

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 1日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651218

研究課題名（和文） プラズマ援用生体物質結晶化

研究課題名（英文） Plasma-Assisted Biological Macromolecular Crystallization

研究代表者

伊藤 剛仁 (ITO TSUYOHITO)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：70452472

研究成果の概要（和文）：200字程度

本研究は、「プラズマ援用生体物質結晶化」といった新技術の確立を目的としたものである。卵白由来リゾチームを用いた実験において、プラズマ照射による結晶化促進が報告された。そのメカニズム解明のため、構造が比較的簡単であることや、脱色の過程から反応速度を見積もることができる色素を対象とし、プラズマ照射が与える影響を観察した。各種 pH における実験から、色素ごとに異なる pH 依存性が見られた。結果として、本技術の適応においては、生体物質が置かれる溶液環境が大きく影響するという知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

We have been studying a new technique “plasma-assisted biological macromolecular crystallization”. Improvement in the crystallization probability of biological macromolecules by plasma irradiation had been reported with lysozymes from hen egg whites. For understanding the mechanisms, we studied decolorization process of various dyes indicating the reaction speed by their color change. The reaction speeds largely depend on pH of the solution and the dependency is not unique. The results suggest that, for useful application of the new crystallization technique, the conditions of solution should be considered properly.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：プラズマ、結晶化、構造解析

1. 研究開始当初の背景

多くのタンパク質や核酸といった生体物質の立体構造解析において、その結晶化プロセスはボトルネックとなっている。生物の神秘の追及や、新薬の開発等といった大きな発展性を伴う重要課題のため、構造未知生体物質の立体構造解明を目的とした無重力下での結晶成長や、フェムト秒レーザーを用いた結晶化等、高価な手法を含む様々な手法が精

力的に試みられているのが現状である。

放電プラズマは、従来から、ラジカル、紫外光、荷電粒子の生成に広く用いられ、各種無機・有機材料プロセスに用いられてきた。近年の大気圧低温プラズマ技術の発展により、ラジカルや紫外光の生成といったプラズマの持つ特徴が真空雰囲気を作製することなく可能となり、液体を始めとした真空雰囲気を嫌う生体物質含有媒体とプラズマとの

融合が図り易くなった。

本研究の開始時において、モデルタンパク質である卵白由来リゾチームを含む溶媒にプラズマ照射を行うことにより、結晶化が大きく促進される結果が得られていた(図1)。プラズマ照射の効果は、たった10秒のプラズマ照射から約一週間経過してから明確に見られるようになり、プラズマ照射によって成長核となるクラスターが形成されることに起因するものと考えられた。しかしながら、プラズマがもたらす効果は、光やラジカルなど多方面にわたるため、そのバランスや対象によっては、結晶化の促進にも抑制寄与する可能性があり、結晶化の実現や、品質改善において有益に使用できる可能性が考えられていた。

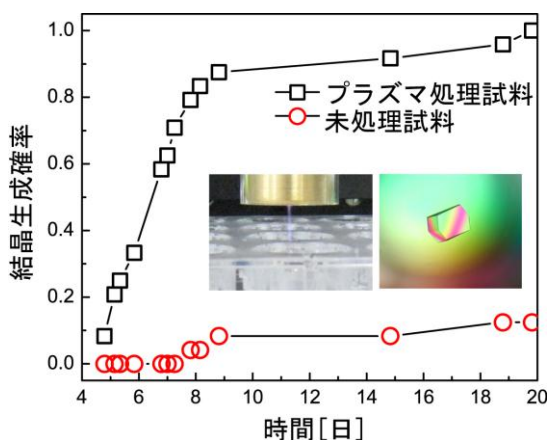


図1. 卵白由来リゾチームの結晶化確率時間依存: プラズマ処理サンプル(□)と未処理のコントロール(○) [T. Ito et al. Appl. Phys. Express 4, 026201 (2011)より]。挿入写真はプラズマ処理中の様子と生成された結晶を示す。

2. 研究の目的

本研究は、「プラズマ援用生体物質結晶化」といった挑戦的萌芽技術の確立を目的としたものである。タンパク質や核酸といった生体物質の立体構造を解明することは、それらの機能の理解へとつながる。つまりは、生物の持つ神秘の追及や、新薬の開発などにおいて、非常に強力な知見となりえる。生体物質の立体構造解析において、その結晶構造解析は、最も強力な手法の一つであるものの、「結晶化しない」・「結晶の質が不十分」等の要因から、結晶化プロセスは多くの生体物質の立体構造解析におけるボトルネックとなっている。そこで本研究では、安価かつ簡便な大気圧非平衡プラズマを用い、そのボトルネックの解消に取り組むものである。

