

運動負荷により血清中に出現する 蛋白質の運動と健康との関係

昭和大学 牧野義彰
(共同研究者) 同 門福強樹
鶴見大学 弘 卓三

Relationship Between Exercise and Health on Specific Protein Detected in Serum after Physical Exercise

by

Yoshiaki Makino, Tsuyoki Kadofuku
*Department of Biochemistry, School of
Medicine, Showa University*

Takumitsu Hiro
School of Dentistry, Tsurumi University

ABSTRACT

A specific protein which appeared in plasma after a 10 km-run was detected using two-dimensional electrophoresis, and its properties were investigated. This specific protein could not be detected in non-exercising human plasma.

This specific protein was also detected in tri-athlon race, but its increase did not definite.

This specific protein was detected at almost the same protein as albumin on two-dimensional gel under non-denaturing condition, but it was not adsorbed to anti-albumin-Sepharose column.

This specific protein was purified on polyacrylamide gel electrophoresis, anti-albumin affinity chromatography and isoelectrofocusing. This specific protein was detected at the position of pI 5.0, molecular weight of about 70,000 on two-dimensionall polyacrylamide gel electrophoresis under non-denaturing condition, but it showed a molecular weight of 25,000 on SDS-

polyacrylamide gel electrophoresis.

This protein was stained periodic acid-Shiff reagent but not with Sudan Black. This protein contained a large amount of glutamic acid (or glutamine), glycine and leucine residues, and did not contain methionine residue.

要 旨

2次元電気泳動により 10km 走をした後の血漿中に特異蛋白質が出現することを確認した。この特異蛋白質は非運動負荷の場合には検出できなかった。この特異蛋白質はトライアスロン競技後には顕著に増加した。しかしその変化は一定ではなかった。この特異蛋白質は未変性の2次元電気泳動ではアルブミンほぼ同じ位置に検出された。しかし、抗アルブミン抗体-Sepharose のカラムで吸収されなかった。

この特異蛋白質をポリアクリルアミドゲル、抗アルブミン抗体のカラムクロマトグラフィー、調製用等電点電気泳動によって精製した。この特異蛋白質は未変性の2次元電気泳動では分子量70,000, pI 5.0 の位置に泳動されたが、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では分子量25,000 の位置に検出した。この蛋白質は Shiff の試薬で染色され、Sudan Black では染色されなかった。この蛋白質のアミノ酸組成はグルタミン酸、グリシンとロイシン残基などが多く、メチオニン残基は見られなかった。

緒 言

人間が健康を維持するためには完全な栄養と適度の運動ならびに休養が必要とされている。このように運動が健康の維持や体力の増進に効果があると考えられているために、近ごろ、多くの人々が日常生活に積極的に運動を取り入れるようになってきた。しかし、一方において運動が身体にどのような影響を与えるかという点については体系

的な研究がなされていない。

われわれは運動が身体に与える影響を調べる目的で運動負荷後の血液成分の変化を研究しているが、この中で血清蛋白質の変動を2次元電気泳動により検討したところ特異蛋白質の出現することを観察した。この特異蛋白質とトライアスロンとの関係、この特異蛋白質を簡易に測定できるようにするために、蛋白質の精製純化、性質などについて今回は報告する。

試料および実験方法

1. 実験対象者、運動負荷および採血

対象は年齢が20~24歳までの健康な体育専攻男子学生6名ならびに体育非専攻の学生とした。運動負荷は400mのトラックを25周(10km)。時間は40~50分間で走行させた。採血は運動開始後30分前と運動終了後にヘパリン加工した真空採血管を用いて行った。また、他の試料として最も過激なスポーツとして知られるトライアスロン競技者の血清も試料とした。

運動特異蛋白質を精製するための試料は運動を負荷したボランティアの体育大学学生の血清をブールしたものを使用した。

2. 試 薬

両性担体は LKB 社の Ampholine (pH 3.5~10.0, pH 4.0~6.5, および pH 5.0~8.0) 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, メルカプトエタノール (以上特級) は和光純薬から購入したものを使用した。

