

Mini Review

好中球のラクトシルセラミドを介した 活性酸素産生機構について

岩瀬和久¹⁾, 小林俊秀²⁾, 石井久美子²⁾, 牧野麻美²⁾,
加賀直子³⁾, 村山季美枝³⁾, 長岡 功¹⁾

¹⁾ 順天堂大学医学部生化学第二, ³⁾ 同 中央機器分析室

²⁾ 理化学研究所・フロンティア研究システム・スフィンゴ脂質機能

Mechanism of lactosylceramide-mediated superoxide generation in neutrophils

Lactosylceramide (LacCer), which is neutral glycosphingolipid and also known as CDw17, mediates superoxide production from neutrophils. Microorganisms such as gram-negative and -positive bacteria and fungi can bind to LacCer. Neutrophils thus appear to contribute to phagocytosis and superoxide generation. Treatment of neutrophils with anti-LacCer antibodies induced superoxide generation from the cells, which was blocked by PP1, wortmannin, SB203580 and H7, suggesting involvement of Src kinase, PI₃ kinase, p38-MAP kinase, and protein kinase C, respectively. Upon exposure to dimethylsulfoxide (DMSO) that triggered differentiation into neutrophil lineage, promyelocytic leukemia HL-60 cells acquired the ability to generate superoxide, while exhibiting little response to the antibodies, if any. Density gradient centrifugation revealed that LacCer and a Src kinase Lyn were recovered in detergent-insoluble membrane (DIM) of neutrophils and HL-60 cells. However, LacCer was associated with Lyn in neutrophils but not HL-60 cells. Anti-LacCer antibody T5A7 phosphorylated Lyn molecules in neutrophil DIM. Taken together, these above data suggest that neutrophils are characterized by the presence of cell surface LacCer-enriched glycosignaling domain coupled with Lyn, and that the ligand binding to LacCer induces the activation of Lyn/PI3K/p38 MAPK/protein kinase C signal transduction pathway. The association of Lyn with LacCer seems to be a key for LacCer-mediated activation of Lyn, leading to superoxide generation by neutrophils.

Rec.3/14/2003, Acc.5/22/2003, pp223-230

Kazuhiwa Iwabuchi¹⁾, Toshihide Kobayashi²⁾, Kumiko Ishiji²⁾,
Asami Makino²⁾, Naoko Kaga³⁾, Kimie Murayama³⁾, Isao Nagaoka¹⁾

¹⁾Biochemistry, ³⁾Central Laboratory of Medical Sciences,
Juntendo University School of Medicine

²⁾Supra-Biomolecular System Research Group,
Sphingolipid Functions Laboratory,
Riken Frontier Research System

Key words neutrophils, lactosylceramide, glycosignaling domain, Lyn, superoxide generation

はじめに

好中球は自然免疫において重要な働きをしている細胞である。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、それらを貪食し、活性酸素を産生したり殺菌活性ペプチドを放出したりすること

で病原微生物の排除を試みる¹⁾。そこで、好中球は病原微生物を認識するために補体レセプター、Fcレセプター、LPSレセプターあるいはグルカンレセプターなど様々な受容体を細胞膜表面に発現している。好中球のスフィンゴ糖脂質の約70%を占めるラクトシルセラミド(Lac-

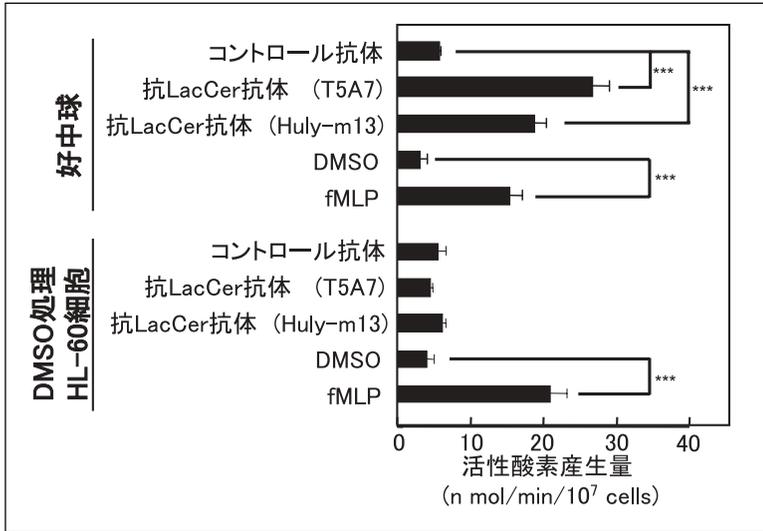


図1 抗LacCer抗体による好中球の活性酸素産生

抗LacCerモノクローナル抗体であるT5A7やHuly m13あるいはコントロール抗体をコートした96穴プレートに好中球やDMSO処理したHL-60細胞を入れて 37 °C 30分間インキュベーションして産生された活性酸素をチトクロームCの還元量で測定した。好中球は、いずれの抗LacCer抗体によってもfMLPと同レベルの活性酸素を産生したが、HL-60細胞は産生しなかった。各データは4例の平均値と標準誤差で示している。
*** $p < 0.001$

