The Changes of Activity and Isozyme-pattern of Lactate Dehydrogenase in Human and Rat Uterus

**Yoshihiro TAKAHASHI, Yuko SANJO, Akio NOMURA,
Taizo TAKEMOTO, and Masao MAEYAMA**

Department of Obstetrics and Gynecology, Nara Medical College, Kashihara, Japan.
(Director : Professor Masao Maeyama, M.D.)

The changes in activity of LDH (L-lactate:NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.27) as well as LDH isozyme-pattern were studied with hormone administered and pregnant rat uterus and with pregnant human uterus.

LDH activity was raised 16–24 hours after the administration of 10 μ g estradiol-17 β to the ovariectomized rat. LDH-isozyme-pattern revealed a shift toward LDH V (M_4). Prolonged administration of estrogen resulted in the increase of distribution of M subunits in the rat uterus which closely resembled the skeletal muscle type pattern in LDH zymogram. The concomitant administration of progesterone (10 mg/rat/day) did not inhibit but rather tended to enhance the increase of LDH activity induced by estradiol administration. Concomitantly used progesterone, however, considerably inhibit the increase of M subunits induced by estrogen.

In muscle tissue of the late pregnant human and rat uterus, activity of LDH was raised and the isozymes changed in the increase percentage of M subunits, namely LDH, V>IV>III>II>I in myometrium of late pregnant rat, and IV>V>III>II>I in human term pregnant myometrium.

It has been well established that five isozymes of LDH are the tetramer consisting of two subunits, M and H, of which amino acid sequence is different from each other and independently controlled by different genes. Proliferative tissue with anaerobic glycolysis contains mainly M-LDH which is not inhibited by high concentration of pyruvate, while in tissues with rather aerobic glycolysis H-LDH sensitive to pyruvate distributes in a much higher proportion.

The fact that the isozyme-pattern of LDH in human and rat uterine muscle resembles that of skeletal muscle, and with the advance of pregnancy the elevation of activity of glycolytic key enzymes (previously reported) indicates a metabolic change of the pregnant uterus into a glycolytic tissue. This may well be explained by the need of rapid energy supply of pregnant uterus at delivery. The distinct response in the isozyme-pattern of estrogen treated from estrogen-progestogen treated uterus suggests the different action of estrogen and progestogen on two genetic loci controlling the synthesis of M and H subunits.

(See pp. 24~27)

ヒト及びラット子宮 Lactate Dehydrogenase の動態

奈良県立医科大学産科婦人科学教室 (主任 前山昌男教授)

高 橋 義 浩, 三 條 侑 子

野 村 皓 夫, 竹 本 泰 三

前 山 昌 男

(昭和44年11月14日受付)

分子レベルでその代謝調節機構の明らかな LDH-isozyme の動態を, ヒト及びラット子宮について検索を行ない, estrogen 投与ラット子宮では, その M-subunit の増加, progestogen 同時投与により, その抑制が認められた。また, 妊娠子宮筋 LDH-isozyme はヒト及びラット共にその末期に M-subunit の著増が認められ, 解糖能の強い組織となつていることが証明された。

は じ め に

先に, ヒト及びラット子宮の glycolytic key enzymes の動態を妊娠時及びホルモン投与時について追求を行い, ヒト及びラット子宮筋組織では, 妊娠時その活性が上昇し, 解糖能の強い組織となること, また estrogen, progestogen+estrogen 投与により, ラット子宮 glycolytic key enzymes 活性が増加することから, 妊娠時のこの酵素活性誘導は, 内因性 estrogen, progestogen によるものであることを明らかにした¹⁾²⁾。今回は, pyruvate $\rightleftharpoons$ lactate の反応を触媒し, しかも, その isozyme について分子レベルで明らかな lactate dehydrogenase (L-lactate : NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.27) について検討を行なった。

実験材料並びに方法

動物 : 体重 160~200gm の去勢雌ラット (去勢後 3 週間目) を用い, 妊娠ラットは腔内に sperm を証明した日を妊娠第 1 日として, それぞれの妊娠日数のものを用いた。投与ホルモン : estradiol-17 β (E) 20 μ g/ml 水溶液, progesterone (P) 10mg/ml ゴマ油溶液, 一部の実験には estradiol dipropionate, 17 α -hydroxyprogesterone capronate を用いた。投与は皮下投与, 量はそれぞれ実験成績で述べる。

