

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590518

研究課題名(和文)病原酵母クリプトコックスの低酸素環境応答機構解析

研究課題名(英文)Molecular and cellular signaling of hypoxic adaptation in the 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・教授

研究者番号：80125921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、偏性好気性病原酵母クリプトコックス・ネオフォルマンズでは、低酸素状態でその増殖を遅くし出芽を遅らせる結果、未出芽のままいわゆるG2-アレスト状態に入ることができることを見出し、低酸素状態に適応できるこの能力は本酵母の病原因子のひとつであると言える。そのことに必要な遺伝子のひとつとして、低酸素応答遺伝子、転写因子Crz1/Sp1を同定し、遺伝子破壊株などを構築して性質を調べたところ、本遺伝子は、細胞の重要な機能に深く関わっていることを見出し報告した。

研究成果の概要(英文)： Limited aeration has been demonstrated to cause slowdown in proliferation and delayed budding, resulting eventually in a unique unbudded G2-arrest in the obligate aerobic pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. Also, the ability to adapt to decreased oxygen levels during pathogenesis has been identified as a virulence factor in *C. neoformans*. The aim of this study was to identify and characterize genes that are necessary for the proliferation slowdown and G2-arrest caused by limited aeration. This gene was identified as homologous both to calcineurin responsive (Crz1) and PKC1-dependent (Sp1-like) transcription factors. Our data demonstrate a tight molecular link between slowdown of proliferation during hypoxic adaptation and maintenance of cell integrity in *C. neoformans* and present a new role for the Crz1 family of transcription factors in fungi.

研究分野：分子細胞医真菌学

キーワード：真菌 クリプトコックス 感染症 細胞周期 低酸素応答 環境適応 G2-アレスト 転写因子

1. 研究開始当初の背景

病原酵母 *Cryptococcus neoformans* は、我が国に常在する真菌のうち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臨床的に極めて重要な真菌である。病原酵母 *Cryptococcus neoformans* は、生育に酸素が必須な偏性好気性真菌であり、本菌は、肺で感染後、脳血液関門を越え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、病原性を発揮して行く。すなわち、本菌の低酸素環境ストレス応答は、本菌感染の病原因子のひとつと言える。しかるに、本菌感染時の生体組織内 *in vivo* での(あるいは、*in vitro* でも)、本菌の低酸素環境感知システムや低酸素シグナル伝達カスケードの分子機構は、それ以上は殆ど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

我々は、本菌の細胞周期制御機構を研究中、低酸素環境条件下では細胞周期制御が flexible になるという、本菌のユニークな低酸素ストレス応答現象を見出した。本菌の「低酸素状態に対する環境応答」は本菌の病原性発揮にも深く関連する病原因子のひとつと考えられ、本菌の低酸素応答遺伝子としてを検索、同定して分子機能解析を行うことによって、低酸素応答機構の分子解析を進める。

3. 研究の方法

まず、*Agrobacterium* 法による形質転換を用いて、ゲノムランダム挿入ミュータントライブラリーを作製し、その中から低酸素環境非適応株を選抜した。次に、選抜された菌株の T-DNA 挿入部位をシーケンス解析によって特

定し、相同組換えによりその遺伝子破壊株を作製した。そして、遺伝子破壊株の低酸素条件下における性質を解析するために、本酵母の各種の性質、機能について各種試験を行って解析した。

4. 研究成果

(1) *C. neoformans* の低酸素応答遺伝子のひとつとして、カルシニューリン応答 (Crz1) 転写因子、及び、PKC1-依存性 (Sp1-like) 転写因子とに homologous な分子であり、Sp1 ファミリーにより似た分子 (*Crz1/Sp1-like gene*) を同定した。また、本分子は、本菌細胞の integrity の維持、低酸素環境下での増殖の slowdown、バイオイルム生成、フルコナゾール感受性など本菌の感染に関連した種々の細胞機能に重要な役割を持つ分子であることを明らかにすることができ、論文として報告した。