Cer, CDw17) は、古くよりグラム陰性菌、陽性菌、真菌など幅広い菌に結合することが知られており²⁾、抗LacCer抗体による架橋形成によって好中球は活性酸素を産生したり³⁾、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⁴⁾。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。

LacCerなどのスフィンゴ糖脂質(GSL)は、親水性の糖鎖と疎水性のセラミドで構成された分子であり、セラミド部分に長鎖脂肪酸を多く含むために融点が高く、互いに会合する性質がある⁵⁾。そのため、スフィンゴミエリンやコレステロールとともにマイクロドメインと呼ばれるクラスターを細胞膜上に形成する⁶⁾。最近、マイクロドメインが様々な細胞内情報伝達分子を含み、細胞外からの情報を受容し、細胞内に発信する場となっていることが明らかとなり、リピッドラフト(lipid raft)とも呼ばれるようになった⁵⁾。リピッドラフトは、カベオリン(caveolin)やGPIアンカー型糖蛋白質など、含まれている分子によって、様々なタイプの機能ドメインに分けることができる⁶⁾。そのうち、グリコシグナリングドメイン(glycosignaling domain; GSD)は、GSLそのものが接着分子や受容体となり細胞内に情報を伝達するリピッドラフトであり、主にB16メラノーマ細胞やNeuro2a神経芽細胞において、その機能が解析されている⁷⁾。

本稿では、好中球においてLacCerがSrcファミリーキナーゼであるLynと会合したグリコシグナリングドメインを細胞膜表面で形成し、LacCerのグリコシグナリングドメインを介して好中球が活性酸素を産生する分子機構について、筆者らの最近の研究成果⁹⁾を中心に紹介する。

好中球のオプソニン非依存性の貪食反応とLacCer

好中球の貪食反応は大きく分けてオプソニン依存性と非依存性の二つの機構がある¹⁾。その中でオプソニン依存性の貪食機構としては、補体系が活性化されてできたC3biがC3bi受容体(CD11b/CD18, Mac1)に結合する経路と、菌体表層抗原と結合した抗体がFc受容体に結合する経路がよく知られている。一方、好中球におけるオプソニン非依存性の貪食機構は主に菌体壁成分のβ-グルカンに対する受容体を介して行われていると考えられている⁹⁾。

いままでのところでは、どのような分子が好中球のβ-グルカン受容体であるかはっきりとしていない。これまでに、Mac1がガレクチン様構造を持つために、β-グルカンとも結合するという報告や¹⁰⁾、マウスのマクロファージのβ-グルカン受容体として同定されたdectin 1がヒトの好中球にも発現しているという報告がある¹¹⁾。しかしながら、β-グルカンによる好中球の活性化にMac1は関与していないことが示されるなど¹²⁾、β-グルカンが実際にこれらの受容体を介して好中球を活性化しているかどうかは、いまのところはっきりとしていない。

一方、Zimmermanらは、可溶性の1-6分岐の1-3グルカン(PGGグルカン)が好中球のLacCerと選択的に結合することを報告している⁹⁾。PGGグルカンは好中球の活性酸素の産生を高め、NF-κB活性を上昇させる。これまでに、大腸菌、百日咳菌、赤痢菌、ヘリコバクターピロリ菌、ウエルシュ菌、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^{2, 13, 14)}。さらに、抗LacCer抗体でLacCerを架橋すると、好中球は活性酸素を産生することから(図1)³⁾、好中球にはLacCerを介したオプソニン非依存性の貪食機構が存在していると考えられる。

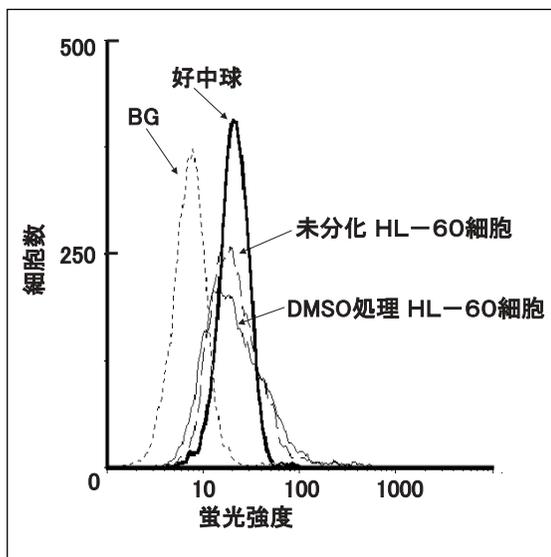


図2 LacCerの発現レベルのフローサイトメトリー解析
好中球や未分化およびDMSOで分化させたHL-60細胞を抗LacCer抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析したHL-60細胞は分化の程度によらず好中球とほぼ同じレベルのLacCerを細胞膜表面に発現している。

