 7) Bidle, K.D., Brzezinski, M.A., Long, R.A., Jones, J.L. and Azam, F.: Diminished efficiency in the oceanic silica pump caused by bacterially-mediated silica dissolution. *Limnol. Oceanogr.*, **48**, 1855-1868 (2003)
- 8) 中村健一, 高谷知恵子, 斎藤 博, 網谷貴彰, 睦田秀実：土壤フォスファターゼ活性値と ATP バイオ

- マス値に基づく干潟土壌環境類型化式の応用, 土木学会論文集, VII-28, 23-28 (2003)
- 9) Nakamura, K.-I.: Analysis of protease digestion patterns in tideland sediments using SDS-PAGE. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* 2006 (in press)
 - 10) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970)
 - 11) Heussen, C. and Dowdle, E.B.: Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* **102**, 196-202 (1980)
 - 12) Mayer, L.M.: Extracellular proteolytic enzyme activity in sediments of an intertidal mudflat. *Limnol. Oceanogr.* **34**, 973-981 (1989)
 - 13) Ruggiero, P. and Radogna, V.M.: Properties of lacase in humus-enzyme complexes. *Soil science*, **138**, 74-87 (1984)
 - 14) Pascual, J.A., Moreno, J.L., Hernández, T. and García, C.: Persistence of immobilised and total urease and phosphatase activities in a soil amended with organic wastes. *Biores. Technol.* **82**, 73-78 (2002)
 - 15) 吉田陽一: 低次生産段階における生物生産の変化, pp92-104, 「水圏の富栄養化と水産増養殖」, 水産生物学会編 恒星社厚生閣 (1973)
 - 16) Nakamura, K.-I. and Takaya, C.: Assay of phosphatase activity and ATP biomass in tideland sediments and classification of the intertidal area using chemical values. *Marine Pollution Bulletin*, **47**, 10-17 (2002)
 - 17) Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, A.C., Cacco, G. and van Elsas, J.D.: Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J. microbial. Methods* **38**, 1-15 (1999)
 - 18) Maarit Niemi, R., Heiskanen, I., Wallenius, K. and Lindstrom, K.: Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Methods* **45**, 155-165 (2001)