

ヒト赤血球でのアクアポリン阻害による加圧溶血の増大

山口 武夫¹⁾

(平成26年 5 月31日受理)

Enhancement of High Pressure-induced Hemolysis by Aquaporin Inhibition in Human Erythrocytes

Takeo YAMAGUCHI¹⁾

(Received May 31, 2014)

Abstract

Erythrocytes, specifically differentiated cells, must pass through the small capillary to carry oxygen to all tissues of the body. Thus, erythrocyte membranes are peculiarized by biconcave shape, stability, and deformability. These membrane properties are regulated by interactions between transmembrane proteins and cytoskeletal ones. Therefore, it is important to understand these membrane protein interactions in more detail. High pressure-induced hemolysis is very sensitive to changes in these interactions. However, it is reported in this paper that the pressure-induced hemolysis is also modulated by changes in water transport, as shown in erythrocytes treated with mercurials and in vivo aged cells. Data from the ¹H spin-spin relaxation times of water show that pressure-induced hemolysis is enhanced by inhibition of water exchange through aquaporin-1, water channel expressed in the erythrocyte membrane. Such an enhancement is characterized by suppression of the fragmentation and release of large vesicles. The relation of fragmentation and flickering is discussed.

1. はじめに

哺乳動物において赤血球は体のあらゆる組織に酸素を運び、また組織で生じた二酸化炭素の一部を肺まで運搬する働きを行っている。そのため、赤血球は非常に小さな毛細血管をも通過しなければならない。このような赤血球における膜の主な特徴は変形能と安定性である。赤血球の円盤状中窪みの形態や膜の変形能と安定性はバンド3などの膜貫通タンパク質とスペクトリンなどの裏打ちタンパク質との相互作用によってもたらされている^[1]。従って、この相互作用を十分に調べることは赤血球膜の構造と機能の理解を深めるために重要である。

これまで、我々はヒト赤血球の膜構造を溶血現象に着目して解析してきた^[2-4]。溶血、すなわち膜の破壊は膜成分間の相互作用の異常あるいは欠損により生じ、膜からのヘモグロビン放出により、感度よく検出する

ことができる。特に、加圧による溶血は次のような特徴を有する。赤血球をバッファー中に浮遊させ加圧すると、パスカルの原理により、圧力は均一に膜に作用する。しかし、赤血球膜は主にタンパク質、脂質、糖鎖から構成されており、これらの分子の圧縮率や相互作用が異なることから、膜の圧力への応答は極めて不均一であるとみなすことができる。赤血球浮遊液を37°Cで30分間加圧すると、溶血および小胞化は130~140 MPaで起こり始め、200 MPaでの溶血の値は40~50%である^[2,5]。ここで、溶血50%というのはすべての赤血球に含まれるヘモグロビン分子の半分が膜外に放出された場合である。加圧(200 MPa)処理した赤血球浮遊液を常圧のもとで光学顕微鏡を用いて観察すると、赤血球の小胞化や断片化によりいろいろな大きさの粒子が生成していることがわかる^[4,6]。加圧による溶血は小胞化や断片化の促進により抑制される。例えば、加熱によりスペクトリンが変性した赤血球を加圧する

1) 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

と小胞化が促進し、また高張バッファー中での加圧は断片化を促進し、いずれの場合も加圧溶血は抑制される(図1)^[7,8]。

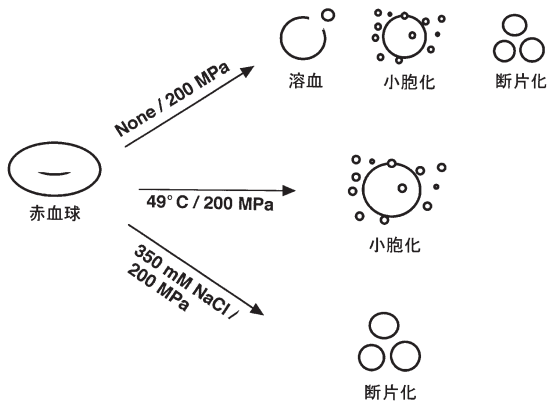


図1. ヒト赤血球の圧力応答
ヒト赤血球を200 MPaで加圧すると、溶血、小胞化、断片化が起こる。加熱(49°C)した赤血球を加圧すると小胞化が促進する。また、高張バッファー中で加圧すると断片化が促進する。

