

# MMRC



**ANNUAL REPORT OF MEDICAL MYCOLOGY  
RESEARCH CENTER, CHIBA UNIVERSITY 2015**

**千葉大学 真菌医学研究センター 報告**

# 19



# 目 次

## Content

はじめに Preface	
感染免疫分野 米山 PI (感染応答) プロジェクト Project for Immune Response in Infections Diseases	3
感染免疫分野 西城 PI (サイトカイン) プロジェクト Project for Cytokine Research	6
感染免疫分野 後藤 PI (微生物・免疫制御) プロジェクト Project for Host-Microbial Interactions in Symbiosis and Pathogenesis	9
病原機能分野 知花 PI (カンジダ・グラブラーダ・フェノーム) プロジェクト <i>Candida glabrata</i> Phenome Project	11
臨床感染症分野 亀井 PI (臨床感染症) プロジェクト Project to Link Basic Sciences and Clinical Medicine	14
臨床感染症分野 山本 (感染宿主応答ネットワーク) プロジェクト Project for Host Response Network of Bacterial Infection	20
臨床感染症分野 川本 (分子細胞シグナリング解析) プロジェクト Project for Molecular Signaling Analysis	24
感染症制御分野 石和田 (感染症制御) プロジェクト Project for Infection Control and Prevention	26
微生物資源分野 五ノ井 PI (真菌・放線菌と宿主の分子相互作用研究) プロジェクト Project for Host Pathogen (fungi/actinomycetes) Molecular Interaction	33
微生物資源分野 高橋 PI (微生物創生) プロジェクト Project for Systems Biology of Microorganisms	40
微生物資源分野 バイオリソース管理室 Management Unit of Microbiological Resources	43
文部科学省 ナショナルバイオリソースプロジェクト「病原微生物」 Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology National BioResource Project “Pathogenic Microorganisms”	46
長崎大学熱帯医学研究拠点特定領域共同研究 Cooperative Research of Priority Areas with NEKKEN, Nagasaki University	47
アスペルギルス症を中心とした新興真菌症制圧プロジェクト The Project Controlling Aspergillosis and the Related Emerging Mycoses	48
平成26年度 共同利用・共同研究報告 2014 Fiscal Year Cooperative Research Program Report	50
感染症研究グローバルネットワークフォーラム2014 Global Network Forum on Infection and Immunity 2014	68
2015年講演会 2015 Scientific Meeting & Seminars	70



# はじめに

我が国は超高齢社会に突入し、高度医療や生活習慣病に起因した日和見感染症、慢性閉塞性肺疾患（COPD）をはじめとする呼吸器病における真菌・細菌感染症は増加の一途を辿り、また経済のグローバル化に伴う輸入真菌症など、真菌症をはじめとするさまざまな感染症の脅威に直面しています。このような状況で、我が国唯一の真菌症の研究・教育機関として、又千葉大学においては、感染症・免疫・病原体の研究プラットフォームとして、本センターの使命は以前にも増して重要になっています。本センターは、病原真菌研究の共同利用・共同研究拠点として、文部科学省より平成22年度から27年度まで拠点認定を受け、大学、国公立研究機関、千葉大学関係部局、医療機関、企業と緊密に連携して、共同利用、共同研究、教育活動を積極的に行ってきました。また本年には、共同利用・共同拠点として文部科学省の期末評価を受け、その結果、平成28年度より再認定を受ける運びとなりました。本センターでは、病原微生物のナショナルバイオリソースプロジェクト中核的拠点として、本事業を大阪大学、長崎大学、岐阜大学と分担して活動を行っています。さらにこれらの事業と平行して、独立研究グループリーダーによる基盤研究を推進しています。一方、平成26年10月には臨床感染症研究分野が、附属病院において我が国初の真菌症専門外来を開設しました。したがって本センターでは、「共同利用・共同研究・バイオリソース拠点事業」、「感染症・免疫基盤研究」、「真菌症臨床研究」の三つを柱として、今後も我が国の真菌医学の発展に先導的な役割を果たす所存です。

平成 28 年 1 月

千葉大学真菌医学研究センター長

笹川千尋

# Preface

Major challenges facing a super-aging society include a rising number of immunocompromised hosts and patients with pneumonia, particularly chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Moreover, the dramatic increase in worldwide trade concomitant with the spread of severe fungal infectious diseases are being recognized as key issues within the aging population. The Medical Mycology Research Center (MMRC) at Chiba University has become increasingly important because it serves dual functions as a research organization as well as promotes educational activities to raise public awareness. MMRC has been actively engaged in medical mycology research and related educational activities through partnerships with universities, public institutions, medical institutions, and pharmaceutical companies. Since 2002, MMRC has been a key institution in the National BioResource Project (NBRP) and continues to be a leader in the field of pathogenic microbes through collaborations with the University of Osaka, Nagasaki University, and Gifu University. MMRC continues to support research activities by providing fungal research resources to expand the understanding of fungal pathogenesis and host innate immune responses. In fact, a specialty clinical research facility for fungal infection was opened at the Chiba University Hospital in October 2014. It is important to highlight that in 2015, MMRC underwent a 5-year research activity evaluation by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology-Japan (MEXT), and received high commendation including renewed funding support for the next six years. We, therefore, envision MMRC to be the leading institution for scientific research excellence in microbiology and immunology, clinical fungal infectious research, and a key resource for pathogenic fungi and actinomycetales, ultimately advancing the field of medical mycology.

January 21, 2016

**Chihiro Sasakawa**

Director of MMRC

# 米山 PI (感染応答) プロジェクト

## Project for Immune Response in Infections Diseases

### 研究概要 (Summary)

感染に対する生体防御は、自然免疫と獲得免疫によって協調して行われている。本プロジェクトでは、ウイルス感染に応答した自然免疫誘導に注目し、感染センサーRIG-I-like受容体 (RLR) によるウイルス由来の非自己RNA検知の分子機構の解明と、それによって引き起こされる免疫応答の生理機能を解析することにより、ウイルス感染症に対する新たな治療戦略の開発を目指した解析を行っている。

**Innate immune system plays an essential role for self-defense against infection of a variety of pathogens. In this project, we focus on antiviral innate immunity, especially molecular machinery for detection of viral RNA by retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs) and the subsequent immune responses. The results obtained from the studies will help us to establish a novel therapeutic or preventive strategy against RNA virus-induced infectious diseases.**

教授	米山 光俊	Professor	Mitsutoshi Yoneyama
助教	尾野本浩司	Assistant Professor	Koji Onomoto
非常勤技術職員	滝澤香代子	Adjunct Research Technician	Kayoko Takizawa
技術補佐員	常喜 儒彦	Research Promotion Technician	Michihiko Jogi
技術補佐員	滝沢みゆき	Research Promotion Technician	Miyuki Takizawa

### 1. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors

Mitsutoshi Yoneyama<sup>1</sup>, Koji Onomoto<sup>1</sup>, Michihiko Jogi<sup>1</sup>, Teppei Akaboshi<sup>1</sup> and Takashi Fujita<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Division of Molecular Immunology, Medical Mycology Research Center, Chiba University, 1-8-1, Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8673, Japan. <sup>2</sup> Laboratory of Molecular Genetics, Institute for Virus Research, <sup>3</sup> Laboratory of Molecular Cell Biology, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

In higher vertebrates, recognition of the non-self signature of invading viruses by genome-encoded pattern recognition receptors initiates antiviral innate immunity. RLRs detect viral RNA as a non-self pattern in the cytoplasm and activate downstream signaling. Detection of viral RNA also activates stress responses resulting in stress granule-like aggregates, which facilitate RLR-mediated antiviral immunity. Among

the three RLR family members RIG-I and melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) recognize distinct viral RNA species with differential molecular machinery and activate signaling through mitochondrial antiviral signaling (MAVS, also known as IPS-1/VISA/Cardif), which leads to the expression of cytokines including type I and III interferons (IFNs) to restrict viral propagation. In this review, we summarize recent knowledge regarding RNA recognition and signal transduction by RLRs and MAVS/IPS-1.

### 2. Functional analysis of RNA binding proteins (RBPs), which are responsible for induction of anti-viral innate immunity via RNA-granule formation.

Koji Onomoto, Takaaki Ito, Marie Ban and Mitsutoshi Yoneyama

We demonstrated that viral infection induces RIG-I to accumulate in cytoplasmic granular-like structure, antiviral

stress granule (avSG). We further revealed that avSG plays a critical role as platform for initiation of RIG-I-mediated antiviral signaling. To understand the molecular machinery for avSG formation, we identified several RBPs that are associated with RIG-I in virus-infected cells, and examined their function in antiviral immune responses. As a result, we found out that several RBPs play an important role for regulation of both RIG-I-mediated signal activation and avSG formation. This work was supported by MEXT KAKENHI, Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (15H01252) and JSPS KAKENHI, Grant-in-Aid for Young Scientist (B) (26293101).

### 3. Recognition of viral ribonucleoprotein complex (RNP) by RIG-I.

Michihiko Jogi and Mitsutoshi Yoneyama

It has remained unclear how RIG-I detects viral ribonucleoprotein complex (RNP), which consists of viral genomic RNA and viral proteins, in the virus-infected cells. Recently, we established *in vitro* reconstitution system for RIG-I activation and examined whether viral RNP can activate RIG-I *in vitro*. As a model RNP, we prepared artificial influenza A virus (IAV) RNP generated in 293T cells and confirmed that the artificial RNP forms a horseshoe-like structure using the atomic force microscope, as reported in the previous report. Our data indicated that IAV RNP can activate recombinant RIG-I (rRIG-I)-mediated antiviral signaling in our assay system. However, we failed to observe direct interaction between viral RNP and rRIG-I by density gradient centrifugation analysis, suggesting possible requirement of additional molecule(s) for the interaction between them. This work was supported by JSPS KAKENHI, Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (26293101).

### 4. Functional analysis of RLR-mediated signal transduction.

Koji Onomoto, Koutaro Okita and Mitsutoshi Yoneyama

RLRs are viral RNA sensors to initiate antiviral innate immunity, including gene activation of type I and III IFNs.

To understand RLR-mediated signaling, we established the artificial RLR activation system that is based on chemically-induced oligomerization of caspase recruitment domain of RIG-I (ARIAD Pharmaceuticals). This system can deliver RLR-mediated signaling into the cells without viral infection. The recent data indicated that the RLR-mediated signaling induces growth inhibition of the cells in IFN-independent manner. We are trying to reveal the molecular machinery for this RLR-induced growth inhibition.

### 5. Identification of new innate immune receptor (s) for fungal infection.

Mitsutoshi Yoneyama

Pattern recognition receptors (PRRs), such as RLRs, recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and initiate innate immune responses. Although it is well known that the fungal cell wall components,  $\beta$ -glucans and  $\alpha$ -mannans, are recognized by the C-type lectin receptors (CLRs), Dectin-1 and Dectin-2, respectively, it remains to be determined how another fungal cell wall component, chitin, is recognized by innate immune receptor(s). We are trying to identify a novel PRR(s), which is responsible for chitin recognition in anti-fungal innate responses. This work was supported by JSPS KAKENHI, Grant-in-Aid for Challenging Exploratory Research (26670209).

### Publications

- 1) Iijima S, Matsuura K, Watanabe T, Onomoto K, Fujita T, Ito K, Iio E, Miyaki T, Fujiwara K, Shinkai N, Kusakabe A, Endo M, Nojiri S, Joh T, Tanaka Y. Influence of genes suppressing interferon effects in peripheral blood mononuclear cells during triple antiviral therapy for chronic hepatitis C. *PLoS One*, 10:e0118000, 2015.
- 2) Okazaki T, Higuchi M, Takeda K, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Miyagishi M, Yanai H, Kato A, Yoneyama M, Fujita T, Taniguchi T, Kawaoka Y, Ichijo H, Goto Y. The ASK family kinases differentially mediate induction of type I interferon and apoptosis during the antiviral response. *Sci Signal*, 8:ra78, 2015.
- 3) Yoneyama M, Jogi M, Onomoto K. Regulation of

antiviral innate immune signaling by stress-induced RNA granules. *J Biochem*, in press.

4) Yoneyama M, Onomoto K, Jogi M, Akaboshi T, Fujita T.

Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Curr Opin Immunol*, 32:48-53, 2015.



# 西城PI (サイトカイン) プロジェクト

## Project for Cytokine Research

---

### 研究概要 (Summary)

生体は、多種多様な細胞や組織が互いに時空的に作用することにより恒常性が維持される一つシステムであり、その維持においてサイトカインは中心的な役割を担っている。多くの疾病は単に一つの臓器、組織の異常ではなく、免疫系を始めとする種々のシステムの異常であることから、これらを統合するサイトカインの役割を知ることは非常に重要である。本プロジェクトでは、感染性疾患や炎症性疾患の病態形成におけるサイトカインの役割を解明し、最終的に新たな治療薬の標的分子を見出すことを目的とする。

**Cytokines play a central role in maintenance of homeostasis. Because, a disease is not caused by only one problem of an organ, but caused by a systemic disorder, which is regulated by cytokines, it is important to study their functions. We aim to find new therapeutic targets for inflammatory diseases and infectious diseases by investigating the roles of cytokines in pathogenesis.**

---

准 教 授	西城 忍	Associate Professor	Shinobu Saijo
特 任 助 教	矢部 力朗	Research Assistant Professor	Rikio Yabe
技 術 補 佐 員	森本 雅子	Research Promotion Technician	Masako Morimoto
技 術 補 佐 員	鈴木 智明	Research Promotion Technician	Tomoaki Suzuki

### 1. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungal infection.

Shinobu Saijo and Rikio Yabe

Division of Molecular Immunology, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba 260-8673, Japan

Dectin-1 and Dectin-2 are type II transmembrane proteins of the C-type lectin family with single carbohydrate recognition domains (CRDs) in their extracellular region. They are expressed mainly in dendritic cells and macrophages. Dectin-1 recognizes  $\beta$ -glucans with its CRD and transduces signals through its immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-like motif in the cytoplasmic domain, whereas Dectin-2 recognizes  $\alpha$ -mannans and transduces its signal through association with the ITAM-containing Fc receptor  $\gamma$  chain. Upon ligand binding, spleen tyrosine kinase is recruited to the ITAM and activates the caspase recruitment

domain family member 9 (CARD9)-nuclear factor- $\kappa$ B axis, resulting in the activation of various genes including those encoding pro-inflammatory cytokines. Both  $\beta$ -glucans and  $\alpha$ -mannans are major cell wall components of fungi including *Candida albicans* (*C. albicans*) and *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*). Recently, it was reported that Dectin-1 is important in protection against *P. carinii* by inducing reactive oxygen species, whereas both Dectin-1 and Dectin-2 play important roles in defense against *C. albicans* by preferentially inducing Th17 cell differentiation. In this review, we briefly revisit the structures, ligands, signal transduction and functional roles of Dectin-1 and Dectin-2 in host defense against fungal infection.

## 2. Inhibition of Dectin-1 Signaling Ameliorates Colitis by Inducing Lactobacillus-Mediated Regulatory T Cell Expansion in the Intestine.

Tang C<sup>1</sup>, Kamiya T<sup>1</sup>, Liu Y<sup>2</sup>, Kadoki M<sup>1</sup>, Kakuta S<sup>3</sup>, Oshima K<sup>4</sup>, Hattori M<sup>4</sup>, Takeshita K<sup>5</sup>, Kanai T<sup>5</sup>, Saijo S<sup>6</sup>, Ohno N<sup>7</sup>, Iwakura Y<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Center for Animal Disease Models, Research Institute for Biomedical Sciences, Tokyo University of Science, Noda, Chiba 278-0022, Japan; Center for Experimental Medicine and Systems Biology, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

<sup>2</sup> Center for Animal Disease Models, Research Institute for Biological Sciences, Tokyo University of Science, Chiba 278-0022, Japan.

<sup>3</sup> Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan.

<sup>4</sup> Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Kashiwa, Chiba 277-8561, Japan.

<sup>5</sup> Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo 160-5882, Japan.

<sup>6</sup> Division of Molecular Immunology, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba 260-8673, Japan.

Dectin-1, the receptor for  $\beta$ -glucans, protects the host against fungal infection; however, its role in intestinal immunity is incompletely understood. We found that Dectin-1-deficient (*Clec7a*<sup>-/-</sup>) mice were refractory to both dextran sodium sulfate (DSS)- and CD45RB (high) CD4<sup>+</sup> T cell-induced colitis, and that this resistance was associated with an increase in regulatory T (Treg) cells. The proportion of lactobacilli, especially *Lactobacillus murinus*, in the commensal microflora was increased in *Clec7a*<sup>-/-</sup> mouse colons, and accompanied by a decrease in antimicrobial peptides induced by Dectin-1 signaling. *L. murinus* colonization increased Treg cells in the colon. Oral administration of laminarin, a Dectin-1 antagonist, suppressed the development of DSS-colitis, associated with an increase of *L. murinus* and Treg cells. Human patients with inflammatory bowel disease were found to have a decreased proportion of closely related

*Lactobacillus* species. These observations suggest that Dectin-1 regulates the homeostasis of intestinal immunity by controlling Treg cell differentiation through modification of microbiota.

## 3. IL-1 receptor antagonist-deficient mice develop autoimmune arthritis due to intrinsic activation of IL-17-producing CCR2<sup>+</sup>V $\gamma$ 6<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T cells.

Akitsu A<sup>1</sup>, Ishigame H<sup>2</sup>, Kakuta S<sup>2</sup>, Chung SH<sup>1</sup>, Ikeda S<sup>2</sup>, Shimizu K<sup>1</sup>, Kubo S<sup>1</sup>, Liu Y<sup>2</sup>, Umemura M<sup>3</sup>, Matsuzaki G<sup>3</sup>, Yoshikai Y<sup>4</sup>, Saijo S<sup>5</sup>, Iwakura Y<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Center for Experimental Medicine and Systems Biology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan

<sup>2</sup> Center for Animal Disease Models, Research Institute for Biological Sciences, Tokyo University of Science, Chiba 278-0022, Japan.

<sup>3</sup> Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus, Okinawa 903-0213, Japan.

<sup>4</sup> Research Center for Prevention of Infectious Diseases, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan.

<sup>5</sup> Division of Molecular Immunology, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba 260-8673, Japan.

Interleukin-17 (IL-17)-producing  $\gamma\delta$  T ( $\gamma\delta$ 17) cells have been implicated in inflammatory diseases, but the underlying pathogenic mechanisms remain unclear. Here, we show that both CD4<sup>+</sup> and  $\gamma\delta$ 17 cells are required for the development of autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra)-deficient mice. Specifically, activated CD4<sup>+</sup> T cells direct  $\gamma\delta$  T-cell infiltration by inducing CCL2 expression in joints. Furthermore, IL-17 reporter mice reveal that the V $\gamma$ 6<sup>+</sup> subset of CCR2<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells preferentially produces IL-17 in inflamed joints. Importantly, because IL-1Ra normally suppresses IL-1R expression on  $\gamma\delta$  T cells, IL-1Ra-deficient mice exhibit elevated IL-1R expression on V $\gamma$ 6<sup>+</sup> cells, which play a critical role in inducing them to produce IL-17. Our findings demonstrate a pathogenic mechanism in which

adaptive and innate immunity induce an autoimmune disease in a coordinated manner.

### Publications

- 1) Akitsu A, Ishigame H, Kakuta S, Chung SH, Ikeda S, Shimizu K, Kubo S, Liu Y, Umemura M, Matsuzaki G, Yoshikai Y, Saijo S, Iwakura Y. IL-1 receptor antagonist-deficient mice develop autoimmune arthritis due to intrinsic activation of IL-17-producing CCR2<sup>+</sup>V $\gamma$ 6<sup>+</sup> $\gamma\delta$  T cells. *Nat Commun.* 6:7464. 2015.
- 2) Herbst S, Shah A, Mazon Moya M, Marzola V, Jensen B, Reed A, Birrell MA, Saijo S, Mostowy S, Shaunak S, Armstrong-James D. Phagocytosis-dependent activation of a TLR9-BTK-calcineurin-NFAT pathway co-ordinates innate immunity to *Aspergillus fumigatus*. *EMBO Mol Med.* 7:240-58. 2015.
- 3) Higashino-Kameda M, Yabe-Wada T, Matsuba S, Takeda K, Anzawa K, Mochizuki T, Makimura K, Saijo S, Iwakura Y, Toga H, Nakamura A. A critical role of Dectin-1 in hypersensitivity pneumonitis. *Inflamm Res.* 2015 online ahead.
- 4) Murayama MA, Kakuta S, Inoue A, Umeda N, Yonezawa T, Maruhashi T, Tateishi K, Ishigame H, Yabe R, Ikeda S, Seno A, Chi HH, Hashiguchi Y, Kurata R, Tada T, Kubo S, Sato N, Liu Y, Hattori M, Saijo S, Matsushita M, Fujita T, Sumida T, Iwakura Y. CTRP6 is an endogenous complement regulator that can effectively treat induced arthritis. *Nat Commun.* 6:8483. 2015.
- 5) Nakamura Y, Sato K, Yamamoto H, Matsumura K, Matsumoto I, Nomura T, Miyasaka T, Ishii K, Kanno E, Tachi M, Yamasaki S, Saijo S, Iwakura Y, Kawakami K. Dectin-2 deficiency promotes Th2 response and mucin production in the lungs after pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 83:671-81. 2015.
- 6) Tang C, Kamiya T, Liu Y, Kadoki M, Kakuta S, Oshima K, Hattori M, Takeshita K, Kanai T, Saijo S, Ohno N, Iwakura Y. Inhibition of Dectin-1 Signaling Ameliorates Colitis by Inducing Lactobacillus-Mediated Regulatory T Cell Expansion in the Intestine. *Cell Host Microbe.* 18:183-97. 2015.
- 7) Uryu H, Hashimoto D, Kato K, Hayase E, Matsuoka S, Ogasawara R, Takahashi S, Maeda Y, Iwasaki H, Miyamoto T, Saijo S, Iwakura Y, Hill GR, Akashi K, Teshima T.  $\alpha$ -Mannan induces Th17-mediated pulmonary graft-versus-host disease in mice. *Blood.* 125:3014-23. 2015.

## 後藤 PI (微生物・免疫制御プロジェクト)

### Project for Host-Microbial Interactions in Symbiosis and Pathogenesis

---

#### 研究概要 (Summary)

腸管は食餌性抗原や腸内細菌・真菌など多種多様な抗原に常に曝されている特殊な組織である。これら無数の抗原に対処するため、腸管では免疫細胞と上皮細胞が相互に作用しながら病原性微生物を排除し、非病原性微生物と共存する基盤を形成することで腸管の恒常性維持に寄与している。この腸内微生物との共生関係の破綻は、炎症性腸疾患に代表される腸疾患のみならず、肥満や糖尿病などの全身性の疾患発症の素因となることから、腸内微生物との共生システムや腸管免疫細胞と上皮細胞による腸管恒常性制御システムを理解することは重要な命題である。本プロジェクトでは、宿主と腸内細菌間の共生因子であり腸管上皮細胞が発現する $\alpha 1, 2$ -フコースの誘導および制御機構を明らかにし、腸管恒常性維持システムの解明とその破綻によって引き起こされる様々な疾患の治療法の開発を目的としている。

Gastrointestinal tract is a unique organ which is constitutively exposed by various antigens including dietary materials and commensal bacteria and fungi. In order to exclude pathogens and create symbiotic environment to non-pathogenic microorganisms, intestinal epithelial cells (ECs) and immune cells contribute to establish homeostasis of intestinal microenvironment. Disruption of symbiotic relationship between host and commensals predisposes to the development of inflammatory bowel diseases and systemic disorders such as obesity and diabetes. Therefore, it is important to understand the mechanism of symbiotic and homeostatic condition regulated by intestinal ECs and immune cells. In this project, we aim to uncover the inductive and regulatory mechanism of epithelial  $\alpha 1, 2$ -fucose which is a symbiotic factor between host and commensal bacteria. We further investigate the role of commensal microbes in the establishment of intestinal homeostasis and develop novel therapeutic approaches for the treatment of diseases caused by the disruption of intestinal homeostasis.

---

准 教 授 後藤 義幸

Associate Professor

Yoshiyuki Goto

#### 1. IL-10-producing CD4<sup>+</sup> T cells negatively regulate fucosylation of epithelial cells in the gut

Yoshiyuki Goto<sup>1,2</sup>, Aayam Lamichhane<sup>3</sup>, Mariko Kamioka<sup>3</sup>, Shintaro Sato<sup>3</sup>, Kenya Honda<sup>4,6</sup>, Jun Kunisawa<sup>5</sup> and Hiroshi Kiyono<sup>3,6</sup>

<sup>1</sup> Division of Molecular Immunology, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba 260-8673, Japan

<sup>2</sup> Division of Mucosal Symbiosis, International Research and Development Center for Mucosal Vaccine, Institute for Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan

<sup>3</sup> Division of Mucosal Immunology, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan

<sup>4</sup> RIKEN Center for Integrative Medical Sciences (IMS), Kanagawa 230-0045, Japan

<sup>5</sup> Laboratory of Vaccine Materials, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japan

<sup>6</sup> Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Agency, Saitama 332-0012, Japan

$\alpha$ 1, 2-fucosylated glycan expressed on the intestinal epithelial surfaces contributes to regulate gut homeostasis by serving as a nutrient source for some species of commensal bacteria. However, the detail mechanism of the regulation of epithelial  $\alpha$ 1, 2-fucose is still unknown. We showed that epithelial fucosylation is negatively regulated by IL-10-producing CD4<sup>+</sup> T cells. The number of fucosylated ECs was increased in mice lacking T cells, especially those expressing  $\alpha\beta$  T cell receptor (TCR), CD4, and IL-10. No such effect was observed in mice lacking B cells and other subsets to T cells. Adoptive transfer of TCR $\alpha\beta$  chain<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells from normal mice, but not IL-10-deficient mice, normalized epithelial fucosylation. These findings suggest that IL-10 produced by CD4<sup>+</sup> T cells contribute to the maintenance of the fucosylation of ECs.

## 2. The role of commensal bacteria and fungi against infection of pathogenic microorganisms

Yoshiyuki Goto<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Division of Molecular Immunology, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba 260-8673, Japan

<sup>2</sup> Division of Mucosal Symbiosis, International Research and Development Center for Mucosal Vaccine, Institute for Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan

In our gastrointestinal tract, numerous numbers of bacteria and fungi peacefully colonize and create mutual relationship

with their host. These commensals contribute to prevent infection of pathogenic microorganisms. However, it is still unclear what kind of and how commensal bacteria and fungi interrupt the pathogenic infections. In our study, we investigate the mechanism of symbiotic colonization by bacteria and fungi in the intestine. We also aim to isolate beneficial commensal bacteria and fungi for the development of novel therapeutic targets for human infectious diseases. After the establishment of this system, we further target other human diseases such as inflammatory bowel diseases, allergy, cancer, and metabolic syndrome.

## Publications

- 1) Farkas AM\*, Panea C\*, Goto Y\*, Nakato G, Galan-Diez M, Narushima S, Honda K and Ivanov II. Colonization and induction of Th17 cells by segmented filamentous bacteria in the murine intestine. *J Immunol Methods*, 421: 104-111. 2015 \*equally contribution
- 2) Goto Y, Kurashima Y, Kiyono H. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Rheumatol*, 27: 388-396, 2015.
- 3) Goto Y, Lamichhane A, Kamioka M, Sato S, Honda K, Kunisawa J and Kiyono H. IL-10-producing CD4<sup>+</sup> T cells negatively regulate fucosylation of epithelial cells in the gut. *Sci Rep*, 5: 15918, 2015
- 4) Panea C, Farkas AM, Goto Y, Abdollahi-Roodsaz S, Lee C, Koscsó B, Gowda K, Hohl TM, Bogunovic M and Ivanov II. Intestinal Monocyte-Derived Macrophages Control Commensal-Specific Th17 Responses. *Cell Rep*, 12: 1314-1324, 2015.

# 知花PI (カンジダ・グラブラータフェノーム) プロジェクト

## *Candida glabrata* phenome project

### 研究概要 (Summary)

病原性酵母カンジダ・グラブラータの全遺伝子改変株を作製し、病原性に関する遺伝子の特定と機能解析ならびに抗真菌薬の開発を行う。

Using the pathogenic yeast *Candida glabrata*, we are systematically constructing mutants for gene identification and functional analyses working on the pathogenicity and for developing of anti-fungal drug targets.

准 教 授	知花 博治	Associate Professor	Hiroji Chibana
技 術 職 員	高橋 梓	Research Technician	Azusa Takahashi
特 任 助 教	佐藤美智代	Research Assistant Professor	Michiyo Sato
グランドフェロー	山口 正視	Grand Fellow	Masashi Yamaguchi
研 究 員	宇野 潤	Researcher	Jun Uno
客員研究員	コスタカタリナ	Guest Researcher	Catarina Costa
技術補佐員	相田 優子	Research Promotion Technician	Yuko Aida
技術補佐員	大岩 真理	Research Promotion Technician	Mari Ohiwa

### 1. Validation of antifungal drug targets in *Candida glabrata* using a tetracycline gene regulation system in a silkworm (*Bombyx mori*) infection model

Chibana H<sup>1\*</sup>, Hiruma J<sup>2</sup>, Harada K<sup>2</sup>, Aoyama T<sup>3</sup>, Maeda A<sup>4</sup>, Takahashi-Nakaguchi A<sup>1</sup>, Costa C<sup>1,5,6</sup>, Yaguchi T<sup>1</sup>, Mizuno T<sup>4</sup>, Takagi H<sup>7</sup>, Hiruma M<sup>8</sup>, Uno J<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Medical Mycology Research Center (MMRC), Chiba University, Chiba, Japan;

<sup>2</sup> Department of Dermatology, Tokyo Medical University, Tokyo, Japan;

<sup>3</sup> Department of Electronic and Information Engineering, Suzuka National College of Technology, Suzuka, Japan;

<sup>4</sup> Faculty of Engineering, Tokushima Bunri University, Sanuki, Japan;

<sup>5</sup> Department of Bioengineering, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal;

<sup>6</sup> Biological Sciences Research Group, Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal;

<sup>7</sup> Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, Nara, Japan, (NAIST), Nara, Japan;

<sup>8</sup> Ochanomizu Institute for Medical Mycology and Allergology, Tokyo, Japan.

