

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12611

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21019

研究課題名（和文）合成DNAを用いた汎用性の高いUV線量計の開発

研究課題名（英文）Development of high versatile UV dosimeter using synthetic DNA

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：紫外線（UV）処理は病原体の殺菌に有効であり、塩基配列から紫外線感受性を推定することが有効である。本研究では、100-150塩基長の合成DNA分子を設計・使用し、DNA内の連続したチミン対数とDNAの二次構造についてUV反応性の決定因子として検討した。結果、紫外線照射による二量体形成DNAは、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）により検出可能であることが示された。またUV照射後のPCR不検出率から、DNA内の連続チミン対の数によって決定されるが、相補的結合数、即ち自由エネルギー値はUV反応性は影響を及ぼさないことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は合成DNAを利用することで、二次構造の有無に関わらずDNA内の連続したチミン対の数によってDNAのUV反応性が決定されるという明確な証拠を提示した。これはDNA塩基からUV反応性を推定するための方法論において非常に重要な学術的意義を示している。また合成DNAのUV反応性を正確に設計できることから、モデル微生物として被照射UV量を測定する生物線量計として使用できることを示した。モデル微生物を用いた被照射UV量の計測はUV装置の評価や、様々な空間におけるUV照射での病原リスク低減効果評価に適用できることから社会的意義は非常に大きい。

研究成果の概要（英文）：Ultraviolet (UV) treatment is effective in reducing pathogens, and it is useful to estimate UV sensitivity of pathogen from DNA or RNA sequences. In this study, synthetic DNA molecules of 100-150 base lengths were designed and used, and the number of consecutive thymine pairs in the DNA and the secondary structure of the DNA were examined as determinants of UV reactivity. The results showed that UV-irradiated dimer-forming DNA was detectable by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The non-detectability of PCR after UV irradiation indicated that the number of complementary bonds, i.e., the free energy value, did not affect the UV reactivity, although it was determined by the number of consecutive thymine pairs in the DNA.

研究分野：環境衛生工学

キーワード：合成DNA UV反応性 連続チミン対数 DNA二次構造

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

令和元年より全ての浄水場において耐塩素性病原微生物(主にクリプトスポリジウム)への体操として紫外線(以下UV)処理の導入が可能となり、以降、その導入例は増加している。水道における処理は安全性の保障が高いレベルで行われる必要があることから、信頼性の高い評価方法が求められている。現在、浄水場などで導入されている通水型UV殺菌装置は導入に当たり性能評価を行うことで安全性を保障しているが、その方法としては、実際の通水条件の下で、UV耐性既知の生物(大腸菌ファージなど)を投入し、その生残率から装置が持つ平均的UV照射量を求めて評価する生物線量計法が一般的である(JWRC(2017), EPA(2006))。

この時、装置に求められる必要UV量の大小によって、適切なUV耐性を持つ生物を用いる必要があるが、そのバリエーションは現有の生物が有するUV耐性に限られる。今後、クリプトスポリジウム対策だけでなく、一般的な消毒処理に用いられることを想定すると、様々な照射エネルギーレベルの装置の評価が行えるようにしておかねばならないが、特に200 mJ/cm²以上の高照量用UV装置の評価に適切な高UV耐性生物がないという不都合な状況である(出口ら(2017))。このため様々なUV耐性をもつ微生物もしくはその代用となるような物質を開発することが求められる。

2. 研究の目的

上記のような背景から本研究の目的は生物の代わりに合成DNAを用いることで、あらゆるUV耐性バリエーションをもつ疑似生物線量計を開発することである。この合成DNAによる線量計には、次のような利点があると考えられた。

- 1) UV殺菌機構はDNAの不可逆損傷であり、ピリミジン塩基(チミン等)の連続箇所が生じる。この連続箇所数を調節することで様々なUV耐性の合成DNAの設計が可能である。
- 2) 合成DNAも生物DNAも同じ構成要素であるため、従来型UV光(水銀ランプ)と照射波長が異なる光源(UV-LED等)においても、生物と反応効率がほぼ等しく殺菌効果を評価するには適している。既報にある化学物質(蛍光染色剤など)による線量計(Blatchelyら(2002)等)にはない長所である。
- 3) UV耐性の異なる生物を複数用いれば照射量評価はより確実になる(EPA(2006))。しかし生物の検出方法は重複することが多く、複数種の同時投入は難しい。合成DNAではそれぞれに特異的な検出法が可能となる設計が可能であり、何種類でも同時投入が可能となり測定値を同時に得ることが可能である。

以上のように汎用性高く使用できる線量計法を開発することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

3.1. UV照射による合成DNAのUV損傷検出の確認

UV照射による合成DNAのUV損傷をPCR法により定量化することを確認する。プライマーが共通の様々な種類の合成DNAを設計、作成し、定量的PCRを用いて、UV照射前後の検出濃度を求めた。作成した合成DNAは70塩基とし含有するチミン連続対の数を変えて設計した。またプライマーおよびプローブは共通とした。表1に示した合成DNAについては含有する連続するチミンの数を名称とした(例えばチミンが10塩基連続する場合T10)。回分式のUV照射実験とし、照射するUV強度はヨウ素カリウム/ヨウ素酸カリウム化学線量計(Goldstein, 2008)を用いて入射光の照射強度を測定した。この入射光はLambert Beer則に従って、ペトリ皿内の合成DNA懸濁液の水深方向に減衰すると仮定し、合成DNA懸濁液の水深および254 nm吸光度を用いて式(1)を用いて懸濁液内の平均紫外線強度を求めた。照射強度は約0.3 mW/cm²とし、照射量は100, 500, 1000 mJ/cm²とした

$$I_{\text{avg}} = I_{\text{in}} * (1 - \exp(-2.3A_{254}d)) / (A_{254}d) \quad (1)$$

リアルタイム定量PCRはStepOnePlus Real Time PCR System(Applied Biosystems)を用い5×10¹⁰~10⁰ copies/Lに10倍ずつ段階希釈した濃度既知のサンプルDNAをリアルタイムPCRに供した。PCR反応溶液は合計20 μLとなるように以下の組成で作成した。

- TaqMan Fast Advanced 2X Master Mix:10 μL
- サンプルDNA溶液 :2 μL
- フォワードプライマー(終濃度 400 nM):0.8 μL
- リバースプライマー(終濃度 400 nM):0.8 μL
- 蛍光プローブ((終濃度終濃度 100 nM)):0.2 μL

・ Nuclease-Free Water:6.2 μ L

反応条件は、50°C2分、95°C2分の後、95°C1秒、60°C30秒のサイクルを40回行った。

表1 使用した合成 DNA の塩基配列

合成 DNA 名	総塩基数	配列
T10(70)	70	CAGATCTCAGGCGTCCAAATCTGGGAGGGCGATCGCAATCTTTT TTTTTCATAGCTGGTGCAATAGCG
T4T3(70)	70	CAGATCTCAGGCGTCCAAATCTGGGAGGGCGATCGCAATCTTTTA AAATTTTCATAGCTGGTGCAATAGCG
TC7(70)	70	CAGATCTCAGGCGTCCAAATCTGGGAGGGCGATCGCAATCTCTCT CTCTCTCATAGCTGGTGCAATAGCG

3.2. UV 反応性への影響因子の検討

総塩基数が70~150 bpの合成 DNA を用いて、ピリミジン二量体形成数に影響する要因を分析することとした。プライマーおよびプローブは共通でチミン塩基の連続数や配置が異なるように設計した。合成 DNA の名称はチミン対、すなわちチミン塩基が隣り合っている組の連続数を表すこととした。例えば T9 は、T-T の塩基組み合わせが9通り存在することを意味する。また T3T2 は、同塩基組み合わせが3通りの箇所と2通りの箇所が存在することを意味する。

それぞれの合成 DNA 溶液 (5×10^8 copies/ μ L) を pH8.0 TE(Tris-EDTA buffer solution)にて希釈し、 5×10^5 copies/ μ L の合成 DNA 溶液 10 mL とした。これをペトリ皿に投入し、回分式 UV 照射装置にて上方より UV 光を 75 mJ/cm² および 150 mJ/cm² にて照射した。UV 光源は 30W の低圧水銀灯 (GL30, Toshiba co.ltd) とし、強度測定法は 3.1.と同様の方法とした。実験はそれぞれ 3 回試行した。

