

新規マルチ銅オキシダーゼ IOX を活用した

酵素殺菌剤の殺菌メカニズムの解明

千葉大学大学院応用生命化学領域 天知 誠吾

【略歴】

1993年3月	北海道大学農学部農芸化学科卒業
1995年3月	北海道大学大学院農学研究科農芸化学専攻修士課程修了
1998年3月	北海道大学大学院農学研究科農芸化学専攻博士課程修了
1998年4月	通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 博士研究員
2000年4月	千葉大学園芸学部生物生産科学科 助手
2007年4月	千葉大学大学院園芸学研究科 助教
2008年10月	千葉大学大学院園芸学研究科 准教授
2016年4月	千葉大学大学院園芸学研究科 教授 現在に至る

ヨウ素を酸化する微生物

我々の研究グループでは、ヨウ素の地球規模での循環に寄与する微生物に関して研究を行っている。これまでに、ヨウ素揮発細菌、ヨウ素蓄積細菌、嫌気性ヨウ素呼吸細菌、還元的脱ヨード細菌などユニークな細菌を多数分離している。その過程で、ヨウ化物イオン (I^-) を分子状ヨウ素 (I_2) へ酸化する細菌 (ヨウ素酸化細菌) の分離にも成功した¹⁾。ヨウ素酸化細菌は天然ガスかん水や、人工的にヨウ化物イオンを添加した海水など、ヨウ化物イオンに富んだ環境からのみ分離された。この原因として、ヨウ素酸化細菌は通常の細菌では死滅する 7~8 ppm 程度の I_2 に対して耐性を持ち、ヨウ化物イオンに富んだ環境下で積極的に I_2 を生成することで、他の細菌に優占して生育できるためと考えられる²⁾。ヨウ素酸化細菌は系統的に 2 グループに分けられ、1 つは海洋細菌 *Roseovarius mucosus* に近縁であるが、もう 1 つは近縁細菌が存在せず、新属新種と考えられる。

ヨウ素酸化酵素 IOX

ヨウ素酸化細菌のヨウ素酸化反応を触媒する酵素 (IOX) は分泌タンパクであり、酸素の存在下でのみ活性を示すことから、オキシダーゼの 1 種と考えられた。最も高い活性を示した Q-1 株より IOX を精製し、その諸性質を検討した³⁾。その結果、IOX はヨウ化物イオン以外に ABTS、2,6-DMP、ヒドロキノン、シリングアルダジンといったフェノール類に対しても活性を示した。また銅イオンの存在下で Q-1 株の IOX 生産量は 20 倍増大し、精製酵素のスペクトル解析では type I および III に特徴的なピークが検出された。以上の結果から、IOX はマルチ銅オキシダーゼ (MCO) の 1 種であることが強く示唆された。MCO は 4 つの 1 電子酸化反応を酸素の 4 電子還元と共役させ、水を生成する銅タンパクの総称であり、ラッカーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、セルロプラスミン、ビリルビンオキシダーゼなどを含む。精製 IOX の内部アミノ酸配列、および LC-MS/MS 解析より得られたペプチド配列を Q-1 株のドラフトゲノム配列情報⁴⁾と比較した結果、IOX は少なくとも 2 種類のタンパク (IoxA、IoxC) からなる複合体であることがわかった。このうち IoxA には、MCO に特徴的な 4 領域の銅結合モチーフが保存されており、IOX が MCO であることを裏付ける結果となった。一方、IOX は CotA や CueO、CumA、CopA など、既知の細菌由来 MCO とは系統的に離れており、新規な MCO であることがわかった。糸状菌由来 MCO において、過去にヨウ素酸化能を持つものが 2 例報告されているが、IOX の触媒効率 (k_{cat}/K_m) はこれら酵素の 1 万~10 万倍も高かった。IOX を持つ細菌は土壌にも存在し、原発事故などにより放出された放射性ヨウ素の土壌への固定化に寄与している可能性がある^{5,6)}。

