

マリアナ海溝に生育していた好塩菌の高圧下での生育における塩の影響

為我井 秀行

日本大学文理学部化学科

概要 1. **研究目的** 海洋は地球上の 7 割をカバーする広大な領域であり、浅海から深海まで多くの微生物が存在する。深海は高塩濃度のほか、高静水圧の環境である。深海微生物はそのような過酷な環境下でも良好に生育している。最近私たちが行った、大腸菌を用いた研究により、培養液中の塩濃度を高めることによって菌の生育における耐圧性を高めることができることが明らかとなった。しかし深海微生物でどのような現象が見られるのかについてはわかっていない。

そこで本研究ではマリアナ海溝に生育していた、つまり世界で最も高い圧力下で生育していた細菌を用い、塩が細菌の高圧下での生育に与える影響についての知見を得る。

2. 研究方法

2.1 マリアナ海溝に生育していた好塩菌の分類

マリアナ海溝底泥から単離した細菌について、分類学的解析によって、種の同定を行った。

2.2 菌の高圧下における生育と塩濃度の影響

以前にマリアナ海溝底泥から単離した *Pseudomonas* sp. MT-1 を用いて、NaCl が持つ耐圧性の寄与について検討を行った。比較対象として、陸上もしくは浅瀬由来の類縁菌を用い、同様の実験を行った。

3. 研究結果および考察

3.1 マリアナ海溝に生育していた好塩菌の分類

本細菌は *Idiomarina* 属に属する細菌であることが示唆された。特に *Idiomarina zobellii*、*Idiomarina seosinensis* との類縁性が高いと思われた。DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果からも、*I. zobellii* との高い類縁性が示された。*Idiomarina* 属は比較的最近同定された属であり、これまで単離されている *Idiomarina* 属細菌はすべて海や海岸、塩湖などから見つかっている。このような好塩濃度環境下では比較的普遍的な細菌であるかもしれない。

3.2 菌の高圧下における生育と塩濃度の影響

Pseudomonas sp. MT-1 をさまざまな塩濃度、様々な圧力下で培養した結果、その耐圧性には培地中に含まれる塩濃度で差が見られ、2% NaCl 存在下では、1% NaCl の時よりも高い耐圧性を示した。この現象は陸上や浅瀬由来の類縁菌では高圧培養時における塩濃度の影響は見られなかった。

これまでの研究で、大腸菌でもやはり高塩濃度下で耐圧性が増すことが示されている。もちろん大腸菌は深海微生物ではない。なぜ *Pseudomonas* 属では陸上由来の株ではなく、深海由来の MT-1 で大腸菌と同様の現象が見られるのかについては、現在のところ不明である。しかし、この現象は MT-1 が塩の存在下で、深海の高圧環境に適応するための機構の 1 つであると考えられる。本研究により、塩の持つ未知の性質の一端が示された。

1. 研究目的

海洋は地球上の 7 割をカバーする広大な領域であり、浅海から深海まで多くの微生物が存在することがわかって

いる。海洋に生育する微生物の多くは、海水塩濃度である 3% 付近に生育至適塩濃度を持つ中度好塩菌である。深海は高塩濃度のほか、高静水圧の環境である。陸上

や浅海の微生物はそのような環境では生育や形態に異常が起こることが知られているが、深海微生物はそのような過酷な環境下でも良好に生育している。最近私たちが行った、モデル微生物としての大腸菌を用いた研究により、培養液中の塩濃度を高めることによって菌の生育における耐圧性を高めることができることが明らかとなった(Ota *et al.* 2011)。この研究により、微生物が高圧環境で生育するための塩の重要性が示唆された。しかし大腸菌で見いだされた現象はあくまでモデル実験の結果であり、実際の深海微生物でどのような機構が働いているかどうかは明らかではない。

マリアナ海溝は深度 11,000 m の、世界最深の海の一つである。これまでの研究で、私はマリアナ海溝底泥から 3 種の菌を単離した。これらはすべて至適塩濃度 3%前後の中度好塩菌であった。そのうち 2 種については種の分類に関する研究も行い、さらにそのうち 1 種については脱窒に関して酵素、遺伝子レベルでの研究を進めている(Tamegai *et al.* 1997; Tamegai *et al.* 2005; Tamegai *et al.* 2006)。残りの 1 種に関しては好塩性であること以外はわかっていない。

