Galectins from the Nematode *Caenorhabditis elegans* and the Genome Project線虫 *Caenorhabditis elegans* のガレクチンとゲノムプロジェクト

Jun Hirabayashi*, Yoichiro Arata, and Ken-ichi Kasai

Department of Biological Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Sagamiko,
Kanagawa 199-01, Japan, FAX: 81-426-85-3742, E-mail: XLA02445@niftyserve.or.jp**Key Words:** *Caenorhabditis elegans*, multiple genes, genome project, tandem-repeat type, molecular evolution**Abstract**

The finding of *Caenorhabditis elegans* galectin (32 kDa) demonstrated, for the first time, the presence of the “tandem-repeat type” of galectin, which consists of two homologous domains (*ca.* 16 kDa). Its N- and C-terminal half domains show relatively low sequence similarity to each other (*ca.* 30% identity), though most (but not all) of the amino acids involved in the carbohydrate binding are conserved. The nematode 32-kDa galectin shows strong hemagglutinating activity, but its saccharide specificity is rather complex. The individual half domains have considerably distinct features in the binding to asialofetuin-agarose. Though the endogenous ligand for them is not known, these observations imply that the 32-kDa nematode galectin functions as a possible “heterobifunctional cross-linker”. Since this galectin is localized most abundantly in the adult cuticle, it possibly plays a role in the formation of tight and insoluble epidermal layers. A recently isolated novel nematode galectin (16-kDa) forms a non-covalent dimer, and exhibits significant hemagglutinating activity, which is inhibitable by lactose. The current progress in the *C. elegans* genome project has revealed the presence of a number of galectin-related genes, and at least four other tandem-repeat-type galectins (40–75% identical to the 32-kDa galectin) have been proved to be expressed. Two closely related genes encoding CRDs (carbohydrate-recognition domains) having a somewhat longer C-terminal tail have also been predicted. Because the complete genome sequence of *C. elegans* (1 x 10⁸ bp) will be obtained in the near future, galectin research utilizing this model animal will hopefully provide us with new concepts about both the biological and evolutionary significance of multivalent galectin-carbohydrate interactions.

要 約

Caenorhabditis elegans で見つかったガレクチンは最初の直列反復型ガレクチンとして記載される 32 kDa の分子で、16 kDa の大きさの類似したドメイン 2 つからなる。N-、C-両末端ドメインは糖結合に関わるアミノ酸残基のほとんど(すべてではない)を保存しているが、両ドメイン間の配列類似性は約 30% と比較的低い。この線虫 32 kDa ガレクチンは強い赤血球凝集活性を示すが、糖に対する特異性は決して単純ではない。N-、C-両末端ドメインをそれぞれ別個に発現させたとき、アシアロフェツイン-アガロースに対する結合力は両者で大きく異なっていた。これらのドメインに対するそれぞれの内在性リガンドはわかっていないが、これらの観察結果は、線虫 32 kDa ガレクチンが等価でない二価性架橋分子として機能している可能性を示す。このガレクチンは成虫クチクラ層に豊富に見出されることから、硬くて不溶性の表皮層の形成に関わっているかもしれない。最近単離された新しい線虫ガレクチン (16 kDa) は非共有結合性の 2 量体を形成し、ラクトースで阻害される赤血球凝集活性を示す。一方、*C. elegans* のゲノムプロジェクトの進展によって、これら以外にも驚くほど多くのガレクチン関連遺伝子が見つかった。少なくともさらに 4 つの直列反復型ガレクチンが存在し (40~75% 一致)、いずれも実際に発現されていることが確認された。幾分長い C-末端をもった糖認識ドメイン (CRD) をコードする二つの類似遺伝子も見ついている。*C. elegans* ではゲノムの完全構造 (1 x 10⁸ bp) が近い将来解読されるという。このモデル生物を有効に使うことで、ガレクチンと糖鎖の相互作用の生物学的、進化的意義に関する新しい概念が誕生すると期待できる。

A. Three Architectural Types in the Galectin Family

Previously, we proposed to classify galectins into three types based on protein architecture (Hirabayashi *et al.*, 1992; Hirabayashi and Kasai, 1993); *i. e.*, i) proto, ii) chimera, and iii) tandem-repeat types (Fig. 1). Though this classification does not assume their evolutionary relationship, it is strongly related

A. ガレクチン家系における 3 つの構築様式

以前、我々はタンパク質の構築様式に基づいてガレクチンを 3 つの型に分類することを提唱した (Hirabayashi *et al.*, 1992; Hirabayashi and Kasai, 1993; 図 1)。このプロト、キメラ、直列反復型という分類方式はガレクチン相互の進化的な近縁関係を示したものではないが、架橋分子としてのガレクチン機能の基

*To whom correspondence should be addressed.

Fig. 1. Three architectural types of the galectin family. Note that this classification (Hirabayashi *et al.*, 1992) is simply based on protein architectural feature, and not based on similarities in protein primary sequence, saccharide specificity, or evolutionary kinship. However, this classification necessarily defines binding features of each type. Proto-type functions as homobifunctional cross-linker since usually this type forms a non-covalent dimer. Chimera-type can cross-link two distinct biomolecules, i.e., sugar and non-sugar ligand. The only chimera-type galectin actually investigated is galectin-3 in mammals, which also undergoes oligomerization under some conditions, and thus can act as an agglutinin. Tandem-repeat-type galectins can function as a heterobifunctional cross-linker (Arata *et al.*, in press).

