

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590457

研究課題名（和文） 侵入因子の制御遺伝子を破壊した動物モデルによる白癬菌病原性発現過程の解析

研究課題名（英文） The investigation on expression and regulation of pathogenic invasive gene in dermatophytes using new transformation system.

研究代表者

槇村 浩一（MAKIMURA KOICHI）

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：00266347

研究成果の概要（和文）：白癬菌の主に侵入因子制御遺伝子破壊株と同野性株を用いた白癬動物モデル実験により、白癬の病原因子候補となっている侵入因子と感染成立とに関わる機序の解明を可能にする以下の研究ツールを研究・開発した。本研究によって、国民病でもある白癬の病態、並びに「侵入因子の制御遺伝子を破壊した動物モデルによる白癬菌病原性発現過程を解析」するための基本的ツールが整備された。

研究成果の概要（英文）：Recently the number of patients affected by dermatophytosis are estimated more than 20% in Japan. For investigation on invasive (pathogenic) factor of dermatophytes, development of methods for destruction of target gene of the fungus is essential. In this study we constructed the original methods which are useful for investigation of invasive factor gene in major dermatophytes; *Trichophyton mentagrophytes* using animal infectious models. At first we reported the new gene transformation system (*Agrobacterium* method) using *Agrobacterium tumefaciens*. Next we construct G418 as the marker of the multiple genes transformation. Finally we developed the Tmku80-destroyed *Trichophyton*, #49 strain. This strain has destroyed gene Tmku80 which is homolog of ku80 gene of *T. mentagrophytes* TIMM2789. By making #49 strain, specific gene destruction became possible, and also we could select target gene freely. At the same time we could compare the pathogenesis between modified gene strain and wild type strain of *Trichophyton* using experimental animal infectious models. Continuously we developed and reported a gene diagnosis system which is useful for human dermatophytosis. The result of this study would contribute to the analysis of clinical condition of dermatophytosis and progress of protection, diagnosis and therapy of the infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：病原性・白癬菌・動物モデル・形質転換・病原因子・遺伝子破壊・遺伝子診断

## 1. 研究開始当初の背景

白癬(水虫、タムシ、シラクモ)は、人類が最も古く認識した感染症である。その患者は今日もなお全人口の10-20%におよび、本症起因菌を保菌している潜在的な患者は50%にも達することが知られている。本症は、我が国のみならず国際的にも患者数として最大の感染症であることは間違いないものの、その疾患があまりに身近であり、また自覚的症状が比較的軽度であることから軽視され続けてきた。しかし、我が国の生活環境および生活習慣の変化に伴い、女性の足白癬増加、家庭内感染の顕在化、動物由来の重症化白癬(ケルスス禿瘡)、さらには柔道・レスリングなどの Contacting Sports に関連した輸入白癬菌による体部および頭部白癬の爆発的な拡散急増が社会的にも問題となりつつある。これら白癬の制御を講ずる上で、感染症としての本症の発症機序ならびに本症起因菌の病原性に関する知見が、今まさに求められている。

そこで我々は、既に従来顧みられることなく放置されていた白癬菌の侵入因子(病原因子)およびその調節因子に関わる遺伝子のクローニングおよび形質転換、ならびに遺伝子破壊系を独自に確立し、報告してきた。

## 2. 研究の目的

白癬における病理的および超微細形態的に解析することによって、その病態を明らかにし、白癬の病原因子候補となっている侵入因子と感染成立とに関わる機序の解明を可能とするため、白癬動物モデル作成の為のツールを作成する。これによって、我々の従来の研究成果を基に、白癬菌の主に侵入因子制御遺伝子破壊株と同野性株を用いた白癬動物モデル実験を可能に

する。

## 3. 研究の方法

我々の検討によって明らかとなった侵入因子またはその他の因子を、個別に同定し、被検白癬菌株の個々の因子を破壊した株を作出した。その上で、非破壊株または野性株との比較対照実験を *in vitro* および *in vivo* 実験にて検討することによって、白癬制御の標的となりうる病原因子の特定を試みた。

