

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05955

研究課題名(和文) カルノシンは アラニンプールとして骨格筋のエネルギー代謝に関わるのか？

研究課題名(英文) Is carnosine involved in skeletal muscle energy metabolism as a beta alanine pool?

研究代表者

江草 愛 (Egusa, Ai)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・講師

研究者番号：90521972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、骨格筋と大脳・嗅球に特異的に存在するカルノシンの生理的役割について、エネルギー代謝の面から解明することを目的とした。カルノシンは アラニンとヒスチジンからなり、ヒトの骨格筋中では20 mMの高濃度で存在する。しかし、その生理作用については未だ十分に解明されていない。そこで、カルノシン合成酵素遺伝子を骨格筋細胞に導入した評価系とこの遺伝子を欠損させたマウスの評価系の2種類を用い、エネルギー代謝への影響を調べた。カルノシンはピルビン酸からアセチルCoAへの反応に関与し、結果的にエネルギー生産量を増大させることを期待したが、骨格筋中のATP合成には直接的な関与は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルノシンは豚や鶏などの脊椎動物の骨格筋中に多く含まれており、近年では抗疲労効果や認知症予防に役立つ食品成分として機能性表示食品などとして利用されている。一方で組織中のカルノシン量を規定する因子については不明な点が多く、動物種あるいは筋線維の違いによりカルノシン量が異なる理由については明らかにされていない。骨格筋におけるカルノシンの生合成やエネルギー代謝における役割を明らかにすることで、生体内における生理的意義を明確にし、カルノシンおよびその類縁体を含む食品を、高齢化率28%を超える日本人の健康を支える切り札として活用したい。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the physiological role of carnosine, which exists specifically in skeletal muscle, cerebrum and olfactory bulb, in terms of energy metabolism. Carnosine is composed of  $\beta$ -alanine and histidine and is present in human skeletal muscle at a high concentration of 20 mM. However, its physiological effects have not been fully elucidated. In this study, we examined the effect of carnosine synthetase gene on energy metabolism using two kinds of evaluation systems: one is an evaluation system in which carnosine synthetase gene is introduced into skeletal muscle cells, and the other is an evaluation system in which the gene is deleted in mice. Carnosine was expected to be involved in the reaction of pyruvate to acetyl-CoA, resulting in increased energy production, however no direct involvement was found in ATP synthesis in skeletal muscle.

研究分野：畜産物利用

キーワード：カルノシン 遺伝子改変マウス エネルギー代謝 運動

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

カルノシンは アラニンとヒスチジンからなるジペプチドであり、ヒトの骨格筋中では 20mM の高濃度で存在する。抗糖化作用や運動機能向上への関与が示唆されているが、生理作用については未だ十分に解明されていない。このペプチドの生理機能として、(1)ヒスチジン残基による運動時の骨格、筋 pH の低下抑制(緩衝作用)、(2)タンパク質の抗糖化作用、(3)抗酸化作用(in vitro)などが報告されているが、いずれも充分には解明されていない。

そこで我々は、カルノシン合成酵素(CARNS1)を骨格筋細胞に導入し、カルノシン高産生細胞で生理作用を評価する系を確立した。さらに、CARNS1の活性中心を欠損させた遺伝子改変(KO)マウスを作製した。このKOマウスでは、野生型に比べて運動能力が半分にまで減少することから、カルノシンの本来の機能が「糖を大量に消費する組織でのエネルギー産生因子」であるとの新しい仮説を導き出した。

カルノシンは、骨格筋での分布に偏りがあり、持久的な運動に関与する遅筋より、無酸素状態で瞬発的な運動に関与する速筋の方が含量は高い。また高強度な運動パフォーマンスを必要とするスポーツ選手に含量が多いとの報告がなされている。速筋のエネルギー代謝は、解糖系優勢であり、1分子のグルコースから生産されるATPの量が、2分子と少ない。これに対し、酸素を必要とするエネルギー代謝であれば、36分子も多くATPを産生することが出来る。解糖系から電子伝達系で大量にATPを産生するTCA回路に入るには、解糖の最終産物であるピルビン酸は脱炭酸と補酵素A(CoA)との結合により、アセチル-CoAに変換する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究は、骨格筋と脳・嗅球に特異的に存在するカルノシンの生理的役割について、エネルギー代謝の面から明らかにすることを目的とした。先に述べた通り、カルノシンには様々な機能性があると報告されているが、我々はカルノシンの存在はもっと本質的なところにあると考え、偏りのある分布と組織の特徴から、「カルノシンは骨格筋において、糖代謝に必要な補酵素(CoA)のアラニンの貯蔵庫(アラニンプール)としてエネルギー代謝に関わる」との仮説を立てた。

