

ANNUAL REPORT OF
MEDICAL MYCOLOGY
RESEARCH CENTER (MMRC)
CHIBA UNIVERSITY 2007

11

千葉大学
真菌医学研究センター報告

平成19年

目 次

はじめに	
病原真菌研究部門 真菌感染分野	3
病原真菌研究部門 系統・化学分野	13
病原真菌研究部門 真菌資源開発分野	20
病原真菌研究部門 生態分野	25
分子機能研究部門 機能形態分野	29
分子機能研究部門 高分子活性分野	37
分子機能研究部門 活性応答分野	48
病原真菌・放線菌管理室（微生物保存事業報告）	49
Review Article（生態分野）	
Wang Li: Excretion Protein Gene of Fungi for Multidrug Resistance	54
Review Article（活性応答分野）	
菊地 護: しょうゆ黄麹菌の育種 ～古くて新しい古典育種～	57
平成 19 年度共同利用研究・共同利用研究会一覧	63
平成 18 年度共同利用研究報告	67
平成 19 年度共同利用研究会報告	103
第 21 回千葉大学真菌医学研究センター講習会	106
第 3 回千葉大学真菌医学研究センター外国人講習会	107
第 3 回千葉大学真菌医学研究センター公開市民講座	108
講演会（第 105 回～第 113 回）	109
2007 真菌医学研究センター報告会	110
真菌医学研究センター 2007 年度ベスト論文賞	111

はじめに

地球温暖化やバイオ燃料など、我々の周りには次々と解決を求められている地球規模の課題が出てきており、研究者には、大きく言えば人類の存亡をかけての新たな対応が求められることになります。地球の温暖化はまた、新たな感染症の増加にも繋がる可能性があります。

平成 20 年度には、燃料費の高騰が直接研究費の配分にも影響するようになってくることも予想されますが、我々はこれらの問題にも関わらず、真菌医学研究センター（真菌センター）の使命に基づいて、社会に貢献する研究を推進することが必要です。

国立大学が平成 16 年 4 月に法人化してから 3 年が経過し、平成 20 年 4 月から 5 年目に入ります。法人化後は、真菌センターも大学の中期目標と中期計画、さらには全国共同利用施設として、内外の研究者との共同研究や教育研究活動及び地域貢献を通して、大学法人としての理念と使命に基づいて活動しています。これらの目標や計画の進捗に関する業績評価は、“暫定評価”とはなっていますが、実質的には平成 19 年度の 4 年目までの業績が評価の対象となることから、真菌センターにおいても、亀井教授を中心に評価に向けた資料の作成等をしており、最終的には平成 20 年 6 月に提出することになります。

千葉大学では国立大学法人化後の改革の一環として、全国共同利用施設を含めて全ての附属のセンターは、2007 年迄に外部評価を受けることになり、この方針に基づき真菌センターには、研究担当の天野 洋理事が中心となった外部評価委員会が設置されました。大学主導の外部評価委員会は、評価委員長として元国立感染症研究所長 竹田美文先生、評価委員としては、長崎大学熱帯医学研究所長 青木克己教授、筑波大学大学院生命環境科学研究科 柿畷 眞教授（日本菌学会会長）、帝京大学医学部皮膚科 渡辺晋一教授（日本医真菌学会理事長）、国立感染症研究所生物活性物質部 上原至雅部長がそれぞれ委嘱されました。各先生には、事前に膨大な評価に関する資料を送って検討していただくと共に、平成 19 年 3 月 7 日に真菌センターの会議室にて評価委員会が開催されました。評価委員会には、天野 洋理事や徳久剛史副理事（研究推進・外部資金・COE 担当）にも出席していただきました。

評価委員会で出された評価について、竹田委員長からは総合評価と提言を、また各委員の先生からは総評も含めたそれぞれの項目ごとにご意見をいただき、最終的には竹田委員長と各委員の了解を得て、『外部評価報告書 2007』としてまとめて外部に公開しました。

真菌センターは、これまで設立の理念と目標に基づいて、輸入真菌症や新興・再興真菌感染症、さらにバイオテロに対応すべく新しい同定および診断法、さらには治療法の開発、優れた抗真菌剤の開発研究等、日本における真菌感染症の先導的な研究を進め、社会貢献を果たしてきたつもりです。この評価報告書では、真菌センターが国内唯一の真菌のみを研究対象とした研究機関であり多くの優れた研究成果を挙げてきたことに対して評価していただきましたが、真菌センターの研究者一人一人が「時代が求めている真菌感染症研究を視野の中心に据えることを真剣に考えずに、従来の研究の流れの中で出てくる真菌感染症研究に満足していたのではないか」と厳しい指摘もいただきました。

このような指摘に対して、一人一人の努力がまだ足りないことを再度認識して、真摯に応える必要があります。そのため既に出ている改組案については、対応する組織として、組織・機能改善委員会を新たにセンター内に立ち上げてその中で検討しており、新しい理念や目標に基づく体制を構築して全国共同利用施設としての使命を果たしていきます。

真菌センターは、平成 14 年に国家プロジェクトのナショナルバイオリソースプロジェクト（National BioResource Project, NBRP）で病原微生物の中核機関に選定され、サブ機関の長崎大学熱帯医学研究所、東京大学医

科学研究所、大阪大学微生物病研究所、岐阜大学大学院医学研究院、理化学研究所バイオリソースセンターと共同して、感染症を中心としたライフサイエンス研究に必須な病原微生物資源の収集・保存・提供の5年間の事業を進めてきました。この5年間の事業が評価されたことから、平成19年に再度中核機関に認定され、これから5年間、2010年に世界最高水準の生物資源を確立することを目指して、新しいスタートをすることになりました。

真菌センターは、例年通り医療関係者を対象として高度病原真菌・放線菌の取り扱いに関する講習会を開催しています。19年度は、山口准教授が担当して、無事終了することができました。日本人を対象としての講習会の後に、アジアの医療関係者を対象とした講習会を開催しました。ベトナム、中国、タイ国の6名の関係者が参加しての講習会でありましたが、名誉教授の西村先生にもお願いして無事に終了することができました。その後、中国を訪問してみると、講習会で習ったことがらを実習生が帰国後に教室員に教えている姿をみて、真菌センターの関係者の努力が窺っているとの認識を新たに持ちました。

科学技術振興調整費「真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成」事業は、2年目を迎え、中国の吉林大学白求恩医学院、北京医科大学第一医院、貴陽医科大学、中山大学附属第二医院、新疆医科大学を担当者が共同研究のため訪問し、さらに関係者との打ち合わせを行いました。それらの訪問は現地の大学のホームページに掲載されなど、中国側の関心の高さがうかがえました。特に福島先生には、退職後も関わらずセンター長の代理として新疆医科大学や中山大学へ行っていただくなど、ご協力をいただきました。

平成19年には、チェコ共和国のパラツキー大学医学歯学部との部局間交流協定が締結されました。東欧の国々との部局間交流協定は、千葉大学においても少なく、将来は大学間交流協定への発展や研究者の交流や共同研究がさらに活発になることが期待されています。協定は、11月26日にチェコ共和国のオロモーツにあるパラツキー大学医学歯学部で、川本教授がセンター長代理で出席して調印されました。

人事面では西村教授の後任として、五ノ井 透講師が系統・化学分野の教授に昇任しました。活性応答分野の客員教授には、キッコマン醤油（株）研究所の菊地 護先生が、また生態分野の外国人客員教授には、中国吉林大学基礎医学院の王 麗教授とブラジルカンピーナス大学医学部感染症科のMaria Luiza Moretti教授が着任されて研究・教育に参加していただきました。運営費の削減が続くなか、定員削減のため公募が出来ない選考は、センターのこれまでの伝統を破るものであり、選考委員会でも活発に議論されましたが、現状を考えた場合は他の道はないとの結論でした。また、18年度に退職された福島教授のあとの定員が1名削減の対象となり、さらに今後の定年退職教員の後任人事は凍結の対象となっています。外部評価委員会は、センターの発展には定員削減を超えた人事の配備が必要であることを提言しています。真菌センターもこれらの外部の貴重な意見を基に新しい改組案を早急に作成し、大学当局に提案すると同時に、研究者コミュニティの支援も得て、世界的にも評価されるセンターとなるよう教職員一同頑張っていきますので、今後ご支援の程宜しくお願い致します。

平成19年12月

千葉大学真菌医学研究センター長

三 上 襄

病原真菌研究部門 真菌感染分野

(Department of Pathogenic Fungi, Division of Fungal Infection)

教授：亀井克彦

- 学内委員 国際教育開発センター連絡協議会委員，研究用微生物安全管理委員会委員，国際展開企画室国際交流連絡会委員，医学薬学府大学院教育委員会委員，亥鼻地区防災対策本部設置準備委員会委員，附属病院 ICT 委員会委員，亥鼻地区安全衛生委員会委員（安全衛生管理者），真菌医学研究センター安全衛生管理者・作業主任者
- センター内委員 運営協議会委員，教員会議委員，総務委員会委員，共同利用委員会委員長，微生物・保存管理施設運営委員会委員長，自己点検・評価委員会委員，倫理審査委員会副委員長，組織・機能改善委員会委員長，研究推進チームメンバー，研究部門連絡会委員，個人評価 WG 委員長，市民相談等対応グループメンバー
- 学協会への貢献 日本医真菌学会評議員・学術集会委員，日本感染症学会編集委員・評議員，日本化学療法学会抗真菌薬臨床評価委員（呼吸器系）・深在性真菌症に対する抗真菌剤の適正使用等のガイドライン作成委員，Mycopathologia 編集委員，Journal of Infection and Chemotherapy 編集委員，真菌症フォーラム幹事，関東深在性真菌症研究会世話人，肺真菌症研究会幹事，関東医真菌懇話会幹事，千葉真菌症研究会世話人，深在性真菌症ガイドライン作成委員会世話人，Advances Against Aspergillosis Scientific Committee & Faculty
- 所属学会 日本内科学会，日本呼吸器学会，日本医真菌学会，日本感染症学会，日本化学療法学会，日本細菌学会，日本臨床微生物学会，日本環境感染学会，日本防菌防黴学会，International Society for Human and Animal Mycology，American Society for Microbiology
- 受賞 分担：地区会長賞：村田佳輝，井上敬子，武藤信吾，林 大輔，熊谷 肇，高橋英雄，高山明子，鎗田響子，亀井克彦，佐野文子：小動物における消化器穿孔に伴った真菌性腹膜炎の2症例。平成19年度関東・東京地区獣医師会連合会大会，日本小動物獣医学会，p.71，東京，2007. 9. 2.

- その他 福島県立医科大学非常勤講師，岡山大学非常勤講師，東京医科大学兼任教授，千葉大学発ベンチャー株式会社ファーストラボラトリーズ顧問，ヤンセンファーマ株式会社 イトラコナゾール内用液臨床試験に係る効果安全性評価委員，ヤンセンファーマ株式会社 製造販売後調査に係る医学専門家

准教授：佐野文子

- センター内委員 教員会議委員，総務委員会委員，共同利用委員会委員，微生物・保存管理施設運営委員会委員，広報委員会委員，自己点検・評価委員会委員，地域連携委員会委員，将来計画委員会委員，実験動物 WG，市民相談等対応グループメンバー，光熱水料節減プロジェクト WG 委員
- 学協会への貢献 日本医真菌学会評議員
- 国および地方公共団体への貢献 内閣府食品安全委員会専門調査会専門委員（9月まで），千葉県獣医師会感染症研究委員会委員
- 所属学会 日本医真菌学会，日本菌学会，日本感染症学会，日本熱帯医学会，獣疫学会，人と動物の共通感染症研究会，日本臨床微生物学会，日本細菌学会，狂犬病臨床研究会，International Society for Human and Animal Mycology
- 受賞 分担：地区会長賞：村田佳輝，井上敬子，武藤信吾，林 大輔，熊谷 肇，高橋英雄，高山明子，鎗田響子，亀井克彦，佐野文子：小動物における消化器穿孔に伴った真菌性腹膜炎の2症例。平成19年度関東・東京地区獣医師会連合会大会，日本小動物獣医学会，p.71，東京，2007. 9. 2.

助教：栗田啓幸

- センター内委員 有害廃棄物委員
- 学協会への貢献 日本医真菌学会評議員
- 所属学会 日本医真菌学会，日本農芸化学会

助教：大荒田素子

- 学内委員 セクシャルハラスメント防止委員会委員
- 学外委員 生体パーオキシド研究会幹事
- センター内委員 共用備品委員，防災対策委員，放射

線同位元素委員, 光熱水料節減プロジェクト WG 委員

○所属学会 日本農芸化学会, 日本栄養・食糧学会, 日本食品免疫学会, 日本油化学会

助教 (兼任): 渡辺 哲

○学内委員 附属病院 ICT 委員, 附属病院病院感染管理委員, 附属病院保険委員, 附属病院ベッドマネージャー委員

○所属学会 日本内科学会, 日本呼吸器学会, 日本感染症学会, 日本医真菌学会, 日本細菌学会, 日本結核病学会

○学協会への貢献 千葉真菌症研究会世話人, 千葉真菌症カンファレンス世話人

○その他 千葉大学医学部附属病院感染症管理治療部助教, 病棟医長

技術職員 (大学院医学薬学府修士課程 ~ 2007. 3): 鎗田響子

非常勤講師: 多部田弘士 (船橋市立医療センター)

非常勤講師: 高橋容子 (きさらび皮膚科クリニック)

研究機関研究員: 豊留孝仁 (2005. 6 ~)

リサーチレジデント: 落合恵理 (2006. 4 ~)

研究支援推進員: 佐藤綾香 (2003. 4 ~)

技術補佐員: 高山明子 (2005. 7 ~)

技術補佐員: 井上京子 (2006. 4 ~)

大学院医学薬学府博士課程: 永吉 優 (2006. 4 ~)

大学院医学薬学府博士課程: 村田佳輝 (2005. 4 ~)

大学院医学薬学府博士課程: 高橋英雄 (2005. 4 ~)

大学院医学薬学府修士課程: 岩崎 彩 (2007. 4 ~)

千葉大学園芸学部: 河合利春 (~ 2007. 3)

研究概要 (共同研究を含む)

1. ヒストプラズマ症における抗ヒストプラズマ抗体検出法の改良

現在市販されているヒストプラズマ症検査・診断薬では検出しているヒストプラズマ抗原は H 及び M 抗原タンパク質のみである。我々は新たな抗原候補を探索し、得られた情報を元に抗ヒストプラズマ抗体検出法を改良したいと考えている。これまでに生体内寄生形態である酵母形ヒストプラズマを材料とし、界面活性剤を用いた表層タンパク質抽出法を検討してきた。この方法により得られた抽出物に患者血清によって認識される抗原タン

パク質が複数含まれていることを確認し、さらにこれらタンパク質を質量分析法により同定を行った。これらタンパク質はヒストプラズマ症迅速診断の開発・改良に向けて有用な抗原と期待される。現在, ELISA 等への応用を試みている。

2. β -グルカン受容体 Dectin-1 による *Aspergillus fumigatus* 認識機構の解明

近年, 感染初期の自然免疫応答が注目を浴びている。細菌やウイルスでは病原体を認識する受容体について盛んに研究が行われている。しかしながら, 真菌についてはその研究は端緒についたばかりである。我々は樹状細胞株 DC2.4 細胞に *A. fumigatus* を感染させると宿主側転写因子 AP1 の活性化が惹起されることを見出した。この AP-1 活性化は *A. fumigatus* 膨化分生子において最も強く惹起された。膨化分生子表面に β -グルカンが露出されることを確認し, β -グルカン受容体 Dectin-1 が AP-1 活性化に重要と推測した。種々の実験より, Dectin-1 が *A. fumigatus* 表面の β -グルカンと会合することによって AP-1 活性化が惹起されることを明らかとし, さらに Dectin-1 細胞質ドメインで会合する Syk チロシンキナーゼが AP-1 活性化に重要であることも確認できた。また, 宿主細胞からの TNF- α 産生にも β -グルカン認識による Dectin-1/Syk/AP-1 のシグナルが重要であることを示した。

3. 黒色真菌 *Stachybotrys chartarum* の病原性に関する研究

これまでに, *Stachybotrys chartarum* の胞子を経気管的に反復投与したマウスで肺動脈壁中膜・内膜が肥厚, 狭窄し, 更に右室圧の上昇が生じることから肺高血圧症が惹起されることを確認した。本年はこの病変形成に関わる物質を検討し, 胞子のメタノール可溶性物質が関与している可能性を示す結果を得た。さらに, 病変の形成はマウスの系統によって差が生じることを明らかにした。また, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium citrinum* では, *S. chartarum* と同数の胞子を投与した場合には病変形成は認められず, 菌種により病変形成に違いがあることを明らかにした。現在, 異なる菌種による病変形成への影響やマウス系統における反応の違いを更に検討するとともに, 本病変形成機序の検討, *S. chartarum* のプライマーを用いた組織中からの本菌 DNA の検出を検討している。

4. 人獣共通真菌症に関する研究

ペット、動物園・学校飼育動物、魚介類、野生動物、産業用動物等の真菌症の症例検討、疫学、診断法の開発として、ネコを原因とした *Arthroderma vanbreuseghemii* の集団感染例の疫学、沖縄美ら海水族館で飼育されているイルカの呼気より分離された病原性酵母について環境、飼育職員との関連の分子疫学的解析、小動物臨床領域における日和見真菌症の治療法の開発、畜産領域に置ける日和見真菌症原因菌の生態などを手がけている。

5. パラコクシジオイデス症における感染防御機構に関する研究

パラコクシジオイデス症は *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) の感染により発症する中南米諸国の主要な全身性真菌症で、我国にとっては輸入真菌症の一つである。種々の温度におけるヒト白血球の Pb に対する抗菌効果を検討したところ 35.0℃から 38.5℃の間では温度が高くなるにしたがって培養5時間以内の抗菌効果が顕著に増強した。このことは、もし白血球の機能が損なわれていなければ、体温上昇（あるいは発熱）により Pb に対する感染抵抗力が顕著に増強することを示唆している。また、IFN- γ は 35.0℃から 38.5℃の範囲において、白血球の抗菌活性を増強した。glucocorticoid の一種である dexamethasone は 37.0℃あるいは 33.0℃において白血球の抗菌活性を阻害したが、38.0℃あるいは 38.5℃の高温ではこの阻害作用がみられなかった。glucocorticoid の白血球活性阻害作用にこのような温度依存性がみられることは、発熱と感染抵抗力との関連性の観点から興味深いことである。

研究成果の発表

1. 著書

- 1) 亀井克彦（分担，領域編集委員長），他 25 名：「深在性真菌症の診断・治療ガイドライン 2007」，深在性真菌症ガイドライン作成委員会編，医歯薬出版，2007。
- 2) 亀井克彦，渡辺 哲：I 深在性真菌症の疫学・環境 Q4 海外渡航者で気をつけるべき真菌症とその対策は？「改訂版 深在性真菌症 Q&A～2007 ガイドラインを踏まえて～」，医薬ジャーナル社 河野茂編，pp.18-21，2007。

- 3) 亀井克彦，渡辺 哲：輸入真菌症－コクシジオイデス症，プラストミセス症，ヒストプラズマ症，パラコクシジオイデス症，マルネツフェイ型ペニシリウム症。「病原性真菌ハンドブック」．宮治 誠編，医薬ジャーナル社，pp.132-139，2007。
- 4) 亀井克彦：真菌症－カンジダ症，クリプトコッカス症，アスペルギルス症，ムーコル症，ムコル症，輸入真菌症。「内科学第9版」，朝倉書店，pp.341-346，2007。
- 5) 宮治 誠編，佐野文子（分担）：「病原性真菌ハンドブック」12. 人獣共通真菌症 pp.157-160，医薬ジャーナル社，2007。
- 6) 河野 茂編，佐野文子（分担）：「深在性真菌症 Q&A」2007 ガイドラインをふまえて改訂版：II 病原真菌の真菌学・免疫・薬剤感受性 Q9 人獣共通の真菌症があるか？ pp.31-33，医薬ジャーナル社，2007。
- 7) 長谷川篤彦監訳，佐野文子（分担）：小動物臨床のための5分間コンサルタント診断治療ガイド：犬猫の感染症と寄生虫病。佐野文子（分担）：93章アスペルギルス症（pp.340-345），94章カンジダ症（pp.346-348），96章コクシジオイデス症（pp.354-358），103章プラストミセス症（pp.380-384），インターズー，東京，2007。

2. 原著論文

英文

- 1) Oarada M, Gonoi T, Tsuzuki T, Igarashi M, Hirasaka K, Nikawa T, Onishi Y, Toyotome T, Kamei K, Miyazawa T, Nakagawa K, Kashima M, Kurita N: Effect of dietary oils on lymphocyte immunological activity in psychologically stressed mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 71(1): 174-182, 2007. (査読有)
- 2) Murata Y, Sano A, Ueda Y, Inomata T, Takayama A, Poonwan N, Nanthawan M, Mikami Y, Miyaji M, Nishimura K, Kamei K: Molecular epidemiology of canine histoplasmosis in Japan. *Med Mycol* 45(3): 233-247, 2007. (査読有) (Faculty of 1000 Biology (<http://www.f1000biology.com>) 推薦, 2007 年度真菌センターベスト論文賞)
- 3) Sakaeyama S, Sano A, Murata Y, Kamei K, Nishimura K, Hatai K: *Lecythophora hoffmannii* isolated from a case of canine osteomyelitis in Japan. *Med Mycol* 45(3):

- 267-272, 2007. (査読有)
- 4) Higurashi H, Arai M, Watanabe A, Igari H, Seki N, Kamei K, Kuriyama T: Gene expression profiling of polymorphonuclear leukocytes treated with the culture filtrate of *Aspergillus fumigatus* and gliotoxin. *Microbiol Immunol* 54(4): 407-419, 2007. (査読有)
 - 5) Melo NR, Vilela MMS, Junior JJ, Kamei K, Miyaji M, Fukushima K, Nishimura K, Groeneveld P, Kelly SL, Taguchi H: HIV-1 anti-retroviral drug effect on the *C. albicans* hyphal growth rate by a bio-cell tracer system. *Braz J Microbiol* 37(3): 223-227, 2006. (査読有)
 - 6) Yarita K, Sano A, Murata Y, Takayama A, Takahashi Y, Takahashi H, Yaguchi T, Ohori A, Kamei K, Miyaji M, Nishimura K: Pathogenicity of *Ochroconis gallopava* isolated from hot springs in Japan and a review of published reports. *Mycopathologia* 164(3): 135-147, 2007. (査読有) (Faculty of 1000 Biology (<http://www.fl1000biology.com>) 推薦論文)
 - 7) Hoshino S, Tachibana I, Kijima T, Yoshida M, Kumagai T, Osaki T, Kamei K, Kawase I: A 60-year-old woman with cough, fever, and upper-lobe cavitory consolidation. *Chest* 132(2): 708-710, 2007. (査読有)
 - 8) Ricci G, da Silva ID, Sano A, Borra RC, Franco M: Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR in biopsies from patients with paracoccidioidomycosis: correlation with the histopathological pattern. *Pathologica* 99(2): 41-45, 2007. (査読有)
 - 9) Kimura M, Sano A, Maenishi O, Ito H: Usefulness of Fungiflora Y to detect fungus in a frozen section of allergic mucin. *Pathol Int* 57(9): 613-7, 2007. (査読有)
 - 10) Sugita T, Takashima M, Sano A, Nishimura K, Kinebuchi T, Yamaguchi S, Osanai H: *Cryptococcus arboriformis* sp. nov., a novel anamorphic basidiomycetous yeast species isolated from a patient's urine. *Microbiol Immunol* 51(5): 543-5, 2007. (査読有)
 - 11) Pavanelli WR, Kaminami MS, Geres JR, Sano A, Ono MA, Camargo IC, Itano EN: Protection induced in BALB/c mice by the high-molecular-mass (hMM) fraction of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* 163(3): 117-28, 2007. (査読有)
 - 12) Togitani K, Kobayashi M, Sakai M, Uemura Y, Taguchi H, Morita T, Sugihara S, Sano A, Nishimura K: Ethmoidal sinusitis caused by *Exserohilum rostratum* in a patient with malignant lymphoma after non-myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis* 9(2): 137-41, 2007. (査読有)
 - 13) Tatibana BT, Sano A, Uno J, Mikami Y, Miyaji M, Nishimura K, Itano EN: Humoral immune response in experimental ddY mice paracoccidioidomycosis. *Semina: Ciencias Agricolas, Londrina* 28(2): 287-294, 2007. (査読有)
 - 14) Ashida H, Toyotome T, Nagai T, Sasakawa C: *Shigella* chromosomal IpaH proteins are secreted via the type III secretion system and act as effectors. *Mol Microbiol* 63(3): 680-693, 2007. (査読有)
 - 15) Furochi H, Nikawa T, Hirasaka K, Suzue N, Ishidoh K, Onishi Y, Ogawa T, Yamada C, Suzuki H, Higashibata A, Oarada M, Kishi K, Yasui N: Distinct gene expression profiles in the femora of rats exposed to spaceflight, tailsuspension and denervation. *Biol Sci Space* 20: 80-91, 2007. (査読有)
- 和文**
- 1) 朴 天鎬, 吉田英二, 佐野文子, 木村久美子, 安藤貴朗, 渡辺大作, 大塚浩通, 小山田敏文: 黒毛和種牛における *Absidia corymbifera* と *Candida tropicalis* の重感染症. *日獣会誌* 60(7): 497-500, 2007. (査読有)
 - 2) 兼島 孝, 佐野文子: ペットショップの不適切な対応により飼い主の重症皮膚疾患の原因となった猫の1例. *獣医畜産新報* 60(5): 382-383, 2007. (査読無)
 - 3) 進藤基博, 佐藤一也, 神保絢子, 細木卓明, 生田克哉, 佐野文子, 西村和子, 鳥本悦宏, 高後 裕: 急性骨髄性白血病に対する骨髄非破壊の前処置による臍帯血移植後 voriconazole 投与中に発症した肺ムコール症. *臨床血液* 48(5): 412-417, 2007. (査読有)
- 3. 総説・解説・その他**
- 1) 亀井克彦, 渡辺 哲: 抗真菌薬の選択と使い方. *メデイカメント ニュース* 1923号: 5-7, 2007.
 - 2) 亀井克彦, 渡辺 哲: 真菌感染症におけるトピックス 輸入真菌症. *臨床と微生物*, 34(6): 729-734, 2007.
 - 3) 亀井克彦, 渡辺 哲: 輸入肺真菌症. *呼吸器科* 11(1): 35-42, 2007.

- 4) 矢口貴志, 亀井克彦, 三上 襄: 病原微生物: 感染症教育研究に貢献する病原微生物資源. 細胞工学 26(6): 1066-1069, 2007.
- 5) 亀井克彦: 深在性真菌症とその対策. 感染防止 17(40): 1-9, 2007.
- 6) 亀井克彦, 渡辺 哲: 感染症学各論 微生物の病原因子 真菌の病原因子. 日本臨床 65 (増刊号3 新感染症学 (下) - 新時代の基礎・臨床研究 -): 451-453, 2007.
- 7) 佐野文子, 亀井克彦: 感染症学各論 感染症法分類 発症・病態・診断・治療 四類感染症 コクシジオイデス症. 日本臨床 65 (増刊号3 新感染症学 (下) - 新時代の基礎・臨床研究 -): 223-228, 2007.
- 8) 亀井克彦: アスペルギルス症の抗真菌薬. 日胸 66(10): 835-843, 2007.
- 9) 佐野文子: めずらしい真菌症. 獣医畜産新報 60(4): 305-310, 2007.
- 10) 亀井克彦 (分担): コクシジオイデス症およびヒストプラズマ症など輸入真菌症国内発生状況の調査, 肺結核偽診例に潜在するヒストプラズマ症のスクリーニングに関する研究, ヒストプラズマ症の血清診断法に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業) 「輸入真菌症等真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究」平成 18 年度総括・分担研究報告書, pp. 15-23, 2007.
- 11) 亀井克彦 (分担): バイオ技術を用いた総合的モニタリングシステムに関する研究 *Pseudallescheria boydii* 北大株の病原性の検討-呼吸器反復暴露における肺感染モデルについて-. 平成 18 年度廃棄物処理等科学研究 研究報告書「バイオ技術を中心とした不法投棄現場及び不適正最終処分場の修復・再生システムの開発」(K1853), pp. 99-101, 2007.
- 12) 亀井克彦 (分担): バイオ技術を用いた総合的モニタリングシステムに関する研究 *Pseudallescheria boydii* 北大株の病原性の検討-呼吸器反復暴露における肺感染モデルについて-. 平成 18 年度廃棄物処理等科学研究 総合研究報告書「バイオ技術を中心とした不法投棄現場及び不適正最終処分場の修復・再生システムの開発」, pp. 200-202, 2007.
- 13) 渋谷和俊 (分担), 亀井克彦 (研究協力者): 真菌感染と特定疾患 - *Stachybotrys chartarum* 吸入と原発性肺高血圧症との関連について -. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究」平成 18 年度 総括・分担研究報告, pp. 61-64, 2007.
- 14) 佐野文子 (分担): 遺伝子検査 診断とリスクファクター 12) 感染症 (13) 真菌, 臨床検査 51(12): 1533-1536, 2007.
- 15) 佐野文子 (分担): 伴侶動物等に由来する真菌症等の診断, 予防法に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「動物由来感染症のコントロール法の確立に関する研究」平成 18 年度 研究成果報告書, pp. 155-164, 2007. (査読無)

4. 学会・シンポジウム・研究集会での招待講演 国内学会

- 1) 亀井克彦: 【シンポジウム】『深在性真菌症改訂ガイドライン』基礎の立場から. 真菌症フォーラム第 8 回学術集会, プログラム/抄録集 p. 29, 神戸, 2 月 10 日, 2007.
- 2) 亀井克彦: 【教育セミナー 10】深在性真菌症-検査法 update -. 第 18 回日本臨床微生物学会総会, 長崎, 2 月 18 日, 2007.
- 3) 亀井克彦: 【ランチョンセミナー】深在性真菌症における最近の展開と対策. 第 81 回日本感染症学会総会, 京都, 4 月 11 日, 2007.
- 4) 亀井克彦: 【イブニングシンポジウム 8】改訂: 深在性真菌症の診断・治療ガイドライン~呼吸器真菌症を中心に~. 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 5 月 11 日, 2007.
- 5) 亀井克彦: 【シンポジウム】肺真菌症-アレルギーと感染症-真菌の抗原性と感染性. 第 58 回日本呼吸器学会九州地方会春季大会, 長崎, 6 月 16 日, 2007.
- 6) 亀井克彦, 落合恵理: 住宅環境に生息する病原性カビ, 特にマイコトキシン産生カビによる真菌症について. 日本マイコトキシン学会第 62 回学術講演会, 神戸, 9 月 6 日, 2007.
- 7) 亀井克彦: ICD のための病原真菌学. 第 57 回 ICD 講習会, 高山, 11 月 10 日, 2007.
- 8) 渡辺 哲, 橋本佳江, 日暮浩実, 落合恵理, 豊留孝仁, 永吉 優, 亀井克彦: 【シンポジウム II 深在性真菌症に挑む-基礎と診療のクロストーカー】深

在性真菌症起因菌の病原因子の探索～*Aspergillus fumigatus*を中心として～. 第51回日本医真菌学会総会, 高山, 真菌誌 48 (増刊1号): 50, 11月9～10日, 2007.

- 9) 亀井克彦: 【シンポジウムIII 皮膚真菌症 真菌症治療に向けた各診療科の協体制作り (クロストーク)】 真菌の同定と保存の現状: 日本のネットワーク. 第51回日本医真菌学会総会, 高山, 真菌誌 48 (増刊1号): 50, 11月9～10日, 2007.

5. 一般発表

国際学会

- 1) Sano A, Itano EN, Takayama A, Ono MA, Uno J, Yarita K, Kamei K, Nishimura K, Mikami Y. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate showing a lower identity in the sequence of major antigen gp43. P3.24, 13th International Congress of Immunology, August 21-25, 2007, Rio de Janeiro, Brazil.
 - 2) Toyotome T, Adachi Y, Watanabe A, Ochiai E, Ohno N, Kamei K: Activator protein 1 is triggered by *Aspergillus fumigatus* β -glucans that have been surface exposed during specific growth stages. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Abstract p.127, Awaji, September 1-5, 2007.
 - 3) ITANO, E. N.; NAGASHIMA, L. A.; SANO, A.; Fujita TC; Murata Y; KAMEI, K.; NISHIMURA, K. Reactivity of paracoccidioidomycosis patients serum with *Arthrographis kalrae* antigens. In: Kalil J; Cunha-Neto E; Rizzo LV. (Org.). 13th International Congress of Immunology. Bologna: Medimond International Proceedings, 2007, p.375-377.
 - 4) NAGASHIMA, L. A.; SANO, A.; KAMEI, K.; NISHIMURA, K.; NAKANISHI, F. A.; ONO, E. Y. S.; ITANO, E. N. Partial characterization of soluble components of *Arthrographis kalrae*. 13th International Congress of Immunology. Bologna: Medimond International Proceedings, 2007, p.557-561.
- 株について. 真菌症フォーラム第8回学術集会, プログラム/抄録集 p.68, 神戸, 2月10日, 2007.
 - 2) 渡辺 哲, 清水公德, 佐藤綾香, 豊留孝仁, 落合恵理, 河合利春, 永吉 優, 川本 進, 亀井克彦: 経静脈的および経気管支的感染によるマウス *Cryptococcus* 症の病態の相違についての検討. 真菌症フォーラム第8回学術集会, プログラム/抄録集 p.74, 神戸, 2月10日, 2007.
 - 3) 落合恵理, 永吉 優, 佐藤綾香, 渡辺 哲, 豊留孝仁, 矢口貴志, 亀井克彦, 渋谷和俊: *Stachybotrys chartarum* の株の相違がマウスの肺血管病変に与える影響について. 真菌症フォーラム第8回学術集会, プログラム/抄録集 p.75, 神戸, 2月10日, 2007.
 - 4) 豊留孝仁, 安達禎之, 渡辺 哲, 落合恵理, 大野尚仁, 亀井克彦: *Aspergillus fumigatus* 形態変化と宿主細胞転写因子 NF- κ B, AP-1 活性化についての解析. 特定領域研究「感染現象のマトリックス」第5回感染症沖縄フォーラム, プログラム・要旨集 p.8, 沖縄, 2月22～24日, 2007.
 - 5) 渡辺 哲, 清水公德, 佐藤綾香, 豊留孝仁, 落合恵理, 川本 進, 亀井克彦: マウスモデルを用いた *Cryptococcus neoformans* 感染進展機構の解明への取り組み. 特定領域研究「感染現象のマトリックス」第5回感染症沖縄フォーラム, プログラム・要旨集 p.35, 沖縄, 2月22～24日, 2007.
 - 6) 鈴木敏彦, 吉川悠子, 芦田 浩, 祝 弘樹, 豊留孝仁, 松井英則, 笹川千尋: エルシニアの *invasin* を利用した新規弱毒赤痢ワクチンの開発. 第80回日本細菌学会総会, 細菌学雑誌 62(1): 173, 大阪, 3月26～27日, 2007.
 - 7) 伊藤淳二, 佐野文子, 亀井克彦, 神戸俊夫, 三上 襄: 高度病原真菌 *Coccidioides* 属のトポイソメラーゼ2遺伝子及び関連遺伝子による同定法. 第80回日本細菌学会総会, 細菌学雑誌 62(1): 191, 大阪, 3月26～27日, 2007.
 - 8) 渡辺 哲, 豊留孝仁, 落合恵理, 永吉 優, 亀井克彦: 【ワークショップ】 *Aspergillus fumigatus* が産生する新規細胞傷害活性物質の探索. 第81回日本感染症学会総会, 感染症誌 81 (臨増): 142, 京都, 4月10～11日, 2007.
 - 9) 豊留孝仁, 安達禎之, 渡辺 哲, 落合恵理, 大野尚仁, 亀井克彦: *Aspergillus fumigatus* 処理における宿

国内学会

- 1) 佐野文子, 高山明子, Itano EN, Ono MA, 鎗田響子, 宮治 誠, 亀井克彦, 宇野 潤, 三上 襄, 西村和子: 各種遺伝子配列で低い相同性を示したブラジル・パラナ州患者由来の *Paracoccidioides brasiliensis* IFM 54648

- 主細胞転写因子 AP-1 活性化についての解析. 第 81 回日本感染症学会総会, 感染症誌 81 (臨増): 201, 京都, 4月10~11日, 2007.
- 10) 高橋華子, 佐野文子, 亀井克彦, 相楽裕子: HIV 感染者に合併した播種性ヒストプラズマ症の一例. 第 81 回日本感染症学会総会, 感染症誌 81 (臨増): 285, 京都, 4月10~11日, 2007.
 - 11) 落合恵理, 亀井克彦, 永吉 優, 渡辺 哲, 豊留孝仁, 渋谷和俊: *Stachybotrys chartarum* 単回投与によるマウス肺高血圧症の形成に関する検討. 第 81 回日本感染症学会総会, 感染症誌 81 (臨増): 287, 京都, 4月10~11日, 2007.
 - 12) 遠田 博, 横倉英人, 山田朋子, 村田 哲, 大槻マミ太郎, 鈴木理恵, 森澤雄二, 五味晴美, 亀井克彦, 菅井順一: パラコキシジオイデス症の 1 例. 第 106 回日本皮膚科学会総会, 日皮会誌 117(4): 707, 横浜, 4月20~22日, 2007.
 - 13) 永吉 優, 渡辺 哲, 多田裕司, 長岡鉄太郎, 佐藤弘一, 笠原靖紀, 田辺信宏, 栗山喬之, 渋谷和俊, 亀井克彦: *Stachybotrys chartarum* の反復気管内投与によって誘発されるマウス肺高血圧に関する検討. 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会, 日呼吸会誌 45 (増): 292, 東京, 5月10~12日, 2007.
 - 14) 渡辺 哲, 日暮浩実, 橋本佳江, 豊留孝仁, 落合恵理, 永吉 優, 亀井克彦: *Aspergillus fumigatus* 培養上清と本菌二次代謝産物 gliotoxin との生物活性の比較. 第 28 回関東医真菌懇話会, プログラム/抄録集 p.3, 東京, 6月2日, 2007.
 - 15) 高橋容子, 佐野文子, 鎗田響子, 亀井克彦, 沢田智恵子, 星見正一, 小山 純: *Arthroderma vanbreuseghemii* によるヒトとネコの集団感染例. 第 28 回関東医真菌懇話会, プログラム/抄録集 p.14, 東京, 6月2日, 2007.
 - 16) 永吉 優, 落合恵理, 佐藤綾香, 渡辺 哲, 多田裕司, 長岡鉄太郎, 佐藤弘一, 笠原靖紀, 田邊信宏, 栗山喬之, 渋谷和俊, 亀井克彦: *Stachybotrys chartarum* の反復気管内投与により惹起されるマウス肺高血圧症に関する検討. 第 1 回 iPUC-II (Integrated Pulmonary Circulation Research-II), 東京, 6月30日, 2007.
 - 17) 豊留孝仁, 安達禎之, 渡辺 哲, 落合恵理, 大野尚仁, 亀井克彦: *Aspergillus fumigatus* 菌体表面に露出された β -グルカン構造による宿主転写因子 AP-1 活性化. 第 4 回真菌分子細胞研究会, プログラム・要旨集 p.18, 千葉, 8月26~27日, 2007.
 - 18) 清水公德, 李 皓曼, 渡辺 哲, 亀井克彦, 山口正視, 川本 進: クリプトコッカスの遺伝子破壊効率向上への取り組み. 第 4 回真菌分子細胞研究会, プログラム・要旨集 p.22, 千葉, 8月26~27日, 2007.
 - 19) 朴 奉柱, 朴 鍾喆, 田口英昭, 松澤哲宏, 玄 丞休, 松村和明, 亀井克彦, 高鳥 浩: Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCg) の皮膚糸状菌に対する抗真菌活性に関する研究. 日本防菌防黴学会第 34 回年次大会, 要旨集 p.57, 神戸, 8月26~27日, 2007.
 - 20) 亀井克彦, 田口英昭, 佐藤綾香, 中室克彦, 田中昭成, 山崎和俊: 新規化合物 ETS-F11 の抗真菌活性に関する検討. 日本防菌防黴学会第 34 回年次大会, 要旨集 p.29, 神戸, 8月30~31日, 2007.
 - 21) 豊留孝仁, 亀井克彦: 新規 *Histoplasma* 抗原を用いたヒストプラズマ症迅速診断法の開発. 千葉大学オープン・リサーチ 2007-千葉大学におけるイノベーション創成への取り組み-, プログラム/抄録集 p.91, 10月6日, 2007.
 - 22) 落合恵理, 亀井克彦, 渡辺 哲, 永吉 優, 豊留孝仁, 渋谷和俊: *Cladosporium* 属, *Penicillium* 属菌の気管内反復投与がマウスの肺動脈に与える影響について. 第 56 回日本感染症学会東日本地方会第 54 回日本化学療法学会東日本支部会, プログラム・講演抄録集 p.89, 東京, 10月26~27日, 2007.
 - 23) 田口英昭, 渡辺 哲, 豊留孝仁, 亀井克彦: BCT による血清中 caspofungin の *Aspergillus fumigatus* に対する抑制効果及び voriconazole との併用の検討. 第 56 回日本感染症学会東日本地方会第 54 回日本化学療法学会東日本支部会, プログラム・講演抄録集 p.89, 東京, 10月26~27日, 2007.
 - 24) 豊留孝仁, 安達禎之, 渡辺 哲, 落合恵理, 大野尚仁, 亀井克彦: *Aspergillus fumigatus* 処理による宿主 AP-1 活性化 TNF- α 産生誘導. 第 56 回日本感染症学会東日本地方会第 54 回日本化学療法学会東日本支部会, プログラム・講演抄録集 p.134, 東京, 10月26~27日, 2007.
 - 25) 高橋英雄, 植田啓一, 宮原弘和, 渡辺紗綾, 内田詮三, 鎗田響子, 村田佳輝, 板野栄子, 高山明子, 西田和紀, 猪股智夫, 矢口貴志, 佐野文子, 亀井克彦:

- 沖縄美ら海水族館で飼育されているイルカの呼気、飼育スタッフ口腔内および飼育環境の病原性酵母叢. 第51回日本医真菌学会総会, 高山, 真菌誌 48 (増刊1号): 65, 11月9～10日, 2007.
- 26) 村田佳輝, 佐野文子, 高山明子, 鎗田響子, 高橋英雄, 亀井克彦: 小動物における消化管穿孔に伴った真菌性腹膜炎の2症例. 第51回日本医真菌学会総会, 高山, 真菌誌 48 (増刊1号): 68, 11月9～10日, 2007.
- 27) 高橋容子, 佐野文子, 鎗田響子, 亀井克彦: *Arthroderma vanbreuseghemii* によるヒトとネコの集団感染例. 第51回日本医真菌学会総会, 高山, 真菌誌 48 (増刊1号): 68, 11月9～10日, 2007.
- 28) 田口英昭, 渡辺 哲, 佐藤綾香, 豊留孝仁, 亀井克彦: 【セレクトッドシンポジウムI. 内臓真菌症】BCTによる血清中 voriconazole の *Aspergillus fumigatus* に対する抑制効果と micafungin との併用効果の検討. 第51回日本医真菌学会総会, 48 (増刊1号): 68, 高山, 11月9～10日, 2007.
- 29) 矢口貴志, 佐野文子, 田中玲子, 佐藤綾香, 松沢哲宏, 亀井克彦, 杉浦義紹: 【セレクトッドシンポジウムII. 分類と同定】 *Pseudallescheria boydii* と関連アナモルフ種の臨床分離株について. 第51回日本医真菌学会総会, 高山, 真菌誌 48 (増刊1号): 70, 11月9～10日, 2007.
- 30) 五ノ井 透, 田中玲子, 松沢哲宏, 渡辺 哲, 矢口貴志, 亀井克彦: TaqMan PCR法を用いた *Aspergillus fumigatus* の定量. 第51回日本医真菌学会総会, 高山, 真菌誌 48 (増刊1号): 70, 11月9～10日, 2007.
- 31) 西村和子, 佐野文子, 亀井克彦, 三上 襄, 宮治誠: 耳鼻科と眼科領域から最近分離された珍しい真菌. 第51回日本医真菌学会総会, 高山, 真菌誌 48 (増刊1号): 73, 11月9～10日, 2007.
- 32) 豊留孝仁, 安達禎之, 渡辺 哲, 落合恵理, 大野尚仁, 亀井克彦: 【セレクトッドシンポジウムIII. 免疫と生化学】 *Aspergillus fumigatus* 処理による宿主転写因子 AP-1 活性化. 第51回日本医真菌学会総会, 高山, 真菌誌 48 (増刊1号): 75, 11月9～10日, 2007.
- 33) 清水公德, 李 皓曼, 渡辺 哲, 亀井克彦, 山口正視, 川本 進: 非相同末端結合に関する遺伝子の破壊による *Cryptococcus neoformans* 相同組換え効率向上の試み. 第51回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊1号): 89, 高山, 11月9～10日, 2007.
- 34) 落合恵理, 亀井克彦, 佐藤綾香, 渡辺 哲, 永吉優, 豊留孝仁, 渋谷和俊: *Stachybotrys chartarum* 胞子のメタノール処理とマウス肺動脈病変の形成について. 第51回日本医真菌学会総会, 高山, 真菌誌 48 (増刊1号): 90, 11月9～10日, 2007.

