
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus restrictus</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Eurotium herbariorum</i>	<i>Trichosporon asahii</i>

図 2. 供試菌を接種して 28 日間培養後の天井パネル用石膏ボード②

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)

東日本大震災にみる災害時居住環境を汚染する真菌のアレルギーリスク評価
及び予防衛生管理に関する研究

分担研究報告書

室内環境を汚染する真菌のアレルゲンの多様性に関する研究

研究分担者	渡辺 麻衣子	(国立医薬品食品衛生研究所)
研究協力者	鎌田 洋一	(岩手大学 農学部獣医学科)
	大波 純一	(独立行政法人科学技術振興機構 バイオデータベースセンター)
	小林 直樹	(東京工業大学大学院 生命理工学研究科)
	木村 悟隆	(長岡技術科学大学 工学部生物系)
	小沼 ルミ	(東京都立産業技術研究センター)

研究要旨

Aspergillus versicolor のアレルゲン遺伝子のアミノ酸配列の多様性について検討する目的で、複数の *A. versicolor* 仮設住宅およびその他環境由来分離株のアレルゲン遺伝子 Asp-v-13 のアミノ酸配列を決定し、比較解析を行った。平成 25 年度の検討では、*A. versicolor* の Asp_v_13 において、アミノ酸配列の多様性が確認され、10 の新たな allele が発見された。今年度、アミノ酸配列のマルチプルアライメントとエピトープに相当する配列部位の特定を行ったところ、アミノ酸配列の変異は報告されたエピトープを形成する配列部分にも入っており、エピトープの欠失および新規エピトープの出現が予想され、同一菌種内でもアレルゲン性の程度に違いがある可能性が示された。さらに、菌株の系統解析を行ったところ、各系統においては明確な allele の偏りが認められ、Asp_v_13 の allele の出現と系統には相関関係があることが示された。当該菌の血清学的検査の妥当性を向上させるためには、同一菌種内のエピトープの多様性に考慮する必要があると考えられた。

A. 研究目的

住環境の真菌汚染がもたらすヒトへの健康被害の中でも、アレルギーは、あらゆる年齢

層が罹患し、患者数も非常に多い疾患群である。本課題の他分担研究の成果から、仮設住宅の多くの世帯の室内空気では、アレルギー

性が最も強い真菌のひとつとして認識されている *Aspergillus* 属菌の検出頻度は、被災していない一般的な住宅室内の傾向よりも比較的高いこと、*Aspergillus* 属菌のうちでは *A. versicolor* の検出頻度・濃度が高いレベルにあることが明らかとなった。*A. versicolor* はアレルギー患者発生事例の報告がある¹⁾。さらに患者血清中の抗体と結合性のあるアレルゲンタンパクの産生が確認され、ゲノム中にアレルゲン産生遺伝子 Asp-v-13 の存在も報告されており、エピトープ部位の特定もなされている²⁾。仮設住宅において本菌によるアレルギー被害が懸念される。一方で、本課題において *A. versicolor* と同定された株の中に、形態的特徴に差異が見られる株が存在し、種内で形態的多様性が認められた。また、本課題の研究代表者らの過去の研究から、*Aspergillus fumigatus* はアレルゲン遺伝子 Asp-f-3 のアミノ酸配列に多様性を持ち、新たなエピトープの出現も確認された。これらのことから、*A. versicolor* は種内においても遺伝的多様性が存在し、株間でのアレルゲン性も多様性を持つ可能性が考えられる。

そこで本分担研究では、菌種内の Asp-v-13 遺伝子の多様性の有無、および菌株間の遺伝的多様性を確認することを目的として、仮設住宅室内空気から本課題の成果によって数多く分離された *A. versicolor* 分離株を用いて、Asp-v-13 遺伝子のアミノ酸シーケンスの比較解析、および菌種内での遺伝的多様性の検証のため菌株の系統解析を行った。

B. 研究方法

本課題の H24 および 25 年度の研究成果から得られた、石巻市内仮設住宅室内空気由来の

A. versicolor 31 株を供試した。過去の研究結果を参照し、真菌からの DNA 抽出に適した菌体培養法および SDS 法³⁾を用いて、*A. versicolor* 菌体から DNA 抽出を行った。DNA 抽出の後、Asp-v-13 遺伝子、および供試菌株のゲノム全体の遺伝的多様性を検討するため β チューブリン(β -tub)遺伝子の PCR 反応およびシーケンス反応を行い、塩基配列を決定した。PCR 反応およびシーケンス反応には、過去の研究^{2, 4)}から引用したプライマーおよび反応条件を用いた。PCR 反応は TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ)を、シーケンス反応は BigDye Terminators v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)をそれぞれ用いて行った。各反応は、添付の実験マニュアルに従って行った。シーケンス反応産物の電気泳動は Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems)を用いて行った。得られた塩基配列は、GENETYX ver. 10 (ゼネティックス)を用いて編集した。Asp-v-13 遺伝子の塩基配列の翻訳およびアミノ酸配列のマルチプルアライメント、および β -tub 遺伝子の塩基配列を指標とした系統解析は、Mega ver. 4.1⁵⁾を用いて行った。Asp-v-13 遺伝子のアミノ酸配列におけるエピトープ領域にあたる配列の推定は、過去の研究結果²⁾を参照して特定した。

