相模湾および遠州灘の海底堆積物から分離した 好圧細菌の諸性状について

今田千秋,* 小林武志, 濱田(佐藤)奈保子, 渡邊悦生

(2002年6月18日受付, 2002年11月13日受理)

東京水産大学大学院食品生産学専攻

Isolation and characterization of barophilic bacteria obtained from
sediment samples collected from Sagami Bay and Enshu-Nada

CHIAKI IMADA,* TAKESHI KOBAYASHI, NAOKO HAMADA-SATO AND ETSUO WATANABE

Course of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries, Minato, Tokyo 108-8477, Japan

Sixteen marine sediment samples collected from Tokyo Bay, Sagami Bay, Suruga Bay and Enshu-Nada were incubated under increased pressure (1-600 atm). Two barophilic microbes were obtained from Sagami Bay at a depth of 1,400 m and Enshu Nada at a depth of 300 m. They were referred to as strains SA-6 and EN-16, respectively. Both strains required seawater for their growth which indicated that they were marine in origin. From the taxonomic characterization, strains SA-6 and EN-16 were identified as *Kurchia* and *Acinetobacter*, respectively. The activities of protease and α -amylase produced by strain EN-16 increased much more than 1 atm under increased pressure.

キーワード：好圧細菌, *Acinetobacter*, *Kurchia*, 海底堆積物

海洋環境には多種多様の微生物が生息している。特に、深海に生息する微生物の中には常圧よりもむしろ加圧下においてよく増殖する微生物が存在することが知られている。¹⁾ ZoBell and Johnson²⁾はこれらの加圧下での増殖が良好な微生物を好圧微生物 (barophile) と呼ぶことを提唱した。この種の微生物の分離源として最もよいのは深海潜水調査船「しんかい 2000」や「しんかい 6500」が採集する現場圧力を保持した海水サンプル³⁾などであるが、採集方法が煩雑である上に入手できるサンプルに限りがある。また、サンプルを減圧することなく現場微生物を接種し、好圧微生物を単離したり、⁴⁾ 液体培地で加圧培養する装置⁵⁾も考案、設計されているが、十分な成果を上げているとは言えない。このような理由から減圧された深海海水⁶⁾や海底堆積物⁷⁾およびソコグラなどの深海魚⁸⁾や甲殻類⁹⁾などがこれまで分離源として多く用いられ、いくつかの好圧微生物が単離されるとともにその諸性状も明らかとなりつつある。Deming^ら¹⁰⁾は大西洋の水深 7,410 m の深層海水中から分離した好圧細菌 2 株について生理生化学的性状と 5S rRNA

遺伝子の塩基配列を調べることにより系統解析を行った。その結果、これらの株がいずれのグループにも属さないため、新属の提唱を行い、*Colwellia hadaliensis* および *C. psychrorhythrus* と命名した。このように深海微生物の中にはまだまだ未知のものも存在することが予想される。そこで本研究では減圧された海底堆積物より好圧細菌の分離を行い、加圧下における培養性状を調べるとともに分類学的性状や酵素の加圧下における活性の変化などを調べることを目的とした。

材料および方法

海底堆積物サンプル 好圧細菌の分離源として海底堆積物を用いた。これらのサンプルは東京大学海洋研究所淡青丸の KT-92-10 次航海においてボックスコーラー採泥器により採集されたものの中から分与されたものであり、以下の実験まで -20°C で凍結保存した。これらのサンプリング海域の位置と深度を Table 1 に示した。

