Receptors for Gangliosides and Related Glycosphingolipids

ガングリオシドおよびスフィンゴ糖脂質の受容体

Ronald Schnaar

Departments of Pharmacology and Neuroscience, The Johns Hopkins School of Medicine,
Baltimore, Maryland 21205, USA, FAX: 1-301-955-3023**Key Words:** gangliosides, glycosphingolipids, sulfoglucuronyl glycolipids, cell-cell adhesion, membrane receptor

Abstract

The biological roles of cell surface glycosphingolipids are being determined due to improvements in the methods for their purification, structural and functional analyses. The hypothesis that this major family of cell surface complex carbohydrates participates in important cell recognition and cell regulation phenomena has now been repeatedly demonstrated. As specific glycosphingolipids are implicated in a greater variety of cell regulation events, there is a continuing need for studies to elucidate the mechanisms of their actions. These are likely to converge on two general schemes: Interactions of glycosphingolipids with complementary receptors on apposing membranes (*trans* recognition), and modulation of activities of proteins in the same membrane (*cis* regulation). A combination of these mechanisms may link glycosphingolipid recognition to transmembrane control of cell physiology.

要 旨

精製法や構造や機能の解析の技術が発達したことによって、細胞表面の糖脂質の生物学的役割が明らかにされつつある。この細胞表面の複合糖質の主要成分が重要な細胞認識や細胞制御の現象に関係しているという仮説が繰り返し示されている。特異的な糖脂質が多様な細胞認識機構に関与しているので、その作用の機構を解明するための研究が行われ続けなければならない。これらは、次の二つの体系にまとめられるように思われる。近傍の別の膜に存在する相補的受容体と糖脂質の相互作用(トランスの認識)と、同じ膜上の蛋白質の活性の調節(シスの制御)である。これらの機構が組み合わされることによって、糖脂質の認識が細胞の生理機能の制御に結び付けられているのであろう。

A. Introduction

Cell adhesion, growth, and differentiation are controlled, in part, by molecular signals received at the cell surface. These signals may be soluble growth factors, components of the extracellular matrix, or molecules on other cell surfaces encountered *via* cell-cell contact. Although multiple mechanisms coordinate to ensure appropriate cell-cell interactions, chemotaxis - the ability of cells to recognize and respond to chemical cues on apposing cell surfaces - plays a significant role.

Both protein-protein and protein-carbohydrate recognition are involved in specific cell-cell interactions(1, 2) [and recently, evidence for carbohydrate-carbohydrate interactions has appeared(3, 4)]. Current data support a model in which multiple cell-cell interaction systems co-exist on cell surfaces, where they may act independently or interactively to ensure appropriate cell adhesion and modulation of cell physiology(5, 6). While the molecular basis of several protein-protein cell interactions(*e. g.* integrins and their receptors), have been elucidated due to advances in molecular biology, the technology to probe the molecular details of carbohydrate actions in cell recognition is just emerging.

Among cell surface molecules, glycoconjugates are well

A. はじめに

細胞の接着、増殖、分化の幾分かは、細胞表面で受け取られる分子信号によって制御されている。これらの信号は、可溶性の成長因子であったり、細胞外基質の構成成分であったり、細胞間の接着の際に出会うほかの細胞の表面にある分子であったりする。複数の機構が連係して適切な細胞間相互作用を確保しているが、化学的親和性—ある細胞が、周囲の細胞表面に存在する化学的なきっかけを認識したり、それに反応したりできる能力—が、重要な役割を演じている。

特異的な細胞間相互作用においては、蛋白質—蛋白質間、および、蛋白質—糖鎖間の認識が関与している(1, 2)[そして最近、糖鎖—糖鎖間の相互作用が示されている(3, 4)]。現在得られているデータから、適切な細胞接着と細胞生理の調節を確保するために、独立して或いは連係して働く複数の細胞間相互作用の機構が細胞表面に存在するというモデルを構築することができる(5, 6)。いくつかの蛋白質—蛋白質による細胞相互作用の分子的原理(たとえば、インテグリンとその受容体)は分子生物学が進歩したことによって明らかになったが、細胞認識における糖鎖の働きの分子機構を詳細に調べる技術は、やっと現われたばかりである。

suited as signal molecules to direct cell recognition and the control of cell behavior. Oligosaccharide chains spread out in the aqueous environment at the cell surface and their shapes are very sensitive to subtle changes in sequence and linkage(7-9). This makes them excellent candidates for cell surface recognition molecules, and biological systems from bacteria to man have taken advantage of glycoconjugates for this purpose. Marked advances in glycoconjugate purification, analysis, molecular biology and cell biology in the past few years have provided the tools to identify carbohydrate structures responsible for cell recognition and the receptors which mediate the subsequent control of cell physiology. This minireview focuses specifically on the roles of gangliosides and related glycosphingolipids as cell surface recognition molecules. These highly mobile, predominantly cell surface glycolipids modulate important pathological and physiological recognition events.

