

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590441
 研究課題名（和文） ゲノム情報に基づく病原放線菌 *Nocardia* の新しい同定法の確立
 研究課題名（英文） A novel identification method of pathogenic *Nocardia* based on whole genome information
 研究代表者
 氏名（ローマ字）：三上 襄 (Yuzuru MIKAMI)
 所属機関・部局・職：千葉大学・真菌医学研究センター・教授
 研究者番号：40092100

研究成果の概要：

病原性 *Nocardia* の 62 菌種の基準株を用いて、必須遺伝子である *gyrB* の解析情報に基づく新しい分類体系の確立と同定法の開発を目的に研究を進めた。*gyrB* 情報に基づく *Nocardia* の系統学的な位置関係を 16S rRNA 遺伝子と比較した場合、16S rRNA の遺伝子に比べて、3.6 倍の差を示した。病原性放線菌の中で、*Nocardia* と同じくミコール酸を含む放線菌は 8 菌属があるが *gyrB* gene の特定の領域の配列を用いることにより、容易に区別する方法を見出し報告することができた。また、簡便な鑑別法を考案して報告した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,000,000	600,000	2,600,000
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：*Nocardia*, pathogenic actinomycete, molecular taxonomy, *gyrB* gene, identification

1. 研究開始当初の背景

平成16年に、申請者らは国立感染症及び北里大学と共同で、病原性の *Nocardia* で最も感染症が多くその原因菌である *Nocardia farcinica* の全ゲノム解析結果を世界に先がけて米国科学紀要に報告した。*N. farcinica* の全ゲノム情報の解析結果は、分類研究をはじめとする *Nocardia* の研究に極めて多くの影響を与え、関連する分野の

研究の進展に貢献することができた。本研究を開始した平成19年度頃は、新しい分子生物学的手法の導入により微生物の分類学革命的な変化がおこった。特に新菌種の発表は、あらゆる微生物において格段に増加しており、*Nocardia* においても例外でなく、数年間でその新規の新たな登録新菌種数は、2倍以上の増加となった。しかし、*Nocardia* の菌種の区別は、他の細菌と同様に、

16SrRNA 遺伝子情報に基づいて行われており、僅か数パーセントの相違で新しい菌種が作成された例も多かった。臨床的に重要な *Nocardia* の菌種は、菌種ごとに薬剤感受性が異なることが多いことが明らかになっており、*Nocardia* 症の効果的な治療法の開始には、迅速な原因菌種の確定が重要で、臨床分野においては、迅速な同定法の確立が求められていた。

2. 研究の目的

本研究は、申請者らが世界ではじめて明らかにした *Nocardia farcinica* の全ゲノム情報に基づいて、分類・同定に有効な新しい遺伝子を探索し、それらの解析情報に基づいた分類・同定法を開発することを目的とする。また、それらの遺伝子情報に基づいて、*Nocardia* の新たな系統関係を明らかにすることも目的とする。同時に、これらの新たに開発した分類・同定法が、*Nocardia* 以外の病原性放線菌についても、応用できるかを検討することも併せて行うことを目的とした。

3. 研究の方法

申請者等が米国科学紀要 (PNAS, 2004) で報告した *Nocardia farcinica* の全ゲノム情報より、分類に有効と思われる遺伝子を検索する。検索により選択された遺伝子について、数種の *Nocardia* の菌種の遺伝子を解析して、菌種の分類・同定への有用性を検討する。分類学的な有効な特定遺伝子領域を確定して、それらの領域で全ての菌種の遺伝子が増幅可能な PCR プライマーの作製する。その後、全ての菌種の有用な遺伝子領域を解析して、それに基づいた *Nocardia* の系統関係を明らかにする。また、*Nocardia* の関連菌である、*Gordonia* についても、本菌属に特徴的な PCR プライ

