

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)	
研究期間：2007～2008	
課題番号：19790328	
研究課題名 (和文)	ウエルシュ菌 α 毒素の生物活性とスフィンゴミエリン分子種代謝の分子生物学的解析
研究課題名 (英文)	The relationship between the metabolism of sphingomyelin species and the hemolysis of sheep erythrocytes induced by <i>Clostridium perfringens</i> alpha-toxin
研究代表者	
小田 真隆 (ODA MASATAKA)	
徳島文理大学・薬学部・助教	
研究者番号：00412403	

研究成果の概要：

本研究では、中国四川大地震でも多く見られたウエルシュ菌によるガス壊疽の主要な病原因子である α 毒素による細胞膜破壊作用とリン脂質代謝との関係に注目し解析した。 α 毒素が血中に移行すると高度の溶血を示すことから、赤血球膜破壊作用を指標に検討した。その結果、本毒素は、不飽和脂肪酸を有するリン脂質を特異的に代謝亢進させることにより、血球膜の恒常性の破綻をきたしていることが判明した。また、不飽和結合を有するリン脂質の増加は、細胞膜の不安定化、あるいは、老朽化の指標となることも示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード： ウエルシュ菌、 α 毒素、溶血、スフィンゴミエリン代謝系、C24:1-セラミド

1. 研究開始当初の背景

ウエルシュ菌の産生する α 毒素は、本菌によるガス壊疽の主要な病原因子で、生物活性として、致死、壊死、そして、溶血活性を有し、さらに、酵素活性として、ホスホオリパーゼ C、及び、スフィンゴミエリナーゼ (SMase) 活性を有している。所属する研究室では、 α 毒素の組織破壊、すなわち、細胞破壊のモデルとして動物赤血球に着目し、溶血機構について解析してきた。既に、本毒素がウサギ赤血球に作用すると、百日咳毒素感受性 GTP 結合タンパク質 (Gi) を介して内因性

ホスホオリパーゼ C を活性化し、ホスファチジルイノシトール 2-リン酸をジアシルグリセロール (DG) とイノシトール 3-リン酸に分解すること、さらに、生成亢進した DG により内因性ホスホオリパーゼ D 活性が亢進し、ウサギ赤血球膜中に多く含まれているホスファチジルコリンがホスファチジン酸に代謝され、溶血が引き起こされると報告してきた [*Infect. Immun.* 62, 717 (1994)、*Infect. Immun.* 64, 3930 (1996)]。私は、細胞膜中にホスファチジルコリンをほとんど含まず、多量のスフィンゴミエリン (SM) を含有する

ヒツジ赤血球に対する α 毒素の影響について検討してきた。 α 毒素は、ヒツジ赤血球膜に結合すると、Gi を介して赤血球膜中の内因性 SMase を活性化し、SM 代謝系を活性化すること、さらに、その最終産物であるスフィンゴシン 1-リン酸が本毒素による溶血のセカンドメッセンジャーとして作用することを報告した [*J. Biol. Chem.* 279, 12181 (2004)]。本毒素活性と SM 代謝系の関係を証明したが、SM は、脂肪酸側鎖の炭素数の違いや不飽和結合の有無により多様な分子種が存在すること、さらに、細胞内シグナル伝達のプラットフォームドメインとして知られているラフトに多く存在していることを考慮すると、毒素活性のメカニズムは、不明な点が多い。また、SM 分子種と生理活性の関係についての研究は、ほとんどなされておらず、本研究は、学際的に大きく貢献できると考える。

2. 研究の目的

α 毒素によるヒツジ赤血球溶血に密接に関係する SM 代謝系に注目し、特異的に代謝される SM と生成するセラミド分子種の解析、及び、本毒素により活性化される内因性 SMase の活性化機構の解析。

3. 研究の方法

(1) ヒツジ赤血球膜 SM 分子種の同定

ヒツジ赤血球を洗浄後、Bligh-Dyer 法により総脂質を抽出し、得られた総脂質をシリカゲル 60 カラムにアプライ後、クロロホルム、アセトン、メタノールの順に溶出し、リン脂質を含むメタノール分画を回収する。さらに、メタノール分画をクロロホルム - メタノール - 酢酸 - 蒸留水 (25 : 15 : 4 : 2) の溶出液で分画し、各分画を TLC で分離後、さらに、高速液体クロマトグラムにより SM 画分を分離し、その分画を逆相のカラムを用いナノ LC-MS/MS で解析する。

