

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430198

研究課題名(和文) リボソームタンパク質を指標とするアスペルギルス症原因菌の新規系統分類

研究課題名(英文) Development of a novel classification method for *Aspergillus* species based on ribosomal protein biomarkers

研究代表者

佐藤 浩昭 (Sato, Hiroaki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・環境管理研究部門・研究グループ長

研究者番号：70357143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、質量分析法を用いてリボソームタンパク質(RP)をバイオマーカーとした、*Aspergillus fumigatus*関連菌種の新しい分析法の開発を行った。ここでは、RPのインフォマティクス解析と質量分析を組み合わせ、公共データベースに登録されているアミノ酸配列情報を全面的に修正して、*Aspergillus section Fumigati*に属する5種の真菌を同定するためのRPの基準質量リストを完成させた。次に、実際の臨床株及び環境株の分類に適用し、これまで識別が非常に困難であった*A. fumigatus*関連菌種の迅速かつ正確な同定・識別が可能であることを実証した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a new method to identify and discriminate *Aspergillus fumigatus* and relating species (*Aspergillus* section *Fumigati*) by mass spectrometry. To make a reliable biomarker list, we have characterized ribosomal subunit proteins of five species of genome sequenced strains of *A. fumigatus* and relating fungus by mass spectrometry, and verified the translated amino acid sequences registered in public databases. Based on the profiles of the ribosomal protein biomarkers, a phylogenetic tree of clinical and environmental fungal samples could be constructed. These results demonstrated the developed method would be a sufficiently high-throughput technique for rapid discrimination of closely related *Aspergillus* species.

研究分野：機器分析化学、質量分析学

キーワード：質量分析 微生物同定 リボソームタンパク質 アスペルギルス 真菌

## 1. 研究開始当初の背景

*Aspergillus* 属真菌はヒト感染症であるアスペルギルス症の原因となることで知られており、特に *Aspergillus fumigatus* および関連菌種 (*Aspergillus* section *Fumigati*) は重症化する侵襲性肺アスペルギルス症の主な原因菌である。これまでこの菌群の分類研究が進められ、各種抗真菌剤に対する感受性に違いが認められることが報告されている。しかしながら数種の遺伝子情報に基づく系統解析だけでは *A. fumigatus* 関連菌種の分類は不完全であり、多様な遺伝子情報に基づく新しい系統分類法の開発が求められている。従来、*Aspergillus* 属真菌の同定は、分生子や分生子柄の形態を基に行う、形態学的方法により行われてきた。しかし、分生子の形状や分生子を形成する部分の形状を評価して同定するためには、菌種の同定の経験が豊富な熟練者や専門家が必要である。そこで、より客観的な同定が可能な、特定の遺伝子の変異に注目する分子生物学的同定が行われるようになった。しかし、分子生物学的手法では、ターゲットとなる遺伝子の解析には、依然として時間やコストがかかるという問題があり、より簡便で迅速な同定法が求められている。

そのようなニーズにこたえる形で、近年、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(MALDI-TOFMS)を用いた真菌類の迅速同定が注目されるようになってきた。MALDI-TOFMS を用いた方法は、得られたマススペクトルをデータベース内の標準マススペクトルと照合することにより迅速同定を行うもので、サンプル量も少なく済むという利点がある。最近、商業的なデータベースが複数の質量分析装置のメーカーから販売され、これらを用いた *A. fumigatus* の同定が試みられている。しかしながら、商業データベースは当該メーカーの装置でしか使用できず一般的ではないうえ、解析に用いたピークの帰属は行っておらず、分子生物学的な同定の根拠が明確ではない。そこで、質量分析法の迅速簡便性を確保しつつ、分子生物学的な根拠に基づいて *Aspergillus* 属真菌を同定できる新しい手法の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

以上のような背景のもと、本研究代表者らは真菌の迅速簡便かつ正確な同定・識別法を提案することを大きな目標として研究を行っている。本課題では、あらゆる生物に存在するハウスキーピングタンパク質であるリボソームタンパク質に着目し、飛躍的に進められている全ゲノム解読情報を基に質量分析法による迅速かつ正確なタンパク質分析を組み合わせた、*Aspergillus* 属真菌の新しい分析手法の開発を目的とする。本研究により、形態学および有性生殖能に基づく分類に限界が指摘されている真菌の分類に対して、臨床分野でも実用化しうる新しい分類指標を

