

総 説

DNA 塩基配列解析による病原真菌の分類・同定

杉 田 隆¹ 西 川 朱 實²

¹ 明治薬科大学微生物学教室

² 明治薬科大学免疫生物学教室

要 旨

真菌界には約8万もの菌種が存在すると言われているが、感染に関与する菌種は1%にも満たない。その僅かの菌種においてさえ分類が長い間混乱していたが、近年ではDNA塩基配列解析の導入により病原真菌分類学は目覚ましい発展をとげている。医真菌学領域における分類の意義は、真の起因菌が明らかにされ診断・治療に貢献することにある。例えば、アトピー性皮膚炎の増悪因子として *Malassezia furfur* の関与が示唆されていたが、最近の研究では *M. furfur* は決して主要な菌種ではないことが明らかにされている。これは *M. furfur* が5菌種の複合体であったことに起因する。この分類学的な異質性を明らかにしたのはDNA塩基配列解析である。同様の例は、*Candida albicans*/*C. dubliniensis* や *Trichosporon cutaneum*/*T. asahii* にみることができる。DNA塩基配列解析は正確な同定を可能にする。汎用される解析遺伝子はrRNAである。D1/D2 26S rDNAあるいはITS領域の塩基配列を決定すればほとんどすべての病原真菌の同定は可能である。

本稿では主要な病原性酵母を例にしてDNA塩基配列解析に基づく実践的な分類・同定法について論じる。

Key words: 分類 (taxonomy), 同定 (identification), DNA塩基配列解析 (DNA sequence analysis)

解析対象となる遺伝子

分類同定に用いる遺伝子は、すべての真菌に存在し、かつ適度な進化速度を示すことが必要である。細菌、真菌を問わず広く用いられている遺伝子はrRNAである。病原性酵母の代表例として子囊菌系不完全酵母 *Candida albicans* のrRNA遺伝子の構造をFig. 1に示す。rRNA遺伝子は、18S (small subunit), 5.8S, 26S (large subunit), および5Sの4つのサブユニット、また、18Sと26Sの間にITS (internal transcribed spacer), 26Sと18Sの間にIGS (intergenic spacer) 領域が存在する。4つのサブユニットの長さは、菌種にかかわらずほぼ同じである。一方、ITSおよびIGSは、菌種により長さは著しく異なる。例えば、*C. albicans* のITSの全長は、約300bpであるが、同属の *C. glabrata* ではその2倍以上の長さを示す。一般に、26Sサブユニットの部分塩基配列 (Domain 1 および2領域で約600bpの長さ) およびITS1/2領域が分類・同定に適している。

再分類が与えたインパクト

結論から先に述べると、ほとんどすべての病原性酵母の分類に問題があり、再分類の必要性があった。この再分類が診断・治療あるいは病態解析に与えた影響は大きい。

1) *Candida*

C. albicans から *C. dubliniensis* が独立した例はあまりに有名である¹⁾。 *C. dubliniensis* は、主にHIV患者の口腔から分離される。分子系統的には *C. albicans* に極めて近縁である。その他、 *C. guilliermondii*²⁾、 *C. parapsilosis*³⁾、 *C. famata*⁴⁾ および *C. haemulonii*⁵⁾ も分類学的には2~3菌種に細分類することができるが、臨床材料からの非典型菌の分離頻度は極めて低く、薬剤感受性にも大きな差異はない。

2) *Trichosporon*

従来、トリコスポロン症の起因菌は、 *T. cutaneum* あるいは *T. beigelii* と考えられてきたが、Guéhoら⁶⁾ および著者ら⁷⁾ の解析から *T. cutaneum* は10菌種以上の複合菌であることが明らかにされた。これに基づいて感染部位により起因菌が異なることも明らかにされた^{8, 9)}。深在性感染症の起因菌は、 *T. asahii* および *T. mucoides* であり、表在性感染症は、 *T. asteroides* であった。これらの菌種は、従来すべて *T. cutaneum* として分類・同定されていた菌種である。特に、深在性トリコスポロン症の起因菌の分類には臨床上の意義もある。 *T. mucoides* 分離株はアムホテリシンBに対するMICが0.25 μg/ml であるのに対し、 *T. asahii* 分離株の約70%は1 μg/ml 以上であり、起因菌種により薬剤感受性が異なる¹⁰⁾。

3) *Malassezia*

澱風、毛包炎、脂漏性皮膚炎およびアトピー性皮膚炎に関与する。これらの皮膚疾患の原因菌種あるいは増悪因子は、 *M. furfur* と考えられていた。1996年にGuého

