

백합조개 체액으로부터 새로운 렉틴 MLA-II 및 MLA-III의 정제

김장환 · 정시련* · 전경희*

영남대학교 약학대학, *이과대학

(Received March 24, 1994)

Purification of New Lectins, MLA-II and MLA-III, from the Hemolymph of *Meretrix lusoria*

Jang Hwan Kim, See Ryun Chung* and Kyung Hee Jeune*

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

Abstract—As a previous step for the development of immunostimulating substance from marine natural products the two new lectins, MLA-II and MLA-III, have been isolated and purified from the hemolymph of *Meretrix lusoria* in addition to the previously reported MLA-I. The new lectins molecules were characterized as pure by electrophoretic studies.

Keywords □ Lectins, MLA-I, MLA-II, MLA-III, Hemolymph of *Meretrix lusoria*.

면역계가 발달되지 않은 무척추동물계에서 recognition factor(lectin, opsonin, etc.)는 생체내에 침입하는 외부로부터의 이물질들을 제거하는 생체방어기전에 관여한다. 이들은 적혈구 응집력을 나타내며, antibacterial activity와 opsonic properties를 가지고 있는 것으로 척추동물의 immunoglobulin과 전혀 다른 것으로 보고되고 있다.¹⁻⁵⁾ 무척추동물 렉틴은 hemolymph, hemocytes, albumin gland, sexual organ 등에서 많이 발견되며 β -galactoside와 sialic acid 특이성이 많은 것으로 밝혀지고 있다.^{4,6)}

렉틴은 한 개체내에 여러종류의 것이 공존하며 쉽게 subunit로 분해되는 거대분자 형태로 존재하며, hemocytes에 의해 합성되는 것으로 알려지고 있으며, 대부분 Ca^{++} 의존성인 경우가 많다.^{5,7)} Rogener와 Uhlenbruck³⁾는 active lectin과 inactive lectin 간에 switch mechanism의 조절인자로 Ca^{++} 이 작용하는 것이라는 보고도 하였다. 한편, horseshoe crab(*Limulus polyphemus*)의 hemolymph에서 분리한 렉틴 limulin은 C-reactive protein과 동일한 물질이라는 보고도 있다.⁸⁾

렉틴은 분자량, subunit, 당특이성 등 생물학적, 물리화학적, 면역학적 성질이 다양하며 여러가지 생리활성을 가진 것으로 임상적으로나 또는 생명과학 연구용 등에서 크게 응용되고 있는 새로운 분야의 천연 생리활성 물질이다.^{6,9)}

해양 천연물자원으로부터 새로운 렉틴을 분리정제하여 면역기능 조정제 등 신약개발을 목적으로 추진하는 연구⁹⁻¹¹⁾의 하나로 본 연구에서는 백합조개의 체액으로부터 MLA-I을 연구한 전보¹²⁾에 이어 2종의 새로운 렉틴을 분리, 정제하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

Veneridae(백합과)에 속하는 살아있는 백합조개(*Meretrix lusoria*)를 부산 수산 시장에서 구입하여 그 체액을 채취해 실험재료로 하였다.

시약

정제과정에 쓰인 DEAE-Cellulose 52는 Whatman Inc. (Clifton, N.J., USA)에서, hydroxyapatite는

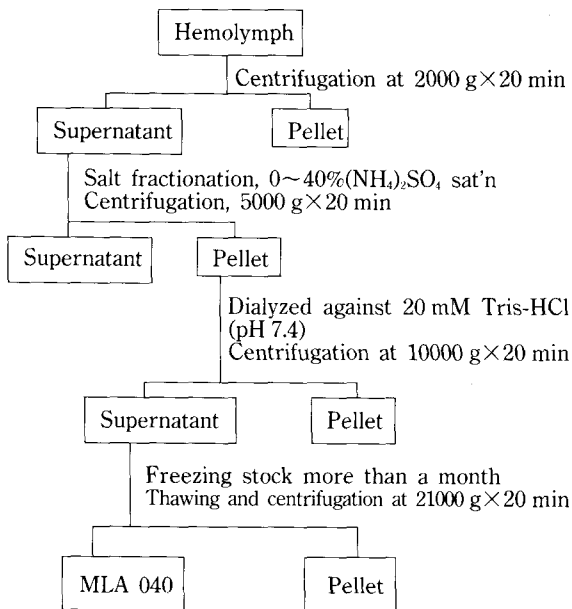
*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

Japan Biochem. Co. (Tokyo, Japan)에서, DEAE-Sephrose CL-6B, DEAE-Sephadex A-50, Sepharose CL-6B, Sephadex G-200, 등은 Pharmacia(Uppsala, Sweden)에서, 전기영동 시약 및 기타 일반 시약은 특급품을 사용하였다.

