

【26】

氏 名	ひろ せ のり ゆき 廣 瀬 教 志
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	乙第783号
学位授与の日付	平成30年10月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項
学位論文題目	Ribosomal internal transcribed spacer of <i>Prototheca wickerhamii</i> has characteristic structure useful for identification and genotyping (プロトテカ・ウィツケルハミィのリボソーム遺伝子内部転写スペーサー領域は種同定と遺伝子型判定に有用な特徴的構造を有している)
論文審査委員	(主査) 教授 井 川 健 (副査) 教授 今 井 康 雄 教授 春 木 宏 介

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

プロトテカ (*Prototheca*) はクロレラ近縁の藻類の一属であり、ヒトや動物に感染症を引き起こすことが知られている。1964年にヒトの皮膚感染症の起因菌として初報告されて以来、患者の皮膚、皮下、関節嚢胞、内臓などからプロトテカの分離が報告されている。2018年現在プロトテカ属は8種が認められており、そのうちヒトに病原性を示すのは*P. wickerhamii*、*P. zopfii*、*P. blaschkeae*、*P. cutis*及び*P. miyajii*の5種である。特に*P. wickerhamii*によるヒトの感染例は報告数が増加している。一方、病原真菌に比べるとプロトテカの認知度は低く、基礎的研究も少ない。従来は、培養検査、塗抹標本を用いた細胞形態の観察あるいは生化学的検査などで診断していたが、種同定に至らなかった例も多い。最近では、遺伝子検査や質量分析法などを組み合わせることで、精度の高い早期診断が可能になると期待されている。

【目 的】

微生物の同定には、リボソームRNA遺伝子 (rDNA) の構造の種差を利用した遺伝子検査を行うことが多い。例えば、原核微生物では16Sスモールサブユニット (small subunit : SSU) rDNAの構造解析を行うのが一般的である。一方、真核微生物の場合、18S SSU rDNAよりも、内部転写スペーサー (internal transcribed spacer : ITS) 領域や28Sラージサブユニット (large subunit : LSU) rDNAの可変領域1 (D1) および2 (D2) に着目した同定がなされている。*P. wickerhamii*についてもD1/D2

領域の塩基配列決定を用いた種同定の報告がある。本研究では、皮膚プロトテカ症の患者から分離されたプロトテカ株の種同定を通じて、プロトテカ属の種識別や特徴づけに有用な遺伝子検査法の探求を行った。

【対象と方法】

P. wickerhamii 9株（ヒト由来8株、環境由来1株）、*P. zopfii* 2株（動物由来）、*P. blaschkeae* 1株（ヒト由来）、*P. cutis* 1株（ヒト由来）、*Prototheca stagnora* 1株（環境由来）、*Prototheca ulmea* 1株（環境由来）及び皮膚プロトテカ症の患者から分離された未同定の1株（FL11-0001株）の計16株を対象とした。培養はポテトデキストロース寒天培地とクロムアガー・カンジダ寒天培地を用いて、それぞれ25℃と35℃で行った。得られたコロニーから採取した細胞をラクトフェノールコットンブルーで染色後、位相差顕微鏡で形態を観察した。炭水化物の資化性は、API20C AUXを用いて判定した。同様に各株のコロニーから細胞を採取し、試薬キット（Genとる君；タカラバイオ）を用いてDNAを抽出した。このDNAを鋳型として、rDNAのITS領域とLSU D1/D2領域をそれぞれ増幅するプライマーを用いてpolymerase chain reaction（PCR）を行った。PCR反応条件は、（98℃、10秒→55℃、30秒→68℃、3分）×30サイクルで実施した。各PCR産物について、ゲル電気泳動にて断片サイズを確認する一方、直接あるいはクローニング後に塩基配列を決定した。種々の株の塩基配列データについては、ClustalWとTrimAIの各ソフトウェアで整列させ不要部分を取り除いた後、系統樹解析を行った。具体的には、MEGAソフトウェアを用いて、バイズ情報量基準をもとに最適置換モデルを選択した後、ブーツストラップ試験（1000回）と最尤法により系統樹を作成した。

【結 果】

皮膚プロトテカ症患者由来の未同定株（FL11-0001）は、培地上で酵母用のコロニーを生じ、細胞の鏡検像は球形からやや楕円であり、複数の孢子嚢胞子を含有していた。API20C AUXを用いて判定した生化学的性状は、*P. wickerhamii*や*P. cutis*と同じであった。LSU D1/D2領域のPCR産物をそのまま用いて塩基配列を決定しようとしたところ、多数のノイズを認め、ゲノム内配列多型の存在が示唆された。そこで、PCR産物をクローニングし、無作為に選んだ6つのクローンの塩基配列を用いて系統樹解析を行ったところ、FL11-0001株は*P. wickerhamii*株と同じ群に属することが明らかとなった。すなわち、FL11-0001株は*P. wickerhamii*であると同定された。

一方、種々のプロトテカ株のITS領域のPCR断片は種によって異なるサイズを示し、特に*P. wickerhamii*のITSは他種のプロトテカに比べてサイズが大きかった。また、FL11-0001株と環境由来の*P. wickerhamii*標準株のITS領域のサイズにはわずかな違いがあり、さらにITS1領域とITS2領域に分けてPCRを行ったところ、それらのサイズにも株間の差が見られた。ちなみに、以前*P. wickerhamii*と同定されていたIFM 53848株のITSは、他の*P. wickerhamii*より小さく、逆にSSU rDNAは明らかに大きかった。