別刷請求先: 杉田 隆

〒204-8588 東京都清瀬市野塩2-522-1

明治薬科大学微生物学教室

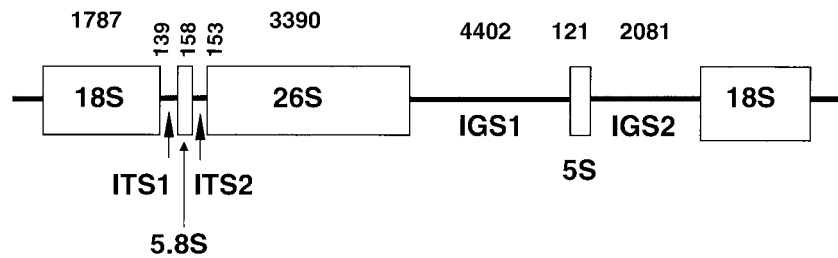


Fig. 1. Schematic representation of the rDNA locus in *Candida albicans*.
ITS, internal transcribed spacer; IGS, intergenic spacer.

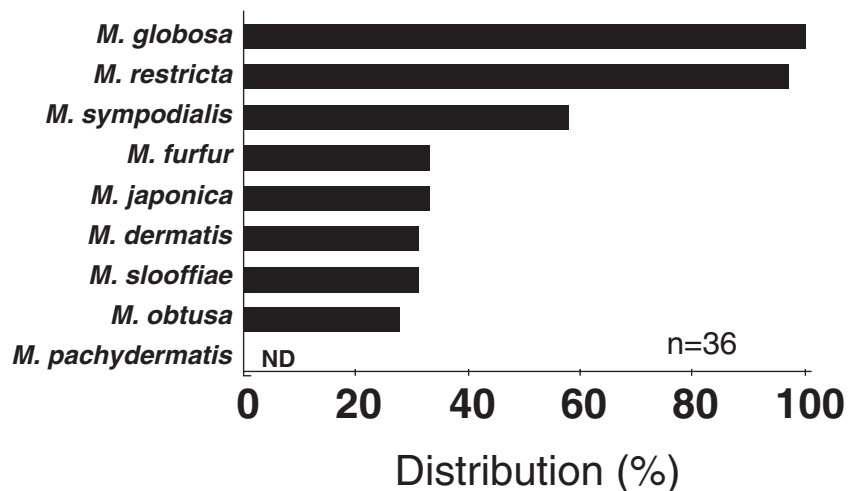


Fig. 2. *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients.

ら¹¹⁾のrRNA解析から、本菌は5菌種から構成されることが明らかにされた。著者ら¹²⁾はこの新しい分類に従って、アトピー性皮膚炎患者皮膚の菌相を解析したところ、*M. globosa*および*M. restricta*はほぼ全例の患者から検出されたのに対して、それ以外の菌種は60%以下の検出率であった (Fig. 2)。主要な2菌種は、従来*M. furfur*として取り扱われていた菌種であり、本来の*M. furfur*はわずか30%程度しか患者皮膚には存在していないことが明らかになった。その他の*Malassezia*の関与が示唆される各種皮膚疾患についても菌相解析をすすめているが、いずれにおいても*M. furfur*は主要なフローラではなかった (unpublished data)。

DNA塩基配列解析による同定

1) 同定基準

DNA塩基配列を用いて同定するには配列の類似度に基づく同定基準を決定する必要がある。PetersonとKurtzman¹³⁾は26Sの部分塩基配列から同種株は約99%以上の塩基配列類似度を示すことを報告した。その後、著者ら¹⁴⁾は、ITS領域の類似度を絶対的同定基準である染色体DNA-DNA交雑実験に基づくDNA相同値 (DNA relatedness) と比較した (Fig. 3)。その結果、同一種内の変種以上の関係ではITS領域の類似度は約99%以上であり、別種はそれ未満であることを示した。26SおよびITS領域の塩基配列類似度に基づく同定基準

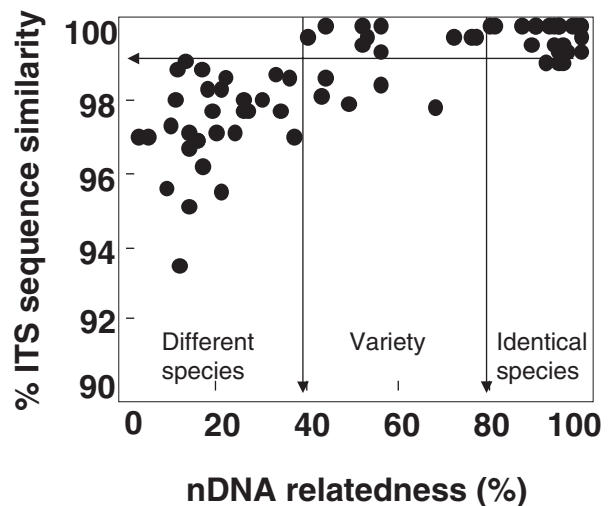


Fig. 3. Relationship between the nuclear DNA relatedness value and similarity of the combined ITS 1 and 2 sequences.

