

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23500519

研究課題名(和文)近紫外線を用いた殺菌効果の波長依存性と機序の解明

研究課題名(英文) Study on wavelength dependency of the effectiveness of UV-A sterilization and its mechanism

研究代表者

芥川 正武 (Akutagawa, Masatake)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・講師

研究者番号：90294727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は近紫外線殺菌(UVA)の機序の波長ごとの違いについて、遺伝子発現量の観点から基礎的な知見を得ることを目的とするものである。腸炎ビブリオを照射対象とし、キセノンランプ光源を用いて5種の波長のUVAをそれぞれ照射し遺伝子発現比を比較した。その結果、(1)鞭毛集合を構成する遺伝子の一部で発現比の変化が見られ、特に365nmで顕著であった。(2)ヒスチジン代謝関連の遺伝子が発現比の変化が見られ、特に340nmで顕著であった。(1)より365nmのUVが腸炎ビブリオの遊走機能や鞭毛数に影響する可能性が示唆され、(2)から340nmのUVでヒスチジンの産生に影響する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate fundamental knowledge of response mechanisms for near-ultraviolet (UV-A) exposure from the view of gene expression levels. *Vibrio parahaemolyticus* was examined to compare the gene expression levels for UV-A of five different wavelengths irradiated from a xenon lamp. As result of experiments, (1) difference of the gene expression level was observed in several parts of the flagellar complex. Particular difference of the level was observed for wavelength of 365 nm. (2) difference of the level was observed in several parts which are related to the histidine metabolism. Particular difference for wavelength of 340 nm. (1) suggests that exposure of UV-A with wavelength of 365 nm may affects on migration of the vibrio parahaemolyticus and the number of flagellum. (2) suggests exposure of UV-A with wavelength of 340 nm may affects on production of histidine.

研究分野：生体医工学

キーワード：近紫外線 遺伝子発現 腸炎ビブリオ 遺伝子発現

### 1. 研究開始当初の背景

紫外線殺菌は塩素等の薬剤を使う方法とは異なり、殺菌対象への副生成物、残留性などが無いなどの特長があり、広く実用に供されている。従来、紫外線殺菌には遺伝子の吸収波長に近く低圧水銀灯で容易に得られる波長 254 nm の紫外線 (UV-C) が利用されてきた。この波長は遺伝子の吸収波長に近く、直接作用することにより対象菌を死滅させることができる。一方、近年新たな紫外線光源として高出力の UV-A LED が利用可能になってきた。現在市販されている高出力 UV-A LED には、発光波長が 365 nm と 385 nm のものがあり、我々はこの 2 波長について殺菌効果の検討を行い、非病原性大腸菌や腸炎ピブリオなどに対して、実用に供することも可能な程度の殺菌効果が得られることを確認していた。また UV-A の殺菌機序は従来の UV-C のように、遺伝子を直接作用して殺菌効果を得ていたのとは違い、細胞内に発生する活性酸素の酸化作用によるものであることが示唆されていた。このように紫外線による菌の反応は照射する波長によって異なることは示唆されているものの、それらの機序が誘導される光の波長域や、その波長域の範囲について、網羅的な調査はあまり行われていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究課題では様々な波長における殺菌効果および特異的性質の探索と、各波長での殺菌機序の調査を目的としている。特に各波長の照射に対する遺伝子発現量の違いについて調査を行い、紫外線に対する反応の機序の解明のための基礎的な知見を得ることを目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 紫外線照射装置の開発

紫外線光源にはキセノン光源 (朝日分光社 MAX-303) を用い、目的とする波長帯の紫外線を光学フィルタで取り出し、光ファイバーを用いて照射対象のシャーレに上方から紫外線するような形とした。図 1 は紫外線照射部を様子である。シャーレ (写真では 96well プレート) を置くステンレスプレートは上方からの光を下部に通過させるよう、シャーレ形状でくり抜いている。これはシャーレ内の菌液に床面から反射光の影響を抑えるため、菌液に照射された光エネルギーの測定を容易にするためのである。この装置により、照射対象への紫外線照射を再現性良く行うことができるようにしている。

#### (2) 紫外線照射及び遺伝子発現量測定

菌液の調整、光照射、再培養、RNA 精製、マイクロアレイ処理の順で遺伝子発現量の測定を行った。指標菌には腸炎ピブリオ (RIMD2210633) を用い、一定の菌液濃度となるようにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈調整した。紫外線は上記の装置または



