

(23) 酵母エキスによる大腸菌の光回復抑制効果

Repressive effects of yeast extract on photoreactivation of *Escherichia coli*

小熊久美子^{*}、片山浩之^{**}、三谷啓志^{**}、大垣眞一郎^{*}

Kumiko OGUMA^{*}, Hiroyuki KATAYAMA^{**}, Hiroshi MITANI^{**} and Shinichiro OHGAKI^{*}

ABSTRACT ; Photoreactivation of *Escherichia coli* after a low-pressure ultraviolet (UV) lamp inactivation was investigated in the presence or absence of yeast extract (YE). The YE solution was dialyzed to specify the fraction affecting photoreactivation. A conventional colony forming test was used to examine the survival of *E. coli*, while an endonuclease sensitive site (ESS) assay was also performed to determine the number of UV-induced pyrimidine dimers in the genome DNA of *E. coli*. In photoreactivation of *E. coli*, survival recovery was significantly reduced in the presence of YE. Further investigations with YE dialysates indicated that the YE components with nominal molecular weights between 1000 and 3500 were mostly responsible for repressing the survival recovery. Interestingly, ESS repair was observed even with the YE dialysate, suggesting that *E. coli* could not recover the survival even after the repair of ESS in the presence of YE. The results of this study indicated that the YE components were effective to repress the survival recovery of *E. coli* without directly affecting ESS repair during photoreactivation.

KEYWORDS ; endonuclease sensitive site (ESS) assay, *Escherichia coli*, photoreactivation, ultraviolet (UV) disinfection, yeast extract

1. はじめに

水処理における消毒方法の一つとして、紫外線照射による消毒が実用化されている。紫外線消毒は、薬品添加を要しない、副生成物を生じない、運転管理や既存施設への導入が容易である等の長所を有し、特にアメリカやヨーロッパ諸国において実浄水場および下水道処理場での稼働例が多い¹⁾。加えて、養殖漁業設備、水泳・水浴施設や噴水等の修景用水への適用例も増加してきている。紫外線消毒が普及した歴史的背景には、塩素消毒における消毒副生成物や残留塩素の毒性に対する社会的関心の高まりがあり、したがって紫外線は塩素の代替消毒手法のひとつという位置付けが主であった。しかし近年、塩素耐性の強いウイルスや寄生虫オーシストに対して紫外線処理が優れた消毒効果を示すとの知見が蓄積されており^{2,3,4)}、さらに紫外線照射装置の性能向上による経済的メリットなどが得られるようになった⁵⁾。これに伴い、積極的に紫外線消毒を採用する動きが見られつつある。日本では、衛生上の措置として水道水の遊離残留塩素濃度 0.1mg/L 以上が義務づけられているため、紫外線単独による浄水の消毒はなされていない。しかしながら、浄水処理工程での前・中塩素処理を紫外線処理で代替することにより、処理工程において生成するトリハロメタンなどの消毒副生成物の量を低減する試みが検討されつつある。また、下水処理においては、処理水の残留塩素濃度下限値が規定されていないため、紫外線単独による消毒がなされている。現在、国内の 20 を超える下水処理場において紫外線消毒設備が稼働しており、その数は年々増加する傾向にある。特に、希少生物の生息区域や養殖漁業区域を放流先とする下水処理場において、塩素消毒を紫外線消毒に代替する例が多い。

短波長の紫外線 (UV-C および UV-B : 200-320nm) は、生物の核酸塩基上にピリミジン二量体などの損傷を生成し、正常な代謝・自己複製能力を妨げることで生物を不活化する⁶⁾。しかし、多くの生物は「光回復」などの遺伝子修復能力を有し、短波長紫外線による核酸損傷を修復することが知られている⁷⁾。光回復とは、ピリミジン二量体に特異的に結合する光回復酵素が、近紫外線から可視光線にかけての光のエネルギーを利

^{*}東京大学大学院工学系研究科: Graduate School of Engineering, University of Tokyo

^{**}東京大学大学院新領域創成科学研究科: Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo

用して二量体を開裂させ、もとの塩基配列に復帰させる現象である。光回復により、生物は正常な代謝と自己複製能を取り戻す。すなわち、光回復が進行すると紫外線照射後の生物が再び活性化し、消毒効果を低減してしまう危険性がある。特に下水処理に紫外線処理を適用する場合、不活化後の微生物が太陽光に曝されるため、処理後の光回復現象を考慮しないと十分な消毒効果を維持できない危険性がある。よって、光回復の定量的評価と抑制は、紫外線消毒における重要な工学的課題である。

