



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

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 <u>in vitro</u>		
	生合成の検討	4
第一節	^{131}I 標識 5-Moniodohistidine 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 <u>in vitro</u> 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, Carnosine 投与の Ortho-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 Carnosine 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、少な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。

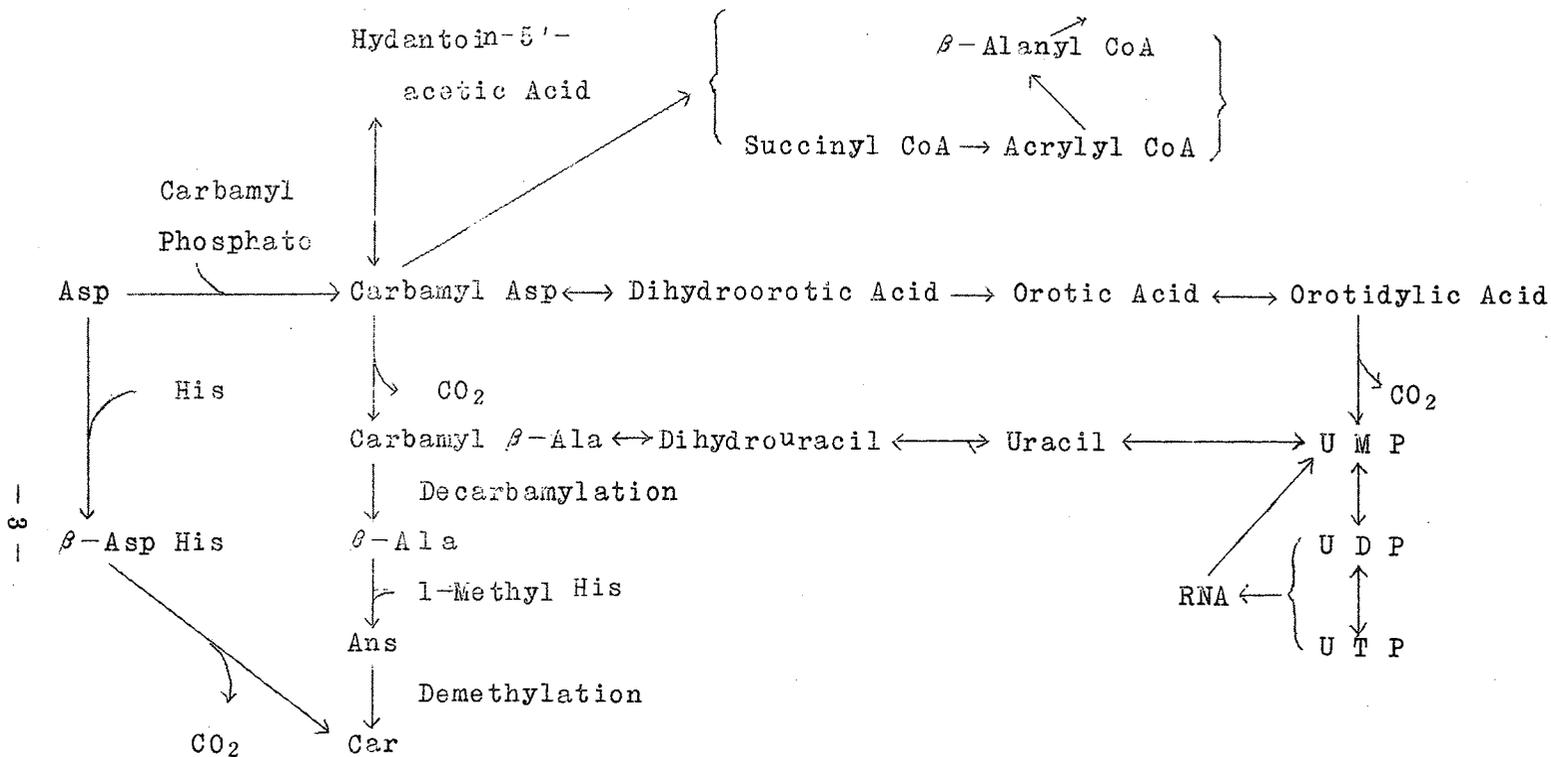
青沼、浜らは心臓ホルモン研究の一環として心臓自動運動を抑制する因子の一つとして哺乳類心筋より初めて anserine を単離証明した。²⁰⁾ しかし先述した如く anserine、carnosine は他の臓器と比較して骨格筋に (例えばねこでは 150~200mg%²¹⁾) 大量含まれるものであるが特有の生体内作用が不明であり生理作用を鮮明に説明出来ない。

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 ¹³¹I - histidine を合成し、¹³¹I - histidine から ¹³¹I - 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 scheme I 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、三の問題点を見出したのが、いずれにしても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 の形成が核糖代謝と密接に関係していることを見出した。



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反応を 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 30 ml の 1N NaOH に L-histidine \cdot HCl 100mg を溶かし、ヘキサン 10 ml を加えて氷浴中で冷却した。一方 8% KI 5ml をキャリアーとして 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 40 ml に吸収した。過剰の NaNO_2 を $\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$ 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 3 hr で滴

加する。1 hr 氷浴中に放置後、別に KI 0.47 g から同様に I₂ を 50 ml のヘキサンに吸収し、先の反応液に加え 4 hr 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 1.5 ml で酸性にし、1% KI 5 ml 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 25 ml ずつのヘキサンで洗浄し I₂ を除く。水層を 50℃ 以下で乾固し、濃 HCl 0.1 ml を含んだエタノール 15 ml で 5 min 煮沸抽出する。溶液を濾過し、残渣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 0.07 M のクエン酸緩衝液に溶し Dowex 50 に吸着する。pH 5.0 の 0.14 M 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 0.5 N 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 R_f 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 histidine³²⁾、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ル

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 0.5 N 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 R_f 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 histidine³²⁾、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ル

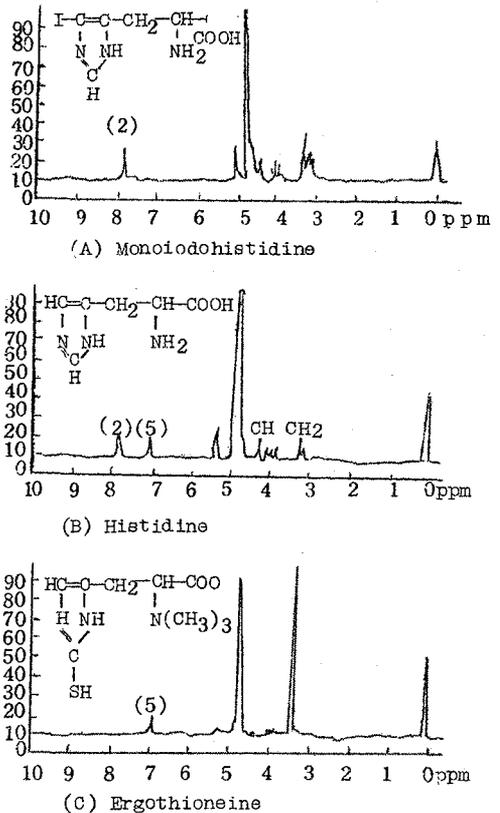


Fig 1. Nuclear Magnetic Resonance Spectra in D₂O (reference: C₆H₁₅NaO₃SSi)

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。I₂ 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-Bu OH : Ac OH : H₂O (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 線フィルムによる autoradiogram によった。

第二節 ¹³¹I 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 100 g 前後のウイスター系雄ラットを 24 hr 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、それ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°C、2 min 2 min 12,000 x 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 ¹³¹I -histidine 1.0 μ mole を 0.1 ml 水溶液として加え、さらに基質 (β -alanine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-leucine) を 1.5 μ mole の ATP および 1.2 μ mole の Mg⁺⁺ を含む medium 0.1 ml の溶液として加える。酵素液および medium を加えて全量 0.7 ml として、37°C で反応を行なった。冷 5% TCA 1 ml を加えて反応を止め 15 min 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-BuOH 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、5 ml の 5% TCA を加え、蒸発を防ぎながら 90°C、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% TCA 3 ml で洗浄遠心分離し上清を合す。上清液を正確に 10 ml 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 262 mμ の吸光度を測定し定量した。

反応生成物の確認

β-alanine と ¹³¹I-histidine の酵素的 dipeptide 形成による生成物について、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により比較検討した。結果を Fig 2 に示す。

Fig 2 (A) および (B) より明らかのようにニンヒドリン分解操作で I-carnosine, I-

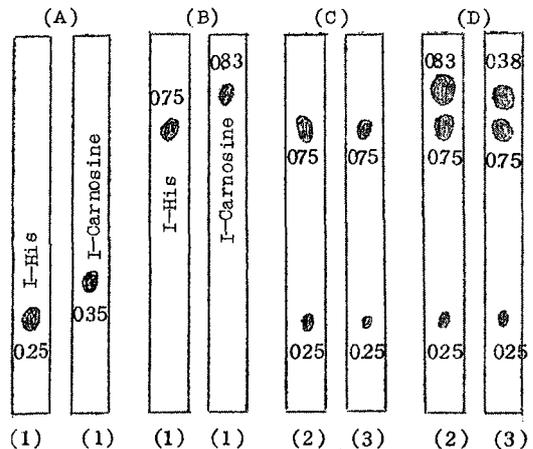


Fig 2. Paperpartition Chromatograms of Reaction Products in Water Layer after Ninhydrin Degradation and n-Butanol Extraction

Toyo Roshi Ltd No 51, n-BuOH:AcOH:H₂O(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 L-histidine の小スポットと L-histidine 分解物が検出され、さらに (D) の完全系では L-histidine の小スポットと L-histidine のニンヒドリン分解物とともに L-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 L-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-glutamic acid 及び L-leucine 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 endogenous 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、glutamic acid は α -脱炭酸して γ -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 -alanine 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

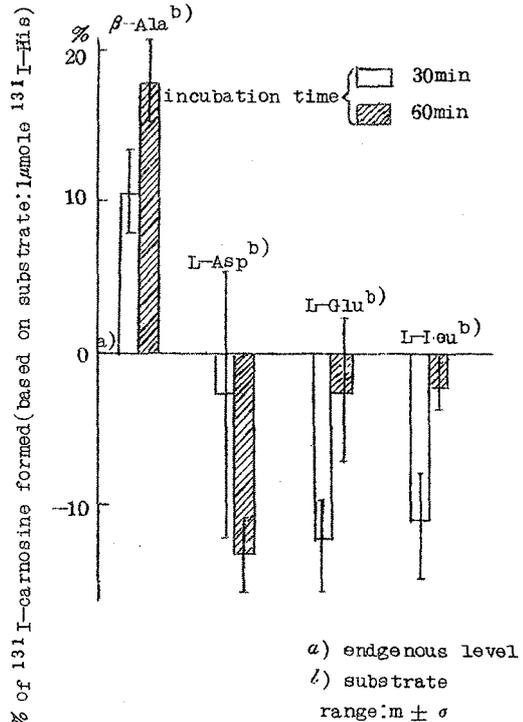


Fig 3. Incorporation of ^{131}I -Histidine into ^{131}I -Carnosine or Related Dipeptides
 Reaction mixture: ^{131}I -histidine 10 μmole , ATP 15 μmole , Mg^{2+} 12 μmole , amino acid 20 μmole and enzyme solution from liver 0.5ml in 0.7ml of 0.04M Tris buffer (pH7.3) containing 10^{-4}M EDTA.

