

中圧紫外線の微生物不活化と光・暗回復

DNA lesions, photoreactivation and dark repair of medium pressure ultraviolet irradiated microorganisms

森田重光

麻布大学大学院環境保健学研究科

Shigemitsu Morita

Graduate school of environmental health, Azabu university

Abstract. Some microorganisms are known to possess the ability to repair the DNA lesion by mechanisms such as photoreactivation and dark repair. However, the ability of spore formed microorganisms to perform photoreactivation and dark repair has not been clarified yet in spite of the importance of these phenomena. In previous study, the photoreactivation and dark repair of *E. coli* were investigated by an endonuclease sensitive site (ESS) assay, which can determine the number of ultraviolet induced pyrimidine dimers in the genomic DNA.

Then, in this study, Photoreactivation of *Bacillus subtilis* spore subsequent to an inactivation by low-pressure or medium-pressure UV lamps was investigated. An endonuclease sensitive site (ESS) assay was applied to determine UV-induced pyrimidine dimers in the genomic DNA of *B. subtilis*, while a conventional cultivation assay was also used to investigate the colony forming ability (CFA) of *B. subtilis*.

The UV-induced pyrimidine dimers were gradually repaired as the exposure time to fluorescent light increased. Approximately 10 % of the ESS were reduced after fluorescent light irradiation at a dose of 540 mJ/cm². After photoreactivation, finally achieved inactivation of the CFA ratio of *B. subtilis* was 1.5 log₁₀ subsequent to a 2 log₁₀ inactivation by LP or MP lamp.

The UV-induced pyrimidine dimers were gradually repaired during storage in the dark. Nonetheless, the number of ESS decreased more slowly in the latter than during the photoreactivation process. Approximately 95 % of the ESS were reduced after storage in the dark for 48 hours, indicating *B. subtilis* has the ability to repair the pyrimidine dimers in the genomic DNA during either exposure to fluorescent light or storage in the dark.

1. 研究の目的

紫外線照射は微生物の不活化技術として有効である。しかし、一部の微生物では紫外線によってDNA上に形成された損傷（主として二量体）、あるいはコロニー形成能（CFA: Colony Forming Ability）が回復することがあり、紫外線消毒の重大な問題となって

いる（Harm, 1980, Harris *et al.*, 1987, Lindenauer *et al.*, 1994, Water Environment Federation, 1996）。これまでの紫外線不活化に関する研究は低圧水銀ランプが発する254 nmの単一波長を照射する実験が主であったが、200 nmから可視光域までの幅広い波長域の光線を発する中圧水銀ランプを用いた実験の結果も報告されるようになり、一部の細菌では中圧紫外線

に曝露されることによって光回復が抑制されるという新しい知見が示されている (Oguma *et al.*, 2002)。

そこで本研究では *Bacillus subtilis* を対象微生物として、その芽胞に低圧または中圧紫外線を照射し、ESS 法 (Endonuclease Sensitive Site Assay: 紫外線照射によって DNA 上に形成された二量体数を定量する手法) およびコロニー形成能で紫外線の不活化力および回復の有無を明らかにした。

本研究は、中圧紫外線を消毒装置に適用する際に必要となる基礎情報を得ることを目的としている。

2. 方法

2.1. 対象微生物

栄研化学株式会社の *B. subtilis* 芽胞 (No.6633 株) を用いた。また、対象微生物として *Escherichia coli* (IFO3301) を用いた。いずれも 10^6 個/mL となるように PBS に懸濁させた溶液を紫外線照射用の試料とした。

2.2. 紫外線照射

5 W 低圧紫外線ランプ (岩崎電気製) から放出される低圧紫外線 (LPUV) または 330 W 中圧紫外線ランプ (荏原製作所製) から放出される低圧紫外線 (MPUV) を照射した。試料懸濁液 10 mL を $\phi 56$ mm のシャーレに入れ、鉛直上方から紫外線を照射した。試料懸濁液の 254 nm における吸光係数は 0.05 cm^{-1} 以下であり、水層底面における紫外線線量率は水層表面の 98 % となることから、水層における紫外線の減衰は補正せず、水層表面における紫外線照射線量率を水層全体の平均紫外線照射線量率とみなした。照射線量率は試料懸濁液とランプの距離で調節し、積算光量計 (UIT-150, ウシオ電機製) で測定した。照射時間は電磁シャッターで制御し、照射線量率と照射時間の積を紫外線照射線量とした。照射中は試料懸濁液を電磁スターラーで常時攪拌した。

