

令和元年6月25日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09954

研究課題名(和文) 呼吸器糸状菌感染症のゲノム基盤構築による局所感染機構の解明と診断・治療法への応用

研究課題名(英文) Elucidation of local infection mechanism by genome infrastructure construction of respiratory filamentous fungal infection and application to diagnosis and treatment

研究代表者

梅山 隆 (Umeyama, Takashi)

国立感染症研究所・真菌部・主任研究官

研究者番号：20360696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：多剤耐性真菌 *Scedosporium prolificans* および *Cunninghamella bertholletiae* のゲノム解読を次世代シーケンサーにより行った。*Aspergillus lentulus* および *Aspergillus viridinutans* に CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を導入するためのプラスミドを構築した。Cas9 蛋白および合成した guide RNA を導入することにより、臨床分離株の *Cyp51A* に遺伝子変異を導入することに成功した。薬剤耐性に関わると予想されるアミノ酸変異を導入することにより耐性への寄与を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

临床上重要な病原真菌のゲノム基盤構築により、新たな抗真菌薬の標的探索に繋がるような基礎研究が推進されることが期待できる。本研究によって呼吸器における病原糸状菌の感染成立に必要な分子が発見されれば、真菌症治療法や早期診断法の開発への応用などに新しい展開をもたらすものと期待される。また、ゲノム編集技術を導入したことにより、近年大きな問題になっている抗真菌薬耐性問題に対する原因解明につながる可能性も考えられる。

研究成果の概要(英文)：Whole genome sequencing of multi-drug resistant fungi *Scedosporium prolificans* and *Cunninghamella bertholletiae* was performed by next-generation sequencer. We constructed a plasmid for CRISPR/Cas9 genome editing in *Aspergillus lentulus* and *Aspergillus viridinutans*. We succeeded in site-directed mutation in *Cyp51A* of clinical isolates by transformation of ribonucleoprotein consisting of Cas9 protein and in vitro synthesized single-guide RNA. By use of this technique, we verified the contribution of amino acid mutation which might be involved in drug resistance.

研究分野：医真菌学

キーワード：真菌症 糸状菌 ゲノム編集 ゲノム解析 薬剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 糸状菌による呼吸器関連真菌症: カビによる全身性の感染症である深在性真菌症が増加の一途を辿っており、年々問題が深刻になってきている。深在性真菌症の中でも侵襲性アスペルギルス症は、好中球減少症や造血幹細胞移植患者などに発症し、現在最も有効とされている治療薬を用いてもなお致死率が50%を超える。また、接合菌症やスクドスポリウム症などのその他の糸状菌による肺真菌症も重篤化しやすい。菌種により抗真菌薬スペクトルが大きく異なり、糸状菌は培養陽性率が極端に低く、診断の遅れから治療に難渋することが多い。さらに、近年はアゾール系抗真菌薬の標的分子の変異による薬剤耐性や抗真菌薬自然耐性を有する隠蔽種の出現による難治化が臨床で大きな問題になっている。早期迅速診断法や新しい治療法の開発が期待されているが、糸状菌による肺局所的な感染成立機構の詳細は未だ明らかになっていない。

(2) 肺胞上皮細胞との相互作用: 一般に、糸状菌による肺感染症は、環境中から吸入された分生子が、気管支や肺胞の上皮細胞に接着し細胞内に侵入する。申請者の予備実験より、*Aspergillus fumigatus* について以下の2つの現象を捉えている。アスペルギルスの菌糸が肺胞上皮に接着する際、菌糸から生産される蜘蛛の糸状の繊維と肺胞上皮細胞の表面にある繊毛とがお互いに接触している現象を走査型電子顕微鏡で捕らえている。蛍光イメージングにより、アスペルギルスの菌糸が肺胞上皮細胞の細胞膜に包み込まれることを明らかにした。しかも、菌糸によって貫かれた複数の細胞は構造を保ったまま生きていた。

2. 研究の目的

上記の2つの現象は未だにそのメカニズムは明らかにされておらず、感染機序の解明のためにも重要である。また、他のアスペルギルス属や糸状菌による感染成立機構はほとんど明らかにされていない。本研究は重篤化しやすい呼吸器関連糸状菌感染症における、肺胞上皮細胞への接着および肺胞上皮細胞内での菌糸生育のメカニズムを解明し、早期診断法や新しい治療法の開発の足がかりとすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 多剤耐性真菌 *Scedosporium prolificans* および *Cunninghamella bertholletiae* を静置培養により菌体を回収し、ゲノムDNAを精製した。DNA抽出はフェノールクロロホルムを用いたビーズ破碎法により行った。全ゲノム解析をIllumina NextSeqおよびPacBio Sequelを用いて行った。

(2) *Aspergillus fumigatus* の隠蔽種である *Aspergillus lentulus* および *Aspergillus viridinutans* にCRISPR/Cas9ゲノム編集技術を導入するために、ピリチアミン耐性マーカーを有する自律複製型ベクター-pPTRII上でCas9蛋白およびsingle-guide RNAを発現させるプラスミドを構築し、プロトプラスト-PEG法により形質転換を行った。guide RNAを発現させる方法として、SNR52プロモーターから転写する方法とtRNAのプロセッシングを利用する方法を採用した。