表3に示す各 DNA の塩基配列より、Web 上の二次構造予測ソフト mfold を用いて自由エネルギー値および二次構造の推定値を求めた。mfold とは一本鎖核酸の二次構造を予測できる Web 上のソフトウェアである。

4. 研究成果

4.1. UV 照射による合成 DNA の UV 損傷検出の確認

図 4.1 に 70 塩基の合成 DNA の結果を示す。縦軸は次式にて定義する PCR 検出残率の対数とした。

$$\text{PCR 検出残率} = \text{UV 照射後の PCR 検出量} / \text{UV 照射前の PCR 検出量}$$

図に示されるように 100 mJ/cm² の UV 照射では反応性はほぼ変わらなかったが、500, 1000 mJ/cm² の照射では UV 照射に伴う PCR 検出残率の低下が確認され、UV 照射による DNA 損傷 (二量体形成) の多寡が定量的 PCR により検出できることがわかった。さらに連続チミン塩基数が最も大きい T10(70)の反応性が最も大きかった。このことから二量体形成可能配列 (チミン連続塩基) の多寡が UV 反応性に関わっていることが確認できた。T10(70)はチミンが 10 塩基連続しているのに対し、TC5(70)はピリミジン塩基としては 10 塩基連続しているがチミンとシトシンが交互に並んでいるため連続チミン配列を持たない。T10(70)や T4T3(70)と比べて反応性が小さいことからピリミジン塩基でもチミン-チミンの方がチミン-シトシンより二量体形成能が高く、連続チミン塩基数が UV 反応性に大きく寄与していると考えられた。

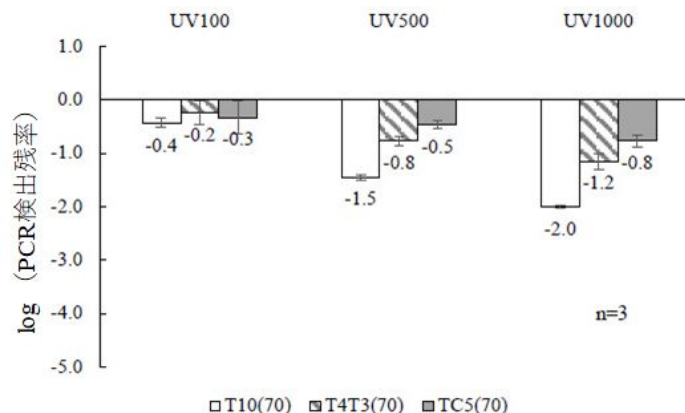


図 4.1 70 塩基の合成 DNA における UV 照射後 (UV100: 100 mJ/cm², UV500: 500 mJ/cm², UV1000: 1000 mJ/cm²) の PCR 検出残率の比較

4.2. UV 反応性への影響因子

合成 DNA の二次構造を予測ソフト mfold を用いて推定した．また図 4.2 に mfold により推定された二次構造の最小自由エネルギー値と二次構造を示す．T3×5，T4×10，T3×8+27 の 3 つの合成 DNA は最小エネルギー値が 17 kcal/mol 以上と他に比べて高くなっているが，これは DNA 内の相補的結合部位が多いためである．

