



## 新生隐球菌一个新的产孢相关蛋白 Srp1 的鉴定与功能分析

范成莉\*

西南大学动物科技学院, 重庆 400715

**摘要:**【目的】研究产孢相关蛋白 Srp1 在新生隐球菌有性产孢和致病性中的作用及机理。【方法】采用基因枪转化技术构建新生隐球菌 *SRP1* 基因缺失突变体及其互补菌株, 并通过小鼠致病性实验和菌株交配实验检测 Srp1 在新生隐球菌有性产孢和致病性中的作用。【结果】与野生型菌株相比, *srp1Δ* 突变体小鼠致病性无差异; *srp1Δ* 突变体能够交配并形成双核菌丝, 但丧失产生担孢子的能力; 初步机理分析表明 *srp1Δ* 突变体交配后其减数分裂过程被阻断, 从而导致 *srp1Δ* 突变体不能产生担孢子。【结论】产孢相关蛋白 Srp1 不影响新生隐球菌的致病性, 但可通过调控减数分裂过程影响新生隐球菌的有性生殖。

**关键词:** 新生隐球菌, 交配, 产孢, 减数分裂

新生隐球菌是自然界广泛存在的具荚膜的环境腐生菌, 其担孢子和干燥的酵母细胞可通过呼吸方式进入人体, 引起隐球菌性肺炎和脑膜炎<sup>[1]</sup>。近年来, 新生隐球菌感染的发病率逐年增高, 在国外隐球菌感染常与艾滋病并发, 成为导致患者死亡的首要原因; 在我国新生隐球菌感染的发病率也呈逐年增加的态势并展现出能感染免疫健全人群的特点<sup>[2]</sup>。据最新统计, 新生隐球菌每年能引起全球约 22 万人感染并导致大约 18 万人死亡<sup>[3]</sup>, 已成为威胁现代人们健康的重要杀手。新生隐球菌属于担子菌, 有  $\alpha$  和 **a** 两个交配型, 不同交配型的细胞可交配融合并产生担子菌所特有的双核菌丝。双核菌丝进一步特化为担子, 其内部的双

核经核融合和减数分裂后在担子顶端产生 4 条串状的担孢子。新生隐球菌作为一种能够快速生长的酵母型病原真菌, 具有明确的性周期, 已成为真菌遗传和致病性研究的模式生物之一<sup>[4-5]</sup>。

有性生殖可促进不同交配型菌株之间基因组合的广泛变异, 增加子代适应自然选择的能力, 促进有利突变在种群中的传播。在新生隐球菌中, 目前已有许多参与有性生殖的相关因子和通路被研究。锌指蛋白是一类广泛存在于真核生物中的重要转录因子, 在隐球菌的生长发育中起重要作用。锌指蛋白 Znf2、Znf3 和 Zfp1 分别被证明能够调控隐球菌的有性生殖过程, 因为上述蛋白编码基因分别敲除后都会阻断新生隐球菌的有性生

基金项目: 国家自然科学基金(31400133); 中央高校基本业务费(XDJK2016C097, XDJK2016A006)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-23-68251196; E-mail: chenglifan@126.com

收稿日期: 2019-01-24; 修回日期: 2019-02-15; 网络出版日期: 2019-03-07

殖过程,使新生隐球菌丧失产生孢子的能力<sup>[6-9]</sup>。RNA 结合蛋白也被证明参与调控新生隐球菌的有性生殖过程;RNA 结合蛋白 Csa1 和 Csa2 是介导减数分裂和孢子成熟的重要元件,相关基因敲除后突变体丧失产孢能力<sup>[10]</sup>;而另一 RNA 结合蛋白 Rbp1 也调控隐球菌的有性生殖过程<sup>[11]</sup>。群体感应蛋白 Qsp1 及其通路重要组分锌指调节因子 Cqs2 也被证明调控新生隐球菌的有性生殖过程<sup>[12]</sup>。另外,钙调磷酸酶应答蛋白锌指转录因子 Crz1 也调控新生隐球菌有性产孢过程<sup>[13]</sup>。蛋白降解通路也被证明调控新生隐球菌的有性生殖。我们课题组前期研究鉴定了泛素蛋白降解通路 E3 中泛素连接酶的一个关键蛋白 F-box 蛋白 Fbp1,功能分析发现 Fbp1 调控新生隐球菌的有性生殖和致病性<sup>[14]</sup>。初步机理分析发现  $\alpha$  和 **a** 交配型的 *fbp1* $\Delta$  突变体交配形成双核菌丝后其减数分裂过程被阻断,从而导致新生隐球菌丧失产孢能力。

Fbp1 作为 E3 泛素连接酶的关键蛋白负责特异性识别底物蛋白并进行泛素化,因此 Fbp1 可能通过调控其下游底物来调控新生隐球菌的有性生殖过程。本课题组前期通过 iTRAQ 蛋白质谱技术鉴定了新生隐球菌野生型 H99 及 *fbp1* $\Delta$  突变体背景下的差异蛋白,发现 *fbp1* $\Delta$  背景下一高丰度蛋白 CNAG\_00626。其可能为 Fbp1 下游底物,可能参与新生隐球菌的有性生殖或致病性过程,因此我们决定对其进行功能分析。本研究通过克隆获得 CNAG\_00626 的序列,并命名为 *SRP1* (Sporulation-related protein 1)。通过 qRT-PCR 分析和构建 *SRP1-mCherry* 融合菌株分析了 *SRP1* 的时空表达特点。利用 Split marker 策略构建基因敲除片段,经基因枪转化和筛选验证后得到 *SRP1* 基因敲除突变体 *srp1* $\Delta$ ;利用体外无缝克隆技术构建 *SRP1* 基因互补质粒,经转化和筛选验证后得到

互补菌株 *srp1* $\Delta$ ::*SRP1*。通过对比野生型和 *srp1* $\Delta$  突变体菌株在毒力和有性产孢等方面的差异,来研究 *Srp1* 蛋白在新生隐球菌致病性和有性生殖中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒与引物:** 本研究所采用的隐球菌菌株详见表 1,其中 H99 和 KN99a 分别为隐球菌  $\alpha$  和 **a** 交配型野生型菌株,其余均为野生型菌株基础上构建的菌株。本研究所用质粒和引物分别详见表 1 和表 2。

**1.1.2 培养基:** 新生隐球菌基础培养基为 YPD 培养基,于 30 °C 黑暗条件下培养;菌株交配诱导培养基为 MS 培养基和 V8 培养基<sup>[15]</sup>;黑色素形成培养基为 Niger Seed 培养基,荚膜诱导培养基为 DME 培养基,配制方法如前所述<sup>[16]</sup>。

