Structure and Functions of Glycosignaling Domain

グリコシグナルドメインの構造と機能

Iwabuchi, Kazuhisa

Institute for Environmental and Gender-specific Medicine, Juntendo University Graduate School of Medicine,
Tomiooka 2-1-1, Urayasu, Chiba 279-0021, Japan
FAX: 81-47-353-3178, E-mail: iwabuchi@med.juntendo.ac.jp**Key Words:** *glycosphingolipid, microdomain, Src family kinase, glycosignaling domain, adhesion***Abstract**

Glycosphingolipids are membrane components consisting of hydrophobic ceramide and hydrophilic sugar moieties. They cluster with sphingomyelin and cholesterol in cell membrane to form glycosphingolipid-enriched microdomains. Biochemical analyses have demonstrated that glycosphingolipid-enriched microdomains contain several kinds of transducer molecules, especially membrane-anchored signal transduction molecules such as Src family kinases. Although it has been speculated that glycosphingolipids are closely associated with cell differentiation, proliferation and functions such as adhesion, there is quite a lot of evidence that glycosphingolipids by themselves directly mediate signal transductions, which lead to cell functions. Glycosignaling domains (GSDs) have been identified as glycosphingolipid-mediated signal transduction units in mouse melanoma B 16 cells, mouse neuroblastoma Neuro2a cells and human neutrophils. In those cells, certain kinds of glycosphingolipids, *e.g.* LacCer for neutrophils, are highly expressed on cell surfaces, and associated with Src family kinases in GSD. Glycosphingolipids in GSD specifically recognize carbohydrate epitopes of ligands and mediate cell functions such as adhesion and superoxide generation. Unlike other types of microdomains, GSD-mediated cell functions and associated signaling are not reduced or abolished in the presence of either filpin or methyl- β -cyclodextrin, which are cholesterol-binding reagents known in general to abolish microdomain structures and their functions. The remaining problem to be solved is how glycosphingolipids transmit signal transduction molecules in GSD.

要 約

スフィンゴ糖脂質は疎水性のセラミドと親水性の糖鎖からなる膜成分である。スフィンゴ糖脂質はスフィンゴミエリンやコレステロールとともに会合して細胞膜上でマイクロドメインを形成している。また、生化学的な分析から、スフィンゴ糖脂質に富んだマイクロドメインには様々な細胞内情報伝達分子、特に Src family kinase のような細胞膜に結合する情報伝達分子が含まれていることが明らかとなった。スフィンゴ糖脂質は細胞分化や増殖、細胞接着などの細胞機能と密接に関係していると推測されているが、グライコスフィンゴ糖脂質自身が、細胞機能発現をもたらすような情報伝達を直接仲介するという証拠はほとんど得られていない。グリコシグナルドメイン (GSD) はマウスメラノーマ B16 細胞、マウス神経芽細胞 Neuro2a およびヒト好中球においてスフィンゴ糖脂質を介した情報伝達ユニットとして同定されている。これらの細胞では、たとえば好中球には LacCer といった特定のスフィンゴ糖脂質が細胞膜上にたくさん発現されており、Src family kinase と GSD で会合している。GSD においてスフィンゴ糖脂質はリガンドの糖鎖エピソードを特異的に認識し、細胞接着や活性酸素産生などの細胞機能を仲介する。他の種類のマイクロドメインとは異なり、GSD が仲介する細胞機能とそれに関連する情報伝達は、マイクロドメインの構造と機能を壊すことが一般には知られている filpin や methyl- β -cyclodextrin によって阻害されたり、障害を受けることはない。今後解決すべき課題は如何にしてスフィンゴ糖脂質が GSD において細胞内情報伝達分子に情報を伝えているかである。

A. Introduction

There are several kinds of leukocytes, which play specialized functions in each cell for host defense. Leukocytes are always produced from anaplastic haematopoietic stem cells. Along with cell differentiation, leukocytes express several kinds of molecules on plasma membranes, which are named as cluster differentiation (CD). The CD molecules expressed by each leukocyte act as more than mere differentiation makers, and most

A. はじめに

白血球には様々な種類の細胞があり、生体防御においてそれぞれが独自の機能を果たしている。各白血球は常に未分化な細胞から分化成熟して作り続けられており、この過程で白血球は cluster of differentiation (CD) と呼ばれる分子を細胞膜表面に発現する。各白血球は CD 分子を単なる分化マーカーとして発現しているわけではなく、多くの CD 分子は各細胞において分化段階に応じて重要な機能を発揮していると考えられている。

of them provide important functions along with differentiation phases. However, the functions of those molecules are not well understood. Based on the sugar chain structure, more than 400 species of glycosphingolipids have been identified, although its abundance is low in membrane lipids (1). Glycosphingolipids have attracted considerable interest because lineage-related and differentiation-dependent expressions of these molecules are well documented for leukocytes. Therefore, those molecules have been believed to perform significant functions in leukocytes. Although glycosphingolipids have been used as differentiation markers, the glycosphingolipid-mediated functions in leukocytes have not been well identified.

LacCer appears on plasma membrane of circulating mature neutrophils (2). It is well known that several kinds of pathogenic microorganisms can bind to LacCer (3-5). However, the roles of LacCer in neutrophil functions remain obscure. Recently, it has been demonstrated that glycosphingolipids cluster to form microdomains coupled with transducer molecules on plasma membrane. Actually, we found that LacCer forms glycosignaling domains (GSD) coupled with Src family protein tyrosine kinase (Src-PTK) Lyn and functions as an adhesion molecule. This mini review introduces how glycosignaling domains, which are the glycosphingolipid-mediated signal transduction unit, recognize the ligands and signal into cells.

B. The Molecular Mechanisms of Binding of Glycosphingolipids with Their Ligands

After the discovery of glycosphingolipids, the physiological functions of glycosphingolipids have been analyzed. Because glycosphingolipids express themselves on cell surface, it has been speculated that glycosphingolipids function as receptors. Although several molecules have been reported as ligands for glycosphingolipids, many of them could not be elucidated. Among those candidates, microorganism-derived molecules such as cholera toxin have been successfully identified as ligands for glycosphingolipids (1). For example, the pentameric B-subunit of the cholera toxin can bind to GM1-ganglioside receptors, leading to toxin entry into mammalian cells (6). Several kinds of pathogenic microorganisms including viruses can directly bind glycosphingolipids (3,7-10). However, pathogenic microbes utilize glycosphingolipids as targets for infecting. There is no clear evidence that glycosphingolipids except for LacCer mediate cell functions through the binding with microorganisms.