*Objectives:* Opportunistic infections caused by *Candida glabrata* is increasing because this yeast can be resistant to currently used antifungal drugs. Thus the development of new antifungal drugs preferentially focused on *C. glabrata* is required. Our goal was to validate drug targets using an in vivo gene regulation system, based on a tetracycline promoter switch (Tet-off) to control selected gene expression, and an insect model of infection.

*Methods:* *C. glabrata* mutant strains were created using a Tet-off promoter switch targeting each of several individual genes (*ERG1*, *ERG7*, *ERG11*, *ERG25*, *ERG26* and *ERG27*) in the synthetic pathway of the essential cell membrane component ergosterol, as well as *TAH18* encoding the flavoprotein involved in the cytosolic Fe-S

protein assembly machinery and nitric oxide synthesis, and *TUB2*, encoding beta-tubulin. The mutants' ability to cause infection in a silkworm infection model was determined in the presence and absence of tetracycline and survival determined at intervals over a three days period.

*Results:* For all mutants, survival was significantly greater for groups of infected worms treated with tetracycline than for untreated groups, indicating that all the genes tested were required for virulence.

*Conclusions:* Given the low homology of the gene products of *ERG25*, *ERG26*, *ERG27* and *TAH18* in *Candida* species with equivalent human proteins, our study has identified their potential as targets for *Candida*-specific antifungal drugs and the product of *ERG25* in *C. glabrata* may also represent a target to develop an antifungal drug with a wide spectrum of activity with expected effect against *Aspergillus*, *Coccidioides*, *Cryptococcus* and *Trichophyton*.

## 2. Membrane Proteome-Wide Response to the Antifungal Drug Clotrimazole in *Candida glabrata*: Role of the Transcription Factor *CgPdr1* and the Drug:H<sup>+</sup> Antiporters *CgTpo1\_1* and *CgTpo1\_2*.

Pais P<sup>1</sup>, Costa C<sup>1</sup>, Pires C<sup>1</sup>, Shimizu K<sup>2</sup>, Chibana H<sup>2</sup>, Teixeira MC<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Bioengineering and Institute for Bioengineering and Biosciences, Biological Research Group, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal,

<sup>2</sup>Medical Mycology Research Center (MMRC), Chiba University, Chiba, Japan

Azoles are widely used antifungal drugs. This family of compounds includes triazoles, mostly used in the treatment of systemic infections, and imidazoles, such as clotrimazole, often used in the case of superficial infections. *Candida glabrata* is the second most common cause of candidemia worldwide and presents higher levels of intrinsic azole resistance when compared with *Candida albicans*, thus being an interesting subject for the study of azole resistance mechanisms in fungal pathogens. Since resistance often relies

on the action of membrane transporters, including drug efflux pumps from the ATP-binding cassette family or from the Drug:H<sup>+</sup> antiporter (DHA) (1) family, an iTRAQ-based membrane proteomics analysis was performed to identify all the membrane-associated proteins whose abundance changes in *C. glabrata* cells exposed to the azole drug clotrimazole. Proteins found to have significant expression changes in this context were clustered into functional groups, namely: glucose metabolism, oxidative phosphorylation, mitochondrial import, ribosome components and translation machinery, lipid metabolism, multidrug resistance transporters, cell wall assembly, and stress response, comprising a total of 37 proteins. Among these, the DHA transporter *CgTpo1\_2* (ORF CAGL0E03674g) was identified as overexpressed in the *C. glabrata* membrane in response to clotrimazole. Functional characterization of this putative drug:H<sup>+</sup> antiporter, and of its homolog *CgTpo1\_1* (ORF CAGL0G03927g), allowed the identification of these proteins as localized to the plasma membrane and conferring azole drug resistance in this fungal pathogen by actively extruding the drug to the external medium. The cell wall protein *CgGas1* was also shown to confer azole drug resistance through cell wall remodeling. Finally, the transcription factor *CgPdr1* in the clotrimazole response was observed to control the expression of 20 of the identified proteins, thus highlighting the existence of additional unforeseen targets of this transcription factor, recognized as a major regulator of azole drug resistance in clinical isolates.

### 3. The Ubiquitin Ligase SCFUcc1 Acts as a Metabolic Switch for the Glyoxylate Cycle

Nakatsukasa K<sup>1</sup>, Nishimura T<sup>1</sup>, Byrne SD<sup>1</sup>, Okamoto M<sup>2</sup>, Takahashi-Nakaguchi A<sup>2</sup>, Chibana H<sup>2</sup>, Okumura F<sup>1</sup>, Kamura T<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, Nagoya University, Nagoya, Aichi 464-8602, Japan,

<sup>2</sup> Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Chiba, 260-8673, Japan

Despite the crucial role played by the glyoxylate cycle in the virulence of pathogens, seed germination in plants, and sexual development in fungi, we still have much to learn about its regulation. Here, we show that a previously uncharacterized SCF(Ucc1) ubiquitin ligase mediates proteasomal degradation of citrate synthase in the glyoxylate cycle to maintain metabolic homeostasis in glucose-grown cells. Conversely, transcription of the F box subunit Ucc1 is downregulated in C2-compound-grown cells, which require increased metabolic flux for gluconeogenesis. Moreover, in vitro analysis demonstrates that oxaloacetate regenerated through the glyoxylate cycle induces a conformational change in citrate synthase and inhibits its recognition and ubiquitination by SCF(Ucc1), suggesting the existence of an oxaloacetate-dependent positive feedback loop that stabilizes citrate synthase. We propose that SCF(Ucc1)-mediated regulation of citrate synthase acts as a metabolic switch for the glyoxylate cycle in response to changes in carbon source, thereby ensuring metabolic versatility and flexibility.

#### Publications

- 1) Costa C, Ponte A, Pais P, Santos R, Cavalheiro M, Yaguchi T, Chibana H, New Mechanisms of Flucytosine Resistance in *C. glabrata* Unveiled by a Chemogenomics Analysis in *S. cerevisiae*. *Teixeira MC. PLoS One.* 12;10 (8):e0135110. 2015.
- 2) Kopecka M, Yamaguchi M, Kawamoto S: The effects of the F-actin inhibitor latrunculin A on the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 161: 1348-1355, 2015.
- 3) Nakatsukasa K, Nishimura T, Byrne SD, Okamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Chibana H, Okumura F, Kamura T. The Ubiquitin Ligase SCF(Ucc1) Acts as a Metabolic Switch for the Glyoxylate Cycle. *Mol Cell.* 2;59 (1):22-34. 2015.
- 4) Nakayama M, Hosoya K, Shimizu-Imanishi Y, Chibana H, Yaguchi T. Development of rapid identification and risk analysis of *Moniliella* spp. in acidic processed foods. *Biocontrol Sci.* (in press)
- 5) Stepanova AA, Vasilyeva NV, Yamaguchi M, Chibana H, Bosak IA. The *Aspergillus fumigatus* penetration through the cells of murine tracheobronchial epithelium cells. *Problems in Medical Mycology*17: 45-50, 2015.
- 6) Stepanova AA, Vasilyeva NV, Yamaguchi M, Shimizu K, Kawamoto S: Electron microscopy of autopsy material from the human brain *Cryptococcosis* and AIDS. *Problems in Medical Mycology*17: 35-40, 2015.
- 7) Takahashi-Nakaguchi A, Muraosa Y, Hagiwara D, Sakai K, Toyotome T, Watanabe, A Kawamoto S, Kamei K, Gono T, Takahashi H: Genome sequence comparison of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from patients with pulmonary aspergilloma and chronic necrotizing pulmonary aspergillosis. *Medical Mycology* 53 (4): 353-360, 2015.
- 8) Yamada H, Yamaguchi M, Chikamatsu, Aono A, Mitarai S: Structome analysis of virulent *Mycobacterium tuberculosis*, which survives with only 700 ribosomes at density per 0.1 fl cytoplasm. *PLoS ONE* 10: e0117109, 2015.



## 亀井PI（臨床感染症）プロジェクト

### Project to Link Basic Sciences and Clinical Medicine

---

#### 研究概要（Summary）

附属病院の真菌症専門外来における診療と並行して全国から寄せられる真菌症のコンサルテーションに対応するなど特色ある臨床活動を行うとともに、一般施設では実施困難な特殊検査を年400件あまり受け入れるなど、名実ともに我が国における真菌症リファレンスセンター（輸入真菌症を含む）として機能している。研究面ではこれらの活動を通じた臨床研究に加えて、**Bedside to bench to bedside**に基づく研究を行っている。特にアスペルギルス症に代表される難治性真菌症の感染機構の研究とこれに基づく診断・治療法の開発を中心的テーマとしているが、近年はアスペルギルス耐性株の疫学と耐性機構の研究なども進めている。

We have been doing basic and clinical research, primarily on fungal infections, as well as seeing patients in the Specialty Clinic for Fungal Infections at the University Hospital. We receive approximately 400 referral consults on fungal diseases from all over the country every year. Thus, our laboratory is also working as a reference center for fungal infections in Japan. In our research activities, finding solutions to the problems of managing and treating patients with fungal infections is our primary concern. To this end, we are investigating the mechanisms of infection of intractable fungal diseases, particularly aspergillosis, while developing diagnostic methods and therapeutic modalities in collaborative efforts with various universities and pharmaceutical companies. The epidemiology of fungal infections and the mechanisms of antifungal resistance present in the infecting organisms also is a prominent part of our research.

---

教授	亀井 克彦	Professor	Katsuhiko Kamei
准教授	渡辺 哲	Associate Professor	Akira Watanabe
特任助教	村長 保憲	Research Assistant Professor	Yasunori Muraosa
特任助教	萩原 大祐	Research Assistant Professor	Daisuke Hagiwara
特任助教 (5月まで)	八尋 真希	Research Assistant Professor	Maki Yahiro
技術補佐員 (6月から)	八尋 真希	Research Promotion Technician	Maki Yahiro
グランドフェロー	田口 英昭	Grand Fellow	Hideaki Taguchi
研究員	東江 昭夫	Researcher	Akio Toh-e
技術職員	鎗田 響子	Research Technician	Kyoko Yarita
技術補佐員	関 里亜	Research Promotion Technician	Rio Seki
技術補佐員	井上 京子	Research Promotion Technician	Kyoko Inoue

## 1. Drug resistance of fungi

### **Epidemiology of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and the mechanism of resistance.**

(Akira Watanabe, Daisuke Hagiwara, Katsuhiko Kamei)

Among clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* deposited to MMRC from 2000, 18 strains revealed to have azole resistance. Of these strains, 13 had point mutation(s) in their *cyp51A* gene, which encodes the *cyp51A* enzyme responsible for one of the step in ergosterol biosynthesis. Most notably, strain harboring TR46/Y121F/T289A mutations in *cyp51A* was firstly detected in Japan. TR46/Y121F/T289A mutations are thought to be accounted for by fungicide used in agriculture, and the strains with the mutations have been found from both environment and patients worldwide, particularly in Europe. This finding may have a strong impact in treatment strategy of aspergillosis.

Moreover, strains with G448S mutation in *cyp51A* become the most common for last few years. The strains with G448S are resistant to voriconazole, and all of the strains were isolated from the patients given voriconazole. The relationship between this mutation and voriconazole exposure in vivo is unclear but warrants examination.

## 2. Pathogenicity of fungi

### **Functional analysis of the novel transcription factor AtrR regulating an ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*.**

(Daisuke Hagiwara, Akira Watanabe, Katsuhiko Kamei)

Treatment of aspergillosis caused by *Aspergillus fumigatus* is confronted with an increasing drug resistance problem. This is a non-negligible situation where the strain resistant to azoles, the major antifungal drugs for aspergillosis, has been widely disseminated in the world. To elucidate mechanisms underlying azole resistance, we identified the novel transcriptional factor whose deletion mutant showed hypersensitivity to azole in *A. fumigatus*. The fungal-specific C6-type transcription factor AtrR was found to regulate the expression of the genes related to ergosterol biosynthesis,

including *cyp51A* encoding a target protein of azoles. The *atrR* deletion mutant showed impaired growth under hypoxic condition and attenuation in virulence in mice infection model for aspergillosis. These results were in accordance with the phenotypes for the mutant of SrbA that was well characterized as a direct regulator for *cyp51A* gene. Notably, AtrR was responsible for the expression of *cdr1B* that encodes an ABC transporter related to azole resistance, whereas SrbA was not involved in the regulation. According to the significance of AtrR in azole resistance mechanism, we deleted the *atrR* gene in a clinically isolated itraconazole resistant strain harboring a mutant *cyp51A* (G54R), resulting in a hypersensitivity to any azole drugs. Together with the result, AtrR plays a pivotal role in azole resistance mechanism co-regulating the drug target (*cyp51A*) and putative drug efflux pump (Cdr1B), regardless of the resistance mutation in *cyp51A*.

### **Investigation of conidia-specific secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus*.**

(Daisuke Hagiwara, Katsuhiko Kamei)

### **Transcriptomic analyses for resting and germinated conidia of *Aspergillus* species.**

(Daisuke Hagiwara, Katsuhiko Kamei)

### **Relationship between the infection type of fusariosis and cryptic species of *Fusarium solani* species complex (FSSC).**

(Yasunori Muraosa, Misato Oguchi, Maki Yahiro, Akira Watanabe, Katsuhiko Kamei)

Species belonging to the genus *Fusarium* are well known as major plant pathogens and soil inhabitants. For humans, *Fusarium* species are common pathogenic fungi that cause superficial and disseminated deep-seated infection, the latter of which could be life-threatening. *Fusarium solani* species complex (FSSC) which is a group of morphologically cryptic species is known to be the most common causative agents in fusariosis. Although FSSC is known to be the major cause of human fusariosis, the complex consists of several cryptic

species, and the relationship between the infection types (superficial and disseminated) and the species in FSSC has not been clarified. We have re-identified 79 *Fusarium* clinical isolates recovered from superficial and disseminated fusariosis by sequencing of elongation factor 1 alpha (EF-1 alpha) gene and are analyzing the relationship between the infection types and the causative species.

### 3. Development of diagnostic methods

#### Detection of *Histoplasma capsulatum* from clinical specimens by cycling probe-based real-time PCR and nested real-time PCR.

(Yasunori Muraosa, Maki Yahiro, Akira Watanabe, Katsuhiko Kamei)

We developed new cycling probe-based real-time PCR and nested real-time PCR assays for the detection of *Histoplasma capsulatum* that were designed to detect the gene encoding N-acetylated  $\alpha$ -linked acidic dipeptidase (NAALADase), which we previously identified as an *H. capsulatum* antigen reacting with sera from patients with histoplasmosis. Both assays specifically detected the DNAs of all *H. capsulatum* strains but not those of other fungi or human DNA. The limited of detection (LOD) of the real-time PCR assay was 10 DNA copies when using 10-fold serial dilutions of the standard plasmid DNA and 50 DNA copies when using human serum spiked with standard plasmid DNA. The nested real-time PCR improved the LOD to 5 DNA copies when using human serum spiked with standard plasmid DNA, which represents a 10-fold higher than that observed with the real-time PCR assay. To assess the ability of the two assays to diagnose histoplasmosis, we analyzed a small number of clinical specimens collected from five patients with histoplasmosis, such as sera (n = 4), formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue (n = 4), and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) (n = 1). Although clinical sensitivity of the real-time PCR assay was insufficiently sensitive (33%), the nested real-time PCR assay increased the clinical sensitivity (77%), suggesting it has a potential to be a useful method for detecting *H. capsulatum* DNA in clinical specimens. (Published in Med Mycol, 2015 Dec 24. pii: myv106. [Epub

ahead of print])

### 4. Phosphate regulation in *Cryptococcus neoformans*

(Akio Toh-e, Katsuhiko Kamei)

By BLAST searches using the amino acid sequences of the components of the PHO system of *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), we found potential counterparts to ScPHO genes in *C. neoformans*, namely, acid phosphatase (*CnPHO2*), the cyclin-dependent protein kinase (CDK) inhibitor (*CnPHO81*), Pho85-cyclin (*CnPHO80*), and CDK (*CnPHO85*). Disruption of each candidate gene, except *CnPHO85*, followed by phenotypic analysis, identified most of the basic components of the CnPHO system. We found that *CnPHO85* was essential for the growth of *C. neoformans*, having regulatory function in the CnPHO system. Genetic screening and ChIP analysis, showed that *CnPHO4* encodes a transcription factor that binds to the CnPHO genes in a Pi-dependent manner. By RNA-seq analysis of the wild-type and the regulatory mutants of the CnPHO system, we found *C. neoformans* genes whose expression is controlled by the regulators of the CnPHO system. Thus the CnPHO system shares many properties with the ScPHO system, but expression of those CnPHO genes that encode regulators is controlled by phosphate starvation, which is not the case in the ScPHO system (except *ScPHO81*). We also could identify some genes involved in the stress response of the pathogenic yeast, but *CnPHO4* appeared to be responsible only for phosphate starvation.

### 5. Improvement of experimental methods in *Cryptococcus neoformans*

(Akio Toh-e, Katsuhiko Kamei)

*Cryptococcus neoformans*, a basidiomycetous human pathogenic yeast, has been widely used in research fields in medical mycology as well as in basic biology. Gene cloning or identification of the gene responsible for a mutation of interest is a key step for functional analysis of a particular gene. The availability, therefore, of the multiple methods for cloning is desirable. We proposed a method for a mapping-based gene identification/cloning (positional cloning) method in *C.*

*neoformans*.

## 6. Biosynthetic pathway of sulfur-containing amino acids in *Cryptococcus neoformans*

(Akio Toh-e, Katsuhiko Kamei)

We elucidated a unique feature of sulfur metabolism in *C. neoformans*. *C. neoformans* produces cysteine solely by the serine pathway that consists of serine-*o*-acetyl transferase and cysteine synthase. We identified the gene encoding the enzyme catalyzing the former reaction as *CYS2* (CNE02740) and that catalyzing the latter reaction as *CYS1* (CNL05880). A disruptant of either gene is viable and requires cysteine. Methionine practically did not support the growth of the *cys1* strain and cysteine did not support the growth of the methionine auxotroph, the *met2* strain, either. These results indicate that the both directions of the transsulfuration pathway are not functional in *C. neoformans*. This fact explains why methionine is a poor sulfur source in *C. neoformans*; hydrogen sulfide is believed to be produced from methionine via the transsulfuration pathway. Among the genes participating in the reactions from homoserine to methionine, the gene corresponding to the *Saccharomyces cerevisiae* *MET17* has not been identified in *C. neoformans*. By genetic analysis of Met<sup>-</sup> mutants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated mutagenesis, we found that *CNC01220* is *C. neoformans* version of *MET17*. The *cys1* strain lost pathogenicity against mice and mammals do not have cysteine synthase, indicating that cysteine synthase, serine-*o*-acetyltransferase as well, is a promising target for anti-*Cryptococcus*-drug development.

### Publications: original articles

- 1) Asahina A, Kobayashi M, Nakano K, Saito I, Yarita K, Kamei K, Tokura Y: Deep cutaneous infection with *Microspora arundinis*: report of two Japanese cases. *Acta Derm Venereol* 95(7): 855-857, 2015.
- 2) Araki T, Toh-e A, Kikuchi Y, Watanabe CK, Hachiya T, Noguchi K, Terashima I, Uesono Y: Tetracaine, a local anesthetic, preferentially induces translational inhibition with processing body formation rather than phosphorylation of eIF2  $\alpha$  in yeast. *Curr Genet* 61(1): 43-53, 2015.
- 3) Bühler N, Hagiwara D, Takeshita N: Functional analysis of sterol transporter orthologues in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 14(9): 908-21, 2015.
- 4) Bom VL, de Castro PA, Winkelströter LK, Marine M, Hori JI, Ramalho LN, dos Reis TF, Goldman MH, Brown NA, Rajendran R, Ramage G, Walker LA, Munro CA, Rocha MC, Malavazi I, Hagiwara D, Goldman GH: The *Aspergillus fumigatus* sitA phosphatase homologue is important for adhesion, cell wall integrity, biofilm formation, and virulence. *Eukaryot Cell* 14(8): 728-44, 2015.
- 5) Fagnani R, Resende MR, Trabasso P, Mikami Y, Schreiber AZ, Lopes AF, Muraosa Y, Kamei K, Moretti ML: Mortality related to candidemia and risk factors associated with non-*Candida albicans*. *Infect Dis (Lond)* 47(12): 930-931, 2015.
- 6) Ishiwada N, Takeshita K, Yaguchi T, Nagasawa K, Takeuchi N, Hishiki H, Watanabe A, Kamei K, Shimojo N: The First case of invasive mixed-mold infections due to *Emericella nidulans* var. *echinulata* and *Rasamsonia piperina* in a patient with chronic granulomatous disease. *Mycopathologia*, 2015 Nov 13. [Epub ahead of print]
- 7) Kawakami H, Inuzuka H, Hori N, Takahashi N, Ishida K, Mochizuki K, Ohkusu K, Muraosa Y, Watanabe A, Kamei K: Inhibitory effects of antimicrobial agents against *Fusarium* species. *Med Mycol* 53 (6): 603-611, 2015.
- 8) Matsudate Y, Murao K, Urano Y, Yarita K, Kamei K, Takeichi H, Kubo Y: Primary cutaneous mucormycosis caused by *Mucor irregularis* in an immunocompetent patient. *J Dermatol* 42 (3): 267-268, 2015.
- 9) Muraosa Y, Toyotome T, Yahiro M, Watanabe A, Shikanai-Yasuda MA, Kamei K: Detection of *Histoplasma capsulatum* from clinical specimens by cycling probe-based real-time PCR and nested real-time PCR. *Med Mycol*, 2015 Dec 24. pii: myv106. [Epub ahead of print]
- 10) Segawa S, Nishimura M, Sogawa K, Tsuchida S, Murata S, Watanabe M, Matsushita K, Kamei K,

- Nomura F: Identification of *Nocardia* species using matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Proteomics* 12: 6, 2015.
- 11) Shimizu K, Nakagawa H, Hashimoto R, Hagiwara D, Onji Y, Asano K, Kawamoto S, Takahashi H, Yokoyama K: The  $\alpha$ -oxoamine synthase gene *fum8* is involved in fumonisin B2 biosynthesis in *Aspergillus niger*. *Mycoscience* 56 (3): 301-308, 2015.
  - 12) Takahashi-Nakaguchi A, Muraosa Y, Hagiwara D, Sakai K, Toyotome T, Watanabe A, Kawamoto S, Kamei K, Gono T, Takahashi H: Genome sequence comparison of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from patients with pulmonary aspergilloma and chronic necrotizing pulmonary aspergillosis. *Med Mycol* 53 (4): 353-360, 2015.
  - 13) Tamiya H, Ochiai E, Kikuchi K, Yahiro M, Toyotome T, Watanabe A, Yaguchi T, Kamei K: Secondary metabolite profiles and antifungal drug susceptibility of *Aspergillus fumigatus* and closely related species, *A. lentulus*, *A. udagawae*, and *A. viridinitans*. *J Infect Chemother* 21 (5): 385-391, 2015.
  - 14) Toh-e A, Ohkusu M, Li HM, Shimizu K, Takahashi-Nakaguchi A, Gono T, Kawamoto S, Kanasaki Y, Yoshikawa H, Nishizawa M: Identification of genes involved in the phosphate metabolism in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet Biol* 80: 19-30, 2015.
  - 15) Toh-e A, Ohkusu M, Shimizu K, Kawamoto S: Positional cloning in *Cryptococcus neoformans* and its application for identification and cloning of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase. *Fungal Genet Biol* 76: 70-7, 2015.
  - 16) Toyotome T, Watanabe A, Ochiai E, Kamei K: N-acetylated  $\alpha$ -linked acidic dipeptidase is identified as an antigen of *Histoplasma capsulatum*. *Biochem Biophys Res Commun* 485 (3): 483-487, 2015.
  - 17) Trabasso P, Matsuzawa T, Fagnani R, Muraosa Y, Tominaga K, Resende MR, Kamei K, Mikami Y, Schreiber AZ, Moretti ML: Isolation and drug susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu lato and other species of *C. parapsilosis* complex from patients with blood stream infections and proposal of a novel LAMP identification method for the species. *Mycopathologia* 179(1-2): 53-62, 2015.
  - 18) Ueno K, Kinjo Y, Okubo Y, Aki K, Urai M, Kaneko Y, Shimizu K, Wang DN, Okawara A, Nara T, Ohkouchi K, Mizuguchi Y, Kawamoto S, Kamei K, Ohno H, Niki Y, Shibuya K, Miyazaki Y: Dendritic cell-based immunization ameliorates pulmonary infection with highly virulent *Cryptococcus gattii*. *Infect Immun* 83 (4): 1577-1586, 2015.
  - 19) Winkelströter LK, Dolan SK, Fernanda Dos Reis T, Bom VL, Alves de Castro P, Hagiwara D, Alowni R, Jones GW, Doyle S, Brown NA, Goldman GH: Systematic global analysis of genes encoding protein phosphatases in *Aspergillus fumigatus*. *G3 (Bethesda)* 5 (7): 1525-39, 2015.
  - 20) Winkelströter LK, Bom VL, de Castro PA, Ramalho LN, Goldman MH, Brown NA, Rajendran R, Ramage G, Bovier E, Dos Reis TF, Savoldi M, Hagiwara D, Goldman GH: High osmolarity glycerol response PtcB phosphatase is important for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Mol Microbiol* 96 (1): 42-54, 2015.
  - 21) Yoshimi A, Fujioka T, Mizutani O, Marui J, Hagiwara D, Abe K: Mitogen-activated protein kinases MpkA and MpkB independently affect micafungin sensitivity in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 79 (5): 836-44, 2015.
- Publications: reviews, reports, books and the related publications**
- 22) 亀井克彦 (分担), 豊留孝仁 (研究協力者), 村長保憲 (研究協力者): 輸入真菌症の国内発生状況調査とヒストプラズマ症の迅速診断法改良・開発へ向けた基礎的研究. 厚生労働科学研究費補助金 (新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)「真菌感染症の病態解明及び検査・治療法の確立とサーベイランスに関する研究」平成26年度総括・分担研究報告書 p.45-51, 2015.
  - 23) 亀井克彦 (分担): ABPMの原因真菌に関する菌学的及び血清学的解析. 厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患等克服研究事業) (難治性疾患等実用化研究事業 (免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野)「アレルギー性気管支肺真菌症の診断・治療指針確立のための調

- 査研究」平成26年度総括・分担研究年度終了報告書 p.34-37, 2015.
- 24) 萩原大祐：真菌感染症分野が直面している薬剤耐性の現状. 化学と生物 53 (5):277-279, 2015.
- 25) 亀井克彦, 渡辺哲：真菌と院内アウトブレイク. 感染と抗菌薬 18 (4):407-410, 2015.
- 26) 渡辺哲, 亀井克彦：〈特集関連情報〉播種性クリプトコックス症と鑑別をすべき他の真菌症について. 病原微生物検出情報 36 (10):10-11, 2015.
- 27) 渡辺哲, 亀井克彦：肺ノカルジア症.呼吸 34 (10):1004-10087, 2015.
- 28) 亀井克彦, 渡辺哲:肺真菌感染症の診断と治療. 呼吸と循環 63 (9):893-897, 2015.
- 29) 渡辺哲：今月の表紙 慢性肺アスペルギルス症. 検査と技術 43 (3):244-245, 2015.
- 30) 渡辺哲：Photo Quiz : Deep-seated mycosis シュウ酸カルシウム結晶. Med Mycol J 56 (1):J1-J2, 2015.
- 31) 渡辺哲, 亀井克彦:各種真菌感染症の取り扱いと課題 健常者で鑑別すべき深在性真菌症. 医薬ジャーナル 51 (6):1547-1551, 2015.
- 32) 渡辺哲：今月の表紙 肺クリプトコッカス症. 検査と技術 43 (8):730-731, 2015.
- 33) 藤内智 (座長), 渡辺哲 (演者)：学会ハイライト 第90回日本結核病学会総会ランチョンセミナー 肺アスペルギルス治療と、これからの課題～耐性, 抗酸菌症合併例を含めて～. メディカメント ニュース 2202号：10-11, 2015.
- 34) Hagiwara D, Yoshimi A, Sakamoto K, Gomi K, Abe K: Response and adaptation to cell wall stress and osmotic stress in *Aspergillus* species. "Stress Biology of Yeasts and Fungi". Eds. Takagi H and Kitagaki H, Springer, p.199-218, 2015.3.19.
- 35) 亀井克彦：抗真菌薬. 「Pocket Drugs 2015」, 監修:福井次矢, 編集:小松康宏, 渡邊裕司, p. 800-801, 医学書院, 2015. 1. 1発行.
- 36) 亀井克彦：真菌学総論. 「標準微生物学 第12版」, 編集:中込治, 神谷茂, p. 325-333, 医学書院, 2015. 2. 15発行.
- 37) 亀井克彦 (分担執筆, 編集協力者), ほか1,262名: 「南山堂医学大辞典 第20版」, 南山堂, 2015. 4. 1発行.
- 38) 亀井克彦, 渡辺哲:カンジダによる深在性カンジダ症. 「微生物学・感染看護学 -微生物から感染防止を考える-」, 岡田忍, 小池和子, 白澤浩編, p.65-66, 医歯薬出版, 2015. 2. 10発行.
- 39) 亀井克彦, ほか85名:「感染症予防必携第3版」, 財団法人日本公衆衛生協会, 2015. 6. 15発行.
- 40) 亀井克彦：肺真菌症. 「今日の診断指針 第7版」, 総編集:金沢一郎, 永井良三, p. 987-990, 医学書院, 2015. 3. 31発行.
- 41) 渡辺哲：クラミジア肺炎. 「今日の診断指針 第7版」, 総編集:金沢一郎, 永井良三, p. 971-971, 医学書院, 2015.3.31発行.
- 42) 渡辺哲, 亀井克彦：キャンディン系薬. 「深在性真菌症のマネジメント」, 編者:河野茂, p.73-78, 医薬ジャーナル社, 2015. 8. 20発行.
- 43) 亀井克彦：輸入真菌症が疑われたときの対応. 「深在性真菌症のマネジメント」, 編者:河野茂, p. 341-346, 医薬ジャーナル社, 2015. 8. 20発行.

