

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590538

研究課題名(和文) ウェルシュ菌の糖鎖分解酵素の機能および病原性解析

研究課題名(英文) Functional and pathogenic analysis of carbohydrate-active enzymes from *Clostridium perfringens*

研究代表者

宮田 茂 (MIYATA, Shigeru)

中部大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：90314913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウェルシュ菌感染時の侵襲性に大きく影響を与えると考えられるヒアルロニダーゼの性質を明らかにすることを試みた。ヒアルロニダーゼ遺伝子としてCanardらによりnagHが報告されており、その後のゲノムプロジェクトによりnagI, nagJ, nagK及びnagLの計5種類が報告された。組換えウェルシュ菌によりそれらのNagを過剰発現し、精製したところ、それらの酵素はすべてN-acetyl- β -glucosaminidaseで、ヒアルロン酸分解酵素活性は全く検出されなかった。そこで、本菌染色体より真のヒアルロニダーゼを検索した結果、新規遺伝子を見出し、発現・精製に成功した。

研究成果の概要(英文)：Clostridium perfringens is notable for their genomic content of numerous open-reading frames that encode carbohydrate-active enzymes. Among them, hyaluronidase is thought to function as virulence factors. This enzyme is believed to spread the organism in infected tissues or potentiate other toxins through facilitation of their diffusion via the degradation of hyaluronan, NagH has been partially purified as hyaluronidase from the organism (Canard, et al., 1994). In this study, we successfully purified NagH and the products of nagH paralogs, NagI, NagJ, NagK and NagL with high quality from recombinant C. perfringens cultures. These recombinant enzymes exhibit exo-N-acetyl- β -glucosaminidase activity but not hyaluronan degrading activity. These results led us question whether C. perfringens Nag(s) could genuinely hydrolyze hyaluronan. Thus, we searched and found a genuine gene of hyaluronidase in the organism, and indicated that the product exhibits hyaluronan degrading activity.

研究分野：分子微生物学

キーワード：Clostridium perfringens hyaluronidase

1. 研究開始当初の背景

ウェルシュ菌は、ヒトに対して食中毒の起因菌であると共に創傷感染によりガス壊疽等の感染症を引き起こす。食中毒や出血性腸炎では、腸管バリアであるムチン(O-結合型糖鎖)の分解によるエンテロトキシン等の毒素作用部位の露出が重要であることが示唆されている。また、ガス壊疽による組織・細胞壊死でも、コラゲナーゼやヒアルロニダーゼのマトリックス分解酵素による感染巣の拡大以外に、N-結合型糖鎖の分解による α 毒素(ホスホリパーゼ C)や θ 毒素(コレステロール依存性膜孔形成毒素)の作用部位の露出が、それらの毒素作用を増強していると考えられている。

ウェルシュ菌の NagH は、最初にクローニングされた family 84 glycoside hydrolase (GH84) であり、N-acetyl- β -D-glucosaminidase (Nag) 活性を有する酵素である。ヒアルロニダーゼ(μ -toxin)としてクローニングされたため、その相同性から真核生物・原核生物問わず多くの GH84 がヒアルロニダーゼとしてアノテートされてきた。真核生物では、GH84 は髄膜腫抗原として最初にクローニングされ、長い間ヒアルロニダーゼとされてきたが、後に O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) 化タンパク質から O-GlcNAc を遊離させる O-GlcNAcase であることが明らかとなった。O-GlcNAc 化タンパク質は Ser/Thr 残基の水酸基が一分子の GlcNAc により修飾されている一連のタンパク質で、サイトゾルや核内に存在する。多種にわたるが、多くの場合リン酸化タンパク質でリン酸化と相反的に修飾され、リン酸化レベルの調節を通じてシグナル伝達を制御している。

