Enzymology of Lysosomal Glycolipid Catabolism

リソソームにおける糖脂質代謝の酵素学

Kolter, Thomas ; and Sandhoff, Konrad

Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität, Gerhard-Domagk-str. 1,
D-53121 Bonn, Germany, FAX: 49- 228-73 77 78, E-mail: Sandhoff@uni-bonn.de

Key Words : *endocytosis, glycolipids, lysosomes, sphingolipids, sphingolipid activator proteins*

Abstract

Glycosphingolipids are amphiphilic components of cellular plasma membranes. Their constitutive degradation occurs in the acidic compartments of the cells, the endosomes and the lysosomes. It is an open question how the lysosomal degradation of membrane lipids is achieved without the destruction of the lysosomal membrane itself, which is entirely composed of substrates of the hydrolytic enzymes present in the lysosol. Several lines of evidence point to intralysosomal vesicles as the real substrate of the lysosomal degradation machinery. Presumably, they differ from the lysosomal membrane in terms of lipid composition, curvature, lateral pressure, and the absence of a glycocalix blocking the access of the hydrolytic enzymes and activator proteins. This review summarizes principles and recent findings of glycolipid enzymology which shed light on this poorly understood phenomenon. On the other hand, the *in vitro* investigation of the multicomponent system responsible for glycolipid degradation in the lysosome has to take into account topological features present in the lysosomes of the cell.

スフィンゴ糖脂質は、細胞膜の両親媒性の構成成分である。細胞中の酸性区画であるエンドソームやリソソームにおいて、スフィンゴ糖脂質の本質的な分解が起こる。リソソームにおいて、リソソーム内の加水分解酵素の基質からなるリソソーム膜自体は分解されずに、細胞膜脂質がどのように分解されるのかということは公然の疑問である。この疑問に関し、リソソームの分解機構の本当の基質がリソソーム内小胞であるということが、いくつかの一連の証拠により示されている。恐らく、リソソーム内の小胞はリソソーム膜とは異なるが、それは脂質組成、曲率、測方圧、加水分解酵素およびその活性化因子が接近するのを妨害する糖衣が存在しないという点においてである。本総説では、糖脂質酵素学の原理や最近の発見について要約するが、これはまだよく理解されていないリソソーム分解という現象に光を与えるものである。一方で、リソソームでの糖脂質分解に必要とされる多様な成分系の試験管内での研究は、リソソームに存在するトポロジ的な特徴を考慮しなければならないことも述べる。

A. Lysosomal Degradation of Macromolecules

The degradation of most cellular components occurs in the lysosomes. Macromolecules reach these organelles by endocytosis, autophagy, or, eventually, by direct transport (1, 2) and are cleaved by hydrolytic enzymes into their building blocks. The building blocks are able to leave the lysosomes *via* diffusion or with the aid of specialized transport systems. In other subcellular compartments the building blocks are utilized for the biosynthesis of macromolecules or for energy production. The entrance of cellular substances into the lysosome is tightly regulated and ensures homeostasis between growth and differentiation. Also foreign and potential pathogenic material is degraded in the lysosomes. On the cell surface, lysosomal fragments of endocytosed material are presented by MHC class II molecules to components of the immune system (3, 4).

Different hydrolases with acidic pH optima are involved in the process of lysosomal digestion, among them proteases, glycosidases, lipases, phospholipases, nucleases, phosphatases, and sulfatases. Inheritable disorders within this degradation path-

A. 高分子のリソソーム分解

細胞成分の多くはリソソームで分解される。高分子はエンドサイトーシス、自食作用によって、または最終的に直接輸送され、リソソームに到達し(1、2)、加水分解酵素により構成ブロックにまで分解される。構成ブロックは、拡散により、または特別な輸送系によりリソソームを離れ、その後他の細胞区画において高分子の生合成やエネルギー産生に利用される。リソソームへの細胞内物質の流入は厳密に制御され、成長と分化の間の恒常性が保たれている。外因性で潜在的な病原性物質も同様にリソソーム中で分解される。エンドサイトーシスされた物質のリソソーム分解断片は、細胞表面でMHCクラスII分子により、免疫系の成分に対して提示される(3、4)。

酸性pHを最適条件に持つ様々な加水分解酵素が、リソソームでの分解に関与している。その中にはプロテアーゼ、グリコシダーゼ、ホスホリパーゼ、ヌクレアーゼ、スルファターゼな

ways lead to lysosomal storage diseases and are characterized by the accumulation of nondegradable enzyme substrates. They can be classified according to the stored substances, *e.g.* as sphingolipidoses, mucopolysaccharidoses, mucopolipidoses, glycoprotein- and glycogen storage diseases (5). Not only the loss of a lysosomal hydrolase, but also the deficiency of transport-, protective-, and sphingolipid activator proteins can cause a lysosomal storage disease (6).

B. Lysosomal Degradation of Glycosphingolipids

Glycosphingolipids (GSLs) are components of cellular plasma membranes. They are composed of a ceramide part which serves as a membrane anchor and an extracellular oligosaccharide chain. Variations in the type, number and linkage of sugar residues within the oligosaccharide chain give rise to the wide range of naturally occurring GSLs. More than 300 different structures have been characterized from natural sources. GSL structures depend on the species and can be classified into series which are characteristic for a group of evolutionary related organisms. Beside the species dependence, GSLs form cell-type specific patterns on the cell surface. In particular sialic acid containing GSLs of the ganglio-series, the gangliosides, are abundant on neuronal cells. Moreover, these patterns change with cell growth, differentiation, viral transformation, ontogenesis and oncogenesis (7). Together with glycoproteins and glycosaminoglycans, GSLs contribute to the glycocalyx which covers the cell surface with a carbohydrate wall. GSLs destined for degradation are endocytosed and traffic through the endosomal compartments to reach the lysosome (8). Here, hydrolyzing enzymes sequentially cleave off the sugar residues from the nonreducing end of glycoconjugates. *Via* lower glycosylated GSLs, ceramide and finally sphingosine is produced, which can leave the lysosome to be further degraded or to reenter the biosynthetic pathway. For GSLs with carbohydrate chains of more than four sugar residues the presence of an enzymatically active exohydrolase is sufficient for the *in vivo* degradation. However, degradation of membrane bound GSLs with short oligosaccharide chains requires the cooperation of an exohydrolase and a protein co-factor, a so called sphingolipid activator protein (9). Several sphingolipid activator proteins are known including the saposins SAP-A, -B, -C and -D and the GM2 activator. (Fig. 1)

Inherited deficiencies of either lysosomal hydrolases or activator proteins give rise to GSL storage diseases (10). In principal, the lysosomal membrane is composed of the same constituents like other cellular membranes that are degraded within the course of endocytosis and subsequent lysosomal digestion. A question that is inadequately addressed in biochemistry and cell biology is why lipids of the lysosomal perimeter membrane are not or at least much slower degraded in contrast to plasma membrane-derived lipids entering the lysosomal compartment. Attempts to answer this question revealed that topological fea-

