

総 説

Cryptococcus neoformans の細胞周期とその遺伝子

竹尾 漢 治¹ Eric Virtudazo¹ 大 楠 美佐子¹
川 本 進¹ 久 和 彰 江² 青 木 茂 治²

¹千葉大学真菌医学研究センター

²日本歯科大学新潟生命歯学部先端研究センター

要 旨

Cryptococcus neoformans の感染形態は培養形態に比べて細胞が大型化し細胞壁と莢膜は顕著に厚くなる等の特徴的な変化を示すことが知られている。また本菌の細胞周期制御は、指数増殖期では、DNA 合成が開始された後、引き続いて出芽し、さらに DNA 合成完了後、核分裂が起り、*Saccharomyces cerevisiae* によく似ていた。しかし、ストレス条件下では様相が変わり特に強いストレス下では一変した。栄養や溶存酸素などの環境の強い悪化は、生育以上に細胞周期に大きな影響を与えた。細胞分裂は抑制され、細胞が大型化し、出芽は G₂ 期にまで遅れ、さらに、未出芽で G₂ 期に停止している細胞が多く認められた。同様の変化はまた、ラット肺の感染時でも見られ、出芽のタイミングは G₂ 期まで遅れた。

細胞周期制御の中心に位置する CDC28/cdc2 ホモログを遺伝子クローニングし *CnCdk1* を単離した。これは *S. cerevisiae* や *Schizosaccharomyces pombe* の CDC28/cdc2 と高い相同性を示した。

GDSEID モチーフは非常に特異的で、これまで知られている Cdk1 全てに共通している。一方、Cdk1 以外の Cdk では保存されていない。*CnCdk1* は GDSEID モチーフが完全に一致、確かに CDC28/cdc2 ホモログということが出来た。また PSTAIRE モチーフはサイクリンとの結合部位であり、保存性の大変良いサイトである。しかし、本菌の Cdk1 ではアラニンがセリンに置き換わっていた。本モチーフが保存されていないのに Cdc28/cdc2 活性欠損を相補できる Cdk1 としては、それまで 3 例が報告されているのみで、*C. neoformans* のものは第 4 例目であり本菌の Cdc28/cdc2 ホモログの特異性を示した。また細胞周期制御に関係する他のシステムも *C. neoformans* では違いが見られた。

Key words: *Cryptococcus neoformans*, basidiomycetous yeast, CDC28 homologue, cell cycle, G₂ budding, unbudded G₂-arrest, stress response

はじめに

すべての真核生物は、DNA 合成開始と核分裂開始という共通した細胞周期制御点を持っている。この制御は子囊菌出芽酵母の *Saccharomyces cerevisiae* と子囊菌分裂酵母の *Schizosaccharomyces pombe* で詳しく調べられている^{1, 2)}。*S. cerevisiae* では細胞周期の最も重要な制御点は“スタート”で、細胞がこの点を通ると (1) 出芽の開始、(2) DNA 合成の開始、(3) 紡錘極体の複製という形で核分裂の開始が起こる。一方、*S. pombe* では通常の培養条件では細胞分裂直後すでにスタートに必要な細胞のサイズを上回っているため、DNA 合成は細胞分裂に引き続き起こる。いわば、スタートは自動的にかかる。また本酵母には出芽という出来事がない。さらに、紡錘極体の複製の開始も G₂ 期の遅い時期に起こる。この様に G₁ から S 期への移行の役割は減少するが、核分裂の開始は真の制御点として重大である。細胞周期の様相は

異なるが、しかし、細胞周期の移行を遂行する酵素の遺伝子 (*S. cerevisiae* では CDC28)、(*S. pombe* では Cdc2) は相補できるほどアミノ酸配列の保存性が高い³⁾。また多くの生物から単離されたものもしばしば同様である。

