

カルノシンの混餌給与がマウスの肝臓および盲腸内容物中低分子代謝物質濃度に及ぼす影響

仲 田 里 瀬¹⁾, 佐 藤 三 佳 子²⁾, 友 永 省 三¹⁾

(¹⁾京都大学大学院 農学研究科 応用生物学専攻*, (²⁾日本ハム株式会社中央研究所**)

(受付 2019年8月30日, 受理 2019年9月27日)

The effect of dietary carnosine supplementation on metabolite levels in the liver and cecal contents of mice

Rise NAKATA¹⁾, Mikako SATO²⁾, Shozo TOMONAGA¹⁾

¹⁾Division of Applied Biosciences, Kyoto University Graduate School of Agriculture

²⁾R&D Center, NH Foods Ltd.

Summary

Carnosine is a dipeptide composed of β -alanine and L-histidine. Carnosine is an antioxidant and has buffering capacity. In addition, the dipeptide could improve glucose metabolism in animal models. However, the effect of dietary carnosine on various metabolisms has not been clarified in detail. In this study, to explore the effect of carnosine on various metabolisms, we investigated liver and cecal contents in mice given graded amount of carnosine by non-targeted metabolomic analysis. Carnosine didn't affect body weight while the perirenal fat weight was decreased dose-dependently. In liver and cecal contents, some metabolite levels were significantly influenced. Among them, carnosine levels were increased dose-dependently. These results suggest that dietary carnosine can affect not only carnosine metabolism but also other metabolisms including lipid metabolism. We need further study on the relationships among some metabolites including carnosine and the reduction of fat.

カルノシンは、 β -アラニンとL-ヒスチジンからなるジペプチドであり、動物の筋肉中に多く存在している。カルノシンは抗酸化能¹⁾、緩衝能^{2,3)}、抗炎症作用⁴⁾および抗うつ様作用⁵⁾を有することが報告されている。また、グルコース代謝との関連も報告されている。たとえば、2-デオキシ-D-グルコース投与による高血糖ラット⁶⁾やレプチン受容体の変異により過食・肥満を引き起こすdb/dbマウス⁷⁾における高血糖を抑制する。更に、ヒトの糖尿病性腎症モデルのBTBR ob/obマウスにおいて、アルブミン尿や腎肥大の抑制など、腎障害の改善が認められている⁸⁾。一方、他の様々な代謝経路への影響は詳細には調べられていない。そこで、低分子代謝物質の網羅的解析系(メタボロミクス)を用い、カルノシンの摂取が及ぼす影響を探索することは有用であると考えた。具体的には、生体内代謝において中心的役割を果たす肝臓と、腸内細菌叢が産生する生理活性物質を含む盲腸内容物のノンターゲットメタボロミクスを行った。一部の遊離アミノ酸は定量分析を行った。加えて、盲腸内容物については、腸内細菌が産生する

短鎖脂肪酸は全身の健康状態に影響を及ぼすことが知られており重要視されていることから⁹⁻¹¹⁾、短鎖脂肪酸の定量分析も行った。

実験方法

動物試験

室温を24 ± 1°C、明期サイクルを5:00 ~ 19:00に設定した実験室で、24匹の3週齢C57BL/6J雄マウス(SLC Japan, 静岡)をアクリルケージで単飼し、蒸留水および飼料は自由に摂取させた。1週間対照飼料を給与した後に、体重に基づき6匹ずつ4群に割り当て、それぞれ対照飼料および、対照飼料のコーンスターチをカルノシン(米沢浜理薬品工業, 山形)に置きかえたカルノシン混餌飼料(0.25, 0.5, 1%)を4週間給与した。

試料採取

試験飼料給与開始から4週間後、午前9時30分から解

*所在地:京都市左京区北白川追分町(〒606-8502)

**所在地:茨城県つくば市緑ヶ原三丁目3番地(〒300-2646)

剖を開始した。解剖前に絶食処理は行わなかった。イソフルラン（マイラン製薬，大阪）麻酔下で血液を頸静脈より採取し，ヘパリン（富士フィルム和光純薬，大阪）を加えておいたチューブに入れ，10,000 g，4℃で10分間遠心分離して血漿を得た。血液採取後，全脳，肝臓，腓腹筋，精巢上体白色脂肪組織，鼠径部白色脂肪組織，腎周囲白色脂肪組織および褐色脂肪組織を採取し，湿重量を測定した。また，盲腸内容物も採取した。これらサンプルは，液体窒素で瞬間凍結させた。全サンプルは，-80℃で分析まで保存した。肝臓は，凍結破砕機（CP-100WP，マイクロテックニチオン，千葉）を用いて凍結粉砕しパウダーとし均一化した。本実験は「実験動物の飼養および保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成25年環境省告示第84号）を遵守し，京都大学における動物実験の実施に関する規程（京都大学動物実験委員会）に基づき行った（承認番号：30-48）。