どがある。この分解経路における遺伝的な欠陥は、リソソーム蓄積症を引き起こし、未分解の基質が蓄積されるという特徴をもつ。このリソソーム蓄積症は、蓄積する基質により、例えば、スフィンゴ脂質蓄積症、ムコ多糖症、糖タンパク質由来オリゴ糖蓄積症、糖原病のように分類される(5)。リソソーム蓄積症は、リソソームの加水分解酵素の欠損に起因するだけではなく、輸送タンパク質や保護タンパク質、スフィンゴ脂質活性化因子の欠損によっても引き起こされる(6)。

B. スフィンゴ糖脂質のリソソーム分解

スフィンゴ糖脂質(GSLs)は細胞膜の構成成分で、膜アンカー部分のセラミドと細胞外のオリゴ糖鎖からなる。そのオリゴ糖鎖の糖残基の種類や数、結合様式の多様性により、広範囲にわたるGSLsが自然界に存在する。300種以上もの異なる構造が、天然材料から得られ特徴づけされている。GSLsの構造は、種に依存的であり、進化的に関連した生物群に特徴的な系列に分類される。種に依存的である他に、GSLsは細胞表面で細胞のタイプに特徴的な構造を示す。特に、ガングリオ系列のシアル酸を含むGSLsであるガングリオシドは、神経細胞上に豊富に存在する。さらに、その構造パターンは細胞成長、分化、ウイルス感染、固体発生や腫瘍発生により変化する(7)。GSLsは、糖タンパク質やグリコサミノグリカンとともに、糖質の壁により細胞表面を覆う糖衣を形成している。分解を受ける運命のGSLsは、エンドサイトーシスで取り込まれ、エンドソーム区画を通して輸送されリソソームに到達する(8)。そこで、加水分解酵素が複合糖質の非還元末端から糖残基を連続的に分解する。低度にグリコシル化されたGSLsを経て、最終的にセラミドとスフィンゴシンが生じ、それはリソソームを離れた後、さらに分解されるか再び生合成経路に入る。糖残基4個以上のGSLsが生体内で分解されるためには、活性なエキソ型加水分解酵素が存在すれば十分である。しかし、短いオリゴ糖鎖を持つ膜に結合したGSLsが分解されるためには、エキソ型加水分解酵素とタンパク補因子、いわゆるスフィンゴ脂質活性化因子が共同的に作用することが必要である(9)。サポシンSAP-A、-B、-C、-DやGM2活性化因子などの、いくつかのスフィンゴ脂質活性化タンパク質が知られている(図1)。

リソソーム加水分解酵素または活性化タンパク質のいずれか一方が遺伝的に欠損すると、GSL蓄積症が引き起こされる(10)。原則的には、リソソーム膜は細胞に存在する他の膜と同じ構成成分からなるが、これらの膜成分はエンドサイトーシス経路やそれに続くリソソーム消化の過程で分解される。なぜリソソームに輸送される細胞膜由来の脂質とは異なり、リソソーム膜の脂質が分解されないのか、あるいはされるとしても非常にゆっくりと分解されるのかという疑問は、生化学的および細胞生物学的にまだ十分に組み込まれていない問題である。この疑問に答える試みにより、リソソームの脂質分解のトポロジ的な特徴が、この分解過程の選択性において、これまでに提出さ

Fig. 1. Lysosomal degradation of ganglioside GM2 requires the presence of the GM2 activator.
Inherited deficiency of the GM2 activator gives rise to the AB variant of GM2 gangliosidoses.

tures of lysosomal lipid degradation play an important and previously unaddressed role for the selectivity of this process.

C. Mechanisms of Lysosomal Glycolipid Degradation

In contrast to the lysosomal degradation of soluble biomolecules like many proteins and oligosaccharides, the digestion of membrane components is associated with some peculiarities. On the one hand, the integrity of the lysosomal membrane has to be maintained during this process, on the other hand, the catabolism of glycolipids with short oligosaccharide chains by water-soluble lysosomal exohydrolases at a phase frontier requires the presence of activator proteins. This makes demands on specific conditions like lipid composition, curvature, lateral pressure and accessibility of the intralysosomal vesicular membranes to be degraded.

C-1. Topology

Glycosphingolipids, as components of the plasma membrane, reach the lysosomal compartment mainly by an endocytic membrane flow *via* the early and late endocytic reticulum (11). During this vesicular flow membrane components are subjected to a sorting process which directs some of the membrane lipids and membrane proteins to the lysosomal compartment, some others to the Golgi apparatus, and others back to the plasma membrane (12, 13). Up to now, it remains an open question whether components of the plasma membrane reach the lysos-

れていない重要な役割を果たしていることが明らかになった。

C. リソソームにおける糖脂質の分解機構

多くのタンパク質やオリゴ糖鎖のような可溶性生体分子のリソソームにおける分解とは異なり、膜成分の分解にはいくつかの特性が付随している。その一方で、リソソーム膜はこの分解過程においてそのまま保持されなければならない。また、水相と疎水相の境界で、短いオリゴ糖鎖をもつ糖脂質が水溶性の加水分解酵素により分解されるのには、活性化タンパク質が必要となる。この分解過程には、脂質の組成や曲率、側方圧、分解を受けるリソソーム内の小胞膜の近づきやすさのような特別な条件が必要とされる。

C-1. トポロジー

細胞膜成分としてのスフィンゴ糖脂質は、初期または後期エンドソームを経て、エンドサイトーシスの膜流動によって、リソソームに到達する(11)。この小胞の輸送中、膜成分は選別を受ける。それにより直接リソソームに運ばれる膜脂質や膜タンパク質もあれば、ゴルジ体に輸送されるものもあり、あるいは細胞膜に戻るものもある(12, 13)。細胞膜成分がリソソーム膜の一部としてリソソームに到達するのかどうかということ

Fig. 2. Two models for the topology of endocytosis and lysosomal digestion of glycosphingolipids (GSLs) derived from the plasma membrane (8). Conventional model (A): degradation of GSLs derived from the plasma membrane occurs selectively within the lysosomal membrane. Alternative model for the topology of endocytosis and digestion of GSLs (B): during endocytosis glycolipids of the plasma membrane become incorporated into the membranes of intraendosomal vesicles (multivesicular bodies). The vesicles are transferred into the lysosomal compartment when the late endosomes transiently fuse with lysosomes. PM, plasma membrane; ●, glycosphingolipid.