3. 方 法

3-1. 2次元電気泳動：血清（または血漿）蛋白質の2次元電気泳動は Kadofukuらの方法を用いた。すなわち，1次元目は4%ポリアクリルアミド—2% Ampholine を用いた等電点電気泳動，2次元目は4~21%の直線濃度勾配ポリアクリルアミドゲルとした。なお，2次元目の泳動時間は20時間とした。

3-2. pH勾配および分子量の測定：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，その内1本を電気泳動終了後10mmずつ切り取って試験管にいれ，蒸留水1mlを加えて室温で2時間放置後pHメーターで測定した。

3-3. 分子量測定には cytochrome C (12,400), carbonic anhydrase (30,000), oboalbumin (45,000), bovine albumin (68,000), phospholylase a (94,000), rabbit muscle myosin (220,000) を標準蛋白として使用した。

3-4. 染色および脱染色：電気泳動後のゲルは0.025%コマシブリリアントブルー R-250—50%メタノール—7%酢酸中で一晩染色した。脱染色は30%メタノール—7%酢酸中で行った。

4. アミノ酸分析：精製した蛋白質のアミノ酸組成は蛋白質を6N HCl 中で20時間，110°C で加水分解した後，日立アミノ酸分析計（835-50型）を使用して分析した。

5. 調製用等電点電気泳動：LKB社のカラム等電点電気泳動装置を用いた。

結果および考察

同一の被験者について運動負荷の前後の血漿蛋白を2次元電気泳動を行ったものの1例を図1に示す。写真中には2次元電気泳動後の蛋白の位置を知るために IgM, IgG, Tf, Hp, Alb の位置を示した。運動前と運動後の血漿の2次元電気泳動像を比較してみると等電点 (pI) 5.0 分子量約70,000の位置（アルブミンの位置の上）に運動

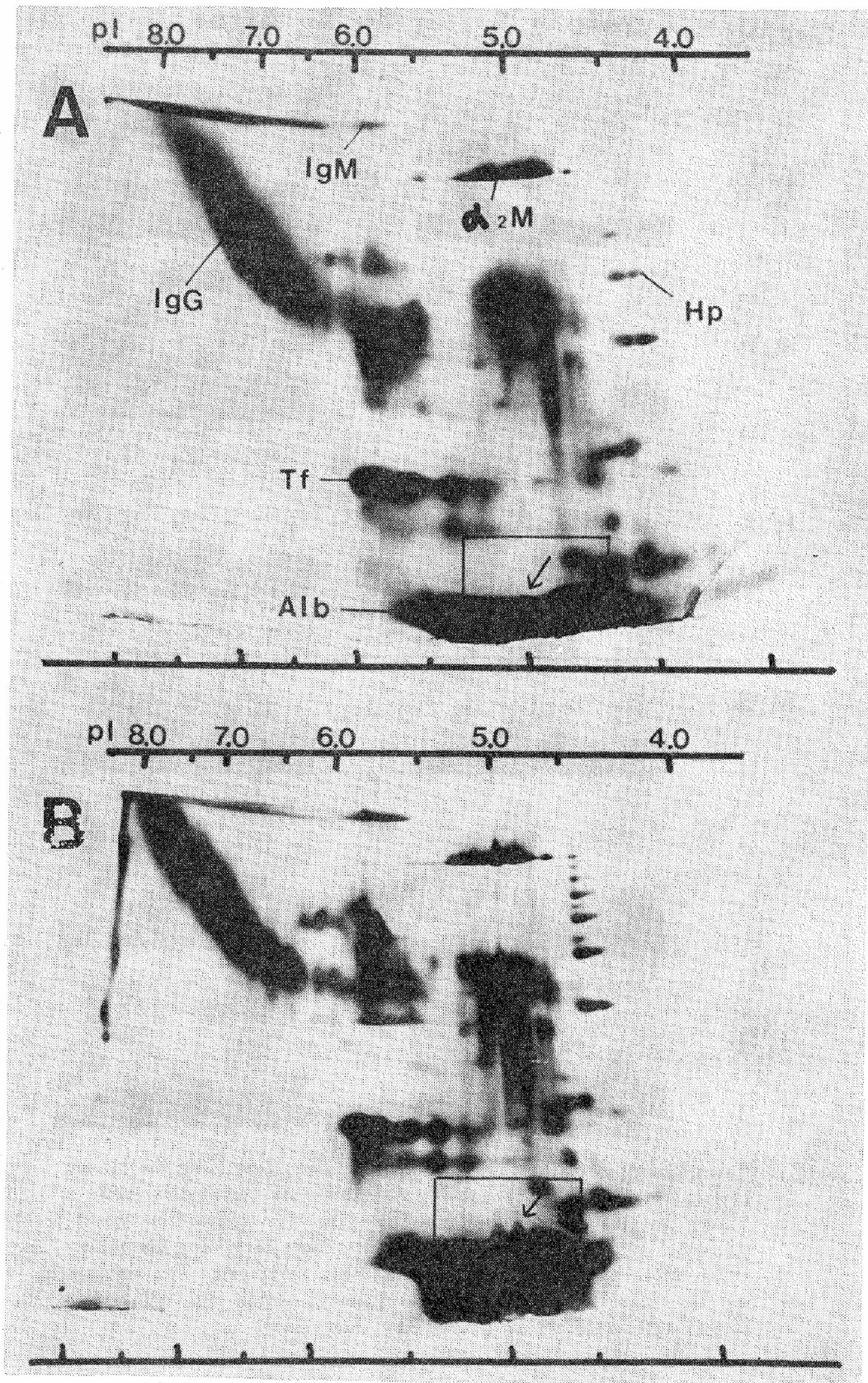
前には検出されず，また通常の蛋白質の泳動像とは異なるロケット状に泳動される蛋白質（図1の黒枠内の矢印で示した蛋白）が運動後に著しく増加していることが観察された。そこで，われわれはこの運動に関係すると思われる蛋白質に注目して以下の実験を遂行した。

