

ヒト胎盤におけるアミノ酸輸送機構の研究 —L-Alanine, L-Leucine の微絨毛膜小胞への 取り込みについて—

名古屋大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 友田 豊教授)

浅井 光 興

Studies on the Amino Acid Transport Systems in the Human Placenta —L-Alanine and L-Leucine Uptake by Microvillous Brush Border Membrane Vesicles—

Mitsuoki ASAI

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Nagoya School of Medicine, Nagoya

(Director: Prof. Yutaka Tomoda)

概要 ヒト胎盤におけるアミノ酸輸送機構の性質を明らかにするために、満期正常分娩の胎盤より調製した微絨毛膜小胞を用い、L-alanine, L-leucine の輸送系について解析した。

調製した微絨毛膜小胞の純度を生化学的に検討した結果、微絨毛膜の指標酵素である、alkaline phosphatase, 5'-nucleotidase の比活性は胎盤ホモジネートに比べ、9~11倍に上昇していた。アミノ酸の取り込み量は膜フィルター法により測定したが、取り込み量と反応溶液に加えた膜タンパク量(200 μ g以下)の間には直線関係があつた。膜小胞のタンパクあたりの容量 (Intravesicular water (IVW)/mg タンパク) を3-O-methyl-D-glucose を用いて測定したところ、0.59 μ l/mg タンパクであつた。

L-alanine, L-leucine の単純拡散を除いた取り込みは、共に基質濃度10mM でほぼ飽和に達した。両逆数プロットにより求めたL-leucine に対する K_m は4.2mM, V_{max} は1.16 μ mol/ml IVW/30s であり、すでに報告したように2組の速度パラメーターをもつL-alanine の場合とは明らかに異なつていた。

L系で取り込まれるとされているL-leucine の取り込みは、100mM Na^+ 濃度勾配存在下では約2倍に促進されたが、L-alanine の場合にみられる overshoot 現象は認められなかつた。100mM Na^+ 濃度勾配存在下での取り込みを100%として、中性アミノ酸の輸送系であるA, ASC, L各系の割合を基質濃度0.1mM の条件下で求めると、L-alanine では55%, 20%, 15%となり単純拡散10%であつた。一方L-leucine ではそれぞれ45%, 0%, 15%となり単純拡散は40%であつた。

以上の結果より、ヒト胎盤微絨毛膜に存在する中性アミノ酸の輸送系は、L-alanine とL-leucine で明らかに異なつてることが示された。

Synopsis To characterize the placental amino acid transport systems, L-alanine and L-leucine uptakes were studied using microvillous brush border membrane vesicles prepared from human placenta. The specific activities of alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase in the membrane preparation were enriched 9-11 times as high as those in the homogenate. Intravesicular water (IVW) volume determined with 3-O-methyl-D-glucose was 0.59 μ l/mg protein. The saturation kinetics of L-leucine uptake by the vesicles equilibrated with Na^+ gave a single set of K_m (4.2mM) and V_{max} (1.16 μ mol/ml IVW/30s). These parameters were clearly different from those for L-alanine uptake reported previously (Asai et al.: Biochem. Int., 4: 377, 1982). In the presence of an inward Na^+ -gradient L-leucine uptake was stimulated about 2 times, but transient accumulation was not observed differing from L-alanine uptake. Discrimination of the neutral amino acid transport systems in the presence of an inward 100mM Na^+ -gradient revealed that the relative contributions of A, ASC and L systems, and simple diffusion were 55, 20, 15 and 10% for L-alanine, and 45, 0, 15 and 40% for L-leucine, respectively. The results indicate that the neutral amino acid transport systems in the human placental microvillous membranes are clearly different between L-alanine and L-leucine.

Key words: L-Alanine • L-Leucine • Transport systems • Membrane vesicle • Human placenta

緒 言

胎児は短期間に急速な発育・発達を遂げるが、この間に供給されるほとんどの物質は、母体血中より胎盤を介して胎児血中へ輸送されている。しかし、タンパクについては、IgGなど少数のものを除いては、胎盤を通過することができないため、アミノ酸として輸送され、胎児側でタンパク合成がおこなわれている。

ほとんどのアミノ酸は母体血中より胎児血中でその濃度が高く、胎盤で能動輸送されていると考えられている³⁴⁾。胎盤におけるアミノ酸輸送機構は、*in vivo*, *in vitro*ともいくつかの方法¹⁹⁾によつて解析されている。*in vitro*の実験としては、主として胎盤還流法²²⁾²⁴⁾、スライス法⁹⁾¹¹⁾¹⁸⁾²⁸⁾などが行われてきた。これらの研究により、アミノ酸は立体特異的に²²⁾、濃度勾配に抗して⁹⁾、アミノ酸グループに特異的な系により¹¹⁾³⁴⁾輸送される事が明らかにされた。しかし、胎盤のどの部位でアミノ酸が能動輸送されているのかについては明らかにされていない。さらに前述の実験方法では、天然のアミノ酸を基質とした時これらは細胞内で代謝されるために輸送の解析には適さず、従来人工基質である α -aminoisobutyric acid (AIB) が用いられることが多かつた⁹⁾¹⁸⁾²⁸⁾。しかし、膜小胞を使えば細胞内代謝の影響を除外でき単純化された一定の条件下で天然のアミノ酸の輸送を解析するこ

