

平成21年 5月15日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18510201

研究課題名（和文） 病原真菌の系統分類学および生態学的研究

研究課題名（英文） Phylogenetical and ecological studies of pathogenic fungi

研究代表者

氏名（ローマ字）：田中 玲子（TANAKA REIKO）

所属機関・部局・職：千葉大学・真菌医学研究センター・助教

研究者番号：60143319

研究成果の概要：

深在性黒色真菌症の原因菌では、日本産の株は同様の病型であるにも関わらず欧米産の菌株とは異なった種であることが判明し、生態学的に興味ある知見が得られた。日和見真菌感染症の原因菌のアスペルギルス属菌では、系統解析結果と生育温度、薬剤感受性、微細構造において明確な相関が見いだされた。中国乾燥地帯で分離された株は、他の地域での分離例が無い株であった。薬剤抵抗性を示すことで臨床上問題な菌種や加工食品の事故原因菌となる耐熱性菌において、迅速同定法を確立した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,700,000	660,000	4,360,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：資源保全学・資源保全学

キーワード：遺伝子，生態学，菌類，微生物，分類学

## 1. 研究開始当初の背景

生物情報の基本である DNA 塩基配列を解析する技術が近年急速に進歩し、あらゆる生物においてその技術が利用されている。たとえば、DNA 塩基配列の比較による親子鑑定、個体識別などはテレビドラマでは既に充分なじみ深い話題である。これと同様に、生物学的な視点においては、これまで形態学的、生理学的な検索により生物種の区別（鑑別）・同定や系統関係について議論されてきたものが、この DNA 塩基配列の情報を取り入れることで新たな展開を示してきているのは事実である。し

かしながら、ややもすると多くの研究者達は新規法（DNA 塩基配列）ばかりに多くを依存し、微細な塩基配列の相違を以て、新種の記載に地道をあげているような状態である。

## 2. 研究の目的

本研究では、病原真菌において、新規法（DNA 塩基配列決定）と従来法（形態、生理）との双方で検討することにより、生物としてよりふさわしい系統関係を見出すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

- (1) 新規法: 千葉大学真菌医学研究センターに保存の真菌(酵母, 糸状菌)について, 各種遺伝子の塩基配列の解析を常法にて行った. 酵母菌を中心に RAPD 解析法や ALTS-PCR と  $\mu$ TGGE (温度勾配電気泳動) の組み合わせにより遺伝子型の決定を行った.
- (2) 従来法: 形態観察 (巨大集落法, スライドカルチャー法), 最高生育温度 (対照温度を 25°C として, 37~45°C について発育の有無を観察), 子のう胞子の表面構造については, 走査型電子顕微鏡による観察を行った.

### 4. 研究成果

- (1) 病原性酵母の同定, 遺伝子型に関する検討
  - ・真菌医学研究センターに保存されている *Trichosporon* 属菌について, 種の判別形質を明らかにするために再同定を行った. D1D2 による塩基配列検索により, 誤った種名で登録されたものを訂正することができた. また, *T. faecale* に関しては, 2つの系統群が混在する事が認められたが, その他の指標を含めて詳細検討を行った結果, 最近新種として報告された菌種と判明した.
  - ・*Malassezia* 属菌に関して, ある病院の小児 ICU より複数分離された菌株について ITS, D1D2 のシーケンスによる同定, typing を行った. Typing には3種類のプライマーを用いた RAPD 解析を実施した. 分離菌はすべて *M. furfur* と同定され, typing の結果はすべて別々の strain であることが判明し, 院内感染の危惧は払拭され, 本法による有効性が実証された.
  - ・中国新疆ウイグル自治区に在住の AIDS 患者より分離した *C. albicans* について, 遺伝子型の決定と薬剤感受性試験を行い, 他の地域のデータと比較した. 分離株のうち7株のフルコナゾール耐性株が見いだされたが, ALTS-PCR と  $\mu$ TGGE (温度勾配電気泳動) の手法を組み合わせる事により, 互いに別系統の株である事が示された.
- (2) 病原性黒色真菌に関する生態学的検討

深在性黒色真菌症の原因菌として知られている *Fonsecaea pedrosoi* について, ITS 領域について系統解析を行なったところ, 日本産の *F. pedrosoi* はすべて de Hoog 等が新規提唱した *F. monophora* であった. 日本産の株は, 同様の病型であるにも関わらず欧米産の菌株とは異なった種であることが判明し, 生態学的に興味ある知見が得られた.

