

深海熱水鉱床より分離された新種 *Thermococcus* 属 微生物の生育における温度と圧力の影響

柳林 美樹^{*1} 加藤 千明^{*1}
Francesco CANGANELLA^{*1} 稲田 哲哉^{*2}
平 清^{*2} 菊間 敏雄^{*2}
鈴木徹三郎^{*2} 堀越 弘毅^{*1}

本研究室において、深海熱水鉱床より噴出する熱水サンプルより分離された、新種の超好熱性古細菌 *Thermococcus peptonophilus* についてその生育における温度と圧力の影響を“深海微生物実験システム”を利用して調べた。その結果本微生物は、生育上限温度である95℃において絶対好圧性を示し、45MPaにて最大増殖能力を示した。こうした現象は多くの微生物において共通して見られる傾向にあり、微生物において普遍的な現象である可能性が示唆された。

キーワード：深海微生物，超好熱性古細菌，圧力，深海微生物実験システム，好圧性，
Thermococcus peptonophilus

The Effects of Temperature and Pressure on the Growth of *Thermococcus peptonophilus* Isolated from Deep-sea Hydrothermal Vents

Miki YANAGIBAYASHI^{*3} Chiaki KATO^{*3}
Francesco CANGANELLA^{*3} Tetsuya INADA^{*4}
Kiyoshi TAIRA^{*4} Toshio KIKUMA^{*4}
Kimio SUZUKI^{*4} Koki HORIKOSHI^{*3}

We have tested the effect of temperature and pressure on growth of *Thermococcus-peptonophilus* newly isolated from the deep-sea hydrothermal vents, using the “DEEP-BATH” system.

The results showed that this archaeon was able to grow well under 45MPa condition at the limited growth temperature, 95°C, and showed an obligatory balophily. Thus, we can say that the strong balophilic profiles appeared at maximum temperature for growth of many microorganisms, and this could be one of the common properties between temperature and

*1 深海環境プログラム，深海微生物研究グループ

*2 深海環境プログラム推進課

*3 The DEEPSTAR Group

*4 DEEP Promotion Division

pressure for microbial growth habitat.

Key Words : Deep-sea microorganisms, hyperthermophilic archaeon, barophily, high pressure, DEEP-BATH, *Thermococcus peptonophilus*

1 はじめに

深海環境は、一般的に大気圧下におかれた、暗黒、低温の環境世界として特徴づけられる。しかし場所によっては、熱水鉱床のような200℃～300℃を越える、生物にとっての超高温環境も同時に存在している。深海世界では、こうした熱水鉱床を中心とした独自の生態系が形成されており、その第一次生産者としての、熱水中に存在する好熱性微生物の役割が大変注目されている。そうした興味から、世界中の研究者により数多くの好熱菌が熱水中より分離され、その性質が明らかにされつつある。それらの結果を総合すると、分離された微生物の多くは極端に酸素を嫌い、酸素に触れると生育ができなくなることで、そして、原始の生命として脚光を浴びている、古細菌という第3の生命の世界に属していることが明らかとなっている。さらに、ある種の超好熱性古細菌は熱水鉱床において地球内部より噴出する水素と炭素ガスのみを利用して生育のためのエネルギーとし、炭化水素を合成していることが報告され、こうした海底の熱水環境は我々の惑星における生命の発生に深く関わっていることが示唆されたのである。そして熱水鉱床の超好熱性古細菌こそが原始生命の生き残りであるという、いくつかの証拠が出されつつあるというのが現状である^{1, 2)}。

こうした研究上の興味にも関わらず、サンプリングのためのコスト、時間等の理由により、まだまだたくさんの研究課題が残されている。第一に、一体どのくらいの種類の微生物が熱水中に存在しているのだろうか、ということが挙げられる。まだまだ新種の微生物が発見される余地は残されており、微生物分離のための培養条件等の、更なる検討が必要である。第2に、これらの熱水中の微生物は、同時に高水圧下におかれており、当然その生育能力に対しての温度の影響を調べると同時に、圧力の影響を考慮しなければならない。しかしながら、研究室において、高温、高圧の培養実験を行うことは高い危険性が伴い、これまで殆ど不可能であった。

我々は当センターにおいて開発された深海微生物実験システム (Deep-sea Baro/Thermophiles Collecting and Cultivating System, 通称“DEEP-BATH”) を利用して、本研究室において分離された、新種の超好熱

性古細菌*Thermococcus peptonophilus*³⁾ の生育に対する温度と圧力の影響を調べたので、ここに報告する。

2 方法と結果

2.1 超好熱性古細菌 *Thermococcus peptonophilus* OG-1株の性質

材料として用いた *T. peptonophilus* OG-1株は、西太平洋海域、深度約1,400mの熱水鉱床 (写真1) より分離された新種の超好熱性古細菌で、電子顕微鏡による観察から、極鞭毛を持ち、表層は2層構造をしている直径 0.7～2 μm の球状の微生物である (写真2)。本微生物は絶対嫌気性で、その生育至適温度が 85℃、16Sr RNAシーケンスの比較から*Thermococcus*属に含まれることがわかった。他の微生物と比較して、生育速度が早く (倍加時間; 25分)、その生育にはペプチド性の成分が必須である点が特に極端だった (表1)。

2.2 深海微生物実験システムによる培養実験

培養方法およびサンプリング方法

深海微生物実験システムの培養槽は、パイレックスガラス製の内槽、加圧槽、加熱・冷却器等から構成されている。内槽内の培養液の圧力は、加圧槽内に満たされた純水を加圧し、その圧力が内槽のベローズを介して伝搬される。温度は加熱・冷却器により加熱された純水の熱が、パイレックスガラスを通して培養液に伝えられる。

