カルノシンおよびアンゼリンの前駆物質としての β -L-Aspartyl-L-histidine の検討 (心臓の研究 第10報¹⁾)青沼 繁, 濱 堯夫, 青木正忠, 玉木七八
大阪大学薬学部²⁾Examination of β -L-Aspartyl-L-histidine as a Precursor for Carnosine and Anserine (Studies on Heart. X¹⁾)SHIGERU AONUMA, TAKAO HAMA, MASATADA AOKI, and NANAYA TAMAKI
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University²⁾

(Received April 10, 1967)

DL-Aspartic acid [$3\text{-}^{14}\text{C}$] is distributed in approximately 10-20% (24-hour value) in the 80% ethanol extracted fraction of various organs of the rat, the distribution concentrated mostly in the spleen. Incorporation of labeled aspartic acid into carnosine and anserine, and the dilution value of specific activities are about the same as in the case of β -alanine, and incorporation of radioactivity is greater into carnosine than into anserine. Under the same conditions, incorporation of L-leucine [$U\text{-}^{14}\text{C}$] into carnosine and anserine not taking place, incorporation of aspartic acid and β -alanine into these peptides are specific. β -Aspartyl-histidine is decarboxylated by the carnosine-synthesizing enzyme system but there is no formation of carnosine or anserine, and β -aspartylhistidine is found to be hydrolyzed and further decomposed. β -Aspartylhistidine decreases the amplitude of systolic heart beat of excised toad heart but does not affect peripheral blood, differing from carnosine, and antagonizes oxytocin action in uterine muscle. From these experimental evidences, it is concluded that aspartic acid is a biological precursor of carnosine and anserine, but there is little possibility than β -aspartylhistidine serves as a direct precursor of carnosine.

著者等はすでに心臓ホルモン活性物質の1つアンゼリン (β -alanyl-L-methylhistidine) を牛心筋から分離同定した。³⁾ アンゼリンはカルノシン (β -alanyl-histidine) とともに広く筋肉成分として含まれているにもかかわらず、その生理作用、生合成機序について不明な点が多い。またこれらの構成成分である β -アラニンは生体内では一般に遊離の形では少なく、蛋白質の構成アミノ酸としても含まれず、アンゼリン、カルノシン、ophidine などとして存在する以外 CoA の構成成分として認められているにすぎない。著者等はカルノシン、アンゼリンの生理的役割の追求に関連して、前報¹⁾ においてアンゼリン、カルノシンの分別定量法を確立し、ついで β -アラニン [$2\text{-}^{14}\text{C}$] の各臓器への分布とアンゼリン、カルノシンへのとり込みについて詳査し、⁴⁾ 体外より与えた β -アラニンがこれらの生合成に利用されていることを認めた。しかし体内のアンゼリン、カルノシンがその比放射能から考えてすべて摂取した β -アラニンからのみ生合成されるものとは考えられない。また体内に遊離の β -アラニンが少なく、しかも β -アラニン自体は腸管から吸収されないことが知られている。⁵⁾ したがって著者等は生体内物質から β -アラニンが生成する系を経て、アンゼリン、カルノシンが生合成される経路の全貌を明らかにせんとした。Kakimoto, Armstrong はヒト尿中から β -L-aspartyl-L-histidine を証明している。⁶⁾ du Vigneaud, Hunt はこれを合成し、ヒスチジン欠乏ラットの生長試験から β -aspartyl-histidine がカルノシンの前駆物質の

1) 第9報: *Radioisotopes*, **14**, 400 (1965).

2) Location: 6-5 Toneyama, Toyonaka, Osaka.

3) 青沼 繁, 濱 堯夫, 稲本 輝雄, 中川 晋, 薬誌, **79**, 1429 (1959).4) 青沼 繁, 真弓 忠範, 青木 正忠, 北川 洋子, *Radioisotopes*, **14**, 400 (1965).5) E.C.C. Lin, H. Hagihara, T.H. Wilson, *Am. J. Physiol.*, **97**, 383 (1962).6) Y. Kakimoto, M.D. Armstrong, *J. Biol. Chem.*, **236**, 3280 (1961).

