

総 説

Candida albicans リン酸代謝制御系 (PHO システム) における負の制御因子 CaPho85 の性状解析

宮 川 洋 三

山梨医科大学生命科学教室

要 旨

出芽酵母において、外界の無機リン酸濃度の変化を敏感にキャッチして細胞内のリン酸代謝を巧みに制御する系として PHO システムが知られている。この制御系においてきわめて重要な役割を果たしているのは負の制御因子として発見された Pho85 である。病原性酵母 *Candida albicans* より当研究室で分離したプロテインキナーゼ遺伝子は解析の結果、出芽酵母のゲノム塩基配列における Pho85 との相同性 (62% identity, アミノ酸レベル)、イントロンの位置の類似性、出芽酵母 *pho85* 変異の相補性、Pho85 と同様の ATP 結合ドメインおよびキナーゼドメインの存在、等の事実から出芽酵母 *PHO85* のホモログ (*CaPHO85*) と結論された。

Key words: *Candida albicans*, プロテインキナーゼ, 酸性ホスファターゼ, PHO システム, *Pho85*

1 はじめに

病原性酵母 *Candida albicans* はよく知られているように、健康人の常在菌でありながら宿主 (ヒト) の感染防御能が低下したときに病原性を発現するいわゆる日和見感染菌の代表的菌種である。これを寄生体 (菌) 側から見れば、自己のおかれた環境、すなわち宿主の生理的条件等の変化を逐次感知しながら素早くこれに対応する巧みな環境適応能力を備えていると考えられる。本菌の特徴である、環境条件の変化に応じて酵母形と菌糸形の形態変換を行う二形性変換もこうした適応能力の現れともいえよう¹⁾。

二形性については、厳密にはこれと異なるが類似の「酵母形 (yeast forms) – 偽菌糸 (pseudomycelial form; filament)」変換を行う出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の二形性ととも、この数年間において精力的に研究が行われ、浸透圧調節等他の細胞内諸事象と同様、MAP キナーゼカスケードがきわめて重要な役割を果たしていることが明らかにされた^{2, 3)}。出芽酵母においてはその後、これらの系と、サイクリン依存性プロテインキナーゼである Cdc28⁴⁾ や Pho85^{5, 6)} 等によって担われる細胞周期制御系や代謝調節系との関連の重要性も指摘されつつある⁷⁾。

Pho85 は、その研究の初期において、外界の無機リン酸濃度の変化を敏感にキャッチして細胞内のリン酸代謝を巧みに制御する調節機構 – PHO システム – における負の制御因子として分離、同定された^{5, 6)} (Fig. 1)。こ

の制御機構は、菌の置かれた環境中でリン酸が十分存在するときは *PHO5* がコードする酸性ホスファターゼの産生は抑止され、逆にリン酸飢餓のときは *PHO5* が発現し、フォスファターゼの働きでリン酸を切り出して供給するという、きわめて合目的なシステムである⁸⁾。さらに最近では、PHO システムにおいて中心的位置を占める Pho85 について、そのパートナーとなりうるサイクリンは Pho80 以外にも多種のものが存在し、Pho85 が選択するサイクリンパートナーの種類によって、細胞内の代謝調節系のみならず、細胞周期や形態形成等の細胞内諸事象に対して多様な影響 (いわゆる pleiotropic effect) を与える分子である事実が注目されるようになった^{7, 9, 10)}。

本稿では、当研究室において *C. albicans* より分離・同定された *PHO85* ホモログ、*CaPHO85* について得られた解析の結果を中心に概説する。

2 *CaPHO85* の分離

C. albicans M1012 株 (serotype A)¹¹⁾ ゲノム DNA より *S. cerevisiae CDC28* のホモログ、*CaCDC28*¹²⁾、のプロテインキナーゼドメイン (nucleotide positions 25-573; Accession No. X80034) をプローブとして low stringency の条件下、各種制限酵素で切断したゲノム DNA に対してサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。得られた陽性クローンの一つ pHD22 は新規のプロテインキナーゼとみられたが、C-末端領域を欠いていたため、キナーゼドメインを含む DNA 断片 pHC5 (Fig. 2 の制限酵素地図の斜線領域) をプローブとして high stringency の条件下で DNA walking を行い、全長 7 kbp のクローン pMV6 を得た (Fig. 2)¹³⁾。