**1.1.3 主要仪器:** 外源 DNA 转化:采用美国 Bio-Rad 公司 PDS-1000/He 基因枪进行转化;细胞破碎:采用美国 MP 公司 Fastprep-24 5G 匀浆仪进行破碎;交配菌丝及荧光观察:分别采用 Olympus CX41 显微镜和 Olympus FV1200 激光共聚焦显微镜进行观察;荧光定量 PCR:采用德国 Roche 公司的 LightCycler®96 实时荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增和数据收集。

### 1.2 *SRP1* 序列及表达模式分析

*SRP1* 基因及蛋白序列获取数据库为 FungiDB (Fungal and Oomycete Genomics Resources),使用 BLASTP 程序对蛋白数据库进行同源性搜索和对比分析。为了研究 *SRP1* 基因在隐球菌交配过程中的表达情况,我们采用实时荧光定量 PCR 技术检测了 *SRP1* 在 mRNA 水平上的变化情况。样品准

表 1. 本研究中所用到的菌株和质粒  
Table 1. The strains and plasmids used in this study

Strains/plasmids	Genotype/properties	Source/reference
<i>C. neoformans</i>		
H99	<i>MAT<math>\alpha</math></i>	Perfect et al., 1993 <sup>[17]</sup>
KN99a	<i>MAT<math>\alpha</math></i>	Nielsen et al., 2003 <sup>[18]</sup>
TBL101	<i>MAT<math>\alpha</math> Nop1-mCherry::NAT</i>	Fan et al., 2019 <sup>[6]</sup>
TBL102	<i>MAT<math>\alpha</math> Nop1-mCherry::NAT</i>	Fan et al., 2019 <sup>[6]</sup>
TBL105	<i>MAT<math>\alpha</math> srp1::NEO</i>	In this study
TBL138	<i>MAT<math>\alpha</math> srp1::NEO</i>	In this study
TBL218	<i>MAT<math>\alpha</math> srp1::NEO SRP1::NAT</i>	In this study
TBL219	<i>MAT<math>\alpha</math> srp1::NEO SRP1::NAT</i>	In this study
TBL220	<i>MAT<math>\alpha</math> Srp1-mCherry::NAT</i>	In this study
TBL221	<i>MAT<math>\alpha</math> Srp1-mCherry::NAT</i>	In this study
TBL222	<i>MAT<math>\alpha</math> srp1<math>\Delta</math>::NEO Nop1-mCherry::NAT</i>	In this study
TBL223	<i>MAT<math>\alpha</math> srp1<math>\Delta</math>::NEO Nop1-mCherry::NAT</i>	In this study
Plasmids		
pBSK(-)	pBluescript SK(-)	
pJAF1	Amp <sup>r</sup> plasmid containing <i>NEO</i> marker gene	Fraser et al., 2003 <sup>[19]</sup>
pCN19	Amp <sup>r</sup> plasmid harboring GFP under histone H3 promoter	Price et al., 2008 <sup>[20]</sup>
pTBL1	Amp <sup>r</sup> plasmid containing <i>NAT</i> marker gene	Fan et al., 2019 <sup>[6]</sup>
pTBL3	Amp <sup>r</sup> plasmid harboring <i>mCherry-GPD1</i> terminator and <i>NAT</i> marker	Fan et al., 2019 <sup>[6]</sup>
pTBL131	Amp <sup>r</sup> vector for <i>P<sub>SRP1</sub>-SRP1-mCherry</i> for Srp1 localization	In this study
pTBL132	Amp <sup>r</sup> vector for <i>P<sub>SRP1</sub>-SRP1-NAT</i> for complementation	In this study

表 2. 本研究中所用到的 PCR 扩增引物  
Table 2. The PCR amplification primers used in this study

Primers	Targeted genes	Sequence (5'→3')
TL217	<i>GAPDH</i> qPCR F	TGAGAAGGACCCTGCCAACA
TL218	<i>GAPDH</i> qPCR R	ACTCCGGCTTGTAGGCATCAA
TL228	<i>SRP1</i> KO F1	GTAGGCGTTGAAGGTGTCGGTGTC
TL229	<i>SRP1</i> KO R1	CTGGCCGTCGTTTTACGGAAGGTGGTGAATGGAATCAAC
TL230	<i>SRP1</i> KO F2	GTCATAGCTGTTTCCTGAGTATGGCCCGTTTGCTCTTG
TL231	<i>SRP1</i> KO R2	CACGGCGCTTGCTTTCTCTTAC
TL232	<i>SRP1</i> KO F3	ACCCCTTGATCATTGGCTCTGCT
TL233	<i>SRP1</i> KO R3	AACAATGGAGAGGAAAAGACGGAG
TL234	<i>SRP1</i> KO F4	TTCCAAATCCCCATCAATCGTG
TL537	<i>SRP1</i> qPCR F1	TGCCAATGCCAATGAAACC
TL538	<i>SRP1</i> qPCR R1	AACAGGAGATTCGCCCTTC
TL564	<i>SRP1</i> Comp F	GATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCCGTGGACTGCTAGGGGTGATAAGGAT ( <i>Bam</i> H I)
TL565	<i>SRP1</i> Comp R	CGGTGGCGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCAGGACCAAAGTTGAACAGGATAGGAG ( <i>Bam</i> H I)
TL877	<i>SRP1-mCherry</i> F1	TTAGTAAACTCGCCCAACATGTCTGGATCCCTTTCCAAATCCCCATCAATCGTG ( <i>Bam</i> H I)
TL878	<i>SRP1-mCherry</i> R1	CTTGCTCACCATTCTAGAACTAGTGGATCCCTTCTGCTTTCCAAACAGGAGATTC ( <i>Bam</i> H I)

备及操作方法如前述<sup>[14]</sup>。*SRP1* 及内源参照基因 *GAPDH* 的扩增引物分别为 TL537/TL538 和 TL217/TL218 (详见表 2)。为了分析 *SRP1* 基因的表达模式, 以野生型菌株 H99 基因组 DNA 为模板利用引物 TL877/878 扩增一包含 *SRP1* 基因上游约 1.5 kb 基因编码序列(无终止密码子)片段, 并通过体外同源重组方式克隆到载体 pTBL3 中得到 pTBL131。pTBL131 经 *Apa* I 酶切后分别转化到两交配型 *srp1Δ* 突变体中, 经筛选验证后获得 Srp1-mCherry 融合荧光表达菌株。分别选取  $\alpha$  和  $\mathbf{a}$  交配型 Srp1-mCherry 融合荧光表达菌株设置交配实验并利用激光共聚焦荧光显微镜(Olympus, FV1200)观察荧光在隐球菌各发育阶段的定位情况。