そこで本研究ではマリアナ海溝に生育していた、つまり世界で最も高い圧力下で生育していた細菌を用い、塩が細菌の高圧下での生育に与える影響についての知見を得る。本研究により、塩の持つ未知の力が明らかになるものと期待できる。

2. 研究方法

2.1 マリアナ海溝に生育していた好塩菌の分類

単離した 3 種の菌のうち、また分類学的研究を行っていない菌について、種の同定を行った。リボソーム RNA 遺伝子配列の解析を始め、形状、生育至適温度と pH の解析、糖の資化試験、キノン分析、脂肪酸分析、DNA-DNA ハイブリダイゼーションなど、細菌の種の同定に必要な試験を行った。これにより、マリアナ海溝に生育していた好塩性細菌の分類学的位置づけを明らかにした。

2.2 菌の高圧下における生育と塩濃度の影響

これまでに解析を進めてきた、3 種の細菌の 1 つである *Pseudomonas* sp. MT-1 を用いて実験を行った。培地組成は 1%トリプトン、0.5% 酵母エキス、0.01% MgSO₄、0.1% CaCl₂、1 - 3% NaCl、30 mM NaNO₃ である。塩濃度を変え

て培養することにより、NaCl が持つ耐圧性の寄与について検討を行った。高圧下の培養では通気を行うことができない。本細菌は硝酸塩呼吸によって嫌氣的に生育することができるため、硝酸ナトリウムを加えて培養を行うことにより、非通気下での生育を可能にした(Tamegai *et al.* 1997)。比較対象として、陸上もしくは浅瀬由来の類縁菌である *Pseudomonas aeruginosa* PAO1、*P. aeruginosa*^T NBRC 12689 (Type strain)、*Pseudomonas stutzeri* ZoBell を用い、同様の実験を行った。

培養には高圧ポンプ (Fig. 1)、高圧容器 (Fig. 2) を用いた。容器内にポンプで水を送り込むことによって高静水圧条件を整える。培養容器はガラスのような堅いものだと内部に圧力が伝わらないため、2 mL チューブを植菌済みの培地で満たしたのちにフィルムでふたをする。大量に菌体が必要な場合はソフトプラスチックパックを用いる (Fig. 3)。これらを圧力容器内に置くことによって、高圧下での培養を行った。培養後、培養液の濁度を波長 600 nm で測定することにより、菌の生育を算定した。



