Structure and Function of Sulfoglycolipids in the Kidney and Testis

硫酸化糖脂質の構造と腎および精巣における役割

Tadano-Aritomi, Keiko; and Ishizuka, Ineo

Department of Biochemistry, Teikyo University School of Medicine, Kaga 2-11-1, Itabashi-ku, Tokyo 173-8605, Japan
FAX: 81-3-5375-6366, E-mail: kta@med.teikyo-u.ac.jp

Key Words: *sulfated glycolipids, galactosylsulfatide, seminolipid, kidney, testis*

Abstract

Galactosylsulfatide (SM4s), a sulfated glycosphingolipid (GSL), is present most abundantly in the brain as the major component of the myelin sheath. Next to the nervous tissue, the kidneys of mammals are rich in sulfated GSLs. Not only SM4s but also various sulfated GSLs, including lactosylsulfatide (SM3), bis-sulfated GSLs and a sulfated ganglioside, have been isolated and characterized from the kidney, suggesting their function as ion barriers to environmental osmolality. On the other hand, seminolipid (SM4g), a sulfated glyceroglycolipid (GGL), is the principal glycolipid in spermatozoa of mammals, suggesting that SM4g plays an essential role in spermatogenesis and the fertilization process. In this review, we summarize the results of the knockout mice generated by gene-targeted disruption of enzymes which catalyze synthesis of SM4s and SM4g, and discuss the potential function of sulfoglycolipids in the kidney and testis. As the basis of functional analyses, the progress of analytical methods of sulfoglycolipids is also described.

要 約

硫酸化スフィンゴ糖脂質の代表であるガラクトシルスルファチド (SM4s) は神経系組織、特にミエリンの主要糖脂質であるが、次いで腎にも高濃度に発現されている。また、腎からはラクトシルスルファチド (SM3) を初めとする多種類のモノ硫酸化糖脂質やビス硫酸化糖脂質、さらに硫酸化ガングリオシドが見出され、尿細管におけるイオンバリアーとしての機能が示唆されている。一方、哺乳類の精巣には硫酸化グリセロ糖脂質であるセミノリピド (SM4g) が高濃度に存在することから、精子形成や受精における役割が議論されてきた。本稿ではこれら硫酸化糖脂質の分析法の進歩について述べるとともに、SM4s および SM4g の生合成に直接関与する酵素遺伝子のノックアウトマウスの解析結果を中心に解説し、硫酸化糖脂質の腎および精巣における機能について考察する。

A. Structure and distribution of sulfoglycolipids

A-1. What are glycolipids and sulfoglycolipids?

Glycolipids, as the name implies, consist of two distinct moieties: a backbone lipid, which is hydrophobic and carbohydrate, which is hydrophilic. The majority of animal glycolipids belong to the class “glycosphingolipids” (GSLs), which have a ceramide as the backbone lipid (1). As a counterpart of GSLs, another class of glycolipids termed “glyceroglycolipids” (GGLs) has been found mainly in plants and bacteria. They have diacylglycerol or alkylacylglycerol (EAG) as a backbone lipid. GSLs serve as major cell surface antigens such as blood group antigens and as receptors for bacterial or viral toxins. Less well-defined functions are to mediate cell adhesion or recognition, and to modulate a certain type of impulse from the cell surface to nucleus, termed signal transduction.

Glycolipids from animal tissues are also classified according to the presence or absence of anionic (sialic acid or sulfate) or cationic (free amino group) residues: neutral, acidic (2)

A. 硫酸化糖脂質の構造と分布

A-1. 糖脂質とは？ そして、硫酸化糖脂質とは？

糖脂質はその名が示すように、脂溶性の脂質部分と水溶性の糖鎖部分より構成された両親媒性の物質で、脂質部分の構造の違いから2つに分類される。脂質部分にグリセロールを含むものをグリセロ糖脂質 (GGL)、スフィンゴシンを含むものをスフィンゴ糖脂質 (SGL) とよび、前者は主に植物や微生物界に、後者は主に酵母および動物界に存在する (1)。スフィンゴ糖脂質は血液型抗原に代表される細胞表面抗原として、あるいは細菌やウイルス毒素の受容体としての役割が古くから知られているが、最近では細胞表面から核への情報伝達過程 (signal transduction) への関与など新たな側面についても多くの報告がなされている。

糖脂質はまた、中性糖鎖のみからなる中性糖脂質、糖鎖に酸性基をもつ酸性糖脂質 (2)、および、遊離のアミノ基をもつ塩

and cationic glycolipids (3), respectively. Glycolipids containing sialic acids are collectively termed “gangliosides”, while those that have sulfate esters on their carbohydrate residues are termed sulfoglycolipids. Cationic GSLs, the quantity of which is much lower than that of acidic and neutral GSLs, may play a novel role in the control of signal transduction affecting the cellular phenotype (3).

A-2. Two Major Sulfoglycolipids, Galactosylsulfatide and Seminolipid

Two major sulfoglycolipids in mammals are “galactosylsulfatide”, i.e. sulfated galactosylceramide (GalCer I³-sulfate, SM4s), which is a GSL, and “seminolipid”, i.e. sulfated galactosylalkylacylglycerol (GalEAG I³-sulfate, SM4g), which is a GGL (Fig. 1). SM4s and SM4g have exactly the same carbohydrate structure, i.e. HSO₃-3Gal on a ceramide or EAG backbone, respectively.

SM4s is a major lipid component of the myelin sheath and is also found in high concentration in the kidneys. While the majority of mammalian glycolipids belong to GSLs as described above (see A-1), SM4g is so far the only acidic glycolipid in mammals that belongs to the class, GGLs. Apart from its existence as a minor component in the brain, SM4g is exclusively present in the testis as the principal glycolipid in spermatozoa comprising, for example, approximately 3% of total lipids and more than 90% of total glycolipids in boar spermatozoa. In freshly ejaculated sperm cells, SM4g was enriched in the plasma membrane of the sperm head, suggesting a role of SM4g in sperm/egg recognition (2).

A-3. Discovery of New Sulfated GSLs

In comparison to neutral GSLs and gangliosides, there were a relatively small number, actually only two sulfoglycolipids, i.e. SM4s and lactosylsulfatide (LacCer II³-sulfate, SM3). SM3 is the second most abundant sulfated GSL, which was found in human kidneys in 1966. Since the discov-

eried glycolipids (3) to be classified. Sulfated glycolipids are glycosphingolipids with a sulfate ester on the carbohydrate part, and are collectively termed “gangliosides”, while those that have sulfate esters on their carbohydrate residues are termed sulfoglycolipids. Cationic GSLs, the quantity of which is much lower than that of acidic and neutral GSLs, may play a novel role in the control of signal transduction affecting the cellular phenotype (3).

