

好熱性好酸性細菌の検索, 単離および諸性質の検討

谷本 保英・稲垣 賢二・田中 英彦

(生物資源開発学講座)

Screening, Isolation and Characterization of Thermophilic and Acidophilic Bacteria

Yasuhide Tanimoto, Kenji Inagaki and Hidehiko Tanaka

(Department of Bioresources Chemistry)

We have isolated 53 thermophilic and acidophilic bacteria from about 150 samples from acidic hot springs. All the strains isolated exhibited growth only at high temperatures and low pH ranges. We extensively characterized the strain UZ-1 which was isolated from Unzen spa. This strain was found to be a gram-negative, aerobic and heterotrophic bacterium. The DNA base composition was 63 mol % GC. Growth occurs over a range of 37°C to 65°C with an optimum temperature of 60°C, and between pH 2.0 and pH 6.0 with an optimum pH of 3.0. On the other hand, the optimum temperature of the other 6 isolated strains was 70°C. We report, in this paper, the characteristics of the isolated strains.

Key words : screening and isolation of bacteria, acidophiles, thermophiles

緒 言

我々, 人間を含め生物が最も広く, かつ最も多く分布している所は, 中性付近の pH, 20°C~37°C の温度, 1 気圧, そして適当な栄養と塩分を含んでいる場所である。その一方, 地球上には我々の目から見て生命の存在が許されないような環境, すなわち極限(特殊)環境が多数ある。例えば, 高温地帯, 高塩濃度の塩湖, 強酸あるいは強アルカリ性の場所, そして光も届かない海底等がそれに該当する。近年では, 生物にとって非常に過酷と思われる極限環境に好んで棲息する微生物が数多く単離されている。これらの微生物群は極限環境微生物と総称されている。極限環境微生物は, 自分のおかれた環境に適応するために種々の特殊な能力を獲得してきた。特殊な能力ゆえに, 最近では利用の幅も広がってきている。1970年代以降, 好アルカリ性細菌由来のプロテアーゼ及びセルラーゼが衣料用洗剤に配合されるようになった。海底からは石油分解細菌が単離されており, 応用研究に期待がもたれている。人間が発見

してきた極限環境微生物はほんの氷山の一角にしか過ぎず, 今後, 人類にとってさらに有益な微生物が単離されるかもしれない。以上のようなことから, この分野の研究は大きな可能性を秘めたものであると思われる。

我々の研究室では, 極限環境微生物の中でも特に好酸性細菌に焦点を当てて研究を行ってきた。*Acidiphilium* 属細菌は, 1981年にアメリカのハリソンにより初めて単離された一群の好酸性従属栄養細菌(1属6種)である¹⁾。我々は, これまでに *Acidiphilium* 属細菌より, 各種制限酵素²⁾⁻⁷⁾, グリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼ⁸⁾などの有用酵素の検索, 単離, 精製を行ってきた。また, 同じく好酸性の従属栄養細菌である *Acidobacterium* 属細菌より, β -グルコシダーゼなどの糖質関連酵素の精製も行ってきた⁹⁾。それらと並行して *Acidiphilium* 属細菌の分子育種の系の確立を目指して, 宿主ベクター系の開発も進めてきた^{10), 11)}。一方, 高温環境に好んで棲息する好

Received October 4, 1995

熱性細菌はタンパク質の大部分が変性する60℃以上の世界でも生育できることから、産生する酵素の耐熱性について詳細に研究されてきた。その結果、好熱性細菌の酵素より得られた知見を基に、部位特異的変異の手法を用いて常温菌の酵素の熱安定性を人為的に向上できるまでに至った。その他にも、好熱性細菌の研究は遺伝子工学や進化生物学の発展上、大きな役割を担ってきた。高度好熱性細菌 *Thermus aquaticus* 由来の DNA ポリメラーゼが¹²⁾、PCR 技術の発達に寄与し、分子生物学分野のみならず犯罪捜査の際の DNA 鑑定等に応用されているのは、その代表例の一つである。

