

深海熱水環境下に棲息する超好熱性細菌の 分離とその性質

小林哲夫^{*1,2} 堀越弘毅^{*1,2}

中部沖縄トラフ伊平屋小海嶺で「しんかい2000」による潜航調査(第543潜航)を行ない、熱水噴出域より岩石および沈殿物を回収した。これらのサンプルより超好熱性細菌の分離を試みた結果、二種の細菌の単離に成功した。これらはいずれも嫌気性の球菌であり、それぞれ DT5432, 5433 と命名した。これらの細菌はいずれも運動性を有しており、その生育限界温度を 90°C および 92°C に持っていた。DT5432, 5433 はいずれも NaCl および無機イオンをその生育に要求し、その膜脂質がエーテル型からなることから、海洋性のイオン依存超好熱古細菌であると考えられた。これらの細菌の 16SrDNA の制限酵素パターンよりいずれも *Thermococcaceae* に属し、G+C 含量より、*Thermococcus stetteri* に類似していると考えられた。しかしながら、DT5432, 5433 は *Thermococcus stetteri* と DNA ホモロジーを示さず、また両者間においてもホモロジーは認められない。以上より、どちらも *Thermococcus* 属に属する新種の細菌であると考えられる。

Isolation and Characterization of Hyperthermophilic Bacteria from a Deep-sea Hydrothermal Vent System.

Tetsuo KOBAYASHI^{*3,4} Koki HORIKOSHI^{*3,4}

"SHINKAI 2000", a manned submersible, was used to collect sediments and rocks on a hydrothermal vent system at Iheys Small Ridge at the Middle Okinawa Trough. After enrichment and purification by repeated serial dilution, two hyperthermophilic bacteria were isolated. These bacteria, designated as strain DT5432 and 5433, grew anaerobically and had coccoid shapes. They were motile and showed upper limit temperature for growth at 90°C and 92°C, respectively. DT5432 and 5433 required NaCl and elemental sulfur for their growth, and contained ether core lipids as a major membrane lipid, suggesting that they belong to marine sulfur-dependent hyperthermophilic archaeobacteria. The restriction enzyme patterns of 16S rDNAs of these strains coincided with that of *Thermococcus celer*, indicating that these strains belong to the family of *Thermococcaceae*. G + C contents of these strains (52.2% for DT5432, 49.6% for DT5433) were relatively close to that of *T.*

* 1 海洋科学技術センター深海環境プログラム

* 2 理化学研究所微生物学研究室

* 3 DEEP-STAR Group, JAMSTEC

* 4 Laboratory of Microbiology, The RIKEN Institute

stetteri (50%), however, total DNAs of these strains did not show any homology to that of *T. stetteri*, suggesting that they represent new species of the genus *Thermococcus*.

1. はじめに

深海熱水噴出域は高い生物密度を持っている。これは地熱エネルギーを利用した地表とは異なる生態系、熱水生態系が存在するためである。この熱水生態系の一次生産者は、化学合成独立栄養細菌であり、その多くは還元型イオウ化合物を酸化することによりエネルギーを得て炭酸固定を行なう細菌である。熱水生態系の無脊椎動物の主な食物源はこれらの細菌であると考えられ、また、しばしばこれらの細菌は無脊椎動物の体内に寄生している。もちろん厳密に言うとイオウ化合物の酸化に用いられる酸素は光合成によって作られたものであり、太陽光を利用しない生態系とはいえない。しかしながら、太陽エネルギーを利用せずに生育する細菌も実際に存在している。熱水中に存在する水素を二酸化炭素で酸化してエネルギーを得るメタン生成菌や、水素をイオウで酸化して生育する H_2 -S 独立栄養性細菌である。これらの細菌は嫌気性細菌であり、還元的な熱水にさらされている場所、すなわち多くはチムニーに付着して生育しているものと考えられる。深海熱水噴出域での水温は高く、時に 300°C を越えることがある。したがって、これらの細菌は 80°C 以上に生育至適温度を持つ超好熱性細菌であることが多く、その生育限界温度は時に 100°C を越えることがある。