A-2.2 大硫酸化糖脂質、ガラクトシルスルファチドとセミノリピド

哺乳類の代表的な硫酸化糖脂質はガラクトシルスルファチド (GalCer I³-sulfate, SM4s) とセミノリピド (GalEAG I³-sulfate, SM4g) である。両者は糖鎖部分に全く同じ構造をもちながら脂質部分の構造が異なり、前者はスフィンゴ糖脂質 (SGL)、後者はグリセロ糖脂質 (GGL) に分類され、まさに2大硫酸化糖脂質というべき存在である (図1)。

硫酸化スフィンゴ糖脂質の代表である SM4s は脳神経系ミエリン鞘の主要構成脂質であり、次いで腎にも高濃度で存在する。前項 A-1 で述べたように哺乳類の糖脂質はほとんど全てがスフィンゴ糖脂質であるのに対して、精巣と脳にはグリセロ糖脂質である SM4g およびその前駆体であるガラクトシルアルキルアシルグリセロール (GalEAG) が存在している。哺乳類で見いだされるグリセロ糖脂質はこの2つのみであり、SM4g は唯一の硫酸化グリセロ糖脂質である。SM4g は脳では微量成分であるが、精巣では主要成分として存在し、ブタ精子では総脂質の3%、総糖脂質の90%を占めている。SM4g は精子の表面に分布することから、長年、受精における卵との認識に関与している可能性が議論されている (2)。

A-3. 新しい硫酸化スフィンゴ糖脂質の発見

SM4s の発見後の1966年にはヒト腎より、ラクツシルスルファチド (LacCer II³-sulfate, SM3) が報告されたが、その後長い間、硫酸化スフィンゴ糖脂質は SM4s および SM3 のみであり、ガングリオシドのような構造の多様性はないものと考えられていた。著者らは1982年に3糖よりなる硫酸化糖脂質 (SM2a)(4)

Fig. 1. Structure of representative sulfated SGL and GGL, galactosylsulfatide and seminolipid, respectively.

Table I. Sulfoglycosphingolipids of mammalian kidney.

Structure	Abbreviation ^a	Symbol ^b	Concentration ^c nmol/g wet tissue (animal)	Reference
HSO ₃ -3Galβ-Cer	GalCer I ³ -sulfate	SM4s*	80-120 (human) 182 (rat) 280 (mouse)	2 4 26
HSO ₃ -3Glcβ-Cer	GlcCer I ³ -sulfate	SM4s-Glc*	5.5 (rat)	7
HSO ₃ -3Galβ-4Glcβ-Cer	LacCer II ³ -sulfate	SM3*	30 (human) 23(mouse)	2 26
GalNAcβ-4(HSO ₃ -3)Galβ-4Glcβ-Cer	Gg ₃ Cer II ³ -sulfate	SM2a*	24 (rat)	4
HSO ₃ -3GalNAcβ-4Galβ-4Glcβ-Cer	Gg ₃ Cer III ³ -sulfate	SM2b*	0.05 (rat)	10
HSO ₃ -3GalNAcβ-4(HSO ₃ -3)Galβ-4Glcβ-Cer	Gg ₃ Cer II ³ ,III ³ -bis-sulfate	SB2*	11 (rat)	11
HSO ₃ -3Galβ-3GalNAcβ-4(HSO ₃ -3)Galβ-4Glcβ-Cer	Gg ₄ Cer II ³ ,IV ³ -bis-sulfate	SB1a*	6 (rat) 10 (mouse)	12 26
HSO ₃ -3Galβ-3GalNAcβ-4(NeuGcα2-3)Galβ-4Glcβ-Cer	II ³ -α-NeuGc-Gg ₄ Cer IV ³ -sulfate	SMGM1a	0.12 (rat)	13
HSO ₃ -3GalNAcβ-3Galα-4Galβ-4Glcβ-Cer	Gb ₅ Cer IV ³ -sulfate	SMGb4	0.03 (human)	5
HSO ₃ -3Galβ-3GalNAcβ-3Galα-4Galβ-4Glcβ-Cer	Gb ₅ Cer V ³ -sulfate	SMGb5	0.19 (human)	6
HSO ₃ -3GalNAcβ-3Galα-3Galβ-4Glcβ-Cer	iGb ₄ Cer IV ³ -sulfate	SMiGb4	0.27 (rat)	8
HSO ₃ -3Galβ-3GalNAcβ-3Galα-3Galβ-4Glcβ-Cer	iGb ₅ Cer V ³ -sulfate	SMiGb5	0.11 (rat)	9

^a Abbreviations follow the IUPAC-IUB recommendations.^b Symbols for sulfoglycolipids belonging to the ganglio-series (*) follow the modifications of the nomenclature system of Svennerholm for gangliosides.^c Data for rat and mouse are those obtained from Sprague-Dawley and C57BL, respectively.

ery of the third sulfated GSL, Gg₃Cer II³-sulfate (SM2a), in 1982, we have isolated and characterized various mono- and bis-sulfated GSLs as well as a sulfated ganglioside from rat and human kidney (Table I). Now they constitute a group of acidic glycolipids comparable to gangliosides. The trivial "sulfatide", which has been used to designate SM4s, is used as a generic term for sulfoglycolipids.

A-4. Distribution of Sulfated GSLs in Visceral Organs

The main sulfated GSL species in rat kidney were localized immunohistochemically using antibodies which recognize SM4s, SM3, SM2a, SB2 and SB1a (14). SM2a epitopes were expressed in the brush border of proximal tubuli, whereas SB2-specific staining was observed in cortical and medullar collecting ducts. SB1a was visualized in epithelia of the distal tubules of Henle's loop and the juxtaglomerular apparatus. SM4s and SM3 were prominently expressed in the cortical and medullar collecting ducts. In contrast, histochemical analyses of the kidney of double knockout mice (*Asa^{-/-}/Cgr^{-/-}*, see D) revealed that SM3 and SB1a are expressed in the long thin limbs and distal convoluted tubules (15).

Some sulfated GSLs are also expressed in the gastrointestinal tract and islet of Langerhans (2).

B. Analytical Methods for Sulfoglycolipids

B-1. Colorimetric Method Using Cationic Dye

To elucidate the roles that each sulfoglycolipid plays *in vivo*, a simple and reliable method is required. Kean reported a

を新たに発見して以来、1~5 糖鎖のモノ硫酸化糖脂質 (5-10)、硫酸基を 2 つもつビス硫酸化糖脂質 (11、12)、さらに硫酸基とシアル酸を併せもつ硫酸化ガングリオシド (13) など 12 種類の構造を決定し、硫酸化糖脂質にも構造の多様性が存在することを明らかにした (表 I)。スルファチドは狭義的には SM4s を指す語であったが、最近では硫酸化糖脂質の総称としても用いられる。

A-4. 神経系以外の組織における硫酸化スフィンゴ糖脂質の分布

各硫酸化糖脂質の特異的抗体を用いた免疫染色により、ラット腎尿細管では、SM2a は近位尿細管の刷子縁に分布しているのに対して、SB2 は腎皮質および髄質の集合管に局在していることが報告されている。また、SB1a はヘンレ係蹄、傍糸球体装置などに主として分布し、SM4s および SM3 は集合管に分布していることが報告されている (14)。一方、ダブルノックアウトマウス (*Asa^{-/-}/Cgr^{-/-}*, D 項参照) の解析では、マウス腎における SM3 および SB1a の代謝回転の場は主としてヘンレ上行/下行脚および遠位尿細管であることが報告されている (D 参照) (15)。

腎以外では、消化管上皮細胞、膵ランゲルハンス島にも分布している (2)。

B. 硫酸化糖脂質の分析法

B-1. 塩基性色素を用いる比色定量

硫酸化糖脂質の機能を解明するためには、簡便かつ高精度の定量法が必須である。Kean は塩基性色素アズール A と SM4s

rapid nonhydrolytic method for quantitative determination of SM4s based on the ability of its sulfate ester to form a blue ion pair with a cationic dye, azure A (16). In the case of sulfoglycolipids with a carbohydrate chain longer than SM3, however, the intensity of the color was very weak because of the increased hydrophilicity of the dye-sulfoglycolipid complex. We reported a modified method in which polar mono- or bis-sulfoglycolipids were successfully determined using azure A after peracetylation (17).