Glycosphingolipids modulate cell physiology by at least two mechanisms(10). In one case, glycosphingolipids in a membrane interact laterally with proteins in the same membrane to modulate their activities. This "*cis*" mechanism appears to be responsible, for instance, for the remarkable modulation of EGF receptor kinase activity by GM₃(11). Alternatively, cell surface glycosphingolipids interact specifically with extracellular binding proteins, which are either soluble or immobilized on the extracellular matrix or on apposing cell surfaces. This "*trans*" mechanism has been well documented in the pathogenesis of certain bacterial exotoxins, which bind to cell surface glycosphingolipids prior to cell entry. More recently, interactions between glycosphingolipids on one cell surface and specific binding proteins on an apposing cell surface have been implicated in cell-cell recognition and adhesion, and it is

細胞表面の分子の中にあつて、複合糖質は細胞認識と細胞反応の制御をつかさどるによく適した分子である。糖鎖部分は細胞表面を取り巻く水溶液中に伸びており、その形は糖の並び方や結合がわずかに変わっただけで大きく変わる(7-9)。このことが複合糖質を細胞表面の認識分子として優れた候補としており、実際、細菌から人に至る生物学的機構ではこの目的のために複合糖質を利用している。複合糖質の精製、解析、分子生物学、および、細胞生物学の此処2、3年の急速な進歩のおかげで、細胞認識に関係したり細胞生理の制御につながる受容体となる糖鎖構造を同定できるようになった。この総説においては、細胞表面の認識分子としてのガングリオシドとスフィンゴ糖脂質に特に焦点を絞って述べてみたい。これらの非常に変化にとんだ細胞表面の主要な糖脂質は、病理学的、生理学的に重要な認識反応を調節している。

スフィンゴ糖脂質は少なくとも二つの機構によって細胞生理を調節している(10)。ひとつには、膜の糖脂質は横方向に同じ膜上の蛋白質と相互作用をしそれらの活性を調節している。この"*cis*"の作用機構は、たとえば、GM₃によるEGF受容体の顕著な調節に関与していると思われる(11)。もうひとつは、細胞表面の糖脂質は、可溶性もしくは細胞外基質や周囲の細胞の表面に組み込まれている細胞外の結合蛋白質と特異的に反応する。この"*trans*"の作用機構は、細胞に進入するに際して細胞表面の糖脂質に結合するいくつかの細菌外毒素の発病学としてよく知られている。最近になって、ある細胞の表面の糖脂質とその周りの細胞の表面にある特異的な結合蛋白質の間の相互作用が細胞間の認識や接着に関係していることが示されたが、このような相互作用をこの総説の主題としたい。

Molecular mechanism for ganglioside recognition and cell regulation.
Mode of carbohydrate recognition are represented in both "*cis*" and "*trans*" configuration.

these interactions which are the subject of this Minireview.

B. Methods for the Study of Glycosphingolipid Receptors

The lipid components which endow glycosphingolipids with desirable properties as cell surface recognition molecules also affect the experimental techniques which can be used to probe their functions. Addition of intact glycosphingolipids to membranes or cells results in various molecular interactions including non-specific membrane adsorption, membrane insertion, and/or specific receptor binding(12, 13). The oligosaccharide portions removed from bioactive glycolipids by chemical or enzymatic methods(14, 15), often have sharply reduced biological potency. This is due, in large part, to the loss of multivalency compared to the intact glycosphingolipids, which form polyvalent micelles(16).

Several clever techniques have been introduced for probing the biological functions of glycosphingolipids. Insertion of even a small portion of a particular exogenously added glycosphingolipid into the membranes of cells deficient in that lipid may generate new biological functions which can then be attributed to that specific glycosphingolipid structure(17). Alternatively, cells can be transfected with genes encoding specific glycosyltransferases, qualitatively altering the glycosphingolipids expressed and generating new biological activities(18). Another approach takes advantage of the amphipathic nature of glycosphingolipids by adsorbing the lipid portion to plastic dishes for use in binding assays(19-21). A particularly powerful related technique to reveal glycosphingolipid binding specificities is direct binding to glycosphingolipids resolved on thin layer chromatography(TLC) plates(22-25). TLC plates with resolved glycosphingolipids are overlaid with labeled antibodies, toxins, viruses, bacteria, or eukaryotic cells. After incubation, non-binding material is removed and the remaining label is located at sites on the plate coincident with migration of the recognized glycosphingolipids. Another approach has been to re-build multivalent structures from isolated glycosphingolipid oligosaccharides using water-soluble carriers. The resulting derivatives retain binding specificity, are of high affinity, and lack some of the disadvantages of amphipathicity(26, 27). The above functional assays, combined with improved methods for glycosphingolipid purification(28) and analysis(9, 29, 30), have combined to generate exciting new data on the pathological and physiological roles of these glycoconjugates.

C. Bacterial Exotoxins: Prototype Ganglioside Binding Proteins

Gangliosides were first recognized as cell surface recognition molecules in bacterial pathology. There is an extensive literature describing the roles of glycosphingolipids in pathogenesis of bacteria and viruses(31-33) which is beyond the scope of this minireview. However, many of the techniques

B. 糖脂質の受容体研究の方法

脂肪部分は、糖脂質に細胞表面の認識分子としての好ましい性質を与えていると同時に、それらの機能を調べるための実験技術にも影響を与えている。糖脂質を膜や細胞に加えると、非特異的な膜への吸着、膜への挿入、特異的な受容体への結合などといった様々な分子相互作用が生じる(12, 13)。化学的、酵素学的な方法(14, 15)によって、生物活性を持つ糖脂質から切り出した糖鎖部分は、多くの場合その生物学的能力を著しく減少させている。この原因の大部分は、多価のミセルを形成する元の糖脂質に比べてそのマルチバレンシーという性質を失ったことにある(16)。

