

細胞内のタンパク質を壊さずに 取り出す技術

熊本大学

パルスパワー科学研究所・バイオエレクトロニクス部門

教授 勝木 淳

令和元年9月26日

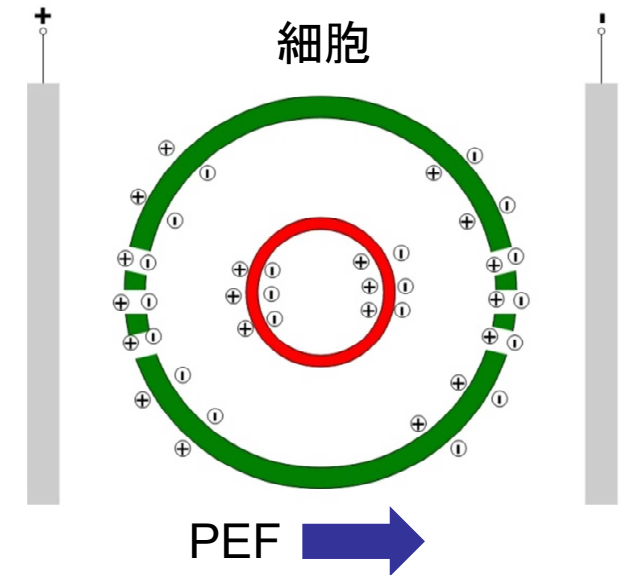
パルス強電界(PEF)は、膜構造を有する対象を**非加熱的(低温)**、物理的、かつ選択的に傷害することによって、膜を介した物質移動を容易にします。