低分子代謝物質のノンターゲット分析

盲腸内容物は5倍希釈し4℃，20,000 gで5分間遠心分離した。この盲腸内容物の上清（50 μL）および肝臓（10 mg）サンプルに対し，Shigematsuら¹²⁾の方法により親水性画分を抽出後，メトキシアミン塩酸塩（MP Biomedicals, California, USA）によりオキシム化し，更にN-メチル-N'-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド（フナコシ，東京）によりトリメチルシリル誘導体とした。これらのサンプルをGC-MS/MS（GCMS-TQ8050，島津製作所，京都）によるSCANモードおよびMRMモードでの分析に供した。両モードでのGC分析条件もShigematsuら¹²⁾に準じた。取得データのピークの検出，アライメントおよびピークの同定には，保持時間ならびにマススペクトルを基準として半自動同定を行うMS-DIAL ver. 3.04と，データベースソフトウェアであるSmart Metabolites Database（島津製作所），データ解析ツールであるMRMPROBS ver. 2.50を用いた。保持指標が±10以内，類似度が50%以上あるいは確認イオンの有無を同定の基準とした。それぞれの物質の濃度は全個体の平均値を100とし相対値で示した。

遊離アミノ酸の定量分析

肝臓および盲腸内容物50 mgに10倍量の0.1 M 過塩素酸を加え，ポリトロンホモジナイザーにかけた。これらを，水中で30分間静置（暗所）して20,000 × g，0℃で15分間の遠心分離を行い，上清を採取した。

肝臓および盲腸内容物を処理して得られた上清およびアミノ酸混合標準液に，内部標準物質としてノルバリンを添加した。EZ：faastキット（Phenomenex, California, USA）による更なる前処理および誘導体化を行い¹³⁾，GC-MS（GCMS-QP2010 Ultra，島津製作所）の電子イオン化法によるSIMモードの分析を行った。カラムはZebron ZB-AAAキャピラリーカラム（10 m × 0.25 mm, Phenomenex）

を用いた。キャリアガスはヘリウムを用い，圧力を15.0 kPa，全流量を9.9 mL/minとした。パージ流量は3.0 mLとしたうえで，スプリットモードでインジェクションした。カラムオープン温度は110℃から320℃まで30℃/minで上昇させ，気化室およびイオン源の温度はそれぞれ280℃，200℃とした。各濃度は，内部標準法により定量した。

盲腸内容物中短鎖脂肪酸定量分析

盲腸内容物（50 mg）を蒸留水で5倍希釈し，20,000 × g，4℃で5分間の遠心分離を行い，上清を採取した。上清50 μLに対して，以下に示す前処理及び誘導体化を行った。内部標準物質としてd4酢酸水溶液を加えた後，メタノールを加えて除タンパクを行った。次に，ボルテックスミキサーを用いて30秒間振蕩させ，16,000 × g，25℃で3分間遠心分離を行った。上清180 μLを採取し，4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド¹⁴⁾およびn-オクチルアミンのメタノール溶液を加え，9時間静置し誘導体化を行った。これらのサンプルをGC-MS/MS（GCMS-TQ8050，島津製作所）による分析に供した。電子イオン化法によるMRMモードを用いた。カラムはBPX5（30 m × 0.25 mm, Trajan Scientific and Medical, South Australia, Australia）を用いた。キャリアガスはヘリウムを用い，圧力を68.4 kPa，全流量を40.4 mL/minとした。パージ流量は5.0 mLとして，スプリットレスで注入した。カラムオープン温度は60℃で2分間保持したのち330℃まで15℃/minで上昇させ，気化室およびイオン源の温度はそれぞれ250℃，200℃とした。酢酸，プロピオン酸，酪酸の各濃度は内部標準法により定量した。

血漿生化学分析

市販の分析試薬（トリアシルグリセロール：ラボアッセイトリグリセライド，総コレステロール：ラボアッセイコレステロール，遊離脂肪酸：ラボアッセイNEFA，グルコース：グルコースC IIテスト，富士フィルム和光純薬，大阪）を用いて定量した。

