

ヒト胎盤におけるグルタチオンの輸送動態

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 赤崎 正佳
 加藤由美子 伊藤 公彦 斉藤 真実 日野 晃治
 岡村 義郎 井谷 嘉男 一條 元彦

Human Placental Glutathione Transport Mechanism

Hideaki IIOKA, Ikuko MORIYAMA, Masayuki KYUMA,
 Masayoshi AKASAKI, Yumiko KATOH, Kimihiko ITOH, Mami SAITOH,
 Koji HINO, Yoshiro OKAMURA, Yoshio ITANI and Motohiko ICHIJO
 Department of Obstetrics and Gynecology, Nara Medical University, Nara

概要 ヒト胎盤におけるグルタチオン (GSH) の輸送機構をヒト満期胎盤より分離した微絨毛膜小胞を用いて検討した。

1) (^3H -glycine)-labeled グルタチオンを用いて検討した結果、グルタチオンは胎盤微絨毛膜小胞外の表面で微絨毛膜に存在する膜酵素である γ -GTP (γ -glutamyltranspeptidase) によつて分解されその結果生じた ^3H -labeled-glycine が Na^+ 共輸送によつて能動的に微絨毛膜小胞内に取り込まれていることが判明した。

2) AT-125処理した微絨毛膜小胞はほぼ完全にその γ -GTP 活性を消失し、この処理された微絨毛膜小胞を用いて、分解を受けない形での真のグルタチオンの輸送機構について検討した。その結果、グルタチオンの微絨毛膜部位での輸送は陰イオン体 (アニオン) の形での膜電位に依存してなされていることが示された。

以上の成績により、微絨毛膜に存在する γ -GTP はグルタチオン代謝に重要な役割を果たしていることが判明した。また、グルタチオンの濃度は絨毛細胞内が母体血流腔内より高いことおよび、絨毛細胞外が電氣的に陽性に荷電していることより、グルタチオンの微絨毛膜部位での輸送は絨毛細胞内より母体血流腔内に向かった方向であることが示された。

Synopsis The placental transport mechanism of glutathione (GSH) was investigated using microvillous membrane vesicles prepared from human term placenta.

1) Using (^3H -glycine)-labeled-GSH, it was clarified that GSH in the extravesicular compartment of placental microvillous membranes was rapidly degraded by γ -GTP (γ -glutamyltranspeptidase) and resulting amino acid, and ^3H -labeled-glycine was actively transported via a sodium cotransport system.

2) AT-125 treated microvillous membrane vesicles almost entirely lost its γ -GTP activity, and showed intact GSH transport. Using AT-125 treated microvillous membrane vesicles, it was revealed that GSH was transported across the microvillous membrane as an anion via a membrane potential-dependent mechanism.

These results indicated that γ -GTP which existed in microvillous membrane played a role in GSH metabolism and that intracellular GSH was translocated out of the syncytiotrophoblast cell into the maternal blood space via a specific carrier in microvillous membrane because the GSH concentration was higher in intracellular than extracellular and extracellular membrane potential was positively charged.

Key words: Placenta • Transport • Glutathione • Microvillous membrane vesicles • γ -glutamyltranspeptidase

緒 言

胎盤組織には多量のグルタチオン (GSH) が含まれている²⁾。グルタチオンの生体内での役割については不明の点も多いが、細胞膜に存在する γ -glutamyltranspeptidase (γ -GTP) によつてグル

タチオンは、構成アミノ酸である、L-グルタミン酸、L-システイン、グリシンの3種のアミノ酸に分解され、各アミノ酸は細胞内に再吸収される。胎盤組織には γ -GTP が存在し、特に微絨毛膜には多量の γ -GTP が存在することより、胎盤にお

いて γ -GTP がアミノ酸の吸収に何らかの役割を果たしている可能性が示されている。

腎、肝におけるグルタチオンの生体内動態については、分離した細胞膜小胞を用いた検討によつて、陰イオン体としてグルタチオンを輸送する輸送システムの存在が示され¹⁾、また細胞膜の機能維持にグルタチオンが重要な役割を果たしていることが明らかにされた³⁾。

