

## Ganglioside Turnover and Formation of Metabolic Regulators

### ガングリオシドの代謝回転と代謝調節物質の産生

Riboni, L., and Tettamanti, G.

Department of Medical Chemistry and Biochemistry, The Medical School, University of Milan,  
Milan, Italy, FAX: 39-2-2363584

**Key Words:** endocytosis, gangliosides, lipid intracellular flow, lysosomes, second messengers

#### Abstract

Gangliosides are components of the plasma membrane and their metabolism consists in: *de novo* biosynthesis, occurring mostly in the Golgi apparatus; catabolism, taking place in the lysosomes; salvage processes (re-cycling of catabolites) with the coordinate participation of lysosomes, endoplasmic reticulum and Golgi apparatus; glycosylation of internalized gangliosides, taking place in the Golgi apparatus. The various steps of ganglioside metabolism are intimately connected with the rapid events of membrane turnover, and occur rapidly themselves. Gangliosides do undergo endocytosis and move from the early endosome compartment partly to the Golgi apparatus, partly to late endosomes and lysosomes. Direct return of gangliosides to the plasma membrane *via* retro-endocytosis or transport, mediated by carrier proteins, has not yet been explored. Intralysosomal biodegradation of gangliosides leads to formation of sphingosine and ceramide, substances that behave as powerful metabolic regulators. The process appears to be influenced by agents that modify the functional state of the cell. The hypothesis is released that factors capable to affect ganglioside endocytosis do affect the rate of ganglioside metabolic processing, thus changing the concentration of second messengers of sphingoid nature.

#### 要 旨

ガングリオシドは細胞膜の構成成分であり、その代謝は、主としてゴルジ装置で行われる新規の生合成と、リソソームで行われる分解、リソソームと小胞体とゴルジ装置の連係によって行われる再利用の過程(分解物のリサイクル)、ゴルジ装置で行われる細胞内に取り込まれたガングリオシドがグリコシル化される。ガングリオシドの代謝の様々な段階は膜の回転の敏速な過程と密接に関連していて、それ自身も敏速に行われている。ガングリオシドは、実際、エンドサイトーシスで取り込まれ、初期エンドソームの部位から一部はゴルジ装置に、一部は後期エンドソームやリソソームへと移動する。逆向きのエンドサイトーシスや、輸送タンパクによる運搬によるガングリオシドの細胞膜への直接の返送については、まだ調べられてはいない。リソソーム内でのガングリオシドの分解によって、スフィンゴシンやセラミドという強力な代謝調節因子として振る舞う物質が生成する。この過程は、細胞の機能的な状態を修飾する薬品に影響されるようである。ガングリオシドのエンドサイトーシスに影響を与える因子は、実際にガングリオシドの代謝過程に量的な影響を与え、その結果スフィンゴイド性のセカンドメッセンジャーの濃度を変化させるという仮説を提唱したい。

#### A. Introduction

Gangliosides, sialic acid containing glycosphingolipids, are components of the plasma membrane of most vertebrate cells, and are particularly abundant in the nervous system (1). They are asymmetrically located in the outer leaflet of the plasma membrane with the oligosaccharide portion exposed on the cell surface, and the ceramide portion inserted into the membrane layer. Small amounts of gangliosides are located intracellularly (2), partly linked to the organelles responsible for their intracellular traffic and metabolism, partly linked to soluble protein carriers (2, 3).

Gangliosides represent recognition sites at the cell surface, and are molecularly suitable for specific interactions with a variety of extracellular substances. This is the basis for their

#### A. はじめに

シアル酸含有糖脂質であるガングリオシドは、ほとんどの脊椎動物の細胞の細胞膜の構成成分であり特に神経系に豊富に存在する(1)。これらは、細胞膜の外側に偏在し、そのオリゴ糖部分を細胞表面側に露出し、セラミド部位を膜層に挿入している。少量のガングリオシドは、細胞内にも存在し(2)、一部はそれらの細胞内での輸送や代謝に関わっている細胞内小器官(オルガネラ)に結合し、一部は可溶性の輸送タンパク質に結合している(2、3)。

ガングリオシドは、細胞表面の認識部位となり、種々の細胞外の物質と特異的な相互作用を行うのに適した分子形態をもつ。このことは、ガングリオシドが受容体の機能や、細胞間や

Abbreviations used: gangliosides are named according to Svennerholm's (64).

implication in receptor function, cell-cell, and cell-substratum recognition processes (4). Moreover, gangliosides interact with membrane-bound functional proteins, modulating their activity, and influencing the membrane mediated transfer of information (4, 5). Finally metabolites (sphingosine, ceramide, etc.) deriving from, or related to, membrane-bound sphingolipids have been recently found to act as regulators of protein phosphorylation and other enzymatic events (6, 7). This poses the possibility that ganglioside turnover is directly involved in the formation of intracellular metabolic regulators.

## B. Outline of Ganglioside Metabolism

Ganglioside metabolism occurs mainly in the cell body with the participation of different subcellular organelles. This implicates the occurrence of efficient mechanisms for sorting and routing of gangliosides between the plasma membrane and the intracellular sites of their biosynthesis and biodegradation. Ganglioside metabolism consists in: *de novo* biosynthesis; catabolism; salvage processes; direct glycosylation following internalization.

### B-1. *De Novo* Biosynthesis.

Gangliosides are formed by sequential additions of monosaccharide units to ceramide, which is formed in the endoplasmic reticulum (8). The process takes place in the Golgi apparatus with the involvement of membrane-bound glycosyltransferases and the corresponding sugar-nucleotides. The sequence of glycosylations is based on the specificity, compartmentation and topology of the involved enzymes. Initiation of the three distinct lines (a, b, c) of the ganglio-series gangliosides is dependent on the strict specificity of sialyltransferase-1, sialyltransferase-2, and sialyltransferase-3, which act on lactosylceramide, GM<sub>3</sub> and GD<sub>3</sub>, and produce gangliosides GM<sub>3</sub>, GD<sub>3</sub> and GT<sub>3</sub>, respectively (9, 10). Further glycosylations are catalysed by enzymes having broader specificity. The glucosyltransferase forming glucosylceramide from ceramide shows an aspecific distribution (the studied enzyme was from liver) along the different Golgi cisternae (11, 12) and has the active site oriented toward the cytosol (11-14). The galactosyltransferase forming lactosylceramide seems also to face the cytosolic side of the Golgi cisternae (11, 14), whereas the following glycosyltransferases show a luminal orientation (10). Therefore, lactosylceramide should be translocated from the cytosolic to the luminal side of the Golgi membrane in order to be further glycosylated. The glycosyltransferases producing the different gangliosides from lactosylceramide show a gradient distribution on the Golgi system. Earlier sialosylations prevail in the *cis*/medial Golgi, and later glycosylations in the *trans* Golgi/*trans* Golgi network (15-17). This implies that the growing glycolipid moves from the endoplasmic reticulum through the Golgi cisternae, presumably *via* a vesicle flow (18), which is also assumed to translocate

細胞と基質間の認識過程に関係する場合の基礎となっている(4)。さらに、ガングリオシドは、膜結合性の機能タンパク質と相互作用し、それらの活性を調節して、膜を介した情報の伝達に影響を及ぼしている(4, 5)。最後に、膜結合性のスフィンゴ脂質に由来したり、それらから派生した代謝産物(スフィンゴシン、セラミドなど)は、タンパク質のリン酸化や他の酵素作用の調節因子として働いていることが最近見い出された(6, 7)。このことは、ガングリオシドの代謝回転が細胞内の代謝調節物質の産生に直接関係している可能性を提起している。

