

三量体 G タンパク質を介する情報伝達における脂質ラフトの役割

大久保聡子,^{*,a} 中畑則道^{b,c}

The Role of Lipid Rafts in Trimeric G Protein-mediated Signal Transduction

Satoko OHKUBO,^{*,a} and Norimichi NAKAHATA^{b,c}

^aDepartment of Pharmacology, National Institute of Health and Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan, ^bDepartment of Cellular Signaling, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, and ^cTohoku University 21st Century COE Program “CRESCENDO”, 6-3 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai City 980-8578, Japan

(Received September 13, 2006)

Lipid rafts and caveolae are microdomains in the cell membranes, which contain cholesterol, glycolipids, and sphingomyelin. While caveolae are relatively stable because caveolin, an integral protein, supports the structure, lipid rafts are considered to be unstable, being dynamically produced and degraded. Recent studies have reported that lipid rafts contain many signaling molecules, such as glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins, acylated proteins, G-protein-coupled receptors (GPCRs), trimeric and small G-proteins and their effectors, suggesting that the lipid rafts have an important role in receptor-mediated signal transduction. Therefore drugs that modify the composition of lipid rafts might influence the efficacy of cellular signal transduction. In this review, we demonstrate the role of lipid rafts in GPCR-G-protein signaling and also present our recent results showing that the wasp toxin mastoparan modifies G_{q/11}-mediated phospholipase C activation through the interaction with gangliosides in lipid rafts.

Key words—lipid rafts; mastoparan; G_{q/11}; cholesterol; methyl-β-cyclodextrin; trimeric G-protein

1. はじめに

細胞は、細胞外からもたらされる様々なシグナルを細胞膜に存在する受容体により受容し、その情報を内部に伝えることによって細胞応答をもたらす。近年、多くの生理活性物質の受容体として知られる G タンパク質連関型受容体 (G-protein-coupled receptor, GPCR) やそれに連関する三量体 G タンパク質、及び G タンパク質に制御される様々なエフェクター分子が「脂質ラフト」と総称される細胞膜上の微小なマイクロドメインに集積していることが明らかになりつつある。このため、脂質ラフトは細胞外からの刺激を受容したのち速やかに細胞内に伝えるための「情報の場」として機能している可能

性が考えられている。これは一方で、脂質ラフトの構造を変化させる薬物が GPCR を介する細胞情報伝達系に対して何らかの修飾作用を及ぼすことを示唆している。

そこで本稿ではまず脂質ラフトの構造及びその特徴について概説し、細胞内情報伝達、特に GPCR を介するシグナリングとの係わりについて述べ、最後に、最近われわれが明らかにしたハチ毒マストパランの細胞内情報伝達に対する修飾作用に対する脂質ラフトの関与について紹介する。

2. 脂質ラフトの構成

現在考えられている細胞膜のモデルになっているのは、1972年 Singer と Nicholson により提唱された流動膜モザイクモデルである。¹⁾ リン脂質は流動的な二重層を形成しており、この中に埋め込まれたタンパク質は其中を自由に動くことができるというこの考えは、当時大変な興味を持って迎え入れられ、その後今に至るまで細胞膜モデルを考える上での基礎になっている。しかし、細胞膜を構成する脂質の種類はグリセロリン脂質やスフィンゴ脂質など

^a国立医薬品食品衛生研究所薬理部 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1), ^b東北大学大学院薬学研究科細胞情報薬学分野, ^c東北大学 21 世紀 COE プログラム “CRESCENDO” (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)

*e-mail: satoko@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S21 で発表したものを中心に記述したものである。

様々であり、さらに脂質分子内のアルキル鎖の炭素鎖長や不飽和度も多様であるにも係わらず、当初それら様々な脂質の分子的性質の違いが及ぼす膜構造への影響については考慮されていなかった。それから年月を経た現在、様々な実験的又は理論的証拠の蓄積により、細胞膜の脂質二重層はけっして均一な形ではないことが明らかになってきた。例えば、細胞膜の内葉と外葉では脂質の組成に違いがあり、ホスファチジルコリンやスフィンゴミエリン、ガンダリオシドなどは主に細胞膜外葉に存在するのに対し、ホスファチジルセリンやホスファチジエタノールアミン、ホスファチジルイノシトールなどは細胞膜内葉に存在する。²⁾ さらに、スフィンゴ糖脂質やコレステロールなど特定の脂質がその分子特性に基づいて他のグリセロリン脂質に富む領域から分離する結果、細胞膜上に微小ドメイン（マイクロドメイン）を構成していることが明らかになってきた。このマイクロドメインについてはこれまで様々な名称が用いられてきたが、現在は脂質ラフト (lipid raft) と総称することが多くなっている。³⁾

脂質ラフトとはその名の通り、「筏 (いかだ)」を意味する英単語であり、マイクロドメインはあたかも細胞膜の大海の中に浮かぶ筏というイメージを表すには好都合な言葉である。このような脂質ラフトの形成にはその構成脂質の分子特性が深く関与すると考えられている。すなわち、細胞膜の多くの構成比率を占めるリン脂質は側鎖として不飽和アシル鎖を有することが多いのに対し、スフィンゴ脂質はセラミド骨格に飽和アシル鎖が結合した形を取ることが多い。その結果、スフィンゴ脂質間の飽和アシル鎖は直鎖状となり分子間相互作用が働き易いため、固くパックされた秩序液相の状態を取っているのに対して、リン脂質はその不飽和アシル鎖の存在が脂質分子の充填を妨げ、無秩序液相の状態を取る。また、コレステロールは脂質分子の炭素鎖が直鎖状に保たれるのを支持し、脂質同士の相互作用を促進すると考えられている。さらに、スフィンゴ脂質のセラミド骨格内に存在するアミド結合とコレステロールのヒドロキシル基の間には水素結合が働き、スフィンゴ脂質とコレステロールが規則的に配列する一因となっていると考えられる。Figure 1 (a)に各脂質の化学構造を示した。

このように脂質ラフトは脂質の分子的特性によっ

て生まれるものであることから、常に離散・集合を繰り返す、刺激に応じてその大きさを変えるダイナミックな構造体として捉えられている。一方、同じく細胞膜に存在するマイクロドメインとして古くから知られるものに、50—100 nm 程度の大きさで細胞膜上にフラスコ状の窪みとして観察されるカベオラ (caveolae) があるが、これはカベオリン (caveolin-1, -2, -3) というタンパク質により細胞膜内葉から構造が裏打ちされており、比較的安定な構造と考えられている (Fig. 1 (b)).⁴⁾ カベオリンにはコレステロール結合活性があり、カベオラも脂質ラフトと同様コレステロールやスフィンゴ脂質に富むことから、脂質ラフトのサブタイプとして捉えられることが多いが、すべての細胞がカベオリンを発現している訳ではなく、カベオラを持たない細胞も多い。また、カベオラに含まれる脂質の組成や局在する分子群は脂質ラフトとかならずしも同一ではなく、⁵⁾ カベオリンの働きによりその違いが生まれている可能性も考えられる。

脂質ラフトには特定の脂質のみならず、様々な特徴を有するタンパク質が局在することが明らかになってきた (Fig. 1 (b)). 例えば、glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカータンパク質は GPI アンカー部分に存在する脂肪酸が飽和型であることが多いため、脂質ラフトに挿入されるらしい。また、ミリスチン酸やパルミチン酸などの脂肪酸による修飾を受けているタンパク質も秩序液相に対して高親和性を有することから、脂質ラフトに会合すると考えられている。膜貫通部位を有するタンパク質も、その局在機構は不明であるが脂質ラフトに局在している場合がある。また、前述したカベオリンはカベオラ構造の裏打ちとしてだけでなくスキャフォールドタンパク質としての機能を有している。このため、様々なタンパク質が自身の有するカベオリン結合モチーフを介してカベオリンに結合し、その結果カベオラに局在することが報告されている。⁶⁾ 一方、flotillin (flotillin-1, -2) は従来それぞれ reggie-2, reggie-1 と呼ばれていた分子と同一のタンパク質である。Flotillin は脂質ラフトに局在することから、脂質ラフトマーカータンパク質として広く認知されるようになった。Flotillin はいくつかの脂質ラフトに局在するタンパク質に共通して見出される PHB ドメイン (prohibitin-like domain) を分子内に有し、