フロリナート添加の有無による現場微生物の増殖およびプロテアーゼ活性 好圧微生物の分離に先立ち、加圧

*Tel : 81-3-5463-0404. Fax : 81-3-5463-0404. Email : imada@tokyo-u-fish.ac.jp

Table 1. Sampling locations and depths

Sample No.	Sea area	Longitude	Latitude	Depth
1	Tokyo Bay T-2	139°55.1'E	35°34.1'N	13 m
2	Tokyo Bay T-3	139°55.1'E	35°30.4'N	27 m
3	Tokyo Bay T-5	139°46.8'E	35°21.1'N	19 m
4	Tokyo Bay T-7	139°47.9'E	35°10.4'N	32 m
5	Tokyo Bay T-8	139°31.7'E	35°03.8'N	800 m
6	Sagami Bay S-1	139°23.0'E	35°00.5'N	1400 m
7	Sagami Bay S-2	139°24.6'E	34°55.9'N	1400 m
8	Sagami Bay S-3	139°15.2'E	34°59.8'N	1300 m
9	Sagami Bay S-4	139°14.1'E	35°02.0'N	1100 m
10	Sagami Bay S-6	138°30.0'E	34°07.6'N	3600 m
11	Ensyu-Nada S-7	137°00.0'E	34°23.8'N	50 m
12	Ensyu-Nada S-8	137°05.0'E	34°05.0'N	1600 m
13	Ensyu-Nada S-10	137°50.0'E	33°30.0'N	4000 m
14	Ensyu-Nada S-11	137°21.0'E	34°34.0'N	35 m
15	Ensyu-Nada S-12	137°38.1'E	34°38.1'N	35 m
16	Enshu-Nada S-14	138°24.0'E	34°36.8'N	300 m

下における液体培地への酸素の供給源としてのフロリナート(商品名, 住友スリーエム社製)の効果を調べた。このフロリナートは酸素とフッ素のみからなるフルオロカーボン化合物で生物に対して不活性であり, 比重が水より大きく, 水と混合せず, 酸素溶解度が水より10倍以上高い液体である。後述べる好圧細菌の分離実験で得られた凍結培養液を解凍後, ZoBell 2216E¹¹⁾液体培地と同培地に0.5%アゾカゼインを添加したもの(プロテアーゼ活性測定用)3 mLに接種し, 酸素をよく曝気させた同量のフロリナート(FC-40型, オートクレープで滅菌済み)とともに滅菌済みのポリエチレンバッグ(Whirl-pak)に分注し, 27°Cにおいて3日間往復しんとう培養(振幅3.5 cm, 回転数60 rpm)した。培養後, 日立分光光度計(100-40型)を用いて培養液の濁度(OD₆₀₀)を測定し, 供試菌株の増殖量とした。また培地中に生産されるプロテアーゼ活性(OD₃₆₅)についても以下に述べる方法で測定を行った。

好圧細菌の分離 海底堆積物サンプル1 gを滅菌済みの海水で段階希釈後, その希釈液0.1 mLをZoBell 2216E液体培地29 mLに接種し, その3 mLを同量のフロリナートとともにポリエチレンバッグに分注し, 無気相状態にて密閉した。このバッグを加圧シリンダー¹¹⁾に装填し, 静水圧で1~600 atmに加圧し, 27°Cで3日間しんとう培養した。培養後, シリンダー内の圧力を常圧に戻し, 培養液の一部を再培養用に凍結保存し, 残りを微生物の増殖量測定に供した。常圧よりもむしろ加圧下において良好な増殖を示したサンプルは, 滅菌海水で段階希釈した後, 寒天平板培地に塗抹後, 27°Cで3日間静置培養し, 出現したコロニーから好圧細

菌を分離した。

プロテアーゼ活性測定方法¹²⁾ 微生物培養後のアゾカゼイン培地2 mLを遠心分離(10,000×g, 1分間)し微生物菌体を遠沈させた。この上清1.0 mLに同量の5%トリクロロ酢酸を加えて酵素反応を停止させた後, 培地中の未消化アゾカゼインを遠心分離して遠沈させた。この上清1.5 mLを同量の水で希釈した後, 培地中に遊離したアゾカゼイン色素を吸光度(OD₃₆₅)で測定し, プロテアーゼ活性とした。なお, ブランクには未接種培養液を用い, 同様に処理した。

好圧細菌の分類学的性状の検討 特に断りがない限りすべての性状試験は「Manual of Methods for General Bacteriology¹³⁾」の方法に準拠して行い, その培地にはZoBell 2216Eを用い, 培養温度27°Cで行った。好圧細菌の形態並びに運動性の有無は同培地組成で作製した斜面培地で2日間培養し, 位相差顕微鏡(ニコン, XF-21型)により観察した。また供試菌の鞭毛の有無は3日間培養の斜面培地上の細胞をコロジオン膜に固定し, 白金-パラジウムでシャドウ後, 日立H-600型電子顕微鏡により観察した。嫌気状態での増殖はBBLガスバックジャー中における増殖の有無から判定した。コロニーの形態は寒天平板で1週間培養後肉眼的に観察した。増殖温度は東洋TN-3型温度勾配培養器で培養(3-55°C)し, 増殖の有無から判定した。

