

ミトコンドリアと老化 バイオフィルム

—総説—

マイトファジー：損傷ミトコンドリアの選択的分解

東京都医学総合研究所 山野 晃史

ハイスループットバイオフィルム薬剤感受性試験法

福岡県工業技術センター 塚谷 忠之

—注目の研究—

超解像ライブイメージングによるクリステ動態の観察

株式会社同仁化学研究所 野口 克也

新製品

細胞周期測定試薬 P.6

ミトコンドリア染色試薬 P.7

バイオフィルム形成阻害測定キット・

バイオフィルム薬剤効果測定キット P.13

脂肪滴測定試薬・キット P.14

エクソソーム染色キット P.15

細胞内代謝測定キット P.16





表紙撮影：熊本県天草市 崎津集落
2018年7月「長崎と天草地方の潜伏キリシタン関連遺産」として世界遺産登録されました。
photo：永島俊介氏

CONTENTS

Review

マイトファジー：損傷ミトコンドリアの選択的分解 ●———[1]

東京都医学総合研究所 山野 晃史

ハイスループットバイオフィルム薬剤感受性試験法 ●———[8]

福岡県工業技術センター 塚谷 忠之

Topics on Chemistry

超解像ライブイメージングによるクリステ動態の観察 ●———[5]

株式会社同仁化学研究所 野口 克也

Commercial

マイトファジー検出蛍光試薬 ●———[5]

ミトコンドリア膜電位測定キット ●———[6]

細胞老化検出キット ●———[6]

微生物検出キット ●———[12]

新製品

細胞周期測定試薬 ●———[6]

ミトコンドリア染色試薬 ●———[7]

バイオフィルム形成阻害測定キット・バイオフィルム薬剤効果測定キット ●——[13]

脂肪滴測定試薬・キット ●———[14]

エクソソーム染色キット ●———[15]

細胞内代謝測定キット ●———[16]

お知らせ

第30回フォーラム・イン・ドージン開催後記 ●———[18]

※希望納入価格には消費税等は含まれておりません。

ツイッターはじめました



@dojindoinfo

マイトファジー：損傷ミトコンドリアの選択的分解

Mitophagy: Selective degradation of damaged mitochondria



山野 晃史

公益財団法人 東京都医学総合研究所
生体分子先端研究分野

Abstract

The quality and quantity of mitochondria, the essential organelles that produce ATP and regulate many metabolic pathways, should be monitored to keep cell homeostasis. The two gene products mutated in the genetic recessive Parkinson's disease, Parkin and PINK1, have been identified as essential proteins to selectively degrade unhealthy mitochondria. Since this clearance process depends on both ubiquitin and autophagy, it is called ubiquitin-mediated mitophagy. In this review, I focus on a decade of significant progress how the mitochondrial kinase PINK1 and the E3 ligase Parkin work cooperatively to selectively mark and eliminate damaged mitochondria, and highlight the molecular crosstalk between ubiquitin and autophagy.

1. はじめに

ミトコンドリアは細胞のエネルギー通貨である ATP を合成するオルガネラとして知られているが、その他にも脂質代謝、アミノ酸合成、鉄硫黄クラスターの生合成も担っている。さらに細胞に必須のオルガネラとして、カルシウム貯蔵、アポトーシス誘導、ウイルス感染応答などのプラットフォームにもなっている。その一方で、ミトコンドリアは常にストレスに曝された危険なオルガネラであるとも言える。酸化リン酸化の際に発生する活性酸素種 (ROS) は、その代表例であるが、ROS は DNA、脂質、タンパク質を攻撃するため、一度 ROS により損傷を受けたミトコンドリアは「不良」となり、酸化リン酸化の悪循環を介した、更なる ROS の発生を招くなどして、細胞全体の恒常性を乱すと考えられる。近年、このような細胞にとって有害となる不良ミトコンドリアは選択的に排除されることが分かってきた。本稿では、細胞内の二大分解システムであるユビキチンとオートファジーが協調して働く、ミトコンドリア品質管理機構について、この 10 年あまりで明らかになったことを概説したい。

2. パーキンソン病 (PD)

ミトコンドリアの多彩な機能のため、ミトコンドリアに対する品質管理機構の破綻は様々な病気の原因となりうる。特に本稿で取り上げる「オートファジーによる損傷ミトコンドリアの選択的分解」はパーキンソン病 (PD) との関連が深いと考えられているため、まずパーキンソン病について簡単に説明したい。

パーキンソン病 (PD) は、中脳・黒質のドーパミン作動性ニューロンが変性・脱落することで引き起こされる神経変性疾患である。日本の人口の 1-2% に見られ、年齢とともに罹患率が高くなるため、超高齢化社会をむかえる我が国にとっては、その病態の理解と根本的な治療法の開発が急務となっている。PD の主な症状は、静止時振戦、筋強剛、運動緩慢、姿勢保持障害などの運動障害であり、孤発性と家族性 (遺伝性) に大別される。遺伝性の場合、正しくはパーキンソン症候群とするべきであるが、わかりやすさを優先して、本稿では遺伝性 PD と記述したい。孤発性 PD (PD 全体の 90%) と遺伝性 PD はその症状が完全に一致す

るわけではない。しかし、それらの病因には共通項が存在すると考えられること、また遺伝性 PD は特定の遺伝子異常に由来することから、近年では遺伝性 PD から病因に迫ろうとする研究が盛んに行われている。

3. ミトコンドリア障害と PD の関係

Parkin と PINK1 は遺伝性 PD の原因遺伝子として同定された^{1), 2)}。どちらも遺伝性潜性の遺伝子であるため、その遺伝子産物である Parkin と PINK1 の機能破綻によって、PD を発症すると考えられる。Parkin あるいは PINK1 をノックアウトしたショウジョウバエでは、精子細胞や飛翔筋のミトコンドリアに異常が見られた^{3), 4)}。そのため、PD 発症とミトコンドリア機能には何らかの関連があると推測されていた。また、合成麻薬の副産物である MPTG がミトコンドリア呼吸鎖を阻害し、急性 PD 様の症状を引き起こすこと、孤発性 PD の患者由来の細胞でもミトコンドリアの呼吸能の低下が認められた。さらにミトコンドリア DNA の変異やその複製を担うポリメラーゼの変異も PD の発症リスクを高めることが知られていた。これらの報告から、(遺伝性 PD の中でも特に) Parkin と PINK1 の機能破綻によって、ミトコンドリアは何らかの障害をきたし、それが原因となって、PD を発症すると考えられる。しかし、長らくの間、Parkin あるいは PINK1 がどのようにミトコンドリア障害とリンクしているか、分子レベルでの実体は不明であった。

4. Parkin と PINK1 によるマイトファジーの誘導

2008 年、アメリカ NIH の Richard Youle らのグループは、Parkin を過剰発現させた培養細胞に CCCP (ミトコンドリアの膜電位を消失させるプロトンイオンフォア) を添加すると、24-48 時間後に、ほぼすべてのミトコンドリアがオートファジー依存的に分解されることを報告した⁵⁾。この報告は、1) Parkin は不良ミトコンドリアを選択的に分解することで、細胞の恒常性を維持していること、そして 2) Parkin の機能阻害により、不良

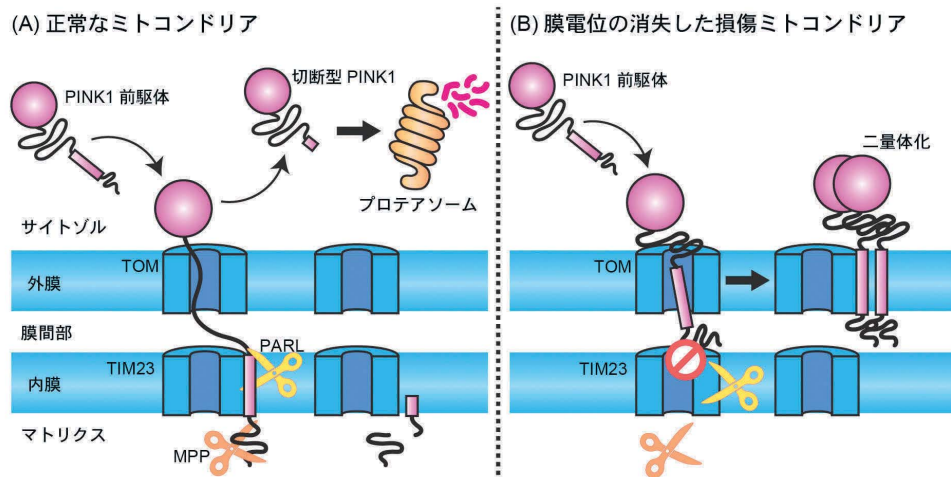


図1 ミトコンドリア膜電位に依存した PINK1 の局在変化

(A) 正常なミトコンドリアでは、サイトゾルで合成された PINK1 前駆体はミトコンドリアに取り込まれ、2 種類のプロテアーゼ (マトリックスの MPP と内膜の PARL) によって切断をうける。切断型 PINK1 はサイトゾルへと逆行輸送され、プロテアソームで分解される。(B) 膜電位の消失した損傷ミトコンドリアでは、内膜への膜透過が阻害されるため、PINK1 前駆体は外膜に留まる。そこで二量体化 (および自己リン酸化) を介して活性化する。

ミトコンドリアが細胞に蓄積することが、PD 発症の本質であることを示唆していた。実際のヒトの神経細胞で、ほとんどのミトコンドリアの膜電位が瞬時に消失して、オートファジーにより分解されるという極端な現象が起きているとは思えにくい、非常に簡便な方法でマイトファジーを観察できることがわかった。そのため、この報告をきっかけに、世界中の研究者がこの分野に参入し、Parkin 依存性のマイトファジーの分子機構の理解は飛躍的に進んだ。実際、2010 年には PINK1 が Parkin の上流で機能するマイトファジー必須因子であること^{6) -9)}、2013 年に Parkin の全長の X 線構造が解かれ¹⁰⁾、2014 年に PINK1 がユビキチンをリン酸化するキナーゼであること^{11) -13)}、その後も損傷ミトコンドリアとオートファジーを橋渡しする分子の同定¹⁴⁾ など、マイトファジーに関連する論文の報告は後を絶たない。では以下に、この 10 年あまりで明らかにされた Parkin と PINK1 の分子機構とマイトファジーの研究結果をまとめたい。これらのほとんどは複数の研究グループからの報告であり、結論や解釈にも一定のコンセンサスが得られている。

まず PINK1 は、その N 末端にミトコンドリア移行シグナルを有するセリン・スレオニンのキナーゼである。そのため、サイトゾルのリボソームで合成されると、速やかにミトコンドリアに移行する (図 1A)。そして、ミトコンドリアの外膜と内膜に存在する膜透過装置 (TOM および TIM23 複合体) の孔を通過して、内膜に到達する。そこで、マトリックスおよび内膜に局在するプロテアーゼ (MPP と PARL) によって切断をうける^{15) -17)}。そして、切断をうけた PINK1 はサイトゾルに逆行輸送され、プロテアソームで分解される¹⁸⁾。この分解は N 末端側とよばれる極めて半減期の短いシステムで制御されている。そのため、通常の細胞では PINK1 は合成されても、キナーゼとして機能するまえに、分解されてしまう。ウエスタンブロッティングでも検出困難なレベルにまで発現が抑制されている。

一方、Parkin は通常、サイトゾルに局在する E3 ユビキチンリガーゼである。一般的に E3 は、基質となるタンパク質にユビキチンを付加するユビキチン化反応の最終酵素であり、ユビキチン

が付加されたタンパク質はプロテアソーム (あるいはオートファジー) で分解される。つまり、Parkin は基質タンパク質を分解へと誘導する実行因子であると言える。しかし、培養細胞に Parkin を過剰発現させても、リガーゼ活性がオフの状態ではサイトゾルに一様に局在し、ミトコンドリアとの関連は見出すことができない。

