

令和元年6月16日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08769

研究課題名(和文) 病原酵母クリプトコックスの低酸素ストレス応答の分子細胞シグナリング解析

研究課題名(英文) Molecular and cellular signaling analysis of hypoxic adaptation of pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*

研究代表者

川本 進 (KAWAMOTO, Susumu)

千葉大学・真菌医学研究センター・客員教授

研究者番号：80125921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、先行研究より、病原酵母 *Cryptococcus neoformans* (クリプトコックス) において、低酸素ストレス応答機構と細胞周期制御機構とは深く関連していることを明らかにしており、本菌の低酸素ストレス応答機構の解析をさらに進めるとともに、それに深く関連する細胞周期制御機構を含めた全体像を探るため、本菌の細胞周期制御機構関連遺伝子などの解析を進めた。また、上記に関連して、クリプトコックスのカイコ感染モデルや低酸素応答機構、中枢神経親和性などについて、考察を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原酵母 *Cryptococcus neoformans* (クリプトコックス) は我が国に常在する真菌の中で最も病原性が強く、易感染患者、特にエイズ患者の直接死因としても極めて重要な真菌であり、さらなるその基礎研究が強く望まれて来た。我々は、クリプトコックスの細胞周期制御機構を研究中に、本菌のユニークな低酸素ストレスへの応答現象を見出し、解析して来たが、本研究により、本菌の低酸素ストレス応答機構や細胞周期制御機構、また、それらの関連性の解析、考察を進め、分子細胞学的理解がさらに進んだ。

研究成果の概要(英文)： For the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* to cause disease, it must adapt to the host environment, which is very different from the natural habitat. We have reported the role of the transcription factor gene in slowdown of proliferation and survival under reduced aeration in *C. neoformans*. We identified and analyzed, in *C. neoformans*, components of the G2-M control machinery, Wee1 kinase and Cdc25 phosphatase homologues, which are involved in the inhibition and activation, respectively, of the Cdk1-cyclin complex at the mitotic entry checkpoint. Our study demonstrated a tight molecular link between hypoxic adaptation and cell cycle regulation in *C. neoformans*. We discussed the molecular link between them, and also infection model using silkworm, and neuro-tropism of *C. neoformans*.

研究分野：分子細胞医真菌学

キーワード：低酸素 細胞周期 病原酵母 環境応答 シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病原酵母 *Cryptococcus neoformans* (クリプトコックス) は我が国に常在する真菌の中で最も病原性が強く、また、世界的には、易感染患者、特にエイズ患者の直接死因としても極めて重要な真菌であり、そのさらなる基礎研究が強く望まれている。本菌は生育に酸素が必須な偏性好気性酵母であるが、自然環境からヒトに感染時、肺に感染して血流に乗り、血液脳関門を通過後、脳内に至って髄膜炎等を起こすと考えられており、高酸素環境(自然環境、肺)から低酸素環境(血流、脳内)への劇的な酸素濃度変化などに打ち勝って初めて増殖し病原性を示す。我々は、本菌の細胞周期制御機構を研究中に、本菌のユニークな低酸素ストレスへの応答現象を見出し、本菌の低酸素ストレス応答機構と細胞周期制御機構とは深く関連していることを明らかにして、本菌における低酸素応答遺伝子として転写因子遺伝子等を見出し、報告して来た。

2. 研究の目的

我々は、我々自身の先行研究により、*C. neoformans* の低酸素状態に対するストレス環境応答は本菌の病原性発揮にも深く関連する病原因子の一つと考えられ、低酸素ストレス応答機構と細胞周期制御機構とは深く関連していることが明らかにして来た。低酸素ストレス応答機構とそれに深く関連する細胞周期制御機構を含めた全体像を探るため、本菌の低酸素ストレス応答関連遺伝子や細胞周期制御関連遺伝子、細胞増殖に関連する遺伝子などのさらなる同定、解析を進め、考察を進める。

3. 研究の方法

C. neoformans の低酸素応答遺伝子、細胞周期制御関連遺伝子などを分子クローニングして、顕微鏡観察などの細胞学的手法、一酸化窒素 (NO) 検出キットを用いた一酸化窒素 (NO) 測定などの生化学的手法、遺伝子クローニング、塩基配列シーケンスなどの分子生物学的手法などを用いて、それらの構造、性質、機能などについて解析を行って考察した。