omes as part of the lysosomal membrane. This is to be expected when the successive steps of vesicle budding and fusion along the endocytotic pathway are taken into account. It is, however, quite unlikely that portions of the lysosomal membrane originating from the plasma membrane can become selectively degraded by lysosomal enzymes without the destruction of the lysosomal membrane. The inner leaflet of the lysosomal membrane is covered with a thick glycocalix composed of glycoconjugates (14). This glycocalix is visible in the microscope and is largely composed of lactosamine units which are thought to protect the perimeter membrane from the attack of the lysosomal hydrolases. It has been demonstrated *in vitro*, that lipid bilayers bearing ganglioside GM1, can be completely protected from the attack of phospholipase A2 when the ganglioside concentration reaches 25 mol % (15). On the other hand, plasma membrane-derived ganglioside GM3 is protected from degradation after incorporation into the lysosomal membrane (16). The observation of multivesicular bodies points to an alternative model of lysosomal lipid digestion (17, 18). They accumulate in certain sphingolipid storage diseases at the level of early and late endosomes and in the lysosomes. This suggests that parts of the endosomal membranes - obviously those enriched in components derived from the plasma membrane - invaginate and bud off into the endosomal lumen and thus form

は、現在までにまだ解明されていない問題である。このことは、エンドサイトーシス経路に沿って小胞が出芽し融合する連続過程を考慮すると予期される。しかし、細胞膜から生じたリソソーム膜の一部が、リソソーム膜自身は破壊されることなく、リソソーム酵素によって選択的に分解されることはありえないだろう。リソソーム膜の内側のリーフレットは、複合糖質からなる厚い糖衣で覆われている(14)。この糖衣は顕微鏡でみることができ、多くはラクトサミンユニットからなる。これは、リソソーム膜をリソソーム加水分解酵素の攻撃から保護すると考えられている。ガングリオシドGM1を含む脂質2重膜は、その濃度が25%に達するとホスホリパーゼA2の攻撃から完全に保護されることが、試験管内の実験で示されている(15)。一方、細胞膜由来のガングリオシドGM3は、リソソーム膜に取り込まれると分解されなくなる(16)。多胞体を観察すると、リソソームの脂質分解の代替のモデルが示される(17、18)。多胞体は、あるスフィンゴ脂質蓄積症で、初期エンドソームや後期エンドソームの段階やリソソームに蓄積する。このことからエンドソーム膜の一部、これは明らかに細胞膜由来の成分に富むのだが、これが内側にたたみこまれ、エンドソーム内腔中に出芽し、エンドソームの内側に小胞を形成することが示唆される。この小胞

intra-endosomal vesicles which become intralysosomal vesicles or other membrane structures by successive processes of membrane fission and fusion along the endocytic pathway (8). Therefore, glycoconjugates originating from the outer leaflet of the plasma membrane face the lysosol on the outer leaflet of intralysosomal vesicles. In this model there is no glycocalyx hindering the access of lysosomal proteins. It explains at least in part why membrane-derived lipids are degraded while the integrity of the perimeter membrane is preserved. This hypothesis was introduced in 1992 (9) and is supported by a series of observations (8). (Fig. 2)

For example, multi-vesicular storage bodies accumulate in cells from patients with sphingolipid storage diseases. Already in 1968 they have been observed in cerebral cells from patients with GM1 gangliosidosis (19). Multivesicular storage bodies also occurred in cells, *e. g.*, Kupffer cells and fibroblasts, of a patient with a rare sphingolipid storage disease, a combined activator protein deficiency (20). Analysis of cultured fibroblasts of this patient shows that the storage vesicles refer to late endosomal or lysosomal compartments. These compartments are still functionally active, except their inability to degrade sphingolipids with short oligosaccharide head groups. Apparently, these glycolipids cover the vesicular surfaces and protect the vesicles in the hostile lysosomal environment against disintegration and catabolism. After complementation of the medium of these cells with the missing protein, the SAP-precursor, the morphological shape of the multivesicular bodies is reversed (21). Moreover, the epidermal growth factor receptor derived from the PM and internalized into lysosomes of hepatocytes is not integrated into the lysosomal membrane but still degraded (22, 23). The hypothesis is also in accordance with observations that spherical multi-vesicular bodies are the predominant endocytic compartments in HEp-2 cells and that they mature within 60 to 90 min into lysosomes still containing internal vesicles (24).

The topology of GSL degradation is entirely different from GSL biosynthesis. The enzymes involved in GSL biosynthesis are membrane-bound glycosyltransferases (25). In contrast to the glycosidases required for GSL degradation which are water-soluble enzymes, the glycosyltransferases operate within the same membrane as their substrates. Therefore they should obey twodimensional enzyme kinetics (26) and apparently need no activator protein for the assistance of their enzymatic action.

C-2 Sphingolipid Activator Proteins

Degradation of GSLs occurs by stepwise action of specific acid exohydrolases. Several of these enzymes need the assistance of small glycoprotein cofactors, the so-called "sphingolipid activator proteins" (SAPs or saposins) (10). They are required for the degradation of GSL substrates with short oligosaccharide head groups, in general three sugar residues in a

は、エンドサイトーシス経路に沿って連続して起こる膜の分裂や融合により、リソソーム内の小胞や他の膜構造になる(8)。それゆえ、細胞膜の外側のリーフレット由来の複合糖質は、リソソーム内小胞の外側のリーフレットでライソゾルに接することになる。このモデルでは、リソソームタンパク質の接近を妨げる糖衣は存在しない。これによって少なくともある程度は、なぜリソソーム膜がそのままの状態で保持され、細胞膜由来の脂質だけが分解されるのかということを説明できる。この仮説は1992年に初めて紹介され(9)、一連の実験結果により支持されている(8)(図2)。

例えば、多胞蓄積体はスフィンゴ脂質蓄積症の患者の細胞に蓄積される。1968年にすでに、それはGM1ガングリオシドーシスの患者由来の脳の細胞で観察されている(19)。多胞蓄積体は、活性化タンパク質を欠損した珍しいスフィンゴ脂質蓄積症の患者のクッパー細胞や繊維芽細胞にもみられた(20)。この患者の培養繊維芽細胞の分析の結果、多胞蓄積体は後期エンドソームあるいはリソソーム区画にあるということが示された。これらの区画は、短いオリゴ糖鎖を持つスフィンゴ脂質を分解できない以外は、なお機能的に活性である。明らかに、これらの糖脂質は小胞の表面を覆っていて、敵対的なリソソームの環境で分解や代謝から小胞を保護している。この細胞の培地に欠損タンパク質であるSAP前駆体を加えると、多胞体の形態は元に戻る。(21)。さらに細胞膜由来で、肝細胞のリソソーム中に取り込まれる上皮成長因子受容体は、リソソーム膜に取り込まれないが、それでも分解される(22, 23)。この仮説は、HEp-2細胞において球状の多胞体がエンドサイトーシス区画の主要な成分であり、60分から90分以内に小胞を内部に含むリソソームに成熟するという結果にも一致する(24)。

GSL分解におけるトポロジーは、GSLの生合成とは全く異なる。GSLの生合成に関わる酵素は、膜に存在する糖転移酵素である(25)。GSLを分解する水溶性の糖加水分解酵素とは異なり、糖転移酵素は基質と同じ膜上で作用する。従ってそれらは2次元の酵素反応速度論に従い(26)、活性化タンパク質なしに酵素作用を示す。

