

# ラット脳内アミン代謝，チロシン水酸化酵素活性および チロシン脱炭酸反応に及ぼすインスリンの効果

岡山大学医学部脳代謝研究施設病態生化学部門（主任：高坂陸年教授）

三 好 公 明

（昭和53年9月7日受稿）

## 緒 言

カテコラミン代謝におよぼすインスリンの影響に関してはこれまでにいくつかの報告がある。すなわち、ヒトにインスリンを投与した結果、Luftら<sup>1)</sup>やElmadjiarら<sup>2)</sup>は尿中エピネフリン排泄量の増加を認め、Goldfienら<sup>3)</sup>は血中エピネフリンの増加を報告しているが、いずれもインスリン低血糖による副腎髄質刺激の結果、カテコラミン分泌が増加すると結論している。さらに、カテコラミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素がインスリンによって誘導されるというPatrickら<sup>4)</sup>の報告もあり、インスリンがカテコラミン代謝を促進させることが示唆されてきた。

われわれの教室では沖田<sup>5)</sup>はすでに、カテコラミン代謝に異常があるといわれる<sup>6,7)</sup>フェニールケトン尿症患者にインスリンを投与した結果、血漿中カテコラミン値の上昇する症例のあることを報告している。また、尿中ホモバニリン酸排泄量がインスリン注射後増加すること、および血漿中チラミン値がインスリン注射1時間後に著明に増加することを示し、インスリンはカテコラミン代謝を促進させるだけでなく、チロシンからチラミンにいたるカテコラミン合成の副側路における代謝をも刺激しうることを推測している。

そこで著者は上記の推論を確認する目的で、ラットにインスリンを投与した際の血漿および脳中フェニールアラミン、チロシン値およびアミン値の変化、脳、肝臓、副腎におけるカテコラミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素活性の変化およびチロシンからチラミン、3,4-ジハイドロキシフェニールアラニン（ドーパ）からドーパミンなどの経路に作用する芳香族アミノ酸脱炭酸酵素活性の変化につい

て検討を加えた。

## 方 法

実験動物にはウィスター系の雄ラットで体重100g前後のものを使用した。ラットは実験前5日間、温度 $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 1\%$ 、明期12時間（午前1時から午後1時）、暗期12時間の動物室において、固型飼料（オリエンタル社製）で飼育した。インスリンはレギュラーインスリンであるイスジリン（清水製薬）を用いてインスリン注射群には $0.1 \text{ IU}/0.1 \text{ ml}/100 \text{ g}$ 体重を筋注し、対照群には生理食塩水を注射した。注射後は両群ともに絶食とし、水のみを自由に与えた。午前9時に注射後それぞれの時間にラットを液体窒素中で数秒間凍結したのち、断頭、採血し直ちに脳、肝、副腎を取り出し、氷冷生理食塩水で洗って脳は線条体、間脳（thalamus, hypothalamusを含む）、皮質に分け、測定まで $-80^\circ\text{C}$ で保存した。

チロシン水酸化酵素活性はCoyle<sup>8)</sup>の方法に準じて測定した。脳は酵素活性の最も高い線条体の両側を用い、副腎は左右2個を合せて、それぞれ10倍量の $0.05 \text{ M}$  トリス緩衝液  $\text{pH } 6.0$  ( $0.2\%$  トリトン X-100を含む) でテフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズしたのち、 $10,000 \times \text{g}$  で10分間遠沈して得た上清を酵素液として用いた。反応液の組成は、最終濃度 $0.1 \text{ M}$  リン酸カリウム緩衝液  $\text{pH } 5.5$ 、 $1 \times 10^{-2} \text{ M}$  2-メルカプトエタノール、 $3 \times 10^{-4} \text{ M}$  硫酸第一鉄アンモニウム、 $3.2 \times 10^{-4} \text{ M}$  DL-6-メチル-5,6,7,8-テトラヒドロプロテリン (Calbiochem)、カタラーゼ (Sigma)  $2,600 \text{ units}$ 、 $5 \times 10^{-6} \text{ M}$  4-プロモ-3-ヒドロキシベンジルオキシアミン-ジヒドロゲンフォスフェイト (NSD 半井化学) とし、基質としては  $2 \times 10^{-4} \text{ M}$  L-チロシンと L-[U-<sup>14</sup>C]チロシン ( $495 \text{ mCi}/\text{mmol}$ , The Radiochemical