Since the specific sugar chains like Le^x are expressed on cell membrane in the differentiation stage which relates to cell adhesion, the glycosphingolipids having Le^x may be involved in cell adhesion. The expression pattern of the glycosphingolipids on cell surface changes with the canceration. Thus, the glycosphingolipids, in which the expression level changes with the canceration, may cause metastasis (11). Mammalian cells recognize the expression changing of glycosphingolipids through

しかしながら、それらの分子には未だに機能が明らかではない分子も少なくない。スフィンゴ糖脂質は細胞膜を構成する糖脂質であり、細胞膜脂質としての割合は少ないが、糖鎖構造の違いによって 400 種類以上がこれまでに同定されている (1)。白血球は細胞膜表面に分化段階に応じて様々なスフィンゴ糖脂質を発現しているだけでなく、白血球ごとに発現しているスフィンゴ糖脂質の種類が異なっている。したがって、スフィンゴ糖脂質が各白血球において重要な機能を果たしていると考えられている。しかしながら、これまでのところスフィンゴ糖脂質は分化抗原マーカーとして利用されることはあっても自らを介して各細胞が具体的にどのような機能を果たしているかはほとんど分かっていない。

ヒトの好中球は成熟して血中に循環するようになると、中性のスフィンゴ糖脂質である LacCer を大量に発現するようになる (2)。様々な病原微生物が LacCer に結合することが報告されているが (3-5)、LacCer の好中球機能における役割についてはこれまで分かっていなかった。近年、スフィンゴ糖脂質が様々な細胞内情報伝達分子と会合し、マイクロドメインを形成していることが明らかとなっている。実際、我々は好中球においても LacCer が Src family protein tyrosine kinase (Src-PTK) である Lyn と会合したグリコシグナルドメイン (glycosignaling domain, GSD) と呼ばれるマイクロドメインを形成し、LacCer 自身が接着分子として機能していることを見だしている。本稿では、スフィンゴ糖脂質を介する情報伝達ユニットであるグリコシグナルドメインを中心に、スフィンゴ糖脂質がどのようにしてリガンド認識するかについて、さらにどのように細胞内へと情報を伝えるかについて解説する。

B. スフィンゴ糖脂質はどのような分子とどのように結合するか？

スフィンゴ糖脂質が発見されて以来、その機能について様々な解析がなされてきた。スフィンゴ糖脂質は主に細胞膜上に局在することから、スフィンゴ糖脂質が受容体の働きを持っている可能性が検討されている。これまでに様々な分子がスフィンゴ糖脂質を受容体とする報告がなされたが、その多くは明確な証拠を示すことができていない。その中にあって、菌体由来の分子がスフィンゴ糖脂質結合分子となることが数多く報告されている。もっともよく知られているスフィンゴ糖脂質に対する結合分子は、コレラ毒素のような菌体由来の毒素である (1)。例えばコレラ毒素の B サブユニットは 5 量体を形成することで GM1 のクラスターと強固に結合する (6)。また、ウイルスを含む様々な病原微生物がスフィンゴ糖脂質と結合することも報告されている (3,7-10)。しかしながらこれらの結合は病原微生物が感染するためのターゲットとしてスフィンゴ糖脂質を利用しているのであって、スフィンゴ糖脂質が菌体膜由来の分子に結合することで何らかの細胞機能を発現しているという明確な証拠は LacCer 以外得られていない。

細胞接着の関わる細胞分化段階において Le^x のような特定の糖鎖が大量に細胞膜上に発現されることから、Le^x を持つようなスフィンゴ糖脂質が細胞接着に関わるのではないかと考えられている。また、ガン化に伴って細胞膜表面のスフィンゴ糖脂

lectins, which recognize certain sugar moieties of glycosphingolipids, and through carbohydrate to carbohydrate interactions between glycosphingolipids and their binders. Selectins and siglecs have been identified as cell adhesion molecules which recognize sugar chains of glycosphingolipids (12). However, few studies have examined how glycosphingolipids affect target cells through binding those lectins. In the case of carbohydrate to carbohydrate interactions, GM3-mediated cell adhesion was well examined (13). It has been demonstrated that cells are activated through GM3 (14,15). For example, the metastatic potential of B16 cells has been demonstrated to be correlated with GM3 levels on cell surfaces of those cells, suggesting the possible development of metastasis through high expression of GM3 (16). B16 cells adhere to Gg3- with strong, LacCer-, Gb4- with weak, but not to other glycosphingolipid-coated plates (17). The same binding specificities of the carbohydrate to carbohydrate interactions through GM3 were observed not only in the liposome binding experiments but also in the quantitative experiments using surface plasmon resonance techniques (18). This type of binding is followed by the trans-interactions between carbohydrate motifs of glycosphingolipids. The binding affinity between GM3 and Gg3 is quite high, and its affinity constant is higher than those of lectins with carbohydrate epitopes.

In general, not very much attention has been paid to cell recognition through carbohydrate to carbohydrate interactions. However, newly developed analytic methods have further demonstrated the height of the specificity and intensity of the binding power between carbohydrate to carbohydrate interactions (19). Live sponge cells can recognize their own kind and form big homogeneous aggregates through the trans-carbohydrate to carbohydrate interactions based on the specific carbohydrate moiety of proteoglycans on cell surfaces. Atomic force microscopy measurements revealed equally strong adhesion forces between glycan molecules as between proteins in antibody-antigen interactions. Interestingly, Ca^{2+} ions are crucial in carbohydrate to carbohydrate interactions both of proteoglycans and glycosphingolipids (19,20). On the molecular level, Ca^{2+} ions probably provide coordinating forces, though ionic forces cannot be excluded (21). These Ca^{2+} interactions are thought to stabilize conformations and can thereby lead to hydrogen bonds and hydrophobic interactions elsewhere in the glycans and glycosphingolipids.

C. Glycosphingolipid-Enriched Microdomains and Glycosignaling Domains

Glycosphingolipids consist of hydrophobic ceramide and hydrophilic sugar chains. Glycosphingolipids have the high melting-point property, and cluster to form microdomains based on *cis*-interactions on plasma membrane (22). Glycosphingolipid-enriched microdomains contain cholesterol, sphingomyelin and

質の発現パターンが変化することが知られており、ガン化に伴って発現量が変化するスフィンゴ糖脂質がガン細胞の転移に関わるともいわれている(11)。ほ乳類においてこれらのスフィンゴ糖脂質の変化を認識する機構としては、糖鎖の特定のモチーフを認識するレクチンによる結合と、糖鎖-糖鎖相互作用によるものがある。レクチンを介する細胞接着としては、selectin や siglec 分子のレクチン構造を介するものが同定されている(12)。しかしながら、レクチンに結合することでスフィンゴ糖脂質を介して標的細胞にどのようなことが起こるかについてはほとんど調べられていない。一方、糖鎖-糖鎖相互作用に基づく細胞接着としては GM3 を介した接着がよく研究されている(13)。GM3 を介して細胞は活性化されることが示されている(14,15)。例えば、B16 メラノーマ細胞はガン化に伴って GM3 の発現パターンを変化させ、GM3 を細胞膜上に大量に発現することで転移能を獲得する可能性が示されている(16)。B16 細胞は GM3 を介して Gg3 と非常に強く、LacCer と強く、また Gb4 と弱く結合するが、他のスフィンゴ糖脂質とは結合しない(17)。この結合特異性は GM3 を含みリポソームを用いた実験結果と同じであるだけでなく、表面プラズモン共鳴法を用いて物理学的にも実証されている(18)。GM3 を介したこの結合は糖脂質が細胞膜上で集合して作り出した糖鎖モチーフが *trans* に相互作用することで行われると考えられている。GM3 と Gg3 の結合親和性は大変高く、 K_d 値は糖鎖を認識するレクチンと同等である。

