

酵母 D-アスパラギン酸酸化酵素遺伝子の
発現制御機構の解析

令和 4 年（2022 年）3 月

長岡技術科学大学大学院

工学研究科

生物統合工学専攻

今 西 大 生

目次

序論	1
第1章 酵母 <i>Cryptococcus humicola</i> UJ1 株のドラフトゲノム解析と D-アスパラギン酸酸化酵素遺伝子発現に関与するアミノ酸パーミアーゼの機能解析	
1. 緒言	26
2. 結果	27
3. 考察	55
4. 材料と方法	70
第2章 酵母 <i>Cryptococcus humicola</i> UJ1 株の D-または L-Asp 存在下における 発現変動遺伝子の解析	
1. 緒言	75
2. 結果	76
3. 考察	84
4. 材料と方法	102
第3章 酵母 <i>Cryptococcus humicola</i> UJ1 株の D-アスパラギン酸酸化酵素遺伝子発現における ピルビン酸カルボキシラーゼの機能解析	
1. 緒言	104
2. 結果	106
3. 考察	113
4. 材料と方法	116
総括	123
謝辞	126
公表論文	127
引用文献	128

序論

D-アミノ酸

アミノ酸は生命活動に必須なタンパク質の構成成分であり、生命体の基本的な構成物質である。タンパク質を構成する 20 種類の α -アミノ酸には、Gly を除いて α 炭素が不斉中心となる、立体的に重ね合わすことができない一对の鏡像異性体が存在する。これらは、L-アミノ酸と D-アミノ酸に区別され、融点や等電点などの物理的性質は同じであるが、旋光度などの光学的性質は異なる。長年、生体を構成するアミノ酸のほとんどが L-アミノ酸であることから、D-アミノ酸は環境異物だと考えられてきた。しかし近年、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などの微量分析技術の発展に伴い、様々な D-アミノ酸が種々の真核生物にも見いだされ、多様な生理機能を担うことが明らかになってきた。

原核生物において、D-Ala や D-Glu などの D-アミノ酸が細胞壁の主要構成物質であるペプチドグリカン (PG) の構成成分として機能することが古くから知られている (1-3)。近年では、D-Asp や D-Asn, D-Lys, D-Ser も PG 構成成分として利用されていることが明らかにされた (4, 5)。PG における D-アミノ酸の存在は、プロテアーゼから身を守るための細菌の生存戦略の一つと考えられている (6)。さらに、いくつかの細菌の培養液上清に、上述した D-アミノ酸以外にも様々な遊離 D-アミノ酸が検出されたことから、PG 構成成分以外の D-アミノ酸が生産されていることが明らかとなった (7)。また、ある種の細菌が生産するポリグルタミン酸や gramicidin S などのペプチド系抗生物質にも D-アミノ酸が含まれることが知られている (8)。近年のゲノム配列解析の進展によって、数多くの細菌に D-アミノ酸の生合成を担う複数のアミノ酸ラーセマーゼホモログ遺伝子が見いだされたことから、多様な細菌種において、複数種の D-アミノ酸が生産されている可能性が指摘されている (9)。さらに、細菌における遊離 D-アミノ酸の生理学的な役割が次々と明らかになっている。例えば、D-Leu, D-Met や D-Tyr は、枯草菌 *Bacillus subtilis* のバイオフィームに高濃度で蓄積し、これら D-アミノ酸がバイオフィームを分散させる機能を有している (10)。また、病原性細菌 *Vibrio cholerae* はラーセマーゼによって、*Vibrio* 属を除く多くの細菌種に対して毒性を示す細胞外エフェクター分子として D-Arg を生産し、生存競争を有利にしていると考えられている (11)。さらに細菌において、D-アミノ酸は孢子の発芽や、リン酸塩の取り込み、栄養源としての利用など多様な細胞プロセスに影響を与えていることが報告されている (Fig. 1) (6)。

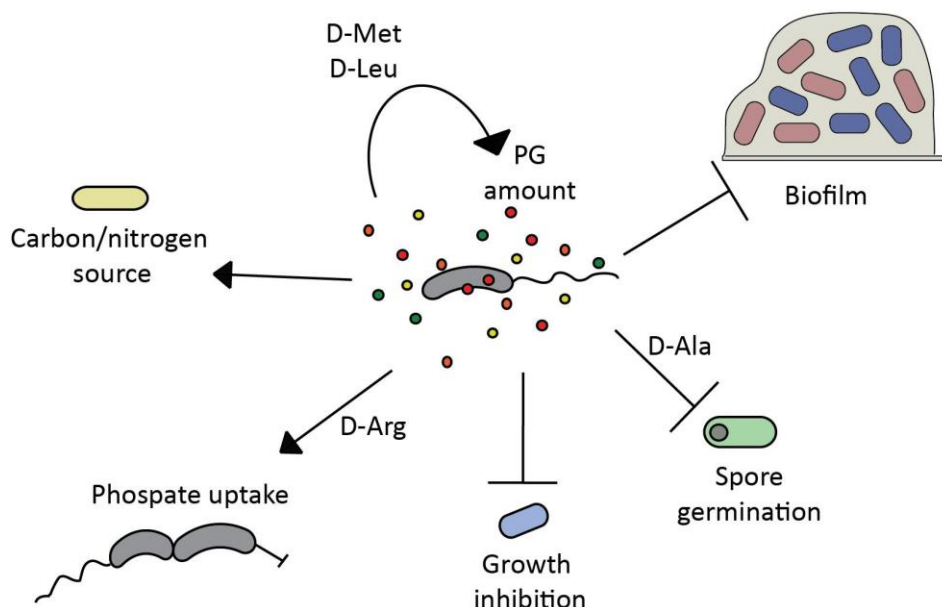


Fig. 1. 細菌における D-アミノ酸の機能

細菌が生産する D-アミノ酸は、自身や同じ場所に生息する細菌に多様な影響を与える。図は Aliashkevich らの論文から引用した (6)。

真核生物においても、D-アミノ酸が多くの生理機能を有している。1981年にカエル *Phyllomedusa sauvagei* の皮膚分泌物に D-Ala 含有オピオイド *dermorphin* が見いだされた (12)。これ以降、クモや軟体動物、甲殻類、脊椎動物からエネルギー貯蔵物質や抗菌作用、神経鎮痛作用を有する様々な D-アミノ酸含有ペプチドが見いだされている (13-15)。真菌においては、ペプチド系抗生物質の構成成分として、*Tolypocladium inflatum* の生産する *cyclosporine* には D-Ala が、*Aspergillus* 属が産生する *penicillin G* には D-Val が利用されている (16)。

水生無脊椎動物では、特に D-Ala や D-Asp が高濃度で見いだされる。二枚貝や甲殻類は Ala ラセマーゼによって D-Ala を生合成し、環境の浸透圧に順応するためのオスモライトとして利用している (17)。さらに、アカガイ *Anadara broughtonii* では Asp ラセマーゼによって生合成された D-Asp が、嫌氣的代謝におけるエネルギー貯蔵物質として機能すると考えられている (18)。一方、カイコ *Bombyx mori* を含む鱗翅目に属するいくつかの昆虫において、Ser ラセマーゼによって生合成された D-Ser が、変態と生殖過程におけるエネルギー源として機能すると考えられている (19, 20)。

哺乳動物では、特に D-Ser と D-Asp が豊富に見いだされる。D-Ser は Ser ラセマーゼにより生合成され、哺乳類の脳内で L-Glu 依存性のイオンチャンネルの 1 つであり、記憶や学習といった脳の高次機能に関与する N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 型グルタミン酸受容体 (NMDAr) の Gly 結合サイトに結合するコアゴニストとして神経伝達に関与していることが報告されている (Fig. 2) (21-23)。また、ヒト脳において D-Ser は大脳新皮質や海馬、基底核に高濃度に見いだされ、NMDAr の分布と非常に類似している (24-26)。また、大脳新皮質の Brodmann 領野に基づく分類において、D-Ser 濃度は特に随意運動に関与する一次運動野で低く、

対して聴覚情報や音声言語処理を担う一次聴覚野とウェルニッケ野で高いことが示された (26, 27). このことから, 大脳新皮質における D-Ser 分布と脳機能との間の相関関係が指摘されている. 実際に, 大脳皮質や脳機能領域における D-Ser 濃度の変化が統合失調症や筋萎縮性側索硬化症などの神経性疾患に関与する可能性が示唆されている (28-31).

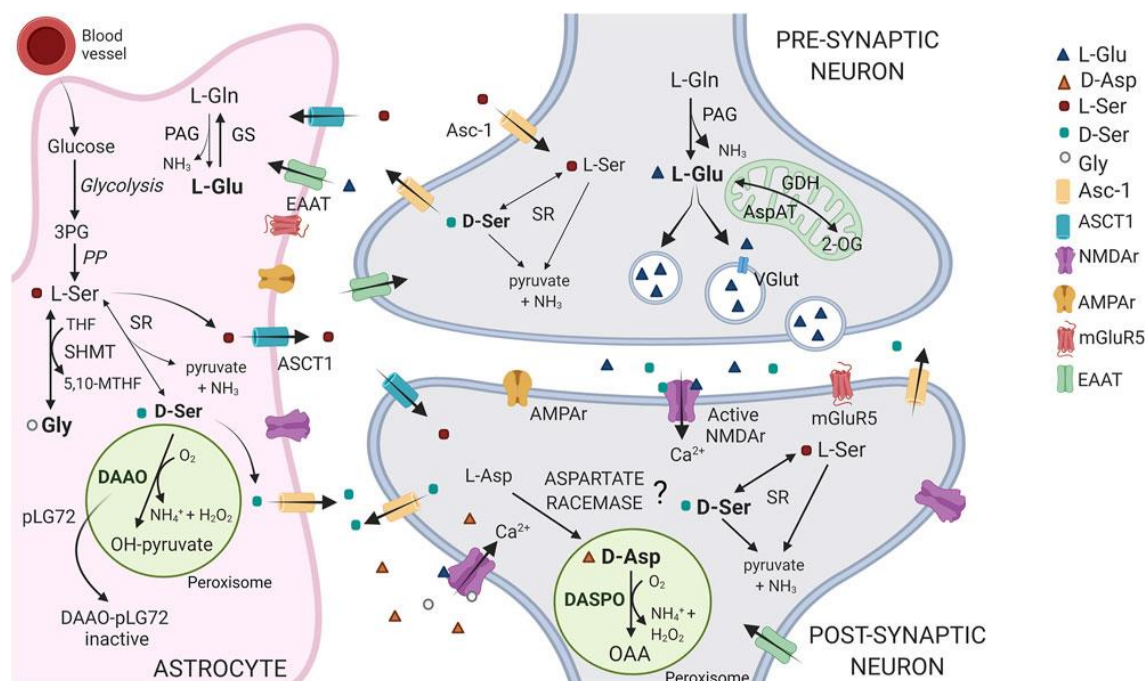


Fig. 2. 脳シナプスにおける D-Ser と D-Asp の代謝と神経伝達への関与

D-Ser と D-Asp および L-Glu は興奮性神経伝達物質として機能する. D-Ser は Ser ラセマーゼ (SR) によって L-Ser から生合成され, DAAO (DAAO) によって分解される. D-Asp は Asp ラセマーゼによって生合成されると考えられており, その後 DDO (DASPO) によって分解される. D-Ser と D-Asp はそれぞれコアゴニストとアゴニストとして NMDAr に結合し神経伝達に関与する. 略称; NMDAr, N-methyl-D-aspartate receptor; AMPAr, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor; mGluR5, metabotropic glutamate receptor 5; EAAT, excitatory amino acid transporter; 3PG, 3-phosphoglycerate; PP, phosphorylated pathway; ASCT1, Ala/Ser/Cys/Thr transporter 1; SHMT, serine hydroxymethyltransferase; PAG, phosphate-activated glutaminase; VGlut, vesicular glutamate transporter; GS, glutamine synthetase; GDH, glutamate dehydrogenase; AspAT, aspartate aminotransferase; 2-OG, 2-oxoglutarate; OAA, oxaloacetate; 図は Pollegioni らの論文から引用した (21).

D-Asp は軟体動物や両性類, 爬虫類, 鳥類, 哺乳類に見いだされ, 哺乳動物では主に脳内および内分泌腺を含む末梢神経組織に分布する (32, 33). いくつかの哺乳動物由来培養細胞株において D-Asp が生合成されることが知られている (34-37). また, ラット胎児視神経細胞の初代培養系において, L-Asp から D-Asp を生成する Asp ラセマーゼ活性が検出された (38). このことから, 哺乳動物では Asp ラセマーゼが D-Asp 生合成を担うと考えられている. 近年, マウスにおいて機能未知のタンパク質であった glutamic-oxaloacetic transaminase-1 like 1 (GOT111) が Asp ラセマーゼ活性を示すことから, 生体内において D-Asp の生合成を担うことが示唆されたが, その後のいくつかの研究によって否定され, 哺乳動物における D-Asp 合成酵素の分子実体

は未だ明らかにされていない (39, 40). D-Asp は脳や中枢神経系に広く分布する NMDAr の Glu 結合サイトに結合するアゴニストとして神経伝達に関与する (Fig. 2) (21, 32). D-Asp を経口投与されたマウスやラットの認知能力に関する研究において, D-Asp が NMDAr を介した神経伝達を強化し, 学習や記憶に有益な効果をもたらすと考えられている (41, 42). さらに, D-Asp を投与された神経疼痛モデルマウスでは対照群と比較して, 痛みの閾値が引き上げられること, また負傷部位を保護する行動が少ないことから, D-Asp が鎮痛特性を有することが示唆されている (43, 44). さらに近年では, D-Asp と NMDAr がヒトの統合失調症に関与する可能性が指摘されている (22, 45-47). ラットの臓器では, D-Asp が高濃度になる時期が, その機能や形態が成熟する時期と一致することから, D-Asp が細胞の増殖と分化に関与している可能性が示唆されている (8, 48, 49). また, メラトニンやテストステロンなど, 種々のホルモンの合成と分泌の調節への D-Asp の関与が指摘されており, 奇形精子症患者の精子や精漿における D-Asp 濃度の減少が観察されている (50-53). 雄ラットの性行動の質が脳の視床下部室傍核における NMDAr の発現レベルと相関関係があることが示唆された (54). また, 交尾中の雄ラットの視床下部室傍核の Glu と Asp 濃度が増加すること, NMDAr 阻害剤によって交尾活動が抑制されることから, NMDAr を介した興奮性神経伝達が勃起機能や交尾活動の制御に関与していることが示唆されている (55). さらに, NMDA を投与された雄ラットでは, 陰茎勃起を誘発する一酸化窒素の脳内レベルが上昇することが示された (56). これらの結果から, D-Asp が NMDAr を介して一酸化窒素の産生を誘発することで性行動を制御する可能性が示唆されている. 一方, D-Asp を投与された雄ラットの脳下垂体と精巣に D-Asp が蓄積し, 同時に性的興奮や陰茎勃起に関与するテストステロンの血中濃度が上昇することが示された (57). また, 精巣細胞を用いた *in vitro* 実験において D-Asp によるテストステロン合成の誘導が観察された (57). このように, D-Asp は特にオスの性行動に影響を与えられている.

これら真核生物における D-Ser や D-Asp の生理機能は, アミノ酸ラセマーゼによる生合成と D-アミノ酸オキシダーゼ (DAO) および D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO) による分解代謝により量的なレベルで制御されていると考えられている (21, 58). 他にも, D-Pro や D-Leu, D-Glu, D-Gln, D-Asn, D-Arg などが哺乳動物組織や組織液, 細胞または尿中に見いだされているが, その生理機能や生合成経路はほとんど明らかにされておらず, 今後の解明が期待されている (59-63).

D-アミノ酸毒性

外部から添加された過剰な D-アミノ酸は多くの生物に対して毒性を示すことが報告されている (64-73). 一般的に, 細胞内に D-アミノ酸が取り込まれると, L-アミノ酸と比較して割合は低いものの, tRNA と結合することが明らかにされている (72, 74-79). *in vitro* において D-アミノ酸が結合した tRNA (D-aa-tRNA) は L-aa-tRNA に比べて非常に低い親和性で, リボソームに取り込まれタンパク質合成に利用されることが示された (80-84). 実際に, 細菌 *Bacillus subtilis* 168 株では D-Tyr がタンパク質中に取り込まれていることが確認され, 高い D-Tyr 感受性に関係していると考えられている (65). 一方, リボソームの P-site に結合したペプチジル D-aa-tRNA は, L-aa-tRNA とは異なるコンフォメーションをとることでペプチジル転移反応を阻害し, 翻訳の停滞を引き起こす (85, 86). 結果として, D-aa-tRNA は不活性なリボソームと, それらが生成する不完全なペプチドの蓄積を引き起こし, 細胞毒性を引き起こすと考えられている (85). さらに, 真核生物では D-aa-tRNA が形成されると, tRNA が減少するとともに核に集積することでタンパク質合成が阻害され, 細胞死を引き起こすことが知られている (72, 85-88). 一方, 細菌特異的な D-アミノ酸毒性も存在する. 例えば, 細菌 *E. coli* や *B. subtilis* では不適切な D-アミノ酸がペプチドグリカンに誤って取り込まれることで毒性を示す (10, 69-71). さらに細菌 *Pseudomonas aeruginosa* や *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* では, D-アミノ酸が細胞外高分子物質のタンパク質成分に影響を与え, 環境への定着と生育を阻害する (89-91).

このような D-アミノ酸毒性はいくつかの D-アミノ酸代謝酵素によって回避される. 例えば, 古細菌や原核生物, 真核生物に広く存在する D-Tyr-tRNA^{Tyr} デアシラーゼ (Dtd) は D-アミノ酸と tRNA 間のエステル結合を切断する酵素であり, D-Tyr や D-Trp, D-Asp, D-Ser, D-Gln, D-Leu の毒性低減に寄与することが報告された (72, 77, 92, 93). 真菌では, D-Ala と L-Ala の相互変換を触媒する Ala ラセマーゼや, D-アミノ酸を α -ケト酸とアンモニアに分解する DAO や DDO, D-セリンデヒドラターゼ (DSD) が D-アミノ酸レベルを低下させることで D-アミノ酸毒性を回避する (58, 94, 95). また, D-アミノ酸-N-アセチルトランスフェラーゼ (DNT) は D-アミノ酸の α -アミノ基にアセチル基を付加して D-アミノ酸の毒性を不活化する役割を担っている (96, 97).

DDO の生理的役割

酵母 *C. humicola* UJ1 株において、DDO 遺伝子 (*ChDDO* 遺伝子) 破壊株は D-Asp 上での生育能を失い、D-Glu 上での生育に遅延を生じた (113). また、過剰な D-アミノ酸は細胞に対して毒性を有し、UJ1 株の生育が阻害されるが、*ChDDO* 遺伝子破壊株は D-Asp と D-Glu 毒性に対する感受性が顕著に増加した (113). したがって、酵母において DDO は D-Asp を生育に利用するための資化酵素としての役割を果たすとともに、酸性 D-アミノ酸の解毒酵素として機能することが示された.

多くの真核生物に DDO は 1 つしか存在しないが、線虫 *Caenorhabditis elegans* には 3 つの DDO (DDO-1, DDO-2, DDO-3) が存在する (114). *ddo-1* 変異体と *ddo-3* 変異体では、それぞれ D-Asp と D-Glu レベルが有意に上昇したことから、DDO-1 と DDO-3 はそれぞれ D-Asp と D-Glu の代謝分解に関与すると考えられている. また、これら 3 つの *ddo* 変異体の表現型から、全ての DDO が繁殖と孵化プロセスに関与し、DDO-3 は増殖と寿命の制御にも関与することが示唆された (115).

哺乳動物では肝臓や腎臓に高い DDO 活性が存在することから、DDO は外因性および内在性の酸性 D-アミノ酸の代謝分解の役割を担うと考えられている (116). また、D-Asp は脳や精巣に豊富に見いだされ、神経伝達やホルモン合成・分泌への関与が示唆されたことから、DDO が D-Asp 代謝分解を介してこれら D-Asp の生理機能を制御していると考えられている. 実際に、げっ歯類ラットにおける DDO の局在は D-Asp の局在と一致している (117). また、DDO 遺伝子をノックアウトした DDO 欠損マウスでは、各組織における D-Asp レベルが上昇し、 α -メラニン細胞刺激ホルモンに依存する行動 (体重の増加、性行動の質の低下や毛づくろい行動の減少など) の変化が観察されている (118-120). これらの結果から、哺乳動物において DDO が内因性 D-Asp の代謝分解の役割を担うことが示唆された. 一方、マウスでは D-Asp の経口投与によって、肝臓の DDO 酵素活性が上昇する (121). また、妊娠したラットに D-Asp を投与すると、新生ラットの肝臓と腎臓の DDO 酵素活性が上昇する (116). したがって、哺乳動物の DDO は外因性 D-Asp の分解にも機能することが示唆された.

また、哺乳動物胚脳における D-Asp レベルは L-Asp レベルに比べて高いが、生後は DDO 活性の上昇に伴って D-Asp レベルが著しく低下する (122, 123). また、非生理的濃度の D-Asp にさらされた DDO 欠損マウスの脳では、加齢によるいくつかの劣化プロセスが加速される (124, 125). これは、過剰な D-Asp が NMDAr の過剰興奮を引き起こすことが原因であると考えられている. したがって、哺乳動物において DDO は加齢による脳の劣化を防ぐことで、神経を保護する役割を担うと考えられている. 近年、統合失調症患者の死後脳において、D-Asp 濃度の減少および DDO 活性と DDO mRNA レベルの増加が報告されたことから、DDO は D-Asp 代謝を介して、統合失調症に関与することが示唆された (126, 127). このように D-Asp 代謝の異常が統合失調症を含む神経性疾患に関与すると考えられている (45-47).

D-アミノ酸依存的な遺伝子誘導発現

D-アミノ酸依存的な遺伝子誘導発現は様々な種で観察されている。いくつかの海洋性細菌において、D-アミノ酸トランスアミナーゼやD-アミノ酸デヒドロゲナーゼを含むいくつかのD-アミノ酸代謝に関与する酵素遺伝子の発現がD-アミノ酸によって誘導されることが報告された(128)。また、細菌 *Klebsiella pneumoniae* におけるD-Ser デヒドラターゼの発現は、培養液中のD-Serによって誘導される(129)。病原性大腸菌のLysR型転写因子DsdCは、D-Serに応答してD-Serの代謝に必要とされるアミノ酸パーミアーゼをコードする *dscX* とD-Serデアミナーゼをコードする *dscA* の転写を活性化する(130)。細菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1株のD-アミノ酸デヒドロゲナーゼをコードする *dguA* はD-Gluによって誘導され、これにはD-Gluのセンサーまたは転写活性化因子として機能するDguRが関与することが示唆された(131)。さらに細菌 *Vibrio fischeri* のLysR型転写因子DarRがD-Aspの存在に応答して、Aspラセマーゼをコードする *racD* の転写を活性化することが明らかにされた(132)。このように原核生物では、D-アミノ酸に応答した遺伝子発現とそのメカニズムが明らかにされつつある。

一方、真核生物では酵母 *C. humicola* UJ1株のDDO(ChDDO)の発現は、培養液中のD-Aspの存在によって特異的に転写レベルで誘導される(110, 113)。また、真菌 *F. sacchari* var. *elongatum* Y-105株では、D-AspまたはD-Gluを唯一の炭素・窒素源として生育させるとDDO活性が増加する(109)。酵母 *C. boidinii* 2201株では、D-Gluを唯一の炭素・窒素源として生育させると、DDO活性が上昇する(111)。このような酸性D-アミノ酸によるDDO活性の誘導は、より高等な哺乳動物でも観察されている。例えば、マウスにD-Aspを経口または腹腔内投与すると、肝臓と腎臓におけるDDO活性の上昇が観察されている(121)。妊娠中のラットにD-Aspを経口投与すると、新生ラットの肝臓や腎臓のDDO活性の上昇が観察されている(116)。また、ラットではステロイドホルモン合成の律速段階にあたるステップに関わる因子であるStAR protein (Steroidogenic Acute Regulatory protein) がD-Aspによって誘導される(52)。さらに、DDOの類似酵素であるDAOもD-アミノ酸によって誘導されることが種々の真菌やコイで観察されている(106, 133-136)。また、酵母 *Schizosaccharomyces pombe* のAlaラセマーゼは、培養液中のD-Alaの存在によって誘導発現される(137)。これらの知見は、D-アミノ酸特異的な遺伝子誘導発現機構が真核生物にも広く存在することを示唆しているが、D-アミノ酸の立体特異的なシグナル伝達や転写誘導に関与するタンパク質因子など、発現誘導メカニズムの詳細はほとんど明らかにされていない。

D-Asp特異的に誘導発現されるChDDOは、L-Aspが培地中に共存することによって、その誘導発現が抑制される(110, 113)。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のプロリン脱水素酵素(Put1)はL-Proの存在によって発現が誘導されるが、他の良好な窒素源の共存によって発現レベルが減少する(138)。これは、L-Proの取り込みを媒介するアミノ酸パーミアーゼ(Aap, Put4)の窒素源カタボライト抑制(Nitrogen Catabolite Repression; NCR)による発現抑制に起因することが示されている(138)。DDOの類似酵素であるDAOのD-アミノ酸による発現誘導は酵母

Rhodotorula gracilis や *Trigonopsis variabilis* で解析されている。 *R. gracilis* DAO は D-Ala によって発現が誘導されるが, L-Ala の共存によって発現レベルが抑制される (136)。一方, *T. variabilis* DAO は D-Ala よりも *N*-carbamoyl-D-Ala や *N*-acetyl-D-Trp, *N*-chloroacetyl-D- α -aminobutyric acid のような D-アミノ酸誘導体で発現が強く誘導される (133)。これら D-アミノ酸誘導体の高い DAO 発現誘導能は, D-Ala よりも低い代謝・分解能によると考えられている。これらの知見は, D-アミノ酸特異的な誘導発現機構に Aap による D-アミノ酸の取り込みが関与することを示唆しているが, その実態は明らかにされていない。

酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 株と DDO (ChDDO)

C. humicola は Basidiomycota 門-Agaricomycotina 亜門-Tremellomycetes 綱-Trichosporonales 目-Trichosporonaceae 科に属する酵母である (139). 近年, *C. humicola* は *Vanrija humicola* に再分類された (140, 141). 本論文では広く使用されている表記 *Cryptococcus* を使用する. *C. humicola* は土壌や植物, 臨床検体など様々な場所から単離され, いくつかの菌株は学術的および工業的に有用な特性を有している (142). BSLL1-1 株はアルミニウム耐性を示し, アルミニウムの生物毒性や耐性メカニズムの解析に有用とされている (143). VKMY-2238 株は重金属耐性を示し, 重金属の生物分解に有用な性質を有している (144). JCM 1461 株は殺菌効果を有するセロビオース脂質を産生することから, 真菌による食品腐敗の抑制に有用とされている (145).

UJ1 株は D-Asp を唯一の炭素・窒素源として生育に利用可能な酵母として土壌から単離された (110). UJ1 株は培地中の D-Asp に特異的に応答して, 多量の DDO (ChDDO) を生産する (110). この D-Asp 特異的な ChDDO の誘導発現は主に転写レベルで制御されている (Fig. 4) (113).

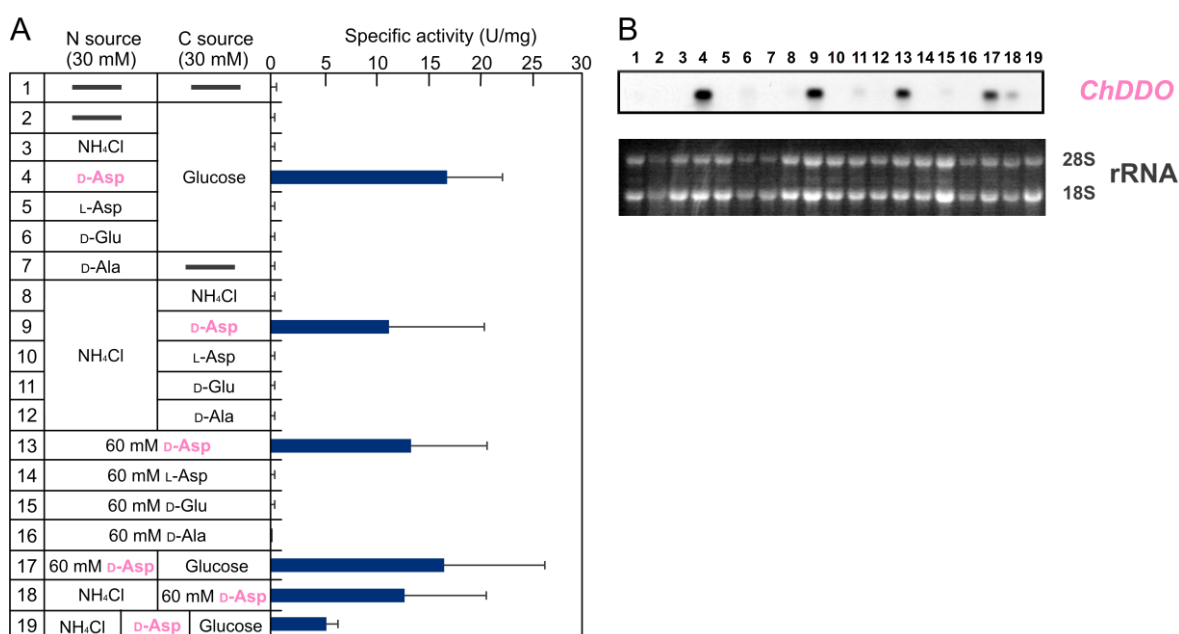


Fig. 4. *C. humicola* UJ1 株における ChDDO 発現の制御

(A) 図に示される化合物を含む培地で誘導した UJ1 株細胞の粗抽出液における DDO 活性. (B) ChDDO 遺伝子のノーザンブロット解析. 図は Takahashi らの論文の Figure 3 を一部改変して引用した (113).

ChDDO は微生物由来の DDO として酵素学的諸特性が詳細に解析されてきた. 本酵素はホモテトラマーであり, 補因子 FAD と非常に強固に結合している (110, 146). さらに, 動物由来 DDO と比較して, D-Asp に対する特異性が高く, 触媒回転数も高い (99, 110). 一般的な真核生物の DDO と同様に, ChDDO はペルオキシソームに局在する (99, 147). UJ1 株において D-Asp は, ChDDO の発現誘導に加えて, カタラーゼ活性やペルオキシソームの増殖を誘導する (Fig.

5) (147). このような D-アミノ酸によるペルオキシソームの増殖とペルオキシソーム酵素活性の誘導はいくつかの真菌で観察されている. 酵母 *R. gracilis* では D-Ala によって, DAO 活性に加えて, カタラーゼ活性とペルオキシソームの増殖が誘導される (148). また, メタノール資化性酵母 *C. boidinii* や *Pichia (Ogataea) methanolica* では, D-Ala が DAO やカタラーゼ遺伝子に加え, ペルオキシソームの増殖に関与するペルオキシシン (*PEX*) 遺伝子の発現を転写レベルで誘導する (134, 149). これらの知見は, 真菌が効率的に D-アミノ酸を利用するために DDO や DAO 活性とともに, D-アミノ酸によってペルオキシソーム機能が誘導されることを示唆しているが, その誘導メカニズムは明らかにされていない.

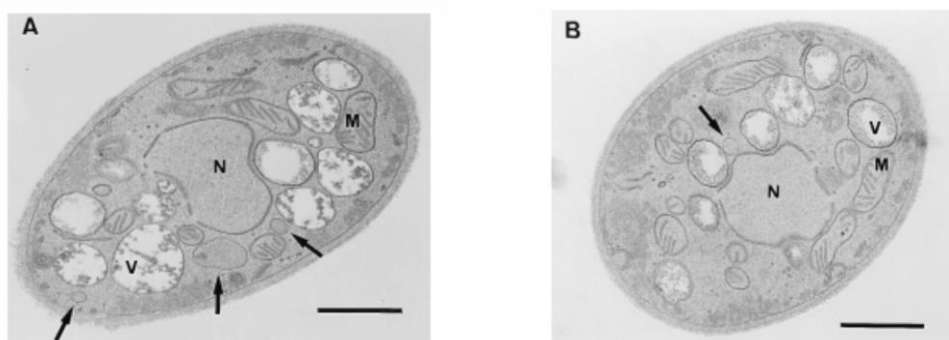


Fig. 5. D-Asp (A) または L-Asp (B)で誘導した *C. humicola* UJ1 株の電子顕微鏡写真

矢印はペルオキシソームを示し, バーは 1 μm を示している. N, 核; M, ミトコンドリア; V, 液胞. 図は Kera らの論文の Fig. 3 を一部改変して引用した (147).

アミノ酸パーミアーズ (Aap)

真菌は L-および D-アミノ酸を窒素源や炭素源、エネルギー源などとして生育に利用することができる (113, 150, 151). アミノ酸は、オキシダーゼ、デアミナーゼやトランスアミナーゼなどの様々な酵素によって代謝され、アンモニアや Glu, Gln として細胞に窒素源を供給する (151). 加えて、アミノ酸の炭素骨格は TCA サイクルや糖新生経路のような生合成の中心的代謝経路へ導入され、炭素源やエネルギー源として利用される (151). 一方、アミノ酸のような親水性化合物は脂質で構成された細胞膜やオルガネラ膜を自身では通過することができないため、アミノ酸の利用はトランスポーターを介した細胞内外あるいはオルガネラ間の膜間輸送に依存している (152). 真菌のアミノ酸トランスポーター (fungal Amino Acid Transporter; fAAT) は細胞膜や液胞膜、ミトコンドリア膜、細胞内小胞膜に存在し、いくつかのトランスポーターファミリーに分類される (152, 153). ほとんどの fAAT は Amino acid-Polyamine-Organocation (APC) superfamily (TC: 2.A.3) に属しており、APC superfamily は真菌だけでなく動物や植物、細菌にも見いだされる (152-154). 一方、分子系統解析では、生物分類のドメインや界を反映したクレードに分類されることから、これらアミノ酸トランスポーター (AAT) は共通の祖先を有する進化的に関連したタンパク質群と考えられている (152-154). 一般的に、AAT は基質アミノ酸の α -炭素周辺の電荷と、側鎖の極性や電荷の有無を認識している (155). 多くの場合、AAT は輸送基質の特異的な結合部位をもち、ミカエリス・メンテン型の基質飽和曲線を示すなど酵素反応と類似した性質を有している (152, 156, 157).

細胞膜に局在する fAAT の大半は、APC superfamily の Yeast Amino acid Transporter (YAT) family (TC: 2.A.3.10) に属している (152, 153, 158). これまで、特に子囊菌門の YAT family タンパク質を中心に遺伝学的あるいは生化学的解析が盛んに行われてきた (159). 典型的な YAT family タンパク質は α -ヘリックスで構成される 12 個の膜貫通領域 (TransMembrane regions: TMs) を有している (Fig. 6) (152, 153). 膜貫通領域 TMI-V と TM VI-X は特徴的な筒状の逆疑似対称性構造を形成し、TMI と TM VI が主な基質結合ポケットを形成している (152, 153). YAT family タンパク質はアミノ酸とプロトンを共輸送 (プロトン駆動型二次能動輸送) するシンポーターとして機能することから、アミノ酸パーミアーズ (Aap) とよばれている (152, 153, 160-162).

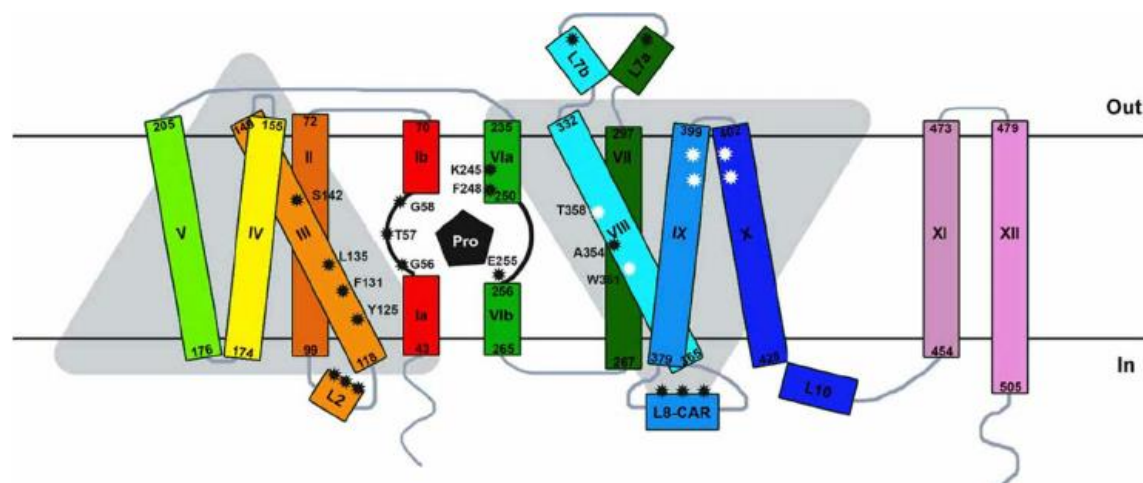


Fig. 6. YAT family タンパク質のトポロジーの模式図

YAT family に属するタンパク質は 12 個の α -ヘリックスで構成される TMs を有し、TM I-V と TM VI-X が筒状の逆疑似対称性構造を形成する。TM I と TM VI にはアミノ酸の α -カルボキシ基と α -アミノ基との結合部位が存在し、基質輸送に重要な役割を担う。真菌 *Aspergillus nidulans* の Pro トランスポーター PrnB の構造を模式図で示した。図は Vangelatos らの論文から引用した (163)。

これまで、酵母 *S. cerevisiae* には 18 個の Aap が見いだされ、基質特異性が詳細に調べられてきた (152) (Table 1)。これら Aap は異なる基質特異性を有するが、general amino acid permease 1 (Gap1) は非常に幅広い基質特異性を有しており、天然に存在する全ての L-アミノ酸に加えて、いくつかの D-アミノ酸やアミノ酸誘導体を輸送することができる (164-170)。また、Gap1 はアミノ酸を輸送すると同時に、細胞外アミノ酸を感知するトランスセプターとしても機能する (171-173)。また、*S. cerevisiae* の Ssy1 は、アミノ酸輸送活性を持たないが細胞外アミノ酸を結合する能力のみを保持している。Ssy1 は Ptr3 と Ssy5 を介して、いくつかの AAP 遺伝子の転写誘導をもたらすシグナル伝達経路を活性化する (SPS センサーシステム) (174-176)。Ssy1 は様々な L-アミノ酸を感知できるが、D-Leu も感知し分岐鎖アミノ酸パーミターゼ遺伝子 (*BAP2* 遺伝子) の転写を誘導することが明らかにされている (174, 177)。*S. cerevisiae* の Dip5 は L-Asp と L-Glu の高親和性かつ高容量の輸送を媒介する Aap である (178, 179)。酸性 L-アミノ酸に特異的な Aap は糸状菌 *A. nidulans* (AgtA) や *Penicillium chrysogenum* (PcDip5) にも見いだされ、生化学的な解析がされている (180, 181)。さらに、糸状菌 *Neurospora crassa* のアミノ酸輸送系 IV は L, D-Asp と L, D-Glu を輸送することが示唆されている (182)。これらの知見から、D-アミノ酸は L-アミノ酸と同様に Aap によって輸送されると考えられるが、酸性 D-アミノ酸が酸性 L-アミノ酸と共通の Aap によって輸送されるかについては直接明らかにされていない。

Table 1. 真菌 Aap の基質特異性

Name	Uniprot	Substrate (s)	Species	Refs.
Agp1	P25376	Broad range (not L-Lys or L-Arg)	<i>S. cerevisiae</i>	(164, 165, 177, 183-185)
Agp2	P38090	L-Val, L-Ile, L-Leu, L-Phe, L-Thr	<i>S. cerevisiae</i>	(185-187)
Agp3	P43548	L-Val, L-Ile, L-Leu, L-Phe, L-Ser, L-Thr, L-Asp, L-Glu	<i>S. cerevisiae</i>	(179, 185)
Alp1	P38971	L-Arg	<i>S. cerevisiae</i>	(179, 188)
Bap2	P38084	L-Val, L-Ile, L-Leu, L-Ala, L-Phe, L-Tyr, L-Met, L-Cys	<i>S. cerevisiae</i>	(165, 179, 189-192)
Bap3	P41815	L-Val, L-Ile, L-Leu, L-Ala, L-Phe, L-Tyr, L-Met, L-Cys	<i>S. cerevisiae</i>	(174, 179)
Can1	P04817	L-His, L-Lys, L-Arg	<i>S. cerevisiae</i>	(193-195)
Dip5	P53388	L-Ala, L-His, L-Asn, L-Gln, L-Asp, L-Glu	<i>S. cerevisiae</i>	(178, 179)
Gap1	P19145	All-natural L-amino acids, some D-amino acids (D-Leu, D-Ala, D-His, D-Arg, D-Ser, D-Met, D-Tyr, D-Trp)	<i>S. cerevisiae</i>	(165-170, 185, 196)
Gnp1	P48813	L-Leu, L-Pro, L-Met, L-Cys, L-Ser, L-Thr, L-Asn, L-Gln	<i>S. cerevisiae</i>	(164, 179, 197)
Hip1	P06775	L-His	<i>S. cerevisiae</i>	(198, 199)
Mmp1	Q12372	S-Methylmethionine	<i>S. cerevisiae</i>	(200)
Lyp1	P32487	L-Lys, L-Met	<i>S. cerevisiae</i>	(179, 194, 201-203)
Put4	P15380	L-Pro, L-Ala, L-Gly	<i>S. cerevisiae</i>	(179, 204-206)
Sam3	Q08986	S-Adenosylmethionine	<i>S. cerevisiae</i>	(200, 207)
Ssy1	Q03770	Amino acid sensor system (Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p)	<i>S. cerevisiae</i>	(176, 208, 209)
Tat1	P38085	L-Val, L-Leu, L-Ile, L-Cys, L-Tyr, L-Trp, L-His	<i>S. cerevisiae</i>	(174, 179, 199, 210)
Tat2	P38967	L-Ala, L-Gly, L-Cys, L-Phe, L-Tyr, L-Trp	<i>S. cerevisiae</i>	(179, 210, 211)
Tat3	A4UZ28	L-Leu, L-Phe, L-Tyr, L-Trp	<i>S. pastorianus</i>	(212)
CnAap1	J9VRP4	L-Met, L-Pro,	<i>C. neoformans</i>	(213)
CnAap2	J9W019	L-Ile, L-Arg, L-Lys	<i>C. neoformans</i>	(214)
CnAap3	J9VLA8	No data	<i>C. neoformans</i>	
CnAap4	J9VEG4	L-Gly, L-Ile, L-Val, L-Ser, L-Met, L-Asp, L-Lys, L-Phe	<i>C. neoformans</i>	(214)
CnAap5	J9VF19	Gly, Ile, Pro	<i>C. neoformans</i>	(214)
CnAap6	J9VP54	Transport activity has been not observed at 30°C	<i>C. neoformans</i>	(213)
CnAap7	J9W199	No data	<i>C. neoformans</i>	
CnAap8	J9VLY1	Transport activity has been not observed at 30°C	<i>C. neoformans</i>	(213)
PcDip5	Q6SKV7	L-Asp, L-Glu	<i>P. chrysogenum</i>	(180)
AgtA	B2M1L6	L-Asp, L-Glu	<i>A. nidulans</i>	(181)
PrnB	P18696	L-Pro	<i>A. nidulans</i>	(215)

真菌 Aap は細胞の栄養条件やアミノ酸の利用可能性に応じて、その活性が転写や翻訳、翻訳後の段階で多様な制御を受ける (Fig. 7, 7) (216-218). 例えば、上述した SPS センサーシステムに加えて、窒素源異化抑制 (NCR) (219), TOR (Target Of Rapamycin) 調節経路を介した窒素・炭素源異化抑制 (220), GAAC (General Amino Acid Control) 経路 (221)によって AAP 遺伝子発現が転写・翻訳レベルで複雑に制御される。また、高親和性 L-Leu パーミアーゼである BAP2 は Leu 生合成の前駆体である α -isopropylmalate の濃度に応じて特異的に転写制御される (222). さらに、細胞は Aap の局在や分解プロセスを制御することで、アミノ酸の輸送活性を調節している (152). これには、アミノ酸との結合による Aap の構造変化をシグナルとするユビキチン化が関与する (216, 223-225). 酵母は Aap の活性を多様なレベルで制御することで、細胞の生育環境条件に応じてアミノ酸の取り込みを最適化している。

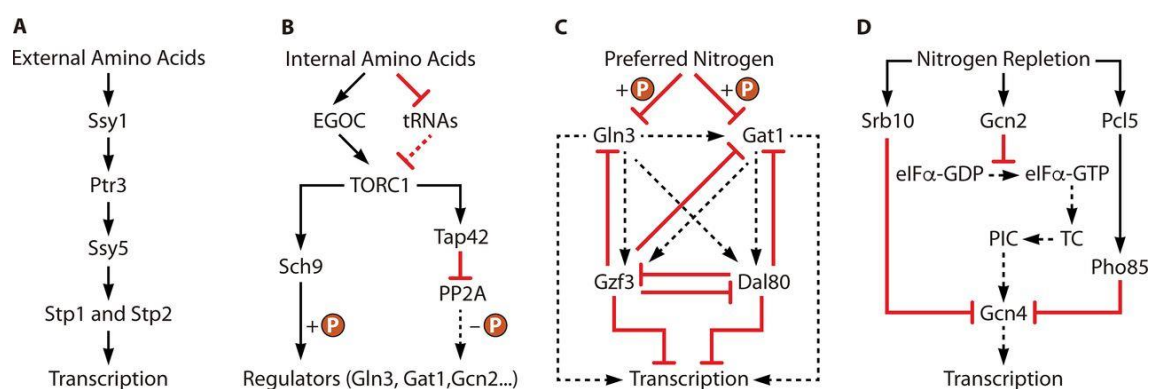


Fig. 7. 酵母 *S. cerevisiae* における AAP 遺伝子の発現制御に関与するシグナル伝達経路

(A) 外部アミノ酸を感知する SPS センサーシステム. SPS センサーシステムによって活性化された Stp1 と Stp2 は AAP 遺伝子の転写を活性化する. (B) 細胞内アミノ酸を感知する TOR 経路. 細胞内アミノ酸は EGO 複合体 (EGOC) を活性化し, tRNA の荷電状態を介して TORC1 の活性を制御する. TORC1 が Sch9 や Tap42 を活性化し, NCR に関与する転写因子 Gln3 や Gat1, Gcn2 のリン酸化状態を制御する. (C) NCR が関与する転写制御. 良窒素源が存在する場合, Gln3 や Gat1 はリン酸化されることでその転写活性化機能が抑制される. (D) GAAC 経路による発現制御. GAAC 経路はアミノ酸の利用可能性に応じて転写因子 Gcn4 を介して AAP 遺伝子の発現を制御する. Gcn2 はアミノ酸の利用可能性に応じてその活性が制御され, 三元複合体 (TC) 形成を制御している. TC は 40S リボソームと結合して 43S 転写開始前複合体 (PIC) を形成し Gcn4 遺伝子の翻訳レベルを制御する. さらに、これとは独立して窒素源が豊富な場合は Srb10 や Pho85 が活性化され, Gcn4 タンパク質を分解する. 図は Zhang らの論文から引用した (218).

Target of rapamycin (TOR)

Target of rapamycin (TOR) は酵母 *S. cerevisiae* においてラパマイシン標的タンパク質として同定された Ser/Thr キナーゼである (236-238)。ラパマイシンは真核生物の細胞成長・細胞増殖を阻害し、ラパマイシン処理された細胞は擬似的に栄養飢餓応答の表現型を示す。TOR は真核生物に高度に保存されており、特に酵母や哺乳動物においてその機能が詳細に調べられてきた。

酵母や哺乳動物において TOR は数種のタンパク質と 2 種類の独立した TOR 複合体 1, 2 (TOR complex 1, 2; TORC1, TORC2) を形成し、様々な代謝プロセスを制御している (Fig. 9) (239, 240)。ラパマイシンに感受性を示すのは TORC1 のみであり、TORC1 が栄養条件やストレスに応答して、細胞の成長を決定するシグナル伝達ネットワークを制御する主要な役割を担っている。TORC1 は栄養素、特にアミノ酸が豊富に存在し細胞活動が活発な条件で活性化され、タンパク質や脂質、核酸やリボソームの生合成などを活性化する。逆にオートファジーやいくつかのストレス応答経路を抑制する。結果として、TORC1 は生育環境に応じて細胞の同化プロセスと異化プロセスを協調的に制御し、細胞の恒常性を維持する重要な役割を担っている。

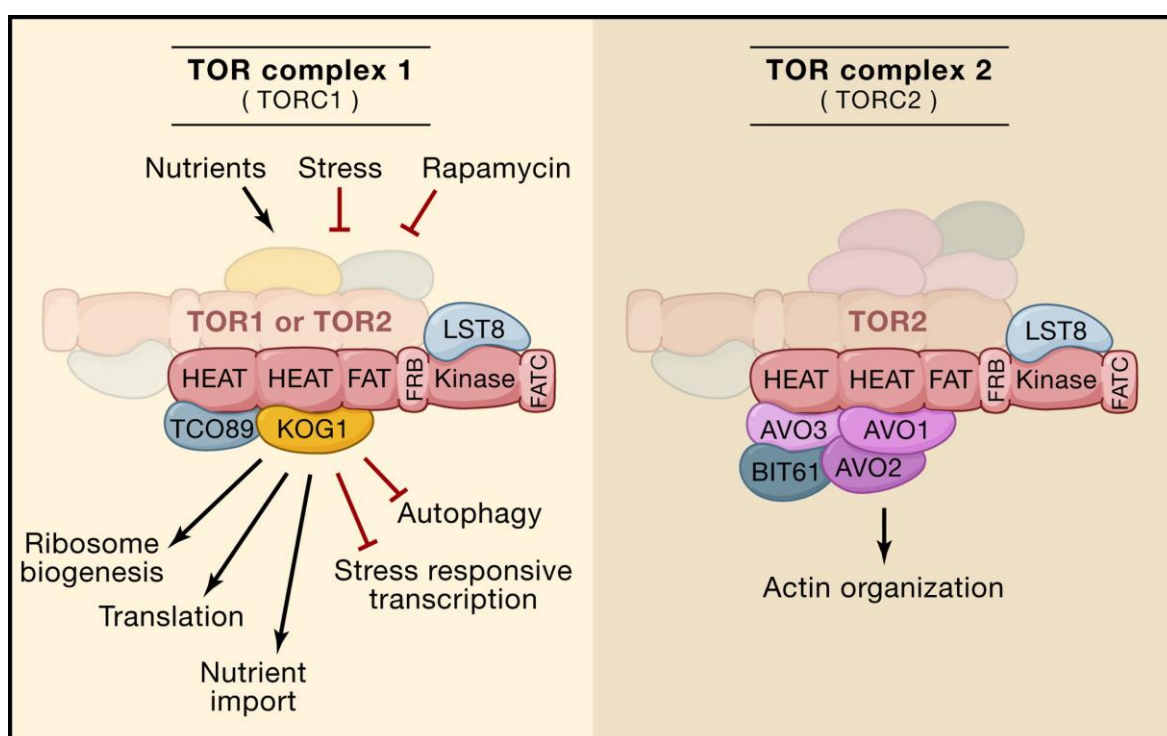


Fig. 9. 酵母 TORC1 と TORC2 の構造

TOR に存在するドメイン (HEAT, FAT, FRB, Kinase, FATC) と TOR 関連タンパク質 (KOG1, TCO89, LST8, AVO1-3, BIT61)。TORC1 と TORC2 はともに複数のタンパク質から構成され、二量体を形成していると考えられている。TORC1 はラパマイシン感受性であり、栄養条件やストレスに応答して、細胞の成長に関するシグナル伝達経路を制御している。TORC2 はラパマイシンに非感受性であり、アクチン細胞骨格の形成に関与している。TORC2 の上流の制御因子は不明である。図は Wullschleger らの論文から引用した (240)。

酵母の TORC1 は液胞膜上に構成的に局在し、細胞質と液胞内のアミノ酸レベルに応じてその活性が制御される (Fig. 10) (240, 241). アミノ酸による TORC1 の活性は Ras-related GTP-binding protein (Rag) GTPase である Gtr1 と Gtr2 からなる Rag 複合体の GTP または GDP 結合状態によって制御される. アミノ酸の存在に応じて活性化された Rag 複合体は TORC1 と直接相互作用して TORC1 活性を刺激する. アミノ酸による TORC1 制御モデルは非常に複雑であり、未解明の部分も多く存在する. 例えば、酵母の液胞は特に塩基性アミノ酸を高濃度に蓄積することから、哺乳動物リソソーム以上にアミノ酸プールとして重要な役割を果たすと考えられているが、TORC1 との直接的な関係は明らかにされていない (238, 241). さらに、細胞が TORC1 の活性制御に対して全 20 種類のアミノ酸センシング機構を有するのか、あるいは特定のアミノ酸のみが TORC1 活性を制御しているのかは現在のところ不明である (238, 241).

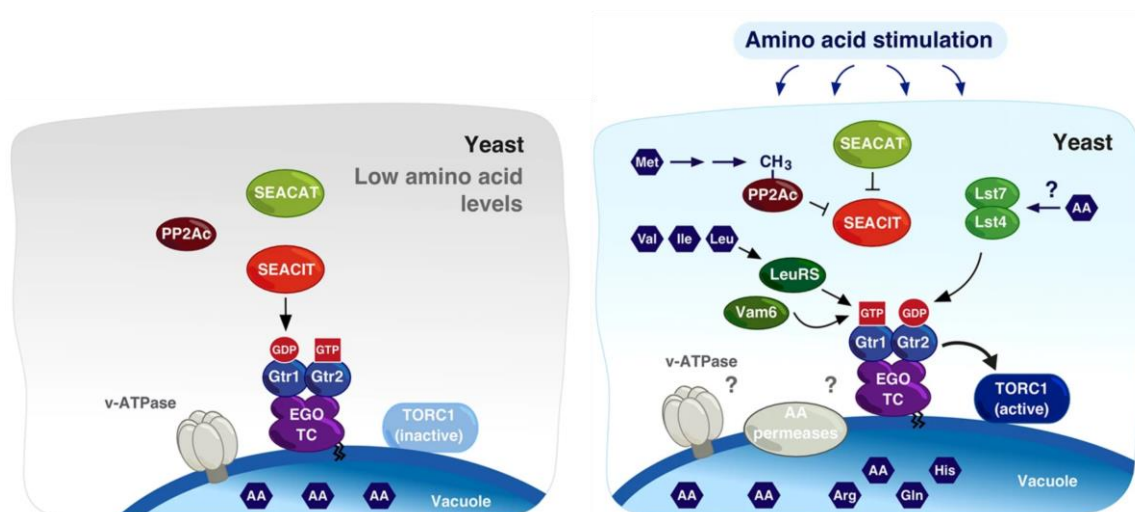


Fig. 10. 酵母におけるアミノ酸依存的な TORC1 の活性化機構

アミノ酸による TORC1 の活性化は GTP または GDP 結合状態によって制御される Rag 複合体を介して行われる. Ego1, 2, 3 から構成される複合体 (EGO TC) は結合ドメインを介して液胞膜に繋がれ、Rag 複合体を液胞膜上にリクルートする. TORC1 は液胞膜上に構成的に存在し、活性型 Rag 複合体 Gtr1^{GTP}-Gtr2^{GDP} によって活性化される. 酵母では Gtr1 に対する LeuRS と Vam6, Gtr2 に対する Lst4-Lst7 が Gtr1^{GTP}-Gtr2^{GDP} の形成を促進し、GTPase 活性化タンパク質 SEACIT の阻害効果に拮抗する. 現在までにアミノ酸が TORC1 を活性化する特定のシグナル伝達経路がいくつか知られている (i) Leu が結合した LeuRS は Gtr1 と相互作用し Gtr1^{GTP} 状態を維持する. (ii) Met が S-アデニルメチオニンシンターゼと Ppm1 メチルトランスフェラーゼを介して PP2Ac をメチル化し、SEACIT を阻害する. (iii) Lst4-Lst7 複合体は不活性な Gtr^{GTP} に結合し、Gtr^{GDP} 形成を促進する. しかしながらアミノ酸の存在がどのように Lst4-Lst7 複合体に伝達されるかは不明である. (iv) 哺乳動物において v-ATPase と AA permeases は Arg や Gln, His レベルを Rag 複合体に伝達することが知られているが、酵母では液胞内のアミノ酸センシング機構は明らかにされていない. 図は Powis らの論文の Figure 1 を一部改変し引用した (241).

General amino acid control (GAAC)

酵母ではアミノ酸飢餓に応答して General amino acid control (GAAC) 経路が活性化される (217, 218, 221, 242). 転写因子 Gcn4 は GAAC 経路におけるマスターレギュレーターとして, アミノ酸生合成や核酸代謝, ペルオキシソーム関連遺伝子を含む 500 以上の遺伝子の発現を誘導する (Fig. 11C). Gcn4 レベルは細胞の栄養条件に応答して翻訳や転写, 分解など多様なレベルで制御され, Gcn4p によるアミノ酸生合成遺伝子の転写活性を高めることによってアミノ酸飢餓に対処している.

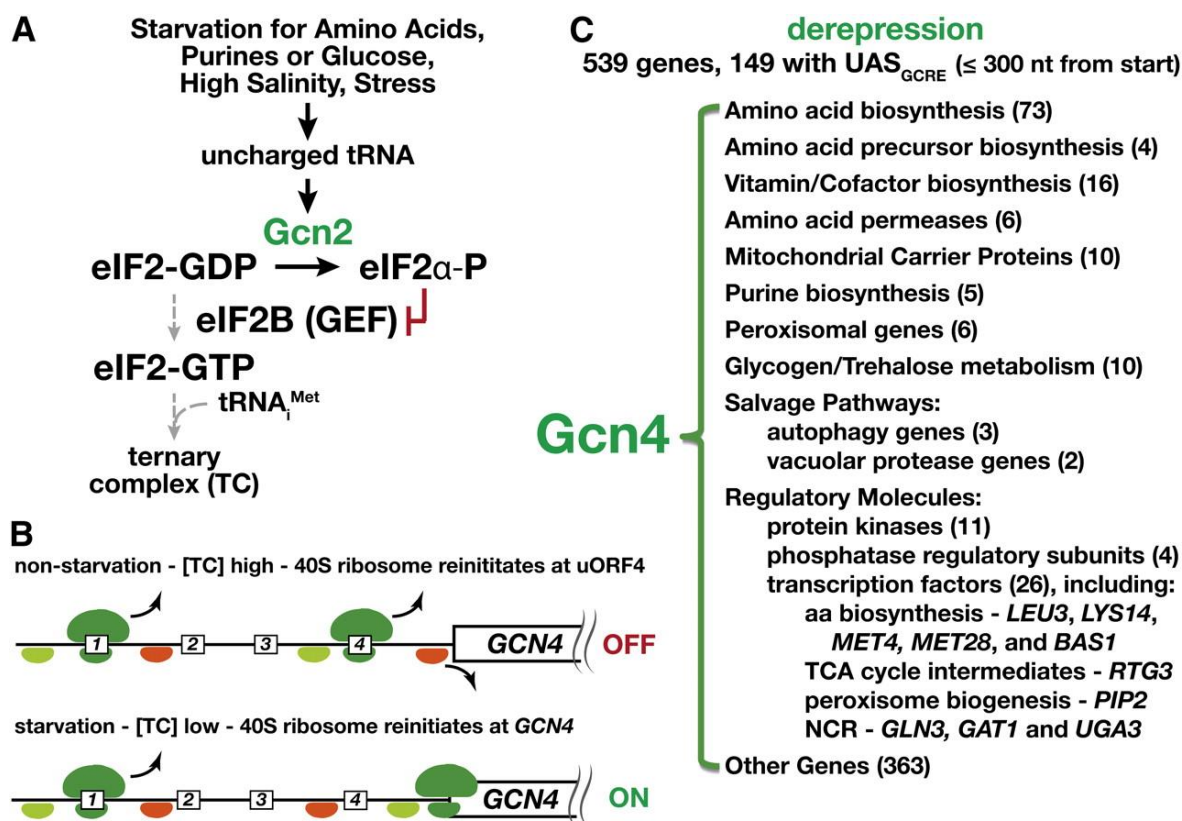


Fig. 11. GAAC 経路の活性化メカニズムと Gcn4 が制御する遺伝子群

(A) アミノ酸非結合型の tRNA は eIF2 の α サブユニットをリン酸化 (eIF2 α -P) する. eIF2 α -P は GTP-GDP 交換因子 eIF2B を阻害して TC 形成速度を低下させる. (B) GCN4 遺伝子は 5'UTR に 4 つの uORF をもつ mRNA として転写される. TC と結合した 40S リボソーム (薄い緑) が uORF1 に到達すると, TC と結合した GTP が GDP に加水分解され eIF2-GDP が遊離し 60S リボソームがリクルートされて翻訳が開始される (濃い緑). uORF1 で翻訳が停止すると 60S リボソームが外れて, 40S リボソームがスキャンを続けるが, 再び TC を獲得するまで翻訳を開始することができない (赤). TC が豊富に存在する条件 (上, GAAC 非誘導条件) では 40S リボソームは uORF4 で翻訳を再度開始する事ができる. uORF4 の翻訳は GCN4 遺伝子の翻訳効率を低下させる. 一方 GAAC 誘導条件 (下) では TC レベルが低いため, 40S リボソームは uORF4 を通過し, GCN4 遺伝子の翻訳を開始できる. (C) Gcn4 は UAS_{GCRE} コンセンサス配列を持つ遺伝子のプロモーター領域に結合して, 転写の大きなプログラミングが起こる. 図は Ljungdahl らの論文から引用した (217).

