

L-lysine の胎盤輸送機構の解明 (人胎盤微絨毛膜小胞を用いて)

奈良県立医科大学産婦人科学教室

飯岡 秀晃 森山 郁子 久間 正幸
尼崎 真実 伊藤 公彦 一條 元彦

Study on the Mechanism of Placental Transport of L-lysine (Using Human Placental Microvillous (Brush Border) Membrane Vesicles)

Hideaki IIOKA, Ikuko MORIYAMA, Masayuki KYUMA,
Mami AMASAKI, Kimihiko ITOH and Motohiko ICHIJO

Department of Obstetrics and Gynecology, Nara Medical University, Nara

概要 満期人胎盤より得た微絨毛膜小胞を用いて L-lysine の小胞への取り込みを急速濾過法によつて検討した。L-lysine の小胞への取り込みは浸透圧に感受性を示す小胞内への輸送で、また Na^+ に依存しない輸送であることを明らかにした。L-lysine の小胞内への取り込み初速度は、膜透過性の高い陰イオンもしくはバリノマイシンによつて惹起された K^+ 拡散電位によつて小胞内陰性の膜電位ポテンシャルが形成された時、著明に増加した。この成績より、小胞内への L-lysine の取り込みは膜電位ポテンシャルに依存していることが判明した。

Kinetics の解析より、L-lysine の小胞内への取り込みは二つの輸送系によつてなされていることが判明し、夫々のパラメーターとして Km_1 0.13mM, Km_2 0.91mM, Vmax_1 590pmol/mg protein/20 sec, Vmax_2 2,010pmol/mg protein/20 sec が得られた。微絨毛膜小胞内への L-lysine の取り込みは塩基性アミノ酸 (L-arginine, L-ornithine, L-glutamine) によつて阻害されたが、一方、その他のアミノ酸は取り込みに影響を与えなかつた。このことより、胎盤微絨毛膜には、塩基性アミノ酸に構造特異的な輸送系が存在することが示された。

Synopsis The uptake of L-lysine in human placental microvilli vesicles prepared from human term placenta was studied using the rapid filtration technique. The uptake of L-lysine into the vesicles was osmotically sensitive. This finding indicates that the uptake of L-lysine by placental microvilli vesicles represents transport into the membrane vesicles. The uptake of L-lysine into microvilli vesicles is sodium independent. The initial rate of uptake is markedly increased when the intravesicular space is rendered electrically more negative by membrane diffusion potential induced by the use of highly permeant anions or by K^+ diffusion potentials via valinomycin. These results indicate that the sodium independent uptake of L-lysine into the microvilli membrane vesicles is dependent on the electrical potential difference of the membranes. A kinetic analysis of the uptake demonstrated that two transport systems for vesicular entry of L-lysine existed with a Km_1 of 0.13mM, Vmax_1 of 590pmol/mg protein/20sec, Km_2 of 0.91mM, Vmax_2 of 2010pmol/mg protein/20sec. The uptake of L-lysine in microvilli vesicles was inhibited by dibasic amino acid (L-arginine, L-ornithine, L-glutamine), but not by other classes of amino acid. These results indicate the existence of a dibasic amino acid specific transport system in placental microvilli membrane.

Key words: L-lysine • Transport • Placenta • Trophoblast • Microvilli membrane

緒 言

胎盤微絨毛膜 (刷子縁膜) 小胞を用いた輸送実験は、代謝による影響を除去できること、また小胞内外のイオン環境等を自由に調節できることなどの理由により、物質の膜輸送機構の解明のため

に非常にすぐれた方法である⁷⁾⁽⁸⁾⁽¹²⁾。我々は、この方法を用いて、胎盤絨毛細胞の母体側膜である微絨毛膜におけるアミノ酸の輸送機構について検討をおこなつてきた^{1)~4)}。その結果、L-alanine, L-glutamate, taurine の微絨毛膜小胞内への取り込