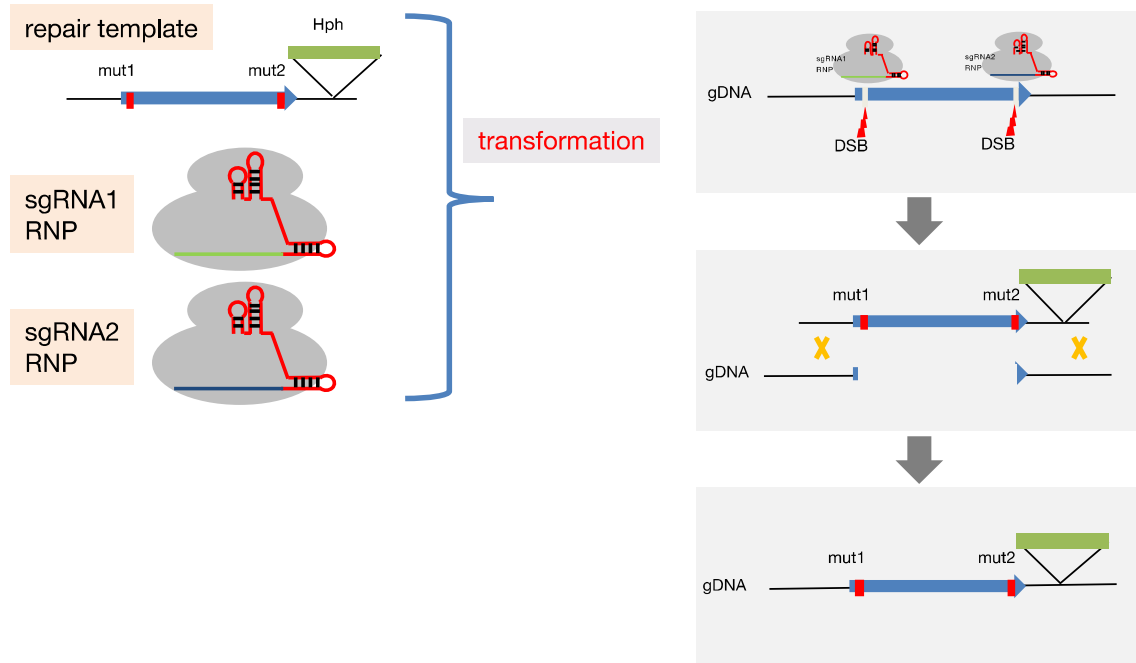
(3) *A. fumigatus* において、アゾール薬の標的分子Cyp51Aに遺伝子変異を導入するために、Cas9蛋白および合成single-guide RNAを直接形質転換する方法を開発した。guide RNAはNEB EnGen sgRNA synthesis kitを用いて合成し、Zymoresearch RNA clean & concentrator 25により精製した。変異導入のためのhygromycinマーカーを含んだrepair templateは、PCRにより増幅した。Cas9蛋白、合成sgRNA、repair templateを同時にプロトプラスト-PEG法により形質転換を行った。

4. 研究成果

(1) ゲノム分子基盤の構築のために、多剤耐性真菌 *Scedosporium prolificans* および *Cunninghamella bertholletiae* のゲノム解読を次世代シーケンサーにより行った。それぞれ、33.2 Mb および 32.2 Mb のゲノムサイズであった。今後、多剤耐性真菌 *S. prolificans* および *C. bertholletiae* について、Cas9/CRISPR ゲノム編集技術を導入することを目標に研究を進めていく。

(2) *A. lentulus* および *A. viridinutans* に CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を導入するためにプラスミドを構築した。ウラシル要求性マーカー *pyrG* を標的としてプラスミドを形質転換することにより、*pyrG* の変異を誘発することに成功した。また、ゲノム編集技術の変異導入効率を上げるために、tRNA のプロセッシングを利用する方法を採用したところ、*A. fumigatus* の色素生産遺伝子 *pksP* への変異導入効率を、従来の 10% 程度から 90% 以上にまでの改良に成功した。

(3) *A. fumigatus* において Cas9 蛋白および合成した guide RNA を導入することにより、臨床分離株の Cyp51A に遺伝子変異を導入することに成功した(図1)。この方法を応用して Cyp51A の、薬剤耐性に関わると予想されるアミノ酸変異を導入することにより耐性への寄与を検証した。単一でアゾール耐性を賦与すると推測される 6 種類のアミノ酸変異、および、TR34/L98H、TR46/Y121F/T289A、TR53 の 3 種類の TR シリーズについてそれぞれ、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術により塩基置換やプロモータ配列挿入を行った。感受性試験を行った結果、過去の報告と同様の傾向を示した。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Umeyama Takashi, Hayashi Yuta, Shimosaka Hisaki, Inukai Tatsuya, Yamagoe Satoshi, Takatsuka Shogo, Hoshino Yasutaka, Nagi Minoru, Nakamura Shigeki, Kamei Katsuhiko, Ogawa Kenji, Miyazaki Yoshitsugu, CRISPR/Cas9 Genome Editing To Demonstrate the Contribution of Cyp51A Gly138Ser to Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 査読有, Vol.62, 2018, e15264,

