

平成 22 年度 共同利用研究報告

研究課題 '10－重点01

Candida glabrata カイコ感染症モデルを用いたパラサイト戦略の分子基盤

中山浩伸 (鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科)

田辺公一・宮崎義継

(国立感染症研究所・生物活性物質部)

長 環 (福岡歯科大学)

関水久・松本靖彦

(東京大学大学院・薬学系研究科)

青山俊弘 (鈴鹿工業高等専門学校・電子情報工学科)

知花博治 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

in vitro (試験管内) と *in vivo* (宿主体内) では、生育に対する必須性が異なる遺伝子も存在し、代謝経路なども大きく異なることから、ゲノムレベルでの *in vivo* 解析は、真菌のパラサイト戦略の詳細を明らかにしたり、真菌感染症の診断や治療法を確立したりするのに不可欠なものとなる。我々は、マウス感染モデルに加え、多数を低コストで飼育できるカイコを用いた真菌感染モデルを用いてのゲノムレベルでの *in vivo* 解析を行っている。また、線虫感染モデルについても系の確立を試みている。本研究期間では、脂質合成・代謝に関与する遺伝子群について、合計 23 遺伝子について変異株を作成し (*in vitro* で必須とないものは欠失株を作成し、必須と考えられるものは発現制御株: TET 株を作成した) 感染時における遺伝子の必須性についての評価を行い、下記の成果を得た。

脂質の合成・代謝に関与する遺伝子のうち、ステロール合成に関与する遺伝子群について 20 遺伝子を試したところ、カイコの感染モデルでしか評価できていないものの *ERG24* が生育に必須である可能性が示唆された。また、タンパク質への脂質 (プレニル基) 修飾酵素である *RAM2* が感染に必須な遺伝子であるが、イソプレノイド合成酵素 (*ERG20*) は必須ではないことが明らか

となった。

研究業績

論文

- 1) Nagi M, Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Aoyama T, Okano M, Higashi S, Ueno K, Chibana H, Niimi M, Yamagoe S, Umeyama T, Kajiwara S, Ohno H, Miyazaki Y: Transcription factors *CgUPC2A* and *CgUPC2B* regulate ergosterol biosynthetic genes in *Candida glabrata*. *Genes Cells*. 16 (1): 80-9. 2011.
- 2) Nakayama H, Ueno K, Uno J, Nagi M, Tanabe K, Aoyama T, Chibana H, Bard M: Growth defects resulting from inhibiting *ERG20* and *RAM2* in *Candida glabrata*. *FEMS Microbiol Lett.*: 317 (1): 27-33. 2011.

課題番号 '10－重点02

Candida albicans における新規病原性関与遺伝子の特定

梶原 将・大浦隆宏

(東京工業大学・大学院生命理工学研究科)

知花博治 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

Candida 属で共通する病原性関与遺伝子の候補として、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では致死遺伝子として知られている *MCD4* 遺伝子と、致死遺伝子ではない *CYB2* 遺伝子を取り上げ、それらの遺伝子欠損株を作製して、その表現型や病原性などを解析した。*MCD4* タンパク質 (*MCD4p*) は、GPI アンカー合成経路の 1 つ Mannose phosphotransferase である。*CYB2* タンパク質 (*CYB2p*) は、乳酸資化のための酵素 Lactate dehydrogenase である。1 年間の研究結果として以下のような成果がえられた。

C. glabrata (一倍体) の *MCD4* knock down (ドキシサイクリン (Dox) によって発現が抑制) 株を作製し、Dox で *MCD4* 発現を抑制したところ、その株の増殖が完全に止まることが確認できた。*C. albicans* (二倍体) では、1つの *MCD4* 遺伝子を *ARG4* (アミノ酸合成酵素遺伝子) で破壊し、もう一方の *MCD4* 遺伝子の上流にマルトースプロモーター (グルコースで発現が抑制) を挿入した。この株もグルコース存在下では増殖が完全に止まることがわかった。これより、*MCD4* 遺伝子は *C. albicans* と *C. glabrata* の双方で *in vitro* では致死となることが分かった。

C. albicans の *CYB2* knock out 株を、*SATI* フリッパーという遺伝子破壊カセットを用いて、双方の *CYB2* 遺伝子を破壊した。*SATI* フリッパーは目的遺伝子を破壊した後にその大部分の DNA 領域を取り除くことが可能であるため、同じカセットで何度も遺伝子を破壊することが可能である。得られた *CYB2* knock out 株も乳酸資化性が欠失していた。今後、マウス等での感染実験で、その腸管定着性等を解析する予定である。

研究業績

学会発表等

- 1) Noda E, Oura T, Ueno K, Chibana H, Kajiwara S:
The characterization of a *CYB2* disruptant of *Candida albicans*, IUMS 2011, Sapporo, Sep 6-10, 2011.

研究課題 '10-01

千葉大学医学部附属病院における深在性真菌症症例数の動向

猪狩英俊・渡辺 哲・渡辺正治・中村安孝
(千葉大学医学部附属病院)
亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

昨年に引き続いて千葉大学医学部附属病院の深在性真菌症症例数の動向を調査し、我が国の本症の疫学に寄与することを目的とし、電子カルテを用いた後ろ向き調査を行った。同院では *Candida* 感染症の原因菌のなかでは *C. albicans* は最も多かったがその割合は低下傾向であり、いわゆる非 *albicans-Candida* によるもの全体よりも少な

くなった。診療科では外科系が多かったが、その要因として手術などの消化管への侵襲、中心静脈カテーテル留置などが挙げられた。*Aspergillus* 症は昨年と同様、内科系診療科に多く見られたが、要因としてはステロイドを含めた免疫抑制薬の使用、慢性肺疾患の存在などが挙げられた。なお、血液内科領域での *Aspergillus* 属菌の検出数がほとんど見られなかったが、薬剤使用の動向、他の血清学的検査値と併せ考察すると、決して血液内科領域において本症が少ないわけではなく、菌検出に至る前に先制攻撃的に治療が開始されているため、いわゆる確定診断例が少ないものと考えられた。

研究発表

学会発表

- 1) 渡辺 哲, 亀井克彦: シンポジウム 2 造血管腫瘍および固形がん治療と感染症 がん化学療法における真菌感染症 その対策と治療の問題点. 第 60 回日本感染症学会日本地方会学術集会第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会, プログラム・抄録集 p.68, 山形, 10月26~28日, 2011.

研究課題 '10-02

真菌の産生するマイコトキシンの分析に関する研究

小西良子 (国立医薬品食品衛生研究所)
亀井克彦・落合恵理
(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

Citrinin は、輸入穀物類や香辛料をしばしば汚染することが知られ、経口摂取による腎毒性を有することが実験動物的に確認されている。本マイコトキシンの主な産生菌は *Penicillium citrinum* である。本研究では、*P. citrinum* を用いて citrinin を大量精製するための citrinin 高産生培養条件について、検討を行った。

まず、citrinin 高産生株の選抜のための簡便なスクリーニング方法の構築を行った。環境または食品由来の *P. citrinum* 28 株を供試した。最初に一次スクリーニングとして、ツァベック酵母エキス寒天 (CYA) 平板培地で

生育したコロニーの UV 照射による蛍光観察を行った。CYA 平板培地に菌体を接種し 7 日間 30℃ で培養した。これに 365 nm の UV を照射し、目視によって蛍光強度を判定した。この結果、菌株を産生能無し・低産生性・高産生性の 3 ランクに分類可能であることが明らかとなった。供試した 28 菌株中 14 菌株が高産生性のランクに属した。次に、二次スクリーニングとして TLC による分析を行った。上記 14 菌株を酵母エキススクロース (YES) 液体培地に摂取し、14 日間 30℃ で静置培養した後、少量の培養液を分取し、培養上清を酢酸エチルで抽出した簡易抽出液を作製した。この抽出液を TLC にて分析した。この結果、最も citrinin 高産生であり夾雑物の少なかった 1 菌株を選抜することに成功した。

さらに、citrinin 産生に適した液体培地および培養期間の検討を行った。比較条件としては、CYA および YES 液体培地を用い、培養期間は 14・21・28 日とした。それぞれの液体培地に菌体を摂取し、決められた期間 30℃ で静置培養した後、上述の方法で酢酸エチル抽出液を作製した。これらの抽出液を TLC にて分析した。この結果、培地については CYA 液体培地を用いた場合により citrinin 産生量が多かったこと、14 日から 28 日の培養期間ではいずれも産生量に差は見られず、長期間の培養を行っても citrinin は減衰しておらず分解はなかったことが明らかとなった。以上の結果から、培養条件としては、CYA 液体培地を用いて 14 日間以上の培養を行うことが適しているということが明らかとなった。

今後は、本検討によって明らかとなった菌株スクリーニング方法および培養条件を用いて citrinin の大量精製を行い、分析方法の開発、および生化学的・病理学的な毒性試験を行う予定である。

研究課題 '10-03

ヒト遺体より分離された真菌相の解析と鑑識への応用の検討

徳留省悟 (獨協医科大学医学部法医学教室)

石井 清 (獨協医科大学国際教育研究施設医学基盤教育センター)