CDC28/Cdc2 活性はそれが果たす重大性から非常に複雑な制御下にあるが^{4, 5)}、サイクリンが最も大きな影響を与える。G₁ 期から S 期への移行には G₁ サイクリンとの結合が、また G₂ 期から M 期への移行には G₂ サイクリンの結合が必須である^{6, 7)}。これらの活性はさらに MIH1/Cdc25, CKS1/Suc1, SWE1/Wee1, CAK/Csk1, SIC1/Rum1 などの影響下にあり⁴⁾、これらの輪はさらに複雑な制御下にある。この様に *S. cerevisiae* の細胞周期およびそれを制御する酵素 (遺伝子産物) の研究は非常に進んでおり、かつ *S. pombe* と並んで単純な真核生物のモデルとしての地位もあって、*S. cerevisiae* の細胞周期制御機構は、基本的には、出芽酵母に一般的に成り立つと暗黙の内に考えられている。“基本的”を狭い意味に取れば、勿論全ての出芽酵母になりたつわけであるが。

深在性真菌症の起因菌として重要な真菌である *Cryptococcus neoformans* は、担子菌酵母として系統発生上

別刷請求先：川本 進

〒260-8673 千葉市中央区亥鼻 1-8-1
千葉大学真菌医学研究センター

の違いから細胞周期(制御機構)も *S. cerevisiae* や *S. pombe* と違いがある可能性が期待できる。さらに, *C. neoformans* の感染時の形態は培養時のものに比べて, 細胞は大型化, 細胞壁と莢膜は顕著に厚くなるなどの特徴的な変化を示すことが前世紀から知られている⁸⁾。このことは *C. neoformans* の細胞周期制御機構が少なくとも感染時は *S. cerevisiae* のそれと顕著に異なることを示唆するが, 感染時の酵母の取り扱いが難しいので, 先ず, 菌にストレスを与えることで感染時の状態をミミックできると考えて菌を様々なストレス条件下で培養した結果を示す。また複雑な制御機構の中心およびその近くに位置するものについてのクローニングの結果を示す。

C. neoformans の細胞周期は可塑的である

栄養豊富な培地で至適温度近くで指数的に増殖している状態は, あまりストレスなしに増殖している状態と見なすことが出来る。この条件では *C. neoformans* の細胞周期に特に変わったことは認められなかった。すなわち, 本酵母でも *S. cerevisiae* と同様に DNA 合成が開始された後, 引き続いて出芽し, さらに DNA 合成完了後, 核分裂が起った。

しかし, 何らかの培養条件を悪化させたストレス下での培養では様相が異なり, そのストレスの程度によっては本酵母の細胞周期は非常に大きな影響を受けた。

培養温度を 25°C から 34°C へ上昇させる, また培地の pH を 6 から 4 へ低下させるなど, 比較的弱いストレス環境下では, DNA 合成の開始時期が遅れ, 出芽開始はさ

らに遅れたが, その程度は小さかった。またその条件下での培養が続くと正常に戻った⁹⁾。

栄養条件の決定的悪化は微生物にとって強いストレスの 1 つと言える。定常期への移行期では *S. cerevisiae* と同様に DNA 合成の開始が遅れた。 *C. neoformans* では出芽はさらに遅れ, その程度は定常期への移行が進むにつれてさらに遅くなった。ついには DNA 合成が終了しても出芽せずに G₂ 期から定常期に入った^{10, 11)}。この未出芽の状態でも G₂ 期に停止した個体も新鮮培地に移すと正常に出芽し, 増殖した。G₁ 期のみならず G₂ 期からも定常期に入れる性質は *S. pombe* では報告されていたが, 出芽酵母では *C. neoformans* が初めてである¹⁰⁾。

C. neoformans は発酵能を持たない。そのため, 溶存酸素濃度低下は本酵母の生育に大きな影響を与えるのは当然であるが, 細胞周期への影響は, 顕著でこれまでどの酵母にも報告されていなかった。すなわち, 細胞分裂が抑制され, 細胞が大型化し, 細胞壁が厚くなった。出芽は, G₂ 期にまで遅れ, さらに, ほとんどの細胞は未出芽で G₂ 期の状態に停止していた^{12, 13)}。