C-2. スフィンゴ脂質活性化タンパク質

GSLsは、エキソ型の酸加水分解酵素が段階的に作用して分解される。これらの酵素の数種は、小さな糖タンパク質性の補因子、すなわち"スフィンゴ脂質活性化因子"(SAPsまたはサポシン)の補助を必要とする(10)。この因子は、大抵3個以下の糖残基が一列に並んだ短いオリゴ糖鎖を持つような、GSL基質の分解に必要である。現在までに知られているスフィンゴ脂質活

Fig. 3. Model for the GM2-activator stimulated degradation of ganglioside GM2 by human β -hexosaminidase A (6). Water-soluble β -hexosaminidase A does not degrade membrane-bound ganglioside GM2, which has a short carbohydrate chain, in the absence of GM2-activator or appropriate detergents. The GM2-activator binds one molecule of ganglioside GM2 and lifts it out of the membrane. The activator-lipid complex can be recognized by water-soluble β -hexosaminidase A which cleaves the lipid substrate.

row or less. The sphingolipid activator proteins known to date are encoded only by two genes. One gene carries the genetic information for the GM2-activator (27) and the other for the SAP-precursor (28–30), which is processed to four homologous proteins including sulfatide activator protein (SAP-B) and glucosylceramidase activator protein (SAP-C). The knowledge of their mechanism of action is necessary for the understanding of the principles that lead to selective degradation of membrane lipids without impairment of lysosomal integrity.

C-2-1. The GM2 Activator

The *in vivo* degradation of ganglioside GM2, the major storage compound in the GM2 gangliosidosis, requires the enzyme β -hexosaminidase A and a lysosomal ganglioside binding protein, the GM2 activator (10). A range of experimental data (31) suggests the mechanism of action of the GM2-activator. In contrast to the membrane-bound glycosyltransferases involved in GSL biosynthesis, β -hexosaminidase A is an enzyme resident in the lumen of the lysosomes, the lysosol. Also the other hydrolases involved in the degradation of macromolecules are water-soluble or at least membrane-associated enzymes. β -Hexosaminidase A can cleave substrates of the membrane surface only if they extend far enough into the aqueous phase. Its mode of action can be represented as a kind of razor blade sliding

性化因子は、二つの遺伝子のみによりコードされている。一つはGM2活性化因子をコードし(27)、もう一つはSAP前駆体をコードしている(28–30)。後者は、スルファチド活性化因子(SAP-B)やグルコシルセラミダーゼ活性化因子(SAP-C)などの4種の同類のタンパク質に分割される。それらの作用機構についての知見を得ることは、リソソーム膜自体を分解せずに、細胞膜由来の脂質が選択的に分解されるという原理を理解するのに必要である。

C-2-1. GM2活性化因子

GM2ガングリオシドーシスではガングリオシドGM2が主に蓄積するが、GM2が生体内で分解されるのには、 β -ヘキソサミニダーゼAとリソソームガングリオシド結合タンパク質、GM2活性化因子が必要とされる(10)。一連の実験結果により、以下に述べるようなGM2活性化因子の作用機構が示唆されている(31)。GSL生合成に関与する膜結合型の糖転移酵素とは異なり、 β -ヘキソサミニダーゼAはリソソーム内腔、ライソゾルに存在する酵素である。高分子の分解に関わる他の加水分解酵素もまた、水溶性もしくは少なくとも膜結合型の酵素である。 β -ヘキソサミニダーゼAは、膜表面に存在する基質が水層中に十分に伸びた時にのみ基質を分解することができる。この作用様式

over a membrane surface. On the other hand, GSL-substrates with oligosaccharide head groups too short to be reached by the enzymes active site cannot be degraded. Their degradation requires a second component, the GM2-activator which can penetrate lipid monolayers (45) and bind ganglioside GM2 as well as structurally related gangliosides. It is able to lift or even extract it from the membrane and present it to the hexosaminidase A for degradation. Formation of the ternary complex presumably involves also a protein-protein interaction between the GM2 activator and β -hexosaminidase A (32). (Fig. 3)

Point mutations within the structural gene of the GM2 activator have been identified in patients with the AB-variant of GM2 gangliosidosis (10) leading to premature degradation of the gene product. This results in a block within the GM2 degradation in the lysosomes. This block can be circumvented by feeding native GM2 activator to the culture medium of the mutant fibroblasts (33). A complete loss of the activator function leads to a variant form of GM2 gangliosidosis with infantile onsets. This indicates that no significant GM2 degradation occurs in the absence of the activator. This is a difference to the deficiency of other sphingolipid activator proteins. The absence of SAP-B or SAP-C leads to variant forms of metachromatic leukodystrophy or Gaucher's disease, respectively, with juvenile onset. This indicates a finite degradation capacity also in the absence of these cofactors.

Besides this *in vivo* function of the GM2-activator, the lipid storage pattern observed in GM2-activator deficient mice (34) and in AB-variant brain tissue (35) indicate that it also facilitates the degradation of GA2.

C-2-2. SAP-Precursor-Derived Activator Proteins

The first activator protein has been identified in 1964 as a protein required for the hydrolytic degradation of glycosphingolipids carrying a sulfuric ester group (sulfatides) by lysosomal arylsulfatase A (36). This activator, SAP-B (saposin B), binds GSLs, but with broader specificity than the GM2 activator. It can be understood as a physiological detergent. *In vitro* it behaves similarly to the GM2 activator in some aspects, *i. e.* it can present GSLs to water-soluble enzymes as substrates (37). The inherited deficiency of the sulfatide activator leads to a lysosomal storage disease which resembles metachromatic leukodystrophy. However unlike typical metachromatic leukodystrophy not only sulfatide but also additional glycolipids, *e. g.* globotriaosylceramide, accumulate due to defects in several points of the pathway of GSL degradation (38).

