

平成 23 年度 共同利用・共同研究報告

研究課題 '11-01

病原真菌の環境応答シグナル伝達機構の解析： クリプトコックスの低酸素ストレス応答機構 を中心として

川本 進・清水公德・大楠美佐子

(千葉大学真菌医学研究センター)

Raclavsky, Vladislav (チェコ・パラツキー大学)

Sipiczki, Matthias (ハンガリー・デブレツェン大学)

関水 和久・松本 靖彦

(東京大学大学院薬学系研究科)

田村 裕 (千葉大学大学院医学研究院)

三浦 恵・園田 智子

(横浜市立大学大学院医学研究科)

畑 邦彦 (鹿児島大学大学院農学研究科)

五味勝也 (東北大学大学院農学研究科)

研究成果

生育に酸素が必須である偏性好気性病原酵母 *Cryptococcus neoformans* は肺で感染後、血流に乗って血液脳関門を越え脳髄膜へ移行して病原性を発揮して行く際、高酸素環境から低酸素環境への酸素欠乏ストレス条件に打ち勝ってはじめて増殖し、病原性を発揮して行く。我々は、本菌の細胞周期制御機構を研究中、低酸素環境条件下では細胞周期制御が flexible になるという、本菌のユニークな低酸素ストレス応答現象を見出した。そこで *Agrobacterium* を用いた、ゲノムランダム挿入遺伝子変異体ライブラリーを構築してスクリーニングし、低酸素応答遺伝子として「転写因子 A」(同定済み、但し本稿では非公開)及び「遺伝子 B」を得て、分子機能解析を進めた。更に、我々は関連して、以前に我々自身が分子クローニングして解析を進めて来た細胞周期制御機構の鍵分子、本菌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) の相互作用のバイオインフォマティクス解析を行うなど、*Cryptococcus neoformans* の細胞周期制御機構や低酸素応答機構の解

析・考察を進めた。また、低酸素関連候補遺伝子の病原性への関与を効率的に検証するため、カイコを用いた *C. neoformans* 感染モデル系の確立と抗真菌剤評価法の構築を行い、報告した。

研究発表

原著論文

英文

- 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 Commun* 416 (1-2): 217-221, 2011.
- 2) 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*. *J Appl Microbiol* 112 (1): 138-146, 2011.

学会シンポジウム・研究集会での招待講演

- 1) Kawamoto S: Towards understanding of cell cycle control in pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. The 2nd Symposium on Microbial Engineering between Kyoto University - Kyungpook National University, Daegu, Korea, June 21, 2011.
- 2) Kawamoto S: Towards understanding cell cycle regulation in medically-important pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. 2011 International Symposium & Annual Meeting of the Korean Society for Microbiology and Biotechnology "Translational Research in Microbiology and Biotechnology", Gyeongju, Korea, June 22-24, 2011.
- 3) 川本 進: 病原性出芽酵母 *Cryptococcus neoformans* 細胞周期制御機構の解明に向けて。Basic Science Joint Meeting, 千葉大学医学研究院, 千葉, 12月2日, 2011.
- 4) 川本 進: 病原性出芽酵母 *Cryptococcus neoformans* "細胞周期エンジン" の分子機能解析, 第181回酵母細胞研究会, 横浜, 12月2日, 2011.

学会発表

国際学会

- 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.
- 2) Ohkusu M, Virtudazo EV, Sato T, Shimizu K, Toe A, Yamaguchi M, Kawamoto S: *Cryptococcus neoformans* Wee1 kinase has an important role in controlling G2-M checkpoint. International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Sapporo Congress, Sapporo, September 6-10, 2011.
- 3) Kawamoto S, Virtudazo EV, Suganami A, Ohkusu M, Tamura Y: Towards understanding cell cycle control in *Cryptococcus neoformans*: Structure-function relationship of G1 and G1/S cyclins homologue CnClm1. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM 2012), Berlin, Germany, June 11-15, 2012.

国内学会

- 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.
- 2) Kawamoto S, Virtudazo EV, Suganami A, Tamura M: Study on cell cycle control mechanism in pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*: Structure-function relationship of G1 and G1/S cyclins homologue CnClm1. 第85回日本生化学会大会, 福岡, 12月21～24日, 2012.