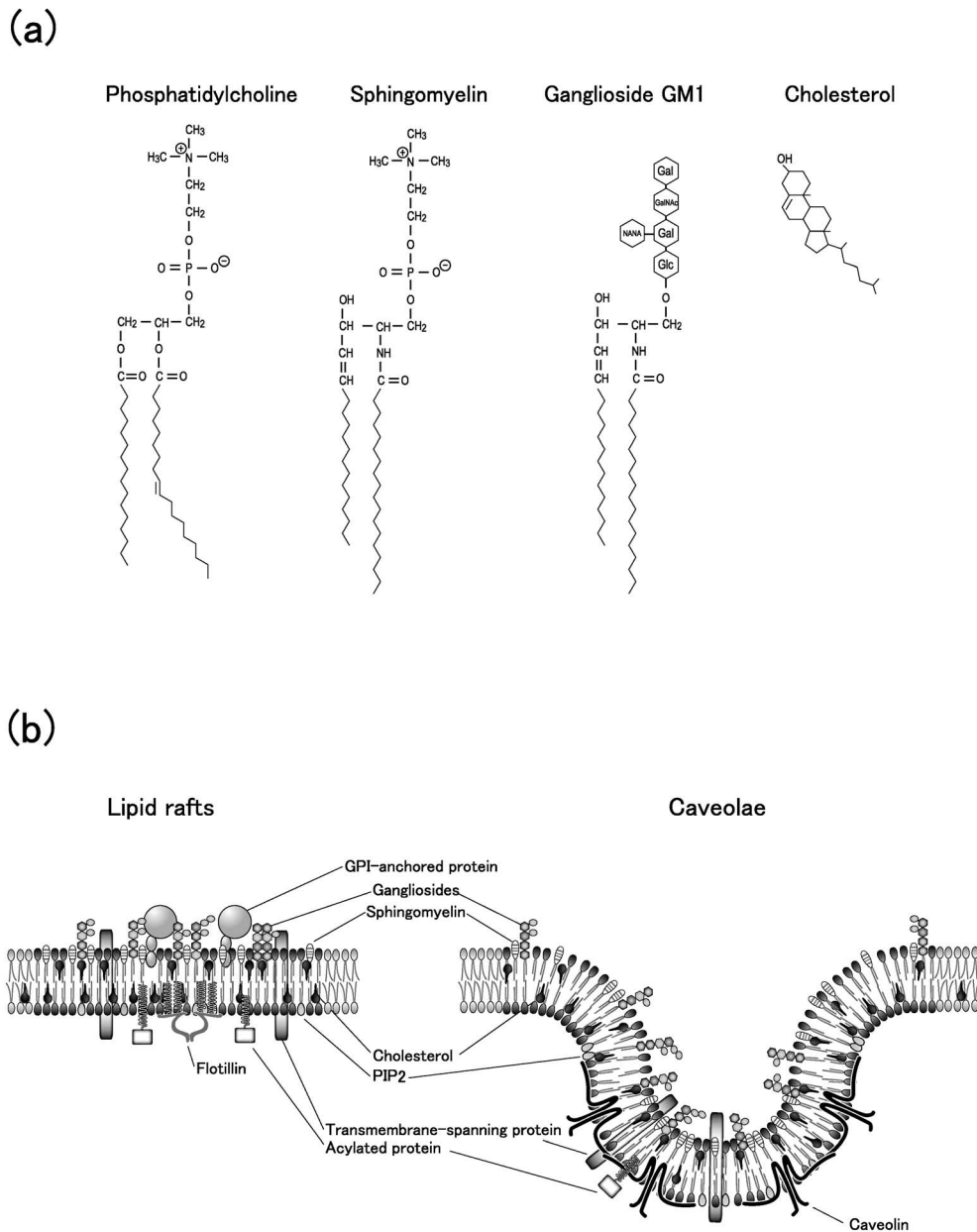


Fig. 1. Model for the Organization of Microdomains in the Plasma Membrane

(a) Chemical structures of phosphatidylcholine, sphingomyelin, ganglioside GM1 and cholesterol. (b) Model for the organization of lipid rafts and caveolae in the plasma membrane. Lipid rafts are separated from the other regions of the lipid bilayer in which unsaturated phosphatidylcholine is predominantly in the exoplasmic leaflet. Lipid rafts contain GPI-anchored proteins, proteins binding to the cytoplasmic leaflet by acyl chains, or proteins containing the transmembrane regions. Flotillin associates with lipid rafts. In contrast to lipid rafts, caveolae are stabilized by caveolin making a hairpin loop in the membrane.

さらに N 末側はパルミトイル化 (flotillin-1),⁷⁾ 又はミリストイル化及びパルミトイル化 (flotillin-2)⁸⁾ されていることから, この PHB ドメインと脂肪酸修飾を介して脂質ラフトに局在すると推測されている。

3. 脂質ラフトの解析法

細胞を低温 (4°C) で非イオン性界面活性剤により処理し, そのライゼートをショ糖密度勾配にて超遠心を行うと, 低—中密度の界面の部分に界面活性

剤難溶性画分が得られる。⁹⁾ これまでこの画分を表す言葉として detergent-insoluble glycolipid-enriched complexes (DIG), glycolipid-enriched microdomain (GEM), detergent-insoluble membrane (DIM) など様々な名称があるが, 本稿では detergent-resistant membrane (DRM) と呼ぶことにする。DRM にはスフィンゴ脂質やコレステロールが濃縮して存在することから, 脂質ラフトを含む画分の生化学的な分離法として現在汎用されている。¹⁰⁾ 分子間相互作用

により秩序相を形成する脂質ラフトは界面活性剤処理に対して安定であるのに対し、他のグリセリン脂質で構成される膜画分は可溶化され易いため、脂質ラフトは DRM に回収されるものと考えられている。しかし、このようにして生化学的に得られた DRM はあくまで界面活性剤処理などの特殊な条件により細胞を破壊して得られたものであり、本当に生細胞の細胞膜上に存在するマイクロドメインを反映しているのか、という疑問は長きに渡って議論が続いていた。現在では、後述する他の脂質ラフト解析法により得られた結果とも複合的に判断し、DRM には細胞膜上で実際観察される脂質ラフトに相当する画分が含まれているものと理解されつつある。そこで、DRM を調製して DRM 及びそれ以外の画分に含まれる目的分子の局在の比率を調べることにより、目的分子の脂質ラフトへの局在を検討する手法は、多くの研究者により行われる 1 つのスタンダードな方法になっている。DRM を単離するために用いられる界面活性剤としては Triton X-100 が最もよく用いられているが、CHAPS, Lubrol WX, Brij 98 など他の界面活性剤を使用した報告や、¹¹⁾ 界面活性剤を使わずに脂質ラフトを分画する試みもなされている。¹²⁾ しかし、それぞれの方法の違い、すなわち可溶化の温度や用いる界面活性剤の種類や濃度によって DRM の構成成分に相違が認められる。例えば 1% Triton X-100 では可溶化されるが、それより低濃度の Triton X-100 処理によって得られる DRM に集積する分子は、脂質ラフトへの会合が弱い分子であると考えられる。また、様々な各ガングリオシド特異的抗体や抗カベオリン抗体を用いた免疫沈降法により、DRM からある特定のガングリオシドを豊富に含む脂質ラフトやカベオラに相当する画分を分離している例もある。¹³⁾ このように、DRM には様々な特性を持った脂質ラフトやカベオラと一緒に含まれていると考えられる。

その他に、脂質ラフトの解析には、コレステロールを除去する薬物が使われる。脂質ラフトはコレステロールの存在がその構造維持に必須であるため、細胞膜からコレステロールを引き抜くことにより脂質ラフトが破壊される。このため、methyl- β -cyclodextrin (M β CD) や filipin などのコレステロールと結合する性質を有する薬物を細胞に処理してから薬理応答の変化を観察する、また、これら薬物処

理による DRM の構成成分の変化を検討することにより、ある細胞応答に対する脂質ラフトの関与について考察することができる。^{14,15)} しかし、このような薬物は細胞膜コレステロールを除去するため、結果的に細胞膜に傷害を与えることによる細胞毒性を有することに留意して使用しなければならない。

