Lipid Rafts and Anti-Glycolipid Antibodies

脂質ラフトと抗糖脂質抗体

Kasahara, Kohji

Laboratory of Biomembrane, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Setagaya-ku, Tokyo 156–8506, Japan
FAX: +81–3–5316–3336, E-mail: kasahara-kj@igakuken.or.jp

(Received on April 1, 2014, accepted on April 21, 2014)

Key Words: lipid rafts, glycosphingolipid, ganglioside, antibody, signal transduction

Abstract

Lipid rafts are dynamic assemblies of glycosphingolipids, cholesterol, and proteins that can be stabilized into platforms involved in the regulation of signal transduction. Compositional and functional heterogeneities exist in lipid rafts. Anti-glycosphingolipid monoclonal antibodies can isolate compositionally specific lipid rafts including signaling molecules from various cells or tissues. Treatment of intact cells with anti-glycosphingolipid monoclonal antibodies can induce transmembrane signaling *via* specific lipid rafts. Therefore, anti-glycosphingolipid monoclonal antibodies are useful tools for the analysis of heterogeneity in raft signaling. Guillain-Barré and Fisher syndromes are autoimmune neuropathies with the clinical symptom of peripheral nerve dysfunction. Lipid raft function might be impaired by the patient's anti-ganglioside antibody.

要 約

脂質ラフトはスフィンゴ糖脂質、コレステロールとタンパク質のダイナミックな集合体であり、安定化することでシグナル伝達制御にかかわる中継点として働く。脂質ラフトには質的および機能的な不均一性が存在することが知られている。抗スフィンゴ糖脂質モノクローナル抗体はシグナル伝達分子を含む質的に特異的な脂質ラフトをさまざまな細胞や組織から単離することができる。無傷細胞を抗スフィンゴ糖脂質モノクローナル抗体で処理すると、特異的な脂質ラフトを介したシグナル伝達を惹起することができる。よって抗スフィンゴ糖脂質モノクローナル抗体は、ラフトシグナルの不均一性を解析するうえで有用な道具である。ギランバレー症候群やフィッシャー症候群は、末梢神経障害を臨床症状とする自己免疫性神経疾患である。患者の抗ガングリオシド抗体は、脂質ラフトの機能を障害しているかもしれない。

A. Introduction

Lipid rafts are dynamic assemblies of glycosphingolipids, sphingomyelin, cholesterol, and proteins that can be stabilized into platforms involved in the regulation of a number of vital cellular processes (1). Low-density, detergent-resistant membrane fractions can be isolated from cells by sucrose density gradient centrifugation. These membrane fractions are rich in glycosphingolipids, sphingomyelin, cholesterol, and a variety of signaling molecules. These observations indicate the presence of lipid rafts in cells and their involvement in signal transduction.

Glycosphingolipids and sphingomyelin 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, which prevent tight packing and confer the characteristic of a low melting temperature. Furthermore, both sides of the plasma membrane in lipid rafts have an elevated content of cholesterol, which leads to the formation of a liquid-ordered domain with sphingolipids that exhibits less fluidity than the surrounding phospholipid bilayer. Consistent with this idea, dipalmitoylphosphatidylcholine is present in the raft fraction of rat cerebellar granule

A. 序論

脂質ラフトはスフィンゴ糖脂質、スフィンゴミエリン、コレステロールとタンパク質のダイナミックな集合体であり、安定化することで細胞の生命維持に必要な数々の過程の制御にかかわる中継点として働いている(1)。ショ糖密度勾配遠心法によって低密度界面活性剤耐性膜画分を細胞から単離することができる。この膜画分はスフィンゴ糖脂質、スフィンゴミエリン、コレステロールとさまざまなシグナル伝達分子に富んでいる。これらのことは、細胞に脂質ラフトが存在し、シグナル伝達にかかわっていることを示している。

スフィンゴ糖脂質とスフィンゴミエリン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。さらに脂質ラフトにおいて形質膜の両側はコレステロール濃度が高く、スフィンゴ脂質とともに秩序液晶相領域を形成し、そこは周囲のリン脂質二重層より流動性が低い。ラット小脳顆粒細胞の脂質ラフト画分においてジパルミトイルフォスファチジルコリンが存在することは、そ

cells (2). Phosphatidylglucoside (PtdGlc) with saturated fatty acyl chains is also present in the raft fraction of human leukemia HL-60 cells (3). Hydrogen bonding among the carbohydrate moieties in glycosphingolipids is also considered to contribute to the formation of lipid rafts.

Src-family tyrosine kinases and trimeric G protein α subunits are modified by saturated-chain lipids: palmitoylation and myristoylation, which are likely to be inserted preferentially into lipid rafts. The Csk-binding protein (Cbp/PAG) and the linker for activation of T cells (LAT) are transmembrane adaptor proteins in lipid rafts, which undergo palmitoylation on two residues (4, 5). Recent studies have shown that the modification and affinity of these proteins can be dynamically regulated depending on the physiological stimulus. Several proteins are therefore found only transiently associated with lipid rafts, by either entering or leaving these compartments in response to extracellular or intracellular events, such as ligand binding or phosphorylation. The specific and dynamic localization of various signaling molecules is postulated to support signal integration. For example, efficient T-cell activation requires one signal from a T-cell receptor and a second signal from the costimulatory molecules. The costimulation leads to the coalescence of lipid rafts to the site of contact between a T cell and an antigen-presenting cell. The accumulation of src-family tyrosine kinases and their substrate LAT adaptor protein, and the exclusion of tyrosine phosphatase CD45 allow stable tyrosine phosphorylation of several substrates, leading to T-cell activation (6). One of the raft coalescence mechanisms involves an interaction between galectin-1 and ganglioside GM1.

