

高圧下でのヒト赤血球の膜安定性におけるスペクトリンの役割

山口 武夫*

(平成18年12月12日受理)

Role of Spectrin in Membrane Stability of Human Erythrocytes under High Pressure

Takeo YAMAGUCHI*

(Received December 12, 2006)

Abstract

Spectrin is a major cytoskeletal protein and plays an important role in the stability and deformability of erythrocyte membranes. So, the role of spectrin in the membrane stability is described on the basis of the disruption of human erythrocytes under high pressures. When the erythrocytes are exposed to a pressure of 200MPa, various sizes of particles are produced and analyzed by the flow cytometry. High-pressure-induced hemolysis is enhanced by the transition of spectrin tetramer to dimer, but suppressed gradually by conformational changes of spectrin above 30°C. Upon exposure to high pressure of 49°C-treated erythrocytes, in which spectrin is denatured, hemolysis is greatly suppressed by release of small vesicles from the membrane surface. In these small vesicles, spectrin content is decreased. From the relationship between hemolysis and vesicle size, it is concluded that pressure-induced hemolysis is suppressed by the release of small vesicles. Thus, these results suggest that the hemolysis and vesiculation of erythrocytes under high pressures are modulated by the conformational changes of spectrin.

1. はじめに

生命活動にとって重要な酸素は、一方でいろいろな物質の酸化に関与するため、生体にとって非常に危険な物質でもある。多くの生物において、酸素分子はヘモグロビンというタンパク質に結合し、体のあらゆる組織に運搬される。このことから酸素がいかに重要で、また危険であるかが分る。しかも、ヘモグロビンは膜の内に閉じ込められていて、血液中のタンパク質などと直接に接することはない。ヘモグロビン

を膜内に閉じ込めた細胞、すなわち赤血球は酸素や二酸化炭素を運搬するのに特化されていると言える。このことは、哺乳動物の赤血球には他の細胞で見られるような核や他の細胞内オルガネラが含まれていないことから理解できる。ここではヒト赤血球を例にとり、主に赤血球膜の特徴について述べてみたい。

ヒト赤血球は直径が約8 μm で、表面積をできるだけ大きくするために円盤上中窪みの形をしている。成熟赤血球の寿命は約120日で、一生の間に血管の中を旅行する距離は約250 kmと

* 福岡大学理学部化学科, 〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1
Department of Chemistry, Faculty of Science, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

されている [1]. 赤血球は体の隅々まで酸素を運ぶため、非常に細い毛細血管 (例えば、直径 $2.8 \mu\text{m}$) を通過しなければならない. そのため、赤血球膜 (図 1) は力学的に非常に安定で、他の細胞では見られない膜変形能を持っている. 赤血球は細胞内オルガネラを持たないために、赤血球から純粋な細胞膜を大量に、かつ容易に調製することができる. そこで、赤血球膜は生体膜のモデルとして研究に大いに利用されている. 赤血球膜の研究から得られてきた情報 (例えば、脂質二重層におけるリン脂質の非対称配置や膜貫通タンパク質と細胞骨格タンパク質との相互作用など) は今日の生体膜の構造と機能の概念を構築するのに大いに貢献してきた.

これまで赤血球膜の主な成分であるタンパク質、脂質、糖などについて、個々の生化学的、物理化学的性質、及びこれらの単純な系での相互作用についての研究は精力的になされてきた. しかし、これらの相互作用が赤血球膜全体に及ぼす影響についての理解は不十分である. 溶血とは膜が壊れ、ヘモグロビンが膜から放出する現象である. この膜の崩壊の詳しい解析は膜を構成している成分間の相互作用を解析するのに有益である. 溶血は浸透圧 [2], 薬物 [3], 原虫感染 [4] などいろいろな要因で引き起こされる. 浸透圧による方法は膜を調製するのに最も良く用いられている方法である. 塩濃度の低いバッファーに赤血球を入れると、水がアクアポリンと呼ばれる水チャンネルを通して膜内に入

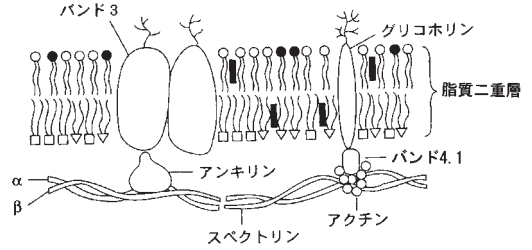


図 1 赤血球膜の構造モデル

り、赤血球は膨張し、ついには膜に大きな孔が生じ溶血する. 一方、赤血球の体積を減少させる方法に加圧がある. 圧力は静電的相互作用、疎水的相互作用、水素結合などに影響を及ぼすことが知られている [5]. 生体膜の構造と機能において、これらの相互作用が重要な働きをしていることが分かっている. そこで、赤血球を加圧し膜の構造変化を調べることは、膜の構成成分間の相互作用を解析するのに有益であると考えられる. これまでにヒト赤血球を加圧することで得られてきた結果について簡単に述べる.

