

미꾸라지 렉틴 성분의 생화학적 특성

정시련 · 김장환 · 소명숙 · 김무경* · 현태금* · 전정희*

영남대학교 약학대학 · *이과대학

(Received September 27, 1991)

Biochemical Studies on Lectins from *Misgurnus* spp.

See Ryun Chung, Jang Hwan Kim, Myung Suk So, Moo Kyung Kim*,
Tae Geum Hyun* and Kyung Hee Jeune*

College of Pharmacy and *College of Science, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

Abstract—Two kinds of new lectin fractions (LOA-I, LOA-II) were obtained from loach (*Misgurnus* spp.) meat by 0.15 M NaCl extraction, salt fractionation, ion exchange and hydroxyapatite column chromatographies. On polyacrylamide gel electrophoresis, LOA-I exhibited one major and a few minor bands, but LOA-II exhibited three minor bands. The partially purified loach lectins agglutinated not only erythrocytes of human B and AB type, rabbit, dog, but also murine splenic lymphocytes. Agglutinability was relatively labile at various pH and stable at increasing temperature, but was not affected by tested several metal ions. By the sugar specificity test, D-glucosamine and methyl- β -galactopyranose inhibited agglutinating activity at a final concentration of 3 mM. The lectins contained relatively high amounts of aspartic acid, valine and leucine, but sulfur containing amino acids, cysteine, methionine and isoleucine were not determined. LOA-I, LOA-II lectins were nonmitogenic toward murine lymphocytes.

Keywords □ lectins, hemagglutinins, mitogen, toxic proteins, *Misgurnus* spp.

1891년 Ehrlich가 abrin과 ricin을 면역학적 연구에 응용한 이래 렉틴(lectins)들은 이 분야에 큰 관심의 대상이 되었으며,^{1,2)} 1908년 Landsteiner 등이 lentil lectin의 적혈구 특이성을, 1936년 Sumner와 Howell은 jack bean으로부터 분리한 Con A(Concanavalin A)의 적혈구 응집현상이 mannose와 glucose에 의해 저해됨을 보고함으로써³⁾ 이 물질군은 생명과학 분야에서 큰 관심을 끌게되었다.

렉틴은 세포응집, 림프구 자극 분열효과, lymphocytes와 macrophages의 cytotoxicity 및 target cell의 phagocytosis 등을 나타내며, 또한 당과의 특이적인 결합능력 등의 중요한 생물학적 특성 등으로 당화합물의 분리 및 구조연구, 세포막연구, 세포분리, microorganism의 확인 및 blood typing, drug-carrier 등으로 이용되며, 근래에는 cancer, immune disease 등 임상적 응용에 많은 연구가 행해지고 있다.⁴⁾

이 물질은 식물, 동물, 미생물 등 자연계에 널리 분포되어 있고, 생체내에서는 soluble lectin 또는 membrane lectin으로 존재하여^{5,6)} 영양물질의 수송 및 저장기능을 담당하고, 특히 하등척추동물 및 식물에 있어서는 척추동물의 항체와 유사한 작용을 하는 생체방어수단의 기능물질로 인정되고 있다.^{4,7-9)}

이러한 렉틴에 대한 대부분의 연구는 식물을 대상으로 수행되어 약 100여종의 식물 렉틴이 분리 정제되었으나, 동물 렉틴, 특히 척추동물을 대상으로한 연구는 소수에 불과한 현실이다. 고등척추동물의 경우, 피부, 생식세포 등 다양한 각 부위에서 렉틴성분이 분리, 정제, 연구되고 있으나, 하등척추동물의 경우에는 독사독의 thrombolectin¹⁰⁾과 같은 Ca^{2+} dependent인 carbohydrate binding lectin에 관한 연구 등이 있지만 아직은 저조한 형편이다.

본 연구에서는 국내에서 식용으로 이용되고 있어

자원이 풍부한 미꾸라지(*Misgurnus* spp.)를 대상으로 이 동물로부터 새로운 렉틴을 분리, 정제하고 이들의 생물물리화학 및 면역학적 특성을 알아보았다.

재료 및 방법

실험재료

기름종개과(Cobitidae)에 속하는 미꾸라지(*Misgurnus* spp.)를 시중 양식장에서 구입하여 실험재료로 사용하였다.

시약

DEAE-Sephadex A-50, CM-Sephadex C-50은 Pharmacia Fine Chemicals(Uppsala, Sweden)에서, Hydroxyapatite는 Japan Chemicals(Tokyo, Japan)에서, Tris(Tris-hydroxymethylaminoethane), bovine serum albumin, streptomycin, N-acetylneuraminic acid, D-mannose는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, Mo., USA)에서, [6-³H] thymidine(specific activity 2.0 Ci/mmol)은 Amersham International Plc.(Buckinghamshire, England)에서, EMEM(Eagles minimum essential medium), fetal bovine serum은 Gibco Lab.(Grand Island, N.Y., USA)에서, Freund's adjuvant는 Difco Lab.(Detroit, Mich. USA)에서, agarose는 Bio-Rad Lab.(Richmond, Ca., USA)에서 구입하여 사용하였으며, HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), trypsin, N-acetyl-D-glucosamine, D-fructose, L-fucose, D-galactose, D-glucose, lactose, sucrose 등 30여종의 당은 Wako, Hayashi, Nakarai, Junsei, Katayama, Fluka, Dojin 등의 특급시약을, 기타 일반시약은 시중에서 구입한 특급 내지 일반시약을 사용하였다.

기기

본 연구수행에 사용된 주된 기기는 다음과 같다.

High speed centrifuge : Hitachi(Hitachi koki Co. Ltd.), Japan. Fraction collector : LKB 2027 ULTRORAC II, Sweden. UV-monitor : LKB 2238 UVICORD, Sweden. CO₂-air incubator : Shel-Lab, USA. Spectrophotometer : Perkin Elmer, USA. Electrophoresis apparatus : LKB 2001, Vertical Electrophoresis system, Sweden. Freeze dryer : DURADRY(FTS System, Inc.), USA. Vacuum evaporator : IKA-WERK, Germany. Amino acid analyzer :

LKB 4150 ALPHA, Sweden. Scintillation spectrometer : MINAXI Tri-carb 4000, Packard, USA.

렉틴의 분리 및 정제

Scheme 1과 같이 행하였으며 모든 buffer에는 0.02 % sodium azide를 함유시켜 4°C에서 시행하였다. 살아있는 미꾸라지의 근육조직을 0.15 M NaCl로 추출하여 원심분리한 다음 상층액을 crude extract로 하였다. Crude extract를 ammonium sulfate로 0~90% 포화, 분리, 침전시킨 다음 원심분리하여 얻은 pellet을 투석시켜 이를 crude lectin으로 하였다. 이때 투석에 사용된 seamless cellulose tube(Visking Co.)는 1 mM EDTA 및 100 mM sodium bicarbonate를 함유한 용액에 끓여 활성화시킨 후 50% ethanol에 저장시켜둔 것을 사용하였다.

이온교환 크로마토그래피

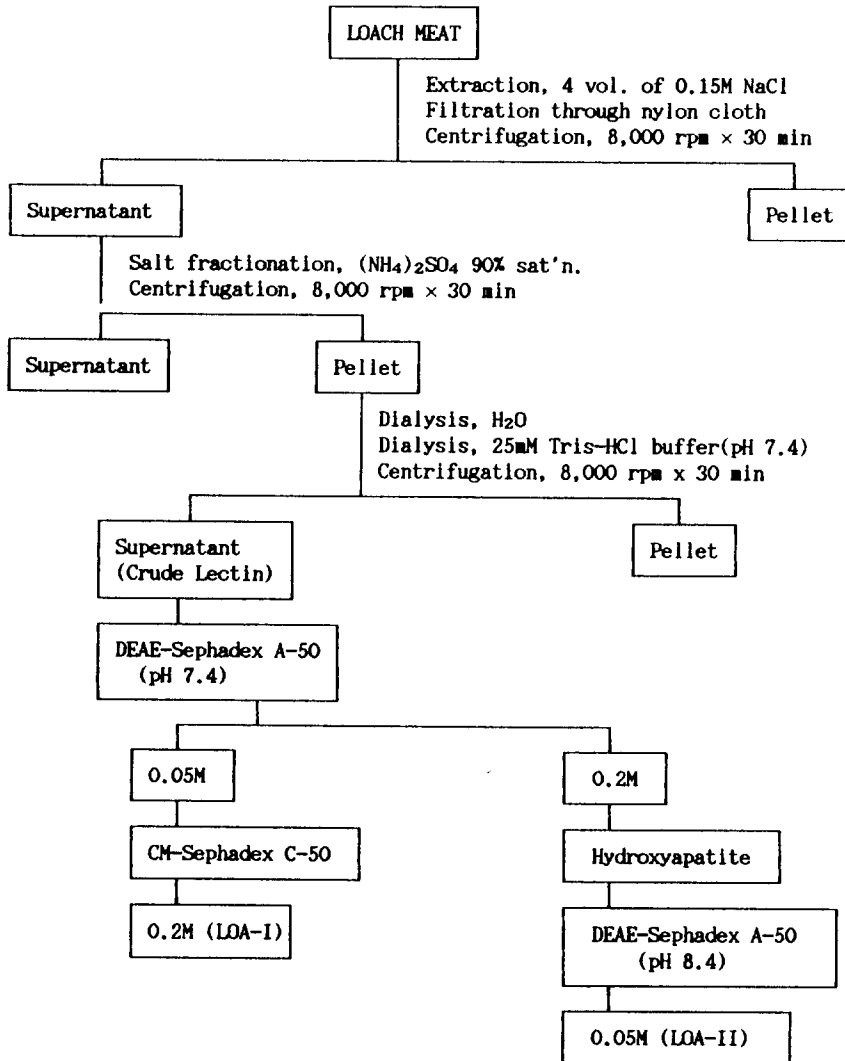
Crude lectin을 Jeune 등¹¹⁾의 방법에 따라 anion exchanger인 DEAE-Sephadex A-50 column chromatography 하였다. 즉, 25 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)로 미리 평형시켜둔 DEAE-Sephadex A-50 column(1.7×25 cm)에 crude lectin을 주입하고, 같은 buffer로 washing한 다음 NaCl gradient로 분리하였다. 이때 단백질 성분은 280 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였으며, 각 fraction의 lectin 활성은 사람 B형 및 토끼 적혈구 응집반응으로 확인하였다. lectin 활성을 나타낸 분획은 Amicon Pressure Cell and Diaflo Ultrafilters PM10(Cutoff : 10,000 dalton, Amicon Corp.)을 이용한 Ultrafiltration 방법으로 농축하였다.

CM-Sephadex C-50 Column Chromatography

DEAE-Sephadex A-50 Column에서 lectin 활성을 나타낸 첫번째 시료(0.05 M fraction)를 10 mM phosphate buffer(pH 6.5)에 투석시키고, 같은 buffer로 미리 평형시켜둔 CM-Sephadex C-50 column(1×27 cm)에 주입하여, 전향과 동일한 방법으로 확인, 농축시켰다.

Hydroxyapatite Column Chromatography

Hydroxyapatite column(2.6×30 cm)을 Kim 등¹²⁾의 방법으로 5 mM phosphate buffer(pH 6.8)로 미리 평형시킨 후, DEAE-Sephadex A-50 column에서 lectin 활성을 나타낸 두번째 시료(0.2 M fraction)를 주입하고, buffer 농도를 step-wise gradient로 증가시키면서 단백질 성분을 분리하여, 전향과 동일한 방법으로 확인한 후, 농축하였다.



Scheme 1—The purification procedure of loach lectin

DEAE-Sephadex A-50 Column Chromatography (pH 8.4)

Hydroxyapatite column에서 활성을 나타낸 시료 (0.3 M fraction)를 pH 8.4로 한, DEAE-Sephadex A-50 column(1×25 cm)에서 앞의 이온교환 크로마토 그래피 항과 동일한 방법으로 분리, 확인, 농축하였다. 이상의 정제과정마다 렉틴의 적혈구 및 림프구 응집력 (렉틴활성)은 microtiter plate(Nunc Co.)에 시료 50 μ 를 2배수 희석한 후, 각종 동물의 적혈구를 3% 용액으로 만들어 사용하였고, 림프구는 Chung 등¹³⁾의

방법에 따라 생쥐의 비장(spleen)으로부터 분리하여 5×10^7 cell/ml로 조제하여 사용하였다.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis(PAGE)에 의한 순도검정

PAGE는 Davis¹⁴⁾의 방법으로 pH 8.3에서 7.5% polyacrylamide gel을 이용하여 실시하였다. 단백질 성분은 25 mA/slab의 전류로 3시간 동안 분리시켰으며, tracking dye는 0.001% bromophenol blue를 사용하였고, 단백질 부위는 0.1% coomassie brilliant blue R-250 sol'n(10% acetic acid : 95% ethanol contain-

ning 0.25% coomassie brilliant blue R-250=1:1) 으로 고정시켜 염색하였다.

렉틴활성에 미치는 pH, 온도, 금속이온의 영향

Chung 등^{15,16)}의 방법으로 crude lectin을 pH 2~11 사이의 여러가지 buffer 4°C에서 24시간 투석시킨 후, 남아있는 lectin 활성을 조사하였다. 이때 사용한 buffer는 25 mM KCl-HCl(pH 2.30), 25 mM glycine-HCl(pH 3.05), 25 mM citrate(pH 4.17, 5.32), 25 mM phosphate(pH 6.20), 25 mM Tris-HCl(pH 7.40, 8.80), 25 mM carbonate buffer(pH 9.61, 10.59)였다. Crude lectin을 10~90°C 범위의 온도에서 30분간 incubation시킨 후, 즉시 얼음으로 식힌 다음 남아있는 lectin 활성을 조사하였다.

BaCl₂, CaCl₂, Cu(SO₄), FeCl₂, FeCl₃, HgCl₂, MgCl₂, MnCl₂, ZnCl₂ 등과 EDTA를 20 mM로 제조하여 각 50 μl를 2배수로 희석하고, 각 Well에 4HU의 crude lectin 용액 50 μl를 가하여 1시간 방치한 후, 3% 적혈구용액 50 μl를 가하여 세포응집력의 저해효과를 Jeune 등¹¹⁾의 방법으로 조사하였다.

렉틴의 당 특이성

당에 의한 적혈구 응집력 저해효과는 Chung 등^{15,16)}과 Iglesias 등¹⁷⁾의 방법을 응용하여 실시하였다. 즉, 35종의 당 용액(200 mM, 30 μl)을 microtiter plate에서 2배수 희석한 후, 각 well에 4HU의 응집력을 나타내는 lectin 용액 30 μl를 가하고, trypsin 처리한 3% 사람 적혈구 용액 30 μl를 가하는 방법으로 수행하였다. 이때 당에 의한 적혈구 응집력 저해효과는 적혈구 응집력을 완전히 저해할 수 있는 최저 당 농도로 표시하였다.

아미노산 분석

Crude lectin, DEAE-Sephadex A-50(pH 7.4) 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M, Hydroxyapatite 0.3 M, DEAE-Sephadex A-50(pH 8.0) 0.05 M과 CM-Sephadex C-50 0.2 M 분획 각 2 mg을 질소가스를 채워 봉한 tube에서 115°C로 22시간 동안 가수분해시켜 여과후 3.5 N NaOH 1 ml로 중화한 다음, 증류수로 세척하여 vacuum evaporator로 건조시켰다. 이를 Suh 등¹⁸⁾의 방법에 따라 loading buffer(0.2 M sodium citrate buffer, pH 2.2) 1 ml에 녹여 Millipore(0.2 μm)를 통과시킨 후, amino acid analyzer로 분석하였다.

단백질 및 당의 함량

단백질 함량은 Lowry¹⁹⁾의 방법에 따라 bovine se-

rum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다. 당함량은 glucose를 표준품으로 하여 phenolsulfuric acid method²⁰⁾로 측정하였다.

면역화학적 시험

실험동물 면역은 Chung¹⁶⁾ 및 Howard와 Shannon²¹⁾ 방법으로 실시하였다. 시료(1 mg/1 ml)를 0.15 M NaCl에 투석시킨 후, Millipore(50 μm)를 통과시키고 이를 Freund's adjuvant complete 또는 incomplete와 현탁액을 만든 다음, 체중 2 kg의 건강한 집토끼의 lymphnode에 주사하였다. Antiserum은 Chung 등^{16,22)}의 방법에 따라 면역 후 27일째 귀의 정맥으로부터 채취한 혈액을 상온에 1시간 방치한 후 3,600 rpm으로 30분간 원심분리하여 얻었다. 모든 immunoassay는 1% agarose gel에서 실시하였으며 gel 용액은 1% agarose를 Tris-barbiturate buffer(24.3 mM diethylbarbituric acid, 73.2 mM Tris, 0.5 mM Ca-lactose, 2 mM sodium azide, pH 8.6) 내에서 가열하면서 녹여 준비하였고, glass plate는 0.1 N HCl, soap, 70% alcohol의 순으로 씻어서 사용하였다.

Immunodiffusion은 Ouchterlony와 Nilsson²³⁾의 방법으로 실시하였다. 먼저 12 ml의 1% agarose plate를 만든 후, template, well puncher(LKB) 및 aspirator를 이용하여 well을 만들고(d=3.5 mm), 중앙의 well에는 antiserum(10~20 μl)을, 바깥 well에는 각종 렉틴시료(antigen)를 넣은 다음, humidity chamber(LKB) 내에서 24시간 확산반응시켰다. 그 후 미반응 antigen 및 antibody는 0.15 M NaCl로 씻어버린 다음(24~48시간), 0.5% coomassie brilliant blue R-250 sol'n(0.5% coomassie brilliant blue R-250 in 45% ethanol and 10% acetic acid)로 염색시키고, 45% ethanol : acetic acid(9 : 2) 용액으로 탈색시켰다.

Immunoelectrophoresis는 Graber와 William(Osterman²⁴⁾)의 방법으로 실시하였다. 먼저 전향과 같은 방법으로 gel plate를 만들고, template, puncher와 aspirator를 이용하여 well을 만든 후, 길다란 홈(trough)의 위치를 scalpel로 표시하였다. well에 각종 antigen(10~15 μl)을 넣고 10°C에서 10 V/cm로 90 분간 전기영동 후, 길다란 홈의 gel을 제거하고 antibody(100 μl)를 넣은 다음, 상온에서 전향과 같은 방법으로 반응시키고, 세척, 염색, 탈색시켰다.

Crossed immunoelectrophoresis는 Clarke와 Freeman(Osterman²⁴⁾)의 방법을 응용하여 2차원 방법으

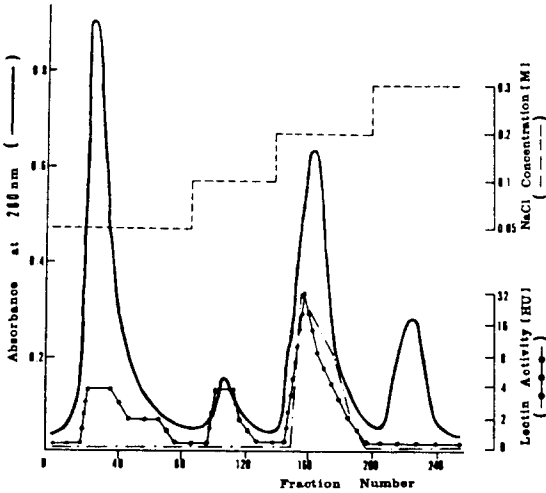


Fig. 1—Elution profiles of loach lectin on DEAE-Sephadex A-50 column, 1.7×25 cm; eluent, 25 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4) with a stepwise salt gradient; flow rate, 60 ml/h

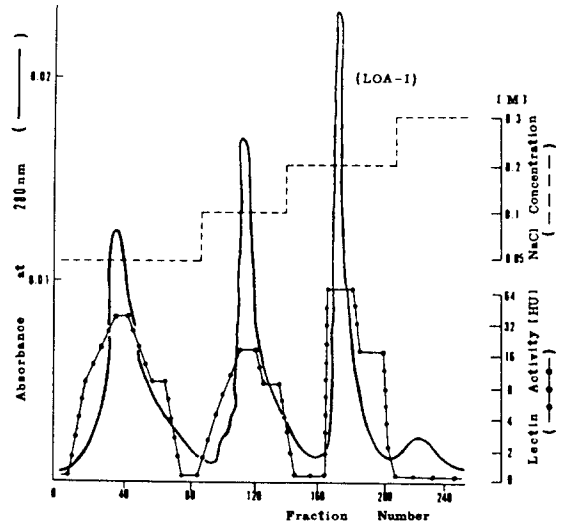


Fig. 2—Elution profiles of 0.05 M fraction from DEAE-Sephadex A-50 column on the CM-Sephadex column, 1×27 cm; eluent, 10 mM phosphate buffer(pH 6.5) with a stepwise salt gradient; flow rate, 24 ml/h

로 실시하였다. 먼저 gel plate에 전향과 같은 방법으로 well을 만들고 antigen(20 μ)을 넣은 다음, 10℃에서 10 V/cm로 3.5시간 동안 전기영동시켰다. 1차 전기영동한 gel을 90° 회전시켜 antiserum을 함유한 gel plate(1% agarose sol'n을 55℃에서 900 μ의 antiserum과 섞어 즉시 gel plate를 만든 것)내로 10℃에서 2 V/cm로 24시간 동안 2차 전기영동하였다. 그후 확산, 세척, 염색, 탈색은 전향과 같은 방법으로 실시하였다.

림프구 자극분열효과

Pandolfino 등²⁵⁾의 방법을 응용하여 LOA-I과 LOA-II 렉틴의 백취 림프구에 대한 mitogenic activity를 측정하였다. 실험에 사용한 렉틴용액은 0.15 M NaCl 용액에 투석시킨 후 Millipore(50 μm) 통과시켜 사용하였다. 백취 림프구는 Chung 등¹³⁾과 같은 방법으로 분리, 세척한 후, 2×10⁶ cells/ml로 조제하였고, medium은 20 mM HEPES와 100 μg/ml streptomycin을 함유한 EMEM(pH 7.2)을 사용하였다. 림프구 배양은 U-shaped microtiter plate(Nunc. Co.)에서 복수로 실시하였다. 즉 렉틴용액(100 μ)을 동량의 medium으로 2-배수 희석한 후, 동량의 lymphocytes 및 20% fetal bovine serum(100 μ)을 각 well에 가하였다. 이를 CO₂-air incubator(5% CO₂/95% humi-

dified air)에서 37℃로 48시간 배양시킨 후, 0.5 μCi의 [6-³H] thymidine(10 μ)을 각 well에 넣고 24시간 더 배양시켰다. 배양이 끝난 lymphocytes는 polypylene filter paper GF/C(1.2 μm)상에 여과수집하고, 0.15 M NaCl, 5% TCA, methanol 용액으로 세척, 건조 후 이를 scintillation cocktail 용액(Pico-FLUOR 15, Packard)에 넣어 Scintillation Counter로 측정하였다.

결과 및 고찰

렉틴의 분리 정제

Crude lectin을 anionic exchanger인 DEAE-Sephadex A-50 column(pH 7.4)으로 chromatography 하여 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다. 25 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)를 NaCl gradient로 유출시켰을 때, 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M 분획에서 토끼 적혈구용액에 렉틴활성이 나타났으며 human blood B형에는 0.2 M에서만 활성이 나타났다. 따라서 토끼 적혈구와 human blood B형 모두에서 활성이 나타난 0.2 M 분획과 rabbit 적혈구 용액에서만 활성이 나타난 0.05 M 분

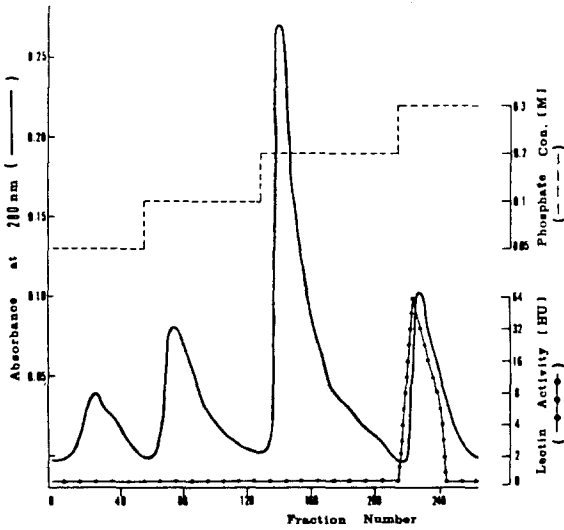


Fig. 3—Elution profiles of 0.2 M fraction from DEAE-Sephadex A-50 column on the hydroxyapatite column, 2.6×30 cm; eluent, 5 mM phosphate buffer(pH 6.8) with a stepwise phosphate concentration; flow rate, 18 ml/h

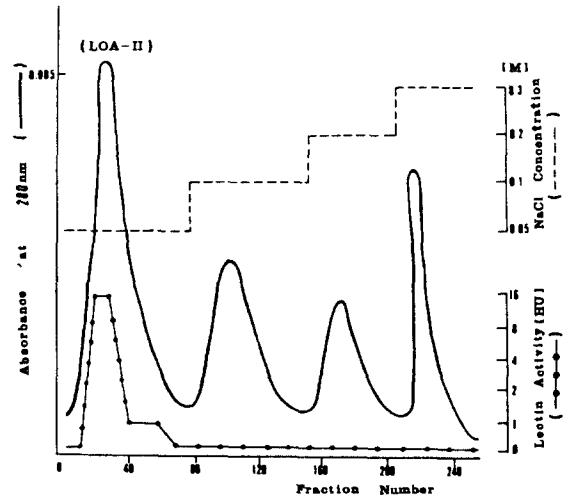


Fig. 4—Elution profiles of 0.3 M fraction from hydroxyapatite chromatography on the DEAE-Sephadex A-50 column, 1×25 cm; eluent, 25 mM Tris-HCl buffer(pH 8.4) with a stepwise salt gradient; flow rate, 30 ml/h

획을 수집, 농축하였다. Anion exchange column chromatography인 DEAE-Sephadex A-50 column을 통과시켰을 때, lectin 활성을 나타낸 0.05 M fraction을 cation exchanger인 CM-Sephadex C-50 column으로 더욱 정제하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 즉, 10 mM phosphate buffer(pH 6.5)에 NaCl gradient로 유출시켰을 때, 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M 분획에서 고르게 렉틴활성이 나타났다. 그러나 0.2 M 분획은 단백질의 함량이 많고 활성이 높으며 다른 분획보다 전기영동결과 순수하였기에 LOA-I이라 하였다.

DEAE-Sephadex A-50 column chromatography에서 얻은 또 다른 시료(0.2 M)를 hydroxyapatite column으로 더욱 정제하여 Fig. 3과 같은 결과를 얻었다. Phosphate buffer(pH 6.8)의 농도를 단계적으로 증가시켰을 때, 0.3 M 분획에서만 렉틴이 유출되었다. 이 분획을 더 정제할 목적으로 buffer의 pH를 달리 하여 DEAE-Sephadex A-50 column(pH 8.4)을 재차 통과시킨 결과는 Fig. 4와 같았다. 즉, 25 mM Tris-HCl buffer(pH 8.4)에서 NaCl gradient로 유출시켰을 때, 0.05 M에서 렉틴활성이 나타났으며 이를 LOA-II라 하였다.

정제도 및 회수율

Crude extract를 기준으로 렉틴의 정제도와 회수율을 검토한 바, Table I과 같은 결과로 나타났다. Extract로부터 추출된 crude lectin은 5.21배 정제되었고 67.9% 회수되었으며, crude lectin을 DEAE-Sephadex A-50 column으로 유출시킨 결과, 0.05 M 분획은 13.75배 정제되고, 35.4% 회수되었으며, 0.2 M 분획은 12.7배 정제되고 38.9% 회수되었다.

또한 DEAE 0.05 M 분획을 정제한 LOA-I은 78.8배 정제되고 9.54% 회수되었으며, DEAE 0.2 M 분획을 hydroxyapatite column으로 정제하여 렉틴활성을 나타낸 0.3 M 분획은 112.95배 정제되고 25.8% 회수되었고, 이를 다시 정제한 LOA-II는 262.8배 정제되고 7.95% 회수되었다.

렉틴의 순도검정

정제 단계마다에서 얻은 각 분획을 PAGE한 결과는 Fig. 5와 같았다. Crude lectin은 다수의 band를 나타냈으나 정제단계에 따라 band의 수가 줄어들어오며 점차 정제되어감을 알 수 있었다. DEAE 0.05 M 분획을 정제시킨 LOA-I은 1개의 major band와 소수의 minor band가 나타났고 DEAE 0.2 M fraction을 정제시킨 정제도가 가장 높은 LOA-II의 경우에는 3개의

Table I—Purification of lectins from the loach meat

	Total protein [mg]	Total activity [units × 10 ⁻³]	specific activity [units/mg]	purification [fold]	Recovery [%]
Extraction	21942.3	4864	221.67	1	100
Salt fractionation	2859.64	3302.4	1154.83	5.21	67.89
DEAE-Sephadex A-50 column (pH 7.4) 0.05 M fraction	564.38	1720	3047.59	13.75	35.36
CM-Sephadex C-50 column 0.2 M fraction (LOA-I)	26.56	464	17467.88	78.81	9.54
DEAE-Sephadex A-50 column (pH 7.4) 0.2 M fraction	674.17	1892	2806.41	12.66	38.90
Hydroxyapatite column 0.3 M fraction	50.35	1260.8	25038.23	112.95	25.92
DEAE-Sephadex A-50 column (pH 8.4) 0.05 M fraction(LOA-II)	6.64	386.88	58256.29	262.81	7.95

***Loach meat; 1.2 kg

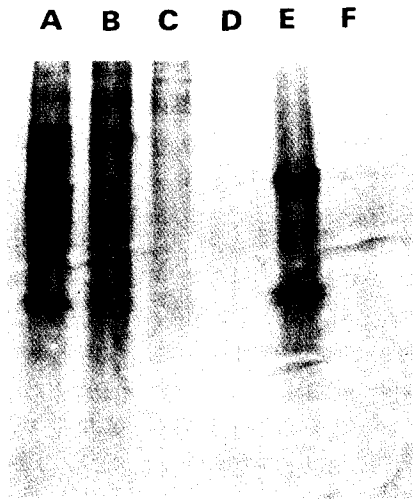


Fig. 5—Polyacrylamide gel electrophoresis patterns of loach lectins

- A: crude lectin
- B: 0.2 M fraction of DEAE-Sephadex A-50(pH 7.4)
- C: 0.3 M fraction of hydroxyapatite
- D: LOA-II
- E: 0.05 M fraction of DEAE-Sephadex A-50 (pH 7.4)
- F: LOA-I

minor band가 나타났다.

렉틴 활성

부분정제된 crude lectin에 대하여 사람 및 각종 동물의 적혈구와 림프구에 대한 렉틴 활성도를 조사한

Table II—Specificity of loach lectin in agglutination with various mammal's erythrocytes and mouse splenic lymphocytes

	Cell Agglutinating Activity [HU]*	
	untreated	trypsinized
Human A type	0	0
Human B type	8	8
Human AB type	2	4
Human O type	0	0
Rabbit	256	256
Mouse	0	0
Rat	0	0
Dog	2	—
Chicken	0	—
Mouse splenic lymphocyte	16	—

*A unit is the reciprocal of dilution end point with agglutinating cells.

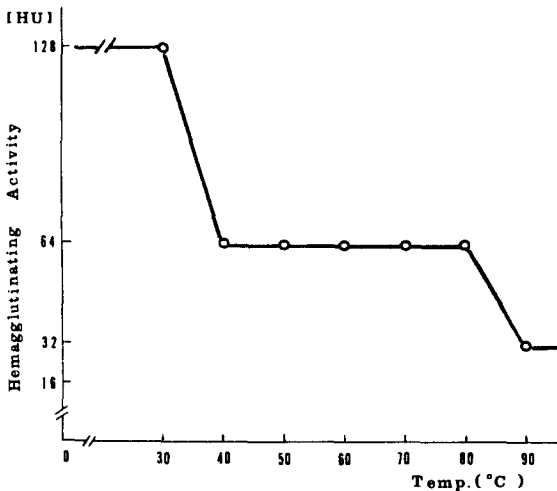
결과는 Table II와 같았다. 사람 A형과 O형, 생쥐, 쥐 그리고 닭의 적혈구와는 응집현상을 나타내지 않았고, 사람 B형과 AB형, 개의 적혈구에서는 약한 응집현상이, 토끼에서는 아주 강한 응집현상이 일어났고, 림프구에서도 응집현상을 나타내었다. 또한 trypsin 처리를 하였을 경우에도 별 차이가 나타나지 않았다.

pH의 영향—pH에 따른 렉틴활성은 Table III과 같다. 산성에서는 응집효과가 상당히 불안정하였으나, 중성 및 염기성에서는 강한 응집역가를 나타내었다.

온도의 영향—온도변화에 따른 안정성은 Fig. 6과 같았다. 30℃까지가 가장 활성이 높고, 40℃에서 약간의 감소를 보였으나, 90℃에서도 lectin의 활성이

Table III—Effect of pH on hemagglutinating activity of loach lectin

Buffer	pH	Hemagglutinating Activity [HU]
25 mM KCl-HCl Buffer	2.30	32
25 mM Glycine-HCl Buffer	3.05	16
25 mM Citrate Buffer	4.17	32
25 mM Citrate Buffer	5.32	16
25 mM Phosphate Buffer	6.20	64
25 mM Tris-HCl Buffer	7.40	128
25 mM Tris-HCl Buffer	8.80	64
25 mM Carbonate Buffer	9.61	256
25 mM Carbonate Buffer	10.59	64

**Fig. 6**—Effect of temperature on hemagglutinating activity of loach lectin

남아있는 것으로 보아 온도변화에 비교적 안정한 것으로 나타났다. 또한 -20°C 에서 냉동 보존하였을 때 1년 이상 활성이 소실되지 않았다.

금속이온의 영향— Ba^{++} , Ca^{++} , Cu^{++} , Fe^{++} , Hg^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} 등과 EDTA를 10 mM 농도에서 0.08 mM까지의 범위에서 시험한 결과, 활성에는 금속이온이 아무런 영향을 미치지 못했다.

당 특이성

35종중 18종의 당에서 저해현상을 보였으며, 그 중 특히 D-glucosamine과 methy- β -galactopyranose가 낮은 농도인 3 mM에서, melibiose는 6 mM, cellobiose, glucose, ribose, sucrose 등이 25 mM의 비교적 낮은 농도에서 저해현상을 보여 당 특이성으로 나타

Table IV—Inhibition of loach lectin activity for human B erythrocytes by sugars

Sugar	Minimum concentration [mM] by sugars completely inhibiting 4 hemagglutinating doses*
N-acetyl galactose	50
cellobiose	25
L-fucose	50
D-glucose	100
L-glucose	25
D-glucosamine	3
lactulose	100
maltose	50
melezitose	100
melibiose	6
methy(α) galactopyranose	25
methy(β) galactopyranose	3
methy(α) glucopyranose	50
D-raffinose	50
L-rhamnose	50
D-ribose	25
sucrose	25
D-trehalose	50

*Inhibition tests were performed with DEAE 0.2 M fraction and 3% suspension of human B erythrocytes. Tested monosaccharides; N-acetyl glucose, D-arabinose, L-arabinose, D-fucose, fructose, galactose, D-galacturonic acid, D-glucuronic acid, lactobionic acid, lactose, D-lyxose, L-lyxose, mannose, methy(β) glucopyranose, L-sorbose, D-xylose, L-xylose

났다(Table IV).

아미노산 조성과 함량

각 정제단계에서 얻은 분획들의 아미노산을 분석하여 Table V와 같은 결과를 얻었다. 각 정제단계별로 비교해 볼 때, 각 분획은 대체로 aspartic acid와 valine 및 leucine 등의 함량이 많았으며, cystine과 methionine 및 isoleucine 등은 그 함량이 극히 미량이거나 확인할 수 없었다. 또한 마지막 정제단계인 LOA-II의 경우, 아미노산 함량은 serine의 량과 glutamic acid의 함량이 증가하였으며, 존재하지 않는 것도 다수 나타났다.

당함량

Phenolsulfuric acid method로 loach lectin의 당 함량을 알아본 결과, LOA-I, LOA-II는 당을 함유하지 않은 순수 단백질로 밝혀졌다.

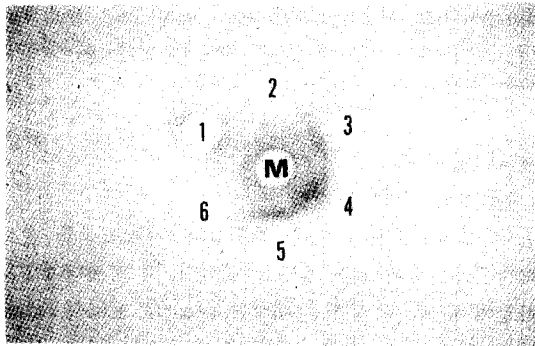
Table V—Amino acid analysis of loach lectins

(amount %)

No. Amino Acid	Crude Lectin	DEAE (pH 7.4)			Hydroxyapatite	LOA-I	LOA-II
		0.05 M	0.1 M	0.2 M	0.3 M		
1. Aspartic acid	13.24	14.68	18.18	23.88	31.53	2.48	0
2. Threonine	5.67	5.83	0	0	5.04	ND	0
3. Serine	4.46	4.82	0	0	ND	ND	20.38
4. Glutamic acid	3.43	5.97	5.49	4.81	ND	ND	19.63
5. Proline	4.42	3.76	3.54	3.28	ND	ND	ND
6. Glycine	11.48	16.20	0	0	ND	ND	0
7. Alanine	10.33	0	0	0	8.03	6.15	0
8. Cystine	ND	ND	0	ND	ND	ND	ND
9. Valine	9.18	10.84	16.61	17.85	ND	2.97	23.24
10. Methionine	ND	ND	2.69	0.45	1.20	ND	ND
11. Isoleucine	5.92	7.20	0	0	ND	ND	0
12. Leucine	9.98	12.07	24.03	26.70	0.008	4.95	22.11
13. Tyrosine	ND	ND	7.17	5.79	ND	ND	5.14
14. Phenylalanine	5.36	10.00	12.73	10.29	0	ND	5.80
15. Histidine	4.01	4.89	0	0	ND	8.69	0
16. Lysine	10.25	0.003	0	0	5.25	1.28	3.72
17. Arginine	2.25	3.45	9.57	6.95	48.13	73.48	ND
Total amino acid amount	119.585	157.229	320.011	124.978	72.91	53.535	20.169

Total amino acid amount per 40 μ l sample (2 mg protein/ml) (nmol)

ND; Not Determined

**Fig. 7**—Double immunodiffusion of lectin

Well M; antiserum

Well 1; crude loach lectin

Well 2, 3 and 4; 0.05 M, 0.1 M and 0.2 M fraction of DEAE-Sephadex A-50 column(pH 7.4), respectively

Well 5; 0.3 M fraction of hydroxyapatite column

Well 6; 0.05 M fraction of DEAE-Sephadex A-50 column (pH 8.4)

면역화학적 시험

Immunodiffusion—DEAE-Sephadex A-50 column (pH 7.4)의 부분정제된 0.2 M 분획을 토끼에 면역시켜 얻은 antiserum으로 immunodiffusion을 실시하여 Fig. 7과 같은 결과를 얻었다. 중앙 well에는 antiserum을 넣고, 바깥 well에는 정제 단계별 분획을 넣고 immunodiffusion하였다. 그 결과 crude loach lectin 및 DEAE-Sephadex A-50의 0.2 M fraction은 다수의 precipitin band를 형성하였고, DEAE 0.1 M과 0.2 M fraction 및 hydroxyapatite 0.3 M fraction이 서로 이어지는 하나의 precipitin band를 형성하는 것으로 보아 DEAE 0.1 M과 0.2 M fraction의 두 lectin은 면역학적으로 유사함을 나타냈고, 또한 점점 정제되어감을 알 수 있었다. 또한 DEAE 0.05 M fraction과는 연결되는 precipitin band를 형성하지 않는 것으로 보아 서로 유사성이 없는 것을 알 수 있었다.

Immunoelectrophoresis—Loach lectins 각 분획의 순도를 확인하기 위해 immunoelectrophoresis를 실

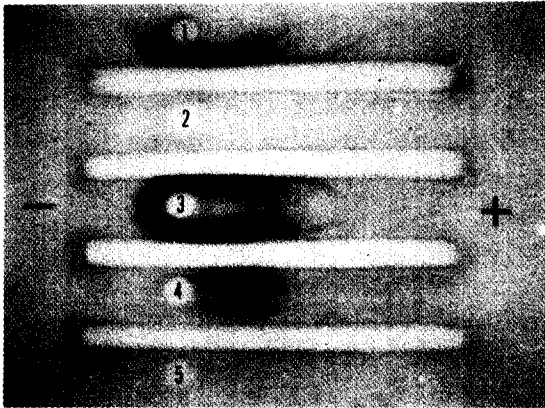


Fig. 8—Immunoelectrophoresis of loach lectin
Antiserum was placed in four troughs
Well 1; crude loach lectin
Well 2; and 3; 0.05 M and 0.2 M fraction of DEAE-Sephadex A-50 column(pH 7.4), respectively
Well 4; 0.3 M fraction of hydroxyapatite column
Well 5; 0.05 M fraction of DEAE-Sephadex A-50 column (pH 8.4)

시하여 Fig.8과 같은 결과를 얻었다. 4개의 trough에는 100 μ l의 antiserum을 넣고, 1번 well에는 crude lectin을, 2번에는 첫 이온교환 크로마토그래피 0.05 M 분획, 3번엔 0.2 M, 4번에는 hydroxyapatite column 정제분획, 그리고 5번 well에는 LOA-II를 넣어 electrophoresis 및 diffusion을 시행하였을 때, crude loach lectin ①과 DEAE 0.2 M 분획 ③은 다수의 band를, DEAE 0.05 M 분획 ②과 hydroxyapatite 0.3 M ④, 그리고 LOA-II ⑤는 하나의 band를 형성하였다. 이 결과로 봐서 렉틴은 효과적으로 정제되었음을 알 수 있었다.

Crossed immunoelectrophoresis—Crude loach lectin, DEAE-Sephadex A-50의 0.2 M 분획 및 hydroxyapatite 0.3 M 분획의 정제 정도를 비교하기 위해 면역확산과 전기영동을 조합한 이 실험결과, Fig. 9와 같이 점차 정제되었음을 확인할 수 있었다. hydroxyapatite 0.3 M 분획에서는 연결되는 하나의 curve를 형성하였으므로 하나의 물질임이 확인되었다.

림프구 자극분열 효과

PHA lectin이 lymphocytes에 대한 mitogen으로 보고된 이래,²⁶⁾ WGA, Con A 등 많은 lectin의 mito-

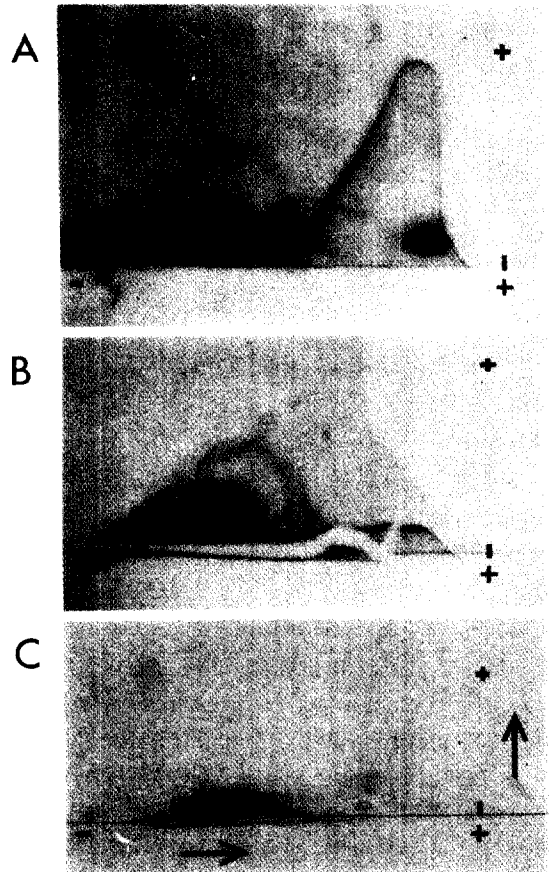


Fig. 9—Crossed immunoelectrophoresis of loach lectin
A: crude loach lectin
B: 0.2 M fraction of DEAE-Sephadex A-50 column(pH 7.4)
C: 0.3 M fraction of hydroxyapatite column
1st dimension, anode to the right, 10v/cm, 3.5 hrs.
2nd dimension, anode to the top, 2v/cm, overnight, 10 $^{\circ}$ C

genic activity가 보고되었다. Mitogen으로 작용하는 물질로는 렉틴외에 antigen 등 여러가지 물질이 있으나, antigen은 특정 lymphocyte clones을 자극분열시키는 반면, 렉틴은 항원특이성에 상관없이 다수의 lymphocyte clones을 자극 분열시킨다.⁴⁾ 그러므로 렉틴의 polyclonal stimulation은 lymphocytes의 분열과정 연구에 중요한 역할을 할 뿐 아니라, 분열된 lymphocytes에서 생성된 interleukin-2(IL-2) 및 *r*-interferon 등과 같은 lymphokines 이용면에서도 중요

한 역할을 한다. 본 실험결과 미꾸라지 렉틴은 murine splenic lymphocytes에 대해서는 mitogen으로서의 역할이 전혀없는 것으로 나타났다. 그러나 앞으로 이 렉틴이 사람의 림프구에 대한 mitogenicity가 어떻게 나타나는지에 대해서 지속적인 연구를 필요로 하고 있다.

결 론

미꾸라지(*Misgurnus* spp.)로부터 새로운 렉틴을 분리, 정제하고, 이에대한 몇가지 특성을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 동물조직을 0.15 M 생리식염수 추출, salt fractionation, anion 및 cation exchange column chromatography, hydroxyapatite column chromatography 등을 이용하여, 렉틴을 분리 정제하여, LOA-I, LOA-II를 얻었으며, 이들은 crude extract를 기준으로 각각 78.8배, 262.8배 정제되고 9.54%, 7.95% 회수되었다.

2. Polyacrylamide gel electrophoresis에서 LOA-I은 1개의 major band와 소수의 minor band가 나타나고, LOA-II는 3개의 minor band가 나타났다. 또 면역확산, 면역 전기영동들의 결과에서도 이들의 정제가 효과적임을 알 수 있었다. 따라서 이 두 렉틴은 비교적 순수하게 정제된 것을 알 수 있었다.

3. 렉틴은 사람, 토끼, 개의 적혈구와 생쥐의 림프구에 응집반응이 나타났으며, 활성은 pH의 변화에는 산성에서는 불안정하나 중성 및 염기성에서는 강한 응집역가를 나타냈고, 온도의 변화에는 30°C 이후에 활성이 약간 감소되었으나 90°C까지 활성이 남아있는 것으로 보아 안정하며, 수중의 금속이온에는 아무런 영향을 받지 않았다.

4. 적혈구 응집반응은 D-glucosamine과 methy- β -galactopyranose의 경우 낮은 농도인 3 mM 농도에서 저해되어 당 특이성을 나타내었다.

5. 대체로 aspartic acid와 valine 및 leucine 등의 함량이 많았고, cystine과 methionine 및 isoleucine 등의 함량은 극히 미량이거나 확인할 수 없었다.

6. 당을 함유하지 않은 순수한 단백질이었다.

7. 면역화학시험결과 이들 렉틴은 구조나 기능상 동질성이 있는 것으로 밝혀졌다.

8. 이 렉틴은 백취 림프구에 대하여는 mitogen이 아닌 것으로 밝혀졌다.

감사의 말씀

본 연구는 1990년도 한국과학재단의 일반기초연구비(KOSEF 901-0408-039-1) 지원에 의해 수행되었기에 감사드리는 바입니다.

문 헌

- 1) Sharon, N. and Lis, H. Lectins: Cell agglutinating and sugar-specific proteins, *Science*, **177**, 949-959 (1972).
- 2) Olsnes, S. and Pihl, A. Toxic lectins and related proteins, in *Molecular action of toxins and viruses*, Cohen and Von Heyningen ed., Elsevier Biomedical Press, 55-105(1982).
- 3) Lis, H. and Sharon, N. Lectins: their chemistry and application to immunology, in *The Antigens*, Sela, M. ed., Academic press, New York, 429-529 (1977).
- 4) Liener, I.E., Sharon, N. and Goldstein, I.J. in *The Lectins: Properties, and Functions and Applications in Biology and Medicine*, Academic Press, New York, 1-600(1986).
- 5) Monsigny, M., Kieda, C. and Roche, A.C. Membrane lectins, *Biol., Cellulaire*, **36**, 289-300(1970).
- 6) Barondes, S.H. Soluble Lectins: A new class of extracellular proteins, *Science*, **223**, 1259-1264(1984).
- 7) Vasta, G.R. and Marchalonis, J.J. Humoral recognition factors in the arthropoda, *Amer. Zool.*, **23**, 157-171(1983).
- 8) Chung, S.R., Jeune, K.H. and Suh, Y.A. Lectins from the Ocean. *Proceedings of the 2nd Symposium on the Biochemical Methodology for the Research and Development of the Bioactive Substances*. The Biochemical Society of Korea, 349-371 (1991).
- 9) Chung, S.R., So, M.S. and Jeune, K.H. Bioactive marine natural substance, lectins. *Proceedings of the International Cogress of New Drug Development* The Pharmaceutical Society of Korea, in press (1991).
- 10) Gartner, T.K. and Ogilvie, M.L. Isolation and Characterization of three Ca^{2+} -dependent-galactoside

- specific lectins from snake venoms, *Biochem. J.*, **224**, 301-307(1984).
- 11) Jeune, K.H., Kim, M.K. and Chung, S.R. Studies on Lectins from Korean Higher Fungi (III). Proc. Int. Sym. on New Drug Development from Natural Products, *Kor. Soc. Pharmacog.*, 32-44(1989).
 - 12) Kim, J.H., Chung, S.R. and Jeune, K.H. Lectins from Marine Shells, IX. Purification and Carbohydrates Specificities of a Lectin, MLA-1, from the Hemolymph of *Meretrix lusoria*. *Korean Biochem. J.*, **23**, 328-334(1990).
 - 13) Chung, S.R., and Hong, S.S. and Jeung-Chung, K. H. Isolation and purification of lectin from *Phaseolus radiatus*, *Yakhak Hoeji (J. Pharm. Soc. Kor.)*, **27**, 221-227(1983).
 - 14) Davis, B.J. Disc electrophoresis II, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427(1964).
 - 15) Chung, S.R., Son, K.S., So, M.S. and Jeune-Chung, K.H. Lectins from Marine Shells, VII. Partial purification and characterization of new lectins from a top shell, *Chlorostoma argyrostoma lischkei*. *Korean Biochem. J.*, **20**, 247-252(1987).
 - 16) Chung, S.R., Kim, J.H. and Jeune-Chung, K.H. Lectins from marine shell (V): Isolation and purification of lectin Tapes *philippinarum*, *Yakhak Hoeji (Pharm. Soc. Kor.)* **31**, 52-59(1987).
 - 17) Iglesias, J.L., Lis, H. and Sharon, N. Purification and properties of a D-galactose and N-acetyl-D-galactosamine specific lectin from *Brithrina cristagalli* *Eur. J. Biochem.*, **123**, 247-252(1982).
 - 18) Suh-Chae, Y.A., Chung, S.R. and Jeune-Chung, K. H. Studies on lectins marine shells VI: A new lectins from the meat of the *Neptunea intersculpta*, *Korean Biochem. J.*, **20**, 51-57(1987).
 - 19) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagents, *J. Biol. Chem.*, **193**, 165-275(1951).
 - 20) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Robers, P.A. and Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **28**, 350-356(1956).
 - 21) Howard, J. and Shannon, L.M. A rapid quantitative and highly specific assay for carbohydrate-binding proteins, *Anal. Biochem.*, **79**, 234-239(1977).
 - 22) Chung, S.R., Kim, J. H. and Jeune-Chung, K.H. Studies on lectins from marine shells (II): Isolation, purification and characterization of lectin from shellfish, *Neptunea intersculpta*, *Korean Biochem. J.*, **18**, 429-435(1985).
 - 23) Ouchterlony, O. and Nilsson L.A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis, in *Handbook of Experimental Immunology*, Weil, D.E. ed., Blackwell Scientific Publications, 19.1-19.39(1973).
 - 24) Osterman L.A., in *Methods of protein and nucleic acid research*, Osterman L.A. ed., Springer-Verlag Publications, Heidelberg, 45-61(1984).
 - 25) Pandolfino, E.R., Namen, A.E., Munske, G.R. and Magnuson, J.A. A comparison of the mitogenic and nonmitogenic lectins from lima beans, *J. Biol. Chem.*, **258**, 9203-9207(1983).
 - 26) Nowell, P.C. Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes, *Cancer Res.*, **20**, 462-468(1960).