

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2013～2016

課題番号：25290079

研究課題名（和文）種多様性の指標となるDNAの網羅的解析による病原真菌資源の付加価値高度化の試み

研究課題名（英文）Value-added advance of pathogenic fungus resources by comprehensive analysis of DNA as the indicator of species diversity

研究代表者

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：千葉大学真菌医学研究センターで保存している主要な病原真菌である *Aspergillus fumigatus*、*A. niger* およびそれら関連種において、次世代シーケンサーを使用して決定し、全ゲノム配列を解析した。得られた塩基配列データのうち、薬剤耐性に関連する遺伝子配列と薬剤感受性データの相関を検討した。また、リボソームタンパク質をターゲットとしたMALDI-TOF-MSによる検討を行い、*A. fumigatus* およびそれら関連種の菌種が検出できることを確認し、*A. viridinutans*の種細分化の妥当性を検討した。新たに得られた結果を菌株データベースに追加し公開した。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the whole-genome of *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* and their related species preserved at the Medical mycology Center, Chiba Univ., using a next-generation DNA sequencer. Among the data, we examined the relationship between antifungal-resistance gene and MICs against antifungal. We also examined the MALDI-TOF-MS for ribosome protein on *A. fumigatus* and their related species and were able to detect each species. The data indicated the high validity of classification on these species. The new data were added to the data-base of pathogenic fungi and opened.

研究分野：医真菌

キーワード：病原真菌 分類 薬剤感受性 次世代シーケンサー MALDI-TOF-MS

1. 研究開始当初の背景

千葉大学真菌医学研究センターでは多くの病原真菌を世界規模で収集、保存、提供している。その保存株を系統的に維持管理するには正確な分類・同定が必須である。また、同種でも生物学的、遺伝的性状は多様である。病原真菌は、菌株に様々な情報(患者の背景、治療経過、菌株の遺伝情報、薬剤感受性、病原性に強弱、地域性など)が付加されることによって、資源として有効に活用できる。

2. 研究の目的

本研究は、これまで世界規模で収集された貴重な保存株、主要な病原真菌である *Aspergillus fumigatus*、*A. niger* およびそれら関連種に新たな情報を付加し、その価値をさらに高めることを目的とする。

3. 研究の方法

これら菌種において当センターで保存している臨床分離株、環境分離株の中から薬剤感受性株、耐性株を選択し、次世代シーケンサーを使用して全ゲノム配列を解析した。得られた塩基配列データのち、薬剤耐性に関連する遺伝子配列と薬剤感受性データの相関を検討した。また、リボゾームタンパク質をターゲットとした MALDI-TOF-MS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化 - 飛行時間型質量分析法) による検討を行った。さらに個体識別に有効なマイクロサテライト解析と統合し、種の多様性について詳細に検討した。

4. 研究成果

(1) *A. fumigatus* とは形態的には類似するが、分子系統的に識別可能な関連種 *A. lentulus*、*A. udagawae*、*A. viridinutans* がアスペルギルス症の原因菌として単離される報告が増加している。我々は、収集した関連種の薬剤耐性試験から、これら関連種はアゾール系薬剤に対する感受性が *A. fumigatus* と異なることを明らかに、関連種はアゾール系薬剤に対し自然耐性を有することを明らかにしてきた。これまで、関連種において 20 株の全ゲノム配列をスキャフォールドレベルでの決定を行った。または、*A. lentulus*、*A. udagawae* の基準株に関して PacBio (第3世代シーケンサー) を使用し完全長の決定を行った。さらに、*A. fumigatus*、*A. lentulus*、*A. udagawae*、*A. viridinutans* の分子系統分類により分割された数種において、リボゾームタンパク質をターゲットとした MALDI-TOF-MS による検討を行い、これらの菌種が検出できることを確認し、*A. viridinutans* の種細分化の妥当性を検討した。

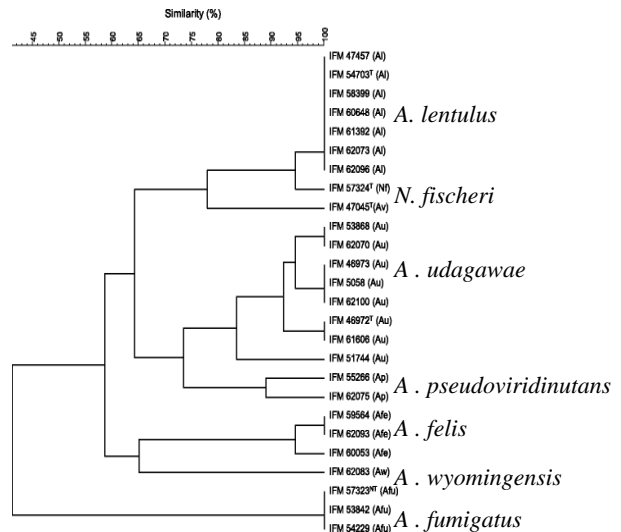


図1. *Aspergillus fumigatus* およびそれら関連種における RSP タイピングによる UPGMA クラスタ解析。

(2) *A. fumigatus* およびそれら関連種における各種機能遺伝子の塩基配列による系統解析の結果、既存の種とは形態的、系統的に識別できる2菌種が見いだされた。それぞれ *A. wyomingensis*、*A. arcoviridensis* として新種報告した。