その他

- 1) 佐藤隆文 (指導教授: 川本 進): 「病原真菌 *Cryptococcus neoformans* における低酸素応答関連因子の探索とその機能解析」, 千葉大学大学院 医学薬学府 医学領域 医科学修士課程 修士論文 (2013年3月修士論文 発表予定).
- 2) 松本靖彦, 上野圭吾, 清水公德, 金城雄樹, 知花博治, 川本 進, 関水 and 久: カイコを用いた真菌感

染症研究. 第86回日本細菌学会総会ワークショップ「真菌症研究のニューフロンティア」, 千葉, 3月18～20日, 2013. (2013年3月 国内学会 招待講演 発表予定).

- 3) Kawamoto S, Virtudazo EV, Suganami A, Tamura M: Cell cycle regulation mechanism in pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*: Structure-function relationship of G1 and G1/S cyclins homologue CnClm1. 2013 Annual Meeting of American Society for Biochemistry and Molecular Biology (Experimental Biology 2013), Boston, Massachusetts, USA, Apr. 20-24, 2013. (2013年4月 国際学会 発表予定)

課題番号 '11-02

カンジダ・グラブラータ遺伝子組換えライブラリーと次世代シーケンサーを用いた病原因子のスクリーニング

知花博治 (千葉大学真菌医学研究センター)

青山俊弘 (鈴鹿工業高等専門学校)

長 環・永尾潤一 (福岡歯科大学)

研究成果

カンジダ属 (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* など) は, 表皮, 粘膜, 口腔, 食道, 腸, 肛門など人体の様々な部位に常在する真菌であり, 易感染状態の患者では, 腸管粘膜より侵襲し, 重篤な全身感染症を起す. 我々はこの感染成立過程に関与する遺伝子を解析することより感染現象を理解する道筋が得られると考えている. そこで, 病原性カンジダ属菌種の中で実験的な取扱いが最も容易なカンジダ・グラブラータを用いて, 体系的な遺伝子組換え体ライブラリー構築し, これを用いて病原性に関する遺伝子解析を進めた. カンジダの感染では, 感染に先立ち腸管粘膜への付着と増殖が必要であるが, 低糖状態である腸管粘膜上での栄養源が不明であった. そこで, 我々は遺伝子組換え体ライブラリーの中から乳酸と酢酸の代謝に関与する遺伝子について着目し, その欠損株についてマウスを用いた腸管定着実験を試みた. その結果, 乳酸の資化性に必須である Cyb2p (乳酸脱水素酵素) が, 腸管定着のために必要な因子である

ことが見出され、カンジダグラブラータは腸管に定着するために乳酸を資化していることが示された。

今後は多数の組換え体を同時に解析する手法、すなわりハイスループット化を計る必要性がある。次世代シーケンサーのデータ解析技術の取得や、そのための予備実験として 100 種類の組換え体を混合し、ゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いスクリーニングすることによって組換え体の個体数比を算出する技術を開発中である。

研究業績

- 1) Ueno K, Matsumoto Y, Uno J, Sasamoto K, Sekimizu K, Kinjo Y, Chibana H: Intestinal resident yeast *Candida glabrata* requires Cyb2p-mediated lactate assimilation to adapt in mouse intestine. PLoS One. 6(9): e24759. 2011.

(招待講演)

- 1) 知花博治, 笹本 要, 上野圭吾, 三谷宏樹, 青山俊弘, 大野道代, 中山浩伸, 宇野 潤: *Candida glabrata* の網羅的遺伝子破壊により得られた知見. 第 32 回関東医真菌懇話会 ランチョンセミナー. 東京. 5 月 21 日, 2011.

受賞

- 1) 第 55 回日本医真菌学会学術集会ポスター賞 (代表): 知花博治, 上野圭吾, 青山俊弘, 中山浩伸, 宇野 潤: 病原因子のデータベース構築をめざした *Candida glabrata* の体系的遺伝子組換え体ライブラリーの作製. 2011 年 10 月 22 日.

一般発表

- 1) 大野道代, 青山俊弘, 中山浩伸, 照屋盛実, 塚原正俊, 知花博治: 次世代シーケンサー SOLiD を用いたゲノム解析, 第 7 回真菌分子細胞研究会 要旨集 p.7, さぬき市, 11 月 13 ~ 14 日, 2011.
- 2) 中山浩伸, 青山俊弘, 上野圭吾, 知花博治: *Candida glabrata* 遺伝子の転写開始点の解析, 第 7 回真菌分子細胞研究会 要旨集 p.17, さぬき市, 11 月 13 ~ 14 日, 2011.

