

八幡平周辺の温泉に生息する好酸好熱性細菌

*東邦大学医学部生物学研究室, **岩手大学工学部資源化学科

杉森賢司*, 高柳進之輔*, 代谷次夫*, 梅津芳生**

(平成元年10月9日受付, 平成元年11月10日受理)

Acidophilic Thermophilic Bacteria Living in Hot Springs of Hachimantai Area, Iwate and Akita Prefectures

Kenji SUGIMORI*, Shinnosuke TAKAYANAGI*,
Tugio SHIROYA*, Yoshio UMETSU**

*Department of Biology, Toho University School of Medicine

**Department of Resource Chemistry, Faculty of Engineering, Iwate University

Abstract

We isolated and characterized the bacteria living in acidophilic thermophilic environments at the Hachimantai Hot Spring Area, including Toshichi Hot Spring (91.6°C, pH3.35), Fukenoyu Hot Spring (91.5°C, pH2.65), Goshogake Hot Spring (80.1°C, pH2.10) and Tamagawa (Higashimori) Hot Spring (2 points-71.4°C, pH2.55 and 92.5°C, pH2.05), located in Iwate and Akita Prefectures. Nine strains were isolated from the hot spring water samples, and their characteristics were found to be as follow: 1) These bacteria could grow well in aerobic conditions, but they were not able to grow in anaerobic conditions. 2) Morphologically, they had a lobe form (resembling a spherical form), no spores and no flagella. By electron microscopic sectional observations they were observed to have specific cell walls and cell membranes. 3) Growth temperature range was between 55°C to 90°C (optimum 65°C to 75°C). 4) Growth pH range was pH 1.0 to pH 6.5 (optimum pH2.5 or pH3.0). 5) They could only grow in sulfur or some organic matter. Based on these findings, the bacteria were determined to be *Sulfolobus* spp.. The characteristics of the isolated strains were compared with those of the type strain (*Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909), and the morphological and physiological characteristics indicated that these bacteria were similar to *S. acidocaldarius*. However these strains seem to be of a new *Sulfolobus* sp. in terms of the GC content of DNA, cell diameter and utilization of sugars, so the isolated strains were identified as *Sulfolobus* sp.. It is interesting to note that different kinds of *Sulfolobus* are found in acidic-hyperthermal springs in Japan.

1. 緒 言

地球上には通常我々が生活している環境とは異なり一見生物が生息できない様な特殊環境(高温環境, 低温環境, 高塩濃度環境, 強酸性環境, 高圧環境等)が存在するが, この様な環境にもその特殊性を上手に利用し生活する様々な生物の生息が知られつつある¹⁻⁷⁾. その中でも高温環境に生息する好酸性細菌についてはそれらが有している耐熱性酵素や耐熱機構等についての研究

が行われ^{3, 8~11}), さらに有効性についての検討もなされている¹²). ところで, このような好熱性細菌の中で, 我々が研究対象としている好酸好熱性菌 *Sulfolobus* についてみると, その研究の発端となったのが Brock T. D. (1972) らの研究で, 彼らは温泉 (Yellow Stone National Park: USA) から, それまで報告のない好酸好熱性細菌を分離し, それを *Sulfolobus acidocaldarius* と命名し新種として記載した¹³). 一方, De Rosa M. (1975) らはイタリアの温泉 (Pisciarelli solfatata) から *S. acidocaldarius* と性状の異なった好酸好熱性菌を分離報告し¹⁴), それは後に Zillig W. (1980) らにより *S. solfataricus* と命名された¹⁵). わが国でも Furuya, T. (1977) らは箱根大涌谷温泉からこの細菌と類似した菌株を分離し, その性状等について報告している¹⁶). さらに高柳ら (1985) も箱根大涌谷温泉 (pH1.45-pH1.54, 91.6°C-94.8°C) にて *Sulfolobus* 様の細菌の生息を確認する一方, コロニー形成法にて分離に成功し, その表層構造等について詳細に報告している¹⁷). ところでこの特殊細菌 *Sulfolobus* は pH 2.5, 75°C の条件下にてよく増殖する細菌であり, この増殖条件が示すようにこの細菌は高温, 強酸性の温泉に広く生息しているものと考えられるが, その生息分布等知られていないことが数多くある.