## B. ガングリオシドの代謝の概要

ガングリオシドの代謝は、主として細胞体の中で行われ、それには種々の細胞内の小器官(オルガネラ)が関係している。このことは、新規生合成、分解、再利用、外側からの取り込みが続く直接の糖付加反応からなるガングリオシドの代謝系と細胞膜との間に、ガングリオシドの仕分けをしたり道筋を決めたりする効率の良い機構が介在していることを示している。

### B-1. 新規生合成

ガングリオシドは、小胞体で合成されたセラミドに、単糖の単位をひとつずつ順に付加することによって作られる(8)。この過程は、膜結合性の糖転移酵素と各糖ヌクレオチドの関与によりゴルジ装置で行われる。グリコシル化の順序は、関係する酵素の特異性と、ゴルジ装置内での存在部位、二重膜上での配位に基づいている。ガングリオ系ガングリオシドの3種の異なる系列(a, b, c)の開始は、ラクトシルセラミドと、GM<sub>3</sub>、GD<sub>3</sub>に働いてそれぞれGM<sub>3</sub>と、GD<sub>3</sub>、GT<sub>3</sub>を生成するシアル酸転移酵素-1、-2、-3の厳密な特異性に因っている(9, 10)。それ以降の糖転移反応は、もっと広い特異性をもった酵素によって触媒される。セラミドからグルコシルセラミドを作るグルコース転移酵素は、異なるゴルジの囊に沿って非特異的な分布を示し(肝臓の酵素による研究、11, 12)、その活性部位を細胞質側に向けている(11, 13, 14)。ラクトシルセラミドを産生するガラクトース転移酵素もゴルジ囊の細胞質側を向いているようである(11, 14)が、それに続く糖転移酵素はルーメン側に面して存在している(10)。そのため、ラクトシルセラミドがさらに糖を付加されるためには、ゴルジ膜の細胞質側からルーメン(内腔)側へ転位されなければならない。ラクトシルセラミドから様々なガングリオシドを産生する糖転移酵素は、ゴルジ体において連続的に分布している。初期のシアル酸付加反応は、シス/メディアール・ゴルジで行われ、後期の糖転移反応はトランス・ゴルジ間のネットワークで行われる(15-17)。このことは、成長していく糖脂質は小胞体からゴルジ装置内を、恐らく小胞の流れによって移動していることを意味している(18)。そして、成熟したガングリオシドも、その小胞による輸送によって細胞膜に配置さ

mature gangliosides to the plasma membrane.

### B-2. Catabolism

Ganglioside biodegradation consists in the sequential removal of individual sugar residues, catalyzed by exoglycosidases, ultimately leading to the formation of ceramide (19), that is degraded by ceramidase into sphingosine and fatty acid (20). The glycosidases involved in this process reside in the lysosomes. In fact, gangliosides accumulate in the cells after administration of the lysosomotropic drug chloroquine (21, 22) and in inborn lysosomal diseases characterized by a defect of enzymes involved in ganglioside biodegradation (23, 24). Moreover, highly purified preparations of lysosomes were proven to carry enzymes affecting ganglioside breakdown (25).

### B-3. Salvage Pathways

The existence of recycling processes, where fragments from ganglioside biodegradation are used for biosynthetic purposes, was demonstrated by supplying animals or cultured cells with gangliosides, carrying radioactivity in different portions of the molecule, and following the metabolic fate of radioactivity. The rationale of this approach relied on the observation that exogenous gangliosides, after being taken up by cells, enter the pool of endogenous gangliosides and undergo regular metabolic processing (26, 27). It was demonstrated in liver (in the case of animal experiments, 28-31), and in cultured cerebellar granule cells (32-36), that gangliosides liberate upon degradation galactose, *N*-acetylgalactosamine, sialic acid, fatty acid and sphingosine, that are re-used for the biosynthesis of novel gangliosides, glycoproteins, glycerophospholipids, and sphingomyelin. Also bigger metabolites, like glucosylceramide and ceramide seem to be submitted to metabolic salvage.

In cultured cerebellar granule cells, compounds of catabolic origin started being detectable at 10-15 min of pulse, and compounds of biosynthesis from recycled catabolites after 15-30 min of pulse (35). In the same cells, fed with GM<sub>1</sub> carrying the radioactivity in the sphingosine moiety, it was showed that most of the sphingosine produced by ganglioside breakdown was metabolically recycled, whereas only a small percentage underwent complete degradation (33). Similar results (unpublished observations) were obtained using exogenous gangliosides carrying the radioactivity in different sugar moieties. Moreover, the recycling process appeared to be blocked by inhibiting lysosome function by chloroquine or preventing endocytosis by low temperature treatment (34, 35). All this means that recycling of catabolic fragments (a) follows endocytosis and lysosomal breakdown (b) is a rapid process and (c) displays a high degree of metabolic salvage. Of course, recycling of metabolites formed in lysosomes implies their exit from lysosomes, possibly by the action of specific carriers (37).

れると推定される。

### B. 2. 分解

gangliosideの生物分解は、エキソ型の糖加水分解酵素の触媒作用により、各糖残基を順に取り除くことによって行われ、最終的にセラミドを生成する(19)。セラミドはセラミダーゼにより分解されて、スフィンゴシンと脂肪酸になる(20)。この過程に関わる糖加水分解酵素は、リソソームに存在する。実際、リソソームに作用する薬剤であるクロロキンを投与した細胞(21、22)や、gangliosideの分解に関係した酵素の欠損が原因の先天性のリソソーム性疾患(23、24)においては、gangliosideが蓄積する。さらに、高度に生成したリソソーム標品が、gangliosideの分解に関わる一連の酵素を有することが証明されている(25)。

### B-3. 再利用経路

gangliosideの生物分解で生じた断片を生合成に使用するというリサイクルのプロセスの存在は、ganglioside分子の種々の部位に放射線標識したものを動物や培養細胞に与えてその放射活性の代謝を追うことによって示された。この場合、外から与えたgangliosideが細胞に取り込まれると、内在性のgangliosideと混ざり合っただ通常の代謝作用を受けるといふ観察を、この手法の根拠としている(26、27)。gangliosideの分解によって生じたガラクトース、*N*-アセチルガラクトサミン、シアル酸、脂肪酸、スフィンゴシンは、新たなgangliosideや、糖タンパク質、グリセリン脂質、スフィンゴミエリンの生合成に再利用されていることが肝臓(動物実験の例は、28-31)や培養小脳顆粒細胞において示された(32-36)。より大きな代謝産物であるグルコシルセラミドやセラミドも再利用されているようである。

培養小脳顆粒細胞においては、分解経路の産物が10-15分間gangliosideを与えた後に検出され始め、再利用された分解産物を用いた生合成産物が15-30分間gangliosideを与えた後に検出され始めた(35)。同じ細胞にスフィンゴシン部分を放射線標識したGM<sub>1</sub>を与えると、gangliosideの分解で生じたスフィンゴシンのほとんどがリサイクルされ、完全な分解を受けるのは極く僅かであった(33)。同様の結果は、異なる糖残基に放射線標識したgangliosideを与えた場合にも得られた(未発表)。さらに、再利用の過程は、クロロキンをリソソームの機能を阻害したり、低温処理によってエンドサイトーシスを阻害すると進まないようであった(34、35)。以上のことから、分解物の再利用は、(a)エンドサイトーシスとリソソームにおける分解の後に行われ、(b)速い過程で、(c)高い再利用率を示すということがいえる。当然、リソソームでの代謝産物が再利用されるということは、それらがリソソームを出るということの意味し、恐らくそれは特異的な輸送体の作用によるのであろう(37)。