統計解析

低分子代謝物質および各組織重量の解析には一元配置分散分析を用いた。有意な影響が認められた場合はTukey法による多重比較検定を行った。また，飼料中カルノシン量を説明変数とした回帰分析を行った。体重および摂食量の解析には反復測定一元配置分散分析を用いた。以上の統計解析には，JMP 13.0.0（SAS, North Carolina, USA）を用いた。肝臓においてカルノシンの影響が認められた成分を用いたエンリッチメント解析により，カルノシンの影響を受けた代謝経路の推定を行った。本解析にはMetaboAnalyst 4.0を用いた。全解析において，P < 0.05を有意差ありとした。

結 果

カルノシンの給与により体重および摂食量は変化しなかった。また、全脳、肝臓、肺、腓腹筋、鼠径部脂肪組織、精巢上体脂肪組織および褐色脂肪組織重量は、カルノシンの給与により変化しなかったが、腎周囲脂肪組織がカルノシン用量依存的に減少した (Table 1)。血漿中トリアシルグリセロール、総コレステロール、遊離脂肪酸およびグルコース濃度はカルノシン給与による影響を受けなかった (Table 2)。

肝臓中低分子代謝物質のノンターゲット分析および遊離アミノ酸の定量分析において、172成分を同定することができた。これらのうち、一元配置分散分析あるいはカルノシンの餌中濃度を説明変数とした回帰分析において有意差が認められた成分を表にまとめた (Table 3, Table 4)。一元配置分散分析においてカルノシンの影響が認められた

成分は5成分 (カルノシン, β -アラニン, β -ヒドロキシプロピオン酸, アスパラギン酸および β -アミノグルタル酸), 回帰分析においてカルノシンの影響が認められた成分は12成分 (カルノシン, β -アラニン, β -ヒドロキシプロピオン酸, アスパラギン酸, β -アミノグルタル酸, トリプトファン, ヒドロキシルアミン, δ -アミノ吉草酸, フェニルアラニン, アスパラギンおよびアコニット酸) であった。更に、エンリッチメント解析によるカルノシンが影響を及ぼした代謝経路の推定においては、 β -アラニン代謝, アスパラギン酸代謝およびアンモニア再利用が検出された。 β -アラニン代謝において今回カルノシンの影響が認められた成分は、カルノシン, β -アラニンおよびアスパラギン酸の3成分であり、いずれもカルノシン用量依存的に増加していた。

盲腸内容物の低分子代謝物質のノンターゲット分析およ

Table 1 Effect of carnosine on total feed intake, body weight and various tissue weights in mice.

	CT	L	M	H	ANOVA	Regression
Total Food intake (g)	103 ± 2	107 ± 5	101 ± 2	102 ± 2	NS	NS
Body weight (g)	28 ± 1	28 ± 1	27 ± 0	27 ± 1	NS	NS
Brain (mg)	470 ± 3	461 ± 3	457 ± 7	466 ± 5	NS	NS
Liver (mg)	1253 ± 47	1249 ± 25	1160 ± 34	1192 ± 97	NS	NS
Lung (mg)	269 ± 32	205 ± 14	239 ± 19	282 ± 24	NS	NS
Gastrocnemius (mg)	274 ± 2	273 ± 7	264 ± 4	264 ± 6	NS	NS
Inguinal fat (mg)	180 ± 32	125 ± 19	136 ± 12	128 ± 29	NS	NS
Epididymal fat (mg)	681 ± 84	636 ± 64	608 ± 39	576 ± 110	NS	NS
Perirenal fat (mg)	195 ± 31	173 ± 23	148 ± 12	125 ± 29	NS	< 0.05
Brown fat (mg)	192 ± 18	183 ± 7	163 ± 12	154 ± 22	NS	NS

Values are means with their standard errors (n = 6). CT: control, L: low carnosine (0.25%kgDiet), M: medium carnosine (0.5%kgDiet), H: high carnosine (1.0%kgDiet), NS: not significant (P ≥ 0.05).

Table 2 Effect of carnosine on triacylglycerol, non-esterified fatty acid (NEFA), total cholesterol and glucose concentrations in plasma of mice.

	CT	L	M	H	ANOVA	Regression
Triacylglycerol (mg/dL)	144 ± 12	159 ± 9	207 ± 40	212 ± 52	NS	NS
NEFA (mEq/L)	1.35 ± 0.12	1.4 ± 0.09	1.78 ± 0.17	1.46 ± 0.17	NS	NS
Total cholesterol (mg/dL)	108 ± 6	114 ± 7	105 ± 3	101 ± 12	NS	NS
Glucose (mg/dL)	226 ± 16	252 ± 13	254 ± 13	259 ± 25	NS	NS

Values are means with their standard errors (n = 6). CT: control, L: low carnosine (0.25%kgDiet), M: medium carnosine (0.5%kgDiet), H: high carnosine (1.0 %kgDiet), NS: not significant (P ≥ 0.05).

