

いい湯だな～ここは温泉 好熱菌の湯～

福田 青郎・今中 忠行*

我が国「日本」には、さまざまな火山がある。時として火山は災害を引き起こすが、その反面、日本を含む火山帯に多くのメタンハイドレート（燃える氷）が存在することは、エネルギー確保の観点から幸運である。また火山は温泉という“憩い”をプレゼントしてくれる。世界中を見渡しても、日本人ほど温泉を楽しみ尽くしている民族はいないだろう。いや、日本“人”だけでなく日本に住むさまざまないきものが温泉の恩恵を受けている。だが一口に温泉といっても、その成分・温度はさまざまである。いくら温泉好きでも、好き好んで100°C近い温泉に入る人はいない。ところがこの人が入ると火傷……で済めば幸運といえるような熱水中にも、生命は存在している。むしろ彼らは温泉の外では生きられない、究極の温泉好きである。本稿ではこの熱水環境そのものや、熱水環境に住む生物・好熱菌を紹介し、その好熱菌を捕まえる方法を紹介したい。

プレートテクトニクス

日本は非常に地震と火山が多い国だが、原因はその立地にある。まず日本の置かれた環境について説明したい。地球の表面は十数枚の岩盤でできたプレート（リソスフェア）で覆われている¹⁾。いわゆる“プレートテクトニクス”という理論である。このプレートは地球の内部の動きに合わせて動き、境界で生成・消滅を続けている。日本という国はこのうち、北アメリカプレート、太平洋プレート、ユーラシアプレート、フィリピン海プレートといったプレートの境界に位置している。この太平洋東部でできた太平洋プレートが北アメリカプレートやフィリピン海プレートに衝突し沈み込む境界が、それぞれ日

本海溝やマリアナ海溝にあたる。この時のプレートが衝突しながら移動する事で、沈み込み面やプレート内部に力の歪が生じ、この力が解放されるときに地震が起こる。またこの沈み込んだ海洋プレートに含まれる海水が地中でマンツルの融点を下げるため、マグマが生成し火山ができる。さらにこのマグマで水が温められて温泉となる(図1)。日本に地震と火山・温泉が多い理由は、上述のような日本の立地が原因である。さらに言うと日本の土地は海洋プレートの沈み込みに伴うプレート堆積物などの積み重ね(付加体の成長)で形成された。我々の住む土地からして、プレートの沈み込みがあったからこそできあがったのだ。

一方で日本からは少し離れるが、プレートが生産される場所・海嶺付近で、生命科学の歴史上重大な発見があった。海嶺の中心部には深い溝(中軸谷)があり、ここでマンツルが上昇してくる。そしてマグマが生成して中軸谷の海底に上昇して海水に触れ、冷却されて板状の新しい海洋プレートを作る。またこのマグマに温められた海水が噴き出すのが熱水噴出孔である。1976年、太平洋プレートが生ずる東太平洋海嶺の支脈で、硫化物からなる黒い煙の様なものを噴き出す熱水噴出孔“ブラックスモーカー”が発見された。熱水噴出孔では地球内部から出てくる還元性物質を利用して炭酸固定を行う微生物を底辺として、その孔周辺にチューブワーム、二枚貝、カニ・エビといった真核生物まで存在しており、複雑な生物社会が成立している。この発見は後述の好熱菌研究、そして生命起源の謎を解く足掛かりとして、非常に重要であった。

好熱菌・超好熱菌

地球上には数多くの微生物が生存するが、その9割以上は純粋分離不可能だと言われている。その原因は、生育の条件が不明であるためであり、この「生きていけれども培養できない」という状態をVBNCまたはVNC(viable but non-culturable)と呼ぶ²⁾。しかし微生物の生育に関する理解が深まるにつれ、徐々にVBNC菌の数は減ることになる。これまでもVBNCという言葉が一般化するよりも前ではあるが、人間が住めないよう

