

機関番号：12501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590437

研究課題名 (和文)：病原真菌クリプトコックス細胞の生存と死の分子解析：
細胞周期制御と真菌細菌相互作用研究課題名 (英文)： **Molecular Analysis of Life and Death in Pathogenic Fungi
Cryptococcus neoformans : Cell Cycle Control and Interaction between Fungi
and Bacteria**

研究代表者

川本 進 (KAWAMOTO SUSUMU)

千葉大学・真菌医学研究センター・教授

研究者番号：80125921

研究成果の概要 (和文)： 真菌クリプトコックスの細胞周期制御の鍵分子、G1 サイクリンの分子機能解析を行い、また、本菌の細胞周期制御と低酸素ストレス状態における環境応答との連関の解析を進めた。更に、真菌クリプトコックス・細菌スタフィロコッカス相互作用における真菌細胞死を誘導する細菌側トリガー、トリオースリン酸イソメラーゼ分子 がブドウ球菌では細胞表層にも確かに局在することを、実験的手法により明白に示した。

研究成果の概要 (英文)： The G1 Cyclin *CnCln1* gene, a key molecule in the cell cycle control in a pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*, was cloned, identified and characterized. Interaction between cell cycle control and stress (hypoxia) response was analyzed. Also, localization of triosephosphate isomerase, the molecules responsible for contact-mediated killing of *Cryptococcus*, on the surface of *Staphylococcus* was demonstrated by scanning immunoelectron microscopy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子細胞医真菌学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：真菌、感染症、細胞周期、遺伝子、タンパク質、国際情報交換、チェコ：ハンガリー

1. 研究開始当初の背景

病原性酵母 *C. neoformans* は我が国に常在する真菌で病原性も強く、臨床的にも極めて重要な真菌である。本菌は、HIV 感染者や臓器移植患者など、免疫機能の低下した患者

の日和見感染症の一つであるクリプトコックス症の原因真菌であり、ヒトの肺、脳、髄膜などを侵し、とりわけエイズ患者の直接死因としても極めて重要であり、また、本症は健常者にも発症することもあり病原性の強

い真菌である。一般的に本菌による感染は、菌体を含むエアロゾルの吸入、肺胞内より血流への移行、脳髄膜などの標的臓器への侵入を経て、髄膜炎を発症するものと考えられており、本菌の病原因子としては、莢膜、メラニン色素などが言われている。しかし、本菌の感染成立過程の詳細や、あるいは、そもそも本菌の病原性発揮過程を考察するのに必要な基礎知識になるはずの、本菌の基礎的生命現象である、細胞の生存、増殖、細胞死などについての分子情報についての知見は非常に乏しいといわざるを得ない。しかるに、2005年には本菌 *C. neoformans* の全ゲノム解読の完了が報告され (Science 307: 1321-1324, 2005)、本菌の研究についても、いよいよポストゲノム、ポストシーケンスの時代に入りつつある。このような背景のもと、本研究では、本菌の宿主における病原性発揮過程を考察するための基礎情報とすべく、本菌の生存、増殖に関わる分子解析を進め、本菌の生存、増殖、細胞応答、環境適応、シグナル伝達等の基礎生命現象に関する更なる知見を得て、本菌の感染成立過程や病原性発揮機構の考察にもつなげて行きたい。

2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床的に重要な病原真菌クリプトコックス・ネオフォルマンズ *Cryptococcus neoformans* の「細胞の生存」と「細胞死」に関わる分子解析を進めることである。本菌の「生存」に関わる解析として「*Cryptococcus neoformans* の細胞周期制御の分子解析」を、また、本菌の「死」に関わる解析として「黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* 付着による *Cryptococcus neoformans* の死滅誘導の分子解析」を進める。尚、前者については、我々のこれまでの成果の更にその発展を期する

ものであり、後者は、我々 (Journal of Bacteriology 189(13): 4815-4826 (2007)) が最近、報告した新たな真菌・細菌間相互作用の更なる分子解析である。

3. 研究の方法

本菌の G1 サイクリン遺伝子 *CnCl1* の遺伝子破壊株を構築して機能解析した。モデル酵母 *S. cerevisiae* には、3種の、いわゆる、G1 サイクリン分子が知られており、それぞれの欠損変異体に、我々がクローニングした1種類の *C. neoformans* G1 サイクリン遺伝子を導入して、その細胞周期の様態の変化などを解析するなどして、本菌の G1 サイクリン遺伝子などの細胞周期制御における機能を探った。