このように上記 2 つの方法は、前者は細胞の破壊を伴う生化学的手法であり、後者は細胞毒性を考慮しなくてはならないため、近年では、生細胞において脂質ラフトを可視化する試みが進んでいる。例えば、コレラ毒素 B サブユニットはガングリオシド GM1 に特異的に結合することから、蛍光標識したコレラ毒素 B サブユニットを用いることにより細胞膜上の GM1 を含む脂質ラフトを可視化する手法が用いられるほか、¹⁶⁾ 他のガングリオシドやスフィンゴミエリンなど脂質ラフトに集積する脂質に対する特異的なプローブの開発が進んでいる。最近では fluorescence resonance energy transfer (FRET) 技術¹⁷⁾ や single dye tracing (SDT) 法¹⁸⁾ などにより、生細胞における脂質ラフトの存在が証明されている。また、カベオラの場合にはその形態の特徴から、古くから電子顕微鏡による観察が行われており、金コロイド標識した抗体を用いた免疫電顕法により様々な分子のカベオラへの局在が報告されている。¹⁹⁾

4. 脂質ラフトの機能と細胞情報伝達系における意義

これまで脂質ラフトは、細胞内小胞輸送、コレステロール輸送、神経突起伸展、免疫応答など、多種多様な生理機能発現や病態生理に関与することが報告されてきた。²⁰⁾ 例えば、細胞内輸送に係わる事象として、上皮細胞において頂部細胞膜と側部・基底細胞膜とを比較すると、頂部細胞膜にはスフィンゴ脂質が多く含まれ、GPI アンカータンパク質も濃縮して存在している。これはスフィンゴ脂質豊富な脂質ラフトを含む小胞に親和性を有する GPI アンカータンパク質が挿入され、頂部細胞膜へと選択的に輸送されることに起因すると考えられている。²¹⁾ また、最近、神経細胞の軸索の運命決定に神経細胞自身の有するノイラミニダーゼ (シアリダーゼ: ガングリオシドのシアル酸を切断する酵素) 活性が関与することが報告され、脂質ラフト構成の変化が神経機能に影響をもたらす可能性が示唆されている。²²⁾ 一方、脂質ラフトと病態発現との関連を指

摘する事実として、インフルエンザや HIV などのウイルス、病原菌が宿主細胞へ侵入する際、その経路に脂質ラフトが使われることが知られている。細菌毒素はガングリオシドを足場として細胞に結合、作用を及ぼすことが知られており、例えばコレラ毒素は前述のようにガングリオシド GM1 と、ボツリヌス毒素やテタヌス毒素は GT1b その他と結合することが報告されている。²³⁾ また、アルツハイマー病におけるアミロイド β ペプチドの凝集及び沈着が、神経細胞の細胞膜上の GM1 やコレステロール豊富な脂質ラフトを足場として生じること、²⁴⁾ さらにプリオン病と脂質ラフトとの関連性など、²⁵⁾ 病態発現と脂質ラフトの関連性については多くの報告がなされている。

しかし、脂質ラフトがこれほどまでに注目されるようになったのは、このマイクロドメインが実は細胞情報伝達を効率的に行うためのいわば「プラットフォーム」としての機能を担っている可能性が、様々な実験的証拠の積み重ねにより示されてきたことが大きい。²⁶⁾ すなわち、細胞内部には膨大な数の細胞情報伝達に関連する分子群が存在するにも関わらず、速やかに多種多様な細胞外からの刺激に対応して各々の細胞内シグナルに翻訳され、最終的な細胞応答につながっていく。この整然とした迅速な一連の流れがどのように惹起され、制御されているのかを考えると、脂質ラフトがシグナリングプラットフォームとしての機能を有し、そこに情報伝達に係わる分子群が集積して、効率的かつ細胞外刺激に応じた特異的なシグナリングを可能にする、という考え方は広く支持されるようになった。

実際、これまで様々な細胞情報伝達に対する脂質ラフトの関与が示唆されている。例えば、チロシンキナーゼ型受容体であるインシュリン受容体は脂質ラフト/カベオラ画分に存在しており、コレステロール除去により脂質ラフトを破壊する M β CD により insulin receptor substrate (IRS)-1 のチロシンリン酸化やグルコース輸送が抑制される一方、インシュリン受容体のリガンド結合能や自己リン酸化は影響されないことから、脂質ラフト/カベオラはインシュリン受容体活性化から次のシグナル分子へと情報が伝わっていく際に必要な場として機能していることが示唆されている。²⁷⁾ また、T 細胞の細胞膜に存在する T 細胞抗原受容体 TCR が活性化シグナル

を受け取ると、次々に脂質ラフトが集合して大ラフトを形成し、多くのシグナル分子が一同に集合して様々なシグナルカスケードが一気に進行する。²⁸⁾ このように現在ではすべて列挙するのが難しいほど、数多くのシグナル伝達と脂質ラフトとの関連性が指摘されており、多くのシグナル伝達関連分子が脂質ラフトに濃縮して存在するとの知見が蓄積しつつある。

5. 三量体 G タンパク質を介するシグナル伝達における脂質ラフトの役割

GPCR は細胞膜を 7 回貫通する受容体膜タンパク質であり、多くの神経伝達物質やホルモン、オータコイドなどの受容体がこの型に属し、スーパーファミリーを形成している。現在臨床で数々の疾病治療に対して使用されている薬物の多くがこの GPCR を標的とすることからも、GPCR を介するシグナル伝達の詳細を知ることは重要であり、精力的にその解析が進められている。²⁹⁾ GPCR の多くは三量体 G タンパク質を介して細胞内へシグナルを伝達するが、現在までに三量体 G タンパク質として G_s, G_i, G_q, G₁₂ ファミリーが知られており、それぞれのファミリーにはさらにいくつかのサブタイプが存在する。受容体活性化に伴い、三量体 G タンパク質 α サブユニット (G α) は GDP 結合型 (不活性型) から GTP 結合型 (活性型) となり、 β , γ サブユニット (G $\beta\gamma$) から解離して G α , G $\beta\gamma$ それぞれが酵素やチャネルなどエフェクター分子の活性制御を通じて細胞内にシグナルを伝えていく。³⁰⁾

このような三量体 G タンパク質を介する情報伝達系に係わる分子も多数脂質ラフトに存在していることが知られている。特に三量体 G タンパク質のシグナル伝達に係わる基本的な分子群の中で、脂質ラフトへの局在が報告されているものの例を Table 1 に示した。このような分子がどのような機構で脂質ラフトに局在するのかについては様々な例が報告されている。例えば、カベオラに存在する分子の中にはカベオリン結合モチーフを有するものがあるが、脂質ラフト/カベオラに局在することが知られる GPCR の中でも、アドレナリン β 受容体やエンドセリン受容体などはそのモチーフを持っており、これが受容体の局在を規定していることが報告されている。³¹⁾ また、GPCR の多くは翻訳後糖鎖修飾を受けているが、その糖鎖修飾が脂質ラフトへの会合

Table 1. Signaling Molecules Related to GPCR-mediated Signaling in Lipid Rafts/Caveolae

GPCR		Regulator of G protein Signaling	
Adrenergic β_1, β_2	<i>J. Biol. Chem.</i> , 276 , 42063 (2001).	RGS9-1	<i>Curr. Biol.</i> , 12 , 421 (2002).
Bradykinin B ₁	<i>Mol. Pharmacol.</i> , 61 , 546 (2002).	RGS16	<i>J. Biol. Chem.</i> , 278 , 19301 (2003).
Cannabinoid CB ₁	<i>J. Biol. Chem.</i> , 280 , 12212 (2005).	Lipids	
Chemokine CXCR1	<i>Mol. Cell. Biol.</i> , 25 , 5752 (2005).	PIP ₂	<i>J. Biol. Chem.</i> , 273 , 22298 (1998).
Sphingosine 1-phosphate EDG-1	<i>J. Biol. Chem.</i> , 275 , 32363 (2000).	Effector etc.	
Endothelin ET _A , ET _B	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> , 91 , 11728 (1994).	Adenylyl cyclase AC3, AC5, AC6	<i>Mol. Pharmacol.</i> , 62 , 983 (2002).
	<i>Eur. J. Biochem.</i> , 270 , 1816 (2003).	Protein kinase C- α	<i>J. Cell Biol.</i> , 131 , 929 (1995).
Gamma-aminobutyric acid GABA _B	<i>J. Neurochem.</i> , 79 , 787 (2001).	TRP1	<i>J. Biol. Chem.</i> , 275 , 11934 (2000).
Gonadotropin-releasing hormone GnRH	<i>J. Biol. Chem.</i> , 278 , 31593 (2003).	IP ₃ receptor	<i>J. Biol. Chem.</i> , 275 , 11934 (2000).
Neurokinin NK1	<i>J. Biol. Chem.</i> , 280 , 7135 (2005).	Kir ₃ channel	<i>J. Neurosci.</i> , 22 , 7154 (2002).
Thyrotropin TSH	<i>Endocrinology</i> , 144 , 4725 (2003).	Ca ²⁺ -ATPase	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> , 92 , 1759 (1995).
Trimeric G proteins		Calmodulin	<i>J. Biol. Chem.</i> , 271 , 6518 (1996).
G _s	<i>J. Cell Biol.</i> , 126 , 127 (1994).	Src family tyrosine kinase (c-Src, Fyn, Lyn etc.)	<i>J. Cell Biol.</i> , 126 , 111 (1994).
G _{i/o}	<i>J. Cell Biol.</i> , 126 , 127 (1994).	eNOS	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> , 93 , 6448 (1996).
G _t	<i>Curr. Biol.</i> , 12 , 421 (2002).		
G _{q/11}	<i>J. Biol. Chem.</i> , 273 , 22298 (1998).		
G ₁₂	<i>J. Biol. Chem.</i> , 277 , 32409 (2002).		
G β	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> , 92 , 10104 (1995).		

に何らかの関与をしている可能性がスフィンゴシン 1 リン酸 Edg-1 受容体において見出されている。³²⁾ また、三量体 G タンパク質はミリスチル化やパルミトイル化など脂肪酸による翻訳後修飾を受けており、³³⁾ これら脂肪酸修飾が三量体 G タンパク質の脂質ラフトへの局在を規定しているほか、直接 G タンパク質がカベオリンとの結合を介してカベオラに局在すること、⁴⁾ また G α_{12} の場合には heat shock protein 90 との結合を介して脂質ラフトに局在するとの報告がある。³⁴⁾

これらシグナル関連分子は常に脂質ラフトに局在するという訳ではなく、その出入りが何らかの機構により制御されていることも多い。例えば、ブラジキニン B₁ 受容体は元々非カベオラ画分に存在しているが、アゴニスト刺激によりカベオラ画分に移行する例として報告されている。³⁵⁾ 一方、心筋細胞におけるアドレナリン β_2 受容体³⁶⁾ やアデノシン A₁ 受容体³⁷⁾ はアゴニスト刺激によりカベオラ画分から非カベオラ画分に移行する。また、光情報伝達に関与する三量体 G タンパク質トランスデュシン (G_t) は、光刺激によるロドプシン活性化により、その制御因子である RGS9-1 とともに脂質ラフト画分へ移

行することが報告されている。³⁸⁾ さらに近年、GPCR 活性化により上皮成長因子受容体 (EGFR) の transactivation が生じ、GPCR 及びチロシンキナーゼ型受容体シグナリングのクロストークが行われていることが広く認識されてきたが、エンドセリンによる ET_A 受容体を介した EGFR の transactivation にはカベオラが必要であることが腎メサンギウム細胞を用いた実験で示された。³⁹⁾ このように脂質ラフトへのシグナル分子の局在は時空間的に制御されており、脂質ラフトは刺激に応じた迅速かつ効率的なシグナル伝達を行うほか、刺激の時間・強度に依存した情報伝達系の脱感作、さらに新たな情報伝達系の活性化 (スイッチング) にも重要な役割を果たしていると考えられる。

6. ハチ毒マストパランの G_{q/11} を介する細胞情報伝達に対する効果

われわれはこれまで三量体 G タンパク質を介するシグナル伝達系に関して様々な検討を試みてきた。前述のように GPCR-G タンパク質活性化経路において、脂質ラフトは効率的なシグナル伝達を担うための場として重要な役割を担っていることが、種々の細胞を用いた結果により蓄積されてきてい

る。しかし、この巧妙なシグナル伝達の machinery が何らかの原因によって破壊された場合、GPCR から三量体 G タンパク質を介するシグナル伝達がストップしてしまい、結果として細胞内部への情報が伝わらない、という状況につながる事が予想される。最近これに関する知見として、ハチ毒の構成成分であり従来 $G_{i/o}$ の直接的な活性化薬として知られているマストパラン (mastoparan) に脂質ラフト攪乱作用があり、 $G_{q/11}$ を介するシグナル伝達系を抑制する作用があることを見出したので、その作用解析を行った。⁴⁰⁾

マストパランは、14 アミノ酸からなる両親媒性ペプチドである。⁴¹⁾ マストパランは肥満細胞からヒスタミン遊離を強力に促すことから、ハチ毒によるアナフィラキシーショックに係わると考えられている。さらに、血小板からのセロトニン放出、⁴²⁾ 持続的な細胞内へのカルシウムイオン流入⁴³⁾ や細胞毒性⁴⁴⁾ など、これら以外にもマストパランの薬理作用は数多く報告されている。マストパランがどのようにこれら多彩な作用を発現するのかについて、いくつかその標的分子の候補が見出されている。Higashijima ら⁴⁵⁾ はマストパランが強力な $G_{i/o}$ 活性化作用を有することを報告した。そのため現在に至るまで、マストパランは $G_{i/o}$ を直接活性化する薬理的ツールとして広く使われている。また、前述の肥満細胞におけるヒスタミン遊離もマストパランにより $G_{i/o}$ が活性化された結果であることが示唆されている。さらに、マストパランはカルシウム結合タンパク質カルモジュリンと相互作用するとの報告⁴⁶⁾ があるほか、ホスホリパーゼ A_2 ⁴⁷⁾ 及びホスホリパーゼ D の活性化、⁴⁴⁾ 骨格筋小胞体からのカルシウム遊離、⁴⁸⁾ など多彩な作用を示す。マストパランの相互作用する標的分子が多種に渡るの、このペプチドの有する特徴的なアミノ酸配列に基づいた両親媒性の性質によるものと考えられる。

われわれはマストパランを用いて様々な細胞応答に対する薬理作用について検討してきたが、その中でこの分子が $G_{q/11}$ を介する情報伝達系に対して興味深い作用をもたらすことを見出した。⁴⁹⁾ すなわち、1321N1 ヒトアストロサイトーマ細胞ではムスカリニック受容体アゴニストであるカルバコールによりホスホリパーゼ C 活性化とそれに伴う細胞内カルシウム濃度上昇が生じるが、マストパランを前処置

することによりこれらの反応は抑制された。さらにマストパランによる $G_{q/11}$ —ホスホリパーゼ C の活性化に対する抑制作用は、細胞膜標本を用いた $GTP\gamma S$ 刺激による $G_{q/11}$ 直接活性化によるイノシトールリン脂質代謝亢進に対しても認められた。以上より、マストパランは GPCR よりも下流に作用し、 $G_{q/11}$ 活性化からホスホリパーゼ C 活性化に至るまでのいずれかのステップに作用点を有するものと考えられた。また、これら $G_{q/11}$ を介するシグナル伝達に対するマストパランの抑制効果は百日咳毒素処理によっても影響を受けないことから、マストパランはその標的分子として従来報告されていた $G_{i/o}$ 活性化以外の経路を介して作用を及ぼしていると考えられた。そこで当初われわれはマストパランの標的因子は細胞内情報伝達に関与するタンパク質であると考え、オーバーレイアッセイなどの手法を用いてマストパラン結合タンパク質の同定を試みたが、そのターゲット分子を見出すことはできなかった。しかし、細胞内情報伝達における脂質ラフトの役割が注目され、さらに、脂質ラフトの構成成分である糖脂質が多く細菌毒素やウイルスの標的となっていることから、マストパランの作用発現にはタンパク質ではなく何らかの脂質が関与しているのではないかと仮定し、以下の実験を遂行した。

本実験では PC12 細胞を用いているが、この細胞において $G_{q/11}$ 連関型 $P2Y_2$ 受容体の活性化はホスホリパーゼ C 活性化によるイノシトールリン脂質代謝亢進と細胞内カルシウム濃度上昇をもたらす。外液 EGTA 存在下 $P2Y_2$ 受容体アゴニスト UTP によりイノシトールリン脂質代謝及び細胞内カルシウム濃度上昇が観察されたが、この作用は 1321N1 細胞で観察されたカルバコールに対する作用と同様、マストパラン前処置により顕著に抑制された (Fig. 2)。このことから、マストパランはムスカリニック受容体のみならず $P2Y_2$ 受容体を介する $G_{q/11}$ —ホスホリパーゼ C 活性化も抑制するものと思われた。

一方、PC12 細胞における UTP によるイノシトールリン脂質代謝は $M\beta CD$ で抑制された (Fig. 3)。われわれは NG108-15 細胞においても $P2Y_2$ 受容体を介するイノシトールリン脂質代謝と細胞内カルシウム濃度上昇が $M\beta CD$ 処理により抑制されることを見出している。¹⁰⁾ ホスホリパーゼ C の基質である PIP_2 は脂質ラフトに多く存在していることが

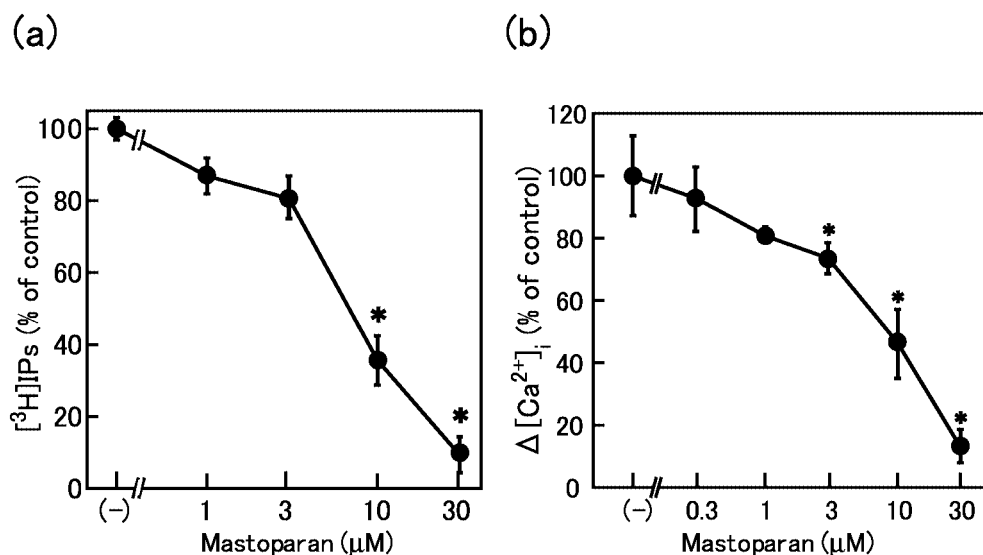


Fig. 2. Characterization of Mastoparan-mediated Inhibition of UTP-induced Phosphoinositide Hydrolysis or the Intracellular Ca²⁺ Mobilization in PC12 Cells

(a) UTP-induced phospholipase C activation was inhibited by mastoparan in a concentration-dependent manner. [³H]inositol-labeled PC12 cells were stimulated by UTP (100 μM) in the presence of 2 mM EGTA and increasing concentration of mastoparan. [³H]inositol phosphates formed were separated by Dowex AG1X8 column. Data are calculated as the percentage of control response without mastoparan, and expressed as the mean ± S.E. from six experiments. (b) UTP-induced Ca²⁺ mobilization was inhibited by mastoparan. Fura-2-loaded suspended PC12 cells were stimulated by UTP (100 μM) in the presence of 2 mM EGTA and increasing concentration of mastoparan, with constant stirring at 37°C. Data are calculated as the percentage of control response without mastoparan, and expressed as the mean ± S.E. from three experiments. *Significant difference from without mastoparan (a and b) (*p* < 0.05).

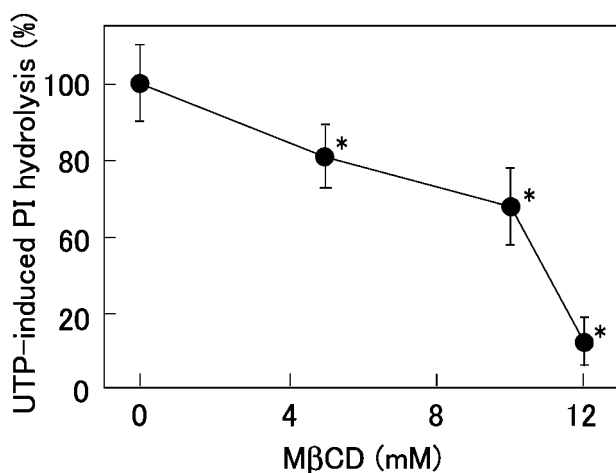


Fig. 3. UTP-induced Phosphoinositide Hydrolysis Was Inhibited by the Disruption of Lipid Rafts with MβCD

PC12 cells were pretreated with MβCD for 30 min before the addition of UTP (100 μM). Data are calculated as the percentage of control response without MβCD, and expressed as the mean ± S.E. from six experiments. *Significant difference from without mastoparan (*p* < 0.05).

報告されており (Table 1), さらに NG108-15 細胞及び PC12 細胞において G_{αq/11} や Gβ はこれまでの報告に一致して脂質ラフトを生化学的に分離した DRM に検出された (Fig. 5 参照). 以上の事実は, この P2Y₂ 受容体—G_{q/11}—ホスホリパーゼ C 活性化のステップが脂質ラフトにおいて生じている可能

性を示唆している.

マストパンはポジティブチャージを有する3つのリジン残基を分子内に有している. 一方, 細胞膜上のガングリオシドはネガティブチャージを持つシアル酸残基を有することから, 両分子は相互作用を示す可能性が考えられた. すなわち, マストパンの標的部位はガングリオシドであり, さらにこれが濃縮して存在する脂質ラフトである可能性が考えられた. そこで, マストパンの作用に対する外来性ガングリオシド混合物の効果について検討した. 仮にマストパンが細胞膜脂質ラフト内のガングリオシドに結合して作用発現するならば, 細胞外に大過剰のガングリオシドを添加した場合, マストパンの脂質ラフトへの結合が競合的に阻害され, その結果マストパンの作用が抑制されると考えられる. そこで, ウシ脳由来のガングリオシド混合物を細胞に前処置したところ, マストパンによるホスホリパーゼ C 抑制作用は解除される傾向を示した (Fig. 4(a)). ガングリオシドの基本構造は, セラミド骨格と, 多数の糖, 及びこれに結合したシアル酸よりなる. ノイラミニダーゼ (シアリダーゼ) は, 細胞膜表面に存在する様々なシアル酸含有ガングリオシドに作用してシアル酸残基を遊離させる. そこで,

細胞をあらかじめノイラミニダーゼ処理すると、マストパランのホスホリパーゼ C 抑制作用はノイラミニダーゼの濃度依存的に解除された (Fig. 4 (b)). しかし、シアル酸を単独で細胞に作用させた場合は、マストパランの反応に全く影響をもたらさなかった (Fig. 4(a)). これらの結果は、マストパランがガングリオシド内に存在するシアル酸残基だけでなく、シアル酸を含めた糖鎖構造やセラミド骨格を総合的に認識していることを示唆している。

P2Y₂ 受容体を介するシグナル伝達が脂質ラフトを介している可能性が見出されたこと、さらに前述のようにマストパランの結合分子がガングリオシドである可能性が示唆されたことから、マストパランが脂質ラフトの構成に何らかの影響をもたらす可能性が考えられた。そこで、PC12 細胞から DRM の分離を試みることにした。細胞を Triton X-100 処理後ライゼートをショ糖密度勾配遠心で分離し、低密度側から順に 12 個のフラクションを回収していくと、低一中のショ糖密度の界面 (ここではフラクション 4 及び 5 に相当) に DRM 画分が得られた (Fig. 5)。得られた DRM には前述した脂質ラフトマーカータンパク質 flotillin-1 が集積しているほか、脂質ラフト構成成分であるガングリオシド GM1 やコレステロールも豊富に含まれていること

から、この DRM は脂質ラフト画分を含むものと判断した。さらにこれまでの報告に一致して、ホスホリパーゼ C 活性化に係わる G $\alpha_{q/11}$ や G β も DRM に含まれていた。これに対し、マストパランを処置した細胞から得られた DRM では、flotillin-1 や GM1 の局在にはあまり影響はみられなかったが、G $\alpha_{q/11}$ 及び G β 、さらにコレステロールが DRM 画分から消失していることが観察された。これらの結果は、マストパランが脂質ラフトと何らかの相互作用を起こし、脂質ラフトの構成を乱している可能性を示唆している。一方、マストパラン処置前にガングリオシド混合物を処置しておくこと、マストパランによる G $\alpha_{q/11}$, G β そしてコレステロール含量の低下が完全に解除され、DRM はコントロールと変わらないパターンを示した。これらのことから、マストパランは細胞膜上のガングリオシドを足場として脂質ラフトに相互作用し、何らかの機構により脂質ラフトを攪乱する結果、G $\alpha_{q/11}$ の局在を変化させるものと思われる。そこで、PC12 細胞から得られた細胞膜画分とマストパランをインキュベートしたところ、元々細胞膜画分に検出されていた G $\alpha_{q/11}$ や G β が細胞膜から遊離し、インキュベーションバッファー中に検出されることを確認した。三量体 G タンパク質は元々脂肪酸修飾により細胞膜内側に固

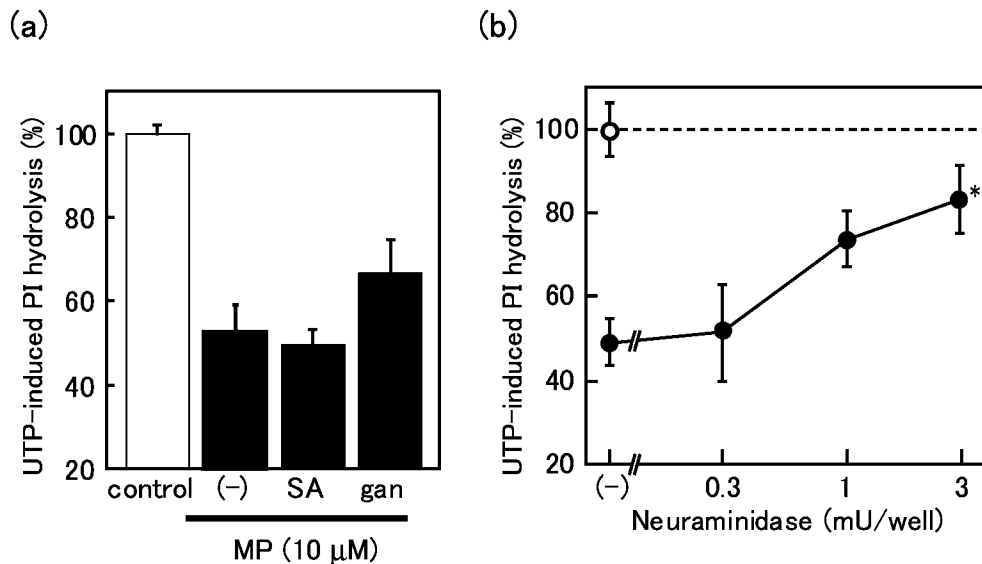


Fig. 4. Attenuation of the Inhibitory Effect of Mastoparan on the UTP-induced Phosphoinositide Hydrolysis by Exogenously Added Ganglioside Mixtures and Neuraminidase

(a) Effects of sialic acid (SA, 10 μ M) and ganglioside mixtures (gan, 20 μ g/ml) on the mastoparan (MP)-mediated inhibition of the phosphoinositide hydrolysis stimulated by UTP. (b) Effect of neuraminidase on the mastoparan-mediated inhibition of phosphoinositide hydrolysis stimulated by UTP. Cells were pretreated with neuraminidase (0.3-3 mU) for 20 min, and incubated with (●) or without (○) mastoparan, followed by the incubation with UTP (100 μ M). The data are expressed as the mean \pm S.E. from six experiments. *Significant difference from without neuraminidase ($p < 0.05$).

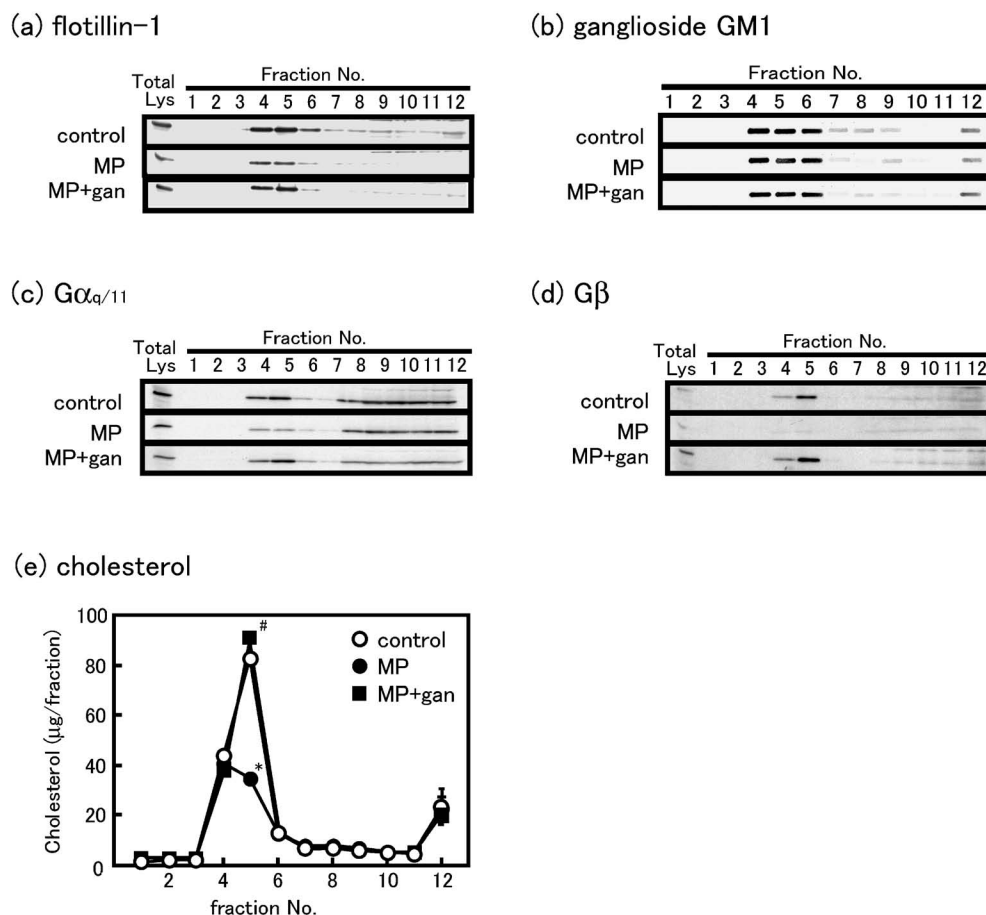


Fig. 5. Effect of Mastoparan on the Composition of the Detergent-resistant Membrane Fraction

PC12 cells were incubated with or without mastoparan (MP; 30 μM) in the presence or absence of ganglioside mixtures (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 1 hr at 37°C. Cell lysates were collected by addition of lysis buffer containing 0.1% Triton X-100, and separated by the sucrose gradient ultracentrifugation. Twelve fractions were obtained from each sample, and DRM was isolated between fraction 4 and 5. The contents of flotillin-1 (a), ganglioside GM1 (b), $G\alpha_{q/11}$ (c), $G\beta$ (d) and cholesterol (e) were analyzed. *Significant difference from control ($p < 0.05$). #Significance between mastoparan alone and mastoparan with gangliosides ($p < 0.05$).

定されており、さらにその修飾が飽和脂肪酸によるものであることから脂質ラフトに多く局在すると考えられているが、マストパランは本来脂肪酸修飾により脂質ラフトに局在していた $G_{q/11}$ の脂質ラフトへの親和性を変化させて細胞膜から遊離させると考えられる。以上まとめると、マストパランは脂質ラフトに存在するガングリオシドを受容体として結合し、何らかの機構により脂質ラフトを攪乱するため、脂肪酸修飾を介して脂質ラフトに固定されていた $G_{q/11}$ が遊離し、結果として $G_{q/11}$ 連関型受容体を介したホスホリパーゼCの活性化や細胞内カルシウム濃度上昇が抑制される、という機構が考えられた。われわれはマストパランがガングリオシドに直接結合することを蛍光スペクトル法にて確認しており、その結合にはガングリオシド分子内のシアル酸残基の存在が必須であることを見出している。し

かし、シアル酸そのものには全く結合しないことから、マストパランはガングリオシド分子のシアル酸を含む糖鎖構造及びセラミド骨格を総合的に認識していると思われる。

さて、マストパランには細胞毒性があり、細胞内乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase: LDH) の細胞外への漏出をもたらす。このマストパラン誘発細胞毒性に対して、ガングリオシド混合物は顕著な抑制効果を示した。すなわち、マストパランによる脂質ラフト攪乱作用と細胞毒性は、最初にガングリオシドを足場として起こる、共通の機構を介して発現している可能性が考えられた。そこで、マストパラン誘発細胞毒性発現に対する各種ガングリオシドの抑制作用を検討することにより、マストパランが認識するガングリオシドの構造について類推することを試みた (Fig. 6)。マストパランにより漏出し

