

# 外因性基質を用いたヒト赤血球膜 protein kinase の 酵素学的検討：正常，遺伝性球状赤血球症， 臍帯血赤血球について

川崎医科大学 血液内科  
宮 島 厚 介  
(昭和56年2月17日受付)

## Kinetic Studies on Protein Kinases in Human Red Cell Membrane with Exogenous Substrates

Kosuke Miyashima

Division of Hematology, Department of Internal Medicine,  
Kawasaki Medical School

(Accepted on Feb. 17, 1981)

ヒト赤血球膜蛋白は，その膜結合酵素 protein kinase によりリン酸化を受ける．この kinase には，cyclic 3':5'-adenosine monophosphate (c-AMP) 依存性及び非依存性の酵素が存在する．また，一方，ヒト赤血球膜には histone type II 及び  $\alpha$ -casein を外因性基質とするリン酸化酵素，即ち，histone kinase 及び casein kinase の存在も知られている．そこで本研究では，ヒト赤血球膜 ghost における histone kinase 及び casein kinase の酵素学的性状を検討し，併せて病的赤血球における意義についても論及した．

まず，histone kinase は c-AMP 依存性酵素で， $10^{-6}$ M c-AMP 濃度で最大活性が認められた．一方，casein kinase は，c-AMP 非依存性酵素であった．外因性基質の至適濃度及び至適 pH は，histone kinase 及び casein kinase とほぼ同様で pH 6.0～8.0 で最大活性を示した．反応系に添加した 5'-adenosine-triphosphate 濃度は，histone kinase において 500  $\mu$ M で最大活性が得られた．反応の経時的变化では，casein kinase では2時間までほぼ直線的にリン酸化の増大がみられるのに対し，c-AMP 依存性 histone kinase 活性は，20分まで著しく増大し，その後，脱リン酸化反応のため，漸次，低下傾向を示した． $Mg^{2+}$  イオン濃度の影響については，histone kinase  $10^{-2}$ M で，また，casein kinase では  $10^{-1}$ M で最大活性が得られた．

次に，遺伝性球状赤血球症 (HS) 患者の赤血球膜において外因性基質を用いて，casein kinase 及び histone kinase 活性を検討した．本症患者の一部で c-AMP 依存性の内因性膜蛋白リン酸化能が低下しているにもかかわらず外因性基質を用いた histone kinase 及び casein kinase 活性の低下は認められなかった．また，幼若赤血球比率の高いヒト臍帯血赤血球において，リン酸化能を検討したが，histone kinase 及び casein kinase 活性は，正常対照群に比べ著差は認めなかった．

以上，外因性基質を用いたヒト赤血球膜酵素 protein kinase 活性の測定及びその酵素学的性状について報告したが，本測定は内因性膜蛋白リン酸化能の検討と共に，赤血球膜代謝の研究に有用であろう．

The endogenous membrane proteins of human red cells are phosphorylated by a membrane-bound enzyme, protein kinase. The kinase is partly cyclic 3':5'-adenosine monophosphate (c-AMP)-dependent and in part independent of c-AMP. It has been known that histone type II and  $\alpha$ -casein are utilized as exogenous substrates in the phosphorylation reactions. These reactions are catalyzed by the two different protein kinases, namely, histone kinase and casein kinase, respectively. The present communication describes the enzymatic characteristics of these two kinases in human red cell ghosts.

Histone kinase is c-AMP dependent and the maximal activity was obtained at  $10^{-6}$ M c-AMP. In contrast, casein kinase activities were completely unaffected by c-AMP. Optimal substrate concentrations and optimal pH for casein were same as those for histone in the phosphorylation reaction. Increment of 5'-adenosine triphosphate (5'-ATP) in the reaction system enhanced the histone kinase activities to the maximum at 500  $\mu$ M. During timed incubation, casein kinase activities were increased upto 2 hours. In contrast, the activities of histone kinase in the presence of c-AMP were increased markedly by 20 minutes of incubation, and dephosphorylated gradually upto 2 hours. Magnesium was required to activate the histone kinase or casein kinase to the maximum at  $10^{-2}$ M or at  $10^{-1}$ M, respectively. Although c-AMP dependent endogenous membrane protein phosphorylation was partly diminished in red cells of the patients with hereditary spherocytosis (HS), the phosphorylation reactions of the exogenous substrates were not impaired in the HS red cells. Casein or histone phosphorylation reactions were normal in red cells of human cord blood which were consisted of the increased younger cell population.

In conclusion, the assay of protein kinases utilizing exogenous substrates are also a useful tool to clarify membrane functions, in addition to endogenous membrane protein phosphorylation of human mature red cells.

