

Functional Roles of Glycoconjugates in Signal Transduction *via* Lipid Rafts

脂質ラフトを介するシグナル伝達における複合糖質の機能的役割

Kasahara, Kohji ; and Sanai, Yutaka

The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research, Bunkyo-ku,
Tokyo 113-8613, Japan, FAX : 81-3-3828-6663, E-mail : kasahara@rinshoken.or.jp

Key Words : carbohydrate, glycoconjugate, glycosphingolipid, GPI-anchored protein, lipid raft

Abstract

Glycosphingolipid-cholesterol formed as microdomains in cell membranes have been proposed to function as rafts for the attachment of specific proteins including glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins, glycoproteins and proteoglycans. The microdomains are postulated to be involved in transmembrane signaling. Here, the functional roles of glycoconjugates in the physical properties of these microdomains, as well as in signal transduction are discussed.

要約

スフィンゴ糖脂質とコレステロールは生体膜においてミクロドメインを形成し、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカータンパク質、糖タンパク質、プロテオグリカンを含む特異的なタンパク質が付着するラフト(いかだ)として働いていることが提唱されている。そのミクロドメインは膜を介するシグナル伝達に関与していると考えられている。ここではミクロドメインの物理的性質、シグナル伝達における複合糖質の機能的役割について論じる。

A. Introduction

Recent studies suggest that glycosphingolipids (GSLs) exist in clusters and form microdomains containing cholesterol in cell membrane. The GSL- and cholesterol-rich microdomains are referred to as lipid rafts or caveolae membrane (1-5). Lipid rafts are implicated in signal transduction, because signaling molecules such as the src-family kinases and trimeric G proteins, are associated with them *via* lipid modification. Low-density, detergent-insoluble membrane fractions can be isolated from cells by density gradient centrifugation, which are rich in sphingolipids (GSLs, sphingomyelin), cholesterol, glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins, and a variety of signaling molecules. These observations indicate the possible presence of lipid rafts in cells. These membrane fractions are referred to as detergent-resistant membranes (DRM) (6), which appear to be present in all mammals, sea urchin (7, 8), *Drosophila melanogaster*, (9) *Caenorhabditis elegans*, (10) *Saccharomyces cerevisiae*, (11) *Dictyostelium* (12) and protozoan parasites such as *Trypanosoma brucei*, (13) *Tetrahymena mimbres*. (14). The presence of lipid rafts *in vivo* is supported by several lines of evidence, including the results of a single-particle tracking study, a fluorescence resonance energy transfer study, a photonic force microscopic study and a chemical crosslinking study (1).

The basic forces driving the formation of rafts are thought to be lipid interactions, which are weak and transient (6). Sphingolipids are relatively rich in saturated fatty acyl chains, which allow tight packing and confer the characteristic of a high melting temperature. On the other hand, phospholipids are relatively rich in *cis*-unsaturated fatty acyl chains (kinked struc-

A. 序論

最近の研究から、スフィンゴ糖脂質(GSL)は生体膜においてコレステロールとともに集合しミクロドメインを形成していることが示唆されている。そのスフィンゴ糖脂質とコレステロールに富むミクロドメインは、脂質ラフトまたはカベオラ膜と呼ばれている(1-5)。脂質ラフトはsrcファミリーキナーゼや三量体Gタンパク質が脂質修飾を介して会合していることからシグナル伝達に関係していると考えられている。スフィンゴ脂質(GSLとスフィンゴミエリン)、コレステロール、GPIアンカータンパク質やさまざまなシグナル伝達分子に富む低密度界面活性剤不溶性膜画分が、密度勾配遠心により細胞から単離することができる。これは、細胞に脂質ラフトが存在する可能性を示している。これら膜画分はdetergent-resistant membranes (DRM)と呼ばれ(6)、すべての哺乳類、ウニ(7,8)、ハエ(9)、線虫(10)、酵母(11)、細胞性粘菌(12)、トリパノソーマ(13)やテトラヒメナ(14)などの原生生物に存在していることが明らかになっている。生体内において脂質ラフトが存在することは、一分子追跡、蛍光共鳴エネルギー移動、原子間力顕微鏡、化学架橋などの研究から得られたいくつかの証拠により支持されている(1)。

ラフトの形成に働く基本的な力は、脂質相互作用であり弱く一時的なものであると考えられている。スフィンゴ脂質は相対的に飽和脂肪酸鎖に富み、固くパックすることができ相転移温度が高い性質を持つ。一方、リン脂質は相対的にシス二重結合不飽和脂肪酸鎖(よじれ構造)に富み、固くパックすることができず相転移温度が低い性質を持つ。そしてスフィンゴ脂質

ture), which prevents tight packing and confers the characteristic of a low melting temperature. Sphingolipids and cholesterol are thought to exist as phase-separated domains from phospholipids in the membrane. The lipid composition renders the rafts and their constituent proteins resistant to solubilization with non-ionic detergents such as Triton X-100.

A number of studies have examined the influence of cholesterol on the physical properties and signaling of lipid rafts. Cholesterol depletion by treatment with cyclodextrin results in disruption of lipid rafts and perturbation of raft-mediated signaling.

B. Glycoconjugate Functions in Physical Properties of Lipid Rafts

In mammalian cells, there are two major classes of sphingolipids: GSLs and sphingomyelin (SM), both of which are synthesized from the hydrophobic molecule ceramide. GSLs and SM have different polar head groups, carbohydrate-chain and phosphocholine, respectively.

Deprivation of sphingolipids leads to increased solubility of GPI-anchored proteins with Triton X-100 using CHO temperature-sensitive mutant defective in serine palmitoyltransferase activity for sphingolipid synthesis (15). DRM are reduced by treatment of cells with fumonisin, which inhibits ceramide synthase and blocks both GSL and SM biosynthesis (16-18). These observations suggest that sphingolipids are important for the formation of lipid rafts.