### 1.3 *SRP1* 基因的敲除与互补

采用两步 PCR 法构建基因敲除片段, 具体方法如前所述<sup>[6]</sup>。通过 PCR 初筛和 Southern blotting 验证获得 *SRP1* 基因敲除  $\alpha$  交配型突变体  $\alpha$  *srp1Δ* 菌株, 并通过交配产孢分离验证方式获得  $\mathbf{a}$  交配型突变体  $\mathbf{a}$  *srp1Δ* 菌株。为获得 *srp1Δ* 突变体互补菌株, 我们以野生型菌株 H99 基因组 DNA 为模板, 利用引物 TL564/TL565 扩增一长约 3.0 kb 的 *SRP1* 基因互补片段(含 1.5 kb *SRP1* 基因启动子、0.85 kb 基因编码序列及 0.5 kb 终止子序列)并克隆到 pTBL1 载体中构建互补质粒 pTBL132。互补质粒经 *Apa* I 线性化后转化到  $\alpha$  和  $\mathbf{a}$  *srp1Δ* 突变体中, 经抗性筛选、PCR 验证和表型测定, 最终得到 *SRP1* 基因的互补突变体菌株 TBL220/TBL221。

### 1.4 突变体毒力因子测定

将野生型 H99、突变体 *srp1Δ* 及互补菌株 *srp1Δ::SRP1* 菌株接种于 YPD 液体培养基中于 30 °C 培养过夜并收集上述菌株酵母细胞, 经

ddH<sub>2</sub>O 洗涤和浓缩后分别滴于 Niger seed 和 DME 培养基上, 于 37 °C 黑暗培养 2 d, 分别检测上述隐球菌黑色素和荚膜形成情况; 同时, 上述菌株经 ddH<sub>2</sub>O 洗涤后调整 *OD*<sub>600</sub> 至 2.0, 经过一系列 10 倍稀释后滴于含有不同应激条件的平板上, 黑暗培养 2–3 d, 观察菌株生长情况。

### 1.5 致病性分析

收集 30 °C 过夜培养的上述三种菌株酵母细胞, 经 PBS 洗过后调整细胞浓度至  $2 \times 10^6$  CFU/mL。通过滴鼻感染方式分别将 50  $\mu$ L 上述菌株酵母细胞接种至 8 周龄大 C57BL/6 小鼠中, 具体接种方法及小鼠发病情况判定标准参见 Liu 等<sup>[14]</sup>。菌株致病性统计及小鼠存活曲线绘制均采用 PRISM 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) 软件进行分析。组织载菌量分析: 分离处死小鼠的脑肺脾取其中一半进行匀浆和稀释, 取 100  $\mu$ L 稀释后的匀浆液涂布于 YPD 平板(含有青霉素和氯霉素)并置于 30 °C 培养, 2 d 后统计酵母菌落数并计算组织载菌量(CFU/g 新鲜器官, Log<sub>10</sub>); 剩余器官经 10% 福尔马林固定后送往武汉赛维尔生物科技有限公司进行组织切片分析。

### 1.6 菌株的交配分析

分别将过夜培养的新生隐球菌两个不同交配型的野生型(H99  $\times$  KN99 $\mathbf{a}$ )、*srp1Δ* 突变体( $\alpha \times \mathbf{a}$ )及互补菌株 *srp1Δ::SRP1*( $\alpha \times \mathbf{a}$ )细胞等量混合后滴于 MS 培养基上并于 25 °C 黑暗诱导培养 14 d, 用 Olympus CX41 显微镜观察并记录隐球菌交配菌丝和担孢子形成情况。为了检测 *srp1Δ* 突变体菌株交配过程中细胞核变化情况, 将含有 Nop1-mCherry 融合蛋白的表达载体 pTBL72<sup>[6]</sup>分别转化到  $\alpha$  和  $\mathbf{a}$  *srp1Δ* 突变体中, 经筛选得到具有细胞核定位的荧光菌株, 用于后续交配实验和荧光观察。



## 1.7 数据分析方法

采用 PRISM 7.0 软件的 Log-rank (Mantel-Cox) test 过程对隐球菌接种小鼠后致病性进行差异性分析; 采用 nonparametric Mann-Whitney test 过程对组织载菌量和荚膜大小进行差异性分析( $P < 0.01$  视为差异显著)。

## 2 结果和分析

### 2.1 Srp1 序列分析

根据新生隐球菌 H99 基因组序列经 PCR 扩增得到 *SRPI*(CNAG\_00626) 基因, 序列分析显示该基因全长 853 bp, 含 4 个外显子(图 1-A); 其 cDNA

全长 675 bp, 编码一个由 224 个氨基酸组成的蛋白(图 1-B), 分子量为 23.6 kDa。然而当我们对该蛋白序列进行保守结构域预测时发现目前没有任何结构域与之匹配; 同时我们又通过 BLASTP 程序对该蛋白进行同源搜索, 结果显示与该蛋白同源性较高的蛋白均为假设蛋白(表 3), 表明该蛋白可能还未被研究过, 因此有必要对其功能进行研究。

### 2.2 *SRPI* 表达模式分析

为了检测 *SRPI* 基因在隐球菌各发育阶段的表达情况, 我们采用了 qRT-PCR 对其进行了检测, 结果表明 *SRPI* 在隐球菌交配过程中呈诱导表达方式(图 2-A), 表明 *SRPI* 基因可能在隐球菌交配过程中

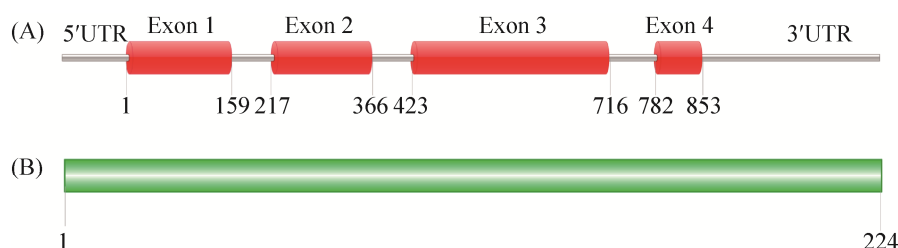


图 1. 产孢相关蛋白 Srp1 基因及蛋白序列分析

Figure 1. Gene and protein sequence analysis of the sporulation-related protein Srp1. A: The sequence structure of the sporulation-related protein gene *SRPI*; B: Sequence of the sporulation-related protein Srp1. Non-conserved domains were found in Srp1.

表 3. 产孢相关蛋白 Srp1 同源蛋白比较结果

Table 3. The eight homologizes of the sporulation-related protein Srp1 identified by BLASTP.