とが可能である¹⁶⁾。

一方中性アミノ酸の輸送系である A (alanine-preferring), ASC (specific for alanine, serine, and cysteine), L (leucine-preferring) 系について、種々の臓器・細胞で研究が進み、多くの中性アミノ酸ではこの3つの輸送系が種々の割合で関与していることが知られてきた⁷⁾⁸⁾²⁷⁾。

そこで、本実験ではヒト胎盤より調製した微絨毛膜小胞を用い、天然のアミノ酸である L-alanine (Ala), L-leucine (Leu) の輸送系について解析をおこなつた。

実験材料ならびに方法

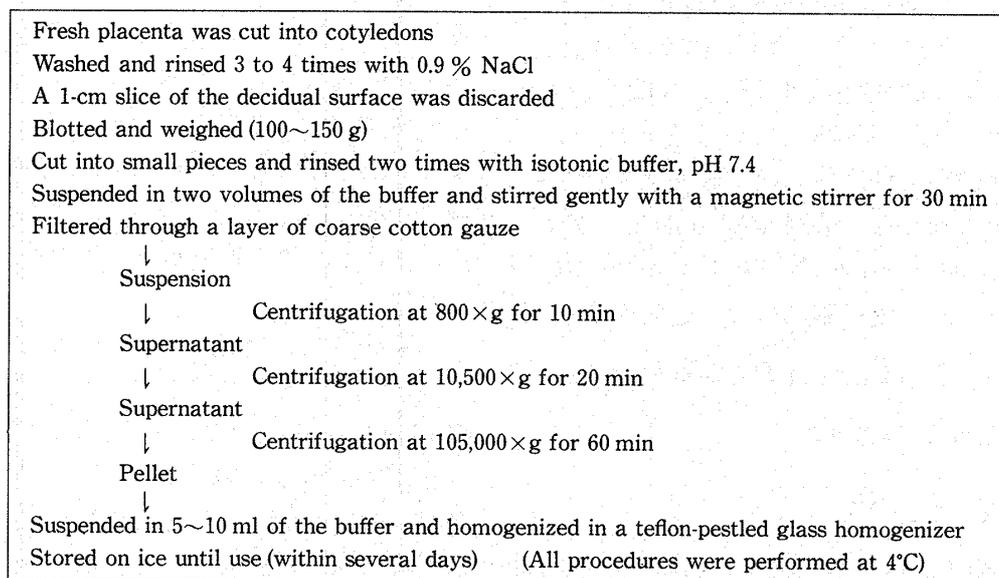
1. 胎盤微絨毛膜小胞の調製

ヒト満期正常分娩の胎盤を、Smith et al.³⁰⁾の方法に準じて処理し微絨毛膜小胞を調製した(図1)。調製用 isotonic buffer としては、① Krebs-Ringer phosphate buffer (KRP): 130 mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 4.2mMKCl, 1.2mM MgSO₄, 0.75mM CaCl₂ を含み H₃PO₄ により pH7.4 としたもの、または、② Mannitol buffer: 0.3M mannitol, 10mM Tris-HCl, pH7.4 を用いた。

2. 酵素活性の測定

胎盤微絨毛膜小胞の純度検定は、細胞下成分に局在する酵素、すなわち alkaline phosphatase⁵⁾ と 5'-nucleotidase²⁾ (細胞膜), succinic dehydrogenase²⁾¹⁾ (ミトコンドリア),

図1 Preparation of human placental microvillous brush border membrane vesicles



arylsulphatase²⁶⁾(ライソゾーム), DPNH diaphorase³¹⁾(マイクロゾーム), lactic dehydrogenase⁴⁾(細胞質溶性画分)の活性を測定することによりおこなった。また酵素活性を比較するため、胎盤ホモジェネートおよびマイクロゾーム分画を以下のごとく調製した。血液を洗い流し、血管を可能な限り除去した胎盤を、細切し9倍量の sucrose buffer (0.25M sucrose, 10mM Tris-HCl, pH7.4) に懸濁した。これを Waring-Blendor にて、最高速度で3分間ホモジェナイズした(胎盤ホモジェネート)。さらにこのホモジェネートを10,500×g, 20分遠心し、得られた上清を105,000×g, 60分遠心した。この沈査をマイクロゾーム分画とし、少量の sucrose buffer に懸濁後、酵素活性を測定した。

3. 取り込み量の測定

微絨毛膜小胞(200 μ g タンパク以下)を最終的に100 μ l になるように後述の反応溶液中に入れ、25°Cで30秒間反応させた。1 ml の ice-cold wash buffer (0.80 M NaCl, 10mM Tris-HCl, pH7.4) を加えることにより反応を停止させ、ただちに膜フィルター (Millipore, HAWP, pore size 0.45 μ m) にて減圧下に濾過、5 ml の ice-cold wash buffer で2回洗浄後、赤外線ランプで乾燥させた。この膜フィルターを5ml の toluene scintillator に入れ、Beckman LS-9000 liquid scintillation system にて放射活性を測定した。取り込み実験の control として、反応時間0秒の時の値を用いた。