我々は、真菌 *C. neoformans* が常在性の病原細菌 *S. aureus* の付着によって死滅する現象の分子機構解析を進めている。*C. neoformans* の死滅のきっかけになる、細菌 *S. aureus* の付着に関与する真菌側、及び細菌側の各細胞表層物質について解析、検討し、*C. neoformans* 側では莢膜主成分の莢膜多糖類 Glucuronoxylomannan (GXM)、*S. aureus* 側では表層タンパク質 Triose-phosphate Isomerase (以下、TPI と省略) (本酵素は細胞質内解糖系酵素でもある) と同定するなど、この新たに知られた「真菌・細菌間相互作用」の分子機構を解明しつつあり、黄色ブドウ球菌側で関与する分子の検証を進めるべく、免疫組織化学的研究などを進めた。

4. 研究成果

Cryptococcus neoformans には特異な細胞周期制御現象が観察され、我々は細胞周期制御の中心に位置する Cdk1 (サイクリン依存性キナーゼ 1) とそれと相互作用する制御因子

サイクリン類について解析を進めた。*CnCln1* 分子は本菌では唯一の G1 サイクリン遺伝子であると思われたが、その遺伝子破壊株が得られたことより、本菌の生存には必須ではないことが示された。*CnCln1* 遺伝子破壊株は「出芽時期が遅れ、細胞は大型化する」等「in vitro 低酸素環境下」や「in vivo 感染時」と類似した極めて異常な形態・特徴的な変化を示し、*CnCln1* は、細胞の大きさや形態、出芽と細胞分裂のタイミング、DNA 合成開始のタイミング、37°Cでの生育遅滞など幅広く細胞の形態形成や生理的機能に大きな影響を及ぼす極めて重要な細胞機能制御遺伝子であることが示された。また、CnCdk1 と CnCln1 の結合について、その構造機能相関解析を行い、生理的意義についても考察した。本菌 *CnCln1* の遺伝子を *Saccharomyces cerevisiae* において発現させその機能を検証し *S. cerevisiae* の G1 サイクリン ScCln1, ScCln2, ScCln3 との分子構造・機能の比較、*S. cerevisiae* のサイクリン依存性キナーゼ ScCDK1 と CnCln1 との間の結合などについてそのバイオインフォマテイクスの解析を行い、その結果を踏まえて分子間結合相関の生理的意義を考察した。

また、*C. neoformans* は肺で感染後、脳髄膜へ移行して病原性を発揮して行く際、高酸素環境から低酸素環境への酸素欠乏ストレス条件に打ち勝ってはじめて増殖して行くが、本菌ゲノムへのランダム挿入遺伝子変異体ライブラリーを構築し変異体の低酸素状態への応答解析などを通して、本菌において低酸素ストレス応答に関与する遺伝子の同定を行った。そのうちのひとつとして転写因子を同定し、分子生物学的、生化学的、細胞学的解析を進め、本分子の低酸素環境ストレス応答機構における意義を考察するとともに、その遺伝子破壊株を用いたマウス病原性試

験も実施するなどして考察を進めた。

更に、我々は真菌・*C. neoformans* 細胞と他の菌種細胞との相互作用に着目したところ、細菌・黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* 細胞が *C. neoformans* へ付着し、*C. neoformans* の死滅が誘導される現象を見だし、分子的解析を進めているが、一般的に細胞質に局在して機能していると言われる解糖系酵素 Triose phosphate isomerase (TPI) がブドウ球菌では細胞表層にも確かに局在することを免疫電子顕微鏡解析法や細胞凝集反応などを用いて、TPI がブドウ球菌では細胞表層にも確かに局在することを、実験的手法により明白に示した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Virutudazo EV, Kawamoto S, Ohkusu M, Aoki S, Sipiczki M, Takeo K: The single Cdk1-G1 cyclin of *Cryptococcus neoformans* is not essential for cell cycle progression but has important roles in the proper commitment to DNA synthesis and bud emergence in this yeast. FEMS Yeast Research 10(5): 605-618, 2010. (査読有)
- ② Yamaguchi M, Ikeda R, Nishimura M, Kawamoto S: Localization by scanning immunoelectron microscopy of triosephosphate isomerase, the molecules responsible for contact-mediated killing of *Cryptococcus*, on the surface of *Staphylococcus*. Microbiol Immunol 54: 368-370, 2010. (査読有)
- ③ Shimizu K, Li H -M, Virutudazo EV, Watanabe A, Kamei K, Yamaguchi M, Kawamoto S: Deletion of *CnLIG4* DNA

ligase gene in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* elevates homologous recombination efficiency. *Mycoscience* 51: 28-33, 2010. (査読有)

