

胎盤における糖代謝の研究

— ヒト絨毛組織の Gluconeogenic enzyme

活性について —

東京大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 小林 隆教授)

東京大学医学部分院産科婦人科 (主任: 吉谷 博助教授)

高 木 秀 雄

概要 初期胎盤絨毛組織における Glucose (G.) の代謝機構を観察し、次の結果を得た。

- 1) Glycogen (Gln.) 生成能は満期より初期絨毛組織において約3倍高い値を示した。
- 2) 組織内遊離G量はほぼ一定の値を保つような機構 (G. Pool) の存在が予想された。
- 3) 組織内Gに取入れられたGは速やかに代謝されて、Glycerol や Gln. に組入れられた。
- 4) Gln. 合成は Gluconeogenesis によってもかなり行なわれ、Estradiol (Est.) はこの過程により促進的に作用した。
- 5) 糖新生の素材となる ^{14}C 化合物の Gln. への組入れは、アスパラギン酸から Gln. への組入れが Est. によつて促進された。
- 6) 糖新生鍵酵素に対する Est. の作用は、PEP-carboxykinase, FDPase に対して促進的に、G6-Pase に対しては抑制的に働き、Pyruvate carboxylase に対しては影響を認めなかった。
- 7) Est. の作用に対し、Actinomycin D は影響を示さず、Cycloheximide は抑制的に働いた。Est. は PEP carboxykinase, FDPase 作用に関する酵素蛋白質の生合成に直接的に作用しているものと思われる。

緒 言

胎盤のグリコーゲン (Gln. と略す) は胎児肝臓の Gln. 合成能の見られない妊娠初期においては比較的多く含まれ、胎児肝臓において Gln. 合成がみられる妊娠後期になると減少する。Gln. の含有量が妊娠過程にしたがつて変動することは、Gln. の合成能もまた変動することであるので、この Gln. の合成の様相を初期胎盤について観察し、その生理学的な意義を解明しようとした。

笠間は、ヒト胎盤絨毛組織を用いる *in vitro* の実験において、ブドウ糖 (G. と略す) の酸化過程で生じた CO_2 が固定されて代謝し、Gln. に組入れられ、この過程にステロイドホルモンが促進的に作用するのであろうと推察した。近年 Weber らは G 代謝過程の酵素を 3 群に分ち、その 1 つのいわゆる key gluconeogenic enzyme に対しては、グルココルチコイドは促進的に作用し、グルココルチコイドの糖新生鍵酵素に対する作用は、酵素蛋白の遺伝情報伝達機構にもとずくと推察している。

著者は初期胎盤絨毛組織における糖新生鍵酵素である Glucose-6-Phosphatase (G6Pase と略す), Fructose diphosphatase (FDPase と略す), Phosphoenol Pyruvate Carboxy kinase (PEP CK と略す), Pyruvate carboxylase (PyCL と略す), の酵素活性を測定し、さらに 17β -Estradiol (Est. と略す) の添加効果を観察して、Gln. 合成機構を観察すると共に Est. の作用機構についても Actinomycin D (Act D と略す), Cycloheximide (Cycloh と略す) を添加し、その様相も観察したので報告する。

実験材料及び実験方法

I. 実験材料

1) 絨毛組織

実験に使用したヒト胎盤絨毛組織は、人工妊娠中絶手術により得た妊娠第12~16週のものである。実験 I の Gln. およびブドウ糖量の測定については満期で帝王切開を行なつた時の胎盤を使用した。絨毛組織はあらかじめ氷冷した Krebs-Ringer (pH 6.9) に直ちに入れて数回洗い、附着し

ている血液や、不要組織を取り除き、濾紙片にて水分を取り除いたものを実験に供した。

2) 基質溶液

グルコース- ^{14}C 、アスパラギン酸 2- ^{14}C 、ピルビン酸 2- ^{14}C 、乳酸 2- ^{14}C 、重曹- ^{14}C 、酢酸 2- ^{14}C を基質として使用する場合には、終末濃度が $10\mu\text{ moles}$ ($0.1\mu\text{C}/\text{ml}$)となるように調製した。

一方、Glucose- ^{14}C が、Gln. 構成のG. 単位へ組入れられる様相を観察する実験においては、Glucose- ^{14}C の濃度を $20\mu\text{ moles}$ ($1\mu\text{C}/\text{ml}$)となるように調製した。

3) 17β -Estradiol 溶液

17β -Est. 結晶は、Potter-Elvehjem 型のホモゲナイザーを用い、再溜水中に均等に懸濁させ、終末濃度が $4 \times 10^{-6}\text{M}$ となる様に調製した。

4) Cycloheximide 溶液

絨毛組織 1 g に対し $20\mu\text{g}$ に相当するより Cycloheximide を用いて調製した。

5) Actinomycin D 溶液

組織 1 g に対し、 $1\mu\text{g}$ に相当するように Actinomycin D を用いて調製した。

II. 実験方法

1. ヒト初期絨毛組織を用いる ^{14}C -化合物の組入れ：

1) 絨毛組織 300mg に対し ^{14}C -基質を $10\mu\text{ moles}/\text{ml}$ ($0.1\mu\text{C}/\text{ml}$) 加え反応液全量を 3 ml として 1 時間 incubation した。