4. 研究成果

我々は、我々自身の先行研究より、病原真菌 *Cryptococcus neoformans* (クリプトコックス) において、低酸素ストレス応答機構と細胞周期制御機構とは深く関連していることを明らかにしており、本菌の低酸素ストレス応答機構の解析をさらに進めるとともに、それに深く関連する細胞周期制御機構を含めた全体像を探るため、本菌の細胞周期制御機構関連遺伝子などの解析を進めた。本菌の低酸素ストレス応答転写因子遺伝子や低酸素応答関連候補遺伝子や、Wee1、Cdc25 などの細胞周期制御関連遺伝子、細胞増殖関連遺伝子 Oat1 などを、さらに同定、解析し、考察を進めた。すなわち、Wee1、Cdc25 は、それぞれ、kinase、phosphatase として、細胞周期 G2-M 制御チェックポイントで働き、一方、細胞増殖には、DNA、RNA 合成の素材としてピリミジンの合成が必須であり、最初にできるピリミジン骨格化合物であるオロト酸はピリミジン合成系の鍵物質と言えるが、Oat1 は、オロト酸トランスポーターとして機能している可能性を示唆し、さらに本菌の病原性にも関わっていることを見出した。

また、本菌において、生体の情報伝達物質である一酸化窒素 (NO) の関与の可能性の検討を進めるなどした。細胞外 NO について、NO 産生試薬 SNP (sodium nitroprusside) 存在下、過酸化水素などのストレスを、SNP 濃度依存的に増強して、病原真菌 *Candida albicans* を死滅させる効果が報告されているが、本菌でも検討を試みた結果、NO による *C. neoformans* を死滅させる効果は *C. albicans* に比較するとやや弱いと同様の効果が得られ、菌体外 NO の真菌感染防御における重要性が示唆された。

さらに、クリプトコックスのカイコ感染モデルや低酸素応答の分子細胞シグナリング機構に

ついて、我々のこれまでの研究成果を中心に、考察した。

一方、クリプトコックスは、ヒトに感染時、肺に感染して血流に乗り、血液脳関門 (Blood Brain Barrier: BBB) を通過後、脳内に至って致命率の高い髄膜炎などを引き起こすが、本菌が BBB を越えて行くメカニズムに関する研究について、考察した。すなわち、本菌は高酸素環境 (自然環境) から肺に感染し血流に乗って低酸素環境 (脳内) へ移動するにつれて酸素濃度が急激に低下して行くという、生体内での劇的な環境変化によるストレス等に打ち勝ってはじめて増殖し病原性を示すと考えられ、大きく異なる酸素レベル(自然環境 >> 肺 >> 血流 >> 脳) に適応するための、本菌の「低酸素状態に対する環境応答現象」は、その血液脳関門通過など病原性発揮にも深く関連することが想定され、本菌の血液脳関門通過などに必要な、一種の病原因子と考えられる。本菌の低酸素環境応答遺伝子として、我々の先行研究で見いだした転写因子 CrZ1/Sp1 遺伝子が、本菌の血液脳関門通過に関与する可能性についても考察した。

ところで、病原真菌 *Aspergillus fumigatus* においては、クリプトコックスの場合と同様、菌が感染する際、肺組織への侵入部位では酸素濃度が低下することが知られており、菌は低酸素環境に適応できない場合、感染を進行させることができないが、我々が見出した新規転写因子 AtrR が、低酸素下での生育に深く関わることなどを見出して考察を進めた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

川本 進 : 病原真菌クリプトコックスの中枢神経親和性の機序の理解に向けて. *Neuroinfection* 23: 84-89, 2018. (査読有)

川本 進 : 病原酵母クリプトコックスの低酸素ストレス応答. *細胞* 50: 44-47. 2018. (査読有)

Matsumoto Yasuhiko, Shimizu Kiminori, Kawamoto Susumu, Sekimizu Kazuhisa: Silkworm infection model to evaluate antifungal drugs for Cryptococcosis. *Medical Mycology Journal* 58: E131-E137, 2017. (査読有)

Toh-e Akio, Ohkusu Misako, Shimizu Kiminori, Takahashi-Nakaguchi Azusa, Kawamoto Susumu, Ishiwada Naruhiko, Watanabe Akira, Kamei Katsuhiko: Putative orotate transporter of *Cryptococcus neoformans*, Oat1, is a member of the NCS1/PRT transporter super family and its loss causes attenuation of virulence. *Current Genetics* 63: 697-707, 2017. DOI: 10.1007/s00294-016-0672-5 (査読有)

