

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780049

研究課題名 (和文) ヨウ素酸化細菌の生態と生化学の解明

研究課題名 (英文) Ecology and biochemistry of iodide-oxidizing bacteria

研究代表者

天知 誠吾 (SEIGO AMACHI)

千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授

研究者番号：80323393

研究成果の概要 (和文)：ヨウ素酸化細菌 (IOB) は揮発性ヨウ素ガスを生産し、オゾン層の破壊や海洋エアロゾル粒子の形成に関与する可能性がある。また、IOB の有するヨウ素酸化酵素は新規なポリフェノールオキシダーゼ (PPO) である可能性が高く、ヨウ素系酵素除菌剤としての利用も期待できる。本研究では、海洋環境における IOB の存在量を Real-time PCR で定量する方法を確立することに成功した。また、IOB が海水中に広く分布することが分子生態学的に初めて明らかになった。Degenerate プライマーを用いた PPO 様遺伝子の取得には至らなかったが、基質特異性試験や反応速度論的解析によりヨウ素酸化酵素は PPO の中でもラッカーゼに類似した酵素であること、またこれまでに知られているラッカーゼの中で最も優れたヨウ素酸化能を有することが明らかになった。

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物、ヨウ素、酸化、定量 PCR、ラッカーゼ、マルチ銅オキシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1)ヨウ素イオン (I⁻) を分子状ヨウ素 (I₂) に酸化するヨウ素酸化細菌 (IOB) は、海洋細菌 *Roseovarius tolerans* に近縁な IOB-1 と、同じく海洋細菌 *Rhodothalassium salexigens* に近縁な IOB-2 から構成されている (Amachi *et al.*, *Microbial Ecology*, 2005)。IOB は海洋に広く分布し、ヨウ素循環に貢献している可能性があるが、その正確な存在量は不明である。

IOB は I₂ のみならず、揮発性有機ヨウ素であるジヨードメタン (CH₂I₂) やクロロヨードメタン (CH₂CI) も生成する。これらのヨウ

素ガスは、大気圏で塩素や臭素よりも効率的にオゾン層を破壊するが、その発生源は未だ特定されていない (Alicke *et al.*, *Nature*, 397, 572-573, 1999)。また最近の研究から、これらヨウ素ガスはオゾン層の存在下で光分解し、全地球的な気候変動に影響する海洋エアロゾル粒子を形成することがわかってきた (O'Dowd *et al.*, *Nature*, 417, 632-636, 2002; Saiz-Lopez *et al.*, *Science*, 317, 348-351, 2007)。ヨウ素ガスの人為的な発生源は知られていないため、藻類などの海洋生物の関与が推察されているが、ヨウ素は外洋上層の大気でも

検出されること、また藻類のヨウ素ガス放出量は全地球規模での放出量を数桁下回ることから、IOB を初めとする海洋細菌の関与も指摘されている (O'Dowd & Hoffmann, *Environ. Chem.*, 2, 245-255, 2005)。現在まで、 I_2 や CH_2I_2 を生成する海洋細菌は、IOB 以外に報告はないため、IOB がこれら大気圏での重要な現象に貢献している可能性もある。

(2) 一方、IOB の有するヨウ素酸化酵素は分泌型のオキシダーゼと考えられ、分子量 168 kDa と 155 kDa の 2 種類のアイソザイムが存在する (江田ら, ヨウ素利用研究国際シンポジウム, 2006)。ヨウ素酸化酵素の生産量は培地に微量 (40 μ M) の銅イオンを添加することで 100 倍以上増加する。また本酵素は分子中に銅を含有し、EDTA や NaN_3 で活性が阻害され、ヨウ素イオン以外にも ABTS やカテコールに対する酸化活性を有することがわかっている。以上の結果は、ヨウ素酸化酵素がポリフェノールオキシダーゼ (PPO) の 1 種であることを示唆しているが、細菌類の PPO についてはこれまで報告例が少なく、ヨウ素酸化活性を持つものも見つかっていない。糸状菌ではヨウ素酸化能を持つラッカーゼ (PPO の 1 種) に関して 2 例の報告があるのみである。よって IOB のヨウ素酸化酵素はこれまでに報告のない新規な酵素と予想される。

