

総 説

マラセチアの chitin synthase 2 (*CHS2*) 遺伝子

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

Malassezia 属菌はヒトや動物の皮膚の常在菌であるが、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎、外耳炎の増悪因子として知られている。そのため現在菌種と病原性との関係が研究されており、医学および獣医学的にも本菌の分子系統分類が注目されている。

犬および猫から分離された *M. pachydermatis* について RAPD 法と *CHS2* 遺伝子解析によって検討したところ、本菌は A 型、B 型、C 型、D 型の 4 型に分別された。A 型は犬の外耳、脂漏性皮膚炎、膿皮症、アトピー性皮膚炎、ノミアレールギーからの分離株で、犬では最も一般的な常在菌であることが示唆された。

次に *Malassezia* 属 11 菌種の系統分類について *CHS2* 遺伝子解析による検討を行った。その結果得られた系統樹は、11 菌種が各枝に分岐されることが明らかになった。

Key words: キチン合成酵素 2 遺伝子 (chitin synthase 2 gene), マラセチア (*Malassezia*), 系統関係 (phylogenetic relationships), 新種 (new species)

はじめに

Malassezia 属菌は、ヒトおよび多種の動物の皮膚に常在する酵母様菌であるが、新生児の高カロリー輸液を介して感染し敗血症を引き起こすことや、ヒトや動物のアトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎、外耳炎の増悪因子となることから注目されている。また、最近の分子系統および生化学性状による検討から、本菌の分類が再編成されるとともに、いくつかの新種が発見されている^{1, 2)}。このような背景から菌種と病原性についても研究が行われている。我々も 4 菌種をケラチノサイトへ感作させ、培養液中に放出された炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- α) について ELISA 法を用いて測定したところ、炎症性サイトカインを誘導させる種と誘導させない種があることを報告した³⁾。このように本菌には病原性の強い種と弱い種があることが推測されるために、本菌の分類および病原性についての研究が必要であると考えられる。

我々は皮膚糸状菌の RAPD 法による菌種鑑別および種内変異の検出や、キチン合成酵素 (chitin synthase; CHS) 遺伝子解析による系統分類および遺伝子診断について報告した^{4, 5)}。CHS 遺伝子解析は、ITS 領域やリボゾーマル D1/D2 領域とは異なりアミノ酸保存領域であるため、種内変異の検出は適していないが、種以上の分類に適している。さらにその利点として真菌特異的遺伝子であるため、遺伝子診断に応用できることや細胞壁

の合成および抗真菌薬などの研究も利用可能であることがあげられる。そこで、今回、*Malassezia* 属菌の *CHS2* 遺伝子をクローニングし、系統分類について検討した結果を紹介する。

1. *M. pachydermatis* の random amplification of polymorphic DNA (RAPD) 法と *CHS2* 遺伝子解析による系統分類

M. pachydermatis は Table 1 に示したように、多種の動物にわたって分離される菌であり、またヒトのケラチノサイトに炎症性サイトカインを他の菌種に比べて強く誘導させる菌である³⁾。また、*M. pachydermatis* は *Malassezia* 属では唯一脂質が添加されていない培地でも増殖するため、その特徴によって *M. pachydermatis* は容易に同定される。そのため本菌は、脂質要求性の無い複数の菌種が含まれている可能性がある。そこで、犬および猫から分離された *M. pachydermatis* について RAPD 法と *CHS2* 遺伝子解析による検討を行った。

Table 2 に示す犬および猫由来の 105 株をサブローブドウ糖寒天培地上に接種し、24°C、7 日間培養を行った。次にエーゼを用いて集落を掻き取り、これを 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 Kougyou, 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。