超好熱性細菌は、主に地表の火山地帯の硫黄孔や温泉、浅海底の硫黄孔などから分離されてきた (Kelly and Deming, 1988)。しかし熱水生態系の発見とそこに生育する超好熱性細菌の発見から、深海熱水鉱床が新しい超好熱性細菌の棲息地として注目されるようになった。深海熱水鉱床においては、その高い水圧から 100°C を越える液体状の水が存在する。このような熱水の存在は超好熱性細菌には適していると考えられ、生物の温度限界をさらに引き上げるような微生物の存在が期待される。超好熱性細菌はわずかの例外を除いて古細菌に属する。古細菌とは原核生物、真核生物と異なる第三の生物であり、現存している生物の中では

最も原始生命体に近い位置に存在している。海水中にあり適度な還元状態にある熱水は、原始地球を反映しているとも考えられ、また生命の誕生に必須である水溶性の磷酸化合物が火山活動により出来上がることから (Yamagata et al., 1991)、熱水鉱床はまさに生命誕生の場に近いとも考えられる。これらの事実から、深海熱水環境下に棲息する超好熱性細菌の研究は生命誕生の謎に迫る糸口ともなりうるのである。また、生物の温度に対する適応を知るうえでも、超好熱菌はまさに格好の材料であろう。応用的な側面から考えると、超好熱酵素の分離源として超好熱性細菌は格好であり、その実用例としては現在の遺伝子操作の方法を大きく変えるに至った Polymerase Chain Reaction (PCR) 法に用いられる DNA polymerase がある。

さて、我々が今回調査を行なった海域は沖縄トラフ伊平屋小海嶺である。この地域での熱水活動は「しんかい2000」により1988年に確認されている (木村ほか, 1989)。この熱水噴出域での大きな特徴としては、熱水性マウンドの主成分が炭酸塩からなる事があげられる。典型的なチムニー等が主に金属硫化物からなる事を考えると、これは明らかに異なった熱水活動を示唆するものである。また、この地域の熱水沈殿物はイオウの顆粒を含んでる (蒲生ほか, 1991)。このような特徴的な環境下においては、その環境に適応した超好熱性細菌が棲息していると考えられる。本稿においては、この調査活動で得たサンプルより超好熱性細菌を分離し、その性質を検討した結果について述べる。

2. 材料と方法

2. 1 第543潜航による試料採取と保存

平成3年5月28日「しんかい2000」での第543潜航により試料採取を行なった。熱水噴出口よりやや離れた地点では採泥器により堆積物を、「ベビーチムニー」(蒲生ほか, 1991)の熱水噴出部では電動グラブにより熱水沈殿物を、「ピラミ

ッドチムニー」(蒲生ほか, 1991)においてはマニピュレーターにより熱水噴出口近くの岩石を採取した。

取得した試料は母船の「なつしま」に持ち帰り、船上にて無菌海水に懸濁し、 -70°C および 4°C で保存した。サンプルの一部については、無菌海水に懸濁し、硫化ナトリウム、レサズリンナトリウムを加えて還元状態とした。この還元処理サンプルについては 4°C で保存した。これらを地上の研究室に持ち帰り、好熱性細菌の分離のためのサンプルとした。

2. 2 集積培養および細菌の純粋分離

それぞれの試料について、高温下 (70°C – 100°C) 種々の培養条件で集積培養を行ない、菌の生育を観察した。基本として用いた培地は、エネルギー源としてトリプトン、酵母抽出液、単体イオウを含み、さらに NaCl および各種金属塩を含んでいる。考慮にいれた条件としては、pH、酸素 (好気および嫌気)、電子受容体、エネルギー源、塩濃度である。各種培地中にサンプルを接種し高温下で培養した。菌の生育は位相差顕微鏡下細胞数を数えることにより調べた。生育した細菌の純化は限界希釈を3回繰り返すことにより行った。

2. 3 生理学的特性

特に記述のないかぎり培養温度は 80°C で行なった。生育の pH 依存性を調べる際には硫酸または水酸化ナトリウムで pH 調整を行なった。各エネルギー源の利用性を調べる際には、各種基質をトリプトンのかわりに加えた。電子受容体の検討の際は、単体イオウの代わりに可能性のある物質を加えた。硫化水素の生産性は培養液中に塩化第一鉄の水溶液を加え、黒色沈殿の産生、特有の臭気の消失により確認した。抗生物質に対する感受性は、各抗生物質を $100\mu\text{g/ml}$ の濃度で加えて生育を観察することにより決定した。膜脂質は、凍結乾燥菌体を酸メタノリシスし薄層クロマトグラフィーにより解析した (Ross et al., 1981)。