(2) In vitro kinase assay

サンプル (1 検体) に、kinase assay 緩衝液 99 μ l、及び、トレーサー溶液 1 μ l を加え、超音波処理後、30°C で 30 分間インキュベーションした。次にクロロホルム - メタノール (1 : 2, v/v) 450 μ l を加え、反応停止後、さらに、クロロホルム、及び、1% PCA を 150 μ l ずつ添加し、十分に混和後、1,000 rpm で 10 分間遠心した。遠心後、上層は除き、下層をエッペンドルフチューブに分注し、デシケーターを用いて、溶媒を留去させた。残渣をクロロホルム 50 μ l に溶解し、これを TLC プレートにスポットし、セラミド分離用展開溶媒を用いて、TLC を行った。展開後、乾燥させた TLC プレートをイメージングプレートに露光し、FLA2000 で解析した。

(3) セラミドの定量法

洗浄済みヒツジ赤血球 (2.4×10^{10} 個/200 μ l) を 75 μ M *N*-OE (セラミダーゼ阻害剤) で前処理後、各々の濃度の α 毒素を添加し、37°C、30 分間インキュベーションした。その後、クロロホルム - メタノール (1 : 2, v/v) 600 μ l を vortex しながら添加し、続いて、クロロホルム、5 mM EDTA - 0.2 mM KCl を 200 μ l ずつ加え、vortex で混和後、2,000 rpm で 10 分間遠心した。遠心後、上層を取り除き、Bligh-Dyer 脂質洗浄液を 400 μ l 加え、vortex で混和後、再び 2,000 rpm で 10 分間遠心した。上層を適量とり除き、下層をエッペンドルフチューブに移した後、デシケーターを用いて溶媒を留去させ、得られた膜脂質を in vitro kinase assay により解析した。

(4) Sph 1-P の定量法

洗浄済みヒツジ赤血球 (2.4×10^{10} 個/200 μ l) を β -escin で 37°C、10 分間インキュベーション後、各々の濃度の各種 Cer を添加し、37°C、1 時間インキュベーションした。溶血を引き起こさない最大濃度の α 毒素 (5 ng/ml) を添加し、 32 P-ATP 存在下で、37°C、30 分間インキュベーション後、クロロホルム - メタノール - アンモニア水 (1 : 2 : 0.04, v/v) 600 μ l を vortex しながら添加し、続いて、クロロホルム、5 mM EDTA - 0.2 mM KCl を 100 μ l ずつ加え、vortex で混和後、アンモニア水 75 μ l 加え、再び vortex を行い、2,000 rpm で 10 分間遠心した。遠心後、上清をエッペンドルフチューブに移し、クロロホルムを 200 μ l、及び、conc.HCl を 150 μ l 加え、vortex 後、2000 rpm で 10 分間遠心し、上層を適量とり除き、下層をエッペンドルフチューブに移し、デシケーターで溶媒を留居させた。クロロホルム 50 μ l に溶解後、薄層板にスポットし、*n*-ブタノール - 酢酸 - 留水 (7 : 1 : 1, v/v) で展開を行った。薄層板をよく乾燥させた後、オートラジオグラフィで解析した。

(5) 125 I ラベル α 毒素の調製方法

4°C に冷却した 0.1 M Borate buffer (pH 8.5) 1000 ml 中で、Dialysis membrane, size 8 を用いて α 毒素 (100 μ g/ml) 300 μ l を一晚透析した。次に、Bolton and Hunter reagent 5 μ l を N_2 ガスで留去した試験管に、透析した α 毒素を約 80 μ l 添加し、水中で 1 時間インキュベーション後、未反応の試薬を除くため、Bio-Spin 6 Chromatography Column にアプライし、3,000 rpm、5 分間遠心した。 α 毒素が 125 I-ラベル化されているか確認するため、濾過されたラベル α 毒素 5 μ l と SDS sample buffer 20 μ l を混和し、37°C で 10 分間インキュベーション後、CBB 溶液 1 μ l を加え、10% SDS - PAGE と Gel dry を