Centre, Amersham)  $0.05 \mu\text{Ci}$  を用い、酵素液  $0.1 \text{ ml}$  (蛋白量約  $0.5 \text{ mg}$ ) を加えた。最終反応液量を  $1.0 \text{ ml}$  とした。なお、 $\text{L-}[U-^{14}\text{C}]$  チロシンはあらかじめ Nagatsu ら<sup>9)</sup>の方法に従ってアルミナにより精製したものをを用いた。 $37^\circ\text{C}$ で30分間インキュベートした後、25%トリクロル酢酸  $0.2 \text{ ml}$  で反応をとめ、 $10,000 \times \text{g}$  で20分間遠沈して上清を分離した。これに  $0.2 \text{ M}$  エチレンジアミン四酢酸 2 ナトリウム  $0.2 \text{ ml}$  と、 $0.2 \text{ M}$  酢酸ナトリウム  $5 \text{ ml}$  およびアルミナ  $0.3 \text{ g}$  を加えて  $1 \text{ N}$  アンモニア水で  $\text{pH} 8.6$  に合せた。5分間マグネティックスターラーで静かに攪拌したのち静置、上清液を捨て、アルミナを内径  $5 \text{ mm}$ 、高さ  $15 \text{ cm}$  のカラム管へ水で洗いこみ、更に水  $50 \text{ ml}$  を流して未反応のチロシンを除いた。ついで  $0.3 \text{ N}$  酢酸  $6 \text{ ml}$  で、ドーパを溶出し、溶出液の  $2 \text{ ml}$  をとりジオキサシンチレーター  $7 \text{ ml}$  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。なおアルミナにより精製した  $\text{L-}[U-^{14}\text{C}]$  ドーパ (New England Nuclear) を用いて  $\text{L-}$ ドーパの回収率を求めたところ  $76.3\%$  であった。酵素活性は蛋白  $1 \text{ mg}$  当たり 1 時間に生成される  $\text{L-}$ ドーパ量により表わした。

芳香族アミノ酸脱炭酸酵素活性は、Christenson ら<sup>10)</sup>の方法に準じて測定した。脳は酵素活性が最も高い線条体とついで高い活性の認められる間脳を合わせるか、または小脳を除く全脳を用いた。脳または肝を5倍量の生理食塩水 ( $0.2\%$  トリトン X-100 を含む) でホモジナイズしたのち、 $10,000 \times \text{g}$ 、10分間遠沈した上清を酵素液とした。チロシンの脱炭酸反応測定には  $0.02 \text{ M}$  トリス緩衝液  $\text{pH} 7.8$  を用い、基質として  $4 \times 10^{-4} \text{ M}$  の  $\text{L-}$ チロシンと  $\text{L-}[1-^{14}\text{C}]$  チロシン ( $54.6 \text{ mCi}/\text{mmol}$ , New England Nuclear)  $0.1 \mu\text{Ci}$  を混合したものを加えた。 $\text{L-}[1-^{14}\text{C}]$  チロシンは Nagatsu ら<sup>9)</sup>の方法により、あらかじめ精製したものをを用いた。 $\text{L-}$ ドーパの脱炭酸反応測定には  $0.08 \text{ M}$  リン酸ナトリウム緩衝液  $\text{pH} 7.0$  を用いて、基質として  $3 \times 10^{-3} \text{ M}$  の  $\text{L-}$ ドーパおよび  $\text{L-}[1-^{14}\text{C}]$  ドーパ ( $7.9 \text{ mCi}/\text{mmol}$ , The Radiochemical Centre, Amersham)  $0.1 \mu\text{Ci}$  を合わせたものを加えた。側室を有する内径  $18 \text{ mm}$ 、長さ  $10 \text{ cm}$  の試験管を用いて、緩衝液  $0.6 \text{ ml}$ 、 $1 \times 10^{-2} \text{ M}$  2-メルカプトエタノール、 $7 \times 10^{-5} \text{ M}$  ピリドキサルリン酸、酵素液  $0.4 \text{ ml}$  (蛋白量約  $4 \text{ mg}$ ) を入れて  $37^\circ\text{C}$  で10分間予備反応を行ったのち水冷して基質を加えた。最終液量は  $1.5 \text{ ml}$  である。側室には  $35\%$  トリ

クロル酢酸  $0.3 \text{ ml}$  を入れた。一方、濾紙片 (ワットマン No. 4,  $15 \times 25 \text{ mm}$ ) を  $50 \mu\text{l}$  の  $\text{NCS}$  (Amersham/Searle) で湿らせたものを試験管内につるして密栓した。これをチロシン脱炭酸反応測定の場合は120分間、 $\text{L-}$ ドーパ脱炭酸反応測定の場合は30分間、 $37^\circ\text{C}$  でインキュベートした。側室よりトリクロル酢酸を加えて反応を止め、更に  $37^\circ\text{C}$  で30分間振盪して、発生した炭酸ガスを濾紙片に吸着させた。この濾紙片を  $7 \text{ ml}$  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。反応量は蛋白  $1 \text{ mg}$  当たり、1時間に生成される炭酸ガスの量で表わした。

血漿および脳内カテコラミン値の測定は、ガスクロマトグラフィー (ECD) 法によって河合ら<sup>11)</sup>の方法で行なった。

フェニールアラニン<sup>12)</sup>およびチロシン<sup>13)</sup>の定量はそれぞれ蛍光法によって行ない、蛋白質量は Lowry 法<sup>14)</sup>により、血糖値は  $\text{O-}$ トルイジン・ホウ酸法<sup>15)</sup>によって測定した。

## 結 果

ラットにインスリンまたは生理食塩水を注射して60分後の血糖値と血漿および脳の皮質部分のフェニールアラニンとチロシン値の測定結果を表1に示した。

血糖値はインスリン群で有意に低下しており、その平均値は対照群の  $47.3\%$  であった。すなわち、本研究で用いた少量のインスリン投与によっても血糖値は明らかに低下した。フェニールアラニン値は血漿、脳ともにインスリン群で有意な低下を示したが、チロシン値には血漿、脳いずれにおいても変化がみられなかった。

