

総 説

皮膚糸状菌のキチン合成酵素 (CHS) 遺伝子について

加 納 壘

日本大学生物資源科学部獣医臨床病理学研究室

要 旨

皮膚糸状菌の分類および皮膚糸状菌症の診断・治療に役立てるため、キチン合成酵素 (CHS) 遺伝子について検討した。まず皮膚糸状菌のうち13菌種の *CHS1* 遺伝子約600bpの塩基配列を解析し、データベース化した。また系統樹を作製したところ、菌種ごとに分岐することが確認された。次にデータベースを用いて、*Trichophyton mentagrophytes* の臨床分離株を検討したところ、迅速同定が可能であり、本邦で今まで報告例の無い *Arthroderma benhamiae* も確認された。さらに皮膚糸状菌の *CHS1* 遺伝子特異的プライマーを用いて、動物の皮膚糸状菌症7例の病変部位の落屑および被毛、健康部位の被毛からそれぞれDNAを抽出し、PCRを行った結果、病変部位からのみ *CHS1* 遺伝子の増幅が確認された。このことは、培養検査結果とも一致し、迅速診断が可能であった。さらに *A. benhamiae* の *CHS1* および *CHS2* 遺伝子cDNAの完全長を解析した。*CHS1* 遺伝子は3158bpで、*CHS2* 遺伝子は3393bpであった。両遺伝子は *Aspergillus nidulans*, *Coccidioides immitis* の *CHS1* および *CHS2* 遺伝子と相同性が、約70~80%であった。またキチン合成酵素阻害剤をそれぞれ添加した培地にて *A. benhamiae* を培養し、両遺伝子の発現を検討したところ、*CHS1* 遺伝子の発現は増加するが、*CHS2* 遺伝子の発現には変化がなかった。

Key words: 皮膚糸状菌 (dermatophyte), キチン合成酵素 (chitin synthase (CHS)), 菌種同定 (identification of species), 遺伝子診断 (molecular diagnosis), PCR

はじめに

皮膚糸状菌症は、本邦で数百万人の患者がいると考えられているが、最近のペットブームに伴い、人獣共通感染症および輸入真菌症としても重要視されている。そのため、皮膚糸状菌の分子生物学的迅速同定や診断、治療法について多くの研究が行われているが、問題の解決にいたっていない。

そこで皮膚糸状菌の分類および皮膚糸状菌症の診断・治療に役立てることを目的に、哺乳類の細胞には存在しないが、皮膚糸状菌をはじめ各種真菌の細胞壁の主要構成成分であるキチンに着目し、キチン合成酵素 (chitin synthase: CHS) 遺伝子について検討した。

1) *CHS1* 遺伝子解析による皮膚糸状菌の系統分類への応用

真菌の *CHS* 遺伝子ファミリーとして、主に *CHS1*, *CHS2*, *CHS3* の3遺伝子が発見されており、それぞれ発現する蛋白の機能が異なっている¹⁻³⁾。これらの中で *CHS1* 遺伝子が各種真菌について解析され、系統分類に応用されている⁴⁾ が、皮膚糸状菌については検討されていなかった。そこで皮膚糸状菌の *CHS1* 遺伝子をクローニングし、系統関係を追究した。

使用菌株は (Table 1), *Epidermophyton* 属, *Microsporum* 属, *Trichophyton* 属の13菌種を用いた。

まず各菌株を液体サブローブドウ糖培地中に接種し、24°C, 5日間、振盪培養を行った。次に約100~200mgの菌糸を回収し、凍結破碎後、lysis buffer [0.1 mM EDTA, 1% SDS, 10 mM Tris hydrochloride (pH 8.0), 0.3% 2-mercaptoethanol, 1 mg/ml の zymolyase-100T (Seikagaku, Kyoto, Japan)] に懸濁し、37°C, 16時間溶解させた。菌体溶液を、フェノール、クロロフォルム処理を行い脱蛋白後、1/10量の3Mの酢酸ナトリウム液を添加し、エタノール沈殿法によってゲノムDNAを抽出した。