さらに、ヨウ素酸化酵素は新規酵素除菌剤としての利用も期待できる。 I_2 はカビや細菌芽胞に対して殺菌力が強く、金属腐食性が少ないため、食品工場等における除菌剤として需要が高い。ところが、 I_2 は水に溶けにくいいため、安定剤に包接する必要があり、環境負荷が高い。一方、安定剤の代わりにパーオキシダーゼを用いたヨウ素除菌剤も実用化されているが、過酸化水素を併用するため安全性に問題がある。ヨウ素酸化酵素はオキシダーゼで、ヨウ素イオンと酸素さえあれば効力を発揮できるため、環境負荷低減型の安全な除菌剤となりうる。

2. 研究の目的

以上述べたように、IOB の生態と生化学の解明は、単に微生物学的な興味のみならず、オゾン破壊物質や海洋エアロゾル前駆体としてのヨウ素の放出源を特定するという、緊急性の高い問題を含んでいる。加えて、IOB の生産するヨウ素酸化酵素は、基礎・応用いずれの観点からも興味深い酵素であり、IOB がその特異な機能を発揮する際にも必須の役割を演じていると予想される。そこで本研究では、主に以下の 2 点に焦点を当てて研究を進めることとした。

(1) 環境中、特にヨウ素循環の主たる場であり、大気中ヨウ素の放出源でもある海洋における IOB の分布と存在量を把握するため、IOB 特異的プライマーを用いた Real-time PCR による IOB の定量法を確立する。

(2) degenerate プライマーを用いた PCR により、ヨウ素酸化酵素の構造遺伝子を取得し、既存の PPO との比較によりその特異性を明らかにする。また遺伝子のみならず酵素学的側面からもヨウ素酸化酵素のさらなる特徴付けを行う。

3. 研究の方法

(1) IOB プライマーの特異性の確認

IOB Group 1 (IOB-1F/1R) 及び Group 2 (IOB-2F/2R) プライマーの特異性を確認するため、東京都港区及び千葉県船橋市で採取した海水から抽出した DNA を鋳型として PCR を行い、プラスミドにライゲーション後クローニングし、塩基配列を決定した。具体的には、200 mL の海水を口径 0.22 μ m メンブランフィルターで濾過し、Extraction buffer に懸濁後、Lysozyme、SDS、Proteinase K 処理により溶菌した。これを PCI、CIA 処理した後、エタノール沈殿により DNA を回収した。プライマーは Group 1 については IOB-1F (5'-GGAACGTACCCTCTTCTGC-3') 及び IOB-1R

(5'-CCGATCCTCCTCCGATAAATC-3') を使用し、Group 2 については IOB-2F (5'-GCTTCCTTCGGGGAGAG-3') 及び IOB-2R (5'-ACGGTATTAGCGCACGTTTC-3') を用いた。PCR 反応条件は、95°C 30 秒、63°C 30 秒、72°C 1 分を 35 サイクルとした。

また、Real-time PCR による近縁菌 (ヨウ素酸化能は持たない) との C_t 値の比較も実施した。近縁菌を培養後 DNA を常法により抽出し、ほぼ同じ鋳型量 (約 10^6 copies) になるよう調製した。IOB-1 の近縁菌として *Roseovarius nubinhibens* DSM15170 株及び *Ruegeria algicola* DSM10251 株を、IOB-2 は *Kordiimonas gwangyangensis* JCM12864 株及び *Rhodotalassium salexigens* DSM2132 株を使用した。MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems) にサンプル及び Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を調製後、ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) で Real-time PCR 反応を行った。Real-time PCR 反応の条件は 95°C 15 秒、60°C 30 秒を 40 サイクルとした。Real-time PCR 反応は 3 連で行い、平均及び標準偏差を求めた。また、増幅曲線の閾値 (Threshold) は全て 0.5 に設定した。非特異的増幅の有無を確認するため、Real-time PCR 反応後、dissociation analysis を 60°C~95°C で

