

2 価鉄の殺菌作用と作用機構

村田 晃*・日高 敏勝**・神田 康三・加藤 富民雄
(応用微生物学研究室)
平成19年11月30日 受理

Bactericidal Action of Iron(II) and Mechanism of the Action

Akira MURATA, Toshikatsu HIDAHA, Kohzo KANDA and Fumio KATO
(Laboratory of Applied Microbiology)
Received November 30, 2007

Summary

The *in vitro* effect of iron(II) on bacteria was investigated using nine bacterial species. Iron(II) was bactericidal toward all species examined. The bacteria were sensitive to iron(II) in this order from greatest to least: *Lactobacillus casei*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Micrococcus flavus* and *Morganella morganii*.

Mechanism of the bactericidal action of iron(II) was investigated with *E. coli* and *M. morganii*. Bubbling nitrogen gas through the reaction mixture inhibited the action. Addition to the reaction mixture of reducing agents, chelating agents and radical scavengers inhibited the action. The findings indicate that free radical mechanism is involved in the action and reactive oxygen species are responsible for the action.

Iron(II) had no effect on bovine serum albumin. It nicked supercoiled form of pUC18 DNA, giving first single-stranded breaks and then double-stranded breaks. The breaks could account for the bactericidal action. In iron(II)-treated bacterial cells, adsorption of T-phages were inhibited, indicating the alteration of bacterial cell surface by iron(II).

Key words: iron(II), bactericidal action, oxygen radical, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*,

緒 言

細菌を使用する微生物利用工業では、雑菌汚染による発酵生産の異常が問題となっていて、その防御対策に関する研究は、重要な課題のひとつである。

これを背景に、アスコルビン酸の細菌に対する作用について研究した。そして、アスコルビン酸は、多種の菌に対して殺菌作用を有すること¹⁾、その殺菌作用にフリーラジカル反応機構が関与していることを報告した²⁾。アスコルビン酸の殺菌作用については、村田の総説がある³⁾。

* 現在：佐賀短期大学食物栄養学科 (〒840 0806 佐賀市神園3 - 18 - 15)

**現在：アサヒビール(株)博多工場 (〒812 0895 福岡市博多区竹下3 - 1)

その後、アスコルビン酸の殺菌作用に関する研究は、より強力な作用を目指して、アスコルビン酸関連化合物に広がった。

アスコルビン酸と2価鉄は、安定な錯体を形成する^{4,5,6)}。著者らは、このアスコルビン酸-2価鉄錯体の細菌に対する作用について検討した。そして、この錯体は、アスコルビン酸の100~2000倍という強力な殺菌作用を有することと、アスコルビン酸が作用しない菌にも作用することを見出した^{7,8)}。さらに、その殺菌作用の機構について追究し、殺菌は、活性酸素種が関与するフリーラジカル反応機構によることを示した^{7,8)}。

しかし、同じフリーラジカル反応機構でも、アスコルビン酸-2価鉄錯体とアスコルビン酸では相違点があって、活性酸素種の生成系や反応系が違うことが示唆される。また、錯体の強力な作用において、2価鉄が重要な役割を果たしていると考えられが、その詳細については解明されていない。

そこで、2価鉄の役割を明らかにすることをひとつの目的として、2価鉄の細菌に対する作用について検討した。その結果、2価鉄は、強い殺菌作用を有することがわかり、その殺菌作用の機構について研究した。

本報文は、その次第と結果について報告するものである。

実 験 方 法

1. 試薬

2価鉄 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) は、和光純薬工業の製品を使用した。2-アミノエチルイソチウロニウム (AET) と2-メルカプトエチルアミン (MEA) は半井テクス社の製品、1,4-ジアザピシクロ [2,2,2] オクタン (DABCO) は片山化学工業の製品、EDTA は同仁化学研究所の製品、過酸化水素 (H_2O_2) は三菱瓦斯化学の製品、牛血清アルブミン (BSA)、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) は Sigma Chemical 社の製品、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動用マーカーは Pharmacia 社の製品、pUC18 DNA はニッポンジーン社の製品、その他の試薬は、和光純薬工業の製品を使用した。

2. 細菌

細菌は、Table 1 に示す9属9種を使用した。培地は、通常のブイヨン培地を使用した。が、*L. casei* は MRT 培地⁹⁾を使用した。培養は、37°C で振盪培養したが、*L. casei* は静置培養した。培養液の濁度は、スペクトロニック (島津 - Bausch - Lomb 20) を用いて660 nm の吸光度を測定した。そして、対数増殖期にある菌細胞を使用した。

Table 1. List of bacteria used

Bacterial strain	Abbreviation
<i>Bacillus subtilis</i> Y12S	BS
<i>Escherichia coli</i> B	EC
<i>Lactobacillus casei</i> S1	LC
<i>Micrococcus flavus</i> IFO3242	MF
<i>Morganella morganii</i> IFO3168	MM
<i>Proteus vulgaris</i> IFO3988	PV
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209P	SA
<i>Serratia marcescens</i> IFO3046	SM
<i>Salmonella typhimurium</i> LT-2	ST

3. 細菌の計数

細菌の計数は、通常のコロニーカウント法によった。*L. casei* は、村田らが改変した重層法によるコロニーカウント法¹⁰⁾によった。

4. 2価鉄の細菌に対する作用

2価鉄は、実験直前に蒸留水に溶解して使用した。細菌に対する作用は、特記しない限り、0.02 M トリス - 塩酸緩衝液 (pH 7.4) に菌 ($1 \sim 4 \times 10^7$ CFU/ml) と2価鉄を混和し、37℃で30分間反応させ、生存する菌を計数することによって検討した。

5. SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動

試料タンパク質と溶解液 (トリス - 塩酸 - グリセロール - SDS - 2 - メルカプトエタノール) を混和し、沸騰水に5分間漬け、タンパク質を分解した。これを平板のゲル (10% アクリルアミド) に載せ、100 V で2時間電気泳動した。泳動用緩衝液は、25 mM トリス - 192 mM グリシン - 0.1% SDS 緩衝液 (pH 8.3) を用いた。ゲルは、0.25% クーマシーブリリアントブルー R - 250 で染色した。

6. アミノ酸分析

試料タンパク質に6N塩酸と1%フェノールを加え、減圧しながら脱気し、封管、110℃で24時間加水分解を行った。加水分解液は、ロータリーエバポレーターで濃縮し、4時間放置、クエン酸緩衝液 (pH 3.15) を加え、メンブランフィルター (日本ミリポア工業 HV) で濾過した。アミノ酸組成の分析は、自動アミノ酸分析機 (日本電子 JLC - 300) を用いて行った。

7. アガロースゲル電気泳動

0.7% アガロースゲルに0.25% プロムフェノールブルーと40% ショ糖を加えた試料を載せ、50 V で40分間電気泳動した。泳動用緩衝液は、40 mM トリス - 20 mM 酢酸 - 1 mM EDTA 緩衝液 (pH 8.0) を用いた。ゲルは、臭化エチジウムを含む同上緩衝液に浸して染色した。この染色ゲルを紫外線照射装置 (Ultra-violet Product TL33) で照射しながら、ポラロイドフィルム (タイプ667) で撮影した。

8. ファージの吸着

E. coli に吸着する T2, T3, T5 ファージを用いた。2価鉄処理を行った菌 (生存率 0.1% 以下) とファージをブイヨン培地に混和し、37℃で10分間吸着させた。遠心分離を行い、上清の未吸着ファージを計数して吸着率を求めた。

9. その他

その他の実験方法は、通常の方法にしたがった。

結 果

1. 2価鉄の細菌に対する作用

2価鉄の細菌に対する作用について、9属9種の菌を用いて検討した。結果は Table 2 に示す。2価鉄は、菌種によって程度の違いはあるが、全ての菌に対して強い殺菌作用を示した。

Table 2. Effect of iron (II) on viability of different bacteria

Concn. (M)	Survival (%)								
	BS	EC	LC	MF	MM	PV	SA	SM	ST
3×10^{-3}	0	0	0	0	0~1	0	0	0	0
1×10^{-3}	0	0	0	0~1	10~20	0~1	0	0	0
3×10^{-4}	0	0	0	30~50	90~100	10~20	0	0	0
1×10^{-4}	0	0~1	0	90~100	-	60~80	5~10	4~8	0~1
3×10^{-5}	0~1	20~30	0~1	-	-	90~100	30~50	30~40	10~20
1×10^{-5}	10~20	50~70	5~10	-	-	-	90~100	90~100	40~60

Bacteria ($1 \sim 4 \times 10^7$ CFU/ml) were incubated with different concentrations of Fe^{2+} in 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) for 30 min. at 37°C. For abbreviation, see Table 1.

Table 3. Comparison of bactericidal action of AsA, iron (II) and AsA-iron (II) complex.

Reagent	Concn. (M)	Survival (%)
AsA	1×10^{-2}	1~2
	1×10^{-3}	20~30
Fe^{2+}	1×10^{-3}	0
	1×10^{-4}	0~1
	1×10^{-5}	50~70
AsA- Fe^{2+} complex	1×10^{-5}	0
	1×10^{-6}	2~4
	3×10^{-7}	40~70

E. coli (3×10^7 CFU/ml) was incubated with a reagent in 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) for 30 min. at 37°C.

菌の2価鉄に対する感受性は、高いほうから *L. casei*, *B. subtilis*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *S. marcescens*, *S. aureus*, *P. vulgaris*, *M. flavus*, *M. Morganii* の順であった。感受性が最も高い *L. casei* は、 3×10^{-5} M で生存率が0~1%, 最も低い *M. Morganii* は、100倍高濃度の 3×10^{-3} M で生存率が0~1%であった。

E. coli を用いて、2価鉄、アスコルビン酸、アスコルビン酸-2価鉄錯体の殺菌力を比較した。結果はTable 3に示す。各濃度における生存率を比較検討すると、2価鉄の殺菌力は、アスコルビン酸-2価鉄錯体の約10分の1である。しかし、アスコルビン酸と比べると、その約200倍と強力であることがわかる。

2. 2価鉄の殺菌作用

2価鉄の殺菌作用における、殺菌曲線と殺菌の可逆性について検討した。

2.1 殺菌曲線

2価鉄の殺菌曲線について、比較的感受性の高い *E. coli* を用いて検討した。結果はFig. 1に示す。曲線の形から、殺菌速度は反応初期に速く、その後は次第に減少することがわかった。

さらに、感受性の相違する4種の菌について、感受性の高い *L. casei*, 中程度の *S. marcescens*, 比較的低い *P. vulgaris*, 最も低い *M. Morganii* について検討した。結果はFig. 2に示す。*L. casei* は、反応初期に多少の肩がみられるが、その後は直線的であった。他方、その他の3菌種では、速度は初期に速く、その後は次第に減少した。すなわち、*E. coli* と同様である。菌種による殺菌曲線の違いは、感受性の高低が一因であろう。

