

## Ektacytometry 及び Electron Spin Resonance (ESR) 法を用いた赤血球膜物性の検討

肥後 郁代, 神崎 暁郎\*, 八幡 義人\*, 細川 桂一

正常赤血球に種々の物理的・化学的修飾を加え, 赤血球膜の物性の変化を electron spin resonance (ESR) 法 (スピラベル法) 及び ektacytometry 法の両者を用いて比較検討した. 今回スピラベル剤として5-doxyl-stearic acid を用いたが, この脂肪酸ラベルによっても, 細胞骨格の変化を察知することが可能であった. 今回の実験の結果, スピラベル法によって得られた膜流動性は ektacytometry による変形能とは必ずしも一致せず, ESR 法では, 部位特異性を有するスピラベル剤を選択することによって, 膜の変化をより鋭敏かつ的確に, 部位特異性をもって検知しうると考えられた. (平成4年10月30日採用)

### Studies of Membrane Physico-chemical Properties on Human Red Cells by Ektacytometry and Electron Spin Resonance

Ikuyo Higo, Akio Kanzaki\*, Yoshihito Yawata\* and Keiichi Hosokawa

Ektacytometry and electron spin resonance (ESR) studies were carried out on normal human red cell membranes treated with heat, N-ethylmaleimide, and calcium. It was proved that lipid labeling with 5-doxyl-stearic acid was useful to clarify the mechanism of cytoskeletal changes. Spin labeling was carried out on the surface of the membrane, but it detected a change in the cytoskeleton. The changes in membrane fluidity detectable by ESR and cell deformability by ektacytometry were different in some cases. ESR studies may be able to indicate the precise site of membrane lesions more sensitively and specifically, depending on the kind of labeling probes employed. (Accepted on October 30, 1992) *Kawasaki Igakkaishi* 18(4):305-313, 1992

**Key Words** ① Ektacytometry ② ESR study ③ Cytoskeleton

#### はじめに

赤血球は, 本来, 中窪み円盤形を呈しているが, 末梢血管網の中を流れていくために, 形を変えて狭い間隙を通り抜け, 再び元の円盤形に戻るといふ, 細胞変形能と膜の安定性を持って

いる.

細胞膜物性を検討する方法には大別して, (1) 膜の物理的伸展度合いを評価する ektacytometry 法,<sup>1)</sup> microcapillary 法,<sup>2)</sup> filtration 法<sup>3)</sup> と, (2) 膜の局所の流動性 (fluidity) を表す electron spin resonance (ESR) 法<sup>4)</sup> が知られている. 前者のうち, ektacytometry 法によ

る細胞変形能を規定する因子には、①表面積／容積比、②細胞内粘度、③細胞膜構成物質があるが、その中でも③の因子が重要である。<sup>5)</sup> 一方スピララベル法による膜流動性は、そのラベル剤が結合する局所環境因子(ラベル剤の拘束の程度すなわち、膜脂質の組成・粘稠度・イオン強度・分子間の結合の度合い等)によって変化する。<sup>6)~8)</sup> 今回我々は、正常赤血球に熱・SH阻害剤およびCa<sup>2+</sup>を負荷することにより、主に細胞膜骨格蛋白に修飾を加え、ektacytometry法による細胞変形能の変化を検討した。また、この各々の血球の膜流動性をESRのスピララベル法でも検討し、細胞変形態と膜流動性について比較検討した。

#### 材料および方法

ヘパリン加にて健康人の静脈血を採取後、速やかに2,000 g, 10分間遠心し、血漿と血球成分に分離した。赤血球はさらに0.9% NaClにて3

回洗浄し、十分にbuffy coatを除去し、濃厚赤血球浮遊液を作成後、検体とした。

#### 1) 測定方法

a. Ektacytometry: Mohandasらの方法に準じて行った。mediumは浸透圧290 mOsm/Kgに調製した15%のDextran T-40(平均分子量:40万)リン酸緩衝液(pH 7.4)を用い、測定は25°Cで行った。用いたflat cellのgapは150 nmで、光源として波長633 nmのhelium-neon laserを使用し、shear stressは18~280 dyne/cm<sup>2</sup>とした。

