

真菌症遺伝子診断とその展望

植 村 浩 一

帝京大学大学院医学研究科 医真菌研究センター／ゲノム解析リサーチ・センター

要 旨

遺伝子技術を利用した真菌症対策の中で、特に診断と疫学への応用について現状をまとめた。またその新たな展開の可能性として、定温遺伝子増幅法：loop-mediated isothermal amplification (LAMP) による遺伝子診断法と、multilocus sequence typing (MLST) による遺伝子菌株識別法を紹介した。これら新規遺伝子技術の真菌症研究上、対策実践上の有用性は計り知れない。

Key words: molecular diagnosis (遺伝子診断), polymerase chain reaction (PCR), loop-mediated isothermal amplification (LAMP), multilocus sequence typing (MLST)

はじめに

真菌症対策上、確実な診断が必須であることは論を待たない。また、特に日和見感染としての色彩が強い本症の感染・発症様式を考えると、疫学的解析の重要性も明らかである。一般に特異的な臨床所見を欠く本症の診断は困難であるため、理論的にはほぼ全ての菌種を各々迅速・高感度・特異的に検出・同定しうる検査法として遺伝子診断法に期待が集められてきた。また、表現形質に乏しい起因菌の型別方法としても、起因菌のゲノム塩基配列解析が、事実上唯一最後の手段と考えられ、今日までその研究と実用性の検討が続いている。

真菌症対策への遺伝子技術によるアプローチ

診断・治療ともに困難を極める真菌症に対して、遺伝子技術を応用する試みは1990年以降断続的に行われてきた (Fig. 1)。

いわゆる (試験管) 遺伝子診断としては、臨床検体から抽出した核酸 (通常はDNA) を Polymerase chain reaction (PCR) によって検出した研究が数多く報告されている¹⁾。検体中から起因菌遺伝子、またはその転写産物が抽出できる以上、理論的には培養を経ることなく起因菌の病原性、抗真菌薬感受性等の情報が得られる可能性もある。しかし、病原真菌において遺伝子診断に耐える程、明らかに起因菌の表現形質を反映する塩基配列はまだ特定されていない。

病理組織にみる形態的特徴から起因菌種を同定する試み (ガラス板遺伝子診断) としては、*in situ* ハイブリダイゼーション法²⁾ などが報告されており、各種病原系状

菌の同定が可能となりつつある。今後検出手順 (技術) とプローブの標準化が可能となれば広く利用されることが期待できる。

真菌症の遺伝子治療としては、アンチセンス技術³⁾、RNA 干渉 (RNAi)⁴⁾ を利用した遺伝子発現制御による病原治療と、DNA ワクチン⁵⁻⁷⁾ を利用した感受性対策の、いずれも実験室レベルの成果報告が続いており、臨床応用可能性の評価が待たれている。

これら様々な試みの中で、現在のところ部分的ながら臨床応用がなされている (試験管) 遺伝子診断について以下に論じ、続いて菌株型別による疫学解析法の可能性について述べる。

遺伝子診断の現状と問題

一般に真菌症の遺伝子診断を論ずる場合、(1) 分離菌株の菌種を同定しようとする遺伝子同定 (Molecular identification) と、(2) 菌種内における型別を同定しようとする遺伝子型別 (Molecular typing)、および (3) 臨床検体から分離培養を経ることなく、起因菌種遺伝子の有無と菌種同定を直接行おうとする狭義の遺伝子診断 (Molecular diagnosis: 試験管遺伝子診断, ガラス板遺伝子診断の両者) が含まれている。

主要病原真菌に関する限り、遺伝子同定では分離菌株の抽出遺伝子から、菌種特異的なリボソーム RNA 遺伝子⁸⁾ またはそのスペーサー領域⁹⁾ を PCR によって増幅後、直接塩基配列決定法による菌種同定が可能である。また、同遺伝子群を標的とした PCR¹⁰⁾ または TaqManTM PCR¹¹⁾ による狭義の「真菌症遺伝子診断」法が本邦では受託検査として施行され、PCR 法キットの販売も行われている。これら従来の「真菌遺伝子診断法」は、他の検査法で起因菌の同定・検出が不能な場合に、特に有用性が高く、比較的迅速性にも優れている。

