

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13608

研究課題名(和文)代謝モデルシミュレーションによるプラズマ照射細胞応答機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of Cell Response Mechanisms for Plasma Irradiation by Metabolic Model Simulation

研究代表者

浜口 智志 (Hamaguchi, Satoshi)

大阪大学・工学研究科 教授

研究者番号：60301826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ゲノムスケール代謝モデル(GSMM)の研究が、最も進んでいる大腸菌(E. coli)を例にとり、プラズマ照射による大腸菌の代謝反応変化(ストレス応答)を解析するシミュレーション・システムを構築した。これにより、プラズマ医療の大きな課題である、低温大気圧プラズマ照射による滅菌作用の生物学的機構を定量的に解明する方法論を確立し、酸化ストレスによる大腸菌の代謝の変化による不活化の過程を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have constructed numerical simulation systems to examine the change in metabolic reactions (stress responses) of Escherichia coli (E. coli) under plasma irradiation. E. Coli is one of the most widely studied systems with Genome Scale Metabolic Models (GSMM). With our simulation model that evaluates oxidative stress generated by low-temperature atmospheric-pressure plasmas, we have established a methodology to determine the biological mechanisms for bactericidal effects by plasma application and clarified the inactivation process of E. coli by its change in metabolism caused by oxidative stress.

研究分野：プラズマ物理学

キーワード：プラズマ医療 活性酸素 酸化ストレス 代謝反応ネットワーク 数値シミュレーション 代謝流速均衡解析 ゲノムスケール代謝モデル 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

近年、気体温度の低い大気圧プラズマを生体に直接照射することにより、止血や創傷治療の効果があることが知られ、その原理の探求や新しい医療応用を目指すプラズマ科学が注目され、「**プラズマ医療**」と呼ばれている。この分野では、プラズマにより気相中で生成される反応活性種（**活性酸素(ROS)**・**活性窒素(RNS)**等）が、生体と相互作用し、様々な化学反応を通して、最終的に生理学的作用を生体にもたらす。応募者は、すでに、**低温大気圧プラズマ**、及び、それが液中に生成する**反応活性種の数値シミュレーションコードを開発済み**である。しかしながら、学界においても、プラズマの生成する活性種が生体を与える生物学的・生理学的影響に関する**理論・シミュレーション研究**は、全く行われておらず、**プラズマにより生成される ROS/RNS の生体への生理学的作用は、未だに十分に理解されていない。**

2. 研究の目的

代謝シミュレーション、特に、**ゲノムスケール代謝モデル(GSMM)シミュレーション**とは、生物内の代謝反応ネットワークをゲノム情報に基づいて記述したモデルの数値シミュレーションであり、現在、発展目覚ましいシステム生物学の根幹をなす技術の一つである。GSMMシミュレーションを用いることにより、外部からの**酸化ストレス**等が、生物の代謝に与える影響を詳しく調べることが可能である。本研究では、GSMMの研究が、最も進んでいる大腸菌(*E. coli*)を例にとり、**プラズマ照射による大腸菌の代謝反応変化(ストレス生成)を解析するシミュレーション・システムを構築し**、これにより、**プラズマ医療の大きな課題である、低温大気圧プラズマ照射による滅菌作用の生物学的機構を定量的に解明する方法論を確立すること**を目的とする。この研究で得られる知見をもとに、将来は、**プラズマ滅菌機構の実験的研究の更なる進展と、人体等動物細胞に対するプラズマ照射の生理学的影響を定量的に解析するプラズマ・GSMM 連成シミュレーション技術の開発への発展が期待される。**プラズマ医療の研究において、GSMMに基づく細胞内代謝系のシミュレーションは、世界的にも、未だ行われていない。しかし、現代のシステム生物学では、GSMMシミュレーションによる生体の**ストレス予測**は広く行われている。生体そのものが、外部刺激により、**ROS/RNS**を生成して、細胞内外でシグナル伝達を行うことを考えると、**プラズマシミュレーションとGSMMシミュレーションを連成して実行することにより、プラズマの物理的作用と生体の生理学的応答が統一的に理解できることが期待される。**この研究が成功すれば、将来的には、より

複雑な動物細胞等の**GSMMシミュレーション**への発展も期待され、**プラズマ医療**の他の応用(**細胞増殖・アポトーシス誘導**等)における生理学的プロセスの定量的理解にも、大いに貢献する。このように、本研究は、当該分野の研究手法に与える影響は極めて大きく、非常に意義深い。

