Membrane Microdomains Defining Cell Adhesion and Signaling

細胞接着と細胞シグナル機能を支配する細胞膜マイクロドメイン

Sen-itiroh Hakomori

Pacific Northwest Research Institute, University of Washington, 720 Broadway, Seattle, WA 98122, USA

FAX: 1-206-726-1222, E-mail hakomori@u.washington.edu

Key Words : *glycosphingolipid clustering, detergent insolubility, cell adhesion, tetraspanin, signal transducer*

Abstract

Following a retrospective view on development of the present concept of microdomain, current views of multiple microdomains are briefly presented. Based on physical properties of membrane components, some lipids are clustered, segregated from other lipids, and organized with cytoplasmic lipophilic signal transducer molecules and with transmembrane receptors with hydrophobic domain, and their associated partners. Typical examples are: (i) glycosphingolipids (GSLs) and sphingomyelin organized with cSrc, Src family kinases, and small G-proteins, collectively termed “glycosignaling domain (GSD)” and involved in GSL-dependent cell adhesion and signaling; (ii) caveolae and caveolar membrane, characterized by high content of cholesterol and caveolin, organized with GPI-anchors and signal transducers, and involved in endocytosis and signal transduction; (iii) integrins and tetraspan membrane proteins (TMP) complexed with some type of GSL; (iv) growth factor receptors with tyrosine kinases complexed with cholesterol-enriched domain, with or without some type of GSL. The defined composition and association of signal transducer molecules in microdomain iii and iv is yet unclear. Relative quantity and proportion of these types of microdomain differs and is characteristic for different types of cells.

要 約

最初にマイクロドメインの概念がつくられて来た過程を回想し、ついで現在考えられている幾つかの組成と機能の異なるマイクロドメインについて概説した。膜組成の物理的性質(物性)の相違にもとづき或種のリピドは、ほかの膜リピドから分離して、クラスターをつくり、原形質シグナル伝達分子や貫膜性レセプター、それに伴う膜成分と会合し、いくつかの異なるマイクロドメインをつくる。典型的な例として (i)GSLとスフィンゴミエリンがcSrc, Srcファミリーキナーゼ、小型G-蛋白と会合して形成されるグリコシグナルドメイン(GSD)、(ii)高濃度のコレステロールとカベオリン、GPI-アンカーやシグナル伝達分子からなるカベオラメンブレン、(iii)インテグリン-テトラスパン複合体とGSLからなるマイクロドメイン、(iv)細胞成長因子レセプターがコレステロール含量の高い膜と会合しているマイクロドメインなどがある。(iii)と(iv)の組成については不明の点が少ない。これら異なるマイクロドメインの量や性質は細胞の性質により大きく異なることが考えられる。

A. Retrospective on Membrane Microdomain: Is This Concept a Revival of the “Mosaic” or “Plate” Model?

Certain lipid and protein components are organized to form membrane microdomains, the functional “plate” involved in adhesion and signaling at the cell surface membrane*. In view of varia-

A. 回想；細胞膜マイクロドメイン：この概念は曾て提唱された“モザイク”又は“プレート”モデルへの復帰か？

細胞表面膜で細胞接着やシグナル伝達にたづさわる膜機能“プレート”、則ち細胞膜マイクロドメイン*は、特定の脂質やタンパク質によって構成されている。細胞膜画分の化学組

*The term “raft”, which is now often used, was introduced as being opposed to the term “caveolae”. However, “raft” connotes a moving or floating platform, which is not appropriate when much of the domain is involved in cell adhesion, as is shown by increasing evidence. If a general term analogous or parallel to “raft” is needed, perhaps “plate” (Jain and White, 1977), “aggregate” (Tillack *et al.*, 1983), or “patch” (Kojima and Hakomori, 1991a) could be used. Terms such as “DIM,” “DRM,” “caveolar membrane,” etc. should be used for connotation of a mixture of membranes. However, if composition and function depend on GSL, the term “GSL enriched microdomain” (GEM) or “GSL-signaling domain” (GSD) is preferable, as discussed in the text.

*最近、しばしば使われる“ラフト(筏)”という言葉は、従来使われていた“カベオラ”に対抗して提唱された言葉であるが、それは浮かんで動いているプラットホームを意味する。マイクロドメインの多くが細胞接着に関与している証拠が増えてきたことから、現在では適切な表現ではない。もしも、ラフトに対応した一般的呼び方が必要なら、“プレート” (Jain and White, 1977)や“凝集体” (Tillack *et al.*, 1983)もしくは“パッチ” (Kojima and Hakomori, 1991b)などの表現が適切であろう。DIMやDRM、カベオラメンブレンなどの従来の呼び名は膜の混合物という意味では“ラフト”と同義語である。しかし、構成成分や機能がGSLに依存しているならば、GSLマイクロドメイン(GEM)、もしくはGSLシグナリングドメイン(GSD)という呼び方が好ましい。

tion in chemical components and their organization in membrane fraction, it is assumed that multiple microdomains exist, and that their functions are different, as will be discussed in Section C. The concept of multiple microdomains in plasma membrane is generally viewed as having evolved from the concept of random or homogeneous distribution of membrane proteins in the “sea” of lipid bilayer as proposed in the “fluid mosaic” model of (Singer and Nicolson, 1972). I personally view the current concept of multiple microdomains, rather, as a revival of the “mosaic model” which predates the Singer & Nicolson model.

People may have forgotten a long-term debate on the basic structure of biological membranes in general. Instead of citing many classic studies along this line, I will simply present the view of D.F.H. Wallach, published as a symposium record just one year before the Singer & Nicolson paper. Based on a number of physical studies, including spectral data, electron micrographs, and cooperative behavior of soluble oligomeric proteins bound to lipids, Wallach summarized the idea that membranes consist of multiple mosaic units which contain membrane protein core bound to lipids (Wallach, 1971). Some of the data and ideas presented in this 1971 review are reproduced in Fig. 1A,B. The “plate model,” a modification of the fluid mosaic model of biomembranes, was proposed by M.K. Jain and H.B. White (Jain and White, 1977), who emphasized that the “biomembrane continuum is broken up into a number of relative rigid plates or patches which are in relative motion with respect to each other.” The ordered and rigid regions may be separated from each other

成と構成の多様性を考えると、第C章で述べるように機能の異なる様々なマイクロドメインの存在が予想される。マイクロドメインの概念は1972年にSinger&Nicolsonにより提唱された流動モザイクモデルから発展したものと一般に考えられている。即ち“リピド二重層の海の中にランダムに分布する膜タンパク質”というイメージに基づいている。しかし私個人はSinger & Nicolsonのモデル以前に提唱されたモザイクモデルへの復帰、又はプレートモデルとの酷似を指摘したい。