B-2. Ion Chromatography

Although variants of Kean's method have been developed for determination of SM4s and more polar sulfoglycolipids, they were not applicable to sulfolipids in general without the use of relevant standard compounds because the color yield depends on the nonpolar nature of the whole molecule. In principle, determination of inorganic sulfate liberated after acid hydrolysis of sulfoglycolipids can be the method of choice when hydrolysis is complete. For the determination of the sulfate liberated by hydrolysis, we adopted ion chromatography, that is, quantification of ionic substances by ion conductimetry after separation by anion-exchange chromatography (18). By this method, sulfoglycolipids with various structures were determined with increased precision and dynamic range using sodium or potassium sulfate as the standard (see Fig. 3 and 6). The detection limit of the method is ~ 10 times lower and the dynamic range is much wider (30 pmol to μ mol) than those of the azure A method (0.5–10 nmol) (17).

B-3. Structural and Quantitative Analysis by Mass Spectrometry

For the structural analysis of sulfoglycolipids in the total lipid extract, thin-layer chromatography (TLC) combined with mass spectrometry is a powerful technique. Total lipid extracts or crude glycolipid fractions developed by one or two-dimensional TLC were transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane by iron-blotting (Far-Eastern blotting) (20). The band on the membrane was excised and analyzed directly by liquid secondary ion mass spectrometry (LSIMS) (19). This method is simple and rapid, and even a faint band on the plate can directly provide structural information without further purification (Fig. 5).

Sensitivity of the azure A method or ion chromatography is not enough for determination of minor components in the biological samples or cultured cells. The use of electrospray ionization mass spectrometry (ESIMS) combined with high performance liquid chromatography (LC-ESIMS) has a great advantage in sensitivity, and it can be applied not only to sulfoglycolipids but also to other glycolipids in the crude lipid extracts. By using MS/MS (selected reaction monitoring, SRM), SM4g as well as its precursor, GalEAG, in the testis can be determined with the detection limit of less than 0.1 pmol (unpublished results).

の複合体がクロロホルム/メタノール/水による分配で下層(有機層)に分配される性質を利用した簡便な比色定量法を報告した(16)。この方法はSM4sおよびSM4gには便利であるが、2糖以上の糖鎖をもつ硫酸化糖脂質のアズールA複合体は一部が水層に分配されるため定量的に回収することができなかった。著者らは硫酸化糖脂質をあらかじめ穏やかな条件で完全アセチル化した後、アズールAにより比色定量すれば2糖以上のモノ硫酸化糖脂質およびビス硫酸化糖脂質にも応用できることを報告した(17)。

B-2. イオンクロマトグラフィーによる定量

クロロホルム/メタノール/水による分配系を用いるアズールA法は色素-硫酸化糖脂質複合体の脂溶性の度合いにより有機層への回収率が左右されるため、厳密に定量するためにはそれぞれの標準試料で補正する必要がある、混合物の場合は正確に定量できないという欠点があった。そこで著者らは構造にかかわらず全ての硫酸化糖脂質を同じ尺度で定量することを目的として、陽イオンおよび陰イオンの一斉分析に用いられているイオンクロマトグラフィーを硫酸化糖脂質に応用することを試みた。この方法は加水分解により遊離した無機硫酸を定量するため、加水分解が完全に行われれば、硫酸ナトリウムなどを基準として、構造によらず全ての硫酸化糖脂質に応用可能であることがわかった(18)。応用例を図3および6に示す(C-1およびD項参照)。

B-3. 質量分析による構造解析と定量

培養細胞などの微量生体試料への応用を目指し、質量分析(MS)による構造解析(19)、および高速液体クロマトグラフィー(HPLC)と直結したLC-MSを用いる定量を行った。薄層クロマトグラフィー(TLC)により分離したスポットをポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜に転写し(Far-Eastern blot)(20)、切り抜いた膜をそのまま質量分析計に導入する。この方法はTLCで相互に分離する展開溶媒を選べば、1スポット分の試料で混合物中の目的物の構造解析が可能である。応用例を図5に示す。またLC-MSによる定量は硫酸化糖脂質に限らず全ての糖脂質に応用可能であり、MS/MS(選択反応モニタリング、SRM)を用いることにより混合物中の微量成分の定量も可能である。実際にマウス精巣の総脂質画分に応用し、SM4gおよびGalEAGをピコモル以下の濃度で定量できることが明らかとなっている(未発表)。

C. Function of Sulfoglycolipids

Carbohydrate chains are present on the cell surface as a component of glycolipids, glycoproteins or proteoglycans. They have a highly varied repertoire of linear or branched chains of sugar residues, and their expressions change according to ontogenic differentiation, oncogenic transformation, or signal transduction. The carbohydrate chains of glycolipids are synthesized by the action of specific glycosyltransferases which transfer sugar residues sequentially from specific nucleotides to a lipid backbone or an oligosaccharide chain bound to the lipid backbone. Recently essentially all glycosyltransferase genes for synthesis of all series of glycolipids have been cloned. Various mutant mice which lack or overexpress specific glycolipids have been generated by knockout or transgenic approach for specific glycosyltransferase genes. Analysis of these mice is answering questions on the function of specific glycolipids *in vivo*.

Insight into the physiological function of sulfoglycolipids was provided by gene-targeted disruption of two enzymes which catalyze the synthesis of SM4s and SM4g. The one is UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase (CGT, EC 2.4.1.62), which catalyzes the biosynthesis of GalCer and GalEAG, the precursor of SM4s and SM4g, respectively (21, 22). The other is 3'-phosphoadenylylsulfate:cerebroside (GalCer) 3'-sulfotransferase (CST, EC 2.8.2.11), which sulfates GalCer to SM4s, as well as GalEAG to SM4g (23). Fig. 2 shows the major pathways by which these enzymes are related. CGT and CST-deficient mice manifest neurological disorders caused by myelin dysfunction, indicating that both GalCer and SM4s are

C. 硫酸化糖脂質の機能

糖鎖はタンパク質あるいは脂質と複合体を構成して細胞表面に分布しているが、このうち脂質と結合したものが糖脂質であり、タンパク質と結合したものは糖タンパク質やプロテオグリカンとよばれている。糖鎖構造は多様であり、発現パターンは細胞の分化、癌化、情報伝達の過程でダイナミックに変化することが報告されている。糖脂質は特異的な糖転移酵素により糖鎖が1つずつ付加されることにより合成される。ペプチドのように遺伝子の直接支配を受けないため、機能解析は十分に発展せず、その実態は推測の域を出ていないものが多かった。近年多くの糖転移酵素遺伝子がクローニングされ、糖鎖合成そのものを直接的な研究対象とすることが可能となった。糖転移酵素を個体レベルで過剰発現あるいはノックアウトする、つまり糖脂質の組成を改変することにより、その生理機能を個体レベルで解析するアプローチが進んでいる。

