

原 著

## スフィンゴミエリンマイクロドメインは Jurkat 細胞の T 細胞抗原受容体依存性の活性化を負に制御する

永福 正和,<sup>1</sup> 豊島かおる,<sup>1</sup> 堀内 隼, 井ノ口仁一 \*

### Sphingomyelin Microdomains Negatively Regulate T Cell Receptor-Mediated Activation in Human Jurkat T Cells

Masakazu NAGAFUKU,<sup>1</sup> Kaoru TOSHIMA,<sup>1</sup> Jun HORIUCHI, and Jin-ichi INOKUCHI \*

*Division of Glycopathology, Institute of Molecular Biomembrane and Glycobiology,  
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku Medical and Pharmaceutical University.*

(Received November 20, 2018)

Sphingolipids, including sphingomyelin (SM) and glycosphingolipids (GSLs), associate with cholesterol to form membrane lipid microdomains in which specific receptors and signaling molecules are localized or recruited to mediate intracellular signaling. During T-cell activation, T cell antigen receptor (TCR) signaling clusters are formed in membrane lipid microdomains. In this study, we investigated the role of individual lipid microdomains constructed from SM and GSLs on TCR signaling. SM synthase 1 (SMS1) is primarily responsible for SM synthesis; glucosylceramide synthase (GlcCerS) is the enzyme responsible for the synthesis of GlcCer, which is the precursor for more complex GSLs such as gangliosides. We established *SMS1* mutant and *GlcCerS* mutant Jurkat cells using the CRISPR/Cas9 system. In *SMS1* mutant cells, SM-microdomain levels on the cell surface were nearly deficient, although cellular SM levels decreased by half compared with Jurkat cells. *GlcCerS* mutant cells did not express any kind of GSLs, while Jurkat cells expressed GlcCer and a-series gangliosides (such as GM3, GM2, GM1 and GD1a). We then examined the phosphorylation of ZAP-70 (a TCR-proximal kinase), intracellular calcium mobilization, and the expression of CD69 (an early activation marker of T cells) by TCR stimulation in the mutant cells; all these TCR-induced signaling events were greatly enhanced in *SMS1* mutant cells, but not in *GlcCerS* mutant cells. The enhanced response to TCR stimulation in *SMS1* mutant cells were restored by reintroduction of *SMS1* gene. These findings indicate that SM-microdomains acts negative regulators of TCR signal transduction.

**Key words** — sphingomyelin, glycosphingolipid, lipid microdomain, lipid raft, TCR signaling

## 緒 論

スフィンゴ脂質に分類されるスフィンゴミエリン (sphingomyelin, SM) やスフィンゴ糖脂質 (glycosphingolipid, GSL) は、哺乳類細胞においてそのほとんどが形質膜二重層の外層に存在している。それらは形質膜上でコレステロールと共に特殊な微小領域 (“脂質マイクロドメイン”あるいは“脂質ラフト”と呼ばれる) を形成すると考えられている。<sup>1,2)</sup> SM は形質膜に最も多く存在するスフィンゴ脂質であり、セラミドから SM 合成酵素 (SM synthase, SMS) によって合成される。de novo の SM 合成には 2 種類の SMS (SMS1, SMS2) が関与

している。SMS1 はゴルジ体に局在して SM の主たる生合成を担うのに対し、SMS2 はゴルジ体の他に形質膜にも存在して膜上でセラミドと SM の間の交換反応に関与するとされる。<sup>3,4)</sup> 一方、GSL もセラミドを起点とし、種々の糖転移酵素によって数百に及ぶ分子種を形成する。セラミドからグルコシルセラミド合成酵素 (glucosylceramide synthase, GlcCerS) によって GlcCer が合成され、そこからラクトシルセラミド (lactosylceramide, LacCer) やガングリオシドなど多様な GSL 分子群が生合成される (Fig. 1A)。

脂質マイクロドメインには膜受容体やシグナル伝達分子が恒常的あるいはリガンド刺激依存的に集積し、そこは受容体シグナル伝達などの場として機能している。<sup>1,5-8)</sup> T 細胞においても脂質マイクロドメインは T 細胞抗原受容体 (T cell receptor, TCR) シグナル伝達に重要な役割を持つと考えら

東北医科薬科大学薬学部分子生体膜研究所機能病態分子学教室

\* e-mail: jin@tohoku-mpu.ac.jp

<sup>1</sup> 共同筆頭著者

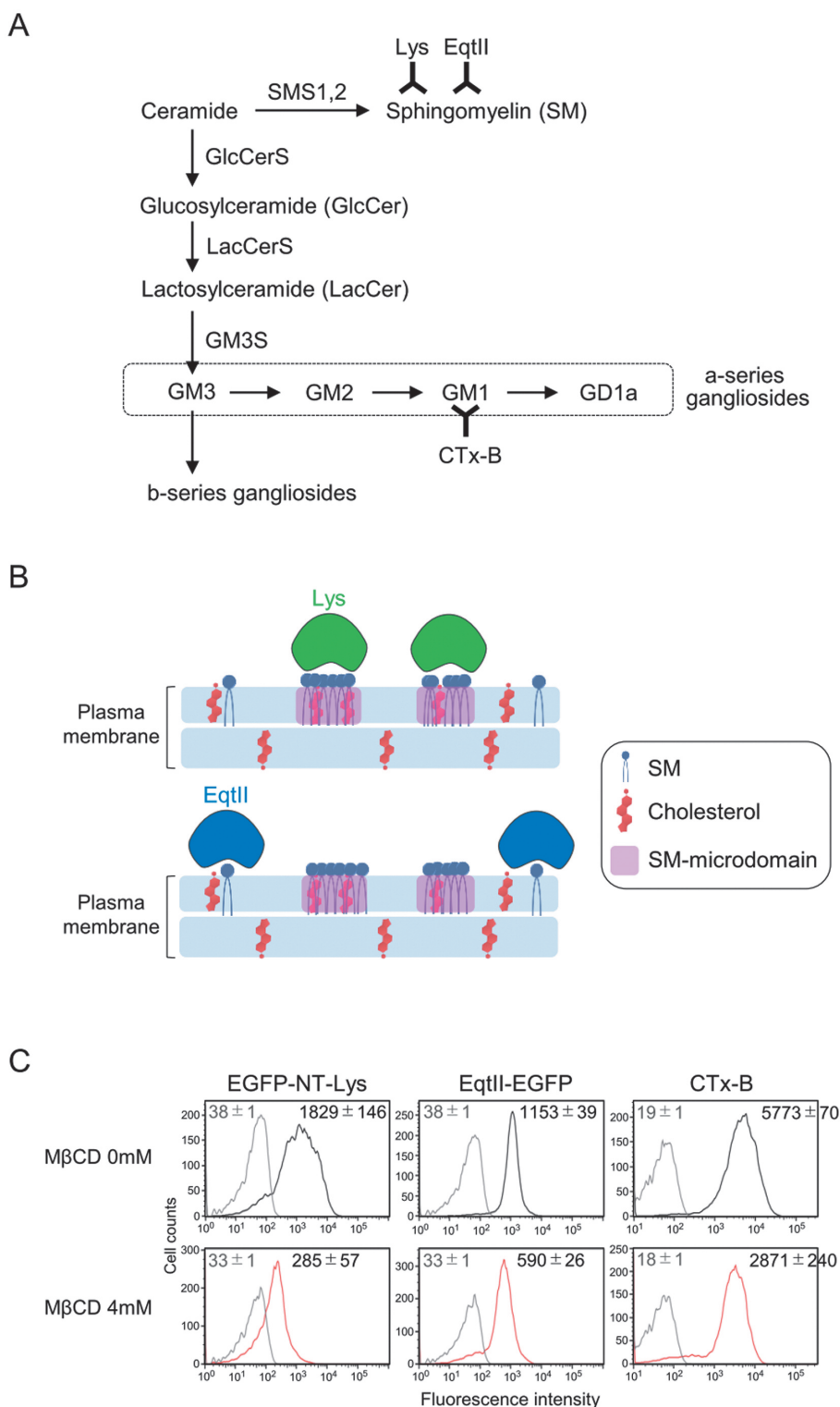


Fig. 1. Lys is a probe for SM-enriched membrane microdomains on the cell surface. (A) SM and GSL biosynthetic pathways. SM is synthesized by SM synthases (SMS1, SMS2), which transfer phosphorylcholine moiety onto ceramide. GSLs, including gangliosides, are also enzymatically synthesized from ceramide. Gangliosides are subclassified as a- and b-series gangliosides. Both lysenin (Lys) and equinatoxin II (EqtII) target SM but they have differing binding modes, as described in Methods and Figure 1B. Cholera toxin B subunit (CTx-B) targets a-series GM1. GlcCerS: glucosylceramide synthase. LacCerS: lactosylceramide synthase. GM3S: GM3 synthase. (B) Schematic representation of SM recognition modes by Lys and EqtII (refs 20, 21). Lys specifically binds clusters composed of 5-6 SM molecules, which are regarded as SM-microdomains present in plasma membrane. EqtII binds preferentially to single SM molecules, which are regarded as dispersed in plasma membrane. (C) Effect of lipid raft disruption on the lipid probe binding to the cell surface. Jurkat cells were untreated (0 mM) or treated with the M $\beta$ CD (4 mM), and stained with EGFP-NT-Lys (left panels), EqtII-EGFP (middle panels) and CF640R-conjugated CTx-B (right panels). Each number indicates the MFI  $\pm$  SD of triplicate assays. Black and red lines: with staining. Light gray lines: without staining.