速度パラメーターは次のようにして求めた。KRPで調製された微絨毛膜小胞を、KRPに溶解した各種濃度(0.075-10mM)の¹⁴C-Alaまたは¹⁴C-Leuと反応させ、各濃度における取り込み量を測定した(total uptake)。mediated uptake (Y) は Akedo と Christensen の方法¹⁾にしたがって以下のごとく計算した。膜小胞への取り込み速度

$\frac{dV_i}{dt}$ は mediated uptake (Y) と拡散の和であり、式(1)のように表わされる。

$$\frac{dV_i}{dt} = Y + Kd (V_o - V_i) \dots (1)$$

ただし V_i は膜小胞内の基質濃度、 V_o は反応溶

液中の基質濃度、 Kd は拡散定数である。式(1)を積分することにより式(2)をうる。

$$\frac{V_i}{V_o} = \frac{Y}{Kd} (1 - e^{-Kdt}) \frac{1}{V_o} + (1 - e^{-Kdt}) \dots (2)$$

基質濃度 V_o が十分に高ければ mediated uptake (Y) は飽和しほぼ一定となり、拡散定数 Kd は、 V_i/V_o を $1/V_o$ に対してプロットしたグラフの切片より計算できる。式(2)と計算により求めた Kd から mediated uptake (Y) が算出される。Y と基質濃度の両逆数プロットより速度パラメーター (K_m と V_{max}) を求めた。

陽イオン濃度勾配存在下での取り込み実験は次のようにおこなった。最終濃度で、100mM NaCl, 100mM mannitol, 0.1mM ¹⁴C-Ala あるいは 0.1mM ¹⁴C-Leu, 10mM Tris-HCl, pH 7.4 になるように反応溶液を作成し、Mannitol buffer で調製された微絨毛膜小胞を加えることにより反応を開始させた。この時、膜小胞に対して100mM の Na^+ の内向き濃度勾配ができています。これを Na^+ -gradient とし、NaCl のかわりに LiCl を用いたものを Li^+ -gradient とした。また陽イオンを含まない場合 (Cation-free) には上述の反応溶液から NaCl を除きその代りに等張になるように mannitol を加えたものを用いた。

4. 中性アミノ酸輸送系の解析

中性アミノ酸の輸送系としてよく知られている A, ASC, L系について解析した。各系の特徴については Christensen⁷⁸⁾により詳しく報告されている。各系の働いている割合は、各系の特異的基質による阻害実験により求める方法¹¹⁾²⁷⁾と、陽イオンに対する依存性の違いから求める方法¹³⁾とがある。後者の場合① A系は Na^+ 依存性、② L系は Na^+ 非依存性、また③ ASC系は Na^+ 依存性であるが Li^+ によつて置換しうる¹⁰⁾という特性が利用される。

本実験ではこの陽イオンに対する依存性の違いから以下のごとく各系を求めた。① A系は Na^+ -gradient 存在下での取り込みから Li^+ -gradient 存在下での取り込みを差し引いたもの、② ASC系は、 Li^+ -gradient 存在下での取り込みから Cation-free の場合の取り込みを差し引いたもの、

③ L系は Cation-free の場合の取り込みから、過剰量の阻害剤 (12.5mM L-phenylalanine) を加えても取り込まれる単純拡散の部分を差し引いたものとした。

5. 膜小胞容量の測定

膜小胞容量 (Intravesicular water (IVW) volume) の測定は, Kletzien et al.¹⁵⁾の方法によつた。膜小胞を glucose analogue である 3-O-methyl-D-glucose と平衡化するまで (25°C, 60分) 反応させ、膜フィルター法により取り込み量を測定した。基質濃度 (mM) を横軸に、取り込み量 (nmol/mg タンパク) を縦軸にプロットすればこのスロープの値から、膜小胞の単位タンパクあたりの容量 ($\mu\text{l}/\text{mg}$ タンパク) が求められる。

6. タンパク量の測定

Lowry et al.¹⁷⁾の方法を用い、牛血清アルブミンを標準タンパクとして測定した。

7. 試薬

L- [$^{14}\text{C}(\text{U})$] -alanine (170—177mCi/mmol), L- [$^{14}\text{C}(\text{U})$] -leucine (328—355mCi/mmol), 3-O- [glucose- $^{14}\text{C}(\text{U})$]-methyl-D-glucose (310mCi/mmol) は New England Nuclear 製のものを用いた。また他の試薬はすべて市販の特級試薬を用いた。

実験成績

1. 微絨毛膜の純度

各細胞下成分についての指標酵素活性を、胎盤ホモジェネート、マイクロゾーム分画および微絨

毛膜について測定した結果を表1に示す。微絨毛膜の指標酵素である alkaline phosphatase, 5'-nucleotidase の比活性は胎盤ホモジェネートに比べ、9~11倍に上昇したが、他の細胞下成分の指標酵素活性はいずれも減少した。これらの結果は諸家の報告²⁹⁾³²⁾とよく一致している。

2. 微絨毛膜タンパク量とアミノ酸の取り込み量との関係

膜フィルター法の検討をするために、タンパク量とアミノ酸の取り込み量との関係をみたのが図2である。200 μg タンパク以下では両者間には直線関係があり、200 μg タンパク以上ではかえつて

図2 Relationship between amino acid uptake and membrane protein. Aliquots of a serially diluted membrane homogenate were incubated with 1.41 μM L- [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-leucine at 25°C for 5 min. L-Leucine uptake is directly proportional to the amount of membrane protein up to about 200 μg .