表2は、インスリンまたは生理食塩水投与後60分の血漿および脳 (小脳を除く全脳) におけるカテコラミンおよびチラミンの測定結果である。血漿中ドーパミンおよびノルエピネフリン値はインスリン群で有意に低値を示し、エピネフリンおよびチラミン値はインスリン群で逆に有意に高値を示した。一方、脳でも血漿と同様に、インスリン群でドーパミン、ノルエピネフリンが有意に低下しており、チラミンは有意に増加し、エピネフリンにも増加傾向がみられた。

表3は、チロシン水酸化酵素活性をインスリンまたは生理食塩水を注射して60分後に、脳 (線条体) および副腎で測定した結果である。脳、副腎いずれにおいてもチロシン水酸化酵素活性はインスリン注

射群で有意に高値を示した。

表4には、同じく注射60分後におけるチロシンの脱炭酸反応を測定した結果を示した。脳は線条体と間脳の部分を合せて用いた。脳、肝ともにインスリン群で酵素活性に有意の上昇が見られた。

以上の結果は、インスリン注射60分後ではチロシ

ン水酸化酵素活性とチロシン脱炭酸反応がいずれも対照群より上昇していることを示す。

つぎに、インスリン注射後のチロシン水酸化酵素活性ならびにチロシンまたはL-ドーパを基質とした場合の芳香族アミノ酸脱炭酸酵素活性の経時的変化を検討した。

表1 血糖値および血漿, 脳内フェニールアラニン, チロシン値におよぼすインスリンの影響

	血 漿			脳	
	グルコース	フェニールアラニン	チロシン	フェニールアラニン	チロシン
	mg/dl (6)	$\mu\text{mol/dl}$ (5)	$\mu\text{mol/dl}$ (5)	$\mu\text{mol/g}$ (4)	$\mu\text{mol/g}$ (4)
対 照 群	148.4 ± 6.3	7.1 ± 2.4	6.1 ± 0.7	0.108 ± 0.010	0.076 ± 0.006
インスリン群	70.2 ± 15.7 *	5.2 ± 0.5 **	6.9 ± 1.5	0.085 ± 0.016 ***	0.076 ± 0.012

数値は平均値 ± 標準偏差, ( ) 内数字は例数

対照群との有意差 (t-test): \*P < 0.005, \*\*P < 0.025, \*\*\*P < 0.05

表2 血漿および脳内カテコラミン, チラミン値におよぼすインスリンの影響

	血 漿		脳	
	(ng/ml)		( $\mu\text{g/g}$ )	
	対 照 群 (12)	インスリン群 (6)	対 照 群 (8)	インスリン群 (6)
ドーパミン	1.36 ± 0.79	0.53 ± 0.26 **	0.774 ± 0.285	0.469 ± 0.173 ***
ノルエピネフリン	3.23 ± 1.73	0.42 ± 0.24 *	0.075 ± 0.036	0.024 ± 0.011 ☆
エピネフリン	1.82 ± 1.03	5.69 ± 1.24 *	0.003 ± 0.002	0.007 ± 0.005 ☆☆
チラミン	3.56 ± 1.89	8.56 ± 2.78 *	0.003 ± 0.002	0.021 ± 0.010 *

数値は平均値 ± 標準偏差, ( ) 内数字は例数

対照群との有意差 (t-test): \*P < 0.005, \*\*P < 0.025, \*\*\*P < 0.05, ☆P < 0.01, ☆☆P < 0.10

表3 脳および副腎のチロシン水酸化酵素活性におよぼすインスリンの影響

	脳	副 腎
対 照 群	2.93 ± 0.69 (8)	3.22 ± 0.56 (5)
インスリン群	3.73 ± 0.64 ** (7)	4.60 ± 1.01 * (5)

数値は平均値 ± 標準偏差 (nmol L<sup>-1</sup>-DOPA/mg protein/hr)

対照群との有意差 (t-test): \*P < 0.005, \*\*P < 0.025

表4 脳および肝のチロシン脱炭酸反応におよぼすインスリンの影響

	脳	肝
対 照 群	0.229 ± 0.011 (9)	3.41 ± 0.18 (9)
インスリン群	0.287 ± 0.013 * (9)	5.25 ± 0.34 * (9)

数値は平均値 ± 標準偏差 (nmol CO<sub>2</sub>/mg protein/hr)

対照群との有意差 (t-test): \*P < 0.005

図1はインスリン注射後5時間までの血糖値の推移を示す。結果は2例の平均値である。インスリン注射後30分ですでに血糖値は明らかに低下しており、60分から120分にかけて最低値となったが、3時間後には上昇し、以後は対照群と同様となった。

図2は脳線条体におけるチロシン水酸化酵素活性の経時的变化である。インスリン注射後60分のチロシン水酸化酵素活性は、インスリン群で有意に高値を示した。

図3は副腎における結果であるが、インスリン群では注射後30分から90分まで、対照群より有意に高活性を示した。

図4および図5はインスリン注射後の脳および肝におけるチロシン脱炭酸反応の経時的推移である。脳は小脳を除く全脳を用いた。脳、肝いずれでも30分、60分後には対照群より有意に高くなり、特に60分後には著しく高い値を示した。