このメカニズムは次のように応用可能です。

- 液体中の微生物の殺滅（殺菌）
- 青果、果皮、微生物などの細胞内成分の抽出

PEF処理は非加熱的かつ物理的であり、対象に含まれるタンパク質などの変性が小さく抑えられます。

⇒対象の品質保持、抽出物の機能性保持



PEFは生体膜に強い力を課します

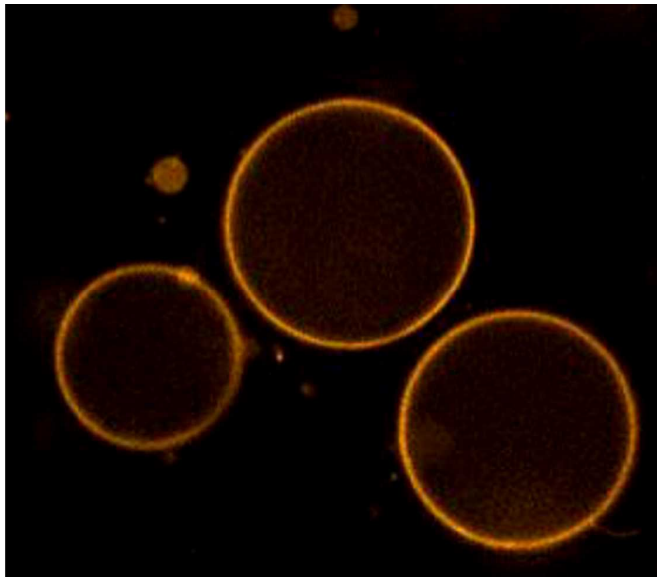


Kumamoto University

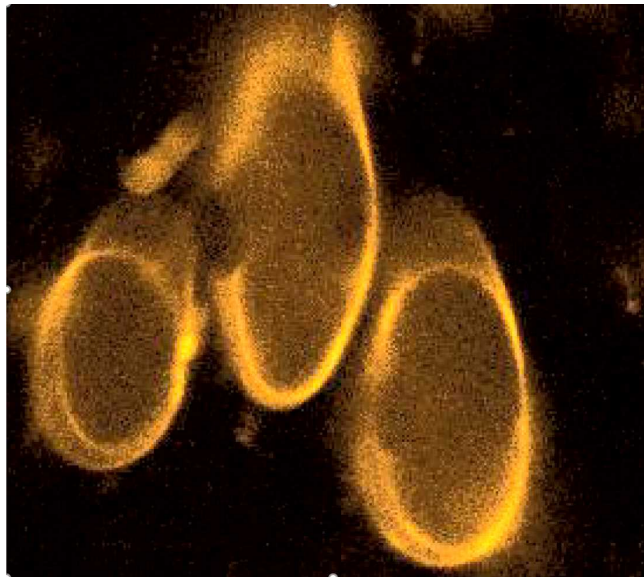
DOPC 膜

露光時間 10 ms

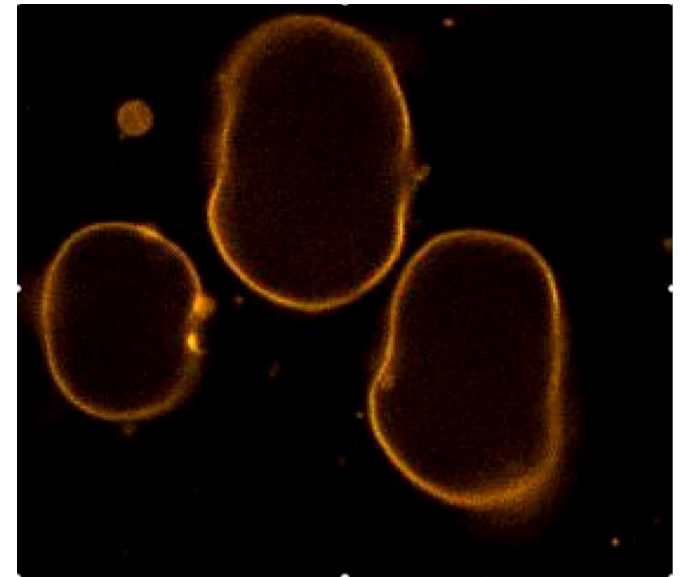
PEF: 20 kV, 10 μ s



PEF印加前



PEF印加 10 ms 後

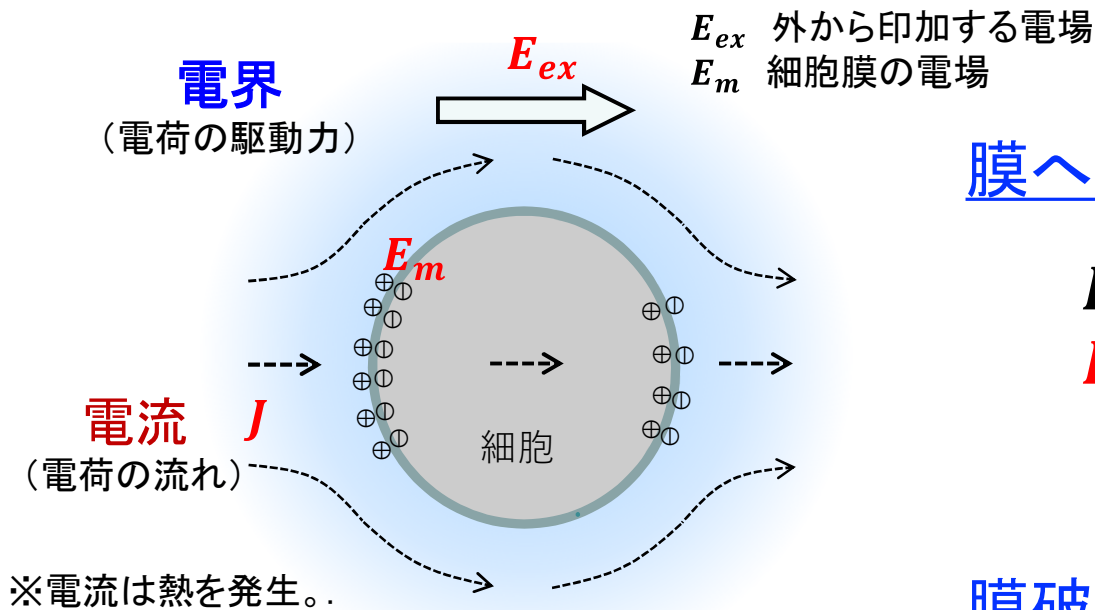


1000 ms 後

細胞膜への電界集中と膜破壊



Kumamoto University



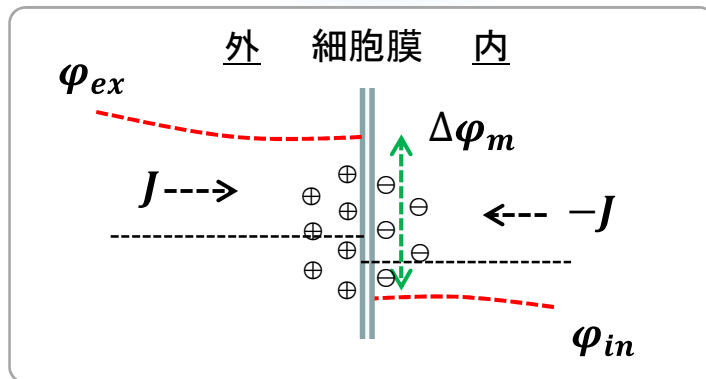
膜への電界集中 $E_m = \frac{\Delta\phi_m}{d} \sim 1000E_{ex}$

$E_{ex} > \text{数 kV/cm}$ を印加すれば、

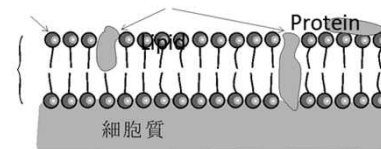
$E_m > 2000 \text{ kV/cm}$

多くの物質は破壊
(電子的、応力)

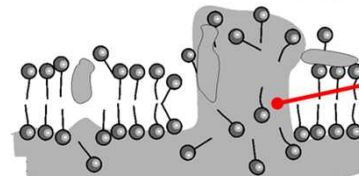
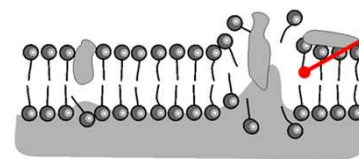
膜破壊、細孔形成 $\Rightarrow$ 物質透過性の亢進



細胞膜は電荷の流れを遮断。
 $\Rightarrow$ 膜表面に電荷蓄積。
 $\Rightarrow$ 膜電界 E_m が増大。



ポア形成(可逆的)

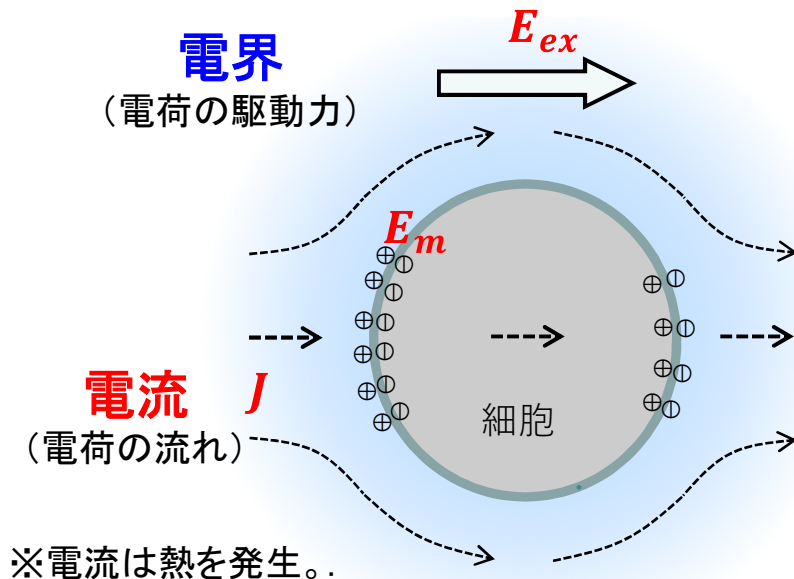


ポア形成(不可逆的)

なぜパルスか？



Kumamoto University



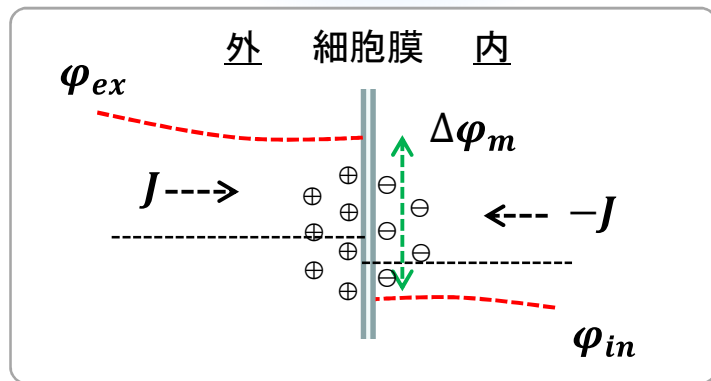
膜ストレス $E_m = \frac{\Delta\phi_m}{d} \sim 1000 E_{ex}$

