

# 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骨格筋における中心炭素代謝変化の解析

川内 暢子<sup>\*1,2</sup> WU Jiawei<sup>\*3</sup> 江草 愛<sup>\*4</sup> 西村 敏英<sup>\*3</sup>

## Research on the changes in central-carbon metabolism in skeletal muscle of carnosine synthase gene-deficient KO mice fed an insufficiency L-histidine diet

Yoko KAWAUCHI<sup>\*1,2</sup>, WU Jiawei<sup>\*3</sup>, Ai EGUSA<sup>\*4</sup>, Toshihide NISHIMURA<sup>\*3</sup>

### Abstract

Recently, the supplementation of imidazole dipeptides (IDs) has been reported to have anti-oxidative and anti-fatigue effects, but the mechanisms of IDs for these activities have still not been known. We have established mice (KO) deficient in the active region of Carns1 that catalyzes syntheses of Carnosine. In this study, KO or wild-type mice (WT) were fed an AIN93 diet or a L-histidine-deficient diet for 3 weeks to measure metabolism-related substances in skeletal muscle. As a result, there was no significant difference in food intake between both groups fed the AIN93 diet and the L-histidine-deficient diet in both KO and WT. However, in all mice, 2 weeks after the start of the study, the body weight of mice in the L-histidine-deficient diet group was significantly decreased by about 4%~8% compared to those in the AIN93M diet group. Analyses of metabolites showed that in KO mice, L-histidine-deficient diet caused an activation in glycolytic pathway and accumulation of pyruvic acid and lactic acid, which are the final products of glycolysis. On the other hand, it suppressed the proceeds of TCA cycle, which was important in energy metabolism. These results seemed to cause the accumulation of ATP. Furthermore, in KO mice, the L-histidine-deficient diet significantly reduced the amounts of carnosine in skeletal muscle compared to the AIN93 diet, indicating that carnosine may play an important role in a supply of L-histidine-deficient *in vivo*.

### 1. 緒言

カルノシンは、 $\beta$ -アラニンとL-ヒスチジンからなるジペプチドの1つで、今からおよそ120年前にGulewitschとAmiradzilbiにより肉の抽出物から単離され、およそ20年後にその構造式が同定された。その後、1929年にガチョウなどの鳥類からアンセリンが、1962年にヒゲクジラの肉サンプルからバレニンが同定された。これらはイミダゾール環を有するためイミダゾールジペプチド (IDs) と呼ばれており、天然に存在するIDsとしてはカルノシン、アンセリン、バレニン、ホモカルノシンなどが代表的である。これらが同定されて以降、IDsの組織分布、カルノシンが経口摂取されたときの体内代謝、ならびにそれに関わる酵素について詳細な研究がなされてきた<sup>1,2)</sup>。近年では健康との関連から、IDsの経口摂取による生理活性が調べられており、これまで様々な効果が報告され

ている<sup>1)</sup>。現在報告されているIDsの機能としては、金属イオンキレート作用<sup>3)</sup>や生理的なpH緩衝作用<sup>4)</sup>、抗グリコシル化作用<sup>5-8)</sup>、抗脂質過酸化作用<sup>9)</sup>などである。なかでもカルノシンは強い抗酸化作用を有すること<sup>10-12)</sup>に加え、抗炎症作用<sup>13)</sup>やアンチエイジング作用<sup>14)</sup>、神経保護作用<sup>15)</sup>など、多面的な薬理効果があることも注目されている。このように、カルノシンやアンセリンは様々な機能や生理作用をもつことから、サプリメントや機能性表示食品の機能性物質として注目されている。これらをサプリメントとして摂取した場合、生体内でのカルノシン代謝において摂取後の分解や吸収のメカニズムは明らかにされているが<sup>1,2)</sup>、より詳細な代謝物質での変化を網羅的に解析した報告は、これまでなされていない。したがって、これら生体内での変化を明らかにすることは、機能性物質として用いられる上でも重要である。また、近年アルツハイマー病や2型糖尿病、神経変性疾患

\*1 東洋食品工業短期大学・包装食品工学科：Toyo College of Food Technology, Department of Packaged Food Engineering