- ④ Li H -M, Virtudazo EV, Toh-e A, Yamaguchi M, Kawamoto S, Shimizu K: Non-homologous end joining pathway of the human pathogen *Cryptococcus neoformans* influences homologous integration efficiency but not virulence. *Mycoscience* 51: 272-280, 2010. (査読有)
- ⑤ Raclavsky V, Husickova V, Moranova Z, Ohkusu M, Fischer O, Precek J, Trtkova J, Takeo K, Kawamoto S: Growth strategy of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* submerged culture under different cultivation formats. *Folia Microbiol* 54 (4): 349-352, 2009. (査読有)
- ⑥ Raclavsky V, Pavlicek J, Novotny R, Moranova Z, Ohkusu M, Trtkova J, Takeo K, Kawamoto S: Peculiar clusters of daughter cells observed in *Cryptococcus neoformans* grown in sealed microtiter plates. *Folia Microbiol* 54 (4) : 369-371, 2009. (査読有)
- ⑦ Moranova Z, Kawamoto S, Raclavsky V: Hypoxia sensing in *Cryptococcus neoformans*: Biofilm-like adaptation for dormancy? *Biomedical Papers* 153 (3): 189-193, 2009. (査読有)

[学会発表] (計22件)

- ① Kawamoto S: Two key players of cell cycle regulation in *Cryptococcus neoformans*, Cyclin-dependent kinase (Cdk) and its regulator, Cyclin.

University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, USA, November 22, 2010.

- ② 山口正視, 池田玲子, 川本 進: 真菌細菌の菌種間相互作用における電子顕微鏡的アプローチ. 第54回日本医真菌学会総会, 真菌誌51(増刊1号): 65, 東京, 10月16-17日, 2010.
- ③ 清水公德, 太田裕子, 増田恵美, Virtudazo E, 山口正視, 川本 進: アグロバクテリウム法による *Cryptococcus neoformans* 形質転換に関する条件検討. 第54回日本医真菌学会総会, 真菌誌51(増刊1号): 65, 東京, 10月16-17日, 2010.
- ④ E. Virtudazo, M. Ohkusu, K. Shimizu, M. Yamaguchi, S. Kawamoto: *Cryptococcus neoformans* Wee1 kinase is not essential for growth but has a role in G2-M. 第54回日本医真菌学会総会, 真菌誌51(増刊1号): 77, 東京, 10月16-17日, 2010.
- ⑤ Kawamoto S, Virtudazo EV, Ohkusu M, Takeo K: Cell-cycle related genes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. 9th International Mycological Congress (IMC9): The Biology of of Fungi, Edinburgh, UK, August 1-6, 2010.
- ⑥ Kawamoto S, Virtudazo EV, Ohkusu M, Sonoda T, Miura S, Takeo K: The main cell cycle genes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. 10th European Conference on Fungal Genetics (ECFG10), Leeuwenhorst, The Netherlands, March 29-April 1, 2010.
- ⑦ Kawamoto S, Virtudazo EV, Ohkusu M, Máňová Z, Raclavský V, Takeo K:

