

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2016

課題番号：25305012

研究課題名(和文) ケニア、中国貴州省その他の地域における真菌・放線菌感染症原因菌の採集とその資源化

研究課題名(英文) Utilization as resources of fungi and actinobacterium collected in Kenya, Chiba and other areas

研究代表者

五ノ井 透 (Gonoi, Tohru)

千葉大学・真菌医学研究センター・教授

研究者番号：30134365

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)：主としてアフリカ・ケニア国を訪れ、同国真菌研究の中心的グループKenya Medical Research Institute(KEMRI)の研究者と協力して、ケニア国の主食である穀物(トウモロコシ、小麦、コメ、稗等)をカビ毒を産生して汚染する真菌について調査し、現地の新聞やインターネットHP等で公表し、注意を喚起した。また、同じく農業被害をもたらす真菌、黒色アスペルギルス、フザリウムについて分子系統学的な解析を行い、新種を報告した。現地で、主としてエイズの患者に感染するクリプトコッカス属真菌について疫学的調査を行い、特定の分子系統をもつ菌の病原性が高いことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We visited Kenya in Africa and conducted epidemiological studies on mycotoxin producing and human and plant pathogenic fungi in collaboration with Kenyan researchers. We found Kenyan cereals were highly contaminated with mycotoxins, and call attention of the natives using news papers and internet HP.

研究分野：医真菌学・放線菌学

キーワード：真菌 放線菌 感染症 カビ毒 食糧汚染

## 1. 研究開始当初の背景

アフリカのケニア国には、高温多湿な時期や地域が多く、真菌(カビ)による穀物被害や、また真菌が産生するカビ毒による穀物の汚染も多いと予測される。これらの穀物は、露天商、小規模マーケット等を通じて、人々の食糧、家畜の飼料として一般に出回っていると考えられ、潜在的な健康被害が予測される。現に2004年には、急性のカビ毒(アフラトキシン)中毒により1地域内で100名以上の死者を出し、カビ毒汚染の実態の解明と人々への警鐘の必要性が叫ばれている。また、それ以外のカビ毒(デオキシニバレノール、フモニシン、その他)による穀物汚染も予測されるが、疫学的実態等については分かっていない。

さらに、ケニア国を含むサハラ以南は、高度のHIV汚染地域であり、免疫不全を原因とする細菌や真菌の感染が患者の死因として大きな問題となっている。しかし、その疫学情報、クリプトコッカス属真菌を中心とする病原真菌の型や遺伝的特性に関する情報は圧倒的に不足しており、今後の対策のために情報収集が必要とされている。

一方、ヒト病原真菌、特にとくに糸状菌については、病原性発現機構、薬剤耐性機構の分子生物学的背景については解析が進んでおらず、医療目的での早急な解析が望まれていた。

## 2. 研究の目的

可能な範囲でケニア全土(ソマリア国との国境地域は安全上の理由で除外する)の圃場、露天商などの小売業、穀物倉庫からケニアの主要穀物(トウモロコシ、小麦、コメ、稗等)をサンプリングし、各試料のカビ毒による汚染度を計測し、汚染の原因となったカビの属と種を特定する。結果を新聞、会議等を通じて公表し、現地の人々の健康・生活の向上に寄与することを目的とする。

採集した菌は、可能な範囲で日本に輸入し、カビ毒のより定量的な解析に供し、分子生物学的な解析を加え、詳細な系統分類関係を明らかにするとともに、2次代謝産物の生合成を解析する。