れている。実際、膜からコレステロールを除去する薬剤 methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) を T 細胞に添加すると、形質膜のコレステロールが減少して脂質マイクロドメインは破壊され、TCR シグナル伝達に影響が及ぶことが知られている。<sup>9,10)</sup> この10年余りの間に、脂質マイクロドメイン構成脂質 (SM, GSL) の分子種ごとに多様なドメインが存在するという知見が続いている。藤本らは、マウス繊維芽細胞の界面活性剤処理凍結割断レプリカを作製して形質膜を免疫染色することにより、GM1 と GM3 とがそれぞれ異なった脂質マイクロドメインを形成すると報告している。<sup>11)</sup> また、好中球では LacCer で構成されるマイクロドメインが存在してその機能に重要な役割を果たす。<sup>12,13)</sup> T 細胞では、TCR 刺激に伴い形成される TCR 活性化ドメインは SM やコレステロールを含むマイクロドメインであるという報告がされた。<sup>14)</sup> このように、細胞の種類あるいは活性化状態などに応じて、ある特定のスフィンゴ脂質で構成された脂質マイクロドメインが機能すると考えられている。

これまでに我々は、マウスの未熟 T 細胞 (胸腺細胞) の分化過程において、SM 発現量は分化に伴って大きく変動し、それは SMSI mRNA の発現と相関することを見いだした。<sup>15)</sup> さらに、SMSI 欠損マウスの胸腺細胞では TCR 刺激に伴う細胞内シグナル伝達が増強し、強い刺激依存的な細胞死である負の選択が亢進していた。しかし、ヒト T 細胞白血病株である Jurkat 細胞の SMSI 遺伝子の発現をノックダウンした実験では、細胞の SM 量の2割減少で SM マイクロドメインは消滅するのに付随して、TCR シグナル伝達が増強することが報告されている。<sup>16)</sup> 一方、GlcCerS の T 細胞特異的欠損マウスでは通常の T 細胞分化には影響がないことが示されている。<sup>17)</sup> また、GlcCerS 阻害剤 D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (D-PDMP) 処理によって Jurkat 細胞の GSL 量を 90%低下させた場合でも TCR シグナル伝達に影響はなかった。<sup>18)</sup> 以上より、マイクロドメイン構成脂質の中で SM が T 細胞の分化・活性化および TCR シグナル伝達に関与すると考えられるが、TCR シグナル伝達における脂質マイクロドメインの機能には議論の余地がある。

そこで本研究では、SM マイクロドメインが TCR シグナル伝達および T 細胞の活性化に対して抑制的と促進的のどちらに寄与するかを再検証す

るとともに、GSL マイクロドメインとの比較を行った。そのために、CRISPR/Cas9 システムを用いて、Jurkat 細胞の SMSI および GlcCerS 遺伝子に変異を導入して、それぞれ SM および GSLs の欠損細胞の作製を試みた。その結果、親株の Jurkat 細胞と比べて SMSI 変異導入細胞では、SM 発現は約半分の低下であったが、このとき SM マイクロドメインはほとんど消失していた。GlcCerS 変異導入細胞では GlcCer やガングリオシド発現が欠損していた。SMSI 変異細胞で特異的に TCR 刺激に伴う細胞内シグナルおよび T 細胞活性化が総じて増強されていることが判明した。先のマウスでの結果と合わせて、SM マイクロドメインは TCR シグナル伝達を負に制御することにより、適切な強さのシグナル伝達の誘導に寄与するものと考えられる。

## 実験材料および実験方法

### 細胞培養

Jurkat 細胞 (クローン E6.1) は、最終濃度 10% (v/v) 非働化牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS), 2-メルカプトエタノール (50  $\mu$ M), ペニシリン (100 U/mL) およびストレプトマイシン (100  $\mu$ g/mL) を添加した RPMI 1640 培地 (ナカライテスク社) を用いて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。<sup>18)</sup> FBS には SM が含まれているため、Jurkat 変異細胞樹立後、親株 Jurkat 細胞も含めてすべての細胞を SM 不含有の無血清培地 AIM-V (Invitrogen 社) を用いて培養した。

### 形質膜 SM の検出

形質膜上の SM の存在状態を明らかにするため、シマミミズ由来のライセニン (lysenin, Lys) およびウメボシイソギンチャク由来のエキナトキシン II (equinatoxin II, Eq2) の 2 種類の SM 結合性タンパク質毒素を用いた。<sup>19)</sup> これら 2 つの毒素は形質膜上の SM を特異的に認識し、膜に孔を形成することで毒性を示すが、認識する SM の存在形態がそれぞれ異なる (Fig. 1B)。<sup>20,21)</sup> Lys は 5-6 分子の SM がクラスター化している状態 (SM マイクロドメインとみなされる構造) でのみ SM に結合することができる。一方、Eq2 は 1 分子単位の分散した SM を優位に認識して結合する。N 末端のアミノ酸 161-297 残基のみの無毒性型 Lys (NT-Lys) に緑色蛍光タンパク質 EGFP を融合させた EGFP-NT-Lys のコンストラクトである pQE30/His6-

EGFP-NT-Lys は既に報告した通りに用意した。<sup>22)</sup> EqtII の C 末端に EGFP を融合した EqtII-EGFP のコンストラクトである pET28/EqtII (8-69)-EGFP-His6 は理化学研究所バイオリソース研究センターより供与された。これらの SM 結合性プローブは既報の方法により精製した。<sup>23)</sup> EqtII の溶血活性を阻害するため、EqtII-EGFP を 0.5 mM 1,10-フェナントロリン酸溶液と 0.1 mM 硫酸銅水溶液で 30°C, 1 時間インキュベートすることによって、Cys8 と Cys69 に分子内ジスルフィド結合を形成させた。<sup>24)</sup>

#### FACS による細胞表面脂質の検出

細胞表面 SM の検出のため前述の EGFP-NT-Lys または EqtII-EGFP を用いた。細胞表面ガングリオシド GM1 の検出のため、フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識 (Sigma 社) あるいは CF640R 標識 (Invitrogen 社) のコレラトキシン B サブユニット (cholera toxin B subunit, CTx-B) を用いた。CTx-B は膜上での GM1 の存在状態に依存せず GM1 に結合すると考えられている。<sup>25)</sup> Jurkat 細胞をリン酸緩衝生理食塩水 PBS で洗浄した後、EGFP-NT-Lys, EqtII-EGFP および FITC 標識 CTx-B を用いて細胞を染色した。細胞表面セラミド発現は、細胞を 4%パラホルムアルデヒドにて室温で 15 分間固定し、0.1%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) 含 PBS にて室温で 15 分間ブロッキングをし、10%正常ヤギ血清含 PBS に抗セラミド抗体 (マウス IgM, Enzo Life Sciences 社) あるいはコントロールマウス IgM を加えた染色液にて 37°C で 1 時間インキュベートし、10%正常ヤギ血清含 PBS にフィコエリスリン (phycoerythrin, PE) 標識ヤギ抗マウス IgM 抗体にて室温で 1 時間インキュベートした後、FACS [FACS AriaII (BD Biosciences 社) あるいは Attune NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific 社)] にてデータを採取し、FlowJo ソフトウェア (Tree Star 社) を用いて解析した。

#### Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) 処理

M $\beta$ CD はコレステロールをキレートして膜から除去する薬剤であり、マイクロドメインの破壊のために広く利用されている。Jurkat 細胞への M $\beta$ CD 処理は既報に従った。<sup>9)</sup> 細胞を RPMI 1640 培地のみあるいは 4 mM M $\beta$ CD (Sigma 社) を含む RPMI 1640 培地にて 37°C で 40 分間インキュベートした後、EGFP-NT-Lys, EqtII-EGFP または FITC 標識

CTx-B にて標識して、FACS 解析を行った。

#### CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子変異 Jurkat 細胞の樹立

CRISPR/Cas9 システムを用いた SMSI および *GlcCerS* 変異 Jurkat 細胞の作製は既報に従った。<sup>26)</sup> CRISPR デザインツールを用いて、オフターゲット効果の可能性が低いガイドオリゴを設計した。<sup>27)</sup> ガイドオリゴの配列は以下の通り。SMSI (センス鎖, 5'-CACCGCTTCATTATTCTTCGCAGT-3'; アンチセンス鎖, 5'-AAACACTGCGAAGAATAATGAAGC-3'), *GlcCerS* (センス鎖, 5'-CACCGAAGAGGACGAACCCGAAGA-3'; アンチセンス鎖, 5'-AAACTCTTCGGGTTTCGTCTCTTC-3')。ガイドオリゴを pSpCas9(BB)-2A-GFP(PX458) プラスミドに導入した。Amaya Human T Cell Nucleofector Kit と Nucleofector I Device (Lonza 社) を用いて、Jurkat 細胞にプラスミドを導入した。本プラスミドには GFP が含まれているため、遺伝子導入の 2 日後、GFP 陽性 Jurkat 細胞を遺伝子導入に成功した細胞として FACS AriaII を用いてソートした。