生体膜の基本構造に関する長い間の議論を忘れてしまっている人々が多いかもしれない。これに関する多くの過去の研究を引用する代わりに、Singer&Nicolsonの論文が公表される1年前にシンポジウムレコードとして発表されたD.F.H. Wallachの見解を簡単に紹介したいと思う。スペクトルデータや電子顕微鏡写真、脂質に結合した水溶性オリゴメリックタンパク質の動きの協同性など、数多くの物理学的な研究を基礎にWallachは、細胞膜は脂質に結合した細胞膜タンパク質のコアを含んだ多様なモザイクユニットからなっているという考えを要約した(Wallach,1971)。このレビューで紹介された幾つかのデータや考えを図1A,Bに示した。Singer&Nicolsonモザイクモデルを部分的に修正したプレートモデルは1977年にM.K.JainとH.B.Whiteによって提唱され、生体膜の均一な連続性は性質の異なる膜領域(プレート)の存在により分断されている可能性が示唆された。即ち、膜成分の配向性がはっきりして流動性が少ない堅い領域と、配向性が乱雑で流動性の高い領域に分れ、夫々の領域(プレート)の相対的運動性が異なる可能性が指摘された。これら“プ

Fig. 1. Unit model or mosaic model of membrane. The concept that biological membranes are composed of multiple lipoprotein units (mosaic units) was supported partially or fully by a few membrane biochemists prior to proposal of the Singer & Nicolson model. The images shown here are from (Wallach, 1971). **Panel A**, structure of erythrocyte membrane shown by EM with freeze-fracture etching. Lattice structure of membrane-associated particles is revealed at the fracture surface. This structure may correspond to clustered GSLs or SM in our current concept. **Panel B1**, conceptual drawing of membrane protein units (A, B, etc.) surrounding bound lipids (L). **Panel B2**, mosaic units of lipoprotein, consisting of diverse lipoprotein subunits and tangential polarities including polar hole and cluster of lipids. **Panel B3**, transverse polarity of membrane. Membrane units or mosaic units in these illustrations are similar to the microdomain concept.

by fluid and disordered regions. Structural and functional units play a role in transport and cellular interaction, and show cooperativity among themselves in order to maintain overall function of biological membranes. This view, particularly the plate model, was remarkably similar to the current concept of microdomains, although the idea of signal transduction was premature and fragmentary at that time. The plate model, in comparison with our current concept of GSL patch(Kojima & Hakomori, 1991) or GSL signaling domain (Hakomori *et al.*, 1998), is shown in Fig. 2A, B, C, D.

B. Development of Our Current Concept of Membrane Microdomain

The current concept of membrane microdomain developed slowly but steadily during the past two decades. Major observations leading to the current concept of multiple membrane microdomains are illustrated chronologically in Fig. 3, and each episode is explained in the following paragraphs, a through h.

プレート”は膜の構造・機能的ユニットを形成し、膜の輸送や細胞間相互作用に役割を演じ、細胞膜全体の機能を維持するために、夫々のプレートの間で協調性を示す。このプレートモデルが提唱された頃は未だシグナル伝達の考えは未熟で断片的であったため、プレートの機能としてのシグナル伝達については言及されていないが、プレートモデルは現在のマイクロドメインという概念に非常によく類似している。GSL patch(Kojima & Hakomori, 1991)、もしくはGSLシグナルドメイン(Hakomori *et al.*, 1998)という今の概念と比較したプレートモデルを図2A, B, C, Dに示した。

B. 細胞膜マイクロドメインという概念の発展

細胞膜マイクロドメインという今の概念は20年間でゆっくりと、しかし着実に発展してきた。多様な細胞膜マイクロドメインという今の概念に至った主な発見(aからh)は、図3に年代順に載せておいた。それぞれのエピソードについては次に説明する。

Fig. 2. Membrane “plate” model proposed by Jain & White (panels A, B, C), in comparison to current concept of GSL microdomain or GSL signaling domain (from Kojima & Hakomori, 1991; Hakomori *et al.*, 1998). A, organized lipid molecules (white circles) are separated from domain consisting of disorganized lipids (shaded circles). B, the two regions as in A are viewed as distinct “plates” (shown as black and gray), each having characteristic properties specified by their components. C, coexistence of distinct “plates” incorporated in lipid bilayer. “Ordered” head groups (white circles) are associated with parallel, rigid lipids. “Disordered” head groups (gray circles) are associated with nonparallel, fluidic lipids composed of phospholipids which inherently contain unsaturated fatty acid. D, GSL microdomain (patches) separated from clustered glycoproteins (Gp). Transducer molecules (TDa, TDb) are associated with GSL microdomain and proteolipid proteins (PLP) which modulate signal transduction. Note the similarity between A-C and D in terms of distinct separation of membrane components due to physical properties.

Fig. 3. Independent observations a to g (in chronological order) led to the concept of GSL microdomains, particularly functional association of GSL with signal transducers (h). Names of scientists principally involved in each observation are shown in italics with shadow background.

B-1. Initial Observation on Cellular polarity: Apical vs. Basolateral Membrane of Epithelial Cells

Two different properties of cell surface membranes are suggested by the observation that GSLs and SM are present in higher concentration in apical than in basolateral membrane in epithelial cells. This was demonstrated initially by enrichment of GSLs, particularly fucose-containing GSLs (a then-newly-discovered type of GSL), in villus membrane as compared to brush border or whole tissue of rat intestinal mucosa. As much as 19% of total lipid of villus membrane was GSL (this is ~4 times the corresponding percentage for whole epithelial membrane), and the presence of fucolipids was limited to villus membrane (Forstner and Wherrett, 1973). Later, dog kidney MDCK cell line was used extensively for study of glycoprotein and GSL sorting in apical vs. basolateral membranes by Simons et al. and other groups. MDCK cells infected with envelope virus (e.g., influenza virus) bud through apical surface membrane, but not basolateral membrane. Lipid composition of envelope

B-1. 上皮細胞にみられる細胞部位の相違(極性)とスフィンゴ脂質組成の相違

1つの細胞の表面膜の部位によって脂質組成が顕著に異なることが最初に発見されたのはラット小腸上皮細胞の刷子縁や絨毛膜が分離精製され、それら膜組成とラット小腸上皮組織の脂質組成の比較が可能になった1970年代のはじめである。Forstner and Wherrett (1973)は絨毛膜の糖スフィンゴ脂質含量が特に高く、又当時発見されて間もなかったフコース含有糖脂質は絨毛膜にだけ限局して見い出されることを示した。絨毛膜の糖スフィンゴ脂質含量は総脂質の19%で、全上皮組織糖スフィンゴ脂質の4倍に及ぶ。絨毛膜は上皮細胞の頂端側膜を代表するので頂端膜は側底膜より糖スフィンゴ脂質を多く含有する可能性が示された。この可能性はSimonsらにより犬腎臓細胞MDCKにエンペロープウイルス(インフルエンザウイルスなど)を感染させた系を巧みに用いることにより追求された。エンペロープウイルスはMDCK細胞の側底側細胞膜から出芽しないが頂端側膜から出

virus is therefore similar to that of apical membrane. Through this approach, the authors found that sphingolipids *i.e.*, GSLs and SM are enriched in apical membrane (for review see Simons and van Meer, 1988).