このような背景から, 我々はわが国に生息する好酸好熱性細菌 *Sulfolobus* の分布ならびに生息環境を調査する目的で, 自然湧出している高温強酸性の温泉を対象に *Sulfolobus* の分離・同定を行っている. 今回, 日本の地熱地帯の中でも非常に有名である八幡平周辺の高温酸性泉 4ヶ所 5地点を研究対象とし, 好酸好熱性細菌 *Sulfolobus* の検索を行ったところ, 全ての温泉に *Sulfolobus* が生息しているのがわかった. さらにこの *Sulfolobus* の分離を試みたところ 9 株の細菌が得られた. その中には現在まで報告のあった株と異なった性状を示す菌株が存在し興味ある結果が得られた. さらに, 八幡平周辺の温泉に生息する好熱性菌の分布等についても考察する.

2. 試料採取と実験方法

2.1 試料採取 (Fig.1, Photo 1)

研究対象とした温泉は硫黄酸性泉で, 自然環境が保持されている秋田県藤七温泉, 蒸ノ湯温泉,

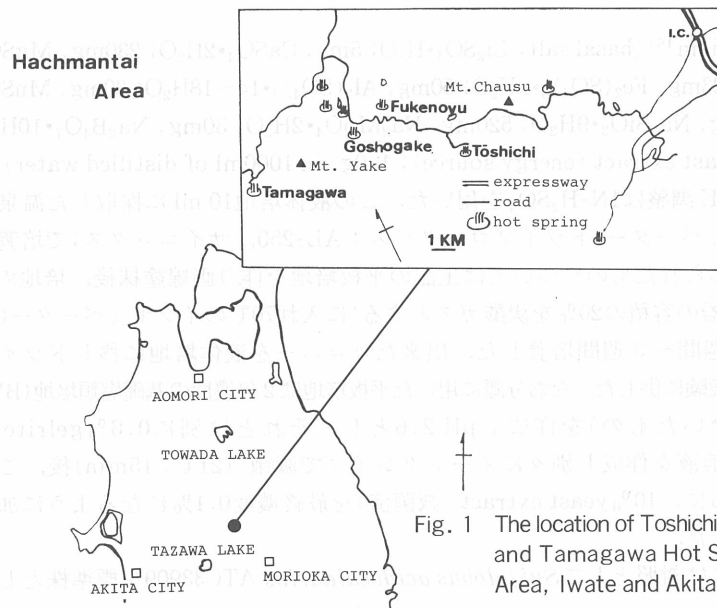


Fig. 1 The location of Tōshichi, Fukenoyu, Goshogake and Tamagawa Hot Springs in Hachimantai Area, Iwate and Akita Prefectures

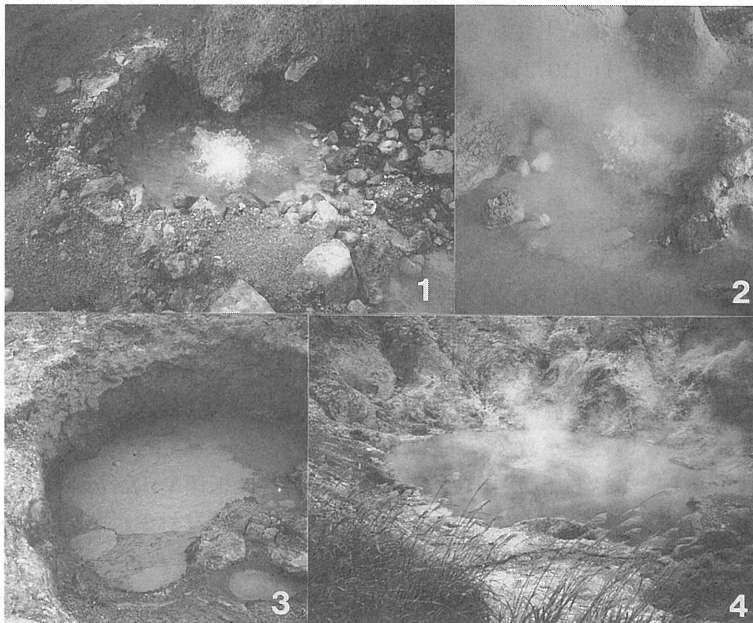


Photo 1 Sampling points of hot springs in Hachimantai Area

- 1) Toshichi Hot Springs 2) Tamagawa Hot Springs
3) Fukenoyu Hot Springs 4) Goshogake Hot Springs