細胞内のアミノ酸が不足するとアミノ酸非結合型の tRNA が増加する。Ser/Thr キナーゼ Gcn2 に tRNA が結合することで Gcn2 が活性化される (Fig. 11A)。活性化された Gcn2 は翻訳開始因子 eIF2 の α サブユニットをリン酸化し三元複合体 (TC) の形成を阻害することで、細胞全体の翻訳活性を制限し、過剰なアミノ酸消費を抑制する。GAAC 誘導条件 (貧アミノ酸条件) において、例外的に *GCN4* mRNA の翻訳レベルは増強される。これには *GCN4* mRNA 5'UTR に存在する短い 4 つの ORF (uORF1-4) が関与している (Fig. 11B) (217, 243)。一般に uORF は下流に存在する真の開始コドンへのリボソーム結合確率を低下させることで翻訳を抑制する。GAAC 非誘導条件 (富アミノ酸条件) では TC が豊富に存在するために uORF1 の翻訳終了後も uORF2-4 の翻訳が再始動しやすくなり、*GCN4* 遺伝子の翻訳効率が低下する。一方で、GAAC 誘導条件では TC が減少するため uORF 上での再翻訳効率が低下し、40S リボソームは mRNA に沿って移動を続け、*GCN4* 遺伝子開始コドンからの翻訳を開始できる。結果として、GAAC 誘導条件下では相対的に *GCN4* 遺伝子の翻訳レベルが増強される。これには uORF1-4 の 3'配列や各 uORF 間の距離が重要な役割を果たしている (243)。さらに *GCN4* 遺伝子の翻訳は tRNA の編集や輸送に欠陥のある細胞で誘導される (244)。これは Gcn2 とは独立して、核内の異常な tRNA 蓄積を検出する未知のシグナル伝達経路が、細胞質内の TC 形成または機能の阻害を引き起こし、*GCN4* 遺伝子の翻訳を誘導するモデルが提唱されている (244)。

酵母 *S. cerevisiae* や *A. nigar*, *N. crassa* の *GCN4* 遺伝子は GAAC 誘導条件下において転写レベルが上昇する (245-247)。しかしながら現在のところ *GCN4* 遺伝子の詳細な転写調節メカニズムは明らかにされていない。

Gcn4 は栄養源が豊富な細胞では半減期が 5 分以下の非常に短命なタンパク質である (242)。このような条件では、Gcn4 はサイクリン依存性キナーゼ Pho85 と RNA ポリメラーゼ II 関連キナーゼ Srb10 によるリン酸化と、ユビキチン結合酵素 Cdc34 とユビキチンリガーゼ複合体 SCF^{CDC4} によるユビキチン化を受け、26S プロテアソームによって迅速に分解される。一方で、厳しいアミノ酸欠乏条件やタンパク質合成が損なわれた細胞では、主に Pho85 の活性が抑制されることで Gcn4 の安定性が大幅に向上する (242, 248-250)。

ピルビン酸カルボキシラーゼ (Pyc)

ピルビン酸カルボキシラーゼ (Pyc; EC 6.4.1.1) はビオチンを補因子としてピルビン酸のオキサロ酢酸へのカルボキシ化を ATP 依存的に触媒する酵素である (Fig. 12). Pyc は酵素機能に重要な 3 つの機能ドメインである N 末端ビオチンカルボキシル化 (BC) ドメインと中央トランスカルボキシル化 (TC) ドメイン, C 末端ビオチンカルボキシルキャリア (BCCP) ドメインで構成される (251). さらに, 3 つのドメイン間をつなぐ領域には酵素の四量体化とアロステリックな調節に関与するドメイン (PT ドメイン) が存在する (252, 253).

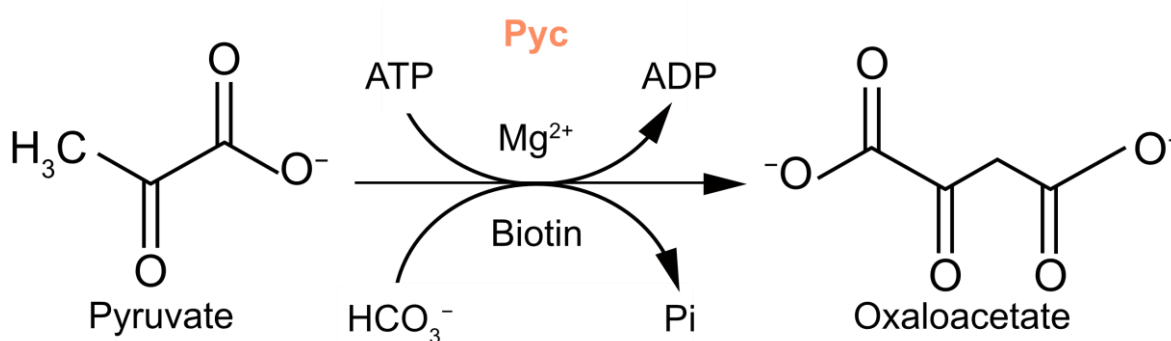


Fig. 12. Pyc によるピルビン酸のカルボキシ化

Pyc は 2 段階の反応によって, ピルビン酸のカルボキシ化を触媒する. BCCP ドメインに結合したビオチンは, BC ドメイン上で ATP 依存的にカルボキシ化される. カルボキシ化されたビオチンは CT ドメイン上のピルビン酸にカルボキシ基を付与しオキサロ酢酸を生成する.

Pyc は細菌から真菌, 植物, 動物に至る幅広い生物に見いだされ, 生物界に広く保存されている (254, 255). オキサロ酢酸は TCA サイクルの構成成分であることから, Pyc が欠損すると効率的な TCA サイクルの代謝回転が阻害される. また, オキサロ酢酸はホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) によってホスホエノールピルビン酸 (PEP) を経てグルコースに変換される (256, 257). オキサロ酢酸はピルビン酸デヒドロゲナーゼから生成されるアセチル CoA と結合し, TCA サイクルのもう一つの間体であるクエン酸を形成する (256, 257). クエン酸は細胞質にも運ばれ, クエン酸リアーゼによって切断され, アセチル CoA とオキサロ酢酸が生成される (256, 257). 細胞質で生成されたアセチル CoA は脂肪酸の合成に利用される (256, 257). さらに, オキサロ酢酸は Asp や Asn の前駆体としてアミノ酸生合成にも関与する (256, 257). このように Pyc は TCA 回路にオキサロ酢酸を補充するアナプレロティック酵素として, またエネルギー代謝や糖新生, 脂質合成, アミノ酸生合成に関与する同化酵素として重要な役割を担っている (Fig. 13).

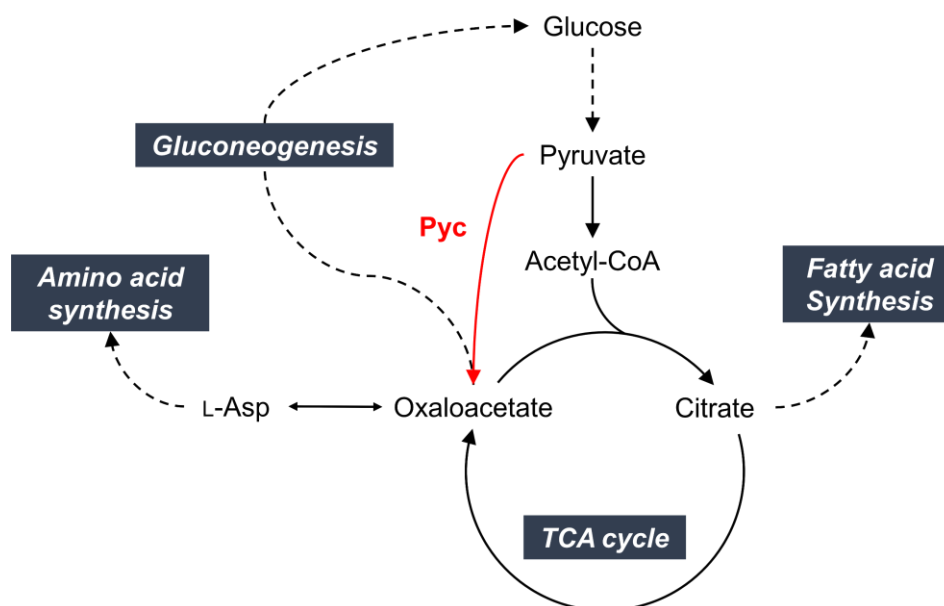


Fig. 13. 代謝経路における Pyc の生理的役割

Pyc によるピルビン酸からオキサロ酢酸の生成は、TCA 回路への基質補充および同化基質を提供することで、エネルギー代謝や糖新生、脂質合成、アミノ酸合成のような重要な役割を担う。

酵母 *S. cerevisiae* の *PYC1* 遺伝子の転写は、L-Asp および L-Glu によって抑制され、エタノールやピルビン酸によって誘導される (258-260)。さらに、Pyc1 の PT ドメインに結合するアセチル CoA は正のアロステリック調節因子であり、BC ドメインにおける反応の律速段階を促進すること、また、BCCP ドメインの BC と CT ドメイン間の物理的な移動を促進すると考えられている (253, 261-266)。一方で、L-Asp はアセチル CoA とは異なる部位に結合して、負のアロステリック調節因子として機能することが知られている (267, 268)。このように、Pyc1 は細胞の栄養状態に応じて転写と翻訳後のレベルでその活性が制御されている。

ほとんどの真核生物において Pyc はミトコンドリアに局在するが、糸状菌 *A. nidulans* や *A. terreus*, *Rhizopus oryzae*, *R. arrhizus*, 酵母 *S. cerevisiae* や *Hansenula (Ogataea) polymorpha*, *Pichia (Komagataella) pastoris* の Pyc1 はミトコンドリア標的シグナルを欠いており、細胞質にのみ局在する (256, 269)。真菌 Pyc が細胞質に局在することから、TCA 回路の補充酵素としてだけでなく、別の生理学的役割に関与する可能性が指摘されている (260, 270)。例えば、いくつかの糸状菌では、細胞質 Pyc は多量のフマル酸生成に寄与している (269)。また、リンゴ酸デヒドロゲナーゼの基質であるオキサロ酢酸を供給し、 NAD^+ と NADH の酸化還元サイクルに関与する可能性が指摘されている (271)。

酵母 *H. polymorpha* はメタノールを唯一の炭素およびエネルギー源として利用可能な子囊菌酵母である。*H. polymorpha* をメタノールで生育させるとペルオキシソームが増殖しアルコールオキシダーゼ (AO; EC 1.1.3.13) の発現が誘導される (272)。AO は、FAD を補因子とし、メタノールのホルムアルデヒドと過酸化水素への酸化反応を触媒する酵素で、ペルオキシソームに局在する。AO は 8 つの同一のサブユニットからなるオクタマーを形成することで活性体と

して機能する (273). ペルオキシソームに局在するほとんどのタンパク質は, C 末端にトリペプチドからなる輸送シグナル PTS1 (peroxisomal targeting signal 1) を有する. PTS1 受容体である Pex5p は C 末端に存在する TPR (tetratricopeptide repeats) ドメインを介して PTS1 を認識し, ペルオキシソームへ PTS1 タンパク質を輸送する (274). *H. polymorpha* AO (HpAO) にも PTS1 (-ARF) が存在し, HpAO モノマーが Pex5p 依存的にペルオキシソームへと輸送され, マトリックス内でオクタマーを形成し活性体として機能する (275-278). これまでに, *H. polymorpha* において細胞内 FAD が制限されたりボフラビン栄養要求性変異体では, HpAO のペルオキシソーム輸送が強く阻害されることが知られていた (279, 280). このことから, 補因子 FAD の HpAO モノマーへの結合がペルオキシソームへの輸送に重要と考えられていた.

近年, メタノール資化性酵母の Pyc1 はその酵素活性とは独立して, AO を活性化する役割を担っていることが報告された (281). Pyc1 を欠損した *H. polymorpha* や *P. pastoris* では, 新規に合成された AO モノマーが FAD と結合することができずペルオキシソームへの輸送が阻害され, 酵素活性を持つオクタマーを形成できない (281). この AO のアセンブリにおける Pyc1 の役割には酵素学的機能を必要としないこと, また Pyc1 と AO タンパク質が特異的に相互作用したことから, メタノール資化性酵母の Pyc1 は FAD を AO モノマーに結合させる moonlighting な機能を有すると考えられている (281-283). このメカニズムは細胞質での過酸化水素やアセトアルデヒドの発生を抑制することで多量のアルコールの処理を可能にし, メタノール資化性を進化させた可能性が指摘されている (281, 284). これらの知見から, 以下のような Pyc1 による AO の活性化メカニズムが提唱されている (Fig. 14) (281, 285).

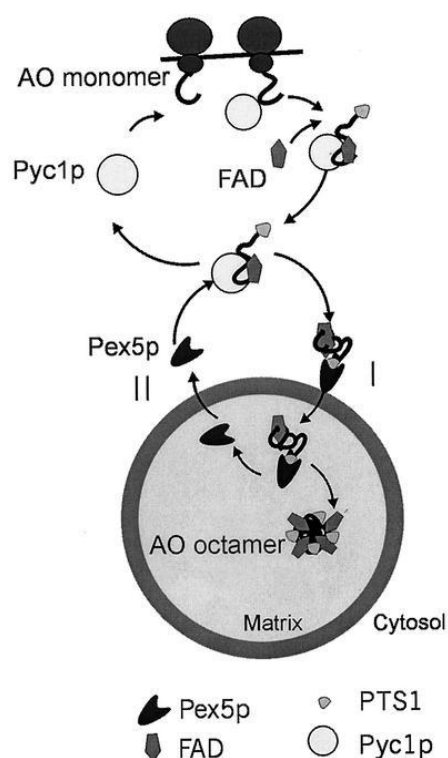


Fig. 14. メタノール酸化性酵母 *H. polymorpha* における Pyc1p による AO 活性化メカニズムのモデル

AO モノマーは細胞質上のリボソームによって合成される。細胞質において、Pyc1p はタンパク質相互作用を介して、新規に合成された AO モノマーへの補酵素 FAD の結合を媒介する。FAD を含む AO モノマーは PTS1 受容体である Pex5p と結合する。AO-Pex5p 複合体はペルオキシソーム膜を横切って移動し、マトリックス内で解離する (I)。その後、FAD を含む AO モノマーがオクタマーを形成する。Pex5p は細胞質に戻り (II)、PTS1 タンパク質の再輸入を仲介する。図は Ozimek らの論文から引用した (281)。

最近、酵母 *P. pastoris* の *PYCI* 遺伝子破壊株において D-Ala 上での生育遅延と DAO 酵素活性の減少が報告されたことから、Pyc1 の DAO 機能発現への関与が指摘された (286)。DAO は AO と FAD を補因子とするペルオキシソーム酵素であるという共通点から、DAO も AO と同様のメカニズムで活性化されると考えられている。

本研究の目的

近年、種々の遊離 D-アミノ酸が、微生物からヒトを含む多くの動物にも見いだされ、多様な生理機能を有していることが明らかになってきた。なかでも、D-Asp は動物に豊富に見いだされ、ホルモン合成・分泌や神経伝達に関与していることが明らかにされている。真核生物体内における D-Asp レベルは、Asp ラセマーゼによる合成と DDO による分解によって制御されている。哺乳動物において Asp ラセマーゼの実体は明確に明らかにされていないが、DDO については古くから多様な真核生物から単離され、酵素学的諸特性や生理機能などが詳細に解析されてきた。近年、DDO による D-Asp の代謝異常が統合失調症を含む神経性疾患に関与することが示唆され、DDO による D-Asp レベルの制御機構の解明が期待されている。哺乳動物や真菌において、酸性 D-アミノ酸の存在によって DDO が誘導発現することが知られているが、その発現制御機構はほとんど明らかにされていない。DDO 遺伝子の誘導発現機構の解明は、D-Asp と DDO が関わる生理機能や病態の解明において有益な知見をもたらすと考えられる。

本研究では、酵母 *C. humicola* UJ1 株における *ChDDO* 遺伝子の D-Asp 依存的な誘導発現機構の解明を目的とした。過去の知見から、D-Asp 依存的な *ChDDO* 遺伝子誘導発現に Aap を介した D-Asp 取り込みが関与することが示唆されている。そこで第 1 章では、UJ1 株において D-Asp 取り込みに関与する Aap を同定し、*ChDDO* 遺伝子誘導発現との関係性について解析した。一方、D-アミノ酸の真核生物に対する影響や分子応答に関する知見は乏しかった。そこで第 2 章では、RNA-seq 解析により D-Asp 特異的に発現が変化する遺伝子の網羅的な情報から代謝経路や細胞プロセスの変化について解析し、*ChDDO* 遺伝子誘導発現を含む細胞全体の D-Asp 応答について解析した。さらに近年、メタノール資化性酵母の Pyc1 が、タンパク質間相互作用による補酵素 FAD の結合補助を介して、DAO の活性化に関与することが示唆された。一方、*ChDDO* 遺伝子の発現は D-Asp 依存的に転写レベルで制御されることが明らかにされているが、翻訳後においても *ChDDO* の機能発現が制御されていれば非常に興味深い。そこで第 3 章では、UJ1 株において *PYCI* 遺伝子を同定し、*ChDDO* 遺伝子の機能発現における Pyc1 の役割について解析した。

第 1 章 酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 株のドラフトゲノム解析と D-アスパラギン酸酸化酵素遺伝子発現に関与するアミノ酸パーミアーゼの機能解析

1. 緒言

酵母 *C. humicola* UJ1 株の DDO (*ChDDO*) の発現は培養液中の D-Asp の存在によって特異的に誘導され、主に転写レベルで制御されている (113)。また、培養液中に L-Asp が共存することで D-Asp による *ChDDO* 遺伝子の誘導発現が抑制されたことから、アミノ酸パーミアーゼ (*Aap*) による D-Asp の取り込みが *ChDDO* 遺伝子の誘導発現に関与すると考えられた (110, 113)。しかしながら、D-Asp の細胞内取り込みに関与する *Aap* は不明であった。そこで第 1 章では、ドラフトゲノム解析によって *C. humicola* UJ1 株のゲノム情報を取得し、*AAP* 遺伝子の同定と遺伝子破壊を通して、*Aap* と *ChDDO* 遺伝子誘導発現との関係性について解析した。

2. 結果

2.1. *C. humicola* UJ1 株のドラフトゲノム解析と D-アミノ酸代謝酵素遺伝子の探索

ILLUMINA HiSeq 2500 を用いて *C. humicola* UJ1 株のゲノム配列を解析した (Table 1-1). その結果, 44,746,782 個の paired-end 配列が生成された. これらの配列の *de novo* アセンブリにより計 46 個の scaffold が得られた. scaffold は最大で 3,532,612 bp, 最小で 151 bp, 平均 491,922 bp の配列長を有しており, N_{50} 長と N_{90} 長 (scaffold を長い順に加算し, 全体の 50%と 90%を超える長さになった時の scaffold 長) はそれぞれ 1,340,400 bp と 602,907 bp であった. Scaffold を全て加算した全長は 22,628,423 bp であり, 全体の GC 含量は 62.8%であった. 酵母 *C. neoformans* の遺伝子モデルパラメータでトレーニングした AUGUSTUS を用いた解析により, 8,919 個の遺伝子の存在が予測された. 現在までに, *C. humicola* では, UJ1 株以外に, CBS 4282 株と JCM 1457 株のドラフトゲノム配列が明らかにされている (287-290). CBS 4282 株と JCM 1457 株のゲノム長と GC 含量は, それぞれ 22,632,906 bp, 62.80%と 22,653,840 bp, 62.70%であり, UJ1 株と同等であった. また, CBS 4282 株のゲノム配列には 4,376 個の ORF が見いだされている (290). JCM 1457 株のゲノム配列についても UJ1 株と同様の条件で AUGUSTUS を用いて解析したところ, UJ1 株と同じ 8,919 個の遺伝子の存在が推定された.

Table 1-1. *C. humicola* UJ1 株と CBS 4282 株, JCM 1457 株のゲノムデータの概要

	UJ1	CBS 4282 ¹	JCM 1457 ²
Total sequence length (bp)	22,628,423	22,632,906	22,653,840
Total ungapped length (bp)	22,606,932	22,632,800	22,618,217
Genome coverage	200x	130x	313x
G+C content (%)	62.8	62.8	62.7
Scaffolds (number)	46	21	10
Scaffold N_{50} (bp)	1,340,400	1,793,818	3,082,120
ORF (number)	8,919	4,376	8,919

¹ GenBank assembly accession: GCA_008065275.1, ² GCA_001600235.1

次に, UJ1 株に存在する *DDO* と *DAO* ホモログ遺伝子を推定するために, ChDDO (g3700) と酵母 *R. gracilis* DAO (RgDAO, UniprotKB: Q99489) のアミノ酸配列を用いて UJ1 株のゲノム配列に対してホモロジー検索を行った. その結果, UJ1 株には 3 つの *DAO* ホモログ遺伝子 g2200 と g6952, g8917 が見いだされた. また, CBS 4282 株と JCM 1457 株には *DDO/DAO* ホモログ遺伝子としてそれぞれ 4 つの遺伝子 (それぞれ TXT10782.1 と TXT06147.1, TXT08871.1, TXT08777.1 および g4124 と g2168, g6973, g7167) が見いだされた. CBS 4282 株の TXT10782.1 と JCM 1457 株の g4124 がコードするタンパク質は ChDDO に対して最も高い 98.4%のアミノ酸配列同一性を示したことから, *DDO* をコードすると考えられた (Table 1-2). また, 3 株に見いだされた他 3 つの *DDO/DAO* ホモログ遺伝子がコードするタンパク質は全て RgDAO に対し

て最も高い 26.4-43.2%のアミノ酸配列同一性を示した (Table 1-2).

Table 1-2. *C. humicola* UJ1 株と CBS 4282 株, JCM 1457 株における DDO と DAO ホモログの配列情報

Strain	Name	Amino acid residues	Amino acid identity (%)			
			vs. ChDDO	vs. TdDDO	vs. RgDAO	vs. TvDAO
UJ1	ChDDO (g3700)	370	-	26.1	29.6	31.2
	g2200	374	27.5	30.3	37.5	30.3
	g6952	377	34.1	30.3	38.1	30.7
	g8917	367	34.5	29.5	43.1	33.8
CBS 4282	TXT10782.1	370	98.4	25.9	30.4	30.7
	TXT06147.1	376	34.9	30.4	38.8	30.5
	TXT08777.1	374	34.7	30.3	37.2	30.1
	TXT08871.1	369	27.3	29.3	42.7	33.8
JCM 1457	g4124	370	98.4	25.9	30.4	30.7
	g2168	377	34.8	30.3	38.7	30.4
	g6973	359	31.2	27.7	38.5	31.8
	g7167	369	27.7	31.0	37.8	31.0

アミノ酸配列同一性は Needleman-Wunsch アルゴリズムによるグローバルアライメントを用いて算出した。使用した DDO と DAO のアミノ酸配列のアクセッション番号を以下に示す：ChDDO (UniprotKB: Q75WF1), TdDDO (*Thermomyces dupontii*, 真菌ゲノムデータベース Genozymes: talh1p4_002474), RgDAO (UniprotKB: Q99489), TvDAO (*Trigonopsis variabilis*, UniprotKB: Q99042).

次に, UJ1 株と CBS 4282 株と JCM 1457 株に見いだされた DDO と DAO ホモログ遺伝子が機能的な DDO または DAO をコードしているか推定するために, 既知の DDO と DAO のアミノ酸配列とアライメントした (Fig. 1-1). DDO と DAO の N 末端領域には補因子 FAD との結合に関与する Wierenga ADP 結合配列 (GxGxxG: x は任意のアミノ酸) が保存されている (291). 3 株の DDO/DAO ホモログには全て GxGxxG が保存されていた。また, 真核生物の DAO と DDO の C 末端には I 型ペルオキシソーム標的シグナル (PTS1: [S/T/A/G/C/N]-[R/K/H]-[L/I/V/M/A/F/Y]) が広く保存されている。3 株の他の DDO/DAO ホモログにはすべて PTS1 が保存されていることから, ペルオキシソームに局在することが示唆された。また, 3 株の DDO/DAO ホモログには, DDO と DAO において基質 D-アミノ酸の α -アミノ基, α -カルボキシ基と相互作用することが知られている Tyr と Arg, Gly/Ser 残基が保存されていたが, UJ1 株の g2200 と CBS 4282 株の TXT08777.1, JCM 1457 株の g7167 には Y ではなく K233 が保存されていた (Fig. 1-1). 真菌 DDO の基質結合部位には, D-Asp 側鎖カルボキシ基と相互作用する Arg 残基と His 残基が保存されているが, 真菌 DAO では Arg 残基に相当する位置に塩基性以外のアミノ酸残基が, His 残基に相当する位置には Asn 残基が保存されており, この相違が真菌に

見いだされる DDO と DAO の区別に有用であることが報告されている (292)。CBS 4282 株の TXT10782.1 と JCM1457 株の g4124 には真菌 DDO に見られる Arg 残基と His 残基が保存されていた。一方、3 株の他の DDO/DAO ホモログには真菌 DAO に見られる Asn 残基が保存されていた。

以上の結果より、アミノ酸配列の同一性と一次構造の比較から、UJ1 株と CBS 4282 株、JCM 1457 株には 1 つの DDO (それぞれ、ChDDO と CBS 4282 株の TXT10782.1, JCM1457 株の g4124) と 3 つの DAO ホモログ (それぞれ、UJ1 株の g2200 と g6952, g8917 と、CBS 4282 株の TXT06147.1 と TXT08871.1, TXT08777.1 と JCM 1457 株の g2168 と g6973, g7167) が存在すると考えられた。これ以降、UJ1 株に見いだされた DAO ホモログ g2200 と g6952, g8917 をそれぞれ ChDAO1 と ChDAO2, ChDAO3 とした。

ChDDO	1	MPP-----SDPIIVLGGVIGLTTAVRLLAEHLG-----ANVHILADHWPSD-----ALDAQYASTIA-GAHHLSFAD--D 63
TdDDO	1	MPP-----RIIILGAGIIGLSTAVELQG--RHQHRSAEPRPSITVSAELPSQPSWEDTEPRCRSPDYASMA-GAHYRPIPG--A 77
CBS 4282 TXT10782.1	1	MPP-----SDPIIVLGGVIGLTTAVRLLAEHPG-----ANVHILADHWPSD-----ALDAQYASTIA-GAHHLSFAD--D 63
JCM 1457 g4124	1	MPP-----SDPIIVLGGVIGLTTAVRLLAEHPG-----ANVHILADHWPSD-----ALDAQYASTIA-GAHHLSFAD--D 63
RgDAO	1	MHS-----QKRVVVLGSGVIGLSSALTLAR--KG-----YSVHILARDLPED-----VSSQTFASWPA-GANWTFPMTLD 63
TvDAO	1	MA-----KIVVIGAGVAGLTTALQLLR--KG-----HEVTIVSEFTPGD-----L-SIGYTSWPA-GCNWQSFEE--A 57
UJ1 g2200 (ChDA01)	1	MT-----GFDALVLGAGVYGLSIATELTLN--RG-----LKVAVVARDLPED-----LTSTGFASWPA-GCNWQSFEE--A 60
UJ1 g6952 (ChDA02)	1	MPQQHN-----KSPFDVVVLGAGILGVATADALTE--AG-----LRVAIVARDLPED-----AHSAQFASWPAVANGWSSFAA--N 67
UJ1 g8917 (ChDA03)	1	MSLRPLDPTTGPAGTLAGQDDVVVVGAGVIGLTTALILAR--RG-----YRVHVAKNLPED-----DLDDQWSSWPA-GANWCPFGA-- 76
CBS 4282 TXT06147.1	1	MPQQHN-----KSPFDVVVLGAGILGVATADALTE--AG-----LRVAIVARDLPED-----AHSAQFASWPA-GANWSSFAA--N 66
CBS 4282 TXT08777.1	1	MT-----GFDALVLGAGVYGLSIATELTLN--RG-----LKVAVVARDLPED-----LTSTGFASWPA-GCNWQSFEE--A 60
CBS 4282 TXT08871.1	1	MSLRPLDPTTGPAGTLAGQDDVVVVGAGVIGLTTALILAR--RG-----YRVHVAKNLPED-----DLDDQWSSWPA-GANWCPFGA-- 76
JCM 1457 g2168	1	MPQQHN-----KSPFDVVVLGAGILGVATADALTE--AG-----LRVAIVARDLPED-----AHSAQFASWPAVANGWSSFAA--N 67
JCM 1457 g6973	1	MSLRPLDPTTGPAGTLAGQDDVVVVGAGVIGLTTALILAR--RG-----YRVHVAKNLPED-----DLDDQWSSWPA-GANWCPFGA-- 76
JCM 1457 g7167	1	MA-----GFDALVLGAGVYGLSIATELTLN--RG-----LKVAVVARDLPED-----LTSTGFASWPA-GCNWQSFEE--A 60
ChDDO	64	GD--ARQRRWDMRTFDVLYDEW--KAVGE-----RTG-LMALQTQEMWEGATSHLAVYEG-HPDFRVLDLP--RTA-PCSNITHMVSFT 137
TdDDO	78	TPQLQREAQWAMDTFRMRRIA--RDAPAEAGV-----RMPGIEYLEDSPKEYGRLRTGDRYAGEHDEFRLDK--AEL-P-EGVAMGCRVQ 158
CBS 4282 TXT10782.1	64	GD--ARQRRWDMRTFDVLYDEW--KAVGE-----RTG-LMALQTQEMWEGATSHLAVYEG-HPDFRVLDLP--RTA-PCSNITHMVSFT 137
JCM 1457 g4124	64	GD--ARQRRWDMRTFDVLYDEW--KAVGE-----RTG-LMALQTQEMWEGATSHLAVYEG-HPDFRVLDLP--RTA-PCSNITHMVSFT 137
RgDAO	64	G---PRQAKWEESTFKKVELVPTGHAMWLK-----G-T-RRFA-QNEDGLLG---HWYKIDITPNYRPLPS--SEC-P-KG-AIGVYTD 133
TvDAO	58	G---KLADYDAVSYPIRELA--RSPSEAGIRLISQSHVLRKDLPL-KLEVAMSAICQRN---PWFKNVTDSFEIIEI--RSRIVHDDVAVLYEFD 142
UJ1 g2200 (ChDA01)	61	G---TPEAEWDAITFKRLAVVA--RDHPDLC-----KLP-FVVV-SDDPNEPL---PWYSLSVPCNRKIDATDPAPL-P-GGFTSIQFD 134
UJ1 g6952 (ChDA02)	67	---AAEQKRDALTFRRFSELS--VAHPEIV-----RRYP-FKYIWNVDVGYGS---PWYKDVVEDFGPLDT--AAV-P-KPYTQGVST 138
UJ1 g8917 (ChDA03)	77	E---ERVCRWETESA-RLRELIPMGLAMPPL-----V-LRYA-PTDAGLHK---HWYENVVNTYRRLDP--AEC-P-NG-GVGVAFE 144
CBS 4282 TXT06147.1	66	---PAEQKRDALTFRRFSELS--VAHPEIV-----RRYP-FKYIWNVDVGYGS---PWYKDVVEDFGPLDT--AAV-P-KPYTQGVST 137
CBS 4282 TXT08777.1	61	A---TPEAEWDAITFKRLAVVA--RDHPDLC-----KLP-FVVV-SDDPNEPL---PWYSLSVPCNRKIDATDPAPL-P-GGFTSIQFD 134
CBS 4282 TXT08871.1	77	E---ERVCRWETESLARLRELIPMGLAMPPL-----V-LRYA-PTDAGLHK---HWYENVVNTYRRLDP--AEC-P-NG-GVGVAFE 145
JCM 1457 g2168	67	---PAEQKRDALTFRRFSELS--VAHPEIV-----RRYP-FKYIWNVDVGYGS---PWYKDVVEDFGPLDT--AAV-P-KPYTQGVST 138
JCM 1457 g6973	77	E---ERVCRWETESA-RLRELIPMGLAMPPL-----V-LRYA-PTDAGLHK---HWYENVVNTYRRLDP--AEC-P-NG-GVGVAFE 144
JCM 1457 g7167	61	G---TPEAEWDAITFKRLAVVA--RDHPDLC-----KLP-FVVV-SDDPNEPL---PWYSLSVPCNRKIDATDPAPL-P-GGFTSIQFD 134
ChDDO	138	SLTIAPTVYLAALAEARVLDLGAHLHRAHVPSLALRTPDALLALYTRPPAAVFCAGLARGHLPAPAEAAALFPTRGQVVVVRAPWNR-AGFTRQVG-SL 235
TdDDO	159	TYSLNAPHYSRWLDRFLAGGGQIVHRKLERLEEA----FTLFEDGSQPLVINCTGRNF----D-QDDKMRIRIGQTVLVRNQFDR-T-ITRQN---- 241
CBS 4282 TXT10782.1	138	SLTIAPTVYLAALAEARVLDLGAHLHRAHVPSLALRTPDALLALYTRPPAAVFCAGLARGHLPAPAEAAALFPTRGQVVVVRAPWNR-AGFTRQVG-SL 235
JCM 1457 g4124	138	SLTIAPTVYLAALAEARVLDLGAHLHRAHVPSLALRTPDALLALYTRPPAAVFCAGLARGHLPAPAEAAALFPTRGQVVVVRAPWNR-AGFTRQVG-SL 235
RgDAO	134	TVSHVAPKYCYQLARELQKLGATFERRVTSLEQA----FD---G-ADLVNATGLGAKSIAIG-DDQAAEPIRGQTVLVKSPCKR--CTMDS-- 216
TvDAO	143	SLCIIHTGVYLNWLSQCLSLGATVVKRRVNIHIDA----NLLHSSGSRDPDIVNCSGLFARFLGGV-EDKMYPIAGGQTVLVKAPLVN-ACVMSVDK-VF 236
UJ1 g2200 (ChDA01)	135	SYILHAPNYLQHLAKGLRDRGVPIIRRRLASLDEA----FDLPETGSVDLVNVALGNRSILGV-EDDKMYPAGGQTVLVKAPLVN-ACVMSVDK-VF 226
UJ1 g6952 (ChDA02)	139	SFCLNPARLNAYLVSRKARGVPIIRARLGLSDEA----FA--AVGNVDFVFNATGLGARTLLGV-EDPAVFPTRGQTVLVKAPLVN-TCFVGRDR-DL 228
UJ1 g8917 (ChDA03)	145	SLSVNAPVYLKWEAQCRALGVTIVRGDVAALADV----VK---PTTRVVNATGLGSLTLTDV-LDAAVEPIRGQTVLVKAPLVN-RCVMSSSRAHI 233
CBS 4282 TXT06147.1	138	SFCLNPARLNAYLVSRKARGVPIIRARLGLSDEA----FA--AVGNVDFVFNATGLGARTLLGV-EDPAVFPTRGQTVLVKAPLVN-TCFVGRDR-DL 227
CBS 4282 TXT08777.1	135	SYILHAPNYLQHLAKGLRDRGVPIIRRRLASLDEA----FDLPETGSVDLVNVALGNRSILGV-EDDKMYPAGGQTVLVKAPLVN-ACVMSVDK-VF 226
CBS 4282 TXT08871.1	146	SLSVNAPVYLKWEAQCRALGVTIVRGDVAALADV----VK---PTTRVVNATGLGSLTLTDV-LDAAVEPIRGQTVLVKAPLVN-RCVMSSSRAHI 234
JCM 1457 g2168	139	SFCLNPARLNAYLVSRKARGVPIIRARLGLSDEA----FA--AVGNVDFVFNATGLGARTLLGV-EDPAVFPTRGQTVLVKAPLVN-TCFVGRDR-DL 228
JCM 1457 g6973	145	SLSVNAPVYLKWEAQCRALGVTIVRGDVAALADV----VK---PTTRVVNATGLGSLTLTDV-LDAAVEPIRGQTVLVKAPLVN-RCVMSSSRAHI 233
JCM 1457 g7167	135	SYILHAPNYLQHLAKGLRDRGVPIIRRRLASLDEA----FDLPETGSVDLVNVALGNRSILGV-EDDKMYPAGGQTVLVKAPLVN-ACVMSVDK-VF 226
ChDDO	236	GGGEGGTRTYIIPRC--NGEVVLGGTMEQGDWTPYPRDETVDITLALQICDPIAPPYARSWPKDDQVAALRSIVVRDVGFRPSRAGGARVALASA-- 331
TdDDO	242	RD--GSAIFLIPRP--FAGTIIIGGTEKPGDMEVPRMETRLKLENCVRAFFPEVD----LED-----F-DVVLDNVGRPRWRDGLLEERIE-- 322
CBS 4282 TXT10782.1	236	GGGEGGTRTYIIPRC--NGEVVLGGTMEQGDWTPYPRDETVDITLALQICDPIAPPYARSWPKDDQVAALRSIVVRDVGFRPSRAGGARVALASA-- 331
JCM 1457 g4124	236	GGGEGGTRTYIIPRC--NGEVVLGGTMEQGDWTPYPRDETVDITLALQICDPIAPPYARSWPKDDQVAALRSIVVRDVGFRPSRAGGARVALASA-- 331
RgDAO	217	DP--ASPAYIIPRP--GGEVICGGTYGVGDWDLVSNPVTQRIKLHCLRDPTIISDGG--TIEG-----I-EVSHNVGLRPAREGGRLEREEREI 310
TvDAO	237	NE---DEALYIMTRF--DGTSIIGGCFQPNNSSEDPDPSLTHRILSRALDRFPPELLTKDG----P-----L-DIVRECVGRHPRREGGPRVELEKI-- 316
UJ1 g2200 (ChDA01)	227	DP--AP-GKTGPGP--EGHIIIGGTYNRDNHNSVLPDLGTAERILQDCYALEPPLLAPNGKSWRD----I--EVVHNHGLRPARKGGVRLVEPREV 312
UJ1 g6952 (ChDA02)	229	PT---GESCYIIPRPGSDGCVIVGGTFLPHNYSLLPERETAQRIKQAYAIQCELAGVNGKSWED----I-EVSHNVGLRPAREGGRLEREEREI 317
UJ1 g8917 (ChDA03)	234	DP--TRSTYIIPRPNSSGGVTCGGCYEVGSWERAPDALSRRILEECLAHVPELSADG--TVEG-----M-DVIRECVGRHPRREGGRLEREEREI 318
CBS 4282 TXT06147.1	238	PA---GESCYIIPRPGSDGCVIVGGTFLPHNYSLLPERETAQRIKQAYAIQCELAGVNGKSWED----I-EVSHNVGLRPAREGGRLEREEREI 316
CBS 4282 TXT08777.1	227	DP--AP-GKTGPGP--EGHIIIGGTYNRDNHNSVLPDLGTAERILQDCYALEPPLLAPNGKSWRD----I--EVVHNHGLRPARKGGVRLVEPREV 312
CBS 4282 TXT08871.1	235	DP--TRSTYIIPRPNSSGGVTCGGCYEVGSWERAPDALSRRILEECLAHVPELSADG--TVEG-----M-DVIRECVGRHPRREGGRLEREEREI 319
JCM 1457 g2168	229	PT---GESCYIIPRPGSDGCVIVGGTFLPHNYSLLPERETAQRIKQAYAIQCELAGVNGKSWED----I-EVSHNVGLRPAREGGRLEREEREI 317
JCM 1457 g6973	234	DP--TRSTYIIPRPNSSGGVTCGGCYEVGSWERAPDALSRRILEECLAHVPELSADG--TVEG-----M-DVIRECVGRHPRREGGRLEREEREI 318
JCM 1457 g7167	227	DP--AP-GKTGPGP--EGHIIIGGTYNRDNHNSVLPDLGTAERILQDCYALEPPLLAPNGKSWRD----I--EVVHNHGLRPARKGGVRLVEPREV 312
ChDDO	331	-----A-G--MRVYVYNGHGGAGWQSCWCGCAEDAVALWAGGA-----GGAR-----L 370
TdDDO	322	-----E--DGKTVIHAYGAGGRGYELSWGIAEKADLVIGQLARV--PQASK-----L 374
CBS 4282 TXT10782.1	331	-----A-G--MRVYVYNGHGGAGWQSCWCGCAEDAVALWAGGA-----GGAR-----L 370
JCM 1457 g4124	331	-----A-G--MRVYVYNGHGGAGWQSCWCGCAEDAVALWAGGA-----GGAR-----L 370
RgDAO	301	LPLDRTKSPLSLGRGSARAAKEKEVTLVHAYGFSAGYQSSWGAEDAVALVDEAFQRYHGAARESK-----L 368
TvDAO	316	-----P-G-VGVFVHNYGAAGAGYQSSYGMADAVALVYERAL-----TRPN-----L 356
UJ1 g2200 (ChDA01)	313	GAAAGTYAHLA-P--RSRAPRRRVAVVHAYGPGGKGYQSSIGLAEKADLVIGQLARV--PQASK-----L 374
UJ1 g6952 (ChDA02)	318	APQRQTLVPEP-----GRAAAPRSVAVLHCYIGGAGYQASLGIAEAKQLALGYLSKK-----AAKAR-----L 377
UJ1 g8917 (ChDA03)	318	-----AVRGRRAIVHAYGIGGAGYQASWGMADKADLVAGAVLDAEAQKAR-----L 368
CBS 4282 TXT06147.1	317	APQRQTLVPEL-----GRAAAPRSVAVLHCYIGGAGYQASLGIAEAKQLALGYLSKK-----AAKAR-----L 376
CBS 4282 TXT08777.1	313	GAAAGTYAHLA-P--RSRAPRRRVAVVHAYGPGGKGYQSSIGLAEKADLVIGQLARV--PQASK-----L 374
CBS 4282 TXT08871.1	319	-----AVRGRRAIVHAYGIGGAGYQASWGMADKADLVAGAVLDAEAQKAR-----L 369
JCM 1457 g2168	318	APQRQTLVPEL-----GRAAAPRSVAVLHCYIGGAGYQASLGIAEAKQLALGYLSKK-----AAKAR-----L 377
JCM 1457 g6973	318	-----AVRGRRAIVHAYGIGGAGYQASWGMADKADLVAGAVLDAEAQKAR-----L 368
JCM 1457 g7167	313	GAAAGTYAHLA-P--RSRAPRRRVAVVHAYGPGGKGYQSSIGLAEKADLVIGQLARV--PQASK-----L 374

Fig. 1-1. *C. humicola* UJ1 株と CBS 4282 株, JCM 1457 株の DDO と DAO ホモログの配列比較

マゼンタは N 末端領域 Wierenga ADP ADP 配列 (GxGxxG) を示す。緑は C 末端領域の PTS1 ([S/T/A/G/C/N]-[R/K/H]-[L/I/V/M/A/F/Y]) を示す。赤は真菌 DDO または DAO に保存されている His または Asn 残基を示す。シアンは DDO と DAO において基質 D-アミノ酸の α -アミノ基, α -カルボキシ基と相互作用する Tyr と Arg, Gly/Ser 残基を示す。黄は ChDDO において基質酸性 D-アミノ酸側鎖カルボキシ基と相互作用する Arg 残基を示す。マルチプルライメントには T-COFFEE server (<http://tcoffee.org.cat/>) を用いた。

UJ1 株と CBS 4282 株, JCM 1457 株の *DDO* 遺伝子近傍に存在する遺伝子配置を以下に示す (Fig. 1-2, Table 1-3). 3 株の *DDO* 遺伝子近傍に存在する遺伝子は類似しており, UJ1 株の ORF1–ORF8 間の塩基配列同一性は CBS 4282 株と JCM 1457 株に対してともに 96.7%であった. さらに *DDO* 遺伝子近傍には酵母において毒性代謝産物の解毒酵素として機能する glutathione-*S*-transferase ホモログ遺伝子 (ORF6) や, D-Ser の毒性低減や資化利用に關与する D-serine dehydratase ホモログ遺伝子 (*ChDSD*, ORF8, *g3704*) が存在していた (95, 293).

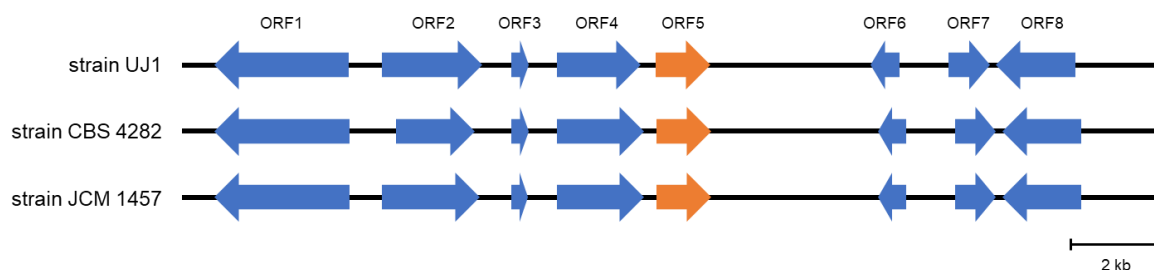


Fig. 1-2. *C. humicola* UJ1 株と CBS 4282 株, JCM 1457 株における *DDO* 遺伝子近傍の遺伝子配置

Table 1-3. *C. humicola* *DDO* 遺伝子近傍の各遺伝子の推定機能と塩基配列の比較

Putative function	UJ1		CBS 4282		JCM 1457	
	Length (bp)	Length (bp)	Identity (%)	Length (bp)	Identity (%)	
ORF1	hypothetical protein	2,982	2,984	100	2,984	100
ORF2	anion transporter	2,270	1,762	77.4	2,270	99.5
ORF3	related to ATPase inhibitor, mitochondrial precursor	337	337	97.0	334	97.0
ORF4	ESCRT-II complex subunit VPS36	1,901	1,896	97.5	1,896	97.5
ORF5	ChDDO	1,183	1,183	98.4	1,183	98.4
ORF6	glutathione- <i>S</i> -transferase	633	633	97.9	633	97.9
ORF7	2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol dehydrogenase	962	959	98.4	959	98.4
ORF8	D-serine dehydratase	1,739	1,745	98.1	1,724	97.9

塩基配列同一性は Needleman-Wunsch アルゴリズムによるグローバルアライメントを用いて算出した。

さらに, Blast2GO Basic を用いた ORF の機能アノテーションにおいて, UJ1 株のゲノム配列には D-アミノ酸代謝に関与する遺伝子として, D-アミノ酸の α -アミノ基にアセチル基を付加して D-アミノ酸を不活化する役割を担う D-アミノ酸-N-アセチルトランスフェラーゼ (*ChDNT*, *g6193*) や D-アミノ酸が付加された tRNA から D-アミノ酸を遊離させることで D-アミノ酸毒性を低減する D-Tyr-tRNA^{Tyr} デアシラーゼ (*Dtd*) ホモログ遺伝子 (*ChDTD*, *g3291*) が見いだされた (72, 95, 96).

2.2. *C. humicola* UJ1 株において D-Asp 輸送に関与する Aap の推定

C. humicola UJ1 株に存在する Aap ホモログを同定するために、*C. neoformans* に見いだされた 8 個の Aap (Aap1-8) のアミノ酸配列を用いて、UJ1 株のドラフトゲノム配列に対して BLASTP 検索した (289, 294)。その結果、*C. neoformans* Aap1-8 に対して有意な類似性 ($e\text{-value} \leq 1.0 \times 10^{-50}$ かつアミノ酸配列同一性 $\geq 25\%$) を有する 31 個の Aap ホモログが見いだされた (Table 1-4)。これら Aap ホモログは 461-885 個のアミノ酸残基からなり、Table 1-4 に記載した各 CnAap に対して最も高いアミノ酸配列同一性を示した。また、いずれの Aap ホモログにおいても APC super family に典型的な 9-12 個の膜貫通領域の存在が予測された。

Table 1-4. Blastp 検索によって同定された UJ1 株の Aap ホモログ

No.	UJ1 Aap	a.a. length	TM regions	a.a. identity (%)	<i>C. neoformans</i> Aap*
1	g920 (ChAap4)	573	12	69.2	CnAap4
2	g1333	540	11	65.4	CnAap3
3	g5887 (ChAap5)	562	12	63.5	CnAap4
4	g7381 (ChAap1)	573	12	56.3	CnAap2
5	g6377	555	11	52.8	CnAap3
6	g1034	564	12	48.0	CnAap7
7	g6586	555	9	45.7	CnAap3
8	g7951	543	10	42.8	CnAap7
9	g2921	557	12	40.5	CnAap3
10	g2529	885	11	40.3	CnAap8
11	g4718	553	11	39.9	CnAap1
12	g6837	560	12	39.6	CnAap3
13	g5432	554	12	39.5	CnAap2
14	g8850	559	9	39.1	CnAap1
15	g6585	601	9	38.8	CnAap3
16	g231	628	11	35.7	CnAap2
17	g8479	591	12	35.7	CnAap3
18	g1106	482	9	35.5	CnAap2
19	g6073 (ChGap2)	593	12	35.3	CnAap2
20	g1718	467	11	34.6	CnAap3
21	g5547	577	10	34.6	CnAap1
22	g5888	554	12	34.2	CnAap4
23	g1125	545	11	34.0	CnAap3
24	g6267 (ChGap3)	607	12	33.9	CnAap2
25	g6268 (ChGap4)	596	12	33.4	CnAap2
26	g8907	510	11	33.0	CnAap1
27	g4165 (ChGap1)	595	12	32.8	CnAap1
28	g997	562	12	32.0	CnAap3
29	g7979	469	10	31.4	CnAap2
30	g8808	536	10	31.1	CnAap3
31	g8890	461	11	29.0	CnAap3

膜貫通領域 (TM regions) の予測には HMMTOP server (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>) を使用した。アミノ酸配列同一性は Needleman-Wunsch アルゴリズムによるグローバルアライメントを用いて算出した。* Fernandes らによって同定された *C. neoformans* の Aap (CnAap1-8) のアミノ酸配列を使用した (294)。

同種のアミノ酸 (プロリン, 酸性アミノ酸, 塩基性アミノ酸, 分岐鎖アミノ酸, 芳香族アミノ酸, 種々のアミノ酸) の輸送を担う YAT は分子系統樹において同一の clade に分類されることが知られている (Fig. 1-3, Table 1-5) (159). UJ1 株に見いだされた 31 個の Aap ホモログのなかから, D-Asp 輸送に関与する可能性のある Aap を推定するために, 輸送アミノ酸が明らかにされている真菌 YAT のアミノ酸配列とともに分子系統樹を作製した (Fig. 1-3, Table 1-5). その結果, UJ1 株に見いだされた g920 と g5887 が, 酸性アミノ酸の輸送を担う Acidic YATs (CnAap4 と CnAap5, Dip5, PcDip5, AgtA) (178, 180, 181, 214) と同一の clade に分類された. したがって, g920 と g5887 が UJ1 株において D-Asp 輸送に関与する可能性が示唆された. g920 と g5887 はそれぞれ *C. neoformans* の CnAap4 と CnAap5 と高いアミノ酸配列同一性を有していたことから, それぞれ ChAap4 と ChAap5 と名付けた (Table 1-4). また, *S. cerevisiae* の広基質特異性 Aap である Gap1 は酸性アミノ酸を輸送することが知られている (166). したがって, General YATs clade に分類された g4165 と g6073, g6267, g6268 も UJ1 株における D-Asp 輸送に関与する可能性が示唆されたことから, これら Aap ホモログをそれぞれ ChGap1, 2, 3, 4 と名付けた. 加えて, *C. neoformans* の CnAap1,2 は L-Asp 輸送に関与することが示されていることから (213), 系統的に近縁である UJ1 株の g7381 (ChAap1) も D-Asp 輸送に関与する可能性が示唆された.

Table 1-5. 真菌 Aap の基質特異性

Name	Uniprot	Substrate (s)	Species	Refs.
Agp1	P25376	Broad range (not L-Lys or L-Arg)	<i>S. cerevisiae</i>	(164, 165, 177, 183-185)
Agp2	P38090	L-Val, L-Ile, L-Leu, L-Phe, L-Thr	<i>S. cerevisiae</i>	(185-187)
Agp3	P43548	L-Val, L-Ile, L-Leu, L-Phe, L-Ser, L-Thr, L-Asp, L-Glu	<i>S. cerevisiae</i>	(179, 185)
Alp1	P38971	L-Arg	<i>S. cerevisiae</i>	(179, 188)
Bap2	P38084	L-Val, L-Ile, L-Leu, L-Ala, L-Phe, L-Tyr, L-Met, L-Cys	<i>S. cerevisiae</i>	(165, 179, 189-192)
Bap3	P41815	L-Val, L-Ile, L-Leu, L-Ala, L-Phe, L-Tyr, L-Met, L-Cys	<i>S. cerevisiae</i>	(174, 179)
Can1	P04817	L-His, L-Lys, L-Arg	<i>S. cerevisiae</i>	(193-195)
Dip5	P53388	L-Ala, L-His, L-Asn, L-Gln, L-Asp, L-Glu	<i>S. cerevisiae</i>	(178, 179)
Gap1	P19145	All-natural L-amino acids, some D-amino acids (D-Leu, D-Ala, D-His, D-Arg, D-Ser, D-Met, D-Tyr, D-Trp)	<i>S. cerevisiae</i>	(165-170, 185, 196)
Gnp1	P48813	L-Leu, L-Pro, L-Met, L-Cys, L-Ser, L-Thr, L-Asn, L-Gln	<i>S. cerevisiae</i>	(164, 179, 197)
Hip1	P06775	L-His	<i>S. cerevisiae</i>	(198, 199)
Mmp1	Q12372	S-Methylmethionine	<i>S. cerevisiae</i>	(200)
Lyp1	P32487	L-Lys, L-Met	<i>S. cerevisiae</i>	(179, 194, 201-203)
Put4	P15380	L-Pro, L-Ala, L-Gly	<i>S. cerevisiae</i>	(179, 204-206)
Sam3	Q08986	S-Adenosylmethionine	<i>S. cerevisiae</i>	(200, 207)
Ssy1	Q03770	Amino acid sensor system (Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p)	<i>S. cerevisiae</i>	(176, 208, 209)
Tat1	P38085	L-Val, L-Leu, L-Ile, L-Cys, L-Tyr, L-Trp, L-His	<i>S. cerevisiae</i>	(174, 179, 199, 210)
Tat2	P38967	L-Ala, L-Gly, L-Cys, L-Phe, L-Tyr, L-Trp	<i>S. cerevisiae</i>	(179, 210, 211)
Tat3	A4UZ28	L-Leu, L-Phe, L-Tyr, L-Trp	<i>S. pastorianus</i>	(212)
CnAap1	J9VRP4	L-Met, L-Pro,	<i>C. neoformans</i>	(213)
CnAap2	J9W019	L-Ile, L-Arg, L-Lys	<i>C. neoformans</i>	(214)
CnAap3	J9VLA8	No data	<i>C. neoformans</i>	
CnAap4	J9VEG4	L-Gly, L-Ile, L-Val, L-Ser, L-Met, L-Asp, L-Lys, L-Phe	<i>C. neoformans</i>	(214)
CnAap5	J9VF19	Gly, Ile, Pro	<i>C. neoformans</i>	(214)
CnAap6	J9VP54	Transport activity has been not observed at 30°C	<i>C. neoformans</i>	(213)
CnAap7	J9W199	No data	<i>C. neoformans</i>	
CnAap8	J9VLY1	Transport activity has been not observed at 30°C	<i>C. neoformans</i>	(213)
PcDip5	Q6SKV7	L-Asp, L-Glu	<i>P. chrysogenum</i>	(180)
AgtA	B2M1L6	L-Asp, L-Glu	<i>A. nidulans</i>	(181)
PrnB	P18696	L-Pro	<i>A. nidulans</i>	(215)

2.3. Acidic YATs clade に分類された ChAap4 と ChAap5 の機能解析

2.3.1. 緒言

2.2 節では UJ1 株に 31 個の Aap ホモログを見いだした。基質特異性が既知の真菌 Aap との分子系統解析において、これら Aap ホモログのうち、ChAap4 と ChAap5 が Acidic YATs clade に分類されたことから、UJ1 株における D-Asp 細胞内輸送に関与する可能性が示唆された。本節では、ChAap4 と ChAap5 の詳細なアミノ酸配列情報と *ChAAP4* と *ChAAP5* 遺伝子破壊を通して両タンパク質のアミノ酸輸送特性と *ChDDO* 遺伝子誘導発現に与える影響を解析した。

2.3.2. ChAap4 と ChAap5 の一次構造と二次構造

ChAap4 と ChAap5 はそれぞれ 574 個と 540 個のアミノ酸残基からなり、*C. neoformans* で酸性アミノ酸の輸送に関わる CnAap4 に対して最も高いアミノ酸配列同一性を有しており、それぞれ 69.2%と 63.5%であった (Table 1-4)。また、ChAap4 は Acidic YATs である Dip5p と PcDip5, AgtA に対してそれぞれ 41.5%と 41.7%, 43.9%のアミノ酸配列同一性を、ChAap5 はそれぞれ 40.1%と 38.9%, 41.2%のアミノ酸同一性を示した。ChAap4 と ChAap5 は 12 個の TM 領域を持ち、N 末端と C 末端領域は細胞質に配向すると予測され、YAT の典型的なトポロジーと一致した (Fig. 1-4)。また、TM 領域の位置は、大腸菌のアミノ酸トランスポーター AdiC (Arg/Agmatine antiporter) における TM 領域の位置とほぼ一致していた (Fig. 1-4)。両 ChAap の TM1 と TM6 には、それぞれ GxG モチーフ (x は任意のアミノ酸) と (F/Y)(S/A/T)(F/Y)xGxE モチーフが見いだされた (Fig. 1-4)。これらモチーフは Aap に高度に保存されており、それぞれアミノ酸基質の α -カルボキシ基と α -アミノ基との相互作用に関与することが知られている (152, 153)。したがって、ChAap4 と ChAap5 は UJ1 株において Acidic Aap として機能することが示唆された。

2.3.3. *ChAAP4* 遺伝子と *ChAAP5* 遺伝子破壊株の作製

UJ1 株の有する *ChAap4* と *ChAap5* の D-Asp 細胞内取り込みによる *ChDDO* 遺伝子誘導発現への関与を明らかにするために、UJ1 株のウラシル要求性変異株 (*ura3*) である UM3 株を用いて、相同組換えに基づく遺伝子置換法により両遺伝子破壊株を作製した (Fig. 1-5). *ChAAP4* と *ChAAP5* 遺伝子の破壊は、破壊候補株に対し両遺伝子破壊カセットの領域内外にプライマーを設定した PCR により確認した (Fig. 1-5A, B). 解析の結果、破壊候補株のみに予想されるサイズの DNA 断片が増幅され、正常な *ChURA3* 遺伝子を含む破壊カセットがゲノム上の *ChAAP4* または *ChAAP5* の遺伝子座に挿入されていることが確認された。以上の結果から、*ChAAP4* と *ChAAP5* 遺伝子破壊株 (Δ *Chaap4* と Δ *Chaap5*) の作製が確認できた。

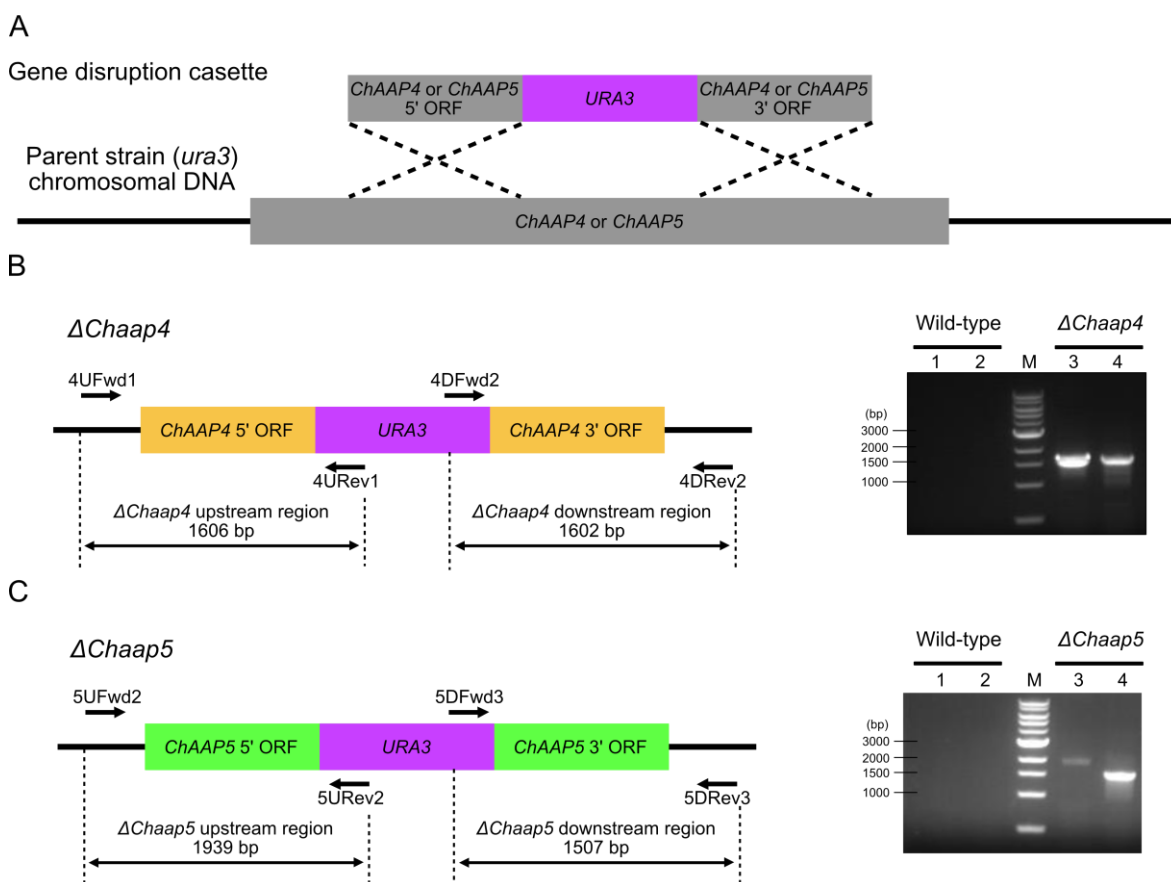


Fig. 1-5. Δ *Chaap4* 株と Δ *Chapp5* 株の作製

(A) *ChURA3* 遺伝子を用いた相同組換えによる *ChAAP4* と *ChAAP5* 遺伝子破壊の概略図。 *ChURA3* 遺伝子は *ChAAP4* と *ChAAP5* 遺伝子の転写方向に対して逆方向に挿入された。(B) Δ *Chaap4* 株の PCR 解析。(C) Δ *Chaap5* 株の PCR 解析。レーン 1 と 2 は野生株 (UJ1 株) における上流と下流領域を増幅したネガティブコントロール。レーン 3 と 4 は Δ *Chaap4* 株と Δ *Chaap5* 株における上流と下流領域を増幅した。

2.3.4. $\Delta Chaap4$ 株と $\Delta Chaap5$ 株の生育特性解析

ChAap4 と ChAap5 のアミノ酸輸送特性を明らかにするために、 $\Delta Chaap4$ 株と $\Delta Chaap5$ 株の pH 7.0 における種々のアミノ酸を窒素源とした培地での生育を野生株 (UJ1 株) と比較した (Table 1-6).