ところで、本実験に用いられているような絶対嫌気性菌の培養実験には、加圧媒体である純水中の溶存酸素の透過及びサンプリング時の圧力・温度の変動ならび空気の侵入を防止する必要がある。溶存酸素の浸透に対しては、ベローズの材質をガス透過性が低く、高真空関係のシールに使用されているフッ素ゴム (商品名バイトン) を用いている (写真3A)。また、サンプリングにはサンプリングチューブと真空ポンプを使用している。サンプリングチューブは2本の約70cmのL字管と3個の高圧バルブからなるU字の形状をした配管であり、内容量が約10mlで、その内約5 mlがサンプルとして使用できる (写真3B)。そのチューブ内を真空ポンプにて吸引している。

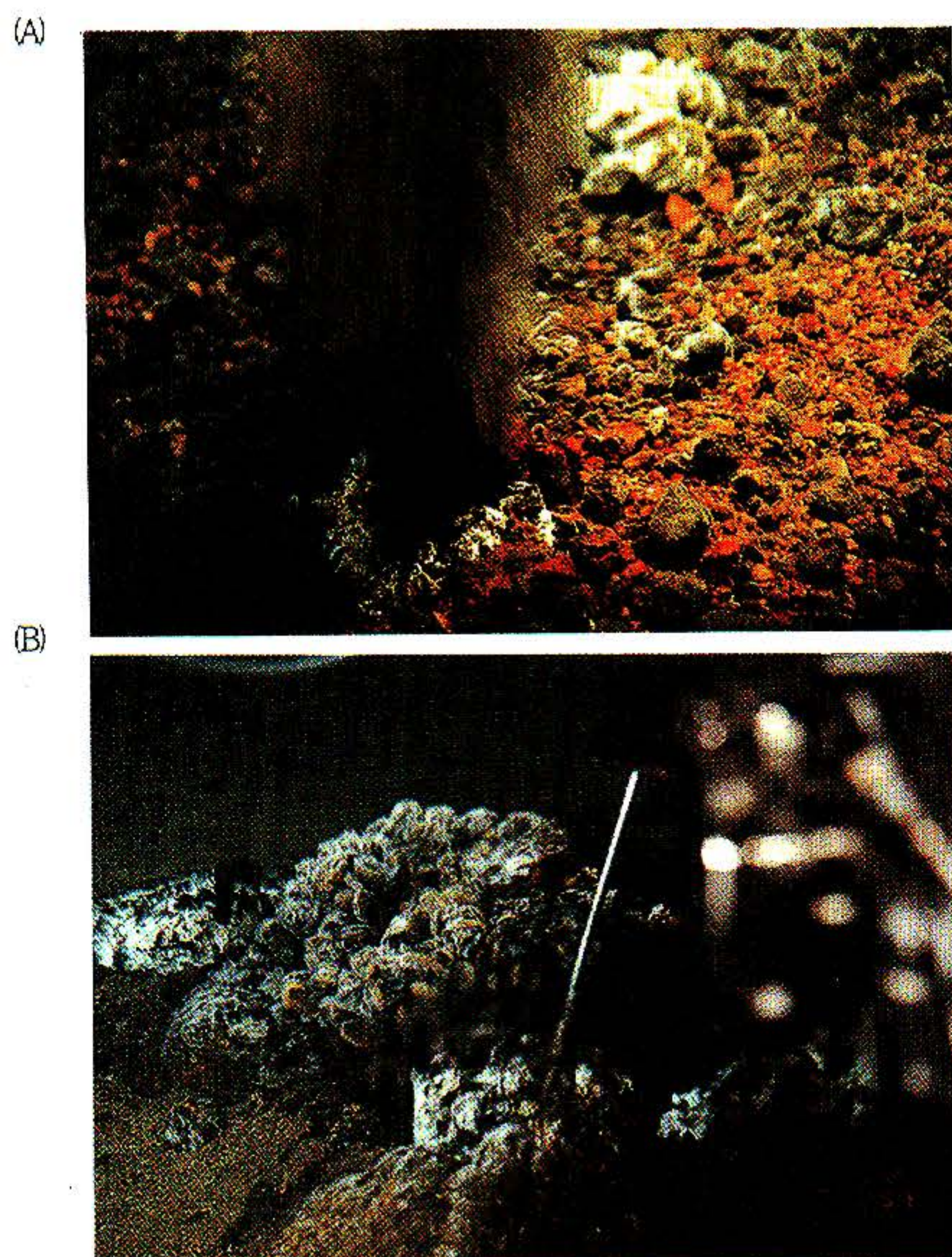


写真1 *Thermococcus peptonophilus* (OG-1) のサンプリングポイント (A) と熱水のサンプリング (B)。場所は伊豆小笠原トラフ、水曜海山 (28°34.2' E, 140°38.9' N) で、深度 1,380mの地点。ダイブ番号は 2 K-389

Photo 1 Sampling point of *Thermococcus peptonophilus* (OG-1), and a water sampling from hydrothermal vent. This point is at Suiyo-sea maunt, Izu-Bonin Forearc (28° 34.2' E • 140° 38.9' N) depth 1,380m. Diving No. #2K-389.

