

人胎盤における L-lactate の輸送機構の解明 (胎盤微絨毛膜小胞を用いて)

奈良県立医科大学産婦人科

南淵 芳 森山 郁子 赤崎 正佳 片上 佳明
久永 浩靖 加藤由美子 一條 元彦

The Study on the Human Placental L-lactate Transport Mechanism (Using Placental Microvillous Membrane Vesicles)

Kaoru NABUCHI, Ikuko MORIYAMA, Masayoshi AKASAKI,
Yoshiaki KATAKAMI, Hiroyasu HISANAGA, Yumiko KATO
and Motohiko ICHIJO

Department of Obstetrics and Gynecology, Nara Medical University, Nara

概要 胎盤における L-lactate の輸送機構を解明する目的で、正期産ヒト胎盤より分離した微絨毛膜小胞を用いて、急速膜濾過法によつて L-lactate の取り込みを検討した。

1. 微絨毛膜小胞への L-lactate の取り込みは、小胞内外の Na^+ の濃度勾配 (小胞外 > 小胞内) に依存性を示さなかつた。

2. 微絨毛膜小胞への L-lactate の取り込みは、小胞内外の H^+ の濃度勾配 (小胞外 > 小胞内) 存在下では著明な overshoot 現象を示した。この H^+ 依存性の overshoot を示す取り込みは H^+ の ionophore (FCCP) を作用させると消失した。

3. H^+ 依存性の微絨毛膜小胞への L-lactate の取り込み初速度は、L-lactate の濃度によつて決まる飽和 kinetics に従つており、取り込み初速度および L-lactate の濃度の両逆数プロットより求めた L-lactate の輸送 kinetics として、 K_m 値は 4.35mM、また、 V_{max} 値は 2.78n mol/mg protein/20sec が得られた。

以上の成績より、満期ヒト胎盤微絨毛膜には H^+ との共輸送の形で L-lactate を輸送する輸送系が存在することが示された。

Synopsis To elucidate the human placental L-lactate transport mechanism, we investigated L-lactate uptake by microvillous membrane vesicles (MMV) prepared from full termed human placenta using the rapid filtration technique.

1. The transport of L-lactate into the MMV was not dependent on the Na^+ electrochemical gradient (extravesicular > intravesicular).

2. The transport of L-lactate into the MMV was dependent on the H^+ gradient (extravesicular > intravesicular) and this H^+ dependent L-lactate uptake showed a tendency to overshoot. This overshoot disappeared with the addition of H^+ ionophore (FCCP).

3. The initial rate of this H^+ dependent L-lactate transport into the MMV exhibited saturation kinetics with respect to the L-lactate concentration: An apparent K_m of 4.35mM and V_{max} of 2.78n mol/mg protein/20sec were calculated.

These results indicated that there existed a H^+ and L-lactate cotransport system in human placental MMV.

Key words: L-lactate • Placenta • Transport • Microvillous membrane vesicles • H^+ -cotransport

緒 言

胎盤は胎児へ栄養を供給する臓器として重要な役割を果たしている。胎内で发育する胎児にとつ

ては、胎盤は、小腸・腎臓・肝臓などの役割を担つており、胎児の代謝を理解するには、胎盤の機能を把握する必要がある。胎盤の機能の中でも、

その物質通過は最も重要である。

L-lactate (乳酸) の胎児血中の濃度は、母体血中濃度に比し高値である。胎児にとって L-lactate は重要な栄養素であり、胎児期においては、胎児の脳内および心臓内に直接取り込まれてエネルギー源として用いられている⁸⁾¹²⁾。また、L-lactate は胎児の肺の成熟にも関与しているものと考えられている⁸⁾。

われわれは、今までに、ヒト胎盤より分離した微絨毛膜小胞を用いて、アミノ酸、無機リン、抗生物質等の胎盤輸送機構について検討してきた¹⁾²⁾。今回は、本法を用いて、L-lactate の胎盤輸送機構について検討した。

方 法

1. 実験材料

ヒト胎盤は、正常正期産分娩直後のもの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 AGA (appropriate for gestational age) 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.¹⁰⁾の方法に準じて分離した¹⁾。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, 0.3M mannitol) 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 MgCl₂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認する目的で、ALP, γ -GTP, 5'-nucleotidase の各酵素活性を測定した¹⁾。試料中の蛋白量の測定は、Lowry et al. の方法を用いた⁶⁾。

