

MMRC



**ANNUAL REPORT OF MEDICAL MYCOLOGY
RESEARCH CENTER, CHIBA UNIVERSITY 2017**

千葉大学 真菌医学研究センター 報告

21



目 次

Content

はじめに Preface	
感染免疫分野 米山教授 感染応答プロジェクト Project for Immune Response in Infections Diseases	3
感染免疫分野 西城准教授 サイトカインプロジェクト Project for Cytokine Research	5
感染免疫分野 後藤准教授 微生物・免疫制御プロジェクト Project for Host-Microbial Interactions in Symbiosis and Pathogenesis	7
病原機能分野 知花准教授 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	9
臨床感染症分野 亀井教授 臨床感染症プロジェクト Project to Link Basic Sciences and Clinical Medicine	12
臨床感染症分野 山本特任教授 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	17
感染症制御分野 石和田准教授 感染症制御プロジェクト Project for Infection Control and Prevention	21
RNA 感染治療学分野 伊庭特任教授 RNA 制御プロジェクト Project for RNA regulation	24
微生物資源分野 高橋准教授 微生物創生プロジェクト Project for Systems Biology of Microorganisms	27
微生物資源分野 矢口室長 バイオリソース管理室 Management of Unit of Microbiological Resources	29
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”	33
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	34
高齢者・新生児アスペルギルス症制圧へ向けた予防・診断・治療開発プロジェクト The project for prophylaxis, diagnosis, and treatment for aspergillosis and the other mycoses in aged and neonate patients	35
AMED/JICA 地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS) AMED/JICA Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development (SATREPS)	37
感染症研究革新イニシアティブ (J-PRIDE) Japanese Initiative for Proffers of Research on Infectious Disease for Global Epidemic (J-PRIDE)	39

千葉大学グローバルプロミネント研究基幹・リーディング研究育成プログラム 『“超個体”の統合的理解に基づく次世代型「感染制御学」研究推進拠点』 Leading Research Promotion Program, Institute for Global Prominent Research 『Advanced Research of Infection and Immunity Based on Integrative Understanding of Host-Microbe Interactions』	40
平成28年度 共同利用・共同研究報告 2016 Fiscal Year Cooperative Research Program Report	42
感染症研究グローバルネットワークフォーラム2016 The 5th Global Network Forum on Infection and Immunity	65
2017年講演会 2017 Scientific Meeting & Seminars	67

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や呼吸器疾患を中心に、真菌感染症も増加の一途を辿り、また経済のグローバル化や海外からの観光客の増加等に伴う輸入真菌症等、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・医療機関として、又千葉大学においては、感染症・免疫・病原微生物の研究・開発機関として、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、病原真菌の研究を中心として感染症・免疫を含む領域の共同利用・共同研究拠点として、文部科学省より平成28年度から拠点として再認定を受け現在に至っています。本研究センターは、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います。本センターの臨床感染症分野は、平成28年度から、AMEDにおける地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム（SATREPS）に採択され、ブラジル・カンピナス大学医学部と連携し、現地における薬剤耐性真菌による感染症の実態解明を目指しています。又、ナショナルバイオリソースプロジェクトとして、本センターでは、病原真菌の収集・保存・ゲノム解析・分与等の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年より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で臨床活動を行っています。又27年以降、BSL-3施設、無菌マウス飼育施設、オープンリサーチラボ等を整備しました。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・生命情報解析」、「真菌症臨床・抗真菌薬開発」の三つを柱として、今後も我が国の真菌感染症の研究と医療に先導的な役割を果たす所存です。

平成30年4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. Moreover, the dramatic increase in worldwide trade and tourists from abroad 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 certified as one of the Joint Usage/Research Centers by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) since 2011. Thereby, MMRC has been actively engaged in medical mycology research and its related fields such as infection immunology and infection disease sciences 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) by performing as a central fungal culture collection institute. MMRC continues to support research activities by providing fungal research resources to expand the understanding of fungal pathogenesis and host innate immune responses. Furthermore, a specialty clinical research facility for fungal infection was opened at the Chiba University Hospital in October 2014, which is only one outpatient clinic for fungal infection in Japan. It is important to highlight that in 2015, MMRC underwent a 5-year research activity evaluation by MEXT, and received high commendation including renewed funding support for the next five 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.

April, 2018

Chihiro Sasakawa

Director of MMRC

米山 P I (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
特任助教	小野口和英	Research Assistant Professor	Kazuhide Onoguchi
技術職員	常喜 儒彦	Research Technician	Michihiko Jogi
技術補佐員	滝沢みゆき	Research Promotion Technician	Miyuki Takizawa

1. Functional analysis of RNA binding proteins (RBPs) responsible for induction of anti-viral innate immunity via RNA-granule formation.

Koji Onomoto, Marie Ban, Eri Miyamoto, Yoshiaki Kuroki, Chiho Tsutsuba, Kazuhide Onoguchi 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. Furthermore, we are trying to identify a novel RBPs that can be involved in anti-viral innate immune responses using several biochemical approaches.

2. Functional analysis of RLR-mediated signaling by enforced oligomerization of RIG-I CARDs

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 or RNA transfection. The obtained data demonstrated that the RLR-mediated signaling activates cell death and growth

inhibition to the cells. We try to reveal the molecular machinery underlying these RLR-induced cellular responses.

3. Recognition of viral ribonucleoprotein complex (RNP) and endogenous self-RNA by RLRs.

Michihiko Jogi, Chiaki Sakuma 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. 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 (AFM), 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. We are now trying to identify the candidate molecules and analyzing its functions.

These works were supported by JSPS KAKENHI, Grant-in-Aid for Challenging Exploratory Research (16K15279) and for Young Scientists (B) (17K15699).

西城 P I (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
助教	矢部 力朗	Assistant Professor	Rikio Yabe
技術補佐員	峰 良子	Technical Assistant	Ryoko Mine
技術補佐員	鈴木 智明	Technical Assistant	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 β -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 α -mannans and transduces its signal through association with the ITAM-containing Fc receptor γ chain. Upon ligand binding, spleen tyrosine kinase is recruited to the ITAM and activates the caspase recruitment

domain family member 9 (CARD9)-nuclear factor- κ B axis, resulting in the activation of various genes including those encoding pro-inflammatory cytokines. Both β -glucans and α -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. C-type lectin receptors in anti-fungal immunity

Moe Shiokawa^{1,2}, Sho Yamasaki^{1,2,3,4*}, and Shinobu Saijo^{4*}

¹ Division of Host Defense, Department of Molecular

Immunology, Research Institute for Microbial Diseases,
Osaka University, Osaka, Japan

² Division of Molecular Immunology, Medical Institute of
Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan

³ Laboratory of Molecular Immunology, Immunology
Frontier Research Center, Osaka University, Osaka, Japan

⁴ Division of Molecular Immunology, Medical Mycology
Research Center, Chiba University, Chiba, Japan

Fungi are ubiquitous in environments and host immune systems are constantly engaged with these eukaryotic pathogens. C-type lectin receptors (CLRs) are expressed in myeloid cells and play central roles in host defenses against fungal infections by coordinating innate and adaptive immune systems. Upon ligand binding, CLRs stimulate cellular responses by inducing the production of cytokines and reactive oxygen species via the Syk/CARD9 signaling pathway, leading to fungal elimination. Due to identification and characterization of the CLRs, the underlying mechanisms of the anti-fungal immunity are being unveiled in the present decade. In this review, we focus on the anti-fungal activities of these molecules and summarize of current knowledge of the related expression profiles, modes of ligand recognition, and signaling cascades.

Publications

- 1) Ito T, Hirose K, Norimoto A, Tamachi T, Yokota M, Saku A, Takatori H, Saijo S, Iwakura Y, Nakajima H. Dectin-1 Plays an Important Role in House Dust Mite-Induced Allergic Airway Inflammation through the Activation of CD11b⁺ Dendritic Cells. *J Immunol.* 198: 61-70, 2017
- 2) Lamprinaki D, Beasy G, Zhekova A, Wittmann A, James S, Dicks J, Iwakura Y, Saijo S, Wang X, Chow CW, Roberts I, Korcsmaros T, Mayer U, Wileman T, Kawasaki N. LC3-Associated Phagocytosis Is Required for Dendritic Cell Inflammatory Cytokine Response to Gut Commensal Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Front. Immunol.* 8: 1397, 2017
- 3) Nakagawa S, Matsumoto M, Katayama Y, Oguma R, Wakabayashi S, Nygaard T, Saijo S, Inohara N, Otto M, Matsue H, Núñez G, Nakamura Y. *Staphylococcus aureus* Virulent PSM α Peptides Induce Keratinocyte Alarmin Release to Orchestrate IL-17-Dependent Skin Inflammation. *Cell Host Microbe.* 22: 667-677, 2017
- 4) Shiokawa M, Yamasaki S, Saijo S. C-type lectin receptors in anti-fungal immunity. *Curr Opin Microbiol.* 40: 123-130, 2017

後藤 P I (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 α 1, 2-フコースによる腸内細菌との共生機構を明らかにし、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、特に感染症や代謝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 predispose 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 symbiotic system with commensal micro- and mycobiota mediated by epithelial α 1, 2-fucose. We further investigate the role of commensal microbes in the establishment of intestinal homeostasis and develop novel therapeutic approaches for the treatment of diseases such as infection and metabolic syndrome caused by the disruption of intestinal homeostasis.

准 教 授	後藤 義幸	Associate Professor	Yoshiyuki Goto
技 術 補 佐 員	高木 弘子	Research Promotion Technician	Hiroko Takagi
技 術 補 佐 員	藤本 恭子	Research Promotion Technician	Kyoko Fujimoto

1. Innate and acquired immune system regulates intestinal epithelial α 1, 2-fucosylation

Yoshiyuki Goto^{1,2,3}, and Hiroshi Kiyono^{3,4}

¹ Project for Host-Microbial Interactions in Symbiosis and Pathogenesis, Division of Molecular Immunology, Medical Mycology Research Center, Chiba University

² Division of Mucosal symbiosis

³ International Research and Development Center for Mucosal

Vaccine, Institute for Medical Science, The University of Tokyo

⁴ Division of Mucosal Immunology, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

α 1, 2-fucosyl linkages located to terminal carbohydrate moiety expressed on intestinal epithelial cells is catalyzed by fucosyltransferase 2 (Fut2). Epithelial α 1, 2-fucose is one of symbiotic factors which mediate host-microbiota interaction.

For example, epithelial $\alpha 1, 2$ -fucose is utilized as a dietary carbohydrate by various symbiotic bacteria such as *Bacteroides*. Therefore, disruption of *Fut2* leads to dysbiosis both in mice and human and predisposed to the development of inflammatory diseases such as Crohn's disease. Despite of the importance for intestinal and systemic homeostasis, the molecular and cellular mechanisms of the induction of epithelial *Fut2* and subsequent $\alpha 1, 2$ -fucosylation remain unknown. We found that group 3 innate lymphoid cells (ILC3) are critical inducers of intestinal epithelial *Fut2* expression and fucosylation that is mediated by the production of interleukin 22 and lymphotoxin from ILC3 in a commensal bacteria-dependent and -independent manner, respectively. In addition, IL-10-producing CD4⁺ T cells negatively regulate intestinal epithelial $\alpha 1, 2$ -fucosylation. These data unveil a novel function of innate and acquired immune cells in creating the appropriate symbiotic environment through regulating the epithelial $\alpha 1, 2$ -fucosylation.

2. Commensal bacteria and host immune system regulate fungi colonization in the gut

Haku Akira¹, Bei bei Bi¹, Kenzo Matsuo¹, Yoshiyuki Goto^{1,2}

¹ Project for Host-Microbial Interactions in Symbiosis and Pathogenesis, Division of Molecular Immunology, Medical Mycology Research Center, Chiba University

² Division of Mucosal symbiosis, International Research and

Development Center for Mucosal Vaccine, Institute for Medical Science, The University of Tokyo

Tremendous numbers of microorganisms colonize in the gut of their host. Several specific fungi including *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* have been reported to reside in the human gut. Although commensal bacteria are known to modulate gut homeostasis and dysbiosis triggers various kinds of host diseases, it is unclear how these commensal fungi colonize and affect host physiology so far. In addition, *C. albicans* are also known to exert pathogenic effects in the immunocompromised host and expand to the systemic compartments, which is called invasive candidiasis, one of the serious infectious diseases in the world. One of the mechanism of invasive candidiasis is triggered by colonization of *C. albicans* in the gut. In this study, we aim to uncover the mechanism by which commensal fungi colonize in the gut and affect the development of host diseases. We examine the role of commensal bacteria and gut immune system in the regulation of fungi colonization and develop novel therapeutic approaches for the treatment of host diseases.

Publications

- 1) Ito T, Hirose K, Saku A, Kono K, Takatori H, Tamachi T, Goto Y, Renauld JC, Kiyono H, Nakajima H. IL-22 induces Reg3 γ and inhibits allergic inflammation in house dust mite-induced asthma models. *J Exp Med.* 214 : 3037-3050, 2017.

知花 P I (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利用し、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
非 常 勤 講 師	宇野 潤	Researcher	Jun Uno
技 術 補 佐 員	大岩 真理	Research Promotion Technician	Mari Ohiwa
技 術 補 佐 員	野村祐理子	Research Promotion Technician	Yuriko Nomura

1. Fungus-derived hydroxyl radicals kill hepatic cells by enhancing nuclear transglutaminase

Shrestha R^{1,2}, Shrestha R¹, Qin XY¹, Kuo TF¹, Oshima Y³, Iwatani S², Teraoka R¹, Fujii K², Hara M¹, Li M¹, Takahashi-Nakaguchi A⁴, Chibana H⁴, Lu J⁵, Cai M⁵, Kajiwara S⁶, Kojima S⁷

¹ Micro-Signaling Regulation Technology Unit, RIKEN Center for Life Science Technologies, Wako, Saitama, Japan

² School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Kanagawa, Japan

³ Condensed Molecular Materials Laboratory, RIKEN, Wako, Saitama, Japan

⁴ Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Chiba, Japan

⁵ China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing, China

⁶ School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Kanagawa, Japan

⁷ Micro-Signaling Regulation Technology Unit, RIKEN Center for Life Science Technologies, Wako, Saitama, Japan

We previously reported the importance of induced nuclear transglutaminase (TG) 2 activity, which results in hepatic cell death, in ethanol-induced liver injury. Here, we show that co-incubation of either human hepatic cells or mouse primary hepatocytes derived from wild-type but not TG2^{-/-} mice with pathogenic fungi *Candida albicans* and *C. glabrata*, but not baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, induced cell death in host cells by enhancing cellular, particularly nuclear, TG activity. Further pharmacological and genetic approaches demonstrated that this phenomenon was mediated partly by the production of reactive oxygen species (ROS) such as hydroxyl radicals, as detected by a fluorescent probe and electron spin resonance. A ROS scavenger, N-acetyl cysteine, blocked enhanced TG activity primarily in the nuclei and inhibited cell death. In contrast, deletion of *C. glabrata* nox-1, which encodes a ROS-generating enzyme, resulted in a strain that failed to induce the same phenomena. A similar

induction of hepatic ROS and TG activities was observed in *C. albicans*-infected mice. An antioxidant corn peptide fraction inhibited these phenomena in hepatic cells. These results address the impact of ROS-generating pathogens in inducing nuclear TG2-related liver injuries, which provides novel therapeutic targets for preventing and curing alcoholic liver disease.

2. Convenient method for better preservation of fine structures of cultured macrophages and engulfed yeast cells by freeze-substitution fixation.

Yamaguchi M¹, Takahashi-Nakaguchi A¹, Aida Y¹, Sato-Okamoto M¹, Chibana H¹

¹ Rapid freeze-freeze substitution after glutaraldehyde fixation (CF-FS method) obtained the natural and fine structures of macrophages and engulfed yeast cells. Culturing macrophages on single hole molybdenum grids placed in culture dishes made possible the rapid freezing of cells by the 'open sandwich method'. This method may be convenient when rapid-freezing cannot be performed immediately, or when a rapid-freezing device is not available in the lab.

Publications

- 1) Romão D, Cavalheiro M, Mil-Homens D, Santos R, Pais P, Costa C, Takahashi-Nakaguchi A, M Fialho A, Chibana H, Teixeira MC: A new determinant of *Candida glabrata* virulence: the acetate exporter CgDtr1. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiol*, 2017 Nov 14; 7: 473.
- 2) Takahashi-Nakaguchi A, Takahashi H, Hagiwara D, Toyotome T, Chibana H, Watanabe A, Yaguchi T, Yamaguchi M, Kamei K, Gono T: *Aspergillus fumigatus* adhesion factors in dormant conidia revealed through comparative phenotypic and transcriptomic analyses. *Cellular Microbiol*, 2017 Nov 7. doi: 10. 1111/cmi. 12802.
- 3) Shrestha R, Shrestha R, Qin XY, Kuo TF, Oshima Y, Iwatani S, Teraoka R, Fujii K, Hara M, Li M, Takahashi-Nakaguchi A, Chibana H, Lu J, Cai M, Kajiwara S, Kojima S: Fungus-derived hydroxyl radicals kill hepatic cells by enhancing nuclear transglutaminase. *Sci Rep*. 2017 Jul 6; 7(1): 4746.
- 4) Aoki S, Morita M, Hirao T, Yamaguchi M, Shiratori R, Kikuya M, Chibana H, Ito K: Shift in energy metabolism caused by glucocorticoids enhances the effect of cytotoxic anti-cancer drugs against acute lymphoblastic leukemia cells. *Oncotarget Journal*, 2017 Oct 9; 8(55): 94271-94285.
- 5) Yamaguchi M, Takahashi-Nakaguchi A, Aida Y, Sato-Okamoto M, Chibana H: Convenient method for better preservation of fine structures of cultured macrophages and engulfed yeast cells by freeze-substitution fixation. *Microscopy* 2017 66: 209-211.
- 6) Yamada H, Yamaguchi M, Shimizu K, Murayama S Y, Mitarai S, Sasakawa C, Chibana H: Structome analysis of *Escherichia coli* cells by serial ultrathin sectioning reveals the precise cell profiles and the ribosome density. *Microscopy* 2017 66: 283-294.
- 7) Ruben T. Bernardo¹, Diana V Cunha, Can Wang, Leonel Pereira, Silva S, Okamoto M, Azusa Takahashi-Nakaguchi A, Chibana H, Aoyama T, Sá- Correia I, Azeredo J, Butler G, Mira NP: The CgHaa1-regulon mediates response and tolerance to acetic acid stress in the human pathogen *Candida glabrata*. *G3-Genes Genomes Genetics*. 2017 Jan 5; 7(1): 1-18.
- 8) Stepanova A, Vasilyeva V, Yamaguchi M, Chibana H, Bosak A: Ultrastructural investigations of early stages of transformation of yeast from hyphal in *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* in vivo. *Problems in Medical Mycology* 2017 19 (No. 2): 19-24
- 9) Bernardo RT, Cunha DV, Wang C, Pereira L, Silva S, Salazar SB, Schröder MS, Okamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Chibana H, Aoyama T, Sá-Correia I, Azeredo J, Butler G, Mira NP. The CgHaa1-Regulon Mediates Response and Tolerance to Acetic Acid Stress in the Human Pathogen *Candida glabrata*. *G3 (Bethesda)*. 2017 Jan 5; 7(1): 1-18.
- 10) Toh-e A, Ohkusu M, Shimizu K, Yamaguchi M, Ishiwada N, Watanabe A, Kamei K: Creation, characterization, and utilization of *Cryptococcus neoformans* mutants sensitive to micafungin. *Curr Genet*. 2017 63: 1093-1104.
- 11) Fujimoto Y, Kobayashi Y, Kato K, Yamaguchi M:

- Delamination of novel ultrathin bioabsorbable abluminal polymer of platinum chromium everolimus-eluting stent. *Cardiovasc Interv and Ther* 33: 97-98, 2018.
- 12) Takahashi H, Kusuya Y, Hagiwara D, Takahashi-Nakaguchi A, Sakai K, Gono T. Global gene expression reveals stress-responsive genes in *Aspergillus fumigatus* mycelia. *BMC Genomics*. 2017 Dec 4; 18(1): 942.
- 13) Win NN, Nakamoto S, Kanda T, Takahashi H, Takahashi-Nakaguchi A, Yasui S, Nakamura M, Wu S, Imazeki F, Mikami S, Yokosuka O, Gono T, Shirasawa H. Discrepancy between Hepatitis C Virus Genotypes and NS4-Based Serotypes: Association with Their Subgenomic Sequences. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 17; 18(1).
- 14) Toh-E A, Ohkusu M, Shimizu K, Takahashi-Nakaguchi A, Kawamoto S, Ishiwada N, Watanabe A, Kamei K. Putative orotate transporter of *Cryptococcus neoformans*, Oat1, is a member of the NCS1/PRT transporter super family and its loss causes attenuation of virulence. *Curr Genet*. 2017 Aug; 63(4): 697-707.

亀井 P I 臨床感染症プロジェクト

Project of Clinical Investigation

研究概要 (Summary)

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)として一般施設では実施困難な菌種同定, 遺伝子検査などの特殊検査を受け入れているが, その件数は年々増加し, 2017年は500件を越えている. これと並行して, 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している. また附属病院に設置した真菌症専門外来も, 全国から患者が来院するなど, 活発な臨床活動を行っている. 研究面では国内のさまざまな研究機関, 医療施設と協力した臨床・基礎研究を行っており, 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や診断・治療法の開発研究を進めているが, その中でもアスペルギルス耐性株の疫学と耐性機構の研究などにも力を入れ, 多くの画期的な論文を発表するなど高い成果を挙げている. また, 昨年からは開始したブラジル・カンピーナス大学感染症内科との SATREPS (地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム) に代表されるように, 国際連携による共同研究も盛んに行っている.

We have been doing basic and clinical research primarily on fungal infections along with seeing patients in the Specialty Clinic for Fungal Infections at the University Hospital. Working as the Reference Center for fungal infections, we also take ca. 500 consulting services on fungal diseases from all over the country in 2017. With regard to research activities, we are investigating the mechanisms of infection of intractable fungal diseases and the development of their diagnostic and therapeutic methods in collaboration with various universities/pharmaceutical companies. The epidemiology and mechanisms of antifungal resistance also hold a prominent part of our research, and a collaborative study with Sao Paulo State University of Campinas, Brazil (SATREPS), which has started last year, has made this topic as its main target.