기기

실험에 사용한 주요 기기는 High speed centrifuge: Hitachi (Hitachi koki Co. Ltd.), Japan; Fraction collector: ISCO (Lincoln, USA); Spectrophotometer : Perkin Elmer, USA & Hitachi Model 200-20, Japan; Freeze-Dryer : DURA-DRY (FTS System, Inc.); Electrophoresis apparatus: SJ-1051 (ATTO Co.), Japan; 그리고 LKB 2001:Vertical Electrophoresis system (Sweden) 등이었다.

Crude lectins, MLA040의 분리 - 살아있는 백합조개의 체액으로부터 hemolymph를 채취하여 2,000 g에서 20분 동안 원심분리하여 hemocyte 및 불순물을 제거하였다. 그 상층액을 ammonium sulfate로 0~40% 포화시킨 후 5,000 g에서 20분간 원심분리하여 단백질 성분을 침전시켜 이를 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)에서 충분히 투석시켜 crude extracts



Scheme 1 - The isolation procedure of the crude lectin(MLA 040).

를 얻었다. 이를 다시 10,000 g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취해 -20°C 에서 1개월 이상 저장한 후, column 정제전에 21,000 g에서 20분간 원심분리하여 점액성 물질을 제거한 후 이를 crude lectins (MLA 040)으로 하여 다음 단계들과 같이 여러가지 방법으로 정제하였다(Scheme 1,2).

MLA-II의 정제

Scheme 2에 요약한 바와 같은 순서에 따라 다음과 같이 정제하였다.

A) DEAE-Cellulose(DE 52) column chromatography: 앞에서와 같이 하여 얻은 crude lectins(MLA 040)을 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)로 미리 평형시켜 둔 DEAE-Cellulose 52 column(5×20 cm)으로 정제하였다.¹²⁾ 단백질 성분은 step-wise NaCl salt gradient 방법으로 분리한 후 280 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였으며, 각 분획의 렉틴활성은 적혈구(human blood A type) 응집반응으로 확인하였다.^{10,13)} Lectin 활성이 나타난 0.3M NaCl 분획과 0.5M 분획을 각각 Diaflo membrane PM10(Amicon Co.)으로 농축하였다.

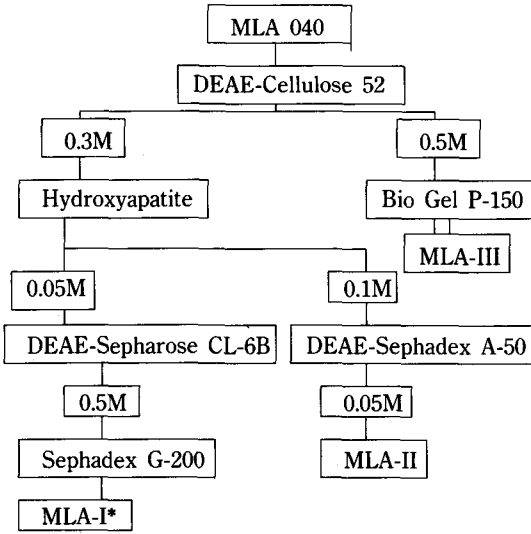
B) Hydroxyapatite column chromatography: 전항에서 농축된 0.3M NaCl fraction을 5 mM phosphate buffer(pH 6.8)에 투석시키고, 같은 buffer로 미리 평형시켜 둔 hydroxyapatite column에 주입하고 buffer의 농도를 step-wise gradient로 증가시키면서 단백질 성분을 분리하였으며,¹²⁾ 전항과 같은 방법으로 렉틴 활성 분획(0.05M, 0.1M)을 확인하고 농축시켰다.