Fig. 1. 高圧ポンプ



Fig. 2. 高圧容器



Fig. 3. 培養容器 左:2 mL チューブ 右:ソフトプラスチックバッグ

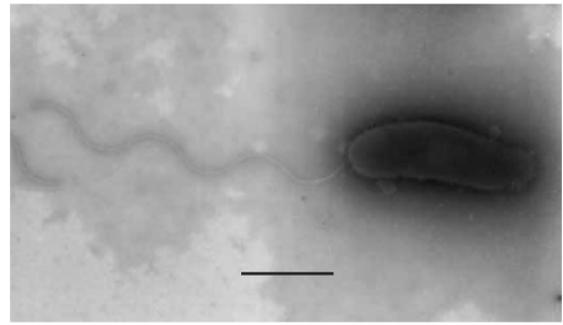


Fig. 4. DT-C の電子顕微鏡写真 バーは 1 μm を示す。

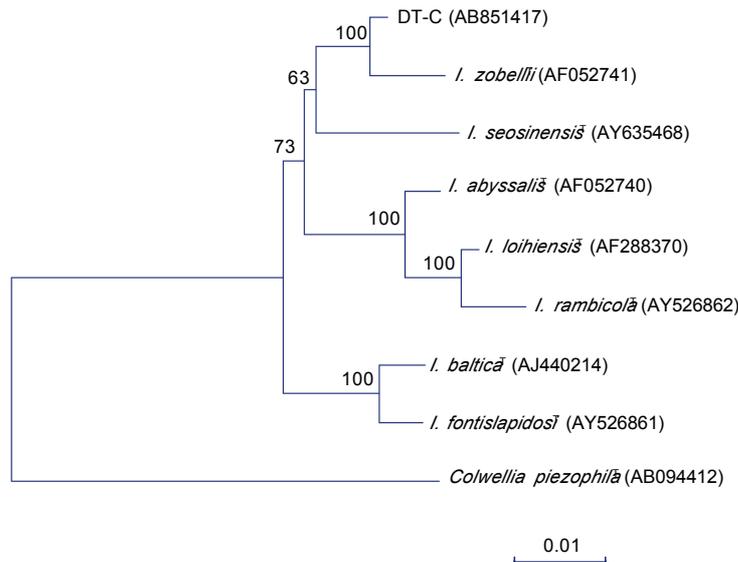


Fig. 5. DT-C および類縁菌の 16S rDNA 配列系統樹。バーは 1 塩基あたり 0.01 塩基の置換が存在することを示す。

3. 研究結果

3.1 マリアナ海溝に生育していた好塩菌の分類

1996 年に海洋科学技術センター(現独立行政法人海洋研究開発機構)が運用する無人潜航調査船「かいこう」によって採取されたマリアナ海溝底泥(11°22.10' N, 142°125.85' E, 深度 10,898 m)より、寒天平板法を用いて細菌を単離した。

単離された細菌 DT-C は極鞭毛を持つ桿菌(2-3 μm x 1-1.5 μm)であった(Fig. 4)。

生育可能な pH は 5 から 10、温度は 4°C から 48°C (至適は 35°C)、塩濃度は 0.1 から 15% NaCl (至適は 1 から 5%) であり、好中温、好中性の中度好塩性細菌であることが示された。また比較的低い温度でも生育可能であり、深海の低温環境への適応の一端を見ることができる。一方 500 気圧(深度 5,000 m に相当)では有意な生育を示さなかった

ことから、深海細菌ではあるが、好圧性細菌ではないことが明らかとなった。単離された場所は深度 10,000 m 以上であり、圧力は 1,000 気圧以上である。この環境は DT-C の生育条件から外れているが、細菌は必ずしも最適な環境に生育しているわけではない。1,000 気圧程度では多くの細菌は死滅することはないので、この結果に特に矛盾があるわけではない。

16S リボソーム RNA 遺伝子配列解析の結果から、本細菌は *Idiomarina* 属に属する細菌であることが示唆された(Fig. 5)。特に *Idiomarina zobellii*、*Idiomarina seosinensis* との類縁性が高いと思われた。DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果(Table 1)からも、*I. zobellii* との高い類縁性が示された。

DT-C と類縁菌の生理学的試験の結果を Table 2 に、脂肪酸組成分析の結果を Table 3 に示す。

Table 1. DT-C と類縁菌の DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果

strains	% homology with DNA from:			
	1	2	3	4
1	100	82	18	9
2	69	100	20	10
3	16	19	100	10
4	8	9	8	100

Strains: 1; Strain DT-C, 2; *I. zobellii* CIP 107407^T, 3; *I. abyssalis* CIP 107408^T, 4; *I. seosinensis* JCM 12526^T.

Table 2. DT-C と類縁菌の生理学的性質

Characteristic	1	2	3	4
Growth properties				
Temperature (°C)				
range	4-48	4-30	4-30	4-40
optimum	35	20-22	20-22	30-35
pH				
range	5-10	5.5-9.5	5.5-9.5	6-10
Salinity (NaCl %)				
range	0.1-15	1-10	0.6-15	1-20
optimum	1-5	3-6	3-6	7-10
Other properties				
gelatin hydrolysis	+	-	+	-
casein hydrolysis	-	-	-	-
starch hydrolysis	-	-	-	-
Tween 80 hydrolysis	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+
Oxidase test	+	+	+	+
GC content (%)	48.1	48.1	48.3	48.5
Acid production from:				
cellobiose	-	-	-	-
fructose	-	-	-	-
galactose	-	+	-	+
glucose	-	+	-	+
lactose	-	+	-	+
maltose	-	+	-	+
mannose	-	+	-	+
raffinose	-	-	-	-
rhamnose	-	+	-	+
sucrose	-	-	-	-
xylose	-	+	-	+

Strains: 1; Strain DT-C, 2; *I. zobellii* CIP 107407^T, 3; *I. abyssalis* CIP 107408^T, 4; *I. seosinensis* JCM 12526^T.