Lipid rafts are also involved in membrane trafficking: Golgi trafficking to the cell surface and glycosphingolipid-mediated endocytosis. The transport machinery in the *trans*-Golgi network of epithelial cells sorts lipids and proteins into common carrier vesicles for targeted delivery to the apical or basolateral surface. Forssman glycolipids, together with cholesterol, generate a hydrogen-bonded network, and the interaction between Forssman glycolipids and galectin-9 generates foci for raft coalescence in the *trans*-Golgi network to facilitate apical transport carrier formation in epithelial MDCK cells (7). Furthermore, galectin-9 is a critical factor for apical membrane biogenesis. When galectin-9 is knocked down by RNAi, MDCK cells fail to establish apical-basolateral polarity. Similarly, the interaction between sulfatide and galectin-4 is involved in the apical sorting in epithelial HT29 cells (8). The yeast raft lipids, which are three classes of sphingolipids (inositolphosphoceramide, mannosyl-inositolphosphoceramide and mannosyl-diinositolphosphoceramide) and the cholesterol homologue ergosterol, were also shown to regulate the delivery of detergent-resistant cargos to the plasma membrane. Shiga toxin

の考えと一致している(2)。飽和脂肪酸鎖を持つフォスファチジルグルコシド (PtdGlc) もヒト白血病HL-60細胞のラフト画分に存在している(3)。スフィンゴ糖脂質の糖鎖部分同士の水素結合も脂質ラフトの形成に貢献していると考えられている。

Src ファミリーチロシンキナーゼや3量体Gタンパク質 α サブユニットはパルミトイル化やミリストイル化といった飽和脂肪酸鎖で修飾されていて、脂質ラフトに優先的に挿入されやすい。Csk 結合タンパク質 Cbp/PAG と T 細胞活性化リンカー LAT は2カ所のアミノ酸残基がパルミトイル化されて脂質ラフトに局在する膜貫通型アダプタータンパク質である(4, 5)。最近の研究からその修飾と親和性は、生理的な刺激に依存してダイナミックに制御されている。それゆえいくつかのタンパク質は脂質ラフトとの結合はほんの一時的で、リガンドの結合やリン酸化といった細胞外または細胞内の反応によって入ったり出たりしている。この特異的でダイナミックなさまざまなシグナル伝達分子の局在が、シグナル調整を支える前提となっている。例えば、T細胞が効果的に活性化するためには、T細胞受容体からの一つの刺激と補助刺激分子からの二つ目の刺激が必要である。補助刺激はT細胞と抗原提示細胞の接着部位に脂質ラフトを集め合体させる。Src ファミリーチロシンキナーゼとその基質である LAT アダプタータンパク質が集まり、チロシン脱リン酸化酵素 CD45 が排除されることにより、いくつかの基質タンパク質の安定したチロシンリン酸化が可能となり、T細胞が活性化する(6)。ラフト合体の一つの機構は、ガレクチン-1 とガングリオシド GM1 との相互作用によっている。

脂質ラフトは、ゴルジ体から細胞表面への輸送やスフィンゴ糖脂質を介したエンドサイトーシスなどの膜輸送にもかかわっている。上皮細胞においてトランスゴルジネットワークから脂質とタンパク質を共通の運搬小胞に載せアピカルまたはバソラテラル側の表面に運ぶ。フォルスマン糖脂質は水素結合したコレステロールとともに、ガレクチン-9 と相互作用することが、MDCK 上皮細胞のトランスゴルジネットワークからアピカル輸送運搬者としてのラフトの合体の中心として働いている(7)。さらにガレクチン-9 はアピカル膜領域の形成においても重要である。ガレクチン-9 を RNAi 法でノックダウンすると、MDCK 細胞におけるアピカル、バソラテラル極性の形成ができなくなる。同じように HT29 上皮細胞のアピカル輸送においてスルファチドとガレクチン-4 の相互作用がかかわっている(8)。3種類のスフィンゴ脂質であるイノシトールフォスフォセラミド、マンノシルイノシトールフォスフォセラミド、マンノシルジイノシトールフォスフォ

binds glycosphingolipids as surface receptors and is internalized by a glycosphingolipid-mediated clustering process. Shiga toxin B subunits are able to bind as a pentamer to glycosphingolipid Gb3. The Shiga toxin binding takes place in the liquid-ordered phase, which induces the segregation of Gb3 into high-density clusters and the formation of narrow tubular invaginations *via* a machinery that leads to the release from the plasma membrane into the cytoplasm (1).

The presence of lipid rafts *in vivo* is supported by several lines of evidence, including the results of fluorescence resonance energy transfer analysis, fluorescence correlation spectroscopy, stimulated emission depletion microscopy, and chemical cross-linking (1). A single-molecule imaging microscopy technique is a powerful tool for the study of raft signaling in living cell plasma membranes. Single-molecule imaging has revealed that molecules are frequently, but transiently, recruited to lipid rafts with the aid of protein-protein, protein-lipid, and lipid-lipid interactions. Individual signaling molecules within lipid rafts are activated only for a short period of time. The transient nature of molecular interactions in lipid rafts generates digital-like signal transduction in the cell membrane (9).

B. Anti-Glycolipid Antibodies

Membrane glycolipids represent tumor-associated antigens. Many glycolipids are over-expressed and altered in tumors compared with normal tissue. Antibodies that recognize tumor glycolipids are strong activators of complements and strong mediators of antibody-dependent cellular cytotoxicity. Therefore, glycolipid markers can be useful targets for the diagnosis and therapy of human cancer (10).

