

# 高フェニールアラニン血症ラットの チロシン代謝に及ぼすインスリンの影響

沖田 美佐子

これまで、フェニールアラニン代謝に及ぼすインスリンの影響を追求してきたが、フェニールケトン尿症患者では多くの症例で、インスリン注射後血漿中チロシンが増加すること、そしてまたカテコラミン、チラミン値が増加することを認めた<sup>1)</sup>。また前報<sup>2)</sup>ではラットを用いて高フェニールアラニン血症をつくり、そのフェニールアラニン、チロシンならびにカテコラミン代謝に対するインスリンの影響について報告した。これまでの成績は、インスリンがフェニールアラニン、チロシン及びカテコラミンの代謝を促進することを示唆するものであった。そこで、この点を更に追求するため、ラットを用いて、カテコラミン生成の律速段階であるチロシンの水酸化反応と、カテコラミン生成の副側路<sup>3)</sup>ともいわれるチロシンからチラミンへの脱炭酸反応について、インスリンとの関係を検討し、いくつかの知見を得たので報告する。

## 方 法

### 1. 実験動物

ウィスター系雄ラットで体重100g前後のものを使用した。高フェニールアラニン血症の作成方法としては、前報<sup>2)</sup>ではフェニールアラニン水酸化酵素の阻害剤であるp-クロロフェニールアラニンを投与したが、今回はフェニールアラニンの過剰投与のみによった。すなわち、フェニールアラニンをトライトンX-100を用いて水に懸濁させたものを、50mg/100g体重、1日2回、7日間腹腔内に投与した。対照正常群にはトライトンX-100を含む生理食塩水を投与した。8日目に高フェニールアラニン血症群には100mg/100g体重のフェニールアラニンを、対照正常群には生理食塩水を投与し、その60分後にインスリン投与群に0.1 IU/100g体重のレギュラーインスリンを筋注した。更に60分経過後断頭して採血、直ちに肝、副腎を摘出し氷冷生理食塩水で洗浄したものを実験に供した。

### 2. 測定法

チロシン水酸化酵素の活性測定はCoyleら<sup>4)</sup>の方法により行った。L-[U-<sup>14</sup>C]チロシン(specific activity 495mCi/mmol, New England Nuclear)はNagatsuら<sup>5)</sup>の方法に従い、アルミナによって精製した。組織を10倍量の生理食塩水(0.2%トライトンX-100を含む)でホモジナイズして、10,000×gで10分間遠沈した上清を酵素液として使用した。反応液組成はTable 1に示すとおりである。全液量1.0mlとし、37°Cで30分間反応させたのち25%トリクロル酢酸で反応をとめ、10,000×g、20分間遠沈した上清に0.2M酢酸ナトリウム2mlと0.2M EDTA 0.2mlを加え、これにアルミナ0.3gを加えたのち1Nアンモニア水でpH8.6に合せ、5分間静かに攪拌した。これを内径5mmのカラム管に流しこみ、水でじゅうぶんに洗浄して未反応のチロシンを除いた。次いで生成したL-DOPAを0.3M酢酸で溶出して、その一定量にジオキサシンチレーターを加えて液体シンチレーションカウンターにより測定した。チロシン水酸化酵素活性は生成したL-DOPA量で表した。

チロシンの脱炭酸反応はChristensonら<sup>6)</sup>の方法を改変して測定した。L-[1-<sup>14</sup>C]チロシン(specific activity 54.6mCi/mmol, New England Nuclear)はアルミナ処理後アンバーライトIRC-50(Na<sup>+</sup>)カラムにより精製した。組織を5倍量の生理食塩水(0.2%トライトンX-100を含

Table 1. Incubation mixture for determination of tyrosine hydroxylase.