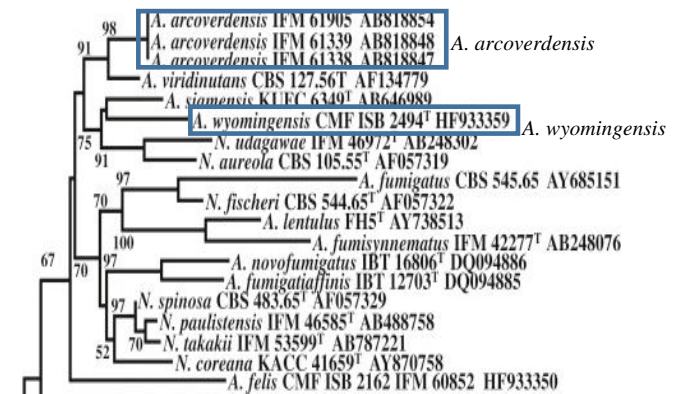


図2. *Aspergillus fumigatus* およびそれら関連種における系統樹 (b-tubulin 遺伝子、近隣結合法)

(3) アスペルギルス症原因菌として *A. fumigatus* とともに重要な *A. niger* に着目し、*A. niger* および形態的に類似するが分子系統的に識別可能な関連種 *A. tubingensis*、*A. welwitschiae* 3 種において臨床分離株、環境分離株の中から薬剤感受性株、耐性株を選択し、次世代シーケンサーを使用して全ゲノム配列を解析した。さらに、重要な菌株においては PacBio を使用し完全長の決定した。得られた塩基配列データを活用し、アゾール系薬剤に対する耐性遺伝子 *Cyp51A* の遺伝子配列と

薬剤感受性データの相関を検討した。

(4) *A. niger* およびその関連種は飲食品上で発ガン性を有するカビ毒オクラトキシンを産生し、汚染原因菌として食品衛生上重要である。特に、*A. carbonarius* は、オクラトキシン産生能の高さからその菌種との迅速な識別が求められている。機能遺伝子の塩基配列を応用してPCR法を用いて、*A. carbonarius* と関連菌種とを区別して、*A. carbonarius* のみ検出することができる方法を開発した。本方法は、擬陽性を生じさせることなく、高精度に*A. carbonarius* のみ検出することが可能であった。

(5) 新たに伊豆諸島、長野県、沖縄県で分離された *Aspergillus fumigatus* 66 株とこれまでに Rad-Seq 法 (ゲノムワイドな塩基多型解析) により遺伝子型の決定を行った 126 株についてマイクロサテライト 9 遺伝子座に基づき遺伝子型を決定した。また、千葉県産の臨床由来と環境由来の *Aspergillus fumigatus* において、9 個のマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝子型、Rad-seq 解析の結果と、薬剤感受性、分離源などの菌株情報と菌株の遺伝子情報との関連性を明らかにした。Rad-Seq 法の結果、*A. fumigatus* は 122 株、*Cryptococcus neoformans* では 162 株について遺伝子型を決定する事が出来たが、実験に供試したサンプル数あたりの決定率はそれぞれ 94% と 92% であった。マイクロサテライトを対象とした遺伝子型の決定の場合、ほぼ 100% の決定率があった。

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] (計 15 件)

Nakamura S, Sato H, Tanaka R, Kusuya Y, Takahashi H, Yaguchi T. Ribosomal subunit protein typing using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the identification and discrimination of *Aspergillus* species. BMC Microbiol. 17:100, 2017. doi: 10.1186/s12866-017-1009-3. 査読有

Hubka V, Dudová Z, Kubátová A, Frisvad JC, Yaguchi T, Horie Y, Jurjević Z, Hong S-B, Kolařík M. Taxonomic novelties in *Aspergillus* section *Fumigati*, *A. tasmanicus* sp. nov., induction of sexual state in *A. turcosus* and overview of related species. Plant Syst Evol. 303: 787-806, 2017. doi: 10.1007/s00606-017-1400-4. 査読有

Kusuya Y, Hagiwara D, Sakai K, Yaguchi T,

Gonoi T, Takahashi H. Transcription factor Afmacl controls copper import machinery in *Aspergillus fumigatus* has been accepted for publication. Current Genetics. DOI 10.1007/s00294-017-0681-z. 査読有

Kusuya Y, Sakai K, Kamei K, Takahashi H, Yaguchi T. Draft genome sequence of the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus lentulus* IFM 54703T. Genome Announc 4(1). e01568-15, 2016. doi: 10.1128/genomeA.01568-15. 査読有

Nakamura S, Sato H, Tanaka R, Yaguchi T. Verification of ribosomal proteins of *Aspergillus fumigatus* for the use of biomarkers in MALDI-TOF MS identification. Mass Spectrometry 5:A0049, 2016. DOI: 10.5702/massspectrometry.A0049. 査読有