可能性を述べている。⁷⁾そこで著者等はアスパラギン酸を原料に β -aspartyl-histidine を経て、この脱炭酸反応によるカルノシンの生合成の可能性を検討した。本報においてまず DL-アスパラギン酸 [$3\text{-}^{14}\text{C}$] を用いてラット体内分布とカルノシン、アンゼリンへのとり込みを検討し、同時に行なった L-ロイシン [$U\text{-}^{14}\text{C}$] の結果とあわせて考察した。さらに β -aspartyl-histidine を合成し、その脱炭酸反応および反応生成物を試験管内で検討するとともに、aspartyl-histidine に関し、二、三の生物活性を試験し、カルノシン、アンゼリンの活性と比較して種々の知見を得たので報告する。

実験の部

実験方法

カルノシン、アンゼリンの標準品 L-カルノシンは Nutritional Biochemicals Corporation 製の合成品を、L-アンゼリン硝酸塩は 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。

標識化合物および放射能測定 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、DL-アスパラギン酸 [$3\text{-}^{14}\text{C}$] は $10\mu\text{Ci}/1.48\text{mg}$ の比放射能で、L-ロイシン [$U\text{-}^{14}\text{C}$] は $100\mu\text{Ci}/2.34\text{mg}$ の比放射能で生理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、自然計数ならびに自己吸収を補正して測定値とした。

β -L-Aspartyl-L-histidine および α -L-aspartyl-L-histidine の合成 Bryant 等の方法⁸⁾ および du Vigneaud 等の方法⁷⁾ にしたがって合成した。Amberlite IR-120 カラムを用い、2N ピリジンで脱塩精製して得た β -aspartyl-histidine は 2 分子の結晶水を含み、^{6,7)} 元素分析値は理論値と一致した。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。同様に α -aspartyl-histidine も合成して用いた。

動物および Autopsy 1 夜絶食させた体重 100—150 g のウィスター系雄ラット 5 匹を用い、ether 麻酔下 DL-アスパラギン酸 [$3\text{-}^{14}\text{C}$] $15.0\mu\text{Ci}$ および L-ロイシン [$U\text{-}^{14}\text{C}$] の場合は $12.8\mu\text{Ci}$ 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 1 部採血するとともに充分瀉血後各臓器を取り出し、秤量後凍結して保存した。糞尿はケージ中に汚紙を敷いて採集した。脱炭酸反応においては同様なラット 2 匹から得た肝、腎および腓腸筋をそれぞれ合して、Winnick 等の方法⁹⁾ によって 20% ホモジネートを調製し、12,000XG 遠心分離の上澄液をカルノシン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。

カルノシン-アンゼリン分画の調製 前報¹⁾ と同様に操作して、Jones の方法¹⁰⁾ で 80% EtOH 抽出エキスを調製し、Dowex 50W-X4 を用いた Stein 等の方法¹¹⁾ によりカルノシン-アンゼリン分画を一分画として得た。

カルノシン-アンゼリンの分別定量法と比放射能 カルノシン-アンゼリン分画の一定量中、その 0.5 ml を蒸発乾固後 60% EtOH 0.5 ml で抽出脱塩し、その上澄 0.1 ml をワコーゲル B-5 の 200μ 薄層クロマトグラフィーで EtOH:AcOH:H₂O (5:5:0.5)⁴⁾ 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% EtOH で加温抽出し放射能を測定する。カルノシン、アンゼリンの化学定量は著者等の方法⁴⁾ でニンヒドリン反応とジアゾ反応により行なった。

脱炭酸反応 ワールブルグ検圧計を用い、酵素液および Winnick 等の pH 7.5 の緩衝液系⁹⁾ を主室に 2.0 ml として入れた。第 1 側室に基質の β -L-aspartyl-L-histidine と $0.7\mu\text{mole}$ のピリドキサル磷酸を 0.7 ml の同じ緩衝液に溶解して入れた。第 2 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。ブレインキュベーションは 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°、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澄について、東洋汚紙 No. 51 を用い *n*-BuOH:AcOH:H₂O (4:1:5) の溶媒系で上昇法ペーパークロマトグラフィーにより、ニンヒドリン反応、ジアゾ反応を用いて成産物を検討した。さらにこの上澄液と沈殿の洗液を合し、Ba(OH)₂ 液で中和後沈殿を除いて塩酸で正確に pH 7.0 に調整する。これを 40° 以下で乾固後 80% EtOH で 3 回抽出、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および標準品と比較した。

生物試験 ガマ摘出心臓を用いた八木-Straub 法、およびガマ後肢血管灌流法、またラット子宮を用いたマクス法により心臓運動、血管に対する作用、子宮収縮に対する作用を常法にしたがって検討した。

7) V. du Vigneaud, M. Hunt, *J. Biol. Chem.*, **125**, 269 (1938).