- 1) 赤血球を高圧に 37°C で 30 分曝すと、溶血および小胞化が $130 \sim 140 \text{ MPa}$ で起こり始め、 200 MPa での溶血の値は約 40% である (図 2) [6].
- 2) 赤血球を 200 MPa で加圧すると、スペクトリンが一部膜から遊離する. そのような膜は常圧のもとで、膜タンパク質がフォールデングする条件 (30°C 以下の温度、 $\text{pH} 6$ 以下の pH) で不

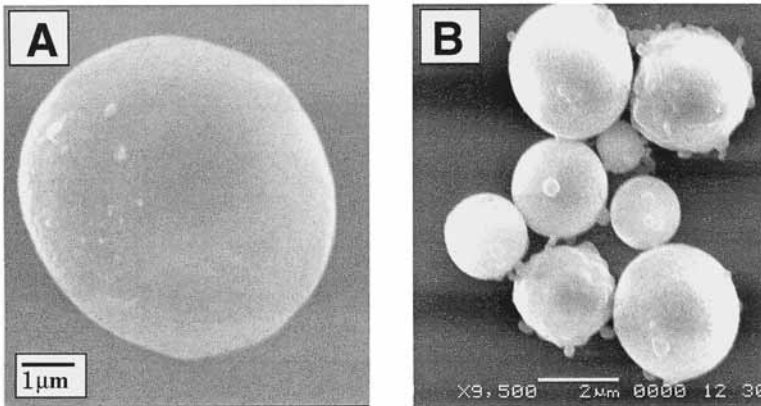


図 2 赤血球の走査型電子顕微鏡写真
A, 無傷赤血球 ; B, 200 MPa で加圧後、常圧に戻した赤血球

安定になる [7]. 3) 膜貫通タンパク質 (例えば、バンド 3 やグリコホリンなど) と細胞骨格タンパク質 (例えば、スペクトリンなど) を diamide やカルボジイミドを用いて架橋すると、加圧による溶血は完全に抑制される [8, 9]. このとき、膜タンパク質として主にバンド 4.1 を含む小胞が膜から放出される [10]. 4) 抗体や赤血球膜の表面に存在する糖鎖を認識するレクチンを用いて赤血球を凝集させると、加圧による溶血は減少する [11]. 5) 膜貫通タンパク質でアニオン輸送を行っているバンド 3 をアニオン輸送阻害剤で化学修飾すると、加圧による溶血は減少する [12, 13]. 6) 膜表面にマイナスの荷電を与えているシアル酸を取り除くと、加圧による溶血は増大する [14]. このように加圧による溶血の値は赤血球膜の構造変化に敏感に反応して変化する. 現在、この溶血の変化が膜を構成している分子に基づいてどのように説明できるか解析を進めている. ここでは、i) 加圧した赤血球から生成する粒子を、フローサイトメトリーを用いて解析する方法、骨格タンパク質であるスペクトリンに注目して、ii) スペクトリンのテトラマー・ダイマー平衡と加圧溶血との関係、iii) スペクトリンの変性と加圧溶血との関係について述べる.

2. 加圧により赤血球から生成する粒子のフローサイトメトリーによる解析

加圧 (200 MPa) 処理した赤血球浮遊液を常圧下に戻し、光学顕微鏡で観察すると、図 3 で見られるように、いろいろな大きさの粒子が生成していることが分る. このような粒子の大きさや粒子内部の状態に関する情報はフローサイトメトリーを用いて得ることができる [15]. フローサイトメトリーは狭い流路を通過する個々の粒子にレーザー光を照射し、前方散乱より粒子の大きさを、側方散乱より粒子の内部についての情報を与える. 図 4 は赤血球浮遊液を 200 MPa で加圧した後、常圧に戻し、フローサイトメトリーで測定した結果を示している. 図 4a は横軸に前方散乱の大きさを、縦軸に粒子の数を、また図 4b は横軸に側方散乱の大きさを、縦軸に粒子の数をプロットしたものである. 図に示すように、領域 I, II, III およびピーク P1, P2, P3 を設定し、それぞれが何を表しているか検討した. これまでの研究から、赤血球を 49 °C で加熱すると、膜表面に小胞が多数生成し、一部、膜から溶血を生じることなしに遊離することが知られている [16]. 図 4c と 4d は 49 °C で熱処理した赤血球浮遊液のフローサイトメトリーを示している. 領域 II とピーク P2 に相当する粒子が著しく減少していることが分る. 次に、49 °C で前処理した