研究開始当初、*Streptococcus pyogenes*、*Bacteroides thetaiotaomicron* の GH84 や、ウェルシュ菌の NagH パラログである NagJ の触媒モジュールがヒアルロニダーゼ活性を持たないことが相次いで報告された。これらの酵素には、糖鎖結合モジュール(CBM)が無いもしくは欠失させてあるためヒアルロニダーゼ活性を示さないとも考えられる。NagH は、N-末端から GH84 触媒モジュール、4 つの family 32 CBM (CBM32)、機能未知のモジュール、3 つの uncharacterised CBM からなる 180 kDa の multi-modular タンパク質である。NagJ は、GH84 触媒モジュール、1 つの CBM32、X82-cohesin 様モジュール、fibronectin type III ドメインからなる 108 kDa 酵素である。大腸菌発現系を用いて酵素全長を発現させることが試みられてきたが、成功していない。*Clostridium* 属の遺伝子は極端に AT-rich であるため、コドン利用頻度の差異から tRNA 遺伝子を補充した大腸菌を用いた発現系でも、このような高分子量タンパク質全長を発現させることは困難であるためと考えられる。そのため、我々は、ウェルシュ菌を宿主とした発現系を開発し、NagH と NagJ、さらに分泌型 β ガラクツィダーゼである BgaA やシアリダーゼ (NanI, NanJ) の発現・精製を行い、一部機能解析を行

った。その結果、NagH、NagJ 共にヒアルロニダーゼ活性は全く検出されず、さらに、基質特異性を調べた結果、NagJ は、キトオリゴ糖やキチンをゆっくりと分解することが可能であり、3 分枝鎖ヒト型糖鎖の 3 つの末端 GlcNAc のうち 2 つを効率よく分解し、BgaA と NanJ もしくは NanI との協同作用により、N-結合型糖鎖の非還元末端から core 構造中のマンノース残基まで効率よく分解できることを明らかにした。一方、NagH は糖鎖構造末端の GlcNAc は分解できず、厳密な基質特異性を有する O-GlcNAcase であることを明らかにしたが、その生理作用は不明である。また、それ以外の Nag や Endo-H 型酵素等の機能解析はまだ全く行われていない。

2. 研究の目的

ウェルシュ菌感染症の機序を解明することを目的とし、Nag やその他の糖鎖分解酵素の機能解析を通じてウェルシュ菌による宿主細胞の糖鎖分解機構を明らかにする。

3. 研究の方法

各種発現ベクターの構築のために、各糖鎖分解酵素遺伝子全長または一部 C-末端領域を欠失させた遺伝子領域を PCR で増幅した。得られた DNA 断片を XhoI で分解した後、pCE11 の EcoRV-XhoI サイトにライゲーションし、*E. coli* NovaBlue を形質転換した。塩基配列を確認し、その結果得られたプラスミドを各種糖鎖分解酵素発現ベクターとした。

それらの発現ベクターで *C. perfringens* clp 株を形質転換し、1/2TY2GP 培地で構成的に発現させた。発現させた組換え酵素は、各種クロマトグラフィーにより精製した。

精製した酵素を用いて各種基質の分解活性を調べた。

4. 研究成果

(1) ウェルシュ菌の Nag の発現と精製

ウェルシュ菌には、NagH、NagJ のパラログとして、さらに NagI、NagK、NagL が存在する。NagI (CPE0881) は、N-末端から GH20 domain 2、GH84 触媒モジュール、2 つの CBM32、そして C-末端領域の LPxTG-cell wall anchor motif からなる 143 kDa 酵素である。NagK (CPE1279) は、GH84 触媒モジュール、3 つの CBM32、1 つの uncharacterised CBM、LPxTG-motif からなる 128 kDa 酵素である。NagL (CPE1523) は、GH84 触媒モジュール、2 つの CBM32、fibronectin type III ドメインからなる 124 kDa 酵素である。これら NagI、NagK、NagL の機能解析はまだ全く行われていない。

そこでウェルシュ菌の産生する Nag の機能的差異や病原性における役割を明らかにすることを目的として、それらの発現系の構築と組換え Nag の精製を行い生化学的性質を明らかにすることを試みた。

