薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
111 (9) 546-550 (1991)

モルモット血清中の *o*- 及び *m*-Tyrosine 含量に及ぼす銅投与の影響

石光 進, 藤本貞毅,* 竹原 潤, 山本みやび, 小原 晃
京都薬科大学

The Effect of Copper on *o*- and *m*-Tyrosine Content in the Serum of Guinea Pigs

Susumu ISHIMITSU, Sadaki FUJIMOTO,* Jun TAKEHARA,
Miyabi YAMAMOTO, and Akira OHARA

Kyoto Pharmaceutical University, 5 Nakauchi-cho, Misasagi,
Yamashina-ku, Kyoto 607, Japan

(Received April 2, 1991)

The effect of copper on the concentrations of *o*- and *m*-tyrosines in the serum of guinea pigs was studied *in vivo*. When guinea pigs were fed the normal diet and 0.1% CuSO₄ solution as a drinking water for 13 d, the concentrations of *o*- and *m*-tyrosines in the serum increased more significantly than that of guinea pigs fed normal diet and water without copper. Phenylalanine hydroxylase in the liver and kidney, and tyrosine hydroxylase in the brain and adrenal were not activated by the administration of copper to guinea pigs. The administration of copper caused an abnormal accumulation of copper in the liver, but not in the kidney, adrenal and brain, and significantly depressed the ascorbic acid content in various organs including the liver, kidney, brain and adrenal. The results obtained suggest that *o*- and *m*-tyrosines may be also formed nonenzymatically *in vivo*, in addition to the formation by the participation of enzymes such as phenylalanine and tyrosine hydroxylases.

Keywords—guinea pig; *o*-tyrosine; *m*-tyrosine; ascorbic acid; copper

L-Phenylalanine は生体内の代謝により, 主として *p*-tyrosine を経由して生理的に重要な物質へと変化をうけることはよく知られた事実である. 最近, 我々はヒト¹⁾及びラット²⁾血清中に *p*-tyrosine 以外に微量成分として *m*- 及び *o*-tyrosine が存在することを認めた. また, それらの生体内での生成に phenylalanine hydroxylase 及び tyrosine hydroxylase が関与することを示唆する結果を報告した.^{2,3-5)} しかし, 未だ, 生体内での *o*- 及び *m*-tyrosine 生成機構に関する知見は乏しい.

Grooveld と Halliwell⁶⁾ は aspirine を服用している健常者の血漿や, 同薬服用のリウマトイド患者の膝関節滑液中に, salicylic acid の通常の酵素的代謝物と認められていない 2-3-dihydroxybenzoic acid を検出し, それが生体内で発生した水酸ラジカルによって salicylic acid が水酸化され, 非酵素的に生成されたものであるとしている. 一方, *in vitro* で銅 (II)-ascorbic acid (AsA) に代表される水酸ラジカル生成系により phenylalanine が水酸化され tyrosine の異性体が生成することが認められている.^{7,8)} したがって, 生体内の *o*- 及び *m*-tyrosine 生成において, 水酸ラジカルによる phenylalanine の非酵素的な水酸化反応の関与の可能性を検討することは興味あることである.

今回, 生体内での銅 (II)-AsA 系を意識して, 生体内に過剰量の銅を投与した時の血中の *o*- 及び *m*-tyrosine 含量の変動を調べた.

実 験 の 部

実験動物及び飼育 ハートレー系雄モルモット (体重 250 g 前後) を各群 5 匹ずつ, 下記のような 3 群に分け, 13 日間 22±2°C で飼育した. 13 日間の飼育後, エーテル麻酔し, 腹部下行大動脈より採血した. 肝臓その他の臓器はただちに摘出し, 試料調製に供した.

1) 対照群 (Control): 飼育用飼料は RC 4 (オリエンタル酵母社) を用いた. 本飼料は 100 g あたり, AsA 56.5 mg, 銅 1.1 mg をそれぞれ含む.

