

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03331

研究課題名(和文)細胞生物学および計算生物学の手法を用いた消毒機構の定量的評価に関する研究

研究課題名(英文)Quantitative evaluation of disinfection mechanism using techniques of cell biology and computational biology

研究代表者

大瀧 雅寛 (Otaki, Masahiro)

お茶の水女子大学・基幹研究院・教授

研究者番号：70272367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：塩素・オゾン処理においては、遺伝子操作により細胞内に蛍光タンパク質(EGFP)発現させた大腸菌を作成し、処理後の蛍光タンパク漏出量から細胞膜損傷の定量的評価が可能となった。3種の大腸菌でEGFP発現を可能とした。またEGFP発現個所を変えることで細胞外膜と内膜の損傷を区別しての評価が可能となった。これら大腸菌の塩素処理によりHOClとOCI⁻の細胞膜への作用機序の違いを明確にした。またオゾン溶解水、オゾン曝気処理とも細胞膜ではなく細胞質が主な作用機序であることを明確にした。紫外線処理においては核酸形態(RNA,DNA,一本鎖,二本鎖)の異いとチミン量の違いによる耐性への影響を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消毒処理による細菌細胞の作用機序を定量的に明らかにする手法を確立した。この手法を大腸菌への塩素・オゾン処理に適用することにより、大腸菌の死滅率だけでなく、作用機序の定量的な結果を把握することで、病原細菌への効果推定をより確たるものとすることができ、さらに致命的な効果を与える消毒条件の推定に利用できる。また紫外線処理における核酸形態およびチミン含有量の違いが紫外線耐性へ与える影響を明らかにした成果により、紫外線耐性が不明な病原ウイルスの核酸種および塩基配列を把握することで、紫外線耐性の推定に応用できる。以上のように病原微生物による衛生環境悪化の効果的な抑制に寄与する研究成果である。

研究成果の概要(英文)：In chlorine or ozone treatment, E.coli with fluorescent protein in cells was prepared by genetic engineering, and it became possible to quantitatively evaluate cell membrane damage from the leakage amount of fluorescent protein after treatment. Up to three types of E.coli with fluorescent protein were made possible, and by changing the protein expression site, it was possible to evaluate the damage by distinguishing between the extracellular membrane and the inner membrane. By chlorination of these E. coli, the difference in the mechanism of action of HOCl and OCI⁻ ion on the cell membrane could be clarified. It was also clarified that the cytosol, not the cell membrane, is the main action site for both ozone-dissolved water and ozone aeration. In UV treatment, it was clarified that different forms of nucleic acid (RNA, DNA, single-stranded, double-stranded) and different amounts of thymine affect the UV tolerance.

研究分野：環境衛生工学

キーワード：消毒処理 損傷部位 蛍光タンパク発現 紫外線耐性 核酸種 塩基配列

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水道原水に含まれる可能性がある病原微生物は、消毒処理の効力を確認できていないものが複数ある。例えばヒト感染ノロウイルスは、培養測定法が未確立であるため、感染力(増殖能力)の失活を実験で確認できてはいない。培養法もしくは感染能評価が未確立な病原微生物に対応するためには、消毒処理のメカニズムを把握した上で、病原微生物の細胞構造や核酸配列といった情報と併せて、消毒効果をより理論的に推定する必要がある。

消毒処理のメカニズム、即ち細胞のどの部位に損傷が生じるのかについては、多くの研究報告がある(金子光美, 1996)¹⁾。しかし各損傷部位を有する菌(被損傷菌)が、どの位存在しているのかといった定量的な検討はほとんど見られない。例えば、電子顕微鏡観察による細胞の損傷を外観的に確認した事例や、細胞の代謝機能(呼吸量等)で評価するといったアプローチも報告されているが、被損傷菌数を損傷部位毎に定量的に評価した例は少ない。少ない研究例の中では、検出原理の異なる培養培地(例えば基本代謝機能があれば検出できる培地と細胞膜が完全でないと検出できない培地)を用いて、処理後の各培地での培養菌数を比較して、損傷箇所を推定する方法などが報告されている(Kazama et al. 2011)²⁾。しかし、損傷の確認には至っておらず、かつ損傷部位は細胞膜の外膜なのか内膜なのかといった情報はなく、損傷部位の定量的な把握が十分にできているとは言えない状況である。