(1-1) ウェルシュ菌の NagI の発現と精製

nagI 遺伝子全長 (3.9 kb) を PCR で増幅し、pCE11 の *EcoRV*-*XhoI* サイトに挿入し、NagI 発現プラスミド pEI1 の構築を行った。pEI1 は *nagI* 遺伝子をフェレドキシン・プロモーター下流に挿入し、C-末端に(His)₆-tag が付加した組換え NagI (rNagI) が構成的に高発現するように設計した。pEI1 で *C. perfringens* 13 clp-株を形質転換し、rNagI (rNagI1) の発現量を SDS-PAGE で確認したところ (図 1)、GAM 培地でも (図 1, lane 1)、1/2TY2GP 培地 (図 1, lane 2) でも、ほとんど発現しなかった。NagI のアミノ酸配列を調べたところ、C-末端領域に LPxTG motif がみられた。この motif の上流には酸性アミノ酸や塩基性アミノ酸に富んでおり、cell wall-anchor domain として機能していると考えられた。クロストリパイン・ノックアウト株を宿主として用いていることもあり、アンカー部位で分解されずに NagI が培地中に遊離しないと考えられた。そこで、C-末端領域の LPxTG motif を欠失させた rNagI の発現系の構築を行なった。

C 末端領域にある LPxTG motif を欠失させた NagI を発現させるために pEI2 を構築した。pEI2 で *C. perfringens* 13 clp-株を形質転換し NagI の発現量を SDS-PAGE で確認したところ (図 1)、GAM 培地でも (図 1, lane 3)、1/2TY2GP 培地 (図 1, lane 4) でも、rNagI2 は、培養上清中に遊離し、メイン・バンドとして検出された。遊離量は、GAM 培地より 1/2TY2GP 培地のほうが多く、さらに GAM 培地では培地由来の成分と考えられるバンドが 50 kDa 付近に観察された。この結果より、rNagI の精製は、*C. perfringens* clp-/pEI2 を 1/2TY2GP 培地で培養した培養上清から始めるのが良いと考えられた。

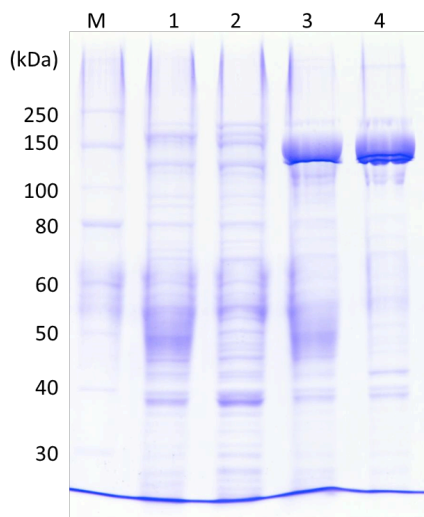


図 1. *C. perfringens* clp-/pEI1 と *C. perfringens* clp-/pEI2 の rNagI 発現量の比較
20 μ g/ml Em 及び 10 μ g/ml Cm を含む GAM 培地 (lane 1, 3) または 1/2TY2GP (lane 2, 4) に *C. perfringens* clp-/pEI1 と *C. perfringens* clp-/pEI2 を植菌し終夜培養した。遠心分離後の培養上清 (各 100 μ l) を TCA 沈殿し、SDS PAGE で解析した。lane M, Molecular marker; lanes 1 and 2, *C.*

perfringens clp-/pEI1; lanes 3 and 4, *C. perfringens* clp-/pEI2。

次に、*C. perfringens* clp-/pEI2 を 1/2TY2GP 培地で培養した場合の菌の増殖と培地中に遊離する Nag 活性を調べた。図 2 パネル (A) に示したように、菌の増殖も Nag 活性も約 7 時間でプラトーに達し、それ以降ほとんど増加しなかった。培地中に遊離したタンパク質を SDS-PAGE で解析した結果、7 時間以降培地中に蓄積した rNagI2 の量はほとんど変化がないが、時間の経過にもなって分解産物と考えられる rNagI2 よりも低分子量のバンドが複数観察された (図 2, パネル B)。可能な限り最大の発現量で、かつ培地中に遊離した rNagI2 の分解を防ぐため、培養時間は 8 時間が妥当であると考えられた。

