特集 一 高圧カバイオサイエンスー

深海微生物の加圧応答

Pressure Response in Deep-Sea Microorganisms

加藤 千明

Chiaki KATO

Several baro(piezo)-philic microorganisms have been isolated from a deep-sea high hydrostatic pressure environment in our laboratory. The results of taxonomic studies showed that all of the barophile isolates belonged to Proteobacteria gamma-subgroup, and four novel species were identified. The moderately barophilic bacterium, *Shewanella violacea* strain DSS12 was one of them, and this strain was able to grow from atmospheric pressure (0.1 MPa) to 70 MPa conditions in the same way. Molecular mechanisms of pressure-regulation on gene expression in *S. violacea* were analyzed, and we identified particular DNA binding proteins that might be essentially important for pressure regulation. Atmospheric pressure adapted *Escherichia coli* that belonged to the same gamma-subgroup of the isolated barophilic species was also studied and we could observe the positive and negative effects on pressure regulation. Finally, we observed that hyper-thermophilic archaea could grow well under higher pressure conditions at higher temperatures. These results indicated that pressure could affect microorganisms' survival in several ways in such an environment.

[baro(piezo)-philic bacteria, deep-sea, high pressure, gene expression, pressure-regulated genes, *Escherichia coli*, hyperthermophilic archaea]

1. はじめに

深海環境は、定常的な高水圧下におかれた世界である。そうした環境に適応した深海微生物は、高水圧下を好んで生息し、「好圧性微生物」と呼ばれている。好圧性微生物は、Zobel と Morita により深海底において存在していることが予測されていたが[1]、加圧下における微生物の分離培養技術が開発されるまで、長いことその分離には成功していなかった。1979 年、Yayanos による深海に生息するヨコエビから好圧性微生物が分離された報告が、世界最初の報告となった[2]。その後、いくつかの好圧性微生物の分離が報告されてきたが、新種記載等の分類学的検討はあまりなされおらず、われわれが本格的に深海微生物研究 (DEEP-STAR プロジェクト) をスタートした 1990 年以前では、わずかに 2 種の報告があるにすぎなかった[3, 4]。

これは、深海底から無菌的にサンプルを採取することがそれほど容易ではなかったということと、深海高

水圧環境を研究室内に再現できる実験装置の開発に大変なコストと手間とがかかることに大きな原因があるといえる。幸いなことに、筆者の所属する海洋科学技術センターは、世界一の潜航深度を誇る、有人潜水調査船「しんかい 6500」[5]、並びに無人潜水ロボット「かいこう」[6]を保有し、また DEEPSTAR プロジェクト立ち上げのため、世界唯一ともいえる、深海現場環境を再現しその環境下で微生物の培養を可能とした「深海微生物実験システム」[7]の開発に成功した。筆者らは、こうした世界最先端のハードウェアを駆使し、深海環境からいくつもの好圧性微生物の分離に成功し、それらの性質を明らかにしてきた。本報告では当研究室で達成された、深海好圧性微生物の分離とその分類学的位置、並びにそれらの微生物の遺伝子発現における加圧応答のメカニズムについて記述する。そしてさらに、好圧性微生物以外の微生物、大腸菌や好熱性微生物等についての加圧応答についてもあわせて記述する。

2. 好圧性微生物の分離とその分類学的位置

潜水調査船「しんかい 6500」、「かいこう」を利用して、琉球海溝、日本海溝、伊豆小笠原海溝、並びに世界最深海域である、マリアナ海溝等から深海底泥を無菌的に採取し、これらのサンプルより、各種の好圧性細菌の分離に成功した[8-10]。Table 1 にこれまで当研究室において分離された代表的な好圧性細菌のリストを示す。

これらの細菌の 16S リボゾーム RNA をコードする遺伝子の全塩基配列を決定し、系統樹を作成したところ、Fig. 1 のようになった。分離された好圧性細菌は、そのすべてがグラム陰性細菌で、プロテオバクテリアガンマサブグループに属していた。種々の分類学的検討の結果、DSJ4 株、DSS12 株、DSK1 株、および DB21MT5 株が、新種の細菌であることが明かとなり、それぞれ、