は分類群によっては多少の例外も存在するが、現時点では概ね妥当であると考えてよい。

2) 種以下の同定

上述した通り「菌種名を与える」作業は、D1/D2 26SおよびITS領域の解析で十分である。変種間、あるいは株レベルでの同定を行いたい場合は、26Sと18Sの間に存在するIGS領域の解析が優れた威力を発揮する。代

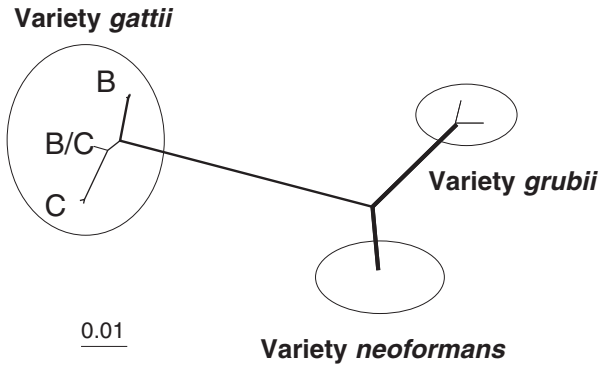


Fig. 4. Molecular phylogenetic trees for three varieties of *Cryptococcus neoformans* generated from sequences of IGS1 region.

Table 1. Taxonomic and identification criteria in each subunit and region in rRNA gene

	Class	Family	Genus	Species	Strain
18S				
D1/D2 26S				
ITS
IGS

表例が *Cryptococcus neoformans* に存在する 3 変種 (variety *gattii*, variety *grubii*, variety *neoformans*) の明確な区別である。ITS 領域の解析でも区別は可能であるが 3 変種間の DNA 塩基配列の差異は 1% 程度である。ところが IGS 領域では、それぞれの変種間の類似度は 40~65% であり区別がより容易である (Fig. 4)¹⁵⁾。さらに variety *gattii* に存在する血清型 (B および C 型) とも相関していた。Table 1 に、rRNA 遺伝子の各々のサブユニットおよび領域の分類・同定上の位置付けについてまとめた。

3) IGS 領域解析の応用

IGS 配列はさらに興味深い情報をもたらす。アトピー性皮膚炎患者皮膚の主要フローラである *M. globosa* の

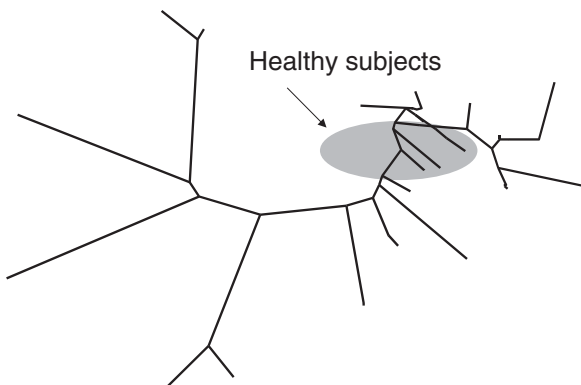


Fig. 5. Phylogenetic tree of *M. globosa* colonizing the skin surface of patients with atopic dermatitis and healthy subjects based on DNA sequences of the IGS 1 region.

IGS 配列を解析したところ、患者由来株と健康人由来株では、IGS 配列が異なっていた (Fig. 5)¹⁶⁾。また、*T. asahii* 臨床分離株では、IGS 配列は地域特異性を示した¹⁷⁾。IGS 配列は著しい種内多様性を示すことから、その解析の応用範囲は広いと考えられる。

おわりに

本稿では、病原真菌の分類・同定の進歩にいかん DNA 塩基配列解析が寄与してきたかを述べた。少なくとも病原性酵母に限ればその分類の大部分は解決された。また同定基準も確立されてきている。今後は、本法の普及のために、「DNA 塩基配列解析法」を標準化する必要がある。