行った。

(2) 検量線の作成

IOB の検出限界を調べるため検量線を作成した。IOB-1 用の検量線は N213-3 株、IOB-2 用の検量線は Mie-8 株、全細菌用の検量線は *E. coli* K-12 株を使用した。それぞれの 16S rDNA は $10^2 \sim 10^8$ copies に TE buffer で段階希釈した。Real-time PCR 反応を 3 連で行い、平均及び標準偏差を求めた。また、dissociation analysis も行った。E = $10^{-1/\text{slope}}$ に基づき、検量線の傾き (slope) から PCR 効率 E 及び相関係数 R^2 を求めた。

(3) 海水中の IOB の定量

海水としては東京都港区台場、千葉県木更津市、宮城県石巻市女川湾沖合 1 km 付近のコンブ養殖場、岩手県宮古市浄土ヶ浜、神奈川県鎌倉市～藤沢市の鶴沼海岸、由比ヶ浜などから採取した。コンブ群落は揮発性ヨウ素の発生源としてよく知られているため、IOB の存在量も多いのではないかと考え、女川湾のサンプルを採取した。海水の採取には採水器を用い、水深 1～5 m 付近からサンプリングした。採取した海水は速やかに実験室に持ち帰り 4℃ で保存し、数日以内に DNA 抽出を行った。また、抽出した DNA から阻害物を除去し精製するため Geneclean Spin Kit (Qiagen) を使用した。

(4) Degenerate プライマーを用いたヨウ素酸化酵素遺伝子の増幅

IOB-2 に属する Q-1 株のヨウ素酸化酵素の N 末端アミノ酸配列、および既知の α -Proteobacteria の PPO (マンガン酸化酵素) で保存性の高い銅結合領域 A 及び B のアミノ酸配列を基に、複数の degenerate PCR プライマーを設計した (Forward primer 2 種類、Reverse primer 6 種類)。Q-1 株からゲノム DNA を調製し、これを鋳型として種々の条件で PCR を行い、目的の断片が増幅されるか試みた。MCO 遺伝子と思われる断片の増幅が認められた場合は、MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて抽出・精製し、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) を用いてクローニング、シーケンスを行った。

(5) ヨウ素酸化酵素の基質特異性と反応速度論的解析

PPO は大きくチロシナーゼとラッカーゼに分類される。ヨウ素酸化酵素がこれらのいずれに属するのかを明らかにするため、Q-1 株の培養上清を限外濾過後、Native-PAGE の活性染色からアイソザイム-II に相当するバンドを切り出し、Tris-HCl 緩衝液に溶出さ

せ精製した。この精製酵素を用いて種々の基質存在下で反応させると共に、ヨウ化物イオンと ABTS については K_m 、 V_{max} 、 k_{cat} 、 k_{cat}/K_m など速度論的パラメーターを算出した。

4. 研究成果

(1) IOB プライマーの特異性の確認

IOB プライマーの特異性を確認するため、港区台場及び千葉県船橋市より採取した海水より抽出した DNA を鋳型として PCR 反応を行い、アガロース電気泳動により目的断片の増幅を確認した。いずれの海水からも目的の断片長 (約 100 bp) を持つバンドが確認されたため、これをクローニング後、系統解析をおこなった。その結果、台場の海水ではシーケンスした 6 クローン中 3 クローンがすでに当研究室で分離している IOB-1 の N213-3 株、残りの 3 クローンが同じく IOB-1 の A-6 株と 97% 以上の相同性を示した。船橋の海水からは、A-6 株と 97% の相同性を示すクローンのみが得られた。一方、IOB-2F/2R プライマーで増幅した産物をクローン解析した結果、台場の海水からは IOB-2 の WAI-2 株と 100% の相同性を示すクローンのみが得られ、船橋の海水からは、同じく IOB-2 の Mie-8 株と 100% の相同性を示すクローンのみが得られた。以上の結果より、IOB プライマーを海水から抽出した DNA にアプライした場合、正しく IOB のみを検出可能であることが明らかになった。