提案することを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) *A. fumigatus* ゲノム解読株のリボソームタンパク質のキャラクタリゼーション： 本法では、バイオマーカーとして用いるリボソームタンパク質の質量を決定する必要がある。ゲノム解読されている *A. fumigatus* のリボソームタンパク質の翻訳アミノ酸配列や遺伝子の塩基配列の情報は、インターネット経由で公共データベースから入手できる。しかし、この登録情報は正確であるとは限らないうえ、翻訳後修飾が起こっている可能性もある。そこで、*A. fumigatus* ゲノム解読株の発現タンパク質を超遠心法で精製し、MALDI-TOFMS で各リボソームタンパク質の正確な分子量を求める。もし、観測されるピーク質量が翻訳アミノ酸配列から計算された質量と合致する場合は、登録情報が正しいということになる。もし異なる場合は、配列情報が誤っているか何らかの翻訳後修飾が起こっていることになるので、インフォマティクス解析を行って配列情報を検証する。このようにして、*A. fumigatus* 基準株のリボソームタンパク質の解析と分子量リストを作成する。

(2) *A. fumigatus* 関連菌種の基準株のリボソームタンパク質の分子量リストの作成： (1)の方法に準じて、*A. fumigatus* 関連菌種である *A. lentulus*, *A. udagawae*, *A. viridinutans* の各基準株のリボソームタンパク質の分子量リストを作成する。これまでに報告されている *A. fumigatus* 関連菌種の  $\beta$ -tubulin 遺伝子の高い相同性から、ある程度の種類のリボソームタンパク質は、分子量(すなわちアミノ酸配列)が一致すると考えられる。分子量が各菌種間で一致するものは、*A. fumigatus* 関連菌種であることを確認するためのバイオマーカーとして、一方、各菌種に固有の分子量を持つものは、各菌種を同定するためのバイオマーカーとして用いる。

つぎに翻訳後修飾が菌種を超えて共通するの否かを調べ、共通するリボソームタンパク質のみを同定用のバイオマーカーとして用いる。また、リボソームタンパク質の種類によっては、イオン化効率が異なって良好なピークが検出されないものがある可能性がある。これらを見極め、菌種を超えて確実に検出されるリボソームタンパク質のみバイオマーカーとして用いることにして、質量リストを完成させる。

(3) リボソームタンパク質の前処理法の検討： 信頼性の高い手法を開発するために、リボソームタンパク質の抽出・精製工程の検証を行う。実際の分析において迅速性を確保するために、簡易な前処理法が開発が望まれるが、真菌類は固い細胞壁が障害となってタンパク質の抽出が困難であるという課題が指摘されている。また、真菌はライフステージによって発現するリボソームタンパク質の量に大きな差が生じる恐れがある。そこで、

簡便かつ確実にリボソームタンパク質を質量分析する条件を検討する。

(4) *A. fumigatus* 関連菌種保存株の系統分類：

以上の検討によって最適化した方法でリボソームタンパク質のマスペクトルを観測し、確定したバイオマーカー質量リストと照合して、千葉大学真菌医学研究センターに保存されている *A. fumigatus* 関連菌種のタイプ分類を行う。これらの試験株はすでに  $\beta$ -tubulin など 3 種の遺伝子に基づく系統解析が報告されており、これらは 5 つのクラスターに分類され、それぞれ分生胞子の形状や抗真菌薬剤に対する感受性が異なることが報告されている。このような分類結果や特徴と、本法による分類結果を比較検証することによって、本法の分類感度や特徴あるいは限界を明確にする。

4. 研究成果

(1) *A. fumigatus* ゲノム解読株のリボソームタンパク質のキャラクタリゼーション：

まず初めに、正確な菌種同定の基準となる分子量リストの作成と検証を行った。ここでは、ゲノム解読されている *A. fumigatus* Af293 株および A1163 株を試料とした。各 *A. fumigatus* ゲノム解読株のリボソームタンパク質の翻訳アミノ酸配列や遺伝子の塩基配列の情報を公共データベースから入手し、分子量を計算した。ここで、公共データベースに登録されているリボソームタンパク質のサブユニットタンパク質の番号に混乱が見られたため、相同性解析を行いながら酵母のリボソームタンパク質に対して提案されている番号に付けなおした。