共同研究

1. 国際共同研究

- 1) 佐野文子 (代表): パラコキシジオイデス症の迅速遺伝子診断法の検討, Eiko Nakagawa Itano 準教授 (ブラジル連邦共和国パラナ州立ロンドリーナ大学生物科学研究所)

2. 共同利用研究以外の国内共同研究

- 1) 佐野文子: 沖縄美ら海水族館で飼育されているイルカの真菌症対策, 植田啓一, 宮原弘和, 沖縄美ら海水族館海獣課
- 2) 佐野文子: 畜産領域における日和見真菌症原因菌の生態, 田山善男 (NOSAI千葉), 高橋圭二 (千葉県畜産総合研究センター生産技術部 養豚養鶏研究室)

学会等活動 (主催学会, 座長, コンビナーなど)

- 1) 亀井克彦, 榎村浩一: 【ワークショップ13】 司会. 「真菌由来の病原因子と防御機構」, 第81回日本感染症学会総会, 京都, 4月11日, 2007.
- 2) 渡辺哲: 特別講演座長. 第12回千葉真菌症研究会学術講演会, 千葉, 6月23日, 2007.
- 3) 亀井克彦: 真菌感染症 (3) 座長. 第56回日本感染症学会東日本地方会第54回日本化学療法学会東日本支部会合同学会 2007, 東京, 10月26日, 2007.
- 4) 亀井克彦: 【ランチョンセミナーIII】 「深在性トリコスポロン症の病態解明に迫る」座長. 第51回日本医真菌学会総会, 高山, 11月10日, 2007.

教育活動

学位指導

- 1) 鎗田響子: 千葉大学大学院医学薬学府修士課程 期課程修了(3月), 並びに学位取得: テーマ「Pathogenicity of *Ochroconis gallopava* isolated from hot springs in Japan and a review of published reports」(研究指導: 亀井克彦)

講義

- 亀井克彦: 1) 看護学部(病態学II 微生物学・免疫学) 授業テーマ:「真菌と真菌感染症」, 2) 薬学部(微生物学・感染症学) 授業テーマ:「真菌学(1)」「真菌学(2)」, 3) 医学部(細菌学) 授業テーマ:「病原真菌」実習(病原真菌の同定), 4) 大学院融合科学研究科(真菌感染機構論), 5) 大学院医学薬学府博士課程(特別講義「研究方法論」) 授業テーマ:「微生物の取り扱い, 危険性の防止」, 6) 博士課程(真菌感染症学) 授業テーマ:「医真菌学特論」「医真菌学演習」「医真菌学実習」, 7) 修士課程(基礎医科学) 授業テーマ:「生体防御医学特論」「生体防御実習」, 8) 岡山大学医学部(細菌学) 授業テーマ:「真菌と真菌症」, 9) 東京医科大学(微生物学) 授業テーマ:「真菌と真菌症」, 10) 福島県立医科大学(微生物学) 授業テーマ:「真菌と真菌症」, 11) 長崎大学熱帯医学研究所熱帯医学研修課程: 授業テーマ「真菌性疾患」, 12) 同大学院医歯薬学総合研究科熱帯医学専攻修士課程(特別講義): 授業テーマ「Tropical fungal infections」
- 佐野文子: 1) 千葉大学大学院医学薬学府(真菌感染症学分野), 2) 千葉大学大学院自然科学研究科(真菌感染学), 3) 普遍教育コア8生命科学(真菌感染に対する生体防御機構), 4) コア科目(真菌(かび)と人とのかかわり合い)
- 渡辺 哲: 医学部ユニット講義(感染症) 授業テーマ:「真菌症と寄生虫症」

社会活動

新聞・テレビ・ラジオ

- 1) 亀井克彦: ガイドラインに沿った深在性真菌症の診断Q&A～千葉大学真菌医学研究センター病原真菌研究部門 真菌感染分野教授 亀井克彦先生に聞く～. INFECTION FILE No.23, p.9-10, 2007.

- 2) 亀井克彦: TBS テレビインタビュー「はなまるマーケット」. 放送日: 2月22日, 2007.
- 3) 佐野文子: 「病を知る: 動物からの感染症⑦皮膚糸状菌症」日本経済新聞(夕刊), 1月16日, 2007.
- 4) 佐野文子: 写真提供. 「御近所の底力」NHK. 放送日: 10月16日, 2007.

センター講習会

- 1) 亀井克彦: 第19回病原真菌講習会講師「病原真菌・真菌症概論」, 「輸入真菌症」(講義), 7月24日, 2007.

講演など

- 1) 亀井克彦: 深在性真菌症における最近の動向. 第2回千葉血液フォーラム, 千葉, 1月27日, 2007.
- 2) 亀井克彦: 真菌症における最近の傾向とその対策～各種抗真菌薬の使い分け～. イトリゾール注1%発売記念講演会, 静岡, 2月3日, 2007.
- 3) 佐野文子: 真菌症エキスパートへの第一歩～めずらしい真菌症を知る～. 足立区獣医師会勉強会, 足立区民ホール, 東京, 3月11日, 2007.
- 4) 亀井克彦: 深在性真菌症～最近の傾向と新ガイドライン～. Kumamoto Systemic Fungal Infection Forum, 熊本, 4月13日, 2007.
- 5) 亀井克彦: 深在性真菌症～新ガイドラインと最近の傾向～. 第6回広島キャンディン研究会. 広島, 4月27日, 2007.
- 6) 渡辺 哲: カビが医療を襲う!～いま, なにが起きているのか～. 第3回千葉大学真菌医学研究センター公開市民講座, 千葉, 5月13日, 2007.
- 7) 亀井克彦: プロトコール検討会への参加と司会および医学的助言. JK1211のプロトコール検討会, 東京, 5月18日, 2007.
- 8) 亀井克彦: 【座談会】血液疾患における抗真菌薬の使い分け. 電通サドラー・アンド・ヘネシー株式会社座談会, 千葉, 5月30日, 2007.
- 9) 亀井克彦: 深在性真菌症～最近の傾向と新ガイドライン～. 神奈川血液フォーラム, 横浜, 6月14日, 2007.
- 10) 亀井克彦: 臨床サイドから見た深在性真菌症とその対策. 第1回奈良アスペルギルス症研究会, 奈良, 6月21日, 2007.
- 11) 亀井克彦: 深在性真菌症とその対策. 第103回感染防止研究会, 東京, 7月7日, 2007.

- 12) 亀井克彦: 外科・救急領域と真菌症. 第5回救急領域感染対策セミナー, 岐阜, 7月21日, 2007.
- 13) 亀井克彦: 新時代のアスペルギルス症とその対応. 第3回東葛呼吸器カンファレンス, 船橋, 7月25日, 2007.
- 14) 亀井克彦: 変貌する深在性真菌症 診断と治療. 感染症診療講演会, 豊田, 9月28日, 2007.
- 15) 亀井克彦: 真菌症肺疾患-最近の知見から-. 第1回呼吸器臨床フォーラム, 東京, 10月5日, 2007.
- 16) 亀井克彦: 変貌する深在性真菌症-診断と治療-. 静岡県東部地区イトリゾール学術講演会, 沼津, 10月9日, 2007.
- 17) 亀井克彦: 真菌と疾患の関わり. 第33回多摩のはな会, 国分寺, 10月20日, 2007.
- 18) 渡辺 哲: アスペルギルス症の診断と最近の治療について. 第3回千葉県臨床検査技師会微生物検査研究班研修会, 千葉, 10月27日, 2007.
- 19) 亀井克彦: 呼吸器疾患と真菌. 第68回滋賀呼吸器疾患談話会, 草津, 11月1日, 2007.
- 20) 亀井克彦: 真菌と肺疾患の新しい関係. 真菌と真菌症: 先端知識のアップデート 2007, 国立感染症研究所シンポジウム, 東京, 11月7日, 2007.
- 21) 亀井克彦: 深在性真菌症-診断と治療の pitfalls -. 第1回大阪真菌症研究会, 大阪, 11月14日, 2007.
- 22) 亀井克彦: アスペルギルス症を巡る最近の話題. 第23回肺真菌症研究会学術集会, 東京, 11月17日, 2007.
- 23) 亀井克彦: 輸入呼吸器感染症-真菌症診療の Pitfalls. 第66回横浜市南部地区胸部疾患談話会, 横浜, 11月21日, 2007.
- 24) 亀井克彦: 深在性真菌症-診断と治療の pitfalls -. 山梨呼吸器感染症研究会, 甲府, 11月30日, 2007.

外部資金

科学研究費補助金

- 1) 亀井克彦 (分担): 厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「深在性真菌症と輸入真菌症

に関する新しい検査法と抗真菌薬の開発, 並びに病原因子の解明に向けたポストゲノムの基盤的研究], 平成19年度~21年度 (平成19年度は550万円).

- 2) 亀井克彦 (研究協力者): 厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服対策研究事業「特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究」, 平成17年度~19年度 (平成19年度は150万円).
- 3) 佐野文子 (分担): 農林水産省平成17年度先端技術を活用した農林水産研究高度化事業委託事業: 「羽毛分解菌のケラチン代謝機構の解明とその高度利用」, 平成17~19年度 (平成19年度は114万円うち間接経費は26万円).
- 4) 佐野文子 (分担): 厚生労働省新興・再興感染症研究事業「動物由来感染症のコントロール法の確立に関する研究-伴侶動物等に由来する真菌症等の診断, 予防法に関する研究」, 平成18年度~20年度 (平成19年度は450万円).
- 5) 大荒田素子 (代表): 科学研究費補助金 基盤研究C 18580112 「心的ストレスによる生体防御能の低下: 脂質摂取による改善効果とその分子機構の解明」平成18~19年度 (平成19年度は110万円, 間接経費33万円).

その他の外部資金

- 1) 亀井克彦: 委任経理金「真菌症の発生機序及び治療法の研究」および「真菌症の診断及び治療法の研究」, 4社から総額800万円.
- 2) 亀井克彦: 委任経理金「真菌症の診断及び治療法の研究」, きさらづ皮膚科クリニック, 50万円.
- 3) 亀井克彦: 委任経理金「真菌症の診断及び治療法の研究」, (株)ERCテクノロジー, 70万円.
- 4) 豊留孝仁: 国際交流助成「特異な生育ステージで露出される *Aspergillus fumigatus* β -グルカンによる activator protein 1 の活性化 (3rd Advances Against Aspergillosis での発表)」, 加藤記念バイオサイエンス研究振興財団, 15万円.
- 5) 大荒田素子: 飯島記念食品化学振興財団研究助成金「心的ストレスによる生体防御能の変調に対する米ぬか油と大豆油の改善効果」, 110万円.

病原真菌研究部門 系統・化学分野

(Department of Pathogenic Fungi, Division of Phylogenetics)

教授: 五ノ井 透

- 学内委員 高熱水料削減プロジェクト部局リーダー, 千葉大学イノベーションセンター委員, 情報化推進企画室図書館専門部会支鼻分館分科会委員, 大学院医学研究科医学系運営委員会委員
- センター内委員 運営協議会委員, 教員会議委員, 総務委員会委員, 研究部門連絡会委員, 高熱水料削減プロジェクト W・G 委員長, CUCRIS システム部局責任者, 組織・機能改善委員会委員, 図書 W・G 委員, 自己点検・評価委員会委員, 共用備品委員会委員長, 倫理審査委員会委員, NetFM・ISO 部局責任者
- 学協会への貢献 日本薬理学会評議委員 (3月まで)
- 所属学会 日本医真菌学会, 日本放線菌学会, 日本微生物資源学会, 日本細菌学会, 日本分子生物学会
- 受賞 2007 年度日本放線菌学会総会ポスター賞: 五ノ井 透, 星野泰隆, 矢沢勝清, 石川 淳, 三上 襄: 「病原性放線菌 *Nocardia* 属 64 種が産生するシデロフォアの多様性の解析」(2007. 6. 1)

准教授: 矢口貴志

- 学内委員 生涯学習推進委員会委員
- センター内委員 教員会議委員, 総務委員会委員, 共用備品委員会委員, 共同利用委員会委員, 微生物・保存管理施設運営委員会委員, 有害廃棄物委員会委員長, 広報委員会委員, 地域連携委員会委員, 自己点検・評価委員会委員, 図書 W・G 委員, 実験動物 W・G 委員, 市民相談等対応グループ, 光熱水料削減プロジェクト W・G 委員, 機種選定委員
- 学協会への貢献 日本菌学会・評議員・将来計画構想委員会委員・関東支部幹事
- 所属学会 日本医真菌学会, 日本微生物資源学会, 日本菌学会, 日本顕微鏡学会, マイコトキシン学会, Mycological Society of America

助教: 田中玲子

- 学内委員 放射性同位元素委員会専門委員会委員
- センター内委員 総務委員会委員 (3月まで), 微生物・保存管理室施設運営委員会委員, 放射性同位元素

委員会委員, 放射性同位元素取扱主任者, 放射線障害の防止に係る安全管理担当者, 防災対策委員会委員, 研究推進チーム委員, 微生物管理保存 W・G 委員, 個人評価 W・G 委員

○学協会への貢献 日本医真菌学会編集委員会幹事

○所属学会 日本医真菌学会, 日本菌学会, 日本微生物資源学会, 日本分子生物学会, 日本臨床環境医学会, 日本感染症学会, American Society for Microbiology

技術職員 (医学薬学府博士課程): 松澤哲宏

非常勤講師: 堀江義一 (千葉県立中央博物館)

非常勤講師: 安西弘行 (茨城大学遺伝子実験施設 准教授)

実験補助員: 土屋由紀子

大学院医学薬学府修士課程: 弘 佑介

研究概要 (共同研究を含む)

1. *Nocardia* の産生する 2 次代謝産物, 特に鉄結合分子に関する解析

鉄は総ての細胞性生物にとって必須の分子であり, 病原性放線菌を含む多くの菌類は siderophore と呼ばれる鉄キレート分子を産生して, 宿主主体内から菌内に鉄を奪っている. *Nocardia* 属菌 60 種が産生する siderophore 分子の生合成を化学的および分子生物学的手法を用いて研究した. ほとんどの菌種が, 鉄結合分子を産生している可能性を CAS 培地試験, PCR 法, 薄層クロマト法等を用いて明らかにしてきた. さらに生合成に必要な他の遺伝子の存在を PCR で確認し一部の配列を決定した. 今後は, 遺伝子構造を解析し次代謝産物の中でも未知の 2 次代謝産物の生合成機構に焦点を絞り, 分子生物学的, 化学的解析を進めたい.

2. Real-time PCR 法を用いたアスペルギルス症診断法の開発

Aspergillus 属菌は通常, 気中などに多数存在し, 我々は日々吸引している. 同菌が健常者に感染症を引き起こす

ことは希であるが、免疫不全症の患者、免疫抑制剤を使用した患者には重篤な感染症を引き起こし、高い致死率を示す。TaqMan PCR 法を用いて、*Aspergillus fumigatus* の精製した遺伝子あるいは胞子を定量する方法を開発した。今後は、動物を用いた実験により、将来はヒト臨床サンプルへも応用できる様にする方法を探りたい。

3. 酵母 Ca チャネルの構造と機能の解析

Ca^{2+} イオンは、細胞内外のシグナル伝達に用いられるなど、総ての細胞性生物にとって重要な役割をもつ。酵母・カビは、ヒトとも相同性の高い Ca^{2+} イオン・チャネル分子 CCH1 を持つが、その生理学的機能はよく解析されていない。出芽酵母と分裂酵母の細胞膜で、Ca チャネルを構成すると予測される蛋白をコードするそれぞれの *ccb1* 遺伝子と *mid1* 遺伝子を発現ベクターに組み込んだ。蛋白の発現と細胞膜への移行を確認するためにそれぞれの細胞の *mid1* 遺伝子を DsRed monomer との融合蛋白を発現する発現ベクターに組み込んだ。今後、*ccb1* 遺伝子を GFP との融合蛋白を発現するベクターに組み込み発現し、機能解析に進展したい。

4. 病原性 *Aspergillus* および関連菌の分類学的研究

当センターに保存されている *Aspergillus fumigatus* を研究材料とし、 β -tubulin, hydrophobin, calmodulin 遺伝子による系統解析を実施した。*Fumigati* 節は 5 つのクラスターに分かれ、*A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. viridinutans* とは系統的に異なる菌群が見出され、*Neosartorya udagawae* と系統的に近縁であった。*A. fumigatus* 関連菌は分子系統と分生子の微細構造、生育温度、マイコトキシン生産性との間には相関が見られたが、薬剤耐性においては差が認められなかった。非典型的な *A. fumigatus* の分布調査を日本、中国などで行い、*N. udagawae* との近縁菌の交配試験による菌学的位置付けを検討している。

Emericella および関連菌の分類学的研究では、 β -tubulin, hydrophobin, *afIR* 遺伝子による系統解析を実施し、分子系統と子う胞子の微細構造、最高生育温度との相関性を検討した。分子系統と形態は一部相関が確認された。分子系統的に既知種とは区別された菌種は、その他の性状を検討した結果、新種と考えられた。

5. 黒色真菌の分類研究

日本産の *Fonsecaea pedrosoi* において ITS 領域による

系統解析を実施し、de Hoog *et al.* (2004) のデータを検証したところ、日本産の *F. pedrosoi* は彼らの提唱する *F. monophora* と近縁のクラスターとして 1 つにまとまった。これまでの検討では、日本産の *F. pedrosoi* は、*F. monophora* の種内における別系統の菌群と考えられる。さらに *F. monophora* が、2 つのクラスターに分かれ、地域性との関連が示唆された。

6. *Pseudallescheria boydii* および関連菌の多相分類と検出法の開発

P. boydii および関連菌の分子系統解析による菌学的な位置づけを検討し、近年、新種として報告された *Scedosporium aurantiacum*, *P. minutispora* を新たに分離し、菌学的性状を確認した。薬剤耐性の面から問題となっている *S. prolificans* の特異的な検出法の開発を行った。

7. 耐熱性菌の多相分類および検出法の開発

食品の製造過程で事故原因菌として問題となる耐熱性菌 *Byssoschlamys*, *Talaromyces*, *Hamigera*, *Neosartorya* などの系統解析および形態の詳細な検討を実施し、菌学的な位置づけを明らかにした。耐熱性菌各属のみに特異的な塩基配列を探索し、この部分の両端をプライマーとして、PCR, LAMP 法でそれぞれに特異的なバンドが確認された。今後、特異性の精度を高める検討を行う。

8. 病原酵母の疫学

これまで、*Candida* 属、*Trichosporon* 属について行ってきたが、今年、*Malassezia* 属菌種について、同一施設から分離された複数の株が得られたので、由来が同じであるかを検討した。分離菌はどれも *M. furfur* と同定され、3 種類のプライマーを用いた RAPD 解析ではどの株も互いに異なっていることが判明し、院内感染の可能性が否定された。また、都内の大学病院検査室より分離源情報のはっきりしているおよそ 600 株の *Candida albicans* を受け入れているので、それらについての解析を行う予定である。

9. *Trichosporon* 属の系統分類の再評価。(NBRC と共同)

NBRC とセンター保存株の品質評価の問題点を洗い出し、登録データの修正を行った。なお、この作業において関連株について双方の株を交換扱いとした。今後は、系統関係を多相的に分析し、検討する予定である。

10. 株識別を目的としたタイピングの検討

C. albicans グループについては、名古屋大学（共同利用研究採択）、科警研・鶴見大学（科警研との共同研究）との共同の他、新疆医科大学・ウイグル人民病院（中華人民共和国）などと共同で、ALTS を中心に検討している。*Microsporium canis* については、新疆医科大学と ISSR-PCR 法について検討中で、どちらもパターン認識性の良い方法への応用を試みた。今後は、同一患者から繰り返し分離されるような事例を多数集めて、株識別法の有効性を実証していく予定である。

研究成果の発表

1. 原著論文

英文

- 1) Oarada M, Gonoï T, Tsuzuki T, Igarashi M, Hirasaka K, Nikawa T, Onishi Y, Toyotome T, Kamei K, Miyazawa T, Nakagawa K, Kashima M, Kurita N: Effect of dietary oils on lymphocyte immunological activity in psychologically stressed mice. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 71: 174-182, 2007. (査読有)
- 2) Hasegawa T, Gonoï T, Ito J, Kogure T, Yazawa K, Mikami Y: Identification of *Nocardia farcinica* by a PCR primer amplifying a specific DNA band for the bacterium. *Jpn J Med Mycol* 48: 173-175, 2007. (査読有)
- 3) Yaguchi T, Horie H, Tanaka R, Matsuzawa T, Ito J, Nishimura K: Molecular phylogenetics of multiple genes on *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from clinical specimens in Japan. *Jpn J Med Mycol* 48: 37-46, 2007. (査読有)
- 4) Yaguchi T, Tanaka R, Nishimura K, Udagawa S: Molecular phylogenetics of strains morphologically identified as *Fonsecaea pedrosoi* from clinical specimens. *Mycoses* 49: 255-260, 2007. (査読有)
- 5) Ishii K, Hitosugi M, Yaguchi T, Tokudome S: The importance of forensic mycology. *Leg Med* 9: 287, 2007. (査読有)
- 6) Yarita K, Sano A, Murata Y, Takayama A, Takahashi Y, Takahashi H, Yaguchi T, Ohori A, Kamei K, Miyaji M, Nishimura K: Pathogenicity of *Ochroconis gallopava* isolated from hot springs in Japan. *Mycopathologia* 164:

135-147, 2007. (査読有)

- 7) Kushida N, Watanabe N, Okuda T, Yokoyama F, Gyobu Y, Yaguchi T: PF1270A, B and C, novel histamine H3 receptor ligands produced by *Penicillium waksmanii* PF1270. *J Antibiot* 60: 667-673, 2007. (査読有)
- 8) Nakadate S, Nozawa K, Horie H, Fujii Y, Nagai M, Tomoo Hosoe T, Kawai K, Takashi, Yaguchi T, Fukushima K: Eujavanicols A-C, decalin derivatives from *Eupenicillium javanicum*. *J Nat Products* 70: 1510-1512, 2007. (査読有)
- 9) Balajee SA, Houbraken J, Verweij PE, Hong S-H, Yaguchi T, Varga J, Samson RA: *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Studies in Mycology* 59: 39-46, 2007. (査読有)

邦文

- 1) 矢口貴志, 滝澤香代子, 田口英昭, 田中玲子, 窪田規, 窪田宜昭, 窪田正昭, 福島和貴: ナノ銀粒子を静電吸着させたコラーゲン水解ペプチド (GX-95) の抗真菌活性. *真菌誌* 48: 97-100, 2007. (査読有)

2. 総説・解説・その他

- 1) 矢口貴志, 亀井克彦, 三上 襄: 病原微生物: 感染症教育研究に貢献する病原微生物資源. *細胞工学* 26(9): 1066-1069, 2007.
- 2) 岡 千寿, 前田 浩, 五ノ井 透, 三上 襄: DNA マイクロアレイ関連技術の開発 (第2報). 千葉県産業支援技術研究所研究報告書, 2007.
- 3) 矢口貴志: カビによる健康被害. *文化財の虫菌害* 54: 3-9, 2007.

3. 学会・シンポジウム・研究集会での招待講演

国際学会

- 1) Yaguchi T, Tanaka R, Matsuzawa T, Horie Y: Polyphasic classification on *Aspergillus* section *Fumigati*. The 24th Annual Conference of the Microscopy Society of Thailand, Bangkok. February 14-16, 2007.
- 2) Yaguchi T: Pathogenic species in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Aspergillus Systematics in the Genomic Era An International Workshop*. Programme, participants and abstracts pp34-35, Utrecht. April 12-14, 2007.
- 3) Yaguchi T: Basic mycology. Lecture at Forest Research

Institute, Malaysia, Kuala Lumpur, November 27, 2007.

4. 一般発表

国内学会

- 1) 五ノ井 透, 武田健二郎, 向井 啓, 矢澤勝清, 星野泰隆, 三上 襄: *Nocardia* 属菌 60 種が産生する鉄キレート分子の多様性の解析. 第 80 回日本細菌学会総会, プログラム・抄録集, 大阪, 3 月 26 ~ 28 日, 2007.
- 2) 五ノ井 透, 星野泰隆, 矢澤勝清, 石川 淳, 三上 襄: 病原性放線菌 *Nocardia* 属 64 種が産生するシデロフォアの多様性の解析. 2007 年度日本放線菌学会総会 プログラム・抄録集, 尾道, 5 月 31 日 ~ 6 月 1 日, 2007.
- 3) 芝崎あずさ, 山本撰也, 斎藤明広, 五ノ井 透, 安藤昭一, 三上 襄: ダンゴムシ (*Armadillidium vulgare*) 体内より分離した新種と考えられる放線菌の分離とその代謝産物について. 2007 年度日本放線菌学会総会 プログラム・抄録集, 尾道, 5 月 31 日 ~ 6 月 1 日, 2007.
- 4) 五ノ井 透, 松澤哲宏, 渡辺 哲, 田中玲子, 矢口貴志, 亀井克彦: TaqMan PCR 法を用いた *Aspergillus fumigatus* の定量 (アスペルギルス症の迅速診断をめざして). 第 12 回千葉真菌症研究会学術講演会, 千葉, 6 月 23 日, 2007.
- 5) 岡 千寿, 前田 浩, 五ノ井 透, 三上 襄, 岡村浩, 磯貝健二: DNA マイクロアレイ関連技術の開発. 千葉県産業支援技術研究所研究発表会, 千葉, 8 月 7 日, 2007.
- 6) 落合恵理, 永吉 優, 佐藤綾香, 渡辺 哲, 豊留孝仁, 矢口貴志, 亀井克彦, 渋谷和俊: *Stachybotrys chartarum* の株の相違がマウスの肺血管病変形成に与える影響. 第 8 回真菌症フォーラム, 抄録集 p. 75, 神戸, 2 月 15 日, 2007.
- 7) 中楯 奨, 野沢幸平, 堀江 均, 藤井祐一, 佐藤博泰, 細江智夫, 河合賢一, 矢口貴志, 福島和貴: *Eupenicillium javanicum* の産生する新規抗真菌環状デプシペプチド. 第 127 回日本薬学会, 講演要旨集 4: 109, 富山, 3 月 28 ~ 30 日, 2007.
- 8) 松澤哲宏, 矢口貴志, 堀江義一, 田中玲子: *Emericella* 属の分子系統解析と新種について. 日本菌学会第 51 回大会, 講演要旨集 p. 31, つくば, 5 月 26 ~ 27 日, 2007.
- 9) 矢口貴志, 堀江義一, 松澤哲宏, 田中玲子: 遺伝子解析による *Neosarorya* 属の評価と新分類について. 日本菌学会第 51 回大会, 講演要旨集 p. 67, つくば, 5 月 26 ~ 27 日, 2007.
- 10) 矢口貴志, 田中玲子, 松澤哲宏, 宇田川俊一: 分子系統解析による *Talaromyces* 属の分類について. 日本菌学会第 51 回大会, 講演要旨集 p. 68, つくば, 5 月 26 ~ 27 日, 2007.
- 11) 五ノ井 透, 矢澤勝清, 矢口貴志, 三上 襄: 60 種の *Nocardia* 属菌が産生するシデロフォアの多様性解析. 日本微生物資源学会第 14 回大会, 日本微生物資源学会誌 23(1): 60, 札幌, 2007 年 6 月 25 ~ 26 日, 2007.
- 12) 今西由巳, 二宮真也, 中桐 昭, 田中玲子, 矢口貴志: *Trichosporon* 属の系統分類の再評価. 日本微生物資源学会第 14 回大会, 日本微生物資源学会誌 23(1): 62, 札幌, 6 月 25 ~ 26 日, 2007.
- 13) 矢口貴志, 田中玲子, 松澤哲宏, 西村和子, 宇田川俊一: 日本産 *Fonsecaea* 属の系統解析について. 日本微生物資源学会第 14 回大会, 日本微生物資源学会誌 23(1): 65, 札幌, 6 月 25 ~ 26 日, 2007.
- 14) 西村和子, 矢口貴志, 佐野文子, 田中玲子, 伊藤純子, 松澤哲宏, 亀井克彦, 三上 襄: *Pseudallescheria boydii* と関連アナモルフ種の臨床分離株について. 日本微生物資源学会第 14 回大会, 日本微生物資源学会誌 23(1): 65, 札幌, 6 月 25 ~ 26 日, 2007.
- 15) 矢口貴志: 病原真菌の多相分類および最近の研究. 第 4 回真菌分子細胞研究会, 要旨集 p. 3, 千葉, 8 月 26 ~ 27 日, 2007.
- 16) 松澤哲宏, 矢口貴志, 田中玲子, 堀江義一: *Emericella* 属の多相分類と新種について. 第 4 回真菌分子細胞研究会, 要旨集 p. 4, 千葉, 8 月 26 ~ 27 日, 2007.
- 17) 佐伯 泰, 清水公德, 矢口貴志, 川本 進, 東江昭夫: 高温増殖性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* からのプロテオームの精製と構造・機能解析. 第 4 回真菌分子細胞研究会, 要旨集 p. 20, 千葉, 8 月 26 ~ 27 日, 2007.
- 18) 高橋英雄, 植田啓一, 宮原弘和, 渡辺紗綾, 内田詮三, 鎗田響子, 村田佳輝, Itano Eiko, 高山明子, 西

- 田和紀, 猪股智夫, 矢口貴志, 佐野文子, 亀井克彦: 沖縄美ら海水族館で飼育されているイルカの呼吸, 飼育スタッフ腔空内および飼育環境の病原性酵母叢. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1 号): 65, 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.
- 19) 松澤哲宏, 矢口貴志, 堀江義一, 田中玲子, 五ノ井 透: 新疆土壤から分離された新種と病原性 *Emericella* 属菌との比較検討. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1 号): 69, 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.
- 20) Minh Duc Pham, 畑井喜司雄, 矢口貴志, 宇田川俊一: シヤコ *Oratosquilla oratoria* の真菌病. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1 号): 70, 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.
- 21) 矢口貴志, 松澤哲宏, 田中玲子, Abliz Paride, Hui Yan, 堀江義一: 中国乾燥地帯における *Aspergillus fumigatus* と *Neosartorya* の分布と系統解析. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1 号): 70, 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.
- 22) 矢口貴志, 佐野文子, 田中玲子, 佐藤綾香, 松澤哲宏, 亀井克彦, 西村和子: *Pseudallescheria boydii* と関連アナモルフ種の臨床分離株について. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1 号): 70, 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.
- 23) 矢口貴志, 伊藤純子, 田中玲子, 松澤哲宏, 堀江義一, 五ノ井 透: 病原性 *Aspergillus* section *Fumigati* の分類とその性状. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1 号): 71, 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.
- 24) 五ノ井 透, 田中玲子, 松澤哲宏, 渡辺 哲, 矢口貴志, 亀井克彦: TaqMan PCR 法を用いた *Aspergillus fumigatus* の定量. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1 号): 73, 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.
- 25) Abliz P, Hui Y, Yaguchi T, Yazawa K, Tanaka R, Wang X, Mikami Y: *Streptomyces albus* isolated from human and animal actinomycetoma in Xinjiang, China. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1 号): 71, 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.
- 26) 服部尚生, 田中玲子, 知花博治, 富田 靖, 神戸俊夫: 反復配列 RPS と内部反復配列 ALT を標的とした PCR によるカンジダ・アルビカンスの genotyping. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1 号): 33, 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.
- 27) 三上 襄, 本田武司, 江崎孝行, 平山謙二, 亀井克彦, 五ノ井 透, 横山耕治, 矢口貴志, 田中玲子: NBRP 「病原微生物」: 感染症法の改正に伴って. 日本分子生物学会, 横浜, 12 月 11 ~ 14 日, 2007.

共同研究

1. 国際共同研究

- 1) 矢口貴志: 中央アジアにおける真菌症原因菌および関連菌の生態研究 (文部科学省科学研究費補助金), 恵 艶教授, 中華人民共和国, 新疆医科大学附属第一病院皮膚科.

2. 共同利用研究以外の国内共同研究

- 1) 田中玲子: 生体試料を用いた民族識別法における指標の研究, 桜田宏一博士, 警視庁科学警察研究所, 佐藤慶太講師, 鶴見大学歯学部.
- 2) 田中玲子: *Trichosporon* 属の系統分類の再評価, 今西由巳博士, NBRC.

国際交流

1. 海外渡航

- 1) 矢口貴志: タイ, バンコック, The 24th Annual Conference of the Microscopy Society of Thailand に出席, 招待講演, 情報収集のため, 2 月 14 ~ 18 日, 2007 (科学研究費補助金).
- 2) 矢口貴志: オランダ, ユトリヒト, *Aspergillus systematics in the Genomic Era An-International Workshop* に出席, 招待講演, 情報収集のため, 4 月 12 ~ 18 日, 2007 (奨学寄附金).
- 3) 田中玲子: 中華人民共和国, 北京, 日中笹川医学研究者制度 20 周年記念式典に参加のため, 8 月 25 ~ 28 日, 2007 (日中医学協会からの招待).
- 4) 矢口貴志, 田中玲子: 中華人民共和国, ウルムチ, 新疆医科大学附属第一病院皮膚科 恵 艶教授との共同研究の打ち合わせ, 討議, 研究サンプル収集のため, 8 月 30 日 ~ 9 月 12 日, 2007 (科学研究費補助金).
- 5) 五ノ井 透: 南アフリカ共和国, ヨハネスブルグ,

Witwatersrand 大学遺伝学教室の訪問, 研究打ち合わせ, 研究発表のため, 9月13日~20日, 2007(日本学術振興会2国間交流事業).

- 6) 矢口貴志: マレーシア, クアラルンプール, 森林研究所にて真菌の分離および講演のため, 11月25~29日, 12月9~13日, 2007(奨学寄附金).

2. 海外研究者の受け入れ

- 1) Abliz Paride 助教授(中華人民共和国, 新疆医科大学附属第一病院), 11月1日~12月8日, 2007(科学研究費補助金), 共同研究(矢口貴志).
- 2) Juhaer Mijiti 助教授(中華人民共和国, ウイグル人民病院), 7月1日~12月31日, 2007(五峯ライフサイエンス研究助成), 共同研究(矢口貴志).

教育活動

1. インターンシップ生(実習生)の受け入れ

- 1) 五ノ井 透: 日本大学生産工学部応用分子化学科3年(太田和孝弘)を実習生として(8月30日~9月12日, 2007).

講義

- 1) 五ノ井 透, 矢口貴志: 千葉大学普遍教育(真菌(カビ)と人との関わり合い).
- 2) 矢口貴志, 田中玲子: 千葉大学医学部微生物実習.
- 3) 矢口貴志, 田中玲子: 千葉県産業支援技術研究所「微生物の分離・同定技術」コース, 生理試験・形態観察を中心としてカビ・酵母の同定方法について(10月12日, 2007).
- 4) 矢口貴志: 千葉大学園芸学部細胞工学.

センター講習会

- 1) 五ノ井 透: 第3回病原真菌外国人講習会「Application of microarray technique in the identification of pathogenic fungi」(2007. 8. 3).
- 2) 矢口貴志: 第3回病原真菌外国人講習会講師「Basic mycology」 「Observation of *Aspergillus* and related fungi」 「Dermatophytes, dematiaceous fungi and *Sporothrix*」 「Scanning electron microscopy」 (2007. 7. 31, 8. 1, 2).
- 3) 田中玲子: 第3回病原真菌外国人講習会講師「Taxonomy on pathogenic yeasts」 (2007. 8. 2).
- 4) 矢口貴志: 第21回病原真菌講習会講師「病原性ア

スペルギルス」 「新興病原真菌」 「病原性接合菌」 (2007. 7. 26, 27).

- 5) 田中玲子: 第21回病原真菌講習会講師「基本手技」 「酵母の同定法」 「酵母結果判定」 (2007. 7. 24, 25, 27).

外部資金

科学研究費補助金

- 1) 五ノ井 透(分担): 科学研究費補助金 基盤研究 C 18580112 心的ストレスによる生体防御能の低下: 脂質摂取による改善効果とその分子機構の解明, 平成18~19年(平成19年度は110万円, 間接経費33万円).
- 2) 矢口貴志(代表) 田中玲子(分担): 科学研究費補助金 基盤研究 B 18405005 海外学術調査 中央アジアにおける真菌症原因菌および関連菌の生態研究, 平成18~21年度(平成19年度は330万円, 間接経費99万円).
- 3) 田中玲子(代表), 矢口貴志(分担): 科学研究費補助金 基盤研究 C 18510201 病原真菌の系統分類学および生態学的研究, 平成18~20年度(平成19年度は130万円, 間接経費39万円).

その他の外部資金

- 1) 矢口貴志(代表): 平成19年度 五峯ライフサイエンス国際基金(代表)「新疆ウイグル地区における病原真菌の形態と分子系統解析による分類研究」(外国人研究者長期招聘) 277万円.
- 2) 矢口貴志(分担): (財)発酵研究所第1回特定研究助成「我が国における微生物の多様性解析とインベントリーデータベースの構築-亜熱帯地域と冷温帯地域の比較から」, 平成19~21年度(平成19年度は100万円).
- 3) 五ノ井 透, 矢口貴志, 田中玲子(分担): ナショナルバイオリソースプロジェクト「病原微生物」, 平成19~23年度.
- 4) 矢口貴志, 田中玲子(分担): 科学技術振興調整費 アジア科学技術協力推進戦略・地域共通課題解決型国際共同研究: 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成, 平成18~20年度.

学長裁量経費

- 1) 矢口貴志(代表): 凍結乾燥機, 平成19年度 350万

円.

共同研究

- 1) 矢口貴志 (代表): 花王 (株), 平成 19 年度「カビの菌種迅速識別・同定法の確立」(77 万円, 間接経費 23 万円).

受託研究生受け入れ

- 1) 矢口貴志 (代表): ニムラ・ジェネリック・ソリュー

ションズ, 平成 19 年度「真菌の分離法の開発とその応用」.

奨学寄附金

- 1) 矢口貴志 (代表): アステラス製薬 (株), 50 万円.
- 2) 矢口貴志 (代表): ニムラ・ジェネリック・ソリューションズ, 50 万円.

病原真菌研究部門 真菌資源開発分野

(Department of Pathogenic Fungi, Division of Fungal Resources and Development)

教授：福島和貴（2007年3月まで）

○学内委員 目標・策定委員会委員，学内評価委員会専門部会委員（研究活動等），海洋バイオシステム研究センター連絡協議会委員，有害廃棄物処理施設運営委員会委員，有害廃棄物処理施設内運用委員会委員，光熱水料削減プロジェクト部局リーダー，亥鼻地区施設整備委員会亥鼻地区専門部会委員，医学薬学府・薬学研究院総合研究棟建設検討委員会委員，大学院医学研究科（医学系）委員会委員，大学院自然科学研究科教授会委員，病原真菌研究部門の危害防止主任者，インキュベーション施設に関するワーキンググループ会議委員

○センター内委員 運営協議会委員，教員会議委員，共用備品管理委員会委員長，将来計画委員会委員，総務委員会委員，倫理審査委員会委員，自己点検・評価委員会委員，光熱水料削減プロジェクト部局リーダー

○学協会への貢献 日本医真菌学会評議員，日本細菌学会評議員，日本菌学会評議員

○所属学会 日本医真菌学会，日本薬学会，日本細菌学会，日本菌学会，日本菌学会関東支部会，日本化学療法学会，International Society of Human and Animal Mycology

准教授：横山耕治

○学内委員 総合メディア基盤センター運用専門委員，亥鼻地区職員駐車場地域利用委員，部局情報管理者

○学外委員 日本医真菌学会評議員

○センター内委員 教員会議委員，総務委員会委員，共同備品委員会委員，共同利用委員会委員，微生物・保存管理施設委員会委員，広報委員会委員，放射性同位元素委員会委員長，自己点検・評価委員会委員，地域連携委員会委員，研究推進チーム委員，個人評価WG委員，光熱水量削減プロジェクトWG委員

○所属学会 日本医真菌学会，日本細菌学会，日本菌学会，日本微生物資源学会，日本農芸化学会，日本マイコトキシン学会，International Society of Human and Animal Mycology

非常勤講師：村山琮明（北里大学 北里生命科学研究
所 & 大学院感染制御科学府）

技術補佐員：各務清美（2006. 9～）

屋久玲子（2007. 6～）

外国人研究員：賀丹（中国吉林大学）

（2006. 8～2007. 1）

郭亮（中国吉林大学）

（2007. 7. 29～8. 6）

研究概要

1. アキレス腱周囲の肉芽腫から分離された真菌の分子
同定に関する研究

左アキレス腱周囲の肉芽腫から灰緑色の糸状菌が分離され，本菌の rDNA の ITS，D1/D2 領域の塩基配列を解析し，両領域の配列から *Pleurostomophora richardsiae* と同定した．本菌は，2004 年に *Phialophora* 属から移され，パルプを青変させる環境菌として知られているが，ヒトへの感染は 1968 年アメリカでの例を初に今まで 20 例ほどが免疫不全患者に報告されている．本症例の患者は糖尿病の罹患歴があった．本菌種の保存株（11 株）を解析した結果，ITS で 6bp，D1/D2 で 1bp の種内多系が認められた．（福島和貴，滝澤香代子）

2. 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成

文部科学省・振興調整費－アジア科学技術協力の戦略的推進・地域共通課題解決型国際共同研究－プロジェクトにおいて，「研究課題：真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成」で，これまでの実績と取り組みが評価され，研究調査が進められることになり，昨年度に引き続き，代表者；千葉大学真菌医学研究センター三上襄，千葉衛生研究所（高橋主席研究員），長春－吉林大学（王教授），北京－北京大学（李教授），広州－中山大学（席教授），貴陽－貴陽医学院（王教授），新疆－新疆医科大学（惠教授，Paride Abliz 助教授），センター内参加者；亀井教授，川本教授，矢口准教授，田中助教，横山准教

授で進めている。

昨年は、長春－吉林大学、北京－北京大学、広州－中山大学、貴陽－貴陽医学院を訪問し、今後の共同研究の進め方を話し合い、共同研究の同意を得た。各地域で土壌採取を行い、吉林大学で真菌の分離作業を行った。

今年、吉林省長白山周辺の国定公園外の地域を対象にサンプルの採取を行った。今年予定していたウイグル自治区南疆鉄道沿いの調査研究を計画していたが、事情により変更し陝西省（西安）、四川省（成都）、雲南省（西双版纳、景洪、麗江）の調査研究を行った。さらに、北京大学第一医院李教授を訪問し、来年長春市で開催予定している真菌フォーラムの打ち合わせ、菌株の交換を行った。広州においては、中山大学席教授と研究打ち合わせ、広東省農業科学院作物研究所を訪問し、植物病原菌に対する耐性種の育種に関する研究紹介を受け、真菌フォーラムの打ち合わせを行った。貴陽においては、安順病院を訪問、貴州省医学分子生物学重点实验室、皮膚科研究室の研究紹介を受け、研究打ち合わせを行った。

今後は、各拠点での真菌症の実態調査及び中国陝西省、四川省、雲南省における真菌生態に関する研究を行い、本プロジェクトの成果を真菌フォーラムにおいて病原真菌のセッションを開催して総括する予定である。（横山耕治、王麗、賀丹、各務清美、屋久玲子）

3. 中国東北部における真菌感染症調査および拠点形成

日中医学協会奨学寄付金（2006年単年度）を獲得でき、中国吉林省長春 吉林大学白求恩基礎医学院を訪問し、真菌症の調査を行った、本年も引き続き、中国東北部黒竜江省、吉林省の土壌からの真菌の分離を吉林大学との共同研究で行っている。中国の広範囲な *Aspergillus section Nigri* の生態解析の貴重なデータとなっている。（横山耕治、王麗、賀丹、各務清美、屋久玲子）

4. チトクローム *b* 遺伝子解析に基づく真菌の進化系統解析

既に解析の済んでいる病原真菌と関連菌のチトクローム *b* 遺伝子からアミノ酸配列を推定し、真核生物のチトクローム *b* のアミノ酸配列と比較し、化石年代、地質年代とを考慮して、各真菌の進化系統を推定している。化石年代から推定する場合に、現存種の古代化石なのか絶滅種の化石なのかの判定は困難であるが、誤差を考慮して推定している。成長様式、繁殖様式など生物種固有の

様式を進化と関連させて多方面からの考慮が必要であると考えた。（横山耕治、王麗、Biswas KS）

5. チトクローム *b* 遺伝子に基づく病原真菌の同定・系統解析および真菌症の迅速診断

チトクローム *b* 遺伝子の解析は、継続し行われている研究テーマで、すでに病原性の *Aspergillus* 属菌、*Candida* 属菌、*Cryptococcus* 属菌、*Rhodotorula* 属菌、*Exophiala* 属菌、*Cryptococcus neoformans* ver. *neoformans*, var. *gattii*, *Trichosporon* 属菌については、8年間で15報の論文を発表している。真菌症原因菌の迅速診断のためのプライマーセットなどの特許を千葉大学から申請し、迅速診断に係わる申請数は、5件となった。今年、希に真菌症を起こす *Aureobasidium*, *Geotrichum*, *Graphium*, *Beauveria* 属菌群の解析を行い系統関係を明らかにした。しかし、これらの菌群には既存のPCRプライマーでは増幅できない菌種、株を含むためプライマーの設計を行っている。（横山耕治、王麗、Biswas KS、賀丹、各務清美、屋久玲子）

6. 病原性発現遺伝子、形態形成関連遺伝子の解析

Candida albicans の二形性に関する研究を続けており、本菌の遺伝子をスライドグラスにプリントしてマイクロアレーを作成した。病原性の強い株と弱い株との間に遺伝子発現にどのような違いがあるかをDNAマイクロアレーを用いて解析し、発現遺伝子に違いのあることを明らかにした。しかし、DNAマイクロアレーは、遺伝子発現を調べるために有効な手法であるが、遺伝子の発現制御やリン酸化などによるシグナル伝達などの変化は解析しにくい。このため放射性同位元素を用いた解析を含めて今後検討する予定である。（横山耕治、各務清美）

7. 真菌症の疫学および真菌生態に関する研究

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) 法により、菌株の個体識別を行い、病原真菌の株識別による疫学的考察と真菌の生態を把握できるものと考え研究を開始した。輸入真菌症原因菌 *P. marneffei* のAFLP法の条件設定を行い、解析の結果、個体識別が可能であり、個体間の近縁関係を示していると考えられ、感染菌の近縁関係から感染地や感染菌の移動が推定できた。

菌株の個体識別は、真菌症疫学にとって重要な要素であり、株間類縁関係解析に欠かせない。従って、AFLP

法は、真菌症疫学や真菌生態解明に有効であり、今後の進展が期待できる。(横山耕治, 各務清美, 屋久玲子)

8. 真菌資源の長期安定保存法の開発

菌糸形細胞は、酵母形や分生子と異なり乾燥保存には耐えにくく、保存中に死滅する場合が多い、特に分生子を作らない株や作りにくい種においては、従来のL-乾燥保存には耐えられない、そこで、乾燥前の処理に工夫を凝らし、分散媒や乾燥保護剤を検討してL-乾燥で保存できる方法を開発中で、このテーマで2007年3月まで(財)発酵研究所から研究助成を受けた。自作のコルクボーラーを用いて、培地ごとL-乾燥させる方法を用いて、従来のL-乾燥法では保存できない、胞子を形成しない*S. commune* 1核菌糸体および2核菌糸体、通常のL-乾燥法では保存できない*E. floccosum* 69株について、このDL-乾燥法を用いた結果63株(91%)で保存可能であった。しかし、一部の株にはこの保存法が適用できなかったのも、更に保存法を検討する必要もある。(横山耕治, 伊藤純子)

研究成果の発表

1. 著書

- 1) 横山耕治(分担): 真菌の保存法 P176-182. 病原性真菌ハンドブック 編者: 宮治 誠, 医薬ジャーナル社. 2007.
- 2) 横山耕治(分担): 深在性真菌症原因真菌の最新分類は?. P28-30. 深在性真菌症 Q&A. ~2007ガイドラインを踏まえて~編者: 河野 茂, 医薬ジャーナル社. 2007.
- 3) 横山耕治(分担): 検出菌の性状検査と分類・同定真菌類 P21-39. 微生物管理実務と最新検査法 技術情報協会. 2007.

2. 原著論文

英文

- 1) Zeng JS, Fukushima K, Takizawa K, Zheng YC, Nishimura K, Gräser Y, De Hoog GS: Intraspecific diversity of species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *J Med Mycol* 45(6): 547-558, 2007. (査読有)
- 2) Moretti A, Fukushima K, Takizawa K, Suzuki M, Vidotto V, Cannizzo FT, Boncio L, Bollo E: First

report of oral colonization by *Debaryomyces nepalensis* in a dog. *Mycopathologia* 164: 189-192, 2007. (査読有)

- 3) Zeng JS, Fukushima K, Zheng YC, Takizawa K, Nishimura K: Comparison among inoculum forms of *Pseudallescheria boydii* isolates on antifungal susceptibility to three azole agents in vitro. *Chin J Leprosy Skin Dis* 23: 12, 2007. (査読有)
- 4) Ko HS, Taguchi H, Takizawa H, Fukushima K, Kim HS: The enzymatic Approach of Zygomycosis-causing Mucorales. *Kor J Med Mycol* 12(1): 9-17, 2007. (査読有)
- 5) Paride A, Fukushima K, Deng SW, Takizawa K: Molecular typing of *Trichophyton schoenleinii* isolated in Xinjiang, China by PCR-RAPD. *Chin J Dermatol* 40(8): 499, 2007. (査読有)
- 6) Nakadate S, Nozawa K, Horie H, Fujii Y, Nagai M, Hosoe T, Kawai K, Yaguchi T, Fukushima K: Eujavanicols A-C, Decalin derivatives from *Eupenicillium javanicum*. *J Nat Prod* 70: 1510-1512, 2007. (査読有)

邦文

- 1) 矢口貴志, 滝澤香代子, 田口英昭, 田中玲子, 窪田 規, 窪田宣昭, 窪田正昭, 福島和貴: ナノ銀粒子を静電吸着させたコラーゲン水解ペプチド(GX-95)の抗真菌活性, *真菌誌* 48(2): 97-100, 2007. (査読有)

3. 総説・解説・その他

- 1) 横山耕治, 王 麗: 中国東北部における真菌感染症調査および拠点形成 2006年度調査・共同研究助成報告 P47. *日中医学* 22. 2. 2007.

4. ワークショップ(国際学会)

- 1) Xi LY, Sun JF, Lu CM, Liu HF, Fukushima K, Takizawa K, Xie Z, De Hoog S: Molecular epidemiology of the agents of Chromoblastomycosis and one mutant of *Fonsecaea monophora* in South China. ISHAM Black Yeast Workshop: Black Yeasts and Related Fungi and on Chromoblastomycosis. CBS, The Netherlands, April 26-28, 2007.
- 2) Zeng, JS, Fukushima K, Takizawa K, Zeng YC, Nishimura K, Graeser Y, de Hoog GS: Molecular intraspecific diversity of *Pseudallescheria boydii* with

recombination: multi-locus analysis. 2nd Meeting of the ECMM-0ISHAM working group on *Pseudallescheria/Scedosporium* infections. Angers, France, 2007.

5. 一般発表

国内学会

一般講演

- 1) 若菜大吾, 細江智夫, 板橋武史, 滝澤香代子, 福島和貴, 河合賢一: *Malbranchea filamentosa* IFM41300 の成分探索. 第 51 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 10月6日, 2007.
- 2) 笠原広之, 細江智夫, 板橋武史, 河合賢一, 滝澤香代子, 福島和貴: *Malbranchea multicolor* の成分探索 (2). 第 51 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 10月6日, 2007.
- 3) 滝澤香代子, 片岡晶志, 中野忠男, 大楠清文, 福島和貴: 左アキレス腱周囲の肉芽腫から分離された *Pleurostomophora richardsiae* について. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1号): 73, 高山, 11月9~10日, 2007.
- 4) 中楯 奨, 野沢幸平, 堀江 均, 藤井祐一, 佐藤博泰, 細江智夫, 河合賢一, 矢口貴志, 福島和貴: *Eupenicillium javanicum* の産生する新規抗真菌環状アプシペプチド. 日本薬学会第 127 年会 講演要旨集 IV p109, 富山, 2007年3月28~30日.
- 5) 横山耕治, 賀 丹, 各務清美, Biswas SK, 王 麗: チトクローム *b* 遺伝子に基づく *Geotrichum* 属菌の系統解析. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1号) p72, 岐阜 高山, 11月9~10日, 2007.
- 6) 王 麗, 賀 丹, 各務清美, 横山耕治: 希な真菌症原因菌を含む *Graphium* 属菌のチトクローム *b* 遺伝子解析. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1号) p72, 岐阜 高山, 11月9~10日, 2007.
- 7) 各務清美, 賀 丹, 王 麗, 横山耕治: 輸入真菌症原因菌 *Penicillium marneffei* の AFLP 解析による疫学的研究. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1号) p72, 岐阜 高山, 11月9~10日, 2007.
- 8) 奥 幸夫, 高橋尚道, 横山耕治, 宮治 誠: 皮膚糸状菌に対する Liranaftate の殺菌活性 (第 2 報). 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1号) p86, 岐阜 高山, 11月9~10日, 2007.

共同研究

1. 国際共同研究

- 1) 福島和貴: AIDS と真菌症に関する研究, Valerio Vidotto 教授, イタリア, トリノ大学.
- 2) 福島和貴: 中国南西地域における真菌症の疫学研究, 席 麗艶 教授, 中国, 中山大学附属第二医院.
- 3) 福島和貴: 接合菌の生化学, 酵素学的研究, Galba Maria de Campos-Takaki 教授, ブラジル, ペルナンブコカソリック大学.
- 4) 福島和貴: 病原真菌の系統保存と疫学研究, Cristina Souza Motta 助教授, ブラジル連邦立ペルナンブコ大学.
- 5) 福島和貴: Comparative genomics in search of origins of human pathogenicity in the fungal tree of life focusing on species with high morbidity and mortality in Chinese patients, G. S. de Hoog 教授, オランダ, CBS.
- 6) 福島和貴: ブラジルにおける土壌中のカビ毒産生菌とヒトの病原真菌の生態, 分布と種多様性, Kaoru Okada 助教授, ブラジル, ペルナンブコカソリック大学.
- 7) 福島和貴: 中国西部における真菌症の疫学研究, Paride Abliz 助教授, 中国, 新疆医科大学.
- 8) 福島和貴: スペインにおける病原酵母 *Cryptococcus neoformans* の疫学的研究, Maria Francisca Colom Valiente 助教授, スペイン, Miguel Hernandez 大学.
- 9) 福島和貴: *Pseudallescheria boydii* complex の多様性解析, 曾 敬思 講師, 武漢医科大学, 中国.
- 10) 横山耕治: チトクローム *b* 遺伝子に基づく菌類の同定と系統解析. 王 麗 教授 (中国 吉林大学).
- 11) 横山耕治: チトクローム *b* 遺伝子に基づく酵母類の同定と系統解析. Biswas SK 博士 (アメリカ合衆国 ペンシルバニア医科大学).
- 12) 横山耕治: 中国東北部における真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成 王 麗 教授 (中国 吉林大学).
- 13) 横山耕治: 中国東中部における真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成 李若瑜 教授 (中国 北京大学).
- 14) 横山耕治: 中国東南部における真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成, 席麗艶 教授 (中国 広州 中山大学).

- 15) 横山耕治: 中国南西部における真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成, 王 和 教授 (中国貴陽医科大学).
- 16) 横山耕治: 中国西部における真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成, 惠 艶 教授 (中国新疆医科大学).
- 17) 横山耕治: 中国南西部における真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成, Paride Abliz 助教授 (中国 新疆医科大学).

国際交流

1. 海外渡航

- 1) 横山耕治: 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成 (文部科学省振興調整費) 中国吉林省長春 吉林大学白求恩基礎医学院, 1月14日～21日, 2007.
- 2) 横山耕治: 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成 (文部科学省振興調整費) 中国吉林省長春 吉林大学白求恩基礎医学院, 8月26日～9月2日, 2007.
- 3) 横山耕治: 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成 (文部科学省振興調整費) 中国吉林省長春 吉林大学白求恩基礎医学院, 8月26日～9月2日, 2007.
- 4) 横山耕治: 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成 (文部科学省振興調整費) 中国吉林省長春 吉林大学白求恩基礎医学院, 10月21日～11月4日, 2007.
- 5) 横山耕治: 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成 (文部科学省振興調整費) 中国北京大学第一医院, 広州市中山大学第二医院, 貴陽市貴陽医学院, 11月25日～12月6日, 2007.

2. 海外研究者の受け入れ

横山耕治

- 1) 賀 丹 助手 (中国吉林大学), 2006年8月1日～2007年1月31日, (財)発酵研究所助成金による外国人受け入れ, 招聘.
- 2) 郭 亮 (中国吉林大学), 2007年7月29日～2007年8月5日, 外国人向け病原真菌講習会参加, 共同研究.
- 3) 王 麗 教授 (中国吉林大学), 2007年11月11日～2008年2月11日, 生態分野客員教授, 共同研究.

講義

- 1) 横山耕治: 医学部4年次医学生命科学特論・研究 (2007).
- 2) 横山耕治: 普遍教育.

外部資金

その他の外部資金

- 1) 福島和貴 (分担): 三上 襄 (代表) 「ナショナルバイオリソースプロジェクトー病原微生物」.
- 2) 福島和貴 (分担): 三上 襄 (代表) 科学技術振興調整費「真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成」.
- 3) 横山耕治 (代表): (財)発酵研究所: 菌糸形菌体の長期保存法の開発および保存株の品質評価, 平成18年度 (平成19年3月末日) 300万円.
- 4) 横山耕治 (分担): 文部科学省振興調整費. プログラム名: アジア科学技術協力の戦略的推進地域共通課題解決型国際共同研究. 課題名: 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成.

病原真菌研究部門 生態分野

(Department of Pathogenic Fungi, Division of Ecology)

外国人客員教授：王 麗

(中国 吉林大学 白求恩医学部病原生物学教室 教授, 主任)

任期: 2007年11月12日～2008年2月11日

- 学会および社会における活動等 日本医真菌学会会員, 日本真菌学会会員, 日本マイコトキシン研究会会員, 中国微生物学会真菌専門委員会委員, 中国菌物学会医学真菌専門委員会委員, 吉林省微生物学会常务理事, 吉林省微生物学会医学専門委員会主任, 吉林省预防医学会理事, 《中国真菌学雑誌》編集委員, 中国国家自然科学基金評議員, 中国国家留学基金 評議員, 中国高等学校博士点基金项目評議員, 吉林省創新基金 評議員

助教：田口英昭

- 学内委員 光熱水量節減リーダー会議, 亥鼻地区光熱水量節減WG, 亥鼻地区職員等駐車区域利用者委員会, 亥鼻地区 ISO 実行委員会
- 学協会への貢献 日本医真菌学会評議員
- 国および地方公共団体への貢献 千葉市環境影響評価委員
- センター内委員 共同利用委員会委員, 微生物・保存管理施設運営委員会委員, 組織・機能改善委員会委員, 有害廃棄物委員会, 放射線同位元素, 防災対策, 組織機能改善, 図書 WG, 光熱水料節減 WG, 微生物管理 WG
- 所属学会 日本医真菌学会, 日本感染症学会, 日本防菌防黴学会, 日本内分泌攪乱化学物質学会
- その他 H18年度亥鼻地区職員等駐車区域利用者委員会会計監査員

技術専門員：滝澤香代子

非常勤講師：久米 光 (日本医科大学客員教授)

研究概要

1. 真菌の生態に関する研究

文部科学省・振興調整費－アジア科学技術協力の戦略



的推進・地域共通課題解決型国際共同研究－プロジェクトにおける「研究課題：真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成」において、中国側拠点の中心的役割を担い、吉林省はもとより、中国各拠点との連絡やサンプルの採取と土壌サンプルからの真菌の分離、同定を行っている。本年（2007年）は、昨年採集した土壌から真菌の分離を行い、22株の同定を行った。さらに分離を進めており、さらに、中国国内の18ヶ所に於いて36の土壌を採取した。

臨床分離株も各拠点から分譲を受けて、真菌症の疫学、真菌の生態に関する共同研究を行っている。

今年は、当研究室、吉林大学 白求恩医学部 病原生物研究室より、賀丹、郭亮が、研究生として訪れ共同研究が促進された。(王、横山)

2. 真菌症の疫学的研究

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) 法により、菌株の個体識別を行い、病原真菌の疫学的考察と真菌の生態の解析を行っている。共同研究に基づき、輸入真菌症原因菌 *P. marneffei* の AFLP 法による解析の結果、個体識別可能であり、個体間の近縁関係を示していると考えられ、感染菌の近縁関係から感染地や感染菌の移動が推定できた。

菌株の個体識別は、真菌症疫学、真菌生態にとって重要な要素であり、株間類縁関係解析に欠かせない。従って、AFLP 法は、真菌症疫学や真菌生態解明に有効であると考え研究を続けている。(王、横山)

3. *Aspergillus fumigatus* の菌糸成長速度を指標とした各種抗真菌剤による治療効果の研究

トリアゾール系抗真菌薬 voriconazole (VRCZ) とファンデン系抗真菌薬 micazole (MCFG) および caspophandin (CAS) の血清中での併用効果を評価するため、ヒト血清中で *Aspergillus fumigatus* を培養し、その菌糸に対する VRCZ と MCFG 或は CAS の併用による成長抑制効果を菌糸成長速度を指標として検討した。侵襲性肺アスペルギルス症患者からの分離株を PDA slant で 35 °C 72 時間培養後、分生子を集めた。ヒト血清は健康成人より採取した血液より分離し、56 °C、30 分熱処理して用いた。被験菌の MIC は酵母様真菌 DP “栄研” を用い、菌接種後 48 時間で測定した。併用効果の検討には VRCZ 0.125 と 0.25 µg/ml と MCFG 5.23 µg/ml (50 mg を単回投与した場合の血漿中 Cmax), CAS 0.5 µg/ml として、(1) 2 剤を同時に添加、(2) VRCZ を先に作用させ一定時間後に MCFG 或は CAS を作用する、(3) MCFG 或は CAS を先に作用させ一定時間後に VRCZ を作用する三系について検討した。その結果、今回用いた VRCZ の薬剤濃度において濃度依存性が確認された。また、VRCZ と MCFG および VRCZ と CAS の併用効果はいずれも MCFG 或は CAS を先に作用させた系で併用効果を確認した。(田口、渡辺、佐藤、豊留、亀井)

4. Green tea polyphenols の抗真菌効果の研究

緑茶から抽出された epigallocatechin 3-O-gallate (EGCg) の抗真菌活性を検討するために *Trichophyton mentagrophytes* (*T. mentagrophytes*), *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*), *Microsporum canis* (*M. canis*) および *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) を用い、AMPH, FLCZ, 5FC, ITCZ, MCFG, MCZ および VRCZ との抗真菌効果の比較検討を行った。供試した菌種中では、*T. mentagrophytes*, *T. rubrum* および *M. canis* に FLCZ と同等かそれ以上の抗菌活性を確認した。しかし、*A. fumigatus* は EGCg に対する感受性は低かった。EGCg は光で分解するために今後、光に安定なカテキン誘導体の抗真菌活性を検討する予定である。(田口、玄、朴、高鳥、亀井)

5. *Trichophyton verrucosum* の分子疫学的研究

人獣共通真菌症起因菌 *Trichophyton verrucosum* の分子疫学的研究のために、特にウシ分離株を多く収集し

た。IFM 保存のヒト分離株および CBS 購入株を加えて、rDNA 領域の配列検討を主に ITS, D1D2 を中心に行った。本研究における最重要課題は核酸の抽出であった。設計したプライマーにより増幅した ITS の配列には、3 グループに分類される特徴的な ITS1 領域が存在した。主グループに属したウシ分離株 (25 株) について、1bp の塩基置換を持つ 2 株以外の全てが同一の塩基配列を示した。また解析した 19 株の D1D2 領域の塩基配列は、ヒト分離株 2 株の塩基置換が大きく異なる他、他の 17 株は全て同一の塩基配列を示した。(滝澤)

6. 骨髄炎罹患のイヌより分離された *Schizopphyllum commune* について

骨髄炎に罹患したイヌのバイオプシ骨髄液から分離された真菌について、交配試験と分子生物学的検討 (rDNA の ITS 及び D1/D2 領域の塩基配列) により、*Schizopphyllum commune* 1 核菌糸体と同定した。本菌の動物への感染例としては 2 例目となるが、骨髄炎からは初分離となった。(滝澤)

7. アキレス腱周囲の肉芽腫から分離された真菌の同定

糖尿病の持病をもつ整形外科患者の左アキレス腱周囲の腫脹部の穿刺検体から灰緑色の糸状菌が分離され、*Pleurostomophora richardsiae* と同定した。ヒトへの感染報告例は非常に少なく、本邦では 3 例目となった。(滝澤)

研究成果の発表

1. 原著論文

英文

- 1) Ko HS, Taguchi H, Takizawa K, Fukushima K, Kim HS: The enzymatic approach of Zygomycosis-Causing Mucorales. Korean Journal of Medical Mycology, 12, 9-17, 2007. (査読あり)
- 2) Texeira ABA, Moretti ML, Machado HC, Nishimura K, Taguchi H, Schreiber AZ: Evaluation of the inhibitory effect of amphotericin B on the apical growth of *F. solani* using the BioCell Tracer System. Mycoses, 50, 183-188, 2007. (査読有)
- 3) Zeng JS, Fukushima K, Takizawa K, Zheng YC, Nishimura K, Gräser Y, De Hoog GS: Intraspecific diversity of species of the *Pseudallescheria boydii* complex.

J Med Mycol 45(6): 547-558, 2007. (査読有)

- 4) Moretti A, Fukushima K, Takizawa K, Suzuki M, Vidotto V, Cannizzo FT, Boncio L, Bollo E: First report of oral colonization by *Debaryomyces nepalensis* in a dog. Mycopathologia 164: 189-192, 2007. (査読有).
- 5) Zeng JS, Fukushima K, Zheng YC, Takizawa K, Nishimura K: Comparison among inoculum forms of *Pseudallescheria boydii* isolates on antifungal susceptibility to three azole agents in vitro. Chin J Leprosy Skin Dis 23: 12, 2007. (査読有).
- 6) Paride A, Fukushima K, Deng SW, Takizawa K: Molecular typing of *Trichophyton schoenleinii* isolated in Xinjiang, China by PCR-RAPD. Chin J Dermatol 40(8): 499, 2007. (査読有).

邦文および中国語

- 1) 焦立新, 张云峰, 贺丹, 张波, 宋文刚, 王丽: 一种念珠菌蛋白质的提取方法. 中国组织工程研究与临床康复, 11(8): 1540. 2007. (査読有)
- 2) 张波, 贺丹, 王爽, 张云峰, 杨艳秋, 王丽, 横山耕治: 儿童真菌感染常见病病原菌及药敏试验研究. 中国妇幼保健, 22(1): 78-81. 2007. (査読有)
- 3) 宋文刚, 孔祥宇, 韩中波, 崔新颖, 王丽: 茜草素在体外抗菌活性的研究. 中国地方病防治杂志, 22(1): 69-70. v (査読有)
- 4) 张云峰, 焦立新, 贺丹, 宋文刚, 孙文通, 横山耕治, 王丽: 白色念珠菌总 RNA 的提取方法. 吉林大学学报医学版, 33(2): 359-361. 2007. (査読有)
- 5) 王爽, 贺丹, 王丽, 杨艳秋, 张波, 郭亮, 张云峰: 117 株临床分离念珠菌的鉴定及药敏试验分析. 中华皮肤科杂志, 40(8): 502-503. 2007. (査読有)
- 6) 于军, 贺丹, 张贯石, 石博, 左文静, 王丽: 医院环境中细菌及真菌的分布 7) 情况调查分析. 中国实验诊断学, 11(5): 673-675. 2007. (査読有)
于军, 苏学今, 王丽.: 射干, 金银花等八种中药抗真菌实验研究. 军医进修学院学报, 28(4): 299-300. 2007. (査読有)
- 7) 矢口貴志, 滝澤香代子, 田口英昭, 田中玲子, 窪田規, 窪田宣昭, 窪田正昭, 福島和貴: ナノ銀粒子を静電吸着させたコラーゲン水解ペプチド (GX-95) の抗真菌活性, 真菌誌 48(2): 97-100, 2007. (査読有)

2. ワークショップ (国際学会)

- 1) Xi LY, Sun JF, Lu CM, Liu HF, Fukushima K, Takizawa K, Xie Z, De Hoog S: Molecular epidemiology of the agents of Chromoblastomycosis and one mutant of *Fonsecaea monophora* in South China. ISHAM Black Yeast Workshop: Black Yeasts and Related Fungi and on Chromoblastomycosis. CBS, The Netherland, April 26-28, 2007.
- 2) Zeng, JS, Fukushima K, Takizawa K, Zeng YC, Nishimura K, Graeser Y, de Hoog GS: Molecular intraspecific diversity of *Pseudallescheria boydii* with recombination: multi-locus analysis. 2nd Meeting of the ECMM-0ISHAM working group on *Pseudallescheria/Scedosporium* infections. Angers, France, 2007.

3. 一般発表

国内学会

- 1) 横山耕治, 賀丹, 各務清美, Biswas SK, 王麗: チトクローム *b* 遺伝子に基づく *Geotrichum* 属菌の系統解析. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1 号) p.72, 岐阜 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.
- 2) 王麗, 賀丹, 各務清美, 横山耕治: 希な真菌症原因菌を含む *Graphium* 属菌のチトクローム *b* 遺伝子解析. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1 号) p.72, 岐阜 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.
- 3) 各務清美, 賀丹, 王麗, 横山耕治: 輸入真菌症原因菌 *Penicillium marneffei* の AFLP 解析による疫学的研究. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1 号) p.72, 岐阜 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.
- 4) 田口英昭, 渡辺 哲, 佐藤綾香, 豊留孝仁, 亀井克彦: 【セレクトッドシンポジウム I. 内臓真菌症】 BCT による血清中 voriconazole の *Aspergillus fumigatus* に対する抑制効果と micafungin との併用効果の検討. 第 51 回日本医真菌学会総会, 48 (増刊 1): 68, 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.
- 5) 田口英昭, 渡辺 哲, 豊留孝仁, 亀井克彦: BCT による血清中 caspofungin の *Aspergillus fumigatus* に対する抑制効果及び voriconazole との併用の検討. 第 56 回日本感染症学会東日本地方会第 54 回日本化学療法学会東日本支部会, プログラム・講演抄録集 p. 89, 東京, 10 月 26 ~ 27 日, 2007.
- 6) 亀井克彦, 田口英昭, 佐藤綾香, 中室克彦, 田中昭

成, 山崎和俊: 新規化合物 ETS-F11 の抗真菌活性に関する検討. 日本防菌防黴学会第 34 回年次大会, 要旨集 p.29, 神戸, 8月30~31日, 2007.

- 7) 朴 奉柱, 朴 鍾喆, 田口英昭, 松澤哲宏, 玄 丞侏, 松村和明, 亀井克彦, 高鳥 浩: Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCg) の皮膚糸状菌に対する抗真菌活性に関する研究. 日本防菌防黴学会第 34 回年次大会, 要旨集 p.57, 神戸, 8月26~27日, 2007.
- 8) 若菜大吾, 細江智夫, 板橋武史, 滝澤香代子, 福島和貴, 河合賢一: *Malbranchea filamentosa* IFM41300 の成分探索. 第 51 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 10月6日, 2007.
- 9) 笠原広之, 細江智夫, 板橋武史, 河合賢一, 滝澤香代子, 福島和貴: *Malbranchea multicolor* の成分探索 (2). 第 51 回日本薬学会関東支部大会. 東京, 10月6日, 2007.
- 10) 滝澤香代子, 片岡晶志, 中野忠男, 大楠清文, 福島和貴: 左アキレス腱周囲の肉芽腫から分離された *Pleurostomophora richardsiae* について. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1号): 73, 高山, 11月9~10日, 2007.

共同研究

1. 国際共同研究

- 1) 当センターと中国 吉林大学 白求恩医学部 病原生物学教室 との共同研究を初めとして, 北京-北京大学, 広州-中山大学, 貴陽-貴陽医学院との共同研究を進めている. (王)
- 2) Park JC (延世大学医学部・准教授): シード化合物の真菌に対する薬剤効果の検討. (田口)
- 3) 中国中山大学附属第二医院 席 麗艶教授と Chromoblastomycosis 患者から分離された *Fonsecaea* 属菌の同定ならびに疫学的研究を行っている. 中国南部地域で分離された 20 株, 東部の 3 株, 北部からの 1 株について再評価を行った. 形態, rDNA の ITS の塩基配列, RAPD 解析の結果, 南部分離株の全てが *F. monophora*, 他の 2 地域の 4 株は *F. pedrosoi* と同定された. 他の対照菌株 63 株との系統関係においては, 中国南部で分離された *F. monophora* は独自のクラスターを形成し, 分離地域との関連性を示

す結果が得られた. (滝澤)

- 4) 中国華中科技大学同濟医学院 曾 敬思博士との共同研究で, ブラジル株を中心に, 日本, コロンビア, ドイツ, オランダで分離された *Trichosporon* 属菌を用いて, rDNA D1D2 領域の塩基配列による再同定を行った. また IGS 領域のサブタイピングでは, *T. asabii*, *T. faecale*, *T. japonicum* の配列から, 其々 7, 2, 2 グループに分けらる結果が得られた. (滝澤)

2. 共同利用研究以外の国内共同研究

- 1) 宮崎大学農学部人獣共通感染症教育部 小菅洵子講師と人獣共通真菌症起因菌 *Trichophyton verrucosum* の分子疫学的研究を行っている. ウシからの分離株を中心に, IFM 保存のヒト分離株および CBS 購入株を加え, rDNA における塩基多型からのサブタイピングを行っている. (滝澤)
- 2) 大分大学医学部附属病院リハビリテーション部 片岡晶志准教授, 大分大学医学部附属病院検査部 中野忠男氏, 岐阜大学大学院医学系研究科病原体制御学分野 大楠 清文准教授との共同研究では整形外科患者より分離された *Pleurostomophora richardsiae* の分離, 同定を行った. (滝澤)
- 3) たなか動物病院 田中博二獣医師および神戸大学医学部医学医療国際交流センター 新矢恭子博士との共同研究で, 骨髄炎を罹患したイヌのバイオプシ骨髄液から *Schizophyllum commune* の分離, 同定を行った. (滝澤)

講義

普遍教育: 環境問題 B (環境保全化学と環境分析化学). (田口)

地域貢献

- 1) 千葉大学・千葉市の共同研究事業「水辺づくりにおける市民と行政のパートナーシップ形成」. (田口)

外部資金

その他の外部資金

- 1) 滝澤香代子 (代表): 科学研究費補助金 奨励研究 19924010 特にウシ・ヒト間, 人獣共通真菌症起因菌の分子疫学的研究 (63 万円).

分子機能研究部門 機能形態分野

(Department of Molecular Function, Division of Ultrastructure and Function)

教授：川本 進

○学内委員 大学院医学系運営委員会委員，大学院自然科学研究科教授会委員（～2007. 3），大学院融合科学研究科教授会委員（2007. 4～），学内評価委員会委員，分析センター連絡協議会委員，アイソトープ実験施設連絡協議会委員，バイオメデイカル研究センター教員会議委員，遺伝子組換え実験安全委員会委員，遺伝子組換え実験安全主任者，分子機能研究部門危害防止主任者，機能形態分野作業主任者，海外協定校コンタクトパーソン（ハンガリー共和国デブレツェン大学）

○センター内委員 運営協議会委員，教員会議委員，総務委員会委員，広報委員会委員長，地域連携委員会委員長，倫理審査委員会委員長，研究推進チームチームリーダー，自己点検・評価委員会委員，研究部門連絡会委員，再審査制度検討委員会委員，実験室内感染事故調査委員会委員

○学協会への貢献 日本医真菌学会編集委員，日本細菌学会・本部評議員・関東支部評議員・関東支部活性化推進委員会委員，日本生化学会・本部評議員・本部代議員・関東支部幹事・関東支部運営委員・関東支部副読本作成委員会委員，日本神経化学会評議員，ニューヨーク科学アカデミー会員

○所属学会 日本細菌学会，日本医真菌学会，日本菌学会，日本生化学会，日本分子生物学会，日本神経化学会，日本神経科学学会，酵母細胞研究会，American Society for Biochemistry and Molecular Biology, American Society of Microbiology, International Society for Human and Animal Mycology, Society for Neuroscience, New York Academy of Sciences

○その他 横浜市立大学医学部 客員教授，認定NPO法人・総合画像研究支援 正会員

准教授：山口正視

○学内委員 附属図書館運営委員会委員（～2007. 3），附属図書館亥鼻分館・運営委員会委員・展示委員会委員（～2007. 3），真菌医学研究センター教員系過半数代表者，両立支援室室長

○センター内委員 教員会議委員，総務委員会委員，共用備品委員会委員，共同利用委員会委員，広報委員会委員（年報担当WG委員長），自己点検・評価委員会委員，地域連携委員会委員，組織・機能改善委員会委員，図書WG委員長（～2007. 3），光熱水料削減プロジェクトWG委員，国際規制物質（酢酸ウラニル）管理者，個人情報保護担当者

○学協会への貢献 日本顕微鏡学会・本部監事（2007. 5～）・欧文誌編集委員（2007. 1～）・技術認定試験委員会委員・微生物研究部会幹事・奨励賞選考委員会委員（～2007. 12）・本部評議員・関東支部常任幹事（庶務担当，～2007. 3）・関東支部幹事・関東支部評議員，日本医真菌学会評議員，日本菌学会評議員，日本メンデル協会評議員，Member of the American Biographical Institute's distinguished Research Board of Advisors, USA.

○所属学会 日本顕微鏡学会，日本医真菌学会，日本菌学会，日本植物形態学会

○その他 認定NPO法人・総合画像研究支援 正会員・研究協力者，キトログリア会員

助教：伊藤恵美子

○センター内委員 動物WG委員，図書委員会委員，有害廃棄物委員会委員，放射性同位元素委員会委員

○学協会への貢献 Association of Official Analytical Chemist (AOAC) 委員

○所属学会 International Society on Toxinology

助教：清水公徳

○センター内委員 総務委員会委員，微生物・保存管理施設運営委員会委員，防災対策委員会委員，研究推進チーム委員，個人評価WG委員，光熱水料削減プロジェクトWG委員

○学協会への貢献 日本菌学会幹事・評議員

○所属学会 日本菌学会，日本医真菌学会，日本細菌学会，糸状菌分子生物学研究会，糸状菌遺伝子研究会，Fungal Genetics Conference

○その他 独立行政法人産業技術総合研究所外来研究員

技官：大楠美佐子

非常勤講師：明石 敏（大正製薬株式会社医薬研究所・
開発薬理研究室次席研究員・グループマネージャー）

非常勤講師：園田智子（横浜市立大学医学部）

特任教員：Eric V. Virtudazo

技術補佐員：大畑美穂子

技術補佐員：岡田 仁

大学院医学薬学府博士課程：李 皓曼

大学院融合科学研究科修士課程：清水 誠（2007. 4～）

大学院自然科学研究科修士課程：高木大輔（～2007. 3）

大学院自然科学研究科修士課程：清水仁聡（～2007. 3）

大学院医学薬学府修士課程：石井知里（～2007. 3）

大学院医学薬学府修士課程：山口哲朗

東邦大学理学部：清水 誠（～2007. 3）

大使館推薦外国人留学生：Jon Andre Ochoa de Eribe
Casas

研究概要（共同研究を含む）

1. *Cryptococcus neoformans* のプロテオーム解析

C. neoformans 細胞破碎抽出液を用いて、二次元電気泳動、タンパク質スポットの解析、アミノ酸配列解析、質量分析、データベース解析などプロテオーム解析を進めつつある。また、培養条件の異なった酵母プロテオームの変動を探索する目的で、細胞破碎抽出液の二次元電気泳動を行い、発現量の増減の顕著なスポットを検索して、その発現量が大幅に変わるタンパク質を網羅的に同定、解析、考察しつつある。また、酵母プロテオームの変動を探索する目的で、酵母破碎抽出液の、タンパク質発現ダイファレンシャル解析法 (DIGE) を行い、発現量の増減の顕著なスポットの検索、同定、解析を進めている。更に、アガロース二次元電気泳動法についても、タンパク質発現解析を行う為の条件検討（タンパク質抽出溶液、アセトン沈殿の有無、二次元電気泳動に用いるゲルの濃度及びタンパク質量）を行い、タンパク質スポットをインゲル消化後、質量分析計 (LC-MS/MS) にて、同定を行っている。

2. *Cryptococcus neoformans* の細胞周期制御の分子機構解析

病原性酵母 *C. neoformans* には、他の酵母には見られない、特異な細胞周期制御現象が観察され、本酵母の病

原性にも深く関わっていることを、我々はこれまでに明らかにして来た。一般に真核細胞の細胞周期制御分子機構の中心はサイクリン依存性キナーゼ (Cdk) 分子であり、Cdk タンパク質分子内の数カ所のアミノ酸残基のリン酸化・脱リン酸化反応などにより、その立体構造と生物機能とを大きく変化させる結果、Cdk 分子が様々な分子、特にサイクリン類と結合、解離することにより、そのタンパク質リン酸化酵素としての基質特異性を変化させて細胞周期を制御していると考えられている。これまでに、*C. neoformans* の細胞周期制御の中心に位置する Cdk1 (サイクリン依存性キナーゼ 1) とそれに相互作用する cyclin を *C. neoformans* から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いる。さらに、同定した遺伝子の相互関係を明らかにするために、タンパク質レベルでの相互作用もモデリングや *in silico* の解析の試みも行うことによって、ウェットデータとの組み合わせでこれらの遺伝子の働きや機能について明らかにしつつある。

3. *Cryptococcus neoformans* の薬剤耐性機構の分子解析

近年、*C. neoformans* の薬剤耐性株が分離されクリプトコックス症の治療効果に影響を及ぼしているが、その研究例は非常に少なく薬剤耐性獲得の分子機構解析は重要である。これまでに、まず、病原性酵母 *C. neoformans* の薬剤感受性測定法に関する検討を行って成果を上げて来た。我々は *C. neoformans* のアゾール系抗真菌剤 fluconazole に対する薬剤感受性測定法について、培地、接種菌量、培養時間、さらに比較的簡便に実施できる E-test 法の結果も合わせて基礎的な検討を行って来た。また、臨床分離株を用いて、薬剤耐性獲得の状況をスクリーニングし、耐性株と感受性株のプロテオーム解析を行い、その選別に有用なマーカー候補を見出すことを目指している。AIDS 患者などから分離された株 100 株を用いて、fluconazole について感受性試験を実施した。感受性株・4 株、耐性株・4 株を用いて、それぞれの株をアガロース二次元電気泳動で比較し、有意に違いのみられたスポットをインゲル消化後、質量分析計 (LC-MS/MS) にて、同定した。耐性株と感受性株の選別に有用なマーカー候補が検出・同定し、更に検討を進めている。

4. *Cryptococcus neoformans* の紡錘極体と細胞周期に関する研究

昨年まで、本菌の細胞周期の時間的側面を明らかにした (Jpn J Med Mycol 48: 147-152, 2007). 本年は、これまで撮影した紡錘極体の電顕像の解析をさらに進めた結果、核分裂は母細胞と娘細胞の間のネックで、細胞軸に直角に開始され、次に核が娘細胞に移行し、核分裂の軸が細胞軸に平行になるように進行することが新たにわかった。

5. 酵母のストラクトーム解析

昨年、細胞の電子顕微鏡レベルのすべての定量的、三次元的構造情報を、structome と呼ぶことを提唱した (Curr Trends Microbiol 2: 1-12, 2006). 本年は、ゲノム解析に用いられたサッカロミセスを材料に、ストラクトーム解析に向けて、電子顕微鏡試料を調製している。ストラクトーム解析には、連続切片作製など、完璧な試料作製が要求されるが、試料包埋の条件など、さまざまな検討を行っている。

6. *Schizosaccharomyces japonicus* の菌糸形成変異体に関する研究

ハンガリー共和国、デブレツェン大学の Matthias Sipiczki 教授との共同研究で、昨年引き続き、本菌の菌糸形成変異体を、凍結置換法により超薄切片を作製し、遺伝子変異と細胞微細構造との関係を解析した (Antonie van Leeuwenhoek 92: 143-154, 2007).

7. 真菌細菌の菌種間相互作用における超微細構造

明治薬科大学の池田玲子博士との共同研究で、*Staphylococcus aureus* による *Cryptococcus neoformans* の死滅誘導について、微細形態学的側面から解析を行っている (J Bacteriol 189: 4815-4826, 2007). 本年は、菌表面の接着に関与する分子に関して、免疫電子顕微鏡を用いて検討中である。

8. 低温位相差電子顕微鏡による微生物の構造観察

岡崎統合バイオサイエンスセンターの永山國昭教授との共同研究で、本年は、氷包埋したインフルエンザウイルスを世界で初めて位相差電子顕微鏡で観察した。その結果、ウイルスは通常像より高いコントラストで明瞭に観察され、外皮の構造から3つのタイプが存在するこ

と、糖タンパク質スパイクはウイルス1個あたり450本存在すること、リボ核タンパク質は1+7の配置をとることなどを明らかにした (J Struct Biol, in press).

9. 貝毒の毒性解析

1) Pectenotoxin の毒性についてデータが少なく、今まで毒性評価が出来ていなかった。Pectenotoxin-2 が下痢原性であることを明らかにしたことで (2006), EU の PTX の規制値が決まった。現在日本で流通、消費されている貝は EU の規制値を遥かに超える量の Pectenotoxin-6 汚染が通常であるため、安全性を確認し独自の規制値を設ける必要がある。マウス経口投与で毒性を観察したが、毒性について有無を決定できるデータは出せなかった (Toxicon 受理)。引き続き、慢性毒性、体内蓄積などについても実験する。2) 今まで天然に抽出された Yessotoxin のうち、いくつかの化合物で行なったマウスへの経口投与実験で毒性が見られていないため、最近 EU で規制がゆるめられたが、Desulfated yessoxin により、多臓器障害に続いて、下痢が起こることが分かった (投稿中)。3) 下痢性貝毒素チェックのために行なうマウスバイオアッセイ時に、珪藻が多い海域では不飽和脂肪酸が多く、偽陽性を呈する。このために、貝の出荷が規制されて経済的な損失となる。下痢性貝毒素と不飽和脂肪酸による病理変化の違いを、マウスの解剖時に目視でチェックすべき点、また、顕微鏡観察による臓器変化で明らかにした。

10. *Cryptococcus neoformans* の LIG4 遺伝子破壊

C. neoformans の標的遺伝子座導入効率を高めるため、非同源末端結合 (NHEJ) に関与する遺伝子 LIG4 を破壊した菌株を作製した。得られた菌株を用いて形質転換を行ったところ、7~9割の形質転換体で意図した遺伝子導入が起こることを確認した (投稿準備中)。

11. *C. neoformans* の二成分シグナル伝達系解析

真菌類の二成分シグナル伝達系の構成因子は、ハイブリッド型ヒスチジンキナーゼ (HHK)、ヒスチジンリン酸転移酵素 (HPT)、レスポンスレギュレーター (RR) である。昨年まで HHK の機能に関する解析を行ってきた (投稿準備中) が、本年は RR の機能解析を開始した。現在までに RR と推定される遺伝子 SSK1, SKN7 および構造的に類似する遺伝子 RIM15 ホモログをそれぞれ構

造解析し、それぞれの遺伝子破壊株を作製した。さらに、これらのタンパク質の細胞内局在および相互作用するタンパク質の単離を目指して GFP および FLAG タグとの融合タンパク質の導入を試みている。

12. *C. neoformans* の PDR 遺伝子の機能解析

パン酵母で薬剤耐性に関与することが知られている PDR 遺伝子群ホモログに関して、*C. neoformans* での機能は分かっていない。そこで本菌の PDR 遺伝子群のうち遺伝子破壊により表現形質が解析可能と考えた遺伝子 *PDR13* および *PDR16* ホモログについて遺伝子破壊による機能解析を試みている。

13. *C. neoformans* の *in vitro* 感染予備実験

C. neoformans の感染初期段階では貪食細胞との相互作用が発生すると考えられている。すでに本菌が *in vitro* でマクロファージ (MΦ) に貪食され、MΦ 細胞内で増殖したのち細胞外に放出される現象が報告されているが、本法を将来の実験に応用するため、再現実験を行っている。

研究成果の発表

1. 著書

- 1) 川本 進. 病原真菌の真菌学・免疫・薬剤感受性: 病原真菌細胞生物学の臨床応用は? 深在性真菌症 Q & A 改訂版~2007 ガイドラインを踏まえて~ (河野茂編), 医薬ジャーナル社 (大阪), pp. 34-36 (2007).