別刷請求先：植村 浩一

〒192-0395 東京都八王子市大塚 359

帝京大学医真菌研究センター

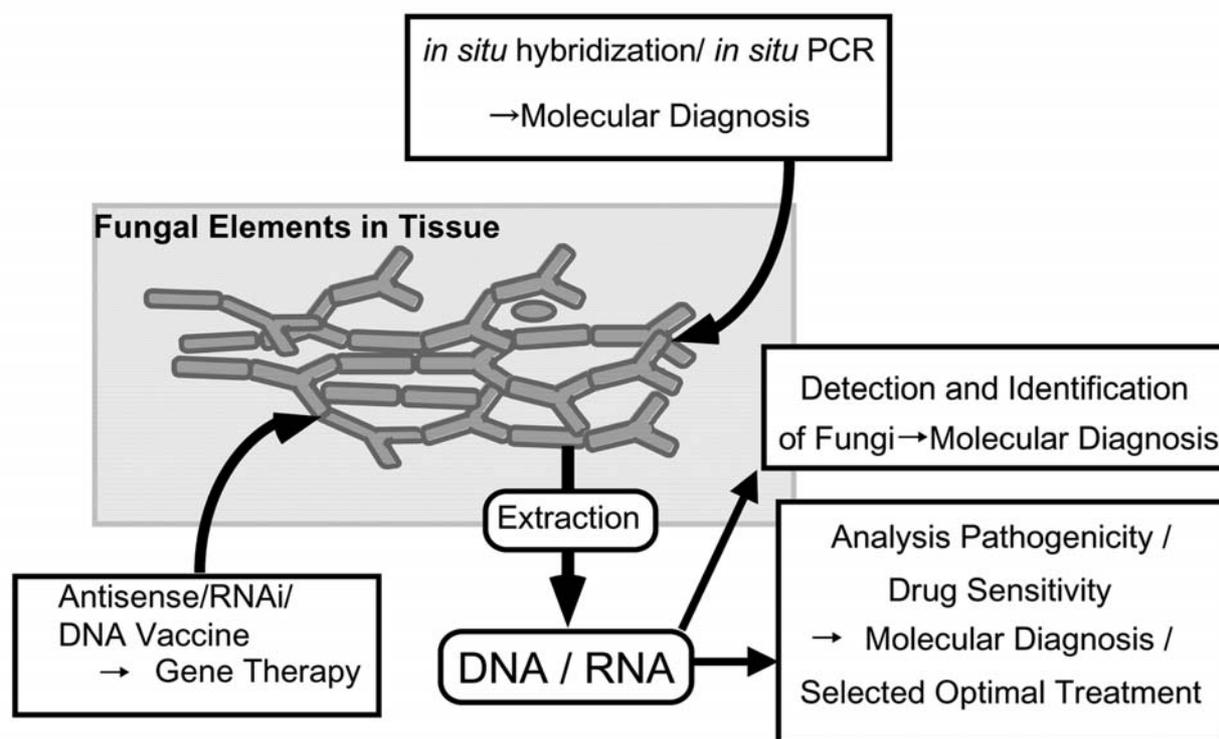


Fig. 1. Molecular biological approach against fungal infection

しかしその反面、検体からの核酸抽出が煩雑であり、また一般に期待されている程高感度ではない上に、反応にはサーマル・サイクラーが必須である点が実施上の制限となっていた。また PCR における反応特異性の限界から、少なくとも電気泳動による増幅産物長の解析、場合によっては塩基配列の解析による産物の確認が求められる。そのため、多くの施設において遺伝子診断は実際上外部機関への受託によってはじめて可能となる検査となっており、本来迅速性が利点の一つであった遺伝子診断法の臨床応用が大きく妨げられていた。

