Galectins in the Phylogenetically Oldest Metazoa, the Sponges [Porifera]

系統上最古の後生動物、海綿にガレクチン見つかる

^{1,*}Müller, Werner E.G. ; ¹Blumbach, Barbara ; ¹Wagner-Hülsmann, Claudia ; and ²Lessel, Uta¹ Institut für Physiologische Chemie, Abteilung Angewandte Molekularbiologie, Universität, D-55099 Mainz, Germany,²Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Abteilung Molekulare Strukturforschung, D-38124 Braunschweig, Germany

FAX: 49 6131-395243, E-mail: WMUELLER@Goofy.ZDV.UNI-Mainz.DE

Key Words: *Geodia cydonium*, sponges, Porifera, phylogeny, evolution

Abstract

With the marine sponge *Geodia cydonium* as a model system for cell reaggregation it was previously shown that cell-cell interactions require an aggregation factor. Recently it was found that this complex molecule is linked to the plasma membrane-bound aggregation receptor via a lectin, which turned out to be a β -galactoside-binding galectin. The cDNA encoding this molecule has been isolated and characterized; the deduced aa sequence comprises high sequence similarity to other members of the family of galectins. Hence, it is shown that sponges [Porifera], the phylogenetically oldest metazoan phylum already possess galectins.

要 約

Geodia cydonium は古くから細胞凝集のモデルとして知られる海綿の一種である。この生物における細胞間相互作用には、凝集因子 (aggregation factor) と呼ばれる複合体の関与が知られていたが、最近、この複合体はある種のレクチンを介して細胞膜に存在する凝集受容体 (aggregation receptor) と結合していることがわかった。このレクチンは β ガラクトシド結合性であり、その cDNA を単離したところ推定アミノ酸配列からガレクチン家系と高い類似性を持つことが示された。ここに、系統発生上、最古の多細胞動物とされる海綿にすでにガレクチンが存在することが明らかになった。

A. Introduction

It took until recently to decide that the classification of Metazoa in (i) Parazoa, including sponges [phylum Porifera] and (ii) Eumetazoa, other animal phyla, has to be abrogated. Sequence data of cDNAs from the marine sponge *Geodia cydonium* [Porifera, Demospongiae, Tetractinomorpha, Astrophorida, Geodiidae] encoding proteins, that are characteristic for multicellularity, such as adhesion molecules, e.g. lectin, receptor tyrosine kinase carrying immunoglobulin-like domains, cell communication molecules, e.g. serine/threonine kinases, and serum response factor revealed high homology to the corresponding molecules from higher Metazoa. Based on these findings, it is now justified to establish the monophyletic origin for all Metazoa (Müller *et al.*, 1994; Müller, 1995). Most of the cDNAs isolated and characterized from sponges come from the species *G. cydonium*, a member of the taxon Geodiidae, which is known to be the oldest group within the Demospongiae [$\approx$ 550 Myrs] (reviewed in: Mehl *et al.*, in press). The very recent finding that the sponge *G. cydonium* contains also genes, encoding the integrin receptor and the Speract receptor, places the sponges with the eumetazoans (Mehl *et al.*, in press; Müller *et al.*, submitted).

Especially the data on the galactose-specific lectin isolated (Vaith *et al.*, 1979; Bretting *et al.*, 1981) and subsequently cloned from *G. cydonium* (Pfeifer *et al.*, 1993) gave rise to the

A. はじめに

近年、後生動物を (i) 側生動物 (海綿などの海綿動物門からなる) と (ii) 真性後生動物 (海綿以外の動物門からなる) に分類する従来の方式が廃止された。というのも、海棲の海綿である *Geodia cydonium* (海綿動物門、普通海綿亜綱、四軸海綿綱、星形海綿目、チョウズバチ海綿科) から、多細胞性を特徴づける多くのタンパク質、すなわち、接着分子群 (レクチン、免疫グロブリン様ドメインをもった受容体チロシンキナーゼ) や細胞シグナル伝達分子群 (セリン/ソレオニンキナーゼ、血清レスポンス因子) に対する cDNA が得られ、その解析の結果、高等動物で見ついている相当するタンパク質と高い配列類似性が示されたからだ (Müller *et al.*, 1994; Müller, 1995)。海綿といっても、cDNA が単離されて性質も調べられているものの多くは *G. cydonium* 由来のものだ。この海綿の属するチョウズバチ科は、普通海綿綱の中でも最も起源が古いとされる (総説: Mehl *et al.*, 印刷中)。ごく最近、この海綿 *G. cydonium* が、インテグリン受容体やスペラクチン受容体に対する遺伝子を持つことも示され、こうして海綿は真性後生動物として新たに位置づけられることになった (Mehl *et al.*, 印刷中; Müller *et al.*, 投稿中)。