2. 原著論文

- 1) Ikeda R, Saito F, Matsuo M, Kurokawa K, Sekimizu K, Yamaguchi M, Kawamoto S: Contribution of the mannan backbone of cryptococcal glucuroxylomannan and a glycolytic enzyme of *Staphylococcus aureus* to contact-mediated killing of *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol* 189: 4815-4826, 2007. (査読有)
- 2) Enczi K, Yamaguchi M, Sipiczki M: Morphology transition genes in the dimorphic fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 92: 143-154, 2007. (査読有)
- 3) Yamaguchi M, Ohkusu M, Biswas SK, Kawamoto S:

Cytological study of cell cycle of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Jpn J Med Mycol* 48: 147-152, 2007. (査読有)

- 4) 畑 邦彦, 大楠美佐子, 川本 進, 曾根晃一: 森林性二形性真菌の培養形態. *九州森林研究* 60(3): 9-12, 2007. (査読有)
- 5) Watanabe-Kaneko K, Sonoda T, Miyagi Y, Yamashita T, Okuda K, Kawamoto S: The synaptic scaffolding protein Delphilin interacts with monocarboxylate transporter 2. *NeuroReport* 18(4) 489-493, 2007. (査読有)

3. 総説, 解説, その他

- 1) 山口正視: 電子顕微鏡試料作製におけるトラブルシューティング 特集にあたって. *顕微鏡* 42: 3, 2007.
- 2) 山口正視: 微生物試料作製におけるトラブルシューティング. *顕微鏡* 42: 26-28, 2007.

4. 招待講演 (国内学会)

- 1) 山口正視: 失敗しないための微生物試料作製法. 日本顕微鏡学会第 63 回学術講演会, 発表要旨集: 44. 新潟, 5月20~22日, 2007.
- 2) 山口正視, 清水仁聡, Radostin Danev, 西山清人, 菅原敬信, 永山國昭: 氷包埋したインフルエンザウイルスの位相差電子顕微鏡観察. 日本顕微鏡学会第63回学術講演会. 発表要旨集: 66. 新潟, 5月20~22日, 2007.
- 3) 山口正視: 酵母細胞のストラクチャー解析. 認定 NPO 法人・総合画像研究支援サイエンスカフェ. 東京, 6月9日, 2007.
- 4) 山口正視: 酵母細胞のストラクチャー解析. 日本顕微鏡学会第 51 回シンポジウム. 発表要旨集: 97-100. 徳島, 10月19~20日, 2007.

シンポジウム (国際学会)

- 1) Raclavsky V, Moranova Z, Ohkusu M, Husickova V, Fisher O, Precek J, Novotny R, Pavfcek J, Kawamoto S. Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to hypoxia. 3rd Trends in Medical Mycology (TIMM) 2007, Torino, Italy, October 28-31, 2007.

5. 一般発表

国際学会

- 1) Ikeda R, Saito F, Matsuo M, Kurokawa K, Sekimizu K, Yamaguchi M, Kawamoto S: The contribution of the mannan backbone of cryptococcal glucuronoxylomannan and a glycolytic enzyme of *Staphylococcus aureus* to contact mediated killing of *Cryptococcus neoformans*. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji Island, September 1-5, 2007.
- 2) Li H-M, Shimizu K, Watanabe A, Yamaguchi M, Kamei K, Kawamoto S: Genetic analysis of hybrid histidine kinase genes of *Cryptococcus neoformans*. Fungal Genetics Conference, Pacific Grove, California, USA. March 20-25, 2007.
- 3) Ito E, Yasumoto T: Toxicity model of palytoxin and ostreocin D by natural route in mice. International symposium on algal toxins. Trieste, Italy, May 27-29, 2007.

国内学会

- 1) 川本 進, 山口正視, 清水公德: 病原酵母 *Cryptococcus neoformans* の細胞増殖・細胞死の機能形態研究. 真菌ワーブ研究会, 千葉, 8月23日, 2007.
- 2) 池田玲子, 斉藤史人, 松尾美記, 黒川健児, 関水久, 山口正視, 川本 進: 細菌 *Staphylococcus* 付着による病原真菌 *Cryptococcus* の死滅誘導-真菌・細菌相互作用の新規分子機構. BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会), 横浜, 12月11~15日, 2007.
- 3) 山口正視, 清水仁聡, Radostin Danev, 西山清人, 菅原敬信, 永山國昭: 氷包埋したインフルエンザウイルスの位相差電子顕微鏡観察. 日本顕微鏡学会関東支部第31回講演会. 予稿集: 111. 東京, 3月17日, 2007.
- 4) 清水仁聡, 山口正視, 川本 進, 天地誠吾, 篠山浩文, 藤井貴明: 好熱性糸状菌 *Thermoascus aurantiacus* におけるオキシダーゼの生産と細胞構造. 日本農芸化学会2007大会. 3月24~27日, 2007.
- 5) 山口正視, 大楠美佐子, 川本 進: 酵母サッカロミセス細胞のストラクチャー解析にむけて. 日本顕微鏡学会第63回学術講演会. 発表要旨集: 188. 新潟, 5月20~22日, 2007.
- 6) 山口正視: 酵母細胞のストラクチャー解析. 第4回

真菌分子細胞研究会. プログラム・要旨集: 28. 千葉, 8月26~27日, 2007.

- 7) 山口正視, 大楠美佐子, 川本 進: 酵母サッカロミセス細胞のストラクチャー解析にむけて. 第48回日本組織細胞化学会総会, 第39回日本臨床分子形態学会総会合同学術集会. 講演プログラム・予稿集: 94. 甲府, 9月28~29日, 2007.
- 8) 山口正視, 大楠美佐子, 川本 進: 酵母サッカロミセス細胞のストラクチャー解析. 第51回日本医真菌学会総会. 真菌誌 48 (増刊1号): 87, 高山, 11月9~10日, 2007.
- 9) 村山琮明, 山口正視, 川本 進, 新見昌一, 梶原 将: *Candida albicans* 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 (*CaFADs*) 破壊株の表現型とトランスクリプトーム解析. 第51回日本医真菌学会総会. 真菌誌 48 (増刊1号): 89, 高山, 11月9~10日, 2007.
- 10) 倉内寿孝, 上野将明, 小笠原綾子, 渡部俊彦, 三上 健, 山口正視, 知花博治, 松本達二: *Candida glabrata* 増殖形態に及ぼす亜硫酸ナトリウムの影響. 第51回日本医真菌学会総会. 真菌誌 48 (増刊1号): 93, 高山, 11月9~10日, 2007.
- 11) 清水公德, 李 皓曼, 渡辺 哲, 亀井克彦, 山口正視, 川本 進: DNA リガーゼ遺伝子破壊による相同組換え効率向上 *Cryptococcus neoformans* 菌株の作製. 日本菌学会第51回大会. 講演要旨集 p. 404. つくば, 5月25~27日, 2007.
- 12) 清水公德, 李 皓曼, 渡辺 哲, 亀井克彦, 山口正視, 川本 進: クリプトコッカスの遺伝子破壊効率向上への取り組み. 第4回真菌分子細胞研究会. プログラム・要旨集: 22. 千葉, 8月26~27日, 2007.
- 13) 清水公德, 山口正視, 川本 進: 非相同末端結合に関与する遺伝子の破壊による *Cryptococcus neoformans* 相同組換え効率向上の試み. 第51回日本医真菌学会総会. 真菌誌 48 (増刊1号): 89, 高山, 11月9~10日, 2007.
- 14) 清水公德, 山口正視, 川本 進: DNA リガーゼ遺伝子破壊による *Cryptococcus neoformans* 相同組換え効率への影響. 第7回糸状菌分子生物学コンファレンス. プログラム: p. 404. 東京, 11月15~16日, 2007.
- 15) 清水公德, 李 皓曼, 渡辺 哲, 亀井克彦, 山口正

- 視, 川本 進: クリプトコッカスの遺伝子破壊効率向上への取り組み. 第4回真菌分子細胞研究会. プログラム・要旨集: 22. 千葉, 8月26~27日, 2007.
- 16) 清水 誠, 清水公德, 李 皓曼, 大楠美佐子, 川本 進: 病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* の薬剤耐性遺伝子に関する研究. 第4回真菌分子細胞研究会. プログラム・要旨集: 13. 千葉, 8月26~27日, 2007.
- 17) 佐伯 泰, 清水公德, 矢口貴志, 川本 進, 東江昭夫: 高温増殖性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* からのプロテアソームの精製と構造・機能解析. 第4回真菌分子細胞研究会 プログラム・要旨集: 20. 千葉, 8月26~27日, 2007.
- 18) 大楠美佐子: 病原性酵母クリプトコックス・ネオフォルマンズの薬剤耐性株におけるタンパク質解析. 第3回奨励研究採択課題技術シンポジウム, 生理学技術研究会報告第29号16-17. 岡崎, 2月16日, 2007.
- 19) 大楠美佐子, 石井知里, 清水 誠, 戎野棟一, 野村文夫, 川本 進: 病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* の薬剤感受性測定法に関する検討. 第18回日本臨床微生物学会総会, 日臨微誌 16(4): 188. 長崎, 2月17~18日, 2007.
- 20) 大楠美佐子, 川本 進: 病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* の病原因子に関するタンパク質解析の試み. 第80回日本細菌学会総会, 日本細菌学雑誌 62(1): 192. 大阪, 2007.
- 21) 大楠美佐子, 高木大輔, 清水公德, 藤井貴明, 川本 進: *Cryptococcus neoformans* の莢膜の厚さと諸性状および病原性の比較. 第51回日本医真菌学会総会 真菌誌 48 (増刊1号): 87, 高山, 11月9~10日, 2007.
- 22) Virtudazo EV, Ohkusu M, Kawamoto S, Aoki S, Takeo K: Structural and functional analysis of the single G1 cyclin CnClm1 in *Cryptococcus neoformans*. 第51回日本医真菌学会総会. 真菌誌 48 (増刊1号): 89, 高山, 11月9~10日, 2007.
- 23) 兼子佳子, 園田智子, 山下哲司, 宮城洋平, 奥田研爾, 川本 進: 神経シナプス足場タンパク質 Delphilin はモノカルボン酸トランスポーター MCT2 と結合する. NEURO 2007 (第30回日本神経科学学会・第50回神経化学学会・第17回神経回路学会合同学会), 横浜, 9月10~12日, 2007.
- 24) 園田智子, 望月千恵子, 山下哲司, 兼子佳子, 宮城洋平, 茂里 康, 矢間 太, 奥田研爾, 川本 進: グルタミン酸受容体デルタ2とその足場タンパク質デルフィリンの結合のPKAによる調節. NEURO 2007 (第30回日本神経科学学会・第50回神経化学学会・第17回神経回路学会合同学会), 横浜, 9月10~12日, 2007.
- 25) 兼子佳子, 園田智子, 山下哲司, 望月千恵子, 宮城洋平, 矢間 太, 奥田研爾, 川本 進: グルタミン酸受容体 (GluR) 2の足場タンパク質 Delphilin はそのFHドメインを介してSrc-tyrosine kinaseのSH3ドメインと相互作用を示す. BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会), 横浜, 12月11~15日, 2007.

共同研究

1. 国際共同研究

- 1) 川本 進, 山口正視, 清水公德: 分裂酵母の遺伝学的, 細胞生物学的研究 (ハンガリー・日本政府間科学技術プロジェクト), Matthias Sipiczki 副学長・教授, ハンガリー共和国, デブレツェン大学遺伝学教室.
- 2) 川本 進, 清水公德: クリプトコッカスのゲノム情報に基づく国際標準規格マイクロアレイの作製 (日本学術振興会二国間交流事業「米国との共同研究」), Christina Hull 准教授, アメリカ合衆国, ウィスコンシン大学マジソン校分子化学部門.
- 3) 川本 進, 山口正視, 大楠美佐子: *Cryptococcus neoformans* の hypoxia への応答研究, Vladislav Raclavsky 准教授, チェコ共和国, パラツキー大学医学歯学部微生物学教室.
- 4) 川本 進, Eric Virtudazo: G1 Cdk1-cyclin ホモログ遺伝子のクローニングと解析, Matthias Sipiczki 副学長・教授, ハンガリー共和国, デブレツェン大学遺伝学教室.
- 5) 山口正視: 石油分解放線菌の微細形態学的研究, Gyorgy Vargha 准教授, George Barabas 教授, Andras Penyige 准教授, ハンガリー共和国, デブレツェン大学医学部.

- 6) 山口正視: 真菌の細胞骨格に関する細胞生物学的研究, Marie Kopecka 准教授, Miroslav Gabriel 准教授, Augustin Svoboda 教授, チェコ共和国, マサリク大学医学部.
- 7) 山口正視: インフルエンザウイルスの構造解析, R. Holland Cheng 教授, アメリカ合衆国, カリフォルニア大学デイビス校.

2. 共同利用研究以外の国内共同研究

- 1) 川本 進, 大楠美佐子: *Cryptococcus neoformans* のプロテオミクス解析, 平野久教授, 山中結子, 横浜市立大学木原生物学研究所.
- 2) 山口正視: 酵母細胞構造の三次元再構築に関する研究, 馬場則男教授, 工学院大学.
- 3) 山口正視: T4 バクテリオファージの低温位相差電子顕微鏡による構造解析, 廣川秀夫名誉教授, 上智大学.
- 4) 山口正視: 低温位相差電子顕微鏡によるインフルエンザウイルスの構造観察, 永山國昭教授, 岡崎総合バイオサイエンスセンター, 西山清人上級研究員, 菅原敬信次長, 化学及び血清療法研究所.
- 5) 山口正視: 電顕観察における生物試料の電子染色に関する検討, 稲賀すみれ助教, 鳥取大学医学部.
- 6) 山口正視: 冠動脈石灰化病変におけるサイファーステントポリマーの損傷についての研究, 小室一成教授, 小林欣夫副部長, 千葉大学付属病院.
- 7) 山口正視: 結核菌の急速凍結法による電子顕微鏡観察, 山田博之研究員, 財団法人結核予防会結核研究所.

国際交流

1. 海外渡航

- 1) 川本 進: チェコ共和国, オロモーツ, パラツキー大学歯学部との部局間交流協定締結 (センター長代理として) 及び微生物学教室 Vladislav Raclavsky 准教授との共同研究の打ち合わせ, 討議, 情報収集のため, 11月23～12月2日, 2007 (研究推進).
- 2) 清水公德: アメリカ合衆国, パシフィックグループ, 24th Fungal Genetics Conference 出席, 発表のため, 3月19～26日, 2007 (科学研究費補助金).

学会等活動 (主催学会, 座長, コンビナーなど)

- 1) 川本 進: 第79回日本薬学会シンポジウム「21世紀の画期的創薬!～無脊椎動物の活用で広がる創薬の可能性について～」座長, 東京, 10月20日, 2007.
- 2) 山口正視: 日本顕微鏡学会関東支部第31回講演会「夢をかなえる最先端の顕微鏡テクノロジー」. 共通セッション「最新技術を用いて得られる顕微鏡像」. 座長. 東京, 3月17日, 2007.
- 3) 山口正視: 日本顕微鏡学会第63回学術講演会プログラム委員会委員, シンポジウム「微生物の構造・機能の顕微科学的解析」オーガナイザーおよび座長, ポスター賞選考委員. 新潟, 5月20～22日, 2007.
- 4) 山口正視: 日本顕微鏡学会第51回シンポジウム実行委員会委員. 徳島, 10月19～20日, 2007.
- 5) 清水公德: 第7回糸状菌分子生物学コンファレンス特別講演「The LaeA Complex Regulates Development, Secondary Metabolism and Virulence in *Aspergillus* spp.」. 座長. 東京, 11月15日, 2007.

教育活動

学位指導

- 1) 石井知里: 千葉大学大学院医学薬学府修士課程修了 (3月), 病原性真菌 *Cryptococcus neoformans* の薬剤耐性研究 (研究指導: 川本 進, 大楠美佐子).
- 2) 高木大輔: 千葉大学大学院自然科学研究科博士前期修了 (3月), 病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* のカプセルサイズ変化に伴う病原性および諸性状変化に関する研究 (研究指導: 川本 進, 大楠美佐子).
- 3) 清水仁聡: 千葉大学大学院自然科学研究科博士前期修了 (3月), 好熱性糸状菌 *Thermoascus aurantiacus* におけるカタラーゼ・オキシダーゼの生産および細胞内微細構造に関する研究 (研究指導: 山口正視).
- 4) 兼子佳子: 横浜市立大学大学院医学研究科博士課程修了並びに医学博士取得 (研究指導: 川本 進).

講義

- 1) 川本 進: 千葉大学大学院医学薬学府医科学専攻修士課程 (先端生命科学), 博士課程 (真菌感染症学), 千葉大学大学院自然科学研究科博士前期課程 (微生物

物工学), 博士後期課程 (微生物資源化学), 千葉大学大学院融合科学研究科博士前期課程 (真菌分子細胞生物学), 博士後期課程 (真菌分子細胞生物学), 横浜市立大学大学院医学研究科 (分子生体防御学), 横浜市立大学医学部医学科 (微生物学), 医学部看護学科 (微生物学).

- 2) 山口正視: 千葉大学大学院医学薬学府博士課程 (真菌細胞生物学, 超微形態学), 千葉大学自然科学研究科博士後期課程 (生命機構学, 高次生体制御学, 形態応答学), 千葉大学普遍教育 (授業科目: 真菌 (カビ) と人との関わり合い, 真菌の形態), 千葉大学園芸学部 (授業科目: 応用細胞工学, 細胞の構造と電子顕微鏡).

インターンシップ生の受け入れ

- 1) 清水公德: 日本大学生産工学部応用化学科 3 年生 1 名 (増田恵美) 受け入れ (8 月 1 日~9 月 15 日).

社会的活動

センター講習会

- 1) 川本 進: 第 3 回病原真菌外国人講習会講師「Workshop on Medical Mycology」講師. 「Proteome analysis and new techniques in molecular medical mycology」(2007. 8. 2).
- 2) 山口正視: 第 21 回病原真菌講習会および第 3 回病原真菌外国人講習会幹事.
- 3) 山口正視: 第 21 回病原真菌講習会講師「電顕による真菌細胞観察」(2007. 7. 24).
- 4) 山口正視: 第 3 回病原真菌外国人講習会「Workshop on Medical Mycology」講師「Electron microscopy of fungal cells」(2007. 8. 1).

その他

- 1) 川本 進 (地域連携委員会委員長): 真菌医学研究センター主催公開市民講座「カビ!? ~そろそろ気になりますね~ Part 2」, 千葉, 5 月 13 日, 2007.
- 2) 山口正視: 第 4 回可視化技術ワークショップ「細胞分裂のイメージング—ここまで見えてきた細胞分裂のメカニズム—」の感想. 認定 NPO 法人・総合画像研究支援ホームページ. 2007 年 11 月.

外部資金

科学研究費補助金

- 1) 山口正視 (代表): 科学研究費補助金 基盤研究 C 19570053 酵母サッカロミセス細胞のストラクチャー解析, 平成 19~20 年度 (平成 19 年度は直接経費 180 万円, 間接経費 54 万円).
- 2) 清水公德 (代表): 科学研究費補助金 若手研究 B 18790302 クリプトコッカスの環境応答を制御するシグナル伝達系と病原性の関与, 平成 18~19 年度 (平成 19 年度は 170 万円).

その他の外部資金

- 1) 川本 進 (分担): 文部科学省科学技術振興調整費, アジア科学技術協力推進戦略・地域共通課題解決型国際共同研究 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成, 平成 18~20 年度 (平成 19 年度は 50 万円) (代表: 三上 襄).
- 2) 川本 進 (分担): 文部科学省研究推進経費「新興真菌症・放線菌症の対策に関する基礎研究」(代表: 三上 襄).
- 3) 川本 進: コスモバイオ (株).

分子機能研究部門 高分子活性分野

(Department of Molecular Function, Division, Division of Molecular Biology and Therapeutics)

教授: 三上 襄

- 学内委員 教育研究評議会委員, 部局長連絡会議委員, 大学法人化対応委員会, 自己点検・評価委員会, 施設整備委員会委員, 放射線同位元素委員会委員, セクシャルハラスメント防止委員会委員, 先端的科学技術共同研究推進会議委員, 部局情報システム管理責任者, 亥鼻地区埋蔵文化財調査委員会委員, 亥鼻地区安全衛生委員会委員, 大学院自然科学研究科教授会委員, 医学研究科(医学系運営)委員会委員, 劇物毒物等管理責任者, 真菌医学研究センター運営協議会議長
- センター内委員 真菌医学研究センター長, 運営協議会議長, 教員会議議長, 総務委員会委員長, 自己点検・評価委員長
- 協会への貢献 日本細菌学会評議員, 日本医真菌学会理事・編集委員長, 日本放線菌学会理事, 日本放線菌学会編集委員, 日本微生物資源学会理事, Microbiology and Immunology, editorial board
- 国および地方公共団体への貢献 国立大学附置研究所・センター長会議委員, 千葉県薬剤師会検査センター評議員, 大学共同利用機関法人国立遺伝学研究所「大腸菌小委員会及び NBRP 大腸菌運営委員会委員, 知的基盤・利用促進研究開発事業「新規抗真菌剤(抗カビ剤)開発のための標的遺伝子知的基盤研究開発」研究計画評価委員会委員, 生物遺伝資源委員会委員, NBRP-情報・運営委員会委員, 理化学研究所バイオリソースセンター 微生物材料検討委員会委員
- 所属学会 日本細菌学会, 日本医真菌学会, 日本放線菌学会, 日本微生物資源学会, 日本菌学会, International Society for Human and Animal Mycology
- 受賞 日本医真菌学会学会賞: 三上 襄「病原真菌の分子系統分類および遺伝子型解析とそれに基づく新しい同定診断法の開発」(2007. 11. 9)
- その他 ベンチャー企業「ファーストラボラトリー」顧問

准教授: 知花博治

- 学内委員 遺伝子組換え実験安全委員会委員, スペー

ス・コラボレーション・システム事業実施委員会委員

- センター内委員 教員会議, 総務委員, 広報委員, 共同利用委員, 自己点検・評価委員, 地域連携委員, 個人評価 WG, センター報告会 WG 長, 研究推進チーム, 組織機能改善委員
- 所属学会 日本微生物ゲノム学会, 日本分子生物学会, 日本細菌学会, 日本医真菌学会, 酵母細胞研究会, 酵母遺伝学フォーラム, アメリカ微生物学会, アメリカ遺伝学会
- その他 琉球大学医学部非常勤講師

助教: 宇野 潤

- 学内委員 動物実験委員会委員, 医学部附属動物実験運営委員会
- センター内委員 共用備品委員会委員, 微生物・保存管理施設運営委員会委員, 有害廃棄物委員会委員, 防災対策委員会委員, 図書 WG, 実験動物 WG, 光熱水料節減プロジェクト WG, 安全衛生作業主任者, 危険物保安監督者, 普通第一種圧力容器取扱い作業主任者
- 学協会への貢献 日本医真菌学会評議会委員, 日本医真菌学会標準化委員会委員, 日本細菌学会評議会委員
- 所属学会 日本医真菌学会, 日本細菌学会, 日本化学療法学会, 日本薬学会, 日本防菌防黴菌学会, 日本感染症学会
- その他 東邦大学薬学部非常勤講師

技官: 矢澤勝清

非常勤講師: 石渡堅一郎 (医療社団法人六治会)

非常勤講師: 佐藤謙一 (元第一製薬株式会社研究所)

非常勤講師: 鈴木健一郎 (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)

非常勤講師: 福島和貴

外国人研究員: Sherif Mohamed Zaki (2007. 8 ~) (エジプトアインシヤム大学講師)

研究機関研究員: 小暮高久

研究支援推進員: 城 彩子

研究支援員：笹本 要

研究支援員：木下妻智子

研究支援員：島田五月

研究支援員：加藤直子

大学院医学薬学府 博士課程：向井 啓（～2007. 3）

大学院医学薬学府 博士課程：Ahmed Hanafy（～2007. 3）

大学院医学薬学府 博士課程：長谷川太一（～2007. 7）

大学院医学薬学府 博士課程：上野圭吾

大学院医学薬学府 博士課程：康 穎倩

大学院医学薬学府 修士課程：武田健二郎（～2007. 3）

大学院自然科学研究科 博士前期課程：松本優子（～2007. 3）

大学院自然科学研究科 博士前期課程：山本摂也（～2007. 3）

大学院医学薬学府 修士課程：伊藤淳二

大学院医学薬学府 修士課程：島田玲緒奈

大学院自然科学研究科 博士前期課程：芝崎あずさ

大学院医学薬学府 修士課程：青山一紀（2007. 4～）

大学院医学薬学府 修士課程：志保沢里奈（2007. 4～）

大学院医学薬学府 修士課程：田中博子（2007. 4～）

大学院医学薬学府 修士課程：三谷宏樹（2007. 4～）

大学院医学薬学府研究生：山本摂也（2007. 4～11）

研究概要（共同研究を含む）

1. 医療機関の依頼に基づく病原性放線菌の同定

2007年に同定した病原放線菌は現在まで75株であり、その中で日本の医療機関から同定依頼を受け同定した病原性放線菌は60株であった。内訳は *Nocardia* が46株で、それぞれ、*N. asiatica* 4株、*N. asteroides* 1株、*N. brasiliensis* 12株、*N. concava* 1株、*N. elegans* 2株、*N. farcinica* 15株、*N. inohanensis* 1株、*N. nova* 5株、*N. otitidiscaviarum* 1株、*N. puris* 1株、*N. testacea* 1株、*N. transvalensis* 2株であった。他に *Actinomadura* sp. 1株、*Gordonia* sp. 2株、*Mycobacterium* sp. 8株、*Rhodococcus equi* 1株、*Rothia* sp. 1株、*Streptomyces* sp. 1株が確認された。外国からの依頼は中国新疆医科大学から *Streptomyces albus* 11株の同定を行った。アメリカからは4株のアミカシン高度耐性の *N. farcinica* の同定依頼があった（青山，矢沢）。

2. *Nocardia* 属の新種の提案

本邦およびタイの患者由来の *Nocardia* 株について再分類を行い、今年には新種 *N. terpenica* の報告を行った。本菌株は本邦で3株、タイから3株分離されているがいずれの菌株も *brasilinolide* および *brasilicardin A* の生産菌であった。また、臨床由来および活性汚泥から分離された *Gordonia* 4菌株、臨床由来 *Nocardia* 3菌株さらに *Rothia* 1菌株を新種として報告する準備をしている（青山，康，小暮，矢沢）。

3. *Nocardia farcinica* におけるアミノグリコシド高度耐性機構の解析

本研究は家畜の感染症の原因菌として単離され、通常 *N. farcinica* が感受性を示すアミカシンを含むほとんどのアミノグリコシドに対して高度耐性を示した。 *N. farcinica* IFM10580 の薬剤耐性メカニズムを解明することを目的としている遺伝子解析の結果 *N. farcinica* IFM10580 の染色体上の全ての16S rRNA 遺伝子にはアミノグリコシドの結合部位である A-site 中に存在する保存されたアデニンのグアニンへの1塩基変異が認められ、これによりアミノグリコシド高度耐性化が惹起されると考えられた。現在、変異による耐性化に *recA* などの組換え酵素が関与しているかどうかを調査中である（島田，小暮）。

4. *Mycobacterium smegmatis* 由来のリファンピシン不活性化酵素 ADP ribosyltransferase の解析

Mycobacterium smegmatis は結核の一次選択薬であるリファンピシンに対し自然耐性で、その耐性機構は、リファンピシンの23位の水酸基をリボシル化による不活性化である。これは *M. smegmatis* が ADP ribosyltransferase をコードする遺伝子 *arr* を持つからである。この研究では ADP ribosyltransferase の結晶構造解析を目的としている。 *M. smegmatis* DMS43756 株を用いてコールドショック発現系ベクター pCold I で *arr* のクローニングを行い、*E. coli* BL21 株の形質転換を行った。この形質転換体より目的タンパクを発現し精製後、SDS-PAGE、ペーパーディスクアッセイ及び RP-TLC より目的タンパクの確認と活性試験を行った。さらに精製を進め、様々な結晶化キットを用いて結晶化条件の検討を行っている（伊藤，矢沢）。

5. 真菌アレイを用いた病原真菌の同定

アレイ会社との共同研究により開発された真菌アレイを用い、以下の条件でアレイでの検出に基づく病原真菌の同定を試みた。その結果、(1) ダイレクト PCR により増幅した DNA 断片を用いた真菌アレイによる検出実験を7種の菌株を用いて行い、培養日数を短くし、PCR のアニリング温度を 53 °C に設定することで、全ての株で良好な同定結果が得られた。エタノール殺菌後の菌体を用いて検討した結果、5種の菌種について1ヶ月間エタノールに浸した菌体から抽出した DNA を用いて、検出を行ったところ、全ての菌株で良好な結果を得られ、5菌種も問題なく同定できた。一方、オートクレーブによる殺菌した菌体を使つての PCR では、遺伝子の増幅がうまくいかず、アレイでの検出もうまくいかないことから、エタノールを用いて殺菌した菌体により、アレイでの検出には適していることが明らかとなった (志保沢)。

6. 放線菌の生物活性二次代謝産物に関する研究

病原性放線菌を中心に活性物質の抗酸菌に対する活性を指標にスクリーニング系を立ち上げて、活性物質の探索を行った。被検菌として、*Mycobacterium smegmatis*, *Gordonia bronchialis* 及び *Corynebacterium xerosis* を用いて、センターの臨床分離株について活性の有無を検討した。その結果、5株の放線菌に活性が認められた。これらの中で、特に抗酸菌である *M. smegmatis* に活性を示す3株については、現在単離と精製を進めている。また *M. smegmatis* と同じ抗酸菌である *R. equi* 及び *C. xerosis* へのみ活性を示し、*M. smegmatis* には活性を示さない IFM 10473 についても、活性物質の精製を進めている (向井, 矢沢)。

ダンゴムシ (*Armadillidium vulgare*) 体内より見出した放線菌の同定を引き続き行った。この放線菌は、抗真菌活性物質を菌体中に生産しており、現在活性物質の抽出と精製を行っている。同定・分類に関しては、現在、硝酸塩の還元能などの生理生化学的性状や系統分類学的な検討を進めている (芝崎)。

Saccharomyces cerevisiae と *Schizosaccharomyces pombe* のカルシウムイオンチャネルの解析を行うために大腸菌を用いたクローニングを試みた。哺乳類細胞での発現をコードする遺伝子を哺乳類細胞発現ベクター及び、GFP 融合タンパク質発現用ベクターへの組み込みをほぼ終了した (芝崎, 五ノ井)。

7. 嫌気性菌の生産する二次代謝産物の研究

今回、土壤中に生息する嫌気性細菌が生産する抗真菌活性物質の探索を行った。指標菌としては病原真菌の *Trichophyton* と *Cryptococcus* 及び *Candida* を用いた。その結果、土壌分離株の中から抗 *Trichophyton* 活性を有する菌株1株、抗 *Cryptococcus* 活性を示す菌株1株を分離し、それぞれの菌株の 16S rRNA 遺伝子を解析した結果、抗 *Cryptococcus* 活性菌株は *Bacillus*、抗 *Trichophyton* 活性菌株は *Enterobacter* に属する細菌であることが明らかになった。抗 *Candida* 活性を有する菌株は得られなかった。現在、これらの細菌より抗真菌活性物質の抽出を試みている (田中)。

8. Taxonomic studies on pathogenic *Actinomycete* *Gordonia* and pathogenic fungi (*Candida tropicalis* and *Cryptococcus*)

A comprehensive phylogeny of *Gordonia* species based on 16S rDNA, *gyrB*, and *secA1* gene analyses was studied. The *secA1* and *gyrB* genes of *Gordonia* species were sequenced in the first half of this year. The data including those of 16S rRNA obtained from GenBank were analyzed by the software ClustalW and NJPLOT. The experiment for DNA hybridization of *Gordonia* species is also being performed at present.

Trf4 is a useful gene for discrimination of *Candida tropicalis* from other medically important *Candida* species. Verification experiments on *Trf4* gene for the discrimination of *C. tropicalis* were performed within this year.

Genetic analysis of a strain isolated in India was performed as a cooperative work between Indian scientists and our research group. With the analysis of the ITS and D1/D2 genes, a new environmental isolate which is related to *Cryptococcus* species in India cannot be identified according to the present database in GenBank. Further detail taxonomic studies are in progress including the working on sequencing its IGS1 gene for the further verification of its taxonomic position (康)

9. *Candida glabrata* フェノームプロジェクト (知花班)

深在性日和見真菌は、複数の病原因子が宿主免疫機構に作用しながら病原性を発揮すると考えられているが、まだ解明されていない点が多い。深在性真菌症に対する

治療の第一選択として抗真菌薬が用いられるが、既存の抗真菌薬には4タイプしか存在せず、選択肢の少なさ、副作用、スペクトラムの狭さ、耐性化などに問題があり、新しい抗真菌薬の開発は病原性の解明とともに重要な研究課題である。このような状況の中、*C. albicans* (PNAS 2004), *C. glabrata* (Nature 2004), *A. fumigatus* (Nature 2005) など数種の病原真菌のゲノムシーケンスが決定され(我々も *C. albicans* のゲノムプロジェクトに参加した{PNAS 2004, Genetics 2005, Genome Biol 2007})。現在ではこれらのゲノム情報を用いた抗真菌薬の開発などの応用研究に期待が寄せられている。しかし、病原真菌の多くは遺伝子操作が煩雑なためゲノムワイドな機能解析には、多大な費用と労力を要し、米国一部の製薬会社が閉鎖的に研究を進めているのが現状である。そこで我々は病原真菌の中で遺伝子操作が最も簡便な *C. glabrata* に着目し、フェノムプロジェクト(網羅的な遺伝子機能解析計画)を2004年に立ち上げた。本プロジェクトでは、*C. glabrata* を用いて全遺伝子機能を解析し、病原真菌の普遍性を見出すことによって①抗真菌薬の開発、②常在性と病原性の解明、③医学・工学的利用などの応用研究を進め、インターネットを介して情報を発信し、世界中の病原真菌の研究の発展のために貢献する事をめざしている。

9-1 第1章 全遺伝子(5,300)の組換え株構築: *C. glabrata* の組換え株の作製には相同組換えを利用しているが、通常真菌では相同組換えより非同相組換えの方が優位に働き、ターゲティング効率が低いという問題点があった。これを改善するために我々は *C. glabrata* における *YKU80* に対するオーソログ遺伝子について欠損株を構築し、ターゲティングの効率が上昇することを確認した。しかし、*YKU80* はDNA修復において重要な遺伝子であるため欠損株では、ゲノムの不安定化などの支障を来すことが予測され、組換え株の作製後に *YKU80* の発現を復帰させる必要があった。これを可能にするために *YKU80* ノックダウンシステムを構築し、論文発表を行った(Eukaryotic Cell 2007)。現在、このシステムを用いて100株/月のペースで組換え株を作製することが可能になった。2007年度中に、全必須遺伝子(約1,000)について組換え株の作製を構築する見通しである。また、2012年までに全遺伝子5,300について組換え株を構築する予定である(上野, 木下, 笹本, 加藤, 島田)。

9-2 第2章 抗真菌薬の開発: 昨年、病原性真菌およ

びヒトゲノムの情報を用い、真菌に高く保存され、人には類似性の低い遺伝子を抽出し、187の標的候補遺伝子を決定した。次にその187遺伝子のうち184の遺伝子についてテットプロモーターを各遺伝子のプロモーター領域に導入した株(Tet株)を体系的に構築した。今年は、①構築したTet株を用いて様々な培養実験を行い、各遺伝子について転写抑制を施した菌体を調べ、生育に対する抑制効果の即効性や殺菌性などを定量的に解析した(笹本)。また、研究分担者の田村と研究協力者の上野による *in silico* の手法により、抗真菌ペプチドの設計と合成ならびに評価などを開始した(上野)。

9-3 第3章 病原性の研究: 感染宿主との相互作用を解析する目的で真菌が宿主に対してファーストコンタクトを行う細胞壁に着目した。今年は、ゲノムデータベースを用いて細胞壁の合成に関する140遺伝子抽出し、組換え株の構築を進めた(三谷)。今後、株の構築を進めるとともに、培養細胞やマウスを用いて宿主応答に対する各遺伝子の影響を解析して行く。

9-4 第4章 バイオエタノールの研究: これまでのカンジダフェノムプロジェクトの研究過程では、エタノール発酵に関する知見も多く得られた。その結果を踏まえてNEDO(新エネルギー開発機構)のバイオマスエネルギー高効率転換技術開発(先導技術開発)に応募し、平成19年~20年度の受託研究が採択され、研究を開始した(小暮)。

10. 真菌より抗アスペルギルス物質の探索

昨年は分野保存の強力な抗アスペルギルス作用物質を生産する糸状菌1株(*Strobilurus* 属)からメトキシアクリレート系の *mucidin* (*strobilurin A*) を単離した。この物質の抗真菌活性は、糸状菌と酵母に対して広い抗真菌スペクトルを示すが、毒性も強い。本物質は作用機序が呼吸障害であるが、経験則からアゾール系薬剤と併用により真菌に相乗効果を示すことが考えられた。そこで *mucidin* 及び農薬に使用されている同族体と同じく農薬として使用されているアゾール系薬剤を用いチェッカーボード法により併用による効果を検討した。これらの薬剤の併用はいずれの薬剤間も糸状菌・酵母に対して相乗作用が観察された(山本, 宇野)。

研究成果の発表

1. 著書

- 1) 三上 襄, 矢澤勝清 (分担): 病原性放線菌とその感染症, 「病原真菌ハンドブック」宮治 誠 編 (医薬ジャーナル社), pp.52-53, 166-171, 2007.
- 2) 服部句子, 三上 襄 (分担): 細菌感染症－放線菌症, ノカルジア症－, 「細菌・ウイルス・真菌感染症治療戦略」渡辺晋一 編, Derma 増刊号 No. 129, 2007.
- 3) 知花博治: *Candida* のゲノム情報 p. 96-98, 大隅良典, 下田 親編, 酵母のすべて, シュプリンガー・ジャパン, 全 348 ページ, 2007.

2. 原著論文

英文

- 1) Kubota T, Sunaura T, Morita H, Mikami Y, Hoshino T, Obata Y, Nakahata N, Kobayashi J: Lycovatine A, a C₁₆N-type quaternary alkaloid from *Lycopodium clavatum* var. *robustum*. Heterocycles 69: 469-474, 2006. (査読有)
- 2) Hanafy A, Uno J, Mitani H, Kang Y, Mikami Y: *In vitro* antifungal activities of sulfa drugs against clinical isolates of *Aspergillus* and *Cryptococcus* species. Jap J Med Mycol 48(1): 47-50, 2007. (査読有)
- 3) Chiba K, Hoshino Y, Ishino K, Kogure T, Mikami Y, Uehara Y, Ishikawa J: Construction of a pair of practical *Nocardia-Escherichia coli* shuttle vectors. Jpn J Infect Dis 60: 45-47, 2007. (査読有)
- 4) Hoshino Y, Watanabe K, Iida S, Suzuki S, Kudo T, Kogure T, Yazawa K, Ishikawa J, Kroppenstedt RM, Mikami Y: *Nocardia terpenica* sp. nov., isolated from Japanese patients with nocardiosis. Int J Syst Evol Microbiol 57: 1456-1460, 2007. (査読有)
- 5) Mizota A, Haki K, Shiina C, Tanaka M, Nakazawa T, Yazawa K, Mikami Y: The first case of keratitis caused by *Nocardia exalbida*. Int Ophthalmol 29: 333-336, 2007. (査読有)
- 6) Murata Y, Sano A, Ueda Y, Inomata T, Takayama A, Poonwan N, Nanthawan M, Mikami Y, Miyaji M, Nishimura K, Kamei K: Molecular epidemiology of canine histoplasmosis in Japan. Med Mycol 45(3):

233-247, 2007. (査読有)

- 7) Ohshita K, Ishiyama H, Takahashi Y, Ito J, Mikami Y, Kobayashi J: Synthesis of penaresidin derivatives and its biological activity. Bioorg Med Chem 15: 4910-4916, 2007. (査読有)
- 8) Araki A, Tsuda M, Kubota T, Mikami Y, Fromont J, Kobayashi J: Nagelamide J, a novel dimeric bromopyrrole alkaloid from a sponge *Agelas* species. Org Lett 9: 2369-2371, 2007. (査読有)
- 9) Nakahara S, Kubo A, Mikami Y, Mitani H: Synthesis of arnoamine B and related compounds. Heterocycles 71: 1801-1806, 2007. (査読有)
- 10) van het Hoog M, Rast TJ, Martchenko M, Grindle S, Dignard D, Hogues H, Cuomo C, Berriman M, Scherer S, Magee BB, Whiteway M, Chibana H, Nantel A, Magee PT: Assembly of the *Candida albicans* genome into sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. Genome Biology 8(4): R52 2007. (査読有)
- 11) Ueno K, Uno J, Nakayama H, Sasamoto K, Mikami Y, Chibana H: Development of a highly efficient gene targeting system induced by transient repression of *YKU80* expression in *Candida glabrata*, Eukaryotic cell 6(7): 1239-1247, 2007. (査読有)
- 12) Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Hodgson S, Takemori D, Aoyama, Metzler TN, Takano Y, Chibana H, Niimi M: The *Candida glabrata* putative sterol transporter gene *CgAUS1* protects cells against azoles in the presence of serum. J Antimicrob. Chemother 60(6): 1264-72, 2007. (査読有)
- 13) Cho T, Aoyama T, Toyoda M, Nakayama H, Chibana H, Kaminishi H: Transcriptional changes in *Candida albicans* genes by both farnesol and high cell density at an early stage of morphogenesis in *N*-acetyl-*D*-glucosamine medium. Jpn J Med Mycol 48: 159-167. 2007. (査読有)
- 14) Hasegawa T, Gono T, Ito J, Kogure T, Yazawa K, Mikami Y: Identification of *Nocardia farcinica* by a PCR primer amplifying specific DNA band for the bacterium. Jap J Med Mycol 48: 173-175, 2007. (査読有)
- 15) Watanabe K, Kubota T, Shinzato T, Ito J, Mikami Y, Kobayashi J: Sarusubine A, a new dimeric lythraceae

alkaloid from *Lagerstroemia subcostata*. Tetrahedron Letters 48(42): 7502-7504, 2007. (査読有)

- 16) Yamazoe S, Hasegawa K, Ito J, Mikami Y, Shigemori H: Hederyne A, a new antimicrobial polyacetylene from galls of *Hedera rhombea* Bean. J Asian Nat Prod Res 9(6): 537-540, 2007. (査読有)
- 17) Shen YC, Cheng YB, Kobayashi J, Kubota T, Takahashi Y, Mikami Y, Ito J, Lin YS: Nitrogen-containing verticillene diterpenoids from the Taiwanese soft coral *Cespitularia taeniata*. J Nat Prod 70: 1961-1965, 2007. (査読有)
- 18) Tatibana BT, Sano A, Uno J, Mikami Y, Miyaji M, Nishimura K, Itano EN: Humoral immune response in experimental ddY mice paracoccidiodomycosis. Semina: Ciencias Agrícolas, Londrina 28(2): 287-294, 2007. (査読有)

3. 総説・解説・その他

- 1) Mikami Y: Biological work on medically important *Nocardia* species. Actinomycetologia, 2007.
- 2) Kageyama A, Mikami Y: Taxonomy and phylogenetic analysis of infectious *Nocardia* strains isolated from clinical samples. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 48(2): 73-78, 2007.
- 3) 知花博治: 抗真菌薬の開発をめざした病原性真菌の網羅的遺伝子機能解析, 医薬の門社「感染・炎症・免疫」2007年, 12月号.
- 4) 矢口貴志, 亀井克彦, 三上 襄: 病原微生物: 感染症教育研究に貢献する病原微生物資源. 使ってみたい! バイオリソース大集合 第11回 (山崎由紀子監修). 細胞工学 26: 1066-1069, 2007.