単球・マクロファージ系細胞もオプソニン非依存性貪食機構を持っている。PGG₂グルカンがマクロファージを活性化することが示されているが¹⁵⁾、単球・マクロファージ系細胞はdectin 1等のグルカン受容体だけではなく、好中球には発現されていないマンノース受容体を用いてオプソニン非依存性に貪食することも知られている¹⁶⁾。また、単球系の細胞は好中球の1割程度しかLacCerを発現しておらず¹⁷⁾、これらの細胞は抗LacCer抗体で活性酸素を産生しない³⁾。さらに、PGG₂グルカンが単球・マクロファージ系細胞に発現されているLacCerに結合するという報告もない。したがって、単球・マクロファージ系細胞は好中球とは異なる機構でβ-グルカンを認識していると思われる。おそらく好中球と単球・マクロファージ系細胞のオプソニン非依存性の貪食機構は互いに異なっているであろう。

LacCerのグリコシグナリングドメイン

好中球は菌を貪食すると、NADPHオキシダーゼ(NADPH oxidase)と呼ばれる複合酵素によって活性酸素を産生する¹⁸⁾。NADPHオキシダーゼは、細胞膜上のチトクロームb558のサブユニットであるgp91^{phox}、p22^{phox}と、細胞質因子であるp67^{phox}、p47^{phox}、p40^{phox}および低分子量G蛋白質のRacで構成されており、好中球の分化・成熟に応じて発現する¹⁸⁾。前骨髄性白血病細胞株であるHL-60細胞は未分化な状態では、NADPHオキシダーゼや好中球の遊走因子であるN-formyl-methionyl-leucyl phenylalanine (fMLP)に対する受容体を発現していないが、dimethylsulfoxide

(DMSO)等によって好中球系細胞に分化させると、これらの蛋白質を発現し、fMLPによって活性酸素を産生ようになる。図1に示すように、抗LacCer抗体で細胞膜表面のLacCerを架橋すると、好中球は活性酸素を産生するが、HL-60細胞は活性酸素を産生しない(図1)。LacCerの細胞膜表面での発現レベルを調べてみると、HL-60細胞は好中球とほとんど同レベルのLacCerを発現することから(図2)、好中球にはLacCerを介した活性酸素の産生機構が存在するが、HL-60細胞は好中球系細胞に分化してもこの機構が上手く働いていないと考えられる。

それではなぜHL-60細胞ではLacCerを介して活性酸素を産生できないのであろうか。LacCerなどのスフィンゴ糖脂質は細胞膜上で会合し、マイクロドメインを形成している¹⁹⁾。マイクロドメインは1% Triton X-100を含む緩衝液中で細胞を破碎し、ショ糖密度勾配超遠心することで、5%と30%のショ糖溶液の界面部分に浮上してくる膜画分(Detergent-insoluble membrane fraction, DIM fraction)として回収することができる²⁰⁾。そこで、好中球とDMSO処理したHL-60細胞のマイクロドメインにそれぞれどのような分子が含まれているかを調べるために、各細胞を破碎後にショ糖密度勾配超遠心すると、どちらの細胞においてもLacCerはDIM fractionに回収される(図3A)。DIM fractionは様々な種類のマイクロドメインを含んでいるので、さらに抗LacCer抗体で免疫沈降することでLacCerに富むDIM fractionを分離すると、好中球ではLacCerやコレステロールとともに、スフィンゴミエリンが多く含まれたマイクロ

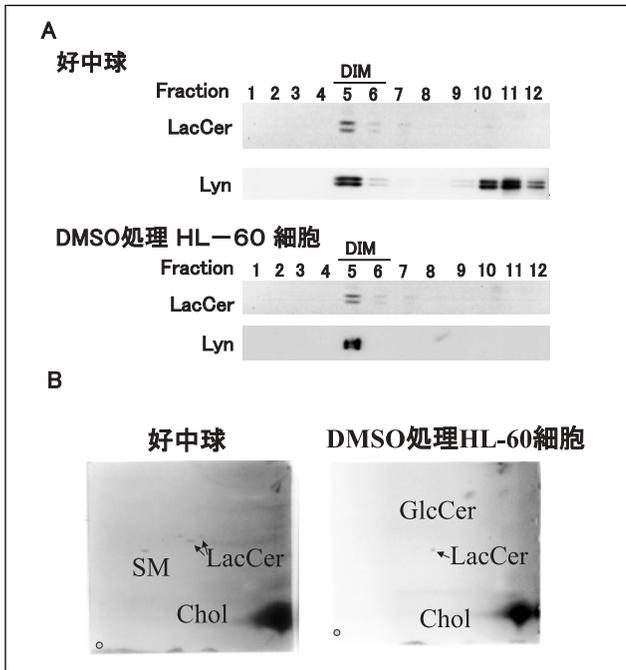


図3 好中球とHL-60細胞のLacCerとLynのシヨ糖密度勾配超遠心における分布とLacCerに富むマイクロドメインの脂質組成

(A)好中球とDMSOで処理したHL-60細胞を1% Triton X-100を含むTris緩衝液で破碎後,シヨ糖密度勾配超遠心した.遠心後,高分解能薄相クロマトグラフィー(HPTLC)解析にてLacCerを,ウエスタンブロットにてLynを同定した.