また、加圧による溶血は膜タンパク質間相互作用を鋭敏に反映することも分かっている。このように、膜構造を研究する上で、圧力もまた有力な手段であることがわかる。これまでに、加圧処理した赤血球の常圧での膜安定性^[9]、スペクトリンが変性した赤血球の加圧による溶血特性^[6]について報告しているので、興味あるかたは参照されたい。

本稿では、膜貫通タンパク質であるアクアポリン-1(AQP1)を介した水の輸送あるいは交換を水銀試薬で抑制すると加圧による溶血が増大すること^[10]、また老化した赤血球ではAQP1による水の輸送能力が低下しており、やはり加圧により溶血が増大することを述べる^[11]。また、何故、AQP1を介した水の交換が抑制されると加圧による溶血が増大するかについて筆者の考えを述べてみたい。

2. 水銀処理した赤血球の加圧による溶血特性

2-1. 加圧溶血は水銀試薬により増大する

赤血球にSH基修飾試薬であるN-ethylmaleimide(NEM)やp-chloromercuribenzoate(pCMB)を作用させると、加圧による溶血はNEMで抑制され、pCMBでは著しく増大する(図2)。

この溶血の増大は還元剤であるdithiothreitol(DTT)により容易に取り除くことができる。溶血の値が元に戻ることで、pCMBの膜への作用は可逆的である。先にNEM処理した後にpCMBを作用させてもpCMBの効果が現れることから、両者の結合部位は異なり、また溶血に関してNEMよりもpCMBの効果が優勢であることがわかる^[10]。pCMBの代わりにHgCl₂を用い

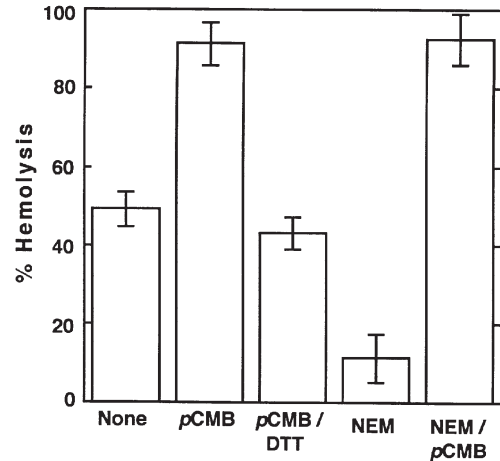


図2. 加圧溶血に関するSH基修飾試薬の効果
pCMBによる加圧溶血の増大は還元剤であるDTTにより取り除かれる。NEMで前処理してもpCMBの効果は現れる。

ても同様な結果が得られる。

2-2. 水銀試薬はAQP1に結合する

赤血球に水銀試薬を作用させると、水銀試薬はバンド3やAQP1のような膜貫通タンパク質に結合する^[12,13]。中でも、バンド3は膜安定性に関与することが知られている。そこで、pCMB処理した赤血球膜からバンド3を取り出し、システイン残基中のSH基の定量を行ったが変化はなかった。そこで、次にAQP1について検討した。AQP1は分子量28-kDaで、4つのシステイン残基(Cys)を含む水チャンネルである^[13]。AQP1はバンド3に比べると存在量が少なく、また膜からの単離も容易でない。そこで、AQP1への水銀の結合を調べるため、原子吸光法を利用した。水銀試薬(HgCl₂)で処理した赤血球からゴーストを調製し、ゲル電気泳動(SDS-PAGE)によりAQP1を他の膜タンパク質から分離した。AQP1のバンドをゲルから切り出し、原子吸光法により分析した結果、水銀がAQP1に含まれていることが判明した^[10]。これらの結果は水銀試薬がAQP1に結合していることを示唆している。

2-3. AQP1を介した水の交換を阻害すると加圧溶血は増大する

水銀試薬はAQP1のCys-189に結合し、水の輸送(あるいは交換)を阻害する^[13]。そこで、水銀試薬による加圧溶血の増大がAQP1を介した水の交換の阻害に起因しているかを検討した。AQP1を介した水の交換速度は¹H-NMRによる水のスピン-スピン緩和時間(T₂)の測定から見積もった^[14]。T₂の値は赤血球のpCMB処理により増大した。pCMB処理した赤血球において、水の交換速度の減少と加圧による溶血の増大は良い相

関を示した^[10]. このことは AQP1 を介した水の交換 (輸送) を阻害すると加圧による溶血は増大することを示唆している.