IOX の酵素除菌剤としての応用

I₂ は細菌、糸状菌、酵母、一部の細菌芽胞に対しても殺菌力があり、かつ金属腐食性が少ないことから、食品加工工場や医療現場等で需要がある。現在広く用いられているヨウ素系殺菌剤としてポビドンヨード (PVP-I) があるが、界面活性剤を含むため環境負荷が高い。天然由来酵素 (ペルオキシダーゼ) からなる殺菌システムが実用化されているが、腐食性と毒性のある過酸化水素が必須である。一方、IOX は酸素とヨウ化物イオンさえあれば I₂ の生成が可能で、従来型よりも安全かつ簡便な殺菌システムの構築が可能である。そこで、IOX システムの殺菌剤としての効果を評価するため、種々の微生物に対する殺菌効果を検討するとともに、特に細菌芽胞に対する効果を PVP-I と比較した⁷⁾。その結果、IOX システムは幅広いグラム陽性・陰性細菌、酵母、糸状菌を 5 分以内に完全に殺菌できた。また、枯草菌やセレウス菌、ジオバチルス等の芽胞に対しても優れた殺菌作用を示し、その作用は 0.1% PVP-I の 2~7 倍優れていた。また、膜透過実験装置を用いた定量により、IOX システム中の遊離ヨウ素濃度 (42 ppm) は 0.1% PVP-I (25 ppm) よりも高いことが明らかになった。I₂ によりタンパク質、脂質、核酸などの微生物菌体成分が酸化されると、ヨウ化物イオンが生成するが、IOX がこれを速やかに再酸化することで、システム中の高い遊離ヨウ素濃度が維持されるものと考えられる。これまでにマルチ銅オキシダーゼを殺菌剤として利用した例はなく、本研究が初めてである。

今後の展望

IOX は市販のヨードホール殺菌剤と比較して優れた殺菌力を示すことがわかったが、その原因や殺菌メカニズムの完全解明には至っていない。そこで、放射性ヨウ素 (¹²⁵I) による細菌細胞や芽胞のラベリング、走査型電子顕微鏡 (SEM) や共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いた細胞表層の構造観察や膜損傷度の評価、細胞内における活性酸素や過酸化脂質の検出といった複数のアプローチにより、IOX の殺菌メカニズムを解明していきたいと考えている。また、実用化とコスト削減のため、IOX 大量生産変異株のスクリーニングや安価な培地成分の検討なども進めていく。

謝辞

本研究は千葉大学大学院応用生命化学領域微生物工学研究室で行われたものであり、ご指導いただいた先生方、共同研究して下さった先生方、そして本研究に関わった大学院生、学部学生の皆様に心より感謝致します。

参考文献

1. S. Amachi *et al.*, Isolation of iodide-oxidizing bacteria from iodide-rich natural gas brines and seawaters, *Microbial Ecol.* 49, 547-557 (2005).
2. Y. Arakawa *et al.*, Growth stimulation of iodide-oxidizing α -*Proteobacteria* in iodide-rich environments, *Microbial Ecol.*, 63, 522-531 (2012).
3. M. Suzuki *et al.*, Iodide oxidation by a novel multicopper oxidase from *Alphaproteobacterium* strain Q-1, *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3941-3949 (2012).
4. A. Ehara *et al.*, Draft genome sequence of strain Q-1, an iodide-oxidizing *Alphaproteobacterium* isolated from natural gas brine water, *Genome Announcements* 2, e00659-14 (2014).
5. M. Seki *et al.*, Laccase-catalyzed oxidation of iodide and formation of organically bound iodine in soils, *Environ. Sci. Technol.* 47, 390-397 (2013).
6. K. Shiroyama *et al.*, A putative multicopper oxidase, IoxA, is involved in iodide oxidation by *Roseovarius* sp. strain A-2, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79, 1898-1905 (2015).
7. T. Yuliana *et al.*, A novel enzyme-based antimicrobial system comprising iodide and a multicopper oxidase isolated from *Alphaproteobacterium* strain Q-1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 10011-10018 (2015).