後生掛温泉(紺屋地獄), 玉川温泉(東森地区2地点)である。これら5地点から温泉水および沈殿物を栓付きポリエチレン製容器(250ml, 滅菌済)に採取した。それを研究室に持ち帰り実験に供した。また, 試料採取地点の泉温およびpHは現地にて試料採取後に測定(pH51, 横河電機)した。

2.2 細菌の分離法

培地としてBY-medium¹⁶⁾(basal salt: $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 5mg, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 230mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 90mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 23mg, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$; 50mg, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 14 \sim 18\text{H}_2\text{O}$; 30mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 8mg, KH_2PO_4 ; 280mg, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; 520mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 30mg, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; 5mg, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1.3g, yeast extract (energy source); 1.0g, in 1000ml of distilled water) pH 3.0を用いた。なお培地のpH調整は1N- H_2SO_4 を用いた。この液体培地10 mlに採取した温泉水を1 ml加え, 70℃のインキュベーター(ドライブロックバス: AL-250, サイニックス)で培養した。7~10日後, 混濁の認められたものについては上記の平板培地を作り画線塗抹後, 培地の乾燥を防ぐために密封容器(容器の容積の20%を炭酸ガスとする)に入れ70℃のインキュベーター(KF-60D, KAYAGAKI)にて1週間~3週間培養した。出来たコロニーを液体培地に移しドライブロックバスで2~3代培養後実験に供した。なお分離に用いた平板培地は2倍濃度の基礎塩類培地(BY-mediumのyeast extractを除いたもの)を作成しpH 2.6とし, それとは別に0.6% gelrite (Difco), 0.06% $\text{CaCO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液を作成し別々にオートクレイブで滅菌(121℃, 15min)後, これら2種類を等量混合し, さらに, 10% yeast extract (滅菌済)を最終濃度0.1%になるように加えシャーレに流し込んで作成した。

また, 以後の実験には対照として*Sulfolobus acidocaldarius* ATC33909を標準株として用い, 分離株と比較した。

2.3 形態

コロニーに関しては、大きさ、形について観察する。菌体に関しては、グラム染色を行い光学顕微鏡にて菌体の大きさ、形、芽胞の有無、芽胞の形や位置を観察する。またNegative染色を行い、透過型電子顕微鏡(JEOL, 100B型)にて形態、繊毛、鞭毛などを観察した。

2.4 細菌の増殖条件

BY-medium を用い以下の実験を行った。増殖可能pHに関して、pH 1.0-pH 7.0まで、0.5間隔で培地を作り、それぞれについて菌の増殖の有無を光度計(ANA-7A, 東京光電)にて濁度の増減(520nm)により判定した。なお、培養は70℃で行った。増殖可能温度域に関しては25℃-80℃まで、5℃間隔で温度を設定し、各々について菌の増殖の有無を光度計にて先と同様に判定した。なお、培養はpH 3.0で行った。嫌気的条件下における増殖の有無についてはgas pack system を用いて行った。いずれも培養開始後7日目に判定した。

2.5 細菌のエネルギー源(糖および硫黄の資化能)

BY-medium の基礎塩類培地を10 ml ずつ試験管に分注し滅菌した後、最終濃度が0.5%になるようにエネルギー源を加えたものを試験用培地とする。菌体浮遊液は3日間培養した菌株を3回遠心洗浄し、基礎塩類培地で最終的にもとの濃度の2倍になるように調整する。それを試験用培地に0.1 ml ずつ接種し、増殖の有無を光度計を用い先と同様に調べた。なお培養はpH 3.0, 70℃で行った。まず、使用するエネルギー源のうち、糖としては、単糖類のglucose, fructose, galactose, mannose, mannitol, sorbitol, inositol, arabinose, xylose, rhamnose, 2糖類のsaccharose, lactose, maltose, 3糖類のraffinoseの以上14種類を用いた。つぎに、sulfurとしてはelemental sulfur 1種類を用いた。