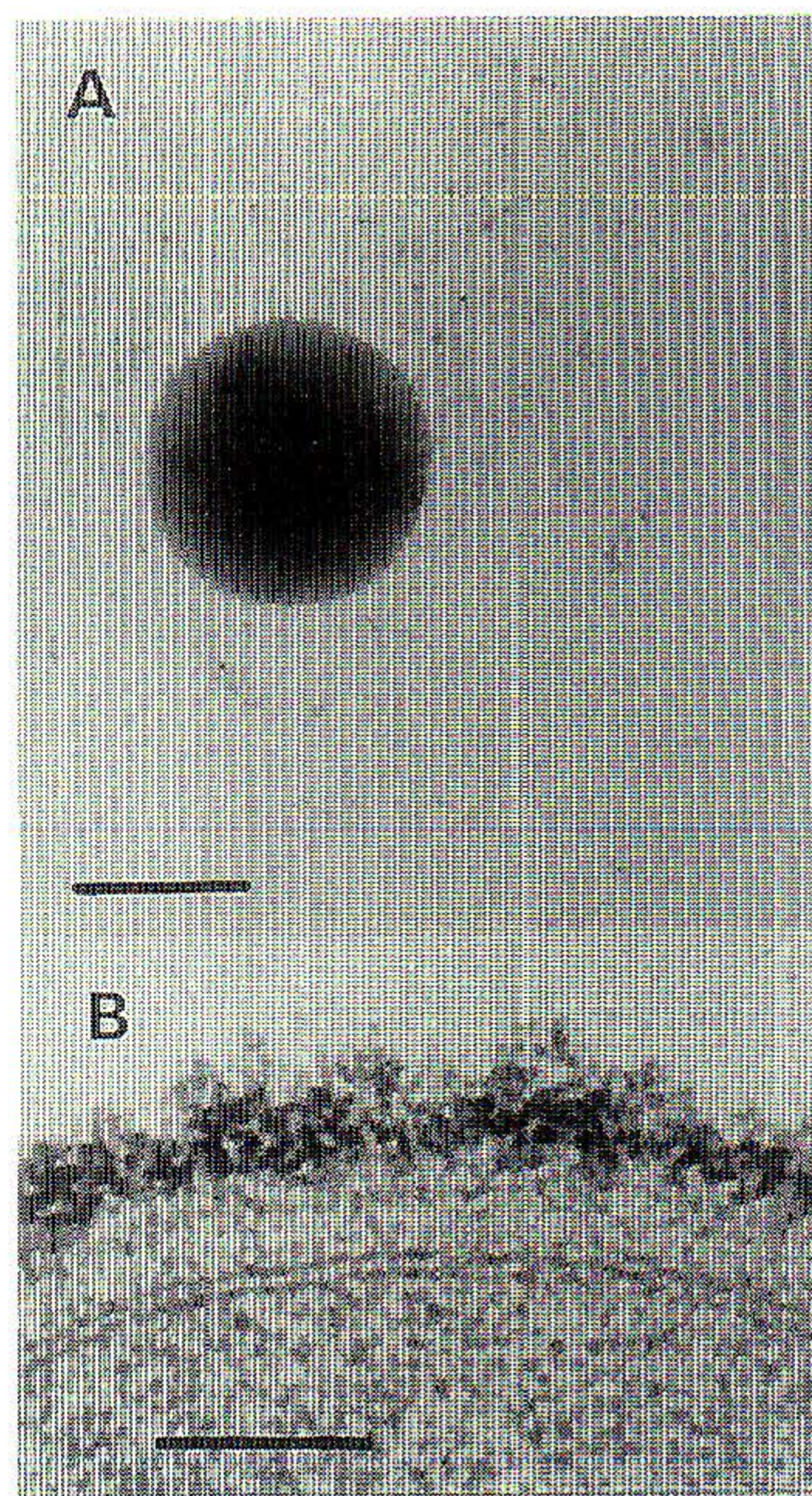


写真2 *Thermococcus peptonophilus* (OG-1)の電子顕微鏡写真。Aはネガティブ染色 (バーは 0.5 μ m), Bは超薄切片像 (バーは 0.05 μ m)

Photo 2 Electron micrographs of *T. peptonophilus* (OG-1). A, Platinum-shadowed (bar, 0.5 μ m); B, thin section (bar, 0.05 μ m).

表1 *Thermococcus peptonophilus*と他の*Thermococcus*属微生物との性質の比較

Table 1 Characteristics of *Thermococcus* species and the new isolate, *Thermococcus peptonophilus*.

Species	G+C Content (mol%)	Growth temperature (°C)		Optimum NaCl concentration (g/l)	Optimum pH	Carbon source	S° effect ^a	Rifampicin resistance ^b	Generation Time (min)
		Optimum	Maximum						
<i>T. celer</i> (57)		88	93	38-40	5.8	Peptides Sucrose	E	+	50
<i>T. litoralis</i> (38)		85-88	96-98	18-65	6	Peptides Pyruvate	E	-	-
<i>T. stetteri</i> (50)		75	94-98	25	6.5	Peptides Starch Pectin	R	-	70
<i>T. profundus</i> (52.5)		80	90	20	7.5	Peptides Pyruvate Starch	R	-	50
<i>T. peptonophilus</i> (52)	85		95	30	6	Peptides	E	-	25

^a, E, elemental sulfur stimulates growth; R, elemental sulfur is required for growth.

^b, +, rifampicin-resistant; -, rifampicin-sensitive.

(A)



(B)