\*2 女子栄養大学栄養科学研究所：Institute of Nutrition Sciences, Kawgawa Nutrition University

\*3 女子栄養大学大学院・栄養学専攻：Graduate School of Kawgawa Nutrition University・Graduate School of Nutrition Sciences

\*4 日本獣医生命科学大学・応用生命科学部：Nippon Veterinary and Life Science University・Department of Food Science

などの慢性疾患に内在性IDsが関与している報告が増えていることから<sup>16-18)</sup>、その機能解明や生体内での作用機序を明らかにすることは非常に重要であると考えられる。

これまで当研究室では、 $\beta$ -アラニンとL-ヒスチジンよりカルノシンを合成する酵素 (Carns1) を欠損させたカルノシン合成酵素KOマウスを作出し、内在性のカルノシンおよびアンセリンの様々な生理機能の検討を行ってきた。本研究では、内在性IDsの生理作用の解明を最終目標とし、カルノシン合成酵素遺伝子欠損マウス (KO) および野生型マウス (WT) を用いて栄養面からアプローチした際の腓腹筋 (骨格筋) 中の代謝物質量の変化を分子レベルおよび遺伝子レベルで検討した。具体的な検討方法としては、必須アミノ酸の1つであり、カルノシンの構成アミノ酸であるヒスチジンを欠乏させたヒスチジン欠乏食またはAIN93Mを一定期間摂餌させ、摂餌量および体重変化、自発運動量の変化、摂餌試験後の骨格筋のメタボローム解析を行うこととした。なお、本研究は2018-19年度東海物産株式会社助成金を受け実施した。

## II. 実験方法

### 1. 材料および方法

#### 1-1) 動物

今回用いたKOマウスは江草らによって作製されたものである<sup>19)</sup>。これは、ATP要求性のカルノシン合成酵素であるCarns1の、ATP結合ドメインを含むExon10を転写しないことで作製されたトランスジェニックマウス (Carns1<sup>tm1a</sup>(KOMP)<sup>Wtsi</sup>) である。ターゲティングベクターには、CarnsのIntron9にEn2 SA, IRES, LacZ, poly AならびにhBactP, Neoを含むカセットを挿入し、Exon10の両端とhBactP前方のファージ組換え酵素 (Cre) の認識配列であるloxPを配したベクター (KOMP-CSD, ID: 45781, PRPGS00167-A-H12) を用いた。これをES細胞に導入し、相同組換えESクローンを選抜し、レシピエントマウスに移植した。今回実験で用いたマウスはいずれも、江草らの方法に基づき、loxP配列の有無によりCarns1がKOされているか否かを確認した。WTとしてはC57BL/6マウスを日本チャールズ・リバー株式会社 (日本) より購入した。

#### 1-2) 飼育条件および給餌方法

13週齢の雌または雄のKO群 (n=4) およびWT群 (n=5) に、コントロール食であるAIN93M (AIN93食)、またはAIN93Mのカゼイン中のヒスチジン含量分をコーンスターチで置き換えた試験食 (ヒスチジン欠乏食) を3週間自由摂餌させた。試験中は体重、飲水量、摂餌量を測定した。また、行動の変化を検討するため、赤外線センサー式自発運動量測定装置 (ACTIMO-100N, バイオリサーチセンター株式会社) を用いて、電気信号を行動量としてカウントし、24時間の運動量を記録した (WT群n=6, KO群n=5)。

なお、実験動物を用いた研究は全て、「日本獣医生命科学大学」並びに本学の規定の「実験動物の使用及び保管に関する基準」に基づき、両大学の動物実験管理規定ガイドラインに従い実施した。また、研究計画は全て実験動物に関する倫理審査委員会の承認のもと行った。(女子栄養大学承認番号: 18-3)

### 2. メタボローム解析

給餌試験終了後は吸引麻酔による屠殺後、主大動脈より全採血し、解剖を行った。今回サンプルで使用した骨格筋試料は、試料に対し50%アセトニトリル水溶液 (v/v) (内部標準物質濃度: 20 $\mu$ M) を加え、冷却下にて破砕機を用いて破砕 (1,500rpm, 120秒 $\times$ 3回) し、さらに同量の50%アセトニトリル水溶液 (v/v) を加えた。組織破砕後、遠心分離 (2,300 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 5分) を行った。遠心分離後、上層を限外ろ過チューブ (ウルトラフリーMCPLHCC, HMT, 遠心式フィルターユニット 5kDa) に400 $\mu$ L移し取り、これを遠心 (9,100 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 120分) し、限外ろ過処理を行った。ろ液を乾固させ、再び50 $\mu$ LのMilli-Q水に溶解して測定に供した。この試料を用いて、CE-TOFMSによるHMT社のBasic scanで行った。