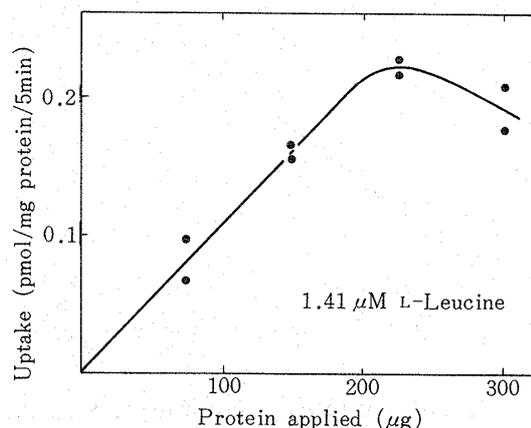


表1 Marker enzyme analysis of placental subcellular fractions

	Whole	Microsomal		Microvillous	
	SA*	SA	RSA**	SA	RSA
Alkaline phosphatase (6)	0.355 \pm 0.228	1.44 \pm 0.728	4.06	3.77 \pm 1.64	10.6
5'-Nucleotidase (3)	0.231 \pm 0.033	0.676 \pm 0.105	2.93	2.02 \pm 0.382	8.74
Succinic dehydrogenase (3)	0.011 \pm 0.001	0.008 \pm 0.001	0.73	<0.001	N D.***
Arylsulphatase (6)	0.007 \pm 0.002	0.013 \pm 0.005	1.93	0.006 \pm 0.003	0.86
DPNH diaphorase (6)	0.230 \pm 0.070	0.464 \pm 0.163	2.02	0.131 \pm 0.002	0.57
Lactic dehydrogenase (6)	0.279 \pm 0.201	0.039 \pm 0.039	0.14	0.035 \pm 0.029	0.13

The enzymic activities were determined in duplicate as described in Materials and Methods. Values represent the averages \pm S.D.. The numbers of placentae studied were indicated in parentheses.

* Specific activity: micromoles of product formed per mg protein per min.

** Relative specific activity: SA of the fraction/SA of the whole homogenate.

*** Not determined.

取り込み量が減少する。したがって本実験では1枚のフィルターあたり200 μ g以下のタンパク量となるようにした。

3. 微絨毛膜小胞の容量

3-O-methyl-D-glucoseで膜小胞を平衡化した時、取り込み量と基質濃度との間に直線関係が認められた(図3)。実験方法で述べたようにこの直線の傾斜がタンパクあたりの膜小胞容量である。6例の胎盤より求めた結果は、 $0.59 \pm 0.12 \mu\text{l}/\text{mg}$ タンパクであった。したがって以下の計算には、膜小胞容量として $0.59 \mu\text{l}/\text{mg}$ タンパクを用いた。

図3 Determination of intravesicular water volume by 3-O-methyl-D-glucose. Membrane vesicles were incubated with the substrate for 60 min at 25°C. Slope shows intravesicular water volume in $\mu\text{l}/\text{mg}$ protein.

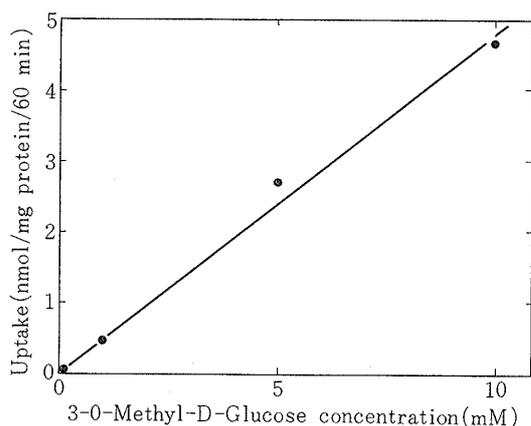
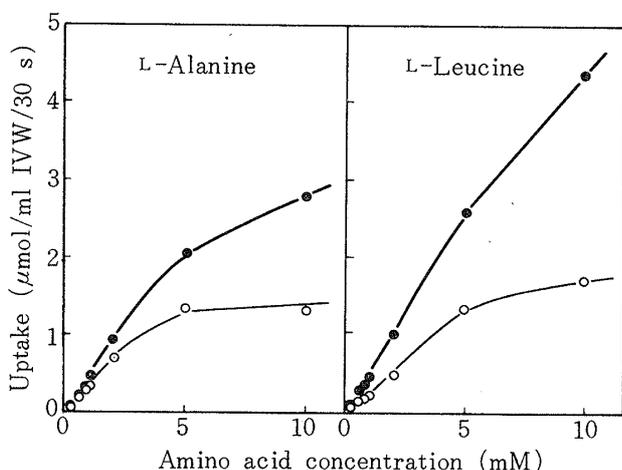


図4 Effect of substrate concentration on the uptake of L-alanine (left) or L-leucine (right). Upper (●) and lower (○) curves represent the total and the mediated uptakes, respectively.