従来、光回復の定量には対象微生物の培養に基づく測定方法が用いられてきた。微生物の水質基準がほぼすべて培養法の測定値で規定されていること、さらに、培養法が概ね病原性や生残性を反映することを考えると、培養法による消毒効果の評価は必須である。一方、紫外線による不活化および回復が主に遺伝子損傷の生成と修復に起因することを考えると、遺伝子損傷そのものの定量も紫外線処理の評価に重要であることが指摘できる。筆者らはこれまでに、ピリミジン二量体の定量方法として Endonuclease Sensitive Site (ESS)法を用い、指標細菌の一種である *Escherichia coli* および水系感染を引き起こす病原原虫 *Cryptosporidium parvum* を対象としてその有用性を明らかにしてきた^{8,9,10)}。一方筆者らは、培養法による測定結果から、酵母エキスを大腸菌の光回復を抑制する効果があることを報告した¹¹⁾。これは、処理水中の溶存物質が光回復に影響しうることを示唆する、興味深い知見である。

そこで本研究では、酵母エキス存在下での大腸菌の光回復を培養法と ESS 法を併用して定量し、生残性と遺伝子損傷の両面から酵母エキスの光回復抑制特性について議論することを試みた。さらに、酵母エキスを透析分画し、特に光回復抑制効果の高いフラクションについて検討した。

2. 実験方法

2.1 対象微生物

Escherichia coli K12 (IFO3301)を 37℃の LB 液体培地(DIFCO)中で一晩振とう培養し、その後遠心分離(7000 ×g, 10min)によってペレットを回収した。回収した菌体を滅菌済みリン酸緩衝液(pH 7.6)に初期濃度 2.5-4.0 ×10⁷(cfu/mL)で懸濁し、40mL ずつ滅菌済みガラスシャーレ(直径 100mm)に投入して光照射実験に供した。

2.2 酵母エキス透析液

酵母エキス粉末(Yeast extract, DIFCO) 50mg を超純水 1L に溶解してオートクレーブ滅菌し、酵母エキス液として実験に供した。また、酵母エキスを公称分画分子量 1000 および 3500 の 2 種の透析膜(Spectra pore, FUNAKOSHI)を用いて 10 倍容積のリン酸緩衝液に対して透析し、酵母エキス透析液を回収した。酵母エキス液およびその透析液は、酵母エキス粉末換算で 0.125mg/L となるよう紫外線照射直後の試料 40mL にすみやかに添加し、その後の光回復への影響を調べた。

2.3 光照射条件

不活化には、低圧紫外線ランプ(STANLEY 殺菌灯, 20W, TOSHIBA)を用いた。紫外線線量計(UVR-2 UD-25, TOPCON)による測定の結果、試料表面における 254nm の紫外線線量率は 0.24(mW/cm²)で一定であった。紫外線照射線量は照射時間を変えることで調節した。

光回復操作では、紫外線を 6.0(mJ/cm²)照射して 99.9%の *E. coli* 生残率不活化を達成した直後、上述の手順に従ってすみやかに当該量の酵母エキス透析液を添加し、さらに白色蛍光灯(18W, HITACHI)を照射した。紫外線線量計(UVR-2 UD-36, TOPCON)を用い、試料表面における 360nm 光の線量率が 0.1(mW/cm²)となるよう蛍光灯と試料の間隔を調節した。蛍光灯による可視光照射中の試料を経時的に採取し、生残率および ESS 数の測定に供した。対照として、紫外線照射後に暗条件においた試料についても同様の測定操作を行った。実験中は試料を滅菌済みマグネティックスターラーにより攪拌し、試料温度は 20℃で一定となるよう水冷により調節した。想定外の光回復の進行を避けるため、紫外線および可視光照射を除くすべての作業は暗所において迅速に行った。

2.4 生残率の測定

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(栄研化学)を用いた平板重層寒天法¹²⁾により、遮光した室内で迅速に行った。全ての試料は、アルミホイルによる遮光を施したシャーレ内において、37℃で18時間培養した。形成したコロニーの数をカウントし、(1)式に従って当該試料の生残率を算出した。

$$S_t = \frac{N_t}{N_0} \quad (1)$$

ここに、 S_t は時間 t における生残率、 N_t (cfu/mL)は時間 t における *E. coli* 濃度、 N_0 (cfu/mL)は紫外線照射前の初期 *E. coli* 濃度である。

