

特集：第I期（2004年-2008年度）中期計画の成果

－ 総 説 －

**極限環境生物圏研究センター，3プログラム研究
（極限環境生物展開研究プログラム・深海バイオ事業化推進計画および地殻内微生物研究プログラム）
における第1期中期計画（2004-2008年度）研究成果トピックス**

堀越 弘毅¹，

極限環境生物展開研究プログラム・深海バイオ事業化推進計画および地殻内微生物研究プログラム研究員一同

極限環境生物圏研究センターでは，この5年間，海洋の多様な生物や生態系が持つ特殊・固有な機能を把握すると共に，その産業応用等により，社会や経済の発展に資することを目的として研究を行ってきた。その結果，JAMSTECならではの独創性の高い，インパクトのある，世界的に優れた成果を挙げてきた。また，民間企業との共同研究により，有用酵素の産業応用等，社会に役立つ研究開発も進めている。ここでは，同センター・極限環境生物展開研究プログラム・深海バイオ事業化推進計画および地殻内微生物研究プログラムにおける，この中期計画5年間に得られた数多くの研究成果の中から，いくつかのトピックを紹介する。なお，これらの研究成果の詳細及びそれ以外の研究成果については，平成21年3月刊行の「極限環境生物圏研究・研究報告書」を参照していただきたい。また，同センター・海洋生態・環境研究プログラムの研究成果の概要報告は，別論文として本誌9巻1号に報告している。

キーワード：極限環境生物，極限環境微生物，深海バイオテクノロジー，地殻内微生物

2009年4月3日受領；2009年4月10日受理

1 独立行政法人海洋研究開発機構・極限環境生物圏研究センター

代表執筆者：

堀越 弘毅

独立行政法人海洋研究開発機構・極限環境生物圏研究センター

〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町2-15

+81-46-867-9609

horikok@jamstec.go.jp

著作権：独立行政法人海洋研究開発機構

– Review –

Research topics for three programs (Extremophiles Research Program, Cooperative Research Project for Extremophiles and Deep Subsurface Extremophiles Research Program) of Extremobiosphere Research Center in last 5 years, 2004-2008.

Koki Horikoshi*¹ and Researchers of Extremophiles Research Program,
Cooperative Research Project for Extremophiles and Deep Subsurface Extremophiles Research Program.

Extremobiosphere Research Center (XBR) have been challenging to discover not only basic studies for Marine Microbiology, Biology and Ecosystems, but also their application studies for contributing to develop our society and economy. Then we have obtained many creative scientific results, and useful biomaterials cooperation with the industrial companies. In this article, the research topics of three programs, Extremophiles Research Program, Cooperative Research Project for Extremophiles and Deep Subsurface Extremophiles Research Program, were introduced and their summaries were described. The detailed report of those three programs results was published separately with this report, in the book “Research Report of Extremobiosphere Research Center (March, 2009, JAMSTEC)”. By the way, the report of another program of XBR, Marine Biology and Ecology Research Program, was published in JAMSTEC-R Vol. 9, number 1.

Keywords : Extremophiles, Extremophilic microorganisms, Deep-sea biotechnology, Deep subsurface microorganisms

Received 3 April 2009 ; accepted 10 April 2009

1 Extremobiosphere Research Center, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology

Corresponding author:

Koki Horikoshi

Extremobiosphere Research Center, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology

2-15, Natsushima, Yokosuka 237-0061, Japan

+81-46-867-9609

horikok@jamstec.go.jp

Copyright by Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology

1. 海底下深部堆積物中の好気性細菌の世界 ～地球深部探査船「ちきゅう」の採取した下北沖 コアの解析～

1.1. 概要

2006年8月から10月にかけて地球深部探査船「ちきゅう」を用いて下北半島東方沖の掘削試験が行われた。水深1,180 m地点から海底下365 mまで非ライザー掘削によって得られたコア堆積物中に酵素活性を見出し、さらに非常に多くの好気性細菌の存在を培養・分離によって明らかにした。また、分離菌が生産する酵素の解析も合わせて行った。本研究成果は、学術誌*Extremophiles*, 12, 519-527, 2008 (Kobayashi et al., 2008) に掲載された。

1.2. 背景

地殻という地球の深部環境には膨大な微生物バイオマスが存在していると考えられている。世界中で行われてきた海底下200～500mの深部掘削から得られたコアサンプル1 cm³当たりにおける培養可能な細菌数は10⁶オーダーが最大とされている。さらに海底下約1,600 mまでの深度においては10⁶オーダーの染色による微生物細胞数が報告されている。これらの値から推測される地殻内の微生物バイオマス量は陸域のバイオマス量よりも遥かに多いことが示唆され、地殻内は地球最大の生命圏であると言われている。

1.3. 実験方法及び結果の概要

1.3.1. コア堆積物中の酵素活性

堆積物コアサンプルは船上において処理され、4℃で保管された。その一部を遠心分離し、さらに滅菌口過を行った溶液を酵素活性検出キットに供した。その結果、酸性ホスファターゼ、C4エステラーゼ活性が検出され、さらにカタラーゼ活性やチトクロムオキシダーゼ活性なども見出さ

れた。そこで各コアサンプル中の酵素活性を定量的に測定した(表1)。海底表層から342.5 mまでの殆どのコアサンプル中に酵素活性が認められ、特にカタラーゼ活性が見出されたことから好気性細菌の存在が示唆された。

1.3.2. 好気性細菌数と分離

種々の寒天平板培地、培養条件下でコアサンプル中の好気性細菌数を測定するとともに純粋分離を行った。コアサンプルを適宜希釈した溶液をマリンアガー2216 (pH5, 7, 及び9に調整) に塗抹し、4℃, 15℃, 30℃並びに50℃で培養し、生育した菌数を調べた。図1に示した結果から判るように、コアサンプル中の好気性細菌数は予想外に多く、最大数はコア番号24-4 (212.5 mbsf)において 2.4×10^8 cells cm⁻³に達していた。また、190 mbsfから345 mbsfにかけて10⁷オーダーの菌数が見出され、これまで報告されている培養可能な菌数に比べて100～1000倍も多いことが明らかになった。各培地から優占種や変わった菌を純化し約500株を分離した。

1.3.3. 分離菌の生産する酵素

分離菌の16S rRNA遺伝子配列を決定し、系統解析を行った結果、4種の門 (*Actinobacteria*門, *Bacteroidetes* / *Chlorobi*門, *Firmicutes*門および*Proteobacteria*門) に分類され、さらにこれらは9, 5, 31および17の属種に細分類された。

得られた分離菌がどのような酵素を生産するかを14種類のプレートを用いたアッセイ法により調べたところ、約50%の菌はホスファターゼ、リパーゼ、アミラーゼを生産し、10-20%は、プロテアーゼ、核酸分解酵素及びキチナーゼを生産していることが明らかになった。この他、エンドグルカナーゼ、キシラナーゼ、アルギン酸分解酵素生産菌も僅かに存在した。他方、魚類などには多く含まれる

Table 1. Enzyme activities in the core sediment samples.

表1. コア堆積物中の酵素活性.

コア番号	深度 (mb sf)*	タンパク質 (mg cm) ⁻³	酸性ホスファターゼ (mU cm) ⁻³	C4エステラーゼ (mU cm) ⁻³	カタラーゼ (mU cm) ⁻³
1-1	0.5	0.112	0.05	<0.01	<10
1-4	4.8	0.632	0.072	0.178	52
2-1	8.0	0.788	<0.01	0.644	46
3-2	13.4	0.57	0.12	0.128	126
6-3	48.2	0.652	0.042	0.758	<10
12-4	106.7	0.62	0.068	0.87	480
21-4	190.4	0.15	0.042	0.064	<10
24-4	212.5	0.212	<0.01	0.66	60
24-4	216.9	0.464	0.038	0.322	776
38-7	342.5	0.22	0.072	1.02	58

*meter below seafloor

コンドロイチン硫酸を分解する菌, 海藻由来の寒天やカラギーナンを分解する菌は皆無だった. 各コアサンプル中における優占菌種は異なるものの, 生産される酵素の分布は比較的, 類似していることが判った (図2).

1.3.4. アルカリ耐性菌と産生酵素

コア堆積物から分離された菌の予想外な特徴として, その殆んどがアルカリ耐性菌であることが明らかになった. 即ち, pH 10に調整した培地に生育可能な分離菌は, 499株中, 実に90%にあたる450株であった. 但し, いわゆる好アルカリ性細菌とは異なり, アルカリ性培地よりも中性培地上の方が, 生育が良好であったことから, 高アルカリ性下でも生育可能なアルカリ耐性菌であると判断した. 何故, コア堆積物から分離された菌株の殆んどが耐アルカリ性であるのか, それは必然なのか偶然なのかは, 今のところ明確ではないが, 地殻内はアルカリ (耐) 性菌の王国であるかもしれないという可能性を秘めている.

2. 世界で初めて微生物によるメタンハイドレート形成過程の解明に糸口

2.1. 概要

南米ペルー沖, ガラパゴス諸島近傍の東太平洋赤道域及び北米オレゴン沖の海底から数百メートルの深さまで堆積物を掘削し, 海底下に棲む微生物の系統学的多様性を, 環境中から直接抽出した遺伝子解析などによって解明した. 本研究によって, 海底下深部に存在する微生物の多くがこれまでに分離されたことのない未知の微生物種であることが詳細に解明されたこと及び太平洋沿岸のメタンハイドレートが存在する海底下に特有の未知微生物群集が存在していることが世界で初めて示された. 本研究成果は, 2006年2月6日付けの「米国科学アカデミー紀要 (Proceedings of National Academy of Sciences of the U.S.A.)」online版 (Inagaki et al., 2006) に掲載された.

