

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13904

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24108005

研究課題名(和文) プラズマと生体ユニットとの原子・分子動的相互作用の解明

研究課題名(英文) Multiscale modeling of plasma-bio interactions

研究代表者

水野 彰 (Mizuno, Akira)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・シニア研究員

研究者番号：20144199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 66,300,000円

研究成果の概要(和文)：大気圧低温プラズマは、細胞や生体組織に直接照射することが可能であり、抗腫瘍効果などの画期的な実験結果が相次いで報告されており、メカニズム解明が急務である。プラズマ照射の生体への作用メカニズムの理解のためには、生物学的階層性の概念が重要であると考え、本研究では生体分子・細胞・組織・個体の各階層に対してプラズマ照射が及ぼす影響を解析・体系化した。プラズマが気相および水溶液中の化学反応を誘起して活性種を生成し、細胞壁・細胞膜に損傷を与え、活性種が内部に侵入して生体高分子に影響を及ぼし、その結果として細胞死などの細胞応答を示すというフレームワークが、多様なモデルにおいて共通していることを示している。

研究成果の概要(英文)：Non-Thermal atmospheric pressure Plasma, NTP, has been extensively studied for medical applications, which include sterilization, treatment of wounds and blood coagulation, and cancer therapy. For understanding of the mechanism of plasma treatments for medical applications, the effect of NTP on biomacromolecules, viruses, E. coli, Bacillus subtilis spore, S. cerevisiae, human cancer cells, and C. elegans are studied using various method. Our results suggests that reactive species produced in liquids attack cell membrane or cell wall, and then oxidative damage on biomacromolecules are induced, finally various kinds of cellular responses are observed. This framework is common to various model organisms.

研究分野：静電気・大気圧プラズマ応用

キーワード：大気圧プラズマ プラズマ医療応用 プラズマ応用

### 1. 研究開始当初の背景

大気圧や液中での低温プラズマは、細胞や生体組織に直接照射することが可能であり、抗腫瘍効果や止血・創傷治癒への有効性を示す画期的な実験結果が相次いで報告され、プラズマの医療応用に関する研究が急速に進展している。しかし、研究開始当初それらの多くは放電条件や処置時間を試行錯誤的に変化させた結果の報告であり、プラズマ照射影響のメカニズムについては、国内外で多くの研究が行われていたにも関わらず、推測に留まっている部分が多く残されていた。

### 2. 研究の目的

大気圧プラズマ照射の生体への作用メカニズムの理解のためには、生物学的階層性の概念が重要であり、生体分子・細胞・組織・個体の各階層に対してプラズマ照射が及ぼす影響の解析が必要であると考えた。そこで本研究では、細胞生存率や治癒経過のみを指標とした解析から脱却し、分子・細胞・組織など各階層に対してプラズマ照射が及ぼす影響を系統的に解析し、相互作用のモデル化とそれを踏まえたプラズマ医療の創成に寄与することを目的とした。分子レベルでは、核酸 (DNA)・タンパク質を主に用い、細胞以上の階層では、生命科学分野で従来用いられているモデル生物、具体的には核酸-タンパク質複合体であるウイルス (ウイルスは遺伝情報とそれを覆うキャプシドと呼ばれるタンパク質の殻で構成され、宿主細胞がないと自己複製できないので半生物と呼ばれることがある)、モデル微生物として最もポピュラーな大腸菌、枯草菌芽胞、真核細胞の代表的なモデル生物である出芽酵母、個体のモデルとして線虫を用いた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 生体分子損傷

DNA は遺伝情報の伝達などを担う重要な生体分子である。細胞内の DNA が酸化ストレスなどによって損傷を受けると、糖修飾・鎖切断などを起こすことが知られている。このような生体分子としての重要性を鑑みて、プラズマ照射によって生じる DNA 損傷が研究対象となってきた。プラズマ照射によって生じる DNA 損傷の解析は、DNA 溶液に対してプラズマを照射してその後解析するものと、プラズマ照射した細胞内に生じた DNA 損傷の解析に大別される。前者の解析のほとんどはゲル電気泳動によるものであるが、通常 30-40 分程度の泳動時間を要し、その後さらに DNA 可視化のための染色、ゲルのイメージングのプロセスを要する。本研究では、5'末端を蛍光物質で、3'末端を消光物質で修飾した、ステムループ構造をとりうるオリゴヌクレオチド (Molecular beacon: MB) を利用した方法を新たに開発して評価した。酸化ストレスなどにより MB のステム部分が切断されると、それまで近接していた蛍光物質と消