しかし、これらの状況はミトコンドリアの膜電位を消失させることで一変する。まず、ミトコンドリアの膜電位が消失すると PINK1 はミトコンドリアの外膜に蓄積する (図 1B)。ミトコンドリアタンパク質の (マトリックスおよび内膜への) 輸送は、膜電位を駆動力としている。つまり、膜電位の消失した損傷ミトコンドリアでは PINK1 は内膜へと到達できず、PARL による切断をうけない。このため、サイトゾルへの逆行輸送もプロテアソームによる分解も阻害される。その代わりに PINK1 はその局在を外膜へと変化させる。さらに PINK1 は外膜上で二量体化し、自己リン酸化を介して活性化することもわかっている^{19) -21)}。したがって、外膜上で活性化した PINK1 は、ミトコンドリアの「不良」を Parkin に伝えるセンサー分子として機能する。

サイトゾルに局在している Parkin はミトコンドリア膜電位の消失に伴い、そこへリクルートする (図 2)。顕微鏡で観察するとダイナミックな Parkin の局在変化に驚かされる。なぜ Parkin が膜電位の消失したミトコンドリアにのみ選択的にリクルートするか? についても精力的に研究が展開されてきた。まず、Parkin のミトコンドリアへのリクルートは PINK1 のノックアウト細胞で完全に阻害される。そのため、PINK1 キナーゼの基質が Parkin のミトコンドリア移行の鍵を握っていると考えられた。2010 年以降、世界中のグループが Parkin のミトコンドリア移行に必須となる PINK1 の基質を探索した。そして 2012 年から 2014 年にかけて、その基質が Parkin 自身^{22) -24)} とユビキチン^{11) -13)} であることが判明した。Parkin の N 末端にはユビキチンに類似したドメインが存在し、PINK1 はそのドメインの 65 番目のセリンをリン酸化する。さらにユビキチンにも 65 番目のセリンは保存されており、やはり PINK1 によってリン酸化される。特

にユビキチンのリン酸化に関しては、マイトファジーの研究分野を超えて、分子細胞学全般に大きなインパクトを与えた。本来、ユビキチンはタンパク質性の翻訳後修飾因子であるが、それ自体がリン酸化という翻訳後修飾を受けること、つまり「翻訳後修飾因子の翻訳後修飾」というシグナルの多様性が判明したためである。現在では、生化学および構造生物学による解析から、PINK1によってリン酸化されたユビキチン（リン酸化ユビキチン）はParkinのミトコンドリア移行へのレセプター分子として機能し²⁵⁾、Parkinのユビキチン様ドメインがPINK1によってリン酸化されると、Parkinのリガーゼ活性が劇的に上昇すること^{26) -28)}が証明されている。したがって、ミトコンドリアの膜電位が消失すると、PINK1、Parkin およびユビキチンが、損傷ミトコンドリア上で正のフィードバックループを形成し²⁹⁾、そこに大量のユビキチン鎖が形成される（図3）³⁰⁾。

5. オートファジーの誘導と隔離膜形成

マイトファジーを誘導すると、その近傍で隔離膜と呼ばれる膜構造が出現する。隔離膜は損傷ミトコンドリアに沿って伸長し、最終的にオートファゴソームと呼ばれる閉じた膜構造となり損傷ミトコンドリアは特異的に包囲される。その後、オートファゴソームは、分解専用のオルガネラであるリソソームと融合し、損傷ミトコンドリアは分解される。オートファジーに必須のタンパク質は、酵母からヒトまで進化的によく保存されている。それらはいくつかの機能ユニットに分けられるが、本稿ではATG8ファミリーについて紹介したい。ATG8はそれ自体が隔離膜の脂質分子であるホスファチジルエタノールアミンと共有結合するため、ATG8は隔離膜にも完成したオートファゴソームにも常在するオートファジータンパク質である。そして、ATG8と相互作用するタンパク質（あるいはオルガネラ）は、より効率的にオートファゴソームに包囲される分解基質となるはずである。ほ乳類には酵母ATG8のホモログが6種類あるため、基質認識の多様性が生み出されているのかもしれない。

前述のように、損傷ミトコンドリアには、Parkinによって大量のユビキチン鎖が付加される。ATG8は直接ユビキチン鎖と相互作用できないが、オートファジーアダプターとよばれる分子群がオートファジーとユビキチン鎖を橋渡しする役割をもっている。ほ乳類には5種類のオートファジーアダプターが同定されているが、それらはすべて分子内にユビキチン結合ドメインとATG8結合領域を有している。このような作用機序によって、ユビキチン鎖で修飾された損傷ミトコンドリアはオートファジーアダプターを介してオートファゴソームに選択的に取り込まれる。これまでユビキチン鎖は、その基質をプロテアソーム分解へと導く目印であると考えられてきたが、オルガネラに大量にユビキチン鎖が付加された場合、オートファジー膜形成場の目印にもなっていることは注目すべきことである。

6. おわりに

Parkin依存性のマイトファジーは膜電位の低下したミトコンドリアを「不良」と見なし、それを選択的に分解する巧妙な品質管理機構である。Parkin および PINK1 は遺伝性PDの原因遺伝子産物であるため、マイトファジーは神経科学や臨床医学からも注目されている。このような競争的背景もあり、マイトファジーはこの10年あまりで、その理解が飛躍的に進み、今や一つの研究分野となりつつある。本稿では生化学・細胞生物学から得られた知見を中心に紹介させていただいたが、動物個体を用いた生理学的

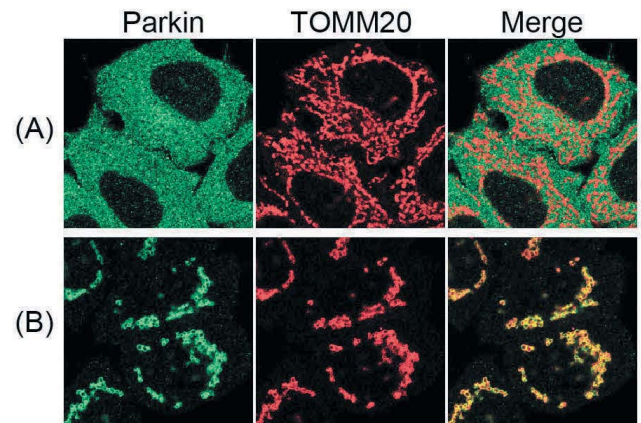


図2 Parkinの損傷ミトコンドリアへのリクルート

Parkinを過剰発現させたHeLa細胞（A）に、終濃度10μM CCCPを添加して3時間培養し、ミトコンドリアの膜電位を消失させた（B）。その後、細胞を固定し、蛍光免疫染色法によってParkinとミトコンドリアマーカーであるTOMM20を可視化した。ミトコンドリアの膜電位の消失により、サイトソルのParkinがミトコンドリアにリクルートされたことがわかる。

意義解明の研究も盛んに行なわれている。スペースの都合上、動物個体を含む多くの重要なトピックについて本稿で紹介できなかったことをお詫びしたい。また、マイトファジーについて詳細に知りたい方は、より専門的な英文総説を参照されたい^{31), 32)}。

[参考文献]

- 1) T. Kitada, et al., Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism, *Nature*, **1998**, 392, 605-608.
- 2) E. M. Valente, et al., Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1, *Science*, **2004**, 304, 1158-1160.
- 3) I. E. Clark, et al., Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin, *Nature*, **2006**, 441, 1162-1166.
- 4) J. Park, et al., Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin, *Nature*, **2006**, 441, 1157-1161.
- 5) D. Narendra, A. Tanaka, D. F. Suen and R. J. Youle, Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy, *The Journal of cell biology*, **2008**, 183, 795-803.
- 6) D. P. Narendra, et al., PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin, *PLoS biology*, **2010**, 8, e1000298.
- 7) N. Matsuda, et al., PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy, *The Journal of cell biology*, **2010**, 189, 211-221.
- 8) S. Geisler, et al., PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1, *Nature cell biology*, **2010**, 12, 119-131.
- 9) C. Vives-Bauza, et al., PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2010**, 107, 378-383.
- 10) J. F. Trempe, et al., Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation, *Science*, **2013**, 340, 1451-1455.
- 11) F. Koyano, et al., Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin, *Nature*, **2014**, 510, 162-166.
- 12) L. A. Kane, et al., PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity, *The Journal of cell biology*, **2014**, 205, 143-153.
- 13) A. Kazlauskaite, et al., Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65, *The Biochemical journal*, **2014**, 460, 127-139.
- 14) M. Lazarou, et al., The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy, *Nature*, **2015**, 524, 309-314.

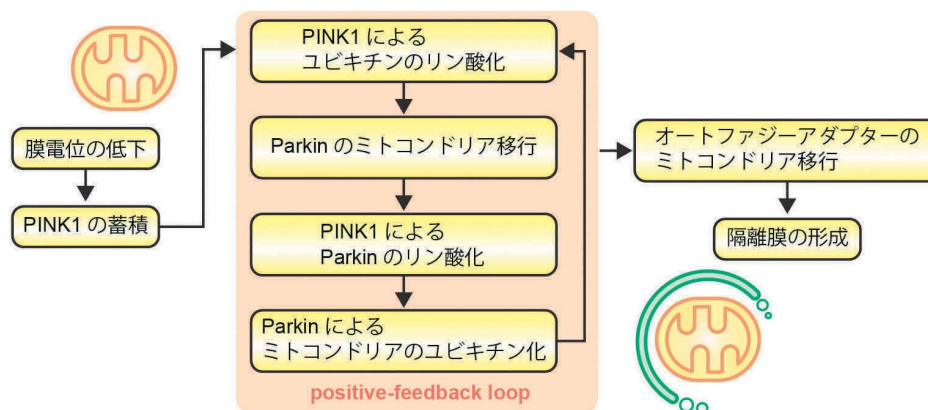


図3 Parkin、PINK1 およびユビキチンにより形成されるユビキチン化反応の亢進と隔離膜形成

図に示した positive-feedback loop により、損傷ミトコンドリアの外膜は高度にユビキチン鎖によって修飾される。これがオートファジーアダプターによって認識され、損傷ミトコンドリア近傍で隔離膜が形成される。

- 15) S. M. Jin, *et al.*, Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL, *The Journal of cell biology*, **2010**, 191, 933-942.
- 16) C. Meissner, H. Lorenz, A. Weihofen, D. J. Selkoe and M. K. Lemberg, The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate Pink1 trafficking, *Journal of neurochemistry*, **2011**, 117, 856-867.
- 17) E. Deas, *et al.*, PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL, *Human molecular genetics*, **2011**, 20, 867-879.
- 18) K. Yamano and R. J. Youle, PINK1 is degraded through the N-end rule pathway, *Autophagy*, **2013**, 9, 1758-1769.
- 19) M. Lazarou, S. M. Jin, L. A. Kane and R. J. Youle, Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin, *Developmental cell*, **2012**, 22, 320-333.
- 20) K. Okatsu, *et al.*, A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment, *The Journal of biological chemistry*, **2013**, 288, 36372-36384.
- 21) K. Okatsu, *et al.*, PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria, *Nature communications*, **2012**, 3, 1016.
- 22) K. Shiba-Fukushima, *et al.*, PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy, *Scientific reports*, **2012**, 2, 1002.
- 23) C. Kondapalli, *et al.*, PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65, *Open biology*, **2012**, 2, 120080.
- 24) M. Iguchi, *et al.*, Parkin-catalyzed ubiquitin-ester transfer is triggered by PINK1-dependent phosphorylation, *The Journal of biological chemistry*, **2013**, 288, 22019-22032.
- 25) K. Okatsu, *et al.*, Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor, *The Journal of cell biology*, **2015**, 209, 111-128.
- 26) K. Yamano, *et al.*, Site-specific Interaction Mapping of Phosphorylated Ubiquitin to Uncover Parkin Activation, *The Journal of biological chemistry*, **2015**.
- 27) T. Wauer and D. Komander, Structure of the human Parkin ligase domain in an autoinhibited state, *The EMBO journal*, **2013**, 32, 2099-2112.
- 28) T. Wauer, M. Simicek, A. Schubert and D. Komander, Mechanism of phospho-ubiquitin-induced PARKIN activation, *Nature*, **2015**, 524, 370-374.
- 29) A. Ordureau, *et al.*, Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis, *Molecular cell*, **2014**, 56, 360-375.
- 30) S. A. Sarraf, *et al.*, Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization, *Nature*, **2013**, 496, 372-376.
- 31) K. Yamano, N. Matsuda and K. Tanaka, The ubiquitin signal and autophagy: an orchestrated dance leading to mitochondrial degradation, *EMBO reports*, **2016**, 17, 300-316.
- 32) A. M. Pickrell and R. J. Youle, The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease, *Neuron*, **2015**, 85, 257-273.