一般に、これまで糖鎖-糖鎖相互作用に基づく細胞認識についてはあまり注意が払われてこなかったが、新たな解析技術によってその特異性の高さと結合力の強さが改めて指摘されている(19)。例えば、海綿のプロテオグリカンも特異的な糖鎖構造を認識して *trans* の糖鎖-糖鎖相互作用でグループごとに細胞集団を形成する。原子間力顕微鏡で測定すると、このプロテオグリカン鎖間の結合力は抗原と抗体の結合力と同等以上の強さがあり、その特異性も細胞レベルでの実験結果と一致している。興味深いことに、スフィンゴ糖脂質やプロテオグリカンにおける *trans* 型の糖鎖-糖鎖相互作用は Ca^{2+} 依存性であり、 Ca^{2+} が存在しなければこれらの相互作用に基づく接着反応は認められない(19,20)。分子レベルでは、 Ca^{2+} イオンはイオン力を除外できないとしても、恐らく配位結合力をもたらし得るであろう(21)。そのため、 Ca^{2+} が糖鎖の立体構造を安定化するためにスフィンゴ糖脂質やプロテオグリカンの糖鎖間で水素結合や疎水結合をつくりだすことができるようになるのではないかと考えられている。

C. スフィンゴ糖脂質のマイクロドメインとグリコシグナルドメイン

スフィンゴ糖脂質は疎水性のセラミドと親水性の糖鎖からなる分子であり、融点が高く *cis* 相互作用に基づいて互いに会合し、細胞膜上でマイクロドメインと呼ばれるクラスターを形成している(22)。スフィンゴ糖脂質に富むマイクロドメインは

saturated fatty acid chain-contained phospholipids. Microdomains are insoluble in a detergent Triton X-100 at 4°C, and float with associated proteins to a low density during gradient ultracentrifugation (23). Because these kinds of biochemical approaches demonstrated that microdomains contain several kinds of adhesion molecules and signal transduction molecules, microdomains are thought to mediate cell functions, and named as lipid rafts (24). However, there is no report of cell function through the glycosphingolipids in the microdomain except for GSD. Glycosphingolipids are mainly thought to modulate the functions of adhesion molecules and receptors in microdomains (Fig. 1) (12).

To metastasize, circulating cancer cells adhere to vessel wall in target tissue, and extravasate into tissues. Since B16 cells

コレステロールやスフィンゴミエリンとともに飽和のリン脂質を多く含んでおり、4°Cで中性の界面活性剤である Triton X-100 で可溶化されず、超遠心によって浮上する画分として分離される (23)。このような生化学的方法で回収されるマイクロドメインには様々な受容体や接着分子および細胞内情報伝達分子が含まれることから、マイクロドメインを介して様々な細胞機能が発現されると考えられ、そのような情報伝達ユニットをリピッドラフトとも呼んでいる (24)。しかしながら、マイクロドメイン中のスフィンゴ糖脂質を介した細胞機能の報告はGSD以外ではなく、スフィンゴ糖脂質はもっぱらマイクロドメインに会合している他の受容体や接着分子の機能を調節する分子として働いていると考えられている (図 1) (12)。

ガン細胞が転移するためには、ガン細胞は標的組織の血管

Fig.1. Schematic models of glycosphingolipid-related signal transduction units. Glycosignaling domains. Glycosphingolipids are clustered with sphingomyelin and cholesterol inserted via ceramide into the outer leaflet of the membrane. GSL clusters organized with signal transducers, which are located at the inner leaflet of plasma membrane. (B) Growth hormone receptors. When EGF-R is located in a GSL-rich domain, signaling through growth factor (EGF) to activate tyrosine phosphorylation is blocked by the association of EGF-R with GM3. Binding of GM3 to EGF-R may result from the interaction of GM3 with carbohydrate N-linked to EGF-R, as suggested by a previous study(48,49). (C) Integrin receptors. N-glycosylation of integrin receptors plays an important role in connection and stabilization of integrin complex(50). The complex of GM3 with or without tetraspanin (proteolipid) molecules regulates integrin receptor functions(51,52).

A

B

Fig. 2. Molecular composition of GM3-enriched glycosignaling domain. (A) GM3 was associated with c-Src, Rho-A and FAK. The low density, detergent-insoluble membrane fraction (DIM, microdomain fraction) was co-immunoprecipitated with anti-GM3 antibody. The bound materials were Western blotted using anti-cSrc (a), anti-Rho-A (b), or anti-FAK (c) antibodies. IP immunoprecipitates with anti-GM3 antibody; C, with control mouse antibody. (B) Lipid composition of DIM and GM3-enriched GSD immunoseparated from DIM. Lipid composition of DIM isolated from B16 cells (open bars), composition of GM3- and c-Src-containing fraction (corresponding to GSD) immunoseparated from DIM by anti-GM3 antibody (closed bars). Total lipids of reconstituted membrane were extracted, and the composition was determined. Each bar shows the mean $\pm$ S.D. of 3 experiments. PS, phosphatidylserine; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; Chol, cholesterol.

adhere to endothelial cells, there is a possibility that B16 cells receive extracellular signaling and activate through GM3, leading to protease release and migration. Actually, we found that the GM3-enriched microdomain, which were immunoprecipitated from detergent insoluble membrane fraction of B16 cells, contain several signal transduction molecules such as cSrc (Fig. 2A) (14). These GM3-associated transducer molecules are activated through GM3. These data indicate that the binding of GM3 with ligands such as Gg3 causes activation of GM3-associated signal transduction molecules. Thus, the glycosphingolipid-enriched microdomain, involved in cell adhesion and capable of sending signals through glycosphingolipids associated with membrane-bound signal transduction molecules, is termed the “glycosphingolipid signaling domain” or “glycosignaling domain” (GSD) (Fig. 1) (25). In contrast, lipids of GM3-enriched GSD in B16 cells are mainly composed of GM3, sphingomyelin, and cholesterol (Fig. 2B). Phospholipids are minor compo-

