

論文の内容の要旨

氏名：萩生田 遼

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：室内環境における好乾性真菌 *Aspergillus* 属 *Restricti* 節の種多様性と地理的分布

はじめに

ハウスダストは、花粉やダニと並び臨床における重要性が高いアレルゲンである。本研究で着目した *Aspergillus* 属 *Restricti* 節はハウスダストからの検出頻度が高いアレルゲン起因菌を含む分類群として認識されている。近年本分類群の新しい分類体系が確立され、従来よりも多様な菌種が含まれることが明らかになった。この分類体系を反映した多様性調査は世界的に行われていない。本分類群の分離報告は室内環境由来のものが占め、野外環境における分布域は殆ど分かっていない。このような背景から、新しい分類体系に基づく室内環境の種多様性の実態、各種の地理的スケールでの分布パターン、室内環境と野外環境の関連性を明らかにすることが環境医学的に重要と考え、以下の 6 つの研究課題を遂行した。第 1 章では菌種の同定に適切な遺伝子領域の検討、第 2 章では本邦のハウスダストの種多様性と各種の分布特性の解明、第 3 章では第 2 章で発見された新規分類群の記載、第 4 章では培養実験による野外環境におけるハビタットの推定、第 5 章では第 4 章で推定されたハビタットの一つである海洋における分布の実態解明、第 6 章では分子系統学的及び集団遺伝学的手法による地理的距離が分布形成に及ぼす影響の評価を行なった。最終的にこれらの研究結果を基に、本分類群の本邦における地理的スケールでの分布形成プロセスについて総合的に考察した。

第 1 章 種同定のための DNA バーコード領域の検討

【目的】

形態情報に DNA 情報を加味した新しい分類体系の確立により、本分類群は 4 シリーズ 23 菌種から構成された。これらの菌種は形態観察により種を区別することが困難な種も存在する。次章以降で行う多様性調査は迅速で正確な種同定が求められる。そこで本章では本邦の室内環境から分離培養された菌株を対象に、種同定を効率的に行うための DNA バーコード領域の検討を行なった。

【方法】

本邦の室内環境から分離培養された 87 菌株から DNA 抽出を行い、rRNA ITS 領域 (ITS)、 β チューブリン遺伝子 (*benA*)、カルモジュリン遺伝子 (*CaM*)、RNA ポリメラーゼ II 遺伝子 (*RPB2*) の塩基配列を決定した。これらの塩基配列を基に分子系統解析と形態観察により菌種の同定をした。

【結果および考察】

遺伝子毎の分子系統解析の結果、*CaM* と *benA* は種同定を行う上で十分な変異が蓄積されていることが分かった。一方で ITS と *RPB2* では *Penicillioides* シリーズ内の菌種を分けることができなかった。*benA* の PCR 増幅の成功率は 65%であったのに対し、*CaM* は 100%であった。これらの結果から DNA バーコード領域として、*CaM* が適当であると考えた。

第 2 章 室内環境における種多様性と種の分布特性

【目的】

室内環境におけるアレルゲン起因菌の地理的スケールの分布の制限要因は分かっていない。本章では本邦の異なる気候帯にまたがる広い範囲でハウスダストを採取後、前章で明らかにした DNA バーコード領域に基づく種同定を行った。得られた種多様性データを基に現在の分布に対する制限要因を評価した。

【方法】

38 都道府県 122 軒の住宅の棚上のハウスダストを滅菌綿棒により合計 336 サンプル採取した。採取したサンプルは DG18 培地を用いた希釈平板法により分離培養を行なった。得られた 986 菌株は *CaM* の塩基配列と形態観察により菌種の同定をした。目的変数を各住宅における菌種毎の有無データ、説明変数を施設、住宅形態、住宅構造、周辺環境、年平均気温、年間降水量、清掃頻度、換気頻度、海岸からの距離とした

一般化線形モデルを用いて主要菌種毎の分布の制限要因を推定した。

【結果および考察】

本邦のハウスダストから未記載種を含む 16 菌種の分布が確認された。特に *A. penicillioides*, *A. clavatorphorus*, *A. magnivesiculatus*, *A. restrictus*, *A. glabripes*, *A. vitricola* は広域的な分布が確認された。統計解析の結果、これら 6 菌種の分布はいずれも清掃頻度により制限されていることが分かった。さらに *A. penicillioides* と *A. magnivesiculatus* はこれに加え海岸からの距離が、*A. restrictus* は年平均気温が分布を制限していることが分かった。これらの結果から、ハウスダストに生存する本分類群の主要菌種の分布が異なる環境要因に制限されていることが初めて明らかになった。

第 3 章 室内環境で発見された新規分類群の記載

【目的】

第 2 章で室内環境の種多様性の調査を行った結果、本分類群の未記載種と考えられる菌株を獲得した。本章ではこの菌株について、複数遺伝子の塩基配列とミトコンドリアゲノム配列を対象とした分子系統解析及び形態観察の結果に基づき分類学的検討を行った。

【方法】

供試菌株は、ITS、*CaM*、*benA* 及び *RPB2* の塩基配列とミトコンドリアゲノムの配列を決定した。これらの情報を基に分子系統解析を行った。形態観察及び PDA + 20% NaCl における無性孢子形成の誘導を行った。

【結果および考察】

4 領域の結合データに基づく分子系統解析を行った結果、新規分類群は本分類群の祖先的系統の *A. halophilicus* と姉妹群であることがわかった。この点はミトコンドリアゲノム配列に基づく分子系統解析においても支持された。形態観察の結果、*A. halophilicus* と同様、新規分類群はホモトリックで子嚢果の形成がみられたが、子嚢果の大きさ、子嚢胞子の表面構造、無性孢子の形成がない点において違いがみられた。これらの結果に基づき新規分類群に対し新種 *Aspergillus verrucosus* を提案した。

