

低温プラズマにより機能性タンパク質の活性を制御する技術基盤の確立

岐阜薬科大学
原 宏和

1. はじめに

低温プラズマ (non-thermal plasma ; NTP) は、電子、イオン、ラジカル、UV などから成る集合体である。NTP は半導体製造に必須の技術として利用されている。近年、この NTP を農業、環境、医療などの分野に応用する取り組みが進められている。医療分野では、細胞や組織に NTP を照射することで、血液凝固、創傷治癒、抗がん活性などさまざまな生理活性が発揮されることが報告されている[1]。特に、NTP はがん細胞を選択的に死滅させることから、がんの新規治療法として期待されている。このような NTP の生物活性の発現には、NTP が空気中の酸素、窒素、水蒸気などと反応して産生される活性酸素種 (ROS) や活性窒素種 (RNS) が関与していると考えられている。

NTP の抗がん活性は、がん組織や細胞に直接 NTP を照射するだけでなく、NTP を照射した培地 (plasma-activated medium ; PAM) を用いる間接的な NTP 照射によりがん細胞を処理しても発揮される[2]。この細胞死には、PAM に含まれる ROS や RNS による酸化ストレスが関与していると考えられているが、その詳細なメカニズムは完全には解明されていない。

2. NTP 照射によるメチオニン溶液の抗がん活性

NTP 処理したメチオニン (Met) 溶液はがん細胞を強く殺傷する効果を有していることが報告されている[3]。NTP 照射により生成されるヒドロキシルラジカルや過酸化水素 (H_2O_2) などの ROS が Met を酸化・分解し、その酸化・分解産物が細胞傷害活性に関与していると考えられている。NTP 照射 Met 溶液中で S-ニトロソチオールやメチオニンスルホキシドなどの物質が同定されているが、いずれも細胞傷害性を示さなかったことから、現在もその細胞傷害の機序は不明であり、がん細胞の殺傷に関与する物質も同定されていない。本研究では、NTP 照射 Met 溶液が細胞傷害を増強する機序を明らかにするために、NTP 照射 Met 溶液に感受性のある高転移性ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞を用いて検討した。

本研究で使用した NTP 照射システムは、パワーコントローラー/ガス流量レギュレーター、アルゴン (Ar) ガスボンベ、プラズマヘッド (PN-120 TPG、NU グローバル) で構成されている。Ar ガスの流量は 2.4 標準リットル/分 (SLM) とした。溶液への NTP 照射は以下の方法で行った。酢酸リンゲル液 (acetate Ringer's solution ; AR) および 20 mM Met 含有 AR (Met/AR) 200 μ L をホールスライドガラスにのせた後、NTP 照射 (距離 3

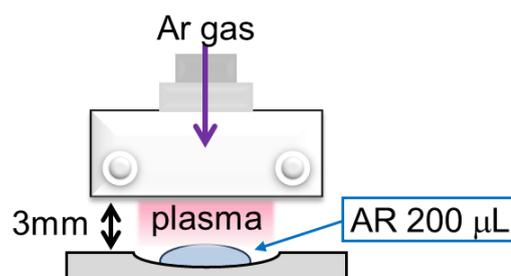


図 1. 溶液への NTP 照射方法

mm) し、プラズマ照射 AR (PAA) およびプラズマ照射 Met/AR (Met/PAA) を調製した (図 1)。溶液中の H₂O₂ を除去する必要がある場合は、PAA および Met/PAA 150 μL にカタラーゼ (Cat ; 5000 U/mL) を 3 μL 添加し、30 分間処理した。作製した PAA と Met/PAA で乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞を処理した後、細胞傷害性を MTT 法により測定した。また、Met/PAA 中に含まれる物質は、high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) により分析した。

Met/PAA は PAA に比較し、強い細胞傷害性を示した。この際、Met/PAA には、細胞傷害性のある H₂O₂ も含まれることから、Cat により H₂O₂ を除去した Cat 処理 Met/PAA の細胞傷害についても細胞傷害活性を測定したが、Cat 処理 Met/PAA でも Met/PAA と同程度の細胞傷害活性を有していた。このことから、NTP により生成する H₂O₂ などの活性種による細胞傷害ではなく、Met が酸化修飾を受け細胞傷害活性を有する新しい物質が生成したのではないかと考えられた。一方、正常細胞であるヒト表皮角化細胞株 HaCaT 細胞に対する Cat 処理 Met/PAA の細胞傷害性は、MDA-MB-231 細胞に比較し弱かったことから、Cat 処理 Met/PAA の効果はがん細胞に特異性があると考えられた。

3. NTP 照射 Met 溶液の分析

我々は、Met が NTP により酸化修飾を受け、細胞傷害活性を有する新しい物質が生成したと考え、LC-MS/MS を用いて Met/PAA 中に含まれる物質の同定を試みた。その結果、我々は主要な成分として、デヒドロメチオニン (De-Met) とメチオニンスルホキシド (Met-sul) を同定した (図 2)。

