

令和 4 年 9 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K14700

研究課題名(和文) プラズマ由来の電界が及ぼす生物学的影響の定量評価およびその機構解明

研究課題名(英文) Quantitative evaluation of biological effects of plasma-derived electric fields and elucidation of their mechanisms

研究代表者

奥村 賢直 (Okumura, Takamasa)

九州大学・システム情報科学研究院・助教

研究者番号：60801149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は大気圧空気低温プラズマを用いた生体応答誘導技術の定量評価・機序解明である。これまで、立体配座変化のその場測定によりタンパク質の二次・三次構造の電界による可逆的変化、プラズマ照射による不可逆的断片化を示し、プラズマ照射への生体応答の表現型解析・オミクス解析を通し応答誘導の最適な条件を同定した。さらに、世界で報告例のない極少量のプラズマ起因活性種をプラズマ照射された生体内から直接測定する方法を創成した。本研究は追加の農地や水、肥料を必要としないSDGs実現を後押しする食糧増産法として期待される一方で、プラズマ科学発信の分子生物学等の異学問領域への貢献が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、プラズマ照射によって生体応答を誘導し、その機序解明を目的とした取り組みで、実施期間に多くの研究成果が世界へ発信された。本研究は、プラズマバイオ応用分野の理解の深化、また異分野への貢献といった学術的意義に加え、社会に対しては持続可能社会の構築に欠かせない革新的再生医療、創薬技術、食糧増産技術として還元可能であることから、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to quantitatively evaluate and elucidate the mechanism of biological response induction technology using plasma. So far, in-situ measurements of conformational changes have shown reversible changes in the secondary and tertiary structure of proteins due to electric fields. Plasma also irreversibly fragmentate the primary structure. The optimal conditions for response induction were identified through phenotypic analysis and omics analysis of the biological response to plasma irradiation. Furthermore, a method for directly measuring a very small amount of plasma-induced active species, which has not been reported in the world, directly from the plasma-irradiated living body was created. This research is expected as a food production increase method that supports the realization of SDGs, requiring no additional agricultural land, water, nor fertilizer, and to contribute to different academic fields such as molecular biology transmitted by plasma science.

研究分野：プラズマ応用科学

キーワード：プラズマ 動物細胞 植物細胞 生体応答 化学種

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、持続可能社会の構築や生涯現役社会の実現に向けて、革新的な医療技術の開発が望まれている。その方策として近年、大気圧プラズマ(以下、プラズマ)が着目されており[新学術領域、プラズマ医療科学の創成]、これまでにプラズマを用いた皮膚治療装置(独国マックスプランク研究所、東京都市大学)、アポトーシス誘導や細胞分化などの細胞応答誘導(独国グライフスバルト大学、仏国オルレアン大学、韓国 KAIST、名古屋大学等)などの研究開発が進められている[A. Fridman, *et al.*, Plasma medicine (2013)]。これらの多くは、プラズマを気中で生成し、液体に覆われた細胞へ照射している。このとき細胞は、化学種や電界の作用を受ける。化学種とは活性酸素や活性窒素などの総称で、これらの多くは液中に溶解し、過酸化水素や亜硝酸、硝酸などの安定な化学種に変化した後、細胞まで輸送され、酸化刺激により細胞応答を誘導する[T. Sato, *et al.*, J. Phys. D: Appl. Phys. (2011)]。一方で電界もまた、細胞の膜に介在するタンパク質(膜タンパク質)の極性アミノ残基を刺激してコンフォメーション変化を引き起こし、その機能を変質させることで細胞応答を誘導する[T. Okumura, *et al.*, Jpn. J. Appl. Phys. (2016)]。しかし、プラズマを用いた細胞応答誘導においては定量評価技術がすでに確立されている化学種の生物学的効果を中心として作用機序を追及する研究がほとんどで、同じく生物学的効果をもつ電界の影響は、プラズマ医療応用分野においては十分に検討されていない。プラズマ応用研究の新規領域[新学術領域、プラズマ医療科学の創成]のさらなる学術的発展には、現在、活発に調べられている化学種の効果に並行して、電界の影響を検討しておく必要がある。そこで本研究では申請者独自の技術を適宜使い、プラズマ照射時に細胞にかかる電界を同定し、プラズマ由来の電界の生物学的効果を定量評価し、さらにその作用機序を明らかにする。なお、本研究では、気中で発生したプラズマが細胞等を含んだ培養液に荷電粒子を与えることで細胞内外に発生させる電界を扱う。プラズマ発生時のストリーマヘッドがその周囲の電界を急峻にかつ著しく変化させるため、その生物学的効果が議論されることが稀にあるが、一般に培養液中の細胞周囲の電界変化は液体の誘電特性により光の早さで緩和されるため、ここでは扱わない。