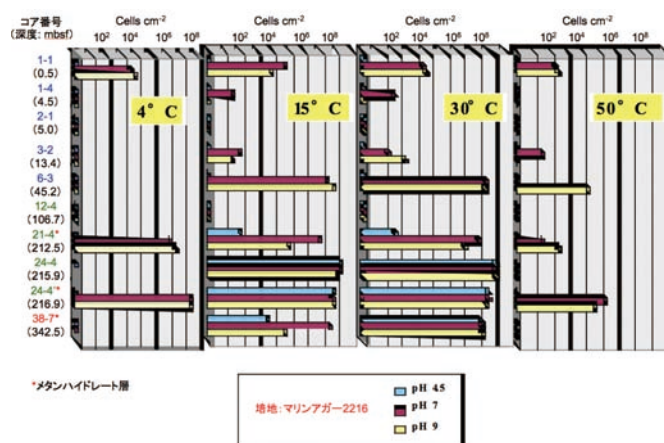


Fig. 1. Numbers of aerobic bacteria in the core samples.

図1. コアサンプル中の好気性細菌数.

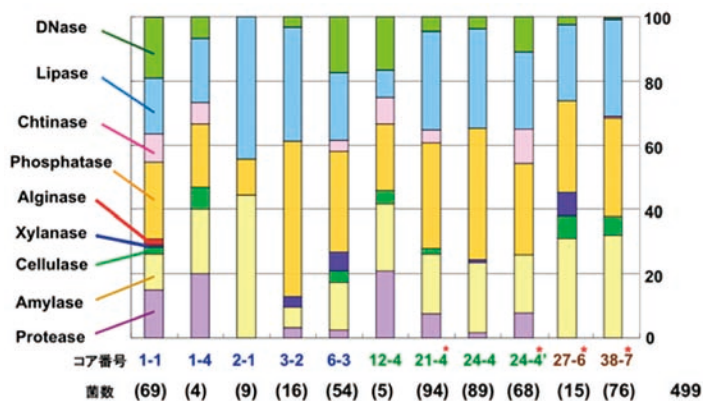


Fig. 2. Ratio of enzyme production in the isolated microorganisms.

図2. 分離菌の生産酵素比率.

2.2. 背景

地球の約70%は海洋で占められており、その海底下の地球内部環境は地球で最も大きな生命圏であると言われている。これまでの国際深海掘削計画 (ODP: Ocean Drilling Program) で採取された海底下1kmまでの堆積物中の微生物細胞の観察結果から、海底下生命圏の生物量は1立方センチメートル当たり1,000,000を優に超える微生物細胞が存在し、その全バイオマスは地表や海水中をも凌駕すると言われている。それらの海底下の膨大な微生物が行う代謝活動は、炭素、窒素、硫黄などの地球規模での物質循環系に大きな役割を果たしていると考えられている。特に、日本近海の海底下にも多く存在し、次世代エネルギー資源として注目されているメタンハイドレートの多くは、その炭素同位体組成の値などから生物学的に生成されたとする説が最も有力となっている。しかしながら、海底下の微生物の系統学的多様性、空間的な広がり、メタンハイドレートとの関連性などその詳細の多くは謎に包まれており、海底下の地球内部生命圏は地球最後のフロンティアであると言われてきた。

ジョイデス・レゾリューション号により2002年にペルー沖及びガラパゴス諸島近傍の東太平洋赤道域で行われたODP第201次掘削航海は、世界で初めての海底下生命圏の解明を目指した国際研究プロジェクトである (図3)。この航海で採取された南米ペルー沖及びガラパゴス諸島近傍

の東太平洋赤道域の堆積物試料に加え、2002年に行われた第204次掘削航海で米国オレゴン沖から採取された海底下約450 mまでの堆積物を対象に、微生物の空間分布と系統学的多様性について研究を行った。この結果、堆積物からメタンハイドレートや高濃度の硫化水素及び玄武岩質基盤からの酸化物質が確認されたことから海底下深部の微生物の代謝活動があったことが示唆された (図4)。

2.3. 研究の方法

掘削されたコア堆積物の中心部から、掘削に用いる循環水などからの外界微生物に汚染されていない試料を無菌的に取り出し、直接DNAを抽出した。抽出したDNAを磁気ビーズ吸着法などによって精製後、微生物の分子系統の指標となる遺伝子16S rRNA や無酸素条件下でのメタン生成・消費に関わる鍵酵素遺伝子 *mcrA* をPCR (Polymerase Chain Reaction) 法によって増幅し、遺伝子のクローンライブラリーを作成した。約2,800クローンの16S rRNA 遺伝子配列の相同性を既存のデータベースと比較し、348クローンの代表的な遺伝子について詳細な分子系統解析を行った。

これらによって評価した微生物群集の系統学的構造は、既に報告のあった南海トラフやオホーツク海の海底下堆積物中の微生物群集構造と併せて統計学的に評価し、環太平洋沿岸に分布するメタンハイドレートの存在と比較検討した。

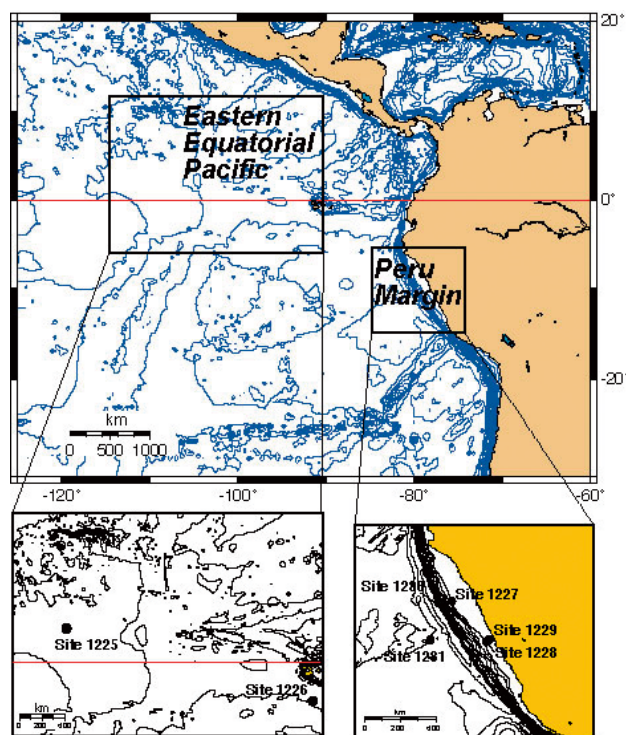


Fig. 3. ODP sites around Eastern Pacific area.

図3. ジョイデス・レゾリューション号による掘削地点のうち南米ペルー沖及びガラパゴス諸島近傍の東太平洋赤道域の位置図。

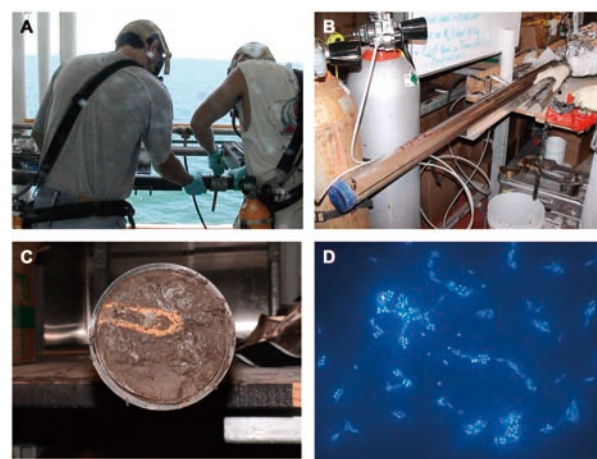


Fig. 4. Procedure of the core samples on board by the ODP#201 cruise.

- A) To protect from hydrogen sulfide, people used the gas mask.
- B) Core samples obtained from Peru Margin.
- C) Section of the core samples. Oxidized iron was identified.
- D) DAPI staining of the cultured microorganisms.

図4. 国際深海掘削計画ODP第201次航海調査でペルー沖の海底下から掘削したコア試料の船上における採取と分析。

- A) 有毒な硫化水素が発生するため、ガスマスクをして作業をする。
- B) ペルー沖から採取されたコアの一部。4℃の冷蔵室内で微生物解析用の様々な試料が採取された。
- C) コアの断面。鉄の酸化物がパッチ状に含まれている。
- D) 培養された微生物をDAPI染色した蛍光顕微鏡像。

2.4. 実験結果の概要

地球上の生命は、生命進化の過程で「ユーカリア（真核生物）」、「バクテリア（原核生物）」、「アーキア（古細菌）」の細胞内の構造が異なる3つの「ドメイン」から構成されている。海底下堆積物から検出した約2,800クローンの「バクテリア」と「アーキア」の16S rRNA遺伝子の塩基配列は、これまでに陸上や海水中などから培養され性状の分かっている微生物の配列とは系統的に大きく異なっていることが明らかとなった。「バクテリア」はJS1グループ、クロロフレキシ、プランクトマイセス、デルタプロテオバクテリアなどの「(亜)門」に分類される遺伝子が多く検出され、これまでに分離さ

れた微生物とは系統的に離れた未知の菌であった(図5)。「アーキア」はDSAG (Deep-Sea Archaeal Group) の系統やクレーンアーキオータの系統群、南アフリカ金鉱の陸上地下深部数kmから検出されたユーリアーキオータの系統群などが優占的に検出され、「バクテリア」と同様に未知の菌であった。16S rRNA 遺伝子の定量PCRによる解析では、海底下の微生物構成種の多くは「バクテリア」であり、「アーキア」は海底下50m付近までの浅い堆積物内に比較的多いことが示された。本研究で得られた16S rRNA遺伝子の系統的検出頻度に基づくクラスター解析及び主成分解析の結果、環太平洋沿岸のメタンハイドレートが胚胎する場所から得られた海底