担当としては、研究の立案・総括に加えて菌学的検討と遺伝子解析は槇村、遺伝子操作と動物実験は山田、超微細形態学的検討は西山が行った。

我々の検討から明らかとなった角質侵入、あるいは角質内形態異常に関連する因子を調節する遺伝子について、その調節する蛋白分解酵素群の各因子についての検討を行った。

この際、各調節遺伝子破壊株と野性株を比較対照としたザイモグラム解析によって当該蛋白分解酵素を特定し、そのアミノ酸配列を解読後、遺伝子を推定・クローニングを行った。

次に、ここで単離した病原(侵入)因子候補の各々の遺伝子を破壊し、*in vitro* 実験による表現形質レベルの検討を経て、白癬モデル動物を用いた *in vivo* 実験の可能性を検討した。

## 4. 研究成果

我々は、本研究によって(1)白癬病態の(初期侵入)成立に必要な侵入因子ならびに(2)侵入因子の発現制御システム(3)白癬感染病態研究に必要な遺伝子のクローニング・形質転換、ならびに遺伝子破壊系の技術開発に成功した。併せて、動物モデルにおける白癬感染を定量

的に評価する目的で、ヒト臨床にも応用可能な白癬菌の遺伝子診断法を併せて開発・報告した。以上の研究成果によって、国民病でもある白癬の病態、並びに「侵入因子の制御遺伝子を破壊した動物モデルによる白癬菌病原性発現過程を解析」するための基本的ツールが整備され、分子生物学的知見に基づいた白癬の予防・診断・治療に関わる新たな知と技術の創出が可能となった。

#### 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] すべて査読有 (43 件)

- 1) Onozaki M, Makimura K, Hasagawa A: Rapid identification of *Prototheca zopfii* by nested polymerase chain reaction based on the nuclear small subunit ribosomal DNA. *Journal of Dermatological Science* 54(1):56-59, 2009.
- 2) Koga H, Nanjoh Y, Makimura K, Tsuboi R: In vitro antifungal activities of luliconazole, a new topical imidazole. *Medical Mycology* 47(6):640-647, 2009.
- 3) Yamada T, Makimura K, Satoh K, Umeda Y, Ishihara Y, Abe S: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the dermatophyte, *Trichophyton mentagrophytes*: an efficient tool for gene transfer. *Medical Mycology* 47(5):485-494, 2009
- 4) Yamamura M, Makimura K, Ota Y: Evaluation of a new rapid molecular diagnostic system for *Plasmodium falciparum* combined with DNA filter paper, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and melting curve analysis. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 62(1): 20-25, 2009.
- 5) AlShahni MM, Makimura K, Yamada T, Satoh K, Ishihara Y, Takatori K, Sawada T: Direct Colony PCR of Several Medically Important Fungi using Ampdirect® Plus. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 62(2):164-167, 2009.
- 6) Uchida T, Makimura K, Ishihara K, Goto H, Tajiri Y, Okuma M, Fujisaki R, Uchida K, Abe S, Iijima M: Comparative study of direct PCR, microscopic examination, and culture-based morphological methods for detection and identification of dermatophytes in nail and skin samples. *Journal of Dermatology* 36(4): 202-208, 2009.
- 7) Ogawa H, Fujimura M, Takeuchi Y, Makimura K: Is *Bjerkandera adusta* important to fungus-associated chronic cough as an allergen? Eight cases report. *Journal of Asthma* 46(8):849-55, 2009.
- 8) Ogawa H, Fujimura M, Takeuchi Y, Makimura K: Efficacy of itraconazole in the treatment of patients with chronic cough whose sputa yield basidiomycetous fungi; fungus-associated chronic cough (FACC) *Journal of Asthma* 46(4):407-12, 2009.
- 9) Saito T, Shime N, Itoh K, Fujita N, Saito Y, Shinozaki M, Shibuya K, Makimura K, Hashimoto S: Serum Galactomannan Negative Disseminated Aspergillosis In An Intensive Care Unit; A Case Report. *Infection* 2009, in press.
- 10) Ebihara M, Makimura K, Sato K, Abe S, Tsuboi R: Molecular detection of dermatophytes and nondermatophytes in onychomycosis by nested PCR based on 28S ribosomal RNA gene sequences. *British Journal of Dermatology* 161(5):1038-1044,