矢口貴志 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

ヒト遺体に真菌が生育する現象はしばしば見られるが、法医学の観点からどのようなサンプルにどの種類の真菌が生育するか、経過時間によって生育する真菌が変化するかなど、ほとんど研究されていない。そこで、ヒト遺体に生育する真菌のフローラおよび生活環の特徴の解明を試み、鑑識への応用について検討を行った。

白骨化したもしくはミイラ化した検体は、一部切り取り、70%エタノールにより表面に付着している雑菌を殺菌し、検体内部に侵入した真菌の分離を試みた。水分量の多いサンプルは、表面殺菌を行わず、検体表面(皮膚、筋肉など)を分解していると考えられる真菌の分離を試みた。遺体の分解の程度、水分量により分離されてくる真菌が異なったが、同一遺体の各部位から分離される真菌には、種差は見られなかった。水分量が少なくなった検体からは *Eurotium* 属の他に好塩性を示す *Scopulariopsis* 属が分離された。

検体の水分量の減少に伴い、最初、*Penicillium* 属、*Aspergillus* 属、*Trichoderma* 属などの環境に多くみられるものが出現し、次に好塩性を示す *Aspergillus* 属の一部の菌種、*Scopulariopsis* 属などに移り、最後は好乾性を示す *Eurotium* 属などに変化していく。

今後は、検体数をさらに増やし、遺体の分解段階、水分量と出現する真菌の相関から、遺体が遺棄されてからの時間経過の推測に繋げたい。

研究課題 '10-04

病原糸状菌の薬剤排出系ABCトランスポーター遺伝子発現に関与する転写因子の機能解析

五味勝也（東北大学大学院農学研究科生物産業創成科学専攻）

川本 進・清水公徳

（千葉大学真菌医学研究センター）

研究成果

抗真菌剤として有用なアゾール系薬剤に対する耐性化機構の一つとして、薬剤排出に働く ABC トランスポーターの機能充進が挙げられる。薬剤排出に働く ABC トランスポーターは複数知られているが、糸状菌ではこれまでこれらの複数のトランスポーターの発現を制御する転写因子は未知であった。私たちは安全性が高く産業的に重要な糸状菌である麹菌においてその可能性を持つ転写因子を見出し、高発現株および遺伝子破壊株が薬剤にそれぞれ低感受性、超感受性を示すことを認めている。本研究では病原糸状菌の *Aspergillus fumigatus* に存在するこの転写因子オーソログを中心に各種転写因子の機能を解明することにより、ヒト感染菌における抗真菌剤に対する耐性機構の一端を明らかにし、効果的な抗真菌剤開発に資することを目的としている。

糸状菌においては、アゾール系薬剤排出に関与する ABC トランスポーター遺伝子の発現を制御する転写因子 AtrR を我々が見出している以外には薬剤耐性に直接関与する転写因子は報告されておらず、したがって転写因子の活性化に関する分子機構も明らかになっていない状況にある。ABC トランスポーター遺伝子の発現量が *atrR* 遺伝子高発現時よりも薬剤を添加した場合の方が高いことから、転写因子 AtrR が薬剤により何らかの活性化を受けている可能性について検討し、アゾール系薬剤の種類の違いによって ABC トランスポーター遺伝子の発現量に差があることを明らかにした。しかし、アゾール系薬剤の構造上の特徴（イミダゾール系・トリアゾール系）に依存した応答が存在することは認められず、今のところ AtrR のそれぞれの薬剤の種類に対する応答の分子機構は不明である。一方、出芽酵母では、同様の薬剤排出 ABC トランスポーター遺伝子の発現制御に関わる転写因子 PDR1/PDR3 の機能発現において、メ

ディエーター活性化補助因子 GAL11/MED15 サブユニットが重要な役割を果たしていることが明らかにされている。麹菌ゲノム上には GAL11 と相同性の高いタンパク質が見出されておらず、麹菌では出芽酵母と同じような転写制御機構が存在しない可能性がある。そこで、麹菌において ABC トランスポーター遺伝子の発現に関与する転写メディエーターの役割を担うタンパク質を明らかにするために、TAP タグを融合した AtrR を発現させ、薬剤を加えて活性化させた AtrR と相互作用するタンパク質を共免疫沈降法によって単離を試みた。共免疫沈降により回収したタンパク質を SDS-PAGE により分離し、薬剤添加菌体に特異的なタンパク質バンドが検出できる条件を設定できた。今後は単離したタンパク質をマスマスペクトロメトリー解析することにより、AtrR の補助因子を同定することを予定している。

研究発表

国際学会発表

- 1) Ohba A, Shimizu K, Shintani T, Kawamoto S, Gomi K: Azole drug species-dependent responses of the transcription factor AtrR in *Aspergilli*, 8th International *Aspergillus* meeting (Asperfest8), Asilomar, CA, USA, March 14-15, 2011.
- 2) Ohba A, Shimizu K, Shintani T, Kawamoto S, Gomi K: Azole drug species-dependent responses of the transcription factor AtrR in *Aspergilli*, 26th Fungal Genetics Conference, Asilomar, CA, USA, March 15-20, 2011.

研究課題 '10-05

放線菌・細菌由来のキトサン加水分解酵素の抗菌活性についての研究

安藤昭一（千葉大学大学院融合科学研究科）

齋藤明広（千葉大学大学院融合科学研究科，静岡理工科大学理工学部）

山口正視（千葉大学真菌医学研究センター）

研究成果

細菌 *Bacillus circulans* MH-K1 株に由来するキトサン加水分解酵素（キトサナーゼ；以下、MH-K1 キトサ

ナーゼ)は *Rhizopus* 属および *Mucor* 属 (いずれも接合菌) に対して抗菌活性を示す. 本年度は, MH-K1 キトサナーゼの抗菌活性におけるキトサン加水分解活性の重要性に関する考察を更に深めるため, MH-K1 キトサナーゼの活性中心残基の1つである37番のグルタミン酸 (E37) をグルタミンに置換した変異型キトサナーゼ (以下, E37Q) を作成し, 野生型酵素や, 昨年度作出した変異型酵素 D55N と比較した. その結果, 濁度による増殖阻害評価では, E37Q は, D55N と同様, 接合菌 *Mucor javanicus* の増殖をほとんど阻害しなかった. また, *M. javanicus* の菌糸を光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡によって観察したところ, 野生型酵素存在下では菌糸長が短く, 縮れていたのに対し, E37Q 存在下ではそのような著しい形態の異常はほとんどなく, 一部で菌糸の凝集が観察された. これらの形態異常や凝集の頻度は, D55N よりも低いように見受けられた. 以上の結果から, MH-K1 キトサナーゼの抗菌活性において, 2つの活性中心残基が重要な役割を果たしていることが判明した. E37Q と D55N のキトサンオリゴ糖 (基質アナログ) に対する親和性は野生型酵素と同程度であること, また, E37Q のキトサン加水分解活性がほとんどないのに対し, D55N の活性は野生型の0.2%程度であること, の2点から, MH-K1 キトサナーゼのもつ抗菌活性は, 主に, キトサンの加水分解によるものであることが強く示唆された.

研究課題 '10-06

遺伝子塩基配列を指標とした *Fusarium* 属菌の同定方法に関する研究

小西良子・渡辺麻衣子

(国立医薬品食品衛生研究所)

亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

形態学的同定が困難であることが知られる *Fusarium* 属菌について, 分子生物学的指標を導入することによる迅速・正確・簡便に同定できる遺伝子指標を特定することを目的として, 複数遺伝子塩基配列を解析し, それら遺伝子の *Fusarium* 属菌同定指標としての有用性を評価,

検討した.

Fusarium 属菌 22 菌種 47 菌株を用い, 18S rDNA 遺伝子 (rDNA), 5.8S rDNA, internal spacer region 1 (ITS1), 28S rDNA, β チューブリン遺伝子 (β -*tub*) およびアミノアジピン酸還元酵素遺伝子 (*lys2*) の塩基配列を決定した. 次いで供試した *Fusarium* 属菌の菌種間で, 遺伝子ごとに塩基配列相同率を算出した. さらに, 最尤法による系統解析を行い, 6 遺伝子間の塩基置換速度の比を推定した.

塩基配列相同率を比較したところ, 菌種間で塩基配列が100%一致するものが認められた遺伝子は18S rDNA, 5.8S rDNA, ITS1 および28S rDNA であり, *lys2* および β -*tub* では100%一致する菌種は認められなかった. 菌種間塩基配列相同率は *lys2* で52.9~99.0%, β -*tub* で85.5~99.2%であった. また, 塩基置換速度を比較したところ, *lys2* が最も早く, 次いでITS1, β -*tub*, 28S rDNA, 5.8S rDNA であり, 18S rDNA は最も遅く, *lys2* と18S rDNA の差は約55倍であることが明らかとなった. 未知の *Fusarium* 属菌株の遺伝子塩基配列をデータベース上の登録配列と照合することによって算出された塩基配列相同率を用いて同定を行う時には, *lys2* および β -*tub* 以外の4遺伝子では, 塩基配列が100%一致する種が複数挙げられて同定が不可能となる場合もあることが示唆された. しかし, *lys2* および β -*tub* では, 菌種間塩基配列相同率が100%であった菌種はなかったことから, 1つの種に同定ができる可能性が他の4遺伝子よりも高いことが示唆された. また, *lys2* は最も早い塩基置換速度を持つことから, 遺伝子塩基配列上に塩基置換を蓄積し易く, 塩基配列の菌種間での差異を認識し易い遺伝子であることが示された. 以上のことから, *Fusarium* 属菌の同定に適する指標として6遺伝子中で *lys2* が最も適しているということが明らかとなった.

