

《様式B》

研究テーマ 「大気圧低温プラズマ照射によるアミノ酸・ペプチドの反応とその機構評価」

研究責任者 所属機関名 岐阜薬科大学

官職又は役職 助教

氏名 高須 蒼生 メールアドレス takasu-so@gifu-pu.ac.jp

共同研究者 所属機関名

官職又は役職

氏名

(令和6年度募集) 第37回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1,000字程度)

大気圧低温プラズマ (NTP) は、創傷治癒、止血、抗腫瘍作用、殺菌、食品の品質保持など幅広い応用が期待されている。一方で、NTP が液相中で生じさせる活性酸素種・活性窒素種が、生体分子にどのような化学変化を引き起こし、生理活性や副反応に結びつくのかは十分に解明されていない。本研究では、申請時点までに見出していたメチオニン減少、2種類の主要生成物、および HClO 関与の可能性を出発点に、含硫アミノ酸メチオニンとメチオニン残基を含むペプチド・タンパク質を対象として、NTP 照射後の反応生成物を LC-MS/MS で解析した。さらに、関連研究でトリプシン消化を用いたプロテオミクス解析条件が整い、タンパク質由来ペプチドの測定が可能となったため、当初の短鎖ペプチド評価を、より生体内状態に近いモデルタンパク質評価へ発展させた。

遊離メチオニンでは、NTP 照射によりメチオニンスルホキシドおよびデヒドロメチオニンが生成することを確認した。溶液組成の影響を検討した結果、Cl⁻を含む条件でデヒドロメチオニンの生成が増加し、次亜塩素酸ナトリウム処理でも同一生成物が得られたことから、NTP 照射時に生成する HClO がこの反応経路に関与することが示された。また、pH により生成物比が変化し、反応場の条件が活性種の生成とメチオニンの反応選択性を左右することが明らかとなった。さらに、アスパラギン酸様生成物の検出により、NTP によるメチオニン反応が単純な酸化にとどまらず、脱メチル化等を含む複数経路で進行する可能性が示された。

次に、牛血清アルブミン (BSA) をモデルタンパク質として NTP 照射後にトリプシン消化し、得られたペプチドを評価したところ、照射時間に応じて BSA 由来ペプチドの検出量

が低下し、タンパク質の構造変化または化学修飾が示唆された。とくにメチオニン残基は短時間で酸化され、メチオニンスルホキシド化ペプチドが増加したほか、硫黄脱離を伴うホモセリン生成に対応するペプチドも検出された。NTP 照射下でタンパク質中メチオニン残基からホモセリン生成を確認したことは新しい知見であり、遊離アミノ酸で見出した反応が生体高分子中でも展開されることを示す。

以上より、NTP の作用は、溶液成分、pH、分子の存在状態に依存する多様な化学反応の総和として理解する必要があることが明らかとなった。本成果は、NTP の生理作用および副作用の分子基盤を理解するうえで重要であり、医療、食品、バイオ材料処理における安全で効果的な照射条件の設計に資する基礎知見となる。細胞影響との対応は現在検討中であり、今後は細胞培養液や細胞内成分を含む複雑な系へ解析を拡張し、化学変化と細胞応答との関係を明らかにすることで、NTP の活性制御や反応選択的利用への展開が期待される。

2. 実施内容および成果の説明 (A 4 で、5 ページ以内)

【研究目的】

大気圧下で生成可能な低温プラズマ (NTP) は、医療分野では創傷治癒、止血、抗腫瘍作用、食品分野では殺菌や鮮度保持などへの応用が期待されている。これらの作用には、NTP 照射により液相中で生じる活性酸素種・活性窒素種が関与すると考えられているが、どの活性種がどの生体分子と反応し、どのような化学変化を介して活性発現や副反応につながるのかは未解明な点が多い。NTP を安全かつ有効に利用するためには、生体関連分子に対する反応機構を分子レベルで明らかにする必要がある。

本助成開始前までに我々は、NTP に対して高い反応性を示す含硫アミノ酸であるメチオニンに着目し、NTP 照射によりメチオニンが減少し、メチオニンスルホキシドおよびデヒドロメチオニンが生成することを見出していた。また、過酸化水素や一重項酸素による単純な酸化とは異なり、Cl⁻存在下で生成する HClO を介した反応経路が関与する可能性を示していた。一方、生体内のメチオニンは遊離アミノ酸としてだけでなく、ペプチドやタンパク質中の残基として存在している。そのため、遊離メチオニンで観測された反応がペプチド・タンパク質中でも生じるのか、また分子の存在状態によって反応性がどのように変化するのかを明らかにすることが重要である。

