

## 팽이버섯으로부터 Lectin의 정제와 특성

김형석 · 손승렬<sup>1</sup> · 황세영 · 홍범식\*

\*고려대학교 생명공학원, <sup>1</sup>단국대학교 미생물학과

**초 록** : 식용버섯인 팽이버섯(*Flammulina velutipes*)으로부터 적혈구 응집능력을 갖는 렉틴(*flammulina velutipes* lectin, FVL) FVL-1과 FVL-2을 정제하였다. FVL-1과 FVL-2의 분자량은 각각 10.6 kDa과 37 kDa으로 추정되었다. FVL-2는 사람적혈구의 경우 모든 혈액형에서 응집현상을 나타내었으나, FVL-1은 O형의 적혈구에 대하여 높은 상대활성도를 나타내었다. 렉틴의 hemagglutination inhibition test 결과 FVL-1과 FVL-2는 fetuin, bovine submaxillary mucin, asialofetuin, porcine stomach mucin에 의해 적혈구 응집력이 저해되었다. FVL-1은 1.56 mM Cu<sup>2+</sup>에서 적혈구 응집력이 저해되었으며, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> 등에서도 저해되었다. 반면 FVL-2는 금속 이온에 대한 저해가 나타나지 않았다. pH 안정성에 있어서 FVL-1은 pH 5~11에서 안정하였으며, FVL-2는 pH 4~7까지의 범위에서 안정하였다. 온도 안정성에 있어서는 FVL-1과 FVL-2 각각 55°C, 45°C까지 안정하였다. FVL-1은 단백질이었으며 FVL-2는 당 단백질이었다. (1999년 9월 4일 접수, 1999년 10월 30일 수리)

### 서 론

### 재료 및 방법

렉틴은 당과 결합하는 단백질 또는 당 단백질로, 적혈구 세포를 응집시키고 당화합물을 침전시키며 적어도 두개 이상의 당결합부위를 갖는 것으로 정의된다. 그들은 세포나 다른 물질들을 응집시키기 때문에 서로 그룹지어져 있으며 특별한 당물질이나 다른 분자들과 특이적으로 결합한다.<sup>1-3)</sup>

렉틴의 특이한 성질은 mitogenic factor로서 임파구를 자극한다는 점이다. 생체내 이물질인 항원이 들어오게 되면 임파구의 면역반응을 도와주는 macrophage가 이를 임파구에 전해줌으로서 그 면역반응이 시작되게 된다. 또 어떤 렉틴은 T임파구나 B임파구의 유사분열 촉진 능력을 가지기도 한다.<sup>4)</sup> 최근에는 종양세포에 대한 렉틴의 연구가 많이 행해지고 있으며 최근 연구 결과<sup>5)</sup>에 따르면 피마자에서 추출한 ricin의 어떤 효소의 작용으로 ribosome이 단백질 합성을 수행하지 못하게 함으로써 암세포의 증식을 막아준다고 하였다. 이러한 성질때문에 렉틴은 생명과학분야의 중요한 단백질로서 세포간 인식작용, glycopeptide나 glycoprotein의 분리, surface carbohydrate나 다른 세포들의 분리에 이용되며, 혈액형검사, 면역학적 연구, 그리고 암의 치료와 진단에 응용되고 있다. 현재 각종 천연물 자원에서 개발하려는 시도가 활발히 전개되고 있으며 계속 새로운 성질의 렉틴이 개발, 연구되고 있다. 본 실험에서는 버섯으로부터 렉틴을 정제하여 성질을 알아보고자 하였다. 실제로 많은 버섯들이 렉틴을 생산하며 *Agaricus campestris*,<sup>6)</sup> *Agaricus bisporus*,<sup>7)</sup> *Maramius oreades*,<sup>8)</sup> *Laccaria amethystina*,<sup>9)</sup> 그리고 *Volvariella volvacea*<sup>10)</sup> 등의 담자균류의 자실체로부터 몇몇 렉틴은 분리되어 보고되었다. 본 연구에서는 렉틴의 생물학적 역할을 연구하기 위한 준비로써 식용버섯중의 하나인 팽이버섯(*Flammulina velutipes*)으로부터 렉틴을 분리, 정제하고, 그 특성을 조사하였다.

