

紫外線による微生物の遺伝子損傷定量法の検討

Quantification of gene damage in Microorganism by UV irradiation

9730118 清水 桂 Katsura SHIMIZU

1. 研究の背景と目的

上下水道において、病原細菌・ウイルスに感染する危険性がなく、安全な生活環境を維持するためには確実に消毒されていなければならない。

日本では塩素消毒が一般的に使われている。塩素消毒は残存性があるため消毒処理後の病原微生物の再増殖による感染の危険性を抑える効果もある。しかし近年の水環境悪化により、この塩素消毒過程において水中の有機物と塩素が反応して生成するトリハロメタンなどの消毒副生成物による健康影響が心配されている。また、塩素消毒に対して耐性のあるクリプトスポリジウムなどの病原性原虫による汚染問題もある。このような背景から塩素消毒の代替手法として研究が進められているのが紫外線消毒である。紫外線消毒は副生成物を生成しないという特徴をもつが、消毒効果が残存しない¹⁾。そのため日本の浄水処理においては実用化されにくい。排水処理においては既に実用化されている。紫外線消毒技術の確立には様々な微生物に対する効果を調べる必要があるが²⁾、その中には従来の検出法では生死が判定しにくいものも存在する。紫外線の場合、塩素消毒とは消毒機構が異なり直接遺伝子の損傷を測定することにより、消毒効果を正確に把握することが出来る可能性がある。本研究の目的は、紫外線消毒法において遺伝子損傷測定法による消毒効果の評価手法を検討することである。

2. 紫外線による不活化

紫外線(UV-CおよびUV-B;200-320nm)が微生物の遺伝子DNA(RNA)上にシクロブタン型ピリミジン二量体などの損傷を与え、通常の遺伝子複製機構を妨げる。つまり増殖能力がなくなる。これを不活化という。(Fig.1参照)

3. 光回復

紫外線によって不活化された微生物に、近紫外線あるいは可視光線(340-400nm)を照射することで、二量

体が開裂して修復することである。この反応は細胞内で光回復酵素が生成され、この酵素を触媒とすることで起こる。(Fig.2参照)

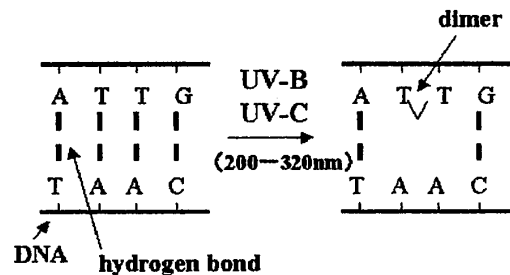


Fig.1 UV inactivation

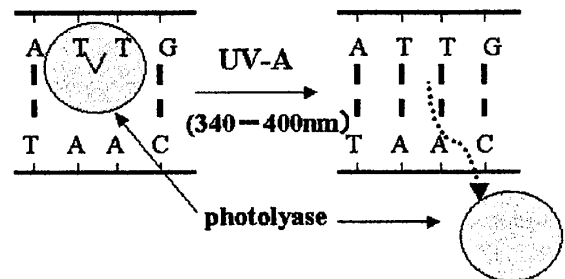


Fig.2 photoreactivation

4. バクテリオファージ(bacteriophage)

細菌に感染して増殖するウイルス。遺伝子(DNA, RNA)を蛋白性の外被が囲む単純構造で、特異な宿主細菌に寄生し、増殖するため、自己増殖できない³⁾。光回復酵素を生成できないファージは、光回復をしないため、紫外線照射によって生成された二量体数と不活化速度を光回復による影響を考慮せずに比較できる。

5. 本研究の流れ

本研究の流れにおいて、Fig.3で示してあるはじめの段階「対象微生物からの遺伝子抽出法の確立」は、非常に重要な段階である。この段階で遺伝子が確実に抽出されれば、後は確立されているESS法を行うことができるからである。