上述のガラクトース結合性レクチンが *G. cydonium* から単離され (Vaith *et al.*, 1993; Bretting *et al.*, 1981)、続いてその cDNA がクローン化されたことは (Pfeifer *et al.*, 1993)、側生動物を真性後生動物と独立させて分類しようとする従来の方式を覆す一

* Corresponding author.

drop of the Parazoa-Eumetazoa split.

B. The Sponge Galectin and its Carbohydrate Binding Specificity

The galectin(s) from the marine sponge *G. cydonium* has been purified by HCl-treated Sepharose 4B as absorbent (Vaith *et al.*, 1979) or using a Sepharose 4B hog A+H matrix (Bretting *et al.*, 1981). Purification by elution with lactose revealed forms of M_r 13 to 18 kDa (Müller *et al.*, 1983; Pfeifer *et al.*, 1993). The lectin(s) binds to galactans [composed of $\beta 1 \rightarrow 3$ and $\beta 1 \rightarrow 6$ DGal] and lactose, as well as the sugars DGalNAc, DGal $\beta 1 \rightarrow 4$ DGlcNAc, DGal $\beta 1 \rightarrow 3$ DGlcNAc and DGalNAc (Vaith *et al.*, 1979; Bretting *et al.*, 1981). Recently it was described that the sponge galectin binds much more tightly to GalNAc $\alpha 1$ -3GalNAc (Forssman disaccharide) or GalNAc $\alpha 1$ -3(Fuc $\alpha 1$ -2)Gal (blood group A) than to lactosamine (Hanisch *et al.*, 1996). This β -galactoside specificity is the first criterion of a galectin. For its sugar recognition property and its amino acid [aa] sequence, deduced from the nucleotide [nt] sequence this lectin has to be classified to the galectins (Barondes *et al.*, 1994b).

Originally, it was assumed that four sponge galectins are linked by disulfide bonds to a 60 kDa complex (Bretting *et al.*, 1981), while the galectins obtained by chromatography on HCl-treated Sepharose 4B are found to form a 36.5 kDa trimer (Müller *et al.*, 1983). The sponge galectins are glycoproteins, comprising 15 % carbohydrate (Bretting *et al.*, 1981; Hanisch *et al.*, 1984). In the presence of Ca^{2+} the sponge galectins undergo conformational changes and "polymerize" to large three-dimensional clumps (Diehl-Seifert *et al.*, 1985). The galectins so far described from animals of phyla higher than sponges lack carbohydrate side chains (Kasai and Hirabayashi, 1996).

Sponge galectins exist in several processed forms. In the total extract from *G. cydonium* six forms of galectins with sizes of ≈ 13 , ≈ 14 , ≈ 15 , ≈ 16 , ≈ 17 , ≈ 18 kDa can be visualized (Fig. 1 A, lanes a and Fig. 1B lane a). While the soluble fraction contains the three low molecular weight forms (Fig. 1B, lane b), the

つのきっかけであったことを強調しておきたい。

B. 海綿ガレクチンと糖結合特異性

海綿 *G. cydonium* のガレクチンは酸処理セファロース 4B (Vaith *et al.*, 1979)、もしくはブタ (A+H) 抗原固定化セファロース 4B (Bretting *et al.*, 1981) を吸着体として精製される。ラクトースで溶出されたレクチンは分子量 13 kDa から 18 kDa の範囲にかけて分子的多形を示す (Müller *et al.*, 1983; Pfeifer *et al.*, 1993)。このレクチン (混合物) はガラクトサン ($\beta 1$ -3、 $\beta 1$ -6 結合からなる D-ガラクトースポリマー) や、ラクトース、GalNAc、Gal $\beta 1$ -3GlcNAc、Gal $\beta 1$ -4GlcNAc に特異性を示した (Vaith *et al.*, 1979; Bretting *et al.*, 1981)。最近の報告では、海綿ガレクチンは GalNAc $\alpha 1$ -3GalNAc (フォルスマン二糖) や GalNAc $\alpha 1$ -3 (Fuc $\alpha 1$ -2) GalNAc (A 型血液物質) に対し、ラクトサミンよりずっと強く結合するという (Hanisch *et al.*, 1996)。しかしながら、一般に β ガラクトシドに高い特異性を示すという本レクチンの性質は、ガレクチンの第一の判断基準を満たす。この糖特異性と、塩基配列から推定されるアミノ酸配列上の高い相同性から、本レクチンはガレクチンとして分類される (Barondes *et al.*, 1994b)。