## 序 論

蛋白リン酸化酵素である protein kinase (PK) は、生体内の種々の臓器や組織に広く分布し、糖質や脂質の代謝調節、蛋白質合成、平滑筋の収縮など種々の生命現象に広く関与しているものと考えられている<sup>1)~3)</sup>。また生体膜においては、その膜蛋白リン酸化反応と細胞形態・細胞膜機能との関連が注目されており、ヒト赤血球でも膜蛋白リン酸化が、その形態維持に重要な役割を演じているものと推定されている<sup>4)~15)</sup>。そして、溶血性疾患、特に遺伝性球形赤血球症 (HS) を始めとし、遺伝性楕円赤血球症、遺伝性有口赤血球症などの患者に認め

られる病的赤血球において、その膜蛋白リン酸化の意義が検討されている<sup>17)~23)</sup>。この赤血球膜蛋白リン酸化酵素である protein kinase は、主に赤血球膜内表面に存在し、自己膜蛋白 (内因性膜蛋白) を基質とし、ATP の  $\gamma$ -位にある高エネルギーリン酸結合を解離し、その内因性膜蛋白をリン酸化する。そして、本酵素には cyclic 3':5'-adenosine monophosphate (c-AMP) により賦活化される活性型 (c-AMP 依存性) と、賦活化されない非活性型 (c-AMP 非依存性) とが存在することが知られている<sup>4)6) 15)16)</sup>。また一方、ヒト赤血球膜には、外因性蛋白 ( $\alpha$ -casein, histone type II など) を基質とする蛋白リン酸化酵素 (いわゆる casein kina-

se, histone kinase など)の存在も知られている<sup>24)25)</sup>。

本研究では、上記のうち、特に外因性蛋白を基質とした外因性蛋白リン酸化能、すなわち casein kinase 活性、histone kinase 活性について、それらの酵素学的性状を検討した。また最近、その血球形態異常 (microspherocyte) と膜蛋白リン酸化能との代謝的相関が注目されている遺伝性球状赤血球症について、casein kinase 活性、histone kinase 活性を測定し、その病態的意義についても検討を加えた。また、多染性赤血球及び網状赤血球の出現率の高いヒト臍帯血についても、protein kinase 活性を測定したので併せて報告する。

## 方 法

### (1) 膜標品の作成:

赤血球膜標品は、Dodge らの方法<sup>26)</sup>に一部変更を加えて行なった。ヘパリン処理した全血を遠心沈殿し、血漿及び buffy coat を吸引除去し、等張生理的食塩水にて3回洗浄(2,500 rpm, 5分)し、洗浄赤血球浮遊液を作成した。この洗浄赤血球を遠心沈殿させ、その赤血球分画 1.5 容に対して、0.01 M Tris Hcl 緩衝液(20 m Osm) 35 容を加えて低張溶血をおこさせ、高速遠心沈殿の後、上清を吸引除去した。この操作を3回反覆施行し、得られた膜分画を洗浄することにより白色 ghost を得た。

得られた ghost は、 $-70^{\circ}\text{C}$  凍結によって、1 週間は保存可能であった。測定直前、acetone-ether 及びドライアイスにて3回凍結・解氷を繰り返し、破碎膜標品として、protein kinase 活性の測定に供した。そして、これらすべての操作は、氷温にて行なった。

### (2) 内因性膜蛋白リン酸化能の測定:

従来<sup>27)</sup>の Guthrow 法<sup>27)</sup>に若干の変更を加えた。即ち、標準測定系としては、破碎膜標品 50  $\mu\text{l}$  (蛋白量: 150~200  $\mu\text{g}$ ) に反応液(25 mM Mg acetate, 0.75 mM EGTA, 0.25 mM NaF, 6 mM theophyllin) 75  $\mu\text{l}$ , 0.4 M adenosine

5'-triphosphate (5'-ATP: Boehringer Mannheim GmbH #127523, 終濃度 10  $\mu\text{M}$ ), 20  $\mu\text{M}$  cyclic 3':5'-AMP (Sigma Chemicals Ltd. #A-6885) 10  $\mu\text{l}$  及び 100,000~200,000 cpm ATP- $\gamma$ -<sup>32</sup>P (New England Nuclear, #NEG-002H) を加えて総量を 200  $\mu\text{l}$  とした。これを  $37^{\circ}\text{C}$ , 20 分間 孵置した後、 $4^{\circ}\text{C}$ , 7% trichloroacetic acid (TCA) 3 ml を加えて、反応の停止とした。そして、遠心沈殿物を TCA にて3回洗浄し、蛋白沈殿中の <sup>32</sup>P 放射活性を測定し、protein kinase 活性とした。