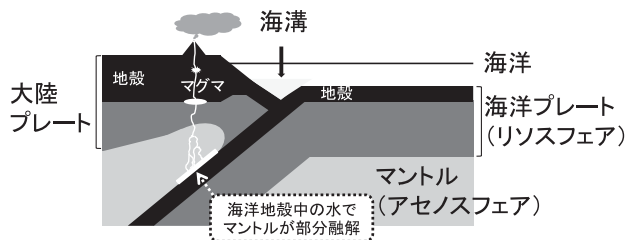


図1. 沈み込み帯のマグマ活動

*著者紹介 立命館大学生命科学部生物工学科(教授) E-mail: imanaka@sk.ritsume.ac.jp

な極限環境に対する理解は、生命への理解を一気に広げ、さまざまな微生物の培養を可能にしてきた。たとえばよく知られた極限環境の一つとして高温環境が挙げられる。高温環境に住む微生物・好熱菌の存在が知られて以来、どんどん新しい好熱菌が見つかってきた。

好熱菌の定義としては、至適生育温度が45°C以上、あるいは生育限界温度が55°C以上の微生物であり、特に65°C以上で生育可能なものを中等度好熱菌、75°C以上で生育可能なものを高度好熱菌と呼ぶ。さらに至適生育温度が80°C以上、あるいは生育限界温度が90°C以上のものを超好熱菌と呼ぶ。好熱菌は陸上温泉や海底の熱水噴出孔などの熱水環境だけでなく、発酵熱により高温となった堆肥などでも発見されている。その発見は古く、1920年に中等度好熱菌 *Geobacillus stearothermophilus* (至適生育温度55–65°C) の発見が報告されている³⁾。その後1969年に高度好熱菌 *Thermus aquaticus* (至適生育温度70°C) に関する報告がなされた⁴⁾。さらに1980年には超好熱菌である *Sulfolobus solfataricus* (至適生育温度85°C) の報告がなされ、今なお世界各地から新たな好熱菌発見の報告が続いている⁴⁾。日本でも1974年に伊豆の峰温泉から単離された *Thermus thermophilus* の報告を皮切りに、さまざまな好熱菌の報告がなされている⁴⁾。

一言で好熱菌といっても、その性質はさまざまで、(通性/偏性)好気性/嫌気性・硫黄依存性・硝酸還元性・好酸性・独立栄養/従属栄養菌など、多種多様である。一般に好熱菌の場合好気性菌も多いが、超好熱菌になると嫌気性菌の方が多くなる傾向がある。通性好気性・微好気性を含めて好気性の超好熱菌としては *Aquifex* 属 (至適生育温度85°C) や *Sulfolobus* 属 (至適生育温度65–85°C), *Aeropyrum* 属 (至適生育温度90–95°C), *Pyrolobus* 属 (至適生育温度106°C), *Pyrobaculum aerophilum* (至適生育温度100°C) などが挙げられるが、これら以外のほとんどの超好熱菌が嫌気性菌である^{4,5)}。また好熱菌の中には *Thermoplasma* 属 (至適生育温度55–59°C, 至適生育pH 1-2) や *Sulfolobus* 属 (至適生育pH 2–4.5) のような好酸性菌もあるし、北海道で単離された *Picrophilus* 属 (至適生育温度60°C) に至ってはpH 0 (至適生育pH 0.7) の環境でも生育する⁴⁾。さらには好熱菌の中にはさまざまなメタン生成菌が存在するし、*Thermococcus* 属 (至適生育温度75–88°C) などでは元素硫黄を主たる最終電子受容体として硫黄存在下では硫化水素を生産するが、硫黄非存在下ではプロトンに電子を与え水素を生産するものも多い⁴⁾。

好熱菌は高い温度領域で生息することから、細胞内のタンパク質は基本的に高度な耐熱性を示す事が予想さ

れ、安定な有用生体触媒の供給源として期待される⁶⁾。一般に酵素は基質特異性が高く、触媒としては優秀であるが、割と低い温度で変性・失活するという弱点がある。その点耐熱性酵素ならば、熱どころか有機溶媒・界面活性剤などの変性剤にも耐性が高いことや、長期間の保存がきくなど、工業的に有利である。このもっとも実用化に成功した例として、好熱細菌 *T. aquaticus* 由来耐熱性DNAポリメラーゼ (Taq ポリメラーゼ) が挙げられる。Kary B. Mullisは、このTaq ポリメラーゼを用いたPCRの研究により、1993年にノーベル化学賞を受賞しており、分離源のイエローストーン国立公園には、*T. aquaticus* の電子顕微鏡写真が掲示されている。その後、*Thermococcus kodakarensis* (至適生育温度85°C) や *Pyrococcus furiosus* (至適生育温度100°C) などの超好熱菌由来ポリメラーゼが取得され、高い正確性を有するポリメラーゼとして販売されるようになった。