みが Na^+ の電気化学的濃度勾配に依存した形でなされていることを明らかにした。胎盤絨毛細胞基底膜側（胎児側）膜には Na^+ , K^+ -ATPase の存在が確認されており、この酵素によつてエネルギーを消費することによつて細胞内外に形成された Na^+ の電気化学的濃度勾配 ($\text{Na}^+ \text{ out} > \text{Na}^+ \text{ in}$) によつて、アミノ酸は Na^+ と共輸送の形で二次的に能動輸送されていることが明らかにされている⁷⁾¹²⁾。刷子縁膜小胞を用いたアミノ酸輸送機構の解明は、小腸、腎を用いた研究が多くあり、その成績はアミノ酸と Na^+ との共輸送の形でアミノ酸の輸送機構が報告されている¹²⁾。しかし、すべてのアミノ酸が Na^+ 依存性により膜輸送されているのではなく、塩基性アミノ酸である L-lysine, L-arginine は腎刷子縁膜小胞を用いた研究によつて Na^+ 非依存性の膜輸送機構が明らかにされている⁹⁾¹⁰⁾。我々の本研究は胎盤における塩基性アミノ酸輸送機構を明らかにする目的で、胎盤微絨毛膜小胞を用いて L-lysine の胎盤輸送機構を検討したのでここに報告する。

実験材料ならびに方法

1. 人胎盤微絨毛膜小胞の調整

微絨毛膜小胞は、Smith et al. の方法²⁰⁾の変法¹⁾により調整した。分娩直後の満期人胎盤の絨毛組織を細切し4℃の buffer (0.25M sucrose, 10mM Hepes-Tris buffer pH 7.4, 0.25mM CaCl_2 含有)を加えて、30分間ゆるやかに攪はんした。800×gにて10分間遠心後上清を取り、最終濃度10mM CaCl_2 になるように加え10,500g 10分間遠心した。遠心後上清をさらに27,000g 20分間遠心した。

2. 酵素活性の測定

分離調整した微絨毛膜小胞の純度を検定するために、alkaline phosphatase⁶⁾, γ -GTP¹¹⁾, 5' nucleotidase⁵⁾の各酵素活性を測定した。蛋白量は Lowry et al. の方法¹³⁾を用いた。

3. L-lysine の小胞取り込み量の測定

^3H -L-lysine の微絨毛膜小胞取り込み量の測定は、急速膜濾過法を用いておこなった¹⁴⁾。反応溶液の最終容量は0.15ml (0.25M sucrose, 0.25mM CaCl_2 , 10mM Hepes-Tris buffer pH 7.4, 0.1M NaCl), 微絨毛膜小胞 (蛋白量60 μg) に各種濃度

の ^3H -L-lysine を加えた。L-lysine の取り込み実験は130 μl の反応溶液中に20 μl の微絨毛膜小胞を加えることによつて反応を開始し、反応停止後、すばやくミリポアフィルター (HA 0.45 μm) を用いて急速濾過をおこない、膜フィルターを3mlの toluene scintillator に入れ放射活性を測定した。取り込み実験の control として微絨毛膜を含まないものを用いた。

4. 試薬

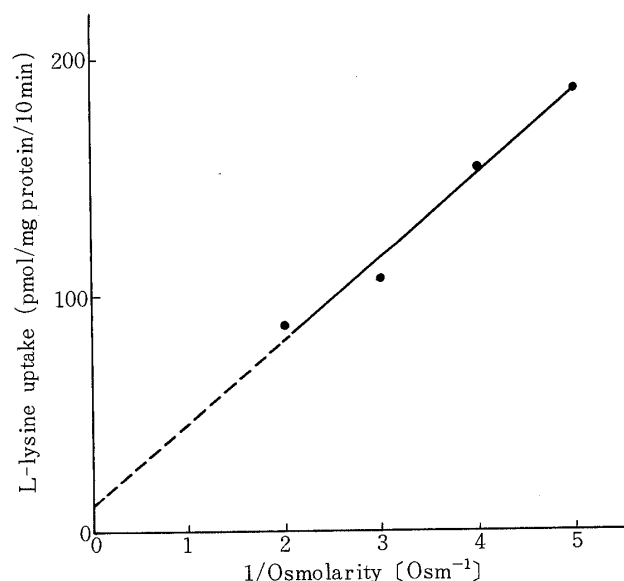
^3H -L-lysine は New England Nuclear 製のものを用いた。また、他の試薬はすべて特級のものを用いた。