別刷請求先: 宮川 洋三

〒409-3898 山梨県中巨摩郡玉穂町
山梨医科大学生命科学教室

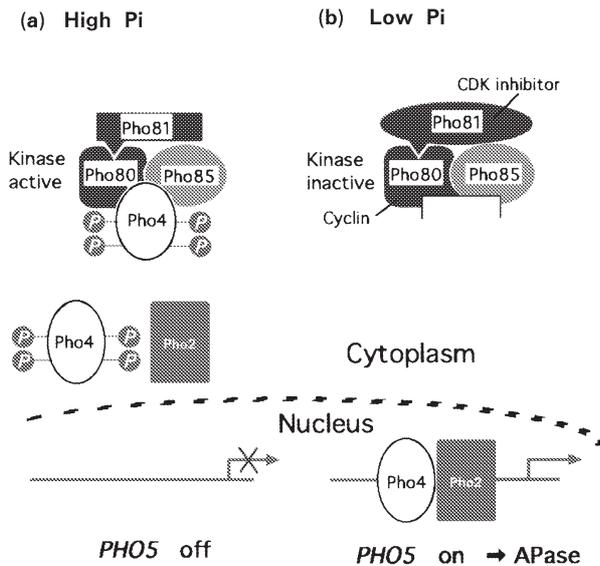


Fig. 1 Model for regulation of acid phosphatase production in *S. cerevisiae*⁸⁾ (partially modified). (a) In the condition of high phosphate, the transcription of *PHO5* (the structural gene for acid phosphatase) is repressed because the transcription factor Pho4 is phosphorylated by the Pho80 (cyclin)-Pho85 (CDK) complex. The ability of Pho4 to activate *PHO5* transcription is inhibited by phosphorylation, as phosphorylation of Pho4 causes it to be localized in the cytoplasm. The CDK inhibitor Pho81 is associated with Pho80-Pho85 when the yeasts are grown in both high and low phosphate medium. (b) In the low-phosphate condition, the Pho80-Pho85 activity is inhibited by Pho81, and unphosphorylated Pho4 enters the nucleus. Pho4 and Pho2 then activate the transcription of *PHO5*.

3 塩基配列の解析

1) イントロン

塩基配列の解析から, pMV6は推定326アミノ酸配列(37.6 kDa)をコードするORFを含み, N-末端コード領域近傍(第7コドン内)に81塩基対からなるイントロンが挿入されていることが推定された(Fig. 3). この部分はbeta-tubulin遺伝子や出芽酵母の*PHO85*等に認められる真菌のイントロン共通配列^{14, 15)}ときわめて類似性の高い, 5'-GTATGT-----TACTAACT---15---TAG-3'配列(Fig. 3の四角)を含んでいることが示された.

2) BLASTサーチ

pMV6にコードされる推定326アミノ酸の配列についてBLASTサーチを行ったところ, 出芽酵母ゲノムがコードするタンパクのうち, PHOシステムの負の制御因子Pho85^{5, 6)}と最も高い相同性(62% identity)をもつことが明らかになった. よって, この塩基配列を*CaPHO85*と命名した. 東江ら⁵⁾によれば, Pho85はこれと同様にCDKタンパクに属している細胞周期制御因子Cdc28と高い相同性(51% identity)を示すが, CaPho85もCdc28(50% identity)やその*C. albicans*ホモログCaCdc28(49% identity)と高い相同性を有している. 一方, やはりキナーゼドメインをもつMAPキナーゼ, Mpk1¹⁶⁾(31% identity)やその*C. albicans*ホモログ, Mkc1¹⁷⁾