た細胞外 LDH の活性を指標に、各種ガングリオシドの毒性発現抑制作用を検討した結果、GT1b 及び GD1b が最もその抑制作用が強く、ついで GD1a、GM1 が作用し、一方、GQ1b 及び、GM1 からシアル酸残基がなくなった形である asialoGM1 はほとんど効果を示さなかった。以上のことから、1) マストパランの作用発現にはガングリオシド分子中のシアル酸残基の存在が必須であるが、2) ガングリオシドのシアル酸含有数とマストパランの細胞毒性に対する抑制効果の間に相関はみられず、一方、3) ガングリオシドのセラミド骨格から数えて 2 番目のガラクトースに 2 個のシアル酸が結合している場合にはマストパランとの相互作用がより強くなるが、4 番目のガラクトースに 2 個のシアル酸が結合すると親和性が大幅に低下することが明らかになった。

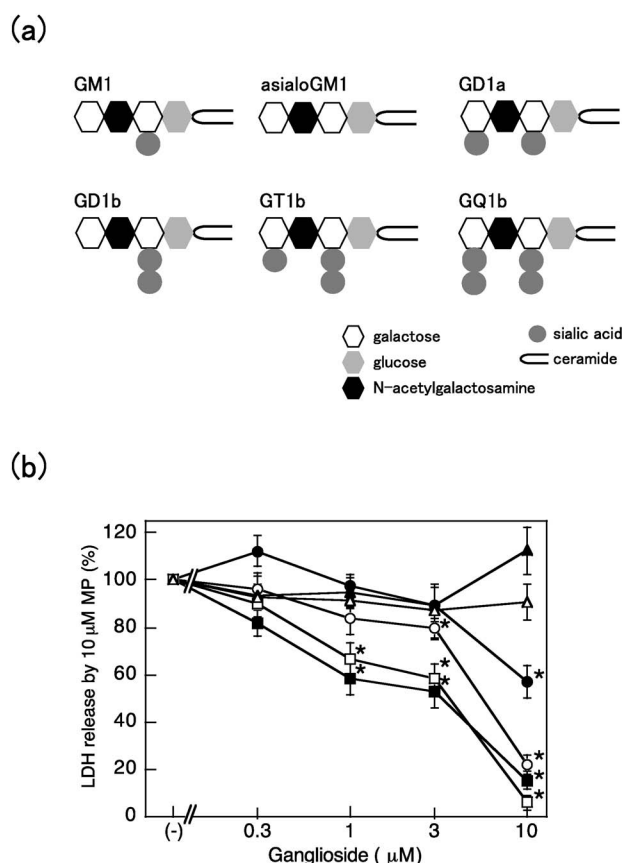


Fig. 6. Effects of Several Gangliosides on Mastoparan-elicited Lactate Dehydrogenase Release

(a) Structures of each ganglioside used in this experiment. (b) PC12 cells were preincubated with increasing concentration of GM1 (●), GD1a (○), GD1b (■), GT1b (□), asialoGM1 (▲) or GQ1b (△) for 15 min, and stimulated by mastoparan (10 μM) for 15 min at 37°C. LDH release induced by mastoparan alone was expressed as 100%, and data are expressed as mean ± S.E. from three experiments. *Significant difference from mastoparan alone ($p < 0.05$).

マストパランはこれまで $G_{i/o}$ の直接的な活性化を起こす薬理的ツールとして広く用いられてきた。今回脂質ラフトにおける $G_{q/11}$ の局在に対するマストパランの攪乱作用を示したが、われわれはマストパラン処理により G_{α_s} や $G_{\alpha_i/o}$ も脂質ラフトへの局在が阻害されることを確認している。 $G_{i/o}$ の活性化に用いられるマストパランの濃度域と、今回明らかになった脂質ラフトとの相互作用を引き起こすマストパランの有効濃度域はほぼ一致していることから、今後、 $G_{i/o}$ 活性化薬としてマストパランを使用するときには、 G_q 、 G_i 、 G_s など他の三量体 G タンパク質を始めとして多様なシグナル伝達への影響も生じている可能性を考慮する必要がある。一方で、マストパランは脂質ラフトを介する情報伝達系の解析に有用なツールになり得ると考えられ、今後これをリード化合物とした脂質ラフト解析のための新規プローブの開発も期待される。

7. おわりに

以上、脂質ラフトの概略と三量体 G タンパク質を介した情報伝達に対する役割、そしてハチ毒マストパランの脂質ラフトとの相互作用を介した $G_{q/11}$ シグナリング抑制機序について述べた。

カベオラはその構成脂質の類似性から脂質ラフトのサブタイプとして考えられてもいるが、その構造を維持するカベオリンはそのスキャフォールディング活性により、⁴⁾ 様々なシグナル伝達関連物質を特異的にカベオラに局在させることが報告されている。Oh ら⁵⁰⁾ は、ラット培養内皮細胞や上皮細胞などのカベオラを有する（カベオリンを発現する）細胞では G_q はカベオラに、 G_s や G_i は脂質ラフトに局在するのに対して、カベオリンを発現していない N2a 細胞では、 G_q 、 G_s 、 G_i すべてが脂質ラフトに局在することを示している。この結果は、カベオラを持つ細胞と持たない細胞では、同じ分子でもその局在が変わってくることを示唆する。また、アドレナリン β_1 、 β_2 受容体に関して、Ostrom ら⁵¹⁾ はこの受容体が心筋細胞ではカベオラ画分に存在するのに対して、血管平滑筋細胞では非カベオラ画分に存在することを報告している。両細胞ともカベオラを有しているにも係わらず、細胞によって分子の局在が異なるという事実は興味深い。どのような機序に基づいてこのような局在の差異が生まれるのか定かにはなっていないが、細胞種の違いによるガングリオシ

ドやコレステロール含量の差異が、各々の細胞の有する脂質ラフト/カベオラの性質に違いを与えているのかもしれない。また、細胞種特異的なアンカータンパク質が存在し、受容体と相互作用して局在を規定している可能性も考えられる。しかしそれ以上にこの結果は、強制発現系である特定の細胞において観察された事象がかならずしもすべての細胞・組織において当てはまる事象ではない可能性があることを意味しており、脂質ラフトの研究を進める上で今後留意する必要がある。

ガングリオシドには様々な亜型があることから、含有するガングリオシドの種類やコレステロール含量の違いによって細胞膜上にも多種多様な脂質ラフトが存在していると考えられる。一方、脂質ラフトを含む画分として生化学的に得られた DRM は、あくまで界面活性剤難溶性という性質によって分画したに過ぎない。この中にはカベオラも、また、異なるガングリオシドを含む脂質ラフトサブタイプも、様々な特性を有する脂質ラフトが混在している状態であると考えられる。実際、前述のように抗カベオリンや抗ガングリオシド抗体を用いることにより、DRM をさらにカベオラ画分やある特定のガングリオシドを豊富に含む画分に分画していくことが可能である。¹³⁾ 現在のところ、どのような種類の脂質を多く含む脂質ラフトに、どんなシグナル分子が濃縮して存在するのか、その局在の特異性については全く明らかにはなっていないが、今後、含有脂質やその特性に応じた脂質ラフトの細分化と、それぞれの脂質ラフトサブタイプに対するシグナル関連分子の局在に目を向けていく必要があると思われる。

病態又は何らかの原因によってスフィンゴ脂質又はコレステロール代謝が変化した場合、これら脂質の量的変化が脂質ラフトの構成に変化を与え、様々なシグナル伝達物質の局在変化が起こり、GPCR やその他受容体を介するシグナル伝達効率に大きな変化をもたらす。これが病態発現・進展に影響を及ぼす可能性が考えられる。例えば、脂質ラフトを介するシグナル伝達異常と疾病との関連を示す例として、インスリン抵抗性糖尿病がある。この場合、ガングリオシド GM3 の量的変化が脂質ラフトにおけるインスリン受容体を介する情報伝達系に影響を与え、本来のインスリンの効果であるグルコーストランスporter GLUT4 を介する糖取り込み作用を減