さらに、国際的な物流・ヒトの交流が進み、温暖化が懸念される日本の将来のためにも、これらの菌を貴重な微生物資源として保存する。

ヒト病原糸状菌の病原性発現機構、薬剤耐性機構の分子生物学的背景について解析を進め、真菌症の治療、新規薬剤の開発に寄与する。

## 3. 研究の方法

研究は長崎大学熱帯医学研究所ケニア拠

点の研究者およびケニア中央研究所(KEMRI)の真菌研究者の協力を得て行う。首都ナイロビ市はもちろんケニア全土を対象として、主要穀物のサンプリングを行う。試料は一部はそのまま粉碎・懸濁して現地(ナイロビ大学構内の研究室)でイミュークロマト法により汚染カビ毒を定量する。また、一部の穀物試料は、培地に植え、菌の生育を待ち、菌種を同定する。穀物試料、菌はケニア、日本両国関係機関の許可を得て、可能な範囲で日本に輸入し、分子生物学的解析等より詳細な解析に供する。また、微生物資源として将来の研究のために保存する。

一方、ヒト病原真菌の病原性発現機構および薬剤耐性機構の解析については、日本国内の設備・機器を用い、ゲノムシーケンス、遺伝子発現解析、電子顕微鏡観察、バイオインフォマティクス的手法を中心に用いて研究を進め、収集・保存してある微生物資源を用いて研究を進める。

## 4. 研究成果

上記解析の結果、ケニア国内で採集した穀物試料(トウモロコシ、小麦、コメ、稗)の50%以上が、アフラトキシン、デオキシニバレノール、オクラトキシン、フモニシンなどの何らかのカビ毒により高度に(西洋諸国、日本の基準値を超えて)汚染されていることが判明した。また2種以上のカビ毒に同時に汚染されている試料も多数見つかった。さらに研究を進めると、現地で冠婚葬祭に頻繁に用いられる地ビールも高濃度のアフラトキシン(B1,G1)に、また牛乳もアフラトキシンM1に西洋諸国の基準値を超えて汚染されていることが判明した。これらの結果は、学術論文として発表するとともに、現地の新聞、インターネット・ホームページを通じて公表し、現地の人々に対し注意を喚起した。

また、ケニアに滞在する米国人医師と協力し、ケニアのエイズ患者に感染し、直接の死因となる真菌クリプトコッカス属菌について研究・解析した。MultiLocus Sequence Typingと呼ばれる分子系統学手法を用いて解析したところ、行き来の無い遠方に住む患者にも分子系統学的に同種・同型の菌が感染していることが明らかとなり、ヒトに感染し易い菌の種類がいることが示唆された。

さらに、これらの研究過程で、新種の黒色アスペルギルス属菌4種を発見し、論文を作成した。

また、関連ヒト病原真菌(アスペルギルス属菌等糸状菌)について、日本国内で分子生物学的、生理・生化学的、形態学的解析を進め、病原因子、病原因子発現機構、薬剤耐性機構に関する発見を行った。

またケニア各地の圃場を回り、黒色アス

ペルギルス属菌 50 株を採取し、これらの菌の分子系統解析を行なって、少なくとも 5 種の新種を見つけた。

新種のヒト病原放線菌ノカルジア・シナノエンススを見つけ報告した。

糸状菌アスペルギルス・フミガータスは、ヒトに感染し重篤化することが多く、また治療薬アゾールに対する耐性菌の出現が大きな問題となっている。アゾール耐性の出現機構を解明する目的で、アスペルギルスに共通する転写因子を探索し、新たな Zn2-Cys6 型転写因子 AtrR を見つけた。AtrR は遺伝子欠損株の作製実験等から、cyp51A 等エルゴステロール合成遺伝子の転写を制御するほか、ABC トランスポーター cdr1B の発現も同時に制御していることが解明され、新たな抗菌剤のターゲットとして注目される。また上記と同様な方法を用い、アスペルギルス・フミガータスにおいて、転写因子 AtfR が、胞子の休眠状態の制御において中心的な役割を果たしていることを明らかにした。銅イオンは、真菌においても適切な細胞内濃度の調節が必要である。しかし糸状菌における細胞内銅イオン濃度の制御は、理解されていない。アスペルギルス・フミガータスの銅イオン濃度を調節する転写制御因子を探索し、その結果、Afmac1 を見いだした。Afmac1 欠損株は、成長に遅延が見られるだけでなく、胞子形成の異常や銅イオン・トランスポーター遺伝子の発現抑制が見られた。Afmac1 を介した銅イオンの制御が、菌の成長と胞子形成に重要な役割を果たすと結論づけた。