これらのことから好熱性と好酸性の両性質を併せ持つ好熱性好酸性細菌に着目し、検索、単離及び諸性質の検討を試みた。全国各地の泉質が酸性である温泉でサンプルを採取して、それらから53株の好熱性好酸性細菌を単離することができた。以下に単離菌株の諸性質に関する研究を報告する。

材料と方法

サンプル及び培地

目的とする好熱性好酸性細菌の検索のために、長崎県雲仙温泉等の硫化水素泉あるいは酸性泉へサンプリングに赴き、土壌サンプル及び液状サンプルを採取した。細菌の単離及び培養には、*Acidiphilium* 属細菌の培養に使用される HGYE 培地 [0.4% グルコース, 0.3% 硫酸アンモニウム, 0.1% トリプティケースソイブローズ, 0.05% 酵母エキス, 0.05% 硫酸マグネシウム, 0.01% リン酸水素 2 カリウム, 0.01% 硫酸カリウム] を用いた。培地の pH は、硫酸で pH 3.0 に調整した。また、固体培地の場合には寒天を 3.0% となるように添加した。

スクリーニング

各地で採取したサンプルを滅菌水に懸濁し、それを 50 μ l ずつ HGYE 固体培地に塗布した。その後、60℃ で数日間培養した。コロニーの生育確認されたものについては、更に均一化する為に単離操作を数回繰り返した。

電子顕微鏡写真

電子顕微鏡写真の撮影は、(財)日本食品分析センター名古屋支所において、日本電子(株)製の走査電子顕

微鏡 JSM-220A を用いて行われた。

単離菌株の性質検討

単離菌株の性質検討には、HGYE 培地で60℃で培養した菌体を用いた。グラム染色は、Hucker の方法に基づいて行った¹³⁾。単離菌株の生育可能 pH を調べる場合は、HGYE 液体培地を様々な pH に調整したものをを用いた。それを試験管に 10ml ずつ分注して、前培養した菌体の培養液を 100 μ l 添加することによって培養を開始した。24時間後に、OD₆₆₀ を測定することによって生育量を求めた。

生育曲線は、pH 3.0 に調整した HGYE 液体培地を、100ml ずつ入れた坂口フラスコを用いた。前培養液を 1ml 添加することによって培養を開始した。一定時間ごとにサンプリングして OD₆₆₀ を測定することによって生育量を求めた。炭素源の資化性は、グルコースのかわりに各炭素源を培地中の最終濃度が 0.4% になるように添加した。生育阻害剤の検討は、HGYE 固体培地に各試薬を結果に示す濃度になるように添加した。

菌体の GC 含量

単離菌株の GC 含量を求めるために、染色体 DNA の抽出を基本的には Saito らの方法に準じて行った¹⁴⁾。得られた染色体 DNA をエッペンドルフチューブに入れ、沸騰水に10分間つけ、2本鎖を1本鎖に解離した。水中で冷却後、ヌクレアーゼ P₁ を添加し、50℃ で1時間酵素反応を行った。それを HPLC に供することによって細菌の GC 含量を求めた。HPLC 分析の際には、移動層は 10 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0) を、カラムは Cosmosil 5C₁₈ (4.6 \times 150mm) を使用した。カラムオープン内の温度は 30℃、流速は 1.0ml/min で、UV260 nm の吸収により検出を行った。なお、GC キットはヤマサ醤油株式会社より購入した¹⁵⁾。

菌体のキノン系の分析¹⁶⁾

菌体のキノンの抽出は、クロロホルム/メタノール (3:1, v/v) を用いて凍結乾燥菌体より行った。分液ろとで抽出した後、減圧エバポレーターで濃縮した。残渣を少量のアセトンに溶解したものを、TLC に供した。TLC の展開溶媒には、石油エーテル/ジエチルエーテル (85:15, v/v) を使用した。標準サ

ンプルには, ビタミン K₁ (東京化成工業), コエンザイム Q₉ 及び Q₁₀ (シグマ) を用いた.

