フェニルアラニン過剰投与がフェニルアラニン代謝 に及ぼす影響について (第5報)

フェニルアラニン過剰投与シロネズミにおける ^{14}C -フェニルアラニン
体内酸化と分布について

小 畠 義 樹

国立栄養研究所食品科学部

Effects of Ingestion of Excess Amounts of Phenylalanine on Phenylalanine Metabolism

Distribution and Oxidation of ^{14}C -Phenylalanine in Rats Fed
the Excess Phenylalanine Diet

Yoshiki Kobatake

Division of Food Science, the National Institute of Nutrition

This experiment was designed to study the distribution and metabolism of phenylalanine (Phe) pool in rats fed the diet contained an excess of Phe by using radioactive tracers such as L-Phe- ^{14}C and L-tyrosine (Tyr)- ^{14}C

- 1) When the excess Phe diet caused a rise in Phe-pool in rats, Phe- ^{14}C was rapidly oxidized to $^{14}\text{CO}_2$ in the expired air, and L-Phe- ^{14}C incorporation into the organ tissue protein was lowered. In addition, ^{14}C -radio-activities in urine increased in the groups ingested excess Phe.
- 2) In rats fed excess Tyr-diet, the expired $^{14}\text{CO}_2$ from L-Tyr- ^{14}C also increased. Thus, it is suggested that Tyr metabolism was accelerated when Tyr pool was maintained a high level by the excess Phe-pool.
- 3) When Phe pool was adjusted to the same level as that of control group even after rats were received the excess Phe or Tyr in diets for 3 weeks, the injected L-Phe- ^{14}C was significantly oxidized to $^{14}\text{CO}_2$ in the expired air, these effects were marked in rats fed the excess Tyr in diet. It may be concluded that enzymes in Tyr metabolic pathway were easily adapted to remove excess Tyr pool.
- 4) When chlorophenylalanine was administered to experimental rats received excess Phe and control rats, the rates of oxidation in both groups were as half as those of groups of non-chlorophenylalanine for five hours after administration.
- 5) ^{14}C -radio-activity in urine of rats injected DL-Phe-2- ^{14}C was higher than that of rats injected L-Phe- ^{14}C .

Jap. J. Nutr., 36 (4) 165~174 (1978)

フェニルアラニン (Phe) の過剰投与が生体に与える影響に関しては従来多くの研究がなされており、特に過剰 Phe の生体に対する毒性と実験的 phenylketonuria との関係において、尿中や血中の Phe およびその代謝物の動向が多く検討されている^{1~10)}。著者も Phe 過剰投与の条件におけるその代謝経路の酵素活性や他のアミノ酸プールとの関係について検討を行ってきた^{11~14)}。

また、Phe 過剰の生体に及ぼす作用をみるためには種々の飼料条件下での生体内での Phe プールの移動や分布について検討が必要であり、これと同時に Phe 代謝経路の酵素活性との関連について考察も必要である

と考えられる。この点について Godin¹⁵⁾ は DL-Phe-¹⁴C を用いて、L-Phe 過剰シロネズミの Phe 代謝を調べ、L-Phe 過剰により、Phe-¹⁴C の代謝が促進されることをみている。Grüner ら¹⁶⁾ は phenylketonuria 患者に Phe-¹⁴C を投与し、体内たん白合成速度などについての検討を行なった結果、正常人との差のないことを認めている。その他シロネズミを用いた Phe 過剰における Phe プールについての検討は若干みられている¹⁷⁾¹⁸⁾。

この実験では過剰 Phe プールの体内分布と移動や代謝の検討を行なうために、L-Phe を過剰投与したシロネズミの L-Phe-¹⁴C の体内での動きを中心に検討した。

実 験 方 法

1. 実験動物および飼料組成

実験動物は Wistar 系、雄のシロネズミで3週齢のものを日本ラット(株)から購入し、一週間固型飼料(日本クレア CE-2)で飼育した後、体重変化の大きいものを除き、実験に供した。体重 60~80 g の範囲のシロネズミを1群5~6匹とし、1匹ずつ個別に金網カゴに入れ、室温 22°C、湿度50%前後に調節し、12時間サイクル(明7:00 a.m.~7:00 p.m.)の明暗を蛍光灯で行なった室内で飼育した。

実験飼料は Table 1 に示すような基礎飼料に L-Phe または実験条件に応じて L-tyrosine (L-Tyr) を5%の割合で α -でんぷんと入れ替えて添加して調製したが、対照群の飼料としては基礎飼料をそのまま用いた。飼料投与期間はすべての実験を通じて3週間とし、飼育期間中体重と飼料摂取量を測定した。