- 2009.
- 11) Sugita T, Suzuki M, Goto S, Nishikawa A, Hiruma M, Yamazaki T, Makimura K: Quantitative analysis of the cutaneous *Malassezia* microbiota in 770 healthy Japanese by age and gender using a real-time PCR assay. *Medical Mycology* May 21:1-5, 2009.
  - 12) Ogawa H, Fujimura M, Takeuchi Y, Makimura K: The importance of basidiomycetous fungi cultured from sputum of chronic idiopathic cough. *Respiratory Medicine* 103(10):1492-7, 2009.
  - 13) Yamamura M, Makimura K, Fujisaki R, Satoh K, Kawakami S, Nishiya H, Ota Y. Polymerase chain reaction assay for specific identification of *Candida guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*). *J Infect Chemother.* 15(4):214-8, 2009.
  - 14) Satoh K, Ooe K, Nagayama H, Makimura K. *Prototheca cutis* sp. nov., a newly discovered pathogen of protothecosis isolated from inflamed human skin. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009, in press.
  - 15) Yamada T, Makimura K, Hisajima T, Ishihara Y, Umeda Y, Abe S. Enhanced gene replacements in Ku80 disruption mutants of the dermatophyte, *Trichophyton mentagrophytes*. *FEMS Microbiol Lett.* 298(2):208-17, 2009.
  - 16) Kimura M, Udagawa SI, Makimura K, Satoh K, Toyazaki N, Ito H. Isolation and identification of *Rhizomucor pusillus* from pleural zygomycosis in an immunocompetent patient. *Medical Mycology* 47(8): 869-873, 2009.
  - 17) Kishimoto Y, Kano R, Maruyama H, Onozaki M, Makimura K, Ito T, Matsubara K, Hasegawa A, Kamata H. 26S rDNA-based phylogenetic investigation of Japanese cattle-associated *Prototheca zopfii* isolates. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2009, in press.
  - 18) Alshahni M, Makimura K, Yamada T, Takatori K, Sawada T. Nourseothricin acetyltransferase: a new dominant selectable marker for the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*. *Medical Mycology* 2009, in press.
  - 19) Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiology and Immunology* 53(1):41-4, 2009.
  - 20) Kaneko T, Shiota R, Shibuya S, Watanabe S, Umeda Y, Takeshita K, Yamamoto M, Nishioka K, Makimura K: Human External Ear Canal as the Specific Reservoir of *Malassezia slooffiae*. *Medical Mycology* 2009, in press.
  - 21) Mirhendi H, Moazeni M, Nikaeen M, Makimura K. Typing of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* Strains by Random Amplification of Polymorphic DNA Analysis Using a Six Primer Set. *Shiraz E-Medical Journal* 10(4):190-200, 2009.
  - 22) Uemura N, Makimura K, Onozaki M, Otsuka Y, Shibuya Y, Yazaki H, Kikuchi Y, Abe S, Kudoh S: Development of loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing *Pneumocystis pneumonia*. *Journal of Medical Microbiology* 57(1):50-7, 2008.
  - 23) Yamada T, Makimura K, Hisajima T, Ito M, Umeda Y, Abe S: Genetic transformation of

