総 説

細菌の酸化ストレス防御システムと 酸化系抗菌剤の作用メカニズム

Bacterial Defense Systems against Oxidative Stress and the Mode of Action of Oxidative Antimicrobial Agents

坂 元 仁^{*1,†}・土 戸 哲 明^{*2}

(^{*1}関西大学先端科学技術推進機構, ^{*2}関西大学工学部生物工学科・ハイテクリサーチセンター)

Jin J. SAKAMOTO,^{*1,†} and Tetsuaki TSUCHIDO^{*2}

(^{*1}The Organization for Research and Development of Innovative Science and
Technology, Kansai University; [†]Corresponding author)

(^{*2}Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, and
High Technology Research Center, Kansai University)

1. はじめに

活性酸素自体やそれを発生させて有害微生物を殺滅させる作用をもつ抗菌剤は酸化系殺菌剤あるいは酸素系殺菌剤と呼ばれる。これらはその高い有効性から、食品やその製造環境、医療や病院、建築物などの衛生消毒、殺菌の目的で多用される。それらを使用する現場では、とかく結果としての薬剤処理の効力だけを注視しがちであるが、その基本となるこれらの薬剤の特性を把握するとともにその効果を適正に評価し、殺菌の十分さを確認あるいは予測する必要がある。さらには、薬剤がどのように微生物細胞に作用するのか、そのメカニズムを知るとともに、その薬剤に対して対象微生物がどのような耐性をもつのか、またどのような防御システムをもっているのかなど、相手の微生物細胞の抵抗戦略を細胞レベル、分子レベルで理解し、その上に薬剤作用の本質を知っておくことは実用にあたって有益であると思われる⁹¹⁾。

酸化系殺菌で利用される活性酸素種にはさまざまなものがある(表1)が、一般的にはヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)、スーパーオキシドアニオン($\text{O}_2^{\cdot-}$)、一重項酸素($^1\text{O}_2$)、過酸化水素(H_2O_2)が代表的なものである。微生物制御の方法の一つである活性酸素による酸化殺菌は効果も大きいことから、過酸化水素、過酢酸やオゾン、また二酸化チタンなど光増感物質への紫外線照射系、銀ゼオライトをはじめとする無機系の化合物などが医療、食品、環境などさまざまな分野で適用されている⁷⁵⁾。

本稿では、一般に対象微生物として細菌を取り上げ、

これらの酸化ストレスに対する防御システムと耐性機構について最近の知見を紹介するとともに、これに関連して食品の製造・流通環境における活性酸素を用いた酸化殺菌法におけるこれらの薬剤の作用メカニズムを取り上げることにはしたい。なお、本稿に先立って、別途、細菌の酸化ストレス防御機構とともに応用面から酸化系殺菌法の特性を述べた解説⁷⁵⁾を著しているので併せて参照されたい。

2. 細菌栄養細胞における酸化ストレス防御のための 酵素・物質

1) スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)

活性酸素消去酵素の一つである SOD は、スーパーオキシドアニオンの不均化反応を触媒し、過酸化水素と水を生ずる(図1)。この酵素には分子内に配位する金属の種類によって Mn, Fe, Cu/Zn, Ni の4種類のものがあり、このうち Mn-SOD と Fe-SOD との間にはそのアミノ酸配列に高い相同性がある⁶³⁾。細菌の Cu/Zn-SOD について活性が特定されているものは N 末端側にシグナルペプチドをもち、ペリプラズムか細胞質膜に局在するもので、細胞表層の酸化ストレス防御に関与していると考えられている^{10, 99)}。大腸菌の SodC はこのイオン型の酵素で、定常期に発現するペリプラズム酵素であり、酸化ストレス耐性に関与している^{33, 42)}。病原細菌である *Salmonella Choleraesuis* では2種類の Cu/Zn-SOD 遺伝子をコードし、感染時のマクロファージからの酸化バーストからの防御に関与すると考えられている⁷⁶⁾。Ni-SOD は、他の金属型酵素とはアミノ酸配列の相同性

[†] 連絡先

^{*1, 2} ☎564-8680 吹田市山手町 3-3-35

表 1. 活性酸素の種類

ラジカル	構造	非ラジカル	構造
スーパーオキシド	$O_2^{\cdot -}$	過酸化水素	H_2O_2
ヒドロキシラジカル	$\cdot OH$	一重項酸素	1O_2
一酸化窒素	NO	ヒドロペルオキシド	$LOOH$
一酸化窒素	NO_2	オゾン	O_3
ペルオキシラジカル	$LOO^{\cdot}$	次亜塩素酸	$HOCl$
アルコキシラジカル	$LO^{\cdot}$

図 1. 活性酸素とその発生。

がない新規な SOD として *Streptomyces* 属で初めて同定された酵素である^{47, 48)}。Mn-SOD, Fe-SOD は 2 量体あるいは 4 量体, Cu/Zn-SOD は単量体または 2 量体, Ni-SOD は 6 量体酵素である。大腸菌と枯草菌の SOD とそのホモログを表 2 にまとめた。

筆者らの研究室では、枯草菌の Mn-SOD である SodA は主要な SOD として栄養細胞だけでなく胞子にも存在していることを見いだした⁴³⁾。またゲノム上にコードされていたそれぞれ Fe 型と Cu/Zn 型の SOD ホモログである SodF と YojM の解析から、SodF は定常期、胞子形成初期にのみ SOD 活性が検出される 4 量体酵素であることを明らかにした⁷⁴⁾。また YojM については、最近 SOD 活性を示さない SOD 様の Zn 結合蛋白質であるとの報告がある⁸⁾が、SOD 多重欠損株の酸化系殺菌剤耐性試験で *yoyM* 欠損株の感受性化を認めたことからこれが細胞の耐性化に関与すると考えている⁷⁴⁾ (表 2 参照)。

2) カタラーゼ・ペルオキシダーゼ

カタラーゼは、SOD の反応によって発生する過酸化水素を水と酸素に変換する (図 1) が、これには大きく次の 3 種類のものがある¹⁸⁾。①シトクロム P450 と同じく鉄プロトポルフィリン (ヘム) を含むヘムオキシゲナーゼ型酵素、②そのヘムオキシゲナーゼ型カタラーゼの C 末端側にペルオキシダーゼを連結した型の酵素、③ Mn-カタラーゼで、3 つ目の Mn-カタラーゼは乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* で最初にクローニングされ、これはヘムを必要とせず、ヘムオキシゲナーゼ型カタラーゼとはアミノ酸配列上の相同性を示さない⁴¹⁾。

大腸菌 K-12 はヘムオキシゲナーゼ型の KatG とカタラーゼ-ペルオキシダーゼ型の KatE の 2 種類のカタラーゼを有している。どちらも細胞質内酵素で、ともにシグマ因子 σ^d で制御を受ける⁸⁴⁾。さらに KatG はレドックス制御型の転写調節因子 OxyR でも制御され、ストレス応答や発現時期に応じて合成量は変化する⁸⁴⁾。一方、大腸菌 O157 の大型プラスミド上からシグナルペプチドをコードするカタラーゼ-ペルオキシダーゼ型の *katP* 遺伝子が発見され¹³⁾、実際にペリプラズム酵素として活性を示すことが報告されている⁹⁷⁾。これら大腸菌のカタラーゼを表 3 にまとめた。また、*Helicobacter pylori* のヘムオキシゲナーゼ型カタラーゼ KatA は *katA* 遺伝子上流にコードされる KapA 蛋白質と結合し、KapA が TAT (Twin-Arginine 輸送システム) 依存性シグナルペプチドを含むことから複合体として輸送され、細胞外で活性を示すことが報告されている^{35, 36)}。このように病原菌の中には少数例ではあるが細胞質外にカタラーゼを分泌し、それが細胞の耐性化に寄与している場合がある。