行い、Imaging plate に露光し、FLA2000 で解析した。

(6) ラフト画分の取得方法

3 mM CaCl₂ を含む GTBS で懸濁したヒツジ赤血球 (6×10¹⁰ 個/500 μl) に、¹²⁵I ラベル α 毒素を加え、37°C、30 分間、攪拌しながらインキュベーションした。その後、超音波処理を行い、沈渣を懸濁させ、2% Triton X-100 - TNE-PI を 0.5 ml (終濃度 1%) 加え、4°C で 1 時間攪拌しながらインキュベーションした。サンプルに 80% スクロースを 1 ml 加え (終濃度 40%)、vortex 後、超遠心チューブに静かに移し、さらにその上に、界面を乱さないように 36% スクロース 1.2 ml、5% スクロース 1.2 ml を重層した。超遠心チューブをローターに固定し、4°C で、45,000 rpm、16 時間超遠心した。超遠心後、遠心チューブの上層から 0.4 ml ずつ小試験管に分画した。

ラフト分画調整後の各フラクションを vortex し、その内の 25 μl を分注後、同量の SDS sample buffer を加え、3 分間煮沸後、SDS - PAGE を行った。得られた SDS ゲルをゲルドライし、Imaging plate に一晩露光後、オートラジオグラフィーで解析した。

(7) ヒツジ赤血球膜 Gi の免疫沈降法

α 毒素処理、あるいは、未処理ヒツジ赤血球 (12×10¹⁰ 個/ml) を予め 37°C で保温しておいた Lysis buffer で溶解後、anti-Gi antibody を 10 μl 添加し、37°C で 1 時間処理した。続いて、Protein G-sepharose を 20 μl 加え、37°C で 1 時間インキュベーション後、8,000 rpm、37°C で 1 分間遠心した。上清を取り除き、再度 Lysis buffer で溶解し、8,000 rpm、37°C で 1 分間遠心する上記の操作を 3 回繰り返した。

(8) 免疫沈降物の SMase 活性の測定方法

ラベル SM 1.5 μl (1.39 KBq) をエッペンドルフチューブに移し、デシケターで溶媒を留去後、SC-TB (終濃度 : 0.8%) を加え、超音波処理した。続いて、anti-H148G antibody 存在下、あるいは、非存在下で Gi の免疫沈降物を 37°C、30 分間インキュベーションした。Bligh-Dyer 法に従い、クロロホルム - メタノール (1 : 2, v/v) 600 μl を添加することにより反応を停止させ、30 秒間 vortex を行い、PCA とクロロホルムを 150 μl ずつ加え、30 秒間 vortex を 3 回繰り返した。次に、2,000 rpm で 20 分間遠心することでラベル SM の分解産物である Cer (下層) とラベルホスホリルコリン (上層) を分離し、ラベルホスホリルコリン量を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

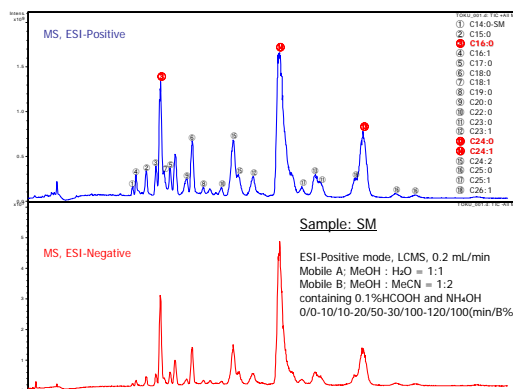
4. 研究成果

(1) ヒツジ赤血球膜 SM 分子種の同定

ヒツジ赤血球を洗浄後、Bligh-Dyer 法により総脂質を抽出し、得られた総脂質をシリカゲル 60 カラムクロマトグラフィーにかけ、クロロホルム、アセトン、メタノールの順に溶出し、リン脂質を含むメタノール分画を回収した。さらに、メタノール分画をクロロホルム - メタノール - 酢酸 - 蒸留水 (25 : 15 : 4 : 2) の溶出液で分画し、各分画を TLC で分離後、Dittmer - Lester 試薬を用いてリン脂質を染色した。SM 標品 (Nacalai) と同様の Rf 値を示す画分をかきとり、HPLC により SM 画分の純度を確認後、LC/MS/MS 解析を行った。その結果、ヒツジ赤血球膜中には炭素数 14 から 26 までの飽和、不飽和脂肪酸を有する 18 種類の SM 分子種が存在することが明らかになった(図 1)。続いて、18 種類の SM 分子種の相対比を算出した結果、脂肪側鎖が C16:0 のパルミトイル SM が 19%、C24:0 のリグノセリル SM が 8%、そして、C24:1 のネルボノイル SM が 49%で、これら 3 種類の SM がヒツジ赤血球膜 SM の主要な SM であることが明らかになった。