C. neoformans の特徴を直感的に訴えるデータとして Fig. 1, 2 を示す。また以上の結果を Fig. 3 に纏めた。

もし未出芽で定常期に入った酵母が, DNA 合成を既に完了していることをいわば忘れた場合, その細胞は生長のはじめに再び DNA の合成を開始することになる。このことは事実 *C. neoformans* に起こった。すなわち, *C. neoformans* の調べた全ての半数体菌株で自然な倍数体化が, 個々の酵母細胞レベルでは高頻度でおこること

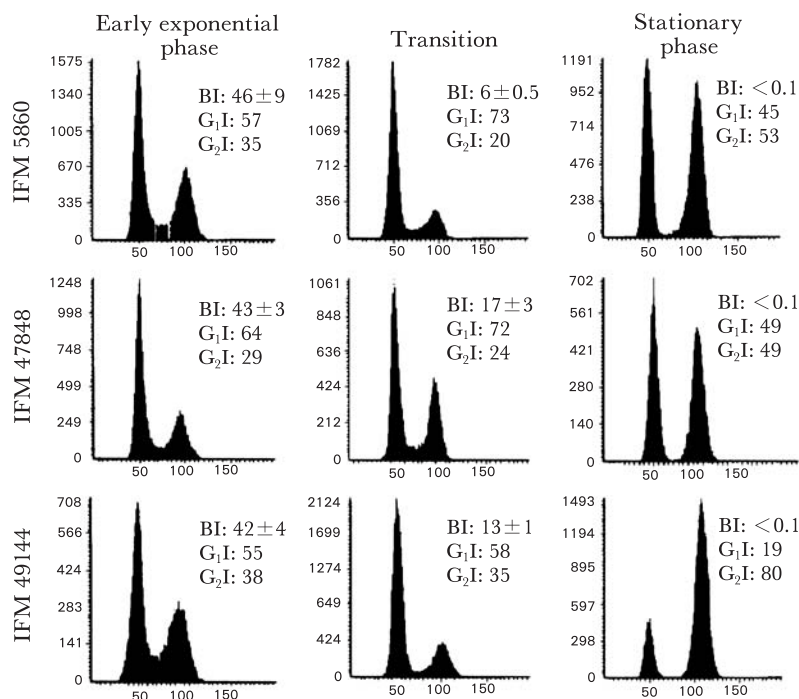


Fig. 1. Change of cell cycle distribution of *C. neoformans* with progression of growth phase as examined by laser scanning cytometer. Horizontal axis shows propidium iodide fluorescence value. Vertical axis shows full scale count, i.e. number of cells showing a particular propidium iodide fluorescence value. BI indicates budding index; G₁I, and G₂I, G₁ and G₂ indexes, i.e. the proportion (%) of cells in the G₁ and the G₂ phase, respectively. Cited from¹¹⁾.

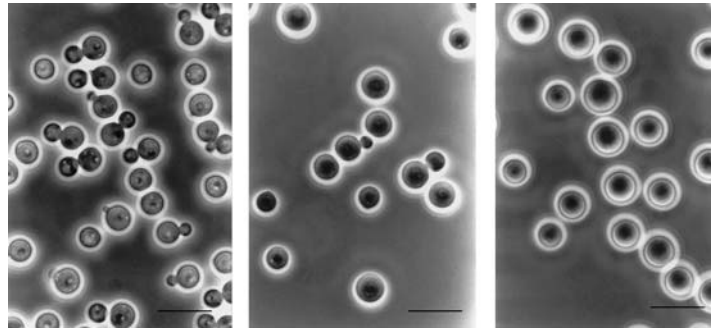


Fig. 2. Cell population of strain IFM 49144 under phase contrast. Number of the cells with buds decrease and the cells clearly become larger from (a) to (c). The bar indicates 10 μ m. (a) Exponential phase cells grown under moderate aeration (OD 1). (b) Cells grown to OD 4 under moderate aeration. (c) Cells grown to OD 4 under moderate aeration as in (b), diluted 2.5 times, and then grown under limited aeration for 5 h. Cited from¹²⁾.