酵素液の調整 : ホルモン投与例は全子宮を, 妊娠産褥例は内膜を除去し筋層のみとして用いた。ヒト子宮筋組織は手術時, 一部を biopsy し, 直ちに freeze したものを用いた。子宮組織に 0.01M NaCl, あるいは 0.04M veronal buffer pH 8.4 を加え 10% homogenate を作成, 10,000 xg 30分遠沈上清を用い, electrophoresis に, 適当に稀釈したものを LDH 活性の測定に用いた。

LDH-zymogram の作成は Wieme³⁾, Van der Helm⁴⁾ の寒天電気泳動, nitrotetrazolium 酵素染色法によつた。すなわち 0.04M veronal buffer pH 8.4 で 1.2% の溶融寒天を作成し, それをガラス板上に展開, 放冷, 子宮組織 10% homogenate 上清の 2~3 μ l を添加 (試料の活性値に応じて量を加減し), 泳動槽に装着, 6v/cm になる様に電流調整し, 定電流方式で 90分冷却箱内で通電した。泳動後直ちに lactate, KCN, phenazine methosulfate, NAD, nitrotetrazolium, 0.06M Tris. buffer pH 7.4 の反応液中で 37°C, 60分

incubation 後, 酢酸, エタノール液にて固定した. ついでセロファン紙に固定移動させ, Beckman Recording Densitometer にて densitometry を行なつた.

なお, LDH 活性は Kornberg 法⁵⁾にて測定した.

実験成績

1) ホルモン投与ラット子宮 LDH-isozyme

去勢ラットに E10 μ g 投与し, 24時間後子宮では明らかに LDH-V のしめる比率が増加し, 去勢対照子宮に比し, M-subunit の増加が認められた. 3, 5日間連続投与により, この傾向は一層明らかとなつた.

E 10 μ g に P 10mg を同時投与すると, 1回投与では明らかではないが3, 5日間投与後24時間の子宮

Table 1. Percentage distribution of activity of LDH-isozymes in uterus of ovariectomized rat following the hormones administration by agar gel electrophoresis

Treatment		LDH-isozymes				
		I	II	III	IV	V
Castrated control		4.1 $\pm$ 1.7	22.1 $\pm$ 4.0	25.0 $\pm$ 1.8	27.8 $\pm$ 3.7	21.0 $\pm$ 4.0
Estradiol 10 μ g/day	$\times$ 1	2.5 $\pm$ 0.8	15.5 $\pm$ 1.8	20.0 $\pm$ 2.6	31.0 $\pm$ 1.0	31.0 $\pm$ 4.2
	$\times$ 3	0.5 $\pm$ 0.5	8.0 $\pm$ 1.3	17.5 $\pm$ 1.3	32.0 $\pm$ 1.8	42.0 $\pm$ 2.8
	$\times$ 5	2.5 $\pm$ 0.9	10.0 $\pm$ 1.0	18.5 $\pm$ 0.8	29.0 $\pm$ 0.6	40.0 $\pm$ 2.1
Estradiol 10 μ g/day + Progesterone 10mg/day	$\times$ 1	2.5 $\pm$ 0.6	15.5 $\pm$ 2.3	22.0 $\pm$ 3.7	33.0 $\pm$ 1.0	27.0 $\pm$ 4.8
	$\times$ 3	6.5 $\pm$ 4.1	16.0 $\pm$ 2.9	30.0 $\pm$ 4.9	27.0 $\pm$ 3.8	20.5 $\pm$ 4.7
	$\times$ 5	4.0 $\pm$ 1.7	24.5 $\pm$ 3.1	32.0 $\pm$ 2.2	24.5 $\pm$ 5.2	15.0 $\pm$ 3.1
E.D. 1mg/week	$\times$ 3	1.0 $\pm$ 0	8.0 $\pm$ 0.8	15.0 $\pm$ 2.2	27.0 $\pm$ 0.8	49.0 $\pm$ 3.7
E.D. 1mg/week + OH-P.C. 12.5mg/week	$\times$ 3	3.5 $\pm$ 1.7	21.5 $\pm$ 1.3	26.5 $\pm$ 3.3	24.5 $\pm$ 2.1	24.0 $\pm$ 1.9

E.D.: Estradiol dipropionate, OH-P.C.: 17 α -hydroxyprogesterone capronate. Each value is expressed as mean $\pm$ S.D. of 3 experiments and control value is mean $\pm$ S.D. of 9 experiments (1-3 uteri, each).

では明らかに E による M-subunit の増加の抑制が認められた.

Estradiol dipropionate 1mg 毎週投与, 3回投与後1週目子宮では, LDH-V (M₄) の著明な増加が認められた. 17 α -hydroxyprogesterone capronate を同時投与した場合, estradiol dipropionate による M-subunit の増加が抑制され, その LDH-isozyme pattern は去勢ラット子宮の pattern に類似した. (Table 1). その zymogram を Fig. 1 に示した.

なお, LDH 活性は E 投与16~24時間で明らかな増加を示し, P 同時投与によりその活性抑制は認められなかつた.

Fig. 1. LDH-zymogram of rat uterus.

1. Control uterus of castrated rat
2. Uterus treated with estradiol dipropionate 1mg + 17 α -hydroxyprogesterone capronate 12.5mg/week $\times$ 3
3. Uterus treated with estradiol dipropionate 1mg/week $\times$ 3

2) 妊娠ラット子宮筋 LDH-isozyme

妊娠ラット子宮筋の LDH-isozyme pattern をみると妊娠12日子宮筋では, LDH-IV,>III,>V,>II>I の percentage distribution を示したが, 妊娠16, 21日では, V>IV>III>II>I の pattern を示し, 明らかに M-LDH の増加が認められた. 産褥7日子宮筋では LDH-isozyme の分布は妊娠末期と同じ pattern を示したが, M-subunit の減少が認められた (Table 2).

LDH 活性は去勢対照子宮 0.373 ± 0.018 (mean $\pm$ S.D.) μ moles lactate formed/min./mg protein, 妊娠中期 (10~12日目), 末期 (18~21日目) 子宮筋ではそれぞれ 0.496 ± 0.053 , $0.831 \pm 0.068 \mu$ moles lactate formed/min./mg protein で妊娠末期には明らかに増加を示した.

Table 2. Percentage distribution of activity of LDH-isozymes in uterine muscle tissue of pregnant and postpartal rat

Subject	LDH-isozymes				
	I	II	III	IV	V
Pregnancy 12th day	3.5	16.2	25.6	32.0	22.7
Pregnancy 16th day	2.5	7.9	10.5	24.3	54.8
Pregnancy 21st day	1.5	6.3	10.6	31.9	49.7
Postpartum 7th day	6.0	16.6	19.0	26.7	31.7

Each value is average of 2 experiments.

3) ヒト子宮筋 LDH-isozyme

正常周期を有するヒト子宮筋の LDH-isozyme は LDH-III が最も多く, 排卵前期, 後期及び閉経婦人子宮筋で, その pattern に有意の差は認められなかった. 妊娠10カ月の子宮筋 isozyme pattern は LDH-IV>V>III>II>I を示し, M-subunit の明らかな増加が認められた (Table 3). ヒト子宮筋 LDH 活性は正常周期例 0.482 ± 0.038 (mean $\pm$ S.D.) μ moles lactate formed/min./mg protein (7例), 妊娠10カ月例 $0.686 \pm 0.079 \mu$ moles/min./mg protein (6例) であった.

Table 3. Percentage distribution of activity of LDH-isozymes in human uterine muscle tissue

Subject	Number of Exp.	LDH-isozymes				
		I	II	III	IV	V
Preovulatory	(6)	4.8 ± 2.0	20.6 ± 4.0	40.4 ± 2.4	28.2 ± 3.9	6.0 ± 1.6
Postovulatory	(5)	6.4 ± 2.5	26.2 ± 3.4	39.6 ± 5.6	21.8 ± 4.2	6.0 ± 1.6
Menopause	(5)	4.8 ± 2.2	25.6 ± 3.7	42.8 ± 5.7	21.4 ± 4.0	5.4 ± 2.2
Pregnancy (3M)	(3)	1.8 ± 0.9	16.6 ± 1.3	39.3 ± 1.7	32.5 ± 1.8	9.8 ± 1.3
Pregnancy (10M)	(6)	2.3 ± 1.3	4.5 ± 2.2	25.3 ± 3.7	38.6 ± 2.1	29.3 ± 4.6

Each value is mean $\pm$ S.D..

考察並びに結論

LDH は lactate $\rightleftharpoons$ pyruvate の反応を触媒する酵素であるが, すべての動物の LDH は M, H の2つの subunit よりなり, 前者は主として骨格筋, 後者は心筋にその起源があり, 各組織あるいは血清中の LDH はこの二つの type の subunit が tetramer となつてその LDH 分子を構成している. この二つの

M-, H-LDH はその amino 酸構成を異にし, catalytic な性質および immunological な性質を異にし, 興味あることには, それぞれ異なる gene の支配下にあると考えられている^{8)~9)}.

また, H-LDH は pyruvate→lactate の反応で比較的低濃度の pyruvate で抑制を受け, M-LDH は高濃度 pyruvate によつても抑制を受けない¹⁰⁾¹¹⁾, すなわち H-type はより aerobic な代謝をする組織に認められ, M-type はより anaerobic な代謝を行う組織に存在する.

一般に骨格筋は M-LDH のしめる比率が大であるが, 急速な収縮運動をする筋と比較的, 急速収縮運動を必要としない筋によつてその M-type LDH に多少のあることはよく知られた事実である¹²⁾. 一方, 増殖の盛んな腫瘍組織ではその隣接正常組織より一般に M-subunit が高濃度に存し, 高い解糖能を有するという事実がある¹³⁾. かくのごとく LDH についてはその代謝調節機構が分子レベルで明らかとなっている.

Kaplan ら¹⁴⁾は幼若家兎あるいは去勢ラットに estrogen を投与するとその標的臓器である子宮の LDH の活性の上昇が認められ, しかもその増加は M-type の増加であり DNA-dependent RNA 阻害剤である actinomycin で阻害されるところから, estrogen はその標的臓器の gene に働き, M-LDH の新合成を誘導し, その臓器の代謝調節を行なっていることを報告している.

われわれの去勢ラットの estrogen 投与実験でも同様成績をえたが, progestogen 同時投与により, M-LDH の estrogen による増加が明らかに抑制される結果をえ, その子宮 LDH-isozyme pattern は去勢子宮と類似したが, LDH 活性の抑制は認められずかえつてその増加が認められたことは LDH の M-, H-subunit がそれぞれ異なる gene regulation を受けていること⁸⁾を考えると progestogen 同時投与により何らかの型で estrogen による gene activation と異なる調節を gene に与えたことが推定出来, また糖代謝の面よりも estrogen 単独投与と progestogen 同時投与により, 去勢ラット子宮は前者により anaerobic な代謝, 後者により aerobic な代謝を営む組織に化学的修飾をうけたことが推定出来る.

ラット妊娠子宮筋 LDH-isozymes pattern はその末期に M-LDH の著増を示し, その pattern は estrogen 投与群と類似していた. ヒト妊娠子宮筋では10カ月子宮で M-LDH の増加を認めたが LDH-IV が最高比率をしめ, その成績は Geyer¹⁵⁾の報告と一致した. ヒトおよびラット妊娠子宮筋は M-LDH の増加したことより解糖能の強い組織に内因性ホルモンによつて化学的に修飾されたことは明らかである.

文 献

- 1) 高橋義浩, 岸田秀雄, 竹本泰三, 斉藤守重: 日本内分泌誌, 45: 738, (1969).
- 2) 高橋義浩, 徳井 宏, 岸田秀雄, 斉藤守重: 日本内分泌誌, 45: 823, (1969).
- 3) WIEME, R.J.: Clin. Chim. Acta, 4: 317, (1959).
- 4) VAN DER HELM, H.J.: Clin. Chim. Acta, 7: 124, (1962).
- 5) KORNBERG, A.: Methods in Enzymology, I: 441, Academic Press Inc., N.Y.
- 6) KAPLAN, N.O. and M.M. CIOTTI: Ann. N.Y. Acad. Sci., 94: 701, (1961).
- 7) CAHN, R.D., N.O. KAPLAN, L. LEVINE, and E. ZWILLING: Science, 136: 962, (1962).
- 8) MARKERT, C.L. and H. URSPRUNG: Develop. Biol., 5: 363, (1962).
- 9) WIELAND, T. and G. PFLEIDERER: Angewandte Chem., 1: 169, (1962).
- 10) KAPLAN, N.O.: Regulatory effect of enzyme action, Mechanisms of action of steroid hormones, 247, (1961). Pergamon Press, Oxford.
- 11) KAPLAN, N.O.: Proc. Fifth Intern. Cong. Biochem., III: 97, (1963). Pergamon Press, Oxford.
- 12) KAPLAN, N.O. and R.D. CHAN: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 48: 2123, (1962).
- 13) KAPLAN, N.O. and T.L. GOODFRIEND: Advan. in Enzyme Regulation, 2: 203, (1964).
- 14) GOODFRIEND, T.L. and N.O. KAPLAN: J. Biol. Chem., 239: 130, (1964).
- 15) GEYER, H.: Klin. Wschr., 46: 390, (1968).

(本論文の要旨は第16回日本内分泌学会西部会総会及び第21回日本産科婦人科学会総会, 前山昌男教授の宿題報告の一部として発表した.)