

ヒト赤芽球における Spectrin および Integral Protein の発現と分化に関する研究

和田 秀穂

ヒト赤芽球における band 3 や glycophorin A (GPA) を主体とする integral protein と spectrin との発生の相互関係を明らかにする目的で、末梢血前駆細胞 (BFU-E) 由来の赤芽球系培養細胞 (Wada, H., et al. : Blood 75 : 505—511, 1990)¹⁾ を用いて免疫化学的に検討した。蛍光抗体法では、培養第 2 相の day 3 ですでに spectrin 陽性細胞を認め、integral protein はこれより遅れ、赤芽球成熟に伴って day 5 で GPA, day 7 で band 3 が順次陽性を示した。さらに SDS-PAGE 後の western blot 法による解析では、spectrin は day 5, day 7 では α 鎖優位の発現を示したが、より成熟赤芽球の細胞集団である day 9 では、 α 鎖、 β 鎖が末梢血赤血球同様に等量発現していた。またこの段階の成熟赤芽球では細胞質分画、膜分画ともに α 鎖、 β 鎖が等量に発現し、spectrin が細胞膜に結合、固定されていく様相が明らかとなった。

(平成 3 年 2 月 25 日採用)

Immunochemical Studies on Expression of Spectrins and Integral Proteins in Human Erythroid Cells

Hideho Wada

The sequential expression of spectrins and integral proteins in human erythroid cells was studied using a two phase liquid culture system (Wada, H., et al. : Blood 75 : 505—511, 1990). The erythroid cells in this procedure were identified by immunofluorescence staining with antibodies for human spectrins, glycophorin A (D 2-10), and band 3 (BRIC 130). First spectrins appeared on day 3 of the second phase, and then, glycophorin A was expressed on day 5. Band 3 appeared on day 7, much later than the spectrins. The results indicate that cytoskeletal proteins (e. g. spectrins) appear to be expressed first in human erythroid cells and then assembled to the membranes with integral proteins such as band 3.

Molecular expression of spectrins was studied in the cultured erythroid cells using the western blot method on SDS-PAGE. Only α -spectrin was detected on day 5 ($\beta/\alpha=0.00$). The appearance of β -spectrin followed ($\beta/\alpha=0.05$) on day 7. The amount of α and β -spectrins was equalized to the same extent as that observed in normal mature intact red cells in peripheral circulation on day 9 ($\beta/\alpha=1.14$).

(Accepted on February 25, 1991) *Kawasaki Igakkaishi* 17(1) : 18—24, 1991

川崎医科大学 血液内科
(指導：八幡義人教授)
〒701-01 倉敷市松島577

Division of Hematology, Department of Medicine
(Director : Prof. Yoshihito Yawata), Kawasaki
Medical School : 577 Matsushima, Kurashiki, Okayama,
701-01 Japan

Key Words ① Human erythroid differentiation ② Spectrins
③ Glycophorin A ④ Band 3

はじめに

ヒト成熟赤血球膜は脂質二重層を基本構造とし、この細胞質側に spectrin を主体とした cytoskeleton の六角形網目状構造が存在する。そして、この細胞骨格に band 3 や glycophorin A (GPA) などの integral protein が結合することによって、脂質二重層にこの cytoskeleton を固定している。そしてこれら末梢血赤血球の精力的な研究によって、遺伝性球状赤血球症 (hereditary spherocytosis : HS) や遺伝性楕円赤血球症 (hereditary elliptocytosis : HE) などに、spectrin などの膜蛋白の分子異常が同定されるようになった。²⁾ 一方さらに検索が進められていく過程で、成熟赤血球が末梢血中へ流入する以前の、造血幹細胞にはじまって、赤芽球、さらに網赤血球を経て、成熟赤血球に至る一連の分化成熟過程それぞれについて、膜蛋白の発現を検索することが必要となってきた。

歴史的には、赤芽球の研究は、まずトリ類の有核赤血球が研究材料として使用された。³⁾ ヒト赤芽球に関しては、今まで純粋な赤芽球集団を得ることができなかったため、いまだ不明な点が多い。そこで著者は、末梢血中に存在する前期赤芽球系前駆細胞 (BFU-E) を液体培養することによって赤芽球から、最終的に赤血球にまで分化し得る培養法を考案した。¹⁾ 本研究ではこの培養法を用いて、ヒト正常赤芽球における

spectrin と band 3 や GPA を主体とする integral protein との発生の相互関係を解析し、その臨床応用の可能性とともに検討した。

