

総 説

Malassezia の多遺伝子解析による系統分類と同定の新展開 ミトコンドリア・チトクローム *b* 遺伝子

横 山 耕 治

千葉大学真菌医学研究センター

要 旨

Malassezia 属は、相継いで新種が記載されたため11種となった。これらの種はチトクローム *b* 遺伝子の部分配列 (396 bp) において、それぞれ固有の配列を示し、種内多型を示す種もみられた。この塩基配列から種の同定が可能であり、チトクローム *b* 遺伝子の進化速度に比例したアミノ酸置換率を利用すれば進化系統に近い系統関係を明らかにできる。属内の系統関係には、塩基配列が有効で、種内変異や疫学的検討も可能である。担子菌系酵母の推定したアミノ酸配列から系統樹を作成すると *Malassezia* 属は独立なクラスターを形成し従来の分類学的特徴を反映していた。塩基配列による属内の系統関係では、*M. sympodialis* と *M. dermatis* は非常に近縁でアミノ酸配列に翻訳すると同じ配列を示した。*Malassezia* 属の種同定のため、種に特異的な変異を含む256塩基を増幅する *Malassezia* 属に共通なプライマーを設計し、種を決定するためのプローブとしてDNAマイクロアレイを作成した。

Key words: チトクローム *b* (cytochrome *b*)、マラセッチア (*Malassezia*)、同定 (identification)、系統関係 (phylogenetic relationship)

はじめに

ミトコンドリアのチトクローム *b* 遺伝子は、電子伝達系の一部を担う重要なタンパク質をコードしており、ミトコンドリアを持つ真核生物に共通に存在している。さらに、細菌の一部にはホモロジーの高い遺伝子を持つものもあり、ある種の細菌との共生により真核細胞が形成されたとするミトコンドリアの共生説を支持している。この遺伝子を真菌の同定や系統関係の解析に使う利点として次の5点を上げることができる。①細胞質遺伝のため組み替えが起こりにくい、②真核生物に共通な機能タンパク質で保存性が高く真核生物全体の系統関係を調べられる、③アミノ酸の置換率が進化速度に比較的比例している、④核遺伝子に比較して変異率が高い、⑤細胞あたりのコピー数が多いため検出感度が高い、などの特徴を持っている。我々が病原真菌の同定や系統関係を解析するためにチトクローム *b* 遺伝子を調べようとしていた時期に、すでに、ほ乳類¹⁻⁴⁾ や鳥類^{2, 5-8)} では使われていたが、真菌では、6種⁹⁻¹¹⁾ のみで系統的な研究は成されていなかった。我々は1998年に病原性 *Aspergillus* のチトクローム *b* 遺伝子解析を行い、同定と系統解析に有効であることを示した¹²⁾。以来、*A. fumigatus* グループ¹³⁾、*A. flavus* グループ¹⁴⁾、*A. niger* グループ¹⁵⁾ の各関連菌、*Exophiala jeanselmei* と関連菌¹⁶⁾、病原性 *Candida* 属菌¹⁷⁻¹⁹⁾、*Rhodo-*

torula 属菌と関連する担子菌系酵母²⁰⁾、*Cryptococcus neoformans* と関連菌²¹⁾ について報告した。*Penicillium* 属菌、*Fusarium* 属菌、皮膚糸状菌群の解析は進み投稿準備中である。その他の主要な病原真菌と関連菌の解析も進んでおり、チトクローム *b* 遺伝子の部分配列約400塩基を比較すると種に特有な配列が見いだされ、種内変異を示す種も明らかになっている。