### 3. 遺伝子解析

遺伝子解析では、エネルギー代謝関連物質であるAMPK (AMP活性化プロテインキナーゼ: adenosine monophosphate kinase) 量を確認するため、TRIZOL試薬 (TRIZOL Reagent, Thermo Fisher Scientific) を用いて骨格筋抽出液からRNAを抽出した。得られたRNAは逆転写プレミックス (Prime Script RT Master Mix, タカラバイオ) を用いてcDNA化し、AMPKプライマー (F:5'-GCTGTGGCTCACCCAATTAT-3', R:5'-TGTTGTACAGGCAGCTGAGG-3') を用いてqPCR反応を行った。

### 4. 統計処理

WT群またはKO群の代謝物質量および体重の差異については、それぞれStudentのt検定を行い、いずれも有意水準5%未満 ( $p < 0.05$ ) を有意差ありと判断した。すべての図表に、 $P$ 値 $<0.05$ を\*,  $P$ 値 $<0.01$ を\*\*,  $P$ 値 $<0.001$ を\*\*\*として表記した。実験結果は、各群の平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。

## III. 結果・考察

### 1. ヒスチジン欠乏食給餌が摂餌量、体重変化および自発運動量に及ぼす影響

3週間AIN93食およびヒスチジン欠乏食を摂餌中のマウスの摂餌量の変化および体重変化を図1に、1時間毎の24時間自発運動量の変化を図2に示した。

AIN93食を摂餌していたマウスは、WT群およびKO群ともに摂餌量は緩やかに低下したが、体重の減少は認められなかった (図1)。ヒスチジン欠乏食を摂餌していたマウスの摂餌量は8日目まで徐々に低下し、その後大

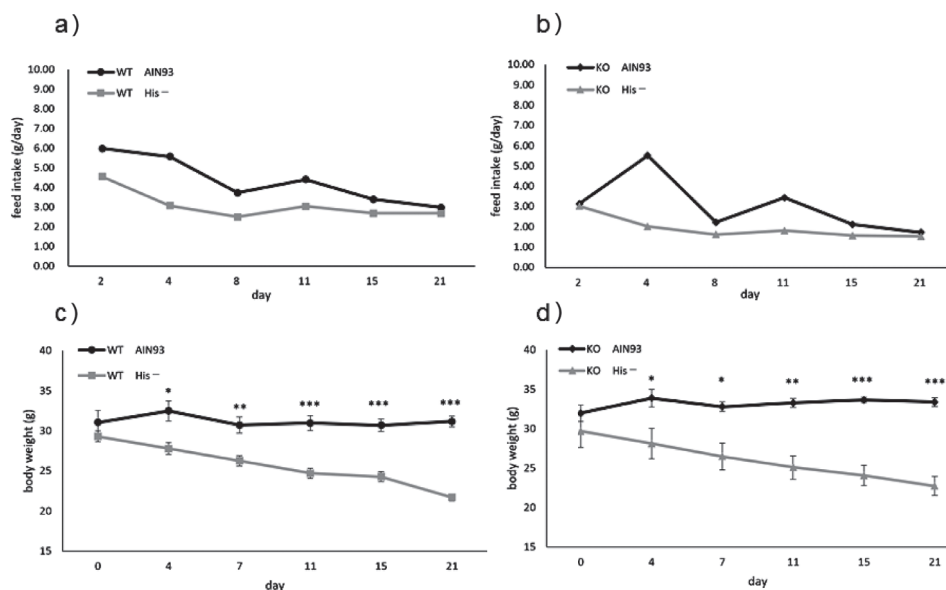


図1 ヒスチジン欠乏食給餌がマウスの摂餌量並びに体重に及ぼす影響

a), b): WT群とKO群の摂餌量の変化, c), d): WT群とKO群の体重の変化  
各試験共に, WT群はn=5, KO群はn=4で, 各群の平均値をプロットした。  
有意差は, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ で示した。