(B)好中球とHL-60細胞のDIMをさらに抗LacCer抗体で免疫沈降し,沈降物の脂質を抽出後,2次元のHPTLC解析²⁰⁾を行った.SM;スフィンゴミエリン,GlcCer;グルコシルセラミド,Chol;コレステロール

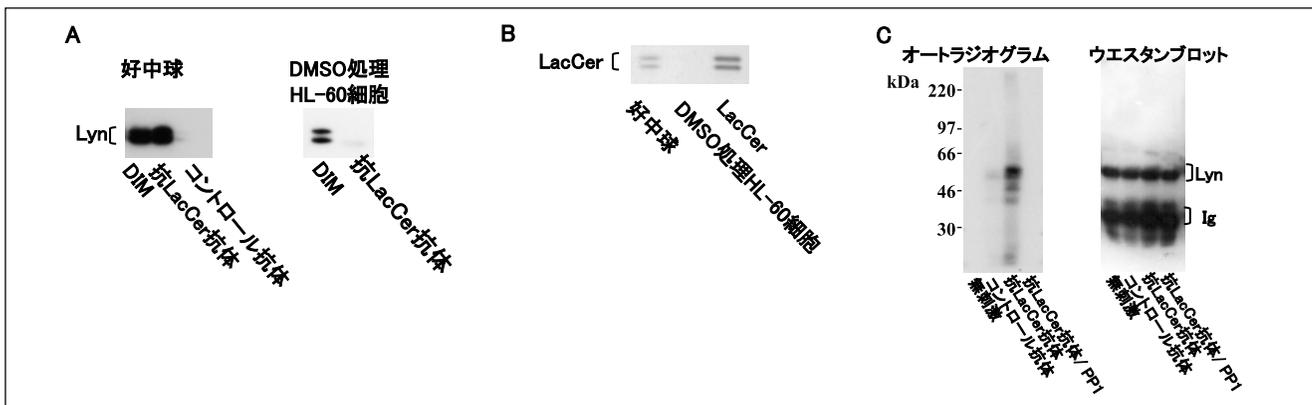


図4 LacCerに富むマイクロドメインにおけるLacCerとLynとの会合

(A)好中球とDMSO処理したHL-60細胞からDIMを調製し,これらを抗LacCer抗体で免疫沈降し,抗Lyn抗体でウエスタンブロットした結果.

(B)好中球とHL-60細胞のDIMを抗Lyn抗体で免疫沈降した沈降物をHPTLC解析した結果.

(C)好中球からDIMを調製し,これらを抗LacCer抗体をコートしたディッシュ中で³²P-ATP存在下37 5分間反応後,抗Lyn抗体で免疫沈降し,SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後,プロットングした.得られた膜をオートラジオグラムした後,抗Lyn抗体でウエスタンブロットした.Lyn以外のDIMに含まれるLynと会合するタンパク質も抗LacCer抗体でリン酸化された.一方,PP1存在下ではLynを含む全てのタンパク質のリン酸化が抑えられた(抗LacCer抗体/PP1).

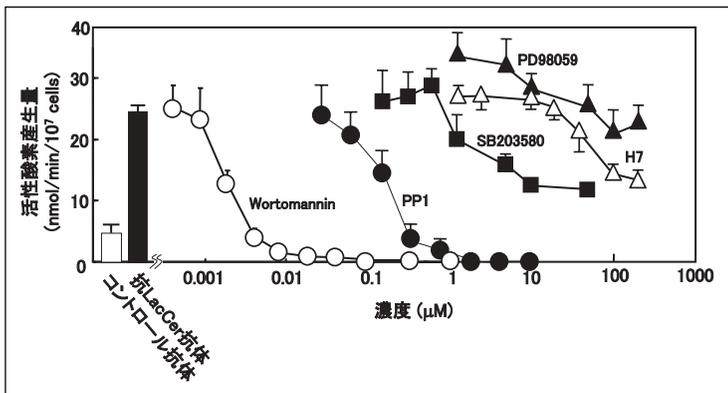


図5 抗LacCer抗体による好中球の活性酸素産生における細胞内情報伝達分子阻害剤の効果

抗LacCer抗体をコートした96穴プレートに好中球を入れ,PP1,SB203580,PD98052およびH7の存在,非存在下37 30分間インキュベーションする間に産生された活性酸素量をチトクロームC還元法で測定した.