(2) *C. neoformans* の細胞周期制御機構の研究の中で、特異な低酸素応答現象を見出し、解析を進めて来たが、従来すでの詳細の研究が進んでいる *Saccharomyces cerevisiae* の細胞周期制御機構についてバイオインフォマティクス解析などを用いて更なる考察を行い新たな知見を得て、論文として報告した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

Toh-e A, Ohkusu M, Li H-M, Shimizu K, Takahashi-Nakaguchi A, Gonoï T, Kawamoto S, Kanasaki Y, Yoshikawa H, Nishizawa M : Identification of genes involved in the phosphate metabolism in *Cryptococcus neoformans*. Fug Gen Biol 80 : 19-30 (2015)

DOI: 10.1016/j.fgb.2015.04.019 (査読)

有)  
Toh-e A, Ohkusu M, Shimizu K, Kawamoto S: Positional cloning in *Cryptococcus neoformans* and its application for identification and cloning of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase. *Fung Genet Biol* 76: 70-77 (2015) DOI:10.1016/j.fgb.2015.02.007 ( 査読有 )  
Kopecká M, Yamaguchi M, Kawamoto S: The effects of F-actin inhibitor latrunculin A on pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Chemotherapy* 60(3):185-190 ( 2014 ) DOI: 10.1159/000377619 ( 査読有 )  
Shimizu K, Imanishi Y, Toh-e A, Uno J, Chibana H, Hull CM, Kawamoto S: Functional characterization of *PMT2*, encoding a protein-*O*-mannosyltransferase, in the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Fung Genet Biol* 69: 13-22 ( 2014 ) <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2014.05.007> ( 査読有 )  
Moráňová Z, Virtudazo EV, Pospíšilová K, Ohkusu M, Kawamoto S, Husičková V, Raclavský V: The *Crz1/Sp1*-like gene links survival under limited aeration, cell integrity and biofilm formation in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Biomedical Papers* 158( 2 ): 212-220 ( 2014 ) <http://dx.doi.org/10.5507/bp.2013.024> ( 査読有 )  
Suganami A, Takase N, Sugiyama H, Virtudazo EV, Kawamoto S, Tamura Y: Structure based functional distinction between *Cln1* and *Cln2* depends on the

ubiquitin-proteasome pathway. *J. Proteomics Bioinformatics* 7 ( 5 ) : 102-107 ( 2014 ) <http://dx.doi.org/10.4172/jpb.1000309> ( 査読有 )  
Urayama S-I, Fukuhara T, Moriyama H, Toh-e A, Kawamoto S: Heterologous expression of a gene of *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 strain A disrupts growth of the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol.Immunol* 58 ( 5 ) : 294-302 ( 2014 ) DOI: 10.1111/1348-0421.12148 ( 査読有 )  
Kopecká M, Kawamoto S, Yamaguchi M: A new F-actin structure in fungi: actin ring formation around the cell nucleus of *Cryptococcus neoformans*. *Microscopy* 62 ( 2 ) : 295-301 ( 2013 ) DOI: 10.1093/jmicro/dfs074 ( 査読有 )  
Kozubowski L, Yadav V, Chatterjee G, Sridhar S, Yamaguchi M, Kawamoto S, Bose I, Heitman J, Sanyal K: Ordered kinetochore assembly in the human-pathogenic basidiomycetous yeast *Cryptococcus neoformans*. *mBio* 4 ( 5 ) : e00614-13 ( 2013 ) DOI:10.1128/mBio.00614-13 ( 査読有 )  
Y. Matsumoto, S. Miyazaki, D.H. Fukunaga, K. Shimizu, Kawamoto S, K. Sekimizu: Quantitative evaluation of cryptococcal pathogenesis and antifungal drugs using a silkworm infection model with *Cryptococcus neoformans*. *J Appl Microbiol* 112 ( 1 ) : 138-146 ( 2012 ) DOI:10.1111/j.1365-2672.2011.05186.x ( 査読有 )

[ 学会発表 ] ( 計 1 2 件 )

Kawamoto S, Virtudazo EV, Moranova Z, Ohkusu M, Shimizu K, Toh-e A, Takagi H, Suganami A, Tamura Y, Raclavsky V: Towards understanding cell cycle regulation, hypoxic adaptation and nitric oxide (NO) signaling in *Cryptococcus neoformans*. 19th Congress of International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM) (Melbourne, Australia), May 3-8, 2015.