弱させる結果、インスリン抵抗性をもたらす可能性が考えられている。⁵²⁾ また、ショウジョウバエにおける代謝型グルタミン酸受容体はコレステロール比によりアゴニストの結合活性が変化することが報告されており、脂質ラフトの構成脂質の存在比率が受容体に対するリガンド結合能に影響を与え、受容体を介するシグナル伝達効率の変化をもたらす可能性が考えられる。⁵³⁾ 今後、疾病や老化などに伴う脂質ラフト構成分子の量的・質的变化によるシグナル伝達の変化について詳細に検討していくことにより、疾病治療や予防に対する様々な有益情報が得られ、脂質ラフトをターゲットとする薬物の開発につながることが期待される。

謝辞 本研究は筆者が東北大学大学院薬学研究科・細胞情報薬学分野在籍時に同分野にて行われました。研究の全般に当たり御助言頂きました同分野・中畑則道教授に厚く御礼申し上げます。また実験を遂行した同分野の学生（または卒業生）である須釜 淳さん、渥美真徳さん、小谷篤史さん、小池延幸さんに深く感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Singer S., Nicolson G., *Science*, **175**, 720-731 (1972).
- 2) Op den Kamp J., *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 47-71 (1979).
- 3) Simons K., Ikonen E., *Nature*, **387**, 569-572 (1997).
- 4) Okamoto T., Schlegel A., Scherer P., Lisanti M., *J. Biol. Chem.*, **273**, 5419-5422 (1998).
- 5) Schnitzer J., McIntosh D., Dvorak A., Liu J., Oh P., *Science*, **269**, 1435-1439 (1995).
- 6) Couet J., Li S., Okamoto T., Ikezu T., Lisanti M., *J. Biol. Chem.*, **272**, 6525-6533 (1997).
- 7) Morrow I. C., Rea S., Martin S., Prior I. A., Prohaska R., Hancock J. F., James D. E., Parton R. G., *J. Biol. Chem.*, **277**, 48834-48841 (2002).
- 8) Neumann-Giesen C., Falkenbach B., Beicht P., Claasen S., Luers G., Stuermer C. A. O., Herzog V., Tikkanen R., *Biochem. J.*, **378**, 509-518 (2004).
- 9) Brown D. A., Rose J. K., *Cell*, **68**, 533-544 (1992).

- 10) Nakahata N., Ohkubo S., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **122**, 419–425 (2003).
- 11) Gil C., Cubi R., Blasi J., Aguilera J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **348**, 1334–1342 (2006).
- 12) Song K., Li S., Okamoto T., Quilliam L., Sargiacomo M., Lisanti M., *J. Biol. Chem.*, **271**, 9690–9697 (1996).
- 13) Iwabuchi K., Handa K., Hakomori S., *J. Biol. Chem.*, **273**, 33766–33773 (1998).
- 14) Sheets E., Holowka D., Baird B., *J. Cell Biol.*, **145**, 877–887 (1999).
- 15) Schnitzer J., Oh P., Pinney E., Allard J., *J. Cell Biol.*, **127**, 1217–1232 (1994).
- 16) Pang H., Le P., Nabi I., *J. Cell Sci.*, **117**, 1421–1430 (2004).
- 17) Zacharias D., Violin J., Newton A., Tsien R., *Science*, **296**, 913–916 (2002).
- 18) Schutz G., Kada G., Pastushenko V., Shindler H., *EMBO J.*, **19**, 892–901 (2000).
- 19) Fujimoto T., Nakade S., Miyawaki A., Mikoshiba K., Ogawa K., *J. Cell Biol.*, **119**, 1507–1513 (1992).
- 20) Simons K., Eehalt R., *J. Clin. Invest.*, **110**, 597–603 (2002).
- 21) Brown D. A., Crise B., Rose J. K., *Science*, **245**, 1499–1501 (1989).
- 22) Da Silva J., Hasegawa T., Miyagi T., Dotti C., Abad-Rodriguez J., *Nat. Neurosci.*, **8**, 606–615 (2005).
- 23) Schengrund C., DasGupta B., Ringler N., *J. Neurochem.*, **57**, 1024–1032 (1991).
- 24) Kakio A., Nishimoto S., Yanagisawa K., Kozutsumi Y., Matsuzaki K., *J. Biol. Chem.*, **276**, 24985–24990 (2001).
- 25) Baron G., Wehrly K., Dorward D., Chesebro B., Caughey B., *EMBO J.*, **21**, 1031–1040 (2002).
- 26) Hoessli D., Ilangumaran S., Soltermann A., Robinson P., Borisch B., Nasir-Ud-Din., *Glycoconj. J.*, **17**, 191–197 (2000).
- 27) Parpal S., Karlsson M., Thorn H., Stralfors P., *J. Biol. Chem.*, **276**, 9670–9678 (2001).
- 28) Alonso M., Millan J., *J. Cell Sci.*, **114**, 3957–3965 (2001).
- 29) Jacoby E., Bouhelal R., Gerspacher M., Seuwen K., *Chem. Med. Chem.*, **1**, 761–782 (2006).
- 30) Cabrera-Vera T., Vanhauwe J., Thomas T., Medkova M., Preininger A., Mazzoni M., Hamm H., *Endocr. Rev.*, **24**, 765–781 (2003).
- 31) Ostrom R., Post S., Insel P., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **294**, 407–412 (2000).
- 32) Kohno T., Wada A., Igarashi Y., *FASEB J.*, **16**, 983–992 (2002).
- 33) Wedegaertner P., Wilson P., Bourne H., *J. Biol. Chem.*, **270**, 503–506 (1995).
- 34) Waheed A., Jones T., *J. Biol. Chem.*, **277**, 32409–32412 (2002).
- 35) Sabourin T., Bastien L., Bachvarov D., Marceau F., *Mol. Pharmacol.*, **61**, 546–553 (2002).
- 36) Ostrom R., Gregorian C., Drenan R., Xiang Y., Regan J., Insel P., *J. Biol. Chem.*, **276**, 42063–42069 (2001).
- 37) Lasley R., Narayan P., Uittenbogaard A., Smart E., *J. Biol. Chem.*, **275**, 4417–4421 (2000).
- 38) Nair K., Balasubramanian N., Slepak V., *Curr. Biol.*, **12**, 421–425 (2002).
- 39) Hua H., Munk S., Whiteside C., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **284**, F303–F312 (2003).
- 40) Sugama J., Ohkubo S., Atsumi M., Nakahata N., *Mol. Pharmacol.*, **68**, 1466–1474 (2005).
- 41) Hirai Y., Yasuhara T., Yoshida H., Nakajima T., Fujino M., Kitada C., *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 1942–1944 (1979).
- 42) Ozaki Y., Matsumoto Y., Yatomi Y., Higashihara M., Kariya T., Kume S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **170**, 779–785 (1990).
- 43) Nakahata N., Ishimoto H., Mizuno K., Ohizumi Y., Nakanishi H., *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 299–303 (1994).
- 44) Mizuno K., Nakahata N., Ohizumi Y., *Toxicol.*, **36**, 447–456 (1995).
- 45) Higashijima T., Burnier J., Ross E., *J. Biol. Chem.*, **265**, 14176–14186 (1990).
- 46) Barnette M., Daly R., Weiss B., *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 2929–2933 (1983).
- 47) Argiolas A., Pisano J., *J. Biol. Chem.*, **258**, 13697–13702 (1983).
- 48) Hirata Y., Nakahata N., Ohizumi Y., *Mol. Pharmacol.*, **57**, 1235–1242 (2000).
- 49) Nakahata N., Abe M., Matsuoka I., Nakanishi H., *FEBS Lett.*, **260**, 91–94 (1990).
- 50) Oh P., Schnitzer J., *Mol. Biol. Cell*, **12**, 685–698 (2001).

-
- 51) Ostrom R., Liu X., Head B., Gregorian C., Scasholtz T., Insel P., *Mol. Pharmacol.*, **62**, 983–992 (2002).
- 52) Tagami S., Inokuchi J., Kabawama K., Yoshimura H., Kitamura F., Uemura S., Oga-
wa C., Ishii A., Saito M., Ohtsuka Y., Sakaue
S., Igarashi Y., *J. Biol. Chem.*, **277**, 3085–
3092 (2002).
- 53) Eroglu C., Brugger B., Wieland F., Sinning I.,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **100**, 10219–
10224 (2003).