Accession	Description	Query cover/%	E-value	Identity/%
XP_012046847	Srp1, <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> H99	100	7e-158	100
XP_566960	Hypothetical protein, <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21	100	5e-130	91
KGB75464	Hypothetical protein, <i>Cryptococcus gattii</i> VGII R265	99	4e-109	81
ODN89942	Hypothetical protein, <i>Cryptococcus depauperatus</i> CBS 7841	99	7e-59	49
XP_018996930	Hypothetical protein, <i>Cryptococcus amyloletus</i> CBS 6039	100	3e-45	46
XP_019032557	Hypothetical protein, <i>Tsuchiyaea wingfieldii</i> CBS 7118	70	3e-44	56
RSH85290	Hypothetical protein, <i>Saitozyma podzolica</i>	93	1e-07	31
PPQ76540	Hypothetical protein, <i>Gymnopilus dilepis</i>	87	0.005	31
KIK43939	Hypothetical protein, <i>Suillus luteus</i> UH-Slu-Lm8-n1	67	0.002	28

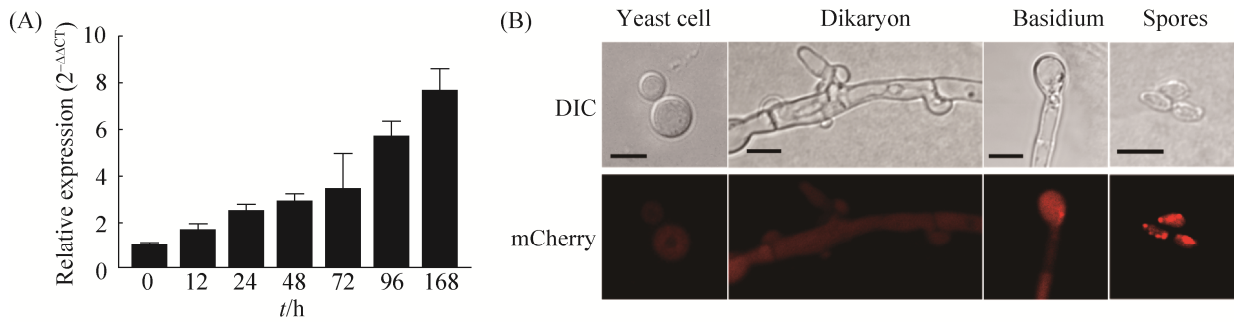


图 2. *SRP1* 基因的表达模式分析

Figure 2. Expression pattern of the *SRP1* gene in *C. neoformans*. A: Expression of *SRP1* during early stages of mating was detected by qRT-PCR. Mating cultures of the wild type strains (H99 × KN99a) were collected from the V8 plates after 12, 24, 48, 72, and 96 h and 7 d incubation for RNA purification and cDNA synthesis. The 2<sup>-ΔΔCT</sup> method was used to analyze the relative changes in *SRP1* expression and *GAPDH* was used as internal control. The experiment was repeated three times; B: Localization of Srp1-mCherry fusion protein in cryptococcal different developmental stages. The Srp1-mCherry fusion protein was located to the cytoplasm of the yeast cell, mating hyphae, basidium and basidiospores of *C. neoformans*. Bars, 5 μm.

起重要作用。同时我们也构建了 *P<sub>SRP1</sub>-SRP1-mCherry* 融合表达载体 pTBL131, 经转化和筛选后得到 α 和 a 交配型荧光菌株(TBL220 和 TBL221), 荧光观察结果表明 Srp1-mCherry 融合蛋白定位于隐球菌的细胞质中(图 2-B); 为了检测 *SRP1* 在隐球菌各个发育阶段的表达情况, 我们将 TBL220 和 TBL221 交配后在共聚焦显微镜下观察, 发现 Srp1-mCherry 在隐球菌的酵母细胞、双核菌丝、担子以及担孢子阶段都有表达, 且定位于细胞质中(图 2-B)。

### 2.3 *SRP1* 基因敲除及互补菌株的获得

利用 Split marker 策略构建 *SRP1* 基因敲除片段, 通过基因枪将基因敲除片段转化到 H99 菌株中, 经 G418(200 mg/L)筛选获得 3 个转化子, 并经 Southern blotting 验证后确认获得 *srp1Δ* 基因敲除突变体菌株(图 3)。构建 *SRP1* 基因互补质粒(pTBL132)并通过基因枪转化至 *srp1Δ* 突变体中, 经 NAT 抗性筛选、PCR 验证和表型测定确认得到 4 株互补菌株, 选取其中 1 株互补菌株进行后续实验。

### 2.4 *SRP1* 基因敲除不影响隐球菌毒力因子的形成

黑色素、荚膜形成以及能在 37 °C 条件下生长是新生隐球菌目前研究较为透彻的经典毒力因子, 与新生隐球菌的致病性密切相关。为了研究 Srp1 在新生隐球菌致病性中的作用, 我们首先检测了 *SRP1* 基因敲除突变体 *srp1Δ* 背景下各毒力因子变化情况。结果发现与野生型菌株 H99 相比, *srp1Δ* 突变体在 Niger seed 培养基上能够形成正常的黑色素(图 4-A), 在 DME 培养基上形成正常的荚膜(图 4-B), 且在 37°C 条件生长正常(图 4-C), 表明 Srp1 不参与新生隐球菌上述毒力因子的形成。

为了进一步研究 Srp1 在真菌毒力中的作用, 我们又检测了 *srp1Δ* 突变体在高渗(YPD+1 mol/L Sorbitol)、硝化应激(YPD+1 mmol/L NaNO<sub>2</sub>, pH 4.0)、细胞完整性应激(YPD+SDS/Congo red)等条件下的生长情况(图 4-C)。与野生型菌株 H99 相比, *srp1Δ* 突变体对上述应激条件不敏感, 表明 Srp1 也不调控隐球菌在上述应激条件下生长。