[著者プロフィール]

氏名：山野 晃史 (Koji Yamano)

所属：公益財団法人 東京都医学総合研究所
生体分子先端研究分野

〒156-8506 東京都世田谷区上北沢 2-1-6

Tel：03-5316-3123

E-mail：yamano-kj@igakuken.or.jp

出身学校：名古屋大学大学院理学研究科

学位：博士（理学）

専門分野：細胞生物学、ミトコンドリア学

現在の研究テーマ：ユビキチン、オートファジーを介したミトコンドリア品質管理機構の解明

Topics on Chemistry

超解像ライブイメージングによるクリステ動態の観察

株式会社同仁化学研究所 野口 克也

ミトコンドリアは主にエネルギー産生を行っている細胞内小器官であり、ヘムの合成やアポトーシスに関与していることも知られている。ミトコンドリアは外膜と内膜を持ち、内膜はマトリックスへ陥入し、クリステと呼ばれるひだ折り構造となっている。内膜には呼吸鎖複合体や ATP 合成酵素があり、ミトコンドリアはクリステによって内膜の表面積を増加させることによりエネルギー産生効率を向上させている。以上のことから、クリステの形態はミトコンドリアのエネルギー生産能力と密接に関連している。

ショウジョウバエの間接飛翔筋組織のミトコンドリア超微細構造を電子線トモグラフィーにより三次元構造を解析した結果、野生型の個体は老化するにつれ、グローバルなクリステの空胞化及び崩壊が観察され、ミトコンドリア DNA (mtDNA) に変異・欠損が多い個体では、タマネギのような形状のクリステを多く持っていることが報告されている (図 1) ¹⁾。このことから老化や mtDNA の変異・欠損とクリステの形態との関係が示唆される。加えて、タマネギ状のクリステを免疫電子顕微鏡法で分析した結果、ATP 合成酵素は外周の膜には存在せず、中心部にのみ存在することがわかり、ATP 合成酵素の局在とクリステの形態が互いに影響していることが考えられる。このタマネギ状のクリステを持つミトコンドリアは cytochrome c oxidase 活性を有しているためか、ユビキチンプロテアソーム系やマイトファジーによる品質チェック機構から免れており、結果として不良なミトコンドリアが蓄積している可能性がある。

上記のように、老化や mtDNA の変異・欠損によるクリステの形態変化がミトコンドリアの機能へ影響を及ぼすことが分かりつつある。しかし、クリステの幅は数十 nm 程度であるため光学顕微鏡では観察できない。電子顕微鏡では生きた細胞を取り扱うことができないことから、超解像イメージング技術を用いた生細胞のクリステ観察に注目が集まっている。

Wang らはミトコンドリア内膜のみ選択的に染色し、STED 光でも退色しにくい蛍光プローブ (MitoPB Yellow) を用いて生きた細胞のクリステ動態の観察 (超解像イメージング (STED 法)) に成功した ²⁾。MitoPB Yellow は超耐光性骨格 C-Naphox を有し、ミトコンドリアへ集積するためのトリフェニルホスホニウム基及び滞留性を向上させるためのエポキシ基が付加された構造である。MitoPB Yellow と類似した骨格を持つ蛍光色素 (図 2) を用い、溶媒効果を確認した結果、MitoPB Yellow は疎水性環境下で強い蛍光を発することから、疎水性であるミトコンドリア膜で蛍光性となることが推測された。さらにミトコンドリア外膜及び内膜を Halo-tag 技術で染色し、MitoPB Yellow と多重染色すると、内膜と局在が一致した。上記のことから MitoPB Yellow はミトコンドリア内膜のみに選択的に局在していることが証明された。既存のミトコンドリア染色色素 (MitoTracker Green など) は染色後に細胞を固定すると色素が漏出し、蛍光強度が固定前と比べ約 30% 程度に低下するが、MitoPB Yellow はエポキシ基の効果によりミトコンドリア内膜で共有結合するため約 70% 以上の蛍光強度を保っていた。このような性能を持つ MitoPB Yellow を開発したことにより、クリステ動態を超解像イメージングで観察可能となった。mtDNA 複製阻害薬 2',3'-dideoxycytidine を HeLa 細胞に 5 日間処理した後、MitoPB Yellow で染色した結果、クリステの形態がラメラ構造から同心円状に変化した様子を生きた細胞で観察できた。これは mtDNA に変異・欠損があるショウジョウバエ間接飛翔筋組織で電子線トモグラフィーにより観察された結果

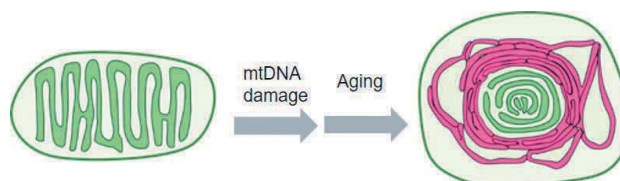


図 1 mtDNA 損傷の多いミトコンドリアにおける加齢によるクリステ構造の変化

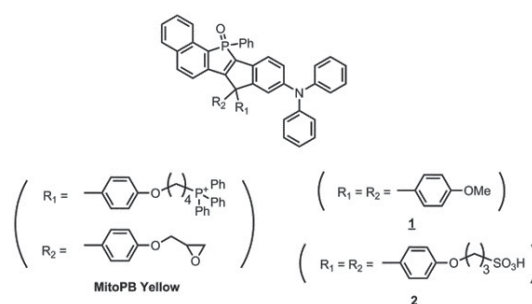


図 2 MitoPB Yellow 及び誘導体の構造

と類似している。MitoPB Yellow と超解像イメージング技術により、生きた細胞でクリステの動態観察が可能となったことから電子顕微鏡で得られなかった知見が今後得られると期待される。

[参考文献]

- 1) Y.-F. Jiang, et al., *Sci. Rep.*, **2017**, 7: 45474.
- 2) C. Wang, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2019**, 116(32), 15817-15822.

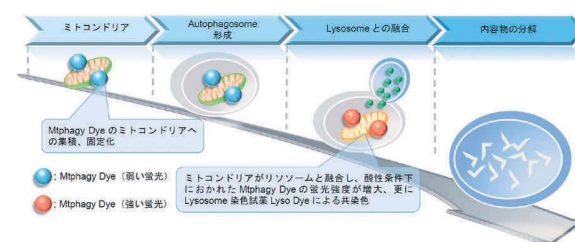
DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

マイトファジー検出蛍光試薬

Mitophagy Detection Kit

< 特長 >

- ・低分子蛍光試薬を用いてマイトファジーを簡便に検出
- ・培養細胞に試薬を添加するだけの簡単操作



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Mitophagy Detection Kit	1 set	36,000	MD01
Mitophagy Dye	5 µg × 3	78,000	MT02

ミトコンドリア膜電位測定キット

JC-1 MitoMP Detection Kit

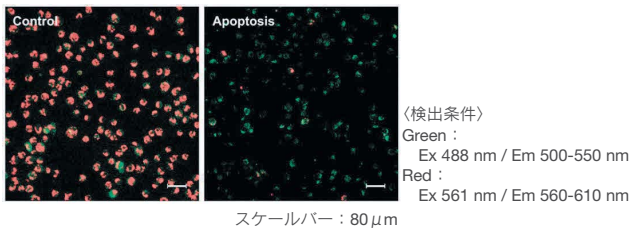
<特長>

- ・難溶性 JC-1 の溶解プロトコルを準備
- ・顕微鏡、フローサイトメーター、プレートリーダーに対応

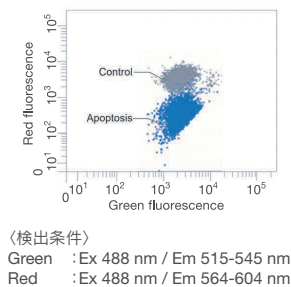
測定例

Jurkat 細胞を使用し、アポトーシス誘導後、各装置にてミトコンドリアの膜電位変化を検出しました。

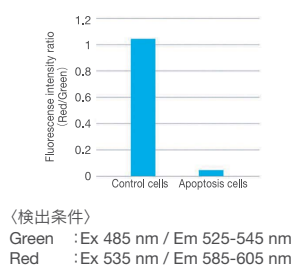
蛍光顕微鏡



フローサイトメーター



プレートリーダー



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
JC-1 MitoMP Detection Kit	1 set	23,000	MT09

新製品

細胞周期測定試薬

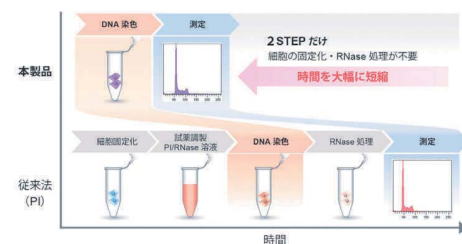
Cell Cycle Assay Solution Blue

Cell Cycle Assay Solution Deep Red

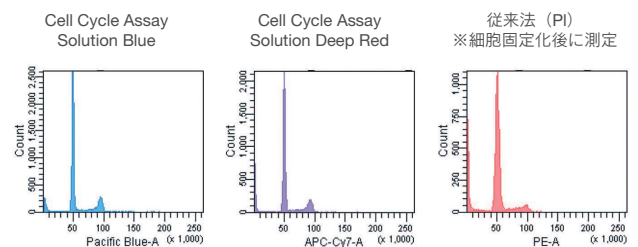
<特長>

- ・細胞の固定化、RNase 処理が不要で試薬を添加するだけ
- ・405 nm、633 nm のレーザーで励起が可能

一般的に使用される Propidium Iodide (PI) を用いた手法と比較して、高い細胞膜透過性と DNA 選択性を有する色素を使用しているため、細胞懸濁液に試薬を添加するだけで測定が可能です。



シャープなヒストグラム



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Cell Cycle Assay Solution Deep Red	50 tests	13,000	C548
Cell Cycle Assay Solution Blue	50 tests	13,000	C549

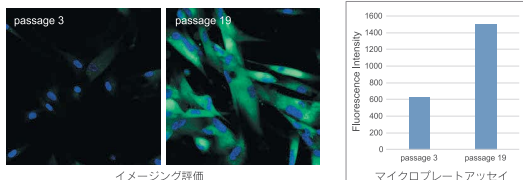
細胞老化検出キット

【蛍光顕微鏡・FCM】Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal

【プレートリーダー】Cellular Senescence Plate Assay Kit - SPiDER-βGal

小社の老化細胞検出キットは、老化細胞の指標の一つである SA-β-gal (senescence-associated β-galactosidase) 活性を特異的に検出することができます。各キットには、蛍光検出が可能な β-galactosidase 基質 (SPiDER-βGal) を用いており、蛍光顕微鏡・フローサイトメーター・プレートリーダーを用いた解析が可能です。