### 3. 研究の方法

マウス由来の骨格筋細胞に *Carns1* 遺伝子を強制発現させ、高濃度でカルノシンを保有する状態で運動させた場合の代謝産物や各種遺伝子の変異を定量PCRで測定し、遺伝子を強制発現させない細胞との比較をおこなった。さらに、カルノシンを全く有さないKOマウスと野生型マウスを用いて、エネルギー産生に関わる代謝産物の骨格筋中の量の違いを比較するため、メタボローム解析を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 骨格筋細胞を用いたカルノシンとエネルギー産生の検討

初めに、細胞を用いた実験を実施するにあたり、評価に適した細胞を選定するため、由来の異なる2種の骨格筋細胞(C2C12とL6)を用いて、筋芽細胞から筋管細胞への分化に伴うカルノシン量の変動と、関連する遺伝子やタンパク質の発現量について調べた。欠損型遺伝子を導入した筋芽細胞では共にCarの合成を認めず、野生型を導入した場合にはC2C12においてL6より5倍多いCarが検出された。筋芽のC2C12ではCarの基質のアラニンがL6より10倍多く存在しており、qPCRの結果からアラニンのトランスポーターであるTauTの発現量が多いことに起因すると考えられた。一方、C2C12では筋芽から筋管に分化させることで、TauT発現量は変動しないものの、CARNS1発現量がmRNAとタンパク質で増加していた。

次に、C2C12細胞を用いて、細胞を分化に伴う、カルノシンの変動を調べた。表1にC2C12の筋芽細胞(分化前)と筋管細胞(分化後)に含まれる遊離アミノ酸量を比較した。全38種類のアミノ酸およびその類縁体とジペプチドのうち、筋管細胞と筋芽細胞で有意な差が認められたアミノ酸を抜粋した。分化することで、カルノシンの基質であるヒスチジンは約4倍

表1. 細胞中の遊離アミノ酸量の比較

	筋芽細胞(分化前)	筋管細胞(分化後)
P-Ser	18.0±0.4	25.8±0.2
Tau	12.1±0.2	19.9±1.3
PEA	16.4±0.4	20.8±0.2
Asp	4.1±0.7	10.2±0.4
Thr	6.0±0.2	12.2±0.8
Ser	N.D	2.4±0.4
Glu	48.3±0.5	57.1±0.5
Gly	20.7±2.0	51.5±1.7
Ala	33.5±1.2	46.3±1.9
Val	2.6±0.1	4.7±0.5
b-Ala	173.1±11.4	336.9±7.8
Phe	N.D	2.8±0.1
His	5.5±0.2	19.0±1.1
Lys	N.D	3.7±0.5
Car	N.D	3.2±0.3
Arg	N.D	0.7±0.1
Pro	11.9±2.8	41.1±4.5

に、-アラニンは約2倍に増加した。その他、全体的にアミノ酸量は増加しており、筋芽細胞ではその存在が認められなかったカルノシンが筋管細胞では検出された。従って、分化によりアミノ酸トランスポーターの発現が増加し、細胞内のアミノ酸量が増えること、或いは分化に伴いカルノシン合成酵素が誘導されることが推察された。

続いて、筋芽細胞と筋管細胞の分化に関わるマーカー遺伝子(MyoD)と分化に伴って増加する筋タンパク質(Myosin heavy chainとTroponin I)、筋特異的色素タンパク質(Myoglobin)の遺伝子発現量を比較した。その結果、筋管細胞ではMyoD、Myosin heavy chainやTroponin Iが4~8倍へと有意に増加し、分化誘導していることを確認した。続いて、-アラニンのトランスポーター(TauT)ならびにカルノシンの合成と分解に関わる遺伝子(CARNS1, CNDP2)発現量を比較した(図2)。TauTは分化前後での変動はなかったが、カルノシンの合成酵素は約3倍に、分解酵素は1.5倍に有意に増加した。タンパク質レベルでCARNS1とCNDP2の量を調べたところ、CARNS1では筋管細胞でタンパク質発現の増加が認められたが、CNDP2では顕著な差は認められなかった。

これらの結果を基に、エネルギー代謝に大きく関わる運動(電気刺激による強制運動; EMS)を負荷させた場合のカルノシンとエネルギー産生に関わる代謝物の影響を調べた。その結果、当初の予想と反して、3時間のEMSによりカルノシンとアラニンで各々6割と4割の有意な減少が認められた。また、アラニンの代謝に関わるアスパラギン酸も有意な減少が認められた。

さらに、カルノシンが減少した原因を明らかにするため、*Carns1*の発現量をqPCRで調べたところ、図3に示す通りEMSによって9割近くの有意に減少していた。さらに、ウエスタンブロッティングの結果から、タンパク質レベルでもCARNS1の発現量は減少しており、これらの理由により筋管中のカルノシン量が減少したことが明らかとなった。エネルギーが必要となる運動時にカルノシンおよびその基質が減少したことは当初の予測と大きく反する結果となった。