上記のような工業への応用と期待がある一方で、好熱菌は生命進化の観点からも非常に興味深い。地球上にすむ生物が共通して有している16S/18S rRNA 遺伝子配列を元に進化系統樹を作製すると、大きく三つのドメインに分かれる。すなわち真核生物とバクテリア (細菌)、そしてアーキア (始原菌) である (図2)。この系統樹を見ると、我々を含む真核生物はアーキアから枝分かれして進化したように見えるが、真核生物の成り立ち、特にミトコンドリアや葉緑体の成り立ちにはバクテリアも絡んでいると考えられている。また根の近傍には至適生育温度が80°Cを超える超好熱菌が位置している (図2太線)。このことから超好熱菌は生命の起源である可能性

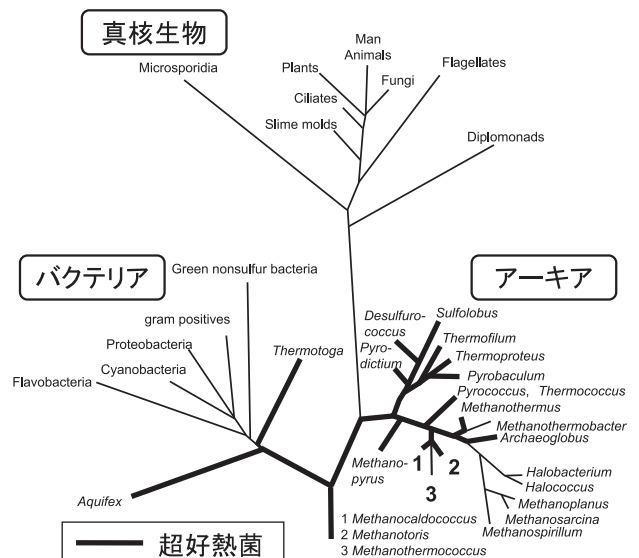


図2. 16S/18S rRNA 遺伝子配列を基に作製された系統樹

が高いと考えられている。特に海底の熱水噴出孔で地球最初の生命が誕生した(生体分子が合成される反応の場だった)という考えは、さまざまな生命起源に関する説がある中でも多く人に支持されている⁷⁾。さらにこの現存する超好熱菌の中には原始の代謝を予想させるものがあり、この微生物は非常に興味深い存在である。その一方で現存する多くの生物は常温で生育することから、生物進化の過程で低温に適応していったのだろう。

好熱菌の分離源としての温泉

それでは好熱菌の捕まえ方について記述したい。好熱菌に限らず、微生物のスクリーニングを行う際は、欲しい微生物の特徴に合わせたサンプル、および培養条件が必須となる。一口に好熱菌と言っても前述の通りさまざまな特徴を持った好熱菌があるので、単離したい菌の種類がはっきりしている場合は、過去の文献を参考に培養条件を定めるのがよい。本稿では培養条件よりも、好熱菌を取得・単離する際の全般的な注意について記述したい。

まず好熱菌のいそうな場所の環境サンプルを採取する必要がある。超好熱菌は海底の熱水噴出孔などに生息する事が多いが、この場合潜水艇や無人探査機が必要となり、通常気軽に海底に行くことはできない。日本という土地柄、比較のお手軽なサンプル源は、温泉の源泉である。そこでまず、分離手法に先だてて“日本の温泉”の説明をする。

日本の法律で“温泉”とは、『地中からゆう出する温水、鉱水及び水蒸気その他のガス(炭化水素を主成分とする天然ガスを除く)で、別表に掲げる温度又は物質を有するものをいう。(温泉法第二条)⁸⁾』と定められており、温泉源から採取されるときに温度が25°C以上、または特定の鉱物を含む水を“温泉”と呼ぶ。また環境省が定める鉱泉分析法指針では地中からゆう出する温水(25°C以上)、および特定の鉱物を含む水を鉱泉と呼び、常水と区別する⁹⁾。さらにこの鉱水は、冷鉱泉(25°C未満)・微温泉(25°C以上34°C未満)・温泉(34°C以上42°C未満、狭義の温泉)・高温泉(42°C以上)の4種類に分類される。以上の通り日本の法律で言う“温泉”とは必ずしも高温であるわけではないため、当然好熱菌がない“温泉”も存在しうる。そのため好熱菌分離のためにサンプル採取を行う場合、事前に源泉温度を確認しておく必要がある。