電流 $\Rightarrow$ ジュール熱による媒体の温度上昇

ジュール熱 $\text{Heat} = \frac{1}{\sigma} J^2 = \sigma E_{ex}^2$

熱エネルギー = Heat・時間 = $\sigma E_{ex}^2 \cdot \text{時間}$

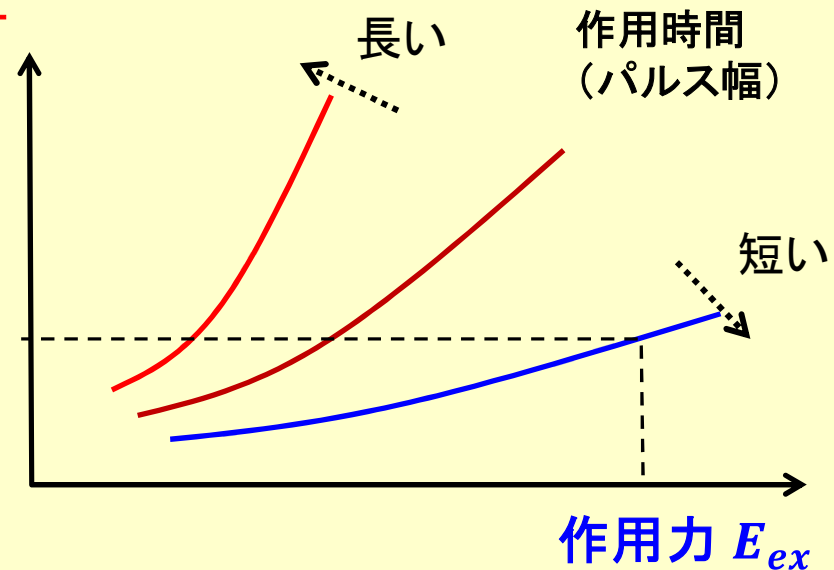
$\rightarrow$ 媒体の温度上昇 ΔT



細胞膜は電荷の流れを遮断。
 $\Rightarrow$ 膜表面に電荷蓄積。
 $\Rightarrow$ 膜電界 E_m が増大。

熱エネルギー
 $\Rightarrow$ 温度 ΔT

$E_{ex}^2 \cdot \text{時間}$

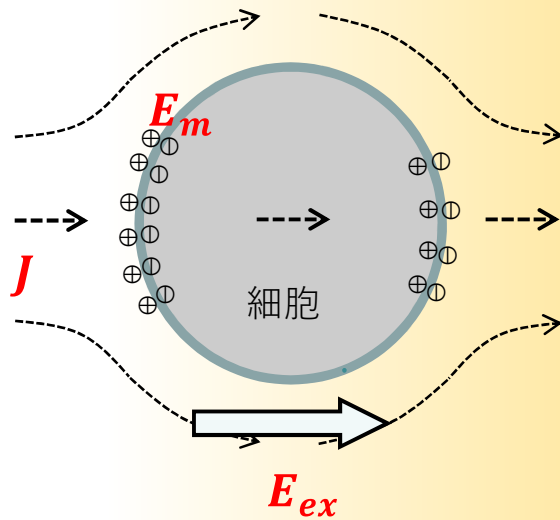


P E F 印加中の作用： 膜充電⇒膜破壊・小孔形成⇒小孔拡大／熱化

E

Time →

膜充電／膜ストレス
⇒ 膜破壊・小孔形成

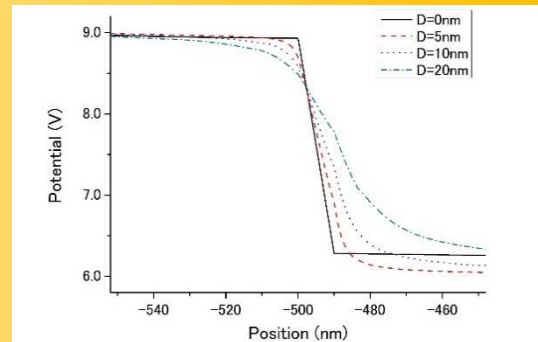
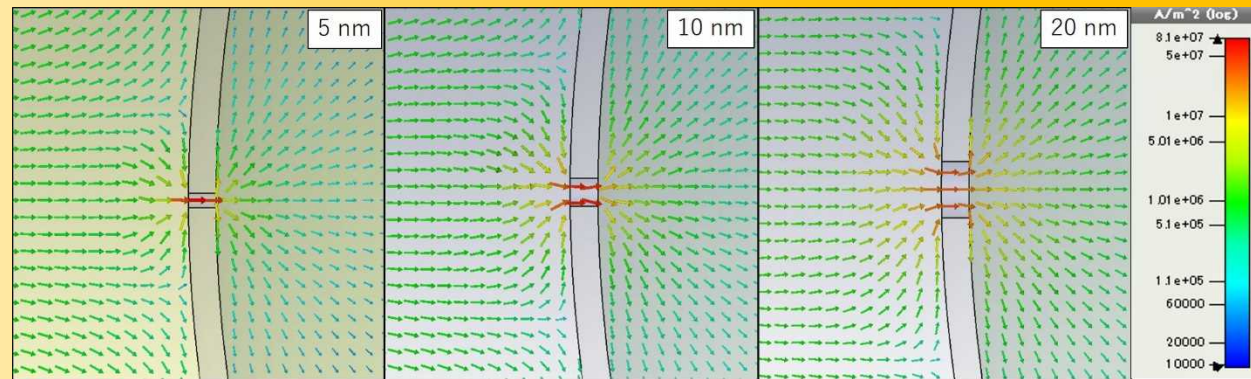


ジュール熱による
媒体の熱化



小孔への電流集中
⇒ 小孔拡大

小孔拡大の緩和

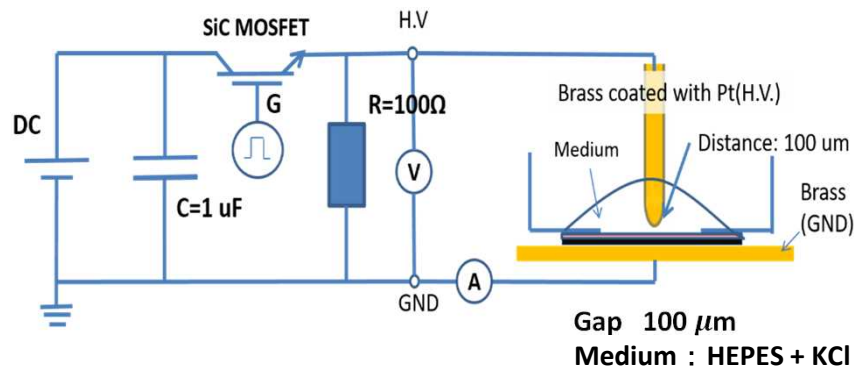


PEFによって膜に形成される細孔

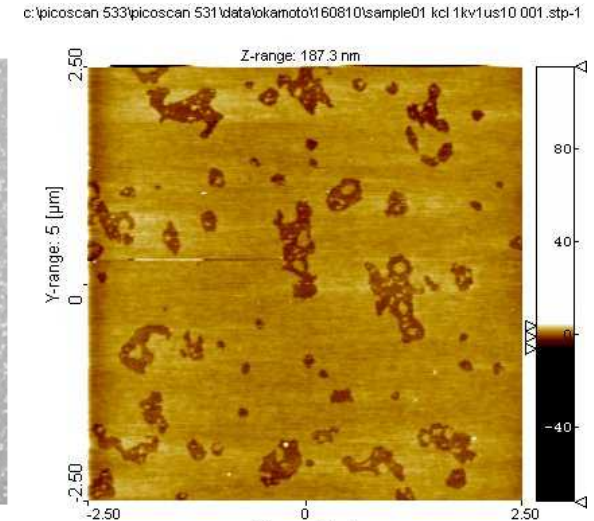
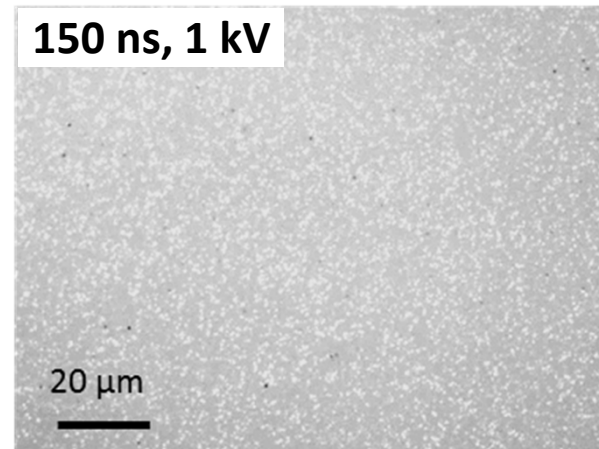


Kumamoto University

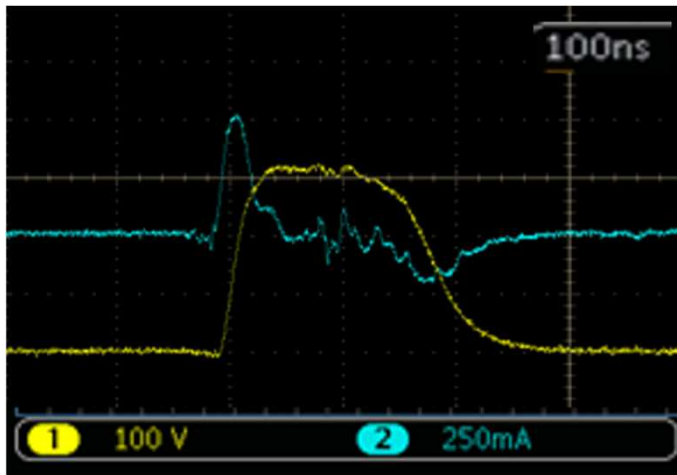
シリコン単結晶基板の酸化膜上に形成した単層リン脂質膜(DOPC)にPEFを印加し、観察。