糖脂質の生物学的機能を探るためにいくつかの巧妙な手法が導入された。ある糖脂質をその糖脂質を欠く細胞に外部から加えて、そのほんの一部が取り込まただけでも新しい生物学的機能が発現されれば、それはその糖脂質の構造に特異的なものであると考えることができる(17)。ほかの方法としては、細胞に特異的な糖転移酵素をコードした遺伝子をトランスフェクトすることで発現される糖脂質を質的に変化させ、新しい生物活性を発現させることができる(18)。このほか、糖脂質の両親媒性を利用して、脂質部分をプラスチックのディッシュに吸着させ結合反応に用いるという方法もある(19-21)。これに関連した特に強力な方法として、薄層クロマトグラフィー(TLC)で分離した糖脂質に直接結合させることで結合の特異性を調べるというものがある(22-25)。糖脂質を分離した薄層板に標識した抗体、毒素、ウイルス、細菌、および真核細胞を加える。インキュベーションの後、結合しなかったものを取り除くと、残された標識は、薄層板上で認識した糖脂質の移動した位置に位置する。このほか、分離した糖脂質の糖鎖を水溶性のキャリアーを用いて多価の構造に再構成するという方法がある。こうしてできた誘導体は結合特異性を維持して結合親和性が高く、そして両親媒性であることによる短所のいくつかを除かれている(26, 27)。上記の機能検査法を、改良された糖脂質の精製法(28)や解析法(9, 29, 30)と共に用いることによってこれら複合糖質の病理学的そして生理学的役割について魅力的な新しいデータが得られた。

C. 細菌外毒素：典型的なガングリオシド結合蛋白質

ガングリオシドは、まず最初に細菌病理学の分野において、細胞表面の認識分子として認識された。細菌やウイルスの発病学における糖脂質の役割を述べた大量の文献があるが(31-33)、それは、このミニレビューの範囲を越えてしまう。しかしながら、脊椎動物の糖脂質性受容体の研究のために開発された技術の多くは、細菌毒素の研究の際に初めて導入されたものである。コレラ外毒素とこれに非常に似ている大腸菌の感熱性毒

developed for the study of vertebrate glycosphingolipid receptors were first introduced in the study of bacterial toxins. The cholera exotoxin and the closely related *E. coli* heat-labile toxin are the most extensively studied ganglioside binding proteins. These toxins are multimeric proteins which bind to cells via high affinity interaction with ganglioside GM₁ (34, 35). The isolated protein binds GM₁ adsorbed on plastic dishes or on thin layer chromatography plates (22, 34). Cell lines resistant to cholera toxin become susceptible when GM₁ is inserted into their membranes (36, 37). The ability of gangliosides to associate with each other laterally in the plane of the membrane facilitates toxin binding, in that closely grouped GM₁ oligosaccharide determinants are required for high-affinity binding (27). This observation emphasizes the importance of multivalency and spacing to carbohydrate recognition, a phenomenon which has been reported for other carbohydrate-mediated protein recognition events [e.g. (38, 39)]. Due to their role in toxin binding, gangliosides have often been referred to as toxin receptors. This terminology is confusing when discussing receptors for (e.g. complementary to) gangliosides in vertebrate systems. Therefore, the term determinant is used to denote a recognized carbohydrate structure and the term receptor is used to denote a ganglioside binding protein.

D. Gangliosides as Leukocyte Adhesion Molecules

One of the most exciting recent advances in cell-cell recognition has been the demonstration that specific cell surface gangliosides on neutrophils and complementary ganglioside binding proteins on the endothelial lining of blood vessels contribute to specific cell-cell adhesion during inflammation (40). Inflammation involves the specific binding of leukocytes to activated endothelium and their extravasation into the surrounding tissue. Immunological techniques were used to identify a series of proteins involved in leukocyte adhesion to vascular endothelium (41). Determination of their primary amino acid sequences (42-45) revealed that three of these (gp90me1, ELAM-1, and GMP-140) contained structural motifs related to well-characterized vertebrate lectins (46). One of these proteins, ELAM-1 (also known as E-Selection) is expressed on vascular endothelium upon activation, and a monoclonal antibody to ELAM-1 inhibits leukocyte adhesion to activated endothelial cells *in vitro* (47). Discovery of a lectin domain in the primary structure of ELAM-1 (43) led investigators to the leukocyte cell surface glycoconjugates responsible for leukocyte-endothelial adhesion.

The first isolation of an endogenous carbohydrate ligand supporting ELAM-1 mediated adhesion was by Tiemeyer, *et al.* (48, 49), who combined molecular biology with cell adhesion to adsorbed glycosphingolipids to purify the glycosphingolipid targets for ELAM-1. Glycosphingolipids extracted from neutrophil-like human myelogenous leukemia cells (50)

素はもっとも詳しく研究されているガングリオシド結合蛋白質である。これらの毒素は多量体の蛋白質でGM₁ガングリオシドとの高親和性相互作用によって細胞に結合する(34, 35)。分離された蛋白質はプラスチックディッシュに吸着されているか、或いはTLC板上のGM₁に結合する(22, 34)。コレラ毒素に抵抗性の細胞株は、GM₁が膜に挿入されると感受性になる(36, 37)。ガングリオシドは、膜の面内で横方向に集合し合うことができるので毒素の結合が促進される。そして、GM₁の糖鎖の決定基が高度に寄り集まることが高親和性の結合には必要である(27)。この観察によって、糖の認識におけるマルチバレンシーや間隔の重要性が重要視されるようになった。そしてこの現象は、ほかの糖に関連した蛋白質の認識においても報告されている(例えば、38, 39)。ガングリオシドは毒素に結合することから、たびたび毒素"受容体"と呼ばれる。この呼び方は脊椎動物の系においてガングリオシドの(例えば、相補的な)受容体を考えるときには紛らわしい。したがって、認識される糖の構造を現すには、"決定基"という言葉を用い、ガングリオシド結合蛋白質を現すときに"受容体"という言葉を用いる。