枯草菌にも KatA, KatE, KatX の 3 種類のヘムオキシゲナーゼ型カタラーゼが存在し、異なる転写制御下に

表 2. 大腸菌と枯草菌の SOD

菌種	型	遺伝子	配位金属	調節因子	4 次構造	局在位置
大腸菌	Mn-SOD	<i>sodA</i>	Mn^{2+}	SoxRS, ArcAB, FNR	2 量体	細胞質
	Fe-SOD	<i>sodB</i>	Fe^{2+}	Fur ⁶⁶⁾ , Hfq ³¹⁾ , RyhB ³¹⁾	2 量体	細胞質
	Cu/Zn-SOD	<i>sodC</i>	Cu^{2+}, Zn^{2+}	σ^S , FNR	単量体 ⁶⁹⁾	ペリプラズム
枯草菌	Mn-SOD	<i>sodA</i>	Mn^{2+}	σ^A , σ^B ? ⁷⁰⁾	2 量体 ⁴³⁾	細胞質, 胞子, 細胞外
	Fe-SOD	<i>sodF</i>	Fe^{2+}	$\sigma^{E83)$	4 量体 ⁷⁴⁾	胞子 ⁵⁴⁾
	Cu/Zn-SOD	<i>yoyM</i>	Zn^{2+}	$\sigma^{H12)}$	単量体 ⁸⁾	ペリプラズム, 細胞外?

表 3. 大腸菌と枯草菌のカタラーゼと Mn-カタラーゼホモログ

菌種	型	遺伝子	配位金属	調節因子	4 次構造	局在位置
大腸菌	ヘム含有カタラーゼ	<i>katG</i>	Fe ²⁺	OxyR, σ^S	4 量体	細胞質
	ヘム含有カタラーゼ-ペルオキシダーゼ	<i>katE</i>	Fe ²⁺	σ^S	2 量体	細胞質
	(O157:H7) ヘム含有カタラーゼ-ペルオキシダーゼ	<i>katP</i>	Fe ²⁺	?	2 量体?	ペリプラズム
枯草菌	ヘム含有カタラーゼ	<i>katA</i>	Fe ²⁺	σ^A , PerR	4 量体?	細胞質
	ヘム含有カタラーゼ-ThiJ/PfpI/DJ-1 ファミリー	<i>katE</i>	Fe ²⁺	σ^{B26}	2 量体?	細胞質
	ヘム含有カタラーゼ	<i>katX</i>	Fe ²⁺	σ^B , σ^F	4 量体?	胞子
	Mn-カタラーゼ	<i>cotJC</i>	Mn ²⁺ ?	σ^E	CotJA と相互作用 ⁸¹⁾	胞子殻
	Mn-カタラーゼ	<i>ydbD</i>	Mn ²⁺ ?	σ^B	6 量体?	細胞質
	Mn-カタラーゼ	<i>ydhU</i>	Mn ²⁺ ?	Fur? ⁷⁾	?	?
	Mn-カタラーゼ	<i>yjqC</i>	Mn ²⁺ ?	σ^{K83}	6 量体?	胞子 ⁵⁴⁾

において、栄養細胞のストレス応答や、胞子形成期、胞子の発芽後生育時の過酸化水素耐性に関与することが報告されている^{6, 25, 71)}。筆者らの研究室では、これら 3 種類のカタラーゼを大腸菌 *katE*, *katG* 欠損株を宿主とした組換え体発現系より単離精製し、それらの生化学的諸性質を調査した。その結果、KatA>KatE>KatX の順で 1 分子当たりの過酸化水素処理能力が高く、なかでも KatE 酵素は他と比較して著しい耐酸性、耐熱性、耐塩性を示した⁷⁴⁾ (表 3 参照)。このように細胞は、各カタラーゼの発現制御だけでなく酵素の活性やその特性に応じてさまざまなストレスに対応しているのであろう。

3) グルタチオンおよびチオレドキシンの抗酸化因子

一般に、細胞内の酸化還元状態はグルタチオンとチオレドキシンのによって決定されると考えられている。チオレドキシンは分子内に特徴的なシステイン残基のモチーフ (Cys-X-X-Cys) を 2 カ所含み、酸化された場合チオレドキシ還元酵素の作用によって再生される。一方、グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペプチドで SH 基をもつ化合物として細胞内に多量に存在し、還元型が大部分を占める。還元型は GSH、酸化型は GSSG と表記される (図 1)。枯草菌はグルタチオン合成酵素をもたないが、必須遺伝子としてチオレドキシ *trxA*、チオレドキシ還元酵素 *trxB* とそのホモログ *yumC* の存在が報告されている^{51, 78)}。枯草菌の TrxA はアルキルヒドロペルオキシドレダクターゼ (AhpCF) とともに酸化ストレス防御に関与している^{3, 14)}。また枯草菌では有機ペルオキシド類の耐性にかかわる因子として大腸菌の OsmC と同性を示す OhrA と OhrB が存在する²⁸⁾。大腸菌の OsmC は浸透圧耐性や過酸化水素に関与すると報告されている⁵⁵⁾。OhrA と OhrB も 2 カ所のシステイン残基を保存していて細胞の耐性に関与すると考えられている。

4) 蛋白質, DNA を保護あるいは修復する因子

細胞内の蛋白質や DNA は酸化ストレスによって損傷を受けるが、細胞にはこれらの分子が損傷することから保護する因子や損傷を修復する因子がある^{20, 95)}。また、

酸化ストレスによって熱ショック蛋白質が重複して誘導される場合があり⁹⁶⁾、大腸菌では低分子熱ショック蛋白質 IbpAB や Hsp33 などの分子シャペロンの誘導が報告されている^{84, 105)}。当研究室で報告しているように、大腸菌の IbpA と IbpB は熱だけでなく酸化剤による蛋白質の変性や凝集を防ぎ、機能障害から守っているものと推察される^{49, 50)}。HSP33 は酸化ストレスにさらされた大腸菌において、システイン残基を介した分子内レドックス制御により活性化してシャペロンとして働くことが報告されている⁴⁵⁾。DNA の保護蛋白質としては、大腸菌では Dps が^{2, 61)}、枯草菌でも Dps ホモログの PexB と MrgA が知られ、栄養細胞の過酸化水素耐性に関与することが報告されている^{4, 19)}。さらに、DNA は活性酸素による攻撃によって容易に酸化され、8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-dG) を生成して変異の原因となるが、8-OH-dGTPase や他の DNA 修復酵素群により修復されることが知られている⁹⁸⁾。

5) その他の因子

細菌にはほかにも酸化ストレスに対する防御機能をもつ因子がある。Mn イオンの添加は細胞を抵抗性化するが、このイオンは細胞内の Mn 型 SOD に取り込まれて活性が上昇するほか、筆者らの研究室で枯草菌の Mn-SOD 欠損株を用いて明らかにしたように、Mn イオン自体も *in vivo* でスーパーオキシドアニオン消去活性をもつことを認めている^{43, 44)}。

3. 細菌栄養細胞の酸化ストレス応答とその制御システム

細菌栄養細胞を酸化的な殺菌処理にさらすと、細胞は酸化ストレスを感知して、それに対する防御システムを発動させる。この酸化ストレス応答は、特定の制御因子の働きで染色体上に散在する各種の酸化ストレス遺伝子の発現が活性化し、種々の酸化ストレス蛋白質が合成される。また、細菌は酸化ストレスを含む多くのストレスに共通して作動する一般ストレス応答システムももっている。これらの蛋白質の働きによって細胞内の酸化ストレスによる損傷が修復されたり、不都合な状況が除去、