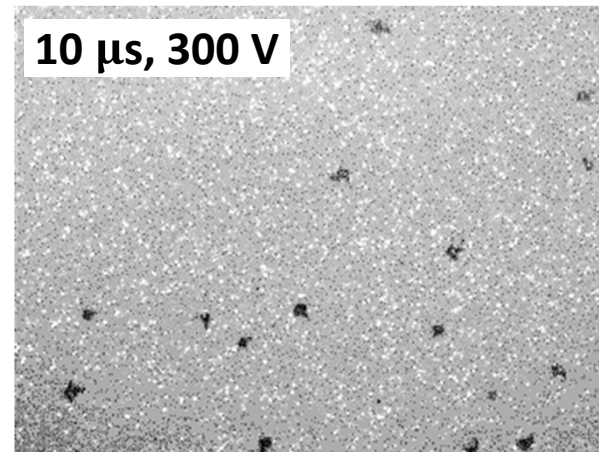
装置概要



AFM 像



電圧・電流波形

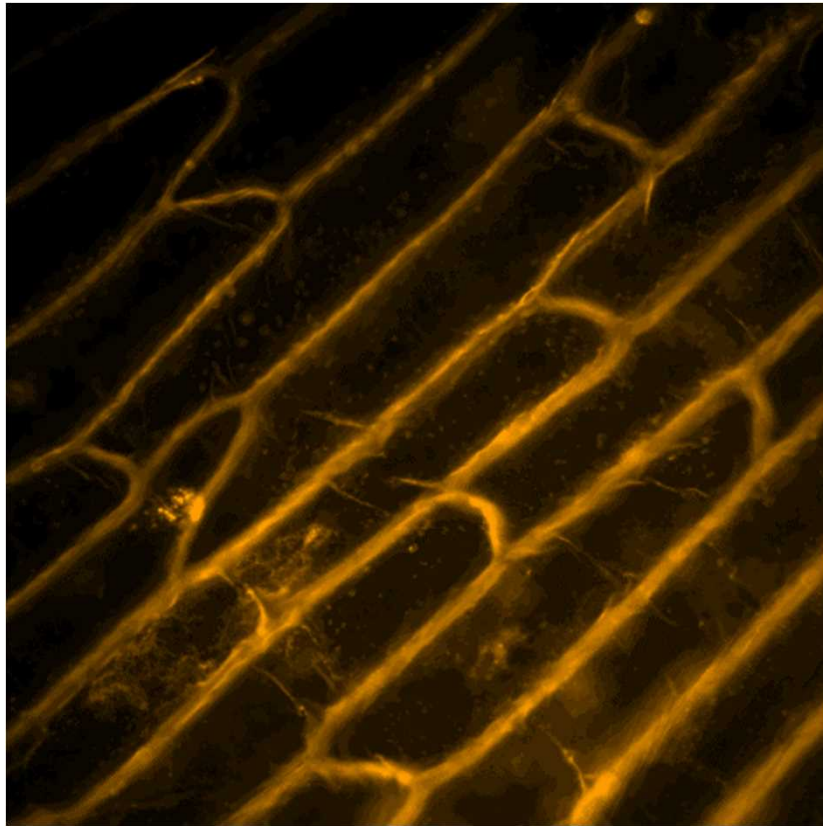


脂質膜の蛍光顕微鏡画像

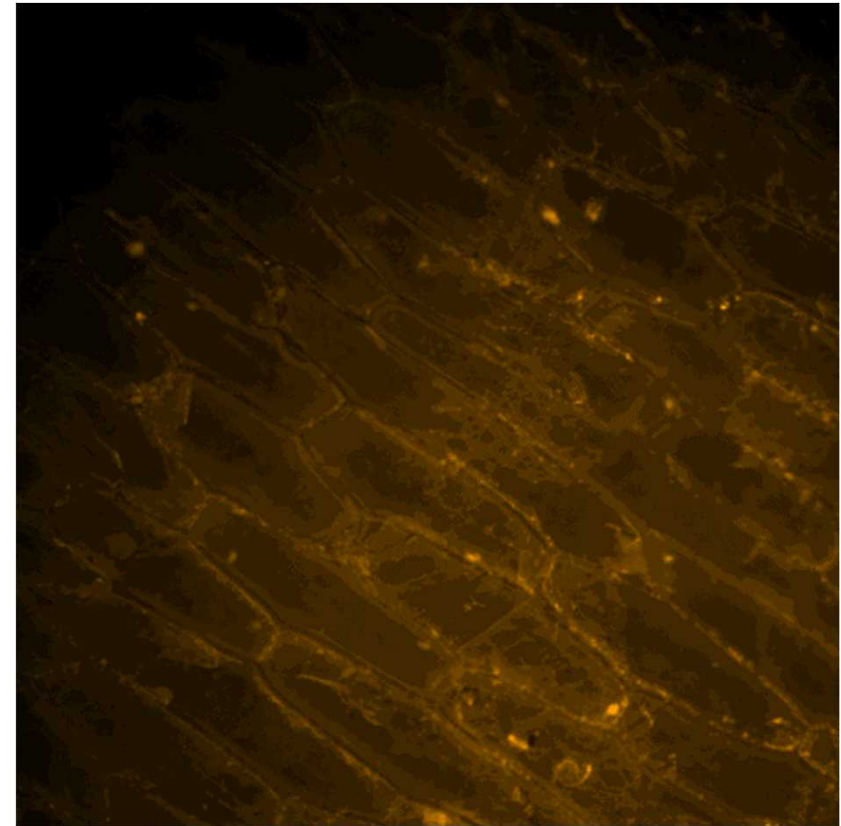
P E F による植物 (たまねぎ) の細胞膜破壊



Kumamoto University



正常な組織



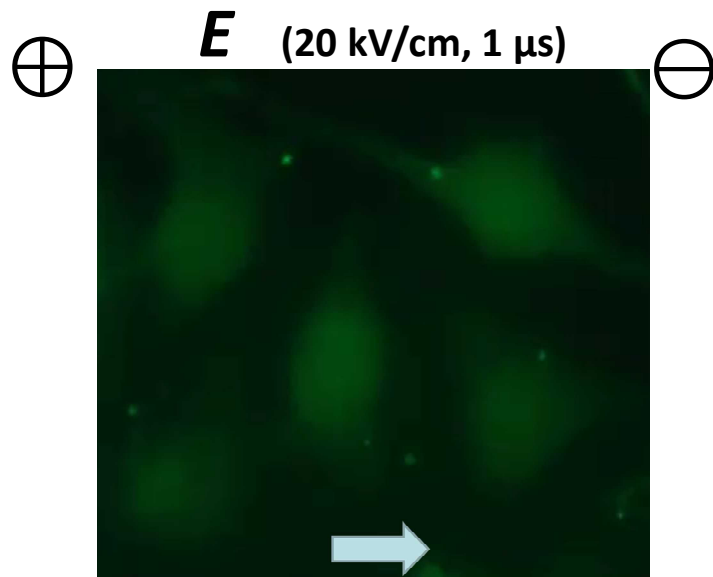
P E F 印加後の組織

細胞膜を染色したたまねぎの蛍光顕微鏡写真

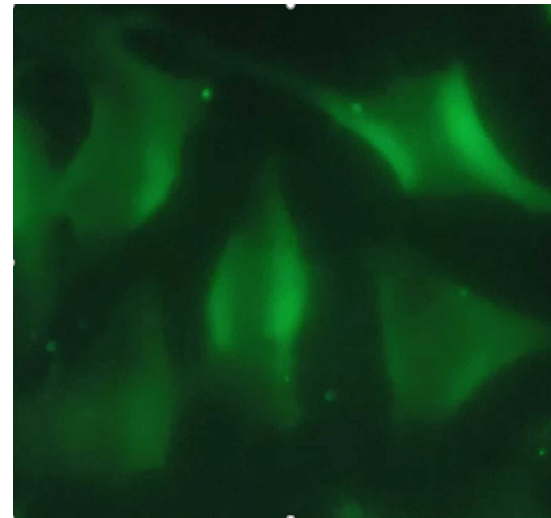
PEF印加後の膜を介した物質輸送



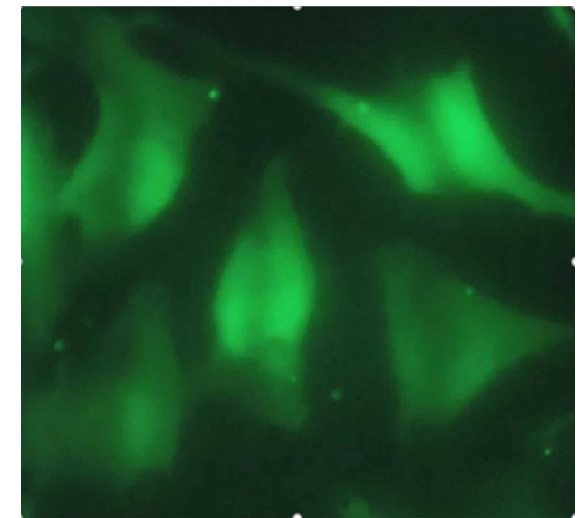
Kumamoto University



Before pulse



30 ms after the PEF

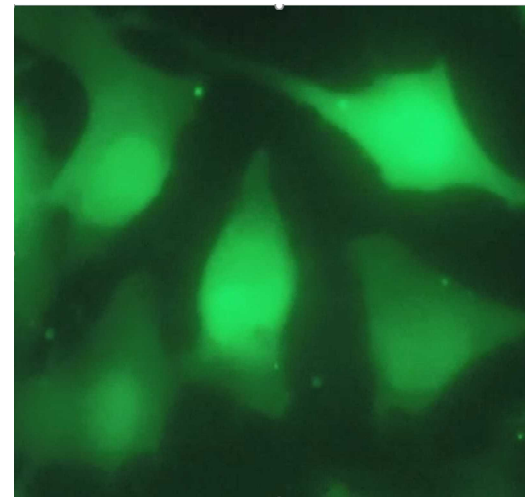


60 ms

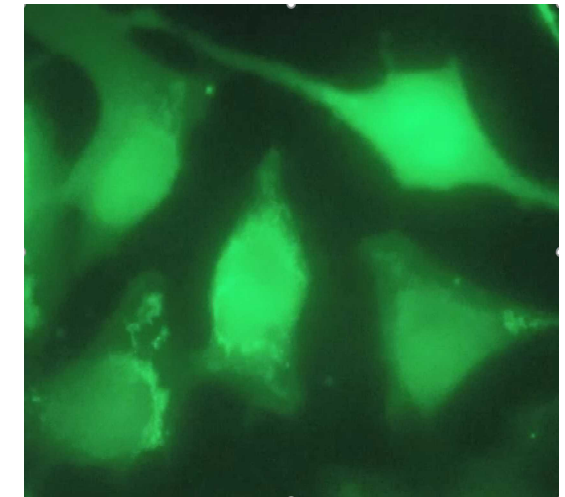
パルスで誘引される過渡的な
イオン輸送 (Ca^{2+})

ヒト子宮頸がん由来