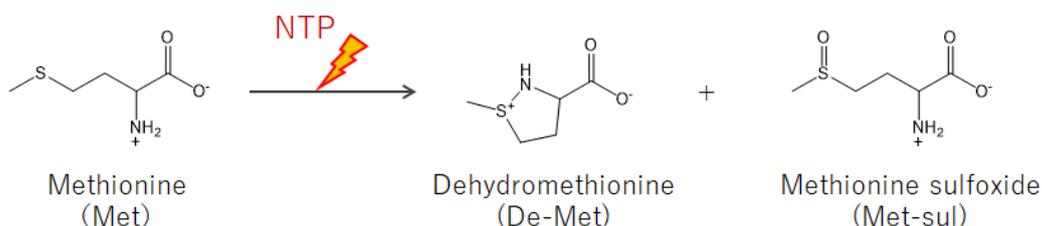


図 2. Met への NTP 照射により生成する Met 酸化修飾体

そこで、これら 2 つの化合物の細胞傷害効果を検討した。Met-sul は以前報告されているように、細胞傷害性を示さなかった。また、De-Met については現在市販品がないことから、合成実験を行ったが、De-Met による細胞傷害は認められなかった。しかし、De-Met については、精製がうまくいかず不純物も入っていることから、De-Met の細胞傷害性については再度検討する必要があると考えている。

一方で、Cat 処理 Met/PAA による細胞傷害は、チオール基を有する抗酸化剤グルタチオン (GSH) や N-アセチルシステイン存在下で抑制された。また、Cat 処理 Met/PAA と還元型 GSH を混合した際、還元型 GSH 量が減少した。これらの結果から、Cat 処理 Met/PAA 中にはチオール基との反応性を有する物質が生成していると考えられた。現在、この物質の同定には至っ

ていないことから、今後、この物質の同定に取り組み、NTP 照射 Met 溶液が細胞傷害を引き起こす機序の詳細を明らかにしていきたい。

4. NTP によるタンパク質の活性制御

タンパク分子内に含まれる Met の酸化修飾により、その機能が変化（活性化あるいは阻害）することが報告されている。カルモジュリンキナーゼ（CaMKII）は、Met の酸化修飾によりキナーゼ活性が亢進する[4]。そこで本研究では、CaMKIIをモデルとして利用し、NTP 照射により CaMKIIの活性制御が可能か検討した。

組み換え CaMKII に NTP を照射（間接）し、NTP 照射後の CaMKII のキナーゼ活性を測定した。CaMKII 活性の測定には、CycLex CaM-kinase II Assay Kit（MBL ライフサイエンス）を使用した。AR に NTP を照射して作製した PAA で組み換え CaMKII を処理したとき、NTP 未照射の AR に比較し CaMKII の活性が増大する傾向を示した。しかし、抗 oxidized CaMKII 抗体を用いたウエスタンブロット法により CaMKII の Met 酸化状態を解析したが、PAA 処理した CaMKII において、その活性制御部位に存在する Met の酸化状態の変化は確認できなかった。CaMKII の活性化に対する PAA (NTP 間照射) の効果が弱かったことから、ウエスタンブロット法では Met の酸化状態の変化を十分に検出できなかったのかもしれない。今後は、プラズマジェットを用いた直接照射法を採用するなど異なるプラズマ源を利用し、CaMKII のみならず他のタンパク質の活性制御についても NTP 照射の効果を検証することで、NTP を利用したタンパク質の活性制御技術の開発に取り組んでいきたい。

5. まとめ

本研究では、NTP 照射により、Met の酸化修飾が促進すること、まだ未同定ではあるが細胞傷害活性を有する Met 酸化誘導体が生成することを示した。また、この NTP 照射 Met 溶液は NTP 照射による細胞傷害とは異なる機序で細胞傷害を引き起こすことも明らかにした。さらに、NTP の独特の非熱的反応により新規化合物を創出することができる可能性が示されたことから、今後、NTP は創薬研究においても有用なツールになることが期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人 天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- 1) Tanaka H, Hori M. Medical applications of non-thermal atmospheric pressure plasma. *J Clin Biochem Nutr* **60**, 29-32, 2017.

- 2) Adachi T, Tanaka H, Nonomura S, Hara H, Kondo S, Hori M. Plasma-activated medium induces A549 cell injury via a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrial-nuclear network. *Free Radic Biol Med* **79**, 28-44, 2015.
- 3) Uchida G, Mino Y, Suzuki T, Ikeda JI, Suzuki T, Takenaka K, Setsuhara Y. Decomposition and oxidation of methionine and tryptophan following irradiation with a nonequilibrium plasma jet and applications for killing cancer cells. *Sci Rep* **9**, 6625, 2019.
- 4) Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJ, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* **133**, 462-474, 2008.