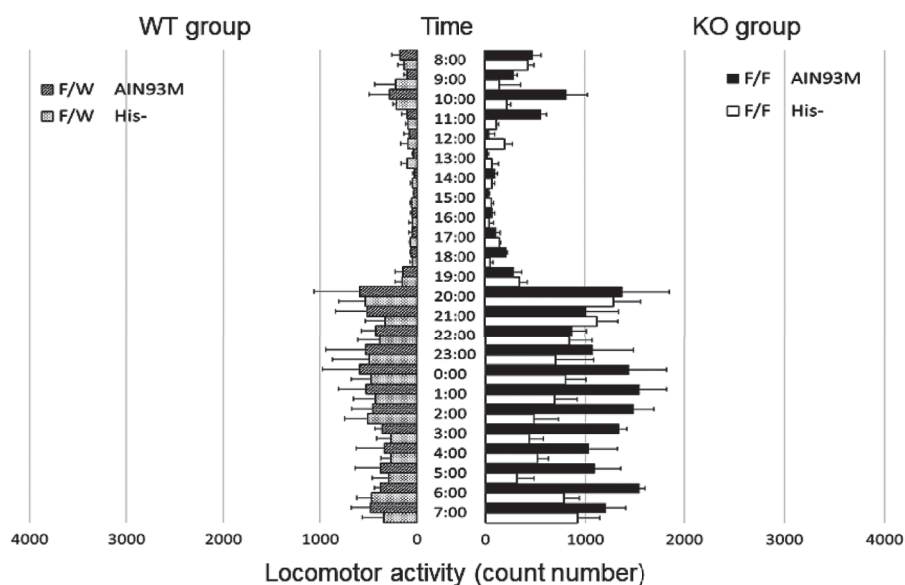


図2 ヒスチジン欠乏食摂餌がマウスの自発運動量に及ぼす影響

左側: WT群の自発運動量, 右側: KO群の自発運動量  
マウスの自発運動量は, 電気信号を運動量に変換し, 1時間毎に24時間測定した。各1時間の運動量は, 各群のマウスの平均で示した。WT群はn=6, KO群はn=5で実験を行った。

きな変化は認められなかったが, 体重は給餌試験開始4日目から5~8%有意に減少した(図1)。このことから, ヒスチジンの欠乏により, 摂餌量にかかわらず体重が減少することが明らかとなった。

また, 1時間毎の24時間自発運動量の変化においては, WT群よりもKO群の方が明期(活動期)の運動量が多い傾向にあるが, 有意な差は認められなかった(図2)。これは, 各群内での個体差が大きいためと考えられる。このことから, カルノシンおよびアンセリンが自発運動に影響を及ぼすことが示唆されたが, 今

回は個体差も大きく対象マウスが少ないため, 更に数を増やして検討する必要がある。

## 2. ヒスチジン欠乏食摂餌がKOマウス骨格筋のエネルギー代謝に及ぼす影響

エネルギー代謝の指標比較を表1および図3に示した。代謝の指標としてはメタボローム解析よりATPおよびAMPを(表1), 細胞内エネルギー代謝を検討するため, AMPKの遺伝子量を比較検討した(図3)。

KO群において, ヒスチジン欠乏食群のATP含有量

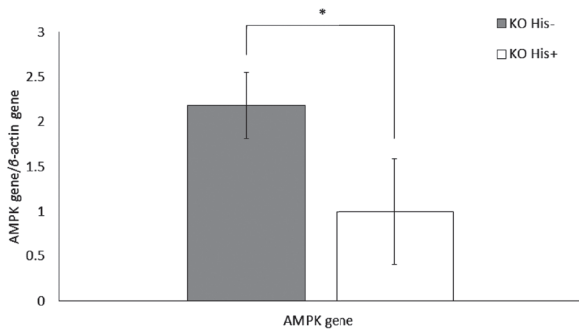


図3 ヒスチジン欠乏食摂餌がKOマウス骨格筋のAMPK遺伝子発現量に及ぼす影響

AMPK遺伝子発現量と $\beta$ -アクチン遺伝子発現量(コントロール)の比で示した。4匹のKOマウスを用いて、実施した。AMPKプライマー (F: 5'-GCTGTGGCTCACCCTAATAT-3', R: 5'-TGTGTACAGGCAGCTGAGG-3')を使用した。有意差は、\*:  $p < 0.05$ で示した。

