琉球大学学術リポジトリ

# [総説]ヒト赤血球膜タンパク質の生化学



| メタデータ | 言語: Japanese<br>出版者: 琉球大学医学部<br>公開日: 2014-07-18<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 井上, 文英<br>メールアドレス:<br>所属: |
| --- | --- |
| URL | http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016327 |

琉大保医誌 4(4)：301～312, 1982.

# ヒト赤血球膜タンパク質の生化学

琉球大学医学部第一生化学講座
（主任教授：中田　福市）
井上　文英

## はじめに

ヒト成熟赤血球の細胞膜は，SingerとNicolsonの脂質二重層構造を基本とする袋（膜）よりなっている．赤血球が他の細胞と異なる点は，無核で，独立して存在することである．このことが膜調製に非常に便利であるがゆえに，古くから細胞膜の研究材料として利用されてきた．

赤血球の膜が，biconcave disc を呈しているdiscocytoであることはよく知られている．これは，脂質二重層内側に，収縮性タンパク質のspectrinとactin の網目が張りめぐらされて，その特異な構造を維持していることが，ここ数年の間に明らかにされつつある．一方，膜の外表面には，sialic acid や血液型物質を有するタンパク質が存在しており，膜面に陰電荷を与えている．この膜は，水，glucose，陰イオンを自由に通過させるが，陽イオンについては，選択性を保持している．それ故，赤血球内容液の陽イオン含量（$Na^+$ 16 mEq/ℓ，$K^+$ 198 mEq/ℓ）は血漿中（$Na^+$ 140 mEq/ℓ，$K^+$ 5 mEq/ℓ）と著しく異なっていることからも判る．これは，膜に存在する($Na^+$-$K^+$)ATPaseがATPをエネルギー源にして，赤血球内部の$Na^+$を外部に汲み出し，逆に$K^+$を汲み入れているのである．一方，赤血球膜タンパク質の保全には，活性SH基が必要であることも知られている．

ところで，赤血球膜に関する研究は，ここ20年の間に急速に発展したが，1864年 Kölliker らが，赤血球のfragmentationと云う赤血球膜形態異常の発見に始まったと考えられる．その後，電子顕微鏡の発達にともない，1930年代からは，赤血球の膜構造の解明が進んだ．さらに，1970年頃から，走査型電子顕微鏡による赤血球膜の形態と膜構成成分の局在性についての研究が盛んになった．

一方，生化学的方面からは，赤血球の形態保持には，赤血球内解糖系で生産されるATPレベルが重要な役割を担っていることを，中尾真らが明らかにした．以後，赤血球膜の可溶化の問題が，赤血球膜構成成分の研究上，関心が高まり，陰イオン性界面活性剤の sodium dodecyl sulfate，(SDS)で膜タンパク質を完全に可溶化することが判った．さらに，1971年にFairbanksらによるSDS存在下でのpolyacrylamide gel電気泳動での膜タンパク質分画法の確立により，膜タンパク質の研究は急速に進展した．また，1980年以後は，赤血球膜形態および膜構成成分と疾患との研究が盛んになってきた．

本論文では，歴史的記載も含め主に1970年から1980年の10年間に発表された論文で，赤血球膜タンパク質機能と構造，および赤血球膜タンパク質異常について，以下の項目を中心に全般的傾向について述べる．

Ⅰ．膜モデルおよび赤血球形態
Ⅱ．赤血球膜標品および構成成分
Ⅲ．赤血球膜タンパク質

この他，秀れた成書[1-5]および総説[6-9]があるのであわせて参照していただきたい

## Ⅰ．膜モデルおよび赤血球形態

細胞膜の形態学的基本構造については，古くから種々のモデルが提唱されている．もっとも古典的なものは，1953年DanielliとDavson[10]による，細胞膜物質の物理化学的解析より導かれた，脂質二重層仮説による膜モデルである（Fig. 1）．ついで，1961年に Robertson[11]が神経線維の形質膜を電子顕微鏡的に観察して，

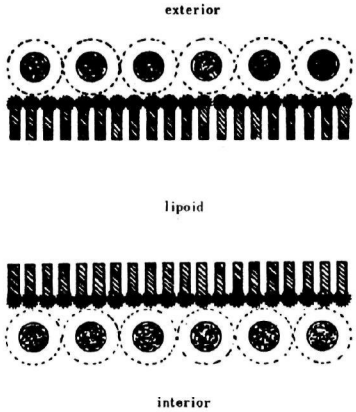


Fig. 1. Danielli -Davson model of membrane structure

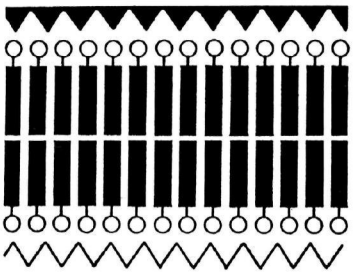

Fig. 2. Diagrammatic representation of the unit membrane hypothesis of Robertson

内外二層の電子密度の高い部分と，その間にはさまれた電子密度の低い部分とからなる三層構造を保持していることを示した．この三層構造が膜の基本単位（unit）と考えて，単位膜仮説を呈示した（Fig. 2）．以後，各種のモデルが示されたが，1972年にSinger とNicolson[12]が示した膜の流動性を取り入れた流動モザイクモデルが，一般に膜モデルとして広く利用されている（Fig. 3）．このモデルの特長は，膜は静止した構造ではなく，平行な運動と垂直な方向にも運動すると云うものである．さらに膜タンパク質は，この脂質二重層内に埋め入まれていたり，膜の内外面を貫通したりして，周囲の脂質の粘性ないし流動性に応じて並進拡散 translational diffusion しうるものとされている．赤血球膜についても以上のべたような膜構造モデルが，一般に適応されてきた．