The crypticity of glycolipids is a difficult problem to overcome when these antigens are pursued as a target of cancer immunotherapy. A monoclonal antibody M2590, previously established by immunization of mice with syngenic melanoma B16 cells, is directed against ganglioside GM3. The reactivity of the antibody M2590 depends on the density of GM3 exposed at the B16 cell surface (11). There is a threshold density of GM3 at which the antibody recognizes it in an all-or-none manner. The reactivity of the antibody M2590 also depends on the density of human glioma KG-1C cells (12). Cryptic GM3 does exist in the outer cell membrane, and the crypticity of GM3 is reversible. KG-1C glioma cells express GM3 as their sole glycolipid component, so there should be no steric hindrance from other glycolipid molecules. Ganglioside GM1 in living neuronal membranes is masked from binding to the anti-GM1 monoclonal antibody DG1 by an interaction with ganglioside GD1a, which shields a critical domain of the oligosaccharide head group involved in antibody binding (13). The

セラミドとコレステロールに相当するエルゴステロールから成る酵母のラフト脂質は、界面活性剤耐性の形質膜への輸送貨物を制御していることが示されている。

志賀毒素は表面受容体としてスフィンゴ糖脂質に結合し、スフィンゴ糖脂質を介するクラスター化の過程により取り込まれる。志賀毒素Bサブユニットはペンタマーでスフィンゴ糖脂質 Gb3 に結合する。この志賀毒素の結合が秩序液晶相で起こり、Gb3 を高密度のクラスターとして分離し、狭い管状の陥没を形成し、形質膜から細胞質へ放出される装置として使われる (1)。

脂質ラフトが *in vivo* でも存在することは、蛍光共鳴エネルギー移動、蛍光相関分光法、誘導放射抑制顕微鏡や化学架橋法の結果を含むいくつかの証拠から支持されている (1)。一分子イメージング顕微鏡技術は、生きた細胞膜上でのラフトシグナルの研究において強力な道具である。一分子イメージングは、タンパク質-タンパク質相互作用、タンパク質-脂質相互作用、脂質-脂質相互作用によって分子が脂質ラフトに頻繁にしかし一過性に移行することを示した。それぞれのシグナル伝達分子は脂質ラフト内で、ほんの短い時間のみ活性化される。脂質ラフトにおいて分子が一過性に相互作用をすることから、細胞膜におけるシグナル伝達はデジタル方式であると考えられている (9)。

B. 抗糖脂質抗体

膜糖脂質は腫瘍関連抗原である。多くの糖脂質が正常組織と比較して腫瘍では、発現が過剰になる変化がある。腫瘍糖脂質を認識する抗体は、補体を強く活性化し抗体に依存した細胞性障害を仲介している。そのため、糖脂質マーカーはヒトがんの診断および治療のための有用な標的になりうる (10)。

糖脂質の潜在性は、がんの免疫療法の標的として追跡する際におこるむずかしい問題である。以前マウスに同系のメラノーマ B16 細胞を免疫することで、ガングリオシド GM3 を認識するモノクローナル抗体 M2590 が樹立された。この M2590 抗体の反応性は B16 細胞表面における GM3 の密度に依存している (11)。密度に、抗体がすべて認識するか全く認識しないかの閾値が存在する。M2590 抗体の反応性はヒトグリオーマ KG-1C の細胞密度にも依存している (12)。潜在 GM3 は確かに細胞表面に存在し、その潜在性は可逆的である。GM3 は KG-1C グリオーマ細胞に発現している唯一の糖脂質であることから、当然他の糖脂質による立体障害ではない。生きた神経細胞膜のガングリオシド GM1 は抗 GM1 モノクローナル抗体 DG1 と結合するが、抗体結合にかかわる頭部の糖鎖領域がガングリオシド GD1a との相互作用で隠されることにより結合しなくなる (13)。糖脂質の潜在性の正確な

precise mechanism underlying glycolipid crypticity remains to be explored. Detergent-resistant membrane rafts act as an effective immunogen. Raft immunization was used to produce monoclonal antibodies against glycolipids (14, 15).

C. Heterogeneity in Lipid Rafts

Lipid rafts are spatially heterogeneous in a single cell membrane. In a migrating T cell, ganglioside GM3-rich rafts containing a chemokine receptor CXCR4 and Rho localize to the cell front (leading edge), whereas GM1-rich rafts containing integrin $\beta 1$ and CD44 localize to the cell rear (uropod) (16). Sphingomyelin-rich rafts are spatially distinct from ganglioside GM1-rich rafts in Jurkat T cells (17). Gangliosides GM3 and GM1 are present in distinct microdomains in the apical domain of epithelial cells. Freeze-fracture immunolabeling electron microscopy showed that ganglioside GM3 and GM1 make independent clusters of <100 nm in diameter in fibroblasts (18). Sphingomyelin-rich rafts localize in the central region of adhering platelets with thrombin, whereas cholesterol-rich rafts localize evenly on the membrane. Sphingomyelin-rich rafts act as platforms of fibrin-mediated outside-in signals, leading to clot retraction (19). These observations suggest that lipid rafts are compositionally and functionally heterogeneous (20).

D. Heterogeneity in Raft Signaling

Cholera toxin B subunits are able to bind as a pentamer to ganglioside GM1. Ligation of GM1 by cholera toxin B subunits induces tyrosine phosphorylation of LAT, Ca^{2+} flux and MAP kinase activation in Jurkat T cells (Fig. 1) (21). Ligation of Gb3 by

機構はまだわかっていない。

界面活性剤耐性ラフト膜は効果的な抗原になることが知られている。ラフトを免疫することで、糖脂質に対するモノクローナル抗体が得られている (14, 15)。

C. 脂質ラフトの不均一性

脂質ラフトは一つの細胞の膜の中で、空間的に不均一である。移動しているT細胞の前方（先端）にケモカイン受容体CXCR4とRhoを含むガングリオシドGM3に富むラフトが局在し、細胞後方（尾肢）にインテグリン $\beta 1$ とCD44を含むGM1に富むラフトが局在する (16)。スフィンゴミエリンに富むラフトはJurkat T細胞においてガングリオシドGM1に富むラフトと空間的に区別される (17)。ガングリオシドGM3とGM1は、上皮細胞のアピカル領域において異なるミクロドメインに存在する。フリーズフラクチャー免疫標識電子顕微鏡法によりガングリオシドGM3とGM1は、線維芽細胞において直径100nm以下の独立したクラスターを形成していることが示された (18)。トロンビン刺激で接着させた血小板においてスフィンゴミエリンに富むラフトは中央領域に局在するのに対し、コレステロールに富むラフトは全体に存在した。スフィンゴミエリンに富むラフトは、フィブリンが媒介するOutside-in signalの中継点として働き、血餅退縮を引き起こす (19)。これらのことは、脂質ラフトは構成的および機能的に不均一であることを示している (20)。