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 (~ 2017.9.30)
特任助教	新居 鉄平	Research Assistant Professor	Teppey Arai
研究員	東江 昭夫	Researcher	Akio Toh-e
グランドフェロー	田口 英昭	Grand Fellow	Hideaki Taguchi
技術職員	鎗田 響子	Research Technician	Kyoko Yarita
技術補佐員	八尋 真希	Research Promotion Technician	Maki Yahiro
技術補佐員	関 里亜	Research Promotion Technician	Rio Seki
技術補佐員	土屋由紀子	Research Promotion Technician	Yukiko Tsuchiya
技術補佐員	井上 京子	Research Promotion Technician	Kyoko Inoue

1. Analysis of the azole-drugs resistant clinical strains with mutation in HMG1

Tepei Arai, Daisuke Hagiwara, Akira Watanabe, Katsuhiko Kamei

Medical Mycology Research Center (MMRC), Chiba University, Japan

In *Aspergillus fumigatus*, Mechanisms for azole-drugs resistance have been mainly investigated about mutation of CYP51A. But, azole resistant strains with unknown resistance mechanism has been reported. These suggest that no mutation has been introduced in CYP51A, and a new resistance factor is present. In the previous study of our group, we obtained results suggesting that mutation of HMG-CoA reductase (HMG1), the rate-limiting enzyme in ergosterol biosynthesis, is mechanism conferring azole-drugs resistance. The aim of this study is clarifying the role of SNP in *hmg1* for the azole resistance mechanism.

It was investigated whether the azole-drugs resistance clinical strains without any mutation in CYP51A (non-*cyp51A* resistant strains) possess mutations in *hmg1* gene. The phenotypes associated with ergosterol biosynthesis were examined in non-*cyp51A* resistant strain (*hmg1* mutation azole resistant strain).

The mutations in *hmg1* were a found in other non-*cyp51A* azole resistant strains. These results suggested a close link between azole resistance and the SNP in *hmg1* gene. Disk diffusion assay showed that the *hmg1* mutation azole resistant strain was more sensitive to polyene drugs. Interestingly, *hmg1* mutation azole resistant strain showed increased sensitivity to lovastatin that is an inhibitor for HMG-CoA reductase. The ergosterol content in the cells was measured by HPLC, showing significant increase in the *hmg1* mutation azole resistant strain.

It was strongly suggested that mutation of *hmg1* is involved in azole resistance mechanism. The phenotypes associated with ergosterol biosynthesis was different between *hmg1* mutation azole resistant strain and susceptible strain (Wild type). This phenotypic difference was considered to be related to resistance mechanism. Genetic transformation test for clarifying the role of SNP in *hmg1* is underway.

2. Changing of the profile of *cyp51A* mutations of *Aspergillus fumigatus* clinical strains isolated in Japan

Akira Watanabe, Daisuke Hagiwara, Takahito Toyotome, Takashi Yaguchi, Katsuhiko Kamei

Medical Mycology Research Center (MMRC), Chiba University, Japan

Increasing of the rate of azole resistant strains among the clinical isolates of *A. fumigatus* is becoming a serious concern worldwide. To know the recent status of azole resistance of the fungus in Japan, we investigated antifungal susceptibility and *cyp51A* mutations of clinical isolates of *A. fumigatus* in the culture collection of MMRC.

We tested antifungal susceptibilities according to CLSI M38A2. Regarding azole-resistant strains, we analyzed the *cyp51A* gene of each resistant strain.

Total of 411 *A. fumigatus* strains which isolated from patients in 2011 to 2016 were examined. Among these strains, 26 (6.3%) isolates were determined as resistant to azole(s). Tandem repeat of *cyp51A* promoter was detected in 3 strains. Sixteen strains had point mutation in *cyp51A* gene. Particularly, all of the strains with G448S mutation were isolated from patients to whom voriconazole had administered. By Fisher's exact test, the G448 mutation is correlated with the administration of voriconazole in each patient ($P=0.0239$). The remaining 6 strains had no mutation in *cyp51A*.

In previous Japanese report (Tashiro M, AAC 2012), only G54 mutation were found in resistant strains, but changing the profile of *cyp51A* mutation are emerging.

3. Drug sensitivity and resistance mechanism in *Aspergillus* section *Nigri* strains from Japan

Aki Hashimoto, Daisuke Hagiwara, Akira Watanabe, Maki Yahiro, Alimu Yikelamu, Takashi Yaguchi, Katsuhiko Kamei

Medical Mycology Research Center (MMRC), Chiba

University, Japan

Aspergillus section *Nigri* is ubiquitously distributed worldwide and is often isolated from clinical specimens. In Japan, this species is the second-most often isolated from clinical specimens following *A. fumigatus*. We determined the species of *Aspergillus* section *Nigri* isolated in Japan by DNA sequencing of partial β -tubulin genes and investigated drug susceptibility by CLSI M38-A2 method. The collection contained 20 *A. niger*, 59 *A. welwitschiae*, and 39 *A. tubingensis* strains. Drug susceptibility testing revealed 30-55% of *A. niger*, 6.8-18.6% of *A. welwitschiae*, and 79.5-89.7% of *A. tubingensis* to be less susceptible (so-called resistant) to itraconazole (ITCZ) and/or voriconazole (VRCZ) according to the epidemiologic cutoff values (ECVs) proposed for *A. niger* previously. Minimum inhibitory concentrations (MIC) distributions of ITCZ or VRCZ showed no remarkable differences between clinical and environmental isolates. When the *cyp51A* sequences were compared between susceptible and resistant strains, 18 amino acid mutations were specific for resistant isolates of *A. niger* and *A. tubingensis*, however none of them were confirmed to be associated with azole resistance. Three non-related *A. welwitschiae* isolates possessed a partial deletion in *cyp51A*, likely attributable to being more susceptible to azoles when compared to other isolates. 1 of 5 ITCZ-resistant *A. tubingensis* isolates showed higher expression level of *cyp51A* than those of susceptible strains. Our results show that *cyp51A* point mutations may have no association with azole resistance but in some cases the over-expression of *cyp51A* might lead the azole-resistance in these species.

4. Cytotoxic effect of gliotoxin on human alveolar epithelial cells

Yuichi Fujimoto, Akira Watanabe, Daisuke Hagiwara, Maki Yahiro, Masashi Yamaguchi, Katsuhiko Kamei

Medical Mycology Research Center (MMRC), Chiba University, Japan

Aspergillus fumigatus is one of the major fungal pathogens

which cause pulmonary aspergillosis. Its conidia are taken into human airway from the environment, and adhere to lung epithelial cells in the first process of infection. Some virulence factors should be produced by *A. fumigatus* and facilitate the infection, but such substances have not confirmed yet. Gliotoxin, one of the secondary metabolites of this fungus, has been recognized as a candidate of virulence factor and has been investigated thoroughly. This molecule has been shown to have cytotoxicity to various cell lines such as human alveolar epithelial cells and human neutrophils. But the impact of gliotoxin in the first phase of the infection remains unclear. This study aims to investigate cytotoxic effect of gliotoxin on epithelial cells and elucidate the effect of gliotoxin to the adhesion of conidia to them. We observed the surface of A549 lung epithelial cells by scanning electron microscope (SEM) and evaluated the adhesion rate of conidia of *A. fumigatus* Af293 to A549 cells, after exposure of gliotoxin. One hour exposure of gliotoxin led to cell shrinking. By the observation with SEM, microvilli decreasing or shortening were seen on the surface of A549 cells by gliotoxin. The adhesion rate of Af293 conidia to A549 cells tended to increase after exposure of gliotoxin at a concentration of 100 ng/ml, compared with control. From these results, we found that gliotoxin gives morphologic changes of lung epithelial cells and increases the adhesion of conidia to them. This may open a new approach to unravel the infection mechanism.

5. Study on the relationship between the causative *Fusarium* species of invasive fusariosis and environmental fungal flora

Yasunori Murasosa, Yutaro Hino, Maki Yahiro, Akira Watanabe, Takashi Yaguchi and Katsuhiko Kamei

Medical Mycology Research Center (MMRC), Chiba University, Japan

Systemic fusariosis has been an increasing invasive fungal infection among immunocompromised patients, especially those with hematologic malignancies and recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Several

routes of entry for disseminated invasive fusariosis (IF) are suspected. The most suspected route is airborne, in which water distribution systems of hospitals represent a reservoir and infection source. Skin is another route of entry and primary skin lesions or onychomycosis lead to disseminated IF in immunocompromised patients. In the present study, we investigated the relationship between the causative *Fusarium* species of invasive fusariosis and environmental fungal flora.

In our previous study of *Fusarium* species causing IF and superficial fusariosis (SF) in Japan between 1998 and 2015. *Fusarium solani* species complex (FSSC) was predominately isolated from both patients with IF and SF (IF, 77.8% and SF, 67.6%). Distribution of the phylogenetic species of FSSC isolates from patients with IF and SF exhibited different spectra; specifically, *F. keratoplaticum* (25.0%) was the most frequent isolate from patients with IF, whereas *F. falciforme* (FSSC 3+4) (32.4%) was the most frequent isolate from patients with SF. *Fusarium* sp. (FSSC 5) was the second most frequent isolate from both patients with IF and SF (IF, 22.2% and SF, 24.3%). Notably, *F. petroliophilum* was isolated only from patients with IF (Muraosa et. al, 2017).

Preliminary surveys of the indoor air and the indoor plumbing drain (bathroom and kitchen) for *Fusarium* spp. were carried out. Filamentous fungal isolates were identified using *Fusarium*- and FSSC-specific real-time PCR. *Fusarium* spp. were not isolated from indoor air, whereas FSSC were predominately isolated from indoor plumbing drain. Our data from preliminary surveys will help to reveal the infection source of IF.

Publications

- 1) Silva LP, de Castro PA, Dos Reis TF, Paziani MH, Kress MR, Ria o-Pach n DM, Hagiwara D, Ries LN, Brown NA, Goldman GH: Genome-wide transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to osmotic stress reveals regulators of osmotic and cell wall stresses that are SakAHOG1 and MpkC dependent. *Cell Microbiol* 19 (4): e12681, 2017.
- 2) Muraosa Y, Oguchi M, Yahiro M, Watanabe A, Yaguchi T, Kamei K: Epidemiological study of *Fusarium* species causing invasive and superficial fusariosis in Japan. *Med Mycol J* 58(1): E5-E13, 2017.
- 3) Sakurai A, Yanai H, Ishida T, Kuwata H, Kamei K, Izumi S: Possible relationship between organizing pneumonia and chronic pulmonary aspergillosis: A case report and literature review. *Respir Investig* 55(1): 74-78, 2017.
- 4) Toh-E A, Ohkusu M, Shimizu K, Takahashi-Nakaguchi A, Kawamoto S, Ishiwada N, Watanabe A, Kamei K: Putative orotate transporter of *Cryptococcus neoformans*, Oat1, is a member of the NCS1/PRT transporter super family and its loss causes attenuation of virulence. *Curr Genet* 63(4): 697-707, 2017.
- 5) Hagiwara D, Miura D, Shimizu K, Paul S, Ohba A, Gono T, Watanabe A, Kamei K, Shintani T, Moyer-Rowley WS, Kawamoto S, Gomi K: A Novel Zn²⁺-Cys⁶ Transcription Factor AtrR Plays a Key Role in an Azole Resistance Mechanism of *Aspergillus fumigatus* by Co-regulating *cyp51A* and *cdr1B* Expressions. *PLoS Pathog* 13(1): e1006096, 2017.
- 6) Igari H, Watanabe A, Ichimura Y, Sakurai T, Taniguchi T, Ishiwada N: Quality control in QuantiFERON-TB gold in-tube for screening latent tuberculosis infection in health care workers. *J Infect Chemother* 23(4): 211-213, 2017.
- 7) Kusuya Y, Hagiwara D, Sakai K, Yaguchi T, Gono T, Takahashi H: Transcription factor Afmacl controls copper import machinery in *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet* 63(4): 777-789, 2017.
- 8) de Souza M, Matsuzawa T, Sakai K, Muraosa Y, Lyra L, Busso-Lopes AF, Levin AS, Schreiber AZ, Mikami Y, Gono T, Kamei K, Moretti ML, Trabasso P: Comparison of DNA Microarray, Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) and Real-Time PCR with DNA Sequencing for Identification of *Fusarium* spp. Obtained from Patients with Hematologic Malignancies. *Mycopathologia* 182(7-8): 625-632, 2017.
- 9) Hirayama T, Takazono T, Iwata K, Senju H, Shimazaki T, Tashiro M, Saijo T, Tanaka T, Nakamura S, Imamura Y, Kojiro M, Miyazaki T, Tsukamoto M, Furumoto A, Morimoto K, Muraosa Y, Matsubara Y, Yanagihara K, Mukae H, Kamei K, Kohno S, Izumikawa K: A case series of histoplasmosis patients

- with elevated serum soluble interleukin-2 receptor levels. *J Infect Chemother* 23(9): 642-647, 2017.
- 10) Hagiwara D, Sakai K, Suzuki S, Umemura M, Nogawa T, Kato N, Osada H, Watanabe A, Kawamoto S, Gono T, Kamei K: Temperature during conidiation affects stress tolerance, pigmentation, and tryptacin accumulation in the conidia of the airborne pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 12(5): e0177050, 2017.
 - 11) Onishi K, Sarumoh BM, Hagiwara D, Watanabe A, Kamei K, Toyotome T: Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* containing a 34-bp tandem repeat in *cyp51A* promoter is isolated from the environment in Japan. *Med Mycol J* 58(2): E67-E70, 2017.
 - 12) Hashimoto A, Hagiwara D, Watanabe A, Yahiro M, Yikelamu A, Yaguchi T, Kamei K: Drug sensitivity and resistance mechanism in *Aspergillus* section *Nigri* strains from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 61(8): e02583-16, 2017.
 - 13) Oguma T, Taniguchi M, Shimoda T, Kamei K, Matsuse H, Hebisawa A, Takayanagi N, Konno S, Fukunaga K, Harada K, Tanaka J, Tomomatsu K, Asano K: Allergic bronchopulmonary aspergillosis in Japan: A nationwide survey. *Allergol Int* 67(1): 79-84, 2018.
 - 14) Toh-E A, Ohkusu M, Shimizu K, Yamaguchi M, Ishiwada N, Watanabe A, Kamei K: Creation, characterization and utilization of *Cryptococcus neoformans* mutants sensitive to micafungin. *Curr Genet* 63(6): 1093-1104, 2017.
 - 15) Toyotome T, Hagiwara D, Kida H, Ogi T, Watanabe A, Wada T, Komatsu R, Kamei K: First clinical isolation report of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H-type mutation in Japan. *J Infect Chemother* 23(8): 579-581, 2017.
 - 16) Hatakeyama S, Yamashita T, Sakai T, Kamei K: Case Report: Disseminated *Talaromyces (Penicillium) marneffei* and *Mycobacterium tuberculosis* Coinfection in a Japanese Patient with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Am J Trop Med Hyg* 97(1): 38-41, 2017.
 - 17) Masaki K, Fukunaga K, Matsusaka M, Kabata H, Tanosaki T, Mochimaru T, Kamatani T, Ohtsuka K, Baba R, Ueda S, Suzuki Y, Sakamaki F, Oyamada Y, Inoue T, Oguma T, Sayama K, Koh H, Nakamura M, Umeda A, Kamei K, Izuhara K, Asano K, Betsuyaku T: Characteristics of severe asthma with fungal sensitization. *Ann Allergy Asthma Immunol* 119(3): 253-257, 2017.
 - 18) Miyachi H, Nakamura Y, Wakabayashi S, Iwasawa MT, Oikawa A, Watanabe A, Matsue H: Case of recurrent severe cellulitis and cutaneous candidiasis during psoriasis treatment with ustekinumab. *J Dermatol* 44(8): e206-e207, 2017.
 - 19) Hoshino T, Omura K, Kimura S, Takahashi H, Kamei K, Ohkusu M: A case of disseminated cryptococcosis with necrotizing fasciitis in a non-HIV patient. *Acute Med Surg* 4(4): 454-457, 2017.
 - 20) Toh-E A, Ohkusu M, Shimizu K, Ishiwada N, Watanabe A, Kamei K: Novel biosynthetic pathway for sulfur amino acids in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Genet* 64(3): 681-696, 2018.

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、細菌と生体の上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⁺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⁺ 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

Professor

Tomoko Yamamoto

技術補佐員 野村祐理子

Research Promotion Technician

Yuriko Nomura

1. Functional Dissection of *Salmonella* SPI2 injectisome

Tomoko Yamamoto¹, Yuriko Nomura¹, Akiko Takaya²

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University ³Project for Systems Biology of Microorganisms, Medical Mycology Research Center, Chiba University

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

² Department of Microbiology and Molecular Genetics,

The type 3 secretion system (T3SS) is essential for the pathogenic potential of Gram-negative bacteria by delivering effector proteins directly into the eukaryotic cytoplasm.

At its core lie the injectisome (a transmembrane secretion apparatus) and a network of specialized chaperones that target secretory proteins (secretory substrates; hereafter 'substrates') to the antechamber of the injectisome. Secretion of substrates through the injectisome occurs in consecutive steps and different switching mechanisms ensure the secretion hierarchy; secretion of early/middle/late substrates. Although several export apparatus components have been shown to be responsible for mediating different steps of secretion, the precise mechanism including substrate switching is not fully understood. The *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI2) T3SS is assembled after acidification (pH ~ 5.0) of *Salmonella* containing vacuoles (SCV) in host cell. Bacteria grown *in vitro* at pH5.0 secrete translocator (middle substrate) but negligible levels of effectors (late substrates). Exposure of bacteria to pH7.2 after growth at low pH causes the secretion of effectors, implicating that the secretion of early and middle substrates of SPI2-T3SS can be specifically dissected at low pH. We have revealed that SsaH is a novel chaperone responsible for secretion of early substrate (SsaI; inner rod) and another chaperone SsaE regulates secretion of early substrate (SsaI) as well as middle substrate (SseB; translocator).

2. *Salmonella* mediates loss of IgG-secreting plasma cells from laminin $\beta 1$ ⁺ bone marrow survival niches

Akiko Takaya¹, Christian Männe², Tomoko Yamamoto³, Koji Tokoyoda¹

¹ Department of Microbiology and Molecular Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

² Rheumatism Research Center Berlin, Germany

³ Project for Host Response Network of Bacterial Infection, Medical Mycology Research Center, Chiba University

Serum IgG, which is mainly generated from IgG-secreting plasma cells in the bone marrow (BM), protects our body against various pathogens. We show that serum IgG and BM-resident IgG-secreting plasma cells are specifically impaired by infection with *Salmonella*. The reduction was caused by a

Salmonella protein SiiE but not by lipopolysaccharide (LPS), flagellin or reduced CXCL12. SiiE-deficient *Salmonella* failed to reduce numbers of BM IgG-secreting plasma cells and strongly induced production of *Salmonella*-specific IgG in the infected mice. SiiE-derived peptide, with homology to laminin $\beta 1$, markedly reduced numbers of IgG-secreting plasma cells in the BM. Histological analyses revealed that laminin $\beta 1$ binds to IgG- but not IgM-secreting plasma cells in the BM. Learning from *Salmonella* we identify laminin $\beta 1$ as a component of the survival niches for IgG-secreting plasma cells in the BM.

3. Diminished nuclear RNA decay upon *Salmonella* infection upregulates antibacterial noncoding RNAs

Katsutoshi Imamura¹, Akiko Takaya¹, Tomoko Yamamoto², Nobuyoshi Akimitsu³

¹ Department of Microbiology and Molecular Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

² Project for Host Response Network of Bacterial Infection, Medical Mycology Research Center, Chiba University

³ Isotope Science Center, The University of Tokyo

Cytoplasmic mRNA degradation controls gene expression to eliminate pathogens during infection. However, such regulation involving nuclear RNA decay has remained elusive. Here, we identify 145 unstable RNAs, including enhancer RNAs (eRNAs) and known long noncoding RNAs (lncRNAs) such as NEAT1v2, that are stabilized upon *Salmonella* infection of HeLa cells. In uninfected cells, the RNA exosome, aided by its Nuclear Exosome Targeting (NEXT) complex, degrades these labile transcripts. Upon infection, however, levels of the exosome/NEXT components RRP6 and MTR4 dramatically decrease, resulting in transcript stabilization. HeLa TO cells deleted for selected lncRNA genes, *NEAT1v2* and *eRNA07573*, show increased susceptibility to *Salmonella* concomitant with dysregulated expression of a distinct class of immunerelated genes, indicating that the accumulation of unstable nuclear RNAs contributes to antibacterial defense. Our results highlight a

fundamental role of regulated nuclear RNA degradation in the response to pathogenic infection.

4. Membrane vesicle protein PagC as a novel biomarker for detecting pathogenic *Salmonella* in the viable but not culturable state

Xu J¹, Suita K¹, Okuno K¹, Takaya A², Yamamoto T³, Isogai E¹

¹Laboratory of Animal Microbiology, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

²Department of Microbiology and Molecular Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

³Project for Host Response Network of Bacterial Infection, Medical Mycology Research Center, Chiba University

The viable but non-culturable (VBNC) state is a remarkable survival mechanism in which cells exist in a physiologically inactive state. Bacteria in the VBNC state do not form colonies, and thus, are difficult to detect using colony-based methods. As a result, VBNC bacteria are potentially virulent and can cause widespread contamination during food production. In the present study, we reported a novel biomarker, the membrane vesicle protein PagC, for the detection of VBNC *Salmonella*. *Salmonella* cells were chemically induced into the VBNC state by H₂O₂ treatment. The bacterial cells retained their shapes but were observed to release numerous membrane vesicles, which were accompanied by a transient PagC overexpression. Immunoblotting was performed to detect PagC in pathogenic strains, including *Salmonella* Enteritidis and *S. Typhimurium*, which are harmful and known to cause food-borne gastroenteritis in humans and other animals. Therefore, our findings demonstrated the potential use of PagC as a biomarker for the detection of VBNC *Salmonella* in food production.