光物質が分離し、DNA 損傷を反映した蛍光増大が生じる (図 1)。MB はリン酸ナトリウム緩衝液に溶解し、95°C、3 分間加熱した後ゆっくりと室温まで下げてステムループ構造を形成させた。この溶液に大気圧低温アルゴンプラズマジェットを所定の印加電圧・照射時間で照射し、照射前後の溶液の蛍光強度を測定した。

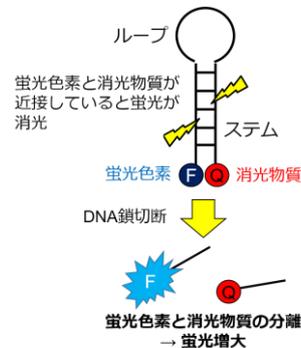


図 1 Molecular beacon による DNA 切断検出

#### (2) ウイルス不活化

バクテリオファージは大腸菌等の原核生物に特異的に感染するウイルスの一種である。バクテリオファージは自己の複製のための数個の遺伝子を持つ二本鎖、あるいは一本鎖 DNA 分子 (ときに RNA) と核酸を包むコートタンパク質あるいはキャプシドのみで構成されており、非常に単純な構造を持つ。DNA・タンパク質それぞれの損傷がプラズマによるウイルス不活化にどのように寄与するかを検討した。バクテリオファージ粒子の不活化は、タンパク質とゲノム核酸両方のダメージの総体として、宿主菌への感染価の減少として表わされる。一方、試験管内パッケージング法と呼ばれる方法を用いると、バクテリオファージのコートプロテイン中に内包されているゲノム核酸を人為的に交換することができ、同様にコートプロテインも交換することができる。プラズマ処理を行ったファージからゲノム核酸を抽出し試験管内パッケージングを行うことでコートタンパク質を更新したファージを得る。プラズマ処理ファージにはゲノム核酸とタンパク質いずれにも損傷がある可能性があるが、コートタンパク質更新ファージには核酸の損傷のみが受け継がれる。両者の相対的な感染率を比較することで、ファージ不活化におけるゲノム核酸損傷およびタンパク質損傷の寄与を調べた。

#### (3) 枯草菌芽胞不活化

芽胞形成菌として滅菌の指標菌とされ、研究対象として広く用いられている枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を実験検体として用いた。枯草菌芽胞はコア、内膜、細胞壁、コレテックス、外膜、スポアコート、外被などから形

成され(図2)、熱、乾燥、放射線などの物理的刺激、さまざまな化学薬品や殺菌剤に対して強い抵抗性を持っている。枯草菌はゲノム解析が進んでおり、芽胞を形成するタンパク質遺伝子が既に同定されているため、芽胞外層を構成するタンパク質遺伝子に緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を融合することで、芽胞外層の異なる部位にGFPを発現させることができる。また、放電プラズマはGFPを不可逆的に失活することが可能である。異なる部位にGFPが局在する枯草菌芽胞に放電プラズマを照射すると、GFP失活の速さや程度が異なると考えられ、それらと芽胞不活化との関係を調査することで、放電プラズマによる枯草菌芽胞の不活化過程の解析ができると考えた。検体として、GFPを発現しない野生型、CotZ(外被)、CotA(スポアコート)、YhcN(コルテックス~内膜)、SspB(コア)それぞれのタンパク質にGFPを融合した5種類の枯草菌株を使用した。

