

## 택사(*Alismatis Rhizoma*) Hemagglutinating Protein의 정제와 특성

박종옥<sup>1</sup> · 김경순\* · 선우근옥

경성대학교 화학과

\*영지대학교 화학과

### Purification and Characterization of Hemagglutinating Protein from Rhizome of *Alisma orientale*

Jong-Ok Park<sup>1</sup>, Kyung-Soon Kim\* and Keun-Ok Sun Woo

Dept. of Chemistry, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea

\*Dept. of Chemistry, Myong Ji University, Yongin 449-728, Korea

#### Abstract

Lectin was purified by using  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , DEAE-cellulose ion-exchange chromatography and Sephadex G-150 column chromatography from *Alismatis Rhizoma* (AR). The specific activity of AR lectin was 50,441 units/mg, and purification folds were 114. The AR lectin agglutinated human erythrocytes of all types (A, B, O, AB). The molecular weight of AR lectin was estimated about 90,500 daltons by gel filtration and each subunits were 42,000, 27,000 and 22,500 daltons on SDS-PAGE respectively. The hemagglutinating activity of the lectin was inhibited by sialic acid, glucose, ribose, galactose, sucrose, and lactose. It was also inhibited by cations such as  $\text{Hg}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$  and  $\text{Pb}^{++}$ .

**Key words** : hemagglutinating protein, lectin, *Alismatis Rhizoma*

#### 서 론

렉틴(Lectin)은 면역계가 발달되지 않은 식물계, 미생물계 및 하등 척추동물에서 항체 대신 외부 침입에 대한 자기방어 기작으로 생성되는 물질로 세포막 표면의 당과 결합하여 적혈구나 다른 여러 종류의 세포들을 응집시키는 성질을 가지고 있다(1-4). 일반적으로 렉틴은 포유동물의 적혈구에 대하여 선택적으로 혹은 비선택적으로 응집현상이 있는 것으로 보고된 바 있다(5). 그리고 적혈구를 응집시키는 물질은 적혈구응집소라고 하며 근래에는 렉틴이라고 부른다(6).

또 어떤 렉틴은 T임파구나 B임파구의 유사분열 촉진능력을 가지기도 한다(7,8). 그리하여 유사분열 촉진인자로 세포생물학에 이용되고 있다(9,10). 최근에는 종양세포에 대한 렉틴의 연구가 많이 행해지고 있으며 Nagata와 Burger 등(11)과 Schaefer 등(12)은 WGA(Wh-

eat germ agglutinin)가 정상세포 보다 종양세포를 더 잘 응집시킬 수 있음을 관찰하여 렉틴 연구의 획기적인 전환점을 가져왔으며 Con A(*Canavalia ensiformis*)는 종양세포만을 응집시킨다는 보고도 있다(8). 실제로 ricin, abrin 등은 암치료에 응용되고 있다(13,14).

이러한 성질 때문에 렉틴은 생명과학 분야의 중요한 연구도구 물질로써 glycopeptides나 glycoprotein의 분리, surface carbohydrate나 다른 세포들의 분리에 이용되며 혈액형 검사, 세포의 종양에 관한 연구, 면역학적 연구 등에 이용되고 있다(15).

우리나라는 현재 약 400여종이 넘는 천연약물 및 식물을 한방치료 목적으로 사용할 뿐 아니라 식용으로 섭취하고 있다. 이러한 천연약물 및 식물은 신약의 발굴 대상으로 연구자의 관심이 높고 그에서 생성된 생약제제가 공급되어 국민이 복용하고 있는 바이다. 본 실험에서는 한방재료 중에서 이노 및 소종제(腫腫劑)로 쓰여던 택사로 부터 적혈구응집소(렉틴)를 분리, 정제하여 그 분자적, 물리화학적 성질을 연구하였다.

<sup>1</sup>To whom all correspondence should be addressed

## 재료 및 방법

### 시약

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, DEAE-cellulose, Gel-filtration molecular weight marker, N-acetyl-D-galactosamine, N-acetyl-D-glucosamine, D-glucosamine, glucose, D-fructose, sucrose, lactose, N-acetyl-neuraminic acid는 Sigma Chemical Co.에서, Bio Gel P-6, SDS-PAGE molecular weight standard는 Bio-Rad Lab에서 구입하였고 N, N'-methylenebisacrylamide와 D-ribose는 Merk Co.에서 구입하여 사용하였다. 그 밖의 시약은 특급 시약을 사용하였다.

