

バイオフィルム ケミカルバイオロジー

—総説—

バイオフィルムを知る

—レジオネラバイオフィルムの評価—

麻布大学 古畑 勝則

Methionine-Selective Protein Bioconjugation

North Carolina State University

Yvonne D. Hall Elizabeth J. Gross Hisham M. El-Shaffey Jun Ohata

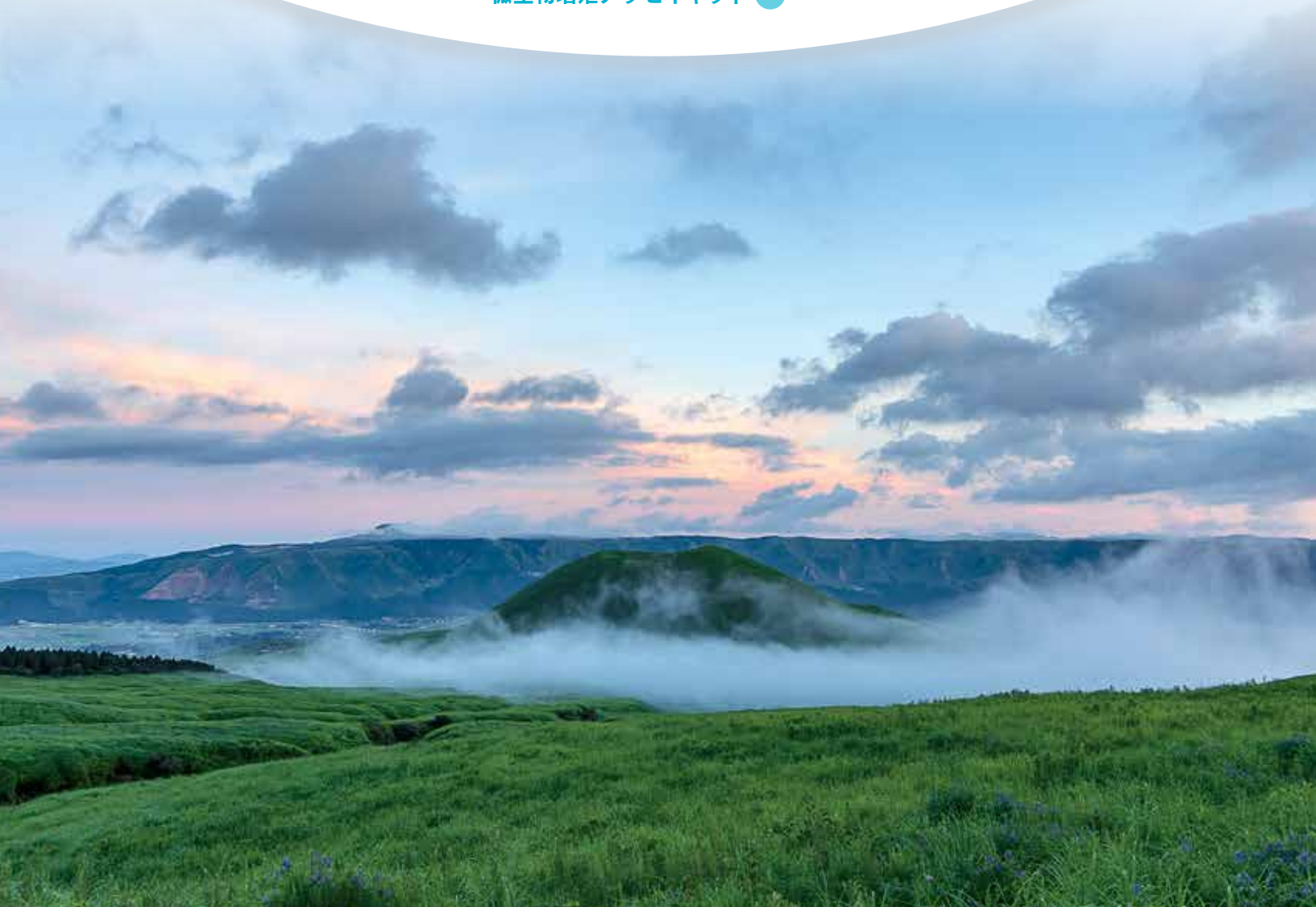
—注目の研究—

蛍光色素による細胞間 H₂O₂ シグナル伝搬の可視化

株式会社同仁化学研究所 岩下 秀文

新製品 試験片用バイオフィルム形成能測定キット P.14

関連製品 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.15
微生物増殖アッセイキット P.15





表紙撮影：熊本県 阿蘇市 米塚
阿蘇神話では、主人公である健甕龍命（たけいわたつのみこと）が阿蘇中の米を積み上げたので「米塚」と呼ばれ、頂のくぼみは、米を掌ですくって人々に与えた跡と伝えられています。

photo：永島俊介氏

CONTENTS

Review

バイオフィルムを知る

ーレジオネラバイオフィルムの評価ー ●—————[1]

麻布大学 古畑 勝則

Methionine-Selective Protein Bioconjugation ●—————[8]

North Carolina State University Yvonne D. Hall

Elizabeth J. Gross

Hisham M. El-Shaffey

Jun Ohata

Topics on Chemistry

蛍光色素による細胞間 H_2O_2 シグナル伝搬の可視化 ●——[13]

株式会社同仁化学研究所 岩下 秀文

Commercial

細胞増殖毒性測定キット ●—————[16]

関連製品

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 ●——[15]

微生物増殖アッセイキット ●—————[15]

新製品

試験片用バイオフィルム形成能測定キット ●—————[14]

お知らせ

学会発表のご案内 ●—————[7]

細胞死セミナーのご案内 ●—————[12]

31st Forum in DOJIN 細胞内膜系のダイナミズム

ーオルガネラが織りなす細胞のドラマー ●—————[18]

お役立ち

知ろう！学ぼう！これから始める微生物実験 ●—————[14]

細胞増殖・毒性測定ー試薬の選び方ー ●—————[16]

動画コンテンツのご案内 ●—————[17]

※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



フォロー
お願いします

@dojindoinfo

バイオフィームを知る—レジオネラバイオフィームの評価— Let's learn about biofilms —Evaluation of *Legionella* biofilm—



古畑 勝則

麻布大学
生命・環境科学部
教授

Abstract

As a preventive measure against Legionella disease, which is a respiratory infection, it is important to take measures against the source of infection. To date, the effectiveness of bactericidal agents, etc. against *Legionella pneumophila*, which is the causative agent of Legionellosis, has been evaluated via an experimental system in which floating cells come into contact

with a chemical agent. However, an evaluation system in an attached state has been anticipated when hypothesizing *L. pneumophila*'s "home". Therefore, a basic examination was experimentally conducted based on the conditions the biofilm of this bacteria are known to form. In other words, *L. pneumophila* was allowed to form a biofilm by changing the strain, the material of the carrier, and the reaction temperature in order to compare the amount of biofilm formation by the CV method (crystal violet method). As a result, the optimum conditions for biofilm formation of *L. pneumophila* were considered to be the use one serogroup strain which is allowed to stand for 7 days on a carrier of silicon and processed at 30°C. Furthermore, upon confirming the reaction state, using the Biofilm Viability Assay Kit via the WST method (water-soluble tetrazolium salt method), which was newly developed as an evaluation method after bactericide treatment, it was believed that it could be used to measure the MBEC (minimum biofilm eradication concentration), due to the fact that the WST method enabled the cell activity of *L. pneumophila*.

1. はじめに

バイオフィームの発生は特殊な現象のように考えられるが、それは我々人間の視点であり、この現象を微生物生態学的に微生物の視点でとらえると、ごく自然な現象であって、バイオフィームは“微生物のすみか”ともいえる。身近な環境において、分野、領域を問わず、水分が存在する場所ではバイオフィームが発生すると考えてはば間違いでない。

本稿では、一般的なバイオフィームについて概説し、さらにレジオネラによるバイオフィームの評価方法についても言及した。

2. 実は身近なバイオフィーム

近年、環境衛生や食品などの製造分野において「バイオフィーム」という言葉を見聞きする機会が多くなった。一方、医学や医療の分野では古くからバイオフィーム感染症として知られていたが、易感染者の増大により難治感染症としてクローズアップされている¹⁾。また、バイオフィームは、製紙工業や衛生工学などの特定の分野ではスライムと称され、さらに一般にはヌメリ、ヌルヌルなどと言われている。

製紙業界でのスライム（バイオフィーム）の発生は古くから大きな課題となっていた。1966年（昭和41年）には上谷と長谷川によって「製紙工場におけるスライムとスライムコントロール剤について」と題する論文がすでに発表されている²⁾。この論文の冒頭には、「今日、製紙工場において発生する障害として、第一にスライムを挙げなければならないほど重要な問題となっている。」という記述があり、この分野では半世紀以上も前からすでにスライムの発生が問題視されていたのである。

一方、住環境においても特に湿度が高い浴室や洗面所、台所等の水周りではピンク色を呈するヌルヌルしたバイオフィームが以前から問題視されていた³⁾。人々の生活水準の向上にともない、アメニティー、すなわち「快適性」という概念が広まり、限られ

た居住空間でできるだけ気持ちよく、清潔に生活したいとの意識が高まってきた。こうした居住者の意識変化を反映して居住環境で発生したバイオフィームの外観や感触から不快感を生じ、設計・施工者を相手に訴訟問題にまで発展した事例もある。

3. バイオフィームの正体

バイオフィームは、細菌をはじめ、真菌、藻類、原生動物など多種多様な微生物から構成される高次構造体であることが知られている⁴⁾。図1に示した通り、バイオフィームは、「細胞外多糖類マトリックス内に閉じこめられた細菌のミクロコロニーが点在し、その間を水が比較的自由に動ける water channels を含む密度の低いポリマーマトリックスが埋めている」というバイオフィームの三次元構造が明らかにされている⁵⁾。

微生物はバイオフィームを形成することによって、好ましい生育環境に滞留し、お互い情報交換しながら自らの役割を果たしつつ、様々な外的攻撃から身を守っている。例えば、バイオフィームを形成した緑膿菌では、抗生物質に対する耐性が浮遊細胞に比べて数百倍も上昇し、薬剤治療を困難にしている⁶⁾。

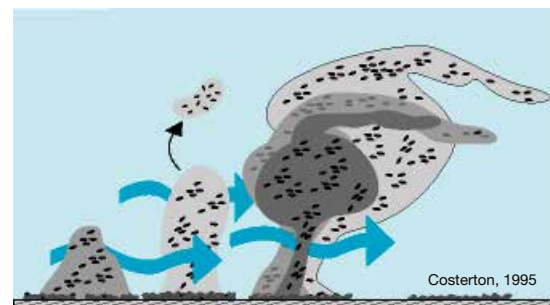


図1 バイオフィームの構造概念図⁵⁾

水之江ら⁷⁾は、黄色ブドウ球菌のバイオフィームから細胞外マトリクス (ECM) タンパク質を単離・同定した。ECM には、多糖体や DNA、タンパク質などが含まれていることは知られていたが、彼らのセリンプロテアーゼ (Esp) を用いた解析によって、約 130 種類のタンパク質が存在することが明らかにされ、その 64% が細胞質タンパクであり、12% が分泌タンパク質、6% が膜タンパク質であった⁸⁾。

4. バイオフィームの形成過程

身近な環境におけるバイオフィームの形成は、ある種の細菌が浴室の床や台所のシンクなどの担体に付着することから始まり、付着した細菌は汚れや洗剤などを栄養源に高温、多湿の条件下で短時間に増殖し、粘液物質を産生しつつさらに成熟していくものと考えられている⁹⁾。微生物の側に視点を移してみれば、「付着」は微生物の生活様式の一つであり、担体への付着に続くバイオフィームの形成は微生物にとって大変安定した状態であり、彼らの生き残りに関して重要な意味を持っている。

一見、清浄に見える物質表面でも多少の有機物や無機物が付着しており、いわゆるコンディショニングフィルムを形成している。このコンディショニングフィルムは、微生物にとって濃縮された栄養源であるばかりでなく、表面の物理化学的性質を変化させている。こうした物質表面に細菌が付着するためには、まず鞭毛や線毛を介して物質表面に可逆的付着状態と呼ばれるように緩く付着する。この状態は、浮遊状態と付着状態の中間の状態であり、一部の細胞は再び浮遊状態へと移行するが、ある細胞はバイオフィーム形成の前段階である不可逆的付着状態へと移行し、初期付着が完了する。その後、付着細胞の増殖や細胞外ポリマー (EPS: Extracellular polymeric substances) の産生によりバイオフィームはキノコ状構造物の集合体へと成熟していく。EPS は菌体同士を互いに結びつけ、物質表面との付着を強固にし、バイオフィームの構造を維持する働きを担っている。バイオフィーム内部には EPS がみられない細長い空洞が観察されており、水路のような構造によりバイオフィーム内部の物質循環に寄与していると考えられている¹⁰⁾ (図 2)。