2.6 細菌のDNAのGC含量

代表的な分離株3株と標準株1株について、菌株を3リットルの培地で培養し、遠心集菌後、Marmur法¹⁸⁾を用いDNAを調整した。各菌株のDNAのGC含量は、CsClによる平衡密度勾配遠心法により求めた。すなわち、1 mg/ml濃度に調整したDNA溶液の0.1mlを0.01M Tris-HCl緩衝液でpH 7としたCsCl溶液($\rho=1.7000$) 5 mlに混和し、35,000 rpm×60 hrs. 遠心(HITACHI: 70P-72, ローター:RPS65-T)した。これをfraction collector(ISCO, 640型)を用い、波長245 nmで吸光度を測定しながら0.4 ml ずつ分画し、各分画は直ちに屈折計(アタゴアッペ屈折計1形)で屈折率を測定した。吸光度のピークに相当する画分の屈折率を密度(ρ_{CsCl})に換算し、GC(mol%)=1020.6($\rho_{CsCl}-1.6606$)の式¹⁹⁾より、DNAのGC含量を求めた。なお、対照として、*Escherichia coli* K-12株(GC含量: 50-51mol%)のDNAを同時に実験に供した。

3. 結 果

3.1 試料採取地点

研究対象とした藤七温泉、蒸ノ湯温泉、後生掛温泉(紺屋地獄)、玉川温泉(東森地区2地点)の泉温およびpHはTable 1に示した。すべて高温酸性泉であった。

3.2 細菌の分離

研究対象とした4ヶ所5地点の温泉水からBY-medium(pH 3.0)を用いて菌株の検索を試みた

ところ、すべての温泉に好酸好熱性細菌が生息しているのが確認され、さらに分離・純培養を試みたところ、藤七温泉から3株(To-2, To-3, To-4)、蒸ノ湯温泉から1株(Fu)、後生掛温泉から2株(Ko-1, Ko-2)、玉川温泉から3株(Ta, TaC-1, TaC-2)の計9株が分離された。

3.3 分離株の生物学的性状(Table 2, Photo 2 and 3)

分離された9株のコロニーは円形で暗黄色を呈し、大きさは直径約0.5 mmであった。さらに、これら9株はグラム染色性が陰性の分葉形を呈する不定形の菌で、芽胞、鞭毛、繊毛は観察されなかった。

細胞の大きさ(直径)は株により異なり、直径約0.8 μm の小型グループに属する3株(To-4, Ko-1, Ta), 1.0 μm 前後(約0.9-1.1 μm)の中型グループに属する5株(To-2, To-3, Ko-2, TaC-1, TaC-2), 約1.5 μm の大型グループに属する1株(Fu)の3つに大別された。

Table 1 Temperature and pH of hot spring waters in Hachimantai Area

Hot springs	Temperature(°C)	pH
Toshichi	91.6	3.35
Fukenoyu	91.5	2.65
Goshogake(Konya-jigoku)	80.1	2.10
Tamagawa(Higashimori)	71.4	2.55
“ point C	92.5	2.05

Table 2 Characteristics of isolated bacteria from hot spring in Hachimantai Area and *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909

Characteristics	To-2	To-3	To-4	Fu	Ko-1	Ko-2	Ta	TaC-1	TaC-2	<i>S. acidocaldarius</i> ATCC 33909
Colony ;										
Color	DY	DY	DY	DY	DY	DY	DY	DY	DY	DY
Shape	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Size(mm)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5-1.0
Cell ;										
Gram stain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Shape	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
Diameter(μm)	1.1	0.9	0.8	1.5	0.8	1.0	0.8	1.0	1.1	1.1
Flagella	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pili	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spore	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cell wall	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temp. for growth(°C)	55-80	55-80	55-85	55-80	55-90	60-85	60-80	55-85	55-90	55-90
Optimum temp.(°C)	75	75	75	70	70	65	70	75	70	70
pH for growth	1.0-4.0	1.0-6.5	1.0-6.5	0.8-4.0	1.0-6.0	1.0-6.0	1.0-4.0	1.0-5.0	1.0-5.0	1.0-6.5
Optimum pH	3.0	3.0	3.0	3.0	2.5	3.0	3.0	3.0	3.0	2.5