#### SMSI 変異 Jurkat 細胞および *GlcCerS* 変異 Jurkat 細胞の樹立

一過性の GFP 発現が消失するまでソートした細胞を数日間培養した後、変異細胞の樹立を行った。SMSI 変異細胞の樹立のため、溶血活性を有する全長の Lys (400 ng/ml, ペプチド研究所) にて細胞を処理することにより、SM マイクロドメインを発現する細胞を除去した。Lys 処理後、生き残った細胞を SMSI 変異細胞とした。このとき、Jurkat 細胞に Lys 処理を行うとすべて死滅することを確認している (データ非表示)。*GlcCerS* 変異 Jurkat 細胞の樹立のため、細胞を FITC 標識 CTx-B で標識し、FITC 陰性の細胞集団を *GlcCerS* 変異 Jurkat 細胞として FACS AriaII で再ソートした。Jurkat 細胞および各変異細胞の TCR 発現レベルが均一であることを、PE/Cy7 標識抗 TCR  $\alpha/\beta$  抗体 (BioLegend 社) にて細胞を染色して FACS 解析にて確認した。

#### ヒト SMSI 遺伝子のクローニングおよび SMSI 遺伝子再構成細胞の樹立

レンチウイルス発現用ベクターの作製およびレンチウイルスの調製は既報に従った。<sup>28)</sup> ヒト SMSI のオープンリーディングフレームを Jurkat 細胞の cDNA より増幅した。増幅産物を pGEM-T Easy ベ

クター (Promega 社) に組み込み pKT1 を作製した. pKT1 を鋳型とし, プライマー (5'-CACCATGAAGGAAGTGGTTTATTGGTCACC-3', 5'-TTATGTGTCATTCACCAGCCGGCTG-3') で増幅した産物を pENTR/D-TOPO ベクター (Life Technologies 社) に組み込み, pKT2 を作製した. レンチウイルス作製のため, Gateway vector conversion system (Life Technologies 社) を用いて, pKT2 の SMS1 配列をレンチウイルス発現ベクター CSII-CMV-RfA に LR クロナーゼ反応により導入し, pKT4 (SMS1/CSII-CMV-RfA) を作製した. HEK293T 細胞に Lipofectamine 2000 を用いて pKT4 あるいは CSII-CMV-RfA (mock) を遺伝子導入した. 16 時間培養後, フォルスコリン (10  $\mu$ M) を添加した高グルコース DMEM 培地に培地交換し, 37°C で 24 時間培養し, 32°C に移しさらに 24 時間培養した後, ウイルスを含む上清を回収した. Jurkat 細胞および各変異 Jurkat 細胞を DMEM/RPMI 1640=1/1 の培地で 37°C, 24 時間培養後, ウイルス含有培地に交換して 32°C で 1 日培養し, 通常の RPIM 1640 に培地交換して 32°C で 1 日培養した後, 37°C に移した. Lys, EqtII 染色と FACS 解析によって, SMS1 遺伝子再構成細胞の樹立を確認した.

#### 薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography, TLC) による脂質解析

Jurkat 細胞の脂質解析方法は既報の通りである.<sup>18,29)</sup> クロロホルム/メタノールを用いて細胞の総脂質を抽出し, DEAE-Sephadex A-25 カラム (GE Healthcare 社) を用いて中性脂質画分と酸性脂質画分とに分離した. 各画分を窒素乾固した後, 0.1 M 水酸化ナトリウム含メタノール溶液を加えて 37°C で 2 時間アルカリ加水分解をすることにより, グリセリン脂質を除去した. 中和後, Sep-Pak C18 (Waters 社) を用いて脱塩処理を行った. 中性および酸性の脂質画分を TLC 用シリカゲルプレートにスポットした. 中性脂質画分のプレートは, クロロホルム/メタノール/水 (60:25:4) にてプレートの下半分まで展開し, 乾燥させた後, SM の解析のために 1-ブタノール/酢酸/水 (3:1:1), 中性スフィンゴ脂質全体の解析のためヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸 (50:50:1) にて再度展開した. 酸性脂質画分のプレートはクロロホルム/メタノール/0.2%塩化カルシウム水溶液 (55:45:10) にて展開した. SM の検出のためリン酸基を含む脂質で青

色を呈する Dittmer 試薬をプレートに噴霧した.<sup>30)</sup> すべての脂質の検出のため銅リン酸試薬を噴霧した後, 180°C で発色するまで加熱した. スフィンゴ糖脂質の検出のため糖を検出するオルシノール硫酸液を噴霧した後, 110°C で発色するまで加熱した. 発色後のプレートの画像をスキャナーで取り込んで, ImageJ を用いてデンシティーを計測した.

#### TCR 刺激後の ZAP-70 リン酸化

TCR 刺激には TCR 複合体の構成分子である CD3 $\epsilon$  に対する刺激抗体 (クローン OKT3, BioLegend 社) を用いた. 細胞を抗 CD3 $\epsilon$  抗体 (3  $\mu$ g/ml) にて 37°C で 5 分間刺激した. その後, 4%パラホルムアルデヒドによる固定, 90%メタノールによる膜透過処理, および 0.1% BSA によるブロッキングを行った後, アロフィコシアニン (allophycocyanin, APC) 標識抗リン酸化 ZAP-70 (Y319) および FITC 標識抗 ZAP-70 抗体 (BioLegend 社) を用いて細胞内染色を行った. 蛍光標識アイソタイプコントロール抗体をネガティブコントロールとして用いた. 標識した細胞を FACS 解析した. 得られた平均蛍光強度 (MFI) から以下の式を用いて, 細胞間における ZAP-70 のリン酸化の比較を行った.

(“APC 標識抗 ZAP-70 抗体の MFI” - “APC 標識コントロール抗体の MFI”) / (“FITC 標識抗 ZAP-70 抗体の MFI” - “FITC 標識コントロール抗体の MFI”)

#### TCR 刺激後の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 応答の測定

Fluo-4 Calcium Assay Kit (Molecular Probes 社) を用い, 製品に添付のプロトコルに従って行った. Ca<sup>2+</sup> インジケータ Fluo-4 を含む溶液にて細胞を 37°C で 40 分間インキュベートした. FACS AriaII を用いて定常状態の Ca<sup>2+</sup> レベルを 15 秒間測定し, それを蛍光のベースラインとして設定した後, CD3 抗体 (3  $\mu$ g/mL) を加え, 引き続き 360 秒間測定を継続した. FlowJo ソフトウェアを用いて, 刺激後における細胞内 Ca<sup>2+</sup> のピークの蛍光値 (Peak) および AUC (area under the curve, 毎秒のカルシウム応答の平均値を結んでカーブを描いたときのカーブより下の部分の面積) を算出した.

#### TCR 刺激後の T 細胞活性化マーカー CD69 発現量

抗 CD3 抗体 (1  $\mu$ g/ml) を固相化した培養プレートに細胞を播種した. また, TCR をバイパスして細胞を直接刺激することで知られるホルボールエステル Phorboll2-myristate13-acetate (PMA,

100 ng/ml) による刺激も行った. いずれも 37°C で 18 時間培養した. 細胞を回収し, APC 標識抗 CD69 抗体 (BioLegend 社) にて標識して FACS 解析を行った.

### 統計処理

実験結果はいずれも平均値と標準偏差で示した. 2 群間の比較には *t*-検定を, 多群間の比較には Tukey-Kramer 法を用いた. 危険率 5% 以下を有意差ありとして判定した. なお, 危険率に関しては, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001 で示した.

## 結 果

### SMS1 変異および *GlcCerS* 変異導入 Jurkat 細胞におけるスフィンゴ脂質の発現

形質膜において, SM や GSL はコレステロール

の存在下でその物理化学的性質により自発的に脂質マイクロドメインを形成するが, ドメインは安定的ではなく可逆的に形成と分散とを繰り返している. 小林らのグループは, Lys と EqtII を用いてドメイン化した SM と分散した SM とが識別できることを示している (Fig. 2A) (“実験材料および実験方法” 参照).<sup>19)</sup> 我々はこのことを Jurkat 細胞において確認するため, MβCD によりマイクロドメインを破壊したときの Lys および EqtII の結合能を解析した (Fig. 1C). Jurkat 細胞を 4 mM MβCD にて処理すると EGFP-NT-Lys の結合は未処理の約 10% まで低下していたが, EqtII-EGFP および CTx-B の結合は半分程度が維持されていた. MβCD 処理により Lys の結合が 90% 近く抑制されたということは, Jurkat 細胞においても Lys を用いることで SM マイクロドメインを選択的に検出