測定例



継代数の異なる WI-38 細胞を用い Cellular Senescence Plate Assay Kit - SPiDER-βGal [メーカーコード: SG05] によるプレートアッセイ (右図) および Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal [メーカーコード: SG03] によるイメージング (左図) を行いました。その結果、継代数を重ねた細胞では、SA-β-gal の発現が亢進している双方の解析結果で確認されました。

<検出条件>

イメージング評価 (左図)
緑色 : Ex 488 nm / Em 500-600 nm
青色 : Ex 405 nm / Em 450-495 nm (DAPI による核染色)

プレートアッセイ (右図)
Ex 535 nm / Em 580 nm

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal	10 assays	38,000	SG03
Cellular Senescence Plate Assay Kit - SPiDER-βGal	20 tests	11,000	SG05
	100 tests	32,000	

新製品

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

ミトコンドリア染色試薬

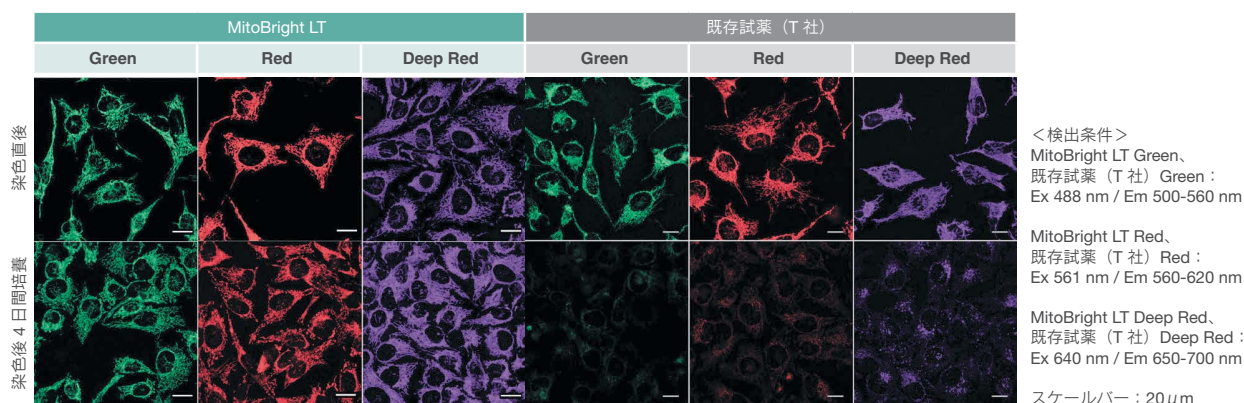
MitoBright LT Green, Red, Deep Red

<特長>

- ・ミトコンドリアを長期間観察可能
- ・血清入り培地中で染色可能
- ・コラーゲンコートプレート上で培養した細胞のミトコンドリアを低バックグラウンドで検出可能

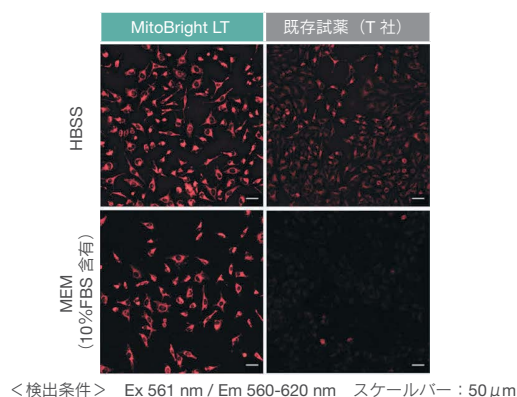
ミトコンドリアを長期間観察

HeLa 細胞を各 MitoBright LT または既存試薬で染色し、4 日間培養後ミトコンドリアを観察しました。その結果、既存試薬の蛍光強度は大きく低下したのに対し、MitoBright LT は蛍光強度が維持され、ミトコンドリアを明瞭に観察できました。



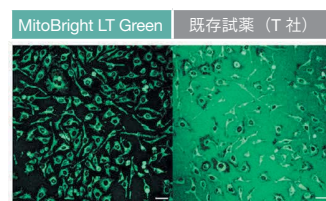
血清入り培地中での染色

HeLa 細胞を MitoBright LT Red または既存試薬を用いて血清有無の培地中で染色し、ミトコンドリア染色の程度を比較しました。その結果、血清含有の培地中で染色した場合、既存試薬は蛍光強度が低下するのに対し、MitoBright LT Red は蛍光強度が低下することなくミトコンドリアを明瞭に染色できました。



コラーゲンコートプレートを用いた検出例

ミトコンドリアの形態評価は高倍率で観察するため、コラーゲンコートしたガラスプレートがよく使用されます。既存のミトコンドリア染色試薬は、コラーゲンに吸着しバックグラウンドを上昇させる問題がありますが、MitoBright LT シリーズはバックグラウンドの影響がなくミトコンドリアを鮮明に染色できます。



<実験条件>
HeLa 細胞をコラーゲンコートプレートに播種し、24 時間培養後、HBSS で洗浄した。100 nmol/l MitoBright LT Green working solution を添加し、30 分インキュベート後、HBSS で洗浄し蛍光顕微鏡で観察した。

<検出条件>
Ex 488 nm / Em 500-560 nm スケールバー：50 μm

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
MitoBright LT Green	20 μl × 1	6,000	MT10
	400 μl × 1	12,000	
	400 μl × 3	30,000	
MitoBright LT Red	20 μl × 1	6,000	MT11
	400 μl × 1	12,000	
	400 μl × 3	30,000	
MitoBright LT Deep Red	20 μl × 1	6,000	MT12
	400 μl × 1	12,000	
	400 μl × 3	30,000	

さらに詳細な情報は小社 HP で！

- ☒ 各試薬の蛍光特性
- ☒ タイムラプス動画 (Red, Deep Red)
- ☒ フローサイトメーターの検出例
- ☒ ミトコンドリア膜電位への影響と応用例

MitoBright LT 同仁

検索

ハイスループットバイオフィルム薬剤感受性試験法

High-throughput method for the susceptibility testing of microbial biofilm



塚谷 忠之

福岡県工業技術センター
企画管理部 情報交流課
専門研究員

Abstract

Biofilms are formed when microorganisms adhere to a solid surface and then encase themselves in a self-produced matrix of extracellular polysaccharides and proteins. Biofilms are extremely difficult to eradicate, and are closely related to various chronic or device-related infections. Therefore, antimicrobial susceptibility testing of microbial biofilm is increasingly important for appropriate patient management and clinical surveillance. A high-throughput method for the susceptibility testing of microbial biofilm using a microbial viability assay based on reduction of a tetrazolium salt WST and the biofilm formation method on 96-pins in the lid of a microtiter plate was developed. The conditions

for biofilm formation of *Escherichia coli*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Streptococcus mutans* were established. The biofilms formed on the 96 pins were challenged by antibiotics, and the minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC), minimum biofilm bactericidal concentration (MBBC), and minimum biofilm eradication concentration (MBEC) were sequentially determined. The MBIC and MBBC were determined from the turbidity of the microplate contents after antibiotic exposure and after further incubation in recovery medium, respectively. Finally, the MBEC was determined from the microbial viability of the biofilms formed on the 96 pins, assessed by the WST colorimetric assay. The MBECs obtained by the proposed and conventional methods favorably agreed. In addition, we clarified that *S. aureus* biofilm was maximally suppressed by a combination of vancomycin, daptomycin, and teicoplanin. The proposed method yields similar performance to conventional methods, but is faster and more easily implemented. Therefore, the proposed method alleviates the tediousness and time-consuming nature of conventional biofilm susceptibility assay.

キーワード：バイオフィルム、薬剤感受性試験、水溶性テトラゾリウム塩、マイクロプレート

1. はじめに

バイオフィルムは、微生物自身が産生する多糖類やタンパク質を主成分とする細胞外マトリックスにより、界面や生体などの固体表面に付着して存在する微生物の集合体である。バイオフィルムの形成は、微生物が厳しい環境中で定着し、生き残るための戦略であると考えられている¹⁾。身近なところでは口腔内プラークなどが代表例として挙げられるが、近年はカテーテルや人工関節などの人工医療材料を用いた治療の増加に伴い、バイオフィルムに関連した感染症が増加している。ヒトの難治性感染症の多くにバイオフィルム形成微生物が関与していることが報告されており、形成されたバイオフィルムは抗生物質などの治療薬に対して抵抗性を示すことで感染症を難治化させている²⁾。

バイオフィルムによる感染症を治療するためには、形成されたバイオフィルムの薬剤感受性を迅速に把握することが非常に重要である。しかし、従来の planktonic cells を対象とした薬剤感受性試験法 (CLSI 法) の結果と治療効果との間には相関性が認められてない。このため、バイオフィルムを対象とした薬剤感受性試験法が求められており、その開発が進められている³⁾。

バイオフィルム薬剤感受性試験には、主に 96 ウェルマイクロプレートのウェル底にバイオフィルムを形成させて測定する手法が適用されてきたが、近年、マイクロプレート用フタに設置した 96 ピンへバイオフィルムを形成させて評価する手法が報告され、その活用が進められている⁴⁾。この手法は、従来の手法と比べて培地交換や洗浄の工程が簡便であり、加えてピベッティングなど

の操作ミスでバイオフィルムを崩してしまう恐れが格段に低いとめ有望な方法と考えられる (図 1)。

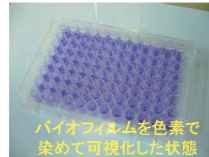
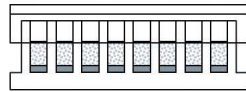
著者らは、図 1 に示す「マイクロプレート用フタに設置した 96 ピンへのバイオフィルム形成法」と「水溶性テトラゾリウム塩 WST を用いた微生物活性測定法 (図 2)」⁵⁾ を組み合わせることで、操作性と迅速性に優れたバイオフィルム薬剤感受性試験法の開発を行ってきた⁶⁾。本稿では、本法の操作手順と本法を用いて実施したバイオフィルム薬剤感受性試験の一例について紹介する。

2. 水溶性テトラゾリウム塩 WST を用いた微生物活性測定法

まず、バイオフィルム薬剤感受性試験を迅速・簡便化するために必要となる水溶性テトラゾリウム塩 WST を用いた微生物活性測定法について紹介したい。

NADH (NADPH) はエネルギー代謝活動に関与する補酵素であり、生命体の活動の一役を担っている。微生物は細胞内の NADH (NADPH) を利用することで外部から供給された酸化型電子メディエータ (キノン化合物など) を還元し、還元型電子メディエータ (ヒドロキノン化合物など) を生成することが知られている⁷⁾。ここへ発色還元試薬である水溶性テトラゾリウム塩 (Water Soluble Tetrazolium salts, WST) が共存すると、生成したヒドロキノン化合物により還元を受けてホルマゼン色素が生成

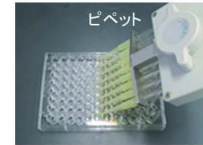
96ウェルマイクロプレートのウェル底に形成 (従来法)



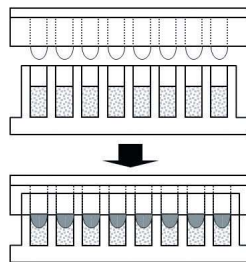
【問題点】

ピペッティングによる

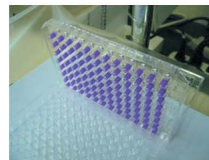
- ・培地の交換が煩雑
- ・洗浄工程が煩雑
- ・バイオフィルムを壊してしまう可能性が高い



