

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月13日現在

機関番号：35313

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590483

研究課題名（和文） Clostripain の活性制御と炎症反応の修飾の機構について

研究課題名（英文） A mechanism for regulation of clostripain activity and modification of inflammatory response by the enzyme.

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：ウェルシュ菌の clostripain (Clp) の病原的意義を調べるため、Clp 変異株と野生株をマウス的大腿筋に接種した。両株ともガス壊疽と leukostasis を認め、組織学的には有意差は見られなかった。in-frame deletion 法を考案し、各種変異株を作成した。さらに、各種の毒素や変異酵素を量産するために、キシロース誘導発現系を構築した。リンカーペプチドによる活性制御や、Clp による多形核白血球の eat-me シグナルへの影響について、検討を試みたが明確な結論を得るには至らなかった。Clp 変異菌は加熱処理で凝集する現象を見出した。Clp の阻害剤である EDTA 添加により野生株は自己凝集を起こした。

研究成果の概要（英文）：To examine a pathogenic role of clostripain (Clp) produced by *Clostridium perfringens*, Clp mutant and wild-type strains were injected into the mouse femur. Both strains showed gas gangrene and leukostasis to a similar extent, but no significant difference in histological characteristics. We developed an in-frame deletion method, by which we constructed various mutant strains. To obtain various toxins and mutant enzymes in large quantities, we constructed xylose-inducible expression system. Although we attempted to analyze regulation of Clp activity by a linker peptide and also an effect of Clp on eat-me signal of polymorphonuclear leukocytes, we failed to obtain conclusive evidence. We found the Clp mutant aggregates upon heating. Addition of EDTA, an inhibitor of Clp, to the culture of the wild type strain caused self-aggregation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：微生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：ウェルシュ菌, clostripain, プロテアーゼ, 病原因子, 凝集性

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

ウェルシュ菌のガス壊疽は、有時に多発する致命的な感染症であり、平時でも易感染者には脅威となる感染症である。自然災害の危険性や高齢者の増加を考慮すれば、今後警戒すべき疾患といえる。また、本菌の食中毒は、近年常に上位を占め、さらに、本菌による家畜の腸管毒素血症、壊死性腸炎、鶏の腸管感染症が増加しており、その対策は国際的な重要課題となっている。したがって、本菌感染症の基礎的・応用的研究の醸成は急務である。

ガス壊疽については、 α 毒素と θ 毒素による溶血や血小板凝集による組織への酸素供給の停止が重視されているが、発症機序の解明には至っていない。病理学変化では、急速に進行する筋肉の壊死と leukostasis（病巣周辺の血管内に白血球が集簇し内部に浸潤しない状態）が知られている。leukostasisにおける α 毒素の意義についての報告があるが、他の因子の関与も考えられる。本症の治療は、感染組織の広範な除去を基本とするが、治療成績は早期発見に依存する。効果的な治療法の創出が必要であり、そのためには発症初期の菌・宿主の相互作用の研究が重要である。我々は、発症初期の重要な病原因子の一つとして、プロテアーゼに注目した。

ウェルシュ菌は、*Clostridium histolyticum*の clostripain (Clo) のホモログである clostripain-like protease (Clp) を分泌する。Clo と Clp は、gingipain R (*Porphyromonas gingivalis* のプロテアーゼ) と同じグループに属する。gingipain R と Clo は、arginine 特異的なプロテアーゼであり、多形核白血球 (PMNs) の eat-me シグナルを増強し、マクロファージによる貪食を亢進することが示されている。eat-me シグナルについては、ホスファチジルセリンが主要であるが、別の経路や抑制経路も存在する。gingipain R と Clo は、ホスファチジルセリン非依存性の経路で eat-me シグナルを活性化すると報告されている。Clo のホモログである Clp も eat-me シグナルを活性化する作用があると予測される。eat-me シグナルがこれらの酵素で活性化されれば、炎症の促進や修復の障害を来す可能性がある。また、Clo と Clp には活性化時に除去されるリンカーペプチドがあり、このリンカーペプチドにより活性が制御され、炎症反応が修飾されることが推測される。