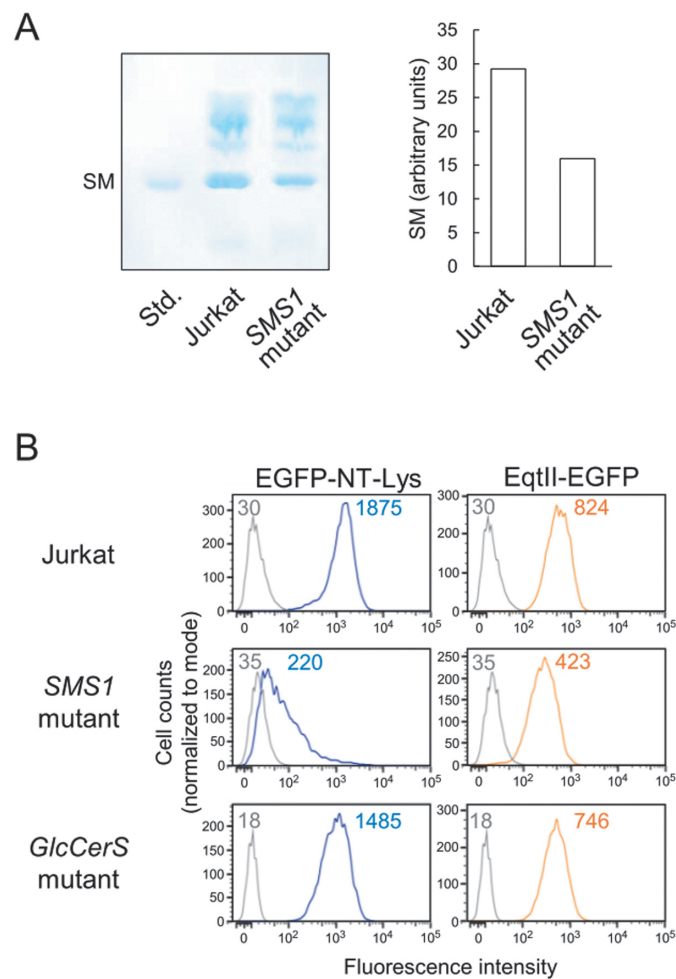


Fig. 2. SM-microdomain levels were reduced in *SMS1* mutant Jurkat cells. (A) Total SM expression. Neutral lipids purified from Jurkat cells and *SMS1* mutant Jurkat cells were separated on TLC plates, and phosphorus-containing lipids such as SM was detected by Dittmer reagent. SM contents were determined by densitometric analysis using ImageJ software program. Std: standard SM. (B) Cell surface staining with EGFP-NT-Lys (left panels) and EqtII-EGFP (right panels). Cell counts are normalized to mode. Each number indicates MFI. Blue and orange lines: with staining. Light gray lines: without staining.

できることを示している。コレステロールはマイクロドメイン以外の形質膜にも存在し、M $\beta$ CDによってコレステロールがキレートされる際には近傍の分子も引き抜かれる非特異的な作用が報告されていることから、分散したSM (EqtIIが認識) やGM1 (CTx-Bが認識) にも多少影響が及んだものと考えられる。

T細胞の活性化における脂質マイクロドメイン構成脂質の役割を解析するために、Jurkat細胞のSMおよびGSLが欠損した細胞の作製を試みた。今回、JurkatにおいてSM生合成を担うSMS1お

よびGSL合成の初発段階GlcCerの生合成を担うGlcCerSを標的とした。SMS1変異導入Jurkat細胞のSM発現を調べた。細胞全体のSM量をTLC解析により調べたところ、SMS1変異細胞ではJurkat細胞の約半分に低下していた (Fig. 2A)。EGFP-NT-LysとEqtII-EGFPを用いたFACS解析により形質膜上のSMマイクロドメインと分散したSMの発現量を調べた (Fig. 2B)。SMS1変異細胞では、形質膜上のSMマイクロドメインの発現量 (EGFP-NT-Lysによる検出量) は親株のJurkat細胞の約12%にまで減少しており、これはM $\beta$ CD

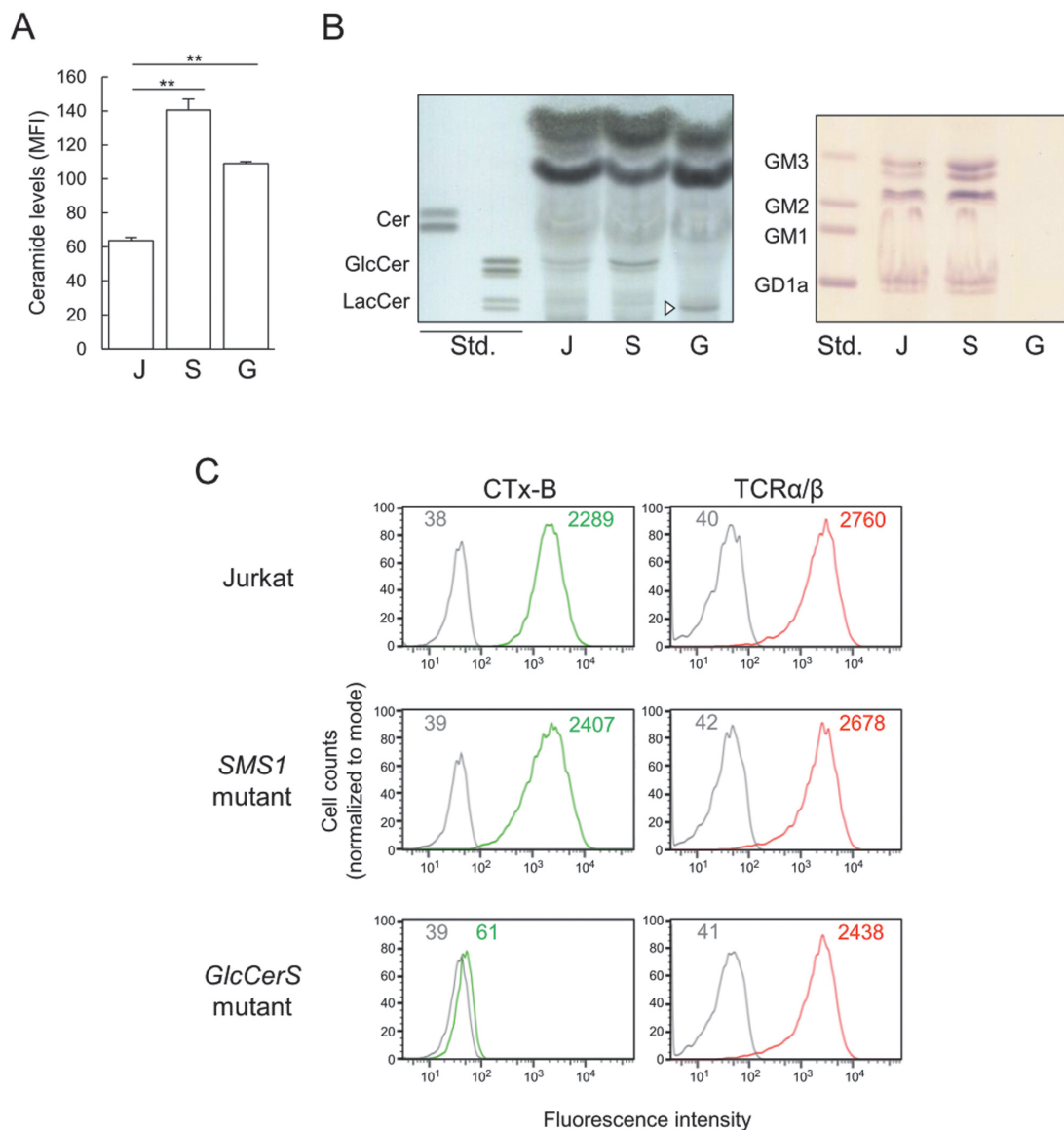


Fig. 3. Sphingolipid expression patterns were altered in mutant Jurkat cells. (A) Surface ceramide expression levels in Jurkat cells (J), SMS1 mutant cells (S), and GlcCerS mutant cells (G) analyzed by FACS. Values presented are MFI  $\pm$  SD of triplicate assays.  $**p < 0.01$ . (B) Neutral sphingolipid fractions (left) or acidic GSL fractions (right) purified from Jurkat and the mutant cells were analyzed by TLC. All lipids were detected using cupric phosphate reagent (left) or sugar-containing lipids such as GSLs were detected using orcinol-sulfuric acid (right). The arrow head is an unknown band. Std: standard lipids. Cer: ceramide. GlcCer: glucosylceramide. LacCer: lactosylceramide. (C) Cell surface staining with FITC-conjugated CTx-B (left panels) and PE-conjugated TCR  $\alpha/\beta$  (right panels). Cell counts are normalized to mode. Each number indicates MFI. Green and red lines: with staining. Light gray lines: without staining.

によるマイクロドメイン破壊のときと同程度の著しく減少であった (Fig. 1C, Fig. 2B). 一方, 分散した SM の発現量 (Eq2II-EGFP による検出) 低下は約半分程度であった. 以上より, SMSI 変異細胞では SM は発現するものの, マイクロドメインを形成するには不十分なレベルであることが判明した. *GlcCerS* 変異導入 Jurkat 細胞では, 形質膜上の SM マイクロドメインおよび分散した SM のどちらの発現量も SMSI 変異細胞で認めたような大きな変化は認められなかった.

セラミドは SM や GSL などの前駆体である (Fig. 1A). FACS 解析により形質膜上のセラミド発現量を解析したところ, いずれの変異導入細胞でも Jurkat 細胞に比べて有意に増加していた (Fig. 3A). Jurkat 細胞では GSL の中で *GlcCer* および a 系列 ganglioside (GM3, GM2, GD1a) の発現量が優位であることが知られている.<sup>18)</sup> SMSI 変異細胞では, TLC を用いた脂質解析より *GlcCer*, GM3 および GM2 の増加が認められたが, GD1a 量には変化がなかった (Fig. 3B). さらに, CTx-B の FACS 解析より GM1 の発現に変化は認められなかった (Fig. 3C). *GlcCerS* 変異細胞では, *GlcCer* 以下すべての GSL の発現が欠損していた (Fig. 3B, C).

以上より, SMSI 変異細胞では, SM の半減により, 代償的に前駆物質 (セラミド) および GSL の増加が起こっていることが判明した. 一方, *GlcCerS* 変異細胞ではセラミドの上昇は起こるが, SM マイクロドメインおよび分散した SM の発現量に変化はないことが判明した.