図6、図7は脳および肝におけるL-ドーパの脱炭酸反応を測定した結果である。脳は小脳を除く全脳を用いた。脳におけるL-ドーパの脱炭酸反応はインスリン注射90分後に対照群より有意に高くなったが、肝ではインスリン注射による変化は全くみられなかった。

図8にラット脳チロシン脱炭酸反応の至適pHを示す。基本反応溶液は方法の項で述べた通りで、図に示した緩衝液を用いてpH5.0よりpH10.0までを調べた結果、至適pHは7.8であった。

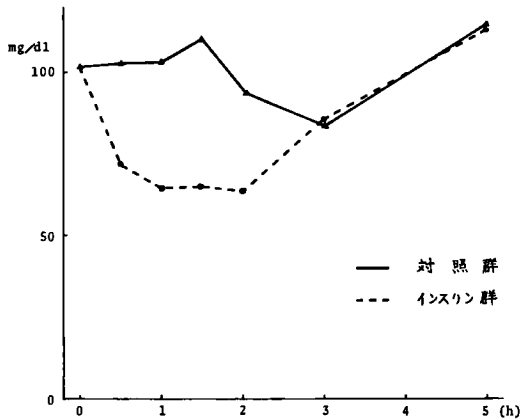


図1 インスリン注射後の血糖値の変化

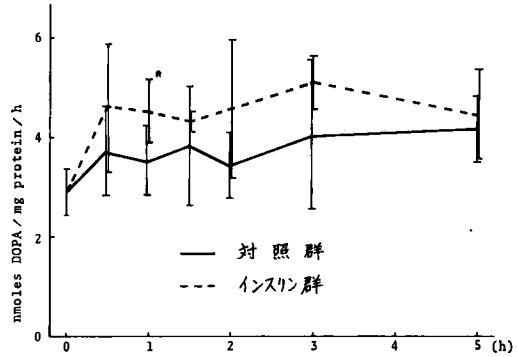


図2 インスリン注射後の脳(線条体)内チロシン水酸化酵素活性の経時的变化

4例の平均±標準偏差

対照群との有意差(t-test): \*P<0.05

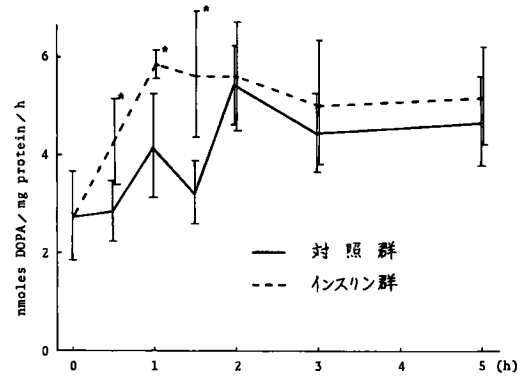


図3 インスリン注射後の副腎内チロシン水酸化酵素活性の経時的变化

4例の平均±標準偏差

対照群との有意差(t-test): \*P<0.01

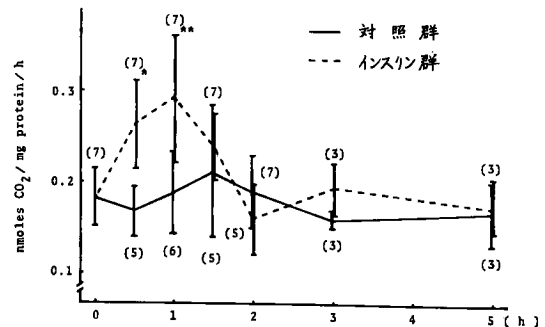


図4 インスリン注射後の脳(小脳を除く全脳)におけるチロシン脱炭酸反応の経時的变化

対照群との有意差(t-test): \*P<0.005, \*\*P<0.05

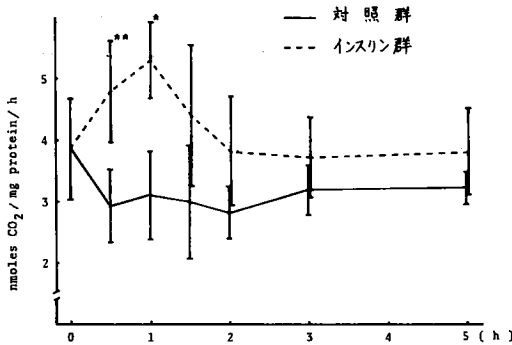


図5 インスリン注射後の肝におけるチロシン脱炭酸反応の経時的変化

4例の平均±標準偏差, 対照群との有意差 (t-test) : \*P<0.005, \*\*P<0.05

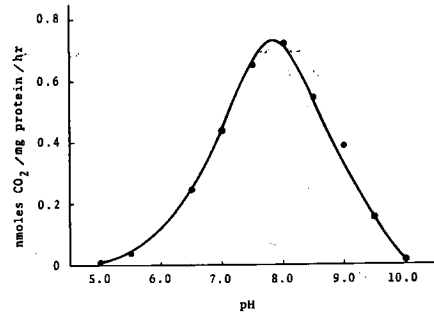


図8 ラット脳におけるチロシン脱炭酸反応の至適 pH

pH 5.0-6.0 : 0.08 M クエン酸緩衝液  
pH 6.5-7.0 : 0.025 M リン酸緩衝液  
pH 7.5-9.0 : 0.02 M トリス緩衝液  
pH 9.5-10.0 : 0.08 M グリシン緩衝液