ドメインが回収される(図3B)。一方,HL-60細胞のLacCerに富むDIMはLacCerとともにGlcCerやコレステロールを主な成分として含んでいる。このように,LacCerに富むDIM中の脂質成分は好中球とHL-60細胞で異なっていた。

非受容体型チロシンキナーゼであるSrcファミリー分子は,N末端のグリシンと二番目のシステインをミリストイル化(N-myristoylation),パルミトイル化(palmitoylation)することで²¹⁾,膜に結合している。好中球には様々な種類のSrcファミリー分子が存在しているが²²⁾,中でもLynは好中球の活性化機構において重要な役割を果たしていると考えられている²³⁾。Lyn分子のショ糖密度勾配超遠心分画における分布を調べてみると,好中球とHL-60細胞どちらにおいても,LynはDIM fractionに回収される(図3A)。しかしながら,抗LacCer抗体でDIM fractionを免疫沈降すると,好中球ではLynが沈降物として回収されるが,HL-60細胞では回収されない(図4A)。また,抗Lyn抗体でDIM fractionを免疫沈降すると,好中球においてはLacCerが沈降物に回収されるが,HL-60細胞では回収されない(図4B)。したがって,好中球のLacCerに富むマイクロドメインはLynを含んでいるが,HL-60細胞では含まれないと考えられる。

それではLynはLacCerに富むマイクロドメインにおいてLacCerを介して活性化されるのであろうか。好中球からDIM fractionを調製し,抗LacCer抗体をコートしたディッシュでインキュベーションさせると,Lyn分子はリン酸化される。このリン酸化はSrc family kinase 特異的阻害剤であるPP1によって完全に抑制される(図4C)。一方,結果は示さないが,同様の実験をHL-60細胞で行っても,Lynは活性化されない。これらの結果は,好中球のLacCerのマイクロドメインはLacCerとLynが会合したグリコシグナリングドメインであり,LacCerにリガンドが結合することでLynが活性化されて細胞内に情報が伝わることを示している。一方,HL-60細胞はLynと会合したLacCerのマイクロドメインを持っていないために,LacCerを介してLynは活性化されないであろう。

LacCerのグリコシグナリングドメインを介した細胞内情報伝達機構

一般に好中球の活性酸素の産生は,受容体にリガンドが結合することで細胞内情報伝達分子が活性化されて,NADPH oxidaseの細胞質因子であるp40^{phox},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²⁴⁾。チトクロームb558は,好中球の細胞膜から調製したDIM fractionを抗LacCer抗体で免疫沈降した沈降物に含まれないことから⁸⁾,抗LacCer抗体による活性酸素の産生は,細

胞膜上のLacCerが直接NADPH オキシダーゼを活性化しているために生じるのではなく,細胞内に情報が伝えられてNADPH オキシダーゼが活性化されると考えられる。

そこで,LacCerを介した好中球の活性酸素産生にどのような細胞内情報伝達分子が関与しているかを調べるために,抗LacCer抗体による好中球の活性酸素の産生に及ぼす種々の細胞内情報伝達分子に対する阻害剤の効果を検討した。図5に示すように,抗LacCer抗体による活性酸素の産生は,Src family kinaseの阻害剤であるPP1と,PI₃ kinaseの阻害剤であるWortmanninによって濃度依存的に抑制され,それぞれ2.0,0.1 μMで完全に抑制される。また,p38 MAP kinaseの阻害剤であるSB203580とprotein kinase Cの阻害剤であるH7も濃度依存的に抗LacCer抗体による活性酸素の産生を抑制するが,完全には阻害しない。一方,ERK kinaseの上流に存在するMAPK-1の阻害剤であるPD98052や,phospholipase A₂の阻害剤であるHELSSとAACOCF₃は,いずれも抗LacCer抗体による活性酸素の産生に影響しない(未発表データ)。これまでに,PI₃ kinaseはLynと会合することで活性化されることが示されている²⁵⁾。また,p47^{phox}の細胞膜への移行にprotein kinase Cやp38 MAPKの活性化が必要であると言われている^{26,27)}。したがって,LacCerにリガンドが結合すると,Lynを介してPI₃ kinaseが活性化され,さらにp38 MAPKとprotein kinase Cが活性化されて,NADPH オキシダーゼの活性化が起こると考えられる。

グリコシグナリングドメインにおけるLacCerのLyn活性化機構

細胞膜の脂質二重層は,温度によって,液晶相とゲル相の間で相転移する⁵⁾。液晶相は脂質が比較的自由に拡散し流動性を保っているが,ゲル相では脂質は硬くパッキングされてしまう。LacCer等のGSLは長鎖脂肪酸鎖を多く含み,互いに水素結合を形成するので,GSL同士がcis相互作用することでクラスターを形成し,相転移温度が高くなると考えられている。実際,C16:0-LacCerは比較的脂肪酸鎖の炭素数が短いにもかかわらず,その融点は69以上にもなる²⁸⁾。人工膜の研究から,GSLをスフィンゴミエリンやコレステロールと一定の割合で混合した膜は,液晶相とゲル相の中間の性質を示し,ある程度の流動性を保ちながら界面活性剤不溶性を示すliquid order相の状態で存在することが示されている²⁹⁾。共焦点レーザー顕微鏡で観察すると,好中球は抗LacCer抗体で大きなLacCerのクラスターを形成するが,HL-60細胞では全く起こらない(未発表データ)。LynなどのSrcファミリー分子は,会合している受容体リガンドと結合して凝集するにつれて,Srcファミ