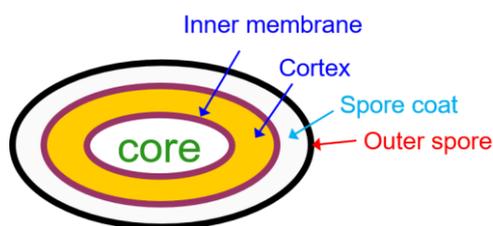


図2 枯草菌芽胞の構造

#### (4) 出芽酵母

出芽酵母は真核生物のモデル生物として広く利用されてきた。出芽酵母を研究することにより、真核細胞の基本的性質について知ることができ、その真核生物の中にヒトも植物も含まれるため、出芽酵母で明らかになった分子機構は、どの真核生物にもおおむね当てはめることができる。本研究では、特定の遺伝子発現を制御するプロモーター配列をレポーター遺伝子の upstream に連結し、そのレポーター遺伝子の産物の活性を測定する方法で出芽酵母へのプラズマ照射の影響を解析した。解析した遺伝子のひとつは、DNAの前駆体合成の際に重要な働きをする酵素であり、DNA合成において主要な役割を果たすリボヌクレオチドレダクターゼ(ribonucleotide reductase; RNR)である。RNR活性は細胞周期及びDNA損傷チェックポイント機構により高度に制御され、細胞内のデオキシリボヌクレオチド濃度を最適に保つことにより、遺伝的忠実性の保持に不可欠な役割を果たしている。DNAに損傷が加わり修復が必要になると、これらのDNA修復遺伝子が活性化され、修復タンパク質の量が増大し、修復が開始される。プラズマ照射に対するRNRプロモーターの活性化をレポーター遺伝子の発現を介して計測した。

#### 4. 研究成果

(1) Molecular beacon による DNA 損傷解析  
 プラズマジェットを所定の印加電圧・照射時間でDNA溶液に照射し、照射後の溶液の蛍光強度を測定したところ、蛍光強度は照射時間依存的に有意に増大し、その時間変化率は放電電力に比例した(図3右)。また、照射距離依存性は、電子スピン共鳴で測定したOHラジカル生成特性とよく一致し、DNA切断の要因の一つがOHラジカルであることが考えられる(図3左)。また同時にO<sub>2</sub>も生成されていた。MBを用いた方法では、従来の方法と比較すると計測時間が圧倒的に短く、活性種反応性蛍光プローブと同じように扱うことが可能である。一方、生じたDNA切断がSSBかDSBかを区別することはできないが、電気泳動で観察されたDNA切断のほとんどがSSBであったことを考えると、ここで観察した蛍光増大はSSBによるものであると考えるのが妥当である。また、合成リン脂質を用いて人工的に構築した人工細胞モデル(ベシクル)にMBを内封させてプラズマ照射した。その結果、MBをベシクルに内封させてもDNA溶液への照射と同様にDNA切断が生じたにも関わらず、ベシクルが崩壊していないことが明らかになった。これは人工細胞モデルを崩壊しないプラズマ照射でもその内部にDNA切断因子が侵入していることを意味する。プラズマ照射による脂質の過酸化などによって細胞膜の流動性が変化したり、小孔が生じたりしていることが報告されているが、この場合のDNA切断因子の特定やその細胞膜透過機構の解明には至っていない。しかし、多種多様な分子で構成される実際の細胞では得ることが難しい知見が、単純な人工細胞モデルを用いて明らかになった。

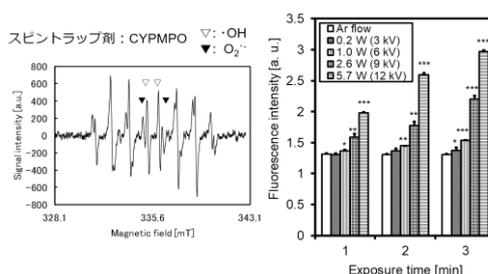


図3 水溶液中に生成する活性種計測(左)とDNA切断検出(右)

#### (2) ウイルス不活化

先行研究において、大腸菌を宿主とし、2本鎖DNAをゲノムとするλファージに誘電体バリア放電で生成したプラズマを照射して活性を測定した場合には、プラズマで不活化したλファージにおいてDNAのダメージは非常に小さかったことが電気泳動で確認されたことから、コートタンパク質のダメージが不活化の主な原因であることが判明し

ていた (図 4 左)。また、プラズマによるペプチド結合の切断はほとんど起こらなかったことから、アミノ酸残基の酸化などによる不可逆的な変性がタンパク質ダメージの主体であると思われる。さらに、インフルエンザウイルスやノロウイルスなどと構造の類似した  $\phi$ X174 ファージにおいても同様の結果が観察された。次に一本鎖 DNA ファージである M13 ファージや一本鎖 RNA ファージである MS2 ファージについて解析したところ、ファージの減衰曲線と抽出したゲノム核酸の減衰曲線のグラフはほとんど同じものになった (図 4 右)。すなわち、プラズマによる M13 ファージや MS2 ファージの不活化の主な要因はゲノム核酸のダメージであることが分かった。 $\lambda$  ファージは 2 本鎖 DNA を持ち、そのダメージは宿主菌体内で効率よく修復されるのに対し、M13 ファージや MS2 ファージの 1 本鎖ゲノム核酸のダメージはほとんど修復されないためであることが考えられる。