結果及び考察

1. 好熱性好酸性細菌の検索及び単離

好熱性好酸性細菌の検索のため, 全国各地の酸性泉あるいは硫化水素泉である温泉へ出かけサンプルを持ち帰った (Table 1). 持ち帰った154種類のサンプルから, 好熱性好酸性細菌のスクリーニングを行った. pH 3.0, 60°C という条件で培養したところ, いくつかのサンプルについては HGYE 固体培地上にコロニーの生育が確認された. さらに均一にする目的で単離操作を数回繰り返した結果, 53株を単離することができた. 単離菌株のうち代表的な5株のコロニーの形態を Table 2 に示した. Table 2 のものは色が白色かクリーム色かのどちらかであるが, 中には透明で固体培地上で判別しにくいものもあった. また, 長崎県の雲仙より単離した UZ-1 株の電

子顕微鏡写真 (Fig. 1) から本菌は, 長さ約 2 μ m の桿菌で, べん毛の存在は認められなかった. そのためか, 光学顕微鏡による観察で運動性も確認できなかった.

単離菌株の名称は, サンプル地ごとに括弧内の様にした. 雲仙 (UZ-1), 排水処理場 (EMG), 霧島 (MIH), 南阿蘇 (SAS), 筋湯温泉小松地獄 (KHA, KHB, KHC).

2. 単離菌株の性質検討

単離した53株の好熱性及び好酸性についての検討を行った. ここで, 好熱性及び好酸性の定義について言及しておく. 好熱性細菌は, 生育最適温度が 55°C 以上のもの, 好酸性細菌は, 酸性域に生育最適 pH をもち, 中性域では増殖不能なものである. 実験の結果, 53株全てが 60°C 以上を生育最適温度とし, 生育最適 pH が酸性域で, かつ中性域では生育できないことがわかった. よって, 今回, 単離した菌株すべてが目的とする好熱性好酸性細菌であることが確認された. Fig. 2 には, UZ-1 株及び他3株の生育可能 pH を, Fig. 3 には UZ-1 株の温度ごとの生育

Table 1 Habitats of isolated strains

	Source	Number of samples	Number of strains
1	Nagasaki Unzen	25	1
2	U. S. A. Yellowstone	5	0
3	U. S. A. Salt Lake	2	0
4	Okayama Yubara	1	0
5	Okayama Yanahara	10	0
6	Okayama Okayama Univ.	20	0
7	Kumamoto Mt. Aso	3	0
8	Okayama Yuba	1	0
9	Okayama Sauna bath	1	0
10	Okayama Treatment plant	3	6
11	Kagawa Shionoe	5	0
12	Kyoto Arashiyama	3	0
13	Nagano Norikura	7	0
14	Kagoshima Kirishima	15	9
15	Miyazaki Ebino	6	0
16	Kumamoto Minami Aso	10	10
17	Oita Amagase	7	0
18	Oita Sujiyu	29	27
19	Hokkaido lozan	1	0

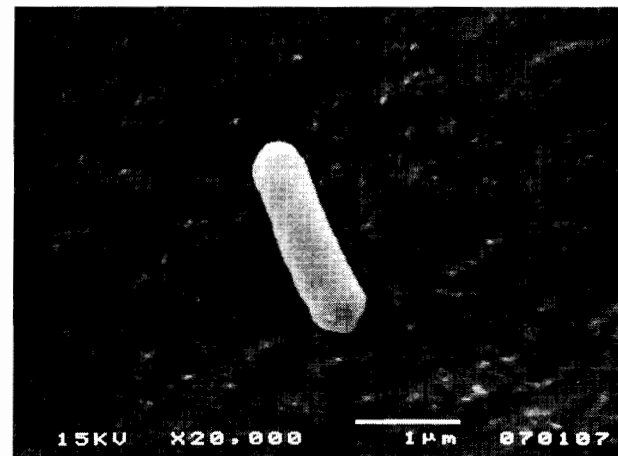


Fig. 1 Electron micrograph of strain UZ-1. Bar represents 1 μ m.