図 1

Identification of sphingomyelin molecular species with LC/MS/MS

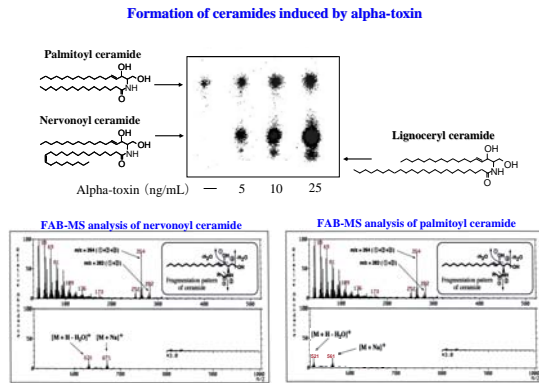


(2) α 毒素処理により代謝される SM 分子種

α 毒素による SM から Cer への分解に関して選択性が認められるか検討するため、まず、セラミド(Cer)からスフィンゴシン(Sph)への代謝阻害剤である N-OE (75 μM) でヒツジ赤血球を 37°C で 30 分間前処理した。続いて、ヒツジ赤血球を種々の濃度の α 毒素で処理し、反応停止後、Bligh-Dyer 法により膜脂質を抽出し、³²P-ATP 存在下で大腸菌由来 DG キナーゼによりラベルリン酸化した。TLC を用いて各々のリン酸化 Cer を分離後、オートラジオグラフィーで検出した結果、パルミトイル SM、リグノセリル SM、及び、ネルボノイル SM の代謝物であるパルミトイル Cer、リグノセリル Cer、及び、ネルボノイル Cer が α 毒素の処理濃度に依存して増加してい

ることが明らかになった。さらに、それら Cer 分子種の生成比が膜中に存在する SM 分子種の相対比とほぼ同様であることから、 α 毒素処理により活性化された内因性 SMase のヒツジ赤血球膜 SM 分子種に対する分解選択性は、極めて低いと考えられる (図 2)。

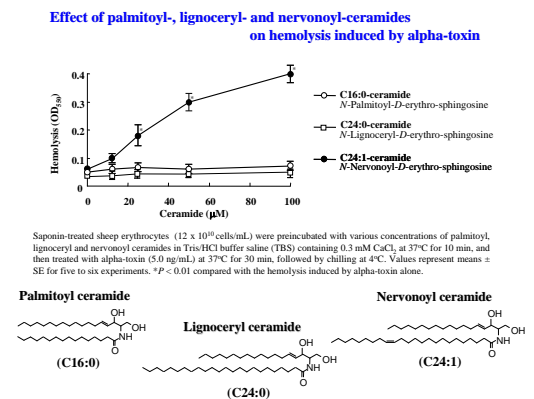
図 2



(3) α 毒素によるヒツジ赤血球溶血に対する Cer 分子種の影響

サポニンでスキンド化したヒツジ赤血球をパルミトイル Cer、リグノセリル Cer、及び、ネルボノイル Cer で前処理後、溶血を引き起こさない最大濃度の α 毒素を添加し、37°C、30 分間インキュベーション後、4°C で 10 分間処理した。その結果、ネルボノイル Cer の処理濃度に依存して α 毒素による溶血が有意に亢進した。しかしながら、パルミトイル Cer、及び、リグノセリル Cer 処理赤血球においては、100 μ M 添加条件下においても溶血の亢進は全く認められなかった(図 3)。従って、本毒素によるヒツジ赤血球溶血に C24:1 の脂肪側鎖を有するネルボノイル Cer の重要性が示唆された。

