

해양 천연물로부터 면역기능 조정제 렉틴 개발: MLA-I, MLA-II, MLA-III의 특성

정시련* · 김장환 · 전경희*

영남대학교 약학대학, *영남대학교 이과대학

(Received March 21, 1995)

Immunostimulating Lectins from Marine Natural Products: Characteristics of the MLA-I, MLA-II and MLA-III

See Ryun Chung[†], Jang Hwan Kim and Kyung Hee Jeune^{*}

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

^{*}College of Science, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

Abstract—Three new lectins, MLA-I, MLA-II and MLA-III, have been isolated and purified from the hemolymph of *Meretrix lusoria* and reported previously. Biophysicochemical characteristics were investigated with these three MLA lectins. The MLA lectins agglutinated human erythrocytes non-specifically and proved as D-galactose group carbohydrate specific. Molecular weight of MLA-I, II and III were estimated to be 330, 500 and 310KD, respectively, by gel filtration on Sepharose CL-6B column. On SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, MLA-I was dissociated into a single subunit of 42KD. MLA-II was into the twelve subunits of 46, 32, 30, 28, 25, 23, 22, 20, 19, 16, 15, and 14KD, and MLA-III was into the two subunits of 72 and 44KD. The pI of MLA-I, II, III were 4.0, 4.9 and 5.0. Amino acid analysis revealed a high contents of acidic and hydroxy amino acids, and a paucity of sulfur containing amino acids. Proline was not contained in MLA-II.

Keywords □ Lectins, MLA-I, MLA-II, MLA-III, Hemolymph of *Meretrix lusoria*, Biophysicochemical properties, Immunostimulants, Marine natural products.

렉틴(lectins)의 다양한 생물물리화학적 특성은 렉틴이 당과 특이적으로 결합하며, 적어도 2개 이상의 당과의 결합부위를 가지고 있다는 성질에 기인하며, 이와 같은 성질을 이용하여 렉틴을 당화합물의 분리 및 구조연구, 세포막연구, 세포분리, 미생물의 확인, 혈액형 연구, 약물수송(전달체) 연구, 면역성 질환 및 암의 실험 등에 이용하고 있으며 임상적 응용까지 시도하고 있다.^{1,9)}

이렇듯 생리활성이 독특한 물질인 렉틴은 대부분 육상식물, 그 중에서도 콩과(leguminosae)식물에서 주로 연구되어 왔으나, 미생물, 척추동물, 무척추동물을 대상으로 한 연구도 상당수에 이르고 있다. 이들 중 무척추동물 렉틴에 대한 연구를 살펴보면 1902년과 1903년 Noguchi가 두 종류의 갑각류, horseshoe

crab *Limulus polyphemus*와 american lobster *Homarus americanus*의 체액으로부터 적혈구응집성 물질을 분리, 보고⁶⁾한 이후, Yeaton^{7,8)}과 Vasta⁹⁾에 의하여 102종의 무척추동물 lectin이 연구되었으며, 그 이후 많은 렉틴이 분리정제되어 지금은 상품화 된 것이 무수히 많다.¹⁰⁾

본 연구는 해양동물로부터 면역기능 조정제로 쓰일 수 있는 렉틴을 개발하고자 시도한 것으로 백합조개(*Meretrix lusoria*)로부터 전보^{11,12)}에서와 같이 얻은 3종의 렉틴 MLA-I, MLA-II, MLA-III를 대상으로 이들의 생물물리화학적 특성을 연구한 것이다.

실험 방법

실험재료 렉틴 - MLA-I, MLA-II, MLA-III는

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

Veneridae(백합과)에 속하는 살아있는 백합조개 (*Meretrix lusoria*)로부터 전보^{11,12)}와 같은 방법으로 얻었다.

시약 - Electrophoresis M.W. calibration kit, Gel filtration M.W. calibration kit은 Pharmacia Fine Chemicals(Uppsala, Sweden)에서, Bio-Gel P-150은 Bio-Rad Lab. (Richmond, CA., USA)에서, carbohydrates(44종) 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, Mo., USA)에서, 기타 일반 시약은 시중에서 구입한 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 : LKB 2001; Vertical Electrophoresis system, Sweden; Electrofocusing apparatus : LKB 2117-004 Multiphor II, Sweden 등이었다.

당 특이성 - 적혈구응집력 저해효과는 Ravindranath 등¹³⁾의 방법을 응용하여 4HU(hemagglutination unit)의 응집력을 나타내는 lectin 용액으로 실시하였다. 각종 당용액 (100 mM, 33 μ l)을 microtiter plate에서 PBS(phosphate buffered saline)로 2배수 희석한 후, 각 well에 렉틴용액 (33 μ l)을 가하고 다시 3% 적혈구 용액(33 μ l)을 넣었다. 당에 대한 적혈구응집력 저해효과는 4HU 적혈구응집력을 완전히 저해할 수 있는 최소한의 당농도로 표시하였다.

pH의 영향 - MLA lectins을 pH 2.2~12.0 범위의 buffer로 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 투석시킨 후 pH 7.4에서 남아 있는 렉틴 활성을 조사하였다. 이 때 buffer는 25 mM glycine-HCl buffer (pH 2.2), sodium citrate buffer (pH 3.3, pH 4.0), sodium acetate buffer (pH 5.0), phosphate buffer (pH 6.0, pH 7.0), Tris-HCl buffer(pH 8.0, pH 9.0), glycine-NaOH buffer (pH 10.0, pH 10.6), Na₂HPO₄-NaOH buffer (pH 12.0) 등을 사용하였다.