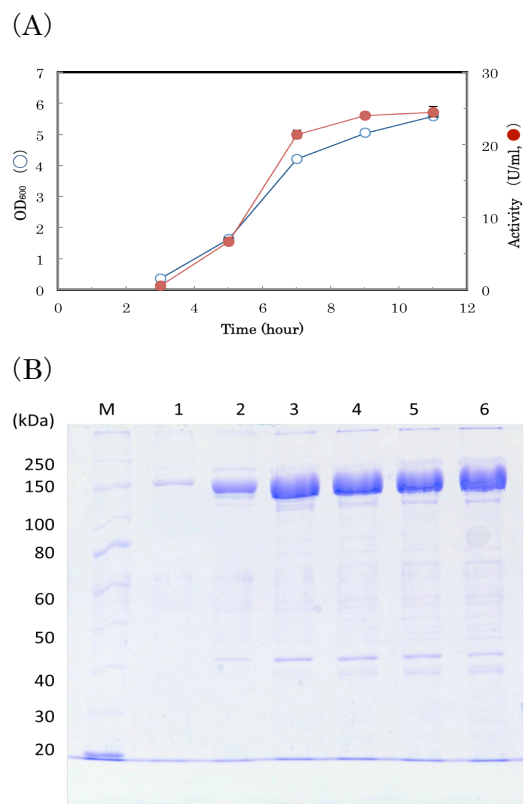


図 2. *C. perfringens* clp-/pEI2 の生育曲線と培地中に遊離する rNagI の培養時間依存性

20 μ g/ml Em 及び 10 μ g/ml Cm を含む 1/2TY2GP 培地に *C. perfringens* clp-/pEI2 の終夜培養液を 1% 接種し、37 $^{\circ}$ C で培養した。(A) 3、5、7、9、11 時間培養した培養液の一部をサンプリングし、OD₆₀₀ の測定と遠心分離後の上清に含まれる pNP-GlcNAc 分解活性を測定した。1U は 1 分間に 1 μ mol の pNP-GlcNAc を加水分解する酵素量とした。(B) 各時間の培養上清及び終夜培養液の上清 (各 100 μ l) を TCA 沈殿し、SDS PAGE で解析した。M, Molecular marker; 1, 3 時間培養; 2, 5 時間培養; 3, 7 時間培養; 4, 9 時間培養; 5, 11 時間培養; 6, 終夜培養。

100 ml の培地に *C. perfringens* clp-/pEI2 を接種し、8 時間培養した培養上清から rNagI2 を精製した。80% 飽和硫酸画分を透析後、Ni-IMAC によるアフィニティクロマトグラフィーで分画した。透析後、さらに陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した。各ステップのタンパク質量及び酵素活性は表 2 にまとめた。最終的に約 3 mg の rNagI2 が精製できた。回収率は約 44% だった。また、各画分のタンパク質成分を SDS-PAGE により解析した(図 3)。培養上清中に存在したマイナータンパク質は、Ni-IMAC によりほぼ完全に除去することができた。最終的に高純度の rNagI を得ることができた。