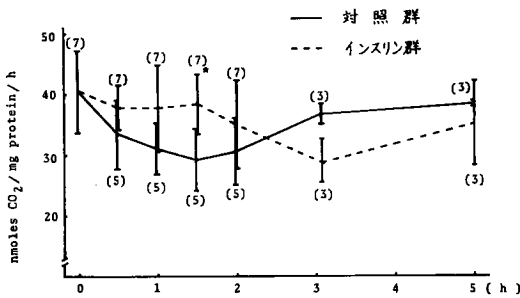


図6 インスリン注射後の脳 (小脳を除く全脳) における L-DOPA 脱炭酸反応の経時的変化  
対照群との有意差 (t-test) : \*P<0.025

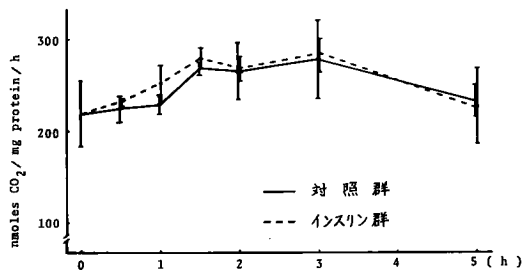


図7 インスリン注射後の肝における L-DOPA 脱炭酸反応の経時的変化  
4例の平均±標準偏差

以上, インスリン投与後60分で, 血漿および脳内のフェニールアラニンが減少し, 血漿および脳内とともにドーパミン, ノルエピネフリンが減少し, エピネフリンが増加し, ドーパミンおよびノルエピネフリンの代謝回転の促進を示す結果を得た。また, チラミンも増加していることからチラミンへの代謝亢進を示す結果を得た。

また, 同様にインスリン投与後短時間で脳, 肝臓, 副腎において, チロシン水酸化酵素, ドーパ脱炭酸酵素 (芳香族アミノ酸脱炭酸酵素) の活性化, およびチロシン脱炭酸反応の亢進を示す結果を得た。

### 考 察

本研究では, 表1に示したごとくインスリン投与60分後に, 血漿および脳内のフェニールアラニンが有意に減少するという結果を得た。また, 同じ時点で血漿および脳内のドーパミンとノルエピネフリンは減少し, エピネフリンは逆に増加している (表2)。これらの成績はインスリンがドーパミンおよびノルエピネフリンの代謝回転を促進することを示唆するものと考えられるが, さらにインスリン投与後血漿および脳内チラミンの増加も認められることから, チロシンからチラミンへの代謝をも亢進させる可能性がある。ここで血漿および脳内いずれにおいてもチロシン量に変化が見られないのは, カテコラミン代謝においてチロシン水酸化酵素が律速酵素であるためであろうと考えられる。

Tagliamonte ら<sup>16)</sup>はラットに本研究で用いたインスリン量の約10倍量(2.0 I. U / 100 g 体重)を腹腔内投与し、30~90分後に血清トリプトファンおよびチロシン量が減少する一方、脳内のそれらが増加していることを報告しており、これをインスリンが血液から脳へのトリプトファンおよびチロシンの取り込みを亢進させた結果と解釈している。しかし、本研究では、脳内フェニールアラニン量は血漿のそれと同様に減少しており、さらにチロシン量には有意の変化が認められなかった。ラットの血液—脳関門では、チロシンとロイシンは同じ機構で取り込まれることが知られている<sup>17)</sup>が、ラット横隔膜へのロイシン取り込み機構はインスリン不感応であり<sup>18)</sup>さらに最近 Pardridge<sup>19)</sup>によって血液—脳関門を通してのアミノ酸の輸送はおそらくインスリン不感応であることが報告されている。さらに、MacKenzie ら<sup>20)</sup>はラット大槽内にインスリンを直接投与した場合には脳内トリプトファン量に変化がなく、セロトニンや5-ヒドロキシインドール酢酸にも変化がなかったことから、腹腔内投与の場合に見られる脳内トリプトファン量の増加は、インスリンが直接アミノ酸の脳内への取り込みを亢進させる結果ではないであろうと推論している。したがってインスリンによる低血糖ストレスを介した取り込み亢進の可能性など検討すべき問題を残している。Tagliamonte ら<sup>16)</sup>と著者の成績の相違は、用いたインスリン量の差による可能性を否定できないが、インスリンによる前駆アミノ酸の脳内取り込みへの影響自体についても、さらに追求する必要があると思われる。

上述のごとく、本研究ではラット血漿および脳内の前駆アミノ酸、カテコラミンおよびチラミンの測定結果から、インスリンがドーパミンおよびノルエピネフリンの代謝回転の亢進およびチロシンからチラミンへの代謝亢進を引き起こす可能性が示されたが、つきにこれら代謝経路に関与する酵素活性について得られた成績について述べる。