研究課題 '11-03

カンジダ属のキャディン系抗真菌薬耐性化機構の研究

田辺公一 (国立感染症研究所・生物活性物質部)

知花博治 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

キャンディン系抗真菌薬ミカファンギン (MCFG) は 2002 年に国内で上市され、深在性真菌症治療の第一選択薬になりつつあるが、諸外国では既に耐性株の出現が報告されている。ミカファンギンの標的タンパクは β -1,3 グルカン合成酵素である。カンジダグラブラータの FksP をコードする遺伝子には *FKSI* と *FKS2* が存在し、両遺伝子のどちらか一方の単独欠損株を作製し感受性を調べたところ、ミカファンギンの感受性に変化は確認されなかった。一方、ミカファンギンに耐性化した臨床分離株について両遺伝子の DNA 塩基配列内を決定したところ、*FKSI* 内のホットスポット突然変異と *FKS2* の終止コドンに変異があることを見出した。これらの変異を付与した遺伝子を導入したところ、臨床分離株と同様に耐性化が確認された。

また、真菌医学研究センター保存菌株のうち、深部臓器への感染が疑われる *Candida glabrata* 18 株について薬剤感受性試験を行ったところ、2 株は耐性株 (MIC 4 μ g/ml 以上) であった。これらは、2009 年以降に分離されたものであり、*FKSI* にこれまでに報告されていない遺伝子変異が認められた。

研究業績

論文

- 1) Niimi K, Woods MA, Maki K, Nakayama H, Hatakenaka K, Chibana H, Ikeda F, Ueno K, Niimi M, Cannon RD, Monk BC: Reconstitution of high-level micafungin resistance detected in a clinical isolate of *Candida glabrata* identifies functional homozygosity in glucan synthase gene expression. J Antimicrob Chemother. 67(7). 1666-76, 2012.

学会発表

- 1) Tanabe K, Ohno H, Umeyama T, Yamagoe S, Chibana H, Miyazaki Y: Genetic analysis of echinocandin-

resistant *Candida glabrata* isolated in Japan. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM 2012), Berlin, Germany, June 11-15, 2012.

- 2) 田辺公一, 大野秀明, 梅山 隆, 山越 智, 知花博治, 宮崎義継: 病原性真菌キャンディン耐性 *Candida glabrata* 株の遺伝子解析. 真菌症フォーラム, 東京, 2月, 2012.

研究課題 '11-04

真菌感染防御における IL-17 産生機構に関する研究

岩倉洋一郎

(東京大学医科学研究所・システム疾患モデル研究センター・細胞機能研究分野)

西城 忍 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

IL-17A は主に活性化 CD4⁺T 細胞から産生され, 細胞外寄生菌に対する感染防御や自己免疫疾患の発症において中心的な役割を担っている. この IL-17 産生性 CD4⁺T 細胞は, 新しい T 細胞サブセットとして Th17 と名付けられた. In vitro では, TGF- β と IL-6 によって Th17 の分化誘導が可能であることが知られていたが, 申請者らは, マウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を *Candida albicans* (*C. albicans*) で刺激し, その培養上清が naïve T 細胞を Th17 細胞に分化させることを見出した. 一方, IL-17A ノックアウトマウスに *C. albicans* を感染させると野生型 (WT) マウスと比較し生存率が有意に低下することを明らかにした. しかし最近, CD4⁺細胞以外にも IL-17 を産生する細胞が見出され, Th17 と他の IL-17 産生細胞との機能の違いが注目されている.

そこで, マウスに *C. albicans* を感染させ IL-17 の産生細胞等を解析したところ, *C. albicans* の感染に伴い, CD4⁺T 細胞からの IL-17 産生が増加するとともに, CD4⁺T 細胞以外の細胞でも IL-17 産生が増加することが確認された. 今後は, ノックアウトマウスやノックインマウスと細胞移植の系などを組み合わせ, どの細胞種が感染防御に重要な役割を担っているのかを明らかにする予定

である.

研究発表

論文

- 1) Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S: Functional Specialization of Interleukin-17 family members. *Immunity* 34: 149-162. 2011.