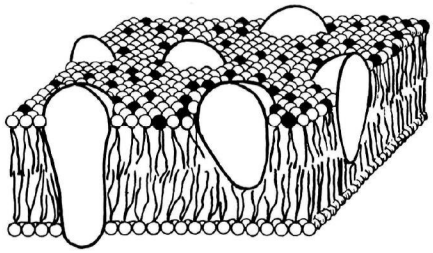

Fig. 3. Fluid mosaic model of Singer and Nicolson

赤血球の形態[5]はよく知られているように，中央の凹んだ円板状，すなわちbiconcave disc を呈している．赤血球の電子顕微鏡的観察によると，比較的明るい中層をはさんで，外層と内層の二つの暗層を認めるが，赤血球内部には，特異な構造物はみあたらない．基本的には脂質二重層からなる膜表面に，直径60～90Åの小構造物が観察され，中には内外層を貫いて存在しているものも認められる．このものはglycophorinといわれるglycoproteinである．

このヒト成熟赤血球の直径は8.5 $\mu m$，中心部の厚さ1 $\mu m$，周辺部の厚さが2.4 $\mu m$である[1]．前述したごとく，成熟赤血球には膜以外の構造物が認められないことから，細胞核，ミトコンドリア等の細胞内小器管は存在しないので，DNA合成，RNA合成およびタンパク質合成は営まれない[1,2]．成熟赤血球の最大の構造成分は他の生体細胞と同様に水で，残りの大部分はhemoglobin分子である．

## II．赤血球膜標品および構成成分

### 1. 赤血球膜標品

膜研究に使用されている赤血球膜（ghost 又はstroma）標品は，通常Dodgeら[13]または，Fairbanks ら[14]およびそれらの変法[15]で調製する．

膜標品調製は，通常遠心沈澱により血漿成分およびbuffy coat（血小板および白血球画分）を完全に除去することが肝要であるが，それでも微量の白血球が混在する．これを完全に除去するには，中尾らのSE－セルロースカラムクロマト法[16]がある．一方，簡便な方法として，脱

脂綿やセルロースを利用することもできる.[17] 微量の血液を処理するには，中尾らの方法が優れている.

一方，赤血球の寿命は，大体120日であるが，とくに赤血球膜代謝を研究する場合には，赤血球のageが重要な要件となる．この赤血球のageによる分画方法として，通常密度勾配遠心法が広く用いられている.[18,19]

上述した方法により得られた赤血球浮遊液packed cellから膜標品を得るには，通常低張処理にて調製する．ここで赤血球膜系の酵素活性，タンパク質の機能および構造について研究する場合には，その目的により低張処理の回数，緩衝液のイオン濃度，pH，種類等に注意する必要がある.

低張処理回数の目安としては赤血球膜に存在する（$Na^+-K^+$）ATPase 活性を調べることにより，その調製度合を知ることができる．緩衝液のイオン濃度およびpHについては，膜に細胞質物質が吸着したりして遊離されない場合もある．以上により乳白色の赤血球膜標品を得ることができる.

一方，赤血球膜内側に存在する物質の性質を調べるなどの特殊な研究目的には，resealed ghost[20,21] や inside-out vesicle[15)22,23] が用いられる． inside-out vesicle の調製は，Fairbanksら[14]の方法で得られた膜標品を，27ゲージの注射針を数回通過させることにより得る．この時，反転した inside-out vesicle 以外に right-side out vesicle もできるので，密度勾配遠心法で分画して用いる．得られた分画が inside－out vesicle であるかの証明は，赤血球膜内外面に局在しているmarker を利用すれば判る[15)24−29] (Table 1).他方，resealed ghostの調製[30]は，packed cellを低張処理して細胞内物質を放出させた後，必要な成分を含んだ溶液と交換して平衡化させ最後に浸透圧を等張に戻してsealedする．得られたresealed ghostは，未処理のpacked cellと同様な形態を保持していることから，赤血球内容物とbi-concave形とは直接関係していないと推定される.

Table 1
Markers of human erythrocyte membrans sideness

| | |
|---|---|
| Outer surface | |
| | Acetylcholinesterase |
| | Sialic acid |
| | Nicotinamide adenine dinucleotidase |
| | Ouabain binding site |
| | Carbohydrates |
| Inner surface | |
| | NADH diaphorase |
| | G3PD and its binding site |
| | Cyclic AMP binding site |
| | Protein kinase |
| | ATPase |

Table 2
Composition of intact erythrocyte ghosts

| Component | Intact ghosts (%) |
|---|---|
| Protein | **49.2** |
| Lipid (total) | **43.6** |
| Phospholipid | 32.5 |
| Cholesterol | 11.1 |
| Carbohydrate (total) | **7.2** |
| Neutral sugars | 4.2 |
| Hexosamines | 2.0 |
| Sialic acids | 1.2 |

Adapted from Rosenberg and Guidotti (1968).

2. 赤血球膜の構成成分

赤血球膜標品の化学組成はよく調べられている.[1)31,32] ヒト成熟赤血球膜は，主としてタンパク質（複合タンパク質を含む),脂質（遊離コレステロール，複合脂質を含む),さらに無機イオン等を含んでいる（Table 2）

## Ⅲ. 赤血球膜タンパク質

赤血球膜に存在するタンパク質には，容易に抽出されうる末梢性または辺縁性タンパク質 peripheral protein と，内在性タンパク質 intrinsic protein（あるいは，結合性タンパク質 integral protein）とに区別されている．ここで後者は界面活性剤の存在下で可溶化され，且つ界面活性剤を除去すると凝集して沈澱を生ずる[12]という性質をもつものもある．

赤血球タンパク質の分離・同定には，Fairbanks ら[14]の陰イオン性界面活性剤SDSによる膜タンパク質可溶化の polyacrylamide gel 電気泳動法（PAGE）への応用により，広く一般に用いられているが，Laemmli の方法[33]も利用されている．但し，Laemmli の方法では gel 内と泳動用緩衝液との間の pH 勾配を利用している関係上，泳動距離と分子量の間に直線性が認めらたない．しかし分離能の面からは，Fairbanks らの方法よりも優れている．さらに2次元電気泳動法を用いて膜タンパク質を250以上の分画した報告もある．[34]

Fairbanks らの方法に準じて赤血球膜タンパク質のSDS－PAGEを行うと，8種類以上の polypeptide に分画できる（Fig. 4, 5）．この時 Coomassie Blue で染色された band の名称は，Steck の方法[9]に準じて分子量の大きい方から順次分画番号を付けるのが，もっとも一般的である．ヒト赤血球膜の主要タンパク質と band の関係を Table 3 に示した．[9)35)]

以下，Fig. 4 に示した電気泳動分画の各 band についての現在までの知見を集約して述べる．

1. Band 1 および 2（spectrin）[36]

本タンパク質は Marchesi ら[37]により spectrin と名付けられた末梢性タンパク質で，膜構成成分の内で最大の分子量をもち，膜総タンパク質の約15%を占めている．[14]さらに低いイオン強度処理で膜から容易に抽出される．また，SH基を多数有しており，その立体構造は microfilament 構造をとると考えられていたが，新しい分析により globular 構造をとっていることが判った．[38,39]歴史的にはペクチンA[40]と呼ばれたものと同一である．このタンパク質が単一であるか否かについては異論がある．Fairbanks らは subunit の存在を認めていない[14]が Bjerrum らは免疫的手法を用いて subunit の存在を示唆[41]しており，isoelectrofocusing で幾つもの band に分離されるとの報告もある．[42,43]

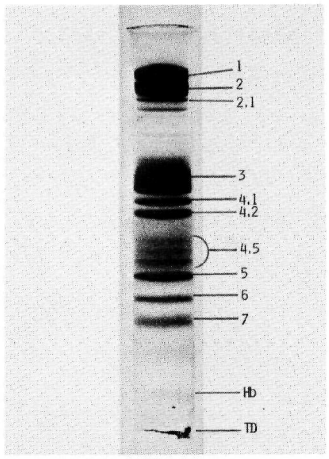


Fig. 4. SDS－polyacrylamide disc gel electrophoresis pattern of human erythrocyte membrane proteins. The gel was run for 90 min. with a current of 5 mA/tube. The amount of protein in sample was 25 μg. Gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R－250.

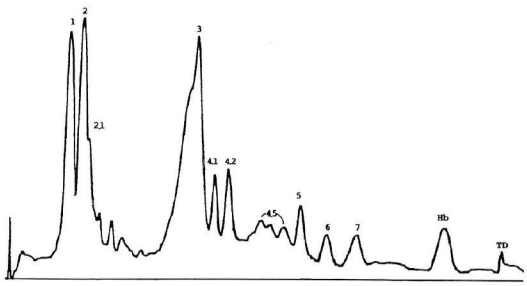


Fig. 5. Electrophotometric scan of Coomassie Blue stained bands on SDS－polyacrylamide gel in Fig. 4. Gel was scanned with a Fujiriken densitometer at 550 nm.

Table 3
The major erythrocyte membrane polypeptides

| Component | Mol. Wt. | Characterization | |
|---|---|---|---|
| 1 | 240,000 | 外在性 | ($Ca^{2+}$-$Mg^{2+}$) ATPase |
| 2 | 220,000 | 外在性 | Spectrin |
| 2.1 | 210,000 | 外在性 | Ankyrin |
| 3 | 95,000 | 膜貫通性 | Anion transport etc. |
| 4.1 | 78,000 | 外在性 | --- |
| 4.2 | 72,000 | 外在性 | --- |
| 4.5 | 50,000 | 外在性 | (catalase) |
| 5 | 43,000 | 外在性 | Actin-like protein |
| 6 | 36,000 | 外在性 | G-3-PD |
| 7 | 29,000 | ? | --- |

本タンパク質の機能面では，膜構造の維持に特異的な立場を占めていることが，ここ数年の間に判ってきた.[39]

第一は赤血球膜形態の保持との関連である.[44] 興味あることは，stomatocyto[45]を生ずる条件下で，vinblastinとのincubationおよび加熱などにより，本bandが減少あるいは消失することである.[46-49]さらに，本bandのmonomerが生理的には，dimerを経て，polymerizeし，tetramerを形成する．このtetramerにband 5のactinが結合して，spectrin-actin networkを形成し，膜内面を網目状に覆っていて，赤血球の形態保持に重要な役割を担っていることが判ってきた.[35)50,51]

第二は，赤血球膜にはcyclic AMP依存性protein kinase活性を有することから，膜タンパク質のリン酸化機構との関係である.[29)52-59] 本タンパク質のband 2への$^{32}P$の取り込みは，全リン酸化の約60%を占めている．このリン酸化は膜タンパク質の機能上重要である.[7)60] 一方，遺伝性球状赤血球症hereditary spherocytosis（HS）の赤血球膜では，本タンパク質へのリン酸化能が低下しているとの報告がある.[61-64] 逆に，HSの赤血球膜の方が$^{32}P$の取り込みが増加しているとの報告もある.[65] しかしながら，Beutler[66]と著者ら（臨床化学シンポジウム. 17, 1977年）の成績では，HSと正常との間には有意の差は見い出すことはできなかった．これらの事実から，band 2へのリン酸化量は直接HSとの間に関連性が存在しないと示唆される.

第三は，band 1には（$Ca^{2+}$-$Mg^{2+}$）ATPaseが存在することである.[67,68] このATPase活性にはcalmodulinを必要とする.[69-72] しかしcalmodulin結合能で見る限りその数は，赤血球1個あたり4500であって，spectrinのわずか2.25%にすぎないが，calmodulinに対するKd値で比較すると，ATPaseの方がはるかに大きい.[73]

2. Band 2.1（ankyrin）

本タンパク質は1979年Benettによりankyrinと命名[74]されたpolypoptideでband 2より分子量がわずかに小さい．本タンパク質の機能としては，赤血球膜内面にspectrin-actin network が網目状に覆っているが，このnetworkと膜の関連[75-78]で膜の形態保持の面から重要である.

3. Band 3

本タンパク質は赤血球膜でもっとも多量（25%）に存在する分子量95,000の内在性タンパク質である．band 3の機能としては，($Na^{+}$-$K^{+}$) ATPaseの活性があり,[79] 糖チャネル,[80,81] 陰イオンチャネル,[82-84] 水チャネル,[85] などの役割を演じている．一方，SDS-PAGEで泳動後，PAS-Shiff試薬[14]で染色される分画が，このband 3よりわずかに泳動距離の異なるところに現われる．この分画された糖タンパク質をMarchesiらは，glycopholinと名付けた．glycopholin

の機能は，各種レクチンとの結合[86,87] MN－抗原性の保持[88]などから免疫反応に関与していると考えられる．glycophorinは赤血球膜の脂質二重層を貫いて存在し，膜表面側の外側に$NH_2$－末端があり，中間の疎水性部分さらにC－末端の親水性部位からなっている[89]．この糖タンパク質の欠損症の報告もある[90,91]．

4. Band 4

Band 4の領域には，band 4.1，4.2それと4.5が含まれている．各々のbandは赤血球膜内側に存在している．

band 4.1のpolypeptideは，赤血球の低張処理時にCaイオンを作用させると，本bandは消失する．また，spectrinを抽出する際に，ankyrin（band 2.1）と本bandも同時に抽出され得る[92]ことから，spectrin－actin networkと本bandが，膜内側で相互作用があることが推定される．しかし，膜機能面でどのような役割を演じているかは，現在までのところ明らかでない．

band 4.2のpolypeptideは，白血球性proteaseで特異的に消失することができる．HSの赤血球膜SDS－PAGEで，林ら[93]野沢ら[94]および著者らは，HSの2家系4症例に本bandが特異的に欠損していることを確認し，他の大部分のHSでは，本bandが減少していることを明らかにした（Fig. 6）．一方，閉塞性黄疸時の末梢血に出現する小赤血球性の球状赤血球においても，本bandの減少がみられる．このことから，赤血球の球状化に関連して本bandが何らかの関与があることを示唆される．また，cyclic AMPのbinding siteが本bandであることも知られている[95]．

band 4.5の領域には，分子量の異なる少なくとも四種類のpolypeptideが含まれている．このbandにはcatalase活性が認められているが[96]，膜機能との関連性は未だ明らかでない．

5. Band 5

本タンパク質は分子量43,000で，赤血球膜内側表面に存在するactin－like proteinといわれている．赤血球膜の形態保持に関与しているspectrin－actin networkを形成して，赤血球膜内側に覆っている[50)97-99]．

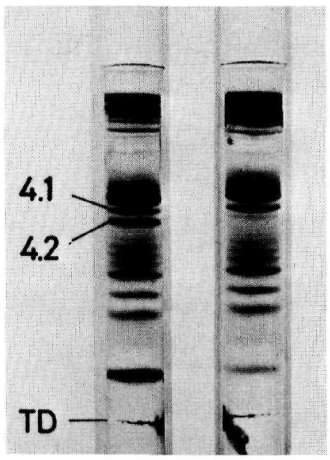


Fig. 6. Comparison of SDS－polyacrylamide gel electrophoresis band patterns of normal erythrocyte membrane（left side）and of membrane from patient with hereditary spherocytosis（right side）.

6. Band 6

本bandは赤血球膜から等張緩衝液で容易に抽出され得る分子量36,000の末梢性タンパク質である．機能面では赤血球内解糖系Embden－Meyerhof pathwayの酵素であるglyceraldehyde－3－phosphate dehydrogenase（G3PD）の活性を有し，本bandはG3PDのmonomerであることが報告されている[100]．

7. Band 7

本bandに関しての知見は現在までのところ無い．

以上，ヒト赤血球膜タンパク質に関する過去10年間の研究の概要を説明した．今後さらに膜に興味をもたれる臨床医が増え，臨床面から疾患と赤血球膜の研究がさらに発展することが期待される．

本稿の終りにあたり，終始研究の御指導をいただいた東京慈恵会医科大学　林伸一教授に深謝します．また，御校閲いただきました中田福市教授に感謝します．

## 文　献


1) Surgenor, D. M. (ed.) : The red blood cell, 2nd ed. vol. 1, Academic Press, New York, 1974.
2) Surgenor, D. M. (ed.) : The red blood cell, 2nd ed. vol. 2, Academic Press, 1975.
3) 野沢義則，香川端雄：生体膜と疾患，講談社，東京，1980.
4) 中尾　真：赤血球の代謝と機能A：赤血球膜In新版日本血液学全書4．貧血II．，丸善，東京，昭和55年．
5) Bessis, M. : Living blood cells and their ultrastructure, Springer-Verlag, Berlin, 1973.
6) 藤井達三：赤血球膜について．蛋白質核酸酵素　19, 59～72, 1974.
7) 八幡義人：ヒト赤血球膜：その正常と病態．臨床血液 17, 927-944, 1976.
8) Murchesi, V. T., Furthmayr, H., Tomita, M. : The red cell membrane. Annu. Rev. Biochem. 45, 667-697, 1976.
9) Steck, T. L. : The organization of proteins in the human red cell membrane, J. Cell Biol. 62, 1-19, 1974.
10) Danielli, J. F., Davson, H. A. : The parmiability of thin films. J. Cell Comp. Physiol. 5, 495-508, 1935.
11) Robertson, J. D. : Ultrastructure of cell membranes and their derivatives. Biochem. J. 65, 43P, 1957.
12) Singer, S. J., Nicolson, G. L. : The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175, 720-731, 1972.
13) Dodge, J. T., Mitchell, C., Hanahan, J. D. : The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 100, 119-130, 1963.
14) Fairbanks, G., Steck, T.L., Wallach, D. F. H. : Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry. 10, 2606-2617, 1971.
15) Steck, T. L., Kant, J.A. : Biomembane In Methods Enzymol. (Eds by Fleischer, S., Packer, L.) p.172-180, 1974.
16) Kankura, T., Kurashina, S., Nakao, M.: A gel filtration technique for separation of erythrocytes from human blood. J. Lab. Clin. Med. 83, 840-844, 1974.
17) Beutler, E., West, C., Blume, K. G. : The move of leurocytes and platelet from whole blood. J. Lab. Clin. Med. 88, 328-333, 1976.
18) Cutts, J. H. : Cell separation In Methods Hematol. Academic Press, New York, 1970.
19) Walks, R., Kumar, K. S., Hochstein, P. : Aging of human erythrocytes—Differential sensitivity of young and old erythrocytes to hemolysis induced by peroxide in the presence of thyroxine. Arch. Biochem. Biophys. 174. 463-468, 1976.
20) Sprandel, U., Hubbard, A. R., Chalmers, R. A. : *In vitro* studies on resealed erythrocyte ghosts as protein carriers. Res. Exp. Med. (Berl.) 175, 239-245, 1979.
21) Bodemann, H., Passow, H. : Factors controlling the resealing of the membrane of human erythrocyte ghosts after hypotonic hemolysis. J. Membrane Biol. 8, 1-26, 1972.
22) Rice, W. R., Steck, T. L. : Pyruvate transport into inside-out vesicles isolated from human erythrocyte membranes. Biochim. Biophys, Acta 468, 305-317, 1977.
23) Steck, T. L., Weinstein, R. S., Straus, J. M., Wallach, D. F. H. : Inside-out red cell membrane vesicles : Preparation and purification. Science 168, 255-257, 1970.
24) Alivisatos, S. G. A., Kashket, S., Denstedt, O. F. : The metabolism of

the erythrocyte IX Diphosphopyridine nucleotidase of erythrocytes. Can. J. Biochem. Plysiol. 34, 46-60, 1956.

25) Hoffman, J. F.: The red cell membrane and the transport of sodium and potassium. Am. J. Med. 41, 666-680, 1966.

26) Nicolson, G. L., Singer, S. J.: Ferritin −conjugated plant agglutinins as specific saccharide strains for electron microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 68, 942-945, 1971.

27) Kant, J. A., Steck, T. L. : Adenosine 3′, 5′ −monophosphate binds only to the inner surface of human erythrocyte membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 116-122, 1973.

28) Marchesi, V. T., Palade, G. E. : The localization of Mg-Na-K activated adenosinetriphosphatase activity on red cell ghost membrane. J. Cell Biol. 35, 385-404, 1967.

29) Rubin, C. S., Rosenfeld, R. D., Rosen, O. M. : Orientation of cyclic-AMP-dependent protein kinase in human erythrocyte membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 70, 3735-3738, 1973.

30) Staros, J. V., Haley, B. E., Richards, F. M. : Human erythrocytes and resealed ghosts. A comparison of membrane topology. J. Biol. Chem. 249, 5004-5007, 1974.

31) Rosenberg, S. A., Guidotti, G. : The protein of human erythrocyte membranes. I. Praparation, solubilization, and partial characterization, J. Biol. Chem. 243, 1985-1992, 1968.

32) 八幡義人：赤血球膜と溶血．代謝 17, 199-210, 1980.

33) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685, 1970.

34) Edwards, J. J., Anderson, N. G., Nance, S. L., Anderson, N. L. : Red cell proteins. I. Two-dimensional mapping of human erythrocyte lysate proteins. Blood 53, 1121-1132, 1979.

35) 垣内史朗：カルモジュリンと細胞骨格，生化学 53, 1267-1289, 1981.

36) Kirkpatrick, F. H. : Spectrin : Current understanding of the physical, biochemical, and functional properties. Life Seience 19, 1-18, 1976.

37) Marchesi, S. L., Steers , E., Marchesi, V. T., Tillack, T. W. : Physical and chemical properties of a protein isolated from red cell membranes. Biochemistry 9, 50-57, 1970.

38) Ralston, G. B. : Physico-chemical characterization of the spectrin tetramer from bovine erythrocyte membranes. Biochim. Biophys. Acta 455, 163-172. 1976.

39) Ralston, G. B. : Physical chemical studies of spectrin. In Normal and abnormal red cell membranes (Eds. by Lux, S. E., Marchesi, V. T., Fox, C. F.) p.47-57, Alan R. Liss, New York, 1979.

40) Clarke, M. : Isolation and characterization of a watersoluble protein from bovin erythrocyte membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 1063-1070, 1971.

41) Bjerrum, O. J., Bhakdi, S., Knüfermann, H., Bøg-Hansen, T. C. : Immunoelectrophoretic heterogeneity and cross reactions of individual "spectrin" components isolated by electrophoresis. Biochim. Biophys. Acta 373, 44-50, 1974.

42) Fuller, G. M., Bonghter, J. M., Morazgini, M. : Evidence for multiple polypeptidle chains in the membrane proteins spectrin. Biochemistry 13, 3036-3041, 1974.

43) Bhakdi, S., Knüfermann, H., Wallach, D. F. H. : Separation of EDTA−

extractable erythrocyte membrane proteins by isoelectric focussing linked to electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. Biochim. Biophys. Acta 345, 448-457, 1979.

44) 八幡義人：Membrane disease としての赤血球膜蛋白異常．日本臨床 37, 3885-3899, 1979.

45) Bessis, M., Weed, R. I., Leblond, P. F. (eds): Red cell shape—physiology・pathology・ultrastructure, Springer Verlag, New York, 1973.

46) Jacob, H. S., Amsden, T., White, J. : Membrane microfilaments of erythrocytes : Alteration in intact cell reproduces the hereditary spherocytosis syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69, 471-474, 1972.

47) Yawata, Y., Matsumoto, N., Jacob, H. S. : Cyclic nucleotide microtuble interaction of erythrocyte shape and survival. J. Clin. Invest. 53, 86a, 1974.

48) Szur, L., Marsh, G. W., Pettel, J. E.: Studies of splenic function by means of radioisotope-labeled red cells. Brit. J. Haematol. 23, 183-199, 1972.

49) Mohandas, N., Greenquist, A, G., Shohet, B. : Effect of heat and metabolic depletion on erythrocyte deformability, spectrin extractability and phosphorylation. In The red cell, p.453-472, Alan R. Liss, New York, 1978.

50) Lux, S. E. : Spectrin—actin membrane skeleton of. normal and abnormal red blood cells. Seminers Hematol. 16, 21-51, 1979.

51) 八幡義人：図説赤血球膜の構造と機能．日本臨床 37, 3836-3840, 1979.

52) Rubin, C. S, Rosen, O. M. : The role of cyclic AMP in the phosphorylation of proteins in human erythrocyte membrane Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 421-429, 1973.

53) Roses, A. D., Appel, S. H. : Erythrocyte protein phosphorylation. J. Biol.Chem. 248, 1408-1411, 1979.

54) Rubin, C. S., Erlichman, J., Rosen, O. M. : Cyclic adenosine 3′, 5′ monophosphate—dependent protein kinase of human erythrocyte membranes. J. Biol. Chem. 247, 6135-6139, 1972.

55) Dreyfuss, G., Schwartz, K. J., Blout, E. R. : Compartmentalization of cyclic AMP-dependent protein kinase in human erythrocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 5926-5930, 1978.

56) Gaetjens, E.: Isolation of a $^{32}$P-labeled polypeptide of low molecular weight from phosphorylated human erythrocyte membranes. Biochemistry 15, 40-45, 1976.

57) Rubin, C. S. : Adenosine 3′, 5′ —mono—phosphate—regulated phosphorylation of erythrocyte membrane proteins. J. Biol. Chem. 250, 9044-9052, 1975.

58) Lincoln, T. M., Corbin, J. D. : Adenosine 3′, 5′-cyclic monophosphate — and guano sine 3′, 5′-cyclic monophosphate —dependent protein kinases : possible hemologous proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 3239-3243, 1977.

59) Guthrow, C. E., Allen, J. E., Rasmussen, H. : Phosphorylation of an endogenous membrane protein by an endogenous, membrane-associated cyclic adenosine 3′, 5′-monophosphate dependent protein kinase in human erythrocyte ghosts. J. Biol. Chem. 247, 8145-8153, 1972.

60) 八幡義人：ヒト赤血球：その正常と病態．臨床血液 17, 1049-1070, 1976.

61) Greenquist, A. C., Shohet, S. B. : Defective protein phosphorylation in membranes of hereditary spherocytosis erythrocytes. FEBS Letters. 48, 133-135, 1974.

62) Matsumoto, N., Yawata, Y., Jacob, H. S. : Association of decreased membrane protein phosphorylation

with red blood cell spherocytosis. Blood 49, 233-239, 1977.

63) Zail, S. S., van den Hoek, A. K. : Studies on protein kinase activity and the binding of adenosine-3′, 5′-monophosphate by membranes of hereditary spherocytosis erythrocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 1078-1089, 1975.

64) 八幡義人，是沢俊輔，山田治，紫田進：遺伝性球状赤血球症における末梢血赤血球代謝と摘脾，厚生省溶血性貧血調査研究班昭和50年度研究報告書（班長三輪四郎）p.115-122, 1976.

65) Nakao, M., Fujii, Y., Hara, Y., Nomura, T., Nakao, T., Konatsu, Y. : Membrane protein phosphorylation in intact normal and hereditary spherocytic human erythrocytes. J. Biochem. (Tokyo) 88, 327-335, 1980.

66) Beutler, E., Guinto, E., Johnson, C. : Human red cell protein kinase in normal subjects and patients with hereditary spherocytosis, sickle cell disease, and autoimmune hemolitic anemia. Blood 48, 887-898, 1976.

67) Avissar, N., de Vries, A., Ben-Shaul, Y., Cohen, I. : Actin-activated ATPase from human erythrocytes. Bichim. Biophys. Acta 375, 35-43, 1975.

68) Weidekamm, E., Briczka, D. : Extraction and localization of a ($Ca^{2+}$ $-Mg^{2+}$)−stimulated ATPase in human erythrocyte spectrin. Biochim. Biophys. Acta 401, 51-58, 1975.

69) Gopinath R. M., Vincenzi, F. F. : Phosphodiesterase protein activator mimics red blood cell cytoplasmic activator of (calcium−magnesium ion)−dependent ATPase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 1203-1209. 1977.

70) Jarrett, H. W., Penniston, J. T. : Partial purification of the (calcium−magnessium ion)−dependent ATPase activator from human erythrocytes : its similarity to the activator of 3′,5′−cyclic nucleotide phosphodiesterase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 1210-1216, 1977.

71) 日高弘義，垣内史郎(編)：カルモジュリン−$Ca^{2+}$受容蛋白質，講談社，1981.

72) 日高弘義：カルモジュリンの薬理学—カルモジュリン阻害剤—．蛋白質核酸酵素 26, 977-993, 1981.

73) Raess, B. U., Vincenzi, F. F. : Calmodulin activation of red cell ($Ca^{2+}$ $+Mg^{2+}$)−ATPase and its antagonism by phenothiazines. Mol. Pharmacol. 18, 253-258, 1980.

74) Bennett, V., Stenbuck, P. J. : The membrane attachment protein for spectrin associated with band 3 in human erythrocyte membranes. Nature 280, 468-473, 1979.

75) Bennett, V., Stenbuck, P. J. : Human erythrocyte ankyrin : Purification and properties. J. Biol. Chem. 255, 2540-2548, 1980.

76) Bennett, V., Stenbuck, P. J. : Association between ankyrin and the cytoplasmic domain of band 3 isolated from the human erythrocyte membrane. J. Biol. Chem. 255, 6424-6432, 1979.

77) Luna, E. J., Kidd, G. H., Branton, D. : Identification by peptide analysis of the spectrin−binding human erythrocytes. J. Biol. Chem. 254, 2526-2532, 1979.

78) Benett, V., Stenbuck, P. J. : Identification and partial purification of ankyrin, the high affinity membrane attachment site for human erythrocyte spectrin. J. Biol. Chem. 254, 2533-2541, 1979.

79) Avruch, J., Fairbanks, G. : Demonstration of a phosphopeptide intermediate in the $Mg^{2+}$-dependent, $Na^{+}$- and $K^{+}$- stimulated adenosine triphos-

phatase reaction of the erythrocyte membrane. Proc. Natl. Acad. Sci, U. S. A. 69, 1216-1220.1972.

80) Taveran, R. D., Langdon, R. G. : Reversible association of cytocharasin B with human erythrocyte membrane. Inhibition of glucose transport and the stoichiometry of cytocharasin binding. Biochim. Biophys. Acta. 323, 207-219, 1973.

81) Lin, S., Spudich, J. A. : Biochemical studies on the model of action of cytochalasin B. Cytochalasin B binding to red cell membrane is relation to glucose transport. J. Biol. Chem. 249, 5778-5783, 1974.

82) Ho, M. K., Guidotti, G. : Membrane protein from human erythrocyte involved in anion exchange. J. Biol. Chem. 250, 675-683, 1975.

(83) 高久史麿, 水上茂樹(編) : 血液の病態生化学, 朝倉書店, 1979.

84) Rothstein, A. : The functional roles of band 3 proteins of the red blood cell. In Molecular speialization and symmetry in membrane function, (Eds by Solmon, Karnovsky) p.128-160, Harvard Univ. Press, 1978.

85) Brown, P. A., Feinstein, M.B., Shuahi, R. I. : Membrane proteins related to water transport in human erythrocytes. Nature, 254, 523-525, 1975.

86) Ji, T. H., Nicolson, G. L. : Lectin binding and perturbation of the outer surface of the cell membrane induces a transmembrane organization alteration at the inner surface. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71, 2212-2216, 1974.

87) Jackson, R. L., Segrest, J. P., Kahane, I., Marchesi, V. T. : Studies on the major sialoglycoprotein of the human red cell membrane. Isolation and charocterization of tryptic glycopeptides. Biochemistry 12, 3131-3138, 1973.

88) Segrest, J. P., Gulik-Krzywicki, T., Sardet, C. : Association of the membrane−penetrating polypeptide segment of the human erythrocyte MN−glycoprotein with phospholipid bilayers I. Formation of freez-etch intramembranous particles. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71, 3294-3298. 1974.

89) Marchesi, V. T. : Functional proteins of the human red blood cell membrane. Semi. Hematol. 16, 3-20, 1979.

90) Anstee, D. J., Barker, D. M., Judson, P. A., Tanner, M. J. A. : Inherited sialoglycoprotein deficiencies in human erythrocytes of type En ($a^-$). Brit. J. Haematol. 35, 309, 1977.

91) Gahmberg, C. G., Myllyla, G., Leikola, J. : Absence of the major sialoglycoprotein in the membrane of human En($a^-$) erythrocytes and increased glycosylation of band 3. J. Biol. Chem. 251, 6108-6116, 1976.

92) Tyler, J.M., Hargreaves, W. R., Branton, D. : Purification of two spectrin−binding proteins : Biochemical and electron microscopic evidence for site-specific reassociation between spectrin and band 2.1 and 4.1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 5192-5196, 1979.

93) Hayashi, S., Koomoto, R., Yano, A., Ishigami, S., Tsujino, G., Saeki, S., Tanaka, T. : Abnormality in a specific protein of the erythrocyte membrane in hereditary spherocytosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 1038-1044, 1974.

94) Nozawa, Y., Noguchi, T., Iida H., Fukushima, H., Sekiya, T., Ito, Y. : Erythrocyte membrane of hereditary spherocytosis : Alteration in surface ultrastructure and membrane proteins, as inferred by scanning electron microscopy and SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis. Clin. Chim.

Acta 55, 81-85, 1974.

95) Haley, E. : Photoaffinity of adenosine 3', 5'-cyclie monophosphate binding sites of human red cell membranes. Biochomistry 14, 3852-3857, 1975.

96) Allen, D. W., Cadman, S., McCann, S. R., Finkel, B. : Increased membrane binding of erythrocyte catalase in hereditary spherocytosis and in metabolically stressed normal cells. Blood 49, 113-123, 1977.

97) Tilney, L. G., Detmers, P. : Actin in erythrocyte ghosts in its association with spectrin : Evidence for a nonfilamentous form of these two molecules in situ. J. Cell Biol. 66, 508-520, 1975.

98) Sheetz, M. P., Painter, R. G., Singer, S. J. : Relationships of the spectrin complex of human erythrocyte membranes to the actomyosins of muscle cells. Biochemistry 15, 4486-4492, 1976.

99) Ohnishi, T. : Isolation and characterization of an actin-like protein from membranes of human red cells. Brit. J. Haematol. 35, 453-458, 1977.

100) McCann, S. R., Finkel, B., Cadman, S., Allen, D. W. : Study of a kindered with hereditary spherocytosis and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase deficiency. Blood 47, 171-181, 1976.