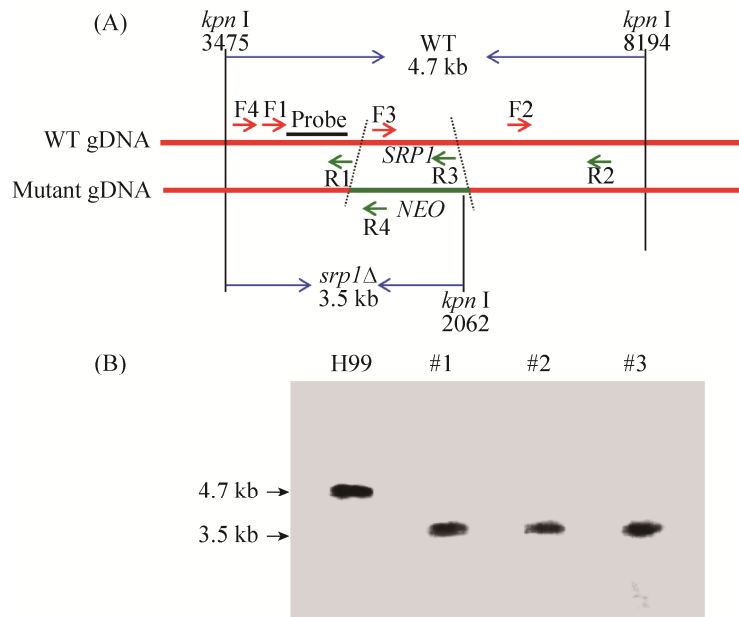


图 3. *SRP1* 基因敲除突变体的验证

Figure 3. Verification of *SRP1* gene knockout mutants. A: The restriction enzyme *Kpn I* was used to digest the genomic DNAs for Southern blotting; B: Disruption of the wild type *SRP1* gene was confirmed by Southern blotting analysis. The Southern blotting was probed with a F1/R1 PCR product specific probe. A fragment of 4.7 kb is present in the wild-type strains while the 3.5 kb band is shown in *srp1Δ* mutant strains. Number 1–3 are the three G418 resistant transformants used for Southern blotting.

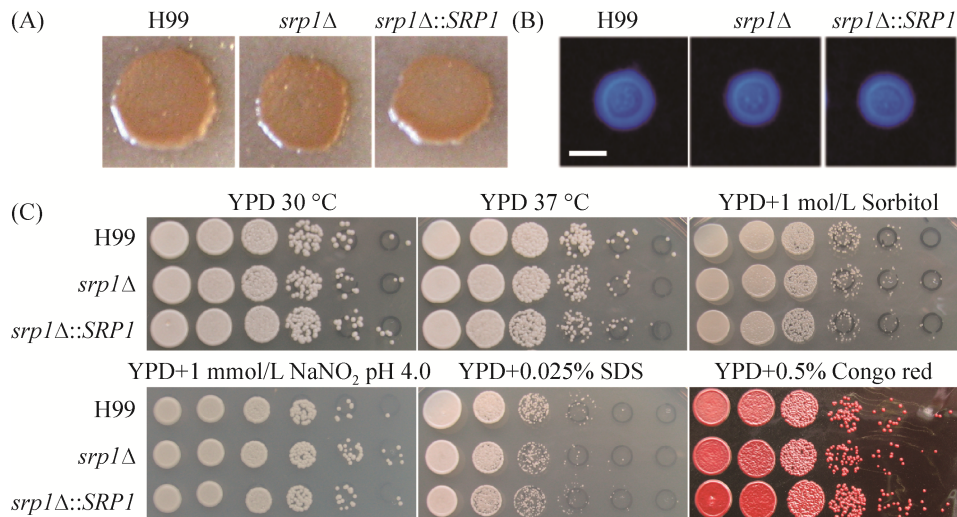


图 4. *SRP1* 基因敲除不影响新生隐球菌经典毒力因子的形成

Figure 4. *Srp1* is dispensable for classical virulence factors development in *C. neoformans*. A: Melanin production was assayed on Niger seed medium. Melanin levels produced by the strains were observed in photographs after incubation for 2 days at 37 °C; B: Capsule formation was assayed at 37 °C on DME medium. Capsule production was visualized by India ink staining after cells were grown on DME medium for 2 days; Bar, 5 μm. C: Cryptococcal overnight cultures in YPD were diluted to an  $OD_{600}$  of 2.0. Tenfold dilutions were made in water and 5 μL of each dilution was spotted on YPD agar with indicative stresses. The plates were incubated for two to three days at indicated temperature. H99, *srp1Δ* mutant and *srp1Δ* complemented strains are indicated on the left and the conditions at the top.

## 2.5 *SRP1* 敲除不影响隐球菌的致病性

由于真菌毒力是一个复杂性状,我们进一步通过 C57BL/6 小鼠致病性实验检测了 *Srp1* 在隐球菌毒力中的作用。当用野生型菌株 H99 接种时,小鼠在接种后 22 d 至 27 d 内死亡,而用 *srp1Δ* 接种时小鼠则在接种后 20 d 到 28 d 内死亡,两者致病性无差异(图 5-A)。组织载菌量(CFU)分析发现两者感染小鼠脑肺脾的组织载菌量分别在  $10^7$ 、 $10^9$  和

$10^7$ , 两者之间无明显差异,表明 *SRP1* 基因的敲除并没有影响新生隐球菌的致病性。隐球菌感染小鼠后的病理组织切片结果也显示小鼠感染野生型菌株 H99 和 *srp1Δ* 突变体后其肺脑脾病变严重,病变部位充满大量含有荚膜增大的酵母细胞(图 5-C)。