# 山本（感染宿主応答ネットワーク）プロジェクト

## Project for Host Response Network of Bacterial Infection

---

### 研究概要 (Summary)

本プロジェクトでは、細菌感染と発症のメカニズムを分子レベルで解明し、研究成果を感染症の予防と治療へ役立てることを目指している。感染現象は、2つの異なる生物（病原体と宿主）の間に形成される新たな生命現象である。細菌感染のメカニズムを分子レベルで解き明かすことにより、細菌と生体の間に展開される複雑系の生命現象を解き明かすことを合わせて目指している。

「主要な研究テーマ」

- (I) サルモネラ属細菌をモデルとした、食細胞内寄生性を有する病原細菌の全身感染症発症機序並びに持続感染機構の解明
- (II) RNA エピジェネティクスとリボソームターゲティング薬の抗菌活性
- (III) AAA<sup>+</sup>プロテアーゼ ClpXP の研究成果に基づいた慢性感染症治療薬となる anti-persister の探索研究

### Research Focus

- (I) Dissecting the molecular mechanisms of systemic infection and persistent infection by facultative intracellular bacteria through the study of *Salmonella*-host interplay: We focus on the *Salmonella* effectors, which we have identified through a meta-analytic approach to the accurate prediction of effectors, to elucidate the dynamic interplay with their host targets and bacterial strategies for withstanding the host innate- and acquired-immune systems.
  - (II) RNA epigenetics and bacterial susceptibility to ribosome-targeting antibiotics: This project is based on our recent findings that post-transcriptional modifications (epigenetic alterations) of 23S rRNA by intrinsic enzymes are essentially responsible for susceptibility of pathogenic bacteria to several ribosome-targeting antibiotics.
  - (III) Identification and development of anti-persister compounds as a new class of antibiotics to treat chronic infection: Our previous studies on the AAA<sup>+</sup> protease, ClpXP allowed us to hypothesize that the dysregulation of proteolysis by activation of ClpP core in the absence of the regulatory ClpX ATPase may lead to corruption of bacterial physiology and eventually death of dormant cells. The compounds leading such uncontrolled proteolysis could be potential as a new class of antibiotics to treat chronic infection
- 

特任教授 山本 友子  
技術補佐員 野村祐理子

Professor  
Research Promotion Technician

Tomoko Yamamoto  
Yuriko Nomura

## 1. Host response network of *Salmonella* infection: Suppression of humoral immune memory by *Salmonella* persistent infection

Tomoko Yamamoto<sup>1</sup>, Akiko Takaya<sup>2</sup> and Koji Tokoyoda<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Project for Host Response Network of Bacterial Infection, Medical Mycology Research Center, Chiba University

<sup>2</sup> Department of Microbiology and Molecular Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

<sup>3</sup> German Rheumatism Research Center Berlin, Germany

*Salmonella* can escape from the host immune surveillance and thereby cause persistent infection. It has been reported that *Salmonella* is resident in myeloid cells of host organs. Since most myeloid cells are short-lived, *Salmonella* is assumed to relocate to new myeloid cells via fluid for the persistence in the host. However, it remains unknown how *Salmonella* escapes from humoral immunity, especially antibodies in fluid. We showed that the great majority ( $\geq 80\%$ ) of bone marrow IgG-secreting plasma cells was diminished within 4 days after intraperitoneal and oral infection of live Lon-deficient attenuated *Salmonella*, whereas bone marrow IgM-secreting and splenic IgG-secreting plasma cells were unaffected. The infection also reduced total IgG titers in serum, resulting in impaired production of previously-generated antibodies against *Salmonella*. This selective diminishment was also induced by culture supernatants from *Salmonella* but not *Escherichia coli* within 24 hours after intraperitoneal injection. From the results that the culture supernatant depleting ligands for Toll-like receptors, lipopolysaccharide and flagellin, reduced the plasma cells, we suggest that *Salmonella*-specific component is involved in the reduction of IgG-secreting plasma cells in the bone marrow. *Salmonella* also reduced B cell precursors in the bone marrow and presumably blocked the provision of B cells for the periphery. Thus, *Salmonella* inhibits humoral immunity targeting the secretion of antibodies and provision of new B cell subsets. To identify a *Salmonella* component reducing IgG-secreting plasma cells and B cell precursors in the bone marrow, genetical and biochemical studies are now in progress.

## 2. Invasive non-typhoidal *Salmonella* (iNTS) disease: Host pathogen interaction in iNTS infection and appropriate vaccine candidate

Tomoko Yamamoto<sup>1</sup>, Akiko Takaya<sup>2</sup>, Hiroki Takahashi<sup>3</sup>, Yuriko Nomura<sup>1</sup>, Kentaro Miyamoto<sup>4</sup>, Kentaro Oka<sup>4</sup> and Motomichi Takahashi<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Project for Host Response Network of Bacterial Infection, Medical Mycology Research Center, Chiba University

<sup>2</sup> Department of Microbiology and Molecular Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

<sup>3</sup> Project for Systems Biology of Microorganisms, Medical Mycology Research Center, Chiba University

<sup>4</sup> Tokyo R&D Center, Miyarisan Pharmaceutical Co., Ltd

Non-typhoidal *Salmonella* (NTS) serovars such as serovar Typhimurium generally cause in humans, self-limited gastroenteritis, associated with intestinal inflammation and diarrhea. Nevertheless, in developed countries up to 5 % of NTS cases may be invasive, extra-intestinal disease leading to bacteremia and focal systemic infections. Moreover, in Sub-Saharan Africa invasive non-typhoidal *Salmonella* (iNTS) have emerged as a major cause of bloodstream infection in immunocompromised and debilitated host. Transmission of iNTS has been demonstrated to be primarily human to human, rather than zoonotic, but little is known about the relationship of invasive disease to diarrheal *Salmonella* disease. To understand the iNTS diseases, we focus on the host-pathogen interaction, i.e. bacterial pathogenesis and host immune responses, in iNTS infection. To attain the goal, we initially analyzed the whole genomes of various iNTS strains isolated in Sub-Saharan Africa during the period 2011-2014 using next generation sequencing.



### 3. RNA epigenetics and bacterial susceptibility to ribosome-targeting antibiotics

Tomoko Yamamoto<sup>1</sup>, Akiko Takaya<sup>2</sup>, Naruhiko Ishiwada<sup>3</sup> and Tsutomu Suzuki<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Project for Host Response Network of Bacterial Infection, Medical Mycology Research Center, Chiba University

<sup>2</sup> Department of Microbiology and Molecular Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

<sup>3</sup> Project to link infection control and prevention, Medical Mycology Research Center, Chiba University

<sup>4</sup> Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, University of Tokyo

In prokaryotic cells, ribosomal RNAs (rRNAs) undergo specific post-transcriptional modifications, i.e. epigenetic alterations, by a wide variety of enzymes during maturation. Most of modified residues of the 23S rRNA are clustered around the nascent peptide exit tunnel, which starts at the peptidyl transferase center (PTC) and spans the body of the large ribosomal subunit. We have found that some of post-transcriptional modifications of 23S rRNA are essentially responsible for bacterial susceptibility to several ribosome PTC-targeting antibiotics.

(i) Interplay between two rRNA methylations responsible for telithromycin (TEL) susceptibility: Inactivation of the intrinsic methyltransferases RlmA<sup>II</sup>, which methylates the N-1 position of nucleotide G748 located in helix 35 of domain II of 23S rRNA, resulted in increased resistance of *Streptococcus pneumoniae* to TEL, a member of ketolides. Primer extension analysis showed the degree of methylation at G748 in all TEL-resistant mutants is significantly reduced by a mutation in the gene encoding RlmA<sup>II</sup>. Adenine at position 752 in a loop of helix 35 from positions 745 to 752 is involved in binding to the ribosome of TEL. RNA footprinting and the molecular modeling study have suggested that the methylation of G748 enhances binding of TEL to A752 and thereby contributes to the stable interaction of TEL with domain II of 23S rRNA. This novel finding shows that methylation of G748 by RlmA<sup>II</sup> renders *S. pneumoniae* TEL-

susceptible. Moreover, we have found that another intrinsic methylation of the adjacent uridine at position 747 enhances G748 methylation by RlmA<sup>II</sup>. U747 and another nucleotide, U1939, were methylated by the dual-specific methyltransferase RlmCD encoded by *SP\_1029*. Inactivation of RlmCD reduced N1-methylated level of G748 by RlmA<sup>II</sup> *in vivo*, leading to TEL resistance. *In vitro* methylation of rRNA showed that RlmA<sup>II</sup> activity was significantly enhanced by RlmCD-mediated pre-methylation of 23S rRNA. These results suggest that RlmCD-mediated U747 methylation promotes efficient G748 methylation by RlmA<sup>II</sup>, thereby facilitating TEL binding to the ribosome (published).

(ii) Intrinsic rRNA methylation responsible for linezolid (LZD) susceptibility: The defects of the gene encoding intrinsic RlmN which methylates 23S rRNA nucleotide A2503 were revealed to link to the resistance to LZD, the first agent of oxazolidinone class, in clinical isolates of *Staphylococcus*.

From these findings, we hypothesize that the epigenetic alterations of 23S rRNA are possibly involved in the bacterial susceptibility to a wide variety of ribosomal PTC-targeting antibiotics. This study will provide innovative perspectives on selecting antibacterial targets and developing antibiotics.

### 4. Identification and development of anti-persister compounds as a new class of antibiotics

Tomoko Yamamoto<sup>1</sup>, Akiko Takaya<sup>2</sup>, Yuriko Nomura<sup>1</sup>, and Walid Houry<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Project for Host Response Network of Bacterial Infection, Medical Mycology Research Center, Chiba University

<sup>2</sup> Department of Microbiology and Molecular Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

<sup>3</sup> Department of Biochemistry, University of Toronto, Canada

Chronic infections are difficult to treat with antibiotics, which kill bacteria by corrupting their targets but these are inactive in dormant persisters, leading to tolerance. We reasoned that a compound capable of corrupting a target in dormant, energy-deprived cells will kill persisters. Our

previous studies on the energy-dependent ClpXP-protease allowed us to hypothesize that the dysregulation of proteolysis by activation of ClpP core in the absence of the regulatory ClpX ATPase may lead to corruption of bacterial physiology and eventually death of dormant cells. The compounds leading such uncontrolled proteolysis could be potential as a new class of antibiotics to treat chronic infection. To identify those compounds, we initially established a system for evaluating ClpP proteolysis *in vitro* and have been conducting high-through-put screening by exploiting various chemical libraries. Very recently, we have found that one of such compounds, ACPb1 (ACP: Activators of Self-Compartmentalizing Protease) originally showing no antimicrobial activity can kill a variety of bacteria under certain condition.

#### Publications

- 1) Hirai S, Yokoyama E, Etoh Y, Seto J, Ichihara S, Suzuki Y, Maeda E, Sera N, Horikawa K, Sato S, Yamamoto T. Putative classification of clades of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 using an IS-printing system. *Lett Appl Microbiol.* 61:267-273. 2015.
- 2) Ishiwada N, Takaya A, Kimura A, Watanabe M, Hino M, Ochiai H, Matsui M, Shibayama K, Yamamoto T. Linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with long-term, repeated linezolid use in a pediatric patient. *J Infect Chemother.* doi:10.1016/j.jiac.2015.10.004. 2015.
- 3) Matsui H, Fukiya S, Kodama-Akaboshi C, Eguchi M, Yamamoto T. Mouse models for assessing the cross-protective efficacy of oral non-typhoidal *Salmonella* vaccine candidates harbouring in-frame deletions of the ATP-dependent protease lon and other genes. *J Med Microbiol.* 64:295-302. 2015.
- 4) Shoji T, Takaya A, Sato Y, Kimura S, Suzuki T, Yamamoto T. RlmCD-mediated U747 methylation promotes efficient G748 methylation by methyltransferase RlmA<sup>II</sup> in 23S rRNA in *Streptococcus pneumoniae*; interplay between two rRNA methylations responsible for telithromycin susceptibility. *Nucleic Acids Research,* 43:8964-7972. 2015.
- 5) Takaya A, Kimura A, Sato Y, Ishiwada N, Watanabe M, Matsui M, Shibayama K, Yamamoto T. Molecular characterization of linezolid-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* isolates in Japan. *J. Atimicrob. Chemother.* 70:658-63. 2015.
- 6) Takeuchi M, Yamamoto T. Apoptosis induced by NAD depletion is inhibited by KN-93 in a CaMKII-independent manner. *Exp Cell Res.* 335:62-67. 2015.
- 7) 山本友子：プラスミドによる薬剤耐性の菌種間伝播と施設内感染：マクロライド/ケトライド耐性。化学療法の領域 31:1458-1468. 2015.

# 川本（分子細胞シグナリング解析）プロジェクト

## Project for Molecular Signaling Analysis

### 研究概要 (Summary)

生化学・分子生物学・細胞生物学等の手法を用い、病原真菌の分子細胞研究を行い、抗真菌薬シーズ創出など真菌症の分子制御に向けた分子細胞医真菌学への貢献を目指す。

- 1) 病原酵母 *Cryptococcus neoformans* の細胞周期と低酸素ストレス応答の分子細胞解析
- 2) 病原真菌における一酸化窒素 (NO) の生成機構と生理機能の解析
- 3) マイコウイルスタンパク質の作用機序解析

We are conducting basic research on the molecular and cellular biology of pathogenic fungi using, mainly, biochemistry and molecular biology methods based on gene and protein science.

- 1) Molecular and cellular analysis of cell cycle regulation and hypoxic adaptation in *Cryptococcus neoformans*.
- 2) Analysis of biosynthesis and physiological function of nitric oxide (NO) in pathogenic fungi.
- 3) Functional analysis of mycovirus protein.

客員教授・グラントフェロー 川本 進 Guest Professor・Grand Fellow Susumu Kawamoto

### 1. Identification of genes involved in the phosphate metabolism in *Cryptococcus neoformans*.

Akio Toh-e<sup>1</sup>, Misako Ohkusu<sup>1</sup>, Hao-Man Li<sup>1</sup>, Kiminori Shimizu<sup>1</sup>, Azusa Takahashi-Nakaguchi<sup>1</sup>, Tohru Gono<sup>1</sup>, Susumu Kawamoto<sup>1</sup>, Yu Kanasaki<sup>2</sup>, Hirofumi Yoshikawa<sup>2,3</sup>, Masafumi Nishizawa<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan

<sup>2</sup>NODAI Genome Research Center, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan

<sup>3</sup>Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan

<sup>4</sup>Department of Microbiology and Immunology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

*Cryptococcus neoformans* is a pathogenic basidiomycetous yeast that can cause life-threatening meningoencephalitis in immuno-compromized patients. To propagate in the human body, this organism has to acquire phosphate that functions in

cellular signaling pathways and is also an essential component of nucleic acids and phospholipids. Thus it is reasonable to assume that *C. neoformans* (Cn) possesses a phosphate regulatory system (PHO system) analogous to that of other fungi. By BLAST searches using the amino acid sequences of the components of the PHO system of *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), we found potential counterparts to ScPHO genes in *C. neoformans*, namely, acid phosphatase (CnPHO2), the cyclin-dependent protein kinase (CDK) inhibitor (CnPHO81), Pho85-cyclin (CnPHO80), and CDK (CnPHO85). Disruption of each candidate gene, except CnPHO85, followed by phenotypic analysis, identified most of the basic components of the CnPHO system. We found that CnPHO85 was essential for the growth of *C. neoformans*, having regulatory function in the CnPHO system. Genetic screening and ChIP analysis, showed that CnPHO4 encodes a transcription factor that binds to the CnPHO genes in a Pi-dependent manner. By RNA-seq analysis of the wild-type and the regulatory mutants of the CnPHO system, we found *C. neoformans* genes whose expression is controlled by the regulators of the CnPHO system. Thus the CnPHO

system shares many properties with the ScPHO system, but expression of those CnPHO genes that encode regulators is controlled by phosphate starvation, which is not the case in the ScPHO system (except ScPHO81). We also could identify some genes involved in the stress response of the pathogenic yeast, but CnPho4 appeared to be responsible only for phosphate starvation.

## 2. Electron microscopy of autopsy material from the human brain cryptococcosis and AIDS.

Amaliya A Stepanova<sup>1</sup>, Natalya V Vasilyeva<sup>1</sup>, Masashi Yamaguchi<sup>2</sup>, Kiminori Shimizu<sup>2</sup>, Susumu Kawamoto

<sup>1</sup>North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov: Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Chair of Medical Microbiology, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup>Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan

The cells of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and human brain macrophages in autopsy material of cryptococcosis AIDS patient has been studied by light and transmission electron microscopy. Use of paraffin blocks for electron microscopic investigation of human brain cryptococcosis was proposed. 1. The use of paraffin blocks of the autopsy material for subsequent electron microscopic studies were acceptable, in particular, to study the pathogenesis of cryptococcosis of the human brain and revealing the structural peculiarity of fungal cells. They can be used also for studies of virus-like particles in human tissues of the dynamics of their distribution in human body. 2. We detected only dead cells of the *C. neoformans* var. *neoformans* both, as outside and, just inside of the macrophages in the brain tissue of dead patient. We described the 6 types of dead yeast cells in the human brain tissue investigated.

## Publications

- 1) Kopecká M, Yamaguchi M, Kawamoto S: The effects of F-actin inhibitor latrunculin A on pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Chemotherapy* 60 (3): 185-190, 2015.
- 2) Shimizu, K Nakagawa H, Hashimoto R, Onji Y, Asano K, Kawamoto S, Takahashi H, Yokoyama K: The *a*-oxoamine synthase gene *fum8* is involved in fumonisin B2 biosynthesis in *Aspergillus niger*. *Mycoscience* 56: 301-301, 2015.
- 3) Stepanova AA, Vasilyeva NV, Yamaguchi M, Shimizu K, Kawamoto S: Electron microscopy of autopsy material from the human brain cryptococcosis and AIDS. *Problems in Medical Mycology* 17 (1): 35-40, 2015.
- 4) Takahashi-Nakaguchi A, Muraosa Y, Hagiwara D, Sakai K, Toyotome T, Watanabe, A Kawamoto S, Kamei K, Gonoi T, Takahashi H: Genome sequence comparison of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from patients with pulmonary aspergilloma and chronic necrotizing pulmonary aspergillosis. *Medical Mycology* 53 (4): 353-360, 2015.
- 5) Toh-e A, Ohkusu M, Li H-M, Shimizu K, Takahashi-Nakaguchi A, Gonoi T, Kawamoto S, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Nishizawa M: Identification of genes involved in the phosphate metabolism in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet. Biol.* 80: 19-30, 2015.
- 6) Toh-e A, Ohkusu M, Shimizu K, Kawamoto S: Positional cloning in *Cryptococcus neoformans* and its application for identification and cloning of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase. *Fungal Genet. Biol.* 76: 70-77, 2015.
- 7) Ueno K, Kinjo Y, Okubo Y, Aki K, M. Urai, Kaneko Y, Shimizu K, Wang DN, Okawara A, Nara T, Ohkouchi K, Mizuguchi Y, Kawamoto S, Kamei K, Ohno H, Niki Y, Shibuya K, Miyazaki Y: Dendritic cell-based immunization ameliorates pulmonary infection with highly virulent *Cryptococcus gattii*. *Infect. Immun.* 83 (4): 1577-1586, 2015.
- 8) 浦山俊一, 森山裕允, 寺岡 徹, 川本 進: ウイルスの毒性遺伝子を用いた病原菌の生育制御. *バイオサイエンスとインダストリー* 74 (4): 306-307, 2015.

# 石和田（感染症制御）プロジェクト

## Project for Infection Control and Prevention

### 研究概要 (Summary)

インフルエンザ菌の病原性解析ならびにインフルエンザ菌感染症と肺炎球菌感染症の疫学調査を継続的に行っている。結合型ワクチン導入後、新しく問題となっているワクチン非含有型株による病原因子の解析を行い、新たな予防法の開発を目指す。また、難治性呼吸器感染症の診断、治療法開発のための臨床研究を実施している。同時に、附属病院における小児科・感染症内科・感染制御部での診療活動及び学内外でのコンサルテーションを行っている。

**Our research focuses on sero-epidemiology and pathogenesis of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. We organize several clinical researches for the development of diagnostic and therapeutic methods for respiratory infectious diseases collaborating with clinicians and also care for patients in the clinic of the University Hospital.**

准 教 授	石和田稔彦	Associate Professor	Naruhiko Ishiwada
助 教	竹内典子	Assistant Professor	Noriko Takeuchi
技 術 職 員	大楠美佐子	Research Technician	Misako Ohkusu

### 1. Molecular characterization of linezolid-resistant CoNS isolates in Japan.

Takaya A<sup>1</sup>, Kimura A<sup>1</sup>, Sato Y<sup>1</sup>, Ishiwada N<sup>2</sup>, Watanabe M<sup>3</sup>, Matsui M<sup>4</sup>, Shibayama K<sup>4</sup>, Yamamoto T<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Molecular Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba, Japan.

<sup>2</sup>Division of Control and Treatment of Infectious Diseases, Chiba University Hospital, Chiba, Japan.

<sup>3</sup>Division of Laboratory Medicine, Chiba University Hospital, Chiba, Japan.

<sup>4</sup>Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, Musashimurayama, Tokyo, Japan.

<sup>5</sup>Department of Microbiology and Molecular Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba, Japan

Linezolid has been reported to remain active against 98% of staphylococci with resistance identified in 0.05% of *Staphylococcus aureus* and 1.4% of CoNS. The objective of this

study was to characterize the linezolid-resistance mechanisms in the linezolid-resistant CoNS strains isolated in Japan.

*Staphylococcus capitis* strains exhibiting linezolid MICs >8 mg/L isolated from inpatients between 2012 and 2014 were screened for *cfr* and mutations in 23S rRNA, L3 and L4 by PCR/sequencing. Isolates were also examined for mutations in the *rlmN* gene. *S. capitis* had six 23S rRNA alleles. Five *S. capitis* isolates displayed linezolid MICs of 8, 16 and 32 mg/L. G2576U mutations were detected in three, four or five copies of 23S rRNA in all isolates. In two isolates exhibiting the highest linezolid MIC (32 mg/L) there was a large deletion in a single copy of 23S rRNA. Repeated 10 bp sequences were found in both 16S and 23S rRNAs, suggesting deletion by recombination between the repeats. One isolate had the mutation Ala-142→Thr in the ribosomal protein L3. All linezolid-resistant isolates also demonstrated mutations in the gene encoding RlmN methyltransferase, leading to Thr-62→Met and Gly-148→Ser. Multiple mechanisms appeared to be responsible for the elevated linezolid resistance in *S. capitis* isolates: a G2576U mutation in different numbers of copies of 23S rRNA, loss of a single copy of 23S rRNA and a mutation in the ribosomal protein L3, suggesting the

accumulation of independent mutational events.

## 2. Pharmacokinetics, efficacy, and safety of caspofungin in Japanese pediatric patients with invasive candidiasis and invasive aspergillosis.

Mori M<sup>1</sup>, Imaizumi M<sup>2</sup>, Ishiwada N<sup>3</sup>, Kaneko T<sup>4</sup>, Goto H<sup>5</sup>, Kato K<sup>6</sup>, Hara J<sup>7</sup>, Kosaka Y<sup>8</sup>, Koike K<sup>9</sup>, Kawamoto H<sup>10</sup>, Maeda N<sup>11</sup>, Yoshinari T<sup>12</sup>, Kishino H<sup>12</sup>, Takahashi K<sup>12</sup>, Kawahara S<sup>12</sup>, Kartsonis NA<sup>13</sup>, Komada Y<sup>14</sup>.

<sup>1</sup> Department of Pediatrics, Yokohama City University Medical Center, Urafune 4-57, Minami-ku, Yokohama, Kanagawa, Japan.

<sup>2</sup> Miyagi Children's Hospital, Miyagi, Japan.

<sup>3</sup> Chiba University Hospital, Chiba, Japan.

<sup>4</sup> Tokyo Metropolitan Children's Medical Center, Tokyo, Japan.

<sup>5</sup> Kanagawa Children's Medical Center, Kanagawa, Japan.

<sup>6</sup> Japanese Red Cross Nagoya Daiichi Hospital, Aichi, Japan.

<sup>7</sup> Osaka City General Hospital, Osaka, Japan.

<sup>8</sup> Hyogo Prefectural Kobe Children's Hospital, Hyogo, Japan.

<sup>9</sup> Ibaraki Children's Hospital, Ibaraki, Japan.

<sup>10</sup> National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan.

<sup>11</sup> National Hospital Organization Nagoya Medical Center, Aichi, Japan.

<sup>12</sup> Japan Development, MSD K.K., Tokyo, Japan.

<sup>13</sup> Merck Research Laboratories, Merck Sharp & Dohme Corp., Upper Gwynedd, PA, USA.

<sup>14</sup> Mie University Hospital, Mie, Japan.

The antifungal agents approved in Japan for pediatric use are limited and many unapproved drugs are actually used without clear instruction for dosage. We investigated the pharmacokinetics of caspofungin for the treatment of invasive candidiasis and invasive aspergillosis in 20 Japanese pediatric patients using a pediatric-specific dosage based on body surface area. Caspofungin was administered intravenously over 60 min as 70 mg/m<sup>2</sup> on Day 1, followed by 50 mg/m<sup>2</sup> (2) per day. Five or 4 point blood sampling were done in 15 patients on Day 4-5 to calculate AUC<sub>0-24 h</sub>. The geometric means (95% confidence interval) of C<sub>24 h</sub> and AUC<sub>0-24</sub>

h in the pediatric patients were 3.3 (2.5, 4.4) μg/mL and 175.1 (139.3, 220.1) μg hr/mL, respectively, which were comparable to those in Japanese adult patients [3.2 (2.8, 3.5) μg/mL and 144.9 (131.7, 159.3) μg hr/mL, respectively]. Among the 20 patients, 10 (50%) had at least 1 drug-related adverse event which was considered related to caspofungin therapy. No drug-related serious adverse event and no death occurred. The most common drug-related adverse events were events relating to hepatic function (mainly increases in ALT and AST). The overall success in efficacy was observed in 13 of 20 patients. In conclusion, once daily administration of caspofungin (70 mg/m<sup>2</sup> on Day 1, followed by 50 mg/m<sup>2</sup> [maximum daily dose not to exceed 70 mg]), which is the same dosage being used in overseas, achieved sufficient drug exposure and a favorable efficacy and acceptable safety profile in Japanese pediatric patients with invasive fungal infections.

## 3. Analysis of *Haemophilus influenzae* serotype f isolated from three Japanese children with invasive *H. influenzae* infection

Hoshino T<sup>1</sup>, Hachisu Y<sup>2</sup>, Kikuchi T<sup>2</sup>, Tokutake S<sup>3</sup>, Okui H<sup>3</sup>, Kutsuna S<sup>3</sup>, Fukasawa C<sup>3</sup>, Murayama K<sup>4</sup>, Oohara A<sup>5</sup>, Shimizu H<sup>5</sup>, Ito M<sup>6</sup>, Takahashi Y<sup>7</sup>, Ishiwada N<sup>8</sup>.

<sup>1</sup> Division of Infectious Diseases, Chiba Children's Hospital, Chiba, Japan

<sup>2</sup> Chiba Prefectural Institute of Public Health, Chiba, Japan.

<sup>3</sup> Division of Infectious Diseases, Chiba Children's Hospital, Chiba, Japan.

<sup>4</sup> Department of Metabolism, Chiba Children's Hospital, Chiba, Japan.

<sup>5</sup> Children's Medical Center, Fujisawa City Hospital, Kanagawa, Japan.

<sup>6</sup> Department of Pediatrics, Nagoya City West Medical Center, Aichi, Japan.

<sup>7</sup> Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan.

<sup>8</sup> Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan.

In Japan, publicly subsidized *Haemophilus influenzae* serotype b vaccines became available in 2011; consequently, the incidence of invasive *H. influenzae* infection in paediatric patients of less than 5 years of age decreased dramatically. In 2013, the first case of *H. influenzae* serotype f (Hif) meningitis in a Japanese infant was reported, and another case of Hif meningitis in a Japanese infant was observed in 2013. We experienced a fatal paediatric case of Hif bacteraemia in 2004; therefore, we conducted an analysis of the three Hif strains isolated from these three Japanese children with invasive Hif infections. All three strains were  $\beta$ -lactamase-non-producing, ampicillin-sensitive strains, with MICs of 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  or less. However, one of the three strains showed slightly elevated MICs for ampicillin (1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), cefotaxime (0.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and meropenem (0.13  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). A molecular analysis by multilocus sequence typing identified all three strains as sequence type (ST) 124, which is a predominant invasive Hif strain in many countries. SmaI-digested PFGE showed variable DNA fragmentation patterns among the strains, suggesting that some highly virulent strains have originated from a single ST124 clone and caused invasive Hif infections in Japan. Additional studies are needed to determine the factors that have led to the clonal expansion of virulent ST124 strains.

#### 4. The impact of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine on the incidence of childhood community-acquired pneumonia and bacteriologically confirmed pneumococcal pneumonia in Japan.

Naito S<sup>1</sup>, Tanaka J<sup>1</sup>, Nagashima K<sup>2</sup>, Chang B<sup>3</sup>, Hishiki H<sup>1</sup>, Takahashi Y<sup>1</sup>, Oikawa J<sup>1</sup>, Nagasawa K<sup>1</sup>, Shimojo N<sup>1</sup>, Ishiwada N<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Department of Pediatrics, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba City, Japan.

<sup>2</sup> Clinical Research Centre, Chiba University Hospital, Chiba City, Japan.

<sup>3</sup> Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.

<sup>4</sup> Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba City, Japan.