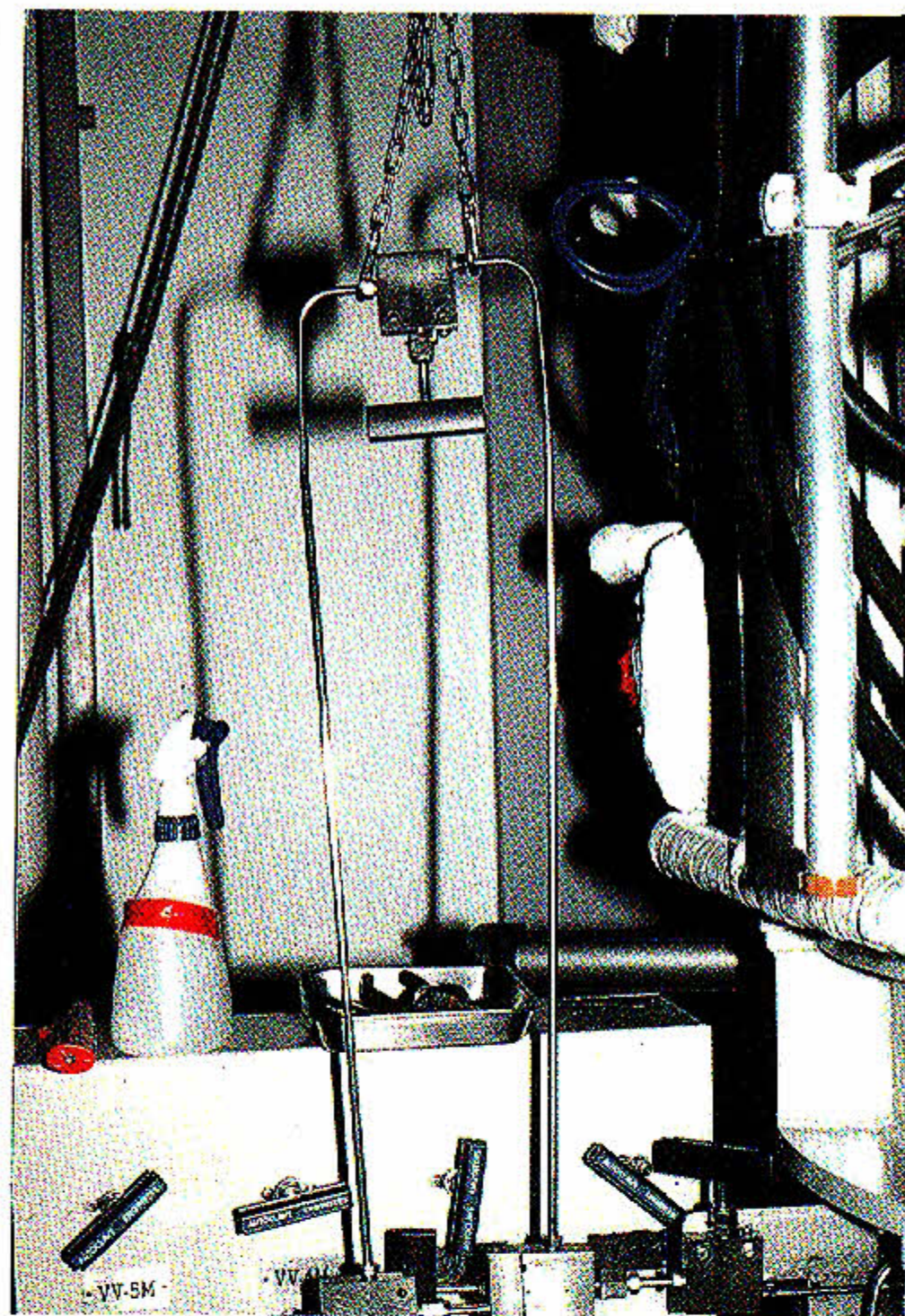
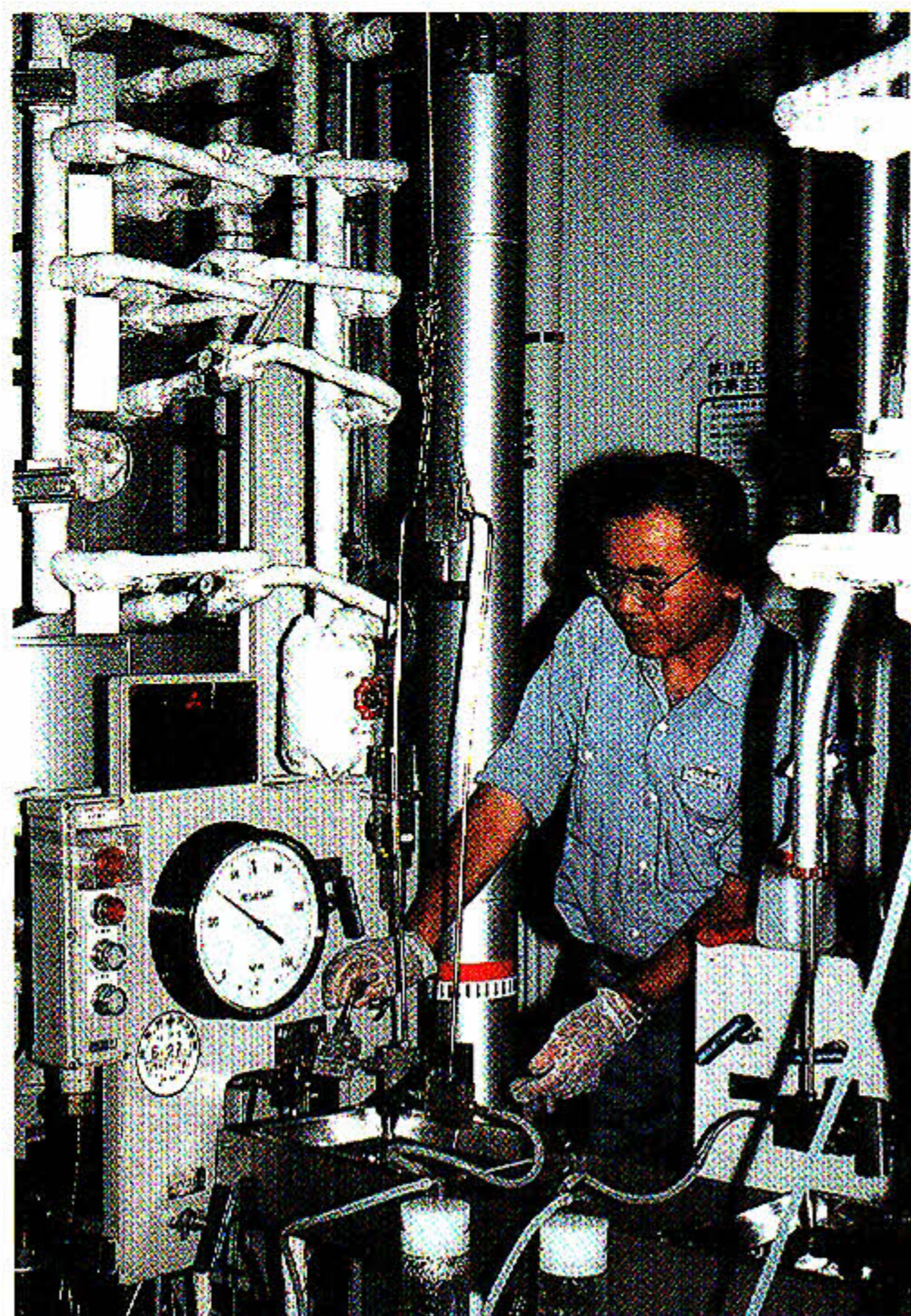