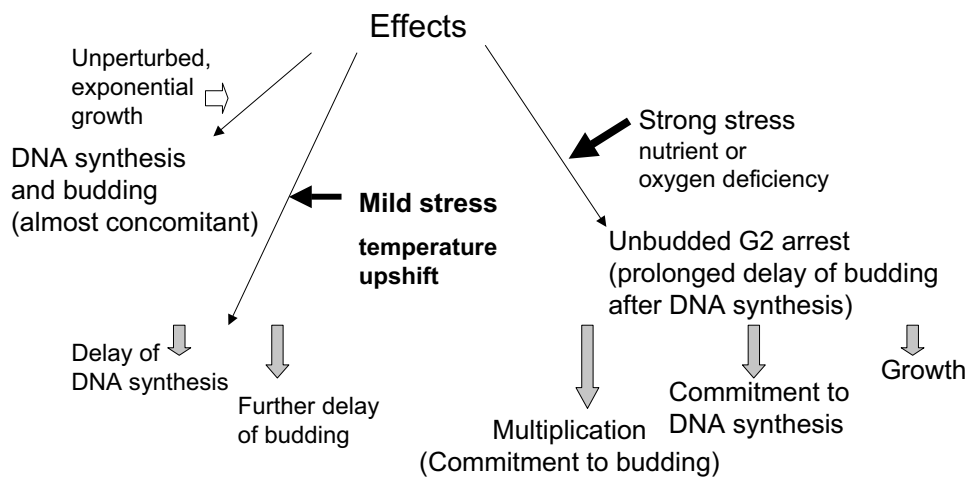


Fig. 3. Effects of stress on cell cycle control of *Cryptococcus neoformans*

を確認した¹⁴⁾。但し菌株として倍数体化するのは例外的であり、かつ長期間を必要としたことを誤解をさけるため付け加える。

*C. neoformans*が感染し体内に寄生、増殖することは当然宿主にとって大きなストレスである。本酵母にとっても、通常の培養条件で増殖している状態に比べればとても大きなストレス下にあるといえる。このことを細胞生物学的に確認するためにラットの肺で増殖している *C. neoformans*が細胞周期のどの時期に出芽するかを調べた。G1 または S 期に出芽している菌はほとんどなく、95%以上の菌は G2 期で、それも遅い G2 期に出芽していた「未発表データ」。

細胞周期を制御する遺伝子、特に **Cdk 1** のクローニング

以上のように *C. neoformans*細胞周期はストレス条件下では *S. cerevisiae*と大きく変わるから、制御の中心に位置する CDC28/cdc2 ホモログ (サイクリン依存性キナーゼ 1, Cdk 1) を *C. neoformans* からクローニングした。Degenerate RT-PCR によって、CDC28/Cdc2 のホモログの cDNA 断片を単離した。また、CDC28/Cdc2 の保存領域の配列を用いて *C. neoformans* のゲノムデータベースを検索し、*Cdk 1* の類似性を持つ遺伝子をいくつ

か同定した。その内、RT-PCR によって単離された cDNA 断片と一致したものが *Cdk 1* に最も類似していることが判明され、これを *CnCdk 1* と名づけた。この遺伝子の全長コーディング領域を増幅するために開始コドンおよび終止コドンに設計したプライマーを用いて、RT-PCR を行い、全長 cDNA のクローンを取得した。その遺伝子配列を解析した結果、*CnCdk 1* は、1283 bp からなり、6 個のイントロンを有し、299 個のアミノ酸からなるタンパク質をコードすることが分かった。なお、その他の Cdk に比較した結果 *S. cerevisiae* や *S. pombe* の CDC28/cdc2 と高い相同性を示した^{3, 15-28)}。また、Cdk1 の特異的な保存領域配列を有し、Pho85, Kin28 など他の Cdk とは明らかに異なることがわかった (Fig. 4)。

この遺伝子を *S. cerevisiae* の CDC28 の温度感受性ミュータントに転換し機能解析を行った。*C. neoformans* の Cdk1 遺伝子を *S. cerevisiae* 用の発現ベクター pYES2 に組み込み、*S. cerevisiae* の CDC28 の温度感受性ミュータントである *cdc28-4* や *cdc28-1N* 株に形質転換し、ガラクトースで発現を誘導し、制限温度下 (36.5°C) での生育を調べた。その結果、*C. neoformans* Cdk1 を導入したことにより、*S. cerevisiae* の CDC28 の温度感受性は相補された。