2. 放射性アミノ酸投与による試験法

下記のような4種類の実験にいずれも放射性アミノ酸 (L-phenylalanine-U-¹⁴C, L-tyrosine-U-¹⁴C, または DL-phenylalanine-2-¹⁴C) を用いた。これら

は各々の実験に応じた条件で飼料が投与されたシロネズミに、腹腔内注射により体重 100 g 当り 1 μ Ci の割合で投与し、直ちにガラス製メタボリックケージに入れ、呼気中 CO₂ をモノエタノールアミンとメチルセロソルブ混液に吸収させる方法により捕集した。同時に尿も採取した。これらに含まれている ¹⁴C-放射活性は液体シンチレーション測定機により測定した。

¹⁴C-アミノ酸投与後の ¹⁴C-放射活性の体内分布測定においては各組織 0.5 g に 4.5 ml TCA (5.6%) を加えホモジナイズし、その上清区分を TCA 可溶区分とした。さらに2回 TCA で洗滌後、熱 TCA (90°C, 5%) の沈澱区分をたん白質区分として、ハイアミンに溶解した。これにトルエンシンチレーターを加えた。上清区分には Bray のシンチレーター²⁴⁾を加えた。これらについて液体シンチレーション測定機により DPM を測定した。また各組織のホモジネート中の全放射活性についても測定を行なった。carcass の総 DPM は脚部の筋肉の一部を取り、その DPM と carcass の重量の積から求めることも試みたが、正確を期するため、全 carcass (内臓と毛皮を除去したもの) に3倍量の 6N-HCl を加えて、オートクレーブ中で 120°C, 10時間加熱分解後、十分攪拌してその一部の DPM を測定した。前者の方法と比較して差は非常に少なかった。肝、腎、小腸、

Table 1 Composition of basal diet

Casein	15%
Salt mixture*	4
Vitamin mixture* (containing 15% choline chloride)	1
Cellulose flour	2
Soybean oil (containing 20% cod liver oil)	5
Sucrose	15
α -Corn starch to total	100

* This is identical with A. E. Harper's mixture. [*J. Nutrition*, 68, 405 (1959)]

脾以外の臓器や毛皮などの組織はすべて加え合わせて3倍量の6N-HClで加熱分解し、一部を取りDPMを測定した。

組織たん白質中の ^{14}C -Phe, ^{14}C -Tyrの測定はたん白質を6N-HClで 105°C , 20時間加水分解した後, エバポレーターで乾固してHClをできるだけ除去し, 一定量とした。そのサンプルをペーパークロマトグラフィー(展開溶媒 n-butanol)により分離し, 各区分を液体シンチレーション測定機で測定した。

3. 各実験方法について

実験1: 15%カゼイン飼料投与の対照群と15%カゼイン+15% L-Phe 飼料群をいずれも3週間飼育し, 飼育最後の日に一夜(16時間)空腹にさせ, 翌朝各群に投与していた飼料を5 g/100 g body weightの割合で2.5時間以内に摂取させた。その後 L-Phe- ^{14}C を腹腔内注射し, メタボリックケージに入れ, 呼気 CO_2 と尿を捕集した。この場合2時間までの呼気 CO_2 を捕集した。2時間経過直後, シロネズミから肝, 腎, 小腸, 脾をすばやく取り出し, 凍結した。また頭部を除く他の臓器は放射活性測定のため塩酸処理をした。体躯は毛皮, 脂肪組織をできるだけ除いて carcass の部分とした。

実験2: シロネズミは実験1と同様に15%カゼイン飼料群と15%カゼイン+5% Phe 飼料群を3週間飼育した後, 一夜空腹にして, これらのシロネズミの体内遊離 Phe プールをできるだけ等しくするために, 各群のシロネズミにいずれも15%カゼイン飼料を5 g/100 g body weightの割合で2.5時間以内に摂取させた。これらのシロネズミに L-Phe- ^{14}C を腹腔内注射し, Godfrey 法²⁰⁾で呼気 CO_2 を1.75時間捕集した。2時間後, 各臓器と carcass の放射活性を測定した。

実験3: 対照群には15%カゼイン飼料を投与し, 他の2種の実験群には15%カゼイン+5% L-Phe 飼料, 15%カゼイン+5% L-Tyr飼料をそれぞれ投与した。この3群のシロネズミは3週間飼育した後, 最終日に一夜(16時間)空腹にして, 2.5時間それぞれの群の飼料を摂取させた後, L-Phe- ^{14}C を腹腔内注射し, 2, 5, 22時間の各時間までの呼気 CO_2 と22時間までの尿を捕集し, その中の ^{14}C -活性を測定した。