材料と方法

1) ヒト赤芽球系細胞調整法

two phase liquid culture system¹⁾ を用いて赤芽球系細胞集団を得た。つまり第 1 相としてヒト末梢血 (30 ml) から、Ficoll-Metrizoate 液を用いて単核細胞を分離した後、これに存在する BFU-E を 5% PHA-stimulated leukocyte conditioned medium とともに 7 日間培養し、後期赤芽球系前駆細胞 (CFU-E) を調整した。さらに第 2 相として、カーボニル鉄で貪食細胞を除去した後、2 U/ml erythropoietin を加えて 0~9 日間培養し、赤芽球系細胞を選択的に分化増殖させた。なお培養器は、マルチガスインキュベーター (BIO-LABO) を使用し、5% CO₂、5% O₂ の低酸素条件下で培養を行った。

2) 赤芽球膜蛋白検出法

①免疫蛍光抗体法

集細胞遠心装置 (Shandon 社製サイトスピン-2) を用いて、培養細胞 (第 2 相の day 0, day 3, day 5, day 7, day 9) をスライドガラスに塗抹し、室温にて 16 時間放置した後、100% アセトンで 5 分間固定した。かかる標本を室温にて十分乾燥し、5% ヤギ血清にて 30 分間処理した後、Table 1 に示した抗体を用いて間接蛍

Table 1. Antibodies used in this study

	Spectrin	Glycophorin A	Band 3
1st antibody	anti-spectrin Ab (polyclonal)	anti-glycophorin A Ab (monoclonal)	anti-band 3 Ab (monoclonal)
clone	polyclonal	D2-10	BRIC-130
Ig class	IgG	IgG ₁	IgG
specificity	α and β spectrins	amino-acid sequence 27-39 of glycophorin A	cytoplasmic domain of band 3
2nd antibody	goat F(ab') ₂ anti-rabbit IgG (H+L)-FITC	goat F(ab') ₂ anti-mouse Ig's R-PE (H+L)	goat F(ab') ₂ anti-mouse IgG (H+L)-FITC

光抗体法を実施した。正常ヒト末梢血赤血球を陽性対象として、落射型蛍光顕微鏡(Nikon)にて観察した。

② SDS-polyacrylamide 電気泳動法 (SDS-PAGE)

細胞数をそろえた培養細胞(第2相の day 0, day 3, day 5, day 7, day 9)を直接 SDS で溶解し, Fairbanks 法⁴⁾もしくは Laemmli 法⁵⁾で電気泳動した。また protease の影響を最小限にする目的で, lysing buffer の中に 2 mM diisopropyl fluorophosphate を加えて調整した。なお gel の染色は, coomassie brilliant blue (CB) 染色⁴⁾および silver 染色⁶⁾を用いた。

③ immunoblotting 法

western blot 法を行い, 赤芽球成熟に伴う

spectrin および band 3 抗原の発現を検討した。抗体は **Table 1** に示したのを用い, 発色はワサビペルオキシダーゼを基質とした。また発色後のニトロセルロースメンブランをデンシトメーター (600 nm) で解析することによって, spectrin α 鎖および β 鎖の発現量比 (β/α) の定量化を試みた。

次に, spectrin の発現を細胞質分画および膜分画に分けて比較検討した。つまり最も成熟した赤芽球系細胞(第2相の day 9)を, Hanspal らの方法⁷⁾に従い, hypotonic buffer (10 mM Tris HCl, pH 7.5, 10 mM KCl, and 1.5 mM MgCl₂) により低張溶血させた。さらにそれを sucrose-step gradient (28%/50%) 法によって遠心分離後, 上清に可溶化分画(soluble), 中間層に膜分画(skeletal)として採取し, 各分画の spectrin を検出した。

なお抗体は, affinity chromatography により精製したものであり, さらに spectrin に関しては, α 鎖, β 鎖を等モルに認識する抗体を使

Table 2. Expression of spectrins prior to integral proteins (glycophorin A and band 3) in cultured cells on day 5 as detected by immunofluorescence staining in a single color analysis and in a double color analysis

Single color analysis	
Spectrins (Sp)	8.5 %
Glycophorin A (GPA)	3.6 %
Band 3	1.2 %
Double color analysis (spectrin-FITC : glycophorin A-PE)	
Double-positive cells/Sp-positive cells	18.4 %
Only GPA-positive cells	0.0 %