### 렉틴의 정제

텍사분말 50g에 0.15M NaCl 500ml를 가하여 4°C에서 24시간 저어주면서 방치한 후 Potter-Elvehjem homogenizer로 균질화하였다. 균질화된 용액을 20,000×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 조추출물로 하였다. 이 추출물에 고체 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가하여 20% 포화시킨 후 30분간 방치하여 20,000×g에서 15분간 원심분리한 다음 상층액에 대해 고체 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하여 80% 포화시켰다. 30분간 방치 후 20,000×g에서 10분간 원심분리하여 20~80% 포화 침전물을 얻었다. 20~80% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 포화침전물을 증류수에 녹여 25mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)로 투석하였다. 투석이 완료된 추출물을 25mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)로 미리 평형 시켜둔 DEAE-cellulose column (1.9×60cm)에 주입하여 같은 buffer로 용출시켜 용출액의 흡광도 (280nm)가 0.05 이하로 될 때 까지 씻어 주었다. 이 column을 0~1M NaCl로 linear gradient하여 25ml/h의 용출속도로 용출시켜 각 분획의 흡광도를 파장 280nm에서 측정하고 렉틴 활성을 갖는 분획을 모아 농축시켰다. 위의 시료를 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)로 미리 평형 시켜둔 Sephadex G-150 column (2.0×98cm)에 주입하여 같은 buffer로 22ml/h의 용출속도로 용출시켜 흡광도를 파장 280nm에서 측정하고 렉틴 활성이 있는 분획을 모아 동결건조하였다. 동결건조된 시료를 증류수에 녹여 Bio-Gel P-6 column (1.6×63cm)에서 탈염한 다음 각종 실험에 사용하였다.

### 분자량 측정

정제된 렉틴의 분자량은 Sephadex G-150 column (2.0×98cm)을 사용하여 Andrews 방법 (16)으로 측정

하였다. 표준 단백질로는 carbonic anhydrase (29,000), bovine serum albumin (66,000), alcohol dehydrogenase (150,000), β-amylase (200,000) 등을 사용하였다. Subunit수와 그 분자량을 알기위하여 Weber와 Osborn 등의 방법 (17)에 따라 측정하였다. 즉, native protein에 β-mercaptoethanol을 첨가한 후 95°C에서 3분간 가열한 후 시료로 사용하였고, separating gel의 polyacrylamide의 농도는 12.5%로 하였으며 standard protein은 phosphorylase b (97,400), bovin serum albumin (66,200), hen egg white ovalbumin (45,000), bovine carbonic anhydrase (31,000), soybean trypsin inhibitor (21,500), hen egg white lysozyme (14,400) 등을 사용하였다. 전기영동은 40mA의 전류를 4시간 동안 흘려서 수행하였고, 전기영동이 끝난 후, gel을 1% Coomassie brilliant blue R250 용액으로 염색하였다. Subunit 분자량은 standard protein들의 분자량과 이동도(R<sub>f</sub>)를 도시하여 계산하였다.

### 단백질의 정량

각 정제과정 중의 단백질 함량은 bovin serum albumin을 표준물질로 하여 Bradford 방법 (18)으로 정량하였다.

### 렉틴활성의 시험

렉틴활성의 시험은 microtiter plate에 렉틴용액 20μl를 0.15M NaCl용액으로 연속 2배 희석법 (19)으로 희석하고, 3% 적혈구용액을 각 well에 25μl씩 가한 후 실온에서 30분 방치하여 적혈구 응집 여부를 관찰하였다. 적혈구는 0.15M NaCl용액으로 4회 씻은 후, 0.15M NaCl로 3% 적혈구용액을 제조하여 사용하였다. 응집 역가는 응집이 일어난 최종 희석배수의 역수로 나타내었다. 혈액형에 대한 특이성을 알아보기 위하여 사람의 A, B, O, AB형 적혈구 및 돼지, 개, 쥐 등의 적혈구를 사용하였다.