#### B-4. Direct Glycosylation

This process consists in the direct glycosylation of membrane-bound gangliosides, internalized into the cell with formation of more complex gangliosides. The occurrence of this process was demonstrated by the use of exogenously administered gangliosides, carrying a proper label. For example, administration to rats (31) or cultured neurons (32) of GM<sub>1</sub> radiolabelled in the terminal galactose moiety resulted in the formation of GD<sub>1a</sub>; as well, administration of GM<sub>2</sub>, radiolabelled in the hexosamine moiety, in the formation of GM<sub>1</sub> and GD<sub>1a</sub>. In cultured neurons, inhibition of endocytosis (35) blocked direct glycosylation, implying that the exogenously added ganglioside had to be internalized to reach the intracellular site where glycosylations occur (presumably the Golgi apparatus). Therefore, it is necessary to assume the existence of a specific sorting of the ganglioside-carrying vesicle from the early endosomal compartment to the Golgi apparatus, parallelly and independently from the sorting to lysosomes (Fig. 1). This kind of lipid traffic is strongly supported by the evidence that in cultured fibroblasts (26), cultured kidney cells (38) and rat liver (31) a pulse of administered biotinylated, fluorescent, or radio-labeled glycolipid, respectively, is followed by appearance of

#### B-4. 直接のグリコシル化

この過程では、膜結合性のガングリオシドが細胞内に取り込まれ、より複雑なガングリオシドを産生するためにグリコシル化される。この過程の存在は、適切に標識したガングリオシドを外から与えることによって示された。例えば、ラット(31)や培養したニューロン(32)に、末端のガラクトースを放射線標識したGM<sub>1</sub>を与えるとGD<sub>1a</sub>を生成し、ヘキソサミン部を放射線標識したGM<sub>2</sub>を与えるとGM<sub>1</sub>とGD<sub>1a</sub>を生成した。培養したニューロンにおいてエンドサイトーシスを阻害すると(35)直接の糖付加反応が進まないの、外から与えたガングリオシドは細胞内のグリコシル化が行われる部位(多分ゴルジ装置)まで到達しなければならないということになる。従って、ガングリオシドを運搬する小胞が初期エンドソームの部分からゴルジ装置に特異的に仕分けされると考える必要がある(図1)。そしてそれは、リソソームへの仕分けと似ているが、それとは全く別個のものである。この種の脂質の輸送系の存在は、培養線維芽細胞(26)や培養腎臓細胞(38)、ラットの肝臓(31)に、それぞれ、ビオ

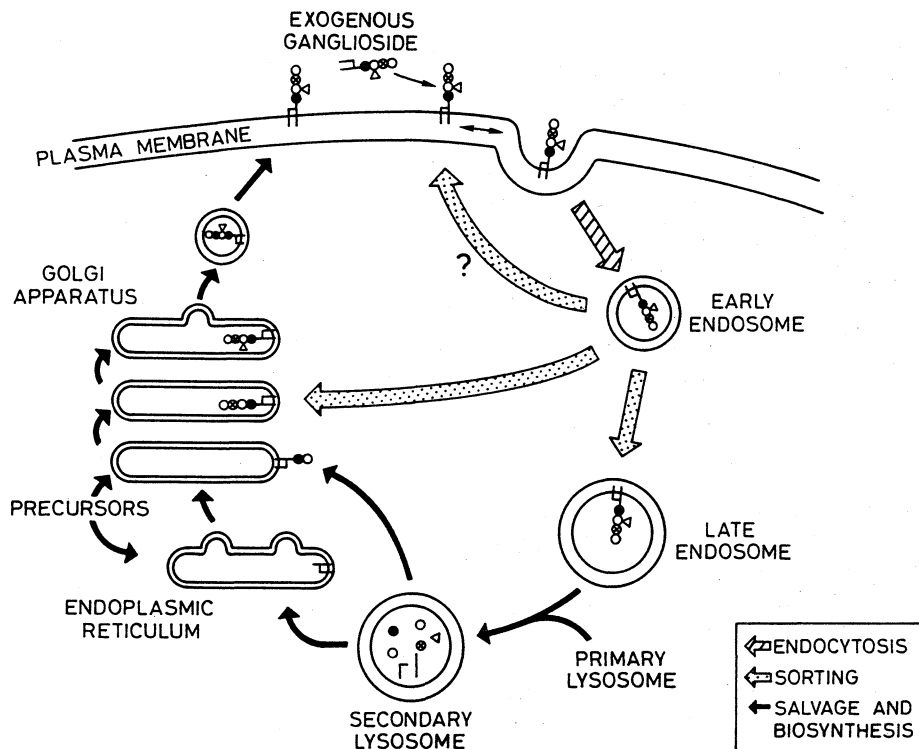


Fig. 1. Connections between membrane turnover (endocytosis; sorting; intracellular membrane flow) and ganglioside metabolism (intralysosomal biodegradation; salvage pathways, *ex novo* biosynthesis; direct glycosylation).

the same compound in the Golgi apparatus.

### C. The Plasma Membrane in Ganglioside Turnover

In addition to the overall turnover that has been described in the previous section gangliosides might undergo a partial turnover at the level of the plasma membrane. This process affects some terminal sugars of gangliosides, particularly sialic acid. Infact, both sialidase and sialyl-transferase activities are present in the plasma membranes of many cells, particularly neural cells. Brain membrane-bound sialidase was shown to be linked to synaptosomal plasma membranes (39, 40) and to face the extracellular environment (41). The same enzyme appears to be linked to the membranes by a glycosylphosphatidyl-inositol anchor (42). On the other hand, sialyltransferases were reported to occur in the outer neural surface (43-45) and to have a different specificity than the Golgi linked sialyltransferases (45).

The proof that desialosylation of gangliosides by membrane-bound sialidase is operative in living cells has been recently provided (22), using primary cultures of cerebellar neurons. It was observed that GD<sub>1a</sub> and GD<sub>1b</sub>, inserted into the cell plasma membrane, are degraded to GM<sub>1</sub> under conditions of complete block of lysosomal function by chloroquine, or of endocytosis by low temperature. Parallely, studies performed on brain slices in the presence of CMP-NeuAc demonstrated the local labeling of membrane-bound gangliosides as the result of the action of the plasma membrane-bound sialyltransferase (45). All together these findings support the hypothesis that plasma membranes, particularly neural plasma membranes possess a sialosylation-desialosylation system that may modulate locally the degree of ganglioside sialosylation (46). This system may be instrumental to some functional cell performances and/or to trigger ganglioside endocytosis.