Table 3. DT-C と類縁菌の脂肪酸組成

fatty acids	1	2	3	4
C _{14:0}	1.1	0.8	ND	ND
C _{16:0}	10.7	9.3	10.8	9.8
C _{18:0}	1.8	2.2	2.7	0.7
iso-C _{11:0}	1.4	1.6	1.5	4.2
iso-C _{13:0}	1.1	1.0	0.9	ND
iso-C _{15:0}	38.7	36.8	33.5	54.5
iso-C _{17:0}	12.8	13.7	11.6	9.4
C _{16:1} ω7c	3.9	8.8	2.9	2.8
C _{18:1} ω7c	8.7	11.0	8.2	4.3
C _{19:1} ω6c	2.8	ND	2.8	0.8
iso-C _{15:1} F	1.1	1.0	1.4	0.4
iso-C _{17:1} ω9c	10.1	7.4	15.5	8.8
C _{17:0} Cyclo	3.3	3.7	5.6	3.2
3OH iso-C _{11:0}	1.4	1.5	1.5	1.1
3OH iso-C _{13:0}	1.2	1.3	1.3	ND

Strains: 1; Strain DT-C, 2; *I. zobellii* CIP 107407^T, 3; *I. abyssalis* CIP 107408^T, 4; *I. seosinensis* JCM 12526^T.

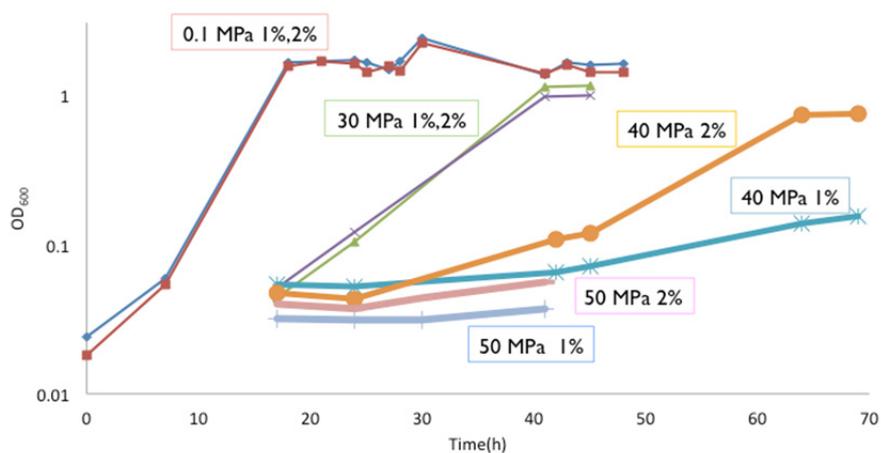


Fig. 6. さまざまな条件で培養した MT-1 の生育曲線

3. 2 菌の高圧下における生育と塩濃度の影響

Pseudomonas sp. MT-1 をさまざまな塩濃度、様々な圧力下で培養した結果が Fig. 6 である。MT-1 は陸上や浅瀬由来の類縁菌に比べると比較的高圧下での生育に適応した細菌であるが、その耐圧性には培地中に含まれる塩

濃度で差が見られ、2% NaCl 存在下では、1% NaCl の時よりも高い耐圧性を示した。またその差は 40 MPa 以上の圧力下で見られるようになることが明らかとなった。この現象が深海微生物である MT-1 のみに見られるものなのか、または一般的な現象なのかを調べるため、陸上や