次に、IOB プライマーの特異性をさらに確認するため、Real-time PCR によってほぼ同じコピー数 (約 10^6 copies) の 16S rDNA を鋳型として、IOB と近縁菌の C_t 値を比較した。IOB-1F/1R プライマーで増幅したところ、IOB-1 である N213-3 株の C_t 値は 18.2 であったのに対し、IOB-2 の Mie-8 株は 33.7、*Ruegeria algicola* は 38.7 と十分な開きが見られた (図 1)。*E. coli* 及び *Roseovarius nubinhibens* 株は増幅しなかった。また、IOB-2F/2R プライマーで増幅したところ、IOB-2 の Mie-8 株の C_t 値は 16.3 であったのに対し、*Kordiimonas gwangyangensis* は 32.6、*Rhodothalassium salaxigens* は 32.4 と十分な開きが見られた (図 2)。*E. coli* では増幅しなかった。また、非特異的増幅の有無を確認するために dissociation analysis を行った結果、IOB-1F/1R プライマー、IOB-2F/2R プライマーで増幅した産物の T_m 値はそれぞれ約 78℃、81℃であり、非特異的な増幅は確認されなかった。これらの結果より、Real-time PCR 反応系においても IOB プライマーの特異性に問題はないと判断した。

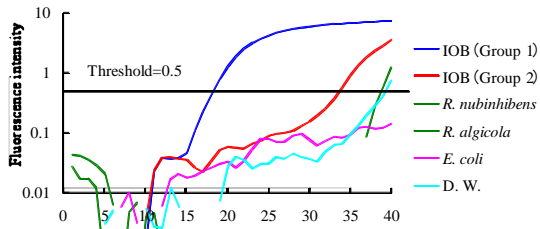


図 1. IOB-1F/1R プライマーの特異性の確認

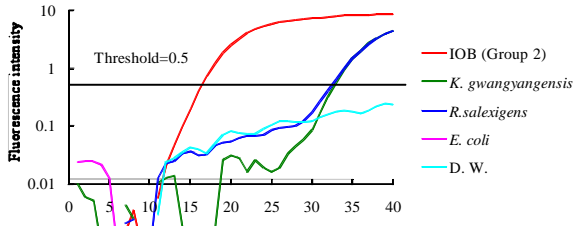


図 2. IOB-2F/2R プライマーの特異性の確認

(2) 検量線の作成

IOB の検出限界を調べるため、検量線を作成した。IOB-1 用の検量線は N213-3 株、IOB-2 用の検量線は Mie-8 株、全細菌用の検量線は *E. coli* K-12 株の 16S rRNA 遺伝子を鋳型とした。各検量線を図 3 に示す。検出限界は IOB-1、IOB-2 とともに 10^2 copies 程度であった。また、検量線の傾きから求めた PCR 効率は IOB-1 で 1.93、IOB-2 で 1.96、全細菌で 2.05、相関係数はいずれも 0.99 以上であった。非特異的増幅の有無を確認するために dissociation analysis を行った結果、IOB-1F/1R プライマー、IOB-2F/2R プライマー、Universal プライマーで増幅した産物の T_m 値はそれぞれ約 79°C 、 81°C 、 82°C であり、非特異的な増幅は確認されなかった。以上の結果より、作成した検量線は IOB の定量に適用できると判断した。