### 재료

팽이버섯 자실체는 조치원시장에서 시판품을 구입하여 사용하였다. DEAE-TOYOPEARL 650 M, TSK-Gel HW-55F는 Tosho사(Tokyo, Japan)에서, 분자량 측정을 위한 표준 단백질과 nonidet P40 그리고 DIG glycan/Protein double labelling kit는 Boehringer Mannheim사(Germany)에서 구입하였고 Coomassie Brilliant R-250, Ponceau S stain dye, hemagglutinating inhibition test를 위한 glycoprotein과 당은 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하였으며, 다른 시약들은 특급 시약들을 사용하였다.

### Lectin의 정제

팽이버섯 100 g에 50 mM PBSE(Phosphate-buffered saline, 2 mM EDTA, pH 7.1) 450 ml을 넣은다음 4°C에서 blender로 균질화 하고(2분간 30초씩 4회), 40분 방치한 후, 렉틴 성분을 12,000×g에서 30분간 원심분리하여 그 상층액을 Miracloth (Calbiochem Co., USA)에 통과하여 그 여과액을 조 추출물(crude extract)로 하였다.

### Ammonium sulfate fractionation

조 추출물을 ice bath상에서 서서히 교반하면서 황산암모늄 분말을 서서히 가하여 0~30%, 그리고 30~70% 포화되게 하고 각 포화도에서 2시간 서서히 교반한 후 13,000×g에서 30분간 원심분리하였다. 각 포화도에서의 침전물은 소량의 PBSE에 녹인 후 전부 모아서 같은 완충용액으로 24시간 투석한 후 원심 분리하여 침전물을 얻었다.

### Ethanol treatment

위에서 얻은 침전물을 ice bath상에서 영하 20°C로 냉각된 95%(v/v) 에탄올을 천천히 가하여 최종농도가 20%되게 하였고

찾는말 : 팽이버섯, lectin, glycoprotein  
\*연락처

0°C에서 2시간 방치한 후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 불용성 물질을 제거하였다. 이 물질은 30°C로 가열하면서 aspirator를 이용해 에탄올을 제거하였고, 바로 동결건조하여 DEAE-TOYOPEARL 650 M column chromatography에 사용되었다.

**DEAE-TOYOPEARL 650 M ion-exchange column chromatography**

에탄올 처리된 조 렉틴을 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 미리 평형화 시킨 DEAE-TOYOPEARL 650M column(2.4×27 cm)에 주입하여 수지에 결합되지 않은 물질을 같은 완충용액으로 씻어내고, 렉틴분획은 0.2 M, 0.5 M NaCl의 염농도를 단계별 농도구배로 용출시켰다. 용출속도는 시간당 50 ml로 하였으며, 렉틴활성을 나타내는 분획을 모아 동결 건조하였다.

**TSK-Gel HW-55F column chromatography**

앞 과정에서 얻은 렉틴부분을 더욱 정제하기 위해 미리 평형시켜둔 TSK-Gel HW-55F column(1.6×65 cm)에 주입하여 10 mM PBS(pH 7.1)로 용출시켰다. 용출속도는 시간당 3 ml로 하였으며, 렉틴활성이 있는 분획을 모아 증류수에서 투석, 동결건조하여 특성시험에 사용하였다.

**SDS-PAGE**

정제한 렉틴의 순도 확인을 위해 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)는 Zahler<sup>11)</sup>의 방법에 의해 행해졌다. 실험에서 얻어진 렉틴의 순도 확인을 위해 15% resolving gel을 사용하여 discontinuous gel electrophoresis를 시행하였다. Sample은 전기영동하기전 2%의 SDS 존재하에서 100°C에서 5분간 가열되었다. 단백질 band는 coomassie brillant blue로 염색하였다.