今回、我々は、胎盤におけるグルタチオンの輸送動態を知る目的で、満期胎盤より分離した微絨毛膜小胞を用いて、グルタチオンの胎盤輸送機構について検討を行なつた。

方 法

1. 実験材料

胎盤は、正常満期分娩直後のものを5個用いて各胎盤より微絨毛膜小胞を分離した。また各胎盤は肉眼上、光顕上異常のないものを用い、娩出された児はすべて AGA (appropriate for gestational age) であつた。

2. 人胎盤微絨毛膜小胞の分離

微絨毛膜小胞は Smith et al.⁸⁾の方法に準じて分離した。詳細は前報⁴⁾で報告した。

3. 蛋白量および酵素活性の測定

蛋白量の測定は、Lowry et al.⁶⁾の方法を用いた。 γ -GTP 活性の測定法は文献 5 に準じて行なつた。

4. グルタチオンの微絨毛膜小胞への取り込み量の測定

グルタチオンの微絨毛膜小胞への取り込み量の測定は、急速濾過法で行なつた⁷⁾。反応溶液の組成は 0.25M sucrose, 0.25mM Ca Cl₂, 10mM HEPES/Tris buffer pH 7.4 とし、微絨毛膜小胞(蛋白量 60 μ g)を加えて最終容量を 0.15ml とした。反応溶液中のグルタチオンの濃度は 0.1mM で実験を行なつた。取り込み実験は 130 μ l の反応溶液中に 20 μ l 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 μ m) を用いて急速濾過を行ない、フィルターを 3ml の toluene scintillator 液に入れ放射活性を測定した。取り込み実験のコントロールとしては微絨毛膜小胞を含まないものを用

いた。

5. 試薬

³H-グルタチオンは 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。valinomycin は最終溶液中の濃度が 70 μ g/ml となるように添加して実験を行なつた。AT-125 は Upjohn 社より提供されたものを用いた。

成 績

1. AT-125 (acidin) による微絨毛膜小胞の γ -GTP の不活性化

5mg/ml の微絨毛膜小胞を 0.1mM の AT-125 で処理した時の微絨毛膜小胞の γ -GTP の不活性化の時間経過を示したのが図 1 である。AT-125 で