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 のペプチド形成の見掛け上の 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 [14C] 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 のように 90 min 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 5 μ mole 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 2.0 μ mole で 60min の反応における肝酵素量

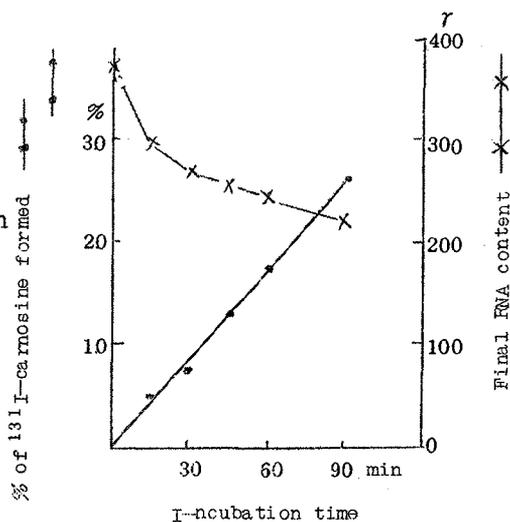


Fig 4. Effect of Incubation Period on Rate of ^{131}I -Carnosine Formation and Residual RNA Contents

Incubation mixture: β -alanine 20 μ mole, 0.5ml of enzyme solution from liver, and others are same to Fig. 3.

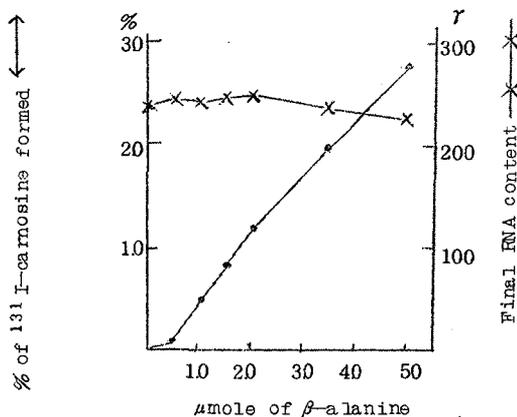


Fig 5. Formation of ^{131}I -Carnosine and Residual RNA Contents after Incubation for 60min at Various β -Alanine Concentrations

Incubation mixture: various β -alanine contents, 0.5ml 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。

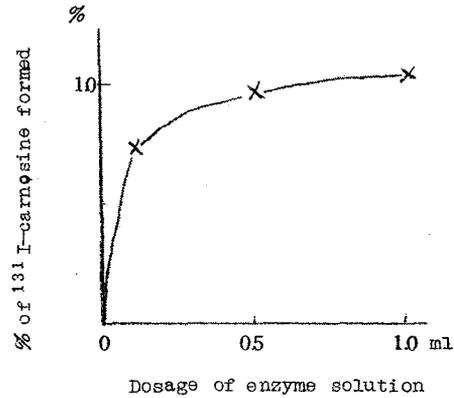


Fig 6. Formation of ^{131}I -Carnosine depend on Dosage of Enzyme Solution from Liver for 60min Incubation

Incubation mixture: β -alanine $20\mu\text{mole}$, and others are same to Fig 3. with the exception of 10ml enzyme solution (total volume 1.1ml)

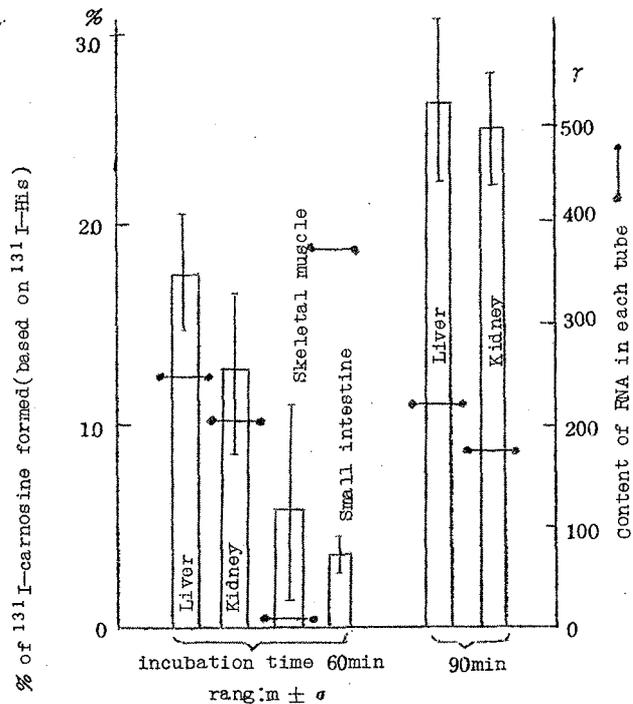


Fig 7. Activities of ^{131}I -Carnosine Formation and Final RNA Content by Enzyme Solution from Each Organ

Reaction mixture: β -alanine $20\mu\text{mole}$ 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 することを確認するとともに、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 ($2\text{-}^{14}\text{C}$) 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 ($3\text{-}^{14}\text{C}$) 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 $10 \mu Ci / 1.48 mg$ の放射能で、L-leucine ($U-^{14}C$) は $100 \mu Ci / 2.34 mg$ 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 2π 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 $100 \sim 150 g$ 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 ($3-^{14}C$) $15.0 \mu Ci$ 及び L-Leucine ($U-^{14}C$) の場合は $12.8 \mu Ci$ 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200 μ 薄層クロマトグラフィーでEtOH:AcOH:H₂O (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 [3-¹⁴C] 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、6hr後に333cpmと減少し、12.24hr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 (3-¹⁴C) 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 intravenous 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、睪丸の順であるが、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 (2-¹⁴C) 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 (2-¹⁴C)²⁹⁾ 及び D, L-aspartic acid (3-¹⁴C) 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だけにすぎない。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/ μ mole)		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、2 N 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 $[\alpha]_D^{25} = +38^\circ$ 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、腎および膀胱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、12,000 XG 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 2.0 ml として入れた。第一側室に基質の β -L-aspartyl-L-histidine と 0.7 μ mole のピリドキサーに磷酸を 0.7 ml の同じ緩衝液に溶解して入れた。第二側室には 2N H₂SO₄ 0.2 ml を入れ全量 2.9 ml 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 10 min であり、また反応終了時 2N H₂SO₄ を主室に導入してさらに 10 min 振盪して検討した。反応は空気相で行ない、温度は 37.5°C、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-Bu OH : Ac OH : H₂O (4:1:5) の溶媒系で上昇法ペーパークロマトグラフィにより、ニンヒドリン反応、ジアゾ反応を用いて生成物を検討した。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°C 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動分析計 KLA 3 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 -aspartyl-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

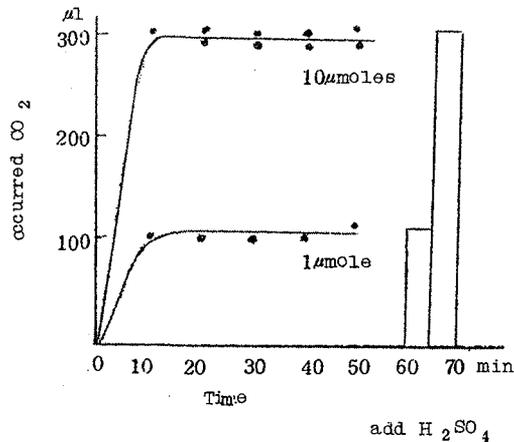


Fig 8. Decarboxylation of β -L-Aspartyl-L-histidine by Freshly Prepared Enzyme Solution from Rat Liver

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°C 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。

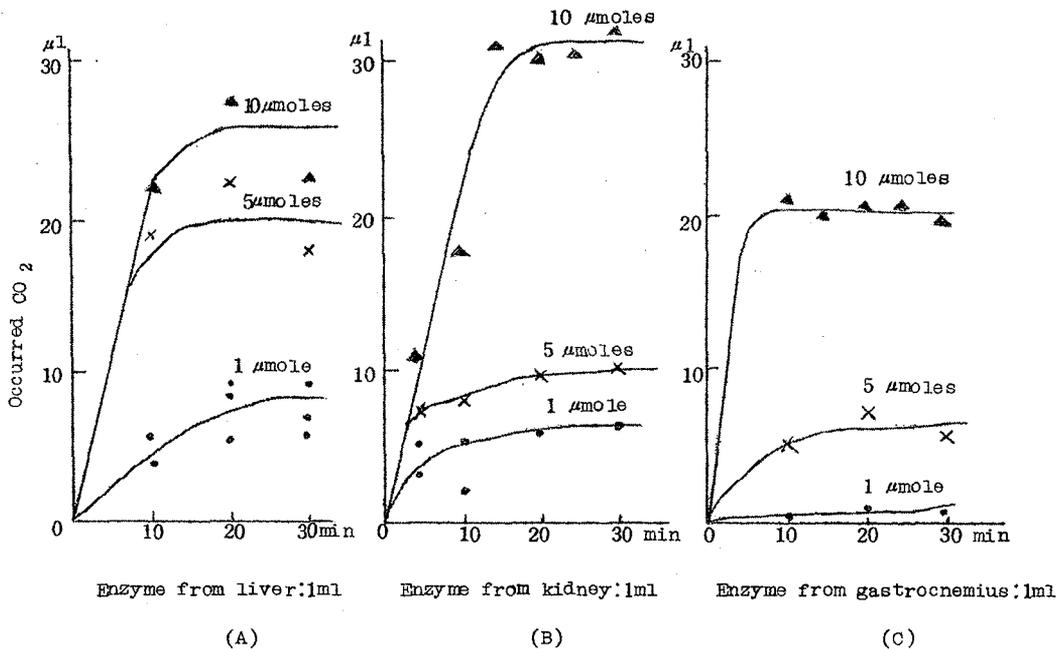


Fig 9. Decarboxylation of β -L-Aspartyl-L-histidine by Ordinary Prepared Enzyme Solution
Reaction: 3-4hr after decapitation