マイクロプレート用フタの96ピンへ形成



96-pins in lid



【利点】

受けプレートを交換するだけで

- ・培地の交換が容易
- ・洗浄工程が容易
- ・バイオフィルムを壊してしまう可能性が低い

図1 マイクロプレート用フタに設置した96ピンへバイオフィルムを形成する利点

される(図2)。この一連の反応は微生物の代謝反応を介して起こることから、生成したホルマザン色素量は微生物の代謝活性に比例することになる。つまり、生きている微生物細胞では代謝が起こり発色するが、死んでいる微生物細胞では発色は生じない。この測定系では吸光度と生成するホルマザン量との間に比例関係が見られるため、吸光度を測定することで微生物の代謝活性を求めることができる^{5, 8)}。

図2の測定原理を利用した微生物検出試薬は、電子メディエータ及び水溶性テトラゾリウム塩から構成される。①様々な微生物をオールラウンドに検出できること、②感度良く微生物を検出できること、③培地成分の影響を受けないことを考慮して、電子メディエータと水溶性テトラゾリウム塩 WST-8 の組み合わせが選抜された⁹⁾。実際の測定では、電子メディエータの DMSO 溶液と WST-8 水溶液を無菌的に混合して検出試薬として使用する。検出試薬は96ウェルマイクロプレートに分注し、吸光マイクロプレートリーダーを用いて生成したホルマザン色素(オレンジ色)を460nmで測定する。この手法は、バイオフィルム内の微生物活性の測定にも適用可能である。

この測定原理を利用した Microbial Viability Assay Kit-WST は(株)同仁化学研究所より販売されている(図3)。また、本キットの使用例については別稿を参考にされたい⁹⁾。

3. マイクロプレート用フタに設置した96ピンへのバイオフィルム形成法

図1に示す96ピンへバイオフィルムを形成するには、形成条件の最適化が必須である。ここではその一例について紹介する。

まず、最適な形成用培地で調製した微生物懸濁液を96ウェルマイクロプレートへ180μlずつ分注し、これに96ピン付きマイクロプレート用フタ(Nunc-Immuno TSP 96 Pins in Lid; Thermo Fisher Scientific Inc.)を被せて37℃で一定時間静置培養して96ピンへバイオフィルムを形成させる。大腸菌 *Escherichia coli*、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis*、黄色ブドウ球菌

Staphylococcus aureus、表皮ブドウ球菌 *Staphylococcus epidermidis*、う蝕菌 *Streptococcus mutans* は、24時間静置培養した後、新鮮培地を分注した96ウェルマイクロプレートへ96ピン付きマイクロプレート用フタを移し、さらに72時間静置培養する。ここでのポイントは培地交換をすることである。培地交換なしで96時間連続培養してもバイオフィルムの形成はあまり促進されない。培地交換することでバイオフィルムの形成を大幅に促進することができる。一方、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* は、培地交換しないで24時間静置培養することでバイオフィルムを形成させる。緑膿菌は培養時間を長くすると逆に形成量が減少する傾向がみられる。ピン素材にはすべてポリスチレンを用いた。ここには示していないが、ピン素材にポリプロピレンを用いたほうがバイオフィルムを形成する菌種もある。表1へ上記6菌種のバイオフィルム形成条件を示す。

4. バイオフィルム薬剤感受性試験法

次に、「水溶性テトラゾリウム塩 WST を用いた微生物活性測定法」と「96ピンへのバイオフィルム形成法」を組み合わせた

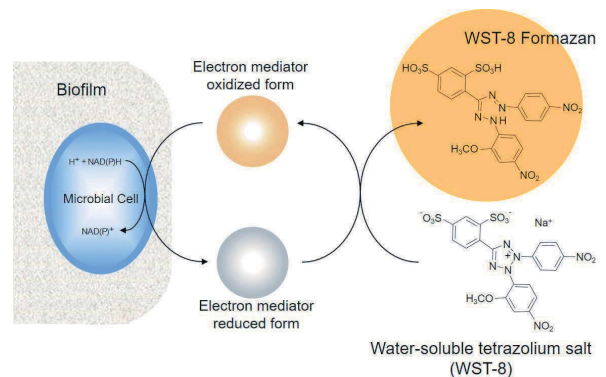


図2 水溶性テトラゾリウム塩 WST を用いた微生物活性測定



図3 Microbial Viability Assay Kit-WST

バイオフィルム薬剤感受性試験法について述べる。図4に測定手順を示す。

バイオフィルムに対する薬力学的パラメーターとしては、様々な指標が提唱されている³⁾。バイオフィルム外への微生物の増殖阻害濃度を示す最小バイオフィルム発育阻止濃度 (Minimum Biofilm Inhibition Concentration, MBIC)、バイオフィルム内微生物を99.9%以上殺菌する濃度を示す最小バイオフィルム殺菌濃度 (Minimum Biofilm Bactericidal Concentration, MBBC)、バイオフィルム内微生物の完全殺菌濃度を示す最小バイオフィルム撲滅濃度 (Minimum Biofilm Eradication Concentration, MBEC) などが挙げられる。Quらは、MBIC、MBBC及びMBECの測定の重要性を説いている¹⁰⁾。ここでは、本法を用いたMBIC、MBBC及びMBECの逐次測定について紹介する。

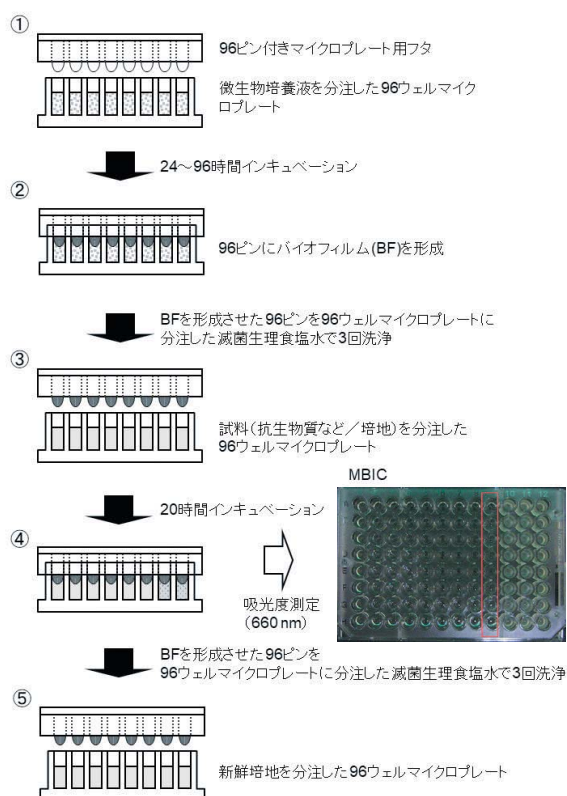


表1 バイオフィルム形成条件

Microorganism	Medium	Cell density (CFU/ml)	Incubation time (h)	Incubation temp. (°C)	Pin materials
Gram-negative					
<i>Escherichia coli</i> NBRC15034	BHI	10 ⁷	24+72	37	PS
<i>Porphyromonas gingivalis</i> JCM12257	Enriched BHI	10 ⁷	24+72	37	PS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBRC13275	BHI or MHB	10 ⁶	24	37	PS
Gram-positive					
<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC13276	MHB	10 ⁷	24+72	37	PS
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC35984	TSB	10 ⁷	24+72	37	PS
<i>Streptococcus mutans</i> NBRC13955	TSB+2% suc	10 ⁷	24+72	37	PS

Medium: MHB, Mueller-Hinton broth; BHI, Brain heart infusion broth; TSB, Tryptic soy broth; TSB+Suc, Tryptic soy broth containing 2% sucrose; Enriched BHI, BHI containing 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine, 0.5mg% hemin and 0.05mg% menadione.

Pin material: PS, polystyrene (Nunc-Immuno TSP 96 Pins in Lid).

まず、表1の条件に従って、マイクロプレート用フタに設置した96ピンへバイオフィルムを形成させる(図4:①~②)。次に、96ピン付きマイクロプレート用フタを滅菌生理食塩水で3回洗浄後、2倍希釈系列濃度の抗生物質/培地200μlを分注した96ウェルマイクロプレートへ被せ、20時間インキュベーションする(図4:③)。インキュベーション後、受けプレートの吸光度測定(660nm)を行い、吸光度が0.1以下のウェルを阻止と判定し、MBICを測定する(図4:④)。次に、抗生物質に接触させた96ピン付きマイクロプレート用フタを滅菌生理食塩水で3回洗浄後、新鮮培地200μlを分注した96ウェルマイクロプレートへ移し、24時間インキュベーションする(回復培養)(図4:⑤)。回復培養後、同様にして受けプレートの吸光度測定(660nm)を行い、MBBCを測定する(図4:⑥)。さらに、96ピン

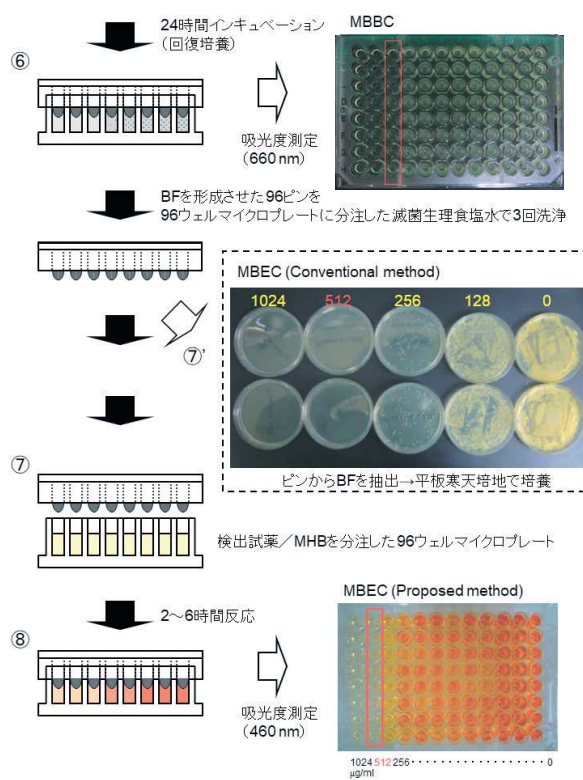


図4 バイオフィルム薬剤感受性試験の手順

表2 黄色ブドウ球菌産生バイオフィルムにおける抗生物質単独使用時の MBIC、MBBC、MBEC

Antibiotics	Proposed method			Conventional method
	MBIC	MBBC	MBEC	MBEC
Azithromycin	16	>1024	>1024	>1024
Cefazolin	<1	>1024	>1024	>1024
Chloramphenicol	32	>1024	>1024	>1024
Ciprofloxacin	<1	1024	>1024	>1024
Clarithromycin	8	>1024	>1024	>1024
Clindamycin	<1	>1024	>1024	>1024
Daptomycin	8	>1024	>1024	>1024
Doxycycline	<1	16	1024	1024
Erythromycin	64	>1024	>1024	>1024
Gentamicin	<1	16-32	>1024	>1024
Imipenem	<1	>1024	>1024	>1024
Kanamycin	4	>1024	>1024	>1024
Linezolid	8-16	>1024	>1024	>1024
Meropenem	<1	>1024	>1024	>1024
Minocycline	<1	8	1024	1024
Oxacillin	1-2	>1024	>1024	>1024
Phosphomycin	8-16	>1024	>1024	>1024
Rifampicin	128-256	256	>1024	>1024
Streptomycin	8	>1024	>1024	>1024
Teicoplanin	2	16-32	>1024	>1024
Tigecycline	<1	64	1024	>1024
Tylosin	8	>1024	>1024	>1024
Vancomycin	4	256	512	512

(μg/ml)

付きマイクロプレート用フタを滅菌生理食塩水で3回洗浄後、検出試薬含有 Mueller-Hinton broth を 200 μl 分注した 96 ウェルマイクロプレートへ移し、一定時間反応させる (図 4: ⑦)。2 ~ 6 時間反応後、マイクロプレートリーダーを用いて受けプレートの吸光度測定 (460 nm) を行う (図 4: ⑧)。コントロール (抗生物質処理なしのバイオフィルム) が吸光度 3.0 以上に達した際、サンプル (各種濃度の抗生物質処理後のバイオフィルム) とブランク (バイオフィルムなし) の吸光度差が 0.1 以下を示す濃度を MBEC とする⁶⁾。

