

# 琉球海溝より分離した耐圧性菌 DSJ4 株の分類学的研究

能木 裕一\*<sup>1</sup> 益井 宣明\*<sup>1</sup> 加藤 千明\*<sup>1</sup> 掘越 弘毅\*<sup>1</sup>

琉球海溝深度 5,110 m の深海底泥より耐圧性菌 DSJ4 を分離した。本菌株は 10°C において常圧である 0.1 MPa でも、70 MPa の加圧下でも良く生育した。DSJ4 株を分類同定するため常圧で培養し、常法に従って生理・生化学試験や化学分類による試験を行った。DSJ4 株はグラム陰性桿菌で、1本の鞭毛で運動し、キノンタイプはユビキノン Q-8、DNA の GC 含量は 42% であった。オキシターゼ、カタラーゼ陽性で O129 耐性を示し、デカルボキシラーゼ活性などからプロテオバクテリウム γ サブグループの *Vibrionaceae* の *Photobacterium* 属に分類された。16S-rDNA による系統樹と type strain の染色体 DNA の相同値から、*Photobacterium* 属に属する新種であることが解った。この DSJ4 株を *Photobacterium profundum* (JCM10084) とした。

キーワード：耐圧性微生物, *Photobacterium profundum*, 琉球海溝, 深海

## Taxonomic studies about barotolerant bacteria DSJ4 isolated from Ryukyu Trench

Yuichi NOGI\*<sup>2</sup>, Noriaki MASUI\*<sup>2</sup>  
Chiaki KATO\*<sup>2</sup> Koki HORIKOSHI\*<sup>2</sup>

A novel, moderately barophilic bacterium was isolated from a sediment sample obtained from Ryukyu Trench, at a depth of 5,110 m. The new isolate, strain DSJ4, is Gram-negative rod capable of growth at pressures between 0.1 MPa to 70 MPa at 10°C. Strain DSJ4 is a moderately barophilic bacterium, and shows no significant change in growth at pressures up to 50 MPa. Phylogenetic analyses of the 16S rRNA sequence of strain DSJ4 places this strain in a new branch within the *Photobacterium*. However, its temperature range for growth and cell fatty acid components differ from those of *Photobacterium* sp., and compared with four *Photobacterium* type strains there was only a low level of DNA similarity. Based on these differences, the description of strain DSJ4 as a new deep-sea type species, *Photobacterium profundum* (JCM 10084), is proposed.

**Key words** : Barophilic bacterium, Deep-sea, *Photobacterium profundum*, Ryukyu Trench

\* 1 海洋科学技術センター深海環境プログラム

\* 2 Deep-sea Microorganisms Research Group, Japan Marine Science and Technology Center

## 1. はじめに

深海の底泥や生物などから種々の目的によって様々な微生物が分離されている。種々の基質の分解菌や低温環境でしか生育出来ない好冷菌，熱水からは高度好熱菌など (Gonzalez *et al.* 1994 : 1995 : 1996 :) も分離されている。

我々は，深海の特徴である高水圧が微生物に与える影響を研究するために好圧性菌や耐圧性菌を分離し，これらの微生物の諸性質や遺伝子について報告 (Kato *et al.* 1995a : 1995b : 1995c : 1996a : 1996b : 1996c : 1997a : 1997b : Sato *et al.* 1995 : 1996 :) してきた。この好圧性菌とは常圧よりも加圧下で培養した方が良く生育する菌，耐圧性菌とは常圧培養でも加圧培養でも同じ様に生育する菌であり，大腸菌などの通常の細菌は常圧で培養したときと比べて，圧力をかけて培養すると生育が悪くなったり，形態の変化が生じる。

我々が今まで分離した好圧菌や耐圧菌はプロテオバクテリアの $\gamma$ サブグループに分類され，特に *Shewanella* 属や *Moritella* 属に類縁の物が多く分離された。そして，他の研究者 (Colwell and Morita 1964 : Deming *et al.* 1984 : Deming *et al.* 1988 : Steven 1990 : DeLong *et al.* 1997 :) からもこれらの属に属する好圧菌や耐圧菌の報告がなされている。しかし，同じくプロテオバクテリアの $\gamma$ サブグループに分類はされているが系統学的には離れた *Photobacterium* 属に属する耐圧性菌についてはその種に関する詳しい報告 (DeLong 1986 : Bartlett *et al.* 1989 :) がいまだなされていない。 *Photobacterium* 属の菌は広く海洋から分離され，同じく海洋からよく分離される *Vibrio* 属に近縁の属として研究されてきている。しかし，耐圧性を持つ *Photobacterium* 属の種については基準株が無い。今回，我々は琉球海溝深度 5,110 m の深海底泥より *Photobacterium* 属に属する耐圧性菌 DSJ4 株を分離した。この DSJ4 株について生理生化学的試験と 16SrDNA のデータなどから分類学的検討を行った。その結果， *Photobacterium* 属に属する新種の株となったのでここに報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料及び分離方法