Together with three other activator proteins, SAP-A, C and D, SAP-B is derived from a common precursor protein, pSAP or prosaposin. The four SAPs show homology to each other and have similar properties, but differ in their specificity and their mechanism of action. The physiological function of these sphingolipid activator proteins is only partially clarified to date; most of our knowledge on this has emerged from studies on

は、膜表面をすべっていくかみそりの刃に例えることができる。一方、糖鎖が短すぎて酵素の活性部位に届かないようなオリゴ糖鎖を持つGSL基質は、分解を受けられない。そのため、この分解には第二の要素であるGM2活性化因子が必要となる。GM2活性化因子は、脂質単分子膜に挿入し(45)、ガングリオシドGM2や類似した構造をもつガングリオシドに結合することができる。そして、GM2を膜から引っぱり上げ、または引きだしさえし、分解させるためにヘキササミニダーゼAの方へ提示することができる。恐らく、この三者の複合体の生成には、GM2活性化因子と β -ヘキササミニダーゼAとのタンパク質-タンパク質相互作用もまた関与している(32)(図3)。

GM2活性化因子の構造遺伝子の点変異が、遺伝子産物の時期尚早な分解を引き起こすAB型GM2ガングリオシドーシスの患者に見い出されている(10)。この変異により、リソソームでのGM2の分解が阻害される。この変異をもつ繊維芽細胞の培地に天然のGM2活性化因子を加えると、GM2分解は阻害されなくなる(33)。その活性化因子の作用が全く失われると、乳児型GM2ガングリオシドーシス様蓄積症が引き起こされる。このことは、活性化因子が存在しないとGM2の分解はほとんど起きないことを示唆している。これは、他のスフィンゴ糖脂質活性化因子の欠損とは異なる。SAP-BやSAP-Cが存在しないと、若年型異染性ロイコジストロフィー様蓄積症や若年型ゴーシェ病様蓄積症が引き起こされる。よって、これらの補因子が存在しない場合もまた、分解能力に限りがあることが示された。

このような生体におけるGM2活性化因子の役割以外にも、GM2活性化因子を欠損したマウス(34)やAB型GM2ガングリオシドーシスの脳(35)に認められる脂質の蓄積のパターンにより、GM2活性化因子がGA2の分解も促進するということが示されている。

C-2-2. SAP前駆体由来の活性化因子

最初の活性化因子は、硫酸基をもつスフィンゴ糖脂質(スルファチド)をリソソームのアリルスルファターゼAが加水分解する際に必要なタンパク質として、1964年に同定された(36)。この活性化因子、SAP-B(サポシンB)はGSLsに結合し、GM2活性化因子よりも広い特異性を示す。これは生理学的な界面活性剤として理解されるだろう。SAP-Bは、試験管内で幾つかの点でGM2活性化因子と同様にふるまう。すなわち、基質であるGSLsを水溶性の加水分解酵素に提示することができる(37)。このスルファチド活性化因子の遺伝的な欠損により、異染性ロイコジストロフィー様のリソソーム蓄積症が生じる。しかし、典型的な異染性ロイコジストロフィーとは異なり、GSLの分解経路の複数の段階に欠陥があるために、スルファチドだけではなくグロボトリオシルセラミドのような別の糖脂質の蓄積も起こる(38)。

SAP-Bは、3種の他の活性化因子、SAP-A、C、Dとともに共通の前駆体タンパク質であるpSAP、又はプロサポシンから生じる。この4種のSAPは互いに相同性を持ち、性質は類似しているが、特異性やその作用機構が異なる。これらスフィンゴ糖脂質活性化因子の生理学的機能は、現在まで部分的にしか明らかになっていない。すなわち、このことについて我々の得た知見のほとんどは、異常な脂質蓄積症の患者に関する研究から得ているにすぎない。SAP-Bの遺伝的欠損が、異染性ロイコジストロ

patients with atypical lipid storage diseases. While the inherited deficiency of SAP-B leads to an atypical form of metachromatic leukodystrophy, SAP-C deficiency causes an atypical form of Gaucher's disease, where glucosylceramide accumulates (39–40). In one patient with a complete deficiency of the whole SAP-precursor protein due to a homoallelic mutation within the start codon (41) there is simultaneous storage of many sphingolipids, including ceramide, glucosylceramide, lactosylceramide, ganglioside GM3, galactosylceramide, sulfatides, digalactosylceramide and globotriaosylceramide (42). Cells from these patient have been used to elucidate the *in vivo* function of SAP-D (43). When SAP-D is fed to the cells of the patient with pSAP-deficiency, ceramide accumulation is prevented. In contrast to the main effect of the GM2 activator and SAP-B, the mechanism of action of SAP-C involves a direct activation of the enzyme glucosylceramide β -glucosidase (44).

D. Glycolipid Enzymology

Besides the topological considerations and the presumed function of the glycocalyx protecting the perimeter membrane but not the surface of intralysosomal vesicles, there are other factors that might influence glycolipid degradation. The factors that will be discussed here are the lateral pressure of lipid bilayers, the specific lipid composition of lysosomal membranes, and the curvature of a membrane. Each of these factors might influence the capability of the degrading system composed of a hydrolase, an activator protein, and the lipid to be degraded.

D-1. Lateral Pressure

Physicochemical measurements at lipid monolayers revealed that the GM2-activator is a membrane-active protein. It is able to insert into membranes as measured by an increase of the lateral pressure of monolayers composed of phosphatidylcholine and ganglioside GM2. Also microcalorimetric data indicate the GM2 activator to be a membrane-active protein. However, the membrane activity is only observed when the lateral pressure of the monolayer is below 25 mN/m (45). The lateral pressure of biological membranes is significantly above this value. It can be excluded from these data that the GM2 activator inserts into the perimeter membrane of the lysosomes. Although there is no experimental basis for this hypothesis to date, it can be expected that the combination of size and special lipid com-

フィー様蓄積症を引き起こすのに対し、SAP-Cの遺伝的欠損は、グルコシルセラミドが蓄積するゴーシェ病様蓄積症を発症する(39、40)。開始コドン中の同質対立遺伝子の変異により、SAP前駆体タンパク質を完全に欠損している患者(41)では、セラミド、グルコシルセラミド、ラクトシルセラミド、ガングリオシドGM3、ガラクトシルセラミド、スルファチド、ジガラクトシルセラミドやグロボトリアシルセラミドなどの多くのスフィンゴ糖脂質が蓄積する(42)。この患者由来の細胞は、生体内におけるSAP-Dの機能を明らかにするために用いられてきた(43)。pSAPを欠損した患者由来の細胞にSAP-Dを加えると、セラミドの蓄積が阻害される。SAP-Cの作用機構は、GM2活性化因子やSAP-Bの主な効果とは異なり、グルコシルセラミド β -グルコシダーゼを直接活性化することを含んでいる(44)。

D. 糖脂質酵素学

トポロジーを考慮することや、リソソーム内の小胞表面でなく周辺のリソソーム膜を保護している糖衣について推測される機能に加えて、糖脂質の分解に影響する他の因子が存在する。ここで取り上げる因子とは、脂質二重膜の側方圧、リソソーム膜の特異的な脂質組成と膜の曲率である。これらの因子はそれぞれ、加水分解酵素、活性化因子および分解を受ける脂質から構成される分解系の分解能に影響を及ぼす。

D-1. 側方圧

脂質単分子膜での物理化学的な測定により、GM2活性化因子が膜活性型のタンパク質であることが明らかになった。ホスファチジルコリンとガングリオシドGM2からなる単分子層の側方圧の増加により測定したところ、GM2活性化因子は膜の中に入り込むことができる。微量熱量測定の実験データもまた、GM2活性化因子が膜活性型のタンパク質であることを示している。しかし、この膜活性は単分子膜の側方圧が25mN/m以下であるときにのみ観察される(45)。実際の生体膜の側方圧は、この値より著しく高い。よってこれらのデータから、GM2活性化因子はリソソーム膜に挿入できないと考えられる。現在のところ、この仮説を支持する実験的な根拠はないが、リソソーム内の小胞の大

Fig. 4. Structure of native sn1, sn1'-(Bismonoacylglycerophosphate) (BMP) (46). The acyl side chains are derived from oleic acid. Acyl migration to the free hydroxyl groups can occur.

position of intralysosomal vesicles (see below) is sufficient to lower their lateral pressure beyond the value of 25 mN/m. At least in the case of the GM2 activator, this would explain why ganglioside GM2 present on the membrane surface of intralysosomal vesicles can be presented to β -hexosaminidase A by the activator while the same ganglioside is refractory to degradation when it is present on the inner leaflet of the lysosomal perimeter membrane.