2) 銅添加群 (Copper Added): RC 4 を飼料とし, 銅は硫酸銅 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) を 1 g/l の濃度に希釈したものを飲料水として自由に与えた.

3) AsA 欠乏群 (AsA Free): RC 4 から AsA のみを除いたものを飼料とした.

Fig. 1 は上記条件下で飼育したモルモットの生長曲線を, 各群の体重増加の平均値をもって示したものである. 対照群では 1 日あたり 5—6 g の体重増加がみられ, 正常な成長を示した. また, 銅投与群では, 銅投与開始当初に一時的な体重減少が認められたものの, その後は正常な体重増加がみられ, また, 外観上も対照群のものとは比べて変化がみられなかった. 一方, AsA 欠乏群では壊血病症状を呈し, 体重増加の割合が明らかに減少した. なお, 上記 3 群のモルモットのうち, AsA 欠乏群のものについては 2 週間以上の飼育で壊血病症状が悪化し, 衰弱がはげしくなるため, 今回の実験には 13 日間の飼育期間を採用した.

Fig. 1. Effect of Dietary Levels of Copper and Ascorbic Acid on Body Weight of Guinea Pigs

Dietary conditions were as described in experimental section of the text. ○, control group; ●, copper added group; △, ascorbic acid free group.

血清中の Tyrosine 異性体及び Phenylalanine の測定 1) 試料: 採血した全血を室温 30 分間放置後 $1000 \times g$ (5 分間) 遠心分離し, 血清を得た. 得られた血清 1 ml に 0.25 ml の 1 M trichloroacetic acid を加えて除タンパク後 $10000 \times g$ (10 分間) 遠心分離を行い, 上清を $0.22 \mu\text{m}$ のフィルターに通した液 $100 \mu\text{l}$ を直接カラムに注入した.

2) 高速液体クロマトグラフィー: 蛍光検出器 (日立 650-10S 型) を接続した高速液体クロマトグラフ (日立 638-50 型) を使用した. 分離及び検出は, 既に報告した方法¹⁾に準じて行った. すなわち, C 18 逆相カラム (Cosmosil ODS, $250 \times 4.6 \text{ mm i.d.}$, 半井化学) を使用し, 溶離液として 1% NaCl を含む 1% acetic acid 溶液を用い, 0.8 ml/分 の流速で行った.

酵素活性の測定 肝臓, 腎臓及び脳はそれぞれ臓器重量の 4 倍量の 0.32 M sucrose を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.3) を, 又副腎には 20 倍量の同緩衝液を加え, ガラス-テフロンホモジナイザーを用いてホモジネートした. そのホモジネートを $12000 \times g$ (20 分間) 遠心分離して得られた上清を, 更に, $105000 \times g$ (60 分間) 遠心して, その上清を酵素液とした. Phenylalanine hydroxylase 及び tyrosine hydroxylase 活性は, それぞれ Bailey と Ayling,⁹⁾ 及び Nagatsu ら¹⁰⁾の方法に準じて行った. Phenylalanine hydroxylase 活性値は phenylalanine から *p*-tyrosine の生成量で, 又 tyrosine hydroxylase 活性値は *p*-tyrosine から 3,4-dihydroxyphenylalanine の生成量で示した.

その他 タンパクは色素法¹¹⁾で, AsA は dinitrophenyl hydrazine 法¹²⁾で測定した. 臓器中の銅は, 臓器を湿式灰化分解したのち原子吸光分析器 (島津 AA-640 型) を用いて行った. 血清及び尿中の銅は bathocuproine 法¹³⁾で測定した.