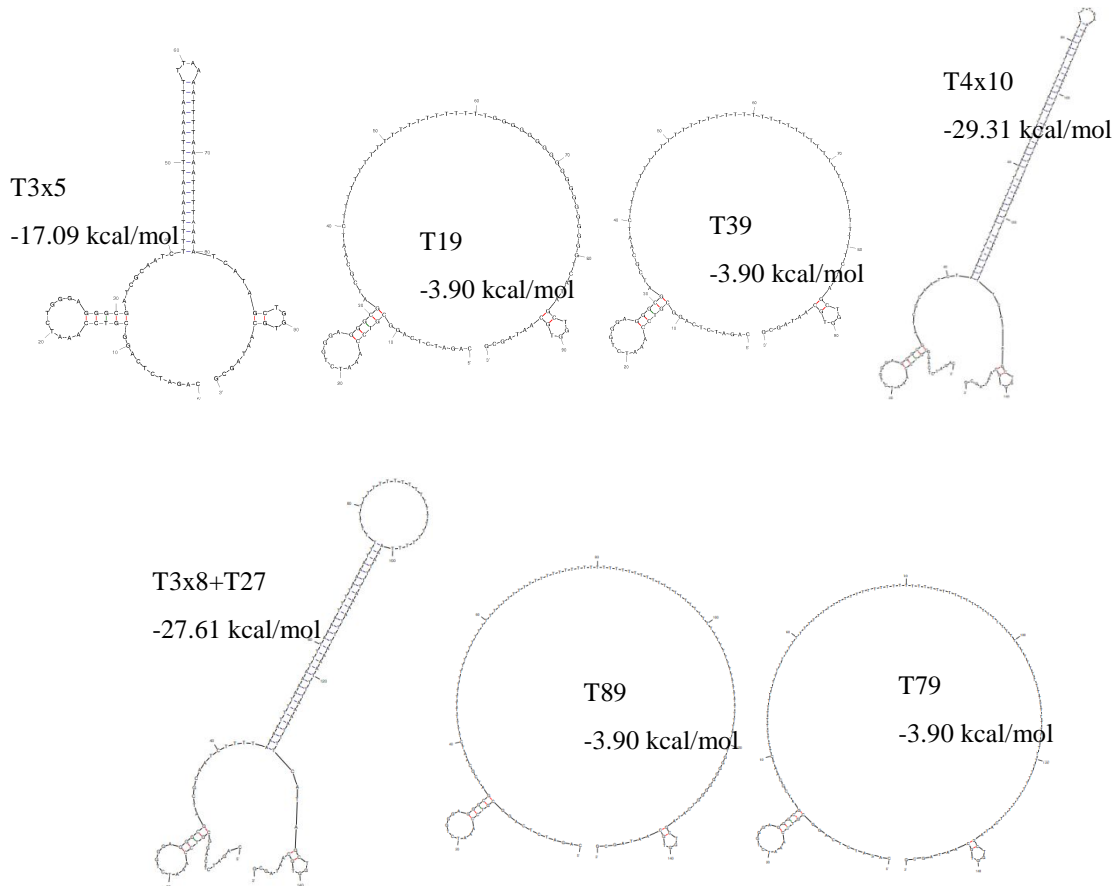


図 4.2 mfold による合成 DNA の二次構造の推定結果

図 4.3 に UV 照射量を大きくしたときの各合成 DNA の反応性の変化を示した．UV 照射量と UV 反応性の間におおむね比例関係が見られた．

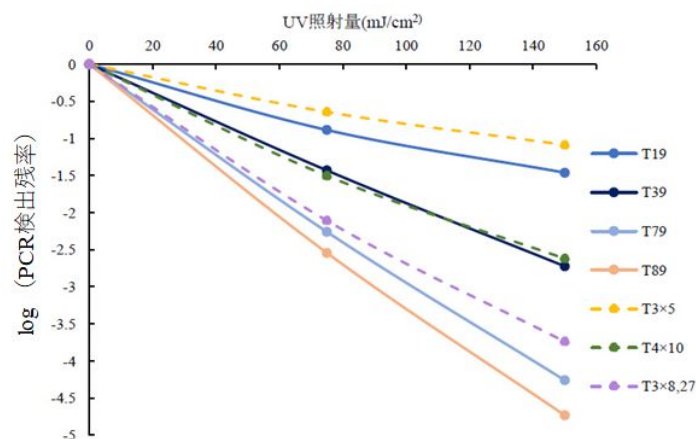


図 4.3 各合成 DNA の UV 照射量による PCR 検出残率の変化 (n = 3)

図 4.4 は、各合成 DNA について、紫外線照射 (75mJ/cm²、150mJ/cm²) 後の PCR 残率と連続するチミン対の数の関係を示したものである．黒丸は自由エネルギーが高く DNA 内で相補結合に入りやすい構造の DNA を、白丸は相補結合ができにくい構造の DNA を示している．図に示されるように自由エネルギーが示す構造の違いに関わらず、チミン配列の数が DNA の UV 反応性の決定因子であると考えられた．相関係数は両者に高い相関があることを示している．