壁に先ず接着した後、血管外へと遊走する必要がある。マウスメラノーマ B16 細胞は GM3 を介して流血中で血管壁に接着できることから、B16 細胞は GM3 を介して細胞内に情報を伝達し細胞を活性化し、プロテアーゼの放出や遊走を引き起こしている可能性がある。実際、我々は B16 細胞からマイクロドメインを調製し、そこから GM3 を主な構成成分とするドメインを分離すると、cSrc などの様々な細胞内情報伝達分子が GM3 と会合していることを見いだした (図 2A) (14)。これらの情報伝達分子は GM3 を介して活性化されることから、B16 細胞は GM3 に Gg3 などのリガンドが結合することでマイクロドメインとして会合している細胞内情報伝達分子を活性化し、細胞内に情報が伝達される。そこで、スフィンゴ糖脂質が Src-PTK を中心とした膜結合型の細胞内情報伝達分子と会合したマイクロドメインで、スフィンゴ糖脂質を介して細胞内に情報を伝達するドメインを GSD (glycosignaling domain, glycosphingolipid signaling domain) と名付けた (図 1) (25)。Triton X-100 不溶性画分として得られる B16 細胞のマイクロドメインにおける GM3 は脂質全

Fig. 3. Cholesterol-depleting reagents do not inhibit GSD-mediated signal transduction. (A) Effects of filipin on FAK activity induced by Gg3. B16 cells were pretreated with 0.5 μ g/ml filipin at 37 °C for 30 min and then added to a Gg3-coated dish (gray bar). Tyrosine phosphorylation of FAK was analyzed by immunoprecipitation with anti-FAK rabbit IgG followed by Western blotting with anti-phosphotyrosine mAb PY20 and quantified. (B) Effects of filipin, cyclodextrin and nystatin on anti-LacCer antibody-induced Lyn activation. DIM prepared from neutrophil plasma membrane was diluted and incubated without or with 0.5 μ g/ml filipin (filipin), 10 mM methyl- β -cyclodextrin (β -Cyclodextrin) or 60 μ g/ mL nystatin (Nystatin) for 30 min at 25°C. After incubation, the reaction mixtures were ultracentrifuged, and the pellets were resuspended in 5 mL of the kinase buffer, followed by incubation in normal IgM- or anti-LacCer IgM T5A7-coated dishes for 15 h at 4°C. Then, an aliquot of 50 μ Ci γ^{32} P-ATP was added to each dish, and the mixture was further incubated at 37°C for 5 min. In some experiments, anti-LacCer-induced Lyn activation was assessed in the presence of 100 nM PP1 (PP1).

nents of lipids in GM3-enriched GSD. Enrichment of glycosphingolipids in microdomains is one of the features of GSD. It has been demonstrated that cholesterol depletion from microdomains by treatment with methyl- β -cyclodextrin generally causes disruption and dysfunction of those domains. It has been indicated that the structure of the microdomains is broken by removing the cholesterol in the as one of the features of the microdomain generally, and damages the function through the microdomain. On the other hand, methyl- β -cyclodextrin does not affect the association of glycosphingolipids with Src-PTK in GSD, and rather enhances the activities of Src-PTK through glycosphingolipids (Fig. 3) (2,25). These data clearly indicate that the molecular mechanisms of GSD-mediated signal transduction are completely different from those of other microdomains.

体の2%程度にすぎず、リン脂質とコレステロールが大量に存在している。一方、B16細胞のGM3のGSDを構成する脂質は主にGM3、スフィンゴミエリンとコレステロールからなっており、リン脂質はあまり含まれていない(図2B)。このように、GSDの脂質構成の特徴は中心となるスフィンゴ糖脂質の存在比が非常に高いことである。一般にマイクロドメインの特徴の一つとして、メチル β シクロデキストリンでコレステロールを取り除くとマイクロドメインの構造が壊れ、マイクロドメインを介した機能が損なわれる。しかしながら、GSDはメチル β シクロデキストリンを加えてもスフィンゴ糖脂質とSrc-PTKとの会合は壊れず、スフィンゴ糖脂質を介した情報伝達は影響されないかむしろ増強される(図3)(2,25)。このことはGSDの構造とシグナル伝達機構が他のマイクロドメインの場合とは大きく異なっていることを示している。

D. GSD-Mediated Neutrophil Functions

When pathogenic microorganisms infect a body, circulating neutrophils immediately extravasate toward the microorganisms and phagocytose them to kill them (26). To recognize microorganisms, neutrophils express on cell surfaces several kinds of adhesion molecules for bacteria such as complement receptor, Fc receptors, LPS binding receptors and β -glucan re-

D. 好中球の GSD を介した機能

病原微生物が身体に侵入すると、好中球は速やかに病原体に向かって遊走し、それらを貪食することで排除を試みる(26)。そこで、病原微生物を認識するために好中球は補体レセプター、Fc レセプター、LPS レセプターあるいは β グルカンレセプターなど様々な接着分子を細胞膜表面に発現している。好中球の貪食反応には大きく分けてオプソニン依存性・非依存性の

Fig. 4. Molecular composition of LacCer-enriched glycosignaling domain. (A) Two-dimensional HPTLC analysis of lipid components in DIM fractions of neutrophils. Lipids compositions of neutrophils were analyzed by two-dimensional HPTLC, and TLC plates were sprayed with primulin. Lysates, whole cell lysates of neutrophils; DIM, fraction 5; Anti-LacCer IgM, immunoprecipitated fraction of DIM with anti-LacCer Huly-m13; Standards, standard lipids. PE, phosphatidylethanolamine; PS, phosphatidylserine; PC, phosphatidylcholine; PI, phosphatidylinositol; LacCer, lactosylceramide; GlcCer, glucosylceramide, Cer, ceramide; SM, sphingomyelin; Chol, cholesterol. (B) Distribution patterns of LacCer, transducer molecules and NADPH oxidase components in fractions separated by sucrose density gradient centrifugation. Neutrophils were lysed in the Triton X-100 containing lysis buffer, homogenized, and subjected to sucrose density gradient centrifugation. A series of 1 mL fractions were taken starting from the top, and subjected to HPTLC (LacCer) or SDS-PAGE/immuno blotting (transducer molecules, NADPH oxidase components and actin), respectively.