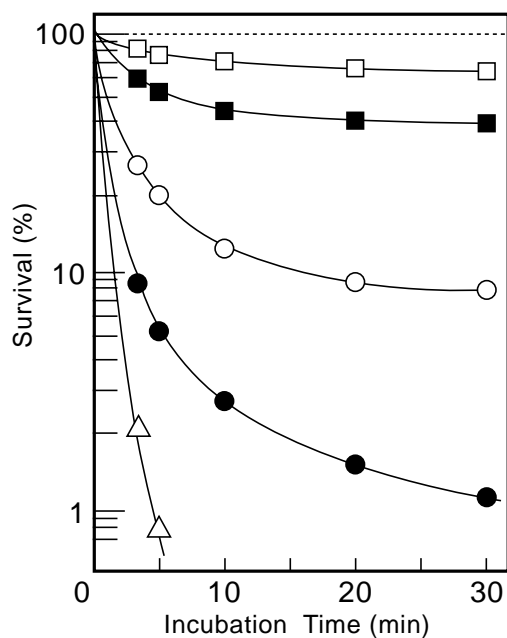


Fig. 1 Killing curve of *E. coli* by iron(II).
E. coli (3×10^7 CFU/ml) was incubated with different concentrations of Fe^{2+} in 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 37°C. Concentrations of Fe^{2+} (M): ----, 0; \blacksquare , 1×10^{-5} ; \circ , 2×10^{-5} ; \bullet , 5×10^{-5} ; \triangle , 1×10^{-4} ; \blacktriangle , 3×10^{-4} .

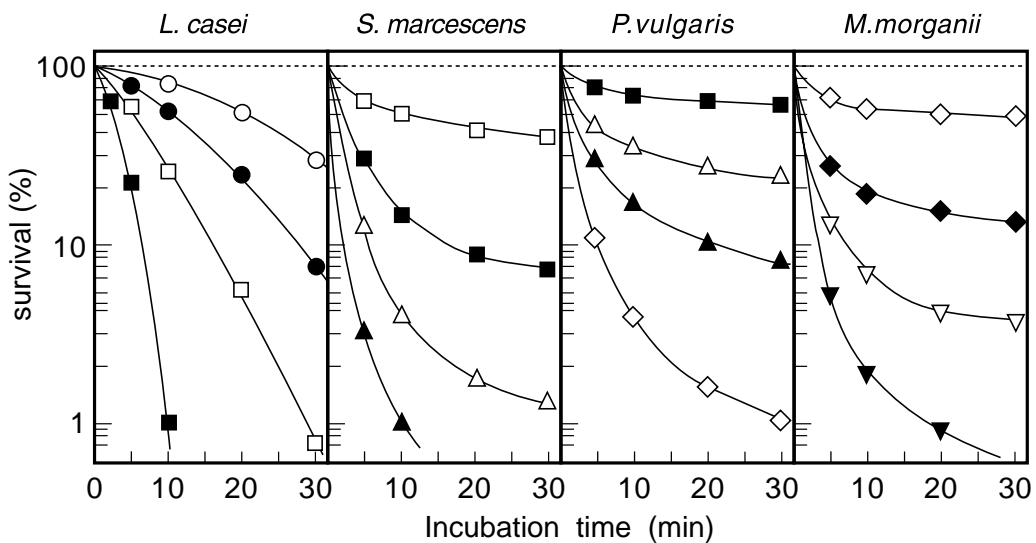


Fig. 2 Killing curve of *L. casei*, *S. marcescens*, *P. vulgaris* and *M. morganii* by iron(II).
 Bacteria ($1 \sim 4 \times 10^7$ CFU/ml) were incubated with different concentrations of Fe^{2+} in 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 37°C. Concentrations of Fe^{2+} (M): ----, 0; \blacksquare , 3×10^{-6} ; \circ , 1×10^{-5} ; \bullet , 3×10^{-5} ; \triangle , 1×10^{-4} ; \blacktriangle , 2×10^{-4} ; \diamond , 3×10^{-4} ; ∇ , 5×10^{-4} ; \square , 1×10^{-3} ; \blacklozenge , 2×10^{-3} ; \blacktriangledown , 3×10^{-3} .

2.2 殺菌の可逆性

2価鉄による殺菌の可逆性について、*E. coli* を用いて検討した。すなわち、反応の途中、反応液から2価鉄を除去（反応液を100倍に希釈して2価鉄の有効濃度以下にする）した場合に、コロニー形成能を失った菌がコロニー形成能を回復するか否かについて検討した。その結果、Fig. 3に示すように、コロニー形成能の回復がみられた。反応時間が短いときは100%近く回復した。反応時間が長くなるにつれて回復率は低下するが、20分反応では約20%にまで回復した。このことは、2価鉄による殺菌は可逆的であることを示す。

さらに、*M. Morganii* について検討したが、*E. coli* と同様、殺菌は可逆的であった（図省略）。

3. 2価鉄の殺菌作用の機構

2価鉄による殺菌の機構を明らかにするために、感受性の比較的高い *E. coli* と最も低い *M. Morganii* を用いて、殺菌作用に影響する因子について検討した。

3.1 *Escherichia coli* の殺菌に影響する因子

まず、*E. coli* について検討した。

1) pH

作用に及ぼす pH の影響について、トリス - 塩酸緩衝液とリン酸緩衝液を用いて検討した。結果は Fig. 4 に示す。pH 4.5~8.0 では、pH が低くなるにつれて作用は増大した。なお、リ