2.5 ピリミジン二量体の測定

E. coli ゲノム中のピリミジン二量体の測定には、Endonuclease Sensitive Site (ESS) 法を用いた。ESS 法は、UV endonuclease によって二量体特異的に一本鎖切断を生成した DNA をアルカリアガロースゲル上で電気泳動し、紫外線照射によって生成したピリミジン二量体を検出・定量する手法である。ESS 法の測定・解析手順は既発表論文に倣い^{8, 9, 10)}、概ね以下のとおりである。

(1) DNA の抽出および精製

照射実験後の *E. coli* 試料 5ml を 5000 g において 10 分間遠心分離し、沈降した菌体から Genomic-tip DNA 抽出キット(QIAGEN)を用いて DNA を抽出した。DNA 抽出液は、Centricon (MILLIPORE)を用いた遠心分離操作(3000×g, 30min)により精製・濃縮し、ESS 測定に供した。

(2) 測定および解析方法

サンプル DNA に *Micrococcus luteus* 由来 UV エンドヌクレアーゼ¹³⁾を $1(\mu\text{l} \cdot \mu\text{g}^{-1}\text{DNA})$ の濃度で添加し、UV エンドヌクレアーゼ緩衝液(30mM Tris(pH 8.0), 40mM NaCl, 1mM EDTA)中において 37℃で 45 分間反応させた。反応後、アルカリダイ(100mM NaOH, 1mM EDTA, 2.5% Ficol, 0.05% bromocresol green)を添加し、0.5%アルカリアガロースゲル(0.5% Agarose H, WAKO, 30mM NaOH, 1mM EDTA)を用いて 0.5 (V/cm)で 16 時間電気泳動に供した。DNA マーカーには、7GT (T4dC+T4dC/Bgl I digest mixture, WAKO) および 8GT (T4dC+T4dC/Bgl II digest mixture, WAKO)を用いた。電気泳動後のゲルは、0.5($\mu\text{g/mL}$)の ethidium bromide 溶液で浸漬染色後 GelDoc 1000 システム(BIORAD)で観察し、Molecular Analyst software (BIORAD)を用いて解析した。各サンプル DNA について、総 DNA のうち半分が通過した泳動距離、すなわち分布の中央値を、当該サンプルの代表泳動距離とした。DNA マーカーの泳動結果から泳動距離と DNA 塩基数の二次回帰式を算出し、それによって各サンプル DNA の泳動距離中央値を塩基数中央値(L_{med} : median molecular length)に換算した。さらに、 L_{med} を断片数により平均化した塩基数平均値 L_n (number average molecular length)には(2)式の関係が成立する¹⁴⁾。

$$L_n = 0.6 \times L_{med} \quad (2)$$

さらに、単位塩基あたりの ESS 数を(3)式¹⁵⁾に従って算出した。

$$\frac{ESS}{base} = \frac{1}{L_{n(+UV)}} - \frac{1}{L_{n(-UV)}} \quad (3)$$

ここに、 $L_{n(+UV)}$ は紫外線照射後のサンプルの L_n 、 $L_{n(-UV)}$ は紫外線照射前のサンプルの L_n である。

また、紫外線照射直後の ESS 数に対する当該サンプルの ESS 数を ESS 残存率として定義し、光回復中の ESS 数変化を評価した。

3. 結果および考察

3.1 酵母エキスの生残率回復への影響

Table 1 に、酵母エキスまたはその透析液を添加した系および添加しない系における *E. coli* 生残率の光回復結果を示す。酵母エキスを添加しない系では、120 分の可視光照射に伴う明らかな生残率の回復が観察された。一方、酵母エキス添加後に蛍光灯を照射した系では、生残率はほとんど回復しなかった。酵母エキスを透析分画して添加した場合には、分子量 3500 以上または 1000 以下の分画を添加した系では光回復が進行したが、分画分子量 3500 以下または 1000 以上のフラクションを添加した系では顕著な回復は見られなかった。よって、酵母エキス成分中の光回復抑制効果物質は、透析分画分子量 1000 から 3500 の物質であることが示唆された。

Table 1. Photoreactivation of *E. coli* in the presence or absence of yeast extract

	mean survival before repair: a	mean survival after repair: b	Recovered survival: b-a
	±standard deviation, n=data number		
without YE	0.001 ±0.0007 (n=18)	0.224 ±0.0542 (n=3)	0.223
with YE		0.003 ±0.0018 (n=3)	0.001
with YE dialysate (MW<1000)		0.196 ±0.0009 (n=3)	0.195
with YE dialysate (MW>1000)		0.001 ±0.0026 (n=3)	0.000
with YE dialysate (MW<3500)		0.002 ±0.0007 (n=3)	0.001
with YE dialysate (MW>3500)		0.369 ±0.0362 (n=3)	0.367

*Final concentration of yeast extract (YE) was 0.125 mg/L for all fractions.