C. 研究結果

β -tub 遺伝子塩基配列を指標として構築した系統樹を参照し、供試菌株をグルーピングしたところ、6 系統に分類された (図 1)。また、Asp_v_13 のアミノ酸配列を株間で比較した結果を図 2 に示す。31 株の *A. versicolor* の Asp_v_13 遺伝子のアミノ酸配列には、10 個の異なる allele が検出され、*A. versicolor* 種内における Asp_v_13 遺伝子の遺伝的多様性が示された。

さらに詳細に配列を検討した結果、Asp_v_13 遺伝子のエピトープ領域においても、allele 間でアミノ酸が異なる位置が存在することが明らかとなった。各系統における allele 出現頻度を比較したところ、 β -tub 遺伝子塩基配列を指標とした系統樹上で現れた 6 つの各系統と allele は完全に 1 対 1 の対応にはならなかったが、各系統においては明確な allele の偏りが認められ (図 2)、Asp_v_13 遺伝子の allele の出現と菌株の系統には相関関係があることが示された。

D. 考察

石巻市内仮設住宅から分離された *A. versicolor* が持つ Asp-v-13 は、これまで報告されている本遺伝子の allele と全て異なるタイプであることが明らかとなった。また、これまでに予想されているエピトープ領域外にも多数のアミノ酸置換が検出されており、新たなエピトープの出現の可能性も考えられた。これらのことから、国内に分布する *A. versicolor* はアレルギー性の程度に違いを發揮する可能性が示唆された。また、Asp_v_13 遺伝子の allele の出現と菌株の系統には相関関係があることが示されたことから、本菌の Asp_v_13 遺伝子の多様性は、菌自体の系統分類に則したゲノムの多様性から生じたものである可能性が高い。今後、当該菌の血清学的検査の妥当性を向上させるためには、同一菌種内のエピトープの多様性に考慮する必要がある。本菌を分子系統分類学的に整理したうえで、Asp_v_13 の多様性についての比較解析を進めることによって、Asp_v_13 遺伝子のアレルギーとしての全貌が明らかになると考える。

E. 結論

国内に分布する *A. versicolor* のアレルギー遺伝子において、アミノ酸配列の多様性が確認され、同一菌種内でも複数の明確に分かれた系統が存在し、これと関連して各系統にはアレルギー性の程度に違いがある可能性が示された。当該菌の血清学的検査の妥当性を向上させるためには、同一菌種内のエピトープの多様性に考慮する必要があると考えられた。

F. 参考文献

1. 田代隆良. 肺アスペルギルス症の病態と呼吸器検体より分離された *Aspergillus* 属の臨床的意義. 2009. 日本臨床微生物学会誌, 19:67-75.
2. Shi and Miller, Characterization of the 41 kDa allergen Asp v 13, a subtilisin-like serine protease from *Aspergillus versicolor*. 2011. *Molecular Immunology* 48:1827-1834.
3. Watanabe, M., Lee, K., Goto, K., Kumagai, S., et al.: Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA. 2010. *J. Food Prot.*, 73:1077-1084.
4. Glass, N. L., Donaldson, G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:1323-1330.
5. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S.: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. 2007. *Mol. Biol. Evol.*, 24:1596-1599.

G. 学会発表

1. 誌上発表

特に無し

2. 学会発表

大波純一, 渡辺麻衣子, 山田 修, 水谷 治,
高橋 徹, 川上裕司, 橋本一浩, 清水公德, 高
橋治男, 横山耕治, 鎌田洋一. カビアレルギー
データベースの構築とその活用. 日本防菌防
黴学会第 41 回年次大会, 2014.9.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し。