GDSEIDモチーフ即ち Glycine, Aspartic acid, Serine, Glutamic acid, Isoleucine, Aspartic acidよりなる配列は CDC28/cdc2 ホモログに特異的で、これまで知られて

いる全ての生物に完全に共通している^{24, 25)}。一方、Cdk1以外のCdkでは保存されていない。Cn Cdk1では確かに保存されていた (Fig. 5)。このことでC.

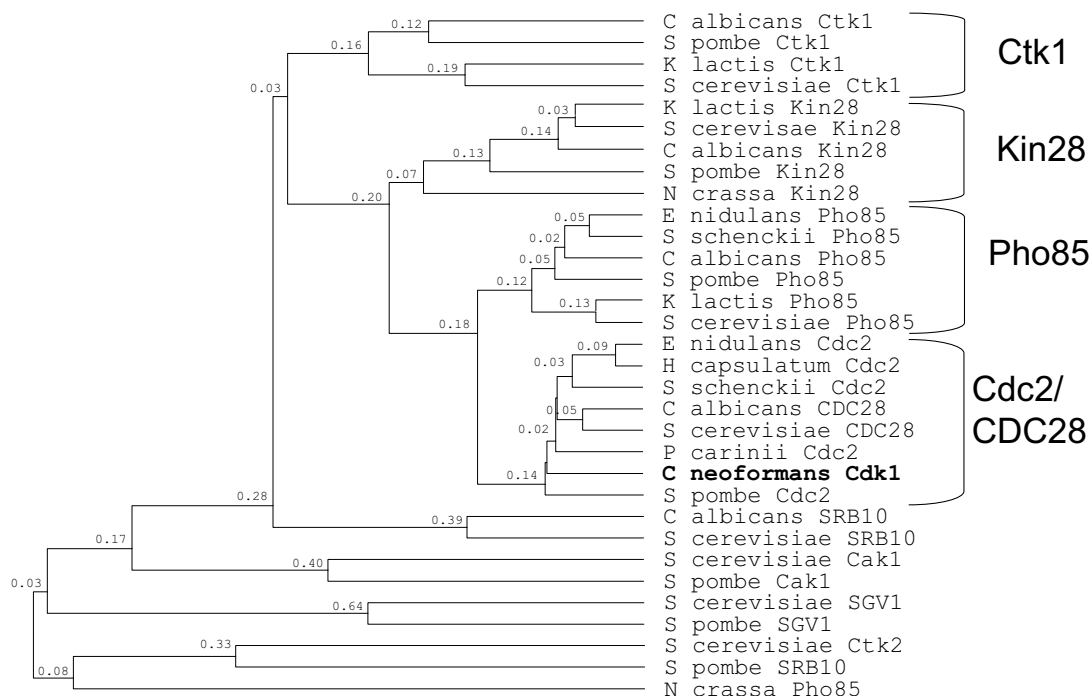


Fig. 4. Phylogenetic tree showing similarity between amino acid sequences of Cn Cdk1 and other fungal Cdk1s. The tree was constructed using the Genetyx-Win v.5.2.3 (Software Development Co., Tokyo, Japan) by the UPGMA method and the numbers refer to the distance (branch length) between the compared sequences. Cited from²⁹⁾.