体育専攻男子学生6名に対して10km走を行い，その運動前後の血漿を2次元電気泳動を行い前記の運動特異蛋白質が泳動された部分（図1に黒枠で示した）のみを拡大したものが図2である。いずれの被験者もこの特異蛋白質は運動後に著しく増加していることが観察された。しかし，T.T. や Y.I. のように泳動像が2峰性になるものや，H.K. のように運動前にもかなり多量にこの特異蛋白質が検出される場合もありその変化は一様ではなかった。

図2の結果の対象となった被験者はすべて体育専攻学生であり，体育非専攻学生に比べて普段から運動量がかかなり多いことが考えられる。そのため運動前にもこの特異蛋白質が検出されるとも考えられる。そこでわれわれは体育非専攻学生の6名について血漿中に特異蛋白質が存在するか，否かを調べた結果，これらの学生の運動前の血漿では運動特異蛋白質を観察することはできなかった（電気泳動像省略）。

次にこの運動特異蛋白質が運動とどのように関係するかを検討するために，現在最も過激なスポーツとして知られるトライアスロンについて検討した。競技者の競技の前と後，ならびに1日後の血清について2次元電気泳動を行った。数例について分析を行ったが，その内の男女各々1例ずつの結果を図3に示す。

男性の被験者 R.K. の場合には同じ量の血清中において，競技前日には少ししか観察されなかったこの特異蛋白は競技終了直後には顕著な増加を示し，翌日にはその量が低下している結果が得られた。女性の被験者 Y.O. でも同様に，競技後に



⊗ 1 Two-dimensional electrophoretic patterns of plasma proteins. (A) Before experiment, (B) after 10 km-run physical exercise. Fifty μ l of plasma was used for each run. Protein which appeared remarkably after the exercise was indicated by arrows.
IgM: immunoglobulin M, IgG: immunoglobulin G, α_2 M: α_2 -macroglobulin, Hp: haptoglobin, Tf: transferrin, Alb: albumin.

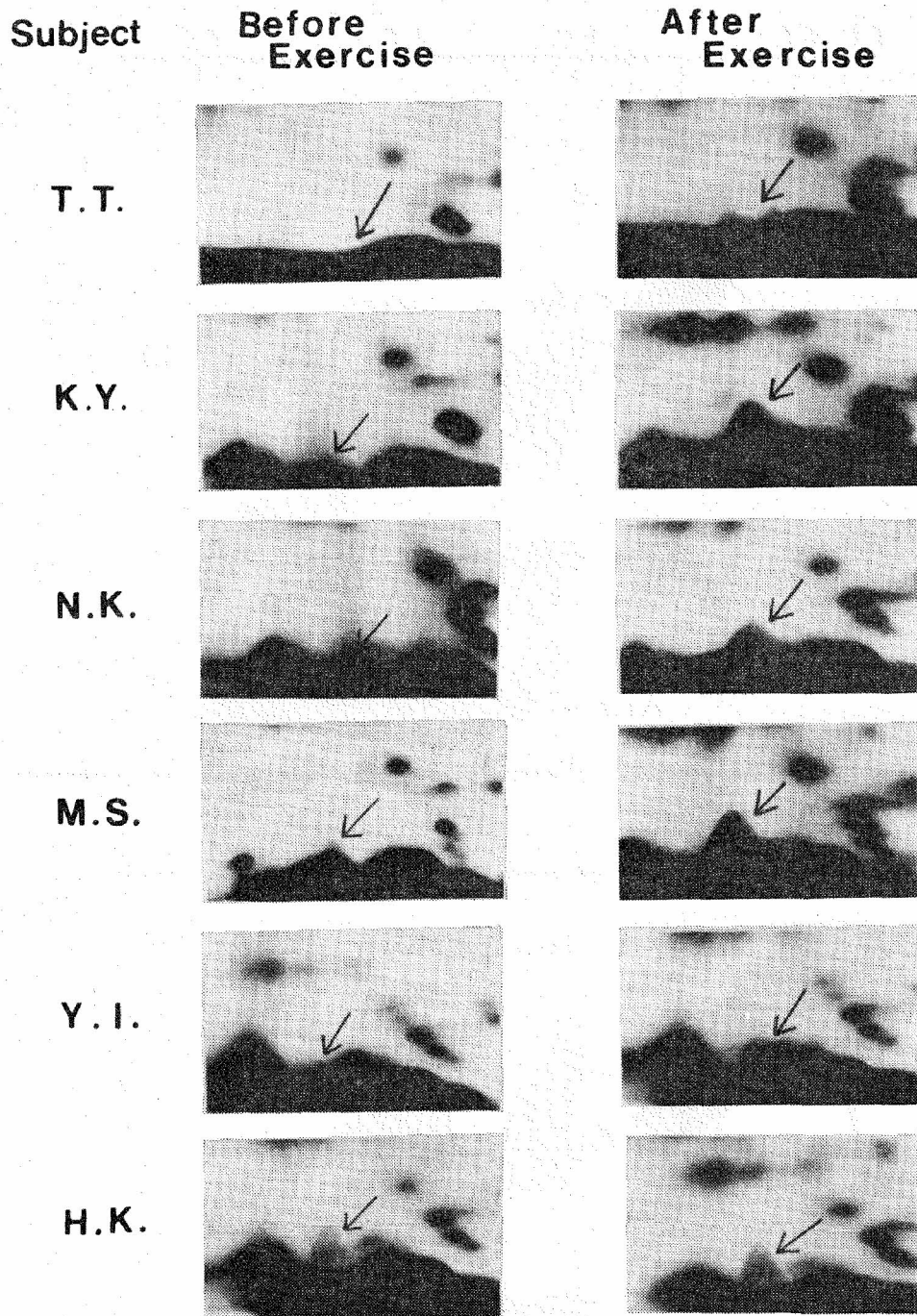


図2 Enlarged figures of two-dimensional gel sections containing the plasma protein which appeared remarkably after 10 km-run physical exercise. Plasma proteins before and after the exercise were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and the gel sections containing the protein which appeared remarkably after the exercise are shown. The area and the position in two-dimensional electrophoretic pattern are indicated in Fig. 1. Fifty μl of plasma was used for each run.

は多量の特異蛋白が検出され、翌日には競技前日のレベルに戻ることが観察された。

以上の結果からこの特異蛋白質は運動を負荷することによって血中に出現するもので、運動の影響

によって血中の蛋白質が他の物質と結合したのか、またはいずれかの組織からの逸脱によるものであることが考えられる。

しかし、トライアスロンという過激なスポーツ

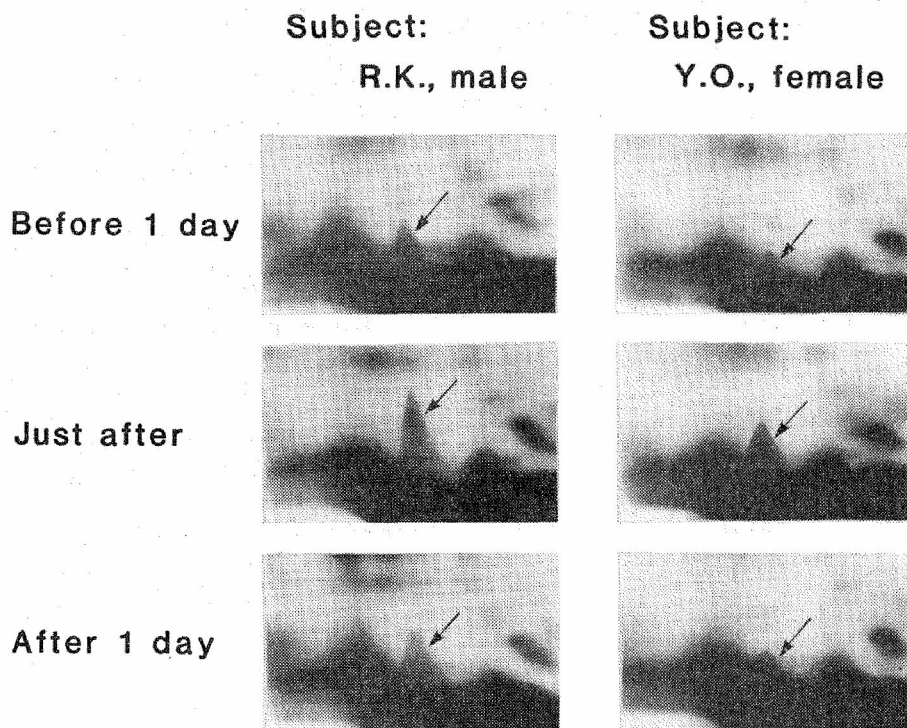


図3 Changes of specific protein in triathlon race. Plasma proteins obtained before 1 day, just after, and after 1 day were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. The gel sections containing specific protein are shown. The area and the position in two-dimensional electrophoretic pattern are indicated in Fig. 1. Fifty μ l of plasma was used for each run.

にしては競技後の増加量が少なく，競技者にも差が見られた．そこで2次元電気泳動の位置ならび分子量の点から考えてアルブミンに他の物質が結合することによってテーリングをしたロケット状の泳動パターンを示したとも考えられるので，抗アルブミン抗体—Sepharose のカラムを使用して試料の血清中のアルブミンを大部分除いたあと，2次元電気泳動を行った．その結果この特異蛋白は除かれず，アルブミンが除かれたためにロケット状を示すこの蛋白の染色像が大きく出現した．

このことからこの蛋白は少なくとも血中のアルブミンに何か他の物質が結合したものではないことが示唆される．また現在までに運動負荷により組織から血中に逸脱する蛋白質としてはミオグロビン，CPK などが報告されているが，これらとは等電点，分子量等も異なる．これらについて2次元電気泳動を行ったところ，泳動位置，泳動パ

ターンなどとともに異なるものであったので，ミオグロビン，CPK 以外の蛋白と考えられる．

われわれはこの特異蛋白質と運動ならび健康との関係を検討することを考えた．そのためには血漿中の特異蛋白質の測定法の開発の必要があり，それには定量性，測定操作の複雑さからも前述の2次元電気泳動よりも，この特異蛋白質の抗体による免疫学的な測定法が適切であると考えた．

そこでわれわれはまずボランティアの運動を負荷した体育専攻学生のプールした血清から特異蛋白質の分離精製を試みた．最初のステップとして血清を7%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った．泳動終了後，最も先端に泳動されるアルブミンの後からトランスフェリンより前の部分のゲルを切り取り生理的食塩水中で抽出する．

次いで2番目のステップとして，この抽出液を抗アルブミン抗体を Sepharose に結合させた抗ア

ルブミン抗体-Sepharose のカラムを通過させ、抽出液中の大部分のアルブミンを除いた。

図4のAは特異蛋白の精製に用いた試料となる血清の2次元電気泳動像であり、Bはステップ-2終了後の泳動像である。ステップ-3ではLKB社の調製用のカラム等電点電気泳動を使用した。使用したpH範囲は4~6.5のアンホラインを用いた。泳動終了後にファクションコレクター

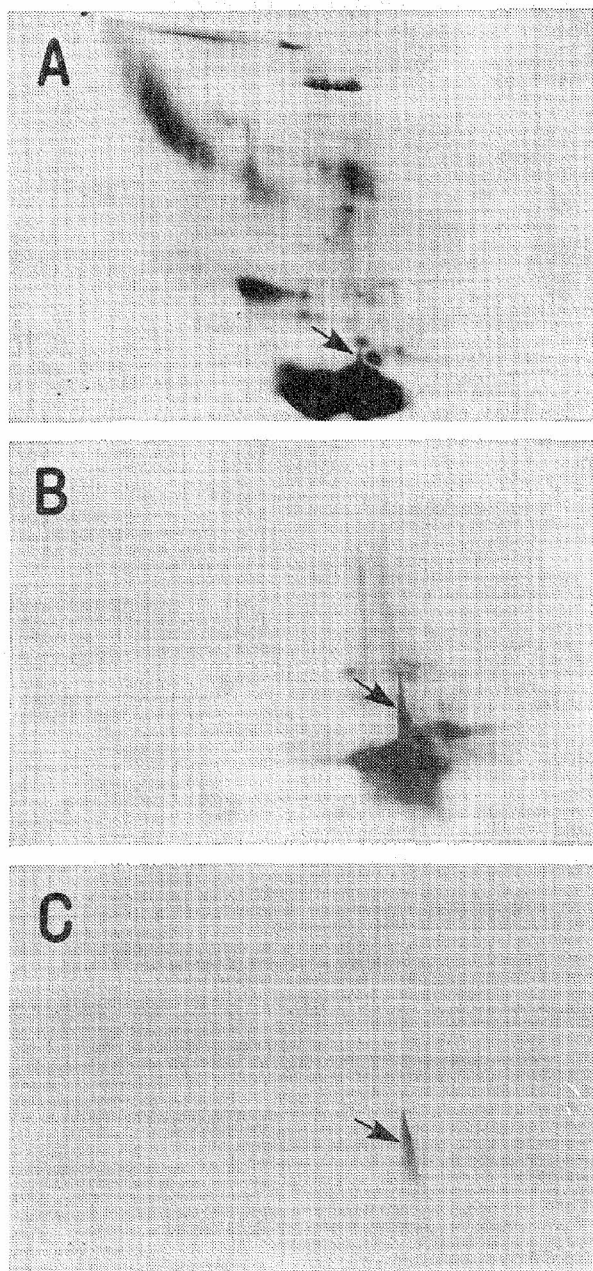


図4 Two-dimensional electrophoretic patterns of specific protein after respective purification procedure. (A) before purification, (B) step 1, (C) step 3. Specific protein was indicated by arrows.

により分画のあと、各分画のpH、OD 280nmの吸収を測定した(図省略)。この各分画について2次元電気泳動を行ったところpH 5.0付近の分画に目的とする特異蛋白質が存在した。

この時点では120mlの血清から約2mgの精製特異蛋白質が得られた。この分画の2次元電気泳動が図4のCである。電気泳動像中ではほとんど特異蛋白質のみと考えられるが、よく観察すると極くわずかに他の蛋白質の混入が見られたので、この分画についてSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(10% PAG)を行った結果を図5のAに示す。同時に泳動した分子量既知の標準蛋白質から算出した特異蛋白質の分子量は25,000であった。

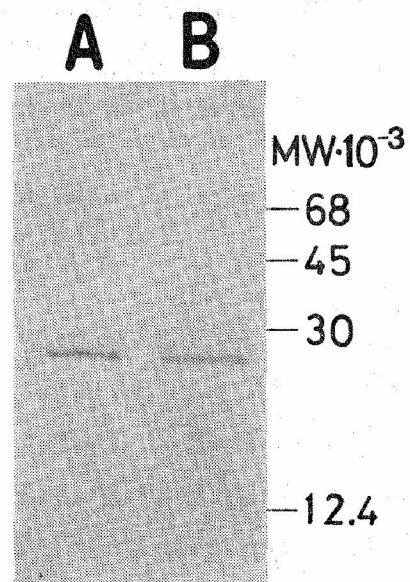


図5 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of specific protein. (A) step 3, (B) purified protein.

またβ-メルカプトエタノール存在下で行った同じ電気泳動でも同じ分子量を示したので、この特異蛋白質は生体内では分子量25,000またはその重合体で存在しているものと考えられる。またこの蛋白を2次元電気泳動を行ったあとPAS染色では染色され、Sudan Black染色では染色されなかった。この特異蛋白質は血中では糖を結合し、脂質とは結合していないと考えられる。

表1 Amino acid composition of specific protein

amino acids	mol %
Asx	9.0
Thr	4.3
Ser	6.7
Glx	16.7
Pro	4.0
Gly	12.0
Ala	7.0
Val	5.7
Cys/2	0.6
Met	0.0
Ile	2.6
Leu	11.4
Tyr	2.2
Phe	3.6
Trp	N.D.
Lys	6.6
His	1.8
Arg	5.8

* Purified protein was hydrolyzed in 6N HCl at 110°C for 20h.

** N.D., not determined.

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動後の分子量25,000の部分のゲルを切り取り、ゲルから抽出し、再泳動したものが図5のBである。この完全に純化した特異蛋白質をゲルから抽出し、この蛋白質を加水分解したのちアミノ酸組成を測定したのが表1である。この蛋白質はGlx, GlyおよびLeu残基の含量が比較的高く、HisおよびCys残基の含量が低かった。またMet残基はまったく含まれていなかった。現在この蛋白を家兎に免疫してこの蛋白の抗体を作製し、血清中の特異蛋

白質の測定系の確立をし、種々の運動との関係を検討中である。

謝辞 本研究に使用したトライアスロン競技者の血清を提供して下さった東京医科大学公衆衛生学教室の岩根久夫教授に感謝いたします。

参考文献

- 1) 弘 卓三; 代謝性 acidosis による赤血球浸透圧弱性の研究, 体力科学, **31**: 2, 279—290 (1982)
- 2) 弘 卓三, 堀居 昭; 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 (1984)
- 3) 弘 卓三, 門福弘樹, 牧野義彰, 佐藤永雄, 紺野邦夫; 身体運動に伴って血漿中に出現する蛋白質の性質, 体力科学, **34**: 368 (1985)
- 4) 弘 卓三, 門福強樹, 牧野義彰, 佐藤永雄, 紺野邦夫, 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 (1985)
- 5) Kadofuku, T. and Sato, T.; Detection of changes in rabbit serum proteins after partial hepatectomy by means of two-dimensional electrophoresis under non-denaturing condition. *J. Chromatogr.*, **311**: 93—99 (1984)
- 6) Laemmli, U.K.; Clearance of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680—685 (1970)
- 7) Zacharius, R.M., et al.; Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **30**: 149—155 (1969)
- 8) 岩根久夫, 他; トライアスロンにおける血清酵素並びにミオグロビンの変化とその経過: 体力科学, **34**: 601 (1985)