온도의 영향 - MLA lectins을 0~70 $^{\circ}$ C의 온도에서 30분간 water bath에서 incubation한 후, 즉시 ice bath로 식힌 다음, 남아있는 lectin 활성을 조사하였다.

분자량 측정 - (1) SDS-polyacrylamide gel elec-

trophoresis : SDS-PAGE는 Laemmli와 King¹⁴⁾방법의 discontinuous buffer system으로 실시하였다. 즉, stacking gel과 separating gel은 각각 3%, 10% polyacrylamide gel로 준비하였고, sample과 standard protein은 SDS와 2-mercaptoethanol을 각각 2%, 5% 가하여 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 처리하여 denaturation시켰다. Electrophoresis는 75 mA/slab의 전류로 5시간 동안 실시하였으며 tracking dye와 염색은 전보의¹²⁾ PAGE와 같이 하였다. Standard protein으로는 high molecular kit : thyroglobulin (669,000), ferritin (440,000) catalase (232,000), lactose dehydrogenase (140,000), bovine serum albumin (67,000)과 low molecular kit : phosphorylase b (94,000), bovine serum albumin (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), soybean trypsin inhibitor (14,400)을 사용하였다.

(2) Gel filtration : Lectin의 분자량은 앞의 SDS-PAGE법 이외에, Andrews¹⁵⁾와 Locascio¹⁶⁾ 등의 방법에 의한 Sepharose CL-6B gel filtration column chromatography로도 측정하였다. Sepharose CL-6B column (1.6 \times 90 cm)을 0.1 M NaCl을 함유한 50 mM Tris-HCl buffer로 평형시킨 후 blue dextran (M.W. 2,000,000)을 통과시켜 void volume (V₀)을 구하였다. 그 다음 standard protein kit을 column에 주입하여 각각의 elution volume (V_e)을 구하고 standard calibration plot을 작성한 후 MLA lectins을 각각 주입하여 elution volume으로 MLA lectins의 분자량을 측정하였다. Standard protein kit으로는 thyroglobulin(669,000), ferritin(440,000), catalase (232,000), aldolase (158,000)를 사용하였다.

단백질함량 분석 - Bovine serum albumin을 표준품으로 하여 Lowry 등¹⁷⁾의 방법으로 단백질함량을 분석하였다.

등전점 측정 - MLA lectins의 등전점 측정은 pH 3.5~9.5의 analytical LKB Ampholine polyacrylamide gel plate 상에서 LKB multiphor system¹⁸⁾을 이용하여 실시하였으며, MLA lectins (MLA-I, II, III)은 1% glycine 용액에서 투석시킨 후 사용하였다. Gel plate의 pH gradient는 surface pH electrode로 측정된 후 PAG(polyacrylamide gel) plate를 fixing(57.5 g trichloroacetic acid+17.25 g sul-

phosalicyclic acid in 500 ml distilled water), staining (0.46 g coomassie brilliant blue R-250 in destaining solution), destaining (500 ml ethanol + 160 ml acetic acid in 2 l distilled water) 하였다.

아미노산 분석 - 렉틴 시료들은 Simpson 등¹⁹⁾의 방법으로 가수분해시켰다. 렉틴 2 mg을 nitrogen gas를 채운 sealed tube에서 0.2% tryptamine을 함유한 4N-methanesulfonic acid 1 ml와 함께 115°C에서 22시간 동안 가수분해시켰다. 가수분해 산물은 glass filter로 여과한 후 3.5N-NaOH 1 ml로 중화한 다음, 다시 증류수로 세척하여 vacuum evaporator로 건조시켰다. 이를 loading buffer (0.2 M sodium citrate buffer, pH 2.2) 1 ml에 녹여 millipore (0.2 µm)를 통과시킨 후, cation exchange column: Integrator Recorder를 갖춘 LKB 4150 ALPHA amino acid analyzer로 아미노산 조성과 함량을 분석하였다.²⁰⁾

당함량 분석 - Glucose를 표준품으로 하여 phenol-sulfuric acid 방법²¹⁾으로 측정하였다.

결 과

당 특이성 - 렉틴의 특성 중 가장 독특한 당 특이성을 확인하기 위해 45종의 당류를 대상으로 MLA의 적혈구 응집력 저해 실험을 한 결과는 Table I과 같았다. MLA-I은 D-fucose, L-arabinose, D-galacturonic acid, D-glucuronic acid에 의해 25 mM에서 4 HU의 적혈구 응집력이 완전히 저해되었으며, D-xylose, D-galactosamine, D-glucosamine, melibiose에 의해서도 50mM에서 저해되었다. MLA-II는 D-fucose, D-glucosamine, N-acetylgalactosamine, N-acetylgalactosamine에 의해 6.1 mM에서 4 HU의 적혈구 응집력이 완전히 저해되었으며, melibiose에 의해 25 mM에서, D-galactosamine, D-galactose, L-arabinose, D-galacturonic acid에 의해서도 50 mM에서 저해 되었다.