各種真菌の *CHS1* 遺伝子の保存領域である約600bpの遺伝子断片を増幅するプライマー (primer 1, 5'-CTG AAG CTT ACT(ACG) ATG TAT(C) AAT(C) GAG(A) GAT(C)-3'; primer 2, 5'-GTT CTC GAG (C)TTT (A)GTA (C)TTC (A)GAA (A)GTT (T) CTG-3'⁴⁾) を用いて、抽出した各菌種のゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った。PCRの反応条件は94°C 1分, 50°C 1分, 72°C 2分を1サイクルとして30サイクルの反応を行い、目的の遺伝子断片を増幅した。増幅した遺伝子断片を2%アガロースゲル上で電気泳動を行い、臭化エチジウムで染色後、紫外線照射下で観察し目的の長さの遺伝子断片が増幅されたことを確認した。

次に各菌株由来の遺伝子断片に対して、インビトロゲン社 TA クローニングキットを用いて pCRII vector に

別刷請求先: 加納 壘

〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866

日本大学生物資源科学部獣医臨床病理学研究室

Table 1. Species and strains

Anamorph	Teleomorph (Mating type)	Strain	
<i>T. mentagrophytes</i>	<i>A. benhamiae</i> (+)	VUT-77011	IAM 12704=RV 26678
<i>T. mentagrophytes</i>	<i>A. benhamiae</i> (-)	VUT-77012	Americano-European race
<i>T. mentagrophytes</i>	<i>A. benhamiae</i> (+)	RV 30000	African race
<i>T. mentagrophytes</i>	<i>A. benhamiae</i> (-)	RV 30001	African race
<i>M. gypseum</i>	<i>A. fulvum</i> (+)	VUT-4006	ATCC 16445
<i>M. vanbreuseghemii</i>	<i>A. grubyi</i> (+)	VUT-78043	UAMH 1465=CDC X470
<i>M. gypseum</i>	<i>A. gypseum</i> (+)	VUT-4004	IAM 12722
<i>M. gypseum</i>	<i>A. incurvatum</i> (+)	VUT-4002	ATCC 26358
<i>M. canis</i>	<i>A. otae</i> (+)	VUT-77054	IAM 12728=ATCC 44334
<i>T. simii</i>	<i>A. simii</i> (+)	VUT-77009	CBS 448.65
<i>T. mentagrophytes</i>	<i>A. vanbreuseghemii</i> (+)	VUT-77007	CBS 646.73=RV 27960
<i>E. floccosum</i>		VUT-98005	[Human]*
<i>E. floccosum</i>		VUT-97008	[Human]
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>		VUT-97004	[Human]
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>		VUT-97007	[Human]
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>		VUT-97009	[Human]
<i>T. rubrum</i>		VUT-97014	[Human]
<i>T. rubrum</i>		VUT-97015	[Human]
<i>T. rubrum</i>		VUT-97016	[Human]
<i>T. violaceum</i>		VUT-98011	[Human]
<i>T. violaceum</i>		VUT-98012	[Human]
<i>T. violaceum</i>		VUT-98013	[Human]

[]*: Origin

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Netherlands

CDC: Centers for Disease Control, United States Public Health Service, Atlanta, Georgia, USA

IAM: Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Tokyo, Japan

RV: Institute de Medecine Tropicale, Antwerp, Belgium

UAMH: Mold Herbarium and Culture Collection, University of Alberta, Edmonton, Canada