Table 3 Effect of carnosine on metabolite levels in liver.

	CT	L	M	H	ANOVA	Regression
Hydroxylamine	83 ± 6	75 ± 6	121 ± 15	121 ± 23	NS	< 0.05
β -Hydroxypropionic acid	74 ± 2 ^c	89 ± 3 ^{bc}	112 ± 11 ^{ab}	125 ± 12 ^a	< 0.05	< 0.05
Hydroquinone	109 ± 9	104 ± 4	100 ± 5	87 ± 9	NS	< 0.05
β -Alanine	55 ± 4 ^b	74 ± 4 ^b	105 ± 22 ^{ab}	165 ± 26 ^a	< 0.05	< 0.05
β -Aminoglutaric acid	97 ± 7 ^{ab}	85 ± 4 ^b	89 ± 10 ^{ab}	129 ± 17 ^a	< 0.05	< 0.05
Aconitic acid	126 ± 13	110 ± 18	76 ± 6	89 ± 11	NS	< 0.05
Carnosine	4 ± 1 ^c	35 ± 1 ^{bc}	95 ± 9 ^b	267 ± 32 ^a	< 0.05	< 0.05
δ -Aminovaleric acid	29 ± 5	22 ± 8	69 ± 37	280 ± 181	NS	< 0.05

Values are means with their standard errors (n = 6). CT: control, L: low carnosine (0.25%kgDiet), M: medium carnosine (0.5%kgDiet), H: high carnosine (1.0%kgDiet), NS: not significant (P ≥ 0.05). Mean values with different letters in the same line were significantly different by Tukey test (P < 0.05).

Table 4 Effect of carnosine on free amino acid levels in liver.

($\mu\text{mol/g}$)	CT	L	M	H	ANOVA	Regression
Asparagine	0.157 \pm 0.006	0.165 \pm 0.004	0.165 \pm 0.005	0.185 \pm 0.012	NS	< 0.05
Aspartic acid	0.438 \pm 0.037 ^{ab}	0.391 \pm 0.02 ^b	0.398 \pm 0.056 ^b	0.619 \pm 0.085 ^a	< 0.05	< 0.05
Phenylalanine	0.177 \pm 0.008	0.182 \pm 0.006	0.183 \pm 0.004	0.198 \pm 0.01	NS	< 0.05
Tryptophan	0.045 \pm 0.002	0.046 \pm 0.001	0.044 \pm 0.002	0.051 \pm 0.002	NS	< 0.05

Values are means with their standard errors (n = 6). CT: control, L: low carnosine (0.25%kgDiet), M: medium carnosine (0.5%kgDiet), H: high carnosine (1.0%kgDiet), NS: not significant ($P \geq 0.05$). Mean values with different letters in the same line were significantly different by Tukey test ($P < 0.05$).

Table 5 Effect of carnosine on metabolite levels in cecal contents.

	CT	L	M	H	ANOVA	Regression
α -Aminoethanol	50 \pm 4	45 \pm 2	122 \pm 70	183 \pm 80	NS	< 0.05
β -Alanine	21 \pm 4 ^c	81 \pm 14 ^{bc}	127 \pm 25 ^{ab}	171 \pm 14 ^a	< 0.05	< 0.05
β -Aminoisobutyric acid	95 \pm 10 ^{ab}	64 \pm 11 ^b	135 \pm 23 ^a	106 \pm 5 ^{ab}	< 0.05	NS
Cysteine	95 \pm 6 ^{ab}	84 \pm 7 ^b	110 \pm 8 ^a	112 \pm 5 ^a	< 0.05	< 0.05
Urocanic acid	95 \pm 13	90 \pm 12	89 \pm 8	126 \pm 9	NS	< 0.05
N-Acetylneuraminic acid	88 \pm 16 ^{ab}	62 \pm 14 ^b	150 \pm 29 ^a	101 \pm 16 ^{ab}	< 0.05	NS
Carnosine	0 \pm 0 ^c	51 \pm 9 ^c	124 \pm 17 ^b	226 \pm 21 ^a	< 0.05	< 0.05

Values are means with their standard errors (n = 6). CT: control, L: low carnosine (0.25%kgDiet), M: medium carnosine (0.5%kgDiet), H: high carnosine (1.0%kgDiet), NS: not significant ($P \geq 0.05$). Mean values with different letters in the same line were significantly different by Tukey test ($P < 0.05$).