他方、ウェルシュ菌の腸管毒素の産生に関係する腸管内での芽胞形成状態や、老化とともに増加する本菌の腸管内で菌の存在様式や生態学的特徴については不明である。我々は Clp による細胞壁分解酵素の活性化を示唆する結果も得ており、腸管内での菌の消長と

いう意味において、重要な課題と考えた。さらに、ウェルシュ菌の biofilm 形成性や他の腸管常在菌との共凝集の報告もあり、それらと Clp の関係性も重要である。

2. 研究の目的

既に述べたとおり、Clo とのホモロジーから、ウェルシュ菌の Clp にも PMNs の eat-me シグナルを活性化する作用があると期待される。さらに、Clp は Ca イオン、酸化還元電位などの物理化学的因子により活性が変化する。また、リンカーペプチドにも活性を制御する可能性がある。これら酵素の活性調節の機構と、in vivo の組織障害作用を明らかにすることは、ガス壊疽の病態を理解し、治療法を確立するために重要である。

本研究の目的は、Clp の活性の制御機構、ならびに活性制御の炎症反応への影響を明らかにすることである。そのために、

- (1) Clp のリンカーペプチドによる活性制御、
 - (2) PMNs の eat-me シグナル活性化に対する Clp の影響、
 - (3) Clp による組織障害と活性制御の影響、
- の3点について検討することを当初の目標とした。

これらを遂行するにあたり、以下の問題を解決する必要性が生じたため、本研究の目標として追加した。

- (4) 特定遺伝子の特定部位に変異を導入した変異株を多数作成するために、マーカーを用いない変異体作成法の開発を行う。これにより Clp の各種変異型、他の病原因子の欠損型、Clp のリンカーの変異型、複数の変異型などの作成を行う。
- (5) Clp や他の病原因子の量産のためには、安全な宿主菌の構築と誘導系の開発が必要であり、そのシステムを構築する。
- (6) 背景で述べたとおり、Clp の生物学的意義として、細胞壁分解酵素の活性化、biofilm 形成性、凝集性など考えられ、このことについて明らかにする。また、Clp 変異株のみ加熱により凝集することを本研究を開始した後に見出したので、その生物学的な意義についても検討する。

3. 研究の方法

(1) Clp を大量精製するために、ベント DNA プロモーターを用いた強制発現系 (*C. perfringens* strain 13/pFFC) を利用して、培養上清から SP セファロース (Hi-trap SP) のクロマトグラフィーと、cutoff 10,000 の YM10 Centricon での限界ろ過を行った。これにより Clp を大量精製した。人工基質を用いて、Clp の基質特異性について解析し、Clo

と比較した。病原性については、マウスの皮下に接種し、血管透過性を調べた。

(2) Clp の変異株やリンカーの変異株作成のために、marker-less の in-frame deletion 法を考案した。*C. perfringens* strain 13 の *galKT* 遺伝子を破壊し、suicide vector (マーカー、標的遺伝子、*Clostridium acetobutylicum* の *galK* を保有するベクター) を作成し、1 回目の組換え体を positive selection で選択し、2 回目の組換え体から negative selection で標的遺伝子の欠失株を選択する方法を考案し、その利便性と信頼性を strain 13 で確認した。

(3) Clp やその変異型酵素、その他の毒素を量産するために、独自の誘導系を開発した。*Clostridium difficile* の xylose 利用の遺伝子の repressor, operator, xylose kinase と xylose isomerase をコードする *xyIBA* を含むプラスミド pXCH を構築した。

(4) Clp のリンカーペプチドによる活性制御の実験として、変異型と野生型のリンカーペプチドを回収し、精製 Clp に添加して活性を調べることを試みた。Clp の PMNs の eat-me シグナル活性化の機構を明らかにするために、Clp 処理後の PMNs の膜画分と未処理の膜画分を用いて SDS-PAGE を行い、プロテオミク解析を試みた。マクロファージによる PMNs の捕食に対する Clp 活性の影響を調べるために、PMNs とマクロファージの捕食系の確率に向けた基礎実験を行った。

(5) Clp 変異株と野生株の感染病理を比較検討するために、マウスの大腿部の筋肉内に $10^8 \sim 10^9$ PFU の洗浄菌体を接種し、肉眼的にガス壊疽発症が判定可能となる 8 時間後に大腿部を切除し、ホルマリン固定後に病理標本を作成し、HE 染色、Gram 染色を行い、顕微鏡観察した。さらに、菌の少量接種を $10^3 \sim 10^5$ PFU の範囲で行い、感染早期 (3~5 時間) に、同様に組織標本を作成し、病理学的変化について検討した。

(6) *C. perfringens* strain 13 の Clp 欠失変異株が示す熱凝集性については、種々の温度で比較した。培養上清と菌体 (生理食塩水で洗浄した菌体) を分離し、それぞれ別の培養上清で懸濁し、60°C、30 分の処理後の凝集性を調べた。Clp の活性阻害剤である EDTA を野生株の 37°C 培養の途中に添加 (終末 2 mM) して、自己凝集の誘発を試みた。また、野生株の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の細胞表面の局在性を調べる実験では、GAPDH の C 末端に His-tag を付加したものをプラスミドで強制発現させた菌体を使用した。洗浄菌体を 2% CHAPS 処理により可溶化した菌体表層画分を SDS-PAGE で分離し、抗 His-tag 抗体を用いた Western blot で検出した。

4. 研究成果

(1) 精製した Clp の SDS-PAGE 解析の結果、38 kDa の重鎖と 16 ないし 15 kDa の軽鎖からなっていた。培養が進むにつれ 15 kDa が増加したが、両者は N 末端の切断部位が異なり、4 アミノ酸残基分異なっていた。しかし、人工基質 Bz-L-Arg pNA の分解活性の差はなく、活性に影響しないと考えられた。一方、重鎖については、培養が進むと、一部が 32 kDa に変化するが、この場合は、活性中心を含む領域が消失し失活すると考えられる。このような分解を防ぐため、前培養菌を遠心洗浄し、10 倍濃縮菌液を 1% 接種し、2.5 時間の短時間培養を行った。その結果、高純度の標品を得ることができた。Clo と Clp の人工基質 (Bz-DL-Arg pNA, Bz-DL-Lys pNA) に対する活性を調べた。Clp の lysine に対する分解活性は arginine に対するよりも 25 倍低いが、Clo の 700 倍に比べると低くはなく、Clo の方が Clp よりも arginine 特異性が高かった。天然基質 azocasein の分解活性を比較すると、Clp の方が 2.5 倍高かった。Bz-L-Arg pNA と Acyl-L-Lys pNA に対する至適 pH を調べたところ、図 1 に示すとおり、Clp の指摘 pH は、6.5 であり、Clo の至適 pH は pH 6.5-7.0 であった。enzyme kinetics の結果は、Clo と Clp は arginine に対しては、 K_m と turnover number はそれぞれ異なるが、catalytic efficiency は両者ほぼ同等であった。一方 lysine に対しては、Clp は Clo よりも K_m が低

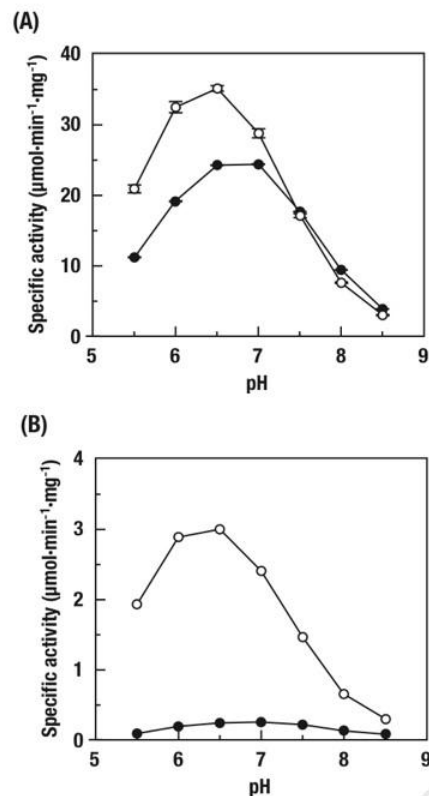
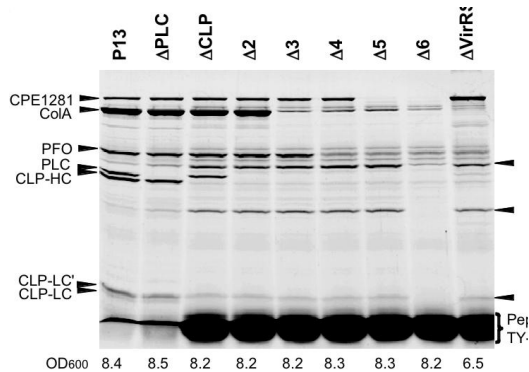


図1 Clp と Clo の人工基質に対する至適 pH の比較 (A) Benzyl-L-Arg pNA (0.25 mM) と (B) Acyl-L-Lys pNAz (2 mM) に対する Specific activity. ○: Clo, ●: Clp

く、turnover number が大きいので、catalytic efficiency は大きい値を示した。よって Clo の方がより基質特異性は厳密であると結論した。Clp の病原性を調べるため、マウスの皮内に 2-10 μg の Clp と、96° C 10 分の加熱処理した Clp を接種し、Evans blue を静注したところ、前者は血管透過性を亢進した。gingipain には lysine 特異的な Kgp と arginine 特異的な Rgps が異なる機構でブラジキニンの産生を促進する作用があるので、Clp では両方の作用で透過性を亢進し、ガス壊疽の特徴である浮腫の形成に関与すると思われる。

(2) GalK を negative selection に利用する系を構築し、標的とする染色体の領域に対して正確な allelic exchange により欠失を起こす系を作ることに成功した。これにより図2に示すとおり、主要な病原因子である Plc (α毒素)、Clp、CoIA (コラゲナーゼ)、Pfo (θ毒素)、CPE1281、Cw10 を順次欠失させ、最終的にこれら全てを欠失する Δ6 株を作成した。また、多数の病原因子の 2 成分制御系である VirRS の欠失株も構築した。この in-frame deletion 法は、suicide vector に変異を導入した DNA 断片を組み込み、染色体上の遺伝子断片と site-specific homologous recombination により染色体上で変異を設計どおりに起こすことが可能である。したがっ

図2 各種欠失変異株の培養上清の



SDS-PAGE

Δ2 は Plc と Clp を欠失、Δ3 以後は、CoIA、Pfo、CPE1281、Cw10 を順次欠失させたもので、Δ6 は全てを欠失することを示す。ゲル先端部分のバンドは Clp により分解される培地由来のペプチド。最下段の数字は培養の増殖後期の OD 値で、6 遺伝子の欠失は発育に影響しないことを示す。右端のレーン: ΔVirRS

て、染色体上の Clp のリンカーの変異や活性

中心の変異なども自由に行うことが可能となった。これとは別に、Clp により活性化される細胞壁分解酵素について検討したところ、その酵素は Cw10 であることが判明した。Clp は周囲の利用可能なタンパク、アミノ酸が不足すると菌体を分解し、自身の構成タンパクを利用するという可能性が考えられる。このことと、Clp 自身の分解 [上記の(1)で述べた重鎖の短縮による不活化] は、菌の個としての消長、集団としての消長に影響する現象である可能性が示唆され、Clp の宿主内や環境中での生存、病原性にも関係している可能性が考えられる。

(3) xylose 誘導系ベクター pXCH の誘導能について、chloramphenicol acetyltransferase (CAT) をレポーターとして濃度と時間の効果を調べた。xylose 濃度が 0.03~4% の範囲で濃度依存的に発現量が増加した。glucose の存在は無関係であり、glucose を含む培地で増殖後に誘導を行うことが可能である。また、xylose 無添加では発現は全く見られず、toxic な遺伝子の誘導に適していることが明らかとなった。α毒素の遺伝子の発現に応用したところ、大量の毒素が産生されることが明らかとなった。他の誘導系として lactose 誘導系が報告されたが、我々の系は xylose 利用の遺伝子を完全に欠いており、プラスミドの制御系 (*C. difficile* 由来) は独立しているので、組換え体は安定な株として維持できる。このことは、lactose 誘導系にはない利点といえる。

