

大腸菌クローン集団中の UV 耐性細胞の存在とその UV 殺菌条件の確立

1. はじめに

UV-LED の開発がすすみ、多様な場面での応用が期待されている。水の殺菌処理は UV-LED の主たる活用機会となりうるが、しかしながら UV 殺菌処理後に細菌の再増殖が生じることが問題となってる (Wang *et al.* 2021)。本研究では、UV-LED の大腸菌不活化の特徴を複合的に明らかにし、得られた知見より、残存生菌数を限りなく小さくするための効果的な UV-LED 照射条件を確立することを目的とした。

2. 実験方法

大腸菌 *Escherichia coli* K-12 懸濁液 (10^8 CFU/mL) をガラスシャーレに用意し、700 rpm で攪拌しながら、262 nm UV-LED (日機装技研) を用いて UV 照射処理を行なった。UV-LED の平均照度は 0.209 mW/cm² だった。UV 照射処理した大腸菌を Petrifilm AC Plate (3M Company) で 35°C、48 時間培養し、形成されるコロニー数から生存菌数を評価した。以上の UV 照射実験を独立に 3 回繰り返して行った。

大腸菌の各細胞における *hipA* 遺伝子プロモーター活性を評価するために、緑色蛍光タンパク質によるプロモーターレポーター株を用いた (Zaslaver *et al.* 2006)。スライドガラス上に薄い LB 寒天培地を作成し、UV 照射処理した大腸菌懸濁液をのせ、その上にカバーガラスをかけた。顕微鏡に設置したペルチェ式加熱ステージ上にプレパラートを置き、37°C で大腸菌を培養した。大腸菌細胞の増殖の様子を、蛍光顕微鏡を用いて観察しながら、15 分ごとに撮影した。

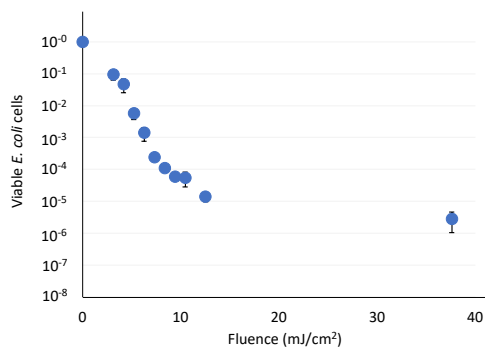


図 1 : 大腸菌の 262nm UV-LED での不活化曲線

3. 実験結果および考察

10 mJ/cm² までの UV 照射では生存菌数に対数的に減少した。一方で、それ以上の照射エネルギーを与えても効果的に生存菌数を減少させることができなかった (図 1)。テーリングと呼ばれるこの現象は、大腸菌にかかわらず多様な細菌の UV 不活化において報告されている (Guo *et al.* 2019)。テーリングの原因は細菌懸濁液中の細胞塊形成であると主張する研究報告がある (Vitzilaiou *et al.* 2021)。本研究では顕微鏡下で UV 処理後の大腸菌細胞の再増殖を観察したが、しかしながら細菌細胞塊との関係は認められなかった。したがって、大腸菌クローン集団中のうちごく一部 ($1/10,000$ 程度) の細胞は UV に耐性を示す結果であると考えられた。

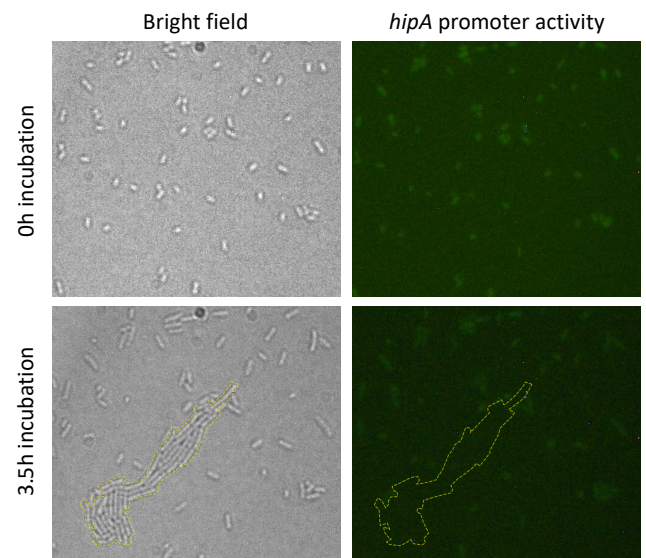


図2: UV 照射処理した大腸菌の再増殖と各細胞での耐性遺伝子 (*hipA* 遺伝子) のはたらき
UV 照射処理後の大腸菌の顕微鏡像 (左図: 明視野、右図: *hipA* 遺伝子のはたらきを表す蛍光像) を示す。3.5 時間経過時点で再増殖している細胞のマイクロコロニーを黄色点線で示す。再増殖している細胞では緑色蛍光がみられず、したがって耐性遺伝子のはたらきが小さいことがわかる。