硫酸化糖脂質についても、SM4s および SM4g の合成にかかわる2つの遺伝子ノックアウトマウスが作成された。1つは前駆体であるガラクトシルセラミド (GalCer) および GalEAG を合成するUDP-ガラクトース：セラミドガラクトシル転移酵素 (CGT) (21,22)、もう1つは硫酸基を転移するセレブロシド硫酸基転移酵素 (CST) である (23)。両酵素が触媒する過程を図2に示す。両酵素の欠損マウスの解析から GalCer および SM4s が脳神経系ミエリンに果たす役割の重要性が明らかにされた (21,22,24)。Cgt および Cst 遺伝子は、前項で述べた硫酸化糖脂質の組織分布に一致して、精巣や腎にも強く発現していることが確認

Fig. 2. Proposed pathway related to CGT and CST in the kidney and testis. CGT, UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase; CST, 3'-phosphoadenylylsulfate:cerebroside (GalCer) 3'-sulfotransferase.

indispensable components of myelin (21, 22, 24). *Cgt* and *Cst* transcripts were clearly detected in the kidney and testis in addition to the brain, suggesting that CGT and CST may play an important role in the function of these organs. In this review, we describe our results of CGT-deficient mice (25, 26) (C-1 and C-2) in comparison with recent results of CST-deficient mice by Honke *et al.* (24) (D).

C-1. Kidney of CGT-Deficient Mice: Absence of SM4s and Compensatory Increase in More Polar Sulfoglycolipids

Fig. 2 shows the proposed pathway of sulfoglycolipids biosynthesis in mouse kidney. CGT-deficient mice, which are incapable of synthesizing either GalCer or SM4s, form myelin containing glucosylceramide (GlcCer) and sphingomyelin with 2-hydroxy fatty acids, both of which are not constituents of normal myelin (21, 22). What happens in the kidney of these mice in the absence of SM4s?

Other than the smaller size reflecting the lower body weight, no evidence of abnormality was recognized in the kidney of *Cgt*^{-/-} mice. To examine the renal function, several parameters including blood urea nitrogen (BUN), creatinine, Na⁺, K⁺, Cl⁻, urinary osmolality, and β-N-acetyl-D-glucosaminidase (NAG) excretion were measured in serum and urine samples. All of these data were within the normal range and no significant differences were observed among genotypes.

In the kidney of *Cgt*^{-/-} mice, GalCer was absent as expected. Instead, GlcCer containing t18:0 sphingosine substantially increased, suggesting the compensatory reaction to increase more polar species, similar to the increase of 2-hydroxy fatty acid-containing species in the brain. In the wild-type kidney,

されているので、CGT あるいは CST 欠損による糖脂質合成の異常が、これらの臓器の機能にも影響を及ぼすと考えられる。本稿では、CGT 欠損マウスを用いて、著者らが行ってきた結果 (25, 26) を中心に紹介し (C-1、C-2)、本家らの CST 欠損マウスの結果 (24) と比較して、硫酸化糖脂質のもつ機能を展望してみたい (D)。

C-1. CGT 欠損マウス腎：SM4s の欠失と極性の高い硫酸化糖脂質の代償的増加

マウス腎における硫酸化糖脂質および関連する脂質の代謝経路 (一部は推定) を図に示す (図 2)。SM4s は GalCer の硫酸化により合成されるため、CGT 欠損マウスでは GalCer のみならず SM4s も通常の分析法では全く検出されない。脳では代償的に正常では存在しない 2-ヒドロキシ脂肪酸 (HFA) を含むグルコシルセラミド (HFA-GlcCer) やスフィンゴミエリン (HFA-SM) が存在することが報告されている (21, 22)。CGT 欠損ホモ接合体マウスの腎では GalCer および SM4s 欠失により何が起きているのであろうか。

野生型あるいはヘテロ接合体に比べてホモ接合体では、腎の重量、形態および組織学的観察では異常な所見は認められなかった。血液および尿を採取して、腎機能を示す指標となる血中尿素窒素 (BUN)、β-N-アセチル-D-グルコサミニダーゼ (NAG)、クレアチニン、Na⁺、K⁺、Cl⁻、尿浸透圧を測定したが、遺伝子型間での有意差は認められず、これらの指標で見える限り腎機能は正常と考えられた。

ホモ接合体では予想通り GalCer が欠失し、4-hydroxy-sphinganine (フィトスフィンゴシン、t18:0) を含む GlcCer (t18:0-GlcCer) が増加していた。脳で HFA-GlcCer が増加していることと考え合わせると、SM4s の代わりに極性の高い糖脂質を増やそうとする代償作用だろうか。野生型およびヘテロ接合体の硫酸化糖脂質は SM4s が主要成分で、他により極性の高い硫酸

Fig. 3. Concentrations of sulfolipids in the kidney of CGT-deficient mice determined by ion chromatography. SM4s, galactosylsulfatide (GalCer I³-sulfate); SM3, lactosylsulfatide (LacCer II³-sulfate); HSO₃-Chol, cholesterol 3-sulfate; SB1a, G₀Cer II³, IV³-bis-sulfate. M, male ; F, female.

SM4s comprises almost 75% of the sulfolipids with three minor sulfolipids, which are SM3 (8%), SB1a (4%) and cholesterol 3-sulfate ($\text{HSO}_3\text{-Chol}$) (15%) (Table I). *Cgt^{-/-}* mice lacked SM4s in their kidney. Instead, the amount of SM3 and SB1a, determined by ion chromatography, were approximately 2- and 3-fold, respectively, the level of wild-type or *Cgt^{+/-}* mice, while the level of $\text{HSO}_3\text{-Chol}$, gangliosides or acidic phospholipids remained unchanged (Fig. 3).

The results of lipid analysis of *Cgt^{-/-}* were summarized as follows: 1) GalCer and SM4s were absent. 2) GlcCer containing t18:0 increased. 3) SM3 and SB1a increased 2- and 3-fold, respectively. 4) No significant changes were observed in $\text{HSO}_3\text{-Chol}$, gangliosides and phospholipids.

C-2. Testis of CGT-Deficient Mice: Absence of SM4g and Arrest of Male Meiosis

Cgt^{-/-} male mice developed severe clinical phenotype early, and thus, it was impossible to ascertain clinically if they were fertile. Anatomically, however, the testis was dramatically impaired. The average testis weight was only one-fourth of that of wild-type littermates and the size of the epididymis was also reduced. Histological examination showed that testicular germ cells after meiosis were absent, whereas spermatogonia and early spermatocytes appeared normal (Fig. 4). The abnormal seminiferous tubules exhibited cellular degeneration and formation of syncytial multinucleated cells. The TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay indicated that the degenerating cells were undergoing apoptotic cell death.