4. 基質濃度と取り込みとの関係

Ala, Leuとも0.075-10mMの範囲で実験をおこなった。図4に示すように、両者とも10mMでも飽和に達しなかつた。実験方法で詳述した Akedo と Christensen¹⁾の方法により求めた拡散定数 Kdは Alaでは $0.18 \pm 0.06/30\text{s}$ (mean \pm S. Dz. n=6), Leuでは $0.26 \pm 0.05/30\text{s}$ (mean \pm S. D., n=8)であり、これを用いて mediated uptakeを算出し、基質濃度に対してプロットすると10mMで両者ともほぼ飽和に達した(図4)。この mediated uptake (Y)についてさらに検討を加えた。

Leuでは図5に示すように両逆数プロットは1本の直線となり、これより Kmは $4.2 \pm 1.8\text{mM}$ Vmaxは $1.16 \pm 0.35 \mu\text{mol}/\text{ml IVW}/30\text{s}$ (n=8)と計算された。しかし、Alaでは既に報告したように³⁾、両逆数プロットは2本の直線となり、高親和性の部分の Kmは0.38mM, Vmaxは $0.35 \mu\text{mol}/\text{ml IVW}/30\text{s}$, 低親和性の部分の Km, Vmaxはそれぞれ3.5mM, $1.53 \mu\text{mol}/\text{ml IVW}/30\text{s}$ であった。

この結果から、LeuはAlaとは明らかに異なつた輸送系で取り込まれていることが示された。

5. 陽イオン濃度勾配の影響

100mM Na⁺-gradient存在下および Cation-freeの条件下で反応時間と取り込み量との関係を調べた。図6左に示したようにAlaではNa⁺-

図5 A double reciprocal plot of the mediated uptake (Y) of L-leucine versus its concentration. In this membrane preparation the kinetic parameters were 6.1mM for Km and $1.74 \mu\text{mol}/\text{ml IVW}/30\text{s}$ for Vmax.

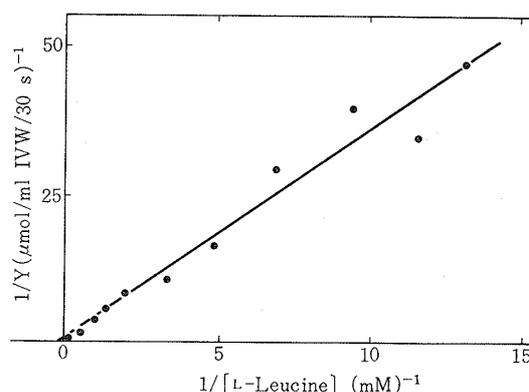
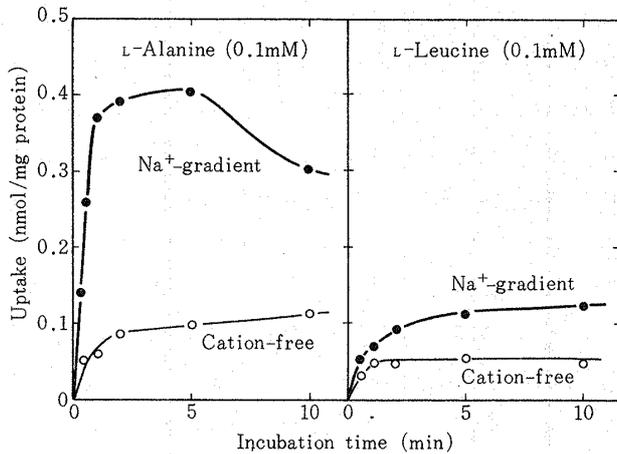


図6 Effect of Na^+ on the time course of L-alanine (left) or L-leucine (right) uptakes. Experimental procedures were described under Materials and Methods. An inward 100mM Na^+ -gradient (\bullet) was established at the initiation of incubation. In the cation free experiment (\circ) NaCl was replaced isoosmotically by mannitol.

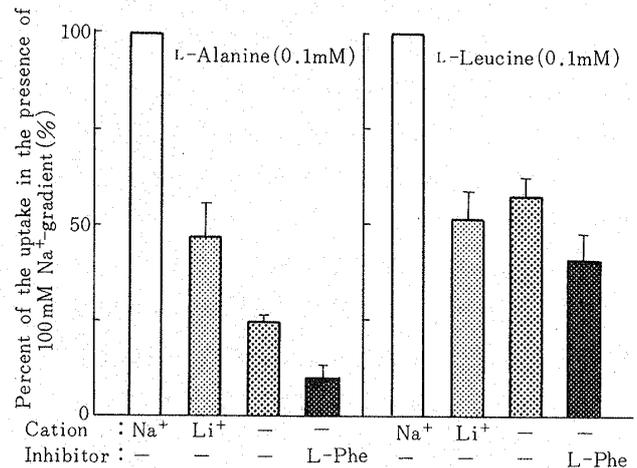


gradient 存在下で overshoot 現象が示されたが, Cation-free ではみとめられず, 既報告³⁾を確認した. 100mM KCl , 100mM Choline-Cl でも Cation-free と同様でありさらに Li^+ -gradient を用いた場合も overshoot 現象はみられなかった. 以上のことより, overshoot 現象は Na^+ に特異的に生ずることが示された. 一方 Na^+ -gradient 存在下での Leu の取り込み量は約 2 倍に増加するが, Ala でみられた overshoot 現象は認められなかった (図 6 右). この事から Leu の取り込みに対する Na^+ -gradient の影響は Ala の取り込みに対する場合と明らかに異なっていることが示された.

