

プロテオーム解析による 銀イオンと生体との相互作用メカニズム解析

Characterization of the Interaction between Silver Ions and *Escherichia Coli* by Proteomic Analysis

山中 幹 宏*
Mikihiro Yamanaka

松井 紀 江*
Norie Matsui

原 圭 太*
Keita Hara

工 藤 淳*
Jun Kudo

要 旨

微生物に対する銀イオン (Ag^+) の抗菌作用について、大腸菌 (*Escherichia coli*) をモデル細胞としたメカニズムの解明を行った。前回、エネルギーフィルタ型透過型電子顕微鏡 (EF-TEM) を用いた解析結果として、菌の不活化が従来から提唱されてきた細胞膜 (ペリプラズム空間) に存在する呼吸鎖酵素の失活以外に、銀イオンが細胞膜を逸早く通り抜け、細胞質内に偏析することにより生じることを報告したが、今回はこの現象をタンパク質レベルで評価する目的でプロテオーム解析を行い、細胞内器官の一つであるリボソームが失活することでタンパク質代謝の正常な働きが阻害され、その結果として細菌が不活化されるとの知見を得たので報告する。

Bactericidal actions of the silver ion on *Escherichia coli* (*E. coli*) as a model microorganism are studied using energy-filtering transmission electron microscopy (EF-TEM), EF-TEM observation demonstrates that the silver ion readily infiltrates into the interior of *E. coli*, contrary to the early hypothesis that it initially resides in the cell membrane area. in the last report. Furthermore, two-dimensional electrophoresis (2-DE) and matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) indicate that the expression of a ribosomal subunit protein as well as some other enzymes and proteins is affected by the silver ion. The present result demonstrates for the first time that one of the major bactericidal functions of the silver ion is its interaction with the ribosome and the ensuing inhibition in the expression of the enzymes and proteins essential to ATP production.

まえがき

銀イオンの抗菌作用は広く知られており、既にわれわれの生活でも身の回りの生活用品へ広く応用されており、例えば洗濯機のような家電製品にも用いられている。これまで多くの文献がその作用について報告し、銀イオンは、膜結合型酵素のチオール基と結合し、まずそれらの酵素に影響を及ぼすことが提唱されてきた^{1)~3)}。しかし、これまでその詳細な抗菌メカニズム、特にタンパク質レベルでの考察は殆ど行われていなかった。そこで我々はまずモデル細胞として大腸菌；*Escherichia coli*を用い、エネルギーフィルタ型電子顕微鏡 (EF-TEM) を用いた形態観察及びナノ領域での元素分析を行うことで、形態的には正常な固体と変わら

ない銀イオン処理済みの固体において、銀イオンが外膜と細胞質膜 (内膜) の間に約10nm程度の厚さで存在するペリプラズム空間すらも通り抜けて、細胞の比較的中央付近 (細胞質内) から検出されることを見出した⁴⁾。そこで、今回、 Ag イオンの細胞内における作用箇所をより詳細に確認する為に、二次元電気泳動法 (2-DE) 及びマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) を用いて検討を行った。

1. 二次元電気泳動法

1・1 一次元目 (等電点電気泳動法)

液体の媒質中の荷電粒子が電場のもとで動くことが

* 技術本部 新材料技術研究所 第3研究室

電気泳動であり、荷電粒子や分子はその荷電と反対の極に向かって移動する。タンパク質は分子内に酸性基と塩基性基を持つ両性電解質であり、これらの分子の電荷は、酸性のpHでは正、アルカリ性のpHでは負になるため、pHが大きくなると電荷はマイナス側に変化する。ここでタンパク質を流す泳動ゲル中にpH勾配があると、タンパク質の電荷の総和が0となるpH（等電点）で、その移動が停止する。通常、泳動ゲルには様々なpIの側鎖を持つアクリルアミド誘導体を用いて、ゲル作製と同時にpH勾配を予め形成して利用する手法（IPG法: Immobilized pH gradient）が用いられる。このように、タンパク質の等電点（pI）の違いを利用して目的のタンパク質を分離する方法が等電点電気泳動である。この等電点電気泳動法を二次元電気泳動法の一次元目の泳動法として利用した。