### 2. 研究の目的

本研究目的は、電気刺激および大気圧空気低温プラズマを用いた生体応答誘導技術の定量評価・機序解明である。

### 3. 研究の方法

本研究は、【1. 細胞にかかる電界の同定】、【2. 電界と細胞の相互作用因子の抽出】、【3. 細胞応答機構の解明】といった3つのテーマに沿って進め、プラズマ由来の電界の生物学的効果を体系的に調べ、その作用機構を解明することとする。【1. 細胞にかかる電界の同定(R1 年度)】では、まずは単一放電を誘起するパルスプラズマ発生装置を構築する。パルス信号発生器および電圧増幅装置を用いて発生させた高電圧パルスを、気中に設置した電極に印加し、同電極から液体に向けて放電プラズマを進展させる。電極材はタングステン、電極先端曲率半径は  $40\mu\text{m}$ 、電極一液面間距離は  $1\text{mm}$  とする。プラズマ発生装置構築後は、高電圧プローブ、高速オシロスコープ、絶縁被覆白金電極により高周波パルス信号計測装置を構築し、回路シミュレーションソフトウェア Simulation Program with Integrated Circuit Emphasis (SPICE)を用いた装置・計測系の等価回路解析、および数値解析による等価回路構成各電気要素の同定、有限要素法を用いた細胞を含んだ電界シミュレーションにより細胞膜にかかる電界の同定を行う。ここでは、一般に用いられているように、細胞膜は絶縁体、細胞内包液は導体として扱った。パルス間隔はミリ秒以下のマイクロ秒スケールとする。【2. 電界と細胞の相互作用因子の抽出(R2 年度)】では、R1 年度で作成した実験・計測系を用いる。細胞への化学種の作用を無効とするラジカルスカベンジャーを添加した細胞懸濁液にプラズマ照射を行い、プラズマ由来の電界の生物学的効果を評価する。これには HeLa 細胞を用い、生存率および増殖率、形状観察、蛍光観察、膜タンパク質機能発現、遺伝子発現を中心に調べる。生存率および増殖率は血球計算板と倒立顕微鏡により調べ、形状観察および蛍光観察には蛍光顕微鏡を用いる。膜タンパク質発現はフローサイトメータを用い、膜介在性接着タンパク質分子機能の発現量を評価する。遺伝子発現は qRT-PCR により刺激後、経時的に調べる。細胞膜自体が受ける損傷も細胞懸濁液に漏出する LDH 活性量により評価する。これらにより、プラズマ由来の電界と細胞の相互作用の定量評価し、細胞増殖や死滅因子とその細胞応答過程を抽出・特定する。【3. 細胞応答機構の解明(R3 年度)】 R1 および R2 年度の結果をもとに、プラズマ由来の電界刺激に対するタンパク質の活性、機能、構造変化を調べる。ここでは膜タンパク質は用いない。細胞膜タンパク質は単離時にその機能が損なわれてしまうため、通常はモデルタンパク質が用いられる。このため、本研究においてもこれに準ずるが、複数のタンパク質を用いる。すなわち、活性評価には  $\alpha$  アミラーゼを、その他にはウシ血清アルブミン(BSA)を用いる。活性評価は、比色法により、機能評価は蛍光分光光度計により行う。最も重要な構造変化についてはより詳細な情報が必要となるため、SDS-PAGE 構造解析に加え、紫外可視分光光度計に電界刺激装置を組み込んだリアルタイム構造解析技術を用いる。リアルタイム構造解析技術の測定メカニズムは、極性アミノ残基が形成する水素結合と非極性アミノ残基由来の疎水性結合の吸収スペクトルがそれぞれ  $238\text{nm}$  および  $278.5\text{nm}$  付近と異なる性質を