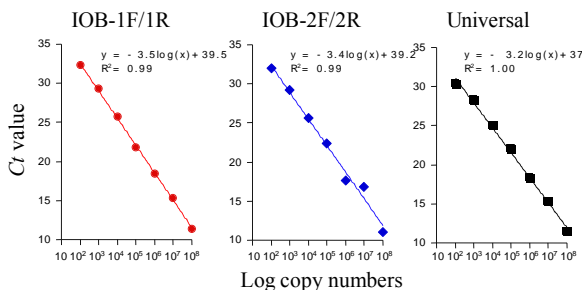


図 3. Real-time PCR の検量線

(3) 海水中の IOB の定量

確立した条件を用いて、各地から採取した海水中の IOB の存在量を、全細菌に対する存在割合として算出し定量した。用いた 6 種類

の海水いずれにおいても IOB-1、IOB-2 のいずれかまたは両方が検出され、IOB が海洋環境に普遍的に分布することが明らかになった。IOB-2 より IOB-1 の方が検出される頻度が高い傾向があった。IOB の存在量は少ない場合で 0.01% (由比ヶ浜)、多い場合は 1.18% (江ノ島) であり、比較的近傍な海域においても IOB の存在量には多様性があることが示唆された。女川湾のサンプルは、揮発性ヨウ素の発生源としてよく知られるコンブ群落から採取した海水であるが、IOB の存在量にその他のサンプルと大きな差は見いだせなかった。以上の結果より、海洋環境における IOB の存在量を Real-time PCR で定量する方法を確立することに成功した。また、IOB が海水中に広く分布することが分子生態学的に初めて明らかになった。今後、IOB が大気中ヨウ素の放出にどの程度貢献しているか、その季節変動やヨウ素ガス濃度との相関などにより明らかにしていく予定である。

(4) Degenerate プライマーを用いたヨウ素酸

表 1. 各地から採取された海水中の IOB の存在量

| 採取地点 | IOB-1/全細菌 (%) | IOB-2/全細菌 (%) | IOB/全細菌 (%) |
|------|---------------|---------------|-------------|
| 台場 | 0.40 | 0.04 | 0.44 |
| 木更津 | 0.05 | 1.14 | 1.19 |
| 鶴沼海岸 | 0.30 | BDL | 0.30 |
| 江ノ島 | 1.18 | BDL | 1.18 |
| 由比ヶ浜 | 0.01 | BDL | 0.01 |
| 浄土ヶ浜 | 0.28 | BDL | 0.28 |
| 女川湾 | 0.54 | BDL | 0.54 |

化酵素遺伝子の増幅

Q1 株のゲノム DNA を鋳型とし、本研究で設計したプライマー NF1, NF2, AR1, AR2, BR1, BR2, BR3, BR4 を用いて PCR を行った。プライマーの組み合わせが NF1 と BR3 の時に約 1800 bp および 180 bp のバンドを、さらに NF2 と BR2 の時に約 700 bp のバンドを確認した。これら断片をそれぞれ Fragment A, B, C とし、クローニング後それぞれの塩基配列を解析した。その結果 Fragment A と B の配列は共に既知タンパク質と高い相同性を示さなかった。一方、Fragment C の配列は α -Proteobacteria に属する *Roseobacter denitrificans* の nitrate reductase の α サブユニットと 81% の相同性を示した。結果としてこれら degenerate プライマーを用いて PPO 類似タンパク質の遺伝子配列を得ることは出来なかった。

(5) ヨウ素酸化酵素の基質特異性と反応速度論的解析

ヨウ素酸化酵素のうちアイソザイムIIを精製し、これを用いて種々の基質存在下での反応を観察した。その結果、ヨウ素酸化酵素はヨウ化物イオン以外に、PPOの代表的な基質であるABTS、*p*-フェニレンジアミン、PPOのうちラッカーゼの代表的な基質であるシリungalダジンやヒドロキノン、その他カテコールや*o*-ジアニシジンなどのフェノール性化合物に対しても酸化活性を有することが明らかになった(表2)。一方、PPOの中でもチロシナーゼの代表的な基質であるチロシンに対しては酸化活性を示さなかった。以上の結果から、ヨウ素酸化酵素はPPOの中でもラッカーゼ(*p*-ジフェノールオキシダーゼ)に類似した酵素であることが明らかになった。これまである種の細菌がラッカーゼ様酵素を生産することは知られているが、その生理機能には不明な点が多く、ヨウ素酸化能を有するものも報告がない。IOBにおいて本酵素がヨウ素の酸化を触媒することは既に明らかであるため、機能が明確である細菌性ラッカーゼという点でも本酵素は特異な酵素といえる。