解消されることになる。これらの応答に関与する制御因子について以下に述べる³⁴⁾。

1) チオール基を用いた酸化還元制御型の転写調節因子

この型の因子の代表は大腸菌の OxyR や枯草菌の PerR である。大腸菌は過酸化水素ストレスにさらされると、細胞内に存在する不活性型の OxyR 転写調節因子分子内の 199 位と 208 位のシステイン残基が過酸化水素存在下でジスルフィド結合を形成して活性型に変換し、OxyR レギュロンの遺伝子発現を誘導する。OxyR は還元型グルタチオンの作用で還元され、不活性型に戻る^{21, 84, 104, 105)} (図 2)。枯草菌では、過酸化水素ストレスにおける負の転写調節因子 PerR¹⁵⁾、有機系ペルオキシドにおける負の転写調節因子 OhrR が知られている^{28, 37)} (図 3)。PerR は大腸菌における鉄取り込みの負の転写調節因子である Fur のホモログで、枯草菌や *Staphylococcus aureus* で保存されている反復配列の *per box* に結合する。PerR は Fur と同様に Fe イオンと Zn イオンが各 1 原子配位し³⁹⁾、C 末端側には Cys-X-X-Cys モチーフを 2 カ所含んでいる。Fe 配位部位が Mn 配位に変わったものは、過酸化水素処理でも不活性

化されにくいことから、細胞内の Fe/Mn イオンのホメオスタシスも関係し、またジチオスレイトール処理で DNA 結合能が回復することから酸化を介して不活性化されると考えられるが詳細は不明である。もう一つの OhrR は、有機ペルオキシド耐性化に関与する OhrA の遺伝子上流にある反復配列に結合してリプレッサーとして作用するが、酸化ストレスにさらされて OhrR 分子の 15 位のシステイン残基のチオール基が酸化して DNA 結合能を消失し、このため *ohrA* 遺伝子の転写が開始される²⁷⁾。OhrA ホモログの OhrB は一般ストレス応答のシグマ因子 σ^B による制御を受けている²⁸⁾。

2) Fe-S クラスター型の転写調節因子

この型のものとしては大腸菌の SoxR や Fnr が挙げられる。大腸菌がスーパーオキシドや一酸化窒素ストレスにさらされたとき、内部に [2Fe-2S] クラスター構造をもつ転写調節因子 SoxR が酸化されて活性化し、別の転写調節因子である SoxS の遺伝子発現の促進をもたらす。この SoxS によって *soxRS* レギュロンの遺伝子の発現が促進され³⁰⁾、Mn-SOD やグルタルレドキシシンが誘導生産される⁸⁴⁾ (図 2)。SoxS は Rsx や RseC により還元されて不活性型に戻る⁵²⁾。Fnr も内部に [4Fe-4S] クラスター構造をもち、嫌気条件下で *fnr box* と呼ばれる DNA 配列に結合して Fnr レギュロンの遺伝子発現を促進するが、好気条件下の酸化によって不活性化されることが報告されている⁶⁸⁾。

3) シグマ因子による転写制御

上述の応答システムは酸化ストレスに特異的なものであるが、細菌には種々のストレスに共通的に働く一般ストレス応答と呼ばれるシステムも保有している。大腸菌では飢餓ストレスによって熱や酸化ストレスに対する耐性が上昇することが報告されているが、これには RNA ポリメラーゼのサブユニットのシグマ因子 σ^S が関与している。 σ^S が発現を支配する遺伝子群である σ^S レギュロンには DNA 保護蛋白質 Dps やカタラーゼの KatE, KatG や Cu/Zn-SOD の SodC など多数の因子が存在し、その中のいくつかは OxyR や SoxRS レギュロンの支配下にもあって複数の因子により制御されている⁸⁴⁾。 σ^S 自体も、転写 (ppGpp, CRP-cAMP など多数)、後述の転写後調節 (*dsrA* snRNA, *oxyS* snRNA など多数)、 σ^S 蛋白質分解過程 (ClpXP, DnaK など多数) において複数の制御を受けている³⁸⁾。

Salmonella では、 σ^S のほかに表層ストレス応答の遺伝子群の発現を制御する σ^E と熱ショック応答の制御因子 σ^H も酸化ストレスに寄与していることが報告されている^{24, 87)}。その後の研究によってこれらの σ 因子はカスケードシステムを形成しており、それを通じて酸化ストレス防御にかかわっているとモデルが提出された⁹⁾。これによれば、表層ストレスによって抗シグマ因子 RseA から σ^E が離脱し、それによって σ^E レギュロンが発現し、そのメンバーである熱ショック応答の制御因

OxyR system

SoxRS system

図 2. 大腸菌における OxyR 系と SoxRS 系。

PerR system

OhrR system

図 3. 枯草菌における PerR 系と OhrR 系。

Sigma R system

OxyS small non-coding RNA system

図4. σ^R 制御系と低分子 RNA コード領域による制御系。

子である σ^H が生成する。 σ^H レギュロンの発現はその構成メンバーの *hfq* 遺伝子を発現させ、 *rpoS* の転写を促進する制御蛋白質の HF-1 が合成される。これによって σ^S レベルが増大し、そのため酸化防御機能が発揮されるというものである⁹⁾。筆者らはこれに呼応する結果として、大腸菌でも、 *rpoS* だけでなく *rpoE* 遺伝子破壊株も過酸化水素に感受性になることを認めている⁷⁴⁾。

一方、枯草菌では一般ストレス応答のシグマ因子 σ^B が知られており、これも飢餓、熱、酸化剤、エタノール、高塩濃度のさまざまなストレスで誘導され、細胞の耐性化に関与している^{88, 72)}。ECF シグマ因子である σ^M も一般ストレスやスーパーオキシドアニオンに対する耐性化に関与することが報告されている^{16, 88)}。また、グラム陽性細菌の *Streptomyces coelicolor* では σ^R -RsrA システムが発見され⁶⁷⁾、同様のものが *Mycobacterium tuberculosis* では σ^H と命名されているが⁵⁸⁾、これらの菌種のそれぞれ σ^R および σ^H 欠損株とも酸化ストレスに感受性を示すことが報告されている。これは普段は抗シグマ因子 RsrA がシグマ因子 σ^R と結合して不活性化しているが、酸化ストレスにより RsrA 内部のシステイン残基でジスルフィド結合を形成して不活性化し、解離した σ^R が RNA ポリメラーゼと結合して、 σ^R レギュロンの遺伝子発現を促進するというシステムである⁵⁾。この σ^R レギュロンの中にはチオレドキシン遺伝子が存在し、RsrA はチオレドキシンにより還元され再活性化されるフィードバック制御を受けている (図4)。

4) 低分子 RNA の転写後調節による制御

細菌細胞にはそのほかにも RNA によって制御を受けるものがある⁸⁵⁾。OxyR レギュロンに含まれる *oxyS* 遺伝子は、酸化ストレス時に OxyR によって転写されるが蛋白質には翻訳されない低分子 RNA (small non-coding RNA; snRNA) をコードしている。この RNA は σ^S をコードする *rpoS* mRNA のリボソーム結合領域に結合するアンチセンス RNA として働き、 *rpoS* mRNA のリボソームへの結合を阻害して翻訳を抑制する^{73, 103)} (図4)。 *oxyS* の欠損により変異率が上がることから、こ

の遺伝子産物は細胞の耐性化を抑制することにより、遺伝的均一性を保つために必要なのではないかと考えられているが詳細は明らかでない³²⁾。RNA シャペロンである Hfq は *sodB* mRNA に強く結合してその二次構造を変化させ、これによって *sodB* mRNA の RyhB small RNA との結合が促進される。これは *sodB* mRNA の翻訳開始阻害をもたらし、さらに *sodB* mRNA の RNase E による分解を引き起こして、SodB の合成を負に制御する³¹⁾。