Fig 9 (A) に肝の例を示したが基質濃度には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、好氣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 ($R_f=0.08$) 及び histidine ($R_f=0.13$) のみ検出され、carnosine ($R_f=0.11$)、anserine ($R_f=0.12$) 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動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 m μ で 58.56%、

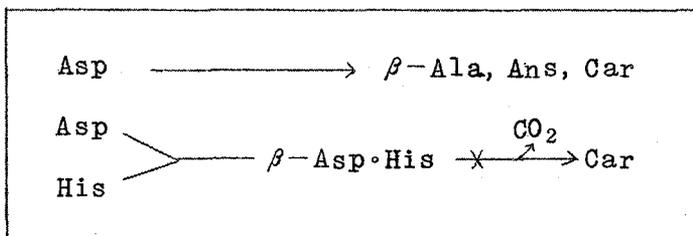
640m μ で61.80%の未反応 β -aspartyl-histidineを回収し、反応は約40%にすぎないことを認めた。塩基性カラムからは一ケの未知分解物と、分解された基質の約 $1/10$ に相当するhistidine及びethanol amine、硫安のピークを検出した。しかしcarnosine, anserineは見い出せなかった。このことは脱炭酸反応とともに分解反応が起きていることを示している。同様な条件ではcarnosineが安定である²²⁾ことから、 β -aspartyl-histidineの α -カルボン酸の脱炭酸が先行してcarnosineが出来る可能性は少なく、carnosine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、carnosine⁴²⁾もしくはanserine²⁰⁾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 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 20 mU/100 mlの子宮収縮作用に対し β -aspartyl-histidine 10 mg/100 ml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 -aspartyl-histidineにはこの拮抗作用が極くわずかし認められない。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 [$6\text{-}^{14}\text{C}$] 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 [6-¹⁴C] 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 [6-¹⁴C] 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 [6-¹⁴C] 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 μ Ci / 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 [6-¹⁴C] 溶液0.2mlを投与した。6-azauracilはFig 13 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 [6-¹⁴C] 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 [6-¹⁴C] 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

分取型アミノ酸自動分析機(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radiochemical 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°C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0.2NPCA 5ml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

Orotic Acid (6-¹⁴C) 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, anserine 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 ($6\text{-}^{14}\text{C}$) から aspartic acid への分解は認められなかった。

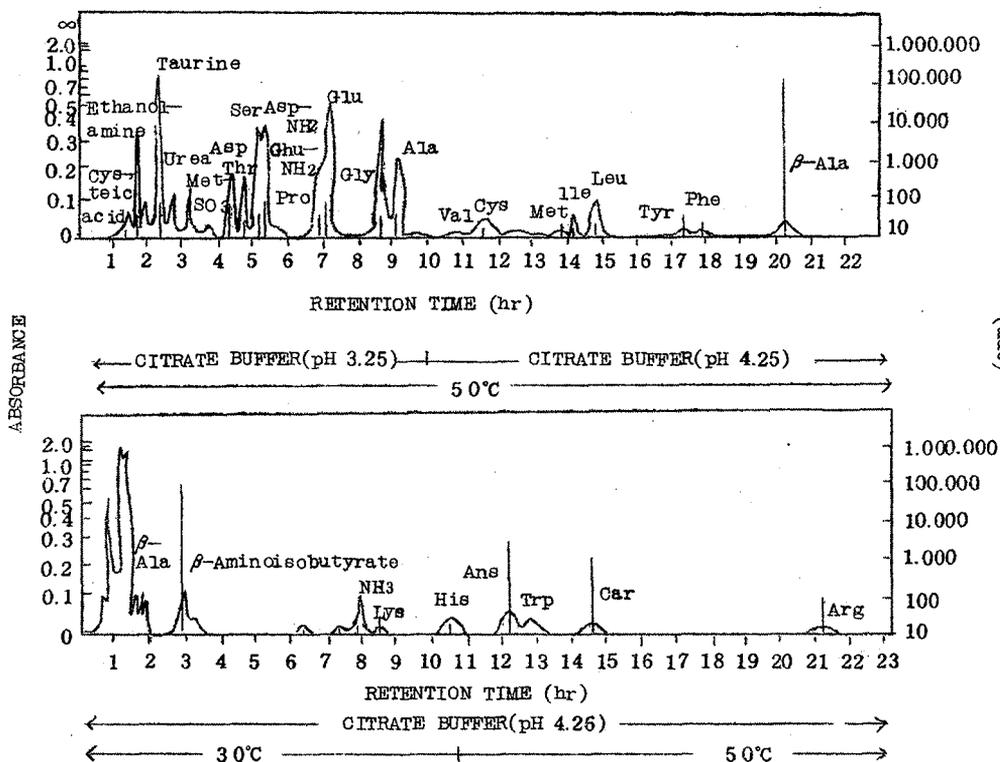


FIG. 10. Column chromatograms of 80% alcoholic extract of liver homogenate of rat with orotate- $6\text{-}^{14}\text{C}$ by a preparative amino acid autoanalyzer (Q D at $560\text{m}\mu$ and radioactivity). Upper: Acid-neutral column ($18 \times 1500\text{mm}$, 120ml/hr , ratio 1:4, Amberlite CG-120 325-400mesh). Lower: Basic column ($18 \times 500\text{mm}$, 120ml/hr , ratio 1:4, Amberlite CG-120 400-600mesh) with adding $1\mu\text{mole}$ of Ans and Car.

Curve: Absorbance at $560\text{m}\mu$

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 $1\mu\text{mole}$ 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

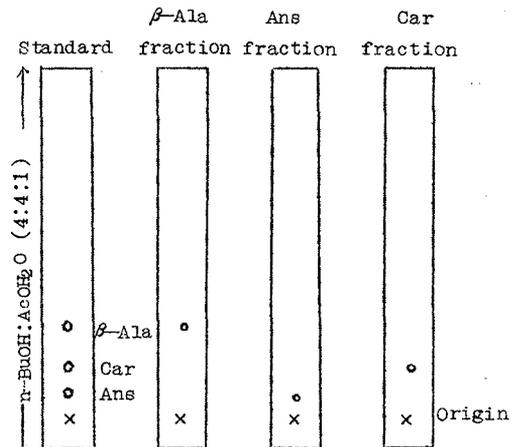
た如く、 β -alanine, anserine, carnosine 相当位置を 1 : 4 の比で同時に分取した分画について、イオン交換樹脂で脱塩後ペーパークロマトグラフィで確認し Fig 11 に示す。ニンヒドリン反応と autoradiography により化学的にも、放射化学的にも β -alanine, anserine, carnosine であることを認められた。anserine 及び carnosine 分画について、それぞれアルカリ加水分解後、薄層クロマトグラフィ

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。

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 1g 当り RNA へとり込まれた放射能は 138,295 cpm であり、また RNA 1mg 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



NINHYDRIN DEVELOPMENT

FIG. 11. Paper autoradiograms of radioactive β -Ala, Ans and Car fractions eluted from the autoanalyzer.

Paper chromatography: Ascending method, Töyö filter paper No 51 (2 x 40cm). Radiation: X-ray film, exposure for 40 days.

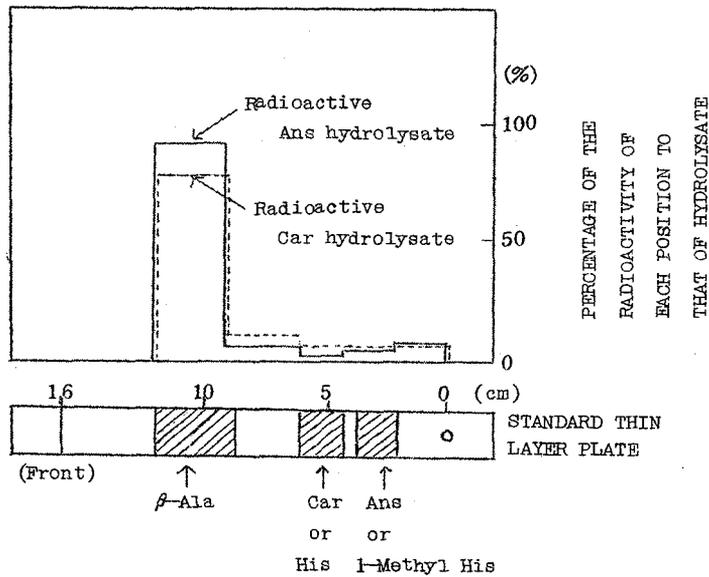


FIG 12. Detection of the labeled β -Ala in the hydrolysates of Ans and Car biosynthesized from crotonate-6- ^{14}C .