Table 2 Colonial morphology on HGYE agar medium at pH 3.0

	UZ-1	EMG-11	MIH-2	SAS-11	KHA-31
shape	circular	circular	circular	circular	circular
edge	entire	entire	entire	entire	entire
surface	smooth	smooth	smooth	smooth	smooth
density	opaque	opaque	opaque	opaque	opaque
color	white	white-cream	white	white	white-cream
size (mm)	0.4-0.5	0.7-1.0	0.7-1.0	0.7-0.8	0.6-0.9

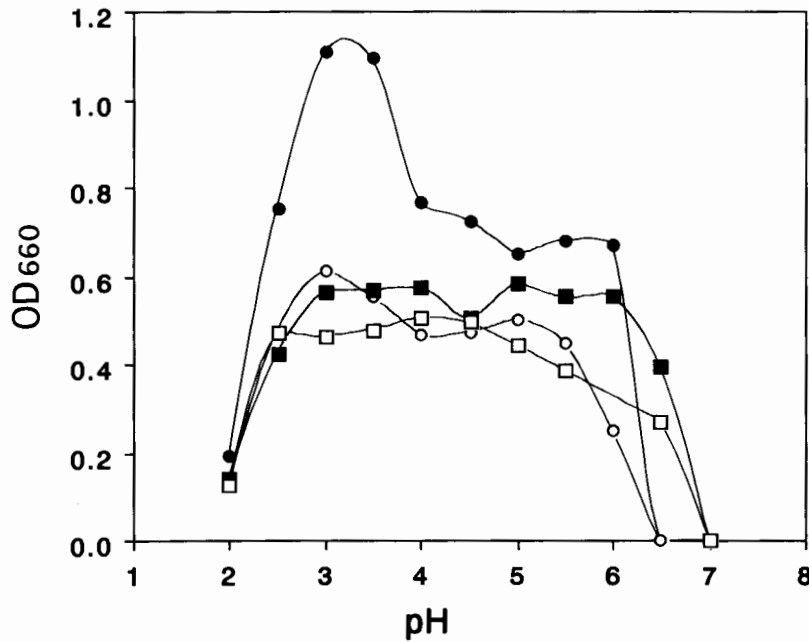


Fig. 2 Effect of pH on the growth of isolated strains. Test medium was HGYE medium adjusted on various pHs. Incubation was for 24 hours at 60°C. Symbols : (●), UZ-1; (○), MIH-2; (■), KHA-31; (□), KHB-11.

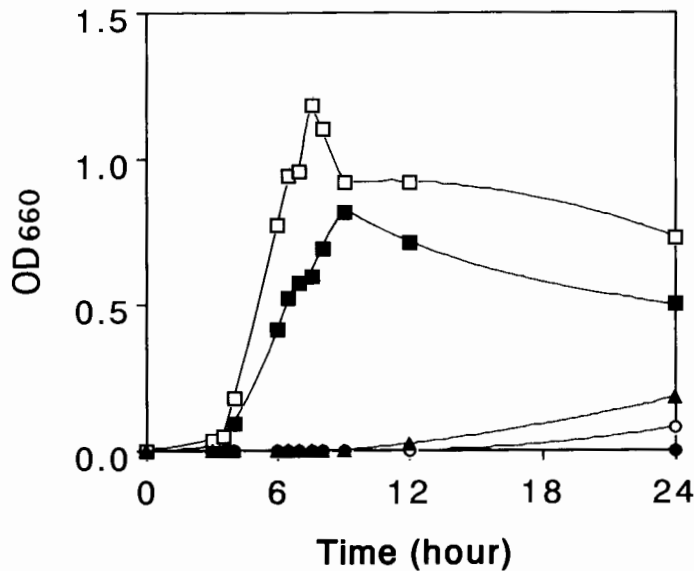


Fig. 3 Growth of strain UZ-1 at various temperatures. Test medium was HGYE medium, which was adjusted to pH 3.0, in a 500-ml shaking flask and incubated with shaking at various temperatures indicated in the figure. Symbols : (●), 27°C; (○), 37°C; (■), 50°C; (□), 60°C; (▲), 65°C.