4. 細菌栄養細胞に対する酸化系抗菌剤の作用メカニズム

酸化系殺菌剤は実用的に広く用いられており、その作用の特性やメカニズムについての文献は数多く発表されている^{75, 82)}。基本的にこれらの薬剤による殺菌効果は、その酸化作用の反応によって発生するヒドロキシルラジカルなどの活性酸素種が、細胞の生命活動に重要な DNA や蛋白質あるいは細胞膜の脂質分子を攻撃して損傷を与え、それらが修復不能となることによってもたらされると考えられる (図1)。以下に代表的な酸化系殺菌剤の作用メカニズムに関する知見を紹介する。

過酸化水素の殺菌作用は発生期の酸素の酸化作用によると考えられている。遷移金属である鉄や銅の還元型イオンが存在するとヒドロキシルラジカルを生じる。また、 Fe^{2+} 存在下に過酸化水素がスーパーオキシドアニオンと反応すると、鉄の触媒による Harber-Weiss 反応かスーパーオキシドアニオン駆動の Fenton 反応によって過酸化水素から高い反応性をもつヒドロキシルラジカルが発生し、これが強力な殺菌作用を示す。過酸化水素の殺菌作用は高温ほど著しくなるが、これは生体内でのこのラジカル発生が温度に強く依存するためとみられる。好氣的に増殖する微生物では少量の過酸化水素が発生するが、*Lactobacilli* などヘムをもたない乳酸菌のグループは、呼吸鎖のチトクローム系を利用して酸素を水に転換できず、L-乳酸オキシダーゼや NADH オキシダーゼ、ピルビン酸オキシダーゼなどによって細胞内で過酸化水素を発生し、これが乳酸菌による抗菌性の要因の一つとなる⁴⁶⁾。また、生体内で高レベルの塩素イオンや重炭酸イオンなどアニオンが含まれている場合には、ヒドロキシルラジカルから二次的なより寿命の長いラジカルが発生する可能性があり、これらも蛋白質などの細胞内の分子を攻撃する。さらに鉄を含む蛋白質や低分子複合体がヒドロキシルラジカル発生の促進剤となり、それによって鉄イオンは結合していた蛋白質などから遊離する⁴⁶⁾。

過酢酸は過有機酸の代表であるが、この製剤は次の反応式に示される化学平衡にあるため、過酸化水素のほかに酢酸が共存する。過酢酸の殺菌作用は過酸化水素よりもかなり強力であり、細菌胞子に対しても有効である。

図5. 大腸菌に対する銀ゼオライトの作用⁶²⁾. (A)酸素の影響. 嫌気条件下(○)と好気条件下(●). (B) カタラーゼ欠損株に対する作用. 野生株 CSH4 株 (○) とカタラーゼ欠損株 UM1 (●) を銀ゼオライト (10 mg/ml) で処理. 温度は 37°C.

作用は高温側で上昇するが低温でも比較的効力を持ち、酸性側で効果が大であるとともに共存有機物の影響が少ない特徴がある。作用メカニズムの詳細は不明であるが、過酢酸の殺菌作用にもヒドロキシルラジカルがかかわっていると考えられる²²⁾。過酸化水素の共存は過酢酸の作用を増強するとされるが、菌種によっては阻害される場合もある^{1, 46, 100)}。

オゾンは空気中や水中で自己分解して酸素を放出し、強力な酸化作用を示す。殺菌作用は空中より水中でより大きく、気中の殺菌効果は相対湿度が高い領域で大きい。水中では酸性側 pH で安定であるがアルカリ側では不安定で、有機物など環境中の物質の存在によって効力が顕著に低下する。この殺菌作用も発生するヒドロキシルラジカルによって発揮され、DNA や蛋白質に対する作用が細胞死滅の要因と推測されている⁶⁴⁾。

重金属イオンは蛋白質に不可逆に結合し、その蛋白質の活性を阻害して殺菌作用を示すと考えられているが、銀や銅イオンは遷移金属として上述の Fenton 反応や Harber-Weiss 反応にかかわって結果的に活性酸素種を発生する。また、これらのイオンをゼオライトやリン酸ジルコニウムなどの無機系担体に結合、置換したものではこれに接触した細胞が死滅するが、この殺菌作用に活性酸素種の関与が示唆されている^{53, 62)}。図5には、37°C における銀ゼオライト (10 mg/ml) の野生株に対する嫌気下での処理とカタラーゼ欠損株に対する処理について検討した筆者らの結果を示した⁶²⁾。二酸化チタンに紫外線 (350~380 nm) を照射するとその表面で正孔と電子が生成され、それぞれ酸化還元反応が起こる²⁹⁾。その光触媒作用によって水が分解されるが、酸素が存在しない場合、水素原子とヒドロキシルラジカル、存在するとスーパーオキシドアニオンとヒドロキシルラジカルが生成し、殺菌作用を示すと考えられている²⁹⁾。

そのほか、種々の光増感物質は酸素存在下に光を吸収して一重項励起状態から三重項励起状態になり、これが

周囲の酸素にエネルギーを移すことによって一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) やスーパーオキシドアニオンを発生させて殺菌作用を示すとされる⁸⁶⁾。光増感物質としては、生体由来のフラビン系化合物やローズベンガル、エオシン Y, NADH, トリプトファン, リボフラビンなどの生体由来物質やテトラサイクリンなどがある。筆者ら⁵⁶⁾は α -ターチエニルフィルムに近紫外光を照射することによって顕著な殺菌効果がみられることを報告しているが、これは発生した一重項酸素が細胞膜に障害を与えたことによるものと推察している。

そのほか、強酸性電解水の殺菌作用は次亜塩素酸が作用の主体と考えられているが、共存する活性酸素の作用が強くかかわっているとみられている⁴⁰⁾。また、酸化カルシウムも殺菌作用を示すが、その粉末スラリーから過酸化水素やスーパーオキシドアニオンが検出されており、これが殺菌作用にかかわっていると考えられている⁷⁷⁾。

5. 細菌胞子における防御システムと酸化系抗菌剤の殺胞子作用メカニズム

1) 細菌胞子の酸化ストレス防御システム

細菌胞子は酸化ストレスに限らず熱や放射線などさまざまなストレスに対して高い抵抗性をもっているが、これはコア内の脱水や胞子殻 (spore coat) や皮層 (cortex) の存在、低分子酸可溶性蛋白質 SASP の DNA 結合、ジピコリン酸の存在など胞子特有の構造や成分、機能によってもたらされるものと考えられている⁸⁰⁾。これら一般的なストレスに対する抵抗性を別とすれば、酸化ストレスに対する特有の防御システムの詳細についてはあまり検討されていない。

細菌胞子の形成には Mn^{2+} や Ca^{2+} などの 2 価カチオンが必要であるが、これら胞子形成時のイオン種は酸化系殺菌剤に対する耐性に影響する。塩酸処理によって H (プロトン) 型胞子に転換させた胞子を Ca 型に戻すと過酸化水素や α -ブチルヒドロペルオキシドに耐性となる。

また、胞子の環境中に遷移金属イオンがあると酸化系殺菌剤に対して感受性となる傾向がある⁵⁹⁾。

枯草菌胞子中には Mn-SOD が存在しているが、当研究室で認められた結果ではこの欠損株の胞子は耐熱性や酸化系殺菌剤に感受性ではなく、発芽時の際のストレスに対する防御機能をもつことが考えられる。また前述したように、この欠損株の解析によって Mn イオン自体も SOD 活性をもつことを明らかにしたことから、胞子形成に必要な Mn イオンは酸化ストレス防御機能にもかかわっている可能性がある。また枯草菌胞子中に存在するカタラーゼとして KatX があり、これが発芽後成長中の耐性に関与しているとする報告がある⁶⁾。