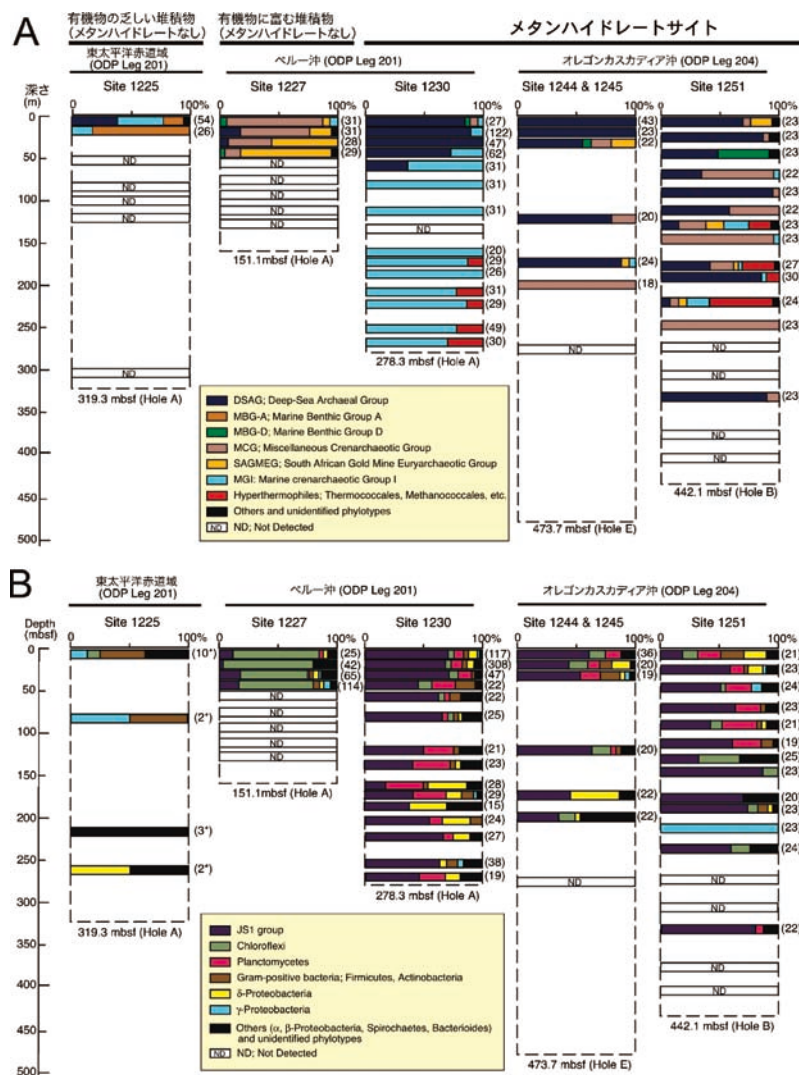


Fig. 5. Microorganisms' community profiles of the core samples obtained from Eastern Pacific and Oregon Off sites.

A) Archaeal profiles, B) Bacterial profiles.

図 5. 東太平洋赤道域、オレゴン沖から採取されたコア中の微生物群集構造プロファイル。堆積物から直接抽出したDNAを解析し、微生物の系統的多様性を調べた。多くの遺伝子配列が、これまでに培養されたことのない未知の系統であった。

A) 「アーキア」の群集構造プロファイル。

B) 「バクテリア」の群集構造プロファイル。括弧内は、各深度から検出したクローン数を示す。

下堆積物中に統計的に類似した固有の未知微生物群集が発達していることが明らかとなった。

2.5. 考察及び今後の展望

本研究で解析した主に大陸沿岸の海底下堆積物環境は、陸上や海洋などの既知生命圏と比べて極端にエネルギー供給の低く、低温で高圧力下の極限環境である。しかし、長らく無生物の世界と信じられてきた海底下の堆積物から遺伝子などの生体高分子が検出されたことで、確かに微生物がそこにはいることが強く示唆された。2,800クローンを超える微生物の遺伝子配列の系統解析の結果、これらのほとんどは培養したことのない未知のものであった。本研究で解明した微生物群集構造の鉛直的空間分布は、(1) JS1やクロロフレキシグループの「バクテリア」がある程度の深さまで均一に分布している、(2) DSAGグループの「アーキア」がメタンハイドレート直上の堆積物に優占的に存在している、(3) 堆積物中のメタン生成・消費に関わる既知のアーキア種が極めて低い検出頻度（もしくは皆無）であるなどの海底下に広がる地球内部生命圏の概要を捉えるとともに、未知微生物資源・遺伝子資源が海底下にあることを明らかにした。これは未知の微生物群の代謝特性及び海底下における生態機能の解明に手がかりを与えている。海底下の地球内部生命圏に存在する微生物は未知系統であるが故に、その生理・生化学的性状やエネルギー代謝も未知であり、メタンハイドレートの成因や地球規模での微生物による物質循環の解明に向けて糸口を掴んだに過ぎない。換言すれば、海底下に広がる地球内部生命圏は我々の手にしたことのない「生命資源の宝庫」であり、「地球に残された最後で最大のフロンティア」であると言える。今後、日米主導の総合国際深海掘削計画（IODP: Integrated Ocean Drilling Program）によるさらなる研究展開が期待される。

3. 沖縄トラフ深海底下において液体二酸化炭素プールを発見 ～二酸化炭素やメタン等を栄養源とする極限環境微生物が生息～

3.1. 概要

沖縄トラフ南部にある熱水活動域を調査し、熱水噴出孔近傍の堆積物中にメタンや硫黄を含む液体二酸化炭素のプールを発見した。さらに、そこから採取した堆積物等の解析により、メタンや二酸化炭素・硫黄化合物などを栄養源とする極限環境微生物が生息していることを発見した。本研究成果は、極限環境における生態系の理解のみならず、温室効果ガスの海洋投棄計画や、火星の極冠部における生命存在の可能性を

議論するうえで極めて重要な発見である。本研究成果は、2006年8月28日週付けの「米国科学アカデミー紀要（Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.）」online版（Inagaki et al., 2006）に掲載された。

3.2. 背景

深海における低温・高圧環境下では、二酸化炭素は液化し、海水と反応することでハイドレートと呼ばれる結晶を形成する。海底で液体の二酸化炭素が湧出している例は世界的にも珍しく、これまでに中部沖縄トラフの伊是名海丘の熱水活動域と北部マリアナ弧永福海山で確認されているが、このような極限的な環境における微生物の生態系を研究した例はなかった。

近年、各国が温室効果ガスの削減に努める一方で、人工的に二酸化炭素を海洋投棄する計画がIPCC（気候変動に関する政府間パネル：Intergovernmental Panel of Climate Change）等によって提案されている。また、火星の極冠部は固体の二酸化炭素と氷で形成されており、その地下には生命が存在する可能性が指摘されている。

このように、二酸化炭素に関連した研究が注目されており、深海における液体二酸化炭素環境の研究は、様々な分野への示唆を与えるものと考えられている。

3.3. 研究の方法

2003年と2004年に南部沖縄トラフ第四与那国海丘熱水活動域（水深1,370 - 1,385m）（図6）において調査を行い、噴出熱水、海底から湧出した液体二酸化炭素、堆積物などを採取し、微生物学的・地球化学的特性について様々な解析を行った。

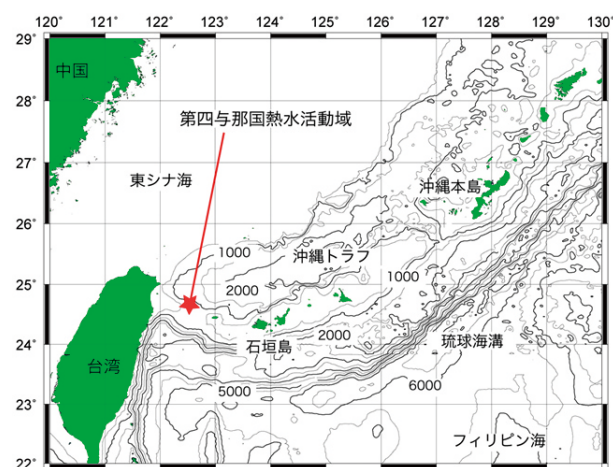


Fig. 6. Daiyon-Yonakuni hydrothermal active site in South Okinawa Trough.

図6. 液体二酸化炭素プールとハイドレートが発見された南部沖縄トラフ第四与那国熱水活動域の位置。

3.4. 実験結果の概要

3.4.1. 熱水活動域と二酸化炭素プール：

第四与那国海丘熱水活動域の中心は、300℃を超す熱水を噴出している高まりであることが明らかになった（図7A）。その周囲には、200℃前後の熱水噴出孔や液体の二酸化炭素の湧出が観察された（図7B）。さらに、ここから南方に50mほど離れた地点に、白くまだら状に変色し、底性生物に乏しいエリアを確認した（図7C）。本エリアに着底すると、着底の衝撃によって海底下から漏れ出す液体二酸化炭素の湧出が認められ、35 cmの柱状採泥器を海底に挿して引き抜くと、海底下から大量の液体二酸化炭素の湧出があった（図7D）。

本環境では、海底表層に熱水のガス成分に由来する液体またはハイドレート状の二酸化炭素がプール状に存在していることが明らかになった。

3.4.2. 堆積物の解析：

液体二酸化炭素およびハイドレートを含んだ堆積物から直接DNAを抽出し、微生物遺伝子の塩基配列を解析した結果、メタンや二酸化炭素・硫黄化合物などを消費する微生物系統が検出された。また、二酸化炭素を栄養源とする酵素の遺伝子やメタンを酸化する代謝経路の酵素の遺伝子も検出された。これらの堆積物から抽出した微生物の脂質や炭素同位体の化学分析などから、堆積物中の微生物がメタンもしくは二酸化炭素を主な栄養源として生息していることが明らかとなった。

3.5. 考察

本海域では、海底下のガス成分が深海底の熱水活動によって堆積物へ移動し、海水との反応によって海底表層に硫黄成分に富んだハイドレートを形成し、表層堆積物中に液体二酸化炭素のプールを閉じ込めていると考えられる（図8）。液体二酸化炭素を含んだ深海底堆積物という環境は、生命にとって明らかに過酷な極限環境であると思われるが、一般的な海底面の1/100ほどの細胞数ではあるものの、生命の存在とその生態系が初めて確認された。検出された微生物の多くは、二酸化炭素やメタンなどの地球温暖化の原因物質を栄養源としていると考えられる。