- the dermatophyte, *Trichophyton mentagrophytes*, based on the use of G418 resistance as a dominant selectable marker. *Journal of Dermatological Science* 49(1):53-61, 2008.
- 24) Fijisaki R, Makimura K, Hayashi T, Yamamura M, Yamaoka T, Shiraishi K, Ishihashi S, Kawakami S, Kurihara T, Nishihya H: Exotic myiasis caused by 19 larvae of *Cordylobia anthropophaga* in Namibia and identified using molecular methods in Japan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102(6):599-601, 2008.
- 25) Osumi T, Kishimoto Y, Kano R, Maruyama H, Onozaki M, Makimura K, Ito T, Matsubara K, Hasegawa A: *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. *Veterinary Microbiology* 131(3-4):419-423, 2008.
- 26) Kano R, Sano A, Makimura K, Watanabe S, Nishimura K, Yamaguchi H, Hasegawa A: A new genotype of *Arthroderma benhamiae*. *Medical Mycology* 46(7):739-744, 2008.
- 27) Hisajima T, Maruyama N, Tanabe Y, Ishibashi H, Yamada T, Makimura K, Nishiyama Y, Funakoshi K, Oshima H, Abe S: Protective effects of farnesol against oral candidiasis in mice. *Microbiology and Immunology* 52(7):327-33, 2008.
- 28) Kalkanci A, Mekha N, Poonwan N, Makimura K, Sugita T: Comparative evaluation of *Trichosporon asahii* susceptibility using ASTY colorimetric microdilution and CLSI M27-A2 broth microdilution reference methods. *Microbiol Immunol* 52(9): 435-439, 2008.
- 29) Satoh K, Makimura K: *Sporobolomyces koalae* sp. nov., a novel basidiomycetous yeast isolated from the nasal smear of Queensland koalas kept in a Japanese zoological park. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58(Pt 12): 2983-2986, 2008.
- 30) Kikuchi K, Sugita T, Makimura K, Urata K, Someya T, Sasaki T, Kamei K, Niimi M, Hiramatsu K, Uehara Y: Is *Histoplasma capsulatum* a native inhabitant of Japan? *Microbiology and Immunology* 52(9):455-459, 2008.
- 31) Kano R, Sano A, Makimura K, Watanabe S, Nishimura K, Yamaguchi H, Hasegawa A: A new genotype of *Arthroderma benhamiae*. *Medical Mycology* Nov 46(7):739-44, 2008.
- 32) Tani K, Adachi M, Nakamura Y, Kano R, Makimura K, Hasegawa A, Kanda N, Watanabe S. The effect of dermatophytes on cytokine production by human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 299(8):381-7, 2007.
- 33) Mirhendi H, Diba K, Kordbacheh P, Jalalizand N, Makimura K: Identification of pathogenic *Aspergillus* species by a PCR-restriction enzyme method. *Journal of Medical Microbiology* 56(11):1568-70 2007.
- 34) Kaneko T, Makimura K, Abe M, Shiota R, Nakamura Y, Kano R, Hasegawa A, Sugita T, Shibuya S, Watanabe S, Yamaguchi H, Abe S, Okamura N: Revised culture based identification system for *Malassezia* *Journal of Clinical Microbiology* 45(11):3737-42, 2007.

[学会発表] (77件)

- 1) Koichi MAKIMURA, Kazuo SATOH,

Tsuyoshi YAMADA, Yayoi NISHIYAMA,  
Shigeru ABE, Yuuji TSUKII, Takashi  
SUGITA, Kosuke TAKATORI, Yoshimi  
BENNO, Takashi YAMAZAKI: Development  
of Analyzing System for Microbial Flora on  
board Space Station and Astronauts. The 5th  
ISLSWG International Workshop on Space  
Microbiology, Tokyo, Sep. 19th-21st, 2007.  
他

図書(37件)

- 1) 榎村浩一 真菌症の診断と治療 ハリソン内  
科学 第3版 Part7 感染症 Section 16  
真菌および微細藻類感染症 p1304-1306,  
2009. 他

[産業財産権]

○取得状況 (計2件)

名称：遺伝子破壊白癬菌  
発明者：榎村浩一、山田剛、安部茂  
権利者：榎村浩一、山田剛、安部茂  
種類：特願  
番号：2008-11432  
取得年月日：平成20年4月22日  
国内外の別：国内

名称：爪真菌症の診断法  
発明者：坪井良治、榎村浩一、海老原睦仁  
権利者：坪井良治、榎村浩一、海老原睦仁  
種類：特願  
番号：2008-67605  
取得年月日：平成20年3月27日  
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

1. 帝京大学医真菌研究センター ウェブサ  
イト <http://timm.main.teikyo-u.ac.jp>
2. 病原真菌データベース  
<http://www.pfdb.net/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榎村 浩一 (MAKIMURA KOICHI)  
帝京大学・医学部・准教授  
研究者番号：00266347

### (2) 研究分担者

山田 剛 (YAMADA TSUYOSHI)  
帝京大学・医真菌研究センター・講師  
研究者番号：80424331

西山 彌生 (NISHIYAMA YAYOI)  
帝京大学・医療技術学部・教授  
研究者番号：10082231

### (3) 連携研究者

なし