実験4: 7群の実験群のシロネズミに Table 8 に示すように各群にそれぞれ飼料を与えた。3週間飼育した後, 実験2と似た条件, すなわち飼育最終日一夜(16時間)空腹にして, 翌朝すべての群に15%カゼイン飼料を5 g/100 g body weightの割合で2.5時間以内に摂取させた後, L-Phe- ^{14}C , またはそれと同時にDL-chlorophenylalanine 300 mgを腹腔内注射, また他の群には DL-Phe-2- ^{14}C を腹腔内注射した。これらの群はいずれも, 5, 10, 22時間の各時間までの呼気 CO_2 と22時間までの尿を捕集し, ^{14}C 活性の測定を行った。

実験結果ならびに考察

実験1: 飼育3週間後のシロネズミの体重増加量と各臓器の重量は Table 2 に示した。Phe 過剰シロネズミの体重増加量は対照に比べて非常に少なく, 体重も1/2以下になっており, 各臓器重量でも低下していた。

このような条件のシロネズミに ^{14}C -Pheを注射2時間後, ^{14}C -活性の体外への排泄と体内分布を調べた結果が Table 3 である。

Phe 過剰投与群のシロネズミでは呼気 CO_2 への排泄は2時間後に投与 ^{14}C -活性の35%に達しており, 対照群に比較して4~5倍になっていた。それに対して, 肝などの組織での分布は対照に比べて, むしろ少ないかまたはほぼ等しくなっていた。特に, 皮膚, 肺, 胃などの混合ホモジネート中の分布は対照に比べてPhe 過剰群で著しく少なくなっていた。

Table 2 Weight gain, body weight and organ weight of rats fed casein or casein plus L-phenylalanine diet (1st Experiment)

Diet	Weight gain (g/3weeks)	Body weight at killing (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Small intestine (g)	Spleen (g)	Carcass (g)
15% Casein diet	138.2±6.1*	220.5±4.4	7.70±0.20	1.92±0.07	7.20±0.39	0.55±0.07	97.8±2.8
15% Casein +5% L-Phe diet	34.4±4.6	112.8±12.1	4.84±0.62	1.58±0.08	6.36±0.27	0.31±0.05	50.0±6.0
	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	NS	NS	P < 0.05	P < 0.01

* Standard error of mean (n=4).

Table 3 Distribution of ¹⁴C-radioactivity in rats 2 hours after injection of L-phenylalanine-U-¹⁴C (1st Experiment)

	15% Casein diet (%)	15% Casein+5% Phe diet (%)	
CO ₂ expired	7.78±0.84*	35.58±4.81	P < 0.01
Liver	13.72±0.40	10.07±1.37	P < 0.05
{ Acid soluble	1.24±0.14	3.57±0.14	} P < 0.01
{ Protein	10.09±0.43	4.13±0.35	
Kidney	1.99±0.28	1.93±0.64	NS
{ Acid soluble	0.22±0.02	0.54±0.10	} P < 0.05
{ Protein	1.78±0.22	0.87±0.23	
Small intestine	9.59±1.57	7.54±1.65	NS
{ Acid soluble	0.66±0.04	1.60±0.74	NS
{ Protein	7.83±1.03	4.48±0.55	P < 0.05
Spleen	0.51±0.10	0.36±0.05	} NS
{ Acid soluble	0.04±0.00	0.07±0.02	
{ Protein	0.31±0.05	0.17±0.03	
Carcass (eviscerated)	20.06±3.03	21.55±3.19	NS
{ Acid soluble	2.77±0.21	11.16±3.19	P < 0.05
{ Protein	11.44±0.82	4.85±1.36	P < 0.01
Other tissues (Skin, Lung, Stomach, Heart, Brain, etc.)	45.05±6.38	19.00±2.26	P < 0.01
Urine**	2.54	5.18	
Total	101.24	101.21	

* Standard error of mean (n=4).

** Urine was pooled from 4 rats.

一方、肝などの組織中の TCA 可溶区分とたん白質区分の ¹⁴C-活性の分布をみると、Phe 過剰群では対照と比較して、TCA 可溶区分は高く、たん白質区分には低くなっていた。特に肝、小腸、carcass の部分では明らかにこのような現象が認められた。

Phe 過剰で呼吸中 CO₂ に排泄が多くなっているのは過剰投与の結果、体内に存在する Phe を速く酸化分解するような代謝が行なわれているためと考えられる。著者が前報¹³⁾で報告した Phe 過剰投与シロネズミの肝