ceptors. Neutrophils phagocytose microorganisms through opsonin-dependent and -independent mechanisms (26). Opsonin-independent phagocytosis is speculated to be mainly mediated by adhesion molecules for the bacterial cell wall components such as LPS and β -glucan. It has been demonstrated that poly β 1-6 glucotriosyl- β 1-3 glucopyranose (PGG) glucan selectively binds to LacCer of neutrophils (10). PGG glucan enhances neutrophil superoxide generation and NF- κ B activity. LacCer has been demonstrated to specifically recognize several kinds of pathogenic microorganisms such as *Escherichia coli*, *Bordetella pertussis*, *dysentery bacillus*, *Helicobacter Pylori*, and *candida albicans* (3-5). Moreover, cross linking of LacCer with anti-LacCer antibodies induces superoxide generation (10) and up-regulation of CD11b/CD18 (Mac1) which serves as a complement receptor for C3bi in neutrophils (27). Therefore, it is speculated that neutrophils possess microbicidal mechanisms through LacCer. LacCer is localized in plasma membranes and granular membranes, and biochemically isolated in microdomains (2). LacCer-enriched GSD, which is isolated from microdomains of neutrophils by anti-LacCer antibody, is mainly composed of LacCer, sphingomyelin and cholesterol (Fig. 4A). Phospholipids are minor components of LacCer-enriched GSD of neutrophils. The lipid composition of LacCer-enriched GSD is quite similar to that of GM3-enriched GSD in B16 cells. Biochemical analysis using Triton X-100 revealed that more than 95% of LacCer in the cell lysates was recovered in microdomains, which only contained 2.5% of total cellular protein (Fig. 4B). Under these conditions, signal transducer molecules Lyn, Ha-Ras and p38 MAPK were enriched in microdomains. In contrast, actin was localized in the high-density fraction. Some of p22^{phox} and gp91^{phox}, membrane components of NADPH oxidase, were recovered in microdomains, whereas p47^{phox} and p67^{phox}, cytosolic components of NADPH oxidase, and small G-protein Rac2 were recovered in high-density fractions. There are several kinds of Src-PTK in neutrophils (28); in particular, Lyn has been demonstrated to play a crucial role in superoxide generation in these cells (29). In mature neutrophils, Lyn is localized only in plasma membrane (Fig. 5), and activated by anti-LacCer antibody treat-

二つの機構がある (26)。その中でオプソニン非依存性の貪食機構は主に菌体壁成分に対する接着分子を介して行われていると考えられている。これまでに可溶性の β 1-6 分岐の β 1-3 グルカン (PGG グルカン) が好中球の LacCer とオプソニン非依存的に結合することが報告されている (10)。PGG グルカンは好中球の活性酸素の産生を高め、NF κ B 活性を上昇させる。さらに、大腸菌、百日咳菌、赤痢菌、ヘリコバクターピロリ菌、カンジダなど幅広い菌が LacCer と選択的に結合することが示されている (3-5)。抗 LacCer 抗体で LacCer を架橋すると、好中球は活性酸素を産生したり (10)、補体の C3bi に対するレセプターである CD11b/CD18 (Mac1) の発現を上昇したりする (27)。したがって、好中球は LacCer を介した貪食・殺菌機構を持っていると考えられている。好中球の LacCer は細胞膜と顆粒膜に存在するが、すべての LacCer は生化学的にはマイクロドメインとして回収される (2)。抗 LacCer 抗体を用いて分離した LacCer に富むマイクロドメイン画分の脂質の構成成分は、B16 細胞の GM3 の GSD と同様に、LacCer、スフィンゴミエリン、コレステロールが主な成分であり、リン脂質はあまり含まれていない (図 4A)。Triton X-100 を用いた生化学的な解析を行うと、95 % 以上の LacCer はマイクロドメイン画分に回収されるが、この画分にはタンパク質全体の 2.5 % しか含まれない (図 4B)。このような条件下で、細胞内情報伝達分子である Lyn, Ha-Ras と p38 MAPK がマイクロドメイン画分に局在している。一方、アクチンは高密度側の画分に局在する。活性酸素産生酵素である NADPH oxidase の膜成分である p22^{phox} と gp91^{phox} の一部はマイクロドメイン画分に存在するが、細胞質成分である p47^{phox} と p67^{phox} および低分子量 G タンパク質 Rac2 は高密度側の画分に回収される。好中球には様々な Src ファミリーの分子が存在しており (28)、中でも Lyn は活性酸素の産生に重要な役割を果たしていることが示されている (29)。好中球の Lyn はすべて細胞膜に局在しており (2)、抗 LacCer 抗体で処理すると好中球の Lyn が活性化され (図 6A)、Src-PTK の特異的阻害剤である PP1 で LacCer を介した Lyn の活性化が阻害されるとともに活性酸素の産生も抑え

Fig. 5. Subcellular localization of Lyn. Subcellular fractionation of neutrophils was performed by Percoll centrifugation techniques, and azurophil, specific, gelatinase granules and plasma membrane containing secretory vesicles were obtained. Lyn molecules in each fraction were identified by Western blotting.

ment (Fig. 6A). A Src-PTK inhibitor PP1 inhibits not only Lyn activation but also superoxide generation by anti-LacCer antibody treatment. These data suggest that neutrophils have LacCer-enriched glycosignaling domain coupled with Lyn on plasma membrane, and that ligands binding with LacCer causes Lyn activation through LacCer in GSD, resulting in superoxide generation from neutrophils. Several kinds of LacCer-enriched GSD-associated proteins were phosphorylated by anti-LacCer antibody, and the phosphorylation was completely inhibited by PP1 (Fig. 6). Lyn-associated neutrophil superoxide generation has

られる。これらのことは、好中球には LacCer に富むマイクロドメインが GSD として機能していて、LacCer に対するリガンドが LacCer に結合すると、Lyn が活性化され、活性酸素が産生されることを示している。抗 LacCer 抗体で処理することで LacCer に富むマイクロドメインに含まれる様々なタンパク質がリン酸化され、PP1 処理によってすべてのタンパク質のリン酸化が完全に抑制される (図 6)。好中球の Lyn を介した活性酸素の産生は、Lyn が活性化されることで p38 MAP kinase と protein kinase C が活性化され、NADPH oxidase の細胞質因子である p47^{phox} が

Fig. 6. T5A7-induced phosphorylation of Lyn and p38 MAPK in DIM. DIM isolated from neutrophils was kept on ice in a polypropylene tube (Resting), or placed in normal IgM- (Normal IgM), or anti-LacCer IgM T5A7-coated dishes (Anti-LacCer IgM) at 4°C for 15 h. Then, the mixtures were incubated with γ -³²P-ATP in the absence or presence of 100 nM PP1 for 5 min at 37 °C, followed by TCA precipitation. (A) The TCA precipitate was immunoprecipitated with mouse anti-Lyn mAb, and subjected to SDS-PAGE, electroblotting transfer and autoradiography (Autoradiogram). To evaluate the recovery of Lyn, the blotted membrane was probed with rabbit anti-Lyn IgG (Immunoblot). (B) The TCA precipitate was immunoprecipitated with mouse anti-pp38 MAPK mAb, and subjected to SDS-PAGE, electroblotting and autoradiography.

been demonstrated to be mediated via p38 MAP kinase and protein kinase C; then cytosolic components of NADPH oxidase p47^{phox} and p67^{phox} translocate to the membrane cytochrome b558, and form the catalytically active complex (30). It has been reported that, in neutrophils, activated Lyn associates with PI₃K for the activation of PI₃K (31,32). PI₃K is believed to regulate the activation of p38 MAPK and protein kinase C, which results in the activation of NADPH oxidase (33,34). PP1 and PI₃K inhibitor wortmannin completely inhibited the anti-LacCer antibody-induced superoxide generation by neutrophils (2). A p38 MAPK inhibitor SB203580 and protein kinases C inhibitor H7 partially inhibited the anti-LacCer antibody-induced superoxide generation from neutrophils. It seems, therefore, that the ligands binding to LacCer in GSD induce the activation of Lyn/PI₃K/p38 MAPK/protein kinase C signal transduction pathway leading to superoxide generation (Fig. 7).