細胞株 (HeLa)

Ca^{2+} 検出蛍光試薬: Fluo-8



210 ms



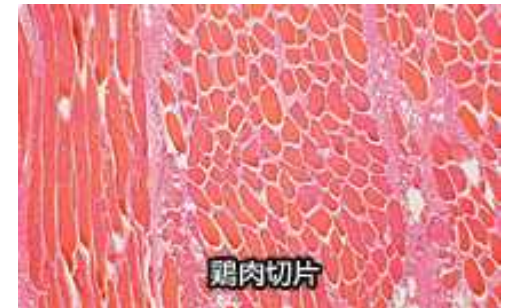
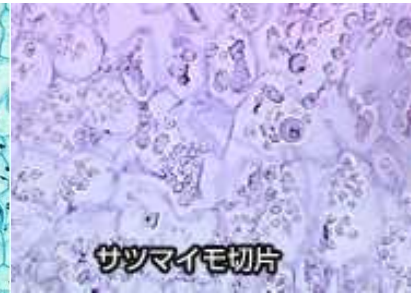
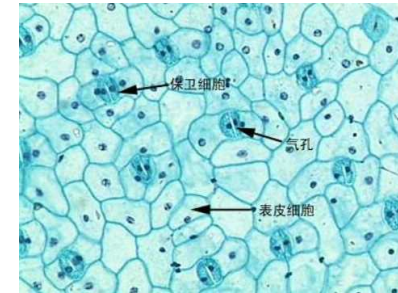
2000 ms



生鮮食品は細胞から成る。

膜破壊

⇒ 膜を介した物質輸送

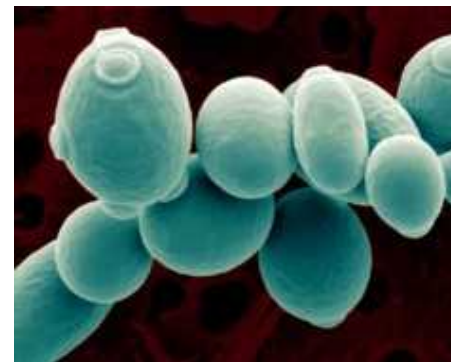


細菌などの微生物も細胞。

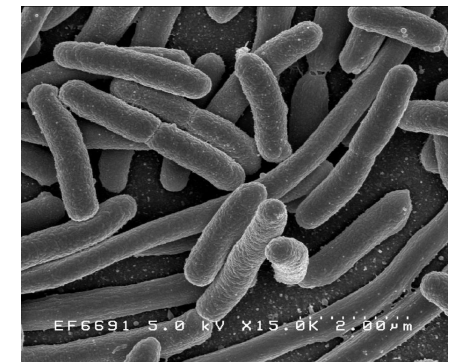
膜破壊

⇒ 膜を介した物質輸送

⇒ 細胞死

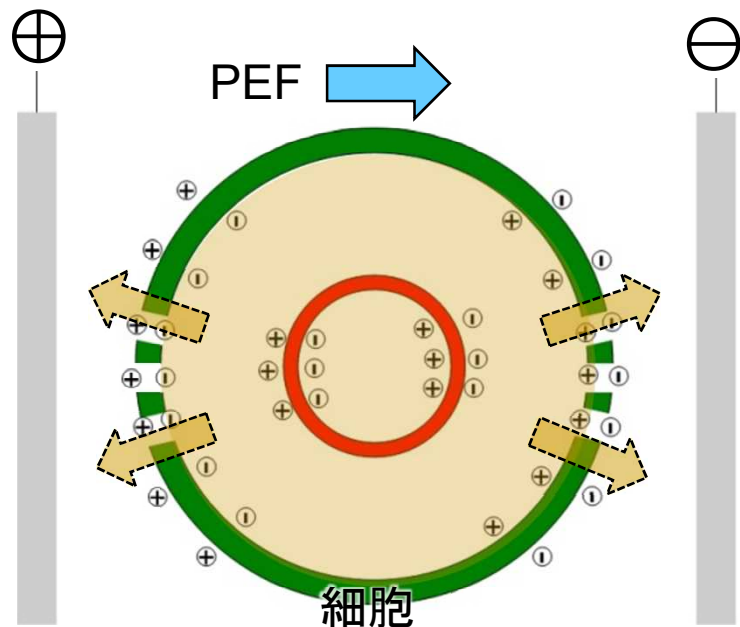


酵母



大腸菌

EscherichiaColi NIAID.jpg



※ 非加熱・非化学処理なので、
ターゲット成分の劣化が小さい。

【多様な応用】

- ① **現行の青果汁抽出法を支援**
⇒ 効率・生産性向上、
低温なら食品機能付加
- ② **残渣から高価値成分を抽出**
⇒ 食材の有効利用
- ③ **細胞内成分を劣化なく抽出**
⇒ 食品、創薬、バイオ技術
- ④ **食品の食感を制御**
⇒ 食品加工
- ⑤ . . .