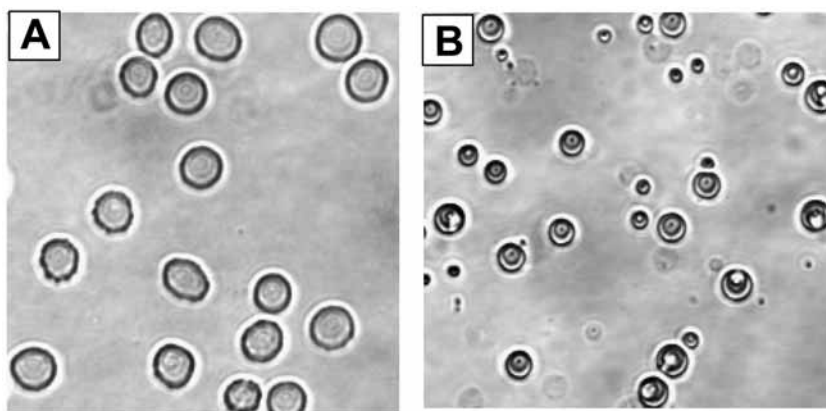
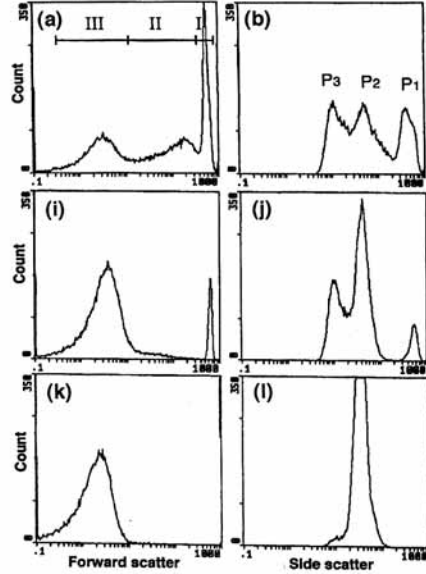
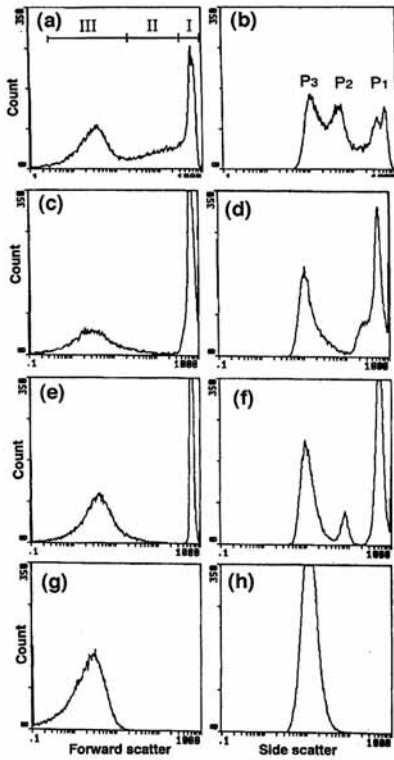


図 3 赤血球の光学顕微鏡写真

A, 無傷赤血球; B, 200 MPa で加圧処理後、常圧に戻した赤血球

赤血球浮遊液の加圧処理した結果を図4eと4fに示す。無傷赤血球の場合に見られた領域IIとピークP2のシグナルが著しく減少している。また、この加圧処理した赤血球浮遊液を遠心すると、上清に小胞、ペレットに赤血球（マザーセル）と分離することができる。この小胞だけを含む上清のフローサイトメトリー（図4gと4h）か

ら、領域IIIおよびピークP3は小胞に由来していることが分る。また、領域IおよびピークP1は赤血球浮遊液の中で、大きな粒子（マザーセル）を表していることが分る。次に、加圧処理により溶血が著しく増大する場合についてのフローサイトメトリーを調べることにする。赤血球をトリプシンあるいはノイラミダーゼ処理