温泉はその温度以外にもpHや1kg中の溶存物質総量ないし凝固点によっても分類される。また鉱泉のうち特に治療の目的に供しうるものを療養泉といい、温泉地の看板には以下のような表示が掲げられている事が多い⁹⁾。

- ①単純温泉(鉱物分・ガス分の含有量が少ない温泉)
- ②二酸化炭素泉(遊離炭酸1g/kg以上)
- ③炭酸水素塩泉(溶存物質量が1g/kgを超え、主たる陰イオンが炭酸水素イオン)
- ④塩化物泉(溶存物質量が1g/kgを超え、主たる陰イオンが塩化物イオン)
- ⑤硫酸塩泉(溶存物質量が1g/kgを超え、主たる陰イオンが硫酸イオン)
- ⑥含鉄泉(総鉄20mg/kg以上)
- ⑦含アルミニウム泉(アルミニウム100mg/kg以上)
- ⑧含銅-鉄泉(銅イオン1mg/kg以上)
- ⑨硫黄泉(総硫黄2mg/kg以上)
- ⑩酸性泉(水素イオン1mg/kg以上)
- ⑪放射能泉(ラドン3nCi/kg以上)

温泉から好熱菌を分離する場合、泉質も考慮に入れて培養を行うとよい。たとえば海岸沿いの温泉は海水が温められたものであることが多く、塩化物泉である事が多い。微生物の培養では塩分濃度も重要な生育の要素であるので、このようなサンプルからの微生物分離では、培養の際に培地に塩分(人工海水)を添加した方がよい。しかし内陸部の塩化物を含まない温泉から好熱菌を分離する場合には、淡水系の培地を使用する必要がある。また硫黄の有無が生育に大きな影響を与える場合もよくある⁵⁾。

また通常温泉には所有者がいるため、事前にサンプル採取の許可を得る必要がある。この時単純に「微生物を採取したい」と伝えると、一般の温泉業者には微生物に対して馴染みがない為、「レジオネラのような病原菌を検出するのが目的ではないか?」と勘繰られてしまう。人間に感染の恐れはない(人間の体温では生育できない)微生物を得ることが目的だとしっかり伝え、誤解がないようにした方がよいだろう。

実際にサンプリングする際には、熱水による火傷や、火山性ガス(硫化水素や炭酸ガス)による酸素欠乏症に注意が必要である。たとえば温泉のくみ出しには、金属や耐熱性プラスチック製の柄の長い杓などがあると便利である⁵⁾。また温度計を持参して、サンプリングした場所の温度を測定しておく、後の培養時の設定温度の目安になる。

好熱菌の培養・分離

源泉サンプルが採集できたら次は分離である。当然のことではあるが、好熱菌の培養で常温菌の培養と大きく異なる部分は、その培養温度である。常温菌の分離・培養設備以外に必要なものは、①高温運転が可能な恒温槽、②培地成分の熱に対する安定性の検討、③耐熱性の高い

培養容器である。この中で①と②はともかく、③は事故に繋がる可能性があるため特に注意が必要である。特に嫌気性菌好熱菌を培養する際に培養瓶を密封すると、微生物が生産したガスにより培養瓶が破裂する恐れがあるため、耐熱性だけでなく耐圧性も重要である。前述のように爆発性の水素や、有毒な硫化水素を生産する好熱菌もいるので、ガスについては特に気をつける必要がある。また逆にメタン菌を培養する場合、高压で水素・炭酸ガスを封入する必要がある。以上のような理由から、培養時には圧力に強い容器を使うことや、培地を入れすぎないように注意する必要がある。また耐熱・耐圧性が保証された容器でも、高温培養に何度も使っていると脆くなる恐れがあり、簡単な衝撃で破裂したりする事もあるため、使いまわしには注意が必要である。この他にも培地などを熱いまま取り扱いフタをすると、培養後に室温で作業する際に容器のフタが開かなくなることがあり、結局力づくで開けた結果、容器を破損することになることもある。