当海域は、極限的な自然環境を理解するだけでなく、温室効果ガスの海洋投棄計画や生物学・化学・惑星科学などの様々な研究分野においても、稀有な研究対象であると考えられる。

4. 世界最深部11,000mの深海底泥より分離した好熱性細菌、ジオバチルスカウストフィラスの全ゲノム解析

4.1. 概要

世界最深部のマリアナ海溝11,000mの深海底泥から分離した好熱性バチルス細菌の一種である「ジオバチルスカウストフィラス」（図9）の全ゲノム配列を解読した。

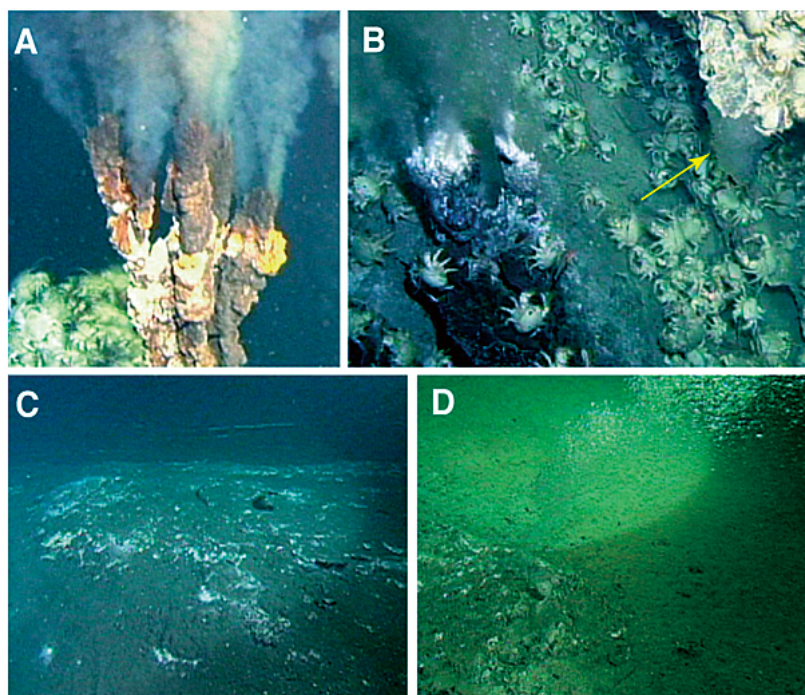


Fig. 7. Daiyon-Yonakuni hydrothermal active site.

- A) Tiger chimney,
- B) Crystal chimney closely located from the Tiger. Arrow, liquid carbon dioxide,
- C) White mat involved carbon dioxide layer,
- D) Elution of the liquid carbon dioxide from core hole.

図7. 第四与那国熱水活動域の様子。

- A) タイガーチムニーマウンドの熱水噴出孔。
- B) タイガーチムニーマウンドの裾野で発見されたガスに富む熱水噴出孔。クリスタルチムニーと命名された。熱水チムニーの近傍に、堆積物から湧出した液体二酸化炭素の液泡が凝集しているのが見える（矢印）。
- C) 白いパッチ状の構造に覆われたエリア。底性生物に乏しく、堆積物内に二酸化炭素が胚胎している。
- D) 柱状の採泥器を挿した穴から大量の液体二酸化炭素の湧出が認められた。

本細菌は、平成11年に全塩基配列決定を行った有用酵素生産菌の「バチルスハロデュランス」よりも約20℃高い74℃まで生育できる好熱性細菌である。本細菌のゲノムは354万塩基からなる染色体DNA（図10A）と4万8千塩基からなるプラスミドDNA（図10B）からなっており、ゲノム中にある約3,500の遺伝子のうち、約2,000遺伝子がこれら2種間で共有されていた。これまで分離された有用酵素生産菌の多くはバチルス関連細菌であるが、そのほとんどが常温細菌であったことから、耐熱性蛋白質の検索が困難であった。しかしながら、全蛋白質が耐熱性を有する好熱性バチルス関連細菌の全ゲノムが解読されたことにより、

これまであまり耐熱性蛋白質の検索対象とされてこなかった常温細菌が有している耐熱性蛋白質の予測が可能となった。また、今回のゲノム配列決定により、初めて系統進化的に類縁性の高い常温細菌と好熱性細菌の比較が可能になったので、高熱環境下における微生物の適応メカニズムの解明に大きく貢献するものと期待される。

本研究は、2004年12月1日付けの英国の専門誌「Nucleic Acids Research」online版（Takami et al., 2004）に掲載された。また、本研究において開発された、常温菌からの耐熱性蛋白質の予測方法とその解析プログラムに関しては、特許出願を行い、製品化へ向けた開発が現在進行中である。

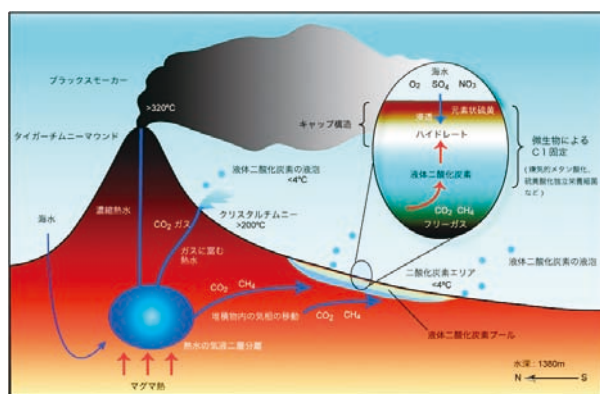


Fig. 8. Scheme of microbial structure in Daiyon-Yonakuni hydrothermal active site.

図8. 第四与那国熱水活動システムと液体二酸化炭素プールにおける単一炭素化合物に依存する微生物群集の模式図。

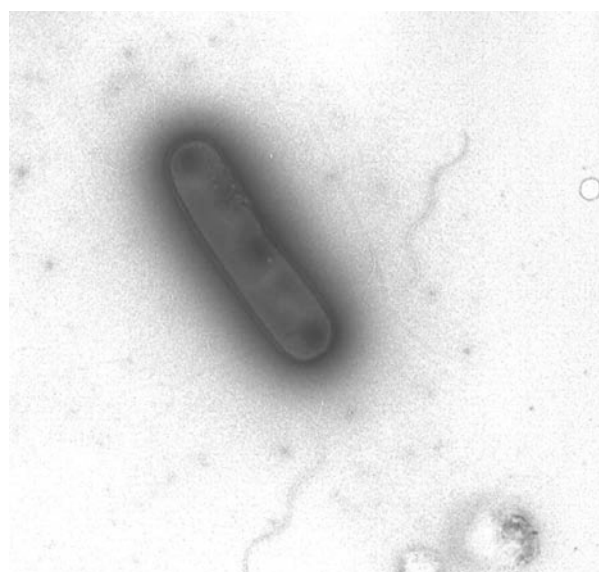


Fig. 9. EM picture of *Geobacillus kaustophilus*.

図9. 全ゲノム決定がなされた好熱菌の一種。

ジオバチルスカウストフィラス (*Geobacillus kaustophilus*)

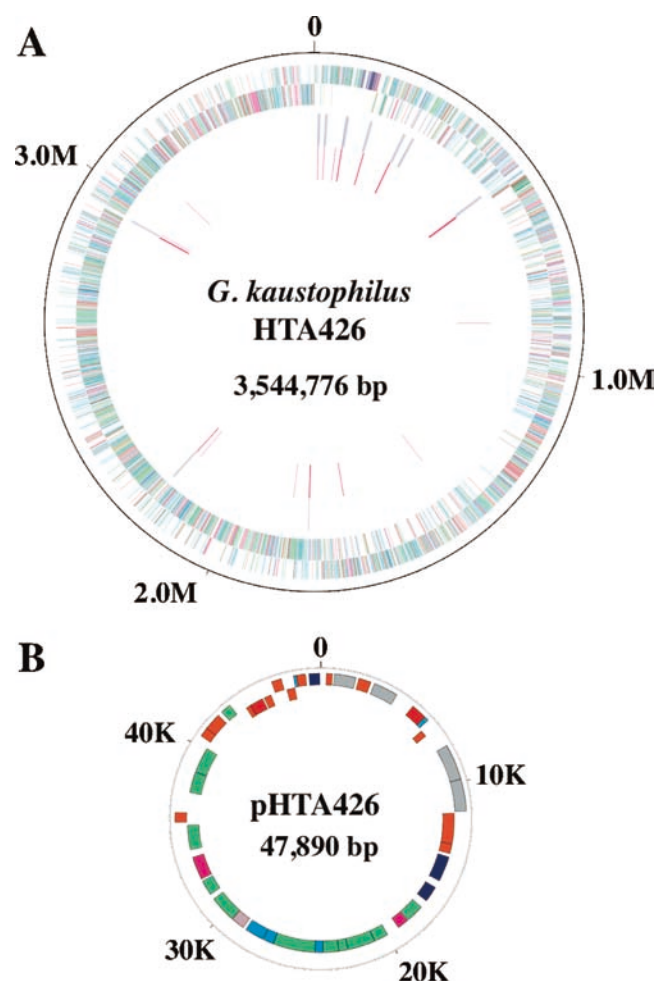


Fig. 10. Genome maps of *G. kaustophilus*.

A) Chromosomal map, B) Plasmid map.