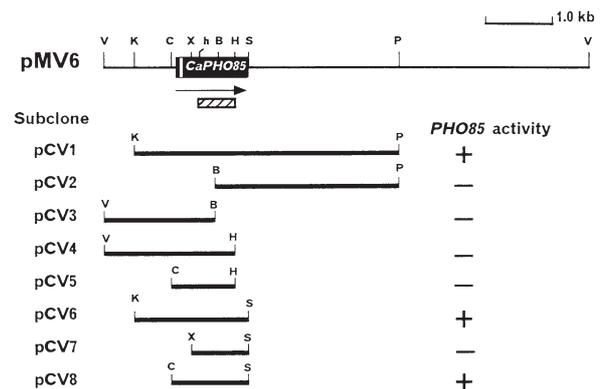


Fig. 2 Restriction map of pMV6 and results of complementation. The *CaPHO85* gene is denoted by the closed box with an arrow indicating the deduced direction of transcription, and includes an intron (a small open box). The striped bar under *CaPHO85* represents the 0.57-kb *HincII-HindIII* region (pHC5; see text) used as a hybridization probe in DNA walking to screen the full length DNA containing this gene. Indicated restriction enzymes are: B, *Bam*HI; C, *Cla*I; H, *Hind*III; h, *Hinc*II; K, *Kpn*I; P, *Pvu*II; S, *Spe*I; V, *Eco*RV; X, *Xba*I. Plasmids pCV1-8 on the left are the subclones constructed by insertion of each DNA fragment of *C. albicans* indicated by the horizontal solid bar into the plasmid vector YEp13. Results of complementation of the *S. cerevisiae pho85* mutation are summarized on the right: + = complemented; - = not complemented. For transformation, each of the recombinant plasmids was introduced into the *pho85* mutant of *S. cerevisiae* YAT 1562 (see text). Transformants that developed as colonies on agar plates containing high-Pi medium were assayed for their *PHO85* activity by the staining method of Toh-e and Oshima¹⁹⁾, using alpha-naphthylphosphate as the substrate.

(33% identity) とはやや低い相同性を示す.

3) アラインメント

CaPho85のアミノ酸配列について, これと相同性の高い配列, Pho85およびCaCdc28とのアラインメントをCLUSTAL W¹⁸⁾を用いて解析したところ, CaPho85は, ATP結合ドメイン, キナーゼドメインの共通配列, CDKのサイクリンとの結合に必要なとされるPSTAIRE配列(アミノ酸48-54), CDKを負に制御するThr-18/Tyr-19残基などをすべて保持していることが明らかになった(Fig. 4).

4 *pho85*変異の相補性

本研究で分離された*CaPHO85*が出芽酵母の*PHO85*の変異を相補するか否かを検討した. 出芽酵母の*pho85*変異株YAT 1562(東京大学理学部, 東江昭夫先生より分与)を宿主とし, Fig. 2に示す8種のサブクローン(pCV1-8)を供与DNAとして形質転換を行い, 得られた形質転換体について寒天培地上での染色法¹⁹⁾により*PHO85*活性を測定した(Fig. 2下部). その結果, サブクローンpCV8で示されるCaPHO85の全長とそのやや上流のプロモータ領域を含む断片が*pho85*変異を十分相補しうることが示された.