図 3



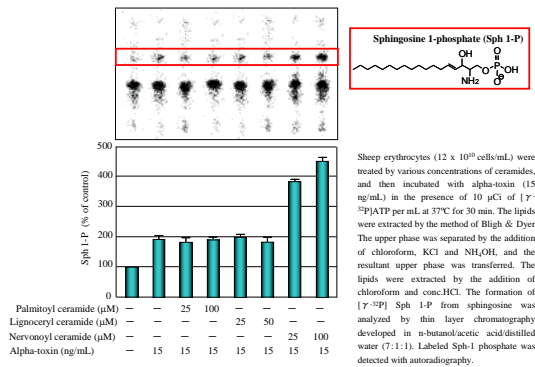
(4) α 毒素による Sph 1-P 生成に対する Cer 分子種の影響

サポニンでスキンド化したヒツジ赤血球をパルミトイル Cer、リグノセリル Cer、及び、ネルボノイル Cer で前処理後、 α 毒素を添加

し、37°C、30 分間インキュベーションした。その後、Bligh-Dyer 法に従い膜脂質を抽出し、³²P-ATP 存在下で DG キナーゼによりラベルリン酸化し、TLC を用いて分離後、オートラジオグラフィーで解析した。その結果、ネルボノイル Cer 処理濃度に依存して、 α 毒素による Sph 生成が有意に亢進した。しかしながら、パルミトイル Cer、そして、リグノセリル Cer 処理条件下における Sph 生成量は、毒素単独処理による Sph 生成量と同程度であった。また、Sph の下流に存在する Sph 1-P 生成についても検討したところ、Sph と同様、ネルボノイル Cer 処理赤血球においてのみ、 α 毒素による Sph 1-P 生成が有意に亢進した(図 4)。以上から、 α 毒素によるヒツジ赤血球溶血に対するネルボノイル Cer の亢進効果は、ネルボノイル Cer が Sph、そして、Sph 1-P に代謝されることによると推察される。

図 4

Formation of sphingosine 1-phosphate induced by alpha-toxin in sheep erythrocytes treated with palmitoyl-, lignoceryl- and nervonyl-ceramides

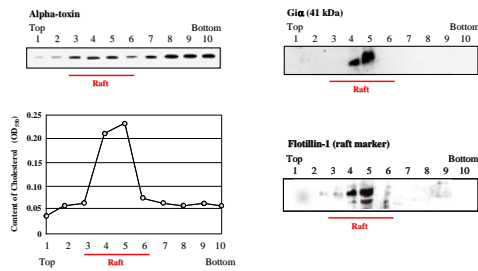


(5) α 毒素のヒツジ赤血球膜ラフトへの結合

α 毒素によるヒツジ赤血球溶血の初期反応を解析するため、まず、本毒素がラフトに結合するか否か検討した。¹²⁵I-ラベル α 毒素とヒツジ赤血球を 37°C、30 分間インキュベーション後、常法に従い、1% Triton X-100 で処理したサンプルの上に、36%、及び、5% スクロースを重層し、45,000 rpm で 16 時間遠心した。得られた画分のいずれがラフトであるか検討するため、ラフトに豊富に存在することが知られているコレステロールの含有量をコレステロール測定キットで、また、ラフトの特異的マーカーとして報告されている Flottilin-1 の分布を SDS - PAGE とウェスタンブロッティングにより解析したところ、コレステロール、及び、Flottilin-1 が 4 から 5 番目の画分に局在していることが明らかになった。これらの結果から、4 から 5 番目のフラクションがラフト画分であると判断し、その上で、ラベル α 毒素の結合を解析した結果、本毒素もラフトに結合していること、そして、本毒素によって活性化される Gi もラフトに局在していることが明らかに

なった(図5)。

図5
Localization of alpha-toxin and GTP-binding protein in sheep erythrocytes

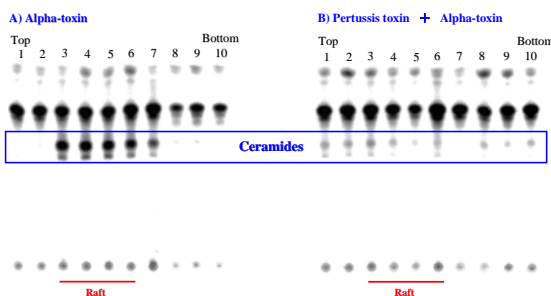


Sheep erythrocytes were incubated with 100 ng/mL of 125 I-alpha toxin at 4°C for 30 min, and then sonicated for 30 sec. The lysates were adjusted to 40% (w/v) sucrose, overlaid with 1.2 mL of 36% sucrose and 1.2 mL of 5% sucrose in HBSS, centrifuged at 45,000 rpm (250,000 × g) for 18 hr at 4°C, and fractionated from the top (450 μL/fraction). Aliquots of the gradient fractions were dissolved in SDS sample buffer and subjected to SDS-PAGE, followed by autoradiography. The content of cholesterol in the sucrose gradient fractions was determined by cholesterol analysis kit (Wako). The distribution of Gi and Floitin-1 was analyzed by immunoblot analysis.