### D. Role of Endocytosis in Ganglioside Turnover

Under culture conditions cells are estimated to internalize *via* endocytosis about half their plasma membrane per hour (47). This event, which is quite rapid, is followed by equally rapid processes of re-cycling and re-synthesis of the membrane components in order to maintain dynamically the integrity of cell surface. In the overall turnover of plasma membrane a key role is played by the sorting processes that from the early endosomes convey vesicles (a) directly back to the plasma membrane (retro-endocytosis), (b) to the Golgi apparatus, and (c) to late endosomes and further to lysosomes (48) (Fig. 1). These sorting routes have different consequences in the metabolic turnover of the individual protein and lipid components of the membrane. In route (a) no molecular modifications occur; in route (b) molecular remodelling is expected to occur in route (c) biodegradation takes place (partially to terminal waste products) followed by re-use of fragments for biosynthetic purposes

チンや、蛍光、放射線で標識した糖脂質を与えると、それらがゴルジ装置に移動していくという証拠によって支持される。

### C. 細胞膜におけるガングリオシドの代謝回転

前節で述べた全体的な代謝回転に加えて、ガングリオシドは細胞膜上で部分的に代謝回転しているようである。この過程は、ガングリオシドの末端にあるいくつかの糖残基、特にシアル酸残基に作用する。実際、シアリダーゼ、シアル酸転移酵素活性の両方が、多くの細胞、特に神経細胞の細胞膜に存在している。脳の膜結合性シアリダーゼが、シナプトソームの細胞膜に結合して(39、40)細胞の外側に面して存在していることが示された(41)。その酵素は、グリコシル・ホスファチジルイノシトール・アンカーによって膜に結合しているようである(42)。一方で、シアル酸転移酵素が神経細胞の外表面に存在し(43-45)、その特異性はゴルジ結合性のシアル酸転移酵素とは異なることが報告された(45)。

最近、小脳のニューロンの初代培養を用いることで、ガングリオシドの脱シアル酸反応が膜結合性のシアリダーゼによって起こることを、生きた細胞でも観察できるようになった(22)。クロロキンでリソソームの機能を完全に抑えたり低温処理でエンドサイトーシスを完全に抑ええた状態で、外から与えて細胞膜に取り込ませたGD<sub>1a</sub>とGD<sub>1b</sub>がGM<sub>1</sub>に分解されることが観察された。同様に、放射線標識を入れたCMP-NeuAc存在下、脳の切片上で細胞膜に結合したシアル酸転移酵素の作用の結果、膜結合性のガングリオシドが局所的に標識された(45)。以上の発見は、細胞膜、特に神経細胞のそれは、ガングリオシドのシアロ化の程度を局所的に調節すると思われるシアロ化と脱シアロ化の機構を有しているという仮説を支持するものである(46)。この機構は、いくつかの細胞の機能が発揮されたり、ガングリオシドのエンドサイトーシスを起こす助けになるのかもしれない。

### D. ガングリオシドの代謝回転におけるエンドサイトーシスの役割

培養条件下では、細胞は1時間にその細胞膜の約半分をエンドサイトーシスによって細胞内に取り込んでいると見積られている(47)。エンドサイトーシスは、極めて速い反応で、それに続いて、同様に速い反応である膜の構成成分のリサイクルや再合成が行われ、細胞表面の恒常性を精力的に維持している。細胞膜の全体の代謝回転においては、(a)初期エンドソームから小胞を細胞膜へ直接戻したり(逆向きエンドサイトーシス)、(b)ゴルジ装置に運搬したり、(c)後期エンドソームを経てリソソームへ送るという仕分け作用が重要な役割を担っている(48)(図1)。この仕分けの道筋が、膜の構成成分である各タンパク質や脂質の代謝回転に異なった結果をもたらす。(a)では、分子的变化は起こらず、(b)では、分子の改変が起こり、(c)では、生物

and concurrent refilling by *ex novo* biosynthesis. Moreover, it cannot be excluded that during the processes of endocytotic vesicle fusion, sorting and routing, some of the membrane components are extruded and conveyed (with possible involvement of carrier proteins in the case of lipids) to the plasma membrane (48).

Gangliosides, as well as glycosphingolipids in general, appear to undergo endocytosis (10, 49, 50). Particularly electron microscopic studies in cultured fibroblasts (49) employing biotinyl-GM1 showed that the biotin label was present on the cell surface, coated pit-like structures, endocytotic vesicles, lysosomes and Golgi cisternae. Indirect evidence supporting ganglioside endocytosis was also provided by studies with cells cultivated *in vitro*, and fed with radiolabelled gangliosides (34, 51). A definite proof that endocytosis of membrane-bound gangliosides follows a receptor-mediated endocytic pathway is not available. However, the observation that in both cultured fibroblasts and cerebellar granule cells (52, 53) exogenous GM<sub>1</sub> (labeled with a photoreactive probe) rapidly binds to one (or few) membrane-bound protein(s) before being internalized and metabolized, strongly suggests this hypothesis. Intracellular destination of endocytosed gangliosides is only partly understood. Thus far no approaches have been devised to inspect the occurrence of ganglioside direct return to the plasma membrane *via* the early endosome intracellular flow (retro-endocytosis) or *via* transfer proteins. Noteworthy, the latter process was demonstrated to occur in artificial model systems (54). Therefore, no suggestions can be given regarding the impact of these events in ganglioside turnover. Instead, convincing evidence was provided for vesicle transport of gangliosides from the early endosome compartment to lysosomes (34, 49), and the Golgi apparatus (26, 31, 55). The percent distribution of endocytosed gangliosides to (a) lysosomes, and (b) Golgi apparatus is presently difficult to evaluate and likely different from cell to cell. However, in cultured fibroblasts and cerebellar granule cells the major portion seems to be targeted to lysosomes (10).

Internalization of gangliosides by endocytosis is expected to be a rapid event. In fact, and as already mentioned, lysosomal breakdown and salvage pathways of gangliosides take place in minutes in the cell systems employed so far (34). Since in these systems previous insertion of exogenous gangliosides into the cell membrane is required, and both lysosomal biodegradation and salvage pathways are consequent upon endocytosis, it should be inferred that ganglioside endocytosis occurs in terms of minutes, if not less. Therefore it can be suggested that the gangliosides present in endocytosed membrane are rapidly turned over. This conclusion, added to the observation that the rapid salvage pathways have a particular importance in ganglioside metabolism, contrasts with the turnover rates of gangliosides determined on tissues or cultured cells,

分解反応が起こり(一部は最終的な老廃物となる)、それに続いて、その分解産物が生合成に再利用され、そうした新規の生合成によって、分解された分が補充される。さらに、エンドサイトーシスされた小胞の融合や、仕分け、配送の際に、押し出されて細胞膜に輸送される膜の構成成分もある(脂質の場合には輸送タンパク質の関与の可能性もある)ということをも否定できない(48)。