マーを作製し同様の解析を行う。

4. 研究成果

病原性 *Nocardia* の 62 種の中の主な菌種 (56 種) の基準種を用いて、必須遺伝子である *gyrB* の解析情報に基づく新しい分類体系の確立を目的に研究を進めた。その結果、*Nocardia* の 56 菌種内の *gyrB* 遺伝子情報の相同性は、82.4~99.9% であった。また解析した約 1,200 塩基数の中での違いは、2~270 塩基に相当することが明らかになった。*gyrB* 情報に基づく *Nocardia* の系統学的な位置関係を 16S rRNA 遺伝子と比較した場合、*gyrB* 遺伝子を用いた場合の系統樹は、16SrRNA 遺伝子情報とほぼ同様な系統関係を示すことを確認することができた。さらに、*gyrB* 遺伝子情報に基づく 56 菌種の系統的な位置関係の解像度は、16S rRNA の遺伝子に比べて (16S rRNA では、94.4-100%であった)、3.6 倍以上の高い解像度を示し、*gyrB* 遺伝子が種の同定や分類において明らかに優れていることを証明することができた。*gyrB* の遺伝子の相同性について、56 菌種のそれぞれの菌種の中で、相互の相同性の関係が 93.5% 以上を同一菌種とした場合では、56 菌種は、36 菌種がそれぞれ 2~7 菌種を含む 13 クラスターにわけられること、また残りの 19 菌種は、それぞれ一菌種からなるクラスターに分けることができた。

病原性放線菌の中で、*Nocardia* と同じくミコール酸を含む放線菌は 8 菌属があるが *gyrB* gene の特定の領域の配列を用いることにより、容易に区別する方法を見出した。また、これらの情報に基づく簡便な鑑別法を考案して報告した。

また、*Nocardia* と同様に、患者から多く分離される病原性の放線菌 *Gordonia* についても *gyrB* 遺伝子とさらに *secA1* 遺伝子配列情報が、本菌種の鑑別に極めて有用であることを明らかにすることができた。

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 8 件)

- (1) Chiba K, Hoshino Y, Ishino K, Kogure T, Mikami Y, Uehara Y, Ishikawa J: Construction of a pair of practical *Nocardia-Escherichia coli* shuttle vectors. Jpn J Infect Dis 60: 45-47, 2007.
- (2) Hoshino Y, Watanabe K, Iida S, Suzuki S, Kudo T, Kogure T, Yazawa K, Ishikawa J, Kroppenstedt RM, Mikami Y: *Nocardia terpenica* sp. nov., isolated from Japanese patients with nocardiosis. Int J Syst Evol Microbiol 57: 1456-1460, 2007.
- (3) Mizota A, Haki K, Shiina C, Tanaka M, Nakazawa T, Yazawa K, Mikami Y: The first case of keratitis caused by *Nocardia exalbida*. Int Ophthalmol 27: 333-336, 2007.
- (4) Hasegawa T, Gonoi T, Ito J, Kogure T, Yazawa K, Mikami Y: Identification of *Nocardia farcinica* by a PCR primer amplifying specific DNA band for the bacterium. Jap J Med Mycol 48: 173-175, 2007.
- (5) Hayashi Y, Matsuura M, Toshima H, Itoh N, Ishikawa J, Mikami Y, Dairi T: Cloning of the gene clusters responsible for the biosynthesis of brasilicardin A, unique diterpenoid. J Antibiot 61: 164-167, 2008.
- (6) Ono M, Kobayashi Y, Shibata T, Maruyama D, Kim SV, Watanabe T, Mikami Y, Tobinai K: *Nocardia exalbida* brain abscess in a patient with follicular lymphoma. Int J Hematol 88: 95-100,

2008.

- (7) Kang Y, Takeda K, Yazawa K, Mikami Y: Phylogenetic studies of *Gordonia* species based on *gyrB* and *secA1* gene analyses. Mycopathol 167: 95-100, 2009.
- (8) 吉田和恵, 布袋祐子, 佐藤友隆, 三上 襄: *Nocardia brasiliensis* による皮膚ノカルジア症の小児例. 臨床皮膚科 63: 145-147, 2009.

[学会発表] (計 13 件)

- (1) 林 豊, 松浦信康, 伊藤伸哉, 三上 襄, 大利 徹, Brasilicardin A 生合成遺伝子群の解析, 日本農芸化学会大会, 東京, 3月, 2007.
- (2) 五ノ井透, 武田健二郎, 向井 啓, 星野泰隆, 矢澤勝清, 三上 襄: *Nocardia* 属菌 60 種が産生する鉄キレート分子の多様性の解析. 第 80 回日本細菌学会総会抄録集, p. 92, 大阪, 3月 26 日~28 日, 2007.
- (3) 芝崎あずさ, 山本撰也, 三谷宏樹, 齋藤明広, 五ノ井透, 安藤昭一, 三上 襄: ダンゴムシ (*Armadillidium vulgare*) 体内より分離した新種と考えられる放線菌の分類とその代謝産物について. 2007 年度日本放線菌学会大会講演要旨集, p. 72, 広島, 5月 31 日~6月 1 日, 2007.
- (4) 小暮高久, 島田玲緒奈, 矢澤勝清, 石川 淳, 三上 襄: *Nocardia farcinica* におけるアミノグリコシド高度耐性化機構の解析. 2007 年度日本放線菌学会大会講演要旨集, p. 99, 広島, 5月 31 日~6月 1 日, 2007.
- (5) 五ノ井透, 星野泰隆, 矢澤勝清, 石川 淳, 三上 襄: 病原性放線菌 *Nocardia* 属 64 種が産生するシデロフォアの多様性の解析. 2007 年度日本放線菌学会大会講演要