D. 白血球接着分子としてのガングリオシド

細胞間認識の分野の最近の進歩でもっとも魅力的なもののひとつは、好中球の細胞表面の特異的なガングリオシドと、それに相補的な血管の内皮の内張りのガングリオシド結合蛋白質が、炎症における特異的な細胞間の接着に寄与しているということである(40)。炎症は、白血球が活性化された内皮へ特異的に接着し、血管壁から周りの組織に浸潤するという過程を含んでいる。白血球の血管内皮への接着に関与する一連の蛋白質を同定するために免疫学的な手法が用いられた(41)。アミノ酸の一次配列を決定したところ(42-45)、これらの3つ(gp90me1, ELAM-1, GMP-140)がよく知られた脊椎動物レクチンに関連した構造を含んでいた(46)。これらの蛋白質のうちELAM-1(E-Selectionともいわれる)は血管内皮の活性化に際して発現され、ELAM-1に対するモノクローナル抗体は*in vitro*において白血球が活性化された内皮細胞に接着することを阻害する(47)。ELAM-1の一次構造中にレクチン領域が発見されると(43)、白血球と内皮の接着に関与している白血球細胞表面の複合糖質の検索が始まった。

それに関連した糖鎖の決定基の最初の報告はTiemeyerらによってなされた(48, 49)。彼らは、分子生物学を固定化した糖脂質に細胞を接着させる方法と共に用いて、ELAM-1の標的として好中球の糖脂質を同定した。好中球様のヒト骨髓性白血病細胞(50)から抽出した糖脂質をTLCで分離した。薄層板を特製の細胞接着用の容器にセットし(25)、ELAM-1をコードするcDNAをトランスフェクトした放射標識COS細胞を加えて、接着した

were resolved by TLC. The TLC plates were placed in specially-designed cell adhesion chambers(25), overlaid with radiolabeled COS cells transfected with cDNA coding for ELAM-1, and adherent cells detected by autoradiography. ELAM-1 transfected cells transiently expressed the lectin and adhered to positions on the TLC plate corresponding to the migration of a sub-population of neutrophil gangliosides. The supportive glycolipid species were isolated using specific cell adhesion as an assay to direct their purification. Mass spectroscopy and carbohydrate compositional and linkage analysis of the purified glycosphingolipids revealed oligosaccharides having non-reducing termini related to the sialyl Lewis^x(sLe^x) antigen: NeuAc α 2, 3Gal β 1, 4(Fuc α 1, 3)GlcNAc-R and a related structure, NeuAc α 2, 3Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4(Fuc α 1, 3)GlcNAc-R.

Two other experimental approaches identified the same structural determinants: (i) Transfection of non-myeloid cells with cDNA for an α (1, 3)fucosyltransferase converted them from ELAM-1 non-binders to binders. Among fucosylated determinants which could be identified by previously characterized monoclonal antibodies, ELAM-1 binding correlated best with the expression of the sialyl Lewis^x(sLe^x) structure(18), and (ii) myeloid cell adhesion to activated endothelium or to plastic-adsorbed ELAM-1 was inhibited by anti-sLe^x antibodies or by liposomes carrying purified glycolipids with the sLe^x determinant(51, 52).

The concordance of these reports generates confidence that the sLe^x structure is the minimum binding determinant for ELAM-1. These studies establish the physiological importance of carbohydrate-mediated cell recognition and demonstrate several technologies useful for identifying the relevant carbohydrate determinants.

E. Glycosphingolipid Binding Proteins on Neural Cells

Complementary binding proteins for gangliosides on neural cells have been demonstrated using cell adhesion to adsorbed gangliosides(20, 53) and by radioligand binding(26). When embryonic neural retina cells were radiolabeled, isolated, and placed on microwells adsorbed with various lipids, selective adhesion to gangliosides was observed(20). Pre-treatment of the cells with protease, at a concentration greater than that used for tissue dissociation but which did not reduce cell viability, attenuated ganglioside-directed adhesion. These data suggested the presence of a protein ganglioside receptor on the surface of neuronal cells. Similar results were obtained using the murine neuroblastoma cell line, S20Y(53), which preferentially adhered to plastic-adsorbed GM₁, and a preliminary report describes selective labeling of S20Y surface proteins with a photoaffinity conjugate of GM₁ oligosaccharide(54).

Direct probing for receptors using radiolabeled gangliosides has been complicated by non-specific adsorption and

細胞をオートラジオグラフィーで検出した。ELAM-1をトランスフェクトされた細胞は、一過性にレクチンを発現してTLC板上で好中球の糖脂質のある亜種の位置に接着した。標的となる糖脂質は、特異的な細胞接着を指標にして分離精製された。マスマススペクトルと糖組成と結合様式の解析の結果、精製された糖脂質はシアリルLewis^x(sLe^x)抗原、つまりNeuAc α 2, 3Gal β 1, 4(Fuc α 1, 3)GlcNAc-R、およびそれに類した構造NeuAc α 2, 3Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4(Fuc α 1, 3)GlcNAc-R、を非還元末端に有することが判明した。

二つの別の方法による実験においても同じ構造を持つ決定基が同定された。(i)ELAM-1に結合しない非骨髄細胞に、 α (1, 3)フコシルトランスフェラーゼのcDNAをトランスフェクトすると、その細胞はELAM-1に結合するようになった。以前にモノクローナル抗体で同定されたフコース含有決定基の内、ELAM-1の結合はシアリルLewis^x(sLe^x)構造の発現ともっともよく関連した(18)。そして、(ii)活性化された内皮やプラスチックに固定化されたELAM-1への骨髄細胞の接着は、抗sLe^x抗体、又はsLe^x決定基を持つ精製糖脂質を含むリボソームによって阻害された(51, 52)。

これらの複数の報告が一致することから、sLe^xの構造がELAM-1による最小の結合決定基であると確信できる。これらの研究の結果、糖鎖を介する細胞認識の生理学的な重要性が確立され、いくつかの手法が糖鎖決定基の同定に有効であることが示された。