to their functions as a cross-linker (Kasai and Hirabayashi, 1996): the proto-type one usually forms a non-covalent homodimer, thus acting as a homobifunctional cross-linker. The other two types, chimera and tandem-repeat types can act as heterobifunctional cross-linkers. The basic difference between the latter two types is that the chimera type, consisting of galectin and non-galectin domains, may link carbohydrate and non-carbohydrate biomolecules (e.g., polynucleotide and polypeptide), whereas the tandem-repeat type can cross-link different types of glycoconjugates. Most of the past investigated galectins, including electric eel lectin (Paroutaud *et al.*, 1987), two chicken isolectins (Ohyama *et al.*, 1986; Hirabayashi *et al.*, 1987; Sakakura *et al.*, 1990), human placental lectin (galectin-1; Hirabayashi and Kasai, 1984; Gitt and Barondes, 1986; Hirabayashi and Kasai, 1988; Gitt and Barondes, 1991), belong to the proto type. More recently, new members of this type have also been found in various animal species; i.e., galectins- 2 (Gitt and Barondes, 1986; Gitt *et al.*, 1992), -5 (Gitt *et al.*, 1995a), and -7 (Magnald *et al.*, 1995; Madson *et al.*, 1995), human Charcot-Leyden crystal protein (Ackerman *et al.*, 1993), frog galectins (Ahmed *et al.*, 1996b), nematode 16-kDa galectin (Hirabayashi *et al.*, 1996), and two sponge isolectins (Pfeifer *et al.*, 1993). In contrast to the proto-type galectins which have been found in a wide variety of animal species, a sole chimera type (i.e., galectin-3) has been found predominantly in mammals, but more recently also in the chicken (Nurminskaya and Lindsenmayer, 1996). The tandem-repeat-type is the latest one to be recognized, and was found for the first time in the nematode *Caenorhabditis elegans*

本的な違いを表現している (Kasai and Hirabayashi, 1996)。プロト型は非共有結合性の2量体を形成するので等価な架橋分子と言えるが、キメラ型と直列反復型は非等価な架橋分子として機能しうる。その違いは、キメラ型がガレクチンドメインと非ガレクチンドメインからなるため、一方では糖鎖と、他方では糖以外の生体分子(ポリヌクレオチドやポリペプチド)と架橋を形成できるのに対し、直列反復型では異なるタイプの糖鎖を架橋する点である。従来研究されてきたほとんどのガレクチンはプロト型である。これには代表的なものとして、電気ウナギレクチン (Paroutaud *et al.*, 1987)、ニワトリの2つのレクチン (Ohyama *et al.*, 1986; Hirabayashi and Kasai, 1987; Sakakura *et al.*, 1990)、ヒト胎盤レクチン (ガレクチン-1; Hirabayashi and Kasai, 1984; Gitt and Barondes, 1986; Hirabayashi and Kasai, 1988; Gitt and Barondes, 1991) などが含まれる。より最近見つかったものとして、哺乳類では、ガレクチン-2 (Gitt and Barondes, 1986; Gitt *et al.*, 1992)、ガレクチン-5 (Gitt *et al.*, 1995a)、ガレクチン-7 (Magnald *et al.*, 1995; Madson *et al.*, 1995)、ヒト Charcot-Leyden 結晶タンパク質 (Ackerman *et al.*, 1993)、また哺乳類以外では、カエルガレクチン (Ahmed *et al.*, 1996b)、線虫 16 kDa ガレクチン (Hirabayashi *et al.*, 1996)、海綿の2つのガレクチン (Pfeifer *et al.*, 1993) を挙げることができる。このように多くの生物種で見つかったプロト型ガレクチンに対し、キメラ型ガレクチン (唯一、ガレクチン-3がこれに相当) は哺乳類でしか見つかっていない (ごく最近、ニワトリからガレクチン-3の相同物が見つかった; Nurminskaya and Lindsenmayer, 1996)。直列反復型は一番最後に見つかったが、我々が線虫 *Caenorhabditis elegans* で発見した 32 kDa ガレクチンがその初めての例である

(Hirabayashi *et al.*, 1992). One possible reason why tandem-repeat-type galectins were not found earlier may be their basic insolubility, as has been demonstrated for porcine galectin-4. This protein is involved in cell-to-cell attachment as a possible junction protein and is extractable only with 9 M urea (Chiu *et al.*, 1994). This insolubility can be related to their potential as a heterobifunctional cross-linker (Arata *et al.*, in press; Brewer, in this issue).

B. *C. elegans* 32-kDa Galectin: Structure, Function and Localization

The first galectin found in *C. elegans* is a 32-kDa protein, which consists of two homologous lectin domains of approximately 16 kDa. Both domains show approximately 25% amino acid sequence identities to vertebrate galectin carbohydrate-recognition domains (CRDs). Since the homology between the two repeated domains (30% identity) is still higher than this value, they appear to have diverged by gene duplication from an ancestral galectin domain significantly later than the divergence between nematodes and vertebrates (Hirabayashi *et al.*, 1992). The nematode 32-kDa galectin is not necessarily a counterpart molecule of any of the mammalian tandem-repeat-type galectins; *i.e.*, galectins-4 (Oda *et al.*, 1993), -6 (Gitt *et al.*, 1995b), -8 (Hadari *et al.*, 1995) and -9 (Sahin *et al.*, 1995). Notably, both this and another galectin (16-kDa proto-type galectin, described below) were purified by the same strategy as has been used for vertebrate galectins, *i.e.*, with specific extraction with lactose, followed by asialofetuin-agarose affinity chromatography. The success of this strategy suggests that these nematode galectins retain the basic sugar-binding properties found in vertebrate galectins.

Study of the structure and function of the 32-kDa nematode galectin will give us an answer to the very fundamental question as to whether its two CRDs exhibit similar or distinct sugar-binding properties. We prepared recombinant genes for expression in *E. coli* of individual N- and C-terminal half domains (16 kDa), together with native 32-kDa galectin by using the pET/T7 RNA polymerase system (Arata *et al.*, in press). It should be noted that the conserved hexapeptide sequence, "His-Phe-Asn-Pro-Arg-Phe" responsible for the recognition of galactose 4-OH group (Lobsanov *et al.*, 1993, Liao *et al.*, 1994; Bourne, *et al.*, 1994) is maintained in the C-terminal half domain, but is substituted by "His-Val-Ser-Val-Arg-Phe" in the N-terminal domain. When their sugar-binding affinities were assessed by means of frontal affinity chromatography (Kasai *et al.*, 1986), the C-terminal domain showed only one-seventh of the binding strength of native 32-kDa galectin to asialofetuin, probably due to the loss of multivalency. On the other hand, the N-terminal domain showed significant, but much lower, affinity to this glycoprotein. Gel filtration analysis showed that both N- and C-termi-

(Hirabayashi *et al.*, 1992). 直列反復型が比較的最近まで見つからなかった一つの理由として、不溶性の問題が考えられる。例えば、このタイプに属するブタガレクチン-4はジャンクションタンパク質の一つとして細胞間接着の機能が推定されているが、9 M 尿素を用いなければ抽出できないという (Chiu *et al.*, 1994)。この点は直列反復型のガレクチンが非等価な架橋分子として機能するという上述の性質と関係があるかもしれない (Arata *et al.*, in press; Brewer, in this issue)。