次に、各ゲノム解読株のリボソームタンパク質を抽出・超遠心法による簡易精製法を検討し、得られたリボソームタンパク質を質量分析した。その結果、半数以上のリボソームタンパク質の観測質量が計算質量と一致しなかったため、公共データベースに登録されている情報が誤っている可能性を検討した。他の *Aspergillus* 属真菌の配列情報との比較や、DNA 配列の検証により、DNA 配列のイントロン/エクソン領域の誤判定により、遺伝子の中で実際にタンパク質に翻訳される領域 (CDS 領域) が誤ってアノテーションされていることが明らかとなった。そこで、修正 CDS の候補を挙げ、質量分析による観測質量と合致する正しい配列に修正した。さらに、遺伝子領域がアノテーションされていなかったリボソームタンパク質の DNA 配列をゲノム配列情報から見出した。これらの検討により、約半数ものリボソームタンパク質の情報が誤って登録されていることを見出し、それらを修正した。

上記の作業でも質量が合致しないリボソームタンパク質は、アセチル化やメチル化などの翻訳後修飾が予想された。そこで、すでに翻訳後修飾が明らかな酵母やラットなどの情報を参考にしながら、リボソームタンパ

ク質の配列の共通性をもとに翻訳後修飾を予測し、観測質量と比較して翻訳後修飾を決定した。それでもピークが検出されないリボソームタンパク質は、分子量が大きすぎるか、質量分析のイオン化効率が低い酸性タンパク質であることが分かったので、これらはバイオマーカーから除外することにした。

以上の解析により、分子量 2 万以下のリボソームタンパク質 32 種類をバイオマーカーの候補とし、質量分析法を用いた *A. fumigatus* の迅速同定を行うための基準質量リスト (表 1) を完成した。

表 1 . *A. fumigatus* を同定するためのリボソームタンパク質バイオマーカー

名前 <sup>a</sup>	質量 <sup>b</sup>	配列修正 <sup>c</sup>	翻訳後修飾 <sup>d</sup>
L40	6001.7	yes	
L39	6151.4	yes	-Met
S29	6646.5	yes	-Met
S30	6789.5		-Met
L29	7457.0		-Met
S28	7710.0	yes	+Ac
S31	9133.9	yes	
L38	9154.5		-Met
L43	10024.5		-Met
S21	10053.2		+Ac
L37	10386.4	yes	-Met
L30	11170.9		-Met
L36	11869.4	yes	-Met
L42	12028.1	yes	-Met, +Me
L33	12215.2	yes	-Met
L34	13164.4	yes	-Met
S26	13337.7		-Met
L31	13918.5		-Met, +Ac
L35	14533.0	yes	-Met, +Ac
L23	14695.6	yes	-Met, +Ac, +Me(4)
L32	14835.9		-Met
L26	14979.1	yes	-Met
S24	15226.0		-Met, +Ac
L27	15683.5	yes	
S23	15801.9		-Met, +Hyd(2)
S16	15881.9		-Met, +Ac
S17	16087.9	yes	-Met
S19	16350.6	yes	-Met
L28	16630.9		-Met
S15	17626.5		-Met, +Ac
S18	17780.5	yes	-Met, +Ac
S11	18480.7	yes	-Met, +Ac

a: 酵母の命名法によるサブユニットタンパク質の名称。

b: プロトン付加分子[M+H]<sup>+</sup>の質量

c: yes は公共タンパク質データベースの登録配列を修正したリボソームタンパク質

d: -Met, N 末端メチオニンの切断、+Ac: アセ

チル化、+Me: メチル化、+Hyd: ヒドロキシル化。括弧内の数字は修飾の数。

(2) *A. fumigatus* 関連菌種の基準株のリボソームタンパク質の分子量リストの作成: 微生物の分類の基準はゲノム解読株ではなく、基準株である。*A. fumigatus* の基準株のゲノムは解読されていないが、(1)で作成した *A. fumigatus* ゲノム解読株のリボソームタンパク質の基準質量リストを参照して、基準株のリボソームタンパク質の同定及び質量の検証を進め、*A. fumigatus* 同定用の基準質量リストを作成した。その結果、基準株のリボソームタンパク質は、2種類のゲノム解読株 (Af293 と A1163) のうち、A1163 と同じであることが分かった。