まず、チロシン水酸化酵素については、インスリン投与後60分で脳(線条体)での有意の活性上昇が認められた(表3、図2)。副腎においても同様に活性上昇が認められるが、経時的変化を調べたものでは脳の成績と異なり、投与後30分および90分にも活性上昇が見られる(図3)。チロシン水酸化酵素はカテコラミン生合成の律速酵素であり、その代謝調節に重要な役割を果していることは周知の通りである。したがって、インスリンによる本酵素の活性化が上

述のドーパミンおよびノルエピネフリンの代謝回転の亢進に大きな影響を及ぼしていることが考えられる。

本研究で得られたインスリンによるチロシン水酸化酵素の活性化の機序は明らかでないが、本酵素活性の短時間内での調節機構についてはすでにいくつかの報告がある。すなわち、Morgenroth ら<sup>21)</sup>はサイクリックアデノシン3', 5'-モノフォスフェイト(cAMP)の増加に伴い、cAMP 依存性タンパクリン酸化酵素が活性化され、チロシン水酸化酵素がリン酸化されることによって酵素活性の上昇が見られるとしている。本酵素自体のリン酸化は未だ証明されてはいないが、この機構は低血糖ストレスにより神経細胞(あるいは副腎髄質細胞)から放出されたカテコラミンが、シナプス後膜受容体に結合してアデニレートサイクラーゼが活性化され、ついでcAMPが増加するという機構に連続するものである。しかし、脂肪細胞では、インスリンがcAMP 分解酵素であるフォスホジエステラーゼ活性を上昇させることが報告されており<sup>22)</sup>、インスリンによるチロシン水酸化酵素の活性化を上述の機序で説明することは現在のところできない。

また、*in vitro*におけるトリプシンによる限定分解によって切断され、本来のチロシン水酸化酵素9.2 s が3.7 s と小さくなった時、その活性は3~5倍上昇するという事<sup>23)</sup>から、生体内ではこのような活性化機構も考慮されなければならないであろう。

つきに、本研究ではインスリン投与後30分と60分に脳および肝臓のチロシン脱炭酸反応の亢進(表4、図4、5)と、投与後90分における脳のドーパ脱炭酸反応の亢進が認められた(図6)。これらの成績も、インスリン投与によるカテコラミンおよびチラミンへの代謝亢進という前述の結果とうまく符合するものではあるが、チロシンおよびドーパ脱炭酸酵素についてはこのような短時間内での活性化の報告は未だ見あたらない。したがって、いかなる機構によって脱炭酸酵素の活性化がおこるかについては現段階では全く不明と言わざるを得ない。

本研究では、脱炭酸酵素活性はチロシン、ドーパについて、いずれもカルボキシル-<sup>14</sup>C からの放射性炭酸ガスの放出量を測定しており、また、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素は基質特異性の極めて低いことが知られている<sup>10)</sup>。また、方法の項で述べたごとく粗酵素を用いているので、チロシン脱炭酸酵素活性測定の際にもドーパ脱炭酸酵素や、インスリンによって活性化されることの知られているチロシニアミノ

転移酵素<sup>24)</sup>を経た後の脱炭酸酵素活性などを合せて測定した可能性は否定できない。しかし、表2に示したごとく、ラットにインスリンを投与した60分後の脳内チラミンの増加、ならびに脳およびその他の臓器でのチラミン合成を反映する血漿中のチラミン量が増加していることは、少なくともチロシン脱炭酸酵素が活性化されたことを示すものであると考えられる。また、酵素標品に混在するチロシン水酸化酵素を介した、ドーパからドーパミンへの脱炭酸反応を含めて測定した可能性については、ここで用いたチロシン脱炭酸反応液の *in vitro* の条件ではチロシン水酸化酵素活性が全く認められなかった(未発表)ことから否定されよう。一方、Sundaresan<sup>25)</sup>によれば、チロシン脱炭酸酵素の最適 pH は 5.5 とされているが、本研究で用いた酵素標品における最適 pH は図8に示すごとく7.8と大きく異なる結果を得た。これらのことを含め、インスリン投与によって活性化された脱炭酸酵素の同定確認について、今後なお検討の余地を残している。

最後に、本研究では比較的少量のインスリンを投与することによって、チロシン水酸化酵素の活性化によると考えられるドーパミンおよびノルエピネフリンの代謝回転の促進、およびチロシン脱炭酸酵素の活性化によるチロシンからチラミンへの代謝亢進が認められた。カテコラミンの合成に焦点を合わせた場合にはチロシン水酸化酵素が律速酵素であり、この酵素が最も重要な調節の役割を果していることはよく知られていることである。しかし、内在性ホルモンであるインスリンのこのような効果を考えた場合、通常のカテコラミン代謝経路だけでなく、チラミンへの代謝経路および p-ヒドロキシフェニルピルビン酸への経路といったカテコラミン代謝の側副経路への代謝を介した間接的なカテコラミン合成の調節にもあらためて注目しなければならないと考えられる。沖田<sup>5)</sup>はフェニルケトン尿症患者にインスリンを投与した後のカテコラミンおよびアミノ酸の変動を検討した成績から、インスリンの治療的応用の可能性について言及している。本研究での成績が示すように、インスリンが単に脳中フェニールアラニンを減少させるばかりでなく、チロシン水酸化酵素や脱炭酸酵素の活性化を介してドーパミンおよびノルエピネフリンの代謝回転を促進させることは、フェニールケトン尿症に対するインスリン治療の試みに対しても新しい論拠を与えるものと考えられる。