図 1 紫外線照射部

既存の UV LED を用いた紫外線照射装置を用いて、波長は 255nm, 290nm, 310 nm, 340 nm, 365 nm, 385 nm の 6 種類の波長について照射実験を行った。光照射量は予備実験で菌の log 生存率が -0.5 (32%) となるような条件を求めておき、それらを用いた。これは紫外線照射後の菌量すなわち RNA 量を一定にするためである。光照射後の菌液に対しては再培養を行い、得られる RNA 量を増やし誤差の低減を図った。その後、RNA を精製し、マイクロアレイ処理を行い、遺伝子シグナル値を取得した。これらの一連の実験を各波長 3 回ずつ行った。

#### (3) 遺伝子発現解析

遺伝子シグナル値は正規化、低発現遺伝子の除去、t 検定を用いた有意差検定、変動遺伝子の抽出、Pathway 頻度解析の順で処理を行った。正規化は遺伝子のシグナル値の遺伝子アレイ間での偏りとばらつきを揃えるために、各実験で得られたシグナル値の 75 パーセンタイルのシグナル値で除した。さらに正規化シグナル値が全体の 20 パーセンタイル以下のものは、値自体の信頼性が低いとして除去した。残った遺伝子のうち、対照群とのシグナル値が 1.5 倍以上または 2/3 倍以下で、t 検定で対照群のシグナル値と  $p < 0.05$  で有意差が見られたものを「変動遺伝子」とした。Pathway 頻度解析は KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) で公開されている腸炎ピブリオの Pathway, 110 種について行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 抽出遺伝子数

表 1 に各波長で (正規化された) 遺伝子シグナル値が増加および減少した遺伝子数と t 検定により有意な変動があったとされた遺伝子数を示す。マイクロアレイにより抽出した腸炎ピブリオの遺伝子数は全部で 4,826 種であるが、シグナル値が 1.5 倍および 2/3 倍になった遺伝子は波長によって大きく異なることがわかる。ただし、数の差異は照射した波長に対する反応の違いというよりは、実験条件のばらつきによるものと考えるのが自然である。従って結果の考察にはシグナル値が変化した遺伝子がどのような機能を持っているかについて着目するものとする。また全体にシグナル値が増加する遺伝子の数

が多い。この原因は現時点ではまだ明らかにはなっていないが、仮説として波長によらず紫外線照射により何らかのストレス反応が起こっており、全体的に遺伝子発現数を増加させることにより、あらゆる機能を向上し、環境変化に対応しようとしていることが考えられる。また UV-C での変動遺伝子数が少ないが、これは UV-C により遺伝子そのものが損傷を受け、RNA 数が全体に減少したためと考えられる。

表 1 シグナル値が増減した遺伝子数

照射波長[nm]	255	290	310	340	365	385	
増 加	遺伝子数	2,752	2,667	2,375	3,027	3,086	3,248
	1.5倍以上	14	44	14	75	140	255
	変動遺伝子	3	14	10	31	67	110
減 少	遺伝子数	2,074	2,159	2,451	1,799	1,740	1,578
	2/3倍以下	7	16	16	28	119	125
	変動遺伝子	1	1	0	3	23	30

(2)発現比上位 5 位までの変動遺伝子

表 2 に各波長で発現比の大きさが上位 5 位だった変動遺伝子の VP 番号とそれぞれの発現比を示す。UV-C, UV-B で共通して VP0648 の発現比が大きかった。VP0648 は組み換え修復タンパク質であり、DNA の損傷部分を補充、修復する働きがある。すなわち紫外線により傷ついた遺伝子の修復に関わる遺伝子である。また 310nm, 340nm と UV-B, UV-A にまたがるように VPA1471, VPA1472 は光回復に関連する酵素である。我々のグループのこれまでの実験で、365nm の紫外線照射により殺菌を行った場合、光回復が怒らないという結果が得られているが、その機序を示唆するもの

表 2 発現比上位 5 位まで変動遺伝子と log<sub>2</sub> 発現比

VP #	UV-C		UV-B		UV-A		
	255	290	310	340	365	385	
VP0648	0.722	0.825	0.862				
VP1119			0.802				
VP1120			0.765				
VP1121				0.960			
VP1122				1.020			
VP1124				1.018			
VP1315					1.274		
VP1669	-0.729						
VP2342	0.720						
VP2638		0.801					
VPA0085		1.100					
VPA0242					-1.451	-1.547	
VPA0243					-1.545	-1.583	
VPA0318					-1.471	-1.461	
VPA0762		0.815					
VPA0906		1.044					
VPA1278						-1.346	
VPA1279					1.256	-1.551	
VPA1471			0.969	0.969			
VPA1472			0.716	0.978			
VPA1663	0.610						