PDMP is an inhibitor of ceramide glycosyltransferase (GlcCer synthase), which blocks a first step of most GSL biosynthesis, but not SM biosynthesis (19). Single-particle tracking of a GPI-anchored protein and GSLs in intact cell membrane showed transient confinement in patches, which are thought to represent lipid rafts *in vivo*. The size of the confining domain for the GPI-anchored protein is reduced by treatment with PDMP (20). GSL depletion by PDMP causes elimination of src from the lipid raft fraction on a density gradient (21).

DRM are not detected in the presence of octylglucoside. This is attributed to the resemblance of the detergent to GSLs. Incubation of cells with lyso-GSL reduces GSL clustering (22). Furthermore, exogenously administered gangliosides abolished clustering of the GPI-anchored protein in lipid rafts and increased their detergent solubility (23). These observations suggest that GSLs are also important for the formation of lipid rafts.

GSL self-association through hydrogen bonds between the GSL headgroups is thought to contribute to the formation of lipid rafts (5). (i) GSLs have much higher melting temperature than SM (6). (ii) GlcCer synthase-deficient tumor cell mutant does not express GSLs, and up-regulated expression of SM compensates for the lack of GSLs. However, the yield of DRM protein is 2-fold higher in the parental than the mutant line (24). (iii) Furthermore, enzymatic removal of the carbohydrate moi-

ty and cholesterol is membrane-associated from phase-separated domains from phospholipids in the membrane. The lipid composition renders the rafts and their constituent proteins resistant to solubilization with non-ionic detergents such as Triton X-100. (6).

脂質ラフトの物理的性質、シグナル伝達におけるコレステロールの影響についての研究は数多くある。たとえばシクロデキストリン処理によりコレステロールを除去すると、脂質ラフトは壊れラフトを介するシグナル伝達は攪乱される。

B. 脂質ラフトの物理的性質における複合糖質の役割

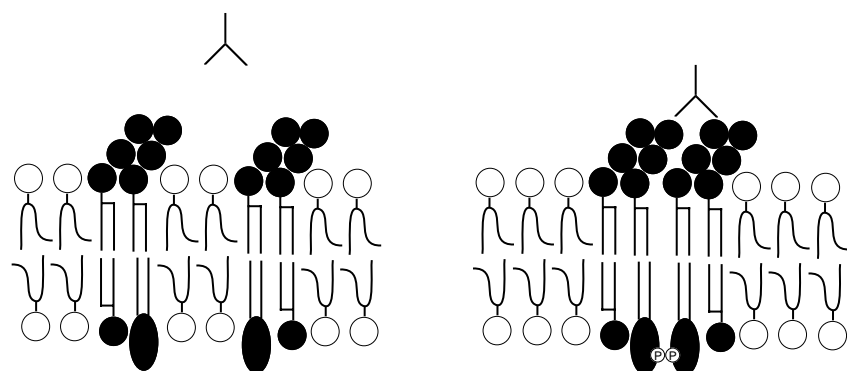
哺乳動物細胞のスフィンゴ脂質には、GSLとスフィンゴミエリン(SM)の主に二つのクラスがあり両方とも疎水性分子であるセラミドから合成される。GSLsとSMとは異なる極性頭部を持ち、それぞれ糖鎖とホスホコリンである。スフィンゴ脂質を合成するセリンパルミトイルトランスフェラーゼ温度感受性変異CHO細胞において、スフィンゴ脂質が欠損すると結果的にGPIアンカータンパク質のトリトンX-100に対する溶解性が増す(15)。セラミド合成を阻害しGSLとSMの両方の生合成を止めるフモニシンで細胞を処理するとDRMが減る(16-18)。これらは、脂質ラフトの形成にスフィンゴ脂質が重要であることを示している。

PDMPはセラミドグルコース転移酵素(グルコシルセラミド合成酵素)の阻害剤で、ほとんどのGSLの生合成の最初の反応を止めるがSMの生合成過程には影響を及ぼさない(19)。無傷細胞膜上においてGPIアンカータンパク質およびGSLの一分子軌跡は瞬間的のある一区画に局在化するが、それは脂質ラフトを表わしているものであると考えられている。PDMP処理により、そのGPIアンカータンパク質の局在化する領域の大きさが小さくなる(20)。PDMPによりGSLを欠損させると、密度勾配遠心においてsrcはラフト画分から排除される(21)。

オクチルグルコシド存在下ではDRMは検出されないが、この界面活性剤がGSLと構造が似ていることによる。またリゾ体GSLを細胞とインキュベーションするとGSLクラスターが減少する(22)。さらに外からガングリオシドを加えるとGPIアンカータンパク質の脂質ラフトでのクラスター化が減少し、界面活性剤に対する溶解度が増加する(23)。これらのことはGSLsもまた脂質ラフトの形成に重要であることを示している。

GSL頭部間の水素結合によるGSL自己会合は、脂質ラフトの形成に寄与していると考えられている(5)。たとえば(i) GSLsはSMよりも高い相転移温度を持つ(6)。(ii) グルコシルセラミド合成酵素欠損癌細胞変異体はGSLsを発現していないが、SMの発現増加がその分を補っている。しかし親細胞におけるDRM構成タンパク質の量は変異細胞の二倍である(24)。(iii)

A : *Trans*-interaction



B : *Cis*-interaction

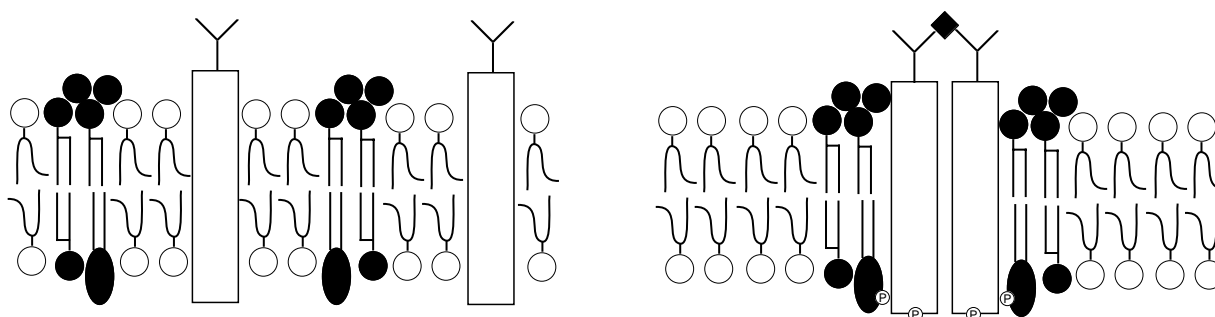


Fig.1 Two modes of interaction with lipid raft. (A) *Trans*-interaction : GSL ligation induces coalescence of lipid rafts (28).