B-2. Electron Microscopic (EM) Demonstration of GSL Clusters in Phospholipid Bilayer

Soon after scanning EM with freeze-etch technique of membrane became available in the late 1970s/ early 1980s, studies with distribution patterns of globoside and glycophorin, the major GSL and glycoprotein of erythrocytes respectively, indicated that globoside is clustered and present in domains separate from glycophorin domains (Tillack *et al.*, 1983). Clustering of GSLs (Forssman antigen, GM1) was observed not only in plasma membrane but also at the surface of liposome consisting of GSL and synthetic phosphatidylcholine, where even cholesterol was completely excluded. Some clustered GSLs have regular lattice structure which appears crystal-like (Rock *et al.*, 1991), but these images are regarded by some as EM artifacts. More recent studies with transmission EM or confocal fluorescence microscopy confirmed the clustering of GSLs at the cell surface (Sorice *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000).

B-3. Detergent Resistance of GSLs, SM, and Cholesterol together with Pericellular, Cytoskeletal, and Nuclear Membrane.

Based on the then-new concept of transmembrane organization of proteins (integral proteins) which can be solubilized only by detergent or chaotropic reagents (Marchesi *et al.*, 1972), detergent extraction was applied in many subsequent studies for isolation and characterization of integral membrane proteins. The earliest study along this line was solubilization of glycophorin and other integral membrane proteins from erythrocyte "ghosts" by 1% Triton X-100. The insoluble residue contained cytoskeletal components together with GSLs and SM (Yu *et al.*, 1973). In contrast to erythrocytes, the major detergent-insoluble residues of fibroblasts consist of (i) extracellular matrix (ECM), including fibronectin, Gp250 (today's tenascin or hexabrachion), and Gp140 (today's integrin); (ii) cytoskeletal system (particularly microfilaments, or actin fibers); (iii) all nuclear membranes and nucleus; and (iv) GM3 and other GSLs (Carter and Hakomori, 1981). Detergent-insoluble GSLs, particularly GM3, together with ECM components, increased upon cell confluency. GM3 was enriched at the site of cell attachment to glass surface; this attachment site was termed "detergent-insoluble substrate adhesion matrix" (DISAM) or "detergent-insoluble membrane" (DIM) (Okada *et al.*, 1984). GM1 ganglioside as cholera toxin receptor in 3T3 cells was found to be detergent (Triton X-100)-insoluble, together with organized cytoskeletal system (Streuli *et al.*, 1981). These early observations suggested that proper detergent can be used to separate clustered sphingolipids from membrane. In fact, many later stud-

ies have shown that the lipid composition of the apical membrane of cells is similar to that of the plasma membrane. This approach has shown that sphingolipids (mainly GSLs and SM) are enriched in the apical membrane (for review see Simons and van Meer, 1988).

B-2. Electron Microscopic Demonstration of GSL Clusters in Phospholipid Bilayer

細胞膜のフリーズエッチング法を用いた走査電子顕微鏡が、1970年代後半から80年代前半にかけて利用できるようになり、赤血球の主なGSLと糖タンパク質であるグロボシドとグリコホリンの分布パターンに関する研究が行われた。その結果、グロボシドはクラスターを形成し、グリコホリンのドメインとは別に存在しているという事を示唆する結果が得られた(Tillack *et al.*, 1983)。GSLsのクラスタリングは形質膜だけでなく、コレステロールを含まない、GSLとフォスファチジルコリンとだけからなるリポソームの表面でも観察される。GSLクラスターの中には結晶構造のような規則正しい形を示すものもある(Rock *et al.*, 1991)。これら初期の走査電子顕微鏡による所見は一部の人々により、電子顕微鏡像によくみられるアーティファクトであるとみられ、永い間、一般の人々の興味をよばなかった。最近の透過電子顕微鏡や共焦点蛍光顕微鏡を用いた研究は、細胞表面でのGSLクラスタリングを裏付けた(Sorice *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000)。

B-3. Detergent Resistance of GSLs, SM, and Cholesterol together with Pericellular, Cytoskeletal, and Nuclear Membrane.

生体膜につよく結合しているタンパク質は界面活性剤やカオトロピック試薬によってのみ可溶化することが出来、それらのタンパク質は膜を貫いているトランスメンブレンドメインを持つという、当時としては新しい概念が確立された(Marchesi *et al.*, 1972)。その概念を基礎として、多くの研究に界面活性剤抽出が内在性膜タンパク質の分離や評価に応用された。その中でも最も早かった研究は、1% TritonX-100により赤血球ゴーストからグリコホリンや他の内在性膜タンパク質を可溶化したものだった。残った不溶性画分にはGSLsやSMと共に細胞骨格系の成分が含まれていた(Yu *et al.*, 1973)。赤血球とは対照的に繊維芽細胞の界面活性剤に不溶性成分は(i)フィブロネクチンやGp250(今日のテネシシンもしくはヘキサブラチオン)、Gp140(今日のインテグリン)などの細胞外マトリックス(ECM); (ii)細胞骨格系(特にミクロフィラメントやアクチン繊維); (iii)核膜と核; (iv) GM3や他のGSLsから成っていた(Carter and Hakomori, 1981)。ECM成分と共に界面活性剤に不溶になるGM3などのGSLsは、細胞密度が高ければ高い程増加する。GM3はガラス表面の細胞接着部位に豊富に存在する; この細胞接着部位はdetergent-insoluble substrate adhesion matrix(DISAM)もしくは detergent-insoluble membrane(DIM)と呼ばれていた(Okada *et al.*, 1984)。3T3細胞でコレラ毒素の受容体として機能しているGM1は一連の細胞骨格系タンパクと共に界面活性剤(TritonX-100)に不溶であることが見出された(Streuli *et al.* 1981)。これら初期の観察は適切な界面活性剤は細胞膜からのクラスターを形成したスフィンゴ脂質を分離できるということを示唆している。事実、最近の多くの研究では特定の膜分離の基礎として界面活性剤不溶性を

ies used detergent-insolubility as a basis of separation, and the terms DIM or its synonym “detergent-resistant membrane” (DRM) (Brown and London, 1997) have been used. DIM/DRM is highly enriched in GSLs and gangliosides, and so the term “glycosphingolipid-enriched microdomain” (GEM) was also applied (Hakomori et al., 1998; Rodgers and Rose, 1996).

