




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第488号	氏名	串間尚子
審査委員会委員		主査氏名	山岡吉生 
		副査氏名	西園晃 
		副査氏名	渡邊哲生 
<p>論文題目 Cloning of the lanosterol 14-α-demethylase (<i>ERG11</i>) gene in <i>Trichosporon asahii</i>: a possible association between G453R amino acid substitution and azole resistance in <i>T. asahii</i> (<i>Trichosporon asahii</i> のアゾール標的酵素 lanosterol 14-α-demethylase (<i>ERG11</i>) の遺伝子配列決定と、FLC 耐性株における同遺伝子とアミノ酸変異の検討: lanosterol 14-α-demethylase 453 番目アミノ酸のグリシンからアルギニンへの単一置換が <i>T. asahii</i> のフルコナゾール耐性化に関与する可能性がある)</p> <p>論文掲載雑誌 FEMS Yeast Research</p> <p>論文要旨 <i>Trichosporon asahii</i> (<i>T. asahii</i>) は、アゾール系抗真菌薬に対し良好な感受性を示すが、臨床検体からフルコナゾール (FLC) 高度耐性を示す菌株が検出されたという報告もある。本研究では、今まで明らかでなかった本菌のアゾール標的酵素 lanosterol 14-α-demethylase (<i>ERG11</i>) の遺伝子配列を決定し、実験的に誘導した FLC 耐性株でどのようなアミノ酸変異が認められるかを検討した。実験的に FLC 耐性株を誘導するために、FLC 感受性標準株 <i>T. asahii</i> MYA-1296 株を、1 倍 MIC 濃度の FLC (4μg/ml) を含む RPMI1640 培地に接種し、振盪培養し、菌の増殖後、その一部を同濃度、もしくは 2 倍濃度の FLC を含む培地に移し、継代を繰り返した。継代前の <i>T. asahii</i> MYA-1296 株の FLC に対する MIC は、4μg/ml であったが、1 倍 MIC 濃度の FLC を含む培地で継代培養を続けると、MIC は 32μg/ml まで上昇した。2 倍 MIC 濃度 (8μg/ml) の FLC を含む培地で継代培養すると、MIC は 32μg/ml まで上昇、さらに 4 倍 MIC 濃度 (16μg/ml) の FLC を含む培地で継代培養すると、64μg/ml まで上昇した。継代を繰り返した最終の株を、それぞれ MYA1296-4, 8, 16 とした。さらに、同菌の既知の <i>ERG11</i> 遺伝子の部分配列をもとに、5'RACE および 3'RACE 解析を行い、その全配列を解析した。高度耐性を示した MYA1296-16 株では <i>ERG11</i> の一塩基の変異を認め、グリシンからアルギニンへのアミノ酸置換が確認された。一方、中等度の耐性を示した MYA1296-4 及び 8 株では、同様の変異は認められなかった。MYA1296-16 株において置換されたアミノ酸は、過去報告されている他の真菌では保存性が高く、耐性クリプトコックス株で報告されているアミノ酸変異部分に極めて近い位置にあった。以上の結果より、FLC に長期間接触することで <i>ERG11</i> 遺伝子に変異が生じ、これによるアミノ酸置換がアゾール標的酵素の構造変化を生じ、FLC 感受性を変化させる原因のひとつになることが示唆された。すなわち、FLC の長期使用は、同薬剤に対する耐性化の一因になると考えられた。</p> <p>今回の検討では、世界で初めて、<i>T. asahii</i> の <i>ERG11</i> 遺伝子の全遺伝子配列を確定し、さらに高度 FLC 耐性株で、アミノ酸変異が引き起こされていることを確認した点で、非常に評価される論文である。今回見出されたアミノ酸変異が、本当に FLC 耐性にかかわっているかなどの証明はされていないが、多くの新しい知見を含む内容であり、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