Enzyme preparation	0.8-1.0mg protein
2-Mercaptoethanol	$1 \times 10^{-5}$ moles
Ferrous ammonium sulfate	$3 \times 10^{-7}$ moles
Catalase	2,600 units
6-Methyltetrahydropterine	$3.2 \times 10^{-7}$ moles
N S D	$5 \times 10^{-9}$ moles
Potassium phosphate buffer pH5.5	$3 \times 10^{-1}$ moles
L-Tyrosine	$2 \times 10^{-7}$ moles
L-[U- $^{14}$ C] Tyrosine	100,000 cpm

む) でホモジナイズして10,000×g、10分間遠沈した上清を酵素液とした。反応液組成はTable 2に示した。側室を有する内径18mm、長さ10cmの試験管にトリス・塩酸緩衝液、ピリドキサルリン酸、2-メルカプトエタノール及び酵素液を入れて、37°Cで10分間予備反応を行い、次いで基質L-チロシンとL-[1- $^{14}$ C]チロシンを加え、反応液量1.5mlとした。側室には35%トリクロ

Table 2. Incubation mixture for determination of tyrosine decarboxylation.

Enzyme preparation	4-5 mg protein
2-Mercaptoethanol	$1.5 \times 10^{-5}$ moles
Pyridoxal phosphate	$1 \times 10^{-7}$ moles
Tris · HCl buffer pH7.8	$1.2 \times 10^{-4}$ moles
L-Tyrosine	$6 \times 10^{-7}$ moles
L-[1- $^{14}$ C]Tyrosine	100,000 cpm

ル酢酸0.3mlを入れた。一方、濾紙片(ワットマンNo.4, 15×25mm)を50 $\mu$ lのNCSで湿らせたものを試験管内につるして密栓した。これを37°Cで120分間反応させたのち、側室よりトリクロル酢酸を加えて反応をとめ、次いで37°Cで30分間振盪することにより、発生した炭酸ガスを濾紙片に吸着させた。この濾紙片をトルエンシンチレーターに浸して液体シンチレーションカウンターで測定した。血漿中カテコラミン、チラミンの測定法は前報<sup>2)</sup>と同様である。血漿中フェニールアラニン、チロシンの測定は蛍光法により、また蛋白質量の測定はLowry法によった。

## 結 果

### 1. 血漿フェニールアラニンおよびチロシン値

Table 3にラットの血漿フェニールアラニン、チロシン値測定結果を示した。フェニールアラニンを8日間腹腔内に投与したラットでは、血漿フェニールアラニン値は対照正常ラットの約30倍に増加して、明らかに高フェニールアラニン血症状態となった。一方、チロシン値はフェニールアラニン投与によって、対照正常群の約3倍に増加しており、この点ではフェニールアラニン水酸化酵素欠損のために高フェニールアラニン、低チロシン値を示すフェニールケトン尿症とは状態が異なるものである。次に血漿フェニールアラニン、チロシン値に及ぼすインスリン注射の影響をみると、対照正常群ではインスリンによってフェニールアラニン値は有意に低下したがチロシン値には有意な相違を認めることはできなかった。しかし、高フェニールアラニン血漿群ではフェニールアラニン値が有意に低下するとともにチロシン値が有意に増加

して、フェニールアラニンからチロシンへの代謝の促進が認められた。

Table 3. Effect of insulin on phenylalanine and tyrosine levels in plasma of normal rats and hyperphenylalaninemic rats.

	Normal rats		Hyperphenylalaninemic rats	
	Insulin(-) (5)	Insulin(+) (5)	Insulin(-) (4)	Insulin(+) (4)
Phenylalanine (mg/dl)	1.17±0.17	0.85±0.04*	37.72±2.40	29.90±4.63***
Tyrosine (mg/dl)	1.10±0.05	1.14±0.12	3.64±0.48	5.91±0.42**

Results are given as mean±S.E.M. Numbers in parentheses are the number of samples.

\*Differs from Normal Insulin(-), P<0.005.\*\*\*Differ from Hyperphenylalaninemia Insulin(-), \*\*P<0.005; \*\*\*P<0.025.

## 2. 血漿カテコラミン、チラミン値

対照正常ラットの血漿カテコラミンおよびチラミン値に及ぼすインスリンの影響を調べた結果をTable 4 に示した。インスリンを注射するとドーパミン、ノルエピネフリン値は有意な低下を示し、エピネフリン、チラミン値は有意に増加した。

Table 4. Effect of insulin on catecholamines and tyramine levels in plasma of normal rats.