ガングリオシド、そして一般にスフィンゴ糖脂質は、エンドサイトーシスを受けるようである(10, 49, 50)。特に、ビオチン化-GM1を与えた培養線維芽細胞の電子顕微鏡による研究において、ビオチン標識は、窪み様の構造に覆われた細胞表面と、エンドサイトーシスされた小胞、リソソーム、ゴルジ装置に存在した(49)。ガングリオシドのエンドサイトーシスは、放射線標識したガングリオシドを培養細胞に与えることでも間接的に証明された(34, 51)。膜結合性ガングリオシドがエンドサイトーシスを受ける際に、受容体が関与したエンドサイトーシスの経路で行われるという明確な証拠はまだない。しかしながら、培養線維芽細胞や小脳顆粒細胞の両方(52, 53)で、外から与えたGM1(光反応性基で標識)が、取り込まれて代謝される前に、すばやくひとつの(もしくは2-3個の)膜結合性のタンパク質に結合したという観察結果は、この仮説を強く示唆するものである。エンドサイトーシスを受けたガングリオシドの細胞内での行き先は、部分的にしか解かっている。今のところは、ガングリオシドが初期エンドソームの細胞内の流れを経由するか(逆エンドサイトーシス)、輸送タンパクによって細胞膜に直接戻されるのかどうかを、調べる手法も考え出されていない。注目すべきことは、後者の過程が人工的なモデル系で起こることが示されたことである(54)。従って、ガングリオシドの代謝回転においてこれらの過程がどう影響しているのかに関しては、何も示唆するものはない。その代わり、初期エンドソームからリソソーム(34, 49)とゴルジ装置(26, 31, 55)に向かうガングリオシドの小胞輸送に関しては、説得力のある証拠が得られている。エンドサイトーシスを受けたガングリオシドの内どれだけが(a)リソソームに行き、どれだけが(b)ゴルジに行くのかを見極めるのは現在のところ難しいし、多分、細胞によって異なるであろう。しかしながら、培養線維芽細胞や小脳顆粒細胞においては、大部分がリソソームへ向かっているようだ(10)。

エンドサイトーシスによるガングリオシドの細胞内への取り込みは、非常にすばやく行われると予想される。実際に、すでに述べてもいるように、ガングリオシドのリソソームにおける分解と再利用の反応は、調べた細胞においては、数分で起こっている(34)。これらの系においては、外から与えたガングリオシドが細胞膜にまず入り込む必要があり、リソソームにおける分解と再利用の経路はエンドサイトーシスの結果として起こるので、ガングリオシドのエンドサイトーシスは一分以内ではないにしても分の単位で起こると推測される。従って、エンドサイトーシスを受けたガングリオシドは、すばやく代謝回転されると示唆することができる。この結論とガングリオシドの代謝において素早い再利用の経路が特に重要であるという観察結果

with the use of radioactive simple precursors (glucose, *N*-acetylmannosamine, serine, fatty acid). Half lives ranging from a few days to several weeks were reported (56). In order to provide an acceptable explanation of this seeming contradiction more knowledge has to be gained especially on (a) the ability of gangliosides to be recycled back to the membrane *via* retro-endocytosis, or carrier-protein transport; (b) the precise quantification of salvage pathways; (c) the possibility for ganglioside molecules to be internalized at a different frequency than that of other membrane components.

### E. Gangliosides as Precursors of Sphingosine and Ceramide

Recent studies have demonstrated that sphingosine and ceramide, together with sphingosine-1-phosphate, *N*-monomethyl-sphingosine, *N,N*-dimethyl-sphingosine, and ceramide-1-phosphate, exert a powerful regulatory effect on enzymes, like protein kinase C, that are fundamental in the control of cellular metabolism (6, 7, 57, 58). This evidence prompted the hypothesis that sphingosine and ceramide serve as metabolic second messengers (4, 6, 7) and that sphingolipids may produce them under particular conditions of cell stimulation by external substances. With regards to gangliosides two questions appear to be crucial in assessing the validity of the above hypothesis: (a) by which pathway are sphingosine and ceramide formed from gangliosides, and, (b) which external stimuli are able to modify the rate of production of sphingosine and ceramide from gangliosides.

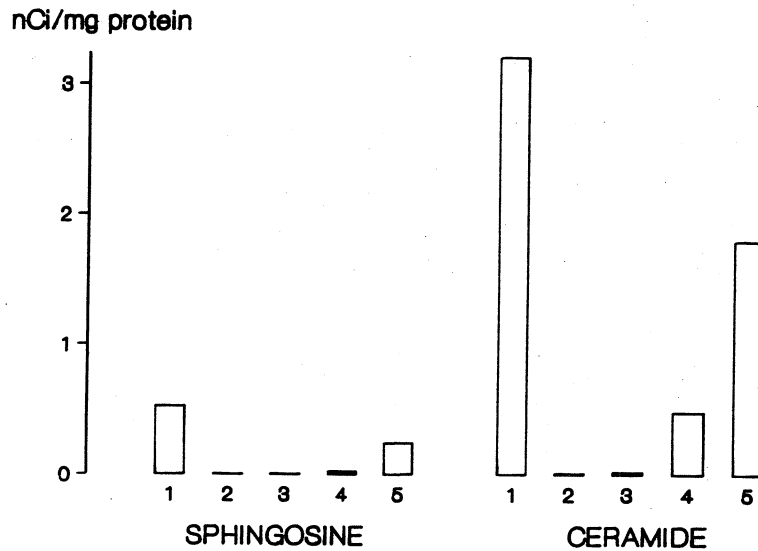
Sphingosine and ceramide are present in free form in cultured cells and tissues (59-62). Both molecules are assumed to be formed during sphingolipid degradation (7). Quite recently, it was demonstrated that ceramide and sphingosine are formed in cultured cerebellar granule cells during degradation of administered GM<sub>1</sub> (radiolabeled at the sphingosine moiety) (35). Both substances appeared to be produced very rapidly (10 and 15 minutes after pulse for ceramide and sphingosine, respectively). Current experiments on the same cells showed (Fig. 2) that the formation of sphingosine and ceramide was completely abolished when endocytosis was prevented by low temperature (4°C) and the lysosomal apparatus blocked by chloroquine. Moreover, it was markedly reduced in the presence of Brefeldin A, a substance known to impair some steps of the intracellular vesicle flow, including the route from late endosomes to lysosomes (63). All this supports the view that the formation of sphingosine and ceramide from membrane-bound gangliosides follows ganglioside internalization by endocytosis, sorting to lysosomes, and breakdown in the lysosomal apparatus (Fig. 3). How sphingosine and ceramide leave the lysosomal apparatus in order to be available at the subcellular sites where they exert regulatory roles is not known. Sphingosine surely leaves the lysosomal apparatus since it is recycled for the Golgi apparatus-assisted biosynthesis of both gangli-

is, 放射線標識した単純な前駆物質(グルコース、*N*-アセチルマンノサミン、セリン、脂肪酸)を用いて組織や培養細胞で測定した ganglioside の代謝回転率と対照的である。後者の場合は、半減期として2-3日から数週間という値が得られている(56)。この矛盾していると思われる事柄をうまく説明するためには、特に、(a)逆エンドサイトーシスや輸送タンパクにより ganglioside が膜へ戻されるのかどうか、(b)再利用経路の正確な量、(c) ganglioside 分子が他の膜構成成分と異なった頻度で取り込まれるのかどうかに関してより多くの知見を得る必要がある。