は、AIN93食群よりも47%有意に低下していた。また、ヒスチジン欠乏食群では、AIN93食群と比較して、エネルギー代謝の指標であるATP/AMP比が顕著に低値を示しており、ATPおよびAMPの含有量、すなわち細胞内エネルギーの不足により活性化されるAMPK<sup>20)</sup>について、ヒスチジン欠乏食群がAIN93食群の遺伝子発現量1.00に対し2.18と高値であることが明らかとなった。ATPが体内で低下すると、ATPを合成する中心炭素代謝が亢進されることから、エネルギーの代謝亢進はATP/AMP比で確認する必要がある。KO群においてヒスチジンの摂取が不足すると、AIN93食群と比較し、ATP/AMP比は顕著に低下し、エネルギー代謝が亢進していることが明らかとなった。また、遺伝子レベルでも、AMPK遺伝子発現量の増加から、このことは確認できた。これらのこと

から、KO群のヒスチジン欠乏食群ではエネルギー代謝が亢進していることが示唆されたため、中心炭素代謝経路である解糖系の代謝物質を比較検討した。

### 3. ヒスチジン欠乏食摂餌がKOマウス骨格筋の解糖系代謝物質質量に及ぼす影響

KO群における骨格筋中の各代謝物質有量の比較を表1に示した。

解糖系の中心炭素代謝物であるグルコース6-リン酸(Glc 6-P)、フルクトース1,6-リン酸(Fru 1,6-P)、フルクトース6-リン酸(Fru 6-P)は解糖系の出発産物であり、各メタボローム代謝変化の中でも、有意差が認められた。いずれにおいても、KO群ではヒスチジン欠乏食群がAIN93食群よりも約55%程度低い結果が得られた。また、解糖系の最終産物であるピルビン酸及び乳酸は、ヒスチジン欠乏食群においてAIN93食群よりも40%前後有意に高値を示した。このことから、カルノシンおよびアンセリンが合成不可能なマウスにおいて、ヒスチジンの摂取が不足すると、解糖系の代謝は亢進するが、最終代謝産物であるピルビン酸や乳酸が蓄積することが明らかとなった。

### 4. ヒスチジン欠乏食摂餌がKOマウス骨格筋のTCA回路代謝物質質量に及ぼす影響

解糖系の代謝ではピルビン酸や乳酸の蓄積が認められたため、エネルギー代謝経路として重要な、ミトコンドリア内でおこるTCA回路の代謝物質を比較検討した。今回測定したTCA回路の各代謝物質の中で有意差のあったクエン酸およびコハク酸では、ヒスチジン欠乏食群

表1 ヒスチジン欠乏食摂餌がKOマウス骨格筋の核酸関連、解糖系並びにTCA回路の代謝物質質量に及ぼす影響

Metabolite	Concentration (nmol/g)				Comparative Analysis	
	KO His-		KO AIN93		KO His- vs KO AIN93	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	$p$ -value	
ATP	2,286	785	4,343	416	0.004	**
AMP	25	15	1.4	0.2	0.023	*
ATP/AMP ratio	139	128	3,053	221	0.000	***
Glucose 6-phosphate	1,834	1,339	4,067	763	0.027	*
Fructose 1,6-diphosphate	35	19	77	22	0.025	*
Fructose 6-phosphate	484	327	1,030	153	0.023	*
Pyruvic acid	178	35	110	26	0.020	*
Lactic acid	21,144	1,653	13,520	1,529	0.001	**
Citric acid	70	11	101	14	0.013	*
Succinic acid	93	38	175	20	0.009	**

実験は、4匹のKOマウスを用いて、実施した。

表2 ヒスチジン欠乏食摂餌がWTマウス骨格筋のヒスチジン量並びにカルノシン量に及ぼす影響

Metabolite	Concentration (nmol/g)				Comparative Analysis	
	WT His-		WT AIN93		WT His- vs WT AIN93	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	$p$ -value	
His	39	15	117	24	0.001	**
Carnosine	1,250	137	2,039	307	0.003	**