第 4 章 生理学的特性に基づく野外環境における分布域の推定

【目的】

第 2 章で本邦の室内環境に少なくとも 16 菌種の分布が確認された。野外環境のハビタットを推定するためには各菌種の生理学的特性の理解が必要であると考え、本章ではこれら 16 菌種を対象に、野外環境での分布に影響を及ぼす可能性のある、(1) 耐塩性、(2) 至適 pH、(3) 炭酸カルシウム可溶化能を明らかにした。

【方法】

第 2 章で分離された 16 菌種 986 菌株について、*CaM* の塩基配列を基に分子系統解析を菌種毎に行なった。その結果を基に同一種内の系統的に異なる 109 菌株を供試菌株として選抜した。これらの菌株は、(1) 0, 5, 10, 15, 20, 25% NaCl を添加した MEA 培地上での菌糸成長量、(2) pH 3, 5, 7, 9, 11 に調整した DG18 培地上での菌糸成長量、(3) 炭酸カルシウム添加培地上でのハロの有無を評価した。各実験は 1 菌株につき 3 平板行なった。

【結果および考察】

培養実験の結果、以下の点が明らかになった。(1) いずれの菌種においても 5–20% NaCl で著しく成長した。(2) いずれの菌種においても至適 pH は pH 5–7 であった。(3) *Halophilici* シリーズを除く 3 シリーズで炭酸カルシウムの可溶化が確認された。これらの特徴は、真菌の他の分類群では殆どみられず野外環境のハビタットが限定的であることを示唆している。本章の結果を受けて推定される野外環境のハビタットとして海洋やカルスト台地が挙げられた。

第 5 章 海洋表層水における種多様性評価

【目的】

第 4 章で本分類群の野外環境のハビタットとして海洋が推定された。本章では室内環境に分布する本分類群の起源の一つとして海洋表層水が考えられるか検討した。

【方法】

静岡県下田市と鹿児島県奄美市の海岸 4 サイトにおいて海洋表層水を合計 32 サンプル採水した。フィル

ター濾過後、65% スクロースを使用した好稠性培地を用いて希釈平板法により分離培養を行なった。得られた菌株の菌種の同定は第 2 章に従った。種同定の結果を基に、各菌種の調査地点毎の試料数あたりの出現頻度を算出した。

【結果および考察】

調査地の海洋表層水から *A. caesiellus*, *A. penicillioides*, *A. restrictus*, *A. reticulatus* の 4 菌種の分布が確認された。これらはいずれも室内環境から分離報告がある菌種である。*Aspergillus penicillioides* の出現頻度 (20–60%) が高く、調査地に関わらず検出された。また、*A. restrictus* の出現頻度は奄美市で *A. penicillioides* について高かった (20%)。これらの結果から海洋は本分類群の野外環境のハビタットのひとつであることが示唆された。

第 6 章 アレルゲン起因菌の分子系統地理

【目的】

第 5 章では室内環境で高頻度かつ広域で検出された *A. penicillioides* と *A. restrictus* が、本邦の海洋表層水に普遍的に分布していることが確認された。本章では、これら 2 菌種の地理的な遺伝構造を室内と野外環境由来の菌株を用いて評価した。

【方法】

第 2 章と 5 章で分離された *A. penicillioides* 69 菌株 (海洋由来 7 菌) と *A. restrictus* 26 菌株 (海洋由来 2 菌株) を供試菌株とした。DNA 抽出後、ゲノム中に散在する大量の一塩基多型 (SNP) を網羅的に検出できる MIG-seq 解析を行い、各菌株の遺伝子型を決定した。得られた SNP データを基に地理的な遺伝構造がみられるか検討するために分子系統解析及び STRUCTURE 解析を行った。

【結果および考察】

Aspergillus penicillioides で 80 遺伝子座、*A. restrictus* で 30 遺伝子座の SNP に基づき各菌株の遺伝子型を決定した。これらのデータを基に分子系統解析と STRUCTURE 解析を行った結果、両菌種ともに遺伝的交流の少ない複数のクラスターから構成された。また、各クラスターを構成する菌株に地理的距離や分離源に依存した傾向はみられなかった (図 1)。これらの結果から、両種とも地理的な遺伝構造はみられなかった。

総合考察

本研究により、本邦のハウスダストから新種と日本新産種 11 菌種を含む 16 菌種の分布が確認された。中でも重要なアレルゲン起因菌である *A. penicillioides* と *A. restrictus* は、本邦において広域的に分布していることがわかった。どちらの種も地理的な遺伝構造がみられなかったことから、現在の室内環境における地理的スケールでの分布は、*A. penicillioides* は清掃頻度と海岸からの距離、*A. restrictus* は清掃頻度と年平均気温の影響を受け形成されていると考えられる。このことは、迫り来る地球温暖化による海面上昇と年平均気温の上昇が、*A. penicillioides* と *A. restrictus* の潜在的な分布域の変化をもたらす可能性を示しているのと同時に、室内環境を適切な頻度で清掃を行うことでこれらの種の定着を抑えることができることも示している。超高齢化社会を迎える本邦において室内環境の真菌により引き起こされるアレルギー疾患は今後増加する可能性があり、本研究で得られたアレルゲン起因菌毎の分布の特性や将来予測はアレルギー対策を考える上で重要な一側面であると思われる。