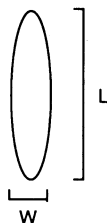
Ektacytometryによって得られた影から2つの指標、すなわち陰影の長軸方向の長さL、短軸の長さWを得、このLとWとの値を用いてdeformability index [DI: (L-W)/(L+W)]を算出し、変形能の指標とした(Fig. 1)。この指数は0(L=Wの状態)から理論的には1まで変化し、1に近いほど変形能が大きい事を示す。<sup>1)</sup>

b. ESR(スピララベル法):スピララベル剤は5-doxyl-stearic acid(5-SAL)を用いた。ス

#### (1) Cell deformability by ektacytometry

Deformability index :

$$\frac{L - W}{L + W}$$



#### (2) Membrane fluidity by ESR

Order parameter (S) :

$$S = \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1)$$

$$= \frac{T_{zz} - T_{xx}}{T_{zz} + T_{xx}} \cdot \frac{1}{3} \frac{(T_{xx} + T_{yy} + T_{zz})}{(T_{xx} + 2T_{zz})}$$

(T<sub>xx</sub>, T<sub>yy</sub>, T<sub>zz</sub> : hyperfine coupling constant)

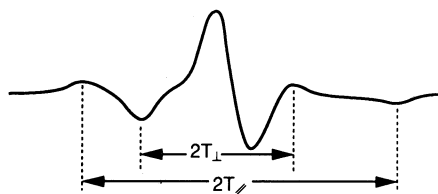


Fig. 1. Indices for biophysical properties of red cell membranes

ピンラベル剤は99.5%エタノールに溶解し、3.5  $\mu\text{g}$  になるように試験管にとり、 $\text{N}_2$ ガスでエタノールを揮発させて thin film<sup>9)</sup> とした。これに  $2 \times 10^9$  個の赤血球浮遊液 (Ht 約40%) を加え、37°C 15分間孵置し、ラベリングした。さらに赤血球を0.9% NaCl にて十分に洗浄し、free のラベル剤を除去した後、その赤血球を 20  $\mu\text{l}$  取り試料とした。電子スピン共鳴装置は、JES-RE 2 X 型、日本電子のものを用いた。

この ESR スペクトルを定量化するために order parameter (S) を用い、流動性の指標とした (Fig. 1)。この値は 0 から 1 の値をとり、0 に近いほど膜流動性が高いことを意味する。<sup>10)</sup>

## 2) 赤血球の処理方法

### a. 熱処理

濃厚赤血球浮遊液を各温度 (20°C ~ 50°C) で10分間孵置し、ektacytometry 及び ESR の測定に用いた。

### b. N-ethylmaleimide (NEM) 処理

b-1. リン酸緩衝液 (PBS) にて赤血球浮遊液は Ht 10% に調製し、種々濃度 (0, 0.2, 0.5, 2 mM) の NEM を加えて37°C 15分間反応させた。反応終了後、PBS にて十分洗浄し、ektacytometry 及び ESR の測定に用いた。

同時に NEM 処理赤血球の spectrin の dimer-tetramer equilibrium を検討する目的で、Marchesi らの方法に従い、spectrin を抽出し、Liu らの方法で non-denaturing PAGE で spectrin を検出した。その後 coomassie blue 染色にて spectrin のバンドを検出し、560 nm で測定した。

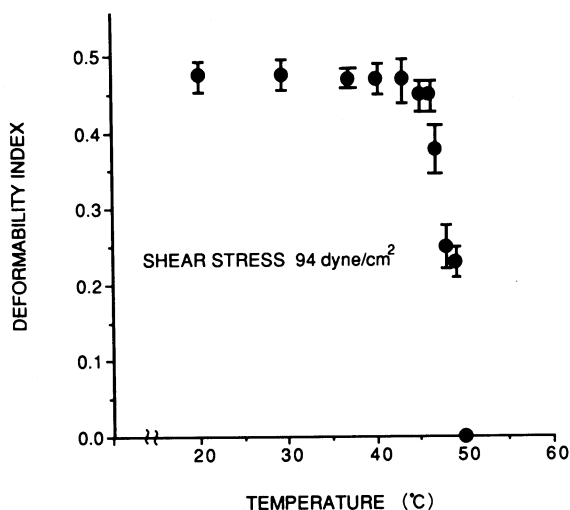
b-2. 0 及び 2 mM の NEM 処理赤血球をさらに各温度 (37°C ~ 43°C) で 10 分間孵置し、これらの血球を ektacytometry 及び ESR にて測定するとともに、1% グルタルアルデヒド加 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて

固定し、その形態を顕微鏡的に観察した。

### c. $\text{Ca}^{2+}$ 負荷赤血球の調製

洗浄赤血球を 2  $\mu\text{M}$  A23187, 50  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 20  $\mu\text{M}$  EGTA 加 K-HEPES buffer (130 mM KCl, 50 mM N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid) pH 7.4 にて Ht 10% とし、37°C 60分孵置することで  $\text{Ca}^{2+}$  負荷赤血