結 果 と 考 察

血清中の Tyrosine 異性体及び Phenylalanine 含量に及ぼす銅投与の影響

Fig. 1 で示した条件下で, 13 日間飼育したモルモットについて, その血清の tyrosine 異性体及び phenylalanine 含量を測定した. Fig. 2 に血清サンプル及び標準品について得られた代表的なクロマトグラムを示す. 対照群に比べて銅投与群では, *m*-及び *o*-tyrosine に相当するピークが明らかに大きくなっており, 銅投与により血清中 *o*-及び *m*-tyrosine 含量が高くなっていることを示している. 測定結果を Table I に示す. *o*-及び *m*-tyrosine 含量は, 対照群においてそれぞれ 2.18 ± 0.58 及び $1.36 \pm 0.46 \text{ ng/ml}$ 血清と, 対照群に比べて, 約 5 ないし 8 倍高濃度であった. なお, *p*-tyrosine 含量には変化がみられず, phenylalanine はわずかながら増加し

ていた。一方, AsA 欠乏群においては, 上記いずれのアミノ酸においても血中濃度に有意の変化が認められなかった。

肝及び腎臓中の Phenylalanine Hydroxylase 並びに副腎及び脳中の Tyrosine Hydroxylase 活性に及ぼす銅投与の影響

o-及び *m*-tyrosine の生体内における生成量に対して, phenylalanine hydroxylase 及び tyrosine hydroxylase 活性が影響を及ぼすことを認めている。^{2,3)}そこで, 銅投与による血中 *o*-及び *m*-tyrosine 含量の増加が, 上記酵素活性の変動に起因するの可否を知るために臓器中の酵素活性を調べた。結果を Table II に示す。Phenylalanine hydroxylase 活性については, それを含有する肝と腎臓について測定したところ, 銅投与群では対照群に比べて肝臓の酵素で約 76%, 腎臓の酵素で約 85% の活性を示し, 若干の活性低下の起こっているのが認められた。Tyrosine hydroxylase については, それを含有する副腎及び脳について調べたところ, 銅投与群では対照群に比べて, 副腎の酵素で約 84%, 脳の酵素で約 75% と, これもまた若干の活性低下が認められた。これらの結果は, 銅投与による血中 *o*-及び *m*-tyrosine 含量の増加は上記酵素活性の上昇によるものではないことを示唆している。

各種臓器中の AsA 及び銅含量に及ぼす銅投与の影響

臓器中の銅含量を Fig. 3 に示した。銅投与群の場合, 対照群に比べて, 肝臓で約 6 倍高い濃度の銅が検出された。その他, 血清中で若干の増加が認められる以外, 腎臓, 脳及び副腎では銅含量の有意な増加は認められず, 主に, 肝臓に銅の蓄積が起こったことを示している。

Fig. 4 に臓器中の AsA 含量を示した。銅投与群では, 対照群に比べて, 肝臓, 脳, 副腎及び血清の AsA 含量は有意に低下していることが認められ, 銅投与による体内 AsA 量の有意な低下が引き起こされることを示唆している。なお, AsA 欠乏群においては, 当然のことながら, 各臓器の AsA 含量は低下しており, その程度は, 銅投与群の場合と同程度, もしくはそれ以上であった。

尿中への AsA 排泄量に及ぼす銅投与の影響

尿中への AsA 排泄量が銅の過剰投与により促進されたの否を知る目的で尿中 AsA 含量を測定した。すなわち, 対照群, 銅投与群について 13 日の飼育期間中, 1 日おきに計 6 回, 24 時間尿を集め, それぞれについ

Fig. 2. Chromatograms of *o*-, *m*-, and *p*-Tyrosines in Guinea Pig Serum

Preparation methods of serum samples, dietary conditions and chromatographic conditions were as described in experimental section of the text.

(A) The mixture of the synthetic tyrosines (1 ng each) as the reference compounds, (B) serum sample from control group, (C) serum sample from copper added group. Peaks: 1, *p*-tyrosine; 2, *m*-tyrosine; 3, *o*-tyrosine. The arrow indicates the elution position of phenylalanine.