#### 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 51 件)

1. Meningitis and ventriculitis due to *Nocardia araoensis* infection.  
Yamamoto, F; Yamashita, S; Kawano, H; Gonoi, I, et al. INTERNAL MEDICINE 56:853-859 (2017) [査読あり]
2. *Nocardia elegans* infection: a case report and literature review.  
Nakamura, I; Nagakura, T; Fujita, H; Gonoi, I, et al. INTERNATIONAL JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES 54:15-17 (2017) [査読あり]
3. A Novel Zn-2-Cys(6) transcription factor AtrR plays a key role in an azole resistance mechanism of

*Aspergillus fumigatus* by

coregulating cyp51A and cdr1B expressions. Hagiwara, D; Miura, D; Shimizu, K; Gonoi, I, et al. PLOS PATHOGENS 13:1 (2017) [査読あり]

4. *Nocardia shinanonensis* sp nov., isolated from a patient with endophthalmitis. Matsumoto, T; Negishi, T; Hamada, M; Gonoi, I, et al. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY 66:3324-3328 (2016) [査読あり]
5. Successful treatment of primary cutaneous *Nocardia brasiliensis* infection with oral potassium iodide. Numata, S; Numata, T; Gonoi, Toru; et al. JOURNAL OF DERMATOLOGY 43:843-844 (2016) [査読あり]
6. Multi-azole resistant *Aspergillus fumigatus* harboring Cyp51A TR46/Y121F/T289A isolated in Japan. Hagiwara, D; Takahashi, H; Fujimoto, M; Gonoi, I, et al. JOURNAL OF INFECTION AND CHEMOTHERAPY 22:577-579 (2016) [査読あり]
7. Comparative transcriptome analysis revealing dormant conidia and germination associated genes in *Aspergillus species*: an essential role for AtfA in conidial dormancy. Hagiwara, D; Takahashi, H; Kusuya, Y; Gonoi, I, et al. BMC GENOMICS 17:358 (2016) [査読あり]
8. Identification and functional analysis of the nocardithiocin gene Cluster in *Nocardia pseudobrasiliensis*. Saka K; Komaki, H; Gonoi Tohru. PLOS ONE :10:11:doi e0143264 (2015) [査読あり]

