

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05909

研究課題名(和文)カルノシン合成酵素欠損マウスを用いた運動と脂質代謝に関する研究

研究課題名(英文)Study on exercise and lipid metabolism in carnosine synthase-deficient mice

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・准教授

研究者番号：90521972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、骨格筋や大脳に特異的に存在するカルノシンの生理的役割について、運動時の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。マウス由来骨格筋細胞(C2C12)にカルノシン合成酵素(CARNS1)遺伝子を強制導入したもの(WT型)と、カルノシン合成能を欠失させたKO型を遺伝子導入したものを、電気刺激によるATP産生能の比較を行った所、ATP産生量はWT型の方が多く、同様に高強度運動をさせた遺伝子欠損マウスの前脛骨筋のATP量もWT型で高かった。FABP3遺伝子発現量はKO型で対照より2倍高くなったことから、内因性カルノシンによる脂質の酸化を介したATP産生能は低いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルノシンやアンセリンは、これらを含む食材を経口摂取すると、抗疲労や抗糖化作用、認知機能の改善効果が報告されている。今後、高齢化率30%を迎える日本においては、健康寿命を延ばす上で重要な物質である。しかし、これら効果のメカニズムは未だ十分に解明されておらず、生体における本来の機能についても不明な点が多い。これまでに、カルノシンやアンセリンを外部から取り入れた場合には、脂質の酸化を促進することが報告されているが、内因性因子としてのカルノシンの役割の解明は十分になされていない。今回、骨格筋細胞とマウスを用いて評価を行ったが、得られた成果は本来の生理的機能を解明するための一助となったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the physiological role of carnosine in energy metabolism during exercise. The ATP production capacity under electrical stimulation was compared between mouse-derived skeletal muscle cells (C2C12) transfected with the carnosine synthase (CARNS1) gene (WT) and those transfected with a gene lacking carnosine synthesis capacity (KO). The results showed that ATP production was higher in the WT type. Since a higher amount of glycerol 3-phosphate was detected in the WT, it was inferred that FADH<sub>2</sub>-mediated oxidative phosphorylation was insufficient in the KO. The amount of ATP in the anterior tibialis muscle of gene-deficient mice subjected to high-intensity exercise was also higher in the WT type. Additionally, FABP3 gene expression was 2-fold higher in the KO type compared to controls, suggesting that the ability to produce ATP via endogenous carnosine-mediated beta-oxidation of lipids is low.

研究分野：畜産物利用学

キーワード：カルノシン カルノシン合成酵素 骨格筋 エネルギー代謝 運動

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

1900年に肉抽出液から発見されたカルノシン( $\beta$ アラニル-Lヒスチジン)は2010年にポーランドのDrozakらによってATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1)(EC6.3.2.11)であることが明らかにされた。カルノシンは脊椎動物の骨格筋に高濃度で存在しており、ヒトや馬では10-30 mMで検出されている。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、その機能は十分に解明されていない。生体を使ったカルノシンの生理機能を調べるための実験手法は、40年以上に亘り、カルノシンあるいはその基質を摂取させ、運動パフォーマンスの向上や筋肉への蓄積を調べたり、肥満や糖尿病との関わりを調べたりするものが主であった。そこで我々は、ATPGD1の活性化部位を欠損したマウスを作製し、その生理的存在意義について検討を行ってきた。しかし、通常のケージ飼育下では、超高齢(130週齢)に亘って、これまでに報告されてきた効果が全く認められなかった。そこで、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、クレアチンと協働して持久運動時に必要な脂質代謝を促進し、エネルギー産生因子として働く」との仮説を立てた。この考えの根拠になったデータは2つあり、1)通常飼育下のカルノシンKOマウスは、メタボローム解析の結果、解糖系に関わる代謝物の量が野生型と同等であったこと、2)カルノシンはクレアチン存在下で脂肪酸結合タンパク質FABP3を介して脂肪酸代謝を亢進する(Shimada et al. 2015)ことに依る。当初カルノシンの生理機能は糖の消費が多い組織でCoAを作るための $\beta$ アラニンプールとして存在していると推察していたが、1)に示した通り、非運動条件下でATP産生量に違いは認められなかった。特に、持久的な運動でカルノシンKOマウスの著しい体力低下は、ヒトでの65%VO<sub>2</sub>max(最大酸素消費量)においてカルノシン摂取の効果が認められるという既報とも合致しており、運動時にカルノシンが脂質代謝系を亢進することでATPの産生に寄与するとの仮説を立てた。