TABLE I. Effect of Dietary Levels of Copper and Ascorbic Acid on the Concentrations of Tyrosine Isomers and Phenylalanine in Serum of Guinea Pigs

Diet ^{a)}	Amino acids content ^{b)}			
	<i>o</i> -Tyrosine (ng/ml)	<i>m</i> -Tyrosine (ng/ml)	<i>p</i> -Tyrosine (μg/ml)	Phenylalanine (μg/ml)
Control	2.18±0.58	1.36±0.46	7.5±0.9	15.4±1.9
Copper added	11.47±0.86 ^{c)}	11.80±2.15 ^{c)}	7.5±0.9	18.7±3.0
Ascorbic acid free	2.38±0.25	1.37±0.16	6.5±0.7	15.6±0.8

a) Diet conditions were as described in experimental section of the text. b) Each value represents the mean±S.D. from 5 guinea pigs. c) $p < 0.001$ significantly different from each control group.

TABLE II. Effect of Dietary Levels of Copper on Phenylalanine Hydroxylase and Tyrosine Hydroxylase Activities of Various Tissues of Guinea Pigs

Tissue	Diet ^{a)}	Phenylalanine hydroxylase activity (nmol/min/mg protein) ^{b)}
Liver	Control	4.6 ± 0.5
	Copper added	3.5 ± 0.4 ^{c)}
Kidney	Control	0.71 ± 0.10
	Copper added	0.60 ± 0.08
Tissue	Diet ^{a)}	Tyrosine hydroxylase activity (pmol/min/mg protein) ^{b)}
Adrenal	Control	278 ± 51
	Copper added	233 ± 47
Brain	Control	16.0 ± 2.3
	Copper added	12.1 ± 1.9 ^{d)}

a) Diet conditions were as described in experimental section of the text. b) Each value represents the mean ± S.D. from 5 guinea pigs. c) and d) $p < 0.01$ and 0.05 significantly different from each control group, respectively.

て AsA 及び銅濃度を測定した。このようにして得られた測定値の平均値は次のようであった。すなわち、対照群及び銅投与群で AsA 量は、それぞれ 1.97 ± 0.52 及び 1.22 ± 0.45 $\mu\text{g}/24$ 時間尿/100 g 体重であった。したがって、尿中に検出される AsA 量は対照群に比べて、銅投与群で明らかに低く、銅投与による AsA の体外への排泄促進は起こらないものと考えられる。なお、検体として採取した尿中の銅濃度は、対照群及び銅投与群で、それぞれ 3.87 ± 1.68 及び 4.76 ± 1.61 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 尿であり、銅投与群で特に高濃度ではなかった。したがって、尿中への AsA 排泄量において、対照群に比べて銅投与群で低い値が得られたのは実験上の原因によるものではないと考えられる。すなわち、24 時間尿の採取中に AsA の自動酸化が促進され、みかけ上 AsA 排泄量が低い値を示したのではないことが推察できる。

今回の実験において、過剰量の銅を投与すること

により、血中の *o*- 及び *m*-tyrosine 含量が顕著に増加する現象を認めた。Table II の結果からみて、銅投与による tyrosine 異性体の増加は、少なくとも phenylalanine hydroxylase や tyrosine hydroxylase の関与によるものでないことが推察できる。

銅投与による tyrosine 異性体の血中濃度が上昇する原因として、次のようないくつかの原因を推察した。過剰量の銅投与による体内の AsA 濃度の低下 (Fig. 4) は、体内に侵入した高濃度の銅によって AsA の自動酸化が促進されたことを示唆している。この銅触媒による AsA の酸化過程で、一時的に過剰量の水酸ラジカルが発生し、それによって phenylalanine の非酵素的な水酸化反応が起こり、tyrosine 異性体の血中濃度が上昇した可能性

Fig. 3. Effect of Dietary Levels of Copper and Ascorbic Acid on Copper Content of Various Tissues of Guinea Pigs

Dietary conditions were as described in experimental section of the text. □, control group; ■, copper added group; ▨, ascorbic acid free group. Each bar represents the mean ± S.D. from 5 guinea pigs. a) $p < 0.001$ significantly different from control group.