実験結果

1) 小胞外浸透圧による L-lysine の取り込みの影響

小胞への L-lysine の取り込みが確実に小胞内への輸送をあらわしているのか、もしくは単なる小胞との結合であるのかを検討する目的で小胞外の浸透圧を0.2~0.5に変化させて小胞内への L-lysine の取り込みに与える影響を測定した。図1に示したごとく小胞外の浸透圧に逆比例して、小胞への取り込みは減少した。すなわち0.5では87 pmol/mg protein/10min, 0.2では183pmol/mg protein/10min であつた。浸透圧を無限大に増加させて理論的に小胞容量が0になる条件下におい

図1 Effect of extravesicular osmolarity on L-lysine uptake



る L-lysine の取り込みはほとんど認めなかつた成績から、小胞膜への L-lysine の結合はほとんどないことを明らかにした。すなわち、以上の成績は小胞への L-lysine の取り込みが小胞内への実際の L-lysine の輸送であることを意味している。

2. L-lysine の小胞内取り込み速度

小胞内への L-lysine の取り込みの経時的経過を測定した成績を図 2 に示した。Na⁺, K⁺, Li⁺, choline⁺ の各陽イオン濃度勾配 (out=100mM>in=0mM) 存在下での L-lysine の小胞内への取り込み量には差がなく、1.5分後に230pmol/mg protein と peak に達した。また L-lysine の取り込みは30分後には平衡に達し265pmol/mg protein であつた。以上の成績より L-lysine の小胞内への取り込みは Na⁺ 濃度勾配に依存しないことが明らかになつた。

3. L-lysine 濃度と小胞内取り込み量

L-lysine の濃度を0.05mM から2mM の間で変化させ L-lysine の小胞内への取り込みを測定したのが図 3 である。濃度2mM でも L-lysine の小胞内への取り込みは飽和に達しなかつた。

取り込み初速度および L-lysine の濃度の両逆数をプロットしたのが図 4 である。高親和性 (K_{m1} , V_{max1}), 低親和性 (K_{m2} , V_{max2}) のパラメーターの値はそれぞれ K_{m1} 0.13mM, K_{m2} 0.91mM, V_{max1} 590pmol/mg protein/20 sec, V_{max2} 2,010pmol/mg protein/20 sec であつた。

4. 各種アミノ酸の L-lysine 取り込みに与える

図 2 Time course of L-lysine uptake

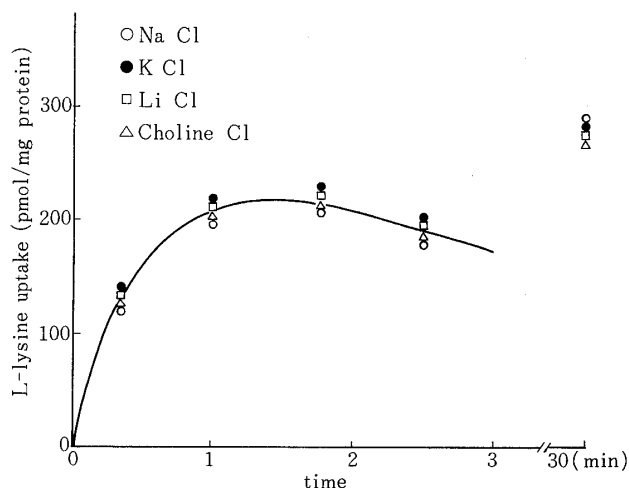


図 3 Dose dependency on L-lysine uptake

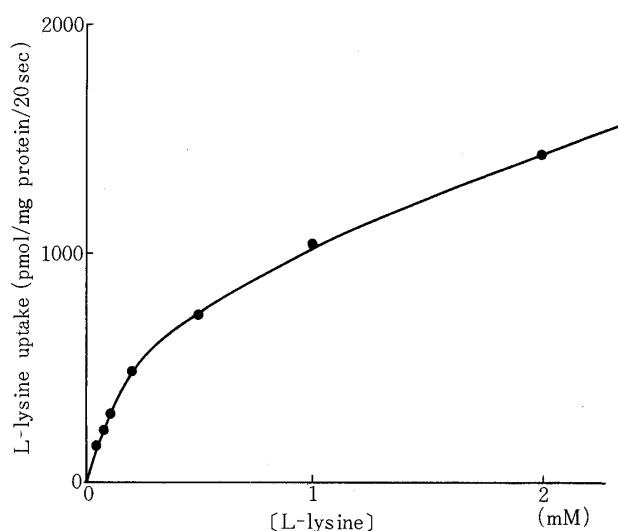
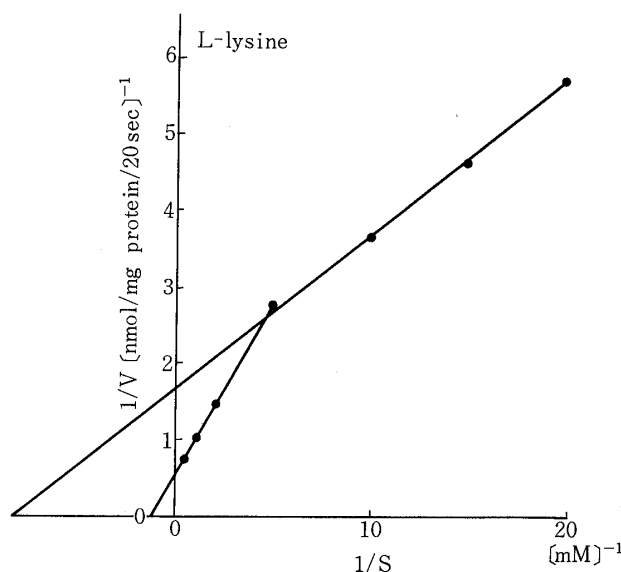


図 4 Double reciprocal plot of L-lysine uptake versus concentration



影響

塩基性アミノ酸である L-arginine, L-ornithine, L-glutamine は L-lysine の小胞内への取り込みを著明に阻害した。一方、中性アミノ酸である L-alanine, また酸性アミノ酸である L-glutamate, 含硫アミノ酸である taurine などの他のアミノ酸種は L-lysine の取り込みには影響を与えなかつた (表 1)。

5. 陰イオンの L-lysine の微絨毛膜小胞内取り込みの影響 (陰イオン置換実験)

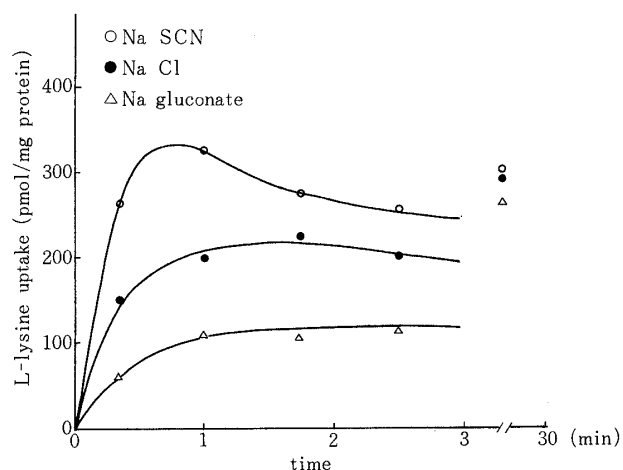
細胞透過性の異なる陰イオンを用いて、小胞内

表1 Inhibition by amino acids of L-lysine uptake (measured over initial 20 sec) into microvillous vesicles