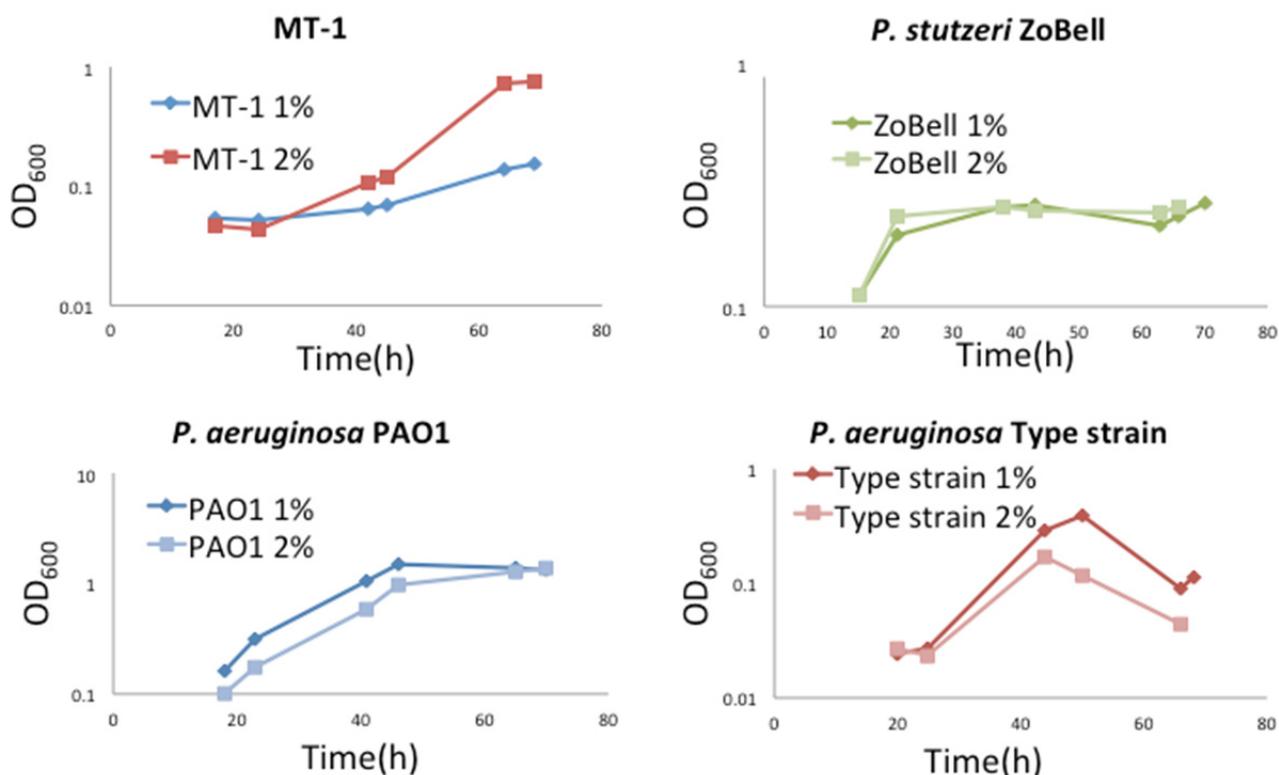


Fig. 7. 40 MPa で培養した MT-1 および類縁菌の生育曲線

浅瀬由来の類縁菌 (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa*^T NBRC 12689 (Type strain), *Pseudomonas stutzeri* ZoBell) を用いて同様の実験を行った。培養時の圧力は 40 MPa とした。結果を Fig. 7 に示す。その結果、MT-1 以外の菌株では、高圧培養時における塩濃度の影響は見られなかった。

4. 考察

4.1 マリアナ海溝に生育していた好塩菌の分類

本研究の結果、マリアナ海溝にも、他の海域で見られるものと類縁性の高い好塩菌が生育していることが明らかとなった。*Idiomarina* 属は比較的最近同定された属であり、これまで単離されている *Idiomarina* 属細菌はすべて海や海岸、塩湖などから見つかった (Ivanova *et al.* 2000; Choi and Cho 2005)。このような好塩濃度環境下では比較的普遍的な細菌であるかもしれない。特に *I. zobellii* は北西太平洋の深海底泥から見いだされており (Ivanova *et al.* 2000)、マリアナ海溝のような潮流の少ない場所で単離された細菌とこのように高い類縁性を示すことは興味深い。

4.2 菌の高圧下における生育と塩濃度の影響

本研究の結果、MT-1 では、NaCl 濃度が生育における耐圧性に影響を及ぼし、高塩濃度下では耐圧性が増すことが明らかとなった。またこの現象は陸上や浅瀬由来の類縁菌では見られず、深海由来の MT-1 に特徴的であった。

これまでの研究で、大腸菌でもやはり高塩濃度下で耐圧性が増すことが示されている。さらに大腸菌の場合では、浸透圧ではなく、塩化物イオンの存在が重要であることが示唆されている (Ota *et al.* 2011)。もちろん大腸菌は深海微生物ではない。なぜ *Pseudomonas* 属では陸上由来の株ではなく、深海由来の MT-1 で大腸菌と同様の現象が見られるのかについては、現在のところ不明である。しかしこの現象は MT-1 が塩の存在下、深海の高圧環境に適応するための機構の 1 つであると考えられる。