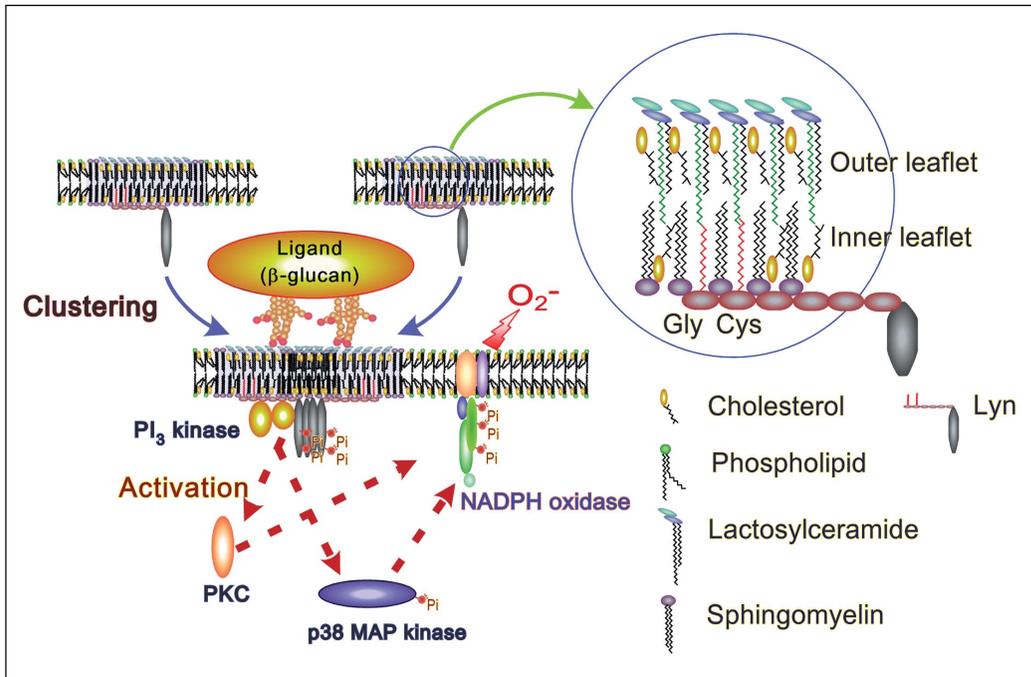


図6 好中球のLacCerに富むグリコシグナリングドメインを介した好中球の活性酸素産生機構
 LacCerはスフィンゴミエリンやコレステロールとグリコシグナリングドメインを形成している。脂質二重層の外側の層にあるLacCerは内側の層にまで突き出て、内側の層に組み込まれているLynと会合している。リガンドがLacCerに結合すると、LacCerが集まってより大きなグリコシグナリングドメインクラスターを形成する。それに伴い、Lynが集まり互いに活性化される。Lynの活性化に伴ってPI₃ kinaseの活性化が起こり、さらにp38 MAP kinaseとprotein kinase Cが活性化され、NADPH オキシダーゼが活性化されて、活性酸素が産生される。

リー分子同士も集まり、互いにリン酸化することで活性化が始まる³⁰⁾。したがって、好中球の細胞膜上のLacCerのグリコシグナリングドメインが、抗LacCer抗体でLacCerを架橋することで互いに集まってより大きなドメインを形成する過程で、細胞内のLyn分子も集まり互いに活性化すると考えられる。一方、HL-60細胞のLacCerのマイクロドメインは上手くLacCerがLynと会合できず、Lyn分子を集められないのであろう。

LacCerは親水性のラクトースと疎水性のセラミドで構成されている。セラミドの構造は組織や細胞によって様々であるが、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。LacCerのラクトース部分は細胞外に露出しているが、セラミド部分は細胞質内に分子を突き出していない。一方、グリコシグナリングドメインでLacCerから情報を受け取っているLynは脂質二重層の外側の層まで到達していない²¹⁾。それでは、脂質二重層の外側にあるLacCerが内側にあるLynにどのようにして会合しているのであろうか。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6)。