B-4. GSL clustering is required for GSL antigenicity and GSL-dependent adhesion.

Essentially all anti-GSL antibodies react much better with GSLs when presented in clustered state on cells or liposomes, than with non-clustered GSLs alone. Some anti-GSL antibodies recognize density of GSLs on solid phase, and show reactivity only when density is above a threshold value (Nores et al., 1987). GSL-dependent cell adhesion as typically observed with interaction of GM3-to-Gg3 or GM3 to other GSLs (Gb4, LacCer) also occurs above a defined threshold concentration of Gg3, Gb4, or LacCer (Kojima and Hakomori, 1991a). A model of cellular interaction of clustered GSLs with GSLs, synergistic with fibronectin-integrin adhesion, was shown (Kojima and Hakomori, 1991b). In all these cases, GSL clustering is essential for their recognition.

B-5. Ganglioside Modulation of Growth Factor Receptor Function

Starting with the observation that gangliosides modulate cell growth, a series of systematic studies showed that gangliosides may inhibit or activate signal transduction through growth factor receptor or hormone receptor function, particularly associated tyrosine kinase (see citations in Section 3.b). An idea that membrane-associated tyrosine kinase is affected by GSLs, particularly gangliosides, arose from these studies and has evolved into the concept of glycolipid signaling domain (see paragraph h), and growth factor receptor domain (see Section 3.b).

B-6. Association of Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anchored Proteins with Src Family Kinases

The important biological notion for association of microdomain components with signal transducer molecules emerged in 1991. The first paper along this line was based on observations that many human GPI-anchored T cell markers (CD59, CD55, CD24, etc.) as well as mouse GPI-anchored Thy-1 and Ly-6, are associated with p56^{lck}, suggesting that stimulation of GPI-anchored proteins in T cells may cause activation of tyrosine kinase, although biological effect on T cell activation was not shown (Stefanova et al., 1991). Many subsequent studies showed the presence of Src family kinases in DIM with or without GPI anchors. However, a functional connection of membrane receptors to transducer molecules was not demonstrated until 1997-98.

用いており、DIMとかdetergent-resistant membrane(DRM)(Brown and London, 1997)という言葉が使われている。DIM/DRMにはGSLsやガングリオシドを多く含んでいることから、glycosphingolipid-enriched microdomain(GEM)という呼び方も使われている(Rodgers and Rose, 1996; Hakomori et al., 1998)。

B-4. GSL抗原性やGSL依存性細胞接着にはGSLクラスターリングが必要

GSLの基本機能として古くから細胞抗原性が知られ、最近では細胞接着機能が明らかになった。これらGSL機能はGSLが細胞膜上でクラスターを形成していることに強く依存する。抗GSL抗体は細胞膜やリポソーム膜上でクラスターを形成しているGSLと強く反応する。抗GSL抗体の中には固相GSLの特定の密度を認識し、或る閾値よりも高い密度の場合にのみ反応性を示すものもある(Nores et al., 1987)。次にGSL依存性細胞接着の場合を考えよう。GM3を高濃度に発現しているB16メラノーマ細胞は、Gg3Cerやその他のGSL(Gb4, LacCer)をコートした固相強く接着する。このような、典型的なGSL依存性の細胞接着においても接着をおこすGSL濃度に閾値があることが判明した(Kojima and Hakomori, 1991a)。インテグリンを介する細胞接着とGSL依存性細胞接着は協調相乗性があるが、この場合にもGSLは不可欠である。

B-5. 増殖因子受容体の機能を調節するガングリオシド

ガングリオシドが細胞増殖を調節するという観察を契機として、ガングリオシドが増殖因子受容体やホルモン受容体の機能を通して、シグナル伝達を抑制したり、活性化したりすることが一連の体系的研究によって示された(Section 3.b参照)。膜に結合したチロシンキナーゼが、GSLsの中でも特にガングリオシドによって影響を受けるという考えは、これらの研究から生まれ、糖脂質シグナルドメイン(h参照)、増殖因子受容体ドメインといった概念は徐々に発展してきた(Section 3.b参照)。

B-6. GPIアンカー型タンパク質とSrcファミリータンパク質との会合

シグナル伝達分子がマイクロドメインに存在し、マイクロドメインの構成要素と会合しているという重要な概念は1991年以来明らかになった。この線にそった最初の実験はマウスやヒトのGPIアンカーに結合している種々のTリンパ球マーカーについて行われた。即ちマウスのThy-1やLy-6、ヒトのCD59, CD55, CD24等がTリンパ球特有のシグナル伝達分子であるp56^{lck}と会合していることを示し、T細胞のGPIアンカー型タンパク質を刺激すると、チロシンキナーゼの活性化を引き起こすかもしれないことを示唆していた(Stefanova et al., 1991)。しかし、この研究では実際にT細胞が活性化されたかどうかは示されていない。その後の多くの研究ではGPIアンカーが有る、無しにかかわらずDIMにSrcファミリーキナーゼは存在するというを示された。しかしながら、膜に存在する受容体とシグナル伝達分子の機能的な関係は、1997年から1998年になるまではわからなかった。

B-7. Biochemical Characterization of Caveolar Membrane, and Its Similarities to GSL/ SM/ Cholesterol/ GPI-Enriched Microdomain

Invaginations of plasma membrane, particularly well developed in endothelial cells and fibroblasts, discovered and termed "caveolae" over 45 years ago, have been recently characterized biochemically as being enriched in the scaffold protein caveolin, cholesterol, sphingolipids, and GPI anchor, and being detergent-resistant. Many signaling molecules and growth factor receptors are also claimed to be associated with caveolar domain, and involved in endocytosis and signal transduction (for review see Anderson, 1998).

However, many types of cells do not show caveolar structure. Nevertheless, low-density membrane fraction resistant to detergent (DIM fraction) is isolable from essentially all types of cells regardless of presence of caveolin or caveolar structure. Lipid/ protein composition of DIM is very similar to that of caveolar membrane fraction, although cholesterol content is much higher in membranes where caveolin is present than in fractions without caveolin (Iwabuchi *et al.*, 1998a), and such membranes are structurally and functionally susceptible to cholesterol-binding reagents such as filipin and nystatin (Baorto *et al.*, 1997; Schnitzer *et al.*, 1994). Distinction between caveolar membrane and sphingolipid/ cholesterol/ GPI anchor-enriched membrane is generally difficult unless two approaches are applied: (i) immunoseparation by antibodies to various components, *i.e.*, caveolin, GSLs, or other proteins (Iwabuchi *et al.*, 1998a; Stan *et al.*, 1997); (ii) determination of susceptibility to cholesterol-binding reagents.