Table 6 Effect of carnosine on free amino acid levels in cecal contents.

($\mu\text{mol/g}$)	CT	L	M	H	ANOVA	Regression
α -Aminobutyric acid	0.014 \pm 0.002	0.011 \pm 0.002	0.019 \pm 0.005	0.022 \pm 0.003	NS	< 0.05
Valine	0.192 \pm 0.015	0.159 \pm 0.021	0.266 \pm 0.017	0.25 \pm 0.036	NS	< 0.05

Values are means with their standard errors (n = 6). CT: control, L: low carnosine (0.25%kgDiet), M: medium carnosine (0.5%kgDiet), H: high carnosine (1.0%kgDiet), NS: not significant ($P \geq 0.05$). Mean values with different letters in the same line were significantly different by Tukey test ($P < 0.05$).

Table 7 Effect of carnosine on short-chain fatty acid levels in cecal contents.

($\mu\text{mol/g}$)	CT	L	M	H	ANOVA	Regression
Acetic acid	17.21 \pm 1.55	13.95 \pm 1.82	16.02 \pm 0.96	17.39 \pm 1.25	NS	NS
Propionic acid	3.84 \pm 0.77	2.79 \pm 0.68	2.27 \pm 0.35	3.30 \pm 0.39	NS	NS
Butyric acid	4.21 \pm 0.63	4.15 \pm 0.85	3.66 \pm 0.78	5.34 \pm 1.04	NS	NS

Values are means with their standard errors (n = 6). CT: control, L: low carnosine (0.25%kgDiet), M: medium carnosine (0.5%kgDiet), H: high carnosine (1.0%kgDiet), NS: not significant ($P \geq 0.05$).

び遊離アミノ酸の定量分析において、145成分を同定することができた。これらのうち、一元配置分散分析あるいは回帰分析において有意差が認められた成分を表にまとめた (Table 5, Table 6)。一元配置分散分析においてカルノシンの影響が認められた成分は5成分 (カルノシン, β -アラニン, システイン, β -アミノイソ酪酸およびN-アセチルノイラミン酸)、回帰分析においてカルノシンの影響が認められた成分は7成分 (カルノシン, β -アラニン, システイン, ウロカニン酸, α -アミノエタノール, α -アミノ酪酸およびバリン) であった。

盲腸内容物中の短鎖脂肪酸の定量分析において、酢酸, プロピオン酸および酪酸のいずれもカルノシンの給与による影響は認められなかった。(Table 7)

考 察

4週間のカルノシンの給与により体重や筋肉重量は変化しなかったものの、腎周囲脂肪組織重量が用量依存的に減少した。カルノシンの摂取はインスリンの分泌を促進すること¹⁵⁾が報告されている。インスリンの分泌が促進されると、その働きにより脂肪の蓄積が促進されることから、今回の脂肪組織重量の減少にインスリンは介していない可能性が推測される。脂肪重量減少の原因は不明であるが、実際にインスリンが今回の条件で変動したのかを確かめることも、カルノシンと脂質代謝の関連を評価する上で有用な可能性がある。

カルノシンは高血糖の抑制に働くこと^{6,7)}が報告されているが、高血糖を誘発していない健常マウスを用いた本試験においては、カルノシンの摂取は血中グルコース濃度に

影響を及ぼさなかった。本試験においては通常飼育条件下におけるカルノシンの摂取の影響を重視して自由採食条件下のサンプリングとした。したがって、本条件は、生体のグルコース代謝に及ぼす影響を正確に把握するために有用な絶食条件下では無いことから、結果に影響した可能性がある。

カルノシンの給与は血中トリアシルグリセロール濃度、総コレステロール濃度および遊離脂肪酸濃度に影響を及ぼさなかった。Brownら¹⁶⁾は、高血糖および脂質代謝異常を引き起こしたマウスにおいて、カルノシンは血中トリアシルグリセロール濃度の上昇を抑制するが、健常マウスにおいてはカルノシンによる影響は認められなかったことを報告している。このことから、健常マウスにおいては脂質代謝に影響を及ぼしにくく、本試験においても血中トリアシルグリセロール濃度、総コレステロール濃度および遊離脂肪酸濃度が変動しなかった可能性が考えられる。一方で、前述したように、腎周囲脂肪組織重量が用量依存的に減少したことから、脂質代謝との関連解明は行う余地があると推測している。以上より、脂質代謝異常モデル動物の脂質代謝に及ぼす影響を確認する価値があるかもしれない。