### (3) 外因性基質のリン酸化能の測定:

外因性基質を用いた casein kinase, histone kinase の標準測定系は、以下の如くである。即ち、基質には、 $\alpha$ -casein (Sigma Chemicals Ltd. #C-3883), histone type II (Sigma Chemicals Ltd. #H-9125) を用い、前記の内因性基質による protein kinase 活性測定系を使用した。即ち、ghost 量を 25  $\mu\text{l}$  (蛋白量 75~100  $\mu\text{g}$ ), 40  $\mu\text{M}$  c-AMP, 反応時間を 10 分間とした。反応停止後はリン酸化測定液を glass microfiber filter (Whatman GF/B) を用いて濾過し、7% TCA 3 ml で 10 回洗浄し、洗浄沈渣中の <sup>32</sup>P 放射活性を測定した。

## 結 果

### I. casein kinase, histone kinase の酵素学的性状:

赤血球膜破碎 ghost を粗酵素標品として、 $\alpha$ -casein を基質とするリン酸化活性を casein kinase 活性とし、histone type II を基質とするリン酸化活性を histone kinase 活性とした。

Casein kinase は、c-AMP を添加しても活性化は全く得られず、c-AMP 非依存性 pk であった。一方 histone kinase は c-AMP 依存性で、cyclic 3':5'-AMP  $10^{-6}\text{M}$  で最大活性が得られた。(Fig. 1)。

粗酵素標品である赤血球膜 ghost 量を増加させると、外因性基質リン酸化は casein, histone のいずれの場合も、ほぼ直線的に増大し

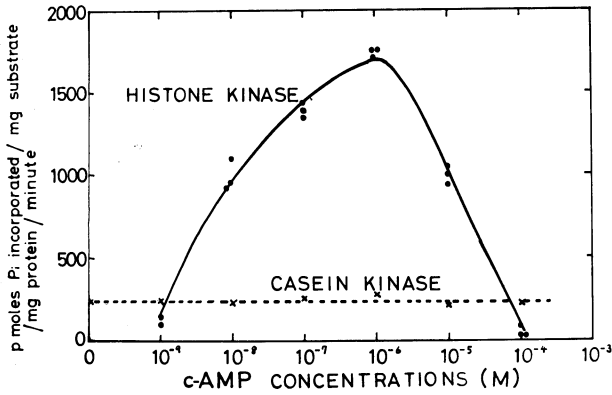


Fig. 1. Comparison of effects of cyclic 3':5'-AMP concentration on phosphorylations of  $\alpha$ -casein and histone type II as exogenous substrates by casein kinase and histone kinase in human erythrocyte ghosts.

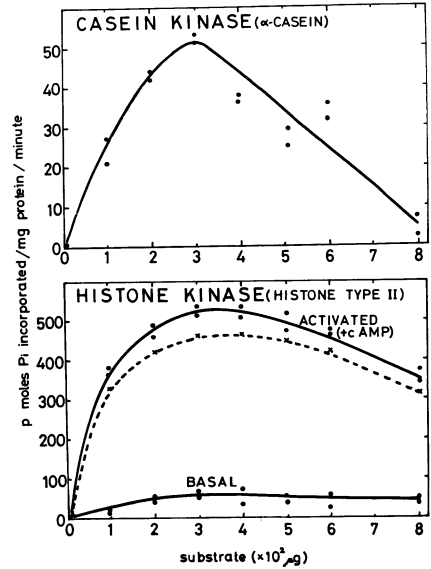


Fig. 3. Effects of amounts of  $\alpha$ -casein and histone type II on <sup>32</sup>P incorporation into these exogenous substrates by casein kinase and histone kinase in human erythrocyte ghosts.

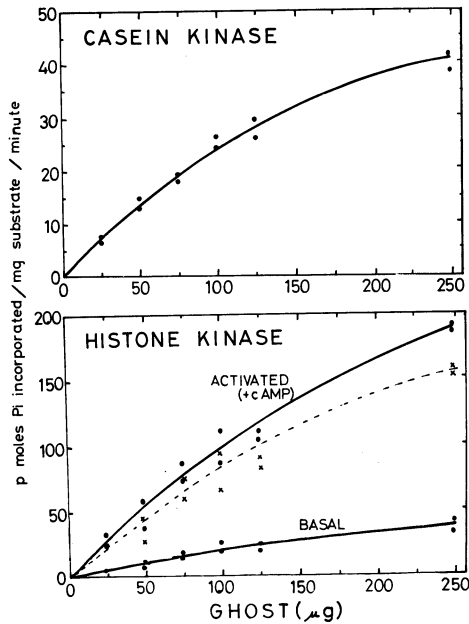


Fig. 2. Effects of amounts of human erythrocyte ghosts on <sup>32</sup>P incorporation into  $\alpha$ -casein and histone type II.