Photoreactivation was allowed under visible light exposures for 120 min

Figure 1 に、酵母エキス透析液 (分画分子量 3500 以下) を添加した系および添加しない系について、蛍光灯による可視光照射中の *E. coli* 生残率の経時変化を示す。酵母エキス透析液の添加により、生残率の回復が著しく抑制されたことがわかる。

3.2 酵母エキスの二量体修復への影響

酵母エキスの光回復抑制効果について遺伝子損傷レベルから調べるため、酵母エキス透析液 (分画分子量 3500 以下) を添加した系および添加しない系におけるピリミジン二量体の修復特性を ESS 法を用いて定量した。

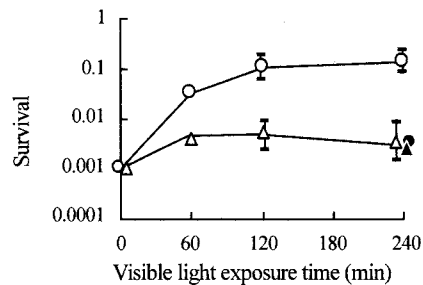


Figure 1. Survival profiles of *E. coli* during visible light exposures with (Δ) or without (○) YE dialysate (MW<3500)

*Control data were obtained in the darkness with (▲) or without (●) YE dialysate.

*Plots indicate the mean for three independent results.

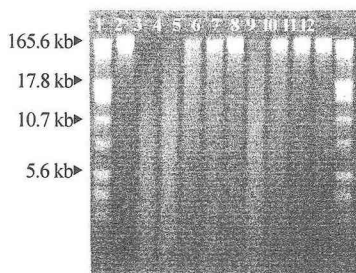


Figure 2. ESS gel image for *E. coli* during visible light exposures with or without YE dialysate (MW<3500)

*Lanes 1 and 12: standard markers, 2: before UV,
3: after UV, 4-7: UV followed by visible light exposures without YE for 60, 120, 180 and 240min in series,
8-11: UV followed by visible light exposures with YE dialysate (MW<3500) for 60, 120, 180 and 240min in series.

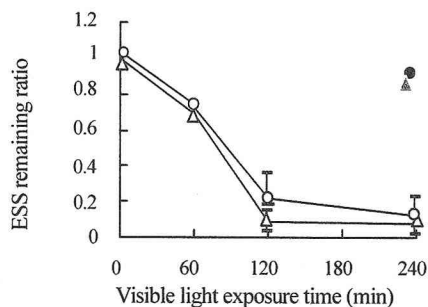


Figure 3. ESS profiles in *E. coli* during visible light exposures with (-Δ-) or without (-○-) YE dialysate (MW<3500)

*Control data were obtained in the darkness with (▲) or without (●) YE dialysate.

* Plots indicate the mean for three independent results.

Figure 2 に、ESS 法によって得られた *E. coli* DNA の電気泳動ゲル画像を示す。紫外線照射直後には二量体特異の酵素と反応して DNA が細断化されており (lane 3)、すなわち二量体の生成が観察されるが、その後可視光を照射すると経時的に DNA の断片化が生じにくくなっており (lane 4-7 および lane 8-11)、光回復による二量体の修復が確認できる。

Figure 3 に、ゲル画像の解析から算出された ESS 残存率の経時変化を示す。可視光照射による二量体の修復は 120 分でほぼ飽和に達しており、紫外線照射によって生成した二量体のおよそ 80-90% が修復された。興味深いことに、酵母エキスを透析液の添加は ESS 修復に影響を及ぼさなかった。すなわち、酵母エキ스가存在する場合にも二量体の修復は正常に進行することが示された。

Figure 4 に、可視光照射中の *E. coli* 生存率と ESS 残存率の関係を示す。酵母エキスを透析液を添加しない系では、可視光照射に伴う ESS の修復が観察され、同時に生存率も回復した。一方、酵母エキスを透析液を添加した系では、ESS は修復されたにもかかわらず生存率の顕著な回復は見られなかった。このように遺伝子損傷と生存性との相違が見られたことから、酵母エキ스는二量体の修復反応自体は阻害せずにコロニー形成能の回復を抑制している可能性が示唆された。