2. 4 遺伝的特徴

細菌全 DNA は溶菌液をフェノール処理し、プロテインゼ K, RNase A, RNase T₁ 処理することにより調製した。G+C 含量は玉岡らの方法 (Tamaoka and Komagata, 1984) にしたがって決

定した。16S rRNA 遺伝子は、すでに報告されている *Thermococcus celer* および *Desulfurococcus mobilis* の 16S rRNA 配列の (Achenbach-Richter et al., 1988; Kjems et al., 1987) 5'末端領域及び 3'末端領域に相当するプライマー DNA を、ABI 社の DNA 合成機を用いて化学合成し、これらを用いて PCR 法により目的菌株の 16S rDNA を増幅することにより取得した。増幅した DNA 断片は調製用アガロースゲル電気泳動により精製し、制限酵素により切断した。解析はアガロースゲル電気泳動により行なった。DNA-DNA ホモロジー解析は、dot blot 法 (Huber et al., 1990) を改変して行なった。*Thermococcus celer* DSM2476, *Thermococcus litralis* DSM5473, *Thermococcus stetteri* DSM5262 の全 DNA を Boehringer Mannheim 社のキットを用いて digoxigenin dUTP によりラベルし、これをプローブとして Hybond N⁺ ナイロン膜に blotting したサンプル DNA と $\text{Tm}-19^{\circ}\text{C}$ の条件でハイブリダイゼーションを行なった。シグナルの検出は、アルカリフォスファターゼ結合抗 digoxigenin 抗体を用いて行なった。

3. 結果および考察

3. 1 集積培養および細菌の純粋分離

ベビーチムニーから取得した試料を用い、嫌気的環境下で培養を行なったときのみ菌の生育が認められた。この際用いた培地はトリプトンを主栄養源とし、単体イオウを含む。限界希釈を三回繰り返すことにより、最高生育温度を 90°C に持つ DT5432, 92°C を限界とする DT5433 の純化に成功した。

3. 2 形態

DT5432, DT5433 は直径 1–2 ミクロン程度のやや不定形の球菌であり (図 1)、運動性を有している。いずれも 1 細胞、または 2 細胞が連結した状態で存在し、多細胞からなる集合体はまれであった。二つの細胞が鉄アレイ状に連なった分裂中間体と思われる細胞が観察されることから、分裂は constriction によると推定される。

3. 3 生育特性

DT5432 は 50°C から 90°C , DT5433 は 50°C から 92°C で生育を示す。生育最適温度は DT5432 が 80°C , DT5433 が 80 から 85°C であり (図 2), い

DT5432



DT5433

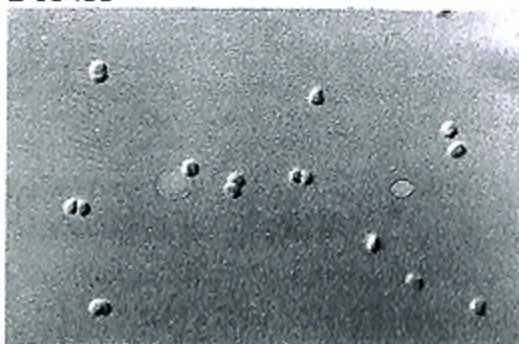


図1 DT5432, 5433の微分干渉顕微鏡写真
Fig. 1 Differential interference micrographs of strain DT5432 and 5433.

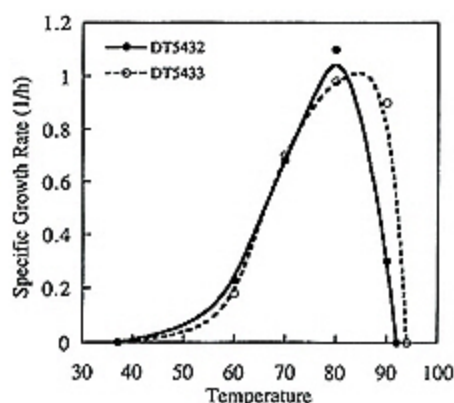


図2 DT5432, 5433の生育速度に対する温度の影響
Fig. 2 Effect of temperature on specific growth rates of DT5432 and 5433.