た (Fig. 2).

次に、外因性基質量 ( $\alpha$ -casein, histone type II) に対するリン酸化能を検討すると、casein, histone ともに 300  $\mu$ g で最大活性が得られた (Fig. 3).

反応系における至適水素イオン濃度 (pH)

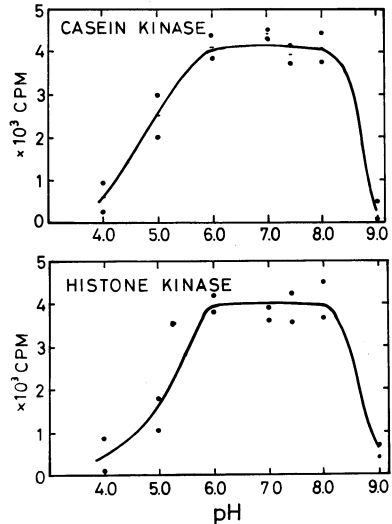


Fig. 4. pH effect profile on casein kinase and histone kinase activities in human erythrocyte ghosts.

は、casein kinase, histone kinase ともに pH 6.0~8.0 であった (Fig. 4).

測定系に含まれる carrier 5'-ATP 濃度に関しては、casein kinase, histone kinase 活性

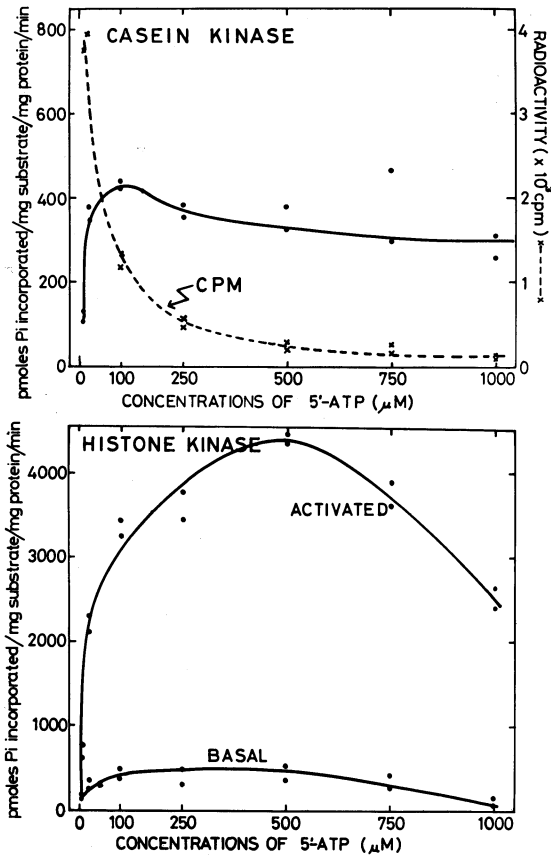


Fig. 5. Effects of varying concentration of carrier 5'-ATP on phosphorylations of  $\alpha$ -casein and histone type II by casein kinase and histone kinase in human erythrocyte ghosts.

では異なった性状を示した (Fig. 5)。即ち, casein kinase 活性では, 50  $\mu$ M までほぼ直線的に増加し, 100  $\mu$ M 前後で最大値をとり, 以後, 低下傾向を示すが, 250  $\mu$ M~1,000  $\mu$ Mの間ではほぼ同値を保っている。一方, histone kinase 活性では, 5'-ATP 50  $\mu$ M まで直線的に増加するものの, 最大活性が 500  $\mu$ M 前後まで得られた後, 急速に低下を示した。この現象は, 特に c-AMP 添加群で著明であった。

また経時的变化についても, casein kinase, histone kinase 活性は 各々異なった反応を示した (Fig. 6)。即ち, casein kinase 活性は, 反応開始後 120 分まで漸次増大傾向を示すのに対して, histone kinase 活性は, c-AMP 非添加で 30 分, c-AMP 添加で 20 分に最大活性を示し, 以後, 低下傾向を示した。このリン酸化能の低下は, 脱リン酸化反応の亢進とも考えられ, これらの異なった経時的变化には注意する必要がある。

Mg<sup>2+</sup> イオンの本反応に対する影響についても検討した (Fig. 7)。内因性膜蛋白を基質とした protein kinase 活性は, Mg<sup>2+</sup> イオン添加により活性化を受けることが知られている。casein kinase では, 10<sup>-1</sup>M Mg<sup>2+</sup>