研究課題 '10-07

皮膚科領域で分離される真菌の同定と分子疫学

高橋容子 (きさらづ皮膚科クリニック)
佐野文子・亀井克彦
(千葉大学真菌医学研究センター)

研究概要

Arthroderma vanbreuseghemii によるヒトとネコの集団感染例の背景には衛生動物のネズミ類が関与していることが文献的に示唆されている。そこで、千葉県を中心にドブネズミ、クマネズミ合計 100 頭を調べたところ、6 頭より無性型を *Trichophyton mentagrophytes*, 遺伝子型から有性型を *A. vanbreuseghemii* と同定された皮膚糸状菌が分離された。よって、皮膚糸状菌の感染にドブネズミの関与が強く示唆された。一方、これらの分離株の遺伝子型は均一であったが、ヒトとネコの集団感染例由来株とは遺伝子型が異なることから、ネズミからネコを通じてヒトへ感染すると推定されていた経路の証明には更なる調査が必要である。

研究成果

- 1) 佐野文子, 春成常仁, 鎗田響子, 花見有紀, 高山明子, 亀井克彦, 高橋容子, 谷川 力: 2010 年 3 月, 特集 人と動物の共通感染症最前線 7. ドブネズミより分離された *Arthroderma vanbreuseghemii*. 獣医畜産新報 63: 212-213.

研究課題 '10-08

海洋微生物を素材とした抗真菌物質の探索

小林淳一 (北海道大学大学院薬学研究院)
五ノ井 透 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

沖縄で採取した *Pseudoceratina* 属, *Suberites* 属, ならびに *Rhabdastrella* 属の海綿よりそれぞれ単離した, プロモチロシンアルカロイド ceratinadin A および B, 複素芳香族アルカロイド nakijinamine C および E, ならびにトリ

テルペノイド Stelliferin L および N に抗菌および抗真菌活性が認められた。

また, オトギリソウ属植物ダイセツヒナオトギリ (*Hypericum yojiroanum*) ならびにナガサキオトギリ (*Hypericum pseudopetiolum* var. *kiusianum*) よりそれぞれ単離した, フロログルシノール誘導体 yojironin A および B ならびに petiolin J に抗菌および抗真菌活性が認められた。

今後は, 特異性の高い抗真菌活性を示す化合物の探索を継続して行う予定である。

研究発表

原著論文

- 1) Tanaka N, Mamemura T, Shibazaki A, Gono T, Kobayashi J. Yojironins E-I, prenylated acylphloroglucinols from *Hypericum yojiroanum* (2011) Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 21 (18), 5393-5397, 2011.
- 2) Tanaka N, Momose R, Shibazaki A, Gono T, Fromont J, Kobayashi J. Stelliferins J-N, isomalabaricane-type triterpenoids from Okinawan marine sponge *Rhabdastrella cf. globostellata* (2011) Tetrahedron, 67 (35), pp. 6689-6696.
- 3) Mamemura T, Tanaka N, Shibazaki A, Gono T, Kobayashi J. Yojironins A-D, meroterpenoids and prenylated acylphloroglucinols from *Hypericum yojiroanum* (2011) Tetrahedron Letters, 52 (28), pp. 3575-3578.
- 4) Takahashi Y, Kubota T, Shibazaki A, Gono T, Fromont J, Kobayashi J. Nakijinamines C-E, new heteroaromatic alkaloids from the sponge *Suberites* species (2011) Organic Letters, 13 (12), pp. 3016-3019.
- 5) Tanaka N, Otani M, Kashiwada Y, Takaishi Y, Shibazaki A, Gono T, Shiro M, Kobayashi J. Petiolins J-M, prenylated acylphloroglucinols from *Hypericum pseudopetiolum* var. *kiusianum* (2010) Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 20 (15), pp. 4451-4455.
- 6) Kon Y, Kubota T, Shibazaki A, Gono T, Kobayashi J. Ceratinadins A-C, new bromotyrosine alkaloids from an Okinawan marine sponge *Pseudoceratina* sp. (2010) Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 20 (15), pp. 4569-4572.

研究課題 '10-09

病原性真菌の病理学的検出・同定法の検討

村山琮明（北里大学大学院感染制御科学府 & 北里生命科学研究所）
横山耕治（千葉大学真菌医学研究センター）

研究成果

深在性真菌感染症は、今や 20 人に 1 人（剖検輯報等によれば）、移植の際には 10 人に 1 人の割合で起こる重篤な感染症である。特に、先進諸国では大きな課題の一つとなっている。

ところが深在性真菌症では培養が困難で確定診断の難しい症例が依然として少なくなく、あらゆる臨床検体について、非培養系診断あるいは制度の高い推定の手順が求められている。実際、深在性真菌症に関する非培養系診断法として遺伝子解析法を応用した知見は徐々に集積されつつある。臨床において常用されている病理診断材料に真菌を確認すれば確定診断としての意義は大きい。しかし、菌種の推定に関しては、標本内で観察される菌の形態のみでは限界があり、病理・細胞診断領域における新たな補助診断法の開発が必要と考えられる。*in situ* hybridization (ISH) 法を基幹とした病理診断材料における遺伝子病理組織学的診断法について方法などを検討した。

遺伝子情報が良好に保持された試料では、ISH より精度の高い診断の可能性が示唆された。また、本年は PNA とはペプチド核酸 (Peptide Nucleic Acids: PNA) プローブを用いた *Histoplasma* など新たな菌種同定をおこなった。

本法の普遍・均霑化は、有益な情報基盤の構築と臨床現場での抗真菌化学療法を選択に寄与する病理診断領域の迅速な検査法になり得ると考えている。

研究課題 '10-10

病原性真菌由来の揮発性分子を利用した感染および宿主応答の研究

鈴木孝仁・岩口伸一（奈良女子大学理学部）
横山耕治（千葉大学真菌医学研究センター）

研究成果

真菌感染症は表在性と深在性の感染状態をとり、表在性真菌症では感染部位が限定され、診断・治療も比較的容易であり重篤に至ることも少ない。これに対し深在性真菌症では診断方法が限られている上に、早期に検出することは非常に困難であり、治療も難しい。特に、免疫力が著しく低下した患者において発症した場合には難治性となり、死亡率が高い疾患であるが、深在性真菌感染症を早期に診断できる有効な方法はほとんどないのが現状である。深在性真菌症の起因菌が宿主への感染過程、宿主応答に対して放出する微生物由来揮発性低分子化合物 (MVOCs: Microbial Volatile Organic Compounds) を特定し、真菌感染症の早期診断、感染のモニタリングなどの指標として MVOCs が有効であるかどうかについて、真菌感染動物の呼気に含まれる MVOCs の変化を捉える実験を計画した。

平成 22 年度は真菌感染時に放出される MVOCs の検出を動物感染実験モデル (マウス) を用いて行うための装置を作成した。装置からの VOC の放出を避けるために材質は主としてガラス、テフロンを使用した。マウスの呼気から MVOCs の採取は SPME を用いて行うが、感染実験および呼気の採取は千葉大学真菌医学研究センターで実施し、MVOCs の測定を奈良女子大学で行う。そのため、移動時における VOC の吸着等を極力避けるために SPME 部位を格納できるフィールドサンプラーを使用し、これを設置できるように装置を設計した。まず、装置の有効性を確かめるために、健康マウスを使用して呼気中に含まれる VOC が検出できるかについて実験を行い、呼気を SPME に吸着させる際、装置を 65°C に保温することにより効率的に VOC を検出できることを確認した。さらに、千葉大学真菌医学研究センターにおいて実験の打ち合わせを行い、飼育室のバックグラウンドの VOC について測定を実施した。

研究課題 '10-11

真菌症原因菌に対する新規生体接着剤の抗真菌効果の検討

玄 丞侏 (京都大学再生医科学研究所)
亀井克彦・田口英昭
(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

臨床の間では手術による切開部位を短時間で接合、患部の止血、あるいは臓器移植部の固定のため等に生体接着剤が使われている。

我々は新たに開発された生体接着剤の抗真菌効果の検討を行なった。

試験菌株は *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* および *Candida albicans* について抗菌活性を評価した。

方法は 20mm 角で切り出した豚の皮膚肉片を γ -線 で殺菌し、肉片の周辺に試験菌各々を接種した。その後 aldehyded-dextran と ϵ -poly (L-lysine) の重量比が 80:20 のパウダー型と 20% の aldehyded-dextran と 10% の ϵ -poly (L-lysine) を混合した液体型の生体接着剤 2 種類について菌が接種された部位上に塗布して培養を行ない培養後、各肉片の周辺と生体接着剤を塗布していない肉片自体の阻止性、菌の発育を比較して確認した。

結果は aldehyded-dextran と ϵ -poly (L-lysine) を主成分とした生体接着剤は試験した全ての試験菌に対して一定の抗菌効果を示すことが確認された。

研究発表

論文発表

- 1) Lee JH, Kim HL, Lee MH, Taguchi H, Hyon SH, Park JC: Antimicrobial effect of medical adhesive composed of aldehyded dextran and ϵ -poly (l-lysine). J Microbiol Biotechnol 21 (11): 1202-1205, 2011.