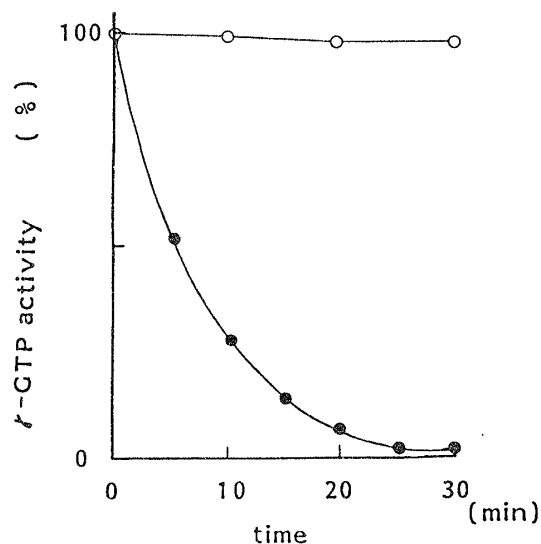


図1 Effect of AT-125 on γ -GTP activity of microvillous membrane vesicle

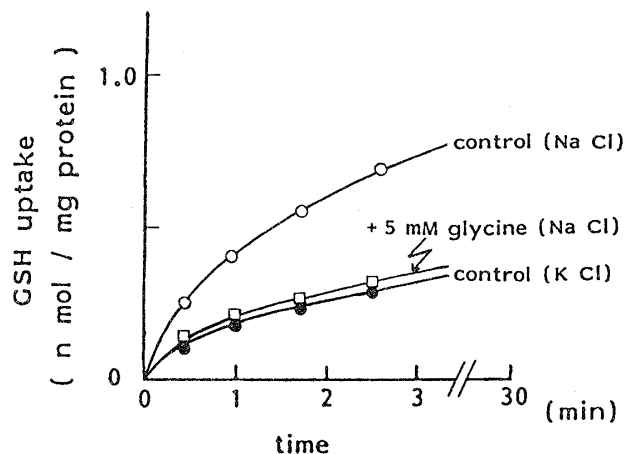


図2 Effect of glycine on uptake

処理すると30分後には γ -GTP の酵素活性は完全に不活化された。

2. AT-125未処理の微絨毛膜小胞内へのグルタチオンの取り込み (図2)

γ -GTP 活性をもつ微絨毛膜小胞内へのグルタチオン (グリシン基に ^3H ラベルされたもの) の取り込みは, Na^+ 濃度勾配存在下では $0.26\text{ n mol/mg protein/20sec}$ であり, K^+ 濃度勾配存在下の取り込み ($0.12\text{ n mol/mg protein/20sec}$) の2.2倍であつた。一方, この Na^+ 濃度勾配依存性のグルタチオンの取り込みは 5 mM のグリシンを反応溶液中に加えるとほぼ完全に阻害された。従つて, この Na^+ 濃度勾配依存性のグルタチオンの小胞内への取り込みは γ -GTP によつてグルタチオンが分解された結果生じた ^3H -グリシンの小胞内へのみかけ上の取り込みであることが確認された。

3. AT-125で処理した微絨毛膜小胞によるグルタチオンの取り込み

0.1 mM の AT-125を用いて γ -GTP を不活化した微絨毛膜小胞内へのグルタチオンの取り込みはグルタチオンの構成アミノ酸ではなくグルタチオンそのものの取り込みを示している。この AT-125で γ -GTP を不活化した微絨毛膜小胞を用いてグルタチオンの胎盤輸送機構を検討した。

a) グルタチオンの取り込みに与える浸透圧の影響 (図3)

微絨毛膜小胞へのグルタチオンの取り込みが果たして実際の小胞内への輸送を意味するのか, ま

たは単なる小胞表面への結合であるのかを検討する目的で, 小胞外の浸透圧を, raffinose を用いて $0.2\sim 0.5\text{ osmolarity}$ の間で変化させ, その場合のグルタチオンの小胞への取り込み量の変化について検討した。この点について, もしグルタチオンの小胞への取り込みが単なる小胞表面への結合であれば小胞外の浸透圧が変化しても取り込み量の変化は起こらない。図1の如くグルタチオンの小胞への取り込み量は, 小胞外の浸透圧の増加とともに直線的に減少し 0.2 osmolarity の場合は $0.102\text{ n mol/mg protein/10min}$ となり, 0.5 osmolarity の場合は $0.047\text{ n mol/mg protein/10 min}$ となつた。従つて, グルタチオンの小胞への取り込みは, 小胞内への実際の輸送を意味していることが明らかとなつた。

b) グルタチオンの取り込みに与える Na^+ 濃度勾配の影響

微絨毛膜小胞内へ能動輸送される各種物質 (アミノ酸, 無機リン) は, 小胞内外の Na^+ 濃度勾配 (小胞外>小胞内) が関与していることがすでに明らかにされている。図4は, 微絨毛膜小胞内外に Na^+ 濃度勾配および K^+ 濃度勾配 (反応開始時に小胞外濃度= 100 mM >小胞内濃度= 0 mM) が存在する時の小胞内へのグルタチオンの取り込み量の時間経過を示したものである。 Na^+ 濃度勾配および K^+ 濃度勾配存在下でのグルタチオンの小胞内への取り込み量に差は認められず, その取り込みは30分後には $0.171\text{ n mol/mg protein}$ と平衡に達した。その結果よりグルタチオンの輸送は満期人