Malassezia 属は、杉田ら^{22, 23)} と平井ら²⁴⁾ により相継いで新種が記載されたため11種となった。

1. チトクローム *b* のアミノ酸配列に基づく真核生物の系統樹

DNA 塩基配列のデータベースより検索した、ほ乳類、鳥類、植物のチトクローム *b* 遺伝子塩基配列から推定したアミノ酸配列と我々が解析した子囊菌類、担子菌、接合菌、子囊菌系酵母、担子菌系酵母の塩基配列から推定したアミノ酸配列を基に平均距離法 (UPGMA: unweighted pair group method with arithmetic mean) により系統樹を作成した (Fig. 1)。平均距離法は距離の期待値が進化時間に近似的に比例する場合には、正しい分岐距離と樹形が示される。従って、DNA の塩基置換率よりもパラツキが少なく比較的進化時間に比例しているアミノ酸配列は、平均距離法により正しい系統樹が期待できる。この系統樹 (Fig. 1) は、ほ乳類、鳥類、植物、菌類が独立したクラスターを形成しており、分岐の時期も、化石などより推測されている従来の時期と違わないと思われる。菌類では分裂系酵母が早い時期に分岐し、ほぼ同時

別刷請求先：横山 耕治

〒260-8673 千葉市中央区亥鼻 1-8-1
千葉大学真菌医学研究センター

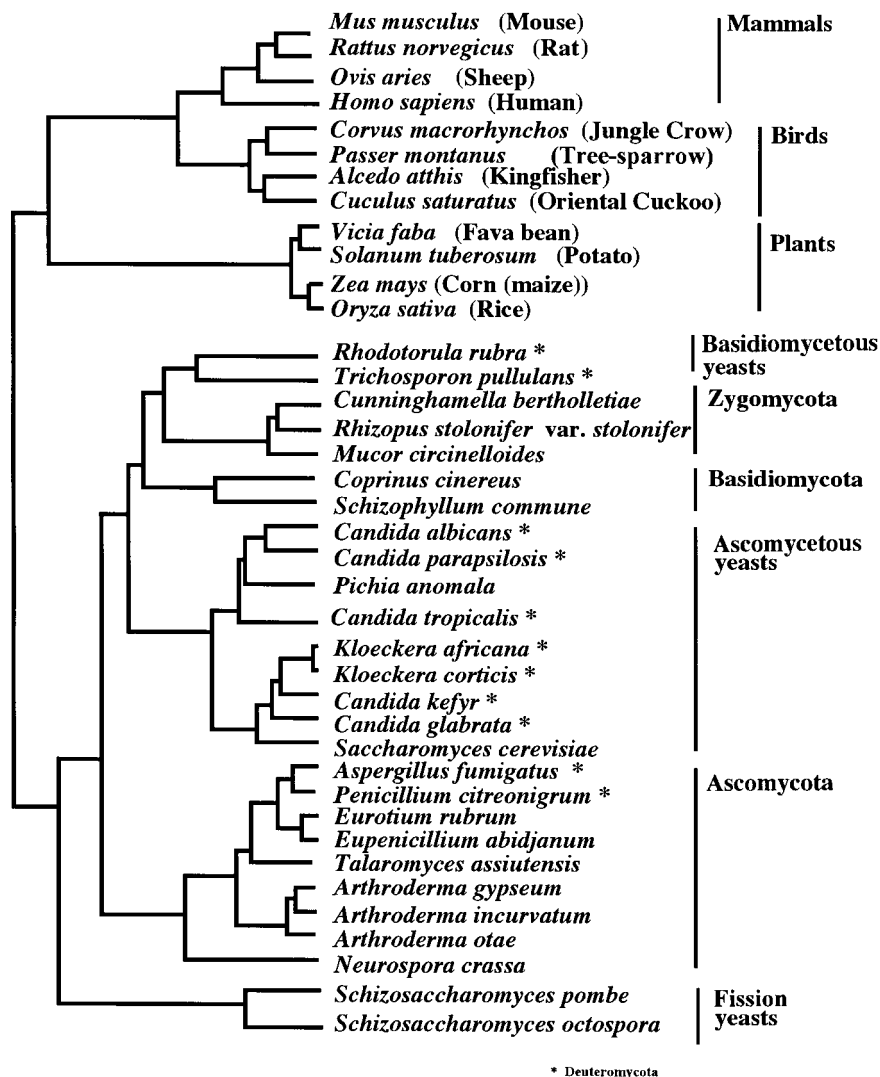


Fig. 1. Phylogenetic tree of the Eukaryote based on deduced amino acid sequences from cytochrome *b* gene. UPGMA was used.