- 1) 無傷赤血球を200 MPaで処理した赤血球浮遊液 (a, b)
- 2) 49℃で加熱した赤血球浮遊液 (c, d)
- 3) 49℃で加熱した赤血球を200 MPa処理した赤血球浮遊液 (e, f)
- 4) サンプル3)の遠心後の上清 (g, h)
- 5) トリプシン処理後、200 MPaで処理した赤血球浮遊液 (i, j)
- 6) オープンゴースト浮遊液 (k, l)

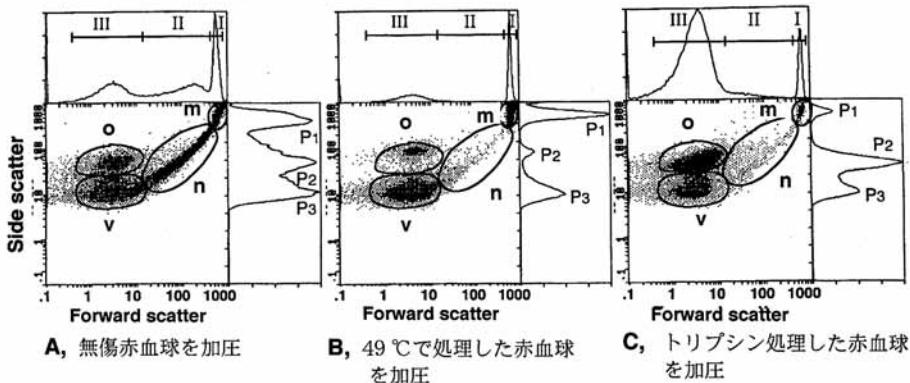


図4 赤血球浮遊液のフローサイトメトリー

して、膜表面のシアル酸に起因しているマイナスの荷電を減少させる。このような赤血球を加圧処理すると、溶血は著しく増大する [14]。このときのフローサイトメトリーを図 4i と 4j に示す。この場合、領域 III とピーク P2 に相当する粒子が著しく増大し、領域 I とピーク P1 のシグナルが減少している。また、赤血球を低張バッファー中で溶血させたときのフローサイトメトリーを図 4k と 4l に示す。この場合、領域 III とピーク P2 にシグナルが観測されている。このようにして、膜に孔があいた粒子（オープンゴースト）は領域 III とピーク P2 にシグナルを与えることが分る。これらの結果をまとめると、マザーセルは領域 I とピーク P1 に、断片化した粒子（マザーセルよりも小さいが小胞よりは大きい）は領域 II とピーク P2 に、小胞は領域 III とピーク P3 に、オープンゴーストは領域 III とピーク P2 に現れることが分る。更に、これらの結果は前方散乱と側方散乱のドットプロットから確かめることができる。無傷赤血球、49 °C で加熱した赤血球、およびトリプシン処理した赤血球の加圧後のドットプロットをそれぞれ図 4A, 4B, 及び 4C に示す。ドットプロットを図のように 4 つの領域に分けると、領域 m にはマザーセル、領域 n には断片化した粒子、領域 v には小胞、領域 o にはオープンゴーストを含むことが分る [15]。領域 o にオープンゴーストを含むことはトリプシン処理した赤血球を加圧後、遠心

し、上清に存在する大きな粒子の光学顕微鏡による観察から確かめることができる (図 5)。赤血球を 49 °C で処理し、それから加圧すると、小胞化が促進し、溶血は抑制される。一方、トリプシン処理した赤血球を加圧すると、赤血球は断片化することなくオープンゴーストになり、溶血は増大する。無傷赤血球を加圧した場合、溶血の値は両者の中間であり、断片化もかなり生じている。ここで述べた三つの場合から明らかかなように、赤血球膜の構造を一部変化させると、加圧に対する膜の応答が大きく異なってくることが分る。こうして、フローサイトメトリーによる粒子解析は加圧による溶血機構を調べる上で非常に有益である。

3. スペクトリンのテトラマー・ダイマー平衡と加圧による溶血特性

スペクトリンは細胞骨格タンパク質で、脂質二重層を膜の内側から支えているので、裏打ちタンパク質とも呼ばれている。スペクトリンは α 鎖 (280 kDa) と β 鎖 (246 kDa) からなるヘテロダイマー (2 量体) で、赤血球膜においてはダイマー同士がさらに会合してテトラマーを形成している (図 6) [17, 18]。 α 鎖と β 鎖は共に 106 アミノ酸残基からなるセグメントがそれぞれ 22 回と 17 回繰り返している。これらの各セグメントは 3 つのヘリックスから成る構造をとって