VUT: School of Veterinary Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan

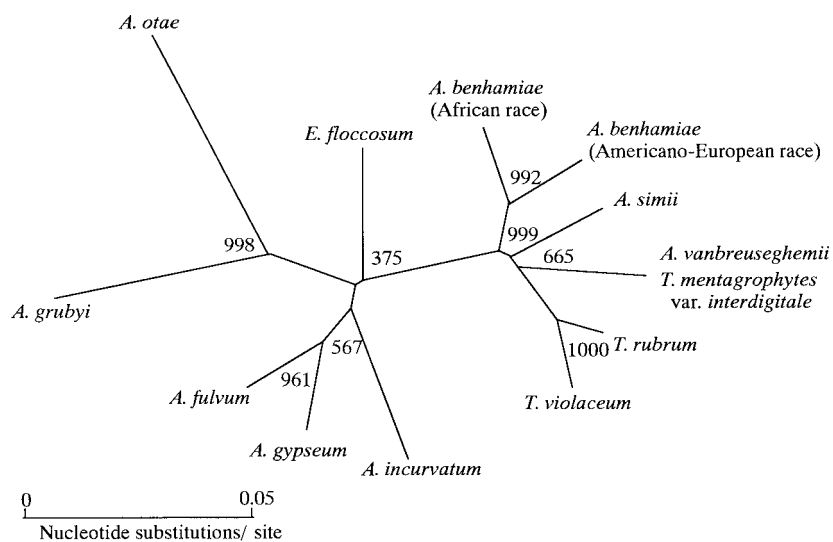


Fig. 1. A tree showing the phylogenetic relationships of 13 dermatophyte species based on *CHS1* gene fragment sequence comparison. The DNA sequences were compared by Clustal W multiple sequence alignment programs and then a phylogenetic tree was constructed using the TREEVIEW program. Bootstrap analysis was performed on 1000 random samples and analyzed by the Clustal W program. Numbers at branches were determined by the bootstrap analysis indicating the number of times out of 1000 repeat sub samples the grouping shown was supported as monophyletic.

Table 2. Clinical isolates used in this study

Species (Mating type)	Strain	Origin
<i>A. benhamiae</i> (+)	VUT-97010	Rabbit (isolated at Hyogo)
<i>A. benhamiae</i> (-)	VUT-00001	Guinea pig (isolated at Hyogo)
<i>A. benhamiae</i> (-)	VUT-00002	Rabbit (isolated at Saitama)
<i>A. benhamiae</i> (-)	VUT-00003	Rabbit (isolated at Saitama)
<i>A. benhamiae</i> (-)	VUT-00003-2	Human (isolated at Saitama)
<i>A. benhamiae</i> (-)	KMU-4137	Rabbit (isolated at Tottori)
<i>A. benhamiae</i> (-)	KMU-4169	Human (isolated at Gifu)
<i>A. benhamiae</i> (-)	KMU-4170	Human (isolated at Gifu)
<i>A. gypseum</i> (-)	VUT-99011	Cat
<i>Trichophyton rubrum</i>	VUT-97021	(6-year-old female Dachshund)
<i>T. rubrum</i>	VUT-97020	(3-year-old female Yorkshire Terrier)
<i>T. rubrum</i>	VUT-97022	(11-year-old male Yorkshire Terrier)
<i>T. rubrum</i>	VUT-010001	(dog)

組み込みこれを大腸菌に形質転換し、選択培地を用いて目的の遺伝子を保有した大腸菌の集落を回収した。この大腸菌を増殖し、それからプラスミドを回収し、DNA シークエンサーで塩基配列を解析した。

各菌株の *CHS1* 遺伝子塩基配列を DNA データバンク (DNA Data Bank of Japan: DDBJ) に登録後、データベース化した。また各菌の塩基配列をもとに NJ 法を用いて系統樹を作製したところ、各菌種に分岐することが確認された (Fig. 1)⁵⁻⁷⁾。この結果は、形態学的、生化学的分類および交配試験に基づく分類を支持するとともに、internal transcribed spacer 1 (ITS1) 領域およびミトコンドリア DNA の制限酵素切断パターン解析結果とも一致するものであった^{8, 9)}。さらにヒト、犬、猫、兔、齧歯類由来株 (Table 2) についても上記手法を用いて *CHS1* 遺伝子を解析し、既にデータベースに登録した各菌種の *CHS1* 遺伝子と上記手法を用いて系統樹を作成し、菌種の同定を行った。得られた結果は、従来の手法による同定結果と一致した。

2) 臨床分離株の迅速同定

構築したデータベースを用いて、臨床分離株の迅速同定を検討した。

Trichophyton mentagrophytes の完全時代の *Arthroderma benhamiae*, *A. simii*, *A. vanbreuseghemii* の各 *CHS1* 遺伝子に特異的な PCR プライマーを設計した¹⁰⁾。これを用いて人、犬、兔由来の *T. mentagrophytes* の臨床分離株について、PCR を用いて解析したところ、人および犬由来株は、*T. mentagrophytes* var. *interdigitale* または *A. vanbreuseghemii* と一致したが、兔由来株が、本邦で今まで報告例の無い *Arthroderma benhamiae* が確認され (Fig. 2)、交配試験結果でも *A. benhamiae* であることが確認された (Fig. 3)。これは、本邦での最初の *A. benhamiae* 分離例として報告した¹¹⁾。