## A. DEFORMABILITY BY EKTACYTOMETRY



## B. FLUIDITY BY ESR

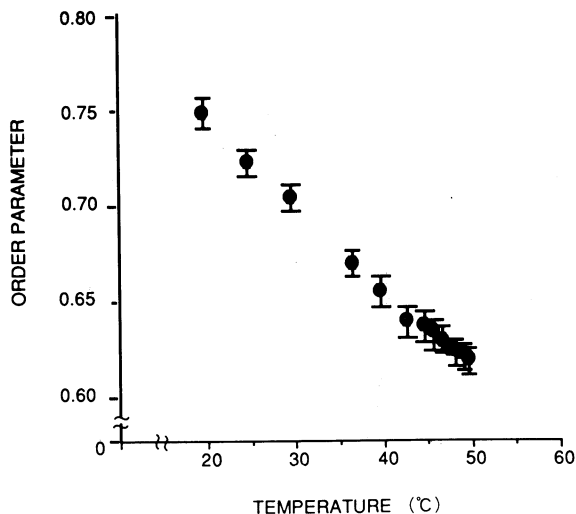


Fig. 2. Membrane biophysiology studied by ektacytometry and ESR with 5-SAL in normal red cells under heat treatment

球を調製した。さらに、この処理赤血球の一部を三分割し、a.  $30 \mu\text{M}$  W-7, b. 0.25% (W/V) glucose, または c. 2 mM EGTA を添加した条件下で、 $37^\circ\text{C}$ , 30分再孵置した。

以上の条件で処理した赤血球について、ESR

および ektacytometry を行い、その膜流動性および細胞変形能を比較検討した。なお、血球形態は1%グルタルアルデヒド加0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.4)にて固定し、光顕的に観察した。