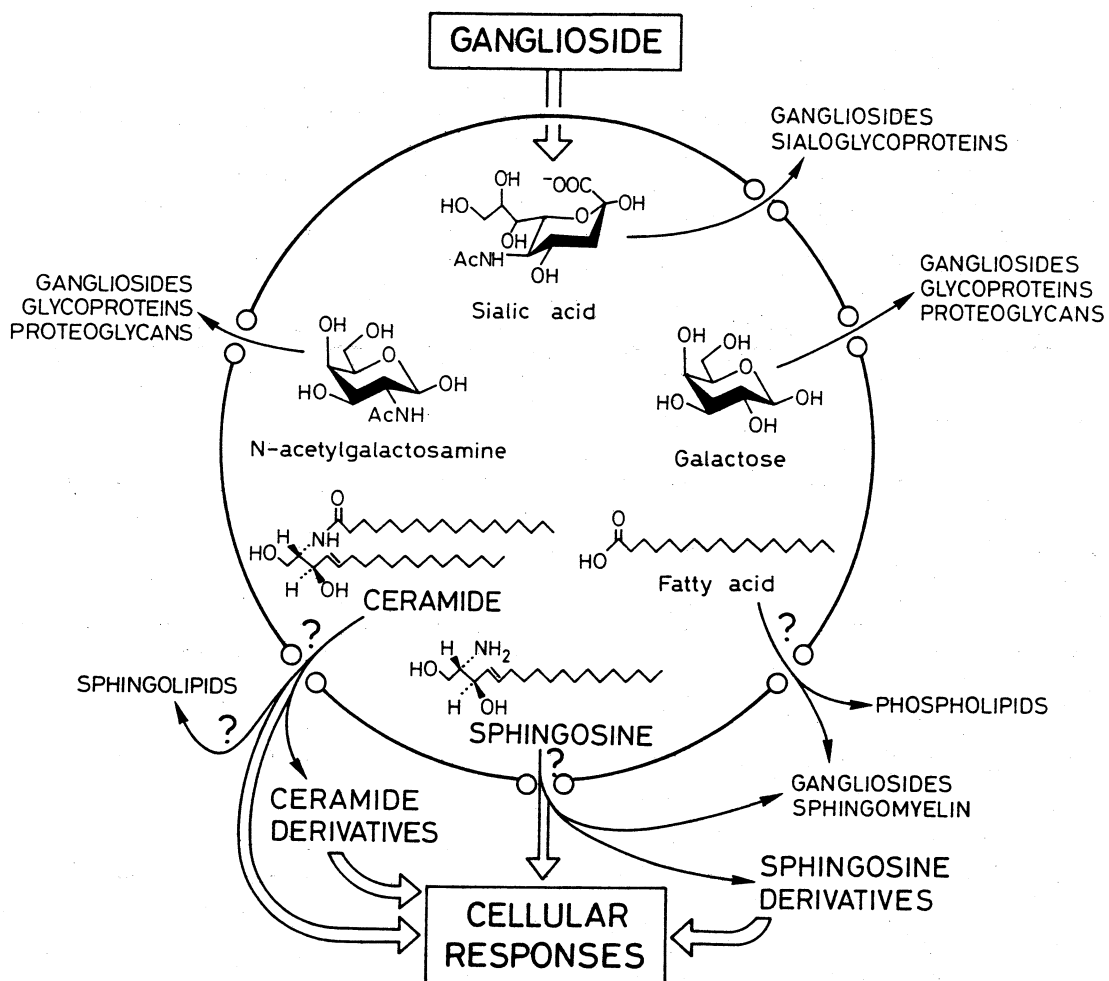
### E. スフィンゴシンとセラミドの前駆体としての ganglioside

最近の研究によって、スフィンゴシンとセラミド、それに、スフィンゴシン-1-リン酸、*N*-モノメチルスフィンゴシン、*N,N*-ジメチルスフィンゴシン、セラミド-1-リン酸は、細胞の代謝の管理において根本的な働きをもつタンパク質キナーゼCのような酵素に対して強力な調節作用を発揮することが示された(6, 7, 57, 58)。この証拠から、スフィンゴシンとセラミドは、代謝のセカンドメッセンジャーとして働き(4, 6, 7)、スフィンゴ脂質はそれらを細胞外物質によるある特異的な細胞刺激条件下で産生するという仮説が出されている。ganglioside についてこの仮説の妥当性を評価するには、以下のふたつの問題が極めて重要であろう。(a)どの経路で、ganglioside からスフィンゴシンやセラミドが産生されるか。(b)どのような外部刺激が、ganglioside からスフィンゴシンやセラミドを産生する割合を調節しうるのか。

スフィンゴシンとセラミドは、培養細胞や組織で遊離状態で存在する(59-62)。両分子は、スフィンゴ脂質の分解過程で産生されると考えられている(7)。極く最近、セラミドとスフィンゴシンが、培養小脳顆粒細胞に与えたGM<sub>1</sub>(スフィンゴシン部位に放射線標識)の代謝過程で産生されることが示された(35)。両物質とも非常にすばやく産生されるようだ(セラミドはGM<sub>1</sub>を10分間与えた後、スフィンゴシンは15分間与えた後に検出された)。同じ細胞による一連の実験で、エンドサイトーシスを低温処理(4°C)で阻害したり、クロロキンでリソソームの機能を阻止すると、スフィンゴシンとセラミドの産生は完全に止められることが示された(図2)。さらに、後期エンドソームからリソソームへの経路を含む細胞内の小胞流のいくつかの段階を阻害する物質であるブレフェルジンAの存在下で、それらの産生が著しく減少した(63)。以上の事柄は、膜結合性の ganglioside がエンドサイトーシスで取り込まれて、リソソームに送られ、そこで分解されることによって、スフィンゴシンとセラミドが産生されるという考え方を支持する(図3)。スフィンゴシンとセラミドがどのようにリソソームの構造を抜け出して、それらが調節作用を発揮する細胞の部位に到達するののかについては、まだ判っていない。スフィンゴシンは、ゴルジにおける ganglioside とスフィンゴミエリン両者の生合成において再利用され



**Fig. 2.** Incorporation of radioactivity into sphingosine and ceramide after exposure of cerebellar granule cells to  $2 \times 10^{-6}$  M  $GM_1$  ( $^3H$ -labelled at the level of the sphingosine moiety) for 1 h, followed by 2 h chase. 1: control; 2:  $4^\circ C$ ; 3: chloroquine ( $50 \mu M$ ); 4: brefeldin A ( $3.5 \mu M$ ); 5: PMA ( $300 nM$ )



**Fig. 3.** Ganglioside turnover and formation of metabolic second messengers of sphingoid nature: intralysosomal formation and exit of products of ganglioside biodegradation



osides and sphingomyelin (34, 35, 55). Data on ceramide exit from lysosomes are not available. However, it has been established (48) that ceramide can easily undergo transmembrane movement and be rapidly translocated from one to another intracellular site.

An open question is to what extent ganglioside endocytosis and biodegradation contribute to produce physiologically active concentrations of sphingosine and ceramide (or their derivatives). In a study, where cerebellar granule cells were submitted to a 1 h pulse - 4 h chase with  $2 \times 10^{-6}$  M exogenous ganglioside, it was calculated that 2 pmol and 20 pmol/ $10^6$  cells of sphingosine and ceramide were produced, respectively (35). Considering that the used cells were under basal conditions and assuming that the levels of free sphingosine and ceramide in cerebellar granule cells are in the range of those determined in other cells (59-62), it should be inferred that gangliosides do contribute to the maintenance of near-basal levels of free sphingosine and ceramide.

A second question is whether extra-, and/or intra-cellular stimuli might influence the sequence of events producing sphingosine and ceramide from gangliosides. In the case of cultured cerebellar granule cells it has been already established that higher amounts of both compounds are produced by differentiated than undifferentiated cells (35). In the same cells, made deficient in protein kinase C by long term exposure to phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), the formation of sphingosine and ceramide from ganglioside GM<sub>1</sub> was only half that of control cells (Fig. 2). These preliminary pieces of evidence encourage to suggest the possible existence of a relationship between formation of metabolic sphingoid-regulators from gangliosides and some functional states of the cell.

