

## グルタチオンが胎盤アミノ酸輸送に対して果たす役割 (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 伊藤 公彦 日野 晃治  
岡村 義郎 井谷 嘉男 加藤由美子 一條 元彦

### The Role of Glutathione on Placental Amino Acid Transport (Using Microvillous Membrane Vesicles)

Hideaki IIOKA, Ikuko MORIYAMA, Kimihiko ITOH,  
Kohji HINO, Yoshiroh OKAMURA, Yoshio ITANI,  
Yumiko KATOH and Motohiko ICHIJO

*Department of Obstetrics and Gynecology, Nara Medical University, Nara*

**概要** グルタチオンが胎盤でのアミノ酸輸送に果たしている役割を解明する為に、正期ヒト胎盤より分離した微絨毛膜小胞を用いて検討を行った。

1. L-lysine の微絨毛膜小胞内への取り込みは、グルタチオンによつて影響を受けなかった。
2. L-lysine の微絨毛膜小胞内への輸送は、無機水銀 ( $\text{Hg}^{2+}$ ) によつて阻害され、0.1mM  $\text{Hg}^{2+}$  では34%、1mM  $\text{Hg}^{2+}$  では50%、その取り込みは阻害された。
3. 無機水銀によつて阻害された L-lysine の微絨毛膜小胞内への取り込みは、グルタチオン添加によつて、ほぼもとの取り込みに回復した。

以上の成績より、グルタチオンは、微絨毛膜レベルでの無機水銀によるアミノ酸輸送障害を防御する作用のあることが示された。

**Synopsis** To elucidate the role of glutathione (GSH) on placental amino acid transport, we investigated L-lysine transport using microvillous membrane vesicles prepared from full term human placenta.

1. The transport of L-lysine into microvillous membrane vesicles was not affected by glutathione.
2. The transport of L-lysine into microvillous membrane vesicles was inhibited by inorganic mercury ( $\text{Hg}^{2+}$ ), and 0.1mM  $\text{Hg}^{2+}$  inhibited 34% of this transport and 1mM  $\text{Hg}^{2+}$  inhibited 50%.
3. The transport of L-lysine inhibited by  $\text{Hg}^{2+}$  was almost completely restored when glutathione was added simultaneously.

These results indicated that glutathione defended the inhibitory action of inorganic mercury on L-lysine transport across microvillous membrane.

**Key words:** Placental transport • Inorganic mercury • Microvillous membrane vesicles • Amino acids • Glutathione

### 緒 言

胎盤にはきわめて高濃度にグルタチオンが存在している<sup>6)</sup>。グルタチオンはSH基をその分子内に含む物質である。SH基は、生体内では、酵素活性の維持などに欠かせないものであり、グルタチオンは、このSH基を、生体内での数々の障害から保護する役割を果たしているものと考えられている<sup>1)</sup>。しかし、グルタチオンが、胎盤の機能維持にいかなる意義を有しているかについては未だ不

明である。

我々は、既に、ヒト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動態について検討してきた<sup>4)</sup>。微絨毛膜小胞を用いた方法は、代謝の影響を除外することができ、純粋に輸送動態のみの把握が可能であることより、アミノ酸をはじめとする各種物質の胎盤輸送機序の解明に優れた方法である<sup>1)~3)</sup>。今回は、本法を用いて、グルタチオンが胎盤でのアミノ酸輸送動態に果た

す意義について検討した。

## 方 法

### 1. 実験材料

ヒト胎盤は、正常正期分娩直後のものを5個を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AFD (appropriate-for-dates) であった。

### 2. 胎盤よりの微絨毛膜小胞の分離

微絨毛膜小胞は Smith et al.<sup>14)</sup>の方法に準じて分離した<sup>1)</sup>。分娩直後の胎盤より絨毛組織のみを分離してから細切し、4℃のbuffer (10mM Hepes-Tris buffer pH 7.4, 0.25M sucrose, 0.25 mM  $\text{CaCl}_2$ ) を加えて、30分間ゆるやかに攪拌した。次に、800g にて10分間遠心した後、上清を取り、最終濃度が10mM  $\text{CaCl}_2$  となるようにした後、10,500g にて10分間遠心した。遠心後、上清を取り、20,000g にて20分間遠心し沈澱分画を採取し微絨毛膜小胞として用いた。