1・2 二次元目

タンパク質の荷電はその種類によって異なるが、陰イオン系界面活性剤の一種であるドデシル硫酸ナトリウム（SDS）の存在下では、SDS分子がタンパク質の分子量に応じて結合することで、総じて負に帯電することになり陰極から陽極に向かって泳動する。またタンパク質を流す担体にはポリアクリルアミドゲルやアガロースを用いることが多い。ポリアクリルアミドゲルは、その網目構造がゲルを構成している鎖状分子の熱運動の為に絶えず揺れ動いており、どの場所でも網目の間隔は絶えず広がったり狭くなったりしている。タンパク質は、その網目が広がって動くことの出来る隙間が出来た時だけ電気泳動する為、分子量の大きいものほど動きにくくなる。この効果を分子ふるい効果と呼ぶ。先程、等電点電気泳動において各pIに応じて分離されたタンパク質に対して（一次元目）、直行方向にSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（二次元目）を行うことで、横軸にpH、縦軸に分子量をとったタンパク質に次元マップが得られる。

2. MALDI-TOF MS

MALDI法では、試料と、試料のイオン化（気相への脱離）を促進させる為に試料に混ぜる物質、マトリックスの混合物に対して、窒素レーザー光（波長：337nm）をパルス照射することで試料をイオン化し、その後装置内で加速し、加速されたイオン（と電荷の比；m/z）が、運動エネルギー方程式に従い、その質量に依存した飛行時間を有する（小さい軽いイオン程速く、大きい重いイオン程遅く検出器に到達する）ことを利用して質量分析を行う。

試料にマトリックスを混ぜて混合結晶とする理由

は、試料をイオン化する際に先ずマトリックスがレーザーの光子を吸収して励起状態となり、それと同時に結晶の温度が上昇して蒸発点に達し、試料もろとも蒸発（昇華）する。この際、高い励起状態にあるマトリックス分子から脱離したプロトンが試料に移動し、見かけ上イオン化されたような状態になる。このように直接試料がレーザーのエネルギーを吸収することなく、マトリックスを介してイオン化することで、熱に不安定な試料、直接はイオン化しにくい試料の分析が可能となる。

3. ペプチドマスフィンガープリント（PMF）法

PMF法では、データベース上のタンパク質のトリプシンなどの制限酵素で切断（酵素消化）が予測される理論的マススペクトルと、実際のマススペクトルとを比較して、その確からしさをスコアリングしタンパク質の同定を行う手法である。マススペクトルデータからタンパク質同定を行う検索ソフトはWeb上でも利用可能であり、MS-Fit, MASCOTなど異なったアルゴリズムで同定を行うものが知られている。

4. プロテオーム解析を用いた銀イオン-生体相互作用解析

2-DEおよびMALDI-TOF MSを用いたプロテオーム解析の流れを図1に纏めた。

今回プロテオーム解析を行う為に、900ppbおよび0ppbの銀イオン溶液90mLに、*E. coli* (NBRC-3972, 約 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL) 懸濁液10mLを3時間反応させたものを試料として準備した。この銀イオン溶液は、水中に設置した2枚の銀板電極間に所定の電流を一定時間印加することにより、電氣的に調製可能な銀イオン発生ユニットを用いて作製した。また用いた水道水中の遊離残留塩素濃度は、0.2mg/Lになるように予め調整した。得られた溶液の銀イオン濃度は、日立製の原子原子吸光度計（Z-5010）を用いて測定することでその濃度を確認し、0ppbの溶液は銀イオン発生ユニットを動作させずに得た。2種類の試料を2,900×g, 4℃で20分間遠心分離し、沈殿を溶解バッファーに懸濁し、水中に保持したマイクロ遠心管の中で30秒間超音波破碎を行った。更にこの試料を4℃の環境下、16,000×gで30分間遠心分離することで、その上清に可溶性（親水性）タンパク質からなる画分を得た。予め分析用のタンパク質の量を、900ppbのもの0ppbのものとして揃える必要があるため、Bio-Rad社のタンパク質アッセイ法を用い、どちらの試料も、0.4 mg/mLの濃度に調整した。