細菌胞子は基本的には代謝的に不活性であり、紫外線による DNA 損傷の胞子特異的な修復機構のような積極的な修復や応答システムは酸化系抗菌剤の損傷作用に対

してはもっていないとされる⁶⁵⁾。しかし、胞子はそれに対して耐性を付与する特性をもっており、胞子表層の胞子殻は薬剤や活性酸素種侵入の透過障壁として働き、また胞子内では低分子酸可溶性蛋白質 SASP (small acid soluble protein) が胞子内 DNA の保護蛋白質として胞子耐性化に寄与している⁷⁹⁾。

2) 酸化系抗菌剤の殺胞子作用メカニズム

酸化系抗菌剤の胞子殺滅作用メカニズムについては多くの知見があり、筆者ら⁷⁵⁾も関連の解説を記しているが、ここでは最近の主な報告を取り上げる。

銅イオンとアスコルビン酸は食塩存在下、好気条件下では細菌胞子に対して有効な酸化系殺菌剤として作用する。これは高濃度アスコルビン酸 (AA) と銅イオンとの間の反応で AA の酸化型であるデヒドロアスコルビン酸 (DAA) が生じ、これによって生じる 1 価銅イオンが酸化される際にスーパーオキシドアニオンを発生し、さらにこれに由来して過酸化水素が殺菌作用を示す。すなわち、

全体では、 Cu^{2+} 存在下で

となる。*Bacillus globigii* 胞子はこれによって著しく死滅するが、これに 2M 食塩と 1% 界面活性剤を加えておくと効果はさらに増強されることが報告されている²³⁾。この作用はヒドロキシルラジカルの発生剤であるオゾンと異なって外部から直接胞子殻を破壊するものではなく、胞子内部へ透過したアスコルビン酸や銅イオンから溶存酸素によってヒドロキシルラジカルが発生したことによると推察され、食塩によるイオン強度の上昇は胞子殻の透過を高め、界面活性剤は溶液の表面張力を下げて胞子との接触を促進したものと考察されている²³⁾。

細菌胞子に対する過酸化水素の殺菌作用については多くの知見があるが、胞子殻がそれに対する耐性に関与することは古くから知られている¹¹⁾。過酸化水素あるいは過硫酸カリウムを活性成分とする酸化系殺菌剤（それぞれ、Decon と OxoneTM）やオゾンの殺胞子作用は DNA 損傷によるものではなく、おそらく胞子膜に障害を生じ

て発芽能を失わせるために起こると考えられている^{101, 102)}。同様な作用は Sterilox[®] という商品名の次亜塩素酸を含む酸化系殺菌剤についても示されており、この場合は発芽後のプロセスが抑制される⁵⁷⁾。したがって、胞子殻はこれらの殺菌剤に対する胞子の耐性に大きな働きをもつとみられている。さらに、筆者ら⁸⁹⁾は、気相系過酸化水素の殺胞子効果を検討し、処理時の相対湿度が 33% のときに最も感受性であり、胞子形成時の存在 2 価カチオンが影響すること、また胞子殻の除去は感受性を高めることを報告した (表 4)。

これらの抗菌剤の効果と作用の特性を考えるにあたって、殺菌を誘発する本体であるラジカルを主とする反応性分子が、細胞のどこで不可逆な損傷を起こすための有効濃度の量に達するかが重要であろう。過酸化水素や t-ブチルヒドロペルオキシドについて報告されている一般的な処理例では、それらの標的部位は胞子内部コアにあるとするものもあるが⁶⁰⁾、むしろ表層の胞子殻を攻撃することを指摘する報告も多い¹¹⁾。発生する活性酸素種がヒドロキシルラジカルのような寿命の短い種の場合、胞子外で発生すればその主な標的は胞子殻となり、内部に到達できず、殺菌効果は小さくなると推定される。

6. おわりに

細菌の酸化ストレスに対する耐性や応答防御システムは複雑多様であり、巧妙緻密に制御されている。酸化系殺菌剤にさらされた場合、細胞は単純に死滅するのではなくこれらの防御システムを作動させて必死に損傷を修復して生存性、増殖能を取り戻そうとする。一方、この細胞側の抵抗戦略とは別に薬剤側の視点から酸化系殺菌剤の作用メカニズムを考える場合、これらの薬剤の実質的な活性作用種は反応性が高く細胞のさまざまな分子に傷害を与える活性酸素であり、どの活性酸素種がどこで発生するかが問題である。これには添加した殺菌剤自体の細胞膜透過性もかわる。細胞外で反応活性種が発生した場合は細胞表層が傷害を受けると推察されるが、過酸化水素のような寿命の長いものは外で発生してもその後細胞内へ侵入し、細胞内の状況に依存するがヒドロキシルラジカルを生じて細胞死に至るだろう。酸化系殺菌剤の殺菌効果は、対象微生物の防御反応と薬剤の作用

表 4. 枯草菌 ATCC9372 株の胞子の気相系過酸化水素処理に対する耐性とそれに対する相対湿度、胞子形成時の 2 価カチオン、胞子殻除去の影響⁸⁹⁾

胞子形成のイオン型	脱胞子殻処理	相対湿度 (%)			
		10	33	53	85
Mn	×	16	8.3	35	36
	○	0.9	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Ca	×	7.4	<0.0001	12	7.8
	○	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

過酸化水素蒸気は加熱プレート上で発生させ、積算濃度は 175.3 mg/l で胞子を 120 分処理。
数字は処理後の初発値に対する生存率 (%)。

反応の双方がかかわった結果として現れるので、これらの基礎的な事項を把握しておくことは、酸化系殺菌剤の実用にあたって有益であると思われる。

紙面の都合のため本稿では取り上げなかったが、その他の関連項目としては以下のものがあり、実用にあたってはこれらについても考慮すべき問題である。

①酸化系殺菌剤と加熱など他の処理との併用によって相乗殺菌効果が得られるが、最初の酸化ストレス処理によって酸化ストレス応答や一般ストレス応答が作動する系では、逆に二次ストレス処理に対して抵抗性となる交差保護の現象が現れるケースもあることに留意する必要がある⁹³⁾。②最近話題となっている付着細胞やバイオフィームは浮遊細胞に比べて薬剤耐性が高いが、酸化系殺菌剤の中でも過酢酸はこれらに対して比較的強く作用する¹⁷⁾。しかし、十分に発達したバイオフィームの制御は単独処理では困難であり、物理的な処理などとの併用や処理条件の最適化などの工夫が必要である⁹⁴⁾。③酸素存在下でのさまざまな殺菌処理によって生ずる損傷菌や自然界で多く存在すると見られる培養不能生存（いわゆる VNC）菌は、酸化ストレスを併発しているとみられ、カタラーゼやピルビン酸ナトリウムの添加によって蘇生することがある^{75, 92)}。④酸化系殺菌剤は一般に殺孢子効果ももち、今後も高温が適用できない対象材料や環境において簡便かつ有用な制御方法と言えるが、種々の薬剤についての適正な選択や処理条件設定のためには、過去に発表されている論文の殺菌データを系統的にまとめた殺菌データベースの利用が有用であろう。加熱殺菌のデータベースの新版公開に引き続いて、筆者らは現在、酸化系殺菌剤を含む薬剤殺菌データベースの作成を進めている⁹⁰⁾。

なお、ここで取り上げた酸化系抗菌剤については食品製造環境や機械装置への適用が主体と想定されるが、食品への応用や混入の可能性がある場合、わが国では食品衛生法によって制限が加えられたり禁止されているものがあるので十分留意し、これを遵守すべきであることを付言する。