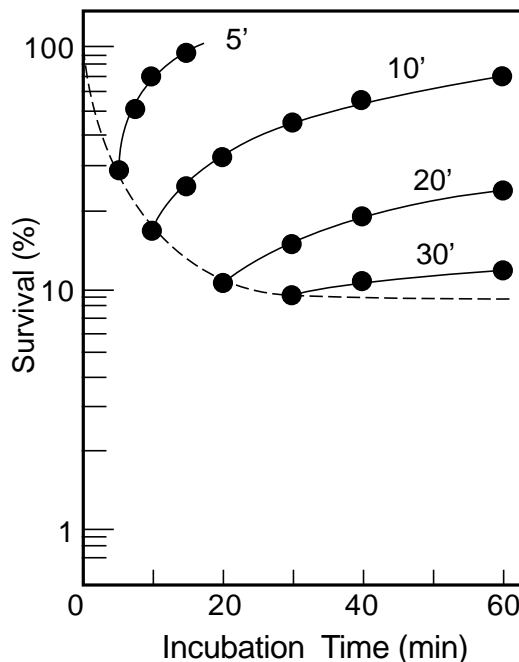


Fig. 3 Reversibility of killing of *E. coli* by iron(II). *E. coli* (3×10^7 GFU/ml) was incubated with 5×10^{-5} M Fe^{2+} in 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 37°C. At the times indicated in the figure, an aliquot of the reaction mixture was diluted 100-fold with the buffer and further incubated at 37°C. -----, killing curve of *E. coli*.

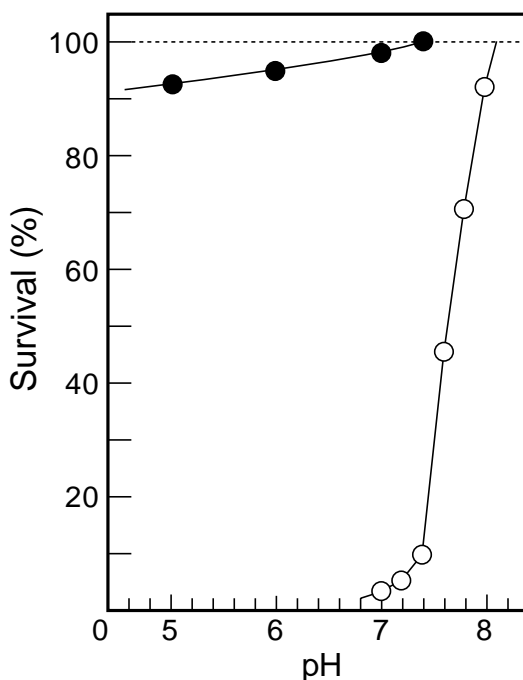


Fig. 4 Effect of pH on killing of *E. coli* by iron(II). *E. coli* (3×10^7 CFU/ml) was incubated with 5×10^{-5} M Fe^{2+} in different pHs of 0.02 M Tris-HCl buffer (○) or 0.02 M phosphate buffer (●) for 20 min. at 37°C. -----, without Fe^{2+}

Table 4. Effect of temperature on killing of *E. coli* by iron (II).

Temperature (°C)	Survival (%)
0	50 ~ 70
10	40 ~ 50
20	30 ~ 40
30	10 ~ 20
37	10
40	4 ~ 6
43	1 ~ 2
45	0 ~ 1

E. coli (3×10^7 CFU/ml) was incubated with 5×10^{-5} M Fe^{2+} in 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) for 20 min. at each temperature.

ン酸緩衝液に比べ、トリス - 塩酸緩衝液のほうが強い作用を示した。

以下の実験は、トリス - 塩酸緩衝液を用いて、生理的な pH である 7.4で行った。

2) 温度

温度の影響について検討した。結果は Table 4 に示す。温度が高くなるにつれて作用は増大した。0°Cでは反応は遅いが、長時間反応させると120分で生存率10%になり、37°C20分反応に相当するようになった。

以下の実験は、37°Cで行った。

3) 酸素

酸素の影響について検討した。結果は Table 5 に示す。反応液に酸素を吹き込んだ場合、作用に影響はみられなかった。一方、窒素を吹き込んで酸素を除去した場合と、真空中で反応させた場合には、作用は完全に阻害された。この結果は、作用に分子状酸素が必須であることを示す。

4) 酸化剤および還元剤

反応液に酸化剤あるいは還元剤を添加して、酸化剤と還元剤の影響について検討した。結果は Table 6 に示す。酸化剤である H_2O_2 は、高濃度ではそれ自体の殺菌作用のため実験できないが、実験可能な低濃度では作用を阻害した。還元剤の L-システインと 2-メルカプトエタノールは、作用を完全に阻害した。また、チオグリコール酸塩、ジチオスレイトール、グルタチオンは、程度の違いはあるが作用を阻害した。

5) 金属イオンおよび金属キレート剤

金属イオンと金属キレート剤の影響について検討した。結果は Table 7 に示す。1 価イオンの Na^+ は、作用を阻害した。2 価イオンの Ca^{2+} と Mg^{2+} は、作用を完全に阻害した。また、 Cu^{2+}

Table 5. Effect of oxygen on killing of *E. coli* by iron (II).