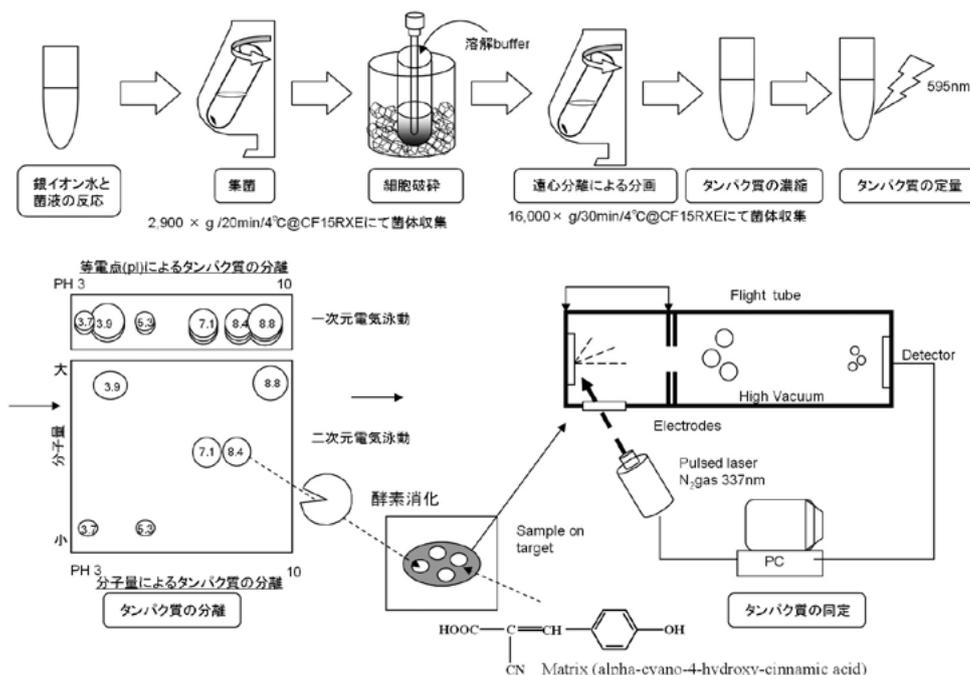


図1 プロテオーム解析の概略
Fig. 1 A schematic diagram of proteomic analysis.

今回、一次元目においては、長さ11cmの、pH3～10の範囲で非直線な勾配を持つ固定化pH勾配（IPG；Immobilized pH Gradient）ゲルを用いた。先ずこれらのタンパク質試料と、尿素、ジチオスレイトール等からなる膨潤溶液に溶解させ、20℃で12時間静置した。この処理により、タンパク質がIPGストリップに取り込まれることになる。このIPGストリップを、最大電圧8,000Vで用いて等電点電気泳動を行った。等電点電気泳動の後、平衡化溶液中でストリップに含まれるタンパク質をSDS平衡化と同時にタンパク質の再酸化を防ぐ為のアルキル化を行った後、200Vで30分間、先程の等電点電気泳動で分離されたゲルに対して、直交方向に2次元目の電気泳動を行った。続いて、これらのゲルをSYPRO Ruby 蛍光試薬を用いて染色し、488nmのアルゴンレーザを励起源として、SYPRO Rubyを励起し、縦軸に分子量、横軸にpHの違いで分離されたタンパク質の二次元マップを得た。ここで各スポットの分子量は、タンパク質と同時に泳動を行った標準試料を基準にして、その推定分子量の決定を行った。このようにして得られた、0ppbの銀イオン水で処理した試料と、900ppbの銀イオン水で処理した試料を比較することで、その蛍光強度に基づいたタンパク質の発現量を比較解析した。