DY; Dark Yellow, C; Circular, L; Lobe

増殖に関しては、分離株の増殖可能温度域の下限が55℃または60℃で、上限は80℃、85℃または90℃であった。至適温度は65℃-75℃の範囲にあった。増殖可能pHの下限はpH 1.0(Fu株のみpH 0.8)で、上限はpH 4.0-pH 6.5の範囲にあった。至適pHはpH 2.5あるいはpH 3.0であった。

嫌気的条件下での増殖は認められず、すべて好気性菌であった。標準株(*S. acidocaldarius* ATCC33909)の細胞の大きさは約1.1 μm で、中型グループに分類されたが、他の性状についてはほぼ同様であった。

3.4 糖の資化能(Table 3)

分離株のうちTo-2株、Ta株については実験に使用した14種類の糖を全て単独で資化すること

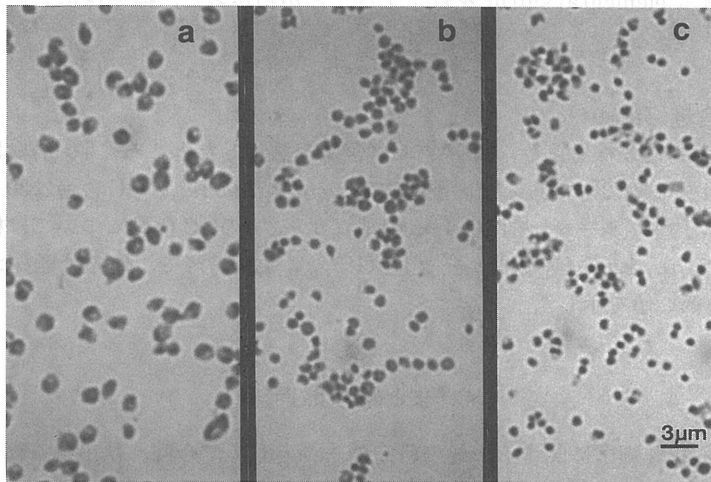


Photo 2 Gram stained cells of isolated bacteria living in low pH and high temperature environment with a light microscope

a) Strain Fu (large size groupe) b) Strain To-3 (middle size groupe) c) Strain To-4 (small size groupe)

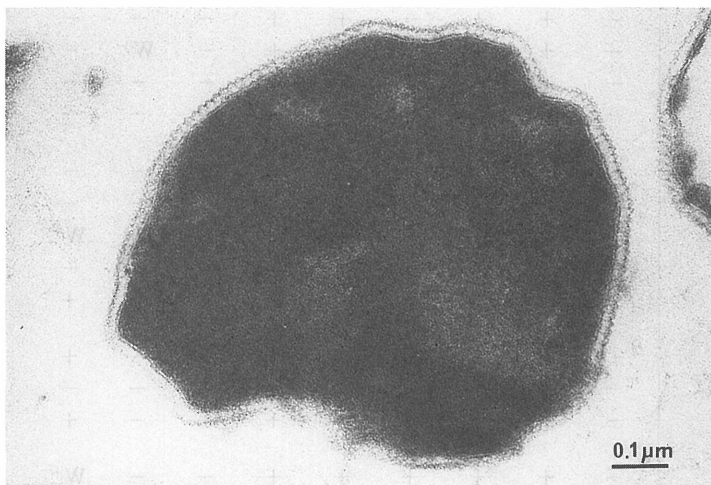


Photo 3 An electronmicrograph of isolated bacteria living in low pH and high temperature environment with ultrathin section method