引用文献

- 1) Alasri, A., Roques, C. and Michel, G.: Bactericidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, and chlorine and formaldehyde against water strains. *Can. J. Microbiol.*, **38**, 635-642 (1992).
- 2) Almiron, M., Link, A. J., Furlong, D. and Kolter, R.: A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev.*, **6**, 2646-2654 (1992).
- 3) Antelmann, H., Engelmann, S., Schmid, R. and Hecker, M.: General and oxidative stress responses in *Bacillus subtilis*: Cloning, expression, and mutation of the alkyl hydroperoxide reductase operon. *J. Bacteriol.*, **178**, 6571-6578 (1996).
- 4) Antelmann, H., Engelmann, S., Schmid, R., Sorokin, A., Lapidus, A. and Hecker, M.: Expression of a stress- and starvation-induced *dps/pexB*-homologous gene is controlled by the alternative sigma factor sigma B in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **179**, 7251-7256 (1997).
- 5) Bae, J. B., Park, J. H., Hahn, M. Y., Kim, M. S. and Roe, J. H.: Redox-dependent changes in RsrA, an anti-sigma factor in *Streptomyces coelicolor*: Zinc release and disulfide bond formation. *J. Mol. Biol.*, **335**, 425-435 (2004).
- 6) Bagyan, I., Casillas-Martinez, L. and Setlow, P.: The *katX* gene, which codes for the catalase in spores of *Bacillus subtilis*, is a forespore-specific gene controlled by sigma F, and KatX is essential for hydrogen peroxide resistance of the germinating spore. *J. Bacteriol.*, **180**, 2057-2062 (1998).
- 7) Baichoo, N., Wang, T., Ye, R. and Helmann, J. D.: Global analysis of the *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon. *Mol. Microbiol.*, **45**, 1613-1629 (2002).
- 8) Banci, L., Bertini, I., Calderone, V., Cramaro, F., Del Conte, R., Fantoni, A., Mangani, S., Quattrone, A., Viezzoli, M. S.: A prokaryotic superoxide dismutase paralog lacking two Cu ligands: from largely unstructured in solution to ordered in the crystal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 7541-7546 (2005).
- 9) Bang, I.-S., Frye, J. G., McClelland, M., Velayudhan, J. and Fang, F. C.: Alternative sigma factor interactions in *Salmonella*: σ^E and σ^H promote antioxidant defences by enhancing σ^S levels. *Mol. Microbiol.*, **56**, 811-823 (2005).
- 10) Battistoni A.: Role of prokaryotic Cu, Zn superoxide dismutase in pathogenesis. *Biochem. Soc. Trans.*, **31**, 1326-1329 (2003).
- 11) Bayliss, C. E. and Waites, W. M.: The effect of hydrogen peroxide on spores of *Clostridium bifermentans*. *J. Gen. Microbiol.*, **96**, 401-407 (1976).
- 12) Britton, R. A., Eichenberger, P., Gonzalez-Pastor, J. E., Fawcett, P., Monson, R., Losick, R. and Grossman, A. D.: Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (sigma-H) regulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **184**, 4881-4890 (2002).
- 13) Brunder, W., Schmidt, H. and Karch, H.: KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology*, **142**, 3305-3315 (1996).
- 14) Bsat, N., Chen, L. and Helmann, J. D.: Mutation of the *Bacillus subtilis* alkyl hydroperoxide reductase (*ahpCF*) operon reveals compensatory interactions among hydrogen peroxide stress genes. *J. Bacteriol.*, **178**, 6579-6586 (1996).
- 15) Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P. and Helmann, J. D.: *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues. Identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol. Microbiol.*, **29**, 189-198 (1998).
- 16) Cao, M., Moore, C. M. and Helmann, J. D.: *Bacillus subtilis* paraquat resistance is directed by sigma M,

- an extracytoplasmic function sigma factor, and is conferred by YqjL and BcrC. *J. Bacteriol.*, **187**, 2948–2956 (2005).
- 17) Carpentier, B. and Cerf, O.: Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.*, **75**, 499–511 (1993).
 - 18) Chelikani, P., Fita, I. and Loewen, P. C.: Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol. Life Sci.*, **61**, 192–208 (2004).
 - 19) Chen, L. and Helmann, J. D.: *Bacillus subtilis* MrgA is a Dps (PexB) homologue: evidence for metalloregulation of an oxidative-stress gene. *Mol. Microbiol.*, **18**, 295–300 (1995).
 - 20) 張 秋梅, 中村允耶, 米倉慎一郎, 米井脩治: DNA 酸化への防御戦略. 蛋白質核酸酵素, **50**(4), 322–329 (2005).
 - 21) Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G. and Ryu, S.: Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell*, **105**, 103–113 (2001).
 - 22) Clapp, P. A., Davies, M. J., French, M. S. and Gilbert, B. G.: The bactericidal action of peroxides; an E.P.R. spin-trapping study. *Free Rad. Res.*, **21**, 147–167 (1994).
 - 23) Cross, J. B., Currier, R. P., Torraco, D. J., Vaanderberg, D. J., Vanerberg, L. A., Wagner, G. L. and Gladen, P. D.: Killing of *Bacillus* spores by aqueous dissolved oxygen, ascorbic acid, and copper ions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 2245–2252 (2003).
 - 24) Dukan, S. and Nystrom, T.: Bacterial senescence: stasis results in increased and differential oxidation of cytoplasmic proteins leading to developmental induction of the heat shock regulon. *Gene Dev.*, **12**, 3431–3441 (1998).
 - 25) Engelmann, S. and Hecker, M.: Impaired oxidative stress resistance of *Bacillus subtilis* *sigB* mutants and the role of *kata* and *katE*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **145**, 63–69 (1996).
 - 26) Engelmann, S., Lindner, C. and Hecker, M.: Cloning, nucleotide sequence, and regulation of *katE* encoding a sigma B-dependent catalase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **177**, 5598–5605 (1995).
 - 27) Fuangthong, M. and Helmann, J. D.: The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 6690–6695 (2002).
 - 28) Fuangthong, M., Atichartpongkul, S., Mongkolsuk, S. and Helmann, J. D.: OhrR is a repressor of *ohrA*, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **183**, 4134–4141 (2001).
 - 29) 藤嶋 昭: 光触媒による殺菌・脱臭, さるなる可能性. 有害微生物管理技術, 第1巻. 芝崎 勲監修. p. 770–777 (2000).
 - 30) Gaudu, P. and Weiss, B.: SoxR, a [2Fe-2S] transcription factor, is active only in its oxidized form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10094–10098 (1996).
 - 31) Geissmann, T. A. and Touati, D.: Hfq, a new chaperoning role. Binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J.*, **23**, 396–405 (2004).
 - 32) Gonzalez-Flecha, B. and Demple, B.: Role for the *oxyS* gene in regulation of intracellular hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **181**, 3833–3836 (1999).
 - 33) Gort, A. S., Ferber, D. M. and Imlay, J. A.: The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **32**, 179–191 (1999).
 - 34) Green, J. and Paget, M. S.: Bacterial redox sensors. *Nature Rev. Microbiol.*, **2**, 954–966 (2004).
 - 35) Harris, A. G. and Hazell, S. L.: Localisation of *Helicobacter pylori* catalase in both the periplasm and cytoplasm, and its dependence on the twin-arginine target protein, KapA, for activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, **229**, 283–289 (2003).
 - 36) Harris, A. G., Hinds, F. E., Beckhouse, A. G., Kolesnikow, T. and Hazell, S. L.: Resistance to hydrogen peroxide in *Helicobacter pylori*: Role of catalase (KatA) and Fur, and functional analysis of a novel gene product designated 'KatA-associated protein,' KapA (HP0874). *Microbiology*, **148**, 3813–3825 (2002).
 - 37) Helmann, J. D., Wu, M. F., Gaballa, A., Kobel, P. A., Morshedi, M. M., Fawcett, P. and Paddon, C.: The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors. *J. Bacteriol.*, **185**, 243–253 (2003).
 - 38) Hengge-Aronis, R.: The general stress response in *Escherichia coli*. *Bacterial Stress Responses*. Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds.), p. 161–178. *Am. Soc. Microbiol.*, Washington, D.C., USA (2000).
 - 39) Herbig, A. F. and Helmann, J. D.: Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol. Microbiol.*, **41**, 849–859 (2001).
 - 40) 堀田国元: 酸性電解水による殺菌効果と殺菌のメカニズム. 有害微生物管理技術, 第1巻. 芝崎 勲監修. p. 751–757 (2000).
 - 41) Igarashi, T., Kono, Y. and Tanaka, K.: Molecular cloning of manganese catalase from *Lactobacillus plantarum*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 29521–29524 (1996).
 - 42) Imlay, K. R. and Imlay, J. A.: Cloning and analysis of *sodC*, encoding the copper-zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **178**, 2564–2571 (1996).
 - 43) Inaoka, T., Matsumura, Y. and Tsuchido, T.: Molecular cloning and nucleotide sequence of the superoxide dismutase gene and characterization of its product from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **180**, 3697–3703 (1998).
 - 44) Inaoka, T., Matsumura, Y. and Tsuchido, T.: SodA and manganese are essential for resistance to oxidative stress in growing and sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **181**, 1939–1943 (1999).
 - 45) Jakob, U., Muse, W., Eser, M., Bardwell, J. C.: Chaperone activity with a redox switch. *Cell*, **96**, 341–352