3. 研究の方法

上述のように、モデルタンパク質である卵白由来リゾチームを用いた実験において、プラズマの短時間照射によって結晶化が大きく促進されることを本研究グループが発表している[1]。そのメカニズム解明から、本技術の適応指針を得るため、構造が比較的簡単であることや、脱色の過程から反応速度を見積もることができるといった利点から、メチレンブルーやオレンジ G 等の色素を対象とし、プラズマ照射が与える影響を観察した。

プラズマの生成にはヘリウムガス流をとる誘電体バリア放電プラズマ(Heプラズマジェット)を用いた[2]。図2に示すように、二つの中空円筒状電極にガラス管ノズルを通し電極間でプラズマを発生させ、ノズルにヘリウムガス(流量 1.7 L/min)を供給することでジェット状のプラズマを生成させる。図3に示すように印加電圧は約 9 kV_{pp}、周波数は 35 kHz とした。ガラス管先端-液面距離は、10 mm とした。

ノズル下流端より噴出したジェット状プラズマを、色素含有溶液(1.28×10⁻⁴ mol/L, 0.5 mL)表面へ照射した。脱色過程の観察は、白色光源と分光器を用い、透過光強度の減衰から、吸収度の波長依存性を求めることで行った。また、pH 依存性を調べるため、リン酸緩衝液および酢酸緩衝液を用いた。

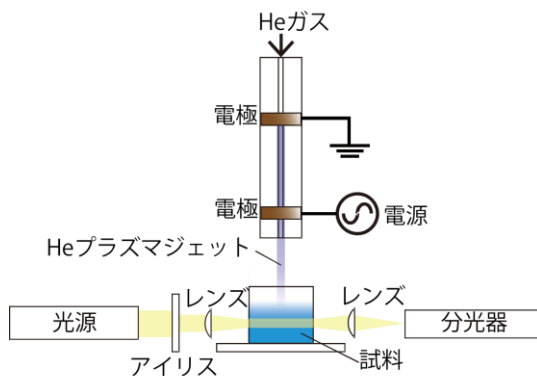


図2. 吸光度変化測定実験概略図

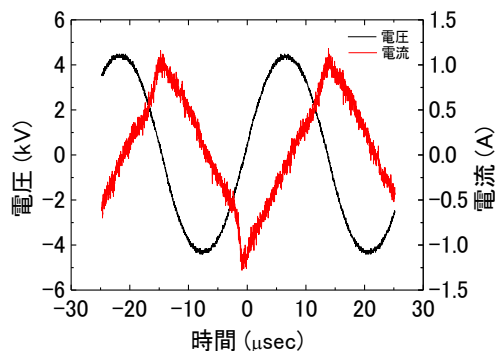


図3. 電流-電圧特性

更に、処理後のメチレンブルー、オレンジ G、およびリゾチーム溶液に対するマトリックス支援レーザー脱離イオン化法による質量測定も試みた。

4. 研究成果

プラズマ照射によるメチレンブルーの吸光度の波長・時間依存性を測定したところ、図4、5に示すように、時間とともにその吸光度が減少する傾向が全ての条件で見られた。また、430 nm 付近における増加に顕著に表れているよう、波長依存性は時間とともに若干変化している。選択的な分解の可能性や化学的変化を示唆するものと考えており、今後、その由来と共に詳細に解明していく必要がある。図6には、それぞれの pH に対し、665 nm における吸光度の時間変化を示した。プラズマの照射とともに吸光度は減少し脱色が進む過程がより明確に見て取れる。また、酢酸緩衝液を用いた3サンプルの間では、低 pH の方が脱色反応が若干早く進むことが確認された。しかしながら、より高 pH 領域であるリン酸緩衝液を用いた系の方がより早い反応速度を示した。なお、脱色処理中において pH が保たれていることは、処理後溶液の pH の測定を通じ確認している。