4. 学会・シンポジウム・研究会での招待講演

国際

- 1) 三上 襄: 特別講演「Impact of determined whole genome sequences of *Nocardia farcinica* on the progress biomedical works in our laboratory」, 中国貴陽医学院講演, December 6, 2007.
- 2) Chibana H: Phenome Project in *Candida glabrata*, Minneapolis USA, Magee Symposium and Retirement Celebration. 2007. 8. 2.
- 3) Chibana H, Ueno K, Nakayama H, Uno J, Mikami

Y: Prioritization of drug targets as a goal of functional genomics I pathogenic fungi. 日本医真菌学会 International Symposium, 高山, 2007. 11. 9.

- 4) Chibana H: *Candida glabrata* phenome project. New Zealand, Palmerston north, マッセイ大学講演, November 23, 2007.
- 5) Chibana H: Drug target selection as the first goal of *Candida glabrata* functional genomics. New Zealand, Wellington, NZMS-NZSBMB Annual conference, November 27-30, 2007.
- 6) Chibana H: *Candida glabrata* phenome project. New Zealand, Dunedin, オタゴ大学講演, December 3, 2007.

国内

特別講演

- 1) 三上 襄: 医真菌学会賞受賞講演, 高山, 11月9日, 2007.

シンポジウム

- 1) 三上 襄: 病原性真菌について-医学系における細菌学教育と感染症教育, 第80回日本細菌学会総会, 京都, 3月26~27日, 2007.
- 2) 三上 襄: ノカルジア症, 放線菌症, 日本医真菌学会50周年記念シンポジウム, 東京, 2月25日, 2007.

ワークショップ・セレクトテッド

- 1) 知花博治, 中山浩伸, 上野圭吾, 宇野 潤, 三上 襄: *Candida glabrata* の遺伝子発現制御株を用いた血清培地生育必須遺伝子の評価. 日本細菌学会総会ワークショップ6, 発表要旨集, p.63, 大阪, 3月26~28日, 2007.
- 2) 長 環, 豊田美香, 知花博治, 中山浩伸, 小倉理恵子, 上西秀則: *Candida albicans* の Quorum-sensing 分子に対する初期応答, 日本細菌学会総会ワークショップ6, 発表要旨集, p.63, 大阪, 3月26~28日, 2007.
- 3) 中山浩伸, 田辺公一, 新見昌一, 知花博治: 病原性真菌 *Candida glabrata* のステロールトランスポーターを介したアゾール耐性機構. 日本細菌学会総会ワークショップ1, 発表要旨集, p.52, 大阪, 3月26~28日, 2007.
- 4) 小山友嗣, 川 良香, 宇野 潤, 知花博治, 三上 襄, 中山浩伸, 飯村 穰, 宮川洋三: 病原性酵母

Candida に対する抗真菌剤の標的候補: 必須遺伝子群の分離と同定. 日本医真菌学会総会セレクトッドシンポジウム, 発表要旨集 p. 73, 高山, 11月9-10日, 2007.

- 5) 服部尚生, 田中玲子, 知花博治, 神戸俊夫: 反復配列 RPS と内部反復配列 ALT を標的とした PCR によるカンジダ・アルピカンスの genotyping, 日本医真菌学会総会セレクトッドシンポジウム, 発表要旨集 p. 73, 高山, 11月9-10日, 2007.
- 6) 知花博治, 上野圭吾, 笹本 要, 中山浩伸, 青山俊弘, 宇野 潤, 釣谷克樹, 中井謙太, 三上 襄: 病原真菌フェノームプロジェクト 第1章-*Candida glabrata*-を用いた抗真菌ゲノム創薬-, 第1回日本ゲノム微生物学会 セレクトッドオーラル, 木更津, 3月1-3日, 2007.

5. 一般発表

国際学会

- 1) Ishikawa J, Chiba K, Hoshino Y, Ishino K, Kogure T, Mikami Y: Development of genetic analysis system for *Nocardia* species. ISBA Meeting, Aug 26 ~ 30, 2007.
- 2) Hoshino Y, Chiba K, Fukai T, Igarashi Y, Mikami Y, Ishikawa J: Identification of the salicylate synthase gene of *Nocardia farcinica* and its role in the biosynthesis of nocobactin. ISBA Meeting, Aug 26 ~ 30, 2007.
- 3) Chibana H, Sasamoto K, Ueno K, Aoyama T, Kinoshita S, Uno J, Nakayama H, Mikami Y: Functional genomics in pathogenic fungus *Candida glabrata* achieved to prioritization of antifungal drug targets, The 7th Awaji Interational Forum, on Infection and Immunity, Abstracts p.125, Awaji, Sep 1-5, 2007.
- 4) Nakayama H, Bard M, Tanabe K, Aoyama T, Takemori D, Hodgson W, Wu S, Kumaraswari N, Metzler L, Takano Y, Chibana H, Niimi M: The *Candida glabrata* sterol transporter *CgAUS1* protects against azole toxicity in the presence of serum, The 7th Awaji Interational Forum, on Infection and Immunity, Abstracts p.126, Awaji, Sep 1-5, 2007.
- 5) Sano A, Itano EN, Takayama A, Ono MA, Uno J, Yarita K, Kamei K, Nishimura K, Mikami Y. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate showing a lower identity in the sequence of major antigen gp43. P3.24, 13th International Congress of Immunology, August 21-25, 2007, Rio de Janeiro, Brazil.

国内学会

- 1) 林 豊, 松浦信康, 伊藤伸哉, 三上 襄, 大和 徹, Brasilicardin A 生合成遺伝子群の解析, 日本農芸化学会大会, 東京, 3月, 2007.
- 2) 五ノ井 透, 武田健二郎, 向井 啓, 星野泰隆, 矢澤勝清, 三上 襄: *Nocardia*属菌 60種が産生する鉄キレート分子の多様性の解析. 第80回日本細菌学会総会抄録集 p.92, 大阪, 3月26日~28日, 2007.
- 3) 山本撰也, 宇野 潤, 深井俊夫, 三上 襄: 糸状菌から得られた抗アスペルギルス物質の活性と真菌薬併用効果の検討. 第80回日本細菌学会総会抄録集 p.145, 大阪, 3月26日~28日, 2007.
- 4) 宮川洋三, 宇野 潤, 知花博治, 三上 襄, 中山浩伸: 病原性酵母 *Candida* 抗真菌剤の標的候補, 必須遺伝子群の分子生物学的解析. 第80回日本細菌学会総会抄録集 p.190, 大阪, 3月26日~28日, 2007.
- 5) 伊藤淳二, 佐野文子, 亀井克彦, 神戸俊夫, 三上 襄: 高度病原真菌 *Coccidioides* 属のトポイソメラーゼ 2 遺伝子及び関連遺伝子による同定法. 第80回日本細菌学会総会抄録集 p.191, 大阪, 3月26日~28日, 2007.
- 6) 芝崎あずさ, 山本撰也, 三谷宏樹, 齋藤明広, 五ノ井 透, 安藤昭一, 三上 襄: ダンゴムシ (*Armadillidium vulgare*) 体内より分離した新種と考えられる放線菌の分類とその代謝産物について. 2007年度日本放線菌学会大会講演要旨集 p.72, 広島, 5月31日~6月1日, 2007.
- 7) 小暮高久, 島田玲緒奈, 矢沢勝清, 石川 淳, 三上 襄: *Nocardia farcinica* におけるアミノグリコシド高度耐性化機構の解析. 2007年度日本放線菌学会大会講演要旨集 p.99, 広島, 5月31日~6月1日, 2007.
- 8) 五ノ井 透, 星野泰隆, 矢澤勝清, 石川 淳, 三上 襄: 病原性放線菌 *Nocardia* 属 64種が産生するシデロフォアの多様性の解析. 2007年度日本放線菌学会大会講演要旨集 p.75, 広島, 5月31日~6月1日, 2007.
- 9) 小暮高久, 島田玲緒奈, 矢澤勝清, 三上 襄: 病原性放線菌 *Nocardia farcinica* におけるアミカシン高

- 度耐性化遺伝子の単離と解析. 第 51 回日本医真菌学会総会プログラム・抄録集 p. 23, 岐阜, 11 月 9 日～10 日, 2007.
- 10) 康 穎倩, 武田健二郎, 伊藤淳二, 矢澤勝清, 三上 襄: A Comprehensive phylogeny of *Gordonia* species based on 16S rDNA, *gyrB*, and *secA1* gene analysis. 第 51 回日本医真菌学会総会プログラム・抄録集 p. 23, 岐阜, 11 月 9 日～10 日, 2007.
 - 11) 西村和子, 佐野文子, 亀井克彦. 三上 襄, 宮治誠: 耳鼻科と眼科領域から細菌分離された珍しい真菌. 第 51 回日本医真菌学会総会プログラム・抄録集 p. 23, 岐阜, 11 月 9 日～10 日, 2007.
 - 12) 小山友嗣, 川 良香, 宇野 潤, 知花博治, 三上 襄, 中山浩伸, 飯村 穰, 宮川洋三: 病原性酵母 *Candida* に対する抗真菌剤の標的候補: 必須遺伝子群の分離と同定. 第 51 回日本医真菌学会総会プログラム・抄録集 p. 23, 岐阜, 11 月 9 日～10 日, 2007.
 - 13) 明見能生, 菅田辰海, 許 奉一, 小原忠博, 三上 襄, 村山聡明: 血液疾患患者で発生した *Candida albicans* による真菌血症 - アゾール感受性菌と耐性菌との比較. 第 22 回広島感染症研究会, 広島, 12 月 8 日, 2007.
 - 14) 上野圭吾, 知花博治, 中山浩伸, 三上 襄: 病原性真菌 *Candida glabrata* における新規宿主ベクター系の開発と DNA 修復に関わる遺伝子の機能解析, 第 5 回感染症沖縄フォーラム, 沖縄北谷, 要旨集 p. 56, 2 月 22 日～24 日, 2007.
 - 15) 知花博治, 中山浩伸, 上野圭吾, 宇野 潤, 三上 襄: 病原性酵母 *Candida* 抗真菌剤の標的候補, 必須遺伝子群の分子生物学的解析, 日本細菌学会総会, 発表要旨集, p. 63, 大阪, 3 月 26～28 日, 2007.
 - 16) 知花博治, 宇野 潤, 田村 裕: 真菌フェノームプロジェクト第 2 章: 標的の決定とインシリコ抗真菌ペプチドの創出, 特定領域研究「感染現象のマトリックス」班会議, 東京, 5 月 12 日, 2007.
 - 17) 知花博治, 宇野 潤, 中山浩伸, 青山俊弘: カンジダ酵母における網羅的発現制御株の構築と応用 - 病原性ゲノム機能学 -, 特定領域研究「ゲノム」4 領域班会議, 要旨集 A-H05, 神戸, 6 月 25～27 日, 2007.
 - 18) 知花博治, 宇野 潤, 田村 裕: 真菌フェノームプロジェクト第 2 章: 標的の決定とインシリコ抗真菌ペプチドの創出, 特定領域研究「感染現象のマトリックス」B05 班会議, 東京, 7 月 18 日, 2007.
 - 19) 知花博治, 宇野 潤, 田村 裕: 真菌フェノームプロジェクト第 2 章: 標的の決定とインシリコ抗真菌ペプチドの創出, 特定領域研究「感染現象のマトリックス」真菌ワーブ研究会, 千葉, 8 月 25 日, 2007.
 - 20) 中山浩伸, 岩田哲郎, 長 環, 青山俊弘, 上野圭吾, 知花博治: 病原性酵母 *Candida glabrata* における GDP-mannose pyrophosphorylase 遺伝子の解析, 第 4 回真菌分子細胞研究会, 要旨集 p. 11, 千葉, 8 月 26～27 日, 2007.
 - 21) 上野圭吾, 田村 裕, 安達統衛, 杉山 肇, 中山浩伸, 三上 襄, 知花博治: *Candida* フェノームプロジェクトから抗真菌剤の設計へ - コンピュータを活用した抗真菌剤の設計 -, 第 4 回真菌分子細胞研究会, 要旨集 p. 15, 千葉, 8 月 26～27 日, 2007.
 - 22) 三谷宏樹, 上野圭吾, 知花博治, 三上 襄: *Candida glabrata* を用いた宿主応答を担う遺伝子の網羅的解析, 第 4 回真菌分子細胞研究会, 要旨集 p. 16, 千葉, 8 月 26～27 日, 2007.
 - 23) 青山俊弘, 中山浩伸, 知花博治: *Candida glabrata* データベース, 第 4 回真菌分子細胞研究会, 要旨集 p. 24, 千葉, 8 月 26～27 日, 2007.
 - 24) 知花博治, 笹本 要, 上野圭吾, 青山俊弘, 木下妻智子, 小暮高久, 三谷宏樹, 住江祐介, 加藤直子, 水野貴之, 宇野 潤, 中山浩伸, 三上 襄: *Candida glabrata* フェノームプロジェクト (網羅的遺伝子機能解析, ゲノム機能解析), 第 4 回真菌分子細胞研究会, 要旨集 p. 29, 千葉, 8 月 26～27 日, 2007.
 - 25) 知花博治, 宇野 潤, 中山浩伸, 青山俊弘: カンジダ酵母における網羅的発現制御株の構築と応用 - 病原性ゲノム機能学 -, 特定領域研究「ゲノム」4 領域班会議 微生物ゲノム合同班会議, 広島, 9 月 23～25 日, 2007.
 - 26) 中山浩伸, 田辺公一, 知花博治, 青山俊弘, 新見昌一: *Candida glabrata* ステロールトランスポーター *AUS1* の機能発現, 日本医真菌学会総会, 要旨集 p. 65, 高山, 11 月 9～10 日, 2007.
 - 27) 倉内寿孝, 上野将明, 小笠原綾子, 渡部俊彦, 三上 健, 山口正視, 知花博治, 松本達二: *Candida glabrata*

増殖形態に及ぼす亜硫酸ナトリウム燻今日. 日本医真菌学会総会, 要旨集 p. 93, 高山, 11月9-10日, 2007.

- 28) 岩田哲郎, 長 環, 西川和範, 青山俊弘, 上野圭吾, 知花博治, 中山浩伸: 病原性酵母 *Candida glabrata* における GDP-mannose pyrophosphorylase 遺伝子の機能解析, 第 30 回日本分子生物学会プログラム p. 781, 横浜, 12月11-15日, 2007.

共同研究

1. 国際共同研究

- 1) 三上 襄: 抗酸菌の薬剤不活化に関する研究: Eric R. Dabbs 教授, ウィットウォーターズ大学教授, 南アフリカ.
- 2) 三上 襄: 病原性放線菌および真菌の分子分類学的研究, N. Poonwan 博士, タイ国立衛生研究所, タイ.
- 3) 三上 襄: 病原性放線菌の系統学的研究: R. M. Kroppenstedt 教授, 微生物及び細胞株保存センター (DSMZ), ドイツ.
- 4) 三上 襄: 病原真菌 *Cryptococcus* の系統解析: W. Meyer 准教授, シドニー大学病院, オーストラリア.
- 5) 三上 襄: 病原真菌の疫学的研究: M. L. Moretti 教授, カンピーナス大学医学部, ブラジル.
- 6) 知花博治: *Candida albicans* ゲノムシーケンスプロジェクト, Paul T. Magee 教授, アメリカ合衆国, ミネアポリス, ミネソタ大学.

2. 共同利用研究以外の国内共同研究

- 1) 田中玲子, 松澤哲宏, 宇野 潤, 五ノ井 透, 三上 襄: *Malassezia* 属菌の免疫賦活化作用に関する研究, 斉藤 隆博士, 山崎 晶博士, 独立行政法人理化学研究所・免疫アレルギー科学総合研究センター.

国際交流

1. 海外渡航

- 1) 三上 襄: 文部科学省科学技術振興調整費: 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成, 中国吉林大学 (長春), 8月26日~9月2日, 2007.
- 2) 三上 襄: 文部科学省科学技術振興調整費: 真菌症

原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成, 貴陽医学院 (貴州), 11月30日~12月7日, 2007.

- 3) 三上 襄: 二国間共同実験 (学術振興会), 共同実験の開始のため南アフリカウィットウォーターズ大学訪問, 9月16日~24日, 南アフリカ, 2007.
- 4) 知花博治: アメリカ合衆国, ミネアポリス, Magee Symposium and Retirement Celebration に出席ならびに共同研究打合せのため, 7月24~8月10日, 2007 (科研費).
- 5) 知花博治: ニュージーランド, パーマストンノース, マッセイ大学, ウェリントン, ニュージーランド微生物学会, クウィーンズタウン, ダニーデン, オタゴ大学, 11月21日~12月7日, 2007 (招待, 共同研究費).

2. 海外研究者の受け入れ

- 1) 李 若瑜教授 (中国, 北京大学皮膚科, 11月7~13日, 2007 (振興調整費), 共同研究 (三上 襄).
- 2) Wei Liu 准教授 (中国, 北京大学皮膚科, 11月7~13日, 2007 (振興調整費), 共同研究 (三上 襄).
- 3) 席 麗艶教授 (中国, 中山大学附属第二医院皮膚科, 11月7~14日, 2007 (振興調整費), 共同研究 (三上 襄).
- 4) Luo Zhenhua 講師 (中国, 貴陽医学院病原微生物, 11月14~29日, 2007 (振興調整費), 共同研究 (三上 襄).
- 5) Youtaro Shibayama 院生 (南アフリカウィットウォーターズ大学) 12月18日, 2007~1月18日, 2008 (二国間共同研究費), 共同研究 (三上 襄).
- 6) Chris Hadjiannis 院生 (南アフリカウィットウォーターズ大学) 12月18日, 2007~1月18日, 2008 (二国間共同研究費), 共同研究 (三上 襄).
- 7) Eric Dabbs 教授 (南アフリカウィットウォーターズ大学) 12月24日, 2007~1月18日, 2008 (二国間共同研究費), 共同研究 (三上 襄).

学会等活動 (主催学会, 座長, コンビナーなど)

- 1) 三上 襄: 座長 第 28 回関東医真菌懇話会 特別講演 2 「麹菌のポストゲノム研究 - 転写因子の網羅的機能解析を中心に -」, 東京都, 6月2日, 2007.
- 2) 知花博治: 第 80 細菌学会総会ワークショップコン

- ピーナー, 座長.
- 3) 知花博治: 第5回感染症沖縄フォーラム実行委員.
 - 4) 知花博治: 真菌ワーブ研究会事務局.

教育活動

学位指導

- 1) 向井 啓: 大学院医学薬学府 医学博士課程終了 (3月). Novel antimicrobial compounds produced by pathogenic actinomycetes. (研究指導: 三上 襄).
- 2) ハナフィ アメド メドハット モーセン: 大学院医学薬学府 医学博士課程終了 (3月). Phylogenetic and drug susceptibility studies on fungi and actinomycetes isolated from clinical specimens in Japan (本邦において臨床材料より分離される病原真菌および放線菌の系統分類と薬剤感受性) (研究指導: 三上 襄).
- 3) 武田健二郎: 大学院医学薬学府 修士課程終了 (3月). *GyrB* 遺伝子情報を用いた *Nocardia* 属放線菌の系統分類とその応用に関する研究. (研究指導: 三上 襄).
- 4) 山本摂也: 大学院自然科学研究科 博士前期課程終了 (3月). 抗真菌活性を有する新規微生物代謝産物の探索 (研究指導: 安藤 昭, 三上 襄).
- 5) 松本優子: 大学院自然科学研究科 博士前期課程終了 (3月). *Nocardia* のシデロフォア生産性と生産に関与する遺伝子の解析 (研究指導: 安藤 昭, 三上 襄).
- 6) 三谷宏樹: 園芸学部卒業 (3月). (研究指導: 三上 襄).
- 7) 住江祐介: 日本大学生産工学部卒業研究1名 (3月) (研究指導: 知花博治).

講義

- 1) 三上 襄: 千葉大学大学院医学研究科 (真菌感染症学分野-高分子活性学), 千葉大学大学院自然科学研究科博士後期課程 (分子生態機能学-真菌感染応答論I), 千葉大学大学院自然科学研究科博士前期課程 (分子生態機能学), 千葉大学薬学研究院 (化学療法学) 普遍講義 (真菌 (かび) と人との関わり合い).
- 2) 知花博治: 千葉大学大学院自然科学研究科博士前期課程 (真菌活性応答論), 千葉大学園芸学部 (応用

細胞工学 分担), 千葉大学普遍教育 (真菌とくらし-真菌のゲノムと応用, 分担), 琉球大学医学部講義 (微生物学-細菌学-, 分担).

- 3) 宇野 潤: 千葉大学普遍教育 (真菌 (カビ) と人との関わり合い-抗真菌剤の選択毒性とは, 分担), 東邦大学薬学部講義 (薬物治療学III-感染症).

インターンシップ生 (実習生) の受け入れ

- 1) 志思沢里奈, 三上 襄: 日本大学生産工学部応用化学科の3年生1名を実験の実習生として (平成19年7月31日~9月12日).

社会的活動

- 1) 市民公開講座「カビ!」実行委員 宇野 潤.

センター講習会

- 1) 矢沢勝清: 第71回病原真菌講習会講師「病原性放線菌」(2007. 7. 12).

外部資金

科学研究費補助金

- 1) 三上 襄 (代表): 科学研究費補助金 基盤研究 C 19590041 ゲノム情報に基づく病原性放線菌 *Nocardia* の新しい同定法の確立, 平成18~19年度 (平成19年度は200万円, 間接経費60万円).
- 2) 三上 襄 (代表): 平成19年度文部科学省科学技術振興調整費「真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成」(平成19年度は2,548万円, 間接経費633万円).
- 3) 三上 襄 (代表): ナショナルバイオリソースプロジェクト「病原微生物」(平成19年度は950万円, 間接経費86万円).
- 4) 知花博治 (代表), 宇野 潤 (分担), 医学研究院 田村 裕 (分担): 特定領域「感染マトリックス」カンジダフェノームプロジェクト 第2章: 標的の決定とインシリコ抗真菌ペプチドの創出, 平成19~20年度 (平成19年度は770万円).
- 5) 知花博治 (代表), 宇野 潤 (分担): 特定領域「応用ゲノム」カンジダ酵母における病原性ゲノム機能学-網羅的遺伝子発現制御株の構築と応用, 平成18~19年度 (平成19年度は470万円).
- 6) 上野圭吾: 科学研究費補助金 (日本学術振興会特別

研究員奨励費)「*Candida* フェノミクスによる抗真菌剤開発への展開」平成 19～21 年度 19 年度は 90 万円.

- 7) 矢沢勝清 (代表): 平成 19 年度文部省科学研究費 奨励研究 研究課題番号 19924017) 病原性放線菌ノカルジア菌属の新種に関する研究 (75 万円).

その他の外部資金

- 1) 三上 襄 (代表): 日本学術振興会 2 国間交流事業: 南アフリカとの共同研究, 病原性放線菌 *Nocardia* 及び関連菌の薬剤感受性に関する研究, 平成 18～19 年度 (平成 19 年度は 220 万円).
- 2) 三上 襄 (代表): 第一三共株式会社「抗真菌薬および抗結核薬の探索研究」308 万円, 間接経費 92 万円.
- 3) 三上 襄 (代表): 塩野義製薬株式会社「病原性真菌の臨床分離株の薬剤感受性」, 154 万円, 間接経費 46 万 2 千円.

- 4) 三上 襄 (代表) 株式会社プロテイン・エクスプレス「蛍光標識タンパク質を用いた微生物由来新規生理活性物質の探索」80 万円, 間接経費 24 万円.

- 5) 知花博治 (分担): 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) バイオマスエネルギー高効率転換技術開発 (先導技術開発) 平成 19 年～20 年, 19 年度 342 (間接経費 52) 万円.

- 6) 知花博治 (代表): 民間との共同研究, 株式会社大正製薬 カンジダ・グラブラータ遺伝子の機能に関する研究, 平成 19～20 年度, (平成 19 年度は 100 万円 間接経費 58 万円).

- 7) 知花博治 (分担), 平成 19 年度柏市新産業創出促進事業補助金, 100 万円.

- 8) 小暮高久: 学長裁量経費 平成 19 年度研究支援プログラム 若手研究者に対する助成 (若手助成 B) 「病原性真菌の有用代謝物質生産への応用利用」90 万円.

分子機能研究部門 活性応答分野

(Department of Molecular Function, Division of Biological Specification)

本年度の客員教授は、キッコーマン醤油株式会社(株) 研究開発本部長の菊地 護博士が就任した。菊地教授の最近の社会的活動や研究は以下の通りである。

教授: 菊地 護 (客員)

学会および社会における活動等

2004年7月～: 千葉県立現代産業科学館 展示運営協力会 理事

2005年4月～: (財) 日本醤油技術センター 雑誌編集委員

2005年9月～: 千葉・東葛都市エリア健康科学推進会議 委員

2006年3月: 日本農芸化学会, Most-Cited Paper Award 受賞

2006年4月～: 千葉県「産業支援技術研究所課題評価専門部会」委員

2006年4月～: (財) 野田産業科学研究所 理事

2006年5月～2007年5月: (財) 日本醸造協会 洋酒技術研究会 運営委員長

2006年9月～: IFT ジャパンセクション 評議員

2007年5月～: 社団法人発明協会千葉県支部 副支部長

所属学会: 日本農芸化学会, 日本生化学会等会員

センターでの19年度の共同研究

結核の一次選択薬であるリファンピシンに対し自然耐性で、その耐性機構は、リファンピシンの23位の水酸基をリボシル化による不活化である。これまでの研究で、*M. smegmatis* がADP ribosyltransferase をコードする遺伝子 *arr* を持つことが明らかになっている。本研究では、酵素と薬剤の結合様式の解明を目的に大学院生の伊藤らが行っているADP ribosyltransferase の結晶構造解析を目的としている研究の支援を行った。また、新たに、*Nocardia brasiliensis* のリファンピシンの23位の水酸基のグルコシル化酵素とリファンピシンの結合様式の解明についても、院生(伊藤, 志保澤ら)が行う予定の結晶解析研究などの支援を行っている。



研究成果の発表

原著論文

- 1) Yamakoshi J, Fukuda S, Sato T, Saito M, Obata A, Matsuyama A, Kikuchi M, Kawasaki T: Antihypertensive and natriuretic effects of less-sodium soy sauce containing γ -aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 165-173, 2007.

病原真菌・放線菌管理室（微生物保存事業報告）

(Culture Collection of Pathogenic Fungi and Actinomycetes)

技術職員：伊藤純子（真菌）

技術職員：矢澤勝清（放線菌）

技術補佐員：大楠悦子

技術補佐員：佐海知子

on *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from clinical specimens in Japan. Jpn J Med Mycol 48: 37-46, 2007.

業務概要

病原真菌・放線菌管理室は、真菌・放線菌の保存・維持管理を主な業務とし、新規登録株の受付（台帳およびアンプルの作製）、既に登録されている株のアンプル補充や菌株情報の整備（データベースの更新）を行っている。本年の新規登録は真菌が820株、放線菌が136株であった。また、ナショナルバイオリソースプロジェクトの支援により研究用菌株の分譲業務も担当し、その分譲実績は表に示すとおりである。本年6月より施行された「改正感染症法」を受け、設備の見直しと改善を行った。

松田千恵子氏（平成19年3月末日退職）の後任として、新たに大楠悦子氏が4月1日より採用された。また、保存業務の技術補佐員として佐海知子氏が6月1日より採用され、人員も増えロットの追加・管理やデータベースの整備に益々力を注いでいる。

原著論文

- 1) Yaguchi T, Horie H, Tanaka R, Matsuzawa T, Ito J, Nishimura K: Molecular phylogenetics of multiple genes

学会発表

国内

- 1) 西村和子, 矢口貴志, 佐野文子, 田中玲子, 伊藤純子, 松澤哲宏, 亀井克彦, 三上 襄: *Pseudallescheria boydii* と関連アナモルフ種の臨床分離株について. 日本微生物資源学会第14回大会, 日本微生物資源学会誌 23(1): 65, 札幌, 6月25～26日, 2007.
- 2) 矢口貴志, 伊藤純子, 田中玲子, 松澤哲宏, 堀江義一, 五ノ井 透: 病原性 *Aspergillus* section *Fumigati* の分類とその性状. 第51回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊1号): 71, 高山, 11月9～10日, 2007.
- 3) 小暮高久, 島田玲於奈, 矢澤勝清, 三上 襄: 病原性放線菌 *Nocardia farcinica* におけるアミカシン高度耐性化遺伝子の単離と解析. 日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊1号): 65, 高山, 11月9～10日, 2007.
- 4) 康 穎倩, 武田健二郎, 伊藤淳二, 矢澤勝清, 三上 襄: A comprehensive phylogeny of *Gordonia* species based on 16S rDNA, *gyrB*, and *secA1* gene analysis. 日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊1号): 71, 高山, 11月9～10日, 2007.

2007年 分譲件数と分譲株数

		国内	国外	合計
件数 (株数)	真 菌	39 (706)	4 (16)	43 (722)
	放線菌	15 (163)	5 (97)	20 (260)

2007年 患者検体から分離された菌株の同定と依頼機関

患者検体から分離された菌株の同定と依頼機関（起因菌の可能性の高いもののみ）を示す。

真 菌	菌 名	件 数
	<i>Aspergillus flavus</i>	1
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	3
	<i>Bipolaris</i> sp.	1
	<i>Candida albicans</i>	1
	<i>Candida guilliermondii</i>	1
	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	1
	<i>Exophiala dermatitidis</i>	1
	<i>Fusarium solani</i>	2
	<i>Microsporum canis</i>	3
	<i>Microsporum gypseum</i>	4
	<i>Malassezia furfur</i>	25
	<i>Pseudozyma antarctica</i>	1
	<i>Rhodotorula rubra</i>	2
	<i>Scedosporium apiospermum</i>	7
	<i>Sporothrix schenckii</i>	2
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	5
	<i>Trichophyton verrucosum</i>	1
	<i>Trichosporon</i> sp.	1
	合 計	62

依 頼 機 関
横浜市立大学付属病院
船橋医療センター
東名古屋病院
東京女子医大感染症科
千葉大学附属病院第一内科
高橋動物病院
聖マリア病院
国立国際医療センター
きさらづ皮膚科クリニック
金沢大学医学部呼吸器内科
沖縄美ら海水族館

放線菌

菌名	件数
<i>Actinomadura</i> sp.	1
<i>Gordonia aichiensis</i>	2
<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	1
<i>Mycobacterium</i> sp.	7
<i>Nocardia asiatica</i>	4
<i>Nocardia asteroides</i>	1
<i>Nocardia brasiliensis</i>	12
<i>Nocardia concava</i>	1
<i>Nocardia elegans</i>	2
<i>Nocardia farcinica</i>	15
<i>Nocardia inohanensis</i>	1
<i>Nocardia nova</i>	5
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	1
<i>Nocardia puris</i>	1
<i>Nocardia testacea</i>	1
<i>Nocardia transvalensis</i>	2
<i>Rhodococcus equi</i>	1
<i>Rothia</i> sp.	1
<i>Streptomyces</i> sp.	1
合計	60

依頼機関	
JA広島総合病院	常滑市民病院
さいたま赤十字病院	聖マリアンナ医科大学
愛媛県済生会今治病院	静岡市立静岡病院
羽生総合病院	千葉大学医学部附属病院
越谷市立病院	大阪医科大学附属病院
燕労災病院中央検査部	大阪府立成人病センター
音羽病院	大分大学医学部
関東中央病院	中国電力(株)中電病院
岐阜大	中国労災病院
慶應義塾大学医学部	仲皮フ科クリニック
厚生連刈羽郡総合病院	長崎大学医学部
厚生連広島総合病院	長良医療センター
厚生連高岡病院	東京厚生年金病院
広島赤十字・原爆病院	東京都立駒込病院
江東微研	東芝病院
国立国際医療センター	東邦大学医療センター大橋病院
済生会横浜市東部病院	徳島赤十字病院検査部
三井記念病院	日本赤十字社医療センター
山田赤十字病院	北松中央病院
鹿児島大学医学部	

保存菌株の原産国別分類

North America	916
Bahamas	1
Canada	106
Costa Rica	243
Cuba	9
Dominican Republic	1
Gulf of Mexico	1
Honduras	5
Jamaica	3
Mexico	27
Nicaragua	2
Panama	4
Puerto Rico	8
USA	506
South America	1,973
Argentina	16
Brazil	1,736
Chile	15
Colombia	60
Ecuador	7
French Guiana	5
Guyana	3
Peru	3
Surinam	4
Uruguay	7
Venezuela	117
Africa	178
Argeria	1
Central African Republic	1
Congo	1
Egypt	27
Ethiopia	1
Gabon	1
Ghana	19
Guinea	4
Ivory Coast	5
Kenya	8
Madagascar	4

Malawi	3
Morocco	1
Mozambique	2
Namibia	1
Nigeria	11
Rwanda	2
Somalia	2
South Africa	66
Sudan	3
Togo	1
Uganda	3
Zaire	10
Zimbabwe	1
Asia	5,905
Bhutan	2
Ceylon	3
China	653
India	76
Indonesia	23
Iran	5
Iraq	1
Israel	1
Japan	4,555
Kazakhstan	1
Korea	43
Kuwait	4
Malaysia	4
Myanmar	1
Nepal	7
Pakistan	6
Saudi Arabia	1
Sri Lanka	31
Tadzhikistan	1
Taiwan	72
Thailand	385
Turkey	6
Uzbekistan	3
Vietnam	21

Europe	1,559
Austria	34
Belgium	20
Bohemia	1
Bulgaria	3
Croatia	1
Czech Republic	331
Czechoslovakia	16
Denmark	15
Eritrea	1
Estonia	1
Finland	241
France	65
Germany	118
Greece	2
Hungary	45
Ireland	2
Irish Republic	1
Italy	111
Luxembourg	1
Netherlands	141
Norway	16
Poland	7
Portugal	14
Rumania	2
Russia	21

Slovakia	32
Spain	62
Sweden	35
Switzerland	26
UK	182
Ukraine	6
USSR	5
Yugoslavia	1
Oceania	177
Antarctic Ocean	14
Antarctica	19
Australia	67
Bougainville island	1
New Zealand	62
Papua New Guinea	3
Philippines	1
Samoa	1
Solomon Islands	6
Tahiti	2
Tonga	1
unknown	2,255
total	12,963

Excretion Protein Gene of Fungi for Multidrug Resistance

Wang Li

(Department of Pathogenic Fungi, Division of Ecology)

Foreigner Guest Professor of the Medical Mycology Research Center, Chiba University (2007).

Present address: Department of Pathogenobiology, Norman Bethune Medical School, Jilin University, P. R. China

Email: wli99@jlu.edu.cn

In the past ten years, with the abuse of the antifungal drug and the increasing of the treatment time, the varieties and quantities of the drug resistance strains has been constantly showing up. Besides, they also show resistance to the antifungal drug different in chemical constitution and never used in clinic, that is to say, they have MDR (multiple drug resistance)¹⁾. So, it becomes a hot point to deeply research the drug resistance mechanism and slow down its development. One of the mechanism which is very important, is the increasing of excretion which can decrease the drug concentration inside the cells. With the application of molecular biological technology, more and more complete genome sequence is determined and some new drug excretion systems are also found, including the excretion protein of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* have been sequenced^{2,3)}, it has been uncovered and accepted that active efflux system plays an important role in clinical resistance pathogenic strains.

1. Classification, structure and function of the excretion system

Over expression of the efflux pump protein, which is the principal mechanism of the MDR phenomenon, can be divided into two sorts according to different energy resource: ATP-binding cassette transporter (ABCT) and major facilitator superfamily (MFS). ABCT, as multidrug transport carrier with an ATP energy dependent form, is the efflux function pump in cell membrane. And another MDR protein — MFS belong to non-energy dependent form, which can passive transport with electrochemistry potential energy.

ABCT has the similar molecular structure, which possesses four domains with 2 hydrophilic regions in N-end and 2 hydrophobic regions in C-end. The hydrophilic regions include highly conservative nucleotide binding domain (NBD), are able to couple the process of ATP hydrolysis and transporting motion. Hydrophobic regions contain a transmembrane segments (TMS) make up of 6 α -helix. ABCT is a kind of dimeride, which is polymerized by two subunits with the same or different topological structure. And each subunit is composed of 6 TMS and 1 NBD, that is also to say the NBD-6TM or 6TMS-NBD.

ABCT is concerned with many cell functions, such as forming drug resistance, secreting pheromone, function of mitochondrion, action of peroxidase, extension in translation process, stress reaction of cells with toxic substance and so on⁴⁾. Moreover, ABCT can maintain the cell membrane's asymmetry by transporting phospholipid, which ensure the normal cell physiologic function.

2. Excretion gene

2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae is the first eukaryote which has the complete genome sequence determined. According to the complete genome sequence, it's speculated to have 29 ABCT genes²⁾. Among these ABCTs, Pdr5p, Snq2p, Ycf1p, Yor1p have been known and related with *S. cerevisiae*. And the first discovered Pdr5p is the homolog which function is similar to P-gp in mammalian, interacting with many substrates of P-gp substrate, as well as regulated by the regulatory factors of P-gp, such as FK506 and enniatine. As a result, the Pdr5p is a significant protein model to study the structure and function

of MDR^{6,7}).

And *S. cerevisiae* is speculated to own 23 MFS, among of which the gene of Qdr1 has been sequenced. It is supposed that its function is related with the resistance of ketoconazole and quinidine⁸).

S. cerevisiae is used as a model system to study and identify the molecular mechanisms of MDR. In *S. cerevisiae* mutants AD1-8u, heterologous overexpression model of ABCT or other membrane proteins is built to further determine the features of function and structure of these proteins by resistance restitution. In AD1-8u mutant, it has been knock out seven major resistance related ABCTs: Pdr5p, Pdr10p, Pdr11p, Pdr15p, Snq2p, Yor1p, Ycf1p. Different gene fragments of *C. albicans*, *Candida glabrates* and other resistant strains of *Candida* are transferred into Pdr5p sites of plasmids in *Saccharomyces cerevisiae* cell without ABCT genes, induced by regulatory elements of *S. cerevisiae*, to observe the structure and function of gene⁹).

2. 2 *Candida albicans*

On the basis of known genome sequence, there are 81 nucleotidebinding domain in *C. albicans*. It is supposed that 28 ABCTs possibly exist, which are divided into 6 groups, and all of them have corresponding homologs with *S. cerevisiae*³). There are 7 varieties of ABCTs have been found in *C. albicans*, which are Cdr1 to Cdr7 respectively. Among them, only Cdr1p and Cdr2p, are concerned with multiple drug resistance. But the resistance mechanism and regulation mechanism between them are different¹⁰).

It has been determined that CaMdr1 (BenR) and Flu1 are representative genes of MFS in *C. albicans*. The study found the expression of CaMdr1 is relative to fluconazol resistance, but not has association with Ketoconazole¹¹). And it is also show that Flu1 is indispensable gene in azoles resistance strains¹²).

2. 3 *Aspergillus nidulans*

atrA and atrB are initially found ABCTs in *Aspergillus nidulans*, which have the same topological structures with Pdr5, Snq2 and Cdr1. And these 2 genes have highly homology¹³). atrC, atrD and P-gp are also in higher homology, and it has been indicated that the expression of atrC and cellular metabolism are related. The amino acid sequence of atrD and AfuMdr1 of *Aspergillus fumigatus* are

highly consistent, and the expression of atrD is relevant to drug resistance^{14,15}).

2. 4 *Aspergillus fumigatus*

In *A. fumigatus*, AfuMdr1, AfuMdr2, AfuMdr4 and atrF are ABCTs, while the structure of AfuMdr3 has the highly similarity (30-42%) to transport proteins of MFS family, which is the first MFS gene of filamentous fungi related to drug resistance. The effect of AfuMdr1 and AfuMdr2 in drug resistance has not been identified¹⁶). But AfuMdr3 and AfuMdr4 are highly expressed and accompanied in resistance strains, which is considered that they both have the same reactivator, or AfuMdr3 controls the expression of AfuMdr4, or the opposite^{17,18}).

3. Excretion protein regulatory factor

Many transcription factors are able to regulate the expression of ABCT or MFS, the change or amplify of genes encoding membrane transport proteins or transcription regulation factors may cause MDR phenomenon. There are 2 kinds of regulating factors: bZip protein family and zinc cluster proteins. Yap1p protein is the represent of bZip protein family, which mainly regulates the stress reaction and also the expression of Ycf1p in *S. cerevisia*. Zinc cluster proteins have effects on the primary and secondary metabolism, drug resistance and maturation division of cells¹⁹).

Excretion system exists generally in many sorts of cells such as mammalian, bacteria and fungi, so that the researches on the structure, function and regulation mechanisms may be significant to illuminate the MDR mechanism of the cell. With excretion drug resistance gene as the new medicine target and new efflux pump inhibitors blocked up the excretion function, medicine in the cells will be accumulated and anti-fungal activities will be strengthened to the antifungal drugs.

Reference

- 1) White TC, Marr KA, Bowden RA: Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev 11(2): 382-402, 1998.
- 2) Decottignies A, Goffeau A: Complete inventory of the yeast ABC proteins. Nat Genet 15(2): 137-145, 1997.
- 3) Gaur M, Choudhury D, Prasad R: Complete inventory

- of ABC proteins in human pathogenic yeast, *Candida albicans*. J Mol Microbiol Biotechnol 9(1): 3-15, 2005.
- 4) Wolfger H, Mamnun YM, Kuchler K: Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. Res Microbiol 152(3-4): 375-389, 2001.
 - 5) Rogers B, Decottignies A, Kolaczowski M, *et al.*: The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. J Mol Microbiol Biotechnol 3(2): 207-214, 2001.
 - 6) Egner R, Rosenthal FE, Kralli A, *et al.*: Genetic separation of FK506 susceptibility and drug transport in the yeast Pdr5 ATP-binding cassette multidrug resistance transporter. Mol Biol Cell 9(2): 523-543, 1998.
 - 7) Hiraga K, Wanigasekera A, Sugi H, *et al.*: A novel screening for inhibitors of a pleiotropic drug resistant pump, Pdr5, in *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci Biotechnol Biochem 65(7): 1589-1595, 2001.
 - 8) Sa-Correia I, Tenreiro S: The multidrug resistance transporters of the major facilitator superfamily, 6 years after disclosure of *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. J Biotechnol 98(2-3): 215-226, 2002.
 - 9) Nakamura K, Niimi M, Niimi K, *et al.*: Functional expression of *Candida albicans* drug efflux pump Cdr1p in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters. Antimicrob Agents Chemother 45(12): 3366-3374, 2001.
 - 10) Gauthier C, Weber S, Alarco AM, *et al.*: Functional similarities and differences between *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p transporters. Antimicrob Agents Chemother 47(5): 1543-1554, 2003.
 - 11) Wirsching S, Moran G, Sullivan D J, *et al.*: MDR1-Mediated Drug Resistance in *Candida dubliniensis*. Antimicrob Agents Chemother 45(12): 3416-3421, 2001.
 - 12) Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM: Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. Infect Immun 71(8): 4333-4340, 2003.
 - 13) Andrade AC, Del Sorbo G, Van Nistelrooy JG, *et al.*: The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds. Microbiology 146(Pt8): 1987-1997, 2000.
 - 14) Angermayr K, Parson W, Stoffler G, *et al.*: Expression of atrC - encoding a novel member of the ATP binding cassette transporter family in *Aspergillus nidulans* - is sensitive to cycloheximide. Biochim Biophys Acta 1453(2), 304-310, 1999.
 - 15) Andrade AC, Van Nistelrooy JG, Peery RB, *et al.*: The role of ABC transporters from *Aspergillus nidulans* in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production. Mol Gen Genet 263(6): 966-977, 2000.
 - 16) Nascimento AM, Goldman GH, Park S, *et al.*: Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. Antimicrob Agents Chemother 47(5): 1719-1726, 2003.
 - 17) Brookman JL, Denning DW: Molecular genetics in *Aspergillus fumigatus*. Curr Opin Microbiol 3(5): 468-474, 2000.
 - 18) Burghoorn HP, Soteropoulos P, Paderu P, *et al.*: Molecular evaluation of the plasma membrane proton pump from *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother 46(3): 615-624, 2002.
 - 19) Akache B, Turcotte B: New regulators of drug sensitivity in the family of yeast zinc cluster proteins. J Biol Chem, 277(24): 21254-21260, 2002.