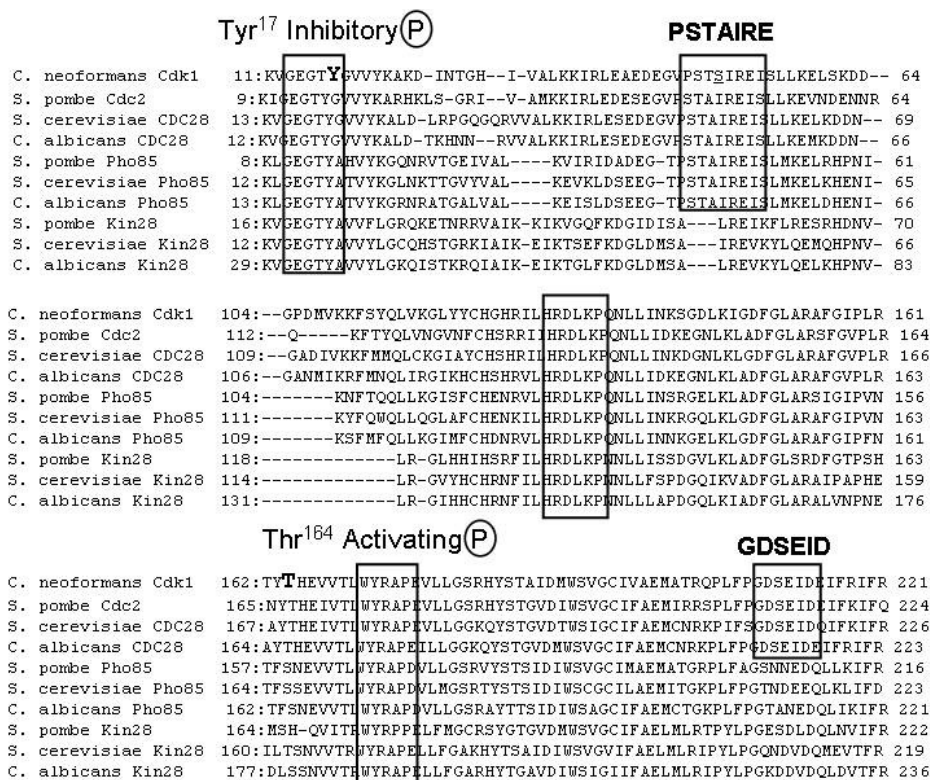


Fig. 5. Alignment of Cn Cdk1 amino acid sequence with sequences of other reported fungal Cdk1s showing the conserved motifs shared by Cn Cdk1, other Cdc28/Cdc2p homologues and other Cdk1s. Asterisk shows the divergence in the conserved PSTAIRE motif. Boxed sequences represent conserved regions. Cited from²⁹⁾.

neoformans の Cdk1 は確かに CDC28/cdc2 ホモログというものが出来た²⁹⁾.

C. *neoformans* の Cdk1 とそれを制御するシステムの特徴

PSTAIRE モチーフ即ち Proline, Serine, Threonine, Alanine, Isoleucine, Arginine, Glutamic acid 配列部位はサイクリンとの結合部位であり, 保存性の大変良いサイトである^{28, 30, 31)}. PSTAIRE モチーフが保存されていない Cdk では一般的には Cdc28/cdc2 活性の欠損を相補できない. しかし, 本菌の Cdk1 ではアラニンがセリンに置き換わっていた (Fig. 5). PSTAIRE モチーフ保存されていないがしかし Cdc28/cdc2 活性を相補できる Cdk1 としては, それまで線虫 *Caenorhabditis elegans*³²⁾, 細胞性粘菌タマホコリカビ *Dictyostelium discoideum*³³⁾, リーシュマニア *Leishmania major*³⁴⁾ のみがいられている. これらの生物はいずれも真菌に属せず, 系統発生的に *S. cerevisiae* や *S. pombe* から遠くへだたっている. *C. neoformans* のものは第 4 例であり, Cn Cdk1 の特異性を示した²⁹⁾.

おわりに, われわれは *C. neoformans* の G1 サイクリンと G2 サイクリン遺伝子, さらにこの活性を制御する遺伝子もクローニングし, その性質を調べている. 出芽制御がフレキシブルで, 環境条件により大幅に変わることは本酵母の細胞周期制御に関わる遺伝子系の特徴であることが示唆された「未発表」.