B. *C. elegans* 32-kDa ガレクチン：構造、機能、および局在

C. elegans で最初に見つかったガレクチンは、約 16 kDa の類似したガレクチンドメインが2回繰り返した 32 kDa のタンパク質であった。両ドメインは脊椎動物でわかっていた各ガレクチンの糖認識ドメイン (CRD) と約 25% のアミノ酸配列上の一致を示す。この値は繰り返シドメイン間の類似性 (30% の一致) より若干ではあるが有意に低いため、反復ドメイン部分の遺伝子重複は、脊椎動物と線虫が共通の祖先から分岐した後で起こったものと考えられる (Hirabayashi *et al.*, 1992)。しばしば誤解されることだが、線虫 32-kDa ガレクチンは必ずしも哺乳類で見ついている類似構造のガレクチン [ガレクチン-4 (Oda *et al.*, 1993)、-6 (Gitt *et al.*, 1995b)、-8、(Hadari *et al.*, 1995) -9 (Sahin *et al.*, 1995)] の完全な相同物ではない。32 kDa ガレクチンも、後に見つかった 16 kDa ガレクチン (後述) も、脊椎動物ガレクチンの精製法と同じ操作で単離できる点には注目すべきである。両者で用いられるのは、ラクトースによる特異的抽出とアシアロフェツイン-アガロースによるアフィニティークロマトグラフィーである。このことは、これら線虫ガレクチンが脊椎動物ガレクチンと基本的に同じ糖結合性を保持していることを示唆する。

線虫 32-kDa ガレクチンの構造-機能相関に関する研究は、大変基本的な問題を含んでいる。このガレクチン分子が持つ2つの糖認識ドメインが、果たして同じ糖結合特異性を示すものなのか、あるいは異なった性質を示すものなのかを調べるため、我々は 32-kDa ガレクチンそのものに加え、N-末端側、およびC-末端側のドメインを単独で発現すべく、組み換え遺伝子を調製した。発現系には pET/T7 RNA ポリメラーゼによる大腸菌発現系を用いた (Arata *et al.*, in press)。ここで、N-末端側ドメインではガラクトースの4位水酸基の認識に関わる保存されたヘキサペプチド、"His-Phe-Asn-Pro-Arg-Phe" (Lobsanov *et al.*, 1993, Liao *et al.*, 1994; Bourne, *et al.*, 1994) が "His-Val-Ser-Val-Arg-Phe" に置き換わっている点は言及しておく必要がある(下線部は置換アミノ酸)。前端アフィニティークロマトグラフィー (Kasai *et al.*, 1986) という分析法で調べたところ、単独発現したC-末端側のドメインでは、32-kDa ガレクチンと比較してアシアロフェツインに対する結合力が7分の1に低下していた。これはおそらく単独発現によって多価でなくなったためと考えられるが、N-末

nal half domains were eluted at the retention time for a monomer (16 kDa). Neither of them showed significant hemagglutinating activity, whereas the native galectin showed strong hemagglutinating activity. Considering the fact that both N- and C-terminal domains retain similar extents of sequence homology to other galectins (*ca.* 25%) and that native 32-kDa galectin has strong hemagglutinating activity, the N-terminal domain may have binding activity toward an as yet unidentified oligosaccharide(s). Since *N*-acetylgalactosamine is more abundant than unmodified galactose in *C. elegans* (Furukawa, K., personal communication; Bakker, H., personal communication), di-*N*-acetylglactosamine is a possible candidate as a receptor saccharide.

By immunohistochemical study, the 32-kDa nematode galectin was most prominently localized in cuticle of the adult worm. On the other hand, egg and worms of each developmental stage were only weakly stained (Arata *et al.*, 1996). The main component of the adult cuticle is collagen (Wood, 1988). Therefore, it is possible that the 32-kDa galectin is involved in the formation of tough and insoluble adult cuticle as a result of cross-linking. This galectin is also found, in the terminal bulb of the pharynx where food is physically processed before being pumped into the gut. Thus, the 32-kDa nematode galectin shares common properties with vertebrate galectins with respect to multiple locations feature (see Colnot *et al.*, in this issue).

For some unknown reason, no cosmid clones encoding the 32-kDa galectin have been registered as a result of the *C. elegans* genome project. This suggests that a few cosmid clones are still missing. Therefore, we adopted the conventional strategy for genomic cloning. *C. elegans* genome DNA was digested with relevant restriction enzymes, and target gene fragments were cloned into plasmid pBluescript by means of colony hybridization. By combination with genomic polymerase-chain reaction (PCR) and subsequent dideoxy-termination sequencing, the entire region of 32-kDa galectin spanning over 5 kbp, including start and termination signals for the coding region as well as the poly(A) signal, was completely sequenced (Arata *et al.*, in preparation). The absence of signal sequence for secretion was also confirmed. The presence of two introns consisting of 2,430 bp (intron 1) and 631 bp (intron 2) was revealed. The first intron is relatively long in comparison with other introns found in *C. elegans*, and inserted after the ninth codon from the initial methionine codon. This insertion position closely corresponds to the intron-insertion position previously identified for mammalian galectin-1 (Gitt *et al.*, 1990), -2 (Gitt *et al.*, 1992), -3 (Gritzmacher *et al.*, 1992) and chick 14-kDa galectin genes (Ohyama and Kasai, 1988). On the other hand, the second intron was inserted at a position where no intron has been observed in the vertebrate galectins. Apparently, further consideration is necessary to elucidate reasons for

端側のドメインでは、さらに大幅な結合力の低下が認められた。ゲル濾過によりオリゴマー構造を調べたところ、N-末端側、C-末端側ドメインいずれの場合も単量体(16 kDa)として溶出されることがわかった。また、両者はいずれも有意の赤血球凝集活性を示さなかった。しかし、N-、C-両ドメインが他のガレクチンと同程度のアミノ酸配列類似性(約25%)を示すこと、32-kDa ガレクチンが強い赤血球凝集活性を示すことを考えると、N-末端ドメインはN-アセチルラクトサミンとは異なる構造未知のオリゴ糖に強く結合するのかもしれない。*C. elegans*では未修飾のガラクトースよりもN-アセチルガラクトサミンの方が多量に検出されており (Furukawa, K., personal communication; Bakker, H., personal communication)、ジ-N-アセチルラクトサミンがN-末端ドメインの相手糖鎖である可能性もある。