以上、浄水処理に用いられている消毒処理として塩素・オゾン・紫外線において、処理効果が不明な病原微生物に対し、より論理的に効果を推定する方法が求められている状況であった。

2. 研究の目的

代表的な消毒処理(塩素、オゾン、紫外線)の効果について、被損傷菌を定量的に把握するという視点で評価することを目的とした。

薬注型処理である塩素やオゾンは、酸化還元反応により微生物細胞に損傷を与えるが、光化学型処理である紫外線は核酸に直接損傷を与える。従って、薬注型処理と光化学型処理とは、手法を変えて評価する必要がある。そこで以下の2つの方法にて研究を進めることとした。

(1) 薬注型消毒処理(塩素やオゾン)の作用機構の解明

細胞膜および細胞内に局在的に発光タンパクを発現させた大腸菌を使用して損傷部位を特定した。モデル細菌である大腸菌を用い、消毒による損傷が細胞膜のどの部位に及んでいるのかを確認するため、遺伝子組み換えにより、蛍光タンパク質を細胞膜およびペリプラズム部位に発現させる大腸菌を用いた。蛍光タンパク質の漏出状況を確認することにより、塩素やオゾンによる被損傷菌数を損傷部位毎に計測し評価した。また、この計測をフローサイトメーター(迅速細胞計数装置)にて行い細胞毎に蛍光タンパク質の残存の有無を確認するとともに、被損傷菌の菌数比を迅速に把握できる手法を試みた。これを様々な条件の塩素およびオゾン処理に適用し、主たる損傷メカニズムがどう変化するのか比較検討した。さらに蛍光タンパク質をその他の大腸菌にも発現が可能か検討することで、本手法の汎用性を調べた。

(2) 紫外線消毒処理の不活化機構の解明

モデルウイルスである大腸菌ファージのうち異なる核酸種をもつファージを多種用意し、核酸種(DNA, RNA, 一本鎖, 二本鎖)の違いによる紫外線耐性の傾向を把握する。また異なる含有チミン量となるように人工DNAを作成し、紫外線耐性と含有チミン量との関連性を実験的に確認する手法の確立を試みた。それらの結果を総合し、紫外線耐性が未知の病原ウイルス等の紫外線耐性を推定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 薬注型消毒処理(塩素やオゾン)の作用機構の解明

形質転換による蛍光タンパク発現大腸菌の作成⁴⁾⁵⁾

本研究では大腸菌として3種類(DH5 α , NBRC13965, NBRC3972)を用いた。いずれもコンピテントセルにpEGFPを加え、氷中に6分置いた後、42°C(水浴)に3分置いた。LB液体培地を加え、アンピシリンを含むLB寒天培地に塗布し、37°Cで20時間培養することで、形質転換できた大腸菌のみを選択的に培養した。

また大腸菌(DH5 α)については、Thomas et al. (2001)³⁾の手法を参考に、特定のDNA配列を変異導入し、大腸菌のペリプラズムに蛍光タンパク質を発現するプラスミドを作成した。pEGFPとプライマーでPCRを実施し、環状化したPCR産物を用いて大腸菌で形質転換を行った。形質転換できた大腸菌を培養し、プラスミド抽出キットを用いてプラスミドDNAを回収した。シーケンス解析で、特定配列が導入できていることを確認した。

消毒処理実験

塩素処理では、大腸菌懸濁液に次亜塩素酸ナトリウム溶液を0.2~0.4 mg/Lとなるよう添加し、所定時間接触後、チオ硫酸ナトリウム溶液で脱塩素処理した。

オゾン処理では、オゾン溶解水およびオゾン曝気水による処理を行い結果を比較した。オゾン溶解水の場合はPBS中にてオゾン濃度約1.1~1.5 mg/Lに調整し、大腸菌懸濁液と接触させた。オゾン曝気水は大腸菌懸濁液に曝気流量0.19~0.24 L/min(オゾン発生量6.9~8.6 mg/h)

の場合、内膜まで損傷を受け漏出したと考えられた。Fig.2 より、同程度の生残率において、細胞質発現とペリプラズム発現では漏出率に 5% 程度差があることが分かった。この差は外膜と内膜までの損傷の差であると考えられ、EGFP の発現部位を変え、比較することで大腸菌の特定部位の損傷をより詳細に評価することができると考えられた。

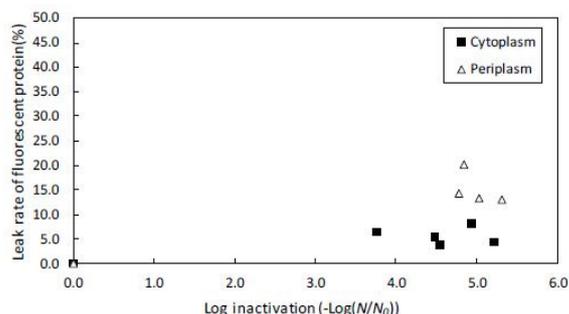


Fig.2 蛍光タンパク質漏出率と大腸菌 (DH5α) 生残率⁵⁾

オゾン溶解水処理における細胞損傷⁶⁾

オゾン溶解水の処理条件 (CT 値 0.54~0.67 mg・min/L) において、処理後 LB 培地 (非選択培地)、DESO 培地 (選択培地) とともに生残率は約 $10^{-3.3}$ となり培地間での有意な差は見られなかった。LB 培地結果からオゾン溶解水の不活化率は 3.3 log であるが、この時の大腸菌からの EGFP 漏出率は $1.22 \pm 0.59\%$ であった。EGFP の蛍光強度はオゾン濃度 1.1 mg/L × 1 min. によって 30% 程度低下することを考慮しても漏出率は 2% に満たないことがわかった。さらにフローサイトメーターによる EGFP 含有細胞数測定では、オゾンの有無に関わらず含有率が約 95% であり、蛍光強度のヒストグラムにも大きな変化が見られなかった。従って、大腸菌 (DH5α) のオゾン溶解水処理での蛍光タンパク質の漏出はごく少量であり、多くが菌体内に残存したと考えられた。

以上、EGFP 漏出率および細胞内の EGFP 残存率と複数培地の結果を総合して考えると、今回の結果からオゾン溶解水によって、細胞膜損傷はほとんど生じず細胞質にオゾンが作用することで、不活化に至ったと考えられる。

塩素およびオゾン曝気水処理における細胞損傷⁷⁾⁸⁾⁹⁾

Fig. 3 に塩素およびオゾン曝気処理前後の菌体内蛍光強度の変化をフローサイトメータにて計測した結果を示す。塩素処理での pH は 7.4 であり、次亜塩素酸および次亜塩素酸イオンの比率はほぼ同じと考えられた。

塩素処理での不活化率は 4~5log であったが、菌体内の EGFP の蛍光強度に変化は見られなかった。また菌体外に漏出した EGFP も数% であったことから、細胞膜への作用は生じていないと考えられた。一方オゾン処理では、塩素処理と同程度の不活化率であったが、塩素処理と異なり、菌体内の EGFP の蛍光強度が減少していた。菌体外への漏出は確認されなかったことから、オゾンが菌体内部に入り込み、EGFP に作用したと考えられた。また処理後の 7-AAD 染色では、塩素・オゾンどちらの処理後もほとんど染色されなかった。

以上のことから、塩素処理、オゾン曝気処理ともに大腸菌の外膜、細胞壁に有意な損傷を与えず、菌体内部に浸透して内部機能に損傷を与えて不活化させることが考察された。オゾン処理においては、菌体内の EGFP に有意な損傷を与えることが考えられた。

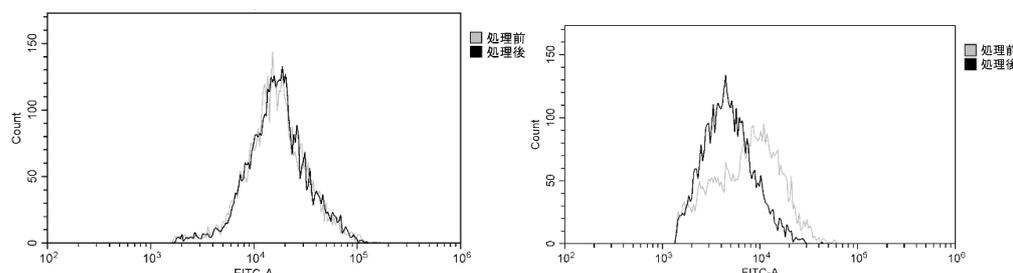


Fig.3 菌体内蛍光強度 (左: 塩素処理, 右: オゾン曝気処理)⁷⁾⁹⁾

(2) 紫外線消毒処理の不活化機構の解明

核酸種による紫外線耐性比較

異なる核酸種をもつファージはいずれも UV 照射量に対し、一次反応に従って減少した。各ファージにおいて、一次反応速度定数を最小二乗法によって求め、さらに 90% 減少に必要な紫外線照射量 D_{10} を算定した。結果を Fig.4 に示す。図に示される通り対象ファージの紫外線耐性を遺伝子構造に着目してまとめると $dsRNA > ssRNA > ssDNA > dsDNA$ となっていた。またこの傾向は、低圧水銀ランプ (254 nm) も UV-LED (265 ± 5 nm) のどちらの場合も同様であった。また表 2 に低圧水銀ランプ (254 nm) と UV-LED (265 ± 5 nm) での D_{10} 値の比率を各ファージで求め、比較したものである。t 検定を行った結果、ウイルス種間の有意差は見られず紫外線耐性の波長依存性は変わらないことが分かった。この結果から低圧水銀ランプでの耐性

が既知である病原ウイルスのロタウイルス ($D_{10} = 8.0 \text{ mJ/cm}^2$) およびポリオウイルス ($D_{10} = 3.0 \text{ mJ/cm}^2$) の UV-LED 耐性が推定でき、それぞれ D_{10} が $6.9 \sim 7.7 \text{ mJ/cm}^2$ および $2.6 \sim 2.9 \text{ mJ/cm}^2$ となる。

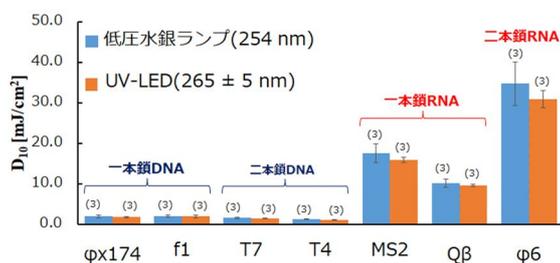


Fig.4 90% 不活化に必要な照射量 D_{10} 比較¹⁰⁾
()は実験回数, 誤差範囲は 95%信頼区間

表 2 UV 光源の D_{10} 比の比較¹⁰⁾

遺伝子構造	ファージ名	D_{10} 比[-]
ssDNA	φx174	0.92 ± 0.071
	f1	0.96 ± 0.087
dsDNA	T7	0.89 ± 0.053
	T4	0.86 ± 0.041
ssRNA	MS2	0.91 ± 0.051
	Qβ	0.94 ± 0.037
dsRNA	φ6	0.89 ± 0.061

合成 DNA によるチミン含有量と紫外線耐性の関連性の検討

作成した 3 種の人工 DNA に対し、 100 mJ/cm^2 照射前後の定量 PCR 検出数の比率を求め、その負の対数値を \log 不活化率とした (\log 不活化率 = $-\log(N/N_0)$, N : 照射後 PCR 検出数, N_0 : 照射前 PCR 検出数)。その結果を DNA-1 は 1.8, DNA-2 は 1.9, DNA-3 は 1.1 となった。 t 検定の結果, DNA-1 および DNA-2 には有意差はなく, チミン塩基が 40bp 連続と 20bp ずつ連続した並びでの UV 耐性に違いはなかった。一方, チミン塩基の含有数が半分の DNA-3 とは有意な差が生じており, ほぼ半分程度の \log 不活化率であったことから, チミン塩基量との相関が確認できた。