海綿ガレクチンのオリゴマー構造に関しては、元来、4つのサブユニットがジスルフィド結合によって 60 kDa の複合体を形成するものと推定されていた (Bretting *et al.*, 1981)。しかし、酸処理セファロース 4B によって精製されたガレクチンは 36.5 kDa の分子量を示し、3量体構造を示唆した (Müller *et al.*, 1983)。海綿ガレクチンは糖タンパク質であって 5% の糖を含むことが示されているが (Bretting *et al.*, 1981; Hanisch *et al.*, 1984)、これまで高等動物から単離されたガレクチンはいずれも糖鎖を含まないという (Kasai and Hirabayashi, 1993)。また、海綿ガレクチンはカルシウムイオン存在下では、コンフォメーション変化を起こし、3次元的にも大きな多量体へと転換してしまうことが知られている (Diehl-Seifert *et al.*, 1985)。

海綿ガレクチンはいくつかの分子形で存在する。*G. cydonium* の全粗抽出物から得られるガレクチンは、分子量がそれぞれ約 13, 14, 15, 16, 17, 18 kDa の 6 つの分子種として観察される (図 1A レーン a および図 1B レーン a)。これを可溶性画分と膜画分に分離して精製を行うと、可溶性画分には、下の 3 つ

Fig. 1. Size and Non-covalent Dimerization of *G. cydonium* Galectins. A, The sponge galectins have been isolated from the crude extract of *G. cydonium* (lane a) or from the soluble fraction, after dissociation of the cells (lane b) by affinity chromatography, using HCL-treated Sepharose 4B; B, The crude fraction of the sponge galectins (lane a) and the membrane fraction of the sponge (lane b) have been enriched by affinity chromatographic technique. The fractions in A and B have been size-separated using 15% SDS-PAGE; the gels were stained with Coomassie brilliant blue; C, Separation of the galectins from the soluble fraction. The samples were treated by heat at 95°C and applied immediately [<1 min] (lane a) or after 5 min (lane b) to the gel. I: High molecular weight forms of the galectin [~ 16 , ~ 17 and ~ 18 kDa]; II: low molecular weight forms [~ 13 , ~ 14 and ~ 15 kDa].

C. Cloning of Two cDNAs from *G. cydonium* Encoding Galectins GCLT1 and GCLT2

Two nt sequences, encoding the galectins GcLt1 and GcLt2 have been isolated from an expression cDNA library of *G. cydonium* using monospecific anti-galectin antibodies (Pfeifer *et al.*, 1993; Wagner-Hülsmann *et al.*, in press). The 788 [627] nt long GcLt1 [GcLt2] sequence comprises a predicted open reading frame of 570 [480] nt. An alignment of the two deduced aa sequences reveals that galectin GCLT1 exceeds GCLT2 by 29 aa at the N-terminus (Fig. 2A). Previously we showed that the complete 190 aa of GCLT1 are translated in vitro to a 21 kDa long polypeptide (Wagner-Hülsmann *et al.*, in press). The N-terminal galectin peptide of 29 aa length shows similarity [30% identical and 48% similar aa] with the sequence of rat intercellular adhesion molecule-1 precursor (Kita *et al.*, 1992). Analysis for putative transmembrane helix potential revealed a peak value of 1.42, indicating such a helix (RAOARGOS-PC/GENE, 1995). A cleavage site typical for eukaryotic signal sequences exists between the two aa A and A as marked in Fig. 2A; this site conforms the -3 [A], -1 [A] rule (Von Heijne, 1986). Galectins isolated from higher animals are synthesized without a signal sequence (Ohyama *et al.*, 1986). It remains to be proven, whether this N-terminal part of the sponge galectin is synthesized and cleaved off during secretion; for reasons of comparison, we start to number the aa sequence of GCLT1 from the second putative Met on.