## (2) KOマウスを用いたメタボローム解析の結果

30週齢、50週齢、90週齢のライフステージの異なるKOマウスと野生型マウスを用いて、腓腹筋のメタボローム解析を行い、エネルギー産生に関わるATP量やその代謝物の変動を調べた。KOマウスと野生型マウスとで、ATP量に違いはなく、アラニンを内部構造に持つアセチルCoA量も同様であった。これは、運動を特に負荷していない状態での比較であるため、今後は強制回転かご等で十分な運動をさせてATP量やアセチルCoAおよびエネルギー代謝に関わる物質の変動について今後も検討を続けていきたい。

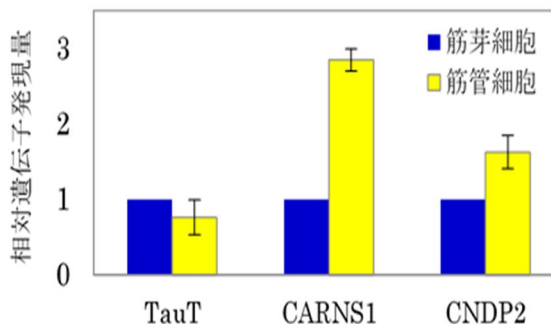


図2. 分化前後でのカルノシン合成に関わる遺伝子発現量の比較

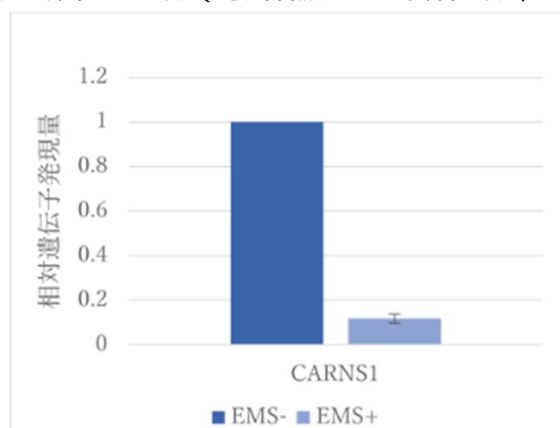


図3 カルノシン合成酵素の遺伝子発現量の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Thanutchaporn Kumrungsee, Takeshi Arima, Kanako Sato, Takumi Komaru, Mikako Sato, Yasuyuki Oishi, Ai Egusa, Noriyuki Yanaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Dietary GABA Induces Endogenous Synthesis of a Novel Imidazole Peptide Homocarnosine in Mouse Skeletal Muscles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anino Acids	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 野口こと葉, 鈴木彩夏, 中尾暢宏, 戸塚護, 江草(雑賀)愛
2. 発表標題 低酸素ストレスが骨格筋細胞のカルノシン合成に及ぼす影響
3. 学会等名 第62回日本食肉研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野実織, 鈴木彩夏, 中尾暢宏, 戸塚護, 江草(雑賀)愛
2. 発表標題 骨格筋細胞の由来の違いや分化誘導がカルノシン合成に及ぼす影響
3. 学会等名 日本畜産学会第128回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Wu Jiawei, 江草 愛, 塩谷茂信, 佐藤謙一郎, 柳内延也, 戸塚護, 西村敏英
2. 発表標題 イミダゾールジペプチドが骨格筋代謝におよぼす影響
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川中暢子, Wu Jiawei, 江草愛, 塩谷茂信, 佐藤謙一郎, 柳内延也, 西村敏英
2. 発表標題 ヒスチジン欠乏食を給餌したカルノシン合成酵素遺伝子欠損マウスのメタボローム解析
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ai Egusa, Nobuhiro Nakao, Takaki Saito, Nobuya Yanai, Shigenobu Shiotani, Kenichiro Sato, Mamoru Totsuka, Toshihide Nishimura
2. 発表標題 hysical characteristics of carnosine synthase gene-deficient mice
3. 学会等名 International conference on Food Factors (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川内暢子, WU JIAWEI, 江草 愛, 塩谷 茂信, 佐藤 謙一郎, 柳内 延也, 戸塚 護, 西村 敏英
2. 発表標題 ヒスチジン欠乏食を給餌したカルノシン合成酵素遺伝子欠損マウスのメタボローム解析
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wu Jiawei, 江草 愛, 塩谷 茂信, 佐藤 謙一郎, 柳内 延也, 戸塚 護, 西村 敏英
2. 発表標題 イミダゾールジペプチドが骨格筋代謝におよぼす影響
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江草 愛
2. 発表標題 カルノシン合成酵素遺伝子ノックアウトマウスの生理機能
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂野太研、江草 愛、塩谷茂信、仲西宏樹、柳内延也、戸塚護、西村敏英
2. 発表標題 カルノシン合成酵素遺伝子ノックアウトマウスへのアンセリン経口投与によるイミダゾールジペプチドの組織分布
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------