5. RNA epigenetics and bacterial susceptibility to ribosome-targeting antibiotics

Tomoko Yamamoto¹, Akiko Takaya², Yuriko Nomura¹, Naruhiko Ishiwada³ and Tsutomu Suzuki⁴

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

²Department of Microbiology and Molecular Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

³Medical Mycology Research Center, Chiba University

⁴Department 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 such as macrolides, ketolide and oxazolidinone. This study will provide innovative perspectives on selecting antibacterial targets and developing antibiotics.

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

Tomoko Yamamoto¹, Akiko Takaya², Yuriko Nomura¹, and Walid Houry³

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

²Department of Microbiology and Molecular Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

³Department 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-throughput 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 anti-microbial activity can kill a variety of bacteria under certain condition.

Publications

1. Xu J, Suita K, Okuno K, Takaya A, Yamamoto T, Isogai E. Membrane vesicle protein PagC as a novel biomarker for detecting pathogenic *Salmonella* in the viable but not culturable state. *J. Vet. Med.* doi: 10.1292/jvms.17-0164, 2017.
2. Takeuchi N, Ohkusu M, Hoshino T, Naito S, Takaya A, Yamamoto T, Ishiwada N: Emergence of quinolone-resistant strains in *Streptococcus pneumoniae* isolated from paediatric patients since the approval of oral fluoroquinolones in Japan. *J. Infect. Chemother.* 23: 218-223, 2017.

石和田 P I (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, 肺炎球菌感染症, B 群溶血性レンサ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. 日本新生児成育医学会と共同で, 新生児深在性真菌感染症の全国調査を実施した.

Our research focuses on sero-epidemiology and pathogenesis of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus agalactiae*. We organize several clinical researches for the development of diagnostic and therapeutic methods for respiratory infectious diseases and also care for patients in the clinic of the University Hospital. Nationwide survey on neonatal invasive fungal infections was conducted collaborating with the Japan Society for Neonatal Health and Development.

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

1. Nationwide survey of neonatal invasive fungal infection in Japan.

Ishiwada N¹, Kitajima H², Morioka I³, Takeuchi N¹, Endo M⁴, Watanabe A¹, Kamei K¹

¹ Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Japan

² Department of Neonatology, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health, Japan

³ Department of Pediatrics, Kobe University Graduate School of Medicine, Japan

⁴ Department of Pediatrics, Chiba University Hospital, Japan

Invasive fungal infection (IFI) is a life-threatening infectious disease in high-risk neonates. Strategies for the treatment and prevention of IFI in neonates in Japan remain unclear. We conducted a nationwide retrospective survey to determine IFI incidence between January 2014 and October 2015. Primary

survey questionnaires were submitted to 309 medical facilities that regularly treat high-risk neonates. The questionnaire assessed IFI incidence during the study period, methods for preventing fungal infection in early delivery neonates, and methods for preventing mother-to-child fungal transmission. The secondary questionnaire was for facilities that had IFI cases and replied to the primary questionnaire. In total, 128 medical facilities (41.4%) completed the primary questionnaire, 17/128 facilities recorded 23 proven or probable IFI cases. Estimated annual IFI incidence was 0.33/1000 live births of hospitalized neonates. Patient data at IFI onset were available for all 23 patients. Birth weight was < 1000 g in 18 patients. Causative microorganisms were identified in 22 patients. *Candida* species (n = 21) were the most common pathogens, and one patient had mucormycosis. The mortality rate was 17.4%. Regarding neonatal fungal prophylaxis, 55/128 facilities (43.0%) reported administering therapy. The most frequently used prophylactic drugs were fluconazole, then micafungin. Fungal prophylaxis for mothers

who showed fungal colonization was performed in 30/128 facilities (23.4%). Oxiconazole vaginal tablets were most commonly used as prophylaxis for high-risk mothers. In Japan, the diagnosis, treatment, and prevention of neonatal IFI varied. Continuous surveillance and treatment regimen for neonatal IFI are required to improve outcomes in high-risk neonates.

2. Emergence of quinolone-resistant strains in *Streptococcus pneumoniae* isolated from paediatric patients since the approval of oral fluoroquinolones in Japan.

Takeuchi N¹, Ohkusu M², Hoshino T³, Naito S⁴, Takaya A⁵, Yamamoto T², Ishiwada N²

¹ Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan

² Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan

³ Division of Infectious Diseases, Chiba Children's Hospital, Chiba, Japan

⁴ Department of Pediatrics, Chiba University Hospital, Chiba, Japan

⁵ Department of Microbiology and Molecular Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba, Japan

Tosufloxacin (TFLX) is a fluoroquinolone antimicrobial agent. TFLX granules for children were initially released in Japan in 2010 to treat otitis media and pneumonia caused by drug-resistant bacteria, e. g. penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* and beta-lactamase-negative, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. The evolution of bacterial resistance since TFLX approval is not known. To clarify the influence of quinolones administered to children since their approval, we examined the resistance mechanism of TFLX-resistant *S. pneumoniae* isolated from paediatric patients as well as patient clinical characteristics. TFLX-resistant strains (MIC \geq 2 mg/L) were detected among clinical isolates of *S. pneumoniae* derived from children (\leq 15 years old) between 2010 and 2014. These strains were characterised based on quinolone resistance-determining regions (QRDRs), i. e. *gyrA*, *gyrB*,

parC, and *parE*. In addition, the antimicrobial susceptibility, serotype, and multilocus sequence type of strains were determined, pulsed-field gel electrophoresis was performed, and patient clinical characteristics based on medical records were assessed for cases with underlying TFLX-resistant strains. Among 1168 *S. pneumoniae* isolates, two TFLX-resistant strains were detected from respiratory specimens obtained from paediatric patients with frequent exposure to TFLX. Both strains had mutations in the QRDRs of *gyrA* and *parC*. One case exhibited gradual changes in the QRDR during the clinical course. This is the first study of quinolone-resistant *S. pneumoniae* isolated from children, including clinical data, in Japan. These data may help prevent increases in infections of quinolone-resistant *S. pneumoniae* in children; specifically, the results emphasise the importance of administering fluoroquinolones only in appropriate cases.

3. Analysis of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolated from middle ear fluid before and after the introduction of government subsidies for pneumococcal and *H. influenzae* type b vaccines in Japan.

Hoshino T¹, Takeuchi N², Fukasawa C³, Hirose S³, Okui H³, Sato H⁴, Sato M⁴, Arimoto Y⁵, Nakano A⁵, Ishiwada N²

¹ Division of Infectious Diseases, Chiba Children's Hospital, Chiba, Japan

² Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan

³ Division of Infectious Diseases, Chiba Children's Hospital, Chiba, Japan

⁴ Division of Clinical Laboratory, Chiba Children's Hospital, Chiba, Japan

⁵ Division of Otorhinolaryngology, Chiba Children's Hospital, Chiba, Japan

This study aimed to identify trends in frequency, serotype, and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolated from middle ear fluid specimens of children aged \leq 15 years (mean, 2 years), before and after the introduction of the 7-valent pneumococcal

conjugate vaccine (PCV7) and the *H. influenzae* type b vaccine, at a pediatric facility in Japan. Sixty-six *S. pneumoniae* and 88 *H. influenzae* strains were isolated from 820 middle ear fluid samples. Serotyping and antimicrobial susceptibility testing were performed. The study time-frame was divided into period 1 (2007-2010) and period 2 (2011-2014), according to the availability of vaccine public funding. The *S. pneumoniae* detection rate decreased from 9.6% in period 1-6.1% in period 2 ($p = 0.042$). PCV7 serotypes decreased from 56.8% to 9.1% ($p = 0.0002$). No significant change was observed for the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) serotypes: 72.7% in period 1 and 59.1% in period 2. Penicillin-resistant strains (penicillin G-MIC ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$) decreased from 25% to 4.5% ($p = 0.038$). Detection rates for *H. influenzae* did not change significantly: 10.3% in period 1 and 11.3% in period 2. Serotypes were mostly non-typeable: 97.9% in period 1 and 90.2% in period 2, and only one serotype b strain was isolated in each period. The frequency of ampicillin-resistant strains (MIC ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$) did not change. These results show a preventative effect of PCV7 on otitis media due to *S. pneumoniae*. PCV7 was replaced with PCV13 in 2013 in Japan; therefore, a further decrease in pneumococcal otitis media is anticipated in the future.

Publications: original articles

- 1) Ishiwada N, Kitajima H, Morioka I, Takeuchi N, Endo M, Watanabe A, Kamei K. : Nationwide survey of neonatal invasive fungal infection in Japan. *Med Mycol.* 2017 Oct 26. [Epub ahead of print]
- 2) Takeuchi N, Ohkusu M, Hoshino T, Naito S, Takaya A, Yamamoto T, Ishiwada N. : Emergence of quinolone-resistant strains in *Streptococcus pneumoniae* isolated from paediatric patients since the approval of oral fluoroquinolones in Japan. *J Infect Chemother.* 23: 218-223, 2017.
- 3) Hoshino T, Takeuchi N, Fukasawa C, Hirose S, Okui H, Sato H, Sato M, Arimoto Y, Nakano A, Ishiwada N. ; Analysis of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolated from middle ear fluid before and after the introduction of government subsidies for pneumococcal and *H. influenzae* type b vaccines in Japan. *J Infect Chemother.* 23: 85-89, 2017.
- 4) Toh-E A, Ohkusu M, Shimizu K, Ishiwada N, Watanabe A, Kamei K. : Novel biosynthetic pathway for sulfur amino acids in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Genet.* 2017 Nov 20. [Epub ahead of print]
- 5) Otsuka T, Hosokai R, Watanabe T, Ishiwada N, Saitoh A. : Subcutaneous chest wall abscess as a complication of BCG vaccination. *Pediatr Int.* 2017 Oct 3. [Epub ahead of print]
- 6) Toh-E A, Ohkusu M, Shimizu K, Yamaguchi M, Ishiwada N, Watanabe A, Kamei K. : Creation, characterization and utilization of *Cryptococcus neoformans* mutants sensitive to micafungin. *Curr Genet.* 63: 1093-1104, 2017.
- 7) Kimura H, Nagasawa K, Kimura R, Tsukagoshi H, Matsushima Y, Fujita K, Hirano E, Ishiwada N, Misaki T, Oishi K, Kuroda M, Ryo A. : Molecular evolution of the fusion protein (F) gene in human respiratory syncytial virus subgroup B. *Infect Genet Evol.* 52: 1-9, 2017
- 8) Igari H, Watanabe A, Ichimura Y, Sakurai T, Taniguchi T, Ishiwada N. : Quality control in QuantiFERON-TB gold in-tube for screening latent tuberculosis infection in health care workers. *J Infect Chemother.* 23: 211-213, 2017.
- 9) Toh-E A, Ohkusu M, Shimizu K, Takahashi-Nakaguchi A, Kawamoto S, Ishiwada N, Watanabe A, Kamei K. : Putative orotate transporter of *Cryptococcus neoformans*, Oat1, is a member of the NCS1/PRT transporter super family and its loss causes attenuation of virulence. *Curr Genet.* 63: 697-707, 2017.

伊庭 P I (RNA 制御) プロジェクト

Project for RNA Regulation

研究概要 (Summary)

細胞内でみられる遺伝子発現の制御ネットワークは、その細胞のもつ発生、分化、増殖に関する特異性はもちろん、真菌・細菌・ウイルス等の寄生体に対する宿主の応答性や **competency** をも規定している。平成 28 年 4 月に開始された本プロジェクトではこのような制御ネットワークを形成する主要な因子として 1) 各遺伝子のプロモーター上で作用する転写制御因子、2) クロマチンの活性化状態を規定するクロマチン構造変換因子、3) 多数の遺伝子群の発現を **post-transcriptional** レベルで一括して負に制御する **miRNA** の 3 者に注目する。そして疾患の原因となる遺伝子制御ネットワークの乱れの原因を解明し、それを制御する方法論を開発することによって感染症、がんを初めとしたヒト疾患の制圧をめざす。

Gene regulatory networks in a cell determine not only cellular specificity of development, differentiation, and growth activity but also cellular response or competency to virus, bacterial, and mycete. Whereas these expression patterns are regulated by many factors, this project, which has started in April 2016, concentrate on the following three factors; 1) transcriptional factors, which operate on the promoter region of their target genes, 2) chromatin remodeling factors that modulate epigenetical states of the genes, 3) miRNA, which suppresses expression of many genes at the post-transcriptional level to establish new therapeutic methods for human infectious diseases and cancer.

特任教授	伊庭 英夫	Professor	Hideo Iba
特任助教	原口 健	Research Assistant Professor	Takeshi Haraguchi
特任研究員	小林 和善	Research Fellow	Kazuyoshi Kobayashi
特任研究員	平松 寛明	Research Fellow	Hiroaki Hiramatsu
技術補佐員	桜井 典子	Research promotion Technician	Noriko Sakurai
技術補佐員	古田 杏望	Research promotion Technician	Anmi Furuta
技術補佐員	相川 尚美	Research promotion Technician	Naomi Aikawa

1. MiR-199a Inhibits Secondary Envelopment of Herpes Simplex Virus-1 through downregulation of Cdc42-specific GTPase activating protein localized in the Golgi apparatus

Kyousuke Kobayashi¹, Fumiko Suemasa¹, Hiroshi Sagara², Shinya Nakamura¹, Yasushi Ino³, Kazuyoshi Kobayashi^{1,6}, Hiroaki Hiramatsu^{1,6}, Takeshi Haraguchi^{1,6}, Kazuo Kurokawa⁵, Tomoki Todo³, Akihiko Nakano^{4,5}, and Hideo Iba^{1,6}

¹ Division of Host-Parasite Interaction, Department of

Microbiology and Immunology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, 108-8639, Japan

² Fine Morphological Analysis Group, Medical Proteomics Laboratory, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, 108-8639, Japan

³ Division of Innovative Cancer Therapy, Advanced Clinical Research Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, 108-8639, Japan

⁴ Laboratory of Developmental Cell Biology, Department of Biological Science, Graduate School of Science, University of Tokyo, Tokyo, 113-0033, Japan

⁵ Live Cell Super-Resolution Imaging Research Team, Extreme Photonics Research Group, RIKEN Center for Advanced Photonics, Saitama, 351-0198, Japan

⁶ Division of RNA Therapy, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, 260-8673, Japan

Because several studies have shown that exogenous miR-199a has antiviral effects against various viruses, including herpesviruses, we examined how miR-199a exerts its antiviral effects using epithelial tumour cell lines infected with herpes simplex virus-1 (HSV-1). We found that both miR-199a-5p and -3p inhibit secondary envelopment of HSV-1 by suppressing their common target, ARHGAP21, a Golgi-localized GTPase-activating protein for Cdc42, and, further, that the trans-cisternae of the Golgi apparatus is a potential membrane compartment for secondary envelopment. Exogenous expression of either pre-miR-199a or sh-ARHGAP21 exhibited shared phenotypes: alteration of Golgi function in uninfected cells, inhibition of HSV-1 secondary envelopment, and reduction of trans-Golgi proteins upon HSV-1 infection. A constitutively active form of Cdc42 also inhibited HSV-1 secondary envelopment. Endogenous levels of miR-199a in epithelial tumour cell lines were negatively correlated with the efficiency of HSV-1 secondary envelopment in them. These results suggest that miR-199a is a crucial regulator of Cdc42 activity on Golgi membranes, which is important for the maintenance of Golgi function, including that of retrograde COPI vesicles, and for the secondary envelopment of HSV-1 upon its infection.

2. The role of the SWI/SNF chromatin remodeling complex in maintaining the stemness of glioma initiating cells

Hiroaki Hiramatsu^{1,2}, Kazuyoshi Kobayashi^{1,2}, Kyouyusuke Kobayashi¹, Takeshi Haraguchi^{1,2}, Yasushi Ino³, Tomoki Todo³, and Hideo Iba^{1,2,4}

¹ Division of Host-Parasite Interaction, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan

² Division of RNA Therapy, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba 260-8673, Japan

³ Division of Innovative Cancer Therapy, and Department of Surgical Neuro-Oncology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan

Glioma initiating cells (GICs) are thought to contribute to therapeutic resistance and tumor recurrence in glioblastoma, a lethal primary brain tumor in adults. Although the stem-like properties of GICs, such as self-renewal and tumorigenicity, are epigenetically regulated, the role of a major chromatin remodeling complex in human, the SWI/SNF complex, remains unknown in these cells. We here demonstrate that the SWI/SNF core complex, that is associated with a unique corepressor complex through the d4-family proteins, DPF1 or DPF3a, plays essential roles in stemness maintenance in GICs. The serum-induced differentiation of GICs downregulated the endogenous expression of DPF1 and DPF3a, and the shRNA-mediated knockdown of each gene reduced both sphere-forming ability and tumor-forming activity in a mouse xenograft model. Rescue experiments revealed that DPF1 has dominant effects over DPF3a. Notably, whereas we have previously reported that d4-family members can function as adaptor proteins between the SWI/SNF complex and NF- κ B dimers, this does not significantly contribute to maintaining the stemness properties of GICs. Instead, these proteins were found to link a corepressor complex containing the nuclear receptor, TLX, and LSD1/RCOR2 with the SWI/SNF core complex. Collectively, our results indicate that DPF1 and DPF3a are potential therapeutic targets for glioblastoma.

3. Tumor suppression via inhibition of SWI/SNF complex-dependent NF- κ B activation

Kazuyoshi Kobayashi^{1,2†}, Hiroaki Hiramatsu^{1,2†}, Shinya Nakamura¹, Kyouyusuke Kobayashi¹, Takeshi Haraguchi^{1,2} and Hideo Iba^{1,2}

¹ Division of Host-Parasite Interaction, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan

² Division of RNA Therapy, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba 260-8673, Japan

†These authors contributed equally to this work.

The transcription factor NF- κ B is constitutively activated in many epithelial tumors but few NF- κ B inhibitors are suitable for cancer therapy because of its broad biological effects. We previously reported that the d4-family proteins (DPF1, DPF2, DPF3a/b) function as adaptor proteins linking NF- κ B with the SWI/SNF complex. Here, using epithelial tumor cell lines, A549 and HeLaS3, we demonstrate that exogenous expression of the highly-conserved N-terminal 84-amino acid region (designated “CT1”) of either DPF2 or DPF3a/b has stronger inhibitory effects on anchorage-independent growth than the single knockdown of any d4-family protein. This indicates that CT1 can function as an efficient dominant-negative mutant of the entire d4-family proteins. By in situ proximity ligation assay, CT1 was found to retain full adaptor function, indicating that the C-terminal region of d4-family proteins lacking in CT1 would include essential domains for SWI/SNF-dependent NF- κ B activation. Microarray analysis revealed that CT1 suppresses only a portion of the NF- κ B target genes, including representative SWI/SNF-dependent genes. Among these genes, IL6 was shown to strongly contribute to anchorage-

independent growth. Finally, exogenous CT1 expression efficiently suppressed tumor formation in a mouse xenograft model, suggesting that the d4-family proteins are promising cancer therapy targets.

Publication

- 1) Kobayashi, K*, Hiramatsu, H*, Nakamura, S., Kobayashi, K., Haraguchi, T. and Iba, H. (* equally contributed) Tumor suppression via inhibition of SWI/SNF complex-dependent NF- κ B activation. *Scientific Reports*, 7: 11772 (2017)
- 2) Kobayashi, K., Suemasa, F., Sagara, H., Nakamura, S., Ino, Y., Kobayashi, K., Hiramatsu, H., Haraguchi, T., Kurokawa, K., Todo, T., Nakano, A., and Iba, H. MiR-199a inhibits secondary envelopment of Herpes Simplex Virus-1 through the downregulation of Cdc42-specific GTPase activating protein localized in Golgi apparatus. *Scientific Reports*, 7: 6650 (2017)
- 3) Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Kobayashi, K., Haraguchi, T., Ino Y., Todo, T., and Iba, H. The role of the SWI/SNF chromatin remodeling complex in maintaining the stemness of glioma initiating cells. *Scientific Reports*, 7: 889 (2017)

高橋 P I (微生物創生) プロジェクト

Project for Systems Biology of Microorganisms

研究概要 (Summary)

我々はコンピュータ解析によって、次世代シーケンサーを含む様々な生物実験で得られる大量データからの新規生物学的知見の創出、並びに、数理モデルアプローチによる生命現象の解明に取り組んでいます。大量データによる生命の「構成要素の理解」、数理モデルによる「挙動の理解」という二つのコンセプトの下、病原真菌を含む微生物を対象に細胞機能の分子レベルでの理解を目指しています。

Our research areas are Bioinformatics and Systems Biology. 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
特 任 助 教	石原 潤一	Research Assistant Professor	Jun-ichi Ishihara
技 術 補 佐 員	守 涼子	Research Promotion Technician	Ryoko Mori
技 術 補 佐 員	八原あずさ	Research Promotion Technician	Azusa Yahara
技 術 補 佐 員	辺 彩	Research Promotion Technician	Cai Bian

1. Global gene expression reveals stress-responsive genes in *Aspergillus fumigatus* mycelia.

Hiroki Takahashi^{1,2}, Yoko Kusuya¹, Daisuke Hagiwara¹, Azusa Takahashi-Nakaguchi¹, Kanae Sakai¹, Tohru Gono¹

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

² Molecular Chirality Research Center, Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan

Background: *Aspergillus fumigatus* is a human fungal pathogen that causes aspergillosis in immunocompromised hosts. *A. fumigatus* is believed to be exposed to diverse environmental stresses in the host cells. The adaptation mechanisms are critical for infections in human bodies. Transcriptional networks in response to diverse environmental challenges remain to be elucidated. To gain insights into the adaptation to environmental stresses in *A. fumigatus* mycelia,

we conducted time series transcriptome analyses.

Results: With the aid of RNA-seq, we explored the global gene expression profiles of mycelia in *A. fumigatus* upon exposure to diverse environmental changes, including heat, superoxide, and osmotic stresses. From the perspective of global transcriptomes, transient responses to superoxide and osmotic stresses were observed while responses to heat stresses were gradual. We identified the stress-responsive genes for particular stresses, and the 266 genes whose expression levels drastically fluctuated upon exposure to all tested stresses. Among these, the 77 environmental stress response genes are conserved in *S. cerevisiae*, suggesting that these genes might be more general prerequisites for adaptation to environmental stresses. Finally, we revealed the strong correlations among expression profiles of genes related to 'rRNA processing'.