以上のことから、*CHS1* 遺伝子解析は、皮膚糸状菌の系統分類および迅速同定に有用であると考えられた。

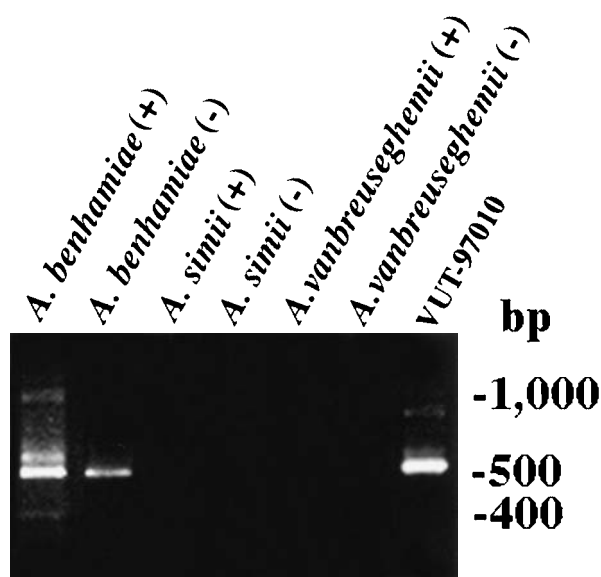


Fig. 2. PCR amplification of genomic DNA samples was carried out with *A. benhamiae*-specific primers. Lanes: 1, *A. benhamiae* (+); 2, *A. benhamiae* (-); 3, *A. simii* (+); 4, *A. simii* (-); 5, *A. vanbreuseghemii* (+); 6, *A. vanbreuseghemii* (-); 7, VUT-97010 isolated from rabbit.

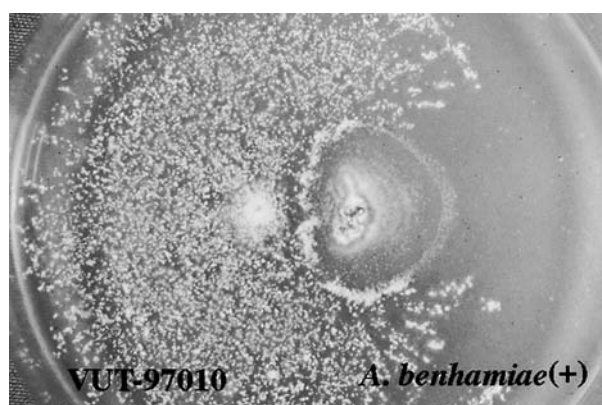


Fig. 3. Gymnothecia produced on sunflower seed agar.

3) 皮膚糸状菌症の迅速診断法

皮膚糸状菌およびその他病原真菌の *CHS1* 遺伝子塩基配列をもとに、皮膚糸状菌の *CHS1* 遺伝子に特異的プライマーを設計した。皮膚糸状菌の *CHS1* 遺伝子特異的プライマーの塩基配列は 5'-CAT CGA GTA CAT GTG

Table 3. Genomic DNAs samples from fungi and bacteria

Species	Strain
<i>Aspergillus fumigatus</i>	VUT-98008
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	TIMM-1840
<i>Candida albicans</i>	TIMM-1800
<i>Cryptococcus neoformans</i>	VUT-77034
<i>Epidermophyton floccosum</i>	TLD-0121
<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	TIMM-0727
<i>Microsporum canis</i>	VUT-77054
<i>Microsporum gypseum</i>	VUT-4004
<i>Malassezia furfur</i>	VUT-98021
<i>Malassezia pachydermatis</i>	VUT-98014
<i>Sporothrix schenckii</i>	TLD-0221
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	VUT-77007
<i>Trichophyton rubrum</i>	VUT-97020
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12600

ATCC: American Type culture Collection

TLD: Teikyo University Laboratory from Dermatology

TIMM: Teikyo University Institute of Medical Mycolgy

VUT: School of Veterinary Medicine, University of Tokyo

CTC GC-3' (primer CHS1 1S) および 5'-CTC GAG GTC AAA AGC ACG CC-3' (primer CHS1 1R) で、約 450 bp の遺伝子断片を増幅するように設計した¹²⁾。まず皮膚糸状菌の *CHS1* 遺伝子に特異性があることを確認するため、皮膚糸状菌、皮膚糸状菌以外の真菌、細菌 (Table 3)、犬、猫の DNA をそれぞれ鋳型として PCR を行った。PCR の反応液の組成は上記と同様であるが、反応条件は、94°C 1分、63°C 2分、72°C 2分を1サイクルとし、35サイクルで行った。その結果、皮膚糸状菌の DNA からのみ *CHS1* 遺伝子の増幅が確認された (Fig. 4)。