(4) 変異型と野生型のリンカーペプチドを構築し、それぞれ変異型と野生型のペプチドの精製を試みたが、単離することができなかった。通常の液体クロマトグラフィーとは異なる方法、あるいは合成人工ペプチドを使用して活性制御を行うべきであった。変異の導入方法や誘導系の開発に時間を費やしたため、この部分については十分な時間をかけることができず、今後の検討課題として残った。Clp による PMNs の eat-me シグナル活性化の機構を明らかにするために、Clp 処理後の PMNs の膜面分と未処理の膜面分を用いてプロテオミク解析を試みた。それぞれ膜面分を調製し SDS-PAGE による解析を試みたが、両者の間に有意差を認める結果が得られなかった。二次元の SDS-PAGE 解析が必要であるが、そのためには膜面分の量を如何に確保するかが問題となり、計画年度内に結論を得るには至らなかった。マクロファージによる PMNs 捕食系の基礎実験も試みたが、系の確立の段階で終了し、eat-me シグナルの問題について結論を得ることはできなかった。

(5) *C. perfringens* strain 13 の Clp 変異株

と野生株を用いて実験的ガス壊疽を起こした。肉眼判定できるガス壊疽発症には 10^9 PFU 以上の菌体が必要であった (図 3)。病理学的所見としては、筋肉組織の広範な壊死と leukostasis が認められた。しかし、野生株と変異株で病理的な差異は認められなかった。また、種々の菌量 ($10^8 \sim 10^9$) を用いたが、発症に至る時間や病巣の程度に明確な差は見られなかった。接種菌量を $10^3 \sim 10^5$ と少なくし、感染初期の変化を病理学的に比較検討したが、有意差を認めることはできなかった。ガス壊疽のように急速に進行する特殊な疾患は、*P. gingivalis* による歯周病のような慢性的な疾患と異なり、一義的な役割は少ない可能性も考えざるを得ない。しかし、strain 13 よりもより高病原性の標準株である ATCC 13124 などを用いた実験により検討する必要もあると考えられる。

図 3 *C. pefringens* strain 13 の野生株を 10^9 CFU マウスの右側大腿の筋肉内 (矢印の場所) に接種し、8 時間後に屠殺し、写真撮影した。左側の健常側に比較し、著明なガス産生を伴う腫大が観察された。Clp 変異株でも同様な結果であった。



(6) 野生株と Clp 変異株を TYG で一夜培養した後の培養液を、 121°C 15 分処理したところ、Clp 変異株のみ凝集性を示した。この加熱凝集には、 60°C 以上の加熱を必要とした。 $\Delta 6$ 株でも、同様な加熱により凝集が見られた。したがって、Clp 以外の 5 つの病原因子は無関係であり、その他の因子のうち、Clp で分解されるタンパクの関与が示唆された。加熱凝集は、上清中のタンパクによるのか、菌体表層の変化によるのかを明らかにするため、洗浄菌体と上清を交換する実験を行った。野生株の菌体は野生株の上清では凝集しないが、Clp 変異株や $\Delta 6$ 株の上清では凝集した。ところが、Clp 変異株の菌体も $\Delta 6$ 株の菌体も、野生株の上清では凝集を起こさないで、上清の変化によるということが明らかとなった。加熱は、Clp に感受性のタンパクの凝集反応性を高めるために必要であると推測し、特殊な条件では、通常の発育温度域でも凝集が起きると考えた。そして、野生株を 37°C で培養し、Clp の活性を抑制して自己凝集性を誘導することを試みた。Clp の阻害剤である EDTA を培養の初期から中期にかけて添加すると自己凝集性が観察された。通常の発育に利用する TYG 培地の濃度を希釈