4. 微絨毛膜小胞への L-lactate の取り込み量の測定

L-lactate 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⁷⁾。反応溶液の組成は、100mM mannitol, 100mM NaCl または 100mM

KCl, 1mM L-lactate とし、反応溶液の pH は、10mM の HEPES-Tris または MES-Tris を用いて、7.4~5.5 に調整した。その他の組成の詳細は成績の中で示した。取り込み実験は 130 μ l の反応溶液に 20 μ l の微絨毛膜小胞 (蛋白量 200 μ g) を加えることによつて、反応を開始し、4℃冷却にて反応停止後、すばやくミリポアフィルター (HA 0.45 μ m) を用いて急速膜濾過を行つた。その後、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

¹⁴C-L-lactate は New England Nuclear 社製を用い、FCCP (carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone) は Sigma 社のものを用いた。他の試薬は特級のものを用いた。

成 績

1. 微絨毛膜小胞への L-lactate の取り込みに与える Na⁺濃度勾配の影響

反応溶液の pH を 7.4 とし、ヒト胎盤より得られた微絨毛膜小胞への、L-lactate 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。小胞内外の内向き 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-lactate の取り込みと、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

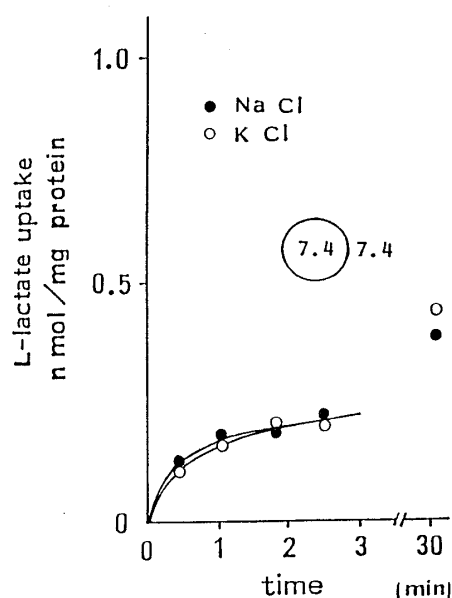


図 1 Effect of Na⁺ gradient on L-lactate uptake

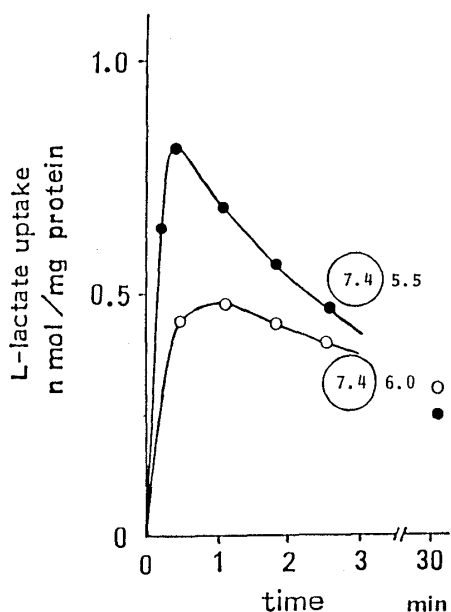


図2 Effect of H^+ gradient on L-lactate uptake

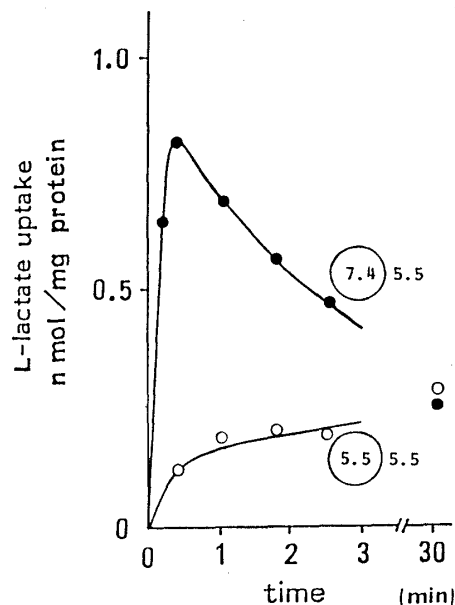


図4 Effect of H^+ gradient on L-lactate uptake