5. 今後の課題

今後、今回の研究で性質を明らかにした DT-C や、すでに得られている深海微生物を用いて、菌の高圧下におけ

る生育と塩濃度の影響についてさらに調べていく。

またマイクロアレイなどを用いて、培養条件の違いによる遺伝子発現の違いについて明らかにし、この現象にはどのような因子が関与しているのかを明らかにしていきたいと考えている。

謝 辞

本研究に対してご援助いただきましたソルト・サイエンス研究財団に感謝申し上げます。また実験にご協力いただいた独立行政法人海洋研究開発機構の能木裕一博士、加藤千明博士に感謝申し上げます。

6. 文献など

Choi DH, Cho BC (2005) *Idiomarina seosinensis* sp. nov., isolated from hypersaline water of a solar saltern in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:379-83

Ivanova EP, Romanenko LA, Chun J, Matte MH, Matte GR, Mikhailov VV, Svetashev VI, Hug A, Mangel T, Colwell RR (2000) *Idiomarina* gen. nov., comprising novel indigenous deep-sea bacteria from the Pacific Ocean, including descriptions of two species,

Idiomarina abyssalis sp. nov. and *Idiomarina zobellii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:901-907

Ota Y, Sekiguchi T, Fujimori H, Sambongi Y, Kato C, Tamegai H (2011) Chloride Ions is Effective for the Improvement of the Growth of *Escherichia coli* under High Hydrostatic Pressure. *J. Jpn. Soc. Extremophiles* 10:30-33

Tamegai H, Furukawa T, Nitta J, Chikuma S, Miyazaki M, Nogi Y, Arakawa S, Kato C, Horikoshi K (2006) *Halomonas* sp. strain DT-W, a halophile from the 11,000 m-depth of the Mariana Trench. *J. Jpn. Soc. Extremophiles* 5:27-33

Tamegai H, Li L, Masui N, Kato C (1997) A denitrifying bacterium from the deep sea at 11000-m depth. *Extremophiles* 1:207-211

Tamegai H, Nakamura S, Miyazaki M, Nogi Y, Kasahara R, Kato C, Horikoshi K (2005) Physiological properties of *Pseudomonas* sp. strain MT-1, denitrifier from the 11,000 m-depth of Mariana Trench. *J. Jpn. Soc. Extremophiles* 4:25-31

Effects of Salt Concentration on the Growth of Halophiles from Mariana Trench under High Pressures

Hideyuki Tamegai

College of Humanities and Sciences, Nihon University

Summary

Oceans occupy about 70% of the earth. Recently, some bacteria were isolated from the deep sea, and it has been found that they represent a relatively unexplored viable environment. Deep sea is the environment of high pressure and high salinity. The organisms living there should be adapted with such extreme environment. Recently, we used *Escherichia coli* as a model organism for the investigation of relationship between salt concentration on growth and piezotolerance. As a result, relatively high salt concentrations improved the growth of *E. coli* under high hydrostatic pressures. However, *E. coli* is not deep-sea organism. The relationship between salt concentration on growth and piezotolerance of the deep-sea bacteria is still unclear. In this study, I carried out the taxonomic study of halophilic bacterium isolated from the mud of Mariana Trench, one of the deepest areas on the Earth. Further, I investigated the relationship between salt concentration on growth and piezotolerance using *Pseudomonas* sp. MT-1, also isolated from the mud of Mariana Trench.

At first, moderately halophilic strain DT-C was isolated from the mud of the Mariana Trench. Cells of the organism were rod-shaped (3 μm x 1.5 μm) with polar flagella. Growth occurred in a NaCl concentration of about 0.1-15% (optimal: 1-5%), at pH of 5-10, and at temperatures ranging from 4-48 $^{\circ}\text{C}$ (optimal: 35 $^{\circ}\text{C}$). The results of 16S rDNA analysis and DNA-DNA hybridization analyses showed that DT-C was closely related to *Idiomarina zobellii* which is also isolated from the deep sea.

Further, I found that relatively high salt concentrations improved the growth of MT-1 under high hydrostatic pressures. This phenomenon cannot be observed in the case of related bacterial strains, and it can be said that this is one of the mechanisms for the adaptation of MT-1 for the environment of deep sea. I can show the novel character of salts in this study.