申請時には、これらの知見を 2-5 残基程度のモデルペプチドへ展開する計画であった。その後、並行して進めていた関連研究により、トリプシン消化後のタンパク質由来ペプチドを LC-MS/MS で評価するプロテオミクス解析条件の検討が進み、測定が可能となった。そこで、単純なモデルペプチドに限定するよりも、実際の生体分子の存在状態やタンパク質機能変化との関係を検討しやすいと判断し、BSA をモデルタンパク質として用いる方針に発展させた。

そこで本研究では、第一に遊離メチオニンに対する NTP 反応について、溶液中の Cl⁻および pH が生成物分布に与える影響を評価し、関与する活性種と反応経路を検証した。第二に、当初計画したペプチド評価を発展させ、メチオニン残基を含むモデルタンパク質に NTP を照射し、トリプシン消化で得られるペプチドを指標としてタンパク質中メチオニン残基の化学修飾を LC-MS/MS により解析した。これらにより、NTP による含硫生体分子の反応機構を、遊離アミノ酸からタンパク質まで連続的に理解することを目的とした。

【実験方法】

NTP の発生にはプラズマ照射システム (PN-120 TPG, NU Global, Nagoya, Japan) を用い、アルゴンガスを 2.4 L/min で供給した。メチオニン水溶液は、超純水、NaCl 水溶液、リン酸緩衝液、PBS など各種条件で調製し、200 μ L の試料に NTP を照射した。照射後の反応溶液を回収し、LC-MS/MS によりメチオニンおよび反応生成物を分析した。反応機構の比較検証として、次亜塩素酸ナトリウム、過酸化水素、一重項酸素などを用いた酸化実験も行った。

タンパク質試料には牛血清アルブミン (BSA) を用いた。BSA を超純水または酢酸リンゲル溶液に溶解し、0~30 秒間 NTP を照射した。照射後試料をトリプシン消化し、得られたペプチドを LC-MS/MS に供した。測定には SCIEX 3200QTRAP、Agilent 6460 Triple Quad LC/MS、SCIEX Triple Quad 7500 Plus などを使用し、生成物の同定、ペプチドピークの変化、およびメチオニン残基の修飾を評価した。

【結果 1：遊離メチオニンの反応機構評価】

メチオニンに NTP を照射すると、主要生成物としてメチオニンスルホキシドおよびデヒドロメチオニンが観測された。溶液組成の影響を検討したところ、Cl⁻を含む溶液中でデヒドロメチオニンの生成が顕著に増加した。また、次亜塩素酸ナトリウムによる処理でも同一生成物が確認された一方、過酸化水素や一重項酸素では同様の生成挙動は限定的であった。これらの結果から、Cl⁻存在下で NTP 照射により生成する HClO が、デヒドロメチオニン生成に強く関与すると考えられた。

pH 依存性を評価した結果、pH 上昇に伴いデヒドロメチオニンの生成量は増加し、メチオニンスルホキシドは減少する傾向が認められた。一方、強塩基性条件ではデヒドロメチオニン生成が抑制される傾向もみられた。また、メタノール中では一重項酸素酸化によりデヒドロメチオニンが生成した。これらの結果から、NTP 照射で生じる活性種の種類、存在比、安定性は反応場の pH により変化し、さらに活性酸素種の反応性も溶媒環境に左右されることが示唆された。その結果として、メチオニンの反応選択性が変化すると考えられた。