## 結 語

ウイスター系雄ラットに0.1 IU/100 g 体重のインスリンを筋注して、フェニールアラニン、チロシン値、カテコラミンとチラミン値、チロシン水酸化酵素活性、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素活性を測定し、インスリンのアミン代謝におよぼす影響を検討した。結果は次のとおりであった。

1. インスリン注射後60分で、生理食塩水を注射した対照群に比べて、血糖値は47.3%に低下し、血漿および脳内フェニールアラニン値は低下したがチロシン値には変化がなかった。
2. インスリン注射後60分で、血漿中ドーパミン、ノルエピネフリンは有意に低下、エピネフリン、チラミン値は有意に増加した。脳では、ドーパミン、ノルエピネフリンは有意に低下、エピネフリンは増加の傾向を示し、チラミンは有意に増加した。
3. 脳線条体および副腎のチロシン水酸化酵素活性はインスリン注射後60分では、対照群より有意な活性増加を示した。
4. 脳線条体および肝のチロシン脱炭酸反応は、インスリン注射後60分で、対照群より有意に高い値を示した。
5. インスリン注射後の経時的変化を追求した結果では、チロシン水酸化酵素活性は、脳(小脳を除く全脳)ではインスリン注射後60分で、副腎では30分から90分後にわたって活性の増加を認めた。
6. チロシン脱炭酸は、脳、肝いずれでも30分、60分後に高い値を示した。L-DOPAを基質とした場合の芳香族アミノ酸脱炭酸酵素活性は、脳ではインスリン注射後90分に反応の有意な増加が認められたが、肝では対照群との間に相違を認めなかった。

以上の結果から、インスリンがチロシン水酸化酵素活性を短期間のうちに高め、ドーパミンおよびノルエピネフリンの生成を増加させるものと考えられた。同時に L-DOPA の脱炭酸反応も、脳で増加しており、この点でもドーパミンおよびノルエピネフリンの代謝回転の速まることが推測された。また、チロシン脱炭酸反応の著明な増加は、血漿あるいは脳内チラミン値の増加と一致し、インスリンがチラミンを経る代謝経路を促進することを推論した。

稿を終えるにのぞみ、御指導、御校閲を賜わりました高坂睦年教授に深く感謝いたします。また、終始御助言と御協力をいただきました盛政忠臣博士、沖田美佐子博士、論文作製にあたって御教示いた

いた小林清史講師および脳代謝研の皆様にも厚く御礼を申し上げます。

(本論文の要旨は第7回九州、中国、四国合同生化学支部総会(昭和53年5月、松山)にて発表した。)

## 文 献

1. Luft, R. and von Euler, U.S.: Effect of insulin hypoglycemia on urinary excretion of adrenaline and noradrenaline in man after hypophysectomy. *J. Clin. Endocr.* **16**, 1017-1025, 1956.
2. Elmadjian, F., Lamson, E.T., Freeman, H., Neri, R. and Varjabedian, L.: Excretion of epinephrine and norepinephrine after administration of insulin and methacholine. *J. Clin. Endocr.* **16**, 876-886, 1956.
3. Goldfien, A., Moore, R., Zileli, S., Havens, L.L., Boling, L. and Thorn, G.W.: Plasma epinephrine and norepinephrine levels during insulin-induced hypoglycemia in man. *J. Clin. Endocr. Metab.* **21**, 296-304, 1961.
4. Patrick, R. and Kirshner, N.: Effect of stimulation on the level of tyrosine hydroxylase, dopamine  $\beta$ -hydroxylase, and catecholamines in intact and denervated rat adrenal glands. *Mol. Pharmacol.* **7**, 87-96, 1971.
5. 沖田美佐子: フェニールケトン尿症に対するインスリンの効果. 第一編 カテコールアミン代謝に及ぼす影響. *岡山医誌*, **88**, 697-708, 1976.
6. Nadler, H.L. and Hsia, D.H.-Y.: Epinephrine metabolism in phenylketonuria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **107**, 721-723, 1961.
7. Curtius, H.-Ch., Baerlocher, K. and Vollmin, J.A.: Pathogenesis of phenylketonuria: Inhibition of dopa and catecholamine synthesis in patients with phenylketonuria. *Clin. Chim. Acta* **42**, 235-239, 1972.
8. Coyle, J.T.: Tyrosine hydroxylase in rat brain-cofactor requirements, regional and subcellular distribution. *Biochem. Pharmacol.* **21**, 1935-1944, 1972.
9. Nagatsu, T., Levitt, M. and Udenfriend, S.: Tyrosine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **239**, 2910-2917, 1964.
10. Christenson, J.G., Dairman, W. and Udenfriend, S.: Preparation and properties of a homogeneous aromatic L-amino acid decarboxylase from hog kidney. *Arch. Biochem. Biophys.* **141**, 356-367, 1970.
11. 河合聡, 今井一洋: 生体試料の分析法 (V) — カテコールアミンおよび代謝物の分析(1) —. *代謝* **6**, 915-924, 1969.
12. McCaman, M.W. and Robins, E.: Fluorimetric method for the determination of phenylalanine in serum. *J. Lab. Clin. Med.* **59**, 885-890, 1962.
13. Waalkes, T.P. and Udenfriend, S.: A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. *J. Lab. Clin. Med.* **50**, 733-736, 1957.
14. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275, 1951.
15. 佐々木禎一: o-Toluidine を用いる血糖の簡易定量法—特に o-Toluidine- 磯酸法を中心として—. *臨床病理* **16**, 45-54, 1968.
16. Tagliamonte, A., DeMontis, M.G., Olianias, M., Onali, P.L. and Gessa, G.L.: Possible role of insulin in the transport of tyrosine and tryptophan from blood to brain. *Pharmacol. Res.*