琉球海溝 (24°15.23 N, 126°47.30 E) の深度 5,110 m から「しんかい 6500」で無菌的に採取した深海底泥を用いた。

耐圧性菌の分離方法は，まず 50 MPa の加圧下 4°C で，Marine broth 2216 培地に良好に生育する細菌を単離し

た。そして，その中で常圧でも加圧下でも同じように生育する株を選択した。この方法で耐圧性菌 DSJ4 株を分離 (Kato *et al.* 1995a :) した。

分離株と比較検討するため以下の基準株 (Type strain) を用いた。

*Photobacterium angustum* ATCC 25915<sup>T</sup>

*Photobacterium damsela* ATCC 33539<sup>T</sup>

*Photobacterium leiognathi* ATCC 25521<sup>T</sup>

*Photobacterium phosphoreum* ATCC 11040<sup>T</sup>

*Photobacterium histaminum* JCM 8968<sup>T</sup>

(ATCC : American Type Culture Collection, JCM : Japan Collection of Microorganisms)

### 2.2 培地・培養条件

すべての比較用の基準株と DSJ4 株の培養には，Difco 社の Marin broth 2216 培地，またはそれに寒天を 1.7% 加えた寒天プレートを用いた。Type strain に関しては各至適温度 (25°C または 20°C) で，DSJ4 は 10°C で培養を行った。また，試験方法はオキシダーゼ試験，カタラーゼ試験などの培地を特に指定しない物は Marin broth 2216 培地を使用し，その他の試験や糖の資化性に用いる培地などは総て人工海水により調製したが，それ以外の点に関しては常法 (Holt *et al.* 1994 : 門田・多賀 1985 : 坂崎 1993 :) に従って行った。

### 2.3 菌体脂肪酸及びキノン分析

分析には各至適温度で Marine broth 2216 培地を使用し，常圧で 24 時間培養した菌体を用いた。脂肪酸は凍結乾燥した菌体 20 mg を無水塩酸・メタノールで 100°C，3 時間処理を行い，脂肪酸メチルエステルとした。これをヘキサンに抽出後蒸留水で洗浄，脱水，濃縮した (Komagata and Suzuki 1987 :)。サンプルの分析はガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC/MS) で成分組成比と構造の解析 (Goodfellow *et al.* 1993 :) を行った。

キノン分析は凍結乾燥した菌体 300 mg からクロロホルム-メタノールで菌体成分を抽出した。薄層クロマトグラフィー (TLC) で展開し，メナキノン，ユビキノンの画分を分離した。ユビキノンを分離後抽出し，高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定性的に分析 (矢野ら 1987 : Komagata and Suzuki 1987 :) を行った。

### 2.4 DNA の GC 含量とハイブリダイゼーション

DNA の精製は Saito & Miura (1963) の方法で調製を行った。DNA の GC 含量は P1 ヌクレアーゼとアルカリフォスファターゼを使ってヌクレオシドにしてから HPLC で定量分析 (鈴木ら 1987 : Tamaoka and

Komagata 1984 :) を行った。分離株と Type strain の DNA-DNA ハイブリダイゼーションはホトビオチン標識 DNA を使った、蛍光マイクロプレート法 (Ezaki *et al.* 1989) で行った。ホルムアミドの濃度を 40% とし、ハイブリダイゼーション温度を 40°C で、2 時間行った。

### 2.5 16SrDNA シーケンスと系統樹

DSJ4 株の 16SrDNA シーケンスは PCR 法を用い遺伝子を増幅し、ABI 社のオートシーケンサー (model 373S) を使用し解析した (Kato *et al.* 1997c)。Photobacterium 属の Type strain 及び系統樹作成に用いた他の株のデータは DDBJ, GenBank から入手した。

これらのデータに基づいて系統樹作成用計算ソフト Clustal W (Thompson *et al.* 1994) を使用し、NJ 法 (Saitou and Nei 1987) で表した。また、そのときのブートストラプトは 1,000 回行った。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 形態観察

DSJ4 株はグラム陰性桿菌で 1 本の鞭毛で運動をし、大きさは 2-3×0.6-0.8 mm。この電子顕微鏡写真 (写真 1) は DSJ4 株を深度 5,000 m の圧力に相当する 50 MPa で、10°C、16 時間培養し、リントングステン酸で

ネガティブ染色を行った物である。DSJ4 株は常圧である 0.1 MPa で培養した場合でも加圧培養した場合でも、菌体の異常伸張などの形態的变化は見られなかった。