参考文献

- Lew DJ, Weinert T, Pringle JR: Cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology*. (Pringle JR, Broach JR, Jones EW, eds.), pp.607-695. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 1997.
- Fantes PA: Cell cycle control. In *Molecular Biology of the Fission Yeast*. (Nasim A, Young P, Johnson BF, eds.), pp.127-204. Academic Press, San Diego, 1989.
- Beach D, Durkacz B, Nurse P: Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* **300**: 706-709, 1982.
- Mendenhall MD, Hodge AE: Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1191-1243, 1998.
- Lees E: Cyclin dependent kinase regulation. *Curr Opin Cell Biol* **7**: 773-780, 1995.
- Futcher B: Cyclins and the wiring of the yeast cell cycle. *Yeast* **12**: 1635-1646, 1996.
- Moser BA, Russel P: Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Opin Microbiol* **3**: 631-636, 2000.
- Casedevall A, Perfect JR: *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington, DC, 1998.
- Takeo K, Ohkusu M, Kawamoto S: Effects of growth temperature upshift on cell cycle progression in *Cryptococcus neoformans*. *Mycoscience* **44**: 465-471, 2003.
- Takeo K, Tanaka R, Miyaji M, Nishimura K: Unbudded G2 as well as G1 arrest in the stationary phase of the basidiomycetous yeast *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Lett* **129**: 231-235, 1995.
- Ohkusu M, Hata K, Takeo K: Bud emergence is gradually delayed from S to G₂ with progression of growth phase in *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Lett* **194**: 251-255, 2001.
- Ohkusu M, Raclavsky V, Takeo K: Deficit in oxygen causes G₂ budding and unbudded G₂ arrest in *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Lett* **204**: 29-32, 2001.
- Ohkusu M, Raclavsky V, Takeo K: Induced synchrony in *Cryptococcus neoformans* after release from G₂-arrest. *Antonie van Leeuwenhoek* **85**(1): 37-44, 2004.
- Hata K, Ohkusu M, Aoki S, Ito-Kuwa S, Pienthawechai K, Takeo K: Cells of different ploidy are often present together in *Cryptococcus neoformans*. *Jpn J Med Mycol* **41**: 161-167, 2000.
- Nishizawa M, Suzuki K, Fujino M, Oguchi T, Toh-e A: The Pho85 kinase, a member of the yeast cyclin-dependent kinase (Cdk) family, has a regulation mechanism different from Cdk's functioning throughout the cell cycle. *Genes to Cells* **4**: 627-642, 1999.
- Toh-e A, Tanaka K, Uesono Y, Wickner RB: PHO85, a negative regulator of the PHO system, is a homolog of the protein kinase gene, CDC28, of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **214**: 162-164, 1988.
- Sherlock G, Bahman AM, Mahal A, Shieh JC, Ferreira M, Rosamond J: Molecular cloning and analysis of CDC28 and cyclin homologues from the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Gen Genet* **245**: 716-723, 1994.
- Osmani AH, van Peij N, Mischke M, O'Connell MJ, Osmani SA: A single p34cdc2 protein kinase (encoded by nimXcdc2) is required at G₁ and G₂ in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Sci* **107**: 1519-1528, 1994.
- Di Lallo G, Gargano S, Maresca B: The *Histoplasma capsulatum* cdc2 gene is transcriptionally regulated during the morphologic transition. *Gene* **140**: 51-57, 1994.
- Thomas CF, Anders RA, Gustafson MP, Leaf EB, Limper AH: *Pneumocystis carinii* contains a functional cell-division-cycle Cdc2 homologue. *Am J Respir Cell Mol Biol* **18**: 297-306, 1998.
- Miyakawa Y: Identification of a *Candida albicans* homologue of the PHO85 gene, a negative regulator of the PHO system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**: 1045-1051, 2000.
- de Jesus-Berrios M, Rodriguez-del Valle N: Expression of a Pho85 cyclin-dependent kinase is repressed during the dimorphic transition in *Sporothrix schenckii*. *Fungal Genet Biol* **37**: 39-48, 2002.
- Bussink HJ, Osmani SA: A cyclin-dependent kinase family member (PHOA) is required to link developmental fate to environmental conditions in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* **17**: 3990-4003, 1998.
- Lin S, Carpenter EJ: A PSTTLRE-form of cdc2-like gene in the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Gene* **239**: 39-48, 1999.