いずれも超好熱性細菌に属する。生育 pH は 5 から 9 で、至適は DT5432 が 7.5, DT5433 が 7 にある。いずれも 1 から 6 % の NaCl をその生育に要求し、至適濃度は 2 から 4 % である (図 3)。NaCl

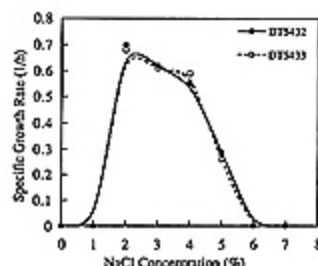


図3 DT5432, 5433の生育速度に対する NaCl 濃度の影響
Fig. 3 Effect of NaCl concentration on specific growth rates of DT5432 and 5433.

非存在下においては細胞の膨張および溶菌が観察された。至適条件下での世代時間はそれぞれ 50 分および 40 分であり、定常期において 5×10^8 cells/ml 以上に達した。

3. 4 代謝特性

DT5432, DT5433 は嫌気性の超好熱性細菌である。トリプトン、ペプトンなどペプチド系の栄養源と硫黄を含む培地で良好な生育を示す。カゼイン、ゼラチンなどのタンパク質やトリプトファン添加カザミノ酸、酵母抽出液も利用する。糖類の利用は認められない (グルコース、フルクトース、アラビノース、ガラクトース、ザイロース、シュークロース、セロビオース、メリビオース、ラクトース、トレハロース、デンプン、プルラン、ザイラン、セルロース、カンテン)。唯一の例外はマルトースで DT5432 のみ利用することができる。いずれの菌株においても生育には単体硫黄が必須であり、また生育にともなって硫化水素を産生する。硫酸イオン、亜硫酸イオン、チオ硫酸イオン、硝酸イオン、 Fe^{3+} をイオウの代替物とはできない。

抗生物質の影響を調べたところ、いずれの菌株もアンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、ストレプトマイシン、エリスロマイシン、クロラムフェニコールに耐性を示した。リファンピシンには感受性を示したが ($100 \mu\text{g/ml}$), $50 \mu\text{g/ml}$ の濃度では増殖可能であった。この抗生物質に対する試験の結果は、これらの菌株が真性細菌とは異なることを示唆するものである。その生育温度、単体イオウおよび NaCl の要求性を考慮にいれると、海洋性の高度好熱性イオウ依存古

細菌の可能性が考えられる。

3. 5 膜脂質

古細菌の最も大きな特徴の一つは、その膜脂質が真性細菌や真核生物に見られるグリセロールエステルではなく、グリセロールエーテルであるという点である。DT5432, 5433が古細菌に属することを証明するため、凍結乾燥菌体の酸メタノリシス産物を解析した結果、いずれの菌株の膜脂質もエーテル型であることが明らかとなった。

以上までの結果から、DT5432, DT5433は高度好熱性硫酸依存古細菌であり、中性領域で生育する嫌気性球菌である点を考慮にいと、*Thermococcales* 目 *Thermococcaceae* 科の *Thermococcus* 属又は *Pyrococcus* 属、あるいは *Thermoproteales* 目 *Desulfurococcaceae* 科の *Desulfurococcus* 属に属するものと推定される (König and Stetter, 1989)。さらに、NaCl 要求性、生育温度から *Thermococcus* 属の可能性が高い。

3. 6 16S rDNA

16S rDNA の配列は同一属内では非常に相溶性が高く、一般に90%をはるかに越える。*Thermococcus celer* および *Desulfurococcus mobilis* の16S rDNA の配列はすでに報告されており、それぞれ1486, 1496塩基よりなる。これらの配列を ENBLE の核酸配列データベースより抽出し比較したところ、全体の相溶性は81%であるが、5'末

端および3'末端のそれぞれ20塩基、17塩基以内では1塩基しか異なることが明らかとなった。そこで、ABI社のDNA合成機を用いてどちらの配列にも使用可能なPCR用混合プライマーを作成した。その配列は5'プライマー A (C/T) CCGGTTGATCCTGCCGG, および3'プライマー AGGAGGTGATC (C/G) AGCCG である。これらのプライマーを用いてPCR法により16S rDNAの増幅を試みたところ、いずれの菌株においても主産物として、予想された約1.5kbの位置にDNA断片が検出された。他の副産物を取り除くため、この断片を調製用アガロースゲル電気泳動により精製し、各種制限酵素に対する切断パターンをアガロースゲル電気泳動により解析した。結果は表1に示す通りである。対照として、*Thermococcus celer* および *Desulfurococcus mobilis* の16S rDNAの切断パターンを示した。