The hydrolysate was analyzed with a thin layer chromatography (Wako gel B-5; ethanol: $\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}=10:10:1$). 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 μm 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 24 hr 尿としての排泄レベルは非投与時には低い、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 μm O.D./260 μm 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のように 6-azauracil そのままの排泄増加は認められない。

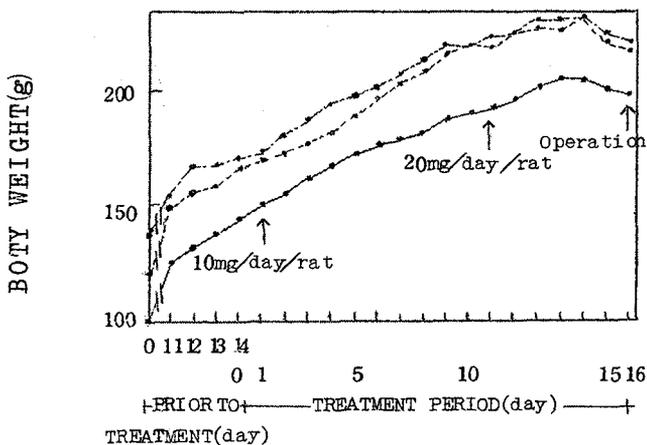


FIG 13. Body weight curves of three rats by 6-azauracil treatment.
 Strain: Wistar.
 Diet: Oriental Yeast Ltd. 's food.
 Water: Free taking
 Temp: $20^{\circ} \pm ^{\circ}C$

The 6-azauracil solution was daily administered to the rat by an intramuscularly injection over a 15-day period (0.5ml/day/rat for the first 10 days and 1.0ml/day/rat for the following 5 days). Only on the last day, 6-azauracil was injected intraperitoneally instead of an intramuscularly injection at 1 hr before orotate- $6-^{14}C$ injection.

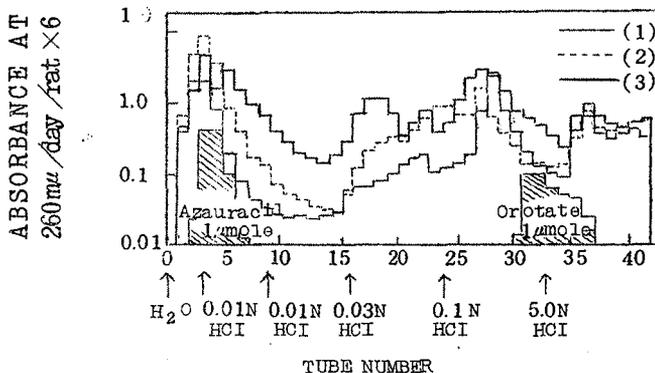


FIG 14. Column chromatography of urine of 6-azauracil treated rat.
 Column: Dowex-1 Cl⁻ form 10ml (height 10cm).

Elution was carried out with every 40ml of 0.001 N HCl, 0.01N HCl, 0.03N HCl, 0.1N HCl and 5.0N HCl successively at 5ml/15min/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 10 days (10mg/day/rat) after the azauracil administration.
- (3): . . . The following 5 days (20mg/day/rat).

The manner 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 ($6-^{14}\text{C}$) を与えたものである。

Orotic Acid ($6-^{14}\text{C}$) 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

Incorporation of orotate- $6-^{14}\text{C}$ 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 (200 μg) of actinomycin D solution was used for the injection to each rat. The intraperitoneal injection of actinomycin D was performed at 1hr before orotate- $6-^{14}\text{C}$ 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 m μ 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 2 π gas flow counter. Each value is the mean \pm standard error of three rats. The rat was given an injection of 20 μCi /rat of orotate- $6-^{14}\text{C}$ 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 \pm 0.28	8.53 \pm 0.46	141.7 \pm 3.1 $\times 10^3$	16.7 \pm 0.7 $\times 10^3$	678.8 \pm 14.0 $\times 10^3$
	Actinomycin D	1.80 \pm 0.03	8.36 \pm 0.29	22.2 \pm 3.3 $\times 10^3$	2.6 \pm 0.3 $\times 10^3$	103.6 \pm 17.5 $\times 10^3$
	6-Azauracil	1.51 \pm 0.11	8.38 \pm 0.41	82.3 \pm 2.0 $\times 10^3$	9.4 \pm 0.5 $\times 10^3$	379.4 \pm 17.6 $\times 10^3$
Muscle	Normal	0.45 \pm 0.22	1.24 \pm 0.16	253 \pm 3	214 \pm 50	1355 \pm 122
	Actinomycin D	0.38 \pm 0.01	1.19 \pm 0.02	246 \pm 72	203 \pm 64	1185 \pm 704
	6-Azauracil	0.39 \pm 0.05	1.15 \pm 0.02	345 \pm 105	286 \pm 78	1592 \pm 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、actino-

mycin 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/ μ mole)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-⁶C 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 HClO₄ 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 (μ mole)	Specific activity (cpm/ μ mole)	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 \pm 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 \pm 3		
	Actinomycin D	283.5 \pm 144.0 $\times 10^3$	0.52 \pm 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 \pm 190		
	6-Azauracil	773.0 \pm 12.0 $\times 10^3$	24.41 \pm 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 \pm 25		
	6-Azauracil ¹⁾	831.5 $\pm 10^3$	23.37	35.6 $\times 10^3$	109.3	14.3 $\times 10^3$	504.4 $\times 10^3$	350		
Anserine	Normal	33.5 \pm 11.8 $\times 10^2$	<0.1	>33000	680 \pm 230	80 \pm 30	3300 \pm 1180		2.2 \pm 1.0	9.1 \pm 2.8
	Actinomycin D	324.7 \pm 96.2 $\times 10^2$	<0.1-0.36	approx. 130000	7190 \pm 2130	880 \pm 280	33070 \pm 9410		16.8 \pm 8.6	562.3 \pm 325.1
	6-Azauracil	157.9 \pm 17.4 $\times 10^2$	3.71 \pm 0.42	4600 \pm 310	2180 \pm 340	250 \pm 30	10020 \pm 1350		2.4 \pm 0.8	20.2 \pm 15.0
	6-Azauracil ¹⁾	59.2 $\times 10^2$	4.18	1400	780	100	3590			17.1
Carnosine	Normal	367 \pm 40	<0.1	>3600	74 \pm 7	8 \pm 0.7	352 \pm 16		0.22 \pm 0.03	
	Actinomycin D	82 \pm 21	<0.1	>800	18 \pm 5	2 \pm 0.7	84 \pm 22		0.05 \pm 0.02	
	6-Azauracil	1870 \pm 1470	0.80 \pm 0.53	1630 \pm 150	270 \pm 210	30 \pm 23	1210 \pm 960		0.33 \pm 0.28	
	6-Azauracil ¹⁾	350	0.25	1390	46	6	210		0.04	

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

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 $3.7 \mu\text{mole}$ も存在する。carnosine は anserine よりは少ないが $0.8 \mu\text{mole}$ 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 ではさ程変わらないが、actinomycin D では非常に anserine が多くなっている。総 cpm は β -alanine、anserine について 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 について 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-5-¹⁴C 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.

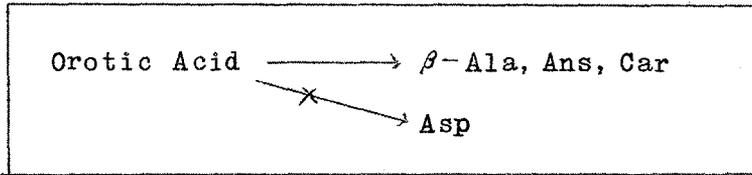
	Treatment	Content			Incorporation ratio			Specific activity	Conversion ratio		Formation ratio of Ans and Car
		Per Wet tissue (g) (μ mole)	Per RNA(mg) (μ mole)	Per protein (g) (μ mole)	Per Wet tissue (g) (cpm)	Per RNA(mg) (cpm)	Per Protein (g) (cpm)	Per μ mole (cpm)	cpm/cpm of RNA (%)	cpm/cpm of β -Ala (%)	cpm of Ans/cpm of Car
β -Alanine	Normal	<0.05	trace	trace	24 \pm 14	17 \pm 7	118 \pm 64	>400	10 \pm 5		
	Actinomycin D	<0.05	trace	trace	345 \pm 94	279 \pm 92	1350 \pm 440	>9000	101 \pm 1		
	6-Azauracil	0.13 \pm 0.04	0.11 \pm 0.03	0.60 \pm 0.20	195 \pm 47	163 \pm 34	901 \pm 193	2540 \pm 1790	58 \pm 4		
	6-Azauracil ¹⁾	0.13	0.12	0.62	62	59	309	500	650		
Anserine	Normal	1.4 \pm 0.4	1.1 \pm 0.1	7.1 \pm 1.6	18 \pm 11	13 \pm 6	92 \pm 50	12 \pm 4		77 \pm 1	1.2 \pm 0.2
	Actinomycin D	1.8 \pm 1.0	1.5 \pm 0.8	6.1 \pm 2.7	90 \pm 35	75 \pm 26	312 \pm 79	45 \pm 3		38 \pm 24	1.2.9 \pm 4.0
	6-Azauracil	3.1 \pm 0.3	2.7 \pm 0.2	14.8 \pm 1.4	126 \pm 27	105 \pm 19	583 \pm 110	38 \pm 11		65 \pm 2	0.3.4 \pm 0.0.8
	6-Azauracil ¹⁾	2.6	2.4	12.8	40	38	199	16		64	1.1
Carnosine	Normal	3.1 \pm 0.1	2.6 \pm 0.7	16.2 \pm 1.8	15 \pm 6	9 \pm 1	74 \pm 28	6 \pm 1		73 \pm 16	
	Actinomycin D	3.0 \pm 0.6	2.5 \pm 0.5	11.0 \pm 2.3	9 \pm 5	7 \pm 4	28 \pm 12	3 \pm 1		4 \pm 3	
	6-Azauracil	9.1 \pm 1.2	8.1 \pm 1.3	43.7 \pm 6.7	415 \pm 130	342 \pm 139	1903 \pm 784	56 \pm 3		202 \pm 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 \pm standard error of 3 animals.