図10. 好熱性 *G. kaustophilus* ゲノムの円形描画図。

A: *G. kaustophilus* の染色体地図 B: プラスミド地図。

最も外側の円: プラスストランド。

2番目の円: マイナスストランド。

3番目の円: rRNA。

4番目の円: tRNA。

4.2. 背景

納豆菌に代表されるバチルス関連細菌は、あらゆる環境中から分離されている。バチルス関連細菌は、系統関係が近縁にありながらその生育環境は広く、pH2~12、5~78℃、0-30% NaCl、大気圧~深海3,000 mに相当する300気圧までの環境下で生育できる環境適応能力を有している。近縁種間でこのような幅広い多様性を有しているものは他に例がないことから、バチルス関連細菌は、生物の多様性、また多様性を持つことによってなし得る環境への適応メカニズムを研究する上で、最良の研究材料の一つであると考えられる。一方、バチルス関連細菌の多くは有用酵素生産菌でもある。実際にこれまでバチルスの生産する酵素が、澱粉からサイクロテクストリンを効率よく作ったり、家庭用洗剤に配合されて広く工業的に生産されてきた。先に述べたようにバチルス関連細菌は様々な多様性を示すことから、これまでに工業的に応用されてきた酵素以外の新しい酵素を有している可能性が秘められている。

そこで、工業的に用いられている酵素の重要な要因の一つである耐熱性に注目し、すべての蛋白質が耐熱性を有している好熱性バチルス関連種と常温性バチルス関連細菌との比較から耐熱性酵素の特性、好熱性菌の高熱環境に対するメカニズムの解明を目指して、マリアナ海溝世界最深部の11,000mの深海底泥から分離した好熱性バチルス関連種、ジオバチルスカウストフィラスの全ゲノム配列決定を行った。

4.3. 実験結果の概要

4.3.1. 工業的応用への波及効果

一般に好熱菌が持つ全ての蛋白質は耐熱性を有しているが、(本細菌の場合も全蛋白質を70℃で熱処理してもほとんどの蛋白質が熱変性しない)、耐熱性蛋白質のアミノ酸組成には非耐熱性蛋白質には見られない特徴があることが知られている。そこで、本件で全塩基配列決定がなされたジオバチルスカウストフィラスとバチルスハロデュランスの間で共有されている遺伝子産物のアミノ酸組成を統計的に比較するための方法論を確立し、それを迅速に行うためのプログラムを作成して解析したところ、常温菌のバチルスハロデュランスの蛋白質の約70%~80%は耐熱性蛋白質であると予測された。実際に、予測された蛋白質の耐熱性を調べると、耐熱性の度合いは蛋白質によってやや異なるものの、そのほとんどが耐熱性を有していることがわかった。

耐熱性酵素は、高温領域においても酵素活性を失わない酵素として産業界、研究開発分野などで広く使用されており、耐熱性酵素の重要性はますます高まってきているが、

これまで行われてきた耐熱性酵素の検索手法は、膨大な手間と時間を要するのみならず、その発見は、多くの場合偶然に左右されることが多かった。また、スクリーニングの対象が、好熱性菌、耐熱性菌に限定されており、好熱性菌や耐熱性菌は微生物全体の種類から考えるとごく限られた種にすぎないため、耐熱性酵素の多様性が限られていた。有用酵素の生産菌の一つとして知られるバチルス関連種のうちでこれまで全ゲノム情報が知られていなかった好熱性ジオバチルスカウストフィラスの全ゲノム配列を世界に先駆けて解読したことにより、この菌の生産する蛋白質と高い相同性を有するものであれば、そのアミノ酸組成から耐熱性を予測することが可能になり、耐熱性酵素の効率的な検索が可能になった。

4.3.2. 高熱適応メカニズムの解明へ向けての波及効果

類縁性の高い種間における好熱性菌と常温菌との比較は、耐熱性蛋白質の検索に有効であることのみならず、微生物の高熱性環境下における適応メカニズムを考える上でも非常に有効で、実際に好熱/耐熱性獲得に関与すると思われる遺伝子候補が数多く見つかった。面白いことにそのうちのひとつは、これまでに原核生物では見つかったことのない全く新しい遺伝子で、コアラの精子に存在するプロタミンという蛋白質をコードする遺伝子であった。このように、本来高等哺乳類にしか存在しないと考えられていた遺伝子がバクテリアのゲノムの中にも見つかったことで、この遺伝子がどのようにバクテリアのゲノムに獲得されたのかなど、生物の多様性を考える上で非常に興味深い知見も、同時に得られている。

5. 深海底熱水活動域で優占的に生息する化学合成独立栄養微生物の全ゲノム解析を達成

5.1. 概要

沖縄本島北西海域の深海底熱水活動域から分離した2株の化学合成独立栄養微生物の全ゲノムを解析した。本研究により、本微生物群が深海底熱水孔環境に優占して生存するために発達させてきた、数々の生存戦略(複数のエネルギー代謝機構、環境感知・応答機構、重金属解毒機構など)を世界で初めて遺伝子レベルで明らかにした。これらは、地球の内部エネルギーに支えられた生命活動を理解する上で極めて重要な研究成果である。本研究成果は、2007年7月2日週付けの「米国科学アカデミー紀要(Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.)」online版(Nakagawa et al., 2007)に掲載された。

5.2. 背景

深海底熱水孔環境は、暗黒・高圧かつ300℃をこえるような高温熱水が噴出する極限環境にありながら、光合成に依存しない特異な生態系を育んでいる。現場に特徴的な高密度の生物群集を養うのは、噴出熱水中の水素や硫化水素といったエネルギー物質を利用する化学合成独立栄養微生物である。

本微生物群は、世界中の深海底熱水孔環境に優占して見つかっており、単独生活もしくは現場に棲息する大型生物の細胞外や細胞内に共生している。その中でも最も優占して見つかるイプシロンプロテオバクテリアと呼ばれる微生物は、ヘリコバクターやキャンピロバクターといった人類に蔓延する病原微生物の祖先にあたる系統学的特徴をもつことから非常に注目され、これまで多くの研究者がその分離・培養を試みたが、実験室内で培養することが難しく、その性状等は謎のままであった。この深海底熱水孔環境に棲息するイプシロンプロテオバクテリアを、それらの生息環境に近い環境を試験管内に再現することで分離培養することに成功し、現在、世界唯一の網羅的な分離株ライブラリーを保有するに至った。本微生物が海洋の極限環境に優占するためにどのような生存戦略を持つかを調べるため、2株の分離株について全ゲノム配列を解析した。

5.3. 研究の方法

今回全ゲノム解析を行った微生物は、沖縄本島の北北西約200 kmの伊平屋北熱水活動域（水深約1,000 m；北緯

27° 47.5′，東経126° 53.8′）（図11）にある高さ約30 mの熱水噴出孔の高まり（硫化物マウンド、311℃の熱水を噴き出す）（図12）から分離した2株の化学合成独立栄養微生物である（両株とも新種。学名：*Sulfurovum* sp.と*Nitratiruptor* sp.）。両株ともに水素や硫化水素などを酸化してエネルギーを獲得し、そのエネルギーを使って二酸化炭素から体内の有機物のすべてを合成する。これらの微生物のうち、一方は30℃付近で良く増殖する中温性微生物

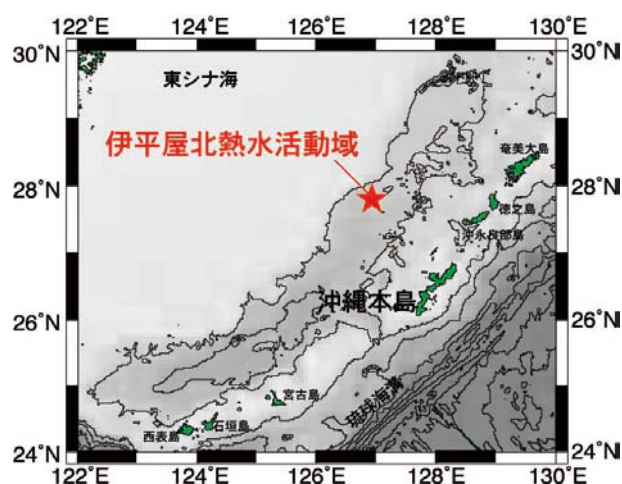


Fig. 11. Investigation site. ★, Chemoautotrophic microorganisms community site.

図 11. 海域図 ★は化学合成独立栄養微生物群を採取した地点。



Fig. 12. Biological community around the hydrothermal vent.

図 12. 高温の熱水を噴出する深海底熱水孔とその周辺に生息する生物群集。

(図13A), もう一方は55℃付近で良く増殖する好熱性微生物(図13B)であり, それぞれの分離株を大量培養してからゲノムDNAを抽出し, 全ゲノムショットガン法を用いてゲノム塩基配列を決定した。

5.4. 実験結果と考察

決定した塩基配列(図14)より, 全ゲノムの大きさはそれぞれ2,562,277塩基対, 1,877,931塩基対からなり, 環境変動の激しい過酷な環境に棲息しているにも関わらず比較的小さなゲノムを持つことがわかった(ヒトゲノムと比べ

ると1000分の1以下の大きさ)。ゲノム上には, それぞれ2,466個, 1,857個の遺伝子が高密度に見つかり, それらの解析から以下のような特徴が明らかとなった(図15)。

- (1) 二酸化炭素から有機物を生産するための炭酸固定回路(還元的TCA回路)を持つ。
- (2) エネルギー物質を合成するための呼吸経路が多い。複数の酵素を使い分け, 酸素や硝酸イオンを用いて硫黄化合物や水素を酸化している。
- (3) 深海底熱水孔環境における噴出熱水は高濃度の重金属(鉄, 銅, マンガンなど)が溶け込んでいるため,

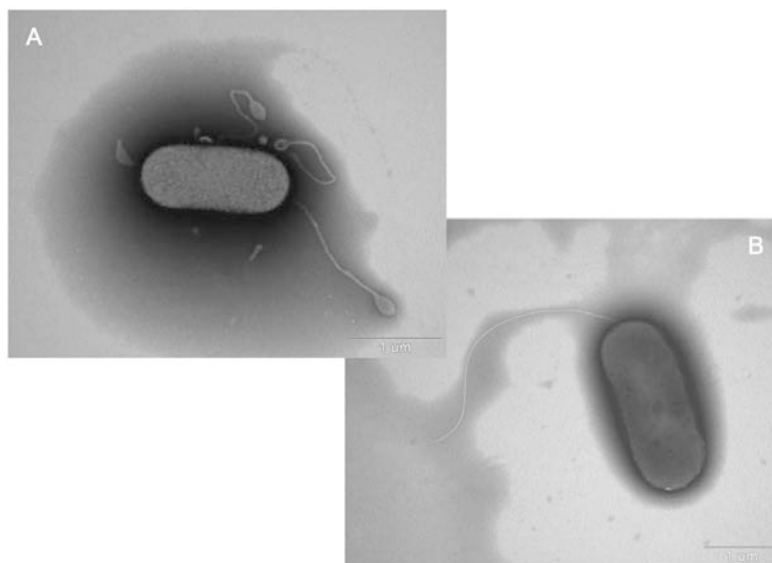


Fig. 13. Chemoautotrophic microorganisms, Left; mesophile (A), right; thermophiles (B).