研究課題 '10-12

真菌のストレス応答シグナル伝達の分子解析

三浦 恵・園田智子
(横浜市立大学大学院医学研究科)
川本 進・大楠美佐子
(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

Cryptococcus neoformans は、日本に常在する真菌の中で最も病原性が強く、ヒトの肺、脳や髄膜などを侵し、エイズ患者の直接死因としても重要な病原酵母であり、野外、動物体内という極めて異なる環境下で生存する能力を有する。また、我々の研究からストレス条件下や、感染時、細胞は大型化し、細胞壁や夾膜は顕著に厚くなる等、特徴的な変化を示すことが明らかになっている。また、本菌の細胞周期制御は、同じ出芽酵母ではあるもののモデル酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と大きく異なることが分かっている。これらの相違はストレス応答や感染時に重要な役割を果たし、病原性発現機構に関与することが考えられる。*S. cerevisiae* においても、細胞周期とストレス応答の密接的に関係していることが知られている。従って、このような複雑な制御機構の中心に位置する遺伝子とその関連遺伝子の網羅的同定および機能解析を行いつつある。これまでに、*C. neoformans* の細胞周期制御の中心に位置する Cdk1 ホモログ (サイクリン依存性キナーゼ 1) *CnCdk1* とそれに相互作用するサイクリンホモログ *CnCln1* をゲノムから見出しクローニングを行い、これらの遺伝子の構造解析を行って来た。*CnCln1* 破壊株の細胞は異常な形態を示したことから、*CnCln1* は幅広く細胞の形態形成や生理的機能に影響を及ぼし、本菌にとって極めて重要な遺伝子であることが示唆されている。*CnCln1* と関連する遺伝子を同定するため、*CnCln1* 破壊株の表現型が戻る変異を探索し *CnCln1* の機能を抑制する遺伝子の同定をするべく、本菌のストレス応答や病原性に関与する細胞制御機構の解明を進めている。

研究課題 '10-13

病原性真菌 *Candida glabrata* の常在化機構の解析と発症抑制

水野貴之 (徳島文理大学理工学部ナノ物質工学専攻)
知花博治
(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

病原性真菌 *Candida glabrata* が発症前に、宿主に常在化している状態に着目し、常在あるいは発症に必要な機構の解析を行っているが、新しい解析用宿主として線虫を用いた実験系を開発した。また、このとき、*C. glabrata* に導入した GFP 遺伝子の発現によって線虫内で観察することを可能とした。線虫の至適増殖温度においては、健康状態を損ねることなく、*C. glabrata* が、常在化す可能であった。現在は、遺伝子破壊株による常在化不能となる株の同定、および抗生物質感受性株のスクリーニングの準備中である。

研究業績

学会発表

- 1) 谷岡拓弥, 前田淳史, 文谷政憲, 中山浩伸, 山口正視, 知花博治, 水野貴之: 線虫を用いた *Candida glabrata* の感染機構の解析～スクリーニング系の構築. 第 28 回イーストワークショップ 2010. 11.
- 2) 山本 茂, 前田淳史, 文谷政憲, 中山浩伸, 知花博治, 水野貴之: 42℃ で生育不能となる *Candida glabrata* 温度感受性変異株の取得と解析. 第 28 回イーストワークショップ 2010. 11.
- 3) 百地史郎, 前田淳史, 文谷政憲, 中山浩伸, 知花博治, 水野貴之: 相同性組み換えを用いた *Candida glabrata* 染色体分断ライブラリーの作成. 第 28 回イーストワークショップ 2010. 11.

研究課題 '10-14

Candida glabrata 表層多糖の宿主免疫応答に及ぼす影響

川上和義 (東北大学大学院医学系研究科保健学専攻
感染分子病態解析学分野)
知花博治 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

真菌感染症は易感染性宿主に日和見感染として発症するため、病原真菌に対する宿主免疫応答機構の解明がその病態の理解に重要となる。近年、真菌多糖体の認識機構として C-type lectin receptors (CLR) が注目されている。そこで本研究では、*Candida glabrata* に対する免疫応答機構を明らかにする目的で、*C. glabrata* の各種表層多糖変異株 8 株を用いて C57BL/6 マウスの骨髄由来樹状細胞 (BM-DC) を刺激し、その活性化指標として IL-12p40 産生について、変異株とその野生株の間で比較検討を実施した。その結果、11255 (KPOPGTB1) 株では、野生株と比較して IL-12p40 産生の顕著な低下が観察された。この変異株では BM-DC 活性化に関わる多糖構造が変異している可能性が予想されたため、in vivo でも同様な影響が観察されるか検討するために、11255 (KPOPGTB1) 株と野生株 2×10^6 を C57BL/6 マウスに経静脈接種し、3 日後に腎臓重量、腎臓内菌数、腎ホモジネート及び血清中の IL-12p40 濃度を測定したところ、両群間で明らかな差を見出せなかった。以上の結果から、11255 (KPOPGTB1) 株の表層多糖構造の変異により in vitro での樹状細胞活性化には影響がみられたものの、in vivo では免疫系のより複雑な真菌認識機構のために in vitro で観察された差がみられなかった可能性が示唆された。今後、さらに表層多糖構造の変異と樹状細胞による認識の関連性について詳細に解析する必要があると考えられる。

研究課題 '10-15

Candida glabrata のステロール取り込みの分子機構の解明

中山浩伸 (鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科)
田辺公一 (国立感染症研究所・生物活性物質部)
青山俊弘 (鈴鹿工業高等専門学校・電子情報工学科)
知花博治 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

本研究期間で、ステロール取り込みに関わる転写因子 *UPC2A* および *UPC2B* の機能解析を行い、下記の成果を得た。

UPC2A および *UPC2B* は、Znフィンガーマチーフを持つ転写因子で、これらの欠損株では、血清添加培地においてステロールトランスポータ *AUS1* を介して起こるフルコナゾールの感受性の低下が見られない。RT-PCR による発現量解析から、野生株において、*UPC2A* は血清添加の刺激による発現変動はなかったものの、*UPC2B* は血清添加の刺激により発現の上昇が確認できた。*upc2A* の欠損の株では、血清を添加による *UPC2B* および *AUS1* の発現の上昇が見られなかった。一方、*upc2B* の欠損の株では、血清を添加による *AUS1* の発現の上昇が部分的に抑えられていた。このことから、*UPC2A* 自身が血清添加刺激によってどのように活性化されるかは不明であるが、*UPC2A* は、*UPC2B* の上流に位置し、*AUS1* の遺伝子発現を調節していることがわかった。さらに *upc2A* の欠損の株では、lovastatin によるステロール枯渇で起こるエルゴステロール合成遺伝子の *ERG2* および *ERG3* の発現上昇も観察されなかったことから、*UPC2A* は、ステロールの取り込みのみならず生合成の調節にも関わり、*Candida glabrata* のステロール恒常性維持に重要な働きを担っている因子であることが示唆された。

研究業績

学会発表

- 1) Nakayama H, Tanabe K, Nagi M, Chibana H, Bard M: Characterization of genes that regulate sterol uptake and transport in *Candida glabrata*. The 10 th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 兵庫 県淡路市. 2010. 9. 7-10.

- 2) 名木 稔, 田辺公一, 中山浩伸, 知花博治, 梶原将, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata* の鉄欠乏ストレス応答. 第7回真菌分子細胞研究会. 香川県さぬき市. 2011. 11. 12-13.

