

氏名（本籍地）	高井 英輔（島根県）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	博甲第6832号
学位授与年月日	平成26年 3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	数理工学物質科学研究科
学位論文題目	

Plasma-Induced Chemical Processing for Biomolecules in Aqueous Solution  
(生体分子に対するプラズマ誘起液中化学プロセス)

主査	筑波大学 准教授 博士(理学) 白木賢太郎
副査	筑波大学 准教授 博士(工学) 藤田淳一
副査	筑波大学 准教授 博士(工学) 長谷宗明
副査	理化学研究所 専任研究員 博士(工学) 座古保

## 論 文 の 要 旨

プラズマを用いた医療は、乾式・非接触という特徴を有するため次世代の治療法として有望視されている。しかし、放電機構の理解にくらべて、プラズマが生成するラジカル種による反応機構や、生体分子への影響は研究されていない。細胞内には個体の維持および種の存続に関わる生体高分子が多数存在する。生体高分子は一般的な合成高分子と違い、生理的条件下で固有の立体構造を形成して生物学的な機能を担う。代表的な生体高分子はタンパク質である。タンパク質はアミノ酸を構成要素としており、アミノ酸の配列に従った立体構造にフォールディングする。タンパク質のフォールディングに関わる相互作用として挙げられるのが、水素結合や、静電相互作用、ファンデルワールス力、疎水性相互作用といった非共有結合である。そこで、菌を含む溶液の pH を 4.8 以下にすると LF プラズマの殺菌効果が急激に増大するという現象の機構解明および、LF プラズマジェットが生体分子、特にタンパク質を構成するアミノ酸、タンパク質の一種である酵素、タンパク質が自己会合し形成されたアミロイドへの効果を調べた。

第一章ではプラズマ誘起液中化学プロセスによる殺菌効果の pH 依存性を調べた。菌を含む溶液の pH を 4.8 以下にすると LF プラズマの殺菌効果が急激に増大する現象を3種の菌を用いて、再現した。S. mutans は pH 6.5 の菌液中では 5 min プラズマ照射を行っても菌数は全く減少しなかったが、pH 5.0 では 5 min プラズマ照射でのみ減少が見られた。一方、pH 4.7 では 3 min 以上で減少が観察され、pH 4.5 では 3 min プラズマ照射で、pH 3.7 では 1.5min のプラズマ照射で検出限界以下まで減少が観察された。C. rectus は pH 6.5 から pH 5.0 ではプラズマ照射による緩やかな減少が見られた。一方、pH 4.7 では 3 min 以上で減少が観察され、pH 3.7 では 1.0min のプラズマ照射で検出限界以下まで減少が観察された。E. coli は pH 6.5 の菌液中では 5 min プラズマ照射を行っても菌数は全く減少しなかったが、pH 5.2 では 4 min プラズマ照射でのみ減少が見られた。一方、pH 4.7 では 2 min 以上で減少が観察され、pH 4.2 では 1 min 以上で減少が観察され、pH 3.7 では 2 min のプラズマ照射で検出限界まで減少が観察された。

第二章では、プラズマ誘起液中化学プロセスにおけるアミノ酸の酸化反応を調べた。タンパク質を構成するアミノ酸に対するプラズマ誘起液中化学プロセスの効果を調べた。実験はアミノ酸溶液にプラズマを一定時間照射した後、質量分析を行い、分子量変化からアミノ酸に生じている化学反応を推定した。また、質量分析におけるピークの増減からアミノ酸が辿る反応経路についても推察した。実験は天然アミノ酸全20種に対して行った。その結果、20種のアミノ酸のうち、14種類のアミノ酸に変化が起きていることがわかった。さらに、その変化の起きた14種類のアミノ酸に起きた化学反応はすべてアミノ酸側鎖の官能基における酸化反応であることも示唆された。20種のアミノ酸のうち特に興味深い結果となったチロシンとシステインの結果について以下に詳しくその結果を述べる。チロシンはフェノール基を側鎖に持つ分子量181の芳香族アミノ酸である。Fig.8a-cには、0-10分間プラズマ照射したチロシンのMSスペクトルを示している。変化の起きていないチロシンは  $m/z=182$  のシグナルとして現れているが、それ以外に4つのシグナルが観測されました。4つのシグナルはそれぞれ、 $m/z=198.08$  がヒドロキシ基が1つ付加したチロシンで、 $m/z=214.07$  は2つ付加したもの、 $m/z=227.07$  はニトロ基が1つ付加したもの、 $m/z=243.06$  はヒドロキシ基とニトロ基が1ずつ付加したことを示している。さらに、照射時間を変えたチロシンのMSスペクトル変化から、得られた4つのチロシン反応物は、Fig.8dのような反応経路で生成されていることが示唆された。初めに、ヒドロキシ基またはニトロ基が1つ付加し、それらにさらに付加が起きる。このようにチロシンは、酸化反応の一種であるヒドロキシ基やニトロ基の付加が組み合わさるとい興味深い化学反応が起きているということが明らかになった。