Inhibitor	Uptake
L-arginine	35 ± 5
L-ornithine	23 ± 5
L-lysine	29 ± 3
L-glutamine	24 ± 3
L-glutamate	100 ± 8
L-alanine	100 ± 10
taurine	90 ± 5

All inhibitors were added to give a final concentration of 2mM
Uptake is expressed as a percentage of control values.
Values are means ± S.E.M. for three determinations.

図5 Effect of anion replacement on L-lysine uptake

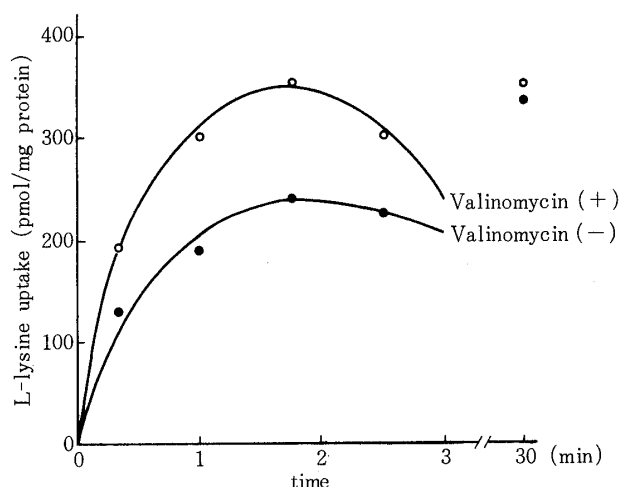


陰性の膜電位ポテンシャルを小胞膜内外に形成した時の L-lysine の小胞内への取り込みの影響を図 5 に示した。細胞透過性は $\text{SCN}^- > \text{Cl}^- > \text{gluconate}^-$ の順序であり、すなわち SCN^- 存在下での小胞内陰性の膜電位ポテンシャルが最も大きい。20秒後の取り込みを初速度と比較すると、 SCN^- ; 260pmol/mg protein, Cl^- ; 148pmol/mg protein, gluconate^- ; 61pmol/mg protein であり、小胞内陰性の膜電位ポテンシャルによつて L-lysine の小胞内への取り込みが著しく促進されることが判明した。

6. valinomycin による L-lysine 取り込みの影響

valinomycin によりひきおこされた K^+ 拡散電

図6 Effect of valinomycin induced inside negative K^+ diffusion potential on L-lysine uptake into microvillous vesicles



位ポテンシャルの L-lysine の小胞内への取り込みに与える影響を検討した。

K^+ をあらかじめ小胞内に前負荷して $\text{K}^+ \text{ in} = 50 \text{ mM} > \text{K}^+ \text{ out} = 6.7 \text{ mM}$ として K^+ の ionophore である valinomycin を作用させると K^+ 拡散電位による小胞内部陰性の膜電位ポテンシャルが形成される。この時の L-lysine の小胞内への取り込みに与える影響について測定したのが図 6 である。 K^+ 拡散電位による小胞内部陰性の膜電位ポテンシャル存在下での L-lysine の取り込み初速度は 195pmol/mg protein/20 sec であり膜電位ポテンシャルが存在しない時の取り込み初速度 (120 pmol/mg protein/20 sec) に比べ著明な増加を示した。この成績は陰イオン置換実験の成績と合わせて L-lysine の小胞内への取り込みが electrogenic な機構でなされていることを示すものである。