Conclusions: The time series transcriptome analysis revealed the stress-responsive genes underlying the adaptation mechanisms in *A. fumigatus* mycelia. These results will shed light on the regulatory networks underpinning the adaptation

of the filamentous fungi.

2. Transcription factor *Afmacl* controls copper import machinery in *Aspergillus fumigatus*.

Yoko Kusuya¹, Daisuke Hagiwara¹, Kanae Sakai¹, Takashi Yaguchi¹, Tohru Gono¹, Hiroki Takahashi^{1,2}

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

² Molecular Chirality Research Center, Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan

Copper (Cu) is an essential metal for all living organisms, although it is toxic in excess. Filamentous fungus must acquire copper from its environment for growth. Despite its essentiality for growth, the mechanisms that maintain copper homeostasis are not fully understood in filamentous fungus. To gain insights into copper homeostasis, we investigated the roles of a copper transcription factor *Afmacl* in the life-threatening fungus *Aspergillus fumigatus*, a homolog of the yeast *MAC1*. We observed that the *Afmacl* deletion mutant exhibited not only significantly slower growth, but also incomplete conidiation including a short chain of conidia and defective melanin. Moreover, the expressions of the copper transporters, *ctrA1*, *ctrA2*, and *ctrC*, and metalloreductases, *Afu8g01310* and *fre7*, were repressed in $\Delta Afmacl$ cells, while those expressions were induced under copper depletion conditions in wild-type. The expressions of *pksP* and *wetA*, which are, respectively, involved in biosynthesis of conidia-specific melanin and the late stage of conidiogenesis, were decreased in the $\Delta Afmacl$ strain under minimal media condition. Taken together, these results indicate that copper acquisition through *AfMacl* functions in growth as well as conidiation.

Publications

- 1) Rai M, Rai A, Kawano N, Yoshimatsu K, **Takahashi H**, Suzuki H, Kawahara N, Saito K, Yamazaki M. De novo RNA-sequencing and transcriptome analysis of *Aconitum carmichaelii* to analyze key genes involved in the biosynthesis of diterpene alkaloids. **Molecules**. 22 (12). pii: E2155. 2017
- 2) **Takahashi H**, Kusuya Y, Hagiwara D, Takahashi-Nakaguchi A, Sakai K, Gono T. Global gene expression reveals stress-responsive genes in *Aspergillus fumigatus* mycelia. **BMC Genomics**. 18(1):942. 2017
- 3) Nakamura S, Sato H, Tanaka R, **Kusuya Y**, **Takahashi H**, Yaguchi T. Ribosomal subunit protein typing using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the identification and discrimination of *Aspergillus* species. **BMC Microbiol**. 17(1): 100. 2017
- 4) **Kusuya Y**, Hagiwara D, Sakai K, Yaguchi T, Gono T, Takahashi H. Transcription factor *Afmacl* controls copper import machinery in *Aspergillus fumigatus*. **Curr Genet**. 63(4):777-789. 2017
- 5) Win NN, Nakamoto S, Kanda T, **Takahashi H**, Takahashi-Nakaguchi A, Yasui S, Nakamura M, Wu S, Imazeki F, Mikami S, Yokosuka O, Gono T, Shirasawa H. Discrepancy between Hepatitis C Virus Genotypes and NS4-Based Serotypes: Association with Their Subgenomic Sequences. **Int J Mol Sci** 18(1). pii: E172. 2017.
- 6) Rai A, Kamochi H, Suzuki H, Nakamura M, **Takahashi H**, Saito K, Yamazaki M. De novo transcriptome assembly and characterization of nine tissues of *Lonicera japonica* to identify potential candidate genes involved in chlorogenic acid, luteolosides, and secoiridoid biosynthesis pathways. **J Nat Med**. 71(1): 1-15. 2017

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. Ribosomal subunit protein typing using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the identification and discrimination of *Aspergillus* species.

Nakamura S¹, Sato H¹, Tanaka R², Kusuya Y², Takahashi H², Yaguchi T²

¹ Environmental Management Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan

² Medical Mycology Research Center, Chiba University, Japan

Accurate identification of *Aspergillus* species is a very important subject. Mass spectral fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is generally employed for the rapid identification of fungal isolates. However, the results are based on simple mass spectral pattern-matching, with no peak assignment and no taxonomic input. We propose here a ribosomal subunit protein (RSP) typing technique using MALDI-TOF MS for the identification and

discrimination of *Aspergillus* species. The results are concluded to be phylogenetic in that they reflect the molecular evolution of housekeeping RSPs. The amino acid sequences of RSPs of genome-sequenced strains of *Aspergillus* species were first verified and compared to compile a reliable biomarker list for the identification of *Aspergillus* species. In this process, we revealed that many amino acid sequences of RSPs (about 10-60%, depending on strain) registered in the public protein databases needed to be corrected or newly added. The verified RSPs were allocated to RSP types based on their mass. Peak assignments of RSPs of each sample strain as observed by MALDI-TOF MS were then performed to set RSP type profiles, which were then further processed by means of cluster analysis. The resulting phylogenetic tree based on RSP types show a relatively good concordance with the tree based on β -tubulin gene sequences. RSP typing was able to further discriminate the strains belonging to *Aspergillus* section *Fumigati*. The RSP typing method could be applied to identify *Aspergillus* species, even for species within section *Fumigati*. The discrimination power of RSP typing appears to be comparable to conventional β -tubulin gene analysis. This method would therefore be suitable for species identification and discrimination at the strain to species level. Because RSP

typing can characterize the strains within section *Fumigati*, this method has potential as a powerful and reliable tool in the field of clinical microbiology.

2. Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene.

Yamada T^{1,2}, Maeda M¹, Alshahni MM², Tanaka R³, Yaguchi T³, Bontems O⁴, Salamin K⁴, Fratti M⁴, Monod M⁴

¹ Teikyo University Institute of Medical Mycology, Tokyo, Japan

² General Medical Education and Research Center, Teikyo University, Tokyo, Japan

³ Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan

⁴ Service de Dermatologie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland

Terbinafine is one of the allylamine antifungal agents whose target is squalene epoxidase (SQLE). This agent has been extensively used in the therapy of dermatophyte infections. The incidence of patients with tinea pedis or unguium tolerant to terbinafine treatment prompted us to screen the terbinafine resistance of all *Trichophyton* clinical isolates from the laboratory of the Centre Hospitalier Universitaire Vaudois collected over a 3-year period and to identify their mechanism of resistance. Among 2,056 tested isolates, 17 (1%) showed reduced terbinafine susceptibility, and all of these were found to harbor SQLE gene alleles with different single point mutations, leading to single amino acid substitutions at one of four positions (Leu³⁹³, Phe³⁹⁷, Phe⁴¹⁵, and His⁴⁴⁰) of the SQLE protein. Point mutations leading to the corresponding amino acid substitutions were introduced into the endogenous SQLE gene of a terbinafine-sensitive *Arthroderma vanbreuseghemii* (formerly *Trichophyton mentagrophytes*) strain. All of the generated *A. vanbreuseghemii* transformants expressing mutated SQLE proteins exhibited obvious terbinafine-resistant phenotypes compared to the phenotypes of the parent strain and of transformants expressing wild-type SQLE proteins. Nearly identical phenotypes were also

observed in *A. vanbreuseghemii* transformants expressing mutant forms of *Trichophyton rubrum* SQLE proteins. Considering that the genome size of dermatophytes is about 22 Mb, the frequency of terbinafine-resistant clinical isolates was strikingly high. Increased exposure to antifungal drugs could favor the generation of resistant strains.

3. Taxonomic novelties in *Aspergillus* section *Fumigati*: *A. tasmanicus* sp. nov., induction of sexual state in *A. turcosus* and overview of related species.

Hubka V^{1,2,3}, Dudová Z¹, Kubátová A¹, Frisvad JC⁴, Yaguchi T⁵, Horie Y⁵, Jurjević Z⁶, Hong S-B⁷, Kolařík M^{1,2}

¹ Department of Botany, Faculty of Science, Charles University, Czech Republic

² Laboratory of Fungal Genetics and Metabolism, Institute of Microbiology AS CR, Czech Republic

³ First Faculty of Medicine, Charles University, Czech Republic

⁴ Department of Systems Biology, Center for Microbial Biotechnology, Technical University of Denmark, Denmark

⁵ Medical Mycology Research Center, Chiba University, Japan

⁶ EMSL Analytical, Inc., USA

⁷ Korean Agricultural Culture Collection, National Institute of Agricultural Science, Republic of Korea

The phylogenetic position of two *Aspergillus* strains isolated from Australian soil and phenotypically resembling *A. unilateralis* was investigated by using multigene phylogeny based on β -tubulin (*benA*), calmodulin (*CaM*), actin (*act*), and RNA polymerase II second largest subunit (*RPB2*) genes. The analysis supported their placement into a separate lineage within a well-supported clade containing 10 other members of section *Fumigati* ("*A. unilateralis* clade"). Comparisons of extrolite profiles, taxonomically informative morphological and physiological characters were made, and it was discovered that the two strains can be differentiated from all relatives by their low maximum growth temperature, short stipes, and ornamentation of conidia. The data justified the proposal of a new species, *A. tasmanicus*

sp. nov. Amplification of mating-type genes showed that the *A. unilateralis* clade contains five heterothallic species. Only the MAT1-1-1 idiomorph was detected among isolates of *A. unilateralis*, *A. tasmanicus*, and *A. marvanovae*, while isolates having both opposite mating types were detected in *A. turcosus* and *A. nishimurae*. The sexual state of *A. turcosus* was induced by mating experiments and is described in this study. Ascospores of this species were unique by their smooth to finely verrucose convex surface and two well-visible equatorial crests. Some exometabolites detected in *A. marvanovae* and *A. tasmanicus* are also indicative of a perfect state, thus supporting the hypothesis that these species have cryptic sexual cycles. The epitype and exepitype culture is designated for *A. nishimurae* to facilitate further taxonomic work with this species.

Publications

- 1) Arai S, Wakana D, Itabashi T, Takeda H, Yaguchi T, de Campos-Takaki GM, Hosoe T. New two pebrolide derivatives, 14-deacetoxy-1-deoxypebrolide and 7'-hydroxyasperphenamate isolated from *Penicillium* sp. IFM 62525. *Heterocycles*. 94 (2): 326-333, 2017.
- 2) Enoki E, Kimura M, Yaguchi T. Squamous cell carcinoma of the lung associated with non-invasive aspergillosis and localised and peripheral blood eosinophilia. *Cytopathology*. 28(4): 347-348, 2017.
- 3) Furuya M, Hasumi H, Baba M, Tanaka R, Iribe Y, Onishi T, Nagashima Y, Nakatani Y, Isono Y, Yao M: Establishment and characterization of BHD-F59RSVT, an immortalized cell line derived from a renal cell carcinoma in a patient with Birt-Hogg-Dubé Syndrome. *Lab Invest* 97(3): 343-351, 2017.
- 4) Hashimoto A, Hagiwara D, Watanabe A, Yahiro M, Yikelamu A, Yaguchi T, Kamei K. Drug sensitivity and resistance mechanism in *Aspergillus* section *Nigri* strains from Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 61(8): e02583-16, 2017.
- 5) Hotta F, Eguchi H, Nishimura K, Kogiso M, Ishimaru M, Kusaka S, Shimomura Y, Yaguchi T. A super-infection in the cornea caused by *Stemphylium*, *Acremonium*, and α -*Streptococcus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 16(1): 11, 2017.
- 6) Hubka V, Dudová Z, Kubátová A, Frisvad JC, Yaguchi T, Horie Y, Jurjević Z, Hong S-B, Kolařík M. Taxonomic novelties in *Aspergillus* section *Fumigati*, *A. tasmanicus* sp. nov., induction of sexual state in *A. turcosus* and overview of related species. *Plant Syst Evol*. 303: 787-806, 2017.
- 7) Imanishia Y, Tanaka R, Yaguchi T, Shimizu K. Capsule gene CAP64 is involved in the regulation of vacuole acidification in *Cryptococcus neoformans*. *Mycoscience* 58 (1): 45-52, 2017.
- 8) Kato I, Furuya M, Matsuo K, Kawabata Y, Tanaka R, Ohashi K: Giant cell tumours of bone treated with denosumab: Histologic, immunohistochemical, and H3F3A mutation analyses. *Histopathology*. 2017 Dec 5. doi: 10. 1111/his. 13448.
- 9) Kusuya Y, Hagiwara D, Sakai K, Yaguchi T, Gonoï T, Takahashi H. Transcription factor Afmacl controls copper import machinery in *Aspergillus fumigatus* has been accepted for publication. *Current Genetics*. 63(4): 777-789, 2017.
- 10) Motooka D, Fujimoto K, Tanaka R, Yaguchi T, Gotoh K, Maeda Y, Furuta Y, Kurakawa T, Goto N, Yasunaga T, Narazaki M, Kumanogoh A, Horii T, Iida T, Takeda K, Nakamura S. Fungal ITS1 deep-sequencing strategies to reconstruct the composition of a 26-species community and evaluation of the gut mycobiota of healthy Japanese individuals. *Front Microbiol*. 8: 238, 2017.
- 11) Muraosa Y, Oguchi M, Yahiro M, Watanabe A, Yaguchi T, Kamei K. Epidemiological study of *Fusarium* species causing invasive and superficial fusariosis in Japan. *Med Mycol J* 58E(1): E5-E13, 2017.
- 12) Nakamura S, Sato H, Tanaka R, Kusuya Y, Takahashi H, Yaguchi T. Ribosomal subunit protein typing using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the identification and discrimination of *Aspergillus* species. *BMC Microbiol*. 17: 100, 2017.
- 13) Noguchi H, Hiruma M, Matsumoto T, Yaguchi T, Sano A, Mitsui N, Ihn H. Subcutaneous cystic phaeohyphomycosis due to *Pleurostomophora richardsiae*. *J Dermatol*. 44(4): e62-e63, 2017.
- 14) Noguchi H, Hiruma M, Matsumoto T, Yaguchi T,

- Tashima H, Ihn H. Multiple subcutaneous *Candida abscesses* on the palm and finger in an immunocompetent patient. *J Dermatol.* 44(7): e176-e177, 2017.
- 15) Noguchi H, Hiruma M, Matsumoto T, Kano R, Tanaka M, Yaguchi T, Sonoda K, Ihn H. Fungal melanonychia. Ungual phaeohyphomycosis caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Acta Derm Venereol.* 97(6): 765-766, 2017.
- 16) Notarte KI, Nakao Y, Yaguchi T, Bungihan M, Suganuma K, Cruz TE. Trypanocidal activity, cytotoxicity and histone modifications induced by malformin A1 isolated from the marine-derived fungus *Aspergillus tubingensis* IFM 63452. *Mycosphere* 8(1): 111-120, 2017.
- 17) Takahashi-Nakaguchi A, Sakai K, Takahashi H, Hagiwara D, Toyotome T, Chibana H, Watanabe A, Yaguchi T, Yamaguchi M, Kamei K, Gono T. *Aspergillus fumigatus* adhesion factors in dormant conidia revealed through comparative phenotypic and transcriptomic analyses. *Cellular Microbiol.* DOI: 10. 1111/cmi. 12802, 2017.
- 18) Tetsuka N, Yaguchi Y, Machida H, Ito S, Miyairi I. Successful treatment of invasive pulmonary aspergillosis due to voriconazole-resistant *Aspergillus lentulus* with micafungin. *Pediatr Itn.* 59(3): 362-363, 2017.
- 19) Yamada T, Maeda M, Alshahni MM, Tanaka R, Yaguchi T, Bontems O, Salamin K, Fratti M, Monod M. Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 61 (7): e00115-17, 2017.

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生物資源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、2017年度より第4期が開始された。

第4期より病原細菌と病原真菌・原虫は別々に活動することとなり、NBRP病原真核微生物においては千葉大学真菌医学研究センター（病原真菌・放線菌、中核機関）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真核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 FY2017, the forth phase has started.

This project is carried out by Chiba University's Medical Mycology Research Center (pathogenic fungi/actinomycetes), and Nagasaki University's Institute of Tropical Medicine (pathogenic protozoa). 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.

Even if any infection develops, the project aims at the pathogenic microorganism collection to deal with it.

長崎大学熱帯医学研究拠点特定領域共同研究

「アフリカで発生している真菌症・放線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 Collections, and morphological, physiological and molecular biological analysis
of human pathogenic fungi and actinomycetes in Africa

長崎大学熱帯医学研究所ケニア拠点の助力を得て、ケニア国周辺の食糧のカビ毒汚染やヒト真菌症に関するプロジェクトを展開している。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、現地食物の多くが、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た。結果は、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た。また現地に滞在する米国医師らと協力し、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る。さらに環境中のアスペルギルス症原因菌種の抗真菌薬に対する耐性、耐性部位などの調査も始めた。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、許可を得るなど多くの問題を解決しなければ前進できない。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る。

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 were 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 *Cryptococcus* in HIV-infected patients was launched in collaboration with Kenya Medical Res. Institute (KEMRI) and doctors from UCSF, USA. Furthermore, we have examined the resistance properties against antifungals and resistance mechanism on the isolates causative aspergillosis in the environment.

高齢者・新生児アスペルギルス症制圧へ向けた 予防・診断・治療開発プロジェクト

The Project for Prophylaxis, Diagnosis, and Treatment for Aspergillosis and the Other Mycoses in Aged and Neonate Patients

内臓が真菌に冒される深在性真菌症は難治性でしばしば致命的である一方、医療の進歩により患者が増加するという一面もあるため、先進各国共通の深刻な問題となっている。深在性真菌症の中でも我が国で最も死亡者が多い疾患はアスペルギルス症であるが、その中でも特に高齢化や慢性閉塞性肺疾患（COPD）等の慢性肺疾患に好発する慢性肺アスペルギルス症が深刻さを増している。本プロジェクトではこれらの疾患の疫学、増悪因子、ヨーロッパを中心として急速に拡大している耐性（とくに主力薬剤であるアゾール薬に対する耐性）に関する研究、さらには我が国で手つかずとなっていた早産低出生体重児を主体とした新生児におけるさまざまな真菌症の疫学調査などを通じて、新規診断法、治療法、予防法の開発を行うことにより本疾患の制圧を目指している。

本年は、慶應大学呼吸器内科にくわえて同大感染制御部・感染制御センターにも参加いただき、当センターの真菌症リファレンスセンターを通じたネットワークも交えて共同研究を行った。その結果、アスペルギルスの耐性化率が0.9%から5.7%に増加していること、さらに薬剤の使用により耐性化は約20%に達することなどを初めて明らかにした。加えて同一患者から得られた菌を経時的に解析することにより、これまで知られていなかった耐性に関する新しい候補遺伝子を発見するなどの大きな成果を挙げることが出来た。現在、慶應大学の持つ膨大な菌株、血清などについて解析の準備を進めている。

一方、新生児領域における深在性真菌感染症に関する研究としては、日本新生児成育医学会・感染対策予防接種委員会の協力を得て、新生児を取扱う全国の医療機関309施設を対象に、国内ではじめてとなる深在性真菌感染症の発症状況調査ならびに予防方法の実態調査を行った。調査の結果、128施設から回答が得られ、深在性真菌症（疑い例を含む）は34症例の報告があり、原因菌はカンジダ属が27例と最も多く、また6例が死亡していた。また、早産低出生体重児などの真菌感染症に対してハイリスク

な新生児に対する抗真菌薬の予防投与は55施設で、また、ハイリスク新生児を出産する母体への抗真菌薬の予防投与は30施設で行われていた。これは日本における新生児深在性真菌症の実態を明らかにしたはじめての研究であり、新生児深在性真菌症の発症率は低いものの致死率が約20%の予後不良な感染症であることが明らかとなったことから、その診断・治療・予防法に関する指針を策定する必要があると考えられた。本調査結果は、*Medical Mycology* 誌に公表済である。この結果を基に、日本新生児成育医学会・感染対策予防接種委員会において、新生児深在性真菌感染症の前向き調査を実施すること、症例から分離された菌株の保存の徹底と真菌センターでの解析を行うことを提言した。

Development of new technologies in medicine, in a twist of irony, results in the increase of systemic mycoses, which are often intractable and fatal. Aspergillosis is the most serious deep-seated mycosis in Japan with high mortality rate. Aged individuals and COPD patients are particularly susceptible and tend to succumb to chronic pulmonary aspergillosis, the most common form of aspergillosis in Japan. This project aims to find seeds for the new diagnostic/therapeutic/preventive measures to counteract the plagues by clarifying the epidemiology, exacerbation factors, the status and mechanism of drug resistance. Investigation of various deep-seated mycoses among neonates, which have been unattended for a long time, is another important issue of the project.

We started out a collaborative study with the Department of Pulmonary Medicine and the Division of Infectious Diseases/Infection Control of Keio University along with the other domestic hospitals networked through the Mycoses Reference Center of MMRC. We found the rate of resistance of aspergilli causing chronic pulmonary aspergillosis in Japan has jumped up from 0.9% to 5.7%. In the patients with the history of using

azoles the resistance was much higher (ca.20%). Analyses of the fungi taken from a single patient suggested a totally new gene that is deeply involved in the azole resistance. Clinical samples collected and stored by Keiko University are now slated for examination in our Center.