	Dopamine	Norepinephrine	Epinephrine	Tyramine
Insulin(-)	1.05±0.24	3.42±0.41	1.86±0.26	3.56±0.55
Insulin(+)	0.51±0.13**	0.46±0.12*	5.81±0.50*	8.56±1.13*

Values are expressed in nanograms per milliliter ±S.E.M. of 5 samples.\*\*\* Differ from Insulin(-), \*P<0.005; \*\*P<0.025.

## 3. チロシン水酸化酵素活性

対照正常ラットおよび高フェニールアラニン血症ラットにインスリンを注射したときの副腎重量ならびに副腎のチロシン水酸化酵素活性の測定結果をTable 5 に示した。副腎は両側を合せて重量を測定してホモジナイズした。副腎重量はインスリン注射をしないものでは高フェニールアラニン血症群が正常群に比べて有意に重くなっており、これにインスリンを注射したものは有意に小さくなった。

チロシン水酸化酵素活性は、副腎1コ当りで比較すると高フェニールアラニン血症群が明らかに対照正常群より高い活性を示し、インスリン注射は対照正常群では有意に活性を高めたが高フェニールアラニン血症群では高くなる傾向はみられるものの有意差は認められなかった。しかしこれを蛋白1mg当りでみるとインスリンの注射は対照正常群、高フェニールアラニン血症群いずれの群でも活性を有意に高めている。

Table 5. Effect of insulin on tyrosine hydroxylase activity in adrenals of normal rats and hyperphenylalaninemic rats.

		Weight of adrenals (mg)	Enzyme activity	
			(nmoles/adrenal/hr)	(nmoles/mg protein/hr)
Normal rats	Insulin(-)	40±5	5.18±0.92	3.22±0.56
	Insulin(+)	36±4	6.81±0.94**	4.60±1.01*
Hyperphenyl- alaninemic rats	Insulin(-)	47±3***	8.17±1.30*	4.79±1.02*
	Insulin(+)	38±6 <sup>+</sup>	9.09±1.24	5.90±1.29 <sup>++</sup>

Results are expressed as nanomoles of dopa formed per adrenal per hr and per milligram of protein per hr. Values are given as mean ±S.D. of 5 samples.

\*,\*\*,\*\*\* Differ from Normal Insulin(-), \*P<0.005; \*\*P<0.025; \*\*\*P<0.05.

+<sup>+</sup> Differ from Hyperphenylalaninemia Insulin(-), <sup>+</sup>P<0.025; <sup>++</sup>P<0.05.

#### 4. チロシン脱炭酸反応

チロシンの脱炭酸反応に関する酵素としてはチロシン脱炭酸酵素 (EC 4.1.1.25) と芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (EC 4.1.1.26) がある。Epps<sup>7)</sup> によって報告されたチロシン脱炭酸酵素はその至適pH は5.5である。芳香族アミノ酸脱炭酸酵素は初めL-DOPA脱炭酸酵素として報告されたものであるが、その後酵素の精製が進みL-DOPAのみならず芳香環を持つL型アミノ酸と反応することが示された。Christensonら<sup>6)</sup> によれば、この芳香族アミノ酸脱炭酸酵素

Table 6. Effect of insulin on decarboxylation of tyrosine in liver of normal rats and hyperphenylalaninemic rats.

		Decarboxylation of tyrosine (nmoles/mg protein/hr)	
Normal rats	Insulin(-)	3.41±0.18	(9)
	Insulin(+)	5.25±0.34*	(9)
Hyperphenylalaninemic rats	Insulin(-)	4.26±0.23**	(10)
	Insulin(+)	4.10±0.19	(10)

Results are expressed as nanomoles of CO<sub>2</sub> formed per milligram of protein per hr. Values are given as mean ±S.E.M.. Numbers in parentheses are the number of samples.