研究課題 '11-05

真菌性肺炎の発症機序の解明

中江 進

(東京大学医科学研究所・システム疾患モデル研究センター・システムズバイオロジー研究分野)

新江 賢 (杏林大学保健学部・免疫学教室)

西城 忍 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

気道や腸管上皮, また, 皮膚表皮では, 細胞と細胞の間が様々な接着分子を介して連結され (tight junction), 外来抗原の侵入を防いでいる. その tight junction の破壊に, 外来および内在性の protease が関与していることが示されつつある. したがって, 真菌 *Aspergillus* による肺炎は, *Aspergillus* 自体の感染による免疫応答だけでなく, *Aspergillus* が産生する protease による宿主の気道上皮の破壊が発症及び症状の重症化に関わっている可能性が強く示唆される. 実際に, マウスに *Aspergillus* 由来の protease を吸入させると, 組織破壊と好中球の浸潤を伴う強い気道炎症が認められた. さらに, 各種欠損マウスを用いた結果, *Aspergillus* protease による好中球性気道炎症は, T 細胞, B 細胞, NKT 細胞, マスト細胞非依存的であることが明らかになった. また, この *Aspergillus* protease による好中球性気道炎症は IL-6 および TNF 欠損マウスでも野生型マウスと同レベルで観察され, IL-6, TNF 以外に好中球の浸潤を誘導するサイトカインなどの関与が示唆された.

研究課題 '11-06

接合菌症の簡易診断法開発に向けた抗原検索の研究

宮崎義継・大野秀明・山越 智

(国立感染症研究所)

掛屋 弘 (長崎大学大学院感染免疫学講座)

亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

成果概要

背景. 接合菌症は診断法・治療法が事実上ないに等しい状況である. そこで, 接合菌症として頻度が高いものの一つであるリゾプス属の簡易診断法構築を目的として, 当該真菌の細胞表面に存在する, あるいは, 真菌細胞外に分泌されるペプチドを検出した. 本研究では, 発現量の多かったペプチドに関して機能の解析と, これを検出することによる診断応用の可能性を検証した.

成果. 23kDa 蛋白と 46kDa 蛋白質をコードする遺伝子をクローン化し, tag によるペプチドの精製を可能とした. ペプチドの機能は一次構造からは推定不可能であったが, 二つの蛋白質が, ①他の *Rhizopus oryzae* 株も当該遺伝子を保有していることを臨床分離株で確認した. ②当該遺伝子を *Saccharomyces cerevisiae* に導入し, 当該蛋白質は両蛋白質とともに培養上清中に分泌されることを, 抗 tag 抗体により確認した. ③接合菌における遺伝子のノックダウンやノックアウトの実験系は未確立であり, 病原性の検討はできていない.

今後の予定. 作成した当該蛋白質のモノクローナル抗体を用いて, 実験マウスの血清や尿から抗原が検出可能か否かを検証する. 検体から検出できれば, 高感度の系を作成しヒト検体で検証する.

研究課題 '11-07

新規レクチンによる抗病原真菌機能の解明と抗真菌剤の開発

館野浩章

(独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター)

五ノ井 透・大荒田素子・酒井香奈江

(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

各種病原真菌に対する生体防御分子の有力候補として糖鎖結合タンパク質・レクチンが挙げられる. 例えば, Dectin-1, MBL, DC-SIGN など C タイプレクチンが抗真菌機能を担っていることが明らかにされている. しかしそのレパートリーは完全ではなく, これら以外にも抗真菌機能を有するレクチンは多数存在していると考えられる. これまでにヒトでは約 100 種類のレクチンが同定されており, 構造的に 10 種類以上のファミリーに分類されているが, 我々がバイオインフォマティクスを援用してデータマイニングを行った結果, それをはるかに上回る数 (~500 種類) のレクチン候補遺伝子の存在が浮かび上がった. 申請者らが開発した糖鎖複合体アレイを用いて 78 種類のヒトレクチン候補分子のスクリーニングを行った結果, 高密度マンノースに結合特異性を示す新規レクチン ZG16 を発見した. 更に本レクチンが高密度マンノースに被覆されたカンジダやマラセチアなど各種ヒト病原真菌に強く結合することを明らかにした. 組織分布を調べてみると, 上部から下部の消化器系の外分泌性の細胞に局在していることが分かった. 糖鎖結合特異性と組織分布から, 本レクチンは真菌に対する防御分子として働いていると考えられた. しかし小腸上皮細胞への接着阻害や真菌の増殖抑制などの機能は見られなかった. 本レクチンの特異性や局在から考えると消化器系上皮のムチン層に局在している他の抗真菌分子と協調的に働き, 真菌の感染を阻害している可能性は高い. 本共同研究により構築した関係を足がかりに, 引き続き更なる機能解析を実施して, 抗真菌機能を明らかにしていく.