研究課題 '10-16

真菌による肺血管構築改変機序に関する遺伝子病理学的解析

渋谷和俊・大久保陽一郎・篠崎 稔
(東邦大学医療センター大森病院)
亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

一般的な環境から分離される黒色真菌である *Stachybotrys chartarum* のマウス気管内への反復接種によって、進行性で予後不良の疾患である肺動脈性肺高血圧症の病態に類似した肺動脈内膜・中膜の肥厚が形成され、肺動脈圧が上昇することが報告されている。われわれは、本モデルにおける病態形成に関連する因子を検索するため、肺組織を用いてマイクロアレイにて mRNA レベルでの遺伝子発現変動を検出し、GO 解析, Pathway 解析を行った。

使用したマイクロアレイは Affymetrix 社製 GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 で、設定遺伝子数 45101 のうち有意に発現上昇していた遺伝子数は 303 で、これらの遺伝子には免疫応答に関する遺伝子が多く含まれていた。発現が低下していた遺伝子数は 436 で、これらの遺伝子からは PDGF, VEGF, Toll Like Receptor 4 (TLR4) に関連する pathway が検出された。肺高血圧症で TGF- β の I 型, II 型, III 型レセプターの SNIP や機能不全が報告されており、これらをコードする Aik-1, BMPR-2, Endoglin 遺伝子の発現は既知の因子介入によって表現される本モデルにおいても低下していた。一方、本モデルと特発性肺高血圧症で発現変動様式に乖離がみられた生物分子として上記以外の TGF- β , 血液凝固, Rock, エストロゲン, 転写因子である STAT3 に関連する因子などを検出した。これらの因子は、サブトラクション解析理論により IPAH の病態形成に深く関与していると考えられ、今後更に解析を進めたい。

研究課題 '10-17

Aspergillus fumigatus が産生するバイオフィルムと fetuin の関連についての基礎的研究

渡邊 浩・秦 亮 (久留米大学医学部)
亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

アスペルギルス症は我が国で最も発生頻度の高い深在性真菌症となってきた。本症の主な原因真菌は *Aspergillus fumigatus* であり、近年、本菌が形成するバイオフィルムについて注目が集まっている。バイオフィルム形成は特にアスペルギローマなどの関連性が指摘されており、慢性の病態形成に寄与していることが推測されている。これまでに千葉大学真菌医学研究センターのグループは血清存在下において *A. fumigatus* がバイオフィルムを形成することを明らかとしている。さらに血清糖タンパク質の一つ、fetuin が重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。我々は fetuin がバイオフィルム形成に果たす役割についてクリスタルバイオレット法による検討を行った。

96 ウェルプレートにおいて各種条件において培養した *A. fumigatus* が形成したバイオフィルムをクリスタルバイオレットで染色して観察を行った結果、fetuin 添加群において非添加群に比べてバイオフィルム形成が促進されている様子が観察された。クリスタルバイオレットの定量からも有意にバイオフィルム形成が促進されたことが明らかとなった。さらにバイオフィルム形成に必要な fetuin 濃度を検討した結果、0.125 mg/ml の濃度であっても有意にバイオフィルム形成を促進する効果が認められた。

千葉大学真菌医学研究センターのグループも矛盾しない結果を得ており、fetuin がバイオフィルム形成に寄与していることが明らかとなった。バイオフィルム形成が抗真菌薬抵抗性を付与するとの報告も海外から出てきており、我々も抗真菌薬感受性に関する検討を今後進めていく予定である。これまでの結果については、千葉大学真菌医学研究センターと共同で学会発表を行う予定であり、また現在論文を国際誌に投稿中である。

学会発表 (予定)

- 1) 豊留孝仁, 秦 亮, 渡辺 哲, 渡邊 浩, 亀井克彦: 血清糖タンパク質 fetuin A が *Aspergillus fumigatus* 生育に及ぼす影響. 第 86 回日本感染症学会総会: 長崎, 4月25~26日, 2012.

研究課題 '10-18

特発性間質性肺炎患者における抗真菌抗体価測定

岡田信司 (みやぎ県南中核病院)
亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

過敏性肺臓炎, 特に慢性過敏性肺臓炎と他の特発性間質性肺疾患群とを鑑別するのは非常に困難である。私達は *Cladosporium* による慢性過敏性肺臓炎の症例を経験し、報告した。この症例は、長年にわたって特発性間質性肺炎として経過観察されてきた。このことは、このような一般的な環境常在真菌による慢性過敏性肺臓炎と特発性間質性肺炎の鑑別が困難であることを顕著に示している。そこで、今回、各種間質性肺炎において、真菌性過敏性肺臓炎の可能性を示す抗真菌抗体価を調べることにより、その鑑別が可能であるかを検討した。

方法: 私達は、各種間質性肺炎患者血清を用い、*Cladosporium* に対する抗体価を間接蛍光抗体法で測定した。コントロールとして気管支喘息、正常健康人の血清を用いた。

結果: 抗 *Cladosporium* 抗体価が高い患者の割合は他の健康者や気管支喘息患者と比べて、間質性肺炎群が優位に高かった。この抗体価の上昇は過敏性肺臓炎だけでなく、特発性間質性肺炎群、膠原病関連間質性肺炎においても認められた。

結論: この検査の結果は、この方法が間質性肺炎の大きなグループから *Cladosporium*-関連過敏性肺臓炎の患者を鑑別するのに有効な方法である可能性と、間質性肺炎全般の発症に於ける真菌抗原の可能性を示している。

Table 1. Number of subjects with a high anti-*Cladosporium cladosporioides* antibody titer.

	Age	Sex (M:F)	High Ab titer / total (number of subjects)
ILDs	71.6 ± 13.3	20 : 14	12/34*
BA	58.1 ± 18.4	6 : 11	0/17
control	37.1 ± 8.2	21 : 0	0/21

*: p < 0.05

Table 2. Number of patients with a high anti-*Cladosporium cladosporioides* antibody titer in ILDs.

	Age	Sex (M:F)	High Ab titer / total (number of patients)
HP	60.4 ± 12.9	2 : 3	2 / 5
IIPs	73.0 ± 14.4	14 : 7	6/21
CVD-ILDs	74.9 ± 6.7	4 : 4	4 / 8

研究課題 '10-19

Trichophyton mentagrophytes の分子多型にもとづく疫学的研究

望月 隆・安澤数史・牛上 敢・川西絢子
(金沢医科大学)

高橋容子 (きさらづ皮膚科クリニック)

亀井克彦・佐野文子

(千葉大学真菌医学研究センター)

研究概要

2009 年初頭から 2010 年末までに金沢医科大学皮膚科もしくは同大皮膚真菌症研究部門に同定の依頼のあった *Trichophyton mentagrophytes* の臨床分離株 42 株について rDNA の ITS 領域の *MvaI*, *HinfI* を用いた RFLP 分析による分子同定、分子疫学的検討を行った。42 株の分離地域は東北 6 株、関東甲信越 10 株、中部 21 株、近畿 1 株、九州 4 株、遺伝子型は *Arthroderma vanbreuseghemii* 型 23 株、*Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* 型 17 株、*A. benhamiae* Americano-European race 型 2 株であった。*Arthroderma vanbreuseghemii* 型 23 株の由来は東北 6 株、関東甲信越 5 株、中部 7 株、近畿 1 株、九州 4 株、内訳ではヒト 21 株 (体部白癬 19 株、白癬菌性毛禿瘡 1 株、ケ

ルスス禿瘡 1 株)、ネコ 2 株である。なおヒトの中で動物と明らかな関係がみられたものはネコ飼育 2 例、イヌ飼育 1 例であった。*T. mentagrophytes* var. *interdigitale* 型 17 株は全例ヒト由来であり、つた。*A. benhamiae* 型は 2 株とも石川県の例でウサギとその飼い主 (体部白癬) からの分離株であった。

研究課題 '10-20

真菌感染による「痒み」のマウスモデルの作製と発生機序の解析

倉石 泰・安東嗣修

(富山大学大学院医学薬学研究部)

佐野文子 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究概要

皮膚への糸状菌感染により痒みが誘発する。しかしながら、その痒みの発生機序は不明である。そこで、ドブネズミより単離同定された糸状菌 *Arthroderma vanbreuseghemii* を用いて糸状菌による痒みの発生機序の解明を試みた。*Arthroderma vanbreuseghemii* の抽出物 (E-DEP と表記) をマウス吻側背部に皮内注射すると後肢による痒み関連反応である掻き動作が惹起されたが、熱処理した E-DEP では観察されなかった。E-DEP 誘発掻き動作は、セリンプロテアーゼ阻害薬と PAR2 拮抗薬で抑制されたが、H1 ヒスタミン受容体拮抗薬では抑制されなかった。また、マスト細胞欠損マウスとその対照マウスで E-DEP がほぼ同程度の掻き動作を誘発した。E-DEP に、セリンプロテアーゼ活性及び、PAR2 受容体 N 末ペプチドを切断する活性 (N 末ペプチド切断により PAR2 は活性化される) が認められた。以上の結果より、E-DEP 誘発掻痒反応には、セリンプロテアーゼ及び PAR2 受容体が関与することが明らかとなった。

研究成果

学会発表

- 1) Yamakoshi T, Andoh T, Takayama Y, Lee JB, Sano A, Shimizu T, Kuraishi Y: Involvement of protease and proteinase-activated receptor 2 in dermatophyte-associated itch. ESDR 41st Annual Meeting 2011, Sep

7-10, Barcelona, Spain.

- 2) 高山祐輔, 安東嗣修, 山腰高子, 清水忠道, 佐野文子, 倉石 泰. 皮膚糸状菌誘発搔痒反応へのプロテアーゼとプロテアーゼ活性化受容体 2 の関与. 日本薬学会北陸支部会平成 23 年度第 1 回総会及び第 123 回例会, 平成 23 年 11 月 27 日, 金沢, 石川.

研究課題 '10-21

17 種漢方配合生薬の抗菌作用の検討

西片奈保子 ((財)宮崎県産業支援財団結集型研究推進室)

佐野文子 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究概要

牛白癬治療効果が確認されている 17 種の生薬からなる生薬配合薬 (新中森獣医散) について, *Malassezia pachydermatis* 及び *Trichophyton verrucosum* に対する配合生薬及び各生薬抽出成分の抗真菌効果を, 微量液体希釈法により評価することができた. これにより, 本生薬の抗真菌効果について客観的な評価が得られた. また, これまで微量液体希釈法では評価が困難とされた 2 種の真菌について, 一定の条件下で最小生育阻止濃度を測定することが可能となった.