- 25) Liu J, Kipreos ET: Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): differential conservation of CAKs in yeast and metazoa. *Mol Biol Evol* **17**: 1061-1074, 2000.
- 26) Ayscough K, Hayles J, MacNeill SA, Nurse P: Cold-sensitive mutants of p34cdc2 that suppress a mitotic catastrophe phenotype in fission yeast. *Mol Gen Genet* **232**: 344-350, 1992.
- 27) Fleig UN, Gould KL, Nurse P: A dominant negative allele of p34cdc2 shows altered phosphoamino acid content and sequesters p56cdc13 cyclin. *Mol Cell Biol* **12**: 2295-2301, 1992.
- 28) Guerrucci MA, Goujon P, Belle R: Distinction by sequence analysis between cdc2 protein kinases involved in cell cycle control and closely related proteins. *Protein Sequences & Data Analysis* **4**: 337-340, 1991.
- 29) Takeo T, Ogura Y, Virtudazo E, Raclavsky V, Kawamoto S: Isolation of a *CDC28* homologue from *Cryptococcus neoformans* that is able to complement *cdc28* temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* **4**: 737-744, 2004.
- 30) Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massague J, Pavletich NP: Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**: 313-320, 1995.
- 31) Card GL, Knowles P, Laman H, Jones N, McDonald NQ: Crystal structure of a gamma-herpesvirus cyclin-cdk complex. *EMBO J* **19**: 2877-2888, 2000.
- 32) Mori H, Palmer RE, Sternberg PW: The identification of a *Caenorhabditis elegans* homolog of p34cdc2 kinase. *Mol Gen Genet* **245**: 781-786, 1994.
- 33) Michaelis C, Weeks G: Isolation and characterization of a cdc2 cDNA from *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta* **1132**: 35-42, 1992.
- 34) Wang Y, Dimitrov K, Garrity LK, Sazer S, Beverley SM: Stage-specific activity of the *Leishmania major* CRK3 kinase and functional rescue of a *Schizosaccharomyces pombe* cdc2 mutant. *Mol Biochem Parasit* **96**: 139-150, 1998.

Cell Cycle Control and CDC28/Cdc2 Homologue and Related Gene Cloning of *Cryptococcus neoformans*

Kanji Takeo¹, Eric Virtudazo¹, Misako Ohkusu¹, Susumu Kawamoto¹,
Shoko Ito-Kuwa², Sigeji Aoki²

¹Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University,
1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8673, Japan

²Advanced Research Center, Nippon Dental University at Niigata,
1-8 Hamaura-cho, Niigata 951-8580, Japan

In *Cryptococcus neoformans* the DNA content of cells having tiny buds varied rather widely, depending on growth phases and strains used. Typically, buds of *C. neoformans* emerged soon after initiation of DNA synthesis in the early exponential phase. However, bud emergence was delayed to G₂ during transition to the stationary phase, and in the early stationary phase budding scarcely occurred, although roughly half of the cells completed DNA synthesis. The timing of budding in *C. neoformans* was shifted to later cell cycle points with progression of the growth phase of the culture. Similarly, a deficit in oxygen was demonstrated to delay the timing of budding, prolong the G₂ phase and cause accumulation of cells after DNA synthesis, but before commitment to budding.

The *C. neoformans* homologue of the main cell cycle control gene CDC28/Cdc2 was isolated using degenerate RT-PCR. The full-length coding region was then amplified using primers to target the regions around the start and stop codons. The gene was called *CnCdk1* and was found to have high homologies to *S. cerevisiae* *CDC28* and *S. pombe* *cdc2*. To determine its function, its ability to rescue *S. cerevisiae* *cdc28*-temperature sensitive mutants was tested. *S. cerevisiae* *cdc28-4* and *cdc28-1N* strains transformed with the pYES2-*CnCdk1* construct exhibited growth at the restrictive temperature. Results of the sequence analysis and the ability of *CnCdk1* to complement the *S. cerevisiae* *cdc28*-ts mutations support its assumed role as the *CDC28/cdc2* homologue in *C. neoformans*.