

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月28日現在

機関番号：33929

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650407

研究課題名（和文）赤血球膜が脆弱化するの、バンド3が変化することが主な原因である

研究課題名（英文）

Osmotic fragility of erythrocyte membrane caused by the change of Band 3

研究代表者

金尾 洋治 (KANA OYOJI)

東海学園大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：10177488

研究成果の概要（和文）：

本研究は、浸透圧の変化に対して、壊れやすい赤血球と、壊れにくい赤血球との差異を、赤血球を構成しているタンパクの差異から明らかにすることを目的として行った。SDS-PAGEによる解析の結果、分子量120、80、66、60(kDa)の4つのバンドで、強い赤血球膜に濃いバンドが認められた。LC-MS/MS分析の結果では、アンキリンが強く検出された。すなわち、アンキリンの一部が失われて、赤血球膜が脆弱化している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to clarify the differences between fragile red cells and not fragile ones through the differences of proteins which compose those red cell. In the analysis of SDS-PAGE, thick bands are found in tough red cells in four bands such as 120, 80, 66, 60, (kDa). Under the analysis of LC-MS/MS, ankyrin is clearly found. Thus that result suggests that the red cell membrane is fragile due to loss of a part of ankyrin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 スポーツ科学

キーワード：運動性貧血、赤血球膜、膜脆弱性、浸透圧変化、二重遠心分離

### 1. 研究開始当初の背景

運動性貧血に関しては、吉村による研究(1959年)をはじめとして多くの報告がされてきた。しかし現状においても、多数の持久的競技者が貧血状態に陥り、成績の低下に悩まされている(川原、2003)。当然日々の

トレーニングによって赤血球破壊が亢進しているのは間違いない(長嶺 1986)。足底にかかる衝撃や、脾臓から出てくるリゾレチンの増加、血中に増加する化学物質の増加などによって血管内溶血が増加すると考えられる(塚中 2005年)。しかしながら長距離

ランナーのように長期的にトレーニングを継続している競技者において、実際にどのようなメカニズムが赤血球膜の抵抗を低下させ、赤血球破壊の亢進が生じているかについては不明なままである（川原、1989）。ゆえに運動性貧血に対する予防策、あるいは対処の方法に関しては、現在においても鉄剤の投与が中心であり、赤血球膜タンパクに関してどのように対処すればいいのか全く分かっていない。

赤血球膜に関しては、これまで生理学の分野で精力的に研究されてきた（八幡：赤血球膜研究史 2007）。SDS-PAGE 法の発明によって赤血球膜タンパク質の定性的、定量的検索が可能となった（Laemmli 1970 年）。赤血球膜の構造も明らかとなり、赤血球膜異常が原因となっている遺伝的な病気に対して研究が多くなされてきた（八幡 2007）。しかしながら運動性貧血に関して、それらの手法を用いて研究されたものは現在ほとんど行われていない。

赤血球膜の脆弱性に関しては二重遠心分離法によって、浸透圧の変化に対して脆弱性の高い赤血球（弱い赤血球）と脆弱性の低い赤血球（強い赤血球）に分けることが可能である。これまでわれわれは、長距離ランナーのトレーニングによる赤血球膜脆弱性への影響を研究してきた（金尾ら、2000 年）。ヒトの赤血球の寿命はおよそ 120 日であるが、日々のトレーニングなどの衝撃によって、赤血球膜の浸透圧に対する脆弱性は増していると考えられる。その強弱の差異は、赤血球膜の骨格を構成している裏打ちタンパクに何らかの変化が起きていることが原因であると考える研究してきた。

## 2. 研究の目的

運動性貧血に悩むランナーは依然として多い。日々のトレーニングによって、赤血球

膜が 120 日という寿命以前に壊れていくからであろう。これまでわれわれは SDS-PAGE 法を用いた研究によって、浸透圧の変化に対して、弱い赤血球膜では、分子量 62kDa と 240kDa のタンパクで、強い赤血球膜と比較して濃いバンドが認められることを明らかにした。本研究では、赤血球が壊れやすくなるのは、膜構成タンパクの一つであるバンド 3 がフラグメント化して分子量 62kDa のペプチドになることと、バンド 3 がクラスターを形成し老化細胞抗原となるということを検証するのが 1 つの目的である。また、赤血球膜を構成している裏打ちタンパクの何か失われることによって、赤血球が脆弱化することは間違いない。そのタンパクの主たるものが何であるのかを明らかにすることが、もう一つの目的である。以上のことが明らかになることによって、運動性貧血改善への手がかりとなる基礎的研究と考えている。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究方法の概略

健康な被験者から、採血して、血液試料 (2ml) を得る。その血液試料に対し二重遠心分離法を用いて脆弱性の高い赤血球と低い赤血球に分離する。さらに、その試料を SDS-PAGE および二次元電気泳動を行い、差異のあるラインおよびスポットを求める。その後予測しうる一次抗体を用いてウェスタンブロッティング法により差異のあるタンパクの同定を行う。その方法で同定できない場合にはさらにタンパク質一次構造分析として質量分析などを行う。