Photobacterium profundum (DSJ4), *Shewanella violacea* (DSS12), *Moritella japonica* (DSK1), および *Moritella yayanosii* (DB21MT5) と命名し、報告した[11-14]。これらの新種微生物は、国際微生物種登録期間に登録申請を行い、記載された。

過去において、好圧性細菌の種としては、*Colwellia hadaliensis* [3] と *Shewanella benthica* [4] との 2 種しか記載がなされておらず、今回筆者らが 4 種の新種記載を行ったことにより、合計 6 種の好圧性細菌が種として同定されたことになる。以上の結果は、深海高水圧環境に適応した微生物、すなわち好圧性微生物は、その多様性においてあまり広くはなく、かなり限られた範囲に位置するものであることを示唆するものである。

Table 1. High pressure-adapted bacterial strains that have been isolated by the DEEPSTAR group

Bacterial strain	Properties	Source	Species	Reference
Extremely barophilic bacteria¹				
DB21MT-2	Optimal growth at 70 MPa, 10 °C No growth at less than 50 MPa	Mariana Trench, at 10,898 m depth	<i>Shewanella benthica</i>	[10, 14]
DB21MT-5	Optimal growth at 80 MPa, 10 °C No growth at less than 50 MPa	Mariana Trench, at 10,898 m depth	<i>Moritella yayanosii</i> *	[10, 14]
Barophilic bacteria²				
DB5501	Optimal growth at 50 MPa, 10 °C	Suruga Bay, at 2,485 m depth	<i>Shewanella benthica</i>	[8, 12]
DB6101	Optimal growth at 50 MPa, 10 °C	Ryukyu Trench, at 5,110 m depth	<i>Shewanella benthica</i>	[8, 12]
DB6705	Optimal growth at 50 MPa, 10 °C No growth at 0.1 MPa	Japan Trench, at 6,356 m depth	<i>Shewanella benthica</i>	[8, 12]
DB6906	Optimal growth at 50 MPa, 10 °C No growth at 0.1 MPa	Japan Trench, at 6,269 m depth	<i>Shewanella benthica</i>	[8, 12]
DB172F	Optimal growth at 70 MPa, 10 °C No growth at 0.1 MPa	Izu-Bonin Trench, at 6,499 m depth	<i>Shewanella benthica</i>	[9, 12]
DB172R	Optimal growth at 60 MPa, 10 °C No growth at 0.1 MPa	Izu-Bonin Trench, at 6,499 m depth	<i>Shewanella benthica</i>	[9, 12]
Moderately barophilic bacteria³				
DSS12	Optimal growth at 30 MPa, 8 °C	Ryukyu Trench, at 5,110 m depth	<i>Shewanella violacea</i> *	[8, 12]
DSJ4	Optimal growth at 10 MPa, 10 °C	Ryukyu Trench, at 5,110 m depth	<i>Photobacterium profundum</i> *	[8, 11]
DSK1	Optimal growth at 0.1 MPa, 10 °C	Japan Trench, at 6,356 m depth	<i>Moritella japonica</i> *	[8, 13]

¹, Extremely barophilic bacteria are defined as bacteria that are unable to growth at pressures below 50 MPa but able to grow well at 100 MPa. ², Barophilic bacteria are defined as those displaying optimal growth at a pressure of more than 40 MPa. ³, Moderately barophilic bacteria are defined as displaying optimal growth at a pressure of less than 40 MPa, and which are able to grow well at atmospheric pressure. *, Novel deep-sea species reported by DEEPSTAR group.