Fig. 4. Effect of Dietary Levels of Copper and Ascorbic Acid on Ascorbic Acid Content of Various Tissues of Guinea Pigs

Dietary conditions were as described in experimental section of the text. □, control group; ■, copper added group; ▨, ascorbic acid free group. a, b, and c) $p < 0.05$, 0.01 , and 0.001 significantly different from each control group, respectively.

が考えられる。単に AsA 濃度が低下したために体内での AsA による酸素ラジカルの消去能力が低下したことが原因であるなら、AsA 欠乏群でも tyrosine 異性体の増加が観察されてもよいものと思われる。また、水酸ラジカルの異常生成の原因として、過剰量の銅投与によって酸素ラジカル消去系の酵素 (catalase, superoxide dismutase など) の活性低下が引き起こされたため、あるいは、酵素的並びに非酵素的な酸素ラジカル発生系に対して過剰量の銅が促進的に作用したため、などが考えられる。しかし、現段階では、今回みられた血中 tyrosine 異性体の増加現象が、上述したような酸素ラジカルの関与する以外の原因、たとえば、肝臓への銅の異常蓄積によるアミノ酸代謝異常などに基づく可能性を否定することはできない。

Phenylalanine hydroxylase は tyrosine hydroxylase に比べて、phenylalanine から *o*- 及び *m*-tyrosine の生成能が極めて低いために、*in vivo* でのそれらの酵素的生成に関して、tyrosine hydroxylase をほとんど含まない肝臓の関与は小さいものと推測されている。^{2,4)} しかし、今回の場合、上述したように、銅連続投与による *o*- 及び *m*-tyrosine の血中濃度上昇の原因が、過剰量の銅による酸素ラジカル発生促進作用に基づくものであると考えるとき、主として、銅の異常蓄積が認められる肝臓において tyrosine 異性体の非酵素的生成が起こったとするのが妥当ではないかと思われる。

今回得られた結果は、生体内における *o*- 及び *m*-tyrosine 生成系として phenylalanine hydroxylase や tyrosine hydroxylase の関与するものの他にも、tyrosine 異性体の生成系が存在する可能性を示唆するものである。すなわち、その系の1つとして、生体内で生成する酸素ラジカル、特に水酸ラジカルによる phenylalanine の非酵素的酸化反応に基づく生成系の存在が推察される。

謝辞 組織中の銅含量の測定にあたり、御指導並びに便宜をはかっていただいた、本学 衛生化学教室 平山晃久助教授に深謝致します。

引用文献

- 1) S. Ishimitsu, S. Fujimoto, A. Ohara, *J. Chromatogr.*, **378**, 222 (1986).
- 2) S. Ishimitsu, S. Fujimoto, A. Ohara, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 768 (1986).
- 3) S. Ishimitsu, S. Fujimoto, A. Ohara, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 1653 (1980).
- 4) S. Ishimitsu, S. Fujimoto, A. Ohara, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2439 (1984).
- 5) S. Ishimitsu, S. Fujimoto, A. Ohara, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3887 (1985).
- 6) M. Grootveld, B. Halliwell, *Biochem. J.*, **237**, 499 (1986).
- 7) S. Ishimitsu, S. Fujimoto, A. Ohara, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 471 (1977).
- 8) S. Ishimitsu, S. Fujimoto, A. Ohara, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 2287 (1979).
- 9) S. W. Bailey, J. E. Ayling, *Anal. Biochem.*, **107**, 156 (1980).
- 10) T. Nagatsu, K. Oka, T. Kato, *J. Chromatogr.*, **163**, 247 (1979).
- 11) M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1974).
- 12) Y. Ogawa, M. Kishigami, *A. Res. Shionogi Res. Lab.*, **7**, 635 (1957).
- 13) 中尾喜久, 服部理男, 堀内 宏, 山口員男, 江原 弘, *臨床病理*, **7**, 277 (1959).
- 14) F. Harber, J. Weiss, *Proc. Roy. Soc. London Ser. A.*, **147**, 332 (1934).
- 15) M. M. T. Khan, A. E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 4176 (1967).
- 16) C. Walling, S. Kato, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 4275 (1971).