文 献

- Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC: *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* **141**: 1507-1521, 1995.
- San Millan RM, Wu LC, Salkin IF, Lehmann PF: Clinical isolates of *Candida guilliermondii* include *Candida fermentati*. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 385-393, 1997.
- Lin D, Wu LC, Rinaldi MG, Lehmann PF: Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J Clin Microbiol* **33**: 1815-1821, 1995.
- Nishikawa A, Tomomatsu H, Sugita T, Ikeda R, Shinoda T: Taxonomic position of clinical isolates of *Candida famata*. *J Med Vet Mycol* **34**: 411-419, 1996.
- Lehmann PF, Wu LC, Pruitt WR, Meyer SA, Ahearn DG: Unrelatedness of groups of yeasts within the *Candida haemulonii* complex. *J Clin Microbiol* **31**: 1683-1687, 1993.
- Guého E, Smith MT, de Hoog GS, Billon-Grand G, Christen R, Batenburg-van der Vegte: Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. *Antonie van Leeuwenhoek* **61**: 289-316, 1992.
- Sugita T, Nishikawa A, Shinoda T: Reclassification of *Trichosporon cutaneum* by DNA relatedness by using the spectrophotometric method and the chemiluminometric method. *J Gen Appl Microbiol* **40**: 397-408, 1994.
- Sugita T, Nishikawa A, Shinoda T, Kume H: Taxonomic position of deep-seated, mucosa-associated, and superficial isolates of *Trichosporon cutaneum* from trichosporonosis patients. *J Clin Microbiol* **33**: 1368-1370, 1995.
- Guého E, Improvisi L, de Hoog GS, Dupont B: *Trichosporon* on humans a practical account. *Mycoses* **37**: 3-10, 1994.
- Toriumi Y, Sugita T, Nakajima M, Matsushima T, Shinoda T: Antifungal pharmacodynamic characteristics of amphotericin B against *Trichosporon asahii*, using time-kill methodology. *Microbiol Immunol* **46**: 89-93, 2002.
- Guého E, Midgley G, Guillot J: The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**: 337-355, 1996.

- 12) Sugita T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Shinoda T, Nishikawa A: Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. *J Clin Microbiol* **39**: 3486-3490, 2001.
- 13) Peterson SW, Kurtzman CP: Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. *System Appl Microbiol* **14**: 124-129, 1991
- 14) Sugita T, Nishikawa A, Ikeda R, Shinoda T: Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *J Clin Microbiol* **37**: 1985-1993, 1999.
- 15) Sugita T, Ikeda R, Shinoda T: Diversity among strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* as revealed by a sequence analysis of multiple genes and a chemotype analysis of capsular polysaccharide. *Microbiol Immunol* **45**: 757-768, 2001.
- 16) Sugita T, Kodama M, Saito M, Ito T, Kato Y, Tsuboi R, Nishikawa A: Sequence diversity of the intergenic spacer region of the rRNA gene of *Malassezia globosa* colonizing the skin of patients with atopic dermatitis and healthy individuals. *J Clin Microbiol* **41**: 3022-3027, 2003.
- 17) Sugita T, Nakajima M, Ikeda R, Matsushima T, Shinoda T: Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *J Clin Microbiol* **40**: 1826-1830, 2002.

Molecular Taxonomy and Identification of Pathogenic Fungi Based on DNA Sequence Analysis

Takashi Sugita¹, Akemi Nishikawa²

¹Department of Microbiology, and ²Department of Immunobiology, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan

Although approximately 80,000 fungi are known, less than 1% are associated with human infection. However, their taxonomy has long been insufficient. During the last decade, DNA sequence analysis was introduced to the taxonomy of pathogenic fungi. Taxonomic advances in the field of medical mycology are helping to identify the causative agents of infectious diseases accurately, facilitating diagnosis and treatment. For example, *Malassezia furfur* was long considered the major microflora in atopic dermatitis, yet recent studies have indicated that this is not the case, as *M. furfur* is taxonomically heterogeneous and consists of five species. DNA sequence analysis resolved its taxonomic heterogeneity. Similar examples can be seen in “*Candida albicans* and *C. dubliniensis*” and “*Trichosporon cutaneum* and *T. asahii*”. DNA sequence analysis also enables accurate identification of fungi. At present, almost all pathogenic fungi can be identified by determining the D1/D2 26S rDNA and ITS region of rRNA gene. This paper describes the practical taxonomy and identification of pathogenic fungi based on DNA sequence analysis.

この論文は、第47回日本医真菌学会総会の“シンポジウム2：分子生物学の役割”において発表されたものです。