(B) *Cis*-interaction : Receptor ligation induces translocation to lipid rafts or stabilization of raft-association. For example, (i) aggregation of IgE-FcεRI by antigen induces coalescence of FcεRI with lipid rafts (36), (ii) antibody-mediated crosslinking GPI-anchored protein increases the amount of GPI-anchored protein in the lipid raft fraction on a density gradient (79), (iii) NGF treatment increases association of Trk with ganglioside GM1 (41).

ety from cell-surface GSLs induces an alteration of GPI-anchored protein distribution on a density gradient (25). These observations suggest that the carbohydrate-chain of GSLs can affect the physical properties of lipid rafts.

C. Glycoconjugate Functions in Signal Transduction via Lipid Rafts

There are two modes of interaction of molecules with lipid rafts (Fig.1) ; (A) interaction of exogenous molecules such as diffusible factor, extracellular matrix, or membrane molecule of the other cell (*trans*-interaction), e.g. association of anti-GSL antibody with carbohydrate-chain of GSLs (B) interaction of membrane-associated molecule within the same cell membrane, such as GPI-anchored protein, immunoreceptor and growth factor receptor. (*cis*-interaction).

C-1. GSL signaling (26-28)

Association of antibody and toxin with cell-surface GSLs has been shown to induce activation of src-family kinases in

さらに細胞表面のGSL糖鎖を酵素で除去すると密度勾配遠心におけるGPIアンカータンパク質の分布が変化する(25)。

これらのことはGSL糖鎖は脂質ラフトの物理的性質に影響を与えることができることを示している。

C . 脂質ラフトを介するシグナル伝達における複合糖質の役割
脂質ラフトと分子の相互作用には二つの様式がある (図 1) 。 (A) 拡散性因子、細胞外マトリックス、他の細胞表面上の膜分子などの外来性分子との相互作用 (トランス相互作用、例 : 抗GSL抗体とGSL糖鎖との相互作用) と、 (B) GPIアンカータンパク質、免疫受容体、増殖因子受容体など同じ細胞膜内での膜会合分子との相互作用 (シス相互作用) である。

C-1. GSLシグナリング(26-28)

細胞表面のGSLsと抗体または毒素との会合が脂質ラフトにおいてsrcファミリーキナーゼを活性化することが示されてきたが、これはGSL糖鎖とそのリガンドとの相互作用による膜を介

lipid rafts, suggesting the presence of transmembrane signaling through interaction of GSL carbohydrates with their ligands *in vivo*. One possible ligand is GSL on adjacent cell surface. Hakomori *et al.* has demonstrated cell adhesion and signal transduction through carbohydrate-carbohydrate interaction in B16 melanoma (29). The cell adhesion and signal transduction are inhibited by preincubation with anti-GSL antibody, or lyso GSL (30). Carbohydrate-carbohydrate interaction is also shown using GSL monolayers by surface plasmon resonance (31).

Lectins have been reported as natural ligands for GSLs, such as selectin, galectin, sialoadhesin and myelin-associated glycoprotein (28, 29). Affinity of sialoadhesin on the cell surface for GSL polymer is higher than that for GSL monomer (32). In GSL/phospholipid mixed monolayers, affinity of lectin for phase-separated GSL is higher than that for homogeneously mixed GSL (33). These observations suggest that cell-cell contact *via* lectin-GSL interaction may induce signal transduction in lipid rafts. However, the physiological significance remains to be explored.

C-2. GPI-Anchored Protein Signaling

GPI-anchored proteins have been implicated in transmembrane signaling *via* lipid rafts. GPI-anchored protein signaling and GSL signaling share many properties (27, 28). (i) Anti-GPI-anchored protein antibody, as well as anti-GSL antibody, co-precipitate src-family kinases. (ii) Antibody-mediated crosslinking of GPI-anchored proteins as well as GSLs induces activation of src-family kinases; (iii) both induce transient tyrosine phosphorylation of common downstream molecules; (iv) both induce Ca^{2+} flux. Thus, GPI-anchored protein and GSLs transduce signals using the same pathway. Enzymatic removal of the carbohydrate moiety from cell-surface GSLs impairs activation of the src-family kinase by antibody-mediated crosslinking of GPI-anchored protein (25). This observation suggests that GSLs are involved in GPI-anchored protein signaling.

The association of GPI-anchored proteins with lipid rafts is developmentally regulated during oligodendrocyte maturation (34). In oligodendrocyte progenitor cells which do not synthesize galactocerebroside (GalCer), a major GSL in myelin, the GPI-anchored neuronal cell adhesion molecule, F3, is not present in lipid rafts and is not associated with the src-family kinase Fyn. In contrast, F3 from maturing oligodendrocytes and from myelin is present in lipid rafts and is associated with Fyn.