研究発表

論文発表

- 1) Tateno H, Yabe R, Sato T, Shibazaki A, Shikanai T, Gonoi T, Narimatsu H, Hirabayashi J. Human ZG16p recognizes pathogenic fungi through non-self polyvalent mannose in the digestive system. *Glycobiology* 22 (2): 210-220, 2012.
- 2) Shibazaki A, Tateno H, Akikazu A, Hirabayashi J, Gonoi T. Profiling the cell surface glycome of live fungi using lectin microarray. *Journal of Carbohydrate Chemistry* 30 (3): 147-164, 2012.

研究課題 '11-08

病原性放線菌 *Nocardia* 属細菌のゲノム解析による遺伝子情報の整備

藤田信之・山崎秀司・山副敦司・細山 哲
黄地祥子・市川夏子・小牧久幸・田村朋彦
浜田盛之

(製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター)

五ノ井 透 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

ノカルジア症の適切な抗菌薬を選択するために、正確な起炎菌の同定を行うことが重要である。このため、*Nocardia* 属の種に特異的な遺伝子を指標とした分子生物学的手法による同定法の開発が望まれている。さらに、同属は多様な生理活性物質の生産菌であることも知られているため、二次代謝産物の生合成に関わる遺伝子情報の整備が求められている。

そこで、*Nocardia* 属研究の基盤となるゲノム情報を収集するために、下記のテーマに沿って研究を実施した。

- 1) *Nocardia* 属のハウスキーピング遺伝子を指標とした新規系統分類手法の開発

本研究で新たにドラフトゲノム解析を実施した4株を含めた計 26 株の *Nocardia* 属基準株について比較ゲノム解析を実施し、26 株すべてに存在する 438 個のハウスキーピング遺伝子を特定した。26 菌種間で遺伝子ごとに配列の類似性を計算し、近隣結合法により系統樹を

作製した。その結果、従来の指標である 16S rRNA 遺伝子を用いた解析に比べ、より解像度の高い系統樹が得られた。さらに指標遺伝子の絞り込みを行い、以下 12 種 (*atpD*, *dnaJ*, *groL1*, *groL2*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *secA*, *secY*, *sodA*, *trpB*, *ycbF*) の遺伝子のうち、5 種の遺伝子を使用することで、ゲノム全体を反映した系統樹を作製できることが示唆された。

- 2) *Nocardia* 属のゲノム情報を利用した二次代謝産物の生合成遺伝子の比較解析

N. otitidiscaviarum IFM 10847, *N. asteroides* NBRC 15531^T, *N. brasiliensis* IFM 11049, *N. brasiliensis* NBRC 14402^T のゲノム配列から、代表的な二次代謝産物の生合成遺伝子である type-I polyketide synthases (PKS-Is) と nonribosomal peptide synthetases (NRPSs) を特定した。その結果、それぞれの菌株から 17 個 (IFM 10847), 22 個 (NBRC 15531), 30 個 (IFM 11049), 27 個 (NBRC 14402) の PKS-I と NRPS 遺伝子クラスターが確認された。このことから、*Nocardia* 属が創薬のための探索源として産業上有用であることがゲノム情報からも示唆された。

今後は、本共同研究により構築した関係を維持しつつ、本成果を足がかりに他の種にも解析対象を広げ、引き続き *Nocardia* 属の遺伝子基盤情報の整備を行う予定である。

研究発表

論文発表

- 1) Tamura T, Matsuzawa T, Oji S, Ichikawa N, Hosoyama A, Katsumata H, Yamazoe A, Hamada M, Suzuki K, Gonoi T, Fujita N: A genome sequence-based approach to taxonomy of the genus *Nocardia*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 102 (3): 481-91, 2012.