MLA-III는 D-galacturonic acid에 의해 3.1 mM에서 4 HU 적혈구 응집력이 완전히 저해되었으며, D-galactosamine에 의해 25 mM에서 저해현상이 일어났으며 D-galactose, D-fucose, D-arabinose, D-glucosamine에 의해서도 50 mM에서 저해현상이 일어났다. 이상과 같은 결과로 살펴보면 3종의 MLA 모두 D-galactose group의 당에 의해 저해현상이 일어

Table I—Correlation between pyranose ring structures and the inhibition of hemagglutination of MLA lectins

Types*	Carbohydrates	Minimum concentration [mM] completely inhibiting 4 hemagglutinating		
		MLA-I	MLA-II	MLA-III
I	L-Galactose	>100	>100	>100
	L-Fucose	>100	>100	>100
	D-Arabinose	>100	>100	>100
	D-Fructose	>100	>100	>100
II	D-Galactose	>100	50	50
	D-Fucose	25	6.1	50
	L-Arabinose	25	50	50
III	D-Galacturonic acid	25	50	3.1
	D-Glucose	>100	>100	>100
	D-Xylose	50	>100	>100
	D-Glucuronic acid	25	50	50
IV	D-Sorbose	>100	>100	>100
	L-Glucose	>100	>100	>100
	L-Sorbose	>100	>100	>100
V	L-Xylose	>100	>100	>100
	L-Lyxose	>100	>100	>100
	L-Mannose	>100	>100	>100
VI	L-Rhamnose	>100	>100	>100
	D-Mannose	>100	>100	>100
VII	D-Lyxose	>100	>100	>100
	D-Ribose	>100	>100	>100
	D-Galactosamine	50	50	25
	D-Glucosamine	50	6.1	50
	Gal NAc	>100	6.1	>100
	Glu NAc	>100	6.1	>100
	Melibiose	50	25	100
Others ^(a)	^(b) >	>100	>100	

*The classification is based on C2, C3 and C4 configuration from Sakakibara *et al.* (1985)²⁰⁾.

(a): N-acetylneuraminic acid, methyl- α -D-galactopyranoside, methyl- β -D-galactopyranoside, methyl- α -D-glucopyranoside, methyl- β -D-glucopyranoside, phenyl- β -D-galactoside, phenyl- α -D-glucoside, phenyl- β -D-glucoside, cellibiose, gentibiose, lactose, lactobionic acid, lacturose, maltose, melizitose, raffinose, stachyose, sucrose, trehalose. (b): Showing no inhibition at more than 100mM.

났으며, amine 기를 가지고 있는 당에 의해서도 저해 현상이 일어났다.

pH의 영향 - pH 변화에 따른 MLA 렉틴의 적혈구 응집력의 변화는 Fig. 1과 같았다. MLA 렉틴의 적혈구 응집력은 pH 6~9 범위에서는 안정하였으나, 그 이하나 그 이상에서는 활성이 급격히 감소하였으므로 MLA 렉틴은 pH에 불안정한 것을 알 수 있었다.

온도의 영향 - MLA 렉틴의 온도에 대한 적혈구 응집력의 변화는 Fig. 2와 같았다. MLA-I은 55°C, MLA-

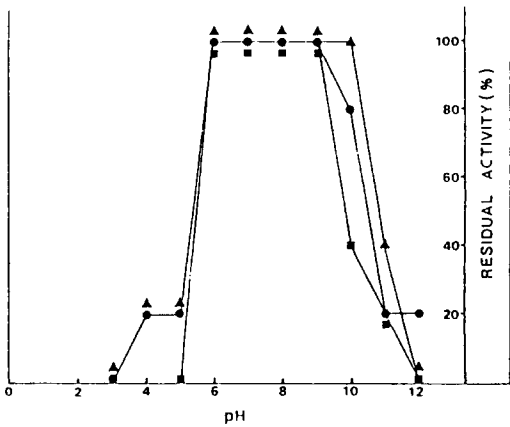


Fig. 1—Stability of MLA lectins at different pH. The purified MLA lectins were incubated in buffers at different pH (2.2~12.0) for 2hr at 4°C and the remaining activity was determined. MLA-I, (●—●); MLA-II, (▲—▲); MLA-III, (■—■).

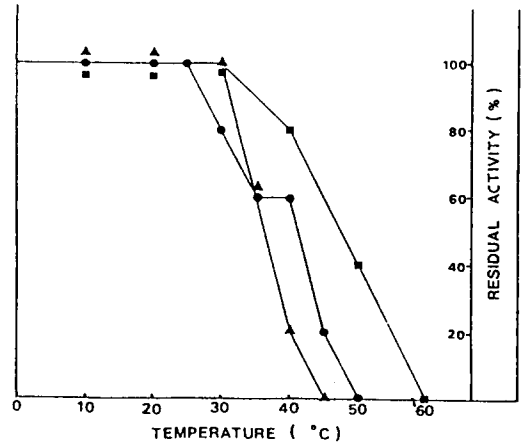


Fig. 2—Effect of temperature on MLA lectins activity. The purified MLA lectins were incubated at different temperature for 30 min. After immediate cooling in an ice bath, the remaining activity was determined. MLA-I, (●—●); MLA-II, (▲—▲); MLA-III, (■—■).

II는 45°C, MLA-III는 65°C에서 활성이 완전히 소실하여 열에 불안정함을 알 수 있었다.

분자량 측정—(1) SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis에 의한 분자량 : MLA 렉틴의 subunit의 분자량을 측정하기 위하여 SDS-PAGE를 실시하여 Figs. 3, 4, 5와 같은 결과를 얻었다. LMW와 HMW calibration kit와 함께 두께 1.5 mm의 slab gel에서 SDS-PAGE하였을 때, MLA-I은 분자량 42,000인 8개의 동일한 크기의 subunit로 구성되어 있으며, MLA-II는 분자량이 46,000, 32,000, 30,000, 28,000, 25,000, 23,000, 22,000, 20,000, 19,000, 16,000, 15,000, 14,000인 12개의 subunit로 구성된 heterogenous한 분자로 존재하며, MLA-III는 분자량이 72,000, 44,000인 2개의 subunit로 구성되어 있음을 추정할 수 있었다.