曲線を示した。他の菌株についても Fig. 2 と同様の結果が得られた。Fig. 3 より、UZ-1 株の生育最適温度を60°Cと決定した。しかし、53株中6株（鹿児島県霧島温泉郷由来の MIH-321株など6株）の生育最適温度は70°Cであった。

以下、UZ-1 株の性質について詳細に報告する。

UZ-1 株は、グラム陰性で生育に酸素を要求する好気性細菌であった。好熱性好酸性古細菌である *Sulfolobus acidocaldarius* は、硫黄をエネルギー源として増殖する独立栄養細菌であるが、UZ-1 株は硫黄あるいは二価鉄を酸化してエネルギー源を獲得できないことから、生育に有機物を必須とする従属栄養細菌

菌であることが明らかになった。次に, UZ-1 株がどのようなものを炭素源として利用できるかを調べた (Table 3)。比較的広い資化性を示したが, この中でグルコースを炭素源とした場合が最も生育がよかった。しかしながら, 培地中にグルコースが 0.6% 以上存在すると生育が阻害された。同様の現象は酵母エキスについても観察され, 0.1% 以上培地中に添加された時, 生育量はその半分程度に減少した。グルコースによる生育阻害の原因は不明だが, 酵母エキスについては *Acidiphilium* 属細菌で観察された様

Table 3 Growth of the isolated strains on various carbon sources

C-Source	UZ-1	MIH-2	KHA-31
Glucose	+++	++	++
Fructose	+++	++	+
Sucrose	+	+++	++
Xylose	+	++	++
Galactose	+++	++	+
Glycerol	+	++	++
Maltose	+++	+++	++
Cellobiose	++	++	+
Lactose	+	+	++
Trehalose	++	++	+
Citrate	++	++	+
Lactate	-	-	-
Succinate	-	-	-
Acetate	-	-	-

Test medium was HGYE medium adjusted on pH 3.0. Incubation was for 24 hours at 60°C. Growth of the bacteria was measured by the turbidity at 660 nm.

Symbols: +++ very good growth (≥ 1.0);
 ++ good growth (0.5-1.0);
 + slight growth (0.05-0.5);
 - no growth (≤ 0.05).

に, 酵母エキス中に含まれる乳酸及びコハク酸の影響と考えられる¹⁷⁾。炭素源が乳酸及びコハク酸の場合は UZ-1 株, MIH-2 株及び KHA-31 株の 3 株ともに生育を示さなかった (Table 3)。抗生物質などの生育阻害剤についても検討した (Table 4)。低濃度では生育が観察された。一般に抗生物質耐性遺伝子はプラスミド DNA 上にコードされていることが多いが, UZ-1 株はプラスミド DNA をもっていない。他の単離菌株についてもプラスミド DNA の有無を調べる必要がある。好熱性古細菌の多くは抗生物質に対して非感受性であることが報告されている¹⁸⁾。古細菌の膜脂質はエーテル脂質より構成されており, これが古細菌と同定する際の指標となっている。このエーテル脂質のために抗生物質に対して非感受性になったと言うのは適切ではない。しかしながら, *Sulfolobus acidocaldarius* などの好熱性好酸性古細菌が過酷な環境に適応できたのは, エーテル脂質のためだと予想できる。古細菌か否かの判断基準のためにも, UZ-1 株及び他の単離菌株について膜脂質分析を行わなければならない。

GC 含量は UZ-1 株の場合, 63% であった。好熱性細菌は, 一般的には GC 含量は高いと報告されている。しかし, 中には例外もあり好熱性である *Bacillus brevis* や古細菌の一部のものは, 50% 以下と常温菌より低い値を示している¹⁹⁾。低い GC 含量でありながら, 高温環境下で棲息できるのは高温で DNA を安定化する機構があるからである。その機構の一つとして, 好熱性好酸性古細菌である *Thermoplasma acidophilum* よりヒストン様タンパク質が発見されている¹⁸⁾。このタンパク質に DNA が巻きつくこと