For the study of deep-seated mycosis among neonates, we conducted a nationwide retrospective survey to determine numbers of invasive fungal infections (IFI) from January in 2014 to October in 2015. This is the first study on nationwide surveillance of neonatal IFI in Japan. Primary survey questionnaires were submitted to 309 medical facilities that regularly treat high-risk neonates. The questionnaire assessed IFI incidence during the study period, methods for preventing fungal infection in early delivery neonates, and methods for preventing mother-to-child fungal transmission. The secondary questionnaire was for facilities that had IFI cases and replied to the primary questionnaire. In total, 128 medical facilities

(41.4%) completed the primary questionnaire, 24/128 facilities recorded 34 IFI cases. Birth weight was < 1000 g in 25 patients. *Candida* species were the most common pathogens, and two patients had mucormycosis. The mortality rate was 20.6%. Regarding neonatal fungal prophylaxis, 55/128 facilities (43.0%) reported administering therapy. The most frequently used prophylactic drugs were fluconazole, then micafungin. Fungal prophylaxis for mothers who showed fungal colonization was performed in 30/128 facilities (23.4%). Oxiconazole vaginal tablets were most commonly used as prophylaxis for high-risk mothers. In Japan, the diagnosis, treatment, and prevention of neonatal IFI varied. Continuous surveillance and treatment regimen for neonatal IFI are required to improve outcomes in high-risk neonates. This study result was already published in *Medical Mycology*. We are planning prospective surveillance on neonatal IFI collaboration with the members of Japanese Society for Neonatal Health and Development.

AMED/JICA 地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS)

「薬剤耐性真菌検出のための新規検査法の開発とブラジルにおける疫学調査等への応用」

AMED/JICA Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development (SATREPS)

“Development of innovative diagnostic tools to detect drug-resistant fungi and their application to the epidemiological surveillance in Brazil”

SATREPS（感染症分野）とは、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）と独立行政法人国際協力機構（JICA）が共同で実施している、地球規模課題解決と将来的な社会実装に向けて日本と開発途上国の研究者が共同で研究を行う研究プログラムである。本課題は平成28年に採択された。

真菌感染症患者は世界的に急増している。なかでも薬剤耐性真菌による感染症は致死率が極めて高い。真菌が耐性を獲得するメカニズムについては十分に解明されていないが、農地に散布される農薬（抗真菌薬類似の成分を含む）の影響によるもの、慢性真菌感染症患者に対するアゾール系抗真菌薬の長期使用などが原因として考えられている。その一方、ブラジルでは薬剤耐性真菌の実態は十分解明されていない状況にある。本研究では、ブラジルのサンパウロ州立カンピーナス大学と連携し、カンピーナス首都圏における耐性真菌による感染症の実態を明らかにし、耐性真菌の検出法を開発することを通じ、ブラジルにおける難治性真菌感染症の治療戦略を構築するとともにブラジルにおけるカンピーナス大学を中心とした耐性真菌感染症研究拠点研究ネットワークの構築を目指す。平成29年度からプロジェクトが開始され、ブラジルにおいてはカンピーナス大学附属病院と複数の医療機関との研究ネットワーク作成が開始され、真菌症の症例集積、菌株収集の具体的な方法について協議されている。平成29年9月には研究代表者を含めた日本人研究者チームが参加し、カンピーナス大学においてキックオフミーティングが開催された。

SATREPS is a Japanese government program that promotes international joint research. The program is structured as a collaboration between the Japan Agency for Medical Research and Development (AMED) which provides competitive research funds for science and technology projects, and the Japan International Cooperation Agency (JICA) which provides development assistance (ODA). Based on the needs of developing countries, the program aims to address global issues and lead to research outcomes of practical benefit to both local and global society. Our proposal was selected in 2016.

The incidence of fungal infections is increasing worldwide. The fungi's drug resistance has strengthened along with the increased frequency and the mortality rate of the patients having contracted drug-resistant fungal infections is high. The mechanism how fungi gains drug resistance has not been clarified. For example, it could be through the exposure to pesticides containing ingredients similar to medical antifungal drugs in the fields (fungicides), or in the body of a patient with chronic fungal infection who has undergone a treatment using azole-based drugs for a long time. Moreover, there are few public data within Brazil that shows the frequency of identification regarding fungal strains that cause drug resistance. In these situation, we planned our poroject in collabrution with the State University of Campinas in Brazil (UNICAMP). Aims of our project are to clarify the epidemiology of drug-resistant fungi causing drug resistance in Campinas Metropolitan area, develop a new detection method for the drug resistant fungi and establish an optimum treatment system and research network regarding the drug-fungi centered in UNICAMP.

The project was started in 2017FY. The research network between UNICAMP and several medical institutes in Brazil has started to be built and expedient approach for amassing

clinical cases of fungal infection and collecting clinical fungal strains are discussing.



感染症研究革新イニシアティブ (J-PRIDE)

Japanese Initiative for Progress of Research on Infectious Disease for Global Epidemic

病原真菌 *Aspergillus fumigatus* によるアスペルギルス症は先進国を中心に増加傾向にある。既存の抗真菌薬の抗菌力は十分とは言えず極めて難治であるため、新規治療薬開発が求められている。我々はこれまでに、臨床分離株と次世代シーケンサー (NGS) 技術を活用して、*A. fumigatus* が感染中に薬剤耐性のみならず、高温耐性能を獲得するという環境適応進化ともいべき現象を明らかにしてきた。本プロジェクトでは、自然環境中での形質変化をモデル化することで病原性を規定する形質の同定を目指す。「どのような形質変化がどのような環境因子によって生み出されるか」を明らかにして、病原性と環境因子を繋げることを計画している。

Aspergillus fumigatus is a major cause of aspergillosis from allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA)

to invasive pulmonary aspergillosis (IPA), particularly in immunocompromised individuals. The efficacy of antifungal therapy is, however, incomplete, because of emergence of resistance strains worldwide. Besides, the molecular mechanisms of pathogenicity in *A. fumigatus* has yet to be fully elucidated. Of critical importance is further understanding of the mechanisms behind infections with *A. fumigatus*. In this project, we propose the elucidation of the quantitative effect of environmental conditions on adaptation of *A. fumigatus*. Toward this goal, we explore the statistical modelling framework to decipher the phenotypic heterogeneity of *A. fumigatus*. We utilize both clinical isolates and strains obtained by experimental evolution to derive and validate the model, where phenotypic heterogeneity can be explained by transcriptome data.

千葉大学グローバルプロミネント研究基幹・ リーディング研究育成プログラム

「超個体」の統合的理解に基づく次世代型「感染制御学」研究推進拠点

Leading Research Promotion Program, Institute for Global Prominent Research

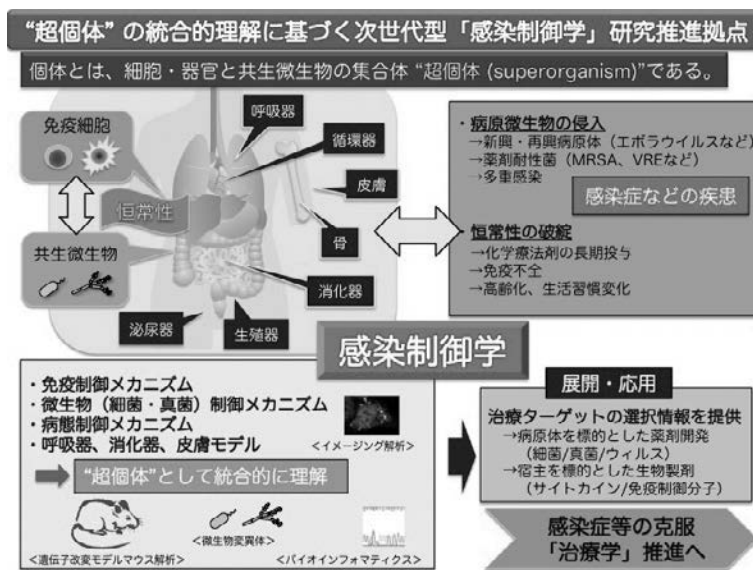
Advanced Research of Infection and Immunity Based on Integrative Understanding of Host-Microbe Interactions

千葉大学では、学内での研究の核となる新たな研究グループの創出を目指す「グローバルプロミネント研究基幹」を設置しており、当センターの教員が中心となった研究プロジェクトが、リーディング研究育成プログラムに採択され、活動を開始している。本プログラムでは、感染免疫分野及び微生物資源分野の教員が中心となり、医学研究院、薬学研究院、附属病院の研究者と連携して、共生微生物と宿主である個体の免疫システムとの相互作用、そこへ侵入する病原体による恒常性の破綻と感染症の発症機序などについての基礎研究を、皮膚、呼吸器、消化器など各種器官でのモデル実験系を用いて解析し、そこから得られる成果を統合的に理解することで、感染症・免疫制御の分子メカニズムを明らかにする次世代型の「感染制御学」を創出し、我々の健康維持と感染症などの克服へつながる新規イノベーション創生を目指している。

2017年には、研究基幹のサポートで、当センター内に無菌動物実験施設の設置を開始した。また、グループ内共同研究により複数の研究成果が発表された。

主な発表論文

- 1) Ito T, Hirose K, Saku A, Kono K, Takatori H, Tamachi T, Goto Y, Renauld JC, Kiyono H, Nakajima H: IL-22 induces Reg3 γ and inhibits allergic inflammation in house dust mite-induced asthma models. *J Exp Med*, 214, 3037-50, 2017.
- 2) Nakagawa S, Matsumoto M, Katayama Y, Oguma R, Wakabayashi S, Nygaard T, Saijo S, Inohara N, Otto M, Matsue H, Núñez G, Nakamura Y: Staphylococcus aureus Virulent PSM α Peptides Induce Keratinocyte Alarmin Release to Orchestrate IL-17-Dependent Skin Inflammation. *Cell Host Microbe*, 22: 667-677, 2017.



The research group composed of MMRC, School of Medicine, Faculty of Pharmaceutical Sciences and University Hospital has started to work as The Leading Research Promotion Program of Chiba University. In this program, members focus on understanding of molecular interactions between hosts and microbes, especially commensal fungi and bacteria, using the model assay system in skin, respiratory and digestive organs of mouse and human. Also, the members aim

to reveal the molecular machinery underlying disruption of the homeostatic balance by invasive pathogens and the pathogenesis of infectious diseases. The results obtained from this project will help to create innovative achievements in therapeutics of the infectious diseases and lead to improvement of human health. In 2017, several reports have been published by the collaborative researches in the research group.

平成28年度 共同利用・共同研究報告

2016 Fiscal Year Cooperative Research Program Report

研究課題 16-1

遺伝子サイレンシングと自然免疫反応のクロストーク機構の解析

程久美子

(東京大学大学院理学系研究科)

高橋朋子

(東京大学大学院理学系研究科)

米山光俊

(千葉大学真菌医学研究センター)

尾野本浩司

(千葉大学真菌医学研究センター)

Molecular interaction between gene silencing and innate immune response

Kumiko Ui-Tei

(Graduate School of Science, The University of Tokyo)

Tomoko Takahashi

(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

近年のトランスクリプトーム解析から、多くのタンパク質をコードしないノンコーディングRNAの存在が明らかになってきた。ノンコーディングRNAの中でもsmall interfering RNA (siRNA) やmicroRNA (miRNA) などの小分子二本鎖RNAは、RNAサイレンシングという塩基配列特異的な遺伝子抑制機構によって、広く多様な遺伝子機能を制御している。一方、ウイルスは、ほぼすべての生物に感染する病原体である。哺乳類細胞では、ウイルスなどの外来性RNAが侵入すると、米山らにより発見されたRIG-I like receptors (RLRs) と呼ばれるウイル

スセンサータンパク質が発現誘導される。RLRsはウイルスRNAを認識すると、インターフェロン誘導を伴う抗ウイルス反応を引き起こす。RLRsはRNAヘリカーゼタンパク質であり、RIG-I, MDA5, LGP2の3つが知られている。

RNAサイレンシングも抗ウイルス反応もともに二本鎖RNAによる機構であり、両経路はクロストークしている可能性が考えられる。我々は、特定の種類のウイルス感染により抗ウイルス反応が誘導されると、RNAサイレンシングにおける主要な因子であるTAR-RNA binding protein (TRBP) とLGP2が直接相互作用し、RNAサイレンシングを抑制することを見出し、現在、その詳細な分子機構を解析している。さらに、TRBPは限られたmiRNA群の機能を制御し、ゲノムワイドな遺伝子発現調節が起こると想定される。抗ウイルス反応は哺乳類に保存された機構であり、両経路のクロストーク機構を明らかにすることで、哺乳類特異的なウイルス感染に伴う生命現象の作用機序の解明に結びつくと期待できる。

なお、本研究成果の一部は、現在論文投稿中である。

学会発表

- 1) 高橋朋子, 中野悠子, 尾野本浩司, 小森千晶, 米山光俊, 程久美子
ヒト細胞における, RNAサイレンシングと抗ウイルス反応のクロストーク
Crosstalk mechanism between RNA silencing and antiviral response in human cells
第39回日本分子生物学会年会 (2016.11.30) 横浜
(優秀ポスター賞受賞)
- 2) Takahashi T., Nakano Y., Onomoto K., Komori C., Yoneyama M., Ui-Tei K
Mutual regulation between RNA silencing and anti-virus defense system.
Cell Symposia Functional RNAs (2016.11.7-8) Langham Place Hotel, Guangzhou, China

研究課題 '16-2

Dectin-1シグナル伝達系を標的にした新規難治性疼痛制御法の開発

栗原 崇

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科生体情報薬理学分野)

西城 忍・米山光俊

(千葉大学真菌医学研究センター)

Development of a new treating strategy for intractable pain by controlling dectin-1 signaling pathway

Takashi Kurihara

(Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University)

Shinobu Saijyo, Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

C型レクチン受容体ファミリーに属するdectin-1は、自然免疫受容体として真菌感染等の防御に重要な役割を担っているが、慢性炎症や神経障害に伴う疼痛など、難治性疼痛発症との関連を検討した報告はなされていない。

申請者らはまず、dectin-1遺伝子欠損マウスを用い、後肢の機械的刺激に対する逃避閾値を測定したところ、野生型に比べ雌雄ともに有意な閾値低下(過敏行動)を示した。さらに、完全フロインドアジュバンド後肢皮下投与(遷延性炎症性疼痛モデル)、あるいは第4/第5脊髄神経結紮手術(末梢神経障害性疼痛モデル)を適用することで後肢の機械的刺激に対する逃避閾値に与える影響を検討したところ、野生型に比べ欠損マウスにおいては、両モデルとも逃避閾値のさらなる低下が誘発された。

そこでdectin-1作動薬として使用されるzymosan depleted (10~100 µg/ml)をアジュバント後肢皮下投与後72時間目、および末梢神経障害後5週間目に(共に野生型マウスに対して)、処置側後肢に皮下投与すると、有意な機械的閾値の上昇(すなわち、鎮痛効果)が観察された。しかし、zymosan depleted (100 µg/ml)を野生型正常マウスに同様に皮下投与しても、有意な機械的閾値の上昇は観察され

なかった。

以上の結果から、dectin-1は末梢感覚神経終末において皮膚感覚(機械)受容調節、すなわち、dectin-1刺激は機械的感覚を鈍麻させる方向に調節することが示唆された。

研究課題 '16-3

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

(京都大学ウイルス・再生医学研究所)

加藤博己

(京都大学ウイルス・再生医学研究所)

米山光俊

(千葉大学真菌医学研究センター)

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

本共同研究では、高等脊椎動物における抗ウイルス自然免疫において重要な役割を担うウイルス感染センサーであるRIG-I-like受容体(RLR)に着目し、それらによるウイルスRNA検知の分子機構と生理機能について継続して解析を行っている。特に近年は、細胞内ストレス顆粒(SG)の形成を介したRLR活性化の分子機構について解析しており、これまでにPumilioの機能解析など複数の報告を行ってきた(PLoS Pathogens, 2016, 2014; Curr Opin Immunol, 2015)。本年度は、SGに局在する新たなRNA結合タンパク質(RBP)の同定とそれについての機能解析を実施した。その結果、この新規RBPは、ウイ

ルス感染に応答してSGに局在すること、遺伝子破壊細胞においてRNAウイルス感染に応答したI型インターフェロン (IFN) 遺伝子誘導などの抗ウイルス応答が顕著に減弱していたこと、さらに強制発現した細胞ではI型IFN遺伝子の発現誘導が増強していたことなどから、この分子がSG局在を介して抗ウイルス自然免疫誘導を正に制御する因子であることが強く示唆された。さらにこの分子は、ウイルス非感染細胞でRLRの一つであるLGP2と構成的に会合していることを見出した。これまでにLGP2は抗ウイルスシグナル活性化をウイルス種の違いで正あるいは負の制御因子として機能することは報告されているものの、その分子メカニズムはほとんど明らかになっておらず、本研究から得られた知見は、新たなウイルス検知制御機構の一端を示唆している可能性がある。今後、この分子のノックアウトマウスの解析を通じて生理的な機能解析へとつなげる計画である。

学会発表

- 1) Narita R, Takahashi K, Murakami E, Hirano E, Yamamoto SP, Yoneyama M, Kato H, Fujita T. A novel function of human pumilio proteins innate immune responses. International Congress of Immunology, Aug. 21-26, 2016, Melbourne, Australia.

研究課題 '16-4

IL-17により制御される好中球依存性 *Candida albicans* 感染防御機構の解明

若林正一郎・岩澤真里・松岡悠美
(千葉大学大学院医学研究院皮膚科学)
西城 忍
(千葉大学真菌医学研究センター)

Analysis of neutrophil-dependent protective mechanisms of *Candida albicans* regulated by IL-17.

Seiichiro Wakabayashi, Mari Iwasawa, Yuumi Nakamura
(Dermatology, Chiba University)
Shinobu Saijo
(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

ヒトの皮膚における感染防御機構においてTh17細胞が重要な役割を持つことが慢性皮膚粘膜カンジダ症などによって示されている。 *Il17af*^{-/-}マウスに *Candida albicans* を感染させると、野生型マウスと比較して感染の感受性が亢進することや、宿主の抗原提示細胞上に存在するDectin-1, Dectin-2が真菌細胞壁成分を認識することでTh17細胞の分化に必要なサイトカインを誘導することから、Th17型免疫応答が真菌感染防御に強く関わっていることが示唆されている。これまでに我々は野生型マウス、 *Il17af*^{-/-}マウスそれぞれの骨髄から分離した好中球と *C. albicans* の菌糸を共培養し、貪食・排除する機能に差があることを発見した。この結果に着目し、RNAシーケンスに基づいた遺伝子解析や、Live imagingによる *C. albicans* に対する好中球の反応について解析・検討を行った。

野生型マウス、 *Il17af*^{-/-}マウスの骨髄から分離した好中球についてRNAシーケンスを行い、両者間のmRNA発現を比較したが、明らかな有意差は見られなかった。好中球の認識機構 (*Dectin-1, 2*) や殺菌能 (*S100a7, 8, 9*) に関わる遺伝子の発現についてqPCRを用いて確認したが、やはり有意差は見られなかった。最後にそれぞれのマウスの好中球を *C. albicans* の酵母、菌糸と共培養しLive

imagingで解析した。どちらのマウスの好中球も酵母に対しては反応しなかったが、野生型マウスの好中球は菌糸に対して遊走、貪食し、菌糸の伸長を抑制した。対して *Il17af*^{-/-}マウスの好中球では遊走、貪食ができず、菌糸の伸長を抑制できなかったが、リコンビナントIL-17を添加することで野生型とほぼ同等の能力を獲得したことから、IL-17による直接制御であることが示唆された。今後、両マウスの好中球の蛋白発現レベルでの解析を予定している。

学会発表

- 1) 岩澤真理 IL-17による皮膚カンジダ排除機構
第60回日本医真菌学会総会・学術集会 シンポジウム12真菌感染防御と糖鎖認識(招待講演) 2017年10月2日東京都立産業貿易センター(東京)

研究課題 '16-5

真菌成分認識に関わる新たな自然免疫受容体の解析

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

(千葉大学真菌医学研究センター)

Studies on innate immune responses to the fungal cell wall component

Taro Kawai

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

Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

植物のキチン受容体の一つであるCERK1受容体のキチン認識モチーフであるLysine motif (LysM) と相同性を示すヒト及びマウスの蛋白質をデータベース検索から6種類見つけ出した。これらの中にはキチンに対する自然免疫応答を制御するものが含まれる可能性があることから、遺伝子欠損マウスの樹立を行うことを目的の一つ

として、本年度CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集により、2種類について作製に成功した。現在キチン投与後の自然免疫応答について、肺胞洗浄液中の免疫細胞集積や炎症関連遺伝子の発現を中心に解析を行っている段階である。また、これら6種類の蛋白質については発現ベクターを構築し、HEK293細胞内へと過剰発現し、NF- κ BやIRFファミリーの活性化誘導をレポーターアッセイにより検討したが、有為な上昇は認められなかった。今後、リガンド刺激後の活性化に影響を与えるか検討が必要である。さらに、キチン粒子とこれら遺伝子を発現する細胞の可溶化物を混合し、キチンとこれらファミリー分子との結合を検討したところ、3つの分子についてLysMドメイン依存的なキチンとの結合を認めた。今後、これら3つを中心に、遺伝子欠損マウスを用いてさらに解析を継続していく。

関連論文

- 1) Kawasaki T, Ito K, Miyata H, Akira S, Kawai T. Deletion of PIKfyve alters alveolar macrophage populations and exacerbates allergic inflammation in mice. *EMBO J.* 2017 May 22. pii: e201695528. doi: 10.15252/embj.201695528.
- 2) Ori D, Murase M, Kawai T. Cytosolic nucleic acid sensors and innate immune regulation. *Int Rev Immunol.* 2017 Mar 4; 36(2): 74-88.
- 3) Kitai Y, Kawasaki T, Sueyoshi T, Kobiyama K, Ishii KJ, Zou J, Akira S, Matsuda T, Kawai T. DNA-containing exosomes derived from cancer cells treated with Topotecan activate a STING-dependent pathway and reinforce antitumor immunity. *J Immunol.* 2017 Feb 15; 198(4): 1649-1659.

