

	た なか えいいちろう
氏 名	田 中 英一郎
学 位	博 士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第16号
学位授与の日付	平成17年 3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Comparisons of the Laccase Gene among Serotypes and Melanin-Deficient Variants of <i>Cryptococcus</i> <i>neoformans</i> (クリプトコックス・ネオフォルマンズにおける血清型間お よびメラニン非産生株のラッカーゼ遺伝子の比較)
論文審査委員	主査 教授 山 本 達 男 副査 教授 伊 藤 雅 章 副査 教授 木 南 凌

#### 博士論文の要旨

真菌 *Cryptococcus neoformans* はクリプトコックス症の起原因菌であり、肺、中枢神経、皮膚などに感染し、免疫力の低下した患者では致死的な感染となることも多い。細胞は直径が 2.5~10 $\mu$ m の球形で、最外層に多糖類からなる莢膜をもっている。本真菌は分類的に3変種5血清型に分けられる。*C. neoformans* var. *grubii* は血清型 A で、世界各地に広く分布し皮膚にもしばしば感染を起こす。*C. neoformans* var. *neoformans* は血清型 D で、主に北ヨーロッパに分布している。皮膚への感染傾向は低いとされている。*C. neoformans* var. *gattii* は血清型 B または C で、亜熱帯から熱帯地方に分布している。自然界では、var. *grubii* と var. *neoformans* が鳥類の糞や土壤に生息しているのに対して、var. *gattii* は主にユーカリの腐食洞から分離される。

本真菌の病原因子として、莢膜、メラニン産生能、37 $^{\circ}$ Cでの増殖能、菌体外酵素などがあげられている。厚い莢膜は貪食に対する抵抗力を強くし、メラニンは抗酸化作用により貪食細胞による酸化的殺菌から逃れる働きをしている。本真菌のメラニン産生は、L-DOPA が数種類の phenoloxidase により酸化されて生成される。その一つである laccase については、Williamson (1994)により約 4.9 kb からなる遺伝子 *CNLAC1* が同定された。

本研究は、laccase 遺伝子が血清型株間でどのような系統的違いがあるか、またメラニン欠損株でメラニンが産生されない原因が laccase 遺伝子の変化によるものか、あるいはそれ以外の原因によるものかを明らかにすることを目的におこなった。

菌株： 日本、タイ、イタリアおよびブラジルで臨床材料あるいは自然界から分離された合計 64 株 (A 型 30 株, B 型 9 株, C 型 7 株, D 型 16 株, AD 型 2 株) を使用した。これらの中には、メラニン非産生株 10 株が含まれている。

方法： 菌体より genomic DNA を抽出し、PCR 法で laccase 遺伝子の一部を増幅して、その塩基配列を決定した。系統樹は近隣結合法で構築した。メラニン産生株と非産生株細胞のメラニン合成能の測定は、laccase 誘導培地で処理した細胞を toluene-ethanol で透過処理し、L-DOPA を基質にしておこなった。*CNLAC1* mRNA のノーザン解析は、laccase 誘導した菌体から全 RNA を抽出し、化学蛍光法で *CNLAC1* mRNA の検出をおこなった。

結果： *CNLAC1* の塩基配列のうち約 600 塩基の配列を比較した結果、A 型株内、D 型株内、B/C 株内での変化はほとんど見られなかった。系統樹解析により、被検株は血清型 A、血清型 D および血清型 B/C の 3 クラスタに分かれ、分類学的類縁関係を支持した。メラニン非（弱）産生株の *CNLAC1* の塩基配列は、同じ血清型のメラニン産生株と同じであり、メラニン非（弱）産生が遺伝子変化によるものではないことが示めされた。また本研究により、Uno et al. (2001) がメラニン非産生株の *CNLAC1* では塩基の欠落、置換や挿入などが起こっていると報告したが、これは比較に異なる血清株を使ったためであることが明らかになった。ノーザン解析の結果、メラニン非（弱）産生株では、*CNLAC1* mRNA の発現が抑制されており、これがメラニン産生量にかかわっていることが示めされた。

## 審査結果の要旨

*Cryptococcus neoformans* は、5 種類の血清型に分類される。いずれの血清型でも、主要な病原因子としてメラニン産生能があげられている。本研究では、メラニン産生で重要な laccase 遺伝子 (*CNLAC1*) の塩基配列に着目して *C. neoformans* の分類を試みた。また、*C. neoformans* にはメラニン非産生株が存在するが、その原因を調べた。被検株は、臨床分離株と環境株の 64 株で、うち 10 株はメラニン非産生株であった。*CNLAC1* 遺伝子の塩基配列を比較解析した結果、被検株は 3 クラスタに分かれ、それぞれが異なった血清型に対応した。一方、メラニン非産生株では、*CNLAC1* 遺伝子配列には変異を認めなかったが、mRNA の発現は抑制されていた。

以上、本研究は *CNLAC1* 遺伝子配列解析が *C. neoformans* の分類に有用であること、そしてメラニン非産生の原因が転写レベルにあることを示した点に学位論文としての価値を認める。