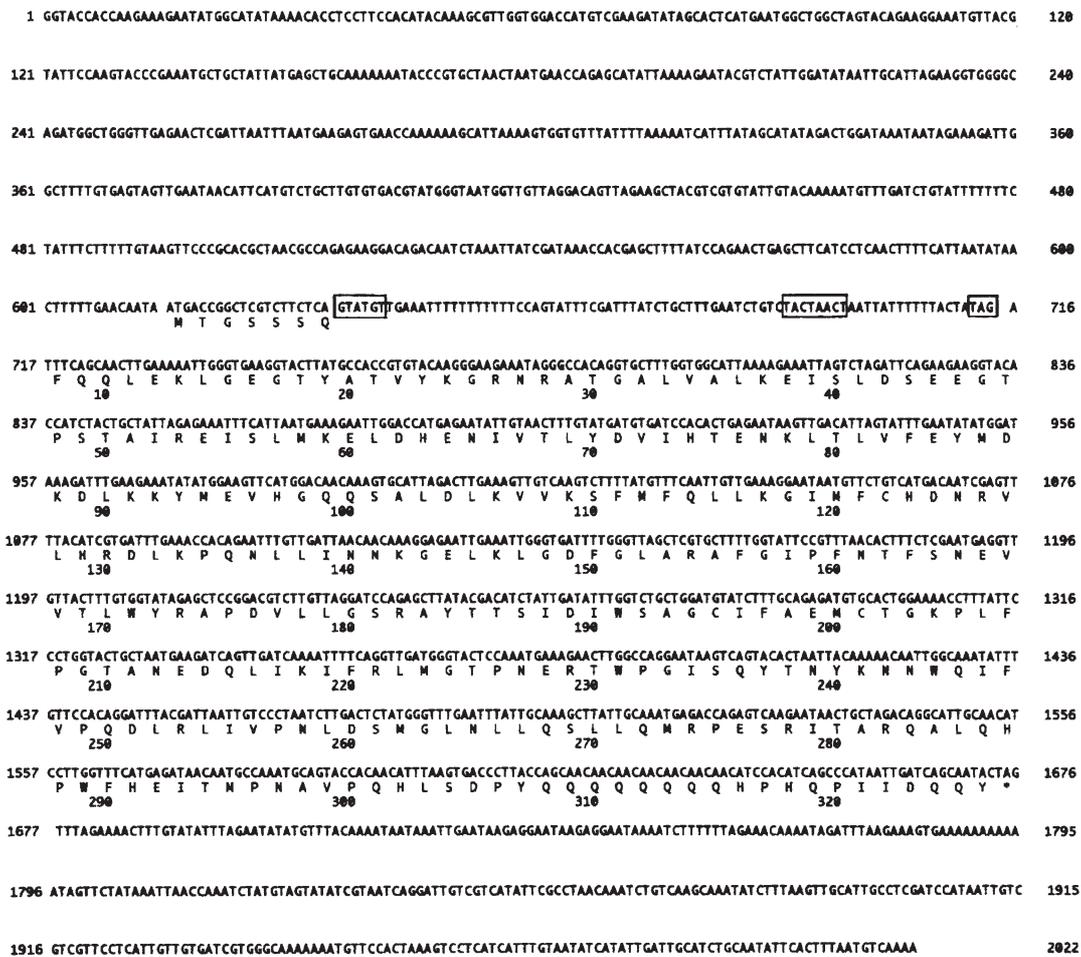


Fig. 3 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the *CaPHO85* gene¹³⁾ (DDBJ/EMBL/GenBank Accession Number: AB033276). The region where the nucleotide sequences of both strands were determined is shown. The nucleotide sequences in the square boxes indicate the consensus sequences for yeast intron: the 5'-splice-site, internal, and the 3'-splice-site sequence.

5 *CaPHO85* の性状

CaPHO85 の性状を解析するため、Ura-blaster²⁰⁾ カセットによりコーディング領域全体を置換し遺伝子破壊を試みた。二倍体ゲノムの一方の allele の破壊株は容易に得られたが、これを宿主とした第二の allele の破壊実験では、同カセットを C-末端コード部位に挿入した場合を除き、homozygous mutant はこれまでのところ得られていない。このことから本遺伝子は、出芽酵母 *PHO85* と異なり必須遺伝子である可能性も考えられる。一方、出芽酵母の *Pho85* の全長 (305 アミノ酸) を越える C 末端近傍領域には グルタミンに富む (Gln-rich) 領域が存在 (Fig. 4) し、点変異 (あるいはフレームシフト変異またはストップコドン) を導入したところ、導入部位によりコロニー性状や細胞形態、増殖速度等に変異が認められた。

6 おわりに

以上のように、病原性酵母 *C. albicans* より分離・同定した *CaPHO85* は出芽酵母 *PHO85* とかなりの類縁性を有

しているが、必須遺伝子である可能性等、いくつかの点において相違も示唆された。これらの点が、常在菌でありながら日和見感染症の原因菌である本菌の二形性等の生物学的特性とどのような関わりをもつのか、今後の研究が待たれるところである。

REFERENCES

- 1) Gow NA: Germ tube growth of *Candida albicans*. *Curr Topics Med Mycol* **8**: 43-55, 1997.
- 2) Posas F, Takekawa M, Saito H: Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Curr Opin Microbiol* **21**: 383-387, 1998.
- 3) Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL: Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**: 143-180, 1999.
- 4) Reed SI, Ferguson J, Groppa JC: Preliminary characterization of the transcriptional and translational products of the *Saccharomyces cerevisiae* cell division cycle gene *CDC28*. *Mol Cell Biol* **2**: 412-425, 1982.
- 5) Toh-e A, Tanaka K, Uesono Y, Wickner RB: *PHO85*, a negative regulator of the PHO system, is a homolog of