ゲノム DNA を抽出し、これを鋳型として、皮膚糸状

別刷請求先：加納 壘

〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866

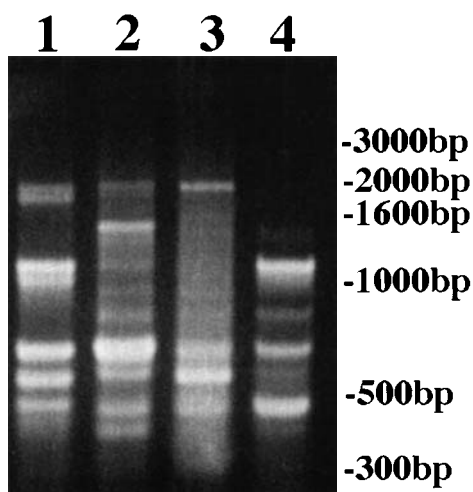
日本大学生物資源科学部獣医臨床病理学研究室

Table 1. Isolation of *Malassezia* species from animals

<i>M. furfur</i>	Cattle, Dog, Cat, Monkey, Pig
<i>M. globosa</i>	Cattle, Cat
<i>M. obtusa</i>	Cattl
<i>M. pachydermatis</i>	Bear, Cattl, Dog, Cat, Ferret, Pig, Sea lion, Seal
<i>M. slooffiae</i>	Cattl, Goat, Pig
<i>M. sympodialis</i>	Cattl, Dog, Cat

Table 2. Genetic types of clinical isolates of *M. pachydermatis* from dogs and cat

Genetic type	Number of isolates	Otitis externa		Seborrheic dermatitis	Pyoderma		Atopic dermatitis	Flea allergic dermatitis
		Dog	Cat		Dog	Cat		
A	87	56	8	15	4	2	1	1
B	13	9	0	2	0	0	2	0
C	1	1	0	0	0	0	0	0
D	4	2	0	0	0	0	1	1
Total	105	68	8	17	4	2	4	2

Fig. 1. RAPD band patterns of 4 genetic types of *M. pachydermatis*.

All of the genomic DNA samples were amplified with a 21-mer primer (FM1) of arbitrary sequence. Lanes: 1, A type; 2, B type; 3, C type; 4, D type.

菌のRAPD解析で用いたプライマー (FM1: 5'-AGCCGCTCCATGGCCCCAGG-3')⁵⁾を用いて、抽出した各株のゲノム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 1分を1サイクルとして40サイクル反応を行い、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。そのバンドパターンの比較を行った。その結果は、4つの異なるバンドパターン (A型, B型, C型, D型) が認められた (Fig. 1)。

次に各型の *M. pachydermatis* について系統関係を調べるため各型の *CHS2* 遺伝子解析を行った。

まず、抽出した各株のゲノムDNAを鋳型として、*Malassezia* の7菌種の *CHS2* 遺伝子のアミノ酸保存領域である約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-3'⁶⁾を用いて、PCRを行った。PCRの反応条件は94°C 1分, 50°C 2分, 72°C 3分を1サイクルとして35サイクル反応を行い、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シーケンサーで塩基配列を解析した。

各型の *CHS2* 遺伝子塩基配列をDNAデータベース (DNA Data Bank of Japan: DDBJ) に登録後、データベース化した。また各型およびこれまで解析したさらに *Malassezia* 属7菌種の標準株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、4つのクラスターを形成した。 *M. pachydermatis* 標準株と同じA型が87株, B型が13株, C型が1株およびD型が4株でRAPDの結果と一致するものであった (Fig. 2)。また、 *M. pachydermatis* 以外の10菌種と同じクラスターに所属する株は認められなかった。A型は犬の外耳、脂漏性皮膚炎、膿皮症、アトピー性皮膚炎、ノミアレルギーからの分離株で、犬では最も一般的な常在菌であることが示唆された (Table 2)。

2. *Malassezia* 属11菌種の系統分類

1996年 Guéhoらが *Malassezia* 属として7菌種 (*M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*) を報告したが、近年さらに4菌種が (*M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. nana*) 加えられている。しかしながら、これら11菌種の系統関係についての検討は行われていなかった。そこで、 *CHS2* 遺伝子解析による系統分類を行った。