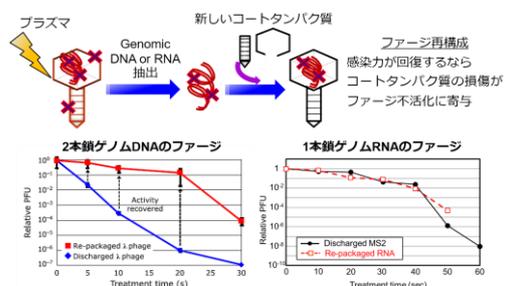


図 4 誘電体バリア放電によるウイルス不活化

### (3) 枯草菌芽胞の不活化

溶液中に懸濁した前述の GFP 融合枯草菌芽胞を誘電体バリア放電に曝露したところ、CotZ 及び CotA は芽胞不活化前に GFP が失活した。YhcN では芽胞不活化前に GFP 失活が始まるが、芽胞不活化後も完全には失活しなかった。SspB は芽胞不活化後に GFP 失活が始まった。以上の結果から、放電プラズマの影響が枯草菌芽胞の外被、スポアコート、コルテックスに到達しても一部または全部が生存可能であることが確認された (図 5)。また、コアに放電プラズマの影響が到達する前に不活化していたことから、コアよりも外側の層へのダメージが枯草菌芽胞において致命的であることが示唆された。これらの結果は、コルテックスとコアの間の内膜が芽胞不活化において重要であることを示唆する。また、放電プラズマは芽胞のタンパク質層の外側から徐々に均一に影響を与えており、放電照射後の芽胞外形にも変化は確認されなかったため、主な不活化要素は局所的な破壊ではないことが示唆された。以上のことから、放電プラズマが生成するラジカル等の活性種が時間と共に徐々に均一に枯草菌芽胞内部に浸透していき、内膜に到達することで枯草菌芽胞は不活化することが示唆された。

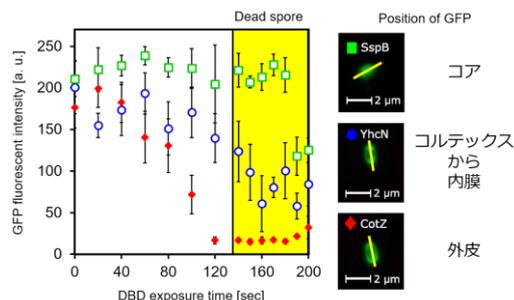


図 5 枯草菌芽胞不活化と不活化因子の内部への浸透

### (4) 出芽酵母の不活化

出芽酵母を滅菌水に懸濁し、アルゴンまたはヘリウムをキャリアガスとしてプラズマ照射したところ、熱ショックタンパク質の著しい発現上昇は観察されなかったが、RNR 活性は最大で 20 倍近く上昇した。対照として、代表的な DNA アルキル化剤である MMS (methyl methanesulfonate)、過酸化水素、紫外線照射などによる DNA 損傷の検出も行ったが、プラズマジェット照射は MMS や紫外線、過酸化水素と同様に高い DNA 損傷を引き起こすことを示した。また、致死量に満たないプラズマジェット照射でも DNA 損傷は起こっており、大気圧低温プラズマは突然変異誘発性や発癌性などの変異原性を有する可能性が示唆された。プラズマ照射によって生成される濃度の過酸化水素投与よりも明らかに高い RNR 活性がプラズマ照射によって観察されており、プラズマ照射によって生成される活性種が大きな要因になっていると考えられる。

以上の結果は、プラズマが気相および水溶液中の化学反応を誘起して活性種を生成し、細胞壁・細胞膜に損傷を与え、活性種が内部に侵入して生体高分子に影響を及ぼし、その結果として細胞死などの細胞応答を示すというフレームワークが、多様なモデルにおいて共通していることを示している。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 105 件)

1. E. Szili, N. Gaur, S.-H. Hong, H. Kurita, J.-S. Oh, M. Ito, A. Mizuno, A. Hatta, A. Cowin, D. Graves, and R. Short, "The assessment of cold atmospheric plasma treatment of DNA in synthetic models of tissue fluid, tissue and cells," *Journal of Physics D: Applied Physics*, Accepted on 25 May 2017. 査読有  
DOI: 10.1088/1361-6463/aa7501
2. H. Kurita, J. Miyamoto, S. Miyachika, Y.