その結果、 $\Delta Chaap4$ 株と $\Delta Chaap5$ 株はグルコースを唯一の炭素源、 NH_4Cl を唯一の窒素源とする培地において野生株と同等の生育を示した。このことから、両 *ChAAP* 遺伝子の破壊は基本的な生育に影響を与えないことが分かった。一方、 $\Delta Chaap4$ 株は L-Leu と L-Thr, L-Cys, L-Asp, D-Asp, L-Glu, L-Phe, L-Trp において、 $\Delta Chaap5$ 株は L-Leu と L-Thr, L-Cys, L-Lys, L-Phe, L-Trp において有意な生育遅延を生じた。これらの結果から、ChAap4 が酸性アミノ酸と L-Leu, L-Thr, L-Cys, L-Phe, L-Trp の輸送に関与し、Acidic Aap として機能すると考えられた。一方、ChAap5 は L-Thr と L-Cys, L-Lys, L-Phe, L-Trp の輸送に関与し、Acidic Aap として機能していないと考えられた。

Table 1-6. 各種アミノ酸を窒素源とした培地における $\Delta Chaap4$ 株と $\Delta Chaap5$ 株の生育

Amino acid group	N source	$\Delta Chaap4$	$\Delta Chaap5$
	None	n.g.	n.g.
	NH ₄ Cl	n.s.	n.s.
Aliphatic	L-Ala	n.s.	n.s.
	Gly	n.s.	n.s.
	L-Ile	n.s.	n.s.
	L-Leu	77%*	72%*
	L-Val	n.s.	n.s.
Hydroxylated	L-Ser	n.s.	n.s.
	L-Thr	69%**	63%**
Sulphur	L-Cys	47%**	48%**
	L-Met	n.s.	n.s.
Acidic/Amide	L-Asp	36%***	n.s.
	D-Asp	67%**	n.s.
	L-Asn	n.s.	n.s.
	L-Glu	84%**	n.s.
	L-Gln	n.s.	n.s.
Basic	L-Arg	n.s.	n.s.
	L-Lys	n.s.	92%*
	L-His	n.s.	n.s.
Aromatic	L-Phe	60%*	79%*
	L-Trp	53%**	76%*
	L-Tyr	-	-
Imino	L-Pro	n.s.	n.s.

唯一の炭素源として 55.5 mM グルコース, 唯一の窒素源として 10 mM の各窒素源とした合成培地において, 初期 pH 7.0 として 30°C で培養した. 数値は野生株 (UJ1 株) の対数増殖中期にあたる生育値 (OD₆₀₀) を 100% とした相対値で示した. 測定値は Student の *t*-検定によって統計解析した. n.g.; No growth, n.s.; Non-significant differences, -; Not tested, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (n = 3).

Acidic Aap は非プロトン化形態の酸性アミノ酸とより強く結合し (182, 295, 296), 大腸菌の Aap であり Arg の細胞内輸送に関わる AdiC (Arg/arginine antiporter) や Glu 輸送に関わる GadC (Glu/ γ -aminobutyrate antiporter) の基質輸送は pH に依存することが知られている (297). そこで, Δ ChAap4 株と Δ ChAap5 株のアミノ酸生育時における培養液 pH の影響を調査した (Fig. 1-6).

その結果, 野生株 (UJ1 株) は試験されたすべての条件で生育可能であったが, 特にアミノ酸を窒素源とした培地において pH の上昇に伴って生育速度が低下した. このことは培養液 pH の上昇に伴って, 細胞のアミノ酸取り込み能力が低下したことを示唆している (Fig. 1-6). NH_4Cl を窒素源とした場合, 両遺伝子破壊株はいずれの培養液 pH においても UJ1 株と同様の生育を示した (Fig. 1-6A-C). しかし, Δ ChAap4 株は, pH 3.0 では L-Asp, D-Asp と L-Glu で野生株と同様の生育を示したが, L-Phe では生育が遅延した (Fig. 1-6D, G, J, M). pH 7.0 では, L-Phe に加え L-Asp と D-Asp で生育が遅延した (Fig. 1-6E, H, K, N). さらに, pH 10 では L-Asp と D-Asp で全く生育せず, L-Phe では pH 7.0 の時よりもさらに生育が遅延し, 加えて L-Glu での生育遅延が観察された (Fig. 1-6F, I, L, O). 一方, Δ ChAap5 株は, いずれの pH においても L-Phe においてのみ生育遅延が観察され, 他のアミノ酸では野生型とほぼ同様の生育が観察された (Fig. 1-6D-O). 以上の結果より, ChAap4 は Acidic Aap として機能し, 高アルカリ性 pH 条件下での L, D-Asp の生育に必須の役割を果たすと考えられた. 一方, ChAap5 は L-Phe の取り込みに関与すると考えられた.

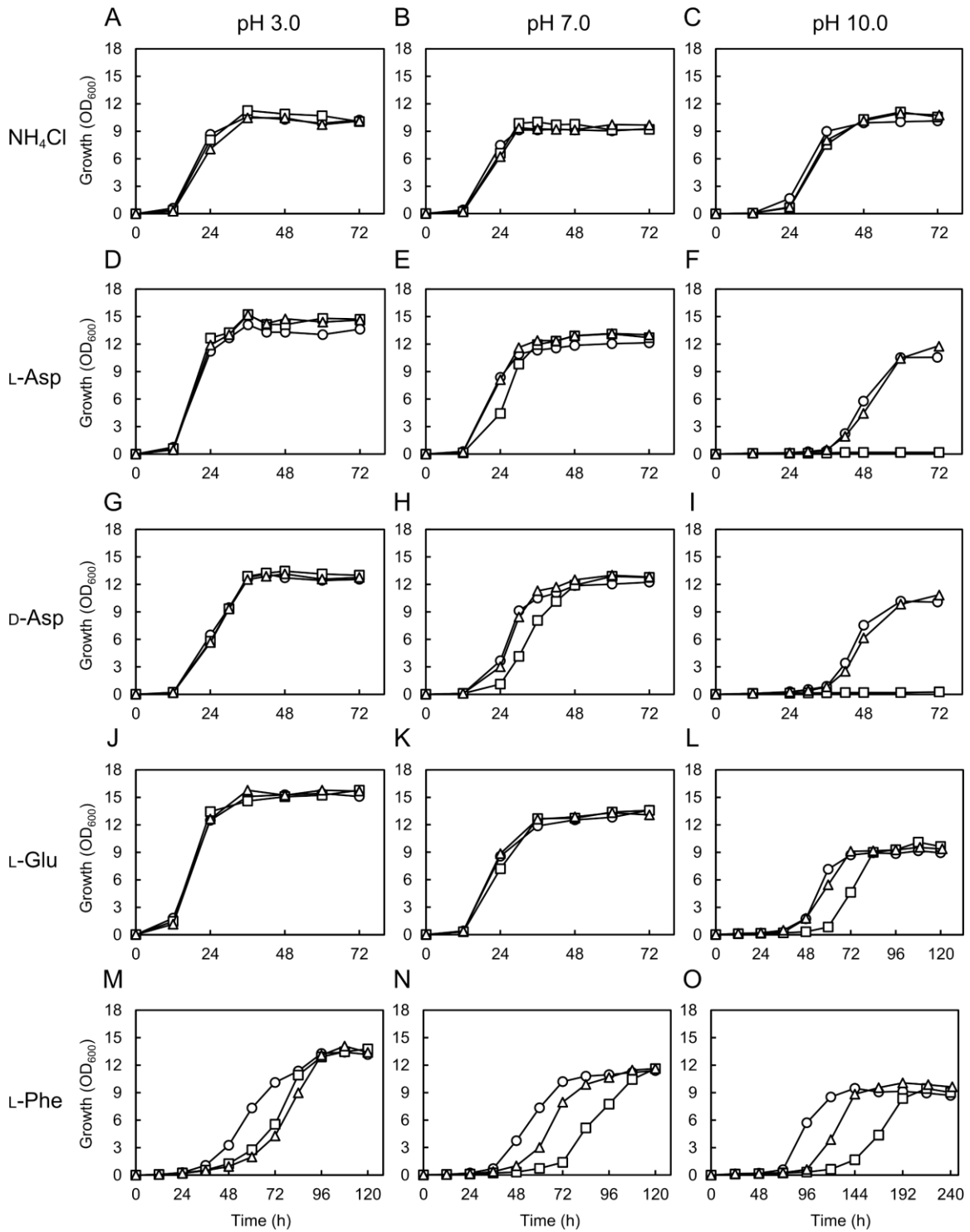


Fig. 1-6. Δ Chaap4 株と Δ Chaap5 株の各種アミノ酸における生育に及ぼす培養液 pH の影響

野生株 (UJ1 株) は○, Δ Chaap4 株は□, Δ Chaap5 株は△で示す. 唯一の炭素源として 55.5 mM グルコース, 10 mM NH_4Cl または各アミノ酸を唯一の窒素源とする培地を pH 3.0 (A, D, G, J, M), pH 7.0 (B, E, H, K, N) 及び pH 10.0 (C, F, I, L, O) に調整し, 30°C で培養した. 各株の生育 ($n = 3$) は培養液の OD_{600} を経時的に測定し平均値を示した.

2.3.5. $\Delta Chaap4$ 株と $\Delta Chaap5$ 株における *ChDDO* 遺伝子発現解析

ChAAP4 遺伝子の破壊は、pH 7.0 と 10 において、D-Asp での生育遅延または不能を引き起こした (Fig. 1-6)。そこで、ChAap4 と ChAap5 の機能と *ChDDO* 発現の関係性を明らかにするため、異なる pH 条件下で D-Asp を唯一の炭素源および窒素源とした培地で誘導した $\Delta Chaap4$ 株と $\Delta Chaap5$ 株の DDO 活性と *ChDDO* 転写を解析した (Fig. 1-7)。

解析の結果、野生株と同様に、 $\Delta Chaap4$ 株と $\Delta Chaap5$ 株における DDO 活性と *ChDDO* 転写は、D-Asp の存在下でのみ誘導され、L-Asp やそれらの非存在下では誘導されなかった。さらに、野生株の DDO 活性と *ChDDO* 転写の誘導レベルは pH の上昇に伴って低下し、D-Asp における生育解析の結果と一致した。また、 $\Delta Chaap5$ 株の DDO 活性と *ChDDO* 転写の誘導レベルはいずれの pH においても、野生型と同等であった。一方、 $\Delta Chaap4$ 株の DDO 活性と *ChDDO* 転写の誘導レベルは、全ての pH において野生型よりも低く、pH 10 では DDO 活性は検出されなかった。これらの結果から、ChAap4 による D-Asp の取り込みが、D-Asp 依存的な *ChDDO* 誘導発現に関与すること、高アルカリ性 pH 条件下における *ChDDO* 遺伝子の発現において ChAap4 による D-Asp の取り込みが重要な役割を担っていると考えられた。

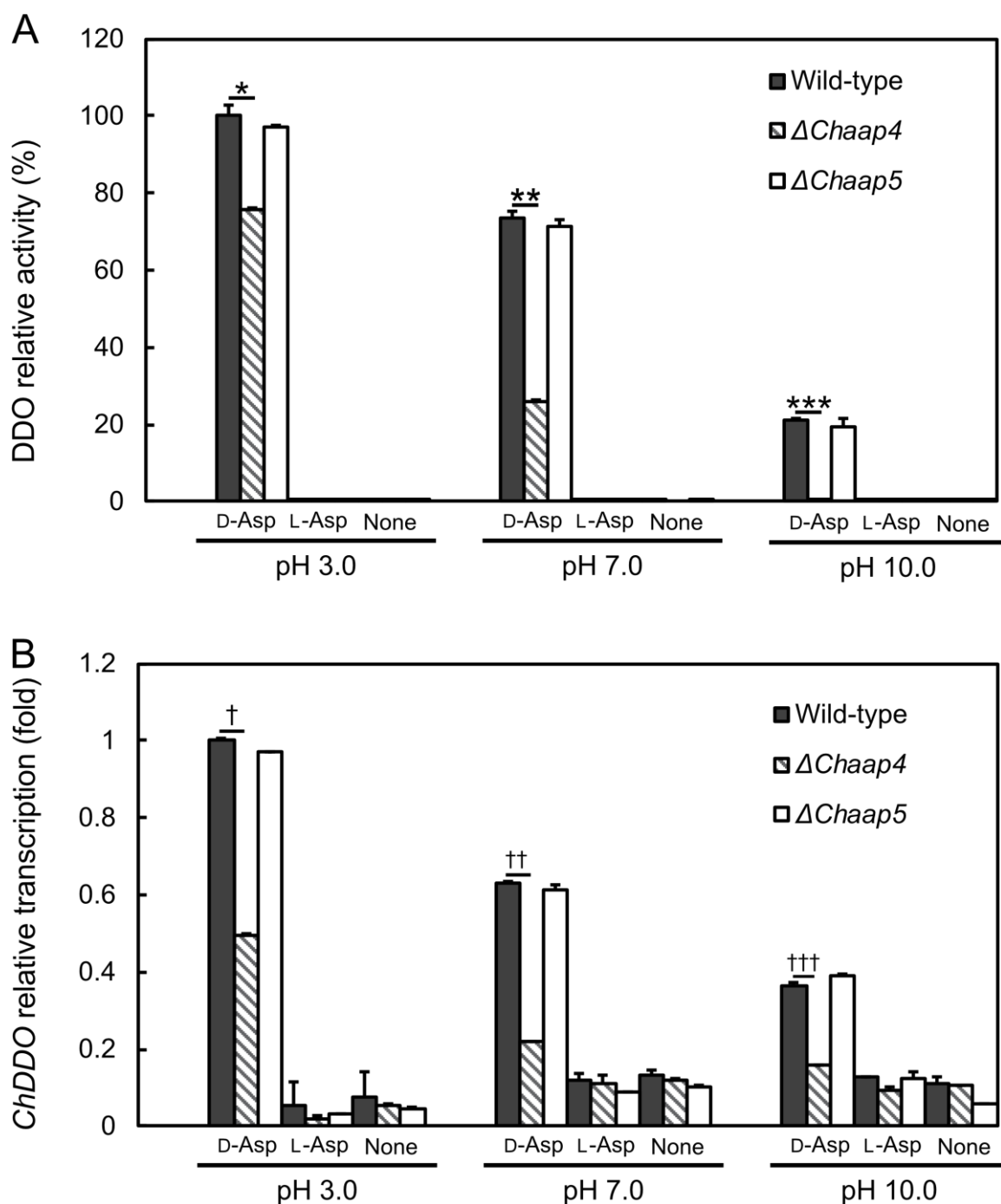


Fig. 1-7. $\Delta Chaap4$ 株と $\Delta Chaap5$ 株における *ChDDO* 遺伝子誘導発現に及ぼす培養液 pH の影響

(A) 60 mM D-Asp または L-Asp を唯一の炭素源・窒素源として含む培地, または含まない培地 (None) で誘導した細胞の粗抽出液の DDO 活性. 酵素活性は pH 3.0 における野生株の酵素活性に対する相対値で示した. 測定値は Student の *t*-検定によって統計解析した. * $p < 5 \times 10^{-4}$, ** $p < 5 \times 10^{-6}$, *** $p < 1 \times 10^{-6}$. (B) *ChDDO* 遺伝子の転写レベル. (A) と同様の条件で培養した細胞の total RNA を用いて qRT-PCR によって *ChDDO* 遺伝子の転写レベルを解析した. 正規化遺伝子として *ChTAF10* 遺伝子を使用して, pH 3.0 における野生株の転写レベルに対する相対値で示した. 測定値は Welch の *t*-検定によって統計解析された. † $p < 5 \times 10^{-4}$, †† $p < 5 \times 10^{-7}$, ††† $p < 1 \times 10^{-7}$. 数値は 3 回の独立した実験の平均値であり, エラーバーは標準偏差を示す.

2.4. General YATs clade に分類された ChGap1-4 と ChAap1 の機能解析

2.4.1. 緒言

2.3 節では, ChAap4 が L,D-Asp の細胞内輸送に関与することを明らかにした. さらに ChAap4 は高アルカリ性 pH において L,D-Asp を輸送する唯一の Aap であることが示された. 一方, 酸性と中性 pH では, その他の Aap が ChAap4 とともに L,D-Asp 輸送を担うことが示唆された. 本節では, 酸性と中性 pH において L,D-Asp を輸送する Aap の同定を目的とした. 2.2 節において, UJ1 株において, L-Asp を含む幅広いアミノ酸を輸送する酵母 *S. cerevisiae* Gap1 に近縁な Aap として ChGap1,2,3,4 が, 酵母 *C. neoformans* で L-Asp 輸送に関与する CnAap1 と CnAap2 に近縁な Aap として ChAap1 が見いだされた. したがって, これら 5 個の Aap ホモログが, 酸性と中性 pH において, UJ1 株における L,D-Asp の細胞内輸送を担う可能性が高いと考えた. 本節では, これら 5 個の Aap ホモログの詳細なアミノ酸配列情報と *AAP* 遺伝子破壊を通して, 各タンパク質のアミノ酸輸送特性と *ChDDO* 遺伝子誘導発現に与える影響について解析した.

2.4.2. ChGap1-4 と ChAap1 の一次構造と二次構造

ChGap1-4 はそれぞれ 595 個と 594 個, 608 個, 596 個のアミノ酸残基からなり, 分子系統解析において全て General YATs clade に系統分類された (Fig. 1-3). ChGap1-4 は, 特に *S. cerevisiae* の幅広い基質特異性を有する Gap1 と L-His を輸送する Hip1 に対して 37.9-42.1% の高いアミノ酸配列同一性を示した (Table 1-7). ChAap1 は 573 個のアミノ酸残基からなり, *C. neoformans* において L-Asp 輸送に関与する CnAap1 と CnAap2 に対してそれぞれ 66.3 と 68.0% の高いアミノ酸配列同一性を示した (Table 1-7). これら 5 つの Aap ホモログには 12 個の TM 領域の存在が予測され, その位置は大腸菌 Arg トランスポーター AdiC の TM 領域の位置とほぼ一致した (Fig. 1-8). さらに, TM1 と TM6 には YAT タンパク質に広く保存され, アミノ酸輸送に重要な役割を果たす GxG (x は任意のアミノ酸) と (F/Y)(S/A/T)(F/Y)xGxE モチーフが見いだされた (Fig. 1-8) (152, 153). したがって, ChGap1-4 と ChAap1 が, 酸性や中性 pH において L,D-Asp を輸送する Aap として機能することが示唆された.

Table 1-7. ChGap1-4 と ChAap1 のアミノ酸配列情報

	ChGap1	ChGap2	ChGap3	ChGap4	ChAap1
Amino acid residues (number)	595	594	608	596	573
Amino acid identity (%)					
vs. Gap1	37.9	41.3	40.5	42.1	35.5
vs. Hip1	39.4	39.1	38.3	39.1	34.4
vs. CnAap1	32.9	34.8	33.9	32.9	66.3
vs. CnAap2	32.6	35.3	33.9	33.4	68.0

アミノ酸配列同一性は Needleman-Wunsch アルゴリズムによるグローバルアライメントを用いて算出した.

2.4.3. *ChGAP1-4* 遺伝子と *ChAAP1* 遺伝子破壊株の作製

D-Asp による *ChDDO* 遺伝子誘導発現への *ChGap1-4* と *ChAap1* の関与を明らかにするために、相同組換えに基づく遺伝子置換法により、UJ1 株のウラシル要求性変異株である UM3 株を用いて、それぞれの遺伝子破壊株を作製した (Fig. 1-9). 各遺伝子の破壊は、遺伝子破壊候補株に対し、それぞれの遺伝子破壊カセットの領域内外にプライマーを設定した PCR によって確認した (Fig. 1-9B-F). 解析の結果、破壊候補株のみに予想されるサイズの DNA 断片が増幅され、破壊カセットがそれぞれの *AAP* 遺伝子座に挿入されていることを確認した. 以上の結果から、*ChGAP1-4* と *ChAAP1* 遺伝子破壊株 ($\Delta Chgap1-4$ と $\Delta Chaap1$ 株) の作製が確認できた.

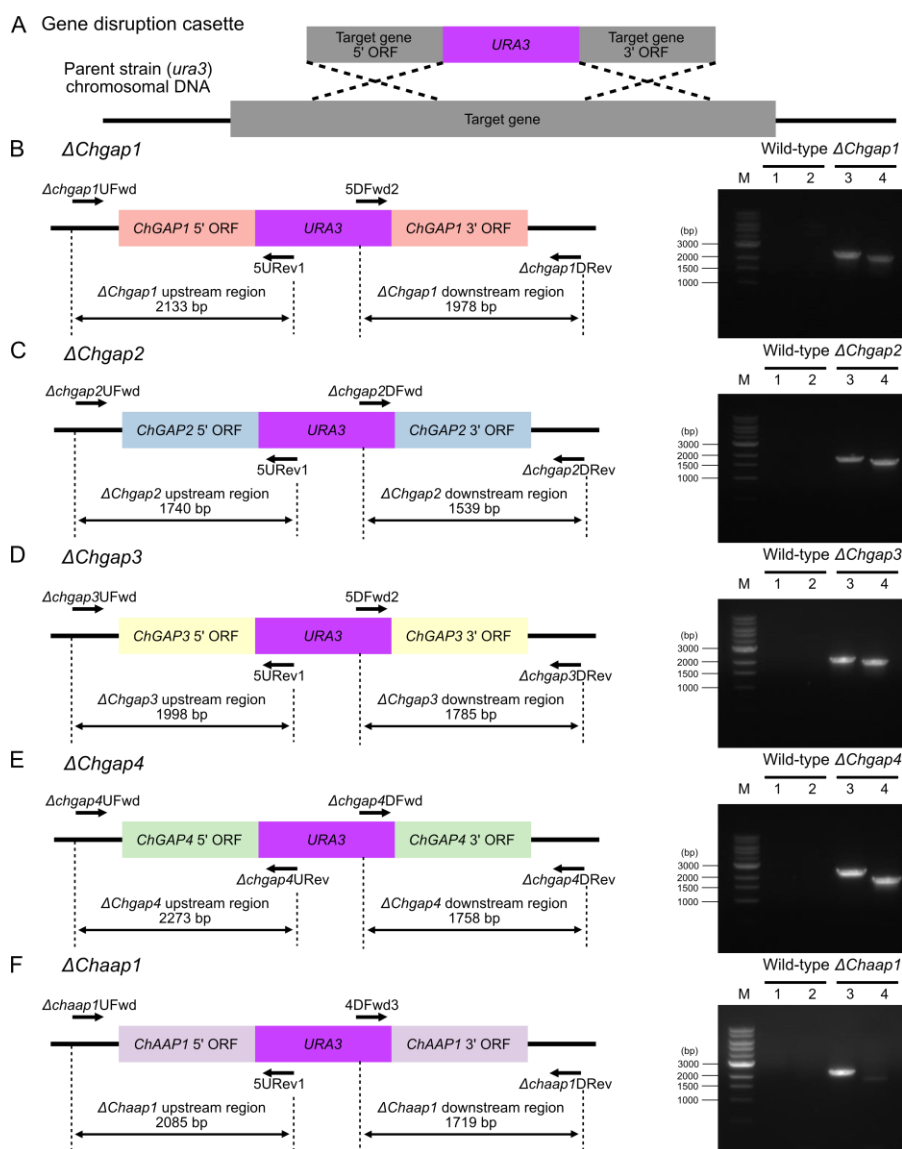


Fig. 1-9. $\Delta Chgap1-4$ 株と $\Delta Chaap1$ 株の作製

(A) *ChURA3* 遺伝子を用いた相同組換えによるゲノム上の *ChGAP1-4* と *ChAAP1* 遺伝子破壊の概略図. *ChURA3* 遺伝子はゲノム上の各 *AAP* 遺伝子の転写方向に対して逆方向に挿入された. (B) $\Delta Chgap1$ 株の PCR 解析. (C) $\Delta Chgap2$ 株の PCR 解析. (D) $\Delta Chgap3$ 株の PCR 解析. (E) $\Delta Chgap4$ 株の PCR 解析. (F) $\Delta Chaap1$ 株の PCR 解析. レーン 1 と 2 は野生株 (UJ1 株) における上流と下流領域を増幅したネガティブコントロール. レーン 3 と 4 は $\Delta Chgap1-4$ 株と $\Delta Chaap1$ 株における上流と下流領域を増幅した.

2.4.4. $\Delta Chgap1-4$ 株と $\Delta Chaap1$ 株の生育特性解析

ChGap1-4 と ChAap1 のアミノ酸輸送特性を明らかにするために、 $\Delta Chgap1-4$ 株と $\Delta Chaap1$ 株の pH 7.0 における種々のアミノ酸を窒素源とした培地での生育を野生株 (UJ1 株) と比較した (Table 1-8).

その結果、 $\Delta Chgap1-4$ 株と $\Delta Chaap1$ 株は NH_4Cl を唯一の窒素源とする培地において野生株と同等の生育を示した。しかし、 $\Delta Chgap1$ 株は L-Ser と L-Asn, D-Asp, L-Cys, L-Phe, L-Trp, $\Delta Chgap2$ 株は L-Ser と L-Asn, L-Cys, L-Phe, L-Trp, $\Delta Chgap3$ 株は L-Ser と L-Asn, L-Phe, L-Trp, $\Delta Chgap4$ 株は L-Ser と L-Asn, D-Asp, L-Glu, L-Cys, L-Phe, L-Trp, $\Delta Chaap1$ 株は L-Ser と L-Asn, L-Glu, L-Phe, L-Trp において有意な生育遅延が生じた。これらの結果から、各 Aap がこれら生育遅延の観察されたアミノ酸の輸送に関与することが示唆された。

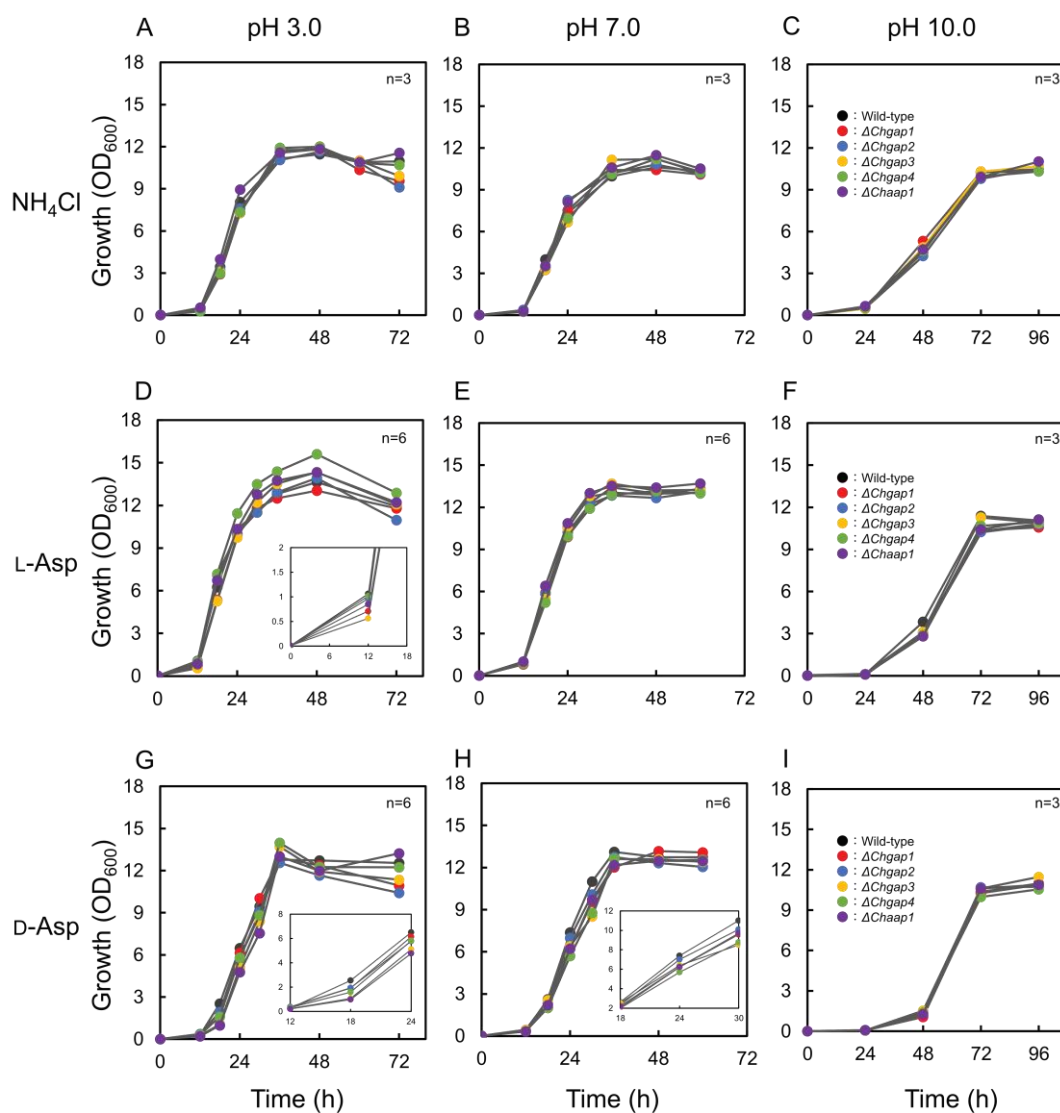
Table 1-8. 各種アミノ酸を窒素源とした培地における $\Delta Chgap1-4$ 株と $\Delta Chaap1$ 株の生育

Amino acid group	N source	$\Delta Chgap1$	$\Delta Chgap2$	$\Delta Chgap3$	$\Delta Chgap4$	$\Delta Chaap1$
	None	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
	NH ₄ Cl	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Aliphatic	L-Ala	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Gly	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	L-Ile	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	L-Leu	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	L-Val	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Hydroxylated	L-Ser	75%*	67%**	79%**	80%*
L-Thr		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Sulphur	L-Cys	66%**	80%*	n.s.	82%*	n.s.
	L-Met	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Acidic/Amide	L-Asp	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	D-Asp	84%***	n.s.	n.s.	77%*	n.s.
	L-Asn	29%***	32%***	37%***	40%**	40%**
	L-Glu	n.s.	n.s.	n.s.	71%**	76%*
Basic	L-Gln	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	L-Arg	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	L-Lys	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Aromatic	L-His	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	L-Phe	35%**	25%***	35%***	24%***	26%***
	L-Trp	41%*	32%**	38%*	30%*	38%**
Imino	L-Tyr	-	-			
	L-Pro	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

唯一の炭素源として 55.5 mM グルコース, 唯一の窒素源として 10 mM の各窒素源とする合成培地において, 初期を pH 7.0 とし 30°C で培養した. 数値は野生株 (UJ1 株) の対数増殖中期にあたる生育値 (OD₆₀₀) を 100% とした相対値で示した. 測定値は Student の *t*-検定によって統計解析した. n.g.; No growth, n.s.; Non-significant differences, -; Not tested, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (n = 3–6).

酵母 *S. cerevisiae* Gap1 の L-Asp 細胞内輸送における V_{\max} 値は pH が 3.0 から 7.0 に上昇すると約 1/2 に低下し、 K_m 値は約 48 倍に増加することが報告されている (298). また、糸状菌 *P. chrysogenum* において多様なアミノ酸の細胞内輸送を担う General amino acid transport system はアニオン形態の L-Glu よりも非荷電形態の L-Glu を優先的に輸送することが報告されている (295). このことは、酸性アミノ酸の荷電状態が Aap の輸送特性に影響を及ぼすことを示唆しており、ChGap1-4 と ChAap1 の Asp 輸送能力が酸性 pH で高く、アルカリ性 pH で低い可能性が考えられた. そこで、L, D-Asp における Δ Chgap1-4 株と Δ Chaap1 株の生育に対する、pH の影響を調査した (Fig. 1-10).

Δ Chgap1-4 株と Δ Chaap1 株は、グルコースを炭素源、 NH_4Cl を窒素源とした培地における全ての pH 条件において、野生株 (UJ1 株) と同様の生育を示した (Fig. 1-10A-C). 一方、L-Asp を窒素源とした場合、pH 7.0 と 10.0 では全ての破壊株が野生株と同様の生育を示したが、pH 3.0 では Δ Chgap1 株と Δ Chgap3 株、 Δ Chaap1 株が対数増殖期初期において、わずかではあるが有意な生育遅延を示した (Fig. 1-10D-E). D-Asp を窒素源とした場合、pH 10.0 では全ての遺伝子破壊株が野生株と同様の生育を示したが、pH 7.0 では Δ Chgap1 株と Δ Chgap4 株の 2 株が対数増殖期中期において、わずかではあるが有意な生育遅延を示した (Fig. 1-10H). また、pH 3.0 では、全ての遺伝子破壊株が対数増殖期初期から中期にかけて有意な生育遅延を示した (Fig. 1-10G). 特に、 Δ Chgap3 株と Δ Chaap1 株の生育遅延が大きかった. 以上の結果から、ChGap1-4 と ChAap1 は L, D-Asp 輸送能力を有し、酸性と中性 pH 条件下での L, D-Asp における生育に寄与する可能性が示唆された.



N source	pH	$\Delta Chgap1$	$\Delta Chgap2$	$\Delta Chgap3$	$\Delta Chgap4$	$\Delta Chaap1$
NH ₄ Cl	3.0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	7.0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	10.0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
L-Asp	3.0	66%***	n.s.	53%***	n.s.	80%**
	7.0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	10.0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
D-Asp	3.0	76%**	76%**	42%***	63%***	39%***
	7.0	84%***	n.s.	n.s.	77%*	n.s.
	10.0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Fig. 1-10. $\Delta Chgap1-4$ 株と $\Delta Chaap1$ 株の L, D-Asp における生育に及ぼす培養液 pH の影響

唯一の炭素源として 55.5 mM グルコース, 10 mM NH₄Cl または各アミノ酸を唯一の窒素源とする培地を pH 3.0 (A, D, G), pH 7.0 (B, E, H), pH 10.0 (C, F, I) に調整し, 30°C で培養した. 各株の生育 (n = 3–6) は培養液の OD₆₀₀ を経時的に測定し平均値を示した. 表の数値は同グラフにおける野生株 (UJ1 株) の対数増殖初期または中期にあたる生育値 (OD₆₀₀) を 100% とした相対値で示した. 測定値は Student の *t*-検定によって統計解析した. n.s.; Non-significant differences, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2.4.5. $\Delta Chgap1-4$ 株と $\Delta Chaap1$ 株における *ChDDO* 遺伝子発現解析

$\Delta Chgap1-4$ 株と $\Delta Chaap1$ 株は pH 3.0 と 7.0 の D-Asp 上でわずかではあるが、有意に生育が遅延した (Fig. 1-10). 次に ChGap1-4 と ChAap1 の機能と *ChDDO* 発現の関係性を明らかにするため、異なる pH 条件下で D-Asp を唯一の炭素源および窒素源とした培地で誘導した $\Delta Chgap1-4$ 株と $\Delta Chaap1$ 株細胞の DDO 活性と *ChDDO* 転写を解析した (Fig. 1-11).

解析の結果、D-Asp における生育解析の結果と一致し、野生株の DDO 活性と *ChDDO* 転写の誘導レベルは pH の上昇に伴って低下した。さらに、 $\Delta Chgap1-4$ 株と $\Delta Chaap1$ 株の DDO 活性と *ChDDO* 転写の誘導レベルは、pH 3.0 において野生株の約 4 割にまで著しく低下したが、pH の上昇に伴って誘導レベルが野生株と同等レベルにまで回復する傾向が観察された。この結果は、 $\Delta Chgap1-4$ 株と $\Delta Chaap1$ 株の D-Asp 上での生育解析の結果と概ね一致しており、ChGap1-4 と ChAap1 が主に低 pH 条件下で D-Asp 輸送を担う Aap であり、*ChDDO* 遺伝子の誘導発現に関与することを示している。

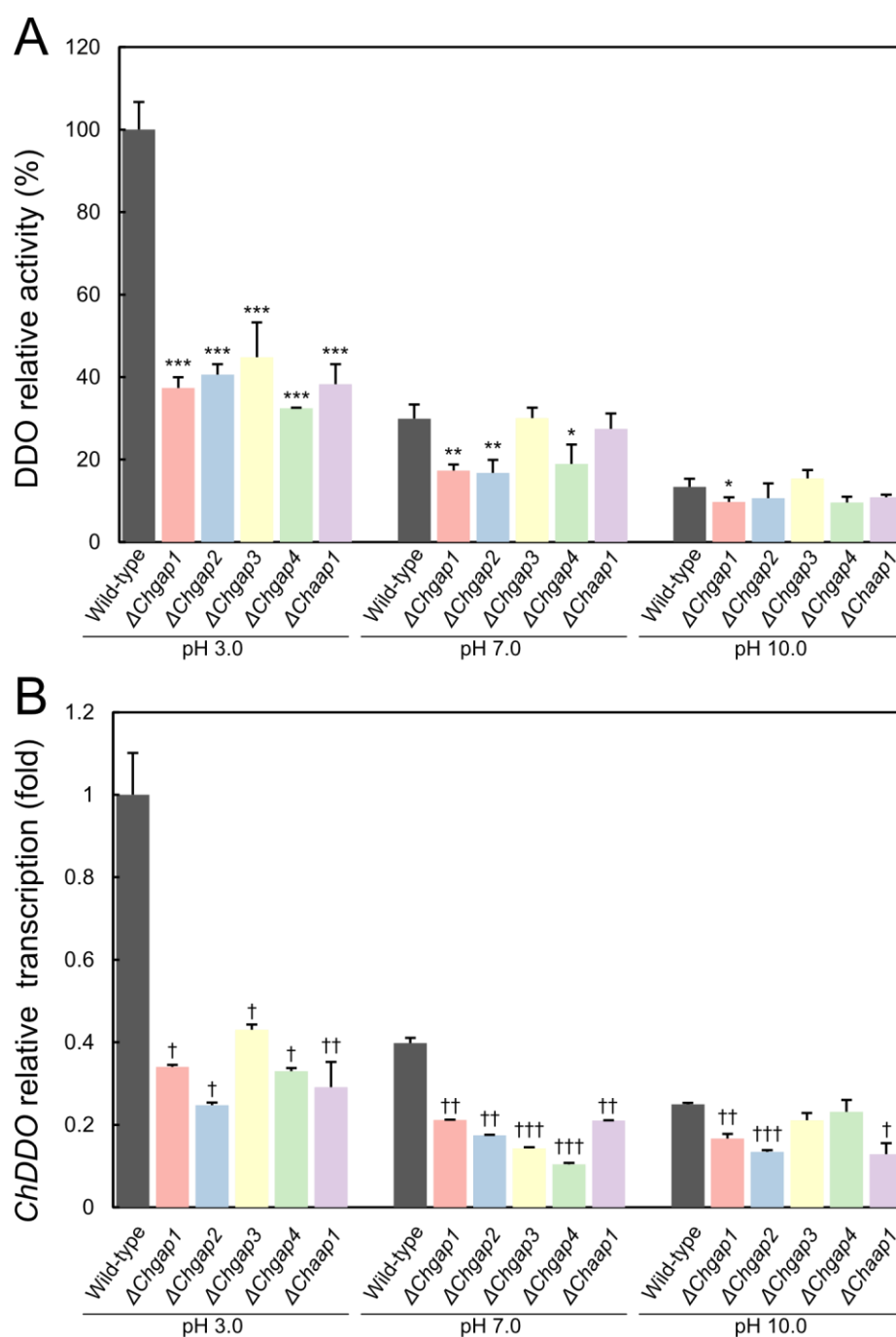


Fig. 1-11. $\Delta Chgap1-4$ 株と $\Delta Chaap1$ 株の *ChDDO* 遺伝子の発現誘導に及ぼす培養液 pH の影響

(A) 60 mM D-Asp を唯一の炭素源・窒素源として含む培地で誘導した細胞の粗抽出液の DDO 活性。酵素活性は pH 3.0 における野生株 (UJ1 株) の酵素活性に対する相対値で示した。測定値は Student の *t*-検定によって、それぞれの pH における野生株の数値に対して統計解析した。* $p < 5 \times 10^{-2}$, ** $p < 1 \times 10^{-2}$, *** $p < 5 \times 10^{-4}$ 。(B) *ChDDO* 遺伝子の転写レベル。(A) と同様の条件で培養した細胞の total RNA を用いて qRT-PCR によって *ChDDO* 遺伝子の転写レベルを解析した。正規化遺伝子として *ChTAF10* 遺伝子を使用して、pH 3.0 における野生株の転写レベルに対する相対値で示した。測定値は Welch の *t*-検定によって、それぞれの pH における野生株の数値に対して統計解析した。† $p < 5 \times 10^{-2}$, †† $p < 5 \times 10^{-3}$, ††† $p < 1 \times 10^{-4}$ 。数値は 3 回の独立した実験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

3. 考察

C. humicola UJ1 株のドラフトゲノム解析と D-アミノ酸代謝酵素遺伝子の探索

真菌において D-アミノ酸資化や毒性低減に関わる酵素として、DDO や DAO, D-Ser デヒドラーゼ (DSD), D-アミノ酸-N-アセチルトランスフェラーゼ (DNT), D-Tyr-tRNA^{Tyr} デアシラーゼ (DTD), Ala ラセマーゼ, Ser ラセマーゼが報告されている (299, 300). これらのうち, UJ1 株には *ChDDO* の他に 3 つの *DAO* と 1 つの *DSD* と *DNT*, *DTD* ホモログ遺伝子が見いだされた.

酵母 *S. cerevisiae* には *DDO* と *DAO* ホモログ遺伝子は存在せず, 酵母 *Schizosaccharomyces pombe* には 1 つの *DAO* ホモログ遺伝子のみが見いだされている (301). 一方, *T. dupontii* や *Rasamsonia emersonii* を含むいくつかの好熱性真菌のゲノム配列には *DDO* と *DAO* ホモログ遺伝子がそれぞれ 1 つずつ見いだされている (302). また, 多くの哺乳類においても両ホモログ遺伝子が 1 つずつ存在する (58). 一方, *C. humicola* に近縁の酵母 *C. neoformans* と *C. gattii* には 1 つの *DDO* と 2 つの *DAO* ホモログ遺伝子が見いだされている (303). 本研究では, *C. humicola* UJ1 株と CBS 4282 株, JCM 1457 株には他の真核生物と比べて多い 1 つの *DDO* と 3 つの *DAO* ホモログ遺伝子を有していることが分かった. *C. humicola* に見いだされた *DDO* と多数の *DAO* ホモログの系統的關係を明らかにするために, 他の真菌の *DDO* と *DAO* のアミノ酸配列を用いて系統解析した (Fig. 1-12). *ChDAO1, 2* は *CgDAO1, 2* および *CnDAO1, 2* と clade を形成し, *ReDDO* や *TdDDO* と近縁であったことから, *C. humicola* では真菌 *DDO* から分岐して *ChDAO1* を獲得し, さらに *ChDAO1* から分岐して *ChDAO2* を獲得したことが示唆された. 一方, *ChDAO3* は *ChDAO1, 2* とは独立して *SpDAO* と近縁であった. また, *ChDDO* は *CgDDO* および *CnDDO* と clade を形成し *TvDAO* や *TdDAO* と近縁であった. したがって, *C. humicola* では真菌 *DAO* から分岐して新たに *ChDAO3* を獲得し, さらに *ChDAO3* から分岐して *ChDDO* を獲得したことが示唆された.

真菌において, *DDO* や *DAO* は, D-アミノ酸の生育への利用や毒性の低減を担っている (73, 113, 304). *C. gattii* の主要な生態学的生息場所は植物であり, いくつかの D-アミノ酸種が高等植物に存在することから, それら D-アミノ酸を生育に利用していると考えられている (305, 306). また, *C. neoformans* と *C. gattii* は哺乳動物に感染し, *Cryptococcus* 症と呼ばれる日和見感染症を引き起こす代表的な種であり, *C. humicola* による感染もいくつか報告されている (306-308). 哺乳動物にも多様な D-アミノ酸が存在することから, これら病原性真菌の D-アミノ酸の利用能は病理学的に非常に重要であると考えられている (303). *C. neoformans* H99 株と *C. gattii* R265 株に存在する 1 つの *DDO* と 2 つの *DAO* はそれぞれが異なる基質特異性を有し, 多様な D-アミノ酸での生育や病原性に関与することが示唆されている (303). 現在, UJ1 株を含む *C. humicola* がどのような D-アミノ酸を生育に利用できるかは不明であるが, *C. humicola* の *DDO* と多数の *DAO* ホモログの存在は, 多様な D-アミノ酸での効率的な生育を可能にしているかもしれない.

DSD は D-Ser の分解代謝に，DNT は D-アミノ酸の α -アミノ基にアセチル基を付加して D-アミノ酸の毒性を不活化する役割を担っている (95, 96). DTD は，D-アミノ酸が誤って結合した tRNA から D-アミノ酸を除去することで，D-アミノ酸の毒性低減に寄与すると考えられている (72). したがって，UJ1 株においてもこれら酵素が D-アミノ酸の毒性低減に関与していると考えられる．酵母 *S. pombe* において Ala ラセマーゼは DAO とともに D-Ala の資化利用に関与している (137). 一方，UJ1 株において Ala ラセマーゼなどの D-アミノ酸の合成に関わる酵素は見いだされなかった．このことから，ChDDO を含むこれら D-アミノ酸代謝酵素は，外因性の D-アミノ酸代謝に関与すると考えられた．

C. humicola UJ1 株における Aap ホモログの推定

各々の真菌において YAT family に属する Aap の個数は種によって多様である。最も詳細に解析されている酵母 *S. cerevisiae* には 24 個の Aap が存在する (309)。一方, Fernandes らによれば, 子囊菌門に属する *Neurospora crassa* と *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans* にはそれぞれ 17 個と 38 個, 31 個の Aap ホモログが, 担子菌門に属する *C. neoformans* と *Ustilago maydis*, *Coprinopsis cinerea* にはそれぞれ 10 個と 9 個, 8 個の Aap ホモログの存在が報告されており, 担子菌門に属する真菌に見いだされる Aap の個数の方が少ない (294)。*C. humicola* UJ1 株は担子菌門に属するが, 他の担子菌に見いだされる Aap の個数よりも非常に数が多い, 31 個の Aap ホモログが見いだされた (Table 1-4)。また, CnAap1-8 のアミノ酸配列を用いて, CBS 4282 株と JCM 1457 株のゲノム配列に対して, BLASTP 検索したところ CBS 4282 株には 20 個, JCM 1457 株には 30 個の Aap ホモログが見いだされた ($e\text{-value} \leq 1.0 \times 10^{-50}$)。したがって, *C. humicola* は担子菌門の中で特に多くの Aap ホモログを有していることがわかった。

Aap の個数の違いは, 生育におけるアミノ酸の利用の違いをもたらす可能性がある。例えば, *C. neoformans* は L-Ala や L-Cys, L-Thr, L-His を単一窒素源として利用することができず, L-Val や L-Leu, L-Ile, L-Met は単一窒素源として有効に利用できない (214)。この理由として, *C. neoformans* ゲノム上にコードされた Aap の数が少なく, これらアミノ酸の取り込み量が低いことに起因すると考えられている (214, 294, 310)。一方, *C. humicola* UJ1 株は, 窒素源として用いた全てのアミノ酸において NH_4Cl と同等の生育が可能であったことから, UJ1 株に存在する多くの Aap は幅広いアミノ酸上での生育に寄与している可能性がある。

基質特異性と系統分類

性質が類似したアミノ酸を輸送する Aap は分子系統樹において同一の clade に系統分類されることが知られている (311). 例えば, 子囊菌酵母 *S. cerevisiae*, *P. chrysogenum*, *A. nidulans* において酸性アミノ酸の輸送を担う Aap はそれぞれ1つ見いだされており (Dip5, PcDip5, AgtA) Acidic YATs clade に分類される (Fig. 1-3). 担子菌酵母 *C. humicola* UJ1 株では ChAap4 と ChAap5, *C. neoformans* では CnAap4 と CnAap5 の 2 つの Aap が Acidic YATs clade に系統分類された (Fig. 1-3). 至適生育温度において, *C. neoformans* の CnAap4 は L-Asp を含む幅広いアミノ酸の輸送に関与するが, CnAap5 は Acidic YATs clade に分類されるにもかかわらず酸性アミノ酸の輸送に関与せず, Gly や L-Ile, L-Pro の輸送に関与することが報告されている (214). 本研究においても, UJ1 株の Acidic YATs clade に属する 2 つの Aap のうち ChAap4 のみが酸性アミノ酸の輸送に関与し, ChAap5 は主に L-Cys や L-Thr の輸送に関与することが示された (Table 1-6). YAT ファミリーに属する Aap は分子系統解析によって, 各々の Aap の基質特異性が推定できるが, 例外も報告されている. 例えば, *S. cerevisiae* の Hip1 や Tat2 は, それぞれ His と Trp 特異的な Aap であるが, 分子系統解析では Gap1 と同じ広基質特異性 Aap に分類される (159). このような分子系統分類と Aap の基質特異性の相違は, アミノ酸輸送能の欠損 (あるいは不足) を補うための進化に起因すると考えられている (159). ChAap4 と ChAap5 はアミノ酸配列の同一性が高く, 遺伝子のエキソン-イントロン構造が同一であったことから (Fig. 1-13), これら遺伝子が遺伝子重複によって生成されたことが示唆された (312, 313). したがって, ChAap5 は ChAap4 から分岐進化した結果, 酸性アミノ酸の輸送能力を失い, 逆に L-Cys や L-Thr の輸送能力を獲得したと考えられる.

至適生育温度において *C. neoformans* の CnAap1 は L-Met と L-Pro を輸送し, CnAap2 は L-Ile と L-Arg, L-Lys の輸送に関与する (213, 214). さらに, *CnAAP1* と *CnAAP2* の二重遺伝子破壊株は酸性アミノ酸を含む幅広いアミノ酸上で生育遅延を生じることから, CnAap1 と CnAap2 は基質特異性が広く重複していることが示唆されている. 一方, UJ1 株からは ChAap1 のみが CnAap1,2 と clade を形成した (Fig. 1-3). ChAap1 は主に酸性アミノ酸と芳香族アミノ酸の輸送に関与しており, CnAap1,2 よりも基質特異性が狭いことが示唆された (Table 1-8). CnAap1,2 が幅広い基質特異性を有することは, 存在する Aap の個数が関係している可能性がある. *C. neoformans* で基質特異性の広い複数の Aap (CnAap1, 2) を有することで, 多様なアミノ酸輸送に少数の Aap で対応していると考えられる.

一方, *ChAAP1* 遺伝子のエキソン-イントロン構造は *ChAAP4,5* 遺伝子と同一であったことから, *ChAAP1, 4, 5* 遺伝子が遺伝子重複によって生成されたことが示唆された (Fig. 1-13). さらに, ChAap1 は系統的に ChAap4,5 と近縁であり (Fig. 1-3), ChAap1 と ChAap4,5 の基質特異性は酸性アミノ酸や芳香族アミノ酸を輸送する点で共通していたが, ChAap1 は L-Ser と L-Asn の輸送にも関与することが示唆された (Table 1-6, Table 1-8). したがって, ChAap1 は ChAap4, 5 から分岐し, 酸性および芳香族アミノ酸の輸送能力を保持したまま, L-Ser と L-Asn の輸送能力を獲得することで基質特異性を拡張したと考えられる.

UJ1 株の Aap ホモログのうち, ChGap1-4 の 4 つの Aap が General YATs clade に系統分類され, いずれの Aap も酸性アミノ酸輸送に関与することが示唆された (Fig. 1-3, Fig. 1-10, Table 1-6, Table 1-8). また, *ChGAP1-4* 遺伝子破壊株のアミノ酸上での生育挙動は非常に類似していることから, これら Aap の基質特異性は類似していると考えられる. *S. cerevisiae* の Gap1 がほとんどのアミノ酸を輸送することができるのに対して, ChGap1-4 の輸送アミノ酸基質は狭いことが示唆された. この理由として, Aap の輸送基質を単一遺伝子破壊株の生育によって間接的に観察しているため, 実際にはアミノ酸を取り込んでいるが生育能に影響を与えなかった可能性が考えられる. *S. cerevisiae* DIP5 遺伝子破壊株の酸性アミノ酸での生育は Gap1 の取り込みによって相補される (178). また, *C. neoformans* の *ChAAP1*, 2 遺伝子二重破壊株および *CnAAP4*, 5 遺伝子二重破壊株はそれぞれの単一遺伝子破壊株よりも広範なアミノ酸において生育遅延を生じる (213, 214). したがって, ChGap1-4 は互いにアミノ酸輸送機能を相補しあっている可能性がある. 各 Aap の機能を詳細に明らかにするためには, *AAP* 遺伝子の多重破壊株の解析やアミノ酸輸送の直接的な測定が必要である.

S. cerevisiae の Aap のうち Gap1 や Agp1, Gnp1 などの広基質特異性を有する Aap が General YATs clade に含まれるが, Hip1 や Tat2 のように基質特異性が狭い Aap も含まれる (Fig. 1-3). Gournas らは, 分子系統解析は基質特異性の決定には十分ではなく, 同一 clade 内に複数の Aap が存在することは, それらが異なる基質特異性を持ち生理的に異なる役割を担う可能性を示唆していると報告している (159). *S. cerevisiae* では多様なアミノ酸の輸送を補うために, General YATs clade で Aap の重複が起こったと考えられている (159). したがって, *C. humicola* UJ1 株においても同様に, 輸送基質を補うために General YATs clade における Aap の重複が起こった可能性が十分考えられる. 一方, *ChGAP1-4* のエキソン-イントロン構造は異なっていた (Fig. 1-14). このことは, これらに共通の祖先遺伝子が同一 clade 内においてイントロンの欠失や挿入が繰り返されたことを示唆している (312, 313).

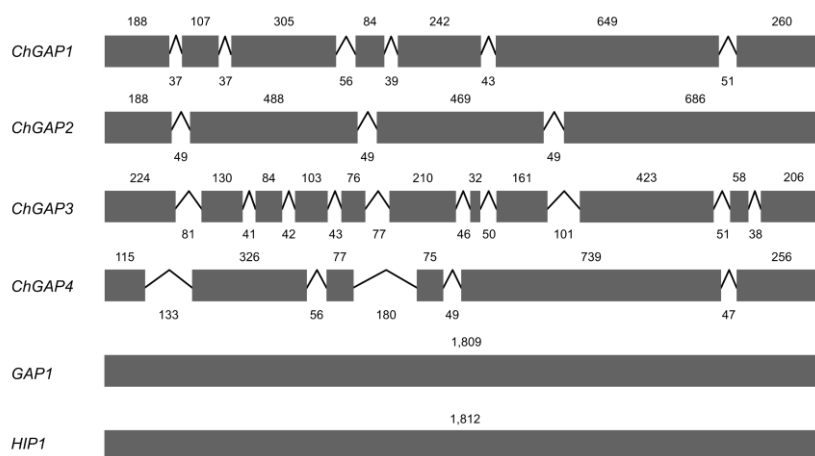


Fig. 1-14. *ChGAP1-4* と *GAP1*, *HIP1* 遺伝子のエキソン-イントロン構造

各 *AAP* 遺伝子のコーディング領域におけるエキソンとイントロンをそれぞれ黒箱と黒線で示す. 数値はエキソンとイントロンの塩基長 (bp)を示す.