Heptavalent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) was introduced to Japan in 2010. We investigated the impact of PCV7 on childhood community-acquired pneumonia (CAP) and pneumococcal pneumonia (PP). Children aged <5 years living in Chiba city, Japan, who were admitted to hospitals were enrolled to estimate the incidence of CAP based on the mid-year population. PP was determined by the presence of *Streptococcus pneumoniae* in cultured blood and/or sputum samples of CAP patients. The incidence of CAP and *S. pneumoniae* isolated from PP patients was compared before (April 2008-March 2009) and after (April 2012-March 2013) the introduction of PCV7 immunization. The annual incidence of CAP was reduced [incidence rate ratio 0.81, 95% confidence interval (CI) 0.73-0.90]. When comparing post-vaccine with pre-vaccine periods, the odds ratio for PP incidence was 0.60 (95% CI 0.39-0.93,  $P = 0.024$ ). PCV7-covered serotypes markedly decreased (66.6% in pre-vaccine vs. 15.6% in post-vaccine,  $P < 0.01$ ), and serotypes 6C, 15A, 15C and 19A increased. Multidrug-resistant international clones in the pre-vaccine period (Spain6B-2/ST90, Taiwan19F-14/ST236) decreased, while Sweden15A-25/ST63 was the dominant clone in the post-vaccine period. A significant reduction in the incidence of both CAP hospitalizations and culture-confirmed PP of vaccine serotypes was observed at 2 years after PCV7 vaccination.

#### 5. Nationwide population-based surveillance of invasive pneumococcal disease in Japanese children: Effects of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine.

Suga S<sup>1</sup>, Chang B<sup>2</sup>, Asada K<sup>3</sup>, Akeda H<sup>4</sup>, Nishi J<sup>5</sup>, Okada K<sup>6</sup>, Wakiguchi H<sup>7</sup>, Maeda A<sup>8</sup>, Oda M<sup>9</sup>, Ishiwada N<sup>10</sup>, Saitoh A<sup>11</sup>, Oishi T<sup>11</sup>, Hosoya M<sup>12</sup>, Togashi T<sup>13</sup>, Oishi K<sup>2</sup>, Ihara T<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Infectious Disease Center and Department of Clinical Research, National Hospital Organization Mie Hospital, Mie, Japan.

<sup>2</sup> National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.

<sup>3</sup> Infectious Disease Center and Department of Clinical Research, National Hospital Organization Mie Hospital,

Mie, Japan.

<sup>4</sup> Okinawa Prefectural Nanbu Medical Center & Children's Medical Center, Okinawa, Japan.

<sup>5</sup> Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima, Japan.

<sup>6</sup> Section of Pediatrics, Department of Medicine, Division of Oral and Medical Management, Fukuoka Dental College, Fukuoka, Japan.

<sup>7</sup> Kochi University, Kochi, Japan.

<sup>8</sup> Department of Pediatrics, Kochi Prefectural Hata-Kenmin Hospital, Kochi, Japan.

<sup>9</sup> Okayama University Graduate School of Health Sciences, Okayama, Japan.

<sup>10</sup> Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan.

<sup>11</sup> Department of Pediatrics, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan.

<sup>12</sup> Department of Pediatrics, Fukushima Medical University School of Medicine, Fukushima, Japan.

<sup>13</sup> Sapporo City University School of Nursing, Hokkaido, Japan.

In Japan, the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) was introduced in 2010. PCV13 has replaced PCV7 since November 2013. The effectiveness of PCV7 in protecting against invasive pneumococcal disease (IPD) in children aged <5 years was evaluated in a nationwide active population-based surveillance of IPD in 2008-2013 in 10 prefectures in Japan. 1181 cases were identified; 711 pneumococcal strains were analyzed for serotyping and antimicrobial resistance. Compared with the baseline IPD incidence (25.0 per 100,000), a 98% decline in IPD caused by PCV7 serotypes was found after the introduction of PCV7. This was partially offset by an increased incidence of IPD caused by PCV13 minus PCV7 and non-PCV13 serotypes, resulting in a 57% decline in overall IPD incidence. Absolute increases in the incidence rates of IPD caused by PCV13 minus PCV7 and non-PCV13 serotypes were 2.1 and 2.8 per 100,000 during the study period, respectively. The proportion of meropenem-nonsusceptible strains, especially with serotypes 19A and 15A, increased significantly after PCV7 introduction. Our data confirmed a 98% decline in

IPD incidence caused by PCV7 serotypes in children aged <5 years and serotype replacement after PCV7 introduction. This shows the importance of continuing surveillance of serotypes responsible for IPD and their antimicrobial resistance in Japan.

## **6. Molecular evolution of the hypervariable region of the attachment glycoprotein gene in human respiratory syncytial virus subgroup B genotypes BA9 and BA10.**

Nagasawa K<sup>1</sup>, Hirano E<sup>2</sup>, Kobayashi M<sup>3</sup>, Ryo A<sup>4</sup>, Oishi K<sup>5</sup>, Obuchi M<sup>6</sup>, Ishiwada N<sup>7</sup>, Noda M<sup>5</sup>, Kuroda M<sup>8</sup>, Shimojo N<sup>9</sup>, Kimura H<sup>10</sup>.

<sup>1</sup> Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Chiba, Japan; Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.

<sup>2</sup> Fukui Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, Fukui, Japan.

<sup>3</sup> Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, Gunma, Japan.

<sup>4</sup> Department of Microbiology, Yokohama City University, Graduate School of Medicine, Kanagawa, Japan.

<sup>5</sup> Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.

<sup>6</sup> Department of Virology, Toyama Institute of Health, Toyama, Japan.

<sup>7</sup> Division of Infection Control and Prevention Medical Mycology Research Center, Chiba university, Chiba, Japan.

<sup>8</sup> Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.

<sup>9</sup> Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan.

<sup>10</sup> Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan; Department of Microbiology, Yokohama City University, Graduate School of Medicine, Kanagawa, Japan.

We studied the molecular evolution of the C-terminal 3rd hypervariable region in the attachment glycoprotein gene of human respiratory syncytial virus subgroup B (HRSV-B)



genotypes BA9 and BA10. We performed time-scaled phylogenetic analyses using Bayesian Markov chain Monte Carlo methods. We also performed a genetic distance analysis (p-distance analysis), positive and negative selection analyses, and a Bayesian skyline plot (BSP) analysis. We found that genotype BA9 diverged from the common ancestor of genotypes BA7, BA8, and BA10, while genotype BA10 diverged from the ancestor of genotypes BA7 and BA8. Strains of both genotypes were distributed worldwide. BA9 and BA10 diverged between 1999 and 2001. Both BA9 and BA10 evolved rapidly (about  $4.8 \times 10^{-3}$  substitutions/site/year) and formed three distinct lineages in a 10-year period. BA10 strains belonging to lineage 3 had large genetic distances (p-distance > 0.07). Thus, it may be possible to classify these strains as a new genotype, BA11. No positive selection site was detected in either genotype. Phylodynamic analyses showed that the effective population size of BA10 decreased gradually since 2010 and BA9 slightly decreased since 2009. The results suggested that the recently prevalent HRSV-B genotypes BA9 and BA10 evolved uniquely, leading to epidemics of HRSV-B worldwide over a 15-year period.

**7. The first case of invasive mixed-mold infections due to *Emericella nidulans* var. *echinulata* and *Rasamsonia piperina* in a patient with chronic granulomatous disease.**

Ishiwada N<sup>1</sup>, Takeshita K<sup>2</sup>, Yaguchi T<sup>3</sup>, Nagasawa K<sup>2</sup>, Takeuchi N<sup>4</sup>, Hishiki H<sup>2</sup>, Watanabe A<sup>4</sup>, Kamei K<sup>4</sup>, Shimojo N<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan.

<sup>2</sup> Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan.

<sup>3</sup> Division of Bioresources, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan.

<sup>4</sup> Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan.

A 16-year-old boy with chronic granulomatous disease presented with pneumonia and rib osteomyelitis. *Emericella*

*nidulans* var. *echinulata* was isolated from his sputum. After starting voriconazole, *Rasamsonia piperina* was isolated from the rib swelling. A combination therapy of voriconazole and micafungin effectively eradicated this invasive mixed-mold infection. In immunocompromised patients, a precise pathogenic diagnosis is clinically useful for administration of an appropriate treatment regimen.

**8. Linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with long-term, repeated linezolid use in a pediatric patient.**

Ishiwada N<sup>1</sup>, Takaya A<sup>2</sup>, Kimura A<sup>2</sup>, Watanabe M<sup>3</sup>, Hino M<sup>4</sup>, Ochiai H<sup>4</sup>, Matsui M<sup>5</sup>, Shibayama K<sup>5</sup>, Yamamoto T<sup>6</sup>.

<sup>1</sup> Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan.

<sup>2</sup> Department of Microbiology and Molecular Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba, Japan.

<sup>3</sup> Division of Laboratory Medicine, Chiba University Hospital, Chiba, Japan.

<sup>4</sup> Department of Pediatrics, Chiba University Hospital, Chiba, Japan.

<sup>5</sup> Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, Musashimurayama, Tokyo, Japan.

<sup>6</sup> Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan; Department of Microbiology and Molecular Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba, Japan.

We report an 8-year-old patient with catheter-related bacteremia caused by linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* that was isolated after the long-term, repeated use of linezolid. Three *S. epidermidis* strains isolated from this patient were bacteriologically analyzed. While the strain isolated prior to linezolid initiation was susceptible to linezolid, two strains after linezolid therapy displayed low-level linezolid susceptibility (MIC, 4 mg/L) and linezolid resistance (MIC, 16 mg/L). T2500A mutation in two copies and G2575T mutations in three copies of 23S rRNA were

detected in the low-susceptible strain and the resistant strain, respectively. Linezolid-resistant *S. epidermidis* infection is rare, but may occur with the long-term administration of linezolid.

#### Publications: original articles

- 1) Hoshino T, Hachisu Y, Kikuchi T, Tokutake S, Okui H, Kutsuna S, Fukasawa C, Murayama K, Oohara A, Shimizu H, Ito M, Takahashi Y, Ishiwada N.: Analysis of *Haemophilus influenzae* serotype f isolated from three Japanese children with invasive *H. influenzae* infection. J Med Microbiol. 64: 355-8, 2015.
- 2) Ishiwada N, Takeshita K, Yaguchi T, Nagasawa K, Takeuchi N, Hishiki H, Watanabe A, Kamei K, Shimojo N.: The first case of invasive mixed-mold infections due to *Emmericella nidulans* var. *echinulata* and *Rasamsonia piperina* in a patient with chronic granulomatous disease. Mycopathologia. 2015 [Epub ahead of print]
- 3) Ishiwada N, Takaya A, Kimura A, Watanabe M, Hino M, Ochiai H, Matsui M, Shibayama K, Yamamoto T.: Linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with long-term, repeated linezolid use in a pediatric patient. J Infect Chemother. 2015 [Epub ahead of print]
- 4) Mori M, Imaizumi M, Ishiwada N, Kaneko T, Goto H, Kato K, Hara J, Kosaka Y, Koike K, Kawamoto H, Maeda N, Yoshinari T, Kishino H, Takahashi K, Kawahara S, Kartsonis NA, Komada Y.: Pharmacokinetics, efficacy, and safety of caspofungin in Japanese pediatric patients with invasive candidiasis and invasive aspergillosis. J Infect Chemother. 21:421-6, 2015.
- 5) Nagasawa K, Hirano E, Kobayashi M, Ryo A, Oishi K, Obuchi M, Ishiwada N, Noda M, Kuroda M, Shimojo N, Kimura H.: Molecular evolution of the hypervariable region of the attachment glycoprotein gene in human respiratory syncytial virus subgroup B genotypes BA9 and BA10. Infect Genet Evol. 36: 217-23, 2015.
- 6) Naito S, Tanaka J, Nagashima K, Chang B, Hishiki H, Takahashi Y, Oikawa J, Nagasawa K, Shimojo N, Ishiwada N.: The impact of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine on the incidence of childhood community-acquired pneumonia and bacteriologically

confirmed pneumococcal pneumonia in Japan. Epidemiol Infect. 30:1-13, 2015.

- 7) Suga S, Chang B, Asada K, Akeda H, Nishi J, Okada K, Wakiguchi H, Maeda A, Oda M, Ishiwada N, Saitoh A, Oishi T, Hosoya M, Togashi T, Oishi K, Ihara T.: Nationwide population-based surveillance of invasive pneumococcal disease in Japanese children: Effects of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. Vaccine. 33, 6054-60, 2015.
- 8) Takaya A, Kimura A, Sato Y, Ishiwada N, Watanabe M, Matsui M, Shibayama K, Yamamoto T.: Molecular characterization of linezolid-resistant CoNS isolates in Japan. J Antimicrob Chemother. 70:658-63, 2015.
- 9) 宇田和宏, 森川和彦, 伊藤健太, 廣瀬慎太郎, 磯貝美穂子, 森野紗衣子, 為智之, 後藤薫, 内藤幸子, 石和田稔彦, 堀越裕歩: 小児病院における肺炎球菌結合型ワクチン導入後の侵襲性肺炎球菌感染症の血清型の推移 小児感染免疫 27:9-15, 2015.
- 10) 朽名悟, 星野直, 深沢千絵, 徳武翔子, 奥井秀由起, 澤田恭子, 佐藤洋子, 高橋喜子, 石和田稔彦: 小児臨床検体由来インフルエンザ菌非b型荚膜株に関する検討 感染症誌 89: 237-43, 2015.
- 11) 菱木はるか, 石和田稔彦, 内藤幸子, 長澤耕男, 染谷知宏, 井上紳江, 原木真名, 黒崎知道, 亀岡洋祐, 鈴木和男: 2013/2014シーズンのインフルエンザ小児症例に対するノイラミニダーゼ阻害薬の臨床効果の比較 JJA 68: 337-44, 2015.
- 12) 竹内典子, 菱木はるか, 石和田稔彦: 多剤耐性結核菌陽性母体の周産期感染管理の経験と問題点 日小呼誌 26: 218-25, 2015.

#### Publications: reviews, reports, books and the related publications

- 13) 石和田稔彦: 1. Hib ワクチン, 肺炎球菌結合型ワクチンの普及と効果 日小医会報 49:11-16, 2015.
- 14) 石和田稔彦: 臨床医が語る 新薬の治療・市場へのインパクト 小児における肺炎球菌ワクチン「シンフロリックス」のインパクト ファームステージ 15:44-47, 2015.
- 15) 石和田稔彦: 特集 小児呼吸器疾患をあなどるな! II. 検査にチャレンジしよう! 呼吸器感染症診断: 迅速かつ正確に行うための極意 小児科診療 78:

- 945-951, 2015.
- 16) 石和田稔彦：特集 子どものかぜ薬 何がホント？  
4 抗生物質は必要ですか？チャイルドヘルス  
18:17-20, 2015.
  - 17) 石和田稔彦：特集 小児感染症2015 小児感染症  
のマネジメント 小児市中肺炎 小児科臨床  
68:2478-2484, 2015.
  - 18) 石和田稔彦：視点 最近注目されているヒトパレコ  
ウイルス・ヒトボカウイルス感染症 東京小児科医  
会報 34:73-76, 2015.
  - 19) 石和田稔彦：8 肺炎球菌（小児）予防接種の現場で  
困らない まるわかりワクチンQ&A 中野貴司編  
日本医事新報社 p217-226, 2015.
  - 20) 石和田稔彦：感染症 今さら聞けない！ 小児のみ  
み・はな・のど診療Ⅱ巻 山中昇・加我君孝編 全  
日本病院出版会 p89-95, 2015.
  - 21) 石和田稔彦：小児の肺炎 改訂版Ⅰ.総論 3. 診  
断 3) 原因診断～意義と問題点 ①細菌検査 砂  
川慶介・尾内一信編 医薬ジャーナル社 p52-62,  
2015.
  - 22) 石和田稔彦：今日の診断指針 第7版 金澤一郎・  
永井良三編 12 感染性疾患 ポリオ（急性灰白髄  
炎）医学書院 p1356-57, 2015.
  - 23) 吉野 弘, 岡田隆文, 佐藤友紀, 竹内典子, 藤野元  
子, 森谷邦彦, 山遠 剛：WS-2コンジュゲートワク  
チンで小児の中耳炎はどう変わるか？ 小児科臨床  
68:485-487, 2015.

# 五ノ井PI (真菌・放線菌と宿主の分子相互作用研究) プロジェクト Project for Host Pathogen (fungi/actinomycetes) Molecular Interaction

## 研究概要 (Summary)

微生物資源分野では、バイオリソース管理室と協力し、日本国内および海外のヒトや動物に由来する病原真菌・病原放線菌を収集、管理、分譲している。これらの菌株数は、現在約2万に達するが、菌のマーカー遺伝子やゲノムを解析し、また薬剤感受性や電子顕微鏡による形態観察、2次代謝産物の解析などを行い菌株資源、遺伝子資源としての付加価値の向上に努めている。さらなる独自の研究テーマ(PIプロジェクト)については下記『主なテーマ』を参照してください。

### 主なテーマ (Research Focus)

- 1) ヒト・動物の病原真菌・病原放線菌の収集、分類、系統解析、2次代謝産物の解析、病原因子解析、2次代謝産物生合成遺伝子、ゲノムの解析を行っている。
- 2) 真菌・放線菌のヒトへの感染機構の解明を分子生物学的手法、動物モデル、ゲノム解析などを用いて行っている。特に、近年は、(I) 糖鎖と糖鎖受容体を介した菌と宿主の相互作用解明、(II) ヒト病原糸状菌の寄生ウイルスが病原性に及ぼす影響を調べることに力を入れている。
- 3) 真菌感染発症と宿主の栄養状態やストレス状態との関連を、動物モデルなどを用いて研究している。特に代謝関連分子と免疫関連分子の機能的リンクに焦点を当てている。

In cooperation with Bio-Resource management office, we collect pathogenic fungi and actinomycetes in both inside and outside of Japan. We identify pathogenic fungi and actinomycetes as a public service, and analyze their phylogenetic relations. We store fungi and actinomycetes with the support of the National BioResource Projects in Japan, and distribute them upon request. Currently we stock approximately 20,000 strains. We analyze sequences of marker genes and genomes, drug-sensitivities, and observe fine structures using electron-microscopy, to enhance biodiversity values. Other projects are listed below.

- 1) We collect, identify and phylogenetically analyze of human and animal pathogenic fungi and actinomycetes. We also analyze 2nd metabolites and their synthetic enzymes, pathogenic factors, and genomes.
- 2) We analyze infection mechanisms of human pathogenic fungi and actinomycetes using molecular methods, animal models, and genome analysis. In particular, we are trying to understand (I) roles of cell surface glycans and their receptors (lectins) of human and fungi in infection, and also (II) studying influence of mycovirus on pathogenicity of filamentous fungi.
- 3) We study effects of diets and mental stresses on fungal infections mainly using animal models and molecular methods. We are trying to clarify yet unknown links between metabolism and immune-related molecules.

教 授	五ノ井 透	Professor	Tohru Gono
助 教	大荒田素子	Assistant Professor	Motoko Oarada
特 任 助 教	酒井香奈江	Research Assistant Professor	Kanae Sakai
技 術 補 佐 員	川名 直美	Research Promotion Technician	Naomi Kawana

## 1. Identification and Functional Analysis of the Nocardithiocin Gene Cluster in *Nocardia pseudobrasiliensis*

Sakai K<sup>1</sup>, Komaki H<sup>2</sup>, Gonoi T<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan

<sup>2</sup> Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japan

Nocardithiocin is a thiopeptide compound isolated from the opportunistic pathogen *Nocardia pseudobrasiliensis*. It shows a strong activity against acid-fast bacteria and is also active against rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Here, we report the identification of the nocardithiocin gene cluster in *N. pseudobrasiliensis* IFM 0761 based on conserved thiopeptide biosynthesis gene sequence and the whole genome sequence. The predicted gene cluster was confirmed by gene disruption and complementation. As expected, strains containing the disrupted gene did not produce nocardithiocin while gene complementation restored nocardithiocin production in these strains. The predicted cluster was further analyzed using RNA-seq which showed that the nocardithiocin gene cluster contains 12 genes within a 15.2-kb region. This finding will promote the improvement of nocardithiocin productivity and its derivatives production.

## 2. *Nocardia nova* identification in a transtracheal wash of a horse with recurrent airway obstruction

Condas LAZ<sup>1</sup>, Ribeiro MG<sup>1</sup>, Olivo G<sup>2</sup>, Franco MMJ<sup>1</sup>, Gonoi T<sup>3</sup>, Matsuzawa T<sup>3</sup>, Yazawa K<sup>3</sup>, Goncalves R<sup>2</sup>, Borges AS<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Univ Estadual Paulista, Sch Vet Med & Anim Sci, Dept Vet Hyg & Publ Hlth, Botucatu, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Univ Estadual Paulista, Sch Vet Med & Anim Sci, Dept Vet Clin Sci, Botucatu, SP, Brazil.

<sup>3</sup> Chiba Univ, Res Ctr, Dept Res Mycol Med, Chuo Ku, Inohana, Japan.

A horse with recurrent airway disease was presented with dyspnea, mucopurulent bilateral nasal discharge and abnormal lung sounds. Microbiological culture, cytological examination and molecular identification (16S rRNA gene sequence) were performed with the transtracheal wash material and allowed the identification of *Nocardia nova*, an uncommon agent associated with equine respiratory abnormalities.

## 3. Molecular identification and antimicrobial resistance pattern of seven clinical isolates of *Nocardia* spp. in Brazil.

Condas LAZ<sup>1</sup>, Ribeiro MG<sup>1</sup>, Muro MD<sup>2</sup>, de Vargas APC<sup>3</sup>, Matsuzawa T<sup>4</sup>, Yazawa K<sup>4</sup>, Siqueira AK<sup>1</sup>, Salerno T<sup>1</sup>, Lara GHB<sup>1</sup>, Riseti RM<sup>1</sup>, Ferreira KS<sup>5</sup>, Gonoi T<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Univ Estadual Paulista, FMVZ UNESP, Dept Vet Hyg & Publ Hlth, BR18618970 Botucatu, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Univ Fed Parana, Clin Hosp, BR80060000 Curitiba, PR, Brazil.

<sup>3</sup> Univ Fed Santa Maria, Dept Vet Prevent Med, Rio Grande Do Sul, Brazil.

<sup>4</sup> Chiba Univ, Med Mycol Res Ctr, Chiba, Japan.

<sup>5</sup> Univ Fed Sao Paulo, UNIFESP, Immunol & Parasitol Sector, Dept Biol Sci, Microbiol, Sao Paulo, SP, Brazil.

*Nocardia* is a ubiquitous microorganism related to pyogranulomatous infection, which is difficult to treat in humans and animals. The occurrence of the disease is on the rise in many countries due to an increase in immunosuppressive diseases and treatments. This report of cases from Brazil presents the genotypic characterization and the antimicrobial susceptibility pattern using the disk-diffusion method and inhibitory minimal concentration with E-test (R) strips. In summary, this report focuses on infections in young adult men, of which three cases were cutaneous, two pulmonary, one neurological and one systemic. The pulmonary, neurological and systemic cases were attributed to immunosuppressive diseases or treatments. Sequencing analysis of the 16S rRNA segments (1491 bp) identified four isolates of *Nocardia farcinica*, two isolates of *Nocardia nova* and one isolate of *Nocardia asiatica*. *N. farcinica* was

involved in two cutaneous, one systemic and other pulmonary cases; *N. nova* was involved in one neurological and one pulmonary case; and *Nocardia asiatica* in one cutaneous case. The disk-diffusion antimicrobial susceptibility test showed that the most effective antimicrobials were amikacin (100%), amoxicillin/clavulanate (100%), cephalexin (100%) and ceftiofur (100%), while isolates had presented most resistance to gentamicin (43%), sulfamethoxazole/trimethoprim (43%) and ampicillin (29%). However, on the inhibitory minimal concentration test (MIC test), only one of the four isolates of *Nocardia farcinica* was resistant to sulfamethoxazole/trimethoprim.

#### 4. Identification of genes involved in the phosphate metabolism in *Cryptococcus neoformans*

Tohe A<sup>1</sup>, Ohkusu M<sup>1</sup>, Li HM<sup>1</sup>, Shimizu K<sup>1</sup>, Takahashi-Nakaguchi A<sup>1</sup>, Gono T<sup>1</sup>, Kawamoto S<sup>1</sup>, Kanasaki Y<sup>2</sup>, Yoshikawa H<sup>2,3</sup>, Nishizawa M<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Chiba Univ, Med Mycol Res Ctr, Chiba, Chiba 260-8673, Japan.

<sup>2</sup> Tokyo Univ Agr, NODAI Genome Res Ctr, Setagaya Ku, Tokyo 156-8502, Japan.

<sup>3</sup> Tokyo Univ Agr, Dept Biosci, Setagaya Ku, Tokyo 156-8502, Japan.

<sup>4</sup> Keio Univ, Sch Med, Dept Microbiol & Immunol, Tokyo 160-8582, Japan.

*Cryptococcus neoformans* is a pathogenic basidiomycetous yeast that can cause life threatening meningoencephalitis in immunocompromised patients. To propagate in the human body, this organism has to acquire phosphate that functions in cellular signaling pathways and is also an essential component of nucleic acids and phospholipids. Thus it is reasonable to assume that *C. neoformans* (Cn) possesses a phosphate regulatory system (PHO system) analogous to that of other fungi. By BLAST searches using the amino acid sequences of the components of the PHO system of *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), we found potential counterparts to ScPHO genes in *C. neoformans*, namely, acid phosphatase (CnPHO2), the cyclin-dependent protein kinase (CDK) inhibitor

(CnPHO81), Pho85cyclin (CnPHO80), and CDK (CnPHO85). Disruption of each candidate gene, except CnPHO85, followed by phenotypic analysis, identified most of the basic components of the CnPHO system. We found that CnPHO85 was essential for the growth of *C. neoformans*, having regulatory function in the CnPHO system. Genetic screening and ChIP analysis, showed that CnPHO4 encodes a transcription factor that binds to the CnPHO genes in a Pidependent manner. By RNA-seq analysis of the wildtype and the regulatory mutants of the CnPHO system, we found *C. neoformans* genes whose expression is controlled by the regulators of the CnPHO system. Thus the CnPHO system shares many properties with the ScPHO system, but expression of those CnPHO genes that encode regulators is controlled by phosphate starvation, which is not the case in the ScPHO system (except ScPHO81). We also could identify some genes involved in the stress response of the pathogenic yeast, but CnPho4 appeared to be responsible only for phosphate starvation.

#### 5. Genome sequence comparison of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from patients with pulmonary aspergilloma and chronic necrotizing pulmonary aspergillosis.

Takahashi-Nakaguchi A<sup>1</sup>, Muraosa Y<sup>1</sup>, Hagiwara D<sup>1</sup>, Sakai K<sup>1</sup>, Toyotome T<sup>2</sup>, Watanabe A<sup>3</sup>, Kawamoto S<sup>1</sup>, Kamei K<sup>1</sup>, Gono T<sup>1</sup>, Takahashi H<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Chiba Univ, Med Mycol Res Ctr, Chuo Ku, Chiba 260-8673, Japan.

<sup>2</sup> Obihiro Univ Agr & Vet Med, Diagnost Ctr Anim Hlth & Food Safety, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan.

<sup>3</sup> Chiba Univ Hosp, Div Control & Treatment Infect Dis, Chuo Ku, Chiba 260-8673, Japan.

*Aspergillus fumigatus* is the *Aspergillus* species most commonly associated with aspergillosis. Of the various presentations of aspergillosis, one of the most frequently observed in cases involving *A. fumigatus* pulmonary infections is aspergilloma (PA). In such infections one finds a fungus ball composed of fungal hyphae, inflammatory cells, fibrin,

mucus, and tissue debris. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis (CNPA), also known as semi-invasive or invasive aspergillosis, is locally invasive and predominantly seen in patients with mild immunodeficiency or with a chronic lung disease. In the present study, with the aid of a next generation sequencer, we conducted whole genome sequence (WGS) analyses of 17 strains isolated from patients in Japan with PA and CNPA. A total of 99,088 SNPs were identified by mapping the reads to *A. fumigatus* genome reference strain Af293, and according to genome-wide phylogenetic analysis, there were no correlations between the whole-genome sequence typing results and pathologic conditions of patients. Here, we conducted the first multi-genome WGS study to focus on the *A. fumigatus* strains isolated from patients with PA and CNPA, and comprehensively characterized genetic variations of strains. WGS approach will help in better understanding of molecular mechanisms of aspergillosis cases caused by *A. fumigatus*.

#### 6. *Aspergillus arcoverdensis*, a new species of *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from caatinga soil in State of Pernambuco, Brazil

Matsuzawa T<sup>1</sup>, Takaki GMC<sup>2</sup>, Yaguchi T<sup>1</sup>, Okada K<sup>2</sup>, Abliz P<sup>3</sup>, Gono T<sup>1</sup>, Horie Y<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Chiba Univ, Med Mycol Res Ctr, Chuo Ku, Chiba 260-8673, Japan.

<sup>2</sup> Univ Catolica Pernambuco, BR50050900, Recife, PE, Brazil.

<sup>3</sup> Xinjiang Med Univ, Affiliated Hosp 1, Dept Dermatol, Urumqi 830053, Xinjiang, Peoples R China.

*Aspergillus arcoverdensis*, a new species isolated from semi-desert soil in a caatinga area, State of Pernambuco, Brazil, and a similar environment in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, China, is described and illustrated. It is characterized by relatively long conidiophores for *Aspergillus* section *Fumigati*, and subglobose to broadly ellipsoidal and smooth conidia. The delimitation of this new species is supported further by phylogenetic analyses of the betatubulin, calmodulin and actin gene sequences.

#### 7. Refeeding with glucose rather than fructose elicits greater hepatic inflammatory gene expression in mice

Oarada M<sup>1</sup>, Takahashi-Nakaguchi A<sup>1</sup>, Abe T<sup>2</sup>, Nikawa T<sup>2</sup>, Miki T<sup>3</sup>, Gono T<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Chiba Univ, Med Mycol Res Ctr, Chiba, Japan.

<sup>2</sup> Univ Tokushima, Sch Med, Dept Nutr, Tokushima 770, Japan.

<sup>3</sup> Chiba Univ, Grad Sch Med, Dept Med Physiol, Chiba, Japan.

Objective: We previously reported that refeeding after a 48h fast, used as a study model of starvation and refeeding, promotes acute liver inflammatory gene expression, which is at least partly mediated by toll-like receptor 2 (TLR2). We also previously demonstrated that dietary carbohydrates play critical roles in this process. The aim of this study was to compare the outcomes of refeeding with different carbohydrate sources.