2-4. 加圧溶血は水銀試薬以外の AQP1 阻害剤でも増大する

Agre らは 1992 年に赤血球膜から AQP1 を発見した^[14]. 彼らは AQP1 が水の輸送を担っていることをアフリカツメガエルの卵母細胞にこの膜貫通タンパク質を発現して証明した. それ以来, AQPs の研究にこの発現系がしばしば用いられている. 例えば, 水銀試薬と同じように tetraethylammonium ions (TEA^+ , イオンチャンネルブロッカー) もまた, 水の輸送を阻害することが報告された^[16]. そこで, 我々も加圧溶血に関する TEA^+ の効果を調べたところ, 加圧による溶血は水銀試薬と異なり, 増大されずに抑制された^[17]. その後しばらくして, 赤血球に TEA^+ を作用した場合, AQP1 による水の輸送は阻害されないことが報告された^[18]. この相違は AQP1 の膜内での立体構造が卵母細胞と赤血球膜では異なることを示している. これまでに AQP1 の阻害剤として報告されている物質の中で, Au^{3+} や dimethylsulfoxide は加圧溶血を増大させたが, acetazolamide (炭酸脱水酵素の阻害薬) や sodium nitroprusside (一酸化窒素のドナー) は増大させなかった. 現在のところ, この相違の理由は明らかでない. しかしながら, AQP1 の阻害剤により加圧溶血が増大するというこれまでの結果は, 新規の AQP1 阻害剤を探索するための化合物スクリーニングに有用であることを示唆している.

2-5. pCMB 処理した赤血球の圧力応答

加圧による赤血球の壊れ方をフローサイトメトリーによって解析することができる^[4,10]. 図 3 は無傷赤血球 (A) および $50 \mu\text{M}$ pCMB 処理した赤血球 (B) をバッファー中に浮遊し, 200 MPa で, 37°C , 30 分間加圧した後, 常圧に戻し, フローサイトメトリーを測定した結果を示している. 図中における領域 a はマザーセル (最も大きな粒子), b は断片化した粒子 (マザーセルと小胞の間の大きさをもつ粒子), c は小胞 (直径 600 nm 以下の粒子), d は溶血した赤血球をそれぞれ含んでいる. 無傷赤血球の加圧により, 様々な大きさの粒子が生じていることが観測された. 一方, pCMB 処理した赤血球においては断片化が抑制され, 溶血が促進していることが分かる^[10]. 断片化の抑制により加圧溶血が増大する例は, プロテアーゼ処理した赤血球においても見ることができる^[21].

また, 加圧により赤血球から放出される小胞の大きさは光散乱法により見積もることができる. 無傷赤血球からは直径 ~ 440 nm の小胞, pCMB 処理した赤血球

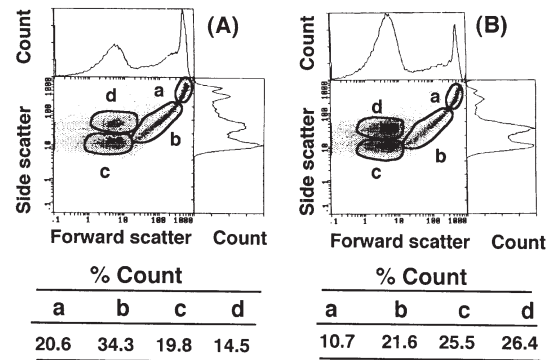


図 3. 加圧処理した赤血球のフローサイトメトリーによる解析
赤血球浮遊液を 200 MPa で 37°C , 30 分加圧した後, 常圧に戻し, フローサイトメトリーの測定を行った. A, 無傷赤血球 (コントロール); B, $50 \mu\text{M}$ pCMB 処理した赤血球

からは ~ 580 nm の小胞が放出される^[10]. また, 小胞を SDS-PAGE で解析した結果は, 小胞膜に含まれるスペクトリンの量が pCMB により変化しないことを示している^[10]. これらの結果から, pCMB 処理した赤血球を加圧すると, 赤血球は断片化が抑制され, 膜表面から大きな小胞を放出して溶血しているものと考えられる.

3. 老化赤血球の加圧による溶血特性

3-1. 老化赤血球の分離と溶血特性

ヒト赤血球の寿命は約 120 日で, その間に体内を巡回する距離は約 250 km と言われている^[1]. 骨髄で造られた赤血球は, 血中に出て体内を巡回する間に老化し, それに伴い細胞の密度は大きくなる. 図 4 A に示すように, 赤血球は密度の違いを利用し, 密度勾配遠心により young cells, middle cells, old cells に分離することができる^[22]. このようにして分けた赤血球の浸透圧による溶血を調べた. 浸透圧溶血では, 赤血球を低張バッファーの中に入れると AQP1 を介して細胞内に水が流入し, 細胞が膨潤し溶血する. 分離した赤血球のうち, old cells において浸透圧溶血が大いに抑制された (図 4 B). また, フローサイトメトリーを用いて低張バッファー中の赤血球の膨潤による細胞の大きさを調べたところ, old cells の膨潤は middle cells の場合と比べて明らかに抑制された^[11]. これらの結果は old cells 内への水の流入が抑制されていることを示している.

次に, 加圧溶血について検討した. 上に述べた水銀試薬などの結果を考慮すると, old cells においても加圧溶血の増大が予想される. 図 4 C が示すように, 加圧溶血は old cells において増大した^[11].

3-2. 老化赤血球膜における AQP1 の存在量

上で述べたように, 老化赤血球においては AQP1 を介した水の輸送が抑制されている. その原因として二

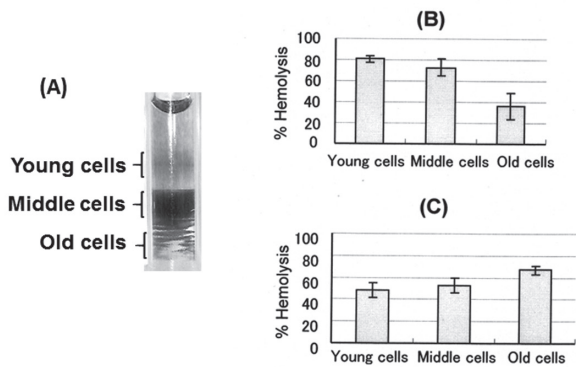


図4. 密度勾配遠心により分離した赤血球の浸透圧溶血と加圧溶血
 A, Percoll を用いて遠心分離 (33,000 × g, 1 時間) した赤血球
 B, 浸透圧溶血 (低張バッファー中で37°C, 10分)
 C, 加圧溶血 (200 MPa で37°C, 30分)

つの可能性が考えられる。一つは赤血球膜に存在する AQP1 のコピー数の減少であり、もう一つは AQP1 の水輸送に関する機能の低下である。そこで、まず膜に存在する AQP1 のコピー数を見積もることとした。Middle cells と old cells からオープンゴースト膜を調製した。次に、AQP1 の細胞質ドメインを認識する抗 AQP1 抗体を作用させた後、フルオレセインで蛍光標識した二次抗体を作用させた。膜に存在する AQP1 の量はフローサイトメトリーを用い、蛍光強度から見積もった。Middle cells と old cells の両者において、蛍光強度の相違は見られなかった (図5) [11]。このことは両方の膜において、AQP1 のコピー数 (存在量) は同じであることを示している。

そこで、次に AQP1 の機能低下の可能性について検討した。タンパク質が長期にわたりグルコースなどの糖に曝されると、非酵素的に糖がタンパク質に結合す

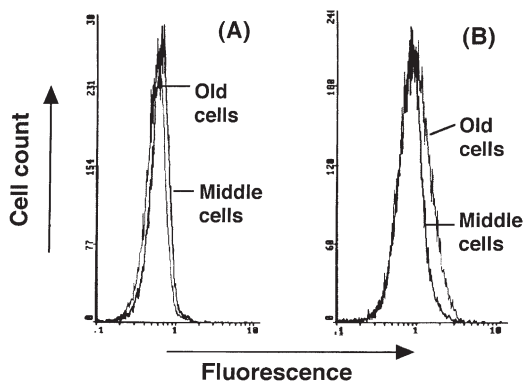


図5. AQP1抗体を作用した赤血球ゴーストのフローサイトメトリー
 赤血球からオープンゴーストを調製し、一次抗体として AQP1 抗体を作用した後、蛍光標識した二次抗体を作用した。A, 一次抗体なし B, 一次抗体あり