Table 4 Effect of antibiotics and other inhibitor on the growth of isolated strains

Strain	10 μ g/ml Chloramphenicol	100 μ g/ml Ampicillin	10 μ g/ml Tetracycline	3% NaCl	6% NaCl
UZ-1	-	+	++	-	-
EMG-11	-	-	++	-	-
MIH-2	++	++	++	-	-
SAS-11	-	-	-	-	-
SAS-21	+	-	++	++	-
KHA-31	++	-	++	-	-
KHB-11	+	++	++	-	-
KHB-43	-	+	++	++	-
KHC-1	++	++	++	-	-

Test medium was HGYE agar medium (pH 3.0). Incubation was for 3 days at 60°C.

Symbols: (++) good growth, uninhibited; (+) slight growth, little inhibition; (-) no growth.

Table 5 Characteristics of strain UZ-1 and thermophilic bacteria

	UZ-1	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
Acidophilic	+	-	+	+
pH range for growth	2.0-6.0	5.5-9.0	0.5-3.0	1.0-5.9
Thermophilic	+	+	+	+
Temp. range for growth (°C)	37-65	40-80	37-65	55-85
GC mol %	63	67	46	38
Quinone system	MK	MK-8	MK-7	

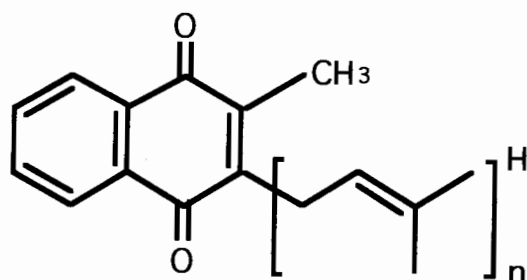


Fig. 4 Structure of menaquinone.

により、熱に対して安定化するのである。

近年、細菌の同定に際して重要なファクターとなりつつあるキノン系の分析も行った。キノンとは呼吸鎖を構成する成分の一つであり、それぞれの種で特有のものをもっている。ユビキノン及びメナキノンがその代表例である。TLC 及び UV スペクトル分析の結果より、UZ-1 株はメナキノン (Fig. 4) をもつことが推測された。グラム陰性細菌でメナキノンをもつものの報告例は少ない。グラム陰性細菌でありながらも *Acidobacterium capsulatum* 及び *Thermus* 属細菌は、メナキノン-8 (MK-8) をもつことが報告されている²⁰⁾。興味深い特徴であるので、マスペクトル分析などにより構造を明らかにすることが重要と思われる。

UZ-1 株の性質をまとめた (Table 5)。現段階において、UZ-1 株は同定するまでに至っていない。他の好熱性好酸性細菌と比較して、性質が一致するような菌株はない。新属新種の可能性もあるので、系統分離のためにも 16S rRNA の塩基配列などを明らかにしたい。他の菌株についてもひき続き性質検討をするとともに、応用に関する研究を進めていくつもりである。