先行研究では、誘電体バリア放電を用いたメチレンブルーの脱色において、脱色速度の明確な pH 依存性が報告されており、低 pH 溶液の方が酸化剤の溶解度が高いために脱色速度が早くなるものと考察されている[3]。今回の実験では、若干の速度差は見られるものの、先行研究と比較すると極めて小さな変化しか観察できなかった。今後、相違の原因解明を進める事が、本技術の適応における重要な課題の一つであると考えられる。

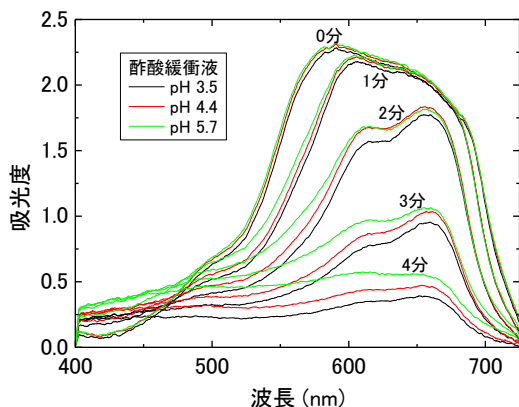


図4. 酢酸緩衝液中メチレンブルーのプラズマ処理による吸光度時間変化：pH 3.5、4.4、および 5.7。

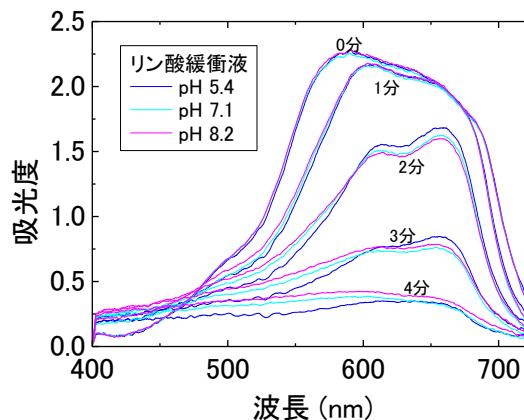


図5. リン酸緩衝液中メチレンブルーのプラズマ処理による吸光度時間変化：pH 5.4、7.1、および 8.2。

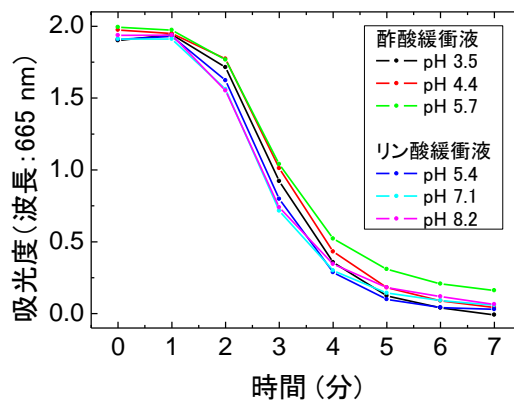


図6. 各 pH 溶液におけるメチレンブルーのプラズマ処理脱色速度 (665 nm)

図7-9には、色素オレンジ G に対する結果を示す。高波長側での吸光度の増加が見られるが、メチレンブルーと比較すると、波長依存性の変化は小さい。反応速度の pH 依存性だが、図9に示すように、低 pH 領域での pH 依存性はより顕著であり、低 pH の方が早く脱色反応が進んだ。しかしながら、メチレンブルーの時と同様に、より高い pH であるリン酸緩衝液を用いた pH5.4-8.2 においては、pH 依存性が見られないのみならず、低 pH のものよりより早い脱色が観測された。このことは、pH のみならず、他の要因が脱色反応に関わっていることを示すものと考えている。

一般的に、酸化剤 (O_3 、 OH 等) が関わる反応においては、液中への酸化剤の溶解度が低 pH 領域で高い点などから、pH 依存性を示す事が知られている。今回の実験では、低 pH 領域での pH 依存性は見られたものの、高 pH における処理のほうが高い反応速度を示すといった予想を覆す結果が得られてい