E. 神経細胞の糖脂質結合蛋白質

ガングリオシドに対する神経細胞上の相補的な結合蛋白質は、細胞を固定化したガングリオシドに接着させたり(20, 53)放射能標識したりガンドを結合させることによって示された(26)。胎児の神経網膜細胞を放射能標識して分散し、種々の脂質を吸着させたプラスチックディッシュに加えると、ガングリオシドに選択的に接着されることが観察された(20)。細胞の生存率を下げない程度で、しかも組織分離に用いるよりも高い濃度の蛋白質分解酵素で細胞をあらかじめ処理しておくと、ガングリオシドに対する接着は減少した。これらの結果は神経細胞の表面に蛋白質のガングリオシド受容体が存在することを示唆した。これに似た結果はマウスの神経芽腫細胞株、S20Yを用いても得られている(53)。即ち、この細胞はGM₁を固定化したプラスチックに選択的に接着し、S20Yの表面蛋白質がGM₁オリゴ糖によって選択的に標識されることが光アフィニティー標識法を用いて示されたと予報されている(54)。

放射能標識したガングリオシドを用いて直接受容体を検出しようとする、非特異的な吸着や膜への挿入がおこって結果は煩雑になってしまう(12, 13)。脂質部分によっておこる非特異

insertion(12, 13). Multivalent ganglioside conjugates which circumvent lipid-mediated associations have been useful in generating well-behaved, high affinity binding ligands for ganglioside receptors(55). The major brain ganglioside GT_{1b} was covalently linked, through its ceramide portion, to a non-glycosylated protein carrier(albumin) to generate a multivalent "neoganglioprotein." Binding of radioiodinated neoganglioprotein to isolated rat brain membranes revealed a receptor with high affinity(2 nM) for the conjugate(26). Purified gangliosides selectively inhibited binding; those having the "1b" substructure(GD_{1b}, GT_{1b}, and GQ_{1b}) were the most potent with IC₅₀ values ≤ 100 nM. Subcellular and anatomical studies localized the binding activity specifically to CNS myelin, which is elaborated by oligodendroglial cells in the brain(56). Interestingly, GT_{1b} and GD_{1b} are nearly absent from rat oligodendroglial membranes, but are the predominant species on the axons which they ensheath, raising the possibility that the myelin ganglioside receptor may be involved in oligodendroglial-axon recognition or in myelin stabilization.

F. Sulfated Glucuronyl Glycosphingolipids as Cell Adhesion Determinants in the Peripheral Nervous System

A proportion of patients with plasma cell dyscrasias expressing monoclonal IgM antibodies have associated weakness and sensory loss characteristic of peripheral neuropathy. Many of these monoclonal IgM's are directed against components of peripheral myelin(57), the membranes of Schwann cells which ensheath and insulate axons projecting to or from the central nervous system(CNS). Some of these antibodies, as well as a mouse monoclonal antibody(HNK-1), bind to carbohydrate determinants found on myelin glycosphingolipids and glycoproteins. Glycosphingolipids expressing this determinant were purified and their structure characterized(58, 59). They are sulfoglucuronylneolactosylceramides(SGNL-lipids), having the unusual non-reducing terminal saccharide 3-SO₄-GlcA β 1, 3 attached to the outermost Gal of a neolactosylceramide core. It is assumed (although not demonstrated) that a similar structure is carried on immunoreactive glycoproteins(60).

The role of the SGNL determinant in neural cell adhesion remains speculative. There is no direct evidence that the monoclonal antibodies associated with peripheral neuropathy cause Schwann cells to de-adhere from axons. However, cell-cell and cell-substratum adhesion of neural cells *in vitro* is perturbed by HNK-1 antibodies(62). Furthermore, rabbits immunized with lipids carrying the SGNL determinant showed some muscle weakness(61) and plasmapheresis reduces neuropathy in some patients expressing antibodies against this epitope(57).

Direct evidence for Schwann cell adhesion to SGNL-lipids was recently demonstrated *in vitro*(63). Peripheral nerve glycolipids were resolved by TLC and overlaid with radiola-

的結合を回避するように作成した多価のガングリオシド複合体は、ガングリオシド受容体を検索するために都合よく挙動して高い親和性を持つリガンドとして有効であった(55)。脳の主要なガングリオシドであるGT_{1b}を、そのセラミド部分を介して糖鎖を持たないキャリアー蛋白質(アルブミン)に共有結合させて、多価の"ネオガングリオ蛋白質"を作成した。放射性ヨウ素標識したネオガングリオ蛋白質のラットの脳の膜への結合から、このものへ高い親和性(2nM)を有する受容体の存在が明らかとなった(26)。精製したガングリオシドは選択的に結合を阻止した。"1b"の構造を有するガングリオシド(GD_{1b}, GT_{1b}, GQ_{1b})が、IC₅₀値が100 nM以下であり、もっとも効果的であった。組織学的な研究の結果、脳の乏枝神経膠細胞によって構築される中枢神経系のミエリンに特異的に結合することが明らかになった(56)。興味深いことに、GT_{1b}やGD_{1b}はラットの乏枝神経膠細胞の膜にほとんど存在せず、それらが包み込んでいる軸索における主要成分であった。このことから、ミエリンのガングリオシド受容体は乏枝神経膠細胞と軸索間の認識、又は、ミエリンの安定化に関与している可能性が出てきた。