免疫組織化学的な研究によると、32-kDa 線虫ガレクチンは成虫の表皮に最も多く見いだされるが、卵や各発生段階の幼虫にはわずかししか認められない (Arata *et al.*, 1996)。成虫表皮の主成分はコラーゲンとされている (Wood, 1988)。それ故、32-kDa ガレクチンは等価でない架橋を作って、強固で不溶性の成虫表皮の形成に関わっているのかもしれない。このガレクチンは、一方では pharynx (咽頭) と呼ばれる、食物を物理的に破碎し胃へ送り込む器官にもかなり局在している。このように多様な局在性は脊椎動物由来のガレクチンにも認められる共通した性質である (Colnot *et al.*, this issue)。

理由は定かではないが、32-kDa ガレクチンをコードするコスミドクローンが *C. elegans* ゲノムプロジェクトでは得られていない。おそらく、プロジェクトでもいくつかのコスミドクローンについては、まだ完全にカバーしていないのだろう。したがって我々は、線虫独特の方法ではなく、より一般的な方法で遺伝子クローニングを行うことにした。*C. elegans* のゲノム DNA を適当な制限酵素で消化し、目的の遺伝子断片のサイズの DNA をプラスミド pBluescript へ挿入後、0.8 kbp の cDNA をプローブとしコロニーハイブリダイゼーションを行った。さらにゲノム DNA を用いたポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) と引き続くジデオキシターミネーション法によって、翻訳開始、停止コドン、ポリ (A) シグナル等を含む 32-kDa ガレクチン遺伝子全領域 (約 5 kbp) の塩基配列を決定した (Arata *et al.*, in preparation)。本レクチン遺伝子にはシグナル配列に相当するものがないことも確認された。一方、イントロンは2箇所見つけた (イントロン-1、イントロン-2)。イントロン-1 (2,430bp) は線虫の遺伝子に見られるものとしては比較的長いもので、開始メチオニンのコドンから9番目の位置に挿入されていた。この位置は今まで明らかにされている哺乳類のガレクチン-1 (Gitt *et al.*, 1990)、-2 (Gitt *et al.*, 1992)、-3 (Gritzmacher *et al.*, 1992)、およびニワトリの 14 kDa ガレクチン (Ohyama and Kasai, 1988) の遺伝子におけるイントロン挿入位置にほぼ対応している。これに対し、イントロン-2 (631 bp) はこれまでの脊椎動物ガレクチン遺伝子では全く見られない位置に挿入されていた。このような保存性、および非保存性のイントロン挿入位置の理由について

such conserved and non-conserved exon/intron organization.

C. *C. elegans* 16-kDa Galectin: A Proto-type Dimeric Galectin

The second *C. elegans* galectin had originally been believed to be a degradation product of the above 32-kDa galectin. In fact, the 16-kDa protein is obtained as a minor component relative to the 32-kDa galectin where the conventional extraction procedure is employed. In addition, the tandem-repeat structure of the 32-kDa galectin seemed to be susceptible to endogenous proteases, resulting in the generation of 16-kDa fragment(s) (Oda *et al.*, 1993; Tardy *et al.*, 1995). However, this possibility turned out not to be the case. We improved the cultivation conditions to obtain as much starting material as possible and also changed the extraction conditions, using buffer containing Ca^{2+} in place of phosphate buffer containing β -mercaptoethanol and EDTA. These changes resulted in great improvement in the yield of 16-kDa lectin.

On the basis of peptide sequencing of the thus purified 16-kDa protein and subsequent reverse-transcriptase polymerase-chain reaction (RT-PCR), a full-length cDNA was cloned. As a result, the 16-kDa lectin proved to be a proto-type, novel member of the nematode galectin family; the protein consists of 146 amino acids and exists as a non-covalent dimer (Hirabayashi *et al.*, 1996). A recombinant 16-kDa galectin was produced in *Schizosaccharomyces pombe* in a novel ASPEX expression system (Giga-Hama *et al.*, 1994), which yielded 50 mg of purified 16-kDa galectin in a soluble form from a one-liter culture (Hirabayashi *et al.*, unpublished result). By using this recombinant protein, we determined the binding specificity for simple saccharides by means of the hemagglutination-inhibition assay. Various β -galactosides were found to be effective in the following order of affinity: (LacNAc)₂, lacto-N-tetraose > N-acetylglucosamine > thiodigalactoside, 2'-Fuc-lactose > lactose. On the other hand, galactose-containing saccharides, such as Gal β 1-6GlcNAc, 3-Fuc-lactose, melibiose, Gal, GalNAc, Me- β -Gal, Me- α -Gal were not inhibitory toward the hemagglutination, nor were glucose, mannose, α -Me-Man, L-Fuc, and sucrose. Such a feature is closely similar to that observed for vertebrate galectins. This result is reasonable because the 16-kDa galectin conserves all of the critical amino acids (Hirabayashi and Kasai, 1991; 1994) involved in the binding of galectin-2 (Lobsanov *et al.*, 1993) and -1 (Liao *et al.*, 1994) to lactose/N-acetylglucosamine, respectively.

An attempt to identify the endogenous ligand for the 16-kDa galectin was made by use of 16-kDa galectin-immobilized agarose. In this case, we used a fusion protein with *E. coli* β -galactosidase α -peptide (designated recN16 α) expecting that the N-terminal a-region would work as a flexible linker (16-kDa galectin has only one lysine residue available for coupling to CNBr-activated agarose, whereas the a-peptide moiety has

ては、今後さらに考察を加える必要があろう。

C. *C. elegans* 16 kDa ガレクチン: プロト型二量体ガレクチン

C. elegans 第二のガレクチン (16 kDa) は、当初 32 kDa ガレクチンの分解産物と考えられていた。実際、この 16 kDa タンパク質は、今までと同様の精製法を用いている限り、32 kDa ガレクチンに比べて少量成分としてしか得られない。加えて、32 kDa ガレクチンの (直列反復という) 構造は内在性プロテアーゼによる切断を受けやすいとも考えられた (消化により半分の分子量 16 kDa の断片が生じる) (Oda *et al.*, 1993; Tardy *et al.*, 1995)。しかし、事実はこれと違っていた。問題解決には、ある程度の量の 16 kDa タンパク質が必要であったが、我々は第一に虫の飼育方法を改良し、多くの虫を簡単に調製できるようにした。第二に、抽出法を検討し、従来の β -メルカプトエタノールと EDTA を含むリン酸緩衝液を抽出緩衝液として用いる代わりに、カルシウムを含むトリス緩衝液を用いることで、16 kDa レクチンを効率よく調製することができた (Hirabayashi *et al.*, 1996)。