Database search with the GCLT1 [GCLT2] 161 [160] aa long predicted protein of the sponge galectins revealed high homology with the corresponding molecules from vertebrates and *Caenorhabditis elegans* (Drickamer, 1988; Hirabayashi and Kasai, 1993; Barondes *et al.*, 1994; Hirabayashi *et al.*, 1996). The deduced aa sequences of both GCLT1 and GCLT2 feature the characteristic carbohydrate-recognition domain [CRD] (Fig. 2A) which is located in GCLT1 at L^HF^NP^R_{#64-69}-G_{#74}-V_{#78}-N_{#80}-W_{#87}-E_{#90}-R^[H]_{#92}-PF_{#97,98} [the aa given in bold (Fig. 2A) are those directly involved in binding to the carbohydrate. These aa are also characterized by the highest radial location position (RADIALOC-PC/GENE, 1995)] (Drickamer, 1988; Wang *et al.*, 1991; Hirabayashi and Kasai, 1993); this domain is conserved from sponge to human (Hirabayashi and Kasai, 1993; Kasai and Hirabayashi, 1996). Figure 3 shows a model of the sponge galectin GCLT1 in complex with lactose based on the known structures of bovine and human galectins (Bourne *et al.*, 1995; Lobsanov *et al.*, 1993). These homologous proteins do not have equivalent residues for the precursor and the N-terminal part of sponge galectin GCLT1. Therefore the tertiary structure of the N-terminus can not be predicted and the model starts at Ala 17. The residues directly involved in binding to the carbohydrate are labeled. The model building revealed three glutamic acid residues (E 40, E150 and E 155) which may participate in a calcium binding site.

C. *G. cydonium* ガレクチン (GCLT1、GCLT2) の cDNA クローニング

レクチンに対する単一特異的抗体を用いて *G. cydonium* の発現ライブラリーからガレクチン GcLt1、GcLt2 をコードする 2 つの cDNA クローンが単離された (Pfeifer *et al.*, 1993; Wagner-Hülsmann *et al.*, 印刷中)。GcLt1 (GcLt2) の配列は 788 (627) ヌクレオチドからなり、このうち 570 (480) ヌクレオチドからなる読み枠を含む。両者の推定アミノ酸配列を比較すると、GCLT1 は GCLT2 より N-末端側に 29 アミノ酸だけ長い (図 2A)。完全長として 190 アミノ酸からなる GCLT1 を *in vitro* で翻訳すると、21 kDa のポリペプチドが生じる (Wagner-Hülsmann *et al.*, 印刷中)。このものの N-末端 29 アミノ酸からなるペプチド部分は、ラットの細胞間接着分子 (intercellular adhesion molecule-1) の前駆体 (Kita *et al.*, 1992) と、同一性にして 30%、相同性で 48% の類似を示す。膜貫通に関与しそうなヘリックス領域を RAOARGOS-PC/GENE (1995) を用いて解析すると、この N-末端領域は 1.42 という高いピーク値を示すので、シグナル配列である可能性が高い。真核生物で典型的と思われるシグナル配列の切断部位は、図 2A で印を付けた 2 つのアミノ酸 (アラニン) の間に位置するが、これは -3 [A], -1 [A] 則と呼ばれる経験則 (Von Heijne, 1986) と一致する。一方、高等動物から単離されたガレクチンは、そのようなシグナル配列なしに合成されるという (Ohyama *et al.*, 1986)。海綿ガレクチンのこの N-末端部分が、はたして分泌過程で合成され、実際に切断されるかについては、今後明らかにせねばならない。ここでは、比較のため GCLT1 のアミノ酸配列を 2 番目のメチオニンから開始した番号を付す。

GCLT1 (160 アミノ酸) や GCLT2 (161 アミノ酸) を用いてデータベース検索したところ、これらが、脊椎動物や *Caenorhabditis elegans* 由来のガレクチン (Drickamer, 1988; Hirabayashi and Kasai, 1993; Barondes *et al.*, 1994; Hirabayashi *et al.*, 1996) と高い相同性を持つことがわかった。GCLT1 および GCLT2 双方から推測されるアミノ酸配列には、図 2A の GCLT1 に示したような、L^HF^NP^R_{#64-69}-G_{#74}-V_{#78}-N_{#80}-W_{#87}-E_{#90}-R^[H]_{#92}-PF_{#97,98} (太字は糖との結合に直接関わるアミノ酸) といった糖認識ドメイン (CRD) の特徴的な配列が見つかる。この領域は、最も露出度の高い部位 (RADIALOC-PC/GENE, 1995) として特徴づけられる箇所 (Drickamer, 1988; Wang *et al.*, 1991; Hirabayashi and Kasai, 1993)、事実、海綿からヒトに至るまで広く保存されている (Hirabayashi and Kasai, 1993; Kasai and Hirabayashi, 1996)。図 3 には、既知の立体構造 (ウシとヒトガレクチンによる: Bourne *et al.*, 1995; Lobsanov *et al.* 1993) に基づいて作成された、海綿ガレクチン GCLT1 のラクトースとの複合体モデルを示す。しかし、これらのモデルとなるタンパク質の構造には、海綿ガレクチン GCLT1 の前駆体 N-末端領域に相当する残基がないため、図には三次構造の定まらない N-末部分 (Ala17 番目以前) は描かれていない。糖と直接相互作用するアミノ酸残基、およびカルシウムとの結合に関与すると考えられる 3 つのグルタミン酸残基 (E40, E150, E155) も合わせて図に記す。