利用している。これらによって細胞応答が、なぜ、どのように誘導されるのかが明らかになる。

#### 4. 研究成果

R.1 年度にリアルタイム立体配座変化測定を通して電界によるタンパク質の二次・三次構造の可逆的な変化、およびプラズマ照射によるタンパク質分子の不可逆的な断片化を明らかにした。R.2 年度は新たな課題となったプラズマにより発生する化学種の定量評価方法を確立した。研究実施者の所属機関移動に際し、生体応用誘導作用は、研究対象として植物を新たに扱うことで本研究を円滑に進めた。続いて、プラズマ照射システムの構築や、プラズマ照射に対する植物の応答、すなわちフェノタイプ解析、オミクス解析を行うことで、種子の発芽等の誘導に最適な条件を明らかにした。さらに、プラズマによって発生する化学種の定量評価方法の確立を目指し、特定の活性種に対して高感度に定量測定する方法を確立した。分析機器およびサンプリング方法等の改善により、検出感度が飛躍的に向上し、これまで報告がないレベル、すなわち世界最高感度にて測定できることが明らかとなった。これらにより、生物学的影響を定量的に解析し、本研究を飛躍的に進める態勢が整ったため、R.3 年度は化学種の定量評価に基づく生体応答誘導解析を行った。詳細は以下の通りである。パルス放電を高速に発生させるシステムを構築し、タンパク質にプラズマを作用させるための液体接触型プラズマリアクタを開発した。リアクタ方式は液体接触型 DBD プラズマを採用した。これによりタンパク質を含む液体にプラズマを直接作用させることが可能となり、高酸化還元電位をもつ・OH を高効率で生成し、処理効率向上を図った。図1は開発したシステムおよびリアクタの一例である。図2にはこれらを用いたパルス放電の電気的特性の観測結果の一例である。図2に示すように、本システムでは大きさ 30kVpp、周波数 1,000Hz の電圧印加により、100ns オーダーの電流パルスを1秒間に約 20,000 回安定的に発生させることができる。開発システムを用い、電界刺激および気液界面プラズマに対するタンパク質の構造変化を調べた。この方法は極性アミノ残基が形成する水素結合(二次構造)と非極性アミノ残基由来の疎水性結合(三次構造)の吸収スペクトルがそれぞれ特有の波長領域と異なる性質を利用している。図3は電界刺激の効果を調べたリアルタイム構造解析の結果の一例で、電界刺激は二次および三次構造を中心に牛血清アルブミンの機能を活性化すること、またその効果は可逆的である。一方、プラズマ処理から 24h 後の蛍光分光測定の結果、電界刺激の効果とは異なり、プラズマ処理では二次・三次構造が不可逆的に失われることを明らかにした。よってプラズマ照射による恒常的な生体分子の応答変動に着目した。さらに生体材料の対象を植物とし、プラズマ誘起物理化学的刺激を利用したバイオマスおよび食糧増産法としての応用に向け検討を進めた結果、植物種子へのプラズマ照射により、発芽誘導が可能であることを示した。続いて、液体-超臨界クロマトグラフィートリプル四重極質量分析計(LC/SFC-MS/MS)を用い、種子内ホルモン量の簡易定量測定方法を創成し(図4)、プラズマ照射種子における発芽関連ホルモンバランスの変動を示した。その後、プラズマ照射は発芽関連ホルモン発現遺伝子の発現レベル変動や DNA の脱メチル化が関わることを示した。本研究の遂行により、農産物の発芽や成長をプラズマ照射によって制御できる可能性が示唆された。今後、プラズマ誘起物理化学的刺激を利用したバイオマス・食糧増産法としての応用を進め、産学官連携を通し社会実装につなげる。

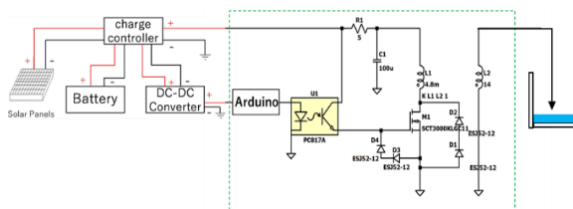


図1. 構築した安価で小型な誘導型パルス高電圧発生回路

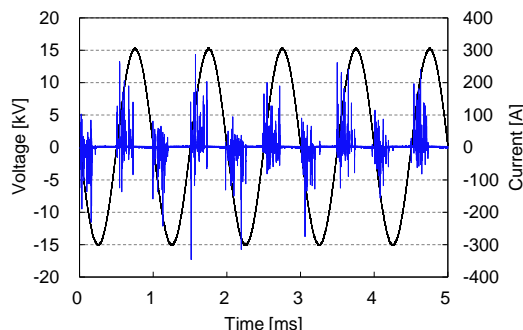


図2. パルス放電の電気的特性観測結果(一例).