Malassezia 属の11菌種の標準株から上記と同様にゲノムDNAを抽出し、 *CHS2* 遺伝子の約600bpの遺伝子配

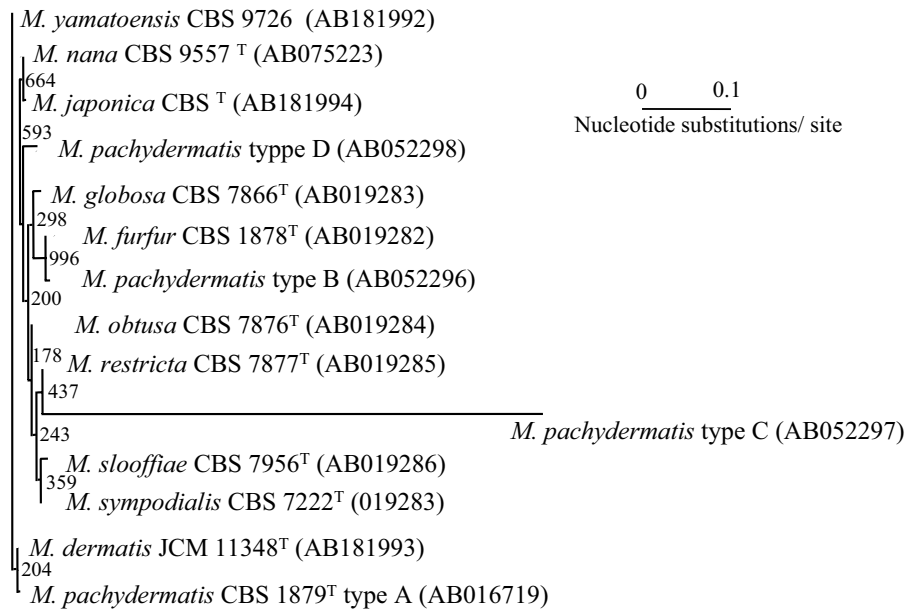


Fig. 2. A tree showing phylogenetic relationships of *CHS2* gene fragments of 11 *Malassezia* species and clinical isolates of *M. pachydermatis*.

The DNA sequences were compared by Clustal W multiple sequence alignment programs and a phylogenetic tree was constructed by the TREEVIEW displaying phylogenies program. Bootstrap analysis was performed on 1,000 random samples and analyzed by the Clustal W programs. Numbers at branches were determined by the bootstrap analysis indicating the times found in 1,000 repeat sub samples in monophyletic grouping.

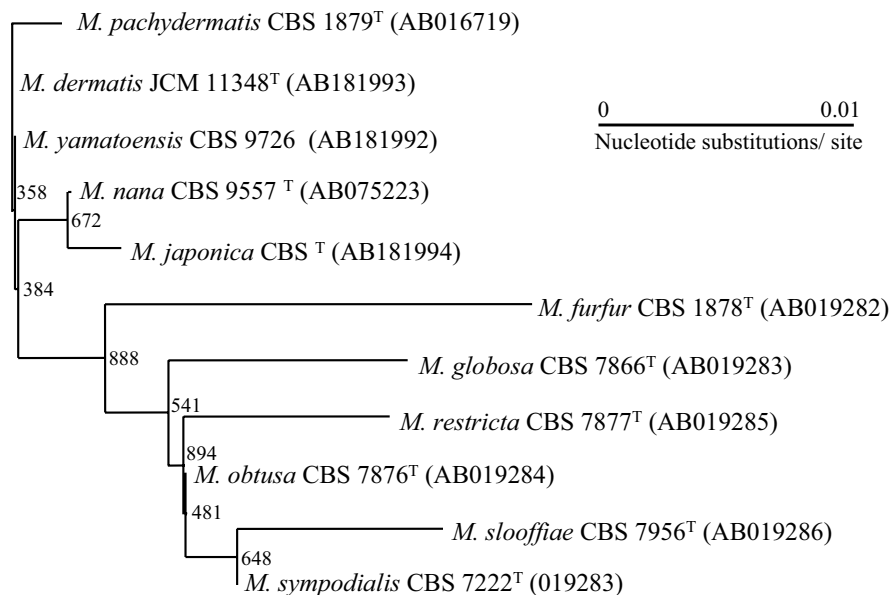


Fig. 3 The NJ tree of *CHS2* gene fragments of 11 *Malassezia* species. Based on *CHS2* gene sequences.

Numbers by nodes are bootstrap frequencies derived from 1000 replicates. The parentheses indicate the GenBank accession nos. of the species.