これは、恐らく、そうした微生物が深海環境、すなわち高水圧・低温といった極めて安定した環境に生息していることが原因であると考えられ、長い生物進化の歴史の中で、ひっそりと過去の形質を維持したまま生き延びてきた可能性が高いと思われる。ならば、こ

うした微生物のもつ遺伝子発現の特徴は、生命進化の原形をとどめたものである可能性が高い。そうした興味から、好圧性細菌の遺伝子発現の加圧応答におけるメカニズムの解明を試みた。次章にその概要について述べる。

Fig. 1. Phylogenetic tree showing the relationships between isolated deep-sea barophilic bacteria within the gamma-subgroup of Proteobacteria and genus *Bacillus* as determined by comparing 16S rDNA sequences 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 %.

3. 好圧性細菌、*Shewanella violacea* DSS12 株における加圧応答遺伝子の単離とその応答メカニズム

Shewanella violacea DSS12 株は、その生育至適圧力を 30 MPa にもつ好圧性細菌であるが、大気圧下 (0.1 MPa) でも高水圧下 (70 MPa) でもその生育に大きな差が見られない、Moderately な好圧菌である [8, 12]。したがって、遺伝子発現の加圧応答メカニズムを検討するための材料として最適であると考え、本菌株から、加圧応答遺伝子のクローニング並びにその解析を行った。

得られた加圧応答遺伝子は、2つの ORF からなるオペロンを構成しており、加圧応答オペロンと名付けた [15]。本オペロンの上流に、プロモーター領域が存在し、本領域からの転写は加圧に应答して転写量が増加した。興味深いことに、本遺伝子オペロンは、好圧性 *Shewanella* 属細菌 (*S. benthica* と *S. violacea*) にのみ検出され、同属の他の菌株では全く検出されなかった [16]。したがって、本遺伝子の発現は、これらの微生物における好圧性に本質的に関わっている可能性が

考えられた。そこで、特に本遺伝子のプロモーター領域における塩基配列構造の解析と、そこに結合解離する DNA 結合蛋白質の加圧応答について詳細に検討を行った。Fig. 2 に本プロモーターの構造とゲルシフトアッセイによる、DNA 結合蛋白質の各圧力下における結合解離の結果をモデル化したものを示す。

プライマー伸長法による転写開始点の解析の結果、本プロモーター領域には、5カ所の転写開始点が存在することが示され、加圧下では、そのすべての転写開始点から活発にその転写発現が確認された [15]。それに対し、大気圧下では、下流の2カ所の転写開始点からのみ、しかもわずかの転写量が見いだされたのみであった。塩基配列の解析から、region A と名付けた下流の転写開始点を含む領域に、大腸菌のシグマ 54 因子が認識する塩基配列と極めて高い相同性を持つ配列を見だし、ここにこうしたシグマ因子が結合し転写発現を促している可能性が示唆され、事実、大腸菌のシグマ 54 因子がここに結合することが確認された。

Fig. 2. Summary of binding of trans-acting factors to the region upstream of the pressure-regulated operon of the deep-sea barophilic *Shewanella violacea* strain DSS12 under atmospheric pressure (0.1 MPa) and high pressure (50 MPa) conditions.

Vertical shading; 13 copy octamer repeat sequence,

Diagonal hatching; Palindrome structure, Dotted shading; σ^{54} consensus sequence.

S. violacea のシグマ 54 様因子は、大気圧下よりも加圧下において本 region A により多く結合し、そのことが転写量の増加に反映しているものと思われた。

また一方、プロモーター上流域の region B と名付けた 3 つの転写開始点を含む領域には、8 塩基対 13 回からなる特徴的な繰り返し配列が見いだされ、その直後にパリンドローム構造を構成する塩基配列が確認された。本領域には、大気圧下において領域全体をカバーするようなインヒビターと思われる DNA 結合蛋白質が被いかぶさり、転写を阻害していると考えられた。また、高圧下においては、インヒビターの代りにアクチベーターと思われる、少なくとも 3 つの DNA 結合蛋白質が結合して、転写発現を促していることが示された[17]。

今後、これらの転写因子を精製しその性質をより詳細に解析しなければならないが、こうした加圧応答の遺伝子発現における分子メカニズムの報告はまだほとんどなされていないので、パイオニア的研究として強力に推進していきたい。

