運動鍛練者に検出される特異血漿蛋白質

弘 卓 三* 門 福 強 樹** 牧 野 義 彰*
佐 藤 永 雄** 紺 野 邦 夫*

SPECIFIC PLASMA PROTEIN DETECTED ON PHYSICAL EDUCATION ATHLETIC STUDENTS

TAKUMITSU HIRO, TSUYOKI KADOFUKU, YOSHIAKI MAKINO,
TSUNEO SATO and KUNIO KONNO

Abstract

The purpose of this study is to analyze the plasma proteins of physical education athletic and general students (aged 19-22) before their breakfast by two-dimensional electrophoresis.

The results of this study, a protein which has not been found in any original report yet is detected from physical education athletic students before breakfast.

This protein was not detected from general students before breakfast. This protein was detected at the position of pI5.0, molecular weight of about 70,000 on two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis under non-denaturing condition, but it showed a molecular weight of about 30,000 on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

As far as this research is concerned, neither special physical education athletic students and nor general students were observed in changes of two-dimensional electrophoretic patterns of blood cell cytosol and blood cell membrane proteins.

(J. Physical Fitness Japan 1986, 35 : 241~247)

key words : athlete, plasma protein, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

I. は じ め に

我々は身体活動と健康や体力の維持増進との関係を明らかにする目的で運動が身体におよぼす影響について報告してきた¹⁾²⁾。前報³⁾では 10 km 走前後の血漿を 2 次元電気泳動法で分析し、運動後特異的に出現する蛋白質が存在することを報告した。しかし、この場合対象者は体育専攻学生およびその大学院生でありスポーツ実践者のみに特異的に出現するものか、あるいは一般人にも出現するものかについては明らかでなかった。

そこで今回は 10 km 走後の血漿中に特異的に出現する蛋白質の性質についての研究を行なう手始めとして、継続的な運動を実施している人と実施していない人の早朝空腹時の血漿蛋白質を 2 次

元電気泳動法で分析し、我々が 10 km 走後の血漿中から検出した特異蛋白質と同じ蛋白質が存在するか否かについて検討した。

II. 試料および方法

A. 実験対象

対象は継続的な運動を実施している某体育大学長距離部員 6 名(以下スポーツ選手, athlete とする)および継続的な運動を実施していない大学生 6 名(以下一般人, non-athlete とする)であり、年齢はいずれの群とも 19~22 才の健康な男子であった。

B. 採血および試料の調製

採血は早朝空腹時に座位安静にて正中皮静脈より約 10 ml, ヘパリン加工させた真空採血管を用

* 昭和大学医学部第 1 生化学教室 Department of Biochemistry, School of Medicine, Showa

** 昭和大学医学部第 2 生化学教室 University

東京都品川区旗の台 1-5-8

1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142, Japan

いて行った。

血液は $3,000 \times g \cdot 10$ 分間の遠心を行い, その上清に10%ショ糖となるようにショ糖を加えたものを血漿蛋白試料とした。

C. 試薬

両性担体は LKB の pH 3.5~10 および pH 4.0~6.5 のアンフォラインを用いた。アクリルアミド, N, N'-メチレンビスアクリルアミド, N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン (以上電気泳動用特製試薬), SDS, 2-メルカプトエタノール (以上生化学用試薬), トリス, グリシン, 過硫酸アンモニウム (以上特級試薬) は和光純薬のものを使用した。コマジーブリリアントブルー R-250 は Sigma のものを使用した。