ca-ph85	MTGSSSQFQQ	LEKLGEGTVA	TVYKGRN-RA	TGALVALKEI	SLDSE-EGTP	48
sc-ph85	MS-SSSQFKQ	LEKLGNGTYA	TVYKGLN-KT	TGVYVALKEV	KLDSE-EGTP	47
ca-cd28	-MVELSDYQR	QEKVGEITYG	VVYKALDTKH	NNRVVALKKI	RLESEDEGVP	49
	* . . .	** * **	***	.. ****	* ** **	
ca-ph85	STAIRIISLM	KELDHENIVT	LYDVIHTEN-	KLTLVFEYMD	KDLKKYMEVH	97
sc-ph85	STAIRIISLM	KELKHENIVR	LYDVIHTEN-	KLTLVFEFMD	NDLKKYMDSR	96
ca-cd28	STAIRIISLL	KEMKDDNIVR	LYDIIHSDSH	KLYLVFEFLD	LDLKKYMESI	99
	*****	** . **	*** **	** *****	*****	
ca-ph85	GQQ---SALD	LKVVKSFMFQ	LLKGIMFCHD	NRVLHRDLKP	QNLINNKGE	144
sc-ph85	TVANTPRGLE	LNLVKYFQWQ	LLQGLAFCHE	NKILHRDLKP	QNLINNKRGQ	146
ca-cd28	PQG---VGLG	ANMIKRFMNQ	LIRGIKHCHS	HRVLHRDLKP	QNLIDKEGN	146
	* . . .	* * * *	* . . *	.. *****	***** *	
ca-ph85	LKLGDFGLAR	AFGIPFNTFS	NEVVTWLYRA	PDVLLGSRAY	TTSIDIWSAG	194
sc-ph85	LKLGDFGLAR	AFGIPVNTFS	SEVVTWLYRA	PDVLMGSRTY	STSIDIWSAG	196
ca-cd28	LKLADFGLAR	AFGVPLRAYT	HEVVTWLYRA	PEILLGGKQY	STGVDMMWSVG	196
	** * *****	** * *	*****	* . * * *	* * * * *	
ca-ph85	CIFAEMCTGK	PLFPGTANED	QLIKIFRLMG	TPNERTWPGI	SQYTNKNNW	244
sc-ph85	CILAEMITGK	PLFPGTNDEE	QLKLIIDIMG	TPNESLWPSV	TKLPKYNPNI	246
ca-cd28	CIFAEMCNRK	PLFPGDSEID	EIFRIFRILG	TPNEEIIWPOV	NYLPDFKSSF	246
	** * * *	* *****	.. * * *	**** **	..	
ca-ph85	QIFVPQDLRL	IVP-----NL	DSMGLNLLQS	LLQMRPESRI	TARQALQHPW	289
sc-ph85	QQRPPRDLRQ	VLQPHTKPEL	DGNLMDFLHG	LLQLNPDMLR	SAKQALHHPW	296
ca-cd28	PQWKKKPLSE	AVP-----SL	DANGIDLLDQ	MLVYDPSRRI	SAKRALIHYP	291
	* . . .	* * * * *	* * * *	* * * *	* . . * * *	
ca-ph85	FHEITMPNAV	PQHLSDPYQQ	QQQQQHPHQ	PIIDQQY		326
sc-ph85	FAEYHHAS-	-----	-----	-----		305
ca-cd28	FNDNDRDHN	NYNEDNIGID	KHQNMQCA--	-----		319
	*					

Fig. 4 Alignment of the deduced amino acid sequence of CaPho85 protein¹³⁾ (abbreviation ca-ph85) with those of *S. cerevisiae* Pho85 protein⁵⁾ (abbreviation sc-ph85, Accession No. Y00867) and *C. albicans* CaCdc28 protein¹²⁾ (abbreviation ca-cd28, Accession No. X80034). Identical amino acids and conserved amino acids among the proteins are denoted by asterisks and dots, respectively. Filled circles indicate amino acid residues that match the consensus sequence for an ATP-binding domain; filled triangles indicate amino acid residues that match the consensus sequence for the kinase domain. A solid lined box indicates the PSTAIRE sequence conserved in CDKs. A black box represents the consensus sequence for negative regulation of CDK activity (Threonine-18 and Tyrosine-19 in the case of *CaPHO85*).