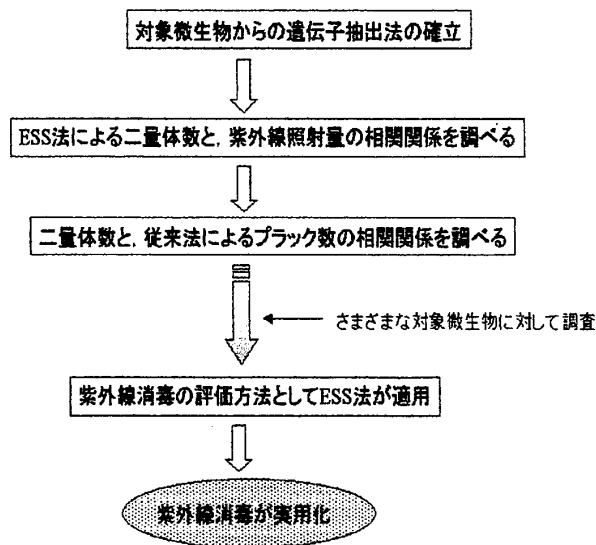


Fig.3 The schematic diagram of the flow

6. 実験方法

6-1. 大腸菌ファージ T4 からの DNA 抽出

DNA ファージ T4 を対象微生物とした。DNA 抽出方法として①, ②, ③を行った。

①DNA 抽出法として QIAGEN Lambda System を使用した。この抽出キットは SDS によってファージの蛋白殻を分解し、DNA を放出させた後、陰イオン交換樹脂を持つカラムに吸着後、溶出させる手法である。

②UF 膜による遠心濃縮、膜ろ過後、90℃で熱破砕により、ファージの外被蛋白を破壊し DNA を放出させた。

③UF 膜による遠心濃縮液を、①で使用した抽出キットで抽出を行った。

6-2. 電気泳動による抽出確認

アガロースゲル(Agarose L03)で電気泳動を行った。核酸が抽出できているかどうか確認するためである。

6-3. アルカリアガロースゲルでの電気泳動

ESS (Endonuclease Sensitive Site) 法^{4) 5)} は、DNA に二量体を選択的に切断する酵素を加えてからアルカリアガロースゲル電気泳動にかける手法である。二量体の数に比例して DNA が断片化されるため、電気泳動後の移動分布の幅が広くなり、バンドが薄く観察される。酵素を加えない状態で、アルカリアガロースゲル電気泳動のバンドが確認できるかどうか調べた。

7. 実験結果および考察

①で抽出したサンプルでは、アガロースゲル電気泳動でバンドが観察された。しかしバンドは非常に薄かった。またアルカリアガロースゲル電気泳動ではバンドが観察されなかった。アガロースゲル電気泳動でバンドが薄い原因は、陰イオン交換樹脂膜を持つカラムに DNA を吸着させた後、カラムから DNA を溶出するが、このキットは 50kb の λファージより DNA を抽出するためのものであり、T4 ファージは 166kb で λファージと比べて長い。そのため、カラムからの溶出が不十分であったと考えられる。改善方法として、溶出液の主成分である NaCl の溶出力を上げるために溶出液を温めることが考えられる。

②で抽出したサンプルでは、アガロースゲル電気泳動で T4 ファージの DNA によるバンドが観察されたが、T4 ファージよりも大きいサイズでもバンドが観察された。このバンドは T4 ファージを培養する際、宿主菌 *E.coli*B を使用するため、ろ過膜で除去するが除去しきれなかったものの遺伝子と考えられる。従ってこの方法では宿主菌の遺伝子の除去方法に関する改良が必要である。改善方法として、熱破砕を行う前に DNase を加え、宿主菌による DNA を壊してから熱破砕を行えば、宿主菌による DNA が除去される可能性がある。③で抽出したサンプルはアガロース電気泳動でバンドが観察されなかった。この原因として考えられるのは、PEG による沈殿と SDS による外被分解の段階で、このキットにおいて PEG と SDS の量は、DNA のモル数に対しての適量であるため、濃縮により DNA のモル数がキットで利用できる限界を超えてしまっていると考えられる。また、濃縮により全量が少ないため、カラムに吸着させた後の回収率が悪いこと、および①と同じ原因が考えられる。

【参考文献】1)佐藤敦久編「水処理紫外線照射」技法堂出版 1992 2)金子光美編「水質衛生学」技法堂出版 1996 3)皆川貞一著「T系ファージ」東京大学出版会 1991 4)Sutherland B.M. and Shi A.G., *Biochemistry*, 22, pp.745-749, 1983 5)Freeman S.E. *et al.*, *Analytical Biochemistry*, 158, pp.119-129, 1986