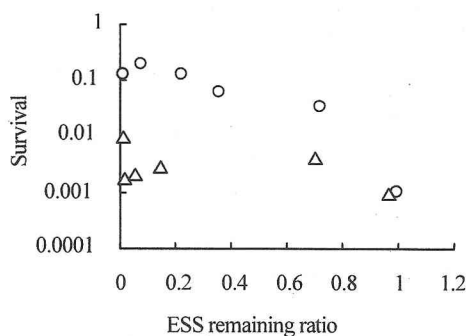


Figure 4. Relationships between ESS remaining ratio and survival during visible light exposures with (Δ) or without (○) YE dialysate (MW<3500)

4. まとめ

酵母エキス成分による *E. coli* の光回復抑制効果について、以下の結論を得た。

- 1) 酵母エキスは、光回復現象における生残率の回復を抑制する効果がある。
- 2) 酵母エキス成分のうち、主に透析分画分子量 1000 から 3500 の物質が *E. coli* 生残率の光回復抑制に寄与する。
- 3) 酵母エキス中の光回復抑制成分は、ピリミジン二量体の修復は阻害せずに生残性の回復を抑制する可能性が高い。

本研究により、光回復を抑制する物質の存在が示された。抑制物質が酵母エキス由来であることは、同様の抑制効果を示す生物由来の物質が自然環境中に存在する可能性を期待させる。光回復の抑制および制御が可能となれば、紫外線消毒の有用性がいっそう高まると期待されることから、抑制物質の同定や抑制機構の解明などが今後の課題となる。

参考文献

- 1) Masschelein, W.J. (2002) *edited by Rice, R.G* Ultraviolet light in water and wastewater sanitation Lewis Publishers, CRC Press LLC, Florida.
- 2) Clancy, J.L., T.M. Hargy, M.M. Marshall and J.E. Dyksen. (1998) Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water using ultraviolet light. J. American Water Works Association **90**:92.
- 3) Huffman, D.E., T.R. Slifko, M.J. Arrowood and J.B. Rose. (2000) Inactivation of bacteria, virus, and *Cryptosporidium* by a point-of-use device using pulsed broad spectrum white light. Water Research **34**:2491-2498.
- 4) Morita, S., A. Namikoshi, H. Tsuyoshi, K. Oguma, H. Katayama, S. Ohgaki, N. Motoyama and M. Fujiwara. (2002) Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. Applied and Environmental Microbiology **68**: 5387-5393.
- 5) Das, T. K. 2002. Evaluating the life cycle environmental performance of chlorine disinfection and ultraviolet technologies. Clean Technologies and Environmental Policy **4**:32-43.
- 6) Harm W. (1980) Biological effects of ultraviolet radiation. Cambridge University Press. pp.31-39.
- 7) Friedberg, E.R., G.C. Walker and W. Siede. (1995) DNA repair and mutagenesis. WSM Press. Washington, D.C.
- 8) 小熊久美子, 片山浩之, 三谷啓志, 大垣眞一郎 (2001) エンドヌクレアーゼ・センシティブ・サイト法による *Escherichia coli* の紫外線不活化および光回復の評価. 日本水環境学会誌, 第 24 巻 8 号, 534-538.
- 9) Oguma, K., H. Katayama, H. Mitani, S. Morita, T. Hirata and S. Ohgaki. (2001) Determination of pyrimidine dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* during ultraviolet light inactivation, photoreactivation and dark repair. Applied and Environmental Microbiology **67**:4630-4637.
- 10) Oguma, K., H. Katayama and S. Ohgaki. (2002) Photoreactivation of *Escherichia coli* subsequent to low- or medium-pressure ultraviolet disinfection determined by an endonuclease sensitive site assay. Applied and Environmental Microbiology **68**:6029-6035.
- 11) 小熊久美子, 片山浩之, 三谷啓志, 大垣眞一郎 (2000) 水中共存物質が大腸菌の光回復に及ぼす影響, 第 34 回日本水環境学会年会講演集, p.68.
- 12) 日本水道協会 (1993) 上水試験法. pp.495-496.
- 13) Carrier, W.L. and R.B. Setlow. (1970) Endonuclease from *Micrococcus luteus* which has activity toward ultraviolet-irradiated deoxyribonucleic acid: purification and properties. J. Bacteriology **102**:178-186.
- 14) Veatch, W. and S. Okada, (1969) Radiation-induced breaks of DNA in Cultured Mammalian cells, Biophysical Journal **9**: 330-346.
- 15) Freeman, S.E., A.D. Blackett, D.C. Monteleone, R.B. Setlow, B.M. Sutherland and J.C. Sutherland. (1986) Quantitation of radiation-, chemical-, or enzyme-induced single strand breaks in nonradioactive DNA by alkaline gel electrophoresis: application of pyrimidine dimers, Analytical Biochemistry **158**:119-129.