期に子囊菌, 担子菌, 接合菌, 担子菌系酵母, 子囊菌系酵母が分岐したように思われる。これらの分岐時期は, チトクローム *b* のアミノ酸配列による進化速度が, それぞれの生物に共通と考えた場合には, ほ乳類と鳥類とが分岐した以前に分岐していたと推測できる。さらに, 特徴的なことは調べているアミノ酸配列中に子囊菌類のみが1個のアミノ酸, つまり塩基3個の欠落が観察された。これは子囊菌が他の菌類と分岐した後欠落が起こり, この欠落を現在まで引き継いでいると推測できる。チトクローム *b* 遺伝子やミトコンドリア遺伝子の解析が進めば更に生物の進化の謎が解けるものと思われる。

2. 担子菌系酵母と *Malassezia* 属菌の系統関係

Malassezia 属菌を含む担子菌系酵母のチトクローム *b* 塩基配列から推定したアミノ酸配列を基に平均距離法により系統樹を作成した (Fig. 2)。この系統樹から *Malassezia* 属菌は, 一つの単一のクラスターを形成し属のコンセプトとチトクローム *b* のアミノ酸配列の置換率は相関していると言える。機能タンパク質のアミノ酸置換は, 時として致命的となり, 生存上重要でアミノ酸配

列は系統進化において保存と同時に選択もされてきた。塩基置換はアミノ酸配列に影響を及ぼさない場合が多く機能的には, 翻訳速度などの影響を除けば生存に大きく影響する事はないと考えられる。このことは, 塩基置換速度と進化速度にバラツキを生じさせている。ミトコンドリアのチトクローム *c* のアミノ酸配列は塩基配列よりも進化速度に比例している事が示されている。チトクローム *b* のアミノ酸配列による系統樹 (Fig. 2) で, *M. sympodialis* と *M. dermatis* は, 同じアミノ酸配列を示し, 極近縁の種であることを意味した。細胞壁に存在するキシロースの有無で担子菌系酵母を大きく分ける化学分類があり, チトクローム *b* のアミノ酸配列から作成した系統樹ではこのキシロースの有無でそれぞれのクラスターに分かれた。*Malassezia* 属, *Trichosporon* 属は, それぞれ単一のクラスターを形成している。これに反して, *Rhodotorula* 属や *Cryptococcus* 属は, 特徴あるコンセプトを持たないか, 分類に用いた表現形質が進化に沿っていないために単一のクラスターを形成していないと思われる。