考 察

母体胎児間におけるアミノ酸血中濃度は一般に母体血中よりも胎児血中に高値を認め¹⁷⁾、アミノ酸は母体側より胎児側へ能動輸送されていると考えられている。さらに、アミノ酸の胎盤組織内濃度は胎児血中および母体血中濃度より高値であることから¹⁷⁾、母体血中から胎盤組織内へのアミノ酸の輸送は能動輸送であり、一方、胎盤組織内から胎児血中へのアミノ酸輸送は受動輸送であると

考えられている。アミノ酸の胎盤輸送実験には、胎盤スライス法¹⁸⁾、胎盤循環法¹⁹⁾を用いた研究があるが、これらはいずれもアミノ酸能動輸送の胎盤内における詳細な輸送機構を十分に明らかにしていない。胎盤絨毛組織より分離した微絨毛膜小胞を用いた輸送実験により Na^+ 依存性のアミノ酸輸送機構が明らかにされ、胎盤絨毛母体側膜である微絨毛膜がアミノ酸の能動輸送の部位であることが始めて示された⁷⁸⁾。

我々は L-alanine の胎盤微絨毛膜小胞内への取り込み機構の検討をおこなった結果、L-alanine の微絨毛膜小胞内への膜輸送は Na^+ の電気化学的濃度勾配に依存しており、さらにその Na^+ 依存性の膜輸送に膜電位ポテンシャルが関与していることを明らかにした²⁾。また、L-glutamate についても同様に検討した結果、L-glutamate の微絨毛膜小胞内への膜輸送は、L-alanine と同様に Na^+ の電気化学的濃度勾配に依存しており、さらに、微絨毛膜小胞内外に形成された K^+ の外向きの電気化学的濃度勾配 ($\text{K}^+_{\text{in}} > \text{K}^+_{\text{out}}$) が、L-glutamate の膜輸送の駆動力となつていていることを明らかにした¹³⁾。

今回のわれわれの成績により、L-lysine の胎盤微絨毛膜小胞内への膜輸送は Na^+ の電気化学的濃度勾配に依存しないこと、またその膜輸送に膜電位ポテンシャルが関与することも判明した。他のアミノ酸を用いた、取り込み阻害実験によつて、微絨毛膜小胞内への L-lysine の膜輸送は、L-arginine, L-glutamine, L-ornithine など他の塩基性アミノ酸 (dibasic amino acids) によつてのみ阻害されることより胎盤微絨毛膜には、塩基性アミノ酸に構造特異的な輸送系が存在することが示された。L-lysine の胎盤組織内濃度は母体血中濃度より高く¹⁷⁾、当然 L-lysine は母体血中より胎盤組織内へ能動輸送されているものと考えられる。

われわれの成績によつて L-lysine の胎盤輸送は、 Na^+ との共輸送の形での二次的能動輸送ではなく、膜電位差に依存した形、すなわち electrogenic な機構でなされていることが示された。絨毛細胞膜内外には細胞内陰性の膜電位差が存在していることが報告されており²¹⁾、L-lysine

はこの膜電位ポテンシャルを駆動力として胎盤組織内へ能動輸送されているものと考えられる。

さらに、以前までにわれわれが報告してきた Na^+ の電気化学的濃度勾配に依存したアミノ酸の輸送系とは全く別個のアミノ酸輸送系が存在することが明らかにされた。したがつて、胎盤におけるアミノ酸の能動輸送は一つの機構ではなくアミノ酸の立体構造、化学的性質などによつて決まる複数の輸送機構が存在することは明らかである。

胎盤にさまざまなアミノ酸輸送系が存在するという事実は、胎盤の物質輸送障害などの病的状態を考える上でも重要である。腎臓では cystinuria の原因として近位尿細管刷子縁膜に存在する L-cystine の輸送系の異常が指摘されている¹⁵⁾¹⁶⁾。胎盤においても、IUGR 等の原因として胎盤微絨毛膜のアミノ酸輸送系の異常が関与している可能性も十分に考えられ、今後の検討によつて、胎盤におけるアミノ酸輸送機構の障害による IUGR の病態が明らかにされる可能性もあると考えられる。