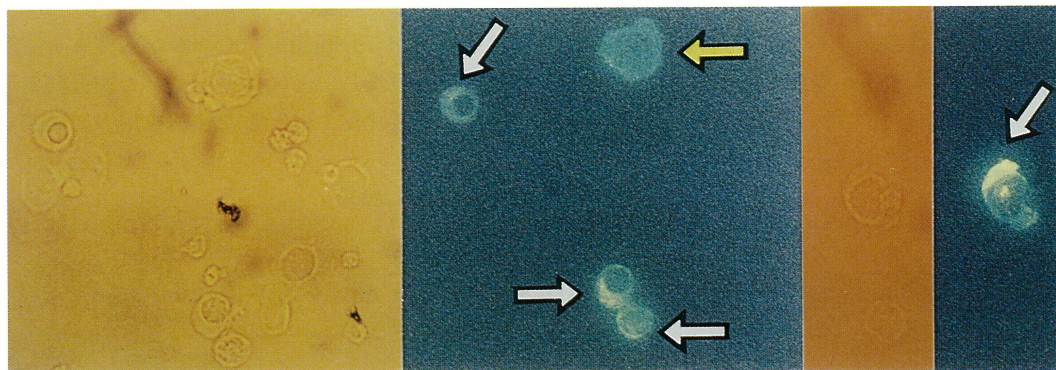


Fig. 1. Double immunofluorescence staining on cytocentrifuge preparations of cultured cells. Superposition of green (spectrin +) and yellow (glycophorin A +) fluorescence gives an orange color for spectrin +/glycophorin A + cells (white arrow). Spectrin +/glycophorin A - cells show a green color (yellow arrow). No spectrin -/glycophorin A + cells are observed (Original magnification, $\times 400$).

用した。

結 果

1) ヒト赤芽球系培養細胞

第2相 day 5 において、好塩基性および多染色赤芽球が4割程度を占める細胞集団が得られ、day 7 では、約半数が正染色赤芽球となり、さらに day 9 では脱核した赤血球を2割程度含む成熟赤芽球集団が得られた。¹⁾

2) 免疫蛍光抗体法

spectrin は第2相の day 3 ですでに陽性細胞の出現を認めた。GPA はこれより遅れて day 5 になり出現し、さらに band 3 は day 7 になり始めて明らかな陽性細胞が増加した。day 5 における各膜蛋白の陽性細胞比率を **Table 2** に示した。また spectrin と GPA の陽性細胞の相互関係を知る目的で、二重染色法を行い解析した。これによると spectrin はより幼若な細胞で陽性を示し、spectrin 陽性細胞のうち、より成熟していると考えられる細胞群(18.4%)が、GPA も同時に陽性を示した (**Table 2, Fig. 1**)。

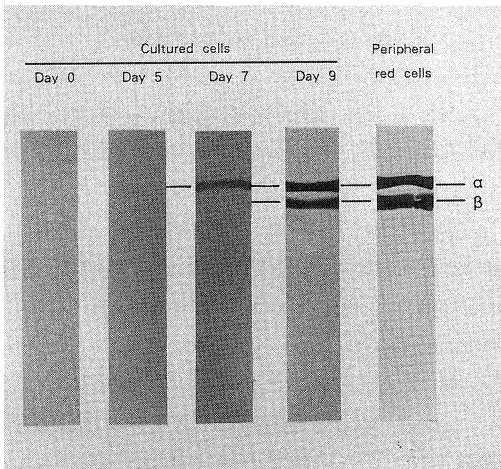


Fig. 3. Expression of α -spectrin prior to β -spectrin during maturation of normal human erythroid cells. Western blot analysis was carried out with anti-human spectrin rabbit antibody in whole lysates of cultured cells. SDS-PAGE was performed by the method of Fairbanks et al. by a 4.2% acrylamide.