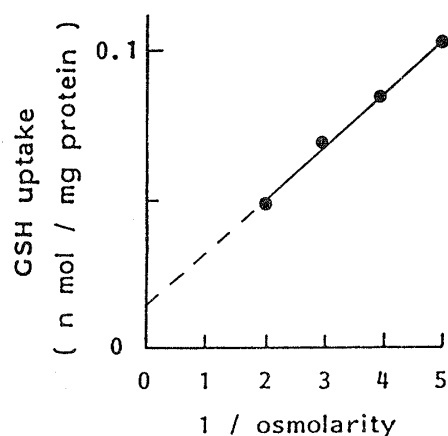


図3 Effect of extravesicular osmolarity on uptake

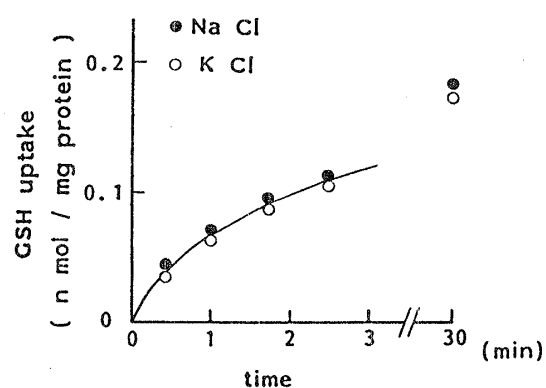


図4 Effect of Na^+ gradient (extravesicular>intravesicular) on uptake

胎盤微絨毛膜には濃度勾配に依存した形の能動輸送は存在しないことが示された。

c) グルタチオンの取り込みに与える微絨毛膜小胞内外の膜電位差の影響

グルタチオンは有機陰イオン体、すなわち有機アニオンであり、その膜輸送には小胞膜内外の膜電位差が関与している可能性が高い。これらを確認する目的で、小胞内外に膜電位差を形成した時のグルタチオンの小胞内への取り込みの変化について検討した。

1) 陰イオン置換の影響

細胞膜透過性の異なる3種類の陰イオン、すなわち細胞透過性の大きい順に、 $\text{SCN}^- > \text{Cl}^- > \text{gluconate}^-$ を用いて、小胞内外に形成された膜電位差がグルタチオンの小胞内への取り込みに与える影響について検討した。細胞膜透過性の大きい SCN^- 存在下では著明な小胞内陰性の膜電位差が形成される。反応開始時には、各陰イオンは小胞

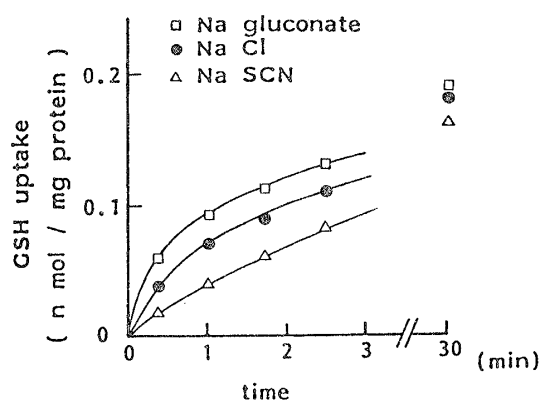


図5 Effect of anion replacement on uptake

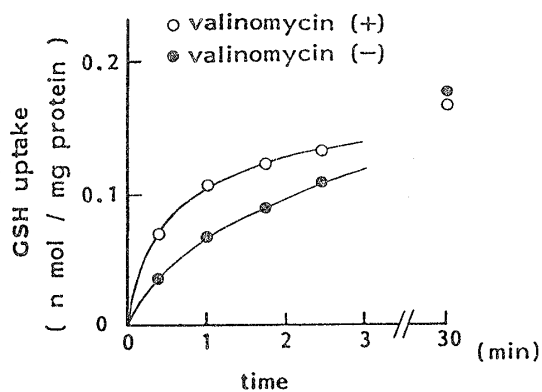


図6 Effect of valinomycin induced inside positive K^+ diffusion membrane potential on uptake

外は100mM, 小胞内は0mMとなる条件下で、取り込みを検討した。その結果、図5に示した如くに、取り込み量は、 $\text{gluconate}^- > \text{Cl}^- > \text{SCN}^-$ であり、20秒後の取り込み初速度で比較すると SCN^- ; 0.013n mol/mg protein, Cl^- ; 0.032n mol/mg protein, gluconate^- ; 0.067n mol/mg protein, の順であった。