Mammalian spermatogenesis takes place in the seminiferous tubules. Within the tubules, somatic Sertoli cells are the only cells to extend from the outer wall of the tubules to the lumen, and to have contacts with all germ cells. The germ cells

化糖脂質である SM3 および SB1a が SM4s のそれぞれ約 8 % および 4 % 存在し(表 I)、糖脂質以外の硫脂質としてコレステロール硫酸 ($\text{HSO}_3\text{-Chol}$) が SM4s の約 15 % 存在する。ホモ接合体では SM4s が欠失し、代わりに SM3 が約 2 倍、SB1a が 3 倍に増加していた(図 3)。すなわち、ホモ接合体では GlcCer から SB1a に至る経路が代償的に活性化されていることが明らかとなった(図 2)。一方、コレステロール硫酸、酸性糖脂質の中でもガングリオシド、および酸性リン脂質には変化が認められなかった。スフィンゴミエリンは量、分子種ともに変化は認められなかった。

脂質分析の結果から CGT 欠損ホモ接合体マウスの腎における脂質組成の変化は、次のようにまとめられる。1) GalCer および SM4s が欠失していた。2) t18:0-GlcCer が増加していた。3) SM3 が約 2 倍、SB1a が約 3 倍に増加していた。4) コレステロール硫酸、ガングリオシドおよびリン脂質には変化が認められなかった。

C-2. CGT 欠損マウス精巣：SM4g の欠失と減数分裂の停止

CGT 欠損ホモ接合体マウスは、進行性の神経症状を示し、成熟とともに四肢の麻痺を起こして交尾行動をとることが難しくなる。メスについては、妊娠・出産におよんだ例もあるが、オスについては生殖能力がない。精巣は、正常マウスの約 1/4 に萎縮しており、精巣上体も小さい。ホモ接合体マウスの精巣には正常な精細管の構造と精子形成が認められず、萎縮した精細管の中には多核化した細胞や変性細胞が目立つ(図 4)。TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling) 法による検出では、アポトーシス像が認められた。

正常な精子形成は、セルトリ細胞により構成された精細管の中で、基底膜側から管腔に向かって分裂増殖する精原細胞、減数分裂を行う精母細胞、減数分裂後の精子細胞が配列して精

Fig. 4. Histology of the testes in CGT-deficient mice. (a) A section from normal adult testis showing the presence of zygotene (ZS) and pachytene (PS) spermatocytes, spermatids (R, E), and the cells in the metaphase of meiosis (arrow). (b) A section from *Cgt^{-/-}* adult testis. The abnormal seminiferous tubules in *Cgt^{-/-}* adult mice could be divided roughly into three stages of development: 1, a simple structure consisting of a layer of spermatogonia; 2, multilayers of spermatocytes at the pachytene stage, together with spermatogonia; 3, cellular degeneration and formation of syncytial multinucleated cells, which were probably produced from spermatocytes at the late pachytene stage. The scale bar = 50 μm .

Table II. The temporal appearance of spermatogenic cells in the prepubertal mouse testis.

Cell type and stage of spermatocyte	Days after birth						
	8	10	12	14	16	18	20
Spermatogonia							
Spermatocytes Preleptotene							
Leptotene							
Zygotene							
Early Pachytene							
Late Pachytene							
Spermatids							
Sertoli cells							

The spermatogenesis process occurs in three phases: the mitotic proliferation of spermatogonia; meiosis with its prolonged meiotic prophase (preleptotene to pachytene spermatocyte) and two reduction divisions which yield 2 x secondary spermatocytes and then 4 x haploid round spermatids; and spermiogenesis which culminates in the formation of spermatozoa. During the first wave of spermatogenesis, each step of spermatogenic cells appears at indicated days after birth.

consist of mitotically cycling spermatogonia located at the outer most layer of the tubules, spermatocytes undergoing meiosis, and differentiating haploid spermatids which lead to the mature spermatozoa (Table II). After several mitotic divisions, spermatogonia commit to meiosis and become primary spermatocytes. The several stages of prophase I of meiosis can be distinguished by chromosomal configuration: leptotene, zygotene, pachytene and diplotene, as shown in Table II (27). RT-PCR analyses for transcripts of genes, expression of which is developmentally programmed during spermatogenesis, indicated that differentiation of spermatogenic cells of *Cgtr*^{-/-} mice was arrested before reaching the first meiotic division. It is consistent with the morphological observation that differentiation of the spermatogenic cells of *Cgtr*^{-/-} mice is affected at the late pachytene spermatocyte stage.

TLC-blot-LSIMS and LC-ESIMS analyses clearly established that *Cgtr*^{-/-} mice are unable to synthesize SM4g and its precursor GalEAG. (Fig. 5). In the normal testis, SM4g and GalEAG become detectable at 12-day-old mice in which spermatocytes develop into the zygotene stage, prior to the pachytene stage. In *Cgtr*^{-/-} male mice, the cycle of spermatogenesis is terminated at the late pachytene stage, which closely follows the phase of rapid SM4g synthesis.

D. Perspective

As described in A-3, the kidney is unique in its large variety of sulfated GSLs which belong to the gala-series, the ganglio-series, the globo-series and isoglobo-series (Table I).

上皮を作り、精子細胞は形態形成を経て精子へと分化する。減数分裂前期の精母細胞は、染色体の構造から表 II のように分類される (27)。また、表 II には、出生後のマウスの精巣において成熟に伴い各分化段階の生殖細胞が出現してくる日齢を示した。ホモ接合体マウス精巣の組織学的観察から、CGT 欠損マウスの精子形成は、後期パキテン期の精母細胞を越えて進行していないことが分かった。また、時期特異的に発現する遺伝子の転写産物の解析の結果からも遺伝子発現のプログラムは、第 1 減数分裂を完了する以前に停止していることが明らかとなった。

野生型とホモ接合体マウス精巣の SM4g および GalEAG を前項 B-3 で述べた TLC-blot-LSIMS および LC-MS により分析定量すると、ホモ接合体マウスでは、SM4g と前駆体である GalEAG が完全に失欠していることが分かる (図 5)。GalEAG と SM4g は精母細胞のレプトテン期からサイゴテン期にかけて合成が始ることから、この時期とホモ接合体マウスにおける精子形成停止の時期がほぼ一致していることが明らかとなった。

D. 将来の展望

前項 A-3 で述べたように腎からは 12 種類の硫酸化糖脂質が同定されている (表 I)。これらの硫酸化スフィンゴ糖脂質は腎尿管細胞に局在していること、NaCl 負荷動物や高浸透圧培地

Fig. 5. Two-dimensional TLC and TLC-blot-LSIMS analysis of a total lipid extract from the testis of wild-type (+/+) and *Cgr*^{-/-} adult mice. An aliquot of the total lipid extract corresponding to 4 mg of testis was separated on a TLC plate with chloroform/methanol/water containing 0.2% CaCl₂ (60:35:8) (first direction) and chloroform/methanol/acetone/acetic acid/water (8:2:4:2:1) (second direction). Glycolipid bands were visualized with orcinol reagent. Identification of the bands was performed by negative-ion liquid secondary ion mass spectrometry (LSIMS) after transferring to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane by TLC blotting. The band on the membrane was excised and placed on a mass spectrometer probe tip with triethanolamine as the matrix (19, 26). In the testis of *Cgr*^{-/-} mice, both SM4g and its precursor GalEAG are completely absent.

These sulfoglycolipids are enriched in renal tubular cells, and expressed at higher levels when renal epithelial cell lines are maintained in hyperosmotic media, suggesting their function as ion barriers to environmental osmolality (2). We applied the ion chromatographic method (B-2) to the quantification of sulfolipids from the kidney of various mammals, the body mass of which differs over 24000-fold, ranging from 25 g (mouse) to 600 kg (bovine). As shown in Fig. 6, there was a significant negative correlation between body mass and the concentration of glycolipid sulfate: the smaller the animal, the higher the concentration, which was characterized by an allometric scaling law (18). These data confirmed our hypothesis that sulfoglycolipids, one of the components of the ion barrier at the cell membrane on the luminal surface of the renal tubules, are more concentrated in the kidneys of smaller animals, which have higher maximum urine concentrating activities per gram of body mass (2).