実験は、5匹のWTマウスを用いて、実施した。

の含有量が、AIN93食群よりも30~50%低値であった(表1)。

これらのことから、KO群のヒスチジン欠乏食群では解糖系の亢進が認められ、解糖系の最終産物であるピルビン酸および乳酸が蓄積していたが、エネルギー代謝として重要であるTCA回路の代謝は、あまり活性化されないことが明らかとなった。

## 5. ヒスチジン欠乏食摂餌がWTマウス骨格筋のヒスチジン及びカルノシンに及ぼす影響

非常に興味深いことに、今回メタボローム解析をした結果、表2で示すように、WTマウスのヒスチジン欠乏食群では、骨格筋中のカルノシンの含有量が有意に低値であった。マウスは生体内に血清カルノシン分解酵素(CN1)を持たず、骨格筋中に組織型のカルノシン分解酵素(CN2)を持つと報告されている<sup>13)</sup>。WTマウスのヒスチジン欠乏食群で骨格筋中のカルノシン含有量が低下していたことから、生体内でヒスチジンが欠乏した時に、骨格筋中のカルノシンはCN2により分解され、生体内にヒスチジンを供給している可能性が示唆された。今後は、カルノシンの生体内物質供給源としての役割、そしてそれが神経経路に作用する可能性を検討する。

## 謝 辞

本研究は東海物産株式会社の柳内延也様、佐藤謙一郎様に多大なるご支援およびご協力を賜りました。この場で深く御礼申し上げます。統計解析では女子栄養大学緒方裕光教授にご指導ご鞭撻を頂きました。深く御礼申し上げます。動物実験では女子栄養大学堀江修一先生、平石さゆり先生、宮澤紀子先生にご助言および機器をお借りいたしましたこと、深謝申し上げます。また、同研究室での研究員、院生、学部生の皆様には、日頃より研究可能な環境を頂き協力を賜りました。心より感謝申し上げます。

## 要 約

近年、イミダゾールジペプチド(IDs)の摂取は抗酸化作用や抗疲労効果を有すると報告されているが、その詳細なメカニズムに関しては未だ不明な点が多い。当研究室ではカルノシン合成酵素であるATPGD1(Carns1とも呼ばれる)の活性領域を欠損させたマウス(KO)を作成した。本研究では、KOまたは野生型マウス(WT)を用いて、AIN93食またはヒスチジン欠乏食を3週間摂餌させ、骨格筋中の代謝関連物質を測定した。その結果、KOとWTともに、AIN93食またはヒスチジン欠乏食を摂餌したマウス群間で摂餌量に有意な差は認められなかった。また、全てのマウスにおいて、ヒスチジン欠乏食の体重は研究開始から2週間後に、AIN93食よりも約4%~8%有意に減少した。