C-3. Immunoreceptor Signaling

Lipid rafts are involved in signaling by immunoreceptors, such as the T-cell antigen receptor (TCR) and IgE receptor (FcεRI) (35, 36). Efficient T-cell activation requires one signal from a TCR and a second signal from the costimulatory molecule. The costimulation leads to the recruitment of lipid rafts to the site of cell-cell contact between the T cell and antigen-

するシグナル伝達が生体内においても存在していることを示唆している。可能性のある一つのリガンドは隣の細胞上のGSLである。箱守らはB16メラノーマにおけるGSLsの糖鎖-糖鎖相互作用が細胞接着およびシグナル伝達をおこすことを報告している(29)。その細胞接着およびシグナル伝達は、あらかじめ抗GSL抗体またはリゾ体GSLでインキュベーションすることで阻害される(30)。糖鎖-糖鎖相互作用は、GSL単分子層を用いた表面プラズモン共鳴法によっても示されている(31)。

GSLsの生理的リガンドとしてセレクチン、ガレクチン、シアロアドヘシン、ミエリン会合糖タンパク質などのレクチンが報告されている(28,29)。細胞表面のシアロアドヘシンとGSLポリマーとの親和力はGSLモノマーとの親和性より強い(32)。またGSLとリン脂質の混合単分子層において、レクチンとGSLの親和力は、GSLが均一に混ざっている時より相分離をおこしている時のほうが強い(33)。これらのことは、レクチン-GSL相互作用による細胞間接着が脂質ラフトでおきる可能性を示している。しかし、その生理的意義についてはまだ研究が進んでいない。

C-2. GPIアンカータンパク質シグナリング

GPIアンカータンパク質は脂質ラフトにおける膜を介するシグナル伝達に関係していると考えられてきた。GPIアンカータンパク質シグナリングとGSLシグナリングとでは多くの性質が共通している(27,28)。(i)抗GPIアンカータンパク質抗体は抗GSL抗体と同様にsrcファミリーキナーゼを共沈する。(ii)抗体でGPIアンカータンパク質をクロスリンクすると、GSLをクロスリンクした時と同様にsrcファミリーキナーゼが活性化し(iii)共通のシグナル伝達下流分子の一過性のチロシンリン酸化がおこり(iv)カルシウム流入がおこる。このようにGPIアンカータンパク質とGSLsは同じ経路でシグナルを伝達している。細胞表面のGSL糖鎖を酵素で除去するとGPIアンカータンパク質クロスリンクによるsrcファミリーキナーゼの活性化がおこらなくなる(25)。これはGPIアンカータンパク質シグナリングにGSLが関与していることを示している。

GPIアンカータンパク質と脂質ラフトの会合は、オリゴデンドロサイトが成熟する際、発生にともない制御されている(34)。ミエリンにおける主要なGSLであるガラクトシルセラミドは、オリゴデンドロサイト前駆細胞においては合成されておらず、このときGPIアンカー神経細胞接着分子F3は脂質ラフトに存在せずsrcファミリーキナーゼFynとは会合してない。これに対し、成熟オリゴデンドロサイトやミエリンにおいてはF3はラフトに存在しFynと会合している。

C-3. 免疫受容体シグナリング

脂質ラフトはT細胞抗原受容体(TCR)やIgE受容体(FcεRI)のシグナル伝達に関与している(35,36)。T細胞を十分に活性化するにはTCRによる第一のシグナルの他に、共刺激分子からの第二のシグナルも必要である。共刺激によりT細胞と抗原提示細胞との細胞間接着部位に脂質ラフトが集まる。srcファミリーキナーゼ、LAT、シグナル伝達下流分子を脂質ラフトに集め、さ

presenting cell. The concentration of src-family kinases, LAT and downstream molecules, and exclusion of tyrosine phosphatase CD45 allow strong and sustained tyrosine phosphorylation of several substrates (37). Aggregation of IgE-FcεRI by antigen also induces coalescence of FcεRI with lipid rafts, activation of the src-family kinases and histamine release from mast cells (36).

One of the RBL-2H3 variants, that was initially selected for deficiency in FcεRI-mediated histamine release, was found to lack expression of the ganglioside. Antigen stimulation did not induce PI turnover, activation of phospholipase A₂, C and D, Ca²⁺ flux and histamine release in the variant, even though it expresses FcεRI (38). Interestingly, deficiency of ganglioside expression and antigen-stimulated signaling is restored by transfection of active Rho family Cdc42.

C-4. Growth Factor Receptor Signaling

GSLs have been shown to be modulators of growth factor receptor signaling (29). However, the underlying molecular mechanism remains to be explored. Recent papers show a modulation mechanism in lipid rafts. In rat pheochromocytoma PC12 cells, NGF triggers neuronal differentiation, but EGF elicits a proliferation, although downstream molecules of signal transduction are virtually identical. NGF induces sustained ERK activation, whereas EGF induces transient activation. Duration of ERK activation is critical for neuronal differentiation. However, the mechanism of different time response remains to be clarified (39). A recent paper shows that Trk of PC 12 cells is present in lipid raft fraction. Furthermore, removal of cholesterol by cyclodextrin inhibits NGF-induced, but not EGF-induced, ERK activation (40). Therefore, NGF-induced sustained activation might be due to the presence of Trk in lipid rafts. Consistent with this idea, exogenous ganglioside GM1 increases NGF-induced autophosphorylation of Trk, but not EGF-receptor autophosphorylation in PC12 cells (41). GSL depletion by PDMP inhibits NGF-induced autophosphorylation of Trk and neurite outgrowth, but not EGF-mediated signaling, in PC12 cells (42). Transfection of the ganglioside GD3 synthase cDNA induced dimerization and activation of Trk and MAP kinase without NGF treatment in PC12 cells (43). Furthermore, unglycosylated Trk can hardly respond to NGF, which does not associate with lipid rafts (44). Glycosylation may affect interaction of membrane proteins with lipid rafts.