### 렉틴활성의 저해성 시험

각종 당은 0.15M NaCl 용액에 녹여 최대농도를 0.2 M로 하여 당용액 50μl를 연속 2배 희석법으로 희석하여 사용하였다. 정제된 렉틴을 0.15M NaCl에 녹인 후 렉틴활성을 나타내는 최종 농도의 4배되는 용액을 25μl씩 넣은 후 실온에서 30분 방치한 다음 3% 적혈구용액 25μl를 가하여 적혈구 응집 반응을 관찰하였다. 금속이온의 저해실험은 당 대신 0.1M 금속이온용액 50μl를 0.15M NaCl용액으로 연속 2배 희석하고 당의 저해

실험과 같은 방법으로 시행하였다.

렉틴의 pH 및 온도에 대한 안정성

정제된 렉틴을 pH가 각기 다른 buffer에 녹여 실온에서 30분 방치한 후 다시 pH를 7.2로 맞추어 남아 있는 활성을 관찰하였다. 렉틴의 온도에 대한 안정성은 0.15M NaCl 용액에 녹인 렉틴을 0~100°C 까지의 여러 온도에서 30분간 숙성시킨 후 온도를 25°C로 맞추어 남아있는 활성을 관찰하였다.

결과 및 고찰

택사로부터 렉틴을 분리, 정제한 결과는 Table 1과 같다. Table 1에서 보는 바와 같이 Alismatis Rhizoma homogenate의 비활성도는 440.61 units/mg protein이었고 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> precipitate분획의 비활성도는 1651.61 units/mg protein으로 3.74배 정제됨을 나타내준다. DEAE-cellulose column chromatography에서는 0.19~0.48M NaCl 농도에서 렉틴이 용출되었으며 비활성도는 2925.71 units/mg protein을 나타내 이때의 정제도는 6.64배였다 (Fig. 1). 더욱 순수하게 정제하기 위해 3차에 걸쳐 Sephadex G-150 gel filtration을 하였다. 정제과정의 최

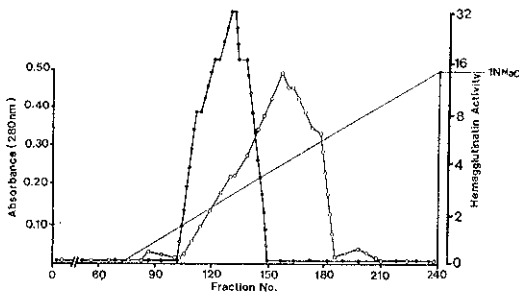


Fig. 1. Elution profile of the Alismatis Rhizoma lectin on DEAE-cellulose ion-exchange chromatography. Column ; 1.9×65cm, Eluent ; 25mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) with a linear gradient, Flow rate ; 25ml/h  
○—○ : Absorbance at 280nm — : Linear gradient  
●—● : Agglutinating activity

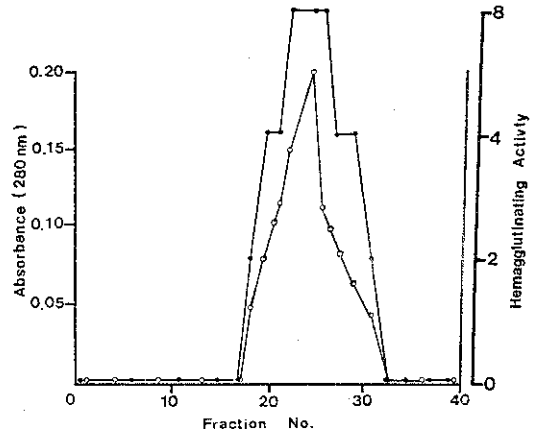


Fig. 2. Elution profile of the Alismatis Rhizoma lectin on the 3rd Sephadex G-150 gel filtration.  
○—○ : Absorbance at 280nm  
●—● : Agglutinating activity,

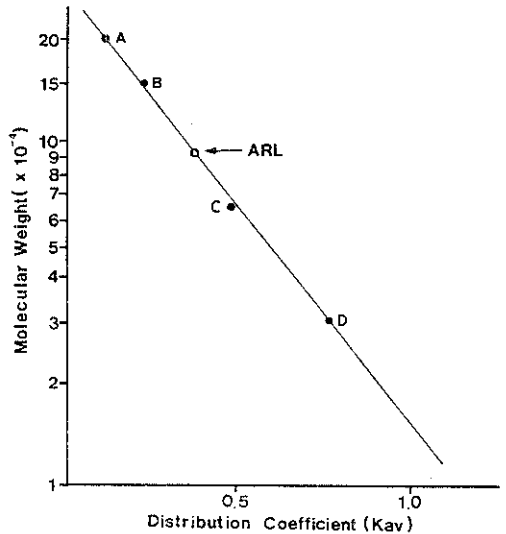


Fig. 3. Determination of the molecular weight of purified lectin on Sephadex G-150 gel filtration. Standard marker proteins were : A : β-amylase (200,000), B : alcohol dehydrogenase (150,000), C : bovine serum albumin (66,000), D : carbonic anhydrase (29,000), ARL : Alismatis Rhizoma lectin.