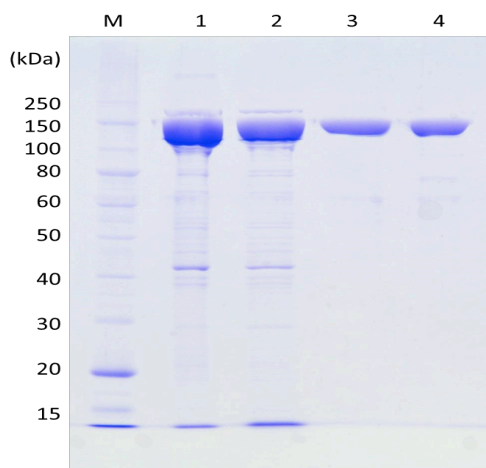


図 3. *C. perfringens* clp-/pEI2 培養上清からの rNagI2 の精製

C. perfringens clp-/pEI2 の終夜培養液を 20 µg/ml Em 及び 10 µg/ml Cm を含む 1/2TY2GP 培地に 1% 接種し、37°C で 8 時間培養した。培養上清を硫酸沈殿後、rNagI2 を Ni-IMAC、Hi-Trap Q で精製した。培養上清は 100 µl を TCA 沈殿し、SDS-sample buffer に溶解した。その他の精製途中の画分は、適当量を SDS-sample buffer と混合した。それらを 70°C で 3 分間加熱した後、SDS-PAGE で解析した。M, Molecular marker; 1, 培養上清; 2, 80% 飽和硫酸画分(6 µg); 3, Ni-IMAC 画分(2 µg); 4, Hi-Trap Q 画分(2 µg)

(1-2) ウェルシュ菌の NagK の発現

NagK の発現も NagI と同様に行った。*nagK* 遺伝子全長(3.5 kb)を PCR で増幅し、pCE11 の *EcoRV-XhoI* サイトに挿入した。pEK1 は *nagK* 遺伝子をフェレドキシン・プロモーター下流に挿入し、C-末端に(His)₆-tag が付加した組換え NagK(rNagK)が構成的に高発現するように設計した。pEK1 で *C. perfringens* 13 clp-株を形質転換し、rNagK(rNagK1)の発現量を SDS-PAGE で確認したところ、ほとんど発現しなかった。NagK のアミノ酸配列を調べたところ、NagI と同様に C-末端領域に LPxTG motif がみられた。そこで、C-末端領域の LPxTG motif を欠失させた rNagK' (rNagK2) の発現系の構築を行なった。

C 末端領域にある LPxTG motif を欠失させた

NagK を発現させるために pEK2 を構築した。pEK2 で *C. perfringens* 13 clp-株を形質転換し NagK の発現量を SDS-PAGE で確認したところ、rNagK2 は、培養上清中に遊離し、メイン・バンドとして検出された。

C. perfringens clp-/pEK1 及び *C. perfringens* clp-/pEK2 を 1/2TY2GP 培地で培養した場合の菌の増殖と培地中に遊離する rNagK の量を SDS-PAGE で調べた。*C. perfringens* clp-/pEK1 の増殖は約 7 時間、*C. perfringens* clp-/pEK2 の増殖は約 9 時間でプラトーに達し、それ以降ほとんど増加しなかった。培地中に遊離したタンパク質を SDS-PAGE で解析した結果、*C. perfringens* clp-/pEK1 では、rNagK1 はほとんど培地中に遊離せず、分解産物と考えられる rNagK1 より低分子量のタンパク質が増加した。一方、*C. perfringens* clp-/pEK2 の場合、9 時間以降培地中に蓄積した rNagK2 の量はほとんど変化がないが、時間の経過にともなって少ないながらも rNagK2 の分解産物と考えられるバンドが複数観察された。これらの結果より、rNagK の精製は、*C. perfringens* clp-/pEK2 を 1/2TY2GP 培地で培養した培養上清から始め、可能な限り最大の発現量で、かつ培地中に遊離した rNagK2 の分解を防ぐため、培養時間は 8 時間が妥当であると考えられた。