Membranes previously termed DIM or DRM (see paragraph c above) are essentially the same as caveolar membrane. The term "raft," introduced by Kai Simons, has nowadays largely replaced the older terms, but the biochemical properties, as being mixtures of various membranes, are identical (see footnote on p.219).

B-8. Functional Association of GSLs with Signal Transducers in GSL-Enriched Microdomain Separable from Caveolar Membrane

Essentially all studies on caveolae, DIM, DRM, or GEM prior to 1997 paid no attention to function of GSLs, *i.e.*, how GSLs are involved in cell adhesion, and how GSLs modulate or initiate signal transduction, as had been discussed for many years (Hakomori, 1990; Hakomori and Igarashi, 1995). A few studies since 1997 address the functional connection of GSLs in GSL microdomain to signal transducers. Some of them, conducted with a mouse melanoma B16 model, indicate that GSL-dependent adhesion through carbohydrate-carbohydrate interaction is coupled with transduction, initially to activate cSrc, which in turn activates Rho A or FAK (Iwabuchi *et al.*, 1998b; Yamamura *et al.*, 1997). The functional unit termed GSD was clearly sepa-

B-7. カベオラメンブレンの生化学的性質とGSL/SM/cholesterol/GPIに富むマイクロドメインとの類似性

内皮細胞や繊維芽細胞で特にはっきりと観察される形質膜の陥入は、45年以上も前に発見され、カベオラと名づけられた。カベオラは最近になってその骨格タンパク質であるカベオリンやコレステロール、スフィンゴ脂質、GPIアンカーに富み、界面活性剤に不溶であるというような生化学的な特徴を持っていることが分かってきた。多くのシグナル分子や増殖因子受容体はカベオラドメインに存在し、エンドサイトーシスやシグナル伝達に関係しているということも主張されている(総説: Anderson, 1998)。

しかしながら、細胞の中にはカベオラ構造を持たないもの多数存在する。それにもかかわらず界面活性剤に不溶な低比重膜画分(DIM fraction)がカベオリンやカベオラ構造を持たない細胞においても分離することができる。DIMを構成する脂質/タンパク質はカベオラメンブレン画分に非常に類似しているが、コレステロール量はカベオリンのない画分よりもカベオリンを含む膜のほうが多く(Iwabuchi *et al.*, 1998a)、そのようなコレステロール量の高い膜は構造的、機能的にフィリピンやナスタチンなどのコレステロール結合試薬により影響を受けやすい(Schnitzer *et al.*, 1994; Baorto *et al.*, 1997)。カベオラメンブレンとスフィンゴ脂質/コレステロール/GPIアンカーを豊富に含む膜との区別は次に示すような二つのアプローチが適用されない限り、一般に困難である。: (i)構成成分であるカベオリンやGSLs、他のタンパク質などに対する抗体による免疫学的分離(Stan *et al.*, 1997; Iwabuchi *et al.*, 1998a); (ii)コレステロール結合試薬に対する感受性の決定。

以前にDIMもしくはDRMと称した膜は、本質的にカベオラメンブレンも含んでいる。今日これら以前に用いた呼び名は、Kai Simonsによって提案されたラフトという呼び方に広く置きかえられているが、様々な膜の混合物であるという生化学的な特性は同一である(P1の脚注参照)。

B-8. カベオラメンブレンから分離したGSLsに富むマイクロドメインにおけるシグナル伝達分子とGSLsの機能的結合

1997年より以前のカベオラやDIM、DRM、やGEMについての研究は、本質的にGSLsの機能に注意を払っていなかった。つまり、長年GSLsについて議論されていた問題: GSLsがどのように細胞接着に関わっているか、またどのようにシグナル伝達を調節しているかということに関してである(Hakomori, 1990; Hakomori and Igarashi, 1995)。1997年になってGSLマイクロドメインにおけるGSLsとシグナル伝達の機能的な関係に焦点を当てた研究が幾つかでてきた。それらの中にはマウスのB16メラノーマモデルを用い、糖鎖間相互作用を介したGSL依存的な接着は、最初にcSrcが活性化され、その後RhoAもしくはFAKへとシグナルが伝わることを示している。GSDと呼ばれる機能的ユニットはカベオリン/コレステロールに富む、カベオラメンブレンから抗体を用いる分離法によりはっきりと分けることができ

rated from caveolin/ cholesterol-enriched caveolar membrane by immunoseparation (Iwabuchi *et al.*, 1998a). GD3 in rat brain is functionally associated with Src family kinase *lyn*, and stimulation of GD3 by its antibody induces tyrosine phosphorylation of *lyn*, although the physiological significance of this phenomenon remains unclear (Kasahara *et al.*, 1997). Another series of studies showed that GM3 in DIM or GEM of human peripheral lymphocytes or T cell leukemia is associated with CD4 and p56^{lck} (Sorice *et al.*, 1997), and that exogenous GM3 added to T cells induces phosphorylation of CD4, which in turn dissociates from p56^{lck} (Garofalo *et al.*, 1998). Since the publication of the above papers, many studies have focused on functional role of GSLs in DIM or GEM. The term “glycolipid signaling domain” or “glycosignaling domain” (GSD) was proposed because adhesion/ signaling through GSL was shown to be coupled with signal transduction (Hakomori *et al.*, 1998).

る(Iwabuchi *et al.*, 1998a)。ラット脳のGD3はSrcファミリーキナーゼであるlynと機能的に会合しており、GD3抗体によるGD3の刺激はlynのチロシンリン酸化を誘導する(Kasahara *et al.*, 1997)。しかしこの現象の生物学的意義はいまだ明確ではない。別の一連の研究では、ヒト末梢リンパ球やTリンパ細胞白血病のDIMもしくはGEMのGM3はCD4やp53lckと会合し(Sorice *et al.*, 1997)、また、外からGM3をT細胞に加えると、CD4のリン酸化を誘導し、次にp53lckから解離することが示されている(Garofalo *et al.*, 1998)。これらの論文が発表されてから、多くの研究がDIMもしくはGEMにおけるGSLsの機能的役割に焦点を当てている。接着/シグナリングはシグナル伝達に連結していることが示されていることから、糖脂質シグナリングドメインもしくは糖シグナリングドメイン(GSD)という呼び方が提案された(Hakomori *et al.*, 1998)。

Fig. 4. Possible hydrogen bond acceptors and donors in sphingolipids, as compared to hydrogen bond acceptors in glycerolipids. Modified from (Pascher, 1976).

