

課題番号	LS041
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成24年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	病原性細菌のゲノム情報を応用した細菌感染特異的オートファジー誘導による感染防御法の開発
研究機関・ 部局・職名	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
氏名	中川 一路

1. 当該年度の研究目的

A 群レンサ球菌の多株比較ゲノム解析を行い、A 群レンサ球菌の各病態に起因する因子の同定を行う。また、宿主細胞由来のレンサ球菌属によるオートファジーの制御・誘導因子を用いて、これらの誘導による感染防御能の解析を行う。これは、現在までに明らかとなっているオートファジーの誘導因子だけでなく、各菌の生体内での遺伝子発現に基づいたプロファイリングにより得られた因子を応用して、感染のどの時期にもっとも効果的にオートファジーを誘導して菌の排除を行えるのか、自然免疫レセプターとの関連にも留意しながら、オートファジーの菌体成分による誘導についての解析を行う。

2. 研究の実施状況

● 多株比較ゲノム解析

A 群レンサ球菌は咽頭炎、扁桃炎、猩紅熱といった多様な疾患の起因菌である。本菌のゲノム内には、病原性遺伝子をコードする数多くのプロファージが存在しているが、保有するプロファージの数は菌株で異なっている。一方で、プロファージ領域以外の染色体上の病原性遺伝子は株間でほぼ共通している。このことから、本菌が示す多様な病原性は、ゲノム内のプロファージ領域の差異に起因していることが推察される。そこで本研究では、前年度解析を行った 53 株に加え、さらに 55 株の菌株を用いて全 108 株の A 群レンサ球菌株のプロファージ領域について比較解析と同時にさらに、ファージの侵入を制御する因子として注目されている CRSIPR に着目し、108 株での CRISPR 配列の解析を行った。

その結果、従来 A 群レンサ球菌に用いられる emm タイピングでは、解析できない興味深い知見を得ることができた。CRISPR タイピングを行ったところ、A 群レンサ球菌には CRISPR の発現に必須である Cas 遺伝子群 (Cas/CRIPSR1 および Cas/CRISPR2) が 2 種類存在するが、その下流に位置する CRISPR 配列により、emm タイピングでは認められない新たな流行株の予測が可能となることが明らかとなった。これは、CRISPR により A 群レンサ球菌に感染するファージは完全に排除されているのを意味しているのではなく、CRISPR により侵入するファージが制限されているため、ある病原遺伝子を持ったファージは特定の菌株にしか感染せず、スペーサー解析を行うことにより新規流行株を的確にまた迅速に予測できることを意味している。この結果は、本菌だけでなく、他の菌において

様式19 別紙1

もスペーサー解析を行うことで、その菌の進化と病原性の獲得に CRISPR が関与していることを明らかにすることができた。

- オートファジー誘導メカニズムの解明

A 群レンサ球菌に感染時に宿主細胞内で特異的に機能する分子として、細胞内メンブレントラフィックに重要な役割を果たしている Rab タンパク質のうち、Rab9A, Rab23 を同定した。これらの分子は、生体内での役割は明らかとなっていなかった分子のため、新たな感染防御因子として機能していることが明らかとなった。また、これらの Rab 以外にも細菌感染特異的に関与する Rab タンパク質を同定するため、ヒトに存在する Rab 約 60 種について解析を行うため、これらの遺伝子の網羅的な解析システムを構築した。また、Rab9A については、通常の飢餓誘導時では、オートファゴソームにおける局在は認められないため、細菌感染時に特異的に膜形成を行うメカニズムを解析するため、そのカウンターパートを網羅的に解析したところ、感染特異的に膜形成を行う分子の同定に成功した。さらに、感染細胞内で Rab の制御を行うと考えられる RabGAP にも着目し、細菌感染時に Rab を制御すると考えられる RabGAP の同定にも成功した。