表2. ヨウ素酸化酵素の基質特異性

| 基質 | 活性 (mU/mL) | 相対活性 (%) |
|-----------------------|------------|----------|
| Iodide | 10,500 | 100 |
| <i>p</i> -PD | 9,380 | 89 |
| ABTS | 1,200 | 11 |
| Syringaldazine | 97 | 0.92 |
| L-tyrosine | 0 | 0 |
| Catechol | 4,830 | 46 |
| Hydroquinone | 310 | 3.0 |
| <i>o</i> -dianisidine | 2,730 | 26 |

一方、糸状菌においてはヨウ素酸化能を持つラッカーゼがこれまで2例(*Trametes multicolor*と*Myceliophthora thermophila*)報告されている。そこで、これら酵素とQ-1株のヨウ素酸化酵素のヨウ素酸化能を比較するため、 K_m 、 k_{cat} 、 k_{cat}/K_m など速度論的パラメーターを算出した(表3)。その結果、これら糸状菌のラッカーゼに比べて、Q-1株の酵素はヨウ化物イオンに対してより低い K_m 、高い k_{cat} を示し、結果的にこれら酵素よりも400~32,000倍も高い k_{cat}/K_m を有していた。これに対し、ABTSに対しては1/600~1/200という低い k_{cat}/K_m を示した。以上の結果より、Q-1株のヨウ素酸化酵素はこれまでに知られているラッカーゼの中で最も優れたヨウ素酸化能を有すること、またラッカーゼ本来の基質であるフェノール性化合物の酸化能はそれほど強くないことが示唆された。

表3. IOBと糸状菌ラッカーゼの反応速度論的比較

| | 基質 | K_m (mM) | k_{cat} (min ⁻¹) | k_{cat}/K_m (min ⁻¹ M ⁻¹) |
|-----------------------------------|--------|-------------------------|--------------------------------|--|
| Q-1株 | Iodide | 2.31 | 1.23 x 10 ³ | 5.33 x 10 ⁵ |
| | ABTS | 2.46 x 10 ⁻² | 9.13 x 10 | 3.71 x 10 ⁶ |
| <i>Trametes multicolor</i> | Iodide | 4.83 x 10 ² | 6.42 x 10 ² | 1.32 x 10 ³ |
| | ABTS | 1.41 x 10 ⁻² | 3.06 x 10 ⁴ | 2.17 x 10 ⁹ |
| <i>Myceliophthora thermophila</i> | Iodide | 1.60 x 10 ² | 2.70 | 1.69 x 10 |
| | ABTS | 4.95 x 10 ⁻² | 3.61 x 10 ⁴ | 7.26 x 10 ⁸ |

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① S. Amachi, K. Minami, I. Miyasaka, and S. Fukunaga, Ability of anaerobic microorganisms to associate with iodine: ¹²⁵I tracer experiments using laboratory strains and enriched microbial communities from subsurface formation water, *Chemosphere*, **79**, 349-354 (2010). (査読有り)

② S. Amachi, Microbial contribution to global iodine cycling: Volatilization, accumulation, reduction, oxidation, and sorption of iodine, *Microbes and Environments*, **23**, 269-276 (2008). (査読有り)

[学会発表] (計4件)

① 荒川裕美、田中寛、天知誠吾、海洋環境におけるヨウ素酸化細菌の存在量の定量、第24回微生物生態学会、平成20年11月25日~29日、北海道大学学術交流会館

② 荒川裕美、田中寛、天知誠吾、ヨウ素酸化細菌の分子生態学的解析、第7回微生物研究会(日本農芸化学会若手企画研究会)、平成20年11月14日、東京工業大学すずかけ台キャンパス

③ 下中知恵、関享子、田中寛、天知誠吾、新規微生物酵素”IOE”を用いたヨウ素除菌剤の開発、第11回ヨウ素学会シンポジウム、平成20年11月7日、千葉大学けやき会館

④ 天知誠吾、ヨウ素と微生物-新規機能を有する微生物の分離とその応用-、日本微生物資源学会、平成20年7月2日、千葉大学けやき会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天知 誠吾 (SEIGO AMACHI)

千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授

研究者番号：80323393