謝 辞

菌体の GC 含量やキノン系の分析などについて、ご指導を

いただいた美作女子大学の岸本憲明助教授に感謝いたします。

References

- 1) Harrison, A. P., Jr.: *Acidiphilium cryptum* gen. nov., sp. nov., heterotrophic bacterium from acidic mineral environments. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **31**, 327-332 (1981)
- 2) Dou, D., K. Inagaki, K. Kita, A. Oshima, N. Hiraoka, N. Kishimoto, T. Sugio and T. Tano: Restriction endonuclease *Afa* I from *Acidiphilium facilis*, a new isoschizomer of *Rsa* I: purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **1009**, 83-86 (1989)
- 3) Inagaki, K., D. Dou, K. Kita, N. Hiraoka, N. Kishimoto, T. Sugio and T. Tano: Isolation and characterization of restriction endonucleases from *Acidiphilium* sp. 16R and 22M. *J. Ferment. Bioeng.*, **69**, 60-62 (1990)
- 4) Inagaki, K., F. Kobayashi, D. Dou, Y. Nomura, H. Kotani, N. Kishimoto, T. Sugio and T. Tano: Isolation and identification of restriction endonuclease *Asp35HI* from *Acidiphilium* species 35H. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6155 (1990)
- 5) Inagaki, K., T. Ito, H. Sagawa, H. Kotani, N. Kishimoto, T. Sugio, T. Tano and H. Tanaka: *AcpI*, a novel isoschizomer of *AsuII* from *Acidiphilium cryptum* 25H, recognizes the sequence 5'TT↓CGAA3'. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 6335 (1991)
- 6) Sagawa, H., H. Kotani, Y. Nomura, K. Inagaki, T. Tano, N. Kishimoto, M. Takagi and K. Nakajima: Isolation and identification of restriction endonuclease *Aor51HI* from *Acidiphilium organovorum* 51H. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 365 (1992)
- 7) Inagaki, K., T. Hikita, S. Yanagidani, Y. Nomura, N. Kishimoto, T. Tano and H. Tanaka: Restriction endonuclease *Aor13HI* from *Acidiphilium organovorum* 13H, a new isoschizomer of *BspMII*: Purification and characterization. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**,

- 1716-1721 (1993)
- 8) Hatta, T., K. Inagaki, T. Sugio, N. Kishimoto and T. Tano : Purification and characterization of glycerol 3-phosphate dehydrogenase from two types of *Acidiphilium* sp.. Agric. Biol. Chem., **53**, 651-658 (1989)
- 9) Kishimoto, N., K. Inagaki, T. Sugio and T. Tano : Purification and properties of an acidic β -Glucosidase from *Acidobacterium capsulatum*. J. Ferment. Bioeng., **71**, 318-321 (1991)
- 10) Inagaki, K., J. Tomono, N. Kishimoto, T. Tano and H. Tanaka : Transformation of the acidophilic heterotroph *Acidiphilium facilis* by electroporation. Biosci. Biotech. Biochem., **57**, 1770-1771 (1993)
- 11) Inagaki, K., J. Tomono, N. Kishimoto, T. Tano and H. Tanaka : Cloning and sequence of the *recA* gene of *Acidiphilium facilis*. Nucleic Acids Res., **21**, 4149 (1993)
- 12) Chien, A., D. B. Edgar and J. M. Trela : Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. J. Bacteriol., **127**, 1550-1557 (1976)
- 13) 山崎真狩 : 光学顕微鏡, 新生物化学実験講座17, 微生物実験法(別府輝彦ら編), 55-66, 東京化学同人, 東京(1992)
- 14) Saito, H. and K. Miura : Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. Biochim. Biophys. Acta, **72**, 619-629 (1963)
- 15) Kishimoto, N. and T. Tano : Acidophilic heterotrophic bacteria isolated from acidic mine drainage, sewage, and soils. J. Gen. Appl. Microbiol., **33**, 11-25 (1987)
- 16) Collins, M. D. and D. Jones : Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. Microbiol. Rev., **45**, 316-354 (1981)
- 17) Kishimoto, N., K. Inagaki, T. Sugio and T. Tano : Growth inhibition of *Acidiphilium* species by organic acids contained in Yeast Extract. J. Ferment. Bioeng., **70**, 7-10 (1990)
- 18) 山岸明彦 : 古細菌の遺伝子構造と操作. 蛋白質 核酸 酵素, **38**, 1556-1565 (1993)
- 19) 大島泰郎 : 好熱性細菌. UP BIOLOGY, 東京大学出版会, 東京
- 20) Kishimoto, N., Y. Kosako and T. Tano : *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov. : An acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment. Curr. Microbiol., **22**, 1-7 (1991)