2) ^{14}C -Glycogen の抽出は、Villemain らの方法にしたがい、 $30\text{ g}/\text{dl}$ KOH で抽出し、生成された Gln. は少量の 96% ethanol に浮遊させ定量的に試料皿にとり Gas flow counter を用い ^{14}C 放射能を測定した。

生成された Gln. 量は絨毛組織の湿性重量 g 当たりが Gln. に転換させた基質の G 量 $m\mu\text{-mole}$ で表わした。

3) $^{14}\text{CO}_2$ の生成は、Villemain, 細谷らの方法にしたがつた。すなわち NaOH を含んだ濾紙片に吸着された CO_2 を水中に溶解させ BaCO_3 (0.11 M) で沈澱させてから 2) と同様に ^{14}C 放射能を測定した。

4) ^{14}C 脂質の抽出は、Folch らの方法によつて、Chloroform : Methanol 溶液 (2 : 1) で抽出した。さらに脂質を Katz らの方法により水解し、脂酸とグリセロールに分画した。

5) 乳酸の生成は、incubate 終了後、反応液を Landau らの方法に従い、ペーパークロマトグラフィによつてグルコース、グリセロール、乳酸に分画した。

6) ブドウ糖量の測定は Huggest らによる Glucose Oxidase 法を用い、比色定量した。

2. 糖新生能の測定：

1) 絨毛組織 500mg に対し ^{14}C -Glucose $20\mu\text{ moles}$ ($1\mu\text{C}/\text{ml}$) を加え、反応液全量を 5 ml とし、30分、60分、120分、にそれぞれ incubate した。

2) 生成された Gln. の抽出ならびに加水分解は Walaas らの方法によつた。さらに Gln. 構成の G. の炭素位置を決定するために、Gln. を加水分解して得られた G を Dunn らの方法によつて過沃素酸で酸化し、炭素間の結合を C_5 と C_6 の間で切断し、 C_{1-5} を義酸とし、 C_6 をホルムアルデヒドとして抽出した。 C_{1-5} の検出は、Calvin らの方法で義酸を酸化し、生じた炭酸ガスを炭酸バリウムとして沈澱させ ^{14}C 放射能を測定した。 C_6 検出のためのホルムアルデヒドの補足は、ジメドンをを用い、生じた沈澱物をアセトンで溶解させ、試料皿上で乾燥後、上記と同様な方法で ^{14}C 放射能を測定した。

G. の炭素位の転換は、G. を一旦分解し再合成して Gln. に組み入れられた G. 量を絨毛組織湿性重量 g 当りの $m\mu\text{ mole}$ で表わした。

3. 酵素活性の測定：

1) ヒト初期胎盤絨毛組織 500mg を、終末濃度 $10\mu\text{ moles}$ の G を含んだ Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液 (pH 7.2) 中に、ワールブルグ反応フラスコ内で浮遊させ、ガス相に O_2 95%, CO_2 5% を用い、 37°C で 2 時間 incubate した (振盪回数 120 回/分)。incubate 終了後、組織を取りだし、氷冷した 0.25M 蔗糖液に加え、Potter 型 homogenizer で 10% の homogenate を作り、冷凍遠心器で 2°C に 700 G 10 分間遠心した後、その上清につい

て酵素活性を測定した。酵素活性度は絨毛組織湿重量g当りで表わした。

2) Glucose-6-Phosphatase (G-6-Pase) 活性は Horecker に従い、基質として Glucose-6-Phosphate (G-6-P) を用い、生成された無機磷を測定した。酵素活性度は30分間の反応で生ずる無機磷をmgで表わした。

3) Fructose diphosphatase (FDPase) 活性は Racker により、基質として Fructose diphosphate (FDP) を用い、生成した Fructose-6-phosphate (F6P) を、Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), Glucose-6-phospho isomerase (G 6 P isomerase), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) 系で、還元型 NADP の増加として波長 340m μ で定量した。酵素活性度は1分間に生じた NADPH₂ を m μ mole で表わした。

4) Phosphoenol pyruvate carboxykinase (PEPCK) 活性は、Utter (1954) らの方法によりホスホエノールピルビン酸、IDP, NaHCO₃ を基質として、生じたオキサロ酢酸を malate dehydrogenase の存在下に還元型 NAD で還元し、340 m μ で吸光度の減少を測定した。活性度は、1分間に減少した NADH₂ の μ mole で表わした。

5) Pyruvate carboxylase (PyCL) 活性は Utter (1963) らによりピルビン酸を基質として、生じたオキサロ酢酸を MDH の存在下に還元型 NAD で還元し 340 m μ で吸光度の減少として測定した。酵素活性度は1分間に減少した NADH₂ の量を μ mole で表わした。