Exogenous ganglioside GM3 inhibits EGF-induced autophosphorylation of the EGF receptor and proliferation of A431 epidermoid carcinoma cells (45). Depletion of ganglioside GM3 by sialidase gene transfection or treatment with PDMP appeared to increase EGF receptor autophosphorylation and proliferation of A431 cells (46, 47). A recent paper showed that EGF receptor of A431 cells is present in lipid raft fraction (48). Thus, EGF receptor is also regulated in lipid rafts. The precise *cis*-regulation mechanism of membrane proteins with GSLs re-

らにチロシンホスファターゼCD45を排除することで、基質の強く持続するチロシンリン酸化を可能にしT細胞を十分に活性化する(37)。マスト細胞においても抗原によるIgE-Fc RIの凝集が脂質ラフトとFc RIの会合を引き起こし、srcファミリーキナーゼを活性化しヒスタミンの放出をおこす。

Fc RIによるヒスタミン放出がおこらないRBL-2H3変異体の中に、GSLsを発現していないものがある。その変異体ではFc

RIを発現しているにもかかわらず、抗原刺激によるPIターンオーバー、ホスホリパーゼA₂, C, Dの活性化、カルシウム流入がおこらない(38)。面白いことに、この細胞に活性化型RhoファミリーCdc42をトランスフェクションすると、GSLsの発現と抗原刺激によるシグナル伝達レベルがもともどる。

C-4. 増殖因子受容体シグナリング

GSLsは増殖因子受容体シグナリングの調節因子であることが示されてきた(29)。しかしその分子機構については、はっきりしていない。最近の論文は脂質ラフトによる調節機構を示している。ラット褐色細胞腫PC12において、NGFは神経分化を引き起こしEGFは細胞増殖をひきおこすが、シグナル伝達下流分子は実質上同じである。NGFは持続的なERK活性化をおこすが、EGFは一過性のERK活性化をおこす。神経分化には持続的なERK活性化が重要であると考えられている。しかし時間的に異なる反応をおこす機構は明らかになっていない(39)。最近の論文は、PC12細胞においてTrkが脂質ラフト画分に存在することを示している。さらにシクロデキストリンによるコレステロール除去で、NGFによるERK活性化は阻害されるが、EGFによるERK活性化は阻害されないことがわかった(40)。よってNGFによる持続的な活性化は、Trkが脂質ラフトに存在することによる可能性がある。この考えと一致することに、ガングリオシドGM 1添加はNGFによるTrkの自己リン酸化は促進するがEGFによるEGF受容体の自己リン酸化は促進しない(41)。PDMPによりGSLを欠損させると、PC12細胞においてNGFによるTrkの自己リン酸化と神経突起伸長は阻害されるが、EGFによるシグナル伝達は阻害されない(42)。ほかの例としてPC12細胞にガングリオシドGD 3合成酵素cDNAをトランスフェクションすると、NGFなしでTrkの二量体化と活性化がおこる(43)。さらに、糖鎖修飾されてないTrkは脂質ラフトとは会合せず、NGFにほとんど反応しないことがわかっている(44)。糖鎖修飾が膜タンパク質と脂質ラフトの会合に影響するのかもしれない。

偏平上皮癌細胞A431においてガングリオシドGM 3添加はEGFによるEGF受容体の自己リン酸化と細胞増殖を阻害する(45)。シアリダーゼ遺伝子トランスフェクションまたはPDMP処理によりガングリオシドGM 3を欠損させるとEGFによるEGF受容体の自己リン酸化と細胞増殖は促進する(46,47)。そして最近A431細胞においてEGF受容体は脂質ラフト画分に存在することが報告された(48)。GSLsによる膜タンパク質の正確なcis調節機構は、まだはっきりしていない。cis調節の一つの機構として形質膜におけるGSLと膜タンパク質の直接相互作用がある(49-

mains obscure. One of the mechanisms is direct-interaction of membrane proteins with GSLs on plasma membrane (49-51).

C-5. Proteoglycan Signaling

Type IIA secretory phospholipase A2 (sPLA2-IIA) is associated with glypican, a GPI-anchored heparan sulfate proteoglycan, on the cell surface caveolae, and transferred to subcellular compartments. Then, sPLA2-IIA is thought to catalyze release of arachidonic acid in the perinuclear compartment of rat 3Y1 fibroblasts (52).

Phosphacan, a neural tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycan, is a high-affinity ligand of TAG-1, a GPI-anchored neuronal cell adhesion molecule.

The binding is decreased by treatment of phosphacan with chondroitinase (53). Phosphacan induces activation of src-family kinase and protein tyrosine phosphorylation in lipid rafts of rat cerebellar primary cultures (25).

C-6. Involvement of Lectin

Galectin-1 is an endogenous lectin with known T cell immunoregulatory activity. Galectin-1 induces partial TCR signaling *via* lipid rafts (54). This is probably due to clustering lipid rafts, because cyclodextrin-mediated raft disruption inhibits the signaling. Furthermore, galectin-1 antagonizes antigen-induced signal transduction and TCR/costimulator dependent lipid raft clustering at the TCR contact site. Galectin-1 associates with ganglioside GM1 (55) or glycoprotein in lipid rafts. However, galectin-1 counter ligands remain to be elucidated.

Several papers report lectin-like molecules associated with lipid rafts: VIP36 (56, 57), annexin II, V, VI (58-62), ZG16p (18). However, the functional role of these lectins in raft-mediated signaling remains to be explored.

D. Heterogeneity in Lipid Rafts

Compositional, distributional and functional heterogeneity is known to exist among lipid rafts. Detergent-insoluble membrane is separated into two distinct subfractions visible as discrete light-scattering bands by density gradient centrifugation. There was a clear difference in their GSL compositions. Both bands are enriched in SM, cholesterol, GPI-anchored proteins. However, GalCer, annexin II and VI are only enriched in the higher-density fraction of porcine lung membranes (63). GSLs are enriched in the higher-density fraction of mouse cerebellum (64). In melanoma, two membrane subfractions were separated from the low-density, detergent-insoluble fractions by immunoprecipitation. The GM3-rich fraction, separated using the anti-GM3 antibody, contained sphingomyelin, cholesterol and c-src, but not caveolin. In contrast, the caveolin-containing fraction, separated using the anti-caveolin antibody, contained GlcCer, a large quantity of cholesterol and Ras (65).