こうしたバイオフィームの一連の形成過程において、常にそれを阻止する脱離作用が働いており、バイオフィームの構造、組成、機能は変化し続けている。バイオフィームからの脱離には、外部環境からの力による「受動的脱離」と、運動性の活性化や EPS の分解による「能動的脱離」がある。脱離によりバイオフィームが新しい環境へと移動して新しいバイオフィームの形成基盤となる¹⁰⁾。

5. 支持固体 (担体) の材質とバイオフィーム形成

バイオフィーム形成に関する細胞レベルあるいは遺伝子レベルでのメカニズムについては、かなり理解が進んできたが、支持固体の材質と細胞の初期付着やバイオフィーム形成との関係については不明な点が多い。

松村の解説¹¹⁾では、一般的に微生物細胞表面は負に帯電した親水性の表面で覆われていると考えられていることから、正電荷に帯電した表面ではバイオフィームが形成されやすいと記述されている。しかし、微生物細胞の初期付着に影響を及ぼす表面特性には、表面電荷や表面の親水性・疎水性だけではなく、表面粗さ、表面硬さ、表面張力、表面自由エネルギーなどが関与している可能性を指摘している。

藤澤らは、台所排水口から分離した菌株を用いて、ステンレス、アクリル、塩化ビニル、ポリエチレン、シリコン、ガラスの 6 種類の担体を対象に、バイオフィーム形成量を ATP 値で比較した¹²⁾。バイオフィーム形成量は供試菌株によって異なったが、*Klebsiella pneumoniae* が最も多く、担体別ではガラス、ステンレス、シリコンの順に多かったが、三者に大差はなかった。

Piao らは、レジオネラ属菌 51 株について、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレンを用いて 25℃、37℃、42℃ の温度条件でバイオフィームの形成状況を比較している¹³⁾。その結果、ガラスとポリスチレンでは、25℃ よりも 37℃ か 42℃ の方が 2 倍から 7 倍多かった。また、ポリプロピレンでは、37℃ や 42℃ よりも 25℃ の方が 2 倍から 16 倍多かった。

森川¹⁴⁾は、細胞が担体に付着する力は、疎水結合やイオン結合、水素結合、分子間力結合などの複合作用であると考えた。すなわち、細胞表層の構造や極性などが異なる細菌の種類ごとにバイオフィームを形成しやすい担体の材質が異なると予想した。ところが、実験の結果、予想に反して細菌種を越えてシリコンやポリウレタン、あるいはポリエチレンやポリプロピレンで高いバイオフィーム形成が確認された。実験に使用した樹脂シートのゼータ電位や接触角を測定したが、バイオフィームを形成しやすいこれらの材質に共通する物理化学的特性は認められず、細胞表層と支持固体表面との相互作用は解明されていない。

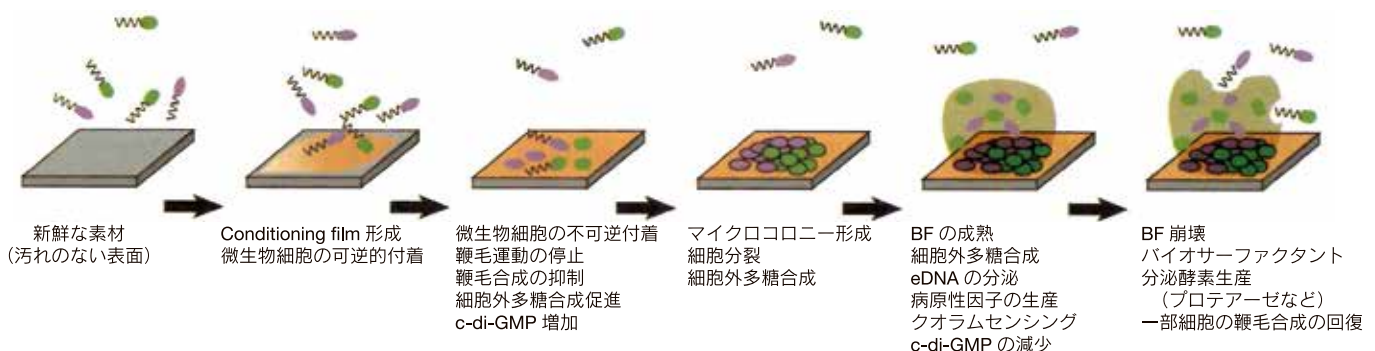


図 2 バイオフィーム形成の模式図¹⁰⁾

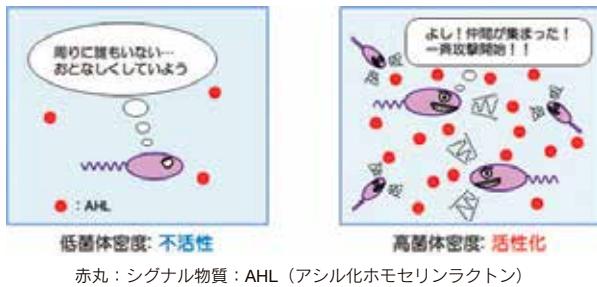


図3 微生物間情報伝達機構 (Quorum Sensing)¹⁶⁾

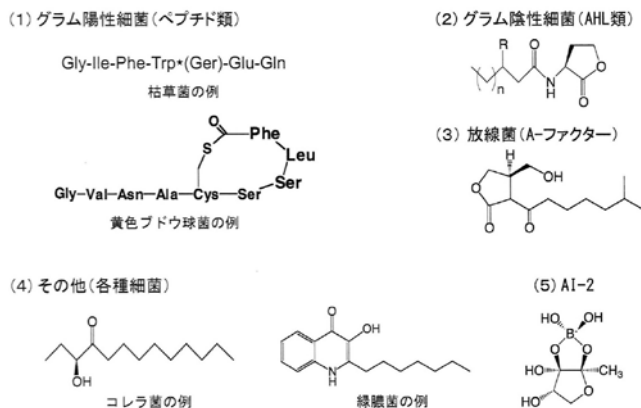


図4 細菌が用いているシグナル物質の一例¹⁵⁾

6. 細菌の情報伝達機構 (クオラムセンシング)

細菌にとって、環境変化に呼応した遺伝子発現の調整は、自らの生き残りを左右する重要な現象である。環境中における栄養素の欠乏、温度変化、急激な pH 変動などへ適応することは必須である。細菌は環境の変化、特に自身の存在環境における密度を的確に感知し、その濃度変化に応じて遺伝子の発現を巧妙に制御していることがわかってきた。近年、Autoinducer と呼ばれる細菌が産生するホルモン様物質 (シグナル物質) を介しての情報伝達機構、クオラムセンシング (Quorum-sensing, QS) が注目されている。この“quorum”とは、会議などの成立に必要な定足数の意味であり、生体内などで細菌が自らの数が優位な状況になったということを感じ、病原因子などの発現を一斉に開始するシステムとして理解することができる¹⁵⁾ (図3¹⁶⁾)。

細菌の種類によって産生されるシグナル物質の構造は様々であり、グラム陰性菌ではアシル化ホモセリンラクトン (AHL) や AI-2 をはじめとする S-アデノシルメチオニン (SAM) 誘導体が知られている。また、グラム陽性菌ではペプチドが、放線菌では A ファクターなどがシグナル物質として同定されている¹⁵⁾ (図4)。

バイオフィーム中では細胞が密集していることから、代謝産物や分泌物だけではなく、シグナル物質も高濃度に蓄積すると考えられる。バイオフィームはしばしば精巧な立体構造を示すが、その構造決定にも QS の関与が示唆されている。このように、バイオフィーム形成と細胞間コミュニケーションの間には重要な関連性が認められるが、その影響は培地などの実験条件によって大きく異なる。また、多くの細菌は細胞間コミュニケーションを欠いていてもバイオフィームを形成することが知られており、両者の

関連性についてはまだまだ解明されていない点も多い。

7. バイオフィームの解析・評価

7.1 バイオフィームの構造解析

バイオフィームはさまざまな機能を有した構造体であり、環境によって多様な生態を示すことがわかってきた。こうした発見はバイオフィームの解析技術の発展に伴うものであり、バイオフィーム解析技術の開発・改良は非常に重要である¹⁴⁾。

バイオフィームは微細な構造をもった複合体であり、その構造を知るために走査型電子顕微鏡を用いた観察が古くから行われてきた。しかし、こうした方法では生きた状態のバイオフィームを観察することができなかったため、近年、これに代わり共焦点レーザー走査型電子顕微鏡を用いた解析手法が広く利用されるようになった。この方法を用いることにより、バイオフィームが環境条件などに応じて、マッシュルーム状の立体構造になることやバイオフィーム内部に水路状の構造空洞が存在することなどが明らかになった⁵⁾ (図1)。

さらに、蛍光タンパク質を用いた共焦点レーザー走査型電子顕微鏡による解析が盛んに行われるようになり、バイオフィームが付着、成熟、脱離のサイクルをもつことなどが明らかにされ、バイオフィームの形成過程の経時的解析が進んだ (図2)。ここで重要な役割を果たしたのがフローセル法である¹⁷⁾。フローセル法は、次に示すようなマイクロプレート法のように多条件を比較する場合には適さないが、バイオフィームの立体構造について経時的な解析を行うには優れた手法であった。

さらに近年では、反射顕微鏡法を基礎とした Continuous-optimizing confocal reflection microscopy (COCRM) が開発され¹⁸⁾、物体からの反射光をシグナルとして利用する点が特徴であり、菌体の形質転換や染色を行わずに 3 次元構造を可視化することができ、そのバイオマス量を定量することも可能になった⁹⁾。

7.2 バイオフィームの定量解析

マイクロプレートを用いてバイオフィームを実験的に生成させ、染色法 (CV 法) によりバイオフィーム形成量を定量的に評価する方法は、以前から広く行われてきた¹⁷⁾。この方法は比較的手技が簡単であり、様々な条件を同時に比較しやすい反面、バイオフィームの形成段階で経時的に検討するには適さず、また純粋な分離株を用いた測定法であった。

一方、近年、多検体のバイオフィームを効率よく作成し、抗菌薬や消毒薬の作用を評価できるマイクロプレート法を応用したデバイスが開発され、カルガリー・バイオフィームデバイス法といわれる¹⁹⁾。この方法は、ペグと呼ばれる突起物があるマイクロプレートの蓋を利用し、このペグにバイオフィームを生成させてから、次にこのペグを供試物質に入れて反応させ、その効果を判定するものである¹⁷⁾ (図5)。こうした方法により細菌が付着した状態での抗菌活性等を測定することが可能になり、「最小バイオフィーム除去濃度、MBEC」として定量的に評価することもできる。この方法を利用して薬剤感受性試験での抗菌活性を測定した報告もみられる^{20, 21)}。また、ペグの材質を変えてバイオフィームを生成させ、CV 法により供試菌の付着特性を検討することも容易である。さらに、蓋から取外した個々のペグについて走査型電子顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡によりバイオフィーム構造の解析もできる²²⁾。いずれも 96 穴のプレート内で実験できることから、培地や薬剤等の条件を変えて経時的にバイオフィーム構

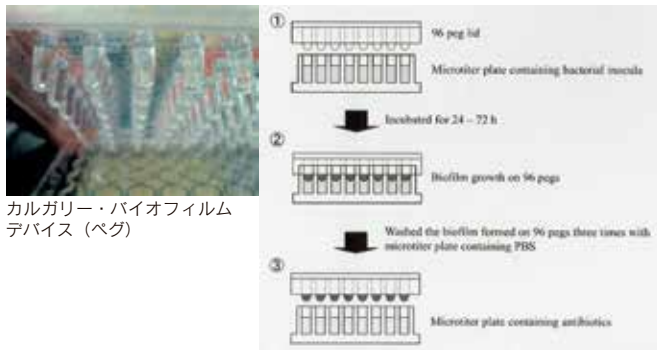


図5 Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC) の測定方法¹⁷⁾

造の観察や菌数の定量が可能である。

7.3 レジオネラ属菌の実験的バイオフィーム形成条件

近年、浴槽水などを原因として呼吸器系の日和見感染症であるレジオネラ症の発生が各地で報告され、4 類感染症である本感染症の報告件数は年間 1,500 件を超えており、患者数は毎年増加傾向である²³⁾。