しょうゆ黄麹菌の育種 ～古くて新しい古典育種～

菊 地 護

(千葉大学真菌医学研究センター活性応答分野客員教授・
キッコーマン株式会社研究開発本部)

1. はじめに

黄麹菌 *Aspergillus sojae*, *Aspergillus oryzae* は、しょうゆ、味噌、日本酒などの醸造物に広く使用され、日本固有の発酵食品の核となることから、「国菌」と称される微生物である¹⁾。黄麹菌は、生活環に有性世代をもたない不完全菌類の一つとして分類されている²⁾(図1)。一つの細胞に複数の核をもつ多核生物であるという特徴をもつ³⁾。醸造において黄麹菌は、原料の分解、それに伴う酵母や乳酸菌発酵のための基質の提供、黄麹菌自身による有機酸の生産など多岐にわたる機能を持っている。そのため醸造物製造の際、コスト面からも品質面からも最も重要視されている。さらに、日本の伝統食品として長い食経験を持つことから、その安全性が評価されており、その高い安全性と高いタンパク質生産能から、食品加工用酵素をはじめとするタンパク質生産の宿主としても利用されている⁴⁾。近年、黄麹菌 *Asperigllus oryzae* RIB40 のゲノム解析が終了し⁵⁾、遺伝子資源としての注目も集め、組換え技術を用いた基礎・応用研究が益々盛んになっている。

本総説では、しょうゆ醸造用の黄麹菌に焦点を当て、しょうゆ醸造における黄麹菌の役割、その育種方法について紹介したい。

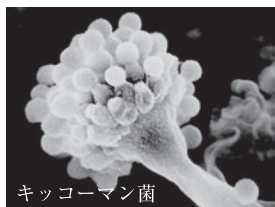


図1 *Aspergillus sojae* の電子顕微鏡写真

2. しょうゆの製造工程

しょうゆは、原料に大豆、小麦、食塩を使用し、微生物の力によって作り出される醗酵調味料である。しょうゆ醸造は原料処理、製麹、発酵熟成、圧搾、火入れの5つの工程からなる(図2)。原料処理工程では、大豆を蒸煮し、小麦を高温で炒ることで、タンパク質やでんぷん質を変性させる。これにより、黄麹菌の生産する酵素が作用し易くなり、黄麹菌が生育し易くなる。次に、蒸煮した大豆と炒った小麦に黄麹菌を播種し、恒温恒湿下で黄麹菌を生育させる。これを製麹という。この製麹工程で黄麹菌は多種多様な酵素を分泌生産する。続いて、製麹した麹と食塩水を混合し、約6ヶ月間、醗酵熟成させる。麹に食塩水を混合したものを諸味という。この諸味の中で製麹中に生産された酵素が働き、タンパク質やでんぷん質を分解する(図3)。定期的に攪拌や通気を行うことで、酵素で分解された糖やアミノ酸を利用し、耐塩性乳酸菌による乳酸醗酵、続いて耐塩性酵母による酵母醗酵が起きる。これらの微生物醗酵により、乳酸やアルコール、揮発性芳香物質などが生成され、まろやかな味わいやしょうゆ独特の香りが生じる。また、長期間の

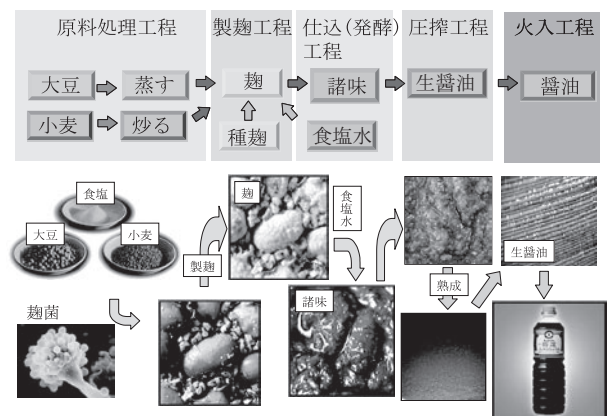


図2 しょうゆの製造法

熟成期間中には糖とアミノ酸によるアミノカルボニル反応をはじめ、様々な化学反応が起き、しょうゆの独特な味や香りをさらに深いものにする。醗酵熟成が終了した時点で、諸味をろ布と呼ばれる布に包み、生しょうゆと未分解の残渣とを分離する。これを圧搾という。得られた生しょうゆは、加熱殺菌し（これを火入れという）、変性したタンパク等の混合物である滓を除去して、製品しょうゆとなる。

3. しょうゆ醸造における黄麹菌の役割^{2,3)}

しょうゆ醸造において、黄麹菌の最も重要な役割は、原料中の高分子物質を低分子物質に分解する酵素や低分子物質をさらに呈味性物質や芳香性物質に変換する酵素を生産することである。これらの酵素は (1) タンパク質分解に関わる酵素、(2) 炭水化物分解に関わる酵素、(3) その他の酵素の3つに大別される。タンパク質分解酵素は、大豆に含まれる不溶性のタンパク質を可溶性のペプチドやアミノ酸にまで分解し、しょうゆの味の基礎をつくる (図3)。炭水化物分解に関わる酵素は、小麦に含まれるでんぷん質をオリゴ糖やブドウ糖にまで分解し、しょうゆの味や色に影響する (図3)。これらの糖やアミノ酸は、乳酸菌や酵母の栄養源となるだけでなく、乳酸やアルコールに代謝され、しょうゆの味や香りを作り出す (図3)。

一方、酵素源の供給と並んで重要視されるのが芳香源としての役割である。黄麹菌が生産する有機酸やアルコール類はそれ自体で、あるいは、エステルに変換されて香りに影響を与える。また、黄麹菌体の自己消化物やそれから2次的に生成される物質、酵母で変換される香気成分の前駆体なども生産するため、しょうゆの香気に

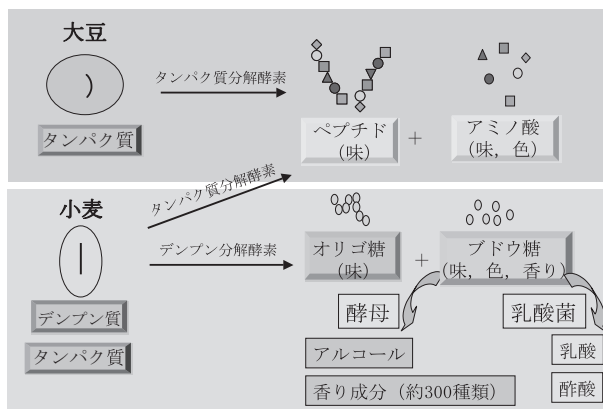


図3 しょうゆの醸造における麹菌酵素の作用

強い影響を与えるといわれている。メーカー間でしょうゆの香味が変わるのは使用している黄麹菌の違いによるとも考えられている。

4. 黄麹菌の育種改良

上述したようにしょうゆ黄麹菌は、しょうゆ醸造において、最終製品に大きく影響するため、古くから、優良菌株への育種改良が行われている。望ましいしょうゆ黄麹菌の特徴を以下にまとめる^{2,3)}。

- (1) タンパク質を分解するアルカリプロテアーゼや中性プロテアーゼ生産能が高い。
- (2) ペプチドをアミノ酸にまで分解するアミノペプチダーゼ生産能が高い。
- (3) グルタミンを旨み成分であるグルタミン酸に変換するグルタミナーゼ生産能が高い。
- (4) 植物組織崩壊に寄与するペクチンリアーゼなどの酵素生産能が高い。
- (5) 諸味の粘度が低く、圧搾性が良い。
- (6) 適量のアミラーゼと酸性プロテアーゼを生産する。
- (7) 製麹中の糖消費量が多くなく、製麹作業性に優れる。
- (8) 生育速度が速く、麹中の菌体量が多い。
- (9) 種麹の分生子着生が良好である。
- (10) アフラトキシンなどのマイコトキシン非生産性である。

これらの性質向上を育種目標に掲げているが、特に以下の2つの目標に向けて育種改良されてきたといっても過言ではない。

- (1) 歩留まりの向上 (原料 (窒素) 利用率の向上)
- (2) 品質の向上 (旨みや香り成分の増強)

しょうゆは窒素濃度で規格される。つまり、窒素利用率は、コストに大きく反映するため、古くから窒素利用率の高い黄麹菌は重要な育種目標である。これらはタンパク分解率を向上させるため、プロテアーゼやペプチダーゼ活性の高い黄麹菌の育種や、植物組織崩壊に寄与し、圧搾性を向上させるセルラーゼやペクチナーゼ活性の高い黄麹菌の育種が試みられている。一方で、うまみや香り成分の増強に関しては、製麹工程での黄麹菌による糖消費を低減させるためにアミラーゼ活性の低い黄麹

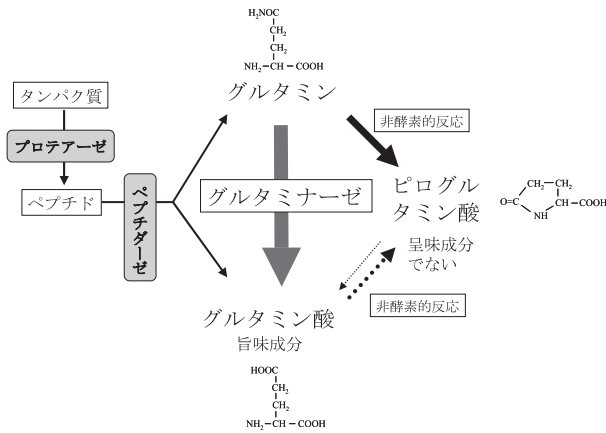


図4 しょうゆ醸造におけるグルタミン酸の生成

大豆タンパクにはアミド体であるグルタミンが豊富に含まれている。麹菌の生産する酵素により大豆タンパクはアミノ酸にまで分解され、アミノ酸の一種であるグルタミンはさらに麹菌の生産するグルタミナーゼにより旨味成分であるグルタミン酸へと変換される。このグルタミナーゼの作用がないとグルタミンは非酵素的反応により、呈味成分ではないピログルタミン酸へと変換し、旨みの乏しいしょうゆとなる。

菌の育種やうまみ成分として知られているグルタミン酸をつくるグルタミナーゼ活性の高い黄麹菌の育種などが行われている (図4)。

これまでにしょうゆ麹菌の育種に用いられてきた方法は以下の4つに大別される。その特徴を簡単に紹介する^{2,3)}。

(1) 選抜法

目的の特徴を持つ黄麹菌を自然界の中から探し出して使用する。従来使っていた菌株とはまったく別のものを使用するため、しょうゆの香味 (色, 味, 香りなど) が大きく変わる。

(2) 人工変異による育種

アルキル化剤などの変異誘発剤や紫外線などの変異原を黄麹菌に照射し、突然変異を人為的に生じさせ、目的の形質を示す変異株を選抜する方法である。比較的容易に行えるため、現在でも育種の主流を走っている。古くは、1955年に黄麹菌にX線を照射し、プロテアーゼ活性の高い変異株を取得したという報告がある⁶⁾。これまで述べてきたとおり、しょうゆ黄麹菌は複数の優良な性質を併せ持つことが望ましい。そのため、一つの性質が向上されても、別の性質が悪くなると実製造には使用できない。人工変異による育種は、目的の形質以外の変異

(付随変異) が起こりやすく、目的の形質が得られたとしても生育が悪いなどの負の影響を併せ持ち、実製造に使用できないことが多々ある。また、古くからこの方法で多くの変異株が取得されているが、現在までに取得できない変異株というものがある。例えば、高いプロテアーゼ活性を保持しつつ、高いグルタミナーゼ活性を示す変異株は取得できていない。つまり、プロテアーゼ向上変異株ではグルタミナーゼが低下し、グルタミナーゼ向上変異株ではプロテアーゼが低下するという負の相関があると報告されている⁷⁾。これは、遺伝的な要因の可能性も考えられるが、従来の変異原では取得できないという可能性も考えられる。このようにこれまでの変異原では与えることのできる形質に限界がある可能性も考えられている。

(3) 細胞融合 (プロトプラスト融合) を利用した育種³⁾

1980年代になると細胞融合による育種が盛んに行われた。しょうゆ黄麹菌のように複数の性質を同時に求められる場合に、特徴ある2種類の優れた性質を兼備させるような育種には大変有効である。例えば、高いプロテアーゼ活性株と高いグルタミナーゼ活性株を融合してヘテロ2倍体を作製し、両方の活性が高い変異株を作製するなどの試みが行われた (図5)。これは、分生子の色と栄養要求性のダブルマーカーをつけた ac7 (黄色, システイン要求性, 高グルタミナーゼ株) と ac14 (白色, ニコチン要求性, 高プロテアーゼ株) をプロトプラスト化し融合させるというものである。分生子着色は白色→黄色→緑色となるため、融合株は、それぞれの劣性変異遺伝子を遺伝的に相補し、緑色の分生子を形成し、栄養要

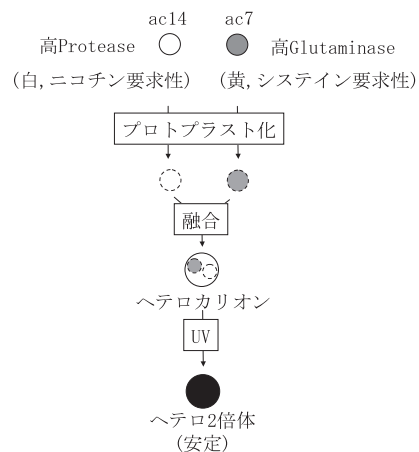


図5 細胞融合による育種¹⁾

求性がなくなる。ヘテロカリオンとなった融合株は紫外線照射することにより2倍体として安定化される。しかし、このように出来上がった変異株はどちらか一方の形質に偏る、つまり、親株とほとんど変わらない変異株がほとんどであった。その中でも両者の中間的な活性を示す変異株も得られたが、両方とも親株並に高い活性を示す変異株は得られなかった。

(4) 遺伝子組換え技術を利用した育種

1990年以降になると黄麹菌の分野でも遺伝子組換え技術が確立し、これを利用した育種が可能となった。遺伝子組換え技術を用いた育種は目的の性質のみを導入するには有効であり、付随変異はなく、短期間に育種改良が可能である。また従来の変異方法ではスクリーニング系がなく取得できなかった株なども遺伝子組換えで作ることは容易に可能である。

遺伝子組換え体には、異種遺伝子を利用した組換え体と自己の遺伝子を増強、または欠落させる、異種遺伝子を全く含まないセルフクローニング法を用いた遺伝子組換え体とがある。工業用酵素や飼料用アミノ酸などの高度精製品のように、遺伝子組換え体を取り除く工程を含む製品の場合、厚生労働省の認可を受けるとセルフクローニングによる遺伝子組換え体を遺伝子組換え体として扱わなくても良いことになっている。2005年に黄麹菌ゲノム配列が公開され、遺伝情報が明らかとなったことから、セルフクローニングによる遺伝子組換え体の作製が急速に進むと思われる。

5. 新しい人工変異の登場⁸⁻¹⁶⁾

工業用酵素やアミノ酸などの高度精製品と異なり、しょうゆを含む醗酵醸造では、黄麹菌を取り除く工程を含まない。そのような食品の製造を考えた場合、遺伝子組換え体の利用はパブリックアクセプタンスの面から、実用化についてまだ目途が立っていない。そのため、変異による黄麹菌の育種改良は今後も大きな課題のひとつである。

これまでにも述べてきたように、実用面から考えると、人工変異である古典育種は重要であるが、与えられる形質に限界がある可能性が示唆されており、新しい変異原の開発が求められていた。近年になって、重イオンビームを新しい変異原として利用する動きがあり、植物育種の分野で成果が挙がっている。ここでは、将来的に

有望な変異原である重イオンビームについて、少し紹介したい。

重イオンビームとは、炭素イオンなど、ヘリウムよりも重い原子のイオン(重イオン)をサイクロトロンという加速器を使って、高速(光速の1/10程度)に加速させ、細いビーム状にしたものである。重イオンビームの応用研究は正常細胞への損傷を最小限に抑え、腫瘍細胞を効果的に死滅させる新しい放射線治療に利用すべく古くから行われていた。マウスを用いたイオンビームによる突然変異体発生率の実験から突然変異誘発させる変異原としてイオンビームを利用できるのではないかという発想に至り、植物育種への応用研究が開始された¹⁴⁾。既に実用化に成功し、重イオンビームで育種された観賞用の花々が市場に出始めている¹¹⁾。これまでの植物育種研究から報告されている重イオンビーム変異の特徴を以下にまとめる¹³⁾。

(1) 純国産の技術である。

日本独自の育種技術であるため、世界をリードしている。

(2) 従来の変異法(ガンマ線など)に比べて突然変異率が高い。

従来変異より効率良く目標とする改良が短期間に達成できる可能性がある。

(3) 突然変異のスペクトルが広い。

今まで得られなかった新しい変異株が得られる可能性がある。

(4) 付随する変異が少ない。

元の特性を損なうことなく、ピンポイントの形質改良が期待できる。

(5) 欠失変異が起こりやすい

数Mbほどの大規模なDNA領域が抜け落ちるなど、大きな構造変化が起こる。

特に従来変異の古典変異よりも突然変異率が高く、従来変異では得られなかった変異株が得られ、かつ、変異原の特性から付随変異が少ないという点は、しょうゆ黄麹菌育種への応用にもかなり有望と思われる。

植物育種の成功例から、微生物分野への利用が徐々に進んできている。酵母 *Saccharomyces cerevisiae*¹⁶⁾、根粒菌 *Mesorhizobium loti*¹⁷⁾ では、薬剤耐性遺伝子などを指標に、変異率や遺伝子変異解析(ホットスポットの有無や欠失変異の有無、遺伝子置換のパターン解析など)が行

われている。育種への応用例としては、黒麹菌 *Aspergillus awamori* でのアミラーゼ高活性株の取得¹⁸⁾、紅麹菌 *Monascus pilosus* でのモノコリン K (コレステロール低下物質) 生産性向上株の取得¹⁹⁾ などが報告されている。

我々はこの変異方法に着目し、黄麹菌の変異に利用すべく、検討を行ってきた。その結果、黄麹菌の変異の場合、イオン種として C イオンの変異効果が高いことを明らかにした²⁰⁾。また、重イオンビームでの変異パターンを解析するため、*wA* 遺伝子の変異により白色化した分生子を持つ変異株を多数取得し、*wA* 遺伝子の変異を調べたところ、紫外線変異では得られなかった欠失変異が全体の約 30 % を占めることを明らかにした。これにより、黄麹菌でも植物と同様に欠失変異が多いことが示唆された。また、豊島らはイオンビームを利用した黄麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 の育種法の開発について報告した²¹⁾。この報告によると、メンブレンに吸着させた凍結乾燥分生子に炭素イオンビーム ($^{12}\text{C}^{5+}$, 220MeV, 107keV/ μm) を 300-700Gy 照射し、セレン酸耐性を指標に変異率を求めた結果、400Gy で最大変異率を示すことが明らかになった。さらにセレン酸耐性に関わる遺伝子について、変異パターンを解析した結果、全耐性株中欠失変異が 27 % であり、400Gy 照射区に至っては、57 % が欠失変異であるという結果であった。黄麹菌の中には麴酸やアスペルギリン酸といったマイコトキシン生産能を有する株があるため、これらの合成系遺伝子が欠失したマイコトキシン非生産を育種するには大変有効な手段と思われる。

6. 重イオンビームの育種以外への応用

重イオンビームは、(1) 欠失変異が取得し易い、(2) 付随変異が少ない、(3) 従来変異では得られない変異株が得られるという特徴から単なる育種手段だけでなく、遺伝子の機能解析に応用できることが考えられる。例えば、重イオンビーム照射により、新しい変異株が取得できたとする。黄麹菌を含め、重イオンビーム照射による変異株に欠失変異が多いという点から、黄麹菌のようにゲノム情報が明らかになったものは、全遺伝子マイクロアレイなどを使って、親株と変異株とで Comparative genome array (CGH) を行うことにより、変異箇所を容易に同定することが可能となる。この中には、機能未知遺伝子などが含まれる可能性も考えられる。遺伝子領域を特定できれば、その遺伝子を相補させることにより遺

伝子機能を明らかにできる。このように新しい変異原を用いることで、目的の表現型から新たな遺伝子の発見につながる可能性が考えられる。また、黄麹菌は同一遺伝子活性を示すホモログ遺伝子を複数もち、マイコトキシンを含めた 2 次代謝産物関連遺伝子など生育に必須ではない遺伝子を多く持つ可能性が高い。重イオンビーム照射により大規模領域が欠失できることから、表現型が得られなくても同様に CGH を行うことで、不要な遺伝子領域を特定できる可能性も考えられる。

古典育種 (変異) は、人間が想像できない箇所に変異を導入し、表現型として姿を表す。近年では逆遺伝学が盛んに行われているが、黄麹菌のように複数のホモログ遺伝子を持つ場合には、一つの遺伝子について遺伝子破壊または遺伝子高発現などを行っても表現型として現れない可能性もある。重イオンビームは、付随変異が少ないが必ずしも一箇所に変異が導入されるわけでない。逆に言うと複数箇所に変異が導入されて始めて表現型として現れてくる可能性もある。その場合にも CGH で複数の変異箇所を同定できることにより、遺伝子の機能解析の一助となると思われる。

7. おわりに

古典育種は即実用化に応用できる点で非常に重要であり、最後の項で述べた重イオンビームのような新しい変異原の登場により、今まで得られなかった変異株が取得できるなど、まだまだ可能性が秘められている。

また、近年、様々な生物でゲノム情報が明らかとなり、新しい遺伝子機能解析のツールも益々発展している。逆遺伝学が主流となっているが、表現型をもつ変異株から遺伝子機能を探る研究も益々重要と思われる。今こそ、古くて新しい古典育種 (古典変異) へと目を向け、古典変異を実用面での育種だけでなく、基礎研究面での遺伝子機能解析に応用していくべきではないだろうか。

参考資料

- 1) 日本醸造学会ホームページ (<http://www.jozo.or.jp/koujikin.htm>).
- 2) 柄倉辰六郎 醤油の科学と技術 (1988).
- 3) 村上英也 麹学 (1986).
- 4) 麹菌ゲノムシンポジウム - 国菌としての麹菌, その故きを温ねて新しきを知る - 要旨集 (2006).
- 5) M. Machida *et. al.* Nature 438(7071): 1157-1161

- (2005).
- 6) 井口信義 農化 第29巻: 第一巻 73-78 (1955).
 - 7) 牛島重臣ら 特許公報 平3-68672 (1991).
 - 8) 渡辺 宏 放射線と産業, No. 83, 31-35 (1999).
 - 9) 田中 淳 放射線と産業, No. 99, 4-10 (2003).
 - 10) 田中 淳 RADIOISOTOPES, No. 52, 186-194 (2003).
 - 11) 岡村正愛 バイオインダストリー 22: No. 3, 55-60 (2005).
 - 12) 農林水産分野における量子ビームの利用シンポジウム要旨集 (2007).
 - 13) イオンビーム育種研究会ホームページ (<http://www.soc.nii.ac.jp/ibbs/>).
 - 14) 独立行政法人 理化学研究所ホームページ (<http://www.riken.go.jp/>).
 - 15) 独立行政法人 日本原子力開発機構 高崎量子応用研究所ホームページ (<http://www.taka.jaea.go.jp/>).
 - 16) Y. Matuo *et. al.* JAERI-Review 2004-025, TIARA Annual Report, 79-81 (2004).
 - 17) 市田裕之ら 日本農芸化学会講演要旨集 2C25P08 (2006).
 - 18) H. Ito *et. al.* JAERI-Review 98-016, TIARA Annual Report, pp. 32-34 (1998).
 - 19) 阿部智子ら 特開 2007-228849 (2007).
 - 20) 伊藤考太郎ら 第2回高崎量子応用研究シンポジウム要旨集, p. 155 (2007).
 - 21) 豊島快幸ら 日本醤油技術センター主催第66回研究発表会講演要旨集, pp. 4-5, (2007).

平成 19 年度共同利用研究・共同利用研究会一覽

共同利用研究

研究課題 '07-01

Aspergillus fumigatus の病原性に関する研究

石橋正己, 大槻 崇 (千葉大学大学院薬学研究院)

関根利一 (城西国際大学薬学部)

渡辺 哲 (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)

研究課題 '07-02

真菌細菌の菌種間相互作用における超微細構造

池田玲子 (明治薬科大学)

山口正視, 川本 進 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-03

人獣共通真菌症の症例検討: ふれあい動物園, 学校飼育動物などの真菌保有率の調査

猪股智夫 (麻布大学獣医学部)

佐野文子, 亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-04

ヒト遺体より分離された真菌類の分類・同定

徳留省悟, 石井 清 (獨協医科大学)

矢口貴志 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-05

病原酵母のプロテオーム解析

奥田研爾, 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)

研究課題 '07-06

Trichophyton tonsurans 感染状態の形態学的, 細胞生物学的検討

比留間政太郎 (順天堂大学練馬病院)

川本 進, 大楠美佐子 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-07

共生・寄生性二形性真菌の形態と生態に関する研究

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)

研究課題 '07-08

真菌が生産する抗アスペルギルス物質の研究

深井俊夫 (東邦大学薬学部)

宇野 潤, 三上 襄 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-09

環境内真菌の吸入と非感染性ヒト疾患との関連に関する研究

渋谷和俊 (東邦大学医学部)

亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-10

分子生物学的手法を用いた魚類病原真菌の同定に関する研究

畑井喜司雄, 和田新平 (日本獣医生命科学大学)

佐野文子, 亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-11

家畜・家禽等の真菌症の病原学および病理学的診断

木村久美子, 播谷 亮, 芝原友幸 (動物衛生研究所)

佐野文子, 三上 襄, 亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-12

Aspergillus 及び関連菌の分子系統解析と形態学的研究との比較研究

堀江義一 (千葉県立中央博物館)

矢口貴志 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-13

病原酵母の株識別法の検討

神戸俊夫 (名古屋大学医学部附属神経疾患・腫瘍分子医学研究センター)

田中玲子, 知花博治 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-14

Candida albicans 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子破壊株のアレイ解析

村山琮明 (北里大学北里生命科学研究所)

横山耕治, 知花博治 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-15

病原真菌 *Candida tropicalis* の二形性変換のゲノム・ネットワーク

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)

研究課題 '07-16

Aspergillus section Nigri の分子分類などによる類別とオクラトキシン産生

高橋治男 (千葉県衛生研究所)

一戸正勝 (東京家政大学)

陰地義樹 (奈良県保健環境研究センター)

大橋正孝 (奈良県生活環境部)

田端節子 (東京都健康安全研究センター)

久米田裕子 (大阪府立公衆衛生研究所)

横山耕治 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-17

Cryptococcus neoformans 薬剤耐性のスクリーニングと分子機構解析

野村文夫 (千葉大学大学院医学研究院)

川本 進, 大楠美佐子 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-18

海洋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)

三上 襄 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-19

Nocardia 属細菌が持つイソプレノイド生合成遺伝子資源の探索

大利 徹 (富山県立大学工学部)

三上 襄 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-20

高度病原真菌のトポイソメラーゼ遺伝子 (*top2*) による同定法の研究

安藤昭一, 篠山浩文 (千葉大学大学院自然科学研究科)

雨宮良幹, 齋藤明広 (千葉大学園芸学部)

三上 襄, 矢澤勝清 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-21

カンジダ酵母の遺伝子の組換え技術に基づく機能解析

長 環, 豊田美香 (福岡歯科大学)

中山浩伸, 青山俊弘 (鈴鹿工業高等専門学校)

水野貴之 (徳島文理大学)

宮川洋三 (山梨大学)

小笠原綾子 (東北薬科大学)

宮崎泰可 (長崎大学医学部附属病院)

知花博治, 三上 襄 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-22

Trichophyton tonsurans の分子疫学的研究

望月 隆, 河崎昌子, 藤田 純 (金沢医科大学)

亀井克彦, 高橋裕子, 佐野文子 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-23

真菌から得られる新規生理活性化合物の探索

河合賢一, 細江智夫, 板橋武史 (星薬科大学)

野沢幸平 (奥羽大学薬学部)

矢口貴志 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-24

DNA マイクロアレイ技術を用いた病原真菌検出技術の確立

岡 千寿 (千葉県産業支援技術研究所)

五ノ井 透 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-25

真菌症原因菌に対するカテキン誘導体の影響評価
玄 丞依 (京都大学再生医科学研究所)
高鳥浩介 (国立医薬品食品衛生研究所)
田口英昭, 亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-26

カイコ幼虫の感染モデルを用いた *Cryptococcus neoformans*
の病原性遺伝子の同定
関水 and 久, 伊藤貴浩 (東京大学大学院薬学系研究科)
川本 進, 清水公德 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-27

病原真菌 *Cryptococcus neoformans* サイクリン依存性キナーゼ
の構造機能相関
田村 裕 (千葉大学大学院医学研究院)
川本 進 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-28

Candida albicans 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子破壊株の形態
学的解析
村山琮明 (北里大学北里生命科学研究所)
山口正視, 川本 進 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-29

Candida albicans バイオフィーム特異遺伝子破壊株の微細
構造
杉田 隆 (明治薬科大学)
山口正視, 川本 進 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-30

亜硝酸塩を代謝する真菌の超微細構造
高谷直樹 (筑波大学大学院生命環境科学研究科)
山口正視, 川本 進 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '07-31

Candida glabrata の増殖形態変化調節機構の解析
渡部俊彦, 松本達二, 三上 健, 小笠原綾子 (東北薬科大学)
山口正視, 知花博治, 川本 進 (千葉大学真菌医学研究セ
ンター)

研究課題 '07-32

臨床材料より分離した放線菌の二次代謝産物に関する研
究
原田健一 (名城大学薬学部)
石川 勉 (千葉大学大学院薬学研究院)
三上 襄, 矢澤勝清 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究会

研究会 1

名称: 真菌分子細胞研究会

課題: 真菌研究のための情報交換

阿部敬悦 (東北大学未来科学技術共同研究センター)

渡部俊彦 (東北薬科大学)

宮川洋三 (山梨大学工学部)

中山浩伸, 青山俊弘 (鈴鹿工業高等専門学校)

水野貴之 (徳島文理大学工学部)

岩口伸一 (奈良女子大学)

東江昭夫 (東京都臨床総合医学研究所)

新見昌一, 田辺公一 (国立感染症研究所)

村山琮明 (北里大学北里生命科学研究所)

山田 剛 (帝京大学医真菌研究センター)

長 環 (福岡歯科大学)

川本 進, 山口正視, 清水公德, 五ノ井 透, 矢口貴志,

三上 襄, 知花博治, 小暮高久, 豊留孝仁 (千葉大学真菌

医学研究センター)

研究会 2

名称: 小動物真菌症症例検討会-2

課題: 小動物の真菌症の症例検討を通じて人獣共通真菌
症を解明する

池田忠生, 荒島康友 (日本大学医学部)

佐藤 克 (佐藤獣医科病院)

羽原弦史 (東京獣医科医院)

杉山和寿 (杉山獣医科)

兼島 孝 (みずほ台動物病院)

村田佳輝 (むらた動物病院)

高橋英雄 (エイランドおゆみの動物病院)

佐野文子, 亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究会 3

名称: アスペルギルス研究会

課題: アスペルギルス症をはじめとした同菌に由来する
疾患に関する研究の討議を行う

安藤常浩 (日赤医療センター)

泉川公一 (長崎大学医学部)

小川賢二 (国立病院機構東名古屋病院)

神田善伸 (自治医科大学附属大宮医療センター)

木村雅友 (近畿大学医学部)

倉島篤行, 蛇沢 晶 (国立病院機構東京病院)

渋谷和俊 (東邦大学医学部)

宮崎義継 (国立感染症研究所)

奥村欣由 (名城大学薬学部)

渡辺 哲 (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)

平成 18 年度 共同利用研究報告

研究課題 '06-01

Aspergillus fumigatus の病原性に関する研究

渡 辺 哲 (千葉大学附属病院感染症管理治療部)

亀 井 克 彦 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌感染分野)

関 根 利 一 (城西国際大学薬学部)

研究成果

本菌マウス肺感染モデルを用いて感染初期の組織反応について検討した。マウスの免疫を軽度抑制し、本菌を経気道的に 2 日間連続で接種し、接種終了直後、24, 48 時間後の肺病理組織を観察した。接種終了後 24 時間までは肺組織内において菌は大部分胞子のままであり、炎症細胞は好中球とマクロファージが主体であった。48 時間後には菌糸形態へと成長し、菌体周囲の炎症細胞はマクロファージ主体となり、好中球が目立たなくなっていた。貪食された胞子も菌糸を伸長させており、細胞内において殺菌が十分に行われていないことを窺わせた。また、アポトーシスの惹起を思わせる像、核の破砕物と思われる顆粒状物質を多数貪食しているマクロファージ

も観察された。今回得られた結果は我々が過去本菌培養上清を用いて行った知見と併せ、本菌菌糸から産生される何らかの好中球機能抑制物質が生体内での生存に寄与している可能性を示唆していると思われる。

研究発表

学会発表

- 1) 渡辺 哲, 佐藤綾香, 豊留孝仁, 落合恵理, 永吉 優, 橋本佳江, 亀井克彦: マウス肺における *Aspergillus fumigatus* 感染初期の免疫反応, 第 50 回日本医真菌学会総会, 東京, 2006.
- 2) 渡辺 哲: 病原真菌の virulence factors の探索, 四大学連携感染症ワークショップ in 千葉, 千葉, 2006.

真菌細菌の菌種間相互作用における超微細構造

池田 玲子 (明治薬科大学微生物学教室)

山口 正 視 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

川 本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

研究成果

Cryptococcus neoformans の増殖と死滅および感染成立における菌種間相互作用に着目し, *Staphylococcus aureus* 細胞の *C. neoformans* への付着およびそれにより誘導される *C. neoformans* の死滅について報告してきた. そこで, この現象の開始となる両細胞の付着に関与する各細胞表層物質の解析を行った. その結果, *C. neoformans* 側では莢膜多糖類の主成分グルクロノキシロマンナン (GXM) の主鎖である α -(1→3)-mannan の 3 残基 (M3) 以上が重要であることが示された. 一方, *S. aureus* 側では, 表層タンパクを抽出し, GXM と相互作用する画分を精製した結果, その分子は解糖系酵素のひとつであるトリオースリン酸イソメラーゼ (TPI) と同定された. 従って, TPI は M3 を認識するレクチンとしての機能があると考えられた. さらに, *S. aureus* 細胞への GXM の結合を免疫電子顕微鏡法により検討した. すなわち, *S. aureus* 細胞と GXM, 抗 GXM ウサギ抗体, 金コロイド標識プロテイン A を順次反応させ走査電子顕微鏡で観察した. その結果, *S. aureus* 細胞表層に GXM との反応陽性を示す金粒子が観察された. 免疫電子顕微鏡法による GXM の結合とその局在については, さらに反応条件を検討し解析を継続する.

研究発表

原著論文

- 1) Ikeda R, Saito F, Matsuo M, Kurokawa K, Sekimizu K, Yamaguchi M, Kawamoto S: Contribution of the mannan backbone of cryptococcal glucuronoxylomannan and a glycolytic enzyme of *Staphylococcus aureus* to contact-mediated killing of *Cryptococcus neoformans*. J

Bacteriol 189: 4815-4826, 2007.

学会発表

- 1) Ikeda R, Saito F, Yamaguchi M, Kawamoto S: Fungus-bacteria interactions: killing of *Cryptococcus neoformans* by the adherence of *Staphylococcus aureus*. The 16th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Paris, 2006.
- 2) 池田玲子, 澤村果菜子, 山口正視, 川本 進: *Cryptococcus neoformans* と *Staphylococcus* の相互作用: 表面プラズモン共鳴法による *Cryptococcus* 菌体認識部位の検討. 第 50 回日本医真菌学会総会, 東京, 2006.
- 3) 池田玲子, 川本 進: *Staphylococcus* の病原真菌への付着と死滅誘導-ブドウ球菌表層タンパクとその認識部位の解析. 第 80 回日本細菌学会総会, 大阪, 2007.
- 4) Ikeda R, Saito F, Matsuo M, Kurokawa K, Sekimizu K, Yamaguchi M, Kawamoto S: The contribution of the mannan backbone of cryptococcal glucuronoxylomannan and a glycolytic enzyme of *Staphylococcus aureus* to contact-mediated killing of *Cryptococcus neoformans*. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2007.
- 5) 池田玲子, 斉藤史人, 松尾美記, 黒川健児, 関水和久, 山口正視, 川本 進: 細菌 *Staphylococcus* 付着による病原真菌 *Cryptococcus* の死滅誘導-真菌・細菌相互作用の新規分子機構 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 2007.

好熱性糸状菌 *Thermoascus aurantiacus* による酸化酵素類の 生産と細胞内微細構造の解析

藤 井 貴 明 (千葉大学園芸学部)

山 口 正 視 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

大 楠 美佐子 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

川 本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

研究成果

堆肥等の植物組織の分解に関わるとされている好熱性糸状菌 *Thermoascus aurantiacus* は、液体培養において高度耐熱性・耐アルカリ性のカタラーゼ (CAT) を細胞内外に多量に生産・分泌する。なぜ、本菌がCATを多量に生産するかに関して、我々は、すでに、本菌におけるCATの基質 H_2O_2 の生成にはアルコールオキシダーゼ (AOD) が関わることを見出している。さらに、本菌を炭素源にペクチンを用いた培地で培養するとAODが通常(デンプン培地)の10~20倍も生産されることを明らかにしている。また、このとき細胞内にはペルオキシソームの形成が顕著となることも見出している。ペクチンは、ガラクトロン酸メチルエステルのポリマーであり、ペクチンが分解するとメタノールを生じる。本菌は、メタノールを唯一の炭素源とした培地では生育できないが、他の炭素源の存在下においては、メタノールをよく利用し、酵素の生産量が増加し、また、ペルオキシソームを形成することが明らかにされている。

今年度は、CATの生産量の向上を変異菌株の取得を中心に図るとともに、酵素の生産や細胞内微細構造の形成と密接に関連する炭素源の一つペクチンに関して、本菌のペクチン分解酵素系について検討を加えた。

(1) 本菌のCATは、耐熱性、耐アルカリ性に優れているが Cu^{2+} への耐性が低い。また、これまでに得られているCATの実用生産の供試株は、変異処理によって酵素の生産性が向上しているものの、胞子の形成率が野生株と比較し、著しく低下している。そこで、これらの点に焦点をあてて、UV照射による変異処理を試みた。その結果、CATの阻害剤3-アミノトリアゾール耐性株の

中に、胞子形成能を損なわないで、酵素の生産性が約2倍に向上した菌株を複数取得することに成功した。また、 Cu^{2+} 耐性株も取得できたが、それが生産する酵素には、 Cu^{2+} 耐性は認められなかった。

(2) 本菌が生産するペクチン分解酵素系に関して以下の検討を加えた。ペクチンからのメタノールの生成に関して、ペクチンエステラーゼの存在が示唆されたが、その活性を培養液中に検出することはできなかった。ペクチンデポリメラーゼ類について検討した結果、ポリガラクトナーゼ (PG)、ポリメチルガラクトナーゼ、ペクチンリアーゼの活性が検出された。そのうち、最も生産性が高かったPGについて検討を進めた。固体培養において、酵素の生産性は向上し、生産された酵素の熱安定性、pH安定性が液体培養の酵素と比較して高いことが示された。そこで、熱安定性、pH安定性に関して、液体培養で生産された酵素との違いを明らかにする目的で、両培養において生産されるPGの精製を試みた。しかしながら、固体培養からの酵素の精製は、粗酵素液の粘性が高いため、カラムクロマトグラフィーの結果に再現性が得られず中断した。今回は、まずは、液体培養において生産されたPGの精製を試みた。培養液をフラッシュエバポレーター濃縮、硫酸分画、DEAE-Cellulose DE 52 カラム、Sephadex G-100 カラム×2の工程で処理したが、この時点で、電気泳動的に単一なまでの標品を得るには至らなかった。得られた部分精製標品は、比活性が $3.58 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ であり、 50°C 、60分の熱処理に対し安定性を示し、至適反応pHは6.0であった。また、その活性は、 Fe^{2+} に約100%、 Ag^{2+} には40%の阻害を受けることがわかった。

研究課題 '06-04

病原放線菌が生産する二次代謝産物や酵素と その病原性に関連する研究

原 田 健 一 (名城大学薬学部)

三 上 襄 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

矢 沢 勝 清 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

研究成果

病原性放線菌 *Nocardia* sp. に着目し, 新たなスクリーニング系を立ち上げて, 活性物質の探索を行っているが新たに, 抗酸菌に活性を示す臨床分離の *Nocardia* 属放線菌の探索を行った. 被検菌として, *Mycobacterium smegmatis*, *Nocardia farcinica*, *Nocardia nova*, *Nocardia brasiliensis*, *Gordonia bronchialis*, *Rhodococcus equii* 及び *Corynebacterium xerosis* を用いて, センターの臨床分離株について活性の有無を検討した.

その結果, IFM 10745, IFM 10757, IFM 10785, IFM 10473 及び他の 5 株の放線菌に活性が認められた. これらの中で, 特に抗酸菌である *M. smegmatis* に活性を示す IFM 10745, IFM 10785 及び IFM 0757 については, 現

在単離と精製を進めている. また *M. smegmatis* と同じ抗酸菌である *R. equi* 及び *C. xerosis* へのみ活性を示し, *M. smegmatis* には活性を示さない IFM 10473 については, 新規化合物の可能性が高いことから同時に精製を進めている. 今年度は, 活性が確認された IFM 0757 の産生する化合物について, 抽出と精製, さらに構造解析が進み, 本化合物はペプチド系の新規活性物質であることが明らかになったので論文投稿の準備を進めている. 本化合物は, *C. xerosis* に対する抗菌活性を指標として単離した活性化合物であり, その後の抗菌活性の測定の結果, rifampicin 耐性結核菌に対しても極めて強い活性を示すことが明らかになった (共同研究者: 向井 啓).

研究課題 '06-05

病原性放線菌由来の天然生理活性物質の探索研究

新 家 一 男 (東京大学分子細胞生物学研究所)

三 上 襄 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

研究成果

放線菌は, 多くの二次代謝産物を生産しており, これまで人類が考えつかなかった構造を有する物質が単離され, 医薬品や農薬など多くの分野で応用されてきた. しかしながら, 放線菌の中でも病原性を示す菌株については, ほとんどスクリーニング研究は行われていなかった. このような中, 病原性放線菌が非病原性放線菌と異なる多くの二次代謝産物を生産していることが見出さ

れ, そのリソースとしての可能性が期待されている. 本研究は, 癌, 糖尿病などの生活習慣病治療薬のリード化合物を見出すことを目的に, 病原性放線菌より有用な生理活性物質を単離することを目的とする.

スクリーニング系は, 主に以下に示す 4 つのものを用いて行った.