第三章では、プラズマ誘起液中化学プロセスにおけるタンパク質の失活と構造変化を調べた。最も重要な生体物質であるタンパク質をターゲットに、大気圧プラズマの作用を分子レベルで明らかにすることを目的に実験を行った。今回用いたタンパク質はリゾチームというアミノ酸129残基、分子量14306で、比較的安定性の高い酵素で、鶏卵由来のリゾチームをタンパク質のモデルとして用いた。実験はプラズマを照射する時間を変えて行い、照射時間に伴うタンパク質の変化を種々の方法で観察した。結果の1つ目として、プラズマ照射によりタンパク質の酵素活性の減少が観察された。Fig.10に示すようにリゾチーム溶液にプラズマを照射すると、照射時間に伴って酵素活性が減少し、30分のプラズマ照射で活性が約70%減少した。酵素活性はこのように溶液中で酵素基質がリゾチームによって分解され溶液全体の吸収が減少することを利用して測定した。プラズマ照射の対照実験として熱量が同程度の熱風を当てたものや、プラズマから発生する紫外線だけを当てる実験を行いました。それらでは酵素活性の減少は観察できなかった。したがって、この結果から溶液中のタンパク質は大気圧プラズマの照射によって失活することがわかりました。

第四章では、プラズマ誘起液中化学プロセスにおけるアミロイドβ線維の変質を調べた。アルツハイマー病と関連する老人斑の主要成分であるアミロイドβ線維をターゲットに、大気圧プラズマの作用の新たな利用原理を開発することを目的に実験を行った。使用したアミロイドβ線維は、アミロイドβ1-40ペプチドをin vitroで線維化させたものを使用した。実験はプラズマを照射する時間を変えて行い、照射時間に伴うアミロイドβ線維の変化を種々の方法で観察した。結果の1つ目として、プラズマ照射にしても線維には形状や線維長、分子量、線維量といったマクロな変化は観察されなかった。形状と線維量は30分プラズマ照射した線維のTEM像から観察した。その結果形状に大きな変化はなく、アミロイド線維の特徴である螺旋もプラズマ照射後にもはっきりと観察された。線維長は十分な線維の長さをTEM像から算出し、

線維長分布を求めたが、プラズマ照射前後に変化は見られなかった。分子量は 0-20 min プラズマ照射した線維を Native-PAGE/Western blotting によって計測した。どのサンプルにもモノマーやオリゴマーとなつたものではなく、線維の分子量は変化していなかった。線維量は光散乱から求め、波長 350 nm における吸光度から定量した。その結果、線維の量に比例して、波長 350 nm における吸光度は増加するが、一定量の線維にプラズマ照射しても吸光度に変化は見られなかった。以上の結果よりプラズマ照射にしても線維には形状や線維長、分子量、線維量といったマクロな変化は起こらないことがわかった。マクロな変化は起きていないアミロイド  $\beta$  線維のプロテアーゼ耐性を調べた。プロテアーゼにはリシンおよびアルギニンのカルボキシル基側を特異的に加水分解するトリプシンを用いた。0-30 min プラズマ照射したアミロイド  $\beta$  線維にトリプシンを加え、24 h 常温で静置した後の波長 350 nm における吸光度を調べると、プラズマ照射時間に伴って吸光度が減少しており、20 および 30 min でその値は約 30 %減少していた。この結果はプラズマ照射されたアミロイド  $\beta$  線維のみがトリプシンの分解を受けたことを意味しており、プラズマ照射によってプロテアーゼ耐性が喪失してことを示している。実際に 30 min プラズマ照射したアミロイド  $\beta$  線維をトリプシン分解後に AFM にて観察すると球状の凝集体となっていた。トリプシンはリシンおよびアルギニンのカルボキシル基側を特異的に加水分解するが、アミロイド  $\beta$  1-40 ペプチドにはリシンが2残基、アルギニンが1残基しかなく、アミロイド  $\beta$  1-40 ペプチド自体に疎水性アミノ酸残基が多く含まれることから、トリプシン分解によって生成されたペプチドも難溶性であると考えられる。つまりトリプシン分解されたアミロイド  $\beta$  1-40 ペプチドが凝集し、球状の凝集体となったのだろう。プラズマ照射していないアミロイド  $\beta$  線維はトリプシン分解後も線維状を残していたことからプラズマ照射によってプロテアーゼ耐性が喪失してことを明示することができた。

## 審 査 の 要 旨

### 〔批評〕

著者によって、生体分子に対するプラズマ誘起液中化学プロセスが解明された。定量的な解析手法は今後より発展していくと考えられるプラズマ医療の研究開発に広く応用可能であり、今後の発展に寄与することが見込まれる。

### 〔最終試験結果〕

平成 26 年 2 月 14 日、数理物質科学研究科学学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

### 〔結論〕

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士(工学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。