### 3. 酵素活性の測定

分離した微絨毛膜小胞の純度を確かめる目的で、ALP<sup>9)</sup>、 $\gamma$ -GTP<sup>10)</sup>、5'-nucleotidase<sup>8)</sup>の各酵素活性を測定した。試料中の蛋白量の測定は、Lowry et al.の方法を用いた<sup>12)</sup>。

### 4. 微絨毛膜小胞へのアミノ酸の取り込み量の測定

<sup>3</sup>H-L-lysine の微絨毛膜小胞への取り込み量の測定は急速膜濾過法で行った<sup>13)</sup>。反応溶液の組成は、10 mM Hepes-Tris buffer pH 7.4 0.1 M NaCl, 0.25mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.1mM L-lysine とし、他の成分の詳細は各実験結果の中で示した。取り込み実験は130 $\mu$ l の反応溶液に20 $\mu$ l の微絨毛膜小胞 (蛋白量60 $\mu$ g) 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 $\mu$ m) を用いて急速膜濾過を行い、膜フィルターを3ml の toluene scintillator 液に入れ、放射活性を測定した。

### 5. 試薬

<sup>3</sup>H-L-lysine は New England Nuclear 社製を用い、他の試薬は特級のものを用いた。

## 成 績

### 1. 微絨毛膜小胞内への L-lysine の取り込みの時間経過

ヒト胎盤より得られた微絨毛膜小胞内への L-lysine の取り込み量の時間経過を追つてみたものが図1である。L-lysine の小胞内への取り込み量は、時間経過とともに増加し、また、その取り込みは30分後に飽和に達した。

一方、小胞内外の内向きの  $\text{Na}^+$  の濃度勾配 (反応開始時に小胞外=0.1M>小胞内=0M) 存在下の小胞への L-lysine の取り込みと、 $\text{K}^+$  の濃度勾配 (反応開始時に小胞外=0.1M>小胞内=0M) 存在下の小胞への取り込みには差異を認めなかつた。従つて、 $\text{Na}^+$  との共輸送による L-lysine の能動輸送機構は、ヒト胎盤には存在しないことが示された。

### 2. 微絨毛膜小胞内への L-lysine の取り込みに与えるグルタチオンの影響

微絨毛膜小胞内への L-lysine の取り込みに与えるグルタチオンの影響をみたのが、図2である。2mM のグルタチオンを微絨毛膜小胞に添加して37℃、10分間放置後、小胞内への L-lysine の取り込みを検討した結果、グルタチオン添加群とグルタチオン非添加群の間で差異を認めなかつた。20秒後の取り込み初速度で比較すると、グルタチオン添加群では0.121n mol/mg protein であり、一

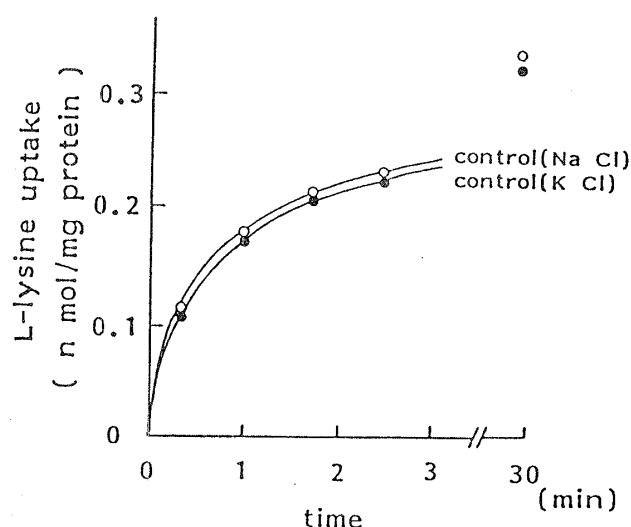


図1 Effect of  $\text{Na}^+$  or  $\text{K}^+$  electrochemical gradient on L-lysine uptake