Methods: Mice were fasted for 46 h and then refed with 1.5% (w/w) agar gel containing 19% carbohydrate (sources: alpha-cornstarch, glucose, sucrose, or fructose). The liver expression of inflammatory and other specific genes was then sequentially measured for the first 14 h after refeeding initiation.

Results: Fasting for 46 h upregulated the liver expression of endogenous ligands for TLRs (HspA5, Hsp90 aal, and Hspd1). Refeeding with agar gel containing alpha-cornstarch or glucose increased the liver expression of Tlr2, pro-inflammatory genes (Cxcl2, Cxcl10, Cxcl1, Nfkb1, Nfkb2, RelB, Sectm1 alpha, 1110), stress response genes (Atf3, Asns, Gadd45 a, Perk, Inhbe), detoxification genes (Hmox1, Gsta1, Abca8b), genes involved in tissue regeneration (Gdf15, Krt23, Myc, Tnfrsf12a, Mthfd2), and genes involved in tumor suppression (p53, Txnrd1, Btg2). This refeeding also moderately but significantly elevated the serum levels of alanine aminotransferase. These effects were attenuated in mice refed with agar gel containing sucrose or fructose.

Conclusion: Dietary glucose, rather than fructose, plays a critical role in refeeding induced acute liver inflammatory gene

expression and moderate hepatocyte destruction. Further studies are recommended regarding the role of these effects in liver inflammation and, consequently, liver dysfunction.

#### 8. Tyrokeradines G and H, new bromotyrosine alkaloids from an Okinawan Verongid sponge

Kubota T<sup>1,2</sup>, Watase S<sup>2</sup>, Sakai K<sup>3</sup>, Fromont J<sup>4</sup>, Gonoï T<sup>3</sup>, Kobayashi J<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Showa Pharmaceut Univ, Machida, Tokyo 194-8543, Japan.

<sup>2</sup> Hokkaido Univ, Grad Sch Pharmaceut Sci, Sapporo, Hokkaido 060-0812, Japan.

<sup>3</sup> Chiba Univ, Med Mycol Res Ctr, Chiba 2600856, Japan.

<sup>4</sup> Western Australian Museum, Welshpool Dc, WA 6986, Australia.

Two new bromotyrosine alkaloids, tyrokeradines G (1) and H (2), have been isolated from an Okinawan marine sponge of the order Verongida. The structures of 1 and 2 were elucidated on the basis of spectroscopic data. Tyrokeradine G (1) is the first bromotyrosine alkaloid possessing a beta-alanine unit, while tyrokeradine H (2) is a rare bromotyrosine alkaloid possessing a Nsubstituted pyridinium ring. Tyrokeradines G (1) and H (2) showed antifungal activity.

#### 9. Amphidinin G, a putative biosynthetic precursor of amphidinin A from marine dinoflagellate *Amphidinium* sp.

Kubota T<sup>1</sup>, Iwai T<sup>1</sup>, Ishiyama H<sup>1</sup>, Sakai K<sup>2</sup>, Gonoï T<sup>2</sup>, Kobayashi J<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Hokkaido Univ, Grad Sch Pharmaceut Sci, Sapporo, Hokkaido 060-0812, Japan.

<sup>2</sup> Chiba Univ, Med Mycol Res Ctr, Chiba 260-0856, Japan.

A new linear polyketide, amphidinin G (1), has been isolated from a symbiotic marine dinoflagellate *Amphidinium* sp. The planar structure of 1 was established mainly based on the 2D NMR data and the stereochemistry was elucidated by the combination of value analysis, modified Mosher's

method, and NMR chemical shift comparison with synthetic analogues. Amphidinin G (1) was expected to be a biosynthetic precursor of amphidinin A (2), a known linear dinoflagellate polyketide. Amphidinin G (1) showed antifungal activity against *Trichophyton mentagrophytes*.

#### 10. Prenylated Benzophenones from *Triadenum japonicum*

Oya A<sup>1</sup>, Tanaka N<sup>1,2</sup>, Kusama T<sup>1</sup>, Kim SY<sup>3</sup>, Hayashi S<sup>4</sup>, Kojoma M<sup>3</sup>, Hishida A<sup>4</sup>, Kawahara N<sup>4</sup>, Sakai K<sup>5</sup>, Gonoï T<sup>5</sup>, Kobayashi J<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Hokkaido Univ, Grad Sch Pharmaceut Sci, Sapporo, Hokkaido 060-0812, Japan.

<sup>2</sup> Univ Tokushima, Grad Sch Pharmaceut Sci, Tokushima 770-8505, Japan.

<sup>3</sup> Hlth Sci Univ Hokkaido, Fac Pharmaceut Sci, Tobetsu 061-0293, Japan.

<sup>4</sup> Natl Inst Biomed Innovat, Res Ctr Med Plant Resources, Hokkaido Div, Nayoro, Hokkaido 090-0065, Japan.

<sup>5</sup> Chiba Univ, Med Mycol Res Ctr, Chiba 260-8673, Japan.

Six new prenylated benzophenones, (-)-nemorosonol (1) and trijapins AE (26), were isolated from the aerial parts of *Triadenum japonicum*. (-)-Nemorosonol (1) and trijapins AC (24) have a common tricyclo[4.3.1.0 (3,7)]decane skeleton, while 1 is an enantiomer of (+)-nemorosonol previously isolated from *Clusia nemorosa*. The absolute configuration of (-)-nemorosonol (1) was assigned by ECD spectroscopy. Trijapins AC (24) are analogues of 1 possessing an additional tetrahydrofuran ring. Trijapins D (5) and E (6) are prenylated benzophenones with a 1,2-dioxane moiety and a hydroperoxy group, respectively. (-)-Nemorosonol (1) exhibited antimicrobial activity against *Escherichia coli* (MIC, 8 μg/mL), *Staphylococcus aureus* (MIC, 16 μg/mL), *Bacillus subtilis* (MIC, 16 μg/mL), *Micrococcus luteus* (MIC, 32 μg/mL), *Aspergillus niger* (IC<sub>50</sub>, 16 μg/mL), *Trichophyton mentagrophytes* (IC<sub>50</sub>, 8 μg/mL), and *Candida albicans* (IC<sub>50</sub>, 32 μg/mL), while trijapin D (5) showed antimicrobial activity against *C. albicans* (IC<sub>50</sub>, 8 μg/mL).



## 11. Halichonadins MQ, sesquiterpenes from an Okinawan marine sponge *Halichondria* sp.

Tanaka N<sup>1</sup>, Suto S<sup>1</sup>, Asai M<sup>1</sup>, Kusama T<sup>1</sup>, Takahashi-Nakaguchi A<sup>2</sup>, Gonoï T<sup>2</sup>, Fromont J<sup>3</sup>, Kobayashi J<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Hokkaido Univ, Grad Sch Pharmaceut Sci, Sapporo, Hokkaido 060-0812, Japan.

<sup>2</sup>Chiba Univ, Med Mycol Res Ctr, Chiba 260-8673, Japan.

<sup>3</sup>Western Australian Museum, Welshpool Dc, WA 6986, Australia.

Four new dimeric sesquiterpenes, halichonadins MP (14), and one new sesquiterpene, halichonadin Q (5), were isolated from an Okinawan marine sponge *Halichondria* sp. The sesquiterpenes have eudesmane skeleton in common. Halichonadin M (1) is a symmetrical dimer linked to a nitrilotriacetic acid fragment through amide bonds. Halichonadin N (2) is a structurally unique dimeric sesquiterpene connected via a pyrrolidine unit, while halichonadins O (3) and P (4) have linker moieties consisting of a piperidine unit. Halichonadin Q (5) is a sesquiterpene possessing a pyrrolidine unit. The structures of 15 were elucidated by spectroscopic analysis. Halichonadin O (3) showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, and *Trichophyton mentagrophytes*.

## 12. Debromonagelamide U, 2-debromomukanadin G, and 2-debromonagelamide P from marine sponge *Agelas* sp.

Nakamura K<sup>1</sup>, Kusama T<sup>1</sup>, Tanaka N<sup>1</sup>, Sakai K<sup>2</sup>, Gonoï T<sup>2</sup>, Fromont J<sup>3</sup>, Kobayashi J<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Hokkaido Univ, Grad Sch Pharmaceut Sci, Sapporo, Hokkaido 060-0812, Japan.

<sup>2</sup>Chiba Univ, Med Mycol Res Ctr, Chiba 260-8673, Japan.

<sup>3</sup>Western Australian Museum, Welshpool DC, WA 6986, Australia.

Two new monomeric bromopyrrole alkaloids (1 and 2) and one new dimeric bromopyrrole alkaloid (3) were isolated

from an Okinawan marine sponge *Agelas* sp. Spectroscopic analyses of these compounds revealed the structures of 13 to be 2-debromonagelamide U, 2-debromomukanadin G, and 2-debromonagelamide P, respectively. Antimicrobial activity of 13 was evaluated.

## Publications

- 1) Condas LAZ, Ribeiro MG, Muro MD, de Vargas APC, Matsuzawa T, Yazawa K, Siqueira AK, Salerno T, Lara GHB, Riseti RM, Ferreira KS, Gonoï T. Molecular identification and antimicrobial resistance pattern of seven clinical isolates of *Nocardia* spp. Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 57: 251-56. 2015.
- 2) Condas LAZ, Ribeiro MG, Olivo G, Franco MMJ, Gonoï T, Matsuzawa T, Yazawa K, Goncalves R, Borges AS. *Nocardia nova* identification in a transtracheal wash of a horse with recurrent airway obstruction. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 47: 231-5. 2015.
- 3) Kubota T, Iwai T, Ishiyama H, Sakai K, Gonoï T, Kobayashi J. Amphidinin G, a putative biosynthetic precursor of amphidinin A from marine dinoflagellate *Amphidinium* sp. *Tetrahedron Lett*. 56: 990-3. 2015.
- 4) Kubota T, Watase S, Sakai K, Fromont J, Gonoï T, Kobayashi J. Tyrokeradines G and H, new bromotyrosine alkaloids from an Okinawan Verongid sponge. *Bioorg Med Chem Lett*. 25: 5221-3. 2015.
- 5) Matsuzawa T, Takaki GMC, Yaguchi T, Okada K, Abliz P, Gonoï T, Horie Y. *Aspergillus arcovendensis*, a new species of *Aspergillus* section Fumigati isolated from caatinga soil in State of Pernambuco, Brazil. *Mycosci*. 56: 123-31. 2015.
- 6) Nakamura K, Kusama T, Tanaka N, Sakai K, Gonoï T, Fromont J, Kobayashi J. Debromonagelamide U, 2-debromomukanadin G, and 2-debromonagelamide P from marine sponge *Agelas* sp. *Heterocycles*. 90: 425-31. 2015.
- 7) Oarada M, Takahashi-Nakaguchi A, Abe T, Nikawa T, Miki T, Gonoï T. Refeeding with glucose rather than fructose elicits greater hepatic inflammatory gene expression in mice. *Nutrition*. 31: 757-65. 2015.
- 8) Oya A, Tanaka N, Kusama T, Kim SY, Hayashi S,

- Kojoma M, Hishida A, Kawahara N, Sakai K, Gonoï T, Kobayashi J. Prenylated Benzophenones from *Triadenum japonicum*. J Nat Prod. 78: 258-64. 2015.
- 9) Sakai K, Komaki H, Gonoï T. Identification and Functional Analysis of the Nocardithiocin Gene Cluster in *Nocardia pseudobrasiliensis*. PLoS ONE. DOI:10.1371/journal.pone.0143264. 2015.
- 10) Takahashi-Nakaguchi A, Muraosa Y, Hagiwara D, Sakai K, Toyotome T, Watanabe A, Kawamoto S, Kamei K, Gonoï T, Takahashi H. Genome sequence comparison of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from patients with pulmonary aspergilloma and chronic necrotizing pulmonary aspergillosis. Med Mycol J. 53: 353-60. 2015.
- 11) Tanaka N, Suto S, Asai M, Kusama T, Takahashi-Nakaguchi A, Gonoï T, Fromont J, Kobayashi J. Halichonadins MQ, sesquiterpenes from an Okinawan marine sponge *Halichondria* sp. Heterocycles. 90: 173-85. 2015.
- 12) Tohe A, Ohkusu M, Li HM, Shimizu K, Takahashi-Nakaguchi A, Gonoï T, Kawamoto S, Kanasaki Y, Yoshikawa H, Nishizawa M. Identification of genes involved in the phosphate metabolism in *Cryptococcus neoformans*. Fungal Genet Biol. 80:19-30. 2015.

# 高橋PI (微生物創生プロジェクト)

## Project for Systems Biology of Microorganisms

---

### 研究概要 (Summary)

当分野では、計算機を駆使して新たな生物学的知見の発見を目指しています。一つは、膨大な実験データを対象にデータ処理技術の開発を通じた生命の理解を目指した「バイオインフォマティクス」の研究を行っています。また、生命を真にシステムとして理解することを目的とした「システムズバイオロジー」の研究も進めています。

**Our research areas are Systems Biology and Bioinformatics. Our Bioinformatics approach aims to deeply and clearly understand massive biological experiment data, e.g., sequence data by next generation sequencers. Systems Biology aims to understand how biological systems work and help the experimental design mainly by mathematical modelling approach.**

---

准 教 授	高橋 弘喜	Associate Professor	Hiroki Takahashi
特 任 助 教	楠屋 陽子	Research Assistant Professor	Yoko Kusuya
技 術 補 佐 員	守 涼子	Research Promotion Technician	Ryoko Mori

### 1. Human EP2 prostanoid receptors exhibit more constraints to mutations than human DP prostanoid receptors.

Tanimoto J<sup>1</sup>, Fujino H<sup>1</sup>, Takahashi H<sup>2</sup>, Murayama T<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratory of Chemical Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba, Chiba 260-8675, Japan

<sup>2</sup>Medical Mycology Research Center, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba, Chiba 260-8673, Japan

Human D-type prostanoid (DP) and E-type prostanoid 2 (EP2) receptors are regarded as the most closely related receptors among prostanoid receptors. Although these receptors are generated by tandem duplication, their physiological outputs often oppose one another. In the present study, we extracted mutations occurring in the coding regions of both receptors using the 1000 genome project database and found that EP2 receptors have 8-fold fewer amino acid mutations. We speculate that EP2 receptors exhibit more constraints to mutations than DP receptors.

### 2. Visualizing translocation dynamics and nascent transcript errors in paused RNA polymerases in vivo.

Imashimizu M<sup>1</sup>, Takahashi H<sup>2</sup>, Oshima T<sup>3</sup>, McIntosh C<sup>1</sup>, Bubunenko M<sup>1</sup>, Court DL<sup>1</sup>, Kashlev M<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Frederick 21702, MD, USA

<sup>2</sup>Medical Mycology Research Center, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba, Chiba 260-8673, Japan

<sup>3</sup>Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, 8916-5, Ikoma 630-0192, Nara, Japan

### Background

Transcription elongation is frequently interrupted by pausing signals in DNA, with downstream effects on gene expression. Transcription errors also induce prolonged pausing, which can lead to a destabilized genome by interfering with DNA replication. Mechanisms of pausing associated with translocation blocks and misincorporation have been

characterized in vitro, but not in vivo.

## Results

We investigate the pausing pattern of RNA polymerase (RNAP) in *Escherichia coli* by a novel approach, combining native elongating transcript sequencing (NET-seq) with RNase footprinting of the transcripts (RNET-seq). We reveal that the G-dC base pair at the 5' end of the RNA-DNA hybrid interferes with RNAP translocation. The distance between the 5' G-dC base pair and the 3' end of RNA fluctuates over a three-nucleotide width. Thus, the G-dC base pair can induce pausing in post-translocated, pre-translocated, and backtracked states of RNAP. Additionally, a CpG sequence of the template DNA strand spanning the active site of RNAP inhibits elongation and induces G-to-A errors, which leads to backtracking of RNAP. Gre factors efficiently proofread the errors and rescue the backtracked complexes. We also find that pausing events are enriched in the 5' untranslated region and antisense transcription of mRNA genes and are reduced in rRNA genes.

## Conclusions

In *E. coli*, robust transcriptional pausing involves RNAP interaction with G-dC at the upstream end of the RNA-DNA hybrid, which interferes with translocation. CpG DNA sequences induce transcriptional pausing and G-to-A errors.

### 3. The dynamic balance of import and export of zinc in *Escherichia coli* suggests a heterogeneous population response to stress.

Takahashi H<sup>1</sup>, Oshima T<sup>2</sup>, Hobman JL<sup>3</sup>, Doherty N<sup>3</sup>, Clayton SR<sup>3</sup>, Iqbal M<sup>3</sup>, Hill PJ<sup>3</sup>, Tobe T<sup>4</sup>, Ogasawara N<sup>2</sup>, Kanaya S<sup>5</sup>, Stekel DJ<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Medical Mycology Research Center, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba, Chiba 260-8673, Japan

<sup>2</sup> Graduate School of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology, 8916-5, Takayama, Ikoma, Nara 630-0192, Japan.

<sup>3</sup> School of Biosciences, The University of Nottingham,

Sutton Bonington Campus, Sutton Bonington, Loughborough LE12 5RD, UK.

<sup>4</sup> Laboratory of Molecular Medical Microbiology, Department of Biomedical Informatics, Osaka University Graduate School of Medicine, 1-7 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

<sup>5</sup> Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology, 8916-5, Takayama, Ikoma, Nara 630-0192, Japan.

Zinc is essential for life, but toxic in excess. Thus all cells must control their internal zinc concentration. We used a systems approach, alternating rounds of experiments and models, to further elucidate the zinc control systems in *Escherichia coli*. We measured the response to zinc of the main specific zinc import and export systems in the wild-type, and a series of deletion mutant strains. We interpreted these data with a detailed mathematical model and Bayesian model fitting routines. There are three key findings: first, that alternate, non-inducible importers and exporters are important. Second, that an internal zinc reservoir is essential for maintaining the internal zinc concentration. Third, our data fitting led us to propose that the cells mount a heterogeneous response to zinc: some respond effectively, while others die or stop growing. In a further round of experiments, we demonstrated lower viable cell counts in the mutant strain tested exposed to excess zinc, consistent with this hypothesis. A stochastic model simulation demonstrated considerable fluctuations in the cellular levels of the ZntA exporter protein, reinforcing this proposal. We hypothesize that maintaining population heterogeneity could be a bet-hedging response allowing a population of cells to survive in varied and fluctuating environments.

### 4. Genome sequence comparison of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from patients with pulmonary aspergillosis and chronic necrotizing pulmonary aspergillosis.

Takahashi-Nakaguchi A<sup>1</sup>, Muraosa Y<sup>1</sup>, Hagiwara D<sup>1</sup>, Sakai K<sup>1</sup>, Toyotome T<sup>1,2</sup>, Watanabe A<sup>1,3</sup>, Kawamoto S<sup>1</sup>, Kamei K<sup>1</sup>, Gono T<sup>1</sup>, Takahashi H<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Medical Mycology Research Center, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba, Chiba 260-8673, Japan

<sup>2</sup> Diagnostic Center for Animal Health and Food Safety, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Nishi 2-11 Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

<sup>3</sup> Division of Control and Treatment of Infectious Diseases, Chiba University Hospital, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba, Chiba 260-8673, Japan

*Aspergillus fumigatus* is the *Aspergillus* species most commonly associated with aspergillosis. Of the various presentations of aspergillosis, one of the most frequently observed in cases involving *A. fumigatus* pulmonary infections is aspergilloma (PA). In such infections one finds a fungus ball composed of fungal hyphae, inflammatory cells, fibrin, mucus, and tissue debris. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis (CNPA), also known as semi-invasive or invasive aspergillosis, is locally invasive and predominantly seen in patients with mild immunodeficiency or with a chronic lung disease. In the present study, with the aid of a next-generation sequencer, we conducted whole genome sequence (WGS) analyses of 17 strains isolated from patients in Japan with PA and CNPA. A total of 99,088 SNPs were identified by mapping the reads to *A. fumigatus* genome reference strain Af293, and according to genome-wide phylogenetic analysis, there were no correlations between the whole genome sequence typing results and pathologic conditions of patients. Here, we conducted the first multi-genome WGS study to focus on the *A. fumigatus* strains isolated from patients with PA and CNPA, and comprehensively characterized genetic variations of strains. WGS approach will help in better understanding of molecular mechanisms of aspergillosis cases caused by *A. fumigatus*.

## Publications

- 1) Han R, Takahashi H, Nakamura M, Somnuk B, Yoshimoto N, Yamamoto H, Suzuki H, Shibata D, Yamazaki M, Saito K. Transcriptome Analysis of 9 Tissues to Discover Genes Involved in the Biosynthesis of Active Ingredients in *Sophora flavescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 38 (6):876-883. 2015.
- 2) Han R, Takahashi H, Nakamura M, Yoshimoto N, Suzuki H, Shibata D, Yamazaki M, Saito K. Transcriptomic landscape of *Pueraria lobata* demonstrates potential for phytochemical study. *Front. Plant Sci.* 6:426. 2015.
- 3) Imashimizu M, Takahashi H, Oshima T, McIntosh C, Bubunenko M, Court DL, Kashlev M. Visualizing translocation dynamics and nascent transcript errors in paused RNA polymerases in vivo. *Genome Biol.* 16 (1):98. 2015.
- 4) Kusuya Y, Sakai K, Takahashi H, Yaguchi T. Draft genome sequence of the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus lentulus* IFM 54703T. *Genome Announcements* 2015 in press.
- 5) Kusuya Y, Takahashi-Nakaguchi A, Takahashi H, Yaguchi T. Draft genome sequence of the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus udagawae* strain IFM 46973T. *Genome Announcements.* 3 (4). 2015.
- 6) Takahashi H, Oshima T, Doherty N, Clayton SR, Iqbal M, Hill PJ, Hobman JL, Tobe T, Ogasawara N, Kanaya S, Stekel DJ. The dynamic balance of import and export of zinc in *Escherichia coli* suggests a heterogeneous population response to stress. *J R Soc Interface.* 12 (106). 2015.
- 7) Takahashi-Nakaguchi A, Muraosa Y, Hagiwara D, Sakai K, Toyotome T, Watanabe A, Kawamoto S, Kamei K, Gono T, Takahashi H. Genome sequence comparison of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from patients with pulmonary aspergilloma and chronic necrotizing pulmonary aspergillosis. *Med Mycol.* 53 (4):353-360. 2015.
- 8) Tanimoto J, Fujino H, Takahashi H, Murayama T. Human EP2 prostanoid receptors exhibited more constraints to mutations than human DP prostanoid receptors. *FEBS Letters.* 589 (6):766-772. 2015.
- 9) Toyotome T, Takahashi H, Kamei K. MEIS3 is repressed in A549 lung epithelial cell by deoxynivalenol and the repression contributes to the deleterious effect. *The Journal of Toxicological Sciences* 2015 in press.

# バイオリソース管理室

## Management Unit of Microbiological Resources

---

### 研究概要 (Summary)

病原真菌・放線菌の「保存・管理・提供」体制を整備し、最新情報が付加された信頼できる菌株の提供を通じて、真菌症ならびにその原因菌の研究・教育の基盤を支援している。

**We are developing a system for preservation, management and distribution of pathogenic fungi and actinomycetes. We support the base of research and education of mycoses and their pathogens in order to supply reliable strains that are added new information.**

---

准 教 授	矢口 貴志	Associate Professor	Takashi Yaguchi
助 教	田中 玲子	Assistant Professor	Reiko Tanaka
技 術 職 員	伊藤 純子	Research Technician	Junko Ito
技 術 補 佐 員	長村 由美	Research Promotion Technician	Yumi Osamura
技 術 補 佐 員	山中 美花	Research Promotion Technician	Mika Yamanaka

### 1. New species in *Aspergillus* section *Fumigati* from reclamation sites in Wyoming (U.S.A.) and revision of *A. viridinutans* complex

Matsuzawa T<sup>1</sup>, Takaki GMC<sup>2</sup>, Yaguchi T<sup>1</sup>, Okada K<sup>2</sup>, Abliz P<sup>3</sup>, Gono T<sup>1</sup>, Horie Y<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Medical Mycology Research Center, Chiba University, Japan

<sup>2</sup>Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, Brazil

<sup>3</sup>Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, China

*Aspergillus arcoverdensis*, a new species isolated from semi-desert soil in a caatinga area, State of Pernambuco, Brazil, and a similar environment in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, China, is described and illustrated. It is characterized by relatively long conidiophores for *Aspergillus* section *Fumigati*, and subglobose to broadly ellipsoidal and smooth conidia. The delimitation of this new species is supported further by phylogenetic analyses of the  $\beta$ -tubulin, calmodulin and actin gene sequences.

### 2. Occurrence, detection and molecular and metabolic characterization of heat-resistant fungi in soils and plants and their risk to human health

M. Fraç<sup>1</sup>, S. Jezierska-Tys<sup>2</sup>, T. Yaguchi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Department of Plant and Soil System, Laboratory of Molecular and Environmental Microbiology, Poland

<sup>2</sup>Department of Environmental Microbiology, University of Life Sciences, Poland

<sup>3</sup>Medical Mycology Research Center, Chiba University, Japan

Heat-resistant fungi are often factors causing spoilage of heat-processed products, especially fruit. Contamination of agricultural raw materials is often as a result of their contact with the soil. Materials contaminated by spores of heat-resistant fungi can be a risk to consumers' health by toxic metabolites (mycotoxins) produced by these microorganisms. Due to the resistance of the fungus to high temperatures they are able to survive the industry pasteurization process. Therefore, the only way to prevent the development of

these microorganisms in the product is suitable selecting material by conducting tests for the presence of heat-resistant fungi. The use of traditional culture methods is long and, therefore, does not apply in the selecting raw materials for production. However, time is a critical factor in assessing the acceptance or rejection of a given batch of raw material, due to the necessity of processing the raw material fresh, which is very important especially in the case of fruit. Due to the sparse literature on rapid detection techniques for heat-resistant fungi in agricultural raw materials in recent years researchers are looking for methods, effective in the detection of these pathogens. This review includes characterization of occurrence, detection and molecular and metabolic characterization of heat-resistant fungi and their risk to human health.

### 3. Development of rapid identification and risk analysis of *Moniliella* spp. in acidic processed foods

Nakayama M<sup>1</sup>, Hosoya K<sup>1</sup>, Shimizu-Imanishi Y<sup>2</sup>, Chibana H<sup>3</sup>, Yaguchi T<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Global R&D-Safety Science, Kao Corporation, Japan

<sup>2</sup> Department of Public Health, School of Medicine, Kurume University, Japan

<sup>3</sup> Medical Mycology Research Center, Chiba University, Japan

Recently the numbers of spoilage accidents in food industry by the species of *Thermoascus* are increasing, but the risk of food spoilage have never been evaluated. It became obvious that their heat-resistances were higher than those of other heat-resist fungi, *Byssosclamyces*, *Hamigera* and *Neosartorya* by our analyses. On the other hand, *T. aurantiacus* and *B. verrucosa* had the *idh* gene, but they showed no patulin production in Potato dextrose broth or Czapek-glucose medium. Therefore, *Thermoascus* must be discriminated from other fungi in the food industry. We developed a rapid and highly-sensitive method of detecting *Thermoascus* in the genus level by using PCR. This method is expected to be extremely beneficial for the surveillance of raw materials in the food production process.

### 4. Draft genome sequence of the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus udagawae* strain IFM 46973<sup>T</sup>

Kusuya Y, Takahashi-Nakaguchi A, Takahashi H, Yaguchi T

Medical Mycology Research Center, Chiba University, Japan

The incidence of aspergillosis by *Aspergillus* infection has dramatically increased in recent years. *Aspergillus udagawae*, *A. fumigatus*-related species, is known as the emerging pathogen of aspergillosis. Here, we present the draft genome sequence of *A. udagawae* strain IFM 46973<sup>T</sup>.

