

トリプトファン代謝鍵酵素の発現に影響を与える食品成分および

転写調節機構に関する研究

2019年 1月

千葉大学大学院 園芸学研究科

環境園芸学専攻 生物資源科学コース

越口愛美

(千葉大学審査学位論文)

トリプトファン代謝鍵酵素の発現に影響を与える食品成分および

転写調節機構に関する研究

2019年 1月

千葉大学大学院 園芸学研究科

環境園芸学専攻 生物資源科学コース

越口愛美

目次

I. 緒論	1
II. 炎症時のトリプトファン代謝鍵酵素発現と食品成分による影響	14
1. 背景・目的	
2. 方法	
3. 結果	
1) ミクログリア細胞における炎症時の <i>Ido</i> および <i>Acmsd</i> mRNA 発現変動	
2) フェルラ酸がマウス脳およびミクログリア細胞における炎症時の <i>Ido</i> mRNA 発現に及ぼす影響	
4. 考察	
III. ACMSD 転写調節機構の解明	30
1. 背景・目的	
2. 方法	
3. 結果	
1) STZ 誘導性糖尿病モデルマウスへのインスリン投与による影響	
2) レポーターアッセイ	
3) 初代肝実質細胞への HNF4 α および PGC1 α 発現ベクター導入	
4. 考察	
IV. 総合考察	49
V. 謝辞	52
VI. 参考文献	54

略語

β AR: beta-adrenergic receptor

3-HAA: 3-hydroxyanthranilic acid

3-HK: 3-hydroxykynurenine

5-HT: 5-hydroxytryptamine

AANAT: arylalkylamine N-acetyltransferase

ACMS: 2-amino-3-carboxymuconate 6-semialdehyde

ACMSD: 2-amino-3-carboxymuconate 6-semialdehyde decarboxylase

AhR: aryl hydrocarbon receptor

AMS: 2-aminomuconate 6-semialdehyde

cAMP: cyclic adenosine monophosphate

CBP: CREB-binding protein

COUP-TF: COUP Transcription Factor

CPT1: carnitine palmitoyltransferase

CREB: cAMP response element binding protein

CRY: cryptochrome

CYP: cytochrome P450

DR: direct repeat

ERK: extracellular signal-regulated kinase

ERR: Estrogen-related receptor

FA: ferulic acid

FOXO: forkhead box-containing protein, O

GAS: gamma interferon activation site

GR: glucocorticoid receptor

G6Pase: glucose 6-phosphatase

HDAC: histone deacetylase

HNF4 α : hepatocyte Nuclear Factor 4-alpha

IFN: interferon

IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase

I κ B α : inhibitor of kappa B

IL: interleukin
JNK: c-jun N-terminal kinase
KAT: kynurenine aminotransferase
KMO: kynurenine 3-monooxygenase
KYN: kynurenine
KYNA: kynurenic acid
LAT: large neutral amino acid transporter
LPS: lipopolysaccharide
MAPK: mitogen-activated protein kinase
MEF: myocyte enhancer factor
NAD: nicotinamide adenine dinucleotide
NaMN: nicotinic acid mononucleotide
NF κ B: nuclear factor-kappa B
NMDAR: N-methyl-D-aspartate receptor
NR: nuclear receptor
PA: picolinic acid
PGC1 α : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase
PKA: protein kinase A
PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor
QPRT: quinolinate phosphoribosyltransferase
QUIN: quinolinic acid
RAR: retinoic acid receptor
RXR: retinoid X receptor
SRC: steroid receptor coactivator
SREBP: sterol regulatory element-binding protein
TDO: tryptophan 2,3-dioxygenase
TPH: tryptophan hydroxylase
TLR: toll like receptor
UCP: uncoupling protein

I. 緒論

1. 生体内におけるトリプトファン代謝の概要とその代謝産物の機能性

トリプトファンはヒトにおける必須アミノ酸のひとつに数えられる。生体を構成するアミノ酸としての機能に加え、その多様な代謝産物が生体に及ぼす作用の面からも重要な物質であり、トリプトファン代謝と疾病の関係について研究が進められている。

トリプトファン代謝においては2つの主要な経路が知られており、その1つは、トリプトファンから N-formylkynurenine への代謝を初発反応とするキヌレニン経路である (Fig. 1)。キヌレニン経路は全身の組織に存在し、この経路上の反応により、炎症や免疫の調節への関与が報告される KYN や 3-HK, QUIN, KYNA が産生される [1]。KYN は免疫機能の調節に関与する受容体型転写因子 AhR のリガンドとして知られ、がんや慢性炎症との関わりが報告されている [2]。また、3-HK はフリーラジカル産生を介し細胞障害を惹起することが知られる [3]。さらに、QUIN および KYNA はいずれも興奮性の受容体である NMDAR のリガンドとして知られるが、QUIN がアゴニストとして機能し、細胞毒性を誘導するのに対し、KYNA はアンタゴニストとして機能することで細胞保護にはたらく [4, 5]。

ビタミン B3 とも呼ばれる水溶性ビタミン NAD⁺もこの経路を介して産生される。NAD⁺は生体内の多様な脱水素反応において補酵素として働き、その欠乏は皮膚症状、消化器症状、神経症状を主徴とするペラグラの発症を誘導する [6, 7]。さらに近年では、SIRT1 をはじめとする HDAC type III の補酵素としても注目されており、脱アセチル化活性の調節を介して多様な遺伝子の発現調節に関与することから、老化防止や健康増進に寄与する因子としても注目されている [8]。

また、トリプトファン代謝産物の一部は、キヌレニン経路上の代謝産物である ACMS から分岐するグルタール酸経路を介しアセチル CoA へと代謝され、TCA 回路においてエネルギー産生に寄与する [9]。

他方の主要なトリプトファン代謝経路は、トリプトファンから神経伝達物質として機

能する 5-HT の産生へと至るセロトニン経路である。また、5-HT は脳内で更なる代謝を受け、睡眠の制御に関与するホルモンであるメラトニンへと転換される [10].

2. トリプトファンの体内動態

食物に由来するトリプトファンの生体内における動態に関する過去の報告によると、その大部分は小腸より吸収され、血管を介して全身の細胞および主要なトリプトファン代謝器官である肝臓へ輸送される。このうち、タンパク質合成に利用されるのはわずか 1%以下とされるが、これは、生体内において絶えずタンパク質の分解および再合成がおこなわれ、トリプトファンの再利用がなされるためである [11]. 食物に由来するトリプトファンの約 95%はキヌレニン経路に、1-2%がセロトニン経路に流入し代謝される [11, 12]. また、セロトニン代謝の約 95%は腸管内に局在し、中枢神経系において産生されるセロトニンは全体の約 5%に過ぎない [12, 13]. トリプトファンの中枢神経経への輸送は血液脳関門に存在する LAT を介しており、トリプトファンの脳内への流入量はこの機構により制御されている [14]. また、一部のトリプトファンは腸内細菌叢によっても代謝を受けることが報告されている [11, 12].

3. 主要なトリプトファン代謝酵素とその生体機能への影響

生体内における主要なトリプトファン代謝経路であるキヌレニン経路は、TDO (EC 1.13.11.11) および IDO (EC 1.13.11.52) の二つの異なる酵素により触媒される反応を初発とする。TDO が主に肝臓に発現し、平常時のトリプトファン代謝を担うのに対し、IDO は全身の免疫細胞において炎症時にその発現が誘導される [15].

この、炎症時の IDO 誘導は主としてマクロファージや樹状細胞、ミクログリアといった免疫細胞においてみとめられる [16, 17, 18]. また、腫瘍細胞や妊娠時の胎盤においても IDO 発現の上昇が知られている [19, 20]. 腫瘍細胞における IDO 発現の亢進は、

トリプトファンの枯渇と細胞毒性を有する KYN 産生量の増加を介し T 細胞の活性を抑制することで免疫逃避の成立に関与する [21].

また、このような古典的な機構に加え、近年では、トリプトファン代謝と T 細胞分化制御を介した免疫調節機構の関連も明らかにされている。樹状細胞やマクロファージといった抗原提示細胞による IDO 発現上昇と、それにより誘導されるキヌレニンによる AhR シグナル活性化が制御 T 細胞分化を誘導し、免疫機能を抑制することが明らかにされており、同様の機構が腫瘍細胞における免疫逃避、妊娠初期における母子間の免疫寛容機構の一端を担うことが予想される [2, 22, 23].

キヌレニン経路の下流には、グルタル酸経路への分岐反応を触媒する鍵酵素として ACMSD (EC4.1.1.45) が存在する。ACMSD は主に肝臓および腎臓に発現し、ACMS から AMS への転換を触媒する [24]. この分岐点の他方の経路では非酵素的に QUIN が産生され、さらなる代謝を経て NAD へと転換される [25]. このことから、ACMSD は QUIN や NAD の産生に影響を与える重要な酵素である。

また、キヌレニン経路の下流で産生されるトリプトファン代謝産物が炎症に関与することから、トリプトファン代謝と疾病、特に中枢神経系における障害との関連については広く研究が行われており、IDO や KMO といったキヌレニン経路上の酵素発現、QUIN や KYNA の産生に着目した報告がなされている。

実際に、アルツハイマー病患者脳における IDO 発現上昇ならびに QUIN 産生量の増加および KYNA 産生量の減少、ハンチントン病モデルマウスの脳における QUIN 産生量の増加が知られるほか、パーキンソン病患者の脳脊髄液における KYN/TRP 比の上昇は IDO 発現上昇を反映することが予想される [26-31].

さらに、近年の疾病に関与する遺伝子変異に関する研究結果から、*Acmsd* 遺伝子上の変異や単一塩基多型とパーキンソン病発症リスクの間に因果関係が存在することが示唆され、治療の新たなターゲットとして注目されている [32, 33].

また、うつ病とトリプトファン代謝の関連についても“セロトニン仮説”として論じられている。この仮説では、神経伝達物質であるセロトニン合成量の低下や、シナプス間隙におけるレセプターを介した過剰な再取り込みを介したセロトニンの枯渇がうつ病の原因であることを仮定しており、中枢神経系における IDO 発現上昇がキヌレニン経路を介したトリプトファン代謝を亢進することがその原因の一つとして予想されている [34, 35, 36].

中枢神経系における 5-HT 産生量はトリプトファン濃度に依存するが、実際に、うつ様症状と血漿または脳脊髄液中のトリプトファン濃度低下が報告がされており、トリプトファンの存在量に依存してセロトニン産生量が低下している可能性が示唆される [34]. さらに、近年、末梢における炎症時の IDO 発現上昇に伴う KYN 産生の増加が末梢マクロファージの活性化と中枢神経系への移行を介し、うつ様症状誘導に関与することが示されており、中枢神経系に限らず全身性の炎症がトリプトファン代謝を介しうつ様症状発症機序の一端を担うことも明らかになりつつある [13, 34].

また、NAD による SIRT1 活性化は、生体内において概日リズムの調節に関与することが知られるが、トリプトファン摂取がこの機序を介し概日リズムに及ぼす影響については不明な点が多い。しかしながら、近年では、NAD に依存しない経路を介したトリプトファンによる概日リズム調節への関与が明らかにされている。この経路においては、光刺激により誘導されるトリプトファン代謝産物が、AhR の活性化を介して時計関連遺伝子である Cry の発現に影響を与え、これにより概日リズムの変動が誘導されるとの報告がなされている [37].

さらに、メラトニンもまた概日リズムの調節に関与することが知られる [38, 39]. また、ラットにおいて、食餌へのトリプトファン負荷は間脳におけるセロトニンおよびメラトニン産生量を増加させることが報告されており、トリプトファン摂取はメラトニン産生を介しても概日リズムの調節に関与する可能性が予想される [38]

ラットを用いた過去の実験において、主要なメラトニン産生器官である松果体におけるセロトニンは明期においても一定量が存在するが、暗期の初期に一過性に約3倍まで上昇することが報告されている。一方でメラトニン量は明期においてはほぼ存在せず、暗期の間のみ産生が増加する。また、平常時のメラトニン量に対し、そのおよそ1/3がメラトニンに転換される [40].

加えて、トリプトファンからセロトニンへの代謝に関与する酵素 TPH や、セロトニンからメラトニンへの転換に関与する酵素 AANAT は、光刺激により調節される概日性を有する [41, 42].

これらのことより、トリプトファン代謝と概日リズムの強い関連が予想される。近年の研究から、概日リズムの乱れは、メタボリックシンドロームや悪性新生物、神経変性疾患をはじめとする多様な疾病の成因との関りが明らかにされており、疾病に対する予防や治療の標的としても注目されている [43-45].

このような背景から、トリプトファン代謝調節機構の詳細や、この機構に影響を与える要因を明らかにすることは、生体機能維持の観点から有用な成果となることが期待される。

本研究では、トリプトファン代謝経路における鍵酵素である IDO および ACMSD に着目し、炎症とトリプトファン代謝の関係、ACMSD 転写調節機構における転写因子および転写活性化補助因子のはたらきの2点について、その解明を目指した。

4. 炎症とトリプトファン代謝

今回着目した鍵酵素の1つである IDO は炎症時に多様な細胞において発現が誘導されることが知られ、その調節機序について、これまでに複数の経路が明らかにされている。IDO 発現を誘導する因子としては、IFN- γ 、TNF α 、IL-1 β や IL-6 といった炎症性サイトカイン、また、大腸菌由来の炎症誘導物質である LPS や、アルツハイマー病患者脳

の病変部位に蓄積がみられる異常タンパク質アミロイド β が知られる [46-48].

さらに、転写レベルでの制御機構についても研究が進んでおり、遺伝子上のプロモーター領域に結合することで *Ido* 発現を直接誘導する転写因子としては、NF κ B や、JNK や p38 経路の下流に存在する AP-1 などが知られる [49]. IFN- γ に依存する経路として、IRF-1 の下流に位置する ISRE や、JAK/STAT 経路の下流に位置する GAS もまた、*Ido* 発現を誘導することが報告されている [46]. さらに、これらの経路はサイトカイン放出と受容体刺激を介した複数の細胞間のクロストークによっても制御される [48]. このように、*Ido* 発現誘導には複数の要因が関与し、多様な外部刺激に対する重要な応答として複数の経路を介し制御を受ける.

過去の研究から、トリプトファン代謝産物と神経変性疾患発症の因果関係が明らかにされていることから、近年、トリプトファン代謝酵素発現の制御が神経変性疾患の予防や治療のターゲットとして注目されている.

特に、トリプトファン代謝経路において炎症下の初発酵素としてはたらく IDO は、疾病との関連が多く報告されており、また、分岐酵素 ACMSD についても神経毒性を有する QUIN の産生に影響を与えることから、これらの酵素の発現制御は疾病予防や治療の観点から有用であることが期待される.

中枢神経系に存在するミクログリアは、免疫細胞として神経細胞の恒常性維持に関与し、活性化されたミクログリアにおいてトリプトファン代謝に変動がみられることから、その活性制御と神経変性疾患発症機序について研究が進んでいる. 実際に、アルツハイマー病やパーキンソン病に関与する異常たんぱく質がミクログリアを活性化することが報告されており、本研究においても、ミクログリア細胞におけるトリプトファン代謝に着目し実験を行った [50, 51].

5. ACMSD 発現調節機構

1) ACMSD 発現に影響を与える因子

今回焦点を当てたもう 1 つのトリプトファン代謝鍵酵素である ACMSD について、その発現を上昇させる因子として、糖尿病の発症や高タンパク質無脂肪食の摂取、絶食状態、グルココルチコイド暴露などが知られる [52-54]。一方で、発現を低下させる因子としては、脂肪酸やコレステロールの摂取、インスリン暴露などが報告されている [55, 56]。

このように、ACMSD は総じて、低栄養状態においてその発現が誘導され、栄養の充足により発現が低下する傾向がみられるが、その制御機構については未だ不明な点が多く、栄養状態を反映し、ACMSD 発現調節を仲介する因子の存在が予想される。

2) 核内受容体 HNF4 α と ACMSD 発現調節機構の関係

過去の報告から、*Acmsd* 発現の主要な調節機構として、核内受容体 HNF4 α による転写誘導が知られる [57]。また、負の制御因子としては PPAR α および SREBP-2 が報告されている。過去の報告から、多価不飽和脂肪酸による ACMSD 発現抑制について、脂肪酸が脂質代謝関連転写因子である PPAR α のリガンドとしてはたらき、HNF4 α 活性を阻害することに起因する機序が示されている [58]。しかしながら、リノール酸による ACMSD 発現抑制など、PPAR α が関与しない機構も報告されており、新たな機序の解明が待たれる [59]。ACMSD 発現制御に関与する可能性を有する新たな因子として、不飽和脂肪酸やコレステロールによりその転写や翻訳後の修飾に影響を受ける脂質代謝関連転写因子である SREBPs が報告されている [59, 56]。また、PPAR α による SREBP1c の発現誘導も知られているが、ACMSD 発現制御機構における詳細な制御機序については明らかにされていない [60]。

本研究で *Acmsd* 転写活性のマスターレギュレータとして着目した HNF4 α (NR2A1) は *HNF4A* によりコードされ、主に腎臓、肝臓、膵臓に発現するほか、胃、小腸、大腸

などの消化管においても発現がみられる転写因子である [61]. その変異が若年発症成人型糖尿病 (MODY) の原因となる遺伝子のひとつに数えられ, インスリン産生に影響を与えることが報告されている [62]. また, 糖質, 脂質代謝や薬物代謝に関連する遺伝子の発現調節に関与する主要な転写因子の 1 つであり, 糖新生関連遺伝子である *Pepck* や *G6pase*, 脂質 β 酸化関連遺伝子である *Cpt1*, 薬物代謝に関連する CYP 群といった遺伝子の発現制御機構への関与が広く知られている [63-65].

この遺伝子の転写調節には P1 および P2 の 2 つの異なるプロモータを介した制御が存在する. プロモータの選択性は成長段階や臓器に依存し, 肝臓においては胎生期に P2 プロモータによる発現が主であるのに対し, 成熟後は P1 プロモータを介した調節がおこなわれる [66]. また, 腎臓においては主として P1 プロモータ依存性の転写調節がおこなわれるのに対し, 胃における転写調節は P2 プロモータに依存する [61, 66]. これらの各プロモータ活性調節には, 複数の転写調節因子が関与することが報告されており, 発現を正に制御する因子として, C/EBP α や RXR α /RAR α 複合体が知られる. これらに加え, HNF1 α , HNF1 β , HNF3, HNF6 などの HNF ファミリーや, HNF4 α 自身によるポジティブフィードバック制御機構が存在することも特徴的である [67, 68]. 一方で, p53 や SNAIL, SREBPs は負の転写制御に関与する [69-71].

HNF4 α は核内受容体 (NR) ファミリーに属し, その構造的特徴として, N-末端側から順に, DNA 結合ドメイン, リガンド結合ドメイン, 転写活性化ドメインを有する (**Fig. 2A**). これは, RXR や RAR, ERR, PPAR, COUP-TFII, REV-ERB といった核内受容体ファミリーに広く保存される構造である [72]

これらの核内受容体は DR 配列 (**Fig. 3A**) (AGGTCA n AGGTCA) と呼ばれる DNA 上の繰り返し配列に結合し転写因子として機能することが知られる. また, この機構において HNF4 α はホモダイマーの形態に加え, RXRをはじめとする他の NR とヘテロダイマーを形成し, 標的遺伝子の転写調節領域に結合する [73, 74].

HNF4 α による ACMSD 発現制御もまた, *Acmsd* 遺伝子 5' 上流転写調節領域上に存在する応答配列への結合を介し, *Acmsd* 転写活性を直接制御する機構によるものであることが明らかにされている [57].

DR 配列は中央に 0-5 mer の任意の塩基を含む繰り返し配列であり, このスペーサー配列の塩基数により DR0-5 に分類される. スペーサー配列の塩基数に関して, NR ごとに選択性がみられ, HNF4 α ホモダイマーは DR1 に対して強い選択性を有し, DR2, DR5 に対しても結合能を有することが確認されている [74]. また, HNF4 α と RXR とのヘテロダイマーは DR1 に対し選択性を有する [75]. *Acmsd* 5' 上流転写調節領域に存在し, *Acmsd* 転写活性に影響を及ぼすことが報告される HNF4 α 結合配列は, DR2 ないし DR5 の逆相補配列を含む (Fig. 3C).

また, 過去の報告において, ヒト HNF4 α ヘテロダイマーは DR1 様配列のハーフサイト (Fig. 3B) に対し, 他の NR ファミリーと比べ高い結合能を有することが報告されているが [76], マウス *Acmsd* 5' 転写調節領域上の HNF4 α 応答配列はこの配列に類似する配列の逆相補配列を含む. ヒトとマウスの HNF4 α アミノ酸配列の相同性は約 90% にのぼり, *Acmsd* 転写活性化においても HNF4 α はヘテロダイマーとして機能することが予想される [77].

また, HNF4 α 活性は, リガンド結合部位への脂肪酸や活性化補助因子の結合を介し調節される. 過去に報告されたリガンドには, C14:0 や C18:0, C18:3 といった脂肪酸, SRC1/2 や CBP/p300 といった補助因子が存在する [78, 79]. また, SHP との結合は, 他のアゴニスト作用を有するリガンドの結合阻害を介し, HNF4 α の活性を抑制する [80].

さらに, HNF4 α は, そのタンパク質上のリガンド結合部位存在する AF2 ドメインへの活性化補助因子の結合により活性が調節されることが知られる. 活性化補助因子 PGC1 α もまた, AF2 ドメインへの結合を介し HNF4 α 活性化に関与することが知られ, 実際に PGC1 α および HNF4 α が関与する機構により発現制御を受ける遺伝子として,

Cpt1, *Pepck*, *G6pase* および *CYP* 群などが報告されている [81].

3) 転写活性化補助因子 PGC1 α

PGC1 α は1998年にPPAR γ の補助因子として褐色脂肪において発現が報告された [82]. 以来, エネルギー代謝に関与する遺伝子の発現調節機構において多様な転写因子の活性に影響を与える重要な補助因子としての機能が明らかにされている. PGC1 α は *PPARGC1A* によりコードされ, 筋肉や褐色脂肪, 腎臓, 肝臓, 脳などで発現がみられる転写活性化補助因子であり, PGC1 α の発現および活性は, 栄養状態や寒冷刺激といった生体の生存環境に応答する複数のシグナルの下流で制御される [83].

発現レベルでの制御機構としては, 絶食や寒冷刺激, 運動, グルカゴンを経た正の制御のほか, インスリンシグナルを経た負の制御などが知られる. これらの機構では, PGC1 α プロモータ領域への MEF, FOXO, CREB といった転写因子の結合を経た転写制御が報告されている. 筋肉においては, 運動時 AMPK-p38 MAPK-MEF 経路や, Ca²⁺-CaMK-MEF 経路, Ca²⁺-CaMK-CREB 経路による発現誘導が明らかになっている [84-88]. また, 褐色脂肪細胞における寒冷刺激下での β AR-cAMP-PKA-CREB を介した経路は, PGC1 α のターゲット遺伝子である UCP1 を介した熱産生機構の主要な機序として研究が進められている [85, 89-91]. 肝臓における PGC1 α 発現調節機序としては, cAMP-PKA-CREB 経路を経た誘導が知られる. グルカゴンがこの経路のシグナル伝達を促進するのに対し, インスリンによるこの経路の阻害は CREB 活性化に関与する CBP や TORC2 のリン酸化による不活化を経たものである [92-94]. さらに, 栄養状態の変化はグルカゴンやインスリン放出を経た間接的な経路に加え, 特に筋肉においては, エネルギー収支を反映し変動する AMP/ATP 比の上昇による AMPK の活性化を経た直接的な経路によっても PGC1 α 発現に影響を与える [95].

PGC1 α は多くの NR ファミリーの補助因子として知られ, この作用は, NR ファミリーに広く保存される AF2 ドメインとの結合を経たものであることが明らかにされて

いる。AF2 ドメインを介した NR の活性化に際しては、PGC1 α の N-末端側に存在する活性化ドメイン上の NR1/2/3 と呼ばれる 3 つの LXXLL モチーフ (Fig. 2B) が重要な働きを担い、過去の報告から、HNF4 α の活性化においてもこれらのモチーフが不可欠であることが明らかになっている [96]。PGC1 α により活性が調節される転写因子としては、ミトコンドリア新生に関与する NRF1/2 や ERR [97, 98]、糖新生に関与する GR や FOXO1 [99, 100]が存在し、転写因子の活性制御を介した PGC1 α による褐色脂肪細胞分化への関与も報告されている [101]。

このように、PGC1 α と ACMSD の発現局在臓器や発現変動に関与する要因の類似性、Pgc1 α および、HNF4 α と PGC1 α の協働により発現が誘導される *Pepck* や *G6pase* の発現が、ACMSD 発現と同じくインスリンにより抑制されることなどの傍証から、本研究では、ACMSD 発現制御機構への PGC1 α の関与を予想した [102]。

以上の背景から、II 章では、中枢神経系における炎症と IDO および ACMSD の関連を、III 章では ACMSD 発現調節機構における転写因子と活性化補助因子の相互作用を明らかにすることを目的とし、実験を行った。

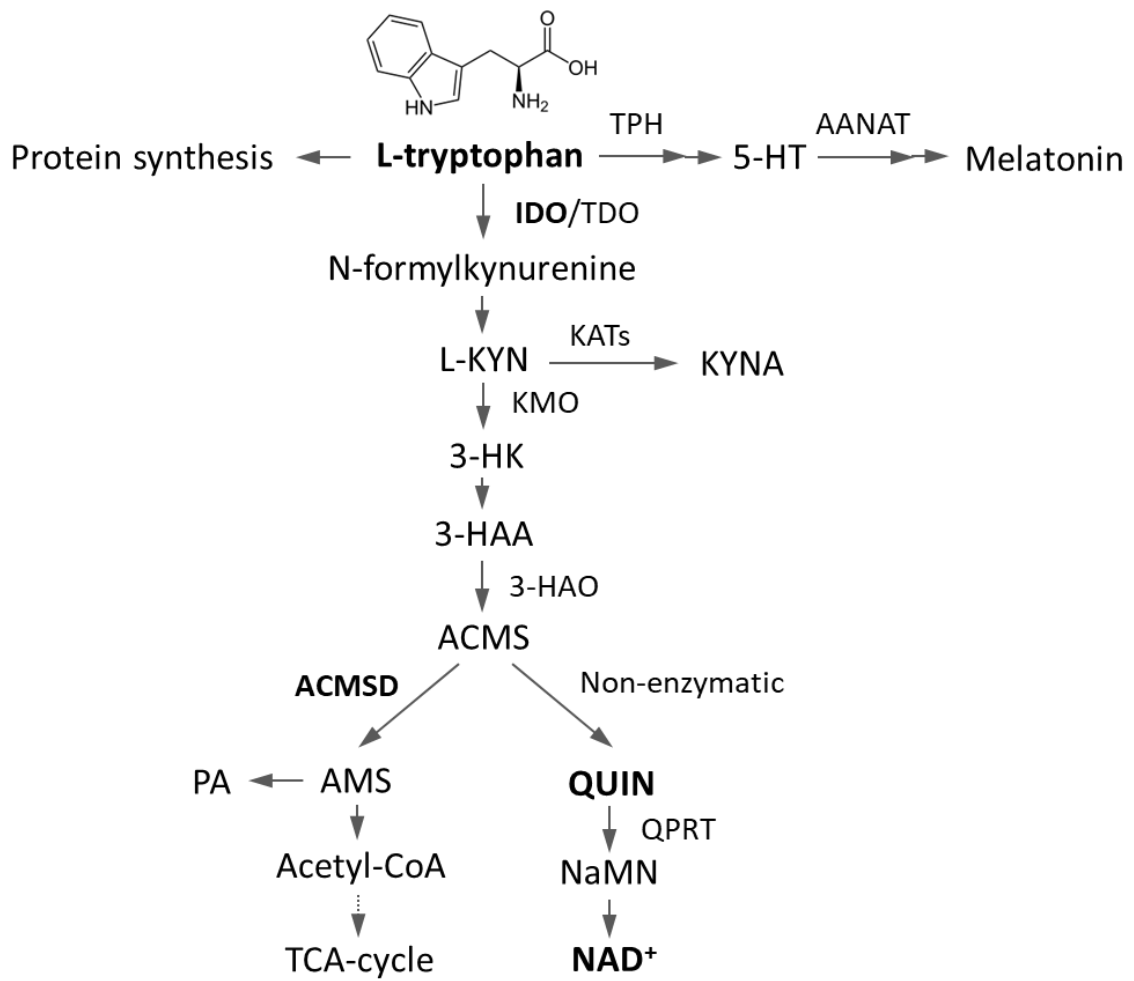


Fig.1 トリプトファン代謝経路

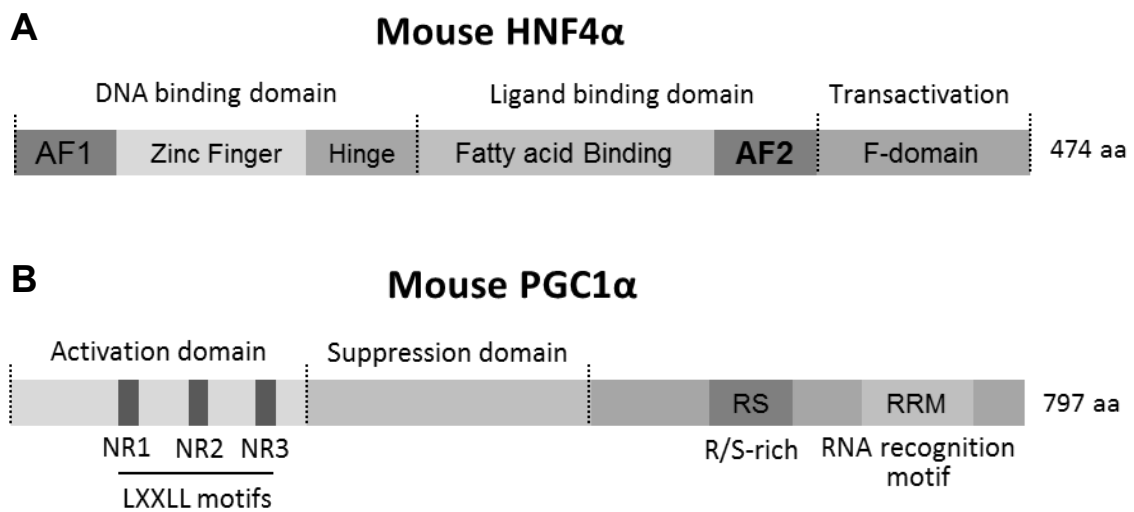


Fig. 2 マウス HNF4 α および PGC1 α の構造
A. HNF4 α , B. PGC1 α

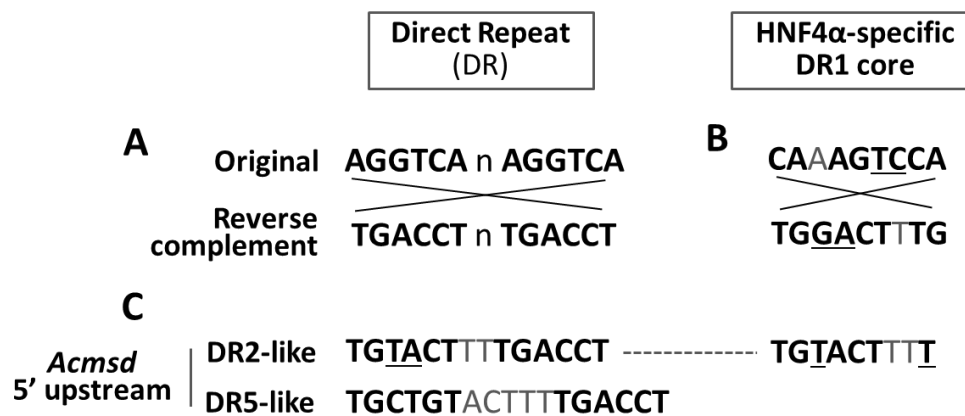


Fig. 3 DR 配列および *Acmsd* 5' 上流転写調節領域 HNF4 α 応答配列の構造

A. DR 配列およびその逆相補配列. n に 0-5 mer の任意の塩基を含む. B. ヒトにおける HNF4 α 特異的 DR1 half-site およびその逆相補配列. C. *Acmsd* 5' 上流転写調節領域上の DR2 および DR5 様配列. 太字は DR に相当する配列を, 灰色の文字はスペーサー配列を, 下線は元の DR 配列と異なる塩基を示す.

II. 炎症時のトリプトファン代謝鍵酵素発現と 食品成分による影響

1. 背景・目的

近年、食品成分による IDO 発現制御に関する研究が盛んであり、ウコンに含まれるクルクミンや、タマネギ外皮に含まれるケルセチン、シソに含まれるルテオリンなどについて、IDO 発現抑制効果が報告されている [103].

本研究においては、フィトケミカルとして知られるフェルラ酸 (FA) に着目し、IDO 発現への影響を検討した。FA は小麦外皮や米糠に多く含まれ、リグニンを形成するフェノール化合物であり、抗酸化や抗炎症、抗肥満作用、高血圧上昇作用といった多様な効果を有する [104-113].

未利用資源の有効活用の観点からも有望であるほか、日常的に摂取する穀類からの長期的な供給が可能であり、疾病予防効果が期待される食品由来成分である。

さらに、FA は、中枢神経系をターゲットとする際の重要な勘案事項となる、血液から中枢神経系への輸送の障壁である血液脳関門を通過することが知られており、神経変性疾患の予防や治療を想定した試験物質として期待される [114]. 実際に、FA の経口摂取が認知機能の改善に有効であるとの報告もなされている [115].

本実験で炎症誘導に用いた LPS は、大腸菌由来のリポ多糖であり、細胞表面に存在する炎症性物質の受容体である TLR 4 に結合し、ERK, JNK, p38 のリン酸化によりシグナルが伝達される MAPK 経路や、NF κ B 経路といったシグナルカスケードを介し *Ido* 転写活性を直接調節する [116, 117].

これらのカスケードが *Ido* 発現を制御する機構については、*Ido* 5' 上流転写調節領域に存在する NF κ B および AP-1 結合配列を介したものであることが報告されている [49]. NF κ B は平常時、核外において I κ B α と結合することでその核移行が阻害されているが、炎症時には上流のシグナルにより I κ B がリン酸化を受け、分解されることで NF κ B の核移行が促進される [118]. MAPK に属する ERK, JNK, p38 もまたリン酸化を介してさらに下流の AP-1 を活性化する [119].

以上より、転写制御機構が明らかにされている IDO については、これらの細胞内シグナル経路に着目し、FA の効果を検討した。

また、IDO に加え、神経変性疾患発症への関与が強く示唆されるトリプトファン代謝産物 QUIN の産生量に影響を与える因子として、トリプトファン代謝経路上の分岐酵素である ACMSD についても着目した。

本章では、トリプトファン代謝の鍵酵素である IDO および ACMSD について、マウスおよびミクログリア細胞における炎症時の各酵素の遺伝子発現および FA が及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

1) ミクログリア細胞における LPS 誘導性炎症条件下の *Ido* および *Acmsd* 発現解析

(1) ミクログリア細胞の培養

マウス胎仔由来ミクログリア細胞株 MG6 (RIKEN BRC) [120, 121] を 24 well plate 0.25×10^6 cells/well, にて播種し, 10% FBS, ペニシリン (1,000 U/mL) およびストレプトマイシン (1 mg/mL) を含むダルベッコ変性イーグル培地 (DMEM) 中で培養した. 24 時間の前培養後, 各細胞に LPS (100 ng/mL) を添加した. LPS 未処理群については, LPS の溶媒である PBS (-)を添加した. 12 well plate にて培養した細胞を, 24 時間後, PBS で洗浄, RNA iso plus (TaKaRa) にて溶解し, 遺伝子発現解析に供した.

(2) Total RNA 抽出, cDNA 合成および real-time qPCR

1) の手順にて RNA iso plus に溶解し回収した細胞より製品プロトコールに従い total RNA を抽出した. 続いて, ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて製品プロトコールに従い逆転写を行い, cDNA を得た. THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO) を用い, ABI PRISM® 7000 (Applied Biosystems) にて各遺伝子の発現量を測定した. 各遺伝子配列の増幅には以下のプライマーを用いた. *Ido* ; Fwd. 5'-GGGATGACGATGTTTCGAAAG-3', Rev. 5'-GTGGACCCAGACACGTTTTT-3', *Acmsd* ; Fwd. 5'-GCCTCCCACAGTTGGATAGA-3', Rev. 5'-GCCTCAAACACAGACCCATT-3' , *18S rRNA* ; Fwd. 5'-CGCGTTCTATTTTGTGGT-3', Rev. 5'-AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3'.

2) フェルラ酸がマウス脳およびミクログリア細胞における炎症時の *Ido* mRNA 発現に及ぼす影響

(1) 動物実験

7 週齢の ICR 雄マウスを日本 SLC より購入した.

マウスを 3 群に分け (n=6), うち standard 群および control 群には標準食を, フェルラ

酸 (FA) 群には 1%FA 添加食を給餌し, 2 週間飼育した. 飼育期間中, 餌および水は自由摂取とした. 解剖の 6 時間前に, standard 群には PBS を, control 群および FA 群には LPS (1 mg/kg/body weight) を腹腔内投与した. ペントバルビタールナトリウムおよび硫酸アトロピン二種混合麻酔の腹腔内投与による麻酔後解剖し, 脳 (小脳, 海馬, 線条体) を回収した. 動物は, 国立大学法人千葉大学動物実験委員会の承認を得て, 「千葉大学動物実験実施規定」に基づき取り扱った.

回収した組織より RNAiso plus (TaKaRa) を用いて total RNA を抽出した後, ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) により逆転写をおこない, cDNA を得た. 手順はいずれも製品プロトコールに従った. 得られた cDNA を用いて, II. 2. 1) (2) と同様の手順で real-time PCR をおこない, 遺伝子発現を測定した.

(2) ミクログリア細胞における炎症誘導と FA の影響

① ミクログリア細胞の培養

マウス胎仔由来ミクログリア細胞株 MG6 (RIKEN BRC) を 12 well plate および 60 mm dish にそれぞれ 0.5×10^6 cells/well, 4.0×10^6 cells/dish にて播種し, 10%FBS, ペニシリン (1,000 U/mL) およびストレプトマイシン (1 mg/mL) を含む DMEM 中で培養した.

24 時間の前培養後, 各細胞に LPS (300 ng/mL) および FA (10, 50, 250 μ M) を添加した. 12 well plate にて培養した細胞を, 24 時間後, PBS で洗浄, RNAiso plus (Takara) にて溶解し, 遺伝子発現解析に供した. 60 mm dish にて培養した細胞は 5, 15 および 30 分後に PBS で洗浄後回収し, タンパク質発現解析に供した.

② Total RNA の抽出, cDNA 合成および real-time qPCR

①の手順にて RNAiso plus に溶解し回収した細胞より total RNA を抽出した. 続いて, ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて逆転写を行い, cDNA を得た. THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO) を用い, ABI PRISM® 7000 (Applied Biosystems) にて cDNA の遺伝子発現量を測定した. 各遺伝子

配列の増幅には以下のプライマーを用いた。 *Ido* ; Fwd. 5'-GGGATGACGATGTTTCGAAAG-3' , Rev. 5'-GTGGACCCAGACACGTTTTT-3' , *36b4* (RPLP0) ; Fwd. 5'-TGTGTGTCTGCAGATCGGGTAC-3' , Rev. 5'-CTTTGGCGGGATTAGTCGAAG-3'

③ NO 測定

細胞培養培地上清中の一酸化窒素 (NO) 濃度をグリース法 [122] により測定した。

④ ELISA

mouse TNF- α ELISA MAX Deluxe, mouse IL-6 ELISA MAX Deluxe (Bio Legend) を用い, MG6 培養培地上清に分泌された TNF- α および IL-6 濃度を測定した。

⑤ タンパク質抽出

①の手順にて培養した細胞よりタンパク質を抽出した。5 および 15 min 後の細胞については全抽出バッファー (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100) にて細胞を回収し, 超音波破碎した後, 4°C, 15,000×rpm, 5 min 遠心したのち, 上清を回収し, 全タンパク質溶液とした。LPS 処理 30 min 後に回収した細胞については, 全抽出に加え, 以下の手順で核抽出を行った。細胞を PBS (-) に懸濁し, 遠心し上清除去後, 細胞を破碎バッファー (25 mM Tris-HCl, 250 mM sucrose, and 1 mM EDTA) に再懸濁し, グラス-テフロンホモジナイザーにて細胞膜を破碎した。4°C, 3,000×rpm, 5 min 遠心後, 上清を除去し, 沈殿した核画分に RIPA バッファー (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% sodium dodecyl sulfate) を加え, 超音波破碎し, 核タンパク質溶液を得た。

得られた各溶液を 4 × sample buffer (0.25 M Tris-HCl, 8% SDS, 40% glycerol, 2-mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue) と 3 : 1 の割合で混合し, 100°C, 5 min 加熱処理したものを SDS-PAGE に供した。

⑥ ウエスタンブロッティング

③で調製した各サンプルを SDS PAGE に供した。各タンパク質の検出には以下の抗体を用いた。IkB α (sc-371), Lamin B (sc-6217), Anti-Goat IgG HRP conjugate (sc-2020) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), NF κ B (#4764), p-p38 (#9215), p38 (#9212S), p-Erk (#9101S), Erk (#4695), p-JNK (#9251), JNK (#9252), β -actin (#4967) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) Anti-Rabbit IgG HRP conjugate (W4018)

3) 統計処理

数値はすべて平均値 \pm 標準誤差で表記した。統計学的解析には EXCEL 統計 Ver. 6.0 (株式会社 エスミ) および BellCurve エクセル統計 Ver. 2.10 (株式会社 社会情報サービス) を用いた。

3. 結果

1) ミクログリア細胞における炎症時の *Ido* および *Acmsd* mRNA 発現変動

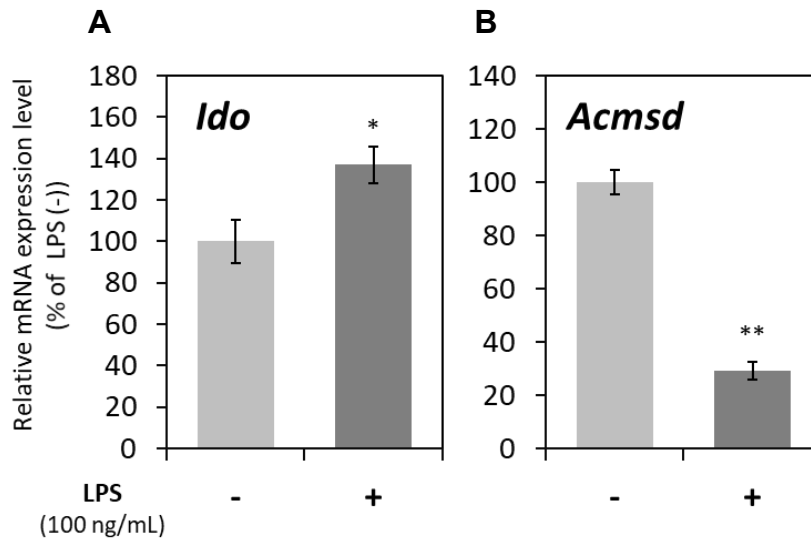


Fig. 4 LPS 処理がミクログリア細胞における *Ido* および *Acmsd* mRNA 発現に及ぼす影響
100 ng/mL の LPS を含む培地中で 24 h 培養した MG6 における各 mRNA 発現レベルを real-time PCR 法により測定した. A. *Ido*, B. *Acmsd*. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, vs 24 h LPS (-) (Student's t-test). 各遺伝子の発現レベルを 18 S rRNA mRNA 発現レベルにより補正し, 平均値 ± 標準誤差で示した (n=6).

まず, LPS による炎症誘導がミクログリアにおけるトリプトファン代謝鍵酵素発現に及ぼす影響を検討した.

LPS 処理 24 時間後の *Ido* mRNA 発現レベルは, LPS 未処理群と比較し有意に上昇した. 一方で, LPS 処理 24 時間後の *Acmsd* mRNA 発現レベルは LPS 未処理群と比較し有意に低下した (Fig. 4).

IDO は炎症時, 中枢神経系におけるトリプトファン代謝の初発酵素としてはたらき, 下流の代謝に影響を与えることから, 以降の実験では, IDO 発現に着目し, 実験を行った.

2) FA がマウス脳およびミクログリア細胞における炎症時の *Ido* mRNA 発現に及ぼす影響

(1) FA が炎症条件下のマウス脳における *Ido* mRNA 発現レベルに及ぼす影響

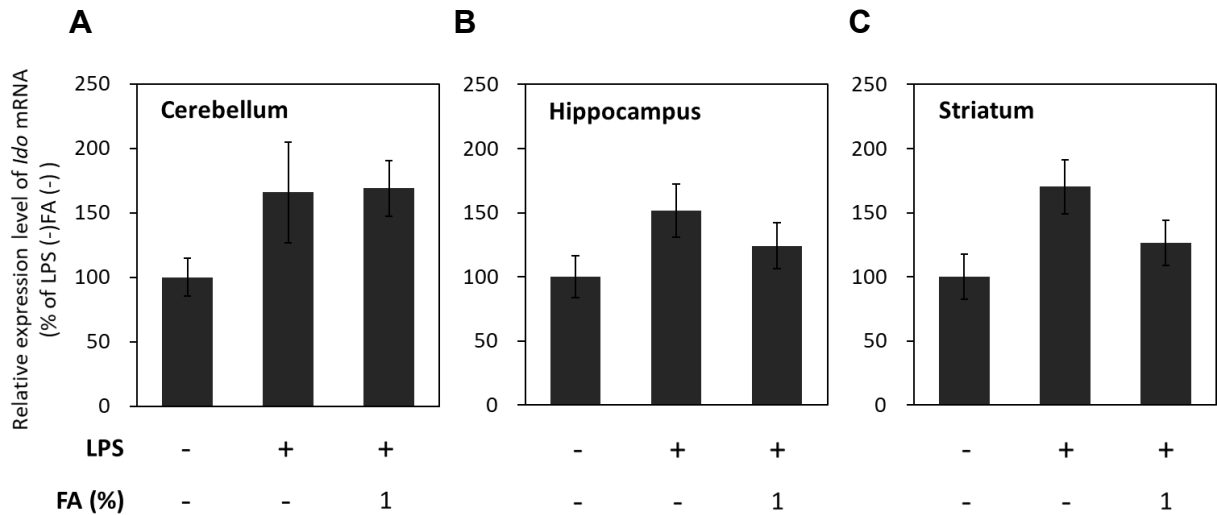


Fig. 5 LPS 投与が脳各部位における *Ido* mRNA 発現に及ぼす影響

対照食または 1% FA 添加食を 2 週間給餌し、解剖の 6 h 前に PBS または 1 mg/kg body weight の LPS を腹腔内投与した。マウスの脳を小脳、海馬、線条体に分け、各部位における *Ido* mRNA 発現レベルを real-time PCR 法により測定した。A. 小脳, B. 海馬, C. 線条体。各遺伝子の発現レベルを *18 S rRNA* mRNA 発現レベルにより補正し、平均値±標準誤差で示した (n=4-5)。

続く実験では、LPS 腹腔内投与時の *Ido* mRNA 発現に対する FA 経口摂取の影響を検討した。

マウス小脳 (**Fig. 5A**)、海馬 (**Fig. 5B**)、線条体 (**Fig. 5C**) 各部位の *Ido* mRNA 発現レベルは、LPS 腹腔内投与により上昇し、この発現上昇は、海馬および線条体において、FA 投与により低下する傾向がみられた。

(2) FA が炎症条件下においてマウスミクログリア細胞に及ぼす影響

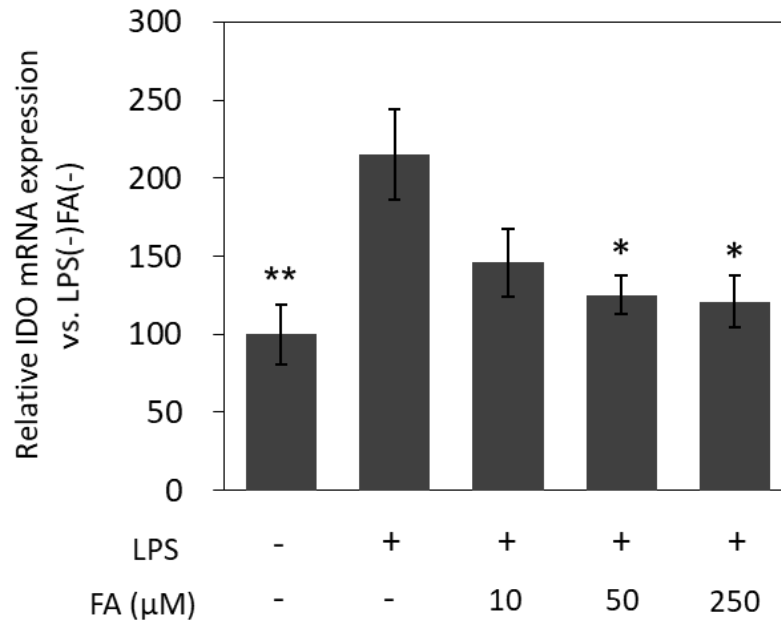


Fig. 6 FA が炎症条件下のミクログリア細胞における *Ido* mRNA 発現に及ぼす影響
300 ng/mL LPS および 10-250 μM FA 含有培地中で 24 h 培養した MG6 における *Ido* mRNA 発現レベルを real-time PCR 法により測定した。
*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, vs LPS (+), FA (-) (Tukey's test). 各遺伝子の mRNA 発現レベルを *36B4* mRNA 発現レベルにより補正し, 平均値±標準誤差として示した(n=6).

ここまでの結果から, マウス脳における FA による *Ido* mRNA 発現抑制がミクログリアに対する作用を介したものである可能性が予想されたため, FA が炎症時のミクログリア細胞における *Ido* mRNA 発現に与える影響を検討した.

Ido mRNA 発現は LPS 処理により上昇し, この上昇は FA 添加により抑制された (**Fig. 6**).

② FA が炎症メディエータ産生に及ぼす影響

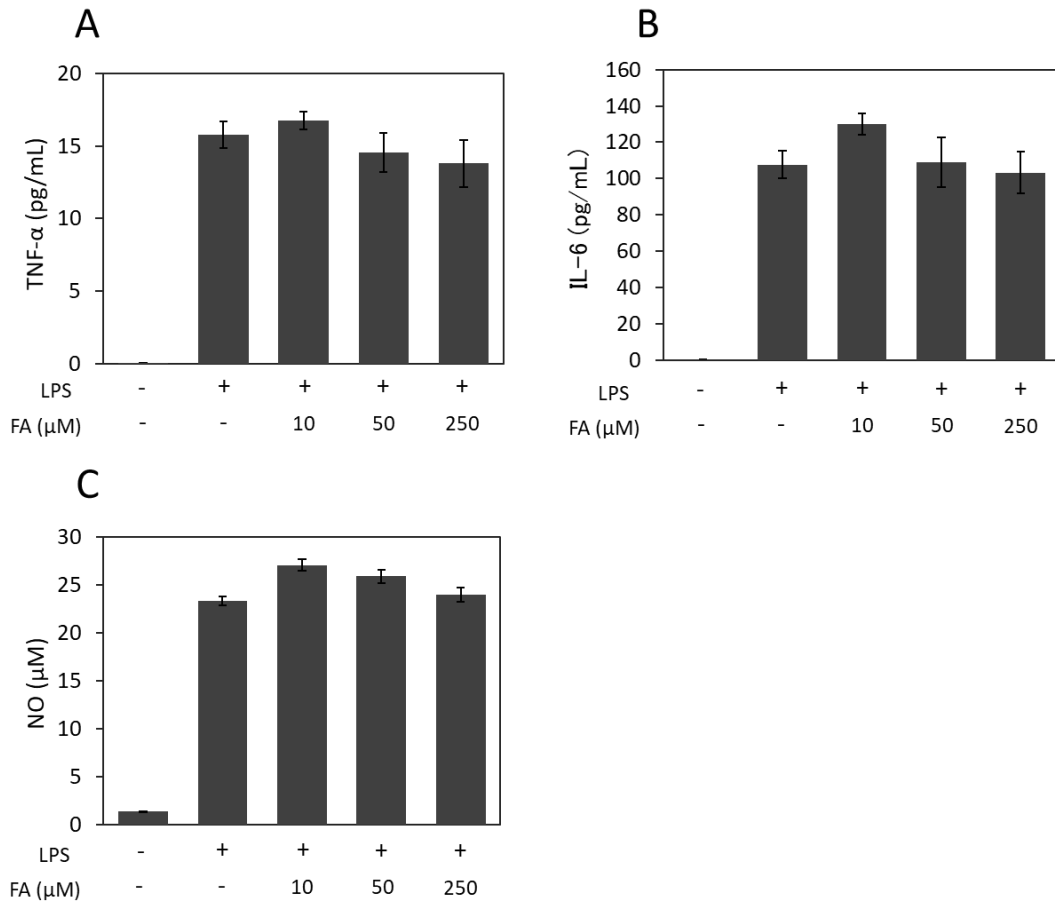


Fig. 7 FA が LPS 処理下のミクログリア細胞における炎症メディエータ産生に及ぼす影響

MG6 を 300 ng/mL LPS および 10-250 μ M FA 含有培地中で 24 h 培養し、回収した培養培地上清中の各炎症メディエータの濃度を測定した。A. TNF- α , B. IL-6, C. NO. 各濃度を平均値 \pm 標準誤差として示した (n=6).

培養培地上清中の TNF α (**Fig. 7A**), IL-6 (**Fig. 7B**) 産生量, NO 濃度 (**Fig. 7C**) は LPS 処理により増加したが, この増加に対する FA 添加による影響は見られなかった.

③ FA が炎症シグナルタンパク質発現に及ぼす影響

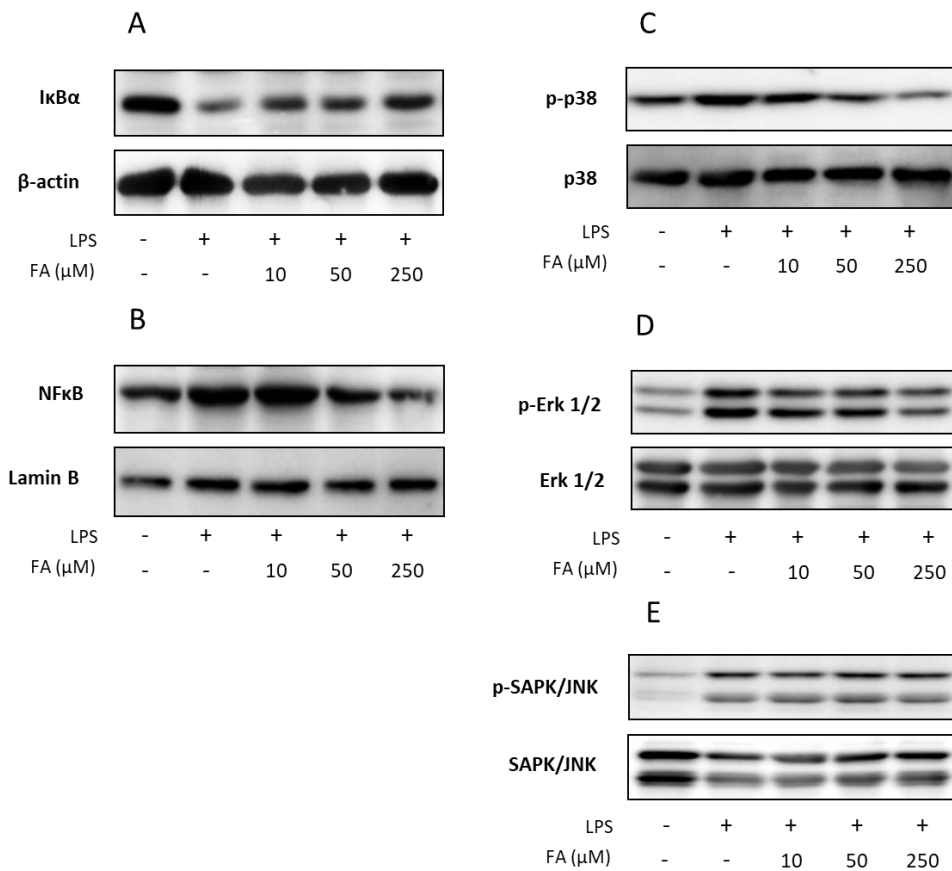


Fig. 8 FA が LPS 処理下のミクログリア細胞における炎症シグナルタンパク質発現に及ぼす影響

A. IκBα, B. NFκB, C. p38, D. Erk, E. JNK. MG6 を 300 ng/mL LPS および 10-250 μM FA 含有培地中で 5, 15, 30 分間処理した後、回収した細胞よりタンパク質を抽出した. p38 については 5 分後, Erk, JNK については 15 分後, IκBα および NFκB については 30 分後に回収したサンプルを用い, 解析を行った. NFκB の検出のみ核抽出溶液を, その他のタンパク質の検出には細胞質抽出溶液を用い検出した.

細胞質における IκBα の分解は, LPS 処理により促進され, この分解は FA 添加により抑制された (**Fig. 8A**). これに伴い, NFκB の核移行は LPS 処理により増加し, FA 添加により減少した (**Fig. 8B**).

また, p38 および Erk 1/2 のリン酸化についても, LPS 処理により促進され, FA 処理により低下した (**Fig. 8C, D**). 一方, SPAK/JNK のリン酸化は LPS により上昇したが, FA 添加による影響は見られなかった (**Fig. 8E**).

5. 考察

ミクログリア細胞において、LPS 処理により *Ido* mRNA 発現レベルが上昇した一方で、*Acmsd* mRNA 発現レベルは低下した。IDO がトリプトファン代謝の初発かつ律速酵素であるのに対し、ACMSD はトリプトファン代謝経路上の分岐酵素であり、QUIN 産生量に影響を与える鍵酵素としてはたらく。ACMSD 発現低下は、QUIN 産生上昇を誘導することから、ミクログリア細胞においても、炎症時に ACMSD 発現変動を介したトリプトファン代謝変動が引き起こされることが示唆された。

IDO により代謝が触媒される反応の下流では、神経変性疾患発症への関与が予想される QUIN や 3-HK, KYN などのトリプトファン代謝産物が産生される。

神経変性疾患発症に際しては、ミクログリア細胞の活性化が症状の顕在化に先行して進行することが報告されており、神経変性疾患発症の一端にミクログリア細胞の活性化とトリプトファン代謝異常を介した機構が関与する可能性が予想される [31]。

また、マウスにおける炎症誘導時、脳各部位で *Ido* mRNA 発現レベルは上昇し、海馬および線条体においては、FA の経口摂取が *Ido* mRNA 発現上昇抑制に有効である可能性が示された。海馬はアルツハイマー病において萎縮が認められることが臨床的に知られており、線条体はパーキンソン病における主要な病変部位の一つである [123]。

これらのことから、海馬および線条体における FA による *Ido* mRNA 発現抑制が神経変性疾患の予防に有用である可能性が示された。

また、FA はミクログリア細胞において、LPS 添加により誘導された *Ido* mRNA 発現および NF κ B, p38 および Erk 経路の活性化を抑制することが明らかになった。

これらの結果より、FA による *Ido* mRNA 発現抑制が NF κ B 経路および p38 MAPK 経路の抑制を介した機序によることが示唆された。

Ido 発現に影響を与える因子は複数知られており、IFN- γ や IL-1 β , IL-6, TNF α といった炎症性サイトカインを介した経路が存在する [124]。しかしながら本研究において、

FA はミクログリア細胞培養培地中のこれらのサイトカイン産生量には影響を及ぼさなかった。これらの因子は、いずれも、MAPK 経路および NF κ B 経路を介した誘導機序が存在することから、FA による抑制が見られなかった JNK 経路を介して誘導されたことが予想される。

また、過去の実験において、FA は低用量の LPS (100 ng/mL) 処理下において、ミクログリア細胞における *Ido* mRNA 発現に加え、IL-6 および TNF α 発現を抑制することが確認されている (データ不掲載)。この結果は、軽度の炎症条件下にあるミクログリア細胞において、FA が他の炎症シグナル経路に加え、JNK 経路を阻害しうる可能性を示唆している。

中枢神経系において IDO を発現する免疫細胞として、ミクログリアおよびアストロサイトが知られるが、これらの細胞では、IDO が触媒する反応の下流で産生される KYN を分岐点として、異なる経路を介し代謝が行われることが報告されている。アストロサイトにおいて、KYN は KATs が触媒する反応により KYNA へと転換される [5]。KYNA は NMDA 型グルタミン酸受容体のアンタゴニストとしてはたらくことから、アストロサイトにおける IDO 発現上昇は炎症下において神経保護につながる意義を有することが示唆されている。一方のミクログリアにおいては、KYN は 3-HK, 3-HAA といった中間代謝産物を経て NMDA 型グルタミン酸受容体のアゴニストである QUIN へと転換される [5]。ミクログリア細胞において、QUIN を基質とした反応を触媒する QPRT の発現は極めて低いことから、ミクログリア細胞における IDO 発現の上昇は QUIN の蓄積を介し、神経興奮毒性を惹起することが予想される [125]。

また、KYN がリガンドとなる AhR の *Ido* 転写調節領域への結合による直接的な *Ido* 転写制御機構が報告されており、KYN による AhR 活性化を介したポジティブフィードバック制御が行われることも明かにされている。このことから、ミクログリア細胞において、FA による *Ido* 発現抑制を介した KYN 産生量の低下が、AhR シグナルの抑制を介

しても *Ido* 発現を負に制御する可能性も予想される [126, 127].

さらに、近年の報告から、ミクログリア細胞には形態や機能の異なる M1 および M2 ミクログリアが存在することが明らかになっている。ミクログリアは LPS や IFN- γ といった炎症性の刺激に応答し M1 ミクログリアに変化し、M1 ミクログリアは IL-1 β や IL-6, TNF α といった炎症性サイトカインの産生を担う [128]. 他方の M2 ミクログリアは抗炎症機能を有し、抗炎症性のサイトカインである IL-4 や IL-13 により誘導された後、IL-10 などの抗炎症性サイトカインを産生する [128]. この転換は神経変性疾患に特異的な異常たんぱく質である A β や α -シヌクレインによっても誘導されることが報告されていることから、新たな治療ターゲットとして注目されている [128].

また、過去の実験において FA が低用量の LPS 処理下で、ミクログリア細胞における L-6 および TNF α 発現を抑制したことから、FA がミクログリアの M1 ミクログリアへの変化を抑制する可能性を示唆する。

以上より、FA は、ミクログリア細胞において NF κ B 経路および p38 MAPK 経路の阻害を介し、*Ido* mRNA 発現を抑制するほか、ミクログリア細胞の活性化抑制を介しても神経変性疾患の予防および治療において効果を有する可能性が示唆された。

なお、ラットを用いた過去の報告において、FA の体内動態が明らかにされている。消化管を介した血中および各臓器への FA 移行については、本研究室における過去の研究において、2.25 μ mol FA をラットの胃内で 25 分間インキュベートした後の FA 濃度は、門脈血中で $13.4 \pm 1.2 \mu$ M, 腹大動脈血中で $9.2 \pm 0.9 \mu$ M, 胆汁中で $271.3 \pm 151.4 \mu$ M, 尿中で $140.0 \pm 136.9 \mu$ M であったとの報告がある [129]. また、経口摂取され胃より吸収された FA は、門脈を介して肝臓に運ばれ、肝臓においてグルクロン酸抱合や硫酸抱合を受け血液を介して全身に運ばれることが明らかになっている [129, 105].

さらに、ラットにおいて、各臓器の FA 濃度は、腎臓や肺、肝臓、脾臓、心臓、脳といった多くの臓器で、尾静脈投与 30 分後をピークに減少することが報告されており、

経口摂取された FA の滞留時間は比較的短く、胆汁や尿中に速やかに排出されることが示唆されている [114].

よって、FA の摂取源は、継続的に摂取可能な食品であることが望ましい。FA は、米胚乳細胞壁 (910 mg/100 g) や小麦ふすま粉末 (530-540 mg/100 g), ライ麦ふすま (280 mg/100 g), グレープフルーツ (10.7-11.6 mg/100 g), ホウレンソウ (7.4 mg/100 g), ブロッコリー (4.1 mg/100 g), コーヒー (9.1-14.3 mg/100 g) など多様な植物性食品に含まれることが知られる [105].

今回の実験で設定した FA の濃度は、動物実験において 1 % であり、これは、およそ 1 g/kg body weight/day に相当する。また、細胞実験において用いた FA の濃度 10-250 μ M は、2-50 μ g/mL に相当する。過去のラットを用いた過去の研究においては、5 mg/kg body weight の FA の尾静脈投与により、脳内の FA 濃度は最大でおよそ 1.2 μ g/g に上昇することが報告されている [114]. これらのことから、本実験で用いた FA の用量はいずれも、市販されるサプリメントの用量が 300 mg 前後であることに比して高用量である。しかしながら、今回の実験で用いた炎症条件が強力なものであったことに鑑み、予防的な効果としてはより低用量の FA により炎症抑制効果が得られることが予想される。さらに、FA が特定のペプチドと結合することにより、生体内における運搬効率の向上や体内滞留時間の伸長がみられるとの報告もなされている [114]. このような修飾を利用したサプリメントの活用により、FA の吸収効率を向上させることが予想される。したがって、FA の摂取方法として、神経変性疾患の予防を目的とした食事からの摂取、また、症状の抑制を目的としたサプリメントの服用という選択が可能である。

穀類や果物、野菜類などからの日常的、かつ継続的な摂取が可能である食品からの FA 摂取は食生活を通じた神経変性疾患の予防において有効であり、本研究の成果として、この機構の一端にミクログリア細胞における IDO 発現抑制が関与する可能性が示唆された。

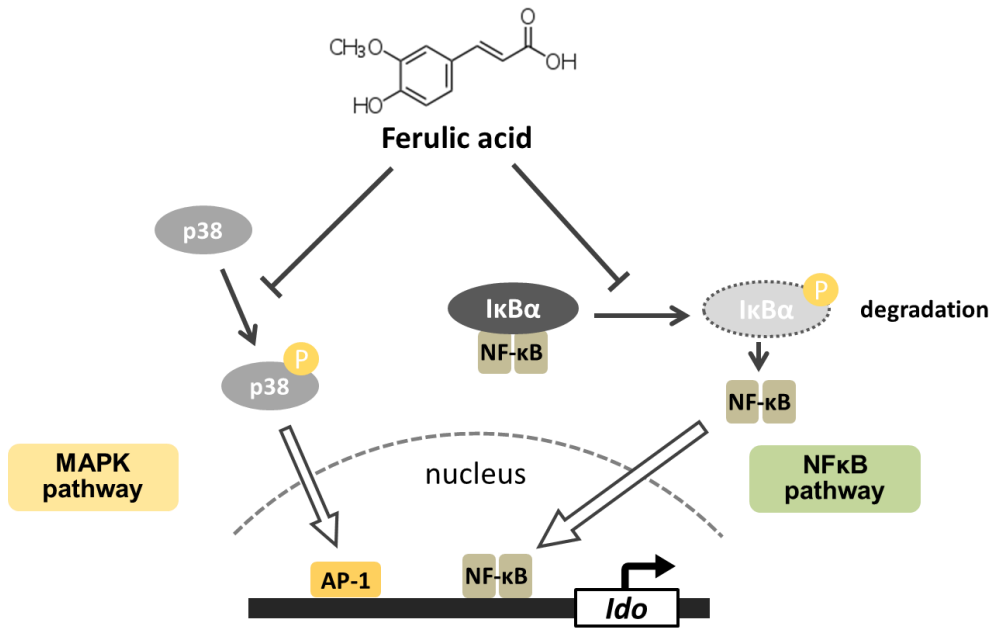


Fig. 9 フェルラ酸による *Ido* 転写抑制機構

III. ACMSD 転写調節機構の解明

1. 背景・目的

本章ではまず、インスリンによる ACMSD 発現調節機構に着目し、HNF4 α を介した ACMSD 発現調節機構への関与が予想される転写活性化補助因子 PGC1 α の発現変動と ACMSD 発現の関係を明らかにするため、I 型糖尿病モデルマウスを用いた実験を行った。本実験で糖尿病の誘導に用いたストレプトゾトシン (STZ) は、げっ歯類において膵臓の β 細胞を選択的に傷害し、インスリン分泌を阻害する薬剤であり、自己免疫により β 細胞の障害が生じる I 型糖尿病のモデル動物作成に用いられる [130]。

続いて、*Acmsd* 転写活性調節機構における HNF4 α および PGC1 α のはたらきを明らかにするため、*Acmsd* 5' 上流転写調節領域上の HNF4 α 応答配列を含むレポーターベクターを用い、HNF4 α および PGC1 α の過剰発現下におけるレポーター活性を測定した。

また、初代肝実質細胞を用いた系により、HNF4 α および PGC1 α の過剰発現が *Acmsd* mRNA 発現に及ぼす影響を検討した。

2. 方法

1) 糖尿病モデルマウスを用いた実験

(1) 動物

日本 SLC より購入した 7 週齢 ICR 雄マウスを 2 群に分け、20 時間の絶食後、各群に STZ (200 mg/kg b.w.) または STZ の溶媒として用いたクエン酸緩衝液 (pH 4.5) を腹腔内投与した。10 日後に尾静脈血を採取し、血糖値および体重により各群をさらに 2 群に分け、計 4 群とした。11 日目より、ストレプトゾトシン投与群、クエン酸緩衝液投与群それぞれについて、インスリン (5 U/kg b.w.) または PBS を、2 回/day (7:00 および 19:00)、10 日間継続して皮下投与した。飼育開始から 20 日後に解剖を行い、血漿、肝臓および腎臓を回収した。

動物実験は、国立大学法人千葉大学動物実験委員会の承認を得て、「千葉大学動物実験実施規定」に基づき執り行った。

(2) 血糖値測定

グルコース CII-テストワコー (和光純薬工業) を用い、血糖値を測定した。

(3) ACMSD 活性測定 [131]

① 粗酵素液抽出

マウス肝臓および腎臓をそれぞれ 3 倍容の 0.02 M KCl-PO₄ buffer (pH 7.0) 中で、ガラス-テフロンホモジナイザーを用いて破碎し、4°C、38,000 × g にて 60 分間遠心した。得られた上清を粗酵素液として ACMSD 活性測定に供した。

② ACMS 生成

ラット肝臓をアセトン中で破碎し、凍結乾燥した粉末 200 mg に 5 mL 0.04 M Tris-acetate buffer を加え、4°C、15,000 × g にて 20 分間遠心し、抽出した 3-HAO を含む溶液を 1 mg/mL 3-HAA 溶液と反応させ、生成した ACMS を ACMSD による触媒反応の基質とした。

③ 活性測定

生成した ACMS に粗酵素液を加え、360 nm の吸光度を継時的に測定した。測定値を下記の計算式に代入し、ACMSD 活性値を算出した。

$$ACMSD \text{ activity } (\mu\text{mol/h/g liver}) = \frac{\Delta OD_{360 \text{ nm}}^{*1}}{4.5 \times 10^4} \times \frac{1.5^{*3}}{1000} \times \frac{1}{0.1^{*4}} \times 4 \times 10^6 \times 60$$

$$^{*1} \Delta OD_{360 \text{ nm}} = OD_{360 \text{ nm}} (\text{反応液} + \text{粗酵素液}) - (OD_{360 \text{ nm}} (\text{反応液}) \times \frac{1.4 (\text{反応液} (\text{mL}))}{1.5 (\text{反応液} + \text{粗酵素液} (\text{mL}))})$$

^{*2} 分子吸光係数 ($4.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

^{*3} 反応液総量 (mL)

^{*4} 粗酵素液量 (mL)

2) レポーターアッセイ

(1) ベクター構築

① レポーターベクター

Acmsd 5' 上流転写調節領域上の既知の HNF4 α 結合配列 (-243/-224 bp) を Sac I, Nhe I, Xho I 認識配列を含む以下のプライマーにより増幅した。Sac I forward 5'-TAGTCAAGTTCTGAGCTCCTATTGAATCAAG-3', reverse 5'-AGAAAACAAGAATGAGCTCAACTCCAGAGGTC-3', Nhe I forward 5'-AGTTCTGAGCAGCTAGCGAATCAAGGCAGC-3', reverse 5'-CTTCAACCAGAAAGCTAGCATGTACTCAACTC-3', Xho I forward 5'-CTGAGCAACTCGAGAATCAAGGC-3', reverse 5'-CAAGAATGTACTCGAGTCCAGAG-3'。増幅した断片を各制限酵素にて処理し、同様に制限酵素処理を行ったホタルルシフェラーゼレポーターベクター pGL3-basic (Promega) に順次導入した。以上の手順で、目的の HNF4 α 結合配列を 3 カ所を含むレポーターベクター pGL3-ACMSD HNF4-RE を得た。

② 発現ベクター構築

HNF4 α および PGC1 α 翻訳配列を、それぞれ Xba I および Not I 配列を含む以下のプ

ライマーにより増幅した。鋳型にはマウス肝臓 cDNA を用いた。 *Hnf4α* forward 5'-CGGGCAGATCTGGGGGCTAAGGC-3', reverse 5'-GAACCCCAGATCTCCCCAGCAGC-3'; *Pgc1α* forward 5'-GCGTCACGCCGGCGCTGGATGGC-3', reverse 5'-GAGAGTGTAACGCCGGCGAAATTC-3'。増幅した断片を各制限酵素にて処理した pCI-neo mammalian expression vector (Promega) に導入し, pCI-neo-HNF4α および pCI-neo-PGC1α を得た。

また, GC1α 結合配列である HNF4α タンパク質上の活性化ドメインである AF2 配列 [132, 133] に変異を有する pCI-neo-HNF4α-Mut を得ることを目的とし、得られた pCI-neo-HNF4α を鋳型に, 以下のプライマーを用いて Inverse PCR を行った。

forward 5'-GAAGATGCAGCAGGGAGGGTCTGCCAGTGATGCAC-3', reverse 5'-TGCAGCAGGTTGTCAATCTTGGCCATGCCGAAGAGC-3'。

(2) ルシフェラーゼ活性測定

マウス由来繊維芽細胞 NIH3T3 を 24 well plate または 96 well plate にそれぞれ 0.8×10^5 および 0.16×10^5 cells/well の密度で播種した。この細胞に, MultiFectam (Promega) を用い, pGL3-basic, pGL3-ACMSD HNF4-RE, pCI-neo, pCI-neo-HNF4α, pCI-neo-PGC1α, pCI-neo-HNF4α-Mut, ウミシイタケレポーターベクター pRL-CMV (Promega) を導入した。レポーターベクターのコントロールとして pGL3-basic を, 発現ベクターのコントロールとして pCI-neo を用いた。pCI-neo-HNF4α-Mut を用いない実験系については 24 well plate を, 用いる実験系については 96 well plate を用いた。上記のベクターを含む形質転換培地中での 4 時間の培養後, 培地を 10% FBS 含有 DMEM に置換した。さらに 24 時間培養した後, Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega) を用い, ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。

3) 初代肝実質細胞への発現ベクター導入

(1) 初代肝実質細胞の単離

過去に報告された方法[134]を参考に単離を行った。

日本 SLC より購入した 6~10 週齢 C57BL/6J 雄マウスより，コラゲナーゼ灌流法を用いて初代肝実質細胞を単離した。手順を以下に示す。

マウスをミダゾラム/メドトミジン塩酸塩/ブトルファノール酒石酸塩混合麻酔により麻酔し，開腹したマウス門脈より前灌流液 (0.8% NaCl, 0.04% KCl, 0.5 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, 0.42 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 5 mM glucose, 0.0006% phenol red and 0.035% NaHCO₃) 続いてコラゲナーゼ溶液 (0.05% collagenase type IV, 0.005% trypsin inhibitor, 0.8% NaCl, 0.04% KCl, 5 mM CaCl₂, 0.5 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, 0.42 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 10 mM HEPES, 0.0006% phenol red and 0.035% NaHCO₃) を灌流し，肝臓を消化した。消化後の肝臓をコラゲナーゼ溶液中で切碎し，冷 PBS (-) で希釈した後，ナイロンメッシュにてろ過した。ろ液を 4°C, 50 × g, 3 min 遠心し，上清を除去した。沈殿した細胞に冷 PBS (-) を加えピペッティング，4°C, 50 × g, 1 min 遠心，上清除去の操作を 2 回行った。回収した細胞を 20% FBS, 100 nM dexamethasone, 10 nM insulin 含有 DMEM にて懸濁し，コラーゲン I 処理された 12 well plate および 24 well plate (IWAKI) にそれぞれ 2.0 × 10⁵ cells/well, 1.0 × 10⁵ cells/well にて播種した。播種から 5 時間後に培地を 20% FBS 含有 DMEM (dexamethasone/insulin 不含) に置換し，さらに 17 時間前培養を行った。

(2) 形質転換

MultiFectam を用い，pCI-neo, pCI-neo-HNF4 α , pCI-neo-PGC1 α を細胞に導入した。形質転換培地中での 5 時間の培養の後，培地を 10% FBS 含有 DMEM に置換した。18 時間の培養後，24 well plate に播種した細胞を遺伝子発現解析に，24 時間の培養後，12 well plate に播種した細胞をタンパク質発現解析に供した。

(3) タンパク質抽出

12 well plate 上で処理した細胞より，第Ⅱ章と同様の手順で whole cell extract および nuclear extract を得た．各群 3 well 分の細胞を 1 検体として回収した．

(4) ウェスタンブロット

第Ⅱ章と同様の手順で SDS-PAGE を行い，下記の抗体を用いてタンパク質発現量を解析した．

ACMSD (sc-107373), HNF4 α (sc-8987), PGC1 α (sc-13067), LaminB (sc-6217), Anti-Goat IgG HRP conjugate (sc-2020) (Santa Cruz), β -actin (#4967S) (Cell Signaling), Anti-Rabbit IgG HRP conjugate (W4018) (Promega).

(5) mRNA 抽出および逆転写

第Ⅱ章と同様の手順で total RNA の抽出および cDNA の合成を行った．

(6) Real-time RT-qPCR

第Ⅱ章と同様の手順で real-time PCR 法により mRNA 発現量を測定した．PCR には以下のプライマーを用いた．

Acmsd (NM_001033041.2) forward 5'-GCCTCCCACAGTTGGATAGA-3', reverse 5'-GCCTCAAACACAGACCCATT-3'; *Hnf4 α* (NM_008261.3) forward 5'-GGTCAAGCTACGAGGACAGC-3', reverse 5'-ATGTACTTGGCCCACTCGAC-3'; *Pgc1 α* (BC066868.1) forward 5'-AATGCAGCGGTCTTAGCACT-3', reverse 5'-TTTCTGTGGGTTTGGTGTGA-3'; *Pepck* (NM_011044.2) forward 5'-GTCAACACCGACCTCCCTTA-3', reverse 5'-CCCTAGCCTGTTCTCTGTGC-3'; *G6pase* (NM_008061.4) forward 5'-AGGAAGGATGGAGGAAGGAA-3', reverse 5'-TGGAACCAGATGGGAAAGAG-3' , *18S rRNA* (X00686.1) forward 5'-CGCGGTTCTATTTTGTGGT-3', reverse 5'-AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3'.

4) 統計処理

数値はすべて平均値±標準誤差で表記した。統計学的解析には BellCurve エクセル統計 Ver. 2.10 (株式会社社会情報サービス) を用いた。

3. 結果

1) STZ 誘導性糖尿病モデルマウスへのインスリン投与による影響

(1) 体重

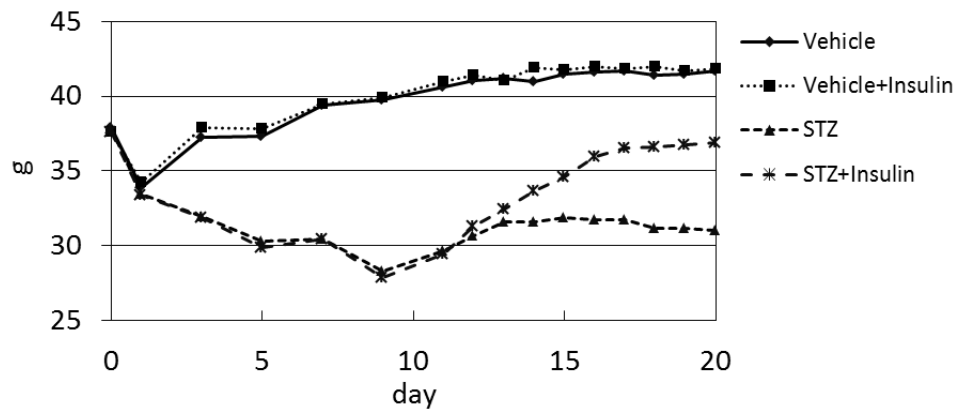


Fig. 10 体重推移

体重は STZ 投与により経時的に低下した。また、10 日目以降のインスリン投与により、STZ 投与群において体重の増加がみられたが、vehicle 投与群において変化は見られなかった (Fig. 10)。

(2) 血糖値

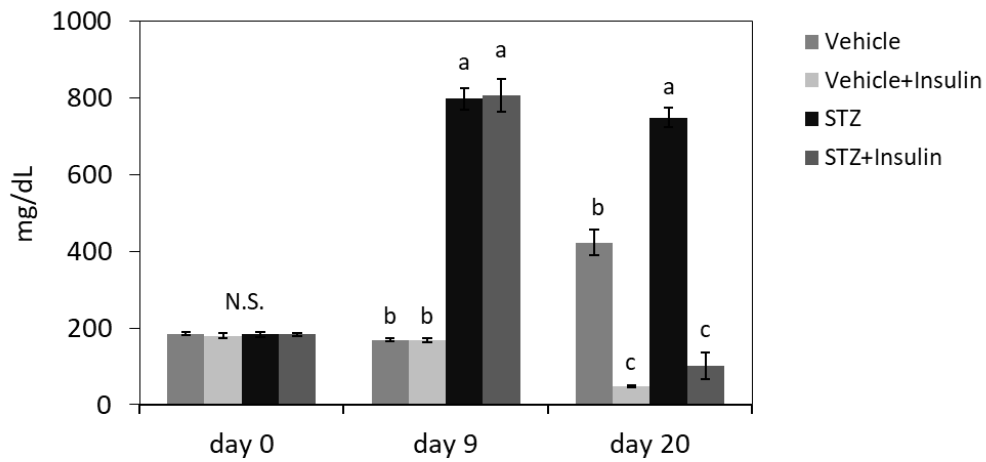


Fig. 11 血糖値推移

Day 0 および day 9 については尾静脈血を， day 20 については解剖時に心臓より採決した血液を用い血糖値を測定した。

異なる文字間に有意差あり ($p < 0.05$, Steel-Dwass multiple comparison test)。

測定値を平均値±標準誤差で示した (n=6-9)。

血糖値は STZ 投与群において，投与 9 日目までに有意な上昇がみられた。この血糖値上昇は，10 日目以降のインスリン投与により，解剖時には有意に低下した (**Fig. 11**)。

このことから，STZ 投与による I 型糖尿発症とインスリン補充による糖代謝の改善が確認された。

(3) ACMSD 活性

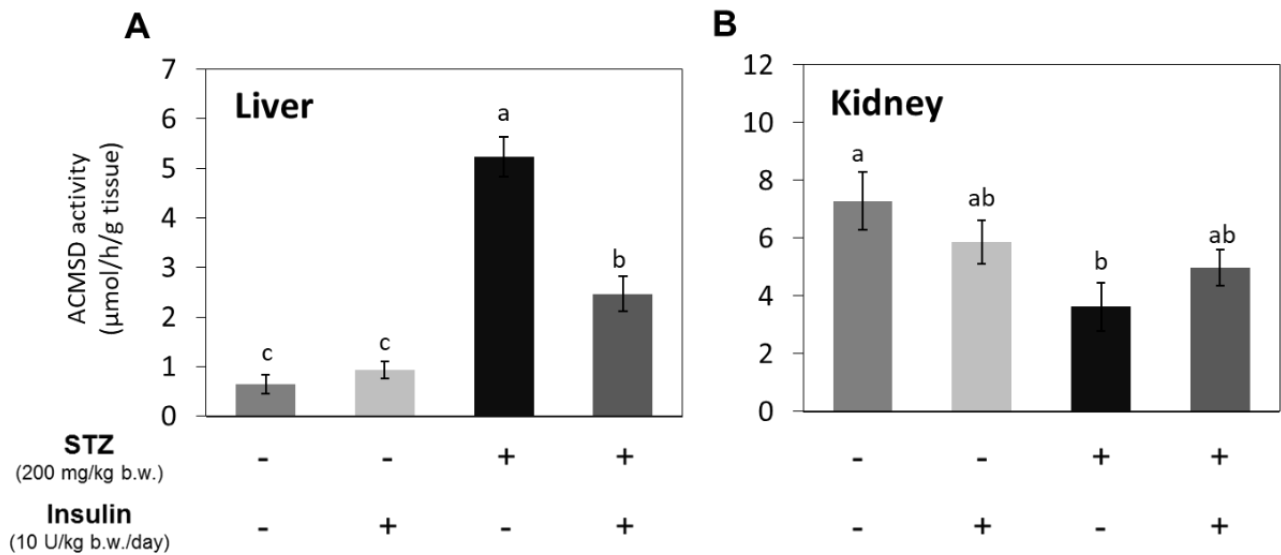


Fig. 12 ACMSD 活性

A. 肝臓, B. 腎臓.

活性値を平均値±標準誤差で示した (n=6-9).

異なる文字間に有意差あり ($p < 0.05$, Steel-Dwass multiple comparison test).

肝臓 ACMSD 酵素活性は STZ 投与により上昇し, インスリン投与により低下した (**Fig. 12A**). 一方, 腎臓における ACMSD 酵素活性は, STZ 投与群において vehicle 投与群と比較し低下したものの, インスリン投与による影響はみられなかった (**Fig. 12B**).

(4) 遺伝子発現

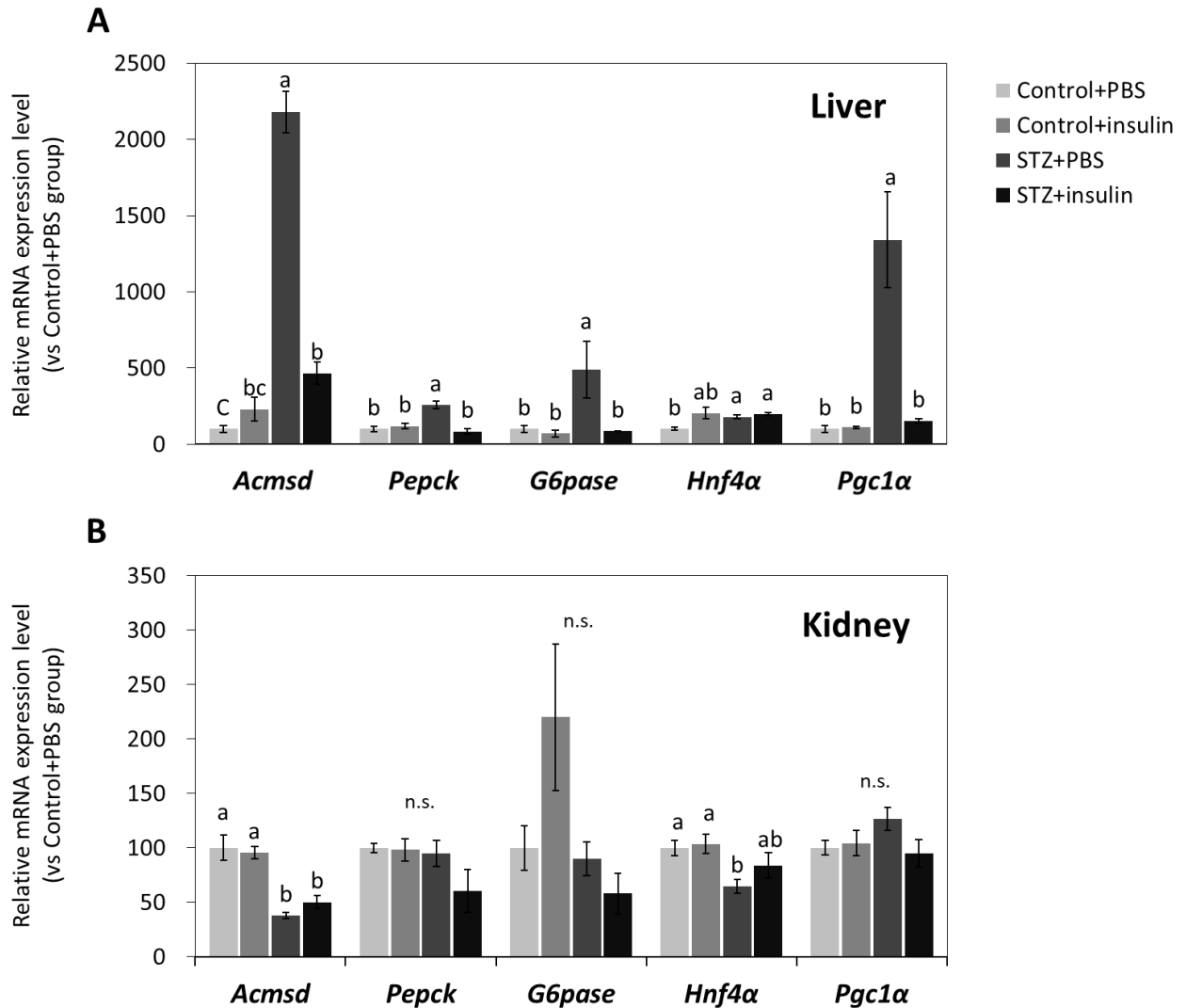


Fig. 13 遺伝子発現

A. 肝臓, B. 腎臓.

異なる文字間に有意差あり ($p < 0.05$, Steel-Dwass multiple comparison test).

各遺伝子の発現レベルを 18 S rRNA 発現レベルで補正し, 平均値±標準誤差で示した (n=6-9).

肝臓において, *Acmsd*, *Pepck*, *G6pase* および *Pgc1α* 発現は STZ 投与により有意に上昇したが, *HNF4α* 発現に変化は見られなかった (Fig. 13A). 一方, 腎臓においては, STZ 投与により *Acmsd* 発現が低下する傾向がみられた (Fig. 13B).

(5) タンパク質発現

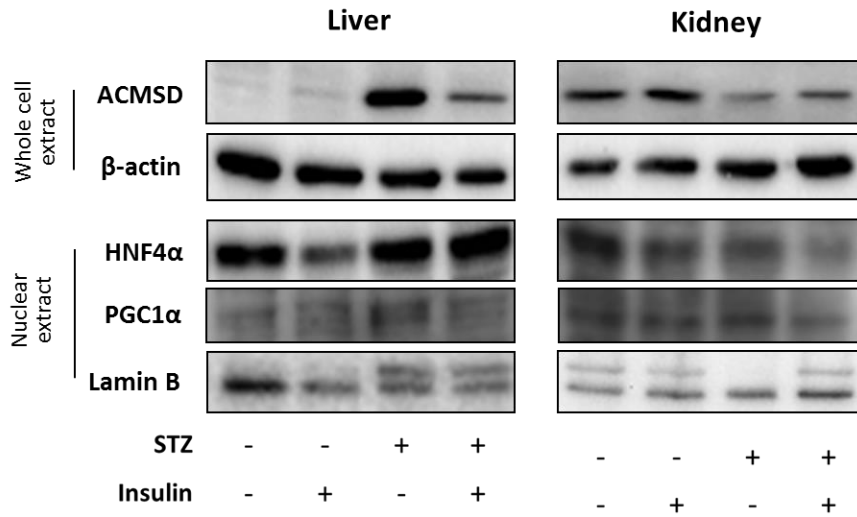


Fig. 14 肝臓および腎臓におけるタンパク質発現

肝臓における ACMSD, PGC1 α のタンパク質発現は mRNA 発現と同様の挙動を示したが, HNF4 α については, mRNA 発現の結果とは一致せず, STZ(-), インスリン(+) 群において発現が低下した (Fig. 14) .

2) レポーターアッセイ

(1) HNF4 α および PGC1 α 発現ベクター導入細胞における各タンパク質発現

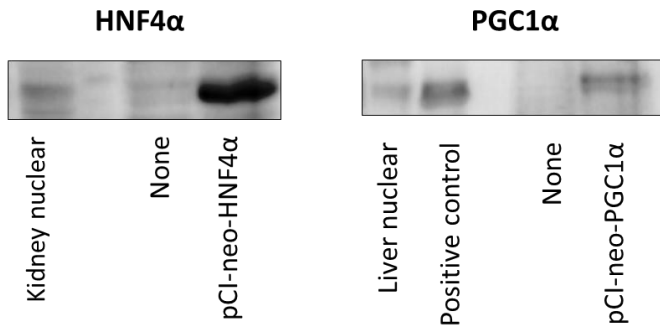


Fig. 15 HNF4 α および PGC1 α タンパク質発現

発現ベクター導入 24 h 後における NIH3T3 細胞中の HNF4 α および PGC1 α タンパク質発現 (各最右レーン).

HNF4 α および PGC1 α いずれのタンパク質についても、各発現ベクターの導入により発現の上昇が確認された (**Fig. 15**).

(2) ルシフェラーゼ活性測定

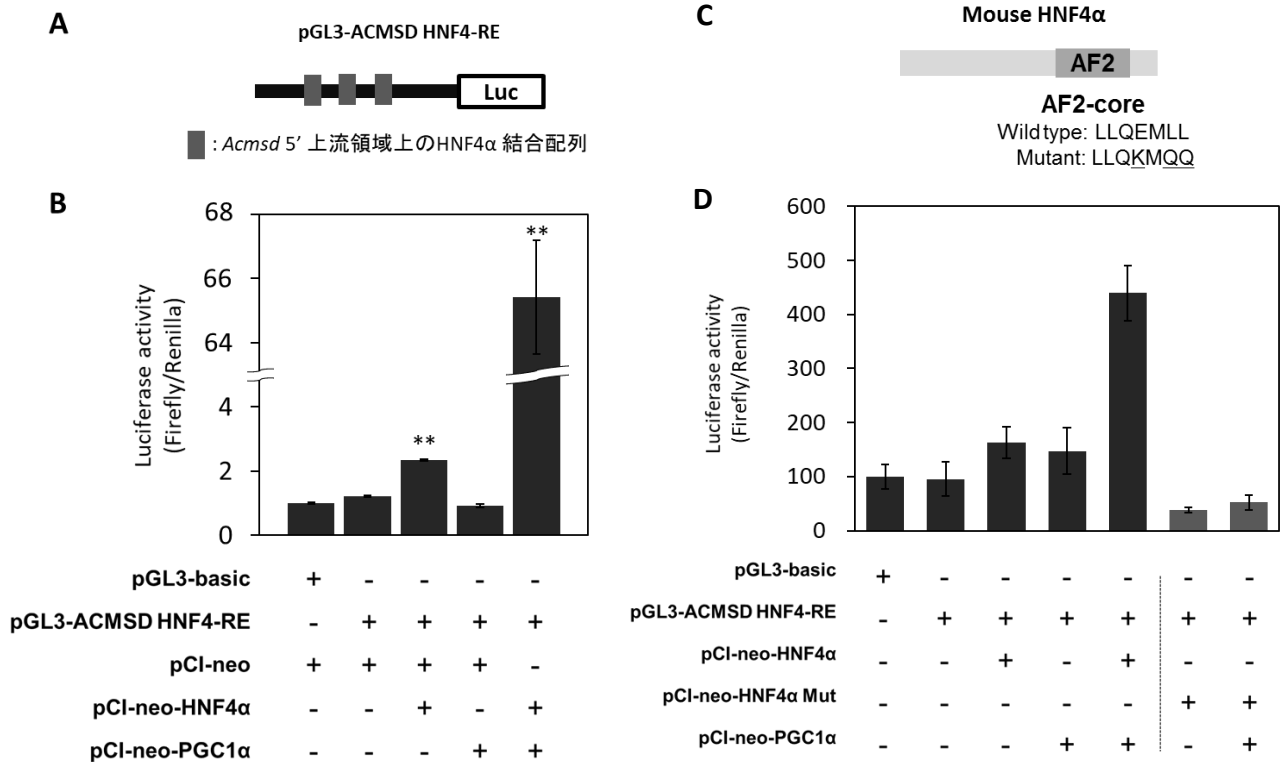


Fig. 16 レポーターアッセイ

A. レポーターベクターの構造, **B.** ルシフェラーゼ活性, **C.** マウス HNF4α タンパク質の構造, **D.** HNF4α 発現ベクターへの変異導入の影響. ** $p < 0.01$ vs. pGL3-ACMSD HNF4-RE/pCI-neo-co-transfected cells (Steel's multiple comparison test). ホタルルシフェラーゼ活性をウミシイタケルシフェラーゼ活性により補正した値を平均値±標準誤差で示した (n=6).

次に, マウス *Acmsd* 5' 転写調節領域における HNF4α および PGC1α のはたらきを明らかにすることを目的とし, レポーターアッセイを行った.

ルシフェラーゼ活性は HNF4α の強発現により有意に上昇し, HNF4α および PGC1α の共発現によって, より顕著な上昇を示した (**Fig. 16 B**). また, この活性上昇は HNF4α の活性化補助因子結合ドメインである AF2 への変異導入 (**Fig. 16 C**) により阻害された (**Fig. 16 D**).

3) 初代肝実質細胞への HNF4 α および PGC1 α 発現ベクター導入

(1) 遺伝子発現

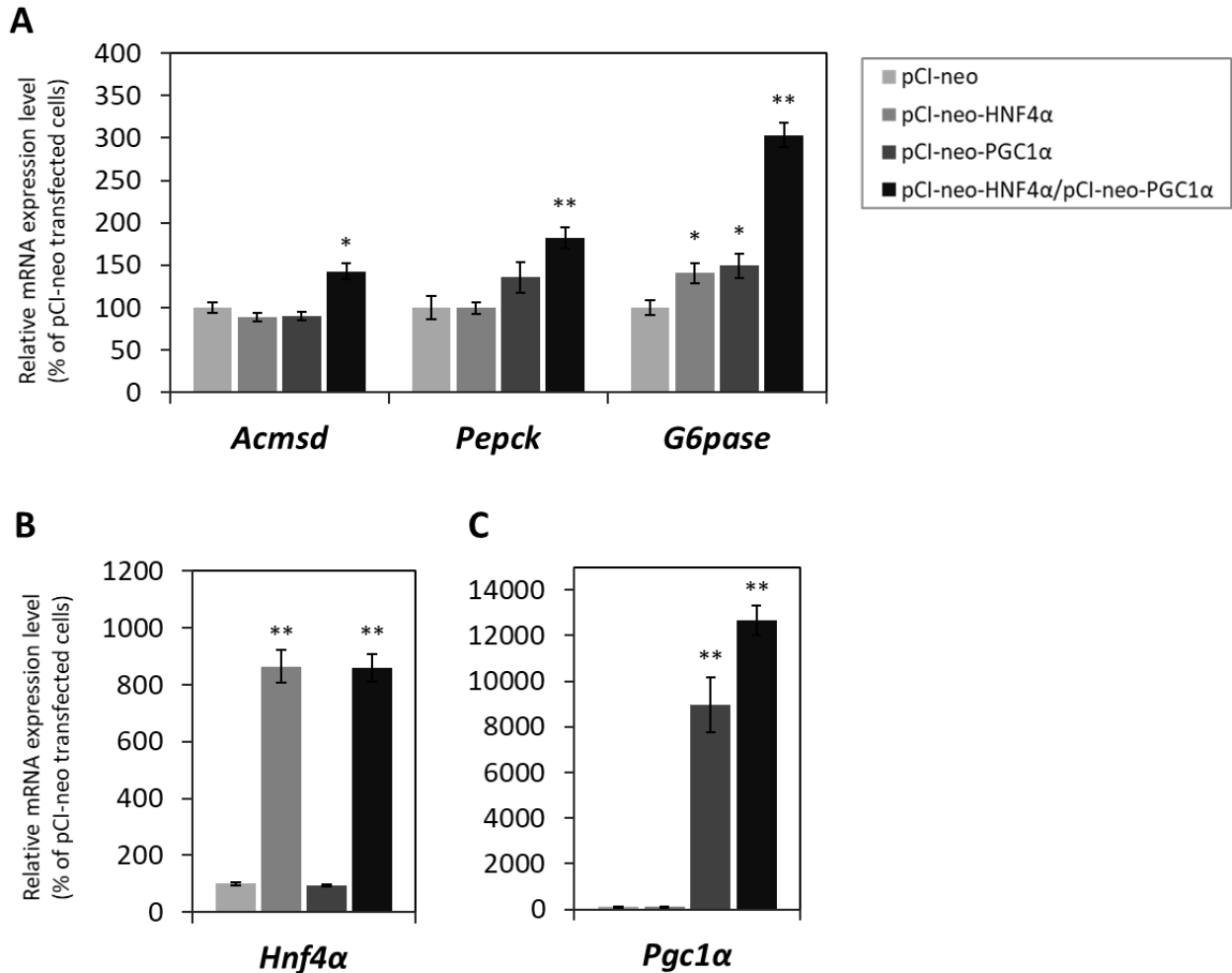


Fig. 17 遺伝子発現

A. *Hnf4 α* , B. *Pgc1 α* , C. *Acmsd*, *Pepck*, *G6pase*

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. pCI-neo-transfected cells (Steel's multiple comparison test), 各遺伝子の発現レベルを 18 S rRNA 発現レベルで補正し, 平均値 \pm 標準誤差で示した (n=6).

HNF4 α および PGC1 α 発現ベクターの導入により, 導入された各遺伝子の発現は上昇した (Fig. 17 B, C). また, *Acmsd*, *Pepck* ならびに *G6pase* 発現は, HNF4 α および PGC1 α の共発現により発現が誘導された (Fig. 17 A).

(2) タンパク質発現

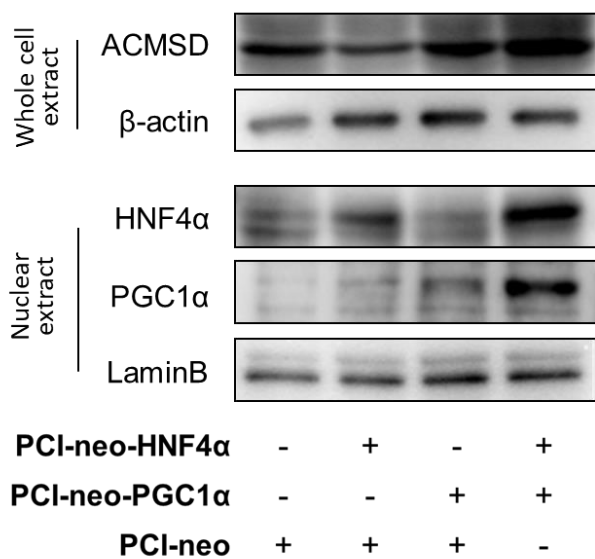


Fig. 18 タンパク質発現

HNF4α および PGC1α タンパク質発現は、各発現ベクターの導入により増加し、ACMSD 発現は HNF4α および PGC1α の共発現により顕著に増加した (Fig. 18).

4. 考察

ACMSD 発現制御に係る因子として、インスリンによる負の制御をはじめ、その制御に関与する複数の要因が知られているものの、その調節機序については未だ明らかにされていない。本研究ではまず、*Acmsd* 転写調節機構における既知のマスターレギュレータである HNF4 α 活性に影響を与える因子の存在を想定し、STZ 誘導性 I 型糖尿病モデルマウスを用いた実験を行った。

マウスへの STZ 投与により体重の低下および血糖値の上昇がみられ、インスリン投与開始後、体重の回復と血糖値の低下が確認された。解剖時、standard 群において血糖値が高い傾向を示したが、これは、解剖前の測定結果が尾静脈血を用いたものであるのに対し、解剖時の血液は心臓採血により得られたものであったことによると考えられた。また、本実験で用いた ICR 系統マウスは肥満が誘導されやすく、このことも高血糖値を示した原因であることが予想される。

ACMSD 活性、タンパク質および mRNA 発現は、肝臓においてのみ STZ 処理による上昇と、インスリン投与による低下が確認された。腎臓における ACMSD 活性および mRNA 発現は、STZ 処理によってやや低下したものの、インスリン投与による影響を受けなかった。このことから、肝臓における ACMSD 発現はインスリン刺激に依存する経路を介し制御されるが、腎臓においてはこの機構による制御を受けないことが示された。さらに、腎臓は糖尿病発症時における主要な病変臓器であることから、腎臓の機能低下もまた STZ 投与による ACMSD 発現低下の一因となった可能性が予想される。

肝臓における ACMSD 発現レベルは、*Acmsd* 転写制御機構におけるマスターレギュレータである転写因子 *Hnf4 α* mRNA 発現レベルとは相関がみられず、HNF4 α の活性化補助因子である *Pgcl α* mRNA 発現レベルに対し、強い相関が認められた。

また、平常時における *Hnf4 α* mRNA 発現レベルが肝臓と腎臓でほぼ同程度であったのに対し、平常時の *Pgcl α* mRNA 発現レベルは、腎臓において肝臓と比較しおよそ 100

倍の高値を示した（データ不掲載）。この結果もまた、平常時の ACMSD 発現レベルが肝臓と比較し、腎臓において高値を示すことと併せ、PGC1 α が ACMSD 発現制御に関与する可能性を示唆した。

これらの結果から、ACMSD 発現制御が HNF4 α 発現レベルに依存しない機序により制御され、この機序に PGC1 α が関与する可能性が示唆された。

さらに、HNF4 α と PGC1 α の協働により転写活性が亢進される *Pepck* および *G6pase* についても、*Acmsd* mRNA 発現レベルと同様の発現パターンを示した。

I型糖尿病モデルマウスを用いたこれらの結果から、*Acmsd* 転写調節機構においても、PGC1 α が HNF4 α 活性化を介した機序が存在することが予想された。

Acmsd 5'上流転写調節領域上の *Acmsd* 転写活性に影響を与えることが報告される既知の HNF4 α 応答配列を含むレポーターベクターを用い、HNF4 α および PGC1 α 過剰発現によるレポーター活性への影響を調べた結果、HNF4 α の過剰発現によりレポーター活性が有意に上昇し、この活性上昇は PGC1 α の共発現により促進された。また、このレポーター活性上昇は、HNF4 α タンパク質上の PGC1 α 結合配列 (AF2) [132, 133] への変異導入により阻害された。このことから、HNF4 α を介した *Acmsd* 発現転写調節には補助因子を介した HNF4 α 活性化が不可欠であることが示された。さらに、初代肝実質細胞を用いた実験においても、HNF4 α および PGC1 α の共発現により *Acmsd* mRNA およびタンパク質発現が上昇した。

これらの結果から、HNF4 α を介した *Acmsd* 転写活性化の一端に PGC1 α が関与することが示唆された。

今回の研究において HNF4 α と PGC1 α が関与する ACMSD 発現調節機構が明らかになったことにより、過去に報告された ACMSD 発現に影響を与える要因について、その制御機序解明につながる以下の示唆が得られた。

インスリンと ACMSD 発現制御との関係について、PGC1 α の関与を想定することで、

インスリンシグナルの下流に存在する FOXO1 を介した PGC1 α 発現抑制による機序や、インスリンシグナル経路上のタンパク質である Akt を介した PGC1 α タンパク質のリン酸化修飾による不安定化による機序が予想される [71, 135].

また、SREBP-2 は ACMSD 発現を抑制する可能性が報告されるとともに、インスリンによりその発現が上昇することが知られている [56, 136]. 既知の *Pepck* 転写活性制御機構において、HNF4 α と PGC1 α の結合は SREBP により阻害されることが報告されており、このことから、SREBP が関与する ACMSD 発現抑制においても同様の機構が存在する可能性が予想される [137].

また、PGC1 α により活性が調節される NR ヘテロダイマーには RXR/PPAR が含まれることから[138], PPAR α による *Acmsd* 転写抑制に際して、PGC1 α に対する競合を介した機構が関与することも想定される.

本研究の成果である PGC1 α が関与する ACMSD 発現調節機構は、炎症や栄養条件といった多様な要因と ACMSD 発現を結びつける新たな機序として予想され、トリプトファン代謝が関与する疾病の発症機序解明や予防の糸口となることが期待される.

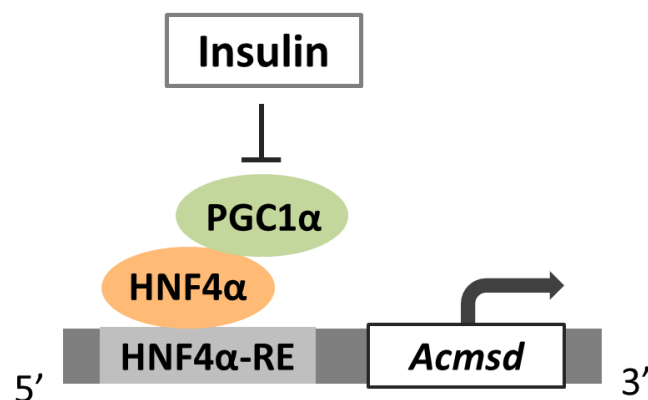


Fig. 19 インスリンによる *Acmsd* 転写調節機構

IV. 総合考察

本研究では、トリプトファン代謝における鍵酵素である IDO および ACMSD に着目し、その発現と炎症の関連や、発現制御機構に影響を与える因子およびその機序の解明を目的とした実験を行った。

中枢神経系におけるトリプトファン代謝変動については、神経変性疾患発症との関連が示唆されている。IDO および ACMSD はいずれも、疾病との関与が予想される代謝産物の産生量に影響を及ぼすトリプトファン代謝経路上の鍵酵素であることから、その発現調節に影響を及ぼす因子を明らかにすることは、神経変性疾患の病因の解明、予防の観点から意義を有する。

II 章では、マウスを用いた実験の結果から、FA の経口摂取により神経変性疾患の病変部位として知られる脳各部位において *Ido* mRNA 発現の抑制傾向がみられ、続くミクログリア細胞を用いた実験から、この抑制の一部はミクログリア細胞における炎症シグナル経路の阻害を介した *Ido* mRNA 発現低下を反映したものであることが示された。

また、炎症時のミクログリア細胞における ACMSD 発現変動についての報告は少ないものの、本研究の結果からは、炎症時の ACMSD 発現低下が QUIN 産生量の増加に寄与する可能性が示唆された。

この結果に関し、III 章で明らかになった ACMSD 発現調節機構において協働する HNF4 α および PGC1 α は、炎症性のシグナルの下流で発現および活性が抑制されることが知られている。HNF4 α 発現は、肝細胞において炎症性サイトカインである IL-1 β 誘導性の炎症条件下で JNK の活性化を介し発現が抑制される [139]。また、PGC1 α は TNF α および IL-1 β によりその発現が抑制されることが報告されており、これらのサイトカインはミクログリア細胞において、LPS によっても誘導されることが知られる [140, 141]。

また、翻訳後修飾による活性調節としては、HNF4 α において Erk や p38 MAPK、AMPK によるリン酸化修飾を介した不活化が知られる [142-144]。他方の PGC1 α においては、AMPK や p38 MAPK、PKA によるリン酸化修飾や、SIRT1 による脱アセチル

化を介した活性化のほか [145-148], AKT によるリン酸化修飾や GCN5 によるアセチル化修飾による不活化が報告されている [47, 149, 150].

このことから, II 章で得られた LPS による *Acmsd* 発現抑制もまた, HNF4 α および PGC1 α の発現低下または修飾を介した機序を介したものである可能性が示唆された.

実際に, LPS による炎症誘導時, ミクログリア細胞において Akt のリン酸化が促進されることが報告されており [135], Akt によるリン酸化修飾を介した PGC1 α の分解が, 炎症時のミクログリア細胞における *Acmsd* 発現低下の要因の 1 つとしてはたらく機序が予想される.

また, CYP7A1 の転写調節機構においては, JNK の下流に位置する c-Jun が PGC1 α の HNF4 α への結合を阻害することが報告されている [151]. これらの報告は, PGC1 α が炎症シグナル経路と ACMSD 発現調節を仲介する因子として機能しうることを示唆している. このことから, 本研究で確認された食品成分による炎症シグナル経路の阻害が ACMSD 発現抑制の阻害に対しても有効であることが予想される.

食品成分の疾病に対する作用は, 薬剤と比較し顕著なものではないが, 日々の摂取により発症前の予防が可能であるという点で有用であると考えられる. 特に, 神経変性疾患の多くでは, 発症に先駆け, ミクログリア細胞の活性化が起こるとの報告がなされており, 発症前の食生活を介した炎症抑制の疾病予防に対する有効性が予想されている.

本論文で示したように, トリプトファン代謝産物は多様な機構を介し疾病の成因に関与することが報告されており, 本研究において着目したトリプトファン代謝経路における 2 つの鍵酵素 IDO および ACMSD は, トリプトファン代謝の調節を介し疾病の発症に関与する.

本研究の結果から, IDO, ACMSD のいずれについても, その発現制御機構と栄養との間に関連が見出された. 本研究で取り扱った FA については, ミクログリア細胞において炎症時のトリプトファン代謝正常化に寄与したことから, 神経変性疾患の予防機能

を有する食品成分として、今後の活用が望まれる。また、*Acmsd* 転写調節機構への $PGC1\alpha$ の関与が示されたことは、栄養条件をはじめ、これまで作用点が不明であった多様な要因による ACMSD 発現調節機構の解明や、未だ不明な点も多い ACMSD のはたらしを明らかにする端緒となることが予想される。

本研究の成果が、食生活によるトリプトファン代謝鍵酵素の適切な発現制御を介し生体の恒常性維持や疾病予防に寄与する糸口となることを期待したい。

V. 謝辭

本論文を終えるにあたり，終始ひとからならぬご指導とご助力を賜った園芸学研究科食品栄養学研究室 江頭祐嘉合教授ならびに平井静准教授，ご多忙のなか主査および副査をお引き受けくださった華岡光正准教授ならびに中村郁郎教授，日々の研究室生活を支えてくださった食品栄養学研究室の皆様へ深く御礼申し上げます。

また，私事ではあるが，長い学生生活を見守り続けてくれた家族に対してもこの場を借りて謝意を表したい。

他人より長い学生生活のなかで，たくさんの方に出会い，支えていただいたことを忘れず，感謝の念を持ってこれからの糧とさせていただく所存である。

COI

本研究について、いかなる利益相反も存在しない。

VI. 参考文献

- [1] Stone TW, Darlington LG. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*. 1(8): 609-20 (2002)
- [2] Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield CA. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol*. 185(6):3190-8 (2010)
- [3] Okuda S, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. *J Neurochem*. 70(1):299-307(1998)
- [4] Guillemin GJ. Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS J*. 279(8): 1356-65 (2012)
- [5] Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ, Wu HQ. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat Rev Neurosci*. 13(7):465-77 (2012)
- [6] Sauve AA. NAD⁺ and vitamin B3: from metabolism to therapies. *J Pharmacol Exp Ther*. 324(3): 883-93 (2008)
- [7] Brown TM. Pellagra: an old enemy of timeless importance. *Psychosomatics*. 51(2): 93-7 (2010)
- [8] North BJ, Verdin E. Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol*. 5(5): 224 (2004)
- [9] Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem*. 23;277(34): 30409-12 (2002)
- [10] Wang L, Erlandsen H, Haavik J, Knappskog PM, Stevens RC. Three-dimensional structure of human tryptophan hydroxylase and its implications for the biosynthesis of the neurotransmitters serotonin and melatonin. *Biochemistry*. 41(42):12569-74 (2002)
- [11] Cervenka I, Agudelo LZ1, Ruas JL. Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. *Science*. 357(6349) (2017)
- [12] Keszthelyi D, Troost FJ, Masclee AA. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterol Motil*. 21(12):1239-49 (2009)

- [13] Jenkins TA, Nguyen JC2, Polglaze KE3, Bertrand PP. Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis. *Nutrients*. 8(1) (2016)
- [14] Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 37(1):13-25 (2010)
- [15] Le Floch N, Otten W, Merlot E. Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. *Amino Acids*. 41(5): 1195-205 (2011)
- [16] Thomas SR, Salahifar H, Mashima R, Hunt NH, Richardson DR, Stocker R. Antioxidants inhibit indoleamine 2,3-dioxygenase in IFN-gamma-activated human macrophages: posttranslational regulation by pyrrolidine dithiocarbamate. *J Immunol*. 166(10):6332-40 (2001)
- [17] Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*. 4(10):762-74 (2004)
- [18] Guillemin GJ, Smythe G, Takikawa O, Brew BJ. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia*. 49(1):15-23 (2005)
- [19] Zamanakou M, Germenis AE, Karanikas V. Tumor immune escape mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunol Lett*. 15;111(2):69-75 (2007)
- [20] Ligam P, Manuelpillai U, Wallace EM, Walker D. Localisation of indoleamine 2,3-dioxygenase and kynurenine hydroxylase in the human placenta and decidua: implications for role of the kynurenine pathway in pregnancy. *Placenta*. 26(6):498-504 (2005)
- [21] Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*. 9(10):1269-74 (2003)
- [22] Yong Wha Moon, Joud Hajjar, Patrick Hwu, and Aung Naing. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *J Immunother Cancer*. 3: 51 (2015)
- [23] Robertson SA, Guerin LR, Moldenhauer LM, Hayball JD. Activating T

regulatory cells for tolerance in early pregnancy - the contribution of seminal fluid. *J Reprod Immunol.* 83(1-2):109-16 (2009)

[24] Pucci L, Perozzi S, Cimadamore F, Orsomando G, Raffaelli N. Tissue expression and biochemical characterization of human 2-amino 3-carboxymuconate 6-semialdehyde decarboxylase, a key enzyme in tryptophan catabolism. *FEBS J.* 274(3): 827-40 (2007)

[25] Bender DA. Biochemistry of tryptophan in health and disease. *Mol Aspects Med.* 6(2):101-97 (1983)

[26] Bonda DJ, Mailankot M, Stone JG, Garrett MR, Staniszevska M, Castellani RJ, Siedlak SL, Zhu X, Lee HG, Perry G, Nagaraj RH, Smith MA. Indoleamine 2,3-dioxygenase and 3-hydroxykynurenine modifications are found in the neuropathology of Alzheimer's disease. *Redox Rep.* 15(4):161-8 (2010)

[27] Gulaj E, Pawlak K, Bien B, Pawlak D. Kynurenine and its metabolites in Alzheimer's disease patients. *Adv Med Sci.* 55(2):204-11 (2010)

[28] Guidetti P, Bates GP, Graham RK, Hayden MR, Leavitt BR, MacDonald ME, Slow EJ, Wheeler VC, Woodman B, Schwarcz R. Elevated brain 3-hydroxykynurenine and quinolinate levels in Huntington disease mice. *Neurobiol Dis.* 23(1):190-7 (2006)

[29] Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Spiden SL, Taylor R, Stone TW, Darlington LG. Blood levels of kynurenines, interleukin-23 and soluble human leucocyte antigen-G at different stages of Huntington's disease. *J Neurochem.* 112(1):112-22 (2010)

[30] Widner B, Leblhuber F, Fuchs D. Increased neopterin production and tryptophan degradation in advanced Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 109(2):181-9 (2002)

[31] Maddison DC, Giorgini F. The kynurenine pathway and neurodegenerative disease. *Semin Cell Dev Biol.* 40:134-41 (2015)

[32] Martí-Massó JF, Bergareche A, Makarov V, Ruiz-Martinez J, Gorostidi A, López de Munain A, Poza JJ, Striano P, Buxbaum JD, Paisán-Ruiz C. The ACMSD gene,

- involved in tryptophan metabolism, is mutated in a family with cortical myoclonus, epilepsy, and parkinsonism. *J Mol Med (Berl)*. 91(12):1399-406 (2013)
- [33] Thirtamara-Rajamani K, Li P, Escobar Galvis ML, Labrie V, Brundin P, Brundin L. Is the Enzyme ACMSD a Novel Therapeutic Target in Parkinson's Disease? *J Parkinsons Dis*. 7(4):577-587 (2017)
- [34] Maes M, Leonard BE, Myint AM, Kubera M, Verkerk R. The new '5-HT' hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 35(3):702-21 (2011)
- [35] Oxenkrug GF. Tryptophan kynurenine metabolism as a common mediator of genetic and environmental impacts in major depressive disorder: the serotonin hypothesis revisited 40 years later. *Isr J Psychiatry Relat Sci*. 47(1):56-63 (2010)
- [36] Lapin IP, Oxenkrug GF. Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. *Lancet*. 1(7586):132-6 (1969)
- [37] Mukai M, Tischkau SA. Effects of tryptophan photoproducts in the circadian timing system: searching for a physiological role for aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Sci*. 95(1):172-81(2007)
- [38] Esteban S, Nicolaus C, Garmundi A, Rial RV, Rodríguez AB, Ortega E, Ibars CB. Effect of orally administered L-tryptophan on serotonin, melatonin, and the innate immune response in the rat. *Mol Cell Biochem*. 267(1-2):39-46 (2004)
- [39] Paredes SD, Marchena AM, Bejarano I, Espino J, Barriga C, Rial RV, Reiter RJ, Rodríguez AB. Melatonin and tryptophan affect the activity-rest rhythm, core and peripheral temperatures, and interleukin levels in the ringdove: changes with age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 64(3):340-50 (2009)
- [40] Chatteraj A, Liu T, Zhang LS, Huang Z, Borjigin J. Melatonin formation in mammals: in vivo perspectives. *Rev Endocr Metab Disord*. 10(4):237-43 (2009)
- [41] Sugden D. Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR. *J Neurochem*.

86(5):1308-11 (2003)

[42] Ganguly S, Coon SL, Klein DC. Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res.* 309(1):127-37 (2002)

[43] Maury E, Ramsey KM, Bass J. Circadian rhythms and metabolic syndrome: from experimental genetics to human disease. *Circ Res.* 106(3):447-62 (2010)

[44] Savvidis C, Koutsilieris M. Circadian rhythm disruption in cancer biology. *Mol Med.* 18: 1249-60 (2012)

[45] Wulff K, Gatti S, Wettstein JG, Foster RG. Sleep and circadian rhythm disruption in psychiatric and neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci.* 11(8):589-99 (2010)

[46] Campbell BM, Charych E, Lee AW, Möller T. Kynurenines in CNS disease: regulation by inflammatory cytokines. *Front Neurosci.* 8:12 (2014)

[47] Myint AM, Kim YK. Cytokine-serotonin interaction through IDO: a neurodegeneration hypothesis of depression. *Med Hypotheses.* 61(5-6):519-25 (2003)

[48] Lugo-Huitrón R, Ugalde Muñoz P, Pineda B, Pedraza-Chaverrí J, Ríos C, Pérez-de la Cruz V. Quinolinic acid: an endogenous neurotoxin with multiple targets. *Oxid Med Cell Longev.* 2013:104024 (2013)

[49] Fujigaki H, Saito K, Fujigaki S, Takemura M, Sudo K, Ishiguro H, Seishima M. The signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 are not essential for the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB pathways, and synergistic effect of several proinflammatory cytokines. *J Biochem.* 139(4):655-62 (2006)

[50] Streit WJ, Braak H, Xue QS, Bechmann I. Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 118(4):475-85 (2009)

[51] Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, Wilson B, Zhang W, Zhou Y, Hong JS, Zhang J. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process

- leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J.* 19(6):533-42 (2005)
- [52] Tanabe A, Egashira Y, Fukuoka S, Shibata K, Sanada H. Expression of rat hepatic 2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase is affected by a high protein diet and by streptozotocin-induced diabetes. *J Nutr.* 132(6):1153-9 (2002)
- [53] Sanada H, Miyazaki M. Effect of high-protein diet on liver alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde decarboxylase in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 30(2):113-23 (1984)
- [54] Egashira Y, Ogawara R, Ohta T, Sanada H. Suppression of Rat Hepatic α -Amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde Decarboxylase (ACMSD) Activity by Linoleic Acid in Relation to Its Induction by Glucocorticoids and Dietary Protein. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58(2), 339-343 (1994)
- [55] Egashira Y, Yamamiya Y, Sanada H. Effects of Various Dietary Fatty Acids on α -Amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde Decarboxylase Activity in Rat Liver. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:12, 2015-2019 (1992)
- [56] Matsuda H, Sato M, Yakushiji M, Koshiguchi M, Hirai S, Egashira Y. Regulation of rat hepatic α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde decarboxylase, a key enzyme in the tryptophan- NAD pathway, by dietary cholesterol and sterol regulatory element-binding protein-2. *Eur J Nutr.* 53(2):469-77 (2014)
- [57] Matsuda H, Gomi RT, Hirai S, Egashira Y. Effect of dietary phytol on the expression of α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde decarboxylase, a key enzyme of tryptophan-niacin metabolism, in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 77(7):1416-9 (2013)
- [58] Sasaki N, Egashira Y, Sanada H. Down-regulation of alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde decarboxylase by polyunsaturated fatty acids in hepatocytes is not mediated by PPARalpha. *Eur J Nutr.* 47(2):80-6 (2008)
- [59] Knight BL, Hebbachi A, Hauton D, Brown AM, Wiggins D, Patel DD, Gibbons GF. A role for PPARalpha in the control of SREBP activity and lipid synthesis in the liver. *Biochem J.* 389 (Pt 2):413-21 (2005)

- [60] Shin M, Kim I, Inoue Y, Kimura S, Gonzalez FJ. Regulation of mouse hepatic alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde decarboxylase, a key enzyme in the tryptophan-nicotinamide adenine dinucleotide pathway, by hepatocyte nuclear factor 4alpha and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Mol Pharmacol.* (4):1281-90 (2006)
- [61] Tanaka T, Jiang S, Hotta H, Takano K, Iwanari H, Sumi K, Daigo K, Ohashi R, Sugai M, Ikegame C, Umezu H, Hirayama Y, Midorikawa Y, Hippo Y, Watanabe A, Uchiyama Y, Hasegawa G, Reid P, Aburatani H, Hamakubo T, Sakai J, Naito M, Kodama T. Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha in the pathogenesis of human cancer. *J Pathol.* 208(5):662-72 (2006)
- [62] Miura A, Yamagata K, Kakei M, Hatakeyama H, Takahashi N, Fukui K, Nammo T, Yoneda K, Inoue Y, Sladek FM, Magnuson MA, Kasai H, Miyagawa J, Gonzalez FJ, Shimomura I. Hepatocyte nuclear factor-4alpha is essential for glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 281(8):5246-57 (2006)
- [63] Louet JF, Hayhurst G, Gonzalez FJ, Girard J, Decaux JF. The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB). *J Biol Chem.* 277 (41): 37991-8000 (2002)
- [64] Yu L, Wang Z, Huang M, Li Y, Zeng K, Lei J, Hu H, Chen B, Lu J, Xie W, Zeng S. Evodia alkaloids suppress gluconeogenesis and lipogenesis by activating the constitutive androstane receptor. *Biochim Biophys Acta.* 1859(9):1100-1111 (2016)
- [65] Martínez-Jiménez CP, Castell JV, Gómez-Lechón MJ, Jover R. Transcriptional activation of CYP2C9, CYP1A1, and CYP1A2 by hepatocyte nuclear factor 4alpha requires coactivators peroxisomal proliferator activated receptor-gamma coactivator 1alpha and steroid receptor coactivator 1. *Mol Pharmacol.* 70(5):1681-92 (2006)
- [66] Dean S, Tang JI, Seckl JR, Nyirenda MJ. Developmental and tissue-specific regulation of hepatocyte nuclear factor 4-alpha (HNF4-alpha) isoforms in rodents.

Gene Expr. 14(6):337-44 (2010)

[67] Bailly A, Briançon N, Weiss MC. Characterization of glucocorticoid receptor and hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) binding to the hnf4alpha gene in the liver. *Biochimie.* 91(9):1095-103 (2009)

[68] Kulkarni RN, Kahn CR. Molecular biology. HNFs--linking the liver and pancreatic islets in diabetes. *Science.* 303(5662):1311-2 (2004)

[69] Maeda Y, Hwang-Verslues WW, Wei G, Fukazawa T, Durbin ML, Owen LB, Liu X, Sladek FM. Tumour suppressor p53 down-regulates the expression of the human hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) gene. *Biochem J.* 400(2):303-13 (2006)

[70] Cicchini C, Filippini D, Coen S, Marchetti A, Cavallari C, Laudadio I, Spagnoli FM, Alonzi T, Tripodi M. Snail controls differentiation of hepatocytes by repressing HNF4alpha expression. *J Cell Physiol.* 209(1):230-8 (2006)

[71] Xie X, Liao H, Dang H, Pang W, Guan Y, Wang X, Shyy JY, Zhu Y, Sladek FM. Down-regulation of hepatic HNF4alpha gene expression during hyperinsulinemia via SREBPs. *Mol Endocrinol.* 23(4):434-43 (2009)

[72] Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* 81(3):1269-304 (2001)

[73] Jiang G, Nepomuceno L, Hopkins K, Sladek FM. Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors. *Mol Cell Biol.* 15(9):5131-43 (1995)

[74] Jiang G, Sladek FM. The DNA binding domain of hepatocyte nuclear factor 4 mediates cooperative, specific binding to DNA and heterodimerization with the retinoid X receptor alpha. *J Biol Chem.* 272(2):1218-25 (1997)

[75] Rastinejad F. Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr Opin Struct Biol.* 11(1):33-8 (2001)

[76] Fang B, Mane-Padros D, Bolotin E, Jiang T, Sladek FM. Identification of a binding motif specific to HNF4 by comparative analysis of multiple nuclear receptors. *Nucleic Acids Res.* 40(12):5343-56 (2012)

[77] Tunçer S, Banerjee S. HNF4A (Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha) *Atlas Genet Cytogenet*

Oncol Haematol. 21(2) 44 (2017)

[78] Hertz R, Magenheim J, Berman I, Bar-Tana J. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature.* 392(6675):512-6 (1998)

[79] Wisely GB, Miller AB, Davis RG, Thornquest AD Jr, Johnson R, Spitzer T, Sefler A, Shearer B, Moore JT, Miller AB, Willson TM, Williams SP. Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor that constitutively binds fatty acids. *Structure.* 10(9):1225-34 (2002)

[80] Lee YK, Dell H, Dowhan DH, Hadzopoulou-Cladaras M, Moore DD. The orphan nuclear receptor SHP inhibits hepatocyte nuclear factor 4 and retinoid X receptor transactivation: two mechanisms for repression. *Mol Cell Biol.* 20(1):187-95 (2000)

[81] Martínez-Jiménez CP, Castell JV, Gómez-Lechón MJ, Jover R. Transcriptional activation of CYP2C9, CYP1A1, and CYP1A2 by hepatocyte nuclear factor 4alpha requires coactivators peroxisomal proliferator activated receptor-gamma coactivator 1alpha and steroid receptor coactivator 1. *Mol Pharmacol.* 70(5):1681-92 (2006)

[82] Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 92(6):829-39 (1998)

[83] Ruas JL, White JP, Rao RR, Kleiner S, Brannan KT, Harrison BC, Greene NP, Wu J, Estall JL, Irving BA, Lanza IR, Rasbach KA, Okutsu M, Nair KS, Yan Z, Leinwand LA, Spiegelman BM. A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell.* 151(6):1319-31 (2012)

[84] Gibala MJ1, McGee SL, Garnham AP, Howlett KF, Snow RJ, Hargreaves M. Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1alpha in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 106(3):929-34 (2009)

[85] Akimoto T, Pohnert SC, Li P, Zhang M, Gumbs C, Rosenberg PB, Williams RS, Yan Z. Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem.* 280(20):19587-93 (2005)

[86] Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev.* 88(2):611-38 (2008)

- [87] Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, Spiegelman BM. An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(12):7111-6 (2003)
- [88] Lee YM, Lee JO, Jung JH, Kim JH, Park SH, Park JM, Kim EK, Suh PG, Kim HS. Retinoic acid leads to cytoskeletal rearrangement through AMPK-Rac1 and stimulates glucose uptake through AMPK-p38 MAPK in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*. 283(49):33969-74 (2008)
- [89] Ihsan M, Markworth JF, Watson G, Choo HC, Govus A, Pham T, Hickey A, Cameron-Smith D, Abbiss CR. Regular postexercise cooling enhances mitochondrial biogenesis through AMPK and p38 MAPK in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 309(3):R286-94 (2015)
- [90] Hondares E, Rosell M, Díaz-Delfín J, Olmos Y, Monsalve M, Iglesias R, Villarroya F, Giralt M. Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) induces PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *J Biol Chem*. 286(50):43112-22 (2011)
- [91] Cao W, Daniel KW, Robidoux J, Puigserver P, Medvedev AV, Bai X, Floering LM, Spiegelman BM, Collins S. p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol*. 24(7):3057-67 (2004)
- [92] Zhou XY, Shibusawa N, Naik K, Porras D, Temple K, Ou H, Kaihara K, Roe MW, Brady MJ, Wondisford FE. Insulin regulation of hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB-binding protein. *Nat Med*. 10(6):633-7 (2004)
- [93] Dankel SN, Hoang T, Flåeng MH, Sagen JV, Mellgren G. cAMP-mediated regulation of HNF-4 α depends on the level of coactivator PGC-1 α . *Biochim Biophys Acta*. 1803(9):1013-9 (2010)
- [94] He L, Sabet A, Djedjos S, Miller R, Sun X, Hussain MA, Radovick S, Wondisford FE. Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein. *Cell*. 137(4):635-46 (2009)

- [95] Zhang Y, Ugucioni G, Ljubcic V, Irrcher I, Iqbal S, Singh K, Ding S, Hood DA. Multiple signaling pathways regulate contractile activity-mediated PGC-1 α gene expression and activity in skeletal muscle cells. *Physiol Rep.* 2(5). pii: e12008 (2014)
- [96] Rha GB, Wu G, Shoelson SE, Chi YI. Multiple binding modes between HNF4 α and the LXXLL motifs of PGC-1 α lead to full activation. *J Biol Chem.* 284(50):35165-76 (2009)
- [97] Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol.* 25(4):1354-66 (2005)
- [98] Schreiber SN, Emter R, Hock MB, Knutti D, Cardenas J, Podvinec M, Oakeley EJ, Kralli A. The estrogen-related receptor alpha (ERR α) functions in PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(17):6472-7 (2004)
- [99] Jang WG, Kim EJ, Park KG, Park YB, Choi HS, Kim HJ, Kim YD, Kim KS, Lee KU, Lee IK. Glucocorticoid receptor mediated repression of human insulin gene expression is regulated by PGC-1 α . *Biochem Biophys Res Commun.* 352(3):716-21 (2007)
- [100] Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature.* 423(6939):550-5 (2003)
- [101] Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med.* 19(10):1252-63 (2013)
- [102] Mounier C, Posner BI. Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. *Can J Physiol Pharmacol.* 84(7):713-24 (2006)
- [103] Yamamoto R, Yamamoto Y, Imai S, Fukutomi R, Ozawa Y, Abe M, Matuo Y, Saito K. Effects of various phytochemicals on indoleamine 2,3-dioxygenase 1 activity: galanal is a novel, competitive inhibitor of the enzyme. *PLoS One.* 9(2):e88789 (2014)
- [104] T. Higuchi. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood*

Science and Technology. 24 (1):23–63 (1990)

[105] Zhao Z, Moghadasian MH. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chem*. 109(4):691-702 (2008)

[106] Kikuzaki H, Hisamoto M, Hirose K, Akiyama K, Taniguchi H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J Agric Food Chem*. 50(7):2161-8 (2002)

[107] Scott BC, Butler J, Halliwell B, Aruoma OI. Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins. *Free Radic Res Commun*. 19(4):241-53 (1993)

[108] Kanski J, Aksenova M, Stoyanova A, Butterfield DA. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies. *J Nutr Biochem*. 13(5):273-281 (2002)

[109] Sudheer AR, Muthukumaran S, Devipriya N, Devaraj H, Menon VP. Influence of ferulic acid on nicotine-induced lipid peroxidation, DNA damage and inflammation in experimental rats as compared to N-acetylcysteine. *Toxicology*. 243(3):317-29 (2008)

[110] Jin Son M, W Rico C, Hyun Nam S, Young Kang M. Influence of oryzanol and ferulic Acid on the lipid metabolism and antioxidative status in high fat-fed mice. *J Clin Biochem Nutr*. 46(2):150-6 (2010)

[111] Suzuki A, Kagawa D, Fujii A, Ochiai R, Tokimitsu I, Saito I. Short- and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 15(4 Pt 1):351-7 (2002)

[112] Ardiansyah, Ohsaki Y, Shirakawa H, Koseki T, Komai M. Novel effects of a single administration of ferulic acid on the regulation of blood pressure and the hepatic lipid metabolic profile in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem*. 56(8):2825-30 (2008)

[113] Jung EH1, Kim SR, Hwang IK, Ha TY. Hypoglycemic effects of a phenolic acid fraction of rice bran and ferulic acid in C57BL/KsJ-db/db mice. *J Agric Food Chem*.

55(24):9800-4 (2007)

[114] Qin J, Chen D, Hu H, Qiao M, Zhao X, Chen B. Body distribution of RGD-mediated liposome in brain-targeting drug delivery. *Yakugaku Zasshi*. 127(9):1497-501 (2007)

[115] Tsai FS, Wu LY, Yang SE, Cheng HY, Tsai CC, Wu CR, Lin LW. Ferulic acid reverses the cognitive dysfunction caused by amyloid β peptide 1-40 through antioxidant activity and cholinergic activation in rats. *Am J Chin Med*. 43(2):319-35 (2015)

[116] Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res*. 12(1):9-18 (2002)

[117] Karin M, Greten FR. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*. 5(10):749-59 (2005)

[118] Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor- κ B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 17(1):3-9 (1997)

[119] Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 3(11):859-68 (2003)

[120] Nakamichi K, Saiki M, Kitani H, Kuboyama Y, Morimoto K, Takayama-Ito M, Kurane I. Suppressive effect of simvastatin on interferon- β -induced expression of CC chemokine ligand 5 in microglia. *Neurosci Lett*. 407(3):205-10 (2006)

[121] Takenouchi T, Ogihara K, Sato M, Kitani H. Inhibitory effects of U73122 and U73343 on Ca^{2+} influx and pore formation induced by the activation of P2X7 nucleotide receptors in mouse microglial cell line. *Biochim Biophys Acta*. 1726(2):177-86 (2005)

[122] Guevara I, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, Gołabek I, Bartuś S, Malczewska-Malec M, Szczudlik A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta*. 274(2):177-88 (1998)

[123] Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*. 10 Suppl: S10-7 (2004)

- [124] Myint AM, Kim YK. Cytokine-serotonin interaction through IDO: a neurodegeneration hypothesis of depression. *Med Hypotheses*. 61(5-6):519-25 (2003)
- [125] Chen Y, Brew BJ, Guillemin GJ. Characterization of the kynurenine pathway in NSC-34 cell line: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 118(5):816-25 (2011)
- [126] Potter MC, Elmer GI, Bergeron R, Albuquerque EX, Guidetti P, Wu HQ, Schwarcz R. Reduction of endogenous kynurenic acid formation enhances extracellular glutamate, hippocampal plasticity, and cognitive behavior. *Neuropsychopharmacology*. 35(8):1734-42 (2010)
- [127] Julliard W, Fechner JH, Mezrich JD. The aryl hydrocarbon receptor meets immunology: friend or foe? A little of both. *Front Immunol*. 5:458 (2014)
- [128] Nakagawa Y, Chiba K. Role of microglial m1/m2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharmaceuticals (Basel)*. 7(12):1028-48 (2014)
- [129] Zhao Z, Egashira Y, Sanada H. Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. *J Nutr*. 134(11):3083-8 (2004)
- [130] Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 51(2):216-26 (2008)
- [131] Ichiyama A, Nakamura S, Kawai H, Honjo T, Nishizuka Y, Hayaishi O, Senoh S. Studies on the Metabolism of the Benzene Ring of Tryptophan in Mammalian Tissues. II. Enzymic Formation of Alpha-Aminomuconic Acid from 3-Hydroxyanthranilic Acid. *J Biol Chem*. 240:740-9 (1965)
- [132] Iyemere VP, Davies NH, Brownlee GG. The activation function 2 domain of hepatic nuclear factor 4 is regulated by a short C-terminal proline-rich repressor domain. *Nucleic Acids Res*. 1;26(9):2098-104 (1998)
- [133] J. Eeckhoutte, P. Formstecher, and B. Laine. Hepatocyte Nuclear Factor 4 α enhances the Hepatocyte Nuclear Factor 1 α -mediated activation of transcription. *Nucleic Acids Res*. 32(8): 2586–2593 (2004)

- [134] Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Moore DD, Auwerx J. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest.* 113(10):1408-18 (2004)
- [135] Moreno M, Lombardi A, Silvestri E, Senese R, Cioffi F, Goglia F, Lanni A, de Lange P. PPARs: Nuclear Receptors Controlled by, and Controlling, Nutrient Handling through Nuclear and Cytosolic Signaling. *PPAR Res.* pii: 435689 (2010)
- [136] Guillemin GJ, Smythe G, Takikawa O, Brew BJ. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia.* 49(1):15-23 (2005)
- [137] Yamamoto T, Shimano H, Nakagawa Y, Ide T, Yahagi N, Matsuzaka T, Nakakuki M, Takahashi A, Suzuki H, Sone H, Toyoshima H, Sato R, Yamada N. SREBP-1 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 alpha and interferes with PGC-1 recruitment to suppress hepatic gluconeogenic genes. *J Biol Chem.* 279(13):12027-35 (2004)
- [138] Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest.* 116(3):615-22 (2006)
- [139] Jahan A, Chiang JY. Cytokine regulation of human sterol 12alpha-hydroxylase (CYP8B1) gene. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 288(4):G685-95 (2005)
- [140] Kim MS, Sweeney TR, Shigenaga JK, Chui LG, Moser A, Grunfeld C, Feingold KR. Tumor necrosis factor and interleukin 1 decrease RXRalpha, PPARalpha, PPARgamma, LXRAalpha, and the coactivators SRC-1, PGC-1alpha, and PGC-1beta in liver cells. *Metabolism.* 56(2):267-79 (2007)
- [141] Wilms H, Sievers J, Rickert U, Rostami-Yazdi M, Mrowietz U, Lucius R. Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. *J Neuroinflammation.* 7:30 (2010)
- [142] Yang YM, Noh K, Han CY, Kim SG. Transactivation of genes encoding for phase II enzymes and phase III transporters by phytochemical antioxidants. *Molecules.* 15(9):6332-48 (2010)

- [143] Han S, Li T, Ellis E, Strom S, Chiang JY. A novel bile acid-activated vitamin D receptor signaling in human hepatocytes. *Mol Endocrinol.* 24(6):1151-64 (2010)
- [144] McGee SL, Hargreaves M. AMPK and transcriptional regulation. *Front Biosci.* 3:3022-33 (2008)
- [145] Jäger S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(29):12017-22 (2007)
- [146] Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB, Spiegelman BM. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell.* 8(5):971-82 (2001)
- [147] Sharma V, Dhillon P, Parsons H, Allard MF, McNeill JH. Metoprolol represses PGC1alpha-mediated carnitine palmitoyltransferase-1B expression in the diabetic heart. *Eur J Pharmacol.* 607(1-3):156-66 (2009)
- [148] Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature.* 434(7029):113-8 (2005)
- [149] Li X, Monks B, Ge Q, Birnbaum MJ. Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator. *Nature.* 447(7147):1012-6 (2007)
- [150] Xiong S, Salazar G, San Martin A, Ahmad M, Patrushev N, Hilenski L, Nazarewicz RR, Ma M, Ushio-Fukai M, Alexander RW. PGC-1 alpha serine 570 phosphorylation and GCN5-mediated acetylation by angiotensin II drive catalase down-regulation and vascular hypertrophy. *J Biol Chem.* 285(4):2474-87 (2010)
- [151] Li T, Jahan A, Chiang JY. Bile acids and cytokines inhibit the human cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene via the JNK/c-jun pathway in human liver cells. *Hepatology.* 43(6):1202-10 (2006)