実験成績

I. ヒト胎盤絨毛組織のグリコーゲンとブドウ糖量

初期絨毛組織の Gln. 量は、湿重量g当り 14.741 \pm 1.32 μ moles で、娩出胎盤絨毛組織のそれは、初期のものに比較して約 $\frac{1}{3}$ に減少し 4.65 \pm 0.423 μ moles であつた。

G. 量は初期では 5.363 \pm 0.528 μ moles/g (湿重量) であり、娩出期では約20%の減少を示し、3.182 \pm 0.283 μ moles であつたが、有意差のあ

表1 Glucose and Glycogen Contents in Human Placenta

Placenta	Term	Young
Glycogen	4.652 \pm 0.423 (9)	14.741 \pm 1.320 (9)
Glucose	3.182 \pm 0.283 (8)	5.363 \pm 0.528 (8)

る値ではなかつた (表1)。

G. 量の変動が比較的少ないのに対して、Gln. 量には著しい変動がみられ、初期のものが娩出期の約3倍も多いことから、初期絨毛組織の Gln. 生成能の極めて高いことが推定できる。

II. ヒト初期胎盤におけるブドウ糖の取りこみ及びその代謝

ヒト初期胎盤絨毛組織においては Gln. の生成能は活発であると推測されるので、Gln. への組み入れを観察してみた。G-U-¹⁴C を基質とした場合の反応液中の G-U-¹⁴C の減少、すなわち組織へのブドウ糖の取りこみは、初期胎盤絨毛組織の G. 量よりも約15%多い 6.08 \pm 1.29 μ moles/g であり、Est. 添加により約25%の増大をみた (P < 0.05)。一方、組織中の G への反応液中の G-U-¹⁴C の組入れは 1.80 \pm 0.21 μ moles であり、Est. を添加した場合にはかえつて少なくなり 1.50 \pm 0.11 μ moles で約25%の減少をみた (P < 0.01)。 (表2)

表2 Glucose-U-¹⁴C Metabolism in Human Young Placenta

Estradiol		Absent	Present
Glucose-U- ¹⁴ C uptake from medium		6.08 \pm 1.29	7.52 \pm 1.35
Glucose utilization		4.28 \pm 1.07	6.02 \pm 1.22
Conversion of Glucose-U- ¹⁴ C to	Tissue glucose	1.80 \pm 0.21	1.50 \pm 0.11
	Carbon dioxide	0.104 \pm 0.021	0.132 \pm 0.018
	Fatty acid	0.058 \pm 0.007	0.068 \pm 0.011
	Glycerol	0.676 \pm 0.063	1.839 \pm 0.276
	Lactate	2.556 \pm 0.451	2.636 \pm 0.317
	Glycogen	0.208 \pm 0.038	0.366 \pm 0.033

(6 determinations) μ moles/g/h

それゆえ、反応液中に添加された G-U-¹⁴C は絨毛組織に取りこまれてから、1 時間でその約 80% 以上がすみやかに代謝される。従つて G-U-¹⁴C の組織中 G. への組入れが少ないようにみえるのも G. の代謝回転 metabolic rate がかなり速いための見かけ上の現象であらう。

さらに G-U-¹⁴C の G. 代謝における各々終末産物への組入れは、Est. を添加すると各々増大するが、これらのなかで G. の代謝比率が有意義に増大するものは、Gln. の合成 ($P < 0.01$) と Glycerol 生成 ($P < 0.01$) であつた。ことに Glycerol 生成に著明な増加が認められた。

Ⅲ. ¹⁴C-物質の Glycogen への組入れ

反応液中に基質として添加された G-U-¹⁴C からの Gln. への組入れは、Est. 添加によつて約 70% 増大する ($P < 0.01$)。 (表 3)

表 3 Incorporation of C¹⁴-substrates into Glycogen in Human Young Placenta
m μ moles/g/h

	G-U-C ¹⁴ (11)	G-6-C ¹⁴ (11)	Pyr-2-C ¹⁴ (5)	Lac-2-C ¹⁴ (5)	Ac-2-C ¹⁴ (7)	Asp-2-C ¹⁴ (5)
without	205 ±34	221 ±37	44.2 ± 6.1	46.0 ± 6.3	43.6 ± 7.0	48.5 ± 6.6
17 β - estra- diol	354 ±37	376 ±42	41.8 ± 6.6	40.8 ± 7.4	32.2 ± 5.4	56.3 ± 7.8

Substrate, 10 μ moles (0.1 μ c)/ml

この Est. による Gln. 合成の増大が Glycogenesis によるものかあるいは Gluconeogenesis によるものかを検討するために、アスパラギン酸 (ASP)-2-¹⁴C, ピルビン酸 (Pyr)-2-¹⁴C, 乳酸 (Lac)-2-¹⁴C, 重曹 -¹⁴C (NaH¹⁴CO₃), 酢酸 (Ac)-2-¹⁴C をそれぞれ基質とした場合の Gln. への組入れを観察してみた。表 3 に示すように、Est. を添加し、1 時間 incubate した後では、ピルビン酸、乳酸、重曹、酢酸からの Gln. への組入れに対しては有意な Est. の影響は認められなかつたが、アスパラギン酸からの Gln. への組入れは、Est. の添加によつて約 15% 増大した ($P < 0.01$)。