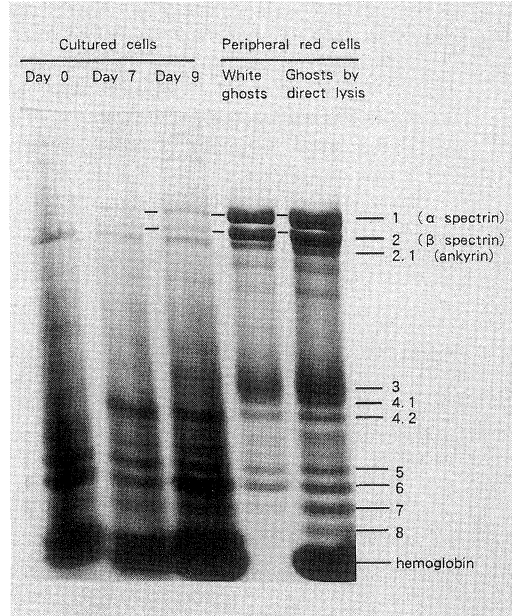


Fig. 2. Electrophoretic profile of membrane proteins in whole cultured cells during maturation of normal erythroid cells. SDS-PAGE was performed by the method of Laemmli by using a 3% to 15% exponential gradient of acrylamide.

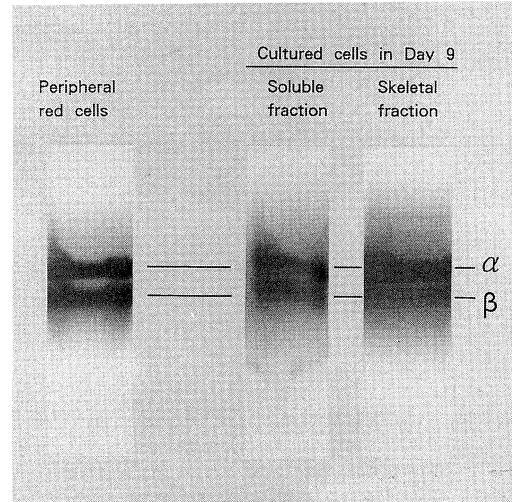


Fig. 4. Synchronous expression of α - and β -spectrins in both soluble fraction and skeletal fraction in cultured erythroid cells in day 9. Western blot analysis was carried out with anti-human spectrin rabbit antibody. SDS-PAGE was performed by the method of Fairbanks et al. by a 4.2% acrylamide.

Table 3. Expression of β -spectrin delayed from α -spectrin during maturation of normal human erythroid cells. The percentage of the expression of α - or β -spectrins was calculated by the ratio of α - or β -spectrin fraction to the total amounts of both spectrins, as studied by immunoblotting. The results on the cultured erythroid cells were compared to those in the peripheral red cells.

	Cultured cells			Peripheral red cells (n=5)
	Day 5	Day 7	Day 9	
α chain	100.0%	95.3%	46.7%	48.6 \pm 3.0%
β chain	0.0%	4.7%	53.3%	51.4 \pm 3.0%
β/α	0.00	0.05	1.14	1.06 \pm 0.13

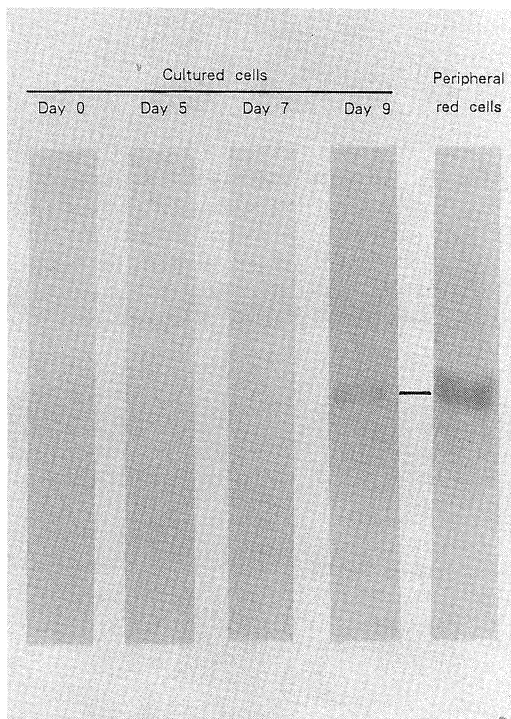


Fig. 5. Expression of cytoplasmic domain of band 3 during maturation of normal human erythroid cells. Western blot analysis was carried out with monoclonal anti-human band 3 antibody in whole lysates of cultured cells. SDS-PAGE was performed by the method of Laemmli by using a 3% to 15% exponential gradient of acrylamide.