D-2. Lipid Composition

The acidic compartments of the cell are unique in their lipid composition. This should influence membrane structure and the properties of the lipid-degrading system. Especially negatively charged lysosomal lipids turned out to be important for the degradation of model substances in detergent-free liposomal systems. Bis(monoacylglycerol)phosphate (BMP) (46–47) is synthesized within the acidic compartments (48) and therefore specifically found in the lysosomes and also in endosomes (49). Immunohistochemical techniques have localized BMP to intraendosomal structures in normal cultured fibroblasts (49) (Fig. 4).

High concentrations of this lipid occur in pulmonary alveolar macrophages (48). Also phosphatidylinositol and dolicholphosphate are found in the lysosomes, together with degradation products like fatty acids and dolichol.

D-3. Membrane Curvature

According to the hypothesis on the topology of lysosomal digestion discussed above, the degradation of plasma mem-

きさや特異的な脂質の組成(下記参照)が、側方圧が25mN/m以下になるための十分条件であると予想される。少なくともGM2活性化因子の場合には、この仮説によって、リソソーム内の小胞の膜表面上に存在するガングリオシドGM2は、GM2活性化因子により β -ヘキソサミニダーゼAに提示され分解されるが、GM2がリソソーム膜内側のリーフレットに存在するときは分解されない理由が説明できる。

D-2. 脂質組成

細胞中の酸性の区画は、特徴的な脂質組成を示し、それが膜の構造や脂質の分解系の特性に影響を及ぼす。特に負電荷をもつリソソーム脂質は、界面活性剤を含まないリポソーム系でのモデル物質の分解に重要であることが明らかになっている。ビス(モノアシルグリセロ)リン酸(BMP)(46、47)は酸性区画で合成されるため(48)、リソソームとエンドソームにも特異的に見い出されている(49)。免疫組織化学的手法により、BMPは正常な培養繊維芽細胞のエンドソーム構造内に局在することが示されている(50)(図4)。

この脂質は、肺胞のマクロファージ中に高濃度で存在する(48)。ホスファチジルイノシトールやドリコールリン酸もまた、脂肪酸やドリコールのような分解産物とともにリソソーム中に見い出されている。

D-3. 膜の曲率

これまでに議論してきたリソソームでの消化のトポロジーについての仮説によると、細胞膜由来の脂質の分解はエンド

Fig. 5. Lysosomal degradation of glucosylceramide and ceramide.

In addition to hydrolytic enzymes the breakdown of these lipids *in vivo* is dependent on the presence of nonenzymatically active activator proteins. Inherited deficiency of glucocerebrosidase leads to Gaucher disease, deficiency of acid ceramidase to Farber disease. SAP-C deficiency resembles Gaucher disease in certain aspects, an isolated deficiency of SAP-D has not been reported to date (6).

Fig. 6. The hydrolysis of glucosylceramide on large unilamellar vesicles by glucocerebrosidase is stimulated by phosphatidic acid (PA) and SAP-C. Degradation of GlcCer is monitored in the presence of 0 mol % PA (x), 5 mol % PA (●), 10 mol % PA (▲) or 20 mol % PA (■) and increasing concentrations of SAP-C (50).

Fig. 7. Lysosomal lipids in large unilamellar vesicles (LUVs) stimulate the enzymatic hydrolysis of glucosylceramide in the presence and in the absence of SAP-C (50). A: Assays were conducted with GlcCer as substrate in the absence (○) and presence of SAP-C (2.5 μM) (●) using LUVs with different concentrations of synthetic (Bismonoacylglycero)phosphate (BMP; 0–40 mol%). B: GlcCer degradation in LUVs containing phosphatidylinositol with (●) and without (○) addition of SAP-C. C: GlcCer hydrolysis in LUVs with or without phosphatidic acid (PA) and varying concentrations of dolichol (0–10 mol %). Without SAP-C (○), with 2.5 μM SAP-C (●), with 10 mol % PA (△), with 10 mol % PA and 2.5 μM SAP-C (▲). D: GlcCer degradation with varying concentrations of dolicholphosphate (0–10 mol%) with 2.5 μM (●) or without (○) SAP-C.

brane-derived lipids occurs on the surface of intraendosomal and intralysosomal vesicles and related membrane structures. Their curvature can be mimicked *in vitro* by experiments using unilamellar vesicles of a size comparable to those observed *in vivo*, i. e. of a diameter in the range from 50 to 100 nm (42). Therefore, unilamellar vesicles have been generated with a diameter of 90 to 120 nm (LUVs, large unilamellar vesicles) and of about 40 nm (SUVs, small unilamellar vesicles) for appropriate *in vitro* experiments.

E. *In vitro* Experiments

E-1. Degradation of Glucosylceramide (Fig. 5)

In vitro experiments are rare that mimic the *in vivo* conditions of lysosomal digestion in terms of lipid composition and vesicle size. Incorporation of a model GSL, glucosylceramide, into vesicles of appropriate size and composition permits the investigation of its degradation by the enzyme glucocerebrosidase in presence of its protein cofactor, SAP-C (50). In the case of the enzymatic hydrolysis of glucosylceramide, *in vitro* studies revealed that a membrane curvature similar to that of intralysosomal vesicles is not sufficient for the degradation of glucosylceramide by glucocerebrosidase, even in the presence of SAP-C. The presence of negatively charged lysosomal lipids is required for degradation. (Fig. 6, Fig. 7)

Moreover, high concentrations of bis(monoacylglycero)phosphate or other negatively charged lysosomal lipids lead to degradation of glucosylceramide even in the absence of SAP-C

ソームやリソソーム内の小胞、および関連膜構造の表面で起こる。それらの曲率は、生体内の小胞と同等の大きさの単層小胞を用いた実験により試験管内で模倣できる。それは50から100nmの範囲の直径をもつ(42)。それゆえ、適切な試験管内での実験のために、直径が90から120nmの大きさ(LUVs)と約40nmの小さなもの(SUVs)が作製されてきた。

E. 試験管内での実験

E-1. グルコシルセラミドの分解 (図5)