### 3.2 生理・生化学試験

Photobacterium 属の各 Type strain と DSJ4 株の生理・生化学試験は、各株の至適温度で常圧培養で行い比較した (Table 1)。

全ての株のキノンタイプは主としてユビキノン Q-8 で Q-7 を若干含む物もあった。生育の至適温度は、Type strain は 25-6°C と 18°C ですが DSJ4 株は 10°C と低く 18°C 以上では生育できない。すべての株で OF テストでは発酵性を示したが、*P. angustum*, *P. histaminum*, DSJ4 の 3 株は GAS 生産は観察されなかった。DSJ4 株はオキシダーゼ陽性、カタラーゼ陽性で *P. damsela*, *P. histaminum*, *P. phosphoreum* と同様であった。DSJ4 株が他の Type strain と違う点はインドールを生産し、O129 耐性 (ビブリオのプテリジン誘導体 O129 に対する耐性) を示す点。共通点は、アルギニンジハイドロラーゼ活性だけが陽性でリジンデカルボキシラーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼが見られない点。生理・生化学試験の結果だけで見ると、*P. histaminum* が一番類縁と考えられた。

表 1 DSJ4 株と Photobacterium 属の基本性状

Table 1 Characteristics of the strain DSJ4 and Photobacterium reference strains.

Characteristics	<i>P. angustum</i> ATCC 25915 <sup>T</sup>	<i>P. damsela</i> ATCC 33539 <sup>T</sup>	<i>P. histaminum</i> JCM 8968 <sup>T</sup>	<i>P. leiognathi</i> ATCC 25521 <sup>T</sup>	<i>P. phosphoreum</i> ATCC 11040 <sup>T</sup>	Strain DSJ4
Quinone	Q-8	Q-8(90%) Q-7(10%)	Q-8(90%) Q-7(10%)	Q-8(90%) Q-7(10%)	Q-8	Q-8(95%) Q-7(5%)
Optimum temp. (°C)	25	26	26	26	18	10
Optimum press. (MPa)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	10
Motility	+	+	+	+	+	+
O/F test	F	F	F	F	F	F
Gas produced: Glucose	-	+	-	+	+	-
Catalase	-	+	+	-	+	+
Oxidase	-	+	+	+	+	+
Production of H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-
Production of Indole	-	-	-	-	-	+
Nitrate reduced	-	+	+	+	+	+
Nitrite reduced	-	-	-	-	-	-
O/129 sensitivity:						
10µg	+	+	-	+	+	-
150µg	+	+	+	+	+	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+	+
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-	-
Glutamine decarboxylase	-	-	-	+	-	-

+:positive -:negative F: fermentation

### 3.3 糖など基質の資化性

*Photobacterium* 属の各 Type strain と DSJ4 株の資化性については 90 以上の基質を試験したが、その中で各株間で違いのある物、重要な糖など 23 基質を選んでまとめた (Table 2)。

全ての株が資化したのが glycogen, D-glucose, maltose, D-mannose で、D-galactose と glycerol は *P. phosphoreum* 以外は資化した。すべての株が資化しなかったのは、adonitol, L-arabinose, myo-inositol, D-lactose, D-raffinose, L-rhamnose, D-sorbitol であった。DSJ4 株のみが資化する事が出来たのは tween 80 と D-Mannitol で、逆に資化出来なかったのが N-acetyl-D-glucosamine と D-fructose。糖の資化のパターンからは類縁の株を選ぶことは出来なかった。

### 3.4 菌体脂肪酸組成

*Photobacterium* 属の Type strain の脂肪酸組成の特徴としては、16:0 と 16:1 を主成分とし、この 2 成分で全体の 50% 以上を構成する (Table 3)。しかし、DSJ4

株は少し異なり 16:1 が一番多い点は共通だが、16:0 が他の株の半分以下と少ない分 iso-16:0 を持ち、16:1 と併せて 3 成分で全体の 50% 以上になる。他の構成成分で DSJ4 株だけが持つのは iso-14:0, iso-15:0 そして 20:5 を持つ。20:5 はエイコサペンタエン酸 (EPA) と呼ばれる物質で老化を防ぐなど健康面で注目されている物質である。逆に、DSJ4 株からは 3OH-14:0, 17:0, 17:1 が検出されなかった。これらのことから、脂肪酸組成比からも他の *Photobacterium* 属の Type strain とは異なっていることが解った。

### 3.5 16S-rRNA による系統樹と DNA のハイブリダイゼーション

Clustal W を使って計算した NJ 法の系統樹は図 1 のようになった。DSJ4 株はいわゆるプロテオバクテリウムの  $\gamma$  サブグループに位置した。その中の *Vibrio* 属や *Photobacterium* 属などの含まれる *Vibrionaceae* に入り、*Photobacterium* 属の枝の中に位置した。この *Photobacterium* 属の各 Type strain との枝の距離も十分離れて、

表 2 DSJ4 株と *Photobacterium* 糖及び基質の資化性  
Table 2 Carbon utilization of the strain DSJ4 and *Photobacterium* reference strains.