2) K^+ 拡散電位の影響

K^+ の valinomycin である ionophore を作用させると、微絨毛膜は K^+ を選択的に透過させるように変化する。valinomycin で微絨毛膜小胞を処理した後に、小胞内外に、小胞外は50mM, 小胞内は0mM となるような K^+ 濃度勾配存在下で取り込みを開始した。その結果、 K^+ は速やかに小胞内へ取り込まれるために小胞内外には一過性に小胞内が陽性となるような膜電位差が形成される。図

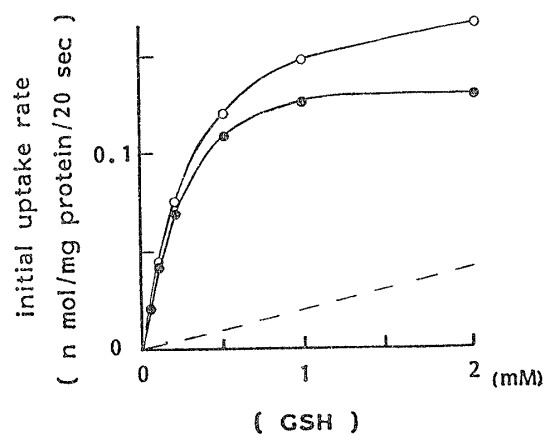


図7 Dose dependency of uptake

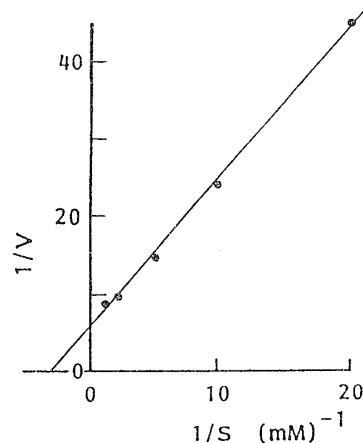


図8 Double reciprocal plot of initial uptake versus concentration

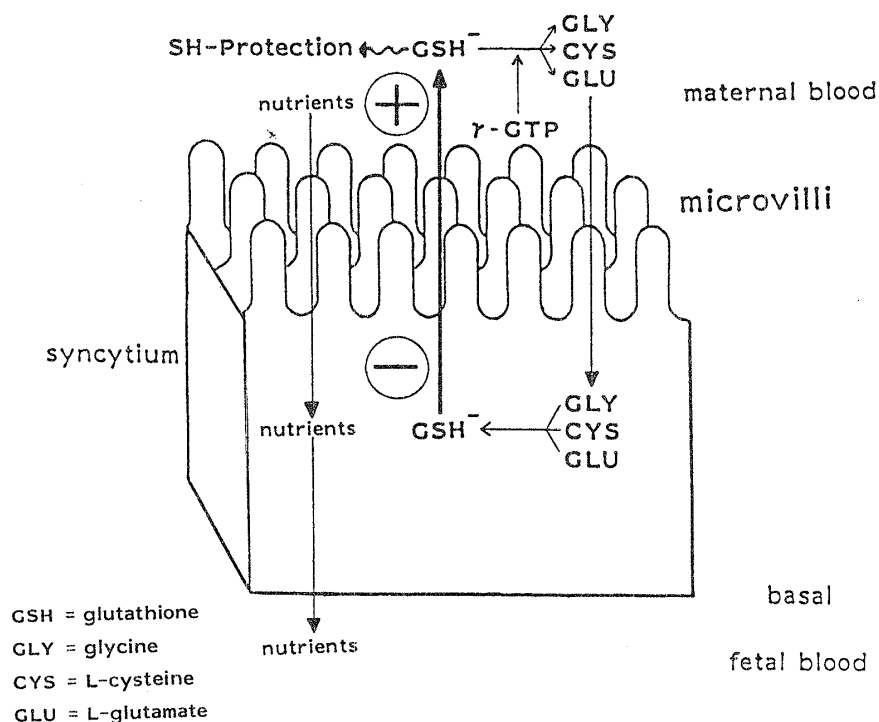


図 9

6に示した如く, valinomycin を作用させた時には, 作用させなかつた時に比べ, グルタチオンの小胞内への取り込み初速度は約2.2倍と著明に増加した。これを20秒後の取り込み初速度と比較すると valinomycin 存在下で0.069n mol/mg protein となり, valinomycin 非存在下では0.031n mol/mg protein であつた。