- (1999).
- 46) Juven, B. J. and Pierdon, M. D. Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. *J. Food Prot.*, **59**(11), 1233–1241 (1996).
 - 47) Kim, E. J., Chung, H. J., Suh, B., Hah, Y. C. and Roe, J. H.: Transcriptional and post-transcriptional regulation by nickel of *sodN* gene encoding nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces coelicolor* Muller. *Mol. Microbiol.*, **27**, 187–195 (1998).
 - 48) Kim, F. J., Kim, H. P., Hah, Y. C. and Roe, J. H.: Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. *Eur. J. Biochem.*, **241**, 178–185 (1996).
 - 49) Kitagawa, M., Matsumura, Y. and Tsuchido, T.: Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **184**, 165–171 (2000).
 - 50) Kitagawa, M., Miyakawa, M., Matsumura, Y. and Tsuchido, T.: *Escherichia coli* small heat shock proteins, IbpA and IbpB, protect enzymes from inactivation by heat and oxidants. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2907–2917 (2002).
 - 51) Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K. K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., Boland, F., Brignell, S. C., Bron, S., Bunai, K., Chapuis, J., Christiansen, L. C., Danchin, A., Debarbouille, M., Dervyn, E., Deuerling, E., Devine, K., Devine, S. K., Dreesen, O., Errington, J., Fillinger, S., Foster, S. J., Fujita, Y., Galizzi, A., Gardan, R., Eschevins, C., Fukushima, T., Haga, K., Harwood, C. R., Hecker, M., Hosoya, D., Hullo, M. F., Kakeshita, H., Karamata, D., Kasahara, Y., Kawamura, F., Koga, K., Koski, P., Kuwana, R., Imamura, D., Ishimaru, M., Ishikawa, S., Ishio, I., Le Coq, D., Masson, A., Mauel, C., Meima, R., Mellado, R. P., Moir, A., Moriya, S., Nagakawa, E., Nanamiya, H., Nakai, S., Nygaard, P., Ogura, M., Ohanan, T., O'Reilly, M., O'Rourke, M., Pragai, Z., Pooley, H. M., Rapoport, G., Rawlins, J. P., Rivas, L. A., Rivolta, C., Sadaie, A., Sadaie, Y., Sarvas, M., Sato, T., Saxild, H. H., Scanlan, E., Schumann, W., Seegers, J. F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S. J., Simon, M., Stragier, P., Studer, R., Takamatsu, H., Tanaka, T., Takeuchi, M., Thomaidis, H. B., Vagner, V., van Dijk, J. M., Watabe, K., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamamoto, M., Yamamoto, Y., Yamane, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H., Zuber, U., Ogasawara, N.: Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4678–4683 (2003).
 - 52) Koo, M. S., Lee, J. H., Rah, S. Y., Yeo, W. S., Lee, J. W., Lee, K. L., Koh, Y. S., Kang, S. O. and Roe, J. H.: A reducing system of the superoxide sensor SoxR in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **22**, 2614–2622 (2003).
 - 53) Kourai, H., Manabe, Y. and Maeda, Y.: Mode of bactericidal action of zirconium phosphate ceramics containing silver ions in the crystal structures. *J. Antibacterial Antifungal Ag.*, **22**, 595–601 (1994).
 - 54) Kuwana, R., Kasahara, Y., Fujibayashi, M., Takamatsu, H., Ogasawara, N. and Watabe, K.: Proteomics characterization of novel spore proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, **148**, 3971–3982 (2002).
 - 55) Lesniak, J., Barton, W. A. and Nikolov, D. B.: Structural and functional features of the *Escherichia coli* hydroperoxide resistance protein OsmC. *Protein Sci.*, **12**, 2838–2843 (2003).
 - 56) Lin, Q., Tsuchido, T. and Takano, M.: Photodynamic inactivation of bacteria on immobilized α -terthienyl film. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 585–590 (1991).
 - 57) Loshon, C. A., Setlow, E. M., and Setlow, P.: Analysis of the killing of spores of *Bacillus subtilis* by a new disinfectant, Sterilox[®]. *J. Appl. Microbiol.*, **91**, 1051–1058 (2001).
 - 58) Manganelli, R., Voskuil, M., I., Schoolnik, G. K., Dubnau, E., Gomez, M. and Smith, I.: Role of the extracytoplasmic-function sigma factor sigma H in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. *Mol. Microbiol.*, **45**, 365–374 (2002).
 - 59) Marquis, R. E. and Shin, S. Y.: Mineralization and responses of bacterial spores to heat and oxidative agents. *FEMS Microbiol. Rev.*, **14**, 375–380 (1994).
 - 60) Marquis, R. E., Sim, J. and Shin, S. Y.: Molecular mechanisms of resistance to heat and oxidative damage. *J. Appl. Bacteriol., Symp. Suppl.*, **76**, 40S–48S (1994).
 - 61) Martinez, A. and Kolter, R.: Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J. Bacteriol.*, **179**, 5188–5194 (1997).
 - 62) Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S. and Tsuchido, T.: Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 4278–4281 (2003).
 - 63) Miller, A. F.: Superoxide dismutase active sites that save, but a protein that kills. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **8**, 162–168 (2004).
 - 64) 内藤茂三: オゾンによる洗浄および殺菌. 有害微生物管理技術, 第1巻. 芝崎 勲監修. p. 758–769 (2000).
 - 65) Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J. and Setlow, P.: Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 548–572 (2000).
 - 66) Niederhoffer, E. C., Naranjo, C. M., Bradley, K. L. and Fee, J. A.: Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *J. Bacteriol.*, **172**, 1930–1938 (1990).
 - 67) Paget, M. S., Kang, J. G., Roe, J. H. and Buttner, M. J.: Sigma R, an RNA polymerase sigma factor that modulates expression of the thioredoxin system in response to oxidative stress in *Streptomyces coelicolor* A 3(2). *EMBO J.*, **17**, 5776–5782 (1998).
 - 68) Patschkowski, T., Bates, D. M. and Kiley, P. J.: Mechanisms for sensing and responding to oxygen deprivation. *Bacterial Stress Responses*. Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds.), p. 61–78. Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C., USA (2000).
 - 69) Pesce, A., Capasso, C., Battistoni, A., Folcarelli, S.,