### (2) 浸透圧の変化に対して壊れやすい赤血球膜と壊れにくい赤血球膜の分離方法

内径 0.5mm 長さ 300cm のチューブを長さ 17cm のコイルの芯に巻き付けた製品を使って、チューブの中に生理食塩水と水を 30 オスモルから 150 オスモルまで濃度勾配がつくように封入する。試料血液を高張側のチューブに 25cm の長さまで入れ、37°C の温度条件

で10分間二重遠心分離し赤血球を溶血させる。それをもとに、溶血開始点、終了点を確認する。

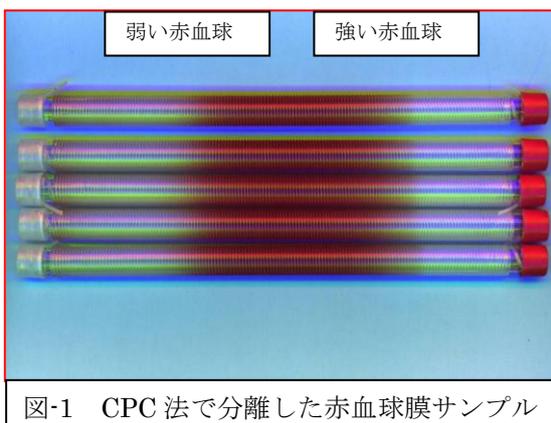


図-1 CPC法で分離した赤血球膜サンプル

そのチューブを溶血開始点から溶血終了点まで3等分する、高張側のチューブに残存している液体を60本分集める。同様に低張側に残存している液体も60本分集める。それぞれを5mmolリン酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)で懸濁し、30,000×gで遠心して、3回洗浄した後、それぞれの赤血球膜を得た。

### (3) 電気泳動

電気泳動はすべて *BIO-RAD* 社のミニプロティアンゲルを使用して行なった。

#### ① SDS-PAGE

得た赤血球膜を等量のサンプルバッファー(尿素、10% (W/V) TritonX-100 保存溶液、2-メルカプトエタノール、バイオライト 5/7、バイオライト 3/10)で溶解し、赤血球膜を各タンパクに分解させる。

それを、ミニプロティアンゲルを用いて、各コームへ、マーカーおよびサンプルを、5 $\mu$ l 入れ、電流を 20mA で一定させて電気泳動を行った。

#### ② 二次元電気泳動における一次元目の泳動(等電点電気泳動)

ゲルモノマー溶液(尿素、一次元用アクリルアミド保存溶液、10% (W/V) TritonX-100 保存溶液、バイオライト 5/7、バイオライト 3/10、10%過硫酸アンモニウム、TEMED)を

封入したキャピラリーチューブを作成し、アルカリ側にサンプルを入れ、上置サンプルバッファーを置いて 500V で 10 分、750V で 4 時間泳動した。

#### ③ 二次元電気泳動における、二次元目の電気泳動(SDS-PAGE 電気泳動)

スラブゲルとして、*BIO-RAD* 社のレディ-ゲル J (2D) を用いた。一次元目の泳動が終了したチューブゲルを、等電点が高い方がマーカー側になるようにスラブゲルの上に乗せ、電流を 20mA で一定にして泳動させた。

#### (4) 染色

染色は Silver Stain Plus 染色(銀染色)を行った。各泳動終了後 20 分間 Fixative Enhancer Solution で固定し、精製水で洗浄後、Staining Solution で約 15 分染色し、十分な発色強度が得られた点で停止させた。その後に染色されたバンドおよびスポットの比較を行った。

#### (5) ウェスタンブロッティング法によるタンパクの同定

脆弱性の高い赤血球膜と低い赤血球膜で得られた、異なったバンドあるいはスポットに関し、もう一度同じサンプルを用いて SDS-PAGE を行い、ウェスタンブロッティング方法を用いてタンパクの同定を行った。一次抗体として、バンド 3、プロテイン 4.1、プロテイン 4.2、グリコフォリン、アンキリンを用いて行った。

#### (6) 質量分析手法(LC-MS/MS 分析)

SDS-PAGE を実施し、壊れにくい赤血球膜サンプルにおいて、濃いバンドが見られた分子量、120、80、66、60 (kDa) のバンドに関して、LC-MS/MS 分析による、タンパク質同定を実施した。この分析に関しては、株式会社アプロサイエンス社に依頼した。

## 研究成果

赤血球膜の浸透圧の変化に関して、強い赤血球と弱い赤血球の SDS-PAGE による解析の結果、分子量 66kDa あたりで、弱い赤血球膜に濃いバンドが検出された。さらに赤血球膜の精製に関して、遠心分離の回転速度を上げ、100,000g で 30 分間の遠心を行い、赤血球膜の精製度を上げて分析したところ、220kDa~200kDa あたりでも、同様に弱い赤血球膜に濃いバンドが認められた (図-2)。

赤血球膜に濃く現れたバンドを、バンド 3、プロテイン 4.1、プロテイン 4.2、グリコフォリン、アンキリンをそれぞれ一次抗体として用いウエスタンブロッティング法によって検出を試みた。しかしながら現段階でははっきりと特定することが出来なかった。

赤血球膜を横方向に構成するスペクトリンやアクチン、4.1 タンパクあるいは、縦方向のつながりを構成するバンド 3 やグリコフォリン (A~D)、アンカーとなるアンキリンや 4.2 タンパクに何らかの変化が見られて、脆弱性が増す可能性は高いのは間違いない。しかし今回のように、脆弱化した赤血球膜の方に濃いバンドが認められる場合には、ウエスタンブロッティング法で、一次抗体として特定するのは困難であった。試料の濃度の問題も考えられるが、何らかのタンパクが赤血球膜から失われるのではなく、フラグメント化するか、何かと結合して、違う生成物となった場合には特定できず、今回とった手法の限界なのかもしれない。

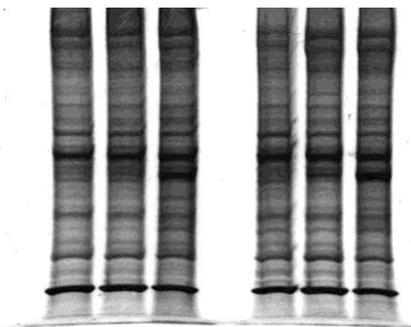
そこで、株式会社アプロサイエンス社に赤血球試料を送り、分析を依頼した。まず SDS-PAGE を行い、バンドの差異について検討した。強い赤血球膜において、分子量 120、

80、66、60 (kDa) の 4 つのバンドで、弱い赤血球膜と比較して濃いバンドが認められた。その 4 つのバンドに対して、LC-MS/MS 分析による、タンパク質の同定を試みた。

分子量 120kDa においては、 $\alpha$  スペクトリン、 $\beta$  スペクトリン、アンキリン、バンド 3、4.2 タンパクの順で検出された。80kDa では、アンキリン、4.2 タンパク、 $\alpha$  スペクトリン、バンド 3 の順で検出された。66kDa では、アンキリン、4.2 タンパク、 $\alpha$  スペクトリン、バンド 3 の順で検出された。最後の 60kDa においては、アンキリン、バンド 3、 $\alpha$  スペクトリン、4.1 タンパクの順で検出された。

分子量 (kDa)

200  
116  
97.4  
66.2  
45.0



全血 強い 弱い 全血 強い 弱い  
被験者 A 被験者 B  
被験者 A 被験者 B

図 2 SDS-PAGE の後の銀染色による強い赤血球膜と弱い赤血球膜との差異

以上のすべてのバンドにおいて、アンキリンが閾値をはるかに超えて高いスコアで検出されたことから、アンキリンの一部が失われることによって、赤血球膜が脆弱する可能性が最も高いと考えられた。また、バンド 3 もすべてのバンドで認められたことから、バンド 3 も、赤血球膜の脆弱化に大きく関与するタンパクである可能性が大きいことが、認められた。

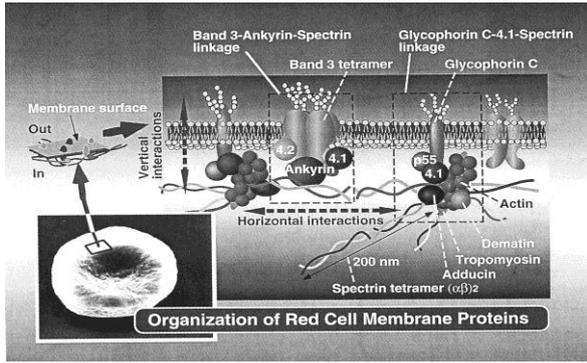


図 3 赤血球膜の基本構造（赤血球：三輪史朗監修、医学書院 1998 年から引用）

図 3 に示したように、赤血球膜の裏打ちタンパクの膜骨格は、いくつかのタンパク質間の横方向のつながりからなる、網目状の構造で、アンカータンパク質を介する縦方向のつながりによって、脂質二重層と膜貫通タンパク質からなる細胞膜に連結している（三輪 1998）。今回の結果はその中でも、アンカー（碓）の役割を果たしているアンキリンと、膜貫通タンパクであるバンド 3 の一部が失われることによって、赤血球膜の脆弱性が増す原因となることは、図 3 に示された膜の構造を考慮してみると、その可能性が高いと考えられた。

また、弱い赤血球膜に濃く表れたバンドを分析して、どのようなものが生成された結果なのかを明らかにすることが、今後の課題として残った。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

①金尾洋治、黒須雅弘：赤血球膜が脆弱する要因となる膜構成タンパク、第 68 回日本体力医学会大会、2013 年 9 月（発表予定、演題採択）、東京都

②金尾洋治、黒須雅弘：赤血球膜が脆弱化する要因、第 67 回日本体力医学会大会、2012 年 9 月 15 日、岐阜市

〔図書〕（計 1 件）

勝田茂編、金尾洋治他、朝倉書店：運動生理学 20 講、第 3 版、2013 年発行予定

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

金尾 洋治 (KANA O YOJI)

東海学園大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：10177488

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

黒須 雅弘 (KUROSU MASAHIRO)

東海学園大学・スポーツ健康科学部・助教

研究者番号：60469054