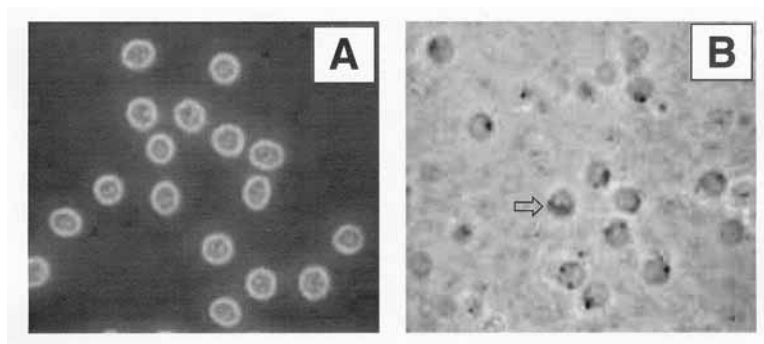


図 5 赤血球の光学顕微鏡写真

A, 無傷赤血球

B, トリプシン処理した赤血球を加圧 (200 MPa) 後、常圧で遠心した後の上清。矢印はゴーストを示している。

いると考えられている。赤血球膜の安定性と変形能はスペクトリンのこのような構造と密接に関係している。スペクトリンのテトラマー・ダイマー平衡は温度やイオン強度に依存して変化する。例えば、単離したスペクトリンのテトラマーからダイマーへの解離は30℃以上で、また、低いイオン強度で促進することが知られている [19]。

赤血球にSH基修飾試薬であるN-エチルマレンイミド (NEM) や diamide を作用すると、膜内に含まれるヘモグロビンなどのタンパク質と同様に膜タンパク質も修飾される。赤血球膜 (オープンゴースト) を0℃で低いイオン強度バッファーに曝すと、スペクトリンがテトラマーとして膜から遊離してくる。一方、NEM や diamide 処理した赤血球膜からはスペクトリンのSH基の化学修飾の程度に依存して、スペクトリンダイマーの割合が増大する。これまでの実験結果から、30℃以下の温度でNEMあるいはdiamide処理した赤血球を、37℃で加圧すると、スペクトリン

のSH基の修飾の度合いに依存して (言い換えると、ダイマーの割合が増加するにつれて)、加圧による溶血は増大することが分かっている。興味あることに、この30℃以下で化学修飾した赤血球をバッファー中で30℃以上の温度でインキュベートすると、インキュベーション時間に依存して加圧による溶血は減少していく (図7) [20]。この減少の意味について、スピラベル法により検討した結果、30℃以上でのスペクトリンのコンホメーション変化と加圧溶血が密接に関係していることが明らかになった [20]。こうして、スペクトリンはNEMあるいはdiamideにより修飾を受けるとテトラマーからダイマーへ解離し、加圧溶血は増大する。しかし、スペクトリンのコンホメーション変化に伴い、加圧による溶血は減少していく。これらの結果はスペクトリンの構造変化により、加圧による溶血が大きく変化することを示している。

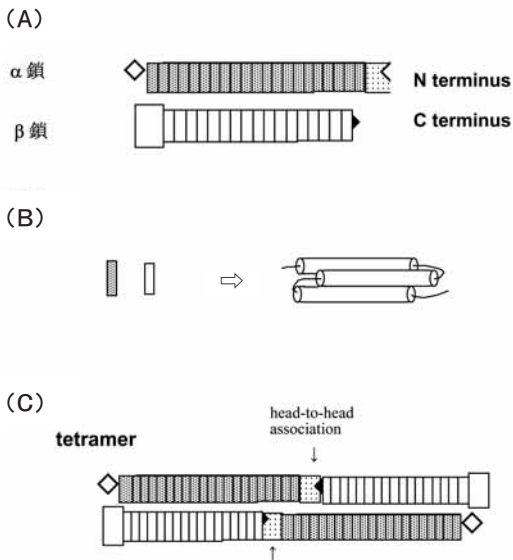


図6 スペクトリンの構造。(A) α 鎖と β 鎖は106アミノ酸残基からなるセグメント (□, □) が多数くり返している。 α 鎖と β 鎖が“side-to-side”で会合しヘテロダイマーを形成する。(B)各セグメントは3つのヘリックス構造をとっている。(C)ヘテロダイマーが“head-to-head”で会合し、テトラマーを形成する。