対数増殖期のものと比較して、定常期の大腸菌細胞集団では、UV 耐性細胞の出現割合が 100 倍増加した。UV 処理後再増殖した大腸菌集団を対象に UV 殺菌処理をした場合も、同様の割合で UV 耐性細胞が生じていた。したがって、UV 耐性は遺伝的に獲得されるものではなく、確率的に生じていることになる。

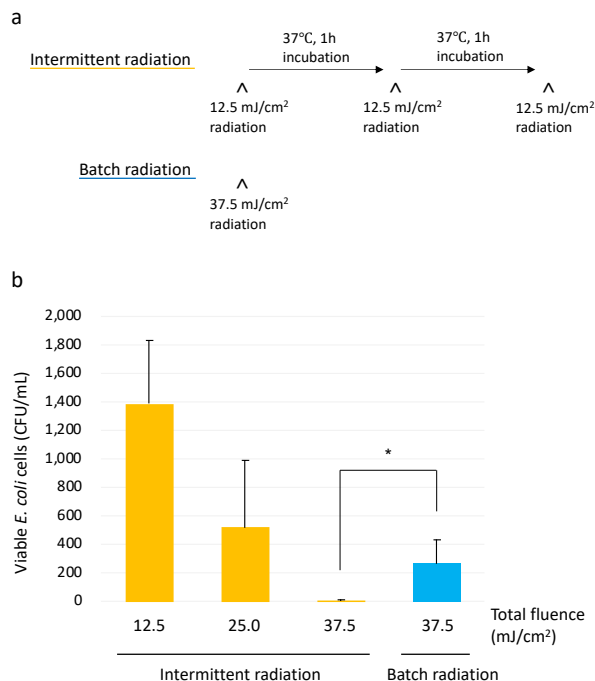


図3: 大腸菌 UV 不活化における間欠照射の効果
(a) UV 照射条件と (b) UV 照射処理後の生存菌数を示す。バッチでの UV 照射では、照射エネルギーを大きくしても生存細菌が残存してしまうことが問題となる(青色)。紫外線を間欠照射することにより、生存菌数を有意に減少させることができた(黄色)。

これら UV 耐性細胞出現現象の特徴は、抗生物質耐性細胞(パーシスター)の特徴と酷似している(Lewis *et al.* 2007)。パーシスター誘導処理を行った大腸菌集団では、UV 処理後生存する細胞数が 100 倍増加することを確認した。パーシスター細胞形成の促進因子として、toxin-antitoxin システム遺伝子 *hipA* (high persistence A) が知られている。プロモーターレポーター株を作成し、*hipA* 遺伝子が定常期細胞で強く発現することを確認した。UV 処理後の大腸菌再増殖の顕微鏡下での観察より、再増殖している大腸菌細胞では *hipA* 遺伝子発現が検出されないことを確認した(図2)。

これらの結果より、再増殖を開始した細胞の UV 耐性は失われている可能性があると考えた。UV 処理後に 37°C で1時間おいて再増殖を促したのちに再度 UV 処理を行うことで(UV 間欠照射)、同等のエネルギーの UV を一度に照射した場合(UV 一括照射)と比較して、有意に生存細胞数を減少させることができた(図3)。

4. 結論

以上の通り、本研究では大腸菌クローン集団中に一部 UV 耐性のある細胞が存在すること、その細胞の形質はパーシスターのものと酷似していること、再増殖中の細胞は耐性を失っており UV 間欠照射により効果的に殺菌できることを明らかにした。

参考文献

- Wang *et al.* 2021. Chemosphere 268, 128850.
- Zaslaver, *et al.* 2006. Nature Methods 3(8), 623-628.
- Guo *et al.* Environ Int. 2019. Sep;130:104883.
- Vitzilaiou *et al.* 2021. Water Research 204, 117593.
- Lewis. 2007. Nature Reviews Microbiology 5, 48-56.