Ⅳ. ヒト初期絨毛組織における糖新生能

高柳によると絨毛組織では糖新生が Est. の添加によつて促進されると云う。著者はこの様相をさらに追求するために G-6-¹⁴C を用い、Gln. への組入れの時間的経過を観察した。また絨毛組織で Gln. が Gln. 構成のいかなる炭素配列に組入れられたかについても観察した (図 1, 表 4)。6 位の炭素への ¹⁴C の組入れは incubate するにしたがつて増大し、Est. の添加によつてさらに増加するが、60 分以上 incubate するとこれが平衡状態になる。1~5 位炭素への ¹⁴C の組入れは、6 位炭素への組入れに比しては少ないが、時間とともに増加する傾向があり、($P < 0.02$), Est. を添加す

図 1 Labeled Carbon Incorporation of Glucose-6-C¹⁴ into the Glucose Units of Glycogen

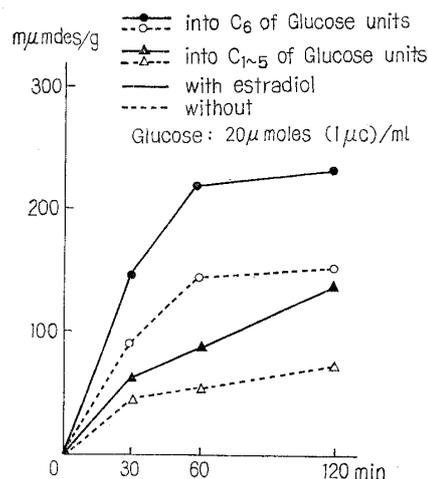


表 4 Incorporation of labeled Carbon from Glucose-1-¹⁴C and Glucose-6-¹⁴C into the Carbon of Glycogen

Substrate	Estradiol	Glucose Unit of Glycogen		
		C 1~6	C 1~5	C 6
G-1- ¹⁴ C	none	192.4 ±21.7	163.9 ±20.8	30.0 ± 7.5
	added	321.4 ±24.1	292.5 ±34.9	27.7 ± 3.3
G-6- ¹⁴ C	none	222.1 ±35.2	52.6 ±10.4	135.2 ±19.3
	added	364.0 ±25.9	83.3 ±16.8	214.9 ±25.5

m μ moles/g weight/h

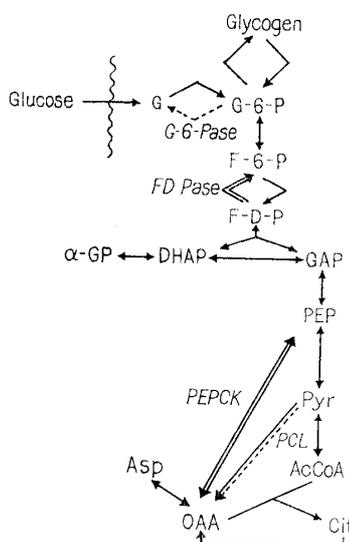
るとこの増加率は時間とともに高まった ($P < 0.01$).

一方、基質として Glucose-1- ^{14}C を用いると Gln. 構成Gの6位炭素への ^{14}C の組入れは、1時間の incubate で $30 m\mu$ moles/g 前後であり、これに Est. を添加してもあまり変化しなかつた。従つて、Est. はG. から直接 Gln. を合成する過程にも作用するが、G. が一旦分解された後に、それが Gln. に再合成されていく過程に対してはさらに促進的に作用していることがうかがわれる。

V. ヒト初期絨毛組織のいわゆる糖新生鍵酵素

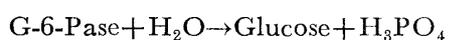
Weberらは白ネズミ肝の解糖系の酵素を解糖鍵酵素, 両作用酵素, 糖新生鍵酵素の3群に分ち, Glucocorticoid は糖新生鍵酵素を genometype で促進すると報告している。そこで著者は絨毛組織について、いわゆる糖新生鍵酵素 key gluconeogenic enzymeである G-6-Pase, FDPase, PEP CK PyCLの酵素活性を測定し、これに対する Est. の添加効果も観察した (図2)。

図 2



1. G 6 Pase

本酵素はグルコース-6-リン酸を加水分解して、ブドウ糖とリン酸にする反応を触媒する酵素である。



絨毛組織における活性は 1.27 ± 0.1 mgPi/g で、これは成人肝の約 $1/3$ の活性であつた。生田の

測定値よりもやや低い値を示した。G. を基質とし、2時間 incubate した後の活性は 1.98 ± 0.15 mgPi であり50%以上の活性上昇が認められた ($P < 0.01$)。また Cycloheximide や Actinomycin D を添加した場合にはその影響は殆んどみられなかつた。