加圧下におけるプロテアーゼの活性測定¹²⁾ 本実験によって得られた好圧微生物をバツフル付きの500 mL容三角フラスコ中で常圧下, 27°Cにおいて3日および6日間回転しんとう培養(180 rpm), 遠心分離によって菌体を除いた上清を粗プロテアーゼ溶液とした。この溶液1 mLと同量のpH 7.0の50 mM Tris-HCl緩衝液を前述のポリエチレンバッグに分注し, 37°Cで12分間ブリーインキュベーションした。その後, 基質として同緩衝液に溶解させた1%アゾカゼイン2 mLを加えた後, 高圧シリンダーに充填し, 37°C, 1-600 atm下において3時間反応させた。反応後, シリンダー内の圧力を常圧に戻し, 5%トリクロロ酢酸4 mLを加え酵素反応を停止させ, 遠心分離した上清について吸光度(OD₃₆₅)を測定し, プロテアーゼ活性とした。なお, ブランクには未接種培養液を用い, 同一条件で3時間反応後, 同様に処理した。標品プロテアーゼの活性測定は適量を緩衝液に溶解させた後, 粗プロテアーゼと同様にを行った。なお, 比較のために以下の標品プロテアーゼを()内の濃度に調製し, 同様に加圧下における活性を測定した。なお, 各プロテアーゼの濃度は上記条件で3時間ブリーインキュベーションした時のOD₃₆₅の増加量が約1.0になるように調製した。キモトリプシン(Sigma C-4129, 5.0×10⁻³ mg/mL), プロテイナーゼK(from *Tritirachium album*, Boeringer Mannheim GmbH, German, 1.0

$\times 10^{-3}$ mg/mL), サーモリシン (from *Bacillus thermo-
proteolyticus*, 生化学工業, 1.0×10^{-3} mg/mL)。

加圧下における α -アミラーゼ活性の測定¹⁴⁾ 1% 可溶性澱粉を添加した液体培地で供試菌を7日間しんとう培養後, 遠心分離した上清を粗アミラーゼ溶液とした。この溶液 1 mL と同量の緩衝液を 37°C においてプリンキュベーションした後, 同緩衝液に溶解させた 0.5% 可溶性澱粉 2 mL を加えた後, 高圧シリンダーに充填し 37°C, 1~600 atm で3時間反応させた。反応終了後シリンダー内の圧力を常圧に戻し, 1N 酢酸溶液 2 mL を加えて, 酵素反応を停止させた。この混合溶液 0.7 mL に 0.2 mL のヨウ素-ヨウ化カリウム溶液 (0.2% I_2 -2% KCl) を加え, さらに 6 mL の水で希釈した後, 吸光度 (OD_{690}) を測定し, α -アミラーゼ活性とした。これらのアミラーゼの濃度は上記条件で3時間インキュベーションした時の OD_{690} の増加量が約 1.0 になるように調製した。なお, 比較のために以下の標品アミラーゼを () 内の濃度に調製し, 同様に加圧下での酵素活性を測定した。 α -アミラーゼ (Sigma A-0521, 2.0×10^{-4} mg/mL), (Sigma A-6255, 2.0×10^{-4} mg/mL), (from *Bacillus subtilis* liquefying type 2.0×10^{-5} mg/mL, 生化学工業)。

結 果

フロリナート添加の有無による現場微生物の増殖およびプロテアーゼ活性 Table 2 にフロリナート添加の有無による No. 6 および No. 16 サンプルの増殖量とプロテアーゼ活性を示した。フロリナートを添加して培養したものは無添加のものに比べ, 増殖量並びにプロテアーゼ活性が顕著に高くなっていることから, 加圧培養における酸素の供給源として本品が適当であることが判明した。従って以後の培養にはすべてこのフロリナートを添加することにした。

好圧細菌の分離 Table 3 にこれら 16 サンプルの 27°C, 3 日間の加圧培養の増殖の結果を示した。これらのサンプルのうち, 2 サンプルのみが常圧よりもむしろ加圧下において良好な増殖を示した。そこでこれらのサンプルを寒天培地に塗抹し 3 日間静置培養後, 出現したコロニーを観察した結果, 両サンプルとも単一のコロニーであった。そこでこれらの微生物を分離し, それぞれを SA-6 および EN-16 と命名し諸性状を調べた。なお, 前者は相模湾の水深 1,400 m, また後者は遠州灘の水深 300 m からの分離菌であった。