Carbon sources	<i>P. phosphoreum</i>	<i>P. angustum</i>	<i>P. leiognathi</i>	<i>P. histaminum</i>	<i>P. damsela</i>	Strain DSJ4
	ATCC 11040 <sup>T</sup>	ATCC 25915 <sup>T</sup>	ATCC 25521 <sup>T</sup>	JCM 8968 <sup>T</sup>	ATCC 33539 <sup>T</sup>	
glycogen	+	+	+	+	+	+
Tween 40	+	-	-	+	+	+
Tween 80	-	-	-	-	-	+
N-acetyl-D-galactosamine	-	+	+	+	+	-
N-acetyl-D-glucosamine	+	+	+	+	+	-
adonitol	-	-	-	-	-	-
L-arabinose	-	-	-	-	-	-
cellobiose	-	-	-	+	+	-
D-fructose	+	+	+	+	+	-
D-galactose	-	+	+	+	+	+
$\alpha$ -D-glucose	+	+	+	+	+	+
myo-inositol	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -D-lactose	-	-	-	-	-	-
maltose	+	+	+	+	+	+
D-mannitol	-	-	-	-	-	+
D-mannose	+	+	+	+	+	+
D-raffinose	-	-	-	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-
D-sorbitol	-	-	-	-	-	-
sucrose	-	+	-	-	-	-
D-trehalose	-	-	-	+	-	+
turanose	-	+	+	+	+	-
glycerol	-	+	+	+	+	+

+ : positive - : negative

表 3 DSJ4 株と *Photobacterium* 属の脂肪酸分析

Table 3 Fatty acid compositions of the strain DSJ4 and *Photobacterium* reference strains.

Strains	% of total fatty acids																
	12:0 3OH	12:0 iso	13:0 iso	14:0 iso	14:0	14:1	14:0 3OH	15:0 iso	15:0	16:0 iso	16:0	16:1	17:0	17:1	18:0	18:1	20:5 (ω 3)
<i>P. phosphoreum</i> ATCC 11040 <sup>T</sup>	6	9			11	1	3				25	40			1	3	
<i>P. leiognathi</i> ATCC 25521 <sup>T</sup>	5	6			7	1	2		2		24	34	2	1	2	15	
<i>P. angustum</i> ATCC 25915 <sup>T</sup>	6	8			3	1	3		2		19	36	3	1	2	17	
<i>P. damsela</i> ATCC 33539 <sup>T</sup>	4	6			5	2	2		3		20	31	2	1	2	23	
<i>P. histaminum</i> JCM 8968 <sup>T</sup>	3	6			9	1	2				25	44				9	
Strain DSJ4	2	5	2	4	3	3		2	1	15	9	32			1	9	13

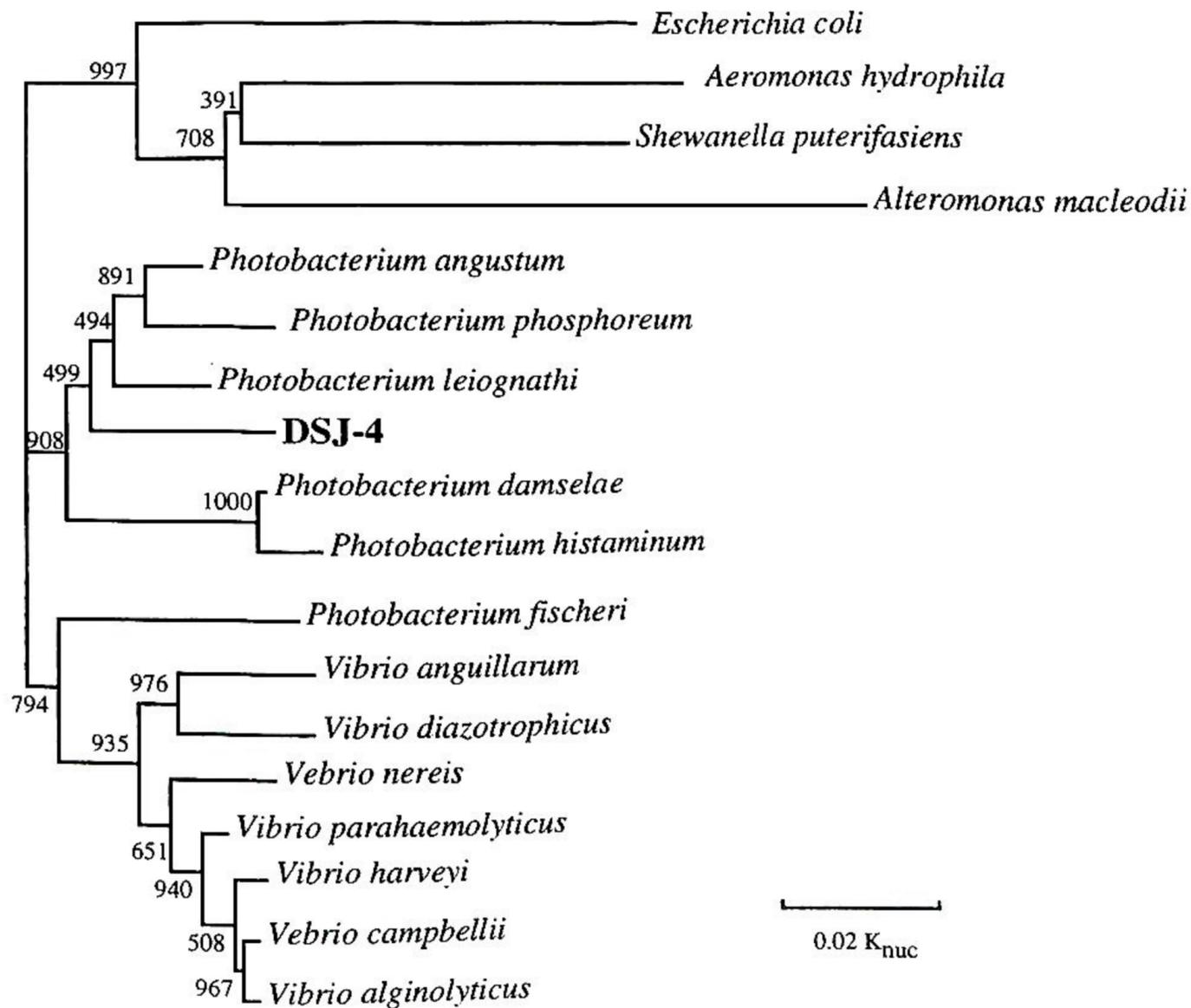


図 1 プロテオバクテリウム γ サブグループの株と DSJ4 株の 16S rDNA 遺伝子配列に基づく系統樹 (NJ 法により作成)

Fig. 1 Phylogenetic tree showing the relationship of amplified DSJ4 16S rDNA within the Proteobacteria γ-subgroup using the neighbor-joining method. The scale represents the average number of nucleotide substitutions per site. Bootstrap values are shown for frequencies above the threshold of 50%.

表 4 DSJ4 株と *Photobacterium* の DNA の相同性

Table 4 Levels of homology for the chromosomal DNAs of strain DSJ4 and *Photobacterium* reference strains.

Strains	GC%	% Homology with DNA from:					
		ATCC 25915 <sup>T</sup>	JCM 8968 <sup>T</sup>	ATCC 25521 <sup>T</sup>	ATCC 11040 <sup>T</sup>	ATCC 33539 <sup>T</sup>	DSJ4
<i>P. angustum</i> ATCC 25915 <sup>T</sup>	39.6	100	30	34	24	25	21
<i>P. histaminum</i> JCM 8968 <sup>T</sup>	41.8	22	100	17	16	65	16
<i>P. leiognathi</i> ATCC 25521 <sup>T</sup>	39.7	46	28	100	25	23	20
<i>P. phosphoreum</i> ATCC 11040 <sup>T</sup>	39.1	43	37	24	100	23	21
<i>P. damsela</i> ATCC 33539 <sup>T</sup>	41.8	28	66	19	19	100	20
Strain DSJ4	42.0	28	28	18	20	19	100

*Photobacterium* 属の中で独立した枝を形成した。

*Photobacterium* 属の各 Type strain と DSJ4 株の DNA の GC 含量を測定した。DSJ4 株の GC 含量は 42% で *P. damsela*, *P. histaminum* とほぼ同じであった。また、*Photobacterium* 属全体の GC 含量も 39-42% と良くまとまっていた。

これら 5 種の *Photobacterium* 属の Type strain と DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行った (Table 4)。DSJ4 株は *Photobacterium* 属の各 Type strain と、DSJ4 をプローブにした場合最大で 21%、DSJ4 を固定した場合でも最大値は 28% で、低い相同値しか示さなかった。バクテリアにおいて相同値が 70% 以上の場合、一般的に同一種とみなす。DSJ4 はこの数値よりはるかに低い 28% しか示さなかったことから独立した種であることを裏付けている。

### 3.6 *Photobacterium* 属の生育に対する圧力の影響

耐圧性細菌 DSJ4 株は *Photobacterium* 属に分類されることが解った。しかし、この生育における耐圧性は *Photobacterium* 属に共通の性質なのか、DSJ4 株に限られた性質なのか検討を行う必要がある。各 Type strain と DSJ4 株の生育に対する圧力の影響を検討した。培養温度はそれぞれの株の至適温度で、常圧である 0.1 MPa と深度 1,000 m の圧力に相当する 10 MPa から、深度 5,000 m の圧力に相当する 50 MPa までの加圧条件下で 24 時間行った。

DSJ-4 株は 50 MPa まで、圧力の影響を受けることなくほぼ同じ様に増殖しているのに対し、他の *Photobacterium* 属の Type strain は圧力の影響を受け、加圧するにしたがいその増殖は抑制された (図 2)。このことから *Photobacterium* 属すべてが耐圧性を示すわけではないことが解った。

### 4. ま と め

以上の結果をまとめると琉球海溝深度 5,110 m の深海底泥サンプルから好冷性で、常圧でも加圧下でも良好に生育する事ができる耐圧性細菌 DSJ4 株を分離した。

DSJ4 株はグラム陰性で、1 本の鞭毛で運動性を持つ桿菌で、大きさは  $2-3 \times 0.6-0.8 \mu\text{m}$ 、生育の至適温度は 10°C。キノンタイプはユビキノン Q-8 を持ち、DNA の GC 含量は約 42% であった。OF テストでは発酵性を示したが、GAS 生産は観察されない。オキシダーゼ、カタラーゼは陽性でデカルボキシラーゼ活性はアルギニンのみ陽性。

DSJ-4 株の既知種との 16S-rRNA シーケンスによる系統樹の分類学的位置は *Photobacterium* 属に位置した。しかし、既知種の *Photobacterium* 属細菌とは染色体 DNA の相同値が 30% 以下と低く、O129 耐性、Tween 80 と Mannitol の資化、EPA を生産するなどの点で異なっていた。

以上のことから、DSJ4 株を新種の *Photobacterium* 属の菌とした。そして、この株が深海から採取されたこと

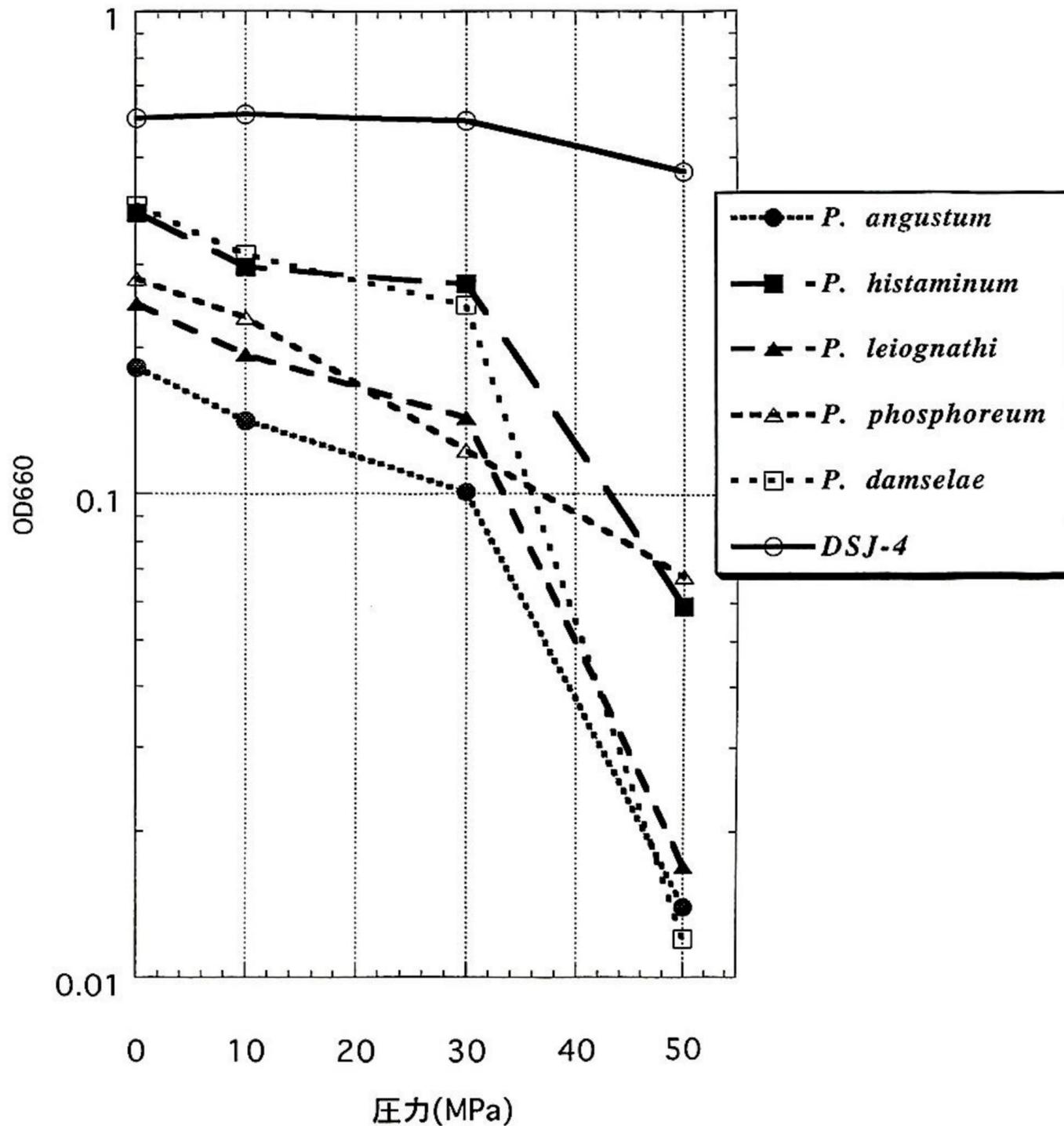


図2 *Photobacterium* 属の種と DSJ4 株の生育に対する圧力の影響  
 Fig. 2 Growth profiles of *Photobacterium* species and strain DSJ4 at several pressures.

にちなんで新種 *Photobacterium profundum* として提案する。

#### 謝 辞

最後に本研究を行うに当たり、琉球海溝での底泥の採取などを行っていただいた「しんかい6500」潜航チーム及び「よこすか」乗船員の各位に感謝を申し上げます。また、電子顕微鏡写真の撮影に多大なご尽力いただきました植松氏（工務課）に感謝を申し上げます。

#### 引用文献

Bartlett D., M. Wright, A. A. Yayanos and M. Silverman (1989): Isolation of a gene regulated by hydrostatic pressure in a deep-sea bacterium. *Nature* 342, 572-574.  
 Colwell R. R. and R. Y. Morita (1964): Reisolation and

emendation of description of *Vibrio marinus* (Russell) Ford. *J Bacteriol* 88, 831-837.  
 DeLong E. F., Franks D. G. and Yayanos A. A. (1997): Evolutionary relationships of cultivated psychrophilic and barophilic deep-sea bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2105-2108.  
 Deming J. W., H. Hada, R. R. Colwell, K. R. Luehrsen and G. E. Fox (1984): The nucleotide sequence of 5S rRNA from two strains of deep-sea barophilic bacteria. *J Gen Microbiol* 130, 1911-1920.  
 Deming J. W., L. K. Somers, W. L. Straube, D. G. Swartz and M. T. MacDonell (1988): Isolation of an obligately barophilic bacterium and description of a new genus, *Colwellia* gen. nov. *Syst Appl Microbiol* 10, 152-160.  
 Ezaki T, Y. Hashimoto and E. Yabuuchi (1989): Fluoro-

- metric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 224–229.
- Goodfellow, M. and A. G. O'donnell (1993) : Handbook of New Bacterial Systematics. Academic press, London, 560.
- Gonzalez, J. M., T. Sato, C. Kato and K. Horikoshi (1994) : Isolation and characterization of hyperthermophilic archaeobacteria from Southwestern Pacific hydrothermal vents. *JAMSTEC J. Deep Sea Res.*, **10**, 471–480.
- Gonzalez, J. M., C. Kato and K. Horikoshi (1995) : *Thermococcus peptonophilus* sp. nov., a fast-growing, extremely thermophilic archaeobacterium isolated from deep-sea hydrothermal vents. *Arch. Microbiol.*, **164**, 159–164.
- Gonzalez, J. M., C. Kato and K. Horikoshi (1996) : A membrane-bound, sodium dodecyl sulfate-resistant protease from an extremely thermophilic archaeobacterium *Thermococcus peptonophilus*. *J. Mar. Biotechnol.*, **4**, 159–164.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Ninth Edition. Williams & Wilkins, Maryland, 787 (1994).
- Kato, C., T. Sato and K. Horikoshi (1995a) : Isolation and properties of barophilic and barotolerant bacteria from deep-sea mud samples. *Biodiv. Conserv.*, **4**, 1–9.
- Kato, C., S. Suzuki, S. Hata, T. Ito and K. Horikoshi (1995b) : The properties of a protease activated by high pressure from *Sporosarcina* sp. strain DSK25 isolated from deep-sea sediment. *JAMSTECR*, **32**, 7–13.
- Kato, C., M. Smorawska, T. Sato and K. Horikoshi (1995c) : Cloning and expression in *Escherichia coli* of a pressure-regulated promoter region from a barophilic bacterium, strain DB6705. *J. Mar. Biotechnol.*, **2**, 125–129.
- Kato, C., M. Smorawska, T. Sato and K. Horikoshi (1996a) : Analysis of a pressure-regulated operon from the barophilic bacterium strain DB6705. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 166–168.
- Kato, C., N. Masui and K. Horikoshi (1996b) : Properties of obligately barophilic bacteria isolated from a sample of deep-sea sediment from the Izu-Bonin Trench. *J. Mar. Biotechnol.*, **4**, 96–99.
- Kato, C., A. Inoue and K. Horikoshi (1996c) : Isolating and characterizing deep-sea marine microorganisms. *Trends in Biotechnol.*, **14**, 6–12.
- Kato, C., A. Ikegami, M. Smorawska, R. Usami and K. Horikoshi (1997a) : Structure of genes in a pressure-regulated operon and adjacent regions from a barotolerant bacterium strain DSS12. *J. Mar. Biotechnol.*, **5**, in press.
- Kato, C., M. Smorawska, L. Li and K. Horikoshi (1997b) : Comparison of the gene expression of aspartate  $\beta$ -D-semialdehyde dehydrogenase at elevated hydrostatic pressure in deep-sea bacteria. *J. Biochem.*, **121**, 717–723.
- Kato, C., L. Li, J. Tamaoka and K. Horikoshi (1997c) : Molecular analyses of the sediment of the 11,000 m deep Mariana Trench. *Extremophiles* (in press).
- Komagata, K. and K. Suzuki (1987) : Lipid and Cell-Wall Analysis in Bacterial Systematics. *Methods in Microbiology*, **19**, 161–207.
- Saito, H. and K. Miura (1963) : Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 619–629.
- Saitou N, M. Nei (1987) : The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.
- Sato, T., C. Kato and K. Horikoshi (1995) : Effect of high pressure on gene expression by *lac* and *tac* promoters in *Escherichia coli*. *J. Mar. Biotechnol.*, **3**, 89–92.
- Sato, T., Y. Nakamura, K. K. Nakashima, C. Kato and K. Horikoshi (1996) : High pressure represses expression of the *mal B* operon in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **135**, 111–116.
- Steven S. E. (1990) : Molecular systematics of *Vibrio* and *Photobacterium*. Ph. D. dissertation. University of Maryland, College Park.
- Tamaoka J, K. Komagata (1984) : Determination of DNA base composition by reverse-phase high-per-