\*,\*\* Differ from Normal Insulin(-), \*P<0.005; \*\*P<0.025.

のフェニールアラニンおよびトリプトファンを基質とした時の至適pHは8.5である。著者ら<sup>8)</sup> は脳を用いた一連の実験において、脳における脱炭酸反応を検討した結果、pH5.5では脱炭酸反応はほとんど認められず、pH7.8において最も高い活性を認めた。そこで肝においてもpH7.8におけるチロシン脱炭酸反応を測定した。しかし、この脱炭酸反応が単一の酵素によって行われているかどうかは明らかではない。結果はTable 6 に示したとおりである。

インスリンを注射しないものについて高フェニールアラニン血症群を対照正常群と比較するとチロシンの脱炭酸反応は明らかに高フェニールアラニン血症群で高まった。次に両群にインスリンを注射した結果では、対照正常ラットではインスリン注射群が注射しなかった群に比べ

て有意な高値を示した。高フェニールアラニン血症ラットではインスリン注射による脱炭酸反応の変化は認められなかった。

## 考 察

フェニールアラニン負荷によって作成した今回の高フェニールアラニン血症ラットに対するインスリン注射の結果は、インスリンが明らかにフェニールアラニンからチロシンへの流れを増加させるというものであった。そこで、フェニールケトン尿症患者でも、フェニールアラニン水酸化酵素活性が全く欠除していないものについてはインスリン注射によってチロシン生成が高まると考えられ、これは著者のこれまでのフェニールケトン尿症患者についての報告<sup>1)</sup>を裏づけるものである。

フェニールケトン尿症におけるカテコラミン生成障害の原因については、高濃度のフェニールアラニンによってチロシン水酸化酵素が阻害されるためであるという報告<sup>5,9)</sup>とフェニールアラニンの異常代謝産物によって阻害されるためという報告<sup>10)</sup>がある。しかし、本実験結果では、血中フェニールアラニン値が異常な高値となった高フェニールアラニン血症群で副腎のチロシン水酸化酵素は有意な活性の増加を示した。また、肝のチロシン脱炭酸反応も高フェニールアラニン血症群で増加した。著者の測定したチロシンの脱炭酸反応はその至適pHから主として芳香族アミノ酸脱炭酸酵素によるものと思われるので、L-DOPAの脱炭酸反応も増加しているのではないかと推測される。これらのことから、単にフェニールアラニンやその異常代謝産物によってこれら両酵素の活性が阻害されるとばかりは考えられず、カテコラミン生成障害にはチロシン量やその他の原因があるものと考えられる。

インスリンとカテコラミンに関する報告としては、正常人にインスリンを負荷すると尿中エピネフリン排泄量が有意に増加するというElmadjianら<sup>11)</sup>の報告や、分裂病患者にインスリンを負荷すると血糖値の低下に少し遅れて血中エピネフリンが増加し、ノルエピネフリンについては血糖値との関連は認められないがインスリン注射後2½～4時間で増加したというGoldfienら<sup>12)</sup>の報告、更にRobertsonら<sup>13)</sup>の正常人にグルコースを負荷すると血中インスリンの増加がまず起り、その後に血中カテコラミン値が高くなり、カテコラミン値が高くなり始めるとインスリン分泌は抑制されてくるという報告がある。これらの報告にみられるようにインスリンが血中カテコラミン、中でもエピネフリン値を高めることは明らかであり、今回の正常ラットによる実験でも一致する結果を得た。

副腎のチロシン水酸化酵素活性はインスリン注射によって高くなるという結果を得た。神経活動が亢進するとカテコラミン合成は促進されるが、その原因の一つの可能性として、貯蔵されているノルエピネフリンが放出されてしまうとチロシン水酸化酵素活性を増すのではないかと、すなわち最終産物であるノルエピネフリン等がこの律速酵素のフィードバック阻害剤として作用していることが考えられている<sup>14)</sup>。本実験結果からは、インスリンによってカテコラミン分泌が高まりその結果として副腎内チロシン水酸化酵素活性が高くなったとも推測されるし、またインスリンが直接チロシン水酸化酵素の活性に影響を与えたり、酵素蛋白量を増加させるということも考えられるが明らかではない。