結果を Table V 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 ($6\text{-}^{14}\text{C}$) は anserine, carnosine へ incorporate 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〔2-¹⁴C〕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-his-
tidine 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
〔6-¹⁴C〕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-aza-
uracil 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 carbamyl 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 ($6\text{-}^{14}\text{C}$) 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 ($2\text{-}^{14}\text{C}$) の β -Alanine, Anserine 及び Carnosine へのとり込み

実験方法

試薬 carbamyl aspartic acid ($2\text{-}^{14}\text{C}$) 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 ($2\text{-}^{14}\text{C}$) $20\mu\text{Ci}/0.7\mu\text{mole/rat}$ 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 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 ($2\text{-}^{14}\text{C}$) 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 ($6\text{-}^{14}\text{C}$) 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 ($2-^{14}\text{C}$) の場合も β -alanine \rightarrow anserine \rightarrow 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 ($2-^{14}\text{C}$) から β -alanine, anserine 及び carnosine へのとり込みは orotic acid ($6-^{14}\text{C}$) の場合に比べバラツキが大きく in vivo の実験では orotic acid ($6-^{14}\text{C}$) 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 ($6-^{14}\text{C}$) 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 V Incorporation of Carbamyl Aspartic Acid ($2-^{14}\text{C}$) into β -Alanine, Anserine and Carnosine in Liver at one hour.

Fraction	whole	Whole μ mole	C P M		C P M	C P M (Anserine)
	C P M		per μ mole	per RNA (CPM)	CPM (β -Alanine)	CPM (Carnosine)
	$\times 10^3$		$\times 10^3$	%	%	
β -Alanine	343.8 \pm 138.3	1.34 \pm 0.04	255.5 \pm 122.6	43.5		—
Anserine	12.0 \pm 3.8	< 0.1	> 120	1.4	4.1	2.3
Carnosine	7.9 \pm 3.1	< 0.1	> 80	1.0	2.8	—

mean \pm s. e.

Table VII Incorporation of Carbamyl Aspartic Acid ($2\text{-}^{14}\text{C}$) into β -Alanine, Anserine and Carnosine in skeletal Muscle at one hour.

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

mean \pm 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 100 g 前後のものを用いた。24 hr 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 10 μ moles もしくは carbamyl β -alanine 5 μ moles / 0.5 ml リン酸緩衝液 pH 7.2、第 2 測室に 5 N 硫酸 0.2 ml、副室に濾紙に 5 N 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 群をつくり 37°C で 10min preincubation 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 反応後マン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。

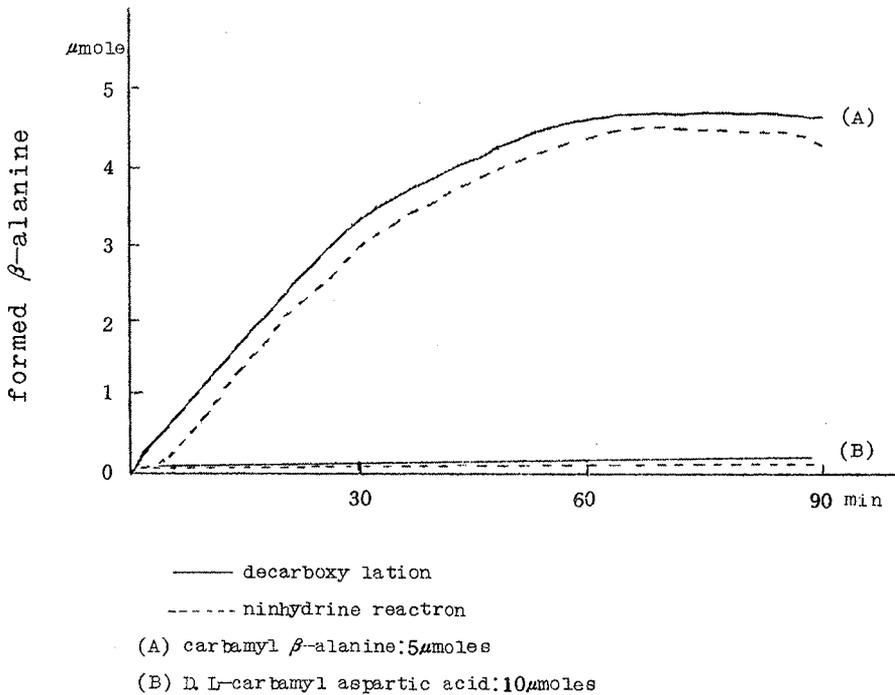
反応生成物の確認 炭酸ガスの発生を求めた後直ちに 10N NaOH により中和後エタノールを加えて 80% アルコールとし、3,000rpm 10 min 遠心分離して上澄を集め沈殿についてさらに 2 回 80% アルコールで洗い 3,000rpm 10 min 遠心分離を行ない上清を合して 40°C 以下で減圧乾固して pH 2.2 のアミノ酸アナライザー用のクエン酸緩衝液にとかし 1.0 ml を用いアミノ酸自動分析機により β -alanine の定量を行なった。常に endogenous な β -alanine を差し引いた。残りの検体につき東洋濾紙 No. 51 を用い n-butanol: 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ヒドリン反応により β -alanine の定性、p-dimethylaminobenzaldehyde 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動分析機により 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氣的条件でも好氣的条件でも加えた基質のほぼ100%が β -alanineに conversionしこの点は Fritzon⁵⁹⁾の示す如く非常に反応性の強い系である。しかし carbamyl aspartic acidについては嫌氣的条件下でも、好氣的条件下でも 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.



carbamyl aspartic acidについてはさらに詳しく pH cofactor として ビタミン B₆, 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、硫酸分画、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 [6-¹⁴C] を用いた実験で 6-azauracil

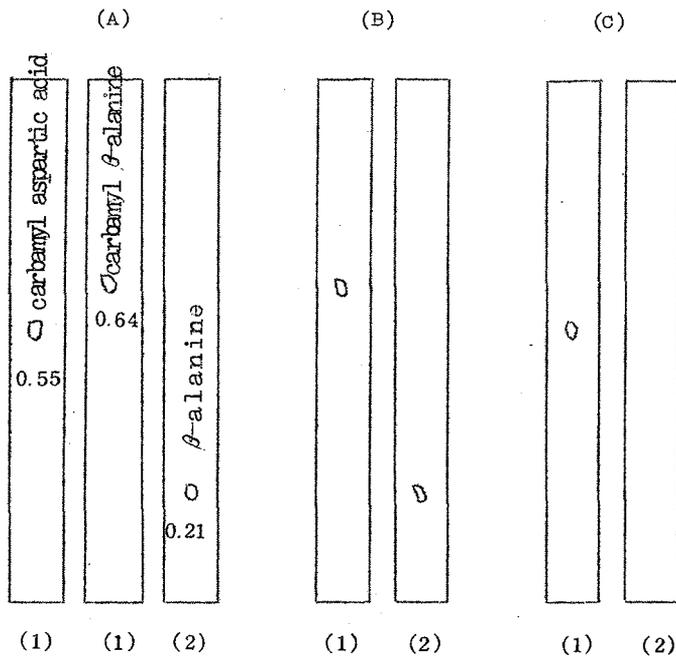


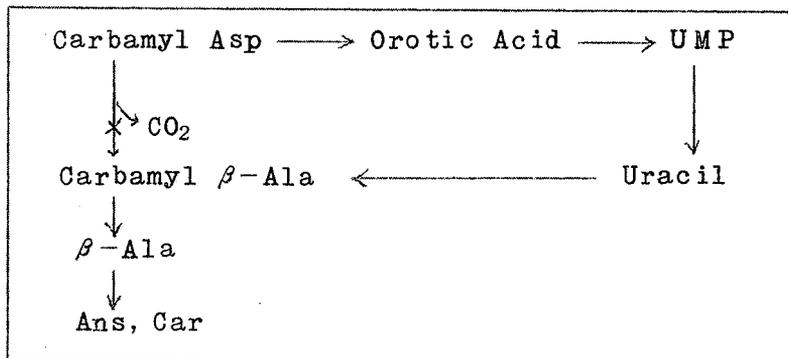
Fig. 16. Paper chromatograms of Reaction Products. Toyo Roshi Ltd. No. 51, ethanol:AcOH:water (10:10:1) ascending method.
 (1) p-dimethylaminobeu 3 aldehyde reaction
 (2) minhydrin reaction
 (A) standard
 (B) reaction with carbamyl β -alanine.
 (C) reaction with carbamyl aspartic acid.

投与により β -alanine の化学的含有量は正常の場合の 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 U M P の形成が阻害され、 carbamyl aspartic acid \rightarrow carbamyl β -alanine \rightarrow 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 Grisolia⁵⁷⁾ 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 \rightarrow carbamyl β -alanine \rightarrow 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、Dobrynina⁶²⁾ 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 へ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 ^3H -anserine 及び ^3H -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 のトリチウムガスを接触させた。遊離しやすいトリチ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
酸自動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を用いてのぞ
んでペーパークロマトグラフィー(BuOH:AcOH:H₂O=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³H-anserine
8,052,400 dpm/0.5 mg/0.2 ml, ³H-carnosine 7,474,250 dpm/0.5 mg/0.2
mlである。なお置換³H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24hr絶食させ各群
3匹づつ用いた。生理食塩水溶液とした³H-anserine もしくは³H-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、分取型アミノ酸自動分析機(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 ^3H -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。 ^3H -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 ^3H -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 \pm standard error)

	Liver				Gastrocnemius			
	dpm per Whole tissue ratio ¹⁾	Conversion Sp. act. dpm/ μ mole value ²⁾	Correct. dpm per conversion sp. act. dpm/ μ mole value ²⁾	Correct. g tissue ratio ¹⁾	dpm per conversion sp. act. dpm/ μ mole value ²⁾	Correct. g tissue ratio ¹⁾	dpm per conversion sp. act. dpm/ μ mole value ²⁾	Correct. g tissue ratio ¹⁾
β -Alanine	2949 \pm 1099	118	2506 \pm 1129	7.500	836 \pm 458	86	7953 \pm 5300	24.000
Anserine	2643 \pm 387	100	>30,000 ³⁾	30.000	970 \pm 449	100	1999 \pm 1024	2.000
carnosine	3657 \pm 852	138	7553 \pm 2598	10.000	359 \pm 195	37	112 \pm 6	150
RNA	3078 \pm 303	116	81 \pm 4 ⁴⁾		801 \pm 216	83	504 \pm 112 ⁴⁾	

1) dpm of each compound / dpm of anserine \times 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 0.1 μ mole.