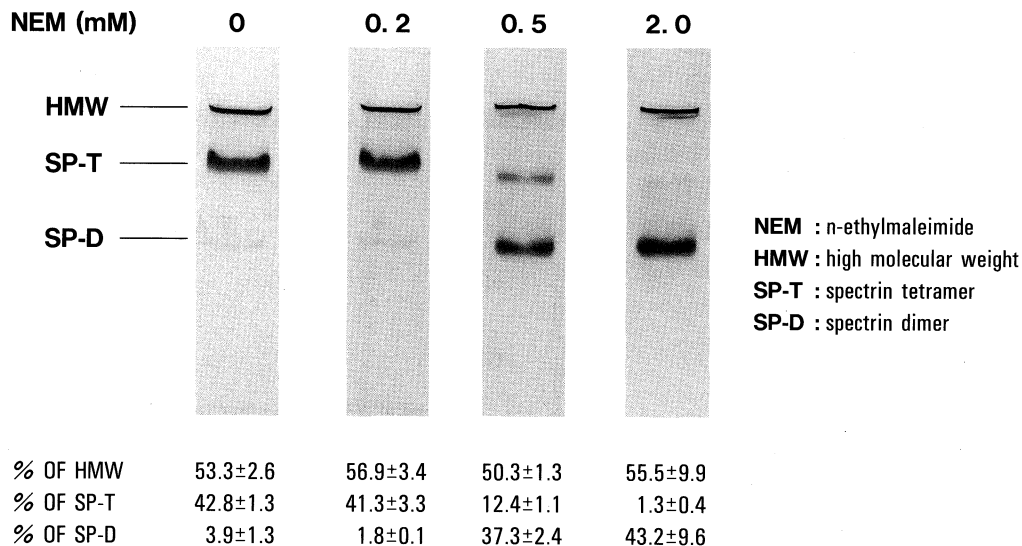


Fig. 3. Polymerization status of spectrins extracted from NEM-treated red cells

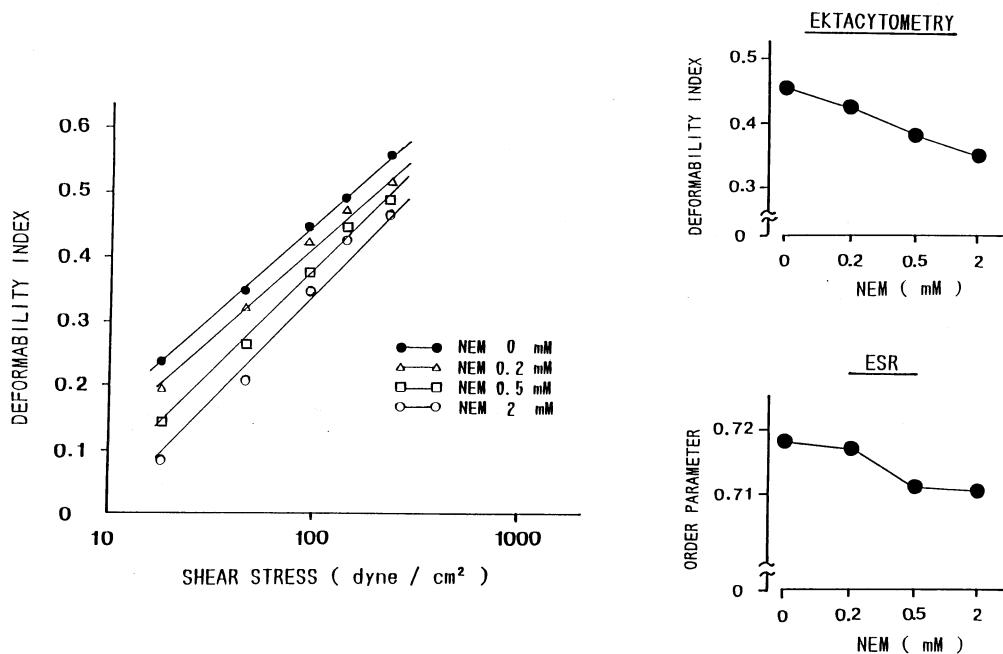


Fig. 4. Ektacytometry and ESR studies in red cells treated with NEM

## 結 果

### 1) 熱処理赤血球

Ektacytometry 法における膜変形能は、45°C までには変化を認めなかったが、47°C 以上では著明に低下し、49°C では約50%に減少した。これに対して ESR 法による order parameter 値は、45°C までには温度依存性に直線的に低下するが、46°C から 49°C までにはその値は減少せず、ほぼ一定であった (Fig. 2)。

### 2) NEM 処理赤血球

#### a. spectrin dimer-tetramer equilibrium の検討

NEM 処理赤血球より抽出した spectrin の high molecular weight complex (HMW), tetramer および dimer の比率はそれぞれ、  
 0 mM :  $53.3 \pm 2.6$ ,  $42.8 \pm 1.3$ ,  $3.9 \pm 1.3$ ,  
 0.2 mM :  $56.9 \pm 3.4$ ,  $41.3 \pm 3.3$ ,  $1.8 \pm 0.1$ ,  
 0.5 mM :  $50.3 \pm 1.3$ ,  $12.4 \pm 1.1$ ,  $37.3 \pm 2.4$ ,  
 2 mM :  $55.5 \pm 9.9$ ,  $1.3 \pm 0.4$ ,  $43.2 \pm 9.6$

となり、濃度依存性に spectrin の dimer 分画の増加を認めた (Fig. 3)。

#### b. Ektacytometry および ESR の測定結果

Ektacytometry における赤血球膜変形能 (DI 値) は、shear stress  $94 \sim 231$  dyne/cm<sup>2</sup> において、NEM の濃度依存性に低下した。また、 $94$  dyne/cm<sup>2</sup> における DI 値は、NEM 非処理赤血球では 0.47 であったのに対し、NEM 0.5 および 2 mM 添加赤血球では 0.38 および 0.35 と低下していた。また、ESR による order parameter は、NEM 非処理赤血球で 0.718 であったのに対し、NEM 0.5 および 2 mM 添加赤血球では 0.711 および 0.710 と低下を示した (Fig. 4)。

#### c. 熱処理による赤血球の形態変化および ektacytometry および ESR の測定結果

NEM の添加による形態変化は Palek らの報告と同様、37°C では認められなかったが、NEM 処理赤血球では熱処理を施行することにより、非処理赤血球より低温の 47°C で budding 現象を認めた (Fig. 5)。