した培地 (1/4 TYG) で、より顕著な自己凝集が見られた (図 4)。



図 4 自己凝集像
1/4TYG にて培養開始後 2 時間で、2 mM EDTA を添加し、その 1 時間後に観察された自己凝集像を示す。

1/4TYG 液で、培養開始後 2 時間で EDTA を 2 mM 添加した培養液の増殖性と形態観察を行った。凝集のため、PFU 測定の結果から増殖性を正當に評価はできないが、OD 値はプラトーであり増殖は停止した状態であると推測される。凝集塊のグラム染色性や形態的な変化については、凝集後の数時間の間では大きな変化は見られなかった。一部溶菌した像も見られるが、殆どは正常な形態であり、biofilm 形成の像も見られなかった (図 5)。したがって、多くの菌は生存していると考えられる。しかし、厳密な生死の判別は、vital

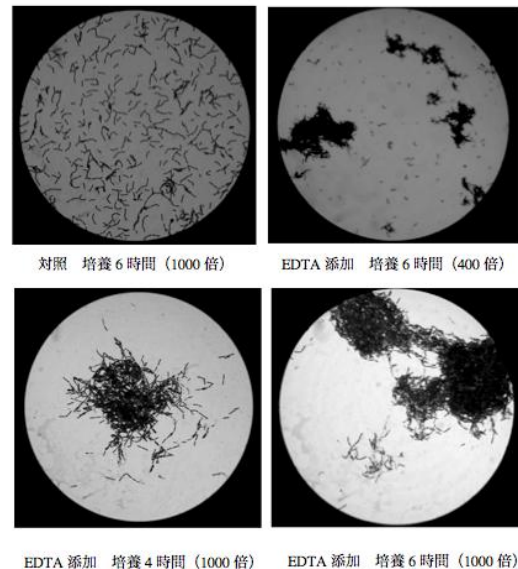


図 5 グラム染色像 対照は EDTA 無添加、EDTA は培養開始後 2 時間で添加した、培養開始後 4 時間、6 時間で写真撮影した。

staining を行う必要がある。さらに、長時間

培養でどのように形態変化が推移するかについても検討することが今後の課題となる。プロテアーゼにより失活するタンパクにより自己凝集が起きる例が報告されており、 $\Delta 6$ 株の培養上清を用いて野生株の熱凝集を起こす物質を同定することも今後の課題となる。熱凝集、自己凝集は、機構は不明であるが、ウェルシュ菌での報告は初めてであり、本菌の環境中、食品中、腸管内での生態学的な意義を考える上で重要な現象である。他の細菌については、自己凝集や共凝集が biofilm の形成や組織への定着に重要であると考えられている。biofilm の形成はストレス応答でもあるが、その biofilm の形成性がウェルシュ菌でも示されている。今回使用した野生株は strain 13 であり、芽胞形成の遺伝子に異常が報告されている。芽胞形成、biofilm の形成を視野に入れたストレス応答としての凝集性を検討するためには、SM101 のような芽胞形成性の標準株を使用して検討することが必要である。腸管内フローラとしての意義については、他の報告にあるように、乳酸菌やビフィズス菌の共存下での共凝集性を調べる必要もあり、今後の検討課題である。

なお、一部の細菌で GAPDH が細胞表層に分布し、病原性や組織定着性に関与するとの報告がある。我々は GAPDH の C 末端に His-tag を付加した酵素をプラスドで強制発現させ、精製酵素が機能を保持していることを確認した。さらに抗 His-tag 抗体を用いた Western blot により、2% CHAPS の菌体表層の抽出物に GAPDH-His を検出した (図 6)。よってウェルシュ菌の菌体表層においても、GAPDH が重要な働きをしていることが確認された。

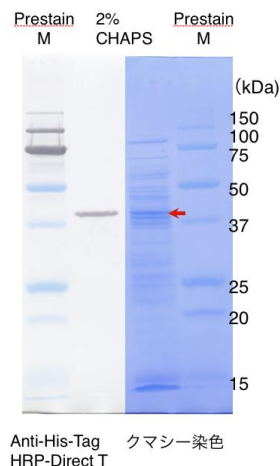


図 6. strain 13 の洗浄菌体を 2% CHAPS で処理した抽出物の SDS-PAGE と Western blot 像。クマシー染色標本 (右側) の矢印は GAPDH-His の monomer を示す。Western blot には抗 His-tag 抗体を用いた。