Incubated	Survival (%)
in normal atmosphere	10
in oxygen atmosphere ^a	10
in nitrogen atmosphere ^a	90 ~ 100
<i>in vacuo</i> ^b	90 ~ 100

E. coli (3×10^7 CFU/ml) was incubated with 5×10^{-5} M Fe^{2+} in 0.02 M

Tris-HCl buffer (pH 7.4) for 20 min. at 37°C.

^a Oxygen or nitrogen gas was bubbled through the reaction mixture.

^b Reaction was performed in a Tunberg tube evacuated with a vacuum pump.

Table 6. Effect of oxidizing and reducing agents on killing of *E. coli* by iron (II).

Addition	Concn. (M)	Survival (%)
None	0	10
H_2O_2	1×10^{-4}	70 ~ 80
	1×10^{-5}	60 ~ 70
L-Cysteine	1×10^{-3}	90 ~ 100
	1×10^{-4}	60 ~ 80
2-Mercaptoethanol	1×10^{-2}	90 ~ 100
	1×10^{-3}	40 ~ 60
Thioglycollate	1×10^{-3}	40 ~ 60
	1×10^{-4}	20 ~ 30
Dithiothreitol	1×10^{-3}	40 ~ 60
	1×10^{-4}	20 ~ 30
Glutathione	1×10^{-3}	30 ~ 40
	1×10^{-4}	10 ~ 20

E. coli (3×10^7 CFU/ml) was incubated with 5×10^{-5} M Fe^{2+} and an additional reagent in 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) for 30 min. at 37°C.

Table 7. Effect of metal ions and chelating agents on killing of *E. coli* by iron (II).

Addition	Concn. (M)	Survival (%)
None	0	10
Na ⁺	1 × 10 ⁻²	30 ~ 40
	1 × 10 ⁻³	10 ~ 20
Ca ²⁺	1 × 10 ⁻³	90 ~ 100
	1 × 10 ⁻⁴	40 ~ 60
Mg ²⁺	1 × 10 ⁻⁴	90 ~ 100
	1 × 10 ⁻⁵	50 ~ 60
Cu ²⁺	1 × 10 ⁻⁵	60 ~ 70
	1 × 10 ⁻⁶	30 ~ 40
Fe ³⁺	1 × 10 ⁻⁴	90 ~ 100
	1 × 10 ⁻⁵	20 ~ 30
Citrate	1 × 10 ⁻³	90 ~ 100
	1 × 10 ⁻⁴	90 ~ 100
EDTA	1 × 10 ⁻⁶	90 ~ 100
	1 × 10 ⁻⁷	50 ~ 60

For legend, see Table 6.

Table 8. Effect of radical scavengers on killing of *E. coli* by iron (II).

Addition	Concn. (M)	Survival (%)
None	0	10
AET	3 × 10 ⁻²	90 ~ 100
	1 × 10 ⁻²	80 ~ 90
MEA	3 × 10 ⁻³	90 ~ 100
	1 × 10 ⁻⁴	60 ~ 70
Tiron	1 × 10 ⁻²	90 ~ 100
	1 × 10 ⁻³	90 ~ 100
KBr	1 × 10 ⁻¹	50 ~ 60
	1 × 10 ⁻²	20 ~ 30
HCOONa	1 × 10 ⁻²	40 ~ 60
	1 × 10 ⁻³	10 ~ 20
KI	1 × 10 ⁻¹	20 ~ 40
	1 × 10 ⁻²	10 ~ 20
DABCO	1 × 10 ⁻²	90 ~ 100
	1 × 10 ⁻³	20 ~ 30

For legend, see Table 6.

Table 9. Effect of catalase and superoxide dismutase on killing of *E. coli* by iron (II).

Addition	Concn. (M)	Survival (%)
None	0	10
Catalase	100	10 ~ 20
	30	10 ~ 20
SOD	100	10 ~ 20
	30	10 ~ 20

See the legend to Table 6, but an enzyme was used instead of a reagent.

は作用を阻害した。3価イオンの Fe³⁺ は、作用を完全に阻害した。金属キレート剤のクエン酸塩と EDTA は、作用を完全に阻害した。

6) ラジカル捕捉剤

ラジカル捕捉剤の影響について検討した。結果は Table 8 に示す。

一般的なラジカル捕捉剤である AET と MEA は、作用を完全に阻害した。

特異的なラジカル捕捉剤のうち、スーパーオキシドアニオンラジカル (O₂⁻) の特異的捕捉剤である 1,2-ジヒドロキベンゼン-3,5-ジスルホン酸 (Tiron)¹¹⁾ は、作用を完全に阻害した。ヒドロキシルラジカル (OH[·]) の特異的捕捉剤である臭化カリウム、ギ酸塩、ヨウ化カリウム¹²⁾ は、程度の違いはあるが作用を阻害した。一重項酸素 (¹O₂) の失活剤である DABCO¹³⁾ は、作用を完全に阻害した。

7) カタラーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼ

カタラーゼと SOD の影響について検討した。結果は Table 9 に示す。H₂O₂ の分解に関与するカタラーゼと、O₂ の不均化反応を触媒する SOD は、作用にほとんど影響を及ぼさなかった。

これらの結果から、2価鉄による *E. coli* の殺菌は、活性酸素種が関与するフリーラジカル反応機構によると考えられる。

3.2 *Morganella morganii* の殺菌に影響する因子

フリーラジカル反応機構が *E. coli* に特異的なのか、菌種をとわず一般的なのかを知るために、2価鉄に対する感受性が最も低い *M. Morganii* について追究した。