Fig. 3. Model of the sponge galectin GCLT1. The model is based on the structures of bovine galectin (Bourne *et al.*, 1995; Brookhaven accession code 1sla) and human galectin (Lobsanov *et al.*, 1993; Brookhaven accession code 1hlc). The structural similarity of these two galectins with known structures is greater than 95% measured by the method of Lessel and Schomburg (1994). Multiple sequence alignments with six lectins from different vertebrates have been created with GCG (1994). The homology modelling was done with the molecular modelling program package BRAGI (Schomburg and Reichelt, 1988) by replacing equivalent amino acids in the structure of the bovine galectin and modelling loop regions with insertions and deletions. Especially for the loop prediction and for positioning the lactose the 3D alignment of bovine and human galectin was used. Energy minimization was performed with AMBER 4.1 (Pearlman *et al.*, 1995). The labeled residues are directly involved in carbohydrate binding or are postulated to participate in calcium binding.

The estimated pI value of GCLT1 [GCLT2] is 4.5 [4.8] and hence close to the value which was determined for the protein isolated from the sponge with 4.1 (Bretting *et al.*, 1981). Only one potential N-glycosylation site is found in GCLT2 at N_{#126}. Interesting is the finding that the deduced instability index [II] of the two sponge galectins differs, while GCLT1 is considered to be an unstable protein [II: 58.2] GCLT2 has been classified as a stable protein [II: 24.1] (PC/GENE, 1995). This might indicate different functions of the galectins in the sponge organism. As known from aa sequencing data, the finally processed *G. cydonium* galectin found in the extracellular space within the organism starts with VFGDLKLTVPSTLVGQ_{#22-37} (Pfeifer *et al.*, 1993) at a thermolysin cleavage site (CUTPRO-PC/GENE, 1995)(Fig. 2A).

On aa level the two sponge galectins share 102 identities and 41 similarities. Earlier calculations revealed that the sponge galectins diverged from the galectin, isolated from the nematode *Caenorhabditis elegans*, 800 million years [Myrs] ago (Hirabayashi and Kasai, 1993). Comparison within the two sponge galectins allows an approximation of the time of divergence of the two sponge genes. The two sequences are 161

GCLT1、およびGCLT2の等電点はpI値4.5 [4.8]と予測されるが、これらの値は、実際海綿から単離されたタンパク質を用いて求めたpI値4.1に近い (Bretting *et al.*, 1981)。ただ1箇所潜在的N-グリコシレーション部位がGCLT2のN#126に見つかる。おもしろいことに、2つのタンパク質の不安定性インデックス [II] を算定比較すると、GCLT1は [II: 58.2] を示し不安定なタンパク質と考えられるのに対し、GCLT2は [II: 24.1] の安定なタンパク質としての性質を示す(PC-GENE, 1995)。したがって、海綿におけるこれら2つのガレクチンは異なった機能をもっているのかもしれない。アミノ酸配列データ中にも示したが、*G. cydonium*の細胞外空間で実際に見つかるガレクチンは、最終的なプロセッシングを受けた後のもので、N-末端はVFGDLKLTVPSTLVGQ_{#22-37}というサーモリシンなどで切断を受けやすい配列 (CUTPRO-PC/GENE, 1995) となっている (Pfeifer *et al.*, 1993) (図2A)。