### 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、運動時のエネルギー代謝の面から明らかにすることを目的とする。カルノシンは $\beta$ 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。我々はこれまでに、カルノシン合成酵素(ATPGD1)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ており、さらに、ATPGD1の活性中心を欠損させたノックアウト(KO)マウスを作製してきた。この2つの実験系を用いて行った予備試験の結果から、カルノシンの機能が「ATPを大量に消費する条件下でのエネルギー産生因子」であるとの仮説を導き出した。通常のケージで飼育される環境下では、カルノシンは寿命や抗酸化、抗糖化作用などこれまでに示唆されている効果を一切示さない。しかし、運動負荷時には、カルノシンKOマウスで著しい運動能力の低下が認められる。そこで、運動負荷時における脂質代謝にカルノシンが関わっているとの仮説を考えた。したがって、本研究では、カルノシン合成酵素強制発現系の細胞とカルノシンKOマウスを用いて、この仮説を証明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 骨格筋細胞(C2C12)を用いた評価系

マウス由来C2C12を10%FBS含有DMEM培地で80%コンフルエントまで増殖させた後、2%HS含有DMEM分化用培地に交換し、6日間培養して筋管を形成させた。また、この間にATPGD1合成酵素遺伝子あるいはATP結合箇所欠損型の遺伝子をリポフェクション法で導入した。十分な筋管が形成されたことを確認した後、電気刺激装置(ION optics社EM-CPACE)を用いて、パルス幅0.4ms、周波数1.0Hz、刺激強度10Vで3時間処理した。回収した両遺伝子型の細胞を用いて、含有するATPおよびADPを定量した。さらに、FABP3や $\beta$ 酸化に関わる遺伝子発現量を測定し、カルノシン強制発現細胞とカルノシン合成酵素欠損型遺伝子導入細胞での比較を行った。また、運動状態時を模するため、脱酸素剤を用いて低酸素状態での脂質代謝に関わる遺伝子発現量も調べた。

#### (2) ATPGD1遺伝子欠損マウス(KO)を用いた評価系

30週齢の雄性KOマウスあるいは野生型マウス(WT)を1群5匹で割り付け、強制遊泳試験を行った。23°Cで流速を10m/minに設定したプールを用いて、強制遊泳させ、鼻先が5秒間水に漬かった時点で、終了とした。その後、直ちにイソフルラン気化麻酔下で開腹し、全採血後、前脛骨筋を採集した。筋肉は常法に則り、tRNAを抽出後、各代謝に関わる遺伝子の発現量を定量PCRで測定した。

#### 4. 研究成果

(1) カルノシン合成酵素遺伝子発現細胞に電気刺激を与えた後の ATP 産生とエネルギー代謝関連遺伝子群の変動

図 1 に細胞中のカルノシンの有無が電気刺激された骨格筋中の ATP 産生量に与える影響について示す。カルノシン合成酵素遺伝子を導入した細胞(C2-WT)では、ATP 存在量が欠損型遺伝子を導入した細胞(C2-KO)より約 1 割少ない結果となった。さらに KO ではグリセロール 3 リン酸量が多く検出されたため、FADH<sub>2</sub> を介した酸化的リン酸化反応が十分に行われていないと推察された(Data not shown)。また、 $\beta$  酸化に関与する FABP3 の遺伝子発現量も WT 側の方が低かったため、内因性カルノシンによる脂質代謝促進作用は別の経路が関与していると考えられた。

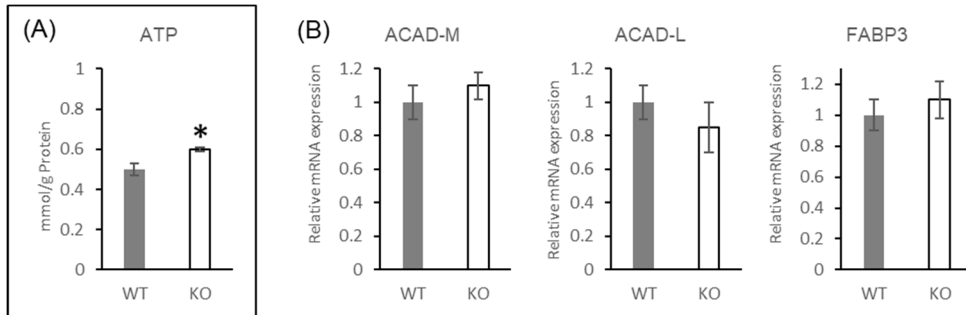


Figure 1. Comparison of ATP content (A) and lipid metabolism related enzyme genes expression level (B) on ATPGD1 gene induced C2C12