このプライマーを用いて、動物の皮膚糸状菌症7例 (Table 4) の病変部位の落屑および被毛、健康部位の被毛をそれぞれ、50 μg/ml の proteinase K を含む上記 lysis buffer に懸濁し、37°C、16時間溶解させた。菌体溶液を、フェノール、クロロフォルム処理を行い脱蛋白後、1/10量の3Mの酢酸ナトリウム液を添加し、エタノール沈殿法によってゲノム DNA を抽出した。その結果、病変部位の DNA からのみ *CHS1* 遺伝子の増幅が確認された (Fig. 5)。

増幅された遺伝子について上記方法を用いて塩基配列を解析し、菌種同定を行った¹²⁾。得られた結果は、採取した試料の培養検査結果とも一致し (Table 4)、病変部位から皮膚糸状菌の *CHS1* 遺伝子の PCR 法を用いた迅速診断が可能であることが確認された。今後、皮膚糸状菌

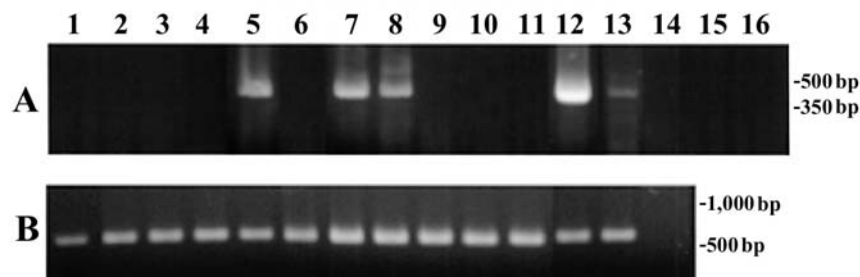


Fig. 4. PCR amplification of genomic DNA samples was carried out with dermatophyte specific primers. A, CHS1 1S and CHS1 1R. B, primer 1 and primer 2. Lane 1, *Aspergillus fumigatus* VUT-98008; 2, *Blastomyces dermatitidis* TIMM-1840; 3, *Candida albicans* TIMM-1800; 4, *Cryptococcus neoformans* VUT-77034; 5, *Epidermophyton floccosum* TLD-0121; 6, *Histoplasma capsulatum* TIMM-0727; 7, *Microsporum canis* VUT-77054; 8, *Microsporum gypseum* VUT-4004; 9, *Malassezia furfur* VUT-98004; 10, *Malassezia pachydermatis* VUT-98014; 11, *Sporothrix schenckii* TLD-0221; 12, *Trichophyton mentagrophytes* VUT-77007; 13, *Trichophyton rubrum* VUT-97020; 14, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600; 15, healthy dog skin sample; 16, healthy cat skin sample.

Table 4. Patient animals and microbiological tests

Patient	Breed	Age	Sex	Direct exam	Isolate
1. Dog	Pomeranian	10 y	Male	+	<i>M. canis</i>
2. Dog	Beagle	10 y	Female	+	<i>M. canis</i>
3. Dog	Yorkshir terrie	8 y	Male	+	<i>M. canis</i>
4. Dog	Maltese	9 y	Female	+	<i>M. canis</i>
5. Cat	Crossbreed	9 y	Female	+	<i>M. canis</i>
6. Cat	Crossbreed	2 m	Female	+	<i>M. gypseum</i>
7. Rabbit		2 m	Female	+	<i>T. mentagrophytes</i>

+: Microscopic examination of skin scraping and hairs from skin lesions revealed hyphae and arthroconidia.

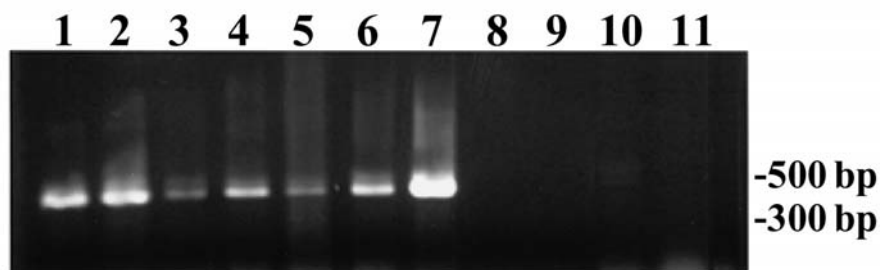


Fig. 5. PCR amplification of genomic DNA samples was carried out with dermatophyte specific primers (CHS1 1S and CHS1 1R). Lanes: 1-7 affected areas of patients 1-7; 8, non-affected areas of patient 1; 9, non-affected areas of patient 5; 10, healthy dog skin; 11, healthy cat skin.