ができなかった。しかし、Fu株はxylose, rhamnose, raffinoseの3種を、TaC-1株はgalactose 1種を、TaC-2株はglucose, xylose, rhamnose, saccharose, maltose, raffinoseの6種を単独で資化することがわかった。To-3株, To-4株, Ko-1株, Ko-2株においてはglucose, fructose, galactose, mannose, xylose, arabinose(To-4株を除く), rhamnose, saccharose, lactose, maltose, raffinoseを単独で資化することがわかった。標準株である*Sulfolobus acidocaldarius*はfructoseについての資化能は認められなかったが、To-3株, To-4株, Ko-1株, Ko-2株とはほぼ同様の結果であった。

3.5 硫黄の資化能(Table 3)

分離株9株ともにelemental sulfurを資化することがわかった。標準株においても同様の結果を得た。

3.6 細菌のGC含量(Table 4)

分離株より代表的な3株を選び、DNAのGC含量を測定したところ、To-4株は39.8%、Fu株は34.9%、TaC-1株は39.3%であった。標準株*S. acidocaldarius*のGC含量は39.8%であった。つまり、To-4株(小型グループ)とTaC-1株(中型グループ)のGC含量については標準株のそれと同様の値を示したが、Fu株(大型グループ)のGC含量は34.9%で、他の分離株および標準株と比較して約5%も低い値を示した。

4. まとめおよび考察

温泉に生息する特殊細菌に関する一連の研究の一つとして、今回、秋田県八幡平周辺の高温酸性泉4箇所5地点を研究対象とし好酸好熱性細菌を検索する目的で研究を行ったところ9株の細

Table 3 Energy sources(sugar or sulfur) for growth

Sugar or sulfur	To-2	To-3	To-4	Fu	Ko-1	Ko-2	Ta	TaC-1	TaC-2	<i>S. acidocaldarius</i> ATCC 33909
Glucose	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+
Fructose	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Galactose	-	+	+	-	+	+	-	W ⁺	-	+
Mannose	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	+	+	+	+	+	-	-	W ⁺	+
Arabinose	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
Rhamnose	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Saccharose	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+
Lactose	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
Maltose	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+
Raffinose	-	+	+	+	+	+	-	-	W ⁺	+
Elemental sulfur	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

W⁺; weak +

Table 4 GC content of DNA

Strains	GC content of DNA (%)
isolated strains	
To-4	39.8
Fu	34.9
TaC-1	39.3
type strain	
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	39.8

菌が得られた。それらの細菌は9株ともグラム染色性が陰性で、細胞の所々が陥入した分葉形を呈する不定形の細菌で芽胞を形成せず、また増殖至適条件が65-70℃、pH 2.5-3.5であり、好気性菌である。さらに、硫黄や一部の有機物を利用して増殖することから、9株とも好酸好熱性細菌 *Sulfolobus* 属に属する細菌であることがわかった。ところで、この好酸好熱性菌 *Sulfolobus* 属に所属する細菌として、現在 *S. acidocaldarius* および *S. solfataricus* が代表として知られている。それらはかつてGC含量が約20%異なるとされていた¹³⁾が、現在ではGC含量を含めた基本的性状は類似している²⁰⁾、今回の実験では対照として *S. acidocaldarius* の標準株(ATCC 33909)を用い、その性状について分離株と同じ条件で調べた。その結果を分離株のそれと比較検討したところ、それは分離された9株とはほぼ同じ性状であった。しかし、細胞の大きさ、糖の資化能、GC含量についてみると、標準株と分離株との間でいくつかの相違点があった。たとえば細胞の大きさ(直径)についてみると、標準株の大きさはFu株の約2/3で、Fu株が非常に大型の細胞形態をとっているのがわかった。また、糖の資化能についても、標準株とはほぼ同様のパターンを示したのが、分離株9株中4株で、他の5株は全く異なるものであった。GC含量についてはFu株が他と異なり低い値を示した。これらのことから、分離株の基本的性状は *S. acidocaldarius* に類似しているが、他の性状については異なる点が多く、特にFu株の性状は他の株(標準株を含む)と著しく異なっており、今回分離した *Sulfolobus* 9株は *Sulfolobus sp.* として記載する。