### (3) 深在性真菌症原因菌としての *Aspergillus* 属菌の系統学および生態学的検討

センター保存株について, 日和見真菌感染症の原因菌として代表的な *Aspergillus fumigatus* 近縁菌を, 複数の遺伝子 ( $\beta$ -チューブリン, カルモジュリン, ハイドロフォビン, ITS) を基にした系統解析とそれぞれのクラスターにおける性状と関連性を調べたところ, 生育温度, 各種抗真菌剤に対する感受性, 分生子の微細構造において明確な相関が見いだされた. さらに, 中国乾燥地帯で分離された *Aspergillus* 属菌種について行った系統解析の結果では, 分子系統と子のう胞子の微細構造, 最高生育温度において相関が確認された. この過程で他の地域では分離されたことの無い特徴的な種が分離されたことが判明し, 現在新種としての提唱するために論文作成中である.

### (4) 病原性真菌の迅速同定法の開発

- ・*Pseudallescheria* 関連菌については, ITS 領域の系統解析より, 系統関係の見直しを行った. 特に薬剤抵抗性を示すことで臨床問題となっている *Scedosporium prolificans* の迅速同定プライマーの開発に成功した.
- ・本研究課題進行中に *A. fumigatus* として登録・保存されていた中に *A. lentulus*, *A. viridinutans* として再同定された株が見出され, これら菌種は薬剤感受性が低い事で臨床問題となっており, 迅速に識別できる PCR 法, LAMP 法を開発した.
- ・加工食品の事故原因菌として問題となる耐熱性菌 (*Byssoschlamys*, *Talaromyces*, *Hamigera*, *Neosartorya*) で系統解析を行い, その結果を基に各菌属に特異的なプライマーを設計し, 迅速同定法を確立した.

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ①. 大内健嗣, 佐藤友隆, 吉澤奈穂, 杉浦丹, 矢口貴志, 畑康樹, 外傷後に生じた皮膚 *Pseudallescheria boydii* 感染症の 1 例, 真菌誌, 49 巻, 119-124, (2008) 査読あり
- ②. Kang Y, Iida S, Yamamoto S, Kogure T, Tanaka R, Mikami Y, *Trf4* is a useful gene for discrimination of *Candida tropicalis* from other medically important *Candida* species, Jpn J Med Mycol, 49 巻, 39-43, (2008) 査読あり
- ③. Yaguchi T, Horie Y, 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 巻, 37-46, (2007) 査読あり

- ④. Yaguchi T, Tanaka R, Nishimura K, Udagawa S, Molecular phylogenetics of strains morphologically identified as *Fonsecaea pedrosoi* from clinical specimens, *Mycoses*, 50 巻, 255-260, (2007) 査読あり

[学会発表] (計 20 件)