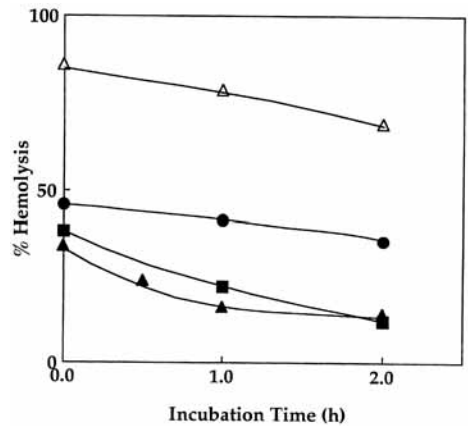


図7 赤血球の加圧溶血に関するNEM処理後のインキュベーション時間の効果
●, none ; △, 2 mM NEM で 15℃, 30 min;
▲, 2 mM NEM で 37℃, 30 min;
■, 2 mM diamide で 37℃, 30 min
前処理した赤血球をバッファー中でインキュベートし、それから加圧 (200 MPa) した。

4. スペクトリンの熱変性と加圧による溶血特性

スペクトリンは49℃で変性することが知られている。そこで、49℃で処理した赤血球の加圧による溶血特性を調べた [16]。赤血球浮遊液を37～52℃で15分間インキュベートした後、加圧処理を行うと溶血は図8に示されるように変化する(ここでは、低張バッファーを用いた浸透圧による溶血の結果も示してある)。加圧溶血の値は37℃から42℃までは一定であるが、42℃を過ぎると減少し、49℃で極小値を示す。スペクトリンの49℃での熱変性は蛍光スペクトルから調べることができる。ゴーストを37℃と49℃で処理し、N-(1-pyrenyl) iodoacetamide (NPIA) でラベルした後、非イオン性界面活性剤であるトリトン X-100 を用いてスペクトリンを抽出する。このスペクトリンをバッファーに溶かし、蛍光スペクトルを測定すると、ピレンによるエキシマー蛍光が49℃で処理した場合にのみ出現する。このエキシマー蛍光はピレン分子が互いに2.4Å以内に存在する時にのみ出現することが知られている。NPIA 分子はスペクトリンのシステイン残基のSH基に結合するので、スペクトリンが49℃でコンフォメーション変化を生じ、SH基同士が非常に接近したことを意味している。

赤血球を49℃で加熱し、スペクトリンを変性させると、膜の表面に小さな小胞が生成する(図9)。図8の結果は、このような赤血球を加圧すると、溶血は著しく抑制されることを示してい

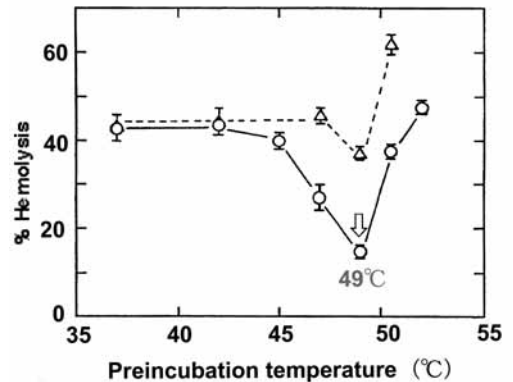


図8 赤血球の加圧溶血に関するプリインキュベーション温度の効果

赤血球をバッファーに浮遊し、37～52℃で15分間インキュベートした。その後、赤血球は加圧(200 MPa)溶血(○)と浸透圧溶血(△)の実験に使用された。

る。この場合、加圧により、膜からの小胞の放出が促進されていることが図4Bのフローサイトメトリーの結果から明らかである。そこで、加圧溶血と放出される小胞の大きさとの関係を調べることにした。加熱処理した赤血球を加圧し、生成する小胞の大きさを光散乱を用いて測定すると、放出される小胞の大きさは37℃～40℃で一定で、それから温度の上昇により減少する [16]。また、小胞に含まれるスペクトリンの量をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用