こうして得た 16 kDa ガレクチンの詳細なペプチド解析、および RT-PCR 解析に基づき、全長 cDNA クローンを得た。その結果、16 kDa レクチンはプロト型に属する新しい線虫ガレクチンのメンバーであることが判明した (Hirabayashi *et al.*, 1996)。このガレクチンは 146 アミノ酸からなり、非共有結合性の二量体として存在する。我々は組み換え 16 kDa ガレクチンを分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を宿主とする新しい発現系 (ASPEX: Giga-Hama *et al.*, 1994) によって調製した。この発現系を用いることで、1 リットル培養液あたり 50 mg もの組み換え 16 kDa ガレクチンを可溶性の状態 で精製できた (Hirabayashi *et al.*, unpublished result)。得られた組み換えタンパク質を用いて、簡単な糖に対する結合特異性を赤血球凝集阻害によって調べたところ、N-アセチルラクトサミン二量体 (LacNAc)₂、ラクト-N-テトラオース > N-アセチルラクトサミン > チオジガラクトシド、2'-フコシルラクトース > ラクトース、の順で強い阻害活性が認められた。一方、ガラクトース含有糖であっても Gal β 1-6GlcNAc、3-フコシルラクトース、メリビオース、Gal、GalNAc、Me- β -Gal、Me- α -Gal には阻害効果が認められなかった (グルコース、マンノース、 α -Me-Man、L-Fuc、シュクロースも同様)。このような傾向は脊椎動物ガレクチンにも共通するものである。この点はガレクチン-1 や -2 が、N-アセチルラクトサミン (Liao *et al.*, 1994)、およびラクトース (Lobsanov *et al.*, 1993) と結合する際に直接関与している重要なアミノ酸 (Hirabayashi and Kasai, 1991; 1994) を、16 kDa ガレクチンがすべて保存していることを考えると納得できる。

16 kDa ガレクチンの内在性リガンドを同定しようとする試みは、このレクチンを固定化したアガロースを用いて行われた。ただしこの目的には、16 kDa ガレクチンそのものではなく、大腸菌 β ガラクトシダーゼ α ペプチドとの融合タンパク質 (recN16 α と略) が用いられた。その理由は、ガレクチン部分にはブロムシアン活性化ゲルへの固定化に使えるアミノ基が 1 つしかないのに対し、 α ペプチド部分には 3 つのアミノ基がある

three amino groups). A number of glycoproteins were adsorbed, most typically, 300 and 150 kDa glycoproteins. All of them gave a positive signal upon lectin-probing by Western-blotting analysis (Hirabayashi *et al.*, 1996). It should be noted, however, that lactose did not effectively inhibit this lectin blotting, whereas the binding to laminin was completely inhibited with the same concentration of lactose. Therefore, saccharide chains in these endogenous ligands for the nematode 16-kDa galectin seem to be significantly different from those of vertebrate glycoconjugates.

D. Other *C. elegans* Galectins Predicted by the Genome Project

The *C. elegans* genome project (Coulson *et al.*, 1988) is now been in progress for complete determination of the whole nucleotide sequence of the *C. elegans* genome (approximately 10^8 bp). Beginning with chromosome III (*C. elegans* genome consists of five autosomes I-V and one sex chromosome X), up to the present, almost 60% of the entire sequence has been analyzed. In the course of the project, it became evident that there are a significant number of other galectin genes (originally based on personal communication with D.N.W. Cooper; Table I). Prediction of each gene function is systematically made by use of established searching programs: i) Genefinder (P. Green and L. Hillier, unpublished), to search for possible open reading frames and most probable exon/intron splicing regions, ii) Blast programs for homology search based on thus predicted amino acid sequences (Altschul *et al.*, 1990). These data are also included in the GeneBank/EMBL/DDBJ DNA databases.

To the present, six new galectin-related genes have been identified. Four of them encode tandem-repeat-type galectins (tentatively designated here as Cel-II, III, IV and V, whereas Cel-I is the 32-kDa galectin). Their deduced amino acid sequences are 40-75% identical to the 32-kDa galectin (Cel-I).

からである。この部分を介して優先的に固定化させることで、柔軟なリンカーとしての機能も期待できる。事実、多くの糖タンパクがこのカラムに吸着したが、中でも分子量 300 kDa と 150 kDa のタンパク質が含量も高く注目された。これらはすべてレクチンプローブによるウェスタンブロットで陽性シグナルを与えたが (Hirabayashi *et al.*, 1996)、ラクトースを添加しても、リガンド糖タンパク質との結合は完全に阻害されなかったことは注目される。なぜなら、ラミニンに対する結合は、同じ濃度のラクトースで完全に阻害されたからである。したがって、線虫 16 kDa ガレクチンが認識する内在性リガンド糖鎖は、脊椎動物ガレクチンの相手糖鎖とはやや異なるものなのかもしれない。

D. ゲノムプロジェクトが予測した他の *C. elegans* ガレクチン群

C. elegans ゲノムプロジェクト (Coulson *et al.*, 1992) は、約 10^8 塩基対からなる *C. elegans* 遺伝子の完全解読を目指し現在進行中である。第三染色体から始まり (*C. elegans* ゲノムは 5 本の常染色体と 1 本の性染色体からなる)、現在、全配列の約 60% を決定しているという。その過程で、驚くべき数のガレクチン関連遺伝子の存在が明らかになってきた (originally based on personal communication with D.N.W. Cooper; 表 I)。プロジェクトでは、以下のようなストラテジーでゲノム解析を系統的に行う。まず、Genefinder (P. Green and L. Hillier, unpublished) というプログラムを使い、読み枠の検索とエキソン・イントロンのスプライシング箇所の予測をする。次に、いくつかの Blast プログラム (Altschul *et al.*, 1990) を用いて、既知の遺伝子、アミノ酸配列とのホモロジー検索を行う。このようにして解析された情報は GeneBank/EMBL/DDBJ の DNA のデータベースにも付加される。

現在まで、6つのガレクチン関連遺伝子が同定されている。そのうちの4つは直列反復型のガレクチン分子をコードしている (ここでは先の 32 kDa ガレクチンを Cel-I とし、これら新しいメンバーを Cel-II、III、IV、V とする)。予測されたアミノ酸配列は、32 kDa ガレクチン (Cel-I) と 40-75% 一致していた。RT-

Table I. So far identified galectin-related genes.