1) 酸素

酸素の影響について検討した。反応液に酸素を吹き込んだ場合、作用に影響はみられなかった。一方、窒素を吹き込んだ場合と、真空中で反応させた場合には、作用は完全に阻害された(表省略)。

2) 酸化剤, 還元剤, 金属イオン, 金属キレート剤, ラジカル捕捉剤

酸化剤, 還元剤, 金属イオン, 金属キレート剤, ラジカル捕捉剤の影響について検討した。結果は Table10に一括して示す。

酸化剤の H_2O_2 は、高濃度では実験できないが実験可能な低濃度では作用を阻害した。

還元剤のグルタチオンとチオグリコール酸塩は、作用を完全に阻害した。また、2-メルカプトエタノール, L-システイン, ジチオスレイトールは、作用を阻害した。

金属イオンの Cu^{2+} は、作用を著しく促進した。他方、 Fe^{3+} は、作用を完全に阻害した。

金属キレート剤のクエン酸塩と EDTA は、作用を完全に阻害した。

一般的ラジカル捕捉剤の AET と MEA は、作用を完全に阻害した。

特異的ラジカル捕捉剤のうち、 O_2 に特異的な Tiron は、作用を完全に阻害した。 $OH\cdot$ に特異的なギ酸塩と臭化カリウムは、作用を完全に阻害した。また、ヨウ化カリウムは、作用を阻害した。 1O_2 に特異的な DABCO は、作用を完全に阻害した。

3) カタラーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼ

カタラーゼと SOD の影響について検討した。カタラーゼと SOD は、作用にほとんど影響を

Table 10. Effect of selected reagents on killing of *M. morganii* by iron (II).

Addition	Concn. (M)	Survival (%)
None	0	10
H_2O_2	1×10^{-3}	90 ~ 100
Glutathione	1×10^{-2}	90 ~ 100
Thioglycollate	1×10^{-2}	90 ~ 100
2-Mercaptoethanol	1×10^{-2}	70 ~ 80
L-Cysteine	1×10^{-3}	50 ~ 60
Dithiothreitol	1×10^{-2}	50 ~ 60
Ca^{2+}	1×10^{-3}	90 ~ 100
Mg^{2+}	1×10^{-4}	90 ~ 100
Cu^{2+}	1×10^{-5}	0
Fe^{3+}	1×10^{-4}	90 ~ 100
Citrate	1×10^{-3}	90 ~ 100
EDTA	1×10^{-3}	90 ~ 100
AET	1×10^{-2}	90 ~ 100
MEA	1×10^{-1}	90 ~ 100
Tiron	1×10^{-3}	90 ~ 100
HCOONa	1×10^{-2}	90 ~ 100
KBr	1×10^{-1}	90 ~ 100
KI	1×10^{-2}	50 ~ 60
DABCO	1×10^{-2}	90 ~ 100

See the legend to Table 6, but incubated with 5×10^{-3} M Fe^{2+} .

及ぼさなかった（表省略）。

これらの結果から，2価鉄による *M. Morganii* の殺菌は，*E. coli* と同様，活性酸素種が関与するフリーラジカル反応機構によると考えられる。

4. 2価鉄の作用部位

2価鉄の殺菌作用において，2価鉄が菌のどの部位に作用するのか知るために，菌の重要な構成成分であるタンパク質とDNAに対する作用について検討した。さらに，菌細胞表層に対する作用について検討した。

4.1 タンパク質に対する作用

2価鉄のタンパク質に対する作用について，モデルとしてBSAを用いて検討した。2価鉄とBSAを混和し，40℃で2時間反応させた。これは，濃度，反応温度，反応時間からみて，菌の99.9%以上が殺菌される条件である。この条件下で反応させたBSAについて，SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で検討した。その結果，泳動パターンは，反応BSAと未反応BSAにおいて有意の変化はみられなかった（図省略）。

さらに，同じ条件下で反応させたBSAについて，アミノ酸組成を検討した。結果はTable 11に示す。反応BSAと未反応BSAで，アミノ酸組成に有意の変化はみられなかった。

これらの結果は，通常の反応条件より厳しい条件下において，2価鉄は，タンパク質に作用しないことを示す。

Table 11. Amino acid composition of bovine serum albumin treated with iron (II).

Amino acid	Molar ratio (%)	
	Treated	Untreated
Asp /Asn	9.7	9.7
Thr	5.8	5.8
Ser	4.8	4.9
Glu / Gln	13.4	13.2
Pro	4.9	4.9
Gly	3.4	3.2
Ala	8.3	8.3
Cys	2.7	2.8
Val	6.4	6.5
Met	0.7	0.7
Ileu	2.3	2.3
Leu	11.0	11.0
Tyr	3.1	3.4
Phe	4.8	4.8
His	4.1	4.1
Lys	10.2	10.0
Trp	0.3	0.4
Arg	4.1	4.0

Reaction was performed in 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.03% BSA and 1×10^{-3} M Fe^{2+} for 2 hr. at 40°C.

Molar ratio (%) is represented by the molar concentration of each amino acid per total amino acid.