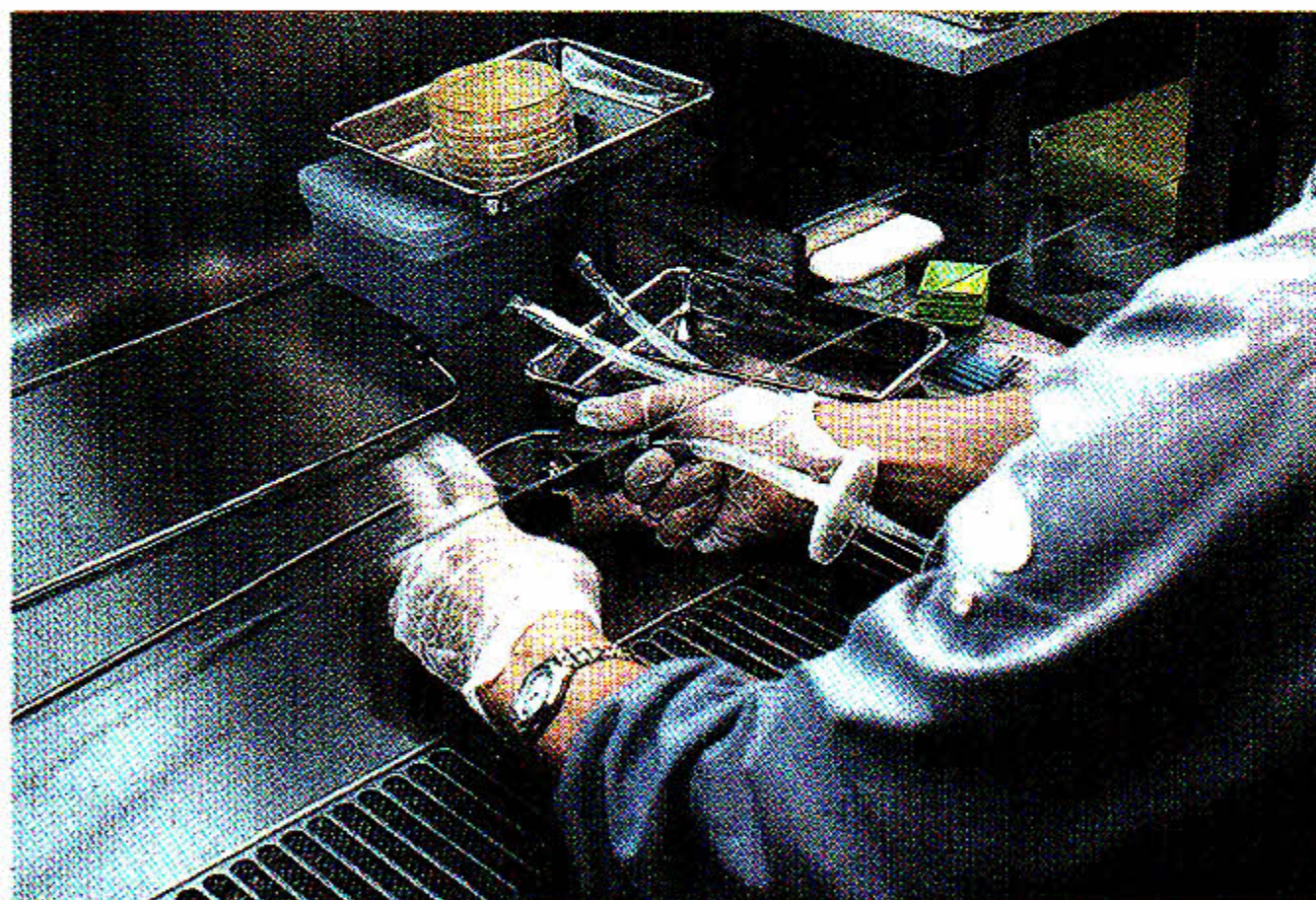
写真3 深海微生物実験システムの微生物培養容器 (A), 及びサンプリング管 (B)

Photo 3 Culture vessels (A) and sampling tube (B) of the "DEEP-BATH" system.

(A)



(B)



(C)