(2) カルノシン合成酵素遺伝子欠損マウスの運動時における ATP 産生とエネルギー代謝関連遺伝子群の変動

図 2 にカルノシン合成酵素遺伝子欠損マウス (Carns-KO) と野生型 (Carns-WT) で運動後の前脛骨筋中に含まれる ATP 量を比較した結果を示す。C2C12 細胞を使った電気刺激の実験と同様に、ATP 量は Carns-KO の方で約 1 割高い結果となった。また、脂質代謝に関連する FABP3, アシル CoA ミディアムチェーン(ACAD-M)、アシル Co-A ロングチェーン(ACAD-L)、PDK4, PPAR $\delta$  および PPAR $\gamma$  についてその発現量を調べたところ、各遺伝子の発現量はほぼ変わらない結果となった。従って、今回の試験を通して、内因性カルノシンによる脂質代謝の改善作用については見いだせない結果となった。

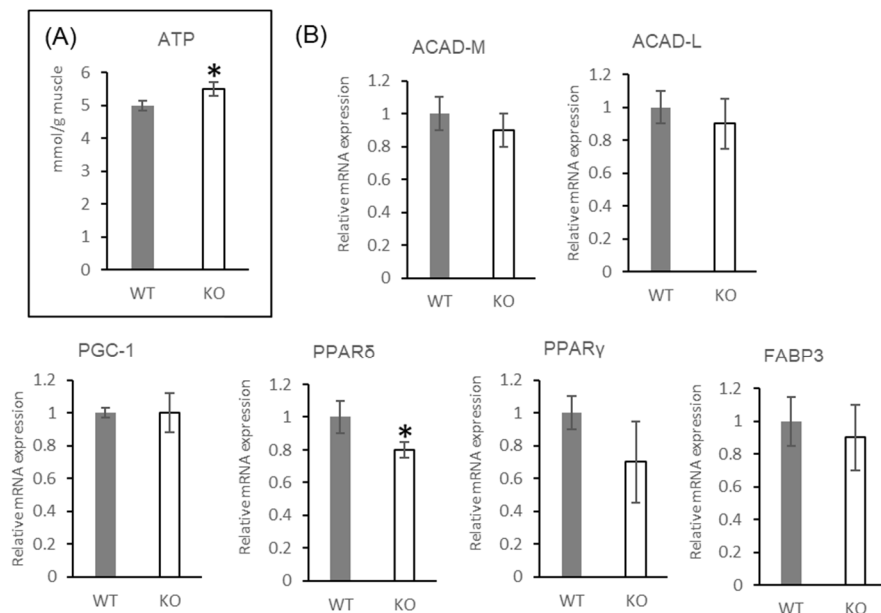


Figure 2. Comparison of ATP content (A) and lipid metabolism related enzyme genes expression level (B) on Carns-KO mice

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakano Taiken, Egusa Ai Saiga, Kawauchi Yoko, Wu Jiawei, Nishimura Toshihide, Nakao Nobuhiro, Kuramoto Ayumu, Kawashima Takumi, Shiotani Shigenobu, Okada Yukio, Sato Kenichiro, Yanai Nobuya	4. 巻 86
2. 論文標題 Pharmacokinetics and tissue distribution of orally administrated imidazole dipeptides in carnosine synthase gene knockout mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1276-1285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac081	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 -

1. 著者名 Wu Jiawei, Egusa Ai, Nishimura Toshihide	4. 巻 612
2. 論文標題 Carnosine synthase deficiency in mice affects protein metabolism in skeletal muscle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 22 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.04.075	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ai Saiga Egusa, Nobuhiro Nakao, Nobuya Yanai, Kenishiro Sato, Toshihide Nishimura
2. 発表標題 Effects of carnosine synthase deficiency on exercise performance and behavior in aged mice
3. 学会等名 International congress of meat science and technology 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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欠損マウスの加齢に伴う骨格筋機能の変動
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ai Egusa, Kanako Mayumi, Mamoru Totsuka, Jun-ichi Shiraishi, Nobuhiro Nakao
2. 発表標題 Effects of Photostimulation on Skeletal Muscle Weight and Histidine-Containing Dipeptide Content in Japanese Quail
3. 学会等名 International congress of meat science and technology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎崇弘, 高波友梨子, 中尾暢宏, 江草愛
2. 発表標題 カルノシン合成酵素の欠損が加齢マウスの運動機能と行動に及ぼす影響
3. 学会等名 日本食肉科学会
4. 発表年 2021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
---------	---------