C. Current View of Multiple Microdomains

Theoretically, we can distinguish several types of microdomain as below; each is characterized by common sphingolipid components SM and GSLs in combination with different amounts of cholesterol and different combinations of functional proteins. Sphingolipid clustering or lattice structure is based on the fact that *cis* interaction between sphingolipids is stronger than that between glycerolipids. Sphingolipid acts as a hydrogen bond acceptor as well as hydrogen bond donor, whereas glycerolipid acts only as hydrogen bond acceptor (Fig. 4).

C-1. GSL Signaling Domain or Glycosignaling Domain (GSD)

These microdomains, as explained above, were isolated and characterized from B16 melanoma cells. Proteolipid proteins associated with GSLs have been detected, although their functional significance is still unclear. Surprisingly, GSD of B16 cells has very low cholesterol content and is resistant to filipin and nystatin, which bind to cholesterol and disrupt function of cholesterol-rich caveolar membrane. Whether similar microdomains are present, and separable from caveolar membrane, in other types of cells is unknown.

C-2. Growth Factor Receptor Domain

Modulation of signal transduction by gangliosides (for review see Hakomori and Igarashi, 1995; Yates and Rampersaud, 1998) was initially suggested by observations that GM3 inhibits FGF receptor function (Bremer and Hakomori, 1982) and EGF receptor tyrosine kinase (Bremer *et al.*, 1986), and GM1 modulates PDGF receptor tyrosine kinase and function (Bremer *et al.*, 1984) and strongly activates nerve growth factor receptor Trk A (Mutoh *et al.*, 1995). Association of PDGF and EGF receptors with caveolar membrane, and their translocation from this membrane by activation of their tyrosine kinase, has been claimed (Liu *et al.*, 1996; Mineo *et al.*, 1996). However, there is no strong evidence to indicate that these growth factor receptors are associated with caveolin/ cholesterol-enriched caveolar membrane, or with GSD (see above). One possibility is that growth factor receptors are associated with an independent domain similar to GSD, but having different lipid environment and cytoplasmic transducer system, since the majority of growth factor receptors are found in high-density fraction.

C-3. Domains Having Integrin/ TMP Complex or Other Associated Membrane Complex

The major receptors involved in cell adhesion and motility are integrins having various combinations of α and β subunits. Integrins are closely associated in membrane with tetraspan membrane proteins (TMP) or other membrane proteins which facilitate and modulate integrin-mediated signaling to stimulate or inhibit cytoskeletal system, leading to adhesion or motility. Integrins are not found in caveolar membrane and DIM when prepared in 1% Triton X-100, but integrin level in

C. マイクロドメインの多様性についての現時点における見解

理論的に考えると、マイクロドメインのタイプを幾つか区別することができる。；それぞれは、コレステロール量の違いや機能タンパク質の種類と通常のスフィンゴ脂質構成成分であるSMやGSLsの組み合わせにより特徴づけられる。スフィンゴ脂質のクラスタリングもしくは格子構造は、スフィンゴ脂質間の*cis*相互作用がグリセロ脂質間のそれよりも強いという事実に基づいている。スフィンゴ脂質は水素結合の受容体にも供与体にもなりうるが、一方でグリセロ脂質は水素結合受容体としてしか働くことができない(Fig.4)。

C-1. GSLシグナリングドメインもしくは糖シグナリングドメイン(GSD)

上で説明したこれらのマイクロドメインはB16メラノーマ細胞から分離され、解析された。GSLsに結合するプロテオリピドタンパク質は検出されていたが、いまだにそれらの機能的な重要性は明らかになっていない。驚いたことに、B16細胞から分離されたGSD膜のコレステロール含量はカベオラ膜に比べて非常に少なく、カベオラの機能を壊すフィリピンやナスタチンはGSD膜の機能を破壊しない。他のいろいろの細胞にも類似したマイクロドメインは存在するが、カベオラ膜から分離されるかどうか今のところ不明である。

C-2. 増殖因子受容体ドメイン

ガングリオシドによるシグナル伝達の制御はFGF受容体の機能やEGF受容体のチロシンキナーゼ活性がGM3により抑制されたり(Bremer and Hakomori, 1982; Bremer *et al.*, 1986), GM1がPDGF受容体のチロシンキナーゼの機能を抑制したり(Bremer *et al.*, 1984)、逆にGM1がNGF受容体(TrkA)のチロシンキナーゼを活性化したりするという現象(Mutoh *et al.*, 1995)により示唆された(総説 Hakomori and Igarashi 1995; Yates and Rampersaud 1998)。一方、細胞がPDGFやEGFで刺激され、夫々の受容体のチロシンキナーゼが活性化されると、受容体は一時的にカベオラメンブレンに移行する(Liu *et al.*, 1996; Mineo *et al.*, 1996)。しかしながら、これらの増殖因子受容体がカベオリン/コレステロールに富んだカベオラメンブレン、もしくはGSDに結合しているということを示す強い証拠はない。一つの可能性は増殖因子受容体がGSDに類似した独立したドメインに存在しているということであるが、主な増殖因子受容体は高比重画分に見られる以上、異なる脂質環境と細胞質情報変換系の存在が考えられる。

C-3. インテグリン/TMP複合体、もしくは他の膜結合型複合体を持つドメイン

細胞接着や細胞運動に関係する主要な受容体は、 α 、 β サブユニットの様々な組み合わせから成るインテグリンファミリーである。インテグリンはテトラスパン膜タンパク(TMP)やその他膜タンパクと会合し、複合体をつくり、インテグリンが細胞骨格系へのシグナルはインテグリン/TMP複合体を介し促進されたり抑制されたりする。インテグリンは1% TritonX-100を用いて調整したDIMやカベオラメンブレンに存在しないが0.5%

DIM increases greatly when prepared in 0.5% Triton X, or when N-glycosylation of receptor and GM3 synthesis are restricted. Caveolin level in DIM decreases when N-glycosylation and GM3 level increase, whereby integrin is translocated from DIM to high-density fraction (Kazui et al., 2000). Integrin level in DIM increases greatly when cells are transfected with TMP CD82 cDNA, and lysate of such cells show exclusive co-localization of $\alpha 5$, $\alpha 3$, and CD82 in DIM but not in high-density fraction when cells are homogenized in 1% neutral detergent Brij 98 (polyoxyethylene 20 oleylether). Coexistence of integrin and TMP is observed only under specific conditions, *e.g.*, N-glycosylation status of the receptor, and quality of detergent, *i.e.*, Brij but not Triton X-100 (Ono et al., 2000). Therefore, the integrin/ TMP domain may be maintained in some special environment, but is obviously independent from other microdomains which are maintained in Triton X-containing media. Integrin $\alpha v \beta 3$ and its associated protein CD47, together with heterotrimeric G proteins, are complexed with a cholesterol-rich microdomain (Green et al., 1999) which has lipid composition different from that of GSD.