#### Publications

- 1) Costa C, Ponte A, Pais P, Santos R, Cavalheiro M, Yaguchi T, Chibana H, Teixeira MC. New mechanisms of flucytosine resistance in *C. glabrata* unveiled by a chemogenomics analysis in *S. cerevisiae*. PLoS One 2015 Aug 12;10 (8):e0135110.
- 2) Eguchi H, Toibana T, Hotta F, Miyamoto T, Mitamura Y, Yaguchi T. Severe fungal sclerokeratitis caused by *Metarhizium anisopliae*: A case report and literature review. Mycoses 58 (2): 88-92, 2015.
- 3) Fraç M, Jezierska-Tys S, Yaguchi T. Occurrence, detection and molecular and metabolic characterization of heat-resistant fungi in soils and plants and their risk to human health. Advances Agronomy 132: 161-204, 2015.
- 4) Furuya M, Hong SB, Tanaka R, Kuroda N, Nagashima Y, Nagahama K, Suyama T, Yao M, Nakatani Y. Distinctive expression patterns of GPNMB and folliculin in renal tumors in patients with Birt-Hogg-Dubé syndrome. Cancer Sci 106: 315-323, 2015.
- 5) Hadano Y, Yoshii H, Hayashi M, Oono H, Tanaka R. A rare case report of central line-associated bloodstream infection caused by *Cryptococcus arboriformis*. Intern Med 54: 1141-1143, 2015.
- 6) Hosoe T, Saito T, Itabashi T, Wakana D, Takeda H, Yaguchi T, Kawai K. Isolation and structure elucidation of new phthalide and phthalane derivatives, isolated as antimicrobial agents from *Emericella* sp. IFM 57991. J Antibiot doi:10. 1038/ja. 2015.85
- 7) Iribe Y, Kuroda N, Nagashima Y, Yao M, Tanaka R,

- Gotoda H, Kawakami F, Imamura Y, Nakamura Y, Ando M, Araki A, Matsushima J, Nakatani Y, Furuya M. Immunohistochemical characterization of renal tumors in patients with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Pathol Int* 65: 126-32, 2015.
- 8) Ishiwada N, Takeshita K, Yaguchi T, Nagasawa K, Takeuchi N, Hishiki H, Watanabe A, Kamei K, Shimojo N. The first case of invasive mixed-mold infections due to *Emericella nidulans* var. *echinulata* and *Rasamsonia piperina* in a patient with chronic granulomatous disease. *Mycopathologia* doi: 10.1007/s11046-015-9963-5.
- 9) Kusuya Y, Takahashi-Nakaguchi A, Takahashi H, Yaguchi T. Draft genome sequence of the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus udagawae* strain IFM 46973<sup>T</sup>. *Genome Announc* 2015 Aug 6;3 (4). pii: e00834-15.
- 10) Kusuya Y, Sakai K, Kamei K, Takahashi H, Yaguchi T. Draft genome sequence of the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus lentulus* IFM 54703<sup>T</sup>. *Genome Announc* (in press).
- 11) Matsuzawa T, Takaki GMC, Yaguchi T, Okada K, Abliz P, Gono T, Horie Y. *Aspergillus arcoverdensis*, a new species of *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from caatinga soil in State of Pernambuco, Brazil. *Mycoscience* 56 (2): 123-131, 2015.
- 12) Nakayama M, Hosoya K, Shimizu-Imanishi Y, Chibana H, Yaguchi T. Development of rapid identification and risk analysis of *Moniliella* spp. in acidic processed foods. *Biocontrol Sci* (in press).
- 13) Okada A, Hirono T, Watanabe T, Hasegawa G, Tanaka R, Furuya M. Partial pleural covering for intractable pneumothorax in patients with Birt-Hogg-Dubé Syndrome. *Clin Respir J* doi: 10.1111/crj.12328, 2015.
- 14) Ogawa A, Matsumoto Y, Yaguchi T, Shimmura S, Tsubota K. Successful treatment of *Beauveria bassiana* fungal keratitis with topical voriconazole. *J Infect Chemother* 2015 Nov 18. pii: S1341-321X(15) 00248-2.
- 15) Tamiya H, Ochiai E, Kikuchi K, Yahiro M, Toyotome T, Watanabe A, Yaguchi T, Kamei K. Secondary metabolite profiles and antifungal drug susceptibility of *Aspergillus fumigatus* and closely related species, *A. lentulus*, *A. udagawae*, and *A. viridinutans*. *J Infect Chemother* 21 (5): 385-91, 2015.
- 16) Yanagihara S, Kobayashi H, Riei K, Hirata C, Hiruma M, Nishimura K, Yaguchi T, Yoshida Y, Yamamoto O, Tsuruta D. Chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea nubica* in Japan. *J Dermatol* 42: 1-2, 2015.



# 文部科学省 ナショナルバイオリソースプロジェクト「病原微生物」

## Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology National BioResource Project “Pathogenic Microorganisms”

文部科学省では2002年度からナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）を開始し、国が戦略的に整備することが重要なものについて体系的に収集、保存、提供などを行うための体制を整備してきた。その後5年ごとの見直しを行い、2012年度より第3期が開始された。

NBRP病原微生物中核機関である千葉大学真菌医学研究センター（病原真菌・放線菌）、大阪大学微生物病研究所および岐阜大学大学院医学研究科（病原細菌）と長崎大学熱帯医学研究所（病原性原虫）は、相互の機関の連携を図り、これらの病原微生物株の収集・保存・提供体制を整備して、高度情報を賦与した信頼できる病原微生物株として提供し、感染症と病原体の教育・研究をする人々を支援している。

本プロジェクトは、今後いかなる感染症が発生しても対応できる病原微生物コレクションを目指している。

In FY2002, the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) implemented the National BioResource Project (NBRP) to construct the framework for systematic collection, preservation, and distribution of bioresources, with a focus on those that required strategic

development by the national government. After the reviewing the NBRP every five years, in FY2012, the third phase has started.

Chiba University’s Medical Mycology Research Center (MMRC) is the “NBRP Center” for pathogenic microorganism, and this project is carried out by MMRC (pathogenic fungi/actinomycetes), Osaka University’s Research Institute for Microbial Diseases (pathogenic bacteria), Gifu University’s Graduate School of Medicine (pathogenic bacteria), and Nagasaki University’s Institute of Tropical Medicine (pathogenic protozoa). Working together, they cooperate in various efforts to support education and research pertaining to infectious diseases and pathogens. Specifically, they are developing a system for collection, preservation, and distribution of pathogenic microorganisms, and they supply reliable strains of pathogenic microorganisms that are backed by high-level information.

The project aims to establish a reliable and sufficient at the collection to deal with infectious diseases carried by any pathogenic microorganisms.

# 長崎大学熱帯医学研究拠点特定領域共同研究

「熱帯地域、特にアフリカおよびベトナムで発生している真菌症・放射菌症の原因菌の収集と形態学的、生理学的、分子生物学的解析」プロジェクト

## Cooperative Research of Priority Areas with NEKKEN, Nagasaki University

### Project for Morphological, Physiological and Molecular Biological Analysis of Pathogenic Fungi and Actinomycetes Collected in Africa and Vietnam.

長崎大学熱帯医学研究所ケニア拠点の助力を得て、ケニアを中心に上記プロジェクトを展開しています。現在までにケニア全土の主要穀物（トウモロコシ、小麦）やミルクなどを汚染するカビ毒（発がん性アフラトキシン他）とその生産菌の解析を進め、現地の食糧の多くが、世界の安全基準値を大きく上回るカビ毒で汚染されていることを明らかにしてきました。結果は昨年度、現地のマスコミにも取り上げられ、大きな反響を呼び起こしました。また現地に滞在する米国の医師団等と協力し新たに、エイズ患者の命を奪う主な原因である真菌感染症、特にクリプトコッカス属菌による感染を中心に疫学的調査を計画しています。海外での研究は、現地の研究者や監督官庁と信頼関係を築き、適切な許可を得るなど多くの問題を解決しなければ前進できません。しかし、現地の医療に貢献し、人々の生活の質（QOL）の向上を図り、さらに日本との友好を深めるために努力を重ねています。一方これらの研究は地球のグローバル化、温暖化、環境・食糧事情の悪化が進む中で、日本の人々の医療やQOLの維持にも、将来大きく貢献するはずで

特に平成27年度には、ケニアの地域に伝わり冠婚葬祭時に愛飲される地ビールが、原料となるトウモロコシ、ヒエなどに生息するカビの産生する毒によって、人体に有害なレベルまで汚染されていることを発表しました（論文参照。また地元の新聞に掲載）。さらにケニア中央研究所の研究院Olga氏を半年間に渡り日本に招き、ケニアの食糧を汚染するカビとカビ毒、皮膚真菌症、エイズ患者のクリプトコッカス症などについて共同で研究を続けています。



2012年2月 ケニア国キスム市の病院・研究施設前

Under assistance of Kenya Research Station, Inst. NEKKEN, Nagasaki Univ., we are analyzing toxins contaminating major local grains (maize, wheat) and milks, and also producer fungi. We found the local foods are contaminated by the toxins at concentrations far above the international standards. The result has been announced in newspapers, and received large attention. A new project for epidemiological study of Cryptococcal fungi in HIV-infected patients is launched in collaboration with Kenya Medical Res. Insti. (KEMRI) and doctors from UCSF, USA. In 2014 we published on the high risk mycotoxin contamination of the domestic beer, busaa, which is very popular in Kenyan local areas and served in several types of celebrations. The results were published in an academic journal and also announced in nationwide papers. In October 2014, we invited Ms. Olga, a research officer of Kenya Medical Research Institute to Medical Mycology Research Center, Chiba University, and started collaborative works on food contaminating fungi and mycotoxins, human pathogenic *Cryptococcus* in HIV patients, and dermatophytes in Kenya.

# アスペルギルス症を中心とした新興真菌症制圧プロジェクト

## The Project on Controlling Aspergillosis and the Related Emerging Mycoses

アスペルギルス症のなかでも慢性肺アスペルギルス症はその高度な難治性と不良な予後のため深刻な問題である。慢性肺アスペルギルス症は環境中で増殖した*A. fumigatus*の胞子が主にヒト下気道に取り込まれて発症するが、その病態・重症度・経過などは多彩である。本症の難治化と密接に関係している多彩な病態の原因は、宿主および菌・胞子双方にあると考えられるが、H27年度の研究で我々は、胞子・菌側の要因について、トランスクリプトーム解析、遺伝子破壊・相補実験、二次代謝産物の解析等を行い様々な角度から検討した。

*Aspergillus*属菌の胞子は、高温・UV・乾燥などの環境ストレスに対して耐性を示すが、その機構はほとんど明らかにされていない。胞子のストレス耐性能に関する新しい知見を得るために、*A. fumigatus*および類縁菌*A. niger*, *A. oryzae*を対象に比較トランスクリプトーム解析を行い、胞子で特異的に発現する遺伝子を選抜した。この中には胞子のストレス制御に関連する転写因子AtfAの下流遺伝子が多数含まれた。*atfA*遺伝子破壊株の胞子では複数の発芽特異的遺伝子の発現上昇も観察され、AtfAがストレス耐性能の制御のみならず、発芽の抑制にも機能することが示唆された。今後更なるデータを蓄積し、AtfAによるストレス制御および胞子発芽を制御機能について解析する。

胞子が作られる自然環境を想定し、異なる温度で、*A. fumigatus*の胞子を形成させた。トランスクリプトームおよび代謝産物の解析により、2種の二次代謝産物、病原因子メラニン (dihydroxynaphthalene-melain) とカビ毒 trypacidin の発現・産生が37°Cに較べ25°Cで大きく上昇していることが明らかになった。さらに、これらクラスターの遺伝子発現を制御する因子について実験により検討し、本菌の病原性発現機構との関連を報告した。

また、近年、慢性肺アスペルギルス症の難治化の要因として大きな問題となっている*A. fumigatus*のアゾール耐性化について検討を重ねた。同一患者において voriconazole 治療中に患者体内の*A. fumigatus*が頻繁に遺伝子変異を繰り返しつつ次第に耐性を獲得する現象を明らかにしてきたが、センターに保存されている*A.*

*fumigatus*の臨床分離株18株のアゾール耐性株について新たに耐性機構を検討し、Cyp51Aをコードする遺伝子の point mutations を確認するとともに、新しいタイプの変異株 (TR46/Y121F/T289A) をわが国で始めて検出し本邦での拡大について警鐘を鳴らした (Hagiwara, et al. J. Infect Chemother, in press). 現在 *cyp51A* 変異以外の耐性機構についてゲノム解析により検討中である。さらに、*A. fumigatus* に次ぐ重要な原因菌である *A. niger* の詳細な菌種および薬剤感受性、*cyp51A* 遺伝子配列を臨床分離株・環境分離株の双方を用いて疫学的に調査した。その結果、これまで cryptic species とされて重視されて来なかった *A. welwitschae* が実際には原因菌として最多である事に加えて、これらの菌種におけるアゾール耐性の頻度を明らかにするとともに、遺伝子解析によりその耐性機構が *A. fumigatus* と大きく異なっている事を示唆した。

Aspergillosis mainly develops by inhalation of spores of *Aspergillus fumigatus* grown in several different environments, and the pathogenic conditions, severities, and courses of disease differ significantly among patients. The variety of pathogenic conditions may arise from states of hosts and fungus/spores. Finding a solution to this intractable disease is the aim of this project. In 2015, we performed transcriptomic, gene-targeting, and secondary metabolite analyses to study factors of spore/fungal side in the disease.

Spores of *A. fumigatus* are resistant to environmental stresses such as high temperatures, UV and drying, of which mechanisms are mostly unknown. We performed comparative transcriptomic analysis of *A. fumigatus*, *A. niger*, and *A. oryzae* for obtaining a new knowledge on stress tolerance mechanisms, and found several genes specifically expressed in spores. Many of these genes were downstream genes of AtfA, a stress-related transcriptional factor. We knockout *atfA* gene and found upregulation of several germination specific genes in the knockout strains, suggesting AtfA suppresses germination as well as endowing stress resistance. We are revealing the regulatory mechanisms of AtfA by further

analysis.

Mimicking a natural environment, *A. fumigatus* spores were formed at different temperatures. Transcriptomic and metabolites analyses revealed gene-expression and production of two secondary metabolites, dihydroxynaphthalene-melain and tryptacidin, were significantly enhanced at 25°C compared to 37°C and 45°C. We experimentally analyzed other genes (*aflR/aflS*, *tpcE/tpcD*) controlling production of these secondary metabolites, and reported relationship between the metabolite production, temperature and pathogenicity.

We made a further investigation into the development of azole resistance in *A. fumigatus*, which is an emerging serious problem in the treatment of intractable chronic pulmonary aspergillosis (CPA). We examined 18 clinical isolates of *A. fumigatus* stored in our Center and found

mutations coding Cyp51A. An isolate which has a new type of mutation (TR46/Y121F/T289A) was found for the first time in Japan, and we issued an alert against the spread of this new resistance in the country (Hagiwara, et al. J. Infect Chemother, in press). We are now making an investigation into the new resistance mechanism other than mutations in *Cyp* genes. To understand the mechanism of this intractable disease, we started an analysis of *A. niger*, another important pathogen of CPA, for the epidemiology, drug resistance and its mechanism using both clinical and environmental isolates. *A. welwitschae*, a cryptic species of *A. niger*, which has been given little consideration as a pathogen, was found to be most common among *A. niger* complex as the causative agents of CPA. We also examined their drug resistance along with the analysis of mutations in *CYP51A* and suggested their resistance mechanism different from that of *A. fumigatus*.

# 平成 26 年度 共同利用・共同研究報告

## 2014 Fiscal Year Cooperative Research Program Report

研究課題 '14-1

### *Aspergillus fumigatus* のアゾール系薬剤耐性 に 関与する転写因子 AtrR と SrbA の協調的発 現制御機構の解明

五味勝也

(東北大学大学院農学研究科)

川本 進・清水公徳・萩原大祐

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Concerted regulatory mechanism for gene expression involved in azole drug resistance by transcription factors, AtrR and SrbA, in *Aspergillus fumigatus*

Katsuya Gomi

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku  
University)

Susumu Kawamoto, Kiminori Shimizu, Daisuke  
Hagiwara

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

### 研究成果

麹菌 *Aspergillus oryzae* において見出されたアゾール系薬剤耐性に関する新規 Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型転写因子 AtrR は、*Aspergillus nidulans* や *Aspergillus fumigatus* にも共通のオーソログとして見出され、それぞれの *atrR* 遺伝子の破壊株では、野生株より 100 倍も低い薬剤濃度でも感受性を示すことを見出した。興味深いことに、*A. fumigatus* の RNA-seq 解析により、AtrR は Cdr1B/AbcC トランスポーターだけでなく、Cyp51A を含むエルゴステロール生合成酵素遺伝子の発現にも関わっていることが示され、エルゴステロール生合成酵素の発現は、すでに報告のある bHLH 型転写因子 SrbA と協調的に制御されている可能性が示唆された。そこで、本研究ではエルゴステロール合成経路ならびに薬剤排出トランスポーターの遺伝子の

発現に AtrR と SrbA がどのように関与しているかを明らかにすることを目的とした。

*A. oryzae* において AtrR-GFP 融合タンパクの観察から、AtrR は薬剤の有無や低酸素などの条件にかかわらず常に核内に局在することが示された。一方、GFP-SrbA 融合タンパク質を用いた解析により、SrbA は薬剤添加や低酸素条件下で核膜または小胞体から核内へ移行することが認められ、2 種類の転写因子の活性化機構は異なることが示唆された。*atrR* 破壊株と *srbA* 破壊株を用いて互いの転写因子の細胞内局在を調べたが、いずれの破壊株も野生株と細胞内局在に違いは認められなかった。同様に、転写因子の発現も一方の遺伝子破壊によって影響は受けなかった。エルゴステロール生合成に関わる遺伝子はどちらか一方の遺伝子破壊によって著しい発現低下が認められたものの、*srbA* 破壊では ABC トランスポーター遺伝子の発現に影響は見られなかった。

一方、*A. fumigatus* でも同様に作製した *atrR* 破壊株と *srbA* 破壊株は低酸素条件下では生育が著しく悪くなり、ともにエルゴステロール生合成経路の遺伝子の発現量が低下したが、ABC トランスポーター遺伝子 (*cdr1B*) の発現は *atrR* 破壊株のみで顕著な低下が観察された。また、マウスを用いた感染性試験により、いずれの破壊株も病原性の著しい低下が認められた。さらに、千葉大学病院から単離された *A. fumigatus* のアゾール耐性株 (IFM 61567) において *atrR* 破壊を行ったところ、イトラコナゾールなどのアゾール薬だけでなくもともと効果が認められないフルコナゾールに対しても高い感受性を示すことが明らかになった。異なるタイプの耐性変異を有する耐性株における *atrR* 破壊株の取得を目指すとともに、AtrR と SrbA のシスエレメントの同定ならびに共免疫沈降試験による両転写因子の相互作用の有無を解析している。

## 研究課題 '14-2

### 新興強毒性真菌 *Cryptococcus gattii* の高病原性機序の免疫学的解析

川上和義・石井恵子

(東北大学大学院医学系研究科)

川本 進・清水公徳

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Immunological analysis of a mechanism for high pathogenicity of *Cryptococcus gattii*

Kazuyoshi Kawakami, Keiko Ishii

(Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai)

Susumu Kawamoto, Kiminori Shimizu

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

#### 研究成果

1999年にカナダのバンクーバー島で *Cryptococcus gattii* によるクリプトコックス症のアウトブレイクが発生し、その後アメリカ合衆国の北西沿岸地域を中心に拡大しつつある (CDC-Morbidity and Mortality Weekly Report Vol.59, No.28, 2010). 2007年には、わが国でも国内感染と考えられる *C. gattii* によるクリプトコックス症例が報告されている (Emerg. Infect. Dis. 16: 1155-1157, 2010). 通常の *C. neoformans* によるクリプトコックス症と異なり、健常者でも中枢神経感染症を発症し、その高い致死率から高病原性クリプトコックス症とも呼ばれており、今後新興感染症として大きな問題に発展することが懸念される。本研究では、*C. gattii* と *C. neoformans* に対する免疫応答性を比較することで、本感染症の病態解明の手掛かりを探ることを目的とする。

*C. neoformans*, *C. gattii* に遺伝子銃を用いて OVA 発現ベクターを導入し、それぞれ 9 株、8 株を得た。C57BL/6 マウスの気管内に OVA 遺伝子導入菌株を感染させ、2 週後の所属リンパ節細胞を同抗原で再刺激し IFN- $\gamma$  産生を検出することで菌体内における OVA の発現を確認した。MHC クラス II 拘束性に OVA を認識する T 細胞受容体を発現するトランスジェニックマウス (OT-II) の気管内に OVA 発現 *C. neoformans* を感染させたところ、

2 週後の肺内での IFN- $\gamma$  産生が非トランスジェニックマウスに比べ有意な増強を示した。これらの結果から、*C. neoformans* と *C. gattii* に共通な OVA 抗原に対するヘルパー T 細胞応答と、それぞれの真菌感染下での影響について詳細に解析することが可能となった。今後は、本実験系を用いることで、*C. neoformans*, *C. gattii* 感染下における免疫応答の相違点について解析を進め、*C. gattii* 感染症の高病原性機序の解明を目指したい。

## 研究課題 '14-3

### *Cryptococcus neoformans* の特異なゲノム安定化機構の分子基盤 —それを標的とした新規治療戦略を目指して— その2

松浦 彰・今成百利子

(千葉大学大学院融合科学研究科)

川本 進・東江昭夫・高橋弘喜

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Molecular basis for specific regulation of genome integrity in *Cryptococcus neoformans* and its application to the development of novel therapeutic strategies

Akira Matsuura, Yuriko Imanari

(Graduate School of Advanced Integration Science, Chiba University)

Susumu Kawamoto, Akio Toh-e, Hiroki Takahashi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

#### 研究成果

*Cryptococcus neoformans* は環境に常在する担子菌酵母であり、主に免疫機能の低下した人に感染し重篤なクリプトコックス症を引き起こす日和見感染真菌として知られている。本菌は、環状プラスミドが維持できない、遺伝子ターゲティングの効率が悪く、導入された直鎖状 DNA 断片の末端に高頻度でテロメア反復配列が付加される、など DNA 修復に関連するユニークな性質をもつことが明らかにされている (Edman, 1992)。本研究では、染色体末端の維持機構という観点から *C. neoformans* 特有

のゲノム維持機構を明らかにし、さらにこのような特有のゲノム維持機構が *C. neoformans* の生活環とどのように関連し、あるいはどのように制御されているかを明らかにすることを目的とした。

昨年度の共同利用・共同研究において、*C. neoformans* 一倍体細胞でテロメアDNA伸長酵素テロメラゼの相同遺伝子 *CnEST2* の遺伝子破壊を行い、*CnEST2* 遺伝子の細胞増殖における機能を解析した結果、本菌においても他生物種と同様、染色体末端の維持にはテロメラゼの活性が必須であることが明らかにしている。本年度はさらに、*S. cerevisiae* においてテロメラゼ欠損時に染色体末端維持に関与することが明らかになっている相同組換え、非相同末端結合に関する遺伝子に注目し、それらが *C. neoformans* における特異なDNA修復経路選択にどのように関わっているかに焦点を当て解析を進めた。まず、ゲノム中に *RAD52*, *RAD51*, *MRE11*, *DMC1* の相同遺伝子を見だし、それらの遺伝子破壊株を作製してその表現型を解析した結果、本菌では *RAD52* のDNA修復における重要性は低く、一方で *RAD51* 欠損はより severe な表現型となることが明らかになった。この傾向は、相同組換えが優先的におきる *S. cerevisiae* とは異なり、むしろ高等動物における相同遺伝子破壊の表現型と類似しており、興味深い。今後は、テロメラゼ活性の制御に必要な分子の探索をさらに進めつつ、テロメラゼ、組換え関連因子を含めたDNA末端修復機構の選択制の違いが生じる機構を分子の側から解析することで、この生物種の特異なDNA損傷修復のメカニズムと生理的意義を明らかにしたいと考えている。

## 研究課題 '14-4

### 病原真菌における一酸化窒素の合成機構と生理機能の解析

高木博史

(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

川本 進・知花博治・東江昭夫・萩原大祐

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Analysis of synthetic mechanism and physiological role of nitric oxide in pathogenic fungus

Hiroshi Takagi

(Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology)

Susumu Kawamoto, Hiroji Chibana, Akio Toh-e, Daisuke Hagiwara

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

#### 研究成果

一酸化窒素 (NO) はシグナル分子として、哺乳類の幅広い生命現象に関与している。最近、高木らは酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、NOがアセチルトランスフェラーゼ Mpr1 およびフラボタンパク質 Tah18 依存的にアルギニンから合成され、酸化ストレス耐性に寄与することを見出した。一方、病原真菌はヒトに感染する際、自然環境と生体内の劇的な環境変化 (温度、酸素濃度、栄養など) によるストレスに曝される。真菌はこれらのストレスに応答し、耐性を獲得することで、増殖や病原性を示すことから、NOが真菌のストレス耐性や病原性の発揮に関与する可能性が考えられる。本研究では、*S. cerevisiae* と同様のNO合成経路の存在が示唆される病原真菌 (*Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*) について、NO合成と増殖、ストレス耐性などとの関連性を解析する。平成26年度には、以下の研究成果が得られた。

- 1) *C. glabrata*: Tah18のオルソログ遺伝子 (*CgTAH18*) の発現抑制株をマウスのマクロファージに貪食させたところ、野生型株に比べてマクロファージ内での増殖率が高かったことから、*CgTAH18*が病原性に関与している可能性が示唆された。
- 2) *C. neoformans*: Tah18のオルソログ遺伝子 (*CnTAH18*) が生育に必須であることが判明したため、銅イオンで発現を誘導する系を構築し、銅キレーター添加によって生育が悪化することを確認した。また、NO特異的蛍光プローブを用いて、アルギニンの添加により細胞内にNOが生成していることが観察できた。
- 3) *A. fumigatus*: Mpr1のオルソログ遺伝子 (*AfMPR1*) の破壊株と高発現株を作製し、表現型を解析したところ、Mpr1と同様に *AfMPR1* がアセチルトランス

フェラーゼをコードしていることが示唆された。しかしながら、これらの株は高温ストレスや酸化ストレスに対して、野生型株と変わらない表現型を示した。また、NO特異的蛍光プローブを用いて、過酸化水素の添加により細胞内にNOが生成していることが観察できた。

今後、Mpr1, Tah18のオルソログ遺伝子の破壊株、発現抑制株、高発現株を用いて、細胞内NOレベルを定量するとともに、ストレス耐性などの表現型を観察することで、病原真菌においてMpr1やTah18がNOの合成と生理機能に関与するかどうか検討する。

## 研究課題 14-5

### 病原性真菌を弱毒化するマイコウイルスの探索と抗菌性素材開発に向けた検討

森山裕充

(東京農工大学大学院農学研究院)

川本 進・五ノ井透・東江昭夫

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Development of antifungal proteins derived from mycoviruses which attenuate host fungus

Hiromitsu Moriyama

(Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)

Susumu Kawamoto, Tohru Gono, Akio Toh-e

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

### 研究成果

これまでの研究において、我々はイネいもち病菌に感染して生育阻害をもたらすマイコウイルス *Magnaporthe oryzae* chrysovirus, MoCV1-A由来のタンパク質のうち、ORF4が抗菌活性を有することをパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子発現系の利用により明らかにしてきた。また、MoCV1-A ORF4完全長 (820残基) が、ヒト病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* に対しても、異常な液胞化や生育速度の減少、そして莢膜多糖形成の抑制が生育阻害効果を有することが確認されてきた (原著論文1)。

そこで本研究においては、*C. neoformans* に導入する

タンパク質サイズを短縮化することを目的として、まず、パン酵母遺伝子発現系を利用することにより、MoCV1-A ORF4の抗菌活性領域を短縮化する研究を行った。その結果、ORF4中心領域の250アミノ酸が、完全長ORFと同等の抗菌をパン酵母に対して示すことが明らかにされた。次に同定された短縮化されたタンパク質に相当する遺伝子配列を、川本進教授の研究室で開発された *C. neoformans* 発現ベクターに連結させる作業を行い、ベクターを完成させることが出来た。今後は、*C. neoformans* にこれらベクターを導入して、完全長ORF4と同等な抗菌活性を有することを検討していく。

アスペルギルス症の原因となり、重篤化をもたらす病原真菌 *Aspergillus fumigatus* に対する新たな薬剤開発を目的として、五ノ井教授の研究グループは、*A. fumigatus* を弱毒化する新規なマイコウイルスの探索とその応用研究を、高橋梓博士を中心として行っているが、本研究課題においては、マイコウイルス探索や同定に関して共同研究を行っている。これまでの探索研究の結果、4種のマイコウイルス由来の2本鎖RNAゲノムが同定されており、このうち、2種に関しては、宿主菌に生育阻害をもたらすことなどが確認できており、マイコウイルスである *Partitiviridae* 属と *Chrysoviridae* 属に分類されるが、既報のウイルスとは類似性は示すが同一ではなく、新種であることが確認されている。今後、宿主菌に対する作用機作などについての検討や、短縮化したMoCV1-A ORF4の効能などについても、共同研究を継続させることで実施していくことが望まれる。

### 発表論文

- 1) Urayama S, Fukuhara T, Moriyama H, Toh-E A, Kawamoto S. Heterologous expression of a gene of *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 strain A disrupts growth of the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol Immunol.* 58(5): 294-302 (2014)



## 研究課題 '14-6

### *Cryptococcus neoformans* の低酸素応答転写因子 Crz1/Sp1 のシグナリング解析

川本 進・清水公德・大楠美佐子・萩原大祐  
(千葉大学真菌医学研究センター)

Raclavsky, Vladislav  
(チェコ・パラツキー大学)

Sipiczki, Matthias  
(ハンガリー・デブレツェン大学)

関水 和久・松本 靖彦  
(東京大学大学院薬学系研究科)

田村 裕  
(千葉大学大学院医学研究院)

三浦 恵  
(横浜市立大学大学院医学研究科)

### Signaling analysis of transcription factor Crz1/Sp1 for hypoxia adaptation in *Cryptococcus neoformans*

Susumu Kawamoto, Kiminori Shimizu, Misako Ohkusu, Daisuke Hagiwara  
(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Vladislav Raclavsky  
(Palacky University, Czech)

Matthias Sipiczki  
(University of Debrecen, Hungary)

Kazuhiisa Sekimizu, Yasuhiko Matsumoto  
(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo)

Yutaka Tamura  
(Graduate School of Medicine, Chiba University)

Satoshi Miura  
(Graduate School of Medicine, Yokohama City University)

### 研究成果

病原酵母 *Cryptococcus neoformans* は、我が国に常在する真菌のうちで最も病原性が強く、易感染患者、特に、エイズ患者の直接死因としても臨床的に極めて重要な真菌である。本菌は生育に酸素が必須な偏性好気性酵母であるが、自然環境からヒトに感染時、肺に感染して血流に

乗り血液脳関門を通過後、脳内に至って髄膜炎等を起こすと考えられており、高酸素環境（自然環境、肺）から低酸素環境（血流、脳内）への劇的な酸素濃度変化などに打ち勝って初めて増殖し病原性を示す。本菌の「低酸素状態に対する環境応答」は本菌の病原性発揮にも深く関連する病原因子のひとつと考えられ、我々は本菌の低酸素応答遺伝子として「転写因子 Crz-1/Sp-1」を得て低酸素応答機構の分子解析を進めているが、更に、本菌の新たな別の低酸素応答遺伝子を以下のようにして得た。まず、*Agrobacterium* 法による形質転換を用いて、ゲノムランダム挿入ミュータントライブラリーを作製し、その中から低酸素環境非適応株を選抜した。次に、選抜された菌株の T-DNA 挿入部位をシーケンス解析によって特定することができ、相同組換えによりその遺伝子破壊株を作製した。そして、その遺伝子破壊株の低酸素条件下における性質を解析するために、生存率測定や RT-PCR や薬剤感受性試験を行った。生存率測定から、遺伝子破壊株が野生株よりも低酸素条件下の生存率が低いことが確認できた。また、RT-PCR によって、野生株は低酸素条件下で真菌細胞膜合成に関わる遺伝子の発現量の増加が認められたが、遺伝子破壊株においてはその遺伝子発現の増加はあまり認められなかった。新たに得た低酸素応答遺伝子と、すでに本菌の低酸素応答遺伝子として解析を進めている「転写因子 Crz-1/Sp-1」との関連を更に調べつつあり、*C. neoformans* の低酸素ストレスに対する環境応答シグナリング機構の解明を目指している。

上記のように、我々は *C. neoformans* の細胞周期制御機構の研究の中で、特異な低酸素応答現象を見出し、解析を進めて来たが、従来すでに詳細な研究が進められ、多くの知見が蓄積されて来ているモデル酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞周期制御機構についても、バイオインフォマテイクス解析などを用いて更なる解析、考察を行ったところ、*S. cerevisiae* の細胞周期制御において、最も重要な役割を果たしていると言われる制御因子「サイクリン-1 分子 (Cln1)」と「サイクリン-2 分子 (Cln2)」の分子構造機能的な差異が、ユビキチン-プロテアソーム経路によるという、新たな重要な知見を得て、その分子機構のモデルも提出して、論文として発表した。

### 発表論文

- 1) Suganami A, Takase N, Sugiyama H, Virtudazo EV, Kawamoto S, Tamura Y: Structure based functional

distinction between Cln1 and Cln2 depends on the ubiquitin-proteasome pathway.