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

9) R.E. Winnick, T. Winnick, *Biochim. Biophys. Acta*, **31**, 47 (1959).

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

11) W.H. Stein, S. Moore, *J. Biol. Chem.*, **192**, 663 (1951).

実験結果

DL-アスパラギン酸 [3-¹⁴C] のラット体内分布とカルノシンおよびアンゼリンへのとり込み DL-アスパラギン酸 [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30 min 後に 472 cpm がとり込まれた例において、6 hr 後に 333 cpm と減少し、12, 24 hr 後ではそれぞれ 209 および 217 cpm と平衡した後 48 hr 後には 138 cpm と著しく減少する。本実験条件はカルノシン-アンゼリンへのとり込みが体内で平衡した 24 hr 後について検討したものである。Table I には各臓器 80% EtOH エキス中への分布濃度を

TABLE I. Distribution of DL-Aspartate [3-¹⁴C] in Alcoholic Extracts of Rat Organ

mean ± S.E.

Organs	Distribution		Uptake into carnosine- anserine fraction (cpm/mg) [II]	$\frac{[II]}{[I]} \times 100$
	cpm/mg of wet tissue [I]	cpm of whole organ administrated cpm $\times 100$		
Liver	22.6 ± 2.5	46.2 ± 3.4 ($\times 10^{-2}$)	2.0 ± 0.5	8.7%
Kidney	15.8 ± 0.7	8.0 ± 0.6	2.1 ± 0.6	13.3
Heart	21.0 ± 1.2	5.3 ± 0.2	4.7 ± 0.5	22.5
Spleen	100.5 ± 15.5	17.6 ± 2.9	1.7 ± 0.8	1.7
Stomach	19.3 ± 1.7	7.3 ± 0.5	3.8 ± 1.1	19.5
Adrenal	46.2 ± 5.7	0.8 ± 0.1	11.9 ± 2.6	25.8
Prostate	23.8 ± 1.1	1.0 ± 0.1	4.3 ± 1.0	17.9
Testis	16.0 ± 11.9	13.9 ± 1.3	4.2 ± 0.7	26.0
Small intestine	21.2 ± 3.5	—	2.8 ± 1.0	13.3
Large intestine	12.2 ± 4.4	—	2.1 ± 0.3	16.9
Lung	53.8 ± 3.2	—	3.5 ± 2.2	6.5
Skeletal muscle	21.1 ± 3.3	—	1.8 ± 0.7	14.9
Blood	2.9 ± 0.4	—	0.3 ± 0.1	10.0
Urine	129558 ± 7716 ^{a)}	72.3 ± 3.1	12707 ± 6430	9.8
Feces	12.8 ± 6.6	0.8 ± 0.0	4.2 ± 2.1	32.6

at 24 hr after intravenous injection

a) total urine for 24 hr b) a part of organ

TABLE II. Incorporation of DL-Aspartate [3-¹⁴C] into Carnosine and Anserine

mean ± S.E.

Organs	Specific activity (cpm/μmole)		$\frac{\text{Carnosine}}{\text{Anserine}}$
	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 24 hr after intravenous injection

単位重量当り、および分布率で表示し、またカルノシン-アンゼリン分画へのとり込みと、これらの全臓器エキス中にしめる割合を示した。Table II にはカルノシンおよびアンゼリンへとり込まれた放射能を比放射能で表わすとともにカルノシンとアンゼリンへとり込まれた両者の割合を比較した。