分子生物学的疫学解析の現状と問題

主要病原菌種について信頼性が高く解析が容易な遺伝子多型領域が見いだされていないため、疫学解析に利用できる手段は限られている。海外では分離菌株から抽出した全ゲノムの制限酵素断片多型 (RFLP) を、Ca3 プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションによって

Table 1. Genome size and number of chromosomes in fungi¹⁶⁻¹⁸⁾

Species	Genome size (Mbp)	Number of chromosomes
<i>Candida albicans</i>	16	8
<i>Candida glabrata</i>	13	13
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12	16
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	13.8	3
<i>Pneumocystis carinii</i>	7.7-8	13-15
<i>Cryptococcus neoformans</i>	18-24	12-13
<i>Aspergillus fumigatus</i>	30	8
<i>Aspergillus nidulans</i>	28.5	8
<i>Histoplasma capsulatum</i>	23-25	7
<i>Neurospora crassa</i>	43	7

可視化、解析する手法¹²⁾ が用いられていた。また本邦ではパルスフィールド電気泳動法 (PFGE) によって、様々な病原真菌菌株の核型解析が報告されてきた¹³⁾。いずれも優れた遺伝子多型解析法であるが、手法がやや煩雑であったため、実際上は特定の研究施設のみで可能な方法と認識されている。また、ゲノム塩基数が 20 Mbp を超える糸状菌 (Table 1) に対して実際上適用不能であることも PFGE の難点の一つとなっている。

分子生物学的手法による真菌症遺伝子診断と疫学的解析の実用化・普遍化の可能性

PCR を基幹とした遺伝子診断法の抱える様々な問題点を解決するべく様々な新規特異的遺伝子増幅系が公表された。その中で、研究者が独自にプライマー系を設計することによって自由に遺伝子検出系を開発できるものは、現時点で栄研化学株式会社の loop-mediated isothermal amplification (LAMP)¹⁴⁻¹⁵⁾ 法に限られている。本法は、特異的塩基配列の検出が一定温度の反応で迅速 (20~60 分) に可能であり、遺伝子診断をサーマル・サイクラーから解き放った画期的なシステムと言える。また、本法をはじめとした真菌遺伝子増幅産物に対して、DNA チップを用いた検出・同定系を組み合わせること (Lab on chip 化) によって、より実際的な真菌症遺伝子診断システムの構築 (特に自動化) も可能となるものと思われる (Fig. 2)。

菌株の識別による疫学解析系としては、永らく遺伝子解析が唯一の方法と考えられながら上述の状況から進展は少なかった。しかし、近年のゲノム塩基配列解析決定技術の普遍化、簡便化に伴って、新たな方法論の可能性