図2に、0ppb及び900ppbの溶液と3時間反応した後の*E. coli*懸濁液から得られた、SYPRO-Ruby染色二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンを比較

を示す。
これまでのEF-TEMを用いた解析結果より、900ppbの銀イオン水で処理した場合、銀イオンは30分では既に細胞内に到達しており、処理時間をそれ以上長くしても銀の検出は大きく増加しないことがわかっている。そこで、30分という短い反応では、未反応の細胞との差異を特定するのに不十分の可能性があること、及び3時間より長い反応時間では、ほとんどの細胞が既に破壊されてしまいプロテオーム解析に不適切であることを考慮して、3時間の反応時間を用いた。図2の2-DEパターンにおいて、図2で印をつけた4つのタンパク質からなるスポットは、900ppb溶液との反応後のタンパク質の発現量が0ppbの試料で示される元来の量の1/3未満に減少していた。図2の2-DEパターンから示唆された、より詳細な、処理時間の経過に伴うタンパク質発現量の減少傾向についての確認は、次の研究の課題である。これら発現量の違う各スポットを正確に切出し、リジン、アルギニンのカルボキシル基側のペプチド結合を加水分解するトリプシン溶液（Promega社製）を用いたゲル内消化を行った。サンプルに含まれる塩類は、ミリポア社製逆相カラム固定チップ；ZipTipC18を用いて取り除いた。レーザ光を吸収してそのエネルギーを試料に与える低分子であるマトリックスとして、 α -CHCA（alpha-cyano-4-hydroxyl-cinnamic acid）を用い、MALDI-TOF MS装置を用いたマススペクトルを得た。得られたマスス

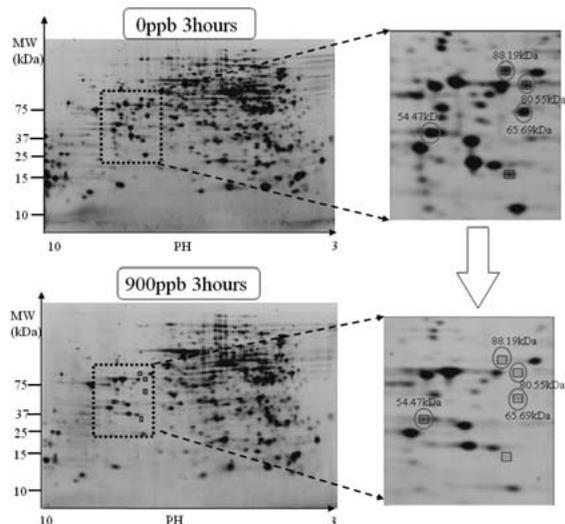


図2 900ppbと0ppbの銀イオン水で処理された *E. coli* の二次元電気泳動イメージの比較

Fig. 2 Analytical SYPRO Ruby stained 2-D PAGE protein patterns obtained from the suspensions of *E. coli* after reaction with 0ppb and 900ppb solutions for 3 hours, respectively.

ペクトルのマスキャリブレーションは、トリプシン自己消化ペプチドで行い、測定したペプチドについてデータベースとのスコアリングを行い、タンパク質の種類を同定した。PMF分析結果について、NCBIおよびSwiss-Protデータベースでの検索により、3つのタンパク質、30S ribosomal subunit protein S2, Succinyl-CoA synthetase, 及び Maltose transporter (MalK) が高い可能性で同定された。また推定タンパク質とされるもう一つのスポットは、そのタンパク質の機能等は同定されなかった。また同様にを行った試験において、図2に示していない Fructose-bisphosphate aldolase も同様に同定された。これら同定結果を、表1に纏める。