Table 1. Purification of hemagglutinin from Alismatis Rhizoma

Purification steps	Total protein (mg)	Total units × 10 <sup>3</sup>	Specific activity (units/mg protein)	Purification (fold)	Recovery
Homogenates	1882.48	829.44	440.61	1.00	100.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitate	347.98	574.73	1651.61	3.74	69.29
DEAE-cellulose	159.25	465.92	2925.71	6.64	56.17
1st Sephadex G-150	18.20	199.68	10971.42	24.90	24.07
2nd Sephadex G-150	3.72	158.72	42666.66	96.83	19.13
3rd Sephadex G-150	2.83	142.75	50441.69	114.48	17.21

\* A unit of hemagglutinating activity is defined as the reciprocal of the dilution endpoint

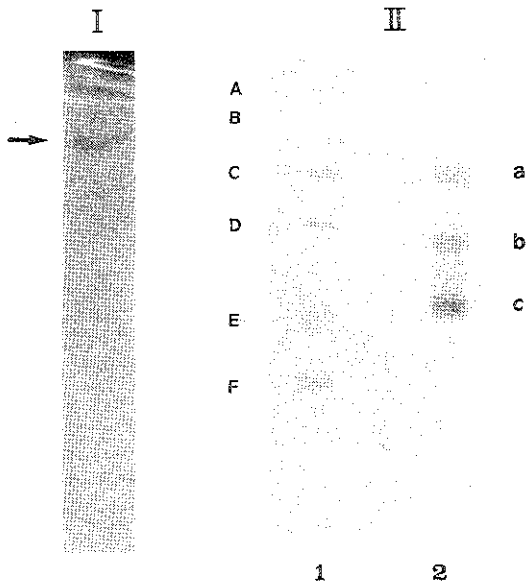


Fig. 4. Electrophoretogram of purified lectin on non-denatured(I) and SDS-polyarylamide gel(II).

Lane 1 was marker proteins. Lane 2 was purified *Alismatis Rhizoma* lectin subunits.

The marker proteins were ; A : phosphorylase b(97,000), B : BSA(66,200) C : hen egg white ovalbumin (45,000), D : bovine carbonic anhydrase (31,000) E : soybean trypsin inhibitor (21,500), F : hen egg white lysozyme(14,400).

종단계인 3차 Sephadex G-150 gel filtration 분획의 비활성도는 50,441.69units/mg protein이고 정제도는 114.48배이며 회수율은 17.21%였다. Fig. 2에 3차 Sephadex G-150 column chromatogram과 렉틴활성도를 나타내었다.

정제된 택사 렉틴을 Sephadex G-150 gel filtration으로 분자량을 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었고 순도 확인 및 subunit수와 그 분자량 측정을 위하여 SDS-PAGE한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 택사 렉틴의 gel filtration으로 측정된 분자량은 90,500 daltons 정도이었다. 그리고 SDS-PAGE (Fig. 4)에서는 3개의 주요 밴드가 나타났고 이들 각각의 subunit 분자량은 a가 약 42,000 daltons, b는 27,000 dal-

Table 2. Agglutination of erythrocytes by purified hemagglutini

Erythrocytes source	Hemagglutinating activity	Relative activity(%) <sup>a</sup>
Human Type A	256	50
Type B	256	50
Type O	256	50
Type AB	256	50
Dog	32	6.25
Pig	512	100
Mouse	4	0.78

<sup>a</sup> The hemagglutinating activity with pig erythrocytes was taken as 100

Table 3. Inhibition of purified *Alismatis Rhizoma* hemagglutinin for human A erythrocytes by sugars