D. 方法

1. 血漿の2次元電気泳動

血漿の2次元電気泳動は Kadofuku たち⁴⁾の方法に準じて行った。1次元目のゲルは内径 0.5cm, 長さ 20 cm のガラス管を用い, 4%アクリルアミド, 0.2% N, N'-メチレンビスアクリルアミド, 2%アンフォライン, 0.03% TEMED, 0.07% 過硫酸アンモニウムによって作製した。電極槽液は陽極側を 0.01 M リン酸, 陰極側を 0.1 M NaOH とし 4℃で20時間の泳動を行った。2次元目は幅 16 cm, 長さ 14 cm, 厚さ 0.4 cm の4~21%の直線濃度勾配ポリアクリルアミドスラブゲルとした。濃度勾配ゲルの組成は高濃度溶液を 0.375 M Tris-HCl (pH 8.9), 21% アクリルアミド, 0.2% N, N'-メチレンビスアクリルアミド, 10% ショ糖, 0.03% TEMED, 0.03% 過硫酸アンモニウム, および低濃度溶液を 0.375 M Tris-HCl (pH 8.9), 4% アクリルアミド, 0.2% N, N'-メチレンビスアクリルアミド, 0.03% TEMED, 0.03% 過硫酸アンモニウムとし, 濃度勾配作製装置を用いて流速 3 ml/min で作成した。

泳動用緩衝液は 0.05 M Tris-0.38 M グリシン (pH 8.3) を用い, 4℃で20時間の泳動を行った。

2. pH 勾配および分子量測定

pH 勾配は1次元目の等電点電気泳動を各試料2本ずつ行い, そのうちの1本を電気泳動終了直後 10 mm ずつ切り取って, 蒸留水 1 ml ずつ加え

室温で2時間放置後 pH メーターで測定した。

SDS 電気泳動による蛋白質の分子量測定には cytochrome C (12,400), carbonic anhydrase (30,000), ovalbumin (45,000), bovine serum albumin (68,000), phospholylase a (94,000), rabbit muscle myosin (220,000) を標準蛋白質として使用した。

3. 染色および脱染色

電気泳動後のゲルは 0.025% コマジーブリリアントブルー R-250, 50% メタノール, 7% 酢酸中で1晩染色した。脱染色は 30% メタノール, 7% 酢酸で行った。

4. 血液有形成分および血清浸透圧の分析

血液有形成分(赤血球数, 白血球数, 平均赤血球容積, ヘマトクリット値, 血色素量, 網状赤血球)は Coulter Electric の Coulter Counter で分析した。また, 血清浸透圧は氷点降下法で分析した。

III. 結 果

表1には被検者の身体特性を示した。 $\dot{V}O_2\max$

Table 1. Characteristics of subjects (n=6)

	Non-Athletes	Athletes
Age (years)	19.9±0.8	20.2±1.1
Height (cm)	171.8±4.0	170.3±5.7
Weight (kg)	57.3±7.6	57.6±5.8
$\dot{V}O_2\max$ (l/min)	2.34±0.35	3.86±0.60*

Level of significance; * $p < 0.01$ from non-athletes

Table 2. Comparisons of blood properties and osmotic pressure before breakfast

	Non-Athletes	Athletes
RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	516±37	486±34
WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	63±6	69±15
Ht (%)	47.1±3.8	43.0±2.7*
Hb (g/dl)	15.3±1.4	14.2±0.9
MCV (μm^3)	91.6±3.2	87.5±2.7*
Reticulocyte (%)	7.6±2.1	14.1±5.8*
Osmotic Pressure (Mos/L)	291±15	292±11

Level of significance of difference; * $p < 0.05$ from non-athletes.

Fig. 1. Typical two-dimensional electrophoretic patterns of plasma proteins in athletes and non-athletes before breakfast. Protein which remarkably appeared in athletes was indicated by arrow. IgM : immunoglobulin M, IgG : immunoglobulin G, α_2 M : α_2 -macroglobulin, Hp : haptoglobin, Tf : transferrin, Alb : albumin.

は自転車エルゴメーターによる最大下作業によって求めた. 両群間には $\dot{V}O_2\text{max}$ において1%水準で有意な差が得られた.

表2には血液有形成分および血清浸透圧を示し

た. 両群間でヘマトクリット, 平均赤血球容積, 網状赤血球に5%水準で有意な差が得られた.

図1はスポーツ選手および一般人の血漿蛋白質を2次元電気泳動したもの各1例ずつを示した

Non-Athlete

N.K.

S.K.

N.S.

T.K.

K.U.

S.N.

Athlete

T.K.

Y.K.

T.F.

M.A.

M.U.

S.I.

Fig. 2. Two-dimensional gel sections containing the plasma protein remarkably appeared in athletes. The area and the position in two-dimensional electrophoretic pattern were indicated in Fig. 1.

ものである。写真中には2次元電気泳動後の蛋白質の位置を知るためにIgM, IgG, Tf, Hp, Alb, の位置を示した⁷⁾。両者とも類似した泳動パターンを示したが詳細に比較してみると一般人にはまったく検出されなかったpI 5.0, MW 約70,000の蛋白質がスポーツ選手からは検出された(図中矢印)。

図2は一般人6名およびスポーツ選手6名の被検者全員の血漿を2次元電気泳動法で分析しpI 5.0, MW 約70,000の部分(図1に黒枠で示した)のみを示したものである。一般人においては被検者6名とも矢印で示したpI 5.0, MW 約70,000の位置にこの蛋白質をまったく検出することはできなかった。しかし、スポーツ選手からは6名中3名(太い矢印で示したY.K., M.U., S.I.)にpI 5.0, MW 約70,000の蛋白質を明らかに検出することができた。なお、この蛋白質は通常の泳動パターンとは異なりロケット状を示し、また2峰性を示す場合もあった。

次にスポーツ選手の早朝空腹時の血漿中に特異的にみられる蛋白質の性質を調べるために2次元電気泳動後のゲルから切り取って、SDS電気泳動によって分析した。すなわち、図3に示したよう

Fig. 3. Enlarged figure of two-dimensional gel section containing the protein which remarkably appeared in athletes. The proteins in area A and B were extracted from two-dimensional gel and then analyzed on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. A: gel section containing the protein only which appeared in athletes. B: gel section containing both the protein which appeared in athletes and albumin.

Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the plasma protein which remarkably appeared in athletes before breakfast. A, B: see Fig. 3.

にスポーツ選手にみられる蛋白質のみが含まれる部分をA、アルブミンとその蛋白質の両方が含まれると思われる部分をBとしてゲルを切り取り、2% β -チオジグリコールを含む0.1N NaOHで抽出後Laemmli⁵⁾の方法によりSDS電気泳動を行った。その結果を示したものが図4である。Bからはアルブミンと考えられるMW 約68,000の主バンドとMW 約30,000の2本のバンドのみが検出された。また、AからはMW 約30,000のバンドのみがはっきりと検出された。

IV. 考 察

電気泳動による蛋白質の分析法は分解能が非常に高く、近年生化学的研究や臨床医学の分野でも頻繁に利用されている。特にManabeたち^{6,7)}はヒト血漿の蛋白質を2次元電気泳動しそのNormalized Mapを作成し、ヒト血漿蛋白質についての研究を行っている。Manabeたちによればヒト血漿蛋白質は約250個に分離されるが、未だに同定されていない蛋白もあり、これらの中には生理学的意義が不明なものもある。

先に我々は体力医学的に運動と健康や体力の維

持増進のメカニズムを追求する目的で血漿蛋白質を2次元電気泳動で分析し, 運動後特異的に増加する蛋白質を報告した³⁾. この蛋白質は等電点が5.0, 分子量が約70,000で通常の蛋白質の泳動像とは異なりロケット状を示し, これまで検出されていないものであった. しかし, この時は被検者が体育専攻学生およびその大学院生であったことからスポーツ実践者のみに特異的に出現するものか, あるいは一般人にもみられるものかは不明であった.

そこで本研究では身体活動を継続的に行っている体育大学男子学生とそうでない一般男子大学生の早朝空腹時の血漿蛋白質を2次元電気泳動法で分析した. その結果, スポーツ選手には6名中3名に pI 5.0, MW 約 70,000 の蛋白質が検出され, 一般人の血漿中にはこの蛋白質はまったく検出されなかった. さらに, 前報告³⁾において我々は6名中4名が運動前の安静時にもこの蛋白質を検出しており, スポーツを実施している人には早朝空腹時や安静時にもこの蛋白質は出現していると思われる. したがって, 前報告とあわせて2次元電気泳動で pI 5.0, MW 約70,000 に出現する蛋白質は身体運動と非常に密接な関係がある蛋白質と推測される.

この運動に関係があると考えられる蛋白質は通常の泳動像と異なり, またアルブミンの泳動位置と非常に近いためアルブミンに何らかの物質が結合したものではないかと考えられたので, その部分をゲルから取り出し SDS 電気泳動で分析した. その結果図4に示すごとく, この蛋白質の MW は約 30,000 でありアルブミン (68,000) とは異なったものであることが確認された. この結果は 10 km 走後特異的に出現する前報³⁾の報告とよく一致するものであり, 運動後特異的に出現する蛋白質と6名中3名のスポーツ継続者の早朝空腹時の血漿中に検出される蛋白質は明らかに同種の蛋白質であることを示唆している.

この運動に関係あると考えられる蛋白質がどのような運動によって出現するのか, すでに血漿中に存在する蛋白質が他の物質と結合したためか, または組織から逸脱したものか, そしてそれが生

体内の生理的役割りとどのように関係しているかは今後の研究課題としてとらえていく必要があると考える.

なお, 早朝空腹時のスポーツ選手および一般人の血球膜蛋白質, 血球内蛋白質の2次元電気泳動も行ってみた. その結果, 血球膜蛋白質は約120個, 血球内蛋白質は約40個の蛋白質に分離されたが現在のところ両群間に顕著な差を検出することはできなかった.

以上のごとく, 現在までに同定されていない蛋白質が身体運動の影響によって出現することは今後の体力医学的研究を進める上でぜひ解明する必要があると思われる.

V. ま と め

運動を継続的に行っている体育専攻男子大学生6名とそうでない一般男子大学生6名の早朝空腹時の血漿蛋白質を2次元電気泳動法を用いて分析し, その泳動パターンを比較した.

その結果, スポーツ選手6名中3名から現在までに報告のない pI 5.0, 分子量約 70,000 の蛋白質を検出した. また, 一般大学生からはこの蛋白質はまったく検出されなかった. この蛋白質は通常の蛋白質の泳動パターンとは異なるものであった. さらに, この蛋白質は2次元電気泳動ではアルブミンとほぼ同じ位置 (pI 5.0, 分子量約70,000) に泳動されたが, SDS 電気泳動では分子量約 30,000 の位置に泳動されアルブミンとは異なった蛋白質であった.

(受付 昭和61年1月20日)

文 献

- 1) 弘 卓三(1982): 代謝性 acidosis による赤血球浸透圧脆弱性の研究. 体力科学, **31**, 279-290.
- 2) 弘 卓三, 堀居 昭(1984): 身体トレーニングに伴う赤血球分布曲線の研究. 体力科学, **33**, 1-7.
- 3) 弘 卓三, 門福強樹, 牧野義彰, 佐藤永雄, 紺野邦夫(1985): 身体運動による血液成分および性状の変化. 生物物理化学, **29**, 355-362.
- 4) Kadofuku, T. and Sato, T.(1984): Detection of changes in rabbit serum proteins after partial

- hapatectomy by means of two-dimensional electrophoresis under non-denaturing conditions. J. Chromatogr., **311**, 93-99.
- 5) Laemmli, U. K. (1970) : Clearance of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**, 680-685.
- 6) Manabe, T., Tachi, K., Kojima, K. and Okuyama T. (1979) : Two-dimensional electrophoresis of plasma proteins without denaturing agents. J. Biochem., **85**, 649-659.
- 7) Manabe, T., Kojima, K., Jitzukawa, S., Hoshino, T. and Okuyama, T. (1981) : Normalization of two-dimensional electrophoretic patterns of human plasma proteins and comparisons of cerebrospinal fluid and urine patterns in terms of the normalized map. J. Biochem., **89**, 841-853.