次にチロシンからチラミンへの脱炭酸反応に関してDavidら<sup>15,16)</sup>は、血中チロシン値が高まると脱炭酸反応がその主要代謝経路になるのではないかと述べている。本実験でも血漿中チロシン値が高い値を示した高フェニールアラニン血症群では明らかに肝のチロシン脱炭酸反応が高まった。芳香族アミノ酸脱炭酸酵素に及ぼすインスリンの影響についてはこれまでに報告をみない。今回の結果は、対照正常ラットにインスリンを注射すると肝のチロシン脱炭酸反応は増加

したが、高フェニールアラニン血症ラットではインスリン注射による変化はみられなかった。これはインスリンの効果に時間的な差が生じたものか、あるいは血中チロシン濃度が影響しているのかその原因は不明であり更に検討を要するものと思われる。

#### 要 約

- 1) フェニールアラニンを8日間腹腔内に投与して高フェニールアラニン血症としたラットと正常ラットについて、チロシン代謝をインスリンとの関連において検討した。
- 2) インスリン注射をしなかったラットでは、高フェニールアラニン血症群で血中フェニールアラニン値の上昇に伴ってチロシン値も上昇し、副腎のチロシン水酸化酵素活性および肝のチロシン脱炭酸反応が高まった。
- 3) 正常ラットにインスリンを注射すると血中エピネフリン、チラミン値が上昇し、副腎チロシン水酸化酵素活性および肝チロシン脱炭酸反応が高まった。
- 4) 高フェニールアラニン血症ラットにインスリンを注射すると副腎チロシン水酸化酵素活性は高くなったが、肝のチロシン脱炭酸反応には変化を認めなかった。
- 5) インスリンがチロシン水酸化酵素活性を高め、カテコラミン合成を促進することが推測され、この点でフェニールケトン尿症に対するインスリンの効果も期待できるものと考えられる。

本論文の要旨は第10回日本栄養・食糧学会中国四国支部大会（1977年11月、倉敷）において発表した。

#### 文 献

- 1) 沖田美佐子：岡山医誌，**88**，697(1976)
- 2) 沖田美佐子，金行孝雄，黒田正清：岡山県立短大紀要，**21**，8 (1977)
- 3) Cooper, J.R., Bloom, F.E., and Roth, R.H. : The Biochemical Basis of Neuropharmacology, p.100, Oxford University Press, New York(1970)
- 4) Coyle, J.T. : *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 1935(1972)
- 5) Nagatsu, T., Levitt, M., and Udenfriend, S. : *J. Biol. Chem.*, **239**, 2910(1964)
- 6) Christenson, J.G., Dairman, W., and Udenfriend, S. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **141** 356(1970)
- 7) Epps, H.M.R. : *Biochem. J.*, **38**, 242(1944)
- 8) 沖田美佐子，金行孝雄，庄盛敏廉，高坂睦年：神経化学，**16**，45 (1977)
- 9) Curtius, H.-CH., Baerlocher, K., and Völlmin, J.A. : *Clin. Chim. Acta.*, **42**, 235(1972)
- 10) Nadler, H.L., and Hsia, D.Y.-Y. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **107**, 721(1961)
- 11) Elmadjian, F., Lamson, E.T., Freeman, H., Neri, R., and Varjabedian, L. : *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **16**, 876(1956)
- 12) Goldfiel, A., Moore, R., Zileli, S., Havens, L.L., Boling, L., and Thorn, G.W. : *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **21**, 296(1961)
- 13) Robertson, R.P., and Porte, D. : *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **39**, 403(1974)
- 14) 永津俊治：蛋白質 核酸 酵素，**22**，530(1977)
- 15) David, J.C., Dairman, W., and Udenfriend, S. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **160**, 561(1974)
- 16) David, J.C., Dairman, W., and Udenfriend, S. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 1771(1974)

昭和53年3月30日受理