4) Per mg of RNA.

Table IX Conversion from the Tritiated Carnosine.

(mean \pm standard error)

	Liver				Gastrocnemius			
	dpm per Whole tissue ratio ¹⁾	Conversion sp. act. dpm/ μ mole	Correct. dpm per g tissue value ²⁾	Conversion sp. act. dpm/ μ mole value ²⁾	Conversion ratio ¹⁾	Conversion sp. act. dpm/ μ mole value ²⁾	Correct.	
β -Alanine	2281 \pm 606	3.0	21836 \pm 10670	50,000	401 \pm 250	45	2282 \pm 1029	5,000
Anserine	2780 \pm 495	3.7	> 30,003 ³⁾	30,000	1098 \pm 38	123	1610 \pm 417	1,600
carnosine	75285 \pm 30389	100	> 753,000 ³⁾	753,000	895 \pm 468	100	231 \pm 20	230
RNA	3968 \pm 374	5.3	106 \pm 14 ⁴⁾		1143 \pm 371	128	808 \pm 281 ⁴⁾	

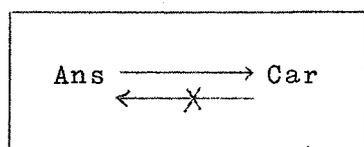
1) dpm of each compound/dpm of carnosine \times 100.

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

3) Chemical content is below 0.1 μ mole.

4) Per mg of RNA.

〔小括〕 以上のことから肝では ^3H -anserine が carnosine に変換し、次いで β -alanine と histidine に加水分解され、 ^3H -carnosine の場合は分解された ^3H - 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 ^3H -anserine 投与でも ^3H -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 [$6-^{14}\text{C}$] 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。さらに放射性磷酸による RNA パルス標識法、また ribonuclease 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 ($6-^{14}\text{C}$) 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 ($6-^{14}\text{C}$) を 0.2ml (= 20 μCi / 0.5 μmole) 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動分析機により 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-Azaauracil, 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 [$6-^{14}\text{C}$]
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 (μ mole/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 X Incorporation of Orotate (6-¹⁴C) into β -Alanine, Anserine and Carnosine

Organ	Fraction	Treatment	Whole CPM	Whole	μ mole	CPM	CPM	CPM
				μ mole	Wet Tissue(g)	Wet Tissue(g)	RNA(mg)	μ mole
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	380,000 <
		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	238	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 3 samples

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、carnosine 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 $\text{orotic acid} \rightarrow \text{UMP} \rightarrow \beta\text{-alanine} \rightarrow \text{anserine} \rightarrow \text{carnosine}$ 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 activity では論ずことが出来ないが cpm/Wet tissue(%)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 -alanine 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。

β -alanine および carnosine 投与による $\text{orotic acid}(6\text{-}^{14}\text{C})$ の RNA へのとり込みに対する影響 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 $\text{orotic acid}(6\text{-}^{14}\text{C})$ 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 $\text{orotic acid}(6\text{-}^{14}\text{C})$ の RNA へのとり込みは β -alanine、carnosine

Table XII Incorporation of Orotate($6-^{14}\text{C}$) into RNA
in Rat

Tissue	Treatment	m ± s. e.				
		D N A Wet Tissue(\mathcal{P})	R N A Wet Tissue(\mathcal{P})	CPM of RNA Wet Tissue (\mathcal{P})	CPM of RNA Protein (\mathcal{P})	CPM of RNA R N A (mg)
Liver	Normal	mg 217 ± 028	mg 353 ± 046	$\times 10^3$ 142 ± 3	$\times 10^3$ 679 ± 14	$\times 1$ 16704 ± 701
	β -Alanine	129 ± 006	999 ± 015	191 ± 10	796 ± 111	19233 ± 1268
	Carnosine	216 ± 003	912 ± 013	193 ± 13	884 ± 52	21232 ± 1880
Gastrocnemius	Normal	045 ± 022	124 ± 016	$\times 1$ 253 ± 3	$\times 1$ 1355 ± 122	$\times 1$ 214 ± 50
	β -Alanine	041 ± 004	119 ± 004	1271 ± 317	5785 ± 933	1087 ± 298
	Carnosine	073 ± 012	141 ± 006	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 \rightarrow RNA \rightarrow β -alanine \rightarrow anserine \rightarrow 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 (6-¹⁴C)

mean of 3 samples

Tissue	Production Ratio Treatment	β -Alanine	Anserine	Carnosine	Anserine
		RNA	β -Alanine	β -Alanine	Carnosine
Liver	Normal	%	%	%	
	β -Alanine	2.4	2.2	0.22	9
	Carnosine	3.6	8.6	0.53	1.4
Gastrocnemius	Normal	5.7	7.9	1.02	9
	β -Alanine	10	77	73	1.2
	Carnosine	19	123	125	0.9
		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) $500\mu\text{moles}/1.0\text{ml}$ (蒸留水)、
carnosine (Nutritional Biochemical Corporation 製) $500\mu\text{moles}/1.0\text{ml}$ (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 24 hr 絶食したウィスター系雄ラットを 3 匹ずつ正常群、 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 $500\mu\text{moles}/1.0\text{ml}$ 蒸留水、carnosine 投与群には carnosine $500\mu\text{moles}/1.0\text{ml}$ 蒸留水を腹腔内投与し、1 時間後に ^{32}P $1\text{m Ci}/1.0\text{ml}$ 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 $260\text{m}\mu$ 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 $720\text{m}\mu$ 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 [$6\text{-}^{14}\text{C}$] 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 [$6\text{-}^{14}\text{C}$] 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 Biosynthesis

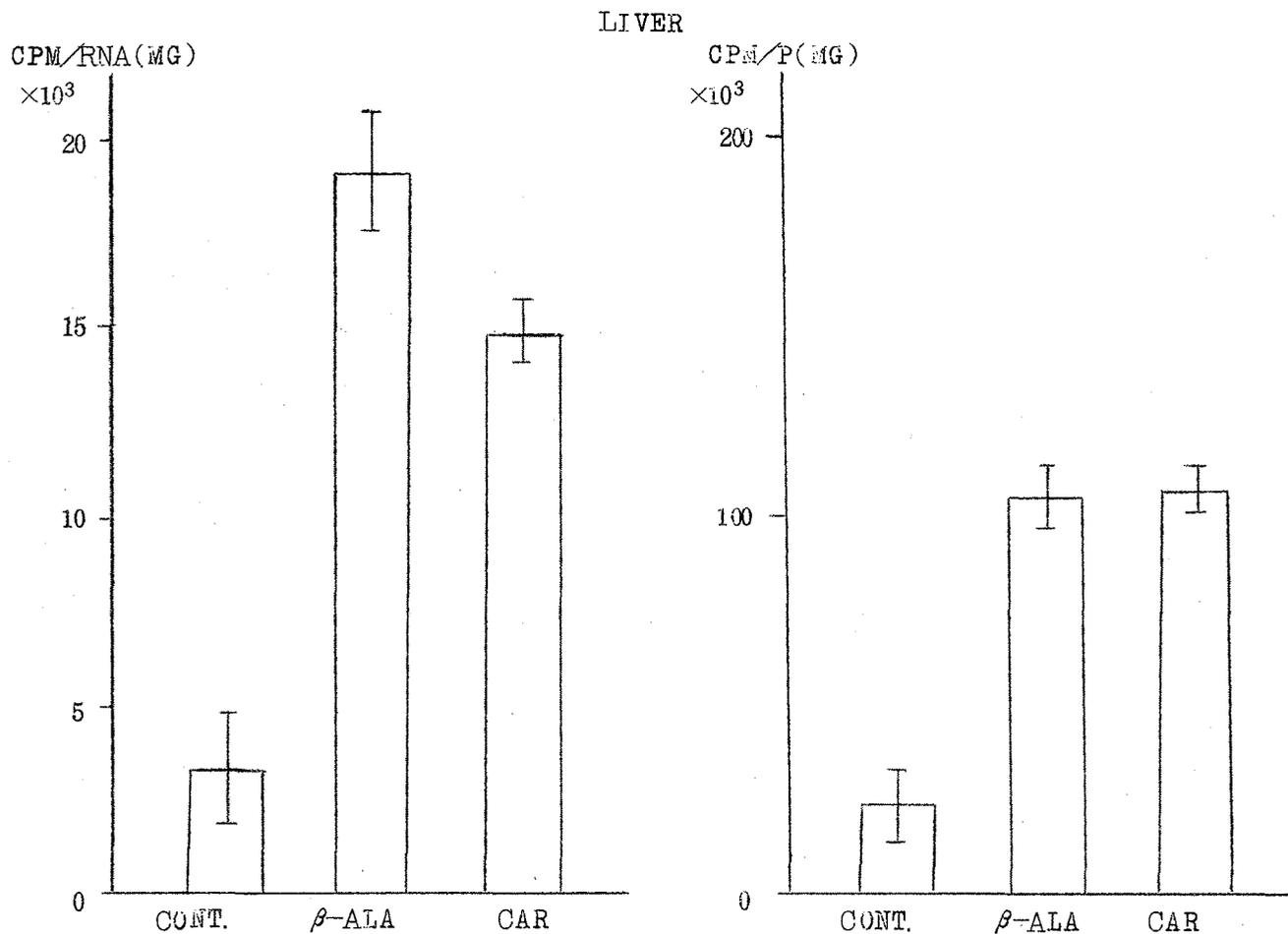
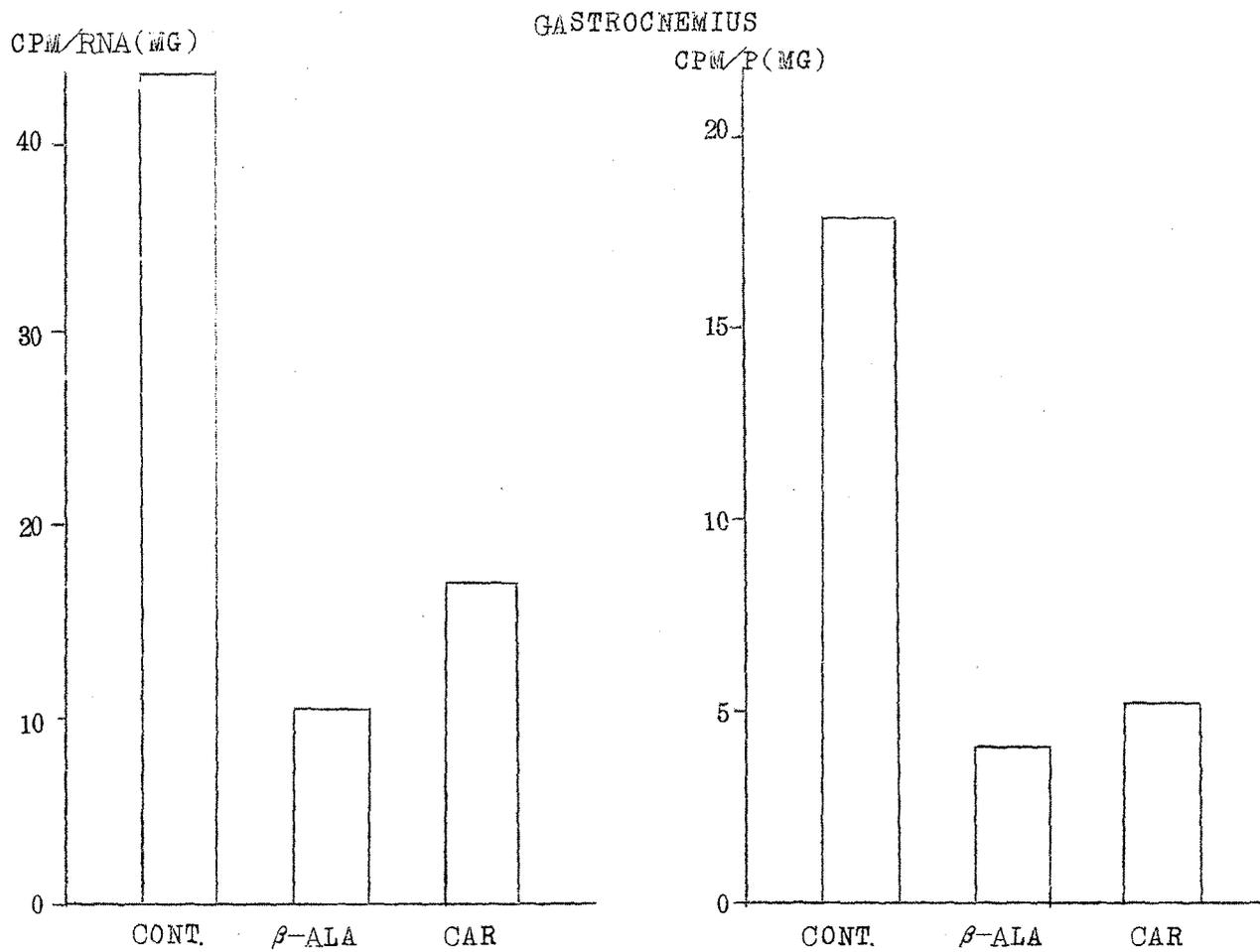