研究課題 '16-6

ショウジョウバエを用いた真菌病原性発現機構と宿主自然免疫応答の解析

倉田祥一郎

(東北大学大学院薬学研究科)

知花博治・高橋 梓

(千葉大学真菌医学研究センター)

Analysis of fungal virulence mechanism and host innate immune responses using *Drosophila*

Shoichiro Kurata

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences)

Hiroji Chibana, Azusa Takahashi-Nakaguchi

(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、5,150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ゲノムワイドに探索できる。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、生活環が短く網羅的に解析に優れている。そこで、本研究では、センターの有する真菌のリソースを利用した、ショウジョウバエでの解析から病原真菌の病原性発現機構の解明と新たな抗真菌薬の標的に迫ることとした。

そのために、平成26年度に確立したショウジョウバエ網羅的感染実験系を用いて（採択番号14-11）、平成27年度に通常の培養条件では生育に必須ではない遺伝子を欠損した変異体2,026系統を解析し、病原性が低下した系統を57系統同定した（採択番号15-13）。今年度は、これらの病原性が低下した系統の宿主体内での増殖を調べた。宿主体内での増殖能が低下していた11系統では、二つのアデニン合成酵素とそれらの遺伝子発現を制御する転写因子、二つの葉酸合成酵素、ウラシル合成酵素、チロシン合成酵素、二つのミトコンドリア関連タンパク質、

SNAREタンパク質、ヒストン結合タンパク質が欠損していた。葉酸合成経路は、抗真菌作用を示すサルファ剤の作用点として知られている。したがって、ショウジョウバエでの網羅的感染実験系を用いて同定した宿主体内での増殖能が低下する系統を調べることで、新たな抗真菌剤の標的が同定できる可能性を指摘できた。

学会発表

- 1) 知花博治, 高橋(中口)梓, 佐藤(岡本)美智代, 渡辺 亮, 倉石貴透, 倉田祥一郎, 宇野 潤: *Candida glabrata*の体系的全遺伝子組換えを用いた病原性と抗真菌薬の研究. 東京, 2016年10月

研究課題 '16-7

*Candida glabrata*細胞壁構築関連遺伝子欠損が菌体の性質に及ぼす影響

柴田信之・佐々木雅人・伊藤文恵・田中 大

(東北医科薬科大学)

知花博治・山口正規・川本 進

(千葉大学真菌医学研究センター)

Analysis of the mutant set involving the cell wall integrity of *Candida glabrata*

Nobuyuki Shibata, Masato Sasaki, Fumie Ito,

Yutaka Tanaka

(Tohoku Medical and Pharmaceutical University)

Hiroji Chibana, Masaki Yamaguchi, Susumu

Kawamoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

病原性酵母 *Candida glabrata* の細胞壁は、複数種の多糖から成る多層構造を形成しており、それぞれヒト病原性あるいは薬剤ストレス抵抗性に関わる分子である。近年、*C. glabrata* において、環境ストレス応答をきっかけに生じる細胞壁のヘテロ再構築が、既存の抗真菌薬耐性や致死的な環境ストレスに対して有利に働くことが相次いで報告された。このことは、細胞壁構造最適化 (Cell Wall Integrity: CWI) の仕組みと病原性・抗真菌薬耐性との

あいだに密接な関わりがあることを示唆している。今回我々は、*C. glabrata* CBS 138株の全遺伝子について作製した変異株ライブラリを用いて、特に①小胞体-ゴルジ体局在型糖転移酵素をコードする遺伝子、②糖タンパク質の品質管理に関わるシャペロン群あるいはストレス耐性遺伝子の欠損株を中心に、細胞壁糖鎖構造構築と環境ストレス応答能、およびCWIに及ぼす影響を解析した。

*KRE5*および*CNE1*は小胞体局在するタンパク質であるkre5pおよびcne1pをそれぞれコードしており、糖タンパク質品質管理を担うカルネキシンシャペロンサイクルを形成している。*KRE5*遺伝子の発現抑制株、および*CNE1*遺伝子欠損株の細胞壁を解析した結果、いずれの株においても、 β 1-6グルカン含量の減少と、細胞壁キチン含量の増加が認められた。このとき、小胞体ストレスマーカーである*KAR2*や*BAG7*のmRNA転写活性化も同時に認められた。興味深いことに、カルシニューリン阻害剤FK-506で処理したところ、これら変異株における細胞壁キチン含量はさらに増大し、かつCWIを司るMAPキナーゼであるSlt2pのリン酸化が極端に亢進することがわかった。加えて、各変異株は野生株に比べて（生育は遅いものの）細胞死はほとんど見られなかったのに対し、FK-506を処理した変異株は細胞周期の停止および細胞死と異形細胞凝集像が観察された。以上のことから、①*KRE5*や*CNE1*の変異によりCWIが誘導されるとともに小胞体ストレスが惹起されること、②カルシニューリン経路を介した小胞体ストレス応答を阻害することで、深刻な細胞壁ダメージと細胞死をもたらすことが明らかになった。これらのことは、カルシニューリン経路を介した小胞体ストレス応答が、CWI誘導を調節する因子として機能している可能性を示唆している。現在、小胞体糖タンパク質品質管理に関わる他の遺伝子、あるいはゴルジ体や分泌経路に関わる遺伝子の欠損株についても同様に解析を実施しており、小胞体ストレス応答とCWIとの関連をより詳細に調べていく予定である。

発表論文

- 1) Yutaka Tanaka, Masato Sasaki, Fumie Ito, Toshio Aoyama, Michiyo Sato-Okamoto, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Hiroji Chibana, Nobuyuki Shibata: KRE5 Suppression Induces Cell Wall Stress and Alternative ER Stress Response Required for Maintaining Cell Wall Integrity in *Candida glabrata*, *PLOS ONE*, pone. 0161371

- 2) Yutaka Tanaka, Masato Sasaki, Fumie Ito, Toshio Aoyama, Michiyo Sato-Okamoto, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Hiroji Chibana, Nobuyuki Shibata: Cooperation between ER stress and calcineurin signaling requires maintaining the cell wall integrity in *Candida glabrata*, *Fungal Biology* (Under review)
- 3) Fumie Itoh, Shizuka Takahashi, Yutaka Tanaka, Atsushi Kudoh, Masato Sasaki, Michiyo Okamoto, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Masashi Yamaguchi, Kazuyoshi Kawakami, Hiroji Chibana and Nobuyuki Shibata: Glycosyltransferase Alg6 is required for cell wall integrity and virulence of *Candida glabrata*, *FEBS Journal* (Under review)

学会発表

- 1) 伊藤文恵, 田中 大, 佐々木雅人, 工藤 敦, 高橋 梓, 山口正規, 知花博治, 柴田信之, *Candida glabrata* 糖鎖合成酵素関連遺伝子欠損株alg6 Δ の性質, 日本医真菌学会, 東京, 2016年10月
- 2) 伊藤文恵, 高橋静香, 田中 大, 工藤 敦, 佐々木雅人, 岡本美智代, 高橋 梓, 山口正規, 山本秀輝, 丹野大樹, 横山 隣, 川上和義, 知花博治, 柴田信之, *Candida glabrata* 細胞壁糖鎖合成酵素遺伝子欠損株alg6 Δ 及びmnn2 Δ の性質, 日本薬学会, 仙台, 2017年3月

薬剤標的開発を目指したパン酵母とカンジダ・グラブラータの生育必須遺伝子多様性解析

Aiming drug targets development, analysis of gene diversity for growth essential between the baker's yeast and the *Candida glabrata*

Erwin Lamping

(Sir John Walsh Research Institute, University of Otago, New Zealand)

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

実験モデル生物のパン酵母では、遺伝学的解析により生育に必須な遺伝子が約1,200同定されており、抗真菌薬の標的開発の際に極めて重要な情報源となっているが、真菌医学研究センターの知花らがカンジダ・グラブラータの相同遺伝子について解析を行ったところ、パン酵母では生育に必須でありながら、カンジダ・グラブラータでは必須ではない、またその逆のケースがそれぞれ約200遺伝子存在することが示唆された。パン酵母とカンジダ・グラブラータにおける生育必須遺伝子の多様化について、遺伝子重複の相違について比較したところ、約3割の遺伝子について遺伝子重複の相違点が示された。残る7割の遺伝子の多様性の原因については、現在検討中である。今後、カンジダ・グラブラータにおける生育必須遺伝子情報が加味されることによって効率的な抗真菌薬標的開発を進めていくことが期待できる。

学会発表

- 1) 知花博治：カンジダ・グラブラータの体系的且つ網羅的遺伝子組換え体コレクションを用いた病原性研究と抗真菌薬の開発，日本微生物資源学会第23回大会，千葉市千葉大学けやき会館。2016. 招待講演

Antifungal drug resistance in *Candida glabrata* from transcriptional control to drug extrusion: aiming improved diagnosis and therapeutics

Miguel C Teixeira

(Institute for Bioengineering and Biosciences, Instituto Superior Técnico/Bioengineering Department)

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

深在性真菌症適応薬の一つである5-FC (5-flucytosine) は、他の抗真菌薬と比較し耐性株の出現率が高いが、その耐性化機序については、明らかにされていない。今回、病原真菌カンジダ・グラブラータに対して5-FCに暴露によるiTRAQ (タンパク質の網羅的解析) のアプローチを使用した細胞膜プロテオーム解析を実施した。その結果、細胞壁構成成分、脂質代謝、アミノ酸とヌクレオチド代謝、リボゾーム成分、ミトコンドリア機能、糖代謝、薬剤排出など、合計32のタンパク質に顕著な発現量の変化が確認された。これらのタンパク質の中から特に薬剤耐性との関連が示唆されたプロトンアンチポーターCgFlr1並びにCgFlr2に着目した。これら遺伝子の欠損株では、5-FCの細胞内蓄積が増加していることが示された。このことから、CgFlr1並びにCgFlr2は5-FCを細胞外へ排出する機能を有していると考えられた。したがって、プロトンアンチポーターCgFlr1並びにCgFlr2の活性を阻害する薬剤の開発によって、5-FCの薬効を増強もしくは耐性菌の出現を抑制することが期待できる。

発表論文

- 1) Pais P, Pires C, Costa C, Okamoto M, Chibana H, Teixeira MC. Membrane proteomics analysis of the *Candida glabrata* response to 5-flucytosine: unveiling the role and regulation of the drug efflux transporters CgFlr1 and CgFlr2. *Frontiers in Microbiology*. 21;7:2045. 2016. 12.

研究課題 '16-10

千葉大学が保有するオリジナル化合物ライブラリーを用いた抗真菌薬シーズの開発

荒井孝義

(千葉大学大学院理学研究科)

知花博治・宇野 潤・高橋 梓

(千葉大学真菌医学研究センター)

Development of the antifungal seeds from the original compound library in Chiba University

Takayoshi Arai

(Graduate School of Science, Chiba University)

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Jun Uno

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Azusa Takahashi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

当研究室が保有する1,000種類のオリジナル合成化合物のうち、平成26年度は450種類、平成27年度は、残る550種類の化合物について *Candida glabrata* を用いて生育阻害活性物質の一次スクリーニングを終了した。その結果、6種類の化合物について *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* 等の主要な病原真菌に対して生育阻害活性が確認された。次にこれらの化合物について、マウスの培養細胞を用いて呼吸阻害活性を指標とした細胞毒性を測定したところ、5種類の化合物に細胞毒性が確認されず、抗真菌薬「シーズ候補」とした。これらの実績に基づき、製薬企業との共同研究を開始することができた。さらに、AMEDの創薬総合支援事業「創薬ブースター」に申請中である。平成29年度はこれまでと同様に、シーズ候補のスクリーニングを進めると共に、化合物の作用機序の解明に取り組んで行くことにした。

学会発表

- 1) 知花博治：カンジダ・グラブラータの体系的且つ網羅的遺伝子組換え体コレクションを用いた病原性研究

と抗真菌薬の開発、日本微生物資源学会第23回大会、千葉市千葉大学けやき会館。2016. 招待講演

研究課題 '16-11

病原真菌における一酸化窒素の合成制御機構と生理機能の解明

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)

知花博治・高橋 梓・宇野 潤・川本 進

(千葉大学真菌医学研究センター)

Analysis of synthetic regulatory mechanism and physiological function of nitric oxide in pathogenic fungus

Hiroshi Takagi

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

Hiroji Chibana, Azusa Takahashi, Jun Uno, Susumu Kawamoto

(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。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。また、Tah18と複合体を形成する Dre2 タンパク質が酸化ストレスセンサーとして働き、Tah18 依存的な NO 合成を制御する機構を提唱した。一方、病原真菌はヒトに感染する際、温度・低酸素などのストレスに応答して耐性を獲得し、病原性を示すことから、NO がストレス耐性や病原性に関与する可能性がある。

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 と増殖・感染・病原性との関連性を解析する。平成28年度には、以下の研究成果が得られた。

1) *C. glabrata*: カイコ幼虫のテトラサイクリン転写抑制系を用いて、NO代謝との関連が予想される *S. cerevisiae* の遺伝子 (*DRE2*, *YHB1*, *SFA1*, *NCP1*, *MET10*, *CYT1*, *COX9*, *YNO1*, *RIB1*など) のオルソログ遺伝子についてカイコ感染実験を行った。その結果、生育に必須とされる遺伝子については、転写を抑制すると感染性が低下していたことから、NO代謝(合成・分解など)との関連性が明確な遺伝子は見出せなかった。

2) *C. neoformans*: アルギニン代謝系に着目し、各酵素(Mpr1, Arg7, Car1, Car2など)のオルソログ遺伝子の破壊株を用い、NO産生量、アルギニン含量、各種ストレスに対する表現型などの解析を試みている。

3) *A. fumigatus*: NOドナー(SNAP)を添加した際のトランスクリプトーム解析をRNA-seqによって行った。その結果、*S. cerevisiae*で見出された銅代謝(銅イオンの還元、取込みなど)や酸化ストレス応答に関与する遺伝子の発現には影響がなかったが、オルニチンから合成されるシデロフォア(鉄キレート物質)の合成系遺伝子の発現が低下していた。一方で、NOにより *A. fumigatus* の病原性に関与する二次代謝が活性化される可能性が示された(糸状菌では報告例なし)。

発表論文以外の特筆すべき成果

高木らは、これまでに発芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) および分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) で得られた研究成果を中心に、下記の総説を執筆した。今後、病原真菌におけるNOの生理的役割を解析する上で有益な情報となる。

1) Rika Indri Astuti*, Ryo Nasuno*, Hiroshi Takagi: Nitric oxide signaling in yeast.

*These authors contributed equally to this work. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 100, 9483-9497 (2016).

2) 高木博史: 酵母における一酸化窒素の分子機能と応用. *バイオサイエンスとインダストリー*, 75, 214-218 (2017).

3) 那須野亮, 吉川雄樹, 高木博史: 酵母に見出した一酸化窒素(NO)の合成制御機構と生理機能. *化学と生物*, 印刷中.

研究費の取得

基盤研究(A), H27-29. 真菌における一酸化窒素の合成制御機構と生理機能の解明

研究代表者: 高木博史

研究分担者: 渡辺大輔, 那須野亮, 知花博治, 川本 進, 萩原大祐.

研究課題 '16-12

Aspergillus fumigatus の病原性におけるガラクトフラノース糖鎖の機能解析

岡 拓二

(崇城大学・応用微生物工学科)

田中 大・柴田信之

(東北薬科大学・感染生体防御学研究室)

亀井克彦・渡辺 哲・萩原大祐

(千葉大学真菌医学研究センター)

Functional analysis of galactofuranose-containing oligosaccharides in the pathogenicity of *Aspergillus fumigatus*

Takuji Oka

(Department of Applied Microbial Technology, Sojo University)

Yutaka Tanaka, Nobuyuki Shibata

(Department of Infection and Host Defense, Tohoku Medical and Pharmaceutical University)

Katsuhiko Kamei, Akira Watanabe, Daisuke

Hagiwara

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* 由来の GfsA に関する機能解析を進め、本酵素が β 1,5-ガラクトフラノース (Gal_f) 転移酵素であることを示す確固たる証拠を得た。pNP- β - Gal_f と大腸菌を用いて発現および精製した組換え GfsA を UDP- Gal_f とともに反応させることで新規に合成された化合物 A を精製し、LC-MS, $^1\text{H-NMR}$ およびメチル化分析に供した。その結果、化合物 A の構造は $\text{Gal}_f\beta$ 1,5 Gal_f - β -pNP であった。以上より、GfsA は、UDP- Gal_f : β 1,5-ガラクトフラノース転移酵素であることが明らかになった。一方で、*gfsA* 破壊株より抽出した真菌型ガラクトマンナンの構造を $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ およびメ

チル化分析によって解析したところ, *gfsA*破壊株では, 真菌型ガラクトマンナン中のGal₇β1,5-Gal₇結合が顕著に減少していることが示された. これは, GfsAが真菌型ガラクトマンナン中のGal₇β1,5-Gal₇結合の生合成を担っていることを示す初めての証拠となった. さらに, パラログであるGfsCの解析についても進めた結果, GfsAとGfsCの二重破壊株では真菌型ガラクトマンナン中のGal₇β1,5-Gal₇結合が全て消失することを明らかにした. すなわち, GfsAとGfsCが協調的にはたらくことで*A. fumigatus*内のGal₇β1,5-Gal₇結合を生合成していることを明らかにすることができた. さらに, *gfsC*破壊株, *gfsAC*破壊株についてマウスを用いた病原性試験を実施した. その結果, *gfsC*破壊株や*gfsAC*破壊株の病原性は親株と比較して有意に差は認められなかった.

発表論文

- 1) Katafuchi Y, Li Q, Tanaka Y, Shinozuka S, Kawamitsu Y, Izumi M, Ekino K, Mizuki K, Takegawa K, Shibata N, Goto M, Nomura Y, Ohta K, Oka T: GfsA is a β1,5-galactofuranosyltransferase involved in the biosynthesis of the galactofuran side chain of fungal-type galactomannan in *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology* 27: 568-581, 2017

研究課題'16-13

アスペルギルス症原因菌が産生する環状ペプチドの宿主免疫応答反応への影響

梅村舞子

(産業技術総合研究所)

亀井克彦・渡辺 哲・萩原大祐

(千葉大学真菌医学研究センター)

Effect of cyclic peptides produced by pathogenic *Aspergillus* species on host immune response

Maiko Umemura

(National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

Katsuhiko Kamei, Akira Watanabe, Daisuke

Hagiwara

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

アスペルギルス症の原因菌である糸状菌 *Aspergillus flavus* において, 近年, 強い微小管重合阻害活性を有する環状ペプチド *ustiloxin* の産生が申請者らによって見出された. 微小管重合は宿主のインフラマソーム形成に必須なため, 本化合物が宿主の正常な免疫反応を抑制する可能性が高い. そこで本研究では, *ustiloxin* と同種の経路 (*ust-RiPS* 経路) で生合成される環状ペプチドが本菌の新規病原因子として機能するかを, 当該経路遺伝子破壊株を用いた動物細胞感染実験等から検証した.

Aspergillus fumigatus Af293 株は, *ust-RiPS* 経路における前駆体ペプチドと考えられる遺伝子を2つ保有する (*rps1a* および *rps2a* と呼称). 前実験では, これら2つの遺伝子は YGMM 培地上でアクチン比3~7倍と高発現していた. そこでこれらをそれぞれ欠失させた遺伝子破壊株 $\Delta rps1a$ および $\Delta rps2a$ を用いて, Transwell システムによるヒト肺上皮細胞 (Calu-3) への侵入試験, ヒト肺上皮細胞 (A549) を用いた細胞障害性試験, コルチコステロイド免疫抑制マウスおよび好中球減少マウスに対する感染実験等を行った. 結果, $\Delta rps2a$ 株において, 細胞侵入活性が有意に低く, またマウス肺内増殖率が低い傾向が見られた (Umemura et al., 7th Advances Against Aspergillosis

(2016, Manchester, UK)にて発表). このように本研究では, *A. fumigatus*においてust-RiPS経路が新規病原因子として機能している可能性が示唆された. 今後は結果をまとめるとともに, *A. fumigatus*に比べてより多くのust-RiPS経路を保有する*A. flavus*を用いて, 同様に同経路の病原性への影響を調べる予定である.

発表論文

- 1) Myco Umemura, Nozomi Nagano, Daisuke Hagiwara, Lea Gregson, Margherita Bertuzzi, Elaine Bignell, “Effect of *A. fumigatus* RiPS precursor-like genes in pH response and pathogenicity”, *Proceedings of the 7th Advances Against Aspergillosis*, pp.80, 2016.

研究課題 '16-14

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

(国立感染症研究所)

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

(National Institute of Infectious Diseases)

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28年度では, Cas9/CRISPRゲノム編集技術を*A. fumigatus*に応用し, 血清存在下での生育に必須な遺伝子群の探索を行った.

幅広い生物種で用いられているCas9/CRISPRゲノム編集技術を*A. fumigatus*で利用可能にし, 遺伝子スクリーニングを行った. ランダムな20塩基を含むsgRNAとCas9蛋白質を導入するためのプラスミドライブラリを大腸菌において作製した. *A. fumigatus*にプラスミドライブラリDNAを形質転換し, 形質転換体の分生子ライブラリを得た. 変異が導入されると予想される分生子ライブラリを血清存在下・非存在下で培養し, DNAを抽出後, PCRにより増幅した20塩基の配列を次世代シーケンサーにより解析を行い, 血清存在下でコピー数が減少している配列から候補遺伝子を26種類抽出できた. これらの26種類の遺伝子は, 血清存在下での生育に必須であることが予想され, 今後, 個々の遺伝子についての解析を行うことにより, 血清刺激に応答する新しい遺伝子群を同定したい.

発表論文・学会発表

- 1) 犬飼達也, 梅山 隆, 山越 智, 中村茂樹, 名木 稔, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* のバイオフィーム形成と抗真菌薬感受性に関与する真菌側因子の制御に向けた検討. 第64回日本化学療法学会総会. 6月9日-11日, 2016年, 神戸.
- 2) 梅山 隆, 壇辻百合香, 犬飼達也, 中村茂樹, 山越 智, 名木 稔, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. 次世代シーケンサーを用いた *Aspergillus fumigatus* 近縁種の網羅的ゲノム解析による抗真菌薬耐性の原因解明. 第64回日本化学療法学会総会. 6月9日-11日, 2016年, 神戸.
- 3) 犬飼達也, 梅山 隆, 山越 智, 青山俊弘, 中山浩伸, 名木 稔, 田辺公一, 中村茂樹, 宮崎義継, *Aspergillus fumigatus* の血清存在下における菌糸生育に

関連する因子の同定, 第60回日本医真菌学会総会・学術集会, 10月1-2日, 2016, 東京.