本研究では、GSMMが極めて詳しく研究され、多くのデータが公開されている大腸菌に着目する。低温大気圧プラズマが気相中及び液相中に生成する**反応活性種の輸送・反応シミュレーション**と、後述する大腸菌の**GSMMシミュレーション**を連成して計算することにより、**プラズマ滅菌の生物学的機構(大腸菌の代謝フラックス変化)を、定量的に明らかにする。**

3. 研究の方法

大気圧プラズマから液中へ供給されたラジカルなどによって誘起された化学種(**ROS/RNS**)が大腸菌の代謝応答に対して与える影響を、**GSMM数値シミュレーション**によって調べた。代謝工学においては、有用な代謝物の増産などを目的として、生物の代謝フラックスを解析する**flux balance analysis (FBA)**が広く用いられており、**COBRApy (Constraint-Based Reconstruction and Analysis for Python)**などの計算ツールが公開されている[Ebrahim A. *et al.*: *BMC Systems Biology* 7 (2013) 74]。FBAでは、化学量論と代謝流量とに着目し、定常状態における代謝ネットワーク中の各反応フラックスを計算する。これら細胞内反応フラックス(代謝フラックス)分布は、細菌や酵母の場合、与えられた条件(細胞内へ流入する炭素源や金属イオンなどのフラック

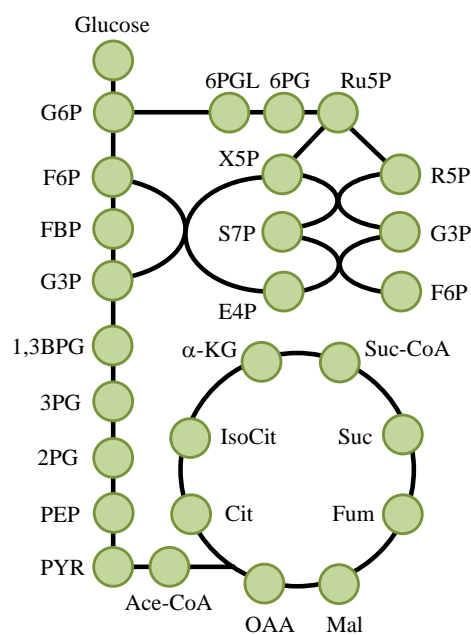


図1. 簡略化した代謝ネットワークの例

ス、遺伝子や特定の代謝反応のノックアウトなど)において増殖率が最大となるように決められる。代謝ネットワークの一例を図1に示す。FBAは対数増殖期のような定常状態を仮定しているため、代謝の動的な応答は計算できないが、酸化ストレスを反映した適当な条件の下で計算することで、本研究にも適用可能であると考えられる。本研究では、特に代謝モデル構築の進んでいる大腸菌について、その代謝経路の一部が酸化ストレスによって不活化されると仮定して菌増殖率の変化を調べた。不活化された代謝経路としては、鉄-硫黄クラスターをもつ酵素が関与している経路とした。鉄-硫黄クラスターをもつ酵素は、代表的な酸化ストレス因子であるスーパーオキシドアニオンラジカル(O₂⁻)によって不活化されることが知られている [Nunoshiba T.: *Environ. Mutagen Res.* 23 (2001) 23]。このような酵素には、フマラーゼ、アコニターゼ、DHAD (dihydroxy-acid dehydratase) がある。また、プラズマ照射された液中では、酸性環境下で液中を輸送されたHO₂から細菌内でO₂が生じて殺菌に至ることが、実験的に示唆されている [S. Ikawa *et al.*: *Plasma Process. Polym.* 7 (2010) 33]。大腸菌モデルとしてはiJO1366を用いた。このモデルには、代謝反応数 2251、代謝物 1136、遺伝子数 1366が含まれている。FBAの線形計画法によって最大化する目的関数には、必要量のアミノ酸、核酸、脂質、ATPから菌体を合成する仮想反応式である菌体合成式を用いた。これは、先に記したように、与えられた条件において大腸菌の増殖率を最大にするフラックスバランスを求めることを意味する。培地の条件は、菌の取り込むグルコースフラックスが10 mmol/gDW/hである Computational minimum mediaとした。

4. 研究成果

フマラーゼ、アコニターゼ、DHADの各酵素が関与する代謝フラックスを増減したときの大腸菌成長率の変化を図2に示す。横軸は各酵素による代謝フラックスであり、縦軸は菌成長率である。また、各グラフ中の縦線は、代謝フラックスを増減させていない標準生育状態でのフラックス値を示している。フマラーゼの場合には、関与する代謝反応のフラックスが減少しても大腸菌成長率への影響は小さかった。アコニターゼの場合も同様であり、代謝フラックスが極端に低下しない限り、大腸菌成長率の受ける影響は小さかった。一方で、DHADの場合には、代謝フラックスの減少が菌成長率に与える影響が大きく、この代謝経路が酸化ストレスによって弱められることが、細菌不活化の主要因となっていることが推察される。この原因は、以下のように考えられる。フマラーゼとアコニターゼとは、