3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計 7 件
計 8 件	<ol style="list-style-type: none"> 1. Okura M, Takamatsu D, Maruyama F, Nozawa T, <u>Nakagawa I</u>, Osaki M, Sekizaki T, Gottschalk M, Kumagai Y, Hamada S. "Genetic Analysis of Capsular Polysaccharide Synthesis Gene Clusters from All Serotypes of <i>Streptococcus suis</i>: Potential Mechanisms for the Generation of Capsular Variation." <i>Appl Environ Microbiol.</i> 79(8):2796-806 (2013) 2. Minegishi K, Aikawa C, Furukawa A, Watanabe T, Nakano T, Ogura Y, Ohtubo Y, Kurokawa K, Hayashi T, Maruyama F, <u>Nakagawa I</u>, Eishi Y. "Complete Genome Sequence of <i>Propionibacterium acnes</i> Isolate from sarcoidosis patient." <i>Genome Announc.</i> 1(1). pii: e00016-12. (2013) 3. Ogawa M, Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, <u>Nakagawa I</u>, Mochizuki M. "Broad-range real-time PCR assay for detection of bacterial DNA in ocular samples from infectious endophthalmitis." <i>Jpn J Ophthalmol.</i> 56(6):529-35 (2012) 4. Nozawa T, Aikawa C, Goda A, Maruyama F, Hamada S, <u>Nakagawa I</u> "The small GTPases Rab9A and Rab23 function at distinct steps in autophagy during Group A <i>Streptococcus</i> infection." <i>Cell Microbiol.</i> 14(8):1149-65. (2012) 5. Aikawa C, Furukawa N, Watanabe T, Minegishi, Furukawa A, Eishi Y, Oshima K, Kurokawa K, Hattori M, Nakano K, Maruyama F**, <u>Nakagawa I</u> and Ooshima T "Complete Genome Sequence of the serotype k <i>Streptococcus mutans</i> LJ23." <i>J Bacteriol.</i> 194(10):2754-5.(2012) 6. Okada K, Roobthaisong A, <u>Nakagawa I</u>, Hamada S, Chantaroj S. "Genotypic and

	<p>PFGE/MLVA analyses of <i>Vibrio cholerae</i> O1: geographical spread and temporal changes during the 2007-2010 cholera outbreaks in Thailand." PLoS One Vol.7(1):e30863 (2012)</p> <p>7. Aoki A, Shibata Y, Okano S, Maruyama F, Amano A, <u>Nakagawa I</u>, Abiko Y. "Transition metal ions induce carnosinase activity in PepD-homologous protein from <i>Porphyromonas gingivalis</i>." Microb Pathog. 52(1):17-24 (2012)</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 1 件</p> <p>1. Watanabe T., Nozawa T., Aikawa, C, Amano A., Maruyama F., <u>Nakagawa I</u>, CRISPR regulation of intra-species diversification by limiting IS transposition and inter-cellular recombination. Mol. Biol. Evol. In press</p>
<p>会議発表 計 10 件</p>	<p>専門家向け 計 10 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 郷田瑛、細見晋吾、渡辺孝康、野澤孝志、相川知宏、丸山史人、道泰之、原田清、<u>中川一路</u>□"顎骨骨髓炎における細菌叢の高解像度解析"□細菌学会関東支部会, 2012年10月10-12日, ホテル日航東京 (東京) 2. 遠藤亜希子、渡辺孝康、細見晋吾、野澤孝志、相川知宏、荒川真一、梅田誠、丸山史人、和泉雄一、<u>中川一路</u>□"全ゲノム解析と多株比較ゲノム解析により見えた <i>Tannerella forsythia</i> の生存戦略"□細菌学会関東支部会, 2012年10月10-12日, ホテル日航東京 (東京) 3. 野澤孝志、相川知宏、郷田瑛、丸山史人、<u>中川一路</u>□"Rab タンパク質による A 群レンサ球菌感染誘導オートファジーの制御機構"□第54回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2012年9月14-16日, 奥羽大学(福島県) 4. 渡辺孝康、野澤孝志、相川知宏、遠藤亜希子、丸山史人、<u>中川一路</u>□"可動性因子が生み出す <i>Porphyromonas gingivalis</i> 種内多様性機構の解明"□第54回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2012年9月14-16日, 奥羽大学(福島県) 5. 遠藤亜希子、渡辺孝康、細見晋吾、野澤孝志、相川知宏、荒川真一、梅田誠、丸山史人、<u>中川一路</u>、和泉雄一□"多株ゲノム解析により見えた <i>Tannerella forsythia</i> の生存戦略"□第54回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2012年9月14-16日, 奥羽大学(福島県) 6. 渡辺孝康、遠藤亜希子、野澤孝志、相川知宏、丸山史人、<u>中川一路</u>□"可動性遺伝因子による歯周病原性細菌の種内多様性創出"□第6回細菌学若手コロッセウム, 2012年8月8日-10日, 八王子セミナーハウス(東京都) 7. 野澤孝志、細見晋吾、相川知宏、丸山史人、<u>中川一路</u>□"フェージとその防御機構に着目したA群レンサ球菌ゲノムの種内多様性"□第2回NGS現場の回研究会, 2012年5月23日-25日, ホテル阪急エキスポパーク(大阪府) 8. Takashi Nozawa, Chihiro Aikawa, Akira Goda, Fumito Maruyama, <u>Ichiro</u>