膜の組成や小胞の大きさにおいて、生体内でのリソソームでの分解の条件を模倣した試験管内の実験は数少ない。モデルGSLであるグルコシルセラミドを適当な大きさと組成からなる小胞に取り込ませると、補因子であるSAP-Cの存在下でグルコセレブロシダーゼによる分解が観察される(50)。グルコシルセラミドの酵素的加水分解の場合、膜の曲率がリソソーム内の小胞の曲率に似ているだけでは、たとえSAP-Cの存在下においてもグリコシルセラミダーゼがグルコシルセラミドを分解するためには十分でないことが、試験管内の研究により明らかになった。負電荷をもつリソソーム脂質が存在することが分解に必要な(図6、図7)。

さらに、ビス(モノアシルグリセロ)リン酸や他の負電荷を帯びたリソソームの脂質が高濃度で存在すると、SAP-Cが存在しなくてもグルコシルセラミドの分解が引き起こされる(50)。明ら

Fig. 8. Model for the degradation of membrane-bound GlcCer by glucocerebrosidase and SAP-C. Besides the interaction of glucocerebrosidase and SAP-C, the model emphasizes binding of SAP-C and glucocerebrosidase to the vesicular surface containing lysosomal BMP. It also illustrates the release of lysosomal lipids by SAP-C (50).

(50). Apparently, the combination of appropriate curvature, lipid composition, and lateral pressure can replace most of the action of the activator protein. To some extent, this is in accordance with the *in vivo* situation. On the one hand, the absence of SAP-C gives rise to lysosomal glucosylceramide accumulation; on the other hand, deficiencies of SAP-B and -C are diseases with juvenile onset indicating a residual degradation capacity present within the lysosomes. A complete deficiency of glucosylceramidase, however, is a severe form of Gaucher disease leading to death within hours after birth due to impairment of skin function and transepidermal loss of water (51). *In vitro* studies conducted before utilized negatively charged lipids, especially phosphatidylserine (52–53), that occur only in very low concentrations - if at all - within the lysosomes. In large unilamellar vesicles, dolicholphosphate appears to be the strongest stimulator (50). In the absence of SAP-C a 35 fold stimulation of GlcCer degradation was observed in the presence of 10 mol % dolicholphosphate. When dolicholphosphate was replaced by an equivalent proportion of phosphatidic acid, the stimulation was diminished 2 fold in the presence as well as in the absence of SAP-C. (Fig. 8)

E-2. Degradation of Ceramide

Also the stimulatory effect of SAP-D on ceramide hydrolysis is highly dependent on the presence of bis(monoacylglycero)phosphate or another negatively charged phospholipid in a detergent-free liposomal assay-system (54). The rate of ceramide hydrolysis, however, is not strongly affected by the size of unilamellar phospholipid vesicles in the range of 50 to 200 nm.

F. Future Directions

The selective degradation of glycolipids within the lysosome is far from clear. Additional experiments are necessary for the understanding of this process. This will include morphological studies as well as the development of appropriate biochemical approaches for the investigation and reconstitution of intralysosomal membrane structures.

かに、適切な曲率や脂質の構成や側方圧が組み合わせられれば、活性化因子の作用の多くに代わりうる。このことはある程度、生体内の状況に一致している。一方、SAP-Cが存在しないとリソソーム中のグルコシルセラミドの蓄積が増加する。また他方で、SAP-BとCの欠損は若年型の蓄積症を起こすので、この疾患ではリソソームに分解能力が残っていることが示される。しかし、グルコシルセラミダーゼが完全に欠損すると、重症のゴーシェ病が発症し、皮膚の機能が損なわれ、上皮透過性が増大し水分の消失により誕生後数時間以内に死に至る(51)。以前に行なわれた試験管内での研究では、負電荷を持つ脂質、特にホスファチジルセリンを利用したが(52、53)、これはリソソーム内にはあるにしても非常に低い濃度でのみ存在する。大きな単層小胞では、ドリコールリン酸が最も強い刺激剤である(50)。SAP-Cの非存在下で、10モル%のドリコールリン酸が存在するとグルコシルセラミドの分解が35倍も刺激された。ドリコールリン酸を等量の比のホスファチジン酸にすると、SAP-Cの存在下でも、SAP-Cが存在しないときと同様に分解への刺激は2倍に減少した(図8)。

E-2. セラミドの分解

セラミドの加水分解に対するSAP-Dの促進効果は、界面活性剤を含まないリポソームの分析系において、ビス(モノアシルグリセロ)リン酸や他の負電荷のリン脂質の存在によく依存する(54)。しかし、セラミドの加水分解速度は、単層リン脂質小胞の大きさが直径50から200nmの範囲内では、その大きさによる影響はそれほど受けない。

F. 展 望

リソソームで糖脂質が特異的に分解される機構が、明らかになるにはまだ時間がかかる。この過程を理解するためには、リソソーム内の膜構造の研究や再構成への適切な生物化学的アプローチの発展と同様に、形態学的な研究も含めたさらなる実験が必要である。

お茶の水女子大学大学院・人間文化研究科・人間環境学専攻
石塚 玲子 訳

References

1. Cuervo, A.M., Dice, J.D., and Knecht, E. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 5606–5615
2. Agarraberes, F.A., Terlecky, S.R., and Dice, J.F. (1997) *J. Cell Biol.* **137**, 825–834
3. Wubolts, R., Fernandezborja, M., Domen L., Verwoerd, D., Janssen, H., Calafat, J., Tulp, A., Dusseljee, S., and Neefjes, J. (1996) *J. Cell Biol.* **135**, 611–622
4. Mellman, I., Turley, S.J., Steinman, R.M. (1998) *Trends Cell Biol.* **8**, 231–237
5. Suzuki, K. (1994) Genetic Disorders of Lipid, Glycoprotein, and Mucopolysaccharide Metabolism in Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects, 5th edition, chapter 38 (Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., and Molinoff, P.B. eds.) pp. 793–812, New York, Raven Press
6. Kolter, T., and Sandhoff, K. (1998) *Brain Pathol.* **8**, 79–100
7. Hakomori, S. (1981) *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 733–764