好圧細菌の分類学的性状 Table 4 に SA-6 および EN-16 の分類学的性状を示した。SA-6 は単一の極鞭毛によって運動するグラム陽性の桿菌であり, また EN-16 菌は運動性のないグラム陰性の桿菌であった。これらの 2 株は絶対好気性菌であり, 酸素の非存在下での

Table 2. The effect of fluorinert on the growth and production of protease by the samples Nos. 6 and 16 under 1 atm

Sample	Growth (OD_{600})		Protease activity (OD_{365})	
	With fluorinert	Without fluorinert	With fluorinert	Without fluorinert
No. 6	0.622	0.270	0.467	0.089
No. 16	1.191	0.640	0.181	0.057

One g of sediment samples were inoculated into 29 mL of ZoBell 2216E broth (growth) and the same broth containing 0.5% azocasein (protease activity). An aliquot of 3 mL was incubated with the same volume of fluorinert FC-40 at 27°C for 3 days on the shaker. After incubation, bacterial growth and protease activity in the broth were determined.

Table 3. The growth of microorganisms in the sediment samples under increased pressure

Sample	Growth (OD_{600})		
	1 atm	300 atm	600 atm
No. 6	0.768	1.020	0.621
No. 16	0.326	1.332	0.666

One g of sediment samples were inoculated into 29 mL of ZoBell 2216E broth. An aliquot of 3 mL was incubated with the same volume of fluorinert FC-40 at 27°C for 3 days under increased pressure. After incubation, the bacterial growth was determined.

増殖は全く認められなかった。これらの 2 株のコロニーはいずれも白く, 丸い平らな隆起をしており, 寒天培地へのメラニンやその他の色素の生産は認められなかった。SA-6 および EN-16 菌の増殖温度 (至適温度) はそれぞれ 6.0~40.0°C (16.4~33.0°C) および 3.8~35.8°C (19.5~29.8°C) であった。2 株の増殖可能 pH 域はいずれも 6~9 であった。増殖 NaCl 濃度は SA-6 では 1.5~12%, また EN-16 菌では 3~9% であり, 0% では全く増殖しないことからこれらが海洋起源の細菌であることが示唆された。

以上の形態, 生理生化学的性状に基づいて Cowan and Steel の Diagnostic table¹⁵⁾ を用いて属の検索を実施したところ, SA-6 は *Kurthia* 属,¹⁶⁾ また EN-16 は *Acinetobacter* 属¹⁷⁾ の細菌と仮同定された。

加圧下におけるプロテアーゼおよび α -アミラーゼ活性 Tables 5 および 6 にそれぞれ加圧下におけるプロテアーゼおよび α -アミラーゼ活性の変化を示した。SA-6 の両酵素の活性は常圧が最も高く, 圧力の増加とともに減少した。しかしながら, EN-16 菌の両酵素の活性は常圧よりもむしろ加圧下において高く, 圧力の増加とともに増大した。一方, 標品プロテアーゼの中ではプロテイナーゼ K の活性がいずれの圧力においてもほぼ同じ値を示したものの, 標品の中には圧力によって活性が増大するものは存在しなかった。また, 標品 α -アミ

Table 4. Taxonomical characteristics of strains SA-6 and EN-16

Character	Strain	
	SA-6	EN-16
Gram stain	+* ¹	-
Colony pigment	-	-
Motility	+	-
Flagella	Polar	None
Oxidase	-	-
Catalase	+	-
O/F test	O* ²	O
Temperature range for growth(°C)	6.0~40.0	3.8~35.8
Optimum temperature range for growth(°C)	16.4~33.0	19.5~29.8
pH range for growth	6~9	6~9
NaCl conc. for growth (%)	1.5~12.0	3.0~9.0
Hydrolysis of Aesculin	+	+
Alginate	-	-
Casein	+	+
Chitin	-	-
DNA	+	+
Gelatin	+	+
<p>-</p> Nitrophenyl phosphate	+	+
Starch	+	+
Tributyrin	-	-
Tween 40	+	+
60	+	+
80	+	+
Urea	-	-
Nitrate reduction	+	-
Fluorescence	-	-
Voges-Proskauer reaction	-	-
Indole production	-	-
Utilization of carbohydrate (1%)		
Glucose	O	O
Sucrose	O	O
Maltose	O	O
Starch	O	O
Lactose	N	N
Galactose	O	N
Levulose	O	N
Arabinose	N	N
Rhamnose	N	N
Xylose	O	N
Mannose	O	N
Glycerol	O	N
Inositol	N	N
Sorbitol	N	N
Mannitol	O	N
Dulcitol	N	N