*P. wickerhamii*のFL11-0001株と標準株について、ITS領域の塩基配列を決定したところ、LSU D1/D2領域と同様、ゲノム内塩基配列多型の存在が示された。また、ITS1の5'端とITS2の3'端のそれぞれ400塩基対を用いて系統樹解析をおこなった結果、*P. wickerhamii*は2つの遺伝子型（genotype 1

[GT1] と genotype 2 [GT2]) に分類できることが示された。

【考 察】

皮膚プロトテカ症の患者から分離されたプロトテカ臨床株を同定する過程で、rDNA領域の構造を明らかにし、他の種々のプロトテカ株と比較した。従来、遺伝子検査による*P. wickerhamii*の同定にはLSU D1/D2領域の塩基配列が用いられてきたが、この領域にはゲノム内配列多型が存在することがあり、PCR産物をそのまま用いた塩基配列決定では、必ずしも明瞭な結果を得られないことがわかった。正確な同定には、PCR産物のクローニングが必要になると思われる。加えて、*P. wickerhamii* のITS領域にもゲノム内配列多型が存在することが本研究で示された。Uenoらの研究により、*P. wickerhamii*のSSU rDNAについてもゲノム内配列多型の存在が報告されている。これらのゲノム内配列多型の生物学的意義は未だ不明であるが、今後の研究対象となるであろう。*P. wickerhamii*のITS領域については、他種に比べてサイズが際立って大きいという特徴も見出された。これはPCRと電気泳動だけで確認可能であり、同定技法としての有用性は高いと思われる。実際、以前は*P. wickerhamii*とされていたIFM 53848株は異なる種である可能性が見いだされ、その後の新種プロトテカの発見に繋がった。

【結 論】

本研究は、*P. wickerhamii*のrDNAには、株間およびゲノム内の配列多型があること、そしてITS領域が種同定に有用な特徴的構造を有していること、さらにITS領域の多型に基づいて、*P. wickerhamii*には2つの遺伝子型 (GT1とGT2) が存在することを明らかにした。プロトテカに関する研究は発展途上にあるが、この研究の成果は、基礎医学と臨床医学のいずれにも有意義な知見を提供したと考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

Prototheca (プロトテカ) はクロレラ近縁の微細藻類であり、近年はヒトや動物の病原微生物としても注目されてきている。ヒトのプロトテカ症の原因として最も頻度が高いのは*Prototheca wickerhamii* (*P. wickerhamii*) である。申請論文では、皮膚プロトテカ症の患者から分離されたプロトテカ株の種同定を目的としてリボソームRNA遺伝子 (rDNA) の解析を行い、*P. wickerhamii*であると同定する一方、rDNAの内部転写スペーサー (internal transcribed spacer : ITS) 領域に着目し、さらなる解析を行っている。当該研究により、1) *P. wickerhamii*の同定には、ITS領域のPCR産物の電気泳動が有用であること、2) ITS領域と28Sラージサブユニット (large subunit : LSU) rDNAの可変領域 1 (D1) および 2 (D2) にはゲノム内多型が存在するため、塩基配列決定にはクローニングが必要であること、3) *P. wickerhamii*にはITS領域の配列が異なる2つの遺伝子型が存在することが明らかとなった。これらの成果は、*P. wickerhamii*の種同定にPCRによる簡便な遺伝子検査が有用であることを示すだけでなく、*P. wickerhamii*のrDNAのゲノム内多型や地理的分布と遺伝子型との関連性など、病原藻類の分子進化に関する新たな研究テーマの発掘にも繋がっており、プロトテカの

臨床的および基礎的研究に貴重な手がかりを提供するものであると結論付けている。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、皮膚プロトテカ症患者由来のプロトテカ臨床分離株および他の研究機関から分与されたプロトテカ標準株や臨床分離株を対象材料としている。培養や鏡検、生化学的性状検査は、従来から用いられてきた方法で実施している。遺伝子解析に用いた、PCR、クローニング、塩基配列決定および系統樹解析も、既に確立された方法で行っている。組換えDNA実験については所定の手続きを経た上で、関連法令を遵守して実施された。従って、研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

従来、プロトテカ症は稀な疾患と考えられており、研究報告例は未だ少ない。特に、*P. wickerhamii* のD1/D2領域やITS領域についてこれほど詳細に解析を行ったのは当該研究が初めてである。*P. wickerhamii*についてITS領域のPCRを用いて簡便に種同定が可能であることを示す一方、D1/D2領域やITS領域のゲノム内多型の存在や地理的分布と関連する可能性のある遺伝子型（1型と2型）の存在を示したことは、従来のプロトテカ研究の流れに一石を投ずるものであり、本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、プロトテカ臨床分離株と適切な対照株を用いて、確立された実験手法による解析を行っており、そこから導き出された結論は論理的に矛盾するものではなく、微生物学、感染症学、皮膚科学、臨床検査医学、病理学など関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文は、プロトテカ症の原因として最も多く分離される*P. wickerhamii*を簡便かつ正確に同定する方法として、ITS領域のPCRを用いた遺伝子検査の有用性を明らかにしている。また、*P. wickerhamii*のrDNAのゲノム内多型や地理的分布と遺伝子型との関連性など、プロトテカに関する新たな研究テーマの発掘にも繋がっている。従って、プロトテカ症の臨床や分子疫学、病原微細藻類の分子進化に関する基礎研究など、医学分野の様々な側面に役立つ研究であると評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、微生物学や分子生物学の理論を学び実践した上で、作業仮説を立て実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し貴重な知識を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌に掲載されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判断した。

(主論文公表誌)

Plos One

(8 : e81223, 2013)