と血清中の遊離 Phe 濃度の測定結果から Phe 過剰シロネズミは対照に比べ単位重量当り肝では2倍、血清では10倍もの高濃度になっていることを確かめたが、Table 3 の肝と carcass の酸可溶性区分の ^{14}C -活性の回収率をみると、肝と carcass の区分に Phe 過剰投与において増加が著しく、過剰 Phe は速い速度で肝と carcass へ遊離の形で蓄積されることを示している。Phe 過剰で呼気中へ多量の ^{14}C が回収されることについては Godin²⁵⁾ のデータと似ているが、彼は DL-Phe-2- ^{14}C のような DL-型を用いており、L-Phe-U- ^{14}C を使用した著者の実験では D-型の Phe 混在がないため、実験結果の考察が単純化できると考えられる。

Phe 過剰投与のシロネズミの成長は低下が起こっており、体たん白質合成の阻害が推定される。この結果は呼気 $^{14}\text{CO}_2$ の増加と carcass たん白質への取込みの割合の低下として現われている。しかし、これらの ^{14}C -活性の移行の割合はその時点における体内遊離 Phe による ^{14}C -Phe の稀釈の割合とも関係している。それ故、ここに示すようなたん白質への ^{14}C の取込みの差が単純にたん白合成速度の差となっているわけではなく、本来は各区分の比活性の測定から検討されるべきであると考ええる。この実験では体内 Phe プールの分布を示すことに重点をおいた。

実験2：Phe 過剰投与群、対照群のシロネズミの体内 Phe プールの濃度をできるだけ等しくした条件で ^{14}C -Phe 由来の ^{14}C -活性の体内での分布を検討することを目的とした。3週間実験飼料で飼育したシロネズミの体重増加量、臓器重量は Table 4 に示した。実験1の結果と同様に体重増加量、carcass、肝などの重量は Phe

Table 4 Weight gain, body weight and organ weight of rats fed casein or casein plus phenylalanine diet (2nd Experiment)

Diet	Weight gain (g/3weeks)	Body weight at killing (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Small intestine (g)	Spleen (g)	Carcass (g)
15% Casein diet	74.8±5.3*	195.8±14.6	7.47±0.56	1.79±0.11	6.98±0.24	0.46±0.04	95.0±1.6
15% Casein +5% Phe diet	28.5±10.5	122.5±12.5	5.52±0.52	1.42±0.10	5.48±0.37	0.28±0.03	61.5±4.3
	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.05	NS	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.01

* Standard error of mean (n=4).

過剰群では対照群より低下していた。また Fig. 1 (a) にこれらのシロネズミの ^{14}C -Phe の体内酸化による呼気中への $^{14}\text{CO}_2$ の排泄量の経時的变化を示した。 ^{14}C -Phe から呼気 $^{14}\text{CO}_2$ として排泄される ^{14}C -活性の割合は Phe を過剰に摂取した群の方が経時的な測定により多くなる傾向を得た。次に ^{14}C -Tyr をこれと同一の条件のシロネズミに注射して、呼気中 CO_2 の排泄の割合を調べた結果は Fig. 1 (b) に示すように、 ^{14}C -Phe 注射の場合と比較して、Phe 過剰群と対照群との差は小さくなっていたが、Phe 過剰群で $^{14}\text{CO}_2$ への ^{14}C -活性の回収率が多くなる傾向が認められたので、Tyr 代謝もこの条件で促進されることが推定された。また ^{14}C -Tyr からの $^{14}\text{CO}_2$ の方が ^{14}C -Phe の場合より4倍速く排泄されていた。この点については Dalglish ら²²⁾ によっても似たような比較をしている。この結果から、彼らは Phe の酸化の律速段階は phenylalanine hydroxylase であると推定しているが、Phe は Tyr 経路のみを通して酸化されるわけではなく、phenylpyruvate や phenylethylamine 経路を通ると考えられる。また Phe は Tyr に移行した場合 Tyr プールで再び稀釈されることを考慮に入ると、この単純な推定は困難であると考えられる。

また同時に、 ^{14}C -Phe を注射したシロネズミの体内 ^{14}C -活性の分布についても調べた。Table 5 に示すように、各臓器の ^{14}C -分布は Phe 過剰群と対照群の間にほとんど差がみられなかった。また TCA 可溶性区分と

Fig. 1 Recovery of radioactivity in CO₂ of rats injected the radioactive phenylalanine or tyrosine. Rats were fed 15% casein diet or 15% casein+5% Phe diet for 3 weeks. After fasting for 16 hours, rats in both groups were fed 15% casein diet for 2.5 hours, and then CO₂ and urine from each rat were collected in glass metabolic cage for 105 minutes.

a : L-phenylalanine-U-¹⁴C injection.

b : L-tyrosine-U-¹⁴C injection.