*¹ +, positive; -, negative*² O, oxidation; N, no action on carbohydrate

ラーゼの活性も常圧が高く、圧力の増加とともに減少した。

考 察

各海域から採集した海底堆積物サンプル合計 16 を加

Table 5. Protease activity of strains SA-6 and EN-16, and commercial product under increased pressure

Sample	Protease activity (% of at 1 atm)		
	1 atm	300 atm	600 atm
SA-6	100	49	36
EN-16	100	115	125
α -Chymotrypsin*	100	95	90
Proteinase K*	100	102	105
Thermolysin*	100	80	62
Trypsin*	100	95	76
Pronase*	100	84	68

* Commercial products

Table 6. α -Amylase activity of strains SA-6 and EN-16, and commercial products under increased pressure

Sample	α -Amylase activity (% of at 1 atm)		
	1 atm	300 atm	600 atm
SA-6	100	88	36
EN-16	100	114	132
α -Amylase (Sigma A-0521)*	100	89	89
α -Amylase (Sigma A-6255)*			
α -Amylase (Seikagaku Kogyo, Liquefying type)*	100	81	60

* Commercial products

圧培養したところ、加圧下での増殖が常圧よりも良好であるサンプルが 2 つ得られた。これらより寒天培地を用いて微生物の分離を行ったところ、それぞれ単一の細菌が分離され、それぞれを SA-6 (採集深度 1,400 m) および EN-16 (300 m) と命名した。これらの細菌の採集深度は他のサンプルに比べるとさほど深い深度ではなかったが、好圧細菌を取得することができた。本研究では培養温度 27°C、培養日数 3 日間という条件で好圧細菌の分離培養を行ったため、深海細菌の中にはこの条件に適さないものも数多く存在するものと推察される。特に深海環境は低温、低栄養であるため、これに適した培養条件を検討する必要があるだろう。

これまで、*Shewanella*¹⁸⁾、*Palaeococcus*¹⁹⁾ および *Moritella* 属²⁰⁾ からの好圧細菌が多く報告されているが、*Kurthia* や *Acinetobacter* 属からの好圧細菌の分離は今回が初めてである。しかしこれらはまだ仮同定であるので今後はこれらの細菌の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列から系統解析を行う必要があると思われる。

多くの細菌について圧力はその増殖を抑制するのみならず、細胞形態にも変化を与えることが知られている。ZoBell and Oppenheimer²¹⁾ は種々の海洋細菌を 600 atm 下で加圧培養し、*Bacillus abyssus* については孢子形成能の欠如や細胞サイズの変化を、また *Serratia*

marinorubra については運動性の欠如や糸状体細胞の形成を報告している。本研究でも、圧力の増加に伴い *Kurthia* sp. SA-6 は長桿菌から短桿菌へと、また *Acinetobacter* sp. EN-16 菌は短桿菌から長桿菌へと形態変化することが観察された（データ未発表）。

これらの細菌は加圧下においてよく増殖する、いわゆる好圧細菌であるが、これらの生産する酵素の加圧下における活性を調べたところ、EN-16 菌のプロテアーゼや α -アミラーゼは常圧よりも加圧下において高い活性を示したことから、深海環境へよく適合していると思われる。加藤らは²²⁾水深 6,500 m の海底堆積物から深海微生物を分離し、その生産するプロテアーゼについて性状を調べた。その結果、この酵素は現場圧（650 atm）において常圧の約 5 倍の活性を示した。また Kobori and Taga²³⁾ は水深 1,000 m の海水中より *Pseudomonas* sp. を分離し、この菌の生産するアルカリフォスファターゼについて調べたところ、1,000 atm において常圧の約 3 倍の活性を有していた。

このように深海微生物の生産する酵素の中には陸上微生物の生産するものとは異なり、加圧下において強活性を有するものが存在する。本研究で得られた分離株の酵素も加圧下において活性の増大が確認された。また生産する酵素を精製し、その諸性状や一次構造を明らかにするとともにそれをコードする遺伝子を単離し、加圧下における遺伝子の発現制御機構²⁴⁾ や生産されたタンパク質自身の高圧下への適合機構等の解明に向けた研究が課題となるであろう。