In dorsal root ganglionic neurons also, two subfractions were separated by immunoisolation. The GPI-anchored prion protein, located primarily in the cell body, was relatively soluble

51)。

C-5. プロテオグリカンシグナリング

ラット線維芽細胞3Y1においてタイプIIA分泌型ホスホリパーゼA2は、細胞表面のカベオラに存在するGPIアンカーヘパラン硫酸プロテオグリカンであるグリピカンに結合し細胞内コンパートメントに輸送される。そして核周辺のコンパートメントでのアラキドン酸産生を触媒すると考えられている(52)。

神経組織特異的コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるフォスファカン、GPIアンカー神経細胞接着分子TAG-1の高親和性リガンドである。フォスファカンコンドロイチナーゼで処理すると、その会合は減少する(53)。フォスファカンはラット小脳初代培養細胞の脂質ラフトにおいて、srcファミリーキナーゼを活性化しチロシンリン酸化を引き起こす(25)。

C-6. レクチンの関与

ガレクチン-1はT細胞の免疫調節活性を持つことが知られる内在性レクチンである。ガレクチン-1は脂質ラフトを介して部分的にTCRのチロシンリン酸化を引き起こす(54)。シクロデキストリンによるラフトの破壊でそのシグナルが阻害されることから、これはおそらく脂質ラフトのクラスター化によっている。さらにガレクチン-1は抗原刺激によるシグナル伝達とTCR/共刺激による細胞間接着部位への脂質ラフトの集合を抑える。ガレクチン-1はガングリオシドGM1(55)か糖タンパク質の糖鎖に結合する。しかしガレクチン-1リガンドについてはまだ評価されていない。

脂質ラフトに会合しているレクチン様分子についてVIP36(56,57)、アネキシンII,V,VI(58-62)、ZG16p(18)など報告がいくつかある。しかしこれらの分子のラフトを介するシグナル伝達における役割については研究が進んでいない。

D. 脂質ラフトの不均一性

脂質ラフトには、その組成、分布、機能の不均一性が知られている。密度勾配遠心において界面活性剤不溶性膜が光を散乱する二本のバンドとして分離できることがある。それらの組成は明らかに異なる。ブタ肺膜においては、両方のバンドともSM、コレステロール、GPIアンカータンパク質に富んでいる。しかしガラクトシルセラミドは低密度側のバンドのみで富み、アネキシンII、VI、IP3レセプターは高密度側のバンドのみで富んでいる(63)。マウス小脳においてはGSLは低密度側のバンドで富んでいる(64)。

メラノーマにおいては、界面活性剤不溶性画分を免疫沈降でさらに二つの画分に分けられる。抗GM3抗体で分離したGM3に富む画分はSM、コレステロール、c-srcは含むがカベオリンは含まない。一方、抗カベオリン抗体で分離したカベオリンに富む画分はグルコシルセラミド、rasと大量のコレステロールを含んでいる(65)。

後根神経節ニューロンにおいても免疫沈降で二つの画分に分けられる。GPIアンカープリオンタンパク質は主に細胞体に

in detergent. Thy-1, abundantly expressed in neurites, was highly resistant to detergent solubilization (66). Distribution of SM and ganglioside recognized by A2B5 antibody is different in a multipolar oligodendrocyte progenitor cell. Although SM is present around the surface of the cell body, distribution of the ganglioside spreads from cell body to processes (67). Thus, functionally different proteins are organized in rafts of different lipid compositions.

E. Perspective

A number of studies have examined the role of lipids in physical properties and signaling of rafts. In contrast, the role of glycoconjugates remains to be explored. However, it can probably be revealed by gene targeting (68). In GalCer synthase-deficient mice, proteolipid protein, a raft protein of myelin, does not associate with lipid rafts (69) and functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane is observed (70, 71). Perturbation of lipid rafts in acid sphingomyelinase-deficient mice reduces tyrosine phosphorylation and consequently mitogenic signaling and increases susceptibility to apoptosis after TCR stimulation. The mice accumulate SM and GSLs (72). Furthermore, GlcCer synthase-deficient mice are embryonic-lethal (73). GD2 synthase-deficient mice exhibit male sterility (74), age-related axonal degeneration (75) and attenuation of interleukin 2 signaling in spleen cells (76). GD2 synthase/ GD3 synthase double knockout mice exhibit lethal audiogenic seizures (77). GPI-anchor biosynthesis deficient mice are embryonic-lethal and keratinocyte-specific GPI-deficient mice exhibit abnormal skin development (78). These phenotypes are possibly due to dysfunction of lipid rafts.

Acknowledgment

This work was supported by Grants-in-Aid 11121237 for Scientific Research on Priority Area, and Special Coordination Funds of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, the Japanese Government.

分布し、界面活性剤に比較的可溶性である。GPIアンカータンパク質Thy-1は神経突起に豊富に発現し界面活性剤に高度に不溶性である(66)。多突起型オリゴデンドロサイト前駆細胞においては、SMとA2B5抗体で認識されるガングリオシドとは分布が異なる。SMは細胞体表面に存在するが、ガングリオシドは細胞体から神経突起まで分布している(67)。このように機能の異なるタンパク質が脂質組成の異なるラフトに組み込まれている。

E. 展望

ラフトの物理的性質、シグナル伝達における脂質の役割については多くの研究がある。一方、複合糖質の役割については研究が進んでいない。しかし、ジーンターゲティングによる結果がそれを明らかにするであろう(68)。ガラクトシルセラミド合成酵素欠損マウスでは、ミエリンのラフトタンパク質であるプロテオリピッドタンパク質は脂質ラフトと会せず(69)、ミエリン膜の機能に異常をきたしている(70,71)。酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損マウスでは、SMおよびGSLsが蓄積し脂質ラフトが乱され、TCR刺激によるチロシンリン酸化と分裂シグナルが抑えられ、アポトーシスに対する感受性が増加する(72)。さらにグルコシルセラミド合成酵素欠損マウスは胎児期致死の表現型を示す(73)。ガングリオシドGD2合成酵素欠損マウスでは、精子形成不全(74)、加齢にともなう軸索変性(75)、ひ臓細胞におけるインターロイキン2シグナルの減少が見られる(76)。ガングリオシドGD2合成酵素/GD3合成酵素欠損マウスは、音刺激で痙攣をおこし死にいたる(77)。GPIアンカー合成酵素欠損マウスは胎児期致死で、皮膚特異的GPIアンカー合成酵素欠損マウスでは、皮膚の発生に異常をきたす(78)。これらの表現型が出る原因は脂質ラフトの機能障害である可能性がある。