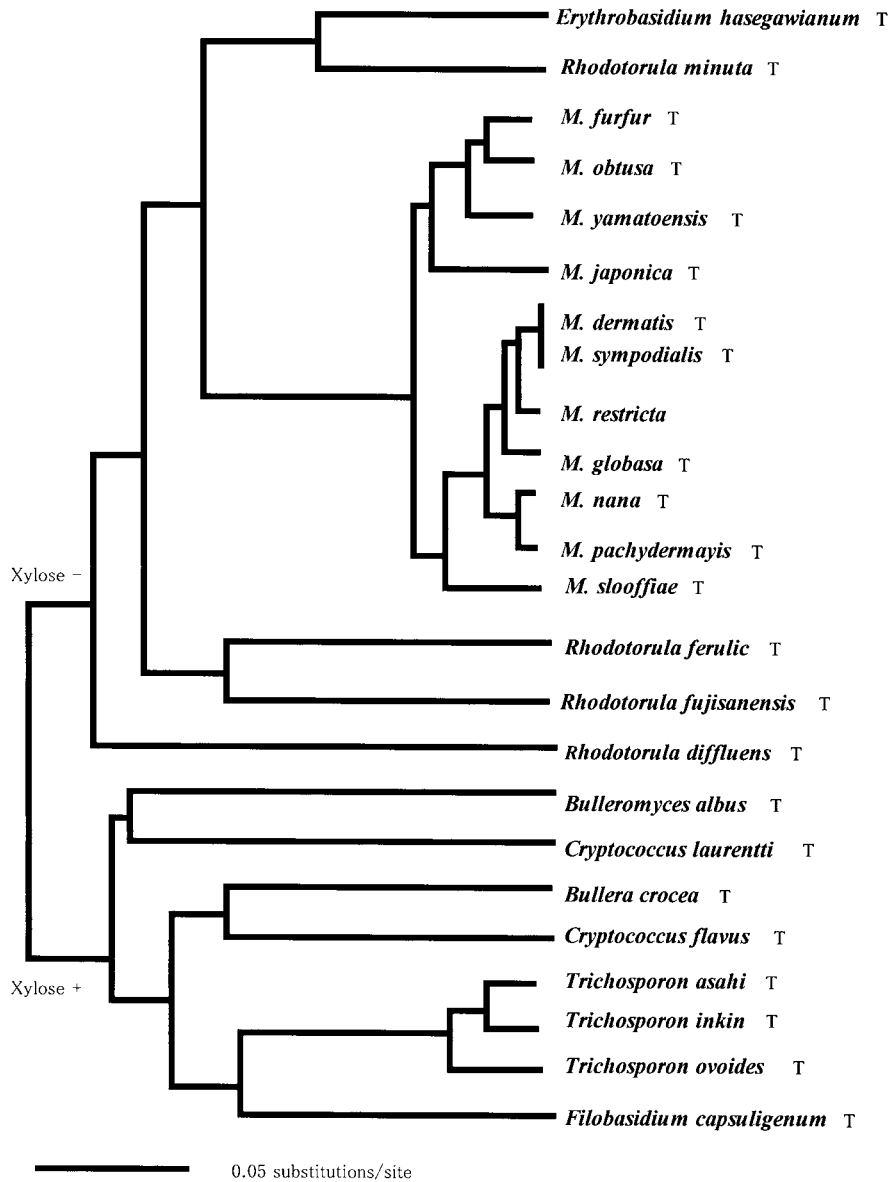


Fig. 2. Phylogenetic tree of the basidiomycetous yeast based on deduced amino acid sequences from cytochrome *b* gene. UPGMA was used.

3. *Malassezia* 属菌のチトクローム *b* 遺伝子塩基配列に基づく系統関係

チトクローム *b* 遺伝子の塩基配列は、種内変異も解析できるために、属内の系統関係や疫学的な研究に適していると思われる。塩基配列による系統樹作成の場合、塩基置換速度と進化速度とにバラツキがみられることから、系統樹作成方法も工夫され近隣接合法 (NJ法; Neighbor Joining method), 最大節約法 (MP法; Maximum parsimony method), 最尤法 (ML法; Maximum Likelihood method) などが考案され使われている。これらの方法を用いてチトクローム *b* の塩基配列を基にした系統を Fig. 3 に示した。数字はブーツストラップ値 (Bootstrap value) を示し、最大節約法, 最尤法では、50%以下は分岐を示していない。枝の長さは、サイト当たりの置換数で示している。同じ塩基配列で異なる方法でも同様の系

統樹を示すことから本遺伝子配列が進化系統のための期待値が正しく反映していると考えられる。アミノ酸配列の系統樹と比較すると塩基配列の系統樹では *M. japonica* と *M. slooffiae* の分岐時期が早い。アミノ酸配列では2つのクラスターに分かれている。rRNA 遺伝子の D1/D2 領域から作成した系統樹 (Sugita ら²³⁾) と比較するとクラスター形成において幾つかの入れかわりが見られるが、近縁な種同士は同じであった。

4. *Malassezia* 属菌と種のコンセプト

真菌の種は、形態的な表現形質により命名されてきた。酵母については形態的な特徴が乏しいために、糖の資化性など生理性状を加えて種を特定していた。従って、研究者の目が多い領域、社会的つながりが強く重要性の高い菌群では、それだけ種の数が多いように思われる。 *Aspergillus* 属, *Penicillium* 属, *Fusarium* 属 では、種内