<i>A. benhamiae</i> CHS1	EFILQRRRWLNGSF	793
<i>A. benhamiae</i> CHS2	***G*****	722
<i>C. immitis</i>	*****	777
<i>E. nidulans</i>	*F*****	777
<i>N. crassa</i>	*****	726
<i>A. aegypti</i>	**YN*****VPSTI	589
<i>D. immitis</i>	**FN*****TPS*I	1,107
<i>L. cuprina</i>	**FN*****TPS*I	1,107

Fig. 6. The 'signature sequence' QRRRW (indicated by box) of CHS genes in *A. benhamiae* CHS1 (DDBJ AB050933), *A. benhamiae* CHS2 (DDBJ AB055893), *C. immitis* (GenBank AF276826), *N. crassa* (GenBank AF127086), *E. nidulans* (GenBank AB023911), *Aedes aegypti* (GenBank AF223577), *Dirofilaria immitis* (GenBank AF288618) and *Lucilia cuprina* (GenBank AF221067). An asterisk indicates identity with the amino acid found in the *A. benhamiae* CHS1 sequence.

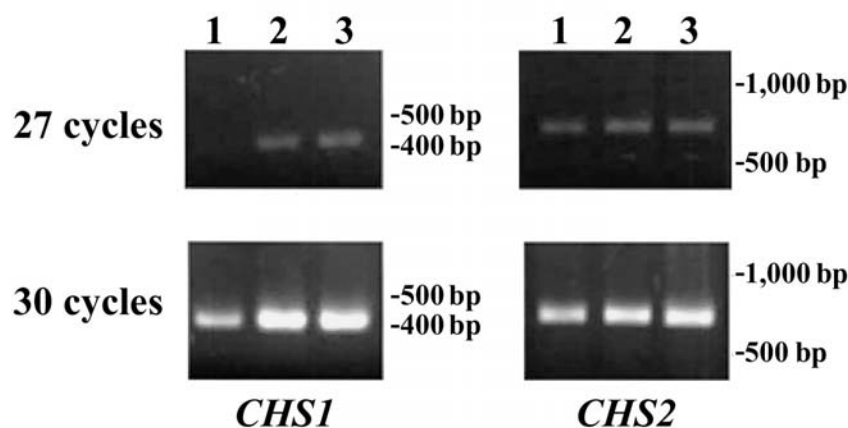


Fig. 7. Reverse transcription-PCR (RT-PCR) assay of *A. benhamiae* CHS1 and CHS2 genes induced by CHS inhibitors. Lane 1: *A. benhamiae* cultured in Sabouraud's broth. Lane 2: *A. benhamiae* cultured in Sabouraud's broth containing nikkomycin Z (50 μ M). Lane 3: *A. benhamiae* were cultured in Sabouraud's broth containing polyoxin D (50 μ M).

の疫学および防疫に本手法が有用であると考えられた。

- 4) *A. benhamiae* の CHS1 および CHS2 遺伝子完全長の決定とキチン合成酵素阻害剤の検討
A. benhamiae 交配型 (+) VUT-77011 株を液体サブ

ローブドウ糖液体培養液に接種し、24°C、7日間振盪培養後、菌糸を回収し、これを凍結破碎した。この試料からキアゲン社 RNeasy total RNA kit を用いて約 100 μ g の total RNA を抽出した。この RNA からライフテックオリエンタル社の 5' RACE System for Rapid Amplifi-

cation of cDNA Ends キットおよび 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends キットを用いて RACE 法を行い、*CHS1* および *CHS2* 遺伝子 cDNA の完全長を解析した。

その結果、*CHS1* 遺伝子は 3158 bp で、*CHS2* 遺伝子は 3393 bp であった¹³⁾。また決定した *CHS1* および *CHS2* 遺伝子情報についてはそれぞれ DDBJ に登録した (accession no.- AB050933, *Arthroderma benhamiae* mRNA for chitin synthase 1, complete cds および accession no.- AB050933, *Arthroderma benhamiae* mRNA for chitin synthase 2, complete cds)。