(2) Gel filtration에 의한 분자량 : MLA 렉틴의 분자량을 측정하기 위하여 Sepharose CL-6B column을 이용하여 gel filtration한 결과를 standard protein으로 부터 얻은 calibration plot으로부터 분자량을 측정하였을 때 MLA-I lectin은 330, MLA-II lectin은 500,000, MLA-III lectin은 310,000으로 추정되었다(Figs. 6, 7, 8).

등전점—MLA 렉틴의 등전점은 pH 3.5~9.5의 LKB Ampholine polyacrylamide gel상에서 iso-

electrofocusing한 결과 Fig. 9와 같았다. MLA-I의 등전점은 4.0, MLA-II는 4.9, MLA-III는 5.0으로 밝혀졌다. 이 결과로 3종의 MLA를 비교해보면 MLA-I이 가장 acidic한 lectin이었으며, MLA-II와 MLA-III의 pI는 유사한 것으로 밝혀졌다.

아미노산 분석—MLA 렉틴의 아미노산 조성을 알아보기 위해 분석한 결과는 Table II와 같다. MLA-I 렉틴은 산성 아미노산인 aspartic acid, glutamic acid를 많이 함유하고 있었으며 당과 O-linkage 할 수 있는 아미노산인 serine과 threonine도 많이 함유하고 있었다. 한편 염기성 아미노산인 arginine 및 histidine, 그리고 sulfur를 함유한 아미노산인 methionine은 소량 함유하고 있었다. MLA-II는 MLA-I과 유사하게 산성 아미노산인 aspartic acid, glutamic acid를 많이 함유하고 있었으며, 염기성 아미노산을 소량 함유하고 있었다. 또한 특이하게 proline을 함유하고 있지 않았다. MLA-III 역시 산성 아미노산을 많이 함유하고 있었으며, 염기성 아미노산은 소량 함유하고 있었다.

이런 결과는 이들 3종 렉틴의 pI가 4.0~5.0인 결과와 일치함을 알 수 있었다. 또한 당과 O-linkage로 결합할 수 있는 아미노산인 serine, threonine잔기를 많이 함유하고 있었으며 N-linkage를 할 수 있는 asparagine도 다량 함유하고 있는 것으로 보아 당을 함유한

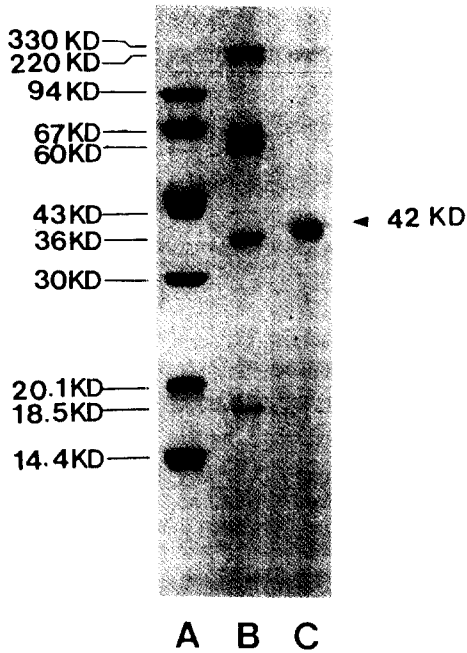


Fig. 3—SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of the MLA-I lectin. Lane A, Low M.W. kit; B, High M.W. kit; C, MLA-I. 1. Thyroglobulin (330,000); 2. Ferritin(half unit) (220,000); 3. Phosphorylase b (94,000); 4. Albumin (67,000); 5. Catalase (60,000); 6. Ovalbumin (43,000); 7. Lactate dehydrogenase (36,000); 8. Carbonic anhydrase (30,000); 9. Trypsin inhibitor (20,100); 10. Ferritin (18,500); 11. α -Lactalbumin (14,400).

glycoprotein임을 추정할 수 있었다.

당 함량 분석—Phenol sulfuric acid method로 MLA lectins의 당 함량을 알아본 결과 MLA-I은 10.4%, MLA-II는 9.1%, MLA-III는 12.6%의 neutral sugar를 함유한 glycoprotein으로 밝혀졌다.

고 찰

본 연구에서는 백합조개 *Meretrix lusoria* 체액으로부터 3종 렉틴(MLA-I, II, III)을 여러가지 방법으로 분리, 정제한 전보^{11, 12)}에 이어, 이들 3종에 대한 생물물리 화학적 특성들을 규명하였다.