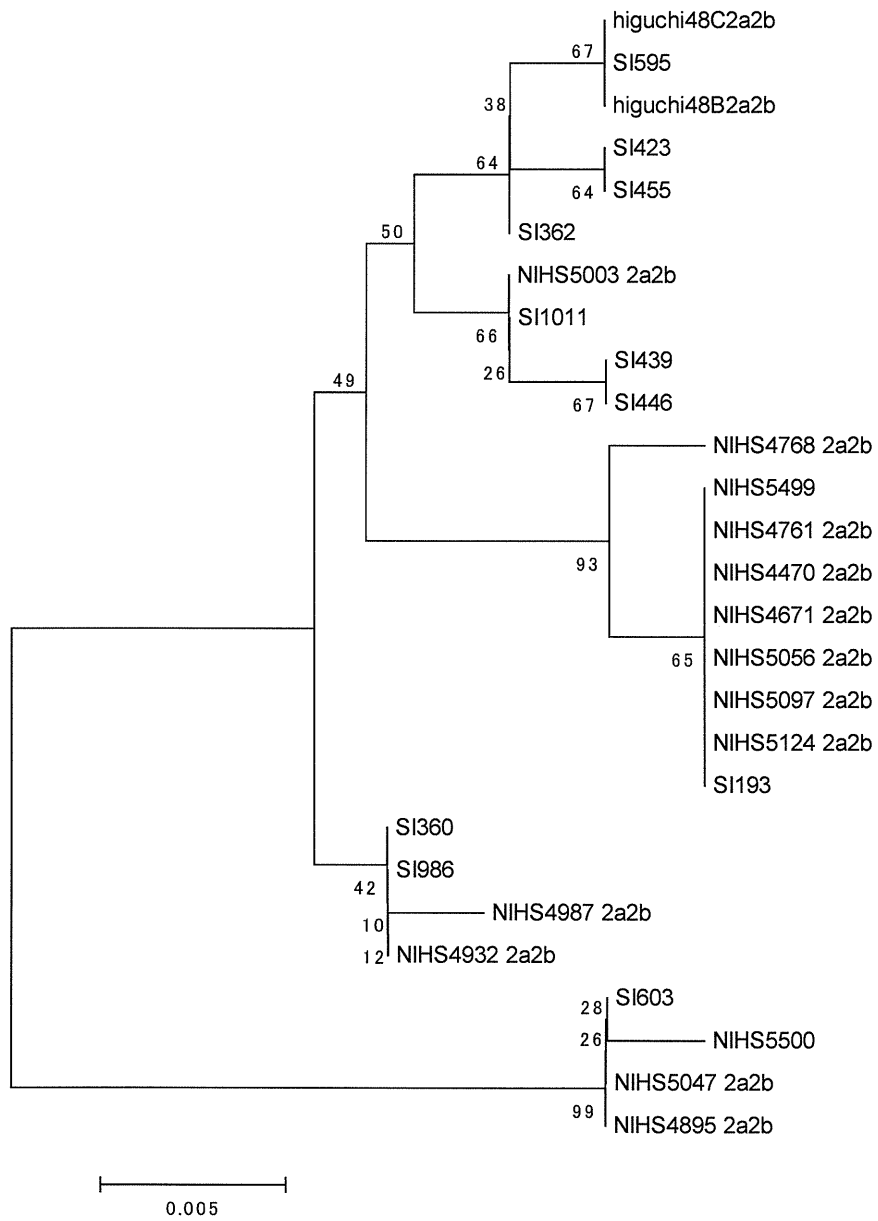


図 1. 供試した *Aspergillus versicolor* 株の分子系統樹

Group	Strain No.	GenBank :における 記載種	Allele No.																								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
			Epitopes region (IgE: allele site is in IgE epitope region, IgG: allele site is in IgG epitope region)																								
			IgE	IgE																							
			IgG	IgG																							
1	IUIS_Asp_v_13	不明		T															S								
2	Strain01	Ac		T																							
	Strain02	Ac		T																							
	Strain03	Ac		T																							
	Strain04	Ac		T																							
	Strain05	Ac		T																							
	Strain06	Ac		T																							
	Strain07	Ac		T																							
	Strain08	Ac		S	T																						
3	Strain09	Ac		S	T																						
	Strain10	Ac		S	T																						
	Strain11	Aj																									
4	Strain12	Aj																									
	Strain13	Aj																									
	Strain14	Aj																									
	Strain15	Aj																									
5	Strain16	Aj																									
6	Strain17	Apu																									
	Strain18	Apu or Av																									
	Strain19	Apu or Av																									
	Strain20	Apu or Av																									
	Strain21	Av																									
7	Strain22	Av		T																							
	Strain23	Av		T																							
	Strain24	Av		T																							
	Strain25	Av		T																							
8	Strain26	Apr				N	I	S	N	K	T	E	E	Y	I			N	A	A		D	S	D	G	S	D
	Strain27	Apr				N	I	S	N	K	T	E	E	Y	I			N	A	A		D	S	D	G	S	D
	Strain28	Apr				N	I	S	N	K	T	E	E	Y	I			N	A	A		D	S	D	G	S	D
	Strain29	Apr				N	I	S	N	K	T	E	E	Y	I			N	A	A		D	S	D	G	S	D
	consensus		R	A	H	L	A	D	Q	S	S	Q	F	V	A	S	T	G	N	N	R	E	A	N	S	S	

図 2. 供試した *Aspergillus versicolor* 株における Asp_v_13 遺伝子アミノ酸配列の比較と既報のエピトープ部位

決定したアミノ酸配列を既報の Asp_v_13 アミノ酸配列 (Group 1: IUIS Asp_v_13) と比較し、IgE および IgG 結合部位に相当する配列を特定した。既報の Asp_v_13 アミノ酸配列と異なる配列部分に、その Group が持つアミノ酸変異を記載した。GenBank における記載種は、β-tubulin 遺伝子塩基配列を GenBank の BLAST 検索にかけ、ヒットした菌種を記載した。以下は全て、新たに新種として提唱された菌種であり、広義には *A. versicolor* に属する。Ac: *Aspergillus creber*、Av: 狭義の *Aspergillus versicolor*、Aj: *Aspergillus jensenii*、Apo: *Aspergillus protuberus*、Apu: *Aspergillus puulaauensis*。

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
渡辺麻衣子	東日本大震災被災地仮設住宅におけるカビ発生影響とその対策	都市有害生物管理学会誌	印刷中	—	2015