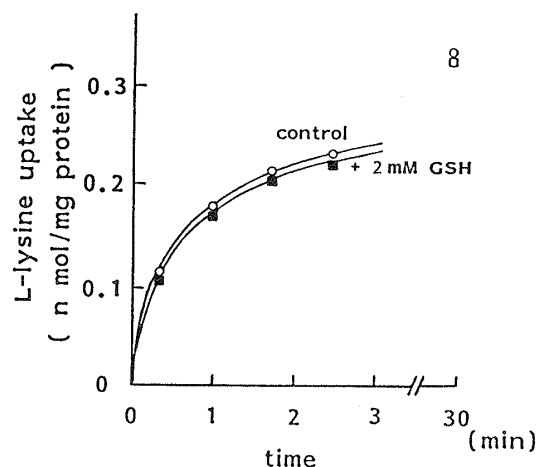


図2 Effect of glutathione (GSH) on L-lysine uptake

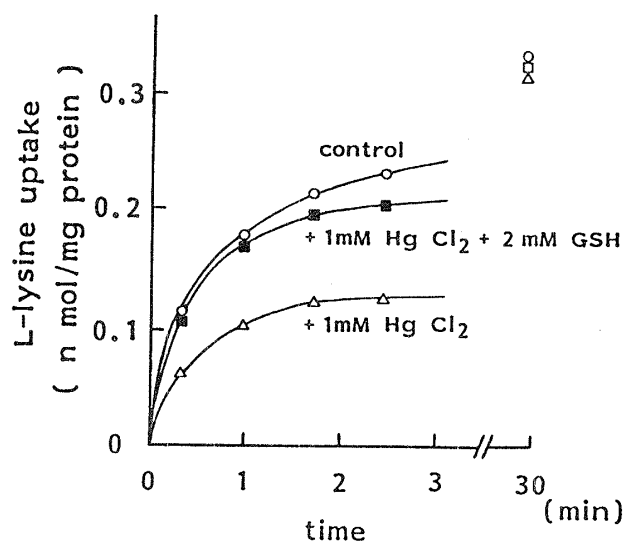


図4 Effect of inorganic mercury ( $\text{Hg Cl}_2$ ) and glutathione (GSH) on L-lysine uptake

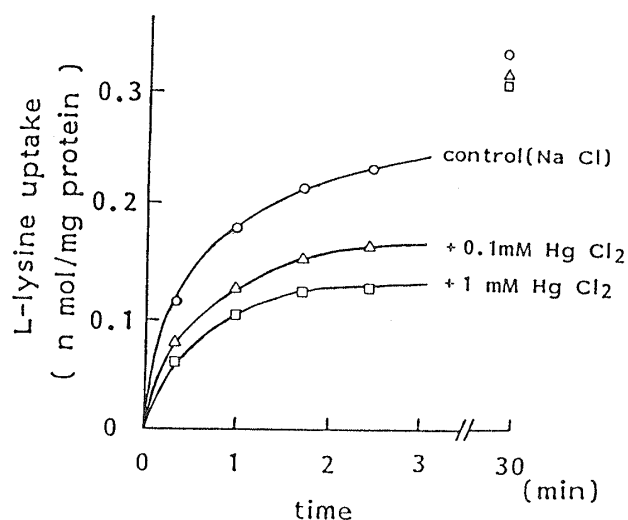


図3 Effect of inorganic mercury ( $\text{Hg Cl}_2$ ) on L-lysine uptake

方, グルタチオン非添加群では0.119n mol/mg proteinであつた。

3. 微絨毛膜小胞内への L-lysine の取り込みに与える無機水銀の影響

微絨毛膜小胞に0.1mM および1mM の無機水銀 ( $\text{Hg Cl}_2$ ) を添加して37℃, 10分間放置した後, L-lysine の小胞内への取り込みをコントロール (無機水銀非添加群) と比較検討した (図3)。また, 1mM の無機水銀と同時に2mM のグルタチオン (GSH) を添加して同様の検討を行つた (図4)。その結果, 図3のごとく無機水銀 (0.1mM, 1 mM) の添加で, L-lysine の小胞内への取り込みは, コントロールに比し著明に阻害され20秒後の

取り込み初速度で比較するとコントロールの66% (0.1mM), 50% (1mM) にまで低下した。一方, 1mM の無機水銀と同時に2mM のグルタチオンを添加した時には, その取り込みはほぼコントロールの取り込みに回復し, 20秒後の取り込み初速度で比較するとコントロールの94%にまで戻つた。

### 考 案

グルタチオンは肝機能障害などの治療薬として臨床において一般的によく用いられている。また, 産科領域では, 妊娠悪阻の時などに用いられており, その薬理学的効果が示されている。

グルタチオンは肝臓, 腎臓および小腸などの組織に高濃度に存在している。グルタチオンの生体内での輸送動態およびその果たす役割については不明の点も多い。しかし, 腎臓においては尿細管刷子縁膜に, また, 肝臓においては静脈洞細胞膜に, グルタチオンを輸送する輸送系が存在することが明らかにされている<sup>5)</sup>。また, 腎臓においては, グルタチオンは, 水銀などによつて惹き起こされるアミノ酸および糖などの再吸収障害を防ぐことが明らかにされている<sup>7)</sup>。

胎盤にも, きわめて高濃度のグルタチオンが存在しており, 胎盤の機能維持に重要な役割を果たしていることが十分に推察される。我々は, 既に, ヒト胎盤より分離した微絨毛膜小胞を用いてグル

タチオンの輸送機構について検討した。微絨毛は胎盤絨毛細胞の母体血流に面した側に多数突出した形で存在しており、小腸絨毛、腎近位尿細管に存在する微絨毛（刷子縁）と同様にアミノ酸をはじめとする各種物質の能動輸送がこの部で行われているものと考えられている。一方、ヒト胎盤微絨毛膜にはグルタチオンを陰イオン体 (anion) として膜輸送するシステムが存在し、また、経胎盤的なグルタチオンの輸送は胎盤側から母体血流側に向かつてであることが微絨毛膜小胞を用いた検討で示された<sup>4)</sup>。さらに、今回の成績によつて、グルタチオンが、微絨毛膜レベルでの水銀によるアミノ酸輸送障害を防ぐ作用があることが示された。この水銀による膜レベルでの輸送障害は、輸送担体 (carrier) 内の SH 基の障害によるものとされており、グルタチオンはこの SH 基の保護作用によつて、水銀による輸送障害を防ぐものと考えられる。

胎盤微絨毛膜に、グルタチオンの輸送システムが存在する意義は不明である。しかし、今回の成績は、胎盤微絨毛膜レベルでのアミノ酸輸送に、グルタチオンが密接に関与していることを示しており、今後、胎盤機能に果たすグルタチオンの役割を検討することは興味深い課題と言える。

#### 文 献

1. 飯岡秀晃, 森山郁子, 尼崎真実, 伊藤公彦, 日野晃治, 一條元彦: Phosphate の胎盤輸送機構の解明 (人胎盤微絨毛膜 (刷子縁膜) 小胞を用いて). 日産婦誌, 37: 2675, 1985.
2. 飯岡秀晃, 森山郁子, 斎藤真実, 日野晃治, 岡村義郎, 一條元彦: L-alanine の胎盤能動輸送能の妊娠経過における変動 (微絨毛膜小胞を用いて). 日産婦誌, 38: 529, 1986.
3. 飯岡秀晃, 森山郁子, 日野晃治, 一條元彦: 人胎盤における胆汁酸の輸送機構の解明 (微絨毛膜に

おけるタウロコール酸の受動輸送機構). 日産婦誌, 38: 837, 1986.

4. 飯岡秀晃, 森山郁子, 斎藤真実, 日野晃治, 岡村義郎, 一條元彦: ヒト胎盤におけるグルタチオンの輸送動態. 日産婦誌, 39: 725, 1987.
5. 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.
6. 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.
7. 小山秀樹, 井上正康, 森野能晶: Glutathione 代謝と腎細胞膜能動輸送: Glutathione による細胞膜機能の保護. Sulfur Amino Acids, 7: 333, 1984.
8. Aronson, N.N. Jr. and Touster, O.: Isolation of rat plasma membrane fragments in isotonic sucrose. Methods Enzymol., 31: 90, 1974.
9. 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.
10. Inoue, M., Kinne, R., Tran, T., Miempia, L. and Arias, I.M.: Rat liver canalicular membrane vesicles: Isolation and topological characterization. J. Biol. Chem., 258: 5183, 1983.
11. Lever, J.: The use of membrane vesicles in transport study. CRC. Crit. Rev., 7: 187, 1980.
12. Lowry, O.H., Rosenberg, N.J., Farr, A.L. and Rondal, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.
13. 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.
14. 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. 6223 昭62・8・10受付)