6. 中性アミノ酸輸送系の解析

Ala, Leu の取り込みに, A, ASC, L 系がどのような割合で働いているかを次に検討した. 100mM Na^+ -gradient 存在下での取り込みを 100% とし, Ala と Leu について算出した (図 7). 100mM Li^+ -gradient 存在下の Ala の取り込みは $46.7 \pm 8.6\%$, Leu では $51.4 \pm 7.0\%$ であり, Cation-free では, Ala, Leu それぞれ, $24.5 \pm 1.5\%$ $57.2 \pm 4.2\%$ であつた. 単純拡散による部分は, Ala では $9.4 \pm 3.8\%$ であつたが, Leu ではこの割合が大きく, $40.7 \pm 6.2\%$ であつた. この結果は前述したように拡散定数が Leu で大きいという

図7 Effects of cations on L-alanine (left) or L-leucine (right) uptake. Experimental procedures were described under Materials and Methods. L-Phenylalanine (12.5mM) was used as an inhibitor of Na^+ -independent uptake. The values are given as percent of the uptake in the presence of 100mM Na^+ -gradient and are the means \pm S. D. of three to five placentae.



ことと一致する.

以上の結果に基づいて各系の割合を求めると, 本実験条件下では Ala の場合, A 系 55% , ASC 系 20% , L 系 15% , 単純拡散 10% であり, 一方 Leu の場合, A 系 45% , ASC 系は認められず, L 系 15% , 単純拡散 40% であつた.

考 案

母体血中, 胎児血中, 胎盤絨毛細胞内のアミノ酸濃度を測定すると, 多くのアミノ酸で, 絨毛細胞内 $>$ 胎児血中 $>$ 母体血中の順となり, 絨毛細胞の母体側細胞膜である微絨毛膜ではアミノ酸が能動的に輸送されていると考えられている³⁴⁾. しかし, 胎盤還流, slice などの従来の実験方法では胎盤における能動輸送の部位を同定することはできなかった.

細胞膜の膜小胞を用いた実験にはいくつかの利点がある¹⁶⁾. まず第 1 に他の細胞内成分による代謝などの影響を除外でき, 単純に物質の膜通過のみを解析できる. 第 2 に反応条件の設定が容易である. たとえば膜小胞内部のイオンの種類や濃度を一定にすることができ, 膜に対する化学的または電気化学的なポテンシャルの大きさはもちろん, その方向性をも決めることが可能である.

Ruzycki et al.²³⁾は、胎盤微絨毛膜小胞へのAIBの取り込みについて解析し、膜小胞においても絨毛組織を用いた場合と同様なアミノ酸輸送活性が保持されていることを報告しており、胎盤におけるアミノ酸輸送機構の研究に微絨毛膜小胞が用いられるようになってきた。

調製された胎盤微絨毛膜の諸性質については著者ら³⁾も一部報告したが、微絨毛膜は浸透圧に感受性のある膜小胞を形成しており、アミノ酸は膜に結合するのではなく、膜小胞内部に取り込まれることが明らかになっている⁶⁾²³⁾。得られた微絨毛膜小胞の容量は、 $0.59\mu\text{l}/\text{mg}$ タンパクであり、Boyd et al.⁶⁾の報告した $0.5\mu\text{l}/\text{mg}$ タンパクによく一致していた。この値は小腸や腎の上皮細胞の膜小胞容量の $0.5\text{--}1.2\mu\text{l}/\text{mg}$ タンパクに近似している。しかし、Ruzycki et al.²³⁾は $3.6\mu\text{l}/\text{mg}$ タンパクと約6倍の値を報告している。この違いの原因については不明である。

アミノ酸の取り込みの速度パラメーターを求めた報告は、ヒト胎盤では非常に少なく、代謝されない合成アミノ酸であるAIB¹⁸⁾²³⁾²⁸⁾、L-proline⁶⁾、Ala³⁾についてのみである。本実験によりはじめてLeuについての速度パラメーターが明らかにされた。Leuは主としてL系で輸送されることが知られており⁷⁾⁸⁾²⁷⁾、ここで求めたKm、 4.1mM はL系のKmと考えられる。

中性アミノ酸の輸送系としてよく知られているA、ASC、L系は個々のアミノ酸の取り込みに際し、種々の割合で働いている⁷⁾⁸⁾²⁷⁾。本実験ではじめて胎盤微絨毛膜へのAla、Leuの取り込みに働く各系の割合が明らかにされた。AlaではA系55%でASC、L系がこれに続き単純拡散10%、一方LeuではASC系は働いておらず、A系L系それぞれ45%、15%で単純拡散は40%を占めると計算された。Enders et al.¹¹⁾が絨毛組織でおこなった実験とはアミノ酸濃度の違いがあり(本実験では 0.1mM 、Enders et al.¹¹⁾では 0.01mM)、また反応溶液組成も異なっているため単純に比較することはできないがAlaについては類似した結果が得られている。Leuは主としてL系で取り込まれるとされているにもかかわらず Na^+ -gradient存

在下では15%しか働いていなかったことについてはその原因として、 Na^+ -gradientによりA系が著明に活性化されること、L系のKmがA系のKm約 0.4mM ³⁾に比べ約10倍大きくそのために 0.1mM という低濃度ではA系が主に働いたことなどが考えられる。