る (糖化という)。例えば、ヘモグロビン (Hb) が長期間グルコースに曝されると、Hb A (α鎖2本とβ鎖2本から成る) のβ鎖の末端にある valine のアミノ基にグルコースが結合する (Hb A1c)。そこで、Hb A1c の量は比較的長期の血糖レベルの指標に用いられている。また、目のレンズに発現している AQP0 の機能はグルコースの結合により低下することが報告されている [23]。これらの例から、老化赤血球においても AQP1 の糖化が機能低下を引き起こしている可能性があるため、今後検討すべき課題である。

4. なぜ AQP1 を介した水の輸送を阻害すると加圧溶血は増大するのか？

赤血球の縁を光学顕微鏡で観察すると赤血球が揺らいでいることがわかる (図6)。この赤血球の“揺らぎ”は“flickering”ともよばれている [24, 25]。興味あることに、この flickering が赤血球の pCMB 処理により抑制されることが報告された [24]。このことより、flickering の現象に AQP1 を介した水の輸送 (あるいは交換) の関与が考えられている。Flickering の抑制は、他に老化した赤血球や低張バッファー中で膨潤した赤血球においても報告されている [25]。低張条件で膨潤した赤血球の加圧溶血は増大することより、これまでに flickering が抑制されるすべての条件で加圧溶血は増大する。また、フローサイトメトリーによる解析から、加圧溶血が増大する赤血球においては断片化が抑制されている。こうして加圧による赤血球の断片化が flickering と関係しているかは、興味深い課題である。



図6. 赤血球の揺らぎ (Flickering)

5. まとめ

赤血球の化学修飾により生じる膜の構造的および機能的変化を、加圧溶血の値から調べることができる。今回、ヒト赤血球の水銀試薬処理による加圧溶血の増大には水チャンネル AQP1 への水銀試薬の結合による水の輸送 (あるいは交換) 阻害が関与していることを紹介した。加圧溶血の増大は赤血球の断片化の抑制に伴う大きな小胞の放出に起因している。他の AQP1 阻害剤によっても、水銀試薬の場合と同様に加圧溶血の増大が観測された。加圧による赤血球の断片化が flickering によって説明できるかは、今後の課題である。最後に、これまでに得られた結果に基づいた加圧溶血機