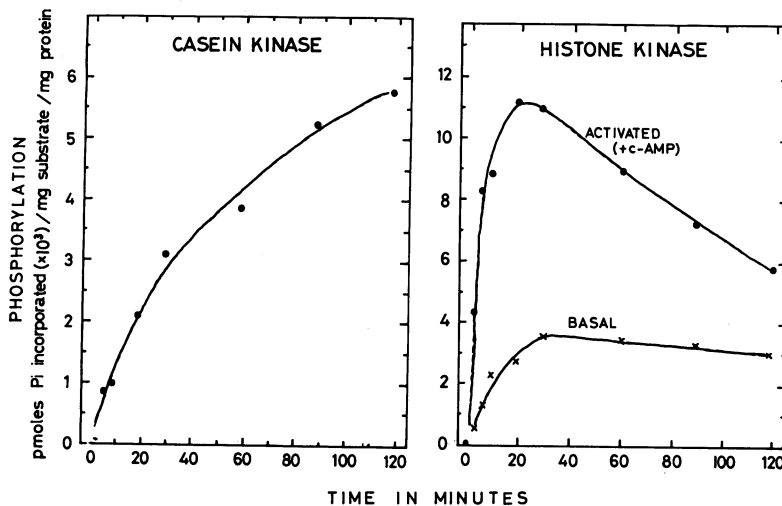


Fig. 6. Time course of phosphorylations of  $\alpha$ -casein and histone type II as exogenous substrates by casein kinase and histone kinase in human erythrocyte ghosts.

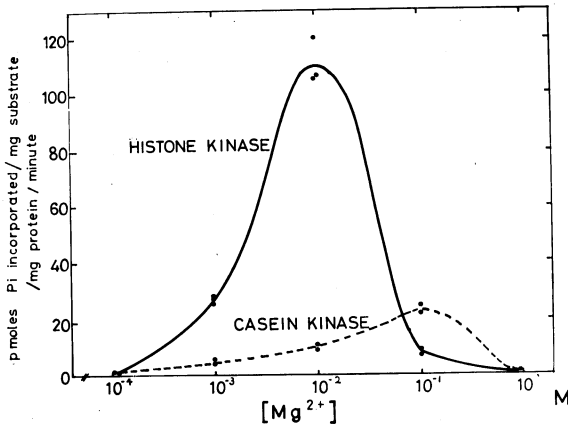


Fig. 7. Effects of varying concentration of  $Mg^{2+}$  on casein kinase and histone kinase activities.

で最大活性を示したが、histone kinase に比べその最大活性は著しく低い。一方、histone kinase では、 $10^{-2}M Mg^{2+}$  で最大活性が得られ、活性値は casein の場合のほぼ5倍であった。

II. 正常及び諸種赤血球における膜蛋白リン酸化能

正常人、遺伝性球状赤血球症 (HS) 患者、ヒト臍帯血につき、赤血球の内因性膜蛋白リン酸化能、casein kinase, histone kinase 活性を測定した。

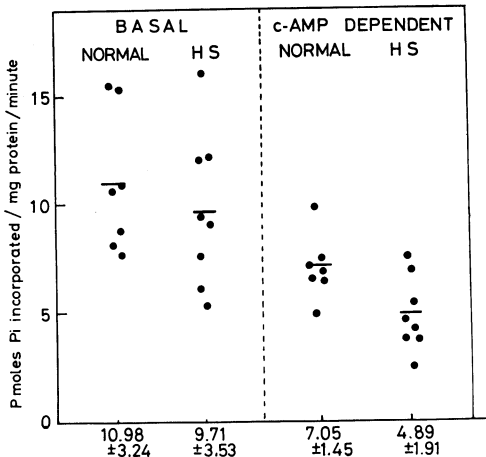


Fig. 8. Phosphorylation on endogenous membrane protein by protein kinase in normal and hereditary spherocytic erythrocyte ghosts.

(1) 内因性膜蛋白リン酸化能 (prolin kinase 活性)

同時採血、同時検体処理を行なった正常及びHS赤血球での成績を示した(Fig. 8). 正常人(7例)では、c-AMP非添加の basal 活性  $10.98 \pm 3.24$  pmoles Pi incorporated/mg protein/min, c-AMP添加  $17.38 \pm 5.13$ , その差(c-AMP dependent)  $7.05 \pm 1.45$  であるのに対し、HS症例(8例)では、basal  $8.20 \pm 4.70$ , c-AMP添加  $15.10 \pm 5.73$ , その差  $4.89 \pm 1.91$  とHS症例においてc-AMP依存性pk活性の低下を認めた ( $p < 0.05$ ).