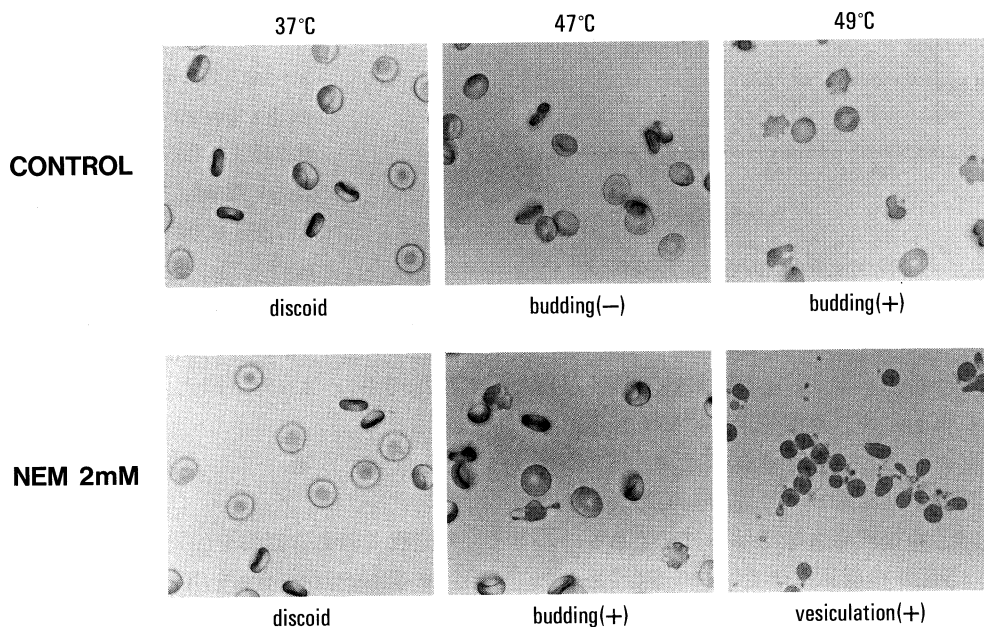
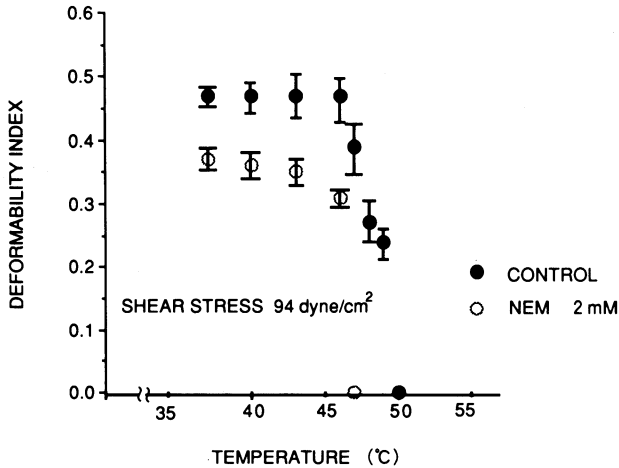


Fig. 5. Morphological changes in normal and NEM-treated red cells under heat treatment

## A. DEFORMABILITY BY EKTACYTOMETRY



## B. FLUIDITY BY ESR

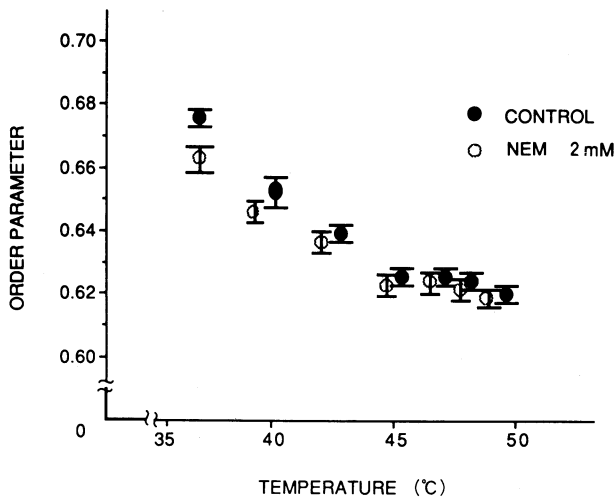


Fig. 6. Membrane biophysiology studied by ektacytometry and ESR with 5-SAL in NEM-treated intact normal red cells under heat treatment

Ektacytometry における DI 値は、NEM 処理の有無に関わらず、温度依存性に46°Cから低下した。しかし NEM 処理赤血球では、46°C以降の低下率がより高度で、DI 値が37°Cの50%となる温度は、非処理赤血球では48.7°Cであるのに対して、NEM 処理赤血球では、46.6°Cであった (Fig. 6)。

ESR における order parameter は37°Cで、非処理赤血球では0.668、処理赤血球で0.662と有

意差を認めたが、41°C以上では明らかな差を認めなかった (Fig. 6)。

3) Ca<sup>2+</sup>負荷赤血球

## a. 形態変化

Ca<sup>2+</sup>負荷により赤血球は100% echinocyte を呈したが、その赤血球に glucose を添加することにより約90%が、W-7添加では100%が discocyte に復帰した。一方、EGTA 添加では echinocyte のままで discocyte 化は認められなかった (Fig. 7)。