#### SMSI 変異 Jurkat 細胞では TCR シグナル伝達が増強する

T 細胞の活性化は TCR を介した種々の細胞内シグナル伝達により生じる. TCR 刺激に伴い TCR は脂質マイクロドメインに局在化し, そこに種々のシグナル伝達分子が動員されて, 十分な活性化が惹起される.<sup>31)</sup> SMSI 変異細胞と *GlcCerS* 変異細胞を用いて, TCR シグナル伝達における脂質マイクロドメインの機能を解析した. はじめに, いずれの変異細胞でも形質膜上の TCR 発現量にほとんど変化はないことを確認した (Fig. 3C).

ZAP-70 は Syk 型チロシンキナーゼの一種で, TCR 刺激に伴いリン酸化を受けて TCR 複合体に会合して活性化し, アダプタータンパク質 LAT のリン酸化を起こすことで下流のシグナル伝達分子

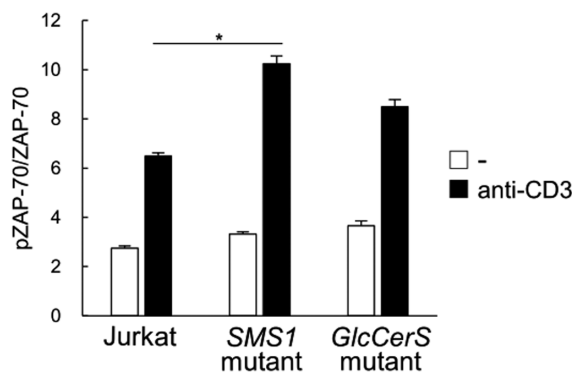


Fig. 4. ZAP-70 phosphorylation was increased in SMSI mutant Jurkat cells. Cells were unstimulated (-) or stimulated with anti-CD3 mAb for 5 min, and analyzed as described in Methods. Relative phosphorylation of ZAP-70 in stimulated cells was normalized relative to total ZAP-70 protein for each group. \* $p < 0.05$ .

を TCR 直下に動員する.<sup>32)</sup> 抗 CD3 抗体による TCR 刺激を行った細胞におけるリン酸化 ZAP-70 (pZAP-70) 量および総 ZAP-70 発現量を FACS 解析し, そこで得られた MFI を用いて, “実験材料および実験方法” で示す方法で ZAP-70 のリン酸化の程度を比較した. SMSI 変異細胞では Jurkat 細胞と比べて ZAP-70 のリン酸化が有意に増加していたが, *GlcCerS* 変異細胞ではリン酸化の程度に有意な変化は認められなかった (Fig. 4).

ZAP-70 による LAT のリン酸化によりホスホリパーゼ PLC $\gamma$ 1 が動員され, この活性により小胞体プールからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出が誘導され細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇する.  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇は, カルシニューリンの活性化, 転写因子 NF-AT の核内移行を介して T 細胞活性化に重要なサイトカインなどの転写に参与する.<sup>31)</sup> Fig. 5A のように, TCR 刺激に伴う細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇は刺激後数秒で認められ, 数分間持続することがわかっている.<sup>18)</sup> この  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の時間変化データを解析したところ, SMSI 変異細胞では  $\text{Ca}^{2+}$  応答のピーク値 (Fig. 5B) および  $\text{Ca}^{2+}$  上昇量 (Fig. 5C) の増強が認められた. 一方, *GlcCerS* 変異 Jurkat 細胞では  $\text{Ca}^{2+}$  上昇量は有意に増加していたが, ピーク値に有意な差は認められなかった (Fig. 5B, C).

$\text{Ca}^{2+}$  シグナルとは別の経路として, ZAP-70 活性化の下流では MAP キナーゼ系の活性化も起こり, その結果として CD69 (T 細胞の早期活性化マーカー分子) の発現が誘導される. TCR 依存的な CD69 発現上昇において Jurkat 細胞と各変異細胞



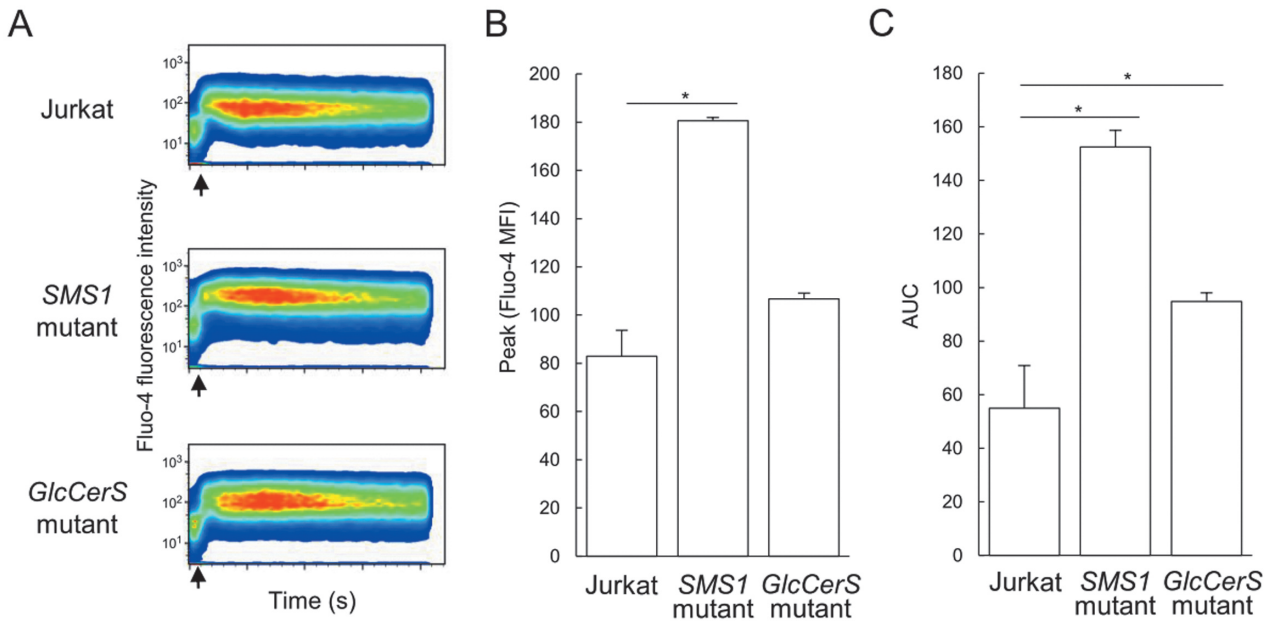


Fig. 5. *SMS1* mutant Jurkat cells exhibited increased  $\text{Ca}^{2+}$  influx. Cells were loaded with the calcium indicators Fluo-4, and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels were analyzed by FACS. (A)  $\text{Ca}^{2+}$  influx, represented by Fluo-4 intensity. Anti-CD3 mAb was added 15s after baseline acquisition (arrows). Plots shown are representative of three experiments with similar results. (B, C) Summary of experiments as peak increase of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels with respect to baseline (B) or as area under the curve (AUC) of the calcium response induced by anti-CD3 treatment (C).  $n = 3$ . \* $p < 0.05$ .

との間に違いがあるか否かを解析した。Jurkat 細胞と変異細胞を 1 対 1 で混和してプレートに播種することにより両細胞に同一の条件で TCR 刺激を行った。刺激後の細胞に CD69 と Lys あるいは CD69 と CTx-B の共染色を行って FACS によって解析した。Jurkat 細胞と *SMS1* 変異細胞の混合細胞の解析にあたっては、Lys の染色強度に基づいて強陽性と陰性~弱陽性とにゲーティングし、それぞれを Jurkat 細胞と変異細胞とみなして CD69 の発現量を調べた。また、Jurkat 細胞と *GlcCerS* 変異細胞の混合細胞では、CTx-B の染色強度に基づいて強陽性と陰性とにゲーティングして同様に解析した。その結果、*SMS1* 変異細胞では TCR 刺激に伴う CD69 発現の有意な上昇が認められたが、*GlcCerS* 変異細胞では有意な低下が認められた (Fig. 6)。このとき、TCR をバイパスして PKC-MAP キナーゼ経路を直接活性化する薬剤である PMA 刺激では、いずれの変異細胞も CD69 の発現量は Jurkat 細胞と同程度であった。

以上の TCR シグナル伝達の解析結果より、Jurkat 細胞の TCR シグナル伝達には SM マイクロドメインが強く関与しており、GSL が形成するマイクロドメインの寄与は小さいと考えられる。また、*SMS1* 変異細胞では TCR シグナル伝達が亢進する

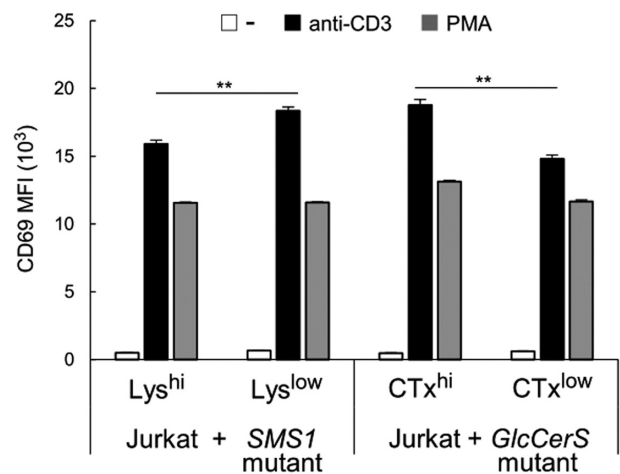


Fig. 6. TCR-induced CD69 expression was upregulated in *SMS1* mutant Jurkat cells. Jurkat cells were mixed with *SMS1* mutant cells or *GlcCerS* mutant cells in ratio 1 : 1, and cultured without (-) or with anti-CD3 mAb (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or PMA (100  $\text{ng}/\text{ml}$ ) for 18 h. Cells were harvested, stained with APC-conjugated anti-CD69 mAb and lipid probes (EGFP-NT-Lys and CF640R-conjugated CTx-B), and analyzed by FACS. To distinguish mutant cells from Jurkat cells for quantification of CD69 MFI, cells were gated according to the staining intensity of lipid probes: Lys<sup>hi</sup> and CTx<sup>hi</sup> cells are Jurkat cells identified by the strong intensity of Lys and CTx staining, respectively, Lys<sup>low</sup> cells are *SMS1* mutant cells with the weak intensity of Lys staining, and CTx<sup>low</sup> cells are *GlcCerS* mutant cells with the weak intensity of CTx-B staining. Results were expressed as mean  $\pm$  SD of triplicate assays. \*\* $p < 0.01$ .