## 2.6 *Srp1* 调控新生隐球菌有性产孢过程

新生隐球菌是担子菌,有  $\alpha$  和  $a$  两个交配型,两个交配型的细胞可交配形成双核菌丝并产生

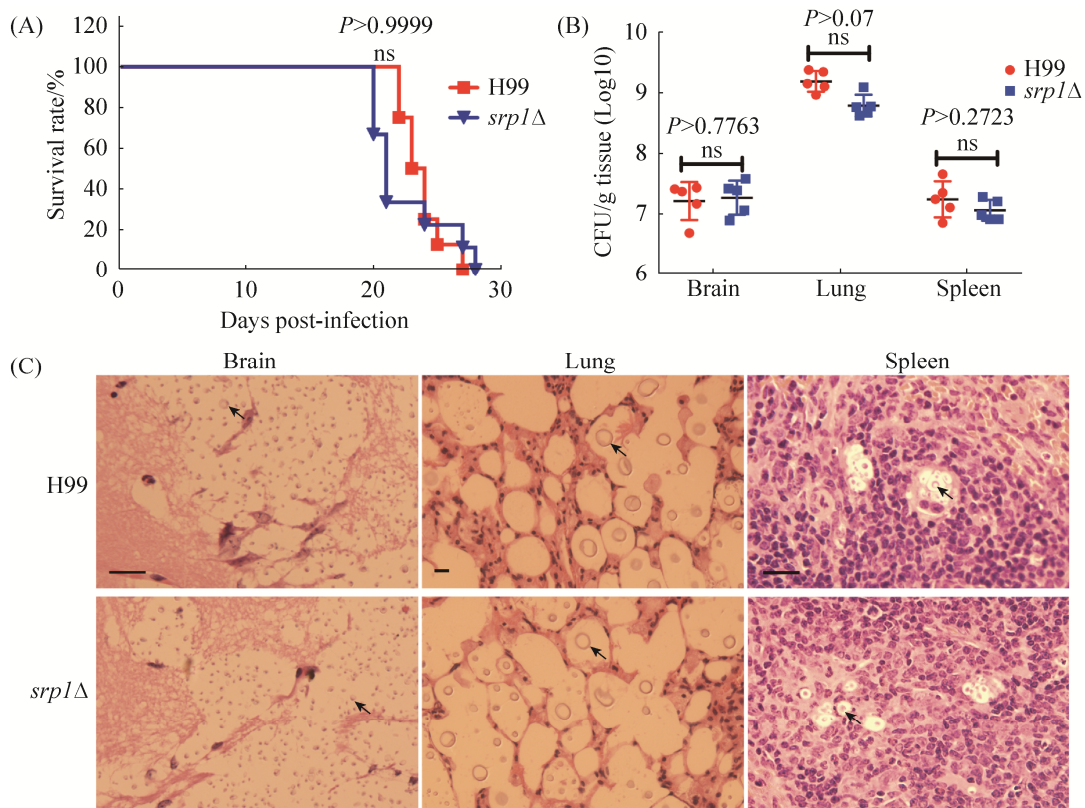


图 5. *SRP1* 基因敲除不影响新生隐球菌的致病性

Figure 5. *Srp1* is not required for pathogenicity in *C. neoformans*. A: Groups of 10 female C57 BL/6 mice were infected intranasally with  $1 \times 10^5$  cells of wild-type H99 and *srp1Δ* mutant cells, and progression to severe morbidity was monitored for 30 days. There was no significant difference between *srp1Δ* mutant and the wild-type strain, H99 in virulence. B: Brains, Lungs and spleens were harvested and homogenized, and serial dilutions were plated for CFU determinations. Error bars indicate standard deviations for five mice per treatment group. ns: not significant. C: Histopathological analysis of *C. neoformans*-infected brain, lung and spleen tissues. Brain, lung and spleen tissues from H99 and *srp1Δ* infected mice were isolated, fixed and stained with H&E. Arrows indicates strained cryptococcal cells. Bars, 25  $\mu$ m.



担孢子。为了检测 *Srp1* 在新生隐球菌有性生殖中的作用, 我们等量混合 *srp1Δ* 突变体  $\alpha$  和  $\mathbf{a}$  交配型酵母细胞并滴于 MS 诱导培养基上, 25 °C 黑暗条件下诱导培养 14 d 后显微镜下观察交配菌丝和担孢子发育情况。结果显示 *srp1Δ* 突变体能够形成正常的交配菌丝和担子, 但不能产生担孢子(图 6), 表明 *Srp1* 调控隐球菌的有性产孢过程。

为了检测 *srp1Δ* 突变体细胞核在有性生殖各发育阶段的变化情况, 我们分别构建了野生型和 *srp1Δ* 突变体  $\alpha$  和  $\mathbf{a}$  交配型背景下细胞核定位荧光菌株并设置交配实验。荧光显微镜观察发现野生型菌株(H99 和 KN99a)和 *srp1Δ* 突变体菌株( $\alpha$  和  $\mathbf{a}$

交配型)的酵母细胞及交配菌丝中分别存在 1 个和 2 个细胞核(图 7), 而交配后形成的新鲜担子内存在 1 个融合的细胞核(图 7), 这表明野生型和 *srp1Δ* 突变体菌株都能够正常交配产生双核菌丝并能够形成担子和进行正常的细胞核融合。然而, *srp1Δ* 突变体成熟担子中仍只观察到 1 个细胞核, 而野生型菌株产生的成熟担子中则可以观察到 4 个细胞核, 表明 *srp1Δ* 突变体菌株成熟担子中的细胞核融合后不能够正常进行减数分裂, 导致只有 1 个细胞核存在。以上结果表明 *Srp1* 调控新生隐球菌有性生殖的减数分裂过程, *Srp1* 缺失导致 *srp1Δ* 突变体菌株交配后不能正常进行减数分裂从而丧失产生担孢子能力。

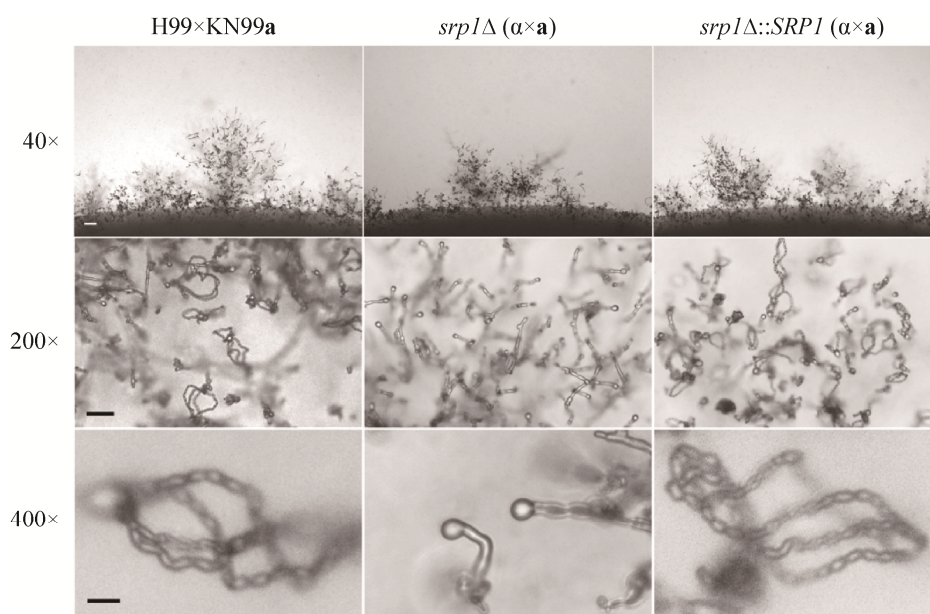


图 6. *Srp1* 调控隐球菌的有性生殖

Figure 6. *Srp1* is required for sexual reproduction in *C. neoformans*. Mating phenotypes for a wild-type cross between H99 and KN99a, the *srp1Δ* mutant bilateral cross between TBL105 and TBL138, and *srp1Δ* complemented strains cross between TBL218 and TBL219. All mating patches were spotted on MS medium and incubated for 14 days in the dark at 25 °C. The top row shows hyphal growth on the edge of mating patches at  $\times 40$  magnification. bar=100  $\mu\text{m}$ . The middle and the bottom rows show the basidium and spore chain morphology at  $\times 200$  (bar=25  $\mu\text{m}$ ) and  $\times 400$  magnification (Bar=10  $\mu\text{m}$ ), respectively.