PEF法の特徴： 非加熱(低温)、物理処理

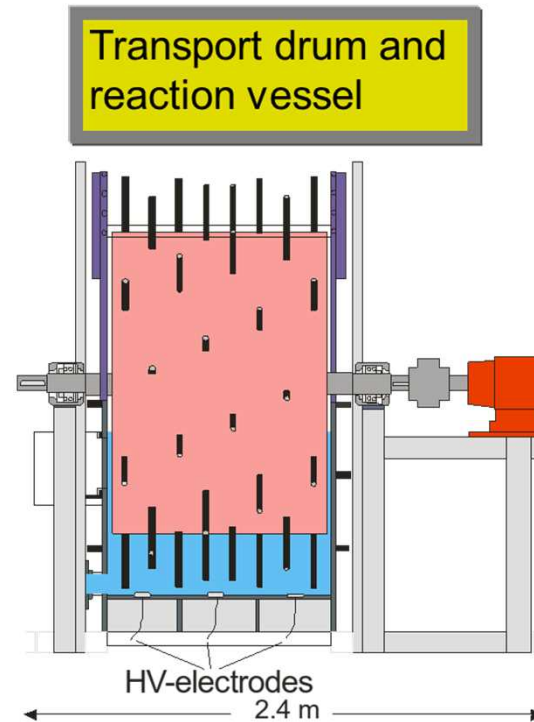
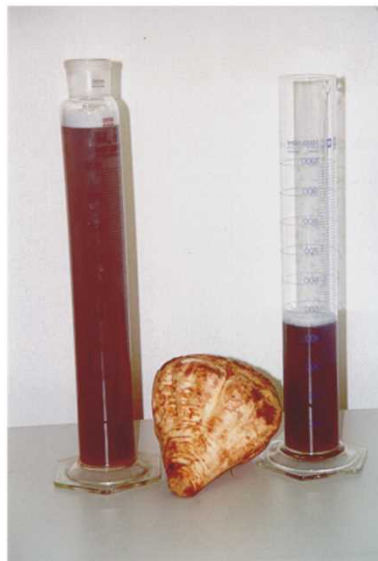
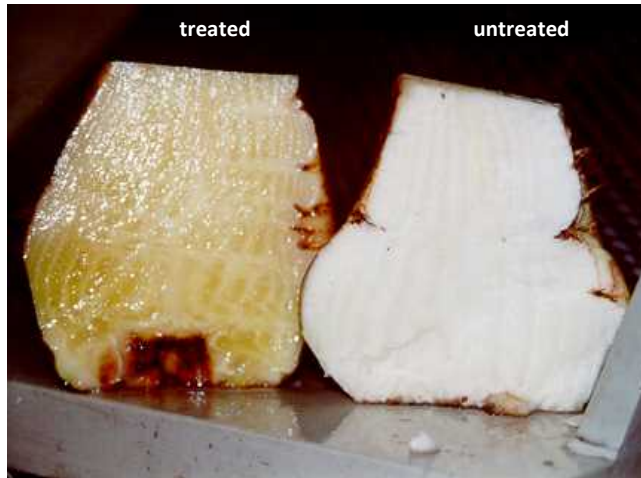
主な対象	目的	既存法	PEF法のメリット
青果汁	食品	加温・圧搾	抽出支援・時短、非破壊、残渣減水
果皮、残渣	食品、医薬品、化粧品	加温・圧搾	抽出支援・時短、非破壊
酵母エキス	食品、医薬品、化粧品、飼料	自己消化、酵素、酸・アルカリ、熱水	非破壊、抽出効率向上
大腸菌など	組換えタンパク質調製	超音波、酵素、界面活性剤	非破壊、抽出効率向上
緑藻類	バイオマス	加熱、溶剤、圧搾	非破壊、抽出効率向上

成分抽出 ⇒ 抽出率向上、残渣減水



Kumamoto University

てんさい(ビート)



H. Bluhm

Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Hochleistungsimpuls und Mikrowellentechnik



パイロット試験機: 36 t/h

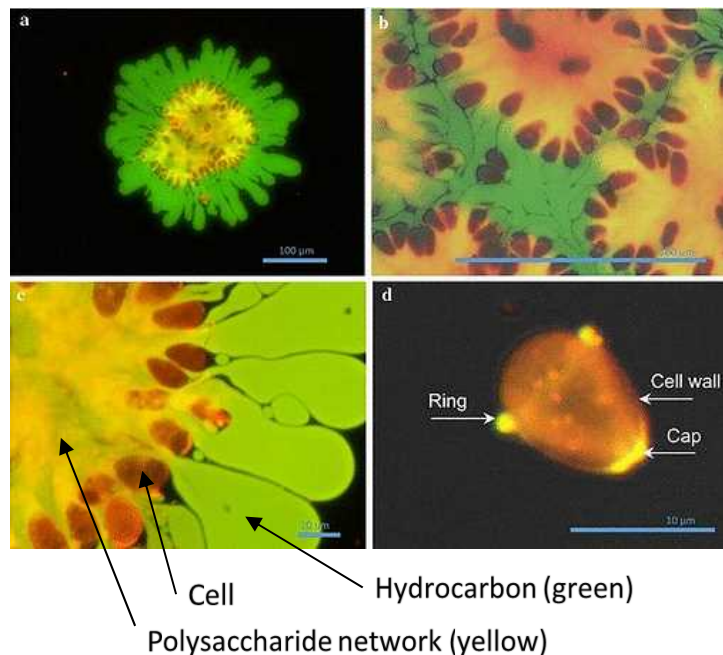
Dr. H. Bluhm:
Institute for Pulsed Power and Microwave Technology,
Forschungszentrum, Karlsruhe, Germany