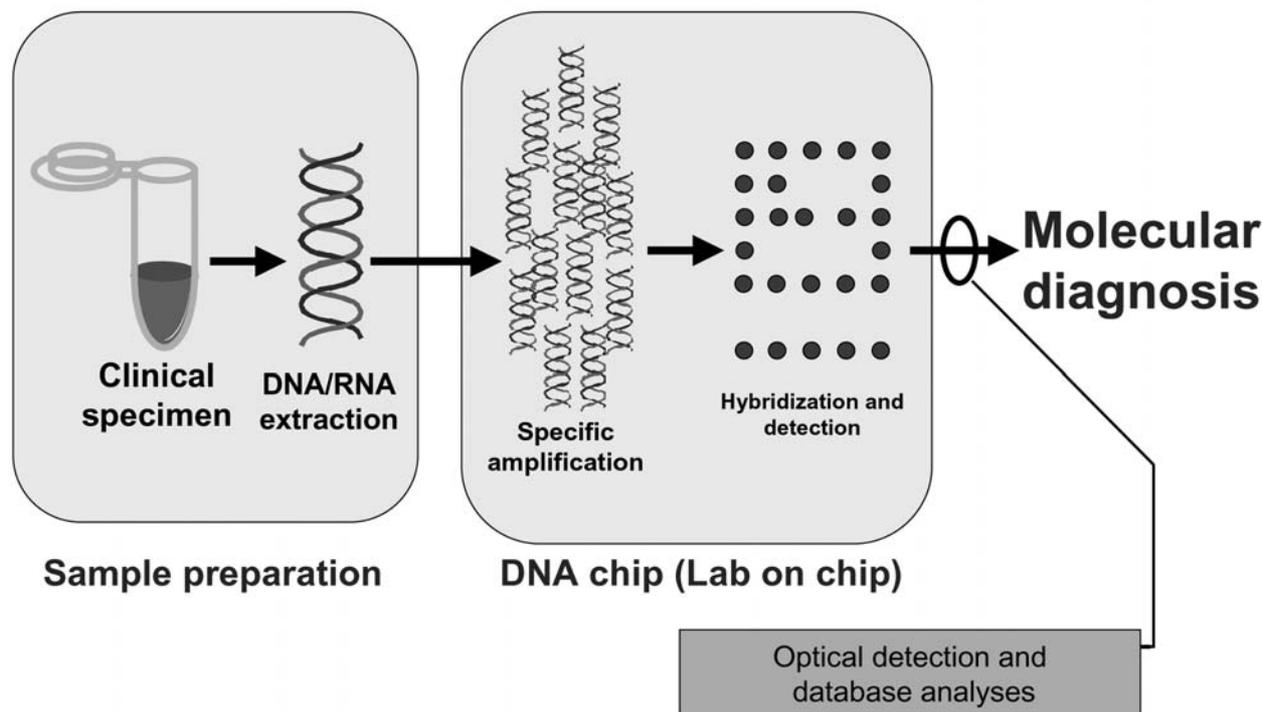


Fig. 2. Molecular diagnosis of fungal infection based on the combination of specific DNA/RNA amplification and DNA chip (Lab on chip)

が提案された。複数の特定遺伝子における遺伝子塩基配列多型を、塩基配列レベルで特定し、その配列多型を集積することによって菌株識別を行おうとする、multilocus sequence typing (MLST) による遺伝子菌株識別法と、その応用についての基礎研究ならびに多施設評価が報告され始めたためである。自動塩基配列決定装置が普遍化した今日において、本法の院内真菌感染対策上の有用性は計り知れない。現段階で、本法の適用範囲は、わずかに *Candida albicans*¹⁹⁾ と *C. glabrata*²⁰⁾ に限られているが、病原真菌ゲノムプロジェクトの進行によって新たな菌種への適応が期待できる。

おわりに

遺伝子技術を利用した真菌症対策の中で、特にその診断と疫学への応用について現状をまとめ、またその新たな展開の可能性を紹介した。真菌症の診断と治療を考えた時、今我々の手中にある情報と手段はあまりに貧弱である。しかし、遺伝子技術の進歩は、この領域の研究と実践の上で希望を与える新しい可能性を、より簡単に、より確実なものとして、次々と我々に示しつつある。

多くの研究者の参入と、有用な情報の交換、および協力関係による斯界の研究発展を期待したい。

文 献

- 1) Chen SC, Halliday CL, Meyer W: A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Med Mycol* **40**: 333-357, 2002.
- 2) Hayden RT, Isotalo PA, Parrett T, Wolk DM, Qian X,

Roberts GD, Lloyd RV: *In situ* hybridization for the differentiation of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Pseudallescheria* species in tissue section. *Diagn Mol Pathol* **12**: 21-26, 2003.