4. 他の微生物における加圧応答

4.1 大腸菌の場合

大気圧下の環境に適応している大腸菌は、分類学的にプロテオバクテリアガンマサブグループに属し、好圧性細菌群とは比較的近縁関係に位置している (Fig. 1 参照)。そこで、大腸菌には深海微生物と同様に圧力に対して制御される遺伝子発現システムが存在しているかどうか、分子生物学的な手法を用いて検討を行った。その結果、プラスミド上にコードされた、糖代謝に関わる重要な遺伝子である *lac* オペロンのプロモーターにおいて、顕著な加圧による遺伝子発現の促進が見いだされ、30 MPa においてその程度は常圧下と比

較して約 100 倍に達した[18, 19]。本遺伝子は 1 気圧下においては通常の条件では発現せず、プロモーター領域の下流に存在するオペレーターといわれる部分に抑制蛋白質 (LacI) が結合している。しかしながら、IPTG 等の発現誘導化学物質が存在すると抑制蛋白質のオペレーター部位からの解離を促し、遺伝子発現のスイッチがオンになることが知られている。加圧による本遺伝子発現の増強は、そうした化学誘導物質による作用に匹敵した (Table 2)。抑制蛋白質 LacI の発現は各圧力下において構成的 (耐圧的) であるのに対し、*lac* プロモーターの発現は 30 MPa において特異的に転写が開始 (好圧的) されている現象が見いだされた[20]。このことは、30 MPa という加圧下での *lac* プロモーターによる遺伝子発現増幅は、抑制蛋白質の量的な減少によるものではなく、抑制蛋白質のオペレーター部位への結合が圧力特異的に阻害されることによるものであると考えられる。これは、化学誘導物質による遺伝子発現調節と極めて機構がよく似ている。本プロモーターの発現は、上述したようになり複雑な遺伝子制御機構に支配されているが、圧力という極めてシンプルな物理的な要因によっても発現しうるという知見が、ここで初めて明らかとなった。この結果から、生命の発生当時、もともと圧力制御されていた遺伝子が進化の過程で大気圧下に適応していくなか、複雑な遺伝子発現制御機構を獲得していったものと考えられることもできる。本知見は、遺伝子発現制御という、高度に進化したシステムが最もプリミティブな、圧力制御という方法で作用しうるという可能性を最初に示唆したものである。

次に、ラムダファージを大腸菌に感染させ、ファージプラークを形成させるとき、培養時の圧力を徐々に上げていくと、30 MPa の加圧下においてファージプラークの形成が完全に失われる現象を見いだした[21]。

Table 2. Pressure-regulation on gene-expression by several promoters in *E. coli*.

Promoters	Inducer*	Enzyme activity (unit/mg of protein)** at different pressures during growth				
		0.1 MPa	10 MPa	20 MPa	30 MPa	40 MPa
<i>Plac</i> -CAT	+	7060				
	-	127	718	2040	11900	1460
<i>PmalK-lamB</i> -CAT	+	174	64.8	26.7	10.9	10.8
	-	20.5	14.3	15.9	25.1	9.3
<i>PmalE-F-G</i> -CAT	+	326	205	57.2	17.9	18.3
	-	27.5	22.4	27.9	37.9	16.9

*; Inducer was present at 0.2 % for maltose (*PmalK-lamB* and *PmalE-F-G*) or 0.05 mM IPTG (*Plac*)