F. 末梢神経系における細胞接着決定基としての硫酸化グルクロン酸含有糖脂質

形質細胞の障害でモノクローンのIgM抗体を産生している患者のなかには、脱力や感覚麻痺といった末梢神経症を伴った人がある。これらモノクローンIgMの多くは、末梢ミエリンの構成成分、即ち、中枢神経へ出入りする軸索を包み込んで絶縁しているシュワン細胞の膜に結合する(57)。これらの抗体のいくつかとマウスのモノクローン抗体(HNK-1)は、ミエリンのスフィンゴ糖脂質と糖蛋白質上の糖鎖の決定基に結合する。この決定基を発現している糖脂質が精製され、その構造が決定された(58, 59)。それらは、スルホグルクロニルネオラクトシルセラミド(SGNL-脂質)であり、ネオラクトシルセラミドのコアの1番外側のGalに珍しい非還元末端糖である3-SO₄-GlcA β 1, 3が結合している。証明されていないが、これに似た構造が免疫活性のある糖蛋白質にも存在すると推定されている(60)。

SGNL決定基の神経細胞の接着における役割は、まだ推測の域を出ていない。末梢神経症を伴うモノクローン抗体が、軸索からシュワン細胞をはがすという直接の証拠はない。しながら、*in vitro*では、神経細胞の細胞間および細胞と基質の間の接着は、HNK-1抗体で阻害される(62)。さらに、SGNL決定基を有する脂質で免疫したウサギは筋肉の脱力を示した(61)、このエピトープに対する抗体を産生している患者のなかには、血漿搬出法を行うと神経症状を改善されたものもいた(57)。

最近、シュワン細胞が*in vitro*で、SGNL脂質に接着するという直接的な証拠が示された(63)。末梢神経の糖脂質をTLCで

beled Schwann cells. SGNL-lipids supported cell adhesion while gangliosides and neutral glycosphingolipids, which were present at higher concentrations, did not. The adhesion was cell type specific, in that liver, retina, and muscle cells did not adhere to SGNL-lipids, while Schwann cells did(64). These data suggest the presence of receptors on Schwann cell membranes complementary to the SGNL determinant which may mediate cell recognition in the peripheral nervous system. Data demonstrating such a receptor on peripheral nerve myelin were recently obtained using a radioligand consisting of multiple SGNL oligosaccharides linked to radioiodinated serum albumin(65).

G. Glycosphingolipids and Soluble Lectins in Dorsal Root Ganglia and Spinal Cord

Primary sensory neurons in the dorsal root ganglion (DRG) receive somatosensory input and send signals on *via* projections to the spinal cord. Several distinct classes of DRG neurons have been identified by anatomic and functional criteria, each of which extends axons to particular regions(lamina) of the spinal cord(66). Studies with monoclonal antibodies which recognize discrete carbohydrate determinants revealed distinct patterns of glycoconjugate expression by different classes of DRG neurons(67). Cells expressing a sialylated globoseries structure recognized by antibody SSEA-4 (having a NeuAc α 2, 3 Gal β 1, 3 GalNAc terminus) make up $\approx$ 10% of the DRG neurons, and project to deep (lamina III and IV) spinal cord targets, while cells expressing neolactoseries determinants with nonreducing Gal termini (recognized by antibody A5) are morphologically distinct, make up about half of the DRG neurons, and project to the more superficial dorsal spinal cord (lamina I and II). A fascinating correlation in the distribution of Gal-terminated determinants and Gal-specific lectins was reported(68). A soluble vertebrate lectin designated RL-29 colocalized with >90% of A5-positive cells but with <1% of cells recognized by SSEA-4. The same lectin was found in the superficial dorsal spinal cord where A5-positive cells project, but not in the deeper lamina where SSEA-4 cells project. Based on this correlation, it has been proposed that extracellular Gal-specific lectins might facilitate cell-cell recognition by cross-linking membranes expressing the appropriate determinants(69).

H. Conclusions and Perspectives

The discoveries of roles for gangliosides and related of glycosphingolipids in cell recognition have accelerated along with improvements in their purification and structural analysis. The hypothesis that this major family of cell surface complex carbohydrates participates in important recognition phenomena has now been repeatedly demonstrated. As specific glycosphingolipids are implicated in a greater variety of cell regulation events, there is a continuing need for studies to elucidate their

分離して、そこに放射能標識したシュワン細胞を加えた。細胞は、SGNL脂質には接着したが、それよりもっと高濃度に含まれるガングリオシドや中性の糖脂質には接着しなかった。接着は細胞の種類に特異的で、シュワン細胞が接着する条件において肝臓、網膜、筋肉の細胞は接着しなかった(64)。これらの結果からシュワン細胞の膜には、SGNL決定基に相補的な受容体が存在し、それが末梢神経系において細胞認識をつかさどっているのかも知れない。最近、そのような受容体が末梢神経のミエリンに存在するという結果が、複数のSGNLオリゴ糖を放射性ヨウ素標識した血清アルブミンに結合して作成した放射性のリガンドを用いることで得られた(65)。