On the other hand, *Cgr*^{-/-} mice lacking SM4s showed neither morphological defects in the kidney nor abnormality in parameters responsible for renal functions. Although these findings do not completely exclude the possibility that GalCer and/or SM4s may be dispensable for normal kidney function, there are other possibilities that are consistent with their functional importance. In place of SM4s, *Cgr*^{-/-} mice still express more polar sulfoglycolipids, SM3 and SB1a. Moreover, both sulfoglycolipids are expressed at higher levels, indicating that the biosynthetic pathway of SB1a from GlcCer via LacCer and

で培養した腎尿細管細胞では濃度が上昇することなどから、イオンバリアとしての機能が示唆されてきた(2)。著者らは前項B-2で述べたイオンクロマトグラフィーを用いて体重25 gのマウスから600 kgのウシにいたる24000倍の体重差をもつ動物腎の硫酸化糖脂質濃度を測定した。その結果、体重が小さいほど硫酸化糖脂質の濃度が高い、つまり体重と腎における硫酸化糖脂質の濃度との間には負の相関があり、アロメトリー則に当てはまることがわかった(図6)(18)。一方、ガングリオシドにはこのような相関はみとめられなかった。体重が小さいほど尿管における尿濃縮能が高いことが知られており、小さい動物ほど硫酸化糖脂質の濃度が高いことは、硫酸化糖脂質が腎尿細管細胞膜においてイオンバリアとして機能している可能性を裏付ける結果と考えられる(2)。

一方、CGT欠損マウスの腎では主要硫酸化糖脂質であるSM4sを欠失しているにもかかわらず、形態および機能に異常が認められなかった(26)。この事実は腎における硫酸化糖脂質の機能に疑問を投じる結果であることは否定できない。しかしながら、腎は余力の大きい臓器であること、SM3およびSB1a濃度が増加していたことから(両者の増加によりSM4sに由来する硫酸基の約20%が補充できたことになる)、これら極性の

Fig. 6. Relation between the renal concentration of glycolipid-bound sulfate and the body mass of mammals. The total concentration of sulfoglycolipids sulfate in the kidney (nmol/g wet tissue) is plotted against body weight (g). Solid circle, the sum of sulfated GSLs (without $\text{HSO}_3\text{-Chol}$) determined by ion chromatography. Open triangle, data from previous papers; 1, mouse (C57BL/6J, 3 weeks); 2, house musk shrew (*Suncus murinus*); 3, human; 4, horse; 5, bovine (18).

SM3 is up-regulated in the kidneys of *Cgt*^{-/-} mice. These increases in SM3 and SB1a can fill up 20% of SM4s-derived sulfate. Because of the formidable compensatory capacity of the kidney to the osmotic environments, it is possible that the increment in SM3 and SB1a can allow the kidneys to retain their normal function. In CST-deficient mice, in comparison, it is expected that not only SM4s but also SM3 and SB1a are absent in the kidney since their sulfation is catalyzed by CST *in vitro*. Nevertheless, no apparent abnormality was noticed in the kidney (24). While *Cgt*^{-/-} mice lack both SM4s and its precursor GalCer in their kidneys, *Cst*^{-/-} mice markedly accumulated GalCer in their kidneys (unpublished observation), suggesting the possibility that GalCer could partially compensate for the lack of SM4s. It might also be expected that $\text{HSO}_3\text{-Chol}$, which should be synthesized normally in the kidneys of CST-deficient mice, could compensate for the total lack of sulfoglycolipids. Another possibility is that subtle abnormalities, undetectable by routine examinations under a normal environment, might be present in the kidneys of CGT and CST deficient mice. Experimental manipulations, such as osmotic stress by dehydration, may uncover such a borderline functional state of these mice. Although the clinical phenotype of these mice is too severe to tolerate additional stress, kidney or age-specific disruption of *Cgt* and/or *Cst* gene could clarify the function of sulfated GSLs in the kidney.

Sulfate esters of sulfoglycolipids are cleaved by an lysosomal enzyme, arylsulfatase A (ASA). The inherited deficiency of ASA causes lysosomal accumulation of sulfoglycolipids (mainly SM4s) and leads to metachromatic leukodystrophy in

高い硫酸化糖脂質が基本的な腎機能の維持に寄与している可能性が考えられる。一方、CST 欠損マウスでは SM4s のみならず SM3、SB1a も含めた全ての硫酸化糖脂質の欠損が予想されるにもかかわらず、腎の形態および機能には影響がないことが報告されている (24)。CST 欠損マウスでは SM4s 前駆体の GalCer が著明に増加している (未発表)。野生型腎では微量成分である GalCer が、あるいは他の脂質が硫酸化糖脂質の欠損を代償しているのだろうか？ CST 欠損マウスではコレステロール硫酸の合成は正常であることが予想されることから、コレステロール硫酸も一部代償に寄与しているのかもしれない。あるいは、CGT や CST 欠損マウスで見られた代償的増加は常に十分というわけではなく、正常状態では腎機能を維持できるものの、例えば脱水などのストレス下に置かれたときは維持できなくなる可能性も残されている。これら欠損マウスは全身症状が悪化するためにストレス負荷などの実験は事実上困難であるが、腎特異的あるいは時期特異的な条件付きノックアウト技術の導入により、腎における糖脂質の特異的な機能を明らかにすることができるかもしれない。

硫酸化糖脂質の硫酸基は特異的なリソソーム酵素であるアシルスルファターゼ A (ASA) により脱離される。ASA の遺伝的欠損は硫酸化糖脂質、特に SM4s のリソソームへの蓄積をも

humans. The sulfoglycolipid storage was examined in the kidneys of double-knockout mice deficient for ASA and CGT, which are incapable of degrading any sulfoglycolipids (*Asa*^{-/-}) and synthesizing the major sulfoglycolipid SM4s (*Cgt*^{-/-}). The results suggested that long thin limbs and distal convoluted tubules, at least in murine kidney, are the main sites for turnover of SM3 and SB1a (15). The *Asa*^{-/-}/*Cgt*^{-/-} mice, which could synthesize SM3 and SB1a but not SM4s, may be a useful model to clarify the specific function of these polar sulfoglycolipids in the kidney.

L-selectin, one of the lymphocyte homing receptors, has been known to interact with diverse sulfated sugar chains (28), and its ligand in high endothelial cells in lymph nodes was characterized as sialyl 6-sulfoLe^x (29). Experimental unilateral ureteric obstruction, which is a model for human renal diseases, leads to interstitial inflammation, interstitial fibrosis and tubular atrophy. Central to these events is the extensive macrophage infiltration into the kidney interstitium, which eventually results in acute tubular injury (30, 31). It was reported that SM4s is a ligand for L-selectin in the kidney and that the interaction between L-selectin and SM4s plays an important role in macrophage infiltration into the interstitium. These results suggested that sulfated GSLs may play a critical role in the inflammation process in the kidney, and a therapeutic strategy based on blocking L-selectin-ligand interactions might be an attractive approach to protect kidneys from obstructive nephropathy (30).