現在まで、わが国で分離された *Sulfolobus* は、大島らが温泉から分離した strain 7²¹⁾、Yeats, S. らが別府の温泉から分離した strain B-12²²⁾、Furuya, T. (1977) らが箱根大涌谷から分離した TA-1 株¹⁶⁾等、*S. acidocaldarius* もしくはそれと性状が類似している株であるとされているが、一方、伊藤(1987)らが箱根大涌谷や登別から分離した株はGC含量や構成脂質等のちがいから *S. acidocaldarius* と異なった性状を持った株と報告されている²³⁾。また、海外では *Sulfolobus* に類似した細菌で *Acidianus infernus*⁵⁾、*A. brierleyi*^{5, 15)}、*Desulforolobus ambivalens*⁷⁾等の新種の分離同定に関する報告があり、高温酸性環境には、まだ発見されていない新しい種も生息している可能性を有していると考えられる。さらに、この *Sulfolobus* は古細菌(archaeobacteria)と呼ばれる一群の生物群に属し、Eukaryote と Eubacteria の両者の性質を持つことで知られている⁴⁾。このことから生物学上非常に貴重な細菌であり、その種の保存等、重要な課題であると考えられる。以上のことから、泉温が90℃前後で、かつ強酸性の環境に生物が生息していることは生物学のおよび進化学的にみても非常に興味深いことであり、実際 *Sulfolobus sp.* が八幡平周辺の高温強酸性の温泉に広く生息していることが今回の研究で確認されたことは本菌の生態を知る上で貴重なデータとなると考えられる。また地域的に考えると、井戸ら(1987)は八幡平周辺を含む秋田県内の温泉に生息する好熱性菌(中性付近に至適pHを持つ)について記載している²⁴⁾が、その中で、高温泉に生息する好熱性菌には既存の種もあれば新種の可能性を持つ菌の生息を示唆している。その結果を含めて八幡平周辺の好熱性菌の生息について考えると、温泉の温度、pH、泉質等のちがいにより、そこに生息する微生物種が全く異なっており、環境条件に適応した生物の生息が確認さ

れている例として、非常に興味ある結果を示している。またこのことは我々が以前調査した那須温泉群に生息している微生物について、高温酸性泉にはacidophilic *Bacillus* sp., *Sulfolobus* が、高温中性泉には*B. stearothermophilus*, *Thermus thermophilus* が生息し、環境に適応した生物の生息が確認された結果と一致している^{25, 26)}。さらに今後は他の地域における*Sulfolobus* を主とした好熱性細菌の性状分布等について調査するとともに、今回のデータを踏まえてさらに検討する。