- 4) 梅山 隆, 犬飼達也, 山越 智, 名木 稔, 中村茂樹, 宮崎義継, 今話題のアスペルギルス基礎研究は?, 第60回日本医真菌学会総会・学術集会, 10月1-2日, 2016, 東京.
- 5) 犬飼達也, 梅山 隆, 山越 智, 中村茂樹, 名木 稔, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継, *Aspergillus fumigatus* の血清存在下でのバイオフィルム形成に関与する真菌側因子の制御に向けた検討, 第65回日本感染症学会東日本地方会学術集会/第63回日本化学療法学会東日本支部総会, 10月26-28日, 2016, 新潟.
- 6) 梅山 隆, 壇辻百合香, 犬飼達也, 中村茂樹, 山越 智, 名木 稔, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継, *Aspergillus fumigatus* 隠蔽種のNGS解析による抗真菌薬耐性の原因解明, 第65回日本感染症学会東日本地方会学術集会/第63回日本化学療法学会東日本支部総会, 10月26-28日, 2016, 新潟.

研究課題 '16-15

Aspergillus fumigatus リボソーム標的薬剤耐性株における二次代謝活性化機構の解明

浅井禎吾

(東京大学大学院総合文化研究科)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

渡辺 哲

(千葉大学真菌医学研究センター)

萩原大祐

(千葉大学真菌医学研究センター)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

Activation of secondary metabolism in *Aspergillus fumigatus* strains with resistance to ribosome-targeting chemicals

Teigo Asai

(Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Akira Watanabe

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Daisuke Hagiwara

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

化学変異源の種類や濃度, 処理時間などを検討することで, *Aspergillus fumigatus* のハイグロマイシンB耐性株を作製した. その中に顕著に二次代謝が活性化した変異株を数多く見出した. 活性化される二次代謝物は変異株ごとにいくつかのタイプが存在することも見出した. 二次代謝活性化のタイプ毎に, それぞれ2から3株ずつピクアップし, 次世代シーケンサーを用いて二次代謝活性化変異株と野生株のmRNAを網羅的に比較解析した. 現在詳細な解析中である. また, それら変異株についてゲ

ノムシーケンスを行った。当初の予想よりはるかに多くの変異が導入されていたが、株間に共通する変異を指標に探索を行うことで、いくつかの候補遺伝子を見出した。現在、これらの変異について、野生株に一塩基変異の導入もしくは変異型タンパク質の過剰発現により、二次代謝活性化やハイグロマイシンB耐性に関わる変異の特定を目指している。以上のように、二次代謝が活性された *Aspergillus fumigatus* のハイグロマイシンB耐性株を作成することに成功し、また次世代シーケンサーを用いて、二次代謝活性化型変異株と野生株の網羅的な発現比較や変異株のゲノムシーケンスなど、メカニズム解明への基礎的な知見を得る事ができた。

研究課題 16-16

臨床分離 *Aspergillus flavus* の新規二次代謝産物生合成クラスター構成遺伝子の発現解析

豊留孝仁

(帯広畜産大学)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Transcriptome analysis of a novel secondary metabolite biosynthesis cluster in a clinical isolate of *Aspergillus flavus*

Takahito Toyotome

(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

Aspergillus flavus はアスペルギルス症の重要な原因菌種の一つであるが、いまだ十分な知見が積み上げられていない。我々はこれまでに10株の臨床分離 *A. flavus* のドラフトゲノム解析を行った。その結果、これまでに *A. flavus* や *A. oryzae* で報告のない新たな構成の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの存在を10株中3株で見いだした。ゲノム解析株である *A. flavus* NRRL3357や *A. oryzae* RIB40には認められない配列が存在し、この領域には一つの転写

産物が予測されていた。そこで、本クラスターのユニークな領域での転写産物を明らかとすることを目的として、このクラスターを持つ *A. flavus* IFM58503株のトランスクリプトーム解析を行った。

トランスクリプトーム解析の結果、予測どおり新規転写産物が確認され、新たな構成を持って機能しているクラスターと強く推測された。この遺伝子は Ankyrin repeat を持つタンパク質をコードしていた。他の *Aspergillus* 種である *A. parasiticus* や *A. bombycis* の遺伝子が相同性の高い遺伝子として見いだされてきたが、これらの相同性も50%以下に留まっていた。このデータを含めて、現在論文投稿の最終段階にある。関連する報告をこれまでにマイコトキシン国際シンポジウム ISMYCO2016などで共同発表してきており、本成果も今後のマイコトキシン学会で発表予定である。また、今後の詳細な解析により、この菌株により産生される新たな二次代謝産物の発見につなげていきたいと考えている。

さらに、本研究の成果としては *A. flavus* IFM58503株の網羅的なトランスクリプトームデータが得られている。詳細に検討することによって他の IFM58503株ユニークな領域の遺伝子発現のみならず、*A. flavus* に共通する遺伝子の発現に関する新たな情報が得られると期待して、解析を進めている。

学会発表

- 1) Yamaguchi S, Takino M, Kamei K, Toyotome T: Production of aflatoxin and the biosynthetic cluster in clinical isolates of *Aspergillus flavus*. マイコトキシン国際シンポジウム ISMYCO2016 abstracts PS06.

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)

亀井克彦・川本 進

(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)

Katsuhiko Kamei, Susumu Kawamoto

(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。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、その後も症例が増加している。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重要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した。

これまでの我々の研究で、*C. neoformans* に対する Th1 免疫応答に TLR9 を介した DNA 認識が重要なことを明らかにしており、前年度の研究では、*C. gattii* (R265株) の DNA が、*C. neoformans* (H99株) に比べ、樹状細胞からの TLR9 に依存した IL-12 産生、そして抗原特異的な Th1 細胞誘導活性が弱いことを見出した。今年度は、その機序に迫るために、両菌株の全ゲノム DNA における TLR9 認識モチーフの頻度、さらに TLR9 刺激活性を低下させることが知られている認識モチーフのメチル化の有無について解析を行ったところ、明らかな違いを見出すことはできなかった。

本真菌の重要な病原因子である莢膜の主要な多糖成分グルクロノキシロマンナン (GXM) を両菌株から精製し免疫応答への影響を比較したところ、H99由来の GXM は樹状細胞からの炎症性サイトカイン産生を誘導したのに対して、R265由来の GXM ではそのような活性がみられなかった。これまでに我々は、*C. neoformans* による樹状細胞からのサイトカイン産生に Dectin-2 が必須なことを明らかにしていたことから、両真菌由来 GXM の Dectin-2 への作用について解析を行った。H99 GXM は Dectin-2-ヒト IgG 融合タンパクに結合し、Dectin-2 レポーターアッセイで明らかな刺激活性を示したのに対して、R265 GXM ではそのような活性はみられなかった。

以上の結果から、*C. gattii* と *C. neoformans* は TLR9 や Dectin-2 への異なる刺激活性を示すことで、その後の免疫応答が大きく異なり、このことが両真菌の病原性の違いに関与する可能性が示唆された。今後は、両真菌の TLR9、Dectin-2 に対する PAMPs の構造の違いとの関連性についてさらに詳細な解析を進める予定である。これらの成果は、第45回日本免疫学会学術集会、第91回日本感染症学会総会・学術講演会にて報告した。

学会発表

- 1) Kotone Kawamura, Tong Zong, Akiho Oniyama, Keiko Ishii, Kazuyoshi Kawakami. Effect of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* on helper T cell response in OT-II mice. 第45回日本免疫学会学術集会. 沖縄. 2016年12月5日～7日.
- 2) Akiho Oniyama, Anna Miyahara, Kotone Kawamura, Keiko Ishii, Kazuyoshi Kawakami. Differentiation of effector helper T cells in response to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* in transgenic mice expressing T cell receptor for 98kD mannoprotein. 第45回日本免疫学会学術集会. 沖縄. 2016年12月5日～7日.
- 3) 川村琴音, 宗 童, 石井恵子, 川上和義. *Cryptococcus neoformans* と *C. gattii* 由来 DNA による免疫活性化の違いとその機序の解析. 第91回日本感染症学会総会・学術講演会. 東京. 2017年4月6日～8日.

研究課題 '16-18

Aspergillus 呼吸器検体臨床分離株の菌種同定・薬剤感受性の検討

武田啓太

(国立病院機構東京病院呼吸器センター)

鈴木純子

(国立病院機構東京病院呼吸器センター)

萩原大祐

(千葉大学真菌医学研究センター)

渡辺 哲

(千葉大学真菌医学研究センター)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

出された *Aspergillus* 培養陽性151株を遺伝子解析による菌種の同定、抗真菌薬耐性を検討した。108株が *A. fumigatus* で、*A. fumigatus* の隠蔽種である *A. udagawae* と *A. lentulus* は各1例ずつ同定された。その他、*A. niger* 3例、*A. tubingensis* 10例、*A. welwitschiae* 19例、*A. flavus* 4例、*A. nomius* 1例、*A. terreus* 4例であった。形態学的に *A. niger* と診断された呼吸器臨床分離株のうち実際は *A. welwitschiae* と *A. tubingensis* が大半を占め、*Aspergillus* section *Nigri* では菌種により MIC 値に差を認めた。

A. fumigatus 108株中では4株(3.7%)がITCZ耐性でうち2例はVRCZも耐性であった。108株中アゾール使用歴があったものは28株で、アゾール使用歴がある株での耐性率は14.3%(4/28株)であった。現在2016年以降の菌株についても検討を続けており、同一患者からの再検出株などについても検討を行っている。

Study of species identification and drug susceptibility of *Aspergillus* clinical isolates in respiratory specimen

Keita Takeda

(Center for Pulmonary Diseases, National Hospital Organization Tokyo National Hospital)

Junko Suzuki

(Center for Pulmonary Diseases, National Hospital Organization Tokyo National Hospital)

Daisuke Hagiwara

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Akira Watanabe

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

肺真菌症の病原真菌となる *Aspergillus* 属菌では、複数の遺伝子解析からアゾール系抗真菌薬などの感受性が低いその亜種(隠蔽種)が報告されており、治療上菌種の同定は重要である。また、慢性肺アスペルギルス症(CPA)では抗真菌薬による治療が長期に及ぶため、治療過程で薬剤獲得耐性が生じるとの懸念があるが、我が国における実際の臨床分離株でのデータは少ない。本研究では2012年から2015年まで東京病院で呼吸器検体から検

研究課題 16-19

質量分析計を用いたインフルエンザ菌莢膜型別に関する研究

佐藤 守

(千葉大学医学部附属病院・マスマススペクトロメトリ検査診断学)

土田祥央

(千葉大学医学部附属病院・マスマススペクトロメトリ検査診断学)

野村文夫

(千葉大学医学部附属病院・マスマススペクトロメトリ検査診断学)

石和田稔彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Identification of *Haemophilus influenzae* capsular serotyping by use of matrix-associated laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

Mamoru Satoh, Sachio Tsuchida, Fumio Nomura

(Division of Clinical Mass Spectrometry, Chiba University Hospital)

Naruhiko Ishiwada

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

インフルエンザ菌は a ~ f の莢膜血清型と無莢膜株 (NTHi) に分類される。小児へのインフルエンザ菌 b 型 (Hib) ワクチン普及後、本邦でも Hib 侵襲性感染症は激減した。一方で、相対的に NTHi による侵襲感染症が増加し、e 型 (Hie) や f 型 (Hif) による侵襲性感染症も認められるようになってきている。また、インフルエンザ菌は鼻咽腔に常在し、その多くは NTHi であると考えられているが、非侵襲性感染症において、血清型解析はほとんど実施されていない。血清型分布を確実に把握することはインフルエンザ菌による感染症の動向および病原性を把握する上で極めて重要であるが、従来の凝集法や PCR 法による解析法は煩雑で時間も要する。そこで我々は MALDI-TOF MS を利用し、インフル

エンザ菌の莢膜血清型別が可能かどうかの検討を行った。方法としてエタノール・ギ酸抽出法にて質量スペクトルを得た Hib 6 株, Hie 6 株, Hif 6 株, NTHi 6 株を MALDI Biotyper (Bruker) の市販データベースに追加登録した。この home-brewed database を用いて、インフルエンザ菌全 79 株 (Hib 22 株, Hie 10 株, Hif 11 株, NTHi 36 株) を同定し莢膜型を決定し、凝集法による莢膜型を対照とし感度、特異度を求めた。検討した結果、検査対象株は全てインフルエンザ菌と同定された。各株 2 回の測定における血清型別の感度、特異度の平均はそれぞれ Hib が 100%, 95.5%, Hie が 100%, 99.1%, Hif が 95.4%, 100%, NTHi が 91.6%, 98.8% であった。本研究により、MALDI-TOF MS は Hi の莢膜型別決定に有用であり、凝集法に比べて簡便に莢膜型決定が可能であることを明らかにした。

学会発表等

- 1) 竹内典子, 石和田稔彦, 大楠美佐子, 瀬川俊介, 村田正太, 土田祥央, 佐藤 守, 野村文夫. 質量分析計 (MALDI-TOF-MS) を用いた *Haemophilus influenzae* の莢膜型決定法の検討. 第 28 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 2017 年 1 月 22 日 長崎.
- 2) Takeuchi N, Segawa S, Ishiwada N, Ohkusu M, Tsuchida S, Satoh M, Matsushita K, Nomura F. Capsular serotyping of *Haemophilus influenzae* by using matrix-associated laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Infect Chemother. 2018 Mar 10. pii: S1341-321X(18)30062-X. doi: 10.1016/j.jiac.2018.02.007.

研究課題 '16-20

侵襲性感染症由来インフルエンザ菌の病原因子に関する研究

西順一郎

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)

藺牟田直子

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)

徳田浩一

(鹿児島大学病院 感染制御部門)

菱木はるか

(千葉大学大学院医学研究院小児病態学)

石和田稔彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Pathogenesis of *Haemophilus influenzae* isolated from patients with invasive disease

Junichiro Nishi

(Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences)

Naoko Imuta

(Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences)

Koichi Tokuda

(Kagoshima University Hospital)

Haruka Hishiki

(Chiba University Graduate School of Medicine)

Naruhiko Ishiwada

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

インフルエンザ菌 b 型 (Hib) ワクチン導入後に発症した小児侵襲性感染症の血液・髄液等無菌部位から分離されたインフルエンザ菌28株に関して病原因子の解析を行った。血清型に関しては、全株、PCR法で無莢膜株と同定された。生物型はⅡ型とⅢ型が多かった。薬剤感受性に関しては、19株にペニシリン結合蛋白に変異を認め、うち2株はβラクタマーゼ産生アモキシシリン/クラブラン酸耐性株であった。接着因子の有無、バイオフィルム産生能に関しては、呼吸器由来のインフルエンザ菌無

莢膜株と比較し、特徴は認められなかったが、莢膜株が保有する特異的な塩基配列である IS1016 を 10.7% の株が保有していた。MLST 解析において 28 株中 26 株が異なる ST 型を示した。本研究により、国内で分離される侵襲性感染症由来、インフルエンザ菌無莢膜株は多様性に富むことを明らかにした。Hib ワクチン普及後、日本における侵襲性インフルエンザ菌感染症の原因菌の主体は無莢膜株に変化しており、今後もその病原性解析を進めていく必要がある。

学会発表等

- 1) Naruhiko Ishiwada: Clinical and bacteriological analysis of non-typeable *Haemophilus influenzae* isolated from blood in pediatric patients. US-Japan ARI panel meeting 13rd Jan 2016 Washington DC, USA.
- 2) 内藤幸子, 石和田稔彦, 菱木はるか, 竹内典子, 大楠美佐子, 西順一郎, 藺牟田直子, 佐々木裕子, 下条直樹: 小児侵襲性感染症由来インフルエンザ菌無莢膜株に関する細菌学的検討. 第120回日本小児科学会学術講演会 2018年4月14日 東京.
- 3) Naito S, Takeuchi N, Ohkusu M, Takahashi-Nakaguchi A, Takahashi H, Imuta N, Nishi J, Shibayama K, Matsuoka M, Sasaki Y, Ishiwada N. Clinical and bacteriologic analysis of nontypeable *Haemophilus influenzae* strains isolated from children with invasive diseases, Japan, 2008-2015. *J Clin Microbiol* 2018 May 2. pii: JCM.00141-18. doi: 10.1128/JCM.00141-18.

研究課題 '16-21

新規抗真菌剤の合成および活性評価研究

椎名 勇

(東京理科大学理学部第一部応用化学科)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

石和田稔彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Enantioselective synthesis of new antibacterial and antifungal agents and evaluation of its activity

Isamu Shiina

(Department of Applied Chemistry, Faculty of Science,
Tokyo University of Science)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Naruhiko Ishiwada

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

東京理科大学理学部応用化学科 椎名研究室 (以下、椎名研) にて、2006年に *Eupenicillium shearii* より単離・構造決定されたユーシェアリライド天然物 (24員環マクロライド) の全合成方法を確立した。また、独自の不斉合成技術によりユーシェアリライド類縁体 (光学異性体およびジアステレオマー) のライブラリーを構築している。平成28年度の共同研究では、カンジダやクリプトコッカスなどの真菌と MRSA などの多剤耐性グラム陽性菌に対するユーシェアリライド立体異性体 (8種類) の発育阻止効果試験を実施したが、天然物よりも抗真菌活性と抗細菌活性ともに高い立体異性体があることを確認することが出来た。

また、母骨格である炭素骨格の不飽和度や官能基の異なるユーシェアリライド類縁体の発育阻止効果試験を実施した。その結果、特に官能基について明瞭な構造活性相関が確認され、標的に対するユーシェアリライド類縁体の作用部位について示唆を得た。

発表論文

- 1) Takayuki Tono, Ryo Kawahara, Takehiko Inohana and Isamu Shiina: Enantioselective total synthesis of naturally occurring eushearilide and evaluation of its antifungal activity: *The Journal of Antibiotics* 69, 697-701 (September 2016) (doi:10.1038/ja.2015.146).

研究課題 '16-22

*Molecular biological analysis of *Cryptococcus* and *Candida* species from selected Counties in Kenya*

Christine Bii

(KEMRI, Center for Microbiology Research)

Olga Mashedi

(KEMRI, Center for Microbiology Research)

Abdi Mohamed

(KEMRI, Center for Microbiology Research)

Tohru Gono

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

ケニア国内で採集した穀物試料 (トオモロコシ, 小麦, コメ, 稗) の50%以上が, アフラトキシン, デオキシニバレノール, オクラトキシン, フモニシンなどの何らかのカビ毒により高度に (西洋諸国, 日本の基準値を超えて) 汚染されていることが判明した。また2種以上のカビ毒に同時に汚染されている試料も多数見つかった。さらに研究を進めると, 現地で冠婚葬祭に頻繁に用いられる地ビールも高濃度のアフラトキシン (B1, G1) に, また牛乳もアフラトキシン M1 に西洋諸国の基準値を超えて汚染されていることが判明した。これらの結果は, 学術論文として発表するとともに, 現地の新聞, インターネット・ホームページを通じて公表し, 現地の人々に対し注意を喚起した。

また, ケニアに滞在する米国人医師と協力し, ケニアのエイズ患者に感染し, 直接の死因となる真菌クリプトコッカス属菌について研究・解析した。MultiLocus Sequence Typing と呼ばれる分子系統学手法を用いて解析したところ, 行き来の無い遠方に住む患者にも分子系統

学的に同種・同型の菌が感染していることが明らかとなり、ヒトに感染し易い菌の種類がいることが示唆された。

さらに、これらの研究過程で、新種の黒色アスペルギルス属菌4種を発見し、論文を作成している。また、関連ヒト病原真菌（アスペルギルス属菌等糸状菌）について、日本国内で分子生物学的、生理・生化学的、形態学的解析を進め、病原因子、病原因子発現機構、薬剤耐性機構に関する発見を行った。

発表論文

- 1) Gla dys Langat, Tetsuhiro Matsusawa, Tohru Gono, Vivienne Matiru, Christine Bii. Aflatoxin M1 Contamination of Milk and Its Products in Bomet County, Kenya. *Advance in Microbiology*, Vol.6: 528-536 (2016).

研究課題 '16-23

未利用微生物を素材とした深在性真菌症治療薬シード化合物の探索

久保田高明

(昭和薬科大学)

五ノ井透

(千葉大学真菌医学研究センター)

The search for seed compounds of antifungal drugs for deep-seated mycosis from unutilized microorganisms.

Takaaki Kubota

(Showa Pharmaceutical University)

Tohru Gono

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

海綿動物からは多くの生物活性天然物が単離、構造決定されており、それらをもとに新たな医薬品が開発されている。近年、メタゲノム解析により、これら生物活性天然物の真の生産者は海綿動物に共生する難培養性微生物であることが明らかになってきた。今回、沖縄で採取した数種の海綿動物を対象に、深在性真菌症の原因真菌に対して抗真菌活性を示す新たな生物活性天然物の探索を

行った。

その結果、*Aspergillus niger* に対して抗真菌活性 (MIC, 4 µg/mL) を示す新規環状ヘプタペプチド *Stylissamide I* を *Stylissa* 属の海綿から単離、構造決定した。また、*Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* に対して抗真菌活性 (MIC, 16 µg/mL, 16 µg/mL, and 2 µg/mL, respectively) を示す新規マンザミンアルカロイド *Zamamidine D* を *Amphimedon* 属の海綿から単離、構造決定した。今後も、深在性真菌症の原因真菌に対して抗真菌活性を示す新たな天然物の探索を継続して行う予定である。

発表論文

- 1) Kubota T, Nakamura K, Kurimoto S, Sakai K, Fromont J, Gono T, Kobayashi J: *Stylissamide I*, a new cyclic heptapeptide from an Okinawan marine sponge *Stylissa* sp. *Heterocycles*. 95, 799-806, 2017.
- 2) Kubota T, Nakamura K, Kurimoto S, Sakai K, Fromont J, Gono T, Kobayashi J: *Zamamidine D*, a manzamine alkaloid from an Okinawan *Amphimedon* sp. marine sponge. *J Nat Prod*. 80: 1196-1199, 2017.