(1-3) ウェルシュ菌の NagL の発現と精製

nagL 遺伝子全長(3.4 kb)を PCR で増幅し、フェレドキシン・プロモーターの制御下に構成的に高発現するように pCE11 の *EcoRV-XhoI* サイトに挿入して NagL 発現プラスミド pEL2 を構築した。また、発現した NagL の C-末端に(His)₆-tag が付加した組換え NagL(rNagL)が発現するように設計した。pEL2 で *C. perfringens* 13 clp-株を形質転換し、rNagL の発現量を SDS-PAGE で確認したところ、メイン・バンドとして検出された。また、遊離量は、GAM 培地でも 1/2TY2GP 培地でもほとんど差がないが、GAM 培地では培地由来の成分と考えられるバンドが 50 kDa 付近に観察された。この結果より、rNagL の精製は、*C. perfringens* clp-/pEL2 を 1/2TY2GP 培地で培養した培養上清から始めるのが良いと考えられた。

100 ml の培地に *C. perfringens* clp-/pEL2 を接種し、8 時間培養した培養上清から rNagL を精製した。80% 飽和硫酸画分を透析後、Ni-IMAC によるアフィニティクロマトグラフィーで分画した。透析後、さらに陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した。培養上清中に存在したマイナータンパク質は、Ni-IMAC により多くが除去することができた。最終的に約 0.7 mg の高純度 rNagL が精製できた。回収率は約 42% だった。

(1-4) 各 Nag の酵素活性

精製した rNagH と rNagJ の酵素活性を調べた。両酵素とも pNP-GlcNAc を加水分解したが、ヒアルロン酸分解酵素活性は検出されなかった。

pNP-(GlcNAc)₂ や pNP-(GlcNAc)₃、キチンを基質とした場合、NagJ はこれら基質を徐々に分解したが、NagH は全く分解しなかった。次に、同様に発現・精製したウェルシュ菌のβ-ガラクトシダーゼ (BgaA) 及びシアリダーゼ (NanI、NanJ) で処理した fetuin を基質とした場合、NagJ では 効率よく GlcNAc を遊離したが、NagH では GlcNAc の遊離は認められなかった。HT-29 細胞抽出物を基質としたところ、両酵素とも O-GlcNAc 化タンパク質から GlcNAc を遊離させた。一方、NagH、NagJ とともに、L-Asn に GlcNAc が結合した N-Asn や endo-H 処理した RNaseB から N-結合型 GlcNAc の遊離は認められなかった。

また、rNagI、rNagK、rNagL はすべて pNP-GlcNAc 分解活性を示したが、ヒアルロン酸は分解しなかった。

これらの結果からウェルシュ菌の Nag はヒアルロニダーゼではなく、それぞれ基質特異性の異なる N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼであることが示唆された。

(2) ウェルシュ菌のヒアルロン酸分解酵素の検索と発現・精製

グリコサミノグリカンの主要構成成分であるヒアルロン酸は、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸 (GlcNAc β1→4 GlcU β1→3) の二糖単位が連結した構造をしている直鎖状の高分子多糖である。分子量は 100 万以上になると言われているおり、コンドロイチン硫酸など他のグリコサミノグリカンと異なっていて、硫酸基の結合が見られず、またコアタンパク質と呼ばれる核となるタンパク質にも結合していない。生体内では、関節、硝子体、皮膚、脳など広く細胞外マトリックスに見られる。

このヒアルロン酸を切断する酵素のグループはヒアルロン酸分解酵素 (Hyaluronidase) と呼ばれるが、作用機作に基づいて加水分解酵素とリアーゼ (脱離酵素) の 2 つのグループに分けられる。加水分解酵素は、1) 精巢ヒアルロニダーゼのようなヒアルロン酸 4-グリカン加水分解酵素 (hyaluronoglucosaminidase)、2) ヒルのヒアルロニダーゼのようなヒアルロン酸 3-グリカン加水分解酵素 (hyaluronoglucuronidase) がある。リアーゼはヒアルロン酸リアーゼと呼ばれており、主に微生物由来の微生物ヒアルロニダーゼである。Clostridium 属や Streptococcus 属のような微生物は感染時に組織に侵入するために、ヒアルロン酸を含むグリカンを分解すると考えられている。