学 位 論 文 要 旨

氏名 串間 尚子

論 文 題 目

..... Cloning of the lanosterol 14- α -demethylase (*ERG11*) gene in *Trichosporon asahii*: a possible association between G453R amino acid substitution and azole resistance in *T. asahii*

..... (*Trichosporon asahii* のアゾール標的酵素 lanosterol 14- α -demethylase (*ERG11*) の遺伝子配列決定と、FLC 耐性株における同遺伝子とアミノ酸変異の検討：lanosterol 14- α -demethylase 453 番目アミノ酸のグリシンからアルギニンへの単一置換が *T. asahii* のフルコナゾール耐性化に関与する可能性がある)

要 旨

【諸言】 *Trichosporon asahii* (*T. asahii*) は、アゾール系抗真菌薬に対し良好な感受性を示すが、近年、臨床検体からフルコナゾール (FLC) 高度耐性を示す菌株が検出されたとの報告されている。今回我々は、今まで明らかでなかった本菌のアゾール標的酵素 lanosterol 14- α -demethylase (*ERG11*) の遺伝子配列を決定し、そのアミノ酸配列を解析した。更に、実験的に誘導した FLC 耐性株との配列を比較し、アミノ酸変異を検索した。

【方法】 FLC 感受性 (血液由来株) *T. asahii* MYA-1296 株を、1 倍 MIC 濃度の FLC (4 μ g/ml) を含む RPMI1640 培地に接種し、35 $^{\circ}$ C で振盪培養した。菌の増殖後、その一部を同濃度、もしくは 2 倍濃度の FLC を含む培地に移し、継代を繰り返した。それぞれの時点の継代株は、Clinical and Laboratory Institute より推奨されている M27-A2 法に基づき、アムホテリシン B (AMB)、FLC、ミコナゾール (MCZ)、イト

ラコナゾール (ITC)、ボリコナゾール (VRC) に対する最小発育阻止濃度 (MIC) 値を測定した。この方法により、FLC に対する高度耐性株を作成した。さらに、同菌の既知の *ERG11* 遺伝子の部分配列をもとに、5'RACE および 3'RACE 解析を行い、その全配列を解析した。さらに、実験的に誘導した FLC 耐性株の SNP 解析を行い、薬剤感受性株と比較した。

【結果】継代前の *T. asahii* MYA-1296 株の抗真菌薬に対する MIC ($\mu\text{g/ml}$) は、AMB: 2、FLC: 4、MCZ: 1、ITC: 0.5、VRC: 0.125 であった。FLC の濃度を上昇させながら培養を継続した結果、1 倍 MIC 濃度、4 $\mu\text{g/ml}$ の FLC を含む培地で継代培養を続けると、FLC に対する MIC は 32 $\mu\text{g/ml}$ まで上昇した。2 倍 MIC 濃度、8 $\mu\text{g/ml}$ の FLC を含む培地で継代培養すると、FLC に対する MIC は 32 $\mu\text{g/ml}$ まで上昇した。4 倍 MIC 濃度、16 $\mu\text{g/ml}$ の FLC を含む培地で継代培養すると、64 $\mu\text{g/ml}$ まで上昇した。継代を繰り返した最終の株を、それぞれ MYA1296-4, 8, 16 とした。高度耐性を示した MYA1296-16 株では *ERG11* の一塩基の変異を認め、グリシンからアルギニンへのアミノ酸置換が確認された。一方、中等度の耐性を示した MYA1296-4 及び 8 株では、同様の変異は認められなかった。MYA1296-16 株において置換されたアミノ酸は、過去報告されている他の真菌では保存性が高く、耐性クリプトコックス株で報告されているアミノ酸変異部分に極めて近い位置にあった。

【考察】FLC に長期間接触することで *ERG11* 遺伝子に変異が生じ、これによるアミノ酸置換がアゾール標的酵素の構造変化を生じ、FLC 感受性を変化させる原因のひとつになることが示唆された。

【結語】FLC の長期使用は、同薬剤に対する耐性化の一因になると考えられた。