一方 Est. とともに incubate すると、その活性上昇は殆んどみられず 1.34 ± 0.12 mgPi/g であつた。それ故、絨毛組織を incubate して G-6-Pase 活性が増大することは incubate により Catabo-

表5 Glucose-6-phosphatase Activities in Human Young Placenta (Pi mg/30min/g wet weight)

	Original Activities	After 2hrs Incubation		
		without	Cydoheximide 20 μ g/g tissue	Actinomycin D μ g/g tissue
without	1.27 ± 0.10 (10)	1.98 ± 0.15 (12)	1.99 ± 0.19 (6)	2.08 ± 0.32 (6)
17 β -estradiol f.c. 4×10^{-6} M		1.34 ± 0.12 (12)	1.50 ± 0.17 (6)	1.39 ± 0.22 (6)

lismが亢進するためと思われる。これは2時間の incubation で、絨毛組織の Gln. の著しい減少と並行しているものと思われる。Est. の添加によつてG-6-Pase 活性の増加がみられないことは、Est. によりGからの合成反応が促進されるためと思われる。Est. 添加に対する Act D や Cyclo h の影響はなかつた。

2. FDPase

解糖系には Phosphofructokinase による非常に強い発エルゴン反応があるが、本酵素はこれに逆行して作用するものであり、FDPを加水分解してF6Pとリン酸にする。



絨毛組織における本酵素の活性は $155.9 \pm 10.73 m\mu$ moles/min/g であつた。incubate すると40%以上の活性増大が認められた ($P < 0.01$)。Cyclo h とともに incubate すると酵素活性の上昇がみられないので、Cyclo h によつて酵素の生

表6 Fructose-16-diphosphatase Activities in Human Young Placenta
(μ moles/min/g wet weight)

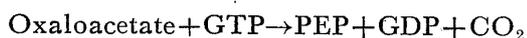
	Original Activities	After 2h Incubation		
		without	Cydohe-ximide 20 μ g/g tissuc	Actino-mycin μ g/g tissue
without	155.9 \pm 10.73 (10)	212.9 \pm 24.5 (10)	174.1 \pm 11.3 (6)	215.7 \pm 26.9 (6)
17 β -estradiol f.c. 4 \times 10 ⁻⁶ M		296.9 \pm 32.2 (10)	190.5 \pm 13.7 (6)	283.3 \pm 29.3 (6)

合成が抑制されているものと思われる。Act D とともに incubate した場合には、酵素活性に対する影響は認められなかった。

絨毛組織を Est. とともに incubate すると酵素活性はさらに増加して 296.9 \pm 32.2 μ moles となった(組織活性に対する P<0.01)。Cyclo h を同時に添加すると、この増大率は抑制されるが (Est. 添加に対する P<0.01)、Original 活性値よりは上昇していた。細胞内の AMP 濃度によって、この系の糖質代謝が調節されていることを考慮に入れても、いずれにせよ Est. は FDPase に関与する酵素蛋白質の合成に対して促進的に作用していることがわかった。

3. PEP CK

本酵素は、GTP の存在のもとにオキザロ酢酸から phosphoenol pyruvate を生成する。



絨毛組織におけるこの酵素の活性は、51.55 \pm 3.76 μ moles/min/g で、絨毛組織を2時間 incubate すると約16%減少が認められる (P<0.01)。Cyclo h とともに incubate するとさらに減少し、Original 活性よりも約20%低下した (P<0.01)。Act D の添加では無添加の場合に比べて変化が認められなかった。

Est. とともに incubate すると、活性増大が観察され、Original 活性よりも約14%増大し 5.862 \pm 3.00 μ moles となるが (P<0.01)、Cyclo h を同時に添加すると 42.58 \pm 3.83 μ moles と Original 活性に比して20%以上の活性減少がみられた (P<0.01)。この場合の活性は絨毛組織を G. の

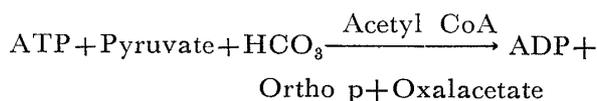
みと温置した場合のそれとほぼ同程度であった。Act D を添加した場合には、酵素活性は少量ながら減少するが (P<0.05)、Cyclo h を添加した場合と比較するとその減少率はわずかであり、G のみと温置した場合の活性よりもむしろ高い活性値を示していた。従つて Est. は絨毛組織の PEP CK に関する酵素蛋白質の合成に促進的に作用しているものと思われる。

表7 Phosphoenolpyruvate carboxykinase Activities in Human Young Placenta
(μ moles/min/g wet weight)