3) SDS-PAGE 法

第2相 day 0, day 7, day 9 の培養細胞の SDS-PAGE 像 (CB 染色) を **Figure 2** に示した。まず spectrin に関しては, day 5 では CB 染色上検出されなかったが, day 7 では α 鎖が β 鎖に比べ濃く染色された。さらに day 9 では α 鎖, β 鎖がほぼ同等に, より濃く染色さ

れた。また band 3 は day 9 になるとはじめて末梢血赤血球同様の移動度に band が検出された。なお silver 染色による解析でもほぼ同様の成績であった。

4) immunoblotting 法

抗 spectrin 抗体を用いた western blot 像を **Figure 3** に示し, またその像をデンストメーターで解析した α 鎖, β 鎖の発現量比 (β/α) を **Table 3** に示した。SDS-PAGE 像では検出不能であった day 5 の細胞において, わずかに α 鎖のみが検出された ($\beta/\alpha=0.00$)。また day 7 では β 鎖も遅れて出現し, α 鎖はさらに発現量を増し検出された ($\beta/\alpha=0.05$)。day 9 になると α 鎖, β 鎖ともに発現量を増し, すでに末梢血赤血球 ($\beta/\alpha=1.06$) 同様に, α 鎖と β 鎖がほぼ等量 ($\beta/\alpha=1.14$) に発現していた。またこの時期の成熟赤芽球は soluble fraction, skeletal fraction とともに spectrin の α 鎖, β 鎖がほぼ等量発現していることが明らかとなった (**Fig. 4**)。

band 3 は, spectrin の発現に比べるとかなり遅く, day 9 になり検出可能で, その移動度は末梢血赤血球と同様であった (**Fig. 5**)。

Table 4 にこれらの成績をまとめて示した。

考 察

著者はヒト末梢血前駆細胞 (BFU-E) を用いた 2 相性赤芽球液体培養法による解析で, 赤芽球成熟に伴う主要な血液型物質の経時的な発現

Table 4. Summary of differentiation of various membrane proteins in normal human erythroid cells

	Second phase of the culture				
	Day 0	Day 3	Day 5	Day 7	Day 9
Spectrins					
(i) IF method*	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
(ii) SDS-PAGE					
silver stain	(-)	(-)	(-)	$\alpha > \beta$	ND
CB stain	(-)	ND	(-)	$\alpha > \beta$	$\alpha = \beta$
(iii) Immunoblotting	(-)	ND	α	$\alpha \gg \beta$	$\alpha = \beta$
Glycophorin A					
(i) IF method*	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
Band 3					
(i) IF method*	(-)	(-)	(±)	(+)	(+)
(ii) SDS-PAGE					
silver stain	(-)	(-)	(-)	(-)	ND
CB stain	(-)	ND	(-)	(-)	(+)
(iii) Immunoblotting	(-)	ND	(-)	(-)	(+)

* IF method : immunofluorescence staining
ND : not done

機構を検討した。¹⁾ この中で、MN 型抗原の存在する glycophorin A (GPA) は赤芽球系細胞に特異的であり、proerythroblast の段階ではじめて発現することがすでに知られていたが、⁸⁾ ABH, P₁, Lewis 型抗原もこの GPA を中心に赤芽球成熟に伴い順次発現してくることを報告した。¹⁾ 本研究では、integral protein としても重要な役割を担うこの GPA をひとつの成熟マーカーとして捕え、spectrin や band 3 がどのように関係をもちながら発現してくるかを明らかにすることを目的にした。

赤血球膜蛋白、特に spectrin の発生、分化についてはトリ、³⁾ ラット、⁷⁾ マウス^{9)~11)} においてすでに多くの研究業績がある。ラットを用いた Hanspal ら⁷⁾ の研究によると赤芽球の段階では① cytosol 内で合成される spectrin は α 鎖が β 鎖に対して優位であること、②膜へ結合、固定される際は α 鎖、 β 鎖はそれぞれ等モルであること、③いったん結合、固定された spectrin は安定であるのに対し、cytosol 内でとどまった過剰 spectrin の分解は極めて速いと報告されている。一方、murine erythroleukemia (MEL) cell を用いた Lehnert ら¹⁰⁾ は、 β 鎖が α 鎖に比較し