C) DEAE-Sephadex A-50 column chromatography: 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)로 미리 평형시켜 둔 DEAE-Sephadex A-50 column에 sample을 주입하고 같은 buffer를 사용하여 step-wise salt gradient로 유출시켰다.¹⁴⁾

MLA-III의 정제

A) DEAE-Cellulose column chromatography: 앞에서 언급한 MLA-II의 A) 항에서 얻은 분획중 0.5M 분획을 시료로 하여 다음과정도로 더욱 정제하였다.

B) Bio-Gel P-150: 0.1M NaCl을 함유한 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)로 미리 평형시켜 둔 Bio-Gel P-150 column에 sample을 주입하고 같은 buffer로 유출시켰다.¹⁴⁾



Scheme 2—The purification procedure of the MLA lectins(*MLA-I is reported previously¹²⁾).

정제한 렉틴의 순도 및 분자량—전기영동법 Polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE)에 의한 순도 검정은 Davis의 방법¹⁵⁾으로 pH 8.3에서 7.5% polyacrylamide gel로 실시하였다. 이때 전류는 stacking gel에서는 1 mA/tube로, separating gel에서는 4 mA/tube로 하였다. Tracking dye로는 0.001% bromophenol blue를 사용하였으며, 단백질 부위는 0.1% coomassie brilliant blue R-250 solution(95% ethanol containing 0.25% coomassie brilliant blue R-250 : 10% acetic acid 1 : 1)으로 염색하였다. 또한 두 렉틴의 분자량은 SDS PAGE법¹⁶⁾과 겔 여과법^{17,18)}을 수정하여 분석 확인하였다.

결과 및 고찰

해양 천연물중 조개류를 대상으로한 렉틴연구는 *Chlorostoma argyrostoma lischkei*,¹³⁾ *Chlorostoma argyrostoma turbinatum*,¹⁹⁾ *Crassostrea gigas*,²⁰⁾ *Lunella coronata coreensis*,¹⁰⁾ *Megabalanus rosa*,²¹⁾ *M. volcano*,²²⁾ *Neptunea intersculpta*,¹¹⁾ *Saxidomus purpuratus*²³⁾ 등 여러가지가 있다. 그러나 백합조개 렉틴의 보고는 찾아볼 수 없었다. 따라서 전보¹²⁾에서 저자들은 백합조개 체액으로부터 MLA-I 렉틴을 분리정제하고 이의 당 특이성으로 fucose, arabinose, gala-

cturonic acid, 그리고 glucuronic acid에 대한 특이성이 있음과 이 렉틴은 SDS PAGE에 의한 측정결과 42 Kd의 소단위 분자와 겔 여과법에 의한 측정결과 330 Kd의 분자량을 갖는 새로운 렉틴으로 규정한 바 있다.

본 연구는 전보¹²⁾의 근거에 따라 같은 동물로부터 여러가지 단계의 정제과정을 거쳐 새로운 2종의 렉틴을 분리하고 이들의 생물물리화학적 특성을 구명하여 MLA-II, MLA-III가 새로운 렉틴임을 입증하고²⁴⁾ 본보에서는 우선 새로운 2종의 분리정제와 그 순도에 관하여만 논하고자 하였으며 곧 이어 생물물리화학적 특성과 면역학적 특성의 결과를 발표하고자 한다.²⁴⁾

Crude lectins, MLA 040의 분리

백합조개 체액을 체강으로부터 분리하여 ammonium sulfate로 여러 범위에서 salt fractionation하였을때, 0~40% 포화침전 부분이 가장 강한 활성을 나타내었다. 이 분획을 -20℃에서 1개월 이상 저장한 후 녹였을 때 응결된 점액성 물질이 형성되었기에 이를 21,000 g에서 20~30분 동안 원심분리 하여 제거하고 이를 crude MLA 렉틴이라 하였다(Scheme 1).

Crude MLA 렉틴은 백합조개 체액(hemolymph)에 비해 12.6배 정제되었으며 64.8% 회수되었다(Table I).