アミノ酸レベルでは、2つの海綿ガレクチンは102箇所まで一致する。相同なアミノ酸同士も考慮に入れると、さらに41箇所共通性を持つ。先の計算によると、海綿ガレクチンは、線虫 *Caenorhabditis elegans*由来のガレクチンと約8億年前に分岐したことになる (Hirabayashi and Kasai, 1993)。同様に、2つの海綿ガレクチンを比較すれば、両者のおおよその分岐年代を推測

(160) aa long and have an overall identity of 65%. According to Kimura (1983) aa substitutions per site, including possible multiple substitutions (K_{aa}), can be calculated from the percentage of identity using the equation $K_{aa} = -\ln x$ (observed identity [%] / 100). This gives a value for K_{aa} of 0.43. The standard value has been set to be 0.9×10^{-9} aa substitutions per site and year (Li *et al.*, 1987). Using this (average) rate for proteins and the obtained value for K_{aa} , it was possible to estimate the time when the two sponge galectins started to diverge from each other ($K_{aa}/2 : 0.22 \times 10^{-9}$) to be 220 Myrs ago. Proteins evolve at relatively steady rates (Kimura, 1983) and can therefore be used as “molecular clock”. However, rates for different proteins are different and this rate is for galectins not yet established.

Among the 102 identical aa between GCLT1 and GCLT2 18 silent substitutions are found (Fig. 2B). One “apparent” double mutation exists in the two sequences at aa 77 [76]; the codon for Leu in GcLtl reads CTT and in GcLt2 it is TTA. However, double mutations are very rare events in nature. Comparing the sponge sequences with those isolated from higher animal phyla (Hirabayashi and Kasai, 1993) it is the aa Ile which at this position precedes the conserved Val_{#78} and Asn_{#80}. Ile and Leu are similar amino acids. Therefore, we propose that the ancestor molecule of sponge galectin had also Ile at this position. After gene duplication the codon for Ile ATA was changed to the Leu codons CTA (found in GcLtl) or to TTA (in GcLt2). Later, one mutation in the CTA codon resulted in the CTT codon. Obviously, this Ile to Leu change was not only permissive, nor silent, but evolutionary favorable and was therefore selected in nature because it created a “more functional” galectin. A similar “double mutation” has been described for the *G. cydonium* ubiquitin (Müller *et al.*, 1994).

D. Biological Role of Sponge Galectins

The first aggregation factors [AF] were enriched from sponges; especially two species served as sources, the marine sponges, *Microciona prolifera* (Henkart *et al.*, 1973; Weinbaum and Burger, 1973) and *G. cydonium* (Müller and Zahn, 1973). However, the subsequent elucidation of the detailed function during reaggregation of cells turned out to be difficult. The AF is in fact a complex, as mentioned above, which interacts with a membrane component [AR] that has been identified, but not yet purified from *G. cydonium* (Müller *et al.*, 1976). The AR is of lower molecular weight. In a recent study monoclonal antibodies have been used as tools to identify the binding domains of the AF (Wagner-Hülsmann *et al.*, in press). A 140 kDa polypeptide was found to participate in the reaggregation process. This polypeptide of the AF very likely interacts with the galectin. The galectin itself is the main component which links individual AF molecules to the AR at the plasma membrane and consequently bridges two cells together

することが出来る。2つのガレクチンの配列は 161、ないし 160 アミノ酸からなっているから、全体での一致は 65%である。Kimura (1983) によると、一座位あたりの多重置換を含めたアミノ酸置換 (K_{aa}) は、 $K_{aa} = -\ln x$ の式から計算でき (ここで x は観測された一致率 [%] / 100)、 K_{aa} は 0.43 となる。種々のタンパク質の平均的な置換率は、アミノ酸一座位・一年あたり、約 0.9×10^{-9} なので (Li *et al.*, 1987)、先の K_{aa} から、2つの海綿ガレクチンの分岐年代は、約 2億 2千万年前 ($K_{aa}/2 = 0.22 \times 10^{-9}$) と推測される。タンパク質は一般に一定の進化速度で変異するので (Kimura, 1983)、このような「分子時計」として利用のが可能になる。しかし、この速度は当然ながらタンパク家系毎に異なっており、この点でガレクチンの進化速度についての定説はまだない。