- ①. Yaguchi T, Horie Y, Matsuzawa T, Tanaka R, Abliz P, Hui Y: Polyphasic taxonomy of pathogenic *Aspergillus fumigatus* and related species in Japan and Xinjiang, China. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum Symposium, Changchun, China, 2008 年 7 月 28 日-8 月 2 日.
- ②. Matsuzawa T, Yaguchi T, Tanaka R, Horie Y, Hui Y, Abliz P: Polyphasic analysis of the genus *Emericella* and new species. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum Symposium, Changchun, China, 2008 年 7 月 28 日-8 月 2 日.
- ③. 矢口貴志, 弘 祐介, 松澤哲宏, 田中玲子, 細谷幸一, 中山素一, 徳田 一: *Aspergillus* section *fumigatus* 関連菌種の形態, 分子系統の相違と迅速同定法の検討. 第 29 回日本食品微生物学会学術総会, 広島, 2008 年 11 月 12-13 日.
- ④. 矢口貴志, 堀江義一, 松澤哲宏, 田中玲子, Abliz, Paride, Hui, Yan: *Aspergillus* section *Fumigati* に分類される非 *A. fumigatus* について. 日本菌学会第 52 回大会, 三重, 2008 年 5 月 30-6 月 1 日.
- ⑤. 松澤哲宏, 矢口貴志, 堀江義一, 田中玲子, 五ノ井 透: *Emericella* 属の多相分類と新種について. 日本菌学会第 52 回大会, 三重, 2008 年 5 月 30-6 月 1 日.
- ⑥. 神戸俊夫, 服部尚生, 田中玲子, 知花博治: RPS/ALT およびマイクロサテライトに基づいた *Candida albicans* のタイピングの評価と genotype variation. 第 52 回日本医真菌学会総会, 長崎, 2008 年 9 月 10-11 日.
- ⑦. Reiko Tanaka, Juhaer Mijiti, Takashi Yaguchi: Genotyping of *Candida albicans* isolated from AIDS patients in Xinjiang, China. 第 52 回日本医真菌学会総会, 長崎, 2008 年 9 月 10-11 日.
- ⑧. 松澤哲宏, 矢口貴志, 堀江義一, 田中玲子, 五ノ井 透: 病原性 *Emericella* 属菌の特異的・迅速的な検出法の開発. 第 52 回日本医真菌学会総会, 長崎, 2008 年 9 月 10-11 日.
- ⑨. 矢口貴志, 堀江義一, 松澤哲宏, 田中玲

子, Paride Abliz, Hui Yan: 病原性 *Aspergillus fumigatus* の系統解析と形態. 第 52 回日本医真菌学会総会, 長崎, 2008 年 9 月 10-11 日.

- ⑩. 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 を指標とした 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, 高山, 2007 年 11 月 9-10 日.
- ⑪. 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, 高山, 2007 年 11 月 9-10 日.
- ⑫. 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, 高山, 2007 年 11 月 9-10 日.
- ⑬. 松澤哲宏, 矢口貴志, 堀江義一, 田中玲子, 五ノ井 透: 新疆土壌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, 高山, 2007 年 11 月 9-10 日.
- 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, 札幌, 2007 年 6 月 26-27 日.
- ⑮. 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, 札幌, 2007 年 6 月 26-27 日.
- ⑯. 今西由己, 二宮真也, 中桐 昭, 田中玲子, 矢口貴志: *Trichosporon* 属の系統分類学的再評価. 日本微生物資源学会第 14 回大会, 札幌, 2007 年 6 月 26-27 日.
- ⑰. 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* 属の評価と新分類について. 日本菌学会第 51 回大会, つくば, 2007 年 5 月 25-27 日.
- ⑱. 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, つくば, 2007 年 5 月 25-27 日.
- ⑲. Yaguchi T, Horie Y, Tanaka R, Matsuzawa T, Ito J, Nishimura K: Classification of pathogenic *Aspergillus* section *Fumigati*. 8th International Mycological Congress, Cairns, Australia, 2006 年 8 月 20-25 日.
- ⑳. 浜野圭一, 田中玲子, 西垣功一, 西村和子: ゲノムプロファイリング (GP) に

よる *Trichosporon* 属菌の簡便迅速識別  
への応用. 第 50 回日本医真菌学会総会,  
東京, 2006 年 10 月 21-22 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 玲子 (TANAKA REIKO)

千葉大学・真菌医学研究センター・助教

研究者番号: 60143319

(2) 研究分担者

矢口 貴志 (YAGUCHI TAKASHI)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

研究者番号: 60361440