## F. Perspectives

The direct involvement of gangliosides in many cell functions is supported by a large crop of experimental evidence and the multifunctional role of these molecules has been clearly envisaged (4). This wider view of interpreting ganglioside function includes the challenging hypothesis that gangliosides contribute to generate a new family of metabolic second messengers, comprising sphingosine, ceramide and some their derivatives. On the basis of present knowledge the only conceivable link between ganglioside metabolism and formation of compounds of sphingoid nature is intra-lysosomal breakdown of membrane-bound gangliosides subsequent to endocytosis. Therefore the suggestion is that external ligand binding to ganglioside affects the rate of ganglioside endocytosis and metabolic processing, thus modifying the concentration of second messengers of sphingoid nature. The final effect is a modification of cellular responses. The various aspects of this new perspective, as well as assessment of its applicability to precise cell functions, must be entirely defined with the need of novel ex-

ているので、確かにリソソームを離れている(34、35、55)。セラミドがリソソームを出るというデータは、得られていない。しかしながら、セラミドが容易に二重膜の一方から他方に移動して細胞内の一方から他の部位へすばやく移動することが立証されている(48)。

ひとつの未解決の問題は、ガングリオシドのエンドサイトーシスと生物分解が、生理学的に活性のある濃度のスフィンゴシンやセラミド(又は、それらの誘導体)の産生にどの程度まで寄与しているのかということである。小脳顆粒細胞に $2 \times 10^6$  Mのガングリオシドを1時間与えて、4時間培養後に調べた場合、細胞 $10^6$ 個当たり2 pmolのスフィンゴシンと20 pmolのセラミドが産生されていた(35)。使用した細胞が基礎状態にあり、小脳顆粒細胞の遊離のスフィンゴシンとセラミドの量が他の細胞の場合と同程度とした場合に(59-62)、ガングリオシドは、確かに、遊離のスフィンゴシンとセラミド量を基礎量の近傍において維持することに寄与していると推量できる。

もうひとつの問題は、細胞内外の刺激がガングリオシドからスフィンゴシンやセラミドを産生する一連の反応に影響を与えるのかどうかということである。培養小脳顆粒細胞においては、分化した細胞では、分化していない細胞よりもこの両物質がより多く産生されることがすでに示されている(35)。同じ細胞において、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)を長時間与えることでタンパク質キナーゼCを欠損させた場合に、GM<sub>1</sub>ガングリオシドからのスフィンゴシンとセラミドの産生は、対照の細胞に比較して僅か半分であった(図2)。これらの予備的な証拠は、ガングリオシドからのスフィンゴイド性の代謝調節因子の産生と、細胞のいくつかの機能状態との間になんらかの関係が存在することを示唆するものである。

## F. 展望

ガングリオシドが細胞の多くの機能に直接関わっているということは多数の実験による証拠によって支持されており、これら分子が多くの機能を有していることがはっきりと予想されている(4)。ガングリオシドの機能を解釈する上でのこの広い考え方には、ガングリオシドが、スフィンゴシンやセラミドやいくつかのそれらの誘導体という新たな代謝のセカンドメッセンジャーを産生することに関わっているという、挑戦的な仮説が含まれている。現在の知見に基づくと、ガングリオシドの代謝とスフィンゴイド性の化合物の産生を結び付ける唯一の考えられる経路は、膜結合性のガングリオシドのエンドサイトーシス後のリソソーム内での分解である。従って、細胞外のリガンドがガングリオシドに結合すると、ガングリオシドがエンドサイトーシスを受けて代謝される割合に影響を与える結果、スフィンゴイド性のセカンドメッセンジャーの濃度を変更することが示唆される。最終的な効果は、細胞反応の変更である。この新しい展望の様々な側面、および、それが細胞の機能

perimental designs and a great deal of work.

### Acknowledgements

This work was supported in part by grants from the Consiglio Nazionale delle Ricerche, C.N.R., Rome, Italy (grant n. 91.01246.PF 70, Targeted Project "Biotechnology and Bio-instrumentation"; and grant n. 91.00052.PF 99, Targeted Project "Genetic Engineering")