C-4. Cholesterol-rich, Caveolin-containing Caveolar Membrane, Presumably with GPI Anchor

Caveolar membrane is defined not by flask-shaped, invaginated morphology, but rather by the following characteristics: (i) very high cholesterol content and consequent susceptibility to cholesterol-binding reagents; (ii) presence of the scaffold protein caveolin family which may regulate signal transduction (Okamoto et al., 1998); (iii) selective association with certain types of GSLs, but exclusion of other GSLs, *e.g.*, association of GlcCer and exclusion of GM3 in B16 caveolar membrane; (iv) selective association with certain types of signal transducers but not others, *e.g.*, association of Ras H but not cSrc or Rho A in B16 caveolar membrane. Association of GPI anchors with caveolar membrane has been suggested by many studies (Anderson, 1998; Brown and London, 1997). However, association of GPI anchors with cholesterol-rich, caveolin-containing fraction or GSL-enriched GSD fraction has not been critically determined. There is a strong possibility that GPI anchors exist as an independent domain, presumably enriched in cholesterol.

Possible organization and functions of various microdomains (not including caveolar membrane) are summarized in Fig. 5.

Acknowledgment

I thank Dr. Stephen Anderson for scientific editing and preparation of the manuscript

以下のTritonXを用いた場合や、インテグリンのアスパラギン酸結合糖鎖やGM3の合成が抑制された状態では、DIMのインテグリン量がふえる。逆に、インテグリンのアスパラギン酸糖鎖やGM3合成がふえるとインテグリンは高密度画分へ移行し、DIMのインテグリンは減少する(Kazui *et al.*, 2000)。TMP CD82 cDNAを細胞にトランスフェクションすると、DIMにおけるインテグリンレベルは著しく上昇する。それは、中性の界面活性剤であるBrij98(polyoxyethylene 20 oleylether)1%でホモジナイズした時、高比重画分ではなくDIMに $\alpha 5$ および $\alpha 3$ インテグリンがCD82と共局在することから示された。インテグリンとTMPの共局在は、N - アスパラギン酸糖鎖の修飾を受けたレセプターやTritonX-100ではなくBrijなどの界面活性剤を用いた系など、特別な条件においてのみ見られる。つまり、インテグリン/TMPドメインは、いくつかの特別な環境によって維持されており、TritonXを含む溶液で維持される他のマイクロドメインからは明らかに独立した存在である。インテグリン $\alpha v \beta 3$ とそれに結合しているタンパク質であるCD47は、3量体Gタンパク質とともに、GSDと異なる脂質組成のコレステロールに富むマイクロドメインと複合体を形成している(Green *et al.*, 1999)。

C-4. GPIアンカーはコレステロールとカベオリンに富むカベオラメンブランに存在しているか？

カベオラはフラスコ状の陥入した形態によって定義されるのではなく、以下に述べる特徴によって定義される；(i)コレステロールの含量が非常に多いこととコレステロール結合試薬に感受性であること；(ii)シグナル伝達を制御するであろう骨格タンパク質であるカベオリンファミリーの存在(Okamoto *et al.*, 1998)；(iii)ある種のGSLsとの選択的な結合と他のGSLsの排除。つまり、B16のカベオラメンブランにおいてはGlcCerが結合しているがGM3は排除される；(iv)ある種のシグナル伝達分子との選択的な結合と他のものの排除。つまり、B16のカベオラメンブランは、Ras Hと結合するがcSrcやRhoAとは結合しない。カベオラメンブランにGPIアンカーが結合していることは、多くの研究によって支持されている。しかしながら、GPIアンカーの結合はコレステロールに富み、カベオリンを含む画分なのか、GSLに富むGSD画分なのかははっきりしていない。GPIアンカーは、おそらくコレステロールに富む、独立したドメインに存在している可能性が高い。様々なマイクロドメイン(カベオラメンブランを除く)の考えられる構成と機能を図5に要約する。

Fig. 5. Three types of microdomain, each mediating different functions with different receptors. (1) GSL-dependent adhesion coupled with signaling through clustered GSLs in GSD as major functional unit where various signal transducers (TDa, TDb) are associated; (2) cell proliferation mediated by growth factor receptors (GFR) clustered in a separate domain where they interact with GSLs, thereby inhibiting or promoting tyrosine kinase to change level of tyrosine phosphate (Y-P); (3) cell motility/ adhesion controlled by integrin receptor (ITR) complexed with tetraspan membrane protein (TMP) or other integrin-associated protein. GSL interacts with ITR or TMP, thereby altering tyrosine phosphorylation of transducers located at cytoplasmic site of ITR, or altering the facilitating effect of TMP. In process 1, lectins or complementary GSLs binding to GSL in GSD change signaling (Sg) through TDa or TDb, which may be modulated by proteolipid protein (PLP) associated with GSD. In process 2, GSLs inhibit or promote clustering of GFR, affecting signaling; alternatively, GSL may translocate (“flip”) to directly interact with tyrosine kinase at cytoplasmic site, leading to altered signaling. GSL may promote or inhibit ITR function by an unknown mechanism, or modulate interaction of ITR with TMP, thereby facilitating ITR-dependent motility or TMP-induced apoptosis (Ono et al., 1999). There is clear evidence for integrin-TMP domain, although its lipid composition remains to be studied. Interaction of GFR with GSL has been well documented, but presence of a GFR-specific domain is still hypothetical. Caveolar membrane is not shown in this model.