G. 背根神経節と脊髄のスフィンゴ糖脂質と可溶性レクチン

背根神経節(DRG)の第一感覚神経は身体感覚の入力を受け取り、突起経路で脊髄にシグナルを送る。解剖学的、機能的基準によってDRG神経はいくつかの異なるクラスに分類されており、それらは脊髄の決まった部位(層)に軸索を伸ばしている(66)。異なった糖鎖決定基を認識するモノクローン抗体を用いた研究により、異なったクラスのDRG神経はそれぞれ複合糖質の発現のパターンが異なることが示された(67)。SSEA-4抗体により認識されるシアリル-グロブ系の構造(NeuAc α 2, 3 Gal β 1, 3GalNAcの末端構造を持つ)を発現する細胞は、DRG神経の約10%を占めており、脊髄の深い部分(IIIおよびIV層)に軸索を伸ばしている。一方、非還元末端にGalを持つネオラクト系の決定基(A5抗体によって認識される)を発現している細胞は、形態的にも他と異なり、DRG神経の約半分を占め、脊髄背部のもっと表層(IおよびII層)に軸索を伸ばしている。末端にGalを持つ決定基とGal特異的なレクチンの分布が見事に関連していることが報告されている(68)。RL-29と呼ばれる可溶性の脊椎動物由来レクチンは、A5陽性細胞の90%以上にも存在するが、SSEA-4により認識される細胞での存在は1%にも満たなかった。同じレクチンは、A5陽性細胞が軸索を伸ばす脊髄背部の表層に見い出されたが、SSEA-4陽性細胞が軸索を伸ばす深層には見い出されなかった。この関係に基づいて、細胞外のGal特異的なレクチンが相補的な決定基を発現している膜同士をつなぎ合わせるることによって、細胞間の認識を促進している可能性が提案されている(69)。

H. 結論と展望

精製法や構造解析の技術が発達することによって、ガングリオシドや糖脂質の細胞認識における役割の発見が加速されてきた。今やこの細胞表面の複合糖質の主要成分が重要な認識現象に関係しているという仮説は繰り返示されている。特異的な糖脂質が様々な細胞認識機構に関与しているので、その作用

mechanisms of action. These are likely to converge on two general schemes(10): Interactions of glycosphingolipids with complementary receptors in apposing membranes(*trans* recognition), and modulation of activities of proteins in the same membrane(*cis* regulation). A combination of these mechanisms may link glycosphingolipid recognition to transmembrane control of cell physiology.

Acknowledgements

Financial support from the National Institutes of Health (HD14010) and the National Multiple Sclerosis Society (RG 2223-A-1) are gratefully acknowledged. Portions of this manuscript were adapted, with permission, from Advances in Pharmacology, Volume 23, Copyright © 1991 by Academic Press, Inc, and Glycobiology, Copyright © 1991 by IRL Press at Oxford University Press.

References

- Sharon, N. and Lis, H. (1989) *Science* **246**, 227-234
- Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M.D. (1987) *Science* **238**, 491-497
- Eggens, I., Fenderson, B., Toyokuni, T., Dean, B., Stroud, M., and Hakomori, S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 9476-9484
- Kojima, N. and Hakomori, S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 20159-20162
- Rutishauser, U. and Jessell, T.M. (1988) *Physiol. Rev.* **68**, 819-857
- Lawrence, M.B. and Springer, T.A. (1991) *Cell* **65**, 859-873
- Homans, S.W., Dwek, R.A., and Rademacher, T.W. (1987) *Biochemistry* **26**, 6571-6577
- Carver, J.P. & Brisson, J.-R. (1984) in: *Biology of Carbohydrates*, Volume 2 (Ginsburg, V. and Robbins, P.W. eds.) pp. 289-331, John Wiley & Sons, New York
- Yu, R.K., Koerner, T.A.W., Scarsdale, J.N., and Prestegard, J.H. (1986) *Chem. Phys. Lipids* **42**, 27-48
- Hakomori, S. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 18713-18716
- Bremer, E.G., Schlessinger, J., and Hakomori, S. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 2434-2440
- Toffano, G., Benvegnu, D., Bonetti, A.C., Facci, L., Leon, A., Orlando, P., Ghidoni, R., and Tettamanti, G. (1980) *J. Neurochem.* **35**, 861-866
- Nakamura, M., Ogino, H., Nojiri, H., Kitagawa, S., and Saito, M. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 782-789
- MacDonald, D.L., Patt, L.M., and Hakomori, S. (1980) *J. Lipid Res.* **23**, 111-120
- Zhou, B., Li, S.-C., Laine, R.A., Huang, R.T.C., and Li, Y.T. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 12272-12277
- Thompson, T.E. & Brown, R.E. (1988) in: *New trends in ganglioside research: neurochemical and neuroregenerative aspects* (Ledeen, R.W., Hogan, E.L., Tettamanti, G., Yates, A.J., and Yu, R.K. eds.) pp. 65-79, Liviana Press, Padova
- Fishman, P.H. (1986) *Chem. Phys. Lipids* **42**, 137-151
- Lowe, J.B., Stoolman, L.M., Nair, R.P., Larsen, R.D., Berhend, T.L., and Marks, R.M. (1990) *Cell* **63**, 475-484
- Holmgren, J., Elwing, P., Fredman, P., and Svennerholm, L. (1980) *Eur. J. Biochem.* **106**, 371-379
- Blackburn, C.C., Swank-Hill, P., and Schnaar, R.L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 2873-2881
- Blackburn, C.C. and Schnaar, R.L. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 1180-1188
- Magnani, J.L., Smith, D.F., and Ginsburg, V. (1980) *Anal. Biochem.* **109**, 399-402
- Magnani, J.L., Brockhaus, M., Smith, D.F., and Ginsburg, V. (1982) *Methods Enzymol.* **83**, 235-241
- Karlsson, K.-A. and Stromberg, N. (1987) *Methods Enzymol.* **138**, 220-232
- Swank-Hill, P., Needham, L.K., and Schnaar, R. (1987) *Anal. Biochem.* **163**, 27-35
- Tiemeyer, M., Yasuda, Y., and Schnaar, R.L. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 1671-1681
- Schengrund, C.-L. and Ringler, N.J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 13233-13237
- Kannagi, R., Watanabe, K., and Hakomori, S. (1987) *Methods Enzymol.* **138**, 3-12
- Dell, A. (1987) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **45**, 19-72
- Lee, Y.C. (1990) *Anal. Biochem.* **189**, 151-162
- Karlsson, K.-A. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 309-350
- Paulson, J.C. (1987) in: *The Receptors*, Vol. II (Conn, P.M. ed.) pp. 131-219, Academic Press, New York
- Ofek, I. and Sharon, N. (1990) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **151**, 91-113
- Holmgren, J. (1973) *Infect. Immun.* **8**, 851-859
- Sixma, T.K., Pronk, S.E., Kalk, K.H., Wartna, E.S., van Zanten, B.A.M., Witholt, B., and Hol, W.G.J. (1991) *Nature* **351**, 371-377
- Moss, J., Fishman, P.H., Manganiello, V.C., Vaughan, M., and Brady, R.O. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 1034-1037
- Pacuszka, T., Bradley, R.M., and Fishman, P.H. (1991) *Biochemistry* **30**, 2563-2570
- Pritchett, T.J. and Paulson, J.C. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 9850-9858
- Lee, R.T. and Lee, Y.C. (1987) *Glycoconjugate J.* **4**, 317-328