また *Aspergillus nidulans*, *Coccidioides immitis*, *Exophiala dermatitidis* の *CHS1* および *CHS2* 遺伝子との相同性は、約 70~80% と高かった。

またアミノ酸配列から酵素の活性領域の相同性が他の真菌と高いことから (Fig. 6), 抗菌活性を有するキチン合成酵素阻害剤が *A. benhamiae* にも抗菌作用があることが示唆された。そこでキチン合成酵素阻害剤である、nikkomycin Z および polyoxin D をそれぞれ添加した培地にて *A. benhamiae* を培養し、mRNA を抽出し、RT-PCR を用いて *CHS1* および *CHS2* 遺伝子の発現を検討した。その結果、キチン合成酵素阻害剤によって、*CHS1* 遺伝子の発現は増加するが、*CHS2* 遺伝子の発現には変化がなかった (Fig. 7)¹³⁾。以上の結果から、キチン合成酵素阻害剤を用いた遺伝子発現を追求することは、キチン合成酵素阻害剤による新たな抗真菌剤の開発に有用な情報をもたらすものと考えられた。

ま と め

皮膚糸状菌の *CHS1* 遺伝子の塩基配列を解析し、DNA データバンクに登録しデータベース化するとともに系統樹を作製した。この系統樹は各菌種に分歧し、この結果は、形態学的、生化学的分類および交配試験に基づく分類を支持するとともに、他の分子生物学的分類結果とも一致することを報告した。さらに構築したデータベースを用いて、臨床分離株の迅速同定法を確立した。また本邦で今まで報告のなかった *A. benhamiae* を確認し、現在、兎および齧歯類の皮膚糸状菌症から *A. benhamiae* が日本各地で分離され、飼い主への感染例もあることを報告した¹⁴⁻¹⁷⁾。今後、本感染症については一層の増加が危惧され、さらなる疫学調査が必要である。

次に皮膚糸状菌症の病変部位から皮膚糸状菌の *CHS1* 遺伝子を PCR 法を用いて検出する迅速診断法を確立した。また *A. benhamiae* の *CHS1* および *CHS2* 遺伝子の完全長を決定するとともに、RT-PCR を用いてキチン合成酵素阻害剤の作用を検討した。

以上、*CHS* 遺伝子を解明することで、皮膚糸状菌の系統分類と菌種同定に有用な知見が得られ、同時に皮膚糸状菌症の迅速診断にも応用することができることが示された。さらに抗真菌剤の開発の端緒がえられたものと考えられた。