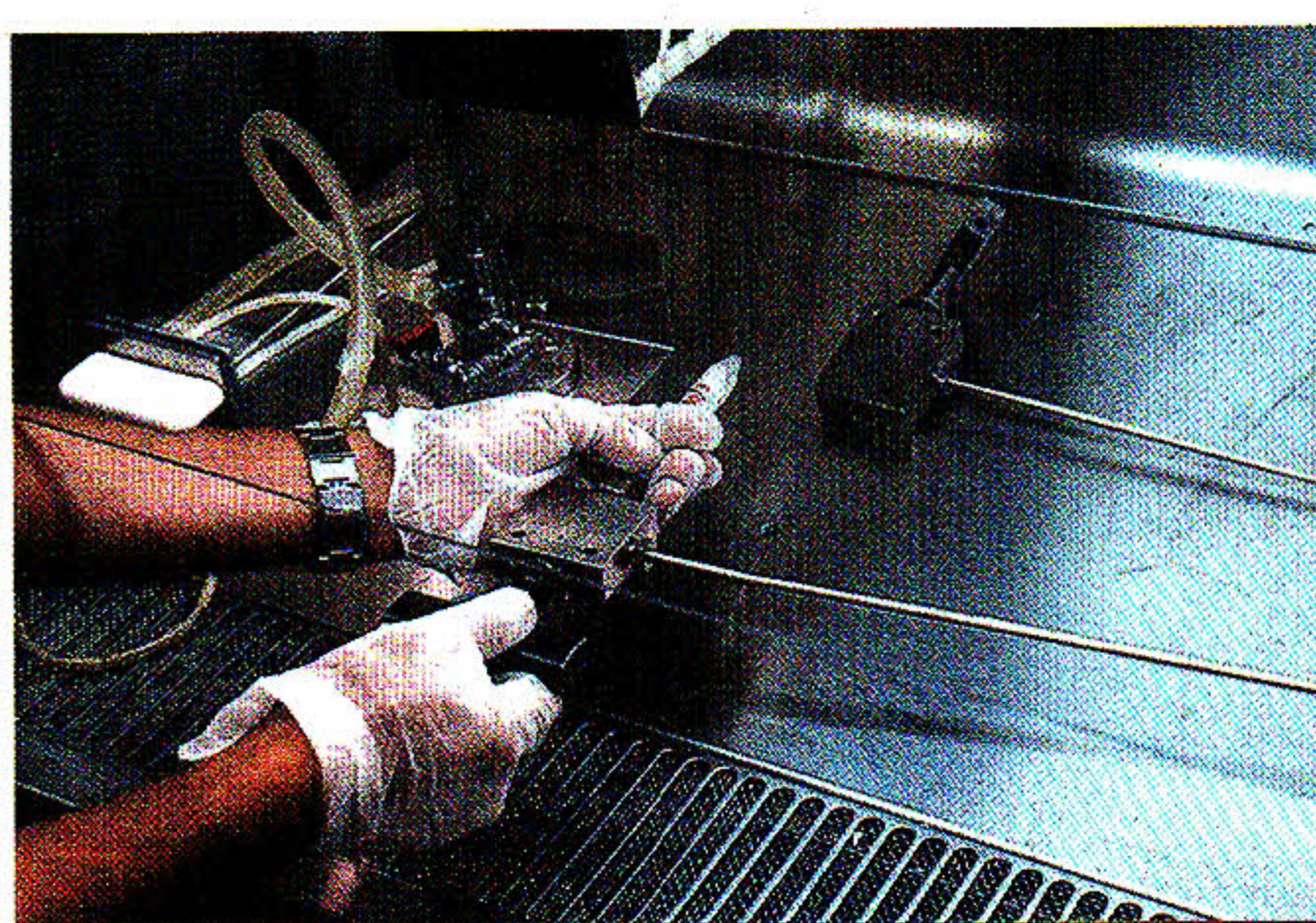


写真4 深海微生物実験システムによるサンプリング作業

Photo 4 Sampling procedure using the "DEEP-BATH" system.

このサンプリングチューブを用いたサンプリング方法の詳細は以下のとおりである。まず、サンプリングチューブを培養槽側の元バルブを閉めた状態にて接続した後、サンプリングチューブの全バルブを開け、トラップを介して真空ポンプで引き、サンプリングチューブの最終バルブを閉める（写真4 A）。これでサンプリングチューブ内に空気がほとんど存在しなくなる。この後、元バルブを全開しサンプリングチューブ内を培養液で満たすのだが、このままではサンプリングライン内の残留液の影響を受けているため、正確な培養液ではない。そこで最終バルブを圧力が下がらない程度開け、約20mlほどトラップに流し出す。そして、全てのバルブを閉めた後サンプリングチューブを取り外し、クリーンベンチ内で分解後、シリンジにて空気を送り込み、サンプリングチューブの上流側の2個のバルブ間の培養液を取り出す（写真4 B, C）。このようにして本体側に減圧や温度の変化が全くない状態で培養液をサンプリングすることが出来る。