1) GRP78 転写制御物質の探索

GRP78 はもともと分子シャペロンであるが, 最近の

研究により細胞の生存因子としても作用していることが判明している。特に固形癌では、中心部の低グルコース環境及び抗癌剤への耐性を獲得するために重要な役割を担っている。また、GRP78はアルツハイマー病など様々な中枢疾患の原因となる小胞体ストレスを抑制する働きを有する。したがって、GRP78の発現を抑制する物質は選択的な固形癌治療薬となり、GRP78の発現を促進する物質はアルツハイマー病をはじめとする中枢疾患治療薬となる可能性が期待される。

スクリーニングは、GRP78プロモーターである ERSE の下流に、ルシフェラーゼを繋いだプラスミドで形質転換した細胞を用いて、ルシフェラーゼの産生を指標に行った。本スクリーニング系を用いて、GRP78制御物質のスクリーニングを行った結果、本年度分譲サンプル計100に関して活性サンプルは得られなかった。

2) ムスカリンレセプター制御物質の探索

ムスカリンレセプターは、GPCR (G-protein coupled receptor) の一つであり、このリガンドは向精神薬として有望な薬剤となりうる。GPCRファミリーは、レセプターとリガンドが結合すると、 β -アレスチンと呼ばれる因子と結合し細胞内へ取り込まれ、細胞内顆粒を形成する。この現象を利用し、 β -アレスチン-GFPの細胞内顆粒形成を指標に、ムスカリンレセプターアゴニストの探索を行った。本スクリーニング系を用いて、分譲サンプル計200サンプルに関して活性サンプルは得られなかった。

3) p21-PCNA 相互作用阻害物質の探索

p21は、癌抑制因子のひとつであり、サイクリンと結合し細胞周期を停止させる。またPCNA (proliferating cell nuclear antigen) は、ポリメラーゼ δ 及び他の多数の因子とでDNA複製複合体を形成し、DNA複製に重要な働きをしており、また放射線照射により誘導された p21,

サイクリン等と結合して、DNA複製を停止させ、修復の効率を高めることに寄与しているものと考えられている。したがって、これらのタンパク質相互作用を制御する物質は、細胞の増殖を制御する新しいタイプの抗腫瘍剤となる可能性が期待される。

アッセイ系として、蛍光タンパク質を用いた蛍光補完法を応用した系を構築した。蛍光タンパク質はGFPを改良した mKG と呼ばれるものを使用し、目的となる p21 及び PCNA にスプリットした mKG を繋いだコンストラクトを作製した。これらスプリットした蛍光タンパク質は、p21 と PCNA が結合することにより空間的に互いに近くに存在するようになり、一つの蛍光タンパク質のように振る舞い蛍光を発する。このような原理により、二つのタンパク質が結合したか否かを判定する。本系を用いて100サンプルについてスクリーニングを行った結果、ヒットサンプルは得られなかった。

4) TCF7-L1- β -catenin 相互作用阻害物質の探索

TCF7-L1は転写因子の一つとして働いており、癌、アルツハイマー病と言った、様々な重要な疾患に関与する β -catenin と結合し、制御を行っている。また、最近ではこの遺伝子が糖尿病の責任遺伝子の重要な一つであるとの報告も多く発表されてきている。そこで、これらの二つのタンパク質の相互作用を制御することにより、癌、アルツハイマー病、糖尿病と言った多くの疾患を治療できると考え、タンパク質相互作用スクリーニングを行った。方法は、p21-PCNAの系と同様蛍光補完法を用い、相互作用に必須な部分タンパク質に、スプリット蛍光タンパク質を結合させたコンストラクトを調製しスクリーニングを行った。本系を用いて計100サンプルについてスクリーニングを行った結果、ヒットサンプルは得られなかった。

人獣共通真菌症の迅速診断法の確立と病原因子の解析

加 納 壘 (日本大学生物資源学部)

長谷川 篤 彦 (日本大学生物資源学部)

佐 野 文 子 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌感染分野)

亀 井 克 彦 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌感染分野)

人獣共通真菌症は最近のペットブームによって増加しており、早急の対応が必要である。本症を防疫するにあたり、従来の診断法では診断に時間がかかることから、分子生物学的手法による迅速診断法の確立が必要である。今回、人獣共通真菌症の迅速診断法に用いる遺伝子の検討として、近年、海外からハリネズミとともに持ち込まれ、その後国内で繁殖しているハリネズミから分離された *Arthroderma benhamiae* の chitin synthase 1 (*CHS1*) 遺伝子について解析した。その結果、*A. benhamiae* ヒト由来株と動物由来株での *CHS1* の相同性は 90%であったが、ハリネズミ由来株間では 99%以上であった。さらに作成した系統樹から、ハリネズミ由来株は Americano-European race や African race とは大きく異なり、別のクラスターを形成することが明らかとなった。また真菌の

同定の指標となるリボソーム RNA 遺伝子の internal transcribed spacer (ITS) 1-5.8S-ITS 2 (ITS 領域) でもそれぞれ別のクラスターに属することが確かめられた。*A. benhamiae* はその交配の適合性によって Americano-European race と African race に分けられるが、ハリネズミ由来株は African race と交配することは知られている。しかしその F1 の交配型 (性) に偏りが有り、African race と完全に適合した交配が行われるとは言えないことが知られている。今回の結果から、

A. benhamiae はその交配行動と関連した遺伝子型が *CHS1* および ITS 領域に認められることが判明した。よって過去に報告された交配行動と今回の遺伝子解析から、新たな遺伝子型として提唱できると考えた。

人獣共通真菌症の症例検討：ふれあい動物園， 学校飼育動物などの真菌保有率調査

猪 股 智 夫 (麻布大学獣医学部)

佐 野 文 子 (千葉大学真菌医学研究センター，真菌感染分野)

亀 井 克 彦 (千葉大学真菌医学研究センター，真菌感染分野)

研究成果

沖縄海洋博記念公園美ら海水族館のイルカの呼気から分離される酵母様真菌叢について調査した。日和見真菌症原因菌として *non-albicans Candida* spp. (以後 NAC と略す) は薬剤耐性菌が多いことからヒトおよび小動物臨床領域で問題となっている。一方、水族館を含む動物園のふれあい動物コーナーにおけるこれら菌種の実態はほとんど調査されていない。我々は美ら海水族館で飼育されているイルカ 20 頭の呼気と飼育プール水の病原性酵母叢を 2006 年 8 月および 2007 年 2 月に調査した。さらに飼育関係者 24 名の口腔内および観客席空中浮遊菌の病原性酵母叢の調査を 2007 年 2 月に行った。保菌イルカは 14 頭 (70%)，分離株は *C. albicans*，*C. tropicalis*，*C. glabrata* で，1 頭を除き 2 回の調査とも保有菌種は同一で，大多数の株はアゾール薬に耐性傾向を示した。また，4 個体は 1 呼気あたり数十から数百の病原性酵母を噴出していた。飼育プール水の検査では 8 箇所中 5 ヶ所から *C. albicans*，*C. tropicalis*，*Candida* spp. など，飼育関係者の口腔からは 24 名中 5 名から *C. albicans*，*C. dubliniensis*，*C. parapsilosis*，*Cryptococcus albidus* が分離され，一部にアゾール薬に耐性傾向を示す株も含まれていた。観客席空中からは *Rhodotorula* spp.，*Candida* spp. など数株の酵母が分離された。しかし，病原性酵母を噴出しているイルカの呼気が観客に直接かかるような状況はなく，実際に観客席

空中からイルカとの共通菌種が分離されなかったため，イルカショーで発生するエアロゾルによる観客への影響は少ないと思われる。一方，イルカ，飼育環境，飼育関係者との間では *C. albicans* が共通して分離されていたので，現在，遺伝子パターンの解析を進めている。また，イルカの真菌保有の有無は免疫状態の指標となりうると考え，今後は体温，血液検査結果などとあわせてこの観点からも検討したいと考えている。

研究発表

原著論文

- 1) Murata Y, Sano A, Ueda Y, Inomata T, Takayama A, Poonwan N, Nanthawan M, Mikami Y, Miyaji M, Nishimura K, Kamei K: Molecular epidemiology of canine histoplasmosis in Japan. *Med Mycol* 45(3): 233-247, 2007.

学会発表

- 1) 高橋英雄，植田啓一，宮原弘和，渡辺紗綾，内田詮三，鎗田響子，村田佳輝，板野栄子，高山明子，西田和紀，猪股智夫，矢口貴志，佐野文子，亀井克彦：沖縄美ら海水族館で飼育されているイルカの呼気，飼育スタッフ口腔内および飼育環境の病原性酵母叢。第 51 回日本医真菌学会総会，高山，真菌誌 48 (増刊 1 号): 65, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.

ヒト遺体より分離された真菌の分類・同定

徳 留 省 悟 (獨協医科大学医学部法医学教室)

石 井 清 (獨協医科大学医学部生物学教室)

一 杉 正 仁 (獨協医科大学医学部法医学教室)

矢 口 貴 志 (千葉大学真菌医学研究センター, 系統・化学分野)

研究成果

ヒト遺体に生育する真菌はしばしば発見される現象であるが、法医学の観点から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た。

白骨化したもしくは乾燥が進んだサンプルは、エタノール処理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。その結果、前者では、*Aspergillus*, *Eurotium*, *Scopulariopsis* 属が、後者では、*Mucor*, *Fusarium* 属が優先的に分離された。サンプルの部位によって、分離される真菌に大きな差は見られなかったため、同一遺体からのサンプルは、

同じ速度で分解が進んでいると考えられる。

今後は、検体数を増やし遺体の分解段階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。

研究発表

原著論文

- 1) Ishii K, Hitosugi M, Kido M, Yaguchi T, Nishinura K, Hosoya T, Tokudome S: Analysis of fungi detected in human cadavers. *Legal Medicine* 8: 188-190, 2006.
- 2) Hitosugi M, Ishii K, Yaguchi T, Chigusa Y, Kurosu A, Kido M, Nagai T, Tokudome S: Fungi can be a useful forensic tool. *Legal Medicine* 8: 240-242, 2006.

日本列島のオオミズナギドリ繁殖地における微小真菌相の解明

岡 奈理子（(財)山階鳥類研究所研究部）

矢 口 貴 志（千葉大学真菌医学研究センター，系統・化学分野）

研究成果

外洋性海鳥オオミズナギドリは、採餌域が広く、その主な繁殖地は御蔵島である。これまで海鳥の繁殖地の真菌相を解明した研究例はほとんどない。そこで、御蔵島において、オオミズナギドリの巣穴土壌、巣材、羽毛、糞などを採集し、それらから真菌の分離を試みた。

採集した各試料から接合菌類 4 属、子囊菌類 1 属、不完全菌類 13 属の計 18 属の菌類が分離同定された。このうち巣穴内の土壌、羽毛および糞の各試料から、40℃付近で良好な生育を示す菌が多数分離された。また、ケラ

チン分解菌である *Chrysosporium* 属菌が巣穴内の土壌と羽毛から複数分離された。しかし、対照区の土壌からは上述の菌の分離頻度は低かった。以上の結果は、巣穴が高温多湿な状態に保たれ、ケラチンを含む物質が豊富に供給されているオオミズナギドリのコロニーの菌類相を特徴づける結果と考えられる。また、巣穴内の土壌から分離された高温菌に *Talaromyces eburneus* が含まれていた。本菌種は、国内では食品からの分離例があるが、環境からは初めてである。以上を含めこれまでの研究成果をまとめて論文投稿中である。

研究課題 '06-10

真菌症原因菌に対する抗酸化剤の影響評価

高 鳥 浩 介（国立医薬品食品衛生研究所）

田 口 英 昭（千葉大学真菌医学研究センター，生態分野）

福 島 和 貴（千葉大学真菌医学研究センター，真菌資源開発分野）

緑茶から抽出された EGCg (Epigallo-catechin-3-O-gallate) の *Aspergillus fumigatus* 7 株および *Trichophyton mentagrophytes* 7 株に対する抗真菌効果を評価した。その結果、*A. fumigatus* 全株に対して抗真菌効果が認められなかったが、*T. mentagrophytes* では *Candida* 属で得られた結果と同様に上市されている抗真菌剤 6 種との比較では FLCZ と同程度の効果が明らかになった。今後、更に糸状菌の菌種を増やして検討するとともに EGCg の脂肪酸誘導体が合成されているので酵母および糸状菌に対する効果についても検討する予定である。

研究成果

学会発表

- 1) 朴 奉柱, 朴 鍾喆, 田口英昭, 松澤哲宏, 玄 丞然, 松村和明, 亀井克彦, 高鳥浩介: Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCg) の皮膚糸状菌に対する抗真菌活性に関する研究. 日本防菌防黴学会第 34 回年次大会, 要旨集 p.57, 大阪, 8月26~27日, 2007.

病原酵母のプロテオーム解析

奥 田 研 爾 (横浜市立大学大学院医学研究科分子生体防御学)

園 田 智 子 (横浜市立大学大学院医学研究科分子生体防御学)

川 本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

大 楠 美佐子 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

研究概要

モデル酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のゲノム解読は、1996年、真核生物としては、他の生物種に先駆けて最も早く完了しており、近年、病原酵母 *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* などについても、それらのゲノム解読が完了している。我々は、このような状況を踏まえ、各病原酵母のプロテオーム解析を行って、分子レベルでの分類系統学的な検討、病原因子の作用機構の解析、また、「ゲノム・プロテオーム創薬」を目指して、抗真菌剤の開発及び作用機作の解析等に本手法を活用するため、まず、手始めに *C. neoformans* を用いて各種培養条件での比較プロテオーム解析などの検討をはじめている。

C. neoformans の細胞壁、莢膜は極めて厚くて強固なことが知られている。本菌の各培養条件によっては、細胞全体を破碎すること自体も、大変難しく、通常の破碎条件では、細胞内タンパク質の回収率も極めて低いことが判明した。そこで、種々の破碎法、破碎条件について検討し、機械的な破碎法条件など本実験計画に最適なプロトコールを作成した。一方、*C. neoformans* 細胞破碎抽出液を用いて、二次元電気泳動、タンパク質スポットの解析、アミノ酸配列解析、質量分析、データベースでの検索、同定などの解析を進めており、切り出したタンパク質スポットを in-gel digestion 後、LC/MS/MS 法などに

よりデータベースと照合しつつ、それらのタンパク質を同定することを行っている。更に、比較プロテオーム解析を行うべく、DIGE 解析法についても検討している。

研究発表

学会発表

- 1) Kawamoto S, Ohkusu M, Virtudazo E, Yamanaka Y, Watanabe K, Sonoda T, Hirano H, Okuda K, Takeo K: *Cryptococcus neoformans* proteome and cell regulation. 2nd Trends in Medical Mycology. Berlin (Germany), October 23-26, 2005.
- 2) Kawamoto S, Ohkusu M, Yamanaka Y, Watanabe K, Sonoda T, Hirano H, Okuda K, Takeo K: Molecular analysis of *Cryptococcus neoformans* cell regulation. 第78回日本生化学会大会発表, 神戸, 10月19~22日, 2005.
- 3) Kawamoto S, Virtudazo E, Ohkusu M, Sonoda T, Miyagi Y, Okuda K, Takeo K: Structural and functional analysis of cell control genes in *Cryptococcus neoformans*. Experimental Biology 2008 (2008 Annual Meeting of American Society for Biochemistry and Molecular Biology), San Diego (USA), 2008.

元素状硫黄を代謝する真菌の超微細構造

高 谷 直 樹 (筑波大学生命環境科学研究科)

山 口 正 視 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

川 本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

研究成果

真菌が嫌気的環境に適応し、そのエネルギー代謝を切り替える現象は、近年、申請者らの研究グループによって解明が進められている。多くの内在性真菌は体内の低酸素環境下で生育することから、この現象の解明は、真菌治療や病徴の発現機構の解明に役立つ可能性が考えられる。本研究では、真菌の中でもっとも嫌気代謝の研究が進められている *Fusarium oxysporum* をモデルとしてその代謝と細胞形態の相関関係を解析している。

本共同利用研究では、昨年度に引き続き、特に、本菌の硫黄還元系の生化学的解析および菌糸内部の微細構造（特に、ミトコンドリアの形態）を検討した。その結果、

本菌の硫黄還元酵素を単離することに成功し、それがグルタチオン還元酵素であることを見いだした。一方、既に、*F. oxysporum* が嫌気条件下では元素状硫黄を硫化水素に変換し発酵する際に、ミトコンドリアの膜構造をはじめとする細胞内の超微細構造は通常の培養と変わらないことを見いだしていた。本年度は、このときのミトコンドリアの細胞内占有率を定量した。その結果、硫黄還元反応に際して、ミトコンドリアの数と面積も通常の培養の際のそれらと変わらないことが明らかとなった。これは、パン酵母のミトコンドリアが嫌気条件下では萎縮するのと対照的である。

Trichophyton tonsurans 感染状態の形態学的, 細胞生物学的検討

比留間 政太郎 (順天堂大学練馬病院)

川 本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

大 楠 美佐子 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

研究成果

Trichophyton tonsurans という白癬菌が, その数年前より外国から日本に持ち込まれた結果, 2000年頃より, 柔道を始めとする格闘技選手の間で体部白癬, 頭部白癬になる人が急増している. この菌は感染力が強く, 家族・友人に伝染し易く, 一度感染すると治りにくいので 심각한注意が必要である. 特に頭に全く症状がないのに, 多量の菌が寄生している保菌者 (無症候性キャリアー) が多く, 危険な感染源となっている.

しかるに, 本菌の宿主への感染状態の基礎的な知見はいまだ乏しく, 今回, 頭部などへの感染時, 本菌がどのような細胞状態で存在しているのかを, 形態学的, 細胞

生物学的に検討することを目的として研究を行った.

患者頭部に感染している *T. tonsurans* 細胞を採取するために数人の患者に hairbrush を使用してもらった. まず, このブラシより菌体を回収する方法について検討を行った. その結果, 界面活性剤を添加したバッファーを入れたビーカーにブラシを直接入れ, 数分間攪拌後, 遠心分離する方法が最も適していた. また, 集菌した菌をファンギフローラで処理した後, 蛍光顕微鏡で観察したところ, 細胞壁の厚い菌体が観察されたことから, 細胞周期の解析には細胞壁の酵素処理が必要であることが示唆され, 処理に適した条件を検討中である.

共生・寄生性二形性真菌の形態と生態に関する研究

畑 邦彦 (鹿児島大学農学部)

川本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

大楠 美佐子 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

研究成果

真菌類における菌糸・酵母の二形性は様々な分類群・生態群中に存在しており, 真菌類の形態形成を考察する上で重要な問題の一つとなっている。とりわけ医真菌学では良く知られており, 環境中では菌糸, 体内では酵母として生育する病原菌はヒトの病原菌の中でも重要な位置を占めている。その一方, 森林においても二形性真菌は普遍的に存在しており, 特に植物と昆虫の寄生菌や共生菌ではしばしば見られるが, 森林環境における二形性の意義は十分明らかになっていない。

報告者らは, 当研究センターにおいて以前行っていた共同利用研究において, いわゆるアンブロシア菌と黒色真菌を中心に培養形態の観察を行ったが, それらの結果から, 寒天培地・液体培地という基質の物理的な特性がこれら二形性真菌の形態形成に重要な意味を持つことを示した。今回の共同利用研究においては, 前回の成果を更に深めるべく, 植物や昆虫に寄生または共生する森林性の真菌類を中心に事例を増やすことを試みている。

2006年度は, まずこれまでのデータを整理し, 学会へ

の成果発表を行った(1,2)。また, 昆虫病原菌 *Beauveria bassiana* および *Nomuraea rileyi* を主な対象として液体培地および寒天培地における培養試験を行った。*B. bassiana* においては液体培地における酵母化が観察され, 基質への反応についてアンブロシア菌などの昆虫関連菌における結果と同様な傾向が見られたが, 同じ昆虫病原菌である *N. rileyi* においては酵母形態自体が観察されなかった。一方, これらに加えて供試菌の幅を広げるために, 二形性植物病原真菌を中心に菌の分離を試みている。

研究発表

原著論文

- 1) 畑 邦彦, 大楠美佐子, 川本 進, 曾根晃一: 森林性二形性真菌の培養形態, 九州森林研究 60: 9-12, 2007.

学会発表

- 1) 畑 邦彦, 大楠美佐子, 川本 進, 曾根晃一: 森林性二形性真菌の培養形態, 第 50 回日本菌学会大会, 千葉, 2006.

真菌が生産する抗アスペルギルス物質の研究

深 井 俊 夫 (東邦大学薬学部)

宇 野 潤 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

三 上 襄 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

研究成果

有用物質探索のため教室に保存されている真菌 (H16-109N) から抗真菌活性物質 4 種を見いだした. H16-109N の活性主要物質は NMR および MS スペクトルの結果, メトキシアクリレート系の Strobilurin A ($C_{16}H_{18}O_3$) と同定された. 生産菌は DNA シークエンサーによる解析の結果, 担子菌 *Strobilurus* 属 (*Strobilurus trullisatus*) であった. 本物質の MIC 値は, *Aspergillus fumigatus* に 1.0-2.0 $\mu\text{g/ml}$, *Tricophyton mentagrophytes* に 1.0 $\mu\text{g/ml}$, *Candida albicans* に 0.125-0.25 $\mu\text{g/ml}$ 及び *Cryptococcus neoformans* に 0.5-1.0 $\mu\text{g/ml}$ と病原真菌に広く抗真菌作用を示した. この物質は fluconazole を除いた miconazole, ketoconazole, itraconazole, voriconazole などのアゾール系抗真菌薬と併用により相乗作用を示した.

研究発表

学会発表

- 1) 山本撰也, 宇野 潤, 日比崇弘, 深井俊夫, エイコ・ナカガワ・イタノ, 三上 襄: *P. pseudocitrinum* が生産する抗アスペルギルス物質の検討. 第 49 回日本医真菌学会総会, 真菌誌, 2005.
- 2) 日比崇弘, 宇野 潤, 深井俊夫, エイコ・ナカガワ・イタノ, 三上 襄: *Penicillium pseudocitrinum* が生産する抗真菌物質の検討. 第 125 年回日本薬学会, 講演要旨集, 2005.
- 3) 山本撰也, 宇野 潤, 深井俊夫, 三上 襄: 糸状菌から得られた Alkenylbenzene 誘導体の抗真菌活性の検討. 第 50 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47 (増刊 1 号), 東京, 10 月 21 ~ 22 日, 2006.
- 4) 山本撰也, 宇野 潤, 深井俊夫, 三上 襄: 糸状菌から得られた alkenylbenzene 誘導体の抗真菌活性の検討. 第 80 回日本細菌学会総会, 細菌誌 47(1), 東京, 3 月 26 ~ 28 日, 2007.

環境内真菌の吸入と非感染性ヒト疾患との関連に関する研究

渋谷 和 俊 (東邦大学附属大森病院病院病理部)

亀井 克 彦 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌感染分野)

研究成果

居住環境内には多種多様な真菌が浮遊しており、ヒトは呼吸によってこれらの真菌に曝露されている。真菌の吸入によるヒトの呼吸器障害としては感染およびアレルギーが知られているが、解明されていない疾患も多いと推測されている。本研究では、環境内真菌の一つであり、またヒトに健康被害を及ぼす可能性の高い真菌として近年注目されている *Stachybotrys chartarum* を用い、胞子をマウスに経気管的に反復投与して諸臓器の病理組織学的検討を行った。

その結果、4-8週間(6-12回)の本菌の反復投与によって肺動脈壁中膜および内膜の肥厚が形成されることを明らかにした。さらに詳細な検討(病理組織学的検討、血行動態の検討など)を行ったところ、肺高血圧の成立が確認された。そこで本病変の形成に必要な *S. chartarum* の孢子数、投与回数・期間を検討し、単回投与した場合にも頻度は低いながらも本病変が形成されることを明らかにした。また、病変の形成には株により相違があることが確認された。マイコトキシン産生性の異なる菌株を用いた検討からは trichothecene 産生株で肺動脈病変が形成され、atranone 産生株(trichothecene 非産生株)では病変が形成されず、本病変形成には trichothecene 産生株が産生する何らかの物質が関与している可能性が示唆された。

研究発表

学会発表

- 1) Ochiai E, Kamei K, Watanabe A, Sato A, Hiroshima K, Shibuya K: Inhalation of *Stachybotrys chartarum* causes pulmonary hypertension in mice - relation to human PPH, The 16th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Paris, France, June. 25-29, 2006.
- 2) 落合恵理, 亀井克彦, 永吉 優, 佐藤綾香, 渡辺 哲, 渋谷和俊: *Stachybotrys chartarum* による肺高血圧症について, 生化学若い研究者の会 第46回夏の学校, 東京, 2006. 8.
- 3) 落合恵理, 亀井克彦, 佐藤綾香, 渡辺 哲, 永吉 優, 豊留孝仁, 渋谷和俊: Trichothecene 産生能の異なる *Stachybotrys chartarum* 2株を用いたマウス肺高血圧症モデルの検討, 第50回日本医真菌学会総会, 東京, 真菌誌 47(S1): 78, 2006. 10.
- 4) 落合恵理, 永吉 優, 佐藤綾香, 渡辺 哲, 豊留孝仁, 矢口貴志, 亀井克彦, 渋谷和俊: *Stachybotrys chartarum* の株の相違がマウスの肺血管病変に与える影響について. 真菌症フォーラム第8回学術集会, プログラム/抄録集 p.75, 神戸, 2007. 2.

琉球大学医学部皮膚科で分離された真菌の形態学的、 生理学的、分子生物学的同定

— 沖縄県における皮膚プロトテコーシスの検討 —

稲 福 和 宏 (琉球大皮膚科)

佐 野 文 子 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌感染分野)

亀 井 克 彦 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌感染分野)

研究成果

沖縄県在住. 59 歳男性, 5 年以上 strongest 群のステロイド外用歴のあるの右前腕の紅斑, 肉芽腫性局面から表在の鱗屑から糸状菌 1), 組織培養から乳白色, 湿性クリーム状の酵母様真菌に類似の形状をしたコロニー 2) を分離した. 同時に病理組織所見で真皮内に好中球, 形質細胞, 組織球などの稠密な細胞浸潤を認めた. 特殊染色にて PAS, グロコット染色ともに真皮内に特徴的な桑実, 車軸状の菌体が多数見られた. 1) はスライドカルチャーで綿状毛小塊を認め, 粉状~顆粒状, 表面は白色, 裏面は淡褐色, 辺縁はギザギザでその性状から

Trichophyton metagrophytes と同定した. 2) は培養から得られた菌体の形状も同様であり *Prototheca wickerhamii* と同定した. 同菌は糖資化性では dextrose, lactose, trehalose 分解, ガス産生なしであった. 治療は塩酸テルビナフィン内服にて紅斑, 腫脹が増強したためイトラコナゾール 200 mg/日に変更し 12 週目にはほぼ治癒となった. 治療に伴い菌数は 96/視野 (初診時) から 16/視野 (内服 8 週目) に著明に減少していた. 沖縄県内の医療施設から近年 5 例の皮膚プロトテコーシス症例の報告があり, 患者背景, 菌の分布, 遺伝子検索を更に検討したい.

分子生物学的手法を用いた魚類病原真菌の同定に関する研究

畑 井 喜司雄（日本獣医生命科学大学獣医学部魚病学教室）

佐 野 文 子（千葉大学真菌医学研究センター，真菌感染分野）

横 山 耕 治（千葉大学真菌医学研究センター，真菌資源開発分野）

亀 井 克 彦（千葉大学真菌医学研究センター，真菌感染分野）

研究成果

近年、養殖魚類はその対象魚が増加し、しかも過密で飼育されることが多い。このような飼育過程で種々の病気が発生するが、真菌病の発生も少なくない。

真菌病の中で、黒色真菌に分類される病気は、海産魚の稚魚に頻繁に発生するが、その原因菌に関しては十分に検討されていない。

とくに、それらの菌は、形態学的な面からだけで同定することは困難になってきている。

千葉大学真菌医学研究センターの黒色真菌の遺伝子解

析データベースを使って、解析研究を進めることは効率的に同定研究を進めることができると考え、協力および示唆をいただき、平成 18 年度は研究を進めた。

その結果、体表に病患部を有するシマアジ、マダイ稚魚などから *Ochroconis* および *Exophiala* 属に分類される菌が培養された。その病原性についてシマアジを用いて検討し、病原真菌であることを確認した。

現在、それらの原因菌について千葉大学真菌センターの協力を得て同定中である。

家畜・家禽等の真菌症の病因学のおよび病理学的診断

木村 久美子（動物衛生研究所 細菌・寄生虫病研究チーム／牛病理ユニット）

播谷 亮（動物衛生研究所 細菌・寄生虫病研究チーム／牛病理ユニット）

佐野 文子（千葉大学真菌医学研究センター，真菌感染分野）

横山 耕治（千葉大学真菌医学研究センター，真菌資源開発分野）

三上 襄（千葉大学真菌医学研究センター，高分子活性分野）

亀井 克彦（千葉大学真菌医学研究センター，真菌感染分野）

研究概要

真菌感染症は人獣共通感染症のひとつであり，日和見感染症としても重要である．家畜・家禽においても多数発生が見られるが，ウイルスあるいは細菌性の感染症に比べると軽視される傾向があるため，その発生実態は明らかにされていない．また生前診断が困難なため，的確な採材が為されず，原因菌が不明な場合も多い．本課題はこれらの現状を踏まえ，野外で発生している家畜および家禽等の真菌症の発生実態調査および病理検査材料を用いた診断法の高度化を目的としている．

真菌症野外例について，病理組織学的検査，免疫組織化学的検査を行うと共に病理組織検査用パラフィンブロックを用いて病原真菌の特定を目的とした遺伝子解析を行った．また，生材料が採取できた症例については菌分離を行った．病原真菌の多くは常在菌であり，遺伝子解析は検出感度が非常に高いため，いくつかの症例においては形態学的診断結果と一致しない真菌遺伝子が検出された．また，真菌培養においても形態学的診断結果と

異なる真菌が同定されてしまうことがあった．一方，病理形態学的検査では原因真菌の一部あるいは断面のみの観察であることから，形態的特徴のみによる原因菌の診断は非常に困難である．また，免疫組織化学的診断は抗体の種類が非常に限られているために，特定真菌以外の診断は不可能である．これらのことより野外の真菌症の診断においては，数種の診断法により総合的に診断していくことが重要であると考えられた．また，今後も野外例の症例を引き続き解析し，各病原真菌における形態学的特徴等の情報を集積していくことが必要かつ重要であると考えられる．

真菌症の免疫組織化学的診断においては，各真菌と抗体との特異反応のみならず交差反応についても熟知しておかなければならない．平成 15 年度からの共同利用研究内で行っていた真菌レファレンスアレイの作製を引き続き行っており，診断用抗体との反応性を検討している．

宿主の病原真菌感染防御能に対する DHA の影響・その分子機構の解明

二 川 健 (徳島大学医学部)
大荒田 素 子 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌感染分野)
栗 田 啓 幸 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌感染分野)
五ノ井 透 (千葉大学真菌医学研究センター, 系統・化学分野)
亀 井 克 彦 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌感染分野)

研究成果

活性酸素は、病原真菌の殺菌作用に伴う炎症反応を亢進する重要な因子であるが、同時に、活性酸素（酸化ストレス）の増加は、宿主細胞に様々な障害をおよぼす。一方、DHA の過剰摂取は、生体組織の脂質過酸化を促進し、酸化ストレスを増大させる。これらの知見から、炎症反応と DHA 摂取の組合せは、酸化ストレスをより促進し、生体に悪影響をおよぼすものと予測した。しかし、予想に反して、炎症反応と DHA 摂取の組合せは、炎症反応の生じていない状況下での DHA 摂取時と比べ

て、酸化ストレスの促進を軽減した。

研究発表

原著論文

- 1) Oarada M, Tsuzuki T, Gono T, Igarashi M, Kamei K, Nikawa T, Hirasaka K, Ogawa T, Miyazawa T, Nakagawa K, Kurita N: Effects of dietary fish oil on lipid peroxidation and serum triacylglycerol levels in psychologically stressed mice. *Nutrition* 24: 67-75, 2008.

Aspergillus 及び関連菌の分子系統解析と形態との比較研究

堀 江 義 一 (千葉県立中央博物館)

矢 口 貴 志 (千葉大学真菌医学研究センター, 系統・化学分野)

研究成果

Aspergillus fumigatus およびその関連テレオモルフである *Neosartorya* 属は、真菌症原因菌として重要である。当センターに保存されている *A. fumigatus* およびその関連菌を研究材料とし、 β -tubulin, hydrophobin, calmodulin 遺伝子による系統解析を実施した。その結果、それらは5つのクラスターに分かれ、*A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. viridinutans* とは系統的に異なる菌群が見出され、*Neosartorya udagarwae* と系統的に近縁であった。*A. fumigatus* 関連菌は分子系統と分生子の微細構造、生育温度、マイコトキシン生産性との間には相関が見られたが、薬剤耐性においては差が認められなかった。また、新たに分離された *Neosartorya* に属する菌株において分子系統、子う胞子の微細形状を詳細に検討したところ、既知種とはことなる菌種が見出された。

研究発表

学会発表

- 1) 堀江義一, 矢口貴志, 松澤哲宏, 田中玲子, 西村和子: なぜ 0011 株だけが fumitremorgen A を生産したのか - fumitremorgen A 生産菌とその関連菌の分子系統解析と分類学的考察. 第 59 回マイコトキシン研究会学術講演会, 要旨集 p.9, つくば, 1月6日, 2006.
- 2) 矢口貴志, 伊藤純子, 田中玲子, 松澤哲宏, 西村和子, 堀江義一: 病原性 *Aspergillus section Fumigati* の分類と性状. 真菌症フォーラム第7回学術集会, 抄録集 pp.40-41, 東京, 2月18日, 2006.
- 3) 矢口貴志, 堀江義一, 松澤哲宏, 田中玲子, 西村和子: *Neosartorya* 属の新種について. 日本菌学会 50 周年記念大会, 講演要旨集 p.47, 千葉, 6月3~4日, 2006.
- 4) 矢口貴志, 堀江義一, 伊藤純子, 田中玲子, 松澤哲宏, 西村和子: *Aspergillus section Fumigati* の分類について. 日本菌学会 50 周年記念大会, 講演要旨集 p.62, 千葉, 6月3~4日, 2006.
- 5) 矢口貴志, 伊藤純子, 堀江義一, 田中玲子, 松澤哲宏, 西村和子: 病原性 *Aspergillus section Fumigati* の分類と性状. 第 50 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47 (増刊1号): 55, 東京, 10月21~22日, 2006.
- 6) 矢口貴志, 堀江義一, 松澤哲宏, 田中玲子: 遺伝子解析による *Neosartorya* 属および *Aspergillus section Fumigati* の分類と種の評価および新分類. 第 50 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47 (増刊1号): 55, 東京, 10月21~22日, 2006.

病原性酵母の株識別法の検討

神戸 俊 夫 (名古屋大学大学院医学系研究科)

田中 玲 子 (千葉大学真菌医学研究センター, 系統・化学分野)

知花 博 治 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

研究成果

Candida albicans の RPS 領域塩基配列を基にデザインしたプライマーにより, RPS 領域が *C. stellatoidea* および *C. dubliniensis* にも存在することが確認できた. さらに, RPS を構成する内部反復配列 (ALT) のクローニングを行い, それぞれの種の ALT 配列を明らかにした. これらの情報を基に, *C. albicans* の RPS 領域に基づいたタイピングと 3 菌種を区別するための 2 種類のプライマーセット (P-II と AS-I) をデザインした. P-II は *C. albicans*, *C. stellatoidea* および *C. dubliniensis* に特異的で, これらの菌種の RPS 内の ALT 反復回数の特徴を知ることができた. AS-I は *C. albicans* と *C. stellatoidea* に特異的で, PCR における増幅パターンにより, 両菌種を区別することが可能となった. 次に, P-II および AS-I を用いた PCR により, *C. albicans* の RPS 領域に基づいたタイピングの特徴について検討した. 結果, P-II

を用いた PCR では, 臨床分離された *C. albicans* の多くが type 3 (ALT の繰り返しが 3 回) であったが, これらの株の間に電気泳動パターンに違い (増幅バンドの数と intensity) がみられた. さらに, AS-I を用いた PCR により, P-II による増幅が類似のパターンを示す株を区別することができた. 以上, 2 種類のプライマーセット (P-II および AS-I) を用いた PCR により, 迅速な *C. albicans* の同定とタイピングが可能となった.

研究発表

学会発表

- 1) 服部尚生, 田中玲子, 知花博治, 富田 靖, 神戸俊夫: 反復配列 RPS と内部反復配列 ALT を標的とした PCR によるカンジダ・アルビカンスの genotyping. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1 号): 33, 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.

新規に単離した抗真菌抗生物質 Fr604 の作用機序

河 合 清 (中京女子大学)

福 島 和 貴 (真菌医学研究センター, 真菌資源開発分野)

研究成果

真菌は真核生物に属し、ミトコンドリアが真菌細胞のエネルギー変換装置として重要な機能を果たしている。したがって、外来性化学物質(殺菌剤や抗生物質)によるミトコンドリア機能傷害は真菌の生育を傷害する。Fr604はその構造研究の結果、側鎖にコリンを有するユニークな環状ラクトンであることが明らかとなり、eushearilide と命名した。そこで、eushearilide の抗真菌作用のメカニズムとしてミトコンドリア毒性を検討した。ミトコンドリアの構造及び機能(酸化リン酸化)は全ての真核生物において基本的に共通していることから、調製の容易なラット肝ミトコンドリアを用いて研究を行った。

[実験方法] ラット肝ミトコンドリアは常法(河合: 毒性生化学上, 1988)により調製した。呼吸活性は酸素電極法により測定した。酸化還元差スペクトルは Beckman DU-70 自記分光光度計を用いて測定した。

[実験結果] (1) 除共役作用: 単離ラット肝ミトコンドリアの呼吸に対して eushearilide は弱い除共役作用を示し、state 4 呼吸を加速した。しかし、呼吸抑制作用が強く(NAD 系呼吸に対する ID_{50} : $50 \mu M$)、除共役作用は

マスクされた。(2) 電子伝達阻害作用: Eushearilide がミトコンドリアの呼吸を阻害することから、電子伝達阻害作用の可能性が考えられ、亜ミトコンドリア粒子 SMP における NADH 酸化酵素への阻害作用を検討した。Eushearilide は SMP の NADH oxidase, succinate oxidase, DHQ oxidase を阻害し、それらの阻害が TMPD で解除されなかった。NADH を電子供与体とした酸化還元差スペクトルでは eushearilide は KCN と同様の電子伝達阻害を示し、全ての cytochromes が還元状態になった。

[結論] 以上の実験から、eushearilide がミトコンドリアの cytochrome c oxidase を阻害することを示す結果が得られた。

研究発表

学会発表

- 1) 福島和貴, 笠原宏之, 滝澤香代子, 細江智夫, 河合清, 河合賢一: 真菌由来の新規骨格を有する新抗真菌物質 eushearilide について. 第 50 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47 (増刊 1 号): 80, 東京, 10 月 21 ~ 22 日, 2006.

真菌からの新規生理活性リード化合物の探索

河合賢一 (星薬科大学)

細江智夫 (星薬科大学)

板橋武史 (星薬科大学)

福島和貴 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌資源開発分野)

矢口貴志 (千葉大学真菌医学研究センター, 系統・化学分野)

研究成果

本センター保存菌 5 菌株 (*Eupenicillium shearii* IFM52672, *E. javanicum* IFM54704, *Penicillium citrinum* IFM53298, *P. simplicissimum* IFM53375, 未同定菌 IFM52672) の成分研究について論文報告を行った。また, *E. shearii* IFM54447 から分離した抗真菌活性物質 eushearilide の作用機序を推定し第 50 回日本医真菌学会総会で報告した。さらに *E. javanicum*, *Malbranchea filamentosa* および *M. multicolor* からそれぞれ数種の新規化合物を分離・構造決定を行い, 第 127 回日本薬学会年会にて報告した。

研究発表

原著論文

- 1) Hosoe T, Fukushima K, Takizawa K, Itabashi T, Kawahara N, Vidotto V and Kawai K: Eushearilide, new antifungal macrolide, isolated from *Eupenicillium shearii*. J Antibiotics 59: 597-600, 2006.
- 2) Nakadate S, Nozawa K, Horie H, Fujii Y, Nagai M, Komai S, Hosoe T, Kawai K, Yaguchi T, K. Fukushima: New dioxomorpholine derivatives, javanicunine A and B, from *Eupenicillium javanicum*. Heterocycles 68: 1969-1972, 2006.
- 3) Wakana D, Hosoe T, Itabashi T, Okada K, Campos Takaki GM, Yaguchi T, Fukushima K and Kawai K: New citrinin derivatives isolated from *Penicillium citrinum*. J Nat Med 60: 279-278, 2006.

- 4) Hosoe T, Fukushima K, Takizawa K, Itabashi T, Yoza K and Kawai K: A new pyrrolidine-2, 4- dione derivative, vermelhotin, isolated from unidentified fungus IFM 52672. Heterocycles 68: 1949-1953, 2006.
- 5) S. Komai, T. Hosoe, T. Itabashi, K. Nozawa, T. Yaguchi, K. Fukushima, and K. Kawai: New penicillide derivatives isolated from *Penicillium simplicissimum*. J Nat Med 60: 185-190, 2006.

学会発表

- 1) 福島和貴, 笠原宏之, 滝澤香代子, 細江智夫, 河合清, 河合賢一: 真菌由来の新規骨格を有する新抗真菌物質 eushearilide について 第 50 回日本医真菌学会総会, 要旨集 p.80, 2006. 10.
- 2) 若菜大悟, 細江智夫, 板橋武史, 河合賢一, 福島和貴: *Malbranchea filamentosa* から得られた新規アントラステロイド配糖体. 第 127 回日本薬学会, 講演要旨集 4, p.64, 富山, 2007. 3.
- 3) 笠原宏之, 若菜大悟, 細江智夫, 板橋武史, 河合賢一, 福島和貴: *Malbranchea multicolor* の成分検索. 第 127 回日本薬学会, 講演要旨集 4, p.69, 富山, 2007. 3.
- 4) 中楯 奨, 野沢幸平, 堀江 均, 藤井祐一, 佐藤博泰, 細江智夫, 河合賢一, 矢口貴志, 福島和貴: *Eupenicillium javanicum* の産生する新規抗真菌環状ゲプシペプチド. 第 127 回日本薬学会, 講演要旨集 4, p.109, 富山, 2007. 3.