- the protein kinase gene, *CDC28*, of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Gen Genet **214**: 162-164, 1988.
- Uesono Y, Tanaka K, Toh-e A: Negative regulators of the PHO system in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation and structural characterization of *PHO85*. Nucleic Acids Res **15**: 10299-10309, 1987.
 - Andrews B, Measday V: The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. Trends Genet **14**: 66-72, 1998.
 - Lenburg ME, O'Shea EK: Signaling phosphate starvation. Trends Biochem Sci **21**: 383-387, 1996.
 - Measday V, Moore L, Retnakaran R, Lee J, Donoviel M, Neiman AM, Andrews B: A family of cyclin-like proteins that interact with the Pho85 cyclin-dependent kinase. Mol Cell Biol **17**: 1212-1223, 1997.
 - Huang D, Moffat J, Andrews B: Dissection of a complex phenotype by functional genomics reveals roles for the yeast cyclin-dependent protein kinase Pho85 in stress adaptation and cell integrity. Mol Cell Biol **22**: 5076-5088, 2002.
 - Miyakawa Y, Mabuchi T, Kagaya K, Fukazawa Y: Isolation and characterization of a species-specific DNA fragment for detection of *Candida albicans* by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol **30**: 894-900, 1992.
 - Sherlock G, Bahman A, Mahal A, Shieh JC, Ferreira, 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.
 - 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.
 - Smith HA, Allaudeen HS, Whitman MH, Koltin Y, Gorman JA: Isolation and characterization of a beta-tubulin gene from *Candida albicans*. Gene **63**: 53-63, 1988.
 - Yaar L, Mevarech M, Koltin Y: A *Candida albicans* RAS-related gene (*CaRSR1*) is involved in budding, cell morphogenesis and hypha development. Microbiol **143**: 3033-3044, 1997.
 - Torres L, Martin H, Garcia-Saez MI, Arroyo J, Molina M, Sanchez M, Nombela C: A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. Mol Microbiol **5**: 2845-2854, 1991.
 - Navarro-Garcia F, Sanchez M, Pla J, Nombela C:

- Functional characterization of the *MKC1* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol Cell Biol* **15**: 2197-2206, 1995.
- 18) Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680, 1994.
- 19) Toh-e A, Oshima Y: Characterization of a dominant, constitutive mutation, *PHO0*, for the repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **120**: 608-617, 1974.
- 20) Fonzi WA, Irwin MY: Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717-728, 1993.

Isolation and Molecular Characterization of the *CaPHO85* Gene: A Negative Regulator of Phosphate Metabolism (PHO System) in *Candida albicans*

Yozo Miyakawa

Department of Life Sciences, Yamanashi Medical University,
Tamaho Yamanashi 409-3898

The PHO system is an ingenious mechanism by which the yeast *Saccharomyces cerevisiae* regulates the expression of a set of genes involved in phosphate metabolism in response to the change of phosphate concentrations in the environment. A key factor in this mechanism is the Pho85 kinase, which has been discovered as a negative regulator of the PHO system. One of the genes isolated in our laboratory in screening the protein kinase genes from *Candida albicans* was identified as a homologue (*CaPHO85*) of the *PHO85* of *S. cerevisiae*, based on the following results. a) Pho85 is the polypeptide with the highest homology to CaPho85 (62% identity) among the *S. cerevisiae* genome sequence. b) The position of insertion of the intron is quite similar between *CaPHO85* (in the 7th codon of the N-terminal MTGSSSQ) and *S. cerevisiae PHO85* (in the 6th codon of the N-terminal MSSSSQ). c) The nucleotide sequences in the intron possess the consensus sequences for yeast intron: the 5'-splice-site, internal, and the 3'-splice-site sequence. d) *CaPHO85* complemented the *S. cerevisiae pho85* mutation. e) CaPho85 contains all of the consensus sequences for the ATP-binding domain and for the kinase domain found in *S. cerevisiae* Pho85.

この論文は、第46回日本医真菌学会総会の“シンポジウムⅢ：カンジダ属のMolecular Mycology: 臨床医にも必要な最近のトピックス”において発表されたものです。