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 7 件)

- ① Hirofumi Nariya, Shigeru Miyata, Tomomi Kuwahara, and Akinobu Okabe. “Development and characterization of a xylose-inducible gene expression system for *Clostridium perfringens*” *Applied and Environmental Microbiology* **77**(23):8439-8441 (2011) 査読有
- ② Hirofumi Nariya, Shigeru Miyata, Eiji Tamai, Hiroshi Sekiya, Jun Maki, and Akinobu Okabe. “Identification and characterization of a putative endolysin encoded by episomal phage phiSM101 of *Clostridium perfringens*” *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**(6):1973-1979 (2011) 査読有
- ③ Hirofumi Nariya, Shigeru Miyata, Motoo Suzuki, Eiji Tamai, and Akinobu Okabe. “Development and application of a method for counterselectable in-frame deletion in *Clostridium perfringens*” *Applied and Environmental Microbiology* **77**(4):1375-1382 (2011) 査読有
- ④ Hiroaki Tanaka, Hirofumi Nariya, Motoo Suzuki, Hitoshi Houchi, Eiji Tamai, Shigeru Miyata, and Akinobu Okabe. “High-level production and purification of clostripain expressed in a virulence-attenuated strain of *Clostridium perfringens*” *Protein Expression and Purification* **76**(1): 83-89 (2011) 査読有.
- ⑤ Sadao Manabe, Hirofumi Nariya, Shigeru Miyata, Hiroaki Tanaka, Junzaburo Minami, Motoo Suzuki, Yuki Taniguchi, and Akinobu Okabe. “Purification and characterization of a clostripain-like protease from a recombinant *Clostridium perfringens* culture” *Microbiology* **156**(2): 561-569 (2010) 査読有.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Hirofumi Nariya, Shigeru Miyata, and Akinobu Okabe. “Development and characterization of a xylose-inducible gene expression system for *Clostridium perfringens*” XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, International Union of Microbiological Societies Congresses 2011, Sapporo, Japan, 2011 September 6-16 September 8

- ② Hiroaki Tanaka, Hirofumi Nariya, Motoo Suzuki, Shigeru Miyata, Eiji Tamai, Shinji Kosaka, Noriyasu Fukuoka, Hitoshi Houchi, and Akinobu Okabe.
“ High-level production and purification of clostripain expressed in a virulence-attenuated strain of *Clostridium perfringens*” XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, International Union of Microbiological Societies Congresses 2011, Sapporo, Japan, 2011 September 6-16 September
- ③ 田中裕章, 成谷宏文, 鈴木基生, 谷口有紀, 芳地 一, 宮田 茂, 岡部昭延「ウェルシュ菌の glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase の性状解析。」第 63 回日本細菌学会中国・四国支部総会 (松山) 2010.10.16

[その他]

報告書等

- ① 岡部昭延, 成谷宏文, 宮田 茂. “ウェルシュ菌の Clostripain-like protease の病原激意義についての研究” 乳酸菌研究会に関する報告書 平成 21 年度 300-303, 2010.
- ② 岡部昭延, 宮田 茂, 成谷宏文. “*Clostridium perfringens* の菌体表面の glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase の研究” 乳酸菌研究会に関する報告書 平成 22 年度 274-277, 2011.
- ③ 坂本知世, 杉井美香, 平田知之; 担当教員 岡部昭延. “ウェルシュ菌の自己凝集に関する研究” 平成 23 年度卒業研究 中国学園大学現代生活学部, 人間栄養学科 7 期生 印刷中. 2012.

ホームページ等

http://www.med.kagawa-u.ac.jp/faculty/center/igaku_kouza/bunshi_biseibutsu/

<http://www.cjc.ac.jp/eiyo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(1) 研究分担者

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

成谷 宏文 (NARIYA HIROFUMI)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：30452668

(3) 研究分担者

鈴木 基生 (SUZUKI MOTOO)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：80457340