Desig.	Cosmid (Acc. No)	Chrom	Expression (cDNA)	AA Residues	Binding to ASF	% Identity to N32 repeat -i -ii	
#Tandem-repeat type							
Cel-I (N32*)	No	II	Yes	279	Yes	100	100
Cel-II	F52H3.7 (Z66512)	II	Yes	280	Yes	74	67
Cel-III	ZK892.1 (Z48638)	II	Yes	289	Yes	70	73
Cel-IV	C44F1.3 (Z48067)	III	Yes	283	?	45	43
Cel-V	ZK1248.16 (U29244)	II	Yes	333	?	36	43
#Proto type							
Cel-VI No (N16**)	No	?	Yes	146	Yes	28	27
#Modified proto type							
Cel-VII	R07B1.2 (Z48621)	X	Yes	182	?	32	27
Cel-VIII	R07B1.10 (Z48621)	X	?	184	?	26	27

* 32-kDa galectin : Hirabayashi, J. Satoh, M., and Kasai, K. (1992) J. Biol. Chem. 267, 15485-15490

** 16-kDa galectin : Hirabayashi, J. Ubukata, T., and Kasai, K. (1996) J. Biol. Chem. 271, 2497-2505

According to RT-PCR analysis, all of these genes are actually expressed to various extents. Interestingly, Cel-II (cosmid F52H3) and -III (ZK892) are highly homologous to each other, as well as the Cel-I (ca. 70% identities to one another), and all of them have been mapped to the same chromosome II (Table I). In addition, among them, the conserved hexapeptide "His-Phe-Asn-Pro-Arg-Phe" is replaced with "His-Val-Ser-Val-Arg-Phe" in the N-terminal domains of both Cel-I and Cel-II, and with "His-Leu-Ser-Ile-Arg-Phe" in that domain of Cel-III. These observations suggest that Cel-I, -II and -III have diverged at a relatively late stage of evolution, and thus, have retained similar properties. We cloned the full-length cDNAs of Cel-II and -III and expressed their protein product as a fusion protein in a conventional bacterial system. Both recombinant proteins formed a precipitate (inclusion body) upon bacterial expression, and required 8 M urea for complete solubilization as in the case of Cel-I (Arata *et al.*, in press). As a result, both Cel-II and -III proved to bind to asialofetuin-agarose (Hirabayashi and Kasai, unpublished result).

On the other hand, homologies to the other two tandem-repeat-type galectins (Cel-IV and -V) are much lower (ca. 40%). Since we have not confirmed cDNA sequences for them, there still remains possibility that predicted exon/intron boundaries are incorrect, which would greatly alter the resulting amino acid sequences. Predicted polypeptides of the remaining two genes (Cel-VII and -VIII) are more unusual, because they are not included in any of the known structural types. They show high sequence similarity to each other (43% identity at the predicted amino acid level), and have somehow a redundant C-terminal tail, which makes them about 40 amino acids longer than the 16-kDa galectin (Cel-VI). Nevertheless, it is possible to assign them to the modified proto type.

If mRNA (cDNA) transcripts from the above candidate genes can be detected, the genes are actually expressed. However, this does not necessarily mean that the thus expressed gene products are really functional as galectins; *i.e.*, it is not certain whether they have galactose-binding activity or not. To the present, however, all five of the identified tandem-repeat-type galectins have been proved to be actually expressed, and at least three of them (Cel-I, II, and -III) have been found to be functional. It is not known whether the two modified proto-type galectins (Cel-VII and -VIII) are really expressed as the predicted polypeptides or not. Our preliminary RT-PCR analysis detected the presence of Cel-VII mRNA, but it rather showed the presence of splicing variants. Apparently, systematic functional studies on this increasing number of candidate galectin genes are necessary.

E. Merits of Studies with *C. elegans*

The number of possible galectin genes is still increasing as a result of updating of the genome project. In consideration

PCR解析を行うと、これらの遺伝子は程度こそ異なるがいずれも実際に発現していた。興味深いことに、Cel-I (32 kDa ガレクチン)、Cel-II (コスミドクローン F52H3)、Cel-III (ZK892) の3者は、互いによく似ており (アミノ酸配列上、約 70% 一致)、すべて第二染色体に位置していた (表 1)。これに加え、保存性の高いヘキサペプチド "His-Phe-Asn-Pro-Arg-Phe" がこれら3者のC-端側ドメインでは保存されているのに対し、N-端側ドメインではどれも変異が見られた。すなわち、Cel-I と Cel-II では "His-Val-Ser-Val-Arg-Phe" に置換しており、Cel-III では "His-Leu-Ser-Ile-Arg-Phe" となっている。このことから、Cel-I、II、III が分子進化の比較的遅い時点で分岐し、その結果、現在まで類似の性質が維持されてきたと考えられる。我々は、これらに対する全長 cDNA を単離し、融合タンパク質の形で大腸菌発現を試みている。Cel-II、III 両組み換えタンパク質は、発現に際し Cel-I と同様 (Arata *et al.*, in press)、沈澱 (封入体) を形成し、菌体からの可溶化には 8 M 尿素が必要であった。しかし、結局、Cel-II、Cel-III 双方にアシアロフェツイン-アガロースに対する結合活性が確認された (Hirabayashi and Kasai, unpublished result)。

一方、他の2つの直列反復型ガレクチン (Cel-IV および -V) の Cel-I に対するホモロジーは比較的低い (約 40% 一致)。我々はこれらに対する全長 cDNA の配列をまだ確認していないので、プログラムの予測通りにイントロンのスプライシングが起こっているかどうかはまだ不確かである。そうした場合には読み枠がずれることもありうる。残る2つの遺伝子 (Cel-VII、および -VIII) の構造はある意味では異常である。つまり、これらから予想されるタンパク質構造は、既知のいずれの構造タイプとも違っているからである。これらは、予測された限りでは、相互の間での類似性が最も高く (アミノ酸レベルで 43% 一致)、双方ともやや長めの C-末端尾部を持つ (先の 16 kDa ガレクチン (Cel-VI) より約 40 アミノ酸長い)。しかし、これらを一種の“変形”としてプロト型に分類しておくことは可能であろう。