## b. Ektacytometry および ESR の測定結果

Ektacytometry による DI 値は、非処理時は0.58±0.02であったが、Ca<sup>2+</sup>負荷により0.51±0.02と低下した。その赤血球を glucose、W-7、EGTA に再懸置することにより、DI 値は各々0.58±0.02、0.56±0.02、0.57±0.02と正常もしくは正常下限の値に復帰した。(shear stress 280 dyne/cm<sup>2</sup>)。一方 order parameter は非処理時は0.713±0.005 (測定: 25°C)であったが、Ca<sup>2+</sup>負荷により0.736±0.04と高値となった。しかし、glucose の添加では0.721±0.05、W-7 添加では0.714±0.05、EGTA 添加では0.727±0.04となった (Fig. 8)。

## 考 察

今回我々はある修飾を加えた赤血球の細胞変形能を ektacytometry を用いて測定すると共に、ESR によるスピラベル法 (5-SAL label) を用いて膜流動性を検討し、この両者を比較した。まず熱処理赤血球では、49°Cで ektacy-

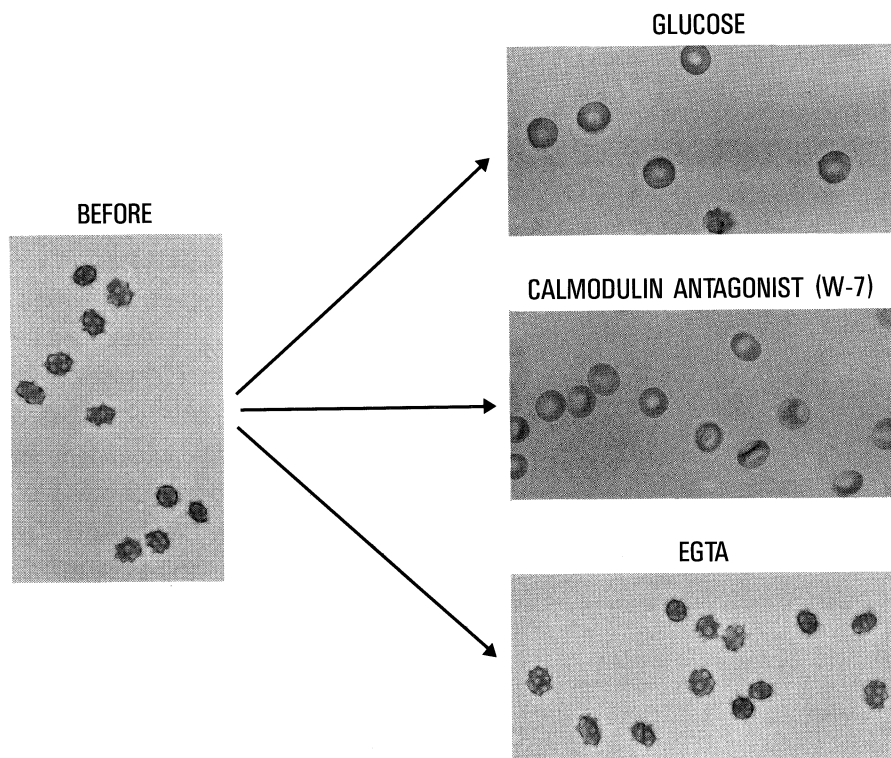


Fig. 7. Morphological changes of  $\text{Ca}^{2+}$ -loaded normal red cells after treatment with glucose, calmodulin antagonist (W-7), or EGTA

tometry における変形能が急激に低下したが、これは spectrin が  $\alpha$  と  $\beta$  に解離し、非可逆的变化を受ける<sup>11)</sup> ことに起因すると思われる。一方、ESR で見た膜流動性は  $45^{\circ}\text{C}$  までほぼ直線的に増加し、その後横這いとなっている。これは今回用いたラベル剤が脂肪酸ラベル剤であったことに関与すると思われる。なお、今回の実験では、各設定温度の幅が比較的広かったために相転位の温度は明らかではなかった。

次に SH 基阻害剤である NEM を用いて、膜骨格の主要蛋白である spectrin を、通常の状態である tetramer 優位から dimer 優位に変化させてみた。一般に spectrin の dimer が優位になると、spectrin による格子構造が形成できず、細胞骨格に破綻をきたし、細胞は形態を保つことができなくなる。<sup>12)</sup> これを反映して、NEM 処理赤血球では ektacytometry による変形能の低下