図13. 化学合成独立栄養微生物 左上が中温性(A), 右下が好熱性(B).

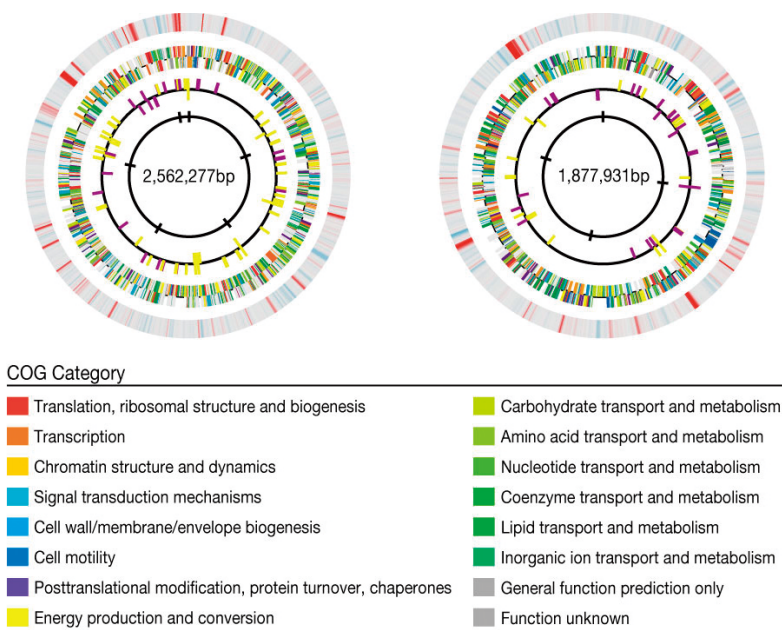


Fig. 14. Genome structures of the chemoautotrophic microorganisms. Left; mesophile, right; thermophiles.

図14. 化学合成独立栄養微生物のゲノム構造. 左が中温性, 右が好熱性.

様々な重金属を解毒するための仕組みを持っている。

- (4) 栄養分の濃度など外部環境の変化を感知し、応答するための遺伝子セットが多い。
- (5) 病原性がないにも関わらず、近縁の病原微生物に固有であると考えられていた病原性関連遺伝子群（抗原遺伝子や宿主生物への付着に関わる遺伝子など）を持つ。
- (6) 近縁の病原微生物と同じく、多くの遺伝子修復系を欠きゲノム構造が柔軟である。ゲノム構造が柔軟であることは、安定した環境に住む生物にとっては不利であるが、環境変動の激しい深海底熱水孔環境に住む化学合成独立栄養微生物にとっては有利な特性であると考えられる。一方、近縁の病原微生物においてはゲノムの柔軟性が、宿主生物の生体防御機構から逃れ慢性疾患を引き起こす原因の一つになっている。

(1)-(4)は、化学合成独立栄養微生物が深海底熱水孔環境に適応するために獲得した戦略を遺伝子レベルで明らかにした世界初の成果である。加えて(5)-(6)は、人類に蔓延する病原微生物が持つ病原性決定因子の一部が、深海底熱水孔環境に優占する化学合成独立栄養微生物にルーツを持つことを明らかにした画期的発見である。それら病原性決定因子のプロトタイプは、本化学合成独立栄養微生物群が他の生物と共に過酷な深海底熱水孔環境を生き抜くために発達させたシステムであり、その後の病原微生物の発生・進化過程においてコアの役割を果たしたと考えられる。

5.5. 今後の展開

今回ゲノム解析を行ったイプシロンプロテオバクテリアは単独生活する能力を有している。しかし深海底熱水孔環境には全くの同種であるにもかかわらず、大型生物と細胞内共生あるいは細胞外共生し、単独では生活することの難しいイプシロンプロテオバクテリアが存在する。現在、それらを含めた比較ゲノム解析を進めている。これまで様々な共生微生物

がゲノム解析されているが、単独生活能を持つ同種が存在しないため、共生関係の成り立ちを遺伝子レベルで研究することが困難であった。大型生物の細胞内で生活したり細胞外に付着して生活するような、程度の異なる共生能力を持つ同種間で比較研究を行うことのできるイプシロンプロテオバクテリアは、微生物・大型生物間の共生機構がどのように成立・進化してきたかを研究する格好のモデル生物である。

本研究により同定された遺伝子の約半数が機能未知であり、そのうちいくつかは近縁の病原微生物にも良く保存されたユニークな遺伝子であった。これらの遺伝子の機能解析を進めることにより、病原微生物の新規治療法の開発に寄与するものと考えられる。

6. 新しい高压培養法による生命の最高生育温度記録更新と高压メタン生成

～122℃で増殖し、重い炭素に富んだメタンを生成する超好熱メタン菌の培養に成功～

6.1. 概要

新しく開発した高压培養方法により、インド洋の深海熱水環境から分離された超好熱メタン菌が122℃までの高温下でも増殖可能であることを発見した。

これまで微生物の最高生育温度記録は再現可能な記録として113℃（再現できない記録としては121℃がある。）と報告されており、生命活動の限界が122℃まで引き上げられたことにより、地球における生命圏の拡がりだけでなく、地球外の宇宙環境における生命存在限界条件を理解するのに大きく貢献するものである。

さらに、琉球大学及び北海道大学と共同で、この超好熱メタン菌の生成するメタンが、従来の定説を覆す「重い炭素同位体に富んだメタン」であることを発見した。本成果

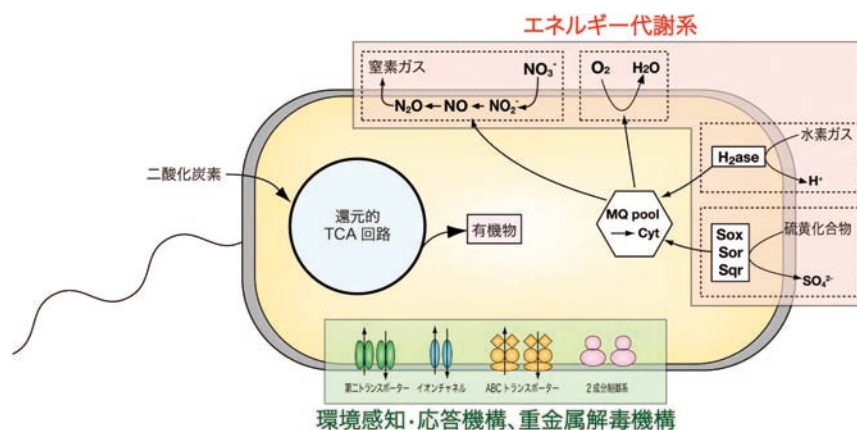


Fig. 15. Metabolic map and major pathway of the chemoautotrophic microorganisms.

図 15. 化学合成独立栄養微生物の代謝マップと主要メカニズム。

は温室効果ガスや未来のエネルギー資源と考えられるメタンに関して、微生物学的な生成メカニズムの重要性を示す画期的な発見である。

本研究成果は、2008年7月28日週付けの「米国科学アカデミー紀要 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.)」online版 (Takai et al., 2008) に掲載された。

6.2. 背景

1960年代から続く微生物の最高生育温度記録更新の歴史は、地球の極限環境における生命活動の拡がりや生命存在限界に関する理解の歴史とも言える (図16)。

追試可能な最高生育温度は、1997年に報告された超好熱古細菌 *Pyrolobus fumarii* の113℃であるとされていた (Blöchl et al., 1997)。また、2003年に121℃まで生育可能な超好熱古細菌の分離に成功したことが報告 (Kashefi and Lovely, 2003) されているものの、追試による確認ができていない。

こうした超好熱古細菌は、すべて深海熱水域に由来する化学合成独立栄養微生物であり、深海や地殻内の高压条件を再現し培養することが必要であるにもかかわらず、これまで生育環境の物理 (特に圧力) ・化学 (水素や二酸化炭素などのガス濃度) 条件で培養された例はほとんどなかった。それゆえ、現場の深海熱水域での生育特性や生理は不明のままであった。

一方、地球化学の分野では自然環境中に存在するメタンの由来を推定する際、メタンの炭素に含まれる安定同位体の比 ($\delta^{13}\text{C}$ 値) を用いて、微生物活動起源、有機物熱分解起源、マグマ起源のメタンを区別する方法がよく使われてきた (図17)。

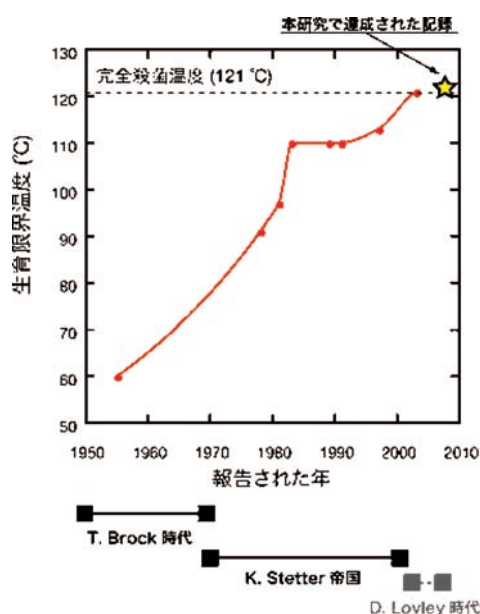


Fig. 16. Update of limited growth temperature for microorganisms.