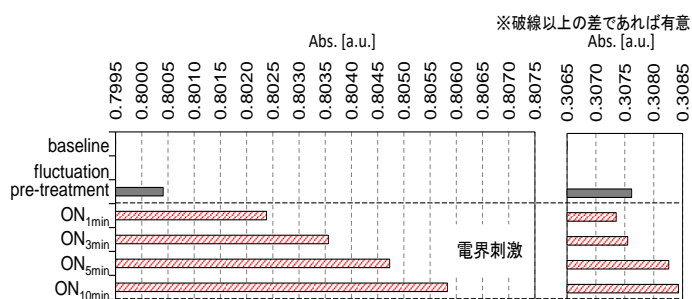


図3. 電界刺激によるアルブミンの可逆的構造変化.

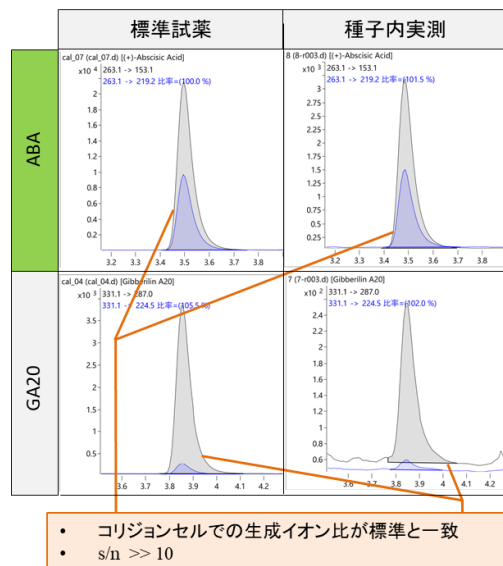


図4. 種子抽出液から測定した植物ホルモン: アブシジン酸(ABA)およびジベレリン酸 20(GA20)のMRM クロマトグラム(一例).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okumura Takamasa, Attri Pankaj, Kamataki Kunihiro, Yamashita Naoto, Tsukada Yuichi, Itagaki Naho, Shiratani Masaharu, Ishibashi Yushi, Kuchitsu Kazuyuki, Koga Kazunori	4. 巻 -
2. 論文標題 Detection of NO3- introduced in plasma-irradiated dry lettuce seeds using liquid chromatography-electrospray ionization quantum mass spectrometry (LC-ESI QMS)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-16641-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Suriyasak Chetphilin, Oyama Yui, Ishida Toshiaki, Mashiguchi Kiyoshi, Yamaguchi Shinjiro, Hamaoka Norimitsu, Iwaya-Inoue Mari, Ishibashi Yushi	4. 巻 10
2. 論文標題 Mechanism of delayed seed germination caused by high temperature during grain filling in rice ( <i>Oryza sativa</i> L.)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74281-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Attri Pankaj, Ishikawa Kenji, Okumura Takamasa, Koga Kazunori, Shiratani Masaharu, Mildaziene Vida	4. 巻 11
2. 論文標題 Impact of seed color and storage time on the radish seed germination and sprout growth in plasma agriculture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-81175-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Attri Pankaj, Teruki Anan, Arita Ryo, Okumura Takamasa, Tanaka Hayate, Yamashita Daisuke, Matsuo Kayo, Itagaki Naho, Kamataki Kunihiro, Koga Kazunori, Shiratani Masaharu, Kuchitsu Kazuyuki, Ishibashi Yushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Plasma Treatment Effect on the Paramagnetic Species of Barley Seed Radical's Intensity: An EPR study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plasma Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1615/PlasmaMed.2020036353	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Attri Pankaj、Ishikawa Kenji、Okumura Takamasa、Koga Kazunori、Shiratani Masaharu	4. 巻 8
2. 論文標題 Plasma Agriculture from Laboratory to Farm: A Review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Processes	6. 最初と最後の頁 1002 ~ 1002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pr8081002	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 奥村賢直、中川裕子、高橋克幸、高木浩一
2. 発表標題 放電プラズマおよび電界のバイオ応用 タンパク質分子の構造変化 -
3. 学会等名 AAPPS-DPP2020サテライト会議オンライン開催 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. Okumura, H. Tanaka, R. Arita, D. Yamashita, K. Matsuo, P. Attri, K. Kamataki, N. Itagaki, K. Koga, M. Shiratani, A. Tanaka
2. 発表標題 Growth of Rice Cultivated in Field from Plasma-irradiated Seeds and Its Health Assessment for rats
3. 学会等名 2020 The Materials Research Society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 H. Tanaka, R. Kogawa, Y. Oba, M. Fujita, T. Okumura, P. Attri, K. Kamataki, N. Itagaki, K. Koga, M. Shiratani