カルノシンの摂取により肝臓においてカルノシンが用量依存的に増加した。肝臓は肝門脈経路で吸収された栄養が初めに到達する臓器であるため、カルノシン給与により吸収されたカルノシン量が、分解・放出されるカルノシン量を上回った結果肝臓中濃度が増加したと考えられる。カルノシンは肝臓において、拘束および寒冷曝露による酸化ストレスの改善効果¹⁷⁾や、虚血再灌流障害に対する細胞保護効果¹⁸⁾が報告されている。今回の条件下でも、カルノシンが肝臓に到達したことから、幾つかの肝障害に対する予防および改善効果が期待できるかもしれない。

また、カルノシンの構成アミノ酸であるβ-アラニンおよびその代謝物であるβ-ヒドロキシプロピオン酸が肝臓において用量依存的に増加し、エンリッチメント解析においてもβ-アラニン代謝が影響を受けた代謝経路として推測された。カルノシンの給与による肝臓中β-アラニン代謝物の変化をFig. 1にまとめた。カルノシンは組織および血中に存在するカルノシナーゼによりβ-アラニンとヒスチジンに分解される¹⁹⁾。β-アラニンはアミノ基転移によ

りマロン酸セミアルデヒドに変換され、その後アセチルCoAとなりクエン酸回路に入る。また、マロン酸セミアルデヒドはアセチルCoAの他プロピオン酸やβ-ヒドロキシプロピオン酸へと代謝される。カルノシンの摂取により、肝臓中カルノシンが増加した結果、余剰のカルノシンが分解され、β-アラニンおよびその下流のβ-ヒドロキシプロピオン酸が増加したと考えられる。また、アスパラギン酸は細胞質内でβ-アラニンに変換されるが、カルノシン摂取によりβ-アラニンが多量に存在するためこの変換が少なくなり、アスパラギン酸が増加した可能性が考えられる。

β-アラニンが増加した一方で、カルノシンのもう一つの構成アミノ酸であるヒスチジンはカルノシン摂取による影響を受けなかった。ヒスチジンはウロカニン酸を経てグルタミン酸へと変換され、さらにα-オキソグルタル酸に変換されてクエン酸回路で代謝されエネルギー源となるほか、神経伝達物質であるヒスタミンに代謝される経路が存在する²⁰⁾。アスパラギン酸、トリプトファンおよびフェニルアラニンといったアミノ酸が用量依存的に増加していることから、余剰のヒスチジンが速やかに代謝されエネルギー源として利用された結果、他のアミノ酸のエネルギー源としての利用が減少し増加した可能性も考えられる。一方で、カルノシンの腹腔内投与によって大脳皮質および海馬においてヒスタミン濃度が増加することが報告されていることから²¹⁾、今回も組織内でヒスタミンに変換された可能性が考えられるが、今回の分析系においてウロカニン酸やヒスタミンは同定できず、どの経路で代謝されたかは不明であるため、今後これら成分の分析はカルノシンの代謝の基盤情報を知る上で有用であると考えた。

盲腸内容物において、カルノシンが用量依存的に増加した。摂取したカルノシンは小腸刷子縁膜上に発現しているペプチドトランスポーターであるPEPT1により取り込まれ代謝されるが¹⁹⁾、吸収されなかったカルノシンが盲腸に到達した可能性が考えられる。また、カルノシンの構成アミノ酸である、β-アラニンも用量依存的に増加した。カルノシンをβ-アラニンとヒスチジンに分解するカルノシナーゼは、いくつかの微生物中にも存在していることが報告されていることから²²⁾、腸内で余剰のカルノシンが分解された結果、β-アラニンが増加した可能性が考えられる。腸内において、高脂肪食により二次胆汁酸が増加し、大腸がんのリスク要因となること²³⁾が報告されており、この二次胆汁酸の生成には腸内pHも関係している。カルノシンは前述のとおり緩衝能を有しているため^{2,3)}、今回の条件における盲腸内容物中のカルノシンの増加は、食生活の偏りなどによる腸内pHの変動を緩和し、前述したようなリスクを予防することにつながるかもしれない。今回の試験において盲腸内容物のpH測定は行っていないため、腸内のカルノシンの増加が及ぼす影響を検討する上で、今後盲腸内容物のpHや二次胆汁酸の測定を行うことも有用であるかもしれない。