図 16. 微生物の生育限界温度の更新。

ンが低い $\delta^{13}\text{C}$ 値を有すると考えられていたが、高压条件下での実験例は皆無であり、深海や地殻内の微生物による「軽い炭素に富んだメタン」生成の実験的証拠はなかった。

6.3. 研究の方法

インド洋中央海嶺のきれいフィールドの熱水 (水深2,450m, 温度360℃) から分離された超好熱メタン菌 *Methanopyrus kandleri* 116株 (図18) について、新しく開発した深海熱水域や地殻内に生息する化学合成独立栄養微生物を現場環境の物理化学条件 (温度, 圧力, ガス組成や濃度) で培養する方法 (図19, 図20) によって、高压条件下での生育及び生存特性, 生育に伴うメタン生成及び炭酸固定の際の炭素同位体分別効果を調べた。

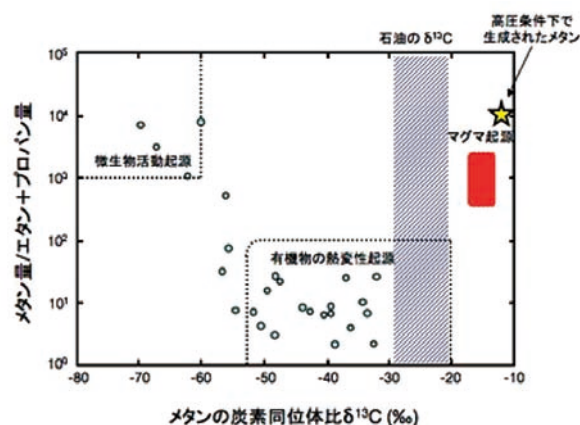


Fig. 17. Distribution of originated methane in nature by carbon isotope ratio.

図 17. 炭素同位体比に基づく自然界に存在するメタンの起源の分類。

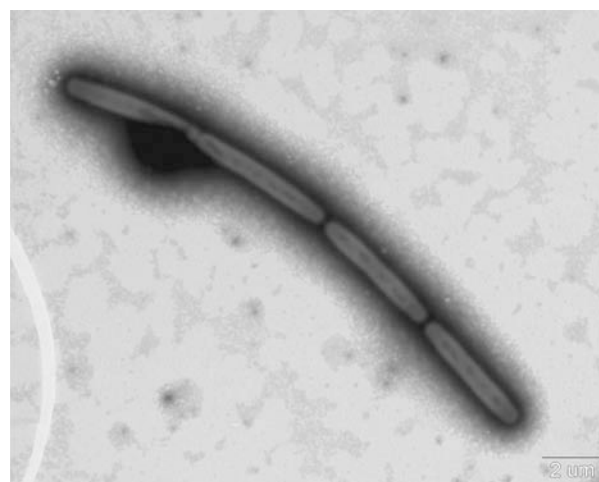


Fig. 18. EM picture of *Methanopyrus kandleri* strain 116 isolated from Kaikai Field, Indian Ocean.

図 18. インド洋中央海嶺のきれいフィールドから分離された超好熱メタン菌 *Methanopyrus kandleri* 116株の電子顕微鏡写真。右下の線は2マイクロメートルを示す。

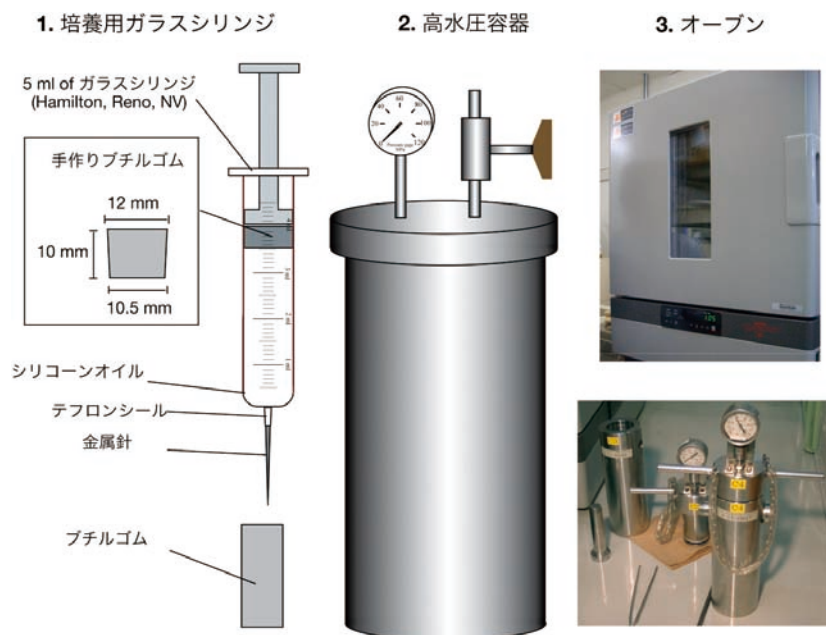


Fig. 19. High-pressure microbial cultivation system by the Takai procedure.

図 19. 新しく開発した高圧培養法（高井法）のツール。

水圧は、手作りブチルゴムピストンが動くことでシリンジ内のガス+液体に伝えられる。高水圧容器は中が空洞であり、蒸留水を満たした中に、培養用ガラスシリンジを沈めて、水圧ポンプで目的の圧力まで上昇させる。圧力を加えた後、オープンもしくは温度制御インキュベーターで温度コントロールし、培養を行う。

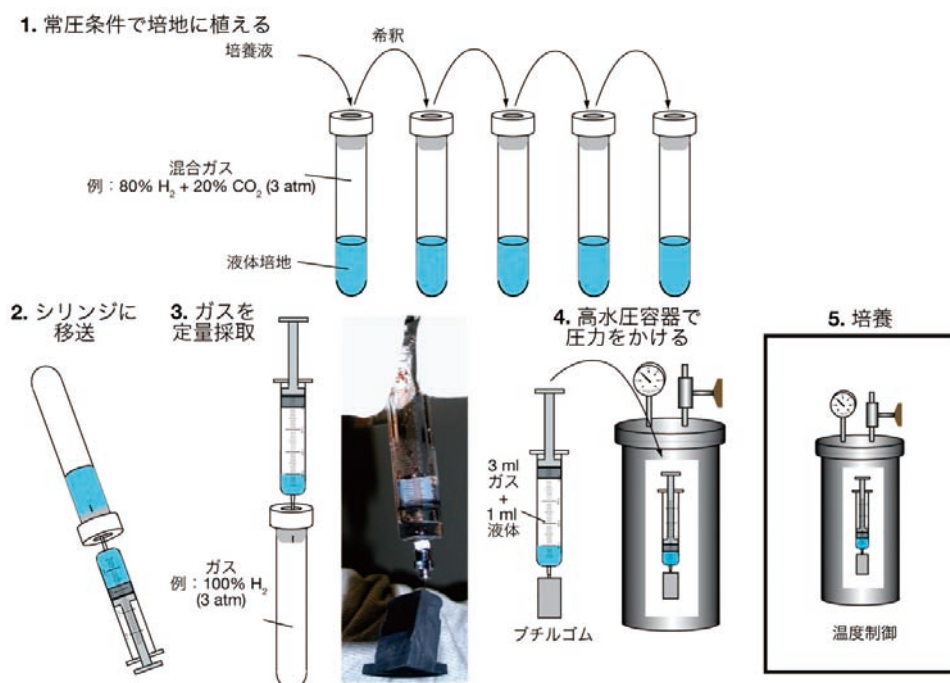


Fig. 20. Protocol of the Takai procedure.

図 20. 新しく開発した高圧培養法（高井法）の手順。

菌の培養準備は常圧下で、通常の注射器操作で行う。通常の微生物の培養実験の際には、希釈は特に必要がないが、深海や地殻内のサンプルを希釈して培養し、定量的なデータを得る場合に用いられる。安価で簡便な操作を可能にした点が高井法の長所であり、その長所のため実験可能なサンプルの数を増やすことができたようになった。

6.4. 実験結果の概要

Methanopyrus kandleri 116株は, 従来の培養条件では85~116℃で生育することが確認されており, 今回, 高压条件下では, 122℃まで生育可能であることが明らかになった(図21a). また高温での生存能力も, 常圧下では130℃, 2時間まで生存できたのに対し, 高压下では130℃, 3時間の加熱後も生存可能であることがわかった(図21b).

同株は水素と二酸化炭素からメタンを生成しエネルギーを得ながら, 二酸化炭素を固定することによって細胞の有機物を合成する. このメタン生成と炭酸固定の二つの代謝過程で, 炭素安定同位体比の分別を引き起こす. つまり反応前の二酸化炭素の同位体比が, メタンや有機炭素に変換される代謝過程でより軽い炭素を含むように同位体比が変化する. このメタン生成や炭素固定での分別効果について, 従来の培養条件下では-27~-34%であり, これまでの報告と似た結果を示した(図22). 一方, 高压下では-12%以下と極めて小さな値を示した(図22). この結果は, 自然環境中で $\delta^{13}\text{C}$ 値が-10%程度の重い炭素に富んだメタンが微生物によって作られ得ることを意味する(図23). 従来の地球化学の定説に従えば, 本株が生成したメタンはすべてマグマ起源とされてきたものあり(図17), 本研究の結果は従来の地球化学の定説を覆したことになる.

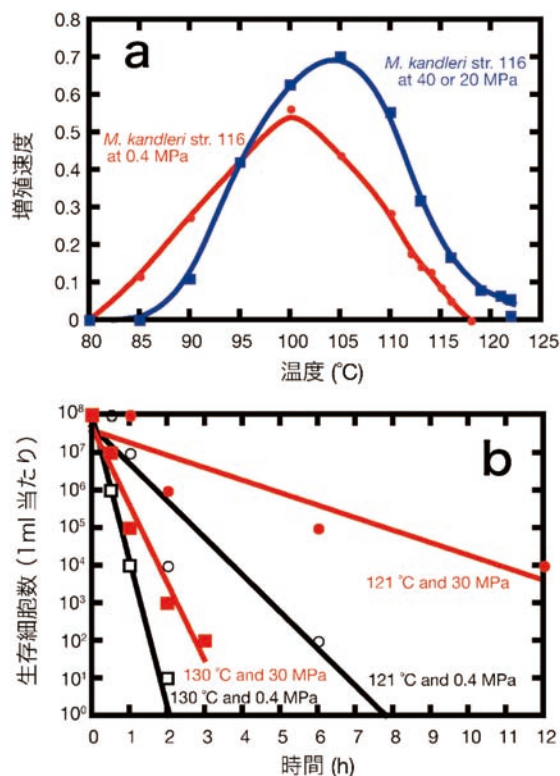


Fig. 21. Growth temperature range and thermotolerance of *M. kandleri* strain 116.