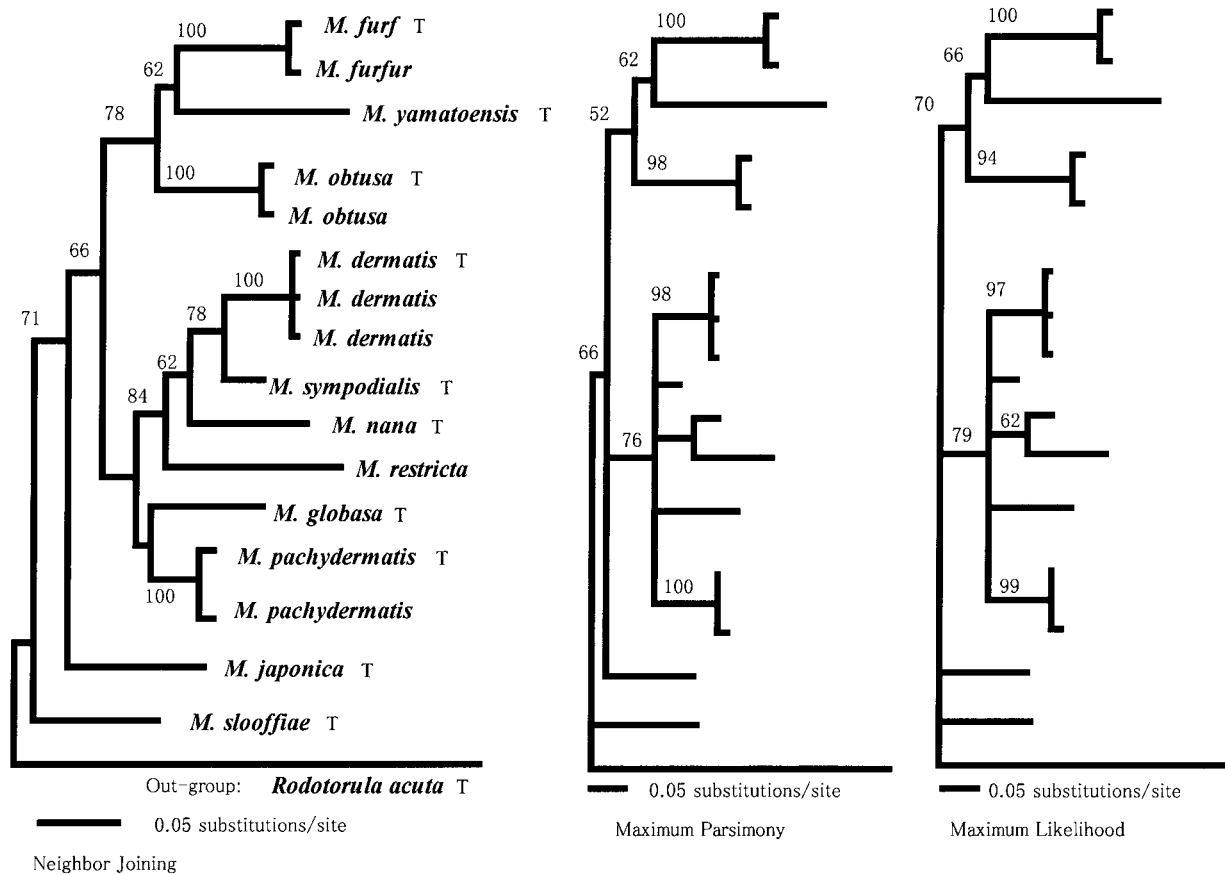


Fig. 3. Phylogenetic tree of the genus *Malassezia* based on nucleotide sequences from cytochrome *b* gene. Neighbor Joining method, Maximum parsimony method, Maximum Likelihood method were used.