次にヒト臍帯血赤血球(29例)のpk活性を検討したが、basal活性で正常  $9.59 \pm 4.59$  に比べ  $7.39 \pm 3.36$  とやや低下傾向を示すもの

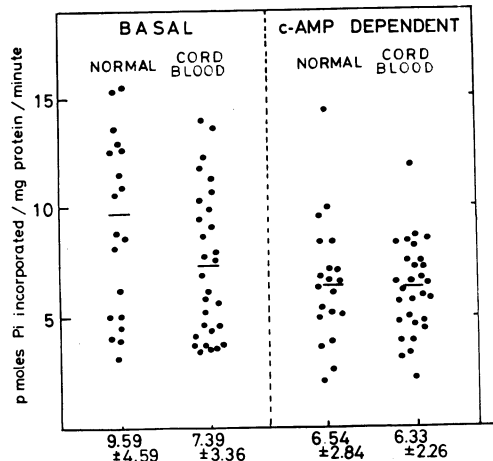


Fig. 9. Phosphorylation on endogenous membrane protein by protein kinase in normal and cord blood erythrocyte ghosts.

の、c-AMP依存性pkでは、正常  $6.54 \pm 2.84$  と有意な差は認められなかった(Fig. 9).

(2) 外因性基質を用いた蛋白リン酸化能 (casein kinase, histone kinase):

Casein kinase 活性は(第10図)、正常対照(7例)  $102 \pm 22$  pmoles Pi incorporated/mg substrate/mg protein/minute に対し、HS赤

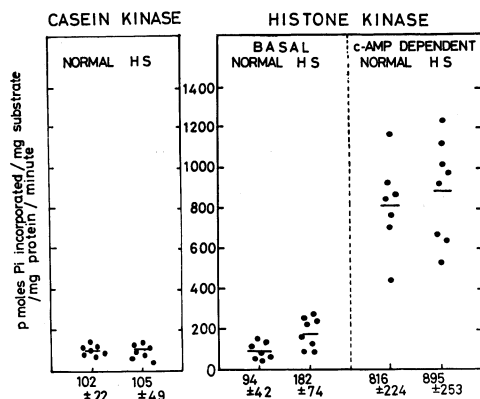


Fig. 10. Phosphorylations of exogenous substrates;  $\alpha$ -casein and histone type II, by casein kinase and histone kinase in normal and hereditary spherocytic erythrocyte ghosts.

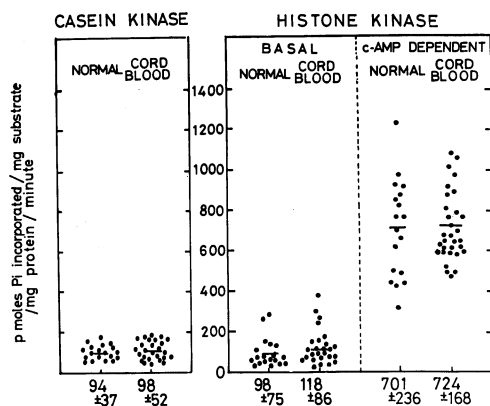


Fig. 11. phosphorylations of exogenous substrates;  $\alpha$ -casein and histone type II, by casein kinase and histone kinase in normal and cord blood erythrocyte ghosts.

血球では  $105 \pm 49$  と有意な差は認められなかった。

Histone kinase については (Fig. 10), basal 活性が正常  $94 \pm 42$  pmoles Pi incorporated/mg substrate/mg protein/minute に対して, HS 赤血球では  $182 \pm 74$  と有意の上昇を示した ( $p < 0.05$ )。しかし, c-AMP 依存性活性では正常  $816 \pm 224$  に対して, HS 赤血球  $895 \pm 253$  とこの 2 群間に有意な差は認められなかった。

また, 正常及び臍帯血赤血球における活性

は (Fig. 11), casein kinase で, 正常  $94 \pm 37$  pmoles Pi incorporated/mg substrate/mg protein/minute, 臍帯血  $98 \pm 52$ , histone kinase で basal 活性, 正常  $98 \pm 75$ , 臍帯血  $118 \pm 86$ , 更に c-AMP 依存性活性は, 正常  $701 \pm 236$ , 臍帯血  $724 \pm 168$  と有意な差は認められなかった。