図 21. 超好熱メタン菌 *Methanopyrus kandleri* 116株の生育温度と高温での生存能力.

6.5 考察と今後の展望

新しく開発された高压培養法によって超好熱メタン菌による最高生育温度更新が達成されたことにより, 同様の方法を用いることで超好熱メタン菌以外の他の化学合成独立栄養微生物がさらに生命活動の限界温度を引き上げる可能性も示唆されている. また, 温度以外の生育可能条件の限界も上げられる可能性が考えられ, 地球のみならず宇宙での生命存在条件の理解に大きく貢献することが期待できる.

また, これまで培養困難とされてきた深海や地殻内の未知の微生物の培養が可能になることにより, 微生物の生息する環境での機能や生態学的に役割の解明についても画期的な役割を果たすことは間違いない.

さらに, 本研究では, 超好熱メタン菌によって地球化学

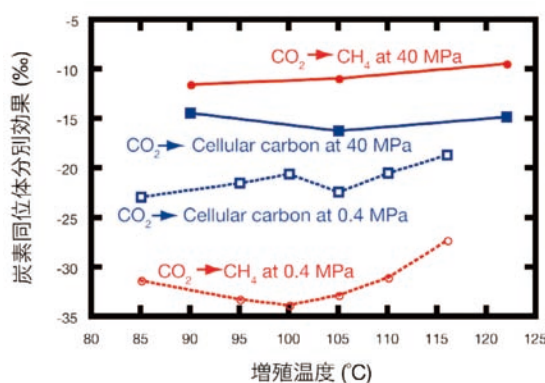


Fig. 22. Stable carbon isotope fractionation of *M. kandleri* strain 116 under different growth conditions. Kinetic isotope effects of methanogenesis (red lines) and carbon fixation (blue lines) at different growth temperatures at 0.4 MPa (dotted lines) and 40 MPa (solid lines).

図 22. 異なる培養温度, 圧力条件での炭素同位体分別効果.

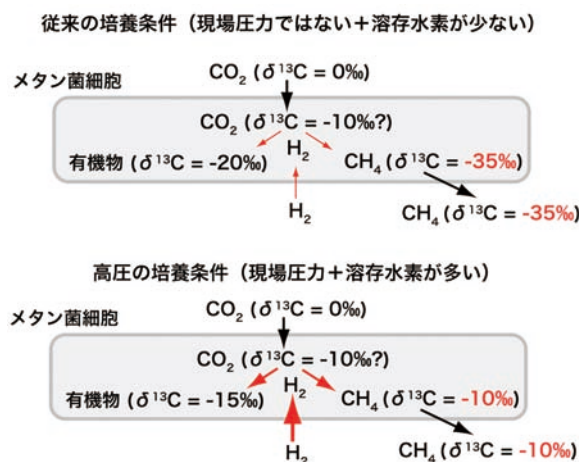


Fig. 23. Conclusion of the methane production under high-pressure cultivation.

図 23. 高压培養条件下でのメタン生成における炭素同位体分別のまとめ.

の定説を覆す「重い炭素に富んだメタン」が生成されることが明らかにただけでなく、微生物によるメタン生成に伴う炭素安定同位体比の分別が、その反応が進行する環境の熱力学的な条件によって決定されるということも世界で初めて明らかになった。生物活動の指標としての安定同位体化学は、地球と生命の進化、生物による物質循環、地球外生命探査の研究分野における強力なツールとして広く用いられているが、今後より詳細な実験結果に基づいた正しい解釈を行っていく必要がある。

7. 硫化鉄の鱗を持つ巻貝の生態解明に手がかり

7.1. 概要

2006年2月、インド洋中央海嶺における熱水活動域の地球生物学的調査を行い、本調査において、硫化鉄の鱗を持った巻貝 *Crysomallon* (俗名：スケारीーフット) (図24) を深海底の熱水活動環境において観察し、さらに初めて船

上に持ち帰っての水槽飼育による観察を行うことに成功した。スケारीーフットは、2001年に米国研究チームによりインド洋で発見された、世界でたった1例しか知られていない、身体の一部が硫化鉄でできている生物である。

本調査における現場と船上での観察により、スケारीーフットが鱗を広げて海底のチムニー等に強く付着し、共存する捕食性のカニやエビなどから身を守っていることが証明された。同時に生息場を共にするアルビン貝との棲み分けの観察や生息環境の測定等も行われた。また、採取されたスケारीーフットの飼育については、船上で1週間程度、90%以上の個体を生存させることに成功し、さらに飼育条件下で、スケारीーフット 及びその共生細菌からなる共生システムのエネルギー源、栄養メカニズムなどを明らかにするための様々な実験を行うことができた。

今回の研究調査航海によって採取されたサンプルを用い、未だ謎に包まれたスケारीーフットの硫化鉄の鱗の獲得過程や硫化鉄鉱物形成制御の機構、共生細菌との共生システムの生成機構等の解明に向けた研究を進めている。

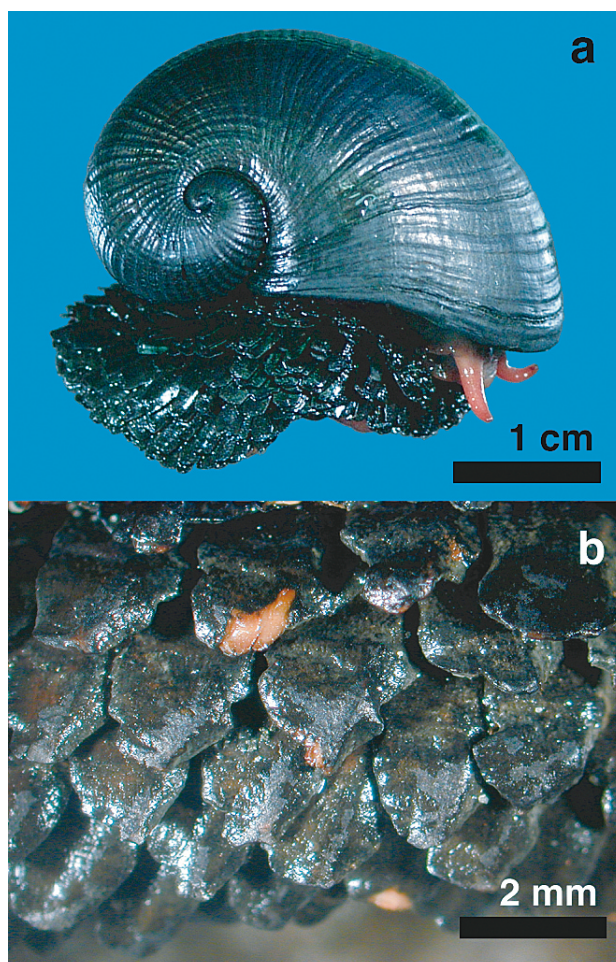


Fig. 24. Scaly Foot, *Gastropoda* gen. et sp.

図 24. スケारीーフット (和名：ウロコフネタマガイ)。

8. 謝辞

本論文は, XBR3プログラム研究のトピックを中心に, XBR推進室の佐塚由起枝さんによりまとめられたものです。いつも変わらぬ支援に対し, 心から感謝申し上げます。

9. 引用文献

- Blöchl. E., R. Rachel, S. Burggraf, D. Hafenbradl, H. W. Jannasch and K. O. Stetter (1997), *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C, *Extremophiles*, 1, 14-21.
- Inagaki, F., M. M. M. Kuypers, U. Tsunogai, J. Ishibashi, K. Nakamura, T. Tredo, S. Ohkubo, M. Nakaseama, K. Gena, H. Chiba, H. Hirayama, T. Nunoura, K. Takai, B. B. Jørgensen, K. Horikoshi and A. Boetius (2006), Microbial community in a sediment-hosted CO₂ lake of the southern Okinawa Trough hydrothermal system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 14164-14169.
- Inagaki, F., T. Nunoura, S. Nakagawa, A. Taske, M. Lever, A. Lauer, M. Suzuki, K. Takai, M. Delwiche, F. S. Colwell, K. H. Nealson, K. Horikoshi, S. D'Hondt and B. B. Jørgensen (2006), Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 2815-2820.
- Kashefi, K. and D. R. Lovley (2003), Extending the upper temperature limit for life, *Science*, 301, 934.
- Kobayashi, T., O. Koide, K. Mori, S. Shimamura, T. Matuura, T. Miura, Y. Takaki, Y. Morono, T. Nunoura, H. Imachi, F. Inagaki, K. Takai and K. Horikoshi (2008), Phylogenetic and enzymatic diversity of deep subseafloor aerobic microorganisms in organics- and methane-rich sediments off Shimokita Peninsula. *Extremophiles*, 12, 519-527.
- Nakagawa, S., Y. Takaki, S. Shimamura, A. -L. Reisenbach, K. Takai and K. Horikoshi (2007), Deep-sea vent e-proteobacterial genomes provide insights into emergence of pathogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 12146-12150.
- Takami, H., Y. Takaki, G-J. Chee, S. Nishi, S. Shimamura, H. Suzuki, S. Matsui and I. Uchiyama (2004), Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*, *Nucleic Acids Res.*, 32, 6292-6303.
- Takai, K., K. Nakamura, T. Toki, T. Tsunogai, M. Miyazaki, J. Miyazaki, H. Hirayama, S. Nakagawa, T. Nunoura and K. Horikoshi (2008), Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high pressures cultivation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 10949-10954.