を認めた。また、脂肪酸ラベルによる ESR でも、これに相応する結果が得られた。さらに、NEM 処理血球に熱処理を加えたが、光顕的に非処理血球より低温で budding を認めた。NEM 処理血球に熱処理を施すと、電顕的に NEM 非処理血球では  $49^{\circ}\text{C}$  以上でしか認められないスペクトリン分子の凝集が、より低温で認められており、それにより膜が不安定になると考えられている。<sup>13)</sup> これは hereditary pyropoikilocytosis (HPP) の赤血球を  $46^{\circ}\text{C}$  で処理し膜蛋白を酸化すると、容易にスペクトリン分子の凝集をきたす<sup>14)</sup> ことに類似している。HPP の赤血球ではスペクトリン分子の head の部分に構造異常があることが知られているが、NEM 処理血球で、スペクトリンの dimer が優位になること及び熱処理時の形態変化等 HPP に類似する結果は、NEM 処理赤血球において、HPP 同様のスペクトリンの構造異常

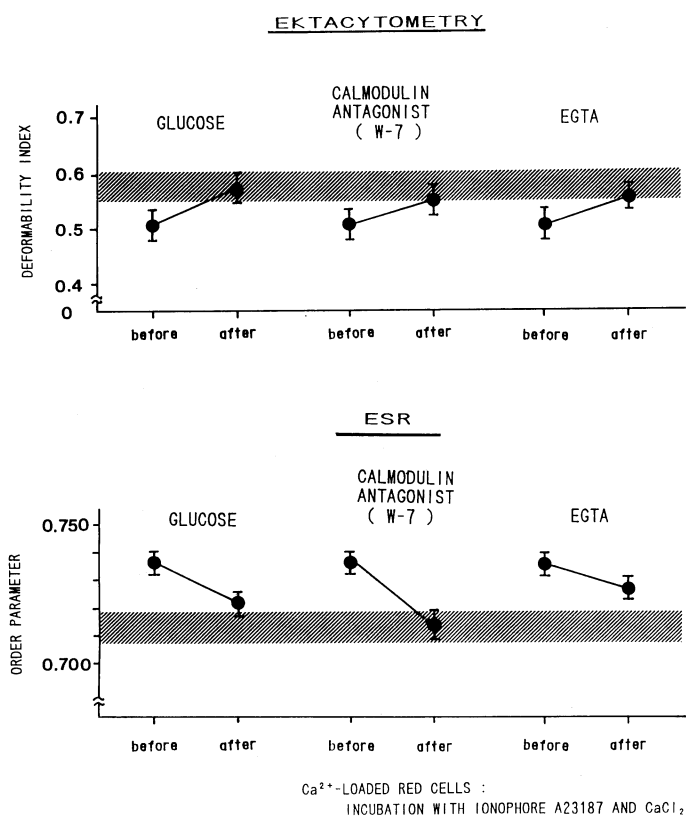


Fig. 8. Properties studied by ektacytometry or ESR with 5-SAL in  $\text{Ca}^{2+}$ -pretreated red cells incubated with glucose, calmodulin antagonist (W-7), or EGTA

が生じていることを示唆する。

ところで、ektacytometryの結果は形態変化に相応し、NEM処理赤血球では各温度において非処理赤血球に比しDI値が低いと共に、より低温の47°Cで、すでにrefraction patternを呈しなくなった。しかしESRの結果はこれに相応せず、41°C以上では両者間に差を認めなかった。これは、脂肪酸ラベルを用いたために、ラベルされている周囲の脂質の影響を膜骨格蛋白の変化よりも強く受けたためと思われる。したがって、ラベル剤の選択によっては41°C以上の条件下でも、骨格蛋白の変化をより鋭敏に反映することが可能であろう。

最後に $\text{Ca}^{2+}$ 負荷した際の細胞形態と変形能および流動性の変化を検討した。光顕的には従来の報告<sup>15),16)</sup>同様、 $\text{Ca}^{2+}$ 負荷によりechinocyte

となった。これをglucoseによりエネルギーを与える、あるいはcalmodulin antagonistであるW-7に再孵置する、あるいはEGTAで $\text{Ca}^{2+}$ をキレートする等の3種の方法で $\text{Ca}^{2+}$ の影響を除外した。なお、赤血球膜においてcalmodulinはspectrin, band 4.1に関連し、このcalmodulinの存在下で $\text{Ca}^{2+}$ が膜の安定性に関与する<sup>17),18)</sup>といわれている。そして、calmodulin antagonistを赤血球に作用させると高濃度(W-7の場合、100  $\mu\text{M}$ 以上)ではそれ単独で血球がcup formingすることが知られている。<sup>16)</sup>今回我々が用いたW-7の濃度は30  $\mu\text{M}$ であり、W-7自体による形態変化は認めていない。しかし、glucoseおよびW-7添加では $\text{Ca}^{2+}$ 負荷によりechinocyteになっていた形態がdiscocyteに復旧し、EGTAでは著変なく

echinocyteのままであった。しかしektacytometryのDI値はいずれの方法でも復旧し、この形態変化と変形能には相関が認められなかった。一方ESRの結果はglucoseおよびW-7添加でほぼ復旧し、EGTA添加では十分に復旧せず、形態変化に一致するように思われた。