E. Signal Transduction Mechanisms between Glycosphingolipid and Lyn in GSD

LacCers, like other glycosphingolipids, span halfway through the membrane, yet they have to transmit the signal in GSD from the outside to the inside of the cell. The connection of LacCer, located in the external leaflet of the bilayer, with Lyn, located in a cytoplasmic site of membrane, remains unclear. The same question applies to various glycosphingolipids and other Src-PTK, G-proteins, and signal transducers. Several protein kinases including Lyn have been found in microdomains, and associated with the cytoplasmic leaflet through myristylation and palmitylation (35). How does LacCer mediate the signals to

リン酸化されて、p47^{phox} と p67^{phox} が細胞膜のチトクローム b558 に移行することで始まる (30)。好中球において PI₃ kinase は Lyn と会合して初めてリン酸化されることが示されている (31,32)。また、PI₃ kinase を介して p38 MAP kinase や protein kinase C が活性化されて NADPH oxidase が活性化されるといわれている (33,34)。抗 LacCer 抗体による活性酸素産生は PP1 や PI₃ kinase の特異的阻害剤である wortmannin で完全に阻害されるが、p38 MAP kinase の阻害剤である SB203580 や protein kinase C の阻害剤である H7 では部分的にしか阻害されない (2)。したがって、LacCer にリガンドが結合すると、Lyn が活性化され、PI₃ kinase、さらに protein kinase C と p38 MAP kinase の経路を介して p47^{phox} がリン酸化されて、NADPH オキシダーゼが順次活性化されると考えられる (図 7)。

E. GSD におけるスフィンゴ糖脂質から Lyn への情報伝達機構

LacCer は他のスフィンゴ糖脂質同様に、細胞膜の途中までしか入っていないが、細胞外から細胞内へと GSD において情報を伝達しなければならない。細胞膜の外側の層に存在する LacCer が細胞膜の内側の層に存在する Lyn とどのようにつながっているかは未だに良く分かっていない。同様の疑問は他のスフィンゴ糖脂質と Src-PTK や G タンパク質、情報伝達分子でもいうことができる。Lyn を含む様々な細胞内情報伝達分子はパルミトイル化やミリストイル化によって細胞膜の内側に結合している (35)。それでは、GSD において脂質二重層の外側にあるスフィンゴ糖脂質が内側にある Src ファミリー分子にどのようにして情報を伝えているのであろうか。細胞膜は脂質二重層

Fig. 7. Signal transduction cascade of LacCer-enriched GSD in neutrophils. Neutrophil LacCer-enriched GSD is mainly composed of LacCer, sphingomyelin phospholipids and cholesterol. LacCer is closely associated with Lyn in GSD. It seems that the binding of microorganisms to LacCer induces the clustering of LacCer-enriched GSD, leading to superoxide generation through Lyn-, PI₃K-, p38 MAPK-, and protein kinase C-dependent signal transduction pathway. It seems that long fatty acid-chain contained-LacCers may interdigitate into the inner leaflet, and play an important role in signal transduction at LacCer-enriched GSD from outside to inside of the cells.

Lyn molecules? Plasma membrane consists of a lipid bilayer. The fatty acid side chains of the phospholipids present in microdomains tend to be more highly saturated than those in the surrounding membrane. This allows close packing with the saturated acyl chains of glycosphingolipids and probably leads to phase separation. Due to the presence of cholesterol, a liquid ordered domain is formed exhibiting less fluidity than the surrounding plasma membrane (36). This tight packing of lipids and phase separation is probably responsible for the signature property of microdomains (37). Regardless of the structural variations of the carbohydrate moieties, glycosphingolipids have a common minimum-energy conformational structure in which the oligosaccharide chain is oriented at a defined angle to the axis of ceramide (12). Those physical properties lead to form extensive clusters separated from glycerophospholipids and some types of glycoprotein clusters in the plasma membrane. Flow cytometric analysis revealed that Lyso-GM3, which is composed of sphingosine instead of ceramide, markedly diminished the reactivity of anti-GM3 antibody on B16 cells (38). The reactivity of anti-GM3 antibody was found only on plasma membrane with high GM-density (22,39). For instance, in human mononuclear cells, no significant staining patterns using immunofluorescent-conjugated anti-LacCer were observed in confocal microscopic analysis (Fig. 8), although those cells are believed to express LacCer on cell surface (40). Therefore, similar to the reactivity characteristic of anti-GM3 antibody, it seems that the reactivity of anti-LacCer antibody depends on the LacCer-density on cell surface. Lyso-GM3 diminished the GM3-mediated functions of B16 cell (25, 38). Thus, it can be speculated that

からなっている。マイクロドメイン中では飽和の脂肪酸鎖を持つリン脂質が周囲の膜よりも多く、そのため飽和の脂肪酸鎖をもつスフィンゴ糖脂質をよりパックしてクラスターを形成することで周囲の膜から区別する (36)。この強固なりびッドの固まりと相分離がマイクロドメインを作り出していると考えられている (37)。糖鎖構造の多様性によらず、スフィンゴ糖脂質はセラミド軸に対して一定の角度を持っており、各糖鎖はもっとも安定な立体構造をとる (12)。そのためスフィンゴ糖脂質はこれらの物理的な特性によって細胞膜上で他の糖リン脂質や糖タンパク質から完全に分かれたクラスターを作っている。セラミド部分をスフィンゴシンに置き換えた Lyso-GM3 は B16 細胞のフローサイトメトリー上での抗 LacCer 抗体の反応性を著明に減弱させることが示されている (25,38)。抗 GM3 抗体は、GM3 が一定の大きさのクラスターを形成していないと反応しない (22、39)。例えば、単核球は LacCer を細胞表面に発現しているといわれているが (40)、これらの細胞は共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察では抗 LacCer 抗体で有意に染色することができない (図 8)。このことは抗 LacCer 抗体も抗 GM3 抗体と同様の性質を持っていることを示している。Lyso-GM3 を B16 細胞に加えると、B16 細胞の GM3 に富む GSD を介した情報伝達分子の活性化と細胞機能が抑制される (25,38)。抗 GM3 抗体は、GM3 が一定の大きさのクラスターを形成していないと反応しない (22、39)。Lyso-GM3 が膜に取り込まれたことで、GM3 の *cis* 相互作用

Fig. 8. Immunofluorescence staining of leukocytes with LacCer. Human neutrophils and mononuclear cells were stained with Alexa546-conjugated anti-LacCer mAb, and examined with a Zeiss LSM 510 confocal microscope equipped with a Plan-Apochromat x100 oil DIC objective. a, Immunofluorescence images; b, Nomarski images.

Lyso-GM3-induced destruction of GM3 *cis*-interaction collapses GM3 clusters (microdomains), resulting in dysfunction of GM3-enriched GSD-mediated functions of B16 cells.