*J. Proteomics Bioinformatics* 7: 102-107 (2014)

## 研究課題 '14-7

### 病原真菌の mild heat stress 応答分子の機能評価と診断・治療への分子基盤

長 環・永尾潤一・田中芳彦

(福岡歯科大学)

知花博治

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Functional evaluation and application of mild heat stress responded molecules in pathogenic fungi.

Tamaki Cho, Junichi Nagao, Yoshihiko Tanaka

(Fukuoka Dental College)

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

## 研究成果

ヒトの発熱や外部加温による mild heat stress (39°C ~ 41°C) は、ヒト常在病原性真菌 *Candida albicans* のバイオフィルムに対する薬剤感受性を亢進した (Cho T et al: BPB, 2012). 平成25年度センター共同利用研究にて、37°Cおよび39°Cにおける *C. albicans* のバイオフィルム形成時の遺伝子発現を網羅的に探索した。平成26年度はさらに解析を進め、37°Cと比較して39°Cで発現が増加する遺伝子として *HYR* (菌糸形細胞壁タンパク質をコードする)、逆に39°Cで発現が減少する遺伝子として *YWP* (酵母形細胞壁タンパク質をコードする) や *TEP1* (酵母形細胞壁関連タンパク質をコードする) など細胞壁に関連する遺伝子群に変化が見られることを明らかにした。

以上の結果は温度による菌体の表層構造の変化を示唆するものであり、抗原性に変化が見られる可能性も考えられる。そこで各温度で増殖した *C. albicans* のバイオフィルムを抗原として、マウス骨髄細胞由来樹状細胞とナイーブT細胞の培養系で抗原応答を検討した。IL-17を産生するヘルパーT細胞の誘導能を細胞内サイトカイ

ン染色後にフローサイトメトリーにより評価した。解析の結果 (n = 3), 平均値が37°Cの抗原に対して39°Cの抗原で1.6倍のIL-17産生能を示した (p < 0.1). 2°Cの温度変化によるT細胞の分化誘導は弱いながら認められたので、39°Cで何らかの抗原変化があると考えられる。

温和な加温に対する菌体の薬剤感受性の変化および宿主細胞の応答の変化は、薬剤投与方法などへの応用も考えられる。

## 研究課題 '14-8

### *Candida glabrata* の糖鎖合成に関与する遺伝子欠損株の性質の解析

柴田信之・工藤 敦・伊藤文恵・田中 大

(東北薬科大学薬学部)

知花博治

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Analysis of the cell wall integrity of *Candida glabrata* glycosyltransferase deletion mutants

Nobuyuki Shibata, Atsushi Kudoh, Fumie Itoh, Yutaka Tanaka

(Tohoku Pharmaceutical University)

Hiroji Chibana,

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

## 研究成果

*Candida glabrata* の細胞壁糖鎖生成に関与する各種の遺伝子欠損株について細胞壁の構造および性質の解析を行い、特に大きく変化の見られた *alg6* Δ 株と *mnn2* Δ 株について細胞壁に与える影響を詳細に解析した。細胞壁グルカンはアルカリ可溶性画分、酸可溶性画分、アルカリ・酸不溶性画分に画分し解析した。キチンの定量はエルソン・モルガン法により行った。グルカン結合性キレートキシンに対する感受性は増殖阻止円の測定により行った。マンナン構造解析はアセトリシス、<sup>1</sup>H NMR 分析、メチル化分析により行った。細胞壁グルカン層およびマンナン層の形態変化は透過型電子顕微鏡により解析した。

*alg6* Δ 株は SDS, Calcofluor white 等の薬剤感受性、β-1,3-

グルカナーゼ感受性が上昇し、TEMでもマンナン層が薄く不鮮明になっていた。しかし、micafunginおよびキラーチンに対する感受性は逆に低下し、キチン含量は野生株の2倍以上に増加していた。*alg6*Δ株はマンナンの構造に変化が見られなかったが分子サイズは低下していた。*mnn2*Δ株はマンナンの側鎖が失われα-1,6-結合の直鎖構造に変化していた。しかし、薬剤感受性等に著しい変化は見られなかった。カイコを用いた感染実験の結果、*alg6*Δ株は野生株と比較して大きく病原性の低下していることが明らかとなった。これらの結果は特に*alg6*Δ株では細胞壁合成系の酵素活性の低下が生じ、細胞壁 integrity の低下から病原性の低下につながっていることを示唆している。細胞壁構造の変化が免疫系細胞による認識に影響を与えている可能性も検討している。

#### 研究協力者

川上和義

(東北大学大学院医学系研究科)

高橋 梓, 山口正視

(千葉大学真菌医学研究センター)

#### 研究課題 '14-9

#### *Candida glabrata* バイオフィーム形成に関する遺伝子群の機能解析

梶原 将・Xinyue Chen

(東京工業大学大学院生命理工学研究科)

知花博治

(千葉大学真菌医学研究センター)

#### Function analysis of genes related with the biofilm formation in *Candida glabrata*

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Susumu Kajiwara, Xinyue Chen

(Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology)

#### 研究成果

病原真菌 *Candida glabrata* は種々のカンジダ症(真菌症)の主要起因菌の一種で、この真菌種が医療デバイス等の表面にバイオフィームを形成すると、高い抗真菌剤耐性を有することが知られている。そこで、我々は未だあまり研究が進んでいない *C. glabrata* のバイオフィーム形成機構に注目し、この真菌の細胞壁結合タンパク質を網羅的に解析することで、その分子機構を明らかにし、当該真菌症の治療や対策の礎となりうる情報を提供することとした。

*C. glabrata* のバイオフィーム形成に関係すると考えられる分泌シグナルペプチド領域と膜貫通領域を有すると考えられる102のタンパク質をコードする遺伝子を選定し、それら遺伝子の破壊株を用いてプラスチックプレート上でのバイオフィーム形成を観察し、それらを野生株のものと比較解析した。

その結果、102の遺伝子の中の5つの遺伝子の破壊株において、*C. glabrata* のバイオフィーム形成量が明らかに減少したことが分かった。それら遺伝子は、脂質トランスポーター *Arv1p*、MFS トランスポーター *Qdr2p*、2つのERからゴルジ体へのタンパク質輸送に関わるタンパク質 *Syc2p* と *Syn8p*、細胞ストレスに関係するタンパク質 *Frt2p* をコードしていると推測された。その中で、*SYC2* と *SYN8* 遺伝子についてさらに詳細に解析したところ、これらの遺伝子破壊株が医療デバイス材料として用いられているシリコン表層でもバイオフィーム形成が野生株よりも減少し、それらバイオフィームをSEMで観察したところ、バイオフィーム形成の初期過程での細胞接着性が特に減少していることが分かった。加えて、これらの株は、ハイグロマイシンB、コンゴレッド、SDSに対する感受性が増加することも分かった。一方、*QDR2* を破壊した株でも、シリコン表層上でのバイオフィーム形成では、野生株と比べ明確な差が認められた。

今後、さらに詳細な解析を進めることで、これらのタンパク質がどのようにしてバイオフィーム形成に関わっているのかのメカニズムを明らかにする予定である。

## 研究課題 '14-10

### 線虫を用いた *in vivo* 抗真菌活性物質スクリーニングと作用点の研究

水野貴之・文谷政憲

(徳島文理大学大学院工学研究科ナノ物質工学専攻)

知花博治

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Constriction of the drug screening system of *Candida glabrata* pathogenicity vsing *Caenorhabditis elegans* as a host

Takayuki Mizuno, Masanori Bun-ya

(Tokushima Bunri University)

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

#### 研究成果

我々は、線虫とカンジダ・グラブラータを用いた新しいアッセイ系を確立させ、殺菌効果をもつ化合物のスクリーニングを目指している。

カンジダ・グラブラータを餌として一時間、線虫に摂取させ、その後大腸菌を餌とし、20℃で飼育するとカンジダ・グラブラータは腸内に定着し、25℃で培養すると腸内でのカンジダ・グラブラータが増加し致死率が上昇することを我々はこれまでに報告した。本研究において、抗真菌薬フルコナゾールを線虫に投与した場合、腸内のカンジダ・グラブラータは減少し致死率も未感染のレベルまで回復することが分かった。これに対して *sek-1* (自然免疫系の遺伝子) に欠損を持つ線虫と同様の実験を行ったところ、25℃の培養で致死率が著しく増加するが、フルコナゾールの投与した場合、*sek-1*欠損系統においても、生残率が改善した。野生型と *sek-1*欠損を持つ系統をすりつぶして生菌数を調べたところ、野生型では、フルコナゾールの添加によって腸内のカンジダ・グラブラータが死滅しており、*sek-1*欠損系統では、菌数は少ないものの生菌が一定レベルで存在していることが分かった。これらの結果から、線虫体内においてフルコナゾールがカンジダ・グラブラータに対して静菌的に作用し、自然免疫系によって殺菌されていることが示唆

された。また、限られた量の化合物を使用するにあたり、より高感度な実験系の開発を試みた。腸内に定着したカンジダ・グラブラータは、CTC染色によりライブイメージが観察可能であり、線虫内の生菌数を推定することができる。本実験系は96穴プレートでの解析が可能となった。現在、東大の創薬オープンイノベーションセンターより分与された化合物ライブラリーを用いて、スクリーニングを進めている。

## 研究課題 '14-11

### ショウジョウバエを使った真菌の感染実験系の開発

倉石貴透・倉田祥一朗

(東北大学大学院薬学研究科)

知花博治

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Development of a fugal infection system using *Drosophila*

Takayuki Kuraishi, Shoichiro Kurata

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University)

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

#### 研究成果

日和見感染症に代表される感染症を引き起こす病原真菌の病原性発現機構は、依然として不明であり、大きな脅威となっている。真菌医学研究センター知花准教授は、*Candida glabrata*を用いて、ゲノムワイドに5150遺伝子を組換えた変異体ライブラリーを作成している。このリソースを用いると、病原性の発現に関わる遺伝子を網羅的に探索できる。しかしながら、マウスなどの哺乳動物を宿主として用いて、網羅的に解析することは、現実的に不可能である。一方、自然免疫研究によく利用されているショウジョウバエは、遺伝子操作が容易であるばかりか、生活環が短く網羅的に解析に優れている。また、すでに確立されている自然免疫変異体を用いることで、病原性がどのように発現しているのかを分子レベルで解

析できる。

本研究では、まず *C. glabrata* をショウジョウバエに感染させる感染実験系を確立した。そのために、研究目的、すなわち、真菌リソースを利用した網羅的解析を達成させるために、通常の感染実験で用いるマイクロインジェクション法ではなく、タングステンニードルを用いた体表傷害法を検討し、数千レベルでの感染実験が可能となった。一方、真菌医学研究センターでは、体表傷害法に適した真菌の培養法と、東北大学に輸送可能な方法を確立した。次に、免疫系に関与することが知られている遺伝子の欠損ショウジョウバエに野生型の *C. glabrata* を感染させ、その後の生存率を測定することで、易感染宿主のモデルとしてスクリーニングに適したショウジョウバエシステムを探索した。その結果、真菌感染抵抗性を制御している Toll 受容体の上流の因子である *psb* と *modSP* を欠損させた変異体において、感染後の生存率が有意に低下しており、易感染宿主のモデルとしてスクリーニングに最適であることがわかった。そこで、真菌の生育には必須ではない約2,500遺伝子を欠損した系統について、感染実験を行い、病原性が低下した系統を58系統、病原性が高まった系統を30系統同定した（第37回日本分子生物学会年会で発表：カンジダ酵母の病原性を規定する遺伝子の網羅的同定：ショウジョウバエ成虫への殺傷能力を指標としたカンジダ非必須遺伝子欠損株のスクリーニング：渡辺亮，倉石貴透，青山俊弘，中山浩伸，知花博治，倉田祥一郎）。これらの変異体で病原性が変化した理由を明らかにすることで、病原真菌の病原性発現機構の一端が明らかに出来るものと期待している。

## 研究課題 '14-12

### 感染に応答した自然免疫誘導の分子機構の解析

藤田尚志・加藤博己

(京都大学ウイルス研究所)

米山光俊・尾野本浩司

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Innate immune responses against pathogen infection

Takashi Fujita

(Institute for Virus Research, Kyoto University)

Hiroki Kato

(Institute for Virus Research, Kyoto University)

Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Koji Onomoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

### 研究成果

高等脊椎動物における抗ウイルス自然免疫において、RIG-I-like 受容体 (RLR) は細胞内に侵入した非自己 RNA を検知するセンサー分子として必須な役割を担っている。本研究は、最近明らかにした細胞内ストレス顆粒 (SG) の形成を介した RLR シグナル誘導の分子機構について解析することを目的とした。

これまでの共同研究から、Pumilio と呼ばれる RNA 結合タンパク質が、RLR を介したシグナルに何らかの役割を担っていることを示唆する結果を得ていた。そこで本研究では、この Pumilio のウイルス感染応答および SG 形成への関与などについて詳細な解析を行った。その結果、1) Pumilio が三種の RLR のうち LGP2 と特異的に会合していること、2) ウイルス感染に反応して SG に共局在すること、3) Pumilio が LGP2 とウイルス由来二本鎖 RNA との会合の増強に補助的に働くことなどが明らかとなった。これらの結果は、RLR による非自己ウイルス RNA 認識における Pumilio タンパク質の新たな機能を明らかにしている。さらに、これらの成果を含め RLR の機能とウイルス RNA 検知の分子メカニズム、SG 形成とその重要性などについての総説を共同で 2 報執筆し報告した。

## 発表論文

- 1) Yoneyama M, Onomoto K, Jogi M, Akaboshi T, Fujita T: Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Curr Opin Immunol*, 32: 48-53, 2015.
- 2) Narita R, Takahashi K, Murakami E, Hirano E, Yamamoto SP, Yoneyama M, Kato H, Fujita T: A novel function of human Puvilio proteins in cytoplasmic sensing of viral infection. *PLoS Pathog*, 10: e1004417, 2014.
- 3) Onomoto K, Yoneyama M, Fung G, Kato H, Fujita T: Antiviral innate immunity and stress granule responses. *Trends Immunol*, 35: 420-428, 2014.

## 研究課題 '14-13

### 自然免疫受容体を介した真菌核酸認識機構の解析

河合太郎

(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

米山光俊・尾野本浩司

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Recognition of fungal nucleic acids by pattern recognition receptors

Taro Kawai

(Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology)

Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Koji Onomoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

## 研究成果

自然免疫を介する核酸認識機構を理解する上で細胞内RNAヘリカーゼRIG-I-like receptors (RLRs)に着目し研究を行った。その結果、RLRsファミリーの一つであるMDA5の機能を負に制御する新たな制御因子Arl5Bを同定することができた。Arl5BはArf/Arlファミリーに属する低分子量G蛋白質であるが、その機能については

不明な点が多い。また、これまでの研究からArf/Arlファミリー分子はRIG-Iを始めとする自然免疫系を制御することも示唆されている。これらのことから我々はArlファミリー分子群に着目し、これらに対する発現ベクターを構築しMDA5とともに培養細胞へ発現させインターフェロンβ遺伝子プロモーター活性化を指標にスクリーニングを行ったところ、Arl5Bの過剰発現がMDA5によるインターフェロンβ遺伝子プロモーター活性化を有為に抑制した。更なる解析からMDA5とArl5Bが結合することを見いだした。また、MDA5に対する抑制効果はArl5BのGTP/GDP結合活性に依存しなかった。これらのことからArl5BはMDA5に直接結合することでその機能を抑制すると考えられた。そこでArl5B欠損マウスを作成し解析を行った。Arl5B欠損マウスは胎生致死であったため胎児繊維芽細胞を樹立し解析に用いた。その結果、Arl5B欠損細胞においてはMDA5アゴニストであるPoly I:Cや脳心筋炎ウイルスに対するインターフェロンβの発現や転写因子IRF3とNF-κBの活性化が野生型と比して上昇していた。以上の結果から、Arl5BはMDA5の抑制因子として機能していることが示された。今後、真菌核酸に対するArl5BならびにRLRsの役割を明らかにしていく予定である。

## 発表論文

- 1) Kitai Y, Takeuchi O, Kawasaki T, Ori D, Sueyoshi T, Murase M, Akira S, Kawai T: Negative regulation of Melanoma Differentiation-associated Gene 5 (MDA5)-dependent antiviral innate immune responses by Arf-like Protein 5B. *J Biol Chem*, 290: 1269-80, 2015.

## 研究課題 '14-14

### 宿主免疫応答とRNAサイレンシングのクロストークの分子機構

程久美子

(東京大学大学院理学系研究科)

米山光俊・尾野本浩司

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Crosstalk between RNA silencing and host immune responses

Kumiko Ui-Tei

(Graduate School of Science, The University of Tokyo)

Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Koji Onomoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

### 研究成果

高等真核生物では、ウイルス感染に対する生体防御機構としてインターフェロンの誘導を伴う自然免疫応答機構が発達している。自然免疫応答では、米山らが見出したRIG-I, MDA-5, LGP2などのウイルスセンサータンパク質が重要な役割を果たす。一方で、小分子非コードRNAによるRNAサイレンシングも、2本鎖RNAの侵入やウイルス感染に対する生体防御機構の1つであり、これら2つの機構は、共通にRNAによって惹起されるため、相互に調節し合うクロストークの機構が存在することが想定される。平成26年度には、両経路に共通に関わる因子であることを独自に見出したTrans-activating response (TAR) RNA-binding protein (TRBP) と、ウイルスセンサータンパク質のRNAサイレンシング機構における機能を解析した。

RNAサイレンシングでは、小分子RNAがArgonauteと呼ばれるタンパク質へ取り込まれて、初めてその遺伝子抑制機能を発揮する。TRBPは小分子RNAのArgonauteへの取り込みを促進することで、RNAサイレンシング活性を促進する。そこで、ウイルスセンサータンパク質のRNAサイレンシング効果に対する影響を、それらのノックダウンによるレポーターアッセイ

や強制発現によって検討したところ、RIG-IはRNAサイレンシング活性を抑制する作用があることがわかり、TRBPと何らかの機構で拮抗することが想定された。さらに、小分子RNAとTRBPやウイルスセンサータンパク質との相互作用をゲルシフトアッセイで解析した結果、TRBPのみでなく、RIG-IとLGP2も小分子RNAと相互作用することが明らかになった。これらの機能的意味を明らかにし、より詳細な解析を行うため、現在、CRISPRゲノム編集システムを用いたこれらの因子のヒトノックアウト細胞株の作製を進めている。

さらに、我々は、アポトーシスで活性化されるカスペアーゼによって、TRBPがプロセシングを受けて構造変換することも明らかにしている。そこで、免疫応答反応とRNAサイレンシング機構において、プロセシングによる構造変換によって、TRBPが異なる機能を示す可能性についても検討した。その結果、プロセシングされた後のTRBPはRNAサイレンシング活性を促進する効果が消失していることが明らかになった。さらに、プロセシング前後のTRBPと相互作用する二本鎖RNAをRNA免疫沈降シークエンスによって解析した結果、相互作用している二本鎖RNAの種類が大きく異なることがわかってきた。今後は、プロセシング前後のTRBPと相互作用する二本鎖RNAの特徴を明らかにし、TRBPの免疫応答機構における機能の解明を目指す。

## 研究課題 '14-15

### 真菌認識機構 Dectin を標的とした新規難治性喘息の治療機軸の確立

廣瀬晃一・中島裕史

(千葉大学大学院医学研究院 アレルギー・臨床免疫学)

西城 忍

(千葉大学真菌医学研究センター 感染免疫分野)

### Roles of Dectin-1 and Dectin-2 in the development of allergic airway inflammation.

Koichi Hirose, Hiroshi Nakajima

(Allergy and Clinical Immunology, Graduate School of Medicine, Chiba University)

Shinobu Saijo

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

### 研究成果

真菌への暴露，感作は喘息の重症化に関与することが知られているが，そのメカニズムに関しては不明な点が多い．本研究では真菌認識機構である Dectin-1, Dectin-2 のアレルギー性気道炎症発症における働きを解析した．野生型マウス，Dectin-1欠損マウス，Dectin-2欠損マウスを用いてチリダニ（HDM）誘発性アレルギー性気道炎症を惹起し，気管支肺洗浄液（BALF）中の炎症細胞浸潤，気道過敏性，縦隔リンパ節T細胞分化，およびサイトカイン産生能を比較検討した．その結果，Dectin-2欠損マウスでは，野生型マウスに比べてHDM投与後のBALF中への好酸球浸潤，肺組織における気道周囲への好酸球，リンパ球浸潤が減少しており，気道過敏性も低下していた．また，Dectin-2欠損マウスでは縦隔リンパ節T細胞からのIL-5, IL-13, IL-17産生が低下していることが明らかとなった．さらにそのメカニズムを解明した結果，Dectin-2は肺に局在するCD11b陽性樹状細胞からのサイトカイン産生を制御することによりHDM特異的Th2細胞分化，Th17細胞分化を促進していることが明らかとなった．

既に我々はDectin-1もアレルギー性気道炎症に関与することを示唆するデータを得ており，現在そのメカニズ

ムを解析中である．

### 発表論文

Am J Respir Cell Mol Biol. 2014 ;51:201-9. doi: 10.1165/rmb.2013-0522OC.

## 研究課題 '14-16

### 結核菌細胞壁成分を認識する新規受容体の探索と免疫賦活への応用

米川晶子・三宅靖延・石川絵里・

大洞将嗣・山崎 晶

(九州大学生体防御医学研究所)

西城 忍・米山光俊

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria.

Akiko Yonekawa, Yasunobu Miyake, Eri Ishikawa, Oh-hora, Sho Yamasaki

(Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University)

Shinobu Saijo, Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

### 研究成果

結核菌などの抗酸菌に特有の細胞壁の成分のうち，マンノース付加リポアラビノマンナンは宿主の免疫応答に対し抑制性と刺激性の両方の活性を示すことが知られている．しかし，その多面的な作用を説明しうるような受容体は，はっきりとは同定されていない．本研究では，C型レクチン受容体であるDectin-2がマンノース付加リポアラビノマンナンの受容体であることを見出した．マンノース付加リポアラビノマンナンはDectin-2に依存して樹状細胞を活性化し，炎症性サイトカインおよび抑制性サイトカインの産生を誘導した．また，Dectin-2を介して樹状細胞において抗原に特異的なT細胞の応答を増強することもわかった．さらに，マウス自己免疫疾患モデルにおいてマンノース付加リポアラビノマンナンのもつアジュバント活性が明らかにされた．実際の感染において，Dectin-2ノックアウトマウスは肺における病態の悪化を示した．以上より，病原真菌に対する感染防御



に必須の役割を示すDectin-2が、真菌だけではなく、マンノース付加リポアラビノマンナンを認識することにより抗酸菌に対する宿主の免疫応答にも寄与することが明らかになった。

尚、本研究はNature Review Immunology誌のHighlightで紹介された (Nat. Rev. Immunol., 14, 648-649, 2014).

### 発表論文

Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria.

Yonekawa A, Saijo S, Hoshino Y, Miyake Y, Ishikawa E, Suzukawa M, Inoue H, Tanaka M, Yoneyama M, Oh-Hora M, Akashi K, Yamasaki S.

Immunity. 41 (3):402-13. 2014.

### 研究課題 '14-17

#### 真菌感染に対する免疫応答におけるカルシウムシグナル役割の解明

大洞将嗣

(九州大学生体防御医学研究所)

西城 忍

(千葉大学真菌医学研究所)

#### Elucidation of the role of calcium signaling in immune response to fungal infection

Masatsugu Oh-hora

(Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University)

Shinobu Saijo

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

### 研究成果

骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を用いて、真菌感染防御に重要なC型レクチン受容体Dectinファミリーにおけるカルシウム流入-カルシウムシグナルの制御機構と機能を解析した。PLC- $\gamma$ の下流で活性化される“ストア作動性カルシウム (SOC) 流入”を欠損するBMDCを用いた解析の結果、Dectinファミリーはリガンド刺激によってSOC流入を活性化することが明らかとなった。またSOC流入欠損BMDCでは、リガンド刺激による

IL-2, GM-CSFの産生が有意に低下していた。さらに、SOC流入欠損BMDCによるT細胞のプライミングも部分的に低下していた。

次に、真菌感染防御における樹状細胞のカルシウムシグナルの役割を個体レベルで解析するために、樹状細胞特異的にSOC流入を欠損するマウスにカンジダ菌のSC5314株を投与した。その結果、コントロールとノックアウトマウスの生存率に変化はなかった。そこで、別株のATCC18804株を投与した場合、ノックアウトマウスでは生存率が低下していたが、統計的有意差は出なかった。以上から、カンジダ菌に対する感染防御において、樹状細胞のSOC流入の関与はそれほど大きくない可能性が示唆された。しかし、他の免疫応答に関与している可能性を排除することはできず、さらなる解析が必要である。

### 研究課題 '14-18

#### スエヒロタケ感作による気管支喘息重症化メカニズムの解明

廣瀬晃一・中島裕史

(千葉大学大学院医学研究院 アレルギー・臨床免疫学)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター 臨床感染症分野)

渡邊 哲

(千葉大学医学部附属病院 感染症管理治療部)

#### Roles of sensitization to *Schizophyllum commune* in the development of severe asthma

Koichi Hirose, Hiroshi Nakajima

(Allergy and Clinical Immunology, Graduate School of Medicine, Chiba University)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Akira Watanabe

(Department of Control and Treatment of Infectious Diseases, Chiba University Hospital)

## 研究成果

真菌への暴露，感作は喘息の重症化に関与することが知られている．スエロタケ（SC）は喘息，アレルギー性気管支肺真菌症（ABPM）の発症に関与することが報告されている真菌だが，これまでにSC特異的抗体の効率的なスクリーニング方法の報告は無く，喘息患者におけるSC感作率は不明である．我々はこれまでの共同研究によりSCによるABPM患者血清を用いて主要抗原を探索・同定し，この主要抗原を用いてSC特異的抗体測定ELISA法を確立した．このELISA法を用いて喘息患者における感作率を検討した結果，47名の喘息患者（Step2 6名，Step3 29名，Step4 12名）中，4名がSC特異的IgG陽性，6名がSC特異的IgE陽性であることが明らかとなった．さらにSC特異的抗体陽性喘息患者と陰性喘息患者の呼吸機能を比較した結果，SC特異的IgE陽性喘息患者は陰性喘息患者に比較し1秒率（FEV1.0）が有意に低下していることが明らかとなった．SC特異的抗体陽性患者はアスペルギルスに対しても感作が成立している傾向がみられたが，SC特異的IgE抗体価とアスペルギルス特異的IgE抗体価は相関しなかった．今後はSC感作とアスペルギルス感作，それぞれの気管支喘息重症化における働きを解析するため予定である．

## 研究課題 '14-19

### アムホテリシンBによる *Aspergillus fumigatus* バイオフィーム産生の抑制効果についての研究

秦 亮・渡邊 浩

（久留米大学医学部感染制御学講座：2014年4月に久留米大学医学部感染医学講座臨床感染医学部門より教室名称変更）

亀井克彦

（千葉大学真菌医学研究センター臨床感染症分野）

### Basic research for anti-biofilm effect formed by *Aspergillus fumigatus* using amphotericin B

Liang Qin, Hiroshi Watanabe

（Department of Infection Control and Prevention, Kurume University School of Medicine）

Katsuhiko Kamei

（Division of Clinical Research, Medical Mycology Research Center, Chiba University）

## 研究成果

人に感染症を引き起こす病原体として *Aspergillus fumigatus* は非常に重要であり，近年，感染の増加傾向が報告されている．*A. fumigatus* は主に経気道感染し，侵襲性アスペルギルス症，アスペルギローマや慢性壊死性肺アスペルギルス症などを引き起こす．また，肺病変から全身性播種性病変をつくることもある．感染防御能の低下した患者において，アスペルギルス症などの深在性真菌症は，発症件数ならびに治療の困難さの面でも，臨床治療上重要な課題とされている．近年，亀井，渡邊らは *A. fumigatus* によるバイオフィームの産生を報告し，重要な生育因子としてFetuinとの濃度依存性的な関連を示唆した（Int J Med Microbiol., 2012）．アムホテリシンBはアスペルギルス感染症に対しての臨床効果は認められているが，同病原体が産生するバイオフィームに対する抑制効果については未だ明らかになってはいない．

我々は96穴マイクロプレートに *A. fumigatus* を接種し，バイオフィームの産生を確認後，0.1xMIC, 1xMIC, 10xMICのアムホテリシンBを添加し，バイオフィームの抑制効果についてMicrotiter biofilm assayで評価した．アムホテリシンBの0.1xMIC存在下ではOD595で2.69, 1xMIC存在下で0.057, 10xMIC存在下で0.056と濃度依存性のバイオフィームの抑制効果が確認された．今後は様々な状態においても同様な効果が得られるかどうかを確認し，臨床効果との相関についても検討していく予定である．

## 発表論文

- 1) Qin L, Kida Y, Ishiwada N, Ohkusu K, Kaji C, Sakai Y, Watanabe K, Furumoto A, Ichinose A, and Watanabe H. The relationship between biofilm formations and capsule in *Haemophilus influenzae*. J Infect Chemother, 20: 151-156, 2014.