各臓器への分布濃度は脾に特異的に多く、ついで肺、副腎に多い。肝、心、胃、前立腺、小腸に 20 cpm/mg 前後分布し、その他は 10—15 cpm/mg であるが、血液中には非常に少ない。投与量に対する分布量は一般に投与 24 hr 後の 80% EtOH 抽出物中に取り出せる形のは少ないことを示す。24 hr 尿、肝に相対的に多く分布していて、脾、睾丸にもやや多い。各臓器間に差が認められると同時に、前報⁴⁾で報告した β -アラニン [$2-^{14}\text{C}$] の分布とは著しくことなっている。カルノシン-アンゼリン分画へのとり込みは副腎が多く、ついで心、前立腺、糞、睾丸の順であるが、副腎以外は臓器による大きな差を認めない。血液には少ない。この傾向は β -アラニンの場合によく類似する。臓器中へとり込まれた放射能のうちカルノシン-アンゼリン分画のしめる割合は少なく、一般に 1/5—1/7 であり、肝、肺では 1/10 以下、脾では 1/100 にすぎない。副腎では β -アラニンは 100% がカルノシン-アンゼリン分画中に見出されたが、アスパラギン酸では 1/4 にすぎない。これらのことは各臓器抽出物中へとり込まれた大部分のアスパラギン酸はカルノシン-アンゼリン以外の形で存在していることを示している。カルノシン-アンゼリンの比放射能は臓器による差が認められるが全体的なレベルにおいてはほとんど変らない。そして β -アラニンと同程度にアスパラギン酸もカルノシン-アンゼリンにとり込まれることが認められる、一般にカルノシンの方にアンゼリンより 10—20 倍多くとり込まれ、とくに副腎、小腸、血液ではカルノシンの方に著しく多くとり込まれる。

L-ロイシン [$U-^{14}\text{C}$] のカルノシン-アンゼリンへのとり込み β -アラニン [$2-^{14}\text{C}$]⁴⁾ および DL-アスパラギン酸 [$3-^{14}\text{C}$] の投与後 24 hr 後のカルノシン、アンゼリン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 標識ロイシン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 III と IV に示す。肝にごくわずかの活性を認めたにすぎない。したがってカルノシン、アンゼリンへのとり込みは β -アラニンとアスパラギン酸に特有な代謝経路と考えられる。

TABLE III. Distribution of L-Leucine [$U-^{14}\text{C}$] in Alcoholic Extracts of Rat Organ

Organs	Distribution		Uptake into carnosine- anserine fraction (cpm/mg) [II]	$\frac{[\text{II}]}{[\text{I}]} \times 100$
	cpm/mg of wet tissue [I]	cpm of whole organ administrated cpm $\times 100$		
Liver	1.4	12.1 ($\times 10^{-2}$)	0.011	0.09%
Kidney	2.8	3.1	0.075	2.44
Lung	1.7	2.5	0.000	0
Others	trace	trace	trace	0

at 24 hr after intravenous injection

TABLE IV. Incorporation of L-Leucine [$U-^{14}\text{C}$] into Carnosine and Anserine

Organs	Specific activity (cpm/ μ mole)		$\frac{\text{Carnosine}}{\text{Anserine}}$
	Carnosine	Anserine	
Liver	0.07	0.02	3.5
Kidney	0	0	—
Lung	0	0	—
Others	0	0	—

at 24 hr after intravenous injection

β -L-Aspartyl-L-histidine の脱炭酸 Fig. 1 および Fig. 2 に反応時間と炭酸ガス発生を μl で示した。肝より調製したカルノシン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冷下で操作して反応系をつくり、約 30 min 後に反応を行なうと Fig. 1 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 μ mole 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 μ mole の基質に対しては等 mole より高い値を示した。この酵素液を数時間氷水中もしくは -20° で凍結して保存すると著しく活性を低下し、24 hr 凍結保存することで全く活性を失う。したがって Fig. 2 の結果はすべて撲殺後操作 3—4 hr 目に条件を一定に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. 2 (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. 2 (B)、腓腸筋は Fig. 2 (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 30 min 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 10 min 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) およびヒスチジン (R_f 0.13) のみ検出され、カルノシン (R_f 0.11), アンゼリン (R_f 0.12) は見出されなかった。さらに肝酵素を用いた反応の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 48 min であり、イソロイシンとロイシンの間に溶出する。反応混液から 570 m μ で 58.56%, 640 m 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 1 ケの未知分解物と、分解された基質の約 1/10 に相当するヒスチジンおよびエタノールアミン、硫酸のピークを検出した。しかしカルノシン-アンゼリンは見出せなかった。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。同様な条件ではカルノシンが安定である⁹⁾ ことが