Sugars	Concentration, mM						
	200	100	50	25	12.5	6.25	3.13
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactosamine	-	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl-D-glucosamine	-	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl-D-galactosamine	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	-	-	-	-	-
D-Fructose	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	+	+	+	-	-	-	-
D-Glucosamine	-	-	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	+	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	-	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	-	-	-	-	-
N-Acetyl-Neuraminic acid (Sialic acid)	+	+	+	+	+	+	+

\* Hemagglutination inhibition tests were performed by using a concentration of lectin that was four times higher than the dilution endpoint and a 3% suspension of human A erythrocytes

\* + : Inhibition, - : Non-inhibition

tons, c는 22,500 daltons으로 측정되었다. 세개의 밴드를 slicing하여 buffer 용액에 녹여 적혈구 응집실험을 한 결과 모두 응집반응을 보였다. 이것은 각 subunit에도 당과 결합하는 부위가 있음을 시사해 준다. 이 결과로부터 택사 렉틴은 3종류의 subunit으로 이루어진 것으로 생각된다. 렉틴의 분자량과 subunit의 분자량은 매우 다양하며 subunit수도 monomer에서 octadecamer로 이루어져 있는 것 까지 있으며 한 종류의 subunit type으로 되어 있는 것에서 부터 여러 종류의 subunit가 모여

분자를 이루고 있는 것으로 보고되어 있다(20-23). 이러한 차이는 생물종의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

택사 렉틴으로 사람, 돼지, 개 및 쥐 등의 적혈구에 대한 응집시험을 행한 결과는 Table 2와 같다. 일반적으로 렉틴은 포유동물의 적혈구에 대하여 선택적으로 혹은 비선택적으로 응집현상이 있는 것으로 보고된 바 있다(5). 즉 N-acetyl-D-galactosamine에 특이성이 있는 *Dolichos biglorus* lectin은 사람의 A형 적혈구에만 응집현상을 나타내며 lactose에 특이성이 있는 전기뱀장어 lectin은 사람의 O형 적혈구만을 응집시킨다. 그러나 mannose에 특이성이 있는 Con A나 galactose 유도체에 특이성이 있는 ricin 등은 포유동물 적혈구에 대해 특이성이 낮다. Table 2에서 보는 바와 같이 택사 렉틴은 사람, 쥐, 돼지 및 개 등의 적혈구에 대하여 응집의 차이는 있으나 전반적으로 응집현상을 유발하여 혈구 비특이성임을 보여 주었다.

택사 렉틴에 대한 당들과 금속이온의 저해결과는 Table 3 및 4와 같다. Sialic acid, glucose, ribose 등 당에 의한 응집현상에 대한 방해는 곧 세포표면의 lectin에 특이하게 결합하는 탄수화물이 존재함을 나타내는 것이다. 척추동물의 조직으로부터 분리된 대부분의 렉틴은  $\beta$ -galactoside와 결합한다. 또 무척추 동물 렉틴중 *Sarcophaga peregrina* larvae의 hemolymph에서 분리한 렉틴도 galactoside-specific 렉틴이다. 이러한 적혈구 특이성 또는 당 특이성을 이용하여 세포표면의

Table 4. Inhibition of purified *Alismatis Rhizoma* hemagglutinin for human A erythrocytes by metal ions and EDTA

Metal ions	Concentration, mM					
	100	50	25	12.5	6.25	3.13
MgCl <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
CaCl <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
HgCl <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+
KCl	-	-	-	-	-	-
FeCl <sub>2</sub>	+	+	+	+	-	-
MnCl <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
CuCl <sub>2</sub>	+	+	+	-	-	-
PbCl <sub>2</sub>	+	+	+	-	-	-
BaCl <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
EDTA	-	-	-	-	-	-

\* Hemagglutination inhibition tests were performed by using a concentration of the lectin that was four times higher than the dilution endpoint and a 3% suspension of human A erythrocytes