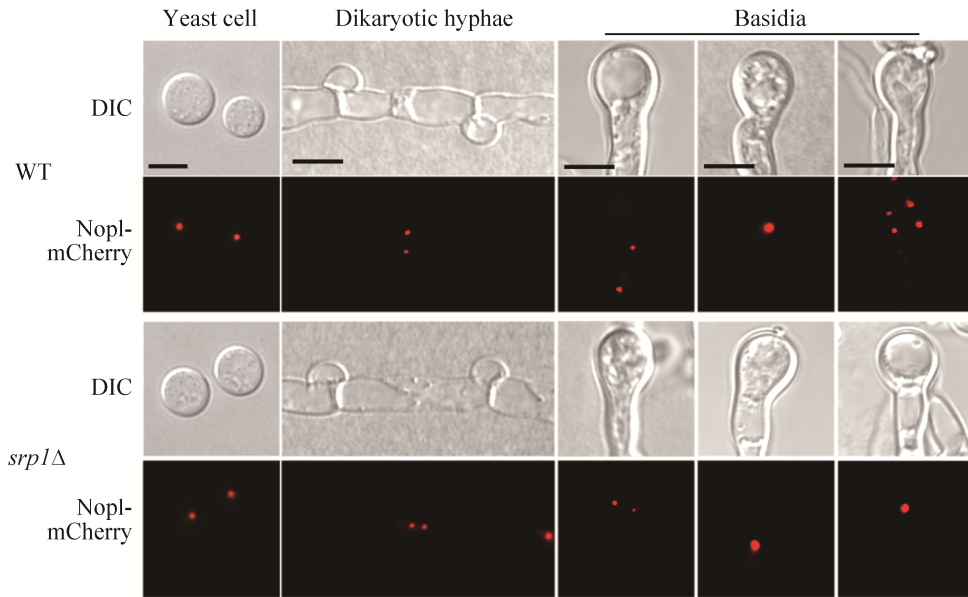


图 7. *srp1Δ* 突变体交配过程中细胞核变化情况

Figure 7. Fungal nuclei development assay in yeast cell, mating hyphae and basidia of the wild-type and *srp1Δ* mutant strains. Mating cultures were harvested from MS plates after incubation for 7 or 14 days at 25 °C in the dark and examined under inverted confocal laser scanning microscope (Olympus, FV1200). Bars, 5 μm.

### 3 讨论

新生隐球菌是自然界广泛存在的具荚膜的酵母型病原真菌，能感染免疫缺陷及正常人群引起隐球菌性肺炎和脑膜炎，导致每年超过 18 万人的死亡<sup>[3]</sup>。新生隐球菌具有  $\alpha$  和  $a$  两个交配型，可通过交配进行有性生殖并产生担孢子<sup>[1]</sup>。有性生殖可以促进隐球菌不同菌株之间遗传物质交换，利于子代细胞适应新的环境，也会导致高致病性和耐药性菌株的出现<sup>[21]</sup>，这对于新生隐球菌致病力进化有积极意义。本研究鉴定了一新的产孢相关蛋白 Srp1，功能分析结果显示 Srp1 能够影响新生隐球菌的有性生殖过程，*SRP1* 基因敲除能导致隐球菌丧失产生担孢子的能力，表明 Srp1 在隐球菌有性生殖过程中起重要作用。

Srp1 为一新的产孢相关蛋白。我们研究组前期通过 iTRAQ 蛋白组学方法鉴定 *fbp1Δ* 突变体背

景下高丰度蛋白时发现一未被研究的蛋白 CNAG\_00626，该蛋白在 *fbp1Δ* 突变体背景下的丰度与野生型的丰度比值(*fbp1Δ*/H99)为 3.0265681，为 *fbp1Δ* 突变体背景下最高丰度蛋白。我们首先对 Srp1 进行了序列分析，经过同源比对和保守结构域分析后发现 Srp1 不含有目前已知的保守结构域；与其同源性较高的蛋白都是假设蛋白，功能还未被研究，因此 Srp1 为一未被研究蛋白，对其进行功能研究十分有意义。

Srp1 调控新生隐球菌的减数分裂过程。为了研究 Srp1 的功能，我们对其进行了基因敲除，结果表明新生隐球菌产孢相关蛋白基因 *SRP1* 敲除后其突变体交配时可正常进行细胞融合并形成双核菌丝和担子，但丧失产生担孢子的能力，推测可能原因是突变体交配后其有性生殖过程被阻断，导致其不能产生担孢子。至于是否是有性生殖过程被阻断，是有性生殖的细胞核融合过程被

阻断, 还是融合细胞核的减数分裂过程被阻断尚不明确。为进一步探究 Srp1 调控隐球菌有性产孢的机理, 我们构建了核定位蛋白 Nop1 和红色荧光蛋白 mCherry 融合表达载体用以示踪新生隐球菌有性生殖过程中细胞核变化情况。表达载体经转化和筛选后分别获得野生型和 *srp1Δ* 突变体  $\alpha$  和  $\mathbf{a}$  交配型核定位荧光菌株。交配实验及细胞核发育结果表明 *srp1Δ* 突变体交配后形成的年轻担子里面含有 2 个细胞核, 可进一步融合形成 1 个细胞核, 但不能继续分裂形成 4 个细胞核, 表明 Srp1 缺失阻断了减数分裂过程, 从而导致 *srp1Δ* 突变体丧失产生担孢子的能力。至于 Srp1 如何调控隐球菌的减数分裂过程, 是间接还是直接, 目前还不得而知。因此 Srp1 调控隐球菌有性生殖的分子机制还有待于进一步研究。

Srp1 是否是 Fbp1 下游底物还有待于进一步验证。Fbp1 是新生隐球菌 E3 泛素连接酶关键蛋白, 负责特异性地识别和泛素化底物蛋白并进行降解, 其基因敲除突变体 *fbp1Δ* 完全丧失致病性和产孢能力<sup>[14, 22]</sup>。DAPI 染色结果显示 *fbp1Δ* 突变体交配后其成熟担子中的 2 个细胞核融合形成 1 个细胞核后不再进行减数分裂, 从而导致隐球菌丧失产孢能力。我们前期的质谱工作显示 Srp1 在泛素连接酶关键蛋白 Fbp1 缺失突变体背景下高丰度表达, 表明 Srp1 可能是 Fbp1 的一下游底物。功能分析表明 *srp1Δ* 突变体丧失产生担孢子的能力也是由于细胞核融合后减数分裂过程受到阻断, 表型与 *fbp1Δ* 一致, 因此 Fbp1 有可能通过调控 Srp1 来调控新生隐球菌的有性生殖过程。至于 Fbp1 与 Srp1 是否存在相互作用以及 Srp1 是否是 Fbp1 的下游底物还有待于进一步验证。