分離の際にはまず液体培地で集積培養を行う場合や、固体培地に直接サンプルを塗布する場合などがあるが、まずは液体培養の話をする。と言っても上述の注意点さえ忘れなければ、特に難しい知識は要らない。目的に応じた培地を用意して、温泉などから採取した環境サンプルを添加し、高温（だいたい源泉温度に合わせるとよい）の恒温槽に放りこんで2-3日（場合によってはもっと長時間）待つだけである。しかし単なる培養なら簡単だが、単離は少し面倒である。大腸菌のような常温菌ならアガープレートにまいて、コロニーから釣る所だが、高温で保温するとアガーが溶けてしまう。そこでゲランガム（商品名ゲルライト）という多糖を利用する。このゲルライトは固まるのに Mg^{2+} や Ca^{2+} などの2価の金属イオンを必要とし、耐熱性・耐酸性に優れる⁵⁾。通常は2価の金属イオンを含む2倍の濃度の培地溶液、およびゲランガム溶液（2%程度、混合後の濃度は1%程度）をそれぞれ用意し、オートクレーブ後滅菌後、90°C以上で速やかに混合し固化させる。ここでゆっくり混合していると、プレート培地作成前に固まってしまう。経験的にはもう少し低い温度（80°Cくらい）で混合しても、シャーレに流し込む時間はあるが、固まるまでに時間的な余裕はないので、一度に作製するプレートの枚数を数枚程度にするなど、注意が必要である。筆者の研究室でプレート培地を作製する場合は、一度に作製できる上限は4-5枚程度（計100 ml）である。またプラスチックシャーレは変形する恐れがあるので、ガラスのシャーレを用いる方がよい。

また一度単離した好熱菌の保存は、例外もあるが基本的には簡単である。通常好熱菌は、われわれが生活するような低い温度では増殖しない。短期的な常温菌の保存法として培養液を冷蔵庫に置いておくことがあるが、好熱菌の場合は冷蔵庫で比較的長期の保存ができ、室温で置いておくだけでも保存がきく。スクリーニングで得られた菌株は、通常の微生物と同様、10%程度のグリセロールを添加し-80°Cで凍結保存しておく、長期的に保存できる。ただし酸素に弱いもの場合は、低温（10°C以下）で死滅する例も報告されているし、プラスチックなどの酸素透過性素材の容器を用いると凍結保存中に死滅してしまう事もある⁵⁾。

最後に

1960年代にイエローストーン国立公園の温泉から好熱性バクテリア *T. aquaticus* が発見されて以来、高温環境に生きる微生物の発見・研究が相次いでいる。1980年代には100°Cを超える温度で生育する超好熱菌が発見され、現在では深海の熱水孔より単離された超好熱メタン菌 *Methanopyrus kandleri* 116株が高压環境下において122°Cで生育する事が知られている¹⁰⁾。100°Cを超える環境を用意するには高い圧力をかける必要があり、どこの研究室でも実験を行うというわけにはいかないが、生育温度100°C以下の好熱菌は案外簡単に分離できる。日本という国は地理的・歴史的に温泉に恵まれたせいもあり、好熱菌をはじめとする極限環境微生物の分離源の候補も多い。人間が立ち入れないような世界に居る生物を捕まえる。聞いた感じは難しそうだが、何だかワクワクするのではないか。それに、ちょっとしたアイデアでビッグなビジネスチャンスに繋がるかもしれない。

文 献

- 1) 宮島 敏ら：地球のしくみ，新星出版社（2008）。
- 2) 今中忠行監修：微生物利用の大展開，p. 100およびp.250，エヌ・ティー・エス（2002）。
- 3) Vos, P. D. et al. (ed.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2 nd. vol. 3*, p.144, Springer-Verlag (2009)。
- 4) Garrity, G. et al. (ed.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2 nd. vol. 1*, Springer-Verlag (2005)。
- 5) 古賀洋介ら編：古細菌の生化学，p. 7，東京大学出版会（1998）。
- 6) Imanaka, T. et al.: *Chem. Rec.*, **2**, 149 (2002)。
- 7) Barton, N. H. et al.: 進化-分子・個体・生態系，p.100，メディカルサイエンスインターナショナル（2009）。
- 8) <http://law.e-gov.go.jp/htmldata/S23/S23HO125.html>
- 9) <http://www.env.go.jp/nature/onsen/>
- 10) Takai, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 10949 (2008)。