MLA-II의 정제

DEAE-Cellulose(DE 52) column chromatogra

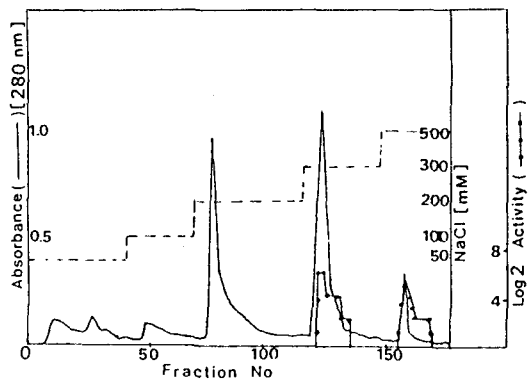


Fig. 1—Elution profiles of MLA 040 on DE 52 anion exchange column.

Column, 5.0×20 cm; Flow rate, 54 ml/hr

Table I—Purification of the MLA-II lection

Steps	Total protein (mg)	Total units ($\times 10^{-3}$)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Hemolymph	9400.0	1280.8	136.2	1.0	100.0
MLA 040	483.6	829.4	1715.2	12.6	64.8
DEAE-Cellulose (0.3M)	177.0	604.2	3413.3	25.1	47.2
Hydroxyapatite (0.1M)	17.3	122.9	7111.1	52.2	9.6
DEAE-Sephadex A-50(0.05M)	0.2	51.2	284444.4	2088.0	4.0

The purification data presented here are for 1000 ml hemolymph of *M. lusoria*. A unit of hemagglutinating activity is defined as the reciprocal of dilution endpoint.

phy—crude MLA 렉틴을 DEAE-Cellulose 52 column으로 정제하여 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다. 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)에 NaCl의 농도를 단계적으로 증가시켰을 때 0.3M NaCl 및 0.5M NaCl 분획에서 렉틴활성이 나타났다. 이 단계에서 0.3M NaCl 분획은 25.1배 정제되고, 47.2% 회수 되었다 (Table I).

Hydroxyapatite column chromatography—DEAE-Cellulose 52 column의 0.3M NaCl 분획을 hydroxyapatite column으로 정제하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. Phosphate buffer(pH 6.8)의 농도를 단계적으로 증가시켰을 때 0.05M과 0.1M 분획에서 렉틴이 유출되었으며, 0.05M 분획은 전보¹²⁾에서와 같

이 MLA-I으로 정제되었고, 이때 0.1M phosphate buffer(pH 6.8) 분획은 52.2배 정제되었으며 9.6배 회수되었다(Table I). 이의 순도를 검정키 위해 7.5% PAGE를 하였을 때 비교적 순수하였으나 단일 band는 아니었으므로 더욱 정제를 시도하였다(Fig. 5).

DEAE-Sephadex A-50 column chromatography—Hydroxyapatite column에서 유출된 0.1M 분획을 DEAE-Sephadex A-50 column에 적용하여 NaCl 농도를 단계적으로 증가시켜 유출하였을 때 0.05M과 0.4M NaCl, 두 분획에서 렉틴 활성이 나타났다 (Fig. 3).

이들 두 분획의 순도를 확인하기 위해 7.5% PAGE 하였을 때 0.05 M NaCl분획은 1개의 band를, 0.4M NaCl 분획은 1개의 major band와 1개의 minor band를 나타내었다(Fig. 5). 그리하여 순수히 정제된

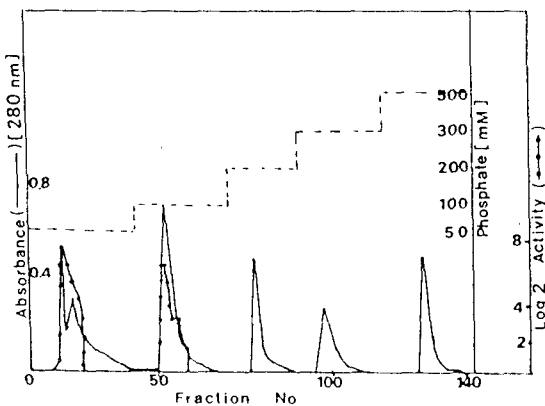


Fig. 2—Elution profiles of 0.3M NaCl fraction from DE 52 anion exchange column on hydroxyapatite chromatography.

Column, 2.6×40 cm; Flow rate, 18 ml/hr.

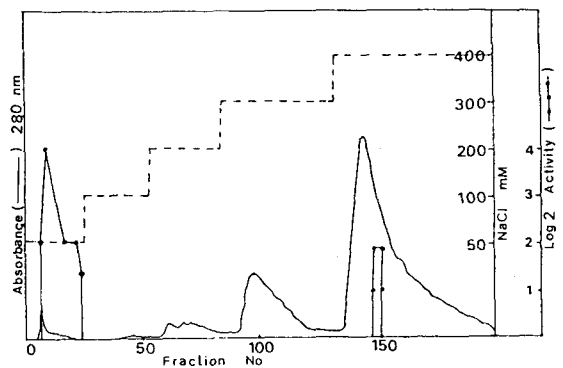


Fig. 3—Elution profiles of 0.1M fraction from hydroxyapatite column on DEAE-Sephadex A-50 chromatography.

Column, 1.6×35 cm; Frow rate, 20 ml/hr.

0.05M 분획을 MLA-II라 명명하였다.

MLA-II lectin은 2088.0배 정제되었으며 4.0% 회수되었다(Table I). MLA-II 렉틴은 생물물리화학적 특성 및 임상적 응용 연구를 위해 증류수에 투석시킨 후 냉동 건조하였다.

MLA-III의 정제

DEAE-Cellulose 52 column chromatography—MLA-II의 (1)항과 같은 column에서 유출된 0.5M NaCl fraction은 96.4배 정제되었으며 38.8% 회수되었다(Table II). 이 분획을 7.5% PAGE한 결과 2개의 major band가 확인되었으므로 다음과 같이 더욱 정제하였다.

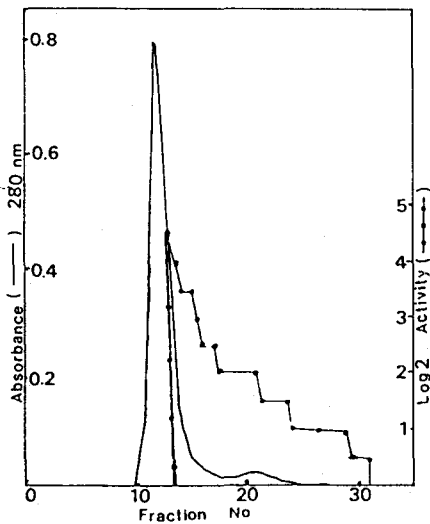


Fig. 4—Elution profiles of 0.5M NaCl fraction from DE 52 anion exchange column on Bio-Gel P-150 chromatography. Column, 0.9×30 cm; Flow rate, 6 ml/hr.

Bio-Gel P-150 column chromatography—DEAE-Cellulose column의 0.5M NaCl 분획을 더욱 정제하기 위해 Bio-Gel P-150 column에 적용하여 정제하였다(Fig. 4). 이 단계에서 유출된 렉틴 활성 분획을 PAGE하였을 때 1개의 band를 나타내었으므로 이를 MLA-III라 명명하였다(Fig. 6). MLA-III 렉틴은 608.2 배 정제되었으며 17.2배 회수되었다(Table II). 이상과 같은 정제과정을 거쳐 백합조개 체액으로부터 전

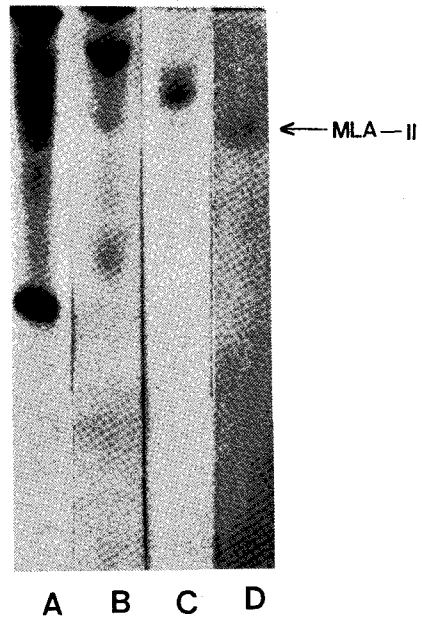


Fig. 5—Polyacrylamide disc gel electrophoretic patterns of MLA-II lectin along with purification steps. Lane A, MLA 040; B, DE 52 0.3M; C, Hydroxyapatite 0.1M D, DEAE-Sephadex A-50 0.05 M.

Table II—Purification of the MLA-III lection

Steps	Total protein (mg)	Total units ($\times 10^{-3}$)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Hemolymph	9400.0	1280.8	136.2	1.0	100.0
MLA 040	483.6	829.4	1715.2	12.6	64.0
DEAE-Cellulose (0.5M)	37.8	496.6	13128.2	96.4	38.8
Bio-Gel P-150	3.4	220.2	82823.5	608.2	17.2

The purification data presented here are for 1000 ml hemolymph of *M. lusoria*. A unit of hemagglutinating activity is defined as the reciprocal of dilution endpoint

보¹²⁾의 MLA-I에 이어 새로운 2종 MLA-II와 MLA-III를 분리할 수 있었다.

MLA-II, MLA-III의 순도

전기영동에 의하여 MLA 렉틴의 여러 정제 단계에서 얻은 각 분획에 대한 순도를 확인하기 위한 7.5% PAGE(pH 8.3)결과를 Fig. 5,6과 같았다. 그림에서와 같이 여러 정제단계에서 얻은 시료를 비교한 결과 분리 과정에 따라 효과적으로 정제되어 MLA-II, III는 각각 1개의 band만이 나타났으므로 순수하게 분리, 정제된 것으로 판단할 수 있었다.

한편 이들의 분자량은 SDS PAGE 결과²⁴⁾ MLA-II는 12개의 소분자로, MLA-III는 2개의 소분자로 되어있으며, Sepharose CL-6B gel filtration 결과²⁴⁾ 이들은 각각 500,000과 310,000의 거대분자임을 확인할 수 있어 이들도 새로운 렉틴으로 확인되었으며 이에 대한 자세한 보고는 곧 발표될 것이다.

백합조개는 전세계 어디서나 대단히 고귀한 식품 자원으로 인정되어 애용되고 있으며, 우리나라와 일본에서는 날것으로 인기가 높다. 렉틴은 일반적으로 독성 단백질에 해당하지만, 이 동물의 경우는 근육

조직에서는 그 성분이 확인되지 않고, 다만 체액속에 미량 함유되어 있어 사람에게 복용될 수 없음을 대단히 흥미있고, 해양 동물의 생리학적 기능을 생각할 때 더욱 관심을 모은다. 본 연구진에서는 앞으로 이들 3종의 렉틴(전보의 MLA-I 및 본연구의 MLA-II, MLA-III)에 대한 생물물리화학적 특성 및 면역기능 조정제로서의 기능²⁴⁾ 이외에 이 3종의 렉틴이 서로 어떤 임상적 특성을 갖고 있는지를 밝히기 위해 계속적인 연구가 수행중이다.

감사의 말씀

본 연구는 1993년도 한국과학재단 핵심전문 연구 과제 (931-0700-016-2) 연구비 지원에 의해 수행된 것 중의 하나이기에 이에 감사드리는 바입니다.

문 헌

- 1) Prescott, L. M., Harley, J. P. and Klein, D. A. The immune response: Antigen-antibody reactions, in *Microbiology*, 2nd Ed., WCB Publishers, 1-647 (1993).
- 2) Renwranz, L. Lectins in molluscs and arthropods: their occurrence, origin and roles in immunity. *Symo. Zool. Soc. Lond.* **56**, 81 (1986).
- 3) Rögner, W. and Uhlenbruck, G. Invertebrate lectins: The biological role of a boigical rule. *Dev. Comp. Immunol.* **5**, 535 (1984).
- 4) Lackie, A. M. Invertebrate immunity. *Parasitology* **80**, 393 (1980).
- 5) Parish, C. R. Simple model for self-nonsel self discrimination invertebrates. *Nature* **267**, 711 (1977).
- 6) Liener, I. E., Sharon, N. and Goldstein, I. J. Properties, function and application in biology and medicine. in *The Lectins*. Academic press, New York, pp. 1-600 (1986).
- 7) Vasta, G. R. and Marchalonis, J. J. Humoral recognition factors in the arthropoda. The specific of chelicerata serum lectin. *Amer. Zool.* **23**, 157 (1983).
- 8) Rohey, F. A. and Liu, T. Y. Limulin: A C-reactive protein from *Limulus polyphemus*. *J. Biol. Chem.* **256**, 969 (1981).
- 9) Chung, S. R. and Jeune, K. H. Lectins from Natural