謝辞

この仕事は、文部科学省の特定領域研究(11121237)および平成12年度科学技術振興調整費による「生体膜脂質の新しい機能の解析技術と制御技術の開発に関する研究」の一環として行われました。

References

1. Simons, K., and Toomre, D. (2000) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31–39
2. Kurzchalia, T.V., and Parton, R.G. (1999) *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 424–431
3. Anderson, R.G.W. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 199–225
4. Smart, E.J., Graf, G.A., McNiven, M.A., Sessa, W.C., Wngelman, J.A., Scherer, P.E., Okamoto, T., and Lisanti, M. (1999) *Mol. Cell Biol.* **19**, 7289–7304
5. Masserini, M., Palestini, P., and Pitto, M. (1999) *J. Neurochem.* **73**, 1–11
6. London, E., and Brown, D.A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1508**, 182–195
7. Ohta, K., Sato, C., Matsuda, T., Toriyama, M., Lennarz W.J., and Kitajima, K. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **258**, 616–623
8. Ohta, K., Sato, C., Matsuda, T., Toriyama, M., Vacquie, r V.D., Lennarz, W.J. and Kitajima, K. (2000) *Glycoconj. J.* **17**, 205–214
9. Rietveld, A., Neutz, S., Simons, K., and Eaton, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 12049–12054
10. Scheel, J., Srinivasan, J., Honnert, U., Henske, A., and Kurzchalia, T.V. (1999) *Nature Cell Biol.* **1**, 127–129
11. Kübler, E., Dohlmán, H.G., and Lisanti, M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32975–32980
12. Xiao, Z., and Devreotes, P.N. (1997) *Mol. Biol. Cell* **8**, 855–869
13. Nolan, D.P., Jackson, D.G., Biggs, M.J., Brabazon, E.D., Pays, A., Van Laethem, F., Paturiaux-Hanocq, F., Elliot, J.F., Voorheis, H.P., and Pays, E. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 4072–4080
14. Zhang, X., and Thompson, G.A.Jr. (1997) *Biochem. J.* **323**, 197–206
15. Hanada, K., Nishijima, M., Akamatsu, Y., and Pagano, R.E. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 6254–6260
16. Merrill, A.H., Liotta, D.C., and Riley, R.T. (1996) *Trends Cell Biol.* **6**, 218–223
17. Futerman, A.H. (1995) *Trends Cell Biol.* **5**, 377–380
18. Schmidt, K., Schrader, M., Kern, H-F., and Kleene, R. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 14315–14323
19. Radin, N.S., Shayman, J.A., and Inokuchi, J. (1993) *Adv. Lipid Res.* **26**, 183–213
20. Sheets, E.D., Lee, G.M., Simson, R., and Jacobson, K. (1997) *Biochemistry* **36**, 12449–12458
21. Inokuchi J, Uemura S, Kabayama, K., and Igarashi Y (2000) *Glycoconj. J.* **17**, 239–245
22. Zhang Y, Iwabuchi K, Nunomura S., and Hakomori S (2000) *Biochemistry* **39**, 2459–2468
23. Simons, M., Friedrichson, T., Schulz, J.B., Pitto, M., Masserini, M., and Kurzchalia, T.V. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 3187–3196
24. Ostermeyer, A.G., Beckrich, B.T., Ivarson, K.A., Grove, K.E., and Brown, D.A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 34459–34466
25. Kasahara, K., Watanabe, K., Takeuchi, K., Kaneko, H., Oohira, A., Yamamoto, T., and Sanai, Y. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 34701–34709
26. Kasahara, K., Watanabe, Y., Yamamoto, T., and Sanai, Y. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 29947–29953
27. Kasahara, K., and Sanai, Y. (1999) *Biophys. Chem.* **82**, 121–127
28. Kasahara, K., and Sanai, Y. (2000) *Glycoconj. J.* **17**, 153–162
29. Hakomori, S., Handa, K., Iwabuchi, K., Yamamura, S., and Prinetti, A. (1998) *Glycobiology* **8**(10), xi–xix
30. Iwabuchi, K., Zhang, Y., Handa, K., Withers, D.A., Sinay, P., and Hakomori, S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 15174–15181
31. Matsuura, K., Kitakouji, H., Sawada, N., Ishida, H., Kiso, M., Kitajima, K., and Kobayashi, K. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 7406–7407
32. Hashimoto, Y., Suzuki, M., Crocker, P.R., and Suzuki, A. (1998) *J. Biochem.* **123**, 468–478
33. Hashizume, M., Sato, T., and Okahata, Y. (1998) *Chem. Lett.* 399–400
34. Krämer, E., Klein, C., Koch, T., Boytinck, M., and Trotter, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 29042–29049
35. Ilangumaran, S., He, H-T., and Hoessli, D.C. (2000) *Immunol. Today* **21**, 2–6
36. Sheets, E.D., Holowka, D., and Baird, B. (1999) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 95–99
37. Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y., and Lanzavecchia, A. (1999) *Science* **283**, 680–682
38. Field, K.A., Apgar, J.R., Hong-Geller, E., Siraganian, R.P., Baird, B., and Holowka, D. (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 3661–3673
39. Marshall, C.J. (1995) *Cell* **80**, 179–185
40. Peiro, S., Comella, J.X., Enrich, C., Nartin-Zanca, D., and Rocamora, N. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 37846–37852
41. Mutoh, T., Tokuda, A., Miyadai, T., Hamaguchi, M., and Fujiki, N. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5087–5091
42. Mutoh, T., Tokuda, A., Inokuchi, J., and Kuriyama, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 26001–26007
43. Fukumoto, S., Mutoh, T., Hasegawa, T., Miyazaki, H., Okada, M., Goto, G., Furukawa, K., Urano, T., and Furukawa, K. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 5832–5838
44. Mutoh, T., Hamano, T., Tkuda, A., and Kuriyama, M. (2000) *Glycoconj. J.* **17**, 233–237
45. Bremer, E.G., Schlessinger, J., and Hakomori, S. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 2434–2440
46. Meuillet, E.J., Kroes, R., Tamamoto, H., Warner, T.G., Ferrari, J., Mania-Farnell, B., George, D., Rebbaa, A., Moskal, J.R., and Bremer, E.G. (1999) *Cancer Res.* **59** 234–240
47. Meuillet, E.J., Mania-Farnell, B., George, D., Inokuchi, J., and Bremer, E.G. (2000) *Exp. Cell Res.* **256**, 74–82
48. Waugh MG, Lawson D., and Hsuan JJ (1999) *Biochem. J.* **337**, 591–597
49. Zhou, Q., Hakomori, S., Kitamori, K., and Igarashi, Y. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 1959–1965
50. Kukimoto, M., Nureki, O., Shirouzu, M., Katada, T., Hirabayashi, Y., Sugiya, H., Furuyama, S., Yokoyama, S., and Hara-Yokoyama, M. (2000) *J. Biochem.* **127**, 181–184
51. Hara-Yokoyama, M., Nagatsuka, Y., Katsumata, O., Irie, F., Kontani, K., Hoshino, S., Katada, T., Ono, Y., Fujita-Yoshigaki, J., Furuyama, S., and Hirabayashi, Y. *Biochemistry* (in press)
52. Murakami, M., Kambe, T., Shimbara, S., Yamamoto, S., Kuwata, H., and Kudo, I. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 29927–29936
53. Milev, P., Maurel P., Häring, M., Margolis, R.K., and Margolis, R.U. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 15716–15723
54. Chung, C.D, Patel, V.P, Moran, M., Lewis, L.A., and Miceli, M.C. (2000) *J. Immunol.* **165**, 3722–3729
55. Kopitz, J., von Reitzenstein, C., Burchert, M., Cantz, M., and Gabius, H.-J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 11205–11211
56. Fiedler, K., Parton, R.G., Kellner, R., Etzold, T., and Simons, K. (1994) *EMBO J.* **13** 1729–1740