C. erfringens NCTC8237 株、SM101 株、13 株の培養上清をヒアルロン酸が入った寒天培地に穴を開けて、各菌株の培養上清を加えて 37°C、24 時間反応させたところ、NCTC8237 株と SM101 株はヒアルロン酸を分解したが、13 株だけは分解しなかった。Streptococcus pneumoniae や Streptococcus pyogenes、Staphylococcus aureus などの細菌類が産生するヒアルロニダーゼは、hyaluronan lyase であり、CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes)

database (<http://www.cazy.org/>) では、Polysaccharide Lyase family 8 (PL8) に属している。一方、ウェルシュ菌では Glycoside Hydrolase family 84 (GH84) に属している NagH がヒアルロニダーゼであると考えられてきたが、前項に示したように NagH やそのパラログ産物である NagI、NagJ、NagK、NagL にはヒアルロン酸分解酵素活性が検出されなかったことから、C. perfringens のゲノム DNA から PL8 に属するタンパク質をコードする遺伝子を検索した。その結果、hyl 遺伝子を新たに見出した。C. perfringens NCTC8237 よりゲノム DNA を鋳型とし、PCR により hyl 遺伝子全長を増幅し、pCE11 の EcoRV-XhoI サイトにクローニングした。塩基配列を確認後、C. perfringens clp-株の形質転換を試みたが、形質転換体は得られなかった。原因として、Hyl はグラムポジティブアンカーリング配列 (Gram-positive anchoring motif) を有しているため、Hyl が細胞壁に過剰に蓄積し細胞壁の integrity に影響を与えているためであると考えられた。そこで LPxTG 配列を欠失させた組換え Hyl の発現を試みた。

3'-末端領域が欠失した hyl 遺伝子を PCR で増幅し、同様に pCE11 にクローニングした。得られたプラスミド pMA2 の塩基配列を確認後、C. perfringens clp-株を形質転換した。

100 ml の培地に C. perfringens clp-/pMA2 を接種し、8 時間培養した培養上清から rHyl を精製した。80% 飽和硫酸アンモニウムを透析後、Ni-IMAC によるアフィニティクロマトグラフィーで分画した。透析後、さらに陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した。培養上清中に存在したマイナータンパク質は、Ni-IMAC により多くが除去することができた。最終的に約 1.8 mg の高純度 rHyl が精製できた。回収率は 16.7% だった。図 4 に各画分のタンパク質成分を SDS-PAGE により解析した結果を示した。

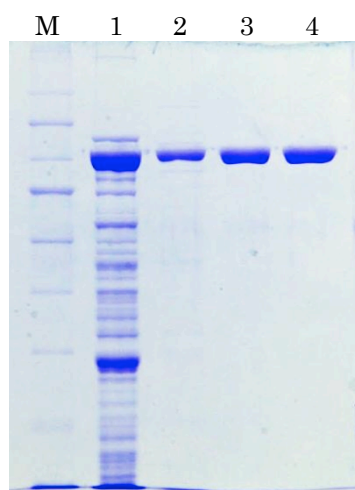


図 4. C. perfringens clp-/pMA2 培養上清からの rHyl の精製

C. perfringens clp-/pMA2 の終夜培養液を 20 μg/ml Em 及び 10 μg/ml Cm を含む 1/2TY2GP 培地に 1% 接種し、37°C で 8 時間培養した。培養上清を硫酸沈殿後、rHyl を Ni-IMAC、Hi-Trap Q で精製した。培養上清

は 100 μ l を TCA 沈殿し、SDS-sample buffer に溶解した。その他の精製途中の画分は、適量を SDS-sample buffer と混合した。M, Molecular marker; 1, 培養上清; 2, 80%飽和硫酸画分(2 μ g); 3, Ni-IMAC 画分(2 μ g); 4, Hi-Trap Q 画分(2 μ g)