Our observations in the testis of CGT-deficient mice provide the first experimental evidence that SM4g and/or GalEAG are indeed essential for normal spermatogenesis (25). In the testis of CST-deficient mice, spermatogenesis was also blocked before the meiotic division (24), which was somewhat later than the arrested stage in CGT-deficient mice, suggesting that GalEAG and SM4g are successively involved in the genetic program of spermatogenesis in the same order as their biosynthesis. What is the role of SM4s and/or GalEAG in the process of normal spermatogenesis? Several lines of evidence suggest that the coordination of germ cell differentiation may be mediated by surface interactions between germ cells and Sertoli cells. The results of CGT and CST-deficient mice supports the general idea that cell surface glycolipids are functionally important in germ cell differentiation and/or interactions with other cell types (32). It is also speculated that cellular concentration of certain lipids may be a factor in initiating apoptosis of germ cells.

In the traditional fluid mosaic model of the cell membrane, the carbohydrate chains of glycolipids may be obscured by those of glycoproteins and become inaccessible to potential ligands (32, 33). Recently, many lines of evidence have shown that GSLs are clustered and organized to form GSL patches, which are separate from clusters of glycoproteins. These GSL-enriched domains (GEM) (32-35) organized with various signal transducer molecules such as cSrc, Src family kinases, and

たらし、ヒトにおける異染性ロイコジストロフィー (metachromatic leukodystrophy) の原因となる。SM4s の合成に関与する CGT および分解酵素である ASA を同時に欠損したダブルノックアウトマウス尿細管の塩基性色素を用いた組織染色の結果から、SM4s と SM3/SB1a の尿細管における局在が異なることが示唆された (15)。SM4s を欠損し SM3/SB1a を発現していることが予想されるこのダブルノックアウトマウスの解析により、SM3 や SB1a の腎尿細管における特異的機能が明らかにできるかもしれない。

硫酸化糖鎖はリンパ球のホーミングを媒介する L-セレクトインとよく反応することが知られており (28)、リンパ節血管内皮細胞ではシアリル 6-スルホ Le^x が糖鎖リガンドであることが報告されている (29)。腎炎などの腎障害の原因となる尿管閉塞では、腎間質の炎症および繊維化、尿細管の萎縮や損傷が起こることが知られている。片側の尿管を結紮したモデルマウスを用いた研究から、腎間質へのマクロファージの浸潤が尿細管損傷の原因であることが報告されている (30, 31)。マクロファージの浸潤には L-セレクトインが関与し、腎尿細管における L-セレクトインのリガンドは SM4s であることが報告されていることから、硫酸化糖脂質は腎における免疫や炎症反応の調節、腎炎の発症にも関与していることが示唆されている (30)。L-セレクトインと硫酸化糖脂質の結合を阻害することが、治療法開発の糸口になる可能性も考えられる。

CGT 欠損マウスの精巣における解析結果は、SM4g および GalEAG がともに精子形成において減数分裂の進行に関わっているという新しい概念を示した (25)。CST 欠損マウス精巣では CGT 欠損マウスに比べて精子形成がわずかに進行しており (24)、この時間のずれは、CGT 欠損では GalEAG の前で、CST 欠損では SM4g の前で生合成が停止していることと一致している (図 2)。CST 欠損マウス精巣では GalEAG が著明に蓄積しているにもかかわらず精子形成が停止してしまうということは、少なくとも GalEAG だけでは精子形成過程を進行することができないことを示していると思われる。それでは、GalEAG あるいは SM4g が欠損するとなぜ精子形成が停止するのだろうか？糖脂質が糖鎖間相互作用を介して細胞間認識あるいは接着分子として機能していることが徐々に明らかになってきている (32)。欠損マウスにおける精母細胞分化の停止が、セルトリ細胞と精母細胞との細胞間相互作用に依存しているのか、またアポトーシスの機構あるいは減数分裂機構そのものに関与しているのか等については、今後の解析を待たなければならない。

生体膜の古典的流動モザイクモデルでは糖脂質糖鎖は糖タンパク質糖鎖に隠れてしまい、サイズも大きく分枝が存在する糖タンパク質糖鎖の方が情報認識には圧倒的に有利であると考えられるのは当然のことと思われる。しかし近年では、糖脂質と糖タンパク質が細胞膜上で別々に存在しているモデルが提示され、糖脂質は集合構造を形成することで高い糖鎖認識性を発現すると考えられるようになった (32, 33)。このような糖脂質が集合した膜領域には glycolipid enriched microdomain (GEM) (32)、ラフト (34)、カベオラ (35)、などさまざまな名前がつけられ、

G-proteins, are involved in GSL-dependent cell adhesion coupled with signal transduction, and were termed glycosignaling domain (GSD) (32). The capability of glycolipids to form clusters may be influenced by the structure of the backbone lipid. Because Cer-to-Cer interaction is stronger than glycerol-to-glycerol interaction, GSLs could be clustered easier than GGLs (32, 36). Why does the testis express SM4g which is a GGL, rather than SM4s which is a GSL, although they have exactly the same carbohydrate structure? It has been a long standing question. Now it is speculated that "GGLs" (not "GSLs") might be required for the formation of functional domains in germ cell membranes which can mediate signal transduction to precede normal spermatogenesis. Changes in ceramide species of GlcCer and sphingomyelin in CGT-deficient mice may also be related to the formation of these microdomains.

The sulfate half-ester has a pKa < 1 ensuring that sulfoglycolipids carry a formal negative charge on the membrane under nearly all of the biological conditions. How do sulfoglycolipids control the function of kidney and testis? The precise molecular mechanism remains to be investigated.

Acknowledgements

We thank Prof. Kunihiko Suzuki (Neuroscience Center, University of North Carolina), Dr. Hirokazu Fujimoto (Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences), Dr. Toshiyuki Hikita (Teikyo University School of Medicine), Prof. Toshio Imanari, Dr. Toshihiko Toida, Dr. Hidenao Toyoda (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University), and other colleagues for their collaboration.