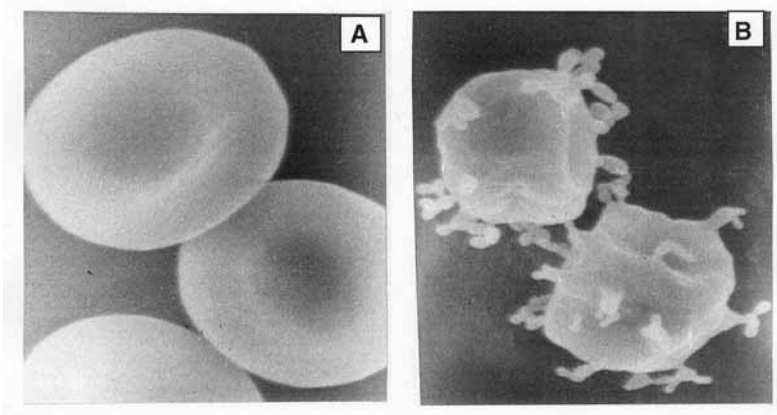


図9 49℃で処理した赤血球の走査型電子顕微鏡写真
A, 無傷赤血球; B, 常圧で49℃, 15分間加熱した赤血球

いて調べたところ、小胞の大きさが減少するにつれて、スペクトリン含量も減少した [16]. このように、加圧による溶血は放出される小胞の大きさと関係しているように思われる. そこで、これまでに得られた加圧溶血と放出される小胞の大きさとの関係について調べてみた (図 10). 例えば、赤血球内の ATP 含量を枯渇させると、膜表面に小胞が形成され、一部膜から放出される. この場合、スペクトリンは変性していないが、スペクトリンのリン酸化状態が変化し、他の膜タンパク質との相互作用も変化していることが考えられる. このような赤血球を加圧すると、溶血は抑制され、放出される小胞の大きさも小さく、また小胞に含まれるスペクトリン量も減少している. また、膜タンパク質架橋剤として diamide を用いて、バンド 3 などの膜貫通タンパク質とスペクトリンなどの細胞骨格タンパク質を架橋する. この場合、赤血球膜の表面に小胞は生成しない. このような赤血球を加圧すると、溶血は著しく抑制され [8], 直径 260 nm の小胞が放出される. この小胞にはバンド 4.1 が多く含まれている [10]. 次に、加圧による溶血が増大する場合について見てみよう. 赤血球膜表面のシアル酸を取り除き、負の表面電荷を減少させると、加圧による溶血は著しく増大する [14]. このとき、膜表面から放出される小胞

の大きさも 560 nm と大きくなる. こうして、赤血球の加圧溶血は膜から放出される小胞の大きさが小さくなるにつれて抑制されることが分る. 小さな小胞には含まれてくるスペクトリンが少ないことから、おそらく、赤血球膜の裏打ち構造の損傷も小さく、小胞を放出しても孔が生成しにくいことが予想される.

5. おわりに

ヒト赤血球を加圧 (200 MPa) すると、膜を構成している成分間の相互作用の変化に応じて、いろいろな大きさの粒子が生成する. 今回、これらの粒子をフローサイトメトリーで解析する方法を紹介した. また、赤血球の加圧による溶血特性をスペクトリンに注目し、特にスペクトリンのダイマー・テトラマー平衡およびスペクトリンの熱変性の観点から検討した. そして、加圧による溶血はスペクトリンの構造 (コンホメーション) と大いに関係し、膜の表面から放出される小胞の大きさが小さくなるにつれて抑制されることを述べた. 今後の課題は、膜を貫通しているタンパク質 (例えば、バンド 3 やグリコホリンなど) の加圧溶血に及ぼす影響を検討していくことである. これからも、赤血球膜の研究を通じて、生体膜の構造と機能に関する知見がより深まり、また新しい発見がなされることを期待してやまない.

最後に、ここに紹介した一連の研究に関わっていただいた共同研究者の方々に深く感謝いたします.

参考文献

1. Bull, B. S. and Breton-Gorius, J. (1995) Morphology of the erythron in *Hematology* (Beutler, E., Lichtman, M. A., Coller, B. S., and Kipps, T. J., eds.) pp. 349-363
2. Dodge, J. T., Mitchell, C., and Hanahan, D. J. (1963) The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 119-130
3. Fujii, T., Sato, T., Tamura, A., Wakatsuki,