8. Sandhoff, K., and Kolter, T. (1996) *Trends Cell Biol.* **6**, 98–103
9. Fürst, W., and Sandhoff, K. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1126**, 1–16
10. Sandhoff, K., Harzer, K., and Fürst, W. (1995) *Sphingolipid Activator Proteins in The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 7th Edition, Chapter 76 (Scriver, C., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. eds.) pp. 2427–2441, New York, Mc Graw Hill
11. Griffiths, G.W., Hoflack, B., Simons, K., Mellman, I.S., and Kornfeld, S. (1988) *Cell* **52**, 329–341
12. Sandoval, I.V., and Bakke, O. (1994) *Trends Cell Biol.* **4**, 292–297
13. Robinson, M.S., Watts, C., and Zerial, M. (1996) *Cell* **84**, 13–21
14. Peters, C., and von Figura, K. (1994) *FEBS Lett* **346**, 108–114
15. Bianco, I.D., Fidelio, G.D., and Maggio, B. (1989) *Biochem. J.* **258**, 95–99
16. Henning, R., Stoffel, W. (1973) *Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem.* **354**, 760–770
17. Berg, T., Gjoen, T., and Bakke, O. (1995) *Biochem. J.* **307**, 313–326
18. Futter, C.E., Pearce, A., Hewlett, L.J., and Hopkins, C.R. (1996) *J. Cell Biol.* **132**, 1011–1023
19. Suzuki, K., and Chen, G.C. (1968) *Pathol. Europ.* **3**, 389–408
20. Harzer, K., Paton, B.C., and Poulos, A. (1989) *Eur. J. Pediatr.* **149**, 31–39
21. Burkhardt, J.K., Hüttler, S., Klein, A., Möbius, W., Habermann, A., Griffiths, G., and Sandhoff, K. (1997) *Eur. J. Biochem.* **73**, 10–18
22. Renfrew, C.A., and Hubbard, A.L. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 21265–21273
23. Futter, C.E., Pearce, A., Hewlett, L.J., Hopkins, C.R. (1996) *J. Cell Biol.* **132**, 1011–1023
24. van Deurs, B., Holm, P.K., Kayser, L., Sandvig, K., and Hansen, S.H. (1993) *Eur. J. Cell Biol.* **61**, 208–224
25. van Echten, G., and Sandhoff, K. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 5341–5344
26. Scheel, G., Acevedo, E., Conzelmann, E., Nehr Korn, H., and Sandhoff, K. (1982) *Eur. J. Biochem.* **127**, 245–253
27. Klima, H., Tanaka, A., Schnabel, D., Nakano, T., Schröder, M., Suzuki, K., and Sandhoff, K. (1991) *FEBS Lett.* **289**, 260–264
28. Fürst, W., Machleidt, W., and Sandhoff, K. (1988) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369**, 317–328
29. O'Brien, J.S., Kretz, K.A., Dewji, N., Wenger, D.A., Esch, F., and Fluharty, A.L. (1988) *Science* **241**, 1098–1101
30. Nakano, T., Sandhoff, K., Stümper, J., Christomanou, H., and Suzuki, K. (1989) *J. Biochem.* **105**, 152–154
31. Meier, E.M., Schwarzmann, G., Fürst, W., and Sandhoff, K. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 1879–1887
32. Kytzia, H.J., and Sandhoff, K. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 7568–7572
33. Klima, H., Klein, A., van Echten, G., Schwarzmann, G., Suzuki, K., and Sandhoff, K. (1993) *Biochem. J.* **292**, 571–576
34. Liu, Y., Hoffmann, A., Grinberg, A., Westphal, H., McDonald, M.P., Miller, K.M., Crawley, J.N., Sandhoff, K., Suzuki, K., and Proia, R.L. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8138–8143
35. Sandhoff, K., Harzer, K., Wässle, W., and Jatzkewitz, K. (1971) *J. Neurochem.* **18**, 2469–2489
36. Mehl, E., and Jatzkewitz, H. (1964) *Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem.* **339**, 260–276
37. Li, S.C., Sonnino, S., Tettamanti, G., and Li, Y.T. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 6588–6591
38. Schlote, W., Harzer, K., Christomanou, H., Paton, B.C., Kustermann-Kuhn, B., Schmid, B., Seeger, J., Beudt, U., Schuster, I., and Langenbeck, U. (1991) *Eur. J. Pediatr.* **150**, 584–591
39. Christomanou, H., Aignesberg, A., and Linke, R.P. (1986) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **367**, 879–890
40. Schnabel, D., Schröder, M., and Sandhoff, K. (1991) *FEBS Lett.* **284**, 57–59
41. Schnabel, D., Schröder, M., Fürst, W., Klein, A., Hurwitz, R., Zenk, T., Weber, J., Harzer, K., Paton, B.C., Poulos, A., Suzuki, K., and Sandhoff, K. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 3312–3315
42. Bradova, V., Smid, F., Ulrich-Bott, B., Roggendorf, W., Paton, B.C., and Harzer, K. (1993) *Hum. Genet.* **92**, 143–152
43. Klein, A., Henseler, M., Klein, C., Suzuki, K., Harzer, K., and Sandhoff, K. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**, 1440–1448
44. Ho, M.W., and O'Brien, J.S. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 2810–2813
45. Giehl, A., Lemm, T., Sandhoff, K., and Blume, A. (1998) (manuscript submitted)
46. Brotherus, J., Renkonen, O., Herrmann, J., and Fischer, W. (1974) *Chem. Phys. Lipids* **13**, 178–182
47. Joutti, A., Brotherus, J., Renkonen, O., Laine, R., and Fischer, W. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **450**, 206–209
48. Amidon, B., Brown, A., and Waite, M. (1996) *Biochemistry* **35**, 13995–124002
49. Kobayashi, T., Stang, E., Fang, K.S., de Moerloose, P., Parton, R.G., and Gruenberg, J. (1998) *Nature* **392**, 193–197
50. Wilkening, G., Linke, T., and Sandhoff, K. (1998), *J. Biol. Chem.* **273**, 30271–30278
51. Liu, K., Commens, C., Choong, R., and Jaworski, R. (1988) *Arch. Dis. Childh.* **63**, 854–856
52. Vaccaro, A.M., Ciaffoni, F., Tatti, M., Salvioli, R., Barca, A., Tognozzi, D., and Scerch, C. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 30576–30580
53. Vaccaro, A.M., Tatti, M., Ciaffoni, F., Salvioli, R., Barca, A., Scerch, C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 16862–16867
54. Linke, T., Wilkening, G., and Sandhoff, K. (1999) (in preparation)

Received on September 2, 1998, accepted on September 30, 1998

Profile of the Authors

Thomas Kolter was born in 1963 and studied chemistry at the University of Bonn. He received his Ph.D. with A. Giannis in 1993 about the development and synthesis

of peptidomimetics. Subsequently, he worked with K. Sandhoff on lipid biochemistry. Currently, his major research interests are bioorganic aspects related to glycolipid metabolism.

★★★★★★★★

Konrad Sandhoff was born in 1939 and studied chemistry at the University of Munich. He received his Ph.D. with Horst Jatzkewitz and Feodor Lynen in 1965. He joined the Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München,

the Johns Hopkins University, Baltimore, and the Weizmann Institute, Rehovot. In 1979 he became full professor for biochemistry and director of the Institute for Organic Chemistry and Biochemis-

try in Bonn. Among the honors he received is the use of the eponym "Sandhoff disease" for an inherited disorder, the award of the Richard-Kuhn-medal from the Gesellschaft Deutscher Chemiker in 1992 and of the K.J. Zülch-Award of the Max-Planck-Gesellschaft in 1998. His research interests include the analysis of lysosomal storage diseases and all aspects of glycolipid metabolism.