(6) α 毒素処理したヒツジ赤血球膜ラフトでのセラミド生成

ヒツジ赤血球をα毒素で37°C、30分間インキュベーションし、スクロース濃度勾配遠心法に基づき分画後、Bligh-Dyer脂質抽出法により得られたCerをin vitro kinase assayによりラベルリン酸化した。ラベルリン酸化CerをTLCで分離後、オートラジオグラフィを用い解析した。その結果、α毒素の結合やGiの分布と同様、本毒素によるCer生成もラフトにおいて引き起こされていることが明らかになった。さらに、ヒツジ赤血球をPT (20 μg/ml) で120分間前処理すると、本毒素によるラフト内でのCer生成は、ほぼ完全に阻害されることが判明した(図6)。従って、α毒素はヒツジ赤血球膜のラフトに結合後、Giを介してラフトに豊富に存在するSMをCerに分解亢進していると考えられる。

図6
Effect of pertussis toxin on ceramide formation induced alpha-toxin in sheep erythrocytes



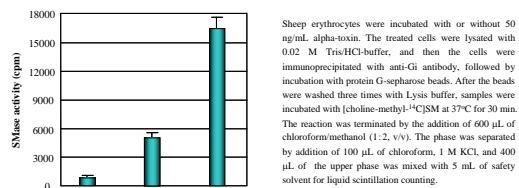
Lysated sheep erythrocytes were incubated with or without 20 μg/mL pertussis toxin at 37°C for 2 hr. They were incubated with or without 50 ng/mL alpha-toxin at 37°C for 30 min, and then sonicated for 30 sec. The lysates were adjusted to 40% (w/v) sucrose, overlaid with 1.2 mL of 36% sucrose and 1.2 mL of 5% sucrose in HBSS, followed by centrifugation at 45,000 rpm (250,000 × g) for 18 hr at 4°C, and fractionated from the top (450 μL/fraction). The lipids extracted by the method of the Bligh & Dyer were phosphorylated by diacylglycerol kinase from *Escherichia coli*. Phosphorylated lipids were separated by TLC (CHCl₃:MeOH:AcOH = 10:85:5).

(7) ヒツジ赤血球膜 Gi と内因性 SMase の関係

Gi と内因性 SMase の相互作用を解析する目的で、α毒素処理、あるいは、未処理ヒツジ赤血球をLysis bufferで溶解後、抗Gi抗体、及び、Protein G-sepharoseを用いて免疫沈降を行った。ここで、沈降物中にα毒素

が共沈している可能性が考えられたため、本実験とは別に本毒素が有する SMase 活性に対する抗α毒素抗体の影響について検討した。ラベル SM と各々の濃度のα毒素を抗α毒素抗体存在下、あるいは、非存在下で37°C、30分間インキュベーション後、ラベル SM の分解産物であるホスホリルコリンをBligh-Dyer法により抽出し、液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。その結果、抗α毒素抗体は、50 ng/ml α毒素自身の SMase 活性をほぼ完全に阻害することが判明した。そこで、免疫沈降物を抗α毒素抗体で37°C、30分間前処理後、沈降物中の SMase 活性を測定するため、ラベル SM と37°Cで30分間インキュベーションした。続いて、ラベル SM の分解により生じるラベルホスホリルコリンを液体シンチレーションカウンターを用い測定した。その結果、α毒素未処理条件下の免疫沈降物には低い酵素活性しか認められないが、α毒素処理赤血球を免疫沈降した場合の SMase 活性は、毒素未処理赤血球のものと比較して約5~6倍高いことが明らかになった(図7)。従って、α毒素処理ヒツジ赤血球において、抗Gi抗体を用いて免疫沈降した場合、Giと共に内因性 SMase が共沈していると推察される。

図7
Interaction of GTP-binding protein with endogenous SMase in sheep erythrocytes



Sheep erythrocytes were incubated with or without 50 ng/mL alpha-toxin. The treated cells were lysated with 0.02 M Tris/HCl-buffer, and then the cells were immunoprecipitated with anti-Gi antibody, followed by incubation with protein G-sepharose beads. After the beads were washed three times with Lysis buffer, samples were incubated with [choline-methyl- 14 C]SM at 37°C for 30 min. The reaction was terminated by the addition of 600 μL of chloroform-methanol (1:2, v/v). The phase was separated by addition of 100 μL of chloroform, 1 M KCl, and 400 μL of the upper phase was mixed with 5 mL of safety solvent for liquid scintillation counting.