Hagiwara Daisuke, Sakai Kanae, Suzuki Satosh, Umemura Myco, Nogawa Toshihiko Kato, Naoki, Osada Hiroyuki, Watanabe Akira, Kawamoto Susumu, Gonoï Tohru, Kamei, Katsuhiko: Temperature during conidiation affects stress tolerance, pigmentation, and tryptacidin accumulation in the conidia of the airborne pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLOS ONE* 12: e0177050, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0177050 (査読有)

Hagiwara Daisuke, Miura Daisuke, Shimizu Kiminori, Paul Sanjoy, Ohba Ayumi, Gonoï Tohru, Watanabe Akira, Kamei Katsuhiko, Shintani Takahiro, Moye-Rowley Scott, Kawamoto Susumu, Gomi Katsuya: A novel Zn2-Cys6 transcription factor AtrR plays a key role in an azole resistance mechanism of *Aspergillus fumigatus* by co-regulating cyp51A and cdr1B expressions. *PLOS Pathogens* 13: e1006096, 2017. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006096 (査読有)

Hagiwara Daisuke, Takahashi Hiroki, Kusuya Yoko, Kawamoto Susumu, Kamei Katsuhiko,

Gonoi Tohru: Comparative transcriptome analysis revealing dormant conidia and germination associated in *Aspergillus* species: an essential role for AtfA in conidia dormancy. *BMC Genomics* 17: 358-374, 2016. DOI: 10.1186/s12864-016-2689-z (査読有)

[学会発表](計 11 件)

Kawamoto Susumu, Moranova Zuzana, Virtudazo Eric, Ohkusu Misako, Raclavsky Vladislav: Towards understanding cell cycle regulation, hypoxic adaptation and neuro-tropism in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. The 7th Global Network Forum on Infection and Immunity, 2018.

Kawamoto Susumu, Moranova Zuzana, Virtudazo Eric, Ohkusu Misako, Suganami Akiko, Tamura Yutaka, Raclavsky Vladislav: Towards understanding the molecular link between cell cycle regulation and hypoxic adaptation in *Cryptococcus neoformans*. 20th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), 2018.

Kawamoto Susumu, Moranova Zuzana, Virtudazo Eric, Ohkusu Misako, Raclavsky Vladislav: Cell cycle regulation and hypoxic adaptation in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. 2018 Annual Meeting of American Society for Biochemistry and Molecular Biology (Experimental Biology 2018), 2018.

川本 進: 病原真菌クリプトコックスの中枢神経親和性の機序の理解に向けて. 第 22 回日本神経感染症学会総会・学術大会, 2017.

萩原大祐, 川本 進: 糸状菌の薬剤応答機構を統御する転写因子の発見. 第 192 回酵母細胞研究会例会, 2017.

松本靖彦, 石井雅樹, 清水公德, 川本 進, 関水久: クリプトコックス感染症に対する抗真菌薬のカイコを用いた評価. 真菌症フォーラム 第 23 回学術集会, 2017.

Hagiwara Daisuke, Sakai Kanae, Nogawa Toshihiko, Kato Naoki, Osada Hiroyuki, Watanabe Akira, Kawamoto Susumu, Gonoi Tohru, Kamei Katsuhiko: Temperature during conidiation affects stress tolerance, pigmentation, and trypanidin accumulation in the conidia of the the airborne pathogen *Aspergillus fumigatus*. International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2017 Singapore Congress, 2017.

Kawamoto Susumu, Virtudazo Eric, Ohkusu Misako, Suganami Akiko, Tamura Yutaka: Cell cycle regulation in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* and the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2017 Singapore Congress, 2017.

Kawamoto Susumu: Our recent research projects of *Cryptococcus* yeasts: multilocus sequence typing (MLST) analysis of *Cryptococcus gattii* isolated in Brazil. Guiyang Medical University Seminar, 2016.

Moriyama Hiromitsu, Urayama Syun-Ichi, Kimura Yuri, Fukuhara, Toshiyuki, Toh-e Akio, Kawamoto Susumu: Functional analyses of novel proteins of mycoviruses infecting phytopathogenic fungi using heterologous expression system in *Saccharomyces cerevisiae*. 14th International Congress on Yeasts, 2016.

Kawamoto Susumu, Virtudazo Eric, Ohkusu Misako, Suganami Akiko, Tamura Yutaka: Towards understanding cell cycle regulation in the pathogenic *Cryptococcus neoformans* and *Saccharomyces cerevisiae*. 2016 Annual Meeting of American Society of Biochemistry and

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。