57. Hara-Kuge, S., Ohkura, T., Seko, A., and Yamashita, K. (1999) *Glycobiology* **9**, 833–839
58. Harder, T., and Gerke, V. (1994) *Biochem. Biophys. Acta* **1223**, 375–382
59. Babiychuk, E.B., and Draeger, A. (2000) *J. Cell Biol.* **150**, 1113–1123
60. Kassam, G., Manro, A., Braat, C.E., Louie, P., Fitzpatrick, S.L., and Waisman, D.M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 15093–15100
61. Ishitsuka, R., Kojima, K., Utsumi, H., Ogawa, H., and Matsumoto, I. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 9935–9941
62. Gao-Uozumi, C.X., Uozumi, N., Miyoshi, E., Nagai, K., Ikeda, Y., Teshima, T., Noda, K., Shiba, T., Honke, K., and Taniguchi, N. (2000) *Glycobiology* **10**, 1209–1216
63. Parkin, E.T., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (1996) *Biochem. J.* **319** 887–896
64. Olive, S., Dubois, C., Schachner, M., and Rougon, G. (1995) *J. Neurochem.* **65**, 2307–2317
65. Iwabuchi, K., Handa, K., and Hakomori, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 33766–33773
66. Madore, N., Smith, K.L., Graham, C.H., Jen, A., Brady, K., Hall, S., and Morris, R. (1999) *EMBO J.* **18**, 6917–6926
67. Nakai, Y., Sakurai, Y., Yamaji, A., Asou, H., Umeda, M., Uyemura, K., and Itoh, K. (2000) *J. Neurosci. Res.* **62**, 521–529
68. Muramatsu, T. (2000) *J. Biochem.* **127**, 171–176
69. Simons, M., Krämer, E., Thiele, C., Stoffel, W., and Trotter, J. (2000) *J. Cell Biol.* **151**, 143–153
70. Coetzee, T., Fujita, N., Dupree, J., Shi, R., Blight, A., Suzuki, K. Suzuki, K., and Popko, B. (1996) *Cell* **86**, 209–219
71. Bosio, A., Binczek, E., and Stoffel, W. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13280–13285
72. Nix, M., and Stoffel, W. (2000) *Cell Death Differentiation* **7** 413–424
73. Yamashita, T. Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreund, U., Sandhoff, K., and Proia, R.L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9142–9147
74. Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., Zhao, J., Fukumoto, S., Yamashiro, S., Okada, M., Haraguchi, M., Shin, M., Kishikawa M, Shiku, H., Aizawa, S., and Furukawa, K. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12147–12152
75. Sheikh, K.A., Sun, J., Liu, Y., Kawai, H., Crawford, T.O., Proia, R.L., Griffin, J.W., and Schnaar, R.L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7532–7537
76. Zhao, J., Furukawa, K., Fukumoto, S., Okada, M., Furugen, R., Haraguchi, M., Miyazaki, H., Takamiya, K., Aizawa, S., Shiku, H., Matsuyama, T., and Furukawa, K. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 13744–13747
77. Kawai, H., Allende, M.L., Wada, R., Kono, M., Sango, K., Deng, C., Miyakawa, T., Crowley, J.N., Werth, N., Bierfreund, U., Sandhoff K., and Proia, R.L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 6885–6888
78. Tarutani, M., Itami, S., Okabe, M., Ikawa, M., Tezuka, T., Yoshikawa, K., Kinoshita T., and Takeda, J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 7400–7405

Received on February 21, 2001, accepted on March 14, 2001

Profile of the Author



Kohji Kasahara

Kohji Kasahara graduated in chemistry in 1986 and received his master's degree in 1988 from the Tokyo Institute of Technology. He received his Ph.D in 1992 from the Institute of Medical Science, University of Tokyo. Since 1992 he has been a research scientist in the Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science. He has been studying the function of gangliosides in signal transduction via membrane microdomains : lipid rafts.