研究課題 '16-24

ヒト病原性真菌に対する植物病原菌マイコウイルスタンパク質の生育阻害効果の解析とその医療素材としての開発

森山裕充

(東京農工大学大学院農学研究科)

五ノ井透・川本 進

(千葉大学真菌医学研究センター)

Evaluation of anti-fungal proteins of mycoviruses infecting in plant pathogenic fungi and development of effective proteins derived from the mycoviruses

Hiromitsu Moriyama

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

Susumu Kawamoto, Tohru Gono

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

我々はイネいもち病菌に感染するマイコウイルス *Magnaporthe oryzae chrysovirus*, MoCV1-Aが宿主菌に対して、菌糸生育抑制、異常な色素沈着や分生子形成抑制などの生育阻害現象をもたらすことを見出しており、MoCV1-Aウイルスの遺伝子がコードするタンパク質のうち、パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子発現系の利用によりORF4が抗菌性タンパク質をコードすることを明らかにしてきた。MoCV1-AのORF4タンパク質の部分領域をパン酵母に発現させることで、抗菌活性領域を調査したところ、MoCV1-Aの近縁ウイルス間で保存性の高い、中央部の領域 (SUa領域) に活性があることが確認された。これまでにピキア酵母を利用した発現系を検討してきたが、本研究においては、タンパク質発現量多い大腸菌を利用してSUaの生産を試みた。その結果、不溶性画分ではあるが、高い産生効率でSUaタンパク質の産生が確認された。今後、可溶性タグなどを付加する事により、可溶性画分における調製方法を確立していく。

病原真菌 *Aspergillus fumigatus* はアスペルギルス症の主な原因菌である。五ノ井教授の研究グループにより、マウ

スに対する *A. fumigatus* の病原性を抑制するそれぞれ4本鎖、5本鎖dsRNAゲノムをもつマイコウイルス2種を見出し、新規抗真菌薬としての応用を目指して研究を行ってきた。ウイルスフリーの *A. fumigatus* (KU株) にウイルスゲノムのORFをそれぞれ強制発現させた株、protoplast fusion法によりウイルスを導入した株それぞれにおいて、宿主の形態、生育速度、ストレス耐性、および二次代謝産物生産能などの表現型を比較した。その結果、4本鎖dsRNAマイコウイルスのORFc、5本鎖dsRNAマイコウイルスのORFb, cの強制発現株で糸状菌生育抑制が観察された。さらに、これらの株を用いてマウス感染実験を行い、肺のCFUを比較した。4本鎖dsRNAマイコウイルスのORFc強制発現株、ウイルス導入株、5本鎖dsRNAマイコウイルスのORFb, d, e強制発現株で他の株よりコロニー数が減少する傾向が見られ、これらの遺伝子が *A. fumigatus* の病原性を抑制していることが示唆された。またイネいもち病菌マイコウイルスMoCV1-AのORF4をウイルスフリーの *A. fumigatus* (KU株) に発現させた場合においても糸状菌生育抑制が観察された。

学会発表

- 1) Hiromitsu Moriyama¹, Syun-Ichi Urayama^{1,2}, Yuri Kimura¹, Toshiyuki Fukuhara¹, Akio Toh-e³, Susumu Kawamoto³

Functional analyses of novel proteins of mycoviruses infecting phytopathogenic fungi using heterologous expression system in *Saccharomyces cerevisiae*

1. Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Research and Development Center for Marine Biosciences, 2. Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC), 3. Division of Molecular Biology, Medical Mycology Research Center, Chiba University.

ICY2016: 14th International Congress on Yeasts. 平成29年9月12日~15日 淡路国際夢舞台会議場 (兵庫県淡路島市)

- 2) 森山裕充 酵母異種発現系によるマイコウイルスタンパク質の機能探索 新産業酵母研究会 日時: 平成28年11月4日(金) 会場: 産総研: 臨海副都心センター
- 3) 宍戸絵里香¹, 高橋 梓², 酒井香奈江³, 萩原大祐², 森山裕充³, 五ノ井透² 病原真菌 *Aspergillus fumigatus* を

弱毒化するマイコウイルス遺伝子の発現量と機能解析 (1. 千葉大・医学薬学府, 2. 千葉大・真菌センター, 3. 農工大) 平成28年11月17日-18日(金)
場所: 宇治おうばくプラザ

研究課題 '16-25

Cryptococcus neoformans の感染サイクルにおけるゲノム再編成の分子機構とそれを標的とした新規治療戦略の開発に向けて

松浦 彰・久保田俊介

(千葉大学大学院融合科学研究科)

亀井克彦・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)

Towards development of novel therapeutic strategies targeting the mechanism of specific genome rearrangement during infection cycle of *Cryptococcus neoformans*

Akira Matsuura, Shunsuke Kubota

(Graduate School of Advanced Integration Science, Chiba University)

Katsuhiko Kamei, 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, *C. neoformans* 染色体末端近傍でのゲノム変化に注目し, テロメア末端およびDNA損傷末端で作用する分子の機能とゲノム変化, 感染サイクルとの関連を明らかにするとともに, それを標的とした新規治療戦略の開発を目指す.

これまでに, DNA末端を維持・修復する過程に関す

る *C. neoformans* 特有の現象を主として遺伝学的, 分子生物学的手法を用いて解析をしており, 我々が同定した染色体末端を伸長する酵素であるテロメラーゼの触媒サブユニット *CnEST2* の欠損細胞が, 一倍体で致死性を示すことを見出した. 他の多くの生物種では, テロメラーゼの欠損は直ちには致死とはならないことから, この違いが *C. neoformans* 特異的な治療戦略として利用できる可能性が考えられる.

そこで, 既知のヒトテロメラーゼ阻害剤を増殖中の *C. neoformans* に投与したところ, *CnEST2* 遺伝子のコピー数と相関して増殖の低下がみられることが明らかになった. さらに, 薬剤添加時の遺伝子発現変化をRNA-Seqにより調べたところ, テロメラーゼ阻害と増殖抑制とを繋ぐ, 未知の経路の存在が示唆された.

今後は, テロメラーゼ阻害により引き起こされる *C. neoformans* 特有の増殖阻害現象のメカニズムの分子機構, その感染サイクルにおける生理的意義を解析しつつ, *C. neoformans* テロメラーゼ活性をより特異的に阻害する化合物の探索を行う予定である.

学会発表

- 1) 久保田俊介, 高田実里, 今成百合子, 東江昭夫, 高橋弘喜, 川本 進, 亀井克彦, 松浦 彰. *C. neoformans* におけるテロメア維持機構の解析 酵母遺伝学フォーラム第49回大会, 神戸, 2016年9月
- 2) Shunsuke Kubota, Hideki Takahashi, and Akira Matsuura. Unique response to telomerase inhibition in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. The Second Symposium of Chiral Materials Science, Chiba, March 2017

研究課題 '16-26

臨床検体から分離されたテルビナフィン低感受性（耐性）白癬菌株における耐性化メカニズムの解明に向けた遺伝子工学的アプローチの導入

山田 剛

(帝京大学医真菌研究センター)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

田中玲子

(千葉大学真菌医学研究センター)

Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene

Tsuyoshi Yamada

(Teikyo University Institute of Medical Mycology)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Reiko Tanaka

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

世界各地の臨床現場で白癬の治療に使用されているテルビナフィン (TBF) は耐性株の分離に関する報告が少ない。申請者らとスイス・ローザンヌにある Centre Hospitalier Universitaire vaudois (CHUV) の共同研究グループは、2013年~2016年にかけてCHUVを拠点に収集した臨床分離白癬菌2,056株を対象に、TBF (0.2 µg/ml) を含むサブローデキストロース寒天培地を用いた簡易培養試験を行い、約1%にあたる17株の培養陽性株を見出した。これらのTBF低感受性株について、薬剤の作用標的であるスクワレンエポキシダーゼをコードするSQLE遺伝子の塩基配列を解析したところ、ORF内にアミノ酸の置換を生じる幾つかの点変異 (SNP) が認められた。そこでTBFに感受性の白癬菌 *Arthroderma vanbreuseghemii* の遺伝子操作を行い、内在性のSQLE遺伝子に同様のSNPを導入した変異株を作出した。CLSI法を用いて、作出したSQLE変異株のTBF感受性を解析した結果、変異株の

感受性はコントロール株に比べ8~512倍低く、上記17白癬菌株のTBF感受性低下の主要原因がSQLE遺伝子内のSNPであることが判明した。

発表論文

- 1) Yamada T, Maeda M, Alshahni MM, Tanaka R, Yaguchi T, Bontems O, Karine Salamin K, Fratti M, Monod M.: Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrob Agents Chemother*, doi:10.1128/AAC.00115-17, 2017.

研究課題 '16-27

薬剤耐性および感受性 *Aspergillus fumigatus* 株の代謝産物のメタボローム解析

細江智夫

(星薬科大学 薬化学教室)

武田 尚

(星薬科大学 薬化学教室)

若菜大悟

(星薬科大学 薬化学教室)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

Metabolomics between drug-resistance and drug-sensitive *Aspergillus fumigatus*

Tomoo Hosoe

(Department of Organic chemistry, Hoshi University)

Hisashi Takeda

(Department of Organic chemistry, Hoshi University)

Daigo Wakana

(Department of Organic chemistry, Hoshi University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

Aspergillus fumigatus は深在性真菌症であるアスペルギルス症の主たる原因菌である。その治療薬にはアゾール系、

キャンディン系，ポリエン系抗菌薬などが存在する．近年，深在性真菌症治療薬 amphotericin B (AMPH) に対し，薬剤耐性を示す *A. fumigatus* が発生し，原因菌の薬剤耐性に応じた治療薬の選択が重要となっている．我々は化学成分の観点から AMPH 耐性及び感受性株の違いを見出すことが可能ではないかと考え，各菌株の代謝産物について網羅的に解析可能なメタボロミクスの手法を用い，両者の分類を検討した．

千葉大学真菌医学研究センターよりご供与いただいた AMPH 耐性及び感受性 *A. fumigatus* 株を PDB 培地を用い，25 °C（自然条件下）及び 37 °C（5 % CO₂ 条件下）の異なる 2 種の条件での培養を行い，各菌株の代謝産物の ¹H-NMR スペクトルデータを用いてメタボローム解析を行った．その結果，両培養条件において OPLS-DA 解析の

スコアプロットから耐性株群と感受性株群の 2 群が観測された．25 °C（自然条件下）培養時のローディングプロットから，感受性株には共通して 6.6–7.0 ppm を示す芳香族化合物が存在することが示唆された．また，耐性株には 1.5–5.1 ppm を示す多数の物質の存在が示唆された．37 °C（5 % CO₂ 条件下）での培養では，感受性株は芳香族化合物の存在が示唆されたが，化学シフト値から 25 °C 培養時とは異なる物質が産生されていることが明らかとなった．一方，耐性株は 2.4–3.7 ppm 及び 4.0–4.6 ppm にピークを持つ物質が存在し，有機酸やアミノ酸が多く存在することが明らかとなった．

以上の結果から，耐性株群と感受性株群は産生成分が異なることが明らかとなったため，今後はより詳細な解析を行い，両者を分類する成分の特定を試みる予定である．

感染症グローバルネットワークフォーラム2016

The 5th Global Network Forum on Infection and Immunity

主催：千葉大学真菌医学研究センター共同利用・共同研究拠点「真菌感染症研究拠点」，千葉大学大学院医学研究院小児病態学

研究成果

平成24年度に千葉大学内での感染症研究のネットワーク構築を目指して開始された「千葉大学感染症研究ネットワーク」は，平成28年度で第5回の開催となった。本年度は，千葉大学附属病院小児病態学の下条直樹先生に世話人をお願いし，前年度に引き続き午前中を日本語，午後を英語での国際フォーラムの形式で，平成28年11月12日（土）に千葉大附属病院ガーネットホールにて開催された。午前中には，慶應大学の金井隆典先生に特別講演として腸内細菌研究の最先端の知見をレクチャーしていただき，引き続き国内の新進気鋭の研究者による講演が行われた。また，午後の国際フォーラムでは，真菌以外のウイルス・細菌・寄生虫などの微生物による感染症研究を行う国内外の著名な4名の研究者による講演が行われ，最先端の研究についての活発な議論とネットワーク形成を目指した意見交換が行われた。

日時：平成28年11月12日 9:30~17:00

場所：千葉大学医学部附属病院3階 ガーネットホール

下条直樹（千葉大学大学院医学研究院小児病態学 教授）
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）

米山光俊（千葉大学真菌医学研究センター 教授）

石和田稔彦

（千葉大学真菌医学研究センター 准教授）

【午前の部】

【開会の挨拶】

徳久剛史（千葉大学学長）

座長：下条直樹

（千葉大学大学院医学研究院小児病態学 教授）

金井隆典（慶應義塾大学医学部消化器内科 教授）

『腸内細菌が教える「医と食」の融合研究』

座長：菱木はるか（千葉大学医学部附属病院小児科）

長澤耕男（国立感染症研究所感染症疫学センター 研究員）

『Human respiratory syncytial virus (HRSV) F遺伝子の分子進化』

座長：石和田稔彦

（千葉大学真菌医学研究センター 准教授）

大塚岳人（新潟大学医学部小児科学 助教）

『アンチセンス療法：新しい抗微生物薬とその応用』

座長：高屋明子（千葉大学大学院薬学研究院 准教授）

松岡悠美（千葉大学大学院医学研究院皮膚科学 助教）

『アトピー性皮膚炎および健康者における黄色ブドウ球菌ゲノム進化と生着のメカニズム』

【午後の部】（International forum）

Chair: Hiroshi Ashida (Associate Professor, Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Trinad Chakraborty (Professor, Institute of Medical Microbiology, Biomedical Research Centre Seltersberg, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany)

“Exploring the One Health paradigm with antimicrobial resistance: Insights from genome-based epidemiology”

Chair: Mitsutoshi Yoneyama (Professor, Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Yasushi Kawaguchi (Professor, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo)

“Strategies of herpesviruses to hijack host cell machinery”

Chair: Kazumi Norose (Department of Infection and Host Defense (F3), Graduate School of Medicine)

Tomoyoshi Nozaki (National Institute of Infectious Diseases)

“Unique evolution of mitochondria and metabolism in the human enteric parasite.”

Chair: Yoshiyuki Goto (Associate Professor, Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Eric G. Pamer (Head, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA)

“Microbiota-mediated defense against intestinal infection”

【Closing Remarks】

Chihiro Sasakawa (Director, Medical Mycology Research Center, Chiba University; Emeritus Professor, The University of Tokyo)

2017年講演会

2017 Scientific Meetings & Seminars

The 6th Global Network Forum on Infection and Immunity

日時：平成29年10月28日 9:30~17:30

場所：千葉大学医学部附属病院3階 ガーネットホール

【特別講演】

【午前の部】

Masayuki Amagai (Keio University, Japan)

『Stratum skin microbiocorneum as niche to control ta』

Gordon Brown (University of Aberdeen, UK)

『MelLec: A new player in antifungal immunity』

Glen N. Barber (University of Miami, USA)

『The STING controlled innate immune signaling pathway, infectious disease, inflammation and cancer』

【午後の部】

Shuta Tomida (Okayama University, Japan)

『Comparative genomics with strain-level resolution』

Yumi Matsuoka-Nakamura (Chiba University, Japan)

『Cutaneous acquisition of *Staphylococcus* quorum-sensing *agr* mutations protects against atopic dermatitis development』

Saeko Nakajima (Kyoto University, Japan)

『*Candida albicans* skin colonization exacerbates the inflammation of imiquimod induced psoriasis-like dermatitis in mice』

Nobuhiko Kamada (University of Michigan, USA)

『The mouth-gut axis in gastrointestinal diseases』

Satoshi Uematsu (Chiba University, Japan)

『Comprehensive analysis of intestinal virome』

Hiroshi Kiyono (Tokyo University, Japan)

『Gut Multi-ecosystem of Epithelial Cells, Immune Cells and Commensal Microbiota for Symbiosis and Inflammation』

「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28年度 合同成果報告会」

日時：平成29年3月16日（木）

場所：東京大学医科学研究所 2号館2階 大会議室

【午後の部】

【特別講演】

竹田 潔

(大阪大学免疫学フロンティア研究センター 教授)

『腸管恒常性維持機構の解析』

【合同成果報告会】

《千葉大学真菌医学研究センター成果報告》

梅山 隆

(国立感染症研究所 主任研究官)

『アスペルギルスのバイオフィル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』

柴田 信之

(東北医科薬科大学 教授)

『*Candida glabrata*細胞壁構築関連遺伝子欠損が菌体の性質に及ぼす影響の解析』

呉 成旭

(京都大学ウイルス・再生医科学研究所 教務補佐員)

『抗ウイルスIFNシステムにおけるRLRsとRNP複合体の機能解析』

萩原 大祐

(千葉大学真菌医学研究センター 特任助教)

『アゾール系薬剤耐性機構に関わる *Aspergillus fumigatus* の新規転写因子AtrRの解析』

《感染症・免疫共同研究領域》

杉田 征彦

(沖縄科学技術大学院大学 博士研究員)

『エボラウイルス・ヌクレオキャプシドの極低温電子顕微鏡解析』

呉羽 拓

(沖縄科学技術大学院大学 研究員)

『CCR4-NOT複合体による poly (A) 短鎖はT細胞のポジティブセレクションに必要である』

野地 智法

(東北大学大学院 准教授)

『乳腺での感染防御を可能にする免疫賦活化因子の探索』

「真菌医学研究センターMonthlyセミナー」

場所：真菌医学研究センター 大会議室

1) 日時：平成29年1月16日 17:00~18:30

Gabriel Nuñez

(Department of Pathology and Comprehensive Cancer Center, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA)

『Linking pathogen virulence, host immunity and the microbiota at the intestinal barrier』

(千葉大学GPリーディング研究育成プログラム「“超個体”の統合的理解に基づく次世代型「感染制御学」研究推進拠点」第1回感染制御学セミナーと共催)

2) 日時：平成29年4月11日 16:30~18:00

Michael Way

(Cellular Signalling and Cytoskeletal Function Lab, The

Francis Crick Institute, London)

『How vaccinia virus (ab) uses the host cytoskeleton to promote its spread』

3) 日時：平成29年4月12日 16:00~17:30

Matthias Sipiczki

(Department of Genetics and Applied Microbiology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary)

『The pigment producing, antagonistic *Metschnikowia* yeasts pose a challenge to rDNA barcoding』

4) 日時：平成29年7月19日 17:00~18:30

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 教授)

『自然免疫受容体を介するPAMPs及びDAMPsの認識機構と免疫制御における役割』

(千葉大学GPリーディング研究育成プログラム「“超個体”の統合的理解に基づく次世代型「感染制御学」研究推進拠点」第2回感染制御学セミナーと共催)

5) 日時：平成29年7月25日 16:00~17:30

八尋 錦之助

(千葉大学大学院医学研究院病原細菌制御学 准教授)

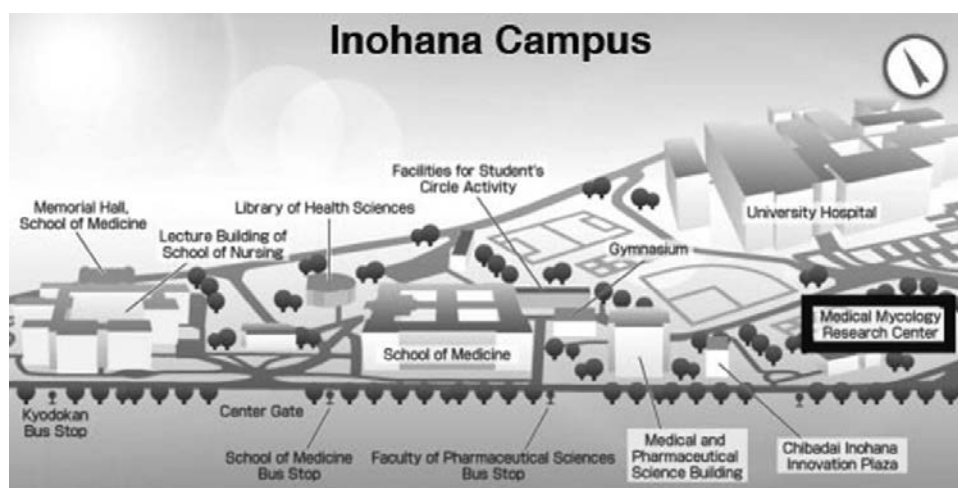
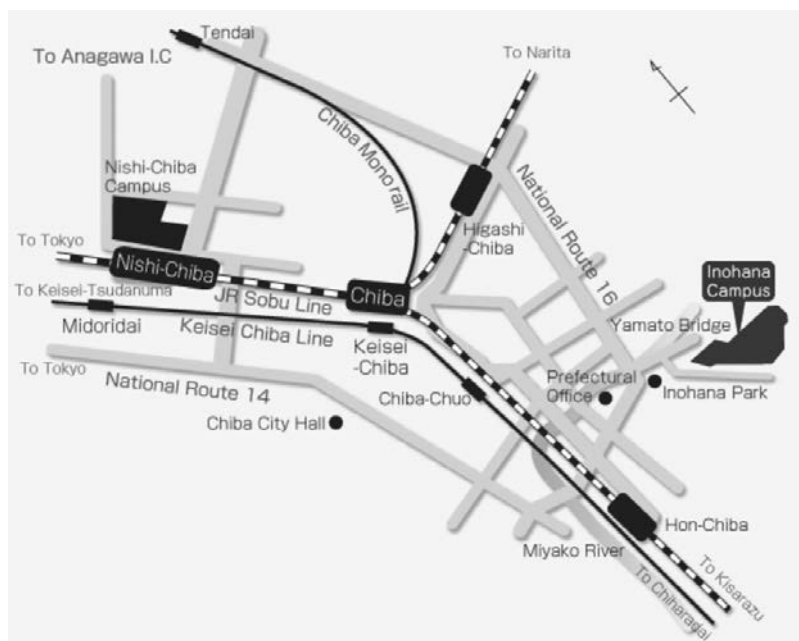
『細菌毒素が引き起こす多様な宿主応答分子機構：ピロリ菌や病原性大腸菌の話題を中心に』

6) 日時：平成29年11月14日 17:30~18:00

加藤 康幸

(国立研究開発法人国立国際医療研究センター国際感染症センター国際感染対策室 医長)

『ウイルス性出血熱～エボラからSFTSまで～』



平成 30 年 7 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)

July 2018

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
2017