Each perpendicular indicate standard error of mean (n=4). (2nd Experiment)

Table 5 Distribution of ¹⁴C-Radioactivity in rats injected with L-Phenylalanine-U-¹⁴C (2nd Experiment)

	15% Casein diet (%)	15% Casein+5% Phe diet (%)	
CO ₂ expired*	3.43±0.39**	5.06±0.46	P < 0.05
Liver	8.83±0.82	11.49±1.27	} NS
{ Acid soluble	2.55±0.22	3.48±0.65	
{ Protein	5.22±0.96	6.12±0.50	
Kidney	1.67±0.11	1.86±0.12	} NS
{ Acid soluble	0.51±0.03	0.51±0.03	
{ Protein	1.01±0.08	1.06±0.08	
Small intestine	5.32±0.63	5.91±0.23	} NS
{ Acid soluble	1.14±0.09	1.15±0.07	
{ Protein	3.43±0.54	3.77±0.26	
Spleen	0.29±0.04	0.25±0.04	} NS
{ Acid soluble	0.05±0.01	0.04±0.01	
{ Protein	0.19±0.01	0.19±0.01	
Carcass	14.01±1.38	15.00±0.70	} NS
{ Acid soluble	3.90±0.53	3.34±0.27	
{ Protein	8.44±0.78	6.12±0.75	

* The respiratory CO₂ was collected for 105 min.

**Standard error of mean (n=4).

Rats were adapted to 15% casein diet or 15% casein+5% Phe diet for 3 weeks. At last feeding, food was removed from the cages for 16 hours and then all rats were fed 15% casein diet (5g/100g body weight) for 2.5 hours before rats were injected with ¹⁴C-Phe. These animal were sacrificed after 2 hour collecting of urine and 1.75 hour collecting of CO₂.

たん白質区分に差がみられなくなっていた。この結果はあらかじめ3週間摂取の飼料に対する適応期間があっても、 ^{14}C -Phe 注射直前に摂取した飼料による影響が強いことを意味していた。しかし、Fig. 1 (a) にも示すように、呼気中への ^{14}C -活性排泄は各時点で統計的に差が明確ではなかったが (105分後のみ $P < 0.05$)、経時的にみて、一定の傾向を示しているので、Phe と過剰シロネズミでは対照に比べて呼気 CO_2 への ^{14}C -活性排泄には差があることが推定された。

Phe 過剰の影響が体たん白質中の ^{14}C -Phe と ^{14}C -Tyr の比にどのように現われるか調べるために、Phe 過剰群と対照群のシロネズミの各組織たん白質中の ^{14}C -Phe, ^{14}C -Tyr の ^{14}C -活性区分のペーパークロマトグラフィー (展開溶媒 n-butanol) で分離測定し、その比率を求めた。結果は Table 6 に示したが、Phe 過剰

Table 6 Distribution of Phe- ^{14}C and Tyr- ^{14}C in various organ protein* (2nd Experiment)

	Liver		Kidney		Small intestine		Muscle		Serum	
	Casein**	+Phe**	Casein	+Phe	Casein	+Phe	Casein	+Phe	Casein	+Phe
(Phe- ^{14}C /total- ^{14}C) $\times 100$	60	57	61	53	62	73	44	36	66	63
(Tyr- ^{14}C /total- ^{14}C) $\times 100$	14	13	6	9	10	7	16	13	5	6
(Tyr- ^{14}C /Phe- ^{14}C) $\times 100$	24	23	9	16	17	10	38	32	7	2

* Each sample was pooled from four rats. Tissue protien was hydrolysed with 6N-HCl, and phenylalanine was separated from tyrosine by paper chromatography.

** Casein : 15% casein diet, +Phe : 15% casein+5% Phe diet.

Table 7 Recovery of radioactivity in CO_2 and urine of rats injected with L-Phenylalanine-U- ^{14}C (3rd Experiment)

Diet	Weight gain (g/3 weeks)	Body weight at killing (g)	Recovery in CO_2			Recovery in urine
			2 hr. (%)	5 hr. (%)	22 hr. (%)	22 hr. (%)
15% Casein diet	115.0 $\pm$ 7.2 ^a	200.4 $\pm$ 9.9	4.57 $\pm$ 1.12	7.63 $\pm$ 1.50	15.61 $\pm$ 0.65 ^a	4.75 $\pm$ 0.68 ^a
15% Casein +5% L-Phe diet	16.8 $\pm$ 7.8 ^b	91.8 $\pm$ 6.2	29.89 $\pm$ 1.32	52.08 $\pm$ 0.62	67.56 $\pm$ 1.80 ^b	6.83 $\pm$ 1.06 ^a
15% Casein +5% L-Tyr diet	60.0 $\pm$ 16.7 ^c	140.8 $\pm$ 17.1	6.44 $\pm$ 1.34	12.49 $\pm$ 1.36	24.14 $\pm$ 1.54 ^c	7.92 $\pm$ 0.13 ^b

* Standard error of mean (n=4).