- Rotilio, G., Desideri, A. and Bolognesi, M.: Unique structural features of the monomeric Cu, Zn superoxide dismutase from *Escherichia coli*, revealed by X-ray crystallography. *J. Mol. Biol.*, **274**, 408-420 (1997).
- 70) Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J. D., Volker, U. and Hecker, M.: Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **183**, 5617-5631 (2001).
- 71) Petersohn, A., Engelmann, S., Setlow, P. and Hecker, M.: The *katX* gene of *Bacillus subtilis* is under dual control of sigma B and sigma F. *Mol. Gen. Genet.*, **262**, 173-179 (1999).
- 72) Price, C. W.: Protective function and regulation of the general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. *Bacterial Stress Responses*. Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds.), p. 179-197. Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C., USA (2000).
- 73) Repoila, F., Majdalani, N. and Gottesman, S.: Small non-coding RNAs, co-ordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: The RpoS paradigm. *Mol. Microbiol.*, **48**, 855-861 (2003).
- 74) Sakamoto, J. J. and Tsuchido, T.: unpublished.
- 75) 坂元 仁, 松村吉信, 土戸哲明: 活性酸素による化学的殺菌とバクテリアの防御システム, *食品工業*, **48**(12), 42-53 (2005).
- 76) Sansone, A., Watson, P. R., Wallis, T. S., Langford, P. R. and Kroll, J. S.: The role of two periplasmic copper- and zinc-cofactored superoxide dismutases in the virulence of *Salmonella Choleraesuis*. *Microbiology*, **148**, 719-726 (2002).
- 77) Sawai, J., Kawada, E., Kanou, F., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T. and Shimizu, M.: Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity. *J. Chem. Eng. Jpn.*, **29**, 627-633 (1996).
- 78) Scharf, C., Riethdorf, S., Ernst, H., Engelmann, S., Volker, U. and Hecker, M.: Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **180**, 1869-1877 (1998).
- 79) Setlow, B. and Setlow, P.: Binding of small, acid-soluble spore proteins to DNA plays a significant role in the resistance of *Bacillus subtilis* spores to hydrogen peroxide. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3418-3423 (1993).
- 80) Setlow, P.: Resistance of bacterial spores. *Bacterial Stress Responses*. Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds.), p. 217-230, ASM Press (2000).
- 81) Seyler, R. W. Jr., Henriques, A. O., Ozin, A. J. and Moran, C. P. Jr.: Assembly and interactions of *cotJ*-encoded proteins, constituents of the inner layers of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Mol. Microbiol.*, **25**, 955-966 (1997).
- 82) 芝崎 勲: 改訂新版 新・食品殺菌工学, p. 258-265, 光琳, 東京 (1998).
- 83) Steil, L., Serrano, M., Henriques, A. O. and Volker, U.: Genome-wide analysis of temporally regulated and compartment-specific gene expression in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, **151**, 399-420 (2005).
- 84) Storz, G. and Zheng, M.: Oxidative stress. *Bacterial Stress Responses*. Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds.), p. 47-59. Am. Soc. Microbiol., Washington D. C., USA (2000).
- 85) Storz, G., Opdyke, J. A. and Zhang, A.: Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.*, **7**, 140-144 (2004).
- 86) 高野光男: 光・紫外線照射による殺菌技術 (原理と微生物の感受性). 新殺菌工学実用ハンドブック. 高野光男, 横山理雄監修, p. 317-323, サイエンスフォーラム, 東京 (1991).
- 87) Testerman, T. L., Vazquez-Torres, S., Xu, Y., Jones-Carson, J., Libby, S. J. and Fang, F. C.: The alternative sigma factor σ^E controls antioxidant defences required for *Salmonella* virulence and stationary-phase survival. *Mol. Microbiol.*, **43**, 771-782 (2002).
- 88) Thackray, P. D. and Moir, A.: SigM, an extracytoplasmic function sigma factor of *Bacillus subtilis*, is activated in response to cell wall antibiotics, ethanol, heat, acid, and superoxide stress. *J. Bacteriol.*, **185**, 3491-3498 (2003).
- 89) Tsuchida, Y. and Tsuchido, T.: Sensitivities to hydrogen peroxide vapor of intact and decoated spores of *Bacillus subtilis* as influenced by divalent cations supplemented in sporulation medium. *Biocontrol Sci.*, **2**, 19-26 (1997).
- 90) 土戸哲明, 阿部智子, 中村一郎: 未発表.
- 91) 土戸哲明, 高麗寛紀, 松岡英明, 小泉淳一: 微生物制御—科学と工学, 講談社サイエンティフィク, 東京 (2002).
- 92) 土戸哲明: 殺菌プロセスにおいて発生する損傷菌の特性. *日食微誌*, **20**, 141-149 (2003).
- 93) 土戸哲明: 食品殺菌における細菌の損傷回復, ストレス抵抗性化と crossprotection の問題. *低温生物工学会誌*, 印刷中 (2005).
- 94) 土戸哲明: 付着細菌とバイオフィルムの薬剤・熱抵抗性と食品における制御. *防菌防黴誌*, **28**, 623-633 (2000).
- 95) 内田浩二: 酸化変性蛋白質. 酸化ストレスマーカー, 二本鋭雄, 野口範子, 内田浩二編, p. 79-85, 学会出版センター (2005).
- 96) VanBogelen, R. Abshire, K. Z., Pertsemilidis, A., Clark, R. L. and Neidhardt, F. C.: Gene-protein database of *Escherichia coli* K-12. Edition 6. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology, Neidhardt, F. C. (ed.), p. 2067-2117. Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., USA (1996).
- 97) Varnado, C. L., Hertwig, K. M., Thomas, R., Roberts, J. K. and Goodwin, D. C.: Properties of a novel periplasmic catalase-peroxidase from *Escherichia coli* O157:H7. *Arch. Biochem. Biophys.*, **421**, 166-174 (2004).
- 98) Volkert, M. R. and Landini, P.: Transcriptional responses to DNA damage. *Curr. Opin. Microbiol.*, **4**, 178-185 (2001).
- 99) Wintjens, R., Noel, C., May, A. C., Gerbod, D., Dufernez, F., Capron, M., Viscogliosi, E. and Rooman, M.: Specificity and phenetic relationships of iron- and

- manganese-containing superoxide dismutases on the basis of structure and sequence comparisons. J. Biol. Chem., **279**, 9248–9254 (2004).
- 100) 山崎俊輔, 岡野哲也, 岩崎慎也, 土戸哲明: *Bacillus cereus* における過酢酸の殺孢子効果とそれに対する過酸化水素の影響. 日本防菌防黴学会年次大会要旨集, p. 90 (2005).
- 101) Young, S. B. and Setlow, P.: Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore resistance to and killing by aqueous ozone. J. Appl. Microbiol., **96**, 1133–1142 (2004).
- 102) Young, S. B. and Setlow, P.: Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by Decon and Oxone™, two general decontaminants for biological agents. J. Appl. Microbiol., **96**, 289–301 (2004).
- 103) Zhang, A., Altuvia, S., Tiwari, A., Argaman, L., Hengge-Aronis, R. and Storz, G.: The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein. EMBO J., **17**, 6061–6068 (1998).
- 104) Zheng, M., Aslund, F. and Storz, G.: Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. Science, **279**, 1718–1721 (1998).
- 105) Zheng, M., Wang, X., Templeton, L. J., Smulski, D. R., LaRossa, R. A. and Storz, G.: DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. J. Bacteriol., **183**, 4562–4570 (2001).