列をそれぞれ解析した。次に各菌種の塩基配列をもとに近隣結合法および最大節約法を用いてそれぞれ系統樹を作製した。

その結果、*CHS2* 遺伝子の塩基配列の相同性は、各菌種間で約 95~99%であった。近隣結合法および最大節約法で作製した両系統樹はともに、11 菌種が各枝に分岐されることを示しており、これら 11 菌種は *CHS2* 遺伝子解

析においても鑑別可能であった (Fig. 3)⁷⁾。以上の結果は、internal transcribed spacer 1 (ITS1) および large-subunit (26S) rDNA 解析においても同様の結果が得られた⁷⁾。また 11 菌種の生化学的性状も異なることから (Table 3), これら 11 菌種の分子系統学的手法による分別を指示していた。

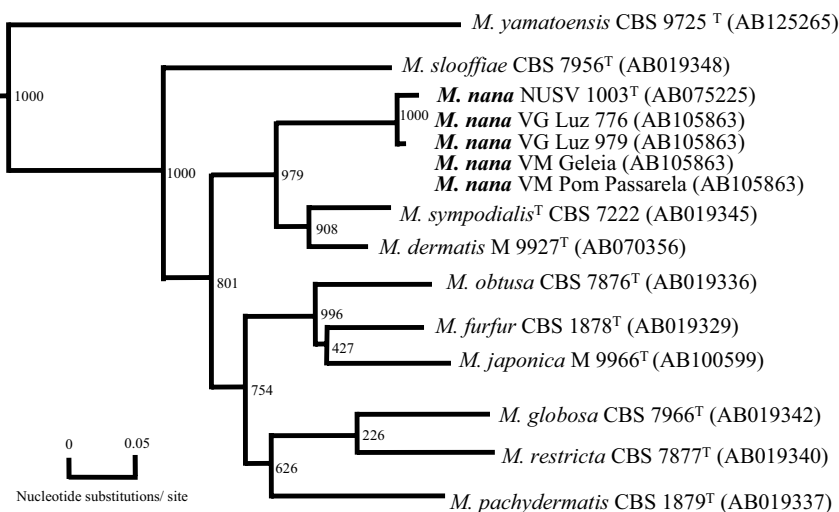


Fig. 4. Phylogenetic relationships of 11 *Malassezia* species based on ITS1 region sequences.

Numbers by nodes are bootstrap frequencies derived from 1000 replicates. The parentheses indicate the GenBank accession nos. of the species.

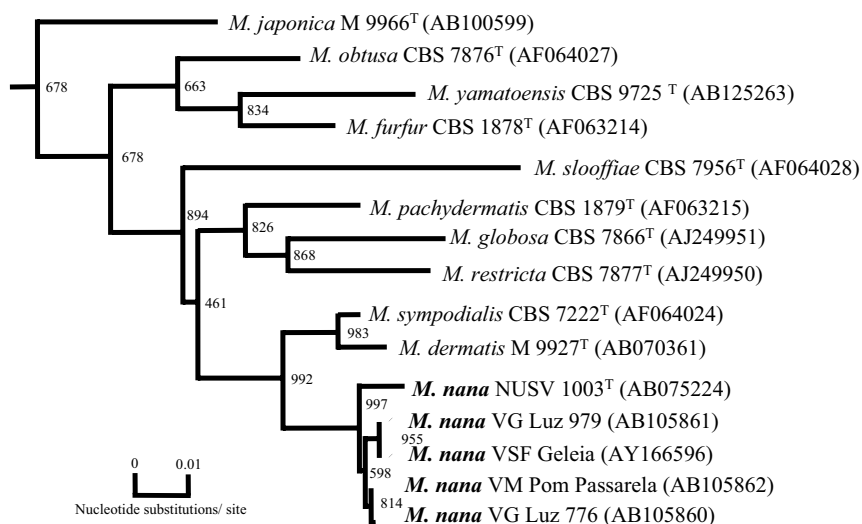


Fig. 5. Phylogenetic relationships of 11 *Malassezia* species based on the D1/D2 region of the 26S rDNA sequences.

Numbers by nodes are bootstrap frequencies derived from 1000 replicates. The parentheses indicate the GenBank accession nos. of the species.