	Original Activities	After 2 hrs Incubation		
		without	Cyclohe-ximide 20 μ g/g tissue	Actino-mycin D μ g/g tissue
without	51.55 \pm 3.76 (8)	43.13 \pm 2.86 (8)	40.58 \pm 3.91 (6)	43.59 \pm 2.91 (6)
17 β -estradiol f.c. 4 \times 10 ⁻⁶ M		58.62 \pm 3.00 (8)	42.58 \pm 3.83 (6)	48.40 \pm 4.26 (6)

4. PyCL

この酵素は ATP とアセチル CoA を必須因子として、ピルビン酸からオキザロ酢酸を生成する。糖新生系の初段階反応を触媒する酵素で、解糖系と TCA 回路の接点に存在し細胞内の糖代謝に重要な役割を果している。



絨毛組織におけるこの酵素活性は 10.25 \pm 0.91

表8 Pyruvate carboxylase Activities in Human Young Placenta
(μ moles/min/g wet weight)

	Original Activities	After 2hrs Incubation		
		without	Cyclohe-ximide 20 μ g/g tissue	Actino-mycin μ g/g tissue
without	10.25 \pm 0.91 (8)	11.34 \pm 1.03 (8)	11.53 \pm 0.79 (6)	10.71 \pm 0.88 (6)
D17 β -estradiol f.c. 4 \times 10 ⁻⁶ M		11.70 \pm 1.08 (8)	10.08 \pm 0.90 (6)	10.36 \pm 1.07 (6)

μ moles/min/g であり、組織を incubate しても、さらに Est. とともに incubate しても酵素活性の増大は殆んどみられなかつた。さらに Actinomycin D や Cycloheximide を添加しても変化はなかつた。

ヒト胎盤絨毛組織における糖新生鍵酵素について Est. によつて酵素活性の促進するものは、FDPase, PEP CK であり、逆に抑制されるものは G-6-Pase であつた。

考 察

絨毛組織に Est. を添加した場合に、G. からの Gln. 合成の増加することは、Villev, 細谷らによつて観察されている。さらに笠間は、この現象は初期胎盤にはみられるが、末期胎盤には観察されないことを報告している。また笠間は、G-1-¹⁴C と G-6-¹⁴C とを基質とした場合に、G-6-¹⁴C からの Gln. への組入れは G-1-¹⁴C に比して大きいことを観察し、高柳は生成された Gln. を解析して、Est. は Glycogenesis は勿論 Gluconeogenesis の過程を促進するのであらうと報告している。

そこで著者は、ヒト胎盤絨毛組織における Gln. 合成に対する Est. の作用を観察し、その作用機構を考察した。

ヒト胎盤における Gln. 量は妊娠の進行にとともに減り、末期は初期の約 $\frac{1}{3}$ 量になるが、一方胎児肝の Gln. 量は、胎盤のそれに反比例して増大することが知られている。しかしながら、絨毛組織内の遊離 G. 量は、妊娠初期と末期においてあまり差異は認められなかつた。胎盤絨毛組織内には G. のプールがあり、母体血糖値の変動に影響されずほぼ一定の値に保たれて、胎児へのブドウ糖の供給を円滑に行なつていゝものと思われる。

一方、Est. の添加効果は、末期においては認められず、初期胎盤組織において観察される。胎児付属物である胎盤の絨毛組織が妊娠の初期においては、Est. の作用を受け、胎児および胎盤発育の energy 源として重要な Gln. 或は G. の代謝も、子宮に近い代謝様相を示すものと思われる。

それ故、初期胎盤絨毛組織に Est. を添加した場合にみられる G. の組織内への取り込みが増大す

る現象は、Roskoski, Steiner らがネズミの子宮で、Est. の添加が G. の能動輸送の過程を促進する事実を認めたが、胎盤においても子宮と同じこの現象が成立しているものと思われる。また初期胎盤絨毛組織において Gln. 合成が Est. によつて増大する現象も、Bitman, Cecil らが Est. を投与した白ネズミ・ウサギ・ヒツジの子宮に Gln. が増大する現象を認めた事実と極めて類似している。

G-U-¹⁴C を基質とし Est. とともに初期胎盤絨毛組織を incubate すると、Gln. への G-U-¹⁴C の組入れは約70%増加する。一方、組織内遊離 G. への G-U-¹⁴C の組入れが見掛上少なくなることは Est. の添加によつて G の代謝が活発になることを意味していゝ。

さらに G-U-¹⁴C の Glycerol への組入れが著しく増大することは、胎盤の膜様構造を形成するために、Est. によつて Glycerol 生成が増大するためであらう。この現象も末期胎盤においてはみられなくなるが、これは胎盤において、Est. 添加によつて増大する Glycerol 代謝が、胎盤それ自身の発育のために必要なもので、発育が完了したのちには、不必要になるためであらうと思われる。