変異と考えられる菌についても種名が付いていることが多い。それに反して酵母は形態的な特徴が乏しいこともあり糸状菌に比較して種の数が少ない。特に、*Malassezia* 属菌においても例外に漏れず種の数が少ないが、培養方法が確立されたこともあり最近増えてきている。特に遺伝子解析が容易になり種に関するコンセプトが明らかになりつつあり、種を決める大きなよりどころになっている。今後、研究者の目の届かなかった菌群ではさらに種の数が増えてくると予想される。

5. *Malassezia* 属菌の迅速同定法

培養に手間がかかり形態的特徴も少ない *Malassezia* 属の同定は、容易ではないが、これらの菌の遺伝子に塩基配列の特異性が示せば、迅速同定はさほど難しいものではない。つまり特異性を示す配列をプライマーとして PCR を行えば 30 分程度で同定可能となる。増幅されてきた DNA の塩基配列を解析すればより確かな同定となる。最も大事なものは特異的配列で、その特異性を確認する事が重要となる。*Malassezia* 属菌においてもチトクローム *b* 遺伝子の塩基配列から PCR 用の特異的プライマーを設計して、リアルタイム PCR を用いれば迅速な同定が可能である。将来 DNA のハイブリダイゼーションが迅速に検出できるようになれば、種に特異的塩基配列を用いてマイクロアレーを作成し未知検体とハイブリダイゼーションさせて種を決定することが可能となる。

我々はすでに *Malassezia* 属菌のそれぞれに特異的な配列スライドガラス上にスポットしてマイクロアレーを作成しハイブリダイゼーションにより同定可能なことを確認している。

6. おわりに

チトクローム *b* 遺伝子は、真菌の同定に有効であり、進化系統の解析にも適することが明らかとなった。この遺伝子は、種のコンセプトを確立するために利用でき、迅速な同定、真菌症の迅速診断に進展させることができる。

謝 辞

本総説のデータは、チトクローム *b* 遺伝子解析の長年の蓄積により得られたもので、小森隆嗣、遠藤成朗、Biswas, K Swarajit, Wang, Li, 伊藤純子各氏との共同研究に依るものであり、西村和子教授の指導による。また、*Malassezia* 属菌の菌株情報をお教えして頂いた北里大学生命科学研究所の村山琮明博士に感謝いたします。本研究の一部は、文部科学省振興調整費「病原真菌放線菌の遺伝資源の国際拠点形成のための基盤整備」、(財)発酵研究所研究助成を得て行われた。