であると考えられる。365nm, 385nm では変動遺伝子が似通っており、紫外線照射による反応は大差がないことが示唆されている。

(3)Pathway 頻度解析

遺伝子発現解析により抽出した、1 つ以上の波長で変動遺伝子とみなされた遺伝子 200 種を 1 グループとみなし、超幾何分布を用いて Pathway 頻度解析を行った。その結果、鞭毛集合とヒスチジン代謝の Pathway に有意に変動がみられるという結果が得られた。図 2 は鞭毛集合の Pathway のうち変動が見られた遺伝子に印を付したもので、特に 365nm の紫外線照射時に最も多くの変動遺伝子が見られた。これにより UV-A 照射により鞭毛の運動あるいは数などに影響があることが示唆された。

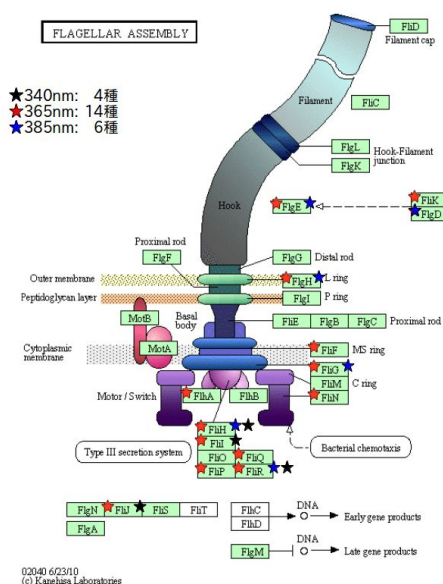


図 2 鞭毛集合の Pathway における変動遺伝子。(図は KEGG より引用)

また、ヒスチジンは酵素の活性中心やタンパク質分子内でのプロトン移動に関与しているアミノ酸の一種である。変動遺伝子は Phosphonbosyl-ATP から L-Histidine の生成までの過程に関与する遺伝子がほとんどであり、特に 340nm の照射時にこの経路の変動遺伝子数が多かった。これは 340nm の光の照射により L-Histidine の生成が促されている可能性があることを示唆している。L-Histidine は活性酸素種のスカベンジャーとなるとの報告もあり、活性酸素が主要な役割を担う UV-A の殺菌機構との関連がより明確にされることが望まれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 9 件)

星山 哲平 他, UV 及び可視光照射に対する腸炎ビブリオの遺伝子発現解析, 平成 26 年度電気関係学会四国支部連合大会, 徳島大学, 2014 年 9 月 13 日 (徳島県徳島市)

星山 哲平 他, 異なる波長の光照射に対する腸炎ビブリオの遺伝子発現解析, ME とバイオサイバネティクス研究会, 2014 年 7 月 26 日, 岡山大学 (岡山県岡山市)

石崎 仁愛 他, UV-A 殺菌推移を表すモデル化に関する研究, 平成 25 年度電気関係学会四国支部連合大会, 2013 年 9 月 21 日, 徳島大学 (徳島県徳島市)

星山 哲平 他, UV 照射に対する腸炎ビブリオの遺伝子発現解析, 平成 25 年度電気関係学会四国支部連合大会, 2013 年 9 月 21 日, 徳島大学 (徳島県徳島市)

Masachika Ishizaki et. al, Represent UV-A sterilization by model equation, BioEM2013, 2013 年 6 月 10 日~14 日, テッサロニキ (ギリシャ)

Tepei Hoshiyama et. al, Gene expression analysis of Vibrio parahaemolyticus for UV irradiation, BioEM2013, 2013 年 6 月 10 日~14 日, テッサロニキ (ギリシャ)

石崎 仁愛 他, UVA による殺菌のモデル化に関する研究, 平成 24 年度電気関係学会四国支部連合大会, 2012 年 9 月 29 日, 四国電力株式会社総合研修所 (香川県高松市)

Masachika Ishizaki et. al, Improvement of a pipe type UVA-LED sterilizer using a condenser lens, 34th Annual Conference of the bioelectromagnetics society, 2012 年 6 月 17 日~22 日, ブリスベン (オーストラリア)

真鍋 佑輔 他, UVA-LED を用いたパイプ型殺菌装置におけるレンズの効果, 平成 23 年度電気関係学会四国支部連合大会, 2011 年 9 月 23 日, 阿南工業高等専門学校 (徳島県阿南市)

〔その他〕

芥川 正武, 遺伝子発現解析を用いた光生体反応の波長特異性に関する研究, TECH Biz EXPO 2014 研究シーズ発表会「LED ライフイノベーション研究プロジェクト-特に殺菌, 滅菌, 抗菌技術について-」, 2014 年 10 月 22 日, ポートメッセ名古屋 (愛知県名古屋市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

芥川 正武 (AKUTAGAWA, Masatake)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス  
研究部・講師

研究者番号: 9 0 2 9 4 7 2 7

### (2) 研究分担者

高橋 章 (TAKAHASHI, Akira)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授

研究者番号: 9 0 3 0 4 0 4 7