ことから, SM マイクロドメインには TCR シグナルを負に調節する役割があることが示唆される。

### SMS1 遺伝子再構成 SMS1 変異 Jurkat 細胞では TCR シグナル伝達が回復する

CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子変異導入にはオフターゲット効果が知られている。<sup>33)</sup> SMS1 変異細胞の表現型の原因として, TCR シグナルに関与する他の分子の遺伝子に変異が導入されたということも考えうる。そこで, その可能性を検討するために, TCR シグナルにおける SMS1 変異細胞の変化が SMS1 遺伝子の再導入によって回復するか否か解析したところ, SMS1 遺伝子導入 SMS1 変異細胞では Lys および EqtII 結合能が完全に回復した (Fig. 7)。そこで, TCR 刺激に伴う  $Ca^{2+}$  応答を解析したところ, mock 導入 SMS1 変異細胞では, Fig. 6 同様,  $Ca^{2+}$  応答が増強したのに対し, SMS1 遺伝子導入 SMS1 変異細胞では mock 導入 Jurkat 細胞と同程度にまで低下した (Fig. 8A, B)。次に, TCR 刺激後の CD69 発現上昇を解析したところ, mock 導入 SMS1 変異細胞では, Fig. 7 同様, CD69 発現上昇が著明に増強しているのに対し, SMS1 遺伝子導入 SMS1 変異細胞では mock 導入 Jurkat 細胞と同程度にまで低下した (Fig. 8C)。以上の結果より, SMS1 変異細胞における SM マイクロドメインの喪失と TCR シグナルの増強は SMS1 の変異によって生じていることが明らかとなった。

## 考 察

今回我々は, SM マイクロドメインまたは GSL マイクロドメインを欠損した変異 Jurkat 細胞を構築することによって, TCR 依存性の T 細胞活性化におけるマイクログドメイン構成脂質の役割を検討した。CRISPR/Cas9 システムを用いて Jurkat 細胞に SMS1 および *GlcCerS* の変異を導入した細胞を作製した。*GlcCerS* 変異細胞では *GlcCer* 以下の全ての GSL の発現が欠損していた (Fig. 3B, C)。一方, SMS1 変異細胞では SM 発現量は親細胞の約 5 割の低下であったにもかかわらず, 形質膜上の SM マイクロドメインの発現は M $\beta$ CD 処理によるマイクログドメイン破壊と同レベルの著明な減少を示した (Fig. 2)。M $\beta$ CD 処理により, マイクログドメインの破壊が起こり, TCR 刺激に伴うマイクログドメイン局在分子の集積が起こらないということが生化学的あるいは形態学的に示されていることから, SMS1 変異細胞において SM マイクロドメインはほとんど消失したと考えられる。実際, 既報の SMS1 ノックダウン細胞においても, SM の 2 割の低下で形質膜上の Lys 陽性の SM マイクロドメインは消失することが報告されている。<sup>16)</sup> 形質膜における SM 密度の低下は形質膜の流動性および脂質の側方拡散速度を高めるので, 効率的な SM マイクロド

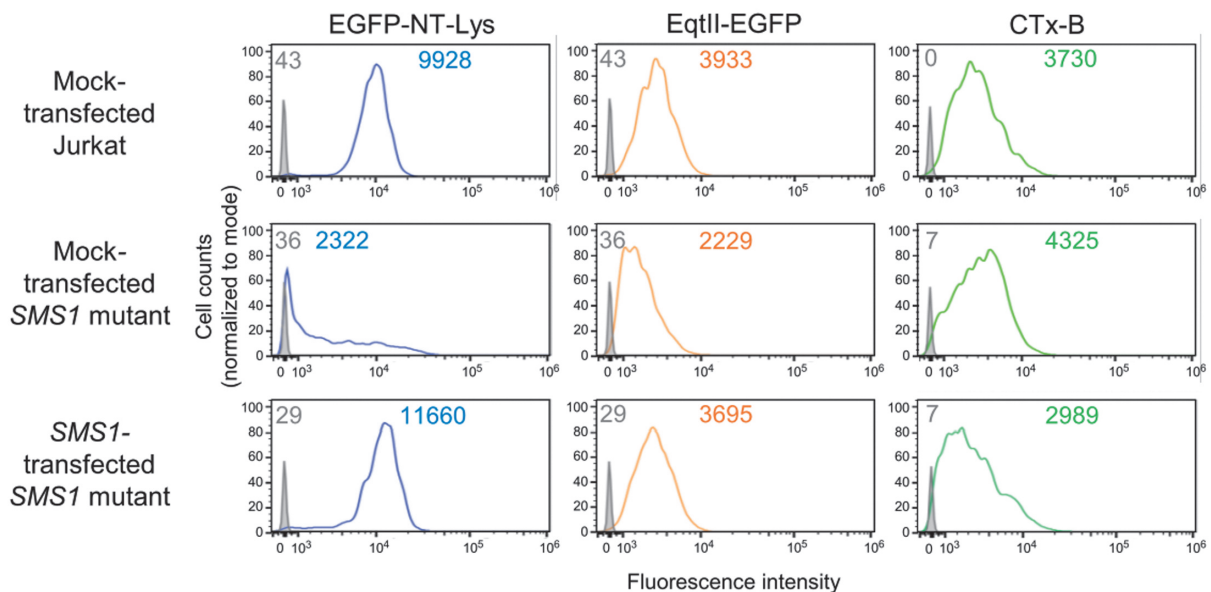


Fig. 7. SMS1 mutant Jurkat cells reconstituted with SMS1 gene completely restored SM-microdomain levels. Mock-transfected Jurkat cells and mock- or SMS1-transfected SMS1 mutant cells were stained with EGFP-NT-Lys (left panels), EqtII-EGFP (middle panels) and CF640R-conjugated CTx-B (right panels), and analyzed by FACS. Cell counts are normalized to mode. Each number indicates MFI. Blue, orange and green lines: with staining. Light gray lines: without staining.

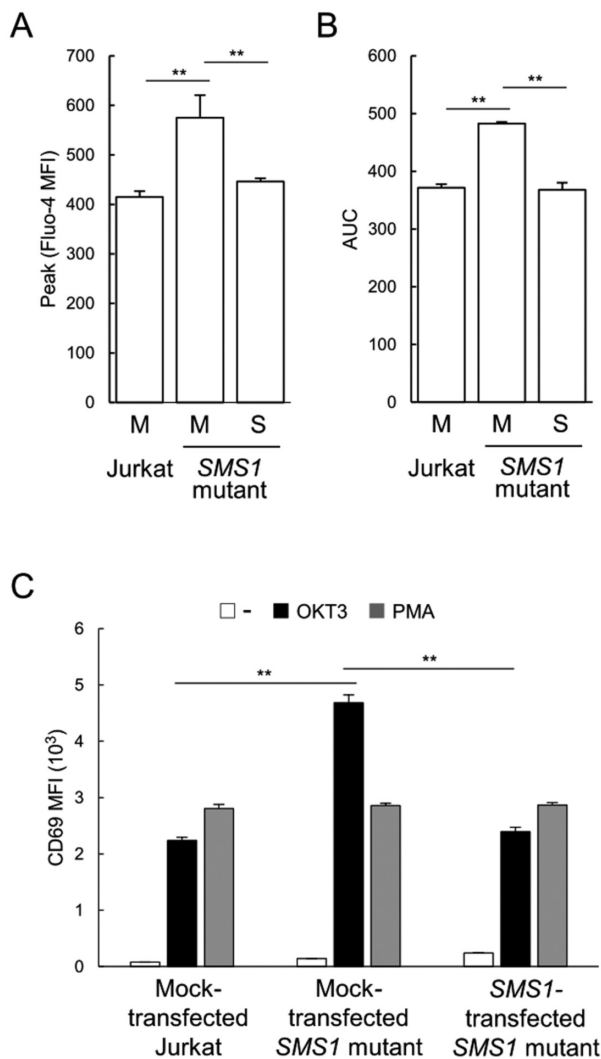


Fig. 8. Enhanced TCR signaling in *SMS1* mutant cells is reversed by reintroducing *SMS1* gene. (A, B)  $\text{Ca}^{2+}$  influx assay under similar conditions of Fig. 5. Summary of experiments as peak increase of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels with respect to baseline (A) or as area under the curve (AUC) of the calcium response induced by anti-CD3 treatment (B). M: mock-transfected. S: *SMS1*-transfected.  $n=3$ . (C) Cells were cultured without (-) or with anti-CD3 mAb (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or PMA (100  $\text{ng}/\text{ml}$ ) for 18 h, stained with APC-conjugated anti-CD69 mAb and analyzed by FACS. Results were expressed as mean  $\pm$  SD of triplicated assays. \*\* $p<0.01$ .