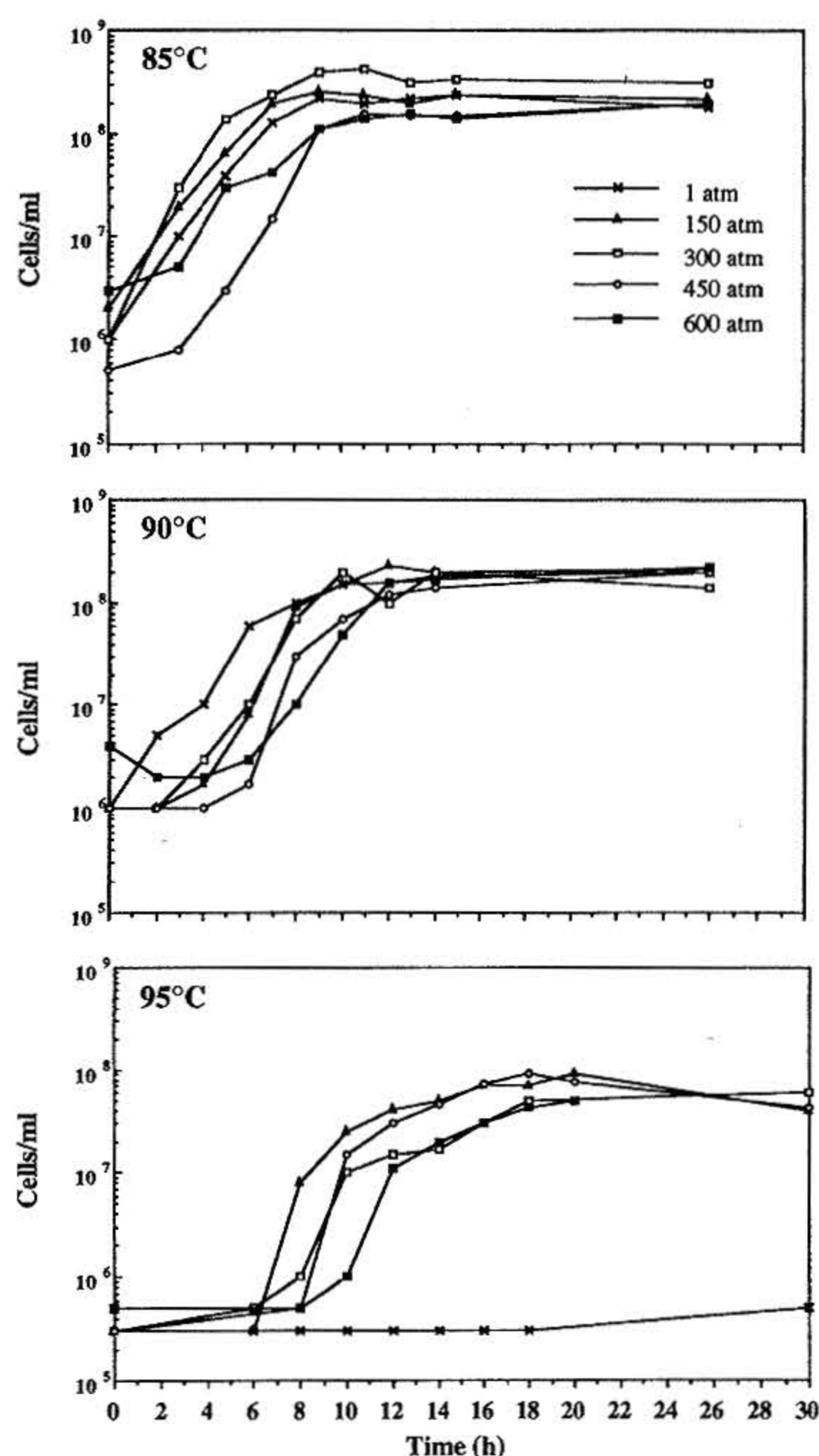


図1 各温度、圧力下における *T. peptonophilus* の増殖曲線
Fig1 Growth of *T. peptonophilus* at several temperatures and pressures.

T. peptonophilus の培養条件として、温度は 85°C, 90°C, 95°C, 100°C を用い、圧力条件は 0.1MPa, 15MPa, 30MPa, 45MPa, 60MPa として実験を行った。サンプリングは培養開始後約 2~3 時間おきに行い、DAPI（正式名称：4', 6-diamidino-2-phenylindone）によるDNA染色後、蛍光顕微鏡にて生細胞数のカウントを行った。図1に各培養時間における細胞数の変化を各温度、圧力条件下でプロットした結果を示した。大変に興味深いことに生育至適温度である85°C、及び90°Cにおいてはいずれの圧力下においても良好に生育し、 $2 \sim 3 \times 10^8$ 細胞数/ml位まで生細胞数が上昇したのに対し、生育上限温度である95°Cにおいては大気圧下では殆ど生細胞数の上昇が見られなかった。そしてこの温度では、加圧下において始めて良好な生細胞数の上昇が観察され、絶対好圧性の性質を示した。なお、100°Cではいかなる圧力条件下においても生育は見られなかった。

図1の結果から細胞の倍加時間を算出し、その逆数（生育速度）を縦軸として横軸に圧力をプロットし、図2とした。*T. peptonophilus* における生育速度は温度90°C, 95°Cで45MPaの条件で培養した時に最大値を示した（図2）。