When promyelocytic leukemia HL-60 cells were differentiated into neutrophilic lineage by dimethylsulfoxide (DMSO)-treatment, they acquired superoxide generating activity. Although DMSO-treated HL-60 cells express LacCer on cell surface as well as on neutrophils, they did not generate superoxide anion by anti-LacCer antibodies. Lyn molecules were not recovered in the LacCer-enriched microdomains isolated from plasma membrane of DMSO-treated HL-60 cells (2). Moreover, Lyn molecules of DMSO-treated HL-60 cells were not phosphorylated by anti-LacCer antibodies. These data indicate that, DMSO-treated HL-60 cells do not form LacCer-enriched GSD coupled with Lyn. Then, why is LacCer not able to be associated with Lyn molecules in HL-60 cells? The ceramide structures are various in cell types. In human neutrophils, ceramide consists of d18 sphingosine and C16- to C24- fatty acids. It seems most possible that interdigitation of long-chain LacCer into the opposing membrane leaflet could lead to the preferential binding of LacCer to acyl chains of Lyn (Fig. 7). LacCer molecules of neutrophils have been reported to possess C24 acyl chains (41,42). *In vitro* experiments using artificial membrane demonstrated that the methyl end of the C24 fatty acid of LacCer in a bilayer of host matrix crosses the hydrophobic membrane center and interdigitates with fatty acids of phospholipids and affects the fluidity of the opposing monolayer (41,42). Cross-linking experiments using cerebellar granule cells with a photoactivable, radioactive GD1b derivative show that c-Src and Lyn associate directly with GD1b (43). Src family kinases are auto-phosphorylated by gathering themselves (44). Cross-linking of LacCer by anti-LacCer antibody was able to induce LacCer-mediated signaling. Thus, the clustering of LacCer at exoplasmic leaflet may activate the cytoplasmic Lyn molecules via the interaction between acyl chains of these molecules (Fig. 7).

F. Future Direction

Now, the concept of "lipid rafts" in itself seems to slide into chaos (45). The main reason is that the microdomains have to be biochemically isolated and characterized using neutral detergents such as Triton X-100. Moreover, there are several kinds of microdomain-isolation methods; concentrations of Triton X-100 in reports about microdomains are different from each group (46). Therefore, the real structure and functions of microdomains still remain unclear. In particular, nobody knows the real domain size of microdomain in living cells (19). Moreover, how microdomains can achieve such signaling remains unknown (47). It has been demonstrated that glycosphingolipids regulate the functions of adhesion molecules and receptors through the (supra-) biomolecular complex formation of

用が妨げられて、GM3 のクラスター形成が阻害され、B16 細胞は GM3 を介した c-Src 等の活性化や接着反応が起こらなくなったと考えられる。

前骨髄性白血病細胞株である HL-60 細胞は DMSO 存在下で培養することで好中球系細胞に分化し、活性酸素を産生するようになる。HL-60 細胞は細胞膜上に LacCer を好中球と同程度発現しているにもかかわらず、抗 LacCer 抗体を介しては活性酸素を産生することができない。HL-60 細胞の細胞膜から分離した LacCer に富むマイクロドメインには Lyn が含まれておらず、抗 LacCer 抗体で処理した HL-60 細胞の Lyn 分子はリン酸化されない (2)。それでは、なぜ HL-60 細胞では LacCer と Lyn は会合しないのであろうか。セラミドの構造は組織や細胞によって様々であるが、ヒト好中球のセラミドは炭素数18のスフィンゴシンと炭素数 16 から 24 の脂肪酸鎖からなっている。最も可能性があると筆者らが考えているのは、外側の脂質層にある LacCer の脂肪酸鎖が内側の脂質層に突き出して、直接 Lyn の脂肪酸鎖と相互作用するという考え方である (図 7)。人工膜を使った実験によれば、少なくとも C24 の脂肪酸鎖を持つスフィンゴ糖脂質は脂質二重層の反対側の層に常に突き出して、反対側の層の流動性に影響を与えられることが示されている (41,42)。また、GD1b が c-Src や Lyn と直接結合できることを光感受性架橋剤とアイソトープ標識した GD1b を用いて小脳顆粒細胞で示されている (43)。Src-PTK は互いに集合した状態になることで活性化される (44)。リガンドが LacCer に結合すると、LacCer のクラスターがさらに凝集して大きな GSD クラスターを形成し、LacCer 分子が集合するとともに細胞の内側の Lyn 分子が集合して互いにリン酸化することで、細胞内に情報が伝わるのではないだろうか (図 7)。

F. 今後の展望

最近になって、いわゆるリピッドラフトの概念そのものが混沌としている (45)。その主な理由として、マイクロドメインの精製や機能解析などの生化学的な解析手段に Triton X-100 等の中性界面活性剤を用いている点が挙げられる。グループによって異なる濃度の Triton X-100 を用いて研究を進めたりするため (46)、マイクロドメインが実際にどのような構造で、どのような機能に関与しているかがはっきりとしない。特に、マイクロドメインを構成する分子のクラスターがどの範囲まで及ぶかが明確でない (19)。また、マイクロドメインにおいてどのように情報が細胞外から細胞内へと伝達されているかは今もって明らかとはなっていない (47)。これまでに、スフィンゴ糖脂質

glycosphingolipid-enriched microdomains with those molecules. There is a possibility that, in such biomolecular complexes, glycosphingolipids form GSD and the binding of glycosphingolipids with ligands may transmit outside information into cells to affect the association of molecules in the complexes, and then those complexes-mediated cell functions would occur. It remains a significant challenge to reveal the actual functions and mechanisms of those complexes.

が他の接着分子や受容体と超分子複合体を形成することで、他の分子を介した生物機能を調節することが示されつつある。超分子複合体においてスフィンゴ糖脂質がGSDを形成し、GSDを介して情報が細胞内に入ることによって他の分子の会合に影響を与え、結果として超分子複合体を介して細胞機能が発現される可能性もある。いかにこれら複合体の真の姿を明らかにするかが今後の重要な課題である。