- Commun.* **7**, 493-499, 1975.
17. Wade, L.A. and Katzman, R.: Synthetic amino acids and the nature of L-dopa transport at the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* **25**, 837-842, 1975.
  18. Riggs, T.R. and McKirahan, K.J.: Action of insulin on transport of L-alanine into rat diaphragm in vitro. *J. Biol. Chem.* **248**, 6450-6455, 1973.
  19. Pardridge, W.M. : Kinetics of competitive inhibition of neutral amino acid transport across the blood brain barrier. *J. Neurochem.* **28**, 103-108, 1977.
  20. MacKenzie, R.G. and Trulson, M.E.: Does insulin act directly on the brain to increase tryptophan levels. *J. Neurochem.* **30**, 1205-1208, 1978.
  21. Morgenroth III, V.H., Boadle-Biber, M.C. and Roth, R.H.: Dopaminergic neurons; activation of tyrosine hydroxylase by a calcium chelator. *Mol. Pharmacol.* **12**, 41-48, 1976.
  22. Manganiello, V. and Vaughan, M: An effect of insulin on cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase activity in fat cells. *J. Biol. Chem.* **248**, 7164-7170. 1973.
  23. Kuczenski, R.: Rat brain tyrosine hydroxylase — activation by limited tryptic proteolysis. *J. Biol. Chem.* **248**, 2261-2265, 1973.
  24. Kenney, F.T. and Flora, R.M. : Induction of tyrosine- $\alpha$ -ketoglutarate transaminase in rat liver. I. Hormon nature. *J. Biol. Chem.* **236**, 2699-2702, 1961.
  25. Sundaresan, P.R. and Coursin, D.B.: Microassay of pyridoxal phosphate using L-tyrosine- $^{14}$ C and tyrosine apodecarboxylase. *Methods in Enzymology* **18 A**, 509-512, 1970.

**Effects of insulin on the metabolism  
of catecholamines, tyrosine hydroxylase and tyrosine decarboxylation  
in rat brain**

**Kimiaki MIYOSHI**

Institute for Neurobiology, Okayama University Medical School

(Director : Prof. M. Kohsaka)

Wistar strain albino male rats (100g — 150g) were injected intramuscularly with insulin (0.1 IU per 100g body weight). Quantitative analysis of phenylalanine and tyrosine in plasma and the brain cortex, and of catecholamines and tyramine in plasma and whole brain was performed. The activity of tyrosine hydroxylase in brain striata and the adrenal glands, and the activities of tyrosine decarboxylase and aromatic amino acid decarboxylase in both the whole brain (except cerebellum) and the liver were also studied.

The quantitative analysis of plasma phenylalanine was performed using the method of McCaman and Robins. Tyrosine was analysed by the method of Waalkes and Udenfriend. Tyrosine hydroxylase activity was measured by the method of Coyle, and aromatic amino acid decarboxylase activity by the method of Christenson. Catecholamines were quantitated by the method of Kawai. All activities (Results 1 — 4) were determined 60 minutes after the insulin injection, the time by which hypoglycemia had definitely developed.

The results were as follows;

1. Blood glucose decreased to 47.3% sixty minutes after the insulin injection. Phenylalanine in plasma and in the brain decreased significantly but tyrosine levels did not show any change.
2. In the blood, dopamine and norepinephrine decreased significantly whereas epinephrine and tyramine increased significantly. In whole brain (except cerebellum), dopamine and norepinephrine decreased significantly, tyramine increased significantly, but epinephrine increased only slightly.
3. Tyrosine hydroxylase activities in striata and in the adrenal glands increased significantly.
4. Tyrosine decarboxylation in diencephalon combined with striata and in the liver was also high.
5. Tyrosine hydroxylase activity in whole brain (except cerebellum) was high 60 minutes to 90 minutes after the insulin injection. Tyrosine hydroxylase activity in the adrenal glands was high 30 minutes to 90 minutes after the insulin injection.
6. Tyrosine decarboxylation in the whole brain (except cerebellum) and in the liver was significantly high 30 minutes to 60 minutes after the insulin injection. When L-DOPA was used as the substrate, the activity of aromatic amino acid decarboxylase in the brain increased 90 minutes after the insulin injection. The activity of this enzyme in the liver, however, was not different from that of in the liver of the control rats.

These results suggest that insulin causes an increase in the activity of tyrosine hydroxylase and an increase in the production of catecholamines. It also accelerates the metabolic pathway from tyrosine to tyramine by increasing the activity of tyrosine decarboxylase.