**; Amount of CAT activity in *E. coli* JM109 carrying various plasmids when grown at different hydrostatic pressures.

また一方、大腸菌における、外膜蛋白質の発現と加圧の影響を調べた実験から、浸透圧により発現調節を受ける OmpF, C が、圧力センシティブに加圧下でその存在量が減っていくことがわかったが、同時に OmpX と命名されたもうひとつの外膜蛋白質がドラスティックに減少することを見いだした[22]。その後、この OmpX を精製し、N 末端からのアミノ酸配列を決定したところ、本蛋白質は、ラムダファージの受容蛋白質として知られている LamB 蛋白質であることが判明した。これら 2 つの独立して行なわれた実験結果はここで関連性を持ち、LamB 蛋白質の遺伝子発現が、ネガティブな圧力制御を受ける可能性を示唆した。LamB の遺伝子発現は、*malB* オペロンの活性化によって引き起こされることが知られている。すなわち、*malB* オペロンに含まれる *malK-lamB* 方向の転写と、その逆方向の *malE-F-G* の転写が、誘導物質としてのマルトースの添加によりその両方向のプロモーターを含む領域 (*malB* 調節インターバル領域) の活性化を促すという遺伝子制御の仕組みが解明されている[23]。そこで、加圧により *malB* 調節インターバル領域の発現調節がどうなるかレポーター遺伝子、CAT (クロラムフェニコールアセチル転移酵素) を用いて調べた。Table 2 にその結果を示した。その結果、誘導物質の存在しない条件下においては、圧力によって遺伝子発現が引き起こされるということではなかったが、誘導物質存在下、加圧にしたがって発現が抑制されるという現象を見いだした。そして、30 MPa 以上の加圧下において、誘導物質

なしの発現のレベルを下回り、全く発現が起こっていないことが示唆された。以上の結果から、本項の初めに述べた加圧によるラムダファージのプラーク形成の抑制は、ファージ受容蛋白質である LamB 蛋白質の遺伝子発現の加圧による抑制によるものであることが示された[21]。

以上の結果から、大気圧下に適応した大腸菌においても加圧応答する遺伝子発現の機構が存在することが明らかとなった。

4.2. 超好熱性古細菌の場合

深海環境からは、熱水鉱床のようなところからいくつもの超好熱性微生物が単離されている。筆者らの研究室においても、いくつかの新種の超好熱性微生物を分離しその性質について報告している[24-28]。この中から 2 種の超好熱性古細菌、*Thermococcus peptonophilus* [25]、*Pyrococcus horikoshii* [26] を選び、深海微生物実験システム[7]を用いて高温下での加圧培養実験を行った。Fig. 3 にこれらの微生物の生育プロファイルの結果を示す[29, 30]。

大気圧下における *T. peptonophilus* の生育至適温度は 85-90 °C で、95 °C を越える温度では全く生育が認められなかった。しかしながら、Fig. 3A に示されたように、この大気圧での生育限界温度の 95 °C において、加圧下の条件下でのみ良好に生育し絶対好圧性を示した。なおこの時の生育至適圧力は、45 MPa であった。

Fig. 3. Effect of pressure on growth rate of *T. peptonophilus* (A) and *P. horikoshii* (B) at various temperatures. The growth rate is shown as $1/t_d$, where t_d represents the doubling time (in hours)

また一方、大気圧下における *P. horikoshii* の生育至適温度は 95 °C であるが、100 °C では好圧的な生育プロファイルを示した (Fig. 3B)。さらに、大気圧下での生育限界温度の 103 °C において、30 MPa の条件でのみ良好な生育を示し、ここでも絶対好圧性が観察された。

これまで筆者らは、深海環境より分離された好圧性細菌の生育に対する圧力の影響を精力的に調べてきているが、これらの微生物は共通して、より低温環境では耐圧的なプロファイルを示し、高温環境では好圧的なプロファイルを示すことを指摘してきた[8]。すなわち Fig. 3 で示された結果は、超好熱性古細菌においても、全く同様であることを示しており、そうした微生物の生育に対する圧力特性は、多くの微生物において普遍的な特徴の一つである事が考えられた。事実大腸菌においても、その大気圧下の生育限界温度である 50 °C において、100 気圧、200 気圧と加圧するに従い菌体量が増加したという報告[31]がなされている。