学会発表

- 1) Tamura T, Matsuzawa T, Ohji S, Katsusmata H, Ichikawa N, Hamada M, Suzuki K, Gonoi T and Fujita N: Taxonomic approach based on genome sequencing of the genus *Nocardia*, 国際放線菌学会 16th International Symposium on the Biology of Actinomycetes Mexico Dec. 2011.
- 2) Komaki H, Ichikawa N, Hosoyama A, Takahashi A, Matsuzawa T, Suzuki K, Fijita N and Gonoi T: A Genome-wide Analysis of Type-I Polyketide Synthase and Nonribosomal Peptide Synthase Gene Clusters in

the genus *Nocardia*, 国際放線菌学会 16th International Symposium on the Biology of Actinomycetes Mexico Dec. 2011.

- 3) 小牧久幸, 市川夏子, 細山 哲, 関根光雄, 田村朋彦, 山崎秀司, 高橋 梓, 松澤哲宏, 五ノ井 透, 鈴木健一郎, 藤田信之: Intrageneric diversity of type-I polyketide synthase genes in the genus *Nocardia* (*Nocardia* 属における I 型ポリケタイド合成酵素遺伝子の多様性, 2011 年度 (第 26 回) 日本放線菌学会大会 札幌 2011 年 9 月.

研究課題 '11-09

病原性担子菌酵母の細胞表層糖鎖の構造解析

大橋貴生・藤山和仁

(大阪大学生物工学国際交流センター)

五ノ井 透 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

病原性真菌類は他のモデル真菌類と同様に細胞表層は糖鎖からなる細胞壁で覆われており, 細胞の物理的強度, 宿主細胞への接着・侵入, 宿主の免疫応答などの感染メカニズムに深く関与していると考えられている. これらの病原性真菌類では糖鎖生合成不全変異により病原性の低下が報告されているが, 病原性担子菌酵母である *C. neoformans*, *M. furfur* および *R. mucilaginosa* においては, *C. neoformans* の夾膜多糖を除いて, ほとんど糖鎖構造解析された例がない. そこで本研究では上述の 3 種の病原性担子菌酵母より細胞表層糖鎖構造の基礎的な知見を得るために, 詳細な細胞表層糖鎖の構造解析を試みた.

各病原性担子菌酵母を培養後, ヒドラジン分解-ピリジルアミノ化法を用いて, ピリジルアミノ化糖鎖を調製後, サイズ分画 HPLC によるピリジルアミノ化糖鎖の分画, 次いで LC-MS/MS による質量分析を行った. サイズ分画 HPLC 解析により, O-結合型糖鎖に関しては各酵母とも Hex₁₋₄-PA の糖鎖の存在が明らかとなった. さらなる LC-MS/MS 解析により, *C. neoformans* においてモデル酵母では見られない特異的な糖鎖として, Hex-(Pent)-Hex-PA の糖鎖が検出された. N-結合

型糖鎖に関しては各酵母ともサイズ分画 HPLC 上にて Hex₅₋₁₁GlcNAc₂-PA の糖鎖が検出された. この結果より本病原性担子菌酵母ではモデル子囊菌酵母で見られるハイパーマンノシレーション糖鎖が付加しない事が示唆された. これらの情報を元に将来的には糖鎖生合成関連酵素遺伝子の同定, 本酵素の阻害剤の探索の効率化が達成され, 効果的な抗真菌剤の開発へと発展することが期待される.

研究業績

学会発表

- 1) 大橋貴生, 酒井香奈江, 五ノ井 透, 藤山和仁: 病原性担子菌酵母 *Cryptococcus neoformans*, *Malassezia furfur*, *Rhodotorula mucilaginosa* の糖鎖構造解析. 日本農芸化学会 2012 年度大会. 3 月 22 ~ 26 日, 2012.

研究課題 '11-10

日和見真菌症原因菌 *Aspergillus* section *Nigri* の感染性とマイコトキシン産生性

横山耕治 (真菌医学研究センター)

久米田裕子・坂田淳子 (大阪府公衆衛生研究所)

浅野勝佳・陰地義樹

(奈良県保健環境研究センター)

田端節子・千葉隆司

(東京都健康安全研究センター)

川上裕司・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)

渡辺麻衣子・高橋治男 (国立医薬品衛生研究所)

橋本ルイコ (千葉県衛生研究所)