先に述べた GCLT1 と GCLT2 間の 102 箇所一致するアミノ酸のうち、塩基レベルでは置換が起こっている場所が 18 箇所観察される (Fig. 2B)。このうち、明らかに多重置換の起こった箇所が指摘できる。アミノ酸 77 [76] 番目は、GcLtl では CTT にコードされるロイシンであるのに対し、GcLt2 では TTA にコードされる。しかし、多重置換は自然ではかなり稀なことである。海綿ガレクチンを他の動物門由来のガレクチン (Hirabayashi and Kasai, 1993) と比較すると、このロイシンは保存性の高い Val_{#78} と Asn_{#80} の前にあるイソロイシンに相当することに気づく。イソロイシンとロイシンは性質の似たアミノ酸であり、おそらく、海綿ガレクチンの祖先分子は、この位置にかつてイソロイシンをもっていたのだろう。その後、遺伝子重複を経てイソロイシンをコードする ATA は GcLtl では CTA となってロイシンをコードするようになった。一方、GcLt2 では TTA となったが、アミノ酸としては結局同じロイシンをコードした。その後、CTA の方にさらに変異が起こり、CTT コドンとなったのではないだろうか。明らかに、このイソロイシンからロイシンへの変化は、受動的なものでも静的なものでもなく、進化的にむしろ好ましく、それゆえ自然選択されたと考えべきだろう。なぜなら、そのことでより機能的なガレクチンが創造されるからである。同様な二重置換の例は、*G. cydonium* のユビキチンについても述べられている (Müller *et al.*, 1994)。

D. 海綿ガレクチンの生物機能

凝集因子 [AF] は海綿ではじめて見つかったが、これは *Microciona prolifera* (Henkart *et al.*, 1973; Weinbaum and Burger, 1973) と *G. cydonium* の 2 種を用いた研究に代表的される。AF を精製し濃縮することはできたが、一度解離した細胞が再凝集する過程を詳細に解明するのはそう容易ではなかった。事実、AF は既に述べたように複合体であり、膜成分の一種である AR と相互作用している。*G. cydonium* の AR は低分子であり、同定はされているが、まだ単離はされていない (Müller *et al.*, 1976)。最近では、モノクローン抗体を使って AR の結合ドメインを同定しようという試みがなされている (Wanger-Huslamann *et al.*, 印刷中)。その結果、再凝集において 140 kDa のポリペプチドが関与することがわかったが、実は、この AF 中のポリペプチドがガレクチンとよく相互作用するのである。つまり、ガレクチンは、細胞膜上に存在する個々の AF 分子を AR につなげている主な成分であり、このことによって複数の細胞が架橋されると考えら

Fig. 4. Scheme of AF-mediated cell recognition in *G. cydonium*. A 29-kDa aggregation receptor [AR] is inserted into the plasma membrane to which one galectin molecule binds. In the presence of Ca^{2+} a second galectin molecule binds to the first one. Then these two molecules form a bridge between the AR and the 140 kDa polypeptide, associated with the AF. Following this scheme, the interactions between the AF and the AR involves the galectin which might bind to carbohydrate both at the 140 kDa polypeptide and at the AR. In addition, the sponge contains an integrin receptor [until today only the α -chain has been cloned from *G. cydonium*] which is assumed to interact with fibronectin.

(Fig. 4). As mentioned above, the galectin from *G. cydonium* forms in the presence of Ca^{2+} multimers (Diehl-Seifert *et al.*, 1985; Gramzow *et al.*, 1989). We therefore postulate that the role of Ca^{2+} is to associate two and more monovalent galectin molecules.

Immunohistological studies revealed that the spherulous cells contain and perhaps synthesize the galectin. Confocal laser scanning microscopical analysis demonstrated that both the galectin and the AF are present at the rim of the cells (Wagner-Hülsmann *et al.*, in press). From this we conclude that the sponge galectin is one of the key molecules involved in cell-cell adhesion. In addition the sponge plasma membrane contains the integrin receptor (Müller *et al.*, submitted) which might interact with matrix molecules, *e.g.* fibronectin. Molecular cloning of the latter molecule is in progress. our data demonstrate that sponges contain both cell-cell and cell-matrix adhesion molecules which are typical for other Eumetazoa.

Acknowledgements

The studies performed in the authors laboratory were supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft [Mü348/12-1] and the International Human Frontier Science Program [RG-333/96-M].