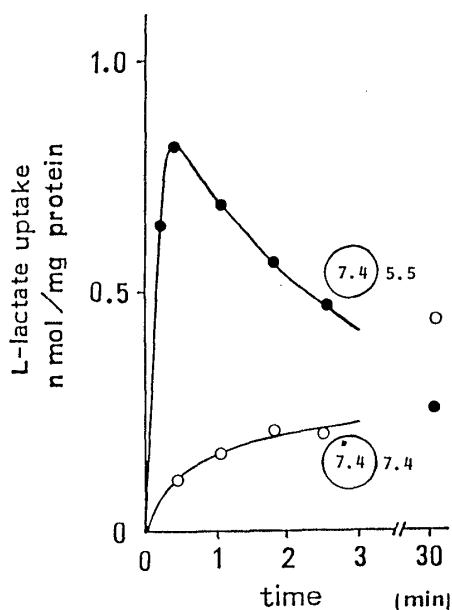


図3 Effect of H^+ gradient on L-lactate uptake

の取り込みには差異を認めなかつた。したがって、 Na^+ との共輸送による L-lactate 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-lactate の取り込みに与える H^+ 濃度勾配の影響

微絨毛膜小胞内への L-lactate の取り込みに与える H^+ 濃度勾配の影響をみたものが図 2 である。小胞内外の内向き H^+ の濃度勾配(反応開始時に小胞外 $pH=5.5 < 小胞内 pH=7.4$ または小

胞外 $pH=6.0 < 小胞内 pH=7.4$) 存在下では、小胞内への L-lactate の取り込みは、20 秒後 ($pH=5.5$) または 1 分後 ($pH=6.0$) に、 $0.81 n mol/mg protein (pH=5.5)$, $0.48 n mol/mg protein (pH=6.0)$ の peak をもつ overshoot を示す取り込みであった。一方、図 3・図 4 のごとく、 H^+ 濃度勾配非存在下(反応開始時に小胞外 $pH=小胞内 pH=7.4$ または 5.5) では、L-lactate の小胞内への取り込みは、overshoot は認めなかつた。また、 H^+ 濃度勾配存在下での取り込み初速度は、 H^+ 濃度勾配非存在下の取り込み初速度の約 6 倍であった。

3. 微絨毛膜小胞への L-lactate の取り込みに与える H^+ ionophore (FCCP) の影響

小胞内外の内向き H^+ の濃度勾配(反応開始時に小胞外 $pH=5.5 < 小胞内 pH=7.4$) 存在下で overshoot を示した L-lactate の小胞内への取り込みは、FCCP ($10 \mu M$) の存在下では認められなかつた。また、その取り込みは著明に減少した(図 5)。

4. 微絨毛膜小胞への L-lactate の取り込み初速度に与える L-lactate 濃度の影響

反応溶液中の L-lactate の濃度を、 $1.0 mM$ から $8.0 mM$ の濃度の間で変化させ、 H^+ 依存性の L-lactate の小胞内への取り込み初速度(20 秒後の取り込み量)の変化を検討した。各濃度下での H^+ 依

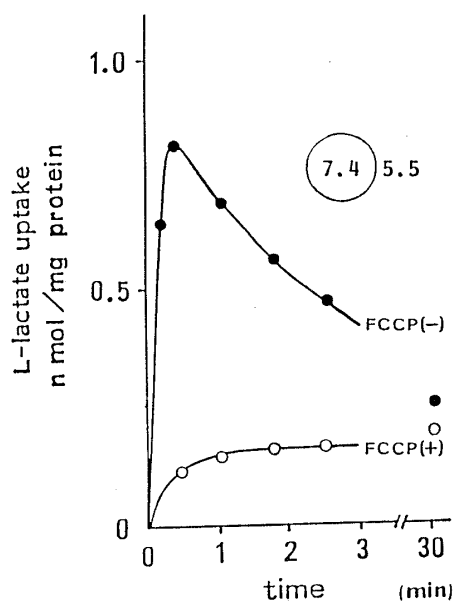


図5 Effect of FCCP on H^+ dependent L-lactate uptake

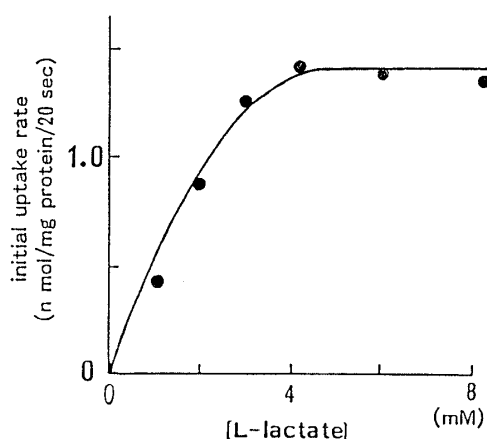


図6 Dose dependency of L-lactate uptake

存性の L-lactate の取り込み初速度は、 H^+ 濃度勾配存在下 (小胞内 $pH=7.4 >$ 小胞外 $pH=5.5$) の取り込み量から H^+ 濃度勾配非存在下 (小胞内 $pH=$ 小胞外 $pH=7.4$) での取り込み量を差し引いて求めた。 H^+ 依存性の微絨毛膜小胞への L-lactate の取り込み初速度は、L-lactate の濃度に依存した飽和 kinetics に従って決まることが確認され、図6のごとく、その取り込み初速度は、4.0mM で1.39n mol/mg protein/20sec と飽和に達した。また、図7のごとく、L-lactate の濃度ならびに取り込み初速度の両逆数プロットの結果、微絨毛膜小胞への L-lactate の取り込みの飽和 kinetics パラメーターとして、 K_m 値としては、

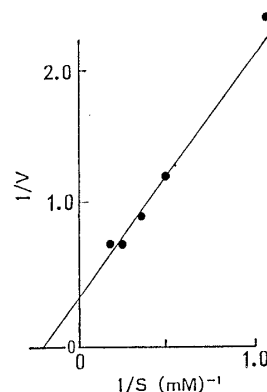


図7 Double reciprocal plot of initial uptake rate versus L-lactate concentration

4.35mM, また、一方、 V_{max} 値としては、2.78 n mol/mg protein/20sec が、得られた。

考 案

われわれは、これまでに、ヒト胎盤より分離した微絨毛膜小胞を用いて、アミノ酸などの胎盤輸送機構について検討してきた¹⁾²⁾。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。ヒト胎盤より分離した微絨毛膜小胞を用いた検討によつて、 Na^+ との共輸送の形でアミノ酸が能動輸送されていることが明らかとなった¹⁾²⁾。微絨毛膜小胞を用いた検討は小胞内外のイオン環境を自由に変えることができ、また、代謝の影響を除外することができるなどの理由により各種物質の胎盤輸送機構の解明に非常に優れた方法である⁵⁾。

今回は、本法を用いて L-lactate の胎盤輸送機構について検討を加えた。その結果、 H^+ 濃度勾配存在下では L-lactate の小胞内の取り込みは著明な overshoot を示した。このような overshoot 現象が認められるのは以下のごとく説明される。すなわち、時間経過と共に小胞内外の H^+ の濃度勾配は減少してゆくが、L-lactate の小胞内外の濃度勾配が消失した時点 (約5秒後: 平衡時 [30分後]) の取り込み量と同一になる時点) でもまだ、 H^+ の濃度勾配 (小胞外 $>$ 小胞内) が小胞内外に存在しているために、 H^+ の小胞内への流入に伴つて L-

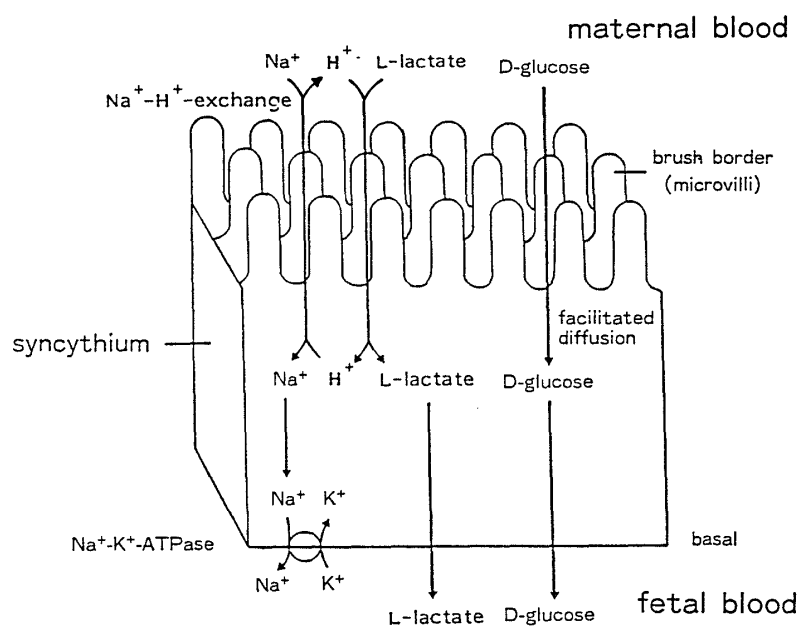


図8 Placental L-lactate transport mechanism

lactateが自らの濃度勾配に逆らつてH⁺と共に共輸送されるため, overshoot現象が生ずる. したがつて, 正期産ヒト胎盤微絨毛膜には, L-lactateをH⁺との共輸送の形で輸送するシステムが存在することが示された.

このようなH⁺とL-lactateの共輸送は肝臓および心臓内へのL-lactateの取り込みにも認められている³⁾¹¹⁾. また, このH⁺との共輸送には微絨毛膜に存在するNa⁺-H⁺-交換ポンプが関与しており, Na⁺-K⁺-ATPaseによつて形成された細胞内外のNa⁺の濃度勾配(細胞外>細胞内)に依存した形で, まず, H⁺がNa⁺と交換の形で細胞外にくみ出され, このくみ出されたH⁺と共にL-lactateは共輸送される.

今回, 胎盤微絨毛膜小胞を用いることによつて, 胎盤におけるH⁺とL-lactateの共輸送系の存在を具体的に示唆することができた. H⁺との共輸送は, 小腸・腎近位尿細管刷子縁膜でのpeptide, アミノ酸輸送にも認められている⁴⁾. 一方, 小腸・腎近位尿細管の刷子縁膜での, L-lactateの輸送はNa⁺との共輸送によつて行われていることが明らかとなつている¹³⁾. これらの臓器と異なり, L-lactateの胎盤輸送がH⁺との共輸送で行われていることは, pHの維持などにもこの輸送系が関与している可能性があり, 今後の検討が必要であ

る. また, 乳酸は, 胎児自身, 体内にて産生しているが, 好氣的条件下では, エネルギー源として活発に心臓では利用されていると考えられており⁸⁾¹²⁾, 胎盤の乳酸の輸送系は胎児が乳酸を活発に利用する時にその役割を果たしているものと考えられるが, その詳細については今後の検討が必要である.

なお, 本研究費の一部は昭和63年度厚生省心身障害研究「産科管理における環境因子に関する研究」によつた.

文 献

1. 飯岡秀晃, 森山郁子, 齊藤真実, 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.
2. 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.
3. Fafournoux, P., Demigne, C. and Remesy, C.: Carrier-mediated uptake of lactate in rat hepatocyte. J. Biol. Chem., 260: 292, 1985.
4. Hoshi, T.: Proton-coupled transport of organic solutes in animal cell membranes and its relation to Na⁺ transport. Jap. J. Physiol., 35: 179, 1985.
5. Lever, J.: The use of membrane vesicles in transport study. CRC. Crit. Rev., 7: 187, 1980.
6. Lowry, O.H., Rosenberg, N.J., Farr, A.L. and Randal, R.J.: Protein measurement with the

- 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. *Medina, J.M.* : The role of L-lactate as an energy substrate for the brain during the early neonatal period. *Biol. Neonate*, 48 : 237, 1985.
 9. *Patterson, C.E., Davis, K.S. and Beckman, D. E.* : Fatty acid synthesis in the fetal lung: Relationship to surfactant lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 878 : 110, 1986.
 10. *Smith, C.H., Nelson, D.M., King, B.F., Donohue, T.M., Ruzycski, 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.
 11. *Trosper, T.L. and Philipson, K.D.* : Lactate transport by cardiac sarcolemmal vesicles. *Am. J. Physiol.*, 252 : C483, 1987.
 12. *Werner, J.C. and Sicard, R.E.* : Lactate metabolism of isolated perfused fetal and newborn pig hearts. *Pediat. Res.*, 22 : 552, 1987.
 13. *Wright, E.M.* : Transport of carboxylic acids by renal membrane vesicles. *Ann. Rev. Physiol.*, 47 : 127, 1985.

(No. 6459 昭63・10・4 受付)