\*+ : Inhibition, - : Non-inhibition

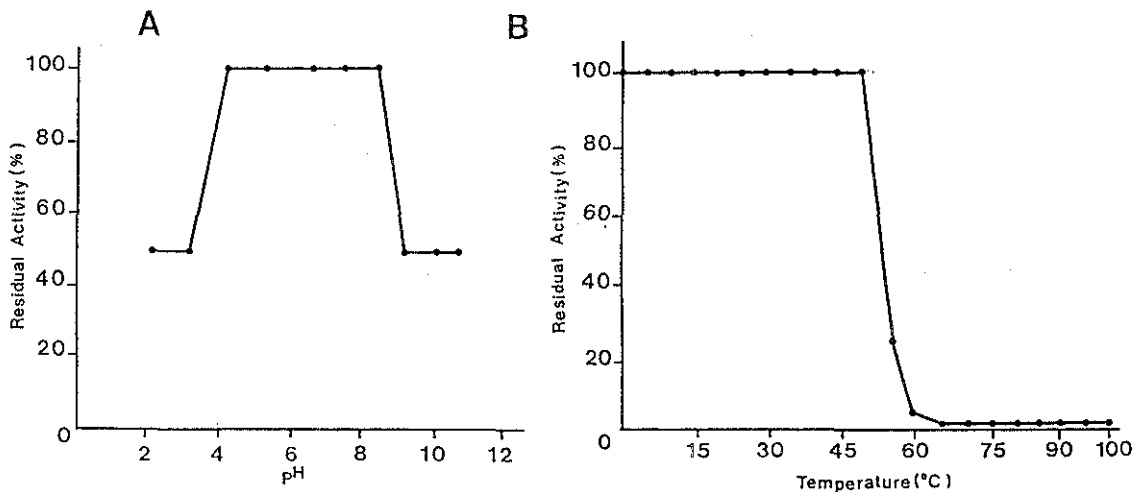


Fig. 5. Stability at different pH and temperature of the purified *Alismatis Rhizoma* lectin.

A : The purified ARL was preincubated in buffers with different pH from 2.01 to 10.77 for 30mins at room temperature and the remaining activity was determined at pH 7.2 in saline.

B : The purified ARL dissolved in saline was incubated at various temperature for 30min and the remaining activity was determined at 25°C.

당 연구나 항체 같은 당단백질을 정제하는데 렉틴이 쓰이고 있다.

Becker 등(24)은 X선 회절에 의해 Con A 렉틴의 3차원적 구조를 밝히고, Con A 렉틴은  $Ca^{++}$ 과  $Mn^{++}$ 이온이 함유되어 있어 당과 결합하는데 쓰인다고 하였다. 텍사 렉틴은 Table 4에서 보는 바와 같이  $Hg^{++}$ 이온이 3.51mM에서, 그리고  $Cu^{++}$ ,  $Pb^{++}$ 이온은 25mM에서 응집력의 저해가 시작되었다.

텍사 렉틴은 pH 3.15 이하와 pH 9.33 이상에서 활성이 50% 감소하였고 pH 4.11~8.33 사이의 범위에서 안정하였다(Fig. 5). 또한 온도를 변화시켰을 때 적혈구의 응집력이 45°C까지는 100% 안정하였으나 65°C 이상에서는 완전히 소실되었다(Fig. 5). 이러한 결과를 볼 때 텍사 렉틴은 온도에 비교적 안정한 편이나 65°C 이상의 고온에서는 불안정함을 보여 준다.

우리나라는 많은 수의 생약과 식물을 한방진료의 목적에 사용할 뿐만 아니라 민간약으로 사용해 왔으므로 그 자원은 풍부하나 그 약효성분에 대한 자료는 부족한 상태라고 생각된다. 본 논문은 텍사의 유효성분 중 렉틴의 분리, 정제를 목적으로 이루어졌으며, 앞으로 이들에 대한 보다 깊은 생화학적 분석과 생리적 활성 작용에 대한 연구가 뒤따라야 할 것이다.

## 요 약

텍사로부터 황산암모늄 분별 침전, DEAE-cellulose ion exchange chromatography, Sephadex G-150 chromatography 등의 방법을 이용하여 렉틴을 분리, 정제하였다. 정제한 렉틴의 분자량은 gel filtration법에 의해 측정된 결과 90,500 dalton이었으며, SDS polyacrylamide gel 전기영동을 실시한 결과 그 subunit 분자량은 각각 42,000, 27,000, 22,500 dalton으로 나타나므로 텍사 렉틴이 heterotrimer임을 알았다. 정제된 텍사 렉틴은 사람 적혈구의 경우 모든 혈액형에 대하여 응집현상을 나타내었으며 돼지, 쥐 및 개 등의 적혈구에 대해서도 모두 응집현상이 나타나 혈구 비특이성임을 보여주었다. 또한 이 렉틴은 sialic acid, glucose, ribose, sucrose, lactose, galactose 등 당에 의해서, 그리고  $Hg^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Cu^{++}$  이온 등에 의해 적혈구 응집력이 저해되었다.