文 献

- 1) Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC: Evolution of the

- cytochrome *b* gene of mammals. *J Mol Evol* **32**: 128-144, 1991.
- 2) Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwarda SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC: Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6196-6200, 1989.
 - 3) Aquadro CF, Greenberg BD: Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* **103**: 287-312, 1983.
 - 4) Krajewski C, Driskell AC, Baverstock PR, Braun MJ: Phylogenetic relationships of the thylacine (Mammalia: Thylacinidae) among dasyuroid marsupials: evidence from cytochrome *b* DNA sequences. *Proc R Soc Lond B* **250**: 19-27, 1992.
 - 5) Chikuni K, Mori Y, Tabata T, Saito M, Monma M, Kosugiyama M: Molecular phylogeny based on the k-casein and cytochrome *b* sequences in the mammalian suborder Ruminantia. *J Mol Evol* **41**: 859-866, 1995.
 - 6) Edwards S, Wilson AC: Phylogenetically informative length polymorphism and sequence variability in mitochondrial DNA of Australian Songbirds (Pomatostomus). *Genetics* **126**: 695-711, 1990.
 - 7) Edwards SV, Arctander P, Wilson AC: Mitochondrial resolution of a deep branch in the genealogical tree for perching birds. *Proc R Soc Lond B* **243**: 99-107, 1990.
 - 8) Chikuni K, Minaka N, Ikenaga H: Molecular phylogeny of some *Passeriformes*, based on cytochrome *b* sequences. *J Yamashina Inst Ornithol* **28**: 1-8, 1996.
 - 9) Burke JM, Breitenberger CA, Heckman JK, Dujun B, RajBhandary UL: Cytochrome *b* gene of *Neurospora crassa* mitochondria: partial sequence and location of introns at sites different from those in *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **259**: 504-511, 1984.
 - 10) Lang BF, Ahne F, Bonen L: The mitochondrial genome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: The cytochrome *b* gene has an intron closely related to the first two introns in the *Saccharomyces cerevisiae* *cox1* gene. *J Mol Biol* **184**: 353-366, 1985.
 - 11) Waring RB, Davies RW, Lee S, Grisi E, Berks MM, Scazzocchio C: The mosaic organization of the apocytochrome *b* gene of *Aspergillus nidulans* revealed by DNA sequencing. *Cell* **27**: 4-11, 1981.
 - 12) Wang L, Yokoyama K, Miyaji M, Nishimura K: The identification and phylogenetic relationship of pathogenic species of *Aspergillus* based on the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Med Mycol* **36**: 153-164, 1998.
 - 13) Wang L, Yokoyama K, Miyaji M, Nishimura K: Mitochondrial cytochrome *b* gene analysis of *Aspergillus fumigatus* and related species. *J Clin Microbiol* **38**: 1352-1358, 2000.
 - 14) Wang L, Yokoyama K, Miyaji M, Nishimura K: Mitochondrial cytochrome *b* gene analysis of *Aspergillus fumigatus* and related species. *J Clin Microbiol* **38**: 1352-1358, 2000.
 - 15) Yokoyama K, Wang L, Miyaji M, Nishimura K: Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene. *FEMS Microbiol Lett* **200**: 241-246, 2001.
 - 16) Wang L, Yokoyama K, Miyaji M, Nishimura K: Identification, classification and phylogeny of pathogenic species *Exophiala jeanselmei* and related species by mitochondrial cytochrome *b* gene analysis. *J Clin Microbiol* **39**: 4462-4467, 2001.
 - 17) Yokoyama K, Biswas SK, Miyaji M, Nishimura K: Identification and phylogenetic relationship of the most common pathogenic *Candida* species inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. *J Clin Microbiol* **38**: 4503-4510, 2000.
 - 18) Biswas SK, Yokoyama K, Wang L, Nishimura K, Miyaji M: Typing of *Candida albicans* isolates by sequence analysis of the cytochrome *b* gene and differentiation from *Candida stellatoidea*. *J Clin Microbiol* **39**: 1600-1603, 2001.
 - 19) Biswas SK, Yokoyama K, Wang L, Nishimura K, Miyaji M: Identification of *Candida dubliniensis* based on the specific amplification of mitochondrial cytochrome *b* gene. *Jpn J Med Mycol* **42**: 95-98, 2001.
 - 20) Biswas SK, Yokoyama K, Nishimura K, Miyaji M: Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1191-1199, 2001.
 - 21) Biswas SK, Wang L, Yokoyama K, Nishimura K: Molecular analysis of mitochondrial cytochrome *b* gene sequences of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* **41**: 5572-5576, 2003.
 - 22) Sugita T, Takashima M, Kodama M, Tsuboi R, Nishikawa A: Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J Clinical Microbiology* **41**(10): 4695-4699, 2003.
 - 23) Sugita T, Tajima M, Takashima M, Amaya M, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A: A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol Immunol* **48**(8), 579-583, 2004.
 - 24) Hirai A, Kano R, Makimura K, Duarte RE, Hamdan SJ, Lachance AM, Yamaguchi H, Hasegawa A: *Malassezia nana* sp. Nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int J Syst Evol Micro* **54**: 623-627, 2004.

Phylogenetic Relationship of the Genus *Malassezia* Based on Mitochondrial Cytochrome *b* Gene

Koji Yokoyama

Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University
1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8673, Japan.

Mitochondrial cytochrome *b* genes of pathogenic yeasts and fungi were analyzed for identification and phylogenetic relationship. The species of genus *Malassezia* also were analyzed and each sequence was specific in the same domain of cytochrome *b* gene. Some species represented intraspecies variation. The structure and function of cytochrome *b* protein was retained and its substitution rates may be in proportion to the evolutionary period. The deduced amino acid sequence was encoded by each nucleotide sequence of cytochrome *b* gene, and the phylogenetic tree of eukaryote and basidiomycetous yeast was obtained using this sequence. The species of genus *Malassezia* formed one cluster in this tree, meaning that the concepts of this genus reflect its evolution. The mitochondrial cytochrome *b* gene analysis was valuable for the identification and phylogenetic analysis of the genus.

この論文は、第48回日本医真菌学会総会の“シンポジウム2：マラセチアの基礎と臨床”において発表されたものです。