5. 本法を用いた抗生物質の評価とその併用効果

本法を用いて、黄色ブドウ球菌 *S. aureus* NBRC13276 のバイオフィルムを対象として、代表的な抗生物質とその併用効果について評価を行った⁶⁾。

まず、抗生物質単独での MBIC、MBBC 及び MBEC の逐次測定を行ったところ、いずれの抗生物質においても MBIC < MBBC < MBEC の傾向を示した。また、いずれの抗生物質もバイオフィルム外への微生物の増殖阻止は可能であった (MBIC)。バイオフィルム内の微生物殺菌の指標となる MBEC に関しては、ほとんどの抗生物質が無効 (> 1024 μg/ml) であったが、Doxycycline、Minocycline、Tigecycline、Vancomycin は高濃度で

はあるが有効性を示した (表 2)。

次に、*S. aureus* バイオフィルムに対する抗生物質の併用効果を検討した。単独では Vancomycin (MBEC = 512 μg/ml) が最も有効であったため、Vancomycin と他の抗生物質の併用効果を検討した。その結果、Ciprofloxacin、Daptomycin、Gentamicin、Teicoplanin との組み合わせにおいて相乗効果がみられた (データ未掲載)。さらに、Vancomycin、Daptomycin と第 3 の抗生物質の組み合わせを検討したところ、Teicoplanin との組み合わせにおいて最も高い相乗効果がみられた (表 3)。Vancomycin 単独では MBEC = 512 μg/ml であるのに対して、Vancomycin = 8、Daptomycin = 4、Teicoplanin = 8 μg/ml と低い濃度で殺菌効果を示すことが明らかとなった。さらに、この組み合わせは MRSA を含む他の *S. aureus* バイオフィルムへも有効であった。

抗生物質の併用効果を検討する場合、数十~数百通りの組み合わせが必要となる。従来法により正確な MBEC 値を求めるためには、まずピンからバイオフィルムを滅菌綿棒等で物理的に回収し、さらに超音波処理でマトリックスから微生物細胞を抽出・分散後、抽出液を平板寒天培地で培養して生菌数を測定しなければならない。したがって、従来法では多大な労力と時間を要するため、大量の試料の測定は実質不可能である。筆者らが行った従来法による実験では、96 ピン (プレート 1 枚分) を処理するのに約 5 時間、さらに培養に 24 時間が必要であった。従来法では実験者 1 人で 1 日に処理可能なプレートは 1 枚が限界であるのに対して、本法では 10 枚以上の処理が可能であり、測定の操作性及び迅速性が格段に向上したと考えられる。また、本法で得られた MBEC 値を、従来法 (図 4: ⑦) で測定した MBEC 値と比較したところ、両者は良好に一致した (表 2)⁶⁾。この結果から本法による MBEC 測定の信頼性が確認された。

6. おわりに

本稿では、バイオフィルム薬剤感受性試験法について実施例を交えて紹介した。従来法では、測定に多大な労力と時間を要していたが、「水溶性テトラゾリウム塩 WST を用いた微生物活性測定法」と「96 ピンへのバイオフィルム形成法」を組み合わせることで、測定の操作性及び迅速性を格段に向上させることができた。しかし、バイオフィルム薬剤感受性試験法による結果とバイオフィルム感染症の治療効果との相関性に関しては未だ検討段階であり、今後の進展が期待される¹¹⁾。

近年、安全性の高い食材を中心にバイオフィルム内の微生物に対して殺菌活性を有する素材を探索する研究も活発化している¹²⁾。本法は、抗バイオフィルム素材のスクリーニングにも適用可能であり、筆者らも食材を中心とした天然素材からのスクリーニングを進めているところである¹³⁾。医療分野ではバイオフィルム薬剤感受性試験法の結果が治療に適用できるか検討されている段階であるため、食品、化粧品、生活・サニタリー、環境などのバイオフィルム制御が必要となる分野で先行して本法が使用されることが期待される。

また、著者らは、これまでに得られた知見に基づき、「クリスタルバイオレットを用いたバイオフィルム染色法」と「96 ピンへのバイオフィルム形成法」を組み合わせたバイオフィルム形成阻害活性測定法の確立にも取り組んでいる¹⁴⁾。予防的観点からバイオフィルムによる感染症を未然に防ぐには、まずバイオフィルムの形成を抑制することが効果的である。食材を中心にバイオフィルム形成阻害活性を有する素材の探索は広く行われているが、本法を用いることでそのスピードが飛躍的に高まると考えら

表3 黄色ブドウ球菌産生バイオフィームにおける抗生物質併用時のMBEC

Antibiotics	Alone	Combination (other antibiotics / daptomycin / vancomycin)		
	MBEC (μg/ml)	MBEC (μg/ml)	FIC*	Effect
<i>S. aureus</i> NBRC13276				
Vancomycin	512	—	—	—
Daptomycin	>1024	—	—	—
+ Ciprofloxacin	>1024	8 / 4 / 64	<0.5	synergy
+ Gentamicin	>1024	2 / 4 / 64	<0.5	synergy
+ Teicoplanin	>1024	8 / 4 / 8	<0.5	synergy
<i>S. aureus</i> ATCC29213				
+ Teicoplanin	>1024	32 / 4 / 64	<0.5	synergy
<i>S. aureus</i> NBRC14462				
+ Teicoplanin	>1024	32 / 4 / 64	<0.5	synergy
<i>S. aureus</i> ATCC43300 (MRSA)				
+ Teicoplanin	1024	16 / 4 / 64	<0.5	synergy

*FIC index: ≤0.5, synergy; 0.5 to 1.0, additivity; 1.0 to 4.0, indifference; and >4.0, antagonism.

れる。近い将来、今回紹介した手法が様々な分野でバイオフィームの評価に利用されることを期待したい。

[参考文献]

- 1) M. Simões, L. C. Simões and M. J. Vieira, A review of current and emergent biofilm control strategies, *LWT - Food Sci. Technol.*, **2010**, 43, 573-583.
- 2) S. Hogan, M. Zapotoczna, N. T. Stevens, H. Humphreys, J. P. O' Gara and E. O' Neilla, Eradication of *Staphylococcus aureus* catheter-related biofilm infections using ML:8 and Citrox, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2016**, 60, 5968-5975.
- 3) M. D. Macià, E. Rojo-Molinero and A. Oliver, Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria, *Clin. Microbiol. Infect.*, **2014**, 20, 981-990.
- 4) J. J. Harrison, C. A. Stremick, R. J. Turner, N. D. Allan, M. E. Olson and H. Ceri, Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening, *Nat. Protoc.*, **2010**, 5, 1236-1254.
- 5) T. Tsukatani, H. Suenaga, T. Higuchi, T. Akao, M. Ishiyama, T. Ezoe and K. Matsumoto, Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts, *J. Microbiol. Methods.*, **2008**, 75, 109-116.
- 6) T. Tsukatani, T. Kawaguchi, H. Suenaga, M. Shiga and T. Ikegami, Rapid and simple determination of minimum biofilm eradication concentration by a colorimetric microbial viability assay based on reduction of a water-soluble tetrazolium salt and combined effect of antibiotics against microbial biofilm, *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.*, **2016**, 6, 677-680.
- 7) M. V. Berridge, P. M. Herst and A. S. Tan, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction, *Biotechnol. Annu. Rev.*, **2005**, 11, 127-152.
- 8) T. Tsukatani, H. Suenaga, T. Higuchi, T. Akao, M. Ishiyama, T. Ezoe and K. Matsumoto, Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water-soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances, *Anal. Biochem.*, **2009**, 393, 117-125.
- 9) 塚谷忠之, 水溶性テトラゾリウム塩 WST を用いた微生物検出法の開発と食品分野への応用, *日本食品科学工学会誌*, **2015**, 62, 321-327.
- 10) Y. Qu, A. J. Daley, T. S. Istivan, D. A. Rouch and M. A. Deighton, Densely adherent growth mode, rather than extracellular polymer substance matrix build-up ability, contributes to high resistance of *Staphylococcus epidermidis* biofilms to antibiotics-authors' response, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2010**, 65, 1405-1411.
- 11) T. Coenye, D. Goeres, F. Van Bambeke and T. Bjarnsholt, Should standardized susceptibility testing for microbial biofilms be introduced in

clinical practice?, *Clin. Microbiol. Infect.*, **2018**, 24, 570-572.

- 12) K. L. Kavanaugh and K. Ribbeck, Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2012**, 78, 4057-4061.
- 13) 塚谷忠之, 川口友彰, 黒田理恵子, グラム陰性菌産生バイオフィームの殺菌活性を有する香料の探索, *日本食品科学工学会第64回大会要旨集*, **2017**, p. 104.
- 14) 塚谷忠之, 川口友彰, 末永 光, バイオフィーム形成阻害活性スクリーニング法の開発, *日本食品科学工学会第63回大会要旨集*, **2016**, p. 140.

[著者プロフィール]

氏名: 塚谷 忠之 (Tadayuki Tsukatani)

所属: 福岡県工業技術センター 企画管理部 情報交流課 専門研究員

〒818-8540 福岡県筑紫野市上古賀 3-2-1

Tel : 092-925-5977 Fax : 094-925-7724

E-mail : tukatani@fitc.pref.fukuoka.jp

出身学校: 九州大学大学院農学研究科食糧化学工学専攻
学位: 博士 (農学)

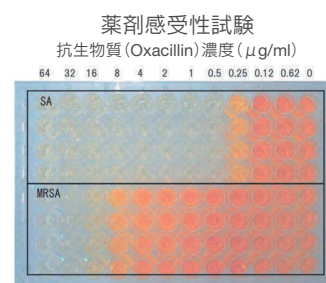
微生物検出キット

Microbial Viability Assay Kit-WST

<特長>

- ・WST 法による簡便かつ迅速な測定
- ・マイクロプレートアッセイによる多検体処理が可能

本キットに含まれる還元発色剤 WST-8 は、電子メデイエーターを介して微生物内で生成する NAD(P)H によって還元され発色します。還元された WST-8 ホルマザン量は微生物の代謝活性に比例しており、吸光度を測定することで、微生物の生存率や活性度合いを簡単に測定することができます。



	従来法		本方法
	コロニー形成法	濁度法	WST 法
所要時間	24 時間以上	18-24 時間	約 8 時間* (培養 6 時間) (発色 2 時間)
特長	・標準法 ・操作が煩雑	・マイクロプレートアッセイが可能 ・代謝活性は見えない	・短時間でのマイクロプレートアッセイが可能 ・代謝活性を指標とする

*菌種によって最適条件は異なります。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Microbial Viability Assay Kit-WST	100 tests 500 tests	6,000 21,300	M439