アスパラギン酸からの Gln. への組入れは、Est. によつて著しい影響をうけた。これは糖原性アミノ酸であるアスパラギン酸が脱アミノ化されて生ずるオキザロ酢酸が比較的よく代謝されるためと思われるし、この系に作用するアミノ酸脱アミノ酵素に対する Est. の影響も推定出来る。なお、胎盤のアミノ酸のなかで、アスパラギン酸が最も多いと云われている。また、胎盤においては、酢酸やピルビン酸は、酸化の過程と Gln. 代謝の compartment を異にしているために、ピルビン酸などからの Gln. 合成に対して Est. の影響がみられなかつたものと推察される。

ヒト胎盤絨毛組織の Gln. 合成に対する Est. の添加効果について、高柳は、Est. は、Glycogenesis は勿論 Gluconeogenesis の過程も促進するという。Bo らは白ネズミの子宮において、Est. の投与は Glycogen synthetase 活性を増大し、Phosphorylase 活性は抑制すると報告している。高柳

は、Gln. 合成の中間体を測定することにより、ヒト初期胎盤絨毛組織においては、Gln. 合成の各段階の酵素活性が、Est. の添加によつて一様に増大するであろうと推察している。

ヒト初期絨毛組織において、Est. の添加により Gluconeogenesis の増大することを証明するために高柳の用いた方法にしたがつて観察した。G-6-¹⁴C, G-1-¹⁴C を基質として、Gln. 構成G. 分子の炭素位への¹⁴C 組入れとその経時的変化を観察すると、Est. の添加は Glycogenesis よりも Gluconeogenesis への過程をより促進していることが知られた。

Weber は白ネズミ肝のG.代謝に関与する酵素と3群に分けた。そしてGlucocorticoidは糖新生鍵酵素 key Gluconeogenic enzyme に対して誘導効果を示し、Insulinはこの誘導に対して抑制作用を示すことを明らかにしている。そこで著者はヒト胎盤絨毛組織において、Est. が糖新生鍵酵素に対してどのような影響を与えるか観察した。

初期絨毛組織をG.を基質として2時間incubateすると、G-6-Pase活性は約60%増加し、G.によつてその酵素活性は直接誘導されるようになりかわれる。さらにFDPase活性はG.によつて約30%増加し、PEPCKは逆に15%減少し、PyCLは殆んど影響を示さなかつた。Est.を添加した場合には、G-6-Pase活性は、Original活性と殆んど同じ程度であり、G.による誘導効果がEst.により打消されているためと思われる。これは白ネズミにInsulinを投与した場合に、肝のG-6-Paseの減少するのに似た現象を示している。BitmanがEst.は子宮にとつては、Insulinに似た作用を示すと表現しているが、著者の結果からもこのことがうなづける。Est.の添加によつてG-6-Paseが低下することは、G.の放出を抑えて、Gln.合成を促進するためであり、このことから胎盤絨毛組織におけるEst.の作用は、胎盤それ自身の発育のために作用していると思われる。

PEPCKならびにFDPase活性はEst.の添加によつて、それぞれ39%、36%の増大を示した。特にFDPaseにおいてはOriginal活性より90%以

上の活性増大をみた。一方、PyCL活性は、G.とincubateしても変化がみられなかつたが、さらにEst.を添加しても活性の増大効果は全く認められなかつた。

ActDはDNAと結合し、RNA polymeraseを阻害してRNA合成を阻害する。初期絨毛組織とActDとをともにincubateした場合にはEst.に対して何ら添加効果を示さなかつた。

一方、Cyclo hは蛋白合成を阻止し、RNAの蓄積をもたらすと云われている。絨毛組織とCyclo hとをともにincubateすると、Est.の添加によつて増大するFDPase、PEPCKの活性は打消されるので、これらの酵素蛋白の生合成がCyclo hによつて阻害されることがわかる。したがつてEst.はPEPCK、FDPase活性に関与する酵素蛋白の生合成を直接的に促進するものと思われる。

Cecil, Bitman, Gorski, Morganらは白ネズミにCyclo hを投与すると、子宮におけるEst.によるGln.合成の増大が抑制されると報告している。それ故Est.のGln.合成に対する作用機構は、Gln.合成に関与する酵素蛋白の合成に直接的に作用するものと思われる。

肝においては、糖新生の初発反応はPyCLであると云われ、Glucocorticoidによつて、この酵素活性が誘導される。しかるに初期絨毛組織においては、本酵素活性はEst.によつて何ら変化を示さなかつた事から、絨毛組織においてPyCLは鍵酵素とはならないのかも知れない。しかしながら、PyCLはミトコンドリアに含まれているので、細胞質分画に含まれるFDPaseやPEPCKとはEst.に対する態度を異にしているのかも知れない。

一方、逆の立場から考察すると、絨毛組織に添加されたEst.は細胞質においてのみ作用を示すのかも知れない。

結 語

ヒト初期胎盤絨毛組織におけるブドウ糖の代謝機構を観察し、とくに糖新生に対するエストラジオールの添加効果を観察して、エストラジオールの作用機構を解析した。

1) Gln.生成能は満期胎盤に比し、初期胎盤絨毛組織に高い活性を示す。

2) 組織内G.量は初期、満期ともほぼ一定の値を示す。組織内遊離G.量は常に一定の値を保つような機構の存在 (Glucose Pool) が予想される。

3) 組織内G.に組入れられる G-U-¹⁴C は速やかに代謝されて Glycerol や Gln. などに組入れられる。Est. は後者の過程に促進的に働いているものと思われる。