盲腸内容物において、システイン、バリンなどのアミノ

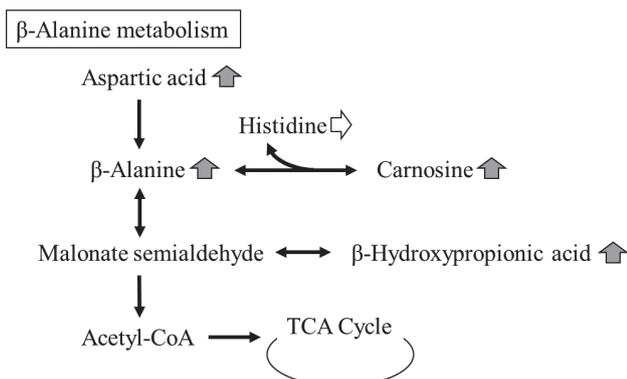


Fig. 1

酸がカルノシン用量依存的に増加した。カルノシンは他のペプチドと同様に PEPT1 により取り込まれるため、カルノシンと拮抗して吸収されなかったペプチド由来のアミノ酸が増加した可能性が考えられる。また、腸内細菌はアミノ酸を合成する²⁴⁾ ことから、カルノシンの投与により腸内細菌による合成が促進された可能性も考えられる。カルノシン給与による腸内環境の変化をより詳細に知るために、腸内細菌叢の変化を詳細に解析することも有用かもしれない。

盲腸内容物において、カルノシンの給与により酢酸、プロピオン酸および酪酸濃度は変化しなかった。短鎖脂肪酸の生成量は食事や宿主の健康状態、腸内の通過速度など様々な要因により変化する²⁵⁾。また、Hartstra²⁶⁾ は、2型糖尿病患者では健常者と比べて、酪酸を産生する腸内細菌が減少すると報告している。健常マウスを用いた本試験においては変化が見られなかったが、腸内細菌が関連する代謝異常疾患においてカルノシンが短鎖脂肪酸濃度に及ぼす影響を検討することも有用であるかもしれない。

本試験において、カルノシンの給与により脂肪重量の減少が観察された。これは脂質代謝に何らかの影響を及ぼしたことを意味する。また、本条件においては、カルノシンは血中トリアシルグリセロール、遊離脂肪酸、総コレステロールおよびグルコース濃度および盲腸内容物中短鎖脂肪酸濃度に影響を及ぼさないことが明らかになった。更に、肝臓および盲腸内容物においてカルノシンや β -アラニンを含む幾つかの低分子代謝物質が投与したカルノシン用量依存的に変化することが明らかになった。これらの結果より、今後、これら代謝物質の変化と脂肪重量の減少との関連について更に詳細な研究をすることは、肥満などの脂質代謝異常に対する新たな予防や治療法を見出す上で重要であるかもしれない。

謝 辞

本研究の立案および遂行においてご協力いただいた京都大学大学院農学研究科の松井徹教授および舟場正幸准教授に感謝する。

参考文献

- 1) Klebanov GI, Teselkin YuO, Babenkova IV, Popov IN, Levin G, Tyulina OV, Boldyrev AA, Vladimirov YuA (1997) Evidence for a direct interaction of superoxide anion radical with carnosine. *Biochem Mol Biol Int* 43: 99-106.
- 2) Smith EC (1938) The buffering of muscle in rigor; protein, phosphate and carnosine. *J Physiol* 92: 336-343.
- 3) Davey CL (1960) The significance of carnosine and anserine in striated skeletal muscle. *Arch Biochem*

Biophys 89: 303-308.