이들 3종의 분자량은 SDS-electrophoresis 결과 MLA-I은 분자량 42KD인 1개의 subunit로 구성되어

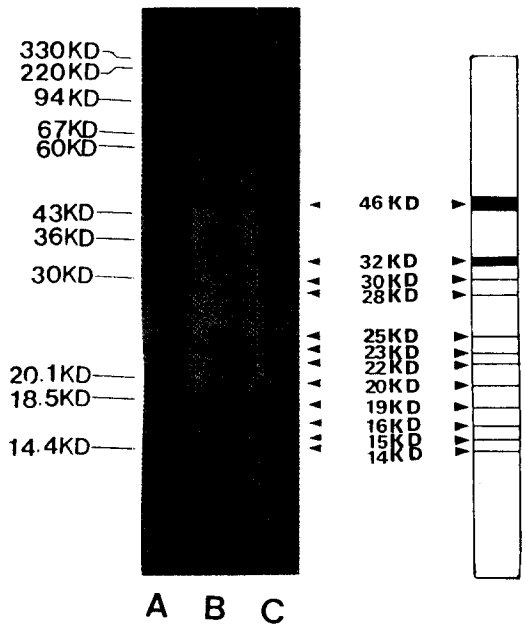


Fig. 4—SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of the MLA-II lectin. Lane A, Low M.W. kit; B, High M.W. kit; C, MLA-II. 1. Thyroglobulin (330,000); 2. Ferritin(half unit) (220,000); 3. Phosphorylase b (94,000); 4. Albumin (67,000); 5. Catalase (60,000); 6. Ovalbumin (43,000); 7. Lactate dehydrogenase (36,000); 8. Carbonic anhydrase (30,000); 9. Trypsin inhibitor (20,100); 10. Ferritin (18,500); 11. α -Lactalbumin (14,400).

있었으며, MLA-II는 46KD, 32KD, 30KD, 28KD, 25KD, 23KD, 20KD, 19KD, 16KD, 15KD, 14KD인 heterogeneous한 12개의 subunits로 구성된 multimeric한 분자형태로 추정되었으며, MLA-III는 분자량이 72KD, 44KD인 2개의 subunits로 구성된 것으로 추정되었다. 이러한 결과는 무척추동물의 체액에는 여러종류의 lectins이 존재하며 subunit가 쉽게 분해된다는 보고와 유사하였다.^{9, 22)}

또한 이들의 native 분자량을 측정하기 위해 Sepharose CL-6B column으로 gel filtration한 결과 MLA-I, II, III는 각각 분자량이 330KD, 500KD, 310KD인 거대분자로 밝혀졌다. 이러한 결과는 무척추동물 렉틴이 거대분자 형태로 존재한다는 Vasta 와 Marchalonis⁹⁾의 보고와 유사하였다.

이상과 같은 결과를 종합해 보면, MLA-I은 분자량이 42KD인 8개의 subunits로 구성된 octomer로,

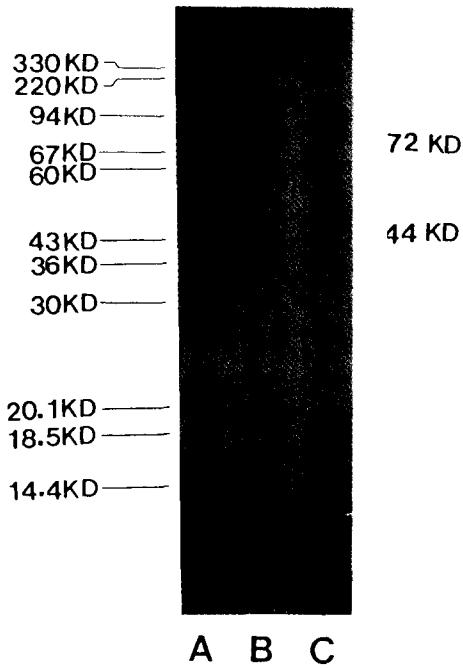


Fig. 5—SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of the MLA-III lectin. Lane A, Low M.W. kit; B, High M.W. kit; C, MLA-III. 1. Thyroglobulin(330,000); 2. Ferritin(half unit)(220,000); 3. Phosphorylase b(94,000); 4. Albumin(67,000); 5. Catalase(60,000); 6. Ovalbumin(43,000); 7. Lactate dehydrogenase (36,000); 8. Carbonicanhydrase(30,000); 9. Trypsin inhibitor(20,100); 10. Ferritin(18,500); 11. α -Lactalbumin(14,400).

MLA-II 렉틴은 분자량이 46KD, 32KD, 30KD, 28KD, 25KD, 23KD, 20KD, 19KD, 16KD, 15KD, 14KD인 12개의 subunits로 구성된 heterogeneous 한 것으로, MLA-III 는 72KD, 44KD인 2개의 subunits로 구성된 것으로 추정된다.

이런 결과는 바다말발굽가재 *Limulus polyphemus* 렉틴 limulin이 500KD으로 여러 분자량을 나타내는 12개의 polypeptide chains으로 구성된 것²³⁾, 바다성게 *Anthocidaris crassispina* 체액 렉틴의 분자량이, 13KD와 26KD인 두개의 subunits로 구성된 300KD 라는 점²⁴⁾, 멩게 *Halocynthia roretzi* 체액 렉틴은 subunit 분자량이 28KD이며 총분자량이 500KD라는 점²⁵⁾, 삿갓조개 *Megabalanus rosa* 체액의 경우는 3종류의 렉틴(MRA-I, MRA-2, MRA-3)이 분리되었으며

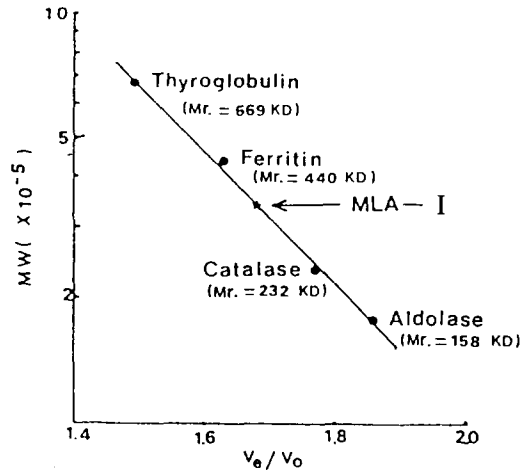


Fig. 6—Determination of the molecular weight of the MLA-I lectin by gel filtration on Sepharose CL-6B column. Vo, void volume; Ve, elution volume.