Table 3. Characteristics of *M. nana* and other *Malassezia* species

Characteristic*	Growth on Sab, † at 32°C	Growth on mDixon ‡ at 40°C	Catalase reaction	Use as lipid source			Cremophor EL	Ability to split esculin	Precipitate production on mDixon
				Tween 20 (10%)	Tween 40 or 60 (0.5%)	Tween 80 (0.1%)			
<i>M. nana</i> sp. nov.	—	+ (—)	+	+ (—)	+	±	—	—	+
<i>M. furfur</i>	—	+	+	+	+	+	+	—	—
<i>M. pachydermatis</i>	+	+	± or +	—	+	+	v	v	Not tested
<i>M. sympodialis</i>	—	+	+	—	+	+	—	+	+
<i>M. globosa</i>	—	—	+	—	—	—	—	—	+
<i>M. obtusa</i>	—	—	+	—	—	—	—	+	—
<i>M. restricta</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	Not tested
<i>M. slooffiae</i>	—	+	+	± or +	+	—	—	—	—
<i>M. dermatis</i>	—	+	+	+	+	+	+	—	+
<i>M. japonica</i>	—	—	+	—	+	—	+	+	—
<i>M. yamatoensis</i>	—	—	+	+	+	+	+	—	—

†Sab, Sabouraud agar without any lipid supplementation; ‡mDixon, modified Dixon agar; +, positive; —, negative; ±, weakly positive; v, variable.

ま と め

Malassezia 属菌はアトピー性皮膚炎, 脂漏性皮膚炎, 外耳炎の増悪因子として知られており, 現在 11 菌種が報告されている. 動物から最も多く分離され, 人獣動物感染症の原因菌にもなりうる *M. pachydermatis* には複数の遺伝子型があることや, ヒトや動物から脂質要求性の *Malassezia* 属菌の分離が世界各地で行われているため, 今後の研究によってはさらに新種が報告される可能性が高いと思われる. 現在, 各菌種と病原性との関係について研究が行われているが, 本菌の生態については解明されていないことが多い. したがって, 本菌のさらなる研究が重要であると考えられる.

文 献

- 1) 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**: 579-583, 2004.
- 2) 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 Clin Microbiol* **41**: 4695-4699, 2003.
- 3) Watanabe S, Sato H, Kano R, Nakamura Y, Hasegawa A: The effects of *Malassezia* yeasts on cytokine production by human keratinocytes. *J Inv Dermatol* **116**: 769-773, 2001.
- 4) 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.
- 5) Kano R, Nakamura Y, Watari T, Watanabe S, Takahashi H, Tsujimoto H, Hasegawa A: Identification of clinical isolates of *Microsporum canis* and *M. gypseum* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and Southern hybridization analyses. *Mycoses* **41**: 139-143, 1998.
- 6) Kano R, Aizawa T, Nakamura Y, Watanabe S, Hasegawa A: Chitin synthase 2 gene sequence of *Malassezia* species. *Micobiol Immunol* **43**: 813-815, 1999.
- 7) Hirai A, Kano R, Makimura K, Duarte ER, Hamdan JS, Lachance M-A, Yamaguchi Y, Hasegawa A: *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependant yeast species isolated from animals. *Int J Syst Microbiol* **54**: 623-627, 2004.

Chitin Synthase 2 (*CHS2*) Gene of *Malassezia* Species

Rui Kano

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

Malassezia species have been recognized as members of the microbiological flora of human and animal skin; they are also considered to play an important role in the pathogenesis of folliculitis, atopic dermatitis and otitis externa. Therefore, the molecular characteristics were investigated to clarify the epidemiology and the pathogenesis of diseases associated with *Malassezia* species in human and animals. Molecular investigation was made of 105 clinical isolates of *M. pachydermatis* from dogs and cats by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and chitin synthase 2 (*CHS2*) gene sequence analyses. The RAPD analysis and *CHS2* gene analysis indicated that clinical isolates of *M. pachydermatis* were divided into four distinct genetic types (A, B, C and D). Type A was isolated from lesions of atopic dermatitis, flea allergic dermatitis, otitis externa, pyoderma and seborrheic (dermatitidis) in dogs and cats, and might be predominant on this.

The phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of *CHS2* gene fragments of standard strains of 11 *Malassezia* species showed 11 distinct clusters of this species.