Fig 18. Effect of β -Alanine and Carnosine on RNA

Biosynthesis



みが減少することは orotic acid [6-¹⁴C] 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 [6-¹⁴C] 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 ³²P を用いた実験の場合 ³²P 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 活性に対する影響

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 活性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 24 hr 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 匹ずつの臓器を用いた。0.04 M Tris buffer pH 7.4 を用いて、1 分間 10 ストロークの速さでテフロム homogenizer により homogenize した。核酸合成系の核ヤミトコンドリアを除くため 12,000 X G 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 1.0 ml とり β -alanine,

carnosine 及び anserine それぞれ $5\mu\text{ moles}/0.25\text{ ml}$ pH 7.4 Tris·HCl buffer を加え 37°C で反応する。反応終了後氷冷するとともに 0.4 NPCA を 4 ml 加えて反応を止めた。 β -alanine, anserine 及び carnosine を添加したものは 30 min において比較した。

残存 RNA の定量 反応物を 0.4 NPCA 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 0.2 NPCA 1 ml 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 度ずつ洗い粉末化した。 0.4 NPCA 4.0 ml を加え 90°C 、 15 min 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 0.2 NPCA 2.0 ml で 2 度洗って洗液を合し、正確に 10 ml とし冷蔵庫に一夜放置後遠心分離して上清につき $262\text{ m}\mu$ 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 30 min 後の残存 RNA 量で比較した。

実験結果

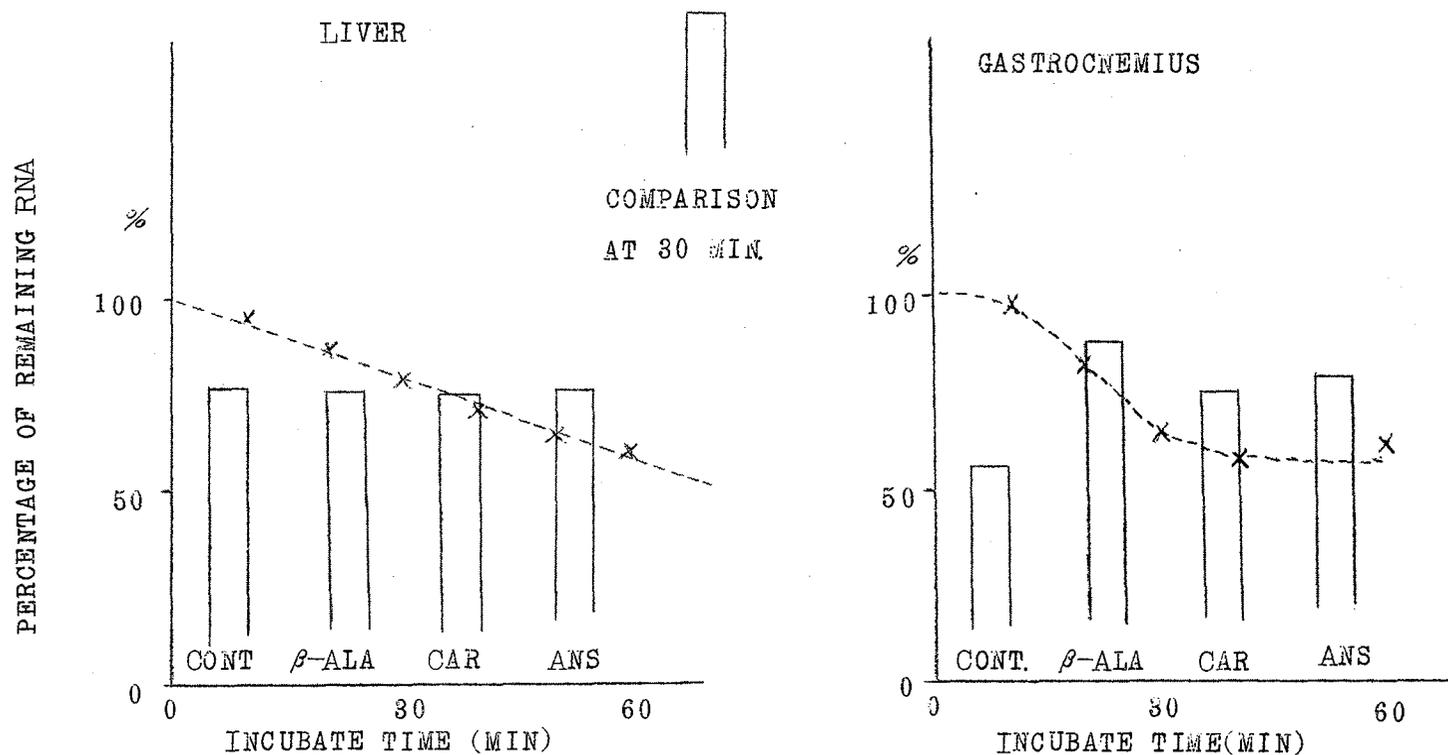
結果を Fig 19 に示す。肝において 60 min まで RNA の分解は直線的に表われているが、 30 min 後における β -alanine, anserine 及び carnosine の影響はほとんど認められない。腓腸筋においては 30 min まで急激に分解されるが 30 min から 60 min までほとんど変化がない。そこで 30 min 後の β -alanine, anserine 及び carnosine 添加の影響はやや RNA の分解を阻害している。このことは ^{32}P の RNA へのとり込みで肝の場合、とり込みの増加が β -alanine, carnosine 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もかかわらず ^{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°C)



抑えられているのではないかと考えられる。

〔小括〕 β -alanine \rightarrow anserine \rightarrow 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
$^{32}\text{P} \longrightarrow$ RNA (after 1hr)	β -Ala	+	-
	Car	+	-
Orotic Acid \rightarrow RNA (after 1hr)	β -Ala	+	+
	Car	+	+
RNase Activity	β -Ala	\pm	+
	Ans	\pm	+
	Car	\pm	+