Kusuya Y, Takahashi-Nakaguchi A, Takahashi H, Yaguchi T. Draft genome sequence of the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus udagawae* strain IFM 46973T. Genome Announc 2015 Aug 6;3(4). pii: e00834-15. doi: 10.1128/genomeA.00834-15. 査読有

Tamiya H, Ochiai E, Kikuchi K, Yahiro M, Toyotome T, Watanabe A, Yaguchi T, Kamei K. Secondary metabolite profiles and antifungal drug susceptibility of *Aspergillus fumigatus* and closely related species, *A. lentulus*, *A. udagawae*, and *A. viridinutans*. J Infect Chemother 21(5): 385-91, 2015. DOI: 10.1016/j.jiac.2015.01.005. 査読有

Matsuzawa T, Takaki GMC, Yaguchi T, Okada K, Abliz P, Gonoi T, Horie Y. *Aspergillus arcovendensis*, a new species of *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from caatinga soil in State of Pernambuco, Brazil. Mycoscience 56(2): 123-131, 2015. Doi.org/10.1016/j.myc.2014.04.006. 査読有

Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong S-B, Hubka V, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Stud Mycol 78: 141-173, 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004. 査読有

Novakova A, Hubka V, Dudova Z, Matsuzawa T, Kubatova A, Yaguchi T, Kolarik M. New species in *Aspergillus* section *Fumigati* from reclamation sites in

Wyoming (U.S.A.) and revision of *A. viridutans* complex. Fungal Diversity 64: 253-274, 2014. Doi: 10.1007/s13225-013-0262-5. 査読有

Kikuchi K, Watanabe A, Ito J, Oku Y, Wuren T, Taguchi H, Yarita K, Muraosa Y, Yahiro M, Yaguchi T, Kamei K: Antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* clinical isolates collected from various areas in Japan. J Infect Chemother. 20: 336-338, 2014. Doi: 10.1016/j.jiac.2014.01.003. 査読有

Matsuzawa T, Horie Y, Abliz P, Gono T, Yaguchi T. *Aspergillus huiyanae* sp. nov., a teleomorphic species in sect. *Fumigati* isolated from desert soil in China. Mycoscience. 55: 213-220, 2014. Doi:10.1016/j.myc.2013.08.007. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

Yaguchi T, Tanaka R, Ito J, Horose D, Watanabe A, Kamei K. Isolation of *Aspergillus fumigatus* related species from the environment in Japan and their antifungal susceptibilities. The 19th Congress of International Society for Human and Animal Mycology. 2015 年 5 月 4 - 8 日 . Melbourne, Australia.

Dudova Z, Hubka V, Svobodova L, Haml P, Matsuzawa T, Yaguchi T, Kolarik M. Multilocus phylogeny, antifungal susceptibilities and mating behavior of opportunistic pathogen *Aspergillus viridutans*. The 10th International Mycological Congress 2014. 2014 年 8 月 3 - 8 日. Bangkok, Thailand.

Watanabe A, Kikuchi K, Oku Y, Taguchi H, Yaguchi T, Kamei K. Antifungal susceptibility and frequency of *Aspergillus fumigatus*-related species of clinical strains collected as “*A. fumigatus*” from various area in Japan. The 6th Advance Against Aspergillosis. 2014 年 2 月 27 - 3 月 1 日. Madrid, Spain.

矢口貴志, 伊藤純子, 今西由巳, 廣瀬 大. 本邦環境中からの *Aspergillus fumigatus* 及び関連種の分離とその薬剤感受性. 第 58 回日本菌学会大会 2014 年 6 月 14 日. 小松. サイエンスヒルズこまつ.

矢口貴志. 菌種同定と薬剤感受性の問題点. 第 57 回日本医真菌学会総会. 2013 年 9 月 28 日. 東京. 京王プラザホテル.

〔図書〕(計 3 件)

矢口貴志, 西村和子. ヒトの病原真菌類・菌類の生物学 分類・系統・生態・環境・利用(日本菌学会企画)共立出版. 東京. pp 296-310. 2014.

矢口貴志. 真菌. 新 GMP 微生物試験法 第 3 版(佐々木次雄, 棚元憲一, 菊池 裕編)じほう. 東京. pp 165-186. 2016.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

名称: アスペルギルス・オクラセウス及びアスペルギルス・ウェスタジキアエの検出方法
発明者: 富山大輔, 中山素一, 矢口貴志
権利者: 花王株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2014-076418
出願年月日: 2014 年 4 月 2 日
国内外の別: 国内

名称: アスペルギルス・カーボナリウスの検出方法
発明者: 富山大輔, 中山素一, 矢口貴志
権利者: 花王株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2014-076417
出願年月日: 2014 年 4 月 2 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等
<https://daphne.pf.chiba-u.jp/distribution/catalog>

6. 研究組織

- (1)研究代表者
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
- (2)研究分担者
廣瀬 大 (HIROSE, Dai)
日本大学・薬学部・准教授
研究者番号: 20513922
- (3) 研究分担者
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