References

- Hakomori, S. (2003) *Curr. Opin. Hematol.* **10**, 16-24
- Iwabuchi, K., and Nagaoka, I. (2002) *Blood* **100**, 1454-1464
- Angstrom, J., Teneberg, S., Milh, M. A., Larsson, T., Leonardsson, I., Olsson, B. M., Halvarsson, M. O., Danielsson, D., Naslund, I., Ljungh, A., Wadstrom, T., and Karlsson, K. A. (1998) *Glycobiology* **8**, 297-309
- Karlsson, K. A. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 309-350
- Saukkonen, K., Burnette, W. N., Mar, V. L., Masure, H. R., and Tuomanen, E. I. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 118-122
- Lesieur, C., Cliff, M. J., Carter, R., James, R. F., Clarke, A. R., and Hirst, T. R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 16697-16704
- Hahn, P. Y., Evans, S. E., Kottom, T. J., Standing, J. E., Pagano, R. E., and Limper, A. H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 2043-2050
- Karlsson, K. A. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 309-350
- Manes, S., del Real, G., and Martinez, A. C. (2003) *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 557-568
- Zimmerman, J. W., Lindermuth, J., Fish, P. A., Palace, G. P., Stevenson, T. T., and DeMong, D. E. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 22014-22020
- Hakomori, S., and Zhang, Y. (1997) *Chem. Biol.* **4**, 97-104
- Hakomori Si, S. I. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 225-232
- Kojima, N., and Hakomori, S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 17552-17558
- Iwabuchi, K., Yamamura, S., Prinetti, A., Handa, K., and Hakomori, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 9130-9138
- Prinetti, A., Iwabuchi, K., and Hakomori, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 20916-20924
- Hakomori, S. (2000) *Glycoconj. J.* **17**, 627-647
- Kojima, N., and Hakomori, S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 17552-17558
- Matsuura, K., Oda, R., Kitakouji, H., Kiso, M., Kitajima, K., and Kobayashi, K. (2004) *Biomacromolecules* **5**, 937-941
- Bucior, I., Scheuring, S., Engel, A., and Burger, M. M. (2004) *J. Cell Biol.* **165**, 529-537
- Kojima, N., and Hakomori, S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 20159-20162
- Haseley, S. R., Vermeer, H. J., Kamerling, J. P., and Vliegthart, J. F. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9419-9424
- Hakomori, S., Handa, K., Iwabuchi, K., Yamamura, S., and Prinetti, A. (1998) *Glycobiology* **8**, xi-xix
- Brown, D. A., and London, E. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 1-7
- Brown, D. A., and London, E. (1998) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 111-136
- Iwabuchi, K., Handa, K., and Hakomori, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 33766-33773
- Greenberg, S., and Grinstein, S. (2002) *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 136-145
- Arai, T., Bhunia, A. K., Chatterjee, S., and Bulkley, G. B. (1998) *Circ. Res.* **82**, 540-547
- Parolini, I., Sargiacomo, M., Lisanti, M. P., and Peschle, C. (1996) *Blood* **87**, 3783-3794
- Gaudry, M., Gilbert, C., Barabe, P., Poubelle, P. E., and Naccache, P. H. (1995) *Blood* **86**, 3567-3574
- Lal, A. S., Clifton, A. D., Rouse, J., Segal, A. W., and Cohen, P. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**, 465-470
- Corey, S., Eguinoa, A., Puyana-Theall, K., Bolen, J. B., Cantley, L., Mollinedo, F., Jackson, T. R., Hawkins, P. T., and Stephens, L. R. (1993) *Embo J* **12**, 2681-2690
- Yu, W., Cassara, J., and Weller, P. F. (2000) *Blood* **95**, 1078-1085
- Rane, M. J., Carrithers, S. L., Arthur, J. M., Klein, J. B., and McLeish, K. R. (1997) *J Immunol* **159**, 5070-5078
- Vlahos, C. J., Matter, W. F., Brown, R. F., Traynor-Kaplan, A. E., Heyworth, P. G., Prossnitz, E. R., Ye, R. D., Marder, P., Schelm, J. A., Rothfuss, K. J., and *et al.* (1995) *J. Immunol.* **154**, 2413-2422
- Resh, M. D. (1994) *Cell* **76**, 411-413
- Rietveld, A., and Simons, K. (1998) *Biochim. Biophys. Acta.* **1376**, 467-479
- Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., and Simons, K. (1998) *J. Cell Biol.* **141**, 929-942
- Iwabuchi, K., Zhang, Y., Handa, K., Withers, D. A., Sinay, P., and Hakomori, S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 15174-15181
- Sakiyama, H., Takahashi, T., Hirabayashi, Y., and Taniguchi, M. (1987) *Cell Struct. Funct.* **12**, 93-105
- Goyert, S. M. (1996) in CDw17 workshop panel report. Leukocyte Typing VI - White cell differentiation antigen- (Kishimoto T., G. S., Kikutani H., Mason D., Miyasaka M., Moretta L., Ohno T., Okumura K., Shaw S., Springer T.A., Sugamura K., Sugawara H., von dem Borne A.E., and Zola H., Eds.), Garland Publishing, Inc, New York & London
- Grant, C. W., Mehlhorn, I. E., Florio, E., and Barber, K. R. (1987) *Biochim. Biophys. Acta.* **902**, 169-177
- Morrow, M. R., Singh, D., Lu, D., and Grant, C. W. (1995) *Biophys. J.* **68**, 179-186
- Prinetti, A., Marano, N., Prioni, S., Chigorno, V., Mauri, L., Casellato, R., Tettamanti, G., and Sonnino, S. (2000) *Glycoconj. J.* **17**, 223-232
- Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990) *Cell* **61**, 203-212
- Pike, L. J. (2003) *J. Lipid Res.* **1**, 1
- Pike, L. J. (2004) *Biochem. J.* **378**, 281-292

- 47. Kusumi, A., Koyama-Honda, I., and Suzuki, K. (2004) *Traffic* **5**, 213–230
- 48. Nohara, K., Wang, F., and Spiegel, S. (1998) *Breast Cancer Res. Treat* **48**, 149–157
- 49. Wang, X. Q., Sun, P., O’Gorman, M., Tai, T., and Paller, A. S. (2001) *Glycobiology* **11**, 515–522
- 50. Hakomori, S. (2004) *Arch. Biochem. Biophys.* **426**, 173–181
- 51. Miura, Y., Kainuma, M., Jiang, H., Velasco, H., Vogt, P. K., and Hakomori, S. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**, 16204–16209
- 52. Wang, X., Sun, P., Al-Qamari, A., Tai, T., Kawashima, I., and Paller, A. S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 8436–8444

Received on December 13, 2004, accepted on December 18, 2004

Profile of the Author

Kazuhisa Iwabuchi graduated from Tokyo Science University, School of Pharmaceutical Science (in 1984), and obtained a masters degree from Osaka University Graduate School of Pharmaceutical Science (in 1986), then obtained a Ph.D. from Juntendo University (in 1992). He started biochemical research on the molecular mechanisms of neutrophil adhesion and migration at the Department of Biochemistry, Juntendo University School of Medicine as Assistant Professor in 1986. He joined Dr. Sen-itiroh Hakomori’s laboratory as a senior fellow scientist, Department of Pathobiology, Washington University School of Public Health and Community Medicine, Seattle, Washington, USA. (1997-1999). After coming back to Juntendo University as Assistant Professor, he became a Lecturer at Juntendo University School of Medicine (in 2002).

Since 2004, he has been Associate Professor of the Laboratory of Biochemistry, Juntendo University School of Health Care and Nursing, and of the Institute for Environmental and Gender-specific Medicine, Juntendo University Graduate School of Medicine. He is also a visiting scientist at Sphingolipid Functions Laboratory, Frontier Research System, RIKEN.