产孢相关蛋白 Srp1 通过调控减数分裂过程而影响新生隐球菌的有性产孢, 在新生隐球菌有性

生殖进程中发挥着关键作用。对该蛋白进行功能和调控机理研究不仅为新生隐球菌有性生殖的调控及机制阐述提供数据支撑, 而且也为后续新生隐球菌有性生殖精确调控机理的解析提供理论基础和技术支持。

## 参考文献

- [1] Lin XR, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology*, 2006, 60: 69–105.
- [2] Fang W, Fa ZZ, Liao WQ. Epidemiology of *Cryptococcus* and cryptococcosis in China. *Fungal Genetics and Biology*, 2015, 78: 7–15.
- [3] Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, Denning DW, Loyse A, Boulware DR. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 2017, 17(8): 873–881.
- [4] Carroll SF, Guillot L, Qureshi ST. Mammalian model hosts of cryptococcal infection. *Comparative Medicine*, 2007, 57(1): 9–17.
- [5] Hull CM, Heitman J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annual Review of Genetics*, 2002, 36: 557–615.
- [6] Fan CL, Han LT, Jiang ST, Chang AN, Zhou ZY, Liu TB. The Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> zinc finger protein Zfp1 regulates sexual reproduction and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genetics and Biology*, 2019, 124: 59–72.
- [7] Feretzaki M, Heitman J. Genetic circuits that govern bisexual and unisexual reproduction in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Genetics*, 2013, 9(8): e1003688.
- [8] Gyawali R, Zhao YB, Lin JF, Fan YM, Xu XP, Upadhyay S, Lin XR. Pheromone independent unisexual development in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Genetics*, 2017, 13(5): e1006772.
- [9] Lin XR, Jackson JC, Feretzaki M, Xue CY, Heitman J. Transcription factors Mat2 and Znf2 operate cellular circuits orchestrating opposite- and same-sex mating in *Cryptococcus*

- neoformans*. *PLoS Genetics*, 2010, 6(5): e1000953.
- [10] Liu LX, He GJ, Chen L, Zheng J, Chen YY, Shen L, Tian XY, Li EW, Yang EC, Liao GJ, Wang LQ. Genetic basis for coordination of meiosis and sexual structure maturation in *Cryptococcus neoformans*. *eLife*, 2018, 7: e38683.
- [11] Fan CL, Yu QK, Liu TB. Cloning and functional analysis of *RBPI* gene in *Cryptococcus neoformans*. *Mycosystema*, 2018, 37(11): 1466–1478. (in Chinese)  
范成莉, 余启昆, 刘同宝. 新生隐球菌 *RBPI* 基因克隆与功能分析. 菌物学报, 2018, 37(11): 1466–1478.
- [12] Tian XY, He GJ, Hu PJ, Chen L, Tao CY, Cui YL, Shen L, Ke WX, Xu HJ, Zhao YB, Xu QJ, Bai FY, Wu B, Yang EC, Lin XR, Wang LQ. *Cryptococcus neoformans* sexual reproduction is controlled by a quorum sensing peptide. *Nature Microbiology*, 2018, 3(6): 698–707.
- [13] Fu C, Donadio N, Cardenas ME, Heitman J. Dissecting the roles of the calcineurin pathway in unisexual reproduction, stress responses, and virulence in *Cryptococcus deneoformans*. *Genetics*, 2018, 208(2): 639–653.
- [14] Liu TB, Wang YN, Stukes S, Chen Q, Casadevall A, Xue CY. The F-Box protein Fbp1 regulates sexual reproduction and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 2011, 10(6): 791–802.
- [15] Xue CY, Tada Y, Dong XN, Heitman J. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. *Cell Host & Microbe*, 2007, 1(4): 263–273.
- [16] Alspaugh JA, Perfect JR, Heitman J. *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein  $\alpha$  subunit GPA1 and cAMP. *Genes & Development*, 1997, 11(23): 3206–3217.
- [17] Perfect JR, Ketabchi N, Cox GM, Ingram CW, Beiser CL. Karyotyping of *Cryptococcus neoformans* as an epidemiological tool. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31(12): 3305–3309.
- [18] Nielsen K, Cox GM, Wang P, Toffaletti DL, Perfect JR, Heitman J. Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and virulence of congenic **a** and  $\alpha$  isolates. *Infection and Immunity*, 2003, 71(9): 4831–4841.
- [19] Fraser JA, Subaran RL, Nichols CB, Heitman J. Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. *Eukaryotic Cell*, 2003, 2(5): 1036–1045.
- [20] Price MS, Nichols CB, Alspaugh JA. The *Cryptococcus neoformans* Rho-GDP dissociation inhibitor mediates intracellular survival and virulence. *Infection and Immunity*, 2008, 76(12): 5729–5737.
- [21] Fraser JA, Giles SS, Wenink EC, Geunes-Boyer SG, Wright JR, Diezmann S, Allen A, Stajich JE, Dietrich FS, Perfect JR, Heitman J. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature*, 2005, 437(7063): 1360–1364.
- [22] Masso-Silva J, Espinosa V, Liu TB, Wang YN, Xue CY, Rivera A. The F-Box protein Fbp1 shapes the immunogenic potential of *Cryptococcus neoformans*. *mBio*, 2018, 9(1): e01828–17.



# Identification and characterization of a novel sporulation-related protein Srp1 in *Cryptococcus neoformans*

Chengli Fan\*

College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** **[Objective]** To investigate the role and its mechanism of the sporulation-related protein Srp1 in sexual reproduction and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **[Methods]** Biolistic transformation method was conducted to construct the *srp1*Δ mutants and its complemented strains. Fungal virulence assay and bilateral mating assay were used to test the role of Srp1 in fungal development in *C. neoformans*. **[Results]** In comparison with the wild-type strain H99, the *srp1*Δ mutants had no significant difference in fungal virulence. Although the *srp1*Δ mutants can mate and form the dikaryotic hyphae in bilateral mating, the *srp1*Δ mutants have lost their ability to produce basidiospores. Fungal nuclei development assay showed that the nuclei in the bilateral mating of *srp1*Δ mutants failed to undergo meiosis after fusion, which can lead to failure of basidiospore formation in *srp1*Δ mutants. **[Conclusion]** The sporulation related protein Srp1 is not required for fungal virulence, but control sexual reproduction by regulating meiosis during mating in *C. neoformans*.

**Keywords:** *Cryptococcus neoformans*, mating, sporulation, meiosis

(本文责编: 张晓丽)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31400133) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (XDJK2016C097, XDJK2016A006)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-23-68251196; E-mail: chenglifan@126.com

Received: 24 January 2019; Revised: 15 February 2019; Published online: 7 March 2019