Kawamoto S: Towards understanding of cell cycle regulation and hypoxic signaling in *Cryptococcus neoformans*. 貴陽医学院講演会、貴陽医学院(貴陽、中国), December 13, 2014.

川本 進: *Cryptococcus neoformans* の細胞周期制御と低酸素ストレス応答の分子細胞シグナリング解析. 第 58 回日本医真菌学会総会・学術集学会賞記念講演、ワークピア横浜(神奈川県横浜市)、2014年11月1~2日.

川本 進: *Cryptococcus neoformans* の細胞周期制御と低酸素応答の分子機能解析. 第 87 回日本生化学会シンポジウム「感染症研究における生化学的イノベーションの最前線」、国立京都国際会館(京都府京都市)、2014年10月15~18日.

川本 進: 有用酵母研究から病原酵母研究へ. 第 21 回酵母合同シンポジウム、東京大学伊藤謝恩ホール(東京都文京区)、2014年9月3~4日.

Kawamoto S, Eric V Virtudazo, Zuzana Moranova, Misako Ohkusu, Kiminori Shimizu, Akiko Suganami, Yutaka Tamura, Vladislav Raclavsky: Cell cycle regulation and hypoxic adaptation in pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. International Union of

Microbiological Societies Congress, (Montreal, Canada), July 27 - August 1, 2014.

Kawamoto S, Virtudazo EV, Moranova Z, Ohkusu M, Shimizu K, Suganami A, Tamura Y, Raclavsky V: Towards understanding cell cycle control and hypoxic adaptation in *Cryptococcus neoformans*. 9th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis. (Amsterdam, The Netherlands) May 14-19, 2014.

川本 進: 病原酵母 *Cryptococcus neoformans* の細胞周期制御と低酸素応答機構の解明に向けて. 第 86 回日本生化学会大会シンポジウム「多様な生物に学ぶユニークな酵素・代謝機能とその応用」、横浜パシフィコ(神奈川県横浜市)、2013年9月11~13日.

Kawamoto S, Virtudazo EV, Suganami A, Tamura M: Cell cycle regulation mechanism in pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*: Structure-function relationship of G1 and G1/S cyclins homologue CnCln1. 2013 Annual Meeting of American Society for Biochemistry and Molecular Biology (Experimental Biology 2013), (Boston, USA), Apr. 20-24, 2013.

松本靖彦、上野圭吾、清水公德、金城雄樹、知花博治、川本 進、関水久: カイコを用いた真菌感染症研究. 第 86 回日本細菌学会総会ワークショップ「真菌感染症のニューフロンティア」、幕張メッセ(千葉県千葉市)、2013年3月18~20日.

Kawamoto S, Virtudazo EV, Suganami A, Tamura Y: Study on cell cycle control mechanism in pathogenic yeast,

*Cryptococcus neoformans*:  
Structure-function relationship of G1 and  
G1/S cyclins homologue CnCl<sub>1</sub>. 第 8  
5 回日本生化学会大会, 福岡国際会議  
場 (福岡県福岡市), 2012 年 12  
月 14 ~ 16 日.

Kawamoto S, Virtudazo EV, Suganami  
A, Ohkusu M, Tamura Y: Towards  
understanding cell cycle control in  
*Cryptococcus neoformans*:  
Structure-function relationship of G1 and  
G1/S cyclins homologue CnCl<sub>1</sub>. 18th  
Congress of the International Society for  
Human and Animal Mycology (ISHAM  
2012), Berlin, Germany, June 11-15,  
2012.

## 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) 連携研究者

萩原 大祐 (HAGIWARA Daisuke)  
千葉大学・真菌医学研究センター・  
特任助教  
研究者番号: 20612203