レジオネラ属菌は、元来、土壤中に生息しているといわれ、これらが人工的な水環境に侵入し、そこで増殖したレジオネラ属菌がヒトへ飛沫核感染（空気感染）すると考えられている²⁴⁾。こうしたレジオネラ症の感染経路から、その感染源となる水環境の消毒が重要であると考えられている。しかし、浴槽水等の消毒だけでは一時的なものに過ぎず、根本的な対策にはならない。そこで、“レジオネラ属菌のすみか”となるバイオフィームを除去することがレジオネラ症対策として必須である²⁵⁾。

これまで *Legionella pneumophila* に対する殺菌剤等の効果を評価するには、細胞を浮遊させた状態での接触による実験系が用いられており²⁶⁾、付着状態での評価系は確立されていなかった。そこで、*L. pneumophila* を担体に付着させたままの状態で殺菌効果を評価することを最終目的として、歯科領域などの研究で用いられている Calgary Biofilm Device¹⁹⁾ を用いた MBEC（最小バイオフィーム除去濃度）assay に着目し、本菌のバイオフィームを形成させるための条件について基礎的検討を行った²⁷⁾。また、薬剤処理後の評価方法として、従来は生菌数の測定や電子顕微鏡による付着状態の比較であったが、今回は、(株)同仁化学研究所によって開発された WST 法^{28, 29)} による Biofilm Viability Assay Kit を使用し、その反応状態を確認した。

7.3.1 供試材料

- 1) 菌株：温泉浴槽水由来 *L. pneumophila* 血清群 1 群および 3 群の各 1 株
- 2) 増菌培地：BCYE α 液体培地（(株)日研生物医学研究所）
- 3) ペグ付き蓋：Nunc-TSP、No. 445497
- 4) マイクロプレート：96F Without Lid Si Microwell Plate、No. 269787、Thermo Fisher Scientific・Nunc A/S
- 5) 活性測定試薬：Biofilm Viability Assay Kit (B603)（(株)同仁化学研究所）

7.3.2 実験方法

- 1) バイオフィーム形成実験 両菌株を BCYE α 液体培地で

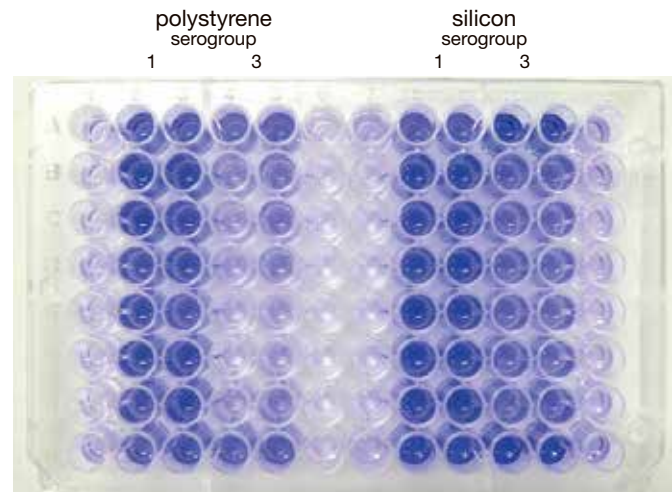


図6 CV 法によるバイオフィーム生成量の比較（30℃）

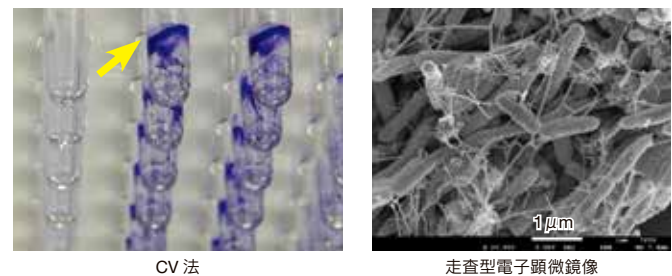


図7 ペグに形成されたバイオフィーム

37℃、5 日間培養後、マイクロプレートの各穴に 200 μl ずつ分注した。これにペグ付き蓋をして 30℃で 3 日間付着させた。なお、この時のペグは半分が本来のポリスチレン、半分はシリコン加工したものを使用した（(株)同仁化学研究所）。その後、新しい BCYE α 液体培地にペグ付き蓋を移動させて 30℃あるいは 37℃で 7 日間静置した。

- 2) バイオフィーム産生量の測定（Crystal violet: CV 法）常法によりバイオフィームを 0.5% クリスタルバイオレット液で染

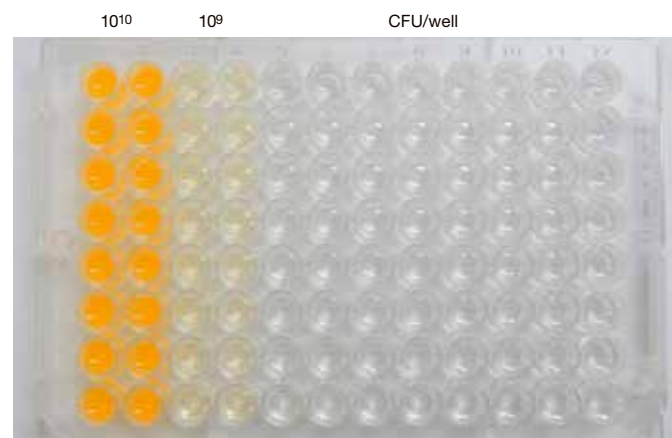


図8 レジオネラ浮遊細胞の生物活性（WST 法、30℃、6 時間）

色し、滅菌蒸留水で2回リンスしてから95%エタノールで色素を溶出させ、波長570 nmでOD値を測定した。

- 3) 微生物活性の測定 (Water-soluble tetrazolium salt: WST 法) *L. pneumophila* 血清群 1 群の培養菌液を希釈して2枚のマイクロプレートに200 μ l ずつ分注した。次に、仕様書に準拠して調製した試薬を20 μ l ずつ添加した。これらを30℃と37℃にそれぞれ放置し、2、4、6、8、24 および 48 時間後に波長450 nmでOD値を測定した。

7.3.3 成績および考察

1) バイオフィーム形成量の比較 (n = 12)

- ① 菌株：シリコン加工の担体に30℃で形成させた場合、1 群は 2.043 ± 0.336 であったが、3 群は 0.417 ± 0.155 と低く、約5倍の差があった (図6)。このことは、1 群と3 群では増殖速度に差があり、前者の方が増殖速度が速いためBF産生量に反映したものと考えられた。

- ② 担体：1 群を30℃でポリスチレンとシリコンに形成させた場合、前者では 1.458 ± 0.183 であったが、後者では 2.043 ± 0.336 と後者の方が良好であった (図6)。この差を検討するために、両担体の表面を走査型電子顕微鏡で確認したところ、シリコンの方がスムーズな表面であった。また、元素分析の結果では、ポリスチレンは炭素のみであったのに対し、シリコンは炭素 (45.7 Mass%)、酸素 (24.1 Mass%)、シリカ (11.3 Mass%) などの複合であり、こうした相違が担体への付着に影響したものと考えられた。

- ③ 培養温度：1 群をシリコン加工で実験した場合、37℃では 0.999 ± 0.501 であったが、30℃では 2.043 ± 0.336 と約2倍の吸光度であった。通常の *L. pneumophila* の検査では、培養温度を37℃に設定して行うが、自然環境では30℃前後で生息していることが多く、こうした温度に対する感受性がBF産生量の増加に関係したものと推察された。

以上の結果から、*L. pneumophila* のバイオフィーム形成には、血清群 1 群株を用い、シリコンの担体で30℃、7日間静置することが最適条件と考えられた。この条件でペグに形成した本菌のバイオフィームをCV法と走査型電子顕微鏡により確認したところ、図7のように良好な付着状態であり、今後の殺菌剤等の評価実験に十分に利用できるものであった。

表1 新規バイオフィームコントロール剤 (BFC 剤)

性 状	BFC剤
外 観	無色液体
粘 度 (mPa・s, 25℃)	10 以下
pH	7.0 ~ 8.0
比 重 (25℃)	1.01 ± 0.01
凍結温度 (℃)	-4 ~ -2
保存性	6ヶ月 (25℃以下) 凍結融解による性能劣化なし

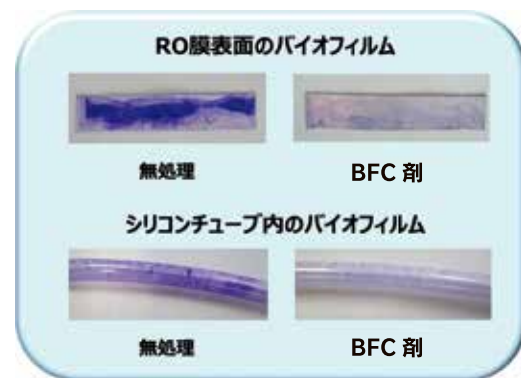


図10 バイオフィーム形成の抑制効果 (星光 PMC 株式会社)

2) 微生物活性 (n = 16)

図8に示したように、 10^{10} CFU/well の菌量で比較すると、30℃では6時間後で最高の 1.825 ± 0.031 に達し、その後、OD値は徐々に減少した。一方、37℃では、8時間後で最高の 2.227 ± 0.095 となり、30℃の場合よりわずかに高い吸光度であった。このように、*L. pneumophila* の細胞活性をWST法で評価することが可能であり、MBECの測定に利用することができると判断した。なお、これらの結果から、今後のOD値の測定は37℃で6時間後と24時間後の2回実施することを基本とした。

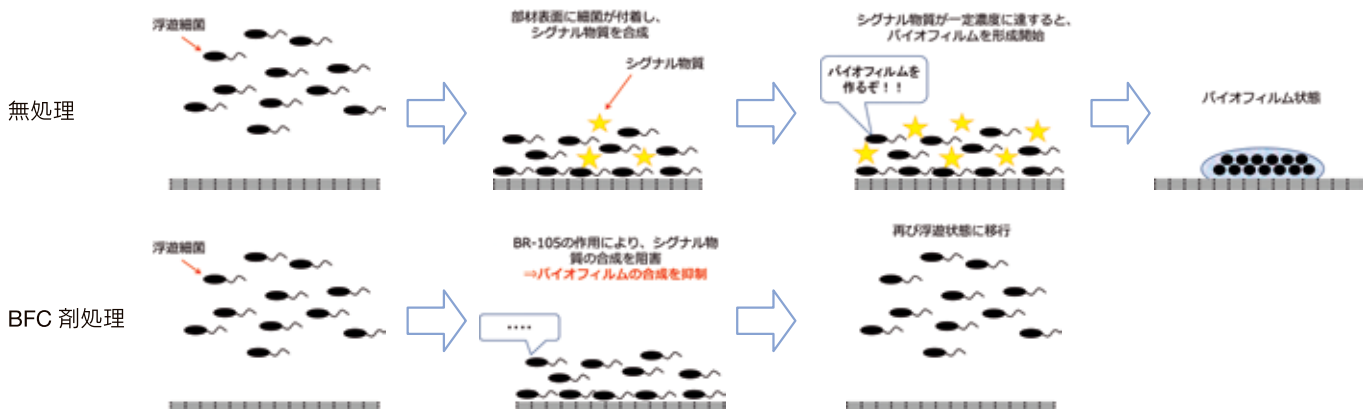


図9 バイオフィームコントロール剤 (BFC 剤) の作用メカニズム³⁴⁾

8. バイオフィルムの形成防止・除去

現状、バイオフィルムの発生防止のポイントは、以下の3点である³⁰⁾。一つは、細菌の担体への付着防止である。バイオフィルムの形成は、細菌が担体に付着することからスタートするため、これを防止することは理にかなっている。しかし、細菌の付着は担体の表面構造のみならず、細菌と担体との物理化学的相互関係などによって起こるため、細菌の活動を停止し、付着を阻止することは簡単ではない。二つ目は、付着は容認したとして、増殖させないことである。細菌がコンディショニングフィルムに付着しただけではバイオフィルムは形成されないが、増殖してマイクロコロニーを形成することで進展する。そこで、細菌の増殖を抑制するために、担体表面の水分を残さない超撥水の発想や、担体に抗菌性を持たせる³¹⁾等の策があるが、なかなか完璧なものはない。そして三つ目は、バイオフィルムが成熟し、認識される前の段階で物理的に除去することである³¹⁾。まさに清掃である。清掃後に殺菌剤等を使用して次のマイクロコロニーの形成をできるだけ遅らせることが現状での得策であろう。