DT5432, 5433は同一の切断パターンを示し、そのパターンは *Thermococcus celer* のものと完全に一致した。この結果は、DT5432, 5433が *Thermococcus* 属、またはやや可能性は低い、同一目、同一科に属する *Pyrococcus* 属に属することを示している。

3. 7 G+C 含量

現在、*Thermococcus* 属には三種、*Pyrococcus* 属には二種の種が知られている。これらの種との比

表1 DT5432, 5433, *Thermococcus celer*, *Desulfurococcus mobilis* 間の16S rDNA の制限酵素パターンの比較

Table 1 Restriction enzyme patterns of 16S rDNAs of DT5432, 5433, *Thermococcus celer*, *Desulfurococcus mobilis*.

Restriction Enzyme	No. of Sites (Fragment Length in bp)		
	DT5432 DT5433	<i>Thermococcus celer</i>	<i>Desulfurococcus mobilis</i>
AatI	>1 (1200, ND)	2 (1223, 159, 104)	2 (812, 514, 170)
Apal	1 (1000, 550)	1 (957, 529)	1 (1159, 337)
HincII	0	0	3 (721, 393, 209, 173)
HpaI	0	0	1 (1287, 209)
KpnI	1 (900, 650)	1 (870, 616)	0
NaeI	2 (900, 400, 230)	2 (892, 377, 217)	1 (952, 544)
SacI	1 (800, 700)	1 (789, 697)	0

較のための一つの指標として DNA の G+C 含量を測定した。その結果、DT5432 は 52.2%，5433 は 49.6% という結果を得た。玉岡らの方法によれば、測定誤差は 1% 以内である。このデータから判断するとこれらの菌株が同一種に属するか否かは微妙なところであると言えよう。*Thermococcus* 属の三種の種 *Thermococcus celer*, *Thermococcus litralis*, *Thermococcus stetteri* の G+C 含量はそれぞれ 57%，38%，50%，*Pyrococcus* 属の二種の種 *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woesei* ではそれぞれ 38.3%，38% である (Zillig, 1991)。これらから判断すると DT5432, 5433 は *Thermococcus stetteri* に最も類似している。

3. 8 DNA-DNA ホモロジー

Thermococcus 属の type strain である *Thermococcus celer* DSM2476 (Zillig et al., 1983), *Thermococcus litralis* DSM5473 (Neuner et al., 1990), *Thermococcus stetteri* DSM5262 (Miroshnichenko, 1989) との DNA の相同性を検討した結果が図 4 である。この図で明らかなように、DT5432, 5433 はいずれの菌株とも相同性を示さなかった。また両者間においても相同性は認められなかった。以上の結果は、DT5432, 5433 が *Thermococcus* 属に属する新種の細菌である事を示している。

3. 9 Description

Thermococcus sp. DT5432

直径 1-2 μ m のやや不定形の球菌。運動性を示す。嫌気性。生育温度範囲は 50°C から 90°C で 80°C に至適を持つ。生育 pH は 5 から 9，至適

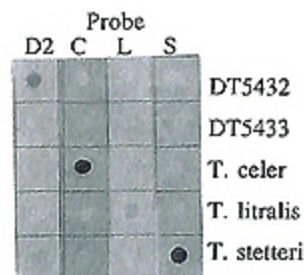


図 4 DT5432, 5433 と他の *Thermococcus* 属細菌との Dot-blot DNA/DNA hybridization

Fig. 4 Dot-blot DNA/DNA hybridization between DT5432, 5433 and type strains of the genus *Thermococcus*.

pH 7.5。1 から 6% の NaCl をその生育に要求し、至適濃度は 2 から 4%。単体イオン非存在下での生育は見られない。エネルギー源として、トリプトン、ペプトン等のペプチド系、カゼイン、ゼラチン等タンパク質、トリプトファン添加カザミノ酸、酵母抽出液を利用。マルトースを除いて糖での生育は見られない。硫化水素を生成する。G+C 含量 52.2%。沖縄トラフ伊平屋小海嶺の深海熱水噴出域に棲息。