2.3. 光・暗回復処理

光回復処理では紫外線照射直後に試料懸濁液の鉛直上方から蛍光灯 (FL15N, 東芝製) の可視光線を照射した。可視光線の照射線量率は試料懸濁液と蛍光灯ランプの距離で調節し、積算光量計 (UVR-2, TOPCON 製) で測定した。照射中は試料懸濁液を電

磁スターラーで常時攪拌した。また、暗回復処理では紫外線照射直後の試料懸濁液を消灯した 20 °C のインキュベータ内に静置した。

2.4. ESS 数の測定・算出

紫外線照射を行った試料を遠心濃縮 (8000 rpm, 10 min, 4 °C) した後、沈渣を 5 回凍結融解 (-80 °C 10 min で凍結後, 80 °C で融解) し, *B. subtilis* の芽胞を破碎した。DNA 抽出キット (Genomic-tip, QIAGEN) を用いて, *B. subtilis* から DNA を抽出 (平均 DNA サイズ: 50 ~ 100 k base) し, 抽出 DNA を膜濃縮キット (Centricon, Millipore) で遠心濃縮した。抽出 DNA は UV エンドヌクレアーゼ緩衝液 (30 mM Tris (pH 8.0), 40 mM NaCl, 1 mM EDTA) で 3 回遠心洗浄し, ESS 測定に供した。

東京大学工学部より分与して頂いた UV エンドヌクレアーゼ (*Micrococcus luteus* から抽出) を抽出 DNA に添加し, 37 °C で 45 分間反応後, アルカリダイ (最終濃度, 100 mM NaOH, 1 mM EDTA, 2.5 % Ficoll, 0.05 % bromocresol green) を加え, 反応を停止させた。0.5 % アルカリアガロースゲル (0.5 % Agarose H (日本ジーン), 30 mM NaOH, 1 mM EDTA) にサンプルを 1 ウェルおきに添加し, アルカリ緩衝液 (30 mM NaOH, 1 mM EDTA) で満たした電気泳動槽を用いて 0.5 V/cm で 17 時間電気泳動した。また, マーカーとして 8 GT (T4GT7 + T4GT7/Bgl II digest mixture, 和光純薬工業) をサンプルと同条件で電気泳動した。泳動後のゲルは 0.05 mL/mL の 1M Tris-HCl (pH 8.0) (和光純薬工業) で 2 時間中和した後, 0.25 $\mu\text{g/mL}$ のエチジウムブロマイド溶液 (和光純薬工業) に浸漬し, 5 時間染色した。染色後, ゲルの蛍光画像の CCD カメラ (GelDoc 2000, BIORAD) で取り込み, 画像解析ソフトウェア (Quantity One, BIORAD) を用いて解析した。

ゲルの蛍光画像 (Photo. 1) を解析する上で用いるバックグラウンドはサンプル泳動レーンをはさむ両隣の泳動レーン (サンプルを流していないレーン) の平均値とした。総 DNA の中央値にあたる移動距離をマーカーの移動距離と DNA 塩基数の関係式に挿入し, サンプル DNA の L_{med} を算出した。この値から 1 塩基当たりの ESS 数を算出し, 1.0×10^4 塩基当たりの ESS 数で示した。

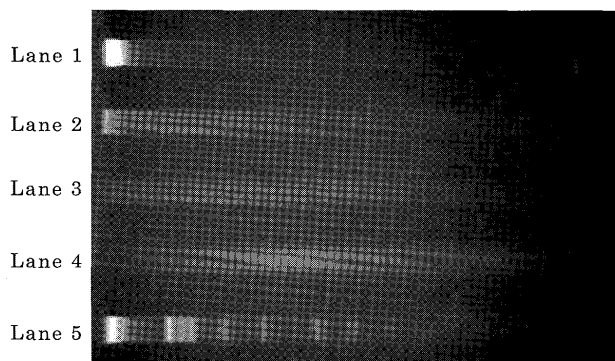


Photo. 1 Gel images of ESS assay for *B. subtilis* during exposure to LPUV lamp.

Lane 1: no UV exposure, Lane 2,3,4: UV exposures at doses of 1, 3, 6 mJ/cm², Lane 5: standard markers

2.5. 生残率の測定

B. subtilis の生残率の測定は普通寒天培地（日本製薬）を用いた平板法により行った。また、*E. coli* の生残率の測定は、デソキシコール酸塩標準寒天培地（日本製薬）を用いた平板法により行った。紫外線照射した試料を 80℃ の水浴中で 20 分間熱処理し、5 段階希釈した後、直径 85 mm のプラスチックシャーレに 1 mL ずつ試料溶液を入れ、普通寒天培地を 20 mL 加え混雑した。混雑後、37℃ のインキュベータ内で 24 時間培養し、形成したコロニーの数をカウントした。各希釈段階につき 5 枚ずつ培養し、コロニー数はその平均値をとった。