References

- Anderson, R. G. W. (1998). *Annu.Rev.Biochem.* **67**, 199–225
- Baorto, D. M., Gao, Z., Malaviya, R., Dustin, M. L., van der Merwe, A., Lublin, D. M., and Abraham, S. N. (1997). *Nature* **389**, 636–639
- Bremer, E. G., and Hakomori, S. (1982). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **106**, 711–718
- Bremer, E. G., Hakomori, S., Bowen-Pope, D. F., Raines, E. W., and Ross, R. (1984). *J.Biol.Chem.* **259**, 6818–6825
- Bremer, E. G., Schlessinger, J., and Hakomori, S. (1986). *J.Biol.Chem.* **261**, 2434–2440
- Brown, D. A., and London, E. (1997). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **240**, 1–7
- Carter, W. G., and Hakomori, S. (1981). *J.Biol.Chem.* **256**, 6953–6960
- Forstner, G. G., and Wherrett, J. R. (1973). *Biochim.Biophys.Acta* **306**, 446–459
- Garofalo, T., Sorice, M., Misasi, R., Cinque, B., Giammatteo, M., Pontieri, G. M., Cifone, M. G., and Pavan, A. (1998). *J.Biol.Chem.* **273**, 35153–35160
- Green, J. M., Zhelesnyak, A., Chung, J., Lindberg, F. P., Sarfati, M., Frazier, W. A., and Brown, E. J. (1999). *J.Cell Biol.* **146**, 673–682.
- Hakomori, S. (1990). *J.Biol.Chem.* **265**, 18713–18716
- Hakomori, S., Handa, K., Iwabuchi, K., Yamamura, S., and Prinetti, A. (1998). *Glycobiology* **8**, xi–xviii
- Hakomori, S., and Igarashi, Y. (1995). *J.Biochem.(Tokyo)* **118**, 1091–1103
- Iwabuchi, K., Handa, K., and Hakomori, S. (1998a). *J.Biol.Chem.* **273**, 33766–33773
- Iwabuchi, K., Yamamura, S., Prinetti, A., Handa, K., and Hakomori, S. (1998b). *J.Biol.Chem.* **273**, 9130–9138
- Jain, M. K., and White, H. B. (1977). *Adv.Lipid Res.* **15**, 1–60
- Kasahara, K., Watanabe, Y., Yamamoto, T., and Sanai, Y. (1997). *J.Biol.Chem.* **272**, 29947–29953
- Kazui, A., Ono, M., Handa, K., and Hakomori, S. (2000). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **273**, 159–163
- Kojima, N., and Hakomori, S. (1991a). *J.Biol.Chem.* **266**, 17552–17558
- Kojima, N., and Hakomori, S. (1991b). *Glycobiology* **1**, 623–630
- Liu, P., Ying, Y., Ko, Y.-G., and Anderson, R. G. W. (1996). *J.Biol.Chem.* **271**, 10299–10303

- Marchesi, V. T., Tillack, T., Segrest, J., and Scott, R. (1972) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **69**, 1445–1449
- Mineo, C., James, G. L., Smart, E. J., and Anderson, R. G. W. (1996) *J.Biol.Chem.* **271**, 11930–11935
- Mutoh, T., Tokuda, A., Miyada, T., Hamaguchi, M., and Fujiki, N. (1995) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **92**, 5087–5091
- Nores, G. A., Dohi, T., Taniguchi, M., and Hakomori, S. (1987) *J.Immunol.* **139**, 3171–3176
- Okada, Y., Mugnai, G., Bremer, E. G., and Hakomori, S. (1984) *Exp.Cell Res.* **155**, 448–456
- Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P. E., and Lisanti, M. P. (1998) *J.Biol.Chem.* **273**, 5419–5422
- Ono, M., Handa, K., Withers, D. A., and Hakomori, S. (1999) *Cancer Res.* **59**, 2335–2339
- Pascher, I. (1976) *Biochim.Biophys.Acta* **455**, 433–451
- Rock, P., Allietta, M., Young, W. W. J., Thompson, T. E., and Tillack, T. W. (1991) *Biochemistry* **30**, 19–25
- Rodgers, W., and Rose, J. K. (1996) *J.Cell Biol.* **135**, 1515–1523
- Schnitzer, J. E., Oh, P., Pinney, E., and Allard, J. (1994) *J.Cell Biol.* **127**, 1217–1232
- Simons, K., and van Meer, G. (1988) *Biochemistry* **27**, 6197–6202
- Singer, S. J., and Nicolson, G. (1972) *Science* **185**, 720–731
- Sorice, M., Parolini, I., Sansolini, T., Garofalo, T., Dolo, V., Sargiacomo, M., Tai, T., Peschle, C., Torrisi, M. R., and Pavan, A. (1997) *J.Lipid Res.* **38**, 969–980
- Stan, R.-V., Roberts, W. G., Predescu, D., Ihida, K., Saucan, L., Ghitescu, L., and Palade, G. E. (1997) *Mol.Biol. Cell* **8**, 595–605
- Stefanova, I., Horejsi, V., Ansotegui, I. J., Knapp, W., and Stockinger, H. (1991) *Science* **254**, 1016–1019
- Streuli, C. H., Patel, B., and Critchley, D. R. (1981) *Exp.Cell Res.* **136**, 247–254.
- Tillack, T. W., Allietta, M., Moran, R. E., and Young, W.W.J. (1983) *Biochim.Biophys.Acta* **733**, 15–24
- Wallach, D. F. H. (1971). Cooperativity in biomembranes. In "The dynamic structure of cell membranes" (D. F. H. Wallach and H. Fischer, Eds.), pp. 181–199. Springer-Verlag, New York.
- Yamamura, S., Handa, K., and Hakomori, S. (1997) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **236**, 218–222
- Yates, A. J., and Rampersaud, A. (1998) Sphingolipids as receptor modulators: An overview. In "Sphingolipids as signaling modulators in the nervous system" (R.W. Ledeen, S. Hakomori, A.J. Yates, J.S. Schneider, and R.K. Yu, Eds.), Vol. 845, pp. 57–71. New York Acad. Sci., New York, NY.
- Yu, J., Fischman, D. A., and Steck, T.L. (1973) *J.Supramolec.Struc.* **3**, 233–248
- Zhang, Y., Iwabuchi, K., Nunomura, S., and Hakomori, S. (2000) *Biochemistry* **39**, 2459–2468

Received on November 18, 2000, accepted on November 28, 2000

Profile of the Author

Sen-itiroh Hakomori

Sen-itiroh Hakomori was educated at Tohoku University School of Medicine, and earned the Dr. Med. Sci degree (Biochemistry) in 1956. Appointed to various faculty positions at Tohoku University School of Medicine, Tohoku College of Pharmaceutical Science, Harvard Medical School, and Brandeis University. From 1971 to present: Professor of Pathobiology and Microbiology, University of Washington, Seattle, WA. Simultaneous with these appointments, he has been Member and Program Head, Biochemical Oncology, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA (1975-87); Scientific Director, The Biomembrane Institute, Seattle, WA (1987-96); and Head, Division of Biomembrane Research, Pacific Northwest Research Institute, Seattle, WA (1996-present).

His major study is structure and function of glycosphingolipids (GSLs), particularly involved in cell adhesion and signal transduction. Subsidiary observations such as discovery of cell surface fibronectin and its deletion during transformation, and cloning and defining of ABO gene structure, are also due to his studies.