D. ラフトシグナルの不均一性

コレラ毒素Bサブユニットは5量体でガングリオシドGM1に結合する。Jurkat T細胞においてコレラ毒素BサブユニットがGM1に結合すると、LATチロシンリン酸化、カルシウム動員、MAPキナーゼ活性化が引き起こされる (Fig. 1)

Fig. 1. Signal transduction by anti-glycolipid antibody, bacterial toxin and amyloid β protein in lipid rafts. Ligation of glycolipids with anti-glycolipid antibody, bacterial toxin (Toxin) and amyloid β protein ($\text{A}\beta$) could induce transmembrane signaling in lipid rafts.

Shiga toxin B subunits induces activation of src-family kinase Yes in Burkitt's lymphoma (22). Lysenin, an earthworm toxin, specifically binds to sphingomyelin-rich rafts and induces clustering of sphingomyelin-rich rafts and tyrosine phosphorylation of Cbl (23). These observations show the heterogeneity of raft signaling (24).

Two raft subfractions of melanoma B16 cells were separated by immunoprecipitation using an anti-ganglioside GM3 monoclonal antibody (25), suggesting that anti-glycosphingolipid monoclonal antibodies are tools for analysis of specific lipid rafts. The anti-ganglioside GM3 monoclonal antibody DH2 immunoprecipitates

(21). パーキットリンパ腫細胞において志賀毒素BサブユニットがGb3に結合すると、srcファミリーキナーゼYesが活性化する(22)。ミミズ毒素のライセニン(lysenin)はスフィンゴミエリンに富むラフト特異的に結合し、スフィンゴミエリンに富むラフトのクラスター化、Cblのチロシンリン酸化を引き起こす(23)。これらのことは、ラフトシグナルが不均一であることを示している(24)。

抗ガングリオシドGM3モノクローナル抗体を使った免疫沈降によって、メラノーマB16細胞のラフトを二つの画分に分けることができる(25)。これは抗スフィンゴ糖脂質モノクローナル抗体が脂質ラフトの特異性を解析する道具であ

Table 1. Anti-glycolipid monoclonal antibodies co-immunoprecipitate signaling molecules.

Antibody	Clone	Signaling molecule	Reference
LacCer	Huly-m13	Lyn	Iwabuchi <i>et al.</i> <i>Blood</i> 100 , 1454–1464 (2002)
GM3	DH2	c-src	Iwabuchi <i>et al.</i> <i>J. Biol. Chem.</i> 273 , 9130–9138 (1998)
GM3	DH2	FAK	Iwabuchi <i>et al.</i> <i>J. Biol. Chem.</i> 273 , 9130–9138 (1998)
GM3	DH2	Rho	Iwabuchi <i>et al.</i> <i>J. Biol. Chem.</i> 273 , 9130–9138 (1998)
GM3	DH2	CXCR4	Sorice <i>et al.</i> <i>FEBS Lett.</i> 506 , 55–60 (2001)
GD3	R24	Lyn	Kasahara <i>et al.</i> <i>J. Biol. Chem.</i> 272 , 29947–29953 (1997)
GD3	R24	Cbp	Sekino-Suzuki <i>et al.</i> <i>J. Neurochem.</i> 124 , 514–522 (2013)
GD3	R24	Goa	Yuyama <i>et al.</i> <i>J. Biol. Chem.</i> 282 , 26392–26400 (2007)
GD3	R24	EGF receptor	Wang <i>et al.</i> <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> 110 , 19137–19142 (2013)
9-O-Acetyl GD3	27A	caveolin-1	Simons <i>et al.</i> <i>Am. J. Pathol.</i> 159 , 1069–1077 (2001)
Fuc(Gal)-GM1	PR#1	Fyn, Yes	Yamazaki <i>et al.</i> <i>Biochem. J.</i> 407 , 31–40 (2007)
α GalGD1b	AA4	Lyn	Minoguchi <i>et al.</i> <i>J. Biol. Chem.</i> 269 , 5249–5254 (1994)
Gb3	38.13	Yes	Katagiri <i>et al.</i> <i>J. Biol. Chem.</i> 274 , 35278–35282 (1999)
DSGG	RM2	c-src	Satoh <i>et al.</i> <i>Int. J. Oncol.</i> 16 , 529–536 (2000)
DSGG	RM2	Rho	Satoh <i>et al.</i> <i>Int. J. Oncol.</i> 16 , 529–536 (2000)
Sulfatide	O4	Fyn, Lyn	Miki <i>et al.</i> <i>Glycoconj. J.</i> 30 , 819–823 (2013)
PtdGlc	rGL-7	Lyn, Hck, Cbp	Nagatsuka <i>et al.</i> <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> 100 , 7454–7459 (2003)

Table 2. Cellular response by anti-glycolipid antibodies.