9. Identification of genes involved in the phosphate metabolism in *Cryptococcus neoformans*. Toh-e, A; Ohkusu, M; Li, H-M; Gonoi, T, et al. FUNGAL GENETICS AND BIOLOGY 80:19-30 (2015) [査読あり]
10. Molecular identification and antimicrobial resistance pattern of seven clinical isolates of *Nocardia* spp. IN BRAZIL. Zeni C, A; Ribeiro, M G; Muro, M D; Gonoi, T, et al. REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SAO PAULO 57:251-256 (2015) [査読あり]
11. Genome sequence comparison of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from patients with pulmonary aspergilloma and chronic necrotizing pulmonary aspergillosis. Takahashi-Nakaguchi, A; Muraosa, Y; Hagiwara, D; Gonoi, T, et al. MEDICAL MYCOLOGY 53:353-360 (2015) [査読あり]
12. *Aspergillus arcoverdensis*, a new species of *Aspergillus* section Fumigati isolated from caatinga soil in State of Pernambuco, Brazil. Matsuzawa, T; Campos T, Galba M.; Yaguchi, T; Gonoi, T, et al. MYCOSCIENCE 56:123-131 (2015) [査読あり]
13. Prenylated benzophenones from *Triadenum japonicum*. Oya, A; Tanaka, N; Kusama, T; Gonoi, T, et al. JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS 78:258-264 (2015) [査読あり]
14. *Nocardia nova* identification in a transtracheal wash of a horse with recurrent airway obstruction. Condas, L. A. Z.; Ribeiro, M. G.; Olivo, G.; Gonoi, T, et al. ARCHIVOS DE MEDICINA VETERINARIA 47:231-235 (2015) [査読あり]
15. Halichonadins M-Q, sesquiterpenes from an Okinawan marine sponge *halichondria* sp. Tanaka, N; Suto, S; Asai, M; Gonoi, T, et al. HETEROCYCLES 90:173-185 (2015) [査読あり]
16. 2-Debromonagelamide U, 2-debromomukanadin G, and 2-debromonagelamide P from marine sponge *Ageles* sp. Nakamura, K; Kusama, T; Tanaka, N; Gonoi, T, et al. HETEROCYCLES 90:425-431 (2015) [査読あり]
17. Pulmonary nocardiosis caused by *Nocardia cyriacigeorgica* in patients with *Mycobacterium avium* complex lung disease: two case reports. Yagi, K; Ishii, M; Namkoong, H; Gonoi, T, et al. BMC INFECTIOUS DISEASES 14:684 (2014) [査読あり]
18. The role of AtfA and HOG MAPK pathway in stress tolerance in conidia of *Aspergillus fumigatus*. Hagiwara, D; Suzuki, S; Kamei, K; Gonoi, T, et al. FUNGAL GENETICS AND BIOLOGY 73:138-149 (2014) [査読あり]
19. Whole-genome comparison of *Aspergillus fumigatus* strains serially isolated from patients with aspergillosis. Hagiwara, D; Takahashi, H; Watanabe, A; Gonoi, T, et al. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 52:4202-4209 (2014) [査読あり]
20. Amphidinins C-F, amphidinolide Q analogues from marine dinoflagellate *Amphidinium* sp. Kubota, T; Iwai, T; Sakai, K; Gonoi, T, et al. ORGANIC

- LETTERS 16:5624-5627 (2014) [査読あり]
21. Agelamadins C-E, bromopyrrole alkaloids comprising oroidin and 3-hydroxykynurenine from a marine sponge *Age/ as* sp. Kusama, T; Tanaka, N; Sakai, K; Gonoi, T, et al. ORGANIC LETTERS 16:5176-5179 (2014) [査読あり]
  22. *Gordonia iterans* sp nov., isolated from a patient with pneumonia. Kang, Y-Q; Ming, H; Gonoi, Tohr; et al. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOG 64:3520-3525 (2014) [査読あり]
  23. *Fusarium napiforme* systemic infection: case report with molecular characterization and antifungal susceptibility tests. de Souza, M; Matsuzawa, T; Lyra, L; Gonoi, T, et al. SPRINGERPLUS 3:492 (2014) [査読あり]
  24. Agelamadins A and B, dimeric bromopyrrole alkaloids from a marine sponge *Age/ as* sp. Kusama, T; Tanaka, N; Sakai, K; Gonoi, T, et al. ORGANIC LETTERS 16:3916-3918 (2014) [査読あり]
  25. Identification of fungal pathogens by visible microarray system in combination with isothermal gene amplification. Sakai, K; Trabasso, P; Moretti, M L; Gonoi, T, et al. MYCOPATHOLOGIA 178:11-26(2014) [査読あり]
  26. Hikiokoshins A-I, diterpenes from the leaves of *Isodon japonicas*. Tanaka, N; Tsuji, E; Sakai, K; Gonoi, T, et al. PHYTOCHEMISTRY 102:205-210(2014) [査読あり]
  27. Bromopyrrole alkaloids from a marine sponge *Age/ as* sp. Kusama, T; Tanaka, N; Takahashi-Nakaguchi, A; Gonoi, T, et al. CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN 62:499-503(2014) [査読あり]
  28. *Aspergillus huiyaniae* sp nov., a teleomorphic species in sect. Fumigati isolated from desert soil in China. Matsuzawa, T; Horie, Y; Abliz, P; Gonoi, T, et al. MYCOSCIENCE 55:213-220 (2014) [査読あり]
  29. Genome based analysis of type-I polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase gene clusters in seven strains of five representative *Nocardia* species. Komaki, H; Ichikawa, N; Hosoyama, A; Gonoi, T, et al. BMC GENOMICS 15:323(2014) [査読あり]
  30. Two new species of *Aspergillus* section Fumigati isolated from caatinga soil in the State of Pernambuco, Brazil. Matsuzawa, T; Campos T,G M.; Yaguchi, T; Gonoi, T, et al. MYCOSCIENCE 55:79-88(2014) [査読あり]
  31. Nakijiquinone S and Nakijinol C, new meroterpenoids from a marine sponge of the family Spongiidae. Suzuki, H; Kubota, T; Takahashi-Nakaguchi, A; Gonoi, T, et al. CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN 62:209-212(2014) [査読あり]
  32. Hyrtimomines, indole alkaloids from Okinawan marine sponges *Hyrtios* spp. Tanaka, N; Momose, R; Takahashi-Nakaguchi, A; Gonoi, T, et al. TETRAHEDRON 70:832-837 (2014) [査読あり]