緑藻類からの炭化水素抽出 バイオマス



Kumamoto University

Botryococcus braunii

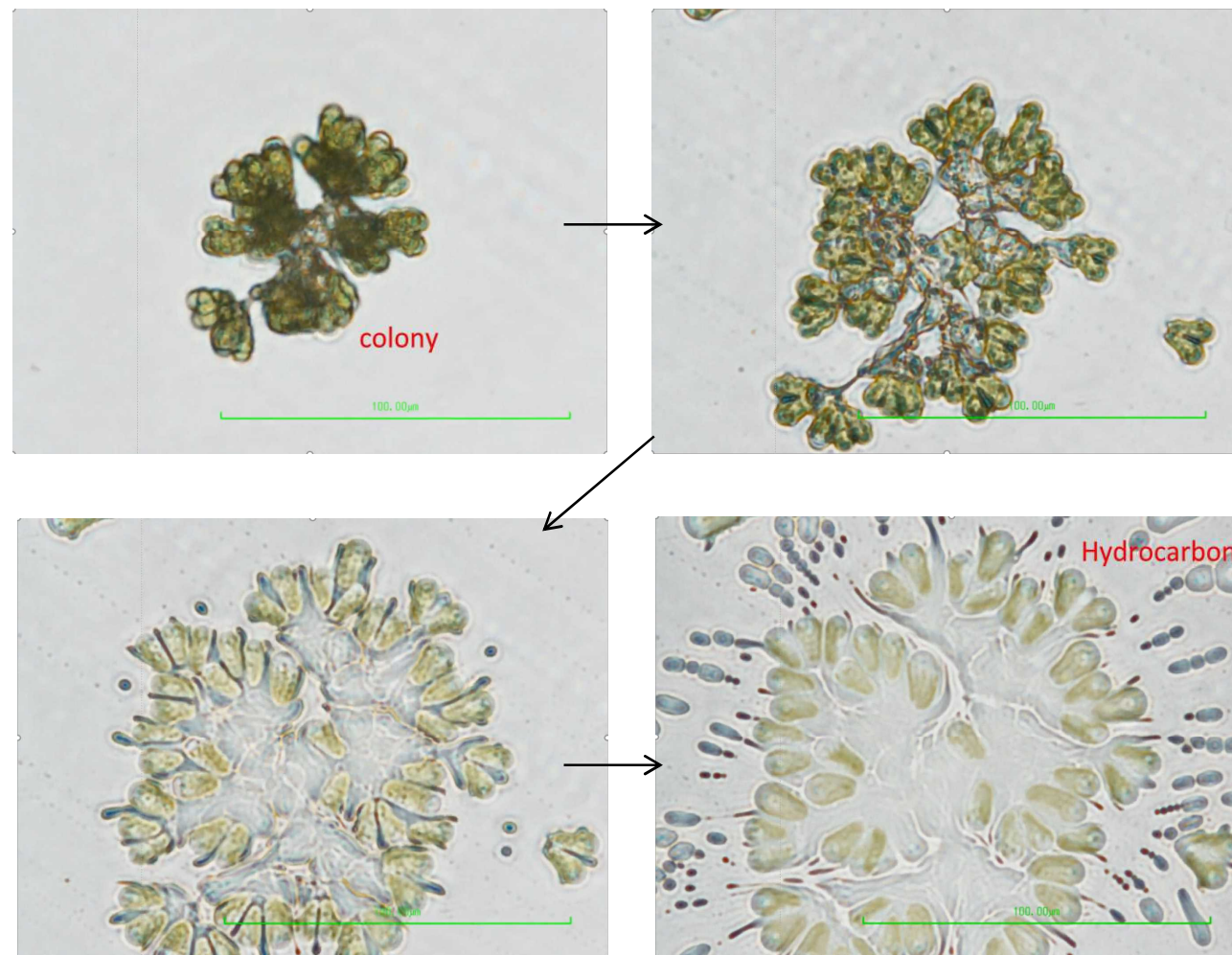


細胞集合体(コロニー)の細胞間
マトリックスに蓄積された炭化水素

現行の炭化水素抽出法

濃縮／加熱／脱水／乾燥／
溶媒抽出／分離

PEF印加による炭化水素の放出

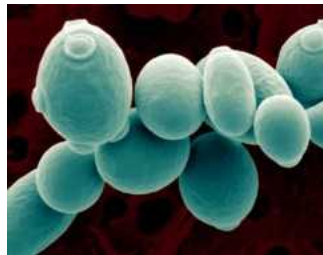


Guionet, Akiyama, Hosseini: Biotechnology for Biofuels (2017)

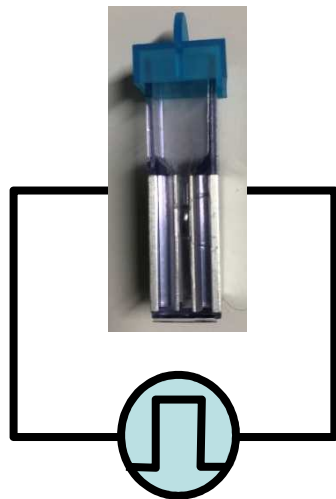
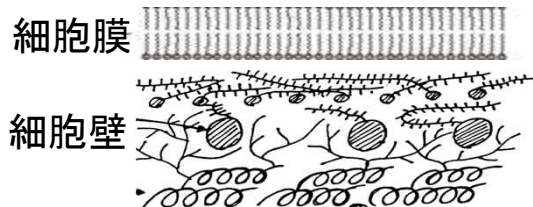
PEFによる酵母エキス抽出



Kumamoto University



yeast

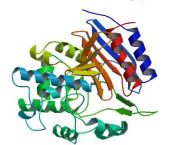


20 kV/cm, 600 ns

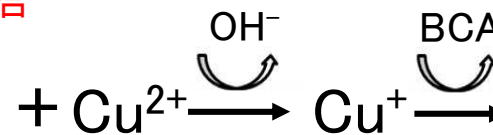
◆抽出量の定量

タンパク質／アミノ酸：BCA法

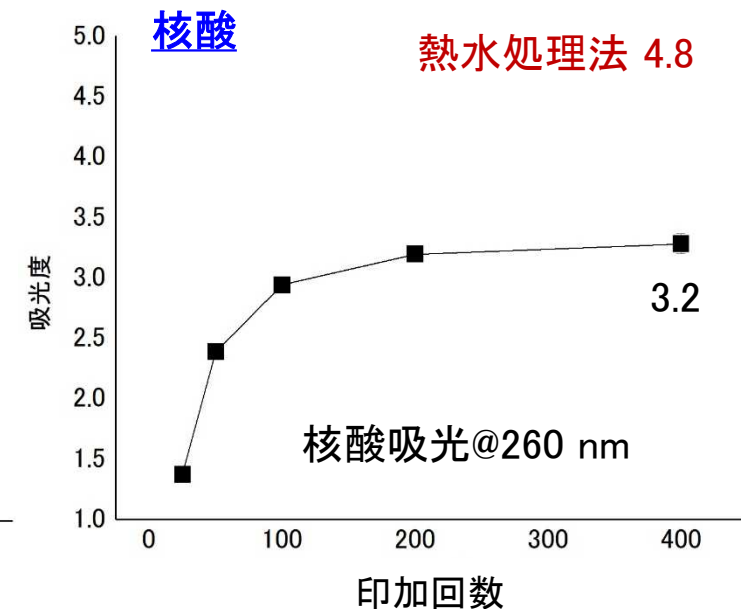
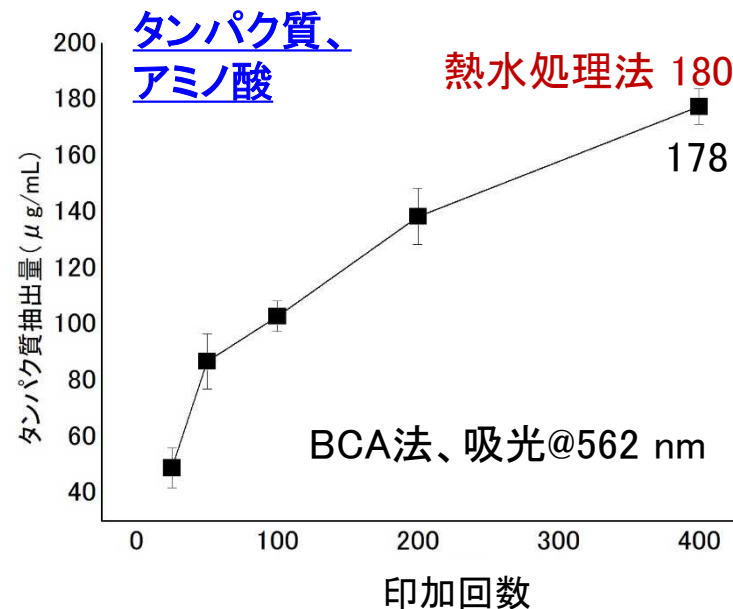
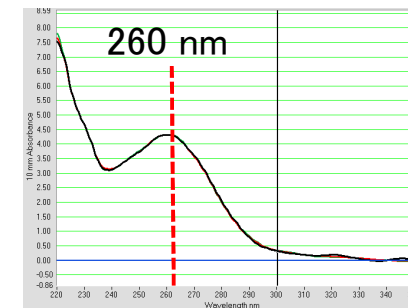
ペプチド結合