5. 謝 辞

本研究を実施するにあたり温泉水の採取にご協力下さいました岩手大学工学部名誉教授後藤達夫先生に感謝いたします。また、ご指導ご助言をいただきました東邦大学医学部化学研究室教授相川嘉正先生、元岡山大学三朝分院御船政明先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Brock T.D.: Thermophilic microorganisms and life at high temperatures, Springer-Verlag, New York, 1978.
- 2) Kushner D.J.: Microbial life in extreme environment, Academic Press, London, 1978.
- 3) 大島泰郎: 好熱性細菌, 東大出版, 東京, 1978
- 4) 古賀洋介: 古細菌, 東大出版, 東京, 1988
- 5) Segerer, A., A. Neuner, J.K. Kristjansson and K.O. Stetter: *Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov., and *Acidianus brierleyi* conv. nov.: facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing archaeobacteria, Int. J. Syst. Bacteriol., 36: 559-564, 1986.
- 6) Zillig, W., K.O. Stetter, D. Prangishvilli, W. Schaffr, S. Wunderl, D. Janekovic, I. Holz and P. Palm: *Desulfurococcaceae*, the second family of the extremely thermophilic, anaerobic, sulfur-respiring *Thermoproteales*, Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. C3, 304-317, 1982.
- 7) Zillig, W., S. Yeats, I. Holz, A. Bock, M. Rettenberger, F. Gropp and G. Simon: *Desulforolobus ambivalens*, gen. nov., sp. nov., an autotrophic archaeobacterium facultatively oxidizing or reducing sulfur, System. Appl. Microbiol., 8: 197-203, 1986.
- 8) Cowan, D.A., R.M. Daniel, A.M. Martin and H.W. Morgan: Some properties of a β -galactosidase from an extremely thermophilic bacterium, Biotechnology Bioengineering 26: 1141-1145, 1984.
- 9) 大島泰郎: 好酸好熱性細菌: 生化学的特異性と進化生化学的意義, 細胞, 12: 372-378, 1980.
- 10) 大島泰郎: 好熱菌の耐熱酵素と酵素の熱安定性, 蛋白質 核酸 酵素, 18: 454-458, 1973.
- 11) 今堀和友, 大島泰郎: 好熱性をさぐる一生物高分子の熱安定化機構, 現代化学, 79: 48-54, 1977.
- 12) Kargi, F. and J.G. Weissman: Kinetic parameter estimation in microbial desulfurization of coal, Biotechnology Bioengineering 30: 1063-1066, 1987.
- 13) Brock, T.D., K.M. Brock, R.T. Belly and R.L. Weiss: *Sulfolobus*: A new genus of sulfur oxidizing bacteria living at low pH and high temperature, Arch. Microbiol., 84: 54-68, 1972.
- 14) De Rosa, M., A. Gambacorta and J.D. Bu'lock: Extremely thermophilic acidophilic bacteria convergent with *Sulfolobus acidocaldarius*, J. Gen. Microbiol., 86: 156-164, 1975.
- 15) Zillig, W., K.O. Stetter, S. Wunderl, W. Schulz, H. Priess and I. Scholz: The *Sulfolobus*-*Caldariella* Group: Taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases, Arch.

- Microbiol., 125:259-269, 1980.
- 16) Furuya, T, T. Nagumo, T. Itoh and H. Kaneko: A thermophilic acidophilic bacterium from hot springs, Agric. Biol. Chem., 41: 1607-1612, 1977.
 - 17) 高柳進之輔, 杉森賢司, 千頭道子: Sulfolobusの単離とその細胞構造, 東邦教養紀要, 17: 43-52, 1985.
 - 18) Marmur, J.: A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms, J. Mol. Biol., 3: 208-218, 1961.
 - 19) Deley, J.: Reexamination of the association between melting point, buoyant density and chemical base composition of deoxyribonucleic acid, J. Bacteriol., 101: 738-754, 1970.
 - 20) Christiansen, C., E.A. Freundt and O. Vinther: Lack of deoxyribonucleic acid - deoxyribonucleic acid homology between *Thermoplasma acidophilum* and *Sulfolobus acidocaldarius*, Int. J. Syst. Bacteriol., 31: 346-347, 1981.
 - 21) Inatomi, K., M. Ohba and T. Oshima: Chemical properties of proteinaceous cell wall from an acid-thermophile, *Sulfolobus acidocaldarius*, Chem. Letter, 140: 1191-1194, 1983.
 - 22) Yeats, S., P. McWilliam and W. Zillig: A plasmid in the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*, EMBO J., 1: 1035-1038, 1982.
 - 23) 伊藤俊洋, 富永 浩, 金子 弘, 名雲照一: 古細菌系好酸好熱菌TAの脂質特異性について, 日本農芸化学会昭和61年度大会(京都)要旨集, p.708, 1987.
 - 24) 井戸栄治, 高橋 享, 山崎 誠: 秋田県内の温泉から分離された好熱性細菌, 温泉科学, 37: 231-237, 1987.
 - 25) 杉森賢司, 高柳進之輔: 那須温泉郷に生息する特殊細菌の性状と分布, 東邦教養紀要, 19: 53-65, 1987.
 - 26) 杉森賢司, 高柳進之輔, 代谷次夫: 栃木県の高温泉より分離された好酸好熱性細菌*Sulfolobus sp.*の性状について, 第41回日本温泉科学会大会(伊香保)要旨集, p.40, 1988.