アミノ酸の能動輸送のエネルギーについては従来より多くの報告がある。胎盤スライスを用いた実験で、 $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{-ATPase}$ の阻害剤であるouabainやethacrynic acidを添加すると著明に取り込みが減少することが報告された¹⁸⁾。しかし、膜小胞によるアミノ酸輸送の解析により $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{-ATPase}$ が直接エネルギーを供給するのではなく、 $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{-ATPase}$ によつて形成された Na^+ 、 K^+ の濃度勾配による電気化学的ポテンシャルが関与していることが明らかになってきた¹³⁾¹⁶⁾²⁵⁾。事実、微絨毛膜には $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{-ATPase}$ は存在せず、基底膜側の細胞膜に局在することが知られている⁶⁾²⁰⁾。したがつて胎盤においてもアミノ酸能動輸送は、 Na^+ -gradientなどにより生ずる電気化学的ポテンシャルが直接エネルギー源になっていると考えられる³⁾⁶⁾。

Christensen⁸⁾は胎盤微絨毛膜小胞へのAIBの取り込みが、 Na^+ -gradientにより2時間以上も持続するというRuzycki et al.²³⁾の報告を引用し、この現象は胎盤におけるアミノ酸輸送の特徴的所見であると述べている。しかし、著者ら³⁾は Na^+ -gradientによる取り込み促進は約30分で消失し腎における結果¹²⁾と同様であることを報告した。Boyd et al.⁶⁾も著者らと同様な結果を報告している。したがつて胎盤における特徴的な所見とは考えられない。以上述べたように、現在までのところ胎盤におけるアミノ酸輸送は、他の臓器・細胞と本質的には同じ機構によるものと考えられよう。

本実験では、アミノ酸の絨毛細胞への取り込み機構について解析したが、胎盤におけるアミノ酸輸送を解析するためには、さらに絨毛細胞から基底膜側へ運ばれる過程、結合組織中を通り絨毛血管の内皮細胞を通過する過程についての研究も不可欠である。小腸におけるアミノ酸輸送の研究で

は、上皮細胞の細胞膜を絨毛側と基底膜側に遠心法によつて分離し²⁰⁾、両者のアミノ酸輸送系が異なっていることが示されている¹⁴⁾。胎盤において絨毛細胞内から胎児側へアミノ酸が拡散によつて運ばれていると考えられているが、小腸と同様に基底膜側の絨毛細胞膜を単離し、それを用いての研究が必要である。また glutamic acid が臍帯血中より胎盤へ取り込まれているとの報告もあるが²⁴⁾、これについても同様な実験が必要であり今後の研究が待たれる。

子宮内胎児発育遅延 (IUGR) の発症要因の一つとして胎盤におけるアミノ酸の輸送障害が考えられており³³⁾、その治療法として総合アミノ酸製剤の輸液がおこなわれている。しかし本実験で明らかになつたように中性アミノ酸間においてその輸送系が異なっていることを考えれば、IUGR におけるアミノ酸輸送障害も各アミノ酸間で種々の程度に違っている可能性がある。今後 IUGR の胎盤におけるアミノ酸輸送系の詳細な検討が必要であることはいうまでもないが、それとともに各アミノ酸でその輸送障害の程度が違っている可能性があることから、IUGR の治療においても適切な組成をもつたアミノ酸製剤の投与が考えられねばならないであろう。

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師友田豊教授に感謝いたします。また終始、御指導、御助言をいただきながら本研究を行わせていただいた愛知県心身障害者コロニー、発達障害研究所、周生期学部柏保重夫部長、周生期学部各位にあつくお礼申し上げます。また胎盤を快く提供していただいた名古屋市立守山市民病院産婦人科各位に感謝いたします。

本論文の一部は第33回日本産科婦人科学会学術講演会、第54回日本生化学会大会において発表した。

文 献

1. Akedo, H. and Christensen, H.N.: Nature of insulin action on amino acid uptake by the isolated diaphragm. *J. Biol. Chem.*, 237: 118, 1962.
2. Aronson, N.N. Jr. and Touster, O.: Isolation of rat liver plasma membrane fragments in isotonic sucrose. *Methods Enzymol.*, 31: 90, 1974.
3. Asai, M., Keino, H. and Kashiwamata, S.: L-Alanine uptake by microvillous brush border membrane vesicles prepared from human placenta. *Biochem. Int.*, 4: 377, 1982.
4. Bergmeyer, H.U. and Bernt, E.: Lactic dehydrogenase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd ed. (ed. H.U. Bergmeyer), 579, Academic Press, New York, 1974.
5. Bessey, O.A., Lowry, O.H. and Brock, M.J.: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.*, 164: 321, 1946.
6. Boyd, C.A.R. and Lund, E.K.: L-Proline transport by brush border membrane vesicles prepared from human placenta. *J. Physiol.*, 315: 9, 1981.
7. Christensen, H.N.: Some special kinetic problems of transport. *Adv. Enzymol.*, 32: 1, 1969.
8. Christensen, H.N.: Exploiting amino acid structure to learn about membrane transport. *Adv. Enzymol.*, 49: 41, 1979.
9. Dancis, J., Money, W.L., Springer, D. and Levitz, M.: Transport of amino acids by placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 101: 820, 1968.
10. Edmondson, J.W., Lumeng, L. and Li, T.-K.: Comparative studies of alanine and α -aminoisobutyric acid uptake by freshly isolated rat liver cells. *J. Biol. Chem.*, 254: 1653, 1979.
11. Enders, R.H., Judd, R.M., Donohue, T.M. and Smith, C.H.: Placental amino acid uptake. III. Transport systems for neutral amino acids. *Am. J. Physiol.*, 230: 706, 1976.
12. Fass, S.J., Hammerman, M.R. and Sacktor, B.: Transport of amino acids in renal brush border membrane vesicles. Uptake of the neutral amino acid L-alanine. *J. Biol. Chem.*, 252: 583, 1977.
13. Hayashi, K., Yamamoto, S., Ohe, K., Miyoshi, A. and Kawasaki, T.: Na⁺-gradient-dependent transport of L-proline and analysis of its carrier system in brush-border membrane vesicles of the guinea-pig ileum. *Biochim. Biophys. Acta*, 601: 654, 1980.
14. Hopfer, U., Sigrist-Nelson, K., Ammann, E. and Murer, H.: Differences in neutral amino acid and glucose transport between brush border and basolateral plasma membrane of intestinal epithelial cells. *J. Cell. Physiol.*, 89: 805, 1976.
15. Kletzien, R.F., Pariza, M.W., Becker, J.E. and Potter, V.R.: A method using 3-O-methyl-D-glucose and phloretin for the determination of