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GSL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³¹⁾。また、GSLがc-SrcやLynと直接結合できることが光感受性架橋剤を用いて細胞レベルで示されている³²⁾。好中球のLacCerはC24の脂肪酸鎖を持っていることから³³⁾、LacCerが細胞膜・脂質二重層の内側の層に突き出していると考えられる。さらに、Srcファミリー分子は互いに集合した状態になることで活性化される³⁰⁾。細胞外でリガンドが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グリコシグナリングドメイン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6)。好中球から調製したDIMを、コレステロールを取り除く試薬である β -シクロデキストリン等で処理すると、抗LacCerによるLynの活性化が増強される⁸⁾。これは、反対側に突き出た脂肪酸鎖によって生じた隙間をコレステロールが埋めているので³⁴⁾、好中球のDIMからコレステロールを取り除いたことで、LacCerやLyn分子同士がより密接に集合するようになって、LacCerを介したLynの活性化が増強

されたためかもしれない。

それでは、HL-60細胞ではなぜLacCerとLynが会合できないのだろうか。DMSOで分化させたHL-60細胞の細胞膜にはC24-LacCerはほとんど含まれていない(未発表データ)。このことは、LacCerの脂肪酸鎖の構造が好中球とHL-60細胞で異なっていて、HL-60細胞にはC24-LacCerのような長い脂肪酸鎖がほとんど無いために、LacCerとLynが直接相互作用できないことを示唆している。HL-60細胞は、好中球と脂質成分の構成が違うだけではなく、LacCerの脂肪酸鎖が細胞膜・脂質二重層の内側の層に入り込めないために、内側の層の流動性に影響することができないためにLyn分子をグリコシグナリングドメインに留めておけないのかもしれない。

おわりに

CDw17とも呼ばれるLacCerの好中球における機能は長らく不明であったが、今回の研究により、好中球にはLacCerを介した情報伝達機構が備わっていることが分子レベルで明らかとなった。LacCerは自然免疫担当細胞でもある上皮細胞の細胞膜表面にも大量に発現されていて、LacCerを介して活性化されることが示されている³⁵⁾。したがって、これらの細胞にもLacCerのグリコシグナリングドメインがあって、グリコシグナリングドメインを介した活性化機構が存在する可能性がある。自然免疫担当細胞の内、LacCerを大量に発現しているものはLacCerのグリコシグナリングドメインを介した防御機構があるのかもしれない。今後これらの細胞においてもLacCerのマイクロドメインについて詳細に検討する必要がある。

謝辞

本研究の一部は順天堂大学医学部環境医学研究所の研究助成を受けて行われた。

文 献

- Greenberg S, Grinstein S: Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 14: 136-145, 2002.
- Karlsson KA: Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Annu Rev Biochem*, 58: 309-350, 1989.
- Lund-Johansen F, Olweus J, Horejsi V, Skubitz KM, Thompson JS, Vilella R, Symington FW: Activation of human phagocytes through carbohydrate antigens (CD15, sialyl-CD15, CDw17, and CDw65). *J Immunol*, 148: 3221-3229, 1992.
- Arai T, Bhunia AK, Chatterjee S, Bulkley GB: Lactosylceramide stimulates human neutrophils to upregulate Mac-1, adhere to endothelium, and generate reactive oxygen metabolites in vitro. *Circ Res*, 82: 540-547, 1998.
- Rietveld A, Simons K: The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim Biophys Acta*, 1376: 467-479, 1998.
- Hakomori S, Handa K, Iwabuchi K, Yamamura S, Prinetti A: New insights in glycosphingolipid function: "glycosignaling domain," a cell surface assembly of glycosphingolipids with signal transducer molecules, involved in cell adhesion coupled with signaling. *Glycobiology*, 8: xi-xix, 1998.
- Hakomori SI: Cell adhesion/recognition and signal transduction through glycosphingolipid microdomain. *Glycoconj J*, 17: 143-151, 2000.
- Iwabuchi K, Nagaoka I: Lactosylceramide-enriched glycosphingolipid signaling domain mediates superoxide generation from human neutrophils. *Blood*, 100: 1454-1464, 2002.
- Zimmerman JW, Linderthum J, Fish PA, Palace GP, Stevenson TT, DeMong DE: A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a beta-(1-3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes. *J Biol Chem*, 273: 22014-22020, 1998.
- Ross GD, Vetvicka V: CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clin Exp Immunol*, 92: 181-184, 1993.
- Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S, Wong SY: The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol*, 169: 3876-3882, 2002.
- Michalek M, Melican D, Brunke-Reese D, Langevin M, Lemerise K, Galbraith W, Patchen M, Mackin W: Activation of rat macrophages by Betaflectin PGG-glucan requires cross-linking of membrane receptors distinct from complement receptor three (CR3). *J Leukoc Biol*, 64: 337-344, 1998.
- Saukkonen K, Burnette WN, Mar VL, Masure HR, Tuomanen EI: Pertussis toxin has eukaryotic-like carbohydrate recognition domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 118-122, 1992.
- Angstrom J, Teneberg S, Milh MA, Larsson T, Leonardsson I, Olsson BM, Halvarsson MO, Danielsson D, Naslund I, Ljungh A, Wadstrom T, Karlsson KA: The lactosylceramide

