

論文要約

蛍光タンパク質発現大腸菌を用いた塩素処理による損傷機構の解明

溝添倫子

「水の消毒処理は、水系感染症の原因となる病原微生物抑制のために重要である。日本では主に塩素消毒が用いられている。しかし近年、塩素耐性のある病原微生物による感染報告もあり、病原微生物に対する迅速な対応は常に求められている。また消毒効果の評価工程では、病原微生物ではなくその指標微生物を用いて評価しているのが現状である。しかし、生きているが培養できない **viable but non-culturable (VBNC)** 状態の微生物や、細胞の一部を損傷している損傷微生物の存在により、生きているのに死滅したと誤判定してしまう可能性が問題となっている。指標微生物の生死判定のみを消毒効果の最終評価としていいのか、十分な検証が必要であるといえる。これらの課題を解決するためには、消毒処理によって微生物がどれだけ死滅するかという議論だけでなく、消毒処理によって微生物がどのように死滅するかという損傷機構の解明が必要である。損傷機構を解明することで、病原微生物に対してメカニズムの観点から最も有効な消毒処理を提案することができる。また消毒効果の評価においても、どのような手法で評価するべきか、適切な評価方法を提案することができ、消毒効果における誤評価の可能性を防ぐことができる。このような観点から近年、様々な研究で消毒処理による微生物の損傷機構が解析されている。本研究では微生物中の細菌に着目し、様々な研究分野で使用されている蛍光タンパク質を用いて、消毒処理により細菌のどこがどの程度損傷しているのか、より詳細に解析できる手法の確立を試みた。蛍光タンパク質は蛍光を発し、発現制御により細胞の特定部位に発現可能であると言われている。指標性と局在性を併せ持っていることから、細胞の特定部位の損傷評価に使用できると考えた。本研究では塩素処理において、指標細菌である大腸菌を用いて、大腸菌の細胞質に蛍光タンパク質を発現させ、塩素処理し、菌体から漏出した蛍光タンパク質の蛍光強度から、大腸菌の細胞膜、細胞壁損傷を評価可能か検討した。漏出蛍光強度は漏出後の減少も考慮して考察した。また処理前後の菌体内部の蛍光強度も測定し、漏出結果の整合性を確認した。まず初めに、形質転換により大腸菌の細胞質に蛍光タンパク質を発現させた。形質転換では形質転換効率の高い大腸菌株が用いられているが、本研究ではその他に、消毒評価に用いられている大腸菌株 2 種にも蛍光タンパク質発現を試みた。その結果、発現の安定性や培養、保存方法に留意する必要はあったが、2 種の菌株に蛍光タンパク質を発現させることができた。これにより複数の大腸菌株での評価が可能となり、共通のメカニズム、菌株による特異的なメカニズムを考察することとした。またこれらの株は形質転換を利用した様々な研究において今後、使用菌株の一つとして提案することができると考えられた。形質転換効率の高い大腸菌株では、既存の細胞質に蛍光タンパク質を発現させるプラスミド DNA を改良し、ペリプラズムに発現させるプラスミド DNA の作製に成功した。同じ蛍光タンパク質を別部位に発現させることができたため、この菌株では細胞壁の損傷をより詳細に解析した。塩素処理は試料 pH を 2 種設定することで、遊離塩素主形態毎の損傷機構を考察した。塩素処理によって大腸菌体から漏出した蛍光タンパク質の蛍光強度を測定した結

果、遊離塩素の主形態が次亜塩素酸イオンである時、不活化に伴う顕著な漏出が確認された。試料 pH による細胞膜損傷も一部確認されたが、そのような状態で次亜塩素酸イオンは大腸菌の細胞壁、細胞膜に損傷を与え不活化させたと考えられた。また、蛍光タンパク質残存率を細胞損傷率とみなすことで、不活化と細胞損傷の関係を定量化することができ、細胞損傷は不活化よりも遅く生じることが示された。一方、遊離塩素に次亜塩素酸が含まれる時、全ての菌株で不活化に伴う顕著な漏出は確認されなかった。このことから次亜塩素酸は次亜塩素酸イオンが作用する前に浸透して細胞の内側に作用することで不活化させると考えられた。両形態において、菌体内部の蛍光強度変化は漏出の結果と整合性のある結果であった。発現部位で比較すると、細胞質に蛍光タンパク質を発現させた場合とペリプラズムに発現させた場合では漏出率は異なり、ペリプラズムに発現させた方が漏出率は高かった。このことから外膜のみを損傷した大腸菌の存在が示唆され、本手法を用いて詳細な部位損傷解析が可能であると考えられた。菌株で比較すると、漏出率が低い菌株も存在し、菌株によって大腸菌の細胞壁、細胞膜の損傷程度が異なることが分かった。このように、本手法を用いて複数の大腸菌株の塩素処理による詳細な損傷機構解析ができ、消毒処理による損傷機構解析手法を確立することができた。今後他の評価手法との併用や、塩素処理以外の消毒処理に適用することで、消毒処理による損傷機構解析をさらに進めることができると期待される。」