タンパク質
アミノ酸



核酸：塩基による吸収

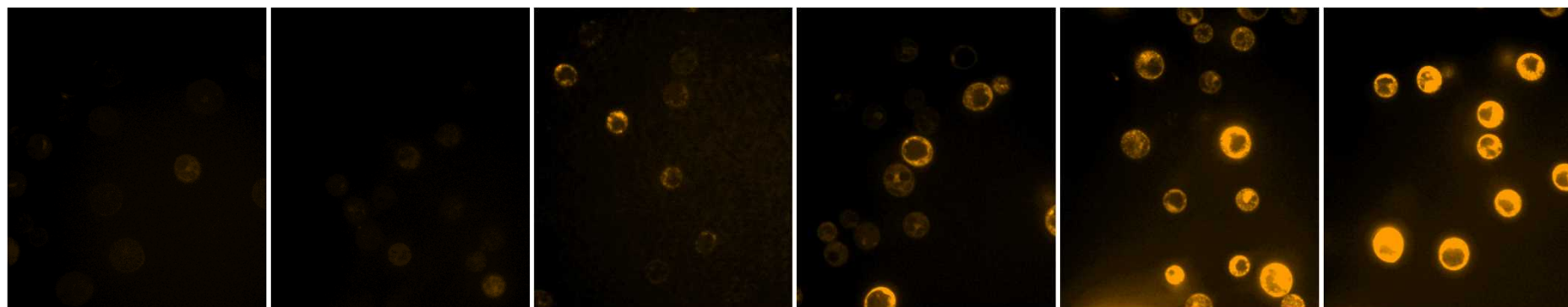


PEF印加後の細胞膜と細胞壁の状況



Kumamoto University

PI (細胞膜破壊)



0 shot

25 shot

50 shot

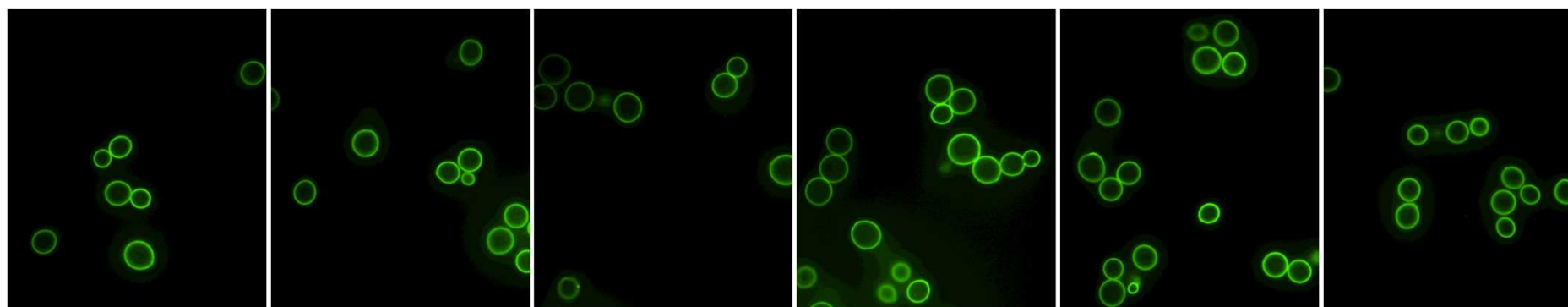
100 shot

200 shot

400 shot

- PEF印加回数の増加に伴って細胞膜傷害の程度が大きくなる。

ConA (細胞壁)



0 shot

25 shot

50 shot

100 shot

200 shot

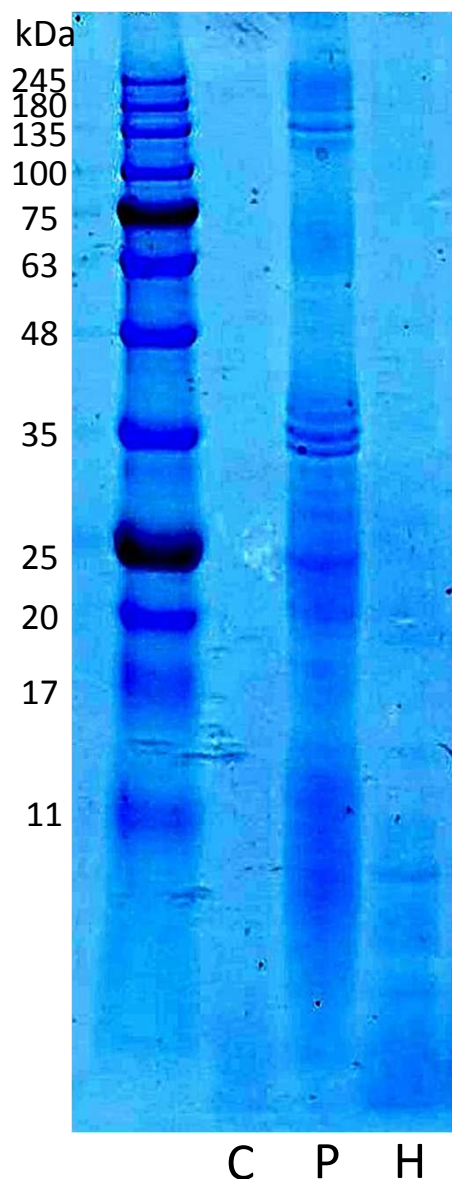
400 shot

- PEF印加回数が増えても、壁の崩壊は確認されない。

抽出液のSDS-PAGE解析



Kumamoto University



ゲル: SDS-PAGE

ゲル濃度: 15%(245~11 kDa)

C: 処理Xのみ

P: 電界PEF (20 kV/cm, 400回) + 処理X

H: 熱水処理 (95°C) + 処理X

- 本技術によって～250 kDaに及ぶ大きい分子が得られる。
- 熱水法ではほとんどのタンパク質はアミノ酸に分解される。

課題:

- ・ 抽出される物質の多角的な評価。(機能性)
- ・ 多様な細胞に対する抽出特性の蓄積。
- ・ 用途によっては、大流量化のための装置開発。

企業への期待:

- ・ 共同研究を通じた用途開発および事業化。

- ・ 発明の名称 : 抽出物の製造方法、細胞内成分の抽出方法、及び抽出装置(仮)
- ・ 出願番号 : 特願2019-●●●●●●●●
- ・ 出願人 : 熊本大学
- ・ 発明者 : 勝木 淳 他2名

熊本大学 熊本創生推進機構

主任リサーチ・アドミニストレーター

松浦 佳子

TEL 096-342-3145

FAX 096-342-3300

e-mail liaison@jimu.kumamoto-u.ac.jp