文 献

1. 飯岡秀晃, 森山郁子, 久間正幸, 伊藤公彦, 尼崎真実, 一條元彦: L-glutamate の胎盤輸送機構(人胎盤絨毛 brush border 膜小胞を用いて). 日産婦誌, 37: 207, 1985.
2. 飯岡秀晃, 森山郁子, 一條元彦: 微絨毛膜小胞を用いた L-alanine の胎盤輸送機構の解明(膜電位ポテンシャルの輸送に与える影響について). 産婦進歩, 36: 595, 1984.
3. 飯岡秀晃, 森山郁子, 一條元彦: L-glutamate の胎盤輸送機構(微絨毛膜小胞内の K^+ の膜輸送に与える影響について). 日産婦誌, 37巻10号, 掲載予定.
4. 森山郁子, 飯岡秀晃, 久間正幸, 伊藤公彦, 尼崎真実, 一條元彦: 胎盤微絨毛 brush border における含硫アミノ酸・タウリンの移送機構. 日産婦誌, 36: 1080, 1984.
5. Aronson, N.N. Jr. and Touster, O.: Isolation of rat liver plasma membrane fragments in isotonic sucrose. Methods Enzymol., 31: 90, 1974.
6. Bessev, 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.
7. Bissonnette, J.M.: Review article: Membrane

- visicles from trophoblast cells as models for placental exchange studies. *Placenta*, 3: 99, 1982.
8. *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.
 9. *Busse, D.*: Transport of L-arginine in brush border vesicles derived from rabbit kidney cortex. *Arch. Biochem. Biophys.*, 191: 551, 1978.
 10. *Hammerman, M.R.*: Na⁺ independent L-arginine transport in rabbit renal brush border membrane vesicles. *Biochem. Biophys. Acta*, 685: 71, 1982.
 11. *Inoue, M., Kinne, R., Tran, T., Miempica, L. and Arias, I.M.*: Rat liver canalicular membrane vesicles: Isolation and topological characterization. *J. Biol. Chem.*, 258: 5183, 1983.
 12. *Lever, J.E.*: The use of membrane vesicles in transport studies. *CRC. Crit. Biochem.*, 7: 187, 1980.
 13. *Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Rondall, R.J.*: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
 14. *Lueke, H., Stange, G., Kinne, R. and Murer, H.*: Taurocholate-sodium Co-transport by brush-border membrane vesicles isolated from rat ileum. *Biochem. J.*, 174: 951, 1978.
 15. *Mcnamara, P.D., Pepe, L.M. and Segal, S.*: Cystine uptake by rat renal brush border vesicles. *Biochem. J.*, 194: 443, 1981.
 16. *Ozegovic, B., Mcnamara, P.D. and Segal, S.*: Cystine uptake by rat jejunal brush border membrane vesicles. *Bioscience Reports*, 2: 913, 1982.
 17. *Philipps, A.F., Holzman, I.R., Teng, C. and Battaglia, F.C.*: Tissue concentrations of free amino acids in term human placentas. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 131: 877, 1978.
 18. *Schneider, H. and Dancis, J.*: Amino acid transport in human placental slices. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 120: 1092, 1974.
 19. *Schneider, H., Mohlen, K.H., Challiver, J.C. and Dancis, J.*: Transfer of glutamic acid across the human placenta perfused in vitro. *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 86: 299, 1979.
 20. *Smith, C.H., Nelson, D.M. and King, B.F., Donohue, T.M., Ruzyski, S.M. and Killy, 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.
 21. *Yano, J., Okada, Y., Tsuchiya, W., Kinoshita, M., Tominaga, T. and Nishimura, T.*: Oscillation of membrane potential in syncytiotrophoblast of human term placenta in culture. *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, 33: 137, 1981.

(No. 5576 昭59・8・10受付)