## 考 案

Protein kinase は, 生体内の種々の臓器に分布し, 種々の生命現象に関与している<sup>1)~3)</sup>。本酵素はヒト赤血球内にも存在し, 形態維持に重要な役割を演じているものと考えられているが, その詳細は明らかでない。ヒト赤血球膜 c-AMP 非依存性 pk は, 主として band 2 及び band 3 をリン酸化させる。また c-AMP 依存性 pk は band 2.1, 4.1, 4.5, 4.8 をリン酸化させることが知られている<sup>4)6)15)16)</sup>。このうち band 1, 2 は spectrin で収縮性蛋白と考えられている。この spectrin は赤血球膜内表面に存在し, actin 分子を介して, spectrin-actin complex を形成し, 赤血球の形態維持機構に重要な役割を果しているものと考えられている<sup>7)8)10)13)</sup>。また外因性基質  $\alpha$ -casein をリン酸化する酵素 casein kinase は, c-AMP 非依存性 pk であり, また histone type II を基質とした histone kinase は, c-AMP 依存性 pk であることから, これらの kinases と内因性膜基質を用いた protein kinase との相互関係が問題となろう。

そこで, 今回, 外因性膜蛋白リン酸化酵素についてその性状を検討した。一般的に酵素自体を検討する目的には, 外因性基質を用いる測定系の方が, 内因性基質を用いる場合よりも適当と考えられる。しかし, 生体細胞内では内因性膜蛋白がリン酸化の実質的な基質となるため, 内因性膜蛋白リン酸化能もまたその生理的意義は大きい。

病的赤血球, 特に遺伝性球状赤血球症での赤血球膜蛋白リン酸化能は注目される所で<sup>17)~23)</sup>, 内因性膜蛋白を基質とした c-AMP 依存性 pk の低下している点が問題となろう。赤血球およ

び赤血球膜には生理的条件下では c-AMP はほとんど存在しないものと考えられていたが、近年、c-AMP の赤血球内への転入が認められており<sup>28)</sup>、HS 症における赤血球への c-AMP 転入も、今後、検討が必要であろう。本実験より、HS 症例において、外因性基質を用いた測定系で、casein kinase 及び histone kinase (c-AMP 依存性及び c-AMP 非依存性) には、その活性化の低下は全く認められないことから、HS 赤血球では膜酵素としての protein kinase 自体には本質的な障害はないものと考えられる。従って HS 赤血球における内因性膜蛋白を基質とした c-AMP 依存性 pk の低下は、おそらく、c-AMP 依存性の内因性膜基質、即

ち、膜蛋白 (band 2.1, 4.1, 4.5, 4.8) に問題が存在している可能性が高い。従来より行なわれている SDS-polyacrylamide disc gel 電気泳動法では、HS 赤血球の膜蛋白組成に有意な異常を認められていない。しかし、たとえ構成蛋白分画が正常であったとしても、膜蛋白自体の機能異常、あるいはこれらの構成蛋白間の cross-linking の異常が存在する可能性は、猶、今後の課題として残されるであろう。

稿を終えるにあたり、御指導を賜わり、御校閲をいただいた川崎医科大学内科八幡義人教授に深謝いたします。また、御指導、御協力を頂いた川崎医科大学内科是沢俊輔講師をはじめ教室員各位に心よりお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 山本正博, 高井義美; 蛋白質のリン酸化による代謝調節と疾病. 代謝 15 (6): 551—564, 1978
- 2) 川原康洋, 水口龍次, 高井義美; 細胞内プロセッシングとプロテアーゼの関与・プロテインキナーゼとプロテアーゼ. 蛋白質核酸酵素 25 (6): 454—462, 1980
- 3) Chau, V., Huaug, L. C., Romero, G., Biltonen, R. L. and Huaug, C.: Kinetic studies on the dissociation of adenosine cyclic 3':5'-monophosphate from the regulatory subunit of protein kinase from rabbit skeletal muscle. *Biochemistry*, 19: 924—928, 1980
- 4) Avruch, J. and Fairbanks, G.: Phosphorylation of endogenous substrates by erythrocyte membrane protein kinase. I. A monovalent cation-stimulated reaction. *Biochemistry*, 13 (27): 5507—5514, 1974
- 5) Greenquist, A. C. and Shohet, S. B.: Phosphorylation in erythrocyte membranes from abnormally shaped cells. *Blood*, 48 (6): 877—886, 1976
- 6) Hosey, M. M. and Tao, M.: Selective phosphorylation of erythrocyte membrane proteins by the solubilized membrane protein kinase. *Biochemistry*, 16 (21): 1977
- 7) Sheetz, M. P. and Singer, S. J.: On the mechanism of ATP-induced shape changes in human erythrocyte membranes. I. The role of the spectrin complex. *J. Cell. Biol.*, 73: 638—646, 1977
- 8) Sheetz, M. P. and Singer, S. J.: On the mechanism of ATP-induced shape change in human erythrocyte membranes. II. The role of ATP. *J. Cell. Biol.*, 73: 647—659, 1977
- 9) Shapiro, D. L. and Marchesi, V. T.: Phosphorylation in membrane of intact human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 252 (2): 508—517, 1977
- 10) McPherson, J. M., Whitehouse, S. and Walsh, D. A.: Possibility of shape conformers of the protein inhibitor of the cyclic-adenosine monophosphate dependent protein kinase. *Biochemistry*, 18 (22): 4844—4855, 1979
- 11) Waxman, L.: The phosphorylation of the major proteins of the human erythrocyte membrane. *Arch. Biochem. Biophys.*, 192 (2) 300—314, 1979
- 12) Simkowski, K. W. and Tao, M.: Studies on a soluble human erythrocyte protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 225 (13): 6456—6461, 1980