## 研究課題 '14-20

### アスペルギルスのバイオフィーム形成および抗真菌薬耐性に関連する新規遺伝子群の探索

梅山 隆・宮崎義継

(国立感染症研究所)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Screening of novel genes involved in biofilm formation and antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*

Takashi Umeyama, Yoshitsugu Miyazaki

(National Institute of Infectious Diseases)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

#### 研究成果

深在性真菌症の中でも *Aspergillus fumigatus* を主要病原菌とするアスペルギルス症は増加傾向にあり、予後が非常に悪い。近年、アスペルギルスのバイオフィーム形成がアスペルギルス感染に関与することが示唆されている。特にアスペルギローマ（菌球）の菌糸塊に見られる菌糸周囲には厚い細胞外マトリクスが観察されている。このようなバイオフィームを形成する状態では、いくつかの抗真菌薬に対する感受性が低下する現象が示され、難治性の原因の1つになっていると考えられる。しかしながら、バイオフィーム形成、および、それによる抗真菌薬耐性の詳細な分子メカニズムは不明な点が多い。本研究では、バイオフィーム形成に関わる新規遺伝子を同定し、抗真菌薬耐性との関連性を明らかにすることを目的とする。平成26年度では、一次配列からプロテインキナーゼと予測される *A. fumigatus* の *AUK4* が菌糸生育やバイオフィーム形成に及ぼす影響を検討した。

ハイグロマイシン耐性マーカーを含むカセットDNAを *A. fumigatus* AfS35株に形質転換し、*AUK4* 遺伝子破壊株を作製した。さらに、遺伝子を戻し、相補株を作製した。これらの株を用いて、生育および分生子形成の観察を行った。遺伝子破壊株の寒天培地上のコロニー生育速度は親株と比べて約75%に低下し、分生子形成効率は

大幅に低下した。親株では血清添加によってバイオフィーム形成量が増加するが、遺伝子破壊株ではその増加は観察できなかったことから、*AUK4* が血清刺激にตอบสนองしたバイオフィーム形成に関与することが示唆された。今後、*AUK4* を手がかりとして、血清刺激にตอบสนองしたバイオフィーム形成におけるシグナル伝達機構の役割を解明していく。

## 研究課題 '14-21

### Sialylglycopeptide が *Aspergillus fumigatus* 生育と biofilm 形成に及ぼす影響

豊留孝仁

(帯広畜産大学)

亀井克彦・高橋弘喜・八尋真希

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Effect of sialylglycopeptide on the growth and biofilm formation of *Aspergillus fumigatus*

Takahito Toyotome

(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Katsuhiko Kamei, Hiroki Takahashi, Maki Yahiro

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

#### 研究成果

近年、*Aspergillus fumigatus* がその感染過程においてバイオフィームを形成することが明らかとなってきた。これまでの研究で血清糖タンパク質フェツインAがバイオフィーム形成を促進することが明らかとなってきた。さらなる検討から、フェツインAのN-結合型糖鎖が重要な役割を果たしていると推測された。また、新たな観点からの研究としてフェツインA添加が *A. fumigatus* の遺伝子発現にどのような影響を及ぼすかを検討してきた。そこで、本研究ではフェツインAのN-結合型糖鎖構造の *A. fumigatus* の遺伝子発現に及ぼす影響について、N-結合型糖鎖構造をもつシアリルグリコペプチド (SGP) を用いて検討を行った。

次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析の結果、SGP添加時に *A. fumigatus* において発現が4倍以上上昇する遺伝子もしくは低下する遺伝子をそれぞれ

れ42遺伝子, 75遺伝子見いだした。これら遺伝子のうち, フェツインA添加時にも共通して4倍以上発現が上昇もしくは低下する遺伝子はそれぞれ1遺伝子, 6遺伝子が見いだされた。フェツインAおよびSGPのいずれを添加しても上昇する遺伝子はMajor facilitator superfamily (MFS) 型トランスポーターをコードしている。一方, 共通して低下する遺伝子のうち, 3つの遺伝子はゲノム上で近接していた。この3つの遺伝子を含むゲノム領域では9つの遺伝子がいずれもSGP添加により発現量が大きく低下しており, 共通して遺伝子発現制御を受けていることが示唆された。

これらの遺伝子について, これまでに詳細な解析はなされていない。今後, これら遺伝子の機能を解析することにより, *A. fumigatus* バイオフィーム形成に関する詳細な分子メカニズムが明らかになると期待される。

## 研究課題 '14-22

### 病原真菌・放線菌の休眠遺伝子を利用した新規抗感染症薬リード化合物の獲得

久保田高明

(北海道大学大学院薬学研究院)

五ノ井透

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Development of lead compound for new anti-infective agent using silent gene of pathogenic fungi and bacteria

Takaaki Kubota

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University)

Tohru Gono

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

### 研究成果

化合物生産性が明らかにされていない病原性放線菌のうち *Nocardia terpenica* IFM0555の生産する成分について精査した結果, *Nocardia terpenica* IFM0406の生産する brasilicardin A (アミノ酸トランスポーターSystem Lの強力な阻害により免疫抑制活性を示す) および関連化合物

を生産している事が明らかになったが, 新規化合物の単離には至らなかった。

また, 次世代シーケンサーによりゲノム解析が行われている数種の *Nocardia* 属放線菌に関して, 構造の新規性が高い化合物の生合成遺伝子である事が期待される trans-ATタイプのポリケチド合成酵素遺伝子の探索を行ったが, 存在を確認する事はできなかった。

一方, 渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. 2012-7-4A株の培養上清の成分を精査し, 新規鎖状ポリケチド amphidin C~Gを単離, 構造決定した。これら新規化合物および同時に得られた既知の鎖状ポリケチド amphidin Aおよびマクロリド amphidinolide Qの抗菌活性を評価した結果, amphidin C~Gおよび amphidinolide Q全てが *Trichophyton mentagrophytes* に抗菌活性を示す事が分かった。また, amphidin Aは *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* に, amphidin CおよびEは *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Staphylococcus aureus* に, amphidinolide Qは *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* に抗菌活性を示す事が分かった。

### 発表論文

- 1) Kubota, T.; Iwai, T.; Sakai, K.; Gono, T.; Kobayashi, J. "Amphidinins C-F, amphidinolide Q analogues from marine dinoflagellate *Amphidinium* sp." *Org. Lett.* 2014, 16, 5624-5627.
- 2) Kubota, T.; Iwai, T.; Ishiyama, H.; Sakai, K.; Gono, T.; Kobayashi, J. "Amphidin G, a putative precursor of amphidin A from marine dinoflagellate *Amphidinium* sp." *Tetrahedron Lett.* 2015, 56, 990-993.

## 研究課題 '14-23

### 膣カンジダ症発症とカンジダ・アルビカンスの遺伝子型に関する研究

神戸俊夫

(名古屋大学大学院医学系研究科附属神経疾患・腫瘍分子医学研究センター)

矢口貴志・田中玲子

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Study on *Candida albicans* genotypes relating with vaginal candidiasis

Toshio Kanbe

(Center for Neurological Diseases and Cancer, Nagoya University)

Takashi Yaguchi, Reiko Tanaka

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

#### 研究成果

*Candida albicans*は口腔、皮膚、膣などの常在性真菌として知られ、カンジダ症のほとんどがこれら常在性カンジダ酵母による内因性感染である。これまでに、健常者口腔に由来する*C. albicans*のマイクロサテライト領域に基づいた遺伝子型解析で5つの主要遺伝子型 (genotype 1, 2, 3, 4, 5) の中で, genotype 5は健常者に由来する*C. albicans*のみにみられる型であり, genotype 2, 3はカンジダ症病巣部に由来する*C. albicans*の主要遺伝子型であることを示してきた。本研究では、膣カンジダ症患者病変部より分離した86株の*C. albicans*の遺伝子型を2種類のマーカー(CDC 3, CAI)により解析し、これまでの結果と比較した。結果、膣カンジダ症の場合も, genotype 5 (健常者由来*C. albicans*特異的) *C. albicans*は認められなかった。カンジダ症病巣部に由来する*C. albicans*でみられるgenotype 2および3については、ほとんどがgenotype 2 *C. albicans* (7%)で, genotype 3 *C. albicans*の分離率は1%であった。これらの結果はカンジダ血症患者に由来する*C. albicans*と同じであった。現在, genotype 2 *C. albicans*の健常者膣における分布に関する解析に加え, genotype 2および5 *C. albicans*の生物学性状についての比較を進めている。

## 研究課題 '14-24

### 真菌認識に重要な自然免疫受容体Dectin-1及びDectin-2の抗腫瘍応答における役割の解析

柳井秀元・谷口維紹

(東京大学生産技術研究所)

西城 忍

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses

Hideyuki Yanai, Tadatsugu Taniguchi

(Institute of Industrial Science, The University of Tokyo)

Shinobu Saijo

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

#### 研究成果

がんに対する新たな治療法として、最近、免疫療法に大きな期待が寄せられている。古くから自身の免疫系ががん細胞を認識し、排除することがわかっていたが、その機構としては、獲得免疫系によるがん細胞の認識機構がよく知られており、免疫系のもう一つの軸である自然免疫系がどのようにしてがん細胞を認識し、その排除を促しているのか、という点については不明な点が多く残されていた。

本研究では、免疫細胞の一種であるマクロファージが樹状細胞に発現するC型レクチンファミリー分子のDectin-1が、がん細胞を直接認識することで、自然免疫系が活性化され、その結果がん細胞が体内から排除されることを明らかにした。

本研究は、病原真菌に対する感染防御に必須の役割を担っている自然免疫受容体がん細胞を認識し、その排除を促していることを世界に先駆けて明らかにしたもので、今後、新しいがんの治療法や予防法の開発へとつながることが期待される。

尚、本研究はeLife誌のInsightで紹介された。

## 発表論文

Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses.

Chiba S, Ikushima H, Ueki H, Yanai H, Kimura Y, Hangai

S, Nishio J, Negishi H, Tamura T, Saijo S, Iwakura Y, Taniguchi T.

eLife. 3:e04177. 2014 (doi: 10.7554/eLife.04177.)

# 感染症研究グローバルネットワークフォーラム2014

(共催：千葉大学真菌医学研究センター共同利用・共同研究拠点事業，千葉大学COEスタートアップ「病原体感染と免疫応答の統合的解析拠点」，東京大学医科学研究所細菌感染生物学社会連携研究部門・特別推進研究「病原細菌の自然免疫克服戦略の解明とその応用」，基盤研究A「エフェクターと宿主標的分子間相互作用を基盤としたサルモネラ感染分子機構の解明」，厚生労働省科学研究費補助金「肝炎等克服実用化研究事業」(B型肝炎創薬実用化等研究事業)「B型肝炎における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発」)

## 研究成果

平成24年度から千葉大における感染症研究のネットワーク化を目指して「千葉大学感染症研究ネットワーク」として開始された本会も今年度で第3回となった。昨年からは日本あるいは世界の第一級の先生方による国際的な意見交換の場となる研究会を目指し，名称を「感染症研究グローバルネットワークフォーラム」に変更しているが，本年度は平成26年11月15日(土)に千葉大学医学部記念講堂にて開催された。一般演題に加え，さまざまな感染症領域で活躍しておられる5名の先生方による特別講演が行われ，まさに研究会レベルをはるかに超えた国際的な研究発表の場となった。参加者は116名に達し，発表のみならずレベルの高い活発な議論が行われた。なお，プログラムは以下のとおりである。

日時：平成26年11月15日(土) 9:30~16:50

場所：千葉大学医学部記念講堂

横須賀 収 (千葉大学医学研究院)

亀井 克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

猪狩 英俊 (千葉大学医学部附属病院)

白澤 浩 (千葉大学医学研究院)

山本 友子 (千葉大学薬学研究院)

開会の挨拶

横須賀 収 (千葉大学医学研究院 教授)

セッション1

座長：白澤 浩 (千葉大学大学院医学研究院 教授)

相馬亜希子 (千葉大学園芸学研究所 助教)

「病原性大腸菌O157株の宿主感染に関わる低分子RNAの同定と機能解析」

高屋明子 (千葉大学薬学研究院 准教授)

「グラム陽性菌の内因性rRNA修飾と薬剤耐性」

村田武士 (千葉大学理学研究科 教授)

「創薬標的膜蛋白質の体系的構造解析技術の確立に向けて」

特別講演1

座長：亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター 教授)

長谷耕二 (慶応義塾大学薬学部大学院薬学研究科 教授  
東大医科学研究所国際粘膜ワクチン開発研究センター粘膜バリア学分野 客員教授)

「腸内細菌によるエピジェネティクス制御を介したTreg分化誘導機構の解明」

セッション2

座長：猪狩英俊 (千葉大学医学部附属病院 感染症管理治療部 部長)

猪狩英俊 (千葉大学医学部附属病院 感染症管理治療部 部長)

「Non-communicable Diseasesが日本の塗抹陽性結核治療成績の及ぼす影響について」

加藤直也 (東京大学医科学研究所先端ゲノム医科学分野 准教授)

「肝炎ウイルス制御後の肝発がん抑止戦略」

特別講演2

座長：横須賀 収 (千葉大学医学研究院 教授)

脇田隆字 (国立感染症研究所 ウイルス第二部 部長)

「DAA時代におけるC型肝炎ウイルス研究」

特別講演 3

座長：山本友子（千葉大学薬学研究院 教授）

山崎 晶（九州大学生体防御医学研究所感染ネットワーク研究センター免疫制御学分野 教授）

「結核菌を認識する受容体と免疫応答」

特別講演 4

座長：米山光俊（千葉大学真菌医学研究センター 教授）

荒瀬 尚（大阪大学免疫学フロンティア研究センター免疫化学研究室 教授）

大阪大学微生物病研究所 免疫化学分野 教授）

「ペア型レセプターを介した宿主病原体相互作用」

特別講演 5

座長：野田公俊（千葉大学医学研究院 教授）

中山俊憲（千葉大学医学研究院 免疫発生学 教授）  
「Pathogenic 記憶 Th2細胞の形成と維持機構」

閉会の挨拶

笹川千尋（千葉大学真菌医学研究センター長，東京大学名誉教授，日本生物科学研究所長）

# 感染症研究 2014

## グローバルネットワークフォーラム

参加費無料

11/15 土

9:30~16:50

※情報交換会参加費：1,000円  
参加希望者は事前に  
chibakannet@yahoo.co.jpに  
申し込んでください。  
10/25締切り

**会場** 講演会：医学部記念講堂  
ランチタイム情報交換会：医学部同窓会館 1階

開会の挨拶 9:30~9:35 横須賀 収 医学研究院 教授

**特別講演3**

◆座長 白澤 浩 医学研究院 教授

9:35 相馬 亜希子 千葉大学園芸学研究所 助教  
「病原性大腸菌O157株の宿主感染に関わる低分子RNAの同定と機能解析」

9:50 高屋 明子 千葉大学薬学研究院 准教授  
「グラム陽性菌の内因性rRNA修飾と薬剤耐性」

10:05 村田 武士 千葉大学理学研究科 教授  
「創薬標的膜蛋白質の体系的構造解析技術の確立に向けて」

10:20

**特別講演4**

◆座長 亀井 克彦 真菌医学研究センター 教授

10:20 長谷 耕二 慶応義塾大学薬学部大学院薬学研究所 教授  
東大医科学研究所国際粘膜炎ワクチン開発研究センター 粘膜炎学分野 客員教授  
「腸内細菌によるエピジェネティクス制御を介したTreg分化誘導機構の解明」

11:05

●コーヒーブレイク 11:05~11:20

**特別講演5**

◆座長 猪狩 英俊 医学部附属病院 准教授・感染症管理治療部 部長

11:20 猪狩 英俊 医学部附属病院 准教授・感染症管理治療部 部長  
「Non-communicable Diseases が日本の塗抹陽性結核治療成績へ及ぼす影響について」

11:35 加藤 直也 東京大学医科学研究所先端ゲノム医学分野 准教授  
「肝炎ウイルス制御後の肝発がん抑止戦略」

11:50

**特別講演6**

◆座長 横須賀 収 医学研究院 教授

11:50 脇田 隆字 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長  
「DAA時代におけるC型肝炎ウイルス研究」

12:35

ランチタイム情報交換会 12:40~13:55 医学部同窓会館 1階

**特別講演7**

◆座長 山本 友子 薬学研究院 教授

14:00 山崎 晶 九州大学生体防御医学研究所感染ネットワーク研究センター 免疫制御学分野 教授  
「結核菌を認識する受容体と免疫応答」

14:45

●コーヒーブレイク 14:45~15:00

**特別講演8**

◆座長 米山 光俊 真菌医学研究センター 教授

15:00 荒瀬 尚 大阪大学免疫学フロンティア研究センター免疫化学研究室 教授・大阪大学微生物病研究所 免疫化学分野 教授  
「ペア型レセプターを介した宿主病原体相互作用」

15:45

●休憩 15:45~16:00

**特別講演9**

◆座長 野田 公俊 医学研究院 教授

16:00 中山 俊憲 千葉大学免疫発生学 教授  
「Pathogenic 記憶 Th2細胞の形成と維持機構」

16:45

閉会の挨拶 16:45~16:50 笹川 千尋 真菌医学研究センター長・東京大学名誉教授・日本生物科学研究所 所長

世話人：亀井克彦（真菌医学研究センター）、猪狩英俊（医学部附属病院）、白澤 浩（医学研究院）、山本友子（薬学研究院）、横須賀 収（医学研究院）  
共 催：千葉大学真菌医学研究センター共同利用・共同研究拠点事業、千葉大学COEスタートアップ「病原体感染と免疫応答の統合的解析拠点」、東京大学医科学研究所細菌感染生物学社会連携研究部門、特別推進研究「病原細菌の自然免疫克服戦略の解明とその応用」、基礎研究A「エフェクターと宿主標的分子間相互作用を基盤としたワルモネア感染分子機構の解明」、厚生労働科学研究費補助金「肝炎等克服実用化研究事業」（B型肝炎創薬実用化等研究事業）「B型肝炎における自然免疫の機能解明とその制御による発症抑止法開発」  
問合せ：千葉大学大学院医学研究院 神田達郎 TEL 043-226-2083 E-mail: chibakannet@yahoo.co.jp



# 2015年講演会

## 2015 Scientific Meetings & Seminars

- 1) 東京大学医科学研究所－千葉大学真菌医学研究センター 共同利用・共同研究拠点事業 平成26年度 成果報告会

【午後の部】

東京大学医科学研究所－千葉大学真菌医学研究センター 合同成果報告会

【特別講演】

藤田尚志  
(京都大学ウイルス研究所・教授)  
ウイルス感染が誘導する自然免疫シグナルの時空間解析

【合同成果報告会（領域3：感染症・免疫共同研究領域）】

[千葉大学真菌医学研究センター成果報告]  
五味勝也  
(東北大学大学院農学研究科 教授)  
*Aspergillus* 属糸状菌のアゾール系薬剤耐性に関する転写因子 AtrR と SrbA の協調的発現制御機構の解析

倉田祥一郎  
(東北大学大学院薬学研究科 教授)  
カンジダ・グラブラータの遺伝子欠損株ライブラリーの構築とショウジョウバエ成虫への殺傷能力を指標とした病原性を規定する遺伝子のスクリーニング

豊留孝仁  
(帯広畜産大学動物・食品衛生研究センター 講師)  
*Aspergillus fumigatus* バイオフィルム形成とその機構

柳井秀元  
(東京大学生産技術研究所 特任准教授)  
自然免疫受容体 Dectin-1 及び Dectin-2 の抗腫瘍応答における役割の解析

[感染症・免疫共同研究領域]

上野貴将  
(熊本大学エイズ学研究センター 准教授)

日本人 HIV 感染者の HIV アクセサリー遺伝子の解析

立川 愛  
(東京大学医科学研究所 准教授)  
HIV 感染細胞における HIV 抗原の抗原提示動態に関する研究

今井正樹  
(岩手大学 准教授)  
インフルエンザウイルスのヒト上気道細胞での増殖を制御する因子の同定とその解析

小柴琢己  
(九州大学大学院 准教授)  
インフルエンザウイルス由来・タンパク質と宿主ミトコンドリアとの相互作用解析

水島恒裕  
(兵庫県立大学大学院 教授)  
赤痢菌病原因子の構造解析による作用機構の解明と創薬への応用

Kun-Yi Hsin  
(沖縄科学技術大学院大学 研究員)  
Discovery of anti-influenza agents and drug targets using curated pathway map (FluMap) and high-precision molecular docking simulation

横田恭子  
(東京工科大学 教授)  
HIV-1の潜伏感染とその長期生体内維持に関わる分子機構の解析

日時：平成27年3月6日（金）13：00～16：50  
場所：東京大学医科学研究所 講堂

- 2) 感染症研究グローバルネットワークフォーラム 2015

(共催：千葉大学真菌医学研究センター 共同利用・共同研究拠点事業 東京大学医科学研究所細菌感染生物学社会連携研究部門・特別推進研究「病原

細菌の自然免疫克服戦略の解明とその応用」

【午前の部】

谷口俊文

(千葉大学医学部附属病院 感染制御部 助教)

米国における HIV 診療最前線

加藤誠也

(公益財団法人 結核予防会結核研究所 副所長)

結核をめぐる国際的な課題と国内の課題について

松本智成

(一般財団法人 大阪府結核予防会 大阪病院 診断検査部長)

結核菌のゲノム解析

伊藤功朗

(京都大学医学部附属病院 呼吸器内科学 助教)

COPD と感染症

加藤康幸

(国立研究開発法人国立国際医療研究センター 医長)

エボラ出血熱など輸入感染症について

【午後の部】 International Forum

Cevayir Coban

(IFReC, Osaka University Professor)

“Tissue-specific immunopathology during malaria”

Gordon Brown

(The Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, UK Professor)

“C-type lectins: key players in antifungal immunity”

Yoshiyuki Goto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University Associate Professor)

(The Institute of Medical Science, The University of Tokyo Visiting Lecturer)

“Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial barrier system against bacterial infection”

Yumiko Imai

(Graduate School of Medicine, Akita University Professor)

“Dynamic nuclear interactions between influenza virus

and its host”

日時：平成27年11月14日（土）9：30～16：40

場所：千葉大学医学部記念講堂

3) 真菌医学研究センター Monthly セミナー

(東京大学医科学研究所細菌感染生物学社会連携研究部門共催)

後藤義幸

(Columbia University Medical Center, Department of Microbiology and Immunology 特別研究員)

東京大学医科学研究所 国際粘膜ワクチン開発研究センター 特任准教授)

『セグメント細菌による腸管免疫制御機構の解明』

日時：平成27年2月17日（火）10：30～

場所：真菌医学研究センター 大会議室

4) 真菌医学研究センター 川本進教授・横山耕治准教授 最終講義

横山耕治

(千葉大学真菌医学研究センター 准教授)

『3 + 40年のカビ研究』

川本 進

(千葉大学真菌医学研究センター 教授)

『基礎生命医科学(生化学・微生物学)研究者として』

日時：平成27年3月17日（火）10：00～

場所：真菌医学研究センター 大会議室

5) 真菌医学研究センター Monthly セミナー

(東京大学医科学研究所細菌感染生物学社会連携研究部門共催)

Jean-Marc Reichhart

(Professor, The University of Strasbourg, CNRS, France)

『Inside the Nobel-Prize Winning Research on Toll-like Receptors: Drosophila as a model to study the innate immune response.』

日時：平成27年3月17日（火）16：00～

場所：真菌医学研究センター 大会議室

- 6) 真菌医学研究センター Monthlyセミナー  
(東京大学医科学研究所細菌感染生物学社会連携研究部門共催)

別役智子  
(慶應義塾大学 医学研究科 教授)  
『COPDの増悪因子としての感染症の重要性』

日時：平成27年5月26日(火) 17:00～  
場所：真菌医学研究センター 大会議室

- 7) 真菌医学研究センター Monthlyセミナー  
(東京大学医科学研究所細菌感染生物学社会連携研究部門共催)

浅野 桂  
(米国カンザス州立大学 生物学科 教授)  
『eIF5類似タンパク質5MPによる翻訳制御』

日時：平成27年6月30日(火) 16:00～  
場所：真菌医学研究センター 大会議室

- 8) 真菌医学研究センター セミナー

Fabio Seiti Yoshikawa-Yamada  
(千葉大学真菌医学研究センター 大学院生)  
『CLRs and IL-17 in the immune response to *Tricophyton rubrum*』

日時：平成27年7月28日(火) 13:00～  
場所：真菌医学研究センター 大会議室

- 9) 真菌医学研究センター Monthlyセミナー  
(東京大学医科学研究所細菌感染生物学社会連携研究部門共催)

萩原大祐  
(千葉大学真菌医学研究センター 特任助教)  
『深在性真菌感染症領域で顕在化してきた薬剤耐性問題～農業から医療、越境する薬剤耐性～』

日時：平成27年7月28日(火) 16:00～  
場所：真菌医学研究センター 大会議室

- 10) 真菌医学研究センター Monthlyセミナー  
(東京大学医科学研究所細菌感染生物学社会連携研究部門共催)

Benoit Marteyn  
(Institut Pasteur, France, Unité de Pathogénie moléculaire et Microbienne)  
『Oxygen modulation of *Shigella flexneri* virulence and neutrophils physiology』

日時：平成27年7月30日(木) 16:00～  
場所：東京大学 医科学研究所 2号館2階 小会議室

- 11) 真菌医学研究センター Monthlyセミナー  
(東京大学医科学研究所細菌感染生物学社会連携研究部門共催)

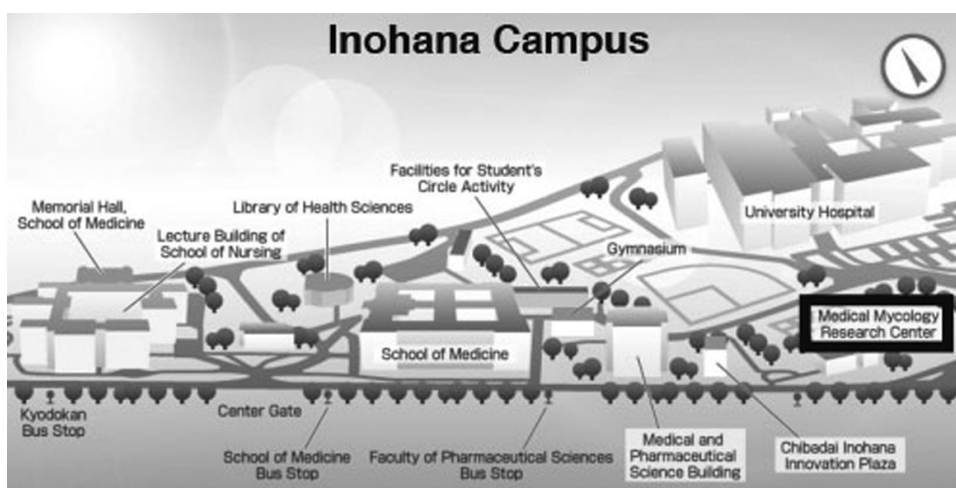
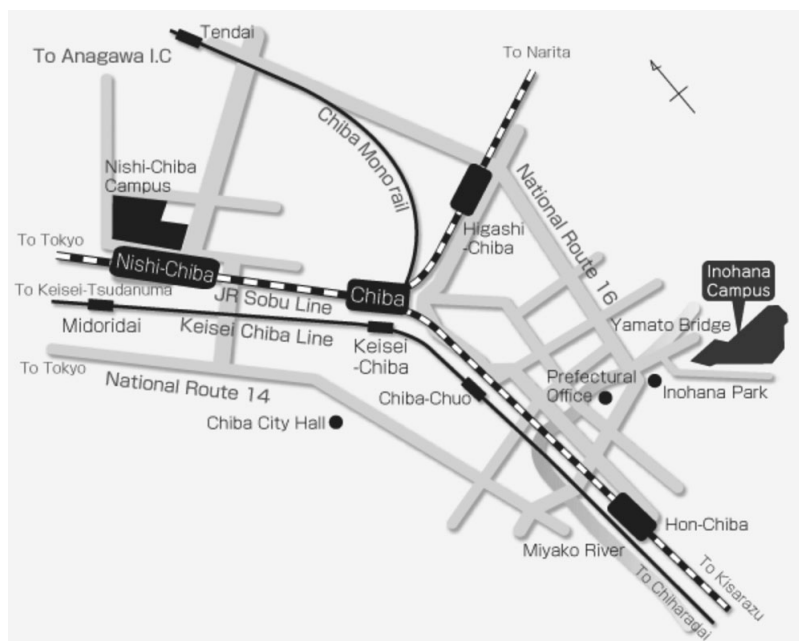
Catarina Costa  
(University of Lisbon, Portugal  
千葉大学 真菌医学研究センター 外国人研究者)  
『The underestimated role of MFS transporters in the pathogenic fungi *Candida glabrata*』

日時：平成27年11月17日(火) 11:00～  
場所：真菌医学研究センター 大会議室

- 12) 真菌医学研究センター Monthlyセミナー  
(東京大学医科学研究所細菌感染生物学社会連携研究部門共催)

岩倉洋一郎  
(東京理科大学 生命医科学研究所 教授  
千葉大学 真菌医学研究センター 客員教授)  
『腸管免疫の恒常性維持に於けるC型レクチンの役割』

日時：平成27年12月15日(火) 16:00～  
場所：真菌医学研究センター 大会議室



平成 28 年 3 月発行

発行者 千葉大学真菌医学研究センター  
 センター長 笹川 千尋  
 〒260-8673 千葉市中央区亥鼻 1-8-1  
 電話 043-222-7171 (代表)

March 2016

Published by  
 Chihiro Sasakawa, Ph. D.  
 Director, Medical Mycology Research Center  
 Chiba University  
 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8673, Japan  
 TEL: 81-43-222-7171

印刷 株式会社 正文社  
 Printed by Seibunsha, Ltd. Chiba, Japan





**CHIBA UNIVERSITY**  
**2015**