2018年3月に発行された日経サイエンスにおいて、「バイオフィルムを退治する、The War on Slime」と題する記事が掲載されている³²⁾。この記事は、ニューヨーク州立大学のSauer教授が書かれたものであり、彼女は、ビンガムトン・バイオフィルム研究センターで副所長を務め、長年にわたりバイオフィルムの形成や脱離、抗菌薬耐性のメカニズムについて研究している。内容は、いかにしてバイオフィルムを攻略するか、その戦術についてまとめられたものである。彼女は最後に「何より重要な問題は、バイオフィルムがみな同じではない点だ」と指摘し、バイオフィルム対策の重要性と、これを完全に制御することの難しさに言及している。

8.1 クオラムセンシングによるバイオフィルムの形成抑制

トピックスとして、池田と諸星により紹介されているQuorum-sensing制御に基づくバイオフィルム形成抑制についてふれる³³⁾。QSは既述したとおり、細胞間情報伝達機構であるが、これがバイオフィルムの形成に関与していることが明らかにされてきた。そこで、このQSを制御することによりバイオフィルムの形成を抑制しようという新しい手法の開発である。彼らは、QSのシグナル物質の1種であるアシル化ホモセリンラクトン(AHL)分解酵素によるバイオフィルムの形成阻害やAHL構造類似体によるバイオフィルムの形成阻害について検討している³³⁾。

また、久保と五十嵐の解説³⁴⁾では、細菌の細胞間シグナル伝達を介したバイオフィルム形成を阻害する安価で実用的な物質を利用した新規バイオフィルム形成抑制・剥離剤(バイオフィルムコントロール剤:BFC剤)を開発し(表1)、RO膜のバイオフィアウリングの抑制について検討している。このBFC剤は、QSを阻害してバイオフィルムの形成を抑制する物質と界面活性剤を主としたバイオフィルムの剥離に有効な物質の複合剤である。その作用機序は図9に示した。たとえば、これをRO膜に用いるとバイオフィアウリングを抑制し(図10)、膜モジュールの洗浄と交換頻度を抑えることができたとしている³⁴⁾。

8.2 *Legionella pneumophila* のバイオフィルム対策における電解次亜塩素酸水による1例

前述のように、Calgary Biofilm Deviceを用いて実験的にレジオネラ症の原因菌である*L. pneumophila*のバイオフィルムを形成させることができた。そこで、この実験系により本菌のバイオ

フィルムに対する電解次亜塩素酸水の形成阻害と不活化について検討した³⁵⁾。

8.2.1 供試材料

電解次亜塩素酸水(以下、電解次亜水、日本ヘルシーシステム協会)および市販の微酸性電解水(微酸研)を用い、対照として次亜塩素酸ナトリウム溶液(以下、次亜水、富士フィルム和光純薬)を使用した。

8.2.2 実験方法

1) バイオフィルム形成阻害試験

温泉浴槽水由来*L. pneumophila* 1群のバイオフィルム形成途中において、供試消毒剤と30分間接触させたのち、バイオフィルム形成量をCV法により測定した。

2) バイオフィルム不活化試験

バイオフィルム形成後に供試消毒剤と60分間接触させたのち、WST法により微生物活性を測定した。

8.2.3 成績

1) バイオフィルム形成阻害 (n = 24)

各OD値は、電解次亜水(13.2 mg/l)が 0.145 ± 0.064 、次亜水(11.8 mg/l)が 0.150 ± 0.065 、微酸性電解水(10.1 mg/l)が 0.451 ± 0.375 の順であった。なお、無処理(対照)のOD値は、 2.579 ± 0.429 であった。

2) バイオフィルムにおける不活化 (n = 24)

各OD値は、電解次亜水(11.4 mg/l)が 0.563 ± 0.158 、微酸性電解水(10.3 mg/l)が 0.590 ± 0.129 、次亜水(12.0 mg/l)が 0.631 ± 0.215 の順であった。なお、無処理(対照)のOD値は、 0.708 ± 0.253 であった。

このように、電解次亜水は*L. pneumophila*のバイオフィルムに対して形成阻害および不活化に有用であると考えられた。

9. おわりに

2019年2月から新しいレジオネラ症の診断薬「リボテストレジオネラ」が市販され、保険点数も付与された。今後、レジオネラ症の届出件数はさらに増加するものと予想される。また、これに伴い、現場でのレジオネラ属菌対策が一層求められることになる。そこで重要なことは、従来の水環境に浮遊するレジオネラ属菌だけを殺菌・消毒するのでは不十分であり、その「すみか」となるバイオフィルム対策が必須となる。

概して、バイオフィルムの発生防止に対する特効薬はない。既述したとおり、バイオフィルムはライフサイクルによって形成されるため、少しでもこの形成を先送りするための努力が必要である。相手が様々な微生物の集合体であるだけにバイオフィルムの発生を制御することは容易ではなく、微生物と人間との永遠の課題かもしれない。

なお、本稿の内容は、第46回建築物環境衛生管理全国大会のシンポジウムでの講演内容に加筆したものである。また、内容の一部は、すでに日本防菌防黴学会第45回年次大会(東京)および第35回日本環境感染学会総会・学術集会(神奈川)において発表した。

[参考文献]

- 1) H. Yasuda, "Bacterial biofilms and infectious diseases", *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **1996**, 8, 409-417.

- 2) 上谷 巖, 長谷川憲司, “製紙工場におけるスライムとスライムコントロール剤について”, 紙パ技協誌, **1966**, 20, 55-63.
- 3) 古畑勝則, 小池和子, “浴室床面の淡紅色スライムに関する細菌学的検討”, 防菌防黴, **1990**, 18, 407-410.
- 4) 森崎久雄, “バイオフィルム生成のサイエンス, バイオフィルム—その生成メカニズムと防止サイエンス—”, p. 49-67, (株)サイエンスフォーラム (1998)
- 5) J. W. Costerton *et al.*, “Microbial biofilms”, *Annu. Rev. Microbiol.*, **1995**, 49, 711-745.
- 6) 森川正章, “バイオフィルム 微生物だってひとりじゃ生きてゆけない?”, 化学と生物, **2003**, 41, 32-37.
- 7) 水之江義光, ほか, “バイオフィルム細胞外マトリクスの分離解析”, 化学療法の領域, **2015**, 31, 36-43.
- 8) S. Sugimoto *et al.*, “*Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction”, *J. Bacteriol.*, **2013**, 195, 1645-1655.
- 9) 稲葉知大, ほか, “集団微生物学のすずめ—バイオフィルムとその解析技術—”, 化学と生物, **2014**, 52, 594-601.
- 10) 松村吉信, “バイオフィルムの構造と形成過程”, バイオフィルムの発生メカニズムと評価・対策, p. 39-56, (株) R & D 支援センター (2020)
- 11) 松村吉信, “バイオフィルムの構造と特徴—バイオフィルム制御に向けて—”, 日本防菌防黴学会誌, **2016**, 44, 31-38.
- 12) 藤澤直樹, ほか, “台所排水口由来株のバイオフィルム形成条件の検討およびこれらバイオフィルムに対する殺菌効果”, 環境管理技術, **2011**, 29, 42-48.
- 13) Z. Piao *et al.*, “Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2006**, 72, 1613-1622.
- 14) 森川正章, “バイオフィルムを調べてみよう”, 生物工学, **2012**, 90, 246-250.
- 15) 池田 幸, “バイオフィルム形成と Quorum Sensing 機構”, バイオフィルム制御に向けた構造と形成過程—特徴・問題点・事例・有効利用から読み解くアプローチ—, p. 59-66, (株)シーエムシー出版 (2017)
- 16) 諸星知広, 他, “微生物間コミュニケーション (クオラムセンシング)”, バイオフィルムの基礎と制御—特性・解析事例から形成防止・有効利用まで—, p. 38-45, (株)エヌ・ティー・エス (2008)
- 17) 野村暢彦, “バイオフィルムの有効利用に向けたバイオフィルム解析とその展望”, バイオフィルム制御に向けた構造と形成過程—特徴・問題点・事例・有効利用から読み解くアプローチ—, p. 202-209, (株)シーエムシー出版 (2017)
- 18) Y. Yawata *et al.*, “Monitoring biofilm development in a microfluidic device using modified confocal reflection microscopy”, *J. Biosci. Bioeng.*, **2010**, 110, 377-380.
- 19) H. Ceri *et al.*, “The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms”, *J. Clin. Microbiol.*, **1999**, 37, 1771-1776.
- 20) A. L. S. Antunes *et al.*, “Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci”, *APMIS*, **2010**, 118, 873-877.
- 21) T. Tsukatani *et al.*, “Rapid and simple determination of minimum biofilm eradication concentration by a colorimetric microbial viability assay based on reduction of a water-tetrazolium salt and combined effect of antibiotics against microbial biofilm”, *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.*, **2016**, 6, 677-680.
- 22) J. J. Harrinson *et al.*, “The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivation in the Calgary Biofilm Device”, *Biol. Proced. Online*, **2006**, 8, 194-215.
- 23) 倉 文明, “レジオネラ症の国内外の動向”, 日本防菌防黴学会誌, **2018**, 46, 365-376.
- 24) 宮本比呂志, “いま「温泉」「スーパー銭湯」がレジオネラ属菌に狙われている—レジオネラ属菌の特性を知ることが予防の第一歩—”, p. 14-36, レジオネラ症対策研究会編, レジオネラ対策 こうすれば安心, 泉書房 (2003)
- 25) 縣 邦雄, “各種水系におけるバイオフィルム制御方法”, 防菌防黴, **2009**, 37, 57-68.
- 26) 安齋博文, ほか, “黒湯 (腐植質含有温泉) から分離された *Legionella pneumophila* に対する電解水の消毒効果”, 日本防菌防黴学会誌, **2018**, 46, 343-347.
- 27) 古畑勝則, “*Legionella pneumophila* の実験的バイオフィルム形成条件の検討”, *Bacterial Adherence & Biofilm*, **2019**, 33, 39-42.
- 28) T. Tsukatani *et al.*, “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.
- 29) T. Tsukatani *et al.*, “Comparison on the WST-8 colorimetric method and the SLSI broth microdilution methods for susceptibility testing against drug-resistant bacteria”, *J. Microbiol. Methods.*, **2012**, 90, 160-166.
- 30) 古畑勝則, “バイオフィルムの発生防止のポイント”, 月刊ファームステージ, **2017**, 17, 57-60.
- 31) 兼松秀行, “無機物表面のバイオフィルムの評価と対策”, バイオフィルム制御に向けた構造と形成過程—特徴・問題点・事例・有効利用から読み解くアプローチ—, p. 162-189, (株)シーエムシー出版 (2017)
- 32) K. Sauer, “バイオフィルムを退治する”, 日経サイエンス, **2018**, 48, 68-73.
- 33) 池田 幸, 諸星知弘, “Quorum sensing 制御に基づくバイオフィルム形成抑制”, 環境バイオテクノロジー学会誌, **2010**, 10, 15-18.
- 34) 久保 武, 五十嵐亮二, “クオラムセンシングを阻害する新規バイオフィルムコントロール剤—バイオフィルムに対する作用メカニズムと RO モジュールへの適用事例—”, 用水と廃水, **2020**, 62, 769-776.
- 35) 古畑勝則, “*Legionella pneumophila* のバイオフィルム対策における電解次亜塩素酸水の有用性”, P48-2, p. 259, 第 35 回日本環境感染学会総会・学術集会抄録集 (2020)

[著者プロフィール]

氏名: 古畑 勝則 (FURUHATA Katsunori)

所属: 麻布大学 生命・環境科学部

〒 252-5201 神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71

Tel : 042-754-6215

Fax : 042-754-6215

E-mail : furuhata@azabu-u.ac.jp

出身学校: 筑波大学大学院修士課程環境科学研究科

学位: 博士 (獣医学)

専門分野: 環境微生物学、微生物生態学、微生物制御学

現在の研究テーマ: バイオフィルムやレジオネラに関する研究

学会発表のご案内

日本防菌防黴学会にて、小社の技術部門から試験片用バイオフィルムキットのポスター発表を行ないます。詳細に関しては随時小社 HP にてお知らせ致します。

演題: 試験片固定具を用いたバイオフィルム形成能測定法の開発

日本防菌防黴学会第 48 回年次大会

会期: 2021 年 9 月 8 日 (水) ~ 9 日 (木)

会場: オンライン開催

Methionine-Selective Protein Bioconjugation

**Yvonne D. Hall**

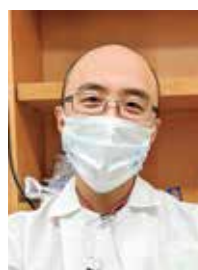
Department of Chemistry,
North Carolina State University
Undergraduate Researcher

**Hisham M. El-Shaffey**

Department of Chemistry,
North Carolina State University
Graduate Student

**Elizabeth J. Gross**

Department of Chemistry,
North Carolina State University
Undergraduate Researcher

**Jun Ohata**

Department of Chemistry,
North Carolina State University
Assistant Professor

Abstract

Despite significant advances of protein bioconjugation strategies targeting a variety of amino acid residues, chemical tagging of methionine residues have been extremely limited. Recent approaches leverage unique reactivity of the thioether

group of the methionine residue through redox and alkylation reaction pathways with the suppression of cross reactivity toward other nucleophilic amino acid side chains. This Review Article highlights the development and applications of the three distinct chemical probes recently reported for selective modification of methionine residues of natural proteins.