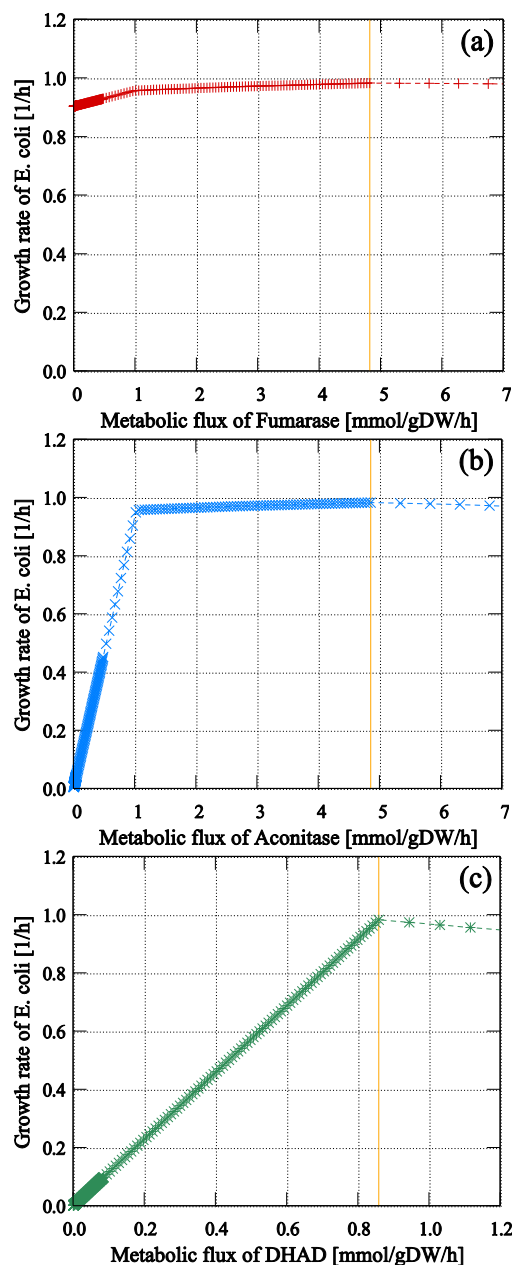


図2. (a) フマラーゼ、(b) アコニターゼ、(c) DHADの各酵素が関与する代謝フラックスを増減したときの大腸菌成長率の変化。グラフ中の縦線は、標準生育状態でのフラックス値を示している。

ともに菌のエネルギー生産を担う TCA 回路 (クエン酸回路) 上の代謝反応に関わっている酵素だが、一方で DHAD は、分岐鎖アミノ酸の生合成経路の代謝反応に関わっている。そのため、比較的ロバストな経路であるエネルギー生成系においては、酸化ストレスによってフマラーゼやアコニターゼが失活したことによるエネルギー生成量の不足をほかの代謝経路で補うことができたが、分岐鎖アミノ酸の生成経路ではそのようにできず、生育に必要な物質が酸化ストレスによって生成できなくなったことに

よって、菌成長率が著しく影響を受けたと考えられる。大腸菌へのプラズマ照射の実験では、大腸菌は、呼吸はしているが成長は停止している状態にあることが知られている。本研究によって得られた GSMM シミュレーション結果は、この実験結果と合致している。また、この酵素が酸素ストレス下の大腸菌で最も必要とされる酵素であることが実験的に確かめられている [Y. Matsumura and T. Imanaka: J. Ferment. Bioeng. 74 (1992) 262]。したがって、プラズマ照射による大腸菌の不活化では、細菌内に生じた O₂ によって DHAD の酵素活性が低下し、分岐鎖アミノ酸の生成が滞ったことが要因であると考えられる。

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 4 件)