もし、これら一連のガレクチン関連遺伝子に対する mRNA (cDNA) が検出されれば、その遺伝子は発現していることを意味するが、必ずしもガレクチンとしての機能を発揮しているとは限らない。ガラクトース結合活性を持っているかどうかは別の問題である。しかし、我々はすでに、上記5つの直列反復型ガレクチン遺伝子が実際に発現されていることを確認しており、少なくともそのうち3つ (Cel-I、II および -III) はガレクチンとしての機能をもっていた (ガラクトース結合活性を持つ)。一方、変形プロト型ガレクチンである Cel-VII と VIII が本当に予測通りの配列で発現されているかはまだ定かではない。予備的な RT-PCR 解析では Cel-VII の mRNA は検出されているが、これにはいくつかのスプライシングバリエーションが存在するらしい。このように、ゲノムプロジェクトが予測したガレクチン候補遺伝子であるが、今後、これらの機能解析に関する研究がますます重要になってくるだろう。

E. *C. elegans* 研究における利点

ゲノムプロジェクトの進展によって、今後ガレクチン候補遺伝子が増殖する可能性は高い。*C. elegans* のゲノムサイズが

of the a relatively small genome size of *C. elegans* (1×10^8 bp), this finding is almost astonishing. In this context, with no exaggeration, *C. elegans* is the sole multicellular animal of which the complete genome sequence will be available in very near future. Once the gene of interest is cloned, its expression pattern can be readily analyzed by a convenient procedure using green fluorescent protein (GFP) as a reporter gene at each developmental stage of living worms without fixation. For elucidation of unknown gene function, the recently developed "gene knock-out" technology is extremely powerful, even though it often meets difficulty in evaluation of the results due to redundancy. In *C. elegans*, a procedure utilizing insertion of the transposone "Tc1" is commonly used for this purpose instead of homologous recombination, partly because the introduced recombination is not fully stable in *C. elegans*, and also because a useful Tc1-insertion mutant library (Zwaal *et al.*, 1993) is now available. Tc1-transposed target gene, the function of which is usually destroyed, can be screened systematically by PCR using a gene-specific primer and Tc1-specific primer to detect the transposone insertion. Further, by mating two independent mutants, double or triple gene-targeted nematodes can also be obtained.

Other than genetic approaches in the nematode, various other approaches are necessary to elucidate galectin function(s); *e.g.*, identification of endogenous glycoconjugate ligands, elucidation of cross-linking features and effects on signal transduction pathways. In this context, conventional biochemistry including glycobiology has less advanced in *C. elegans* than genetics, anatomy, and developmental and neurobiology.

F. Perspectives

Though galectins have been found in wide animal species including vertebrates, nematodes, and sponges, do all metazoan species have galectin as a house-hold protein? However, in our preliminary screening of various invertebrates, *e.g.*, fly, shrimp, earthworm, turbo, sea anemone, etc., we have not been able to find any galectin-related protein. Then, does this result means that galectins are expressed only in specific phyla (vertebrates, nematodes and sponges)? Our answer is emphatically "No!"

Under the concept of "bricolage" (Jacob, 1982; Hirabayashi, 1993), all living organisms make a number of gene copies (duplications) in various forms over a geological time span: "parallel-type" gene duplications result in the formation of a multiple gene family, while some of their descendants may be subjected to "tandem-type" gene duplication. Such tandemly repeated structures are considered to be useful for increasing avidity and/or specificity, and, in fact, are common in a number of binding proteins; *e.g.*, mannose receptor of the C-type lectin family, wheat germ agglutinin, ricin, legume

10^8 塩基対と比較的小さい(ヒトの約1/30)ことを考えると、今回得られた知見は驚嘆に値する。*C. elegans*は、きわめて近い将来に遺伝情報が完全解読されてしまう唯一のモデル動物であるが、遺伝子の機能解析に関してもいろいろな利点がある。一度目的の遺伝子がクローン化されれば、その発現パターンはグリーンフルオレセントプロテイン(GFP)をレポーター遺伝子とした簡便法ですぐに調べることができる。各発生段階の虫を固定化せずに解析できるメリットは大きい。機能のよくわからない遺伝子の役割を調べる際に、遺伝子を「ノックアウト」する方法は有用である。この場合にも、類似遺伝子などの存在によって(いわゆる redundancyの問題)、結果の解釈がしばしば困難になるが、このアプローチが遺伝子機能の解析に強力であることには変わらない。*C. elegans*の場合には「相同的組み換え法」の代わりに、「Tc1」というトランスポゾンを利用した方法が一般に用いられる。*C. elegans*では導入された組み換えが十分安定ではないことと、ランダムにTc1挿入の起こった便利な変異体(*mut-2*)のライブラリーがすでに揃っているからである(Zwaal *et al.*, 1993)。Tc1トランスポゾンが標的遺伝子に挿入されると一般に遺伝子は機能破壊されるが、この変異を含む虫は遺伝子特異的プライマーとTc1特異的プライマーを用いる系統的PCRでスクリーニングすることができる。さらに、別の遺伝子に変異が入った虫同士を掛け合わせることによって、二重、三重の変異体を調製することも十分可能である。

しかし、線虫 *C. elegans* を用いたガレクチンの機能解析には、こういった遺伝学的な解析だけでなく、他の様々な角度からのアプローチが求められる。「内在性の複合糖鎖リガンドを突き止めること」、「架橋形成の実体を解き明かすこと」、そして「その結果がいかにしてシグナル伝達へとつながるのか」等を解析していくことが必要だろう。この意味では、線虫では糖鎖生物学を含む従来の生化学的研究が、遺伝学、発生学、神経生物学と比べてあまり進んではいないのが残念なことである。

F. 展 望

ガレクチンは脊椎動物、線虫、海綿をはじめとする多くの動物で見出されているが、果たして後生動物のすべてが「ハウスホールドタンパク質」としてのガレクチンをもっているのだろうか。我々が予備的に様々な無脊椎動物(ハエ、エビ、ミミズ、サザエ、イソギンチャクなど)をスクリーニングしたところ、ガレクチンと思われるタンパク質は見つからなかった。では、ガレクチンは、脊椎動物、線虫、海綿といった、いわば特殊な動物門でしか発現されていないのだろうか。我々の答えは断じて「否」である。