1. Introduction

Chemical functionalization of natural proteins has become an essential technology in a wide variety of protein-based research fields and applications. Protein modification technology provides

opportunities for the increase of stability, addition of new functionality, and structural changes. One important aspect of protein modification is the development of therapeutic agents; for example, antibody-drug conjugates (ADCs) are target-

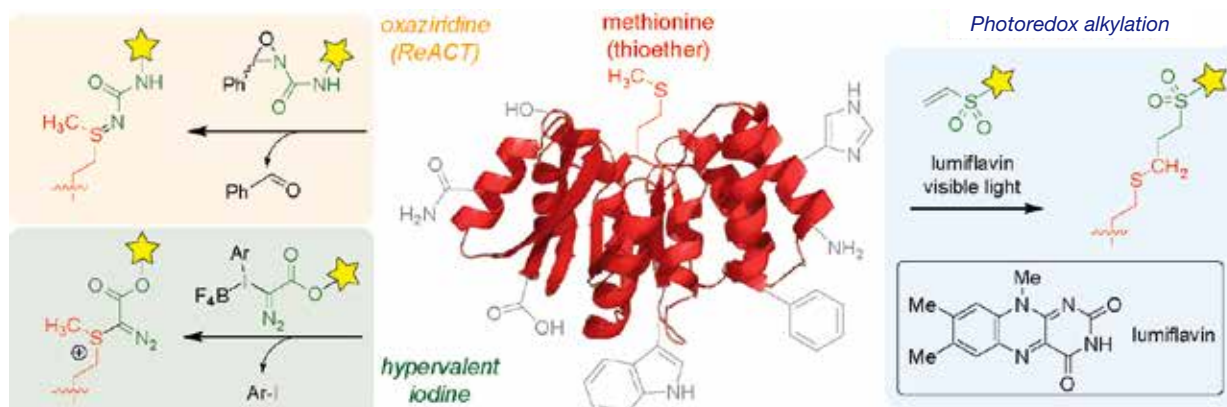


Figure 1. Chemoselective methionine modification in natural proteins. Left top (orange): Redox-Activated Chemical Tagging (ReACT) method to selectively form a sulfimide group on methionine residue with oxaziridine reagents. Left bottom (green): Sulfonium formation with hypervalent iodine reagents. Right (blue): Radical alkylation with electron-poor alkene and lumiflavin photocatalyst.

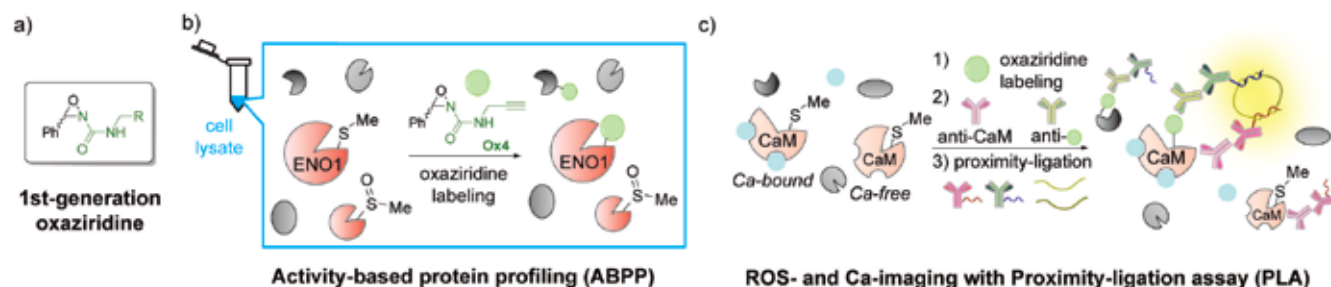


Figure 2. Applications of methionine-selective labeling with first generation oxaziridine reagents. (a) Chemical structure of first generation oxaziridine reagents with an acyclic alkyl moiety. (b) Activity-based protein profiling (ABPP) for oxidation sensitive methionine residues in cell lysate with alkyne-tagged first generation oxaziridine (**Ox4**). ENO1: enolase 1 (dark orange). (c) Methionine proximity-activated imaging reporter (Met-PAIR) method for reactive oxygen species (ROS) and calcium imaging. CaM: calmodulin. Green ball: an antibody-recognizable handle such as biotin and Oregon Green.

specific proteins covalently labeled with potent small molecule-based drugs.¹⁾ Traditionally, protein modifications target highly nucleophilic amino acid sites such as lysine (primary amine) and cysteine (thiol). However, because of lysine's high abundance, targeted reactions are prone to heterogeneous labeling of multiple sites, impairing reproducibility and structural/functional characterization. In this context, cysteine modification benefits from its lower abundance, but the formation of the disulfide bonds and other various post-translational processes greatly decrease their accessibility. Thus, a significant need for development of novel protein modification technologies to target different amino acid residues remains.

Due to its unique reactivity and low natural abundance, methionine offers the opportunity for the selective labeling of proteins. The sulfur atom of the methionine provides its functional diversity in living systems such as sulfoxide formation under the oxidative stress and coordination to various metal ions. The scarcity and hydrophobicity of methionine is beneficial for the development of new site-specific labeling technologies, as those attributes limit the number of surface-exposed residues accessible for the modification process. Despite the promising attributes, however, selective chemical modification of methionine residues still remains underdeveloped, in part due to the presence of the plethora of other nucleophilic functional groups in proteins. Alkyl halide and cyanogen bromide are the classical examples of methionine-targeting reagents, though those approaches suffer from various issues such as harsh conditions, side reactions, and/or limited substrate scopes.^{2) - 4)}

In this Review Article, we focus on three recently reported methionine-specific bioconjugation methods and their applications for biological studies (Figure 1). The seminal work of the modern methionine labeling strategies is the sulfimide formation reaction with the oxaziridine reagent termed Redox-Activated Chemical Tagging (ReACT) method developed by the Chang and Toste laboratories in 2017 (Figure 1, left top in orange).⁵⁾ Inspired by the native biological oxidation of methionine thioether to methionine sulfoxide, this sulfimide-forming reaction involves the nucleophilic attack of the sulfur

atom to the nitrogen atom of the oxaziridine labeling probe through release of a benzaldehyde group. In the following year, Gaunt and co-workers reported hypervalent iodine-based diazo sulfonium forming reaction on methionine residue, which introduces diazo ester group onto the sulfur atom through generation of the aryl iodide side product (Figure 1, left bottom in green).⁶⁾ More recently, Macmillan and co-workers demonstrated radical alkylation reaction of the methionine with electron-deficient alkene and a lumiflavin photocatalyst through the formation of the radical species on the terminal carbon of the methionine side chain (Figure 1, right in yellow).⁷⁾ The following sections will highlight the unique applications of each methionine labeling technology.

2. Oxaziridine reagents

2.1. First-generation oxaziridine for proteomics and imaging applications

An early success of the Redox-Activated Chemical Tagging (ReACT) technique was in its application as a chemical probe for activity-based protein profiling (ABPP) to elucidate relationships between protein activity and the reversible oxidation of methionine residues, an emerging physiologically important class of redox post-translational modifications.⁵⁾ One notable example of methionine oxidation is in the regulation of actin polymerization; Terman and co-workers demonstrated that actin assembly and disassembly are controlled by the oxidation and reduction of the Met44 and Met47 residues by MICAL, an intracellular flavoprotein monooxygenase.⁸⁾ The current understanding of the physiological roles played by methionine residue oxidation has lagged behind other amino acid oxidations such as cysteine, whose impacts on disease progression is well documented,⁹⁾ due to a lack of suitable chemical probes. In this context, ABPP provides a chemoproteomic approach that determines the functional state of proteins through chemical labeling.¹⁰⁾ As the oxaziridine labeling of a methionine residue cannot proceed on a methionine sulfoxide group, the labeling efficiency of a methionine residue on a protein in a biological sample would be inversely correlated to its oxidation status.

Indeed, owing to its high chemoselectivity for methionine and compatibility with cellular conditions, the ReACT method was successfully employed as an ABPP tool to mammalian cell (HeLa cells) lysates with varying doses of oxaziridine used to identify proteins with oxidatively sensitive methionine residues. Validating oxaziridine-based ABPP and demonstrating applicability of the ReACT method to complex biomolecule mixtures, the proteomics results identified the actin Met44 and Met47 residues mentioned above at the lower dose levels of oxaziridine reagents. Importantly, the oxaziridine-based ABPP also identified the Met 169 residue of enolase, near the protein's active site, as a highly reactive target. Subsequent experiments with site-specific mutagenesis and kinetic measurement revealed that the oxidation of enolase Met 169 residue is a crucial modulator of enolase's enzymatic activity. This study demonstrates the practical utility of the oxaziridine reagents for understanding biological roles of methionine oxidation.⁵⁾

The excellent stability and selectivity of oxaziridine reagents allow for their use in protein labeling *in vivo*, which has been utilized for calcium and reactive oxygen species (ROS) imaging together with proximity ligation assay (PLA) in a collaboration between the Chang, Miller, and Toste laboratories.¹¹⁾ Reactivities of methionine residues in a particular protein can be significantly altered in response to cellular small molecules, and the reactivity alteration has been applied for calcium imaging through chemical labeling of calcium binding protein calmodulin (CaM, Figure 2c).