研究成果

学会発表

- 1) 西片奈保子, 中森健太郎, 高橋英雄, 佐野文子. 生薬配合薬のマイクロ液体希釈法での抗真菌活性評価. 第 54 回日本医真菌学会総会. 講演要旨集. p. 67. 平成 22 年 10 月 16 ~ 17 日. 大手町サンケイプラザ, 東京.
- 2) 西片奈保子, 阪本訓代, 中森敏雄, 中森健太郎, 清水正高, 由地裕之, 佐野文子. 「生薬配合薬エキス封入 Solid-in-Oil (S/O) 型油性外用製剤の牛白癬症治療効果」. 第 27 回日本 DDS 学会学術総会. プログラム予稿集. p. 320. 平成 23 年 6 月 9 ~ 10 日. 東京大学本郷キャンパス, 東京.

論文発表

- 1) 西片奈保子, 中森健太郎, 末吉益雄, 高橋英雄, 由

地裕之, 佐野文子. 生薬配合薬の微量液体希釈法による抗真菌活性評価. *Medical Mycology Journal*. Vol. 52, 213-221, 2011.

研究課題 '10-22

病原性真菌を含む真菌によるプラスチック複合材料のかび抵抗性評価法の検討

飯島直人・岡 千寿 (千葉県産業支援研究所)
矢口貴志・田中玲子・五ノ井 透
(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

千葉県産業支援技術研究所では, 「持続可能な循環社会に向けたプラスチック複合素材の開発」という研究テーマでバイオマス資源を活用してプラスチック複合材料の開発を行っている. その 1 つとして千葉県特産の落花生の殻に着目し建材ボードの開発を行っている. その安全性試験の一環として, 抗カビ試験を共同で行った. まず, その評価法の検討を行い, 湿室内に試験検体を置き, それに病原真菌を接種し一定時間の経過後, 供試菌株の生育速度を対照と比較した. その条件はほぼ決定出来たので, 今後は菌種を増やして評価を実施する予定である.

研究課題 '10-23

希少な分離株からの新規生理活性化合物の探索研究

河合賢一・細江智夫・板橋武史
(星薬科大学薬学部, 薬化学教室)
矢口貴志 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

新たに分離した菌株を培養し, その培養抽出物の生物活性試験法を実施した. TLC, HPLC 等で成分の検索を行い, 活性成分を含めた新規化合物の単離を行なった. 化合物の構造については, NMR をはじめとする種々の

スペクトルデータの解析, 化学反応およびX線結晶解析等を併用して決定した. 得られた新規化合物について毒性試験をはじめとする各種活性試験を実施し, 医薬品のリード化合物としての可能性の検討を行う予定である. 本年は, *Aspergillus novofumigatus* から diketopiperazine の誘導体である novoamauromine と ent-cycloechinulin を, 新規 cyclic tripeptide である novofumigatamide を単離しその構造を確定した. これら 3 物質には *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* に対する抗真菌活性を有していた.

研究発表

原著論文

- 1) Ishikawa K, Hosoe T, Itabashi T, Wakana D, Takizawa K, Yaguchi T, Kawai K. Novoamauromine and ent-cycloechinulin: Two new diketopiperazine derivatives from *Aspergillus novofumigatus*. Chem Pharm Bull 58: 717-719, 2010.
- 2) Ishikawa K, Hosoe T, Itabashi T, Takizawa K, Yaguchi T, Kawai K. A novofumigatamide, new cyclic tripeptide from *Aspergillus novofumigatus*. Heterocycles 81: 2143-2148, 2010.

研究課題 '10-24

Aspergillus section *Nigri* の分子生物学的手法及び形態による類別とマイコトキシン産生性

久米田裕子・坂田淳子 (大阪府公衆衛生研究所)
横山耕治 (千葉大学真菌医学研究センター)
高橋治男・橋本ルイコ (千葉県衛生研究所)
陰地義樹・浅野勝佳 (奈良県衛生研究所)
田端節子・千葉隆司
(東京都健康安全研究センター)
川上祐司・橋本一浩
(株) エフシージー総合研究所)
中川博之 (農研機構食品総合研究所)

研究成果

- 1) 醸造に用いられている株, あるいは用いられた黒麹菌, 10 株, *Aspergillus awamori* のタイプ種を含む

NBRC 保存株, 7 株, さらには, 汚染食品から *A. niger*, 1 株の, 計 18 株について, チトクローム *b* および rDNA の D1D2 領域, さらには ITS 領域の遺伝子解析を行った.

その結果, チトクローム *b* の遺伝子解析では, 実用黒麹菌は D-9-1 型に集中し, 保存株は, D-9-1 型と D-5-1 型の両方に別れ, 食品分離株は, D-5-1 型であった. D1D2 の遺伝子解析では, チトクローム *b* の遺伝子型が, D-9-1 型で有る場合は, D1D2-8 型に, 同じく, D-5-1 型の場合は D1D2-6 型に別れた. また, ITS 領域の解析では, チトクローム *b* の遺伝子型が, D-9-1 型の場合は Ng6 型に, D-5-1 型の場合は Ng4 型となった.

- 2) 遺伝子型とマイコトキシン産生の関係

チトクローム *b* 遺伝子型が D-9-1 型の場合は, フモニシンもオクラトキシンの産生も認められなかった. すなわち, 実用麹菌では, マイコトキシン産生を有する株は 1 株も認められなかった. これに対して, マイコトキシン産生を有する株は, D-5-1 型に集中した.

以上の結果から, 今回の調査では, 実用麹菌は安全性に問題がないと見られたが, 親株とも見られる NBRC 保存株にマイコトキシン産生を有する考えられる遺伝子型を有する株が存在することから, 継続的な調査が必要であることを示唆した.

研究発表

学会発表

- 1) 橋本ルイコ, 各務清美, 横山耕治, 王麗, 川上裕司, 陰地義樹, 浅野勝佳, 久米田裕子, 高橋治男: 醸造用黒麹菌を含む *Aspergillus* section *Nigri* の類別及びオクラトキシン A 産生性. 日本微生物資源学会 (岐阜) 2010年.

研究課題 '10-25

カイコ幼虫の感染モデルを用いた *Cryptococcus neoformans* 転写因子 SII 遺伝子等の病原性の検証と機能解析

関水 和久・垣内 力

(東京大学大学院薬学系研究科)

川本 進・清水 公徳

(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

本研究の目的は病原性真菌 *Cryptococcus neoformans* のカイコ幼虫を用いた病原性検定法を確立するとともに、本菌由来の遺伝子、特に、関水らが長年、その解析を進めて来た転写因子 SII 遺伝子の本菌病原性との関わりを、カイコ幼虫を用いて評価し解析することにある。関水らは、「カイコ幼虫による感染モデル」が、黄色ブドウ球菌、レンサ球菌など細菌類に対する病原性解析モデルとして適用できることを既に報告している。従来のマウス等の代替実験生物として、カイコ幼虫を真菌の病原性解析のための感染モデル生物として用い、「カイコ幼虫による真菌感染モデル」を真菌の新しい病原性解析法の開発を目指した。カイコ幼虫の感染モデルを用いた *Cryptococcus neoformans* の病原性の検証と機能解析を行う目的で、病原酵母 *C. neoformans* 感染モデル系の構築を行い確立した。その「カイコ・*C. neoformans* 感染モデル系」を用いて、抗真菌剤の評価法を構築し、主要な抗真菌剤 (Amphotericin B, Flucytosine, Fluconazole, Ketoconazole, Micafungin) について、その評価を行い、本感染モデル系が有効な方法であることを確認した。*C. neoformans* の血清型 A が血清型 D よりも病原性が強い点、病原性発揮に必要とされる遺伝子 *gpa1*, *pkal* and *cnal* 等の各遺伝子破壊株では親株に比較して病原性が減少する点など、哺乳類感染モデルですでに示されている、病原性に関するさまざまな性質について検証したところ、基本的にカイコ感染モデルにおいても同様であることなどが確認でき、今後、我々が構築、検証した「カイコ・*C. neoformans* 感染モデル系」は、*C. neoformans* に対する抗真菌剤のスクリーニングに実用的にも利用されることが期待される。

研究発表

原著論文

- 1) Matsumoto Y, Miyazaki S, Fukunaga D-H, Shimizu K, Kawamoto S, Sekimizu K: Quantitative evaluation of cryptococcal pathogenesis and antifungal drugs using a silkworm infection model with *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Applied Microbiology* 112 (1): 138-146 (2011).