文 献

- 1) Chen-Wu JL, Zwicker J, Bowen AR, Robbins PW: Expression of chitin synthase genes during yeast and hyphal growth phases of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **6**: 497-502, 1992.
- 2) Cabib E, Shaw JA, Mol PC, Bowers B, Choi W-J: Chitin Biosynthesis and Morphogenetic Processes. In *The Mycota. Biochemistry and Molecular Biology III* (Esser K, Lemke PA eds), p.243-267, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1996.
- 3) Valdivieso MH, Duran A, Roncero C: Chitin synthases in yeast and fungi. *EXS* **87**: 55-69, 1999.
- 4) Bowen AR, Chen-Wu JL, Momany M, Young R, Szanislo PJ, Robbins PW: Classification of fungal chitin synthases. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 519-523, 1992.
- 5) Kano R, Nakamura Y, Watari T, Watanabe S, Takahashi H, Tsujimoto H, Hasegawa A: Phylogenetic analysis of 8 dermatophyte species using chitin synthase 1 gene sequences. *Mycoses* **40**: 411-414, 1997.
- 6) Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Tsujimoto H, Hasegawa A: Phylogenetic relation of *Epidermophyton floccosum* to the species of *Microsporum* and *Trichophyton* in chitin synthase 1 (*CHS1*) gene sequences. *Mycopathologia* **146**: 111-113, 1999.
- 7) Kano R, Aihara S, Nakamura Y, Watanabe S, Hasegawa A: Chitin synthase 1 (*Chs1*) gene sequences of *Microsporum equinum* and *Trichophyton equinum*. *Vet Microbiol* **78**: 85-90, 2001.
- 8) Kawasaki M, Aoki M, Ishizaki H, Nishimura K, Miyaji M: Phylogeny of *Epidermophyton floccosum* and other dermatophytes. *Mycopathologia* **134**: 121-128, 1996.
- 9) Summerbell RC, Haugland RA, A Li, Gupta AK: rRNA gene internal transcribed spacer 1 and 2 sequences of asexual, anthropophilic dermatophytes related to *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol* **37**: 4005-4011, 1999.
- 10) Kano R, Nakamura Y, Watari T, Watanabe S, Takahashi H, Tsujimoto H and Hasegawa A: Species-specific primers of chitin synthase 1 (*CHS1*) gene for the differentiation of the *Trichophyton mentagrophytes* complex. *Mycoses* **42**: 71-74, 1999.
- 11) Kano R, Nakamura Y, Yasuda K, Watari T, Watanabe S, Takahashi H, Tsujimoto H and Hasegawa A: The first isolation of *Arthroderma benhamiae* in Japan. *Microbiol Immunol* **42**: 575-578, 1998.
- 12) Kano R, Hirai A, Muramatsu M, Watari T, Hasegawa A: Direct detection of dermatophytes in skin samples based on sequences of the chitin synthase 1 (*CHS1*) gene. *J Vet Med Sci* **65**: 267-270, 2003.
- 13) Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Hasegawa A: Chitin synthase 1 and 2 genes of dermatophytes. *Stud Mycol* **47**: 49-56, 2002.
- 14) Mochizuki T, Kawasaki M, Ishizaki H, Kano R, Hasegawa A, Tosaki H, Fujiihiro M: Molecular epidemiology of *Arthroderma benhamiae*, an emerging

- pathogen of dermatophytoses in Japan, by polymorphisms of the non-transcribed spacer region of the ribosomal DNA. *J Dermatol Sci* **27**: 4-20, 2001.
- 15) Saito K, Kano R, Nakamura Y, Watanabe S and Hasegawa A: *Arthroderma benhamiae* infection in a rabbit. *J Vet Med Sci* **63**: 929-931, 2001.
- 16) Nakamura Y, Kano R, Nakamura E, Saito K, Watanabe S and Hasegawa A: Case Report. First report on human ringworm caused by *Arthroderma benhamiae* in Japan transmitted from a rabbit. *Mycoses* **45**: 129-131, 2002.
- 17) Kano R, Hirai A, Hasegawa A: Chitin synthase 1 gene of *Arthroderma benhamiae* isolates in Japan. *Mycoses* **45**: 277-281, 2002.

Chitin Synthase (*CHS*) Gene Analysis of Dermatophytes

Rui Kano

Department of Pathobiology, Nihon University School of Veterinary Medicine,
1866, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan

About 620-bp genomic DNA fragments of *CHS1* genes were amplified from 13 species of dermatophytes by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced. The phylogenetic analysis of *CHS1* gene fragments of these dermatophyte species revealed that 3 genera of *Epidermophyton*, *Microsporum* and *Trichophyton* were genetically different from each other. The molecular analysis of *CHS1* genes will provide useful information for the identification of dermatophytes. The species-specific primers were designed from the nucleotide sequences of *CHS1* gene in 3 teleomorphs of *T. mentagrophytes*. Using these primers the PCR analysis identified the clinical isolates of *T. mentagrophytes* from rabbit as *A. benhamiae*.

By PCR analysis with the dermatophyte specific primer pair, dermatophyte DNA could be diagnosed directly and rapidly in clinical skin samples.

The full length of *CHS1* and *CHS2* genes of *Arthroderma benhamiae* (one of the teleomorphs of *T. mentagrophytes*) was sequenced by 5'-RACE and 3'-RACE methods using cDNA as a template. The full length cDNA sequences of *CHS1* gene (3158 bp) and *CHS2* gene (3392 bp) were proved to encode 890 and 419 amino acids, respectively.

The amino acid sequences of *A. benhamiae CHS1* and *CHS2* in the conserved regions shared, respectively, about 70% and 80% sequence similarity with those of the other filamentous ascomycetes registered in the data base of the GeneBank. RT-PCR analysis suggested that chitin synthase inhibitors (nikkomycin Z and polyoxin D) might stimulate the expression of *CHS1* mRNA in *A. benhamiae*, and not the expression of *CHS2* mRNA.