に正確に当てはまるかどうかの評価を、完全にはっきりと示すためには、斬新な実験計画と多大な仕事が必要であるに違いない。

三菱化成生命科学研究所・複合糖質研究室  
東 秀好 記

### References

1. Wiegandt H., (1985) in: Glycolipids (A. Neuberger and L.L.M. van Deenen, eds.) vol.10, pp. 199-260, Elsevier, Amsterdam
2. Tettamanti G. (1988a) in: New trends in ganglioside research: neurochemical and neuroregenerative aspects (R.W. Ledeen, E.L. Hogan, G.Tettamanti, A.J.Yates, R.K. Yu, eds.), Fidia Research series, vol.14, pp.625-646, Liviana Press, Springer/Verlag Padova/Berlin
3. Sonnino, S., Ghidoni, R., Galli, C., and Tettamanti, G. (1979) *J. Neurochem.* **33**, 117-121
4. Hakomori, S.I. (1990), *J. Biol. Chem.* **265**, 18713-18716
5. Fishman, P.H., (1988) in: New trends in ganglioside research: neurochemical and neuroregenerative aspects (R.W. Ledeen, E.L. Hogan, G.Tettamanti, A.J.Yates, R.K. Yu, eds.), Fidia Research series, vol.14, pp.183-201, Liviana Press/Springer Verlag, Padova/Berlin
6. Hannun, Y.A., and Bell R.M. (1989) *Science* **243**, 500-507
7. Merrill, A.H. Jr., and Jones, D.D. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1044**, 1-12
8. Walter, V.P., Sweeney, K., and Morre, D.J. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **750**, 346-352
9. Basu, M., De, T., Das, K.K., Kyle, J.W., Chon, H-C., Schaper, R.J., and Basu, S. (1987) *Methods Enzymol.* **138**, 575-607
10. Schwarzmann, G., and Sandhoff, K. (1990) *Biochemistry* **29**, 10865-10871
11. Futerman, H., and Pagano, R.E. (1991) *Biochem. J.* **280**, 295-302
12. Jeckel, D., Karrenbauer, A., Burger, K.N.J., Van Meer, G., and Wieland F. (1992) *J. Cell Biol.*, **117**, 259-267
13. Coste, H., Martel, M.B., and Got, R. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **858**, 6-12
14. Trinchera, M., Carrettoni, D., and Ghidoni, R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 9093-9099
15. Pohlentz, G., Klein, D., Schwarzmann, G., Schmitz, D., and Sandhoff, K. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7044-7048
16. Trinchera, M. and Ghidoni, R. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 15766-15769
17. Iber, H., Van Echten, G., and Sandhoff, K. (1992) *J. Neurochem.* **58**, 1533-1537
18. Wattenberg, B.W. (1990) *J. Cell Biol.* **111**, 421-428
19. Fürst, W., and Sandhoff, K. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1120**, 1-16
20. Spence, M.W., Reed S., and Cook, H.W. (1986) *Biochem. Cell Biol.* **64**, 400-404
21. Klinghardt, G.W., Fredman, P., and Svennerholm, L. (1981) *J. Neurochem.* **37**, 897-908
22. Riboni, L., Prinetti, A., Bassi, R., and Tettamanti, G. (1991) *FEBS Lett.* **287**, 42-46
23. O'Brien J.S. (1989) in: The metabolic bases of inherited disease (C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D.Valle, eds.) 6th edition, pp. 1797-1806, McGraw-Hill Information Services Company
24. Sandhoff, K., Conzelmann, E., Neufeld, E.F., Kaback, M.M., and Suzuki, K. (1989) in: The metabolic basis of inherited disease (C.R. Scriver, A.L. Beudet, W.S. Sly, D. Valle, eds) 6th edition, pp. 1807-1839, McGraw-Hill Information Services Company
25. Fiorilli, A., Venerando, B., Siniscalco, C., Monti, E., Bresciani, R., Caimi, L., Preti, A., and Tettamanti, G. (1989) *J. Neurochem.* **53**, 672-680
26. Schwarzmann, G., Hinrichs, U., Sonderfeld, S., Marsh, D., and Sandhoff, K. (1986) in: Enzymes of lipid metabolism II (L. Freysz, H. Dreyfus, R. Massarelli, S. Gatt, eds.) pp.553-562, Plenum Press, New York
27. Huang, T.C., and Dietsch, E. (1991) *FEBS Lett.* **281**, 39-42
28. Ghidoni, R., Sonnino, S., Chigorno, V., Venerando, B., and Tettamanti, G. (1983), *Biochem. J.* **209**, 885-888
29. Ghidoni, R., Trinchera, M., Venerando, B., Fiorilli, A., Sonnino, S., and Tettamanti, G. (1986) *Biochem. J.* **237**, 147-155
30. Ghidoni, R., Trinchera, M., Sonnino, S., Chigorno, V., and Tettamanti, G. (1987) *Biochem. J.* **247**, 157-164
31. Trinchera, M., Ghidoni, R., Greggia, L., and Tettamanti, G. (1990) *Biochem. J.* **266**, 103-106
32. Ghidoni, R., Riboni, L., and Tettamanti, G. (1989) *J. Neurochem.* **53**, 1567-1574
33. Riboni, L., Prinetti, A., Pitto, M., and Tettamanti, G. (1990) *Neurochem. Res.* **15**, 1175-1183
34. Riboni, L., and Tettamanti, G. (1991) *J. Neurochem.* **57**, 1931-1939
35. Riboni, L., Bassi, R., Sonnino, S., and Tettamanti, G. (1992) *FEBS Lett.* **300**, 188-192
36. Van Echten, G., Birk, R., Brenner- Weiss, G., Schmidt, R.R., and Sandhoff, K. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 9333-9339
37. Pisoni, R.L., and Thoene, J.G. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1071**, 351-373
38. Kok, J., Eskelinen, S., Hoekstra, K., and Hoekstra, D. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9896-9900
39. Tettamanti, G., Morgan, I.G., Gombos, G., Vincendon, G., and Mandel, P. (1972) *Brain Res.* **47**, 515-518
40. Schengrund, C.L., and Nelson, J.T. (1976) *Neurochem. Res.* **1**, 171-180
41. Scheel, G., Acevedo, E., Conzelmann, E., Nehrkorn, H., and Sandhoff, K. (1982) *Eur. J. Biochem.* **127**, 245-253
42. Chiarini, A., Fiorilli, A., Siniscalco, C., Tettamanti, G., and Venerando, B. (1990) *J. Neurochem.* **55**, 1576-1584
43. Schengrund, C.L., and Nelson, J.T. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **63**, 217-223
44. Preti, A.S., Fiorilli, A., Lombardo, A., Caimi, L., and Tettamanti, G. (1980) *J. Neurochem.* **35**, 281-296
45. Durrie, R., Saito, M., and Rosenberg, A. (1987) *J. Neurosci. Res.* **18**, 456-465
46. Tettamanti, G., Preti, A., Cestaro, B., Masserini, M., Sonnino, S., and Ghidoni, R. (1980) in: Cell surface glycolipids (C. Sweely ed.) *Am. Chem. Soc. Symp., Series* **128**, 321-343
47. Steinman, R.M., Mellman, I.S., Muller, W.A., and Cohn, Z.A. (1983) *J. Cell Biol.* **16**, 1-27

48. Pagano, R.E. (1990) *Current Opinion Cell. Biol.* **2**, 652-663
49. Schwarzmann, G., Marsh, D., Herzog, V., and Sandhoff, K. (1987) in: *Gangliosides and modulation of neuronal functions* (H. Rahmann, ed.) NATO ASI Series, Series H: Cell Biology, vol. 7, pp. 217-229, Springer Verlag, Berlin
50. Van Meer, G. (1989) *Ann. Rev. Cell Biol.* **5**, 247-275
51. Van Echten, G., Iber, H., Stotz, H., Takatsuki, A., and Sandhoff, K. (1990) *Eur. J. Cell. Biol.* **51**, 135-139
52. Sonnino, S., Chigorno, V., Acquotti, D., Pitto, M., Kirschner, G., and Tettamanti, G. (1989) *Biochemistry* **28**, 77-84
53. Sonnino, S., Chigorno, V., Valsecchi, M., Pitto, M., and Tettamanti, G. (1992) *Neurochem Int.* **20**, 315-321
54. Ledeen, R.W., Wu, G., Vaswani, K.K., and Cannella, M.S. (1990) in: *Trophic factors and the nervous system* (L.A. Horrocks, N.H. Neff, A.J. Yates, M. Hadjicostantinou, eds.) Fidia Research Foundation Symposium Series, Vol.3, pp. 17-33, Raven Press, New York
55. Tettamanti, G., Ghidoni, R., and Trinchera, M. (1988) *Indian J. Biochem. Biophys.* **25**, 106-111
56. Ledeen, R.W. (1989) in: *Neurobiology of glycoconjugates* (R.U. Margolis and R.K. Margolis, eds), pp. 43-83, Plenum Press, New York
57. Igarashi, Y., Nojiri, H., Hanai, N., and Hakomori, S.I., (1989) *Methods Enzymol.* **179**, 521-541
58. Younes, A., Kahn, D.W., Besterman, J.M., Bittman, R. Byun, H., and Kolesnick, R.N. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 842-847
59. Van Veldhoven, P.P., Bishop, W.R., and Bell, R.M. (1989) *Anal. Biochem.* **183**, 177-189
60. Dressler, K.A., and Kolesnick, R.N. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 14917-14929
61. Golkorn, T., Dressler, K.A., Muindi, J., Radin, N.S., Mendelsohn, J., Menaldino, D., Liotta, D., and Kolesnick, R.N. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 16092-16097
62. Merrill, A.H. Jr., Wang, E., Mullins, R.E., Jamison, W.C.L., Nimkar, S., and Liotta, D.C. (1988) *Anal. Biochem.*, **171**, 373-381
63. Lippincott-Schwartz J., Yuan L., Tipper C., Amherdt M., Orcil., and Klausner, R.D. (1991) *Cell* **67**, 601-616
64. Svennerholm, L. (1980) in: *Structure and function of gangliosides* (L. Svennerholm, P. Mandel, H. Dreyfus, P.F. Urban, eds.) *Adv. Exptl. Med. Biol.*, **125** pp. 1-31, Plenum Press, New York

*Received on July 17, 1992, accepted on July, 31, 1992*