の機構を解明するための研究が行われ続けなければならない。これらは、次の二つの体系にまとめられるように思われる(10)。近傍にある別の膜に存在する相補的受容体と糖脂質の相互作用(トランスの認識)と、同じ膜上の蛋白質の活性の調節(シスの制御)である。これらの機構が組み合わされることによって、糖脂質の認識が細胞の生理機能の制御に結び付けられているのであろう。

三菱化成生命科学研究所 複合糖質研究室
東 秀好 訳

40. Brandley, B.K., Swiedler, S.J., and Robbins, P.W. (1990) *Cell* **63**, 861-863
41. Stoolman, L.M. (1989) *Cell* **56**, 907-910
42. Johnston, G.I., Cook, R.G., and McEver, R.P. (1989) *Cell* **56**, 1033-1044
43. Bevilacqua, M.P., Stengelin, S., Gimbrone, M.A., Jr., and Seed, B. (1989) *Science* **243**, 1160-1165
44. Siegelman, M.H., van de Rijn, M., and Weissman, I.L. (1989) *Science* **243**, 1165-1172
45. Lasky, L.A., Singer, M.S., Yednock, T.A., Dowbenko, D., Fennie, C., Rodriguez, H., Nguyen, T., Stachel, S., and Rosen, S.D. (1989) *Cell* **56**, 1045-1055
46. Drickamer, K. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 9557-9560
47. Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Mendrick, D.L., Cotran, R.S., and Gimbrone, M.A., Jr. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 9238-9242
48. Tiemeyer, M., Swiedler, S., Ishihara, M., Moreland, M., Schweingruber, H., Hirtzer, P., and Brandley, B. (1990) *J. Cell Biol.* **111**, 159a
49. Tiemeyer, M., Swiedler, S.J., Ishihara, M., Moreland, M., Schweingruber, H., Hirtzer, P., and Brandley, B.K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1138-1142
50. Fukuda, M.N., Dell, A., Tiller, P.R., Varki, A., Klock, J.C., and Fukuda, M. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 2376-2383
51. Phillips, M.L., Nudelman, E., Gaeta, F.C.A., Perez, M., Singhal, A.K., Hakomori, S., and Paulson, J.C. (1990) *Science* **250**, 1130-1132
52. Walz, G., Aruffo, A., Kolanus, W., Bevilacqua, M., and Seed, B. (1990) *Science* **250**, 1132-1135
53. Fueshko, S.M. and Schengrund, C.-L. (1990) *J. Neurochem.* **54**, 1791-1797
54. Fueshko, S.M. and Schengrund, C.-L. (1991) *Trans. Am. Soc. Neurochem.* **22**, 129 (abstr.)
55. Tiemeyer, M. & Schnaar, R.L. (1990) in: *Trophic Factors and the Nervous System* (Horrocks, L. A., Neff, N. H., Yates, A. J., and Hadjiconstantinou, M. eds.) pp. 119-133, Raven Press, New York
56. Tiemeyer, M., Swank-Hill, P., and Schnaar, R.L. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 11990-11999
57. Quarles, R.H., Ilyas, A.A., and Willison, H.J. (1986) *Chem. Phys. Lipids* **42**, 235-248
58. Chou, D.K.H., Ilyas, A.A., Evans, J. E., Costello, C., Quarles, R.H., and Jungalwala, F.B. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 11717-11725
59. Ariga, T., Kohriyama, T., Freddo, L., Latov, N., Saito, M., Kon, K., Ando, S., Suzuki, M., Hemling, M.E., Rinehart, K.L., Kusunoki, S., and Yu, R.K. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 848-853
60. Schachner, M. (1989) *Ciba Found. Symp.* **145**, 156-172
61. Kohriyama, T., Ariga, T., and Yu, R.K. (1988) *J. Neurochem.* **51**, 869-877
62. Kunemund, V., Jungalwala, F.B., Fischer, G., Chou, D.K.H., Keilhauer, G., and Schachner, M. (1988) *J. Cell Biol.* **106**, 213-223
63. Needham, L.K. and Schnaar, R.L. (1990) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **605**, 416-419
64. Needham, L.K. and Schnaar, R.L. (1991) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* in press
65. Needham, L.K., Yang, L., and Schnaar, R.L. (1991) *J. Cell Biol.* abstract in press
66. Brown, A.G. (1983) *Organization in the Spinal Cord*, Springer-Verlag, New York,
67. Dodd, J. and Jessell, T.M. (1985) *J. Neurosci.* **5**, 3278-3294
68. Regan, L.J., Dodd, J., Barondes, S.H., and Jessell, T.M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2248-2252
69. Jessell, T.M., Hynes, M.A., and Dodd, J. (1990) *Annu. Rev. Neurosci.* **13**, 227-255