- 13) Dunbar, J. C. and Ralston, C. B.: The incorporation of  $^{32}\text{P}$  into spectrin aggregates following incubation of erythrocytes in  $^{32}\text{P}$ -labelled inorganic phosphate. *Biochim. Biophys. Acta.* 510 : 283—291, 1978
- 14) Tao, M., Conway, R. and Cheta, S.: Purification and characterization of a membrane-bound protein kinase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 225 (6) : 2563—2568, 1980
- 15) Fairbank, G. and Auruch, J.: Phosphorylation of endogenous substrates by erythrocyte membrane protein kinase. II. Cyclic adenosine monophosphate-stimulated reactions. *Biochemistry*, 13 (27) : 5514—5521, 1974
- 16) Hossey, M. M. and Tao, M.: Phosphorylation of rabbit and human erythrocyte membranes by soluble adenosine 3' : 5'-monophosphate-dependent and-independent protein kinases. *J. Biol. Chem.*, 102—109, 1977
- 17) Yawata, Y., Koresawa, S., Yamada, O. and Shibata, S.: Defective membrane phosphorylation in red cell of a patient with hereditary spherocytosis. *Acta Haematol. Jap.*, 38 : 311—314, 1975
- 18) Zail, S. S. and van den Hoek, A. K.: Studies on protein kinase activity and the binding of adenosine 3' : 5'-monophosphate by membranes of hereditary spherocytosis erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 66 (3) : 1078—1086, 1975
- 19) Beutler, E., Guinto, E. and Johnson, C.: Human red cell protein kinase in normal subjects and patients with hereditary spherocytosis, sickle cell disease, and autoimmune hemolytic anemia. *Blood*, 48 (6) : 889—898, 1976
- 20) Matsumoto, N., Yawata, Y. and Jacob, H. S.: Association of decreased membrane protein phosphorylation with red blood cell spherocytosis. *Blood*, 49 (2) : 233—239, 1979
- 21) Wolfe, L. C. and Lux, S. E.: Membrane protein phosphorylation of intact normal and hereditary spherocytic erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 253 (9) : 3336—3342, 1978
- 22) Ali, S. A., Gordon-Smith, E. C. and Selhi, H. S.: Kinetics of red cell membrane phosphorylation. Altered affinity of HS membrane protein acceptors. *British Journal of Haematology*, 42 : 225—225—230, 1979
- 23) Nakao, M., Fujii, Y., Hara, Y., Nomura, T., Nakao, T. and Komatsu, Y.: Membrane protein phosphorylation in intact normal and hereditary spherocytic human erythrocytes. *J. Biochem.*, 88 : 327—335, 1980
- 24) Vichers, J. D., Brierley, J. and Rathbone, M. P.: Phosphorylation of casein by human erythrocyte membrane-bound protein kinase: Competition of casein with endogenous substrates. *J. Membrane Biol.*, 49: 123—138, 1979
- 25) Boivin, P. and Galand, C.: Purification and characterization of a casein kinase from human erythrocyte cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 89 (1) : 7—16, 1979
- 26) Dodge, J. T., Mitchell, C. and Hanahan, D.: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 100 : 119—130, 1963
- 27) Guthrow, C. E., Allen, J. E. and Rasmussen, H.: Phosphorylation of an endogenous membrane protein by an endogenous, membrane-associated cyclic adenosine 3' : 5'-monophosphate-dependent protein kinase in human erythrocyte ghosts. *J. Biol. Chem.*, 247 (24) : 8145—8153, 1972
- 28) Tsukamoto, T., Suyama, K., Germann, P. and Sonenberg, M.: Adenosine cyclic 3' : 5'-monophosphate uptake and regulation of membrane protein kinase in intact human erythrocytes. *Biochemistry*, 19 : 918—924, 1980