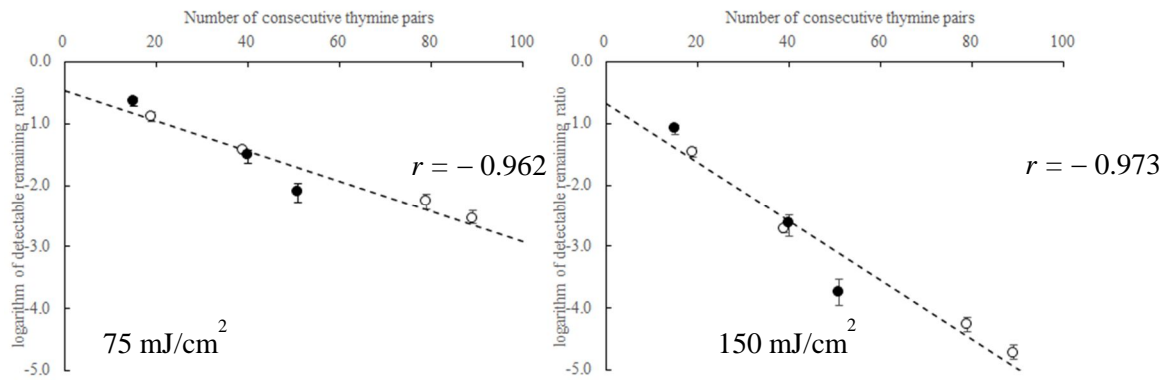


図 4.4 UV 照射量 75 mJ/cm² および 150 mJ/cm² の照射後の PCR 検出残率と連続チミン対数の関係 (黒丸 (●): 自由エネルギーが高く、DNA 内で相補的に結合しやすい DNA, 白丸 (○): 相補的な結合を形成しにくい構造を持つ DNA)

表 2 は、連続するチミン対の数と各 DNA の自由エネルギーを独立変数とし、UV 照射 (75 mJ/cm²) 後の PCR 検出残率を従属変数として重回帰分析を行った結果である。表中の p 値は、各係数が 0 であるという帰無仮説を棄却する確率を示す。 $p < 0.05$ の有意水準では、連続するチミン対の数の係数はゼロにできず、自由エネルギーの係数はゼロにできることを意味している。したがって連続するチミン対の数は紫外線感受性の向上に寄与するが、DNA の二次構造を取り込んだ自由エネルギーの向上は寄与しないと統計的に結論づけられた。

表 2 UV 照射量 75mJ/cm² の照射後の PCR 検出残率に対する、連続チミン対数および各 DNA の自由エネルギーを独立変数とした重回帰分析結果

	係数	標準誤差	p 値
切片	-0.269	0.188	0.226
X_1 (連続チミン対の数)	-0.026	0.0028	<0.001
X_2 (自由エネルギー)	0.011	0.0066	0.174
修正相関係数	0.93		

参考文献

- JWRC (2019) 紫外線照射装置 JWRC 技術審査基準 (UV-LED 編)
- USEPA (2006) Overview of UV disinfection, Ultraviolet disinfection guidance manual for the Final Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule, pp 2-1-2-8.
- 出口ら (2017) 第 15 回日本水環境シンポジウム講演集, pp.92-93,
- Blatchley et al. (2002) *Wat. Res.* 42, pp.77-688
- Bolton J.R., Stefan M.I., Shaw P.S. and Lykke K.R. (2011) Determination of the quantum yields of the potassium ferrioxalate and potassium iodide-iodate actinometers and a method for the calibration of radiometer detectors, *J. Photochem. Photobiol. A*, 222, pp 166-169
- Goldstein S. and Rabani J. (2008) The ferrioxalate and iodide-iodate actinometers in the UV region, *J. Photochem. Photobiol. A*, 193, pp 50-55

成果発表資料

- 1) 山田裕子, 大瀧雅寛, 合成 DNA を用いた UV 不活化反応効率の検証, 第 55 回日本水環境学会年会公講演集 (オンライン開催) (成果発表資料-1)参照)
- 2) M. Otakia, Y. Higashino and Y. Yamada, Experimental validation of determinants of UV sensitivity using synthetic DNA (投稿中論文)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田裕子, 大瀧雅寛
2. 発表標題 合成DNA を用いたUV 不活化反応効率の検証
3. 学会等名 日本水環境学会年会
4. 発表年 2021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	風間 しのぶ (kazama shinobu) (20749444)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任講師 (12601)	
研究分担者	溝添 倫子 (mizozoe michiko) (20894520)	お茶の水女子大学・基幹研究院・基幹研究院研究員 (12611)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------