新製品

バイオフィーム形成阻害測定キット・バイオフィーム薬剤効果測定キット

Biofilm Formation Assay Kit

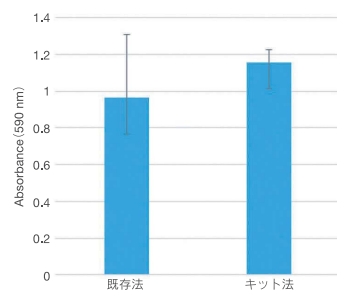
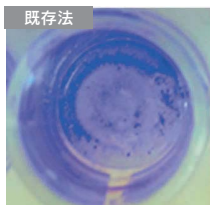
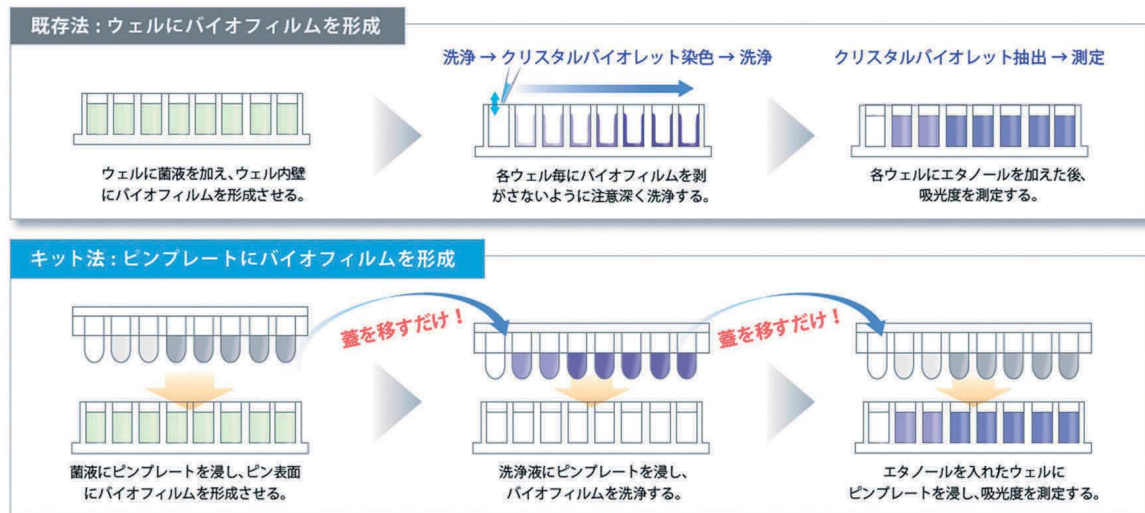
Biofilm Viability Assay Kit

<特長>

- ・マイクロプレートの蓋に固定したピンにバイオフィームを形成させる手法で、洗浄・染色・発色操作が簡便
- ・バイオフィームが剥がれることがなく均一に形成可能
- ・多検体処理が可能

Biofilm Formation Assay Kit はクリスタルバイオレット（CV）染色法によりバイオフィーム形成量および薬剤のバイオフィーム形成阻害を測定することができます。また、Biofilm Viability Assay Kit はバイオフィーム内の生菌の代謝活性を測定することで、バイオフィーム内微生物に対する薬剤の殺菌効果を確認することができます。

既存法はマイクロプレートの底にバイオフィームを形成するため、菌の培養に伴う培地交換や、染色工程前後の洗浄作業に多くの手間を要し、バラツキの問題がありました。本キットは蓋に固定されたピン上にバイオフィームを形成させるため、培地交換や染色工程が蓋を移すだけで完了し、操作が非常に簡便です。



菌種：S.aureus
各 n = 8 の平均
クリスタルバイオレット法によるバラツキの比較

	測定項目	測定対象	測定原理	測定波長	製品名
STEP 1	バイオフィームの形成量測定 ⇒ まず、このキットからスタート！	生菌・死菌・細胞外多糖	CV 法	590 nm	Biofilm Formation Assay Kit (製品コード：B601)
STEP 2	バイオフィーム内の生菌の代謝活性測定 ⇒ 形成量測定ができた後、このキット！	生菌	WST 法	440-480 nm	Biofilm Viability Assay Kit (製品コード：B603)

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Biofilm Formation Assay Kit	100 tests	16,300	B601
Biofilm Viability Assay Kit	100 tests	18,700	B603

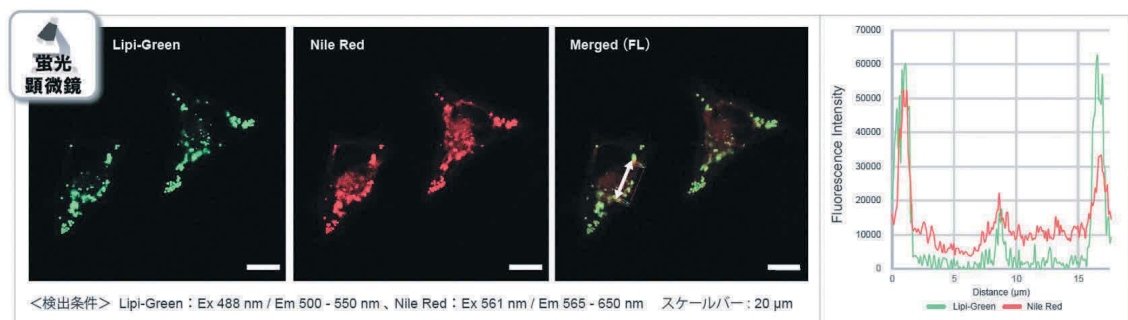
新製品

脂肪滴測定試薬・キット

Lipi シリーズは、脂肪親和性の高い低分子蛍光試薬であり、疎水性環境下で蛍光が増強します。また、試薬を添加するだけで生細胞および固定化細胞中の脂肪滴をイメージングでき、また量的変動を数値化することができます。

脂肪滴を特異的に染める Lipi シリーズ

オレイン酸を添加した HeLa 細胞を生細胞の状態で、100 nmol/l Lipi-Green および 100 nmol/l Nile Red (T 社) で染色しました。その結果、Lipi-Green と Nile Red で相関する局在 (黄色) はみられたものの、Nile Red では脂肪滴以外の部分も染色されました。



専用のキットだから数値化もできる

Lipid Droplet Assay Kit には、プレートリーダー及びフローサイトメーター (FCM) による測定プロトコル、アッセイ用のバッファーが同梱されており、簡便に脂肪滴量を数値化できます。



操作時間を大幅に短縮 生細胞にも適応可能

Lipid Droplet Assay Kit で用いる蛍光色素は、生細胞ならびに固定化細胞での使用が可能です。そのため、Oil Red O (比色試薬) を用いた方法と比較して測定に必要な時間を大幅に短縮することができます。また、Oil Red O にみられるようなプレートに色素が沈着しないため、実験の再現性が向上します。



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Lipi-Blue	10 nmol *1	18,000	LD01
Lipi-Green	10 nmol *1	18,000	LD02
Lipi-Red	100 nmol *1	18,000	LD03
Lipi-Deep Red	10 nmol *1	18,000	LD04
Lipid Droplet Assay Kit-Blue	1 set *2	25,000	LD05
Lipid Droplet Assay Kit-Deep Red	1 set *2	25,000	LD06

*1 Lipi dye : 35 mm dish 10 ~ 50 枚分

*2 Assay Kit : 96 well plate 1 枚分、フローサイトメトリー 40 アッセイ分

Lipi シリーズを使用した論文は
小社 HP よりご覧いただけます。

脂肪滴 同仁 検索

新製品

エクソソーム染色キット

エクソソーム膜 蛍光染色キット

ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Green, Red, Deep Red

エクソソームタンパク質 蛍光染色キット

ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Green, Red, Deep Red

エクソソーム (Exosome) は細胞から分泌される直径約 50-150 nm の細胞外小胞の一種で、内部には核酸やタンパク質などの物質を含み細胞間の情報伝達に関与していると考えられており、現在活発に研究されています。ExoSparkler シリーズは、精製したエクソソームの膜またはタンパク質を選択的に染色し、エクソソームの動態をイメージングすることができます。

より正確にエクソソームの動態を観察することが可能

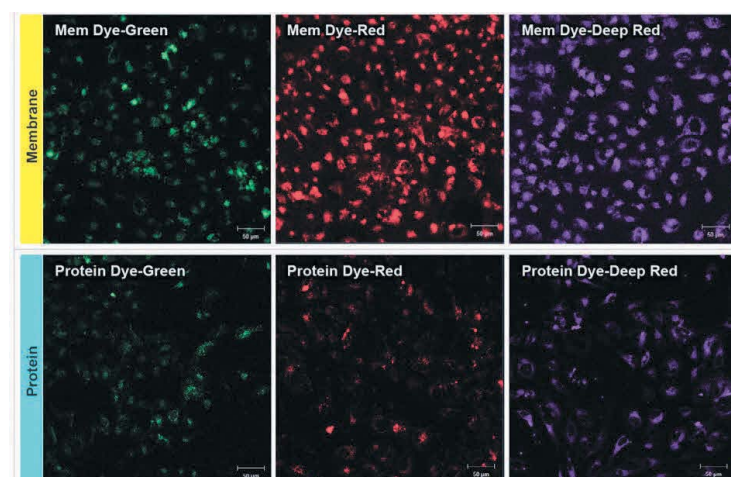
一般的なエクソソーム膜染色試薬には、色素自体が凝集を起こし、エクソソームに由来しない蛍光輝点が生じたり、エクソソームの性質変化やバックグラウンド上昇などの課題が挙げられています^{1), 2)}。

ExoSparkler シリーズで用いている色素は、色素自体が凝集を起こさず、染色前後でのエクソソームのサイズ分布や表面電化状態も変化しないため、より正確にエクソソームの動態を観察することが可能です。

[参考文献]

- 1) D. Mehdi *et al.*, "Exosome labeling by lipophilic dye PKH26 results in significant increase in vesicle size", *bioRxiv.*, **2019**, doi:10.1101/532028
- 2) D. P. Pužar *et al.*, "PKH26 labeling of extracellular vesicles: Characterization and cellular internalization of contaminating PKH26 nanoparticles", *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.*, **2018**, 1860(6), 1350-1361.

<細胞へのエクソソーム取り込み実験例>



<実験条件>

超遠心法で精製したエクソソーム (タンパク質量として 10 μg) を各色素で染色し、HeLa 細胞 (1.25 × 10⁴ cells) に添加、24 時間インキュベートし、洗浄後の蛍光画像を観察した。

<使用製品>

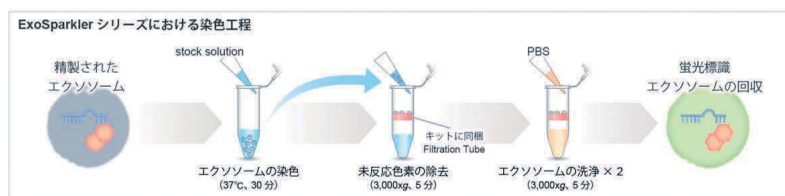
Mem Dye:
ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit
Protein Dye:
ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit

<検出条件>

Green: Ex 488 nm / Em 490 - 540 nm
Red: Ex 561 nm / Em 570 - 640 nm
Deep Red: Ex 640 nm / Em 640 - 760 nm

専用のキットでエクソソームの 蛍光標識が可能

本キットには、エクソソームの標識に最適化したプロトコルに加え、標識後に未反応の色素を除去できるフィルトレーションチューブを同梱しているため、簡便な操作で蛍光標識したエクソソームを調製できます。



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Green	5 samples	25,000	EX01
ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Red	5 samples	25,000	EX02
ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Deep Red	5 samples	25,000	EX03
ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Green	5 samples	20,000	EX04
ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Red	5 samples	20,000	EX05
ExoSparkler Exosome Protein Labeling Kit-Deep Red	5 samples	20,000	EX06