formance liquid chromatography. FEMS Microbiol Lett 25, 125-128.

Thompson J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994) : CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22, 4673-4680.

門田 元・多賀信夫 (1985) : 海洋微生物研究法. 学会出版センター, 東京, 307.

坂崎利一 (1993) : Cowan and Steel's 医学細菌の同定の手びき第3版. 近代出版, 東京, 386.

鈴木健一郎・江崎孝行・朴 勇河(1987) : “核酸の分析” 88-123, 新しい分類学に伴走する細菌同定法, 日本細菌学会教育委員会編, 菜根出版, 東京, 134.

矢野郁也・山田雄三・鈴木健一郎 (1987) : “菌体の成分の分析” 42-85, 新しい分類学に伴走する細菌同定法, 日本細菌学会教育委員会編, 菜根出版, 東京, 134.

(原稿受理 : 1997年7月4日)

(注) 写真は次ページ以降に掲載

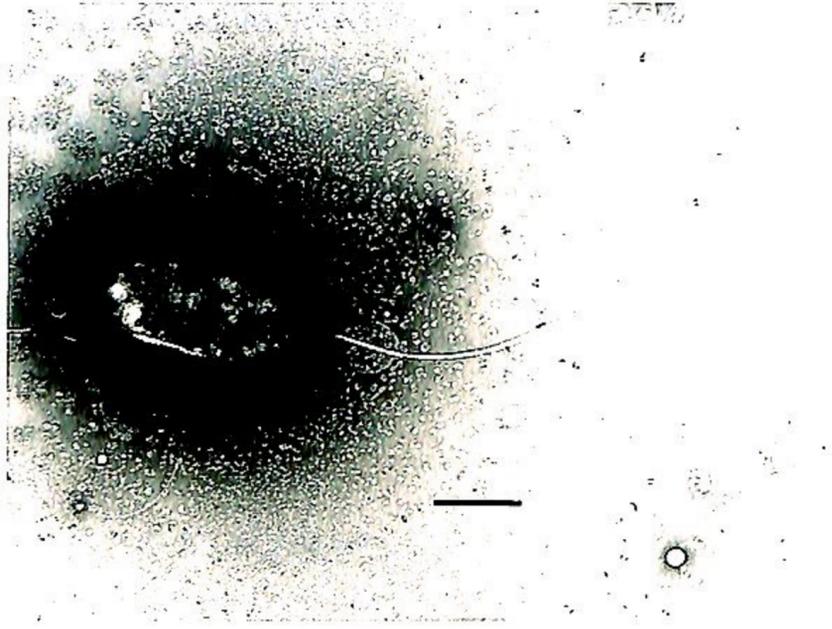


写真 1 ネガティブ染色を行った電子顕微鏡像  
Bar = 1  $\mu$ m

Photo 1 Transmission electron microscopy of a negatively  
stained cell of strain DSJ4.  
Bar = 1  $\mu$ m