3. 結果および考察

3.1. 低圧および中圧紫外線照射による生成 ESS 数および CFA 比の変化

LPUV を照射したときも MPUV を照射したときも照射線量が増加するに従って ESS 生成数は直線的に増加し (Fig. 1), CFA 比は指数関数的に減少した (Fig. 2)。また、紫外線積算光量計の測定値を DNA 吸収スペクトルに基づき重み付けをした紫外線照射線量で補正すると、LPUV と MPUV の単位線量あたりの不活化力および単位線量あたりの ESS 生成数はほぼ一致した。以上の結果から、単位線量あたりの紫外線の *B. subtilis* 不活化力は LPUV でも MPUV でも同じであると考えられる。

3.2. 紫外線照射により生成した ESS の光回復

紫外線を照射した後に光回復処理すると、LPUV

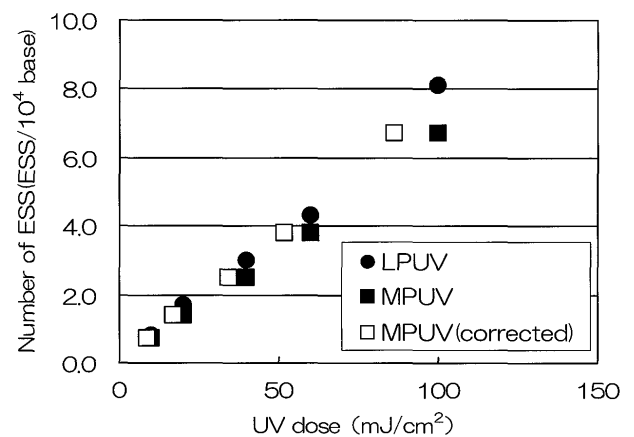


Fig. 1 Relationships between UV dose and number of ESS during exposures to LPUV or MPUV.

●: LPUV, ■: MPUV, □: MPUV corrected using DNA absorption spectra

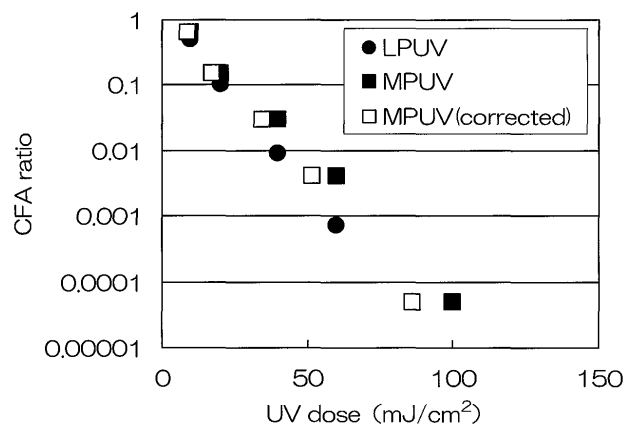


Fig. 2 Relationships between UV dose and CFA ratio during exposures to LPUV or MPUV.

●: LPUV, ■: MPUV, □: MPUV corrected using DNA absorption spectra

を照射したときも MPUV を照射したときも残存 ESS 数は可視光照射 60 分まで急速に減少した後 180 分まで漸次減少し、その後 0.4/10⁴base 付近で平衡に達した (Fig. 3)。一方、CFA 比は可視光照射 60 分まで急速に増加した後、180 分まで漸次増加した (Fig. 4)。ESS 数も CFA も回復速度は *E. coli* などと比べて遅かった。

3.3. 紫外線照射により生成した ESS の光回復

また、紫外線を照射した後に暗回復処理すると、LPUV を照射したときも MPUV を照射したときも残存 ESS 数は暗所静置後 2 日まで漸次減少し、0.2/10⁴base 付近で平衡に達した (Fig. 5)。*E. coli* の一

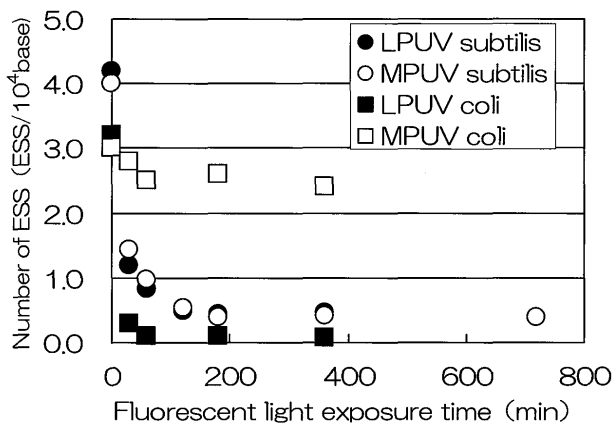


Fig. 3 Number of ESS during fluorescent light exposures subsequent to LPUV or MPUV inactivation.