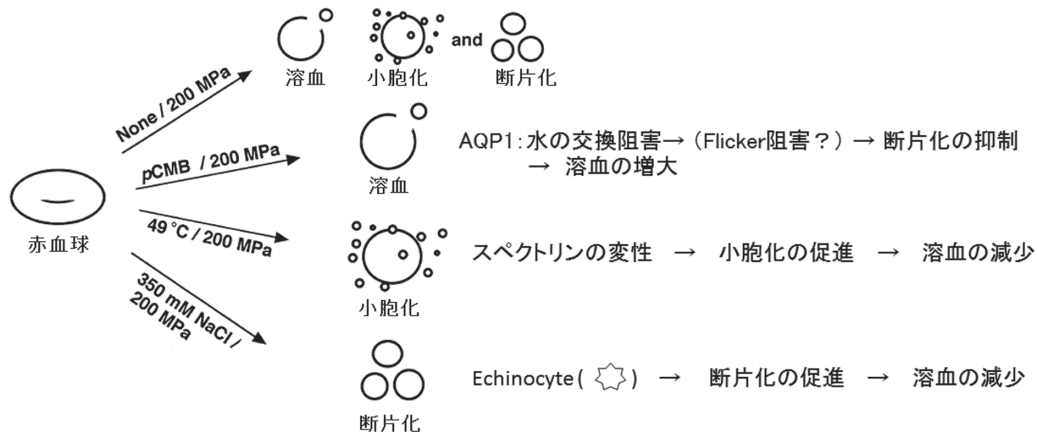


図7. 赤血球の加圧溶血機構

構のモデルを図7に示す。

謝 辞

本稿の成果は筆者が機能生物化学研究室のスタッフ・学生と共同で行ったものです。この場を借りて深く感謝いたします。

References

- Beutler, E. (1995) Composition of the erythrocyte, in *Williams Hematology* (Beutler, E., Lichtman, M. A., Collier, B. S., Kipps, T. J., Ed.) 5 th ed., pp 364-369, McGraw-Hill, New York.
- 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
- 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
- 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
- Yamaguchi, T., Kajikawa, T., and Kimoto, E. (1991) Vesiculation induced by hydrostatic pressure in human erythrocytes. *J. Biochem.*, **110**, 355-359
- 山口 武夫 (2007) 高压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. 福岡大学理学集報 **37**, 117-125
- Yamaguchi, T., Miyamoto, J., and Kimoto, E. (2001) Suppression of high-pressure-induced hemolysis of human erythrocytes by preincubation at 49°C. *J. Biochem.*, **130**, 597-603
- Harano, T., Yamaguchi, T., and Kimoto, E. (1994) Hemolytic properties of Ca²⁺-treated human erythrocytes under hydrostatic pressure. *J. Biochem.*, **116**, 773-777
- 山口武夫 (1997) ヒト赤血球の加圧による溶血特性. 生物物理 **37**, 73-77
- Yamaguchi, T., Iwata, Y., Miura, S., Maehara, Y., and Nozawa, K. (2012) Enhancement of pressure-induced hemolysis by aquaporin-1 inhibitors in human erythrocytes. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **85**, 497-503
- Yamaguchi, T., Miyauchi, S., and Isahara, Y. (2013) Pressure-induced hemolysis of *in vivo* aged human erythrocytes is enhanced by inhibition of water transport via aquaporin-1. *High Press. Res.*, **33**, 285-291
- Salhany, J. M. and Cassoly, R. (1989) Kinetics of p-mercuribenzoate binding to sulfhydryl groups on the isolated cytoplasmic fragment of band 3 protein: effect of hemoglobin binding on the conformation. *J. Biol. Chem.*, **264**, 1399-1404
- Preston, G. M., Jung, J. S., Guggino, W. B., and Agre, P. (1993) The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP 28 water channel. *J. Biol. Chem.*, **268**, 17-20
- Benga, G., Borza, V., Popescu, O., Pop, V.I., and Muresan, A. (1986) Water exchange through erythrocyte membranes: nuclear magnetic resonance studies on resealed ghosts compared to human erythrocytes. *J. Membr. Biol.*, **89**, 127-130
- Preston, G. M., Carroll, T. P., Guggino, W. B., and Agre, P. (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP 28 protein. *Science*, **256**, 385-387
- Brooks, H. L., Regan, J. W., and Yool, A. J. (2000) Inhibition of aquaporin-1 water permeability by tetraethylammonium: involvement of the loop E pore region. *Mol. Pharmacol.*, **57**, 1021-1026
- Yamaguchi, T., Iwata, Y., Miura, S., and Kawada, K.

- (2012) Reinvestigation of drugs and chemicals as aquaporin-1 inhibitors using pressure-induced hemolysis in human erythrocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 2088-2091
18. Yang, B., Kim, J. K., and Verkman, A. S. (2006) Comparative efficacy of HgCl₂ with candidate aquaporin-1 inhibitors DMSO, gold, TEA⁺ and acetazolamide. *FEBS Lett.*, **580**, 6679-6684
 19. Gao, J., Wang, X., Chang, Y., Zhang, J., Song, Q., Yu, H., and Li, X. (2006) Acetazolamide inhibits osmotic water permeability by interaction with aquaporin-1. *Anal. Biochem.*, **350**, 165-170
 20. Lahajnar, G., Pecar, S., and Sepe, A. (2007) Na-nitroprusside and HgCl₂ modify the water permeability and volume of human erythrocytes. *Bioelectrochem.*, **70**, 462-468
 21. 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
 22. Shiga, T., Maeda, N., Suda, T., Kon, K., and Sekiya, M. (1979) The decreased membrane fluidity of *in vivo* aged, human erythrocytes: a spin label study. *Biochim. Biophys. Acta*, **553**, 84-95
 23. Swamy, M., S. and Abraham, E., C. (1992) Glycation of lens MIP26 affects the permeability in reconstituted liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **186**, 632-638
 24. Szekely, D., Yau, T.W., and Kuchel, P.W. (2009) Human erythrocyte flickering: temperature, ATP concentration, water transport, and cell aging, plus a computer simulation. *Eur. Biophys. J.*, **38**, 923-939
 25. Fricke, K. and Sackmann, E. (1984) Variation of frequency spectrum of the erythrocyte flickering caused by aging, osmolarity, temperature and pathological changes. *Biochim. Biophys. Acta*, **803**, 145-152