Antibody	Cell	Response	Reference
GalCer	Oligodendrocytes	Ca ²⁺ flux	<i>J. Cell. Biol.</i> 111 , 625–633 (1990)
LacCer	Neutrophils	Lyn, p38 MAPK activation	<i>Blood</i> 100 , 1454–1464 (2002)
GM3	Melanoma B16	FAK phosphorylation	<i>J. Biol. Chem.</i> 273 , 9130–9138 (1998)
GD3	Cerebellar granule cells	Lyn, p42/44 MAPK activation	<i>J. Biol. Chem.</i> 272 , 29947–29953 (1997)
9-O-Acetyl GD3	Blood mononuclear cells	PI turnover	<i>Scand. J. Immunol.</i> 48 , 615–622 (1998)
GD2	IMR-32 neuroblastoma	Apoptosis	<i>Cancer Lett.</i> 281 , 171–182 (2009)
O-Acetyl GD2	Tumor cell line	Apoptosis	<i>Cancer Lett.</i> 333 , 194–204 (2013)
Asialo-GM1	Muscle-spinal cocultured cells	Voltage-gated Ca ²⁺ channel inhibition	<i>Neurochem. Res.</i> 29 , 953–960 (2004)
GD1a	Postnatal cerebellar neurons	RhoA activation	<i>J. Neurochem.</i> 94 , 15–21 (2005)
GalNAc-GD1a	PC12 pheochromocytoma cells	Voltage-gated Ca ²⁺ channel inhibition	<i>Exp. Neurol.</i> 204 , 380–386 (2007)
GD1a/GT1b	Primary neuronal cultures	RhoA, ROCK activation	<i>J. Neurosci.</i> 31 , 1664–1675 (2011)
GD1b	Cerebellar granule cells	Protein tyrosine phosphorylation	<i>J. Neurochem.</i> 124 , 514–522 (2013)
α GalGD1b	Basophilic leukemia RBL-2H3	Lyn, Syk Activation	<i>J. Biol. Chem.</i> 269 , 19466–19473 (1994)
GT1b	Keratinocyte-derived SCC12	Ser473-Akt phosphorylation	<i>J. Biol. Chem.</i> 276 , 44504–44511 (2001)
GT1b	Postnatal cerebellar neurons	Association of p75NTR to lipid rafts	<i>J. Neurochem.</i> 94 , 15–21 (2005)
PtdGlc	Neural progenitor cells	EGF receptor activation	<i>Biochem. J.</i> 419 , 565–575 (2009)

GM3-rich rafts containing c-Src (Table 1). Treatment with DH2 induces the phosphorylation of c-Src and FAK in melanoma B16 cells (Fig. 1, Table 2). The anti-lactosylceramide (LacCer) monoclonal antibody Huly-m13 immunoprecipitates LacCer-rich rafts containing src-family kinase Lyn of human neutrophils. Treatment of neutrophils with the anti-LacCer monoclonal antibody T5A7 induces activation of Lyn, p38MAP kinase and superoxide generation (26). Treatment of keratinocyte-derived SCC12 cells with the anti-ganglioside GT1b antibody, but not with an anti-ganglioside GD3 antibody, induces the phosphorylation of Ser-473 of Akt (27). Treatment of peripheral blood mononuclear cells with the anti-9-*O*-acetyl GD3 monoclonal antibody 27A, but not with the anti-GD3 antibody, induces tyrosine phosphorylation of p72syk despite the similar cell surface distribution of the two gangliosides (28). Treatment of neural progenitor cells with the anti-PtdGlc monoclonal antibody DIM21 induces recruitment of EGF receptors into lipid rafts, leading to the activation of EGF receptors (29). Furthermore, the anti-ganglioside GD3 monoclonal antibody R24 immunoprecipitates GD3-rich rafts containing Lyn and its substrate Cbp of rat cerebellar granule cells (30, 31). Treatment with R24 induces Lyn activation, phosphorylation of Cbp and p42/44 MAP kinase, and filamentous actin assembly in cerebellar granule cells (32). In a model of Lyn activation by crosslinking of ganglioside GD3 with R24, it is assumed that GD3 crosslinking leads to coalescence of lipid rafts. This may induce clustering of Lyn and transphosphorylation of tyrosine residue in the kinase domain (activating site, Tyr 397; homologous to c-Src Tyr 416) (24).

However, it should be noted that anti-glycosphingolipid monoclonal antibody treatment represents artificial stimulation. Previously, we attempted to identify the cell-surface molecules involved in Lyn signaling, because Lyn is a nonreceptor-type kinase. R24 co-immunoprecipitates the GPI-anchored neural cell adhesion molecule TAG-1, and the antibody-mediated crosslinking of TAG-1 induces Lyn activation in cerebellar granule cells (33, 34). Our previous study demonstrated that GPI-anchored TAG-1 transduces intracellular signaling *via* Lyn in GD3-rich rafts of cerebellar granule cells. Therefore, anti-glycosphingolipid monoclonal antibodies are useful tools for the analysis of heterogeneity in raft signaling.

E. Autoimmune Neuropathy and Anti-Glycolipid Antibodies

Guillain-Barré and Fisher syndromes, characterized by peripheral neuropathy with the clinical symptom of peripheral nerve dysfunction, are postinfectious autoimmune diseases. *Campylobacter jejuni* is the most frequent causal pathogen. The affected patients have anti-ganglioside antibodies, because lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* have ganglioside-like epitopes

ることを示している。抗ガングリオシドGM3モノクローナル抗体DH2は、c-Srcを含むガングリオシドGM3に富むラフトを免疫沈降する (Table 1)。メラノーマB16細胞をDH2で処理するとc-Src, FAKのリン酸化が起こる (Fig. 1, Table 2)。抗ラクトシルセラミド (LacCer) モノクローナル抗体Huly-m13は、ヒト好中球からsrcファミリーキナーゼLynを含むLacCerに富むラフトを免疫沈降する。好中球を抗LacCerモノクローナル抗体T5A7で処理すると、Lyn, p38MAPキナーゼの活性化、活性酸素の産生が起こる (26)。ケラチノサイト由来SCC12細胞を抗ガングリオシドGT1b抗体で処理すると、Aktの473番目のセリンのリン酸化が起こるが、抗ガングリオシドGD3抗体では起こらない (27)。末梢血単核細胞を抗9-*O*-acetyl GD3抗体で処理すると、p72Sykのリン酸化が起こるが、細胞に同程度二つのガングリオシドが発現しているにもかかわらず抗ガングリオシドGD3抗体では起こらない (28)。神経前駆細胞を抗PtdGlcモノクローナル抗体DIM21で処理すると、EGF受容体が脂質ラフトに移行し活性化する (29)。さらに、抗ガングリオシドGD3モノクローナル抗体R24は、ラット小脳顆粒細胞からLynとその基質であるCbpを含むガングリオシドGD3に富むラフトを免疫沈降する (30, 31)。小脳顆粒細胞をR24で処理すると、Lynの活性化、Cbp, p42/p44MAPのリン酸化、F-actinの重合が起こる (32)。R24によるガングリオシドGD3クロスリンクによるLyn活性化のモデルとして、GD3クロスリンクによる脂質ラフトの合体が考えられている。このことがLynのクラスター化、キナーゼ領域の活性化部位 (397番目のチロシン、c-Src416番目のチロシンに相同) のトランスリン酸化 (互いに相手をリン酸化) を起すかもしれない (24)。