- Molecular analysis of cell cycle regulation in *Cryptococcus neoformans*. 4th Trends in Medical Mycology. Athens, Greece, October 18-21, 2009.
- ⑧ Shimizu K, Shimizu M, Li H-M, Kawamoto S: Functional analysis of genes involved in drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. The 17th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM 2009). Program and Abstract book p. 280. Tokyo, Japan, May 25-29, 2009.
- ⑨ Ohkusu M, Kawamoto S: Difference in physiology and protein expression pattern of capsule thickness variants of *Cryptococcus neoformans*. . ISHAM 2009. Program and Abstract p. 355. Tokyo, Japan, May 25-29, 2009.
- ⑩ Virtudazo, E. V., Ohkusu, M., Ohata, M., Miklos, I., Sipiczki, Matthias, Aoki, S., Takeo, K., Kawamoto S. Understanding cell control in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. ISHAM 2009. May 25-29, 2009. Tokyo, Japan.
- ⑪ Virtudazo EV., Ohkusu M, Ohata M, Takeo K, Kawamoto S. Analysis of the role of the single G1 cyclin, CnCln1, in *Cryptococcus neoformans* cell cycle. ISHAM 2009. May 25-29, 2009. Tokyo, Japan.
- ⑫ Moranova ., Virtudazo, EV Ohkusu M, , Kawamoto S, Pospisilova K, Raclavsky V: Study of hypoxia response in *Cryptococcus neoformans*. ISHAM 2009. May 25-29, 2009. Tokyo, Japan.
- ⑬ Virtudazo EV, Ohkusu M, Ohata M, Miklos I, Sipiczki M, TakeoK, Kawamoto S: Structural and functional analysis of the single G1 cyclin CnCln1 in *Cryptococcus neoformans*. 第91回日本細菌学会関東支部総会, 千葉市, 10月23-24日, 2008.
- ⑭ Kawamoto S, Virtudazo E, Ohata M, Ohkusu M, Shimizu K, Yamaguchi M, Miklos I, Sipiczki M, Moranova Z, Raclavsky V, Takeo K: Towards molecular understanding of cell cycle regulation and cell signaling in *Cryptococcus neoformans*. 7th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis. Nagasaki, September 11-14, 2008.
- ⑮ Virtudazo EV, Ohata M, Ohkusu M, Miklos I, Sipiczki M, Takeo K, Kawamoto S: Cloning and functional analysis of the *Cryptococcus neoformans* Cdc25/Mih1 phosphatase homologue. 7th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis. Nagasaki, Japan. September 11-14, 2008.
- ⑯ Ohata M., Virtudazo EV., Ohkusu M., Takeo K., Kawamoto S: Analysis of the role of upstream ORFs in the regulation of CnCln1 expression in *Cryptococcus neoformans*. 7th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis. Nagasaki, Japan. September 11-14, 2008.
- ⑰ Moráňova Z, Husičková V, Ohkusu M, Kawamoto S, Raclavský V: Study of hypoxia response in *Cryptococcus neoformans*. 7th International Conference on Cryptococcus and

Cryptococcosis. Nagasaki, September 11-14, 2008.

- ⑱ ヴィルトウダゾ・エリック, 大畑美穂子, 大楠美佐子, Ida Miklos, Matthias Sipiczki, 竹尾漢治, 川本進. *Cryptococcus neoformans* の Cdc25 ホスファターゼホモログのクローニングと構造機能解析. 第 52 回日本医真菌学会総会, 長崎市, 9月 10-11 日, 2008.
- ⑲ 大畑美穂子, ヴィルトウダゾ・エリック, 大楠美佐子, 竹尾漢治, 川本進. *Cryptococcus neoformans* の細胞周期制御における G1 サイクリン遺伝子 upstreamORF の役割. 第 52 回日本医真菌学会総会, 長崎市, 9月 10-11 日, 2008.
- ⑳ 川本進, E. Virtudazo, 大楠美佐子, 竹尾漢治, 田村裕, Z. Moranova, V. Raclavsky: 病原酵母クリプトコックスの細胞周期制御の分子的理解に向けて. 第 2 回真菌ワークショップ研究会, 千葉, 8月 21 日, 2008.
- ㉑ Kawamoto S, Virtudazo E, Ohata M, Ohkusu M, Takeo K: Molecular approach to understanding cell regulation in a pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum, Changchun 2008 Changchun, China, July 28-August 5, 2008.
- ㉒ Kawamoto S, Virtudazo E, Ohkusu M, Sonoda T, Miyagi Y, Okuda K, and Takeo K: Structural and functional analysis of cell cycle control genes in *Cryptococcus neoformans*. 2008 Annual Meeting American Society for Biochemistry and Molecular Biology (Experimental Biology 2008), San Diego, California, USA, April 5-9,

2008.

[図書] (計 1 件)

- ① 川本進: 酵素を創る- 生物学的アプローチ - 細胞を用いたタンパク質合成: 昆虫培養細胞・バキュロウイルスベクター発現系を用いたタンパク質合成 「酵素利用技術大系~基礎・解析から改変・高機能化・産業利用まで」(小宮山真監修, エヌ・テイー・エス(東京, pp. 172-175, 東京, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川本進 (KAWAMOTO SUSUMU)

千葉大学・真菌医学研究センター・教授
研究者番号: 80125921

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: