

学位申請論文

ヒト赤血球膜の骨格的構造の研究

—バンド4.1と脂質との相互作用—

京都大学理学部生物物理学教室

佐 藤 智

論文内容の要旨

報 告 番 号	甲 第 号	氏 名	佐 藤 智
論文調査担当者	主 査 大 西 俊 一 大 井 龍 夫 柳 田 充 弘		
(論 文 題 目) ヒト赤血球膜の骨格的構造の研究 — バンド 4.1 と脂質との相互作用 —			
(論文内容の要旨) 細胞膜の裏側にはタンパク質複合体よりなる骨格構造があり，細胞膜と骨格構造の相互作用が細胞の機能の発現に重要な役割りを果たすと考えられている。本論文は，この相互作用を，比較的単純なヒト赤血球膜を材料として研究したものである。ヒト赤血球膜を構成するタンパク質・脂質，さらには膜を裏打ちするタンパク質はすでによく分析されており，両者の相互作用様式についても既にかんがりの知見が得られている。それによると，裏打ちタンパク質の一つであるアンキリンは，膜の内在性タンパク質であるバンド 3 に結合する，また同時にスペクトリンにも結合する。裏打ちタンパク質であるスペクトリン・アクチン・バンド 4.1 は繊維状構造体を形成し，上に述べたアンキリンの結合を通じて膜につながる。申請者の研究は，バンド 4.1 と赤血球膜の相互作用に関するもので，その成果から膜裏側のリン脂質（ホスファチジルセリン）に結合することを示唆したもの			

である。

論文の内容は、バンド 4.1 と、リン脂質のみよりなるリポゾームの相互作用の研究と、バンド 4.1 と赤血球膜を裏返しにした小胞との相互作用の研究に大別できる。得られた成果の主なものを列挙すると次のようになる。

(1) バンド 4.1 のリポゾームへの結合。アイソトープ標識した バンド 4.1 を用いて種々の組成のリポゾームへの結合を測定した結果、 バンド 4.1 はホスファチジルセリン (P S) をふくむリポゾームによく結合することが明らかにされた。

(2) リン脂質膜の透過性の増大。テンポコリンというスピンラベルを用いてリポゾーム膜の透過性を測定し、バンド 4.1 が P S をふくむリポゾーム膜の透過性を増大させること、その程度は P S 含量とともに増大することを見出した。

(3) バンド 4.1 とリポゾーム間の蛍光エネルギー移動。ダンシル化したホスファチジルエタノールアミンをふくむリポゾームに、ローダミンラベルしたバンド 4.1 を加えて蛍光スペクトルを測定し、前者から後者へのエネルギー移動を見積った。その結果、 P S をふくむリン脂質小胞からの蛍光エネルギー移動が大きい。

(4) スペクトリン・アクチン共重合体の粘性の増大。鉄球落下法を用いて、リポゾーム存在下でのスペクトリン・アクチン共重合体繊維の粘弾性を調べた。その結果、 P S をふくむリポゾームが著しい粘性の上昇を起こすことを観察した。

(5) カルシウムイオンの阻害効果。バンド 4.1 の P S をふくむリポゾームへの結合、透過性の増大は、カルシウムイオンにより阻害された。また、 P S をふくむリポゾームによるスペクトリン・アクチン共重合体の粘性の上昇も、カルシウムイオンにより阻害された。

(6) バンド 4.1 の赤血球膜裏返し小胞への結合。赤血球膜裏返し小胞か

らさらにアンキリン・バンド 4.1 を除いたものを作製し、それに対するバンド 4.1 の結合を測定した。その結果、バンド 4.1 の結合が実際に起こること、その結合量は予めプロテアーゼ処理した裏返し小胞の場合でもほとんど変わらないことを観察した。いっぽう、ふつうの赤血球膜裏返し小胞を P S デカルボキシラーゼで処理した場合には、バンド 4.1 の結合量の減少が観察された。

これらの実験結果から、バンド 4.1 は赤血球膜の裏側で、タンパク質というよりもむしろ P S をふくむ脂質部分に結合していることを推論している。すなわち、アンキリンを経由するタンパク質－タンパク質相互作用に基づく裏打ちの他に、このタンパク質－脂質相互作用に基づく裏打ちがあって、両者がそれぞれ特徴あるはたらきをしていると考察している。

参考論文二篇のうち一篇（英文）は、スペクトリンによるアクチンの重合促進に関するものであり、もう一篇（邦文）は、生体膜の構造に関する総説であり、細胞骨格との相互作用の重要性にも触れている。

学位論文

ヒト赤血球膜の骨格的構造の研究

ーバンド4.1と脂質との相互作用ー

佐藤 智

京都大学大学院理学研究科

生物物理学専攻

本申請論文は

5 “Interaction of a peripheral protein of the erythrocyte
membrane, band 4.1, with phosphatidylserine-containing
liposomes and erythrocyte inside-out vesicles.”

European Journal of Biochemistry

1983年 掲載予定

を基礎としている。

要 約

ヒト赤血球膜の骨格的構造をなすタンパク質であるバンド4.1を単離し、種々の組成のリン脂質膜および赤血球膜の裏返し小胞との相互作用を検討した。

バンド4.1は、フォスファチジルセリン(PS)を含む膜に高い親和性を示した。PSを含むリポソームへのバンド4.1の結合量は、PSを含まないリポソームへの結合量より高かった。バンド4.1は、スペクトリン、アクチン、アンキリン、バンド4.1等を脱離させた赤血球膜^{小胞}に結合し、結合量は小胞のタンパク質を限定分解しても有意に低下しなかった。また、スペクトリン、アクチンを脱離させた赤血球膜小胞におけるバンド4.1の結合量は、PSデカルボキシラーゼ処理によって減少した。バンド4.1の含PSリポソームへの高い親和性は、蛍光標識したバンド4.1およびリポソーム間の、蛍光エネルギー移動効率の比較でも示された。

バンド41はスピン標識であるテンポユリンを封入した含PSリポソームから、このスピン標識を流出させた。流出量はPS含量が高いたくかった。バンド41とPSを含むリポソームはスペクトリン・アクチン共重合体の粘性を上昇させた。

Ca^{2+} は、バンド41と含PS膜との相互作用に阻害効果があった。すなわち、 Ca^{2+} 存在下では、バンド41の含PS膜への結合は低下し、テンポユリンの流出もスペクトリン・アクチン液の粘性上昇も抑制された。

以上の結果より、バンド41は赤血球膜においてPSに結合することが推定できる。赤血球膜の骨格的構造は、脂質二分子層よりなる膜本体に、スペクトリン、アンキリン間の結合とバンド41、PS間の結合によって、つながれていると考える。バンド41、PS間の結合は、 Ca^{2+} の影響を受け、膜透過性に関与することから、赤血球膜構造維持における調節的役割をはたすと推定する。また、赤血球膜裏側の脂

質組成に近い膜が、 Ca^{2+} 存在下で透過性が上昇し、構造変化をおこすことを示唆する知見を得た。この結果と、先のバンド4.1とPS間相互作用における Ca^{2+} の阻害効果に基づき、 Ca^{2+} の赤血球膜の変化における作用機序を考察する。

目 次

序 論 2 ~ 10

略 語 表 11 ~ 12

5 材料と方法 13 ~ 29

結 果 30 ~ 44

考 察 45 ~ 56

結 語 57 ~ 59

謝 辞 60

10 文 献 61 ~ 64

図 表 65 ~ 85

序 論

細胞の膜構造は、種々の生体機能発現の場として、生物にとって第一義的に重要である。
特に高等動物細胞の形質膜では、細胞間接着、
ホルモンなどの伝達物質の受容、免疫担当細胞の認識など、膜の構造にたち入って研究が進められている(1)。また形質膜は異物侵入
の場でもあり、ウイルスの感染、タンパク質
毒素の作用機構の解明は、膜構造との関係の研究が重要な位置を占めている。

このように、生体膜は細胞生物学の様々な面で注目され研究されており、この生体膜の分子構築を明らかにすることはこれらの研究の基礎をなすものである。

細胞の形質膜は、器官や組織によって特殊化しており、細胞ごとに様々な差異がみられる。しかし、一見機能的構造的差異が大きい、
ても、生体膜は脂質、タンパク質と若干の糖
を構成物質とする二次元的なひろがりを持つ

構造であり、この構造を、あるモデルについて詳細に研究することによって、一般的で共通な性質の記述を試みることは、大いに意味のあることである。この観点に立って、現在までの生体膜構造の研究を概観すれば、大きくわけて三つの方法が発展に寄与してきたと考えられる。

第一の方法は、生体膜のみに多量に見い出されるリン脂質に着目し、それによって人工膜を形成しその物性を物理化学的測定法によって研究するものである。この方法によって、生体膜において脂質分子が非常に運動性に富むことを明らかにしたことは画期的であり、脂質の脂肪酸側鎖の立体構造の変化に伴う相転移や相分離^{2,3,4}、イオンによる相分離⁵、分子の側方拡散⁶等が膜に特徴的な性質として見い出された。

第二の方法として、リンパ球や培養株細胞を研究材料として、細胞表面の分子の分布、結合を研究するものがある。FryeとEdidinは細

胞融合を応用し組織適合性抗原の分布を観察し、細胞表面においても膜上の分子が一定の時定数で自由に運動することを見出した(7)。この研究に続く、Taylorらのリンパ球膜上の抗体のキャッチ形成の観察(8)などは、生体膜の分子の運動に多くの研究者を注目させた。

第三には、均一な膜標品を調製し構成分子の分析を通して膜構造を解明していく方法がある。この方法には、赤血球膜やウィルス膜などがよく用いられ、脂質分子の分布の非対称性(9)タンパク質分布の非対称性(10)等を明確にした意義は大きい。

一方、細胞機能を生体膜と細胞内の立体的構造との関係を把握する試みも進展してきた。Egelmanらは、リンパ球上の抗体とコンカナバリンA受容体の分布・運動性の違いが、細胞内のアクチン・ミオシン等への修飾によって影響され、細胞骨格の状態も逆に細胞表面の変化にともなって変化することを示した(11)。こ

のような観点は、マクロファージの食作用機構(12,13)等にも適用されている。

しかし、現在までの細胞構造についての知識は、一挙にこの問題を解明するのには十分ではない。それは、細胞内の立体的な繊維状構造(細胞骨格)についての知識が不足しているためと、膜の状態変化と膜タンパク質との関係を説明する知見に乏しいためだと思われる。その意味で、生体膜の構造を細胞骨格をきめた動的変化の場としてとらえ、その分子構築を研究することは非常に重要である。

赤血球膜構造の研究は、上述の観点での研究の^{一つの}人間的かつ有効なモデルであると考えられる。赤血球は赤芽球からの分化の最終段階として¹⁵ホニエウ類では細胞内に核を欠き、細胞内に複雑な骨格構造が存在しない。このため、複雑な細胞機能をおこなう細胞に直接知見をあてはめることができないが、膜の分子構築と動的な状態変化の研究材料として研究しやすい利点がある。赤血球は、構成成分の分析の

ための膜分画の調製が容易で、膜構造と細胞形態の変化の要因として細胞膜成分と細胞内の若干の酵素やイオン等を考慮すれば良い。このため、膜の分子構築とその変化を詳細に検討できる。このような赤血球膜の知見をもとにして、より複雑な細胞の機能を検討すれば、細胞機能を膜構造の面から明らかにしていく手がかりが得られると考える。赤血球は以上の意味で基礎的な知見を提供する実験モデルである。

赤血球を低張処理等によって溶血させ、ヘモグロビン等を除くと均一な膜標品（ゴースト）が多量に得られる。この赤血球膜は、表一に示すような組成であり、各成分は他の細胞の形質膜に比して格段に良く分析検討されている。膜成分である糖・タンパク質・脂質が非対称に分布していることは、赤血球においてはじめて明らかにされた。

Yuらは赤血球膜を界面活性剤で処理して、タンパク質よりなる「殻」が得られることを

報告した(14)。この殻は、赤血球膜を機械的に支える骨格的構造をなすものと考えられ、主にスペクトリン・アクチン・バンド4.1等から形成されている(14)。この骨格状構造は、以下⁵に述べるように赤血球膜の様々な状態変化に関係していると考えられている。

赤血球膜を貫通している内在性タンパク質は、主に、陰イオン輸送体であるバンド3と、糖の大部分を結合しているグリコホリンよりなる。¹⁰これらには種々のレクタンが結合し、ウイルスも結合する。これらはフリーズフラクチャー法電子顕微鏡観察において膜内粒子に相当する(15.16)が、赤血球膜からアクチン・スペクトリン等を除くとこの粒子の分布が著るしく変化しやすくなる(17.18)。¹⁵このことは、膜内在性の輸送担体や糖を含む受容体タンパク質の動きが「殻」を形成するタンパク質によって制御されることを示している。

一方、赤血球は様々な条件で、円盤状形態から金米糖状やおわん状の形態へと変化する。

この変化にもスペクトリン等が関与していると考えられる。また、先に述べた、スペクトリンやアクチンを除いた赤血球膜は小胞化をひき起こす(19)。赤血球脂質の運動性は不均一であることが示唆されているが、この不均一性もタンパク質の修飾で失われ、膜の裏側のタンパク質の関与が示唆されている(20)。このように、赤血球膜の骨格的構造を形成するタンパク質は、内在性タンパク質の分布のみならず、細胞形態・脂質運動性等の維持にも関与していると考えられている。

現在まで、赤血球膜の骨格的構造をなすタンパク質の分析とその相互作用は、かなり詳細に研究されている(21)。スペクトリンとアクチンは、そのなかで量も多く、骨格の中心をなすと考えられている。スペクトリンは細長い分子で、その一端でバンド3に結合するタンパク質であるアンギリンに結合し、その反対側でバンド4.1と結合する(22-26)。アクチンはバンド4.1が結合する側でスペクトリンに結合

すると考えられている(24)。スペクトリンとアニキリン、バンド3の結合が、膜の骨格的構造と脂質二分子層よりなる膜本体とを結びつけるという考え(21)は広く受け入れられている。この考えに基づいた、赤血球膜構造のモデル図を図1に示す。このような骨格的構造と膜本体との結合によって、膜内在性タンパク質であるバンド3の運動は、回転拡散(27,28)、側方拡散(29,30)とも制限されていると考えられている。

このように、赤血球膜の骨格的構造をなすタンパク質の役割はかなり詳しく研究されているが、バンド4の役割は、スペクトリンに結合すること以外は不明確な点が多い。ところが、バンド4は、スペクトリンとアクチンを除いた膜にも結合しており、スペクトリン以外にも結合する相手が存在するはずである。従って、バンド4のスペクトリン以外の結合対象を明らかにすれば、赤血球膜の骨格的構造が膜本体へ結合する機構を、より詳細に考察

できる。

筆者は、上述の観点にたち、バンド41の機能について研究してきた。その結果、バンド41が、赤血球膜において裏側にのみ存在する脂質であるフォスファチジルセリン(PS)に高い親和性を示し、PSを含むリポソームの透過性を上昇させることを見出した。また、このPSを含むリポソームへの作用に対し、 Ca^{2+} は阻害効果があった。更に、この発見に基づいて、バンド41の赤血球膜での結合対象を検討し、PSが結合部位であることを強く示唆する知見を得、一般に、細胞骨格と膜との結合にリン脂質も関与する可能性のあることを指摘した。

本論文では、以下に研究の詳細を述べ、あわせて、赤血球膜を構成するタンパク質と脂質の、構造維持、膜の動的構造の変化における役割を、特に Ca^{2+} の効果に注目して考察する。

略語表

(脂質)	PS	フォスファチジルセリン
	PC	フォスファチジルコリン
5	PE	フォスファチジリエタノールアミン
	PG	フォスファチジルグリセロール
	PI	フォスファチジリンイノシトール
	Sph	スフィンゴミエリン
	DMPC	ジミリストイルフォスファチジルコリン
10	DOPC	ジオレオイルフォスファチジルコリン
	DPPC	ジパルミトイルフォスファチジルコリン
(試薬)	THP	ジイソプロピルフルオロリン酸
	EDTA	エチレンジアミン四酢酸
	EGTA	エチレングリコールビス-(2-アミ)エチルエーテル) N,N',N'',N''' 四酢酸
15	PC	リン酸
	DTT	ジチオスレイトール
	Pipes	ピペラジン-N,N'-ビス(エタンスルホン酸)
	DEAE-セルロース	ジエチルアミノエチルセルロース
	ダンシルPE	フォスファチジリエタノールアミンと 5-(ジメチルアミ)-1-ナフタレンスルホン塩化物の 反応物

(スピラブル) 12 PC*

フォスファチジルコリンの2位の脂肪酸を12-キシレステアリン酸におきかえたもの

12 PS*

PC*のコリン残基をセリン残基におきかえたもの

デニホコリン

N,N-ジメチル-N-(2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジリル)-N-(2-ヒドロキシエチル)アンモニウム(塩化物)

5SAL-Me

5-ドキシレステアリン酸メチルエステル

ESR

電子スピン共鳴

NMR

核磁気共鳴

材料と方法

(1) 赤血球膜バンド41タンパク質の調製

バンド41の調製はTylerらの方法(23)に従った。採血後一週間以内のヒト赤血球を、生理的食塩水(0.9% NaCl)で3度遠心操作によって洗浄した(1000×g 10分)。得られた赤血球を20倍量のリン酸緩衝液(10mM NaPi, 1mM EDTA, 0.1mM DFP, pH 7.4, 4°C)で溶血後、遠心操作(25,000×g 30分)によって沈殿に赤血球膜を得た。この操作を数度繰り返してモグロビン^{ほぼ}を完全に除き、得られた膜分画を、0.5mM NaPi, 1mM EDTA, 0.5mM DFP, pH 7.4)に懸濁し37°C 30分の処理によりスペクトリンを除いた。遠心操作(40,000×g 60分)によって得られた沈殿は再び同じ処理を繰り返した。このスペクトリンの大部分を除いた膜分画を30倍量の10mM NaPi, 1mM EDTA, 1mM KCl, 1mM DFP, pH 7.4中に懸濁し37°C 30分の処理後、遠心操作(40000×g 60分)による上清分画にバンド41, アンキリンを抽出した。この抽出液はただちに、100倍量の10mM NaPi, 1mM EDTA, 0.5mM DTT

pH 7.4, 4°C に一晩透折した。この液は, 10mM NaPi, 1mMEDTA pH 7.6 に平衡化した DEAE-セルロースカラム ($\phi = 2\text{cm} \times 30\text{cm}$) に吸着させ、同緩衝液とそれに 50mM 相当の KCl を含む液で順次洗⁵浄し、100mM KCl, 10mM NaPi, 1mMEDTA, 0.5mM DFP, pH 7.6 の緩衝液で溶出した。操作はすべて 4°C で行った。

このようにして得られたバンド 41 は図 2 に示すように、ほぼ満足のいく純度だが微量の低分子量のバンドがみられた。このバンドは調製中に不活化できなかったタンパク質分解酵素がバンド 41 を限定分解して生じたと思われる (23)。この量はわずかなので以後の実験にはこの試料を Pipes 緩衝液 (5mM Pipes, 120mM KCl, 20mM NaCl, 2mM MgCl₂, 1mMEGTA, 0.5mM DFP pH 7.2) に透折し、実験に用いた。バンド 41 は、スペクトリン存在下で重合させたアクチン溶液の粘性を上昇させることが知られている (31)。本試料も同様の活性を示した。

(2) バンド 41 の蛍光および同位元素標識

バンド41とテトラメチルローダミンイソチオシアナートを混合(1mg:50 μ g)し一晩0°Cで反応させ蛍光標識した。反応後セファデックス G-25カラム(2 $\times$ 40cm)で未反応蛍光色素を除きタンパク質は遮光してDipes緩衝液に透析した。蛍光試薬の吸光度とタンパク質量との比較から、タンパク質1分子あたり1.2~1.4分子の蛍光試薬が結合していることがわかった。

タンパク質の 125 I標識はFraker & Speckの方法(32)に従った。50 μ CiのNa 125 I溶液と2mgのバンド41を混合し、5 μ gの1,3,4,6-テトラクロロ-3a,6a,ジフェニルグリコールリルで覆った試験管に移し0°C 10分の反応をおこなった。タンパク質分画を2 $\times$ 25cmのセファデックス G-25カラムによつて得、Dipes緩衝液に透析した。結合した 125 Iは750cpm/ μ g バンド41程度であった。

3) 脂質の調製

フォスファチジルコリン(PC, 33)、フォスファチジルセリン(PS, 34)、フォスファチジルイノシトール(PI, 35)はそれぞれ文献によつて調

製し、更にアイ酸クロマトグラフィーで精製した。フォスファチジルエタノールアミン (PE), フォスファチジルグリセロール (PG) は、PC から、フォスフォリパーゼ D を用いて合成⁵ (36) した。スフィンゴミエリン (Sph) は市販のものを用了。コレステロールは、市販のものを Humphries ら (37) に従って精製して用了。これらの脂質はクロロホルムまたはベンゼン中に -20°C で保存した。

¹⁰ (4) 蛍光標識またはスピン標識した脂質

ダンニル PE (38), 12 PC* (39), 5SAL-Me (40), はそれぞれ文献に従って合成した。PS* は、12 PC* からフォスフォリパーゼ D を用いて合成した。また水溶性イオンのスピン標識試薬であるテンポコリン (41) も使用した。12 PS* は小橋宏司博士、他のスピン標識試薬は伊藤忠直博士の合成したものを、御好意により提供していただいた。

(5) 赤血球膜小胞の調製

(1) に述べた方法により調製した スペクト

リン、アクチンを脱離させた赤血球膜は、小胞状で大部分がもとの膜裏面を外側にむけている(19)。この膜小胞を赤血球膜小胞とよぶ。また、Hargreavesら(26)に従って、赤血球膜^{小胞}を⁵ 1M KCl, 2.5M Urea, 1M Glycin-NaOH, 1mM DFP, pH 7.6 で処理し(37°C, 30分)、遠心(40,000×g, 60分4°C)後、沈殿を20mM NaPi, 0.5mM DFP, pH 7.6 に透析したものも調製した。この試料も裏返し小胞で、Con A-セファロースカラム^に結合しなかった。これを KCl-Urea^{処理}小胞¹⁰とよぶことにする。KCl-Urea^{処理}をセミアルカリプロテアーゼ(2μg/mg膜タンパク質)で処理(0°C, 30分)したものも使用した。この処理によって、バンド3に相当する部分が薄くなり、¹⁵ 他にも薄くなるとともに新しいバンドが見い出された(図2)。なお酵素は10mM DFPで失活させた。いずれの膜小胞も、遠心後、Pipes緩衝液に懸濁した。

(6) バンド4.1と脂質との相互作用の研究

[1] スピンラベル法による研究

(a) バンド4.1による、リポソームに封入したテ

テンポコリンの流出

2 μ molのリン脂質を試験管にとり、 N_2 気流下で溶媒を気化させた後、室温減圧下数時間置き、溶媒を完全に除いた。この試料に0.1~0.2ml⁵の120mM テンポコリン塩化物, 20mM NaCl, 5mM Pipes, 2mM $MgCl_2$, 1mM EGTA pH 7.4の液を加え、
2~3個のガラス小粒を加え、激しく振とうし(3分間)リポソームを形成させる。約1mlのコリン緩衝液(テンポコリンをコリンでおきかえたもの)を加え、20°C 12,000 $\times$ g 20分間の遠心操作を2度行い、外側のテンポコリンを除いた。コリン緩衝液を加え、最終的に4~5mMのリポソーム液を調製した。

このリポソームと、場合によって $CaCl_2$ を含むPipes緩衝液とバンド4.1を混合する。直ちにESR試料管に吸入し37°C $\pm$ 0.5°の定温下で、ESRスペクトルの経時変化を追跡した。リポソーム内に封入されているテンポコリンは高濃度であり、スピン交換相互作用によって単位濃度のニトロキシドラジカルあたりの共

鳴信号の高さが低いのであるが、これが何らかの機構で希釈されると信号の高さが飛躍的に上昇する。この詳細は後で「結果」において論ずる。

5 (b) バンド41のリポソーム脂質の運動性への影響

DMPC (10 mM) または DOPC (10 mM) と PS (10 mM) および PS* (5 mM) または 5SAL-Me (5 mM) をそれぞれ 80 μ l, 20 μ l, 4 μ l ずつ試験管中にて混合しそれから 40 μ l ずつ別の試験管に移し (a) と同様にして溶媒を除いた。0.2 ml のバンド41液 (200 μ g/ml) または同量の Pipes 緩衝液を加え、窒素ガスを吹き込み封をして浴槽型超音波発生機 (ヒートシステム社, モデル K) にて振動を加えリポソームを形成させた。この試料を ESR 試料管に吸入し、2°C から 40°C 間の定温下、各温度で ESR スペクトルを記録した。温度制御は市販の冷却した窒素気流を試料部前で加熱し流す装置によっておこなった。試料保持部の温度変動は、銅-コニスタンタン熱電対によれば $\pm 0.1^\circ$

であり、試料部の水銀温度計の読み取り誤差は $\pm 0.2^{\circ}$ であった。温度は水銀温度計の読み取りで示した。

ESRは、日本電子ME-2X(X-バンド)装置でマイクロ波出力 10mW 、変調 100kHz 、変調幅 0.5G の条件で記録した。

[II] バンド4.1とリポソームの相互作用の蛍光測定法による研究

ダンシルPEを10%含むリン脂質を試料管に $1\mu\text{mol}$ とり、溶媒を[I](a)にしたがって除いた。

チップ型超音波発生機(海上電機製)で窒素気流下 4°C (DPPCでは 45°C)5分間処理しリポソーム小胞(ベジクル)を形成させた。こ

の操作にはPipes緩衝液を用い、 $40,000\times g$, 4°C

60分の遠心処理後、^{上清を}実験に使用した。このベ

ジクルを 5mM CaCl_2 または 1mM EGTA を含む緩衝液で適当な濃度に希釈し、テトラメチルローダミン標識したバンド4.1と混合し、 37°C 30分

後蛍光スペクトルを測定した。蛍光スペクトルは日立MPF-2A型を用い $30^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}$ の水流で

試料室温度を一定にし、励起光 350nm 、観測側 $400 \sim 600\text{nm}$ 、観測側に 390nm のフィルターを用いて測定した。これはダンシル基の蛍光スペクトルとテトラメチルローダミンの吸収スペクトルに重なりがあることを利用し、ダンシル基の励起光のテトラメチルローダミンへのエネルギー移動現象を検出しようとしたものである。詳細は「結果」で検討する。

〔III〕放射性同位元素標識したバンド41のリポ

ソームおよび KCl-Urea ^{処理} 小胞への結合

ポリカーボネート製の遠心管（容量 4ml ）に、卵白アルブミンの Pipes 緩衝液溶液（ 10mg/ml ）を満たし室温一時間後溶液を除いた。更に蒸留水中に遠心管を浸し、それを 4°C の冷室に倒立させて保存した。この遠心管中に $28\mu\text{g}$ の KCl-Urea ^{処理} 小胞または相当する量のリポソームと $18\mu\text{g}$ の ^{125}I 標識バンド41を 0.5ml の Pipes 緩衝液（ 1mM CaCl_2 または 1mM EGTA を含む）中で混合し、 37°C 60分後、 $40,000 \times g$ 60分 20°C の遠心後上清を注意深く回収した。この上清の放射活性を、

Packard オートウェルシンチレーターによって測定し、リポソームまたは KCl-Urea^{処理}小胞と共沈したバンド4.1量を算出した。

リポソーム量は、KCl-Urea^{処理}小胞の表面リン脂質量を50%と見積りそれと等表面積量になるよう加えた。リポソームを [I] に従って調製し、4.500×g 15分の沈殿を用いた。この表面積(リン脂質全体に占める表面のリン脂質量)を以下のように見積った。PS^{または}PE を含むリポソームと、トリニトロベンゼンスルホン酸^(TNBS)を pH 8.0 の Pipes 緩衝液中で 0°C, 2時間反応させた後、大過剰のグリシン溶液を加え反応を停止させた。リン脂質を CHCl₃-CH₃OH で抽出し、ケイ酸薄層クロマトグラフィーで展開し、相当するスポットをかきとり、CHCl₃-CH₃OH 中での 400nm の吸収量をもとに、リポソーム表面にあって TNBS と反応した PS または PE 量を算出した。100% 反応させる条件としては、リポソーム溶液に Triton X-100 を最終 1% 加え反応させた。この結果、PS を含むリポソームでは 5~10% のアミノ基が反応し

た。従って、リン脂質量の10%がリポソームの表面に存在するとして、KCl-Urea処理小胞の場合は50%が表面にあるとし、他のリポソームとほぼ等表面リン脂質量になるように、バンド4.1との混合をおこなった。

PS, PEを含まないリポソームは、「結果」に述べるように、いかなる実験系でも有意なバンド4.1との相互作用を認めなかったので表面リン脂質量は測定しなかった。しかし、文献⁴によれば、PCリポソームで、5(42)~8(43)%であるので、上記の10%の値を用いて比較することは不適当でないと考える。

(7) 赤血球膜小胞からのバンド4.1の脱離

¹⁵ 大腸菌B株からフォスファチジルセリンデカルボキシラーゼ(PS-デカルボキシラーゼ)を、KanferとKennedyの方法(44)に従って調製した。この酵素標品は、フォスホリパーゼ活性はないが、数%の界面活性剤(Cutscum)を含んでいた。失活酵素として、90°C 3分、または100

mm NH₂OH Cl pH 7.8 中 37°C, 30 分処理したものを使用した。この酵素は鬼頭誠教授と石永正隆博士の御好意による。赤血球膜小胞と PS デカルボキシラーゼを 5ml の Pipes 緩衝液中に、1.8mg と 55 μ g 混合し、37°C 30 分間酵素を作用させ、40000 x g 30 分の遠心後、膜分画を回収した。また、界面活性剤の効果を検討するため、赤血球膜小胞を Triton X-100 で処理し、同様な方法で膜分画を得た。このような処理をした赤血球膜小胞を、Fairbank らの方法 (45) によって電気泳動した。染色 - 脱色後、各試料中のタンパク質量を、デニシトメーターによる吸光度測定によって検討した。

PS デカルボキシラーゼによって分解された赤血球膜小胞の PS 量を次のように測定した。酵素を作用させた後トリフルオロ酢酸を加え (最終 5%) 酵素を不活化させてから中和した。脂質を抽出し溶媒を気化させ、0°C のアセトンを加えて、界面活性剤を抽出した。2000 x g 10 分の遠心で脂質を沈殿させ、CHCl₃-CH₃OH に溶解後

シカゲル

薄層クロマトグラフィー ($\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH} - 28\% \text{NH}_4\text{OH}$
 $200:120:15$) で展開し、 I_2 発色後 PS, PE に相当す
 る部分を回収し、 $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$ ($2:1$ および $1:2$)、
 $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ ($6:5:1$) の各 1ml で順次抽出し
 5 た。これに 0.15ml の 2,6-ルチジンを加え 0.3ml の フ
 ルオレスカミンのアセトン溶液 (2mg/ml) を加え
 反応させた。この液の蛍光強度 (励起光 390nm
 観測光 475nm) を測定し、各脂質量を算出した。
 この操作を、活性のある酵素、失活させた酵
 10 素、酵素非存在下の場合で行い比較した結果
 PS デカルボキシラーゼによって赤血球膜小胞
 は上記条件下で PS の約 10% が PE に変換された
 ことが明らかになった。

(8) 赤血球膜のスピンラベル法による研究と 15 赤血球の形態観察

12 PC* とコレステロールの混合液 (重量比 1:1)
 を用いて、 10mM Pipes 120mM NaCl, 20mM KCl, 1mM
 MgCl_2 , 1mM EGTA を緩衝液として、(6)-[II] の方法で
 リポソーム小胞 ^(1mg/ml) を調製した。採血後 1~2 日後の
 ヒト赤血球を 10mM Pipes を含む Hank's 液で洗浄

した。赤血球20%懸濁液に、等容の PC^* リポソーム液を加え、 $37^\circ C$ 、3時間、 PC^* による赤血球膜標識をおこなった。この後、 $1000 \times g$ 、10分の遠心操作で洗浄し、リポソームを除いた。この赤血球を $1mg/ml$ の牛血清アルブミン、 $275 \mu g/ml$ の PS デカルボキシラーゼを含むリポソーム液調製用緩衝液に懸濁し、1l の $10mM$ Pipes, $2mM$ $MgCl_2$, $1mM$ EGTA $0.5mM$ DFP, pH 7.4 に対し $40^\circ C$ 、5時間以上透析した。透析後、試料を $37^\circ C$ 、30分処理し酵素を作用させ、
 10 透析に用いたのと同組成の緩衝液で、2度遠心による洗浄をした。この赤血球の ESR スペクトルを $37^\circ C$ で記録した。

赤血球の形態観察を次のように行った。 PC^* 標識しないで、上述の処理をした赤血球を 4% グルタルアルデヒド液 ($50mM$ カコジル酸ナトリウム, pH 7.4 に溶解) で氷中1時間固定し $CaCl_2$ $1mM$ 含む pipes 緩衝液 pH 7.4 で、2度洗浄後、位相差顕微鏡で観察、写真撮影をおこなった。

(9) アクチン・スペクトリン・バンド 41 とリ

ポリ-ム小胞混合物の粘度上昇

アクチンは Spudich らの方法 (46) により、スペクトリンは赤血球膜低張処理抽出液を、限外ろ過器 (アミコン製、XM-50 膜使用) で濃縮後、セファロース CL-4B カラム ($\phi=1$, $l=90\text{cm}$) で精製した。スペクトリン 0.1mg/ml と G-アクトニン 1mg/ml を 120mM KCl , 20mM NaCl , 2mM MgCl_2 , 10mM Pipes pH 7.4 液に混合し、 20°C 30 分間重合させた。100 $\mu\text{g/ml}$ のバンド 41 と $125\text{ }\mu\text{M}$ のベジフルを同上の後衡液に 1mM CaCl_2 または 1mM EGTA を含むものに混合し 20°C 30 分置く。両混合液を更にまぜ^(3:2)、 37°C または 0°C 30 分間、100 μl の使いすて細管ヒポペットに吸入し直立させた状態で保持する。ヒポペットの内径は 2mm である。直径 1mm のステンレス製球をヒポペットの上端から静かにいれ、この球の 45° 傾斜での落下速度を計測した。

(10) PS-PC PE リポリ-ムからのテンポコリンの流出とリポリ-ムの NMR 測定

(6) [I] に従ってテンポコリンを封入した PS-PC-PE (1:1:2) のリポリ-ムを調製した。この

りポリーム液を 0°C において Pipes 緩衝液を用いて $\frac{1}{2}$ に希釈し更に CaCl_2 溶液を最終 5mM 加えた。 0°C 5分後 ESR 試料管に吸入し直ちに 23°C または 37°C にて ESR スペクトルを経時的に記録した。

同様にして、 50mM Pipes, 1mM EGTA, 2mM MgCl_2 , pH 7.4 液にて PS-PC-PE (1:1:2) 250mM (リン脂質として) のりポリーム液 2ml を調製し、更に凍結融解を繰り返しながら 10mM NaOH で pH 7.4 に調製し直径 8mm の試料管に移し、 23°C および 37°C にて日本電子製 FT-NMR 装置において ^{31}P -NMR を 40MHz 、 7° ロトンデカップリングのもと測定した。 $11\mu\text{s}$ の 90° パルスを 0.8 秒間隔で加え、約 3500 回の積算の後日本電子 EC-100 ユンピューターにてデータ処理を行い NMR スペクトルを得た。測定後、試料に 3M CaCl_2 を最終 500mM になるよう加え、再度上記条件で NMR スペクトルを記録した。

(II) その他の方法

(1) タンパク質の定量は牛血清アルブミン液

を標準として、Lowry法(47)によ、ておこなった。TritonX-100を含む試料は、Dulley & Grienerによる改変法(48)で定量した。

[2] リン脂質の抽出はBligh & Dyerの方法(49)で行い、リン脂質量はBartlett⁽⁵⁰⁾法によ、て定量した。

[3] SDS-ポリアクリルアミドゲルを支持体とする電気泳動は、平板法はLaemmliの方法(51)をわずかに改変し、円筒法はFairbanksらの方法(45)によ、ておこなった。

結 果

(1) バンド 4.1 によるリポソームからのテンポコリンの流出

テンポコリン存在下で多重層のリポソームを形成し、遠心操作でリポソームを沈殿させ外液の交換によってリポソーム内にこのスペンラベルを封入できる。図 3a に高濃度 (120 mM) のテンポコリン存在下で調製した PC-PS (1:1) 膜の ESR スペクトルを示した。高濃度のスペンラベル溶液はスピン交換相互作用のため、単位スペンラベル濃度あたりの共鳴信号の高さが低い。これに対し、このスペンラベル溶液が希釈されるとスピン交換相互作用は解消し信号の高さは増大する。テンポコリンの単位濃度あたりの信号の高さの濃度依存性は前田らによって検討されており、 1 mM から 100 mM の範囲で、濃度増加にともなって信号の高さが $\log[\text{濃度}]$ に比例して低下することが示された。⁽⁵²⁾

・図 3a のスペクトルはスピン交換相互作用に

よる幅の広い共鳴線が大部分を占め、それに非常に低濃度の、線幅が狭く線高の高い共鳴線が重っていると考えられる。この試料のESR共鳴線の2重積分値と既知濃度のテンポコリン水溶液のESRの2重積分値を比較し、
5 リポソーム内のテンポコリン濃度として約60 mMという値を得た。このリポソームにTritonX-100を終濃度1%加えたら、ESRの線高は約10~20倍に増大した。これに対し、37°C 20分後に
10 おいても無処理のリポソームのESR線高は約1.1倍に増加したにとどまった。リポソーム内のテンポコリン溶液部分は、膜がテンポコリンを通さない限り、ESRの線高が増大する程
献されないと考えられるから、このような系で
15 のESR線高^{の増大}は膜構造の修飾によってテンポコリンが流出 希釈されることによつてひき
おこされると考えられる。TritonX-100による線高の増大は、膜構造が完全に破壊され、テン
ポコリンが完全に流出した場合に対応すると
考える。

このような高濃度のテンポコリンを封入した PS-PC (1:1) リポソームとバンド 4.1 を混合し ESR を測定したところ、15 分で共鳴線の高さが約 3 倍に増加した (図 3.6)。このことは、
 バンド 4.1 が、PS-PC 膜に作用してテンポコリンを流出させたことを示している。バンド 4.1 のこの作用を種々の PS-PC 比のリポソームで検討した (図 4.5)。テンポコリンの流出は PS 相対濃度が高い程著しく、^{37°C} 15 分後の流出量を、

$$\text{流出量 (\%)} = \frac{\text{バンド 4.1 による線高増大}}{\text{Triton X-100 による線高増大}} \times 100 \quad \text{であら$$

わすと、100% PS で 56%、75% PS で 31%、50% PS で 16%、25% PS で 5.5% あった。このことは、バンド 4.1 が PS に対して作用しリポソームの膜構造を乱すことを示唆している。^{これに対し} 100% PC からの流出は約 0.6% と非常に少なかった。

カルシウムイオンは、PS に結合し相分離をおこすことが知られている (5)。Ca²⁺ をバンド 4.1 - PS-PC 膜に加えると、Ca²⁺ 濃度の増加に伴ってテンポコリンの流出が抑制された (図 5)。この効果は、Ca²⁺ をまえもって PS-PC 膜に加

えてからバンド41を加えるとより顕著であった。図4では、12 mMの CaCl_2 によっておこる程度の抑制効果が2 mMの CaCl_2 と^{リポソームを}15分間 23°C 以前もって混合することで見られた。なお、 Ca^{2+} はPSを含む膜に結合する際にテンポコリンを流出させる⁽⁷⁷⁾。しかし、この現象は Ca^{2+} を加えて一分以内に終了する瞬間的なもので、ESRの線高も約1.1~1.3倍に増加するのみで以後変化しなかったのて上記測定は混合1分後から行なっ^た。

10 このようなバンド41の作用を色々な組成^のに於いて検討した。PSの他にPEを含むPS-PC-PE(1:1:2)リポソームでもバンド41の作用はみられ 37° 、15分で44%が流出した。 Ca^{2+} はこのリポソームでも抑制作用があった。しかし高濃度の Ca^{2+} はそれ自体でテンポコリンが流出しバンド41の効果はみられなかった(図6A)。このバンド41によらない Ca^{2+} の効果は後で検討する。

15 PC-PE(1:1)リポソームにおいてはバンド41によるテンポコリンの流出はみられなかった。

一方、コレステロールを含むPS-PC膜^(図6B)では、

バンド 4.1 によるテンポコリン流出作用がコレステロール含量の増加にともなって低下した。しかし、コレステロールを 50% (モル%) 含む場合でも、有意な流出 (37°C , 15 分で 2.4%) がみられた。またこのバンド 4.1 の作用は、PS のかわりにフオスファチジルグリセロールやフオスファチジリンシトールを含むリポソーム (PC を 50% 含む) でもみられ、それぞれ 13% および 10% のテンポコリンが 37°C , 15 分で流出した。
 Ca^{2+} の効果は、PG でわずかに流出作用が阻害されたが PS のように顕著ではなかった。

(2) バンド 4.1 の PS-PC 膜の相分離に対する効果

バンド 4.1 が PS を含むリポソームからテンポコリンを流出させたことから、このタンパク質が PS を含む膜の状態を変化させることが考えられる。この状態変化を明らかにするため次のような検討を行った。

10% の PS* または PC* を含む PC-PS (1:1) リポソームをバンド 4.1 存在下で調製し、バンド 4.1 なしで調製したリポソームと 23°C および 37°C で ESR

スペクトルを比較したが、両者に有意な差がみられなかった(図7)。これに対し、1%のPS*または5SAL-Meを含むDMPC-PSリポソームをバンド4.1存在下で調製し、ESRスペクトルをとると、5~20°Cの範囲でバンド4.1のない場合に比して最大分離幅の増大と運動性に富む成分の減少がみられた。5°C以下または22°C以上では有意な差がみられなかった。PS-DOPCリポソームでは5°C以上で差がみられなかった。

バンド4.1は相分離状態にある含PSリポソームに作用にして固相成分を増加させることを示唆している(図8)。

(3) 蛍光標識したバンド4.1からのダンシル-PE 蛍光エネルギーの移動

テトラメチルローダミン標識したバンド4.1とダンシル^{2E}を含むリポソーム小胞を混合し、ダンシル基の吸収帯にある350nmで励起すると、おのれを混合しないで別々に測定した場合に比してダンシルの蛍光の減少とテトラメチルローダミンの蛍光の増加がみられた(図9,10)。蛍光標識

バンド4.1の量を一定にしてダンシルPEリポリ
 ーム量を増加させるとそれに併ってテトラ×
 チルローダミンの蛍光も増大した(図10)。この
 ことはダンシルを励起した光エネルギーがロ
 ードミンに移動しローダミンの蛍光を励起し
 たことを示している。蛍光標識していないバ
 ンド4.1を前もってダンシルPEリポリームと混合
 し、後に蛍光標識バンド4.1を加えるとほとん
 どダンシル-PEの蛍光は変化しなかった。こ
 のことから蛍光エネルギー移動はリポリーム
 とタンパク質の単なる衝突ではなく結合を反
 映していると推定できる。これを更に検討した。

蛍光エネルギー移動の速度定数 k_{et} は、エネ
 ルギー供与体をD、受容体をAと略記し、

$$k_{et} = \frac{1}{\tau} (8.79 \times 10^{-5}) \kappa^2 n^{-4} \phi_D J_{DA} R^{-6}$$

$$= \frac{1}{\tau} (R_0/R)^{-6}$$

とあらわせる(53)。ここで、

τ : A非存在下のDの励起状態の寿命

κ : 方向因子

n : 溶媒の屈折率

ϕ_0 : A 非存在下の D の量子収率

R : D-A 間の距離

R_0 : Förster の臨界距離

J_{DA} : D の蛍光と A の吸収の重なり積分 である。

エネルギーの移動効率 E は、

$$E = k_t / (k_t + k_f + \sum k_i) = 1 - I_{DA}/I_D = 1 - \phi_{DA}/\phi_D \doteq 1 - F_{DA}/F_D$$

k_f : 蛍光輻射の速度定数

k_i : 他の過程で基底状態に戻る速度定数

F : 蛍光強度 DA は D-A の共存下をさす。

と、あらわせる (54)。

ダンシルとローダミンでは、 $R_0 = 28-31 \text{ \AA}$ (54)

で、ダンシルの場合 $\tau_D = 15 \sim 20 \times 10^{-9} \text{ sec}$ である。

水中の分子は $D \doteq 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$ で拡散し、 $(R_0/R)^{-6} \doteq 1/2$

でも $k_t \doteq 1/4 \times 10^{-8} (1/\text{sec})$ であるから、 4×10^{-8} 秒間に分

子は平均約 $100 \text{ \AA}$ 移動する。従って、D の近傍で

自由に拡散している A は、この実験系では蛍

光エネルギーの移動をあまりうけない。よっ

てダンシル PE-リポソームからテトラメチルロ

ーダミン標識したバンド 4.1 へのエネルギー移

動は、バンド 4.1 のリポソームへの結合による

と推定できる。表2に、種々のリン脂質組成のりポリームからバンド4.1へのみかけの蛍光エネルギー移動効率 E を、ダンシルの蛍光強度極大付近の強度減少より算出 ($E = 1 - (F/F_0)_{500nm}$) し、まとめた。一定量のりポリームとバンド4.1を混合して得た E は、 λ_{ex} , λ_{em} , λ_c が変化しない限り、バンド4.1の結合量を反映すると推定できる。移動効率 E は、PSを含むりポリームで高く、コレステロールを含む場合でも移動が^{上述のように}おきていた。無標識のバンド4.1を前もって加えると、わずかにエネルギー移動がおきなくなった。このことから、バンド4.1への蛍光エネルギー移動は、りポリームとバンド4.1の単なる衝突ではなく、特異的な結合によると考えられ、上述の推論を支持している。一方、 Ca^{2+} があっても E は低下しなかった。なお、蛍光標識したバンド4.1はテニポコリン流出作用があった。

(4) 放射性同位元素標識したバンド4.1の KCl-Urea 処理小胞およびりポリームへの結合

¹²⁵I 標識したバンド4.1とりポリーム、KCl-Urea 処理小

胞とを混合し、上清の放射活性を測定した。

結合量は次のように定めた。

$$\text{結合量} = (\text{リポソームなしの上清のバンド41}) - (\text{リポソーム存在下の上清のバンド41})$$

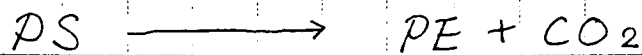
5 図11に結果を示す。結合量はリポソームおよび KCl-Urea^{処理}小胞の表面にあるリン脂質量に対する値とし、リポソームは全脂質の10%、KCl-Urea^{処理}小胞では50%とした。

10 バンド41はこの場合もPSを含むリポソームによく結合し、Ca²⁺の存在下では結合量は低下した。また KCl-Urea^{処理}小胞にもPS-PCリポソームと同程度結合し、限定タンパク質分解によっても結合量はわずかに低下しなかった。なおI標識したバンド41もPSを含むリポソームから15 テンポコリンを流出させた。

(5) 赤血球膜小胞からのバンド41の特異的な脱離

赤血球膜を低張 (~0.5 mM NaPi) 処理して、スペクトリンとアクチンの大部分を除いて得られた小胞をPSデカルボキシラーゼで処理した。

PS デカルボキシラーゼは大腸菌膜から得られ次のような反応を触媒する(44)。



この酵素を小胞に 37°C 、30分作用させ、膜分画を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動シタニパク質を分析した(図12)。酵素の作用により PS は 10% 程減少、バンド 41 も約 10% 減少した。これに対し、失活させた酵素で PS もバンド 41 も減少しなかった。一方、酵素量を増加させると、失活した酵素でもバンド 41 が減少した。試料中には、界面活性剤 Cutscum (Triton X-100 と同等) が含まれているので、低濃度の Triton X-100 で膜小胞を同様の処理をほとんどしその影響を検討した。膜全体を可溶化しない^{低濃度の} Triton X-100 処理によってもバンド 41 のみが可溶化されやすいことが明らかになった(図13) Triton X-100 濃度は、 0.5mg/mg 膜タンパク質という低濃度より低くても十分選択的可溶化効果があった。

また、 Ca^{2+} 存在下で上記の赤血球膜小胞を 37°

C. 30分処理するとバンド41が減少した。(図14) Ca^{2+} 依存性トランスグルタミナーゼの基質阻害剤であるニスタミンを加える(1mM)と Ca^{2+} による¹⁰の効果はみられなかった。

⁵(6) 赤血球の膜リン脂質運動性および細胞形態にたいするPSデカルボキシラーゼの効果
PSデカルボキシラーゼを赤血球と混合し序々に溶血させ、 37°C 30分処理後のESRスペクトルを検討した(図15)。酵素で処理した試料⁴では、最大分離幅が無処理または失活化酵素で48Gであるのに対し、46Gに減少した。

PS-デカルボキシラーゼ処理は赤血球形態にも影響を及ぼした。酵素処理しなかった赤血球ゴーストは、 37°C 30分後には円盤状形態と¹⁵残しながらこぶ状の突起がみられ偏平化した。これに対し、PS-デカルボキシラーゼ処理したものは偏平化したものが少なく、球状形態に近いものがみられた(図16)。

⁴(7) PSを含むリポソームとバンド41によるスペクトリン・アクチン混合液のゲル化

リポソーム小胞とバンド 4.1 の混合液をスペクトロリン・アクチンの共重合体に加え細管に吸入し、30 分後に小鉄球の溶液中での落下速度を計測した(表 3)。PS を含むリポソームでは、
 5 他の場合より著しく落下速度が減少した。このことは、含 PS-リポソーム小胞とバンド 4.1 がスペクトリン・アクチン溶液の粘性を上昇させたことを示している。バンド 4.1 を含まない含 PS-リポソームでは、有意な落下速度の低下は
 10 みられなかった。 Ca^{2+} は、含 PS-リポソームとバンド 4.1 の効果を阻害した。

8) PS-PC-PE リポソームからのテニポコリンの流出とリポソームの構造変化

PS-PC-PE (1:1:2) リポソームにテニポコリン
 15 を封入したものと $CaCl_2$ (終濃度 5 mM) を混合し ESR スペクトルの変化を調べた。23°C では線高がわずかに上昇するのに対し、37°C では線高が急速に増加した(図 17)。これに対し $CaCl_2$ 非存在下では、両温度で差がなかった。この効果はバンド 4.1 の存在とは無関係であっ

た。 Ca^{2+} を加えて 37°C にしたりポリームは、多重層りポリームを大部分沈降できる条件である $5000 \times g$, 10 分の遠心操作では沈降しなくなった。

5 PS-PC-PE (1:1:2) のリポリームの NMR スペクトル (図 18) は、 Ca^{2+} 非存在下では線幅の広い非対称的なスペクトルが得られ (A)、 Ca^{2+} 存在下 23°C (B) でも変化しないのに対し、 37°C では時間の経過とともに線幅の減少とピークの移動がみられ 20 時間後には鋭い対称的なスペクトルが得られた。

リン酸ジエステルの 31P の化学シフトテンソル σ には異方性があることが知られている。従って分子運動が限られた方向でのみ平均化されれば、 σ の異方性も平均化のされかたが異なる。よって NMR 線形の解釈によつてリポリームの構造が^{推定}入できる (55)。図 18 A, B は、リン脂質が長軸 (膜面に垂直) 方向^{のまわり}入でのみ速い運動すると仮定したモデルスペクトル (55, 56) に良く似ており、E は等方的平均化がおきてい

ることを示している。従って A, B ではリポソームは二分子層構造をとっていると思われる。E はリン脂質が単分子で分散しているとは考えられないので、等方的な恐らくは小胞状の構造をとっていると推定できる。C, D は B および E の中間体または B および E の混合物の NMR スペクトルであると考えられることができる。

以上の結果から、PS-PC-PE (1:1:2) リポソームは、 Ca^{2+} 存在下で温度依存性の膜透過性の急激な上昇がおき、二分子層構造から小胞状構造に変化していくことが示唆されると考える。

考 察

11) バンド41のPSを含むリポソームへの結合
バンド41はPSを含む膜に対して高い親和性
を示した。¹²⁵I標識バンド41によるリポソーム
への結合量の測定結果はこのことを示し、PS
を含むリポソームからのテニポコリンの流出
や、蛍光標識脂質を含むリポソームから蛍光
標識バンド41へのエネルギー移動効率の比較
結果も、このことを支持している。

バンド41によるリポソーム内に封入したテ
ニポコリンの流出は、酸性リン脂質である、
PGやPIを含むリポソームでもみられた。この
ことから、バンド41の膜への結合は、脂質の
イオンの性質が関与する可能性がある。負に
荷電した膜面には、溶液中の正荷電粒子が、静
電的引力によって濃縮もしくは吸着すること
が知られている。従って、バンド41分子表面
に正に荷電した部分が集中すれば、バンド41
は負に荷電した膜に吸着するであろう。一方

リニ脂質膜では、酸性リン脂質間で静電的な反発があり、極性の高い残基は水和水を持つので、膜面での極性基の配置が疎になり、すきまが多くなる。バンド41はこのようなすきまの多い部分に選択的に結合する可能性がある。しかし、この両者の可能性を区別して詳細に検討することはできなかった。

バンド41によるリポソームの透過性上昇作用は、PS含量の多い程、顕著であった。また、バンド41は、熱的相分離状態にあるDMPC-PSの固相部分を増加させた。これに対し、バンド41には、 Ca^{2+} でみられる均一な液晶相から固相のPS相を形成させる相分離誘導作用は、みられなかった。以上の結果から、バンド41は、PSがある程度集まった部分に結合して、膜透過性を上昇させると推定できる。

Ca^{2+} は、バンド41の含PSリポソームへの結合においても、透過性上昇作用においても、阻害的に作用した。これは、 Ca^{2+} がPSに結合し集合体を作る相分離のためと考える。PS-PCリポ

ソームへの透過性上昇作用は、 Ca^{2+} 濃度が高い
ほど阻害され、 $2mM$ の Ca^{2+} でも、バンド4.1を
加える10~30分前にリポソームに加えると $12mM$
の Ca^{2+} を同時に混合した場合と同様に阻害した
ことが、この考えを支持する。よって、 Ca^{2+} の
阻害効果は、 Ca^{2+} が直接バンド4.1に作用する可
能性が完全には否定できぬものの、バンド4.1
と Ca^{2+} がPSへ拮抗的に結合することによると考
えられる。

バンド4.1と含PSリポソームの混合物は、ス
ペクトリン、アクチン共重合体溶液の粘度を
上昇させた。バンド4.1は、単独でスペクトリ
ン、アクチン溶液の粘度を上昇させる(31)が、
リポソーム共存下の粘度上昇作用は著しい。

バンド4.1はスペクトリンに結合する(23)ので、
アクチンと結合したスペクトリンがバンド4.1
に結合し、そのバンド4.1がリポソームと結合
して、網目状構造を形成するために、粘度が
上昇すると考える。このときのバンド4.1のリ
ポソームへの結合は、バンド4.1とスペクトリ

ンが結合しても、阻害されないのであろう。

Ca^{2+} は、この粘度上昇作用においても、阻害効果があった。バンド41とスペクトリン・アクチンは会合体を形成し、アクチン・スペクトリン溶液の粘度を上昇させる(57,58)が、 Ca^{2+} は、このようなりポリームを含まない場合でも阻害効果がある(58)。りポリームを含む場合の Ca^{2+} の効果は、タニパク質間相互作用とバンド41とPSの結合の両方に影響を及ぼすと考えられる。

このように、バンド41はPSを含むりポリームに結合し、 Ca^{2+} がそれを阻害すると推定できる。しかし、バンド41の結合を反映すると思われる蛍光エネルギー移動の測定では、 Ca^{2+} の効果はみられなかった。 Ca^{2+} はPSの水和水を遊離させる効果がある(59)ため、膜面は Ca^{2+} の結合によって疎水的になる。このため、膜面のダニシルPEの量子収率の上昇がみられたり、エネルギー移動の要因として重要な方向因子 k (移動効率は k に比例する。)が変化する

可能性がある。従って、 Ca^{2+} 存在下のPSを含むリポソームを、他の組成のリポソームの場合と比較することは、不適切なのかも知れない。

また、蛍光標識したため、 Ca^{2+} が存在してもバンド4.1がPSを含む膜に結合するようになった可能性もある。

(2) バンド4.1の赤血球膜への結合

バンド4.1は、KCl-Urea処理した赤血球膜に結合した。KCl-Urea処理小胞は、赤血球膜の裏側が外側をむいている裏返し小胞であり、スペクトリン・アクチンの大部分とバンド4.1, 4.2アンキリンもほとんど欠いている。従って、バンド4.1がスペクトリンのみに結合するのなら、この小胞には、ほとんど結合しないことになる。Tyler⁽⁶⁰⁾は、バンド4.1を結合したスペクトリンが、アンキリンを欠いた赤血球膜小胞に結合することを報告している。これも、バンド4.1がスペクトリン以外の部位に結合することを示唆している。

赤血球膜を低張処理して、スペクトリン・

アクチンの大部分を除いた試料も、裏返し小胞である。この小胞をPSデカルボキシラーゼで処理すると、PS含量が低下し、他のタンパク質量が変化しないのに、バンド41の結合量が低下した。また、バンド41の可溶化は低濃度のTriton X-100でもおきた。¹²⁵I標識バンド41のKCl-Urea処理小胞への結合は、小胞をセミアルカリプロテアーゼで処理しても、あまり低下しなかった。PSは赤血球膜裏側の脂質の約25%を占めるが、25% PSを含むリポソームからバンド41によってテニポコリンは流出した。これらの結果から、バンド41は、裏返し小胞においては脂質であるPSに結合している可能性が高いと考える。

(3) PSデカルボキシラーゼの赤血球膜への作用

赤血球を、透析等の穏やかな条件でタンパク質と共存させながら低温で溶血させ、温度を上昇して再封させることによって、内部にタンパク質を封入できる。この方法でPSデカ

ルボキシラーゼを赤血球内に入れ、作用させると、リン脂質スピニ標識である PC^* によって検討した膜リン脂質運動性(流動性)が上昇し、赤血球形態も変化した。このことは、膜裏側の PS が、赤血球膜の流動性および細胞形態に関与することを示唆する。同様の流動性、形態変化は、 SH 基修飾試薬である N -エチルマレイミド(20)、アクチンに作用すると考えられるヘビーメロミオシン(60)、 DNA アーゼI(61)処理によってもおきる。 PS デカルボキシラーゼの作用による赤血球膜の状態変化は、 PS の減少によってバンド4.1の存在状態が影響を受けたために、流動性や形態変化がもたらされたと推定できる。しかし、単に、 PS が PE へ変換した(PE は後述するように膜構造不安定化の要因になり得る)こと自体が、要因なのかも知れない。

(4) バンド4.1の赤血球膜への結合と Ca^{2+} の赤血球への作用

以上に述べた結果と考察より、筆者は、バ

ンド41はスペクトリンとPSに結合し(更にア
 クチンと弱い結合をえる可能性が高い)、赤
 血球膜では、スペクトリン・アクチン・バン
 ド41の結合体が、スペクトリンがアンキリン
 5に、バンド41がPSに結合することで、膜本体
 の脂質二分子層に結合していると考ええる。赤
 血球膜では、このようにして、スペクトリン、
 アクチン、バンド41が裏側を網目のように覆
 い、膜の骨格のように補強していると考え
 10のである。バンド41を介しての、この骨格的
 構造の結合は、スペクトリンとアンキリンの
 結合より弱く、 Ca^{2+} などによって容易に修飾を
 受けるのであろう。また、バンド41の含PSリ
 ポリームの透過性上昇作用から示唆されるよ
 15うに、バンド41の結合は、赤血球膜の透過性の
 変化などの機能的に重要な役割に関与してい
 る可能性がある。

赤血球は、ATPを消費して、 Ca^{2+} ポンプの
 作用により、細胞内の Ca^{2+} 濃度を $10^{-6}M$ 以下に維
 持している(63.64)。イオノホアA23187等を用い

て赤血球内の Ca^{2+} 濃度を上昇させると、赤血球は外胞突出し、膜の流動性も上昇する(65)。
 Ca^{2+} がバンド 4.1 の PS への結合を阻害したことは、このような赤血球に対する Ca^{2+} の作用と、関係していると思われる。

ここで、 Ca^{2+} の赤血球膜脂質層への作用を検討したい。赤血球膜の裏側の脂質組成は、およそ、 $\text{PE}:\text{PS}:\text{PC}:\text{Sph} = 47:28:15:10$ である(9)。
 Sph の極性基はコリンであり、極性基の種類を考慮すると、 $\text{PS}:\text{PC}:\text{PE} = 1:1:2$ の膜は、赤血球裏側と良く似た脂質組成をしている。この組成の膜は、 10^6 M 以上の Ca^{2+} で完全に相分離をおこし PS-Ca^{2+} 層と PC-PE 層に分かれる(66)。PE は、卵黄から調製した試料では、加温していくと 30°C 付近に熱吸収があり、 30°C 以上で二分子層構造をとらない(67,68)。この研究に用いた試料も、 30°C 付近に熱吸収があった(66)。従って、先に示した PS-PC-PE 膜からの Ca^{2+} による温度依存性のテニポコリンの流出と NMR スペクトルの変化は、 Ca^{2+} による相分離によって PE-PC が形

成されて温度依存性の構造変化が PE-PC 層にお
こることによると考える。Hope と Cullis は、赤
血球膜外側と内側の脂質組成のリポソームを
 Ca^{2+} 存在下で調製し、 $^3\text{P-NMR}$ によってリポソ
ームの構造を検討した(69)。その結果、 Ca^{2+} 存
在下でも外側の脂質組成のものでは構造変化
を起ささないが、内側の組成のものは構造変
化をおこすことが示された。以上のことを考
えれば、赤血球内に Ca^{2+} を導入すれば、バンド
4.1-PS 間の結合が阻害されるとともに、赤血
球膜脂質層は小胞化に至らないにせよ不安定
化すると推定できる。

先に述べた、バンド 4.1 とスペクトリン・ア
クチンの粘性の高い構造が、 Ca^{2+} で変化し粘性
の低下がおこること(58)を考えると、赤血球
膜の骨格的構造自体も Ca^{2+} で変化すると考えら
れる。従って、 Ca^{2+} は、赤血球膜裏側の様々な
部分に作用し、膜構造の変化をひきおこすの
であらう。

赤血球を Ca^{2+} と A23187 で処理し、5 分以内に

EGTA等で Ca^{2+} を除き、更にグルコースとイノシン存在下で $37^{\circ}C$ 、60分処理すると、形態や膜流動性は回復する^(65,78)。しかし、長時間の Ca^{2+} 処理では回復しなくなる。赤血球内には、 Ca^{2+} 依存性のトランスグルタミナーゼやタンパク質分解酵素が存在し、 Ca^{2+} の導入によってバンド4.1が消失していくことが知られている^(70,71)。スペクトリンを脱離した裏返し小胞を低濃度の Ca^{2+} で処理すると、バンド4.1が消失し、システアミンを共存させると^{その}消失が抑制された。赤血球膜への Ca^{2+} の作用は、 Ca^{2+} が直接膜構造に作用するものと、 Ca^{2+} によって酵素が活性化され膜構造を修飾するものの、二様の経路があると考えられる。 Ca^{2+} による回復可能な変化誘導は、 Ca^{2+} の膜構造への直接的作用によると考えられ、グルコースやイノシンは赤血球内でのATP形成に関与し、 Ca^{2+} ポンプの作用が、回復に関与すると考える。一方、回復不可能な変化は、酵素作用によるバンド4.1等の消失が原因であろう。バンド4.1は、 Ca^{2+} による二様の作用に感

受性が高く、膜構造維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

結 語

ヒト赤血球膜の裏側で骨格状構造を形成しているタンパク質の一つであるバンド4.1は、
5 スペクトリン等の他のタンパク質がよく研究されているのに対し、機能的な面に注目した研究が少なかった。このため、スペクトリン、
アクチン、バンド4.1の膜への結合の仕方も、
アンギリンとスペクトリンとの結合が提起さ
4 10 れ受け入れられているのに対し、スペクトリンの
もう一端でのアクチンとバンド4.1が結合している部分の状態は不明であった。

本研究で、バンド4.1がPSに対して高い親和性を示し、 Ca^{2+} がその結合に対して阻害的であることを見出したことは、赤血球膜構造の
15 解明に寄与するものと思われる。すなわち、
上記知見に基づいて、赤血球膜の骨格的構造が、
膜本体である脂質二分子層にタンパク質-脂
質間相互作用によって結合していることが推
定でき、いくつかの知見は、この考察を支持

した。この膜裏側でのタンパク質-脂質間相互作用による膜構造の維持機構は、他の細胞の膜においても存在している可能性があることを指摘したい。

5 また、本論文では、赤血球膜構造に対する Ca^{2+} の役割を議論した。バンド41は、赤血球内に導入された Ca^{2+} によって、様々な影響を受けると推定できることは興味い。 Ca^{2+} は様々な生理的調節作用に関与するイオンである。細胞
10 内の微小繊維や微小管を形成するタンパク質も非常に多くのものが Ca^{2+} に感受性を持っている(22, 73, 74)。形質膜の細胞質側のタンパク質は、上記の繊維状構造のタンパク質と良く似ている。従って、細胞質の繊維状構造をなすタン
15 パク質と、膜構造をなすタンパク質とを脂質との相互作用、 Ca^{2+} の影響などの観点から研究することは興味深い課題である。

赤血球膜タンパク質に関する研究は、研究材料が赤血球から離れ、興味深い方向へも進展している。スペクトリンと結合するタンパ

ク質であるアニキリンは、微小管結合タンパク質(MAP)と抗原性においても機能的^{特徴}においても良く似ていることが明らかになった(75)。

このことは、細胞の核をとりまく微小管構造と形質膜との機能的、構造的関係を検討する

うえで興味深い。また、スペクトリンと良く似たタンパク質が、脳において見い出された

(76)。赤血球膜を形成するタンパク質が他の細胞でも見い出されたことは、赤血球膜で研

究された分子構築機構が他の細胞の膜においても存在する可能性を示している。従って、

赤血球と他の細胞との比較によって、膜構造の共通点、特殊点とその意義が検討され、形

質膜構造の理解を助けるであろう。

細胞の分子構築とその動態の研究は、多くの課題を前にしてまだ端的初めかも知れないが、赤血球膜で明らかにされた知見が、研究の進展の基礎となることを期したい。

謝 辞

本研究を進めるにあたって、大西俊一教授の御指導に深く感謝致します。教授の御指導による研究室諸氏の研究成果は、研究をすすめる、まとめるのに際し、刺激となり、また励みにもなりました。京都大学食糧化学研究所の鬼頭誠教授、石永正隆助手（当時、現広島女子大学家政学部助教授）は、私の研究に関心をよせられ、試料を提供し激励して下さいました。心より感謝致します。佐治博夫部長をはじめとして、日本赤十字京都支社血液センターには、研究上の討論に応じていただき、あわせてヒト赤血球を譲渡していただきました。深く感謝致します。伊藤忠直助手、小橋宏司博士の試薬の供与も、本研究の推進に不可欠でした。感謝致します。

1. Cell Surface Review ed. by Poste, G and Nicolson, G. L.
North-Holland pub. Co. 1978-
vol. 1 The cell surface in animal embryogenesis and development
vol. 2 Virus infection and cell surface.
vol. 3 Dynamic aspect of cell surface organization
vol. 4 The synthesis, assembly and turnover of cell surface components.
2. Chapman, D. (1968) in Biological membrane (ed. by Chapman, D.)
pp125-202 Academic press, London
3. Rank, J. L., Mateu, L., Sadler, D. M., Tardieu, A., Gluik-Krywicky, T. and
Luzzati, V. (1974) J. Mol. Biol. 85 249-277
4. Shimishick, E. J. and McConnell, H. M. (1973) Biochemistry 12 2351-
2360 (1981)
5. Ohnishi, S. and Tokutomi, S. in Biological Magnetic Resonance Vol. 3
(ed. by Berliner, L. J. and Reuben, J.) pp121-153 Plenum publishing
corp. New York
6. Devaux, P. and McConnell, H. M. (1972) J. Am. Chem. Soc. 94 4475-4481
7. Frye, L. D. and Edidin, M. (1970) J. Cell. Sci. 7 319-333
8. Taylor, R. B., Duffus, W. P. H., Raff, M. C. and de Petris, S. (1973-)
Nature New Biol. 233 225-229
9. Zwaal, R. F. A., Roelfsen, B. and Colley, C. M. (1973) Biochim. Biophys.
Acta 300 159-182
10. Steck, T. L. (1974) J. Cell Biol. 62 1-15
11. Edelman, G. M., Yahara-I. and Wang, J. L. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 70 1442-1446 (1976)
12. Stossel, T. P., Hartwig, J. H. in Cell Mortality, Book B (ed. by Coldman, R.,
Pollard, T. and Rosenbaum, J.) pp529-544
13. Griffin, E. M. Jr., Griffin, J. A. and Silverstein, S. C. (1976) J. Exp. Med.
144 788-809
14. Yu, J., Fishman, D. A. and Steck, T. L. (1973) J. Supramol. struct. 1 233-248
15. Yü, J. and Branton, D. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 3891-3895
16. Grant C. W. M. and McConnell (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 4653-
4657

17. Elgsaeter, A. and Branton, D. (1974) J. Cell. Biol. 63 1018-1030
18. Elgsaeter, A., Shotton, D.M. and Branton, D. (1976) Biochim. Biophys. Acta 426 101-122
19. Steck, T.L. (1974) in Methods in Membrane Biology vol. 2 (ed. by Korn, E.) pp245-281.
20. Tanaka, K. and Ohnishi S. (1976) Biochim. Biophys. Acta 426 218-231
21. Branton, D., Cohen, C.M. and Tyler, J.M. (1981) Cell 24 24-32
22. Bennett, V. and Stenbuck, P. J. (1979) Nature 280 468-473
23. Tyler, J.M., Reinhardt, B.N. and Branton D. (1980) J. Biol. Chem. 255 7034-7039
24. Cohen, C.M., Tyler J.M. and Branton, D. (1980) Cell 21 875-883
25. Bennett, V. and Stenbuck, P. J. (1980) J. Biol. Chem. 255 6424-6432
26. Hargreaves, W.R., Giedd, K.V., Verkleij, A. and Branton, D. (1980) 255 11965-11972
27. Nigg, F. and Cherry, R. J. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 4702-4706
28. Sakaki, T. Tsuji, A. and Ohnishi, S. (1982) Biochemistry 21 2366-2372
29. Sheetz, M. P., Schindler, M. and Koppel, D. E. (1980) Nature 285 510-512
30. Chang C-H., Takeuchi, H., Ito, T., Machida, K. and Ohnishi, S. (1981) J. Biochem. 90 997-1004
31. Cohen C.M. and Foley, S.F. (1980) J. Cell. Biol. 86 694-698
32. Fraker P. J. and Speck Jr, J. C. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80 849-857
33. Singleton W.S. Gray M.S., Brown, M. L. and White, J. L. (1965) J. Am. Oil Chem. Soc. 42 53-56
34. Sanders H. (1967) Biochim. Biophys. Acta 144 485-487
35. Trevelyan W.E. (1966) J. Lipid Res. 7 445-447
36. Comfurius, R. and Zwaal, R.F.A. (1977) Biochim. Biophys. Acta 488 36-42
37. Humphries, G.M.K. and McConnell H.M. (1979) J. Immunol. 122 121-126
38. Waggoner A.S. and Stryer, L. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67 579-589
39. Hubbell W. L. and McConnell H. M. (1971) J. Am. Chem. Soc. 93 314-326
40. Waggoner, A.S., Kingzett, T. J. Rottshaefer, S., Griffith, O. H. and Keith A. D. (1969) Chem. Phys. Lipids. 3 245-253

41. Kornberg R.D. and McConnell (1971) Biochemistry 10 1111-1120
42. Bangham A.D., deGier J. and Greville, G.D. (1967) Chem. Phys. Lipids 1 225-246
43. Schwartz M.A. and McConnell, H.M. (1978) Biochemistry 17 837-840
44. Kanfer, J. and Kennedy E. (1964) J. Biol. Chem. 239 1720-1726
45. Fairbanks, G., Steck T.L. and Wallach, D.F.H. (1971) Biochemistry 10 2606-2617
46. Spudich, J.A. and Watt, S. (1971) J. Biol. Chem. 246 4866-4871
47. Lowry, O.H., Rosebrough, G.H., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193 265-275
48. Dulley, J.R. and Grieve, P.A. (1975) Anal. Biochem. 64 136-141
49. Bligh E.G. and Dyer, W.J. (1959) Can. J. Biol. Physiol. 31 911-917
50. Bartlett, G.R. (1959) J. Biol. Chem. 234 466-468
51. Laemmli U.K. (1970) Nature 227 680-685
52. Maeda, T., Kuroda K., Toyama, S. and Ohnishi, S. (1981) Biochemistry 20 5340-5345
53. Förster, T. (1975) in Modern Quantum Chemistry (ed. by Sinanoglu O.), part III, pp93-137 Academic press, New York
54. Fairclough, R.H. and Cantor, C.R. (1978) in Methods in Enzymology XLVIII "Enzyme structure part F." (ed. by Timasheff, H.) pp347-379. Academic press New York.
55. Seelig J. (1978) Biochim. Biophys. Acta 515 105-140
56. Cullis P.R. and deKrui ff, B. Biochim. Biophys. Acta 559 399-420
57. Ungewickell E., Bennett, P.M., Calvert, R., Ohanian V. and Gratzner, W.B. (1979) Nature, 280 811-814
58. Fowler, V. and Taylor, D.L. (1980) J. Cell. Biol. 85 361-376
59. Hauser, H., Finer, E.G. and Darke, A. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 76 267-274
60. Tyler, J.M., Hargreaves, W.R. and Branton, D. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 5192-5196
61. 田中賢一 (1977) 生物物理 17 29-35
62. 佐藤 智 (1979) 修士学位論文

63. Schatzman, H. J. (1973) J. Physiol. 235 551-569

64. Larsen, F. L., Katz, S., Roufogalis, B. D. and Brooks, D. E. (1981) Nature 294 667-668

65. 山田 訓 (1981) 修士学位論文

66. Tokutomi, S., Lew, R. and Ohnishi, S. (1981) Biochim. Biophys. Acta 643 276-282

67. Cullis, R. P. and deKruiff, B. (1978) Biochim. Biophys. Acta 513 31-42

68. Mantsch, H. H., Martin, A. and Cameron, D. G. (1981) Biochemistry 20 3138-3145

69. Hope, M. J. and Cullis, P. R. (1979) FEBS Lett. 107 323-326

70. Triplett, R. B., Wingate, J. M. and Carraway, K. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49 1014-1020

71. King, L. E. Jr. and Morrison, M. (1977) Biochim. Biophys. Acta 471 162-168

72. Weed, A. (1982) Nature 296 811-816

73. Schliwa, M. (1981) Cell 25 587-590

74. 垣内史朗 (1981) 生化学 53 1267-1289

75. Bennett, V. and Davis, J. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 7550-7554

76. Bennett, V., Davis, J. and Fowler, W. (1982) Nature 299 126-131

77. 楠見明弘 (1977) 修士学位論文

78. Palek, J., Liu, P. A. and Liu, S. C. (1978) Nature 274 505-507

表1 赤血球膜の組成*

タンパク質 49.2 % ——— A

脂質 43.6

{ リン脂質 32.5 ——— B

{ コレステロール 11.1

5 糖質 糖タンパク質分 6.7

糖脂質分 0.5

A. 赤血球膜のタンパク質(主なもの)

名称	分子量	1赤血球あたりの分子数	分布
スペクトリン { バンド1 ***	240,000	200,000	裏 ^o
{ バンド2	220,000	200,000	裏 ^o
アンキリン バンド2.1	200,000	100,000	裏 ^o
バンド3	93,000	1,200,000	内在
バンド4.1	82,000	200,000	裏 ^o
バンド4.2	76,000		裏
バンド4.9	48,000		"
アクチン バンド5	43,000	500,000	" ^o
バンド6	35,000		"
バンド7	28,000		"
アセチルコリンエステラーゼ			表
グリコホリン PAS-1 ***	62,000		内在
PAS-2	31,000	~600,000	"

B 赤血球膜のリン脂質

名称(略語)	量比	表側に占める量**	裏側に占める量**
PC	34.7	76	15
PE	28.0	20	47
Sph	20.1	8.2	10
PS	14.3		28
PA	2.2		

*重量パーセント **モルパーセント ***Fairbanksらの命名.(45)

o「殻」を形成するタンパク質

表 2 ダンシル-PE リポソーム小胞から テトラメチルローダミン
標識 バンド 4.1 への 蛍光 移動 効率.

	リン脂質組成	エネルギー移動効率 (%)	
		-Ca ²⁺	+Ca ²⁺
I	PC	12	12
	PS-PC (5:4)	31	33
	PS-PE-PC (5:10:3)	27	31
II	PC-コレステロール (1:1)	7	4
	PS-PC-コレステロール (1:1:2)	19	23
	PE-PC-コレステロール	14	11
III	無標識バンド 4.1 で前処理		
	PC	3	—
	PS-PC (1:1)	4	—

。エネルギー移動効率は 500 nm において テトラメチルローダミン 標識 バンド 4.1 の 存在下 および 非存在下 での 蛍光強度 を それぞれ F , F_0 とし
 $1 - F/F_0$ として 表示した。

。I では 蛍光標識 バンド 4.1 $1.1 \mu\text{M}$, 10% ダンシル PE-リポソーム $430 \mu\text{M}$
II, III では 蛍光標識 バンド 4.1 $0.4 \mu\text{M}$, ダンシル PE-リポソーム $11 \mu\text{M}$ と
混合した。III では 無標識 バンド 4.1 を $0.4 \mu\text{M}$ ダンシル PE リポソーム
と前もって混合した。 +Ca²⁺: CaCl₂ 2 mM 存在下

表 3 スペクトリン・アクチン共重合体中の鉄球
落下速度に対するバンド4.1-リボソーム小胞の効果。

リン脂質組成	2cm ^{a)} または8cm を落下するのに 要する時間(秒)			
	0°C		37°C	
	-Ca ²⁺	+Ca ²⁺	-Ca ²⁺	+Ca ²⁺
PC-PS (1:1)	500 ^{a)}	300 ^{a)}	500 ^{a)}	116
PE-PC	214	103	—	94
PC-Sph	80	100	93	99
リボソームなし	151	121	—	205

バンド4.1 100 µg/ml, 超音波処理リボソーム小胞 125 µM

溶液を 23°C ± 2mM CaCl₂ でおいた後, スペクトリン

アクチン溶液と混合し, 細管に吸入した。内径1mmの

鉄球の 2cm または 8cm ^{と落下} する時間を測定した。

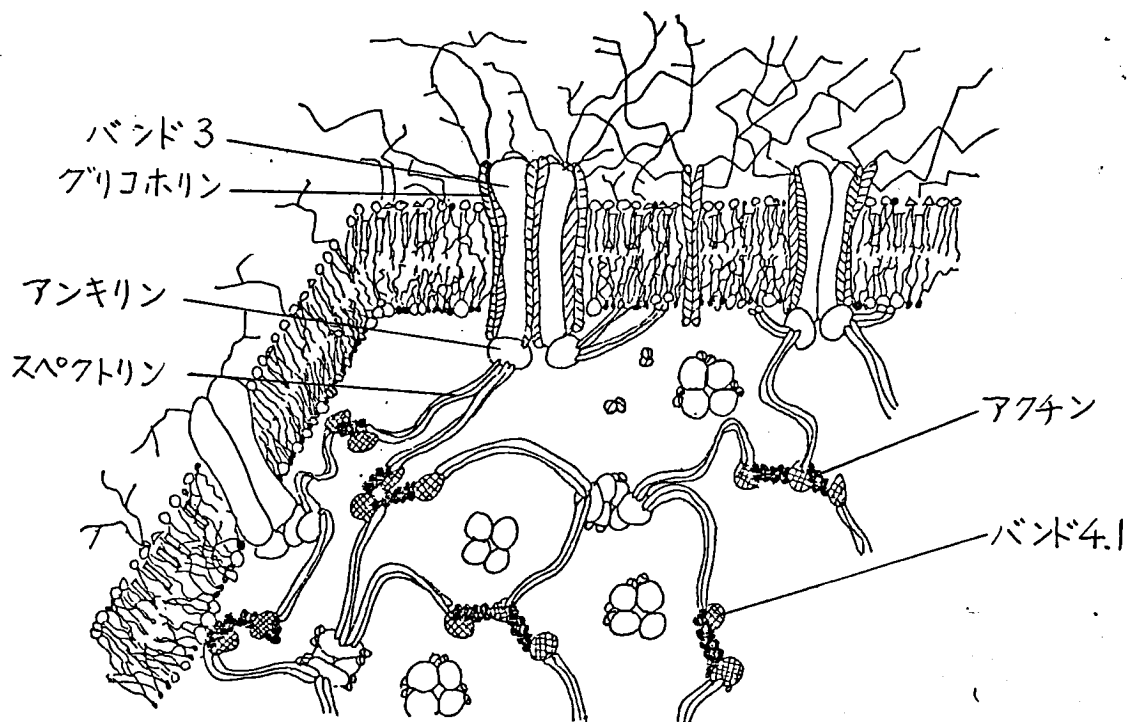


図1. 赤血球膜裏側の骨格的構造の模式図

スペクトリンは、バンド(1+2)の二量体で、細長い柔軟な分子である。

スペクトリン2個が1個のアンキリンに結合している。バンド3は

4量体で存在していると推定し、4量体あたり2個のアンキリンが

結合しているとした。バンド4.1とアクチンは、スペクトリンとア

ンキリン結合部の反対側で、結合している。

Lux, S. (1979) *Nature* 281 426 を参考にした。

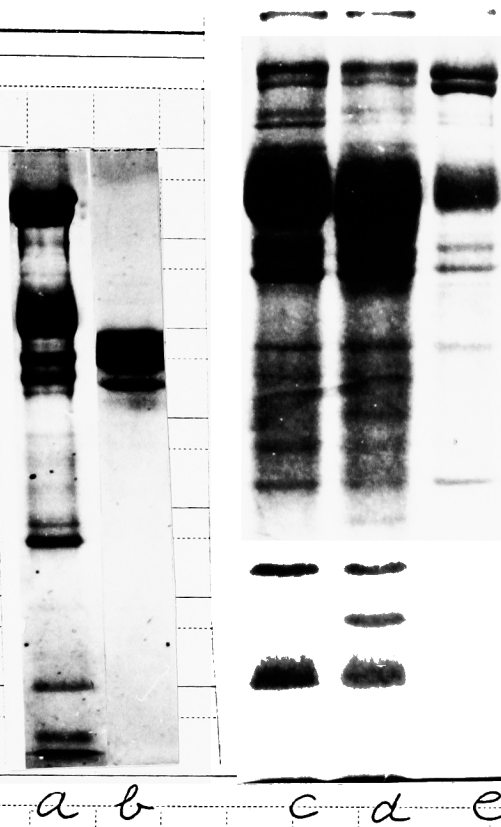


図 2 調製したバンド 4.1 (b), KCl-Urea小胞 (c)

セミアルカリプロテアーゼ処理した KCl-Urea小胞 (d)

a, e は赤血球膜 (ゴースト)。

SDS-ポリアクリルアミド (10.5%) ゲル電気泳動

を Laemmli (51) の方法を改変して行った。

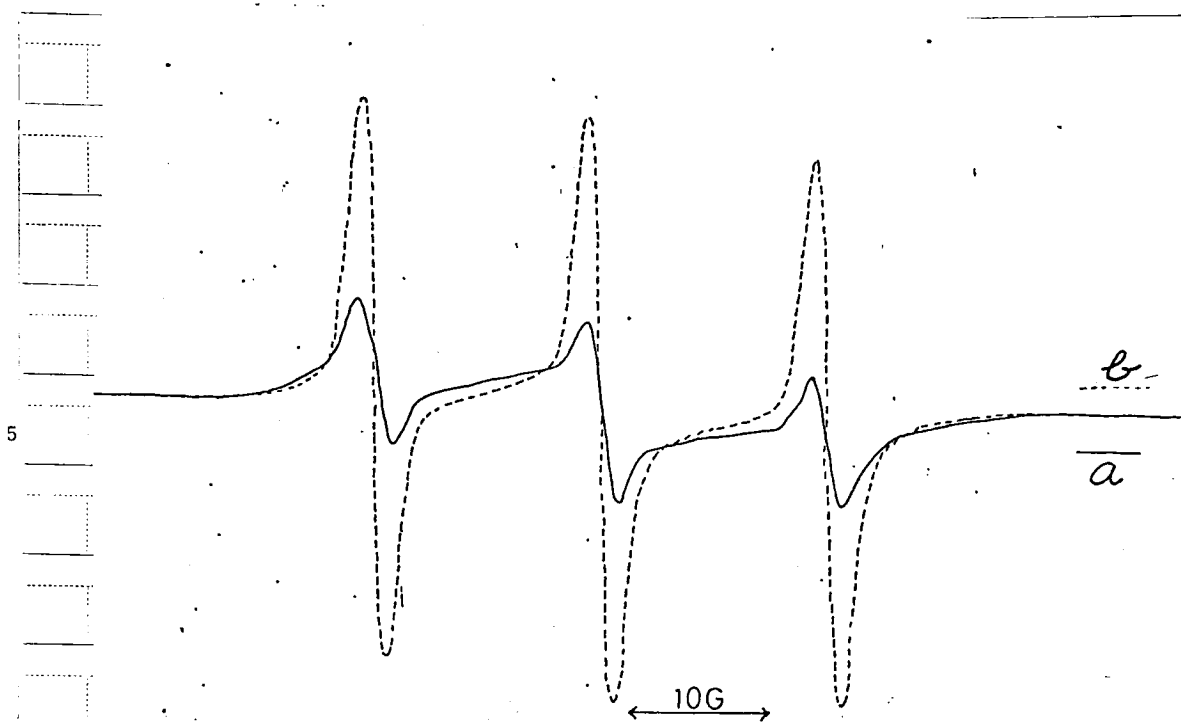


図 3 テンポコリンを封入したPS-PC (1:1) リポソーム
のバンド4.1によるESRスペクトル変化

a) 1mM リポソーム 37°C, 1分後のESRスペクトル
スペクトルは以後もわずかに変化しなかった。

b) 1mM リポソーム と 120 $\mu\text{g/ml}$ ($\sim 1.5 \mu\text{M}$) バンド4.1
共存下のESRスペクトル (37°C, 15分後)

緩衝液; 5mM Pipes 90mM KCl, 30mM コリン7クロリド
20mM NaCl, 2mM MgCl_2 , 1mM EGTA
pH 7.4.

混合温度 4°C, 測定温度 37°C

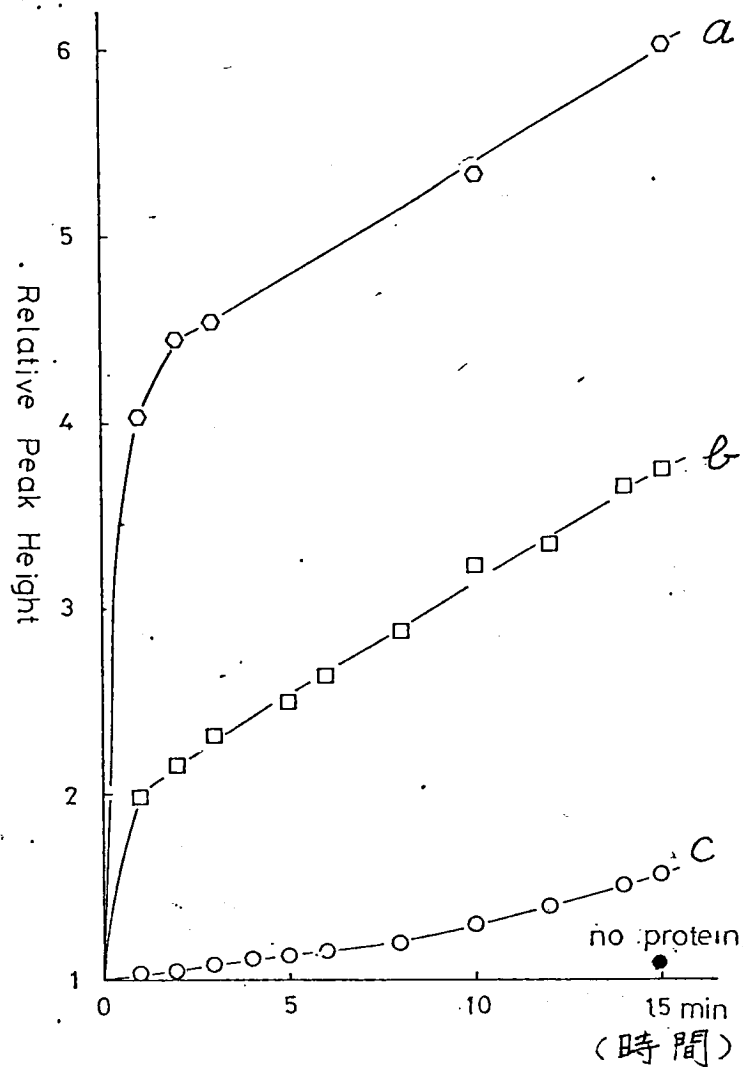


図 4. PS含量の異なるリポソームからのテンポコリンの流出にともなう ESR スペクトル線高の変化.

図 2 と同様の実験条件で、PS 含量 100% (a) 75% (b) 25% (c) の、リポソームからのバンド 4.1 によるテンポコリンの流出に^{ともなう}線高の増大を示す。各リポソームについて Triton X-100 で膜を破壊したときの線高を 1.0 と比較した。● はバンド 4.1 が存在しない場合の 15 分後の線高。
PS-PC リポソームでの実験

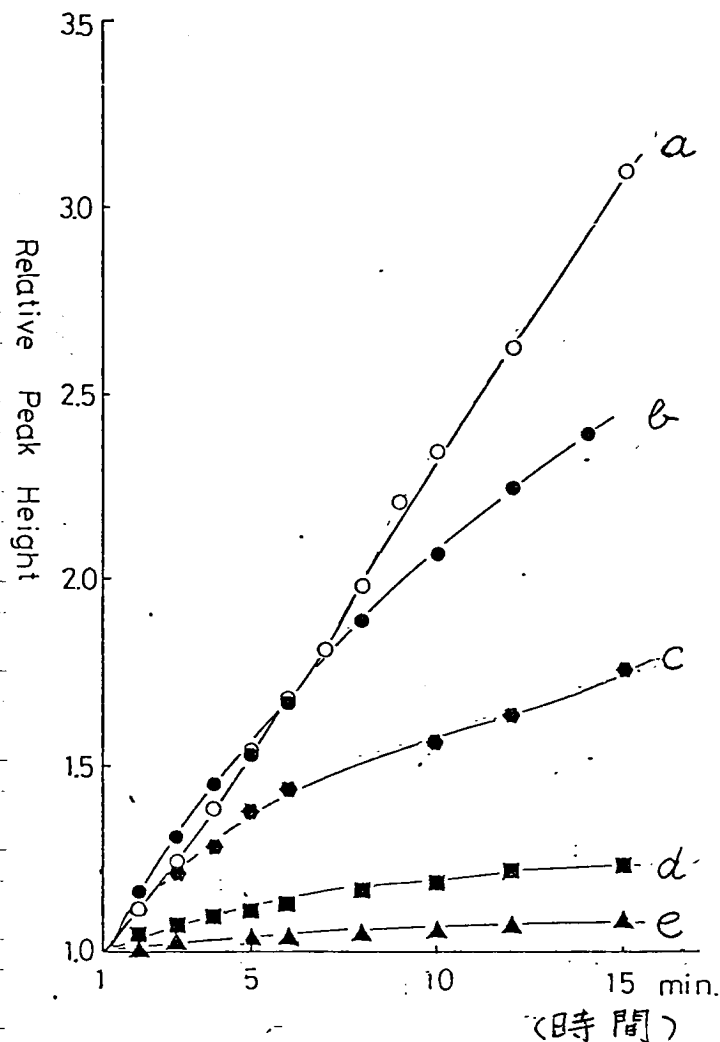


図 5 バンド 4.1 による PS-PC 膜からのテンポグリン
流出効果のカルシウムによる阻害

図 2 と同様の条件で PS-PC (1:1) とバンド 4.1 を
混合した。混合時にそれぞれ 0 (a), 2.0 (b), 4.5 (c)
6.8 (d), 12 mM (e) になるよう CaCl_2 を加えた。

CaCl_2 自体が テンポグリン を流出させ 線高が 1.1 ~ 1.3 倍
になるが、この上昇 4 分以内に終了したので、1 分後の線
高と比較した。

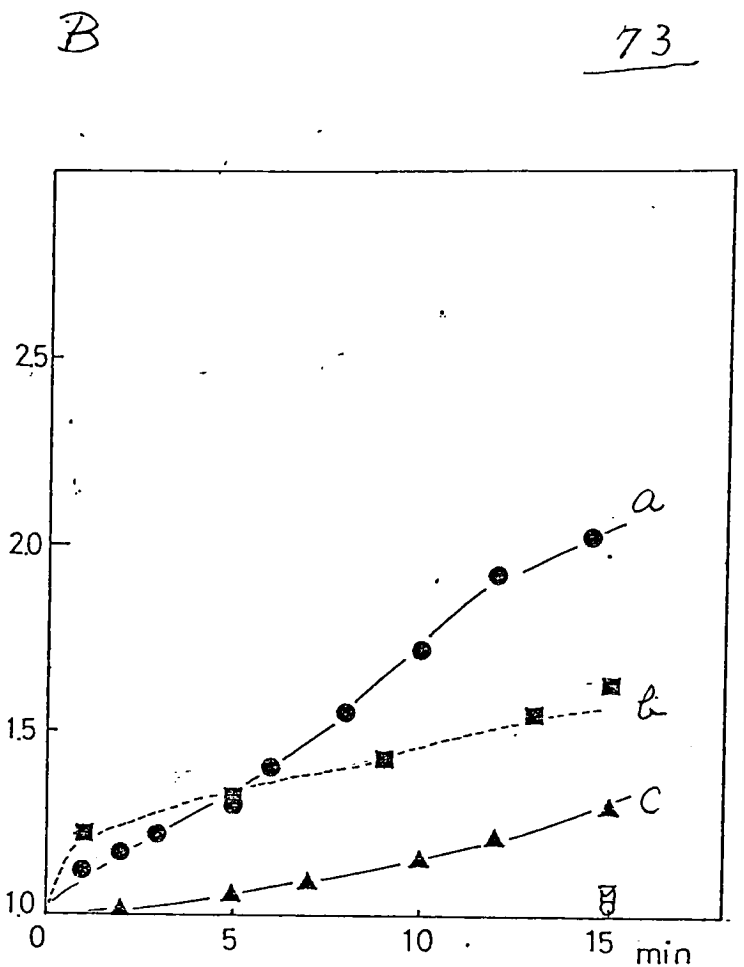
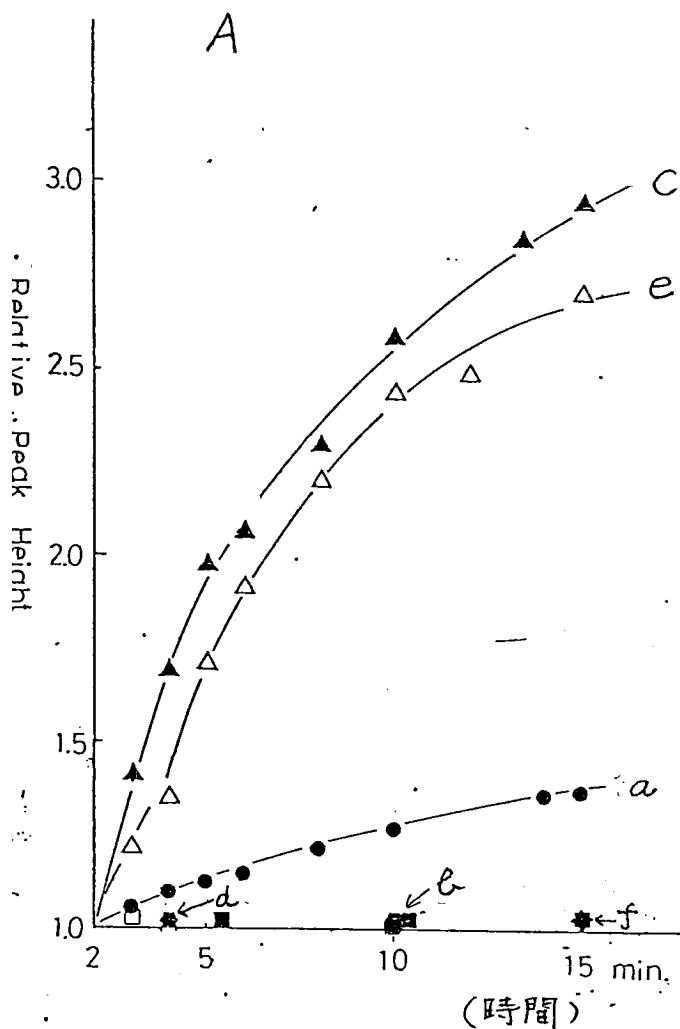


図 6 PS-PC-PE (A) , PS-PC- コレステロール (B)

リポソームからのバンド4.1によるテノコリン
の流出

(A) PS-PC-PE (1:1:2) リポソーム。実験条件は図4に同じ。

(a) 0 mM (b) 2.5 mM (c) 12 mM CaCl_2 ; バンド4.1存在下

(d) 2.5 mM (e) 12 mM CaCl_2 非存在下

(f) ◆ PC-PE (1:1) バンド4.1 (± 2.5 mM CaCl_2 と同じ結果)

(B) コレステロールを含む PS-PC (1:1) リポソームへの作用。

リン脂質として リポソーム 2 mM, バンド4.1 100 $\mu\text{g/ml}$ (1.2 μM)

(a) 0; (b) 30 (c) 50 モル% コレステロール, - CaCl_2

白ぬきの印はバンド4.1 非存在下。

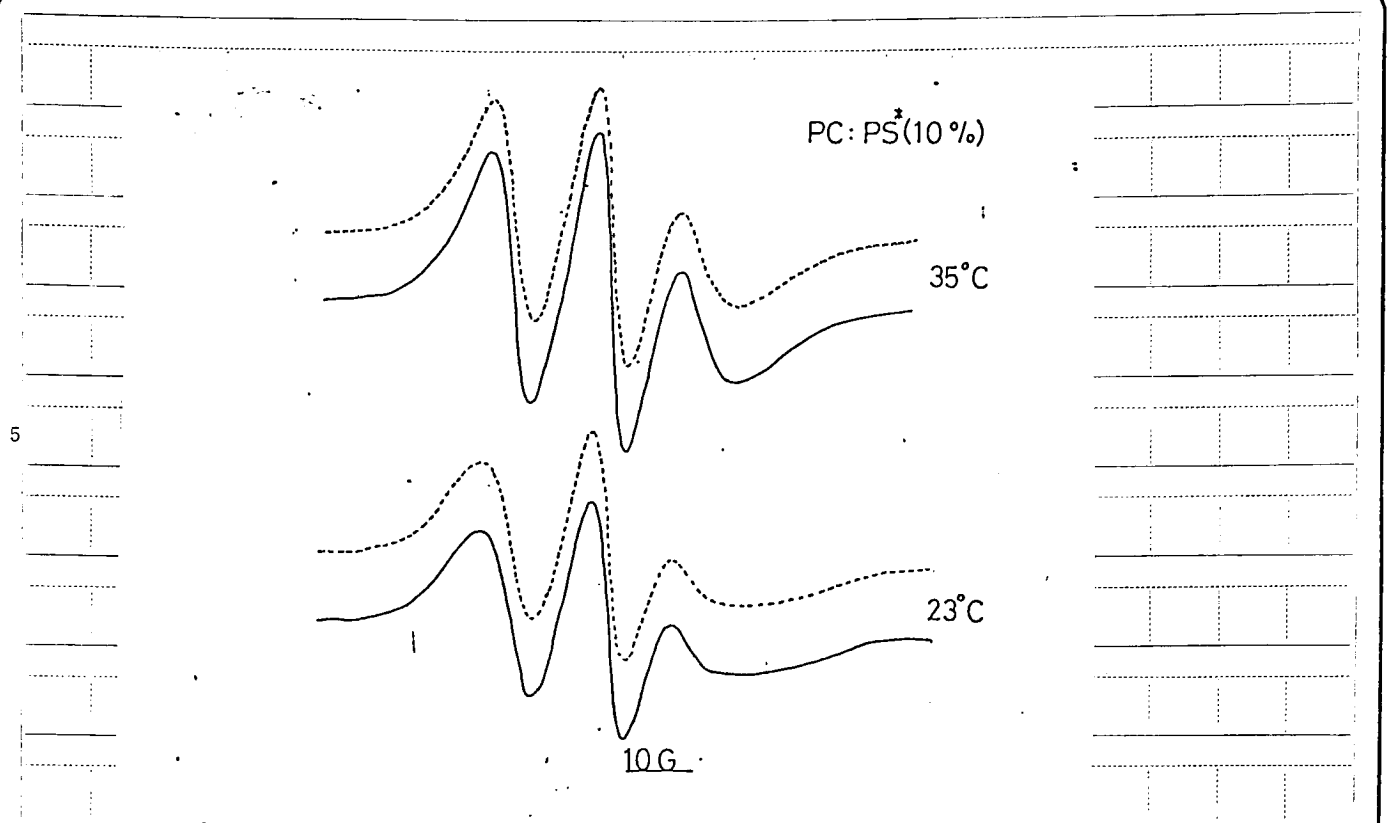


図7 10% PS^* を含む $PC-PS^*$ リポソームの
バンド4.1存在下でESRスペクトル。

実線 バンド4.1非存在下。

破線 バンド4.1存在下。

緩衝液: 5 mM Pipes, 120 mM KCl, 20 mM NaCl

2 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, pH 7.4

リニ脂質 200 μM , バンド4.1 200 $\mu g/ml$ (25 μM)

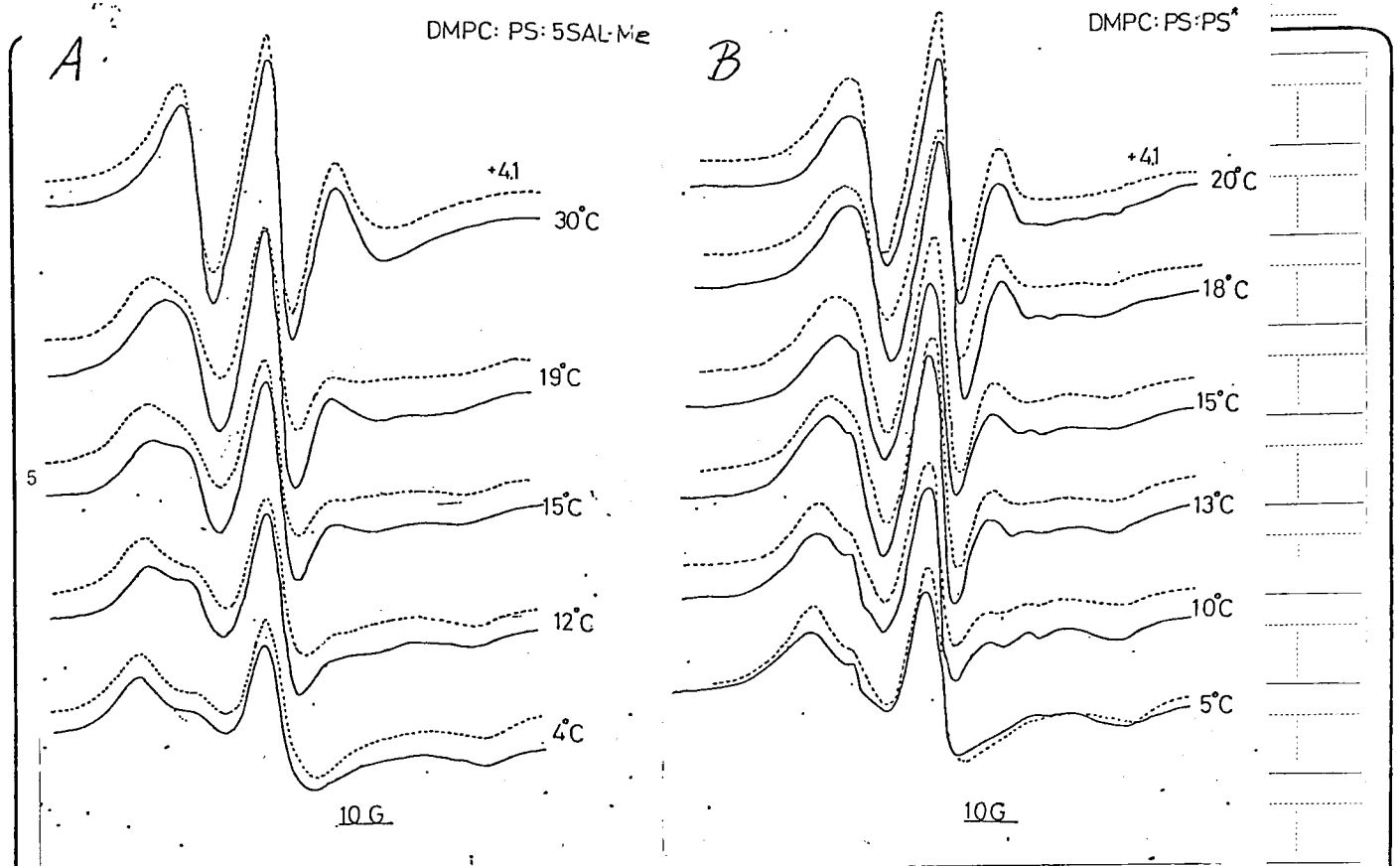


図 8 PS-DMPC (1:10) リポソームに対するバンド

4.1 の効果

(A) 1% の 5SAL-Me, (B) 1% の 12PS* を含む DMPC-PS

リポソーム小胞をバンド 4.1 存在下で調製し、それぞれ

の温度で ESR スペクトルをとった。

破線 バンド 4.1 存在下

実線 バンド 4.1 非存在下

緩衝液等は図 7 に同じ。

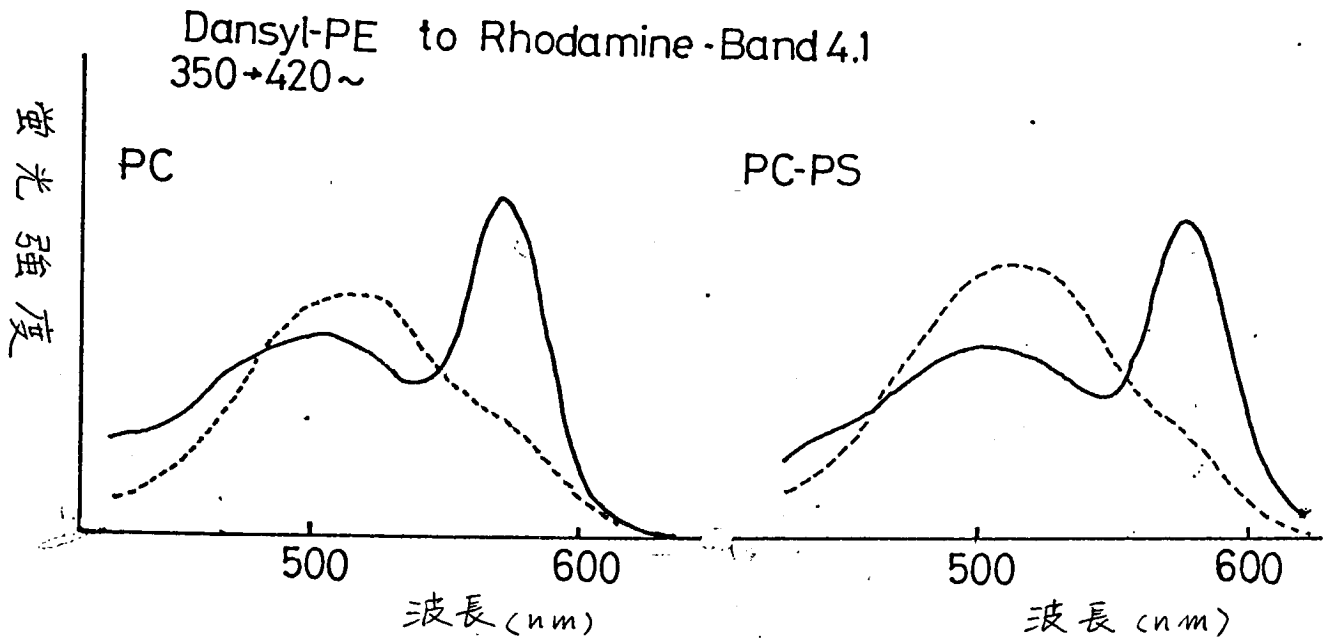


図 9 ダンシル PE を含む PC (A), PC-PS (B)

リポソームからのテトラメチルローダミン
標識バンド 4.1 への蛍光エネルギー移
動。

10% ダンシル PE を含む PC, PC-PS (4:5) リポソーム

30 μ M と蛍光標識バンド 4.1 90 μ g/ml (1.1 μ M) を

37°C, 30 分混合し、35°C, 350 nm の励起光で蛍光

スペクトルを記録した。実線はバンド 4.1 存在下、

破線はバンド 4.1 非存在下。

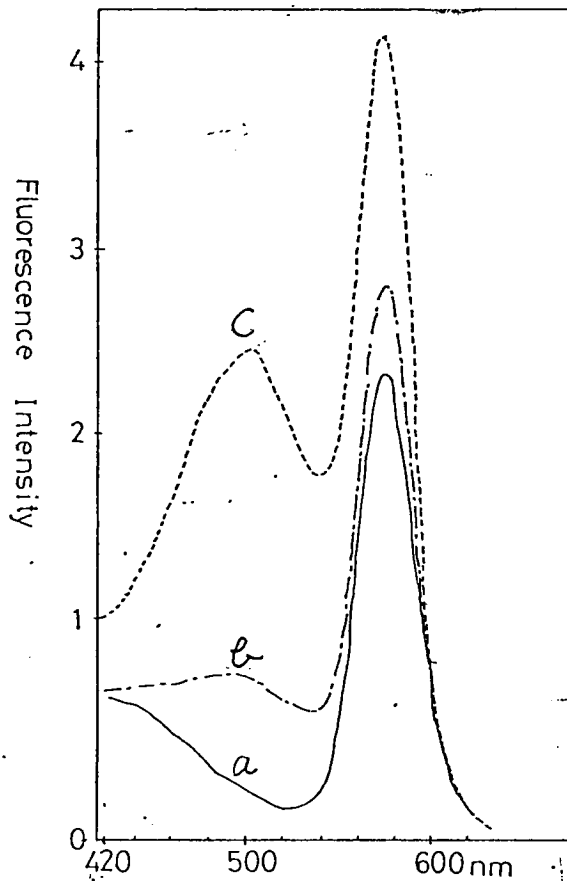


図 10 ダンシル PE-PC リポソームからのテトラメチルロー
ダミン標識バンド 4.1 への蛍光エネルギー移動
のリポソーム濃度依存性。

実験条件は図 9 に同じ。

バンド 4.1 $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($1 \mu\text{M}$) に対し

リポソーム小胞 $0(a)$, $25 \mu\text{M}(b)$, $100 \mu\text{M}(c)$ が
共存している。

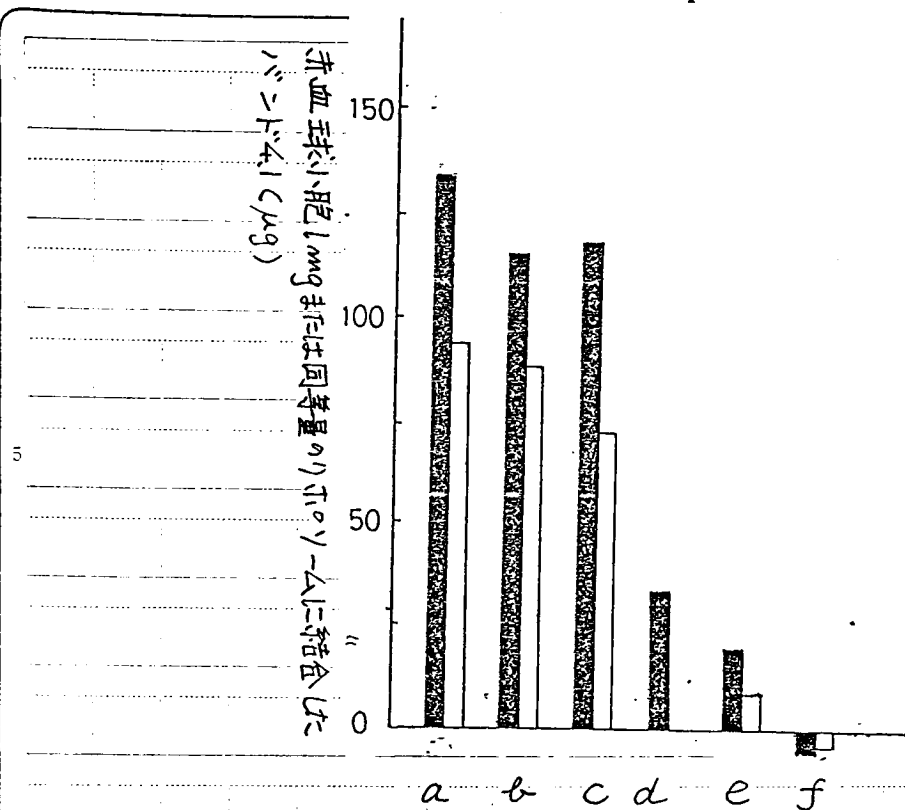


図 11 バンド4.1のリポソームおよび赤血球膜小胞への結合

¹²⁵I標識バンド4.1と、KCl-Urea小胞(a), セミアルカリ
 プロテアーゼ処理KCl-Urea小胞(b), PS-PC(1:1)リポソーム(c)
 PS-PC-PE(1:1:2)(d), PC-PE(1:1)(e), PC-Sph(1:1)(f)
 リポソームと混合し、37°C、30分後の結合を算出した。
 黒くぬりつぶしたのは $-Ca^{2+}$, 白ぬきは2mM Ca^{2+} 存在下での
 結果である。(d)で Ca^{2+} が存在すると、リポソームは沈降し
 なくなったので表示していない。値は、表面に存在する脂質に対し
 て規格化した。結合量をKCl-Urea小胞タンパク質1mgまたは
 同等量のリポソームに結合したバンド4.1(μ g)で示した。

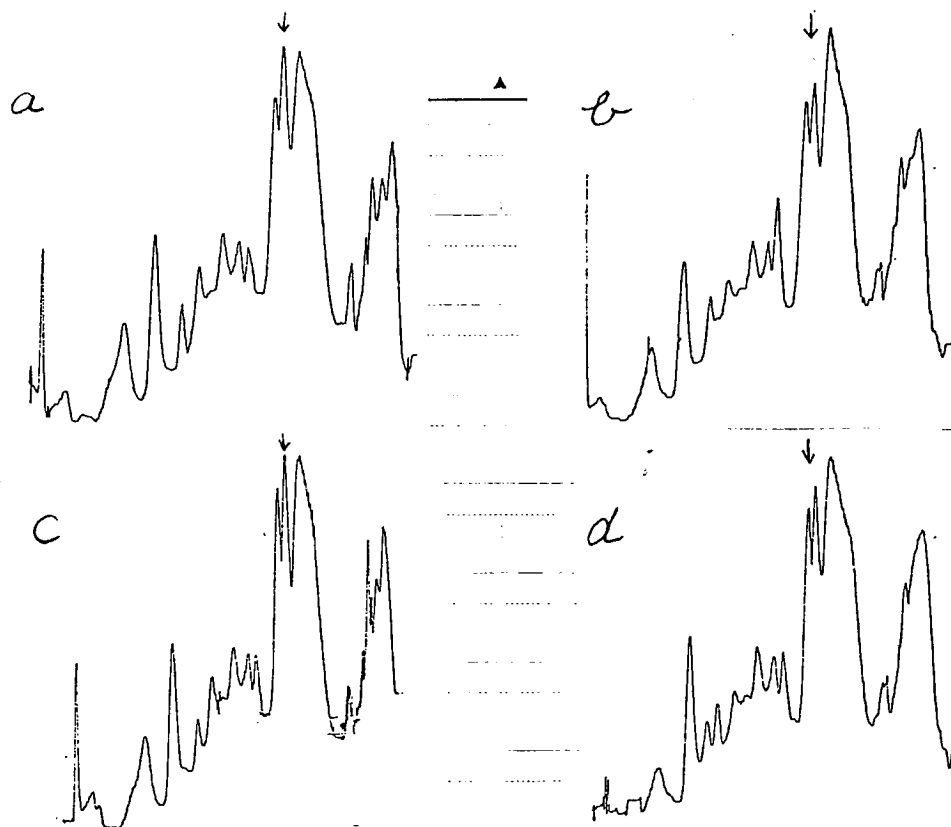


図 12、PS-デカルボキシラーゼの赤血球膜小胞への作用。

スペクトリン・アクチンを脱離させた赤血球膜を PS-デカルボキシラーゼで処理し、電気泳動後タンパク質をクーマジ-ブリーリアントブルーで染色後吸光度を調べた。

- (a) 赤血球膜小胞 (b) PS デカルボキシラーゼ処理
(c) 熱失活酵素処理 (d) $\text{NH}_2\text{OH}-\text{Cl}$ 処理酵素処理
矢印がバンド 4。

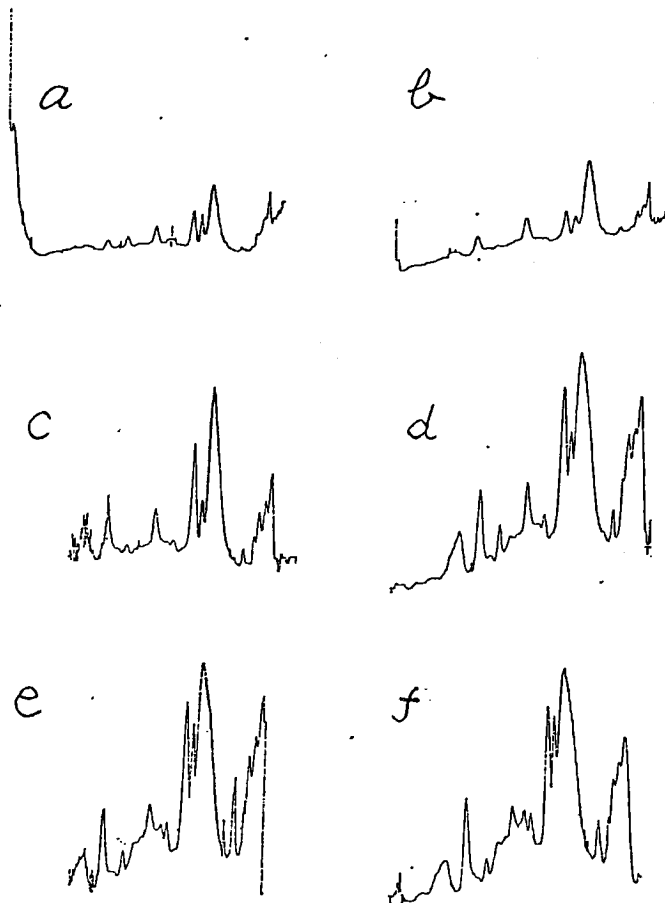


図 13. 赤血球膜小胞に対する界面活性剤

Triton X-100 の効果。

赤血球膜小胞に Triton X-100 を加え、図 12 に準じた操作を行い結果を得た。

Triton X-100 / 膜タンパク比は、(a) 2.5 (b) 1.25 (c) 0.75

(d) 0.5 (e) 0.25 (f) 0.125 (mg/mg) である。

离心沈殿に同体積の可溶化液を加え、一定量を電気泳動した。

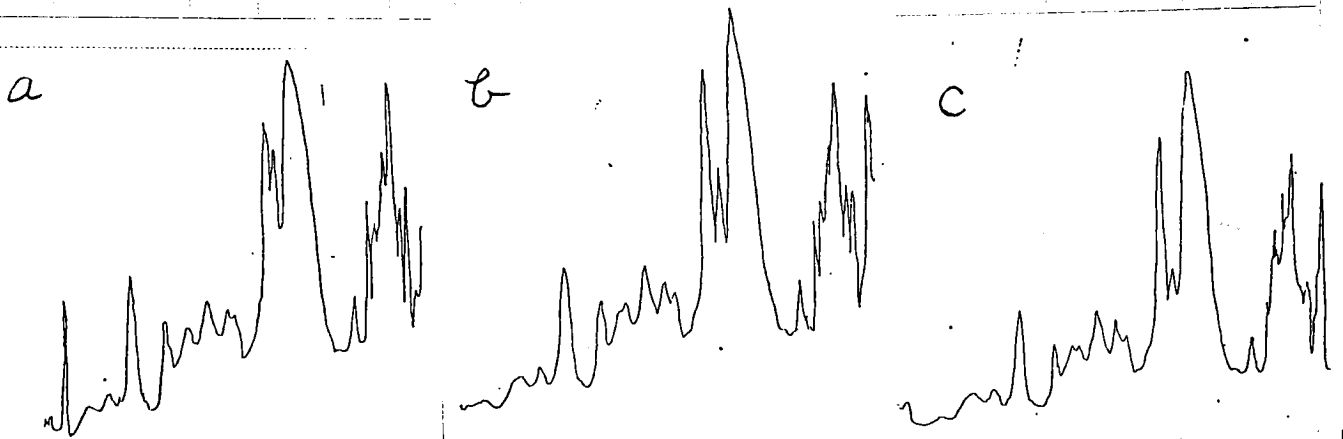


図 14 Ca^{2+} による赤血球膜からのバンド
4.1 の消失。

CaCl_2 10^{-8} M (a) , $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ (b) , $1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ (c)

存在下で 37°C , 30 分後 遠心沈降させた沈殿の
電気泳動結果。

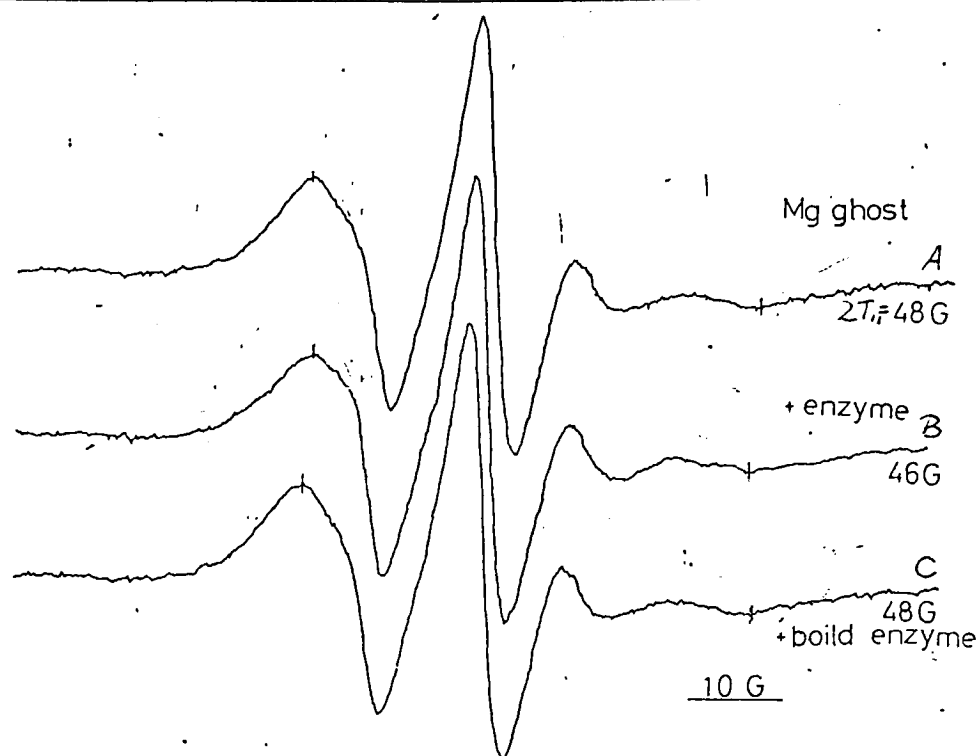


図 15 PS-デカルボキシラーゼ処理した PC^{*} 標識

赤血球膜の ESR スペクトル

(A) 無処理赤血球ゴースト

(B) PS-デカルボキシラーゼ処理

(C) 熱失活 PS-デカルボキシラーゼ処理

緩衝液 10 mM Pipes, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA

pH 7.4

数字はみかけの最大分離幅 (ガウス) である。

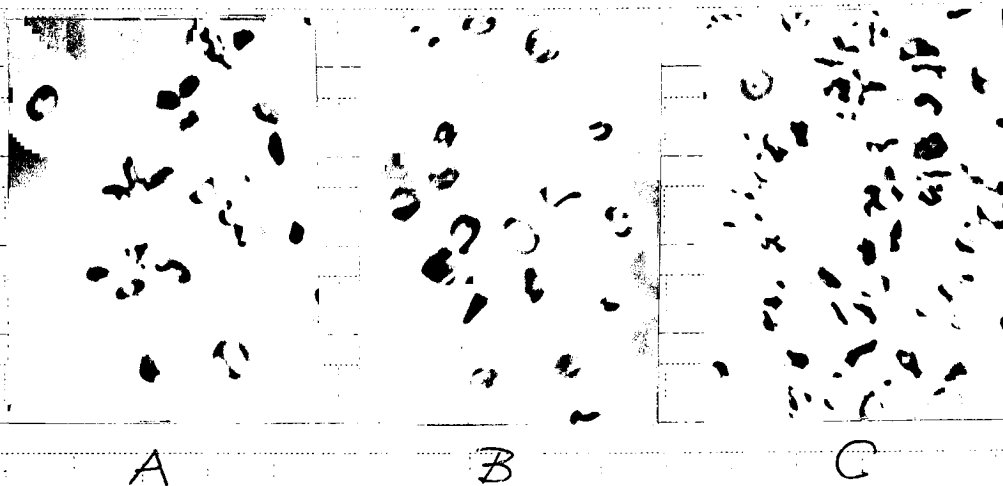


図 16 PS-デカルボキシラーゼ処理 赤血球膜
の形態

図 14 に準じた操作を^{いた} PC* で標識しない赤
血球ゴースをグルタルアルデヒドで固
定し位相差顕微鏡下で写真撮影した。

X 800

(A) 無処理 (B) PS-デカルボキシラーゼ処理

(C) 熱失活酵素処理。

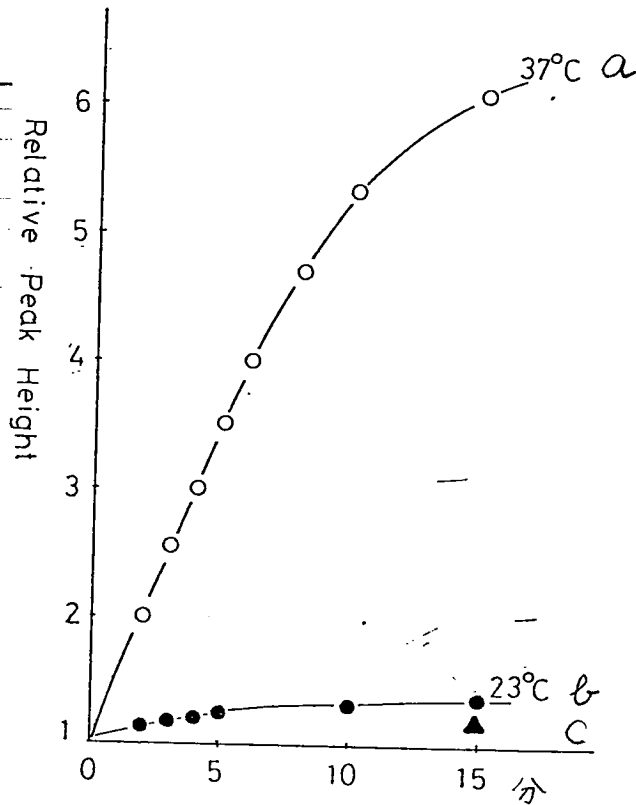


図 17 Ca^{2+} 存在下 PS-PC-PE リポソームからの
テンポエリニの流出

5mM CaCl_2 と 1mM PS-PC-PE (1:1:2) リポソーム
を混合し 0^分 5分後 37°C (a), 23°C (b) に移し
ESR を記録した。(c) は $-\text{Ca}^{2+}$ 37°C である。

Triton X-100 による膜破壊による時の ESR
線高を 10 とした。

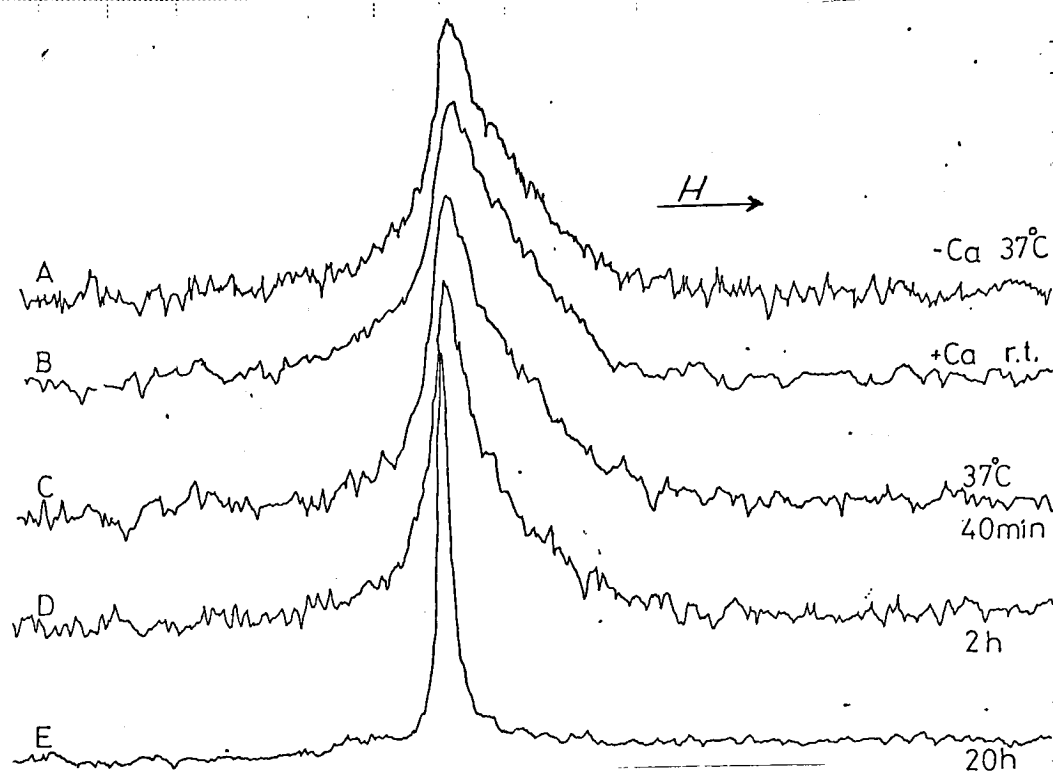


図 18. PS-PC-PE リポソームの ^{31}P -NMR スペクトル.

(A) $-\text{CaCl}_2$, 37°C , (B) $+\text{CaCl}_2$ 23°C , (C) $37^\circ\text{C} + \text{CaCl}_2$
 40分後, (d) $37^\circ\text{C} + \text{CaCl}_2$, 2時間後 (e) $37^\circ + \text{CaCl}_2$,
 20時間後.