研究課題 '10-26

ヒト病原菌を含む新規真菌類の探索源としての樹木寄生真菌および随伴・共生真菌の分子同定

畑 邦彦 (鹿児島大学農学部)

川本 進・大楠美佐子

(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

樹木に寄生・共生する真菌類は膨大な数に上り、様々な観点から研究が行われているが、研究の進展の障害の一つとなっているのが同定の困難さである。とりわけいくつかの分類群でそれは顕著である。形態のみで判別の困難な酵母様真菌や黒色真菌は葉面などに生息する樹木の随伴真菌の主要な構成要素であるし、樹木の寄生真菌・共生真菌として重要な位置を占める分生子果不完全菌は同定に極めて専門的な熟練を必要とする。加えて、そもそも培地上で孢子形成を行わない真菌も少なからず存在する。そこで、本研究においては、それら難同定真菌の同定の手掛かりとして、分子生物学的な手法を検討した。

材料となる菌株は鹿児島県内の五箇所の林分より採取したクロマツ生葉および落葉より表面殺菌法を用いて分離した。今回は分離された菌株の中から孢子をほとんど作らず属レベルの同定すら困難だったクロサイワイタケ科の一種と、属レベルの同定は一応出来たものの既存の文献に該当する種の見当たらなかった黒色真菌 *Phialocephala* 属の一種を材料として用いた。両種の各菌株は、5.8S リボソーム RNA の ITS 領域の DNA 配列を決定し、DDBJ のデータと比較することによって分子同定を試みた。

その結果、クロサイワイタケ科の菌株の遺伝子配列はいくつかの *Xylaria* 属菌に近く、*Xylaria* 属の範囲に入る菌であることが明らかとなった。また、*Phialocephala* 属の菌株については、少なくとも *Phialocephala* 属に近縁の菌であることは明らかになったものの、遺伝子配列が完全に一致する同定された既知菌株は存在せず、形態的に一致する既知種も存在しないため、同属の未記載種である可能性が高いと考えられた。

以上のように、分子同定は同定困難な既知の菌のみならず、未知の菌を扱う場合も極めて有効なツールであることが改めて浮き彫りとなった。

研究課題 '10-27

真菌に生物種を越えて保存されているサイクリン依存性キナーゼとサイクリンの構造機能相関に関する研究

田村 裕 (千葉大学大学院医学研究院生命情報学)
川本 進 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

我々はこれまでに、*C. neoformans* は、同じ出芽酵母であるもののモデル酵母 *Saccharomyces cerevisiae* とは大きく異なり、特異な細胞周期制御機構が存在し、本酵母の病原性にも深く関わっていることを示唆し、また、その細胞周期制御に中心的な役割を果たしているタンパク質複合体、いわゆる“細胞周期エンジン”を構成している2つの鍵タンパク質分子、CDC28/cdc2 ホモログ、サイクリン依存性キナーゼ (CnCdk1) とその制御因子 G1 サイクリン (CnClN1) の分子クローニング、分子細胞機能解析を進めてきた。今回、CnClN1 と CnCdk1 との両タンパク質間相互作用を、*in vitro* 及び *in silico* 解析によって構造機能相関をバイオインフォマテイクス解析も含めて考察するなどして、本菌の特異な細胞周期制御機構の分子解析および考察を進めた。本菌 CnClN1 遺伝子を *Saccharomyces cerevisiae* において発現させ、*S. cerevisiae* の G1 サイクリン ScClN1, ScClN2, ScClN3 との分子構造・機能の比較、また、*S. cerevisiae* のサイクリン依存性キナーゼ ScCDK1 と CnClN1 との間の結合を、CnCDK1 と CnClN1 との間の結合と比較するなどし、更に分子間

結合相関の生理的な意義を考察した。

研究発表

原著論文

- 1) Virtudazo EV, Suganami A, Tamura Y, Kawamoto S: Towards understanding cell cycle control in *Cryptococcus neoformans*: Structure-function relationship of G1 and G1/S cyclins homologue CnClN1. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 416 (1-2): 217-221, 2011.

国際学会発表

- 1) Kawamoto S, Virtudazo EV, Ohkusu M, Tamura Y, Shimizu K, Yamaguchi M, Takeo K: Characterization of Cell Cycle Control Genes in *Cryptococcus neoformans*. 8th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis (ICCC8), Charleston, South Carolina, USA, May 1-5, 2011.

国内学会発表

- 1) Kawamoto S, Virtudazo EV, Ohkusu M, Tamura Y, Moretti ML, Takeo K: Molecular and Functional Characterization of Two Key Players (Cyclin and Cyclin-dependent kinase 1) of Cell Cycle Control Genes in Pathogenic Yeast, *Cryptococcus neoformans*. 第84回日本生化学会大会, 京都, 9月21~24日, 2011.

研究課題 '10-28

TOF-SIMS (飛行時間型二次イオン質量分析装置) による真菌細胞内脂質局在の解析

田辺公一 (国立感染研究所)
山口正視 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

病原真菌 *Candida glabrata* は、感染宿主体内でステロール輸送体遺伝子 *CgAUS1* を発現して、細胞外ステロールを取り込んでいると考えられ、ステロール取り込みが薬剤感受性や病原性に関係することが示唆されている。*C. glabrata* のステロール取り込みは、*in vitro* では血清添加によって再現できることを見出している。本研究では、*C. glabrata* に血清を添加した際に、菌体に取り込まれたコレステロールと菌がもともと持つエルゴステロールの

細胞内局在を TOF-SIMS による解析で明らかにし、新規の抗真菌薬耐性機序を解明することを目的とした。

予備実験として、合成培地で培養した *C. glabrata* を用いてステロールの検出を試みたが、酵母からは脂質を検出することは出来ず、細胞壁が解析の障壁になっていることが推測された。山口正視准教授より電子顕微鏡観察のための酵母超薄切片を提供していただき、細胞内部が露出した状態のサンプルで脂質の検出を試みた。しかしながら、試料表面の微量の樹脂成分が主に検出されてしまい、酵母細胞由来の脂質の検出には至らなかった。現在、試料調製と分析方法の双方の改良を行い、酵母細胞を破壊せずに脂質を検出する実験手法確立を目標に研究をすすめている。

研究課題 '10-29

真菌様深海微生物の微細形態と進化

丸山 正 (海洋研究開発機構)
小塚芳道 (東京医科大学)
植松勝之 (マリン・ワーク・ジャパン)
山口正視 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

現在地上には、核膜に包まれた核を持つ真核生物と、これを持たない原核生物の 2 つの種類のみしか生存していない。真核生物は原核生物から進化したという説が定説になっているが、その直接的証拠はない。本研究は、隔離された深海という環境で、原核生物から真核生物への進化の途上にある生物を、電子顕微鏡を用いて形態学的に探索し、進化の直接的証拠を得ようとするものである。

2010 年 5 月に、研究船「なつしま」に乗船し (NT10-08)、伊豆・小笠原諸島の明神海丘の海域および初島沖で、水深 800 ~ 1,200 メートルの海底からウロコムシやウミケムシなど多種類の小動物を採集した。試料は、船上で 1 mm 角に細切し、グルタルアルデヒドで固定した。固定した試料を研究室に持ち帰り、オスミウム後固定後エポキシ樹脂に包埋し、小動物に共生している微生物を超薄切片法で観察した。また、最初の観察で微生物が存在した試料については、サンドイッチ法による急速凍結

を行い、より自然な状態で観察した。

全部で 101 試料を観察したが、そのうちの約半数に微生物の存在を確認し、多くの細菌、古細菌、真核微生物を撮影した。微生物は非常に多様性に富み、この中には、未同定の新種が多数含まれると考えられる。また、深海微生物には、地上の微生物とは異なるユニークな形態をもつものが多く、1 枚の切片像からは生物の全体の形が想像できない。今後、連続切片法を用いて、コンピュータ上での三次元再構築により、個々の微生物の全体像をも解析していく予定である。

研究発表

原著論文

- 1) Yamaguchi M, Namiki Y, Okada H, Uematsu K, Tame A, Maruyama T, Kozuka Y: Improved preservation of fine structure of deep-sea microorganisms by freeze-substitution after glutaraldehyde fixation. J Electron Microsc 60: 283-287, 2011.

学会発表

- 1) 山口正視, 並木侑一, 岡田 仁, 植松勝之, 多米晃裕, 丸山 正, 小塚芳道: 深海微生物の微細形態と進化. ブルーアース '11 要旨集: 176, 東京, 3 月 7 日, 2011.
- 2) 井上広滋, 吉田尊雄, 山口正視, 他 21 名: 初島沖・明神海丘航海概要: 化学合成生態系構成生物の環境適応機構・共生機構・微細構造の解明をめざして. ブルーアース '11 要旨集: 185, 東京, 3 月 7 日, 2011.
- 3) 植松勝之, 多米晃裕, 山口正視, 小塚芳道, 吉田尊雄, 丸山 正: シマイシロウリガイ共生細菌の立体構造解析. ブルーアース '11 要旨集: 188, 東京, 3 月 7 日, 2011.
- 4) 植松勝之, 多米晃裕, 布浦拓郎, 吉田ゆかり, 渡部裕美, 豊福高志, 藤原義弘, 丸山 正, 北里 洋, 山口正視: 海洋生物の試料作製のノウハウ. 日本顕微鏡学会関東支部第 35 回講演会. 予稿集: 57, 東京, 3 月 5 日, 2011.
- 5) 山口正視, 並木侑一, 岡田 仁, 植松勝之, 多米晃裕, 丸山 正, 小塚芳道: 深海微生物の微細形態と進化. 日本顕微鏡学会第 67 回講演会. 顕微鏡 46, Supplement 1 (発表要旨集): 197, 福岡, 5 月 16 ~ 18 日, 2011.