謝 辞

本研究において海底堆積物サンプルを恵与頂いた東京大学海洋研究所教授（現熊本県立大学教授）大和田紘一先生に感謝の意を表する。

文 献

- Jannasch HW, Taylor CD. Deep-sea microbiology. *Ann. Rev. Microbiol.* 1984; **38**: 487-514.
- ZoBell CE, Johnson FH. The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestrial and marine bacteria. *J. Bacteriol.* 1949; **57**: 179-189.
- Jannasch HW, Wirsén CO. Retrieval of concentrated and undecompressed microbial populations from the deep sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 1977; **33**: 642-646.
- 岡見吉郎, 今田千秋, 山縣民敏. 無気相高圧下で好圧微生物を培養, 分離, 保存するための新装置. 発酵工学会誌 1991; **69**: 163-167.
- Imada C, Kurasawa S, Okami Y. The effect of hydrostatic pressure on the growth of actinomycetes. *Trends in Actinomycetol.* 1989; **27**-29.
- Jannasch HW, Wirsén CO, Taylor CD. Deep-sea: Isolation in the absence of decompression. *Science* 1982; **216**: 1315-1317.
- ZoBell CE, Morita RY. Barophilic bacteria in some deep sea sediments. *J. Bacteriol.* 1957; **73**: 563-568.
- Yano Y, Nakayama A, Yoshida K. Population sizes and growth pressure responses of intestinal microfloras of deep-sea fish retrieved from the abyssal zone. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; **61**: 4480-4483.
- Yayanos AA, Dietz AS, Bostel RV. Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics. *Science* 1979; **205**: 808-809.
- Deming JW, Leslie KS, Straube WL, David GS, Michael TM. Isolation of an obligately barophilic bacterium and description of a new genus, *Colwellia* gen. nov. *System. Appl. Microbiol.* 1988; **10**: 152-160.
- ZoBell CE. Some effects of hydrostatic pressure on the multiplication and morphology of marine bacteria. *J. Bacteriol.* 1950; **60**: 771-781.
- Tomarelli RM, Charney J, Harding ML. The use of azocasein as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. *J. Lab. Clin. Med.* 1949; **34**: 428-433.
- Smerbert RM, Krieg NR. General characterization. In: Gerhardt P (ed) *Manual of Methods for General Bacteriology*, American Society of Microbiology, Washington. 1981; 409-443.
- Fuwa HJ. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *J. Biochem.* 1954; **41**: 583-603.
- Cowan ST, Steel KJ. (ed) *In Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 2nd. Cambridge University Press, London, England. 1974.
- Keddie RM, Shaw S. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, and Holt JG. (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore. 1986; 1255-1258.
- Baumann P, Doudoroff M, Stainer RY. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (Genus *Acinetobacter*). *J. Bacteriol.* 1968; **95**: 1520-1541.
- Nogi Y, Kato C, Horikoshi K. Taxonomic studies of deep-sea barophilic *Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 1998; **170**: 331-338.
- Takai K, Sugai A, Itoh T, Horikoshi K. *Palaeococcus ferropilus* gen. nov., sp. nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int. J. Syst. Evo. Microbiol.* 2000; **50**: 489-500.
- Nogi Y, Kato C. Taxonomic studies of extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench and description of *Moritella yayanosii* sp. nov., a new barophilic bacterial isolates. *Extremophiles*, 1999; **3**: 71-77.
- ZoBell CE, Oppenheimer CH. Some effects of hydrostatic pressure on the multiplication and morphology of marine bacteria. *J. Bacteriol.* 1950; **60**: 771-781.
- 加藤千明, 畠 修一, 伊藤 隆. 深海微生物研究の将来展望, 月刊海洋 1992, **10**: 637-644.
- Kobori H, Taga N. Extracellular alkaline phosphatase from marine bacteria: purification and properties of extracellular phosphatase from a marine *Pseudomonas* sp. *Can. J. Microbiol.* 1980; **26**: 833-838.
- Bartlett D, Wright N, Yayanos AA, Silverman M. Isolation of a gene regulated by hydrostatic pressure in a deep-sea bacterium. *Nature* 1989; **342**: 572-574.