DOI: 10.1128/AAC.00894-18

Takatsuka Shogo, Inukai Tatsuya, Kawakubo Shun, Umeyama Takashi, Abe Masahiro, Ueno Keigo, Hoshino Yasutaka, Kinjo Yuki, Miyazaki Yoshitsugu, Yamagoe Satoshi, Identification of a Novel Variant Form of *Aspergillus fumigatus* CalC and Generation of Anti-CalC Monoclonal Antibodies, Medical

Mycology Journal、査読有、Vol.60、2019、p.11-16、

DOI: 10.3314/mmj.18-00013

Kobayashi Keigo, Asakura Takanori, Kawada Ichiro, Hasegawa Hanako, Chubachi Shotaro, Ohara Kentaro, Kuramoto Junko, Sugiura Hiroaki, Fujishima Seitaro, Iwata Satoshi, Umeyama Takashi, Katano Harutaka, Uwamino Yoshifumi, Miyazaki Yoshitsugu, Kamei Katsuhiko, Hasegawa Naoki, Betsuyaku Tomoko、Disseminated histoplasmosis from a calcified lung nodule after long-term corticosteroid therapy in an elderly Japanese patient、Medicine、査読有、Vol.98、2019、e15264、DOI: 10.1097/MD.00000000000015264

Kitaura Tsuyoshi, Takahashi Masamichi, Umeyama Takashi, Takeshita Nozomi, Katanami Yuichi, Takaya Saho, Yamamoto Kei, Kutsuna Satoshi, Hayakawa Kayoko, Kato Yasuyuki, Yamauchi Takahiro, Narita Yoshitaka, Miyazaki Yoshitsugu, Ohmagari Norio, *Cryptococcus gattii* genotype VGIIa infection imported from Vancouver Island to Japan、Journal of Infection and Chemotherapy、査読有、Vol.24、2018、573-575、

DOI: 10.1016/j.jiac.2017.12.014

〔学会発表〕(計9件)

梅山 隆、壇辻百合香、犬飼達也、中村茂樹、山越 智、名木 稔、田辺公一、大野秀明、宮崎義継、*Aspergillus fumigatus* 隠蔽種の NGS 解析による抗真菌薬耐性の原因解明、第 65 回日本感染症学会東日本地方会学術集会/第 63 回日本化学療法学会東日本支部総会、2016

梅山 隆、犬飼 達也、山越 智、名木 稔、中村 茂樹、宮崎 義継、今話題のアスペルギルス基礎研究は?、第 60 回日本医真菌学会総会・学術集会(招待講演)、2016

梅山 隆、石川 淳、壇辻百合香、犬飼達也、中村茂樹、山越 智、名木 稔、田辺公一、大野秀明、宮崎義継、次世代シーケンサーを用いた *Aspergillus fumigatus* 近縁種の網羅的ゲノム解析による抗真菌薬耐性の原因解明、第 64 回日本化学療法学会総会、2016

梅山 隆、林 悠太、中村茂樹、中山靖子、壇辻百合香、下坂寿希、犬飼達也、名木 稔、山越智、小川賢二、宮崎義継、アスペルギルス症におけるアスペルギルス属の重複感染の検証、真菌症フォーラム第 23 回学術集会、2018

T. Umeyama, Y. Hayashi, H. Shimosaka, T. Inukai, S. Yamagoe, M. Nagi, S. Nakamura, K. Ogawa, Y. Miyazaki、Mutations in the *cyp51A* gene of an azole resistant clinical isolate of *Aspergillus fumigatus*: direct proof using Cas9/CRISPR genome editing.、8th Advances Against Aspergillosis、2018

Takashi Umeyama、Cas9/CRISPR genome editing to prove the contribution of Cyp51A G138S to azole resistance in *Aspergillus fumigatus*、the 7th Global Network Forum on Infection and Immunity、2018

Takashi Umeyama, Yuta Hayashi, Hisaki Shimosaka, Tatsuya Inukai, Satoshi Yamagoe, Minoru Nagi, Shigeki Nakamura, Kenji Ogawa, Yoshitsugu Miyazaki、Cas9/CRISPR genome editing to prove contribution of Cyp51A G138S to azole resistance in *Aspergillus fumigatus*、20th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology、2018

梅山 隆、犬飼達也、山越 智、名木 稔、中村茂樹、小川賢二、宮崎義継、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術による *Aspergillus fumigatus* ポリコナゾール耐性変異の検証、第 92 回日本感染症学会総会・学術講演会 第 66 回日本化学療法学会学術集会 合同学会、2018

梅山 隆、林 悠太、下坂寿希、犬飼達也、山越 智、名木 稔、中村茂樹、小川賢二、宮崎義継、臨床分離されるアゾール耐性アスペルギルス属に対する新しい分子機構検証技術の導入、真菌症フォーラム第 24 回学術集会、2018

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし