

綠豆로부터 렉틴 成分의 分離 精製

鄭時鍊·洪勝洙·全瓊姬*

嶺南大學校 藥學大學·理科大學*

(Received June 1, 1983)

See-Ryun Chung, Seoung-Soo Hong and Kyung-Hee Jeune-Chung*

College of Pharmacy and College of Science*, Yeungnam University, Gyeongsan 682, Korea

Isolation and Purification of Lectin from *Phaseolus radiatus*

Abstract—New lectins, lymphoagglutinating lectins from mung beans (MBLA) have been isolated and purified. Mung beans crude extracts were made with 0.15M NaCl and these were purified through anionic exchange chromatography. Four fractions were obtained from DEAE Sephadex A-50 by salt gradients elution. Lectin activity, enzyme activity, protein assay, identification of purity by polyacrylamide gel electrophoresis and immunochemical studies were carried out with these four fractions. Through these results, it can be suggested that 0.2M fraction is newly found potent MBLA. There were some relationships with MBLA and L-PHA but no similarities were observed between MBLA and E-PHA.

1954年 Boyd에 의해命名된 lectin이란物質은 그本體가蛋白質 또는糖蛋白質로서 여러종류의細胞 즉赤血球, 淋巴球, fibroblasts, 세균 및菌類 등의細胞表面에 있는糖과特異的인結合反應을 나타내므로써細胞를凝集시키게 된다.¹⁻⁴⁾

렉틴은 주로植物界에서發見되지만 가끔은下等動物이나微生物界에서도發見되고 있으며^{3,4)} 이의生化學的 特性으로 인해 많은 관심을 끌고 있다. 例를들면 세포응집성을 이용한 세포막의 구조연구나, 細胞分裂促進效果라든가, 免疫學의 研究, 그리고細胞의分離精製 등에 대단히 좋은 研究道具로 쓰여지는 외에도 최근에 이르러 어떤종류의 癌이나 종양세포의 진단 및 치료에 까지 응용됨으로써 렉틴에 관한 인식이 더욱 높아져 가고 있다.⁵⁻⁸⁾

本 研究에서는 녹두로부터 임파구 응집성을 가진 lectin을 분리 정제키 위해 0.15M NaCl로 crude extract를 만들고 이를 anionic exchanger인 DEAE-Sephadex A-50에 적용시켜 4종의 단백질성 물질을 얻었다. 이들을 대상으로 렉틴 活性, 蛋白質定量, 효소活性, 電氣泳動에 의한 純度 確認, 免疫學的 研究 등 生物物理化學的인 特性을 究明해 보았다.

한편 綠豆와 同屬인 蠶豆(*Phaseolus vulgaris*)에서 얻은 E-PHA^{8,9)} lectin과 L-PHA¹⁰⁾ lectin을 antigen으로 하여 토끼에 免疫시켜 얻은 antisera와도 免疫化學的인 시험을 遂行하여 cross reacting material(CRM)^{11,12)}이 있는지의 여부를 검토해 보았다.

實 驗 方 法

實驗材料—綠豆(Mung bean), *Phaseolus radiatus*(Leguminosae)는 慶尙北道 農村振興院에서 供給받아 實驗材料로 했다. 試藥中 DEAE Sephadex A-50는 Pharmacia Fine Chemicals에서 tris-hydroxymethyl-aminoethane, N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine, N, N'-methylene-bis-

acrylamide, trichloroacetic acid, acrylamide 등은 Wako Chemical에서, Freund's adjuvant는 Difco Lab.에서, bovine serum albumin, p-nitrophenyl α -D-galactopyranoside는 Sigma사에서, 기타 試藥은 特級 내지 一級品을 市中에서 購入하여 使用했다.

렉틴成分의 抽出—Fig. 1에서와 같은 조작에 따라 實驗材料 1kg을 4l의 0.15M NaCl용액으로 48시간동안 교반침출하여 진⁸⁾ 등과 같은 方法으로 crude lectin을 抽出하였다.

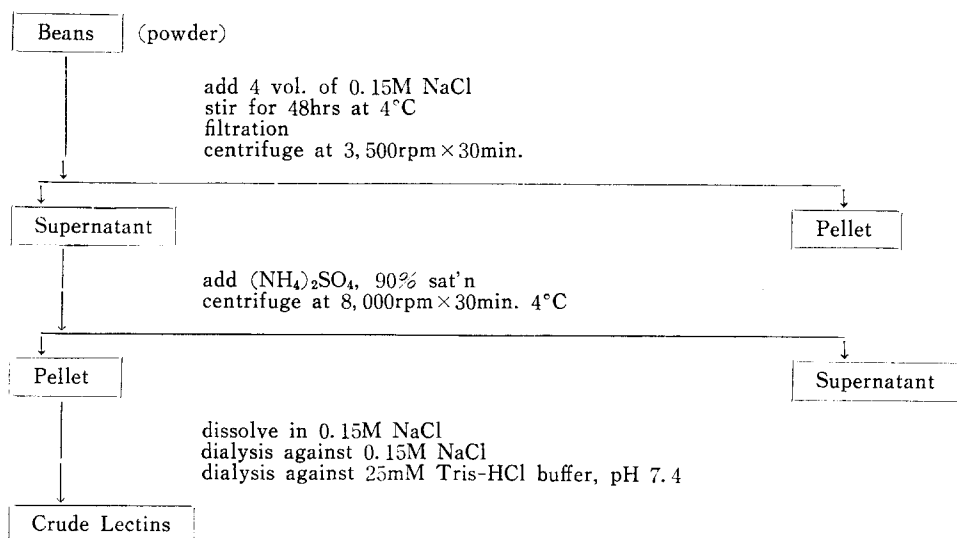


Fig. 1—Extraction and isolation of crude lectins.

임파구 凝集性 렉틴의 分離 精製—前項에서 얻은 crude lectin을 HA 0.45 μ m-Millipore filter (Millipore Co.)로 여과한 다음 정³⁾ 등의 방법과 같이 25mM tris-HCl buffer(pH 7.4)로 미리 평형시켜둔 DEAE Sephadex A-50 column(4.7×30cm)에 주입시켰으며 같은 buffer로 세척시키고 25mM tris-HCl buffer에 0.05M, 0.1M, 0.2M, 그리고 0.3M NaCl을 증가함유시킨 stepwise gradient method로 유출시켰으며(유출속도 20ml/hr) 이렇게 하여 얻은 각각의 fraction은 280nm에서 吸光度를 測定했다. 한편 mouse spleen lymphocytes를 이용한 임파구 응집성(렉틴活性)과, 효소活性, 전기영동에 의한 순도確認 등을 하였다.

Lymphocytes의 分離 調製 및 임파구 凝集性(렉틴活性) 試驗—전⁵⁾ 등의 方法을 精確하여 마우스에서 spleen을 分取하여 이를 0.15M phosphate buffered saline(PBS)(pH 7.2) 속에서 면도날로 잘게 파쇄하고 탈지면으로 여과한 다음 1,500rpm×10min으로 원심분리하여 침전물을 취하였다. 이에 0.15M NH_4Cl (pH 7.4)을 加해 혼합된 赤血球를 파괴시킨 다음 원심분리하여 침전물을 PBS로 세척하고 다시 림프구를 침전분리시켜 PBS로 회석하여 lymphocytes數가 5×10^7 cells/ml되도록 조제하였다.

렉틴 活性試驗은 microtiter plate의 각 well에 30 μ l의 PBS를 넣고, 첫번 well에 DEAE-Sephadex로부터 얻어진 각각의 fraction試料 30 μ l를 加하여 serial 2-fold dilution한 다음 조제된 lymphocytes 용액 30 μ l를 각 well마다 첨가하고 1~2시간 경과후 현미경으로 관찰하여 응집력을 測定하였다.

蛋白質 定量—分離精製目的으로 DEAE-Sephadex A-50에 의해 얻은 각 fraction과 crude extract

의 蛋白質含量은 bovine serum albumin을 標準品으로 하여 Lowry 等¹³⁾의 方法에 依해 定量하였다.

酵素 活性—試料中の galactosidase assay를 하였는바 이는 Agrawal 等¹⁴⁾의 方法에 의거하였다. substrate로서 p-nitrophenyl α -galactoside(PNPG)를 이용하여 이것이 試料中の enzyme에 依해 加水分解되므로 나타나게 되는 p-nitrophenol의 흡광도를 400nm에서 測定하였다.

電氣泳動에 依한 純度 確認—各試料의 純度を 確認하기 위해 7.5% polyacrylamide gel을 利用하여 Davis¹⁵⁾의 方法에 따라 施行하였다.

免疫化學的 試驗—antibody의 生産은 Shannon^{16,17)} 등의 方法에 따라 Table I과 같이 2kg 이상의 집토끼에 immunization시켜 antisera를 얻었다.

Table I—Immunization with 0.2M fraction.

Dates (day)	Sample dose (ml)	Freund's adjuvant (ml)		Route
		complete	incomplete	
1	0.5	0.5	—	popliteal node
2	0.5	0.5	—	"
3	0.5	0.5	—	"
⋮		rest, no injection		
21	0.5	—	0.5	"
22	0.5	—	0.5	"
23	0.5	—	0.5	"
⋮		rest, no injection		
27		bleeding		

immunodiffusion은 1% agar gel을 利用한 Ouchterlony¹⁸⁾ 등의 方法에 따라서 10 μ l의 적은 試料를 적용하는 antigen-antibody interaction을 조사 연구해 보았고 또한 immunoelectrophoresis는 Davis¹⁵⁾ gel을 Shannon^{11,16)}의 方法에 의거 수행하였다.

實驗 結果 및 考察

임파球 凝集性 렉틴의 分離 精製—Crude lectin을 anionic exchanger인 DEAE Sephadex A-50 column chromatography로 分離精製하였든 바 Fig. 2와 같이 4개의 fraction이 얻어졌고, 이중 0.2M 부분이 가장 높은 농도로 나타났다.

렉틴 活性—Fig. 2에 나타난 바와 같이 mouse spleen lymphocytes로 렉틴 活性을 試驗한 결과 0.2M 부분이 가장 强하게 나타났다. 本 研究의 基礎的인 研究과정에서 rabbit erythrocytes를 이용한 렉틴活性測定과 erythroagglutinating lectin을 分離精製하려는 試圖도 있었으나 렉틴과 赤血球와의 結合部位에 α -galactosidase의 作用으로 凝集判定이 대단히 不便함을 알았고 이 결과는 Shanon¹⁹⁾ 등의 研究結果를 더욱 分明하게 하였다.

이와 같은 理由로 本 研究은 lymphocytes를 이용한 lymphoagglutinating lectin의 分離精製를 目標로 하게 된 것이며 erythroagglutinating lectin과는 다른 렉틴이다.

蛋白質 定量—蛋白質定量的 結果는 Table II에 나타내었다. DEAE Sephadex A-50 column에 注入된 crude extract의 量은 5,345mg이다. Stepwise gradient로 유출된 各 fraction이 各各 서로

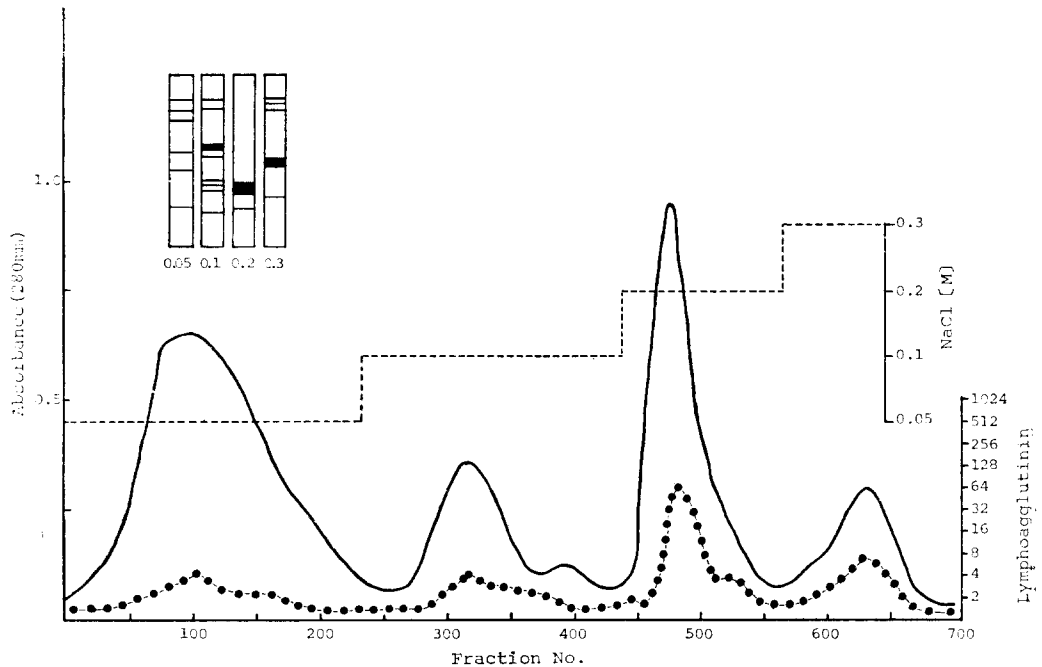


Fig. 2—Elution profiles of mung bean lectins on DEAE Sephadex A-50 column. Column size: 4.7×30cm, Flow rate; 10ml, 30min. Absorbance at 280nm: ———, Lymphoagglutination: —●—●—. Inset shows purity of each fraction by polyacrylamide disc gel electrophoresis (See Fig. 3).

Table II—The comparison of total protein, α -galactosidase activity and lymphoagglutinating activity at different purification steps from mung beans.

Steps	Total protein (mg)	α -Galactosidase activity	Lymphoagglutinin activity*
Crude extract	5,345	+	8
DEAE 0.05M	180	+	4
0.1M	107	+	4
0.2M	136	+	32
0.3M	58	+	8

* each sample O.D. at 280nm=1.0; number indicates reciprocal of serial two-fold dilutions.

다르게 나타나고 있다. 前項에서 言及한 렉틴의 活性과 蛋白質量과의 關係를 살펴보면 Table II에서 회석배수 32를 나타내는 0.2M fraction이 活性이 가장 강하고 단백질 함량도 비교적 높으므로 0.2M fraction이 가장 좋은 렉틴으로 생각되어진다(Fig. 2의 결과와 일치).

酵素活性—Shannon 等¹⁹⁻²¹⁾의 研究에 依하면 legume lectins은 α -galactosidase를 lectin과 함께 植物組織內에 含有한다고 하는데 이는 모두 erythroagglutinating lectin에 관한 보고였고 lymphoagglutinating lectin에 대한 연구결과는 찾아볼 수 없었다. 本 研究는 綠豆 mung bean에 함유된

lymphoagglutinating lectin(MBLA로 略稱함)의 分離精製에 관한 연구로서 다른 누구도 試圖해본바 없는 研究였기에 여기서도 α galactosidase activity가 있는지 試驗해 본결과 Table II에서와 같이 효소활성이 확인되었다. 그러므로 이 MBLA도 glucose나 mannose group²²⁾보다는 galactose group specific^{12, 23)} lectin인 것으로 생각되어진다.

MBLA의 純度—DEAE Sephadex A-50에 의해 분리정제한 렉틴의 純度는 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 測定했고 그 결과 Fig. 3에서 보는바처럼 0.2M fraction이 가장 적은수의 band 즉 major band 1개, minor band 1개 그리고 判定하기 어려운 trace가 있음을 알 수 있는 반면 다른 세 fraction은 많은 band를 나타내고 있다. 따라서 진기영동에 의한 결과도 0.2M fraction이 가장 좋은 MBLA로 밝혀졌다.

免疫化學의 研究—면역화학적 연구는 분리정제한 단백질 성물질의 정제정도 즉 純度確認과 다른 종류의 試料蛋白質과의 同質性 내지 異質性 등 相關關係 등등의 연구에 아주 卓越한 方法으로 이용된다. Fig. 4, a)는 0.2M fraction (MBLA)을 Table I과 같은 方法으로 트끼에 면역시켜 얻은 antisera (A)와 면역시키기 이전의 정상 혈청 (P) (P=preimmune sera or normal sera)(antibody)를 중앙 well에 넣고(10 μ l in agar plate) 바깥 well인 ①, ②, ③, ④엔 各各 同量의 O.D. 1(280nm)로 조성된 Fig. 2에 나타난 4개의 fraction 試料 (antigen)를 넣어 反應시킨 결과이다.

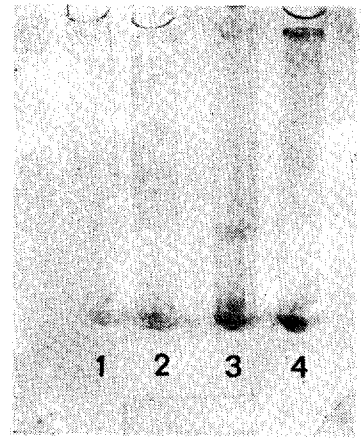


Fig. 3—Polyacrylamide disc gel electrophoresis of four fractions from DEAE Sephadex A-50 (Fig. 2). 1: 0.05M, 2: 0.1 M, 3: 0.2M, 4: 0.3M eluated fraction, respectively.

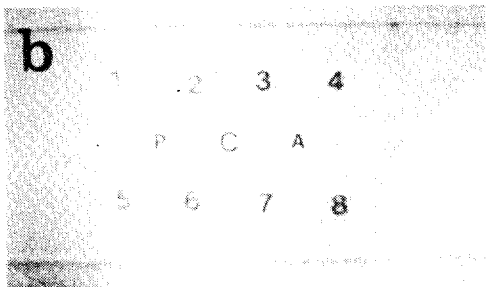
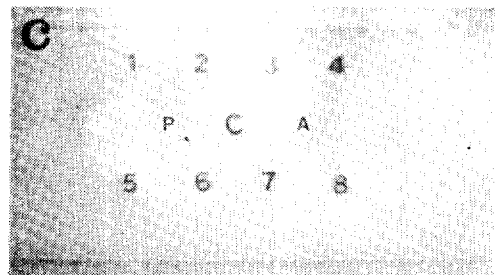
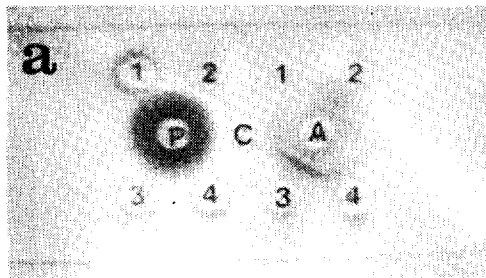


Plate a. P: normal preimmune sera, A: antisera against 0.2M fraction, C: mung beans crude extracts, 1: 0.05M fraction, 2: 0.1M, 3: 0.2M, 4: 0.3 M fraction, respectively.
 Plate b. P: normal preimmune sera, A: antisera against L-PHA, C: mung beans crude extracts, 5&7: 0.2M fraction, 6&8: 0.3M fraction.
 Plate c. same as plate b except A. A contains antisera against E-PHA.

Fig. 4—Immunological cross-reactions between several lectins as antigens and antisera raised against different lectins.

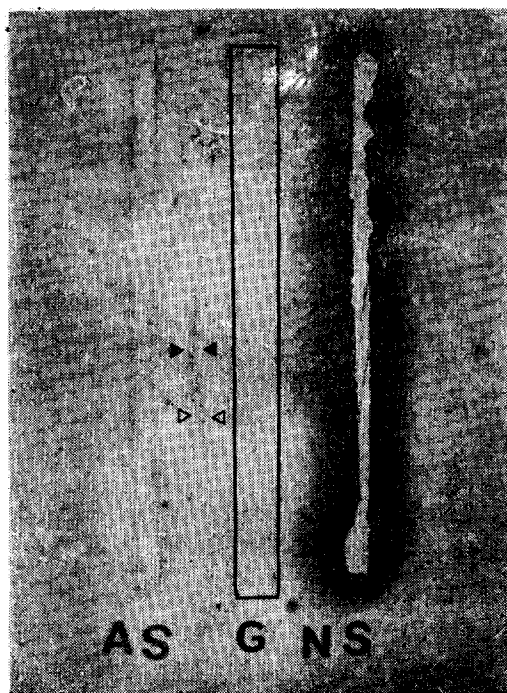


Fig. 5—Immunoelectrophoretic pattern of MBLA lectin.

left trough, AS, contains MBLA (0.2M fraction) antisera, right trough, NS, contains normal preimmune sera and central trough, G, contains electrophoresed gel of 0.2M fraction. Two precipitin bands are pointed as ▶◀ and ▷◁.

(MBLA)을 分離精製하였으며, 이것은 아무도 試圖한 바 없는 새로운 렉틴이다. Anionic exchanger에 의하여 綠豆의 抽出物(mung bean extract)로 부터 4종의 fraction을 얻었고, 이들의 렉틴活性, 酵素活性, 蛋白質定量, 電氣泳動에 의한 純度檢定, 免疫生化學的 研究 등을 수행한 결과 등을 종합해 볼때 그중 0.2M fraction을 MBLA라고 稱할 수 있었다.

MBLA와 L-PHA와는 相關性이 있으나 E-PHA와는 전혀 關係가 없는 物質임을 알 수 있었다.

본 연구는 1982년도 文敎部 學術研究助成費 支援에 의하여 이루어졌음.

文 獻

1. K.H. Jeune-Chung, Purification des isolectines du Haricot rouge, *Thesis, Université d'Orléans*, pp. 1-69 (1977).
2. I.E. Liener, Phytohemagglutinins, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27, 291 (1976).
3. 정시련, 전경희, 한국산 식물자원에서부터 새로운 렉틴성분의 분리정제, *한국생화학회지* 14, 199 (1981).
4. S.R. Chung, K.H. Jeune-Chung and K.A. Kim, Isolation, purification and characterization of phytohemagglutinating proteins from Korean natural products. *Arch. Pharm. Res.* 3, 31 (1980).

그림에서 처럼 preimmune sera와 각 fraction 사이에는 아무런 反應이 없으나 antisera와 ②인 0.1M fraction과는 3개, ③인 0.2M fraction과는 2개, ④인 0.3M fraction과는 1개의 precipitin band가 나타났으나 ①인 0.05M fraction과는 反應이 없었다. 이 결과는 MBLA인 0.2M fraction에는 2종류의 렉틴이 존재하고 이들은 다른 fraction에 함유된 렉틴과 相當히 同一性이 있는 것으로 나타났다.

Fig. 4, b는 본 研究室에서 分離精製中인 L-PHA¹⁰⁾로 면역시켜 얻은 antisera ⑥와 ⑦=0.2M, ⑧=0.3M fraction 사이에 反應이 나타나 한개씩의 precipitin band가 形成되었으며 면역학적으로 同質性의 것으로 생각된다. 그러나 Fig. 4, c는 (亦是 본 研究室에서 分離精製한 E-PHA⁸⁾렉틴으로 면역시켜 얻은 antisera를 ⑥에 넣은 것) ⑥와 ⑦, ⑧과 아무런 反應이 나타나지 않았다. 이로 미루어 MBLA와 E-PHA와는 전혀 關係가 없음이 立證되었다.

Fig. 5는 immunoelectrophoresis의 결과인바, 여기에서 다시 2개의 band가 確認되어 결국 MBLA에는 2종의 렉틴이 存在함을 確實히 해주고 있다.

結 論

本 研究에서는 綠豆로 부터 림프구 凝集性렉틴

5. 전경희, 정서련, PHA렉틴이 림프구 자극분열에 미치는 영향, 기초과학연구소보(영남대학교) **1**, 183 (1981).
6. S.R. Chung and K.H. Jeune-Chung, Lectins, *Proceedings of FAPA symposium*, (1982).
7. H. Lis and N. Sharon, Lectins, Their chemistry and application to immunology, in *The Antigens*, Sela, M. ed., Academic Press, pp.429-529 (1977).
8. 전경희, 채영훈, 서영아, 정서련, 콩과 식물에서 분리 정제한 렉틴의 생물물리화학적 연구(E-PHA렉틴), 한국생화학회지 **16**, 51(1983).
9. M. Monsigny, K.H. Jeune-Chung and Y. Perrodon, Separation and biological properties of *Phaseolus vulgaris* isolectins. *Biochimie* **60**, 1315 (1978).
10. 鄭時鍊 等, 未發表論文.
11. J. Howard, J. Kindinger and L.M. Shannon, Comparison of antigenic determinants among different seed lectins. *Arch. Biochem. Biophys.* **192**, 457 (1979).
12. C.N. Hankins, J. Kindinger and L.M. Shannon, Legume lectins. *Plant Physiol.* **64**, 107 (1979).
13. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagents. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
14. K.M.L. Agrawal and O.P. Bahl, α -Galactosidase, β -glucosidase, β -N-acetyl-glucosaminidase, and α -mannosidase from pinto beans. in *Methods in Enzymol.* **28**, pp.720-728 (1972).
15. B.J. Davis, Disc electrophoresis II. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404 (1964).
16. L.M. Shannon and S.E. Mills, Purification by immunoabsorption chromatography of the normal and a mutant form of the B2 subunit of *E. coli* tryptophan synthase. *Eur. J. Biochem.* **63**, 563 (1976).
17. J. Howard and L.M. Shannon, A rapid, quantitative and highly specific assay for carbohydrate-binding proteins. *Anal. Biochem.* **79**, 234 (1977).
18. O. Ouchterlony and L.A. Nilsson, Immunodiffusion and immunoelectrophoresis, in *Handbook of Experimental Immunology*, D.M. Weil ed., Blackwell Scientific Publications, pp.19.1-19.39 (1973).
19. C.N. Hankins and L.M. Shannon, The physical and enzymatic properties of a phytohemagglutinin from Mung beans. *J. Biol. Chem.* **253**, 7791 (1978).
20. C.N. Hankins, J. Kindinger and L.M. Shannon, Legume α -galactosidase which have hemagglutinin properties. *Plant Physiol.* **65**, 618 (1980).
21. E.D. Campillo and L.M. Shannon, An α -galactosidase with hemagglutinin properties from Soybean seeds. *Plant Physiol.* **69**, 628 (1982).
22. E. Paus and H.B. Steen, Mitogenic effect of α -mannoside on lymphocytes. *Nature* **272**, 452 (1978).
23. L.M. Shannon, Structural properties of legume lectins, 한국생화학회 춘계 학술발표회 특별강연요지 (1983).