る。リン酸緩衝液のほうが、酢酸緩衝液よりも電導率が高いことから、pH 以外の速度決定因子として電導率が関わる因子が存在するものと現在のところ考えている。

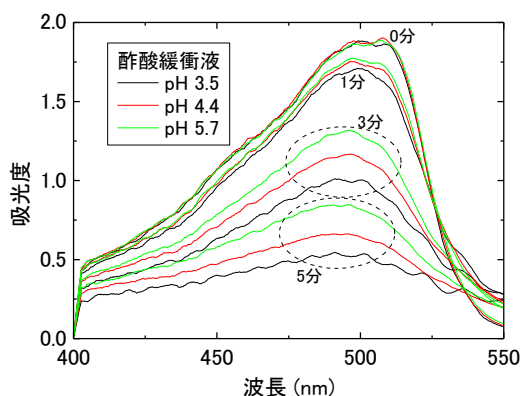


図7. 酢酸緩衝液中オレンジ G のプラズマ処理による吸光度時間変化：pH 3.5、4.4、および 5.7。

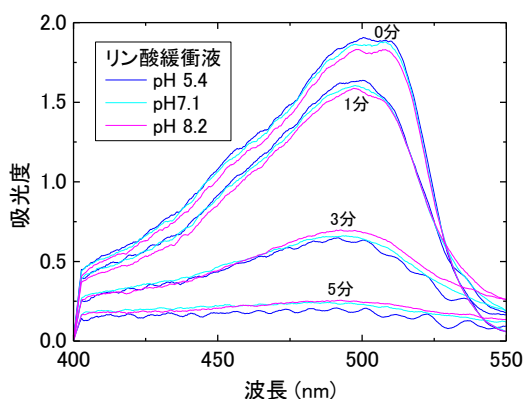


図8. リン酸緩衝液中オレンジ G のプラズマ処理による吸光度時間変化：pH 5.4、7.1、および 8.2。

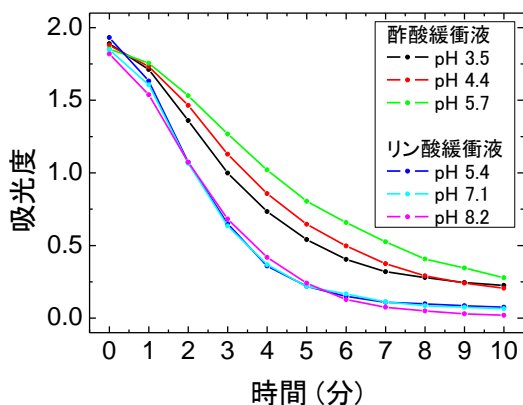


図9. 各 pH 溶液におけるオレンジ G のプラズマ処理脱色速度(500 nm)

また、処理後のメチレンブルー溶液に対し質量分析を行ったところ、プラズマの照射によるダイマー等の生成は確認出来なかったが、メチル基が外れた質量に対応する物質が観察された。オレンジ G およびリゾチームに対する質量分析においては、十分なシグナルが得られない、あまりに複雑な分布が得られた等の理由から、有意義な知見を得ることができなかった。しかしながら、タンパク質においてもメチル基が外れるような化学変化が起こるとすれば、立体構造には大きな変化を与えることなく溶解度を変化させている可能性があり、これは結晶化の促進を説明するものである。

以上より、本挑戦的萌芽技術の適応においては、生体物質が置かれる溶液環境が大きく影響するという知見を得た。また、結晶化の促進には、プラズマ照射による有機物質の一部の化学的変化が影響しているものと考えられる。

参考文献

- [1] T. Ito, T. Ito, and S. Yokoyama, Appl. Phys. Express **4**, 026201 (2011)
- [2] M. Teschke, J. Kedzierski, E. G. Finantu-Dinu, D. Korzec, and J. Engemann, IEEE Trans. Plasma Sci. **33**, 310 (2005).
- [3] F. Huang, Li Chen, H. Wang and Z. Yan, Chem. Eng. J., **162**, 250 (2010).

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

「大気圧プラズマによる水中脱色反応の研究」近藤 崇博、鷹尾 治樹、伊藤 剛仁、伊藤 拓宏、横山 茂之、2013 年春季 第 60 回応用物理学関連連合講演会、神奈川工科大学、2013 年 3 月 27-30 日

〔その他〕

研究代表者ホームページ

<http://www.ppl.eng.osaka-u.ac.jp/tsuyohito/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 剛仁 (ITO TSUYOHITO)

大阪大学・工学研究科・准教授

研究者番号：70452472

(2) 研究分担者

伊藤 拓宏 (ITO TAKUHIRO)

独立行政法人理化学研究所・生命分子システム基盤研究領域・研究員

研究者番号：70401164

(3)連携研究者

横山 茂之 (YOKOYAMA SHIGEYUKI)

独立行政法人理化学研究所・生命分子システム
基盤研究領域・領域長

研究者番号：00159229