- 4) Stegen S, Stegen B, Aldini G, Altomare A, Cannizzaro L, Orioli M, Gerlo S, Deldicque L, Ramaekers M, Hespel P, Derave W (2015) Plasma carnosine, but not muscle carnosine, attenuates high-fat diet-induced metabolic stress. *Appl Physiol Nutr Metab* 40: 868-876.
- 5) Tomonaga S, Yamane H, Onitsuka E, Yamada S, Sato M, Takahata Y, Morimatsu F, Furuse M (2008) Carnosine-induced antidepressant-like activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 89: 627-632.
- 6) Yamano T, Nijima A, Imori S, Tsuruoka N, Kiso Y, Nagai K (2001) Effect of L-carnosine on the hyperglycemia caused by intracranial injection of 2-deoxy-D-glucose in rats. *Neurosci Lett* 313: 78-82.
- 7) Forsberg EA, Botusan IR, Wang J, Peters V, Ansurudeen I, Brismar K, Catrina SB (2015) Carnosine decreases IGFBP1 production in db/db mice through suppression of HIF-1. *J Endocrinol* 225: 159-167.
- 8) Albrecht T, Schilperoort M, Zhang S, Braun JD, Qiu J, Rodriguez A, Pastene DO, Krämer BK, Köppel H, Baelde H, de Heer E, Anna Altomare A, Regazzoni L, Denisi A, Aldini G, van den Born J, Yard BA, Hauske SJ (2017) Carnosine Attenuates the Development of both Type 2 Diabetes and Diabetic Nephropathy in BTBR ob/ob Mice. *Sci Rep* 7: 44492.
- 9) Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K, Ohno H (2013) Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504: 446-450.
- 10) Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, Terasawa K, Kashiwara D, Hirano K, Tani T, Takahashi T, Miyauchi S, Shioi G, Inoue H, Tsujimoto G (2016) The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun* 4: 1829.
- 11) Okazaki Y, Tomotake H, Tsujimoto K, Sasaki M, Kato N (2011) Consumption of a resistant protein, sericin, elevates fecal immunoglobulin A, mucins, and cecal organic acids in rats fed a high-fat diet. *J Nutr* 141: 1975-1981.
- 12) Shigematsu M, Nakagawa R, Tomonaga S, Funaba

- M1, Matsui T (2016) Fluctuations in metabolite content in the liver of magnesium-deficient rats. *Br J Nutr* 116: 1694-1699.
- 13) Badawy AA, Morgan CJ, Turner JA (2008) Application of the Phenomenex EZ:faast amino acid analysis kit for rapid gas-chromatographic determination of concentrations of plasma tryptophan and its brain uptake competitors. *Amino Acids* 34: 587-596.
 - 14) Kunishima M, Kitao A, Kawachi C, Watanabe Y, Iguchi S, Hioki K, Tani S (2002) A racemization test in peptide synthesis using 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM). *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 50: 549-550.
 - 15) Cripps MJ, Hanna K, Lavilla C Jr, Sayers SR, Canton PW, Sims C, De Girolamo L, Sale C, Turner MD (2017) Carnosine scavenging of glucolipotoxic free radicals enhances insulin secretion and glucose uptake. *Sci Rep* 7: 13313.
 - 16) Brown BE, Kim CH, Torpy FR, Bursill CA, McRobb LS, Heather AK, Davies MJ, van Reyk DM (2014) Supplementation with carnosine decreases plasma triglycerides and modulates atherosclerotic plaque composition in diabetic apo E(-/-) mice. *Atherosclerosis* 232: 403-409.
 - 17) Kalaz EB, Evran B, Develi-İş S, Vural P, Dogru-Abbasoglu S, Uysal M (2012) Effect of carnosine on prooxidant-antioxidant balance in several tissues of rats exposed to chronic cold plus immobilization stress. *J Pharmacol Sci* 120: 98-104.
 - 18) Fouad AA, El-Rehany MA, Maghraby HK (2007) The hepatoprotective effect of carnosine against ischemia/reperfusion liver injury in rats. *Eur J Pharmacol* 572: 61-68.
 - 19) Boldyrev AA, Aldini G, Derave W (2013) Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev* 93: 1803-1845.
 - 20) Maintz L, Novak N (2007) Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr* 85: 1185-1196.
 - 21) Dai YJ, Wu DC, Feng B, Hou WW, Xu CL, Ohtsu H, Chen Z, Hu WW (2015) Protective effect of carnosine on febrile seizures in immature mice. *Neurosci Lett* 588: 95-100.
 - 22) Geueke B, Kohler HP (2007) Bacterial beta-peptidyl aminopeptidases: on the hydrolytic degradation of beta-peptides. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 1197-1204.
 - 23) Zeng H, Umar S, Rust B, Lazarova D, Bordonaro M (2019) Secondary Bile Acids and Short Chain Fatty Acids in the Colon: A Focus on Colonic Microbiome, Cell Proliferation, Inflammation, and Cancer. *Int J Mol* 20: 1214.
 - 24) Neis EP, Dejong CH, Rensen SS (2015) The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism. *Nutrients* 7: 2930-2946.
 - 25) Macfarlane S, Macfarlane GT (2003) Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* 62: 67-72.
 - 26) Hartstra AV, Bouter KE, Bäckhed F, Nieuwdorp M (2015) Insights into the role of the microbiome in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 38: 159-165.