

## 論文内容の要旨

### Abstract of Dissertation

氏名Name 今西 大生

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、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。

ドラフトゲノム解析によって 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。これら多数の 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) を推定した。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。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。

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、ヌクレオチド合成、リボソーム合成や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、エンドサイトーシスや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-Aspartyl-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、独立した未知のD-Aspシグナル伝達経路により転写誘導されることが示唆され、これにより細胞の正常化に寄与する可能性が示唆された。

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制御されていると考えられた。