+ increased

\pm not significant

- decreased

第三編 総括及び考察

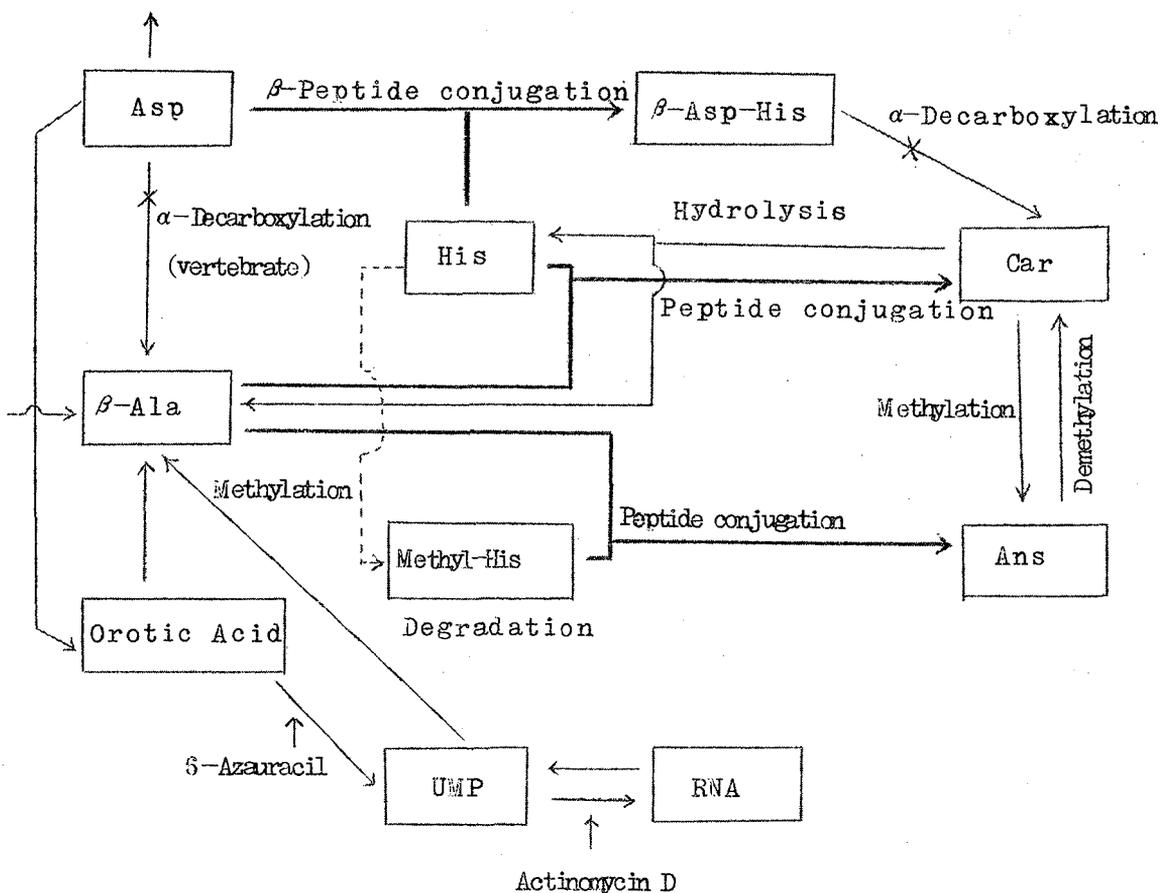
anserine, carnosine は動物とくに脊椎動物の骨格筋に多量含まれ、ラットにおいても腓腸筋中に他の遊離型アミノ酸と同量もしくはそれ以上含まれる (Table V)。ねこの骨格筋中にも他の遊離型アミノ酸とオーダーを異にして多量含まれる²¹⁾。ふるくから anserine carnosine の生理的作用の検討が種々なされて来たが骨格筋中に 100mg% 以上と余りにも多量含まれる²¹⁾ことと臓器によりかなり含量が異なり特に肝臓ではほとんど検出されないこと (Table X)、また carnosine にのみニワトリの血圧降下作用を認めたり^{12)~15)}、aging により anserine, 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 [¹⁴C] を用いて検討しているが、ペーパークロマトグラフィ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 ¹³¹I-histidine 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 r 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 にはペプチド合成能 (^{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。いずれにして ^{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 [$2-^{14}\text{C}$] をラット股静脈内投与 24 hr 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 pathway on Aus and Car biosynthesis

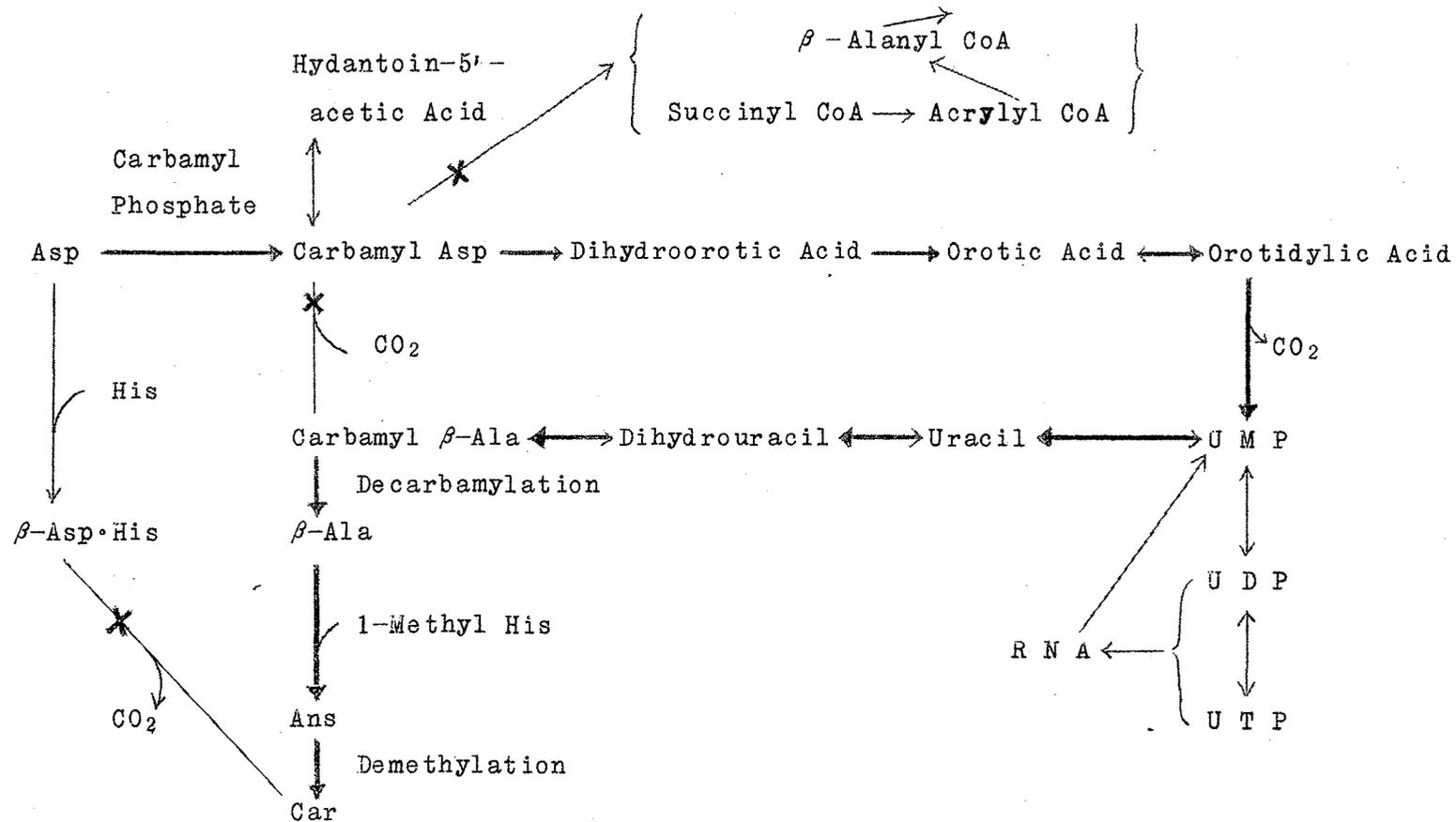
Aus: anserine

Car: carnosine

基源を aspartic acid に想定し、まず aspartic acid ($3-^{14}\text{C}$) をラット股静脈に注射したところ 24 hr で青沼ら²⁹⁾の β -alanine ($2-^{14}\text{C}$) 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での 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、Winnick²²⁾ 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て種々作業仮説を立て検討した。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た経路である。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授与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 β -methyl 化によって anserine が形成される⁶¹⁾ 可能性が薄いことを見出した。投与 1 時間後の比放射能の比較とともに β -alanine [2-¹⁴C] や、aspartic acid [3-¹⁴C] の投与後 24 hr 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、actinomycin D の阻害実験結果からみて、 β -alanine 生成は orotic acid \rightarrow RNA \rightarrow UMP \rightarrow uracil \rightarrow 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 \rightarrow UMP \rightarrow uracil \rightarrow 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 \rightarrow anserine \rightarrow 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 \rightarrow orotidylic acid \rightarrow 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 \rightarrow anserine \rightarrow 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

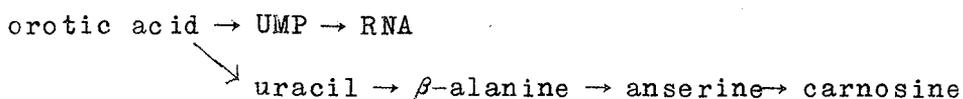
可能である。orotic acid から carbamyl aspartic acid にもどり、これが脱 carbamyl する可能性は aspartic acid に放射のとり込みが認められないことから否定される。さらに carbamyl aspartic acid から succinyl CoA を経て β -alanyl CoA となり β -alanine になるとすると糖原性のアミノ酸である aspartic acid, alanine, glutamic acid などにも放射能がとり込まれてもよいはずであるが、実験上とり込みが認められないのでこの可能性はうすい。そこで carbamyl 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 [6-¹⁴C] 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 ³H-anserine が ³H-carnosine に変換し、ついで β-alanine と histidine に加水分解され、一方 ³H-carnosine の場合は加水分解された ³H-β-alanine が再び anserine 中へとり込まれる所見を得た。一方筋では ³H-anserine 投与でも、³H-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 [6-¹⁴C] 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



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conversion 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³²Pを用いβ-alanine、carnosine投与の影響を投与1hr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endoprodut 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。5-¹³¹I-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出した。⁷¹⁾ aspartic acid [3-¹⁴C] 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 [6-¹⁴C] 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 [2-¹⁴C] の β -alanine, anserine 及び carnosine への incorporation は orotic acid [6-¹⁴C] 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。³H-anserine, ³H-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 ribonuclease 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 [$2-^{14}\text{C}$] 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ます。

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. McManus, J. Biol. Chem., 225, 325 (1957).
- 61) I. R. McManus, 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. McManus, and M. S. Benson, Arch. Biochem. 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、藥誌、88, 8 (1968).
- 72) 青沼、浜、青木、玉木、藥誌、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).