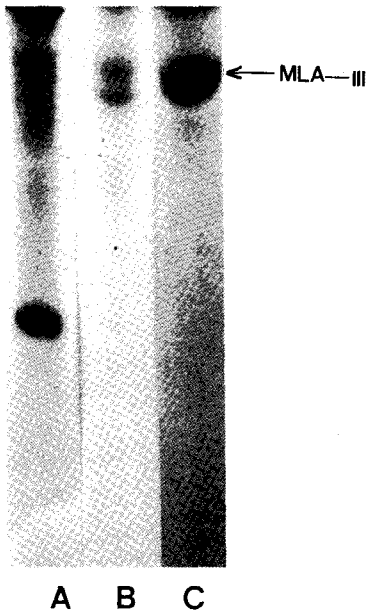


Fig. 6—Polyacrylamide disc gel electrophoretic patterns of MLA-III lectin along with purification steps.
Lane A, MLA 040; B, DE 0.5M; C, Bio-Gel P-150.

- Products and the Applications in Life Science. *Proceedings of the Symposium for the New Drug Development*, Chungbuk National University, 25-42 (1993).
- 10) So, M. S., Jeune, K. H. and Chung, S. R. Lymphocytes Mitogenic and Immunochemical Properties of the Lectins from Marine Animal *Lunella coronata coreensis*. *Yakhak Hoeji.*, **37**, 254 (1993).
 - 11) Jeune, K. H., Suh, Y. A. and Chung, S. R. Lectins from Marine Animals(XI): Lymphocytes Mitogenic and Immunochemical Properties of the Lectins from *Neptunea intersculpta*. *Korean Biochem. J.*, **24**, 240-245 (1991).
 - 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 (1990).
 - 13) 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 (1987).
 - 14) Kim, J. H. Purification and Characterization of the Lectins from Marine Shells, *Ph.D. Thesis*, 1-96 (1990).
 - 15) Davis, B. J. Disc electrophoresis II. *Ann N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404 (1964).
 - 16) Laemmli, G. U. K. and King, J. Polypeptide of the tail fibres of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.*, **62**, 465 (1971).
 - 17) Andrews, P. Estimation of the molecular weight of protein by Sephadex gel filtration. *Biochem. J.*, **91**, 222 (1964).
 - 18) Locascio, G., Tigier, H. A. and Battle, A. M. Estimation of molecular weight of proteins by agarose gel filtration. *J. Chromatogr.*, **40**, 453 (1969).
 - 19) Chung, S. R., Choi, I. S. and Jeune, K. H. Studies on lectins from marine animal *Chlorostoma argyrostoma turbinatum*. *Kor. J. Pharmacogn.*, **25**, in press (1994).
 - 20) Hardy, S. W., Grant, P. T. and Fletcher, T. C., A hemagglutinin in the tissue fluid of the pacific oyster. *Experientia*, **33**, 747 (1977).
 - 21) Muramoto, K., Ogata, K. and Kamiya, H. Comparison of the multiple agglutinins of the acorn barnacle, *Megabalanus rosa*. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 85 (1985).
 - 22) Kamiya, H., Muramoto, K. and Goto, R. Isolation and characterization of agglutinins from the hemolymph of ab acorn barnacle, *Megabalanus volcano*. *Dev. Comp. Immunol.*, **11**, 297 (1987).
 - 23) Tatsumi, M., Arai, Y. and Itoh, T. Purification and characterization of a lectins from the shellfish, *Saxidomus purpuratus*. *J. Biochem.*, **91**, 1139 (1982).
 - 24) Chung, S. R., Kim, J. H. and Jeune, K. H. Immunostimulating Lectins from Marine Natural Products: Characteristics of the MLA-I, MLA-II and MLA-III. Manuscripts in Preparations, (1994).