様式19 別紙1

	<p><u>Nakagawa</u>□"The small GTPases Rab9A and Rab23 function at distinct steps in autophagy during Group A Streptococcus infection"□第11回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 2012年9月11-14日, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県)</p> <p>9. Chihiro Aikawa, Takashi Nozawa, Takayasu Watanabe, Akira Goda, Takashi Ode, Fumito Maruyama, <u>Ichiro Nakagawa</u>□"Discovery of Streptococcus pyogenes genes contributing to evasion of autophagic degradation system"□第11回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 2012年9月11-14日, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県)</p> <p>10. Takayasu Watanabe, Nayuta Furukawa, Takashi Nozawa, Chihiro Aikawa, Bijaya Haobam, Akiko Endo, Fumito Maruyama, <u>Ichiro Nakagawa</u>□"Elucidation of diversification mechanism of periodontogenic bacterium Porphyromonas gingivalis by analyzing genomic and diversity features"□asm2012 (アメリカ微生物学会総会), 2012年6月16日-19日, (アメリカ・サンフランシスコ)</p> <p>一般向け 計0件</p>
<p>図書 計2件</p>	<p>疾病の成り立ち及び回復過程の促進2 微生物学(医歯薬出版)2012年4月〔第2版〕 ISBN978-4-563-42814-6 口腔微生物学・免疫学 (医歯薬出版) 2012年4月(第3版) ISBN978-4-263-45636-1</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>http://www.tmd.ac.jp/grad/bac/</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>1. Sequence based Surveillance and Detection of Hospital Acquired Infections 日本感染症学会 2012年4月25日 長崎 一般・学会員</p> <p>2. 高速シーケンサーによるゲノム配列決定および比較解析に基づくA群レンサ球菌の病原性獲得機構の解明 2012年8月17日 東京・日本歯科医師会館 学生</p> <p>3. Genome analysis of genus Streptococci タイ・バンコク NIH-Chulalongkorn 大学セミナー 2012年9月26日 タイ・ノンタブリ・NIH 学生・一般人</p> <p>4. システム生体防御 2012年10月12日 東京大学医科学研究所 細菌感染のダイナミズム 学生</p> <p>5. オートファジーによる生体防御 第60回日本化学療法学会西日本支部会 2012年11月6日 福岡 一般・学会員</p> <p>6. ゲノムから見た細菌感染 2012年11月9日 東京大学医科学研究所 細菌感染のダイナミズム 学生</p>

様式19 別紙1

新聞・一般雑誌等掲載 計0件	
その他	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	82,000,000	58,020,000	23,980,000	0	0
間接経費	24,600,000	17,406,000	7,194,000	0	0
合計	106,600,000	75,426,000	31,174,000	0	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	89,565	23,980,000	0	24,069,565	24,069,565	0	0
間接経費	38,895	7,194,000	0	7,232,895	7,232,895	0	0
合計	128,460	31,174,000	0	31,302,460	31,302,460	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	20,977,882	超低温フリーザー、全自動洗浄機、顕微鏡デジタル、試薬など
旅費	1,913,864	ASM 2012 (Moscone Center, サンフランシスコ)、歯科基礎医学会など
謝金・人件費等	0	
その他	1,177,819	海外送料、備品修理、学会参加費など
直接経費計	24,069,565	
間接経費計	7,232,895	
合計	31,302,460	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
超低温フリーザー	MDF-U33V-PJ-	1	1,501,500	1,501,500	H24.8.22	東京医科歯科大学
全自動洗浄機	G7883LAB	1	1,348,662	1,348,662	H24.9.11	東京医科歯科大学
顕微鏡デジタル	AxioCam MRc5	1	787,500	787,500	H25.3.18	東京医科歯科大学