2. 発表標題 Nitric Acid Generation by Pulsed Needle-water Discharge Plasma
3. 学会等名 2020 The Materials Research Society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takamasa Okumura, Teruki Anan, Hayate Tanaka, Ryo Arita, Daisuke Yamashita, Pankaj Attri, Kunihiro Kamataki, Naho Itagaki, Kazunori Koga, Masaharu Shiratani
2. 発表標題 Influence of Atmospheric-pressure Plasma Irradiation on Germination of Moistened Lettuce Seeds
3. 学会等名 The 38-th symposium on plasma processing (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥村賢直, 石橋勇志, Chetphilin Suriyasak, 田中颯, 佐藤僚哉, 有田涼, 廣松真弥, 古閑一憲, Pankaj Attri, 松尾かよ, 山下大輔, 板垣奈穂, 鎌滝晋礼, 白谷正治
2. 発表標題 高温障害を持つイネ種子の発芽特性へ及ぼす 誘電体バリア放電プラズマ照射の影響
3. 学会等名 第81回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥村賢直, アトリ パンカジ, 石川健治, 古閑一憲, 白谷正治, ヴィダ ミルダズィネ
2. 発表標題 かいわれ大根種子の発芽と発芽の成長に対する大気圧プラズマ照射の影響 - 種子の色と貯蔵の効果
3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takamasa Okumura, Yuko Nakagawa, Chunhong Yuan, Katsuyuki Takahashi, Koichi Takaki
2. 発表標題 Non-enzymatic Conformational Change of Protein by Non-lethal Stimulation of Atmospheric -Pressure Plasma and Electric Field
3. 学会等名 第36回九州・山口プラズマ研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿南輝樹, 田中颯, 有田涼, 山下大輔, 奥村賢直, アトリパンカジ, 鎌滝晋礼, 板垣奈穂, 古閑一憲, 白谷正治, 石橋勇志, 藤本社史, 熊内雅人, 榎本常利, 松井英享
2. 発表標題 プラズマ照射レタス種子の発芽特性に対する調湿日数依存性
3. 学会等名 プラズマ・核融合学会 九州・沖縄・山口支部 第24回 支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takamasa Okumura, Yuko Nakagawa, Chunhong Yuan, Katsuyuki Takahashi and Koichi Takaki
2. 発表標題 Conformational change of bovine serum albumin by atmospheric-pressure plasma and electric field
3. 学会等名 The 6th Japan-Taiwan Workshop on Plasma Life Science and Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takamasa Okumura, Yuko Nakagawa, Chunhong Yuan, Katsuyuki Takahashi and Koichi Takaki
2. 発表標題 BSA Conformational Change by Atmospheric-Pressure Plasma and Electric Field
3. 学会等名 16th International Conference on Flow Dynamics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Genki FURUSAWA, Ryo HIRAKA, Takamasa OKUMURA
2. 発表標題 R&D of DBD Plasma Reactor for Sterilizing Toothbrush
3. 学会等名 The 6th Japan-Taiwan Workshop on Plasma Life Science and Technology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安部光, 平和幸, 奥村賢直, 渡邊崇
2. 発表標題 大気圧プラズマによる陸上養殖環境の改善
3. 学会等名 電気学会令和元年基礎・材料・共通部門大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松一聖, 古川稜, 石ヶ森大河, 藤田実樹, 奥村賢直
2. 発表標題 再生可能エネルギーを用いたプラズマ生成システムの開発と農業応用への展望
3. 学会等名 電気学会令和元年基礎・材料・共通部門大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥村賢直, 中川裕子, 袁春紅, 高橋克幸, 高木浩一
2. 発表標題 大気圧プラズマおよび電界によるタンパク質の構造変化
3. 学会等名 電気学会令和元年基礎・材料・共通部門大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Takamasa Okumura	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 325
3. 書名 Enzyme Activity Control and Protein Conformational Change	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-



6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------