(3) 成果のまとめ

形質転換して蛍光タンパク質 (EGFP) を発現させた大腸菌を用いて塩素処理並びにオゾン処理における細菌細胞内の損傷部位の特定, 被損傷菌の損傷レベルを定量的に把握する手法を確立できた。またフローサイトメータによる細胞毎の GFP 残存性の定量化, および低分子染色剤 (7-AAD) による細胞毎の膜透過性の定量方法を確立した。その結果, 塩素・オゾン処理のいずれでも不活化率が 99.99% 以上の状況では膜損傷は数%にも至っていなかったが, オゾン曝気においては細胞内でのタンパク質変性が確認された。

ウイルスの核酸情報から紫外線耐性を推定する研究においては, ファージの紫外線耐性から $dsRNA > ssRNA > ssDNA > dsDNA$ の傾向が得られた。またチミン含有量を調整した合成 DNA の紫外線耐性の比較においては, 高紫外線照射量における qPCR 検出において, 耐性とチミン含有量の相関は確認できたものの低感度にとどまった。酵素反応の利用による高検出法の高感度化については試みたが確立できておらず, 申請研究期間終了後も継続して行う予定である。

参考文献

- 金子光美編 (1996) 水質衛生学, 技報堂, 東京
- Kazama S. and Otaki M. (2011), *J. of Wat. and Environ. Tech.*, 9(1), pp.53-66
- Thomas, J. D. et al. (2001) *Molecular Microbiology*, 39(1), pp.47-53.
- 溝添倫子, 大瀧雅寛, 相川京子 (2018) 第 52 回日本水環境学会年会講演集, p.344
- 溝添倫子, 大瀧雅寛, 相川京子 (2019) 第 53 回日本水環境学会年会講演集, p.101
- 宮坂真由, 溝添倫子, 大瀧雅寛 (2019) 第 53 回日本水環境学会年会講演集, p.641
- 大瀧雅寛, 溝添倫子, 宮坂真由 (2019) 第 29 回日本オゾン協会研究講演会講演集, pp.147-150
- 溝添倫子, 大瀧雅寛, 相川京子, 黒岩茉佑子 (2020) 第 54 回日本水環境学会年会講演集, p.516
- Mizozoe M., Otaki M., Aikawa K. (2019) *Water*, 11(10), 2156
- 大瀧雅寛, 小澤瞳 (2019) UV (紫外線水処理技術) ワークショップ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizozoe, Otaki, Aikawa	4. 巻 11
2. 論文標題 The Mechanism of Chlorine Damage Using Enhanced Green Fluorescent Protein-Expressing Escherichia coli	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Water	6. 最初と最後の頁 2156 ~ 2156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/w11102156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 溝添倫子, 大瀧雅寛, 相川京子
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮坂真由, 溝添倫子, 大瀧雅寛
2. 発表標題 蛍光標識等による大腸菌のオゾン不活化機構の解明
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝添倫子, 大瀧雅寛, 相川京子
2. 発表標題 蛍光タンパク質の漏出を指標とした大腸菌損傷の定量的解析
3. 学会等名 第52回日本水環境学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大瀧雅寛, 小澤瞳
2. 発表標題 低圧水銀ランプとUV-LEDによるウイルスの不活化効果の比較
3. 学会等名 UV (紫外線水処理技術) ワークショップ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大瀧雅寛, 溝添倫子, 宮坂真由
2. 発表標題 蛍光標識等を利用した各種消毒方法の反応機構の解明
3. 学会等名 第29回日本オゾン協会年次研究講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝添倫子, 大瀧雅寛, 相川京子, 黒岩茉佑子
2. 発表標題 蛍光タンパク質発現大腸菌を用いた消毒処理による損傷機構の解析
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	由良 敬 (yura kei) (50252226)	お茶の水女子大学・基幹研究院・教授 (12611)	