れる (図4)。 *G. cydonium* ガレクチンが Ca^{2+} の存在下で多量体化することを述べた (Diehl-Seifert *et al.*, 1985 ; Gramzow *et al.*, 1989)。 Ca^{2+} には2個以上のガレクチン分子 (各分子が一個の結合部位を持つ) を会合させるといった働きがあるのではないだろうか。

免疫組織学的な研究によると、ガレクチンは球状細胞 (spherulous cells) に見い出されることから、おそらくこの細胞がガレクチンを合成しているのだろう。共焦点レーザー走査顕微鏡による観察では、ガレクチンとAFは、ともに細胞の輪郭部に見い出される (Wanger-Hulsmann *et al.*, 印刷中)。このことから、ガレクチンは細胞同士の接着を担っている重要な鍵分子であると結論づけられよう。これに加え、海綿の細胞膜にもインテグリンに対する受容体があることが最近わかった (Müller *et al.*, 投稿中)。おそらく、フィブロネクチンなどのマトリックス構成分子と相互作用するのだろうが、この分子については、現在クローニング中である。以上述べてきたように、海綿は他の真性後生動物と同様、細胞-細胞間、及び細胞-マトリックス間を結びつける代表的な接着分子群を含んでいることが理解されよう。

帝京大学薬学部生物化学教室
平林 淳 記

Received on June 24, 1966, accepted on September 4, 1996

Profile of the Author

Werner E.G. Müller

Graduation to Dr. rer. nat. at University of Mainz (1967); title of the thesis "Contributions to the Distance- and Contact-Oriented of Mosquitoes", a standard work cited in textbooks. Start of professional career 1971: Promotion to "Privat-Dozent"; 1973 tenure for "Physiological Chemistry";

[Since 1972 Member of Institute "Ruder Boskovic", Zagreb (Croatia).] 1975– 1976 Sabbatical in the frame of a Yamagiwa-Yoshida Memorial International Cancer Study Grant at Department of Biochemistry, University of Lexington, Albert B. Chandler Medical Center, Lexington, Ky. (USA) (Prof. Dr. F.J. Bollum). [Since 1977 Appointment as Head of "Department of Applied Molecular Biology" and Professor at the Institute for Physiological Chemistry at University of Mainz.]

Since 1976 several research visits at the National Cancer Institute, Bethesda (MD) with Dr. R.C. Gallo and Dr. P.S. Sarin. Since 1986 many stays as a visiting professor at the National Cancer Research Institute, Tokyo, in the frame of a grant of the Japanese Society for the Promotion of Science.

Since 1990 Member of the "Academy of Sciences of Erfurt" [mathematical-natural science class] (1991: member of the Senat). Since 1970 Member in the editorial board of a series of scientific journals and periodicals (such as *Nucleic Acids Research* [until 1979]; *Progress in Molecular and Subcellular Biology*; *Mechanisms of Ageing and Development*)

Awards and Membership: 1972 Boehringer-Ingelheim-Award (Internal medicine); 1977 Johann-Georg-Zimmermann-Award (Cancer research); 1980 Bürger-Award of the German Society of Gerontology; 1980 Member of the executive board of the "German Society of Gerontology";

1975 Member of the "Academy of Sciences and Literature, Mainz"; 1980 Fellow of "The New York Academy of Sciences"; 1986 Institute Ruder Boskovic-Medal in Gold; 1987 Institut Ruder Boskovic-Founders Plaque; Since 1986 Member of the European Committee of Sandoz Foundation for Gerontological Research; 1996 Croatia Award for Science and Research presented by the Croatian Academy of Science and Arts.

Scientific Research: The main aim of his research is to elaborate with selected biological models the fundamentals of programmed syntheses and to apply the knowledge and results to clinical relevant problems. The central topic of his three main research fields is the question for the molecular mechanisms by which extracellularly present and exactly defined factors influence cell metabolism.

1. Studies at the Level of Post-Transcription
2. Molecular Virological Studies
3. Molecular-Biological Investigations of Cell-Cell Interaction

A number of those macromolecules have been isolated and characterized from the marine sponge *Geodia cydonium* which are involved in the control of cell-aggregation and cell-separation; i.e. aggregation factor, aggregation receptor, anti-aggregation-receptor, β -glucuronidase, β -galactosidase, glucuronyl-transferase and galactosyl-transferase. Based on the results gathered the functions of these components were united in the "Modulation-Theory of Adhesion". Detection of the Inositol-trisphosphate/diacylglycerol/protein-kinase C system in sponges. Identification of the molecular mechanism of the intracellular signal transduction pathway leading to the initiation of DNA-synthesis.

At present he is cloning selected genes, coding for proteins from this sponge. Establishment of the "Monophyly of Metazoa".

Hobbies and leisure activities comprise sports such as scuba diving, paleontology and collection of selected fields of stamps.