- binding specificity of *Helicobacter pylori*. *Glycobiology*, 8: 297-309, 1998.
- 15) Wakshull E, Brunke-Reese D, Linderemuth J, Fiset L, Nathans RS, Crowley JJ, Tufts JC, Zimmerman J, Mackin W, Adams DS: PGG-glucan, a soluble beta-(1,3)-glucan, enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates an NF-kappa B-like factor in human PMN: evidence for a glycosphingolipid beta-(1,3)-glucan receptor. *Immunopharmacology*, 41: 89-107, 1999.
 - 16) Astarie-Dequeker C, N'Diaye EN, Le Cabec V, Rittig MG, Prandi J, Maridonneau-Parini I: The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect Immun*, 67: 469-477, 1999.
 - 17) Andrews RG, Torok-Storb B, Bernstein ID: Myeloid-associated differentiation antigens on stem cells and their progeny identified by monoclonal antibodies. *Blood*, 62: 124-132, 1983.
 - 18) Hua J, Hasebe T, Someya A, Nakamura S, Sugimoto K, Nagaoka I: Evaluation of the expression of NADPH oxidase components during maturation of HL-60 cells to neutrophil lineage. *J Leukoc Biol*, 68: 216-224, 2000.
 - 19) Brown DA, London E: Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, 275: 17221-17224, 2000.
 - 20) Iwabuchi K, Handa K, Hakomori SI: Separation of glycosphingolipid-enriched microdomains from caveolar membrane characterized by presence of caveolin [In Process Citation]. *Methods Enzymol*, 312: 488-494, 2000.
 - 21) Resh MD: Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell*, 76: 411-413, 1994.
 - 22) Parolini I, Sargiacomo M, Lisanti MP, Peschle C: Signal transduction and glycosphosphatidylinositol-linked proteins (lyn, lck, CD4, CD45, G proteins, and CD55) selectively localize in Triton-insoluble plasma membrane domains of human leukemic cell lines and normal granulocytes. *Blood*, 87: 3783-3794, 1996.
 - 23) Gaudry M, Gilbert C, Barabe F, Poubelle PE, Naccache PH: Activation of Lyn is a common element of the stimulation of human neutrophils by soluble and particulate agonists. *Blood*, 86: 3567-3574, 1995.
 - 24) Lal AS, Clifton AD, Rouse J, Segal AW, Cohen P: Activation of the neutrophil NADPH oxidase is inhibited by SB 203580, a specific inhibitor of SAPK2/p38. *Biochem Biophys Res Commun*, 259: 465-470, 1999.
 - 25) Yu W, Cassara J, Weller PF: Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. *Blood*, 95: 1078-1085, 2000.
 - 26) Rane MJ, Carrithers SL, Arthur JM, Klein JB, McLeish KR: Formyl peptide receptors are coupled to multiple mitogen-activated protein kinase cascades by distinct signal transduction pathways: role in activation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase. *J Immunol*, 159: 5070-5078, 1997.
 - 27) Vlahos CJ, Matter WF, Brown RF, Traynor-Kaplan AE, Heyworth PG, Prossnitz ER, Ye RD, Marder P, Schelm JA, Rothfuss KJ, et al: Investigation of neutrophil signal transduction using a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol*, 154: 2413-2422, 1995.
 - 28) Saxena K, Zimmermann P, Schmidt RR, Shipley GG: Bilayer properties of totally synthetic C16:0-lactosyl-ceramide. *Biophys J*, 78: 306-312, 2000.
 - 29) Harder T, Scheiffele P, Verkade P, Simons K: Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol*, 141: 929-942, 1998.
 - 30) Ullrich A, Schlessinger J: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61: 203-212, 1990.
 - 31) Morrow MR, Singh D, Lu D, Grant CW: Glycosphingolipid fatty acid arrangement in phospholipid bilayers: cholesterol effects. *Biophys J*, 68: 179-186, 1995.
 - 32) Prinetti A, Marano N, Prioni S, Chigorno V, Mauri L, Casellato R, Tettamanti G, Sonnino S: Association of Src-family protein tyrosine kinases with sphingolipids in rat cerebellar granule cells differentiated in culture. *Glycoconj J*, 17: 223-232, 2000.
 - 33) Fukuda MN, Dell A, Oates JE, Wu P, Klock JC, Fukuda M: Structures of glycosphingolipids isolated from human granulocytes. The presence of a series of linear poly-N-acetyllactosaminylceramide and its significance in glycolipids of whole blood cells. *J Biol Chem*, 260: 1067-1082, 1985.
 - 34) Simons K, Ikonen E: Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387: 569-572, 1997.
 - 35) Hahn PY, Evans SE, Kottom TJ, Standing JE, Pagano RE, Limper AH: *Pneumocystis carinii* cell wall beta-glucan induces release of macrophage inflammatory protein-2 from alveolar epithelial cells via a lactosylceramide-mediated mechanism. *J Biol Chem*, 278: 2043-2050, 2003.