犬の耳道内 *M. pachydermatis* の耳道内環境に与える影響について

小 守 忍 (岩手大学農学部)

福 島 和 貴 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌資源開発分野)

田 口 英 昭 (千葉大学真菌医学研究センター, 生態分野)

研究成果

酵母 *Malassezia pachydermatis* は犬の外耳炎の悪化因子として重要な役割を果たすことが知られている。動物飼育者は非飼育者に比べ *M. pachydermatis* の保有率が高いとも言われている。耳道環境を変化させることによる *M. pachydermatis* の耳垢成分への影響を研究目的とした。健康なビーグル犬について、耳道内における *M. pachydermatis* の存在を培養により検討したが高率に検出されることが判明した。また同時に耳垢を採取しその成分について検討した。色々な因子が耳垢成分に影響すると思われるが、耳道内環境、特に湿度に影響を及ぼす垂直耳道切除術を施す方法を採用することとし、同一ビーグル犬の片方の耳に施術した。無手術のサイドを対照とした。両サイドの耳道内から耳垢を採取し脂質の分析を行った。脂質の抽出は CHCl_3 -MeOH (2:1) で行

い、抽出物をシリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) により分析した。展開溶媒としては hexane-diethyl ether-acetic acid (80:20:1) を用いた。検出は過塩素酸を噴霧後 180 °C で加熱し行った。両サイドから得られた耳垢からは squalene, triglycerides, fatty acids, cholesterol などが脂質成分として検出された。TLC 分析では脂質成分の定量的比較には限界が認められた。ついでガスクロマトグラフィーによる脂質の脂肪酸組成の分析を目的に、耳垢からの脂質の抽出、さらに全遊離脂肪酸の検出の加水分解、エステル化の条件について検討を進めている。対照および施術サイドの試料いずれにおいても、myristic acid (C_{14}), palmitic acid (C_{16}), oleic acid (C_{18}) などが主要な脂肪酸として検出されている。結果は試料の保存をはじめとする更なる高度な実験条件の確立が求められており、当面の課題として早急な解決を目指している。

Candida albicans 不飽和化酵素遺伝子破壊株のアレイ解析

村山 琮 明 (北里大学北里生命科学研究所 & 大学院感染制御科学府)

横山 耕 治 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌資源開発分野)

知花 博 治 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

研究成果

深在性真菌症の起因菌である *Candida albicans* において、酵母形から菌糸形への形態変化に伴い、不飽和脂肪酸が増加することが知られている。しかし、これらの合成に関わる *C. albicans* の FAD 遺伝子 (*CaFAD*) についてはまだ報告がなかった。われわれは2つの *CaFAD* (*CaFAD2*, *CaFAD3*) の同定を行い、破壊株を作製した。破壊株の表現型の解析として、転写レベルでの変化を見るためにアレイ解析を行った。

マイクロアレイは、*C. albicans* の 6,165 遺伝子が搭載されている NimbleGen 社のものを使用した。データの

蛍光強度を Robust Multi-chip Analysis (RMA) アルゴリズムによりデータ補正した。t 検定を行い、さらに多重補正として、Bonferroni 補正を行った。以下の表に変化した遺伝子の数を示す。

	Bonferroni			
	補正なし		補正あり	
	相補株増	<i>Cafad2</i> 破壊株増	相補株増	<i>Cafad2</i> 破壊株増
≥1.5 ~ <2.0	35	1,176	0	5
≥2.0 ~ <4.0	17	897	3	26
≥4.0 ~ <8.0	1	13	0	0
≥8.0	1	0	0	0

病原真菌 *Candida tropicalis* の二形性変換のゲノム・ネットワーク

鈴木 孝 仁 (奈良女子大学理学部)

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, 真菌資源開発分野)

研究成果

不完全真菌 *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) は、ヒトや動物の体内からも分離され、近縁種の *Candida albicans* と共に日和見真菌感染症の原因菌としても知られている。また、アゾール系抗真菌剤に対して、高度の耐性を示すために臨床において問題となっている。*C. tropicalis* は、グルコースを炭素源とする合成液体培地にエタノールを2.5%添加すると高率に同調的に菌糸（偽菌糸）を誘導することが可能である。酵母型と菌糸型の間の二形性変換能力は、病原性に必要であることが示唆されている。

C. albicans では、ゲノムプロジェクトが完了し、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的な解析が可能となっている。*C. tropicalis* と *C. albicans* の遺伝子の相同性は高く、我々が単離した *C. tropicalis* の MAP キナーゼ *CtEK1* も *C. albicans* の MAP キナーゼと非常に高い相同性を示した。そこで、*C. albicans* の DNA マイクロアレイ解析システムを用いて、*C. tropicalis* の菌糸形成過程において遺伝子発現レベルの変化する遺伝子につい

て網羅的な調査を行うことを計画した。*C. tropicalis* は *C. albicans* とは異なり、経時的に菌糸形成過程を追跡できるため、各過程での遺伝子発現を解析することが可能である。マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析には、サンプルからの全 RNA, mRNA の調製, Cy3, Cy5 で標識した cDNA 合成, マイクロアレイへの標識した cDNA へのハイブリダイゼーションとそれに続く洗浄, 蛍光シグナルの検出, 蛍光シグナル強度の数値化, 遺伝子発現量の比較といった一連の実験操作が必要となる。今回我々は、これら実験操作のマニュアルを完成させた。*C. tropicalis* における酵母型成長と菌糸型成長過程前期のサンプルから mRNA を調製し、遺伝子発現解析を行い、発現に差のあるいくつかの遺伝子について選択した。今後、これらの遺伝子についてはリアルタイム PCR 法により詳細な検討を加える予定である。さらに菌糸型成長過程前期と後期において遺伝子発現解析を行う計画である。

Aspergillus section *Nigri* の分子分類などによる 類別とオクラトキシン産生

高橋 治 男 (千葉県衛生研究所)

横山 耕 治 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌資源開発分野)

久米田 裕 子 (大阪府公衆衛生研究所)

浅尾 務 (大阪府公衆衛生研究所)

陰地 義 樹 (奈良県衛生研究所)

大橋 正 孝 (奈良県衛生研究所)

田端 節 子 (都立衛生研究所)

一戸 正 勝 (東京家政大)

研究成果

1) オクラトキシン産生菌種とされる Section *Nigri*, *Aspergillus carbonarius* について, センター保存株のオクラトキシンA産生性を調べた. その結果, 6株中2株にオクラトキシンAの産生性が認められた.

2) ブドウやリンゴ果樹園, あるいはその近くの土壌などから Section *Nigri* の分離を試みたところ, *A.*

carbonarius の近縁種が, 多数分離された. それ以外の土壌からの検出頻度は低く, Section *Nigri* が有機肥料などを多く用いる果樹園などの土壌中に多く生息していることを示した.

3) 現在, それらの分離株の同定とオクラトキシン産生性を検討を進めている.

Cryptococcus neoformans 薬剤耐性のスクリーニングと分子機構解析

野村 文夫 (千葉大学大学院医学研究院, 分子病態解析学)

川本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

大楠 美佐子 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

Cryptococcus neoformans は免疫不全患者, 特に AIDS 患者に日和見感染を引き起こす病原性酵母である。我が国での本菌の分離頻度は *Candida* 属酵母ほど高くはないものの, HIV 陽性患者の増加に伴い高くなる事が予想され, 抗真菌薬の役割が今後ますます重要となるであろう。病原細菌を用いた研究では, 各種抗菌剤に対する薬剤耐性獲得に関する分子機構の理解が進んでおり, 薬剤耐性研究は, 新たに耐性菌の出現しにくい薬剤開発を行うための基礎データを提供する。一方, 病原真菌では, これまで, *Candida albicans* については, その薬剤耐性獲得の分子機構が解析されて来たが, *Cryptococcus neoformans* などでは, その研究例は非常に少ない。今後, 病原真菌の抗真菌剤に対する耐性獲得が更に深刻化して, まますます猛威を振るう可能性があり, 新たな抗真菌剤開発に重要な知見をもたらす薬剤耐性獲得の分子機構解析を目指す。

真菌医学研究センターで収集, 保存されている多数の *Cryptococcus neoformans* 臨床分離株を用いて, まず, アゾール系抗真菌剤フルコナゾールに対する薬剤耐性獲得の状況をスクリーニングして来た。今後, 例えば, SDS-PAGE, 2次元タンパク質発現デイクアレンシャル解析 (DIGE), 質量分析法など, プロテオーム解析手法等を用いて, それらの耐性株細胞内に特異的に高く, または低く発現しているタンパク質を野生株と比較するなどすることにより, 薬剤標的タンパク質が過剰発現して耐性

になっている可能性などを探る。

まず, 病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* の薬剤感受性測定法に関する検討を行って成果を上げて来た。病原性酵母の薬剤感受性測定法については CLSI (旧 NCCLS, M27-A2) 法を改善した日本医真菌学会法が推奨されている。しかし, *C. neoformans* は *Candida* 属菌に比べ発育が遅く, 同じ方法では 48 時間培養後に最終判定を行うことが困難である。こうした状況を背景に我々は *C. neoformans* のフルコナゾールに対する薬剤感受性測定法について, 培地, 接種菌量, 培養時間, さらに比較的簡便に実施できる E-test 法の結果も合わせて基礎的な検討を行って来た。また, 臨床分離株を用いて, フルコナゾールに対する薬剤耐性株と感受性株との比較プロテオーム解析を行って, それぞれに特徴的なタンパク質を同定して, 考察しつつある。

研究業績

- 1) 大楠美佐子, 石井知里, 清水 誠, 戎野棟一, 野村文夫, 川本 進: 病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* の薬剤感受性測定法に関する検討 第 18 回日本臨床微生物学会総会, 長崎, 2月17~18日, 2007.
- 2) 石井知里: 病原性真菌 *Cryptococcus neoformans* の薬剤耐性研究 (千葉大学大学院医学薬学府 修士論文), 2007年3月.

真菌の窒素代謝と NO ストレス耐性機構の研究

祥雲 弘文 (東京大学農学生命科学研究科)
山口 正視 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)
川本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

研究成果

真菌症病原菌として重要な *Candida albicans* が亜硝酸から亜酸化窒素 (N_2O) までの脱窒を行う活性を示すことが、当研究室で見出されている。しかしカビ脱窒系に比べ、酵母脱窒系の解明は進んでいない。ゲノム解析のなされた *C. albicans* JCM 1542 の脱窒系についてその解明を行っている。*C. albicans* ゲノムには *Aspergillus oryzae* や *Fusarium* などに見出されている亜硝酸還元酵素 (NirK) や P450nor の遺伝子が存在しない。また一酸化窒素還元酵素 (Nor) 活性は電子供与体の特異性が P450nor と異なっている。従って *C. albicans* の脱窒系は新たな構成成分と生理的意義が期待される。本年度はまず脱窒条件で

の菌の生育を調べ、脱窒が細菌やカビと同様に菌の生育に貢献することが明らかとなった。しかし既知の脱窒酵素遺伝子ホモログが見当たらないので、全く新しい構成成分による脱窒系の存在が期待される。それら脱窒に関わる遺伝子を取得するため、現在、Subtractive suppression hybridization (SSH) 法と言う方法で検討を行っている。脱窒や硝酸呼吸の生理的意義は嫌気条件下でのエネルギー獲得にあるが、近年、ある種の病原性細菌 (淋病菌、緑膿菌など) ではこれに加えて病原性との関連が示唆されている。*C. albicans* 脱窒系のミトコンドリアへの局在や、病原性との関連を調べる予定である。

Candida albicans バイオフィーム特異遺伝子破壊株の微細構造

杉田 隆 (明治薬科大学微生物学教室)
山口 正視 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)
川本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

研究成果

バイオフィームは菌体と菌体外分泌多糖から構成される膜であり、薬剤耐性化をもたらす。*Candida albicans* のバイオフィーム (BF) 特異遺伝子を見出すために、BF と planktonic (PK) 状態での遺伝子発現を、DNA マイクロアレイを用いて解析した。抽出された遺伝子を破壊

したところ、破壊株の BF 形成能は PK に比べて有意に低下した。野生株と遺伝子破壊株のバイオフィーム形成過程を電子顕微鏡を用いて比較観察したが、その微細構造に大きな変化は認められなかった。このことから、当該遺伝子は接着に関与すると推定された。

海洋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)

三上 襄 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

研究成果

海綿 *Agelas* sp. より単離したプロモピロールアルカロイド nagelamide J に抗菌活性ならびに抗真菌活性が、また、海綿 *Penares* sp. より単離した penaresidin A のアゼチジン環部分の可能なジアステレオマーを合成した結果、一部のジアステレオマーに抗菌活性ならびに抗真菌活性が認められた。

一方、軟体サンゴ *Cespitularia taeniata* より単離した数種の verticillene タイプのジテルペン化合物に抗菌活性、抗真菌活性が認められた。さらに、ヒカゲノカズラ科植物やミソハギ科植物より単離した数種のアルカロイドにも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) Kubota T, Sunaura T, Morita H, Mikami Y, Hoshino T, Obara Y, Nakahata N, Kobayashi J: Lycovatine A: a C₁₆N-type quaternary alkaloid from *Lycopodium clavatum* var. *robustum*. *Heterocycles* 69: 469-474, 2006.
- 2) Ishiuchi K, Kubota T, Mikami Y, Obara Y, Nakahata N, Kobayashi J: Complandines C and D new dimeric alkaloids from *Lycopodium complanatum*. *Bioorg Med Chem* 15: 413-417, 2007.
- 3) Araki A, Tsuda M, Kubota T, Mikami Y, Fromont J, Kobayashi J: Nagelamide J a Novel Dimeric Bromopyrrole Alkaloid from a Sponge *Agelas* species *Org Lett* 9: 2369-2371, 2007.
- 4) Ohshita K, Ishiyama H, Takahashi Y, Ito J, Mikami Y, Kobayashi J: Synthesis of penaresidin derivatives and its biological activity *Bioorg Med Chem* 15: 4910-4916, 2007.
- 5) Watanabe K, Kubota T, Shinzato T, Ito J, Mikami Y, Kobayashi J: Sarusubine A a new dimeric Lythraceae alkaloid from *Lagerstroemia subcostata*, *Tetrahedron Lett* 48: 7502-7504, 2007.

高度病原真菌 *Coccidioides* 属のトポイソメラーゼ遺伝子 (*TOP2*) による同定法の研究

安 藤 昭 一 (千葉大学大学院自然科学研究科)
篠 山 浩 文 (千葉大学大学院自然科学研究科)
雨 宮 良 幹 (千葉大学園芸学部)
斉 藤 明 広 (千葉大学園芸学部)
三 上 襄 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)
知 花 博 治 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)
矢 沢 勝 清 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

研究成果

本研究では機能遺伝子の *TOP2* 及び *TRF4* に着目し, *Coccidioides* 属真菌を特異的に検出する PCR プライマーを開発した.

千葉大学真菌医学研究センターに保存されている *C. immitis* 2 株と *C. posadasii* 3 株を用いて, *TOP2* 遺伝子の DNA 解析を行い, その配列情報を基に種特異的プライマーセット Ptop2F-Itop2F-PItop2R の設計を行った. *TRF4* については種特異的プライマー ctrfF-ctrfR を設計し, PCR を行って遺伝子を増幅して, その遺伝子を解析してその解析結果に基づいて, 種特異的プライマーセット Ptrf4F-Itrf4F-PItrf4R の設計を行った. この 2 つのプライマーセットを混ぜ合わせ, 種特異的に作用すること

を確認した後, ITS プライマーを混ぜ *Coccidioides* 属の近縁 48 種 84 株との反応性を確認した.

その結果, 本カクテル PCR プライマーは, 1 回の PCR で増幅するバンドの数とサイズで 2 菌種を分類することが可能となった. 実際に *Coccidioides* 属の菌種が未知の菌株について, 本研究で開発したプライマーセットを使用した結果, 2 菌種を区別することができた. また近縁種では, バンドの増幅が観察されず, 特異性が高いことも確認された. 以上より, 本研究で開発したプライマーセットにより, 簡便かつ迅速な種の同定が可能であることが実証された (共同研究者: 伊藤淳二, 亀井克彦, 佐野文子).

カンジダ酵母の遺伝子の組換え技術に基づく機能解析

長 環 (福岡歯科大学)
豊田 美香 (福岡歯科大学)
中山 浩伸 (国立鈴鹿工業高等専門学校)
青山 俊弘 (国立鈴鹿工業高等専門学校)
水野 貴之 (徳島文理大学)
宮川 洋三 (山梨大学工学部)
小笠原 綾子 (東北薬科大学)
知花 博治 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)
三上 襄 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

研究成果

一定以上の菌密度を感知するクオラムセンシング (QS) 機構は、カンジダの酵母形から菌糸形への形態発現の初期段階を制御する。しかしカンジダの QS 機構は QS 物質の発見、二成分制御系の関与以外まだ殆ど解明されていない。我々は、カンジダの形態変換能を指標に、QS 機構初期段階の網羅的遺伝子発現解析をゲノムマイクロアレイ法で行った。その結果、QS の初期段階に発現促進がみられる遺伝子として 50 遺伝子が選出されたが、未知遺伝子以外の 22 遺伝子の 1/3 は Gcn4p 転写因子に支配された遺伝子で主にアミノ酸合成に関わるものであった。さらに 1/3 は負の転写因子 (Nrg1p, Tup1p, Ssn6p, Mig1p) に支配された遺伝子で主に解糖系/糖新生/その周辺に関わるものであった。のこり 1/3 は、これら転写因子に支配されないグルコース代謝や酸化ストレスに関わる遺伝子であった。

アミノ酸合成や解糖系/糖新生/その周辺に関わる遺伝子群の発現パターンは、カンジダが食細胞に食された初期段階で発現する遺伝子群のパターンと共通した。この食細胞内でのカンジダの遺伝子発現は、飢餓環境への適応と考えられている。これらのことから、カンジダの QS 機構初期段階の遺伝子発現も、一時的な飢餓に対する適応を示しているのではないかという仮説を立てた。

原著論文

- 1) Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Hodgson S, Takemori D, Aoyama, Metzler TN, Takano Y, Chibana H, Niimi M: The *Candida glabrata* putative sterol transporter gene *CgAUS1* protects cells against azoles in the presence of serum. *J Antimicrob Chemother* 60: 1264-72, 2007.
- 2) Cho T, Aoyama T, Toyoda M, Nakayama H, Chibana H, Kaminishi H: Transcriptional changes in *Candida albicans* genes by both farnesol and high cell density at an early stage of morphogenesis in N-acetyl-D-glucosamine medium. *Jpn J Med Mycol* 48: 159-167, 2007.

学会発表

- 1) Nakayama H, Bard M, Tanabe K, Aoyama T, Takemori D, Hodgson W, Wu S, Kumaraswari N, Metzler L, Takano Y, Chibana H, Niimi M: The *Candida glabrata* sterol transporter *CgAUS1* protects against azole toxicity in the presence of serum, The 7th Awaji International Forum, on Infection and Immunity, Abstracts p. 126, Awaji, Sep 1-5, 2007.
- 2) 倉内寿孝, 上野将明, 小笠原綾子, 渡部俊彦, 三上健, 山口正視, 知花博治, 松本達二: *Candida glabrata* 増殖形態に及ぼす亜硫酸ナトリウム燻今日. 第 51 回日本医真菌学会総会, 要旨集 p. 93, 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.

- 3) 岩田哲郎, 長 環, 西川和範, 青山俊弘, 上野圭吾, 知花博治, 中山浩伸: 病原性酵母 *Candida glabrata* における GDP-mannose pyrophosphorylase 遺伝子の機能解析, 第 30 回日本分子生物学会プログラム p. 781, 横浜, 12 月 11 ~ 15 日, 2007.
- 4) 長 環, 豊田美香, 知花博治, 中山浩伸, 小倉理恵子, 上西秀則: *Candida albicans* の Quorum-sensing 分子に対する初期応答, 日本細菌学会総会ワークショップ 6, 要旨集, p. 63, 大阪, 3 月 26 ~ 28 日, 2007.
- 5) 中山浩伸, 田辺公一, 新見昌一, 知花博治: 病原性真菌 *Candida glabrata* のステロールトランスポーターを介したアゾール耐性機構, 日本細菌学会総会ワークショップ 1, 要旨集, p. 52, 大阪, 3 月 26 ~ 28 日, 2007.
- 6) 小山友嗣, 川 良香, 宇野 潤, 知花博治, 三上 襄, 中山浩伸, 飯村 穰, 宮川洋三: 病原性酵母 *Candida* に対する抗真菌剤の標的候補: 必須遺伝子群の分離と同定, 日本医真菌学会総会セレクトッドシンポジウム, 要旨集 p. 73, 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.
- 7) 宮川洋三, 宇野 潤, 知花博治, 三上 襄, 中山浩伸: 病原性酵母 *Candida* 抗真菌剤の標的候補, 必須遺伝子群の分子生物学的解析, 日本細菌学会総会, 要旨集, p. 190, 大阪, 3 月 26 ~ 28 日, 2007.
- 8) 中山浩伸, 岩田哲郎, 長 環, 青山俊弘, 上野圭吾, 知花博治: 病原性酵母 *Candida glabrata* における GDP-mannose pyrophosphorylase 遺伝子の解析, 第 4 回真菌分子細胞研究会, 要旨集 p. 11, 千葉, 8 月 26 ~ 27 日, 2007.
- 9) 青山俊弘, 中山浩伸, 知花博治: *Candida glabrata* データベース, 第 4 回真菌分子細胞研究会, 要旨集 p. 24, 千葉, 8 月 26 ~ 27 日, 2007.
- 10) 中山浩伸, 田辺公一, 知花博治, 青山俊弘, 新見昌一: *Candida glabrata* ステロールトランスポーター *AUS1* の機能発現, 日本医真菌学会総会, 要旨集 p. 65, 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.

Aspergillus oryzae における抗真菌剤作用点の マイクロアレイによる解析

岡 千 寿 (千葉県産業支援技術研究所)
五ノ井 透 (千葉大学真菌医学研究センター, 系統・化学分野)
清 水 三 弘 (千葉県産業支援技術研究所)

研究成果

2005年12月に公開された *Aspergillus oryzae* のゲノム配列, およびかねてから公開されていた *Candida albicans* のゲノム配列を基に, これらの菌の遺伝子発現を解析する目的で, DNA マイクロアレイを開発・作製した. このカスタム・アレイ・システムでは, 全遺伝子あるいは独自に選択した遺伝子群に対する DNA プローブを任意のパターンでアレイ用スライド・ガラスにスポットすることが出来る. また, アレイ用スライド・ガラスは各社について検討を重ね, 東洋鋼板社の Gene Slide を採用した. 本スライド・ガラスを用いて, 一度ハイブリしたスライドから cDNA を解離 (デ・ハイブリダイゼーション) させ, アレイ・スライドを再使用することが可能であり, 安価で再現性の良い実験解析が可能であった. こ

の結果は, 千葉大学, 千葉県産業支援技術研究所, 東洋鋼板社の共同開発の成果として特許出願中である.

また, センター保存の *C. albicans* 菌株を用いアゾール耐性菌の遺伝子発現をプロファイリングした.

発表・報告書

- 1) 五ノ井 透, 三上 襄, 岡 千寿, 前田 浩, 磯貝健次, 岡村 浩: DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析法の改良. 千葉大学オープンリサーチ, 千葉, 9月18日, 2006.
- 2) 岡 千寿, 前田 浩, 五ノ井 透, 三上 襄, 磯貝健次, 岡村 浩: DNA マイクロアレイ関連技術の開発. 産学交流展 2006, 東京, 10月19~20日, 2006.

2006年度 共同利用研究報告書 研究成果集計累計

発表年	2005年	2006年	2007年	2008年
原著論文	0	8	9	1
学会発表	4	21	23	1

平成 19 年度 共同利用研究会報告

1) 第 4 回真菌分子細胞研究会

日 時: 平成 19 年 8 月 26 日, 27 日

場 所: 真菌医学研究センター

代表者: 新見昌一 (国立感染症研究所 生物活性物質)

事務局: 知花博治

(真菌医学研究センター 高分子活性分野)

開会のあいさつ

新見昌一 (国立感染症研 生物活性物質)

招待講演

- 1) 阿部敬悦 (東北大学未来科学技術共同研究センター 微生物ゲノム) 糸状菌の環境応答情報伝達系

一般発表

- 1) 矢口貴志 (千葉大学真菌医学研究センター系統・化学分野) 病原真菌の多相分類および最近の研究
- 2) 松澤哲宏 (千葉大学真菌医学研究センター系統・化学分野) *Emericella* 属の多相分類と新種について
- 3) 五ノ井 透 (千葉大学真菌医学研究センター系統・化学分野) 病原性放線菌ノカルジアに関する研究～シデロフォア産生を中心に～
- 4) 青山一紀 (千葉大学真菌医学研究センター高分子活性分野) *Nocardia* の産生する siderophore の同定
- 5) 志保沢里奈 (千葉大学真菌医学研究センター高分子活性分野) *Nocardia farcinica* に対するアゾール系抗真菌剤の作用機序の解明
- 6) 田中博子 (千葉大学真菌医学研究センター高分子活性分野) 嫌気性細菌の生産する二次代謝産物の研究
- 7) 渡部俊彦 (東北薬科大学微生物学教室) *Candida albicans* 増殖機構に及ぼすヒノキチオールの効果
- 8) 上野将明 (東北薬科大学微生物学教室) Menadiene による Complex I 依存性 ROS 産生シグナルの制御
- 9) 中山浩伸 (鈴鹿工業高等専門学校生物応用化学科) 病原性酵母 *Candida glabrata* における GDP-mannose

pyrophosphorylase 遺伝子の機能解析

- 10) 亀尾裕子 (奈良女子大学大学院人間文化研究科) *Candida albicans* の核相変換関連遺伝子 (Sps2) の変異により影響を受ける遺伝子
- 11) 清水 誠 (千葉大学真菌医学研究センター機能形態分野) 病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* の薬剤耐性遺伝子に関する研究
- 12) 田辺公一 (国立感染症研究所生物活性物質部) 病原真菌 ABC タンパク質と基質の相互作用
- 13) 上野圭吾 (千葉大学真菌医学研究センター高分子活性分野) *Candida* フェノームプロジェクトから抗真菌剤の設計へ～コンピューターを活用した抗真菌剤の設計～
- 14) 三谷宏樹 (千葉大学真菌医学研究センター高分子活性分野) *Candida glabrata* を用いた宿主応答を担う遺伝子の網羅的解析
- 15) 仲村 究 (東北大学大学院医学研究科内科病態学講座感染制御) TLR9 を介する *Cryptococcus neoformans* 由来 DNA の認識機構の解析
- 16) 豊留孝仁 (千葉大学真菌医学研究センター真菌感染分野) *Aspergillus fumigatus* 菌体表面に露出された β -グルカン構造による宿主転写因子 AP-1 活性化
- 17) 東江昭夫 (東京都臨床研究所) 高温増殖性菌 *Aspergillus fumigatus* からのプロテアソームの精製と構造・機能解析
- 18) 山田 剛 (帝京大学医真菌研究センター) 白癬菌形質転換系の開発
- 19) 清水公德 (千葉大学真菌医学研究センター機能形態分野) クリプトコッカスの遺伝子破壊効率向上への取り組み
- 20) 山本太一, 山田幸穂 (山梨大学大学院生命工学) カンジダ属酵母における抗真菌剤標的候補の探索・同定の試み
- 21) 青山俊弘 (鈴鹿工業高等専門学校) *Candida glabrata* データベース
- 22) 小暮高久 (千葉大学真菌医学研究センター高分子活性分野) *Candida maltosa* アルカン誘導型シトクロム

P450 遺伝子の発現制御機構

- 23) 水野貴之 (徳島文理大学工学部ナノ物質工学科) 産業利用を目指した病原性酵母菌 (*C. glabrata*) の育種と応用
- 24) 村山琮明 (北里大学北里生命科学研究所病原微生物分子疫学) アレルギー性気管支肺真菌症患者の mucus plug から検出された真菌要素の ISH 法による同定
- 25) 山口正視 (千葉大学真菌医学研究センター機能形態分野) 酵母細胞のストラクチャー解析
- 26) 知花博治 (千葉大学真菌医学研究センター高分子活性分野) *Candida glabrata* フェノームプロジェクト (網羅的遺伝子機能解析)

閉会のあいさつ

川本 進

(千葉大学真菌医学研究センター機能形態分野)

「第4回 真菌分子細胞研究会に参加して」

国立感染症研究所 生物活性物質部 田辺公一

第4回 真菌分子細胞研究会は、千葉大学真菌医学研究センターにおいて8月27日から28日までの二日間にわたって開催された。この研究会は第2回まで「真菌若手研究会」という名称だったが、若手という単語が参加者を制限しないように、第3回以降は現在の名称に変更され、今回は日本全国から約40人の参加があった。*Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* などについて、病原性、宿主応答、薬剤耐性など医学、薬学の研究領域の他に超微細構造解析、バイオフィォーマティクス、産業応用など多種多様な研究テーマについて、合計27演題発表があり、猛暑に負けないほどの熱い討論が行われた。毎回恒例の招待公演として今回は、東北大学の阿部敬悦先生が糸状菌のストレス応答についての膨大かつ詳細な研究成果を発表され、大いに刺激を受けた。また、今年の研

究会の特徴としては、研究を始めてまもない修士課程の学生の研究報告が増えたことである。どの学生も緊張しつつも立派な発表を行っていたのが印象的であった。口頭発表の機会が少なくなった昨今、若い学生にとっては良い経験になったのではないだろうか。

本研究会のような小規模の研究会の最大のメリットは、研究者同士の交流が密になることである。休憩時間あるいは懇親会(研究情報交換会)の際に、気軽に質問や討論を行うことができるので、参加者同士がお互いの研究における接点を発見することができ、かつ有効なアドバイスを得ることもできる。このような familiar な雰囲気、大学院生、ポスドクのような若い研究者でも、普段少々近寄りたがたい高名な先生方と話ができる場を作り出しているのであろう。この研究会は4回目となり、私の見る限り20人程度のリピーターが存在し、その数は年々増えているように感じる。会を重ねるごとに研究者同士の理解が深まり、研究についての詳細なディスカッションが活発になってきたように感じられる。その結果として、いくつかの共同研究も発生しているようである。しかし一方では、異分野からの発表数が減少傾向にあり、新規技術や異なる研究分野の話聞くチャンスが減っているようである。病原真菌だけの枠にとらわれずに酵母の基礎研究、あるいは異なる分野の研究者へ参加をさらに呼びかける必要があると思われる。また、会期の都合から以前は行われていたレクリエーションが、なくなってしまっているのが少々残念である。研究会の合間の息抜きは、研究者の人となり垣間見ることができる貴重なチャンスである。レクリエーションは、参加者同士が親密になり研究会が今後長く存続するために、重要なのではないだろうか。

病原真菌研究がアカデミックな領域でより広く認知され、評価されるようになるために、この研究会の存在は重要である。今後もより活発で自由な議論が行われる研究会となるように期待するとともに、私も微力ながら研究会の活性化に尽力できればと思っている。

2) アスペルギルス研究会

アスペルギルス症は先進各国と同様、わが国でもその高い頻度及び致死率から最も重要な真菌症となっている。これまで日本には病原性アスペルギルスおよびアスペルギルス症を専門に討議する研究会は存在しなかったが、2007年6月30日(土)に当センター B1F 講堂で「アスペルギルス研究会」としてわが国で初めて開催された。代表は日赤医療センターの安藤常浩先生であり、長崎、名古屋など全国から招聘された10名の演者による研究発表が行われた。本研究会はアスペルギルス症を中心として、基礎、臨床など広範な内容を形式にとらわれずに自由に発表・議論し、その中から新しい発見を期待することを目的とするもので、closedの会として開催されたにもかかわらず約20名の参加者があり、研究発表のみならずアスペルギルス症の臨床的問題点などを巡って活発な論議が行なわれた。今後の発展を期待したい。

日 時: 平成19年6月30日(土) 13:00～17:30

場 所: 千葉大学真菌医学研究センター B1 講堂

代 表: 安藤常浩(日赤医療センター呼吸器内科)

〈プログラム〉

開会の挨拶: 安藤常浩(日赤医療センター呼吸器内科)

座長: 倉島篤行(独立行政法人国立病院機構東京病院)

1) 「プロテオミクスを用いたアスペルギルス感染症の

新規迅速診断法の開発」 泉川公一(長崎大学医学部第二内科)

2) 「慢性肺アスペルギルス症画像経過と血清マーカー推移の検討」 倉島篤行(独立行政法人国立病院機構東京病院)

3) 「血液疾患患者におけるアスペルギルス症対策」 神田善伸(自治医科大学附属大宮医療センター血液科)

4) 「侵襲性アスペルギルス症壊死病変の組織学的検討」 木村雅友(近畿大学医学部病理学教室)

総括: 倉島篤行(独立行政法人国立病院機構東京病院)

座長: 小川賢二(国立病院機構東名古屋病院臨床研究部/呼吸器科)

5) 「アスペルギルス・フミガーツスが産生する低分子化合物の生物活性について」 渡辺 哲(千葉大学医学部附属病院感染症管理治療部/千葉大学真菌医学研究センター)

6) 「アスペルギルス属の産生するエラスターゼインヒビター - AFLEI について -」 奥村欣由(名城大学薬学部)

7) 「アスペルギルス属の産生するエラスターゼ - 病原因子としての意義とその対策 -」 小川賢二(国立病院機構東名古屋病院臨床研究部/呼吸器科)

総括: 小川賢二(国立病院機構東名古屋病院臨床研究部/呼吸器科)

閉会の挨拶: 倉島篤行(独立行政法人国立病院機構東京病院)

第 21 回千葉大学真菌医学研究センター講習会

担当：山口 正視

病原真菌講習会は、病原真菌の同定、取り扱いについての講義と実習を行う講習会で、今年で第 21 回を迎え、好評の内に終了することが出来た。今年は 18 名の申し込み者があったが、例年通り受講生を 12 名に限定し、密度の高い講習会とすることが出来た。

期間：2007 年 7 月 24 日（火）～ 27 日（金）

場所：千葉大学真菌医学研究センター講習会室

職種内訳：病 院（検査部）7 名
企 業（研究員）1 名
企 業（検査部）2 名
その他 2 名

地域別受講生：東北 1 名
関東 8 名
中部 2 名
九州 1 名

プログラム：

（講師：山口正視，亀井克彦，田中玲子，三上 襄，矢沢勝清，矢口貴志，西村和子，伊藤純子，横山耕治）

- 7 月 24 日（火） オリエンテーション（山口）
病原真菌・真菌症概論（亀井）
電顕による真菌細胞観察（山口）
輸入真菌症（亀井）
基本手技（田中）
- 7 月 25 日（水） 病原性放線菌（三上・矢沢）
酵母の同定法（田中）
（*Malassezia* 属，*Trichosporon* 属菌を含む）
- 7 月 26 日（木） 病原性アスペルギルス（矢口）
真菌の保存法，センター案内（横山）
皮膚糸状菌・病原性黒色真菌（西村・伊藤）
- 7 月 27 日（金） 新興病原真菌（矢口）
輸入真菌症原因菌の遺伝子による同定法（横山）
病原性接合菌（矢口）
酵母結果判定（田中）
修了式（三上センター長）

第3回千葉大学真菌医学研究センター外国人講習会

担当：山口 正視

外国人講習会は、アジア地域における人々を対象に、病原真菌の同定、取り扱いについての講義と実習を行う講習会で、今年で3年目を迎えた。本年は中国、タイ、ベトナムから4名の参加者があった。

期間：2007年7月31日（火）～8月3日（金）

場所：千葉大学真菌医学研究センター講習会室

国別受講生：

中 国	Xinjiang Medical University	1名
中 国	Ji Lin University	1名
タ イ	National Institute of Health	1名
ベトナム	Viet Tiep Hospital	1名

プログラム：

（講師：三上 襄，矢口貴志，亀井克彦，田中玲子，西村和子，山口正視，矢沢勝清，横山耕治，五ノ井 透，川本 進）

- 7月31日（火） Introduction (Director, Mikami)
Basic mycology (lecture, Yaguchi)
Laboratory diagnosis (lecture, Kamei)
Laboratory techniques (practice, Yaguchi)
Observation of *Aspergillus* and related

fungi (lecture and practice, Yaguchi)

- 8月1日（水） Taxonomy on pathogenic yeasts (lecture and practice, Tanaka)

Dermatophytes, dematiaceous fungi and *Sporothrix* (lecture and practice, Nishimura and Yaguchi)

- 8月2日（木） Transmission electron microscopy (lecture and practice, Yamaguchi)

Scanning electron microscopy (lecture and practice, Yaguchi)

Nocardia identification by physiological and chemotaxonomic methods

(lecture and practice, Mikami and Yazawa)

- 8月3日（金） Molecular identification of pathogenic fungi (lecture and practice, Yokoyama)

Application of microarray techniques in the identification of pathogenic fungi (lecture, Gono)

Proteomic analysis and new techniques in molecular medical mycology (lecture, Kawamoto)

Closing ceremony

第3回千葉大学真菌医学研究センター公開市民講座開催

2007年5月13日(日), 西千葉キャンパスけやき会館大ホールにて, 第3回目となる真菌医学研究センター主催の公開市民講座を開催した。参加者は247名を数え, 大いに活況を呈した。

テーマ: 「カビ!? ～そろそろ気になりますね～ Part 2」
演題: カビが医療を襲う! ～いま, なにが起きているのか～

渡辺 哲

(千葉大学病院/真菌センター 助教)

家庭内の微生物による不具合と衛生対策

山岸 弘

(ライオン株式会社 副主任研究員)

食品のカビ被害 -カビ毒と私たちの健康-

堀江義一

(前県立中央博物館分館長/真菌センター)

講演内容:

梅雨をはじめとして湿度の高い季節がある我が国ではカビは非常に身近な存在である。食物に生えたり家の中に入り込んできたりするカビは蛇蝎の如く嫌われているが, 一方でカビの力を利用して作られる酒, 味噌, 鰹節, 醤油などは我が国の食生活においてなくてはならないものとなっている。さらに植物, 動物が土に還っていくプロセスを考えれば地球環境にカビの存在は必要欠くべからざるものであることは自明である。

しかしながら一部のカビが我々の生活や健康を脅かしていることもまた明白な事実である。本講座ではそういうカビの好ましくない面を中心に講演が行われた。まず本学附属病院/真菌センター, 渡辺が先端医療においてカビがどのような問題を引き起こしているのかを紹介し, つづいてライオン株式会社山岸副主任研究員が住環境におけるカビを含めた微生物対策について詳説した。最後に堀江前県立中央博物館分館長/真菌センターが黄変米問題で一躍名を馳せたアフラトキシンなどのカビ毒について解説を行った。

講演会（第105回～第113回）

- 第105回 1月12日
場所：センター講堂
Prof. Richard D Cannon (University of Otago, Dunedin, New Zealand)
Allelic variation in *Candida albicans* drug efflux pumps
Dr. Kyoko Niimi (University of Otago, Dunedin, New Zealand)
Inhibition of *Candida albicans* ABC drug efflux pump Cdr1p
(担当：知花博治)
- 第106回 2月2日
場所：センター講堂
福島和貴教授（千葉大学真菌医学研究センター真菌資源開発分野）
分子紀行 in 真菌（退官記念講演）
(担当：横山耕治)
- 第107回 4月24日
場所：センター講堂
西田芳弘教授（千葉大学園芸学研究科応用生命化学）
糖を分子基盤とする感染症攻略素材の開発研究
(担当：川本 進)
- 第108回 7月9日
場所：センター講堂
豊留孝仁博士（千葉大学真菌医学研究センター真菌感染分野）
Aspergillus fumigatus 処理における宿主転写因子 AP-1 活性化機構の解明/*Histoplasma* 抗原の同定及びその抗原を用いた迅速診断法の検討
(担当：川本 進)
- 第109回 7月12日
場所：センター講堂
Eric Virtudazo 博士（千葉大学真菌医学研究センター機能形態分野）
Towards understanding cell cycle control in *Cryptococcus neoformans*
(担当：川本 進)
- 第110回 7月17日
場所：センター講堂
五ノ井 透教授（千葉大学真菌医学研究センター系統・化学分野）
TaqMan PCR 法を用いた *Aspergillus fumigatus* の定量
(担当：川本 進)
- 第111回 7月18日
場所：センター講堂
横山耕治准教授（千葉大学真菌医学研究センター真菌資源開発分野）
リアルタイム PCR による真菌症原因菌の迅速同定法の開発及び評価
(担当：川本 進)
- 第112回 7月23日
場所：センター講堂
小暮高久博士（千葉大学真菌医学研究センター高分子活性分野）
Candida 属酵母における P450 遺伝子発現制御の解析とその物質生産への応用及び病原性放線菌における薬剤耐性遺伝子の解析
(担当：川本 進)
- 第113回 11月12日
場所：センター講堂
Professor Li Ruoyu (Peking University First Hospital, Beijing, China)
Recent advances on penicillosis marneffeii study in China
Associate professor Dr. Liu Wei (Peking University First Hospital, Beijing, China)
Antifungal resistance - some results concerning with *Aspergillus* spp.
(担当：三上 襄)

2007 真菌医学研究センター報告会

日時: 平成 19 年 12 月 21 日 12:40 ~ 17:30

会場: B1 講堂

三上 襄 センター長 挨拶

高分子活性分野

三上 襄 教授

知花博治 准教授

宇野 潤 助教

機能形態分野

川本 進 教授

山口正視 准教授

清水公德 助教

伊藤恵美子 助教

大楠美佐子 技術職員

Virtudazo V. Eric 特任教員

真菌資源, 生態分野

王 麗 外国人客員教授

横山耕治 准教授

田口英昭 助教

系統・化学分野

五ノ井 透 教授

矢口貴志 准教授

田中玲子 助教

松澤哲宏 技術職員

真菌感染分野

亀井克彦 教授

佐野文子 准教授

栗田啓幸 助教

大荒田素子 助教

渡辺 哲 助教 (兼任)

落合恵理 リサーチレジデント

豊留孝仁 研究機関研究員

報告会ワーキンググループ委員

知花博治 (ワーキンググループ長)

伊藤恵美子

滝澤香代子

松澤哲宏

鎗田響子

真菌医学研究センター 2007 年度ベスト論文賞

真菌センターでは、教員の研究意欲の向上を目指して、これまで、研究推進チームに依頼して、優れた企画と将来性が見込まれる研究プロジェクトを選んでセンター長の裁量経費を重点的に配分して、研究の活性化を図ってきました。3年目を迎える今年は、それらの資金の配分効果が期待できることから、発表した優れた成果に対してベスト論文賞を創設して、さらなる研究の発展の刺激となることを企画しました。研究業績は、一般にはImpact factor (IF) やScientific Citation Index (SCI) 等を用いて、点数化して評価することが多く、教員採用などにも広く利用されてきました。しかし、病原真菌の研究分野は、小さな研究者集団であることから、いろいろな問題もあることも明らかであり、真菌センターでは、独自の評価方式での数値化も図ってきており、本ベスト論文賞の選考においては、IF や SCI での評価以外に、センターのミッションに沿った研究論文についても、その価値を加味して評価することにしました。また、実際の選考は、今年度は、上記の選考基準に基づき研究推進チームのリーダーとサブリーダー（川本教授、亀井教授）に推薦していただき、センター長が決定することにより行いました。最近、新たな評価方法として、H 指数 (h-index) が研究者のより客観的な評価法として、利用されるようになってきました。今後は、この指数もうまく加味して、ベスト論文を決定したいと考えていますが、選考に困る程の多くの論文が投稿されることを期待しています。

(A) 教員: 矢口貴志

Yaguchi T, Tanaka R, Nishimura K, Udagawa S: Molecular phylogenetics of strains morphologically identified as *Fonsecaea pedrosoi* from clinical specimens. *Mycoses* 50: 255-260, 2007.

Yaguchi T, Horie H, Tanaka R, Matsuzawa T, Ito J, Nishimura K: Molecular phylogenetics of multiple genes on *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from clinical specimens in Japan. *Japanese Journal of Medical Mycology* 48: 37-46, 2007.

(B) ポスドク: 豊留孝仁

Toyotome T, Adachi Y, Watanabe A, Ochiai E, Ohno N, Kamei K: Activator protein I is triggered by *Aspergillus fumigatus* β -glucans surface-exposed during specific growth stages. *Microbial Pathogenesis* 44: 141-150, 2008.

(C) 院生

(院生1) 上野圭吾

Ueno K, Uno J, Nakayama H, Sasamoto K, Mikami Y, Chibana H: Development of a highly efficient gene targeting system induced by transient repression of YKU80 expression in *Candida glabrata*. *Eukaryotic Cell* 6: 1239-1247, 2007.

(院生2) 村田佳輝

Murata Y, Sano A, Ueda Y, Inomata T, Takayama A, Poonwan N, Nanthawan M, Mikami Y, Miyaji M, Nishimura K, Kamei K. Molecular epidemiology of canine histoplasmosis in Japan. *Medical Mycology* 45: 233-247, 2007.

————— 編 集 委 員 会 —————

- 川 本 進 (分子機能研究部門 機能形態分野・委員長)
- 佐 野 文 子 (病原真菌研究部門 真菌感染分野)
- 矢 口 貴 志 (病原真菌研究部門 系統・化学分野)
- 横 山 耕 治 (病原真菌研究部門 真菌資源開発分野)
- 山 口 正 視 (分子機能研究部門 機能形態分野・ワーキンググループ長)
- 知 花 博 治 (分子機能研究部門 高分子活性分野)

平成 20 年 3 月発行

編集発行者

千葉大学真菌医学研究センター

〒 260-8673

千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号

電話 043 (222) 7171 (代)

印刷社 株式会社 正文社

〒 260-0001

千葉市中央区都町 1-10-6

電話 043 (233) 2235 (代)

POST CARD

〒260-8673 千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号

千葉大学真菌医学研究センター 御中

Medical Mycology Research Center (MMRC),
Chiba University

1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8673
Japan

郵便はがき

2608673

No. _____

千葉大学真菌医学研究センター報告 第11巻 受領書
Annual Report of Medical Mycology Research Center (MMRC),
Chiba University, No.11 (2007)

日付 Date: _____

機 関 名

Institution: _____

所 在 地 (〒 -)

Address : _____

1. この刊行物を今後も必要とします
Further issues of this publication are wanted.
2. この刊行物を必要としません
This publication is no more wanted.

署 名

Signature: _____



CHIBA UNIVERSITY
2007