基質特異性と構造因子

これまでに、APC スーパーファミリーに属する Aap のうち、大腸菌の L-Arg トランスポーター AdiC と L-Glu トランスポーター GadC の結晶構造が明らかにされている (297, 314)。この構造をもとに、これまでに YAT family に属する 8 つの Aap のモデル構造が作成され、基質ドッキングシミュレーション解析や変異導入解析により、TM1, TM3, TM6, TM8 と TM10 におけるいくつかのアミノ酸残基が、Aap の基質結合ポケットやその近傍に位置し、基質特異性に関与していることが明らかにされている (153, 159, 225, 315)。Fig. 1-15 に、本研究で見いだされた ChAap1, 4, 5 と ChGap1-4 といくつかの Aap の TM1, 3, 6, 8, 10 領域を示した。Gourmas らによって、(1) YAT family に高度に保存され、基質アミノ酸骨格との相互作用が予測されるアミノ酸残基と (2) 保存性が低く基質アミノ酸側鎖との相互作用が予測されるアミノ酸残基が分類されている (Fig. 1-15) (159)。これらのアミノ酸残基は、ChAap1, 4, 5 と ChGap1-4 の三次元構造モデルにおいても、基質結合ポケット近傍に位置すると予測された (Fig. 1-16)。ChAap1 の Y..S...Tl..E (TM3), Q..F.FIG (TM6), SD (TM8) と S (TM10) は同じ clade の属する CnAap1 と CnAap2 のものと、また ChGap1-4 の Y...W...L..E (TM3), T..F.F.G (TM6), S (TM8) と S (TM10) は同じ clade に属する Gap1, Tat2, Bap2 のものと非常に類似していた (Fig. 1-15)。したがって、これらアミノ酸残基が ChAap1 と ChGap1-4 の基質特異性に関与している可能性がある。一方、Acidic YATs clade の Aap には Y..KY.....Q (TM3), SD (TM8) や V (TM10) が完全に保存されていたことから、これらアミノ酸残基が酸性アミノ酸の輸送特性に関与する可能性が示唆されたが (Fig. 1-15)、酸性アミノ酸を輸送しない ChAap5 にも保存されていることから、Aap の酸性アミノ酸の輸送能を決定する必要十分な要件ではないようである。基質結合部位に加えて他の領域も Aap の基質特異性に影響を与えることから (153)、基質特異性に関与する構造的要因を明確に示すためには、部位特異的変異導入実験などのさらなる解析が必要である。

TM1			TM3		
AdiC	15	LMVSGNIM GS GVFLLP 36	AdiC	89	TNVL Y W L ACW I GN I AMV V IGVG 110
ChAap1	68	MIAIGGAI GTGL LVGSG 84	ChAap1	142	VGFNYW Y SW A IT T PT E LVASAI 163
CnAap1	67	MIALGGAI GTGL LVGSG 83	CnAap1	141	TGIN Y W Y SA I T I PT E IVAATI 162
CnAap2	70	MIALGGAI GTGL LVGSG 86	CnAap2	144	LGFN Y W Y SA V T I PT E VVAASI 165
ChAap4	63	MIAIGGAI GTGL LVGSG 79	ChAap4	137	TALV Y L C K Y L I IS P N Q IVAGAL 158
ChAap5	54	MIAIGGAI GAG FLIGSG 69	ChAap5	128	TAL I Y L L C K Y L I IS P N Q LVAGAL 149
Dip5	93	MIAIGG SLGTGL LIGTG 109	Dip5	166	IG Y T Y L F K Y F I L P N Q LTAAL 189
AgtA	47	MIAIGGAI GTGL IIGTG 63	AgtA	121	LG Y T Y W F K Y I I V T P N Q L TAAAL 144
PcDip5	45	MIAIGGAI GTGL LVVGTG 61	PcDip5	118	LGW C Y L K Y I I L P T Q LTAAL 139
ChGap1	94	MIAVGGAI GTGL LVGSG 110	ChGap1	168	LGW N Y V F S W M I T L P L E LTVAGS 189
ChGap2	91	MIAVGG SI GTGL LVGSG 107	ChGap2	165	MGW N Y V F Q W L T I L P L E ITVAGN 186
ChGap3	106	MIAVGGAI GTGL LVGSG 122	ChGap3	180	MAW N Y V F Q W L T I L P L E LTAAGF 201
ChGap4	94	MIAVGG SI GTGL LVGSG 110	ChGap4	168	MGW N Y T F Q W L T I L P L E LTVAGM 189
Gap1	97	MIAIGGAI GTGL LVGSG 113	Gap1	171	NNF N Y M L Q W L V L P L E I VSASI 192
Tat2	89	MIAIGGAI GTGL LVGSG 105	Tat2	163	V S T I Y V L Q W F V L P L E I IAAAM 184
Bap2	102	MMSLGTGI GTGL LVANA 118	Bap2	177	TVW L Y C F Q W L V L P L E L ITASM 198
Put4	117	LIALGGAI GTGL LVGTS 133	Put4	196	TGW N Y F C Y V I L V A E C T AASG 217
Can1	95	MIALGG T IGTGL LVIGLS 111	Can1	169	NG Y M Y W F S W A I T F A L E L SVVGQ 190
Lyp1	117	MIALGG T IGTGL LVIGIS 133	Lyp1	191	NG Y M Y W F N W A I T Y A V E S SVIGQ 212

TM6			TM8			TM10		
AdiC	194	QSTL N W T L W S F - I GVESA 210	AdiC	286	CLG S L G G W TLLAGQ 299	AdiC	351	GLV S S V S V I F T L V 363
ChAap1	264	FSV F T Q A A F S F- I GTEIV 280	ChAap1	365	AWSAG N S D V Y AASR 378	ChAap1	430	NW L Y N I S A I S G L L 442
CnAap1	265	WN V F V Q A A F S F - I GTEII 281	CnAap1	364	AWSAG N S D L Y AASR 377	CnAap1	429	NW L Y N L S A I T G I I 451
CnAap2	268	WN V F V Q A A F S F - I GTEII 284	CnAap2	373	AWSAG N S D L Y ASSR 386	CnAap2	438	DW L Y N L S A I T G I I 450
ChAap4	254	V N A L I L A L F A Y- M GTELV 270	ChAap4	358	T I S A A N S D Q Y IASR 371	ChAap4	422	N Y F V N S V S V F G G L 434
ChAap5	244	V N A L V L A L A F - M GSELI 260	ChAap5	347	T I S A A V S D Q Y ISSR 360	ChAap5	411	N Y F V N S V T I C G G L 423
Dip5	287	V A V F V Y S L F S Y- T GIELT 303	Dip5	389	V F S A C N S D L Y VSSR 402	Dip5	453	N Y F V N V S M F G I L 465
AgtA	246	W A T L V S A T F A Y- L GTELV 262	AgtA	348	V F S A A N S D L Y IATR 361	AgtA	412	K Y F V D L V S Q F G L L 424
PcDip5	239	W S T M V Q A T F A F- L GTELI 255	PcDip5	339	V F S A A N S D L Y IATR 352	PcDip5	403	G Y F T D M V S I F G L L 415
ChGap1	281	C A V L V T A A F A Y- A GSELV 297	ChGap1	379	V L A M S M S C I Y G G S R 392	ChGap1	443	DW L L A L S G L C T L F 455
ChGap2	278	C S V F V T A A F S F- A GTELV 294	ChGap2	376	V L S I G L S A V Y A G S R 389	ChGap2	440	DW L L A L S G L S T L F 452
ChGap3	293	C S L F V T A A F S Y- S GTELM 309	ChGap3	391	V L S I G L S S V Y A G S R 404	ChGap3	455	NW L V Q L S G L S V L F 467
ChGap4	281	C A M F V T A A F S Y- S GTELV 297	ChGap4	379	V L S M G L S A T Y G G S R 392	ChGap4	443	Q W L M A L S G L S T L F 455
Gap1	286	C S V F V T A A F S F- A GSELV 302	Gap1	386	V L S V G N S A I Y A C S R 399	Gap1	450	NW L L A L S G L S S L F 462
Tat2	272	L S V L V A S Y S L - G GIEMT 288	Tat2	368	V L S V G N S C I F A S S R 381	Tat2	432	NW L M A I A G L A T C I 444
Bap2	291	C Y I L V T A Y F S F- G GME L F 307	Bap2	391	V V S V A N S S L Y A G P R 404	Bap2	455	T W L A A I A G L S E L F 467
Put4	313	Y T G I K G A F A F I L G P E L V 330	Put4	417	A W S A A N A F M F A S T R 430	Put4	481	N W F S N I S T I S G F L 493
Can1	287	V S S L I N A A F T F- Q GTELV 303	Can1	386	I I S A A N S N I Y V G S R 399	Can1	450	E W L L N I T G V A G F F 462
Lyp1	309	V S S L I N A A F T Y- Q GTELV 325	Lyp1	408	V V S A A N S M V V G S R 421	Lyp1	472	NW L I N I S T L A G L C 484

Fig. 1-15. Aap の基質特異性に関与する可能性のあるアミノ酸残基

Aap の色分けは系統樹における clade を示す: 黄, CnAap1, 2 clade; 赤, Acidic YATs clade; 緑, General YATs clade; 橙, Proline Yats clade; 青, Basic YATs clade. 赤で示されるアミノ酸残基は基質アミノ酸の主鎖との相互作用が予測されるアミノ酸残基を示す. 青で示されるアミノ酸残基は基質アミノ酸の側鎖との相互作用が予測されるアミノ酸残基を示す. 緑で示されるアミノ酸残基は基質特異性に間接的に影響を与えることが予測されるアミノ酸残基を示す.

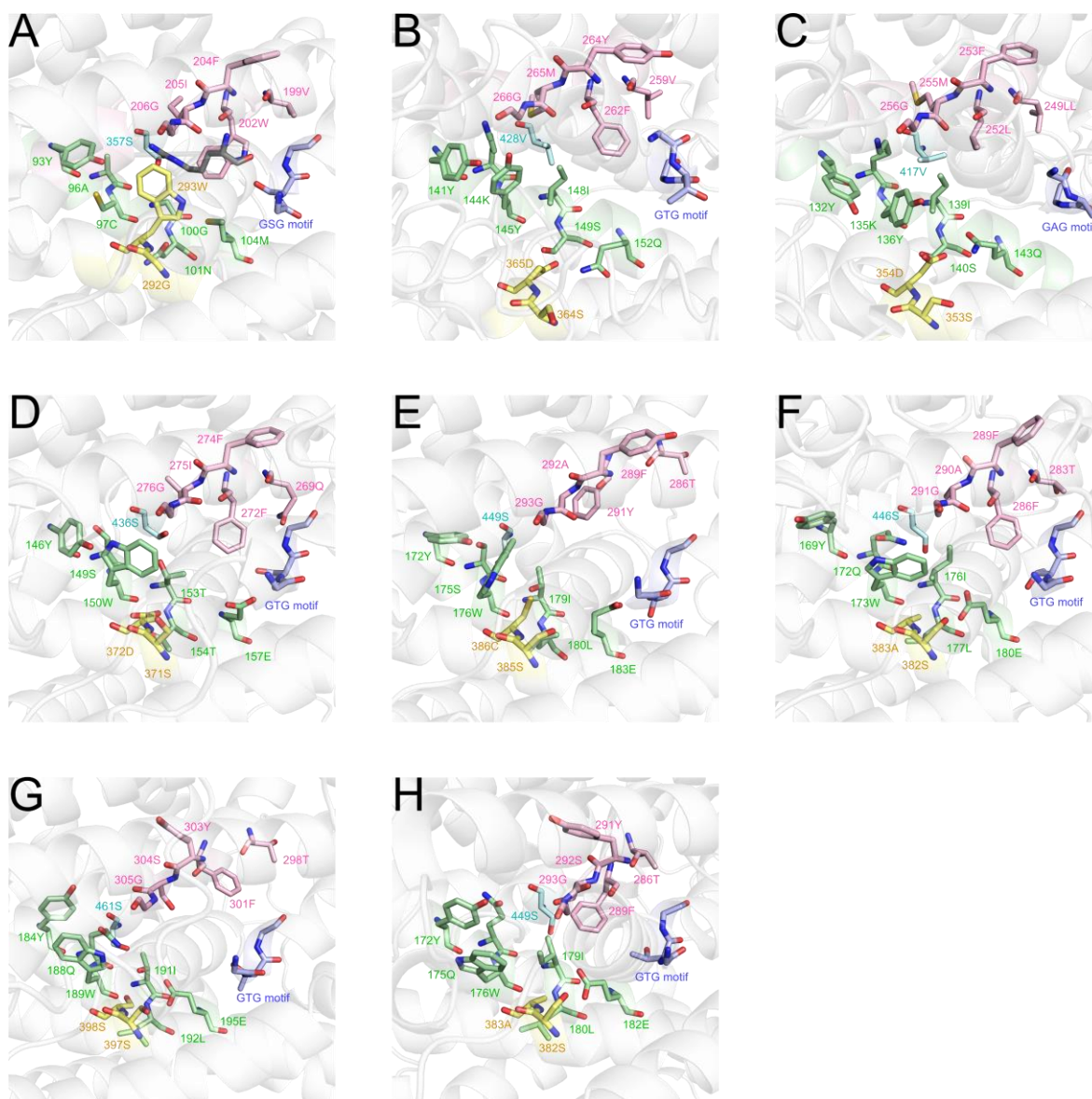


Fig. 1-16. Aap の基質結合部位の比較

(A) AdiC の三次元構造 (PDB ID: 3L1L), (B) ChAap4 の三次元構造モデル, (C) ChAap5 の三次元構造モデル, (D) ChAap1 の三次元構造モデル, (E) ChGap1 の三次元構造モデル, (F) ChGap2 の三次元構造モデル, (G) ChGap3 の三次元構造モデル, (H) ChGap4 の三次元構造モデル. Aap の三次元モデル構造は I-TASSER On-line Server (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) を用いて構築した. A 図中央に示される黒色の分子は基質 Arg を示す. アミノ酸残基の色分けはそれぞれ青:TM1, 緑:TM3, ピンク:TM6, 黄:TM8, 橙:TM10 を表す.

大腸菌の L-Arg トランスポーターである AdiC において、正電荷を帯びた輸送基質である L-Arg が負に帯電した基質結合ポケットに配置されていることから (Fig. 1-17A), 静電的な相互作用が基質特異性と輸送能力に寄与していると考えられている (316, 317). Acidic Aap である ChAap4 と Dip5 のモデル構造の基質結合部位の静電ポテンシャルを解析したところ、正に帯電していることが示唆された (Fig. 1-17B, D). 一方、Asp を輸送しない ChAap5 の基質結合部位は中性であることが示唆された (Fig. 1-17C). したがって、Acidic Aap の ChAap4 と Dip5 の基質結合部位における正の静電ポテンシャルが、負に帯電した酸性アミノ酸の輸送能に寄与すると考えられた.

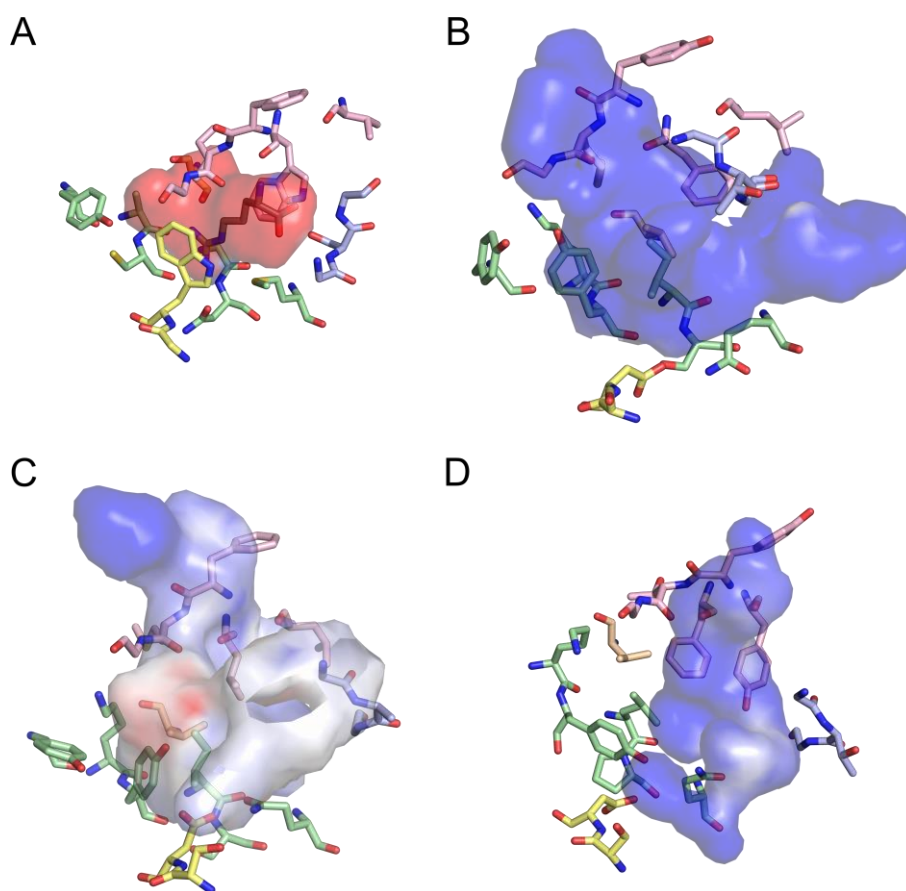


Fig. 1-17. 基質結合部位の静電ポテンシャル

(A) AdiC の三次元構造 (PDB ID: 3L1L), (B) ChAap4 の三次元構造モデル, (C) ChAap5 の三次元構造モデル, (D) Dip5 の三次元構造モデル. 静電ポテンシャルは PyMOL 2.3x によって算出し, 青は正電荷, 赤は負電荷を示し, 色の濃淡はポテンシャルの強さを反映している.

ChAAP1,4 と *ChGAP1-4* 遺伝子破壊株の D-Asp における生育遅延は L-Asp よりも大きい傾向が観察された (Fig. 1-6, Fig. 1-10). 糸状菌 *N. crassa* のアミノ酸輸送系IVの L-Asp と D-Asp に対する K_m 値はそれぞれ 13 と 5.4 μM であることが報告されている (182). したがって, 真菌の Aap は L-Asp よりも D-Asp をより効率的に輸送すると考えられる. このことは, 環境中の存在量が L-Asp よりも少ない D-Asp を効率的に利用するために寄与するかもしれない.

アミノ酸における生育に及ぼす培養液 pH の影響

YAT はプロトンシンポーターであり、プロトン勾配 (細胞外 > 細胞内) を駆動力としてアミノ酸を輸送する。したがって、細胞外 pH の上昇に伴いアミノ酸輸送能力が低下するため、アルカリ性 pH 条件下においてアミノ酸での生育速度の低下を引き起こしたと考えられる (Fig. 1-6, Fig. 1-10)。また、 Δ Chap4 株の酸性アミノ酸での生育は pH の上昇に伴って顕著に遅延し、特に L, D-Asp における生育能は pH 10.0 で完全に失われた (Fig. 1-6)。一方、 Δ Chgap1-4 と Δ Chap1 株の L, D-Asp における生育は、酸性または中性 pH でわずかに遅延し、アルカリ性 pH では野生株と同等であった (Fig. 1-10)。真菌において酸性アミノ酸は、非特異的な (基質特異性の広い) General Aap と Acidic Aap によって輸送される (153, 182, 295, 296)。酵母 *S. cerevisiae* Gap1 の L-Asp に対する V_{max} 値と K_m 値は pH 3.0 から 7.0 にかけて、それぞれ約 1/2 倍と約 48 倍に変化する (298)。これは、L-Asp の荷電状態が輸送能力に影響を与えることを示しており、Gap1 のプロトン化形態の酸性アミノ酸に対する輸送能が高いことを示している (298)。また、糸状菌 *P. chrysogenum* の General amino acid transport system は -1 の荷電形態の L-Glu よりも非荷電形態の L-Glu を優先的に輸送する (295)。一方、*P. chrysogenum* の酸性アミノ酸輸送システムは -1 の荷電形態と非荷電形態の酸性アミノ酸を同等の親和性で輸送する (295)。しかしながら、酸性アミノ酸の側鎖カルボキシ基の荷電状態と Aap の輸送特性に関する分子メカニズムの詳細は明らかにされていない。

Asp (pI=2.77) の α -カルボキシ基、 α -アミノ基と β -カルボキシ基の pKa はそれぞれ 1.99, 9.90 と 3.90 であるため、pH 3.0 において Asp の約 90% が ± 0 の荷電状態をとる。pH 7.0 ではカルボキシ基のほとんどが脱プロトン化され、-1 の荷電形態が支配的となり、pH 10 では α -アミノ基の一部も脱プロトン化され、約 40% の Asp が -1 の荷電形態で存在していると考えられる。このことは、ChAap1 と ChGap1-4 が *S. cerevisiae* Gap1 や *P. chrysogenum* の General amino acid transport system と、また ChAap4 が *P. chrysogenum* の酸性アミノ酸輸送システムと同様の輸送特性を持っていることを示唆している。すなわち、酸性 pH 環境では ChAap1,4 と ChGap1-4 のすべてが Asp 輸送に関与しているが、環境 pH が上昇するにつれて ChAap1 と ChGap1-4 の Asp 輸送能力が低下する。一方、高アルカリ性環境では ChAap4 のみが Asp 輸送能力を保持し、生育をサポートするための効率的な Asp 輸送を担っていると考えられる。

pH 10 において Δ Chap4 株は L-Glu 上で生育は遅延するものの十分生育できたことから、アルカリ性 pH 環境において ChAap4 の他にも Glu 輸送活性を有するトランスポーターが存在することが示唆された。Glu の α -アミノ基の pKa を 9.47 とすると、pH 10.0 において約 80% が -2 の荷電形態で存在することから、ジカルボン酸を輸送するパーミアーゼが L-Glu の取り込みに関与している可能性がある (318)。

Δ Chap4 株は L-Phe 上での生育においても、酸性アミノ酸と同様に pH の上昇に伴って生育遅延が顕著に増大した (Fig. 1-6)。*S. cerevisiae* Gap1 の分岐鎖アミノ酸 Leu に対する K_m 値は pH 2.0 から pH 7.0 にかけてほとんど変化しない (298)。Leu (pKa=2.73, 9.74, pI=5.98) は pH 2.0 に

において+1 の荷電形態が約 80%, pH 7.0 では非荷電形態が支配的に存在している. このことから, Gap1 は+1 の荷電形態と非荷電形態の Leu に対して同等の親和性を持っていると考えられる. 大腸菌 AdiC は輸送基質として Arg⁺² よりも Arg⁺¹ に対して選択性が高いが, Arg の α -カルボキシ基のプロトン化状態ではなく基質の総体的な荷電状態に基づいて基質を区別していることが明らかにされている (319). このことは, Aap の輸送特性が基質アミノ酸の側鎖だけでなく, α -カルボキシ基や α -アミノ基の荷電状態によっても変化することを示唆している. Phe (pKa=2.73, 9.31, pI=5.48) は pH 3.0 と pH 7.0 において非荷電形態が支配的であり, pH 10 では Phe の約 80%が-1 の荷電形態で存在する. このことから, 酸性アミノ酸の場合と同様に, ChAap4 は-1 の荷電形態の Phe の輸送において主要な役割を担っていると考えられる.

アミノ酸パーミアーズと *ChDDO* 遺伝子発現

D-Asp 誘導条件下における *ChAAP1, 4* と *ChGAP1-4* 遺伝子破壊株の *ChDDO* 遺伝子発現は、異なる pH 条件の D-Asp における生育解析の結果と概ね一致していた (Fig. 1-6, Fig. 1-7, Fig. 1-10, Fig. 1-11). このことは、D-Asp 依存的な *ChDDO* 遺伝子誘導発現に Aap による D-Asp 輸送が関与することを示唆している. 一方、 Δ *Chaap4* 株は pH 3.0 の D-Asp で生育遅延は観察されなかったが、DDO 活性と *ChDDO* 遺伝子転写量の低下が観察された (Fig. 1-6, Fig. 1-7). また、 Δ *Chaap1* 株と Δ *Chgap1-4* 株の pH 3.0 と pH 7.0 の D-Asp 上での生育遅延と比較して、DDO 活性と *ChDDO* 遺伝子転写量は顕著に低下していた (Fig. 1-10, Fig. 1-11). *ChDDO* 遺伝子誘導発現は、良好な炭素源 (グルコースなど) および窒素源 (アンモニアや L-Gln など) の共存下ではその誘導レベルが減少する (113). 一方で、*ChDDO* 遺伝子は窒素脱抑制条件下や炭素脱抑制条件下では誘導されないことから、良好な栄養源による *ChDDO* 遺伝子の発現抑制は、D-Asp 取り込みに関わる Aap が窒素源異化抑制 (NCR) あるいは炭素源異化抑制 (CCR) により発現抑制を受けることで、D-Asp の取り込みが減少するためと考えられている (113). 酵母 *S. cerevisiae* の *BAP2* や *GNP1*, *TAT1*, *CAN1* 遺伝子の転写は CCR 脱抑制条件下で上昇し、さらに *BAP2* と *GNP1* 遺伝子は翻訳レベルの増強が観察された (220). さらに、酵母 *C. neoformans* の *CnAAP1, 2, 4, 5, 8* 遺伝子の転写は CCR 脱抑制条件下で上昇する (294). したがって、*AAP* 遺伝子破壊株の生育解析と *ChDDO* 遺伝子発現解析の間に観察された *AAP* 遺伝子破壊の影響の差は、培養液中のグルコースによって *ChAAP1, 4* や *ChGAP1-4* 遺伝子が発現制御を受けていたことに起因すると考えられる. 具体的には、グルコース存在下で行われた生育解析では *ChAAP1, 4* や *ChGAP1-4* 遺伝子の発現レベルが抑制されていた可能性がある. この場合、細胞全体の D-Asp 輸送活性に占める *ChAap1, 4* や *ChGap1-4* の寄与度は低く、これら *AAP* 遺伝子破壊が生育に与える影響が緩和されたと考えられる. 対して、グルコースが存在しない CCR 脱抑制条件で行われた *ChDDO* 遺伝子発現解析では、*ChAAP1, 4* や *ChGAP1-4* 遺伝子の発現レベルが増加し、細胞全体の D-Asp 輸送活性に占める *ChAap1, 4* や *ChGap1-4* の寄与度は増加する. 結果として *AAP* 遺伝子破壊の影響が顕著に観察されたと考えられる.

一方、*ChAap1, 4* と *ChGap1-4* のすべてが D-Asp 輸送に関与することが示唆されたが、これらの遺伝子破壊が D-Asp 上での生育と *ChDDO* 誘導発現に与える影響は、相加的ではなかった (Fig. 1-6, Fig. 1-7, Fig. 1-10, Fig. 1-11). *AAP* 遺伝子の発現は細胞の栄養条件や、特定のアミノ酸の利用可能性、CCR や NCR に応じて多様に制御される (216, 217, 219-221, 294). また、酵母 *S. cerevisiae* *Ssy1* は細胞外に存在する D-アミノ酸を含むさまざまなアミノ酸を認識して、いくつかの *AAP* 遺伝子の転写を誘導する (174, 177). さらに、*AAP* 遺伝子の発現が細胞外 pH の影響を受けることも報告されている (320-322). したがって、*ChAAP1, 4* と *ChGAP1-4* 遺伝子破壊株の D-Asp 輸送能力は誘導条件や細胞の状態によって、大きく変化していた可能性がある. 細胞全体の D-Asp 輸送能力に対する *ChAap1, 4* と *ChGap1-4* の寄与度を詳細に解析するためには、多重遺伝子破壊株の解析や経時的な *ChDDO* 誘導レベルの解析、あるいは *AAP* 遺伝子の発現レ

ベルの変化について解析する必要がある。

本研究で得られた実験結果をまとめると、*C. humicola* UJ1 株における D-Asp による *ChDDO* 遺伝子発現と Aap の関係について以下のモデルが考えられた (Fig. 1-18)。酸性 pH および中性 pH 環境では、D-Asp は ChAap1, 4 と ChGap1-4 の複数の Aap によって輸送される。中性 pH からアルカリ性 pH になるにつれて、ChAap1 と ChGap1-4 による D-Asp 輸送は徐々に減少し、高アルカリ性 pH 環境では ChAap4 のみが D-Asp を輸送する。

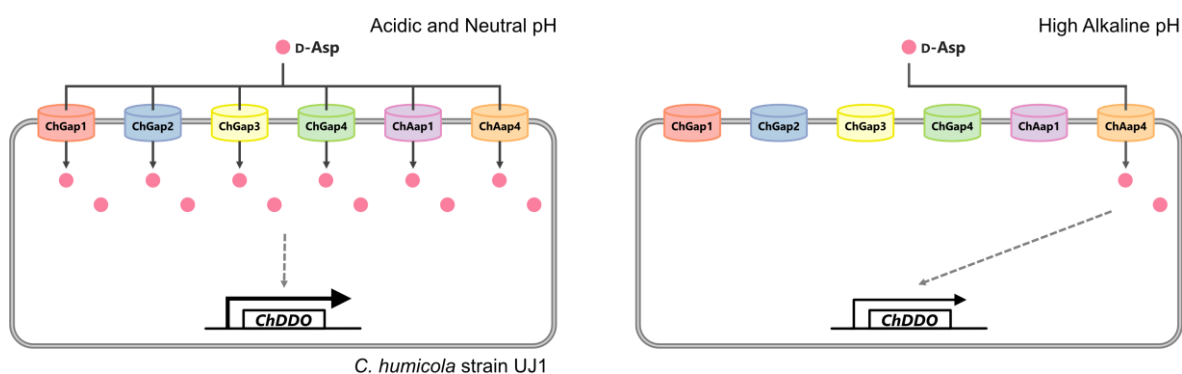


Fig. 1-18. ChGap1-4 と ChAap1, 4 による D-Asp 取り込みと *ChDDO* 遺伝子発現の関係

酸性 pH および中性 pH 環境下では D-Asp は ChGap1-4 と ChAap1, 4 を含む複数の Aap によって輸送される。高アルカリ性 pH 環境下では ChGap1-4 と ChAap1 の D-Asp 輸送能力が消失し、ChAap4 によってのみ D-Asp が輸送される。細胞内の D-Asp は未知のシグナル伝達経路を介して *ChDDO* 遺伝子発現を誘導する。

UJ1 株の D-Asp での生育は DDO 活性に依存すること、また *ChDDO* 遺伝子の転写が D-Asp の存在下でのみ特異的に誘導されることから D-Asp 特異的な転写活性化システムが存在すると考えられる (99, 113)。酵母 *S. cerevisiae* では L-Pro 代謝に関与するプロリンオキシダーゼと Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸デヒドロゲナーゼをコードする *PUT1* と *PUT2* 遺伝子の発現は L-Pro によって誘導される (323, 324)。L-Pro は転写活性化因子 Put3 と結合することでコンフォメーション変化を誘発し、*PUT1* と *PUT2* 遺伝子の転写を活性化する (325)。Put3 はいくつかの Pro 類似体を認識するが、転写活性化能力は D-Pro よりも L-Pro の方が約 2 倍高いことが示された (326)。さらに、転写活性化因子 Aro80 は芳香族アミノ酸に応答して、芳香族アミノ酸トランスアミナーゼ 2 とフェニルピルビン酸デカルボキシラーゼをコードする *ARO9* と *ARO10* 遺伝子の転写を活性化する (327)。したがって、*C. humicola* において細胞内の D-Asp が未知の D-Asp 特異的なセンサータンパク質または転写活性化タンパク質に認識され、*ChDDO* 遺伝子の転写が誘導されると考えられる。今後の研究では、この誘導発現システムに関与するタンパク質を特定し、D-Asp 特異的な転写活性化の全容が明らかになることが期待される。酵母における *DDO* 遺伝子発現の制御機構を解明することは、真菌のみならず動物における DDO や D-Asp の生理機能や、DDO による D-Asp 代謝の関与が示唆されている精神疾患である統合失調症の発症メカニズムの解明にも貢献すると考えられる。

4. 材料と方法

材料

試薬は特記しない場合、FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan), Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), Nacalai tesque (Kyoto, Japan), Difco (Detroit, MI, USA), Takara Bio (Shiga, Japan) または TOYOBO (Osaka, Japan) から購入した。D-Asp は Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation (Osaka, Japan) から寄贈されたものを用いた。オリゴヌクレオチドは、Eurofins Genomics (Tokyo, Japan) または Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) から購入した。

供試菌, 培地

酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 株とそのウラシル要求性変異株 UM3 株を供試菌として使用した (110, 328)。これらの培養には YPD 培地 (10 g/l yeast extract, 20 g/l peptone, 20 g/l glucose) または SD 培地 (0.67 g/l BD Difco yeast nitrogen base w/o amino acids, 5 g/l glucose), YCB 培地 (11.7 g/l BD Difco yeast carbon base), YNB 培地 (0.17 g/l yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate) を用いて 30°C で培養した。必要に応じて 20 mg/l となるように uracil を加え、固体培地には精製寒天粉末を 20 g/l となるように添加した。DNA 組換えの宿主として *E. coli* DH5 α を LB (lysogeny broth) 培地 (5 g/l yeast extract, 10 g/l tryptone, 5g/l NaCl) を用いて 37°C で培養した。必要に応じて 100 μ g/ml となるように ampicillin を加え、固体培地には精製寒天粉末を 15 g/l となるように添加した。

ゲノム DNA の調製

UJ1 株のゲノム DNA は主に Takahashi らの方法に従い調製した (328)。UJ1 株を YPD 液体培地で 30°C, 16 h 培養した後、100 ml の YPD 液体培地に OD₆₀₀ が 0.01 となるように添加して 30°C で OD₆₀₀ が 1.2 になるまで培養した。遠心分離 (4°C, 5,000 \times g, 10 min) によって菌体を回収し氷冷滅菌水で 2 回洗浄した。次に SP buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM 2-mercaptoethanol, 50 mM EDTA, pH 8.0) で洗浄し、SP2 buffer (600 mM KCl, 100 mM tri-sodium citrate dihydrate) に懸濁した。さらに *Trichoderma harzianum* 由来 Lysing Enzymes (終濃度 30 mg/ml) と RNaseA (終濃度 100 μ g/ml) を添加し 30°C で 2 h 保温した。得られたスフェロプラストに 2% (w/v) SDS を含む TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) を添加し、65°C で 30 min 保温した。その後、5 M CH₃COOK (pH 5.2) と 2-propanol を添加して穏やかに転倒混和し、氷上に 30 min 静置してゲノム DNA を析出させた。析出したゲノム DNA をガラス棒ですくい取り、70% ethanol で数回洗浄して風乾し、0.1 \times TE buffer に溶解し、使用するまで 4°C で保存した。

ドラフトゲノム解析

ドラフトゲノム解析は、北海道システム・サイエンス株式会社に委託した。次世代シーケンサー Illumina HiSeq 2500 を用いて Paired-End Sequencing によってリード情報が収集された。得られたリード情報はアセンブリプログラム Velvet 1.2.10 と Platanus 1.2.4 によって *de novo* アセンブリされた (329, 330)。

ゲノムデータ中の ORF 予測と機能アノテーション

C. humicola のゲノム配列中に存在する ORF 領域は、近縁酵母 *Cryptococcus neoformans* の ORF パラメータを使用した真核生物遺伝子予測ソフトウェア AUGUSTUS 2.5.5 (<http://bioinf.uni-greifswald.de/webaugustus/>) によって予測した (331)。また、Blast2GO Basic を使用して得られた ORF に対して機能アノテーションした (332)。

DDO・DAO ホモログ遺伝子の探索

ChDDO と RgDAO のアミノ酸配列を query とし *C. humicola* のゲノム配列に対して localBLASTp 2.6.0+システムを用いてホモロジー検索した (333)。

Aap ホモログ遺伝子の探索

C. neoformans の 8 個の Aap のアミノ酸配列を query とし、*C. humicola* のゲノム配列に対して localBLASTp 2.6.0+システムを用いてホモロジー検索した (333)。

分子系統解析

アライメントソフトウェア MUSCLE を用いてアミノ酸配列をマルチプルアライメントし、分子進化・系統解析ソフトウェア MEGA7.0 の Neighbor-Joining 法を用いて分子系統樹を構築した (334, 335)。

二次構造予測

トポロジー予測ソフトウェア HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>) を用いて、Aap の二次構造を予測した (336)。

AAP 遺伝子破壊カセットの作製

AAP 遺伝子破壊カセットは主に Heckman と Pease の方法に従い DNA ポリメラーゼ (Tks Gflex DNA Polymerase) を使用した PCR によって作製した (337)。ChURA3 遺伝子を含むゲノム組込型ベクター-pICUG を鋳型として、ChURA3 に特異的なプライマーペア URA3F/URA3R (Table 1-9) を使用して ChURA3 領域約 2,000 bp を増幅した (328)。さらに、UJ1 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR により増幅した ChURA3 領域の両末端 17 bp を含む ChAAP4 と ChAAP5、ChGAP1-4、ChAAP1 に特異的なプライマーペア (Table 1-9) を使用して 5' と 3' 領域 (1,000–1,500 bp) 増幅した。増幅された ChURA3 領域と各 AAP 遺伝子の 5' と 3' 領域の増幅断片を混合して、各 AAP 遺伝子の 5' または 3' 末端プライマーを使用した overlap extension PCR によって、これらの断片が融合した AAP 遺伝子破壊カセット (約 5,000 bp) を作製した。

AAP 遺伝子破壊株の作製

C. humicola UM3 株を YPD 液体培地で 30°C で、16 h 培養したのち、100 ml の YPD 液体培地に OD₆₀₀ が 0.05 となるように添加して 30°C で OD₆₀₀ が 0.5 になるまで培養した。遠心分離 (4°C, 5,000×g, 10 min) によって菌体を回収し氷冷滅菌水で 2 回洗浄した。次に、菌体を TMS buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, 92.4 g/l sucrose) で 2 回洗浄し、菌体を 500 µl の TMS buffer に再懸濁した。50 µl の菌体懸濁液に AAP 遺伝子破壊カセットを 5

μg 添加し、MicroPulser (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて抵抗 600 Ω、電圧 0.9 kV、静電容量 10 μF の条件でパルスした。パルス後、直ちに 1 ml の氷冷 1 M sorbitol を加えて 30°C で 2 h 振盪した。その後、SD 寒天培地に塗布して形質転換体を選抜し AAP 遺伝子破壊候補株とした。次に、コロニーPCR (EmeraldAmp MAX PCR Master Mix) によって、各 AAP 遺伝子破壊カセットの領域内外に設定したプライマーペア (Table 1-9) を使用して 5' と 3' 領域を増幅し、AAP 遺伝子の破壊を確認した。

AAP 遺伝子破壊株の生育解析

UJ1 株と各 AAP 遺伝子破壊株 SD 液体培地において 30°C で、16 h 培養したのち、遠心分離 (4°C, 5, 000×g, 10 min) によって菌体を回収し氷冷滅菌水で 2 回洗浄した。HCl または NaOH で pH を調整した 10 mM の窒素源を含む YCB 液体培地に OD₆₀₀ が 0.01 となるように添加し、30°C で振盪培養した。培養液の OD₆₀₀ を分光光度計 UV-1800 (SHIMADU, Kyoto, Japan) で経時的に測定することで生育を評価した。

ChDDO 遺伝子の発現誘導

UJ1 株と各 AAP 遺伝子破壊株を SD 液体培地で 30°C で、16 h 培養したのち、100 ml の SD 液体培地に OD₆₀₀ が 0.05 となるように添加して 30°C で 16 h 培養した。菌体を氷冷滅菌水で 2 回洗浄し、再度氷冷滅菌水に懸濁した。HCl または NaOH で pH を調整した 60 mM D-Asp または L-Asp を含む、または何も含まない YNB 液体培地に OD₆₀₀ ユニットが 50 となるように添加し、30°C で 3 h 培養した。その後、遠心分離 (4°C, 5, 000×g, 10 min) によって菌体を回収し氷冷滅菌水で 2 回洗浄した。菌体を 0.8 g の 0.45–0.5 mm のガラスビーズまたは 0.2 g の 0.45–0.5 mm のジルコニアビーズを含む 2 ml スクリューチューブに移して上清を除いた。菌体は使用するまで -80°C で保存した。

C. humicola 粗抽出液の調製

誘導菌体と 0.8 g の 0.45–0.5 mm のガラスビーズを含む 2 ml スクリューチューブに、800 μl の氷冷破碎 buffer (50 mM KPi, 2 mM EDTA, pH 7.0) を加えて Mini Bead Beater-8 (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) を用いて最大速度で 1 min ホモジナイズし、氷上で 3 min 冷却した。この手順を 8 回繰り返した。その後、菌体破碎液を遠心分離 (4°C, 20, 000×g, 30 min) して上清を粗抽出液とした。

タンパク質濃度測定

タンパク質濃度は Bio-rad protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて添付のプロトコルに従い Bradford 法により測定した。標準タンパク質と酵素試料の吸光度を 2 点ずつ、SpectraMax Paradigm (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を用いて測定し、検量線は 0–1 mg/ml BSA を用いて作製した。

DDO 酵素活性測定

DDO 反応によって生じる H₂O₂ を 4-aminoantipyrine (4-AA) と horseradish peroxidase (HRP) によるカップリング反応により検出することで活性を測定した。具体的には、20 mM D-Asp, 20 μM FAD, 1.5 mM 4-AA, 2 mM phenol および 25 U/ml HRP を含む 50 mM KPi buffer (pH 8.0) を 37°C で 5 min 保存した後、粗抽出液を添加して

反応を開始した。活性は反応により生成するキノノイミン色素を 505 nm ($\epsilon = 6,580 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) で SpectraMax Paradigm (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を用いて経時的にモニタリングすることで算出した。なお、コントロールとして基質を含まない反応液も同様に調製し、基質を含む反応液で得られた活性値からコントロールの活性値を引いた値を活性値とした。

Total RNA の抽出

誘導菌体と 0.2 g の 0.45–0.5 mm のジルコニアビーズを含む 2 ml スクリューチューブを凍結乾燥システム DRC-1100 と FDU-2100 (EYELA, Tokyo, Japan) を用いて凍結乾燥した。凍結乾燥した菌体は使用するまで -80°C で保存した。凍結乾燥菌体を含むチューブをボルテックスミキサーで 5 min 激しく振盪し細胞を破碎した。添付のプロトコルに従って Direct-zol RNA Miniprep Kit (ZYMO Research, Irvine, CA, USA) を用いて、破碎細胞から total RNA を抽出・精製した。

定量的リアルタイム RT-PCR (qRT-PCR)

60 mM D-Asp または L-Asp を含む、または何も含まない YNB 液体培地で誘導した細胞の total RNA と、RNA-direct SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) と StepOne real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用して qRT-PCR を行った。*ChDDO* 遺伝子と *ChTAF10* 遺伝子の転写量はそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーペア (Table 1-9) を使用した。*ChDDO* 遺伝子の相対転写レベルは *ChTAF10* 遺伝子を正規化遺伝子とする $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法によって計算した (338)。

配列解析と三次元構造モデルの作成

アミノ酸配列のアライメントには T-coffee sever (<http://tcoffee.org.cat/>) を使用した (339)。アミノ酸配列と塩基配列の比較と同一性の算出には、EMBOSS Needle Pairwise Sequence Alignment (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) を使用した (340)。各 Aap の三次元構造モデルは I-TASSER Online Server (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) を用いて作成し PyMOL ver. 2.3 によって描画した (<http://www.pymol.org/>) (341, 342)。

Table 1-9 本章で使用したプライマー

Purposes	Primers	Sequences (5' to 3')	
Gene-disrupting cassette	URA3F	CGAGGTCGACGGTATCG	
	URA3R	CAGGAAACAGCTATGAC	
	AAP4UF	CGCGGCATCACGTGAAGTAC	
	AAP4UR	CGATACCGTCGACCTCGTCCTGGGCTGCGTAGACATG	
	AAP4DF	GTCATAGCTGTTTCCTGATCAGTGGCGACGAGACGAG	
	AAP4DR	CACCGGCGACAATCTGGTTG	
	AAP5UF	TCGAGCCGCTCTCAGTACG	
	AAP5UR	CGATACCGTCGACCTCGGCACGCCACCGAGATCAATG	
	AAP5DF	GTCATAGCTGTTTCCTGTCCCACATTGCGTTCATGCG	
	GAP1UF	TGGTGCAGGAAGGTAGCATG	
	GAP1UR	CGATACCGTCGACCTCGTGAAGAAACCACCCGAGACG	
	GAP1DF	GTCATAGCTGTTTCCTGTTCATCATCAGCCGTCGT	
	GAP1DR	TCGGACTCAATGCAACACGA	
	GAP2UF	ATCCTCTACAGCAGCCAGA	
	GAP2UR	CGATACCGTCGACCTCGGTGAGCATAACGAGAAGCGA	
	GAP2DF	GTCATAGCTGTTTCCTGTGCGGTATCGTCTGCATCTGC	
	GAP2DR	CGAGGTCGATCTCAGAAGCC	
	GAP3UF	CCTCCGTCCGACATGATACG	
	GAP3UR	CGATACCGTCGACCTCGTGATGTCACGCACAGTTCCA	
	GAP3DF	GTCATAGCTGTTTCCTGGCGCGTGGATCACAATCTTC	
	GAP3DR	CTGTAGGGAAAGCGCACAGA	
	GAP4UF	GAGGTGGACTGACACTCGTG	
	GAP4UR	CGATACCGTCGACCTCGCCGGTCAAGACTTCTTCAT	
	GAP4DF	GTCATAGCTGTTTCCTGCGGCTCAAGGGTGTGTTG	
	GAP4DR	GTACGAGACGGCTGCGATAA	
	AAP1UF	CGGGCCAATAGAGATCGCAT	
	AAP1UR	CGATACCGTCGACCTCGCGTCCCAGTACGAGATGACG	
	AAP1DF	GTCATAGCTGTTTCCTGCACGATCGTGGGCTTATCA	
	AAP1DR	GCATCGTCGGCAAGATTGAC	
	Checking gene disruption	4UFwd1	ATCTGGACCGACACAGGTAG
		4URev1	TTGCAGGGTCGAATGGAATG
		4DFwd2	ACTTTCTGCGCGTGGTAAAC
		4DRev2	GTACCCATGTAGGCGAAGAG
5UFwd2		CTCTGTTTACCGAGAGGAG	
5URev2		TCTCTCAGCCTTGGGAGTC	
5DFwd3		CCTTGTGCTGCTCTTGATTG	
5DRev3		TCACGATCGTCTTCCAGATG	
<i>ΔChap1</i> UFwd		GGTGATTCAGGCTCCAAGCT	
5Urev1		CTCCCTCCTCCTTCTTCTG	
5DFwd2		TCTTCACTCACCACGCATC	
<i>ΔChap1</i> DRev		TCTTAGCGTGGTGGGCAAG	
<i>ΔChap2</i> UFwd		CCACTCTCCAGTTCGCATGT	
5Urev1		CTCCCTCCTCCTTCTTCTG	
<i>ΔChap2</i> DFwd		AGACAGTACCTTGGCACAACA	
<i>ΔChap1</i> DRev		ACACGAGGGTCCATAGTCTGA	
<i>ΔChap3</i> UFwd		AGATGCGTGCTGTGAGTTGA	
5Urev1		CTCCCTCCTCCTTCTTCTG	
5DFwd2		TCTTCACTCACCACGCATC	
<i>ΔChap3</i> DRev		GCGACATTCTTAGCCGAGA	
<i>ΔChap4</i> UFwd		TGTGGACTGCTTCGTCTGTC	
5Urev1		CTCCCTCCTCCTTCTTCTG	
<i>ΔChap4</i> DFwd		GCCGAGTCTATGCACAAGGT	
<i>ΔChap4</i> DRev		TCAACTCACAGCACGCATCT	
<i>ΔChap1</i> UFwd		GCCGAGTCTATGCACAAGGT	
5Urev1		CTCCCTCCTCCTTCTTCTG	
4DFwd3		CCACCTGTGGAAGCATGGTG	
<i>ΔChap1</i> DRev	CTTCATCCCGCACATCCTGT		
qRT-PCR	RTChDDOF2	CTCACGCAGACCGAGATGTG	
	RTChDDOR2	GTCGAGCACGCGGAAATCT	
	RTChTAF10F	CGAGGAGGTGACCGAGTACT	
	RTChTAF10R	CAGAGACAACAGGCGCTTAGTC	

第 2 章 酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 株の D-または L-Asp 存在下における 発現変動遺伝子の解析

1. 緒言

第 1 章では、酵母 *C. humicola* UJ1 株において D-Asp 取り込みに関与する Aap を同定するために、UJ1 株の 7 個の *AAP* 遺伝子について解析した。その結果、*ChAAP1, 4* および *ChGAP1-4* 遺伝子破壊株は D-Asp 上での生育が遅延し、また *ChDDO* 遺伝子の誘導レベルが低下したことから、これら Aap が D-Asp の取り込みを介して *ChDDO* 遺伝子の誘導発現に関与することが示された。さらに、酸性および中性 pH 条件下では ChAap1, 4 と ChGap1-4 を含む複数の Aap が D-Asp の細胞内輸送を担うのに対して、アルカリ性 pH 条件下では ChAap4 が主要な D-Asp 輸送を担うことが明らかとなった。これらの結果は、Aap によって細胞内に取り込まれた D-Asp が未知のシグナル伝達経路を介して、*ChDDO* 遺伝子の転写を誘導することを示唆している。

近年、海洋性細菌 *Pseudoaltermonas elyakovii* SM1926 株において D-Asp 誘導細胞の RNA-seq 解析結果が報告された (128)。この報告は、これまで明らかにされていなかった細菌における D-アミノ酸代謝経路に関する多くの情報を提供した。一方、私の知る限り、真核生物において D-アミノ酸によるトランスクリプトームの変化を解析した例は存在しない。そこで第 2 章では、UJ1 株の D-Asp と L-Asp 間におけるトランスクリプトーム情報を比較することで、D-Asp 特異的に発現が変化する遺伝子の網羅的な情報から代謝経路や細胞プロセスの変化について解析し、*ChDDO* 遺伝子誘導発現を含む細胞全体の D-Asp 応答について考察した。

2. 結果

2.1. Sequence data の概要

D-Asp または L-Asp を唯一の炭素源、 NH_4Cl を窒素源とした液体培地で、5 時間誘導培養した UJ1 株から total RNA を抽出し RNA-seq 解析を行った結果、D-Asp と L-Asp 条件でそれぞれ 6.4 G と 7.3 G の clean reads が得られ、 Q_{30} と Q_{20} (raw reads のうち、それぞれ 99.9%と 99%以上の信頼度をもつ clean reads の割合) はそれぞれ 93.57%と 93.67%および 97.62%と 97.67%であった。また、*C. humicola* UJ1 株のゲノム配列の GC content が 62.82%に対して、D-Asp と L-Asp 誘導条件の clean reads の GC content はそれぞれ 63.64%と 63.65%であった。さらに、D-Asp と L-Asp 誘導条件の clean reads のそれぞれ 89.03%と 89.23%がゲノム配列に一意にマッピングされた。以上の結果から、RNA-seq 解析が良好に行われたと判断した。

Table 2-1. Quality control and Sequencing data

	L-Asp	D-Asp
Raw reads ¹	49,934,972	44,003,866
Raw bases ²	7.5 G	6.6 G
Clean reads ³	48,813,266	42,953,666
Total clean bases ⁴	7.3 G	6.4 G
GC content ⁵	63.64%	63.65%
Q_{30} ⁶	93.61%	93.57%
Q_{20} ⁷	97.67%	97.62%
Total mapped ⁸	43,554,492 (89.23%)	38,405,554 (89.41%)
Uniquely mapped ⁹	43,460,356 (89.03%)	38,327,441 (89.23%)

1, 2: RNA-Sequence によって得られたオリジナルの reads と bases. 3, 4: Raw reads と bases のうちアダプター配列や品質の低い reads を除いた reads と bases. 5: reads の GC 含量. 6: Clean reads のうち、99.9%以上の信頼度をもつ clean reads の割合. 7: Clean reads のうち、99%以上の信頼度をもつ clean reads の割合. 8: 参照ゲノムに対してマッピング可能な reads. 9: 参照ゲノムに対して一意にマッピングされる reads.

2.2. 発現変動遺伝子 (DEGs) の解析

RNA-seq 解析の結果、7,900 個の遺伝子の転写産物が確認され、D-Asp 条件では 122 個、L-Asp 条件では 244 個の遺伝子が特異的に発現していた (Fig. 2-1A). Volcano plot により発現比 \log_2 (Fold Change (D-Asp/L-Asp)) > 1 および統計的有意性 $q\text{-value} < 0.005$ を満たす発現変動遺伝子 (Differentially Expressed Genes: DEGs) を可視化したところ、計 1,889 個の DEGs が見いだされた。このうち、864 個の DEGs の発現が D-Asp 存在下で上昇しており (\log_2 (D-Asp/L-Asp) > 1), 1,025 個の DEGs の発現が D-Asp 存在下で減少していた (\log_2 (D-Asp/L-Asp) < -1) (Fig. 2-1B).

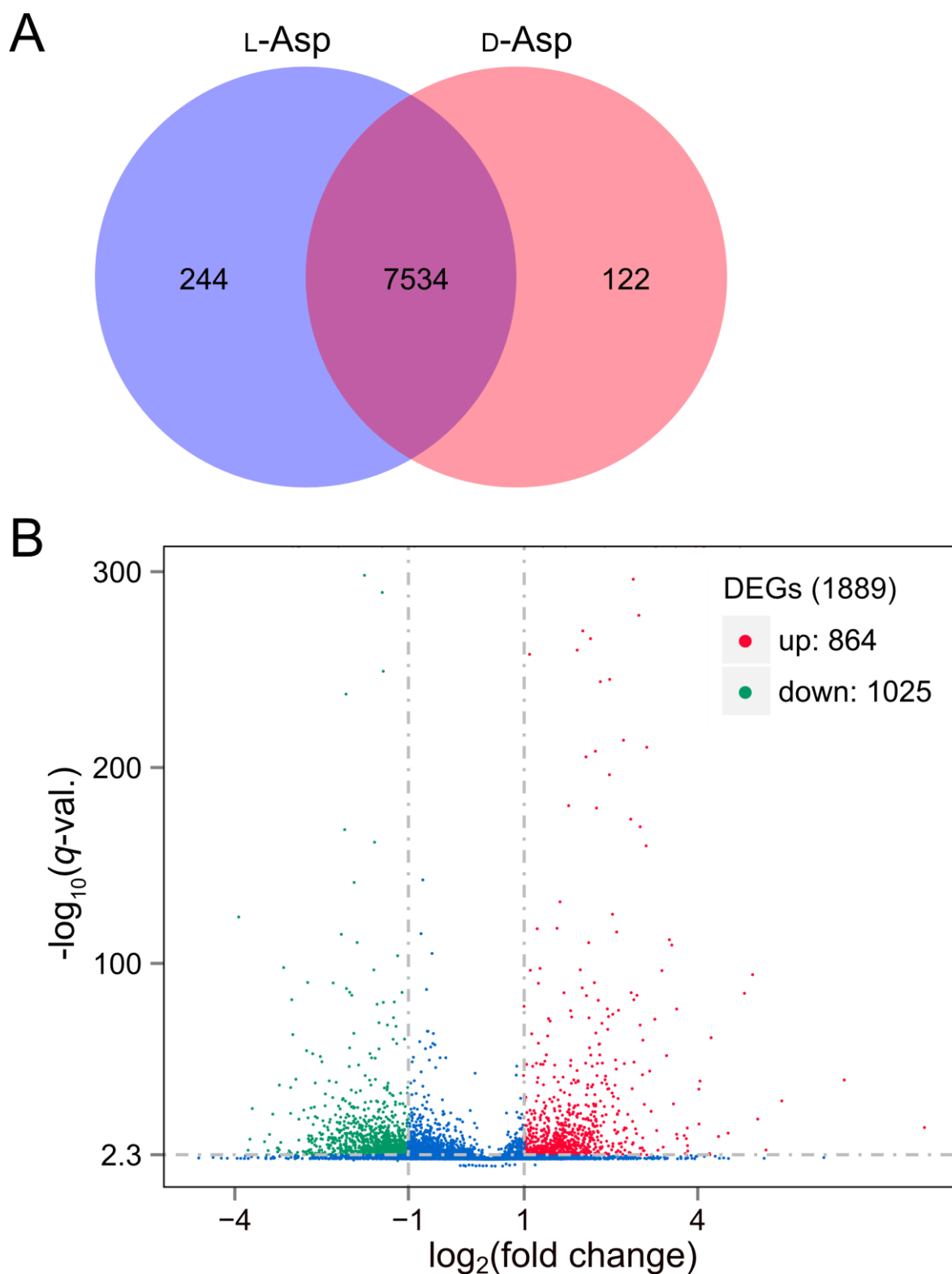


Fig. 2-1. *C. humicola* UJ1 株の D-または L-Asp 存在下における発現変動遺伝子 (DEGs)

(A) 発現遺伝子のベン図。各領域は L-Asp + NH₄Cl (L-Asp, 青) と D-Asp + NH₄Cl (D-Asp, 赤) 誘導条件下で特異的に発現している遺伝子の数と両条件で発現が確認された遺伝子の数を示している。(B) DEGs の volcano plot。横軸は発現比 ($\log_2(\text{D-Asp/L-Asp})$) を示し、縦軸はその差の統計的有意性 ($-\log_{10}(q\text{-val.})$) を示す。発現が D-Asp 存在下で有意に上昇した遺伝子を赤、低下したものは緑で示す。青は両条件で発現に有意な差が見られなかったものを示す。

2.3. D-アミノ酸代謝酵素遺伝子の発現

第 1 章において、酵母 *C. humicola* UJ1 株のゲノム配列に、D-アミノ酸の資化や毒性低減に関与する酵素として *ChDDO* と 3 つの *DAO* (*ChDAO1, 2, 3*), D-アミノ酸-N-アセチルトランスフェラーゼ (*ChDNT*), D-Ser デヒドラターゼ (*ChDSD*), D-Tyr-tRNA^{Tyr} デアシラーゼ (*ChDTD*) ホモログ遺伝子が見いだされた。これら 7 個の遺伝子のうち、*ChDDO*, *ChDAO1* と *DSD* 遺伝子の発現量が D-Asp 上で統計的に有意 ($q\text{-value} < 5.00 \times 10^{-2}$) に上昇した (Table 2-2)。一方、*ChDAO2, 3* と *ChDNT*, *ChDTD* ホモログ遺伝子の発現量は若干低下したが、DEG とはみなされなかった。

Table 2-2. D-アミノ酸代謝酵素遺伝子の発現変動レベル

Gene	Fold change*	q-value
<i>ChDDO</i>	3.80	6.39×10^{-261}
<i>ChDAO1</i>	2.99	8.24×10^{-4}
<i>ChDAO2</i>	0.78	5.26×10^{-2}
<i>ChDAO3</i>	0.89	1.15×10^{-1}
<i>ChDNT</i>	0.80	1.36×10^{-8}
<i>ChDSD</i>	12.4	0
<i>ChDTD</i>	0.61	1.48×10^{-1}

*各遺伝子の L-Asp 誘導条件下における発現レベルに対する、D-Asp 誘導条件下における発現レベル (D-Asp/L-Asp)

2.4. AAP 遺伝子の発現変動レベル

第 1 章において、UJ1 株のゲノム配列に 31 個の *AAP* 遺伝子が見いだされた。これら 31 個の *AAP* 遺伝子のうち、D-Asp 輸送に関与することが示唆された *ChAAPI, 4* および *ChGAPI-4* を含む 25 個の遺伝子の発現が D-Asp によって上昇することが分かった (Table 2-3)。特に、*ChAAPI* と *ChGAP3, 4* 遺伝子を含む 6 個の遺伝子は統計的に有意に 2 倍以上発現が上昇した DEGs (\log_2 (Fold Change (D-Asp/L-Asp)) > 1 および $q\text{-value} < 0.005$) であった。

Table 2-3. *AAP* 遺伝子の発現変動レベル

Gene	Fold change*	q-value
<i>ChAAP4</i>	1.40	3.49×10^{-2}
<i>ChAAP5</i>	7.18	3.53×10^{-4}
<i>ChAAP1</i>	8.10	2.35×10^{-5}
<i>ChGAP1</i>	2.39	2.69×10^{-2}
<i>ChGAP2</i>	1.12	4.02×10^{-3}
<i>ChGAP3</i>	14.13	4.33×10^{-3}
<i>ChGAP4</i>	9.22	2.09×10^{-25}
<i>g231</i>	11.48	4.79×10^{-113}
<i>g997</i>	0.59	1.14×10^{-18}
<i>g1034</i>	2.05	2.87×10^{-1}
<i>g1106</i>	0.85	2.74×10^{-1}
<i>g1125</i>	1.35	4.79×10^{-1}
<i>g1333</i>	1.17	4.66×10^{-1}
<i>g1718</i>	1.14	4.48×10^{-1}
<i>g2529</i>	1.11	2.44×10^{-2}
<i>g2921</i>	1.25	4.48×10^{-1}
<i>g4718</i>	3.56	1.97×10^{-1}
<i>g5432</i>	0.40	2.09×10^{-1}
<i>g5547</i>	1.52	3.90×10^{-1}
<i>g5888</i>	1.83	6.77×10^{-44}
<i>g6377</i>	2.94	4.22×10^{-2}
<i>g6585</i>	4.14	3.91×10^{-1}
<i>g6586</i>	0.66	1.48×10^{-1}
<i>g6837</i>	1.40	3.90×10^{-1}
<i>g7951</i>	2.19	1.77×10^{-1}
<i>g7979</i>	0.98	2.40×10^{-1}
<i>g8479</i>	4.42	2.61×10^{-7}
<i>g8808</i>	1.73	1.57×10^{-1}
<i>g8850</i>	1.54	4.08×10^{-1}
<i>g8890</i>	0.78	4.25×10^{-1}
<i>g8907</i>	2.50	2.65×10^{-1}

*各遺伝子の L-Asp 誘導条件下における発現レベルに対する、D-Asp 誘導条件下における発現レベル (D-Asp/L-Asp)

2.5. DEGs の Gene ontology (GO) エンリッチメント解析

DEGs の機能的関連性を明らかにするため、Gene ontology (GO) エンリッチメント解析を行った。1,889 個の DEGs のうち 1,426 個の遺伝子にいずれかの GO term が割り当てられた。さらに、D-Asp 存在下で発現量が増加した DEGs (669 個) と発現量が低下した DEGs (757 個) それぞれについて GO エンリッチメント解析を行い、統計的に有意に濃縮された GO term (q -value < 0.05) が見いだされた (Fig. 2-2)。発現量が増加した DEGs には、RNA ポリメラーゼやリボソームに関連する GO term など遺伝子の転写や翻訳に関与する GO term が集中していた (Fig. 2-2A)。一方、D-Asp 存在下で発現量が低下した DEGs にはタンパク質の分解・代謝、アクチン細胞骨格や細胞壁やオルガネラを含む細胞構成要素に関連する GO term が集中していた (Fig. 2-2B)。

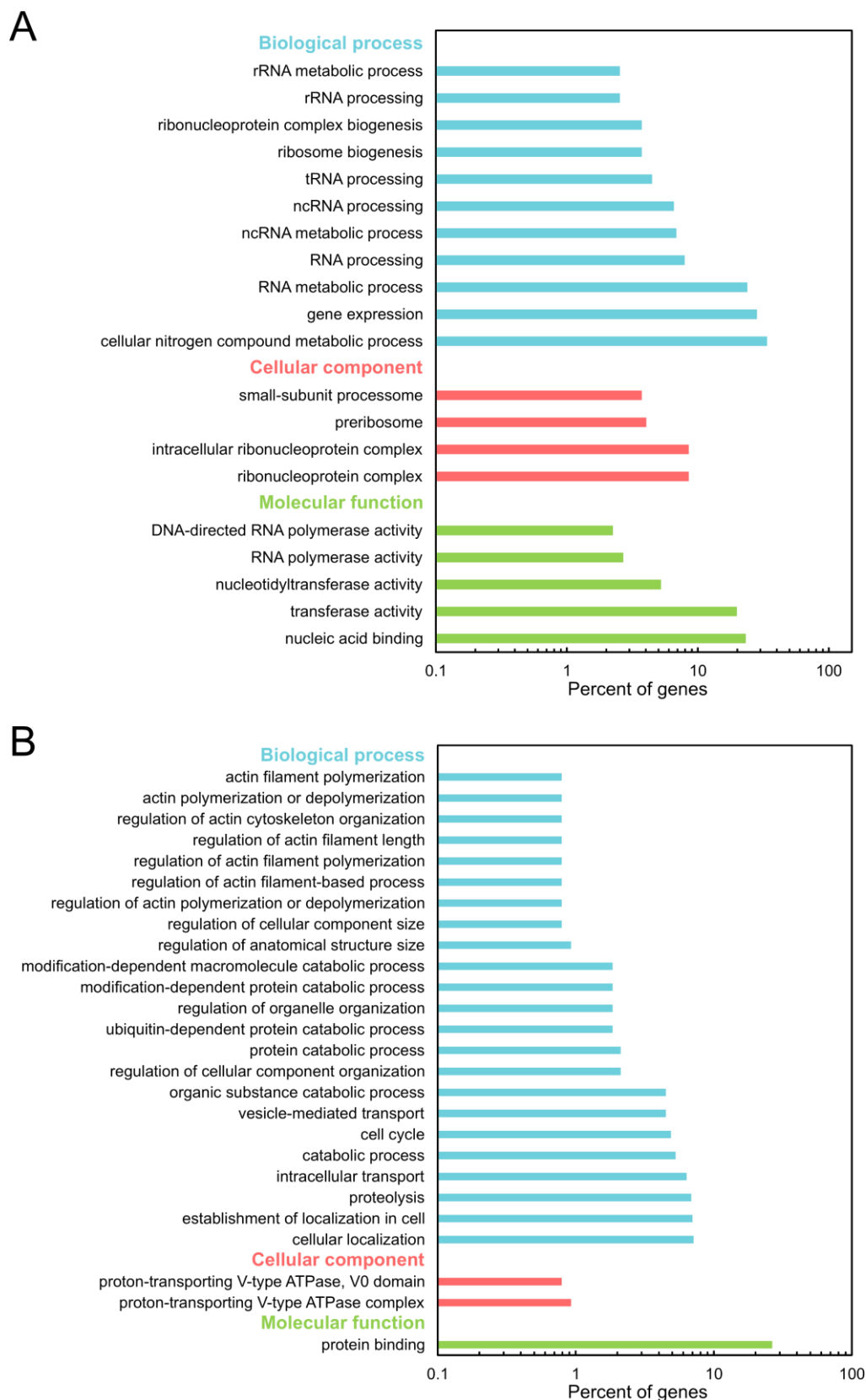


Fig. 2-2. DEGs の GO エンリッチメント解析

(A) D-Asp 存在下で発現量が上昇した DEGs の GO エンリッチメント解析. (B) D-Asp 存在下で発現量が低下した DEGs の GO エンリッチメント解析. 縦軸は GO class と term を示し, 横軸は D-Asp 存在下で発現が上昇または低下した全 DEGs に対してその GO term に分類された DEGs の割合を示している.

2.6. DEGs の KEGG Pathway 解析

DEGs に関する詳細な生物学的機能や代謝経路について調査するために KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Pathway 解析を行った。7つの主要な Class のうち Metabolism, Genetic information processing と Cellular processes にほとんど全ての DEGs が分類された。各 Class で 10 個以上の DEGs が含まれる経路を Fig. 2-3 に示す。Metabolism の Class では、アミノ酸代謝経路に加えて炭素源や脂肪酸、核酸代謝など幅広い代謝経路に関連する遺伝子の発現が上昇もしくは低下していた (Fig. 2-3)。このことは、UJ1 株が D-Asp の効率的な利用のために代謝経路を再構築していることを示唆している。特に、Ala, Asp and Glu metabolism に関連する DEGs や Pyrimidine と Purine metabolism に関与する DEGs の多くが D-Asp 存在下において発現が上昇していた (Fig. 2-3)。Genetic information processing の Class では Ribosome biogenesis in eukaryotes と RNA polymerase 機能に関連する DEGs の全ての発現が D-Asp の存在下において上昇していた (Fig. 2-3)。したがって、UJ1 株の D-Asp に対する応答において、遺伝子の転写や翻訳のプロセスが重要な役割を担うことを示唆している。一方、Ubiquitin mediated proteolysis と Protein processing in endoplasmic reticulum に関連する多くの DEGs の発現が低下していた (Fig. 2-3)。このことは、タンパク質のユビキチン化や小胞輸送の機能低下を意味しており、Cellular processes の Endocytosis や Phagosome, Cell cycle, Meiosis に関連する DEGs の多くの発現が D-Asp 存在下で低下したと関連していると考えられる (Fig. 2-3) (343-349)。逆に、Peroxisome に関連する DEGs の発現が上昇していた (Fig. 2-3)。UJ1 株は D-Asp の唯一の代謝酵素である *ChDDO* 遺伝子発現を誘導するとともに、反応の場である Peroxisome 機能も亢進させることで、効率的な D-Asp 利用を可能にしていると考えられる。

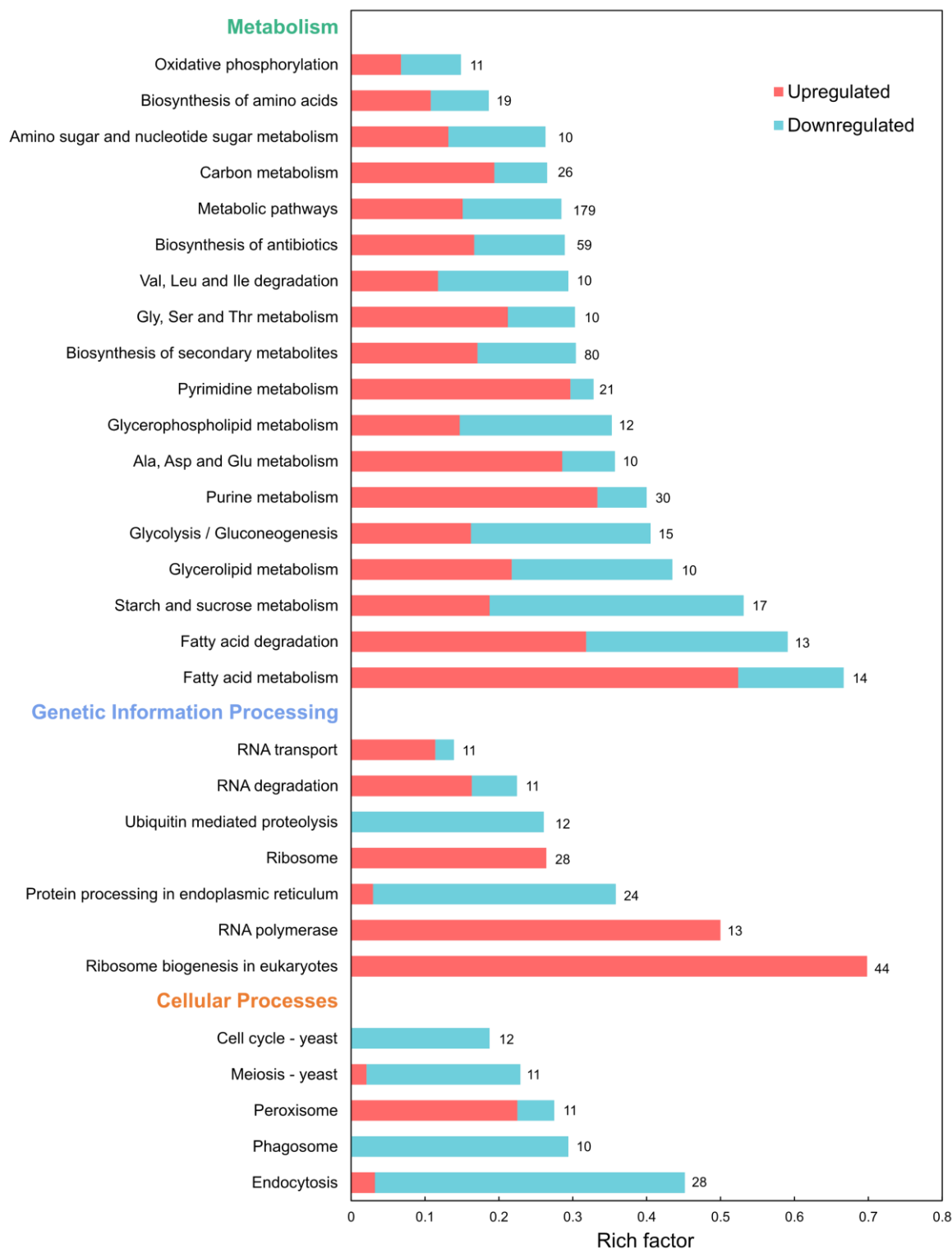


Fig. 2-3. DEGs の KEGG Pathway 解析

縦軸は KEGG pathway Class と Term, 横軸は Rich factor (各 KEGG pathway term に分類された全遺伝子に対する DEGs の割合) を示している. 数字はその KEGG pathway term に分類された DEGs の数を示す. D-Asp 存在下で発現が上昇した遺伝子を赤, 低下した遺伝子を青で示した.

3. 考察

D-アミノ酸代謝酵素遺伝子の発現

UJ1 株に見いだされた 7 個の D-アミノ酸代謝酵素遺伝子 (*ChDDO*, *ChDAO1-3*, *ChDNT*, *ChDSD*, *ChDTD*) のうち, *ChDDO*, *ChDAO1* と *ChDSD* の 3 個の遺伝子の発現が D-Asp において有意に増加した (Table 2-2). 特に, *ChDSD* 遺伝子は *ChDDO* 遺伝子の 3 倍以上の非常に高い発現増加を示した.

ChDAO1 の基質特異性は現在のところ不明であるが, DAO は中性及び塩基 D-アミノ酸を基質とし, D-Asp などの酸性 D-アミノ酸を基質としないこと, *ChDDO* 遺伝子破壊株は D-Asp で生育できないことから, *ChDAO1* が D-Asp を基質とするとは考え難い. *C. humicola* に近縁の *C. gattii* R265 株や *C. neoformans* H99 株に見いだされた 3 つの *DDO/DAO* ホモログ遺伝子の各 D-アミノ酸に対する誘導発現レベルと各 D-アミノ酸の生育利用への関与は明確に一致しないことから (303), *ChDAO1* 遺伝子が D-Asp によって転写誘導される生理的意義は現在のところ不明である.

DSD は D-Ser のピルビン酸とアンモニアへの分解反応を触媒する酵素であり, D-Ser に対して高い特異性を示す. 酵母 *S. cerevisiae* では, DSD は D-Ser の毒性低減に寄与すると報告されている (95). 真菌における *DSD* 遺伝子の転写制御に関する情報は知られていない. 一方, 大腸菌 *DSD* 遺伝子の転写は D-Ser によって誘導されることは知られているが, D-Asp による誘導は不明である (350). また, DSD と約 30%程度のアミノ酸配列同一性を有している細菌 *Delftia* sp. HT23 株由来の酵素 D-threo-3-ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼ (D-THA DH) の生産は 3-hydroxy Asp により誘導されるが, D-Asp では誘導されないことが明らかにされている (351). 一般的に, アミノ酸デヒドラターゼはアミノ酸側鎖に存在するヒドロキシ基と α 水素を水として引き抜く反応を触媒するため, *ChDSD* が D-Asp を基質にするとは考え難いが, D-Asp のヒドロキシ誘導体を代謝しているのかもしれない.

酵母 *S. cerevisiae* DNT は, D-Asp を含む幅広い遊離 D-アミノ酸を基質とし, D-アミノ酸の α -アミノ基にアセチル基を付加して D-アミノ酸の毒性を不活化する役割を担っている (96, 97). *DNT* 遺伝子の転写制御に関する情報は知られていないが, DNT は D-Asp を基質とすることから, *ChDNT* は D-Asp の毒性低減に寄与する可能性がある.

生物界に広く存在する *DTD* は D-アミノ酸が結合した tRNA 間のエステル結合を切断する酵素であり, これまでに D-Tyr や D-Trp, D-Asp, D-Ser, D-Gln, D-Leu の毒性低減に寄与することが知られている (72, 77, 92, 93). したがって, *ChDTD* も D-Asp 毒性の低減に寄与する可能性がある. 哺乳動物において, *DTD* 遺伝子は D-アミノ酸が豊富に存在する中枢神経系で高度に発現することが示されているが, 本遺伝子の詳細な発現制御は知られていない (88).

AAP 遺伝子の発現

Aap は細胞の栄養条件やアミノ酸の利用可能性に応じて、その活性が転写や翻訳、翻訳後の段階で多様な制御を受ける (216-218). 本研究の結果から、D-Asp は多くの AAP 遺伝子の発現を誘導することが示された (Table 2-3).

一般的に、酵母は生育環境の栄養条件が欠乏している場合には、アミノ酸を生育に利用するために、低親和性・広基質特異性 Aap の発現が誘導され、広範なアミノ酸取り込みを促進させる (352, 353). この発現誘導には、TORC1 (Target Of Rapamycin Complex1) 経路や GAAC (General Amino Acid Control) 経路が関与することが知られている (219-221). また、いくつかの Aap は細胞膜に存在する SPS センサーシステムが細胞外アミノ酸を感知して発現が誘導される (174-176).

TORC1 経路では、細胞内にアミノ酸が豊富に存在する場合やアンモニアや Gln などの良好な窒素源が存在する場合、TORC1 は活性化され Gln3 などの転写活性化因子のリン酸化を促進し、これら転写因子を核から細胞質に隔離させることで AAP 遺伝子やアミノ酸合成系遺伝子の転写を抑制する. 逆に、貧窒素源条件下ではこれら転写因子が脱リン酸化され核に移行することで、これら遺伝子の転写を誘導する. 本実験では NH₄Cl が存在する富窒素条件で行われたことから、発現量が増加した AAP 遺伝子は TORC1 経路の抑制によるものではないと考えられた.

GAAC 経路は、アミノ酸飢餓状況下で蓄積するアミノ酸非結合型の tRNA の増加を認識することで活性化され、転写因子 Gcn4 の発現レベルを増加させることで、AAP 遺伝子やアミノ酸合成系遺伝子の転写を誘導する. 逆に、アミノ酸が豊富に存在する条件下では Gcn4 の発現レベルが低下し、これら遺伝子の転写が抑制される. 細胞内に取り込まれた D-アミノ酸は L-アミノ酸と比較して割合は低いものの、tRNA と結合することが実験的に明らかにされている (72, 74-79, 354). この D-アミノ酸が結合した tRNA は DTD によって脱アミノアシル化されてリサイクルされる (72, 77, 92, 93). さらに、D-アミノ酸が結合した tRNA が形成されると、tRNA が減少するとともに核に集積する (72, 85-88, 355). このような tRNA の核への蓄積は、アミノ酸欠乏時にも観察されており、アミノ酸非結合型の tRNA の形成が一因と考えられている (356). さらに、アミノ酸飢餓条件において GCN4 遺伝子は転写レベルにおいても発現誘導を受けることが知られている (247). また、tRNA の核への蓄積は GCN4 遺伝子の翻訳レベルを増強することが示された (244). したがって、UJ1 株における D-Asp 存在下での AAP 遺伝子の発現誘導は、ChGcn4 レベルの増加によって引き起こされた可能性がある. UJ1 株には *S. cerevisiae* の Gcn4 ホモログは見いだされなかったが、*C. neoformans* の Gcn4 (CNAG_06246) に対してアミノ酸配列同一性 32.6%を示すホモログとして g4609 (*ChGCN4*) が見いだされた (357, 358). *ChGCN4* の転写レベルは D-Asp において有意に増加していた (Fold change; 2.13, *q*-val.; 3.79×10^{-15}). *GCN4* 遺伝子の転写レベルにおける誘導メカニズムの詳細は明らかにされていないが、D-Asp は *ChGCN4* の転写レベルを増加させ GAAC 経路を活性化し、AAP 遺伝子の発現を誘導したと考

えられる。

酵母 *S. cerevisiae* や *C. albicans* の SPS システムでは, Ssy1 と Ptr3, Ssy5 から構成される細胞膜アミノ酸センサーが, Pro を除く全てのアミノ酸を認識して転写因子 Stp1 と Stp2 を活性化し, 分岐鎖アミノ酸パーミターゼ *BAP1*, 2 遺伝子や酸性アミノ酸パーミターゼ *DIP5* 遺伝子などいくつかの *AAP* 遺伝子の転写を誘導する (174, 177, 359). さらに, Ssy1 は L,D-Leu を同等のレベルで感知し, 分岐鎖アミノ酸パーミターゼ *BAP2* 遺伝子の転写を誘導することが示されている (174, 177). UJ1 株には, *S. cerevisiae* の Ssy1 に対してアミノ酸配列同一性 22.9%を示すホモログとして ChAap1 が見いだされたが, Stp1 と Stp2 のホモログは見いだされなかった. 同様に, 近縁酵母 *C. neoformans* にも Ssy1 ホモログが存在するが, Stp1 と Stp2 ホモログは見いだされていない (213). したがって現在のところ, UJ1 株において SPS センサーシステムのような細胞外 D-Asp を感知するシステムが存在するかは不明である. さらに, 細胞内外の D-アミノ酸と *AAP* 遺伝子の転写制御に関する情報はほとんど知られていない.

ペルオキシソーム関連遺伝子の発現

酵母ペルオキシソームには脂肪酸の β 酸化経路やグリオキシル酸経路、D-アミノ酸やメタノール代謝など様々な代謝経路が存在している (360). 本研究の結果から、D-Asp はペルオキシソーム機能形成に関与するペルオキシシン (*PEX*) 遺伝子の発現を誘導した (Fig. 2-3). 具体的には、ペルオキシソームの形成および分裂に関与する *Pex19* やペルオキシソームタンパク質の輸送に関与する *Pex5* と *Pex13* のホモログ遺伝子の発現が有意に上昇した (Table 2-4) (361). 実際に、D-Asp で誘導培養した *C. humicola* UJ1 株の細胞にはペルオキシソームの増殖が観察されていることから (147), D-Asp が *PEX* 遺伝子の発現を誘導することは妥当である.

Table 2-4. D-Asp 存在下で発現が上昇したペルオキシソーム関連遺伝子

Term	Gene	Fold change*	Putative function	KO number	Entrez ID
Peroxisome	g2424	2.13	acetyl-CoA acyltransferase 1 [EC:2.3.1.16]	cne:CNA04700	3253293
	g4531	3.33	peroxin-5 (<i>PEX5</i>)	cne:CNB02270	3255595
	g2697	2.07	peroxin-13 (<i>PEX3</i>)	cne:CNC03550	3256121
	g6855	2.36	long-chain acyl-CoA synthetase [EC:6.2.1.3]	cne:CNI00710	3259396
	g4167	2.47	long-chain acyl-CoA synthetase [EC:6.2.1.3]	cne:CNI00710	3259396
	g815	2.37	acyl-CoA oxidase [EC:1.3.3.6]	cne:CNG00320	3258644
	g6749	2.46	peroxin-19 (<i>PEX19</i>)	cne:CND03130	3257318
	g6619	7.39	carnitine <i>O</i> -acetyltransferase [EC:2.3.1.7]	cne:CNF04660	3258465
	g2636	7.50	protein <i>Mpv17</i>	cne:CNA06860	3253980

*各遺伝子の L-Asp 誘導条件下における発現レベルに対する、D-Asp 誘導条件下における発現レベル (D-Asp/L-Asp)

ペルオキシソームの形成や機能は、真核生物のモデル生物として、真菌において活発に研究されてきた (362). 特に、脂肪酸やメタノールで誘導されるペルオキシソーム増殖が活発に研究されており、酵母 *S. cerevisiae* では脂肪酸に応答する転写因子 *Pip2*, *Oaf1* や *Adr1* が *PEX* や脂肪酸代謝関連酵素遺伝子の転写制御に関与していることが明らかにされている (363-365). また、メタノール資化性酵母 *H. polymorpha* ではメタノールによって転写レベルが増大する転写因子 *Mmp1* が、*Pex* やアルコールオキシダーゼを含むメタノール資化関連遺伝子のマスターレギュレーターであると考えられている (366-368). 一方、メタノール資化性酵母 *C. boidinii* や *P. methanolica* において、D-Ala が *DAO* と *PEX* 遺伝子の転写を誘導することが報告されているが、D-Ala によるこれら遺伝子の転写誘導に関わる転写因子は明らかにされていない (134, 149). したがって現在のところ、D-アミノ酸による *DDO* や *DAO* などの D-アミノ酸代謝酵素遺伝子の誘導発現だけでなく、D-アミノ酸により誘導されるペルオキシソーム増殖メカニズムに関する知見もほとんどない. 一方、*S. cerevisiae* において *Gcn4* が *PEX* 遺伝子の転写を誘導することが示唆された (369). したがって、UJ1 株における D-Asp による *PEX* 遺伝子の発現誘導は、D-Asp による *AAP* 遺伝子の発現誘導と同様に *ChGcn4* レベルの増加が関与しているかもしれない.

D-Asp によるリボソーム生合成関連遺伝子群の発現誘導

Genetic information processing の Class において Ribosome biogenesis と RNA polymerase 機能に関与する多くの遺伝子の発現が上昇していた (Fig. 2-3, Table 2-5). また, Metabolism の Class においてこれら遺伝子に関連すると考えられる Pyrimidine や Purine metabolism に関連する遺伝子の多くが誘導されていた (Fig. 2-3, Table 2-5). このことから, D-Asp により RNA 合成と翻訳に関する遺伝子の発現が誘導されることが示された. 前にも述べたが, 細胞内に D-アミノ酸が取り込まれると D-アミノ酸が結合した tRNA が形成され, tRNA が減少するとともに核に集積することでタンパク質合成が阻害されることが知られている (72, 85-88, 355). この D-アミノ酸によるタンパク質合成阻害が細胞にどのような応答を引き起こすかはあまり明らかにされていないが, 酵母 *S. cerevisiae* において, シクロヘキシミド (CHX) でタンパク質合成を阻害した細胞では, 栄養源を感知して細胞成長を制御する TORC1 が活性化され, リボソーム生合成 (Ribi) 遺伝子群 (リボソームのアセンブリと修飾に関与するアクセサリー因子や rRNA, RNA ポリメラーゼ, リボヌクレオチド代謝遺伝子などの 200 個以上の遺伝子) の発現を誘導することが報告されている (239, 240, 370). これは, CHX によるタンパク質合成阻害が細胞内の遊離のアミノ酸濃度を増加させることで擬似的な富栄養状態が作られ TORC1 を活性化することに起因すると考えられている (370, 371). したがって, UJ1 株においても, D-Asp によるタンパク質合成阻害が擬似的な富栄養条件を作りだし, TORC1 が活性化されたことで, リボソームやヌクレオチド生合成に関与する多くの遺伝子の発現が誘導された可能性が考えられる.

Table 2-5. D-Asp 存在下で発現が上昇したリボソーム生合成関連遺伝子群

Term	Gene	Fold change*	Putative function	KO number	Entrez ID
Pyrimidine metabolism	g2220	4.75	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA2 [EC:2.7.7.6]	cne:CNF04080	3258149
	g3674	4.48	carbamoyl-phosphate synthase / aspartate carbamoyltransferase [EC:6.3.5.5 2.1.3.2]	cne:CNA06000	3253832
	g6744	6.02	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1 [EC:2.7.7.6]	cne:CND03140	3257411
	g1652	5.96	CTP synthase [EC:6.3.4.2]	cne:CNC00220	3256812
	g2656	2.61	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1	cne:CNA07710	3253818
	g2125	3.04	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC2 [EC:2.7.7.6]	cne:CNI00420	3259518
	g3480	2.16	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC3	cne:CNI02630	3259437
	g7361	3.98	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA12	cne:CNC02990	3256285
	g4987	3.87	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA49	cne:CNB01360	3255978
	g6561	2.89	carbamoyl-phosphate synthase large subunit [EC:6.3.5.5]	cne:CNM01170	3255144
	g2600	2.11	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC5	cne:CNA06010	3253771
	g393	2.63	orotate phosphoribosyl transferase [EC:2.4.2.10]	cne:CNG03730	3258511
	g8590	3.82	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC3	cne:CNE05090	3257592
	g8331	3.11	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1 [EC:2.7.7.6]	cne:CNF00390	3258319
	g8332	5.12	UMP-CMP kinase [EC:2.7.4.14]	cne:CNF00400	3258230
	g8737	3.11	DNA polymerase delta subunit 1 [EC:2.7.7.7]	cne:CNK00560	3254390
	g8757	4.35	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA43	cne:CNK01350	3254646
	g4989	3.18	DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC2	cne:CNB01370	3255880
	g6740	3.77	DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC1	cne:CND03040	3256969
	Purine metabolism	g7361	3.98	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA12	cne:CNC02990
g6744		6.02	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1 [EC:2.7.7.6]	cne:CND03140	3257411
g6740		3.77	DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC1	cne:CND03040	3256969
g5684		2.34	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase / IMP cyclohydrolase [EC:2.1.2.3 3.5.4.10]	cne:CNA06790	3253233
g2125		3.04	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC2 [EC:2.7.7.6]	cne:CNI00420	3259518
g3480		2.16	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC3	cne:CNI02630	3259437
g8668		2.10	adenylate kinase [EC:2.7.4.3]	cne:CNK03420	3254609
g2085		3.21	guanine deaminase [EC:3.5.4.3]	cne:CNN00990	3255533
g7579		3.83	amidophosphoribosyltransferase [EC:2.4.2.14]	cne:CNC04700	3256268
g2600		2.11	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC5	cne:CNA06010	3253771
g8830		2.71	IMP dehydrogenase [EC:1.1.1.205]	cne:CNA04240	3253376
g3233		2.94	adenylate kinase [EC:2.7.4.3]	cne:CNH02400	3259354
g4221		2.90	phosphoribosylformylglycinamide synthase [EC:6.3.5.3]	cne:CNI03300	3259499
g8590		3.82	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC3	cne:CNE05090	3257592
g8331		3.11	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1 [EC:2.7.7.6]	cne:CNF00390	3258319

Term	Gene	Fold change*	Putative function	KO number	Entrez ID	
Purine metabolism	g2220	4.75	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA2 [EC:2.7.7.6]	cne:CNF04080	3258149	
	g8809	3.80	GMP synthase (glutamine-hydrolysing) [EC:6.3.5.2]	cne:CNK02180	3254682	
	g2656	2.61	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1	cne:CNA07710	3253818	
	g8757	4.35	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA43	cne:CNK01350	3254646	
	g4987	3.87	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA49	cne:CNB01360	3255978	
	g7520	2.69	adenylosuccinate lyase [EC:4.3.2.2]	cne:CNG03070	3258817	
	g2077	2.95	phosphoribosylamine-glycine ligase / phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase [EC:6.3.4.13 6.3.3.1]	cne:CNN00440	3255300	
	g8737	3.11	DNA polymerase delta subunit 1 [EC:2.7.7.7]	cne:CNK00560	3254390	
	g6254	2.29	ribose-phosphate pyrophosphokinase [EC:2.7.6.1]	cne:CNG02440	3258605	
	g4989	3.18	DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC2	cne:CNB01370	3255880	
	Ribosome biogenesis in eukaryotes	g2982	3.11	nuclear GTP-binding protein	cne:CNC01210	3256299
		g794	3.85	RNA 3'-terminal phosphate cyclase-like protein	cne:CNG03270	3258964
		g7265	3.69	RIO kinase 2 [EC:2.7.11.1]	cne:CNC01960	3256506
g6629		4.66	nucleolar protein 4	cne:CNN01920	3255326	
g6666		3.47	ribosomal RNA-processing protein 7	cne:CNG00800	3258799	
g4236		3.58	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1	cne:CNI03970	3259552	
g6480		4.21	RIO kinase 1 [EC:2.7.11.1]	cne:CNN01780	3255542	
g3410		3.30	U3 small nucleolar RNA-associated protein 4	cne:CNM00140	3255100	
g3371		3.46	AAA family ATPase	cne:CNG01950	3258791	
g637		3.08	translation initiation factor 6	cne:CNJ00650	3254179	
g5190		2.80	U3 small nucleolar RNA-associated protein MPP10	cne:CNB05580	3255590	
g24		5.14	U3 small nucleolar RNA-associated protein 22	cne:CND02710	3256988	
g2789		4.70	nuclear GTP-binding protein	cne:CNC03480	3256324	
g6782		3.78	periodic tryptophan protein 2	cne:CNG04380	3258929	
g419		3.47	U3 small nucleolar RNA-associated protein 12	cne:CNL05200	3254866	
g5298		3.47	U3 small nucleolar RNA-associated protein 13	cne:CNC05910	3256407	
g8564		3.01	rRNA small subunit pseudouridine methyltransferase Nep1 [EC:2.1.1.260]	cne:CNJ01990	3254039	
g5645		3.03	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 2	cne:CNE01710	3257858	
g4702		2.96	midasin	cne:CNJ01380	3254120	
g4994		3.49	U3 small nucleolar RNA-associated protein 5	cne:CNB01050	3255832	
g5357		3.06	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4 [EC:5.4.99.-]	cne:CND02940	3256924	
g6242		2.77	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein SNU13	cne:CNG01500	3258685	
g63		3.19	60S ribosomal export protein NMD3	cne:CNK01600	3254570	
g3652		5.05	U3 small nucleolar RNA-associated protein 15	cne:CNA07530	3253546	
g5709		3.72	U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP4	cne:CNE01090	3257909	
g5215		2.81	U3 small nucleolar RNA-associated protein 6	cne:CNB05270	3255983	

Term	Gene	Fold change*	Putative function	KO number	Entrez ID	
Ribosome biogenesis in eukaryotes	g5458	3.85	RNA exonuclease [EC:3.1.-.-]	cne:CNN02200	3255321	
	g5575	3.86	nucleolar GTP-binding protein	cne:CNN01880	3255434	
	g2720	5.32	ribosome biogenesis protein BMS1	cne:CNC02190	3256650	
	g846	3.74	large subunit GTPase 1 [EC:3.6.1.-]	cne:CNC01470	3256187	
	g8178	4.23	U3 small nucleolar RNA-associated protein 14	cne:CNB00340	3255946	
	g4010	4.23	ribosome biogenesis ATPase	cne:CNA06980	3253538	
	g5052	2.25	5'-3' exoribonuclease 2 [EC:3.1.13.-]	cne:CNF01810	3258492	
	g3233	2.94	adenylate kinase [EC:2.7.4.3]	cne:CNH02400	3259354	
	g6755	5.38	U3 small nucleolar RNA-associated protein 21	cne:CND02860	3257313	
	g6491	5.56	<i>N</i> -acetyltransferase 10 [EC:2.3.1.-]	cne:CNN01050	3255449	
	g8337	3.09	nucleolar protein 58	cne:CNF00090	3258236	
	g4952	5.46	NET1-associated nuclear protein 1 (U3 small nucleolar RNA-associated protein 17)	cne:CNB01450	3255660	
	g8798	2.39	RNA-binding protein NOB1	cne:CNA04300	3253364	
	g6347	3.21	rRNA 2'- <i>O</i> -methyltransferase fibrillarlin [EC:2.1.1.-]	cne:CNK00110	3254425	
	g7546	3.09	nucleolar protein 56	cne:CNE03320	3257711	
	g8739	5.98	U3 small nucleolar RNA-associated protein 18	cne:CNB00040	3255586	
	g3348	6.27	U3 small nucleolar RNA-associated protein 10	cne:CNI01790	3259411	
	g5466	4.97	nuclear GTP-binding protein	cne:CND05640	3257402	
	RNA polymerase	g2220	4.75	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA2 [EC:2.7.7.6]	cne:CNF04080	3258149
g2656		2.61	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1	cne:CNA07710	3253818	
g2125		3.04	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC2 [EC:2.7.7.6]	cne:CNI00420	3259518	
g3480		2.16	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC3	cne:CNI02630	3259437	
g7361		3.98	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA12	cne:CNC02990	3256285	
g4987		3.87	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA49	cne:CNB01360	3255978	
g2600		2.11	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC5	cne:CNA06010	3253771	
g8590		3.82	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC3	cne:CNE05090	3257592	
g8331		3.11	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1 [EC:2.7.7.6]	cne:CNF00390	3258319	
g6744		6.02	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1 [EC:2.7.7.6]	cne:CND03140	3257411	
g8757		4.35	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA43	cne:CNK01350	3254646	
g4989		3.18	DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC2	cne:CNB01370	3255880	
g6740		3.77	DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC1	cne:CND03040	3256969	
Ribosome		g1596	2.08	large subunit ribosomal protein L5e	cne:CNC05360	3256387
		g5085	2.61	large subunit ribosomal protein L6	cne:CNG03160	3258738
	g4035	2.24	large subunit ribosomal protein L4	cne:CNB02740	3255565	
	g6628	2.42	small subunit ribosomal protein S12	cne:CNN01910	3255535	

Term	Gene	Fold change*	Putative function	KO number	Entrez ID
Ribosome	g5026	2.17	small subunit ribosomal protein S10e	cne:CNF01650	3258245
	g4219	2.56	large subunit ribosomal protein L15	cne:CNI03170	3259693
	g1257	2.16	large subunit ribosomal protein L3e	cne:CNK02240	3254568
	g8504	2.98	large subunit ribosomal protein L23	cne:CNJ01410	3254119
	g1606	2.01	large subunit ribosomal protein L37e	cne:CNC00700	3256811
	g1547	2.51	small subunit ribosomal protein S10	cne:CNI01480	3259785
	g394	2.08	small subunit ribosomal protein S8e	cne:CNG03720	3258792
	g2445	2.48	large subunit ribosomal protein L24	cne:CNK03370	3254639
	g8563	2.20	large subunit ribosomal protein L4e	cne:CNJ01920	3254193
	g6500	2.49	small subunit ribosomal protein S2	cne:CND04600	3257475
	g8383	2.28	small subunit ribosomal protein S14e	cne:CNF00670	3258345
	g1647	2.03	large subunit ribosomal protein L23Ae	cne:CNC00350	3256686
	g3214	2.45	large subunit ribosomal protein L7Ae	cne:CNH02040	3259208
	g3032	2.00	large subunit ribosomal protein L12e	cne:CNC06990	3256329
	g7350	3.02	large subunit ribosomal protein L24e	cne:CNC03010	3256149
	g7373	2.70	large subunit ribosomal protein L1	cne:CNC03070	3256179
	g5572	2.15	small subunit ribosomal protein S2e	cne:CNF04150	3258428
	g2960	2.47	large subunit ribosomal protein L5	cne:CNC01630	3256596
	g1897	2.13	small subunit ribosomal protein S3e	cne:CNA01060	3253810
	g4489	2.88	small subunit ribosomal protein S11	cne:CNI02150	3259537
g3749	2.15	large subunit ribosomal protein L22	cne:CNE04980	3257499	
g7323	3.11	small subunit ribosomal protein S15	cne:CNC01900	3256136	
g6102	2.24	small subunit ribosomal protein S9	cne:CNG02250	3258621	
g2458	2.01	small subunit ribosomal protein S5e	cne:CNK03230	3254693	
RNA degradation	g6197	3.72	protein AIR1/2	cne:CNA02330	3253825
	g871	4.86	exosome complex protein LRP1	cne:CNA01840	3253820
	g4762	2.04	molecular chaperone DnaK	cne:CNL04260	3254889
	g8231	3.18	exosome complex exonuclease RRP6 [EC:3.1.13.-]	cne:CNC03940	3256693
	g4716	3.53	6-phosphofructokinase 1 [EC:2.7.1.11]	cne:CNJ01080	3254165
	g6287	2.33	polyadenylate-binding protein	cne:CNI01160	3259708
	g5052	2.25	5'-3' exoribonuclease 2 [EC:3.1.13.-]	cne:CNF01810	3258492
	g5426	3.99	ATP-dependent RNA helicase DOB1 [EC:3.6.4.13]	cne:CND05090	3257284
RNA transport	g5064	2.32	exportin-T	cne:CNE02810	3257540
	g3047	2.18	translation initiation factor 1A	cne:CNH01170	3259000
	g2621	2.51	translation initiation factor 4A	cne:CNA07620	3253907

Term	Gene	Fold change*	Putative function	KO number	Entrez ID
RNA transport	g4953	2.12	translation initiation factor 3 subunit D	cne:CNB01420	3255656
	g6287	2.33	polyadenylate-binding protein	cne:CNI01160	3259708
	g8340	2.24	ribonuclease Z [EC:3.1.26.11]	cne:CNF00100	3258073
	g7000	2.01	translation initiation factor 3 subunit B	cne:CND05740	3257438
	g4792	2.57	translation initiation factor 4G	cne:CNA03900	3253408
	g63	3.19	60S ribosomal export protein NMD3	cne:CNK01600	3254570

*各遺伝子の L-Asp 誘導条件下における発現レベルに対する、D-Asp 誘導条件下における発現レベル (D-Asp/L-Asp)

D-Asp による細胞周期関連遺伝子の発現抑制

Cellular processes の Class において, Peroxisome 以外の Cell cycle や Meiosis, Phagosome, Endocytosis に関連する多くの遺伝子の発現が D-Asp の存在により逆に低下した (Fig. 2-3). 細胞周期に関係する遺伝子の発現が低下したことから, D-Asp の存在により細胞増殖の低下が示唆された (Table 2-6). D-Asp 存在下の UJ1 株では Cdc20 や APC/C, コンデンシンと呼ばれる染色体を凝集させる Smc2 と Ycs4, Brn1, Ycg1 からなるタンパク質複合体ホモログ遺伝子などの発現が低下していた (Table 2-6). Cdc20 と APC/C は他のタンパク質と紡錘体チェックポイント複合体を形成し, 細胞周期 M 期における染色体分配を適切に行う役割を果たしている (372). また, コンデンシンは M 期の染色体凝縮に中心的な役割を果たすタンパク質複合体であり, M 期以外の時期においても多様な染色体機能に関わることが明らかになっている (373). したがって, D-Asp 存在下の UJ1 株において M 期の染色体凝集と分配に障害が起きている可能性が考えられる.

Table 2-6. D-Asp 存在下で発現が低下した細胞周期関連遺伝子

Term	Gene	Fold change*	Putative function	KO number	Entrez ID
Cell cycle - yeast	g6137	0.49	mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD1	cne:CNJ02500	3254215
	g2430	0.49	condensin complex subunit 1 (YCS4)	cne:CNK02970	3254443
	g3070	0.43	condensin complex subunit 3 (YCG1)	cne:CNA06590	3253910
	g3716	0.42	anaphase-promoting complex subunit 6 (APC/C)	cne:CNE03820	3257979
	g7071	0.44	E3 ubiquitin-protein ligase RBX1 [EC:2.3.2.32]	cne:CNB03140	3256060
	g403	0.36	structural maintenance of chromosome 2 (SMC2)	cne:CNG04180	3258928
	g8144	0.39	separase [EC:3.4.22.49]	cne:CNB00660	3255663
	g7056	0.38	condensin complex subunit 2 (BRN1)	cne:CNL06800	3254852
	g5289	0.35	anaphase-promoting complex subunit 8 (APC/C)	cne:CNC05740	3256315
	g8605	0.35	checkpoint serine/threonine-protein kinase [EC:2.7.11.1]	cne:CNG03850	3258523
	g4183	0.36	cell division cycle 20, cofactor of APC complex	cne:CNI04330	3259570
	g94	0.32	anaphase-promoting complex subunit 2 (APC/C)	cne:CNN02340	3255460
	Meiosis - yeast	g6137	0.49	mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD1	cne:CNJ02500
g3716		0.42	anaphase-promoting complex subunit 6	cne:CNE03820	3257979
g4801		0.31	protein kinase A [EC:2.7.11.11]	cne:CNA03840	3253859
g8144		0.39	separase [EC:3.4.22.49]	cne:CNB00660	3255663
g5289		0.35	anaphase-promoting complex subunit 8	cne:CNC05740	3256315
g6784		0.41	adenylate cyclase [EC:4.6.1.1]	cne:CNG03670	3258703
g8605		0.35	checkpoint serine/threonine-protein kinase [EC:2.7.11.1]	cne:CNG03850	3258523
g4183		0.36	cell division cycle 20, cofactor of APC complex	cne:CNI04330	3259570
g6632		0.43	carbon catabolite-derepressing protein kinase [EC:2.7.11.1]	cne:CNF04650	3258277
g94		0.32	anaphase-promoting complex subunit 2 (APC/C)	cne:CNN02340	3255460

*各遺伝子の L-Asp 誘導条件下における発現レベルに対する, D-Asp 誘導条件下における発現レベル (D-Asp/L-Asp)

細胞周期や減数分裂に関係する遺伝子の発現には多数の活性化因子や抑制因子が複雑に関わっている. 細胞周期の進行は細胞の栄養条件によって制御され, 栄養源を感知する TORC1 経路が関与することが知られている (239, 374, 375). 活性化された TORC1 は転写因子 SBF と MBF を活性化して, 細胞周期を制御する G₁ サイクリン (CLN) またはサイクリン B (CLB) 遺伝子の転写および翻訳レベルを増強することで, G₁/S 期および G₂/M 期移行を促進する. Cln

や Clb は cdc28 とサイクリン依存性キナーゼ (CDK) 複合体を形成し標的タンパク質のリン酸化を介して細胞周期を制御する。逆に、貧栄養条件では TORC1 経路が活性化されず、細胞周期は G₁/G₀期で停滞する。前述したように、D-Asp 存在下では TORC1 が活性化されることが示唆されたことから、発現が抑制された細胞周期関連遺伝子は TORC1 経路の抑制によるものではないと考えられた。

近年、酵母 *S. cerevisiae* において Gcn4 が *CLN1,2* 遺伝子の翻訳レベルを抑制することが示唆された (376)。Cln1, 2 は SBF と MBF の抑制因子 Whi5 を不活性化することで、自身やその他の *CLB* 遺伝子の転写を促進することができる (375)。本研究では、D-Asp が tRNA の核への蓄積または減少を引き起こすことで ChGcn4 レベルが増加することが示唆された。このことから、UJ1 株ではサイクリン遺伝子の発現が抑制されたことで、細胞周期の進行が抑制された可能性がある。実際に UJ1 株に見いだされたサイクリン遺伝子の転写レベルは D-Asp によって低下していた (Table 2-7)。したがって、UJ1 株における D-Asp 存在下での細胞周期関連遺伝子の発現抑制は、ChGcn4 レベルの増加によってサイクリン遺伝子の発現レベルが低下したことに起因すると考えられる。また、D-Tyr で処理したヒト HeLa 細胞では、S 期と G₂/M 期の細胞増加が観察されており、tRNA の編集・輸送と細胞周期における未知の関係が指摘されていることから (88)、UJ1 株において tRNA の編集・輸送が細胞周期関連タンパク質の発現に負の影響を与えているかもしれない。

Table 2-7. サイクリン遺伝子の発現変動レベル

Genes	Fold change*	q-value
<i>g626</i>	0.55	7.61×10 ⁻³
<i>g7231</i>	0.61	3.28×10 ⁻⁴
<i>g3667</i>	0.64	1.56×10 ⁻¹⁵

S. cerevisiae Cln1-3, Clb1-6 のいずれか 1 つに対して相同性 ($e\text{-value} \leq 1.0 \times 10^{-50}$) を有する遺伝子の発現レベルを示した。*各遺伝子の L-Asp 誘導条件下における発現レベルに対する、D-Asp 誘導条件下における発現レベル (D-Asp/L-Asp)。

D-Asp によるオートファジー関連遺伝子の発現抑制

Cellular processes の Class において Phagosome や Endocytosis に関連する遺伝子の発現が抑制されていた (Fig. 2-3, Table 2-8). オートファゴソームは、オートファジー時にのみ細胞内に見られる脂質 2 重膜で囲まれた球状のオルガネラであり、細胞が飢餓状態に陥った際に、細胞質やオルガネラの一部を分解してエネルギーやタンパク質合成のための材料を供給することで、生存を存続させる役割を担っている (377, 378). オートファジーは、アミノ酸、窒素源や炭素源などの様々な栄養源の飢餓状態により TORC1 の働きが抑制されることで誘導される (379). 一方、栄養源が豊富な状態では TORC1 が活性化されるためオートファジーは誘導されない。オートファゴソームの形成には、多数のタンパク質因子が関与しているが、D-Asp 存在下での UJ1 株では、Vps30/Atg6, Vps34, Sec22, Atg13, Atg4 や Vac8 ホモログ遺伝子などの発現が低下していた (Fig. 2-3, Table 2-8). Vps30/Atg6 と Vps34 は他のタンパク質とホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) 複合体を形成しており、オートファジー形成に必須である (380, 381). Sec22 は、オートファジー形成時の膜融合などに関係している (382). また、Atg13, Atg4 や Vac8 は複数の他の Atg (autophagy-related) タンパク質とともに、液胞近傍に存在する前オートファゴソーム構造体 (PAS) と呼ばれる複合体を形成することに関係している (383, 384). 酵母 *S. cerevisiae* において、オートファジー形成に関連する ATG 遺伝子群の転写は Rph1 や Pho23 などの複数のリプレッサーにより抑制されていることが明らかにされている (385-387). これらリプレッサーは、TORC1 不活性化時にリン酸化されることで不活性化し、ATG 遺伝子が転写される。一方、TORC1 活性化時には ATG 遺伝子の転写を抑制する (385-387). したがって、D-Asp による Phagosome 形成に関連する遺伝子の発現抑制は、D-Asp によるリボソーム生合成関連遺伝子群と同様に、細胞内の遊離アミノ酸濃度増加による TORC1 の活性化に起因する可能性が考えられる。

Table 2-8. D-Asp 存在下で発現が低下したオートファジー関連遺伝子

Term	Gene	Fold change*	Putative function	KO number	Entrez ID
Ubiquitin mediated proteolysis	g6277	0.35	ubiquitin-conjugating enzyme E2 N [EC:2.3.2.23]	cne:CNE03880	3257505
	g7071	0.44	E3 ubiquitin-protein ligase RBX1 [EC:2.3.2.32]	cne:CNB03140	3256060
	g2951	0.50	ubiquitin-activating enzyme E1 [EC:6.2.1.45]	cne:CNA01230	3253709
	g3716	0.42	anaphase-promoting complex subunit 6	cne:CNE03820	3257979
	g3057	0.40	E3 ubiquitin-protein ligase synoviolin [EC:2.3.2.27]	cne:CNH01290	3259240
	g4789	0.45	ubiquitin conjugation factor E4 B [EC:2.3.2.27]	cne:CNL04300	3254790
	g94	0.32	anaphase-promoting complex subunit 2	cne:CNN02340	3255460
	g5527	0.46	ubiquitin-conjugating enzyme E2 G1 [EC:2.3.2.23]	cne:CNF04270	3258043
	g5289	0.35	anaphase-promoting complex subunit 8	cne:CNC05740	3256315
	g4708	0.50	ubiquitin-conjugating enzyme E2 M [EC:2.3.2.34]	cne:CNJ01020	3254214
	g5293	0.38	ubiquitin-conjugating enzyme (huntingtin interacting protein 2) [EC:2.3.2.23]	cne:CNC05160	3256722
	g4183	0.36	cell division cycle 20, cofactor of APC complex (CDC20)	cne:CNI04330	3259570
	Protein processing in endoplasmic reticulum	g877	0.49	oligosaccharyltransferase complex subunit delta (ribophorin II)	cne:CNC04720
g7071		0.44	E3 ubiquitin-protein ligase RBX1 [EC:2.3.2.32]	cne:CNB03140	3256060
g8158		0.46	protein transport protein SEC24	cne:CNB00260	3255871
g5527		0.46	ubiquitin-conjugating enzyme E2 G1 [EC:2.3.2.23]	cne:CNF04270	3258043
g1562		0.50	protein transport protein SEC13	cne:CNI03320	3259673
g2961		0.34	peptide-N ^H -(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase [EC:3.5.1.52]	cne:CNC01650	3256632
g3443		0.24	Ataxin-3 [EC:3.4.22.-]	cne:CNI03470	3259734
g1609		0.42	protein disulfide-isomerase A6 [EC:5.3.4.1]	cne:CNC05350	3256273
g197		0.36	dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase [EC:2.4.99.18]	cne:CNI01850	3259592
g8565		0.45	protein OS-9	cne:CNJ01780	3254031
g4554		0.31	protein kinase C substrate 80K-H	cne:CNA04410	3253346
g4823		0.40	phospholipase A-2-activating protein	cne:CNL05350	3254986
g7146		0.29	GTP-binding protein SAR1 [EC:3.6.5.-]	cne:CNB03430	3255850
g2723		0.46	nuclear protein localization protein 4	cne:CNC02370	3256137
g3057		0.40	E3 ubiquitin-protein ligase synoviolin [EC:2.3.2.27]	cne:CNH01290	3259240
g4789		0.45	ubiquitin conjugation factor E4 B [EC:2.3.2.27]	cne:CNL04300	3254790
g6320		0.32	Derlin-2/3	cne:CNN00930	3255509
g1458		0.48	oligosaccharyltransferase complex subunit beta	cne:CNJ01740	3254145
g8714		0.34	protein transport protein SEC31	cne:CNJ02300	3254267
g2618		0.42	UV excision repair protein RAD23	cne:CNA07500	3253530
g6455	0.42	ubiquitin thioesterase OTU1 [EC:3.1.2.-]	cne:CNN01520	3255445	
g7225	0.43	protein transport protein SEC24	cne:CNM01000	3255235	

Term	Gene	Fold change*	Putative function	KO number	Entrez ID
Phagosome	g5559	0.20	V-type H ⁺ -transporting ATPase subunit a	cne:CND02320	3256882
	g4925	0.34	t-SNARE	cne:CNB01520	3255682
	g7533	0.41	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	cne:CNE03710	3257686
	g4660	0.46	V-type H ⁺ -transporting ATPase 16 kDa proteolipid subunit	cne:CNA02690	3254000
	g7074	0.18	phosphatidylinositol 3-kinase [EC:2.7.1.137]	cne:CNB03120	3255809
	g8586	0.50	V-type H ⁺ -transporting ATPase subunit D	cne:CNC00590	3256674
	g6746	0.46	vesicle transport protein SEC22	cne:CND03150	3257244
	g5050	0.09	syntaxin 18	cne:CNF01710	3258365
	g2289	0.38	V-type H ⁺ -transporting ATPase subunit F	cne:CNF02860	3258107
g7598	0.36	V-type H ⁺ -transporting ATPase subunit C	cne:CNC06660	3256138	
Regulation of autophagy	g8784	0.30	cysteine protease ATG4 [EC:3.4.22.-]	cne:CNK01520	3254616
	g2631	0.32	autophagy-related protein 13 (ATG13)	cne:CNA07560	3253267
	g7018	0.44	beclin (VPS30)	cne:CNC02730	3256443
	g7074	0.18	phosphatidylinositol 3-kinase [EC:2.7.1.137] (VPS34)	cne:CNB03120	3255809
	g4809	0.25	vacuolar protein 8 (VAC8)	cne:CNA03500	3253261
Endocytosis	g3067	0.20	ESCRT-1 complex subunit VPS28	cne:CNA06540	3253940
	g7015	0.32	phospholipase D1/2 [EC:3.1.4.4]	cne:CND05920	3257028
	g1965	0.34	actin related protein 2/3 complex, subunit 3	cne:CNJ01950	3254269
	g2699	0.30	vacuolar protein sorting-associated protein 35	cne:CNC03240	3256155
	g8241	0.32	signal transducing adaptor molecule	cne:CNF00910	3258098
	g5481	0.35	vacuolar protein sorting-associated protein 26	cne:CND05390	3256975
	g2046	0.23	AP-2 complex subunit alpha	cne:CNG00660	3258875
	g2420	0.34	charged multivesicular body protein 1	cne:CNA04510	3253330
	g4806	0.32	amphiphysin	cne:CNA03420	3254027
	g5721	0.36	phospholipase D1/2 [EC:3.1.4.4]	cne:CNE01480	3258006
	g2703	0.23	ESCRT-1 complex subunit TSG101	cne:CNC02240	3256213
	g8609	0.35	epsin	cne:CNE03280	3257945
	g4668	0.38	actin related protein 2/3 complex, subunit 5	cne:CNA03030	3253417
	g7533	0.41	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	cne:CNE03710	3257686
	g7398	0.40	vacuolar protein-sorting-associated protein 4	cne:CNI00460	3259663
	g6949	0.36	vacuolar protein sorting-associated protein IST1	cne:CNE00300	3257966
Endocytosis	g8593	0.38	neural Wiskott-Aldrich syndrome protein	cne:CNE05050	3257888
	g6321	0.19	epidermal growth factor receptor substrate 15	cne:CNK00600	3254418
	g8279	0.47	actin related protein 2/3 complex, subunit 1A/1B	cne:CNF00940	3258118
	g8693	0.44	clathrin heavy chain	cne:CNJ03270	3254223

Term	Gene	Fold change*	Putative function	KO number	Entrez ID
Endocytosis	g3129	0.37	charged multivesicular body protein 2A	cne:CNH01380	3259275
	g6161	0.34	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	cne:CNB03880	3255991
	g8825	0.38	charged multivesicular body protein 3	cne:CNA04070	3253247
	g1726	0.30	rabenosyn-5	cne:CNJ02080	3254045
	g6432	0.41	sorting nexin-1/2	cne:CND04350	3257121
	g3666	0.22	actin related protein 2/3 complex, subunit 2	cne:CNE04410	3257678

*各遺伝子の L-Asp 誘導条件下における発現レベルに対する、D-Asp 誘導条件下における発現レベル (D-Asp/L-Asp)

C. humicola UJ1 株の D-Asp 応答

本章で明らかになった *C. humicola* UJ1 株の D-Asp 応答を Fig. 2-4 にまとめた。D-Asp はアミノアシル tRNA 合成酵素によって tRNA と結合する (D-Asp-tRNA)。また、D-Asp-tRNA は DTD によって切断され、再度アミノ酸非結合型の tRNA が再生されるが、核に集積することで利用可能な tRNA は減少する。その結果、リボソームによるタンパク質合成プロセスが阻害され、細胞内に遊離のアミノ酸が蓄積し TORC1 が活性化されることで、Ribi genes や核酸合成関連遺伝子群の転写を誘導し、オートファジー関連遺伝子群の転写を抑制したと考えられる。また、アミノ酸非結合型の tRNA は転写因子 Gcn4 の発現レベルを増加させ、GAAC 経路を活性化することで、AAP 遺伝子やアミノ酸合成遺伝子群、PEX 遺伝子群の転写を誘導し、細胞周期関連遺伝子群の転写を抑制したと考えられる。一方、*ChDDO* 遺伝子の転写は、TORC1 制御下にある NCR や CCR を受けないこと、また、Gcn4 発現レベルを増加させると考えられる他の D-アミノ酸によって誘導されないことから (99, 113), 未知の D-Asp 特異的なシグナル伝達経路により転写誘導されると考えられる。

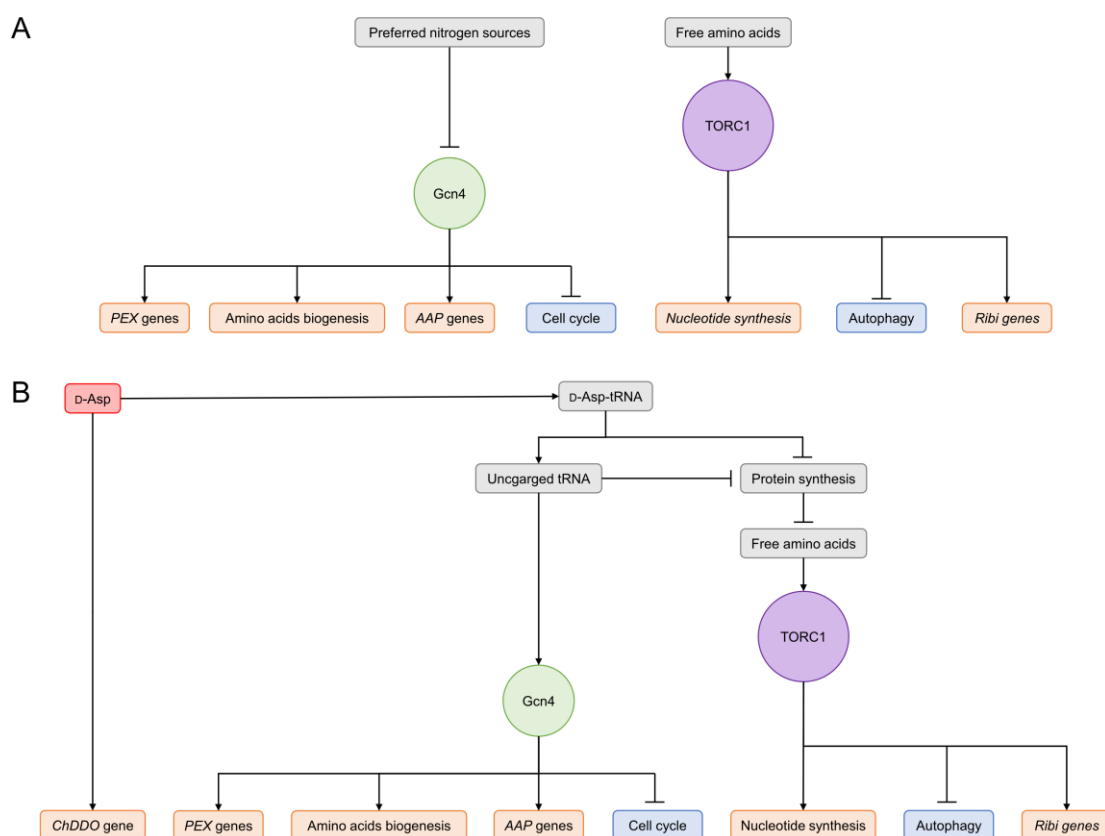


Fig. 2-4. *C. humicola* UJ1 株の D-Asp 応答の概要

(A) L-Asp/NH₄Cl 条件 (D-Asp 非存在下) では、良好な窒素源の存在によって Gcn4 レベルが抑制され、TORC1 の活性が基底レベルで機能している。(B) D-Asp/NH₄Cl 条件 (D-Asp 存在下) では、D-Asp-tRNA が形成され、利用可能な tRNA が減少する。利用可能な tRNA の減少は Gcn4 レベルを増加させ GAAC 経路が活性化される。細胞のタンパク質合成プロセスが阻害されることで、遊離アミノ酸が増加し TORC1 が活性化され下流のプロセスを制御する。*ChDDO* 遺伝子は独立した経路によって誘導される。矢印は活性化を示し、バーは抑制を示す。発現が増加した遺伝子はオレンジ、発現が低下した遺伝子は青で示した。

D-Asp 存在下において *AAP* 遺伝子の転写が誘導されることで、細胞の D-Asp 取り込み活性は増加すると考えられる。さらに、D-Asp の唯一の代謝酵素である *ChDDO* 遺伝子発現を誘導するとともに、反応の場であるペルオキシソーム機能も亢進させることは効率的な D-Asp 利用に寄与していると考えられる。一方で、D-Asp は利用可能な tRNA の減少を引き起こすことで貧栄養条件を作り出すとともに、遊離のアミノ酸を増加させ擬似的な富栄養条件を作り出すことが示唆された。このような状態が継続することは、細胞の代謝経路を攪乱し生育に深刻な影響を与える可能性がある。実際に D-Asp によって Cell cycle 関連遺伝子群の転写が抑制され細胞分裂に負の影響を与えることが示唆された。*ChDDO* 遺伝子の転写は D-Asp の存在下でのみ特異的に誘導されることから D-Asp 特異的な転写活性化システムが存在すると考えられている (99, 113)。*ChDDO* 遺伝子の誘導システムが GAAC 経路や TORC1 経路とは独立して存在することは、効率的な D-Asp 毒性の低減に寄与すると考えられる。

ChDDO 遺伝子を含む D-アミノ酸代謝酵素遺伝子の転写誘導に関するシグナル伝達経路に関する情報はほとんど知られておらず、また D-アミノ酸の真核生物に対する影響や分子応答に関する知見は乏しかった。本研究は、真核生物の D-アミノ酸によるトランスクリプトーム変化を解析した初めての例であり、*ChDDO* 遺伝子誘導発現を含む D-アミノ酸応答に関する有益な情報を提供すると考えられる。本研究によって得られたトランスクリプトーム情報は、*ChDDO* 遺伝子誘導発現に関する D-Asp 特異的な誘導あるいは脱抑制に関するセンサータンパク質や転写因子の特定に有用かもしれない。

4. 材料と方法

試薬

試薬は特記しない場合、FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan), Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), Nacalai tesque (Kyoto, Japan), Difco (Detroit, MI, USA), Takara Bio (Shiga, Japan) または TOYOBO (Osaka, Japan) から購入した。D-Asp は Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation (Osaka, Japan) から寄贈されたものを用いた。オリゴヌクレオチドは、Eurofins Genomics (Tokyo, Japan) または Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) から購入した。

試供菌, 培養条件

酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 株を試供菌として使用した (110)。これらの培養には YPD 培地 (10 g/l yeast extract, 20 g/l peptone, 20 g/l glucose) または SD 培地 (0.67 g/l BD Difco yeast nitrogen base w/o amino acids, 5 g/l glucose), YNB 培地 (0.17 g/l yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate) を用いて 30°C で培養した。固体培地には精製寒天粉末を 20 g/l となるように添加した。

RNA-seq 実験

誘導菌体の調製

UJ1 株を SD 液体培地で 30°C で、16 h 培養したのち、100 ml の SD 液体培地に OD₆₀₀ が 0.05 となるように添加して 30°C で 16 h 培養した。菌体を氷冷滅菌水で 2 回洗浄し、再度氷冷滅菌水に懸濁した。30 mM NH₄Cl と 30 mM D-Asp または L-Asp を含む YNB 液体培地に OD₆₀₀ ユニットが 10 となるように添加し、30°C で 5 h 培養した。その後遠心分離 (4°C, 5,000×g, 10 min) によって菌体を回収し氷冷滅菌水で 2 回洗浄した。菌体を 0.2 g の 0.45–0.5 mm のジルコニアビーズを含む 2 ml スクリューチューブに移して上清を除いた。菌体は使用するまで -80°C で保存した。

Total RNA の調製

誘導菌体と 0.2 g の 0.45–0.5 mm のジルコニアビーズを含む 2 ml スクリューチューブを凍結乾燥システム DRC-1100 と FDU-2100 (EYELA, Tokyo, Japan) を用いて凍結乾燥した。凍結乾燥した菌体は使用するまで -80°C で保存した。凍結乾燥菌体を含むチューブをボルテックスミキサーで 5 min 激しく振盪し細胞を破碎した。添付のプロトコルに従って Direct-zol RNA Miniprep Kit (ZYMO Research, Irvine, CA, USA) を用いて、破碎細胞から total RNA を抽出・精製した。

RNA-seq 解析

一連の RNA-seq 解析はフィルジェン株式会社に委託して行った。RNA サンプルの濃度、純度は Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) と Agarose Gel Electrophoresis, Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies), Qubit 2.0 fluorometer (Life Technologies) によって確認された。Total RNA はオリゴ (dT) ビーズを用いて mRNA が濃縮され、その後断片化された。次に、ランダムヘキサプライマーを用いて cDNA が合成され、A-tail 付加、シーケンシングアダプター配列の付加、PCR エンリッチメント等を経て最終的な cDNA ライブラリーが構築された。

配列解析は Illumina Nova Seq 6000, PE150 によって行われた。

配列のマッピングと機能アノテーションおよび解析

適切な解析データを得るために、raw reads からアダプター配列を含む reads や低品質の reads が除かれた。以降の解析にはフィルタリングされた clean reads が使用された。マッピングにはソフトウェア TopHat2 (388) と酵母 *C. humicola* UJ1 株のゲノムデータ (289) が使用された。発現変動遺伝子 (DEGs) 解析にはソフトウェア DEGseq と edgeR が使用された (389, 390)。得られた ORF 配列はソフトウェア KOBAS を使用して、酵母 *Cryptococcus neoformans* JEC21 株を参照ゲノムとして、機能アノテーションと KEGG pathway 解析された (391, 392)。GO エンリッチメント解析にはソフトウェア GSeq が使用された (393)。

第 3 章 酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 株の D-アスパラギン酸酸化酵素遺伝子発現におけるピルビン酸カルボキシラーゼの機能解析

1. 緒言

第 2 章では、UJ1 株において D-Asp 応答に関与するシグナル伝達経路に関する情報を得るために、RNA-seq により D-Asp 特異的に発現が変動する遺伝子を網羅的に解析した。その結果、D-Asp によって *ChDDO* 遺伝子だけでなくペルオキシソーム増殖に関与する *PEX* 遺伝子の発現も転写レベルで誘導されることが示唆された。さらに、D-Asp の存在は間接的に TORC1 経路や GAAC 経路に関連する遺伝子発現を大きく変化させることが示唆された。これらの結果は、真核生物の D-アミノ酸によるトランスクリプトーム変化を解析した初めての例として、*ChDDO* 遺伝子誘導発現を含む D-アミノ酸応答に関する有益な情報を提供すると考えられる。

ピルビン酸カルボキシラーゼ (Pyc) は細菌や真菌、植物、動物に広く分布し TCA サイクルにオキサロ酢酸を供給するアナプレロティック酵素として機能する。メタノール資化性酵母 *H. polymorpha* や *P. pastoris* では、Pyc1 がタンパク質相互作用を介してアルコールオキシダーゼ (AO) への補酵素 FAD の結合を補助することで、AO のペルオキシソームへの輸送と四次構造形成による活性化に関与することが報告されている (Fig. 3-1) (281, 285)。さらに近年、*P. pastoris* における *PYCI* 遺伝子破壊が D-Ala における生育遅延と D-アミノ酸オキシダーゼ (DAO) 酵素活性の低下も引き起こすことが報告された (286)。DAO と AO は FAD を補酵素とするペルオキシソーム酵素であることから、AO と同様の機構で DAO も活性化されると考えられている。一方、*ChDDO* 遺伝子の発現は D-Asp 依存的に転写レベルで制御されることが明らかにされているが (113)、翻訳後においても *ChDDO* の機能発現が制御されていれば非常に興味深い。ヒトにおいて D-Asp の代謝異常は統合失調症を含む神経性疾患に関与することが示唆されている (45-47)。DDO 機能発現に関する新たな知見は、これら疾患の発病メカニズムやその治療に有益な情報を提供するかもしれない。そこで第 3 章では、*C. humicola* UJ1 株の *PYCI* 遺伝子を同定し、遺伝子破壊と機能解析を通して、*ChDDO* 遺伝子の機能発現における Pyc1 の役割について解析した。

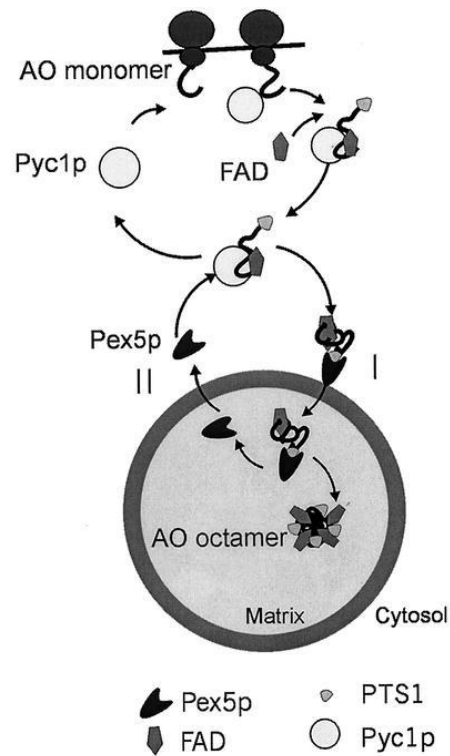


Fig. 3-1. メタノール酸化性酵母 *H. polymorpha* における Pyc1p による AO 活性化メカニズムのモデル

AO モノマーは細胞質上のリボソームによって合成される。細胞質において、Pyc1p はタンパク質相互作用を介して、新規に合成された AO モノマーへの補酵素 FAD の結合を媒介する。FAD を含む AO モノマーは PTS1 受容体である Pex5p と結合する。AO-Pex5p 複合体はペルオキシソーム膜を横切って移動し、マトリックス内で解離する (I)。その後、FAD を含む AO モノマーがオクタマーを形成する。Pex5p は細胞質に戻り (II)、PTS1 タンパク質の再輸入を仲介する。図は Ozimek らの論文から引用した (281)。

2. 結果

2.1. *C. humicola* UJ1 株のピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子の同定

C. humicola UJ1 株の *PYCI* 遺伝子 (*ChPYCI* 遺伝子) を同定するために、酵母 *P. pastoris* の *Pyc1* (PpPyc1, Uniprot: P78992) のアミノ酸配列を用いて、UJ1 株のドラフトゲノム配列中の *Pyc1* ホモログを検索した。その結果、PpPyc1 に対して有意な相同性を有するホモログ g8318 を見いだし、ChPyc1 と名付けた。ChPyc1 は 1,211 個のアミノ酸残基からなり、PpPyc1, *H. polymorpha* *Pyc1* (HpPyc1) および *S. cerevisiae* の *Pyc1p* と *Pyc2p* に対してそれぞれ 58.4%と 60.5%, 59.5%, 59.1%のアミノ酸配列同一性を示した。ChPyc1 には、Pyc の 3 つの機能ドメインである N 末端のビオチンカルボキシル化 (BC) ドメインと中央のトランスカルボキシル化 (TC) ドメインと C 末端のビオチンカルボキシルキャリア (BCC) ドメインが保存されていた (Fig. 3-2)(25I)。このことから、ChPyc1 は UJ1 株において Pyc として機能すると考えられた。真核生物の Pyc の多くはミトコンドリア標的化シグナル (MTS) を有しミトコンドリアに局在するが、酵母 *S. cerevisiae* や糸状菌 *A. nidulans*, *A. terreus*, *Rhizopus oryzae* の Pyc は MTS を有しておらず、細胞質に局在する (256, 269)。さらに、メタノール資化性酵母 *H. polymorpha* や *P. pastoris* の Pyc も細胞質に局在する (28I)。ChPyc1 にも MTS は見いだされなかったことから、他の真菌と同様に細胞質に局在すると考えられた。

2.2. 酵母 *S. cerevisiae* における *ChPYC1* 遺伝子の発現

ChPYC1 遺伝子が機能的なピルビン酸カルボキシラーゼをコードしていることを確認するため、*S. cerevisiae* における *ChPYC1* 遺伝子発現系ベクター (pWGP3_*ChPYC1*) を作製し、*S. cerevisiae* W303-1A 株でグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター制御下で *ChPYC1* 遺伝子を発現させた。

pWGP3_*ChPYC1* を導入した酵母細胞と *ChPYC1* 遺伝子を有していないコントロールベクター (pWGP3) を導入した酵母細胞から粗抽出液を調製し、粗抽出液中の Pyc 活性を測定したところ、コントロールベクターを保持する細胞の粗抽出液の Pyc 活性 (約 10 mU/mg-protein) と比較して、pWGP3_*ChPYC1* を保有する酵母細胞の粗抽出液の Pyc 活性は顕著に高かった (約 60 mU/mg-protein) (Fig. 3-3A)。次に、*ChPYC1* 遺伝子発現産物の分子質量を明らかにするために粗抽出液のタンパク質を SDS-PAGE で解析したところ、*ChPYC1* 遺伝子発現株においてのみ ChPyc1 の推定分子質量に相当する約 133 kDa の位置に特異的なタンパク質バンドが観察された (Fig. 3-3B)。これらの結果から、*ChPYC1* 遺伝子が機能的な Pyc をコードすることが示された。

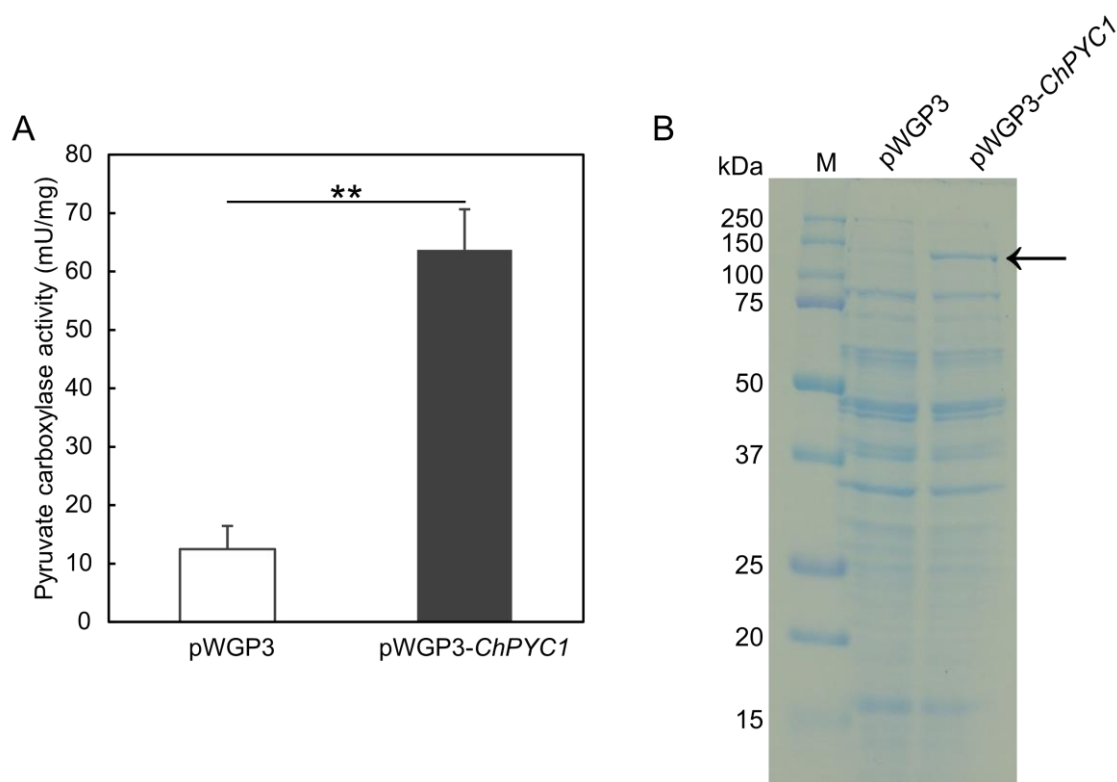


Fig. 3-3. *S. cerevisiae* W303-1A 株における *ChPYC1* 遺伝子の発現

(A) *ChPYC1* 遺伝子を発現させた (pWGP3-*ChPYC1*) 細胞と発現させていない (pWGP3) 細胞の粗抽出液の Pyc 活性. pWGP3-*ChPYC1* または pWGP3 を保持する細胞を SD 最少培地において 30°C で 20 h 培養し粗抽出液を調製した. 活性は、Payne と Morris が報告した malate dehydrogenase (MDH) との共役反応により、分光光度法で測定した (394). 測定は 3 回行い、その平均値を示した. エラーバーは標準偏差を示す. 測定値は Welch の *t*-検定によって統計解析した. ** $p < 5 \times 10^{-3}$. (B) pWGP3-*ChPYC1* または pWGP3 を保持する細胞粗抽出液の SDS-PAGE 解析. 10 μ g のタンパク質を 12% SDS-PAGE で分離し、Coomassie Brilliant Blue で染色した. 矢印は、ChPyc1 に対応するタンパク質バンドを示す (分子質量: 約 133 kDa).

2.3. *ChPYC1* 遺伝子破壊株の作製と生育解析

Pyc は TCA サイクルの代謝物質の 1 つであるオキサロ酢酸を供給するアナプレロティック酵素として機能する。一方, *ChDDO* は D-Asp からオキサロ酢酸を生成することから, *Pyc* 機能を相補できると考えられた。本節では, *ChPYC1* 遺伝子破壊株 ($\Delta Chpvc1$) を作製し, その生育解析を通して, *ChPyc1* が他の生物と同様に TCA 回路のアナプレロティック酵素としての役割を果たしているか, また *ChDDO* がその機能を相補できるか解析した。

UJ1 株のウラシル要求性変異株である UM3 株を用いて, 相同組換えに基づく遺伝子置換法により *ChPYC1* 遺伝子破壊株を作製した (Fig. 3-4A)。 *ChPYC1* 遺伝子の破壊は破壊候補株に対し遺伝子破壊カセットの領域内外にプライマーを設定した PCR によって確認した。その結果, 破壊候補株にのみ予想されるサイズの DNA 断片が増幅されたことから, 正常な *ChURA3* 遺伝子を含む破壊カセットが *ChPYC1* 遺伝子座に挿入された *ChPYC1* 遺伝子破壊株 ($\Delta Chpvc1$) の作製が確認できた。さらに, 野生株 (UJ1 株) と $\Delta Chpvc1$ 株の粗抽出液を調製し, *Pyc* 酵素活性を測定した (Fig. 3-4B)。 その結果, 野生株の粗抽出液の *Pyc* 活性 (約 20 mU/mg-protein) に対して $\Delta Chpvc1$ 株の *Pyc* 活性 (約 1 mU/mg-protein) は顕著に低かった。このことから, $\Delta Chpvc1$ 株において *Pyc* 酵素機能が失われていることを確認した。

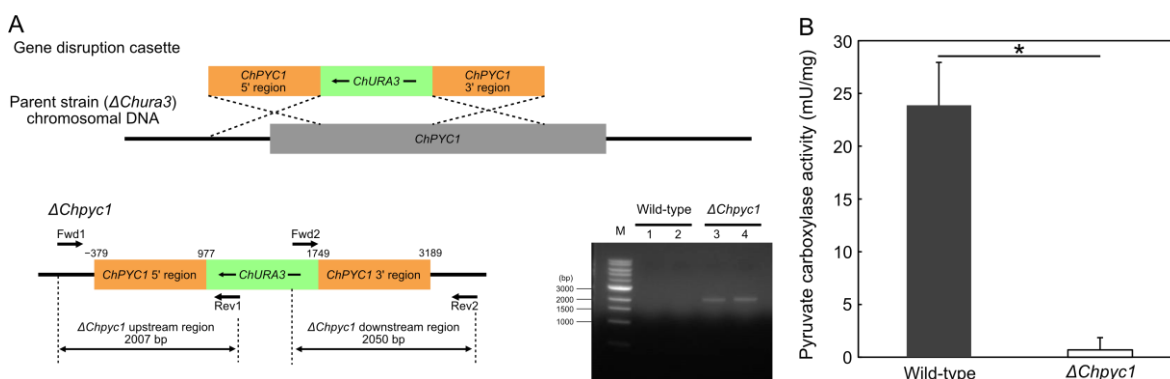


Fig. 3-4. $\Delta Chpvc1$ 株の構築および *C. humicola* の野生株 (UJ1 株) と $\Delta Chpvc1$ 株の粗抽出液の *Pyc* 活性

(A) *ChURA3* 遺伝子を用いた相同組換えによる *ChPYC1* 遺伝子破壊の模式図と PCR による遺伝子破壊の解析。数字は *ChPYC1* 遺伝子の開始コドン ATG からの距離 (bp) を示す。 *ChURA3* 遺伝子は *ChPYC1* 遺伝子の 977 bp から 1,749 bp の間に逆方向に挿入された。 レーン: 1, 2 野生株 (UJ1 株) におけるそれぞれ上流と下流領域を増幅したネガティブコントロール; レーン: 3, 4 $\Delta Chpvc1$ 株における上流と下流領域の増幅産物。 (B) 野生株 (UJ1 株) と $\Delta Chpvc1$ 株を L-Asp を含む SD 最少培地において 30°C で 20 h 培養し粗抽出液を調製した。 *Pyc* 活性は Fig. 3-3 と同様に測定した。測定は 3 回行い, その平均値を示した。エラーバーは標準偏差を示す。測定値は Welch の *t*-検定によって統計解析した。 * $p < 5 \times 10^{-2}$ 。

次に、グルコースを炭素源、 NH_4Cl またはL-Aspを窒素源とした培地における $\Delta\text{Chp}yc1$ 株の生育を観察した (Fig. 3-5A, B). その結果、 $\Delta\text{Chp}yc1$ 株は、グルコースを炭素源、 NH_4Cl を窒素源とした培地において生育が野生株よりも遅延したが、L-Aspを窒素源とした培地では生育が野生株と同等に回復した. さらに、 $\Delta\text{Chp}yc1$ 株は α -ケトグルタル酸を炭素源、 NH_4Cl を窒素源とした培地においても生育が野生株と同等に回復した (Fig. 3-5C). これらの結果から、ChPyc1がアナプレロティック酵素として機能し、またL-Aspと α -ケトグルタル酸はトランスアミナーゼ反応によってオキサロ酢酸を生成し、TCA回路に基質を供給することで、ChPyc1の酵素機能を相補することが示唆された.

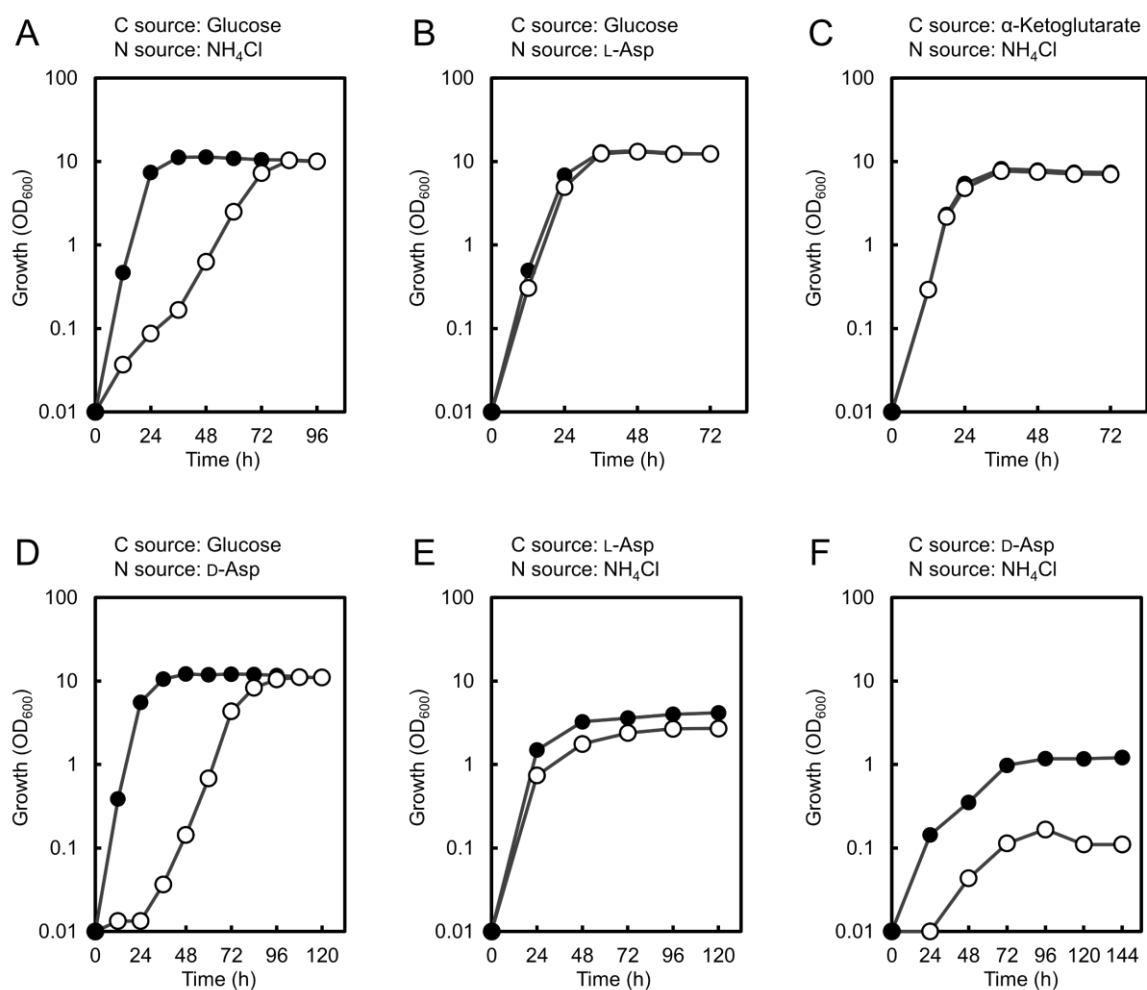


Fig. 3-5. *C. humicola* 野生株 (UJ1 株) と $\Delta\text{Chp}1$ 株の異なる炭素と窒素源における生育

野生株 (UJ1 株, ●) と $\Delta\text{Chp}1$ 株 (○) を、55.5 mM グルコースまたは 66.6 mM α -ケトグルタル酸を炭素源、10 mM NH_4Cl または L-Asp, D-Asp を唯一の窒素源 (A, B, C, D), 83.3 mM L-Asp または D-Asp を炭素源、10 mM NH_4Cl を窒素源 (E, F) とする培地で生育させた. 各株の生育は培養液の OD_{600} を経時的に測定することで観察した.

UJ1株において、D-AspはChDDOによってオキサロ酢酸に変換されることから、L-Aspと同様に、 $\Delta Chpyc1$ 株の生育遅延を回復させる可能性が考えられた。そこで、グルコースを炭素源、D-Aspを窒素源とした培地における $\Delta Chpyc1$ 株の生育を観察したところ、D-AspはL-Aspとは異なり、 $\Delta Chpyc1$ 株の生育遅延を回復させることはできなかった (Fig. 3-5D-F)。したがって、ChDDOによるD-Aspからのオキサロ酢酸の供給はChPyc1の欠損を補うことができないことが分かった。酵母 *P. pastoris* において *PYCI* 遺伝子の破壊はDAO活性の低下を引き起こすことから (286)、 $\Delta Chpyc1$ 株においてもDDO活性が低下し、欠損を補うことができなかった可能性が考えられた。そこで、D-Aspを含む培地で *ChDDO* 遺伝子発現を誘導した細胞の粗抽出液を調製しDDO活性を測定したところ、 $\Delta Chpyc1$ 株のDDO活性は野生株の約60%に低下していた (Fig. 3-6A)。さらに、 $\Delta Chpyc1$ 株の *ChDDO* 転写量も同様に野生株の約6割に低下した (Fig. 3-6B)。このことから、*ChPYC1* 遺伝子破壊により *ChDDO* 転写量が低下し、その結果としてDDO活性の誘導低下が引き起こされたと考えられた。

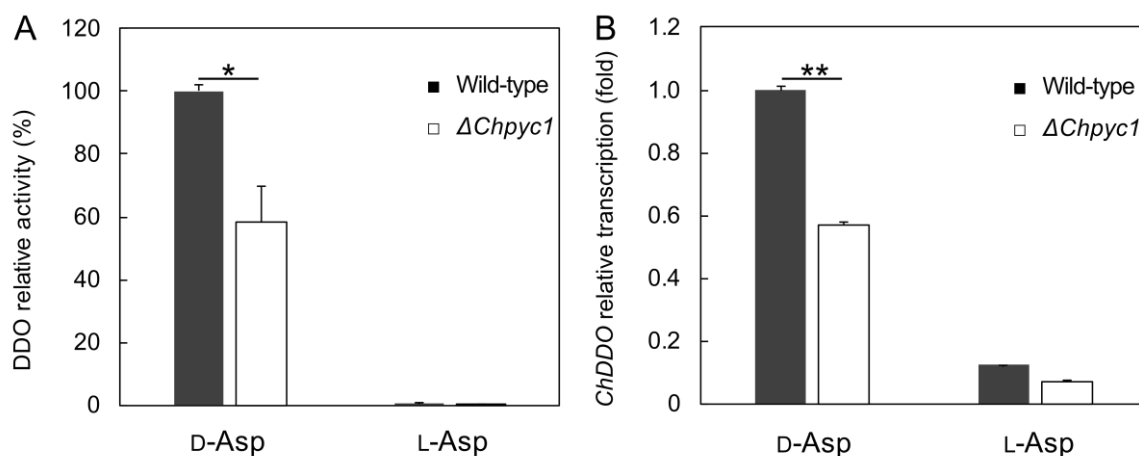


Fig. 3-6. *C. humicola* 野生株 (UJ1株) と $\Delta Chpyc1$ 株における *ChDDO* 遺伝子の誘導発現

(A) 60 mM D-Asp または L-Asp を唯一の炭素・窒素源として含む培地で誘導した細胞の粗抽出液の DDO 活性。数値は D-Asp を用いた野生株の酵素活性を 100% とした相対値で示した。(B) *ChDDO* 遺伝子の転写レベル。DDO 活性と同条件で誘導した細胞の total RNA を用いて qRT-PCR によって *ChDDO* 遺伝子の転写量を *ChTAF10* 遺伝子の転写量で正規化した。数値は D-Asp 上での野生株の *ChDDO* 転写量を 1 とする相対値で示した。測定は 3 回行い、その平均値を示した。エラーバーは標準偏差を示す。測定値は Welch の *t*-検定によって統計解析した。* $p < 5 \times 10^{-2}$, ** $p < 5 \times 10^{-3}$ 。

2.4. ピルビン酸が *ChDDO* 遺伝子誘導発現に与える影響

ChPYC1 遺伝子の破壊によってピルビン酸が細胞内に蓄積し、*ChDDO* 遺伝子誘導発現に負の影響を与えた可能性が考えられた。そこで、野生株と $\Delta Chpyc1$ 株の細胞内ピルビン酸含有量を測定したが、その量に有意な差は見いだせなかった (Fig. 3-7A)。さらに、ピルビン酸が *ChDDO* 誘導発現に与える影響を詳細に解析するため、培養液に 60 mM ピルビン酸を添加し、DDO 活性、*ChDDO* 転写量と細胞内ピルビン酸含有量を測定した。60 mM ピルビン酸を添加した場合、両株の細胞内ピルビン酸含有量に有意な差は観察されなかった (Fig. 3-7A)。一方、野生株の DDO 活性と *ChDDO* 転写量はピルビン酸添加によりともに増加したが、 $\Delta Chpyc1$ 株では逆に低下した (Fig. 3-7B, C)。最近、アミノ酸パーミアーゼ (Aap) を介した D-Asp の取り込みが *ChDDO* 遺伝子の誘導発現に関与することが報告されたことから (395)、モノカルボン酸であるピルビン酸の培養液における存在がジカルボン酸である D-Asp の取り込みに影響を与える可能性が考えられたが、ピルビン酸は D-Asp の細胞内への取り込みを阻害しなかった (Fig. 3-7D)。以上の結果から、D-Asp とは独立して、ChPyc1 によるピルビン酸からオキサロ酢酸への酵素代謝が *ChDDO* 遺伝子の転写を正に、他の酵素によるピルビン酸代謝が *ChDDO* 遺伝子の転写を負に部分的に制御している可能性が示唆された。

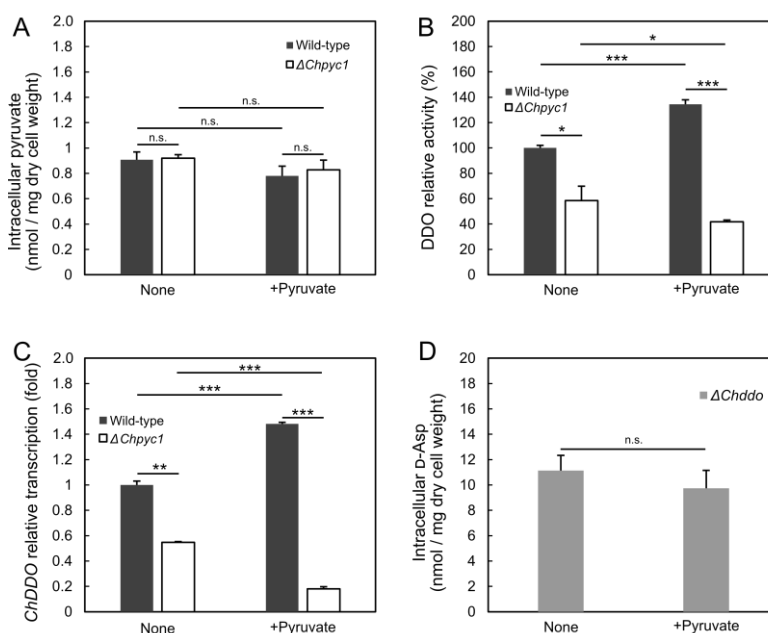


Fig. 3-7 ピルビン酸が *ChDDO* 遺伝子誘導発現に与える影響

(A) 細胞内ピルビン酸濃度。60 mM D-Asp と 60 mM ピルビン酸 (+Pyruvate) またはピルビン酸未添加 (None) の培地において誘導した細胞の粗抽出液のピルビン酸量を測定した。細胞内ピルビン酸濃度は、Zhu ら (396) 方法に従って、酵素法および蛍光光度法により測定した。細胞内のピルビン酸濃度は、乾燥菌体重量あたりのピルビン酸量として算出した。(B) 粗抽出物中の DDO 活性は、野生株、None における活性を 100% とした相対値で示した。(C) *ChDDO* 遺伝子の転写は、野生株、None における転写量を 1 とした相対値で示した。(D) *ChDDO* 遺伝子破壊株の細胞粗抽出液中の D-Asp を、Kajitani ら (397) 方法に従って HPLC 法で測定した。細胞内の D-Asp 濃度は、乾燥菌体重量あたりの D-Asp として算出した。測定は 3 回行い、その平均値を示した。エラーバーは標準偏差を示す。測定値は Welch の *t*-検定によって統計解析された。n.s., no significant, * $p < 5 \times 10^{-2}$, ** $p < 5 \times 10^{-3}$, *** $p < 5 \times 10^{-4}$ 。

3. 考察

酵母 *S. cerevisiae* や *H. polymorpha*, *P. pastoris*, 糸状菌 *A. nidulans* において, Pyc 活性を持たない変異株はグルコース上での良好な生育に L-Asp または L-Glu を必要とし, Pyc は TCA 回路にオキサロ酢酸を供給するアナプレロティック酵素として機能している (281, 398-400). $\Delta Chpyc1$ 株はグルコースを炭素源, NH_4Cl を窒素源とした培地で生育遅延を生じたが, L-Asp または α -ケトグルタル酸の添加により生育遅延が回復した (Fig. 3-5A-C). このことは, ChPyc1 が TCA 回路のアナプレロティック酵素として機能していること, また Asp トランスアミナーゼ (AST) 反応が Pyc の機能を相補できることを示している. ChDDO は D-Asp からオキサロ酢酸を直接供給できるため Pyc の機能を相補できると考えられたが, $\Delta Chpyc1$ 株では ChDDO 発現量が低下したために, D-Asp の添加はグルコースを炭素源, NH_4Cl を窒素源とした培地で生育遅延を回復させることができないと考えられた (Fig. 3-5D-F).

メタノール酵母 *H. polymorpha* や *P. pastoris* の Pyc1 は, 新規に合成された AO に補酵素 FAD を結合させる機能を有していることから, PYC1 遺伝子の破壊は細胞内の AO 活性の顕著な低下を引き起こすことが知られている (281-283). また近年, *P. pastoris* の PYC1 遺伝子破壊が細胞内の DAO 活性も顕著に低下させることが報告され, AO と同様に, Pyc1 欠損による補酵素 FAD の DAO への結合の低下が DAO 活性低下の原因と考えられている (286). 一方, *C. humicola* UJ1 株では, ChDDO 転写誘導レベルの低下が DDO 活性の低下を引き起こすことが明らかとなった (Fig. 3-6B). *P. pastoris* $\Delta pyc1$ 株における DAO 遺伝子の転写が解析されていないため, *P. pastoris* において実際に Pyc1 の欠損が DAO 遺伝子の転写ではなく, DAO の触媒能に影響を与えたことは明らかではないが, これらの結果は, メタノール資化性酵母の AO や DAO とは異なり, ChDDO の機能発現が ChPyc1 の触媒機能を介して, 転写レベルで制御されていることを示唆した.

D-Asp 誘導時にピルビン酸を添加すると, 野生株では ChDDO 遺伝子の転写レベルが増加したが, $\Delta Chpyc1$ 株では低下した (Fig. 3-7C). この時, 野生株と $\Delta Chpyc1$ 株の細胞内ピルビン酸含有量に有意な差は見られなかったことから (Fig. 3-7A), ピルビン酸代謝が ChDDO 遺伝子の転写制御に関与している可能性が考えられた. 酵母において, ピルビン酸は主に Pyc に加えて, ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (Pdh) とピルビン酸デカルボキシラーゼ (Pdc) によって代謝される (Fig. 3-8) (254). したがって, Pdh や Pdc を介したピルビン酸代謝が ChDDO 遺伝子の転写を負に, 逆に Pyc によるピルビン酸代謝が ChDDO 遺伝子の転写を正に部分的に制御する可能性が考えられる. ピルビン酸やオキサロ酢酸は, 糖代謝, 脂肪酸やアミノ酸の生合成など, さまざまな反応に関与する代謝の鍵となる化合物である (254, 401). 酵母 *S. cerevisiae* の PYC1 遺伝子の転写は, L-Asp および L-Glu によって抑制され, エタノールやピルビン酸によって誘導される (258-260). さらに, Pyc1 の酵素活性は acetyl-CoA と L-Asp によってそれぞれ正と負にアロステリックに制御される (402, 403). これらの知見は, 細胞がさらされる環境や栄養条件に応じて Pyc 酵素活性が複雑に制御されることを示している. 本研究では ChPyc1 の非存在下で ChDDO 遺伝子の誘導発現が低下することが示された. このことは, ChDDO 遺伝子の誘導発現が, ChPyc1 酵素活性を介した細胞の代謝レベルに応じて制御されるメカニズムが存在

する可能性を示唆している。メタノール資化性酵母 *P. methanolica* では、AO をコードする *MOD1* と *MOD2* 遺伝子の発現が酸素濃度によって厳密に制御されている (404, 405)。この AO の発現調節は呼吸鎖の活性に応じて転写レベルで制御されており、ミトコンドリアとペルオキシソームの酸素消費バランスを維持することで、メタノール上で効率的な生育に寄与すると考えられている (405)。同様に *ChDDO* がペルオキシソームにおいて酸素を消費すること、また *ChDDO* と *ChPyc1* がミトコンドリアの TCA 回路に基質を供給することを考慮すると、両オルガネラ間の代謝レベルが、D-Asp による *ChDDO* 遺伝子の誘導発現に関与する可能性がある。具体的には、*ChPYC1* 遺伝子の破壊によるオキサロ酢酸の減少は TCA 回路の停滞を引き起こし、ミトコンドリアにおいて好気代謝の機能不全として感知された可能性がある。あるいは、ピルビン酸以降の代謝産物の蓄積がシグナル伝達因子として *ChDDO* 遺伝子の発現制御に部分的に関与している可能性がある。本メカニズムはミトコンドリアとペルオキシソームの代謝レベルを協調的に制御するメカニズムとして D-Asp の効率的な利用に寄与していると考えられる。*ChDDO* 遺伝子の発現とピルビン酸代謝との関係をより詳細に明らかにするためには、*ChPyc1* の生理学的役割や発現制御について、あるいはミトコンドリア機能との関係性について調査する必要がある。

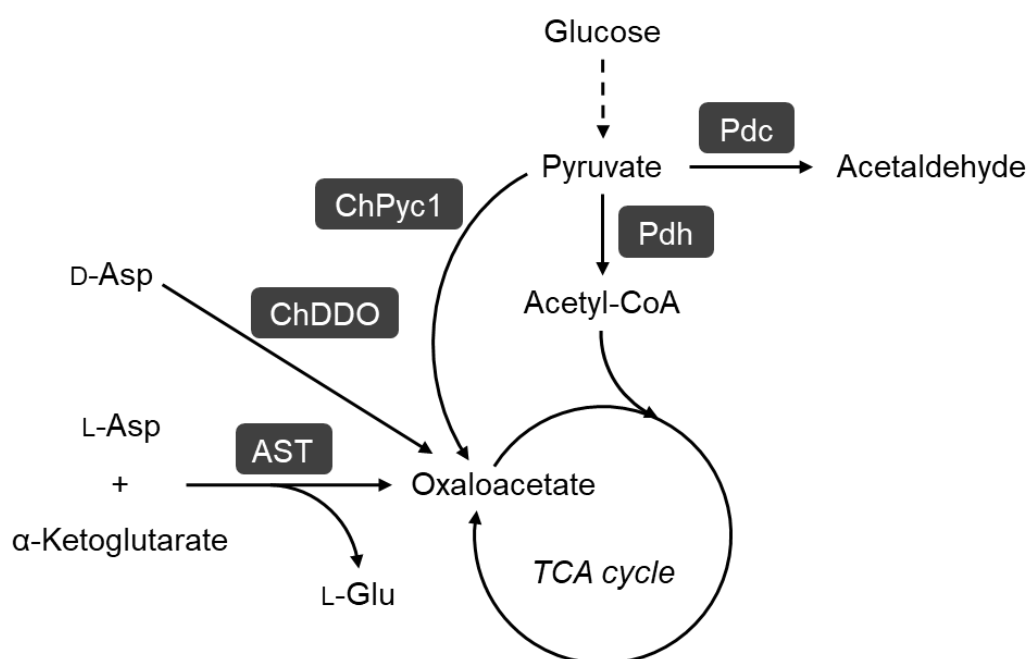


Fig. 3-8. *ChPyc1* 機能を相補する *AST* と *ChDDO* 遺伝子発現に関与する可能性のあるピルビン酸代謝経路

ChPyc1 は TCA 回路にオキサロ酢酸を供給するアナプレロティック酵素として機能し、その反応は *AST* によって相補される。*ChPyc1* によるピルビン酸代謝は *ChDDO* 遺伝子の転写を正に、一方 *Pdh* や *Pdc* を介したピルビン酸代謝は *ChDDO* 遺伝子の転写を負に部分的に制御している可能性がある。

以上の結果と考察から、*ChDDO* 遺伝子の機能発現と *ChPyc1* の関係について、以下のモデルを提案する (Fig. 3-9). *ChDDO* 遺伝子の転写は、アミノ酸パーミアーゼ (*Aap*) を介して取り込まれた *D-Asp* によって、未知のシグナル伝達経路を介して誘導される (395). *ChPyc1* は TCA サイクルにオキサロ酢酸を供給するアナプレロティック酵素として機能しており、その機能は *AST* によって補われるが、*ChPYC1* 遺伝子破壊により *ChDDO* 遺伝子の転写誘導が抑制されるため、*ChDDO* による *D-Asp* からのオキサロ酢酸の供給では補うことができない. また、*D-Asp* による誘導とは別に、*ChPyc1* によるピルビン酸の代謝は *ChDDO* 遺伝子の転写を正に、他の酵素によるピルビン酸代謝は負に部分的に制御している可能性がある. 現在、*ChDDO* 遺伝子の転写制御に関与するピルビン酸代謝産物やそのシグナル伝達経路は不明である. 今後、*ChDDO* 遺伝子の転写制御に関与する代謝産物やタンパク質を同定し、その制御機構の全容解明が期待される. 酵母における *DDO* 遺伝子の発現制御機構に関する知見は、真核生物における *DDO* および *D-Asp* の生理機能の解明に貢献すると考えられる.

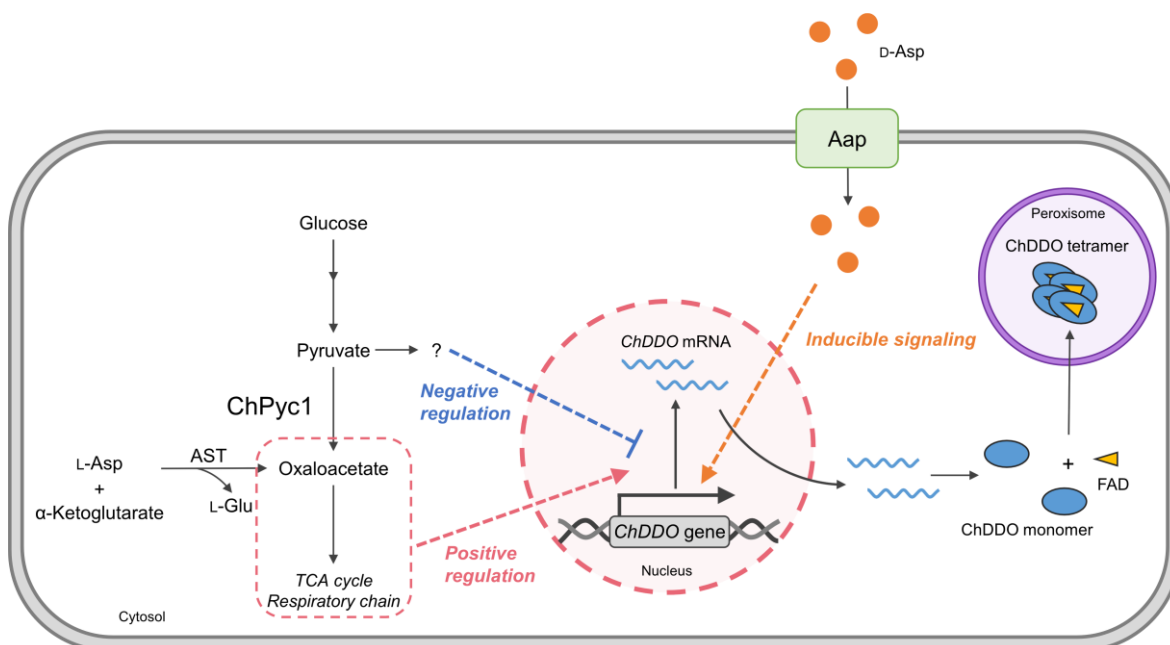


Fig. 3-9. *ChPyc1* が関与する *ChDDO* 遺伝子誘導発現のモデル

Aap によって細胞質に取り込まれた *D-Asp* は、未知のシグナル伝達経路を介して *ChDDO* 遺伝子の転写を誘導する. *ChPyc1* と他の酵素によるピルビン酸代謝は、*D-Asp* による *ChDDO* 遺伝子の転写をそれぞれ正と負に部分的に制御する可能性がある.

4. 材料と方法

材料

試薬は特記しない場合、FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan), Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), Nacalai tesque (Kyoto, Japan), Difco (Detroit, MI, USA), Takara Bio (Shiga, Japan) または TOYOBO (Osaka, Japan) から購入した。D-Asp は Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation (Osaka, Japan) から寄贈されたものを用いた。オリゴヌクレオチドは、Eurofins Genomics (Tokyo, Japan) または Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) から購入した。

供試菌, 培地

酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 株とそのウラシル要求性変異株 UM3 株を供試菌として使用した (110, 328)。遺伝子発現の宿主として酵母 *S. cerevisiae* W303-1A (*MATa*, *leu2-3, 112*, *trp1-1*, *can1-100*, *ura3-1*, *ade2-1*, *his3-11, 15*) 株を使用した。これらの培養には YPD 培地 (10 g/l yeast extract, 20 g/l peptone, 20 g/l glucose) または SD 培地 (0.67 g/l BD Difco yeast nitrogen base w/o amino acids, 5 g/l glucose), YNB 培地 (0.17 g/l yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate) を用いて 30°C で培養した。必要に応じて 20 mg/l uracil および/または 20 mg/l adenine, 100 mg/l L-Leu, 20 mg/l L-His, 20 mg/l L-Trp, 10 mM L-Asp を加え、固体培地には精製寒天粉末を 20 g/l となるように添加した。DNA 組換えの宿主として *E. coli* DH5 α を LB (lysogeny broth) 培地 (5 g/l yeast extract, 10 g/l tryptone, 5g/l NaCl) を用いて 37°C で培養した。必要に応じて 100 μ g/ml となるように ampicillin を加え、固体培地には精製寒天粉末を 15 g/l となるように添加した。

Pyc1 ホモログ遺伝子の探索

PpPyc1 のアミノ酸配列を query とし UJ1 株のゲノム配列に対して localBLASTp 2.6.0+システムを用いてホモロジー検索した (333)。

配列解析

アミノ酸配列のアライメントには T-coffee sever (<http://tcoffee.crg.cat/>) を使用した (339)。アミノ酸配列と塩基配列の比較と同一性の算出には、EMBOSS Needle Pairwise Sequence Alignment (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) を使用した (340)。

ChPYC1 遺伝子発現ベクターの構築

ChPYC1 遺伝子の cDNA (ChPYC1 cDNA) は 60 mM D-Asp を含む YNB 液体培地で誘導した細胞の total RNA を鋳型とし、SuperScrip IV One-Step RT-PCR System (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) と ChPYC1 遺伝子に特異的なプライマーセット ChPyc1F1 / ChPyc1R1 (Table 3-1) を使用して逆転写 PCR によって合成した。次に、KOD FX neo DNA ポリメラーゼと酵母プラスミド pWGP3 を鋳型として、プライマーセット pWGP3R / pWGP3F (Table 3-1) を使用した PCR によって線状化 vector を増幅した (406)。さらに ChPYC1 cDNA を鋳型として、線状化ベクターの両末端 17 bp を含むプライマーセット pWGP3ChPyc1F / pWGP3ChPyc1R (Table 3-1) を使用した PCR によって insert 領域を増幅した。つぎに、In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio) を使用して、insert 領域と線状化 vector を連結した。その結果、酵母 *S. cerevisiae* 由来 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

プロモーター制御下に *ChPYC1* cDNA が挿入され、*ChPYC1* 遺伝子を構成的に発現させるプラスミド pWGP3*ChPYC1* を構築した (Fig. 3-10) . 構築された pWGP3_ *ChPYC1* は Eurofins Genomics に委託してシーケンス解析し *ChPYC1* の配列を決定した.

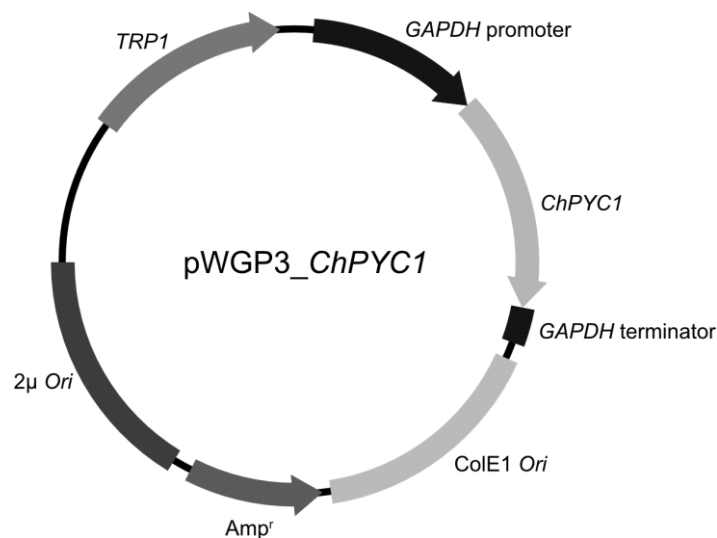


Fig. 3-10. pWGP3_ *ChPYC1* のベクターマップ

ColE1 Ori : 大腸菌複製起点, Amp^r : β-lactamase (ampicillin resistance gene), 2μ Ori : 2μ DNA 複製起点, *TRP1* : Phosphoribosylanthranilate isomerase (tryptophan biosynthesis gene)

S. cerevisiae の形質転換

S. cerevisiae W303-1A 株を YPD 液体培地で 30°C で、16 h 培養したのち、100 ml の YPD 液体培地に OD₆₀₀ が 0.01 となるように添加して 30°C、18 h 培養した。遠心分離 (4°C, 5,000×g, 10 min) によって菌体を回収し氷冷滅菌水で 2 回洗浄した。次に、菌体を 10% glycerol に懸濁した。50 μL の菌体懸濁液に pWGP3*ChPYC1* または pWGP3 を 1 μg 添加し、MicroPulser (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて抵抗 600 Ω、電圧 1.5 kV、静電容量 10 μF の条件でパルスした。パルス後、直ちに 1 ml の氷冷 1 M sorbitol を加えて 30°C で 1 h 振盪した。その後、SD 寒天培地に塗布して形質転換体を選抜した。

S. cerevisiae における *ChPYC1* 遺伝子の発現

pWGP3_ *ChPYC1* 株と pWGP3 株を SD 液体培地で 30°C で、16 h 培養したのち、200 ml の SD 液体培地に OD₆₀₀ が 0.01 となるように添加して 30°C で、20 h 培養した。その後、遠心分離 (4°C, 5,000×g, 10 min) によって菌体を回収し氷冷滅菌水で 2 回洗浄した。上清を除いて、菌体を 0.8 g の 0.45–0.5 mm のガラスビーズを含む 2 ml スクリューチューブに移した。菌体は使用するまで -80°C で保存した。

S. cerevisiae 粗抽出液の調製

菌体と 0.8 g の 0.45–0.5 mm のガラスビーズを含む 2 ml スクリューチューブに氷冷破碎 buffer (100 mM Tris-HCl, 10% glycerol, pH 8.0) を 500 μL 加え、Mini Bead Beater-8 (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) を用いて最大速度で 1 min ホモジナイズし、氷上で 3 min 冷却した。この手順を 8 回繰り返した。その後、菌体破碎液

を遠心分離 (4°C, 20,000×g, 30 min) して上清を粗抽出液とした。

タンパク質濃度測定

タンパク質濃度は Bio-rad protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて添付のプロトコルに従い Bradford 法により測定した。標準タンパク質と酵素試料の吸光度を 2 点ずつ、SpectraMax Paradigm (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を用いて測定し、検量線は 0–0.5 mg/ml BSA を用いて作製した。

Pyc 酵素活性測定

Pyc 酵素活性測定は Payne と Morris の方法に従い、Pyc 反応によって生じるオキサロ酢酸を Malate dehydrogenase (MDH) によるカップリング反応により検出することで測定した (394)。具体的には、終濃度 7 mM pyruvate, 15 mM KHCO₃, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 0.05 mM acetyl-CoA, 0.23 mM NADH および 1 U/mL MDH を含む 135 mM triethanolamine (pH 8.0) を 37°C で 5 min 保温した後、粗抽出液 50 μL を速やかに添加して反応を開始した。活性は、反応により消費される NADH を波長 340 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) で分光光度計 UV-2500 PC (SHIMADU, Kyoto, Japan) を用いて継続的にモニタリングすることで算出した。なお、ブランクとして基質を含まない反応液も同様に調製し、基質を含む反応液で得られた活性値からブランクの活性値を引いた値を活性値とした。

SDS-PAGE 解析

SDS-PAGE 解析は、ラピタス・ミニスラブ電気泳動装置 (Atto, Tokyo, Japan), 12.5% polyacrylamide gel を用いて、Laemmli 法により行った。タンパク質マーカーとして Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いた。泳動後のタンパク質は coomassie brilliant blue R-250 染色によって可視化し、デジタルカメラ COOLPIX P7800 (Nikon, Tokyo, Japan) で撮影した。

ゲノム DNA の調製

UJ1 株のゲノム DNA は主に Takahashi らの方法に従い調製した (328)。UJ1 株を YPD 液体培地で 30°C, 16 h 培養した後、100 ml の YPD 液体培地に OD₆₀₀ が 0.01 となるように添加して 30°C で OD₆₀₀ が 1.2 になるまで培養した。遠心分離 (4°C, 5,000×g, 10 min) によって菌体を回収し氷冷滅菌水で 2 回洗浄した。次に、SP buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM 2-mercaptoethanol, 50 mM EDTA, pH 8.0) で洗浄し、SP2 buffer (600 mM KCl, 100 mM tri-sodium citrate dihydrate) に懸濁した。さらに、*Trichoderma harzianum* 由来 Lysing Enzymes (終濃度 30 mg/ml) と RNaseA (終濃度 100 μg/ml) を添加し 30°C で 2 h 保温した。得られたスフェロプラストに 2% (w/v) SDS を含む TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) を添加し、65°C で 30 min 保温した。その後、5 M CH₃COOK (pH 5.2) と 2-propanol を添加して穏やかに転倒混和し、氷上に 30 min 静置してゲノム DNA を析出させた。析出したゲノム DNA をガラス棒ですくい取り、70% ethanol で数回洗浄して風乾し、0.1×TE buffer に溶解し、使用するまで 4°C で保存した。

ChPYC1 遺伝子破壊カセットの作製

ChPYC1 遺伝子破壊カセットは主に Heckman と Pease の方法に従い DNA ポリメラーゼ (KOD FX neo DNA

ポリメラーゼ)を使用したPCRによって作製した(337). *ChURA3* 遺伝子を含むゲノム組込み型ベクター-pICUGを鋳型として, *ChURA3* に特異的なプライマーペア URA3F/URA3R (Table 3-1) を使用して *ChURA3* 領域約 2,000 bp を増幅した(328). さらに, UJ1 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR により増幅した *ChURA3* 領域の両末端 17 bp を含むプライマーセット ChPYC1UF / ChPYC1UR と ChPYC1DF / ChPYC1DR (Table 3-1) を使用して 5' と 3' 領域 (1,000-1,500 bp) 増幅した. 増幅された *ChURA3* 領域と *ChPYC1* 遺伝子の 5' と 3' 領域の増幅断片を混合して, *ChPYC1* 遺伝子の 5' または 3' 末端プライマーを使用した overlap extension PCR によって, これらの断片が融合した *ChPYC1* 遺伝子破壊カセット (約 5,000 bp) を作製した.

***ΔChpyc1* 株の作製**

C. humicola UM3 株を YPD 液体培地で 30°C で, 16 h 培養したのち, 100 ml の YPD 液体培地に OD₆₀₀ が 0.05 となるように添加して 30°C で OD₆₀₀ が 0.5 になるまで培養した. 遠心分離 (4°C, 5,000×g, 10 min) によって菌体を回収し氷冷滅菌水で 2 回洗浄した. 次に, 菌体を TMS buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, 92.4 g/l sucrose) で 2 回洗浄し, 菌体を 500 μl の TMS buffer に再懸濁した. 50 μl の菌体懸濁液に *ChPYC1* 遺伝子破壊カセットを 5 μg 添加し, MicroPulser (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて抵抗 600 Ω, 電圧 0.9 kV, 静電容量 10 μF の条件でパルスした. パルス後, 直ちに 1 ml の氷冷 1 M sorbitol を加えて 30°C で 2 h 振盪した. その後 SD 寒天培地に塗布して形質転換体を選抜し *ChPYC1* 遺伝子破壊候補株とした. 次に, コロニー-PCR (EmeraldAmp MAX PCR Master Mix) によって, *ChPYC1* 遺伝子破壊カセットの領域内外に設定したプライマーセット ChPYC1UCKF / 5URev1 と 5DFwd2 / ChPYC1DCKR を使用して 5' と 3' 領域を増幅し, *ChPYC1* 遺伝子の破壊を確認した.

Pyc 酵素活性測定に使用する *C. humicola* の粗抽出液の調製

UJ1 株と *ΔChpyc1* 株を, SD 液体培地で 30°C で, 16 h 培養したのち 200 ml の SD 液体培地に OD₆₀₀ が 0.01 となるように添加して 30°C で OD₆₀₀ が 3 になるまで培養した. 菌体を氷冷滅菌水で 2 回洗浄し, 菌体を 0.8 g の 0.45–0.5 mm のガラスビーズを含む 2 ml スクリューチューブに移して上清を除いた. 菌体は使用するまで -80°C で保存した. 菌体と 0.8 g の 0.45–0.5 mm のガラスビーズを含む 2 ml スクリューチューブに, 800 μl の氷冷破碎 buffer (50 mM KPi, 2 mM EDTA, pH 7.0) を加えて Mini Bead Beater-8 (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) を用いて最大速度で 1 min ホモジナイズし, 氷上で 3 min 冷却した. この手順を 8 回繰り返した. その後, 菌体破碎液を遠心分離 (4°C, 20,000×g, 30 min) して上清を粗抽出液とした.

***ΔChpyc1* 株の生育解析**

UJ1 株と *ΔChpyc1* 株を L-Asp を含む SD 液体培地で 30°C で, 16 h 培養したのち, 遠心分離 (4°C, 5,000×g, 10 min) によって菌体を回収し氷冷滅菌水で 2 回洗浄した. HCl または NaOH で pH を 7.0 または 4.0 に調整した窒素源と炭素源を含む YNB 液体培地に OD₆₀₀ が 0.01 となるように添加し, 30°C で振盪培養した. 培養液の OD₆₀₀ を分光光度計 UV-1800 (SHIMADU, Kyoto, Japan) で経時的に測定することで生育を評価した.

***ChDDO* 遺伝子の発現誘導**

UJ1 株と *ChPYC1* 遺伝子破壊株を SD 液体培地で 30°C で, 16 h 培養したのち, 100 ml の SD 液体培地に OD₆₀₀

が0.05となるように添加して30°Cで、16 h培養した。菌体を氷冷滅菌水で2回洗浄し、再度氷冷滅菌水に懸濁した。HClまたはNaOHでpHを調整した60 mM D-AspまたはL-Asp, 60 mM pyruvateを含む、または何も含まないYNB液体培地にOD₆₀₀ユニットが50となるように添加し、30°Cで5 h培養した。その後遠心分離(4°C, 5,000×g, 10 min)によって菌体を回収し氷冷滅菌水で2回洗浄した。菌体を0.8 gの0.45–0.5 mmのガラスビーズまたは0.2 gの0.45–0.5 mmのジルコニアビーズを含む2 ml スクリューチューブに移して上清を除いた。菌体は使用するまで–80°Cで保存した。

DDO 酵素活性測定に使用する *C. humicola* の粗抽出液の調製

誘導菌体と0.8 gの0.45–0.5 mmのガラスビーズを含む2 ml スクリューチューブに、800 µlの氷冷破碎 buffer (50 mM KPi, 2 mM EDTA, pH 7.0) を加えて Mini Bead Beater-8 (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) を用いて最大速度で1 min ホモジナイズし、氷上で3 min 冷却した。この手順を8回繰り返した。その後、菌体破碎液を遠心分離(4°C, 20,000×g, 30 min) して上清を粗抽出液とした。

DDO 酵素活性測定

DDO 反応によって生じるH₂O₂を4-aminoantipyryne (4-AA) と horseradish peroxidase (HRP) によるカップリング反応により検出することで活性を測定した。具体的には、20 mM D-Asp, 20 µM FAD, 1.5 mM 4-AA, 2 mM phenol および25 U/ml HRP を含む50 mM KPi buffer (pH 8.0) を37°Cで5 min 保存した後、粗抽出液を添加して反応を開始した。活性は反応により生成するキノノイミン色素を505 nm ($\epsilon = 6,580 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) で SpectraMax Paradigm (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を用いて経時的にモニタリングすることで算出した。なお、コントロールとして基質を含まない反応液も同様に調製し、基質を含む反応液で得られた活性値からコントロールの活性値を引いた値を活性値とした。

Total RNA の抽出

誘導菌体と0.2 gの0.45–0.5 mmのジルコニアビーズを含む2 ml スクリューチューブを凍結乾燥システムDRC-1100 と FDU-2100 (EYELA, Tokyo, Japan) を用いて凍結乾燥した。凍結乾燥した菌体は使用するまで–80°Cで保存した。凍結乾燥菌体を含むチューブをボルテックスミキサーで5 min 激しく振盪し細胞を破碎した。添付のプロトコルに従って Direct-zol RNA Miniprep Kit (ZYMO Research, Irvine, CA, USA) を用いて、破碎細胞から total RNA を抽出・精製した。

定量的リアルタイム RT-PCR (qRT-PCR)

60 mM D-Asp または L-Asp, 60 mM pyruvate または何も含まない YNB 液体培地で誘導した細胞の total RNA と、RNA-direct SYBR Green Realtime PCR Master Mix と StepOne real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用して qRT-PCR を行った。ChDDO 遺伝子と ChTAF10 遺伝子の転写量はそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーペア (Table 3-1) を使用した。ChDDO 遺伝子の相対転写レベルは ChTAF10 遺伝子を正規化遺伝子とする 2^{-ΔΔC_t} 法によって計算した (338)。

細胞内 D-Asp とピルビン酸の測定

60 mM D-Asp または L-Asp, 60 mM pyruvate または何も含まない YNB 液体培地で誘導した細胞を凍結乾燥システム DRC-1100 と FDU-2100 (EYELA, Tokyo, Japan) を用いて凍結乾燥した。凍結乾燥した誘導菌体にメタノールと等容量の ϕ 0.45–0.5 mm ガラスビーズを添加し, Mini Bead Beater-8 (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) を用いて 5 min ホモジナイズした。破碎液を遠心分離 (4°C, 20,000 \times g, 30 min) し, 得られた上清を 40°C で真空乾燥した。細胞内 D-Asp は Kajitani らの方法に従って HPLC システムで測定した (397)。細胞内ピルビン酸は Zhu らの方法に従ってピルビン酸オキシダーゼ (PO) と HRP, Amplex Ultrared (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) を使用して定量した (396)。PO 反応によって生成される H₂O₂ と Amplex Ultrared の反応によって生じる resorufin を励起/発光波長 530/590 nm で SpectraMax Paradigm (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を用いて測定した。反応液の組成は 0.1 mM Amplex Ultrared, 0.3 mM thiamine pyrophosphate, 0.02 mM FAD, 15 mM Mg₂SO₄, 7.5 U/mL HRP, 1 U/mL PO と 50 mM KPi buffer (pH 5.9) に調製した。

Table 3-1. 本章で使用したプライマー

Purposes	Primers	Sequences (5' to 3')
cDNA synthesis	ChPyc1F1	CGTCATGACACCCACACGTC
	ChPyc1R1	TGAAGCCTAGGCCTTCTCAG
Expression vector	pWGP3_ChPyc1F	TTCGAGCTCGGTACCATGACACCCACACGTC
	pWGP3_ChPyc1R	GACTCTAGAGGATCCCTAGGCCTTCTCAGCCGCCCTCCTC
	pWGP3R	GGTACCGAGCTCGAATTC
	pWGP3F	GGATCCTCTAGAGTCGAC
Gene-disruption cassette	URA3F	CGAGGTCGACGGTATCG
	URA3R	CAGGAAACAGCTATGAC
	ChPYC1UF	GTCACCTCCCGTACAACAAG
	ChPYC1UR	CGATACCGTCGACCTCGGCGATCTCGACGACCTTCTG
	ChPYC1DF	GTCATAGCTGTTTCTGCGACGGCAAGGTTGTTGACAC
	ChPYC1DR	CTGGACGTCAAAGTCGGTGA
	ChPYC1UCKF	CAGGACTTGACCCGGTATAG
Checking gene disruption	5URev1	CTCCCTCCTCCTTCTTCTTG
	5DFwd2	TCTTCACTCACCACGCATC
	ChPYC1DCKR	GTCCCAAGGCAGGTTGAATG
	RTChDDOF2	CTCACGCAGACCGAGATGTG
qRT-PCR	RTChDDOR2	GTCGAGCACGCGGAAATCT
	RTChTAF10F	CGAGGAGGTGACCGAGTACT
	RTChTAF10R	CAGAGACAACAGGCGCTTAGTC

総括

近年、様々な遊離 D-アミノ酸が微生物のみならずヒトを含む多くの動物にも見いだされ、多様な生理機能を有していることが明らかになってきた。なかでも、D-Asp は動物に豊富に見いだされ、ホルモン合成・分泌や神経伝達に関与していることが明らかになってきた。真核生物における D-Asp レベルは、Asp ラセマーゼによる合成と D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO) による分解によって制御されている。哺乳動物において Asp ラセマーゼの実体は明確に明らかにされていないが、DDO は古くから多様な真核生物に見いだされ、酵素学的諸特性や生理機能などが詳細に解析されている。近年、DDO による D-Asp の代謝異常が統合失調症を含む神経性疾患に関与することが示唆され、DDO による D-Asp レベルの制御機構の解明が期待されている。哺乳動物や真菌において、酸性 D-アミノ酸の存在によって DDO が誘導発現することが知られているが、その発現制御機構はほとんど明らかにされていない。DDO 遺伝子の誘導発現機構の解明は、D-Asp と DDO が関わる生理機能、病態の解明やその治療法の開発に有益な知見をもたらすと期待される。

本研究室では、D-Asp を唯一の炭素・窒素源として生育可能な担子菌酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 株を単離し、本酵母が生産する DDO (ChDDO) の生理的役割や酵素学的諸特性を解析してきた。UJ1 株において ChDDO は培地中の D-Asp の存在により転写レベルで誘導発現される。しかし、この D-Asp 依存的な誘導発現に関わる因子は全く明らかにされていない。そこで本研究では、酵母 *C. humicola* UJ1 株における ChDDO 遺伝子の D-Asp 依存的な機能発現に関わる因子を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では、初めにドラフトゲノム解析によって *C. humicola* UJ1 株のゲノム情報を取得した。UJ1 株のゲノム配列には ChDDO 遺伝子以外にも複数の D-アミノ酸代謝に関与する酵素遺伝子が見いだされた。特に、UJ1 株には他の真核生物よりも多い個数の DDO/DAO ホモログ遺伝子が見いだされた。真菌において DDO と DAO は D-アミノ酸の生育への利用や毒性の低減を担うことから、多数の DDO と DAO ホモログは、UJ1 株の多様な D-アミノ酸上での生育を可能にすると考えられた。

過去の知見から、UJ1 株における D-Asp 依存的な ChDDO 遺伝子誘導発現にはアミノ酸パーミアーゼ (Aap) を介した D-Asp の細胞内取り込みが関与することが示唆されていた。そこで、UJ1 株において D-Asp 輸送に関与する AAP 遺伝子を同定し、ChDDO 遺伝子誘導発現との関係を解析した。UJ1 株のゲノム配列には他の担子菌酵母よりも多い 31 個の AAP 遺伝子が存在した。分子系統解析によって D-Asp 輸送に関与する可能性の高い 7 個の AAP 遺伝子 (ChAAP1, 4, 5, ChGap1-4) を特定した。ChAAP1, 4 と ChGAP1-4 遺伝子破壊株の D-Asp における生育は遅延し、DDO 活性と ChDDO 遺伝子が転写レベルで低下したことから、これら複数の Aap が D-Asp の取り込みを介して ChDDO 遺伝子の発現に関与することが明らかとなった。さらに、UJ1 株では酸性および中性 pH 条件下では、ChAap1, 4 と ChGap1-4 を含む複数の Aap が D-Asp の細胞内輸送を担うのに対して、アルカリ性 pH 条件下では ChAap4 が D-Asp 細胞内輸送を主に担

うことが明らかとなった。これらの結果から、複数の Aap による D-Asp の細胞内取り込みが *ChDDO* 遺伝子の発現に関与することが明らかとなった。

第2章では、UJ1株において D-Asp 応答に関与するシグナル伝達経路に関する情報を得るために、RNA-seqにより D-Asp 特異的に発現が変動する遺伝子を網羅的に解析した。D-Asp 誘導細胞では、ヌクレオチド生合成やリボソーム生合成、ペルオキシソーム増殖などに関与する遺伝子の発現が誘導され、オートファゴソームやエンドサイトーシス、細胞周期などに関与する遺伝子の発現が抑制された。これは、D-Asp-tRNA の形成によって利用可能な tRNA が減少することで、GAAC 経路が活性化されること、また利用可能な tRNA の減少によりタンパク質合成プロセスが阻害されることで遊離アミノ酸が細胞内に蓄積し、TORC1 経路が活性化されることに起因すると考えられた。一方、*ChDDO* 遺伝子の転写は、GAAC 経路を活性化すると考えられる他の D-アミノ酸で誘導されないこと、TORC1 制御下にある NCR や CCR を受けないことから、未知の独立した D-Asp シグナル伝達経路により転写誘導されると考えられた。

一般的に、GAAC 経路は貧アミノ酸条件によって活性化されるのに対して、TORC1 経路は富アミノ酸条件によって活性化される。D-Asp の存在により、栄養条件に対する相反する応答が継続することは、細胞の代謝経路を攪乱し生育に深刻な影響を与える可能性がある。*ChDDO* 遺伝子の誘導システムが GAAC 経路や TORC1 経路とは独立して存在することは、効率的な D-Asp 毒性の低減を可能にし、異常な細胞代謝システムを正常な状態に移行するために寄与すると考えられる。さらに、D-Asp 誘導細胞では *ChDDO* 遺伝子だけでなく *AAP* 遺伝子やペルオキシソーム増殖に関与する *PEX* 遺伝子の発現が誘導されていた。このことから、UJ1株では細胞の D-Asp 取り込み活性を増加させ、D-Asp 代謝反応の場であるペルオキシソーム機能も亢進させることで効率的な D-Asp 代謝を促進していると考えられた。

第3章では、UJ1株のピルビン酸カルボキシラーゼ (*Pyc1*) と *ChDDO* 遺伝子の機能発現との関係性について解析した。メタノール資化性酵母において、*Pyc1* は TCA 回路にオキサロ酢酸を供給するアナプレロティック酵素として機能し、ペルオキシソームに局在するフラビン酵素の AO や DAO の翻訳後の機能発現に寄与していると考えられている。しかし、UJ1株においても *Pyc1* がアナプレロティック酵素として機能し、*ChDDO* の翻訳後の活性化に寄与するかどうかは不明であった。そこで、UJ1株の *PYCI* 遺伝子 (*ChPYCI*) を同定し、その遺伝子破壊株を解析したところ、*ChPyc1* は TCA 回路のアナプレロティック酵素として機能することが分かった。また、*ChPyc1* の機能は、Asp トランスアミナーゼ反応による L-Asp からのオキサロ酢酸の供給により相補されたが、*ChDDO* による D-Asp からのオキサロ酢酸の供給では相補されることが分かった。これは、*ChPYCI* 遺伝子破壊により *ChDDO* 遺伝子の発現が転写レベルで低下したことが原因と考えられた。さらに、D-Asp 誘導時にピルビン酸を添加すると、野生株と *ChPYCI* 遺伝子破壊株の細胞内ピルビン酸含有量は同程度であったが、*ChDDO* 遺伝子の転写レベルは野生株では増加し、*ChPYCI* 遺伝子破壊株では低下した。このことから、*ChDDO* 遺伝子の転写は D-Asp だけでなくピルビン酸代謝レベルによっても部分的に制御されていることが示唆された。この

ことは、細胞の好気代謝レベルに応じて*ChDDO*遺伝子発現を制御することで、D-Aspの効率的な資化利用に寄与すると考えられる。

Fig. I に本研究で得られた結果の概要を示す。本研究によって、酵母 *C. humicola* UJ1 株において D-Asp 輸送に関与する 6 つの *AAP* 遺伝子を同定し、細胞内に取り込まれた D-Asp が *ChDDO* 遺伝子を転写レベルで誘導することが明らかとなった。また、D-Asp は GAAC 経路や TORC1 経路を活性化するが、D-Asp による *ChDDO* 遺伝子の転写は、これらシグナル伝達経路とは異なる経路で誘導されることで、効率的な D-Asp 代謝分解に寄与すると考えられる。さらに、Pyc1 によるピルビン酸代謝も D-Asp による *ChDDO* の転写誘導を部分的に制御し、D-Asp 上での効率的な生育に寄与すると考えられた。

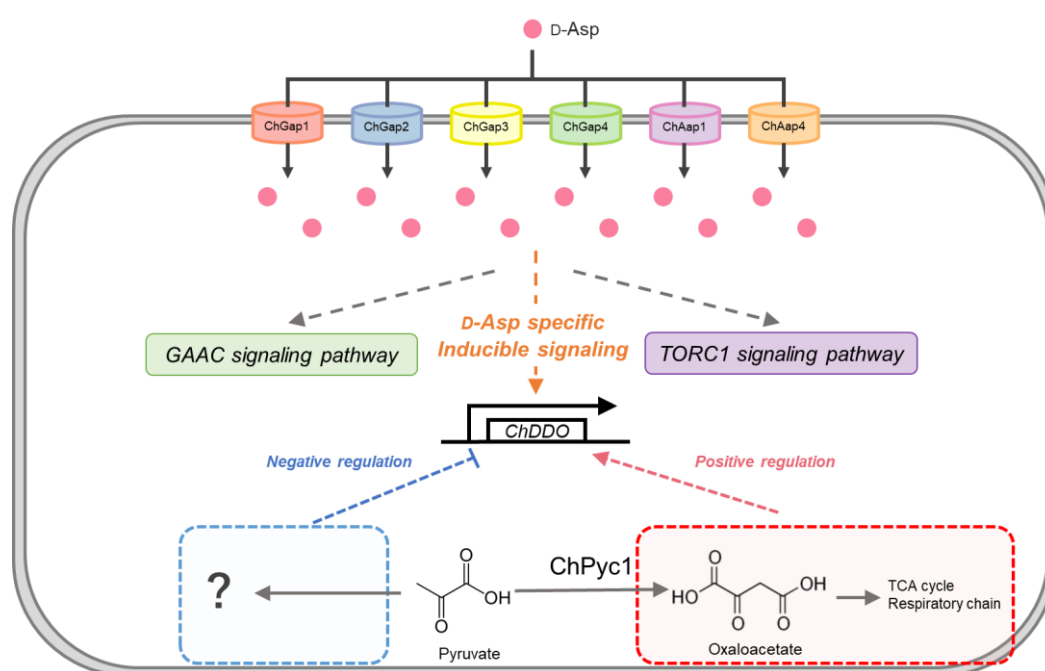


Fig. I. 酵母 *C. humicola* UJ1 株の *ChDDO* 遺伝子発現に関するシグナル伝達経路と D-Asp 応答のモデル

UJ1株においてD-Aspは少なくとも6つのAapによって細胞内へ輸送される。取り込まれたD-AspはtRNAの利用可能性に影響を与え、GAAC経路とTORC1経路を活性化する。D-Aspによる*ChDDO*遺伝子の誘導性シグナル伝達経路はこれら経路とは独立しており、効率的なD-Asp代謝分解に寄与すると考えられる。一方、ピルビン酸代謝レベルは、D-Aspによる*ChDDO*遺伝子の転写誘導を部分的に制御する。このことは、細胞の好気代謝レベルに応じて*ChDDO*遺伝子発現を制御することで、D-Aspの効率的な資化利用に寄与すると考えられる。

今後、D-Aspを立体特異的に認識するセンサータンパク質や*ChDDO*遺伝子プロモーター領域に結合するタンパク質、あるいはピルビン酸代謝レベルを感知する制御因子の同定が期待される。また、本研究で得られた研究成果は真核生物のD-Aspを含むD-アミノ酸応答に関する有益な情報を提供すると考えられ、ヒトを含む哺乳動物細胞に対するD-アミノ酸の毒性、機能や影響の解明に貢献すると期待される。ヒトにおいて、D-Aspの代謝異常は統合失調症を含む神経性疾患に関与することが示唆されていることから、本研究で得られたDDO機能発現に関する新たな知見は、これら疾患の発病メカニズムやその治療に貢献すると期待される。

謝辞

本論文は筆者が長岡技術科学大学大学院 工学研究科生物機能工学専攻と生物統合工学専攻に在籍した5年間の研究成果をまとめたものであり、多くの方々のご支援によって完成に至りました。ここに、お世話になった方々への感謝の言葉を記します。

指導教官として本研究の実施の機会を与えていただき、その遂行にあたって多大なるご支援をいただきました。環境生物化学研究室 高橋祥司教授に深く感謝申し上げます。未熟だった筆者に対し、基礎的な実験操作から学術論文の執筆に至るまで、丁寧に根気強く指導していただきました。高橋祥司教授のもとで5年間の大学院および研究生生活を送ることができたことは、筆者にとってかけがえのない経験であり、研究能力だけでなく人格面、精神面においても大きく成長することができました。

ご多忙の中、本論文の副査を務めていただきました。微生物代謝工学研究室 政井英司教授、発酵科学研究室 小笠原渉教授、志田洋介准教授、環境微生物工学研究室 笠井大輔准教授に深く感謝申し上げます。また、政井英司教授には本論文の副査だけでなく、筆者の修士論文審査においても多くのご助言を与えていただきましたこと、心より感謝申し上げます。

第1章において、ChGap1-4 と ChAap1 の機能解析に携わっていただきました寺尾玲都氏に深く感謝申し上げます。第1章および第3章において qRT-PCR 解析を実施するにあたり、qRT-PCR 装置を快くお貸しいただいた微生物代謝工学研究室 政井英司教授、上村直史助教に深く感謝申し上げます。また、同研究室 棚谷建太氏には qRT-PCR 装置をお借りするにあたり様々な配慮をしていただきましたこと、心より感謝申し上げます。

第2章の RNA サンプルの品質評価を実施するにあたり、RNA 解析装置を快くお貸しいただいた環境微生物工学研究室 笠井大輔准教授に深く感謝申し上げます。

第3章において、Pyc 酵素活性測定および細胞内 D-Asp 濃度測定に携わっていただきました財津奏太氏に深く感謝申し上げます。

筆者が環境生物化学研究室に配属された当初から、研究成果について意見交換し、的確なアドバイスをしていただきました七五三掛湧也博士に心より感謝申し上げます。本学修了後も、後輩を気遣い温かい言葉をかけてくださったことは、筆者にとって大きな励みとなりました。

環境生物化学研究室の博士過程に進む同輩として、助け合いながら研究室生活を共に過ごし、HPLC を利用した解析において多くのサポートをしていただきました。梶谷賢吾氏に心より感謝申し上げます。

筆者が環境生物化学研究室で過ごした5年間において関わった多くの先輩方や同輩、後輩たち、また大学外の友人たちにも心より感謝申し上げます。

最後に、博士課程進学を快く受け入れ、あたたかく見守り続けてくれた両親と姉、叔母に深く感謝申し上げます。

令和4年3月

今西大生

公表論文

Daiki Imanishi, Katsumasa Abe, Yoshio Kera, Shouji Takahashi. Draft Genome Sequence of the Yeast *Vanrija humicola* (Formerly *Cryptococcus humicola*) Strain UJ1, a Producer of D-Aspartate Oxidase. *Genome Announc.* 2018 Mar 15;6(11):e00068-18. doi: 10.1128/genomeA.00068-18.

Daiki Imanishi, Yoshio Kera, Shouji Takahashi. Identification of an Acidic Amino Acid Permease Involved in D-Aspartate Uptake in the Yeast *Cryptococcus humicola*. *Microorganisms.* 2021 Jan 18;9(1):192. doi: 10.3390/microorganisms9010192.

Daiki Imanishi, Souta Zaito, Shouji Takahashi. Regulation of D-Aspartate Oxidase Gene Expression by Pyruvate Metabolism in the Yeast *Cryptococcus humicola*. *Microorganisms.* 2021 Nov 27;9(12):2444. doi: 10.3390/microorganisms9122444.

Daiki Imanishi, Shouji Takahashi. Differentially Expressed Genes in the Presence of D- and L-Aspartate in the Yeast *Cryptococcus humicola*. In preparation for publication.

引用文献

1. Park, J. T.; Strominger, J. L., Mode of action of penicillin. *Science* **1957**, *125* (3238), 99-101.
2. Hancock, R., The amino acid composition of the protein and cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Biochim Biophys Acta* **1960**, *37*, 42-6.
3. Smith, T. J.; Blackman, S. A.; Foster, S. J., Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology (Reading)* **2000**, *146* (Pt 2), 249-262.
4. Radkov, A. D.; Moe, L. A., Bacterial synthesis of D-amino acids. *Appl Microbiol Biotechnol* **2014**, *98* (12), 5363-74.
5. Hernandez, S. B.; Cava, F., Environmental roles of microbial amino acid racemases. *Environ Microbiol* **2016**, *18* (6), 1673-85.
6. Aliashkevich, A.; Alvarez, L.; Cava, F., New Insights Into the Mechanisms and Biological Roles of D-Amino Acids in Complex Eco-Systems. *Front Microbiol* **2018**, *9*, 683.
7. Lam, H.; Oh, D. C.; Cava, F.; Takacs, C. N.; Clardy, J.; de Pedro, M. A.; Waldor, M. K., D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. *Science* **2009**, *325* (5947), 1552-5.
8. Genchi, G., An overview on D-amino acids. *Amino Acids* **2017**, *49* (9), 1521-1533.
9. Cava, F.; Lam, H.; de Pedro, M. A.; Waldor, M. K., Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. *Cell Mol Life Sci* **2011**, *68* (5), 817-31.
10. Kolodkin-Gal, I.; Romero, D.; Cao, S.; Clardy, J.; Kolter, R.; Losick, R., D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* **2010**, *328* (5978), 627-9.
11. Alvarez, L.; Aliashkevich, A.; de Pedro, M. A.; Cava, F., Bacterial secretion of D-arginine controls environmental microbial biodiversity. *ISME J* **2018**, *12* (2), 438-450.
12. Montecucchi, P. C.; de Castiglione, R.; Piani, S.; Gozzini, L.; Erspamer, V., Amino acid composition and sequence of dermorphin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. *Int J Pept Protein Res* **1981**, *17* (3), 275-83.
13. Jilek, A.; Kreil, G., D-amino acids in animal peptides. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly* **2008**, *139* (1), 1-5.
14. Bai, L.; Sheeley, S.; Sweedler, J. V., Analysis of Endogenous D-Amino Acid-Containing Peptides in Metazoa. *Bioanal Rev* **2009**, *1* (1), 7-24.
15. Ollivaux, C.; Soye, D.; Toullec, J. Y., Biogenesis of D-amino acid containing peptides/proteins: where, when and how? *J Pept Sci* **2014**, *20* (8), 595-612.
16. Martinez-Rodriguez, S.; Martinez-Gomez, A. I.; Rodriguez-Vico, F.; Clemente-Jimenez, J. M.; Las Heras-Vazquez, F. J., Natural occurrence and industrial applications of D-amino acids: an overview. *Chem Biodivers* **2010**, *7* (6), 1531-48.
17. Abe, H., Distribution of free D-amino acids and their biosyntheses and physiological roles in aquatic animals. *Seikagaku* **2008**, *80* (4), 308-15.
18. Watanabe, T.; Shibata, K.; Kera, Y.; Yamada, R., Occurrence of free D-aspartate and aspartate racemase in the

- blood shell *Scapharca broughtonii*. *Amino Acids* **1998**, *14* (4), 353-60.
19. Uo, T.; Yoshimura, T.; Shimizu, S.; Esaki, N., Occurrence of pyridoxal 5'-phosphate-dependent serine racemase in silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, *246* (1), 31-4.
20. Tanigawa, M.; Suzuki, C.; Niwano, K.; Kanekatsu, R.; Tanaka, H.; Horiike, K.; Hamase, K.; Nagata, Y., Participation of D-serine in the development and reproduction of the silkworm *Bombyx mori*. *J Insect Physiol* **2016**, *87*, 20-29.
21. Pollegioni, L.; Molla, G.; Sacchi, S.; Murtas, G., Human D-aspartate Oxidase: A Key Player in D-aspartate Metabolism. *Front Mol Biosci* **2021**, *8*, 689719.
22. Errico, F.; Mothet, J. P.; Usiello, A., D-Aspartate: An endogenous NMDA receptor agonist enriched in the developing brain with potential involvement in schizophrenia. *J Pharm Biomed Anal* **2015**, *116*, 7-17.
23. Imai, K.; Fukushima, T.; Santa, T.; Homma, H.; Huang, Y.; Sakai, K.; Kato, M., Distribution of free D-amino acids in tissues and body fluids of vertebrates. *Enantiomer* **1997**, *2* (3-4), 143-5.
24. Schell, M. J.; Molliver, M. E.; Snyder, S. H., D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92* (9), 3948-52.
25. Hashimoto, A.; Nishikawa, T.; Oka, T.; Takahashi, K., Endogenous D-serine in rat brain: N-methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging. *J Neurochem* **1993**, *60* (2), 783-6.
26. Suzuki, M.; Imanishi, N.; Mita, M.; Hamase, K.; Aiso, S.; Sasabe, J., Heterogeneity of D-Serine Distribution in the Human Central Nervous System. *ASN Neuro* **2017**, *9* (3), 1759091417713905.
27. 笹部潤平, D-アミノ酸の哺乳類における生物学的意義 アミノ酸のキラリティが作る鏡の中の生物学. *化学と生物* **2019**, *57* (6), 340-345.
28. Cho, S. E.; Na, K. S.; Cho, S. J.; Kang, S. G., Low D-serine levels in schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci Lett* **2016**, *634*, 42-51.
29. Sasabe, J.; Chiba, T.; Yamada, M.; Okamoto, K.; Nishimoto, I.; Matsuoka, M.; Aiso, S., D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J* **2007**, *26* (18), 4149-59.
30. Sasabe, J.; Miyoshi, Y.; Suzuki, M.; Mita, M.; Konno, R.; Matsuoka, M.; Hamase, K.; Aiso, S., D-amino acid oxidase controls motoneuron degeneration through D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109* (2), 627-32.
31. Keller, S.; Punzo, D.; Cuomo, M.; Affinito, O.; Coretti, L.; Sacchi, S.; Florio, E.; Lembo, F.; Carella, M.; Copetti, M.; Coccozza, S.; Balu, D. T.; Errico, F.; Usiello, A.; Chiariotti, L., DNA methylation landscape of the genes regulating D-serine and D-aspartate metabolism in post-mortem brain from controls and subjects with schizophrenia. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 10163.
32. D'Aniello, A., D-Aspartic acid: an endogenous amino acid with an important neuroendocrine role. *Brain Res Rev* **2007**, *53* (2), 215-34.
33. Hashimoto, A.; Nishikawa, T.; Oka, T.; Hayashi, T.; Takahashi, K., Widespread distribution of free D-aspartate in rat periphery. *FEBS Lett* **1993**, *331* (1-2), 4-8.
34. Long, Z.; Homma, H.; Lee, J. A.; Fukushima, T.; Santa, T.; Iwatsubo, T.; Yamada, R.; Imai, K., Biosynthesis of D-aspartate in mammalian cells. *FEBS Lett* **1998**, *434* (3), 231-5.

35. Long, Z.; Sekine, M.; Adachi, M.; Furuchi, T.; Imai, K.; Nimura, N.; Homma, H., Cell density inversely regulates D- and L-aspartate levels in rat pheochromocytoma MPT1 cells. *Arch Biochem Biophys* **2002**, *404* (1), 92-7.
36. Long, Z.; Lee, J. A.; Okamoto, T.; Nimura, N.; Imai, K.; Homma, H., D-Aspartate in a prolactin-secreting clonal strain of rat pituitary tumor cells (GH₃). *Biochem Biophys Res Commun* **2000**, *276* (3), 1143-7.
37. Matsuda, S.; Katane, M.; Maeda, K.; Kaneko, Y.; Saitoh, Y.; Miyamoto, T.; Sekine, M.; Homma, H., Biosynthesis of D-aspartate in mammals: the rat and human homologs of mouse aspartate racemase are not responsible for the biosynthesis of D-aspartate. *Amino Acids* **2015**, *47* (5), 975-85.
38. Wolosker, H.; D'Aniello, A.; Snyder, S. H., D-aspartate disposition in neuronal and endocrine tissues: ontogeny, biosynthesis and release. *Neuroscience* **2000**, *100* (1), 183-9.
39. Kim, P. M.; Duan, X.; Huang, A. S.; Liu, C. Y.; Ming, G. L.; Song, H.; Snyder, S. H., Aspartate racemase, generating neuronal D-aspartate, regulates adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107* (7), 3175-9.
40. Tanaka-Hayashi, A.; Hayashi, S.; Inoue, R.; Ito, T.; Konno, K.; Yoshida, T.; Watanabe, M.; Yoshimura, T.; Mori, H., Is D-aspartate produced by glutamic-oxaloacetic transaminase-1 like 1 (Got111): a putative aspartate racemase? *Amino Acids* **2015**, *47* (1), 79-86.
41. Topo, E.; Soricelli, A.; Di Maio, A.; D'Aniello, E.; Di Fiore, M. M.; D'Aniello, A., Evidence for the involvement of D-aspartic acid in learning and memory of rat. *Amino Acids* **2010**, *38* (5), 1561-9.
42. Palazzo, E.; Luongo, L.; Guida, F.; Marabese, I.; Romano, R.; Iannotta, M.; Rossi, F.; D'Aniello, A.; Stella, L.; Marmo, F.; Usiello, A.; de Bartolomeis, A.; Maione, S.; de Novellis, V., D-Aspartate drinking solution alleviates pain and cognitive impairment in neuropathic mice. *Amino Acids* **2016**, *48* (7), 1553-67.
43. Onat, F.; Toker, F.; Aslan, N.; Oktay, S.; Berkman, K., Antinociceptive effect of D-aspartic acid in mice. *Pharmacol Biochem Behav* **1995**, *51* (4), 715-9.
44. D'Aniello, A.; Luongo, L.; Romano, R.; Iannotta, M.; Marabese, I.; Boccella, S.; Belardo, C.; de Novellis, V.; Arra, C.; Barbieri, A.; D'Aniello, B.; Scandurra, A.; Magliozzi, L.; Fisher, G.; Guida, F.; Maione, S., D-Aspartic acid ameliorates painful and neuropsychiatric changes and reduces β -amyloid A β ₁₋₄₂ peptide in a long lasting model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* **2017**, *651*, 151-158.
45. Errico, F.; Napolitano, F.; Nistico, R.; Usiello, A., New insights on the role of free D-aspartate in the mammalian brain. *Amino Acids* **2012**, *43* (5), 1861-71.
46. Punzo, D.; Errico, F.; Cristino, L.; Sacchi, S.; Keller, S.; Belardo, C.; Luongo, L.; Nuzzo, T.; Imperatore, R.; Florio, E.; De Novellis, V.; Affinito, O.; Migliarini, S.; Maddaloni, G.; Sisalli, M. J.; Pasqualetti, M.; Pollegioni, L.; Maione, S.; Chiariotti, L.; Usiello, A., Age-Related Changes in D-Aspartate Oxidase Promoter Methylation Control Extracellular D-Aspartate Levels and Prevent Precocious Cell Death during Brain Aging. *J Neurosci* **2016**, *36* (10), 3064-78.
47. Krashia, P.; Ledonne, A.; Nobili, A.; Cordella, A.; Errico, F.; Usiello, A.; D'Amelio, M.; Mercuri, N. B.; Guatteo, E.; Carunchio, I., Persistent elevation of D-Aspartate enhances NMDA receptor-mediated responses in mouse

- substantia nigra pars compacta dopamine neurons. *Neuropharmacology* **2016**, *103*, 69-78.
48. Hashimoto, A.; Oka, T.; Nishikawa, T., Anatomical distribution and postnatal changes in endogenous free D-aspartate and D-serine in rat brain and periphery. *Eur J Neurosci* **1995**, *7* (8), 1657-63.
49. Sakai, K.; Homma, H.; Lee, J. A.; Fukushima, T.; Santa, T.; Tashiro, K.; Iwatsubo, T.; Imai, K., D-aspartic acid localization during postnatal development of rat adrenal gland. *Biochem Biophys Res Commun* **1997**, *235* (2), 433-6.
50. Ishio, S.; Yamada, H.; Hayashi, M.; Yatsushiro, S.; Noumi, T.; Yamaguchi, A.; Moriyama, Y., D-aspartate modulates melatonin synthesis in rat pinealocytes. *Neurosci Lett* **1998**, *249* (2-3), 143-6.
51. Nagata, Y.; Homma, H.; Matsumoto, M.; Imai, K., Stimulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression by D-aspartate in rat Leydig cells. *FEBS Lett* **1999**, *454* (3), 317-20.
52. Nagata, Y.; Homma, H.; Lee, J. A.; Imai, K., D-Aspartate stimulation of testosterone synthesis in rat Leydig cells. *FEBS Lett* **1999**, *444* (2-3), 160-4.
53. D'Aniello, G.; Ronsini, S.; Guida, F.; Spinelli, P.; D'Aniello, A., Occurrence of D-aspartic acid in human seminal plasma and spermatozoa: possible role in reproduction. *Fertil Steril* **2005**, *84* (5), 1444-9.
54. Xia, J. D.; Chen, J.; Yang, B. B.; Sun, H. J.; Zhu, G. Q.; Dai, Y. T.; Yang, J.; Wang, Z. J., Differences in sympathetic nervous system activity and NMDA receptor levels within the hypothalamic paraventricular nucleus in rats with differential ejaculatory behavior. *Asian J Androl* **2018**, *20* (4), 355-359.
55. Melis, M. R.; Succu, S.; Mascia, M. S.; Cortis, L.; Argiolas, A., Extracellular excitatory amino acids increase in the paraventricular nucleus of male rats during sexual activity: main role of N-methyl- D-aspartic acid receptors in erectile function. *Eur J Neurosci* **2004**, *19* (9), 2569-75.
56. Melis, M. R.; Succu, S.; Iannucci, U.; Argiolas, A., N-methyl- D-aspartic acid-induced penile erection and yawning: role of hypothalamic paraventricular nitric oxide. *Eur J Pharmacol* **1997**, *328* (2-3), 115-23.
57. D'Aniello, A.; Di Cosmo, A.; Di Cristo, C.; Annunziato, L.; Petrucelli, L.; Fisher, G., Involvement of D-aspartic acid in the synthesis of testosterone in rat testes. *Life Sci* **1996**, *59* (2), 97-104.
58. Takahashi, S., D-Aspartate oxidase: distribution, functions, properties, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **2020**, *104* (7), 2883-2895.
59. Hamase, K.; Inoue, T.; Morikawa, A.; Konno, R.; Zaitso, K., Determination of free D-proline and D-leucine in the brains of mutant mice lacking D-amino acid oxidase activity. *Anal Biochem* **2001**, *298* (2), 253-8.
60. Hamase, K.; Morikawa, A.; Etoh, S.; Tojo, Y.; Miyoshi, Y.; Zaitso, K., Analysis of small amounts of D-amino acids and the study of their physiological functions in mammals. *Anal Sci* **2009**, *25* (8), 961-8.
61. Hamase, K.; Miyoshi, Y.; Ueno, K.; Han, H.; Hirano, J.; Morikawa, A.; Mita, M.; Kaneko, T.; Lindner, W.; Zaitso, K., Simultaneous determination of hydrophilic amino acid enantiomers in mammalian tissues and physiological fluids applying a fully automated micro-two-dimensional high-performance liquid chromatographic concept. *J Chromatogr A* **2010**, *1217* (7), 1056-62.
62. Han, H.; Miyoshi, Y.; Ueno, K.; Okamura, C.; Tojo, Y.; Mita, M.; Lindner, W.; Zaitso, K.; Hamase, K., Simultaneous determination of D-aspartic acid and D-glutamic acid in rat tissues and physiological fluids using

- a multi-loop two-dimensional HPLC procedure. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2011**, 879 (29), 3196-202.
63. Jaiswal, S.; Singh, R.; Singh, K.; Fatma, S.; Prasad, B. B., Enantioselective analysis of D- and L- Serine on a layer-by-layer imprinted electrochemical sensor. *Biosens Bioelectron* **2019**, 124-125, 176-183.
64. Ohnishi, E.; Macleod, H.; Horowitz, N., Mutants of *Neurospora* deficient in D-amino acid oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **1962**, 237 (1), 138-142.
65. Champney, W. S.; Jensen, R. A., Molecular events in the growth inhibition of *Bacillus subtilis* by D-tyrosine. *Journal of Bacteriology* **1970**, 104 (1), 107-116.
66. Jensen, R. A.; Stenmark, S. L.; Champney, W. S., Molecular basis for the differential anti-metabolite action of D-tyrosine in strains 23 and 168 of *Bacillus subtilis*. *Archiv für Mikrobiologie* **1972**, 87 (2), 173-180.
67. Cosloy, S. D.; McFall, E., Metabolism of D-serine in *Escherichia coli* K-12: mechanism of growth inhibition. *Journal of Bacteriology* **1973**, 114 (2), 685-694.
68. Harris, C. L., Cysteine and growth inhibition of *Escherichia coli*: threonine deaminase as the target enzyme. *Journal of bacteriology* **1981**, 145 (2), 1031-1035.
69. Tsuruoka, T.; Tamura, A.; Miyata, A.; Takei, T.; Iwamatsu, K.; Inouye, S.; Matsushashi, M., Penicillin-insensitive incorporation of D-amino acids into cell wall peptidoglycan influences the amount of bound lipoprotein in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **1984**, 160 (3), 889-894.
70. Caparrós, M.; Torrecuadrada, J.; de Pedro, M., Effect of D-amino acids on *Escherichia coli* strains with impaired penicillin-binding proteins. *Research in microbiology* **1991**, 142 (2-3), 345-350.
71. Caparros, M.; Pisabarro, A. G.; de Pedro, M. A., Effect of D-amino acids on structure and synthesis of peptidoglycan in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **1992**, 174 (17), 5549-5559.
72. Soutourina, J.; Plateau, P.; Blanquet, S., Metabolism of D-aminoacyl-tRNAs in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* cells. *J Biol Chem* **2000**, 275 (42), 32535-42.
73. Friedman, M., Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids. *J Agric Food Chem* **1999**, 47 (9), 3457-79.
74. Baldwin, A. N.; Berg, P., Transfer ribonucleic acid-induced hydrolysis of valyladenylate bound to isoleucyl ribonucleic acid synthetase. *J Biol Chem* **1966**, 241 (4), 839-45.
75. Hopfield, J. J., Kinetic proofreading: a new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1974**, 71 (10), 4135-9.
76. Thompson, D.; Lazennec, C.; Plateau, P.; Simonson, T., Ammonium scanning in an enzyme active site. The chiral specificity of aspartyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **2007**, 282 (42), 30856-68.
77. Calendar, R.; Berg, P., D-Tyrosyl RNA: formation, hydrolysis and utilization for protein synthesis. *Journal of molecular biology* **1967**, 26 (1), 39-54.
78. Soutourina, J.; Plateau, P.; Delort, F.; Peirottes, A.; Blanquet, S., Functional characterization of the D-Tyr-tRNA^{Tyr} deacylase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274 (27), 19109-19114.
79. Soutourina, J.; Blanquet, S.; Plateau, P., D-Tyrosyl-tRNA^{Tyr} Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal*

- of Biological Chemistry* **2000**, 275 (16), 11626-11630.
80. Ellman, J. A.; Mendel, D.; Schultz, P. G., Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins. *Science* **1992**, 255 (5041), 197-200.
81. Fujino, T.; Goto, Y.; Suga, H.; Murakami, H., Reevaluation of the D-amino acid compatibility with the elongation event in translation. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, 135 (5), 1830-1837.
82. Noren, C. J.; Anthony-Cahill, S. J.; Griffith, M. C.; Schultz, P. G., A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Science* **1989**, 244 (4901), 182-188.
83. Tan, Z.; Forster, A. C.; Blacklow, S. C.; Cornish, V. W., Amino Acid Backbone Specificity of the *Escherichia coli* Translation Machinery. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126 (40), 12752-12753.
84. Yamane, T.; Miller, D.; Hopfield, J., Discrimination between D- and L-tyrosyl transfer ribonucleic acids in peptide chain elongation. *Biochemistry* **1981**, 20 (25), 7059-7064.
85. Englander, M. T.; Avins, J. L.; Fleisher, R. C.; Liu, B.; Effraim, P. R.; Wang, J.; Schulten, K.; Leyh, T. S.; Gonzalez, R. L., Jr.; Cornish, V. W., The ribosome can discriminate the chirality of amino acids within its peptidyl-transferase center. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, 112 (19), 6038-43.
86. Melnikov, S. V.; Khabibullina, N. F.; Mairhofer, E.; Vargas-Rodriguez, O.; Reynolds, N. M.; Micura, R.; Soll, D.; Polikanov, Y. S., Mechanistic insights into the slow peptide bond formation with D-amino acids in the ribosomal active site. *Nucleic Acids Res* **2019**, 47 (4), 2089-2100.
87. Fleisher, R. C.; Cornish, V. W.; Gonzalez, R. L., Jr., D-Amino Acid-Mediated Translation Arrest Is Modulated by the Identity of the Incoming Aminoacyl-tRNA. *Biochemistry* **2018**, 57 (29), 4241-4246.
88. Zheng, G.; Liu, W.; Gong, Y.; Yang, H.; Yin, B.; Zhu, J.; Xie, Y.; Peng, X.; Qiang, B.; Yuan, J., Human D-Tyr-tRNA^{Tyr} deacylase contributes to the resistance of the cell to D-amino acids. *Biochem J* **2009**, 417 (1), 85-94.
89. Rohde, H.; Burdelski, C.; Bartscht, K.; Hussain, M.; Buck, F.; Horstkotte, M. A.; Knobloch, J. K. M.; Heilmann, C.; Herrmann, M.; Mack, D., Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Molecular microbiology* **2005**, 55 (6), 1883-1895.
90. Hochbaum, A. I.; Kolodkin-Gal, I.; Foulston, L.; Kolter, R.; Aizenberg, J.; Losick, R., Inhibitory effects of D-amino acids on *Staphylococcus aureus* biofilm development. *Journal of bacteriology* **2011**, 193 (20), 5616-5622.
91. Rumbo, C.; Vallejo, J.; Cabral, M.; Martínez-Gutián, M.; Pérez, A.; Beceiro, A.; Bou, G., Assessment of antivirulence activity of several D-amino acids against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2016**, 71 (12), 3473-3481.
92. Ferri-Fioni, M. L.; Fromant, M.; Bouin, A. P.; Aubard, C.; Lazenec, C.; Plateau, P.; Blanquet, S., Identification in archaea of a novel D-Tyr-tRNA^{Tyr} deacylase. *J Biol Chem* **2006**, 281 (37), 27575-85.
93. Bhatt, T. K.; Soni, R.; Sharma, D., Recent Updates on DTD (D-Tyr-tRNA^{Tyr} Deacylase): An Enzyme Essential for Fidelity and Quality of Protein Synthesis. *Front Cell Dev Biol* **2016**, 4, 32.
94. Pollegioni, L.; Piubelli, L.; Sacchi, S.; Pilone, M. S.; Molla, G., Physiological functions of D-amino acid

- oxidases: from yeast to humans. *Cell Mol Life Sci* **2007**, *64* (11), 1373-94.
95. Ito, T.; Hemmi, H.; Kataoka, K.; Mukai, Y.; Yoshimura, T., A novel zinc-dependent D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **2008**, *409* (2), 399-406.
96. Yow, G. Y.; Uo, T.; Yoshimura, T.; Esaki, N., Physiological role of D-amino acid-N-acetyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*: detoxification of D-amino acids. *Arch Microbiol* **2006**, *185* (1), 39-46.
97. Yow, G. Y.; Uo, T.; Yoshimura, T.; Esaki, N., D-amino acid N-acetyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*: a close homologue of histone acetyltransferase Hpa2p acting exclusively on free D-amino acids. *Arch Microbiol* **2004**, *182* (5), 396-403.
98. Negri, A.; Massey, V.; Williams, C. H., Jr., D-aspartate oxidase from beef kidney. Purification and properties. *J Biol Chem* **1987**, *262* (21), 10026-34.
99. Takahashi, S.; Takahashi, T.; Kera, Y.; Matsunaga, R.; Shibuya, H.; Yamada, R. H., Cloning and expression in *Escherichia coli* of the D-aspartate oxidase gene from the yeast *Cryptococcus humicola* and characterization of the recombinant enzyme. *J Biochem* **2004**, *135* (4), 533-40.
100. Still, J.; Buell, M. V.; Knox, W. E.; Green, D., Studies on the cyclophorase system: VII. D-aspartic oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **1949**, *179* (2), 831-837.
101. D'Aniello, A.; Rocca, E., D-Aspartate oxidase from the hepatopancreas of *Octopus vulgaris* Lam. *Comp Biochem Physiol B* **1972**, *41* (3), 625-33.
102. Zaar, K.; Volkl, A.; Fahimi, H. D., D-aspartate oxidase in rat, bovine and sheep kidney cortex is localized in peroxisomes. *Biochem J* **1989**, *261* (1), 233-8.
103. Neidle, A.; Dunlop, D. S., Developmental changes in free D-aspartic acid in the chicken embryo and in the neonatal rat. *Life Sci* **1990**, *46* (21), 1517-22.
104. Kera, Y.; Aoyama, H.; Watanabe, N.; Yamada, R. H., Distribution of D-aspartate oxidase and free D-glutamate and D-aspartate in chicken and pigeon tissues. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **1996**, *115* (1), 121-6.
105. Yamada, R.-h.; Kera, Y.; Toi, H.; Hayashi, T.; Arimoto, K.; Takahashi, M.; Iwazaki, I.; Yamashita, S., Microbial oxidases of acidic D-amino acids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2001**, *12* (1-6), 93-104.
106. Sarower, M. G.; Matsui, T.; Abe, H., Distribution and characteristics of D-amino acid and D-aspartate oxidases in fish tissues. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* **2003**, *295* (2), 151-9.
107. Sarower, M. G.; Matsui, T.; Abe, H., Distribution and substrate specificity of D-amino acid and D-aspartate oxidases in marine invertebrates. *Sci Asia* **2004**, *30*, 335-40.
108. Di Giovanni, M.; Burrone, L.; Chieffi Baccari, G.; Topo, E.; Santillo, A., Distribution of free D-aspartic acid and D-aspartate oxidase in frog *Rana esculenta* tissues. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **2010**, *313* (3), 137-143.
109. Wakayama, M.; Nakashima, S.; Sakai, K.; Moriguchi, M., Isolation, enzyme production and characterization of D-aspartate oxidase from *Fusarium sacchari* var. *elongatum* Y-105. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **1994**, *78* (5), 377-379.

110. Yamada, R.; Ujiie, H.; Kera, Y.; Nakase, T.; Kitagawa, K.; Imasaka, T.; Arimoto, K.; Takahashi, M.; Matsumura, Y., Purification and properties of D-aspartate oxidase from *Cryptococcus humicola* UJ1. *Biochim Biophys Acta* **1996**, *1294* (2), 153-8.
111. Fukunaga, S.; Yuno, S.; Takahashi, M.; Taguchi, S.; Kera, Y.; Odani, S.; Yamada, R.-H., Purification and properties of D-glutamate oxidase from *Candida boidinii* 2201. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **1998**, *85* (6), 579-583.
112. Takahashi, S.; Osugi, K.; Shimekake, Y.; Shinbo, A.; Abe, K.; Kera, Y., Characterization and improvement of substrate-binding affinity of D-aspartate oxidase of the thermophilic fungus *Thermomyces dupontii*. *Appl Microbiol Biotechnol* **2019**, *103* (10), 4053-4064.
113. Takahashi, S.; Kakuichi, T.; Fujii, K.; Kera, Y.; Yamada, R. H., Physiological role of D-aspartate oxidase in the assimilation and detoxification of D-aspartate in the yeast *Cryptococcus humicola*. *Yeast* **2005**, *22* (15), 1203-12.
114. Saitoh, Y.; Katane, M.; Kawata, T.; Maeda, K.; Sekine, M.; Furuchi, T.; Kobuna, H.; Sakamoto, T.; Inoue, T.; Arai, H.; Nakagawa, Y.; Homma, H., Spatiotemporal localization of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidases during development in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* **2012**, *32* (10), 1967-83.
115. Saitoh, Y.; Katane, M.; Miyamoto, T.; Sekine, M.; Sakamoto, T.; Imai, H.; Homma, H., Secreted D-aspartate oxidase functions in *C. elegans* reproduction and development. *FEBS J* **2019**, *286* (1), 124-138.
116. D'Aniello, A.; D'Onofrio, G.; Pischetola, M.; D'Aniello, G.; Vetere, A.; Petrucelli, L.; Fisher, G. H., Biological role of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase. Effects of D-amino acids. *J Biol Chem* **1993**, *268* (36), 26941-9.
117. Schell, M. J.; Cooper, O. B.; Snyder, S. H., D-aspartate localizations imply neuronal and neuroendocrine roles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94* (5), 2013-8.
118. Errico, F.; Pirro, M. T.; Affuso, A.; Spinelli, P.; De Felice, M.; D'Aniello, A.; Di Lauro, R., A physiological mechanism to regulate D-aspartic acid and NMDA levels in mammals revealed by D-aspartate oxidase deficient mice. *Gene* **2006**, *374*, 50-7.
119. Huang, A. S.; Beigneux, A.; Weil, Z. M.; Kim, P. M.; Molliver, M. E.; Blackshaw, S.; Nelson, R. J.; Young, S. G.; Snyder, S. H., D-aspartate regulates melanocortin formation and function: behavioral alterations in D-aspartate oxidase-deficient mice. *J Neurosci* **2006**, *26* (10), 2814-9.
120. Han, H.; Miyoshi, Y.; Koga, R.; Mita, M.; Konno, R.; Hamase, K., Changes in D-aspartic acid and D-glutamic acid levels in the tissues and physiological fluids of mice with various D-aspartate oxidase activities. *J Pharm Biomed Anal* **2015**, *116*, 47-52.
121. Yamada, R.; Nagasaki, H.; Nagata, Y.; Wakabayashi, Y.; Iwashima, A., Administration of D-aspartate increases D-aspartate oxidase activity in mouse liver. *Biochim Biophys Acta* **1989**, *990* (3), 325-8.
122. Van Veldhoven, P. P.; Brees, C.; Mannaerts, G. P., D-aspartate oxidase, a peroxisomal enzyme in liver of rat and man. *Biochim Biophys Acta* **1991**, *1073* (1), 203-8.
123. Hashimoto, A.; Kumashiro, S.; Nishikawa, T.; Oka, T.; Takahashi, K.; Mito, T.; Takashima, S.; Doi, N.;

- Mizutani, Y.; Yamazaki, T., Embryonic development and postnatal changes in free D-aspartate and D-serine in the human prefrontal cortex. *Journal of neurochemistry* **1993**, 61 (1), 348-351.
124. Cristino, L.; Luongo, L.; Squillace, M.; Paolone, G.; Mango, D.; Piccinin, S.; Zianni, E.; Imperatore, R.; Iannotta, M.; Longo, F.; Errico, F.; Vescovi, A. L.; Morari, M.; Maione, S.; Gardoni, F.; Nistico, R.; Usiello, A., D-Aspartate oxidase influences glutamatergic system homeostasis in mammalian brain. *Neurobiol Aging* **2015**, 36 (5), 1890-902.
125. Nuzzo, T.; Feligioni, M.; Cristino, L.; Pagano, I.; Marcelli, S.; Iannuzzi, F.; Imperatore, R.; D'Angelo, L.; Petrella, C.; Carella, M.; Pollegioni, L.; Sacchi, S.; Punzo, D.; De Girolamo, P.; Errico, F.; Canu, N.; Usiello, A., Free D-aspartate triggers NMDA receptor-dependent cell death in primary cortical neurons and perturbs JNK activation, Tau phosphorylation, and protein SUMOylation in the cerebral cortex of mice lacking D-aspartate oxidase activity. *Exp Neurol* **2019**, 317, 51-65.
126. Nuzzo, T.; Sacchi, S.; Errico, F.; Keller, S.; Palumbo, O.; Florio, E.; Punzo, D.; Napolitano, F.; Copetti, M.; Carella, M.; Chiariotti, L.; Bertolino, A.; Pollegioni, L.; Usiello, A., Decreased free D-aspartate levels are linked to enhanced D-aspartate oxidase activity in the dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenia patients. *NPJ Schizophr* **2017**, 3, 16.
127. Errico, F.; D'Argenio, V.; Sforazzini, F.; Iasevoli, F.; Squillace, M.; Guerri, G.; Napolitano, F.; Angrisano, T.; Di Maio, A.; Keller, S.; Vitucci, D.; Galbusera, A.; Chiariotti, L.; Bertolino, A.; de Bartolomeis, A.; Salvatore, F.; Gozzi, A.; Usiello, A., A role for D-aspartate oxidase in schizophrenia and in schizophrenia-related symptoms induced by phencyclidine in mice. *Transl Psychiatry* **2015**, 5, e512.
128. Yu, Y.; Yang, J.; Zheng, L. Y.; Sheng, Q.; Li, C. Y.; Wang, M.; Zhang, X. Y.; McMinn, A.; Zhang, Y. Z.; Song, X. Y.; Chen, X. L., Diversity of D-Amino Acid Utilizing Bacteria From Kongsfjorden, Arctic and the Metabolic Pathways for Seven D-Amino Acids. *Front Microbiol* **2019**, 10, 2983.
129. Kikuchi, S.; Ishimoto, M., A D-serine dehydratase acting also on L-serine from *Klebsiella pneumoniae*. *J Biochem* **1978**, 84 (5), 1133-8.
130. Moritz, R. L.; Welch, R. A., The *Escherichia coli argW-dsdCXA* genetic island is highly variable, and *E. coli* K1 strains commonly possess two copies of *dsdCXA*. *J Clin Microbiol* **2006**, 44 (11), 4038-48.
131. He, W.; Li, G.; Yang, C. K.; Lu, C. D., Functional characterization of the *dguRABC* locus for D-Glu and D-Gln utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology (Reading)* **2014**, 160 (Pt 10), 2331-2340.
132. Jones, R. M., Jr.; Popham, D. L.; Schmidt, A. L.; Neidle, E. L.; Stabb, E. V., *Vibrio fischeri* DarR Directs Responses to D-Aspartate and Represents a Group of Similar LysR-Type Transcriptional Regulators. *J Bacteriol* **2018**, 200 (15).
133. Horner, R.; Wagner, F.; Fischer, L., Induction of the D-Amino Acid Oxidase from *Trigonopsis variabilis*. *Appl Environ Microbiol* **1996**, 62 (6), 2106-10.
134. Sakai, Y.; Yurimoto, H.; Matsuo, H.; Kato, N., Regulation of peroxisomal proteins and organelle proliferation by multiple carbon sources in the methylotrophic yeast, *Candida boidinii*. *Yeast* **1998**, 14 (13), 1175-87.
135. Gabler, M.; Fischer, L., Production of a new D-amino acid oxidase from the fungus *Fusarium oxysporum*. *Appl*

- Environ Microbiol* **1999**, *65* (8), 3750-3.
136. Molla, G.; Motteran, L.; Piubelli, L.; Pilone, M. S.; Pollegioni, L., Regulation of D-amino acid oxidase expression in the yeast *Rhodotorula gracilis*. *Yeast* **2003**, *20* (12), 1061-9.
137. Uo, T.; Yoshimura, T.; Tanaka, N.; Takegawa, K.; Esaki, N., Functional characterization of alanine racemase from *Schizosaccharomyces pombe*: a eucaryotic counterpart to bacterial alanine racemase. *J Bacteriol* **2001**, *183* (7), 2226-33.
138. ter Schure, E. G.; van Riel, N. A.; Verrrips, C. T., The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **2000**, *24* (1), 67-83.
139. Barnett, J. A.; Payne, R. W.; Yarrow, D., Yeasts: characteristics and identification. **1990**.
140. Sugita, T.; Takashima, M.; Nakase, T.; Ichikawa, T.; Ikeda, R.; Shinoda, T., Two new yeasts, *Trichosporon debeurmannianum* sp. nov. and *Trichosporon dermatis* sp. nov., transferred from the *Cryptococcus humicola* complex. *Int J Syst Evol Microbiol* **2001**, *51* (Pt 3), 1221-1228.
141. Takashima, M.; Sugita, T.; Shinoda, T.; Nakase, T., Reclassification of the *Cryptococcus humicola* complex. *Int J Syst Evol Microbiol* **2001**, *51* (Pt 6), 2199-2210.
142. Statzell-Tallman, A.; Fell, J., *Cryptococcus vuillemin*. In *The Yeasts*, Elsevier: 1998; pp 742-767.
143. Dai, M.; Liu, J.; Zhang, L.; Tan, Y.; Yan, J.; Wang, J.; Nian, H., Transcriptome analysis of *Cryptococcus humicola* under aluminum stress revealed the potential role of the cell wall in aluminum tolerance. *Metallomics* **2020**, *12* (9), 1370-1379.
144. Kulakovskaya, T.; Ryazanova, L.; Zvonarev, A.; Khokhlova, G.; Ostroumov, V.; Vainshtein, M., The biosorption of cadmium and cobalt and iron ions by yeast *Cryptococcus humicola* at nitrogen starvation. *Folia Microbiol (Praha)* **2018**, *63* (4), 507-510.
145. Kulakovskaya, T.; Shashkov, A.; Kulakovskaya, E.; Golubev, W.; Zinin, A.; Tsvetkov, Y.; Grachev, A.; Nifantiev, N., Extracellular cellobiose lipid from yeast and their analogues: structures and fungicidal activities. *J Oleo Sci* **2009**, *58* (3), 133-40.
146. Iwazaki, I.; Yamashita, S.; Arimoto, K.; Takahashi, M.; Kera, Y.; Yamada, R.-h., Apoenzyme from *Cryptococcus humicolus* UJ1 D-aspartate oxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2000**, *10* (1-3), 183-189.
147. Kera, Y.; Niino, A.; Ikeda, T.; Okada, H.; Yamada, R., Peroxisomal localization of D-aspartate oxidase and development of peroxisomes in the yeast *Cryptococcus humicolus* UJ1 grown on D-aspartate. *Biochim Biophys Acta* **1998**, *1379* (3), 399-405.
148. Perotti, M.; Pollegioni, L.; Pilone, M., Expression of D-amino acid oxidase in *Rhodotorula gracilis* under induction conditions: a biochemical and cytochemical study. *European journal of cell biology* **1991**, *55* (1), 104-113.
149. Nakagawa, T.; Yoshida, K.; Takeuchi, A.; Ito, T.; Fujimura, S.; Matsufuji, Y.; Tomizuka, N.; Yurimoto, H.; Sakai, Y.; Hayakawa, T., The peroxisomal catalase gene in the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. *Biosci Biotechnol Biochem* **2010**, *74* (8), 1733-5.

150. Simonetta, M. P.; Verga, R.; Fretta, A.; Hanozet, G. M., Induction of D-amino-acid oxidase by D-alanine in *Rhodotorula gracilis* grown in defined medium. *Microbiology* **1989**, *135* (3), 593-600.
151. Godard, P.; Urrestarazu, A.; Vissers, S.; Kontos, K.; Bontempi, G.; van Helden, J.; André, B., Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **2007**, *27* (8), 3065-3086.
152. Bianchi, F.; Van't Klooster, J. S.; Ruiz, S. J.; Poolman, B., Regulation of Amino Acid Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **2019**, *83* (4).
153. Gournas, C.; Prevost, M.; Krammer, E. M.; Andre, B., Function and Regulation of Fungal Amino Acid Transporters: Insights from Predicted Structure. *Adv Exp Med Biol* **2016**, *892*, 69-106.
154. Reizer, J.; Finley, K.; Kakuda, D.; MacLeod, C. L.; Reizer, A.; Saier, M. H., Jr., Mammalian integral membrane receptors are homologous to facilitators and antiporters of yeast, fungi, and eubacteria. *Protein Sci* **1993**, *2* (1), 20-30.
155. Christensen, H. N., Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* **1990**, *70* (1), 43-77.
156. Klingenberg, M., Transport catalysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **2006**, *1757* (9-10), 1229-1236.
157. Shilton, B. H., Active transporters as enzymes: an energetic framework applied to major facilitator superfamily and ABC importer systems. *Biochemical Journal* **2015**, *467* (2), 193-199.
158. Sophianopoulou, V.; Diallinas, G., Amino acid transporters of lower eukaryotes: regulation, structure and topogenesis. *FEMS Microbiol Rev* **1995**, *16* (1), 53-75.
159. Gournas, C.; Athanasopoulos, A.; Sophianopoulou, V., On the Evolution of Specificity in Members of the Yeast Amino Acid Transporter Family as Parts of Specific Metabolic Pathways. *Int J Mol Sci* **2018**, *19* (5).
160. Horak, J., Amino acid transport in eucaryotic microorganisms. *Biochim Biophys Acta* **1986**, *864* (3-4), 223-56.
161. Horak, J., Yeast nutrient transporters. *Biochim Biophys Acta* **1997**, *1331* (1), 41-79.
162. Forrest, L. R.; Kramer, R.; Ziegler, C., The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **2011**, *1807* (2), 167-88.
163. Vangelatos, I.; Vlachakis, D.; Sophianopoulou, V.; Diallinas, G., Modelling and mutational evidence identify the substrate binding site and functional elements in APC amino acid transporters. *Mol Membr Biol* **2009**, *26* (5), 356-70.
164. Andréasson, C.; Neve, E. P.; Ljungdahl, P. O., Four permeases import proline and the toxic proline analogue azetidine-2-carboxylate into yeast. *Yeast* **2004**, *21* (3), 193-199.
165. Düring-Olsen, L.; Regenber, B.; Gjermansen, C.; Kielland-Brandt, M. C.; Hansen, J., Cysteine uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is accomplished by multiple permeases. *Current genetics* **1999**, *35* (6), 609-617.
166. Grenson, M.; Hou, C.; Crabeel, M., Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. IV. Evidence for a general amino acid permease. *J Bacteriol* **1970**, *103* (3), 770-7.
167. Rytka, J., Positive selection of general amino acid permease mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*

- 1975, 121 (2), 562-70.
168. Stolz, J.; Sauer, N., The fenpropimorph resistance gene *FEN2* from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a plasma membrane H⁺-pantothenate symporter. *J Biol Chem* **1999**, 274 (26), 18747-52.
169. Regenber, B.; Hansen, J., *GAP1*, a novel selection and counter-selection marker for multiple gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **2000**, 16 (12), 1111-9.
170. Uemura, T.; Kashiwagi, K.; Igarashi, K., Uptake of putrescine and spermidine by Gap1p on the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, 328 (4), 1028-33.
171. Donaton, M. C.; Holsbeeks, I.; Lagatie, O.; Van Zeebroeck, G.; Crauwels, M.; Winderickx, J.; Thevelein, J. M., The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **2003**, 50 (3), 911-29.
172. Van Zeebroeck, G.; Rubio-Teixeira, M.; Schothorst, J.; Thevelein, J. M., Specific analogues uncouple transport, signalling, oligo-ubiquitination and endocytosis in the yeast Gap1 amino acid transceptor. *Mol Microbiol* **2014**, 93 (2), 213-33.
173. Van Zeebroeck, G.; Bonini, B. M.; Versele, M.; Thevelein, J. M., Transport and signaling via the amino acid binding site of the yeast Gap1 amino acid transceptor. *Nat Chem Biol* **2009**, 5 (1), 45-52.
174. Didion, T.; Regenber, B.; Jorgensen, M. U.; Kielland-Brandt, M. C.; Andersen, H. A., The permease homologue Ssy1p controls the expression of amino acid and peptide transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **1998**, 27 (3), 643-50.
175. Ljungdahl, P. O., Amino-acid-induced signalling via the SPS-sensing pathway in yeast. *Biochem Soc Trans* **2009**, 37 (Pt 1), 242-7.
176. Forsberg, H.; Ljungdahl, P. O., Genetic and biochemical analysis of the yeast plasma membrane Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p sensor of extracellular amino acids. *Mol Cell Biol* **2001**, 21 (3), 814-26.
177. Iraqui, I.; Vissers, S.; Bernard, F.; de Craene, J. O.; Boles, E.; Urrestarazu, A.; Andre, B., Amino acid signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: a permease-like sensor of external amino acids and F-Box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the *AGPI* gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease. *Mol Cell Biol* **1999**, 19 (2), 989-1001.
178. Regenber, B.; Holmberg, S.; Olsen, L. D.; Kielland-Brandt, M. C., Dip5p mediates high-affinity and high-capacity transport of L-glutamate and L-aspartate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* **1998**, 33 (3), 171-177.
179. Regenber, B.; During-Olsen, L.; Kielland-Brandt, M. C.; Holmberg, S., Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **1999**, 36 (6), 317-28.
180. Trip, H.; Evers, M. E.; Kiel, J. A.; Driessen, A. J., Uptake of the β -lactam precursor α -amino adipic acid in *Penicillium chrysogenum* is mediated by the acidic and the general amino acid permease. *Appl Environ Microbiol* **2004**, 70 (8), 4775-83.
181. Apostolaki, A.; Erpapazoglou, Z.; Harispe, L.; Billini, M.; Kafasla, P.; Kizis, D.; Penalva, M. A.; Scazzocchio, C.; Sophianopoulou, V., AgtA, the dicarboxylic amino acid transporter of *Aspergillus nidulans*, is concertedly

- down-regulated by exquisite sensitivity to nitrogen metabolite repression and ammonium-elicited endocytosis. *Eukaryot Cell* **2009**, *8* (3), 339-52.
182. Pall, M. L., Amino acid transport in *Neurospora crassa* III. Acidic amino acid transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1970**, *211* (3), 513-520.
183. Schreve, J. L.; Sin, J. K.; Garrett, J. M., The *Saccharomyces cerevisiae* YCC5 (YCL025c) gene encodes an amino acid permease, Agp1, which transports asparagine and glutamine. *J Bacteriol* **1998**, *180* (9), 2556-9.
184. Esch, B. M.; Limar, S.; Bogdanowski, A.; Gournas, C.; More, T.; Sundag, C.; Walter, S.; Heinisch, J. J.; Ejsing, C. S.; Andre, B.; Frohlich, F., Uptake of exogenous serine is important to maintain sphingolipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* **2020**, *16* (8), e1008745.
185. Schreve, J. L.; Garrett, J. M., Yeast Agp2p and Agp3p function as amino acid permeases in poor nutrient conditions. *Biochemical and biophysical research communications* **2004**, *313* (3), 745-751.
186. van Roermund, C. W.; Hetteema, E. H.; van den Berg, M.; Tabak, H. F.; Wanders, R. J., Molecular characterization of carnitine-dependent transport of acetyl-CoA from peroxisomes to mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of a plasma membrane carnitine transporter, Agp2p. *EMBO J* **1999**, *18* (21), 5843-52.
187. Lee, J.; Lee, B.; Shin, D.; Kwak, S. S.; Bahk, J. D.; Lim, C. O.; Yun, D. J., Carnitine uptake by *AGP2* in yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on Hog1 MAP kinase pathway. *Mol Cells* **2002**, *13* (3), 407-12.
188. Sychrova, H.; Chevallier, M. R., Yeast sequencing reports. *APL1*, a yeast gene encoding a putative permease for basic amino acids. *Yeast* **1994**, *10* (5), 653-657.
189. Grauslund, M.; Didion, T.; Kielland-Brandt, M. C.; Andersen, H. A., *BAP2*, a gene encoding a permease for branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1995**, *1269* (3), 275-80.
190. Sáenz, D. A.; Chianelli, M. S.; Stella, C. A., L-Phenylalanine Transport in *Saccharomyces cerevisiae*: Participation of *GAP1*, *BAP2*, and *AGP1*. *Journal of amino acids* **2014**, *2014*.
191. Usami, Y.; Uemura, S.; Mochizuki, T.; Morita, A.; Shishido, F.; Inokuchi, J.-i.; Abe, F., Functional mapping and implications of substrate specificity of the yeast high-affinity leucine permease Bap2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2014**, *1838* (7), 1719-1729.
192. Schreve, J.; Garrett, J. M., The branched-chain amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*, *BAP2*, encodes the high-affinity leucine permease (S1). *Yeast* **1997**, *13* (5), 435-9.
193. Ahmad, M.; Bussey, H., Yeast arginine permease: nucleotide sequence of the *CAN1* gene. *Curr Genet* **1986**, *10* (8), 587-92.
194. Ghaddar, K.; Krammer, E.-M.; Mihajlovic, N.; Brohée, S.; André, B.; Prévost, M., Converting the yeast arginine Can1 permease to a lysine permease. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289* (10), 7232-7246.
195. Grenson, M.; Mousset, M.; Wiame, J.; Bechet, J., Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*: I. Evidence for a specific arginine-transporting system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1966**, *127* (2), 325-338.
196. Risinger, A. L.; Cain, N. E.; Chen, E. J.; Kaiser, C. A., Activity-dependent reversible inactivation of the general

- amino acid permease. *Molecular biology of the cell* **2006**, *17* (10), 4411-4419.
197. Zhu, X.; Garrett, J.; Schreve, J.; Michaeli, T., *GNPI*, the high-affinity glutamine permease of *S. cerevisiae*. *Curr Genet* **1996**, *30* (2), 107-14.
198. Tanaka, J.; Fink, G. R., The histidine permease gene (*HIP1*) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **1985**, *38* (1-3), 205-14.
199. Bajmoczy, M.; Sneve, M.; Eide, D. J.; Drewes, L. R., *TAT1* encodes a low-affinity histidine transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, *243* (1), 205-9.
200. Rouillon, A.; Surdin-Kerjan, Y.; Thomas, D., Transport of sulfonium compounds. Characterization of the *S*-adenosylmethionine and *S*-methylmethionine permeases from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **1999**, *274* (40), 28096-105.
201. Sychrova, H.; Chevallier, M. R., Cloning and sequencing of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *LYP1* coding for a lysine-specific permease. *Yeast* **1993**, *9* (7), 771-82.
202. Grenson, M., Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*: II. Evidence for a specific lysine-transporting system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1966**, *127* (2), 339-346.
203. Sychrová, H.; Matějčková, A.; Kotyk, A., Kinetic properties of yeast lysine permeases coded by genes on multi-copy vectors. *FEMS microbiology letters* **1993**, *113* (1), 57-61.
204. Lasko, P. F.; Brandriss, M. C., Proline transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **1981**, *148* (1), 241-247.
205. Sychrová, H.; Chevallier, M.; Horák, J.; Kotyk, A., Thialysine-resistant mutants and uptake of lysine in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current genetics* **1992**, *21* (4), 351-355.
206. Jauniaux, J. C.; Vandenbol, M.; Vissers, S.; Broman, K.; Grenson, M., Nitrogen catabolite regulation of proline permease in *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of the *PUT4* gene and study of *PUT4* RNA levels in wild-type and mutant strains. *Eur J Biochem* **1987**, *164* (3), 601-6.
207. Uemura, T.; Kashiwagi, K.; Igarashi, K., Polyamine uptake by *DUR3* and *SAM3* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282* (10), 7733-7741.
208. Forsberg, H.; Gilstring, C. F.; Zargari, A.; Martinez, P.; Ljungdahl, P. O., The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids. *Mol Microbiol* **2001**, *42* (1), 215-28.
209. Klasson, H.; Fink, G. R.; Ljungdahl, P. O., Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Mol Cell Biol* **1999**, *19* (8), 5405-16.
210. Schmidt, A.; Hall, M. N.; Koller, A., Two FK506 resistance-conferring genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *TAT1* and *TAT2*, encode amino acid permeases mediating tyrosine and tryptophan uptake. *Mol Cell Biol* **1994**, *14* (10), 6597-606.
211. Kanda, N.; Abe, F., Structural and functional implications of the yeast high-affinity tryptophan permease Tat2. *Biochemistry* **2013**, *52* (25), 4296-4307.
212. Omura, F.; Hatanaka, H.; Nakao, Y., Characterization of a novel tyrosine permease of lager brewing yeast

- shared by *Saccharomyces cerevisiae* strain RM11-1a. *FEMS Yeast Res* **2007**, *7* (8), 1350-61.
213. Calvete, C. L.; Martho, K. F.; Felizardo, G.; Paes, A.; Nunes, J. M.; Ferreira, C. O.; Vallim, M. A.; Pascon, R. C., Amino acid permeases in *Cryptococcus neoformans* are required for high temperature growth and virulence; and are regulated by Ras signaling. *PLoS One* **2019**, *14* (1), e0211393.
214. Martho, K. F.; de Melo, A. T.; Takahashi, J. P.; Guerra, J. M.; Santos, D. C.; Purisco, S. U.; Melhem, M. S.; Fazioli, R. D.; Phanord, C.; Sartorelli, P.; Vallim, M. A.; Pascon, R. C., Amino Acid Permeases and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One* **2016**, *11* (10), e0163919.
215. Tazebay, U. H.; Sophianopoulou, V.; Cubero, B.; Scazzocchio, C.; Diallinas, G., Post-transcriptional control and kinetic characterization of proline transport in germinating conidiospores of *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett* **1995**, *132* (1-2), 27-37.
216. Lauwers, E.; Erpapazoglou, Z.; Haguenaer-Tsapis, R.; Andre, B., The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends Cell Biol* **2010**, *20* (4), 196-204.
217. Ljungdahl, P. O.; Daignan-Fornier, B., Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **2012**, *190* (3), 885-929.
218. Zhang, W.; Du, G.; Zhou, J.; Chen, J., Regulation of Sensing, Transportation, and Catabolism of Nitrogen Sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **2018**, *82* (1).
219. Hofman-Bang, J., Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biotechnol* **1999**, *12* (1), 35-73.
220. Peter, G. J.; During, L.; Ahmed, A., Carbon catabolite repression regulates amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae* via the TOR signaling pathway. *J Biol Chem* **2006**, *281* (9), 5546-52.
221. Hinnebusch, A. G., Translational regulation of *GCN4* and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* **2005**, *59*, 407-50.
222. Nielsen, P. S.; van den Hazel, B.; Didion, T.; de Boer, M.; Jorgensen, M.; Planta, R. J.; Kielland-Brandt, M. C.; Andersen, H. A., Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* amino acid permease gene *BAP2*. *Mol Gen Genet* **2001**, *264* (5), 613-22.
223. Finley, D.; Ulrich, H. D.; Sommer, T.; Kaiser, P., The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **2012**, *192* (2), 319-60.
224. MacGurn, J. A.; Hsu, P. C.; Emr, S. D., Ubiquitin and membrane protein turnover: from cradle to grave. *Annu Rev Biochem* **2012**, *81*, 231-59.
225. Ghaddar, K.; Merhi, A.; Saliba, E.; Krammer, E. M.; Prevost, M.; Andre, B., Substrate-induced ubiquitylation and endocytosis of yeast amino acid permeases. *Mol Cell Biol* **2014**, *34* (24), 4447-63.
226. Malandro, M. S.; Kilberg, M. S., Molecular biology of mammalian amino acid transporters. *Annu Rev Biochem* **1996**, *65*, 305-36.
227. Shigeri, Y.; Seal, R. P.; Shimamoto, K., Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev* **2004**, *45* (3), 250-65.
228. Koch, H. P.; Chamberlin, A. R.; Bridges, R. J., Nontransportable inhibitors attenuate reversal of glutamate

- uptake in synaptosomes following a metabolic insult. *Mol Pharmacol* **1999**, *55* (6), 1044-8.
229. Danbolt, N. C., Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* **2001**, *65* (1), 1-105.
230. Kanai, Y.; Hediger, M. A., The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch* **2004**, *447* (5), 469-79.
231. Tanaka, K.; Watase, K.; Manabe, T.; Yamada, K.; Watanabe, M.; Takahashi, K.; Iwama, H.; Nishikawa, T.; Ichihara, N.; Kikuchi, T.; Okuyama, S.; Kawashima, N.; Hori, S.; Takimoto, M.; Wada, K., Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* **1997**, *276* (5319), 1699-702.
232. Maragakis, N. J.; Rothstein, J. D., Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* **2006**, *2* (12), 679-89.
233. Malik, A. R.; Willnow, T. E., Excitatory Amino Acid Transporters in Physiology and Disorders of the Central Nervous System. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (22).
234. D'Aniello, G.; Grieco, N.; Di Filippo, M. A.; Cappiello, F.; Topo, E.; D'Aniello, E.; Ronsini, S., Reproductive implication of D-aspartic acid in human pre-ovulatory follicular fluid. *Hum Reprod* **2007**, *22* (12), 3178-83.
235. 本間浩, 哺乳類体内の遊離型 D-アスパラギン酸の振舞いと機能. *生化学* **2008**, *80* (4), 277-286.
236. Loewith, R.; Hall, M. N., Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* **2011**, *189* (4), 1177-201.
237. Laplante, M.; Sabatini, D. M., mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **2012**, *149* (2), 274-93.
238. 鎌田芳彰, 栄養どうでしょう アミノ酸センシングにおけるトア (TOR) の旅. *化学と生物* **2016**, *54* (11), 827-834.
239. Gonzalez, S.; Rallis, C., The TOR Signaling Pathway in Spatial and Temporal Control of Cell Size and Growth. *Front Cell Dev Biol* **2017**, *5*, 61.
240. Wullschleger, S.; Loewith, R.; Hall, M. N., TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **2006**, *124* (3), 471-84.
241. Powis, K.; De Virgilio, C., Conserved regulators of Rag GTPases orchestrate amino acid-dependent TORC1 signaling. *Cell discovery* **2016**, *2* (1), 1-16.
242. Hinnebusch, A. G.; Natarajan, K., Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryot Cell* **2002**, *1* (1), 22-32.
243. Gunisova, S.; Valasek, L. S., Fail-safe mechanism of *GCN4* translational control—uORF2 promotes reinitiation by analogous mechanism to uORF1 and thus secures its key role in *GCN4* expression. *Nucleic Acids Res* **2014**, *42* (9), 5880-93.
244. Qiu, H.; Hu, C.; Anderson, J.; Bjork, G. R.; Sarkar, S.; Hopper, A. K.; Hinnebusch, A. G., Defects in tRNA processing and nuclear export induce *GCN4* translation independently of phosphorylation of the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* **2000**, *20* (7), 2505-16.
245. Paluh, J. L.; Orbach, M. J.; Legerton, T. L.; Yanofsky, C., The cross-pathway control gene of *Neurospora crassa*, *cpc-1*, encodes a protein similar to *GCN4* of yeast and the DNA-binding domain of the oncogene *v-jun*-encoded

- protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, *85* (11), 3728-32.
246. Wanke, C.; Eckert, S.; Albrecht, G.; van Hartingsveldt, W.; Punt, P. J.; van den Hondel, C. A.; Braus, G. H., The *Aspergillus niger GCN4* homologue, *cpcA*, is transcriptionally regulated and encodes an unusual leucine zipper. *Mol Microbiol* **1997**, *23* (1), 23-33.
247. Albrecht, G.; Mosch, H. U.; Hoffmann, B.; Reusser, U.; Braus, G. H., Monitoring the Gcn4 protein-mediated response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **1998**, *273* (21), 12696-702.
248. Meimoun, A.; Holtzman, T.; Weissman, Z.; McBride, H. J.; Stillman, D. J.; Fink, G. R.; Kornitzer, D., Degradation of the transcription factor Gcn4 requires the kinase Pho85 and the SCF^{CDC4} ubiquitin-ligase complex. *Mol Biol Cell* **2000**, *11* (3), 915-27.
249. Kornitzer, D.; Raboy, B.; Kulka, R. G.; Fink, G. R., Regulated degradation of the transcription factor Gcn4. *EMBO J* **1994**, *13* (24), 6021-30.
250. Bomeke, K.; Pries, R.; Korte, V.; Scholz, E.; Herzog, B.; Schulze, F.; Braus, G. H., Yeast Gcn4p stabilization is initiated by the dissociation of the nuclear Pho85p/Pcl5p complex. *Mol Biol Cell* **2006**, *17* (7), 2952-62.
251. Attwood, P. V., The structure and the mechanism of action of pyruvate carboxylase. *Int J Biochem Cell Biol* **1995**, *27* (3), 231-49.
252. St Maurice, M.; Reinhardt, L.; Surinya, K. H.; Attwood, P. V.; Wallace, J. C.; Cleland, W. W.; Rayment, I., Domain architecture of pyruvate carboxylase, a biotin-dependent multifunctional enzyme. *Science* **2007**, *317* (5841), 1076-9.
253. Liu, Y.; Budelier, M. M.; Stine, K.; St Maurice, M., Allosteric regulation alters carrier domain translocation in pyruvate carboxylase. *Nat Commun* **2018**, *9* (1), 1384.
254. Pronk, J. T.; Yde Steensma, H.; Van Dijken, J. P., Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **1996**, *12* (16), 1607-33.
255. Jitrapakdee, S.; St Maurice, M.; Rayment, I.; Cleland, W. W.; Wallace, J. C.; Attwood, P. V., Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J* **2008**, *413* (3), 369-87.
256. Yang, S.; Zhang, K.; Zhang, B.; Huang, H., 3.16-Fumaric acid. *in-Chief: Murray MY (ed) Comprehensive Biotechnology, 2nd edn. Academic Press, Burlington* **2011**, 163-177.
257. Prasun, P., Disorders of Pyruvate Metabolism and Tricarboxylic Acid Cycle. In *Mitochondrial Medicine*, 2019; pp 83-95.
258. Brewster, N. K.; Val, D. L.; Walker, M. E.; Wallace, J. C., Regulation of pyruvate carboxylase isozyme (*PYC1*, *PYC2*) gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentative and nonfermentative growth. *Arch Biochem Biophys* **1994**, *311* (1), 62-71.
259. Menendez, J.; Gancedo, C., Regulatory regions in the promoters of the *Saccharomyces cerevisiae* *PYC1* and *PYC2* genes encoding isoenzymes of pyruvate carboxylase. *FEMS Microbiol Lett* **1998**, *164* (2), 345-52.
260. Huet, C.; Menendez, J.; Gancedo, C.; Francois, J. M., Regulation of *pyc1* encoding pyruvate carboxylase isozyme I by nitrogen sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **2000**, *267* (23), 6817-23.
261. Attwood, P. V.; Graneri, B. D., Bicarbonate-dependent ATP cleavage catalysed by pyruvate carboxylase in the

- absence of pyruvate. *Biochem J* **1992**, *287* (Pt 3), 1011-7.
262. Legge, G. B.; Branson, J. P.; Attwood, P. V., Effects of acetyl CoA on the pre-steady-state kinetics of the biotin carboxylation reaction of pyruvate carboxylase. *Biochemistry* **1996**, *35* (12), 3849-56.
263. Zeczycki, T. N.; Menefee, A. L.; Jitrapakdee, S.; Wallace, J. C.; Attwood, P. V.; St Maurice, M.; Cleland, W. W., Activation and inhibition of pyruvate carboxylase from *Rhizobium etli*. *Biochemistry* **2011**, *50* (45), 9694-707.
264. Adina-Zada, A.; Zeczycki, T. N.; Attwood, P. V., Regulation of the structure and activity of pyruvate carboxylase by acetyl CoA. *Arch Biochem Biophys* **2012**, *519* (2), 118-30.
265. Adina-Zada, A.; Zeczycki, T. N.; St Maurice, M.; Jitrapakdee, S.; Cleland, W. W.; Attwood, P. V., Allosteric regulation of the biotin-dependent enzyme pyruvate carboxylase by acetyl-CoA. *Biochem Soc Trans* **2012**, *40* (3), 567-72.
266. Westerhold, L. E.; Bridges, L. C.; Shaikh, S. R.; Zeczycki, T. N., Kinetic and Thermodynamic Analysis of Acetyl-CoA Activation of *Staphylococcus aureus* Pyruvate Carboxylase. *Biochemistry* **2017**, *56* (27), 3492-3506.
267. Osmani, S. A.; Marston, F. A.; Selmes, I. P.; Chapman, A. G.; Scrutton, M. C., Pyruvate carboxylase from *Aspergillus nidulans*. Regulatory properties. *Eur J Biochem* **1981**, *118* (2), 271-8.
268. Sirithanakorn, C.; Adina-Zada, A.; Wallace, J. C.; Jitrapakdee, S.; Attwood, P. V., Mechanisms of inhibition of *Rhizobium etli* pyruvate carboxylase by L-aspartate. *Biochemistry* **2014**, *53* (45), 7100-6.
269. Goldberg, I.; Rokem, J. S.; Pines, O., Organic acids: old metabolites, new themes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology* **2006**, *81* (10), 1601-1611.
270. Scrutton, M. C., Fine control of the conversion of pyruvate (phosphoenolpyruvate) to oxaloacetate in various species. *FEBS letters* **1978**, *89* (1), 1-9.
271. Bauer, J.; Luttkik, M. A.; Flores, C.-L.; van Dijken, J. P.; Pronk, J. T.; Niederberger, P., By-product formation during exposure of respiring *Saccharomyces cerevisiae* cultures to excess glucose is not caused by a limited capacity of pyruvate carboxylase. *FEMS microbiology letters* **1999**, *179* (1), 107-113.
272. Veenhuis, M.; Hoogkamer-Te Niet, M. C.; Middelhoven, W. J., Biogenesis and metabolic significance of microbodies in urate-utilizing yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1985**, *51* (1), 33-43.
273. van der Klei, I. J.; Harder, W.; Veenhuis, M., Biosynthesis and assembly of alcohol oxidase, a peroxisomal matrix protein in methylotrophic yeasts: a review. *Yeast* **1991**, *7* (3), 195-209.
274. Miyata, N.; Fujiki, Y., Shuttling mechanism of peroxisome targeting signal type 1 receptor Pex5: ATP-independent import and ATP-dependent export. *Mol Cell Biol* **2005**, *25* (24), 10822-32.
275. McCollum, D.; Monosov, E.; Subramani, S., The *pas8* mutant of *Pichia pastoris* exhibits the peroxisomal protein import deficiencies of Zellweger syndrome cells--the PAS8 protein binds to the COOH-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal, and is a member of the TPR protein family. *The Journal of Cell Biology* **1993**, *121* (4), 761-774.

276. van der Klei, I. J.; Hilbrands, R. E.; Swaving, G. J.; Waterham, H. R.; Vrieling, E. G.; Titorenko, V. I.; Cregg, J. M.; Harder, W.; Veenhuis, M., The *Hansenula polymorpha* *PER3* gene is essential for the import of PTS1 proteins into the peroxisomal matrix. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270* (29), 17229-17236.
277. Waterham, H. R.; Russell, K. A.; Vries, Y. d.; Cregg, J. M., Peroxisomal targeting, import, and assembly of alcohol oxidase in *Pichia pastoris*. *The Journal of cell biology* **1997**, *139* (6), 1419-1431.
278. Salomons, F. A.; Kiel, J. A.; Faber, K. N.; Veenhuis, M.; van der Klei, I. J., Overproduction of Pex5p Stimulates Import of Alcohol Oxidase and Dihydroxyacetone Synthase in a *Hansenula polymorpha* *pex14* Null Mutant. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275* (17), 12603-12611.
279. Evers, M. E.; Titorenko, V. I.; van der Klei, I. J.; Harder, W.; Veenhuis, M., Assembly of alcohol oxidase in peroxisomes of the yeast *Hansenula polymorpha* requires the cofactor flavin adenine dinucleotide. *Molecular biology of the cell* **1994**, *5* (8), 829-837.
280. Evers, M. E.; Titorenko, V.; Harder, W.; van der Klei, I.; Veenhuis, M., Flavin adenine dinucleotide binding is the crucial step in alcohol oxidase assembly in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **1996**, *12* (10), 917-923.
281. Ozimek, P.; van Dijk, R.; Latchev, K.; Gancedo, C.; Wang, D. Y.; van der Klei, I. J.; Veenhuis, M., Pyruvate carboxylase is an essential protein in the assembly of yeast peroxisomal oligomeric alcohol oxidase. *Mol Biol Cell* **2003**, *14* (2), 786-97.
282. Ozimek, P. Z.; Klompmaker, S. H.; Visser, N.; Veenhuis, M.; van der Klei, I. J., The transcarboxylase domain of pyruvate carboxylase is essential for assembly of the peroxisomal flavoenzyme alcohol oxidase. *FEMS Yeast Res* **2007**, *7* (7), 1082-92.
283. Huberts, D. H.; Venselaar, H.; Vriend, G.; Veenhuis, M.; van der Klei, I. J., The moonlighting function of pyruvate carboxylase resides in the non-catalytic end of the TIM barrel. *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1803* (9), 1038-42.
284. van der Klei, I. J.; Harder, W.; Veenhuis, M., Methanol metabolism in a peroxisome-deficient mutant of *Hansenula polymorpha*: a physiological study. *Arch Microbiol* **1991**, *156* (1), 15-23.
285. Ozimek, P.; Veenhuis, M.; van der Klei, I. J., Alcohol oxidase: a complex peroxisomal, oligomeric flavoprotein. *FEMS Yeast Res* **2005**, *5* (11), 975-83.
286. Klompmaker, S. H.; Kilic, A.; Baerends, R. J.; Veenhuis, M.; van der Klei, I. J., Activation of a peroxisomal *Pichia pastoris* D-amino acid oxidase, which uses D-alanine as a preferred substrate, depends on pyruvate carboxylase. *FEMS Yeast Res* **2010**, *10* (6), 708-16.
287. Takashima, M.; Manabe, R.; Iwasaki, W.; Ohyama, A.; Ohkuma, M.; Sugita, T., Selection of Orthologous Genes for Construction of a Highly Resolved Phylogenetic Tree and Clarification of the Phylogeny of Trichosporonales Species. *PLoS One* **2015**, *10* (8), e0131217.
288. Takashima, M.; Sriswasdi, S.; Manabe, R. I.; Ohkuma, M.; Sugita, T.; Iwasaki, W., A Trichosporonales genome tree based on 27 haploid and three evolutionarily conserved 'natural' hybrid genomes. *Yeast* **2018**, *35* (1), 99-111.
289. Imanishi, D.; Abe, K.; Kera, Y.; Takahashi, S., Draft Genome Sequence of the Yeast *Vanrija humicola* (Formerly

- Cryptococcus humicola*) Strain UJ1, a Producer of D-Aspartate Oxidase. *Genome Announc* **2018**, *6* (11).
290. Sun, S.; Coelho, M. A.; Heitman, J.; Nowrousian, M., Convergent evolution of linked mating-type loci in basidiomycete fungi. *PLoS Genet* **2019**, *15* (9), e1008365.
291. Wierenga, R. K.; Terpstra, P.; Hol, W. G., Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol* **1986**, *187* (1), 101-7.
292. Takahashi, S.; Shimada, K.; Nozawa, S.; Goto, M.; Abe, K.; Kera, Y., Possible role of a histidine residue in the substrate specificity of yeast D-aspartate oxidase. *J Biochem* **2016**, *159* (3), 371-8.
293. Salinas, A. E.; Wong, M. G., Glutathione S-transferases--a review. *Curr Med Chem* **1999**, *6* (4), 279-309.
294. Fernandes, J. D.; Martho, K.; Tofik, V.; Vallim, M. A.; Pascon, R. C., The Role of Amino Acid Permeases and Tryptophan Biosynthesis in *Cryptococcus neoformans* Survival. *PLoS One* **2015**, *10* (7), e0132369.
295. Hunter, D. R.; Segel, I. H., Acidic and basic amino acid transport systems of *Penicillium chrysogenum*. *Arch Biochem Biophys* **1971**, *144* (1), 168-83.
296. Robinson, J. H.; Anthony, C.; Drabble, W. T., The acidic amino-acid permease of *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **1973**, *79* (1), 53-63.
297. Ma, D.; Lu, P.; Yan, C.; Fan, C.; Yin, P.; Wang, J.; Shi, Y., Structure and mechanism of a glutamate-GABA antiporter. *Nature* **2012**, *483* (7391), 632-6.
298. Olivera, H.; Gonzalez, A.; Pena, A., Regulation of the amino acid permeases in nitrogen-limited continuous cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **1993**, *9* (10), 1065-73.
299. Wada, M.; Nakamori, S.; Takagi, H., Serine racemase homologue of *Saccharomyces cerevisiae* has L-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase activity. *FEMS Microbiol Lett* **2003**, *225* (2), 189-93.
300. Takahashi, S.; Abe, K.; Shibata, K.; Kera, Y., Functions and metabolism of D-amino acids in microorganisms. *The handbook of microbial metabolism of amino acids* **2017**, 315-331.
301. Takahashi, S.; Okada, H.; Abe, K.; Kera, Y., D-amino acid-induced expression of D-amino acid oxidase in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Microbiol* **2012**, *65* (6), 764-9.
302. 七五三掛勇也, 好熱性真菌 D-アミノ酸酸化酵素の機能と構造解析. 長岡技術科学大学大学院工学研究科博士論文 **2021**.
303. Chang, Y. C.; Khanal Lamichhane, A.; Bradley, J.; Rodgers, L.; Ngamskulrunroj, P.; Kwon-Chung, K. J., Differences between *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in the Molecular Mechanisms Governing Utilization of D-Amino Acids as the Sole Nitrogen Source. *PLoS One* **2015**, *10* (7), e0131865.
304. LaRue, T. A.; Spencer, J. F., The utilization of D-amino acids by yeasts. *Can J Microbiol* **1967**, *13* (7), 777-88.
305. Robinson, T., D-amino acids in higher plants. *Life Sci* **1976**, *19* (8), 1097-1102.
306. Heitman, J.; Kozel, T. R.; Kwon-Chung, K. J.; Perfect, J. R.; Casadevall, A., *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*. ASM press: **2010**.
307. Shinde, S. M.; Vanarse, K. S.; Pandit, A. N., Systemic humicolus cryptococcosis. *Indian Pediatr* **2004**, *41* (11), 1162-4.
308. Khawcharoenporn, T.; Apisarnthanarak, A.; Mundy, L. M., Non-neoformans cryptococcal infections: a

- systematic review. *Infection* **2007**, *35* (2), 51-8.
309. Nelissen, B.; De Wachter, R.; Goffeau, A., Classification of all putative permeases and other membrane plurispansers of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **1997**, *21* (2), 113-34.
310. Kingsbury, J. M.; McCusker, J. H., Cytocidal amino acid starvation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* acetolactate synthase (*ilv2Δ*) mutants is influenced by the carbon source and rapamycin. *Microbiology (Reading)* **2010**, *156* (Pt 3), 929-939.
311. de Vries, R. P.; Riley, R.; Wiebenga, A.; Aguilar-Osorio, G.; Amillis, S.; Uchima, C. A.; Anderluh, G.; Asadollahi, M.; Askin, M.; Barry, K.; Battaglia, E.; Bayram, O.; Benocci, T.; Braus-Stromeier, S. A.; Caldana, C.; Canovas, D.; Cerqueira, G. C.; Chen, F.; Chen, W.; Choi, C.; Clum, A.; Dos Santos, R. A.; Damasio, A. R.; Diallinas, G.; Emri, T.; Fekete, E.; Flipphi, M.; Freyberg, S.; Gallo, A.; Gournas, C.; Habgood, R.; Hainaut, M.; Harispe, M. L.; Henrissat, B.; Hilden, K. S.; Hope, R.; Hossain, A.; Karabika, E.; Karaffa, L.; Karanyi, Z.; Krasevec, N.; Kuo, A.; Kusch, H.; LaButti, K.; Lagendijk, E. L.; Lapidus, A.; Levasseur, A.; Lindquist, E.; Lipzen, A.; Logrieco, A. F.; MacCabe, A.; Makela, M. R.; Malavazi, I.; Melin, P.; Meyer, V.; Mielnichuk, N.; Miskei, M.; Molnar, A. P.; Mule, G.; Ngan, C. Y.; Orejas, M.; Orosz, E.; Ouedraogo, J. P.; Overkamp, K. M.; Park, H. S.; Perrone, G.; Piumi, F.; Punt, P. J.; Ram, A. F.; Ramon, A.; Rauscher, S.; Record, E.; Riano-Pachon, D. M.; Robert, V.; Rohrig, J.; Ruller, R.; Salamov, A.; Salih, N. S.; Samson, R. A.; Sandor, E.; Sanguinetti, M.; Schutze, T.; Sepcic, K.; Shelest, E.; Sherlock, G.; Sophianopoulou, V.; Squina, F. M.; Sun, H.; Susca, A.; Todd, R. B.; Tsang, A.; Unkles, S. E.; van de Wiele, N.; van Rossen-Uffink, D.; Oliveira, J. V.; Vesth, T. C.; Visser, J.; Yu, J. H.; Zhou, M.; Andersen, M. R.; Archer, D. B.; Baker, S. E.; Benoit, I.; Brakhage, A. A.; Braus, G. H.; Fischer, R.; Frisvad, J. C.; Goldman, G. H.; Houbraeken, J.; Oakley, B.; Poci, I.; Scazzocchio, C.; Seiboth, B.; vanKuyk, P. A.; Wortman, J.; Dyer, P. S.; Grigoriev, I. V., Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biol* **2017**, *18* (1), 28.
312. Hardison, R. C., A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93* (12), 5675-9.
313. Boudet, N.; Aubourg, S.; Toffano-Nioche, C.; Kreis, M.; Lecharny, A., Evolution of intron/exon structure of DEAD helicase family genes in *Arabidopsis*, *Caenorhabditis*, and *Drosophila*. *Genome Res* **2001**, *11* (12), 2101-14.
314. Gao, X.; Lu, F.; Zhou, L.; Dang, S.; Sun, L.; Li, X.; Wang, J.; Shi, Y., Structure and mechanism of an amino acid antiporter. *Science* **2009**, *324* (5934), 1565-8.
315. Gournas, C.; Evangelidis, T.; Athanasopoulos, A.; Mikros, E.; Sophianopoulou, V., The *Aspergillus nidulans* proline permease as a model for understanding the factors determining substrate binding and specificity of fungal amino acid transporters. *J Biol Chem* **2015**, *290* (10), 6141-55.
316. Gao, X.; Zhou, L.; Jiao, X.; Lu, F.; Yan, C.; Zeng, X.; Wang, J.; Shi, Y., Mechanism of substrate recognition and transport by an amino acid antiporter. *Nature* **2010**, *463* (7282), 828-32.

317. Kowalczyk, L.; Ratera, M.; Paladino, A.; Bartoccioni, P.; Errasti-Murugarren, E.; Valencia, E.; Portella, G.; Bial, S.; Zorzano, A.; Fita, I.; Orozco, M.; Carpena, X.; Vazquez-Ibar, J. L.; Palacin, M., Molecular basis of substrate-induced permeation by an amino acid antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108* (10), 3935-40.
318. Casal, M.; Paiva, S.; Queirós, O.; Soares-Silva, I., Transport of carboxylic acids in yeasts. *FEMS microbiology reviews* **2008**, *32* (6), 974-994.
319. Tsai, M.-F.; Miller, C., Substrate selectivity in arginine-dependent acid resistance in enteric bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110* (15), 5893-5897.
320. Lamb, T. M.; Xu, W.; Diamond, A.; Mitchell, A. P., Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the *RIM101* pathway. *J Biol Chem* **2001**, *276* (3), 1850-6.
321. Bensen, E. S.; Martin, S. J.; Li, M.; Berman, J.; Davis, D. A., Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Mol Microbiol* **2004**, *54* (5), 1335-51.
322. Hollomon, J. M.; Grahl, N.; Willger, S. D.; Koeppen, K.; Hogan, D. A., Global Role of Cyclic AMP Signaling in pH-Dependent Responses in *Candida albicans*. *mSphere* **2016**, *1* (6).
323. Brandriss, M. C.; Magasanik, B., Genetics and physiology of proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: enzyme induction by proline. *J Bacteriol* **1979**, *140* (2), 498-503.
324. des Etages, S. A.; Falvey, D. A.; Reece, R. J.; Brandriss, M. C., Functional analysis of the *PUT3* transcriptional activator of the proline utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **1996**, *142* (4), 1069-82.
325. Des Etages, S. A.; Saxena, D.; Huang, H. L.; Falvey, D. A.; Barber, D.; Brandriss, M. C., Conformational changes play a role in regulating the activity of the proline utilization pathway-specific regulator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **2001**, *40* (4), 890-9.
326. Sellick, C. A.; Reece, R. J., Modulation of transcription factor function by an amino acid: activation of Put3p by proline. *The EMBO Journal* **2003**, *22* (19), 5147-5153.
327. Lee, K.; Hahn, J. S., Interplay of Aro80 and GATA activators in regulation of genes for catabolism of aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **2013**, *88* (6), 1120-34.
328. Takahashi, S.; Matsunaga, R.; Kera, Y.; Yamada, R. H., Isolation of the *Cryptococcus humicolus URA3* gene encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase and its use as a selective marker for transformation. *J Biosci Bioeng* **2003**, *96* (1), 23-31.
329. Zerbino, D. R.; Birney, E., Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res* **2008**, *18* (5), 821-9.
330. Kajitani, R.; Toshimoto, K.; Noguchi, H.; Toyoda, A.; Ogura, Y.; Okuno, M.; Yabana, M.; Harada, M.; Nagayasu, E.; Maruyama, H.; Kohara, Y.; Fujiyama, A.; Hayashi, T.; Itoh, T., Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. *Genome Res* **2014**, *24* (8), 1384-95.
331. Hoff, K. J.; Stanke, M., WebAUGUSTUS--a web service for training AUGUSTUS and predicting genes in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **2013**, *41* (Web Server issue), W123-8.
332. Conesa, A.; Gotz, S.; Garcia-Gomez, J. M.; Terol, J.; Talon, M.; Robles, M., Blast2GO: a universal tool for

- annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **2005**, *21* (18), 3674-6.
333. Camacho, C.; Coulouris, G.; Avagyan, V.; Ma, N.; Papadopoulos, J.; Bealer, K.; Madden, T. L., BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **2009**, *10*, 421.
334. Edgar, R. C., MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **2004**, *32* (5), 1792-7.
335. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K., MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* **2016**, *33* (7), 1870-4.
336. Tusnady, G. E.; Simon, I., The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **2001**, *17* (9), 849-50.
337. Heckman, K. L.; Pease, L. R., Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc* **2007**, *2* (4), 924-32.
338. Livak, K. J.; Schmittgen, T. D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* **2001**, *25* (4), 402-8.
339. Notredame, C.; Higgins, D. G.; Heringa, J., T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* **2000**, *302* (1), 205-17.
340. Madeira, F.; Park, Y. M.; Lee, J.; Buso, N.; Gur, T.; Madhusoodanan, N.; Basutkar, P.; Tivey, A. R. N.; Potter, S. C.; Finn, R. D.; Lopez, R., The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res* **2019**, *47* (W1), W636-W641.
341. Yang, J.; Zhang, Y., I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res* **2015**, *43* (W1), W174-81.
342. DeLano, W. L., The PyMOL molecular graphics system. <http://www.pymol.org> **2002**.
343. Ciechanover, A.; Orian, A.; Schwartz, A. L., The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *J Cell Biochem Suppl* **2000**, *34*, 40-51.
344. Ciechanover, A.; Orian, A.; Schwartz, A. L., Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* **2000**, *22* (5), 442-51.
345. Bernales, S.; Papa, F. R.; Walter, P., Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2006**, *22*, 487-508.
346. Naidoo, N., The endoplasmic reticulum stress response and aging. *Rev Neurosci* **2009**, *20* (1), 23-37.
347. Thibault, G.; Ng, D. T., The endoplasmic reticulum-associated degradation pathways of budding yeast. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2012**, *4* (12).
348. Bravo, R.; Parra, V.; Gatica, D.; Rodriguez, A. E.; Torrealba, N.; Paredes, F.; Wang, Z. V.; Zorzano, A.; Hill, J. A.; Jaimovich, E.; Quest, A. F.; Lavandero, S., Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol* **2013**, *301*, 215-90.
349. Hetz, C.; Zhang, K.; Kaufman, R. J., Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2020**, *21* (8), 421-438.
350. Norregaard-Madsen, M.; McFall, E.; Valentin-Hansen, P., Organization and transcriptional regulation of the

- Escherichia coli* K-12 D-serine tolerance locus. *J Bacteriol* **1995**, *177* (22), 6456-61.
351. Maeda, T.; Takeda, Y.; Murakami, T.; Yokota, A.; Wada, M., Purification, characterization and amino acid sequence of a novel enzyme, D-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase, from *Delftia* sp. HT23. *J Biochem* **2010**, *148* (6), 705-12.
352. Magasanik, B.; Kaiser, C. A., Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **2002**, *290* (1-2), 1-18.
353. De Virgilio, C.; Loewith, R., Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene* **2006**, *25* (48), 6392-415.
354. Calendar, R.; Berg, P., The catalytic properties of tyrosyl ribonucleic acid synthetases from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **1966**, *5* (5), 1690-1695.
355. Shaheen, H. H.; Horetsky, R. L.; Kimball, S. R.; Murthi, A.; Jefferson, L. S.; Hopper, A. K., Retrograde nuclear accumulation of cytoplasmic tRNA in rat hepatoma cells in response to amino acid deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104* (21), 8845-50.
356. Shaheen, H. H.; Hopper, A. K., Retrograde movement of tRNAs from the cytoplasm to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102* (32), 11290-5.
357. Wallace, E. W. J.; Maufrais, C.; Sales-Lee, J.; Tuck, L. R.; de Oliveira, L.; Feuerbach, F.; Moyrand, F.; Natarajan, P.; Madhani, H. D.; Janbon, G., Quantitative global studies reveal differential translational control by start codon context across the fungal kingdom. *Nucleic Acids Res* **2020**, *48* (5), 2312-2331.
358. Stovall, A. K.; Knowles, C. M.; Kalem, M. C.; Panepinto, J. C., A Conserved Gcn2-Gcn4 Axis Links Methionine Utilization and the Oxidative Stress Response in *Cryptococcus neoformans*. *Front Fungal Biol* **2021**, *2*.
359. Torbensen, R.; Moller, H. D.; Gresham, D.; Alizadeh, S.; Ochmann, D.; Boles, E.; Regenberg, B., Amino acid transporter genes are essential for *FLO11*-dependent and *FLO11*-independent biofilm formation and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **2012**, *7* (7), e41272.
360. Sibirny, A. A., Yeast peroxisomes: structure, functions and biotechnological opportunities. *FEMS Yeast Res* **2016**, *16* (4).
361. van der Zand, A.; Gent, J.; Braakman, I.; Tabak, H. F., Biochemically distinct vesicles from the endoplasmic reticulum fuse to form peroxisomes. *Cell* **2012**, *149* (2), 397-409.
362. Joshi, A. S., Peroxisomal Membrane Contact Sites in Yeasts. *Front Cell Dev Biol* **2021**, *9*, 735031.
363. Simon, M.; Adam, G.; Rapatz, W.; Spevak, W.; Ruis, H., The *Saccharomyces cerevisiae* *ADRI* gene is a positive regulator of transcription of genes encoding peroxisomal proteins. *Mol Cell Biol* **1991**, *11* (2), 699-704.
364. Karpichev, I. V.; Small, G. M., Global regulatory functions of Oaf1p and Pip2p (Oaf2p), transcription factors that regulate genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **1998**, *18* (11), 6560-70.
365. Mast, F. D.; Rachubinski, R. A.; Aitchison, J. D., Signaling dynamics and peroxisomes. *Curr Opin Cell Biol* **2015**, *35*, 131-6.
366. Leao-Helder, A. N.; Krikken, A. M.; van der Klei, I. J.; Kiel, J. A.; Veenhuis, M., Transcriptional down-

- regulation of peroxisome numbers affects selective peroxisome degradation in *Hansenula polymorpha*. *J Biol Chem* **2003**, *278* (42), 40749-56.
367. van Zutphen, T.; Baerends, R. J.; Susanna, K. A.; de Jong, A.; Kuipers, O. P.; Veenhuis, M.; van der Klei, I. J., Adaptation of *Hansenula polymorpha* to methanol: a transcriptome analysis. *BMC Genomics* **2010**, *11*, 1.
368. Wang, X.; Wang, Q.; Wang, J.; Bai, P.; Shi, L.; Shen, W.; Zhou, M.; Zhou, X.; Zhang, Y.; Cai, M., Mit1 Transcription Factor Mediates Methanol Signaling and Regulates the Alcohol Oxidase 1 (*AOX1*) Promoter in *Pichia pastoris*. *J Biol Chem* **2016**, *291* (12), 6245-61.
369. Natarajan, K.; Meyer, M. R.; Jackson, B. M.; Slade, D.; Roberts, C.; Hinnebusch, A. G.; Marton, M. J., Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* **2001**, *21* (13), 4347-68.
370. Santos, D. A.; Shi, L.; Tu, B. P.; Weissman, J. S., Cycloheximide can distort measurements of mRNA levels and translation efficiency. *Nucleic Acids Res* **2019**, *47* (10), 4974-4985.
371. Hatakeyama, R., Pib2 as an Emerging Master Regulator of Yeast TORC1. *Biomolecules* **2021**, *11* (10).
372. Lara-Gonzalez, P.; Pines, J.; Desai, A., Spindle assembly checkpoint activation and silencing at kinetochores. *Semin Cell Dev Biol* **2021**, *117*, 86-98.
373. Kim, K. D., Potential roles of condensin in genome organization and beyond in fission yeast. *J Microbiol* **2021**, *59* (5), 449-459.
374. Moreno-Torres, M.; Jaquenoud, M.; De Virgilio, C., TORC1 controls G₁-S cell cycle transition in yeast via Mpk1 and the greatwall kinase pathway. *Nat Commun* **2015**, *6*, 8256.
375. Charvin, G.; Oikonomou, C.; Siggia, E. D.; Cross, F. R., Origin of irreversibility of cell cycle start in budding yeast. *PLoS Biol* **2010**, *8* (1), e1000284.
376. Weinert, T.; Hopper, A. K., tRNA traffic meets a cell-cycle checkpoint. *Cell* **2007**, *131* (5), 838-40.
377. Huang, W. P.; Klionsky, D. J., Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Struct Funct* **2002**, *27* (6), 409-20.
378. Nakatogawa, H., Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2020**, *21* (8), 439-458.
379. Mizushima, N.; Yoshimori, T.; Ohsumi, Y., The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2011**, *27*, 107-32.
380. Obara, K.; Noda, T.; Niimi, K.; Ohsumi, Y., Transport of phosphatidylinositol 3-phosphate into the vacuole via autophagic membranes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* **2008**, *13* (6), 537-47.
381. Reidick, C.; Boutouja, F.; Platta, H. W., The class III phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem* **2017**, *398* (5-6), 677-685.
382. Adnan, M.; Islam, W.; Zhang, J.; Zheng, W.; Lu, G. D., Diverse Role of SNARE Protein Sec22 in Vesicle Trafficking, Membrane Fusion, and Autophagy. *Cells* **2019**, *8* (4).
383. Reggiori, F.; Klionsky, D. J., Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation. *Genetics* **2013**, *194* (2), 341-61.

384. Hollenstein, D. M.; Gomez-Sanchez, R.; Ciftci, A.; Kriegenburg, F.; Mari, M.; Torggler, R.; Licheva, M.; Reggiori, F.; Kraft, C., Vac8 spatially confines autophagosome formation at the vacuole in *S. cerevisiae*. *J Cell Sci* **2019**, *132* (22).
385. Jin, M.; He, D.; Backues, S. K.; Freeberg, M. A.; Liu, X.; Kim, J. K.; Klionsky, D. J., Transcriptional regulation by Pho23 modulates the frequency of autophagosome formation. *Curr Biol* **2014**, *24* (12), 1314-1322.
386. Bernard, A.; Jin, M.; Gonzalez-Rodriguez, P.; Fullgrabe, J.; Delorme-Axford, E.; Backues, S. K.; Joseph, B.; Klionsky, D. J., Rph1/KDM4 mediates nutrient-limitation signaling that leads to the transcriptional induction of autophagy. *Curr Biol* **2015**, *25* (5), 546-55.
387. Backues, S. K.; Lynch-Day, M. A.; Klionsky, D. J., The Ume6-Sin3-Rpd3 complex regulates *ATG8* transcription to control autophagosome size. *Autophagy* **2012**, *8* (12), 1835-6.
388. Kim, D.; Perteza, G.; Trapnell, C.; Pimentel, H.; Kelley, R.; Salzberg, S. L., TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* **2013**, *14* (4), R36.
389. Anders, S.; Huber, W., Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* **2010**, *11* (10), R106.
390. Robinson, M. D.; McCarthy, D. J.; Smyth, G. K., edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **2010**, *26* (1), 139-40.
391. Mao, X.; Cai, T.; Olyarchuk, J. G.; Wei, L., Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary. *Bioinformatics* **2005**, *21* (19), 3787-93.
392. Kanehisa, M.; Araki, M.; Goto, S.; Hattori, M.; Hirakawa, M.; Itoh, M.; Katayama, T.; Kawashima, S.; Okuda, S.; Tokimatsu, T.; Yamanishi, Y., KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res* **2008**, *36* (Database issue), D480-4.
393. Young, M. D.; Wakefield, M. J.; Smyth, G. K.; Oshlack, A., Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol* **2010**, *11* (2), R14.
394. Payne, J.; Morris, J. G., Pyruvate carboxylase in *Rhodospseudomonas spheroides*. *J Gen Microbiol* **1969**, *59* (1), 97-101.
395. Imanishi, D.; Kera, Y.; Takahashi, S., Identification of an Acidic Amino Acid Permease Involved in D-Aspartate Uptake in the Yeast *Cryptococcus humicola*. *Microorganisms* **2021**, *9* (1).
396. Zhu, A.; Romero, R.; Petty, H. R., A sensitive fluorimetric assay for pyruvate. *Anal Biochem* **2010**, *396* (1), 146-51.
397. Kajitani, K.; Ishikawa, T.; Shibata, K.; Kouya, T.; Kera, Y.; Takahashi, S., Development of an enzymatic screening method for D-aspartate-producing lactic acid bacteria. *Enzyme Microb Technol* **2021**, *149*, 109835.
398. Skinner, V. M.; Armitt, S., Mutants of *Aspergillus nidulans* lacking pyruvate carboxylase. *FEBS Lett* **1972**, *20* (1), 16-18.
399. Stucka, R.; Dequin, S.; Salmon, J. M.; Gancedo, C., DNA sequences in chromosomes II and VII code for pyruvate carboxylase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of pyruvate carboxylase-deficient strains. *Mol Gen Genet* **1991**, *229* (2), 307-15.

400. Menendez, J.; Delgado, J.; Gancedo, C., Isolation of the *Pichia pastoris* *PYC1* gene encoding pyruvate carboxylase and identification of a suppressor of the *pyc* phenotype. *Yeast* **1998**, *14* (7), 647-54.
401. Wood, H. G., Mechanism of formation of oxaloacetate and phosphoenol pyruvate from pyruvate. *J Vitaminol (Kyoto)* **1968**, *14*, Suppl:59-67.
402. Cazzulo, J. J.; Stoppani, A. O., Effects of adenosine phosphates and nicotinamide nucleotides on pyruvate carboxylase from baker's yeast. *Biochem J* **1969**, *112* (5), 755-62.
403. Jitrapakdee, S.; Adina-Zada, A.; Besant, P. G.; Surinya, K. H.; Cleland, W. W.; Wallace, J. C.; Attwood, P. V., Differential regulation of the yeast isozymes of pyruvate carboxylase and the locus of action of acetyl CoA. *Int J Biochem Cell Biol* **2007**, *39* (6), 1211-23.
404. Nakagawa, T.; Inagaki, A.; Ito, T.; Fujimura, S.; Miyaji, T.; Yurimoto, H.; Kato, N.; Sakai, Y.; Tomizuka, N., Regulation of two distinct alcohol oxidase promoters in the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. *Yeast* **2006**, *23* (1), 15-22.
405. Fujimura, S.; Nakagawa, T.; Ito, T.; Matsufuji, Y.; Miyaji, T.; Tomizuka, N., Peroxisomal metabolism is regulated by an oxygen-recognition system through organelle crosstalk between the mitochondria and peroxisomes. *Yeast* **2007**, *24* (6), 491-8.
406. Takahashi, S.; Ueda, M.; Tanaka, A., Function of the prosequence for in vivo folding and secretion of active *Rhizopus oryzae* lipase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **2001**, *55* (4), 454-62.