しかし、抗スフィンゴ糖脂質モノクローナル抗体処理というのは人工的な刺激であることに注意しなければならない。以前我々は、Lynは非受容体型キナーゼであることから、Lynシグナルにかかわる細胞表面分子の同定を試みた。R24は小脳顆粒細胞においてGPIアンカー神経細胞接着分子TAG-1を共沈し、TAG-1を抗体でクロスリンクするとLynが活性化する (33, 34)。この研究は、GPIアンカーTAG-1が小脳顆粒細胞においてガングリオシドGD3に富むラフトに局在するLynを介して細胞内にシグナルを伝達していることを示している。よって抗スフィンゴ糖脂質モノクローナル抗体は、ラフトシグナルの不均一性を解析するための有用な道具である。

E. 自己免疫性神経疾患と抗糖脂質抗体

ギランバレー症候群やフィッシャー症候群は、末梢神経障害を臨床症状とする感染後自己免疫性神経疾患である。最も感染頻度の高い病原体は*Campylobacter jejuni*である。*Campylobacter jejuni*のリボポリサッカライドはガングリオシド様のエピトープを持っているため、患者は抗ガングリオシド抗体を持っている (35)。ギランバレー症候群患者の急性期

(35). IgG antibodies against ganglioside GM1, GD1a and GalNAc-GD1a are present in the acute phase sera from patients with Guillain-Barré syndrome. Anti-ganglioside IgG antibodies bind to the ganglioside antigen that is localized in the nodes of Ranvier of peripheral nerves causing muscle weakness. IgG antibodies against ganglioside GQ1b are present in the acute phase sera from patients with Fisher syndrome. Anti-GQ1b IgG antibodies bind to the GQ1b antigen that is localized in the paranodal myelin of the cranial nerves innervating ocular muscles causing ophthalmoplegia. Anti-ganglioside antibodies are thought to activate complements, causing axonal damage and thereby disturbing action potential conduction. However, complement-independent nerve dysfunction has been suggested by *in vitro* studies showing that anti-ganglioside antibodies directly change the integrity of lipid rafts. This is consistent with the finding that the patient's anti-GM1 antibody alters the distribution of Trk in lipid rafts (36). Patient's anti-GD1a/GT1b antibody activates RhoA and ROCK, and inhibits neurite outgrowth (37). Lipid raft function might be impaired by the patient's anti-ganglioside antibodies. The discovery of anti-glycolipid antibodies that bind to heteromeric glycolipid complexes provides a new concept in antibody-antigen interactions through clustered carbohydrate epitopes (38). Anti-GM1/GD1a, GD1a/GD1b, GD1b/GT1b complex antibodies are associated with Guillain-Barré syndrome (39), whereas anti-GM1/GQ1b, GD1a/GQ1b complex antibodies are associated with Fisher syndrome (40). Anti-ganglioside complex antibodies might induce heterogenous coalescence of lipid rafts.

F. Alzheimer's Disease and Gangliosides

Neuronal degeneration is due to the formation of senile plaques in Alzheimer's disease. The amyloid β protein, the main component of senile plaques, localizes in lipid rafts by its direct binding to ganglioside GM1 clusters (41). The N-terminal region of the amyloid β protein binds to ganglioside GM1 through hydrogen bonding and electrostatic interactions (42) on neuronal membranes, leading to the formation of an endogenous seed with an altered conformation (ganglioside-bound amyloid β) for amyloid fibril formation in the brain. Notably, the risk factors for the development of Alzheimer's disease, including aging and expression of apolipoprotein E4, likely facilitate the formation of lipid raft microdomains at presynaptic terminals, which provide a favorable milieu for the ganglioside-bound amyloid β generation.

This amyloid β protein binding to gangliosides might perturb physiological raft signaling in neurons, because the binding of cholera toxin B subunits or Shiga toxin B subunits to glycosphingolipids on intact cells induce signal transduction *via* lipid rafts (Fig. 1). Amyloid β protein binding to ganglioside GM1 induces

血清にはガングリオシド GM1, GD1a と GalNAc-GD1a に対する IgG 抗体が存在する。抗ガングリオシド IgG 抗体は末梢神経ランビエ絞輪に局在するガングリオシド抗原に結合し、筋力低下を引き起こす。フィッシャー症候群患者の急性期血清にはガングリオシド GQ1b に対する IgG 抗体が存在する。抗ガングリオシド GQ1b IgG 抗体は顔筋を支配する脳神経の傍絞輪部ミエリンに局在する GQ1b 抗原に結合し、眼筋麻痺を引き起こす。抗ガングリオシド抗体は補体を活性化し、軸索損傷を引き起こし活動電位の伝達を妨げると考えられている。しかし、抗ガングリオシド抗体が直接脂質ラフトを不完全な状態にするという *in vitro* の研究があり、補体に依存しない神経障害も提案されている。この考えは、患者 GM1 抗体が脂質ラフトにおける Trk の分布を変化させる報告と一致する (36)。患者 GD1a/GT1b 抗体が RhoA, ROCK を活性化し、神経突起伸長を阻害する (37)。脂質ラフトの機能が患者の抗ガングリオシド抗体によって障害されるのかもしれない。