Values in the same column not followed by the same letter are significantly different ($p < 0.01$).

の影響はみられなかった。むしろ各組織間の差の方が大きく現われていた。例えば、肝と筋肉のたん白質では ^{14}C -Tyr 対 ^{14}C -Phe の比が他の組織たん白質に比べて大きくなっており、またたん白質中に取込まれている ^{14}C -Phe 由来の ^{14}C -活性の50~60%が ^{14}C -Phe に、5~15%が ^{14}C -Tyr に、残りが他のアミノ酸等に変換して取込まれていることが判明した。

実験3 : 15%カゼイン飼料および、それに 5% L-Phe または 5% L-Tyr を添加した飼料を投与した3群のシロネズミを一夜 (16時間) 空腹にした後、それぞれの群の飼料を2.5時間に 5g/100g body weight の割合で摂取させておいて、 ^{14}C -Phe の注射を行なった。その後22時間までの CO_2 と尿中 ^{14}C -活性を測定した結果を Table 7 に示した。3群のシロネズミの体重増加量の比較では、Phe 過剰群の次に Tyr 群が少なかった。

た。呼気 CO_2 の放射活性回収率は 2, 5, 22 時間の時点で測定したが, Phe 過剰では対照に比べて 5 時間目では 6 倍, 22 時間目では 4 倍以上に多くなっていた。しかし, 尿中への排泄の差は少なかった。一方 Tyr 過剰群では 5 時間の呼気 CO_2 への回収率は対照に比べると, 1.6 倍程度増加しており, 22 時間では 1.8 倍の増加を示していた。尿中への排泄は Tyr 過剰で明らかに増加がみられた。

Tyr 過剰においても ^{14}C -Phe 代謝が促進されることは, Fig. 1 (b) の Phe 過剰において ^{14}C -Tyr の代謝が促進されることと考え合わせて過剰 Phe プールは Tyr 経路を通じてかなり多く分解されていることが推定された。Tyr プールが大きい場合 ^{14}C -Tyr の体たん白質への合成の減少と Tyr 分解経路の活性化が考えられる。Alam ら²¹⁾ は Tyr 過剰投与の毒性の研究において Tyr 負荷において血中 Tyr 濃度の高い条件では tyrosine aminotransferase 活性が高まり, この活性は Tyr 濃度とかなり強い関係のあることをみている。

実験 4 : Phe 過剰の条件で Phe 代謝がいかに過剰 Phe プールを処理する方向に進んでいるか, 実験 1, 2, 3 において示したが, これに対する適応はある程度長期の飼育条件に反応する機構と, 一時的な体内環境変化に反応する機構の 2 つが生体に存在すると考えられる。この実験では前者の場合について検討するために, 実験 2 に用いたような方法, すなわち, Phe または Tyr 過剰投与を 3 週間続け, この条件で適応させた後, 体内 Phe, Tyr プールを対照群と等しくし, その時点での Phe, Tyr プールの影響をできるだけ等しくした上で, ^{14}C -Phe の代謝について調べる方法をとった。Phe, Tyr の体内プールについては前報¹³⁾において若干の検討を行なっている。15% カゼイン飼料に 5% L-Phe を添加した場合としない場合の feeding と fasting の条件における血清, 肝の遊離アミノ酸を測定した結果 feeding では Phe 添加群は Phe, Tyr の濃度の大きな上昇が起こっており, それらの fasting ではむしろ濃度が逆になることをみた。それ故これらの fasting の条件では必ずしもプールは両群の間で等しくなっていないと考えられたので, さらにそれら各群に 15% カゼイン飼料を投与することにより Phe, Tyr プールが互いに似たレベルに近づくことを仮定した。

Table 8 に示すように, (1)~(7) 群の飼料群を作り, 3 週間の飼育期間中の体重増加量を比較した。(1)~(5) 群の中で Phe 過剰群 (2), (5) は明らかに体重増加量は少なかった。Tyr 過剰群でも体重増加量の低下がみられた。

Table 9 に ^{14}C -Phe を腹腔内注射した後の呼気 CO_2 と尿中への活性の排泄を示した。(1)~(3) 群間の比較では対照群 (1) に比べて, Phe 過剰群の CO_2 への排泄増加は明らかであった。また Tyr 過剰でも CO_2 への排泄は増加していた。これらの場合,

Table 8 Weight gain and body weight of rats in the fourth experiment (4th Experiment)

Diet	Rat No.	Weight gain (g/3 weeks)
(1) 15% Casein diet	5	83.4 $\pm$ 6.6 ^{*a}
(2) 15% Casein+5% L-Phe diet	5	34.8 $\pm$ 7.7 ^b
(3) 15% Casein+5% L-Tyr diet	5	49.0 $\pm$ 10.1 ^b
(4) 15% Casein diet	4	111.2 $\pm$ 8.8 ^c
(5) 15% Casein+5% L-Phe diet	5	37.4 $\pm$ 7.8 ^b
(6) 15% Casein diet	2	97.0 $\pm$ 1.2 ^a
(7) 15% Casein+5% L-Phe diet	3	39.7 $\pm$ 14.1 ^b

* Standard error of mean.