- 3) de Monbrison F, Picot S: Introducing antisense oligonucleotides into *Pneumocystis carinii*. *J Microbiol Methods* **50**: 211-213, 2002.
- 4) Sommer U, Liu H, Doering TL: An alpha-1,3-mannosyltransferase of *Cryptococcus neoformans*. *J Biol Chem* **278**: 47724-47730, 2003.
- 5) Wong LP, Woo PC, Wu AY, Yuen KY: DNA immunization using a secreted cell wall antigen Mplp is protective against *Penicillium marneffei* infection. *Vaccine* **20**: 2878-2886, 2002.
- 6) Jiang C, Magee DM, Ivey FD, Cox RA: Role of signal sequence in vaccine-induced protection against experimental coccidioidomycosis. *Infect Immun* **70** (7): 3539-3545, 2002.
- 7) Souza MC, Correa M, Almeida SR, Lopes JD, Camargo ZP: Immunostimulatory DNA from *Paracoccidioides brasiliensis* acts as T-helper 1 promoter in susceptible mice. *Scand J Immunol* **54**: 348-356, 2001.
- 8) Sugita T, Makimura K, Nishikawa A, Uchida K, Yamaguchi H, Shinoda T: Partial sequences of large subunit ribosomal DNA of a new yeast species, *Trichosporon domesticum* and related species. *Microbiology and Immunology* **41** (7): 571-573, 1997.
- 9) Makimura K, Tamura Y, Mochizuki T, Hasegawa A, Tajiri Y, Hanazawa R, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H: Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Clin Microbiol* **37** (4): 920-924, 1999.

- 10) Makimura K, Murayama SY, Yamaguchi H: Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol* **40**(5): 358-364, 1994.
- 11) Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y, Kanda Y, Kashima T, Yamazaki Y, Hamaki T, Mori Si, Akiyama H, Mutou Y, Sakamaki H, Osumi K, Kimura S, Hirai H: Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* **33**: 1504-1512, 2001.
- 12) Pujol C, Joly S, Lockhart SR, Noel S, Tibayrenc M, Soll DR: Parity among the randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and Southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **35**: 2348-2358, 1997.
- 13) Iwaguchi SI, Sato M, Magee BB, Magee PT, Makimura K, Suzuki T: Extensive chromosome translocation in a clinical isolate showing the distinctive carbohydrate assimilation profile from a candidiasis patient. *Yeast* **18**: 1035-1046, 2001.
- 14) Eiken GRNOME SITE, <http://loopamp.eiken.co.jp/>, Eiken Chemical Co.,Ltd., access 2004.02.09
- 15) Nagamine K, *et al.*: Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* **16**: 223-229, 2002.
- 16) Fungi genome projects in Entrez, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FUNGI/funtab.html>, access 2004.02.09
- 17) *Histoplasma capsulatum* Sequencing at the GSC, <http://www.genome.wustl.edu/projects/hcapsulatum/>, access 2004.02.09
- 18) Génolevures, <http://cbl.labri.u-bordeaux.fr/Genolevures/>, access 2004.02.09
- 19) Bounoux ME, Tavanti A, Bouchier C, Gow NA, Magnier A, Davidson AD, Maiden MC, D'Enfert C, Odds FC: Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **41**: 5265-5266, 2003.
- 20) Dodgson AR, Pujol C, Denning DW, Soll DR, Fox AJ: Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. *J Clin Microbiol* **41**: 5709-5717, 2003.

Molecular Methods as a Diagnostic Tool for Fungal Infections and Their Prospect

Koichi Makimura

Department of Molecular Biology and Gene Diagnosis,
Institute of Medical Mycology (TIMM) and Genome Research Center (GRCT),
Graduate School of Medical Science, Teikyo University

The current status of molecular biological methods to control mycoses was described. New tools for detecting of specific fungal DNA by reaction at a constant temperature with Loop-mediated isothermal amplification of DNA (©LAMP, Eiken Chemical Co., Ltd.), and for strain typing by multilocus sequence typing (MLST) will greatly aid in managing complex fungal infection.

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。