次に、*A. fumigatus* 関連菌種である、*A. lentulus*, *A. udagawae*, *A. viridinutans* の各基準株のリボソームタンパク質の質量分析を行った (図1)。これらは、本研究を遂行する途中で、共同研究者らが所属する千葉大学真菌医学研究センターでゲノム解読が行われ、*A. udagawae* および *A. lentulus* のリボソームタンパク質の DNA 配列 (および翻訳アミノ酸配列) が公開された。また、未公開の *A. viridinutans* についても、当センターの協力によりドラフト配列を入手し、マニュアルで遺伝子のアノテーション作業を行った。そして、(1)の方法を用いて、これら各菌株のリボソームタンパク質の翻訳アミノ酸配列及び翻訳後修飾の検証を行って、*A. fumigatus* 関連菌種の迅速同定を行うための基準質量リストを完成した。

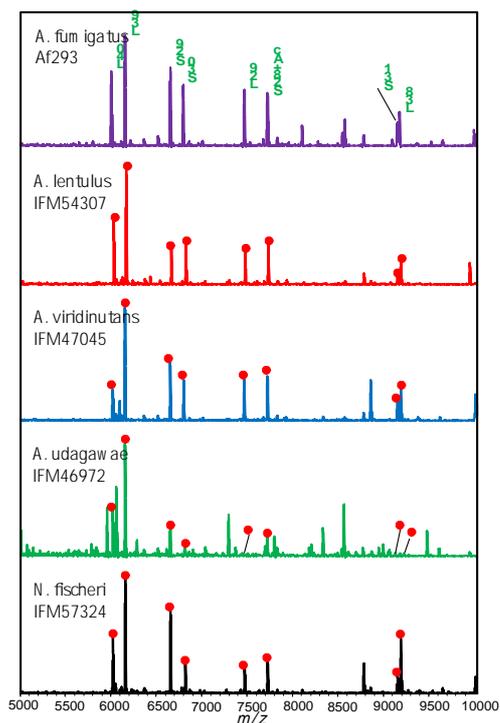


図1. *A. fumigatus* 関連菌種のリボソームタンパク質のマススペクトル

最終的に、29種類のリボソームタンパク質を分類のためのバイオマーカーとして選んだ。各菌種のリボソームタンパク質を比較したところ、8種類のリボソームタンパク質は種を超えて共通しており、少なくとも *Aspergillus* section *Fumigati* に属する菌種を同定するための有力なバイオマーカーになり得ることがわかった。それ以外のリボソームタンパク質は菌種に固有の質量をもち、識別のためのバイオマーカーとして有用であった。すなわち、質量分析を用いれば、これまで識別が困難であった *A. fumigatus* 関連菌種を迅速に同定できることが分かった。

### (3) リボソームタンパク質の前処理法の検討:

従来の質量分析法を用いた真菌類の同定では、十分な強度と数の質量ピークを観測することが困難であるため、その解析結果の信頼性が低いという課題があった。これに対して本研究の方法は、確実にリボソームタンパク質のピークを観測することによって、同定結果の信頼性を確保することが、従来法に対する優位な点である。そこで、試料菌株の最適な前処理法を検討するために、培養法の違いが及ぼすマススペクトルへの影響を調べた。検討対象には、*Aspergillus* 属の中で、ヒトに対する病原性が見られない *A. oryzae* RIB40 をモデルとして用いた。菌体をジルコニア・シリカビーズで破碎した上清 (破碎液) と高速遠心分離により精製したリボソームタンパク質画分のマススペクトルを比較したところ、破碎液およびリボソームタンパク質画分のいずれから、リボソームタンパク質由来のピークが数多く観測された。ただし、タンパク質精製したほうが、より明確にリボソームタンパク質のピークが高強度で観測されることから、よほどの迅速性が要求される場合を除いて、高速遠心分離を行うほうが良いと判断した。また、静置培養及び液体培養のいずれでもリボソームタンパク質のピークが観測できることが確認された。ただし、菌系が良好に成長する液体振とう培養が最も高強度でリボソームタンパク質のピークを観測できることが分かった。そのため、本研究では、液体振とう培養した後に菌体をジルコニアビーズで破碎し、その後高速遠心分離によりリボソームタンパク質画分を精製する方法を採用した。