Thermococcus sp. DT5433

直径 1-2 μ m のやや不定形の球菌。運動性を示す。嫌気性。生育温度範囲は 50°C から 92°C で 80°C から 85°C に至適を持つ。生育 pH は 5 から 9，至適 pH 7。1 から 6% の NaCl をその生育に要求し、至適濃度は 2 から 4%。単体イオン非存在下での生育は見られない。エネルギー源として、トリプトン、ペプトン等のペプチド系、カゼイン、ゼラチン等タンパク質、トリプトファン添加カザミノ酸、酵母抽出液を利用。糖での生育は見られない。硫化水素を生成する。G+C 含量 49.6%。沖縄トラフ伊平屋小海嶺の深海熱水噴出域に棲息。

4. 謝 辞

沖縄トラフでの潜航に際して、段野司令をはじめとし、パイロットの廣瀬氏、佐々木氏、「しんかい 2000」運航チームの皆様、「なつしま」のクルーの皆様に大変お世話になりました。ここで深く感謝いたします。

引用文献

- L. Achenbach-Richter, R. Gupta, W. Zillig and C. R. Woese, 1988, Rooting the archaebacterial tree: The pivotal role of *Thermococcus celer* in archaebacterial evolution. *System. Appl. Microbiol.*, 10, 231-240.
- 蒲生俊敬, 酒井 均, 石橋純一郎, 大森 保, 千葉 仁, 下島公紀, 中島和夫, 田中善孝, 益田晴恵, 1991, 中部沖縄トラフ, 伊平屋凹地 (クラムサイト) における熱水性マウンドの構造的, 鉱物学および化学的特徴から見たマウンドの成長過程について: 「しんかい 2000」第 486, 487, 488 回潜航報告, 第 7 回

- 「しんかい2000」研究シンポジウム報告書, 163-184.
- R. M. Kelly and J. W. Deming, 1988, Extremely thermophilic archaeobacteria : biological and engineering considerations. *Biotechnology Progress*, 4, 47-62.
- R. Huber, P. Stoffers, J. L. Cheminee, H. H. Richnow and K. O. Stetter, 1990, Hyperthermophilic archaeobacteria within the crater and open-sea plume of erupting Macdonald Seamount. *Nature*, 345, 179-182.
- 木村政昭, 田中武男, 許 正慈, 安藤雅孝, 大森保, 井沢英二, 嘉川郁郎, 1989, 「しんかい2000」による沖縄トラフ中部熱水域の地形, 鉱床, 生物の観察, 第5回「しんかい2000」研究シンポジウム報告書, 223-244.
- J. Kjems, R. A. Garrett and W. Ansorge, 1987, The sequence of the 16S RNA gene and its flanking region from the archaeobacterium *Desulfurococcus mobilis*. *System. Appl. Microbiol.* 9, 22-28.
- H. König and K. O. Stetter, 1989, Archaeobacteria, p.2171-2253. In J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig and J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 3* -1989. Williams and Wilkins, Baltimore.
- M. L. Miroshnichenko, E. A. Bonch-Osmolovskaya, A. Neuner, N. A. Kostrikina, N. A. Chernych and V. A. Alekseev, 1989, *Thermococcus stelleri* sp. nov., a new extremely thermophilic marine sulfur-metabolizing archaeobacterium. *System. Appl. Microbiol.*, 12, 257-262.
- A. Neuner, H. W. Jannasch, S. Belkin and K. O. Stetter, 1990, *Thermococcus litralis* sp. nov. : a new species of extremely thermophilic marine archaeobacteria. *Arch. Microbiol.*, 153, 205-207.
- H. N. M. Ross, M. D. Collins, B. J. Tindall and W. D. Grant, 1981, A rapid procedure for the detection of archaeobacterial lipids in halobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 123, 75-80.
- J. Tamaoka and K. Komagata, 1984, Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* 25, 125-128.
- Y. Yamagata, H. Watanabe, M. Saitoh and T. Namba, 1991, Volcanic production of polyphosphates and its relevance to prebiotic evolution. *Nature*, 352, 516-519.
- W. Zillig, 1991, The order *Thermococcales*, p. 702-706. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K-H. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes 2nd ed. Vol.1* -1991. Springer-Verlag, New York.
- W. Zillig, I. Holz, D. Janekovic, W. Schäfer and W. D. Reiter, 1983, The archaeobacterium *Thermococcus celer* represents a novel genus within the thermophilic branch of the archaeobacteria. *System. Appl. Microbiol.*, 4, 88-94.