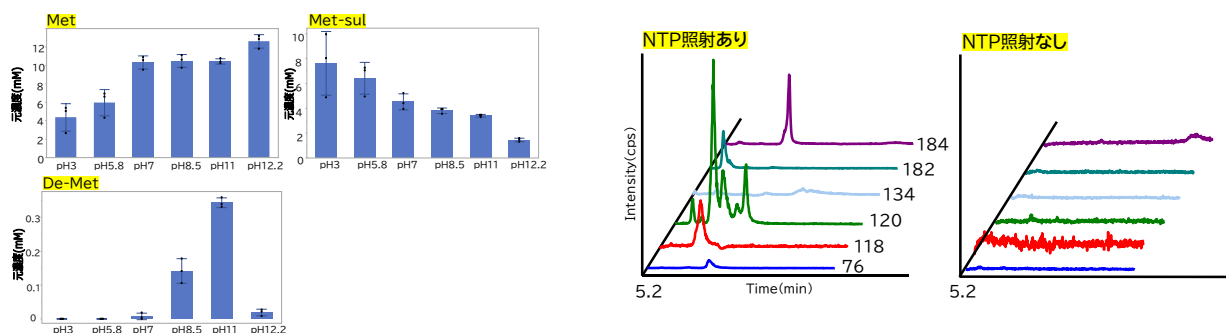


図 1 メチオニンへの NTP 照射、pH の影響と様々な生成物の探索

さらに、主要生成物以外を対象とした探索的解析を行ったところ、アスパラギン酸と保持時間およびフラグメントイオンが一致するピークが検出された。この生成物はメチオニンの脱メチル化に由来する可能性があり、NTP によるメチオニン反応が酸化反応のみではなく、脱硫、脱メチル化等を含む複数の経路で進行することを示唆している。他のアミノ酸（グルタミン酸）においても、NTP 照射によりアスパラギン酸が生成することが確認され、この反応経路の存在が支持された。

【結果 2：ペプチド・タンパク質中メチオニン残基の反応評価】

申請時には 2-5 残基程度のペプチド評価を想定していたが、トリプシン消化後のタンパク質由来ペプチド解析が可能となったため、より生体内のタンパク質状態に近い BSA をモデルとして検討した。BSA に NTP を照射し、トリプシン消化後のペプチドを LC-MS/MS で解析したところ、照射時間の延長に伴い BSA 由来ペプチド全体の検出量が低下した。この結果は、NTP 照射により BSA が立体構造変化、部分分解、または化学修飾を受け、トリプシン消化効率やペプチド検出挙動が変化したことを示唆している。

とくにメチオニン含有ペプチドに着目すると、短時間の NTP 照射で未修飾メチオニン残基を含むペプチドが減少し、メチオニンスルホキシド化ペプチドが増加した。したがって、タンパク質中においてもメチオニン残基は NTP に対する主要な反応部位の一つであることが明らかとなった。

さらに、NTP 照射後の BSA 由来ペプチドから、メチオニン残基の硫黄脱離に伴うホモセリン生成に対応する質量変化を持つペプチドが検出された。NTP 照射下でタンパク質中メチオニン残基からホモセリン生成が確認されたことは新しい知見であり、遊離メチオニンで見出された複数経路の反応が、ペプチド・タンパク質中でも成立し得ることを示している。

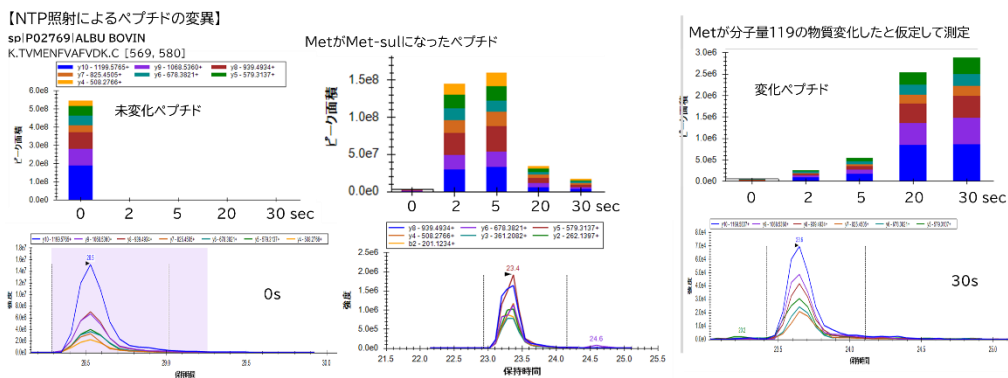


図 2 NTP 照射による BSA の変化

【考察】

本研究により、NTP の生体関連分子への作用は単純な酸化反応だけでは説明できず、Cl⁻の有無、pH、分子の存在状態といった反応場の条件に応じて複数の経路を取ることが明らかとなった。遊離メチオニンでは、Cl⁻存在下で HClO を介したデヒドロメチオニン生成が促進され、pH によってメチオニンスルホキシドとの生成比が変化した。さらに、アスパラギン酸様生成物の検出は、NTP による反応が酸化以外の分子変換を含むことを示している。