- 6) 山口正視, 並木侑一, 岡田 仁, 植松勝之, 多米晃裕, 丸山 正, 小塚芳道: 深海で発見! カモメの3兄弟 (写真コンクール). 日本顕微鏡学会第 67 回講演会. 顕微鏡 46, Supplement 1 (発表要旨集): 270, 福岡, 5月16~18日, 2011.
- 7) 植松勝之, 多米晃裕, 山口正視, 小塚芳道, 吉田尊雄, 丸山 正: シマイシロウリガイ共生細菌の立体構造解析. 日本顕微鏡学会第 67 回講演会. 顕微鏡 46, Supplement 1 (発表要旨集): 135, 福岡, 5月16~18日, 2011.
- 8) 植松勝之, 多米晃裕, 布浦拓郎, 吉田ゆかり, 渡部裕美, 豊福高志, 藤原義弘, 丸山 正, 北里 洋, 山口正視: 海洋生物の試料作製のノウハウ. 日本顕微鏡学会第 67 回講演会. 顕微鏡 46, Supplement 1 (発表要旨集): 74, 福岡, 5月16~18日, 2011.

研究課題 '10-30

線虫を宿主とした時の病原性真菌 *C. glabrata* の局在と機能解析

水野貴之 (徳島文理大学 工学研究科ナノ物質工学専攻)

山口正視 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

C. glabrata が発症前に, 宿主に常在化している状態に着目し, 常在あるいは発症に必要な機構の解析を行っているが, 新しい解析用宿主として線虫を用いた実験系を開発した. 経口投与した線虫の体内で常在化すること, また, 線虫の生育温度によって, 20℃では菌数は一匹あたり 10 個程度で定常化するが, 25℃では, 100 倍以上に増加することが線虫を溶菌することによって明らかとなった. また, 線虫は表皮が透明なことから体内の観察が可能である. 線虫を溶菌することなく AO 染色法により可視化することも可能となった. 現在, 線虫体内での局在と増殖の様子について観察準備中である.

研究業績

学会発表

- 1) 谷岡拓弥, 前田淳史, 文谷政憲, 中山浩伸, 山口

正視, 知花博治, 水野貴之: 線虫を用いた *Candida glabrata* の感染機構の解析~スクリーニング系の構築. 第 28 回イーストワークショップ 2010. 11.

- 2) 河野勇弥, 前田淳史, 文谷政憲, 中山浩伸, 山口正視, 知花博治, 水野貴之: 生物農薬を目指した線虫内物質生産系の構築. 第 28 回イーストワークショップ 2010. 11.
- 3) 大岩嵩裕, 谷岡拓弥, 河野勇弥, 前田淳史, 文谷政憲, 中山浩伸, 知花博治, 山口正視, 水野貴之: 線虫を宿主とした真菌感染症解析系の構築. 第 9 回感染症沖縄フォーラム 2011. 2.
- 4) 大岩嵩裕, 前田淳史, 文谷政憲, 中山浩伸, 知花博治, 山口正視, 水野貴之: 病原微生物 *C. glabrata*: 医学的解析と産業的利用. 第 44 回酵母遺伝学フォーラム 2011. 9.
- 5) 大岩嵩裕, 前田淳史, 文谷政憲, 中山浩伸, 知花博治, 山口正視, 水野貴之: 線虫を宿主とした. 真菌感染症解析系の構築 ~病原性酵母は敵か味方か?. 第 7 回真菌分子細胞研究会 2011. 11.

研究課題 '10-31

Candida glabrata 遺伝子組換え株の細胞壁マンナンの構造への影響

大川喜男・柴田信之・小河朝子

(東北薬科大学感染生体防御学)

知花博治 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

Candida glabrata は *non-albicans Candida* による感染症の原因菌の 1 つとして, 近年 *Candida* 血症患者からの検出頻度が高まっている. *C. glabrata* の病原性は *C. albicans* と比較して低いにも関わらず, 臨床での抗真菌剤耐性菌の出現頻度の高いことが知られている. そこで本菌の細胞壁糖鎖部分の生合成に関与する各種の遺伝子欠損株について, 菌体の性質および細胞壁マンナン構造の変化を解析した.

C. glabrata の各種変異株を酵母エキス加サブロー培地で培養し, 多糖は菌体熱水抽出物より Cetavlon 法により分離した. マンナンタンパク質の構造はアセトリシ

ス分解, 部分酸加水分解, β -脱離反応, 600 MHz NMR スペクトル解析により行った. 菌体の性質は, 浸透圧ストレス (NaCl), 酸化ストレス (H_2O_2), 細胞壁ストレス (Calcofluor white, Congo red), 抗真菌剤 (Itraconazol, Micafungin) 感受性をスポットテストで評価した.

$\Delta mnn10$, $\Delta mnn11$, および $\Delta hoc1$ 株 (いずれも α -1,6-mannosyltransferase 欠損) のマンナンは野生株と比較して NMR スペクトルに変化はなかったが, 分子量の低下がみられた. $\Delta mnn2$ 株 (α -1,2-mannosyltransferase 欠損) のマンナンは側鎖の全く存在しない α -1,6-結合マンノースからなる直鎖構造に変化しており, 分子量はさらに低下していた. $\Delta alg6$ 株 (α -1,3-glucosyltransferase 欠損) および $\Delta gtb1$ 株 (α -1,3-glucosidase II β subunit 欠損) は, 小胞体における N-結合型糖鎖の初期の生合成過程で形成される Glc3Man9GlcNAc2 の代謝に関与する欠損株であるが, マンナンの構造に変化は見られなかった. しかし, $\Delta alg6$ ではいくつかの薬剤 (Calcofluor white, Congo red, SDS 等) に対する感受性が野生株と比較して大きく上昇していた. これはこの遺伝子変異が細胞壁の構築に影響を及ぼしているためと考えられる.

学会発表等

- 1) 高橋静香, 柴田信之, 三浦貴子, 知花博治, 大川喜男. 病原性真菌 *Candida glabrata* 細胞壁多糖合成酵素欠損株の性質. 第 49 回日本薬学会東北支部大会. 郡山市, 2010. 10.
- 2) 高橋静香, 柴田信之, 三浦貴子, 知花博治, 大川喜男. 病原性真菌 *Candida glabrata* 糖鎖合成酵素欠損株の性質および細胞壁の構造. 第 131 回日本薬学会. 静岡市, 2011. 3.
- 3) 柴田信之, 高橋静香, 関由理恵, 伊藤文恵, 田中大, 三浦貴子, 知花博治, 大川喜男. *Candida glabrata* 糖鎖合成酵素欠損株の性質および細胞壁の構造. 第 55 回日本医真菌学会, 東京, 2011. 10.

研究課題 '10-32

Candida glabrata ゲノムのリアノテーションと網羅的発現解析

青山俊弘 (鈴鹿工業高等専門学校・電子情報工学科)
知花博治 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

近年, さまざまな生物種のゲノムの全塩基配列を解読が行われているが, 真菌ゲノムにおいては, 2008 年にその数が 100 を超えている. ところが, ゲノムアノテーションは, *in silico* で推定されたものであり, 実験的には証明されていない. そのためエキソンやイントロン, ならびに遺伝子開始点の誤同定, アンチセンス遺伝子, 300 bp 以下の短い遺伝子の見落としが指摘されており, 品質的に不十分である.

我々は, *Candida glabrata* ゲノムのより正確な情報の提供を目標に, 6 種類の培養条件下で採取した *C. glabrata* RNA から作製した cDNA ライブラリーについて, 次世代シーケンサーを用いて塩基配列を解析し, 転写開始点のデータベースを構築した. 参照配列にマッピングされた塩基配列タグのヒストグラムから転写開始点を推定し, 下流のスタートコドンとの関係を解析したところ, 95% の塩基配列タグがスタートコドンの -100 から -1bp に含まれており, 既知のアノテーションと一致している事が分かった. 次に, 既知のアノテーションと一致しなかった転写開始点候補について, 網羅的にスタートコドンから翻訳し, 未知遺伝子の同定を行った結果, 18 の *Saccharomyces cerevisiae* ホモログが得られた. また, アミノ酸が 50 残基以上の未知遺伝子候補も得ることが出来た.

研究業績

学会発表

- 1) 中山浩伸, 青山俊弘, 上野圭吾, 知花博治: 次世代シーケンサーを用いたゲノム再アノテーション - *Candida glabrata* を用いた研究 -, 第 54 回日本医真菌学会総会シンポジウム, 真菌誌 51 (増刊 1 号): p. 51, 東京, 2010. 10. 16-17.
- 2) 青山俊弘, 上野圭吾, 中山浩伸, 知花博治: *Candida glabrata* ゲノムの再アノテーション, 第 6 回真菌分子細胞研究会, 要旨集 p. 3. 千葉, 2010. 3.