Because of the conformational change and exposure of methionine residues in the presence of calcium, the chemical labeling efficiency of the oxaziridine toward those methionine serves as a proxy for the amount of calcium in the biological samples such as cultured mammalian cells (e.g. HEK293T, Jurkat, and hippocampal neuron cells) as well as zebrafish. Although the methionine-selective reaction itself cannot function as a calcium reporter due to off-reactivity toward other methionine-containing proteins, PLA with antibodies against CaM and chemical tag (green ball in Figure 2c) as well as secondary antibodies bearing corresponding DNA strands provide fluorescence signals only from oxaziridine-labeled CaM through consecutive DNA hybridization processes (Figure 2c). Furthermore, taking advantage of the reactivity decrease of

methionine residues upon oxidation (i.e. methionine sulfoxide formation) in actin, the dual labeling by methionine-selective oxaziridine compound and PLA technique can sense ROS levels in live cell samples. This technique termed methionine proximity-activated imaging reporter (Met-PAIR) is a unique application of chemoselective protein modification in living systems to visualize the intracellular amount of a biological analyte, which would not be easily accomplished by traditional protein labeling reagents such as iodoacetamide for cysteine residues due to their high cytotoxicity. More recently oxaziridines have been employed by researchers at Bristol-Myers Squibb for developing novel 18F PET imaging agents as well (Section 3).¹²⁾

2.2. Second-generation oxaziridine for preparation of stapled peptides and antibody-drug conjugates

In order to modulate the stability of the modification linkage between proteins and installed functionalities, the tunability of the sulfimide linkage was investigated to facilitate wider adoption of the oxaziridine labeling technique.¹³⁾ Toste, Chang, and co-workers probed the physical parameters of a library of oxaziridine reagents, with varying functional groups attached to the urea moiety (Figure 3a,b). Among the various physical parameters of oxaziridine compounds with different electronic and steric functional groups including the urea's dipole moment (μ) and sulfimide's natural bond order (NBO), the vibrational constant of the urea C=O stretch ($\nu_{\text{C=O}}$) yielded the best correlation with the experimental decomposition rate of sulfimide hydrolysis. In other words, the carbonyl stretching frequency provided a predictive platform for the design of next generation oxaziridine with the linkage stability. With piperidine as a substitution group, the next generation of oxaziridine displayed significantly increased sulfimide linkage stability. Stability comparisons, under physiologically relevant conditions (pH 7.4 and 37 °C in phosphate buffered saline) demonstrated that 59% of sulfimide linkages produced by the second-generation oxaziridine remained even after 5 days while sulfimide linkages produced by the first-generation oxaziridine had completely decomposed. As a further demonstration of the enhanced utility of the second-generation oxaziridine, bis-oxaziridine compounds were synthesized and reacted with several peptides to prepare a

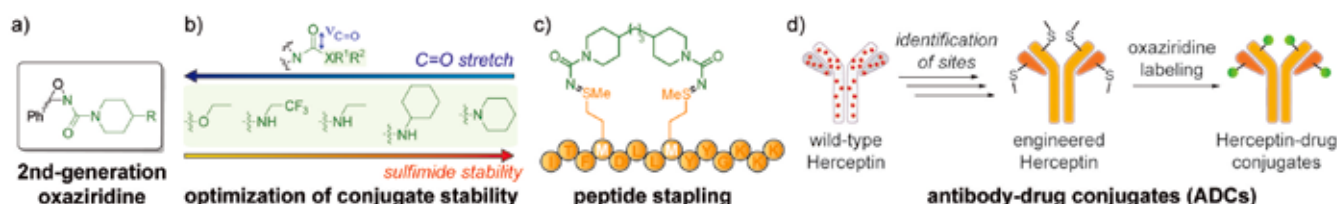


Figure 3. Applications of methionine-selective labeling with second-generation oxaziridine reagents. (a) Chemical structure of second generation oxaziridine reagents with a cyclic alkyl moiety. (b) Physical chemistry approach to discover the optimal oxaziridine reagent for the stable sulfimide linkage. (c) Cartoon of a peptide stapled with bis-oxaziridine reagent with the piperidyl motif for the higher stability. (d) Schematic description of the systematic screening process for the preparation of antibody (Herceptin) – drug conjugates. Site-specific mutagenesis was used to identify the optimal sites from the various locations (red balls depicted in wild-type Herceptin) for the drug installation with the second generation oxaziridine reagent.

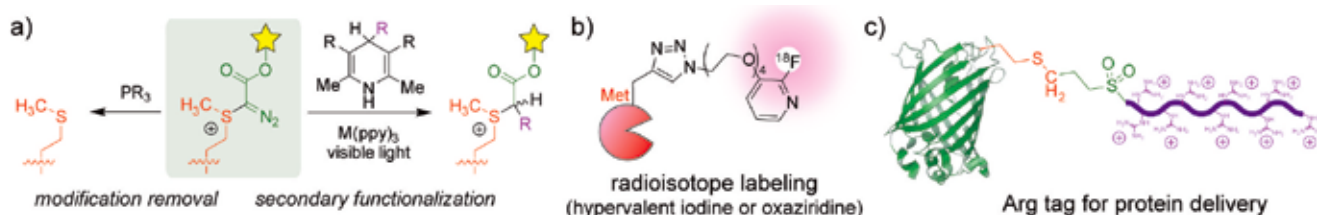


Figure 4. Applications of hypervalent iodine- and photoredox alkylation-based methionine labeling. (a) Secondary modification process of the sulfonium product generated by the hypervalent iodine reagent. $\text{M} = \text{RuCl}_2$ or Ir . (b) Description of the incorporation of fluorine-18 radioisotope onto a methionine amino acid, peptide, or protein with the hypervalent iodine or first generation oxaziridine reagent. (c) Installation of the poly (arginine) tag on a methionine-containing protein (green fluorescence protein, GFP) through the photoredox alkylation reaction.

series of stapled peptides, and indeed the stapled peptides demonstrated improved cellular uptake with human embryonic kidney cell lines (HEK293T) using confocal microscopy and flow cytometry.

The second generation oxaziridine with the increased modification linkage stability was also utilized for production of antibody-drug conjugates (ADCs) in combination with site-specific mutagenesis (Figure 3d).¹⁴ The study led by Wells and co-workers focused on the identification of the optimal modification site of anti-Her2 antibody (trastuzumab or Herceptin) through systemic approaches. Of the 95 potential mutation sites of antigen-binding fragment (Fab) of trastuzumab, 56 mutants were identified satisfying the ADC production criteria including high expression level through *E. coli*, high binding affinity, thermal stability, and efficient labeling with first generation oxaziridine reagents. Alongside the second generation oxaziridine reagents, further investigation revealed 4 sites on the Fab region can generate suitable conjugates with enhanced stability (> 85% conservation of the oxaziridine label after 3 days at 37 °C).

Conjugation of the mutated antibody fragment with the synthetic peptide-based tubulin inhibitor monomethyl auristatin F (MMAF) produced potent ADCs toward breast cancer cell lines such as BT474-M1. By taking advantage of the structural homology between Fab and Fc regions of the antibody, the screening process was extended to discover the optimal conjugation sites in the Fc region as well. With the ideal modification sites identified for both Fab and Fc regions, mutants of the whole trastuzumab were produced (e.g. LC.T74M/HC.S21M) and tested on multiple breast cancer cells lines and a BT474-xenograft mouse model, showing the promoted efficacy of the ADCs compared to the unmodified antibody and unconjugated MMAF. In addition to the practical success of this approach to generate the potent ADCs, this study also illustrated the potential utility of the methionine as bioconjugation sites by suppression of the nonspecific reactivity such as that of lysine and cysteine.

3. Applications of hypervalent iodine S-alkylation and photoredox alkylation

The versatile reactivities of the diazo sulfonium species formed by the hypervalent iodine reagent allowed for secondary functionalization on the methionine residue, including the subsequent radioisotope incorporation (Figure 4).⁶ While the sulfonium product possesses remarkable stability in water (half-life > 100 h), the inherent reactivity of the diazo group enables attachment of various groups through a photocatalytic reduction as well as phosphine-based reduction to cleave the entire modification from the residue (Figure 4a). By leveraging the stability increase of the photocatalytically reduced sulfonium group, Bonacorsi and co-workers demonstrated successful incorporation of ^{18}F radioisotope through copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction.¹² Thus, the sulfonium linkage is of great use for the modulation of the stability and subsequent addition of a new functionality through the photoredox catalysis.

The photoredox alkylation reaction facilitates the incorporation of diverse chemical functionalities to a methionine residue of a protein (Figure 4c).⁷ Despite the generation of the putative methionine radical species through single-electron transfer (SET) process during the modification, this photoredox modification exhibited excellent functional group tolerability toward a variety of functional groups including primary amines, azides, alkynes, and ketones. Conservation of native protein functions was confirmed on the alkyne-labeled enhanced green fluorescence protein (eGFP). The modified eGFP was amenable to the subsequent copper-catalyzed azide-alkyne reaction to append biotin and poly(arginine) tags, which displayed increased cellular uptake in the confocal microscope experiment (Figure 4c).

4. Conclusion

The three classes of methionine-selective chemical reagents developed for protein bioconjugation presented here possess potential for a broad range of applications largely due to rapid reaction kinetics. Although good selectivity has been achieved, particularly in the Redox-Activated Chemical Tagging (ReACT) method, combining approaches that can circumvent the

problems of undesired side reactions, including cysteine-capping strategies with a maleimide reagent (hypervalent iodine)⁶ and use of inert atmosphere to curtail methionine oxidation (photoredox alkylation), can augment this selectivity even further.⁷ Indeed, three independent research programs developed vastly different chemical approaches to form distinct product structures, reflecting the diverse chemical and biological reactivity of methionine: 1) sulfimide formation (oxaziridine labeling)/methionine sulfoxide (oxidation of methionine), 2) sulfonium formation (hypervalent iodine)/S-adenosyl methionine (SAM, S-alkylation of methionine), and 3) C-C bond forming modification (photoredox catalysis)/intact methionine. The diverse achievements of those chemical probes are indicative of their exceptional utility for the elucidation of undiscovered biological roles of methionine as well as the novel protein conjugates preparation.

[References]

- 1) A. Beck, L. Goetsch, C. Dumontet and N. Corvaia, "Strategies and Challenges for the next Generation of Antibody-Drug Conjugates", *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2017**, 16(5), 315-337.
- 2) C. Kleanthous and J. R. Coggins, "Reversible Alkylation of an Active Site Methionine Residue in Dehydroquinase", *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265(19), 10935-10939.
- 3) E. Gross and B. Witkop, "Nonenzymatic Cleavage of Peptide Bonds: The Methionine Residues in Bovine Pancreatic Ribonuclease", *J. Biol. Chem.*, **1962**, 237(6), 1856-1860.
- 4) J. R. Kramer and T. J. Deming, "Reversible Chemoselective Tagging and Functionalization of Methionine Containing Peptides", *Chem. Commun.*, **2013**, 4(45), 5144-5146.
- 5) S. Lin, X. Yang, S. Jia, A. M. Weeks, M. Hornsby, P. S. Lee, R. V. Nichiporuk, A. T. Iavarone, J. A. Wells, F. D. Toste and C. J. Chang, "Redox-Based Reagents for Chemoselective Methionine Bioconjugation", *Science*, **2017**, 355(6325), 597-602.
- 6) M. T. Taylor, J. E. Nelson, M. G. Suero and M. J. Gaunt, "A Protein Functionalization Platform Based on Selective Reactions at Methionine Residues", *Nature*, **2018**, 562(7728), 563.
- 7) J. Kim, B. X. Li, R. Y.-C. Huang, J. X. Qiao, W. R. Ewing and D. W. C. MacMillan, "Site-Selective Functionalization of Methionine Residues via Photoredox Catalysis", *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142(51), 21260-21266.
- 8) R.-J. Hung, C. W. Pak and J. R. Terman, "Direct Redox Regulation of F-Actin Assembly and Disassembly by Mical", *Science*, **2011**, 334(6063), 1710-1713.
- 9) C. E. Paulsen and K. S. Carroll, "Cysteine-Mediated Redox Signaling: Chemistry, Biology, and Tools for Discovery", *Chem. Rev.*, **2013**, 113(7), 4633-4679.
- 10) M. J. Niphakis and B. F. Cravatt, "Enzyme Inhibitor Discovery by Activity-Based Protein Profiling", *Annu. Rev. Biochem.*, **2014**, 83, 341-377.
- 11) J. Ohata, L. Krishnamoorthy, M. A. Gonzalez, T. Xiao, D. A. Iovan, F. D. Toste, E. W. Miller and C. J. Chang, "An Activity-Based Methionine Bioconjugation Approach To Developing Proximity-Activated Imaging Reporters", *ACS Cent. Sci.*, **2020**, 6(1), 32-40.
- 12) D. Lin, M. Wallace, A. J. Allentoff, D. J. Donnelly, E. Gomes, K. Voronin, S. Gong, R. Y.-C. Huang, H. Kim, J. Caceres-Cortes and S. Bonacorsi, "Chemoselective Methionine Bioconjugation: Site-Selective Fluorine-18 Labeling of Proteins and Peptides", *Bioconjugate Chem.*, **2020**, 31(8), 1908-1916.
- 13) A. H. Christian, S. Jia, W. Cao, P. Zhang, A. T. Meza, M. S. Sigman, C. J. Chang and F. D. Toste, "A Physical Organic Approach to Tuning Reagents for Selective and Stable Methionine Bioconjugation", *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, 141(32), 12657-12662.
- 14) S. K. Elledge, H. L. Tran, A. H. Christian, V. Steri, B. Hann, F. D. Toste, C. J. Chang and J. A. Wells, "Systematic Identification of Engineered Methionines and Oxaziridines for Efficient, Stable, and Site-Specific Antibody Bioconjugation", *PNAS*, **2020**, 117(11), 5733-5740.