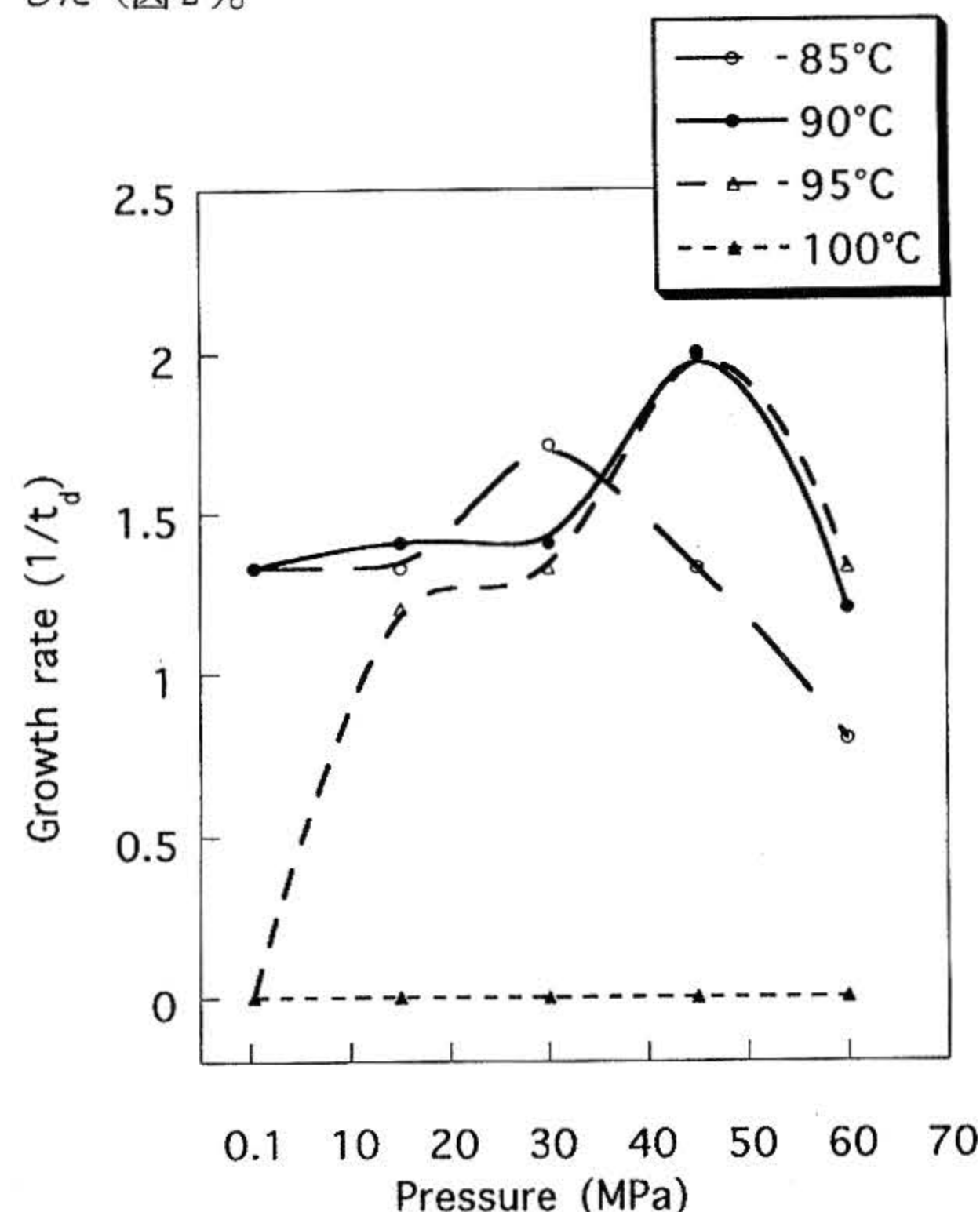


図2 *T. peptonophilus* の各温度条件下における生育速度に対する圧力の影響。 t_d は倍加時間 (hr), MPa は圧力を表す。ちなみに30MPaは約300気圧の圧力に相当する
Fig 2 Effect of pressure on growth rate of *T. peptonophilus* at various temperatures. t_d ; doubling time (hr)

3 考 察

深海熱水鉱床より分離された超好熱性古細菌の生育能力に対する圧力・温度の影響を調べた研究は、これまで7株についての報告がある。すなわち、*Methanococcus jannaschii*⁴⁾、*Desulfurococcus* S株、SY株⁵⁾、*Pyrococcus abyssi*⁶⁾、*Pyrococcus* ES 4株⁷⁾及び超好熱性微生物AL 1株、AL 2株⁹⁾について検討されている。これらの報告を総合すると、加圧により生育上限温度が若干上昇するという共通の傾向が見られ、本報告で我々が指摘した結果と一致している。しかしながらこれらの過去の研究においては、加圧培養実験時の細胞数測定の為のサンプリングを行う際、加圧容器の減圧、温度の低下という工程を経なければならず、そうした操作の際、培養細胞に影響が及ぼされることは避けられず、正確なデータが得られない可能性が指摘されている。我々の用いた深海微生物実験システムは、2.2で説明したように、サンプリング時に培養槽側において、全く圧力、温度の変化なく行えるため、そうした問題点を克服した世界初のサンプリングシステムといえる。

過去の研究例では、深海熱水鉱床より分離されている *Thermococcus* 属微生物について圧力の影響を検討したものは存在しておらず、本報告が最初となる。我々の結果は、本微生物の大気圧下における生育上限温度にて、絶対好圧性を示したという点で大変注目されるが、こうした傾向は微生物一般に広く見られる可能性がある。

我々は深海より分離された好圧性細菌や耐圧性細菌が、やはり生育上限温度でより好圧性を示すという同様な挙動を示していることを見だし¹⁰⁾、また、大腸菌においても同様な報告がある¹¹⁾。そこで、本研究の結論として「一般的に微生物は大気圧下における生育上限温度で好圧性を示す」という仮説を提唱したい。

4 参考文献

- 1) Kandler, O. : The archaeobacteria, biochemistry and biotechnology. Portland press, London, 195pp. (1992)
- 2) Stetter, K. O. : Frontiers of life. Editors Frontiers, Gif sur Yvette France. (1993)
- 3) Gonzalez, J.M., C. Kato and K. Horikoshi : *Thermococcus peptonophilus* sp. nov., a fast-growing, extremely thermophilic archaeobacterium isolated from deep-sea hydrothermal vents. Arch. Microbiol. **164**, 159-164. (1995)
- 4) Miller, J. F., N. N. Shan, C. M. Nelson, J.

M. Ludlow and D. S. Clark : High pressure-temperature bioreactor: assays of thermostable hydrogenase with fiber optics. Biotech. Bioeng., **34**, 1015-1021. (1988)

- 5) Jannasch, H. W., C. O. Wirsen, S. J. Molyneaux and T. A. Langworthy : Extremely thermophilic fermentative archaeobacteria of the genus *Desulfurococcus* from deep-sea hydrothermal vents. Appl. Environ. Microbiol., **54**, 1203-1209. (1988)
- 6) Erauso, G., A. L. Reysenbach, A. Godfroy, J. R. Maunier, B. Crump, F. Partensky, J. A. Baross, V. Marteinsson, G. Barbier, N.R. Pace, and D. Prieur : *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. Arch. Microbiol., **160**, 338-349. (1993)
- 7) Pledger, R. J., B. C. Crump, and J. A. Baross : A barophilic response by two hyperthermophilic, hydrothermal vent Archaea : an upward shift in the optimal temperature and acceleration of growth rate at supra-optimal temperatures by elevated pressure. FEMS Microbiol. Ecol., **14**, 233-242. (1994)
- 8) Holden, J. F. and J. A. Baross : Enhanced thermotolerance by hydrostatic pressure in the deep-sea hyperthermophiles *Pyrococcus* strain ES4. FEMS Microbiol. Ecol., **18**, 27-34. (1995)
- 9) Reysenbach, A. L. and J. M. Deming : Effects of hydrostatic pressure on growth of hyperthermophilic archaeobacteria from the Juan de Fuca Ridge. Appl. Environ. Microbiol., **57**, 1271-1274. (1991)
- 10) Kato, C., T. Sato, and K. Horikoshi : Isolation and properties of barophilic and barotolerant bacteria from deep-sea mud samples. Biodiv. Conserv., **4**, 1-9. (1995)
- 11) Marquis, R. E. : High pressure microbial physiology. Adv. Microb. Physiol., **14**, 159-241. (1976)

(原稿受理 : 1996年12月20日)