

ゾウリムシにおける銀粒子の細胞毒性メカニズムの検討

阿部 大基, 芳賀 信幸 (石巻専修大・理工)

Cytotoxicity mechanism of Ag particles in *Paramecium*

Taiki ABE and Nobuyuki HAGA (Ishinomaki Senshu University, Ishinomaki)

SUMMARY

We have previously reported that Ag nanoparticle dispersion causes severe cytotoxicity in *Paramecium* cells. The Ag-treated cells show a series of remarkable behavioral changes for several minutes before cell death, which suggest a hazardous effect on ciliary movements controlled by cell surface membrane potentials. To detect the molecules associated with cell death caused by Ag nanoparticle treatments, we examined polypeptide changes in Ag-treated cells using SDS-PAGE followed by a silver staining method. We found one major polypeptide band of about 60 kDa molecular weight that appears after treatment in *P. caudatum* and one of about 65 kDa in *P. tetraurelia*. We then compared polypeptides emerging after three different lethal treatments: AgNO₃ solution, heat and freezing. Emergence of a similar polypeptide was observed in AgNO₃-treated cells in both species, but was not observed in heated or frozen cells. This indicates that emergence of the 60 and 65 kDa polypeptides is Ag specific. The amino acid sequence of these polypeptides will be the subject of future experiments.

【目的】 ナノテクノロジーは電子材料や医療など広範な分野で利用されている技術である。しかし、多くのナノマテリアルにおいて環境及び人体に対する安全基準値は設定されていないのが現状であり、多くの研究機関においてその有害性に関する研究がなされている。フラーレンやcarbon nanotubes等のcarbon素材は工学的研究だけでなく有害性に関する研究も行われている(Rancan F., et al 2002)。しかし金属性ナノ粒子における有害性に関する知見は非常に少ないのが現状である為、我々は銀ナノ粒子を用いて細胞毒性試験を行った。

ゾウリムシはcarbon nanotubesの毒性試験が行われ、ナノ粒子の毒性試験に適した材料であることが確認されている (Haga and Haneda, 2007)。我々はゾウリムシを用い銀ナノ粒子の毒性を細胞レベルで検討した結果、強い細胞毒性による細胞死を確認した。しかし、その細胞死の原因及びメカニズムについては不明である。今回我々は死亡メカニズムを解明すること目的として、無処理の細胞と銀処理し死亡した細胞をSDS-PAGEにかけ、ポリペプチドを比較した。

【方法と結果】

1. 株と培養

*Paramecium caudatum*は金沢で採集されたKNZシリーズ (syngen 3, 金沢大学・遠藤) のかけ合わせの子孫であるTAZ0460(O)を用いた。*P. tetraurelia*はSt51(O)を用いた。培養はレタスジュース法 (Hiwatashi, 1968) で行い定常期1日目の細胞を用い実験した。銀処理用の銀粒子(平均粒径17nm)はそれぞれ24時間脱イオン水に対して透析処理を行った試料をK-DS(NaをKに置き換えたDry1氏液)で調整(1 mg/ml)したもの

を原液とした。原液は冷蔵保存し、使用時は約30分の超音波処理の後K-DSで希釈した。

2. SDS-PAGE

細胞をK-DSで3度洗浄し、*P. caudatum*は約150 cells / 15 µl となるように、また*P. tetraurelia*は約200 cells / 15 µl となるように細胞懸濁液を調製した。銀処理は500 µg/ml で30 min間、AgNO₃処理は5 µMで30 min間、熱処理は100°Cで5 min間、凍結処理は-84°Cで30 min間行った。各Sample 15 µl に対してSample Buffer 5 µl, 10% 2-メルカプトエタノール 2.5 µlを加え、100°Cで3 minの熱処理を行い、ポリアクリルアミドゲル(ATTO PAGEL SPU-15S)へアブライした。無処理のコントロールは生細胞懸濁液150 cells / 15 µl へ同量のSample Bufferと 2-メルカプトエタノールを加えた試料を用いた。電気泳動(300 V, 20 mA, 120 min)の後、銀染色法(Wako 銀染色IIキットワコー)によってペプチドバンドを検出した。結果は次頁のFigureに示す。

【考察】 *P. caudatum*のSDS-PAGEでは、銀及びAgNO₃処理の群で、60 kDa付近では非常に強く、また50 kDaと33 kDa付近では微弱に、コントロール群では検出されなかったポリペプチドが確認された。熱処理及び凍結処理の場合でも60 kDa付近にバンドが確認されたが微弱なものであった。*P. tetraurelia*のSDS-PAGEでは、銀処理した場合に65 kDa付近にコントロール群では確認されなかったバンドが検出された。これらのバンドはゾウリムシが死亡する際に出現するポリペプチドであると考えられるが、死亡要因によりそれぞれのバンドの検出量が異なっていることが疑問として残った。

今後の展望として、65 kDaから50 kDa付近のバン

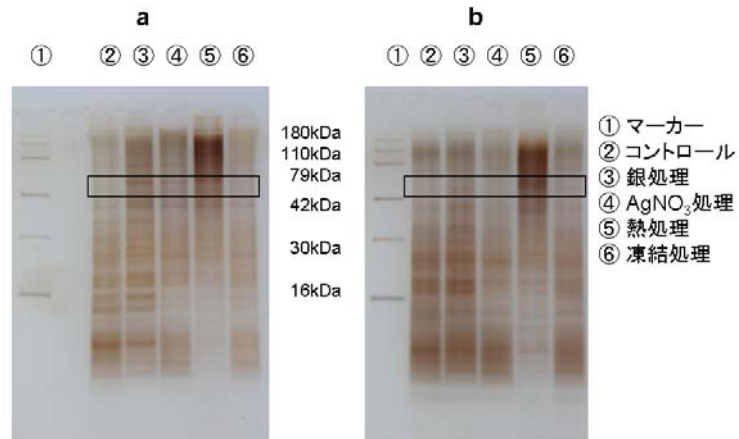


Figure 1. SDS-PAGEの結果

aは*P. caudatum*のSDS-PAGE結果を示し, bは*P. tetraurelia*のSDS-PAGE結果を示す。黒枠内はコントロールでは検出されなかったが, 銀処理時に確認されたポリペプチドバンドを示す。

ドに含まれるポリペプチドのアミノ酸解析をすることによって死亡要因との因果関係を解明する糸口が見つかるのではないかと考えられる。

[文献]

Hiwatashi, K. 1968 Determination and inheritance of mating type in *Paramecium caudatum*. *Genetics* 58, 373-386.
 Haga, N. and Haneda, K. 2007 *Paramecium* as a bioassay

system for elucidation of cytotoxicity and biocompatibility of nanoparticles: effects of carbon nanofibers on proliferation and survival. *Jpn. J. Protozool.* 40. No.2 139-14.

Rancan F., et al 2002 Cytotoxicity and photocytotoxicity of a dendritic C60 mono-adduct and a malonic acid C60 tris-adduct on Jurkat cells. *J. Photochemistry and Photobiology B* 67:157-162