以上から、α毒素は、ヒツジ赤血球膜のラフトに結合後、Giを介して内因性 SMase を直接活性化し、ラフトに豊富に存在する SM をCerに分解誘導すること、そして、生成されたCerの内、ネルボノイルCerの選択的なSph、そして、Sph 1-Pへの代謝が本毒素による溶血に重要であることが明らかになった。本解析により、シグナル伝達に重要なリン脂質と構造維持にかかわるリン脂質は異なることが示唆され、不飽和結合を有するリン脂質の増加は、細胞膜の不安定化、あるいは、老朽化の指標となることも考えられたがその詳細は、今後の課題である。

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 8 件)

- (1) Tumurkhuu G, Oda M, Yokochi T, Sakurai J. 以下を省略 (員数: 12、9 番目). The inhibition of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α and nitric oxide production by *Clostridium perfringens* alpha-toxin and its relation to alpha-toxin-induced intracellular ceramide generation. *Int J Med Microb* (2009 年) 掲載確定、査読: 有
- (2) Oda M, Sakurai J. 以下を省略 (員数: 9、1 番目). The relationship between the metabolism of sphingomyelin species and hemolysis of sheep erythrocytes induced by *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *J Lipid Res* 49 巻、p1039-1047 (2008 年) 査読: 有
- (3) Oda M, Sakurai J. 以下を省略 (員数: 11、1 番目). Effect of erythromycin on biological activities induced by *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *J Pharmacol Exp Ther* 327 巻、p934-940 (2008 年) 査読: 有
- (4) Tsuge H, Oda M, Sakurai J. 以下を省略 (員数: 9、3 番目). Structural basis of actin recognition and arginine ADP-ribosylation by *Clostridium perfringens* iota-toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105 巻、p7399-7404 (2008 年) 査読: 有
- (5) Nagahama M, Oda M, Sakurai J. 以下を省略 (員数: 8、3 番目). Effect of unsaturated bonds in the sn-2 acyl chain of phosphatidylcholine on the membrane damaging action of *Clostridium perfringens* alpha-toxin toward liposomes. *Biochim Biophys Acta-Biomembrane* 1768 巻、p2940-2945 (2007 年) 査読: 有

[学会発表] (計 10 件)

- (1) 小田真隆、ウエルシュ菌 α 毒素処理細胞からの IL-8 分泌メカニズム、**第 82 回 日本細菌学会総会**、3 月 14 日発表、名古屋国際会議場
- (2) 小田真隆、セレウス菌スフィンゴミエリナーゼの構造と機能、**第 47 回 日本薬学会中四国支部学術大会**、2008 年 11 月 9 日発表、岡山ママカリフォーラム
- (3) 小田真隆、Structural basis of actin recognition and arginine ADP-ribosylation by *Clostridium perfringens* iota-toxin.

The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2008 年 9 月 8 日発表、淡路夢舞台

[図書] (計 2 件)

- (1) 小田真隆、細菌由来スフィンゴミエリナーゼの構造と機能、医薬ジャーナル社、2009 年発行、790-796.
- (2) 小田真隆、構造生物学 - ポストゲノム時代のタンパク質研究-溶血性貧血・アトピーの治療に活躍するタンパク質: スフィンゴミエリナーゼ、共立出版、2007 年、91-99.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

(1) 名称: スフィンゴシン化合物、その製造方法及びスフィンゴミエリナーゼ阻害剤、発明者: 西沢麦夫、今川洋、山本博文、櫻井純、小田真隆、権利者: 大塚化学株式会社、産業財産権の種類: 国際特許、番号: PCT/JP2008/053936、出願年月日: 平成 20 年 3 月 5 日、国際

(2) 名称: トレハロース化合物、その製造方法、及び該化合物を含有する医薬、発明者: 西沢麦夫、今川洋、山本博文、櫻井純、小田真隆、権利者: 大塚化学株式会社、産業財産権の種類: 国際特許、番号: PCT/JP2008/051355、出願年月日: 平成 20 年 1 月 30 日、国際

[その他] (計 1 件)

2008 年 5 月 12 日: 徳島新聞に研究成果が掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氏名: 小田 真隆

所属研究機関: 徳島文理大学・薬学部・微生物学教室

職名: 助教

研究者番号: 00412403

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし