The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Anserine及びCarnosineの生合成経路に関する研究
Author(s)	玉木, 七八
Citation	大阪大学, 1971, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27719
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

Anserine 及び Carnosine の生合成経路に関する研究

玉　木　七　八

9

目　　次

第一編　緒　　論 …… 1

第二編　本　　論 …… 4

第一章　Carnosine 関連 N-α-Aminoacyl Histidine の in vitro 生合成の検討 …… 4

第一節　^{131}I 標識 5-Monoiodohistidine 及びヨウ素化 Carnosine の合成 …… 4

第二節　^{131}I で標識された Histidine を利用する in vitro での Histidine の Biochemical な N-α-Aminoacylation …… 6

第二章　Carnosine 及び Anserine の前駆物質としての β-L-Aspartyl-L-Histidine の検討 …… 11

第一節　D, L-Aspartic Acid〔3-^{14}C〕及び L-Leucine〔U-^{14}C〕のラット各臓器 Carnosine 及び Anserine へのとり込み …… 12

第二節　β-L-Aspartyl-L-Histidine の α-脱炭酸反応による Carnosine への変換の可能性 …… 15

第三章　Orotic acid〔6-^{14}C〕の β-Alanine, Anserine 及び Carnosine へのとり込みによる Uracil 分解系と Anserine, Carnosine 形成系の検討 …… 20

第一節　Orotic acid〔6-^{14}C〕の Anserine 及び Carnosine への Incorporation と Actinomycin D もしくは 6-Azauracil 阻害の影響 …… 21

第四章　Carbamyl Aspartic Acid〔2-^{14}C〕の直接の α-脱炭酸反応による Carbamyl β-Alanine の形成の検討 …… 34

第一節　Carbamyl Aspartic Acid〔2-^{14}C〕の β-Alanine, Anserine 及び Carnosine へのとり込み …… 35

第二節　Carbamyl Aspartic Acid の脱炭酸反応による Carbamyl β-Alanine 及び β-Alanine 形成の検討 …… 37

第五章　Anserine の Carnosine への変換の証明 …… 42
第一節　Anserine 及び Carnosine の三重水素化 …… 42
第二節　三重水素標識 Anserine もしくは Carnosine 投与時の
ラット肝臓及び腓腸筋中での相互変換 …… 43
第六章　β－Alanine，Anserine 及び Carnosine 形成系とＲＮＡ
代謝系との関連性に関する検討 …… 47
第一節　β－Alanine もしくは Carnosine の長期大量投与により
惹起された Orotic Acid〔6-^{14}C〕の β-Alanine，Anser-
ine，Carnosine 及びＲＮＡへのとり込みに対する Feed
Back 効果からみた、β-Alanine-Anserine-Carnosine
形成系とＲＮＡ生成系及び Uracil 分解系との関連性の検討 …… 48
第二節　β－Alanine，Carnoine 投与の Orto-Phosphate ^{32}P
によるＲＮＡへのパルス標識に対する影響 …… 54
第三節　β－Alanine，Anserine 及び Carnoine のラット肝臓
及び腓腸筋 Ribonuclease 活性に対する影響 …… 60
第三編　総括及び考察 …… 64
第四編　結　　論 …… 74
第五編　引　用　文　献 …… 76

第一編　緒　論

近年蛋白質化学の進歩にともない蛋白質の構造決定、化学合成を始め生合成、代謝並びに生理的役割の解明が急速になされつつある。一方アミノ酸についてはこれら蛋白質を構成するという観点ばかりでなく、アミノ酸の誘導体やoligopeptide としても生体内に種々発見されている。anserine(3－methyl－N, α－(β－alanyl)－L－histidine：一般名N－β－alanyl－1－methyl histidine：以下anserine と称す)、及びcarnosine(N－β－alanyl－L－histidine：carnosineと称す)は蛋白質の構成成分でないβ－alanine を含む特異的なdipeptide であり、少くとも脊椎動物以上の動物筋肉中に広く分布して存在している。

1900年carnosineが[1]、1929年anserineが[2] 骨格筋中より発見されて以来、生理作用としてhistidine 欠乏食ラットにおけるcarnosineのhistidine 代償性[3]、神経伝達に対する作用[4]～[8]、生体内液の緩衝性[9]～[11]、血圧降下作用[12]～[15]、ATPaseに対する作用[16),17]、筋肉収縮との関係[18]、体温との関係[19] 等が種々報告されているが決定的な生理的作用の解決をみないまま今日に及んでいる。

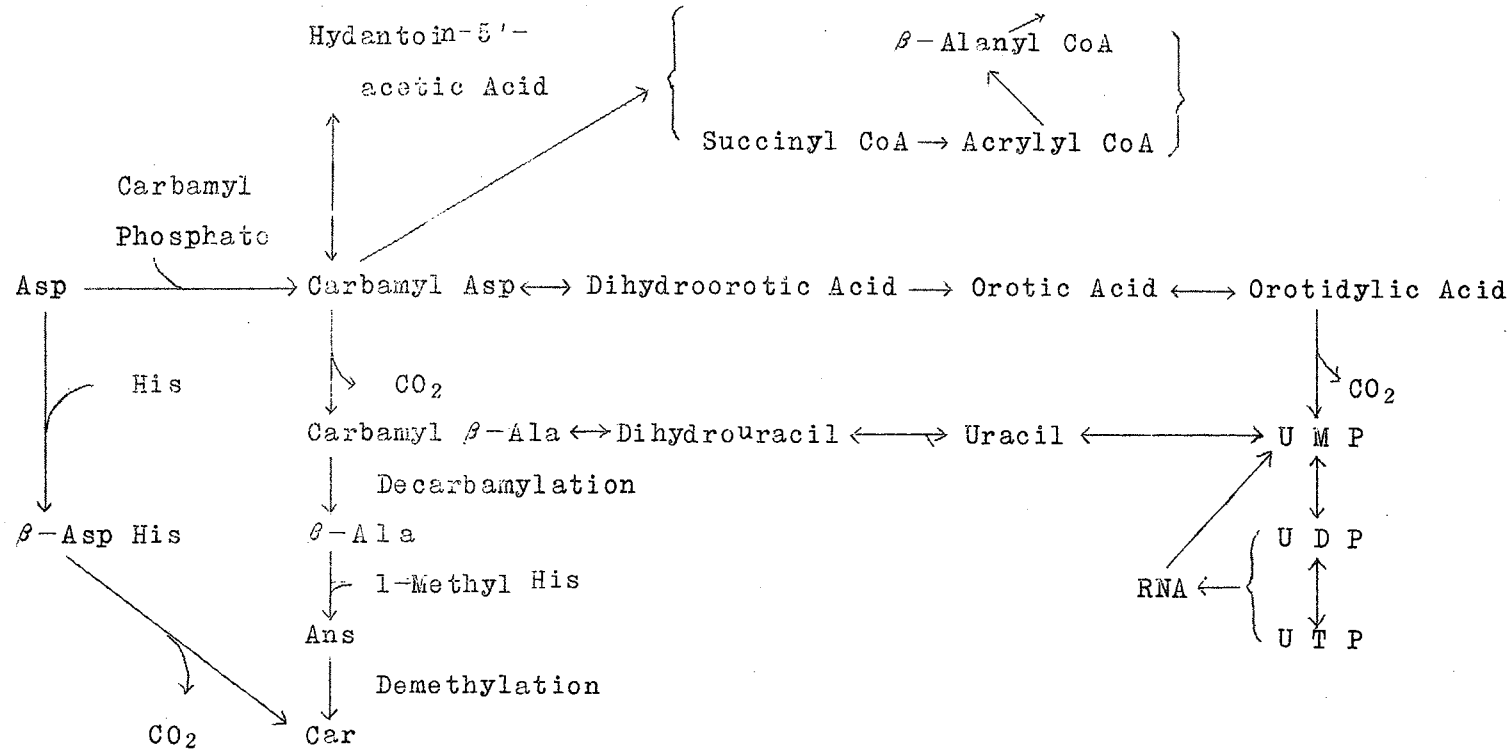
青沼、浜らは心臓ホルモン研究の一環として心臓自動運動を抑制する因子の一つとして哺乳類心筋より初めてanserine を単離証明した。[20] しかし先述した如くanserine、carnosine は他の臓器と比較して骨格筋に(例えばねこでは150～200mg%[21])大量含まれるものであるが特有の生体内作用が不明であり生理作用を鮮明に説明出来ない。

そこで著者はこれらdipeptide の生理的意義を解明することを最終目的に、まずanserine, carnosine の生合成経路の解明を行なった。さいわい旧来

の知見を正すと共に新知見をこれらdipeptide の生体内形成に関し加えることが出来、生合成経路に関する一知見を確立したのでここに論文として提出する。

anserine、carnosine の生合成に関してはWinnickら、[22] Kalyankerら[23), 24)] により in vitro でヒヨコの胸筋を用いて検討した例があるがanserine、carnosine 及び β-alanineの分離方法、胸筋以外で成功していない点、前駆物質としての β-alanine 体内起源等種々の問題があった。著者はこれらの点を分取型アミノ酸自動分析計を駆使して、β-alanine の前駆物質の検討から研究を始めた。

まずanserine、carnosine 合成能の簡単な検討方法として ^{131}I-histidineを合成し、^{131}I-histidine から ^{131}I-carnosine に生合成されたカウントを測定することにより生合成能の検討法を確立した。その結果ラットにおいては骨格筋よりむしろ肝臓、腎臓の方がcarnosine 合成能の強いことを認めた。以後anserine、carnosine の生合成を検討する際には合成能の強い肝臓と含量の多い筋肉とを常に対比させた。ウィスター系雄ラットを用い種々検討考察した生合成経路をschemeIに示した。その結果anserine 、carnosine の生合成はaspartic acid を基源としてcarbamyl aspartic acid, orotic acid を経てuracil の分解でβ-alanine が形成される。この系はFink-派[25)～28)] によっても大略が明らかにされたものである。この系についても二、三の問題点を見い出したのが、いずれにしろこの系によって形成されたβ-alanine とI-methyl histidine とが結合し、続いてdemethylationによりcarnosine にconvert することを明らかにした。このような生合成経路の解明からanserine、carnosineの形成が核酸代謝と密接に関係していることを見い出した。



Scheme I

Possible Pathway for β - Ala, Ans and Car Biosynthesis

Ans: Anserine

Car: Carnosine

第二編　本　　論

第一章　Carnosine関連N－Aminoacyl histidineのin vitro生合成の検討

すでに青沼ら[29]によって体外から静脈注射によって与えたβ－alanineがanserine、carnosineへとり込まれることが認められ、またWinnckら[22]やKalyankarら[23),24]によってβ－alanineとhistidineが酵素的に結合することが報告されている。著者はanserine、carnosineの生合成経路の追求にあたり、より容易なbioassay法の開発を企み^{131}I標識法を利用したN－α－aminoacylationの検討を行なった。^{131}I標識5－monoiodo histidine（以下^{131}I－histidineと略称する）を合成し、これを基質として各種アミノ酸との結合成応を*in vitro*で検討した。この方法はまたWinnckら[22]やKalyankarら[23),24]の^{14}Cを利用した方法と異なり時間的に多数資料の同一条件下での定量的比較を容易ならしめる有効な生合成反応のassay法でもある。本法を用いて生合成siteの問題など新しい知見を得ることが出来た。

第一節　^{131}I標識5－Monoiodo histidine及びヨウ素化Carnosineの合成

^{131}I－histidineの合成　Brunings の方法[30]を応用して合成した。すなわち30mlの1N NaOHにL－histidine・HCl 100mgを溶かし、ヘキサン10mlを加えて氷浴中で冷却した。一方8％ KI 5mlをキャリヤーとして2.0 mCi ^{131}Iをとり、0.09gのNaNO$_2$と数滴の0.1N HClを加えてI$_2$を発生させヘキサン40mlに吸収した。過剰のNaNO$_2$をNH$_4$SO$_3$NH$_2$ 0.20gで分解した後ヘキサン層を水で2回洗い、これをhistidine溶液に3hrで滴

加する。1hr氷浴中に放置後、別にKI 0.47gから同様にI_2を50mlのヘキサンに吸収し、先の反応液に加え4hr 放置してヨウ素化を完結する。反応混液を氷冷下攪拌しながら濃HCl 1.5mlで酸性にし、1% KI 5mlを加えて混合液を分離し、ヘキサン層を除き、水層をさらに2回25mlずつのヘキサンで洗浄しI_2を除く。水層を50℃以下で乾固し、濃HCl 0.1mlを含んだエタノール15mlで5min煮沸抽出する。溶液を濾過し、残査を少量のエタノールで洗う。濾液と洗液を合し減圧濃縮して林の方法[31]に準じてpH 3.0の0.07Mのクエン酸緩衝液に溶しDowex 50に吸着する。pH 5.0の0.14Mクエン酸緩衝液で溶出する。 diiodohistidine, monoiodohistidine および histidine の順に溶出するから monoiodohistidine を集め、減圧濃縮後Amberlite IRC-120に再び吸着して0.5Nピリジンで溶出して精製monoiodohistidine を得る。mp 185°、ペーパークロマトグラフィーによりRf 0.25 の単一スポットを示し、ジアゾ反応で黄色を呈す。ヨウ素の置換位置をNMRスペクトロメーターで重水置換法にてテトラメチルシランを標準に、遊離型histidine[32]、ergothioneine との比較でFig 1に示す結果を得た。面積値からモノ置換体であることを確認し、置換位置はイミダゾー

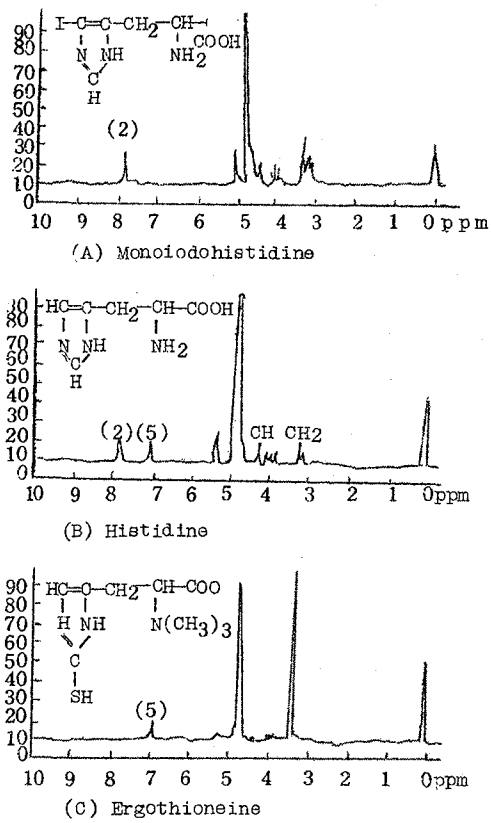


Fig 1. Nuclear Magnetic Resonance Spectra in D_2O

(reference: $C_6H_{15}NaO_3SSi$)

ル核の5の位置と決定した。

ヨウ素化Carnosineの合成　L－carnosineはNutritional Biochemicals Corporationから入手した。I_2をヘキサンに吸収しmono－iodohistidineの場合と同様にして合成した。ペーパークロマトグラフィーでRf 0.35の単一スポットを示す。carnosineはRf 0.11である。

ペーパークロマトグラフィー　東洋濾紙No.51を用い、n－BuOH：AcOH：H_2O（4：1：5）の上層を溶媒として上昇法で行なった。検出はニンヒドリン反応、セリウム反応[33]、およびX線フイルムによるautoradiogramによった。

第二節　^{131}Iで標識されたHistidineを利用するin vitroでのHistidineのBiochemicalなN－α－Aminoacylation

実　験　方　法

酵素液の調製　体重約100g前後のウイスター系雄ラットを24hr絶食させ、撲殺後頸動脈切断により充分瀉血するとともに流水で体温を下げる。肝臓、腎臓、小腸、骨格筋を分離し、そえぞれ組織粥に切断後Winnickら[22]の処方によるmediumで20％ホモジネートに氷冷下調製する。これを0℃、2min 2min 12,000×Gで遠心分離し、上清を2層ガーゼで濾過して生合成酵素系を含んだ無細胞抽出液を得、酵素液とした。

生合成実験　Winnickらの方法[22]に準じて行なった。反応試験管に^{131}I－histidine 1.0μmoleを0.1ml水溶液として加え、さらに基質（β－alanine, L－aspartic acid, L－glutamic acid, L－lencine）を1.5μmoleのATPおよび1.2μmoleのMg^{++}を含むmedium 0.1mlの溶液として加える。酵素液およびmediumを加えて全量0.7mlとして、37℃で反応を行なった。冷5％TCA 1mlを加えて反応を止め15min氷水中に放置し沈殿を完結

する。5min 約1,000 xG で遠心分離し、上清を共栓スピッツに集め沈殿は冷2.5％ＴＣＡ 0.5 mlで洗浄、遠心分離して上清を合す。吸着の対照は酵素液添加前に5％ＴＣＡを加えてつくり、endogenous 対照は基質アミノ酸のみを除いて同様に処理した。上清液にニンヒドリン４０mg を加え沸騰浴中で正確に 13 min加熱後冷却し、室温で水飽和ｎ－Bu OH 1ml で３回抽出洗浄し、残った水層0.5mlをとって井戸型シンチレーション計数器で測定する。

ＲＮＡの定量　生合成実験の操作におけるＴＣＡ沈殿について、５mlの５％ＴＣＡを加え、蒸発を防ぎながら９０℃、１５min加水分解後遠心分離して上清を100mlの目盛付試験管に集め、沈殿はさらに2.5％ＴＣＡ３mlで洗浄遠心分離し上清を合す。上清液を正確に１０mlとなし、冷所に一夜放置後再び遠心分離してその上清につきＴＣＡの吸収に留意して２６２mμ の吸光度を測定し定量した。

反応生成物の確認

β－alanine と ^{131}I－histidine の酵素的dipeptide 形成による成績物について、ニンヒドリン分解後の水層残留物につき標準品を同様に処理した対照とペーパークロマトグラフィーにより比較検討した。結果をFig２に示す。

Fig２(A)および(B)より明らかなようにニンヒドリン分解操作でＩ－carnosine, Ｉ－

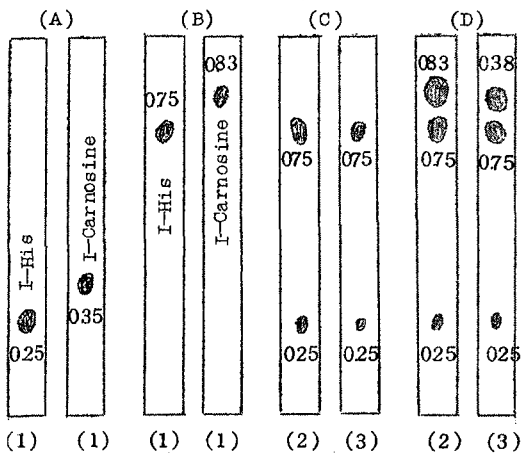


Fig 2. Paperpertition Chromatograms of Reaction Products in Water Layer after Ninhydrin Degradation and n-Butanol Extraction

Toyo Roshi Ltd No 51, n-BuOH:AcOH:H_2O(4:1:5,) ascending method

(1) ninhydrin reaction (2) radioautogram (3)cerium reaction

(A) standard I-His and I-carnosine

(B) reaction product by ninhydrin treatment

(C) control preparation: Without β-alanine

(D) complete mixture: liver enzyme solution, 60min incubation

histidine ともに分解を受けていることはその Rf 値から明らかである。(C)に示す β−alanine を除いた対照の場合には I−histidine の小スポットと I−histidine 分解物が検出され、さらに (D) の完全系では I−histidine の小スポットと I−histidine のニンヒドリン分解物とともに I−carnosine のニンヒドリン分解物を確認した。したがって本定量操作において(D)より、それに相当する各臓器からの酵素の各相当反応時間ごとの(C)を差し引いた I−carnosine のニンヒドリン分解物中の I を ^{131}I で標識してその放射能を測定しているものである。

実 験 結 果

この反応が β−alanine に特異的であるが、その基質特異性を検討し Fig 3 に示す。Fig 3 に β−alanine, L−aspartic acid, L−glntamic acid 及び L−lencine と ^{131}I−histidine を用いて肝臓からの酵素で 30、60 min 反応した場合のペプチド分画へのとり込まれた ^{131}I−histidine を endo−genous 対照を差し引いて百分率で示した。aspartic acid は α− 脱炭酸すれば β−alanine となり、glu tamic acid は α− 脱炭酸して r−aminoisobutylic acid となり homocarnosine の構成アミノ酸であり leucine は一般的なアミノ酸の意味からとりあげた。その結果 β−ala−ine のみ明らかにペプチド分画にとり込まれた。そのほかは endogenous に

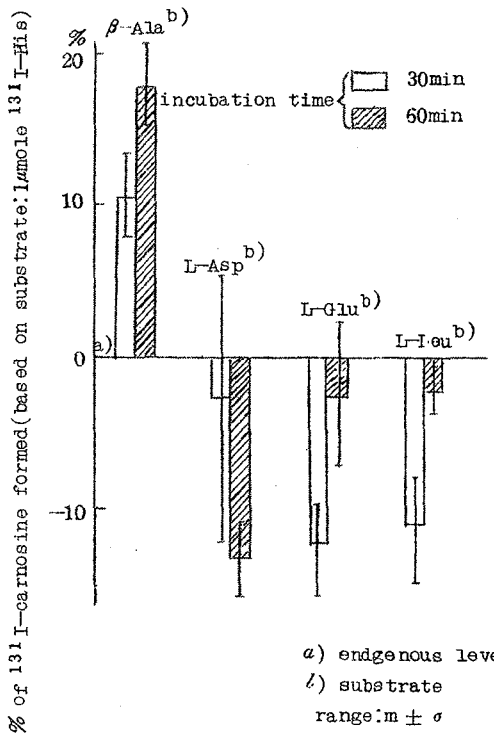


Fig. 3. Incorporation of ^{131}I−Histidine into ^{131}I−Carnosine or Related Dipeptides

Reaction mixture: ^{131}I−histidine 1.0μmole, ATP 1.5μmole, Mg^{2+} 1.2μmole, amino acid 2.0μmole and enzyme solution from liver 0.5ml in 0.7ml of 0.04M Tris buffer (pH7.3) containing 10^{-4}M EDTA

起因するペプチド分画へのとり込みをむしろ阻害していて、L－aspartic acidは30minで、L－glutamic acid, L-leucineでは60minにおいて阻害効果は強い。β－alanineのペプチ形成の見掛け上の1％は全量にすると約4％前後の生成率となり、winnickら[22]のβ－alanine〔^{14}C〕での結果とよく一致する。

反応時間と^{131}I－carnosine生成量およびRNA含量との関係を肝酵素系で検討するとFig 4のようで90minまで反応時間に比例して増加し、同時に残存RNA量は減少して逆相関を示す。基質のβ－alanine量と^{131}I－carnosine生成量を肝酵素を用い60minの反応で比較するとFig 5のように5μmoleまでβ－alanine量に比例して生成量は増加するが、RNA含量に変化は認められない。

β－alanine 2.0μmoleで60minの反応における肝酵素量

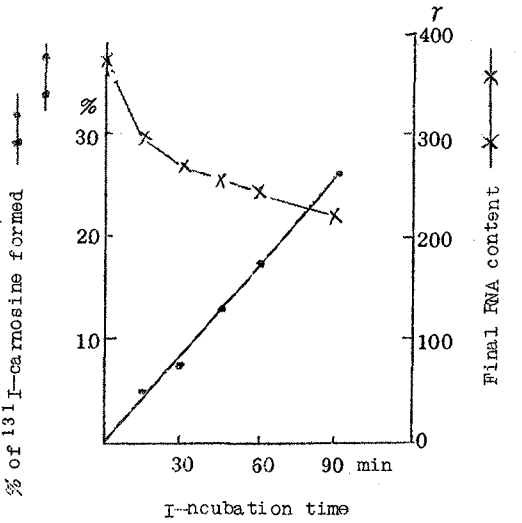


Fig. 4. Effect of Incubation Period on Rate of ^{131}I-Carnosine Formation and Residual RNA Contents

Incubation mixture: β-alanine 20μmole, 05ml of enzyme solution from liver, and others are same to Fig. 3.

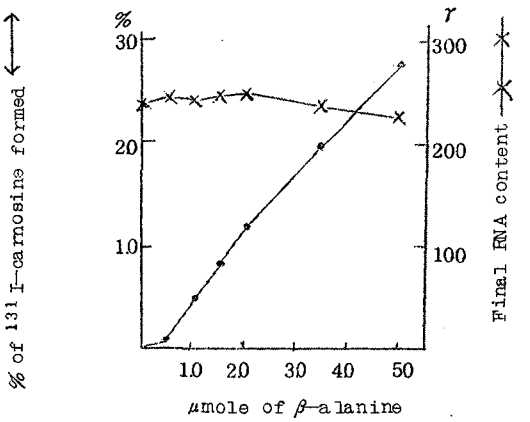


Fig. 5. Formation of ^{131}I-Carnosine and Residuql RNA Contents after Incubation for 60min at Various β-Alanine Concentrations

Incubation mixture: various β-alanine contents, 05ml of enzyme solution from liver, and others are same to Fig. 3.

と ^{131}I－carnosine 生成量の関係をFig 6に示す。肝酵素 0.5 mℓまでは増加するが 1.0 mℓでは 0.5 mℓと変わらない。

以上のような基礎検討のもとに臓器特異性を検討しFig 7に示す。各臓器の活性を 60min及び 90minの反応における ^{131}I－carnosine 生成能と酵素調製液の比較及び含有ＲＮＡの分解との関係を照合するために各ＲＮＡ含量を比較した。合成能は肝が最も強く、腎はやや強く、骨格筋、小腸では少ない。また合成能とＲＮＡ含量との直接の関係は認められなかった。

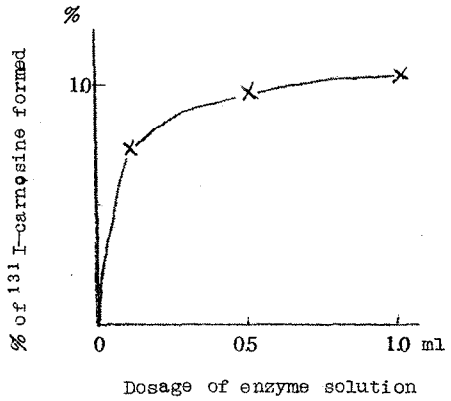


Fig. 6. Formation of ^{131}I-Carnosine depend on Dosage of Enzyme Solution from Liver for 60min Incubation

Incubation mixture: β-alanine 20μmole, and others are same to Fig. 3. with the exception of 1.0ml enzyme solution (total volume 1.1ml)

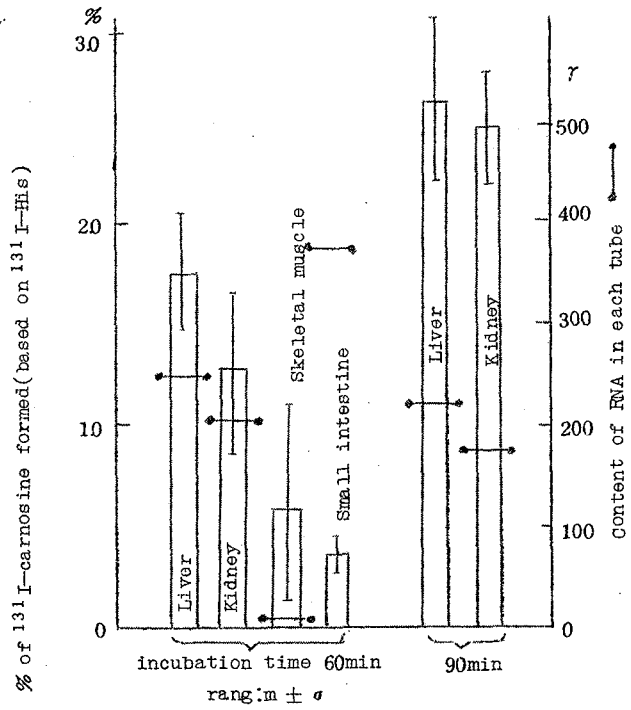


Fig. 7. Activities of ^{131}I-Carnosine Formation and Final RNA Content by Enzyme Solution from Each Organ

Reaction mixture: β-alanine 20μmole and others are same to Fig 3.

〔小　括〕　^{131}I－histidineを応用してcarnosine synthetaseの簡便なassay法を確立し、これを用いてin vitroでβ－alanineがhistidineとconjugateすることを確かめるとともに、その生合成能は肝由来の酵素系で最も強いことを認めた。

第二章　Carnosine及びAnserineの前駆物質としてのβ－L－Aspartyl－L－Histidineの検討

青沼ら[29]らはβ－alanine〔2－^{14}C〕の各臓器への分布とanserine, carnosineへのとり込みについて詳査し、体外より与えたβ－alanineがこれらの生合成に利用されていることを認めた。しかし体内のanserine, carnosineがその比放射能から考えてすべて摂取したβ－alanineからのみ生合成されるものとは考えられない。また本実験を行なった時点では体内に遊離のβ－alanineが少なく、しかもβ－alanine自体は腸管から吸収されない[34]ことが言われていた。したがって生体内物質からβ－alanineが形成される系を経て、anserine, carnosineが生合成される経路を検討しなければならない。

微生物に於いてはaspartic acidの直接のα脱炭酸によりβ－alanineが生成される[35)～37)]が哺乳類に於いては知られていない。しかしKakimotoら[38]はヒト尿中からβ－L－aspartyl－L－histidineを証明している。du Vigneaudら[13]はこれを合成し、histidine欠乏ラットの成長試験からβ－aspartyl－histidineがcarnosineの前駆物質の可能性を述べている。そこでまずラットを用いaspartic acid〔3－^{14}C〕のanserine, carnosine

への incorporation を検討した。一般アミノ酸の炭素プールを経ての結果と比較するため leucine〔U－^{14}C〕を用いた。さらに β－aspartyl－histidine を合成し、carnosine への conversion を検討した。

第一節　D, L－Aspartic Acid〔3－^{14}C〕及び L－Leucine〔U－^{14}C〕のラット各臓器 Carnosine 及び Anserine へのとり込み

実　験　方　法

Carnosine, Anserine の標準品　L－Carnosine は Nutritional Biochemicals Corporation 製の合成品を、L－anserine 硝酸塩は California Corporation for Biochemical Research 製を用いた。いずれもペーパークロマトグラフィーで均一である。

標識化合物及び放射能測定　ペーパークロマトグラフィーで均一と認められる試料を、D, L－aspartic acid〔3－^{14}C〕は 10 μCi／1.48 mg の放射能で、L－leucine〔U－^{14}C〕は 100 μCi／2.34 mg の比放射能で生理的食塩水溶液として所定量動物に投与した。測定は 2 π ガスフロー計数器を用い、自然計数並びに自己吸収を補正して測定値とした。

動物及び Antopsy　一夜絶食させた体重 100 ～ 150 g のウィスター系雄ラット 5 匹を用い、エーテル麻酔下 D, L－aspartic acid〔3－^{14}C〕15.0 μCi 及び L－Leucine〔U－^{14}C〕の場合は 12.8 μCi をいずれも 0.5 ml の溶液として股静脈内に投与した。所定時間後に撲殺し、ただちに頸動脈より一部採血するとともに充分瀉血後各臓器をとり出し、秤量後凍結して保存した。糞尿はケージ中に濾紙を敷いて採集した。

Carnosine － Anserine 分画の調整　青沼ら[29]の方法に従い、Jones の方法[39]で 80％エタノール抽出エキスを調整し、Dowex 50W－X4

を用いたStein らの方法[40]によりCarnosine − anserine 分画を一分画として得た。

Carnosine − Anserine の分別定量法と比放射能

Carnosine − anserine 分画の一定量中、その0.5 mlを蒸発乾固後60%エタノール0.5 mlで抽出脱塩し、その上清0.1 mlをワコーゲルB−5の200μ薄層クロマトグラフィーでEtoH:AcOH:H_2O（5:5:0.5）[29]の溶媒系で展開する。ニンヒドリン呈色による標準と比較して相当部分から60%エタノールで加温抽出し放射能を測定する。Carnosine anserine の化学定量は青沼ら[29]の方法でニンヒドリン反応とジアゾ反応により行なった。

実　験　結　果

D、L−aspartic acid〔3−^{14}C〕のとり込みは各臓器とも投与後一旦増加した後短時間で減少する。肝臓での結果は30min後に472cpm とり込まれた例において、6 hr 後に333cpm と減少し、12.24 hr 後ではそれぞれ209及び217cpm と平衡した後48hr後には138cpm と著るしく減少する。本実験条件はCarnosine − anserine へのとり込みが体内で平衡した24hr後について検討したものである。

TABLE I. Incorporation of D, L-Aspartate〔3-^{14}C〕into Carnosine Anserine

mean±S. E.

Organs	Specific activity(cpm/μmole) carnosine	Anserine	Carnosine/Anserine
Liver	510±231	46±19	11
Kidney	411±163	31±17	13
Heart	696±448	34±23	20
Spleen	216±118	21± 0	10
Stomach	671±203	54±24	12
Adrenal	953±208	19±10	50
Prostate	705±253	57±18	12
Testis	1092±187	44±14	25
Small intestine	1882±198	23± 0	82
Large intestine	1028±292	86±30	12
Lung	702±299	40±14	18
Skeletal Muscle	184± 49	9± 0	20
Blood	486±171	14± 8	35
Urine	462± 73	284± 0	16
Feces	166± 0	68±24	24

at 24hr after iutravenous injection

Table Iにはcarnosine及びanserineへとり込まれた放射能を比放射能で表わすとともにcarnosineとanserineへとり込まれた両者の割合を比較した。carnosine－anserine 分画へのとり込みは副腎が多く、ついで心、前立腺、糞、睾丸の順であるが、副腎以外は臓器による大きな差を認めない。血液には少ない。この傾向は青沼ら[29]のβ－alanine〔2－^{14}C〕の場合によく類似するとともにβ－alanineと同程度にaspartic acidもcarnosine－anserineにとり込まれることが認められる。一般にcarnosineの方にanserineより10～20倍多くとり込まれ、とくに副腎、小腸、血液ではcarnosine の方に著しく多くとり込まれる。

β－alanine〔2－^{14}C〕[29]及びD, L－aspartic acid〔3－^{14}C〕の投与24hr後のcarnosine, anserine へのとり込みが特異的なものであるかどうかを確かめるために比放射能の高いuniform標識leucineについて同様な実験を

行なった。その結果ほとんどとり込みが認められず、一例をTable IIに示す。肝にごくわずかの活性を認めたにすぎない。したがってcarnosine, anserineへのとり込みはβ-alanineとaspartic acidに特有な代謝経路と考えられる。

TABLE II. Incorporation of L-Leucine〔U-^{14}C〕into Carnosine and Anserine

Organs	specific activity(cpm/μmole)		Carnosine/Anserine
	Carnosine	Anserine	
Liver	0.07	0.02	3.5
Kidney	0	0	—
Lung	0	0	—
Others	0	0	—

at 24 hr after intravenous injection

第二節　β-L-Aspartyl-L-Histidineのα-脱炭酸反応によるCarnosineへの変換の可能性

第一節においてaspartic acidからcarnosine, anserineが生合成されることからdu Vigneaudら[13]のいうβ-aspartyl-histidineがCarnosineの前駆物質となるならβ-aspartyl-histidineがaspartic acidのα位のカルボン酸が脱炭酸としてcarnosineになることが考えられる。そこでβ-aspartyl-histidineを合成し、ワールブルグ検圧計により炭酸ガスを発生させ、反応生成物中のcarnosineの検出を試みた。

実　験　方　法

β-L-Aspartyl-L-Histidineの合成　Bryantらの方法[41]及びdu

Vigneaud ら[13]の方法にしたがい合成した。アンバーライトIR−120カラムを用い、2Nピリジンで脱塩精製して得たβ−aspartyl−histidineは2分子の結晶水を含み[13),38)]、元素分析値は理論値と一致した。施光性も1％水溶液で〔α〕$^{27}_{D}$＝＋38°と文献値[13]と一致した。また3種の溶媒系によるペーパークロマトグラムおよびアミノ酸自動分析計により単一性を確認して用いた。

動物およびAutopsy　一夜絶食させた体重100〜150g のウィスター系雄ラット2匹から得た肝、腎および腓腸筋をそれぞれ合して、Winnick らの方法[22]によって20％ホモジネートを調製し、12,000XG 遠心分離の上清液をcarnosine 合成酵素含有分画として酵素液とした。酵素液は実験ごとに新しく調製した。

脱炭酸反応　ワールブルグ検圧計を用い、酵素液及びWinnick ら[22]のpH 7.5の緩衝液を主室に2.0mlとして入れた。第一側室に基質のβ−L−aspartyl−L−histidine と0.7μmole のピリドキサールに燐酸を0.7mlの同じ緩衝液に溶解して入れた。第二側室には2N H_2SO_4 0.2mlを入れ全量2.9mlとして常法によりガス発生量を測定した。プレインキューベションは10minであり、また反応終了時2N H_2SO_4 を主室に導入してさらに10min振盪して検討した。反応は空気相で行ない、温度は37.5℃、振盪は85−95回転／minである。測定値はすべて自家呼吸を差し引いて表示した。

脱炭酸反応生成物の検索　反応終了後、反応混液を遠心分離した上清について、東洋濾紙No.51を用いn−BuOH：AcOH：H_2O(4:1:5)の溶媒系で上昇法ペーパークロマトグラフィーにより、ニンヒドリン反応、ジアゾ反応を用いて成績物を検討した。さらにこの上清液と沈殿の洗液を合し、$Ba(OH)_2$ 液で中和後沈殿を除いて塩酸で正確にpH 7.0に調整する。これを40℃以下で乾固後80％エタノールで3回抽出し、抽出物について常法にしたがって日立製アミノ酸自働分析計KLA3型を用い、基質を加えない対照を同様に処理したもの及び

標準品と比較した。

実　験　結　果

脱炭酸反応　　Fig 8 及び Fig 9 に反応時間と炭酸ガス発生を μℓ で示した。肝より調製した carnosine 生合成系を含む粗抽出液を用いて β－aspatyl－histidine の脱炭酸反応を行なう場合、動物を殺してから可及的速やかに氷

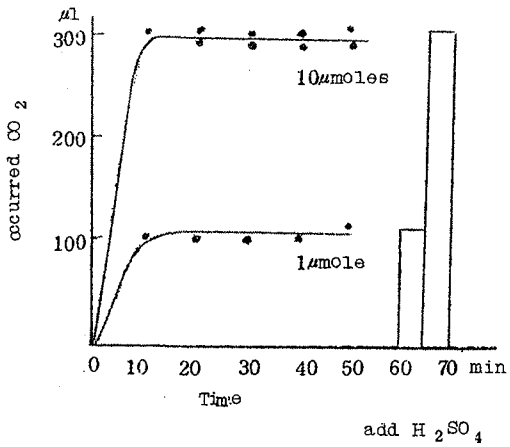


Fig. 8. Decarboxylation of β-L-Aspartyl-L-histidine by Freshly Prepared Enzyme Solution from Rat Liver

Enzyme: 1ml
Reaction: within 30min after decapitation

冷下で操作して反応系をつくり、約 30min 後に反応を行なうと Fig 8 に示すように高いガス発生が認められ、反応は非常に早い。10 μmole の基質に対してはほぼ理論的なガス発生を示す。しかし 1 μmole の基質に対しては等 mole より高い値を示した。この酵素液を数時間氷水中もしくは－20℃で凍結して保存すると著しく活性を低下し、24 hr 凍結保存することで全く活性を失なう。したがって Fig 9 の結果はすべて撲殺後操作上 3 ～ 4 hr 目に条件を一定にして行なったものであり、実験ごとに新しく酵素液を調製した。

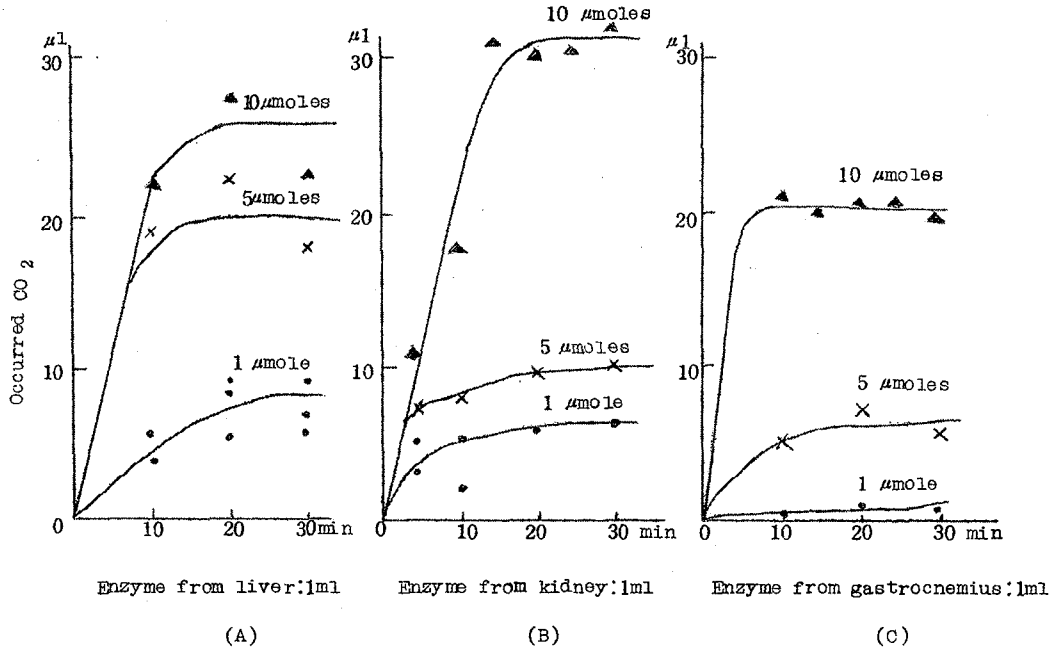


Fig. 9. Decarboxylation of β-L-Aspartyl-L-histidine by Ordinary Prepared Enzyme Solution

Reaction:3-4hf after decapitation

Fig 9 (A) に肝の例を示したが基質濃度にほぼ平行してガスの発生が認められる。腎についてはFig 9 (B)、腓腸筋はFig 9 (C) にその結果を示したが、いずれも肝と同様の結果を得た。これらの結果は酵素の不安定性とともに呼吸の影響がとくに30min以後に強く認められ、好気的な分解も同時に起っていて、反応は10min後で見掛上最大近くになり解析を困難にしている。反応生成物をペーパークロマトグラフィーで検索すると未反応のβ-aspartyl-histidine (Rf=0.08) 及びhistidine(Rf=0.13)のみ検出され、carnosine(Rf=0.11)、anserine(Rf=0.12)は見い出されなかった。さらに肝酵素を用い、反応終了後その反応液についてアミノ酸自働分析計で成績物を検討した。β-aspartyl-histidine の保持時間は酸中性カラムで15 hr 48minであり、isoleucine と leucine の間に溶出する。反応混液から570 mμ で58.56%、

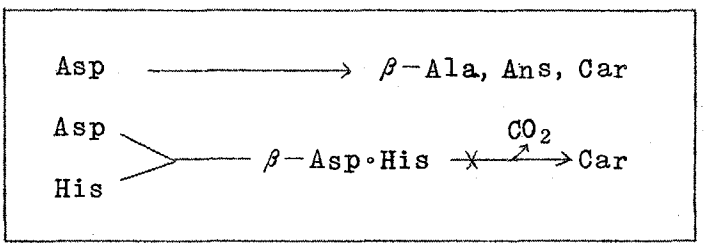
640mμで61.80%の未反応β−aspartyl−histidineを回収し、反応は約40%にすがないことを認めた。塩基性カラムからは一ケの未知分解物と、分解された基質の約1／10に相当するhistidine及びethanol amine、硫安のピークを検出した。しかしcarnosine, anserineは見い出せなかった。このことは脱炭酸反応とともに分解反応が起きていることを示している。同様な条件ではcarnosineが安定である[22]ことから、β−aspartyl−histidineのα−カルボン酸の脱炭酸が先行してcarnosineが出来る可能性は少なく、carnosine生合成系によってβ−aspartyl−histidineからcarnosineは生合成されないことを認めた。

β−Aspartyl−Histidineの生物学的活性　β−aspartyl−histidineが体内でcarnosineもしくはanserineに容易に変換されるのであればcarnosineもしくはanserineと同様な生物活性を示す可能性が考えられる。しかしすでにβ−aspartyl−histidineは家兎血圧に影響しないこと[13]が知られている。さらに、薬理学的試験の面からその活性を検討した。

八木−Straubガマ摘出心臓灌流試験の結果、β−aspartyl−histidine 2.5 mg／5 mlの投与で著明な収縮期心搏振巾の減少を示し、carnosine[42]もしくはanserine[20]と同様の傾向を示すが、α−aspartyl−histidineは影響を示さない。L−aspartic acidは逆に拡大を示し、L−histidineはわずかに同傾向を示すにすぎない。ガマ後肢血管灌流ではβ−aspartyl−histidine, α−aspartyl histidineともに50mg/mlまでの添加濃度で末梢血管に対して影響を示さない。子宮筋に対してはβ−aspartyl−histidine自体は影響を示さない。oxytocin 20mU／100mlの子宮収縮作用に対しβ−aspartyl−histidine 10mg／100mlの前処置は明らかに拮抗作用を示す。この傾向はanserineの作用に類似する。[43]しかしα−asparty−histidineにはこの拮抗作用が極くわずかしか認められない。以上の点はβ−aspartyl

−histidine が容易に carnosine に変換しないことを間接的に示す結果である。

〔小　括〕 ラットを用いた in vivo の anserine, carnosine 形成においては aspartic acid を β−alanine の donor として利用するが、β−aspartyl−histidine の α−脱炭酸による直接的な carnosine への conversion は認められない。これをまとめると



のようになる。

第三章　Orotic acid 〔6−^{14}C〕の β−Alanine, Anserine 及び Carnosine へのとり込みによる Uracil 分解系と Anserine, Carnosine 形成系の検討

第二章に述べた如く β−L−aspartyl−L−histidine の α− 脱炭酸反応による carnosine の形成が疑問であり、また第一章に述べた結果から直接 β−alanine と histidine もしくは 1−methyl histidine との結合により carnosine, anserine の形成が考えられる。β−alanine の形成の研究は古くからなされており acrylyl CoA から、[44),45)] malonate semialdehyde から、[46)〜49)] spermine, spermidine から、[50),51)] propionic acid から、[52)] β−amino−

propionitrile から、[52] aspartic acid から、[35)〜37)] uracil 及び uracil の代謝産物から[25)〜28)]など種々報告されている。

著者らの実験結果から、今迄余り記載がない遊離の β-alanine がラット肝にかなり存在していることを認めた。また骨格筋では anserine, carnosine は他の一般遊離アミノ酸より多量存在するが、第二章に述べた如く、これら dipeptide には aspartic acid が incorporate する点を考えて、aspartic acid から uracil 経由の β-alanine 形成を考えた。まず orotic acid〔6-^{14}C〕からの β-alanine, anserine 及び carnosine の形成を検討するとともに、もし uracil 代謝系が関与するなら当然 actinomycin D により RNA 合成を阻害した場合、また orotidylic acid から UMP への脱炭酸反応を 6-azauracil で阻害した場合に β-alanine, anserine もしくは carnosine 形成に影響が表われるべきであるので検討した。

第一節　Orotic Acid〔6-^{14}C〕の Anserine 及び Carnosine への Incorporation と Actinomycin D もしくは 6-Azauracil 阻害の影響

実　験　方　法

試　薬　L-anserine, L-carnosine は第二章で述べたと同じ試薬を用いた。orotic acid〔6-^{14}C〕を第一化学薬品製を入手し radiochemical purity を確認した上で、生理食塩水 0.1 mℓ 中に 20 μCi／0.5 μ mole を含む溶液とした。actinomycin D は阪大微研川俣教授より恵与された結晶を用いた。この 1 mg を 0.1 mℓ propylenglycol と 0.4 mℓ 蒸留水に溶解してその 0.1 mℓ を用いた。6-azauracil は 260 mg を propylenglycol 3.0 mℓ と蒸留水 10 mℓ の混液に溶解し、投与前半の 11 日間は 0.5 mℓ/day／rat を注射し、その後4日間は

1.0mℓ/day/rat の量を与えた。

動物及び処置　体重約150gのウィスター系雄ラットをオリエンタルKK固型飼料で20°Cにて飼育し、24時間絶食した後実験に供した。注射はエーテル麻酔下股静脈内に目視下で行ない、1時間後断頭により殺して体温を下げるとともに充分瀉血した。actinomycin Dは腹腔内に投与した後、1時間後にorotic acid〔6-^{14}C〕溶液0.2mℓを投与した。6-azauracilはFig13に示すごとく体重の増加が見られなくなるまで16日間連日筋肉内に投与した体重200gのラットを用いた。最後の投与は腹腔内に行ない、1時間後にorotic acid〔6-^{14}C〕を投与してさらに1時間後に臓器をとり出した。なお一例についてはorotic acid〔6-^{14}C〕投与10分後に臓器をとり出して参考とした。その他は各群3例であり、臓器は全肝及び骨格筋（腓腸筋及び背筋）を氷冷下分離し、秤量後80%エタノールでホモジネートとなし青沼らの方法[29]により80%エタノールで加温下抽出し、エーテルで脱脂後一定量として試料を調製した。

β-Alanine, Anserine及びCarnosineの分画と定量

分取型アミノ酸自働分析機（日立KLA-Ⅲ型）を用い、4：1の分取比によってニンヒドリン反応による定量と分取を同時に行なった。各分取分画はイオン交換樹脂（アンバーライトIRC-120）によって脱塩後、溶出液を濃縮して一定量となし、その一部を放射能測定試料に調整した。各分画の同定とradio-chemical purityの検討はペーパークロマトグラフィー及びそのX線フィルムによるautoradiographyによった。なおanserine, carnosine中の放射性β-alanineの確認は常法により加水分解後薄層クロマトグラフィーによりβ-alanine部分を切り取り溶出後放射能を測定した。また含量の少ない場合はβ-alanine, anserineもしくはcarnosineの1μ moleを定量的に添加して操作した。

放射能の測定　測定試料を測定皿上で60℃以下で赤外線により乾燥後、

日本無線製2πガス・フロー計数器を用いて測定し、自己吸収補正した。

RNA，DNAの定量　上記各臓器の80%エタノール抽出残渣について、さらに無水エタノール、エタノール・エーテル(3：1)混液、次いで無水エーテルで各3回づつ洗浄後、0.4NPCAで1回、0.2NPCAで2回洗浄する。ついで0.4NPCA 20ml(肝)もしくは15ml(筋)を加えて90℃15分加熱後室温まで冷却して遠心分離する。上清を集め、沈殿は0.2NPCA5mlづつで2回洗浄して洗液を合してRNA，DNA分画とした。定量は262mμの吸光度により行ないRNA－DNA含量を求めた。さらにBurtonの方法[53]によりデスオキシペントースの定量からDNA含量を求め先の値から差し引いてRNA量を求めた。RNAへとり込まれた放射能は、本条件でorotic acidがDNAにとり込まれないことから、[54]PCA加水分解後のRNA－DNA分画について放射能を測定してRNAにとり込まれた放射能とした。

6－Azauracil投与ラット尿中Orotic Acidの定量　6－azauracil投与前の尿をcontrolとして、6－azauracil投与開始後から5日間までを処理前半、その後10日間を処理後半尿として、全尿を集めた。採尿はメタボリック・ゲージに尿吸収用濾紙を敷いて集め、3匹の尿を合した。この濾紙を蒸留水で60℃にて6時間抽出し、その間2時間ごとに溶媒を新しくかえた。抽出液を濃縮して30mlとなし、その5mlをとり　2倍に希釈後Huguleyらの方法[55]に従ってDowex－1－cl型カラム(1×10cm)を用いて溶出し、溶出曲線を260mμの吸収で求め、定性試験は285mμとの吸光度比で求めた。

実　験　結　果

Ortic Acid〔6－^{14}C〕投与ラット臓器80%アルコール抽出物のアミノ酸自働分析像　正常ラットの肝臓についてアミノ酸自働分析機によるニンヒドリン呈色曲線と各ピークの放射能の分布をFig10に示す。全ピークに幾分

放射能の分布が認められる。しかしβ−alanine, anserne及びcarnosineに特異的に多く放射能が検出され、その他のピークは相対的に問題にならない程度で三者との差は推計処理を問題にせず明らかである。なおaspartic acid分画についてくり返し検討したが、本条件下でorotic acid〔6−^{14}C〕からaspartic acidへの分解は認められなかった。

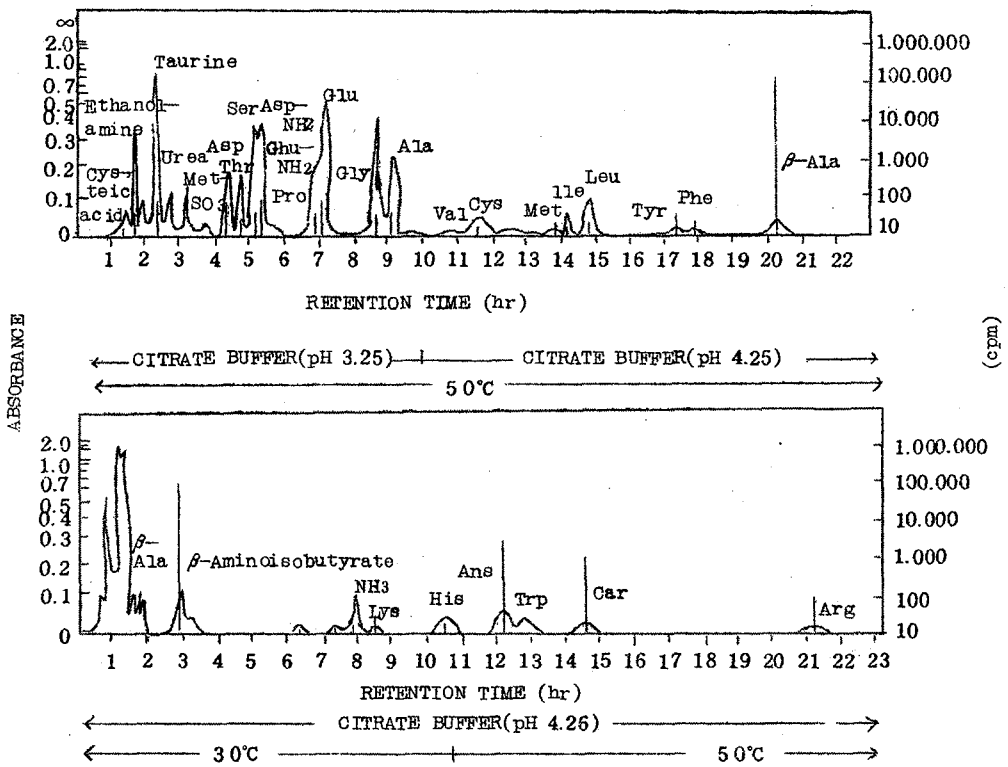
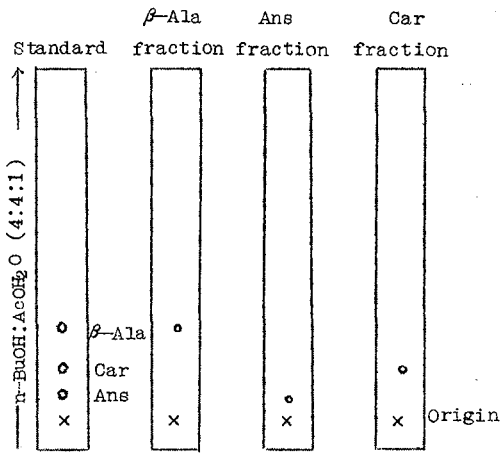


FIG. 10. Column chromatograms of 80% alcoholic extract of liver homogenate of rat with orotate-6-^{14}C by a preparative amino acid autoanalyzer(O.D. at 560mμ and radioactivity).
Upper: Acid-neutral column(18×1500mm, 120ml/hr, ratio 1:4, Amberlite CG-120 325-400mesh).
Lower: Basic column(18×500mm, 120ml/hr, ratio 1:4, Amberlite CG-120 400-600mesh) with adding 1μmole of Ans and Car.
Curve: Absorbance at 560mμ
Vertical lines: Radioactivity of each amino acid fraction.

Prior to the radioactivity counting, the samples were desalted with H^+-form of Amberlite IR-120(300-500mesh). When the contents of β-Ala, Ans and Car were low, the quantitative analysis of them was carried out by addition of 1 μmole of cold samples as carriers on the column.

β−Alanine, Anserine 及び Carnosine 分画の検討　Fig 10 にも示した如く、β−alanine, anserine, carnosine 相当位置を 1 : 4 の比で同時に分取した分画について、イオン交換樹脂で脱塩後ペーパークロマトグラフィーで確認し Fig 11 に示す。ニンヒドリン反応と autoradiography により化学的にも、放射化学的にも β−alanine, anserine, carnosine であることを認めた。anserine 及び carnosine 分画について、それぞれアルカリ加水分解後、薄層クロマトグラフィーを行なうと放射能はほぼ定量的に Fig 12 に示すごとく β−alanine として回収される。従って orotic acid は分解して C−6 位は β−alanine 中に convert していることが認められる。



NINHYDRIN DEVELOPMENT

FIG. 11. Paper autoradiograms of radioactive β-Ala, Ans and Car fractions eluted from the autoanalyzer.
Paper chromatography: Ascending method, Tōyō filter paper No. 51 (2 × 40 cm).
Radiation: X-ray film, exposure for 40 days.

6−Azauracil 処理の検討

actinomycin D に関してはラットを用いた実験において腹腔内注射 1 時間後に核酸の生合成が阻害されることはよく知られている。しかし 6−azauracil は一般に影響がおそく、予備試験で検討した結果でも投与 1 時間後、肝の例で新鮮臓器重量 1 g 当り RNA へとり込まれた放射能は 138,295 cpm であり、また RNA 1 mg 当り 17,653 cpm で Table III に示すごとく正常群の値と同じであった。6−azauracil の影響を in vivo で認めるには比較的長期間経口投与や注射で与えることが報告されている。[55) 56)] そこで購入したラ

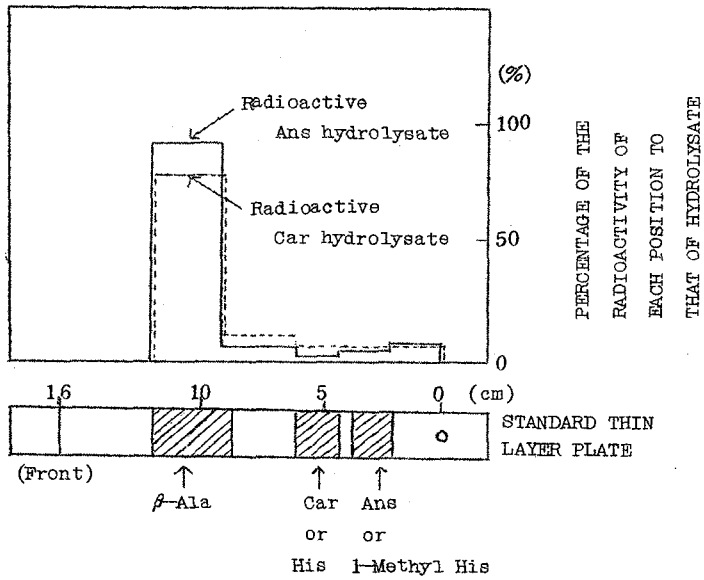


FIG. 12. Detection of the labeled β-Ala in the hydrolysates of Ans and Car biosynthesized from crotate-6-^{14}C.

The hydrolysate was analyzed with a thin layer chromatography(Wako gel B-5; ethanol:CH_3COOH:H_2O=10:10:1). The sample to count its radioactivity was prepared by extraction with 80% alcohol from the plate at the positions corresponding to each standard.

——— Hydrolysate of the radioactive Ans, - - - - - Hydrolysate of the radioactive Car.

ットを本実験室条件下で慣らした後筋肉内注射により長期間連続投与し、影響を体重の変化で追求した。Fig 13 に示す如く、10日目から増加率に影響が表われ、減少が認められた点で実験に供した。この間尿中のorotic acidを中心に260 mμ物質の排泄像を非処置と処置前半及び後半で比較しFig 14に示す。ラット1匹の24hr尿としての排泄レベルは非投与時には低いが、期間とともに増加して、投与期間の後半では5～20管目に285 mμ O.D./260 mμ O.D. 比が0.2～0.3のRNA関連物質と考えられるピークが表われるとともに、明らかにorotic acid相当のピークの増加が認められた。また非処置対照との比較から明らかなように6－azauracilそのままでの排泄増加は認められない。

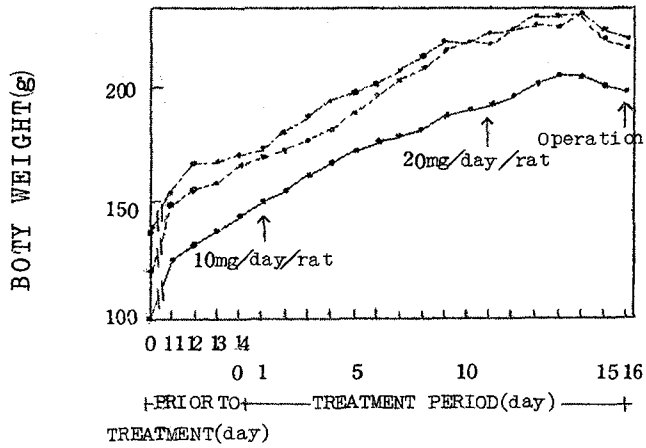


FIG. 13. Body weight curves of three rats by 6-azauracil tretment.
Strain: Wistar.
Diet: Oriental Yeast Ltd. 's food.
Water: Free taking.
Temp. : 20°±℃.

The 6-azauracil solution was daily administered to the rat by an intramusclarly injection over a 15-day period (05ml /day /rat for the first 10dayz and 1.0ml /day /rat for the following 5days).
Only on the last day, 6-azauracil was injected intraperitoneally instead of an intramusclarly injection at 1 hr before orotate-6-^{14}C injection.

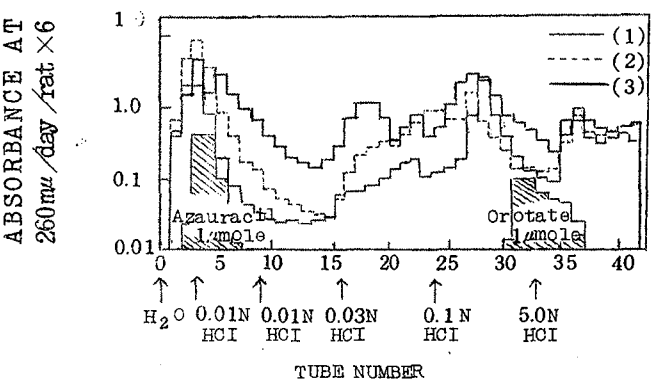


FIG. 14. Column chromatography of urine of 6-azauracil treated rat.
Column: Dowex-1 Cl-form 10ml (hight 10cm).

Elution was carried out with every 40ml of 0.001 N HCI, 0.01N HCI, 0.03N HCI, 0.1N HCI and 5.0N HCI successively at 5ml /15mim /tube.
The absorbance of eluate at 260mμ and 285mμ was measured. The whole urine of rats was collected as follows;
(1): —— Before treatment as control.
(2): ----- The first 10days (10mg /day /rat) after the azauracil administration.
(3): —— The following 5days (20mg /day /rat).

The menner of 6-azauracil administration was shown in legend of Fig. 4. The hatched columns represent the positions of 6-azauracil and orotate standard.

以上の根拠から投与後16日目の最後の注射1時間目にorotic acid〔6-^{14}C〕を与えたものである。

Orotic Acid〔6-^{14}C〕の肝及び骨格筋RNAへのとり込み　Table Ⅲに正常群、actinomycin D群および6-azauracil群のDNA及びRNAへのとり込みを示す。一般に薬物の影響は肝で顕著であり、本条件下では骨格筋につ

TABLE Ⅲ

Incoporation of orotate-6-^{14}C into RNA in liver and skeletal muscle of normal, actinomycin D or 6-azauracil treated male rats at one hour after the intravenous injection

One tenth ml(200μg) of actinomycin D solution was used for the injection to each rat. The intraperitoneal injection of actinomycin D was performed at 1hr before orotate-6-^{14}C injection. 6-Azauracil solution was used as shown in Fig.13 and in the legend to Fig.14 Nucleic acids contents were determined from the optical density at 262 mμ with use of a Beckman spectrophotometer. The determination of DNA was carried out by the deoxypentose assay according to BURTON53) The content of RNA was calculated by deducting DNA content from the total nucleic acid content. Two tenth ml of the nucleic acid fraction was used to measure radioactivity with 2π gas flow counter. Each value is the mean±standard error of three rats. The rat was given an injection of 20μCi/rat of orotate-6-^{14}C solution(1.384×10^{7}cpm/rat). The skeletal muscle was gastrocnemius muscle.

Tissue	Treatment	Nucleic acid content per wet tissue (g)		Radioactivity incorporated into RNA		
		DNA (mg)	RNA (mg)	per wet tissue(g) (cpm)	per RNA(mg) (cpm)	per protein(g)[1]
Liver	Normal	2.17±0.28	8.53±0.46	$141.7\pm3.1\times10^{3}$	$16.7\pm0.7\times10^{3}$	$678.8\pm14.0\times10^{3}$
	Actinomycin D	1.80±0.03	8.36±0.29	$22.2\pm3.3\times10^{3}$	$2.6\pm0.3\times10^{3}$	$103.6\pm17.5\times10^{3}$
	6-Azauracil	1.51±0.11	8.38±0.41	$82.3\pm2.0\times10^{3}$	$9.4\pm0.5\times10^{3}$	$379.4\pm17.6\times10^{3}$
Muscle	Normal	0.45±0.22	1.24±0.16	253±3	214±50	1355±122
	Actinomycin D	0.38±0.01	1.19±0.02	246±72	203±64	1185±704
	6-Azauracil	0.39±0.05	1.15±0.02	345±105	286±78	1592±443

1) Explained in Table Ⅱ.

いては明らかでない。肝において6-azauracilの影響はDNAをやや減少しているがRNA含量には変化ない。orotic acidのとり込みは著明に影響さ

れ、actinomycin Dにより正常値の約15％に、6－azauracilで約40％に減少している。

肝β－Alanine, Anserine及びcarnosineへの影響　正常群、actinomycin D群及び6－azauracil群の肝中のβ－alanine, anserine及びcarnosineの含量、総cpm並びに比放射能とこれらのconversion係数をまとめてTable Ⅳに示した。orotic acidから変換したβ－alanineは総cpmにおいてactinomycin Dでやや増加し、6－azauracilで著明に増加する。しかもこの反応は非常に早く投与10分後にも明らかに認められ，6－azauracil長期投与によってpathwayが変っていることを示唆する。しかしRNAへとり込まれたcpmに対するβ－alanineの生成率は6－azauracil, actinomycin Dとも著明に増加するが、とくにactinomycin DによってRNAの生成抑制の結果より増加する。6－azauracil投与によってβ－alanine含量が50倍以上にも増加していることは明らかにpathwayの変っていることを示している。従って比放射能（cpm／μmole）においてはactinomycin Dでは20％程増加するが6－azauracilでは逆に見掛上正常値の10％以下に減少している。しかも6－azauracilによる比放射能が投与後10分ですでに1時間後の値に達していることと、RNAへのとり込みとの比較からorotic acidからRNAへのconversionより早くβ－alanineへ変換していることが認められる。いずれにしろactinomycin D及び6－azauracil処置は、正常な場合orotic acidからRNAへのconversionの25％程がβ－alanineの系へ流れるものが、100％を越えてβ－alanineへ流れ、つまりRNAへよりはβ－alanineへの経路が多くなっている。

anserineの生合成はtotal cpmでactinomycin Dで10倍、6－azauracilで5倍といずれも著しく促進されている。6－azauracil投与の10分後での値と比較してanserineの生成はβ－alanineの生成よりは速度の

TABLE IV

Incorporation of orota te-6-^{14}C into β-alanine, anserine and carnosine in liver at one hour.

The explanation of treatments is shown in Table I. β-Alanine, anserine and carnosine were abbreviated as β-Ala, Ans and Car in the text. Incorporation ratio was designed to compare with the weight of organ, the content of RNA and the substantial weight of tissue that was represented as protein. The protein was a residual dried powder which removed a $HClO_4$ soluble fraction, nucleic acid, an alcohol and ether soluble fraction and moisture from a tissue.

	Treatment	Incorporation in whole organ (cpm)	Content in whole organ (μmole)	Specific activity (cpm/μmole)	Incorporation ratio			Conversion ratio		Formation ratio of Ans and Car
					per wet tissue(g) (cpm)	per RNA(mg) (cpm)	per protein(g) (cpm)	cpm/cpm of RNA (%)	cpm/cpm of β-Ala (%)	cpm of Ans/cpm of Car
β-Alanine	Normal	$169.1 \pm 23.7 \times 10^3$	0.35 ± 0.03	$484.8 \pm 60.2 \times 10^3$	$34.4 \pm 1.5 \times 10^3$	$3.9 \pm 0.3 \times 10^3$	$162.5 \pm 15.2 \times 10^3$	24±3		
	ActinomycinD	$283.5 \pm 1440 \times 10^3$	0.52 ± 0.04	$602.8 \pm 353.6 \times 10^3$	$62.4 \pm 31.5 \times 10^3$	$7.6 \pm 4.0 \times 10^3$	$288.6 \pm 143.4 \times 10^3$	320±190		
	6-Azauracil	$773.0 \pm 12.0 \times 10^3$	24.41 ± 6.54	$33.8 \pm 4.0 \times 10^3$	$103.7 \pm 13.6 \times 10^3$	$12.5 \pm 2.0 \times 10^3$	$479.7 \pm 68.1 \times 10^3$	120±25		
	6-Azauracil[1)]	831.5 ± 10^3	23.37	35.6×10^3	109.3	14.3×10^3	504.4×10^3	350		
Anserine	Normal	$33.5 \pm 11.8 \times 10^2$	<01	≥33000	680±230	80±30	3300±1180		2.2±1.0	9.1±2.8
	ActinomycinD	$324.7 \pm 96.2 \times 10^2$	<0.1–0.36	approx. 130000	7190±2130	880±280	33070±9410		16.8±8.6	562.3±325.1
	6-Azauracil	$157.9 \pm 17.4 \times 10^2$	3.71±0.42	4600±310	2180±340	250±30	10020±1350		2.4±0.8	20.2±15.0
	6-Azauracil[1)]	59.2×10^2	4.18	1400	780	100	3590			17.1
Carnosine	Normal	367±40	<0.1	>3600	74±7	8±0.7	352±16		0.22±0.03	
	Actinomych D	82±21	<0.1	>800	18±5	2±0.7	84±22		0.05±0.02	
	6-Azauracil	1870±1470	0.80±0.53	1630±150	270±210	30±23	1210±960		0.33±0.28	
	6-Azauracil[1)]	350	0.25	1390	46	6	210		0.04	

1) At 10min after injection, 1animal. And all other values are the mean±standard error of 3animals.

遅いものである。また肝中にはanserine及びcarnosineが定量可能な程検出されないが、6－azauracilの長期投与はβ－alanine の含量増加と同様anserineは3.7μmoleも存在する。carnosineはanserineよりは少ないが0.8μmole程度が認められるようになる。

放射能のとり込みは一般にanserineはβ－alanineの2％、carnosineはさらに少くanserineの1／10程がとり込まれるが、actinomycin Dの処置はanserineの生合成を8倍程促進し6－azauracil は影響していない。一方carnosine は actinomycin Dによって逆に生成を正常値の1/4 程に抑制され、6－azauracil ではanserine に対すると同程度の促進率つまり正常値の5倍に促進しており、β－alanine との比較でも促進的である。従ってanserine と carnosine の生成比は6－azauracil ではさ程変らないが、actinomycin Dでは非常にanserine が多くなっている。総cpmはβ－alanine 、anserine ついでcarnosine の順に少なくなり、しかもオーダーが異なっており明らかに差が認められ、また比放射能（cpm/μmole）も、anserine 、carnosine は定量的ではないが、明らかにβ－alanine 、anserine ついでcarnosine という順に小さくなる。

骨格筋β－Alanine 、Anserine 及びCarnosine への影響

TABLE V

Incorporation of orotate-5-^{14}C into β-alanine, anserine and carnosine in skeletal muscle at one hour.

The experimental conditions explained in Tables III and IV are all the same to Table V.

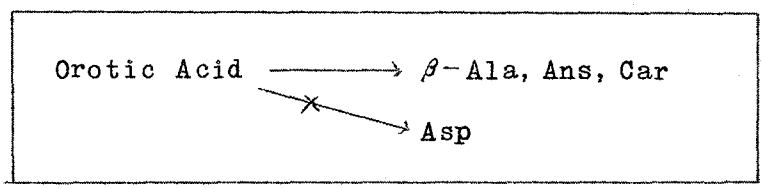
	Treatment	Content			Incorporation ratio			Specific activity	Conversion retio		Formation ratio of Ans and Car
		Per Wet tissue (g) (μmole)	Per RNA(mg) (μmole)	Per protein (g) (μmole)	Per Wet tissue (g) (cpm)	Per RNA(mg) (cpm)	Per Protein (g) (cpm)	Per μmole (cpm)	cpm/cpm of RNA (%)	cpm/cpm of β-Ala (%)	cpm of Ans/cpm of Car
β-Alanine	Normal	<0.05	trace	trace	24±14	17±7	118±64	>400	10±5		
	Actinomycin D	<0.05	trace	trace	345±94	279±92	1350±440	>9000	101±1		
	6-Azauracil	0.13±0.04	0.11±0.03	0.60±0.20	195±47	163±34	901±193	2540±1790	58±4		
	6-Azauracil 1)	0.13	0.12	0.62	62	59	309	500	650		
Anserine	Normal	1.4±0.4	1.1±0.1	7.1±1.6	18±11	13±6	92±50	12±4		77±1	1.2±0.2
	Actinomycin D	1.8±1.0	1.5±0.8	6.1±2.7	90±35	75±26	312±79	45±3		38±24	12.9±4.0
	6-Azauracil	3.1±0.3	2.7±0.2	14.8±1.4	126±27	105±19	583±110	38±11		65±2	0.34±0.08
	6-Azauracil 1)	2.6	2.4	12.8	40	38	199	16		64	1.1
Carnosine	Normal	3.1±0.1	2.6±0.7	16.2±1.8	15±6	9±1	74±28	6±1		73±16	
	Actinomycin D	3.0±0.6	2.5±0.5	11.0±2.3	9±5	7±4	28±12	3±1		4±3	
	6-Azauracil	9.1±1.2	8.1±1.3	43.7±6.7	415±130	342±139	1903±784	56±3		202±44	
	6-Azauracil 1)	10.2	9.7	50.9	35	33	175	3		57	

1) At 10min aft injection, 1 animal. And all other values are the mean ± standard error of 3 animals.

結果をTableVにまとめて示す。骨格筋は肝とは異なってβ－alanine をほとんど含まず、逆にanserineとくにcarnosineが多く含まれ、従来の所見と一致する。しかし生合成の面から考えるとanserine 及びcarnosine ともに肝がその生成場所であることが認められ、従って筋は貯蔵保持される場所と考えられる。この所見は第一章に述べたin vitroの所見とも一致し、一般に代謝も肝に比し著しく低いものである。総cpm及び比放射能とも肝に比し著しく低く、バラツキも大きくて生合成の点ではこれらのデーターから明瞭な結論は得られない。概略肝での傾向と一致している。Table V の値は筋の単位当りで表示した。β－alanine, anserine及びcarnosine ともその含量は6－azauracil処置で著明に増加している。cpmはRNAの1／10がβ－alanineにとり込まれるが、actinomycin D処置でβ－alanine とanserineは増加し、carnosineは減少する。β－alanineへはRNAと同レベルが利用されている。6－azauracilではβ－alanine, anserine及びcarnosineともに増加して、とくにcarnosine の特異的な増加が認められ、β－alanineやanserine より多くとり込まれている。一般的にみて肝の場合より、β－alanineに比してanserineとくにcarnosineへのとり込みが大きい。

〔小　括〕　orotic acid〔6－^{14}C〕はanserine, carnosineへincoporateするとともにactinomycin Dによりβ－alanine, anserine の形成が促進されるが、carnosine形成は減少する。また6－azauracil阻害でβ－alanine, anserine, carnosineへはともに著明に増加する。この影響は肝で著明であり、6－azauracil処置では肝β－alanine含量は約70倍にもなり、普通化学的には骨格筋にのみ検出されたanserine, carnosineが肝でも明らかに認められるようになる。従ってβ－alanine, anserine, car－

nosineの形成系はRNA代謝と直接的関係のあることが考えられる。この章はまとめると



が証明された。

第四章　Carbamyl Aspartic Acid〔2-^{14}C〕の直接のα-脱炭酸反応によるCarbamyl β-Alanine形成の検討

anserine, carnosine形成におけるβ-alanine の体内基源として第二章で述べた如くaspartic acidを証明した。しかしβ-aspartyl-histidineからのα-脱炭酸によるβ-alanine もしくはcarnosineがラットにおいては形成されないことを認めた。また第三章で述べた如くorotic acid〔6-^{14}C〕からβ-alanineの形成を認め、その際6-azauracilによりorotydilic acidからUMPの形成を阻害したが、逆にβ-alanineの形成が異常に増加していることを認め、Finkらの説でβ-alanineのこの増加を説明することは出来ない。そこでこの6-azauracilによる影響の原因がorotydilic acidより前段階での代謝経路の変化によるのか、UMPの形成もしくはRNA合成阻害等による二次的な原因によるのか、さらには6-azauracilの阻害位置が従来の説の如くorotydilic acid の脱炭酸の阻害だけではないのかを検討した。

まずcarbamyl aspartic acidを分岐点としてorotic acid になる系と脱炭酸によるcarbamy β−alanineを経てβ−alanineになる系が考えられる。この点を考慮してin vivoでcarbamyl aspartic acid〔6−^{14}C〕投与によるβ−alanine, anserine及びcarnosineの形成を検討し、in vitroでcarbamyl aspartic acidからcarbamyl β−alanine及びβ−alanineの形成を検討した。

第一節　Carbamyl Aspartic Acid〔2−^{14}C〕のβ−Alanine, Anserine及びCarnosineへのとり込み

実　験　方　法

試　薬　carbamyl aspartic acid〔2−^{14}C〕は大日本製薬中央研究所三奈木博士より恵与されたものである。ペーパークロマトグラフィーにより均一であることを確かめた。

動物及び処置　ウィスター系雄ラット体重約100gを用い一夜絶食し、エーテル麻酔下股静脈にcarbamyl aspartic acid〔2−^{14}C〕20μCi／0.7μmole／rat注射後1時間後に殺し、肝臓と腓腸筋を取り出して第二章の如くにsampleを調整し、β−alanine, anserine, carnosine, RNA及びDNAの分離定量を同様に行なった。

実　験　結　果

carbamyl aspartic acid〔2−^{14}C〕からβ−alanine, anserine及びcarnosineの形成能を肝と腓腸筋について検討した結果をTable Ⅵ、Table Ⅶに示す，肝についてorotic acid〔6−^{14}C〕の場合と同様β−alanineに最も多く放射能が検出され、ついでanserine, carnosineの順である。特に

β−alanineへのとり込みは多くRNAに入ったcountの約44%になる。筋肉においてspecific activityはβ−alanineに最も多く次いでanserine, carnosineの順になっていることからcarbamyl aspartic acid〔2−^{14}C〕の場合もβ−alanine→anserine→carnosineの系で合成されていることがわかる。carbamyl aspartic acidのaspartic acidの骨格が直接尿素合成の系にとり込まれることはないがtrans carbamylationの反応によりcarbamyl基が尿素合成に利用されることを考慮に入れcarbamyl aspartic acid〔2−^{14}C〕からβ−alanine, anserine及びcarnosineへのとり込みはorotic acid〔6−^{14}C〕の場合に比べバラツキが大きくin vivoの実験ではorotic acid〔6−^{14}C〕の場合と直接比較することは困難であった。肝においてanserineとcarnosineの形成率にorotic acid〔6−^{14}C〕の場合ほど差が認められないのもこの点によるものと考えられる。

Table VI Incorporation of Carbamyl Aspartic Acid〔2−^{14}C〕into β-Alanine, Anserine and Carnosine in Liver at one hour.

Fraction	Whole CPM	Whole μ mole	CPM per μ mole	CPM per RNA(CPM)	CPM / CPM(β-Alanine)	CPM(Anserine) / CPM(Carnosine)
	×10³		×10³	%	%	
β-Alanine	343.8±138.3	1.34±0.04	255.5±122.6	43.5		—
Anserine	12.0±3.8	<0.1	>120	1.4	4.1	2.3
Carnosine	7.9±3.1	<0.1	> 80	1.0	2.8	—

mean±s.e.

Tadle Ⅶ Incorporation of Carbamyl Aspartic Acid [2-^{14}C] into β-Alanine, Anserine and Carnosine in skeletal Muscle at one hour.

Fraction	CPM / Wet Jissue(g)	μ mole / Wet Jissue(g)	CPM per μ mole	CPM per RNA(PM)	CPM / CPM(β-Alanine)	CPM(Anserine) / CPM(arnosine)
			×10³	%	%	
β-Alanine	3,670±2,400	0.24±0.09	41.2±3.7	103	—	—
Anserine	11,180±6,960	1.33±0.37	7.4±3.4	247	336	1.0
Carnosine	10,270±5,920	2.12±0.47	6.0±4.0	226	323	—

mean±s.e.

第二節　Carbamyl Aspartic Acid の脱炭酸反応による Carbamyl β-Alanine 及び β-Alanine 形成の検討

前節に述べた如く in vivo 実験において carbamyl aspartic acid から carbamyl β-alanine の形成がはっきり認められなかったので、さらに in vitro でこの系について検討を加えた。

実験方法

試薬　carbamyl aspartic acid, carbamyl β-alanine はシグマ社の製品を用いた。

酵素　ウィスター系雄ラット体重約100g前後のものを用いた。24hr 絶食させ、撲殺後頸動脈切断により充分瀉血するとともに流水で体温を下げる。肝臓を取り出し Grisolia らの方法[57]に順じてリン酸緩衝液 pH 7.2を用い氷水で冷却下テフロンホモゲナイザーにより1分間10ストロークで20％ホモジネ

ートを調整した。12,000 X G 10min冷凍遠心機を用い遠心分離後上清を酵素液として用いた。

反　応　　ワールブルグ検圧計を用いて検討した。主室に酵素液2.0 mℓ、第1測室に基質としてD,L－carbamyl aspartic acid 10μ molesもしくはcarbamyl β－alanine 5μ moles／0.5 mℓリン酸緩衝液pH 7.2、第2測室に5N硫酸0.2 mℓ、副室に濾紙に5N硫酸0.1 mℓしみ込ませた。窒素置換を行なったものと好気中で反応させた2様をつくり37℃で10min preincnbation後第1測室の基質と酵素液を混合し60min反応後第2測室の硫酸を反応液に加え反応を停止させた。さらに10min反応後マノメーターの読みにより炭酸ガスの発生をendogenousなものを差し引いて基質により発生した炭酸ガスとして求めた。

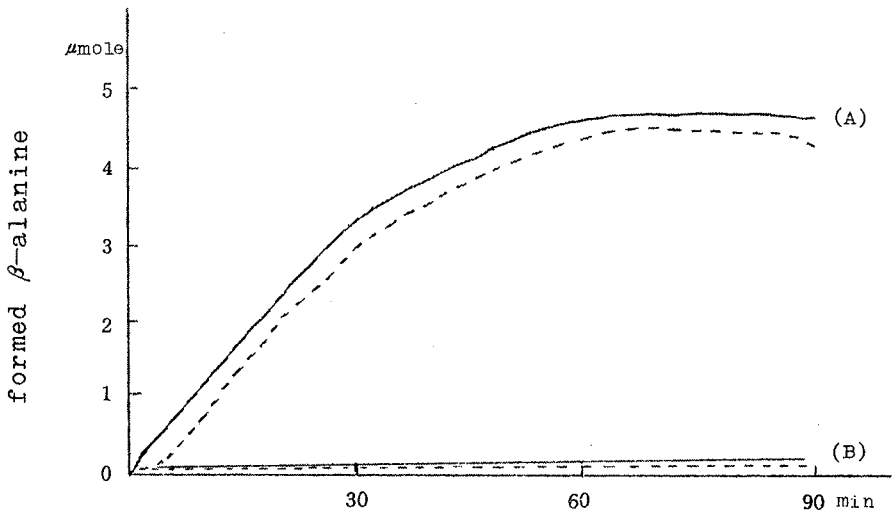
反応生成物の確認　　炭酸ガスの発生を求めた後直ちに10N NaOHにより中和後エタノールを加えて80%アルコールとし、3,000rpm 10 min 遠心分離して上澄を集め沈殿についてさらに2回80%アルコールで洗い3,000rpm 10 min遠心分離を行ない上清を合して40℃以下で減圧乾固してpH 2.2のアミノ酸アナライザー用のクエン酸緩衝液にとかし1.0 mℓを用いアミノ酸自働分析機によりβ－alanineの定量を行なった。常にendogenousなβ－alanineを差し引いた。残りの検体につき東洋濾紙No.51を用いn-butanol：AcOH：water（4：1：5）の展開溶媒を用い上昇法にてペーパークロマトグラフィーを用いニンヒドリン反応によりβ－alanineの定性、P－dimefhylaminobenz－aldehydeの反応[58]によりcarbamyl β-alanine、carbamylaspartic acidの定性を行なった。

実　験　結　果

炭酸ガス発生量とアミノ酸自働分析機によりβ－alanineの定量を行なった結果をFig 15に、ペーパークロマトグラフィーによる結果をFig 16に示

した。carbamyl β−alanine の場合窒素置換による嫌気的条件でも好気的条件でも加えた基質のほぼ100％がβ−alanineにconversionし、この点はFritzson[59]の示す如く非常に反応性の強い系である。しかしcarbamyl aspartic acidについては嫌気的条件下でも、好気的条件下でもcarbamyl β−alanine, β−alanineいずれの生成も認められなかった。

Fig. 15. Decarbamylation of carbamyl β-alanine or carbamyl aspartic acid.



——— decarboxy lation

------ ninhydrine reactron

(A) carbamyl β-alanine: 5μmoles

(B) D, L-carbamyl aspartic acid: 10μmoles

carbamyl aspartic acidについてはさらに詳しくpH, cofactor としてビタミンB_6, ATP, 無機イオン等について検討し、酵素についても肝スライス、ホモジネート、硫安分画、アセトン粉末さらに第二章に示した如く6−azauracil 15日間連日投与の肝酵素など種々検討を加えたが、carbamyl

aspartic acidからcarbamyl β-alanine もしくはβ－alanine は検出されなかった。第二章のorotic acid〔6－^{14}C〕を用いた実験で6-azauracil

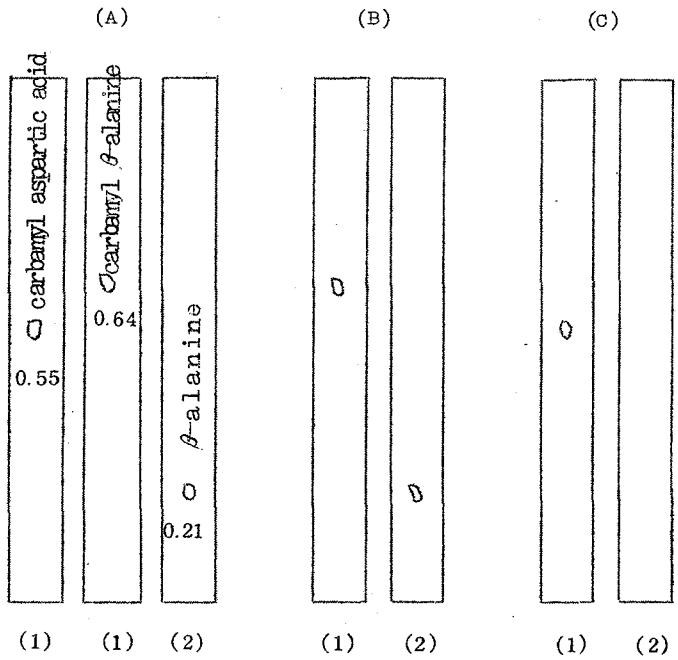


Fig. 16. Poperpertition chromatagrams of Reaction Products. Toyo Roshi Ltd. No. 51, ethanol:AcOH:water (10:10:1) ascending method.

(1) p-dimethylaminobeu 3 aldehyde reaction

(2) minhydrin reaction

(A) standard

(B) reaction with carbamyl β-alanine.

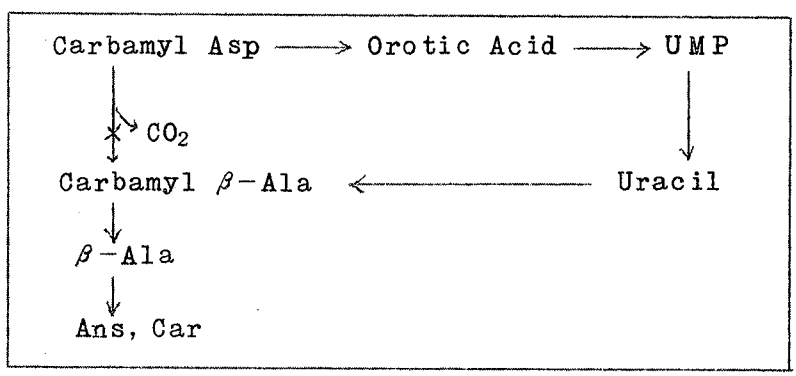
(C) reaction with carbamyl aspartic acid

投与によりβ－alanine の化学的含量は正常の場合の７０倍と異常に増加していることから，

6－azauracil 投与によ

りorotidilic acidからUMPの形成が阻害され、carbamyl aspartic acid → carbamyl β-alanine → β-alanineの素が賦活されることを期待したがendogenousなβ-alanineは正常の場合より多量に存在していたもののcarbamyl aspartic acidを基質にcarbamyl β-alanine、β-alanineは生成されなかった。このことはGrisolia[57]がcarbamyl aspartic acidからcarbamyl β-alanineの系の存在をFederation Proceedingsに簡単に述べそれ以後文献が出ていないことも考えて著者のin vitro, in vivoの結果から、ラット肝ではcarbamyl aspartic acid → carbamyl β-alanine → β-alanineの系は存在しないか、あったとしても非常に反応の弱いものと考えられる。

〔小　括〕　ラットにおいてはcarbamyl aspartic acidの直接の脱炭酸反応によるcarbamyl β-alanine, さらにはこの脱carbamylによるβ-alanineの形成はin vivo, in vitroの実験で認めることは困難であった。しかしcarbamyl β-alanineを基質にすると容易に脱carbamyl反応によりβ-alanineが形成されることから、carbamyl aspartic acidからcarbamyl β-alanineへの変換は起っていないものと考えられる。すなわち



が考えられる。

第五章　Anserine の Carnosine への変換の証明

前章までで体内における anserine, carnosine へとり込まれる β-alanine の形成経路が明らかになったが、一方 histidine の問題がある。本研究においてはこの点に関し、histidine を必須アミノ酸とするラットを素材に追求したものであるので histidine 生合成はさておいて、anserine, carnosine 生合成順序の問題が残る。一般に carnosine が N-methyl 化して anserine が形成されると考えられていた[60) 61)]が、最近多くの問題が指摘され、Dobrynina[62)]は anserine と carnosine はそれぞれ独立に形成されると考えた。著者は第三章の結果から先ず anserine が形成されて、次いで carnosine に変換する可能性を示した。さらにこの点をはっきりさせるため ^{3}H-anserine 及び ^{3}H-carnosine を調整し、これらをラットに投与した場合の β-alanine, anserine 及び carnosine への分布を絶対量と比放射能で検討し、この問題に対する著者の仮説の立証を試みた。

第一節　Anserine 及び Carnosine の三重水素化

実　験　方　法

三重水素 Anserine もしくは Carnosine の調整と放射能測定　約 10 mg の anserine もしくは carnosine を wilzbach 法[63)]に従い 2 週間 1 Ci のトリチュウムガスを接触させた。遊離しやすいトリチュウムを完全に水素と置きかえるため凍結乾燥と水-エタノール溶媒からの再結晶をそれぞれ数回くり返し、水一定量を加えて凍結保存した。標識化合物の放射化学的純度は 2π ラジオクロマト・スキャナーによってチェックした。実際の放射能測定はパッカー

ド社のシンチレーション計数管を用いジオキサン系溶媒[64]（ナフタレン：100g ppo：7g，popop：0.3g ジオキサンに溶して1ℓとする）を用いた。アミノ酸自働分析機より分取した試料を一定量とりアンバーライトIRC−120 により脱塩した試料をシンチレーターに溶した。内部標準によりクエンチングを補正して放射能の絶対測定を行なった。

実　験　結　果

三重水素化合物　標準化合物は水溶液として凍結保存したものを用にのぞんでペーパークロマトグラフィー（BuOH：AcOH：H_2O＝4：1：1）により精製し、水にて溶出し濃縮して一定量とした。比放射能は ^{3}H−anserine 8,052,400 dpm／0.5 mg／0.2 mℓ，^{3}H−carnosine 7,474,250 dpm／0.5mg／0.2 mℓである。なお置換^{3}H数は重水素置換法によりNMRを用いて検討した結果、それぞれ1分子当りβ−alanine 4個、anserine 12個、carnosine 9個であり、それぞれ相互変換した場合モル比により補正した。

第二節　三重水素標識Anserineもしくは Carnosine 投与時のラット肝臓及び腓腸筋中での相互変換

実　験　方　法

動物及び処置　体重約150g のウイスター系雄ラット24 hr 絶食させ各群3匹づつ用いた。生理食塩水溶液とした^{3}H−anserine もしくは^{3}H−carnosine を股静脈内注射した。1時間後に撲殺して殺し、肝と腓腸筋をとり出し5倍量のエタノールを加えテフロンホモゲナイザーにてホモゲナイズ後、第三章に示した如く試料を調整し、分取型アミノ酸自働分析機（日立KLA−Ⅲ型）を用い同様に、分取比4：1としてβ−alanine，anserine 及び carnosine

の分取と化学的定量を行なった。ＲＮＡも第三章に従い化学的定量と放射能を測定した。

実　験　結　果

標識Anserineのβ−Alanine, Carnosineへの転換　結果をTable Ⅷに示す。肝においてβ−alanine, anserine, carnosine及び全ＲＮＡへの放射能は同じである。腓腸筋におけるanserineのcarnosineへの放射能のとり込み率は肝の場合と比較して1／2.5と少ない。conversion ratioは残った^{3}H−anserineの活性を100として表わした。correct valueは比放射能にもとづく転換率を置換された三重水素の数で補正した。anserineは確かにβ−alanineやcarnosineに転移するが、肝と腓腸筋では明らかな差が認められる。^{3}H−anserineの比放射能にもとづく修正放射能の順序は肝ではanserine（30.000）＞carnosine（10.000）＞β−alanine（7.500）であるが腓腸筋ではβ−alanine（24.000）＞anserine（2.000）＞carnosine（150）の順である。

標識carnosineのβ−Alanine, Anserineへの転換　結果をTable Ⅸに示す。肝において投与した^{3}H−carnosineの3〜5％しかanserine, β−alanine及びＲＮＡへとり込まれなかった。腓腸筋において、carnosine, anserine及びＲＮＡへの放射能はほぼ同じレベルであったが、β−alanineへの放射能のとり込みはそれらの半分であった。比放射能にもとづく修正放射能の順序は肝ではcarnosine（753.000）＞β−alanine（50.000）＞anserine（30.000）腓腸筋ではβ−alanine（5.000）＞anserine（1.600）＞carnosine（230）である。

Table VIII Conversion from the Tritiated Anserine.

(mean ± standard error)

	Liver				Gastrocnemius			
	dpm per Whole tissue	Conversion ratio[1]	Sp. act. dpm/μmole	Correct. value[2]	dpm per g tissue	conversion ratio[1]	sp. act. dpm/μmole	Correct. value[2]
β-Alanine	2949±1099	118	2506±1129	7,500	836±458	86	7953±5300	24,000
Anserine	2643±387	100	>30,000[3]	30,000	970±449	100	1999±1024	2,000
carnosine	3657±852	138	7553±2598	10,000	359±195	37	112±6	150
RNA	3078±303	116	81±4[4]		801±216	83	504±112[4]	

1) dpm of each compound/dpm of anserine × 100.

2) specific radioactivity is corrected for the number of tritiated atoms; anserine 12, carnosine 9 and β-alanine 4. This value represents the mole number of each compound converted from anserine,

3) Chemical content is below 0.1μmole.

4) Per mg of RNA.

Table Ⅸ Conversion from the Tritiated Carnosine.

(mean ± standard error)

	Liver				Gastrocnemius			
	dpm per Whole tissue	Convrsion ratio[1]	sp. act. dpm/μmole	Correct. value[2]	dpm per g tissue	Conversion ratio[1]	sp. act. dpm/μmole	correct. value[2]
β-Alanine	2281±606	3.0	21836±10670	50,000	401±250	45	2232±1029	5,000
Anserine	2780±495	3.7	>30,003[3]	30,000	1098±38	123	1610±417	1,600
carnosine	75285±30389	100	>753,000[3]	753,000	895±468	100	231±20	230
RNA	3968±374	5.3	106±14[4]		1143±371	128	808±281[4]	

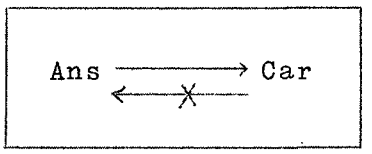
1) dpm of each compound/dpm of carnosine × 100.

2) Specific radioactivity is corrected for the number of tritiated atoms as same in Table Ⅷ.

3) Chemical content is below 0.1μmole.

4) Per mg of RNA.

〔小　括〕　以上のことから肝では ^{3}H－anserine がcarnosion に変換し次いで β－alanine と histidine に加水分解され、^{3}H－carnosine の場合は分解された ^{3}H－β－alanine が再び anserine にとり込まれたものと考えられる。一方筋では ^{3}H－anserine 投与でも ^{3}H－carnosine 投与でも、β－alanine が最も比放射能が高く、ついで anserine であり、carnosine が最も低い。この事実は肝で分解されたβ－alanineが筋においても速度は遅いが肝と同様に anserine にとり込まれ、ついで carnosine に変換したと考えられる。すなわち



が証明された。

第六章　β－Alanine, Anserine 及び Carnosine 系とＲＮＡ代謝系との関連性に関する検討

筋肉中に多量存在する anserine, carnosine は aspartic acid から uraci を経てβ－alanine となりまず anserine が出来てから後脱 methyl 化して carnosine が生ずることを述べて来た。この anserine, carnosine 生成系からみて、anserine, carnosine の生理的意義を考えるとＲＮＡ代謝との関連が問題になる。そこで生合成経路からまず末端の carnosine を大量投与した場合と、dipeptide が出来る分岐点のβ－alanine を大量投与した場合の orotic acid〔6－^{14}C〕のβ－alanine, anserine 及び carnosine への incorporation の検討によりこれら dipeptide の合成経路をさらに確

認すると同時にＲＮＡ合成に対する影響をも検討した。さらに放射性燐酸によるＲＮＡパルス標識法、またribonnclease に対する影響を検討することにより anserine, carnosine 形成系とＲＮＡ代謝系の関連性を検討した。

第一節　β－Alanine もしくは Carnosine の長期大量投与により惹起された Orotic acid〔6－^{14}C〕の β－Alanine, Anserine, Carnosine 及びＲＮＡへのとり込みに対する Feed Back 効果からみた、β－Alanine－Anserine－Carnosine 形成系とＲＮＡ生成系及び Uracil 分解系との関連性の検討

実　験　方　法

動物及び処置　ウィスター系雄ラット体重約100g のものを用い、対照群、carnosine 投与群、β－alanine 投与群、さらに第二章で肝臓の β－alanine 含量を増加させた 6－azauracil 投与群と４群に分け各群３匹づつ用いた。対照群は生理的食塩水 0.2ml を、carnosine, β－alanine 投与群は各 20mg／day／rat 0.2ml 生理的食塩水溶液を、6－azauracil 投与群は 20mg／day／rat 0.2ml 20% propylene glycol 溶液をそれぞれ 15 日間連日皮下投与を行なった。15 日目には一夜絶食させそれぞれ 0.4ml（＝各々 40mg）を腹腔内投与し正確に 1 hr 後 6－azauracil 投与群を除いて orotic acid〔6－^{14}C〕を 0.2ml（＝20μ Ci／0.5μ mole）股静脈より投与して 1 hr 後に撲殺して肝、腎、肺心、脾、小腸及び腓腸筋をとり出し第二章の如く検体を調整しアミノ酸自働分析機により β－alanine, anserine 及び carnosine の定量を,肝臓及び腓腸筋については同時に分取して β－alanine, anserine, carnosine 分画を集め放射能の測定を行なった。6－azauracil 投与群は 15日目に同様 0.4ml（＝40mg）腹腔内投与したあと２時間後に撲殺し、　他

と同様に検体を調整してβ－alanine，anserine及びcarnosine 含量のみを求めた。

実 験 結 果

6－Azauracil，Carnosine及びβ－Alanine長期大量投与による肝臓、腎臓、肺臓、心臓、脾臓、小腸及び腓腸筋中のβ－Alanine，Anserine及びCarnosineの含量　結果をTable Xに示す。6－azauracil 投与群では第二章に述べた如く肝、及び腓腸筋中のβ－alanine含量が異常に多くなっている。その他の臓器も腎、脾及び小腸に於いてβ－alanine含量が増加している。さらに肝、心においてもanserine，carnosine が検出されるようになる。carnosine投与により各臓器にcarnosineが検出されるとともに、β－alanine が多量検出され、むしろ臓器によりβ－alanine 投与による場合より多量検出される。特に肝や腎に多量検出されることはcarnosinase が肝や腎に検出される[65]ことから、carnosine がこれらの臓器中で分解酵素によりβ－alanine に分解され、このβ－alanine が検出されたものと考えられる。β－alanine投与により脾や小腸にcarnosineが検出されてくるとともに腓腸筋にanserineが多量検出される。腓腸筋中にanserine含量が増加することはcarnosine投与によっても同様にanserineが増加することから、腓腸筋中にβ－alanine が増加することによりanserine が増加すると思われる。

β－Alanine及びCarnosine大量長期投与によるOrotic acid〔6－^{14}C〕のβ－Alanine，Anserine及びCarnosineへのとり込み　結果をTable XIに示す。肝においてβ－alanine，carnosine 投与により全般的に全カウントは増加している。β－alanine含量も両処理群とも増加しているので逆にspecific activityは対照群が一番多くついでβ－alanine 投与群でcarnosine投与群が最も低い。このことはβ－alanine合成系は全体として

Table X Contents of β-Alanine, Anserine and Carnosine (μmole/g)

Group	Fraction	Liver	Kidney	Lung	Heart	Spleen	Small Intestine	Skeletal Muscle
Control	β-Alanine	0.07	0.20	0.81	0.06	0	0.04	0
	Anserine	0	0	0	0	0	0	1.38
	Carnosine	0	0	0	0	0	0	3.08
6-Azauracil Treatment	β-Alanine	3.30	1.58	0.12	0.04	0.32	0.55	0.13
	Anserine	0.50	0	0	0.02	0	0	3.11
	Carnosine	0.11	0	0	0.01	0	0	9.24
Carnosine Treatment	β-Alanine	1.21	4.47	1.23	0.14	0.26	0.89	0.97
	Anserine	0.06	0	0	0	0	0.04	3.68
	Carnosine	1.67	7.17	0	0.08	0.66	0.07	3.47
β-Alanine Treatment	β-Alanine	0.28	1.52	1.43	3.19	0.73	4.00	0
	Anserine	0	0	0	0	0.04	0	4.06
	Carnosine	0	0	0	0	0.15	0.13	3.19

mean of 3 samples

Table XI Incorporation of Orotate (6-^{14}C) into β-Alanine, Anserine and Carnosine

Organ	Fraction	Treatment	Whole CPM	Whole μmole / μmole	μmole / Wet Tissne(g)	CPM / Wet Tissne(g)	CPM / RNA(mg)	CPM / μmole
Liver	β-Alanine	Normal	169,137	0.35		34,358	3,895	484,754
		β-Alanine	396,259	1.55		71,562	7,206	286,650
		Carnosine	501,309	5.68		106,536	11,658	88,522
	Anserine	Normal	3,354	0.1>		678	79	33,000<
		β-Alanine	33,568	0.1>		6,077	526	330,000<
		Carnosine	38,677	0.27		8,248	910	145,676
	Carnosine	Normal	367	0.1>		74	8	3,600<
		β-Alanine	2,198	0.1>		395	40	21,000<
		Carnosine	5,452	7.8		1,146	125	669
Gastrocnemius	β-Alanine	Normal			0.1>	24	17	400<
		β-Alanine			0.1>	236	204	2,600<
		Carnosine			0.98	140	98	170
	Anserine	Normal			1.39	18	13	12
		β-Alanine			4.51	270	233	58
		Carnosine			3.67	222	155	58
	Carnosine	Normal			3.08	15	9	6
		β-Alanine			4.08	296	254	77
		Carnosine			3.47	354	246	101

mean of 3samples

β－alanine 投与、carnosine 投与を長期間つづけると強まっているために全カウントが増加するのではないかと考えられる。それ故anserine 、 car－nosine 生成系も賦活されβ－alanine 、 carnosine 投与によりanserine、carnosine 分画の全カウントは対照と比べて大きくなっている。この傾向はanserine 、 carnosine の含量が増加しているcarnosine 投与による方が顕著に認められる。これらのことからβ－alanine 、 carnosine 大量長期投与によりpositive feed back がかかりorotic acid → UMP → β－ala－nine → anserine → carnosine の系が賦活したものと考えられる。

腓腸筋にはβ－alanine 含量が少いのでspecific actirity では論ずことが出来ないがcpm/Wet tissue(g)でもやはりβ－alanine 、 carnosine 大量長期投与で対照より大であり、肝の場合のcarnosine 投与と異なりβ－ala－nine 投与により腓腸筋中のβ－alanine のカウントが最も多くとり込まれている。このことはanserine にも同様であるがspecific activity はβ－alanine投与とcarnosine 投与とでは差がない。carnosine へのとり込みはcarnosine 投与が一番多く、またspecific activity も carnosine 投与した場合一番大である。これらの結果から腓腸筋においてもβ－alanine 、carnosine 投与によりanserine 、 carnosine 合成系の賦活したことを示している。

<u>β－alanine およびcarnosine投与によるorotic acid〔6－^{14}C〕のRNAへのとり込みに対する影響</u>　結果をTable XIIに示す。RNA含量に対しては肝におけるβ－alanine 投与の増加傾向以外含量に対する影響はそれほど認められない。しかしorotic acid〔6－^{14}C〕からRNAへのとり込みは肝ではβ－alanine 、 anserine 、 carnosine へのとり込みと同様carnosine 投与により増加する。RNAへのとり込みに対しては肝より腓腸筋においてorotic acid〔6－^{14}C〕のRNAへのとり込みにβ－alanine 、carnosine

Table XII Incorporation of Orotate[6-^{14}C] into RNA in Rat

m ± s. e.

Tissue	Treatment	DNA / Wet Tissue (g)	RNA / Wet Tissue (g)	CPM of RNA / Wet Tissue (g)	CPM of RNA / Protein (g)	CPM of RNA / RNA (mg)
		mg	mg	$\times 10^3$	$\times 10^3$	$\times 1$
Liver	Normal	2.17 ± 0.28	3.53 ± 0.46	142 ± 3	679 ± 14	16704 ± 701
	β-Alanine	1.29 ± 0.06	9.99 ± 0.15	191 ± 10	796 ± 111	19233 ±1268
	Carnosine	2.16 ± 0.03	9.12 ± 0.13	193 ± 13	884 ± 52	21232 ±1880
				$\times 1$	$\times 1$	$\times 1$
Gastrocnemius	Normal	0.45 ± 0.22	1.24 ± 0.16	253 ± 3	1355 ± 122	214 ± 50
	β-Alanine	0.41 ± 0.04	1.19 ± 0.04	1271 ±317	5785 ± 933	1087 ± 298
	Carnosine	0.73 ± 0.12	1.41 ± 0.06	2591 ±746	12350 ±3168	1806 ± 457

投与の影響が強い。すなわちβ－alanine, carnosine 投与によりＲＮＡ合成に影響を及ぼしていることは確かである。すなわち著者の明らかにした生合成経路を通してＲＮＡ合成に密接な関係を有している。

β－Alanine 及び Carnosine 大量長期投与による Orotic Acid〔6－^{14}C〕の各Fraction へのとり込みに対する割合　β－alanine, carnosine 大量長期投与により orotic acid〔6－^{14}C〕からＲＮＡ、β－alanine, anserine 及び carnosine へのとり込みを増加させることが明らかになったがどの段階に対して影響が最も強く表われるかを Table XIII に示した。肝において anserine と carnosine の生成比に対するβ－alanine, carnosine の影響が非常に強く表われている。しかし総じて orotic acid → ＲＮＡ → β－alanine → anserine → carnosine にいたる各段階が相対的に、β－alanine, carnosine 投与により生成増加することが認められる。腓腸筋においてはβ－alanine, carnosine 投与することによって、anserine, carnosine の生成がβ－alanine 生成よりも増加している。しかし一般的に carnosine 投与する方がβ－alanine 投与するより、これらの経路を促進的に増加していることがわかる。すなわち positive feed back がかかっているものと考えられる。

第二節　β－Alanine, Carnosine 投与の Orto－Phosphate－^{32}P によるＲＮＡへのパルス標識に対する影響

前節に述べた如くβ－alanine, carnosine 投与により orotic acid〔6－^{14}C〕からＲＮＡ、β－alanine, anserine 及び carnosine への放射能のとり込みが増加していることがわかり positive feed back によることを示唆した。そこでさらにＲＮＡへのβ－alanine, anserine 及び car －

Table XIII Conversion of Orotic acid (6 -^{14}C)

mean of 3 samples

Tissue	Production Ratio / Treatment	β-Alanine / RNA	Anserine / β-Alanine	Carnosine / β-Alanine	Anserine / Carnosine
		%	%	%	
Liver	Normal	24	2.2	0.22	9
	β-Alanine	36	8.6	0.53	14
	Carnosine	57	7.9	1.02	9
Gastrocnemius	Normal	10	77	73	1.2
	β-Alanine	19	123	125	0.9
	Carnosine	5	184	269	0.7

calculation : based on cpm

nosineの影響を直接的に検討するため^{32}Pの標識法を用いた。

実験方法

試薬　β-alanine（米山薬品製）500μmoles／1.0mℓ（蒸留水）、carnosine（Nutritional Biochemical Corporation製）500μmoles／1.0mℓ（蒸留水）に調製した。^{32}Pの調製は日本原子力研究所から入手したcarrier freeの^{32}P 10m Ciを常法により濃塩酸0.5mℓで加水分解しオルトリン酸にして1N NaOHで中和後再蒸留水を加え1.0mℓが1m Ciになるようにした。オルトリン酸〔^{32}P〕を以下^{32}Pと略す。

動物及び処置　24hr絶食したウィスター系雄ラットを3匹づつ正常群、β-alanine投与群、carnosine投与群の3群に分け、正常群には生理的食塩水1mℓ、β-alanine投与群にはβ-alanine 500μmoles／1.0mℓ蒸留水、carnosine投与群にはcarnosine 500μmoles／1.0mℓ蒸留水を腹腔内投与し、1時間後に^{32}P 1m Ci／1.0mℓ生理的食塩水を股静脈より投与して正確に5分後に撲殺し　流水中で冷却しながら頸動脈切断して充分瀉血した。肝及び腓腸筋を取り出しフリーザー中に凍結保存した。

粗RNAの調製　肝は個々について、腓腸筋はRNA含量が少ないので各グループ3匹ずつを合し、kirbyの方法[66]に従って調製した。臓器を水でhomogenateする際、1%SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）になるようにSDSを加え蛋白質と核酸の結合を切断してRNAの抽出を容易にした。大略はフェノール抽出を行ないDNAと蛋白質を除き水層に酢酸ソーダを加えた後エタノールを加えてRNAを沈殿させた。エタノール：水（3：1）で洗い粗RNAとした。水を加え正確に一定量として放射能を測定すると同時にリンの定量を行ない一部をとり自記分光光度計により260mμに吸収極大のあることを確かめた。

放射能の測定　フィリップ社の端窓型G－M計数装置を用いて測定した。^{32}Pは半減期が短いので測定ごとに標準の^{32}Pを測定し減数値を補正した。

核酸中のリンの定量　Allenの方法[67]により有機リンを無機リンにかえ、アミドール液とモリブデン酸液により青色の発色を720mμで比色定量した。

実験結果

肝の結果をFig. 17に示す。RNAの抽出方法から肝中の全RNAを抽出出来ないのでspecific activityにより検討した。すなわちRNA mg当りの放射能とリンmg当りの放射能を測定した。いずれの場合もβ-alanine投与やcarnosine投与により対照に比べ非常に有意にとり込みが増加しており、有意差検定を行なうまでもない。β-alanine, carnosine投与により肝中のRNAが4倍に増加し、この結果は第6章に述べたorotic acid〔6-^{14}C〕を用いた場合よりRNAへのとり込まれ方が5分間というごく短時間においてもβ-alanine, carnosine投与により増加している。腓腸筋における結果をFig 18に示す。腓腸筋の場合RNA含量が少ないことから各群3匹分の腓腸筋を合してRNAを抽出した。腓腸筋の場合肝とことなりβ-alanine, carnosine投与により対照より減少している。肝においてはRNA量当りでもリン量当りでも放射能のとり込みが大きいことは5分間のパルスラベルという点から考えてm－RNAが増加したことによるかもしくはβ-alanine, carnosine大量長期投与によりorotic acid〔6-^{14}C〕からRNAへの合成が増加している場合uracilだけにラベルされるが、今回の場合4種の塩基のリンについても同等にラベルされることから差が大きくなったとも考えられる。本実験条件では一般にm－RNAのように代謝回転率の速いものは大部分抽出されてこない[66]ということを考慮すると差が大きく表われたと思われる。一方腓腸筋においてはβ-alanine, carnosine投与することにより^{32}PのRNAへのとり込

Fig. 17. Effect of β-Alanine and Carnosine on RNA Biosyn thesis

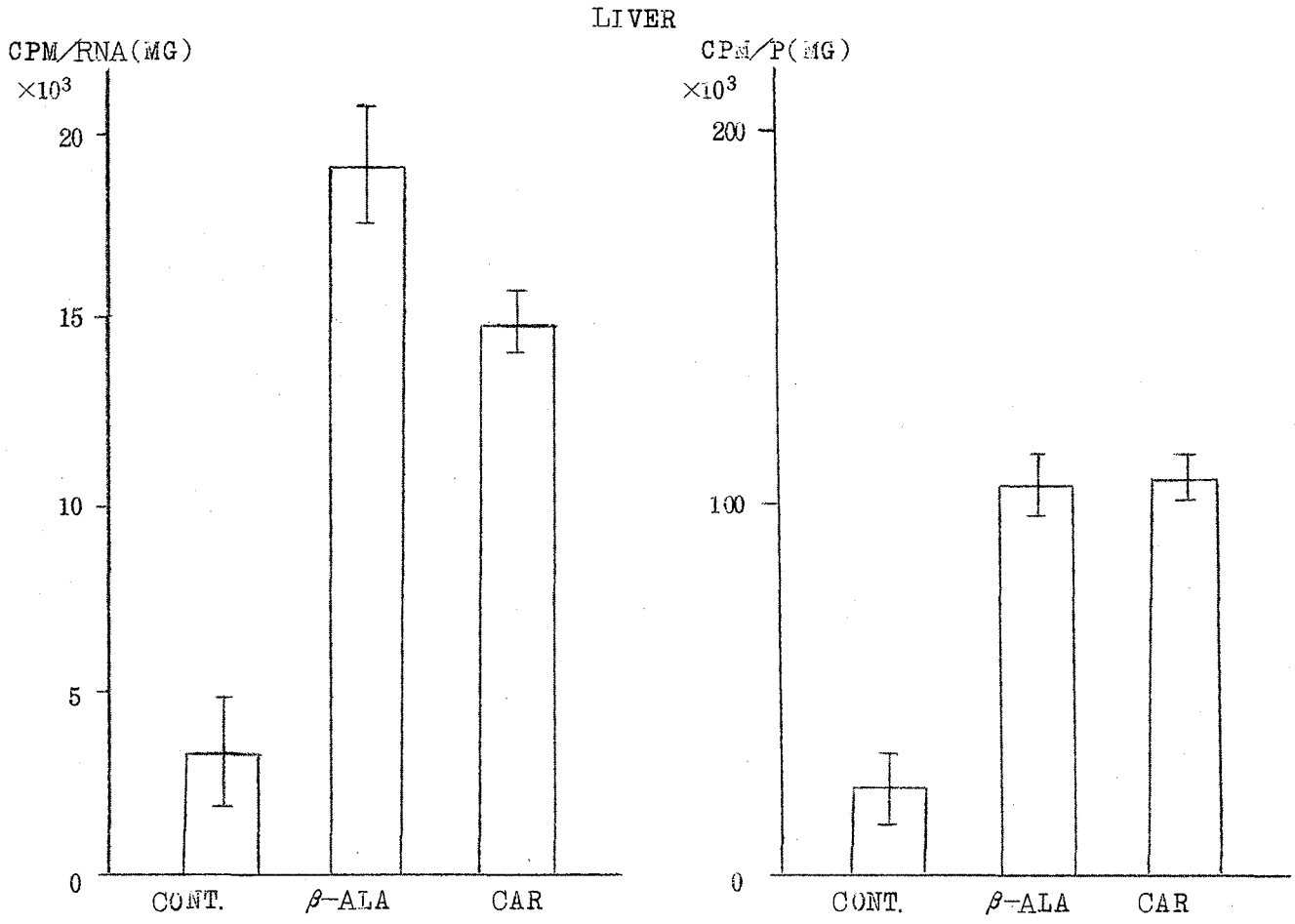
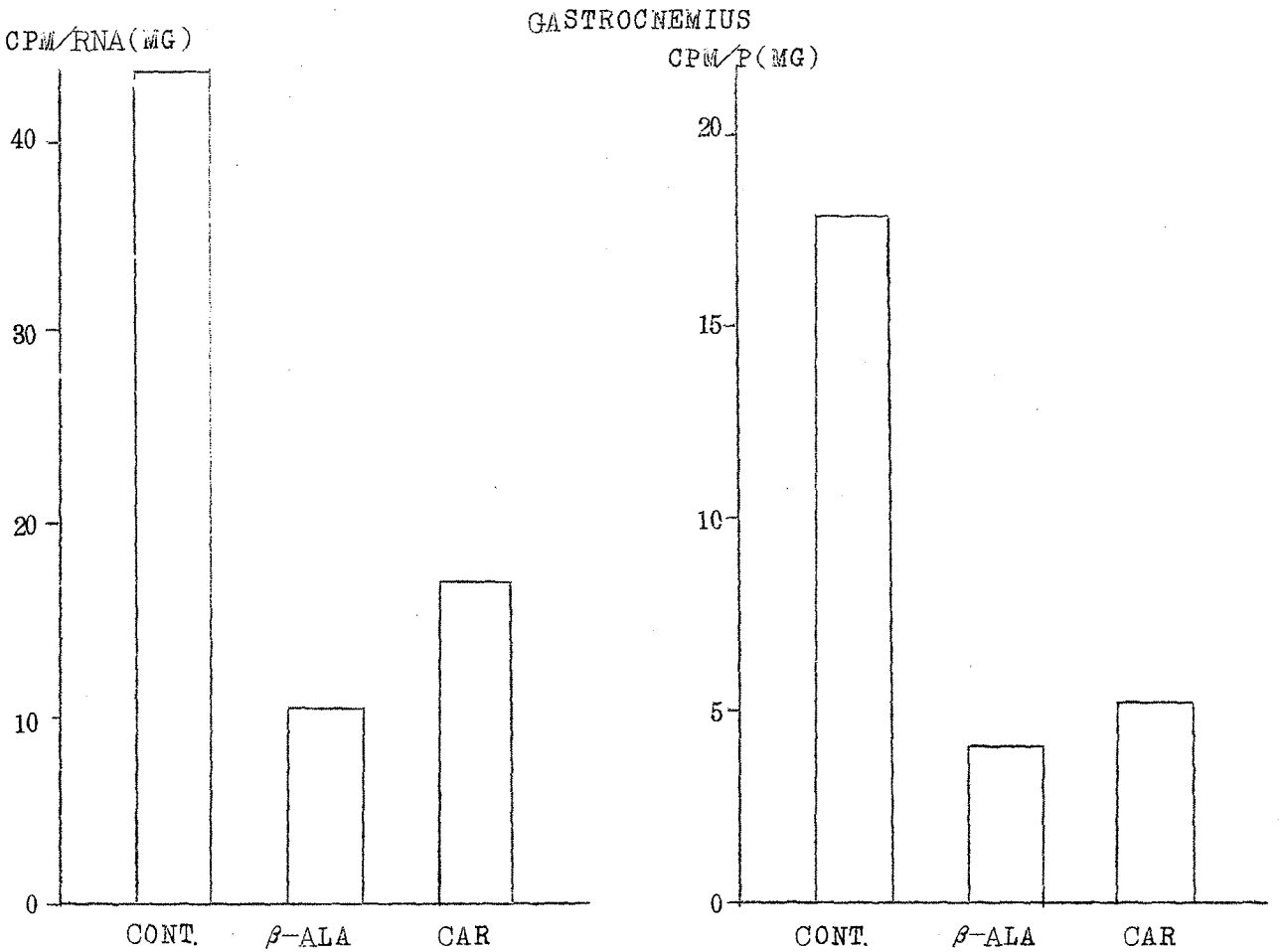


Fig. 18. Effect of β-Alanine and Carnosine on RNA Biosynthesis



みが減少することはorotic acid〔6-^{14}C〕のＲＮＡへのとり込みが増加しているのとは逆になっている。このことはorotic acid〔6-^{14}C〕の場合少量づつ２週間にわたってβ-alanine, carnosineを投与している点と^{32}Pを用いた実験の場合^{32}P投与５分後という短時間後に撲殺しているということで実験条件がことなることから一緒に結論出来ない。しかしβ-alanine, carnosine投与短時間後ではβ-alanine, carnosine投与により５分後のＲＮＡ合成が抑制されていて肝とは全く逆になり、作用の表われかたが肝と腓腸筋とではことなり臓器特異性が見られることは非常に興味深い。

第三節　β-Alanine, Anserine及びCarnosineのラット肝臓及び腓腸筋Ribonucleaseに対する影響

前節によりβ-alanine, anserine　投与が肝ＲＮＡの生成を促進したが、これが代謝率に由来する作用なのか、それとも単にこれらの投与がＲＮＡの分解抑制などの直接的な影響を及ぼしたかを検討する一つとしてRibonucleaseに及ぼす影響を検討した。

実　験　方　法

酵素液の調製　ウィスター系雄ラットを24hr絶食し、撲殺後頸動脈切断して流水で冷却した後肝と腓腸筋をとり出した。各２匹づつの臓器を用いた。0.04M Tris buffer pH7.4を用いて、１分間１０ストロークの速さでテフロンhomogenizerによりhomogenizeした。核酸合成系の核やミトコンドリアを除くため12,000XG　2min遠心分離後２層ガーゼで脂肪を除き酵素液とした。

反　応　小型試験管を氷水に冷しておき酵素液1.0mlとβ-alanine,

carnosine及びanserineそれぞれ5μmoles／0.25mℓ pH7.4Tris・Hcl bufferを加え37℃で反応する。反応終了後氷冷するとともに0.4NPCAを4mℓ加えて反応を止めた。β-alanine, anserine及びcarnosineを添加したものは30minにおいて比較した。

残存RNAの定量　反応物を0.4NPCAで反応を止めたものについて遠心分離を行ない、沈殿を氷冷0.2NPCA 1mℓで洗った後エタノール、エタノール：エーテル(3:1)、エーテルでそれぞれ2度づつ洗い粉末化した。0.4NPCA 4.0mℓを加え90℃、15min加水分解後直ちに氷冷して、遠心分離を行ない、上清を集め、残渣を0.2NPCA 2.0mℓで2度洗って洗液を合し、正確に10mℓとし冷蔵庫に一夜放置後遠心分離して上清につき262mμの吸光度を測定し，0時間を100%として残存RNA量を%で示した。β-alanine, anserine及びcarnosine添加群については30min後の残存RNA量で比較した。

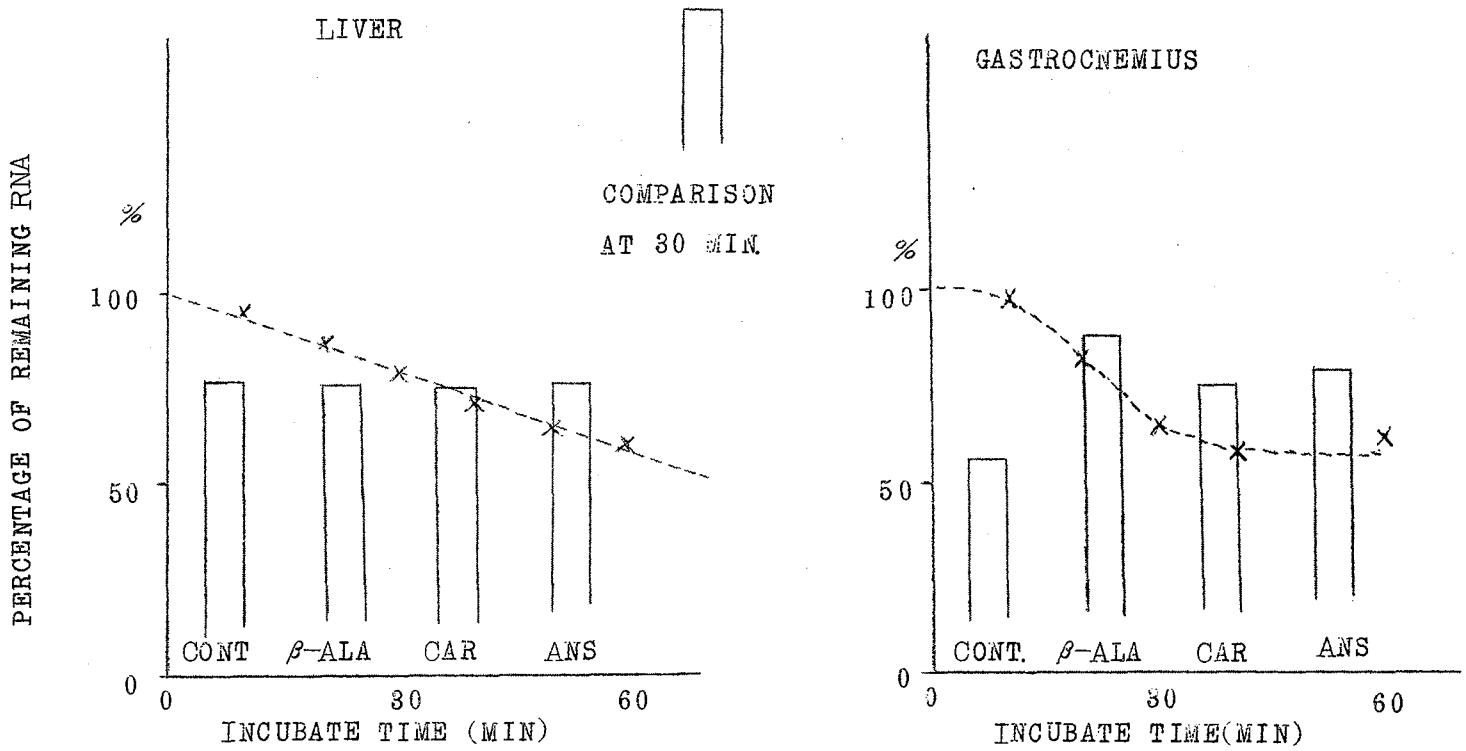
実験結果

結果をFig19に示す。肝において60minまでRNAの分解は直線的に表われているが、30min後におけるβ-alanine, anserine及びcarnosineの影響はほとんど認められない。腓腸筋においては30minまで急激に分解されるが30minから60minまではほとんど変化がない。そこで30min後のβ-alanine, anserine及びcarnosine添加の影響はややRNAの分解を阻害している。このことは^{32}PのRNAへのとり込みで肝の場合、とり込みの増加がβ-alanine, carnosineにおいて著明に認められたがこれはRNAの分解が阻害されたことによるのではなくRNAの合成のみが増加していることを示している。腓腸筋の場合β-alanine, anserine及びcarnosineによりRNAの分解が抑制されているにかかわらず^{32}PのRNAへのとり込みが抑制されていることは腓腸筋中のRNA合成がRNAの分解を考慮に入れてもなおかつ合成促進が強く

Fig. 19. EFFECT ON DEGRADATION OF RNA

0.04M TRIS BUFFER (pH 7.4)

SUPERNATANT SOLN. OF 20% HOMOGENATE(12,000 G 2M MIN., 0℃)



抑えられているのではないかと考えられる。

〔小　括〕　β-alanine → anserine → carnosine 形成系がＲＮＡ代謝を調節しているとは言えないまでも、少なくともこれらdipeptide の生成はＲＮＡ代謝を反映しているものであり、これらの形成系とＲＮＡ代謝が密接な関係にあることが明らかになった。模式的にTable XIV に示す。

Table XIV Effect of β-alanine, Anserine and Carnosine on RNA

	Treatment	Liver	Gastrocnemius
^{32}P ⟶ RNA (after 1hr)	β-Ala	+	−
	Car	+	−
Orotic Acid → RNA (after 1hr)	β-Ala	+	+
	Car	+	+
RNase Activity	β-Ala	±	+
	Ans	±	+
	Car	±	+

+ increased

± not significant

− decreased

第三編　総括及び考察

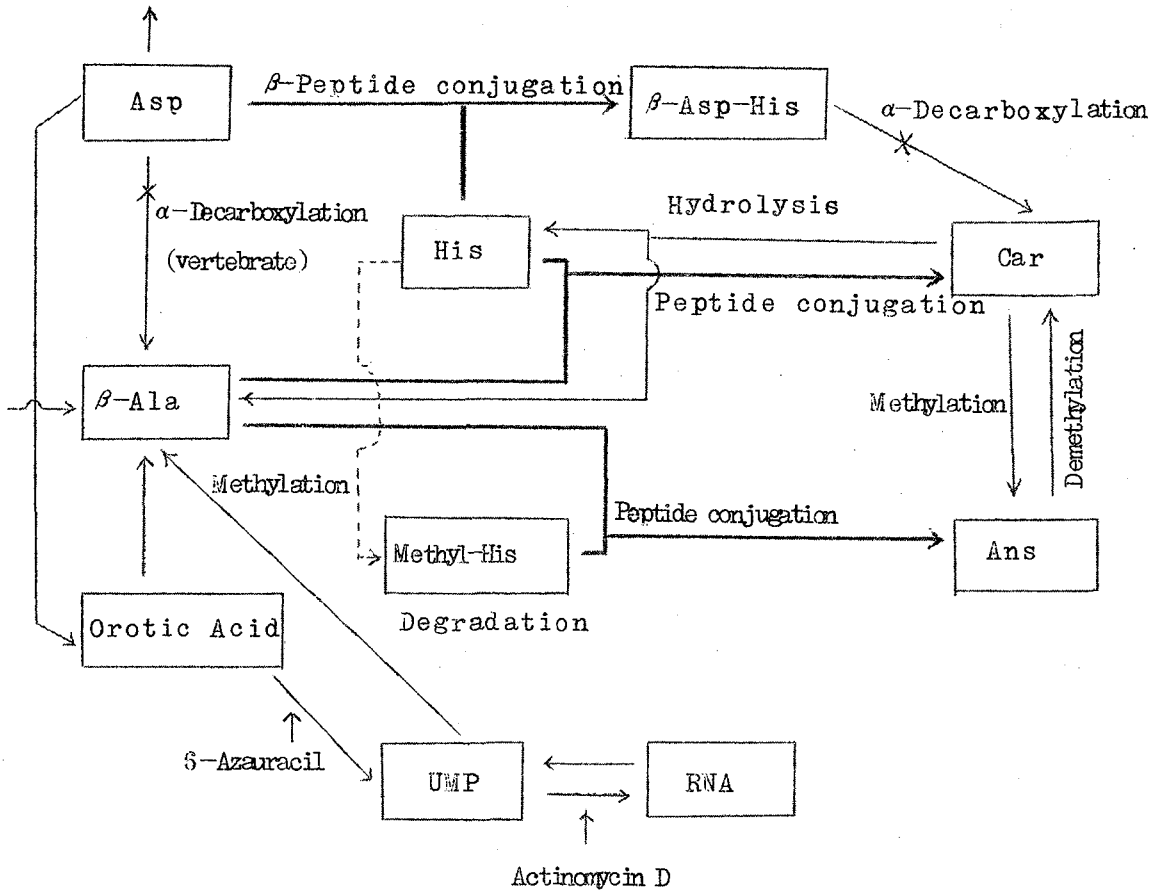
anserine, carnosine は動物とくに脊椎動物の骨格筋に多量含まれ、ラットにおいても腓腸筋中に他の遊離型アミノ酸と同量もしくはそれ以上含まれる(Table V)。ねこの骨格筋中にも他の遊離型アミノ酸とオーダーを異にして多量含まれる[21]。ふるくからanserine carnosine の生理的作用の検討が種々なされて来たが骨格筋中に100mg%以上と余りにも多量含まれる[21]ことと臓器によりかなり含量が異なり特に肝臓ではほとんど検出されないこと(Table X)、またcarnosine にのみニワトリの血圧降下作用を認めたり[12)〜15)]、aging によりanserine, carnosine 含量が変動する[68),69)]、ことなどから直接的な独立した生理作用解明に至っていない。著者はanserine, carnosine の生理的意義を解明するため、まずこれらdipeptide の生合成経路から検討した。

anserine, carnosine の生合成についてWinnick ら[22)]やKalyankaら[23),24)]により検討されているものの彼らの方法はin vitroでしかもヒヨコの胸筋を用い、anserine, carnosine の構成成分であるβ-alanine〔^{14}C〕を用いて検討しているが、ペーパークロマトグラフィーにより分離して定量しているので定量上問題がある。さらにWinnick らも指摘しているごとくヒヨコの胸筋を使用した時は合成酵素の活性が認められるが、ニワトリ、ラット、ウサギ等の筋肉では非常に活性が弱いものである。第一章に述べた著者の方法は同一条件下での多数試料の比較を可能にしたものである。すなわちこの^{131}I-his -tidine を利用したcarnosine あるいは関連N-acyl peptide の合成能の検討において、ラット肝でもcarnosine 合成の可能性が認められ、しかも腓腸筋よりも合成能の強いことを認めた。またWinnick ら[22)]も指摘しているが

anserine, carnosine 合成酵素の活性は非常に不安定であり、著者の方法を用いることの利点は動物をautopsy後すぐにassayにかかれることでもある。しかも測定は^{131}Iによりγ線の測定という利点もある。この結果基質特異性としてはL-aspartic acid, L-glutamic acid, L-leucineにはペプタイド合成能（^{131}I-histidineとのconjugation）は認められず、β-alanineのみ^{131}I-histidineと結合し^{131}I-carnosineが生成する。また基質としてD,L-β-aminoisobutylic acidもuracilの代謝産物のβ-alanineがhistidineと結合してcarnosineが生成されるのと同様にβ-aminoisobutylylhistidineの存在の可能性が示唆される。いずれにしろ^{131}I-histidineを用いることによりcarnosineの生合成がラットにおいて骨格筋より肝臓で生合成されることが判明した。

Winnickら[22]やKalyankarら[23),24]はcarnosine, anserineの生合成の検討をin vitroで検討しているので、酵素系の検討にとどまり生体全体のレベルでのanserine, carnosine形成系が追求されていない。このことはまた彼らがβ-alanineを直接histidineもしくは1-methyl histidineと結合させるという方法で検討しているので生体内β-alanine donerなどの問題を解明する点で限界がある。

生体内合成場所が肝である可能性とともにβ-alanineの体内基源という観点からも検討した。Scheme IIにanserine, carnosineの可能な合成経路を示す。著者はすべてウィスター系雄ラット100～150gを用いて検討したがhistidineがラットにおいて必須アミノ酸であり、体内形成を考える点でβ-alanineからのみアプローチ出来る利点がある。青沼ら[29]はβ-alanine〔2-^{14}C〕をラット股静脈内投与24hr後に種々臓器中のanserine, carnosineに放射能を認めたが、Linら[34]はβ-alanineが腸管から吸収されにくいと報告している。そこでcarnosineの構成成分であるβ-alanineの体内



Scheme Ⅱ

Possible pathway of biosynthesis Aus and Car. The thick line shows the established pathwag on Aus and Car biosynthesis

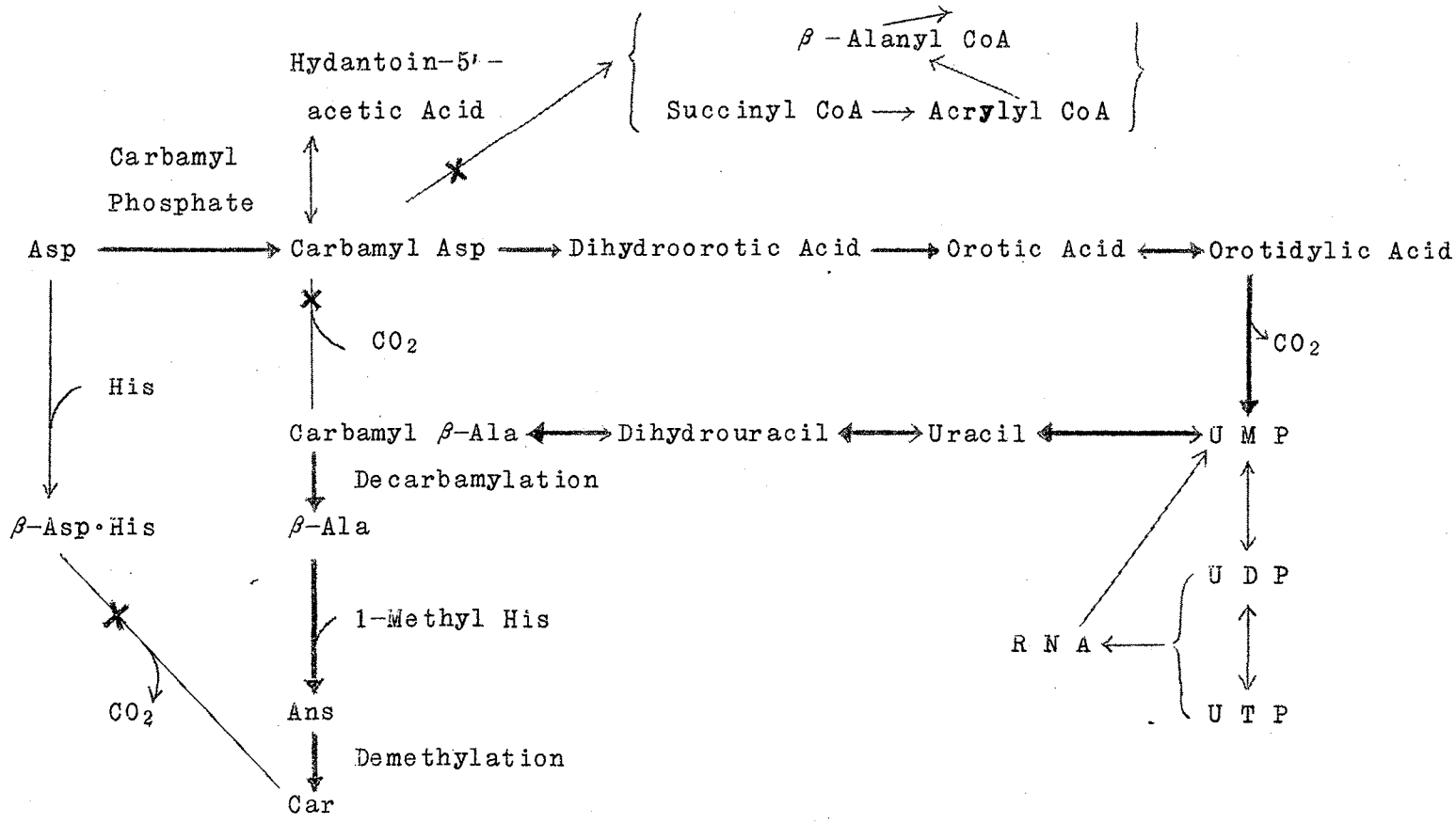
Aus: anserino

Car: carnosine

基源をaspartic acidに想定し、まずaspartic acid〔3−^{14}C〕をラット股静脈に注射したところ24hrで青沼ら[29]のβ-alanine〔2−^{14}C〕を用いた同レベルもしくはそれ以上にanserine, carnosineへのincorporationが認められた。炭素プールに入ってからのincorporationを検討するため、

leucine〔U－^{14}C〕を用いて同様に検討したがanserine, carnosineへのとり込みは認められなかった。このことはaspartic acid〔3－^{14}C〕のanserine, carnosineへのincorporationがaspartic acidに特有であると考えた。さらにβ-alanine〔2－^{14}C〕を用いるよりaspartic acid〔3－^{14}C〕を用いた方がcarnosineへとり込まれる放射能が大であることからaspartic acidのα-脱炭酸によるβ-alanineの形成というよりβ-aspartyl histidineを形成しこのものの α-脱炭酸によりcarnosineになる可能性を考え、Winnickら[22]のcarnosine合成酵素で検討したが、いずれでも脱炭酸反応によるガス発生は認められたが、反応生成物よりcarnosine, anserine及びβ-alanineはいずれも検出されずβ-aspartyl histidineは加水分解されていた。また生物学的作用においてもβ-aspartyl histidineはcarnosineとかanserineの活性とはことなっている。これらのことからβ-aspartyl histidineが直接脱炭酸してcarnosineに換換されるとは考えられないという結論に達した。

そこでβ－alanine生成について、aspartic acidの結果からFink一派[25)～28)]が既に明らかにしているラット肝を用いたuracil、dihydrouracil、carbamyl β－alanineから個々にβ－alanineが形成する経路とaspartic acidからUMPを経る経路とを組み合わせ種々作業仮設を立て検討した。Scheme Ⅲにaspartic acidからβ－alanineに至る経路を示した。太線は著者の確立して経路である。結論に至った過程を考察する。aspartic acidからorotic acidが出来ることはpyrimidine塩基生合成からよく知られている。そこでまずorotic acid〔6－^{14}C〕を用い検討したところ投与1時間後ではまことに明確に肝臓においてはRNAへの約1/4がβ－alanineに、筋では1/10がβ－alanineに変換することを見い出すとともに、肝anserineへはβ－alanineの1/50がとり込まれており、



Scheme Ⅲ

Established Pathway for β-Ala, Ans and Car by Author

Ans: Anserine, Car: Carnosine

carnosine へはさらにその1/10程度であることを見い出した。そして比放射能の希釈値からみてcarnosine より先にanserineが形成されるか、もしくはβ－alanine と histidine からcarnosine が形成されると独立にβ－alanine と 1－methyl histidine によってanserine が形成されることが考えられた。少くとも従来考えられたβ－alanine とhistidine からcarnosine が形成され、その π－methyl 化によってanserine が形成される[61] 可能性が薄いことを見い出した。投与1時間後の比放射能の比較とともにβ－alanine〔2－^{14}C〕や、aspartic acid〔3－^{14}C〕の投与後24 hr での結果ではcarnosine にanserine より多くの放射能が見い出されることから、anserine と carnosine の相互関係ではβ－alanine と1－methyl-histidine の結合でanserine が形成され、その脱methyl 化によってcarnosine にconvert することが考えられる。また生合成場所は筋でなく明らかに肝であり、しかしながらanserine 及びcarnosine の貯留保持は筋であることなどが明らかになった。肝にはanserine 、carnosine ともその含量は非常に少く、正確な定量が可能な程化学的定量法では検出されないが、β－alanine は肝には7 μ moles %とかなりな量が検出される。一方筋にはβ－alanine は非常に少ないことを認めた。orotic acid からβ－alanine の形成とanserine 及びcarnosine への利用は明らかであるが、actino－mycin Dの阻害実験結果からみて、β－alanine 生成はorotic acid→RNA→UMP→uracil→β－alanine の系ではなく、RNAへのとり込みが抑制されてもβ－alanine の形成はむしろ促進されていることから、orotic acid→UMP→uracil→β－alanine の系が考えられ、この場合orotic acid の代謝経路はRNA への方向よりβ－alanine への方向が主経路になっている。そしてanserine の生成が促進されるが、carnosine の生成が抑制される点actinomycin D の新しい作用点としてβ－alanine とhistidine の結合の

位置か、anserine のdemethylation によるcarnosine形成の位置の阻害が考えられる。この事実はanserine 及びcarnosine はRNA 生合成に直接影響しないが、orotic acid のUMPからRNAへの流れをβ-alanine→anserine→carnosine の系がregulate しているか、少なくともRNA合成反応の速度やレベルを反映しているものであり、aging によるanserine, carnosine の含量変化が見られる事実[68),69)]とともにactinomycin Dがこの系に直接関与する点からも何らかの核酸代謝との密接な関係をもっていることが示唆される。

orotic acid→orotidylic acid→UMPの系におけるorotidine-5'-phosphate の脱炭酸反応阻害剤である6-azauracil 阻害[70)]は、orotic acid からのβ-alanine 形成を著しく促進した。またactinomycin D の場とは異なってanserine 及びcarnosine の生成が促進されるが、carnosine の促進率がanserine と同じである。しかし比放射能はβ-alanine > anserine > carnosine の順であり、その生成比も正常と大差ない点actinomycin Dの如く直接β-alanine→anserine→carnosine の系には作用せずβ-alanineの生成促進の結果この系のレベルアップと認められる。また6-azauracil の長期投与によってβ-alanine 含量は肝で70倍にも増加しており、肝においてもanserine 及びcarnosine が定量可能なばかりでなく一般遊離アミノ酸含量レベルよりも著しく多くなる。筋でも同様に多くなる。このようにshame Ⅲにおいて考えられるごとくorotidylic acid の脱炭酸反応が阻害されるとUMP合成が阻害されβ-alanine形成が抑制されると考えられるのに逆に多くなっていた。この点についてorotic acid からcarbamyl aspartic acid へ反応が逆行し、その上でβ-alanine が形成されると考えても、carbamyl aspartic acid がhydantoin-5'-acetic acid となり、これが切れてβ-alanine を形成する可能性は有機化学的に不

可能である。orotic acidからcarbamyl aspartic acid にもどり、これが脱carbamyl する可能性はaspartic acid に放射のとり込みが認められないことから否定される。さらにcarbamyl aspartic acid からsuccinyl CoAを経てβ-alanyl CoAとなりβ-alanineになるとすると糖原性のアミノ酸であるaspartic acid, alanine, glutamic acidなどにも放射能がとり込まれてもよいはずであるが、実験上とり込みが認められないのでこの可能性はうすい。そこでcarbamyl aspartic acid が直接α-脱炭酸してcarbamyl β-alanineとなり、これが脱carbamylしてβ-alanineを生成する系を検討した。carbamyl aspartic acid〔2-^{14}C〕を用いて検討したが、orotic acid〔6-^{14}C〕と同レベルかβ-alanine, anserine, carnosineへ放射能がとり込まれないこと、またcarbamyl aspartic acidの脱炭酸によりcarbamyl β-alanine, β-alanine の生成を検討したが、この可能性も認められなかった。Grisoliaら[57]はFed. Proc.に簡単にこのcarbamyl aspartic acidのcarbamyl β-alanineへの変換をハト肝を用いて報告しているが、それ以後原報として報告されないままになっていることなどからも、この系はあっても非常に弱いものと考えられる。少なくともラットを用いた著者の実験条件では認めることは出来なかった。6-azauracil投与の影響が14日間という長期投与に与えなければ表われないことからも6-azauracilはorotidylic acid の脱炭酸阻害にorotidylic acidからUMPを経ずにβ-alanineを形成するとか、orotic acidが直接uracilになる系の賦活など、その阻害作用siteは複雑であるとともに、β-alanine生成系の全体に亘り複雑な影響を及ぼしていると考えられる。この点については二、三の研究者も6-azauracilの阻害作用がorotidylic acid の脱炭酸阻害だけでは説明しにくいとしたまま未解決になっており、RNA生合成の問題と直接関係し今後の重大な問題と考えている。

orotic acid〔6－^{14}C〕を用いた実験でその比放射能の様相からまずanserineが出来てから脱methyl化によりcarnosineになるのか、それともβ-alanineと1-methyl histidineまたはhistidineと結合して別々にanserine, carnosineが出来たと考えられ、少なくとも従来言われているようにcarnosineが形成され、それがN－methyl化してanserine が形成されるとは考えられないことを認めたが、放射能のとり込みの1時間目と24時間目の比較及び各時点での比放射能からまずanserine が出来それからcarnosineにconvertされると考えて、anserine, carnosine の三重水素標識により相互変換を検討した。しかし従来の所見でin vitroの実験、例えばMc Manusらのヒヨコの筋肉を用いたcarnosineのmethyl化によるanserineの形成など[60),61)]の報告からモデル的にはこの反応を否定するものではないが、生体内での反応を検討したものである。その結果肝では^{3}H－anserineが^{3}H－carnosineに変換し、ついでβ-alanineとhistidineに加水分解され、一方^{3}H－carnosineの場合は加水分解された^{3}H－β-alanineが再びanserine中へとり込まれる所見を得た。一方筋では^{3}H－anserine投与でも、^{3}H－carnosine投与でも、β-alanine が最も比放射能が高く、ついでanserineであり、carnosineが最も低い。これらの事実は肝で分解されたβ-alanineが筋において速度は遅いが肝と同様にanserineにとり込まれ、ついでcarnosineに変換したと考えられる。

これらを総括すると結論的にsheme Ⅲに示した如くaspartic acid →→ orotic acid →→ uracil →→ β-alanine → anserine → carnosine の順序でanserine, carnosine が主として肝で生合成されることが判明した。この経路からＲＮＡ合成と密接な関係を有することが結論出来る。

anserine, carnosine 生合成経路からみて核酸代謝に関係する点を直接証明するために、orotic acid〔6－^{14}C〕を用いβ-alanine, carnosine長

期大量投与した場合のＲＮＡへの放射能のとり込みを検討した。この結果作業仮説を満足するように肝、筋ともにＲＮＡ含量も比放射能も増加した。さらにこの場合当然ながらβ－alanine 、 anserine 及び carnosine への放射能のとり込みはＲＮＡへの取り込みに対する以上にβ－alanine 、carnosine 投与により影響された。そして cold な β-alanine 、carnosine を投与しているにも拘らずこれらに放射能のとり込みが増加している。このことはＲＮＡの生成増加が uracil で分岐した後のβ－alanine → anserine → carnosine の系に対しＲＮＡ生成にとっては negative feed back としてこの系を活性化したか、もしくはＵＭＰとか uracil の増加により positive feed back がかかりこれらの代謝処理が促進され、結果として

orotic acid → UMP → RNA
　　↘ uracil → β-alanine → anserine→ carnosine

の経が全体として見掛上活性化されたと考えられる。この点は、β-alanine とＲＮＡ、carnosine と β-alanine の couversion ratio からも明らかである。さらにＲＮＡ生成との関係を証明すべく ^{32}P を用い β-alanine 、carnosine 投与の影響を投与 1 hr 後での 5min のパルスラベルで検討した結果においてもＲＮＡ合成が肝で促進されていることを認めた。しかも ribo－nuclease に対しては β－alanine 、 anserine 、 carnosine が肝では影響しないことから、ＲＮＡ合成および uracil 代謝に対して β－alanine → anserine → carnosine の系が endoproduct inhibition というより feed back 機構によりＲＮＡ代謝と関係していると考察される。

第四編　結　　論

anserine, carnosineの生理作用解明を目的にanserine, carnosineの生合成経路の研究を行なった。5－^{131}I－monoiodo histidine を合成し、ラットにおいて肝臓にcarnosine 合成能があり腓腸筋よりも強い活性があることを見い出した。[71] aspartic acid〔3－^{14}C〕を用い、in vivoに於いてanserine, carnosineへの放射能の特異的なとり込みを認めた。[72] β-aspartyl-histidineを合成し直接のα-脱炭酸によりcarnosineへconversionしないことを明らかにした。[72] orotic acid〔6－^{14}C〕を用いラットに投与したところ非常に有意にβ-alanine, anserine及びcarnosineに放射能がとり込まれ、肝に於いてＲＮＡの1/4がβ-alanineに、β-alanineの1/50がcarnosine, anserineの1/10がcarnosineにとり込まれることを認め[73]、また肝臓の方が筋肉より合成能が1000倍強いことを見い出した。[73] この場合actinomycin D投与によりＲＮＡの合成を阻害するとβ-alanine生成が促進されanserine生成も促進されるがcarnosineの生成は抑制される。6－azauracil阻害によりＲＮＡ合成は抑えられるがβ-alanine, anserine及びcarnosine合成は三者共正常と同じ割合で、しかし合成レベルは著しく促進される。[73] carbamyl aspartic acid〔2－^{14}C〕のβ-alanine, anserine及びcarnosineへのincorporationはorotic acid〔6－^{14}C〕を用いた場合と同レベルであるが、carbamyl aspartic acid の直接の脱炭酸によりcarbamyl β-alanineは形成しない。^{3}H－anserine, ^{3}H-carnosineを合成し、それぞれラットに投与して、生体内相互変換を検討するとanserineがcarnosineに変換することを認めた。[74] 以上によりanserine, carnosineのラットにおける生成経路として

aspartic acid → carbamyl aspartic acid → orotic acid → uracil → β-alanine → anserine → carnosine

の系を確立した。

この生合成経路からＲＮＡ合成系の関連が考えられβ-alanine もしくは carnosine の長期大量投与により endoproduct inhibition というより feed back 機構での関係が認められる。この点ＲＮＡ生合成時のパルス標識による検討でもβ-alanine もしくは carnosine 投与により肝臓ＲＮＡの代謝回転の促進が認められる。この場合肝臓ＲＮＡ ribonnclease 活性には影響していない。

本研究は恩師大阪大学薬学部教授青沼　繁先生の「心臓の研究」から派生した問題を青沼先生一門が追求している課題の一つであって、この一端を分担しここに学位論文としてまとめ得たことを青沼　繁先生始め神戸学院大学教授浜堯夫先生、大阪大学薬学部助教授三村　務先生に深く感謝する。

また実験に際し種々御協力頂いた大阪大学薬学部微生物薬品化学教室の諸氏、神戸学院大学栄養学部栄養化学教室の諸氏に厚く感謝する。

さらに actinomycin D 結晶を恵与戴いた大阪大学微生物病研究所川俣順一教授、carbamyl aspartic acid〔2－^{14}C〕を合成して戴いた大日本製薬中央研究所三奈木康夫博士に心から御礼申し上げる。

第五編　引　用　文　献

1) W. Gulewitsch, and s. Amiradzibi, Ber. chem. Ges., 33, 1902 (1900).

2) D. Ackermann, O. Timpe, and K. Poller, Z. Physiol. Chem., 183, 1(1929).

3) A. T. Fuller, A. Neuberger, and T. A. Webster, Biochem. J., 41, 11(1947).

4) M. G. Eggleton, and P. Eggleton, Quart. J. Exptl. Physiol., 23, 391(1933).

5) M. G. Yudaev, M. I. Smirnov, P. G. Pazina, and N. N. dobbart, Biokhimiya, 18, 732(1953).

6) S. E. Severin, A. A. Boldyrev, and S. L. Stvolinskii, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 179, 221 (1968)

7) T. L. Perry, S. Hansen, D. Stedman, and D. Love, J. Neurochem., 15, 1203 (1968).

8) A. A. Boldyrev, Byull. Eksp. Biol. Med., 66, 51 (1968).

9) E. C. Bate-Smith, J. Physiol. (London), 92, 336 (1938).

10) A. Deutsch, and P. Eggleton, Biochem. J., 32, 209 (1938).

11) C. L. Davey, Arch. Biochem. Biophys., 89, 303 (1960).

12) V. du Vigneaud, and M. Hunt, J. Biol. chem., 115, 93 (1936).

13) V. du Vigneaud, and M. Hunt, J. Biol. Chem., 125, 269 (1938).

14) M. Hunt, and V. du Vigneaud, J. Biol. Chem., 124, 699 (1938).

15) M. Hunt, and V. du Vigneaud, J. Biol. Chem., 127, 43 (1939).

16) J. Yun, and C. J. Parker Jr., Biochim. Biophys. Acta., 110, 212 (1965).

17) R. M. Avena, and W. J. Bowen, J. Biol. chem., 244, 1600 (1969).

18) A. A. Boldyrev, and A. V. Lebedev, Biokhimiya, 32, 600(1967).

19) M. J. Turnbull, and P. Slater, Life Sci., 9, 83 (1970).

20) 青沼　繁、浜　堯夫、稲本輝夫、中川　晋、薬誌、79, 1429 (1959).

21) H. H. Tallan, S. Moore, and W. H. Stein, J. Biol. Chem., 211, 927 (1954).

22) R. E. Winnick, and T. Winnick, Biochim, Biophys. Acta., 31, 47 (1959).

23) G. D. Kalyankar, and A. Meister, J. Am. Chem. Soc., 81, 1515 (1959).

24) G. D. Kalyankar, and A. Meister, J. Biol. Chem., 234, 3210 (1959).

25) K. Fink, R. B. Henderson, and R. M. Fink, J. Biol. Chem., 197, 441 (1952).

26) R. M. Fink, K. Fink, and R. B. Henderson, J. Biol. Chem., 201, 349 (1953).

27) R. M. Fink, C. Mc Gaughey, R, E. Cline, and K. Fink, J. Biol. Chem., 218, 1 (1956).

28) K. Fink, R. E. Cline, R. B. Henderson, and R. M. Fink, J. Biol. Chem., 221, 425 (1956).

29) 青沼　繁、真弓忠範、青木正忠、北川洋子、Radioisotopes, 14, 400 (1965).

30) K. J. Brunings, J. Am. Chem. Soc., 69, 205 (1947).

31) 林　八重子、星薬科大学紀要、11, 6 (1962).

32) 水島三一郎、赤堀四郎、“蛋白質化学”, 1, 共立出版　70 (1954).

33) C. H. Bowden, and J. H. Wilkinson, Biochem. J., 59, 93 (1955).

34) E. C. C. Lin, H. Hagihara, and T. H. Wilson, Am. J. Physiol., 97, 383 (1962).

35) A. Meister, H. A. Sober, and S. V. Tice, J. Biol. chem., 189, 577 (1951).

36) R. A. Altenbern, and H. S. Ginoza, J. Bacteriol., 68, 570 (1954).

37) W. K. Maas, Natl. Vitamin Foundation Nutrition Symposium Ser., 13, 75 (1956).

38) Y. Kakimoto, and M. D. Armstrong, J. Biol. Chem., 236, 3280 (1961).

39) N. R. Jones, Biochem. J., 60, 86 (1955).

40) W. H. Stein, and S. Moore, J. Biol. chem., 192, 663 (1951).

41) P. M. Bryant, R. H. Moore, P. J. Pimlott, and G. Y. Young, J. Chem. Soc., (1959) 3864.

42) 尾崎正若, 生化学, 26, 660 (1954).

43) Y. Matsumura, T. Mimura, and S. Sumita, Wakayama, Medical Reports, 9, 7 (1964).

44) E. R. Stadtman, J. Am. Chem. Soc., 77, 5765 (1955).

45) P. R. Vagelos, J. M. Earl, and E. R. Stadtman, J. Biol. Chem., 234, 490 (1959).

46) R. A. Altenbern, and H. S. Ginoza, J. Bacteriol., 68, 570 (1954)

47) W. K. Maas, Natl, Vitamin Foundation Nutrition Symposium Ser., 13, 75 (1956).

48) F. P. Kupicki, and M. J. Coon, J. Biol. Chem., 229, 743 (1957).

49) C. F. Baxter, and E. Roberts, J. Biol. Chem., 233, 1135 (1958).

50) S. Razin, V. Bachrach, and I. Gery, Nature, 181, 700 (1958).

51) V, Bachrach, S. Persky, and S. Razin, Biochem. J. 76, 306 (1960).

52) G. Rendina, and M. J. Coon, J. Biol. Chem., 225, 523 (1957).

53) K. Burton, Biochem, J., 62, 315 (1956).

54) E. Herbert, V. R. Potter, and L. I. Hecht, J. Biol. Chem., 225, 659 (1957).

55) C. M. Huguley, Jr., J. Bain, S. L. Rivers, and R. B. Scoggins, Blood, 14, 615 (1959).

56) W. R. Vogler, J. A. Bain, and C. M. Huguley, Jr., Cancer Res., 26, 1827 (1966).

57) S. Grisolia, J. Caravaca, S. Cardoso, and D. P. Wallach, Fed. Proc., 16, 189 (1957).

58) R. M. Fink, R. E. Cline, C. Mc Gaughey, and K. Fink, Anal. Chem., 28, 4 (1956).

59) P. Fritzson, J. Biol. Chem., 226, 223 (1957).

60) I. R. Mc Manus, J. Biol. Chem., 225, 325 (1957).

61) I. R. Mc Manus, J. Biol. Chem, 237, 1207 (1962).

62) O. V. Dobrynina, Biokhimiya, 32, 612 (1967).

63) K. E. Wilzbach, J. Am. Chem. Soc., 79, 1013 (1957).

64) 鶴藤、高橋、内田、高木, Radioisotope, 14, 146 (1965).

65) H. T. Hanson, and E. L. Smith, J. Biol. Chem., 179, 789 (1949).

66) K. S. Kirby, Biochem. J., 64, 405 (1956).

67) R. J. Allen, Biochem. J., 34, 858 (1940).

68) 浜、玉木、宮本, 第23回日本栄養・食糧学会総会講演 (1969).

69) I. R. Mc Manus, and M. S. Benson, Arch. Biocem. Biophys., 119, 444 (1967).

70) H. O. Conn, W. A. Creasey, and P. Calabresi, Cancer Res., 27, 618 (1967).

71) 青沼、浜、玉木、青木、薬誌、88, 8 (1968).

72) 青沼、浜、青木、玉木、薬誌、88, 1 (1969).

73) S. Aonuma, T. Hama, N. Tamaki, and H. Okumura, J. Biochem., 66, 123 (1969).

74) S. Aonuma, T. Hama, and N. Tamaki, J. Biochem., 68, 581 (1970).