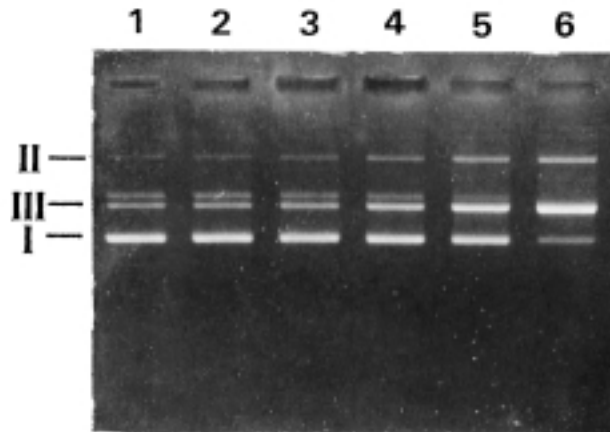


Fig. 5 Pattern of agarose gel electrophoresis of pUC18 DNA treated with iron (II).

pUC18 DNA was incubated with different concentrations of Fe^{2+} in 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) for 30 min. at 37°C. To the reaction mixture were added sucrose and bromophenol blue and loaded on a 0.7% agarose gel. Electrophoresis was carried out at 50 V for 40 min. Lane 1, untreated. Lane 2~6, treated with 1×10^{-6} , 3×10^{-6} , 1×10^{-5} , 3×10^{-5} and 1×10^{-4} M Fe^{2+} , respectively. I, II and III represents supercoiled, open circular and linear forms of DNA, respectively.

4.2 DNA に対する作用

2価鉄のDNAに対する作用について、モデルとして、プラスミドpUC18DNAを用いて検討した。pUC18DNAと2価鉄を混和し、37°Cで30分間反応させた。このDNAについて、アガロース電気泳動法で検討した。泳動パターンはFig.5に示す。初めに、閉環状の2本鎖DNAの片方に切れ目が入って(1本鎖切断)開環状になる。次いで、2本鎖に切れ目が入って(2本鎖切断)直鎖状になる。さらに、アットランダムな鎖切断が進行して、DNAが低分子化することが示された。

この結果は、通常の反応条件において、2価鉄は、DNAに作用すること、つまりDNAが標的分子であることを示す。

4.3 菌細胞表層に対する作用

細菌へのファージの吸着は、菌細胞表層に存在するファージレセプターとの結合による。したがって、ファージの吸着をみることによって、2価鉄によってレセプターが損傷を受けるか否か、つまり菌細胞表層が損傷を被るかどうか知ることができる。これについて、*E. coli*に吸着するT2、T3、T5ファージを用いて検討した。結果はTable12に示す。

2価鉄処理菌では、T2、T5ファージの吸着率は、10分の1以下に低下していた。また、T3ファージの吸着率は、約3分の1に低下していた。このことは、2価鉄によって、菌細胞表層のファージレセプターが損傷を受けること、つまり菌細胞表層が損傷を被ることを示す。

考 察

2価鉄の殺菌作用の機構を明らかにするために、感受性の相違する*E. coli*と*M. Morganii*を

Table 12. Adsorption of phages onto bacterial cells treated with iron (II).

Phage	Adsorption rate (%)	
	Treated cell	Untreated cell
T 2	5 ~ 10	100
T 3	30 ~ 35	100
T 5	2 ~ 5	100

E. coli (1×10^8 CFU/ml) was treated with 3×10^{-3} M Fe^{2+} for 30 min. at 37°C (survival < 0.1%). The treated cells were mixed with each phage (1×10^8 PFU/ml) in nutrient broth and allowed to adsorb for 10 min. at 37°C.

用いて、作用に影響する因子について検討した。

両菌に共通していえることは、1)作用に分子状酸素の存在が必須である、2)還元剤は作用を阻害する、3)金属キレート剤は作用を阻害する、4)一般的ラジカル捕捉剤は作用を阻害する、5)各活性酸素種に特異的なラジカル捕捉剤は作用を阻害することである。したがって、2価鉄の殺菌作用にフリーラジカル反応機構が関与して、菌細胞の内外で生成する活性酸素種が直接的、間接的に作用していると考えられる。

両菌で Cu^{2+} の影響は相違している。すなわち、 Cu^{2+} は、*E. coli* では作用を阻害するが、*M. Morganii* では促進する。これは、菌の感受性の高低、酸素分子や金属イオンなどの細胞膜透過性の相違、細胞内での活性酸素種の生成・反応の違いによるものであろう。

2価鉄の作用は、アスコルビン酸と相異している。アスコルビン酸では、1)殺菌反応に約20分のラグ(lag)がある、2)過剰の酸素は作用を促進する、3) H_2O_2 は作用を促進する、4) Cu^{2+} は作用を促進する、5)カタラーゼは作用を阻害する。したがって、アスコルビン酸と2価鉄では、活性酸素種の生成系と反応系が相違すると考えられる。アスコルビン酸-2価鉄錯体では、1)過剰の酸素、 H_2O_2 、 Cu^{2+} は作用を促進しない。2)カタラーゼは作用にほとんど影響を及ぼさない。3)殺菌反応はラグなしで進行する。これから、2価鉄の作用は、アスコルビン酸と相違し、アスコルビン酸-2価鉄錯体の作用に類似していることがわかる。

本研究の目的のひとつは、アスコルビン酸-2価鉄錯体の殺菌作用における2価鉄の役割を明らかにすることである。遊離の2価鉄は、殺菌作用を有している。その作用力は、アスコルビン酸-2価鉄錯体の約10分の1であるが、作用は錯体に類似している。遊離の3価鉄は、殺菌作用を示さないし、2価鉄の作用を阻害する。アスコルビン酸と2価鉄は、互いに作用を促進する。錯体において2価鉄は、アスコルビン酸の強い還元性によって有効な2価イオンの状態が安定的に保持されている。この特性が、アスコルビン酸-2価鉄錯体の強い作用力の基因であると考えられる。