### (4) *A. fumigatus* 関連菌種保存株の系統分類:

以上の検討により最適化した測定法と、完成したバイオマーカー質量リストを用いて、千葉大学真菌医学研究センターが保有する *A. fumigatus* 関連菌種の同定及び分類を試みた。ここでは、*A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. udagawae*, *A. viridinutans* 及び *Neosartorya fischeri* を用いた。*Neosartorya* は *Aspergillus* の有性世代の属名である。これらは人体や土壌から単離されたもので、国内外から得たものである。

各試料菌株のリボソームタンパク質を質量分析してタイプ分類し、その結果に基づいてUPGMA クラスター解析を行った。その結果、図2に示すように、各菌種ごとにクラスターを形成した。このクラスターの構造は、 $\beta$ -tubulin 遺伝子に基づく従来法による解析結果と概ね一致した。

*A. viridinutans* は明確なクラスターを形成せず、基準株(IFM 47045<sup>T</sup>)が他の株と離れ、

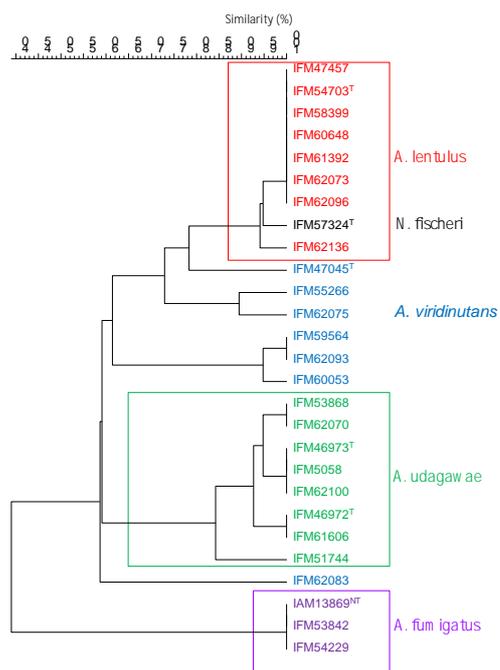


図 2. 質量分析法で観測されたりボソームタンパク質のタイプに基づく *A. fumigatus* 関連菌種の分類結果

IFM62083 株が全く異なる位置に分類された。同様の結果は、DNA 解析法によっても報告されており、この菌種を複数種に分割する提案がなされている。本研究の結果も、その提案を支持している。

さらに本法が実際の臨床株に対して適用できることを検証するために、薬剤耐性が認められた *Aspergillus* 属の臨床株の同定を試みた。その結果、*A. fumigatus* A1163 と同一のリボソームタンパク質のピークが観測され、この株は *A. fumigatus* であると同定できた。この結果は、DNA 解析法でも支持されており、本法が臨床株を正確に同定できることが示された。一方、薬剤耐性の有無については識別することができなかった。これは、本法が遺伝型の分類法であるので、薬剤耐性に関する特定の限られた変異を検出することが困難であるためであると考えられる。すなわち、遺伝型に基づく種の同定及び識別が本法の適用範囲であることが分かった。

以上のように、本研究ではリボソームタンパク質をバイオマーカーとする質量分析法により、従来は識別が難しかったアスペルギルス症原因菌の一種である *A. fumigatus* 関連菌種の同定及び分類する方法を開発した。この成果は、質量分析法を用いて、分子生物学

的な根拠に基づいて真菌を同定した世界で初めての報告である。本成果は、不明確な *A. fumigatus* 関連菌種の分類体系に大きな知見を与え、医真菌学分野への貢献が期待できる。現在、真菌の主たる分類基準が、形態学および生殖能による分類から分子系統学的な分類に移行しようとしている段階であり、全ゲノム解読とプロテオーム解析を関連付けた新しい系統分類手法の開発に関する本成果は、極めて意義深いと考えている。

本法は、その迅速簡便性から、アスペルギルス症の診断や治療薬の選択を迅速かつ適切に行うために必要とされる臨床現場での実用的な分析手法の開発研究へと発展するものであり、本課題の遂行によりその基礎的な成果が得られたものと考えている。