異なる糖脂質複合体に結合する抗体が発見され、糖鎖クラスターエピトープを介した抗体抗原相互作用という新しい概念が生まれた (38)。抗 GM1/GD1a, GD1a/GD1b, GD1b/GT1b 複合体抗体はギランバレー症候群と関連している (39)。抗 GM1/GQ1b, GD1a/GQ1b 複合体抗体はフィッシャー症候群と関連している (40)。抗ガングリオシド複合体抗体は、異なる脂質ラフトの合体を引き起こすかもしれない。

F. アルツハイマー病とガングリオシド

アルツハイマー病における神経変性は老人斑の形成によっている。アミロイド β タンパク質は老人斑の主な構成成分であり、ガングリオシド GM1 クラスターに直接結合することにより脂質ラフトに存在する (41)。アミロイド β タンパク質の N 末領域が水素結合と静電相互作用により神経細胞膜のガングリオシド GM1 に結合し (42)、脳内においてコンフォーメーションを変え (ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質) アミロイド線維形成を起す内在性の「種」になる。興味深いことに、アルツハイマー病発症の危険因子である脳老化やアポリポタンパク質 E4 の発現は、神経突起末端においてガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質形成に適した環境である脂質ラフトの形成を誘導する。

無傷細胞の糖脂質にコレラ毒素 B サブユニットや志賀毒素 B サブユニットが結合すると脂質ラフトにおけるシグナル伝達が惹起されることから、アミロイド β タンパク質がガングリオシドに結合すると神経細胞における生理的なラフトシグナルを妨げるかもしれない (Fig. 1)。アミロイド β タンパク質がガングリオシド GM1 に結合すると、アミロイド β タン

the recruitment of the amyloid β protein into lipid rafts by src-family kinase Fyn-dependent mechanisms (43), decrease GM1 lateral diffusion (44), enhancement of phase separation during amyloid β protein aggregation (45), accumulation of apolipoprotein E and phosphorylated tau in lipid rafts (46), lipid oxidation, Ca^{2+} dyshomeostasis, membrane permeabilization (47) in intact cells, and changes in dynamics of the raft-model membrane (48). Furthermore, lipid raft disruption protects mature neurons against amyloid β oligomer toxicity (49).

パク質はsrcファミリーキナーゼFynに依存して機構によって脂質ラフトに移行し(43)、GM1の側方拡散が減少し(44)、アミロイド β タンパク質の凝集に伴い相分離が増加し(45)、脂質ラフトにアポリポタンパク質Eおよびリン酸化tauが蓄積し(46)、脂質酸化、カルシウム恒常性不全、膜透過が無傷細胞で起こり(47)、ラフトモデル膜においては動的变化が起こる(48)。さらに脂質ラフトを破壊すると、アミロイド β タンパク質オリゴマーの成熟神経細胞に対する毒性から保護される(49)。