研究成果

実用黒麹菌 (10 株) を含めた *Aspergillus niger* ならびにその近縁菌, 40 株について, マイコトキシンであるフモニシンとオクラトキシン産生と遺伝子型の類別を検討した. まず, 培地としては, 製麹を想定した白米培地での産生性をみたところ, IFO 保存株を含めた約 20% の株にフモニシン B2 の産生がみられた. 遺伝子解析の結果は, いずれの産生株も, 特定の遺伝子型 (D5-1) に属し,

また、オクラトキシン産生能を有した株群も全く同一の遺伝子型に属することを示した。

コメ培地で、オクラトキシン産生も認められることから、両マイコトキシンの産生能を有する株では、コメ培地中に、いずれのマイコトキシンも産生される可能性があるかと推定された。

一方、実際に醸造などに用いられている実用麹菌も、特定の遺伝子型（D9-1 など）に集中したが、これまでの結果では、明らかにマイコトキシンを産生する菌群とは遺伝子型が異なることを示した。

また、フモニシンの生合成に欠かせない遺伝子とされる Fum8 遺伝子検出を試みたところ、フモニシン産生の認められた遺伝子型に属した株では、明らかに陽性反応が認められ、概ねフモニシン産生との相関性も認められた。

A. niger の中で、オクラトキシン、フモニシンを産生する株の病原性を調べたところ、マウス肺感染モデルにおいて、感染性のあることが確認された。しかし、トキシンの産生性とのかかわりに関しては、今後の課題として残された。

以上の結果から、実用麹菌は、*Aspergillus niger* と系統的に異なり、マイコトキシン産生性をも有しない可能性も示唆した。

また、今年度は、沖縄などにおける黒麹菌の収集を行っている（株）トロピカルテクノセンター（TTC）共同研究契約（資料添付）を結び、黒麹菌の安全性確立のための研究を推進する体制を整えた。

研究発表

学会発表

1) Yokoyama K, Liu Y, Wang L, Kumeda Y, Hashimoto R, Takahashi H.: DNA typing and SEM observation of conidial wall of black-koji molds *Aspergillus section Nigri*. International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress, September 9, 2011, Sapporo

(Poster Presentation).

- 2) Takahashi H, Hashimoto R., Onji Y, Asano K, Takino M, Tabata S, Yokoyama K.: Mycotoxin production and DNA typing of *Aspergillus niger* and related species including black-koji molds. International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress, September 9, 2011, Sapporo (Poster Presentation).
- 3) 陰地義樹, 橋本ルイコ, 浅野勝佳, 滝埜昌彦, 各務清美, 田端節子, 久米田裕子, 横山耕治, 高橋治男: *Aspergillus niger* および亜その近接種のフモニシン産生. 日本マイコトキシン学会第 69 回学術講演会, 2011 年 1 月 7 日, タワーホール船堀.
- 4) 横山耕治: 黒麹菌の遺伝子分類とマイコトキシン産生. 第 27 回焼酎研究会, 6 月 22 日, 2012. 浅野勝佳, 渡嘉敷唯章, 廣瀬 (安元) 美奈, 高良 亮, 豊里哲也, 吉野 敦, 池端真美, 陰地義樹, 橋本ルイコ, 劉 瑩, 横山耕治, 高橋治男: 黒麹菌のマイコトキシン産生について. 日本マイコトキシン学会第 70 回学術講演会, タワーホール船堀, 1 月 6 日, 2012.
- 5) 川上裕司, 橋本一浩, 橋本ルイコ, 浅野勝佳, 陰地義樹, 横山耕治, 高橋治男: 沖縄県泡盛醸造工場内における section *Nigri* の調査と mycotoxin 産生能. 日本マイコトキシン学会第 71 回学術講演会. 沖縄県市町村自治会館ホール, 7 月 6 日, 2012.
- 6) 中川博之, 佐合由紀, 橋本ルイコ, 清水公徳, 小西良子, 高橋治男, 横山耕治: 国産ワインにおける *Aspergillus niger* 産生マイコトキシンの分析. 日本マイコトキシン学会第 71 回学術講演会. 沖縄県市町村自治会館ホール, 7 月 6 日, 2012.
- 7) 橋本ルイコ, 陰地義樹, 浅野勝佳, 中川博之, 横山耕治, 高橋治男: ベトナム産コーヒー豆から分離された Section *Nigri* とそのカビ毒産生性. 日本マイコトキシン学会第 71 回学術講演会. 沖縄県市町村自治会館ホール, 7 月 6 日, 2012.