5. おわりに

高水圧が微生物にいかなる影響を与えるかという研究は、食品加工における加圧滅菌の技術の開発とともに大きく進展してきた。しかしながら、そうした技術における加圧のレベルは数千気圧以上の超高压であることが多く、私たちの生物圏の限界圧力である、1000 気圧以下の圧力での生物の応答に関する研究は、比較的遅れてきている感がある。筆者らは、生物の生息しうる高水圧環境である「深海」環境より微生物を分離し、その性質の解明を行い、そうした高水圧が生命活動にいかなる影響を与えるかという疑問の回答を得るために研究を続けている。本稿では、深海からの好圧菌の分離と多様性に関する報告と、そうした微生物における遺伝子発現の加圧応答機構、また大気圧下に適応した大腸菌における圧力応答の報告について、これまでの筆者らの成果をまとめたものである。そして、熱水鉱床から分離された、超好熱性古細菌がその生育限界温度において好圧性を示すという、極めて興味深い結果も加えた。現在生命の発生と進化が深海環境を舞台になされてきたと考える研究者が増えてきているが、こうした高水圧下における生命活動の解明は、そうした知見に本質的に貢献するものであると考える。

参考文献

- [1] C. E. Zobel, R. Y. Morita: J. Bacteriol., **73**, 563-568 (1957), "Barophilic bacteria in some deep-sea sediments".
- [2] A. A. Yayanos, A. S. Dietz, R. V. Bostel: Science **205**, 808-810 (1979) "Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics".
- [3] J. W. Deming, L. K. Somers, W. L. Straube, D. G. Swartz, M. T. MacDonell: Syst. Appl. Microbiol., **10**, 152-160 (1988), "Isolation of an obligately barophilic bacterium and description of a new genus, *Colwellia* gen. nov".
- [4] J. W. Deming, H. Hada, R. R. Colwell, K. R. Luehrsén, G. E. Fox: J. Gen. Microbiol., **130**, 1911-1920 (1984), "The nucleotide sequence of 5S rRNA from two strains of deep-sea barophilic bacteria".
- [5] S. Takagawa, K. Takahashi, T. Sano, Y. Mori, T. Nakanishi, M. Kyo: Oceans'89, **3**, 741-746 (1989), "6500 m deep manned research submersible "Shinkai 6500" system".
- [6] M. Kyo, E. Miyazaki, S. Tsukioka, H. Ochi, Y. Amitani, T. Tsuchiya, T. Aoki, S. Takagawa: Oceans'95, **3**, 1991-1996 (1995), "The sea trial of "KAIKO", the full ocean depth research ROV".
- [7] M. Kyo, T. Tsuji, H. Usui, T. Itoh: Oceans'91, **1**, 419-423 (1991), "Collection, isolation and cultivation system for deep-sea microbes study: concept and design".
- [8] C. Kato, T. Sato, K. Horikoshi: Biodiv. Conserv., **4**, 1-9 (1995), "Isolation and properties of barophilic and barotolerant bacteria from deep-sea mud samples".
- [9] C. Kato, N. Masui, K. Horikoshi: J. Mar. Biotechnol., **4**, 96-99 (1996), "Properties of obligately barophilic bacteria isolated from a sample of deep-sea sediment from the Izu-Bonin trench".
- [10] C. Kato, L. Li, Y. Nogi, Y. Nakamura, J. Tamaoka, K. Horikoshi: Appl. Environ. Microbiol., **64**, 1510-1513 (1998), "Extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a depth of 11,000 meters".
- [11] Y. Nogi, N. Masui, C. Kato: Extremophiles, **2**, 1-7 (1998), "*Photobacterium profundum* sp., nov., a new species isolated from a deep-sea sediment".
- [12] Y. Nogi, C. Kato, K. Horikoshi: Arch. Microbiol., **170**, 331-338 (1998), "Taxonomic studies of deep-sea barophilic *Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. nov".
- [13] Y. Nogi, C. Kato, K. Horikoshi: J. Gen. Appl. Microbiol., **44**, 289-295 (1998), "*Moritella japonica* sp.