(5) 他の微生物の同定・分類への応用： 本研究課題の遂行過程で開発した、菌体破碎と高速遠心により高感度でリボソームタンパク質を質量分析できる技術を用いて、環境微生物である藍藻類（シアノバクテリア）の分類に応用した。富栄養化が進行した湖沼で多量に発生する藍藻類は、アオコとも呼ばれ、水質悪化の原因となる。アオコの代表種である *Microcystis aeruginosa* は、ミクロシスチンという毒素を生産するため、生態系保全や飲料水の安全確保の観点から、その発生挙動の監視が必要である。*M. aeruginosa* には、毒素を生産する株としない株が存在することが知られている。さらに、遺伝子解析により *M. aeruginosa* は遺伝多様性があることは分かっているが、地域性との関係については明らかではない。微生物の同定や識別には DNA 解析法が用いられているが、株レベルでの遺伝多様性の評価はあまり得意ではない。そこで、リボソームタンパク質をバイオマーカーとする本法の適用を検討した。当初は、リボソームタンパク質の高感度なピークを観測することが困難であったが、本課題で最適化した方法を適用したところ、明瞭なマススペクトルを観測することが可能になった。この方法を用いて、国立環境研究所微生物系統保存施設が保有する、霞ヶ浦等から採取された *M. aeruginosa* の分類評価を行った。その結果、毒素生産株と無毒株を識別できたうえ、毒素生産株の中でもいくつかのグループに分類できることを示した。以上のように、本課題で開発した技術は、医療分野のみならず環境分野でも有用であることを示した。

## 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)

[論文発表](計1件)

(1) Li-Wei Sun, Wen-Jing Jiang, Hiroaki Sato, Masanobu Kawachi, Xi-Wu Lu (2016), Rapid Classification and Identification of *Microcystis aeruginosa* Strains Using MALDI-TOF MS and

Polygenetic Analysis, PLOS ONE, 11 (5), e0156275.

〔学会発表〕(計6件)

(1) *Aspergillus* 属真菌の迅速同定に向けた *Aspergillus fumigatus* のリボソームタンパク質の解析, 佐藤浩昭, 中村清香, 鳥村政基, 田中玲子, 矢口貴志, 第61回質量分析総合討論会, 茨城県つくば市, 2013/9/11.

(2) Rapid identification of fungi of the genus *Aspergillus* using ribosomal protein biomarkers as observed by MALDI-MS, 佐藤浩昭, 中村清香, 田中玲子, 矢口貴志, 20th International Mass Spectrometry Conference (IMSC 2014), スイス・ジュネーブ, 2014/8/25.

(3) Discrimination of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* by MALDI-MS and analysis of its genetic diversity, 孫麗偉, 佐藤浩昭, 河地正伸, Xiwu Lu, 20th International Mass Spectrometry Conference (IMSC 2014), スイス・ジュネーブ, 2014/8/25.

(4) MALDI-MS によるシアノバクテリア *Microcystis aeruginosa* の系統分類のためのリボソームタンパク質のキャラクタリゼーション, 孫麗偉, 佐藤浩昭, 河地正伸, 第62回質量分析総合討論会, 大阪府吹田市, 2016/5/15.

(5) *Aspergillus* 属真菌の迅速同定で用いるリボソームタンパク質の比較解析, 佐藤浩昭, 中村清香, 田中玲子, 矢口貴志, 第63回質量分析総合討論会, 茨城県つくば市, 2015/6/17.

(6) リボソームタンパク質をバイオマーカーとした MALDI-TOFMS による *Aspergillus fumigatus* 類縁真菌の迅速識別, 佐藤浩昭, 中村清香, 田中玲子, 高橋弘喜, 矢口貴志, 第64回質量分析総合討論会, 大阪府吹田市, 2016/5/18.

〔その他〕

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/emri/113emeastech/index.html>

<http://www.pf.chiba-u.ac.jp/research/project/yaguchi.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤浩昭 (SATO HIROAKI)

国立研究開発法人産業技術総合研究所

環境管理研究部門・研究グループ長

研究者番号: 70357143

### (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

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

### (3) 連携研究者

なし