## 감사의 말씀

이 논문은 1994년도 경성대학교 학술연구 조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Sharon, N. and Lis, H. : Lectins : Cell-Agglutinating and sugar-specific proteins. *Science*, **177**, 949(1972)
2. Pistole, T. G. : Interaction of bacteria and fungi with lectins and lectin-like substances. *Annu. Rev. Microbiol.*, **35**, 85(1981)
3. Sharon, N. and Lis, H. : Lectins as cell recognition molecules. *Science*, **246**, 227(1989)
4. Finstad, C. D., Litman, G. W., Finstad, J. and Good, R. A. : The characterization of purified erythrocyte agglutinins from two invertebrate species. *J. Immunology*, **108**, 1704(1972)
5. Guillot, J., Genaud, L., Gueugnot, J. and Damez, M. : Purification and properties of two hemagglutinins of the mushroom *Laccaria amethystina*. *Biochemistry*, **22**, 5365(1983)
6. Dixon, H. B. F. : Defining a lectin. *Nature*, **292**, 292(1981)
7. Nowell, P. C. : Phytohemagglutinin : An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Research*, **20**, 462(1960)
8. Sjöberg, O. : Reconstitution of immunocompetence in B cells by addition of concanavalin A or concanavalin A-treated thymus cells. *Clin. exp. Immunol.*, **13**, 213(1973)
9. Leroux, J. Y., Poole, A. R., Webber, C., Vippari, V., Choi, H. U., Rosenberg, L. C. and Banerjee, S. : Characterization of proteoglycan-reactive T cell lines and hybridomas from mice with proteoglycan-induced arthritis. *J. Immunology*, **148**, 2090(1992)
10. Sowalsky, R. A. and Fox, B. S. : Pattern of lectin binding to murine T lymphocytes. *Immunology*, **75**, 92(1992)
11. Nagata, Y. and Burger, M. M. : Wheat germ agglutinin. *J. Biol. Chem.*, **249**, 3116(1974)
12. Schaefer, R. L., Keller, K. F. and Doyle, R. J. : Lectins in diagnostic microbiology : Use of wheat germ agglutinin for laboratory identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.*, **10**, 669(1979)
13. Nicolson, G. L., Blaustein, J. and Etzler, M. E. : Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their quantitative interaction with a murine lymphoma. *Biochemistry*, **13**, 196(1974)
14. Wei, C. H., Hartman, F., Pfuderer, P. and Yang, W. K. : Purification and characterization of two major toxic proteins from seeds of *Abrus precatorius*. *J. Biol. Chem.*, **249**, 3061(1974)
15. Doyle, R. and Keller, K. : Lectins in diagnostic microbiology. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, **3**, 4(1984)
16. Andrews, P. : The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weight over a wide range. *Biochem. J.*, **96**, 595(1964)
17. Weber, K. and Osborn, M. : The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406(1969)

18. Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing of principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1956)
19. Chung, S. R., Jeune-chung, K. H. and Kim, K. A. : Isolation, purification and characterization of phytohemagglutinating proteins from Korean natural products. *Arch. Pharm. Res.*, **3**, 31 (1980)
20. Howard, I. K., Sage, H. J. and Stein, M. D. : Studies on a phytohemagglutinin from the lentil. *J. Biol. Chem.*, **246**, 1590 (1971)
21. Lotan, R., Siegelman, H. W., Lis, H. and Sharon, N. : Subunit structure of soybean agglutinin. *J. Biol. Chem.*, **249**, 1219 (1974)
22. Olsnens, S., Stripe, F., Sandvig, K. and Pihl, A. : Isolation and characterization of Viseumin, a toxic lectin from *Viscum album L.* (Mistletoe). *J. Biol. Chem.*, **257**, 13263 (1982)
23. Bausch, J. N. and Poretz, R. D. : Purification and properties of the hemagglutinin from *Maclura pomifera* seeds. *Biochemistry*, **16**, 5790 (1977)
24. Becker, J. W., Reeke, G. N. Jr., Wang, J. L., Cunningham, B. A. and Edelman, G. M. : The covalent and three dimensional structure of concanavalin A. *J. Biol. Chem.*, **250**, 1513 (1975)

(1995년 4월 7일 접수)