- (1) 「高度物理刺激と生体反応(1) — 第1章 高度物理刺激の生成法と計測・予測 —」 佐藤岳彦、金澤誠司、浜口智志、小宮敦樹: 機械の研究 第 67 巻第 8 号 (2015) pp.673-683.
- (2) 「プラズマの医療応用と医療材料の表面処理技術」 浜口智志: 光技術コンタクト 第 54 巻第 4 号 (2016) pp.9-18.
- (3) “Atmospheric-pressure plasma-irradiation inhibits mouse embryonic stem cell differentiation to mesoderm and endoderm but promotes ectoderm differentiation,” T. Miura, S. Hamaguchi, and S. Nishihara, J. Phys. D: Appl. Phys. **49** (2016) 165401 (12pp). DOI:<https://doi.org/10.1088/0022-3727/49/16/165401>
- (4) “Plasma-Liquid Interactions: A Review and Roadmap,” P.J. Bruggeman, M.J. Kushner, B.R. Locke, J.G.E. Gardeniers, W.G. Graham, D.B. Graves, R.C. Hofman-Caris, D. Maric, J.P. Reid, E. Ceriani, D. Fernandez Rivas, J. E. Foster, S.C. Garrick, Y. Gorbanev, S. Hamaguchi, F. Iza, J. Kolb, F. Krcma, P. Lukes, Z. Machala, I. Marinov, D. Mariotti, S. Mededovic Thagard, D. Minakata, E. Neyts, J. Pawlat, Z.Lj. Petrovic, R. Pfeiger, S. Reuter, D.C. Schram, S. Schroter, M. Shiraiwa, B. Tarabová, H. Tresp, P. Tsai, J. Verlet, T. von Woedtke, E. Vyhnankova, K.R. Wilson, K. Yasui, and G. Zvereva, Plasma Sources Sci. Technol. **25** (2016) 053002 (pp59). DOI:<https://doi.org/10.1088/0963-0252/25/5/053002>

[学会発表] (計 1 8 件)

- (1) “Transporters of highly reactive species in

water exposed to a low-temperature atmospheric pressure plasma,” K. Ikuse and S. Hamaguchi, in the *Book of Abstracts of The International Forum on Functional Materials (IFFM), 5th International Symposium on Plasma Biosciences (ISPB2015-5)*, 4th International Symposium on Chemical & Biological Detection (ISCBD-4), 3rd International Symposium on Medical Diagnosis (June 24-26, 2015, Ramada Plaza Jeju Hotel, Jeju, Korea) p. 166 [invited].

- (2) “Concentration profiles of chemical species in water exposed to an atmospheric-pressure plasma: numerical study”, K. Ikuse and S. Hamaguchi, 22nd International Symposium on Plasma Chemistry (July 5-10 2015, University of Antwerp, Antwerp, Belgium) P-I-3-8.
- (3) “Dynamics of reactive oxygen species generated in liquid exposed to gas discharges,” K. Ikuse and S. Hamaguchi, in the *Book of Abstracts of International Conference on Electrical Discharges with Liquids (ICEDL 2016)*, The third annual meeting of COST Action TD1208 “Electrical Discharges with liquids for Future Application” (March 13- 17, 2016, Kocaeli University, Kocaeli, Turkey) p.6 [invited].
- (4) “Plasma-Liquid Interaction,” S. Hamaguchi, *Mini-course on low-power atmospheric pressure plasma sources*, the 43rd IEEE International Conference on Plasma Science (ICOPS2016: June 20- 24, 2016, The Banff Center, Banff, Alberta, Canada) [invited].
- (5) “Liquid-Phase Chemically Reactive Species generated by Water Discharges or Atmospheric-Pressure Discharges,” K. Ikuse, T. Ito, S. Hamaguchi, IVC 20th International Vacuum Congress (IVC-21, Aug. 21-26, 2016, Busan, Korea). [invited].
- (6) “Numerical simulations of plasma-induced metabolic responses of *Escherichia coli*,” K. Ikuse and S. Hamaguchi, in the *Book of Abstracts of 6th International Conference on Plasma Medicine (ICPM6)* (ed. by K. Hensel, B.Tarabová, K. Kučhrová, Z. Koval’ová Mario Janda, and Z. Machala, September 4-9, 2016, Bratislava, Slovakia) P3-68, p.313.
- (7) “Numerical simulation of the generation of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) in water by atmospheric-pressure plasmas and their effects on *Escherichia coli* (E. coli)”, K. Ikuse and S. Hamaguchi,

the Bulletin of the American Physical Society, **61**, (9), 115 (2016); the 69th Annual Gaseous Electronics Conference (GEC16: Oct. 10-14, 2016, Ruhr University of Bochum, Bochum, Germany) SR3-3.

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

浜口 智志 (HAMAGUCHI, Satoshi)
大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：60301826

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

幾世 和将 (IKUSE, Kazumasa)
大阪大学・工学研究科・特任研究員
研究者番号：20795778