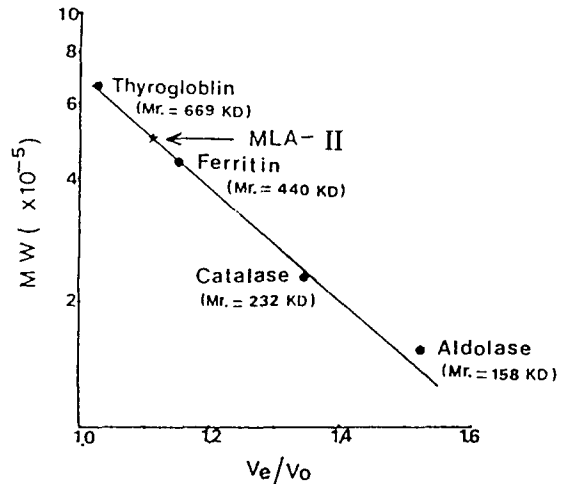


Fig. 7—Determination of the molecular weight of the MLA-II lectin by gel filtration on Sepharose CL-6B column. Vo, void volume; Ve, elution volume.

이들의 분자량은 각각 330KD, 140KD, 64KD이라는 점²⁶⁾, 인도말발굽가재 *Carcinoscorpius rotunda cauda* 체액 렉틴은 subunits의 분자량이 27KD, 28KD이며 native 분자량은 420KD이라는 점²⁷⁾들과 유사하였다. 이와 같이 해양무척추동물의 체액에는 여러 종류의 렉틴이 multimeric한 거대분자로 존재함을 알 수 있었다.

한편, MLA 렉틴은 방법과 결과에서 언급하지는 않

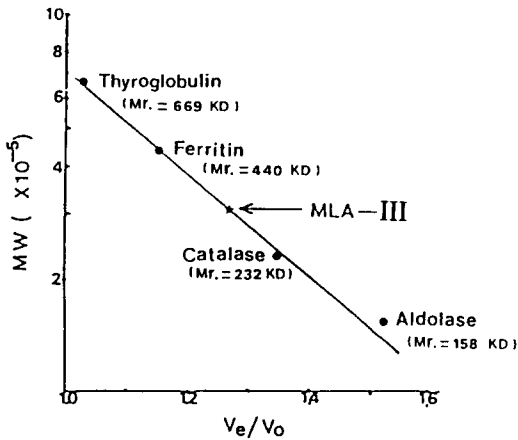


Fig. 8—Determination of the molecular weight of the MLA-III lectin by gel filtration on Sepharose CL-6B column. Vo, void volume; Ve, elution volume.

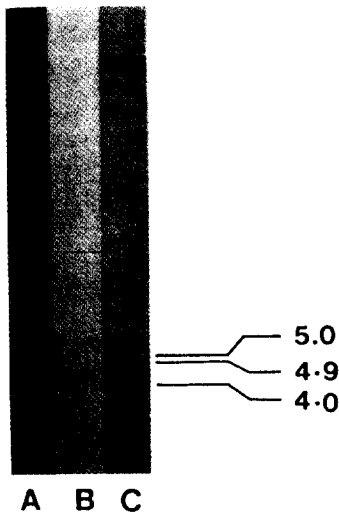


Fig. 9—Analytical isoelectrofocusing of MLA lectins in thin layer ampholine polyacrylamide gel plate (pH 3.5~9.5). Lane A, MLA-I; B, MLA-II; C, MLA-III.

았지만 human blood types와 여러 종의 동물 혈액에 대해 비특이적으로 응집하였으며, trypsin 처리 후 적혈구 응집력시험을 실시하였을때에도 별 차이가 없었다. 또한 2가의 금속이온, Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} 등이 존재할 때 응집현상이 더 강하게 일어났다. 이런 결과는 대부분의 무척추동물 *Limulus polyphemus*²³⁾, *Anthocardis crassispina*²⁴⁾, *Megabalanus volcano*²⁸⁾, *Megabalanus rosa*²⁶⁾ 등에서 얻은 렉틴들이 Ca^{2+} de-

pendent한 결과와 유사하였다.

일반적으로 렉틴의 특성중 가장 흥미있는 부분인 당 특이성을 알아보고자 45종의 carbohydrates로 당에 의한 활성 저해 실험을 한 결과 MLA 렉틴의 활성은 몇 종의 당에 의해 저해되었다.

이들 당의 pyranose ring 구조와 MLA 렉틴의 상관 관계를 알아보기 위해 pyranose ring의 C₃, C₄ 위치에 있는 -OH group의 configuration을 기준으로 분류한 Mekala의 방법을 변형한 Sakakibara등^{6, 29)}의 방법에 따라 C₂, C₃, C₄를 기준으로 분류하였을 때 3종류의 MLA 렉틴은 C₂, C₃, C₄의 pyranose ring configuration이 동일한 D-galactose group과 D-glucuronic acid, 그리고 C₂위치에 -NH₂ group을 가지고 있는 D-galactosamine에 의해 저해현상이 일어났으며, 또한 MLA-II의 경우 C₂위치에 -COCH₃ group을 가진 N-acetyl-D-galactosamine과 N-acetyl-D-glucosamine에 의해서 강하게 저해현상이 일어났다.

이러한 결과는 B형 적혈구를 특이적으로 응집시키는 *Plecoglossus lativelis* (Ayu fish) egg lectin의 C₂, C₃, C₄에 위치한 -OH group이 같은 configuration인 L-rhamnose, L-mannose, L-lyxose에 의해 강한 저해현상을 나타낸 결과²⁹⁾와 같이 당의 configuration이 lectin의 적혈구응집 저해현상과 밀접한 관련이 있는 것으로 사료된다.

전술한 몇가지 특성으로 해양 무척추동물 lectin의 특성을 유추해 보면 이들은 생체내에 여러 종류의 lectin이 다양한 당특이성을 나타내며, multimeric한 거대분자 형태로 존재한다는 보고와 유사하며, Hall and Rowlands³⁰⁾는 이런 이유를 self와 nonself를 구별할 수 없는 무척추동물의 경우 한 종류의 lectin만으로는 self와 multiplicity nonself를 효과적으로 구별할 수 없기 때문이라고 설명하였다.

MLA 렉틴의 아미노산 분석 결과 산성아미노산인 aspartic acid, glutamic acid를 많이 함유하고 있으며 당과 결합할 수 있는 serine, threonine, asparagine을 많이 함유하고 있었다. 이로 미루어 볼 때 MLA lectin은 pI가 낮으며 당을 많이 함유하고 있다고 추정할 수 있으며, 실제 pI를 측정한 결과, MLA-I이 4.0, MLA-II는 4.9, MLA-III는 5.0으로 밝혀졌다.

이런 결과는 아미노산 조성과 일치하며 이런 acidic한 lectins은 다른 해양패류에서도 찾아볼 수 있다. 예를 들면, *Saxidomus purpuratus* lectin인 SAP-I과

Table II — Amino acid composition of MLA lectins

Amino acid	Mol %			Residues/mol.*		
	MLA-I	MLA-II	MLA-III	MLA-I	MLA-II	MLA-III
Asx	15.48	14.58	14.26	63	64	60
Thr	6.65	5.97	6.07	28	27	26
Ser	6.10	6.26	7.51	29	33	38
Glx	15.70	13.84	14.85	51	49	51
Pro	4.67	0.00	6.05	20	00	28
Gly	8.96	11.20	7.70	66	90	59
Ala	5.71	5.55	4.95	34	36	31
Cys	N.D.	N.D.	N.D.**	N.D.	N.D.	N.D.
Val	9.22	8.01	6.93	39	36	31
Met	0.58	1.85	1.29	2	7	5
Ile	0.60	4.28	4.48	35	17	17
Leu	7.50	5.90	6.64	28	24	26
Tyr	6.07	5.49	4.03	16	16	11
Phe	3.53	3.73	3.31	10	12	10
Lys	2.61	1.66	1.63	9	6	6
Trp	1.65	2.70	1.25	4	7	3
His	2.35	6.03	6.02	7	20	19
Arg	2.67	1.06	3.02	7	3	8

* The values of MLA-I, MLA-II and MLA-III lectins are calculated in molar proportion assuming that Mr. W. is 42000, 46000 and 44000, respectively. ** Not detected.

SAP-II의 pI가 각각 4.4, 4.1 이었으며³¹⁾ *Megalobalanus volcano* lectin인 MVA-1과 MVA-2는 각각 4.8, 4.4로 보고되었다.²⁸⁾

한편 이들은 phenol sulfuric acid method로 당함량을 정량하였을 때 MLA lectins은 MLA-I이 10.4%, MLA-II가 9.1%, MLA-III는 12.6%의 당을 함유함이 밝혀졌다. 이런점은 *Geodia cydonium* lectin³²⁾이 9.9%, *T. maxima* lectin³³⁾이 7.0%의 당을 함유한 것과 유사하였다.

진술한 3종의 MLA 렉틴은 당특이성, 등전점, 아미노산 조성이 유사한 isolectins으로 판정할 수 있다. 더욱 이들 3종의 구조유사성과 상관성을 알아보기 위해 널리 이용되는 면역화학적방법, 즉 면역확산법과 면역전기영동 그리고 cross immunoelectrophoresis를 이용하여 3종의 렉틴을 비교한 결과들도 곧 보고하고자 한다.

감사의 말씀

본 연구는 1993-94년도 한국과학재단 핵심전문 연구과제 (931-0700-016-2) 연구비 지원에 의해 수행된 것 중의 하나이기에 이에 감사드리는 바입니다.