33. Lung *Nocardia elegans* infection diagnosed on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Ooi, Y; Shiba, H; Nagai, K; Gonoi, T, et al. INTERNAL MEDICINE 53:2111-2113(2014) [査読あり]
34. Primary brain abscess caused by *Nocardia otitidiscaviarum*. Ishihara, M; Takada, D; Sugimoto, K; Gonoi, T, et al. INTERNAL MEDICINE 53:2007-2012(2014) [査読あり]
35. Taurospongins B and C, new acetylenic fatty acid derivatives possessing a taurine amide residue from a marine sponge of the family Spongiidae. Kubota, T; Suzuki, H; Takahashi-Nakaguchi, A; Gonoi, T, et al. RSC ADVANCES 4:11073-11079(2014) [査読あり]
36. Ultra-deep sequencing analysis of the hepatitis A virus 5'-untranslated region among cases of the same outbreak from a single source. Wu, S; Nakamoto, S; Kanda, T; Gonoi, T, et al. INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES 11:60-64 (2014) [査読あり]
37. Molecular identification and antimicrobial susceptibility of *Nocardia* spp. isolated from bovine mastitis in Brazil. Condas, L A. Z.; Ribeiro, M G.; Yazawa, K; Gonoi, T, et al. VETERINARY MICROBIOLOGY 167:708-712 (2013) [査読あり]
38. Nika/TcsC histidine kinase is involved in conidiation, hyphal morphology, and responses to osmotic stress and antifungal chemicals in *Aspergillus fumigates*. Hagiwara, D; Takahashi-Nakaguchi, A; Toyotome, T; Gonoi, T, et al. PLOS ONE 8:doi e80881(2013) [査読あり]
39. Visual analysis of DNA microarray data for accurate molecular identification of non-*Albicans* *Candida* isolates from patients with candidemia episodes. Ferrari, M D L; Resende, M R; Sakai, K; Gonoi, T, et al. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 51:3826-3829 (2013) [査読あり]
40. Identification of distinct ligands for the C-type lectin receptors mincle and dectin-2 in the pathogenic fungus *Malassezia*. Ishikawa, T; Itoh, F; Yoshida, S; Gonoi, T, et al. CELL HOST & MICROBE 13:477-488 (2013) [査読あり]

[学会発表](計 20件)

[図書](計 2件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

五ノ井 透 (Gonoi, Tohru)

千葉大学・真菌医学研究センター・教授  
研究者番号： 30134365

### (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

松澤 哲宏 (Matsuzawa, Tetsuhiro)

長崎県立大学・看護栄養学部・講師  
研究者番号： 40598702