「ブリコラージュ」の概念によれば、すべての生物は地質学的な時間をかけて幾つもの遺伝子のコピーを作り、それを様々な用途に「使い回し」している(Jacob, 1982; Hirabayashi, 1993)。重複の仕方はいくつかあるが、もし「パラレル」に起これば子孫遺伝子が増え多様な遺伝子家系ができるだろう。一方、遺伝子数を増やさず「タンデム」に遺伝子重複が起これば、直列反復型のタンパク質が生成する。ところで、このような繰り返し構造をつくることは、生命にとって結合力や特異性を増す目的には手っとり早い方法ではないだろうか。事実、こういった繰り返し構造は結合性タンパク質一般に多く見られる。C型レク

protease inhibitors, plasminogen kringle structures, immunoglobulins, etc. In consideration of the fact that both nematodes and mammals make maximal use of tandem-repeat-type galectins, covalently linked CRDs appear to have significant advantage for some fundamental biological reason, *e.g.*, maintenance of both multivalency and heterobifunctionality.

Since the tandem-repeat-type nematode galectins so far identified, except for Cel-I, do not seem to be easily solubilized with readily available saccharides such as lactose, the absence of literature on invertebrate galectins may be attributed to the difficulty in extraction of these tandem-repeat binding proteins. To support this idea, we recently detected a possible 32-kDa galectin homologue in the parasitic nematode *Ascaris*. This 32-kDa protein was only slightly detected in the lactose extract, but was found to be significantly abundant in the Triton-X extract after lactose extraction (Hirabayashi and Kasai, unpublished result). This detergent fraction includes various glycosylated membrane proteins. This observation clearly indicates that the *Ascaris* 32-kDa galectin is only partially extractable with lactose, possibly by forming a rather stable (or insoluble) complex with glycoconjugate ligands.

As described, studies on invertebrate galectins have opened a new area represented by the finding of "tandem-repeat-type" galectins in a useful model animal, *C. elegans*. Hopefully, future systematic functional analyses of all of the discovered galectin genes along with a profit of the ongoing genome project will lead to our understanding of the fundamental biology of galectins.

Acknowledgements

We thank Dr. D.N.W. Cooper for kindly informing the result of EST analyses of *C. elegans*. This work was supported by grant-in-aid for scientific research (5274101, 07857168, 08772109) from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan, and by grants from the Mitsubishi Foundation, Naito Foundation, and Kihara Memorial Yokohama Foundation.

Received on November 15, 1996, accepted on December 4, 1996

チン家系に属するマンノース受容体、コムギ胚芽凝集素、植物毒素リシン、豆科プロテアーゼ阻害剤、プラスミノゲン・クリングル構造、免疫グロブリン、等々その例は多い。線虫や哺乳類の例から明らかなように、直列反復型のガレクチンは最も活用されている構造型である。共有結合で連結された2つのCRDからなる構造は、多価という性質を安定に保ったり、等価でない結合特異性を発揮するなど、有利な点をもっているにちがいない。

これまで遺伝子として同定されている直列反復型の線虫ガレクチンは、32 kDa ガレクチンを除き、ラクトースの様な簡単な糖では容易に可溶化されないから、無脊椎動物ガレクチンの記載が文献上ないのは、本構造をもったガレクチンの「抽出されにくさ」による可能性がある。この考えを支持する知見として、最近我々が精製を試みた寄生性線虫、回虫 (*Ascaris*) のガレクチンについて述べよう。*C. elegans* 32 kDa ガレクチンに対する抗体で同じ分子量をもったタンパク質がウェスタンブロットで検出されたが、このタンパク質はラクトース抽出物にはわずかししか検出されず、その後不溶性画分を Triton-X で可溶化した膜画分に豊富に認められた (Hirabayashi and Kasai, unpublished result)。この膜画分にはガレクチンのリガンドである糖タンパク質が多く含まれているはずであるから、*Ascaris* における 32 kDa ガレクチンの相同物は、複合糖鎖リガンドと安定な(あるいは不溶性の)複合体を形成し、ラクトースでは容易に抽出されないと考えられる。

無脊椎動物ガレクチンの研究は、モデル動物 *C. elegans* における直列反復型ガレクチンの発見に代表されるように、新しい研究の舞台をととのえた。ゲノムプロジェクトで見い出される多くのガレクチン関連遺伝子を系統的に機能解析していくことで、ガレクチンの生物機能に関する我々の理解が深まることを期待したい。

Profile of the Author

Jun Hirabayashi

Graduated from Tohoku University in 1982 (MS), received his Ph.D in Chemistry (Faculty of Science, Tohoku University) in 1989. The thesis is entitled, "Isolation, Characterization and Structures of 14K-type

Soluble β -Galactoside-binding Lectins of Chick and Human". He started his professional career from 1982 as an Assistant Professor in the Department of Biological Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, and is presently a Lecturer in the same laboratory.

Main theme: as a protein chemist, he has long been involved in purification and molecular characterization of diverse carbohydrate-binding proteins including galectins. His approach to structure-function studies is almost orthodox but also has insight into comparative biochemical and evolutionary aspects. His main interest

is to clarify "how and why carbohydrate-binding proteins have evolved". On this point, his original idea "On the Origin of Elementary Hexoses" is described in a recent *Quart. Rev. Biol.* issue (71, 365-380, 1996); where he insists that fructose-glucose-mannose should have been the "first triplet" saccharides by a simple chemical reason, and thus, dominated the most fundamental niche in nature, while galactose was a "late-comer", but has been widely utilized as a "recognition saccharide" in particular multicellular organisms, being expressed at a non-reducing terminal and carrying a distinguishable axial 4-OH group.

He is also an investigator of "slalom chromatography" in the analytical field of high-performance liquid chromatography (a novel size-fractionation phenomenon based on a hydrodynamic principle, specifically observed for large DNA).

He has been an Associate Editor of TIGG from 1993, and also taken a role of an Associate Secretary (Auditor) of FCCA from 1996. Creation of this "Recent Topics on Galectins", is his first monumental work as an Editor.