尿中への排泄には差はみられなかった。(4)~(5) 群間では DL-chlorophenylalanine²³⁾ をあらかじめ投与して, phenylalanine hydroxylase (Phe H) 活性を低下させた条件において, L-Phe- ^{14}C の代謝を調べたが, 対照群 (4) に比べて Phe 過剰群 (5) は呼気 CO_2 中 ^{14}C -活性には差がみられなくなった。しかし,

Phe 過剰でやや $^{14}\text{CO}_2$ の排泄が増加する傾向がみられたが、この現象は恐らく Phe H 活性低下に伴ない Tyr 経路へ Phe がほとんど流れなくなる結果、それ以外の Phe 代謝経路が Phe 過剰に適応して分解を促進する傾向があったものと考えられる。これから推定すると Tyr 経路の Phe 過剰に対する適応がかなり強かったものと考えられる。chlorophenyl-alanine を投与していない他の群と比較するとき、呼気中 CO_2 の ^{14}C -活性は明らかに低下していた。例えば(1), (2)群と比べ5時間と10時間目において、1/3~1/2近くの低下がみられ、Tyr 経路への Phe プールの流れが大きいたことが推定される。また、L-Phe- ^{14}C の代りに DL-Phe-2- ^{14}C を注射した場合、対照群(6)と Phe 過剰群(7)の比較では(6)群と(7)群の間で呼気 CO_2 中 ^{14}C -活性の排泄の差は認められなかった。この場合、尿中への ^{14}C -活性の排泄は L-Phe- ^{14}C 注射の時と比べて約2倍に増加していた。この原因としては、DL-Phe-2- ^{14}C 使用の場合は D-Phe から生産される phenylpyruvate 経路の代謝物の排泄が増加するためではないかと考えられる。

要 約

Phe 過剰投与のシロネズミの体内 Phe プールの分布と代謝について調べるため、放射性 Phe と Tyr を用いた実験により検討を行なった。

1) 体分の Phe プールが大きいたとき、注射した L-Phe- ^{14}C の酸化が促進され、呼気 $^{14}\text{CO}_2$ の増加がみられた。また各臓器の組織たん白質への ^{14}C -Phe の

Table 9 Recovery of radioactivity in CO_2 and urine of rats injected with radioactive phenylalanine (4th Experiment)

Group	Rat No.	Injection	Recovered in CO_2 , hours (%)			Recovered in urine, 22 hrs. (%)
			5	10	22	
(1) 15% Casein	5	L-Phe- ^{14}C	9.26 $\pm$ 1.89 ^{a,b,c}	12.31 $\pm$ 1.11 ^a	15.19 $\pm$ 0.97 ^a	4.03 $\pm$ 0.84 ^a
(2) 15% Casein + 5% L-Phe	5	L-Phe- ^{14}C	10.70 $\pm$ 0.93 ^{a,b}	13.98 $\pm$ 0.91 ^{a,b}	18.06 $\pm$ 0.80 ^b	3.32 $\pm$ 0.25 ^a
(3) 15% Casein + 5% L-Tyr	5	L-Phe- ^{14}C	14.20 $\pm$ 1.31 ^{a,b}	17.54 $\pm$ 1.12 ^b	20.78 $\pm$ 1.12 ^b	3.40 $\pm$ 0.25 ^a
(4) 15% Casein	4	L-Phe- ^{14}C DL-chloro-Phe**	5.56 $\pm$ 1.32 ^{a,c}	8.26 $\pm$ 2.84 ^a	12.52 $\pm$ 0.80 ^a	6.45 $\pm$ 1.60 ^{a,b}
(5) 15% Casein + 5% L-Phe	5	L-Phe- ^{14}C DL-chloro-Phe**	5.50 $\pm$ 0.79 ^{a,c}	8.76 $\pm$ 0.97 ^a	13.46 $\pm$ 1.18 ^a	4.54 $\pm$ 0.51 ^a
(6) 15% Casein	2	DL-Phe-2- ^{14}C	12.36 $\pm$ 0.21 ^{a,b}		19.05 $\pm$ 0.22 ^b	8.05 $\pm$ 1.16 ^b
(7) 15% Casein + 5% L-Phe	3	DL-Phe-2- ^{14}C	11.14 $\pm$ 1.14 ^{a,b}		18.56 $\pm$ 1.40 ^{a,b}	8.28 $\pm$ 0.28 ^b

* Standard error of mean.