● : LPUV exposure to *B. subtilis*,
○ : MPUV exposure to *B. subtilis*,
■ : LPUV exposure to *E. coli*,
□ : MPUV exposure to *E. coli*

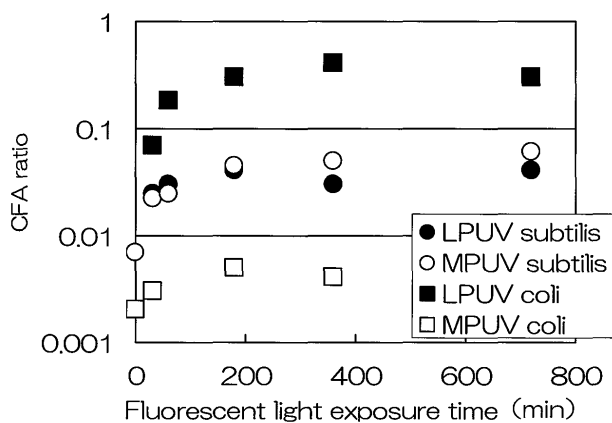


Fig. 4 CFA ratio during fluorescent light exposures subsequent to LPUV or MPUV inactivation.

● : LPUV exposure to *B. subtilis*,
○ : MPUV exposure to *B. subtilis*,
■ : LPUV exposure to *E. coli*,
□ : MPUV exposure to *E. coli*

部の株ではMPUVを照射した後に光回復処理をしても残存ESS数は減少しないが、*B. subtilis*の場合はMPUVによる回復抑制効果は認められなかった。

4. まとめ

本研究では芽胞を形成する *B. subtilis* にLPUV およびMPUVを照射して、不活化力およびESS生成数を定量的に評価した。その結果、以下に示す知見が得られた。

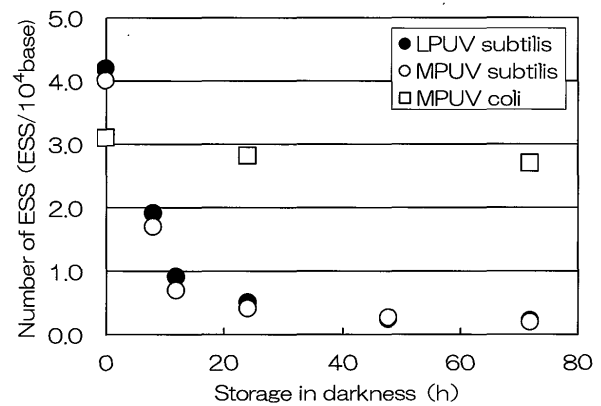


Fig. 5 Number of ESS during storage in darkness subsequent to LPUV or MPUV inactivation.

● : LPUV exposure to *B. subtilis*,
○ : MPUV exposure to *B. subtilis*,
■ : LPUV exposure to *E. coli*,
□ : MPUV exposure to *E. coli*

- 1) LPUV と MPUV の単位線量当たりの *B. subtilis* 不活化力およびESS生成数はほぼ同じであった。
- 2) 紫外線照射した *B. subtilis* のESS数およびCFAは光・暗回復するが、回復速度は *E. coli* などの芽胞を形成しないほかの細菌と比べて遅かった。
- 3) *E. coli* で見られたMPUV照射による回復抑制効果は *B. subtilis* では認められなかった。

参考文献

- Harm, W., Biological effects of ultraviolet radiation, 31-39, Cambridge University Press, New York, 1980.
- Harris, G. D., V. D. Adams, D. L. Sorensen and M. S. Curtis, Ultraviolet inactivation of selected bacteria and viruses with photoreactivation of the bacteria, *Water Res.*, 21, 687-692, 1987.
- Lindenauer, K. G. and J. Darby, Ultraviolet disinfection of wastewater: effect of dose on subsequent photoreactivation. *Water Res.* 28, 805-817, 1994.
- Oguma, K., H. Katayama, and S. Ohgaki, Photoreactivation of *Escherichia coli* subsequent to low- or medium-pressure ultraviolet disinfection determined by an endonuclease sensitive site assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 12, 6029-6035, 2002.
- Water Environment Federation, Ultraviolet disinfection. In *Wastewater Disinfection*, 227-291, Water Environment Federation, Alexandria, Va., USA, 1996.