d) グルタチオンの取り込み初速度に与えるグルタチオンの濃度の影響

微絨毛膜小胞内へのグルタチオンの取り込みに輸送担体(キャリアー)が関与しているかどうかを検討する目的で, グルタチオンの濃度を変化させた時の小胞内へのグルタチオンの取り込み初速度の変化を検討した。各濃度下でのグルタチオンの取り込み初速度は, 総取り込み量から単純拡散による取り込み量(高濃度(20mM)のグルタチオン存在下での取り込みより測定)を差し引いて求めた。図7に示した如く1mMでグルタチオンの取り込み初速度は飽和に達し, 取り込み初速度および濃度の両逆数プロットより求めた小胞内への取り込み初速度の kinetics のパラメーターは K_m は0.31mM, V_{max} は0.15n mol/mg protein/20sec であつた。

考 案

今回の我々の成績から, 胎盤の母体血流に面した細胞膜である微絨毛膜に陰イオン(anion)としてグルタチオンを膜輸送する輸送系が存在することが明らかにされた。胎盤微絨毛膜には γ -GTP が存在する。従つて, γ -GTP の活性が残つた微絨毛膜小胞ではグルタチオンは構成アミノ酸である L-glutamate, L-cysteine, glycine の三つのアミノ酸に分解され各アミノ酸が微絨毛膜小胞内に輸送される。実際に今回の成績でも, グルタチオンの構成アミノ酸である glycine の形での微絨毛膜小胞内への取り込みが γ -GTP の活性が残つた微絨毛膜小胞では認められた。一方, γ -GTP の阻害剤で AT-125 (acivadin) で処理された微絨毛膜小胞では γ -GTP の活性はほぼ100%消失しており, 純粋にグルタチオンのみの膜輸送が検討できる。 γ -GTP の活性のなくなつた微絨毛膜小胞でのグルタチオンでは小胞内に陽性の膜電位差が存在する時にその取り込みが促進されることより, 陰イオン(anion)としてグルタチオンが膜輸送されていることが示された。グルタチオンの胎盤組織内濃度はきわめて高く²⁾, 母体血中濃度より高値である。また, 絨毛細胞内外には, 細胞内が陰性とな

るような膜電位差が形成されていることよりグルタチオンは胎盤絨毛細胞内から母体血中に輸送されていることになる。

生体内でのグルタチオンの意義については不明の点が多い。一般に生体内での細胞膜における物質輸送には、細胞膜のSH基が重要な役割を果たしていることはよく知られた事実である。よつてグルタチオンの分子内に含まれるSH基が、細胞膜に存在するSH基の保護作用を果たしていることは想像に難くない。実際にラットを用いた動物実験によつてグルタチオンが、水銀イオンによる腎近位尿細管刷子縁膜におけるグルコースの能動輸送の障害を軽減させることが明らかにされている³⁾。このことは、細胞膜のSH基を水銀イオンが障害するのをグルタチオンが作用して防いだものと解釈される。したがつて胎盤絨毛細胞内に高濃度に存在するグルタチオンは、微絨毛膜に存在する輸送系（キャリアー）を介して微絨毛膜の母体血流面に放出され微絨毛膜の物質輸送システムの保護作用を果たしているものと考えられる。

文 献

1. 井上正康：グルタチオン代謝と膜輸送の臓器相関。蛋白質・核酸・酵素，29：695，1984。
2. 小宅正博：ヒト胎盤のグルタチオンに関する研

- 究。日産婦誌，33：97，1981。
3. 小山秀樹，井上正康，森野能昌：Glutathione代謝と腎細胞膜能動輸送能：Glutathioneによる細胞膜機能の保護。含硫アミノ酸，7：333，1984。
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：胎盤微絨毛刷子縁（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. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Smith, C.H., Nelson, D.M., King, B.F., Donohue, T.M., Ruzyski, 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.

(No. 6072 昭61・10・14受付)