- 旨集, p. 75, 広島, 5月31日~6月1日, 2007.
- (6) 小暮高久, 島田玲緒奈, 矢澤勝清, 三上 襄: 病原性放線菌 *Nocardia farcinica* におけるアミカシン高度耐性化遺伝子の単離と解析. 第51回日本医真菌学会総会プログラム・抄録集, p. 23, 岐阜, 11月9日~10日, 2007.
- (7) 康 穎倩, 武田健二郎, 伊藤淳二, 矢澤勝清, 三上 襄: A Comprehensive phylogeny of *Gordonia* species based on 16S rDNA, *gyrB*, and *secA1* gene analysis. 第51回日本医真菌学会総会プログラム・抄録集, p. 23, 岐阜, 11月9日~10日, 2007.
- (8) 田中玲子, 亀井克彦, 五ノ井 透, 横山耕治, 矢口貴志, 三上 襄: NBRP・ナショナルバイオリソースプロジェクト「病原微生物」-真菌・放線菌. 日本微生物資源学会第15回大会要旨集, p. 37, 千葉, 2008.
- (9) 岩沢真理, 外川八英, 松江弘之, 三上 襄: *Nocardia brasiliensis* による皮膚ノカルジア症の2例: 第52回日本医真菌学会総会プログラム集, p92, 2008.
- (10) 康穎倩, 矢澤勝清, 横山耕治, 三上 襄: 中国貴陽医学院で分離された病原性酵母の分類学的研究: 第52回日本医真菌学会総会プログラム集, p84, 2008.
- (11) 志保沢里奈, 小暮高久, 三上 襄: アゾール系抗真菌剤 clotrimazole の *Nocardia farcinica* における標的分子の探索. 日本微生物資源学会第15回大会要旨集, p. 39, 千葉, 2008.
- (12) 青山一紀, 矢澤勝清, 三上 襄: 新たに臨床材料から分離された *Rothia* sp. について. 日本微生物資源学会第15回大会要旨集, p. 39, 千葉, 2008.
- (13) 五ノ井 透, 武田健二郎, 志賀祐介,

松澤哲弘, 三上 襄: *gyrB* 遺伝子による *Nocardia* 属菌群の分類 (multilocus sequence typing を目指して). 2008年度日本放線菌学会, 山梨, 2008.

〔図書〕(計 9件)

- (1) 三上 襄: NBRP の紹介, 感染症研究に必須のリソース: 病原微生物-特に病原真菌と放線菌について. *Biophilica* 4: 53-56, 2008.
- (2) 服部尚子, 三上 襄: 放線菌症, ノカルジア症, *MB Derma* 127: 71-80, 2007.
- (3) 三上 襄: ノカルジア症, 放線菌症. *Jap J Med Mycol* 48: 186-188, 2007.
- (4) 影山亜紀子, 三上 襄: 臨床由来病原性 *Nocardia* 属菌の分類と系統解析. *Jap J Med Mycol* 48: 73-78, 2007.
- (5) 矢口貴志, 亀井克彦, 三上 襄: 病原微生物: 感染症教育研究に貢献する病原微生物資源. *細胞工学* 26: 1066-1069, 2007.
- (6) 三上 襄 (分担): 放線菌関連菌一, pp. 390-391, 「医科細菌学一改定第4版」, 笹川千尋, 林 哲也. 南江堂. 2008.
- (7) 三上 襄 (分担): 微生物辞典 (渡辺 信, 他) 朝倉書店. 2008.
- (8) 明見能成, 三上 襄 (分担): 口腔臨床に必要な新菌学, pp. 11-17, 尾崎登喜雄編「口腔内科学」飛鳥出版社. 2008.
- (9) 五ノ井 透, 三上 襄 (分担): ノカルジア症, 放線菌症, pp. 65-69, *Derma* N0/148, 皮膚真菌症診療ガイドーこれだけは知っておきたい皮膚真菌症の知識一, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三上 襄 (Yuzuru MIKAMI)

千葉大学・真菌医学研究センター・教授

研究者番号: 40092100