- Uchihashi, H. Yasuda, K. Takashima, and A. Mizuno, "Production of reactive oxygen and nitrogen species in a cell culture medium exposed to an atmospheric pressure plasma jet," MRS Advances, vol. 2, pp. 987-993, 2017. 査読有  
DOI: 10.1557/adv.2017.34
3. H. Kurita, S. Miyachika, H. Yasuda, K. Takashima, and A. Mizuno, "Use of molecular beacons for the rapid analysis of DNA damage induced by exposure to an atmospheric pressure plasma jet," Applied Physics Letters, vol. 107, 263702 (5 pp.), 2015. 査読有  
DOI: 10.1063/1.4939044
4. Y. Tanaka, H. Yasuda, H. Kurita, K. Takashima, and A. Mizuno, "Analysis of the inactivation mechanism of bacteriophage  $\phi$ X174 by atmospheric pressure discharge plasma," IEEE Transactions on Industry Applications, vol. 50, pp. 1397-1401, 2014. 査読有  
DOI: 10.1109/TIA.2013.2274260
5. H. Kurita, M. Shimizu, K. Sano, T. Nakajima, H. Yasuda, K. Takashima, and A. Mizuno, "Radical reaction in aqueous media injected by atmospheric pressure plasma jet and protective effect of antioxidant reagents evaluated by single-molecule DNA measurement," Japanese Journal of Applied Physics, vol. 53, 05FR01A (4 pp.), 2014. 査読有  
DOI: 10.7567/JJAP.53.05FR01

[学会発表] (計 101 件)  
(招待講演)

1. Hirofumi Kurita, "Analysis of DNA damage induced by exposure to an atmospheric pressure plasma jet", Asian International Workshop on Plasma Science, 2016 年 2 月 13 日, 名古屋大学 (愛知県・名古屋市)
2. 栗田 弘史, "大気圧プラズマ照射による生体分子損傷・細胞応答/静電界と油中液滴による遺伝子導入技術", 新学術領域研究「プラズマ医療科学の創成」+「統合的神経機能の制御を標的とした糖鎖の作動原理解明」合同公開シンポジウム「新学術の最前線～プラズマと生物と医療の協奏曲～」, 2015 年 8 月 6 日, 名古屋大学 (愛知県・名古屋市)
- (国際会議)
3. Hirofumi Kurita, Saki Miyachika, Junichiro Miyamoto, Hachiro Yasuda, Kazunori Takashima, and Akira Mizuno, "Production of reactive species and biomolecular damage induced by exposure to an atmospheric pressure plasma", International Conference on Plasma Medical Science Innovation (ICPMSI) 2017, 2017 年 2 月 27 日, 名古屋大学 (愛知県・名古屋市)

4. Hirofumi Kurita, Saki Miyachika, Hachiro Yasuda, Kazunori Takashima, and Akira Mizuno, "Evaluation methods of DNA strand breaks induced by exposure to an atmospheric pressure plasma", The 6th International Conference on Plasma Medicine (ICPM-6), 2016 年 9 月 5 日, Bratislava (Slovakia)
5. Hirofumi Kurita, Saki Miyachika, Hachiro Yasuda, Kazunori Takashima, and Akira Mizuno, "Analysis of DNA strand breaks induced by exposure to an atmospheric pressure plasma jet", 2016 IEEE International Conference on Plasma Science (ICOPS), 2016 年 6 月 22 日, Banff (Canada)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

水野 彰 (Akira Mizuno)  
豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・シニア研究員・名誉教授  
研究者番号：20144199

##### (2)連携研究者

浴 俊彦 (Toshihiko Eki)  
豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：40192512

辻 秀人 (Hideto Tsuji)  
豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：60227395

高島 和則 (Kazunori Takashima)  
豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：60303707

栗田 弘史 (Hirofumi Kurita)  
豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号：70512177

安田 八郎 (Hachiro Yasuda)  
豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・助手  
研究者番号：20200503