[Contact]

Yvonne D. Hall
ydhall@ncsu.edu
ORCID iD: 0000-0001-9405-4867

Elizabeth Gross
ejgross@ncsu.edu
ORCID iD: 0000-0003-2153-5381

Hisham El-Shaffey
helshaf@ncsu.edu
ORCID iD: 0000-0003-4117-1378

North Carolina State University
Department of Chemistry
2620 Yarbrough Drive
518 Dabney Hall
Raleigh, NC 27695-8204

Jun Ohata (大畠潤)
johata@ncsu.edu
ORCID iD: 0000-0002-3614-7472

North Carolina State University
Department of Chemistry
2620 Yarbrough Drive
527A Dabney Hall
Raleigh, NC 27695-8204

オンライン開催(無料) 細胞死セミナー(全4回)

第一線でご活躍の先生方から、学べるチャンスです。

- 第1回 6/25 (金) 細胞死について**
第2回 7/21 (水) ネクロプトーシスについて
第3回 8月上旬 パイロトーシスについて
第4回 9月上旬 フェロトーシスについて

同仁化学研究所では細胞死研究のサポートを目的に専門の先生方をお招きし、全4回にわたるセミナーを予定しています。

細胞死は生体の恒常性維持に必要であり、古くから知られているアポトーシスやネクローシスだけでなく、近年多くの種類の非アポトーシス細胞死が発見され、がんや免疫、老化、発生などの様々な研究分野で注目を集めています。そのため、「細胞死」研究を専門としていない研究者や学生にとっても大変有意義なセミナーになると考えています。

第1回 6/25 (金)
講師：三浦 正幸 教授
東京大学大学院 薬学研
究科遺伝学教室

第2回 7/21 (水)
講師：中野 裕康 教授
東邦大学 生化学講座生
化学分野

第3回 8月上旬予定
講師：須田 貴司 教授
金沢大学 免疫炎症制御
研究分野

第4回 9月上旬予定
講師：今井 浩孝 教授
北里大学 薬学部・大学
院薬学研究科

講演概要・
お申込みはこちら



Topics on Chemistry

蛍光色素による細胞間 H_2O_2 シグナル伝搬の可視化

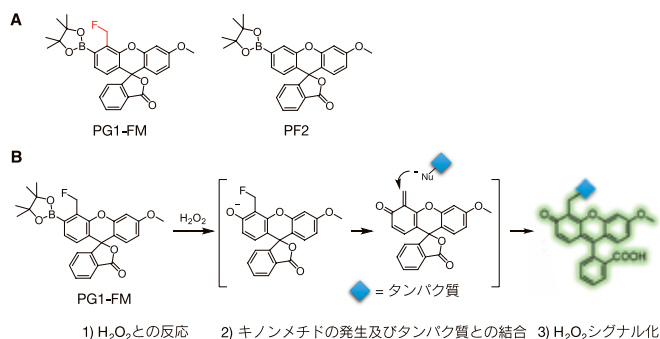
株式会社同仁化学研究所 岩下 秀文

過酸化水素 (H_2O_2) は活性酸素の一種で、酸化ストレスと密接に関係しており長い間研究の対象となってきた。 H_2O_2 は酸化ストレス因子としてだけでなく、化学的安定性と高い膜透過性から、細胞内で重要な働きをするシグナル分子として注目されており、細胞増殖、分化、移動、細胞死など多くのシグナル経路の制御に関わっている。シグナル分子としての H_2O_2 の研究は、一過のかつ反応性の高さがゆえに主に細胞内でのイベントに注目されてきた。一方で H_2O_2 の細胞間でのシグナル伝搬は十分に理解されていない。なぜならば、発生した H_2O_2 シグナルの空間的情報が時間と共に変化するため、シグナルを正確に可視化するための化学的アプローチに制約があるためである。本稿では、ある瞬間の空間的な情報を記録することで細胞間での H_2O_2 のやり取りを可視化した蛍光色素について紹介したい¹⁾。

今回筆者らはこれまで報告してきたボロン酸エステルを H_2O_2 反応性部位に持つ色素 (PF2)²⁾ にフルオロメチル基を付与した蛍光色素、PG1-FM を開発した (図 1A)。フルオロメチル基は H_2O_2 と反応後生成するキノンメチドを介して近接する分子と共有結合することが可能である (図 1B)。つまり PG1-FM は、 H_2O_2 発生箇所での H_2O_2 シグナル捕捉・可視化する。浦野らによる先行研究において、キノンメチドを発生する蛍光色素を用いることで 1 細胞レベルで標的分子を有する細胞を見分けることから、キノンメチドを介した周辺分子との結合により色素の拡散を抑制することが期待できる^{3, 4)}。RAW264.7 細胞を用いて phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 刺激により細胞内でスーパーオキシドを介して H_2O_2 を発生させると、細胞内で PG1-FM 由来の蛍光が顕微鏡により確認された。また、diphenyleneiodonium (DPI) や Ebselen などの阻害剤を共存させた場合、細胞内の蛍光が低下したことから、PG1-FM は H_2O_2 を選択的に検出していることが確認できた。さらに、 H_2O_2 と反応した PG1-FM は細胞内滞留性が飛躍的に向上しているため、顕微鏡を用いた蛍光イメージングだけでなくフローサイトメトリーによる定量解析にも適応できる。フルオロメチル基を導入することで色素の拡散防止、それによる細胞内滞留性の向上により、細胞内 H_2O_2 シグナルを高感度で検出することが可能となった。次に、細胞間でのレッドックスシグナルを可視化するため、異なる 2 種類の細胞、ミクログリアとニューロンを用いた共培養系へ応用した。ミクログリアは lipopolysaccharide (LPS) 刺激により細胞内で H_2O_2 を生成する一方で、ニューロンは H_2O_2 を生成することができない。この性質の違いを利用し、ミクログリアとニューロンを共培養しながら LPS 刺激によりミクログリアのみ H_2O_2 を発生させた。長時間刺激による H_2O_2 の発生後、PG1-FM を添加し、 H_2O_2 を保持した細胞を検出した。期待通り、 H_2O_2 を生成したミクログリアだけでなくミクログリアに接触しているニューロンにおいても PG1-FM の蛍光が観測された (図 2)。一方、ミクログリア内でスーパーオキシドと H_2O_2 発生に必須の p47 (p47^{phos-/-}) をノックアウトしたミクログリアを用いた場合、ニューロン内では PG1-FM の蛍光は観測されなかった。これらの結果は、ミクログリアで発生した H_2O_2 シグナルがニューロンに伝搬し、ニューロン内では PG1-FM の蛍光が観測されたことを示唆している。

本稿で紹介した PG1-FM は、 H_2O_2 の感知、キノンメチドを介した近傍分子への標識と連携して機能することで H_2O_2 シグナルを記録すると共に 1 細胞レベルで H_2O_2 シグナルを可視化してい

る。ミクログリアとニューロンを用いた細胞間でのレッドックスシグナルの可視化は序章であり、PG1-FM を用いた詳細な研究により神経細胞障害などの病態解明に寄与できるだろう。また、さらに複雑な細胞集団での H_2O_2 シグナルの役割を明らかにするツールとしての活躍も期待したい。



(A) PG1-FM と PF2 の化学構造、(B) PG1-FM のキノンメチド発生とそれを介したタンパク質との結合

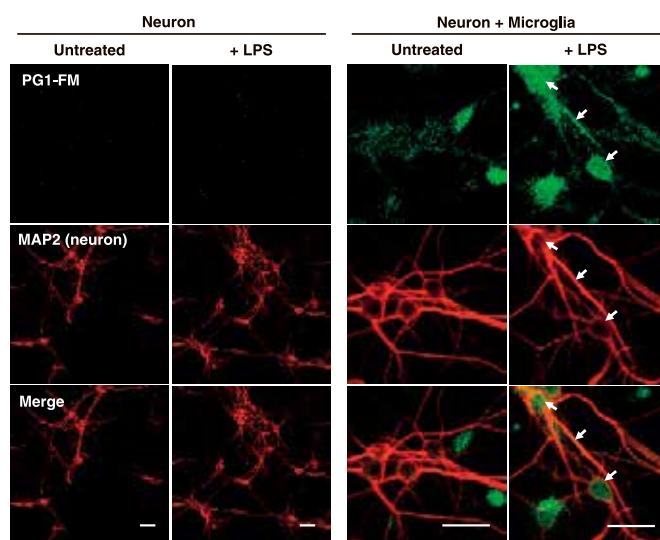


図 2 ミクログリアからニューロンへの H_2O_2 シグナルの伝搬を PG1-FM により検出 (スケールバー: 20 μm)

【参考文献】

- 1) Iwashita, H. *et al.*, "A tandem activity-based sensing and labeling strategy enables imaging of transcellular hydrogen peroxide signaling", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2021**, 118, e2018513118.
- 2) Dickinson, B. C. *et al.*, "A palette of fluorescent probes with varying emission colors for imaging hydrogen peroxide signaling in living cells", *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 5906-5915.
- 3) Doura, T. *et al.*, "Detection of lacZ-positive cells in living tissue with single-cell resolution", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2016**, 55, 9620-9624.
- 4) Chiba, M. *et al.*, "Activatable photosensitizer for targeted ablation of lacZ-positive cells with single-cell resolution", *ACS Cent. Sci.*, **2019**, 5, 1676-1681.

新製品

試験片用バイオフィーム形成能測定キット

Biofilm TestPiece Assay Kit

<特長>

- ・任意の素材（試験片）を簡便に評価できる
- ・浸漬面積が均一なので再現性の良いデータが取得できる
- ・多検体をまとめて簡便に処理することができる（最大 24 片）

詳細情報は、

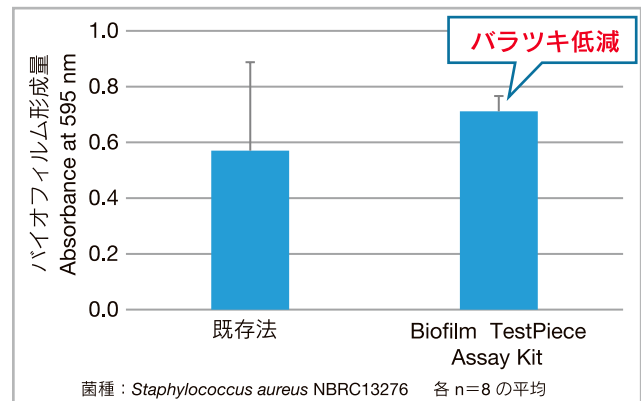
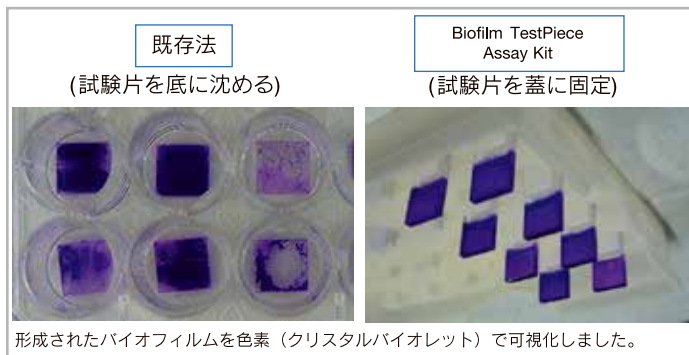
B606 同仁

検索

バイオフィームは医療器具内の細菌汚染やう蝕・歯周病の感染の要因とされ、医科領域や歯科領域など様々な分野で問題視されています。そのため、抗バイオフィーム活性を有する素材の開発や薬剤の探索が注目を集めています。Biofilm TestPiece Assay Kit は任意の素材（試験片）を付属のデバイスに取り付け、試験片に触れることなくバイオフィーム形成能の評価を行うことができます。

<既存法との比較>

既存法ではバイオフィームの剥離や形成ムラが見られるのに対して、本製品では試験片が均一に培養液に浸漬されるため、ムラのないバイオフィームが形成されました。また、バイオフィームを形成した試験片をクリスタルバイオレットで染色し、エタノールに抽出後、プレートリーダーで測定（595 nm）した結果、既存法よりもバラツキの少ない結果が得られました。



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Biofilm TestPiece Assay Kit ※	24 tests	¥25,000	B606
24-well Plate	8 plates	Request	B608

※ 24-well プレートは同梱しておりません。別途、推奨品もしくは、24-well プレートをご購入ください。



これから微生物を実験される方向けに
微生物実験に関する基礎をまとめた情報を公開中

詳細な情報は
Web にて公開中!