- nov., a novel barophilic bacterium isolated from a Japan Trench sediment".
- [14] Y. Nogi, C. Kato: *Extremophiles*, **3**, 71-77 (1999), "Taxonomic studies of extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench and description of *Moritella yayanosii* sp. nov., a new barophilic bacterial isolate".
- [15] C. Kato, A. Ikegami, M. Smorawska, R. Usami, K. Horikoshi: *J. Mar. Biotechnol.*, **5**, 210-218 (1997), "Structure of genes in a pressure-regulated operon and adjacent regions from a barotolerant bacterium, strain DSS12".
- [16] L. Li, C. Kato, Y. Nogi, K. Horikoshi: *FEMS Microbiol. Lett.*, **159**, 159-166 (1998), "Distribution of the pressure-regulated operons in deep-sea bacteria".
- [17] K. Nakasone, A. Ikegami, C. Kato, R. Usami, K. Horikoshi: *Extremophiles*, **2**, 149-154 (1998), "Mechanisms of gene expression controlled by pressure in deep-sea microorganisms".
- [18] C. Kato, T. Sato, M. Smorawska, K. Horikoshi: *FEMS Microbiol. Lett.*, **122**, 91-96 (1994), "High pressure conditions stimulate expression of chloramphenicol acetyltransferase regulated by the *lac* promoter in *Escherichia coli*".
- [19] T. Sato, C. Kato, K. Horikoshi: *J. Mar. Biotechnol.*, **3**, 89-92 (1995), "Effect of high pressure on gene expression by *lac* and *tac* promoters in *Escherichia coli*".
- [20] T. Sato, C. Kato, K. Horikoshi: paper in preparation..
- [21] T. Sato, Y. Nakamura, K. K. Nakashima, C. Kato, K. Horikoshi: *FEMS Microbiol. Lett.*, **135**, 111-116 (1996), "High pressure represses expression of the *malB* operon in *Escherichia coli*".
- [22] K. Nakashima, K. Horikoshi, T. Mizuno: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 130-132 (1995), "Effect of hydrostatic pressure on the synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli*".
- [23] M. Debarbouille, H. A. Shuman, T. J. Silhavy, M. Schwartz: *J. Mol. Biol.*, **124**, 359-371 (1978), "Dominant constitutive mutations in *malT*, the positive regulator gene of the maltose regulation in *Escherichia coli*".
- [24] T. Kobayashi, Y. S. Kwak, T. Akiba, T. Kudo, K. Horikoshi: *Syst. Appl. Microbiol.*, **17**, 232-236 (1994), "*Thermococcus profundus* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeum isolated from a deep-sea hydrothermal vent".
- [25] J. M. Gonzalez, C. Kato, K. Horikoshi: *Arch. Microbiol.*, **164**, 159-164 (1995), "*Thermococcus peptonophilus* sp. nov., a fast-growing, extremely thermophilic archaeobacterium isolated from deep-sea hydrothermal vents".
- [26] J. M. Gonzalez, Y. Masuchi, F. T. Robb, J. W. Ammerman, D. L. Maeder, M. Yanagibayashi, J. Tamaoka, C. Kato: *Extremophiles*, **2**, 123-130 (1998), "*Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent at the Okinawa Trough".
- [27] R. Grote, L. Li, J. Tamaoka, C. Kato, K. Horikoshi, G. Antranikian: *Extremophiles*, **3**, 55-62 (1999), "*Thermococcus siculi* sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent at the Mid-Okinawa Trough".
- [28] K. Takai, A. Inoue, K. Horikoshi: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, in press (1999), "*Themoaerobacter marianensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic extremely thermophilic marine bacterium from the 11,000 m deep Mariana Trench".
- [29] F. Canganella, J. M. Gonzalez, M. Yanagibayashi, C. Kato, K. Horikoshi: *Arch. Microbiol.*, **168**, 1-7 (1997), "Pressure and temperature effects on growth and viability of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus peptonophilus*".
- [30] C. Kato: *J. Jap. Oil Chem. Soc.*, **46**, 517-523 (1997), "Genomic analyses of hyper thermophilic archaea".
- [31] R. E. Marquis: *Advances in Microbial physiology* **14**, 159-241 (1976), "High pressure microbial physiology".

[1999年2月18日 受理]