既存試薬との性能の違いや実験例は
小社 HP よりご覧いただけます。

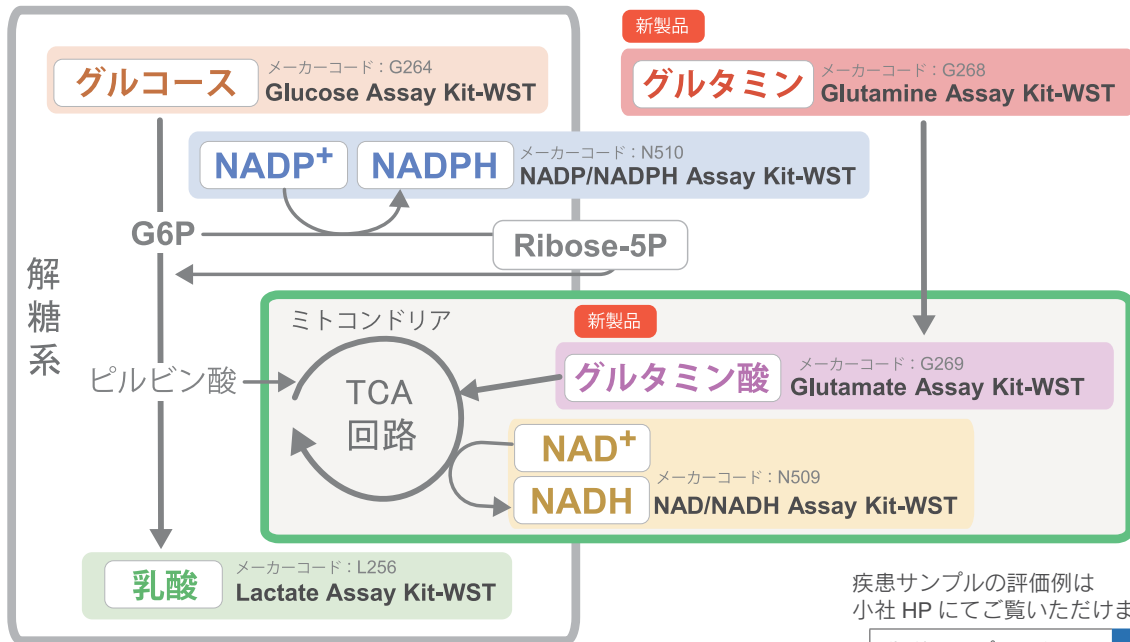
エクソソーム 同仁

検索

新製品

細胞内代謝測定キット

細胞内の代謝システムである解糖系や TCA 回路、ペントース - リン酸経路の解析は、細胞状態を理解する上で重要であり、グルコースや乳酸、NAD(P)⁺/NAD(P)H、グルタミン、グルタミン酸などのエネルギーおよび代謝産物を指標に評価されています。



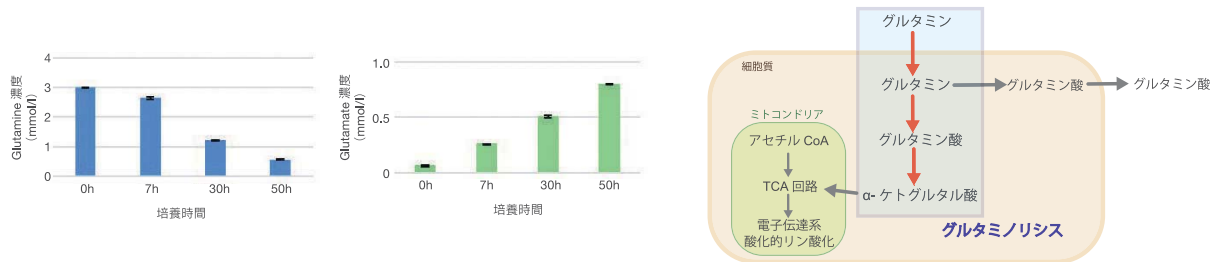
測定操作



1 キットあたり測定可能なサンプル数 (n = 3 で標準サンプル 8 点で検量線を作成した場合) グルタミン、NAD(P)⁺/NAD(P)H : 12 サンプル グルタミン酸 : 24 サンプル

グルタミン及びグルタミン酸の測定例

A549 細胞を 6 穴プレートに播種し、培養時間に伴う細胞培養上清中のグルタミン濃度を Glutamine Assay Kit-WST を用いて測定し、グルタミン酸濃度を Glutamate Assay Kit-WST を用いて測定しました。その結果、培地中のグルタミン濃度は時間と共に減少し、グルタミン酸濃度は時間と共に増加する結果が得られました。



<実験条件> 細胞: A549 細胞 (5×10^5 cells) 測定サンプル: 培養上清

グルコース及び乳酸の測定例

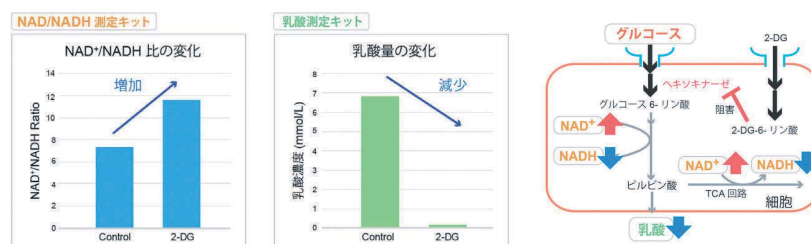
グルコーストランスポーター阻害剤である Phloretin を、Jurkat 細胞に加えた際の代謝活性の変化を Glucose Assay Kit-WST 及び Lactate Assay Kit-WST を用いて確認しました。その結果、Phloretin 添加によりグルコースの取り込みが阻害され、培地中のグルコース消費量は低下、乳酸量は減少する結果が得られました。



<実験条件> 細胞: Jurkat 細胞 (5×10^5 cells)、薬剤: Phloretin (終濃度: $100 \mu\text{mol/L}$)、暴露時間: 一晚、測定サンプル: 培養上清

NAD⁺/NADH と乳酸の測定例

2-Deoxy-D-glucose (2-DG) を HeLa 細胞に添加し、24 時間培養後の上清を用いて Lactate Assay Kit-WST で乳酸量を、培養上清除去後の細胞を用いて NAD/NADH Assay Kit-WST で NAD⁺/NADH 比を測定しました。2-DG 添加により細胞内の解糖系が阻害されたことで乳酸量は減少し、NAD⁺/NADH 比は増加する結果が得られました。



<実験条件> 細胞: HeLa 細胞 (1×10^6 cells)、薬剤: 2-DG (終濃度: 6 mmol/L)、暴露時間: 24 時間、測定サンプル: 培養上清 (乳酸測定)、細胞 (NAD⁺/NADH 測定)

品名	容量	希望納入価格	メーカーコード
Glutamine Assay Kit-WST	100 tests	55,000	G268
Glutamate Assay Kit-WST	100 tests	50,000	G269
Glucose Assay Kit-WST	50 tests	18,000	G264
	200 tests	38,000	
Lactate Assay Kit-WST	50 tests	29,000	L256
	200 tests	68,000	
NAD/NADH Assay Kit-WST	100 tests	54,000	N509
NADP/NADPH Assay Kit-WST	100 tests	54,000	N510

第30回フォーラム・イン・ドージン開催後記 「Nutrio-Metabolomic-Pathology—栄養と代謝からみた疾患の素顔—」

平成2年9月28日の第1回目から毎年開催されてきたフォーラムも今年で30回を迎えることとなった。冒頭、代表世話人である熊本大学の富澤一仁先生から、「栄養・代謝は古い学問で、現在、栄養代謝学を教える大学も少なくなっているが、栄養代謝研究に新しい手法を用いることで新たな面が見えてきた。この分野でどのようなことが新しく、どのような方向に向かっているのか、健康にどう関わっているのかを知る機会として頂きたい。」との趣旨説明があり、講演がスタートした。

最初の演者である山内敏正先生は、日本における糖尿病の現状に触れ、先生らの過去最大級のゲノムワイド解析の結果、2型糖尿病の危険性を高めるGLP-1受容体のミスセンス変異の同定と、この変異には民族的な相違があることも紹介され、日本人で調査する必要性が示された。多彩な手法が用いられており、膨大なデータの積み重ねによって糖尿病という疾病が理解され、健康長寿に向けた研究が行われている状況を知ることができた。質疑応答の中で、日本人は脂肪が蓄積されやすい遺伝子変異が多いことに触れられた。次に、山縣和也先生より、サーチチェーンの一つであるSIRT7についての研究紹介があった。SIRT7をノックアウトしたマウスでは脂肪蓄積の減少、老化の抑制などが観察され、脂質代謝、炎症や老化においてSIRT7とSIRT1、6の役割は逆であること、SIRT7は脂肪組織や骨組織の維持など体を作る上で重要で、60歳以降は活性化させることによりサルコペニアやフレイルの予防に繋がる可能性が示唆された。

午後は、矢作直也先生の栄養素がゲノムに与える影響に関する講演からスタートした。脂肪合成の主要な制御因子であるSREBP-1の発現を*in vivo*で可視化する技術を用いて、絶食時と摂食時でのマウス内での発現変化を観察する方法が紹介された。多価不飽和脂肪酸の栄養シグナルによる活性化抑制の可視化なども行われており、新たな機構の発見に繋がっていることが示された。次に、杉浦悠毅先生より、代謝生化学を可視化することを目的として、質量分析を使った低分子の生理活性化合物の高感度イメージング技術の紹介があった。今回は、酸素添加酵素によるコレステロール代謝産物やモノアミンを三次元的に捉えた事例とトリプトファン分解経路の解析に触れられた。フロアーの質問から、サンプル調製法のポイントなどを伺うことができた。

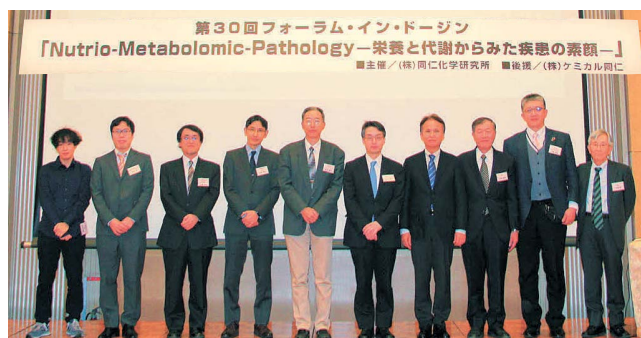
コーヒブレイクの後の長谷耕二先生のご講演では、腸管免疫の仕組みから始まり、パイエル板リンパ球の動きを解析し、絶食時はナイーブB細胞がパイエル板から骨髄へ、再摂食時には骨髄からパイエル板へと移動すること、造血幹細胞は絶食によって減少するが再摂食により戻ってくることなど、免疫に関わる細胞の動きの紹介があった。また、質問に対して、腸内細菌をかく乱させるとリバウンドしやすいとの話もあった。最後に、大澤毅先生から、低pHはWarburg効果の結果なのかという疑問からス



タートし、網羅的オミクス統合解析から、低pH、低栄養のがん微小環境に存在している細胞で発現する遺伝子とその機能、酢酸代謝、グルタミン代謝などの多重代謝適応の仕組みが理解され、アミノ酸欠乏の認識機構の解明による新たながん治療薬開発が示唆された。

セッションの終わりにあたって、世話人の一人である三浦湧先生は、「栄養、代謝、疾患はそれぞれが深い分野であり、多くのパラダイムが生まれては消えていくことを繰り返してきたが、これで終わりにしたい。今後は、インテグレーションの時代となる。演者の方々のご研究の発展を期待する。」と締めくくられた。セッション終了後は、ミキサー会場に移動し、山内先生のご挨拶、乾杯のご発声によって交流会が始まり、ご講演いただいた先生方や参加者との間でにぎやかに意見が交わされた。会場では昨年に続き同仁化学研究所の新入社員によるポスター発表を企画した。ご参加いただいた先生方からの次の30回に向けての期待と激励の言葉は有難かった。盛会な30回フォーラムとなり、企画したメンバーの一人として喜ばしい限りである。本フォーラム開催にあたり、快くご講演をお引き受けいただいた先生方始め、関わった多くの方々に感謝申し上げる。

(志賀匡宣)



要旨集をご希望の方は小社カスタマーサポートまでお問い合わせ下さい。

ホームページアドレス

URL : <https://www.dojindo.co.jp/>

E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス

フリーダイヤル

0120-021557

0120-489548

(受付時間：平日9:00～17:00)
(土・日・祝日は除く)