References

1. Hakomori, S. and Ishizuka, I. (2002) In: Encyclopedia of Life Sciences (Robertson, S., ed.), Macmillan Reference Limited, London
2. Ishizuka, I. (1997) *Prog. Lipid Res.* **36**, 245-319
3. Hikita, T., Tadano-Aritomi, K., Iida-Tanaka, N., Levery, S.B., Ishizuka, I. and Hakomori, S. (2002) *Neurochem. Res.* **27**, 575-581
4. Tadano, K. and Ishizuka, I. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 1482-1490
5. Nagai, K., Roberts, D.D., Toida, T., Matsumoto, H., Kushi, Y., Handa, S. and Ishizuka, I. (1989) *J. Biochem. (Tokyo)* **106**, 878-886
6. Nagai, K., Roberts, D.D., Toida, T., Matsumoto, H., Kushi, Y., Handa, S. and Ishizuka, I. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 16229-16237
7. Iida, N., Toida, T., Kushi, Y., Handa, S., Fredman, P., Svennerholm, L. and Ishizuka, I. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 5974-5980
8. Tadano-Aritomi, K., Kasama, T., Handa, S. and Ishizuka, I. (1992) *Eur. J. Biochem.* **209**, 305-313
9. Tadano-Aritomi, K., Okuda, M., Ishizuka, I., Kubo, H. and Ireland, P. (1994) *Carbohydr. Res.*, **265**, 49-59
10. Tadano-Aritomi, K., Kubo, H., Ireland, P., Kasama, T., Handa, S. and Ishizuka, I. (1996) *Glycoconj. J.* **13**, 285-293
11. Tadano, K. and Ishizuka, I. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 9294-9299
12. Tadano, K., Ishizuka, I., Matsuo, M. and Matsumoto, S. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 13413-13420
13. Tadano-Aritomi, K., Kubo, H., Ireland, P., Hikita, T. and Ishizuka, I. (1998) *Glycobiology* **8**, 341-350
14. Trick, D., Decker, J., Groene, H.J., Schulze, M. and Wiegandt, H. (1999) *Histochem. Cell Biol.* **111**, 143-151
15. Lullmann-Rauch, R., Matzner, U., Franken, S., Hartmann, D. and Gieselmann, V. *Histochem. Cell Biol.* **116**, 161-169
16. Kean, E.L. (1968) *J. Lipid Res.* **9**, 319-327
17. Tadano-Aritomi, K. and Ishizuka, I. (1983) *J. Lipid Res.* **24**, 1368-1375
18. Tadano-Aritomi, K., Hikita, T., Suzuki, A., Toyoda, H., Toida, T., Imanari, T. and Ishizuka, I. (2001) *J. Lipid Res.* **42**, 1604-1608
19. Tadano-Aritomi, K., Kubo, H., Ireland, P., Okuda, M., Kasama, T., Handa, S. and Ishizuka, I. (1995) *Carbohydr. Res.* **273**, 41-52
20. Taki, T. and Ishikawa, D. (1997) *Anal. Biochem.* **251**, 135-143
21. Coetzee, T., Fujita, N., Dupree, J., Shi, R., Blight, A., Suzuki, K., Suzuki, K. and Popko, B. (1996) *Cell* **86**, 209-219
22. Bosio, A., Binczek, E., Stoffel, W. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13280-13285
23. Honke, K., Tsuda, M., Hirahara, Y., Ishii, A., Makita, A. and Wada, Y. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 4864-4868
24. Honke, K., Hirahara, Y., Dupree, J., Suzuki, K., Popko, B., Fukushima, K., Fukushima, J., Nagasawa, T., Yoshida, N., Wada, Y. and Taniguchi, N. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 4227-4232
25. Fujimoto, H., Tadano-Aritomi, K., Tokumasu, A., Ito, K., Hikita, T., Suzuki, K. and Ishizuka, I. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 22623-22626

情報伝達分子の受容体や受容体型タンパク質リン酸化酵素などが局在し、細胞外から細胞内への情報伝達に関与していることから、glycolipid signaling domain (GSD)とも呼ばれている(32)。集合構造の形成には脂質の疎水基部分が大きく影響していることが報告され、セラミド-セラミド相互作用の方がグリセロール-グリセロール相互作用よりも強いいため、スフィンゴ脂質はグリセロ脂質より集合構造を形成しやすいと考えられている(32, 36)。哺乳類の組織のなかで、なぜ精巣だけはスフィンゴ糖脂質ではなく、グリセロ糖脂質が高濃度に存在するのか、糖鎖部分の構造が全く同じであるにもかかわらず、精巣の硫酸化糖脂質はなぜ SM4s ではなく SM4g なのかは、筆者にとって長年の謎であった。しかしながら、精子形成過程を正常に進行させるための情報伝達を行う場としての集合構造の形成にグリセロ脂質であることが重要な意味を持つとすれば、その謎は少し解けたことになるかもしれない。このように考えると CGT 欠損マウスの GlcCer やスフィンゴミエリンに検出されたセラミド分子種の変化も集合体形成の調節に関与しているのかもしれない。

硫酸エステルは 1 以下の pKa をもち、あらゆる条件下で負電荷をもつと考えられる。細胞膜上でこのような強固な負電荷をもつ硫酸化糖脂質が、腎や精巣の機能性コントロールにどのように関与しているのか、今後の研究に興味をもたれる。

謝 辞

この研究は多くの研究者との共同研究によって行われた。特に、鈴木邦彦教授(ノースカロライナ大学医学部)、藤本弘一博士(三菱化学生命科学研究所)、疋田敏之博士(帝京大学医学部)、および、千葉大学薬学部の今成登志男教授、戸井田敏彦博士、豊田英尚博士に深謝いたします。

26. Tadano-Aritomi, K., Hikita, T., Fujimoto, H., Suzuki, K., Motegi, K. and Ishizuka, I. (2000) *J. Lipid Res.* **41**, 1237–1243
27. Bellve, A.R., Cavicchia, J.C., Millette, C.F., O'Brien, D.A., Bhatnagar, Y.M. and Dym, M. (1977) *J. Cell Biol.* **74**, 68–85
28. Suzuki, Y., Toda, Y., Tamatani, T., Watanabe, T., Suzuki, T., Nakao, T., Murase, K., Kiso, M., Hasegawa, A., Tadano-Aritomi, K., Ishizuka, I. and Miyasaka, M. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 426–434
29. Mitsuoka, C., Sawada-Kasugai, M., Ando-Furui, K., Izawa, M., Nakanishi, H., Nakamura, S., Ishida, H., Kiso, M. and Kannagi, R. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 11225–11233
30. Shikata, K., Suzuki, Y., Wada, J., Hirata, K., Matsuda, M., Kawashima, H., Suzuki, T., Iizuka, M., Makino, H. and Miyasaka, M. (1999) *J. Pathol.* **188**, 93–99
31. Lange-Sperandio, B., Cachat, F., Thornhill, B.A. and Chevalier, R.L. (2002) *Kidney Int.* **61**, 516–524
32. Hakomori, S. (2000) *Glycoconj. J.* **17**, 627–647
33. Kasahara, K., Watanabe, Y., Yamamoto, T. and Sanai, Y. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 29947–29953
34. Simons, K. and Ikonen, E. (1997) *Nature* **387**, 569–572
35. Anderson, R.G.W. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 199–225
36. Sato, T., Serizawa, T., Ohtake, F., Nakamura, M., Terabayashi, T., Kawanishi, Y. and Okahata, Y. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1380**, 82–92

Received on October 30, 2002, accepted on November 29, 2002

Profile of the Authors

Keiko Tadano-Aritomi graduated from the Faculty of Pharmaceutical Sciences of Chiba University and obtained her Ph.D. from Chiba University in 1995. During the comprehensive analyses of acidic glycolipids since 1982, she has isolated and characterized several new sulfoglycolipids from the kidney. Her recent research focuses on the mass spectrometric analyses of sulfoglycolipids using the mice deficient in the glycolipid metabolism, aiming to clarify the function of sulfoglycolipids in renal tubular cells and male germ cells.

★★★★★★★

Ineo Ishizuka graduated from the Hokkaido University School of Medicine, and finished his internship at the Red Cross Central Hospital (M.D.) in 1964. Later he completed the Dr. Med. Sci. course in the laboratory of Dr. Tamio Yamakawa at the University of Tokyo Medical School. He has been engaged in the analysis of microbial branched-chain fatty acids, phosphoglycoglycerolipids of gram-positive bacteria, c-series gangliosides of teleost fish brain, seminolipid of mammalian testis, Gs protein-coupled hormone receptors of renal tubular cell lines, and enzymatic and genetic studies on the sulfoglycolipid metabolism in the kidney and male germ cells.