メインの形成あるいはその維持にとって不都合であるのかもしれない。<sup>34,35</sup> 形質膜中のコレステロール量が20%程度減るだけでマイクロドメインは存在しなくなり、受容体シグナル伝達が抑制されることが報告されていることから、形質膜の脂質濃度はマイクロドメイン形成に重要な要素であることが窺える。<sup>36,37</sup> また、今回我々は、*SMS1* の酵素活性部位付近を標的として変異細胞の樹立を試みたが、SM そのものが完全に欠損した細胞を樹立

できなかった。花田らが樹立したCHO細胞(チャイニーズハムスター卵巣由来繊維芽細胞)のLys耐性変異株もLys結合性は喪失しているがSM発現は完全に欠損していない。<sup>38</sup> また、2種類のSMS生合成酵素(*SMS1*と*SMS2*)を同時に欠損させたマウス胎児由来繊維芽細胞ではSM合成能がほぼ欠損しており、ダブル欠損マウスは胎生致死のようである。<sup>39,40</sup> SMは哺乳類細胞におけるスフィンゴ脂質の約85%を占めていることも含めて考えると、SMが完全に欠損したJurkat細胞は細胞死を起こすか増殖能が極めて低いため、結果として*SMS1*酵素活性が低下した変異細胞が選択されてきたのかもしれない。*SMS1*変異細胞でSMが完全に欠損しない別の理由として、*SMS2*はJurkat細胞では発現していないとされているが、<sup>16</sup> この特殊な条件下で*SMS2*が代償的に発現しているのかもしれない。

また、どちらの変異細胞もセラミドの代償的な蓄積が認められた(Fig. 3A)。*SMS1*遺伝子変異または欠損によるセラミド量への影響は細胞株やマウスを用いて検討されているが、セラミドが増加するケースや不変なケースなどさまざまである。<sup>41</sup> SM分解酵素を介したセラミドの増加はアポトーシスの誘導に関与することが知られているが、<sup>42</sup> 我々の変異細胞では細胞死が亢進することはなかった(データ非表示)。

TCR刺激に伴い、TCRは脂質マイクロドメインに局在化し、そこに種々のシグナル伝達分子がリクルートされる。ZAP-70キナーゼのリン酸化には脂質マイクロドメインの存在が重要であることが知られている。<sup>43</sup> *SMS1*変異細胞ではZAP-70のリン酸化は亢進したが、*GlcCerS*変異細胞ではそれに有意な変化はなかった(Fig. 4)。スフィンゴ脂質の分子種ごとに多様な脂質マイクロドメインが存在するが、<sup>44</sup> Jurkat細胞においてはGSLが形成するマイクロドメインよりもSMマイクロドメインの方がTCR近傍シグナルにとって重要であることが実証された。ZAP-70の活性化はその下流のTCRシグナル伝達に大きな影響を及ぼす。活性亢進型の変異ZAP-70遺伝子をJurkat細胞に導入すると、TCR刺激依存的に $\text{Ca}^{2+}$ 応答やMAPキナーゼのERK活性化などが亢進するという報告がある。<sup>45</sup> *SMS1*変異Jurkat細胞ではTCR刺激に伴い、 $\text{Ca}^{2+}$ 応答が増強するとともに、ERK経路依存的に誘導される活性化マーカーCD69の発現も亢

進した (Fig. 5, Fig. 6). SM マイクロドメイン欠損における初期の TCR シグナル伝達 (ZAP-70 のリン酸化) の亢進は, 下流のシグナル伝達および T 細胞の活性化にまで影響していることが実証された.

既報の *SMSI* 遺伝子ノックダウンを利用した Jurkat 細胞の SM 発現抑制では, 今回の我々の結果と反して, TCR 刺激に伴う TCR シグナル伝達の低下が示された.<sup>16)</sup> ただ, その実験では細胞培養の培地として FBS を添加したものを使用したが, 一般的に血清中にはリポタンパク質などに多量の SM が含まれているため, 培地由来の SM が細胞に取り込まれた可能性は高い. また, *SMSI* ノックダウン Jurkat 細胞の実験ではモノクローン化が行われていることから, TCR シグナルの反応性が弱いクローンが選択されていたのかもしれない. 我々の作製した *SMSI* 変異 Jurkat 細胞は, 無血清培地で継代および実験を行った. また, クローン化も行わず, 親株の Jurkat 細胞と TCR 発現量が変わらないことを確認して使用したため, Jurkat 細胞の平均的な TCR の反応性をみていると考えられる. さらに, 既報のノックダウン Jurkat 細胞では, 我々が実施したような *SMSI* 遺伝子の再導入の実験を行っていない. 以上のように既報と我々の実験とは異なる点が多いため比較は難しいと考えている.

*SMSI* 変異細胞に *SMSI* 遺伝子を再導入すると, SM マイクロドメイン発現量は完全に回復し, このとき  $Ca^{2+}$  応答と CD69 発現が Jurkat 細胞レベルに低下した (Fig. 7, Fig. 8). *SMSI* 変異細胞では代償的なセラミドや GSL の増加が確認されたことから, この細胞の表現型が SM マイクロドメイン欠損に起因するのか, 代償的なセラミドや GSL の増加に起因するのかを考察する必要がある. *GlcCerS* 変異細胞でもセラミドの有意な増加が起こるが, *SMSI* 変異細胞のような全般的な TCR シグナルの亢進は認められなかった. したがって, TCR シグナルの場として機能するマイクドメインはセラミドによって構成されていないことが示唆される.

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus, SLE) 患者の T 細胞では, 形質膜の GSL (特に, LacCer, GM1, グロボ系 GSL の Gb3) の発現増加が報告されている. SLE 患者由来 T 細胞に *GlcCerS* 阻害剤である *N*-butyldeoxynojirimycin (NB-DNJ) を処理することにより,

CTx-B 陽性ガングリオシド (GM1) と LacCer の発現量を健常人由来 T 細胞と同程度に戻すと, TCR シグナル伝達が回復するとともに炎症性サイトカインの産生が抑制される.<sup>46)</sup> これは過剰な GSL の発現が TCR シグナルに対して抑制的な効果があることを示している. 我々は, *SMSI* 欠損マウスの胸腺未熟 T 細胞において *SMSI* 変異細胞と同様の傾向を示す結果を得ている. この胸腺細胞ではセラミドや GSL の増加はみられない.<sup>15)</sup> 以上より, SM が形質膜上で特異的に TCR シグナルを抑制的に制御しているものと考えられる.

自己免疫疾患患者の T 細胞では, マイクドメイン構成脂質の質的・量的な変化が起こることがいくつも報告されている.<sup>47)</sup> SLE 患者の T 細胞では, 形質膜のコレステロールや GSL が増加している.<sup>46-48)</sup> SLE 患者由来 T 細胞では TCR 複合体を形成する CD3 $\zeta$  鎖の発現低下により TCR シグナル伝達が低下しているが, これはコレステロール生合成阻害剤 (アトルバスタチン) を添加することによって回復する.<sup>49-51)</sup> T 細胞において形質膜のコレステロールが増加すると, TCR の膜上での流動性が低下した結果, TCR の活性化が抑制されるということが近年相次いで報告されている.<sup>52-54)</sup> Jurkat 細胞では SM はコレステロールと共に TCR を含むマイクドメインを形成することから,<sup>14)</sup> コレステロールが増加している病態では SM マイクドメイン発現量も増加し, TCR シグナル伝達の抑制に寄与している可能性がある. 自己免疫疾患患者の T 細胞における SM 発現量ははまだ報告されていないが, 炎症が関与するような肥満病態では血清中の SM の質的变化 (脂肪酸のアシル鎖長の変化) が起きることが知られている.<sup>55)</sup> 今後, 正常人と自己免疫疾患患者のヒト T 細胞における SM マイクドメインの質的・量的関係を解明することが肝要である. SM 発現を微調整することで TCR シグナル伝達を制御することができれば, T 細胞の機能異常に起因する自己免疫疾患の発症メカニズムの解明や新たな治療法の開発につながることを期待される.