2価鉄の殺菌作用において、2価鉄が菌のどの部位に作用するのか、すなわち2価鉄の標的分子を解明するために、菌の重要な構成成分であるタンパク質とDNAに対する作用について検討した。

タンパク質に対する作用については、BSAを用いて、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とアミノ酸組成分析によって検討した。その結果、2価鉄は、タンパク質に作用しないこと、つまりタンパク質は標的分子でないことがわかった。DNAに対する作用については、pUC18DNAを用いて、アガロースゲル電気泳動で検討した。そして、2価鉄はDNAに作用する(鎖切断を引き起こして損傷を与える)こと、つまりDNAが標的分子であることがわかった。こ

の鎖切断による DNA の損傷が殺菌の遺伝子であろう。

さらに、2 価鉄の菌細胞表層に対する作用について、ファージの吸着を指標として検討した。その結果、2 価鉄処理菌では、ファージの吸着が阻害された。このことは、2 価鉄によって菌細胞表層のファージレセプターが損傷を受けること、つまり菌細胞表層が損傷を受けることを示す。菌細胞の外側で生成する活性酸素種が直接的に作用すると考えられる。

以上総合すると、殺菌反応にラグがないこと、殺菌が可逆的であることから、2 価鉄は、反応初期に菌細胞表層に直接的に作用するのであろう。すなわち、2 価鉄の一次の作用点は、菌細胞表層ないし細胞外膜にあると考えられる。反応が進行すると、菌細胞膜を透過した酸素分子と 2 価鉄によって細胞内で活性酸素種が生成される。この活性酸素種は、菌細胞内膜に結合するクロモソーム DNA ないし膜近くに局在するクロモソーム DNA に作用して損傷を与える。これが殺菌の遺伝子ではあるが、時間的なずれのある二次的な作用である。

摘 要

1) 2 価鉄の 9 属 9 種の細菌に対する作用について検討した。2 価鉄は、菌種によって程度の違いはあるが、全ての菌に対して殺菌作用を示した。

2) 2 価鉄の殺菌作用の反応機構について、感受性の高い *E. coli* を用いて、作用に影響する因子を検討した。還元剤、金属キレート剤、ラジカル捕捉剤は、作用を阻害した。したがって、殺菌は、活性酸素種が関与するフリーラジカル反応機構によると考えられた。

3) さらに、感受性の低い *M. Morganii* について検討した。殺菌は、同様に、活性酸素種が関与するフリーラジカル反応機構によると考えられた。すなわち、反応機構は、菌種を問わず一般的であることがわかった。

4) 2 価鉄の作用部位について検討した。牛血清アルブミンを用いて検討し、2 価鉄は、タンパク質に作用しないことを示した。プラスミド pUC18DNA を用いて検討し、DNA に作用する（鎖切断を起こして損傷を与える）ことを示した。2 価鉄の菌細胞表層に対する作用について、ファージの吸着を指標として検討し、菌細胞表層が損傷を被ることがわかった。2 価鉄の一次の作用点は、菌の細胞表層ないし細胞外膜にあって、細胞内のクロモソーム DNA は二次の作用点であると考えられた。

引 用 文 献

1. 村田 晃・矢野信子 (1990). 細菌及び酵母に対するアスコルビン酸の殺菌作用. ビタミン 64, 709-713.
2. 村田 晃・木下玲子・井上由美・加藤富民雄 (1991). アスコルビン酸の *Escherichia coli* に対する殺菌作用の機序. ビタミン 65, 439-445.
3. 村田 晃 (1992). ビタミン C の殺菌作用. 防菌防黴 20, 439-445.
4. Conrad, M.E. and S.G. Schade (1968). Ascorbic acid chelates in ironabsorption; a role for hydrochloric acid bile. *Gastroenterology* 55, 35-45.
5. Forth, W. and W. Rummel (1973). Iron absorption. *Physiol. Rev.* 53, 724-741.
6. Gorman, J.E. and F. M. Clydesdale (1983). The behavior and stability of iron-ascorbate complexes in solution. *J. Food Sci.* 48, 1217-1225.
7. 盧 日煥・岸川茂樹・亀崎裕子・加藤富民雄・村田 晃 (1991). 2 価鉄 - アスコルビン酸錯体の細菌に対する作用. 農化 65, 1761-1768.

- 8 . 盧 日煥・岸川茂樹・山田いづみ・日高敏勝・加藤富民雄・村田 晃 (1992). 2 価鉄 - アスコルビン酸錯体の殺菌作用 . *ビタミン* 66 , 109 116 .
- 9 . Murata, A. (1971). Temperature-sensitive growth of wild-tipe phage J1 of *Lactobacillus casei*. *Agric. Biol. Chem.* 35, 667-673.
- 10 . 村田 晃・添田栄一・猿野琳次郎 (1969). 乳酸桿バクテリオファージのブランク生成に影響する因子 . *農化* 43 , 311 316 .
- 11 . Fridovich, I. and P. Handler (1962). Xanthine oxidase V. Differential inhibition of the reduction of various electron acceptors. *J.Biol.Chem* 237, 916-921.
- 12 . 浅田浩二 (1976). 酸素毒性 . *生化学* 48 , 226 257 .
- 13 . Ouannes, C. and T. Wilson (1968). Quenching of singlet oxygen by tertiary aliphatic amines. *J. Am. Chem. Soc.* 90, 6527-6528.