表1の結果のうち、銀イオンの作用により、30S ribosomal protein S2の発現が阻害されたことは、特に注目に値する。*E. coli* のリボソームは、50Sおよび30Sのサブユニットを有しており、更に30Sサブユニットは、16S RNAと20種のタンパク質を含有し、mRNAのコドンとtRNAのアンチコドンとの間の塩基対形成をモニタリングすることにより、mRNAを解読する。一方、50Sサブユニットは、ペプチド結合形成を促進させる⁵⁾。銀イオンが作用することで、30S ribosomal protein S2の発現の減少によりリボソームが変性し、そのタンパク質合成及び酵素合成機能が損なわれる。その結果、タンパク質及び酵素、例えば解糖系経路における Maltose transporter (MalK), Fructose-bisphosphate aldolase 並びにクエン酸 (TCA) 回路における Succinyl-CoA synthetase の発現が抑制される。つまり、抗菌メ

表1 タンパク質同定結果

Table 1 Proteins identified through MALDI-TOF MS and interrogation of NCBI and Swiss-Prot databases for peptide mass fingerprinting.

Description	Mr	Data base accession No.	Probability ^{*1}
30S ribosomal subunit protein S2	54.47	26246115 NCBI	69
Succinyl-CoA synthetase	65.69	6980733 NCBI	64
Maltose transporter	88.19	37927753 NCBI	89
Hypothetical protein	80.55	26248233 NCBI	47
Fructose-bisphosphate aldolase	36.33	P71295 SwissProt	121

*1 Probability ; based on the Mowse scoring algorithm

カニズムとして、先ず銀イオンが細胞膜にダメージを与えること無く、イオンチャンネルを通じて、速やかに菌体内に入り、細胞質に存在するリボソームを変性させると考えると、前回の報告⁴⁾で示したEF-TEM解析結果で、銀イオンは、最初は、膜結合酵素、例えば呼吸鎖にあるようなものの機能に影響するとした仮定^{1)~3)}と対照的に、菌体内部の細胞質から検出された結果と矛盾無く一致する。勿論、EF-TEMにより検出できないような微量の銀が、細胞質に影響を与えるのに先立って細胞膜にダメージを与える可能性も完全には否定できないが、今回の研究では、そのような効果を示す実験的証拠は得られなかった。

E. coli において Succinyl-CoA synthetase が、細胞内での ATP 産生を司ることは注目すべき点である。更に解糖系及びTCA回路は、細胞膜領域でのその後の電子伝達鎖における ATP 生産に対して、本質的な役割を演じるので、解糖系及びTCA回路に関連する酵素並びにタンパク質の発現阻害は、最終的には細胞の生命を維持するのに欠かせない ATP の不足を引き起こす筈である。

銀ゼオライトの殺菌作用を評価した以前の報告において、2つの連続するプロセスが関与すると仮定されている⁶⁾。まず、銀ゼオライトと接触した細菌が銀イオンを取り込み、これが細胞内のいくつかの機能を阻害して、結果として細胞にダメージを与え、次に、おそらく呼吸鎖酵素の阻害を介して反応性酸素種が発生し、細胞を攻撃するとするものである。実験データは、銀ゼオライト懸濁液に曝された *E. coli* の生存数が好気的環境下では時間とともに迅速に減少するが、嫌気的環境下では減少しなかったことを示した。硝酸銀を用いた比較試験では、好気性環境下とともに嫌気性環境下で *E. coli* の生存数が迅速に減少していた。この文献における最初の仮定は、銀イオンが細胞内部に直ちに取り込まれるというEF-TEMの結果により間接的に確認された。呼吸鎖が位置する細胞膜領域において

銀イオンは検出されないので、第二の仮定は明快ではない。しかし、上述のように、嫌気的環境下と好気性環境下との間の殺菌作用の実質的な差は、好気性環境下が銀イオンの殺菌作用を促すことを示す。別の先行文献⁷⁾において、*E. coli*の呼吸鎖のin vitro解析は、酸素と反応したNADH脱水素酵素II、わずかではあるが検出できる反応性酸素種を産生するコハク酸脱水素酵素および嫌氣的に合成されたそのアイソザイムであるフマル酸還元酵素が、空気に触れたときに迅速に自動酸化されるように、主に還元された脱水素酵素の自動酸化により反応性酸素種が発生することを示す。また最近のin vivo分析では、反応性酸素種が呼吸鎖以外で形成されることを示すが、その詳細は不明である⁸⁾。今回の結果の中で、特にSuccinyl-CoA synthetaseの発現阻害は、コハク酸の生成を減少させるはずである。コハク酸は、ユビキノンに電子を伝達する呼吸鎖においてコハク酸脱水素酵素複合体によりフマル酸に酸化されるので⁹⁾、Succinyl-CoA synthetaseの発現阻害は、電子伝達およびATPの発生の減少を通じて、呼吸鎖に有害な影響を及ぼす筈である。コハク酸の減少は、フマル酸をコハク酸に変換するフマル酸還元酵素の相補的作用を誘導し、その反応の間に反応性酸素種の産生を伴うと推測される。活性酸素種の発生に関与する酵素は、結局、細胞死に影響を及ぼすことも予想される。*E. coli*および他の微生物に対する銀イオンの殺菌作用における酸素の関与を明確にするためには、さらなる研究が必要であると思われる。

結論として、*E. coli*に対する銀イオン溶液の殺菌作用が、前回報告したEF-TEM、2-DEおよびMALDI-TOF MS解析結果により明らかとなった。銀イオンは、細胞膜領域に存在するよりもむしろ、EF-TEMにて観察されたように、直ちに*E. coli*の内部に浸透し、2-DEおよびMALDI-TOF MSを用いたさらなる分析により、リボソームサブユニットタンパク質並びにいくつかの酵素及びタンパク質が銀イオンにより影響を受けたことが示された。今回の結果は、銀イオンの主要な殺菌作用の一つが、リボソームとの相互作用と、それに引き続く、ATP産生に必須の酵素及びタンパク質の発現の阻害とにより引き起こされたことを示す。今回のアプローチは、銀イオンに関する他の研究、例えば*E. coli*とは異なる、細胞膜を有する微生物の生存能に対するその影響の研究に応用されると思われる。

謝辞

本研究開発テーマは電化システム事業本部電化商品開発センター第2, 3研究室との協創テーマとして推進されました。

また、大阪市立大学大学院・生活科学研究科 長寿社会総合科学講座・長寿社会食生活学分野 西川禎一教授には本研究を進めるにあたり、貴重なご意見を賜りましたこと、ここに感謝致します。

参考文献

- 1) Bragg, P. D., D. J. Rainnie. 1974. The effect of Silver Ions on the Respiratory Chains of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 20:884.
- 2) McDonnell, G., and A. D. Russell. 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12:147-179.
- 3) 内田眞志, 山本達雄, 谷口明男, 中田真一, 中川善兵衛:銀イオンと各種アミノ酸の反応, 防菌防黴, pp.695-704 (2003).
- 4) 山中他, “エネルギーフィルタ型透過型電子顕微鏡による銀イオンと生体との相互作用メカニズム解析” シャープ技報第91号, pp.45-49 (2005).
- 5) Wimberly, B. T., D. E. Brodersen, W. M. Clemons Jr, R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vornrhein, T. Hartsch, and V. Ramakrishnan. 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407:327-339.
- 6) Matsumura, Y., K. Yoshikata, S. Kunisaki, and T. Tsuchido. 2003. Mode of Bactericidal Action of Silver Zeolite and its Comparison with That of Silver Nitrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4278-4281.
- 7) Messner, K. R., and J. A. Imlay. 1999. The Identification of Primary Sites of Superoxide and Hydrogen Peroxide Formation in the Aerobic Respiratory Chain and Sulfite Reductase Complex of *Escherichia Coli*. *J. Biol. Chem.* 274:10119-10128.
- 8) Seaver, L. C., and J. A. Imlay. 2004. Are Respiratory Enzymes the Primary Sources of Intracellular Hydrogen Peroxide?. *J. Biol. Chem.* 279:48742-48750.
- 9) Cecchini, G., I. Schroder, R. P. Gunsalus, and E. Maklashina. 2002. Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1553:140-157.

(2006年6月1日受理)