代謝産物の解析結果より、KOのヒスチジン欠乏食では解糖系の亢進が認められ、解糖系の最終産物であるピ

ルビン酸および乳酸が蓄積していた。一方、エネルギー代謝として重要であるTCA回路の代謝は、あまり活性化されないことが明らかとなり、このことはATPの蓄積と関連していると推察された。さらに、WT群のヒスチジン欠乏食では、骨格筋中のカルノシン含量が、WT群のAIN93食よりも有意に低下したことから、カルノシンは生体内で不足したヒスチジンの供給源として働いている可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) Victor R. Preedy: Imidazole dipeptides: Chemistry, Analysis, Function and Effects, p3-602, Royal Society of Chemistry, Portland (2015)
- 2) Alexander A. Boldyrev, Giancarlo Aldini, and Wim Derave: Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiology Rev.*, **93**, 1803-1845 (2013)
- 3) Mozdzan, M., Szemraj, J., Rysz, J. and Nowak, D.: Antioxidant properties of carnosine re-evaluated with oxidizing systems involving iron and copper ions. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **96**, 352-360 (2005)
- 4) Abe, H. and Okuma, E.: Effect of temperature on the buffering capacities of histidine-related compounds and fish skeletal muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 2101-2107 (1991)
- 5) Nagai, K., Nijijima, A., Yamano, T., Otani, H., Okumura, N., Tsuruoka, N., Nakai, M. and Kiso, Y.: Possible role of L-carnosine in the regulation of blood glucose through controlling autonomic nerves. *Experimental Biology and Medicine*, **228**, 1138-1145 (2003)
- 6) Nijijima, A., Okui, T., Mastumura, Y., Yamano, T., Tsuruoka, N., Kiso, Y. and Nagai, K.: Effects of L-carnosine on renal sympathetic nerve activity and DOCA-salt hypertension in rats. *Autonomic Neuroscience*, **97**, 99-102 (2002)
- 7) Tanida, M., Nijijima, A., Fukuda, Y., Sawai, H., Tsuruoka, N., Shen, J., Yamada, S., Kiso, Y. and Nagai, K.: Dose-dependent effects of L-carnosine on the renal sympathetic nerve and blood pressure in urethane-anesthetized rats. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **288**, R447-R445 (2005)
- 8) Ymano, T., Nijijima, A., Iimori, S., Tsuruoka, N., Kiso, Y. and Nagai, K.: Effect of L-carnosine on the hyperglycemia caused by intracranial injection of 2-deoxy-D-glucose in rats. *Neuroscience Letters*, **313**, 78-82 (2001)
- 9) Jingjing Z., Dheeraj Kumar Posa, Vijay, K., David, H., Amit K., Smirthy, G., Daniel, W. R., Aruni B., Michael, W. and Shahid, P. B.: Carnosine protect cardiac myocyte against lipid peroxidation products. *Amino Acid*, **51** (1), 123-138 (2019)
- 10) Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K. C. and Ames, B. N.: Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and

- anserine present in muscle and brain. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **85**, 3175-3179 (1988)
- 11) MacFarlane, N., McMurray, J., O' Dowda, J. J., Dargie, H. J. and Millera, D. J.: Synergism of histidyl dipeptides as antioxidants. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **23**, 1205-1207 (1991)
  - 12) Yanai, N., Shiotani, S., Mizuno, M., Nabetani, H. and Nakajima, M.: Characteristic of antioxidative activity of carnosine and anserine mixture isolated from chicken extract: comparison with other botanical antioxidants. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*, **51**, 236-246 (2004)
  - 13) Nagai, K. and Suda, T.: Realization of spontaneous healing function by Carnosine. *Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology*, **10** (8), 497-507 (1988)
  - 14) Alan, R. H., Estifanos, B. and Barbor, de, C.: Carnosine and the processes of ageing. *Maturitas*, **93**, 28-33 (2016)
  - 15) Bae, O. N., Serfozo, K., Baek, S. H., Lee, K. Y., Dorrance, A., Rumbelha, W., Fitzgerald, S. D., Farooq, M. U., Naravelta, B., Bhatt, A. and Majid, A.: Safety and efficacy evaluation of carnosine, an endogenous neuroprotective agent for ischemic stroke. *Stroke*, **44**, 205-212 (2013)
  - 16) Alessandra, A., Amilcare, B., Alessandro, R., Sara, G., Carlo, S., Rosaria, R. and Tiziano, V.: Anti-aggregating effect of the naturally occurring dipeptide carnosine on  $\alpha \beta$  1-42 fibril formation. *PLOS ONE*, **8** (7), e68159 (2013)
  - 17) Forteh, A. N., Harrington, R. J., Tsai, A., Liao, P. and Harrington, M. G.: Free amino acid and dipeptide changes in the body fluids from Alzheimer's disease subjects. *Amino Acids*, **32**, 213-224 (2007)
  - 18) Lee, Y., Hsu, C., Lin, M. and Yin, M.: Histidine and carnosine delay diabetic deterioration in mice and prooxidant-antioxidant balance in several tissues of rats exposed to chronic cold plus immobilization stress. *Journal of Pharmacological Sciences*, **120**, 98-104 (2005)
  - 19) Ai Egusa: Physiological functions of carnosine synthase gene knockout mice, 73th Japan Society of Nutrition and Food Science Conference. **41** (2018)
  - 20) Rong Ke, Qicao Xu, Cong Li, Lingyu Luo and Deqiang Huang: Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism. *Cell Biology International Rev.*, **42**, 384-392 (2018)