문헌

- 1) Green, E.D. and Baenziger, J.U. Characterization of oligosaccharides by lectin affinity highperformance liquid chromatography. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 168-172 (1989).
- 2) Sharma, S.K. and Mohendroo, P.P. Affinity chromatography of cell and membranes *J. Chromatogr.* **184**, 471-499 (1980).
- 3) Sharon, N. Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Adv. Immunol.* **34**, 213-298 (1983).
- 4) Kituo, T and Hattor, K. Concanavalin A as a carrier of daunomycin. *Nature* **265**, 81-82 (1977).
- 5) Laurent, G., Pris, J., Farcet, J.P., Carayon, P. Blythman, H., Casellas, P., Poncelet, P. and Tansen, F.K. Effects of therapy with T 101 ricin A-chain immunotoxin in two leukemia patients. *Blood* **67**, 1680-1687 (1986).
- 6) Liener, I.E., Sharon, N. and Goldstein, I. J. Properties, function and application in biology and medicine. in *The Lectin*. Academic press, New York, pp. 1-600 (1986).
- 7) Yeaton, R.W. Invertebrate lectin: I. Occurrence. *Dev. Comp. Immunol.* **5**, 391-402 (1981).
- 8) Yeaton, R.W. Invertebrate lectin: II. Diversity of specificity biological synthesis and function in recognition. *Dev. Comp. Immunol.* **5**, 535-545 (1981).
- 9) Vasta, G.R. and Marchalonis, J.J. Humoral recognition factors in the arthropoda. The specific of chelicerata serum lectin. *Amer. Zool.* **23**, 157-171 (1983).
- 10) Sigma Catalog Biochemicals, organic compounds for research and diagnostic reagents. Sigma Chemical Co., Lectins, pp. 1845-1873 (1995).
- 11) 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).
- 12) Kim, J.H., Chung, S.R. and Jeune, K.H. Purification of New Lectins, MLA-II and MLA-III, from the Hemolymph of *Meretrix lusoria*. *Yakhak Hoeji*, **38**, 394-400 (1994).
 - 13) Ravindranath, M.H., Higa, H.H., Cooper, E.L. and Paulson, J.C. Purification and characterization of an O-acetylsialic acid-specific lectin from marine crab. *Cancer antennarius*. *J. Biol. Chem.* **260**, 8850-8856 (1985).
 - 14) Laemmli, G. U.K. and King, J. Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **62**, 465-477 (1971).
 - 15) Andrews, p. Estimation of the molecular weight of protein by Sepadex gel filtraion. *Biochem. J.* **91**, 222-233 (1964).
 - 16) Locascio, G., Tigier, H.A. and Battle, A.M. Del C. Estimation of molecular weight of proteins by agarose gel filtration. *J. Chromatog.* **40**, 453-457 (1969).
 - 17) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagents. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
 - 18) LKB manual, Immuno-electrophoretic techniques with the LKB 2117 multiphor. *Application note* **249**, 1-10 (1978).
 - 19) Simpson, R.J. Neuberger, M.R. and Lieu, T.Y. Complete amino acid analysis of protein's from a single hydrolysate. *J. Biol. Chem.* **251**, 1936-1940 (1976).
 - 20) Spackman, D.H., Stein, W.H. and Moore, S. Automatic recoding apparatus for use in the chromatography of amino acid. *Anal. Chem.* **30**, 1190-1206 (1958).
 - 21) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K. Robers, P.A. and Smith, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-356 (1956).
 - 22) Parish, C.R. Simple model for selfnonself discrimination invertebrates. *Nature* **267**, 711-713 (1977).
 - 23) Marchalonis, J.J. and Edelman, G.M. Isolation and characterization of a hemagglutinin from *Limulus polyphemus*. *J. Mol. Biol.* **32**, 453-465 (1968).
 - 24) Giga, Y., Sutoh, K. and Ikai, A. New multimeric hemagglutinin from the coelomic fluid of the sea urchin *Anthocidaris crassispina* *Biochemistry* **24**, 4461-4467 (1985).
 - 25) Harada, A.K., Yokosawa, H. and Ishii, S.I. N-acetylgalactosamine-specific lectin, a novel lectin in the hemolymph of the ascidian *Halocynthia roretzi*: Isolation, characterization and comparison with galactose-specific lectin. *Comp. Biochem. Physiol.* **88B**, 375-381 (1987).
 - 26) Muramoto, K., Ogata, K and Kamiya, H. Comparison of the multiple agglutinins of the acorn barnacle, *Megabalanus rosa*. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 85-93 (1985).
 - 27) Bishayee, S and Dorai, T. Isolation and characterization of a sialic acidbinding lectin(Carcinoscorpin) from indian horseshoe crab *Carcinoscorpius rotunda cauda*. *Biochim. Biophys. Acta* **623**, 89-97 (1980).
 - 28) Kamiya, H., Muramoto, k. and Goto, R. Isolation and characterization of agglutinins from the hemolymph of an arcorn banacle, *Megabalanus volcano*. *Dev. Comp. Immunol.* **11**, 297-307 (1987).
 - 29) Sakakibara, F., Kawauchi, H. and Takayanagi, G. Blood group B-specific lectin of *Plecoglossus altivalis*(Ayu fish) eggs. *Biochim. Biophys. Acta* **841**, 103-111 (1985).
 - 30) Hall, S.L. and Rowlands, Jr. D.T. Heterogeneity of lobster agglutinins. I. Purifi.
 - 31) Tatsumi, M. Arai, Y. and Itoh, T. Purification and characterization of a lectin from the shellfish, *Saxidomus purpuratus*. *J. Biochem.* **91**, 1139-1146 (1982).
 - 32) Muller, W.E.G., Conrad, J., Schroder, C., Zahn, R.K., Kurelec, B., Dreesbach, K. and Uhlenbruck, G. Characterization of the trimeric, selfrecognizing *Geodia cydonium* lectin I. *Eur. J. Biochem.* **133**, 263-267 (1983).
 - 33) Baldo, B.A., Sawyer, W.H., Stick, R.V. and Uhlenbruck, G. Purification and characterization of a galactanreactive agglutinin from the clam *Tridacna maxima*(Roding) and a study of its combining site. *Biochem. J.* **175**, 467-477 (1978).