References

1. Simons, K., and Gerl, M. J. (2010) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 688–699.
2. Prinetti, A., Chigorno, V., Prioni, S., Loberto, N., Marano, N., Tettamanti, G., and Sonnino, S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 21136–21145.
3. Nagatsuka, Y., Hara-Yokoyama, M., Kasama, T., Takekoshi, M., Maeda, F., Ihara, S., Fujiwara, S., Ohshima, E., Ishii, K., Kobayashi, T., Shimizu, K., and Hirabayashi, Y. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 7454–7459.
4. Hrdinka, M., and Horejsi, V. (2013) *Oncogene* advance online publication, doi:10.1038/onc.2013.485
5. Wange, R. L. (2000) *Sci. STKE* **2000**, rel.
6. Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y., and Lanzavecchia, A. (1999) *Science* **283**, 680–682.
7. Mishra, R., Grzybnek, M., Niki, T., Hirashima, M., and Simons, K. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 17633–17638.
8. Delacour, D., Gouyer, V., Zanetta, J. P., Drobecq, H., Leteurtre, E., Grard, G., Moreau-Hannedouche, O., Maes, E., Pons, A., André, S., Le Bivic, A., Gabius, H. J., Manninen, A., Simons, K., and Huet, G. (2005) *J. Cell Biol.* **169**, 491–501.
9. Suzuki, K. G. (2012) *Biotechnol. J.* **7**, 753–761.
10. Hakomori, S. (1983) *Bull. Cancer* **70**, 118–126.
11. Nores, G. A., Dohi, T., Taniguchi, M., and Hakomori, S. (1987) *J. Immunol.* **139**, 3171–3176.
12. Tatewaki, K., Yamaki, T., Maeda, Y., Tobioka, H., Piao, H., Yu, H., Ibayashi, Y., Sawada, N., and Hashi, K. (1997) *Exp. Cell Res.* **233**, 145–154.
13. Greenshields, K. N., Halstead, S. K., Zitman, F. M., Rinaldi, S., Brennan, K. M., O’Leary, C., Chamberlain, L. H., Easton, A., Roxburgh, J., Pediani, J., Furukawa, K., Goodyear, C. S., Plomp, J. J., and Willison, H. J. (2009) *J. Clin. Invest.* **119**, 595–610.
14. Katagiri, Y. U., Nakajima, H., Sato, B., Miyagawa, Y., Horiuchi, Y., Okita, H., Fujimoto, J., and Kiyokawa, N. (2008) *Glycoconj. J.* **25**, 495–501.
15. Hirabayashi, Y. (2012) *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.* **88**, 129–143.
16. Gómez-Mouton, C., Abad, J. L., Mira, E., Lacalle, R. A., Gallardo, E., Jiménez-Baranda, S., Illa, I., Bernad, A., Mañes, S., and Martínez-A, C. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 9642–9647.
17. Kiyokawa, E., Baba, T., Otsuka, N., Makino, A., Ohno, S., and Kobayashi, T. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 24072–24084.
18. Fujita, A., Cheng, J., Hirakawa, M., Furukawa, K., Kusunoki, S., and Fujimoto, T. (2007) *Mol. Biol. Cell* **18**, 2112–2122.
19. Kasahara, K., Kaneda, M., Miki, T., Iida, K., Sekino-Suzuki, N., Kawashima, I., Suzuki, H., Shimonaka, M., Arai, M., Ohno-Iwashita, Y., Kojima, S., Abe, M., Kobayashi, T., Okazaki, T., Sour, M., Ichinose, A., and Yamamoto, N. (2013) *Blood* **122**, 3340–3348.
20. Hakomori, S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 225–232.
21. Janes, P. W., Ley, S. C., and Magee, A. I. (1999) *J. Cell Biol.* **147**, 447–461.
22. Katagiri, Y. U., Mori, T., Nakajima, H., Katagiri, C., Taguchi, T., Takeda, T., Kiyokawa, N., and Fujimoto, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 35278–35282.
23. Kulma, M., Kwiatkowska, K., and Sobota, A. (2012) *Cell. Signal.* **24**, 1641–1647.
24. Kasahara, K., and Sanai, Y. (2000) *Glycoconj. J.* **17**, 153–162.
25. Iwabuchi, K., Handa, K., and Hakomori, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 33766–33773.
26. Iwabuchi, K., and Nagaoka, I. (2002) *Blood* **100**, 1454–1464.
27. Wang, X. Q., Sun, P., and Paller, A. S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 44504–44511.
28. Reivinen, J., Holthöfer, H., and Miettinen, A. (1998) *Scand. J. Immunol.* **48**, 615–622.
29. Kinoshita, M. O., Furuya, S., Ito, S., Shinoda, Y., Yamazaki, Y., Greimel, P., Ito, Y., Hashikawa, T., Machida, T., Nagatsuka, Y., and Hirabayashi, Y. (2009) *Biochem. J.* **419**, 565–575.
30. Kasahara, K., Watanabe, Y., Yamamoto, T., and Sanai, Y. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 29947–29953.
31. Sekino-Suzuki, N., Yuyama, K., Miki, T., Kaneda, M., Suzuki, H., Yamamoto, N., Yamamoto, T., Oneyama, C., Okada, M., and Kasahara, K. (2013) *J. Neurochem.* **124**, 514–522.
32. Yuyama, K., Sekino-Suzuki, N., Yamamoto, N., and Kasahara, K. (2011) *J. Neurochem.* **116**, 845–850.
33. Kasahara, K., Watanabe, K., Takeuchi, K., Kaneko, H., Oohira, A., Yamamoto, T., and Sanai, Y. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 34701–34709.
34. Prinetti, A., Prioni, S., Chigorno, V., Karageos, D., Tettamanti, G., and Sonnino, S. (2001) *J. Neurochem.* **78**, 1162–1167.
35. Kuwabara, S., and Yuki, N. (2013) *Lancet Neurol.* **12**, 1180–1188.
36. Ueda, A., Shima, S., Miyashita, T., Ito, S., Ueda, M., Kusunoki, S., Asakura, K., and Mutoh, T. (2010) *Mol. Cell. Neurosci.* **45**, 355–362.
37. Zhang, G., Lehmann, H. C., Manoharan, S., Hashmi, M., Shim, S., Ming, G. L., Schnaar, R. L., Lopez, P. H., Bogdanova, N., and Sheikh, K. A. (2011) *J. Neurosci.* **31**, 1664–1675.
38. Willison, H. J., and Goodyear, C. S. (2013) *Trends Immunol.* **34**, 453–459.
39. Kaida, K., Morita, D., Kanzaki, M., Kamakura, K., Motoyoshi, K., Hirakawa, M., and Kusunoki, S. (2004) *Ann. Neurol.* **56**, 567–571.

40. Kaida, K., Kanzaki, M., Morita, D., Kamakura, K., Motoyoshi, K., Hirakawa, M., and Kusunoki, S. (2006) *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **77**, 1043–1046.
41. Yanagisawa, K. (2011) *J. Neurochem.* **116**, 806–812.
42. Lemkul, J. A., and Bevan, D. R. (2011) *Protein Sci.* **20**, 1530–1545.
43. Williamson, R., Usardi, A., Hanger, D. P., and Anderton, B. H. (2008) *FASEB J.* **22**, 1552–1559.
44. Sasahara, K., Morigaki, K., and Shinya, K. (2013) *Phys. Chem. Phys.* **15**, 8929–8939.
45. Calamai, M., and Pavone, F. S. (2013) *FEBS Lett.* **587**, 1385–1391.
46. Kawarabayashi, T., Shoji, M., Younkin, L. H., Wen-Lang, L., Dickson, D. W., Murakami, T., Matsubara, E., Abe, K., Ashe, K. H., and Younkin, S. G. (2004) *J. Neurosci.* **24**, 3801–3809.
47. Evangelisti, E., Wright, D., Zampagni, M., Cascella, R., Fiorillo, C., Bagnoli, S., Relini, A., Nichino, D., Scartabelli, T., Nacmias, B., Sorbi, S., and Cecchi, C. (2013) *Curr. Alzheimer Res.* **10**, 143–153.
48. Hirai, M., Kimura, R., Takeuchi, K., Sugiyama, M., Kasahara, K., Ohta, N., Farago, B., Stadler, A., and Zaccari, G. (2013) *Soft Matter* **36**, 74.
49. Malchiodi-Albedi, F., Contrusciere, V., Raggi, C., Fecchi, K., Rainaldi, G., Paradisi, S., Matteucci, A., Santini, M. T., Sargiacomo, M., Frank, C., Gaudiano, M. C., and Diociaiuti, M. (2010) *Biochim. Biophys. Acta* **1802**, 406–415.

Profile of the Author

Kohji Kasahara graduated in chemistry in 1986 and received his Masters degree in 1988 from Tokyo Institute of Technology. He received his Ph.D. in 1992 from University of Tokyo. Since 1992 he has been a research scientist in Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science. Since 2005 he has been a project subleader, and since 2010 he has been a team leader in Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science. He held an additional post: PRESTO Japan Science and Technology Agency from 2001–2005.