Tris-HCl、MES-NaOH、Sodium phosphate の各 buffer を用いて、pH 5.5~8.5 間でヒアルロン酸分解活性を調べたところ、pH 6.0~6.5 が最適 pH であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Eiji Tamai, Hiroshi Yoshida, Hiroshi Sekiya, Hirofumi Nariya, Shigeru Miyata, Akinobu Okabe, Tomomi Kuwahara, Jun Maki, and Shigehiro Kamitori. "X-ray structure of a novel endolysin encoded by episomal phage phiSM101 of *Clostridium perfringens*" *Molecular Microbiology* **92**(2): 326-337 (2014). doi: 10.1111/mmi.12559. 査読有

② Tulasi Ponnappakkam, Ranjitha Katikaneni, Hirofumi Suda, Shigeru Miyata, Osamu Matsushita, Joshua Sakon, and Robert C. Gensure. "A single injection of the anabolic bone agent, parathyroid hormone-collagen binding domain (PTH-CBD), results in sustained increases in bone mineral density for up to 12 months in normal female mice" *Calcified tissue international* **91**(3): 196-203 (2012). doi: 10.1007/s00223-012-9626-1. 査読有

[学会発表] (計7件)

① 朝日 航, 東 正人, 成谷 宏文, 宮田 茂. "弱毒ウェルシュ菌株を利用した AT-rich 遺伝子用 T7 発現系の開発" 第 88 回日本細菌学会総会 2015.3.26-28. 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

② 東 正人, 朝日 航, 宮田 茂. "セルロース利用能を付加した弱毒ウェルシュ菌株の構築" 第 88 回日本細菌学会総会 2015.3.26-28. 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

③ 朝日 航, 澤入 駿哉, 森山 龍一, 宮田 茂. "Clostridium perfringens の T7 発現系の開発" 日本農芸化学会中部支部第 171 回例会 2014.10.11. 名古屋大学(愛知県名古屋市)

④ 東 正人, 朝日 航, 森山 龍一, 宮田 茂.

"ウェルシュ菌によるセルラーゼ遺伝子の発現" 日本農芸化学会中部支部第 171 回例会 2014.10.11. 名古屋大学(愛知県名古屋市)

⑤ 成谷 宏文, 今大路治之, 宮田 茂, 桑原知巳. "Novel cloning system of large exogenous DNA as artificial chromosome in *Clostridium perfringens*" 第 87 回日本細菌学会総会 2014.3.26-28. タワーホール船堀(東京都江戸川区)

⑥ 中北慎一, 中北ゆかり, 住吉 渉, 宮田 茂, 神鳥成弘, 平林淳. "ウェルシュ菌が分泌するシアリダーゼの基質特異性" 第 32 回日本糖質学会年会 2013.8.5-7. 大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

⑦ Shigeru Miyata, Masumi Kobayashi, and Ryuichi Moriyama. "Germination-related serine proteases which activate the germination-specific cortex hydrolase, SleC, of *Clostridium perfringens* S40 spores" 7th International Conference on Gram-Positive Microorganisms 2013.6.23-27. Tuscany (Italy)

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮田 茂(MIYATA, Shigeru)
中部大学・応用生物学部・准教授
研究者番号: 90314913

(2)研究分担者

森山 龍一(MORIYAMA, Ryuichi)
中部大学・応用生物学部・教授
研究者番号: 60191061

岡部 昭延(OKABE, Akinobu)
中国学園大学・現代生活学部・教授
研究者番号: 20093677

成谷 宏文(NARIYA, Hirofumi)
香川大学・医学部・助教
研究者番号: 30452668

(3)連携研究者

吉田 裕美(YOSHIDA, Hiromi)
香川大学・総合生命科学研究センター・准教授
研究者番号: 10313305

中北 慎一(NAKAKITA, Shinichi)
香川大学・総合生命科学研究センター・准教授
研究者番号: 40314356