4) Gln. 構成のG.分子の炭素位への組入れをみると、6位炭素への組入れは1~5位炭素へのそれよりも大きい、しかしながら Est. は Gluconeogenesis の過程に、より促進的に作用していた。

5) 低分子炭素化合物の Gln. への組入れは、Est. によりアスパラギン酸から Gln. への組入れが促進された。

6) ヒト初期胎盤絨毛組織において、いわゆる糖新生鍵酵素に対する Est. の作用をみると PEPCK, FDPase に対しては促進的に、G-6-Pase に対してはむしろ抑制的に作用した。Est. がこれら酵素活性におよぼす作用は、Act D は無影響、Cyclo h は抑制的に作用した。

7) 以上のことから Est. は FDPase, PEPCK の作用に関する酵素蛋白の合成に直接的に作用しているものと思われる。

稿を終るに当り御指導、御校閲を賜った恩師小林隆教授、森山 豊前教授に深甚なる謝意を表するとともに、終始直接御懇篤なる御指導を賜った古谷 博助教授並びに保健学科保健栄養学教室細谷憲政助教授に深謝する。

なお、本論文内容の一部は、第7回医化学シンポジウム (1967年)、第6回医化学シンポジウム (1966年)、第38回生化学会総会 (1966年)、第4回胎盤研究会 (1967年) に発表した。

文 献

- 生田基弘 (1959) : 日産婦誌, 11, 37.
 笠間雪雄 (1964) : 日産婦誌, 16, 359.
 高柳正夫 (1966) : 日産婦誌, 18, 9.
 Bartlett, J. (1958): J. Biol. Chem. 195, 466.
 Bitman, J., Cecil, C. (1967): Arch. Biochem.

- Biophys. 118, 424.
 Bitman, J., Cecil, C., Wood, J.R., Wrenn, T.R. (1967): Acta. Endcr. 54, 505.
 Bo, W.J., Maraspin, L.E., Smith, M.S. (1967): J. Endcr. 38, 33.
 Calvin, M. (1949): Isotopic Carbon. New York.
 Cecil, C., Bitman, J. (1967): Arch. Biochem. Biophys. 119, 105.
 Dunn, D.F. (1957): J. Biol. Chem. 194, 225.
 Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H. (1957): J. Chem. 226, 497.
 Gorski, J., Morgan, M.S. (1967): Biochim. Biophys. Acta. 149, 282.
 Horecker, B.L., Wood, W.A. (1957): Methods in Enzymology III, 152.
 Hosoya, N., Kawada, N., Matsumura, Y. (1960): J. Biochem. 48, 262.
 Hosoya, N., Kawada, N. (1961): J. Biochem. 49, 728.
 Hugget, A.G., Nixon, D.A. (1957): Biochem. J. 66, 129.
 Hugget, A.G., Nixon, D.A. (1967): Lancet. II. 368.
 Katz, J., Landau, B.R., Bartsch, G.E. (1966): J. Biol. Chem. 241, 727.
 Landau, B.R., Bartsch, G.E., Williams, H.R. (1966): J. Biol. Chem. 241, 750.
 Racker, E. (1958): Arch. Biochem. Biophys. 74, 326.
 Reich, E., Franklin, R.M., Shatkin, A.J., Tatum, E.L. (1962): Proc. Nettle. Acad. Sci. U.S.A. 44, 1238.
 Roskoshi, R.J., Steiner, D.F. (1967): Biochim. Biophys. Acta. 135, 717.
 Sakurai, T., Takagi, H., Hosoya, N. (1969): Am. J. Obst. Gynec. 104, 1044.
 Shelley, M.J. (1961): Brit. Med. Bull. 17, 137.
 Siegel, M.R., Sisler, H.D. (1964): Biochem. Biophys. Acta. 87, 70.
 Utter, M.F., Kurahashi, K. (1954): J. Biol. Chem. 207, 825.
 Utter, M.F., Keech, D.B. (1963): J. Biol. Chem. 238, 2603.
 Villee, C.A., Hastings, A.B. (1949): J. Biol. Chem. 179, 675.
 Villee, C.A., Hagerman, D.D. (1953): J. Biol. Chem. 205, 873.
 Villee, C.A. (1962): Am. J. Obst. Gynec. 84, 1684.
 Walaas, O. (1950): J. Biol. Chem. 187, 769.
 Weber, G. (1963): Adv. in Engym Regul I, 1.
 Weber, G. (1962): A. J. Phys. 202, 137.
 Weber, G. (1964): Adv. in Engym Regul II. 1. (No. 2333 昭45・2・6 受付)