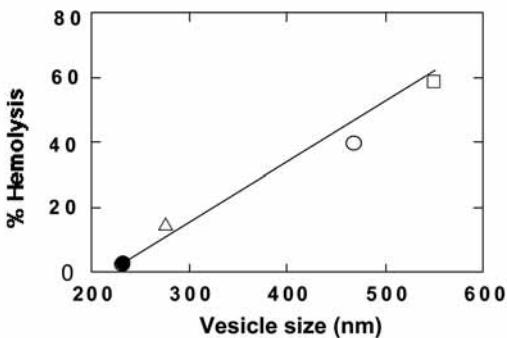


図 10 加圧溶血と小胞の大きさとの関係
○, 無傷赤血球; ●, 100 MPa で diamide 処理した赤血球; △, 49 °C で加熱した赤血球; □, トリプシン処理した赤血球
これらの前処理した赤血球を 200 MPa で 37 °C, 30 分加圧した。

- M., and Kanaho, Y. (1979) Shape changes of human erythrocytes induced by various amphipathic drugs acting on the membrane of the intact cells. *Biochem. Pharmacol.* **28**, 613-620
4. Wickham, M. E., Culvenor, J. G., and Cowman, A. F. (2003) Selective inhibition of a two-step egress of malaria parasites from the host erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **278**, 37658-37663
 5. Hermans, K. (1988) Bio-organic chemistry in *Organic High Pressure Chemistry* (le Noble, W. J., ed.) pp. 380-425
 6. Yamaguchi, T., Kajikawa, T., and Kimoto, E. (1991) Vesiculation induced by hydrostatic pressure in human erythrocytes. *J. Biochem.* **110**, 355-359
 7. Yamaguchi, T., Kawamura, H., Kimoto, E., and Tanaka, M. (1989) Effects of temperature and pH on hemoglobin release from hydrostatic pressure-treated erythrocytes. *J. Biochem.* **106**, 1080-1085
 8. Kitajima, H., Yamaguchi, T., and Kimoto, E. (1990) Hemolysis of human erythrocytes under hydrostatic pressure is suppressed by cross-linking of membrane proteins. *J. Biochem.* **108**, 1057-1062
 9. Yamaguchi, T., Miyamoto, Y., and Terada, S. (1996) Interaction of carbodiimide with human erythrocytes: hemolytic properties induced by high pressure, heating, and hypotonic medium. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **69**, 2305-2308
 10. Yamaguchi, T., Saeki, T., and Kimoto, E. (1993) Release of protein 4.1-rich vesicles from diamide-treated erythrocytes under hydrostatic pressure. *Biochim. Biophys. Acta* **1147**, 1-5
 11. Yamaguchi, T., Satoh, I., Ariyoshi, N., and Terada, S. (2005) High-pressure-induced hemolysis in papain-digested human erythrocytes is suppressed by cross-linking of band 3 via anti-band 3 antibodies. *J. Biochem.* **137**, 535-541
 12. Yamaguchi, T., Matsumoto, M., and Kimoto, E. (1995) Effects of anion transport inhibitors on hemolysis of human erythrocytes under hydrostatic pressure. *J. Biochem.* **118**, 760-764
 13. Matsumoto, M., Yamaguchi, T., Terada, S., and Kimoto, E. (1996) Effects of intracellular pH on high pressure-induced hemolysis of anion transport inhibitor-treated erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1280**, 243-250
 14. Yamaguchi, T., Matsumoto, M., and Kimoto, E. (1993) Hemolytic properties under hydrostatic pressure of neuraminidase- or protease-treated human erythrocytes. *J. Biochem.* **114**, 576-581
 15. Yamaguchi, T. and Terada, S. (2003) Analysis of high-pressure-induced disruption of human erythrocytes by flow cytometry. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **8**, 1013-1016
 16. Yamaguchi, T., Miyamoto, J., and Terada, S. (2001) Suppression of high-pressure-induced hemolysis of human erythrocytes by preincubation at 49 °C. *J. Biochem.* **130**, 597-603
 17. Bennett, V. and Baines, A. J. (2001) Spectrin and ankyrin-based pathways: Metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol. Rev.* **81**, 1353-1392
 18. Winkelmann, J. C. and Forget, B. G. (1993) Erythroid and nonerythroid spectrins. *Blood* **81**, 3173-3185
 19. Ungewickell, E. and Gratzer, W. (1978) Self-association of human spectrin: a thermodynamic and kinetic study. *Eur. J. Biochem.* **88**, 379-385
 20. Yamaguchi, T., Murata, Y., Kobayashi, J., and Kimoto, E. (1994) Effects of chemical modification of membrane thiol groups on hemolysis of human erythrocytes under hydrostatic pressure. *Biochim. Biophys. Acta* **1195**, 205-210