一方、BSA を用いた解析では、タンパク質中メチオニン残基も NTP 照射により速やかに修飾されることが示された。メチオニンスルホキシド化に加え、ホモセリン生成に対応する変化が検出されたことから、NTP はタンパク質中のアミノ酸残基に対して多面的な化学変化を引き起こすと考えられる。これは、NTP による細胞応答やタンパク質機能変化を理解するうえで、個々の活性種の同定だけでなく、標的分子の状態や周囲の溶液環境を含めて評価する必要があることを示している。また、NTP 照射後には BSA 由来ペプチドの検出量が大きく低下した。共同研究で行った電気泳動実験でも、タンパク質バンドが消失する傾向が確認されており、NTP 照射によりタンパク質の分解、凝集、または検出性を変化させる修飾が生じている可能性がある。細胞内で同様の反応がどの程度進行するのか、またそれが細胞応答や活性発現にどのように関与するのかについては、今後さらに検討する必要がある。

申請時には、選択的な抗酸化剤を用いた機構評価も想定していた。しかし、細胞やタンパク質機能への実際の影響との関係を見出すためには、候補活性種を個別に阻害する前段階として、NTP 照射でどのような分子変換が実際に生じるのか、またその反応がタンパク質中でも起こるのかを明らかにすることが重要であると判断した。そのため本年度は、生成物の同定、HClO など主要候補活性種との比較、およびタンパク質中メチオニン残基への展開を優先した。

本成果は、NTP を医療、食品、バイオ材料処理へ応用する際に、どのような条件でどの反応が優先されるかを考えるうえで重要である。たとえば、特定のアミノ酸残基の酸化や修飾が NTP の生理活性に関与する場合、その反応を制御することで、より選択的な治療法、食品加工、材料表面処理の開発につながる可能性がある。また、タンパク質や細胞内成分に生じる副反応を把握することは、安全性向上や過剰な損傷の低減にも寄与すると考えられる。

【今後の展望】

細胞影響との対応については現在検討を進めている段階であり、今後は、細胞培養液、血清成分、細胞抽出物など、より複雑なマトリックス中で同様の反応がどの程度進行するかを明らかにする。また、観測されたメチオニン修飾やタンパク質変化が、細胞死誘導、抗酸化応答、酵素活性変化などの生理活性とどのように対応するかを検証する必要がある。未同定生成物の構造解析を進め、必要に応じて選択的抗酸化剤や活性種捕捉剤を組み合わせることで、NTPの作用機序の全体像をより詳細に理解できると考えられる。これらの研究の進展により、NTPの反応制御技術、医療応用条件の最適化、食品・バイオ材料分野での安全な利用条件の設計につながることを期待される。

【研究成果の公表状況】

1. 高須蒼生, 大気圧低温プラズマ照射によるメチオニンの反応と酸化機構評価, プラズマサミット in 岐阜 (2025 プラズマの日), 岐阜, 2025年6月20日.
2. 片桐今日華, 高須蒼生, 大塚智裕, 原宏和, 江坂幸宏, 大気圧低温プラズマ照射によるメチオニンの反応機構の解明, 日本薬学会第146年会, 大阪, 2026年3月26-30日.

関連論文:

1. Kosei Fujisawa, Sakura Tanahashi, Kyoka Katagiri, Soo Takasu, Tomohiro Otsuka, Tetsuro Kamiya, Kenji Ishikawa, Yukihiro Esaka, Hirokazu Hara, Non-thermal plasma-activated methionine-containing Ringer's solution enhances cytotoxicity by increasing oxidative stress, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, Advance online publication, 2026, Article ID: 25-241. DOI: <<https://doi.org/10.3164/jcfn.25-241>>

【知的財産・社会実装に関する補足】

現時点では本研究成果に基づく特許出願は行っていない。一方で、NTP照射条件、生成活性種、標的分子変換の関係がさらに明確になれば、反応制御法、処理条件最適化法、医療・食品・バイオ材料処理技術として知財化できる可能性がある。本研究は基礎的段階にあるが、将来的にはプラズマ医療、創傷治療補助、食品加工・殺菌、バイオ材料改質、細胞制御技術などへの展開が期待される。