Values in the same column not followed by the same letter are significantly different ($p < 0.05$).

** Rats were intraperitoneally injected 300 mg of p-chlorophenylalanine per kg of body weight and then were given a second dose of 100 mg/kg 24 hours later.

取込みの割合が低下していた。尿中への ^{14}C -活性の排泄もやや増加の傾向がみられた。

2) Tyr 過剰投与においても Phe 由来の $^{14}\text{CO}_2$ の排泄が増加した。一方 Phe 過剰の条件で ^{14}C -Tyr 由来の $^{14}\text{CO}_2$ の排泄も増加していたので、Phe 過剰により Tyr プール増加が起こり、その代謝が促進されたものと推定した。

3) 3週間 Phe または Tyr の過剰投与後、シロネズミの体内 Phe プールをできるだけ等しくした条件でも、注射した L-Phe-U- ^{14}C は呼気 $^{14}\text{CO}_2$ に酸化が促進されていた。特に Tyr 過剰でこの傾向が強かった。これは Tyr プールの処理に対して Tyr 代謝経路の酵素活性の適応が大きいものと推定した。

4) chlorophenylalanine 投与により ^{14}C -Phe 酸化は Phe 過剰、対照シロネズミともに低下し、投与後5時間において $^{14}\text{CO}_2$ 排泄は対照の1/2程度であった。

5) DL-Phe-2- ^{14}C 注射では L-Phe-U- ^{14}C の場合と比較して、尿中への ^{14}C -活性排泄増加がみられた。

最後に本実験を行なうに際し、御指導を賜りました東京農業大学学長鈴木隆雄先生、同教授長谷川先生、国立栄養研究所部長田村盈之輔先生、同部長印南敏先生に深く感謝いたします。

文 献

- 1) G.R.Kerr, and H.A.Waisman : *J. Nutrition*, **92**, 10 (1967)
- 2) D.G.Boggs and H.A.Waisman : *Arch. Biochem. Biophys.*, **106**, 307 (1964)
- 3) G.R.Kerr and H.A.Waisman : *Science*, **151**, 824 (1966)
- 4) S.W.Hier : *J. Biol. Chem.*, **171**, 813 (1947)
- 5) V.H.Auerbuch, H.A.Waisman and L.B.Wychoff, Jr. : *Nature*, **182**, 871 (1958)
- 6) E.B.Goldstein : *J. Biol. Chem.*, **236**, 2656 (1961)
- 7) I.S.Huang, L.B.Tannebaum and D.Y.Hsia : *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.*, **106**, 533 (1961)
- 8) C.Eirks Ventring, R.A.Wapnir and M.C.Brande : *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.*, **127**, 121 (1968)
- 9) R.A.Freedland, M.C.Krakowski and H.A.Waisman : *Am. J. Physiol.*, **206**, 341 (1964)
- 10) D.B.McCormick, S.K.Young and M.N.Woods : *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.*, **118**, 131 (1965)
- 11) 小島義樹 : 栄養学雑誌, **31**, 12 (1973)
- 12) 小島義樹 : 栄養学雑誌, **31**, 57 (1973)
- 13) 小島義樹 : 栄養学雑誌, **32**, 239 (1974)
- 14) 小島義樹 : 栄養学雑誌, **34**, 145 (1976)
- 15) C.Godin and P.Dolan : *J. Nutrition*, **90**, 284 (1966)
- 16) H-D.Grumer, H.Koblet and C.Woodard : *J. Clin. Invest.*, **41**, 61 (1962)
- 17) M.J.Carrer : *J. Neurochem.*, **12**, 45 (1965)
- 18) J.V.Hugher and T.C.Johnson : *J. Neurochem.*, **26**, 1105 (1976)
- 19) H.Jeffay and J.Alvarez : *Anal. Biochem.*, **33**, 612 (1961)
- 20) P.Godfrey and F.Snyder : *Anal. Biochem.*, **4**, 310 (1962)
- 21) S.Q.Alam, Q.R.Rogers and A.E.Harper : *J. Nutrition*, **93**, 3, 7 (1967)
- 22) C.E.Dalgliesh and H.Tabechian : *Biochem. J.*, **62**, 625 (1956)
- 23) M.A.Lipton, R.G.Gordon, G.Guroff and S.Udenfriend : *Science*, **156**, 248 (1967)
- 24) G.A.Bray : *Anal. Biochem.*, **1**, 279 (1960)

(受付 : 昭和53年 7 月 28 日)