**謝辞** 本研究を行うにあたり, CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子変異導入細胞の樹立に多大なご協力を賜りました, 東北医科薬科大学機能病態分子学教室の稲森啓一郎准教授, 宍戸史女史, 山本博之氏, 齋藤恵梨香女史, 南條真央女史, 高

橋沙織女史に深く感謝いたします。本研究は、文部科学省による科研費 16H04767 と水谷糖質科学振興財団、武田科学振興財団、長井記念薬学研究奨励支援、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業の助成を受けて行われました。

### 利益相反

著者全てにおいて、開示すべき利益相反はありません。

### REFERENCES

- 1) Rietveld A., Simons K., *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.*, **1376**, 467–479 (1998).
- 2) Pike L. J., *J. Lipid Res.*, **47**, 1597–1598 (2006).
- 3) Huitema K., van den Dikkenberg J., Brouwers J. F. H. M., Holthuis J. C. M., *EMBO J.*, **23**, 33–44 (2004).
- 4) Yamaoka S., Miyaji M., Kitano T., Umehara H., Okazaki T., *J. Biol. Chem.*, **279**, 18688–18693 (2004).
- 5) Helms J. B., Zurzolo C., *Traffic*, **5**, 247–254 (2004).
- 6) Munro S., *Cell*, **115**, 377–388 (2003).
- 7) Mukherjee S., Maxfield F. R., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **20**, 839–866 (2004).
- 8) Hancock J. F., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 456–462 (2006).
- 9) Tanimura N., Nagafuku M., Minaki Y., Umeda Y., Hayashi F., Sakakura J., Kato A., Liddicoat D. R., Ogata M., Hamaoka T., Kosugi A., *J. Cell Biol.*, **160**, 125–135 (2003).
- 10) Kabouridis P. S., Janzen J., Magee A. L., Ley S. C., *Eur. J. Immunol.*, **30**, 954–963 (2000).
- 11) Fujita A., Cheng J., Hirakawa M., Furukawa K., Kusunoki S., Fujimoto T., *Mol. Biol. Cell*, **18**, 2112–2122 (2007).
- 12) Sato T., Iwabuchi K., Nagaoka I., Adachi Y., Ohno N., Tamura H., Seyama K., Fukuchi Y., Nakayama H., Yoshizaki F., Takamori K., Ogawa H., *J. Leukoc. Biol.*, **80**, 204–211 (2006).
- 13) Nakayama H., Yoshizaki F., Prinetti A., Sonnino S., Mauri L., Takamori K., Ogawa H., Iwabuchi K., *J. Leukoc. Biol.*, **83**, 728–741 (2008).
- 14) Zech T., Ejsing C. S., Gaus K., de Wet B., Shevchenko A., Simons K., Harder T., *EMBO J.*, **28**, 466–476 (2009).
- 15) Toshima K., Nagafuku M., Okazaki T., Kobayashi T., Inokuchi J., *Int. Immunol.*, (in revised)
- 16) Jin Z. X., Huang C. R., Dong L., Goda S., Kawanami T., Sawaki T., Sakai T., Tong X. P., Masaki Y., Fukushima T., Tanaka M., Mimori T., Tojo H., Bloom E. T., Okazaki T., Umehara H., *Int. Immunol.*, **20**, 1427–1437 (2008).
- 17) Popovic Z. V., Rabionet M., Jennemann R., Krunić D., Sandhoff R., Gröne H. J., Porubsky S., *Front. Immunol.*, **8**, 1–16 (2017).
- 18) Nagafuku M., Kabayama K., Oka D., Kato A., Tani-ichi S., Shimada Y., Ohno-Iwashita Y., Yamasaki S., Saito T., Iwabuchi K., Hamaoka T., Inokuchi J., Kosugi A., *J. Biol. Chem.*, **278**, 51920–51927 (2003).
- 19) Makino A., Abe M., Murate M., Inaba T., Yilmaz N., Hullin-Matsuda F., Kishimoto T., Schieber N. L., Taguchi T., Arai H., Anderlüh G., Parton R. G., Kobayashi T., *FASEB J.*, **29**, 477–493 (2014).
- 20) Yamaji A., Sekizawa Y., Emoto K., Sakuraba H., Inoue K., Kobayashi H., Umeda M., *J. Biol. Chem.*, **273**, 5300–5306 (1998).
- 21) Ishitsuka R., Yamaji-Hasegawa A., Makino A., Hirabayashi Y., Kobayashi T., *Biophys. J.*, **86**, 296–307 (2004).
- 22) Abe M., Makino A., Hullin-Matsuda F., Kamijo K., Ohno-Iwashita Y., Hanada K., Mizuno H., Miyawaki A., Kobayashi T., *Mol. Cell. Biol.*, **32**, 1396–407 (2012).
- 23) Abe M., Kobayashi T., *Methods Cell Biol.*, **137**, 15–24 (2017).
- 24) Hong Q., Gutiérrez-Aguirre I., Barli A., Malovrh P., Kristan K., Podlessek Z., Maek P., Turk D., González-Mañas J. M., Lakey J. H., Anderlüh G., *J. Biol. Chem.*, **277**, 41916–41924 (2002).
- 25) Kiyokawa E., Baba T., Otsuka N., Makino A., Ohno S., Kobayashi T., *J. Biol. Chem.*, **280**, 24072–24084 (2005).
- 26) Inamori K., Ito H., Tamura Y., Nitta T., Yang X., Nihei W., Shishido F., Imazu S., Tsukita S., Yamada T., Katagiri H., Inokuchi J., *J. Lipid Res.*, **59**, 1472–1481 (2018).
- 27) Ran F. A., Hsu P. D., Wright J., Agarwala V., Scott D. A., Zhang F., *Nat. Protoc.*, **8**, 2281–2308 (2013).
- 28) Uemura S., Go S., Shishido F., Inokuchi J., *Glycoconj. J.*, **31**, 101–108 (2014).
- 29) Inokuchi J., Uemura S., Kabayama K., Igarashi Y.,

- Glycoconj. J.*, **17**, 239–245 (2000).
- 30) Dittmer J. C., Lester R. L., *J. Lipid Res.*, **5**, 126–127 (1964).
- 31) Horejsi V., Hrdinka M., *FEBS Lett.*, **588**, 2392–2397 (2014).
- 32) Gaud G., Lesourne R., Love P. E., *Nat. Rev. Immunol.*, 485–497 (2018).
- 33) Fu Y., Foden J. a. Khayter C., Maeder M. L., Reyon D., Joung K., Sander J. D., *Nat. Biotechnol.*, **31**, 822–826 (2013).
- 34) London E. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, **1746**, 203–220 (2005).
- 35) Sengupta P., Baird B., Holowka D., *Semin. Cell Dev. Biol.*, **18**, 583–590 (2007).
- 36) Kusumi A., Fujiwara T. K., Morone N., Yoshida K. J., Chadda R., Xie M., Kasai R. S., Suzuki K. G. N., *Semin. Cell Dev. Biol.*, **23**, 126–144 (2012).
- 37) Kusumi A., Suzuki K. G. N., Kasai R. S., Ritchie K., Fujiwara T. K., *Trends Biochem. Sci.*, **36**, 604–615 (2011).
- 38) Hanada K., Hara T., Fukasawa M., Yamaji A., Umeda M., Nishijima M., *J. Biol. Chem.*, **273**, 33787–33794 (1998).
- 39) Mitsutake S., Zama K., Yokota H., Yoshida T., Tanaka M., Mitsui M., Ikawa M., Okabe M., Tanaka Y., Yamashita T., Takemoto H., Okazaki T., Watanabe K., Igarashi Y., *J. Biol. Chem.*, **286**, 28544–28555 (2011).
- 40) Hussain M. M., Jin W., Jiang X. C., *Nutr. Metab.*, **9**, 71–77 (2012).
- 41) Taniguchi M., Okazaki T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1841**, 692–703 (2014).
- 42) Hannun Y. A., Obeid L. M., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 139–150 (2008).
- 43) Dykstra M., Cherukuri A., Sohn H. W., Tzeng S.-J., Pierce S. K., *Annu. Rev. Immunol.*, **21**, 457–481 (2003).
- 44) Gómez-Mouton C., Abad J. L., Mira E., Lacalle R. A., Gallardo E., Jiménez-Baranda S., Illa I., Bernad A., Mañes S., Martínez-A C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 9642–9647 (2001).
- 45) Deindl S., Kadlecěk T. A., Cao X., Kuriyan J., Weiss A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 20699–20704 (2009).
- 46) McDonald G., Deepak S., Miguel L., Hall C. J., Isenberg D. A., Magee A. I., Butters T., Jury E. C., *J. Clin. Invest.*, **124**, 712–724 (2014).
- 47) Jury E. C., Flores-Borja F., Kabouridis P. S., *Semin. Cell Dev. Biol.*, **18**, 608–615 (2007).
- 48) Dong L., Hu S., Chen F., Lei X., Tu W., Yu Y., Yang L., Sun W., Yamaguchi T., Masaki Y., Umehara H., *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, 931018 (2010).
- 49) Baniyash M., *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 675–687 (2004).
- 50) Liossis S. N., Ding X. Z., Dennis G. J., Tsokos G. C., *J. Clin. Invest.*, **101**, 1448–1457 (1998).
- 51) Jury E. C., Isenberg D. A., Mauri C., Ehrenstein M. R., *J. Immunol.*, **177**, 7416–7422 (2006).
- 52) Swamy M., Beck-Garcia K., Beck-Garcia E., Hartl F. A., Morath A., Yousefi O. S., Dopfer E. P., Molnár E., Schulze A. K., Blanco R., Borroto A., Martín-Blanco N., Alarcon B., Höfer T., Minguet S., Schamel W. W. A., *Immunity*, **44**, 1091–1101 (2016).
- 53) Molnár E., Swamy M., Holzer M., Beck-García K., Worch R., Thiele C., Guigas G., Boye K., Luescher I. F., Schwille P., Schubert R., Schamel W. W. A., *J. Biol. Chem.*, **287**, 42664–42674 (2012).
- 54) Wang F., Beck-García K., Zorzín C., Schamel W. W. A., Davis M. M., *Nat. Immunol.*, **17**, 844–850 (2016).
- 55) Hanamatsu H., Ohnishi S., Sakai S., Yuyama K., Mitsutake S., Takeda H., Hashino S., Igarashi Y., *Nutr. Diabetes*, **4**, e141–147 (2014).