目次（各項目に移動します）

- | | |
|---|--|
| <p>1. 微生物とは 2分で解説</p> <p>1-1. 微生物ってなんだ？</p> <p>1-2. 微生物の大きさ</p> <p>2. 微生物に関連した注目の話題 4分で解説</p> <p>2-1. バイオフィーム</p> <p>2-2. 損傷菌</p> <p>2-3. HACCP（ハサップ）</p> | <p>3. 微生物を用いた実験例 3分で解説</p> <p>3-1. 培養法</p> <p>3-2. ①グラム染色
②蛍光染色法</p> <p>4. お問い合わせ</p> <ul style="list-style-type: none"> ・試薬に関するお問合せ ・実験のご依頼に関するお問合せ |
|---|--|

関連製品

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>

- ・測定の手間を大幅に低減
- ・バラツキを抑えた多検体処理が可能

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。

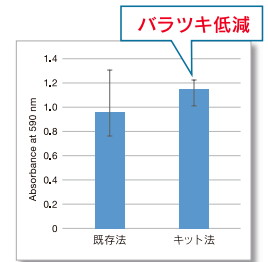
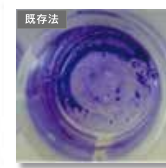
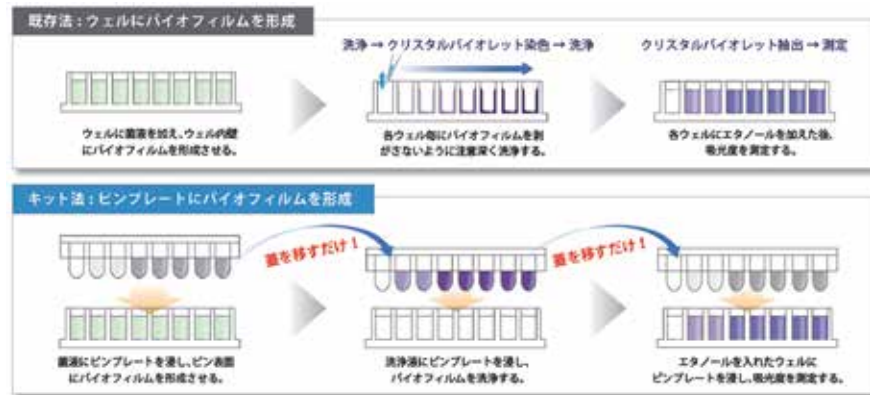
分かりやすい説明動画はこちら



B601



B603



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

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Biofilm Formation Assay Kit	96 tests	¥ 16,300	B601
Biofilm Viability Assay Kit	96 tests	¥ 18,700	B603

小社製品を使った論文を追加しました。

バイオフィーム 同仁 検索

微生物増殖アッセイキット

Microbial Viability Assay Kit-WST

菌種毎と使用論文を掲載しています。

M439 同仁 検索

<特長>

- ・評価にかかる時間を大幅に短縮
- ・生菌の活性評価を濁度から色の变化へ

本キットに含まれる小社の開発品である還元発色剤 WST-8 は、電子メディ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 ホルマゼ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便に測定することができます。

<操作>

96 well プレートに菌懸濁液を準備し、試薬を添加する。



<従来法との比較> * 菌種によって最適条件は異なります。

	既存法		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)
特徴	・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

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

※ 14、15 ページの 4 製品は、福岡県工業技術センター生物食品研究所との共同開発品です。

細胞増殖・毒性測定－試薬の選び方－

細胞増殖・毒性試験には様々な測定方法がありますが、測定する指標から細胞増殖能力、細胞生存能力、細胞毒性の大きく3つに分類されます。中でも細胞生存能力は、細胞内の酵素活性を指標とし、操作の簡便性や特殊な装置を必要とせず、また増殖能力や細胞毒性を間接的に測定できることから最も汎用されています。細胞生存能力を指標とした測定法について指標や特長をご紹介します。

指標	ミトコンドリア内 脱水素酵素活性	細胞内脱水素酵素活性	エステラーゼ活性
検出装置 (検出)	プレートリーダー (吸光度)	プレートリーダー (吸光度)	プレートリーダー、 FCM、蛍光顕微鏡 (蛍光)
メリット	・ 価格が安い	・ 操作が簡便：ミスが少ない ・ 試薬安定性が高い	・ 様々な装置に対応 ・ 反応時間が短い (15 分)
注意点	・ 酸化還元物質の影響有 ・ 反応後に試薬溶解が必要	・ 酸化還元物質の影響有	・ 血清によるバックグラウンド上昇 ・ 試薬の漏れ出しに注意が必要
こんな方に オススメ！	・ コスト重視の方	・ これからはじめる方 ・ 96 well プレートで測定される方	・ イメージングや FCM 測定する方 ・ 酸化還元物質を使う方
[メーカーコード] 製品名	[M009] MTT	[CK04] Cell Counting Kit-8	[CK06] Cell Conting Kit-F [C320] [C396] Calcein-AM

これから実験を始める方へ

細胞増殖・毒性測定の意義から、試薬選定のポイント、併用実験までわかりやすく解説しています！(次ページ p.17, 1 番目の動画)

細胞増殖毒性測定キット

Viability/Cytotoxicity Multiplex Assay Kit

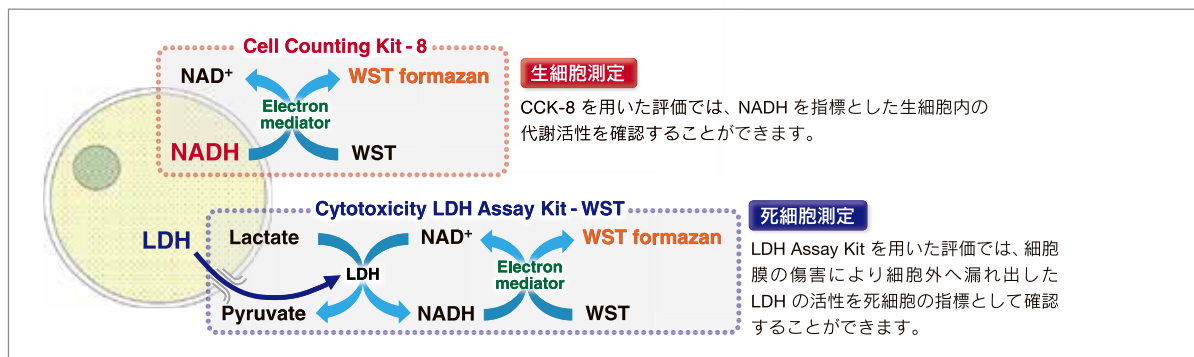
CK17 同仁

検索

細胞傷害性を確認する際、生細胞のみ又は死細胞のみを指標とした評価では、データの信頼性が十分でない場合もあることから、測定原理の異なる複数の指標で評価することで実験の裏付けを行うケースが増えています。

本キットは、それぞれ指標となる Cell Counting Kit-8 (CCK-8) と Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (LDH Assay Kit) がセットになった製品です。

[測定原理]



品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Viability/Cytotoxicity Multiplex Assay Kit	500 tests	¥29,800	CK17

動画コンテンツのご案内

小社では試薬の選び方や技術に関するオンラインセミナーを随時開催しております。

下記は、お客様から特に好評だったセミナーです。キット操作のコツなども盛り込まれた内容になっておりますので、是非ご視聴ください。今後もオンラインセミナーを継続して行なってまいりますので、事前案内をご希望の方は右の案内から登録をご検討ください。



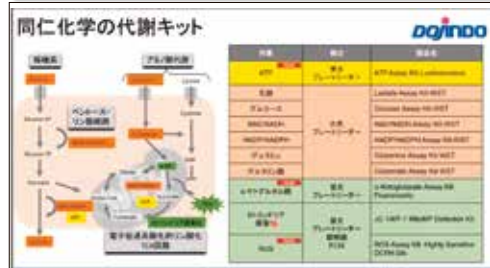
セミナー事前案内
の申し込みはこちら



－試薬の選び方－

細胞増殖・毒性試験

WST 法 (Cell Counting Kit-8) を用いた細胞増殖アッセイの基礎から、実験例までを幅広くご紹介します。



－試薬の選び方－

細胞内代謝測定

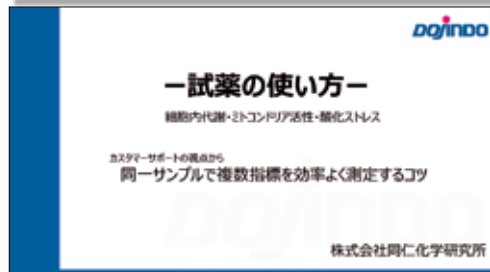
細胞内代謝測定で利用されている測定手法の比較、測定意義について実験例を交えてご紹介します。



－試薬の選び方－

ミトコンドリア

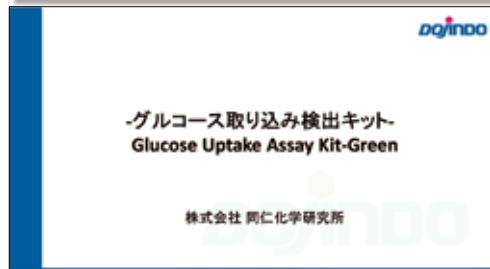
ミトコンドリア解析法から特に重要な指標と測定意義について、実験例を交えてご紹介します。



－試薬の使い方－

1 サンプルで複数代謝指標を 測定するコツ

細胞内代謝キットを用いたミトコンドリア活性、酸化ストレスの複数指標を、一つのサンプルで効率よく測定する方法を紹介します。



グルコース取り込み検出キット

グルコース取り込み検出の目的から、従来測定法との比較・実験例を交え本製品の特徴を解説します。



リンク先は変更の可能性もございます。ご視聴できない場合には小社カスタマーサポート (info@dojindo.co.jp) までお問合せください。



31st Forum in DOJIN

細胞内膜系のダイナミズム

—オルガネラが織りなす細胞のドラマ—

オンライン
開催
参加無料

日時 2021.8.24 [火]
9:30 ~ 17:00

Program

9:30~9:35 主催者挨拶 上野 右一郎 (東京化学研究所)
9:35~9:45 世話人挨拶 富澤 一仁 (熊本大学大学院 生命科学研究部 分子生理学講座)

Session1 富澤 一仁 (熊本大学大学院 生命科学研究部 分子生理学講座)

9:45~10:45 清水 重臣 (東京医科歯科大学 歯学部 歯科学科)
「オルガネラ研究のパラダイムシフト:オルガネラゾーンとは」
10:45~11:30 田村 康 (山形大学 理学部 理学科)
「ミトコンドリア-ER間コンタクト制御を介したERストレス応答」
11:30~12:15 山口 茂弘 (名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所)
「超耐光性・近赤外蛍光プローブの開発」

12:15~13:30 ランチブレイク (東京化学研究所「ランチョンセミナー」12:45~13:15)

Session2 三隅 将吾 (熊本大学大学院 生命科学研究部 細胞分子生物学講座)

13:30~14:15 西頭 英起 (宮崎大学 医学部 機能生化学)
「小胞体-ミトコンドリア間クロストークを介した褐色脂肪組織による熱産生」
14:15~15:00 吉田 秀郎 (兵庫県立大学大学院 生命科学研究科)
「ゴルジ体ストレス応答によるゴルジ体機能ゾーンの動的制御」

15:00~15:15 コーヒーブレイク

Session3 山本 哲郎 (熊本大学大学院 生命科学研究部)

15:15~16:00 濱田 隆宏 (岡山理科大学 理学部 生物化学科)
「植物における微小管ネットワークの役割」
16:00~16:45 新崎 恒平 (東京薬科大学 生命科学部 生命医科学科)
「レジオネラによる宿主輸送経路の多彩な制御機構」

16:45~17:00 閉会のご挨拶 三隅 将吾 (熊本大学大学院 生命科学研究部 細胞分子生物学講座)

主催 株同仁化学研究所 後援 株ケミカル同仁

問い合わせ 〒861-2202 熊本県上益城郡益城町田原2025-5 株同仁化学研究所内「フォーラム・イン・ドージン事務局」(担当:白石)
Tel:0120-489548 Fax:0120-021557 E-mail:info@dojindo.co.jp



お申し込みは
コチラ



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 0120-021557
フリーダイヤル 0120-489548
(受付時間: 平日 9:00 ~ 17:00
土・日・祝日は除く)