- intracellular water space of cells in monolayer culture. *Anal. Biochem.*, 68 : 537, 1975.
16. *Lever, J.E.* : The use of membrane vesicles in transport studies. *CRC. Crit. Rev. Biochem.*, 7 : 187, 1980.
 17. *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, 1951.
 18. *Miller, R.K. and Berndt, W.O.* : Characterization of neutral amino acid accumulation by human term placental slices. *Am. J. Physiol.*, 227 : 1236, 1974.
 19. *Miller, R.K. and Berndt, W.O.* : Mechanisms of transport across the placenta: An *in vitro* approach. *Life Sci.*, 16 : 7, 1975.
 20. *Murer, H., Ammann, E., Biber, J. and Hopfer, U.* : The surface membrane of the small intestinal epithelial cell. I. Localization of adenylyl cyclase. *Biochim. Biophys. Acta*, 433 : 509, 1976.
 21. *Pennington, R.J.* : Biochemistry of dystrophic muscle. Mitochondrial succinate-tetrazolium reductase and adenosine triphosphatase. *Biochem. J.*, 80 : 649, 1961.
 22. *Reynolds, M.L. and Young, M.* : The transfer of free α -amino nitrogen across the placental membrane in the guinea-pig. *J. Physiol.*, 214 : 583, 1971.
 23. *Ruzycki, S.M., Kelley, L.K. and Smith, C.H.* : Placental amino acid uptake. IV. Transport by microvillous membrane vesicles. *Am. J. Physiol.*, 234 : C27, 1978.
 24. *Schneider, H., Möhlen, K.-H., Challier, J.-C. and Dancis, J.* : Transfer of glutamic acid across the human placenta perfused *in vitro*. *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 86 : 299, 1979.
 25. *Shapiro, M.P. and Heinz, E.* : Na⁺-linked cotransport of glycine in vesicles of Ehrlich cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 600 : 898, 1980.
 26. *Shephard, E.H. and Hübscher, G.* : Phosphatidate biosynthesis in mitochondrial sub-fractions of rat liver. *Biochem. J.*, 113 : 429, 1969.
 27. *Shotwell, M.A., Jayme, D.W., Kilberg, M.S. and Oxender, D.L.* : Neutral amino acid transport systems in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, 256 : 5422, 1981.
 28. *Smith, C.H., Adcock, E.W. III., Teasdale, F., Meschia, G. and Battaglia, F.C.* : Placental amino acid uptake: Tissue preparation, kinetics, and preincubation effect. *Am. J. Physiol.*, 224 : 558, 1973.
 29. *Smith, C.H., Nelson, D.M., King, B.F., Donohue, T.M., Ruzycki, S.M. and Kelley, L.K.* : Characterization of a microvillous membrane preparation from human placental syncytiotrophoblast: A morphologic, biochemical, and physiologic study. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 128 : 190, 1977.
 30. *Smith, N.C., Brush, M.G. and Luckett, S.* : Preparation of human placental villous surface membrane. *Nature*, 252 : 302, 1974.
 31. *Wallach, D.F.H. and Kamat, V.B.* : Preparation of plasma-membrane fragments from mouse ascites tumor cells. *Methods Enzymol.*, 8 : 164, 1966.
 32. *Whitsett, J.A., Johnson, C.L. and Hawkins, K.* : Differences in localization of insulin receptors and adenylyl cyclase in the human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 133 : 204, 1979.
 33. *Yamaguchi, R., Matsuda, T. and Aizawa, T.* : Amino acid uptakes in normal and small-for-date placentas, with special reference to activity of transport ATPase in placental Slices and isolated trophoblastic membrane. *Tohoku J. Exp. Med.*, 125 : 367, 1978.
 34. *Young, M.* : Transfer of amino acids. *In Placental Transfer*, (eds. G.V.D. Chamberlain and A.W. Wilkinson), 142. Pitman Medical Book Co., London, 1979.

(No. 5107 昭57・6・9受付)