Fig. 1. Decarboxylation of β -L-Aspartyl-L-histidine by Freshly Prepared Enzyme Solution from Rat Liver

Enzyme: 1 ml
Reaction: within 30 min after decapitation

Fig. 2. Decarboxylation of β -L-Aspartyl-L-histidine by Ordinary Prepared Enzyme Solution

Reaction: 3-4 hr after decapitation

ら、 β -aspartyl-histidine の α -カルボン酸の脱炭酸が先行してカルノシンが出来る可能性は少なく、カルノシン生合成系によって β -aspartyl-histidine からカルノシンは生成しないことを認めた。

β -Aspartyl-histidine の生物学的活性 β -aspartyl-histidine が体内でカルノシンもしくはアンゼリンに容易に変換されるのであればカルノシンもしくはアンゼリン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が知られている。⁶⁾ さらに本報では薬理学的試験の面からその活性を検討した。八木-Straub ガマ摘出心臓灌流試験の結果、 β -aspartyl-histidine 2.5 mg 5 ml の投与で著明な収縮期心搏振巾の減少を示し、カルノシン¹²⁾ もしくはアンゼリン³⁾ と同様の傾向を示すが、 α -aspartyl-

12) 尾崎, 生化学, 26, 660 (1954).

histidine は影響を示さない。L-アスパラギン酸は逆に拡大を示し、L-ヒスチジンはわずかに同傾向を示すにすぎない。gamma後肢血管灌流では β -aspartyl-histidine, α -aspartyl-histidine とともに 50 mg/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 の前処置は明らかな拮抗作用を示す。この傾向はアンゼリンの作用に類似する。¹³⁾ しかし α -aspartyl-histidine にはこの拮抗作用が極くわずかしき認められない。以上の点は β -aspartyl-histidine が容易にカルノシンに変換しないことを間接的に示す結果である。