て約 3 倍合成率が高いと、相反する成績を報告している。本研究はヒトの培養赤芽球を用い、spectrin α 鎖、 β 鎖をすでにでき上がった蛋白として検出し検討したものであるが、① α 鎖が β 鎖に対して優位であること、②膜に結合固定される際は cytosol、membrane とともに α 鎖、 β 鎖がそれぞれ等モルである結果が得られ、Hanspal らの成績によく一致するものであった。

spectrin が細胞膜に結合固定する箇所は、当然 band 3 や GPA などの integral protein であると推定されている。これらの膜蛋白の発生とその相互関係を検討した研究によると、^{3), 8), 9)} 赤芽球段階で spectrin の生合成が先行し、これに続いて band 3 が発現し、cytoskeleton の integral protein への結合、固定が完了するという点で一致している。ヒトの細胞を用いた本研究でも、これらと同様に① proerythroblast から発現する GPA より早い段階で、すでに spectrin は発現し、② GPA より遅い段階ではじめて band 3 が発現され、③そして spectrin が細胞膜に結合・固定され安定化するという一連の流れを示唆する実験結果が得られた。今後は、cytoskeleton を補強する役割である ankyrin や band

4.2の発生とその相互関係の解明が赤芽球発生の重要なテーマであると考えられる。

最近 Hanspal¹²⁾は、重症HS症例において、その末梢血網赤血球を用いて α -spectrin, β -spectrin, ankyrinの生合成を検討し、cytosolでほとんど ankyrinが合成されていない異常症例を報告している。本研究で用いた2相性赤芽球液体培養法は、①骨髄穿刺を行う必要がなく末梢血を利用し、②臨床経過に合わせて検索の反覆ができ、③純粋な赤芽球系細胞が得られる点で赤血球膜異常症に十分臨床応用できると考えられた。今後は、spectrinなどの膜蛋白分子

異常症において、その血球の病態を把握するうえで赤芽球レベルでの異常を検討することが必要となるであろう。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った川崎医科大学血液内科 八幡義人教授、ならびに直接御指導いただいた同科 神崎暁郎講師に深甚なる謝意を表します。

また技術的援助をいただいた血液内科学教室の高原真弓嬢、山根美樹嬢に深く感謝いたします。

なお、本論文の要旨は第23回国際血液学会(1990年12月, Boston)において発表した。¹³⁾

文 献

- 1) Wada, H., Suda, T., Miura, Y., Kajii, E., Ikemoto, S. and Yawata, Y.: Expression of major blood group antigens on human erythroid cells in a two phase liquid culture system. *Blood* 75: 505-511, 1990
- 2) Palek, J. and Lambert, S.: Genetics of the red cell membrane skeleton. *Semin. Hematol.* 27: 290-332, 1990
- 3) Lazarides, E.: From genes to structural morphogenesis: The genesis and epigenesis of a red blood cell. *Cell* 51: 345-356, 1987
- 4) Fairbanks, G., Steck, T. L. and Wallach, D. F. H.: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10: 2606-2617, 1971
- 5) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
- 6) Morrissey, J. H.: Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 117: 307-310, 1981
- 7) Hanspal, M. and Palek, J.: Synthesis and assembly of membrane skeletal proteins in mammalian red cell precursors. *J. Cell Biol.* 105: 1417-1424, 1987
- 8) Fukuda, M. and Fukuda, M. N.: Cell surface glycoproteins and carbohydrate antigens in development and differentiation of human erythroid cells. *In* The Biology of Glycoproteins, ed. by Ivatt, R. J. New York, Plenum Press. 1984, pp. 183-234
- 9) Koury, M. J., Bondurant, M. C. and Mueller, T. J.: The role of erythropoietin in the production of principal erythrocyte proteins other than hemoglobin during terminal erythroid differentiation. *J. Cell. Physiol.* 126: 259-265, 1986
- 10) Lehnert, M. E. and Lodish, H. F.: Unequal synthesis and differential degradation of α and β spectrin during murine erythroid differentiation. *J. Cell Biol.* 107: 413-426, 1988
- 11) Koury, S. T., Koury, M. J. and Bondurant, M. C.: Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. *J. Cell Biol.* 109: 3005-3013, 1989
- 12) Hanspal, M., Yoon, S.-H., Yu, H., Hanspal, J. S., Lambert, S., Palek, J. and Prchal, J. T.: Molecular basis of spectrin and ankyrin deficiencies in severe hereditary spherocytosis: Evidence implicating a primary defect of ankyrin. *Blood* 77: 165-173, 1991
- 13) Wada, H., Kanzaki, A. and Yawata, Y.: Expression of membrane cytoskeletal and integral proteins on human erythroid cells studied by a two phase liquid culture system. *Blood* 76 (Suppl. 1): 20a, 1990