以上、細胞変形能と膜流動性について比較したが、脂肪酸ラベルを用いるスピララベル法においても膜骨格の異常を捕えることが可能であった。しかし、脂肪酸ラベルを用いたために、40°C以上の高温では膜骨格異常があっても、その検出は困難であった。また、細胞変形能に異常を来す場合には、変形能の低下として表現されるが、その際の膜流動性には、亢進する場合と低下する場合の両者が認められた。

今後、膜流動性に関与する因子を検索すると



共に、膜蛋白異常症等の検索を、異なったラベル剤を用いて検討していく予定である。

## 文 献

- 1) Mohandas, N., Clark, M. R., Jacobs, M. S. and Shohet, S. B. : Analysis of factors regulating erythrocyte deformability. *J. Clin. Invest.* 66 : 563—573, 1980
- 2) Skalak, R. and Branemark, P-I. : Deformation of blood cells in capillaries. *Science* 164 : 717—719, 1969
- 3) Jandl, J. H., Simmons, R. L. and Castle, W. B. : Red cell filtration and the pathogenesis of certain hemolytic anemias. *J. Hematol.* 18 : 133—148, 1961
- 4) Ohnishi, S. and McCannell, H. M. : Interaction of the radical ion of chlorpromazine with deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 87 : 2293, 1965
- 5) 高桑雄一 : 赤血球膜骨格の構造と機能. *化学と生物* 26 : 287—294, 1988
- 6) Cooper, R. A. : Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N. Engl. J. Med.* 297 : 371—377, 1977
- 7) Farmer-II, B. T., Harmon, T. M. and Butterfield, D. A. : ESR studies of the erythrocyte membrane skeletal protein network : Influence of the state of aggregation of spectrin on the physical state of membrane proteins, bilayer lipids, and surface carbohydrates. *Biochim. Biophys. Acta* 821 : 420—430, 1985
- 8) Yamaguchi, T., Koga, M., Fujita, Y. and Kimoto, E. : Effects of pH on membrane fluidity of human erythrocytes. *J. Biochem.* 91 : 1299—1304, 1982
- 9) Butterfield, D. A., Roses, A. D., Copper, M. L., Appel, S. H. and Chesnut, D. B. : A comparative electron spin resonance study of the erythrocyte membrane in myotonic muscular dystrophy. *Biochemistry* 13 : 5078—5082, 1974
- 10) Simon, I. : Differences in membrane unsaturated fatty acids and electron spin resonance in different types of myeloid leukemia cells. *Biochim. Biophys. Acta* 556 : 408—422, 1979
- 11) Yoshino, H. and Minari, O. : Heat-induced dissociation of human erythrocyte spectrin dimer into monomers. *Biochim. Biophys. Acta* 905 : 100—108, 1987
- 12) Liu, S. and Palek, J. : Spectrin tetramer-dimer equilibrium and the stability of erythrocyte membrane skeletons. *Nature* 285 : 586—588, 1980
- 13) Smith, D. K. and Palek, J. : Sulfhydryl reagents induce altered spectrin self-association, skeletal instability, and increased thermal sensitivity of red cells. *Blood* 62 : 1190—1196, 1983
- 14) Palek, J., Liu, S., Liu, P., Prchal, J. and Castleberry, R. P. : Altered assembly of spectrin in red cell membranes in hereditary pyropoikilocytosis. *Blood* 57 : 130—139, 1981
- 15) Anderson, R. A. and Lovrien, R. E. : Erythrocyte membrane sidedness in lectin control of the  $Ca^{2+}$ -A23187-mediated diskocyte  $\leftrightarrow$  echinocyte conversion. *Nature* 292 : 158—161, 1981
- 16) Murakami, J., Maeda, N., Kon, K. and Shiga, T. : A contribution of calmodulin to cellular deformability of calcium-loaded human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 863 : 23—32, 1986
- 17) Takakuwa, Y. and Norla, M. : Modulation of erythrocyte membrane material properties by  $Ca^{2+}$  and calmodulin. *J. Clin. Invest.* 82 : 394—400, 1988
- 18) Nelson, G. A., Andrews, M. L. and Karnovsky, M. J. : Control of erythrocyte shape by calmodulin. *J. Cell. Biol.* 96 : 730—735, 1983