総括および考察

DL-アスパラギン酸 [$3\text{-}^{14}\text{C}$] のラット生体内分布およびカルノシン-アンゼリンへのとり込みを検討するとともに、 β -aspartyl-histidine を合成し、カルノシン生合成系とされている。Winnick 等の系を用いて、その脱炭酸反応によるカルノシンの生成の可能性、さらに β -aspartyl-histidine の生物学的活性を調べた。投与した DL-アスパラギン酸 [$3\text{-}^{14}\text{C}$] は各臓器の 80% EtOH 抽出分画中に β -アラニン [$2\text{-}^{14}\text{C}$] に比して⁴⁾ やや少なく分布する。投与したアスパラギン酸の大部分は本条件で抽出されない型に代謝されているもので、 β -アラニン [$2\text{-}^{14}\text{C}$] についての前報の実験の場合にも同様な結果を認めている。カルノシン-アンゼリンの比放射能は臓器差はあるが、ほぼ β -アラニンからのとり込みと同程度と考えられる。前報において投与した β -アラニン [$2\text{-}^{14}\text{C}$] の比放射能は $0.888 \mu\text{Ci}/\mu\text{mole}$ であり、本報の DL-アスパラギン酸 [$3\text{-}^{14}\text{C}$] は $0.898 \mu\text{Ci}/\mu\text{mole}$ である。誤差を見込んで一般にカルノシンは $10^{-4}\%$ の希釈値で、アンゼリンは $10^{-5}\%$ の希釈値で生成され、カルノシンはアンゼリンに比し 10-20 倍、とくに副腎、小腸では 50-90 倍多くとり込まれている。これはラットにおいてカルノシンがアンゼリンより含量が多いことと一致する。現時点においては生合成系においてカルノシンからアンゼリンに変換されるものと考えることができる。アスパラギン酸の脾への分布が著しく、しかもカルノシン、アンゼリンとしてではない特徴は脾がヘムの分解臓器であり、鉄代謝との関係から脾の機能を考える上で興味深い。 β -アラニン、アスパラギン酸のカルノシン、アンゼリンへのとり込みは 24 hr 後の結果を検討したものである。一応一般代謝を経た後 ^{14}C が dipeptide にとり込まれた点を検討するため L-ロイシン [$\text{U-}^{14}\text{C}$] を用いて比較したがロイシンはどの炭素もカルノシン、アンゼリンに利用されていない。この場合 L-ロイシン [$\text{U-}^{14}\text{C}$] の比放射能は $5.565 \mu\text{Ci}/\mu\text{mole}$ と高いもので検討した。したがって総てのアミノ酸を検討していないが現段階では β -アラニンとアスパラギン酸が特異的にとり込まれるものと考えられる。アスパラギン酸は DL-体の形で β -アラニンと同量の放射能を投与したものである。もし L-体のみ利用されたとすると比放射能は変わらないが放射能量は半分である。しかし結果は β -アラニン投与の場合と同程度カルノシン、アンゼリンにとり込まれている。このことはアスパラギン酸がすべて β -アラニンになるわけではないし、もしそうだとすると D-体が L-体と同様に α -カルボン酸の脱炭酸反応が起きなくてはならないことになる。したがって体外から与えた β -アラニンの利用の場合と、 β -aspartyl-histidine 経由もしくは現在哺乳類では認められていないアスパラギン酸の直接 α -脱炭酸反応による β -アラニン経由での、アスパラギン酸のカルノシン、アンゼリンへのとり込みを結びつけることは困難である。そこでアスパラギン酸はカルノシン、アンゼリン生成における生体内の β -アラニン供与源であるが、一度オロチン酸からウラシルへと代謝されて、ウラシルの分解により β -アラニンに変換される可能性などが考えられる。しかもこの機構においては体外から注射によって与えられた β -アラニンより能率よくカルノシン、アンゼリンにアスパラギン酸を利用するものと考えられる。 β -aspartyl-histidine のカルノシン合成酵素系分画による脱炭酸反応は明らかに起こり、基質の約半分が分解されたが、反応は単に脱炭酸反応によってカルノシンが生成するのではなく別の分解反応が起きている。実験結果は基質 1 分子より 2 分子の炭酸ガスが発生している。反応液中の生成物から考えて、まず加水分解が起こりアスパラギン酸とヒスチジンに分解され、アスパラギン酸は脱炭酸、脱アミン反応などによりさらに分解と反応が進んだものと考えられる。 β -aspartyl-histidine の脱炭酸反応自体に関しては嫌気条件などさらに検討を加えなければならない。しかしいずれにしろ Winnick 等⁹⁾ や Kalyankar 等¹⁴⁾ により報告されているカルノシン生合成系を用いて β -aspartyl-histidine からカルノシンはできない。 β -aspartyl-histidine の生物学的活性の比較は体内での代謝を考慮に入れなければならないが、少なくとも薬理試験的には全としてカルノシン-アンゼリンの活性とはことなっている。しかし β -aspartyl-histidine が心臓作用をカルノシ

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

14) G.P. Kalyankar, A. Meister, *J. Biol. Chem.*, **234**, 3210 (1959).

ン-アンゼリンと同様に示すのに対し、 α -aspartyl-histidine が影響しない点収縮機序を考える上で興味深い。また β -aspartyl-histidine が oxytocin の子宮作用にカルノシンとはことなつてアンゼリンの示す拮抗作用と同様の作用を示すことは少なくとも β -aspartyl-histidine の第一段階の代謝として脱炭酸によるカルノシンの生成の可能性の少ないことを間接的に示している。du Vigneaud 等⁷⁾によるカルノシンの前駆物質としての β -aspartyl-histidine の想定はヒスチジンにもとづく生長因子としての作用から考えている。この点 β -aspartyl-histidine の加水分解によるヒスチジンの利用が行なわれたと考えるとカルノシンに変換した結果と考えなくてよい。以上の結果はアスパラギン酸がカルノシン、アンゼリンの生合成に利用され、これらの β -アラニル基の生体内供与源であることを示す。しかし β -aspartyl-histidine 経路によるものでなく、またアスパラギン酸の直接 α -脱炭酸による β -アラニンへの変換を経由するものでなく、オロチン酸を経てウラシルの分解などのように、アスパラギン酸が代謝された後に β -アラニル基として利用されると考えるのが妥当である。

謝 辞 なお本研究に関し種々御便宜をいただいた帝国臓器製薬株式会社研究室に深く感謝する。