**분자량 측정**

분자량을 측정하기 위한, 시약으로는 α2-macroglobulin(M<sub>r</sub> 170,000), β-galactosidase(M<sub>r</sub> 116,353), fructose-6-phosphate kinase(M<sub>r</sub> 85,204), glutamate dehydrogenase(M<sub>r</sub> 55,562), aldolase(M<sub>r</sub> 39,212), triose phosphate isomerase(M<sub>r</sub> 26,626), trypsin-inhibitor(M<sub>r</sub> 20,100), lysozyme(M<sub>r</sub> 14,307)을 사용하였다.

**단백질 정량**

단백질 정량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준 물질로 하여 Lowry<sup>12)</sup>의 방법으로 정량하였다. Column으로부터 용출된 단백질은 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

**Hemagglutination test**

적혈구는 사람의 혈액(Type A)을 saline으로 3번 세척하여 완충용액(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.1)에서 2%의 농도로 현탁되어서 hemagglutination test에 사용됐다. 2% 적혈구의 응집은 microtiter U-plate(Falcon. 3911)에서 행해졌다. Well에 연속 2배 희석된 렉틴을 각각 100 μl씩 넣고 사람의 적혈구 현탁액을 각각의 well에 같은 양 넣어준 다음 혼합액을

실온에서 1시간 반응시킨 후 hemagglutination을 측정하였다. Hemagglutination activity titer(역가, 적정농도)는 혈액응집을 일으키는 최종점 희석에 상당하는 것으로 정의된다.

렉틴의 혈액형에 대한 특이성을 알아보기 위하여 사람의 혈액형 A, B, AB 및 O형의 적혈구들을 사용하였으며, 렉틴용액 25 μl를 saline용액으로 연속 2배 희석하고, 2% 적혈구 용액을 각 well에 25 μl씩 가한 후, 실온에서 1시간 방치하여 적혈구 응집을 관찰하였다.

**Hemagglutination inhibition test**

렉틴활성에 대한 저해성 시험은 렉틴활성을 나타내는 최종농도의 4배가 되는 용액을 기질로 사용하였다. 즉, 당의 저해시험은 200 mM 농도의 가당용액 (D(+)-maltose, D(+)-galactose, D(-)-fructose, D(+)-glucosamine, D(+)-mannose, lactose, 및 N-acetyl-D-glucosamine) 10 μl를 saline으로 연속 2배 희석하고 위의 렉틴용액을 10 μl씩 첨가하여 30분 방치하였다. 여기에 2% 적혈구용액 10 μl를 가하여 실온에서 1시간 방치한 후, 적혈구 응집을 관찰하였다. 금속이온의 저해 실험으로는 당 대신 200 mM의 각 이온용액 (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 및 MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) 10 μl를 saline으로 연속 2배 희석하고 당의 저해시험과 같은 방법으로 시행하였다. 당단백질에 의한 저해시험은 1 mg/ml 농도의 당단백질(fetuin, asialofetuin, bovine submaxillary glands mucin type I, porcine stomach mucin type III) 10 μl를 saline으로 연속 2배 희석하고 위의 렉틴용액을 10 μl씩 첨가하여 30분 방치하였다. 여기에 2% 적혈구용액 20 μl를 가하여 실온에서 1시간 방치한 후, 적혈구 응집을 관찰하였다.

**pH에 대한 안정성**

정제된 렉틴을 각각 pH가 다른 buffer에 녹여 실온에서 1시간동안 방치한 후, pH를 다시 7.2로 맞추고, 혈구응집 반응을 통해 남아있는 렉틴의 활성을 관찰하였다. 여기에 사용한 buffer는, 100 mM citrate-sodium citrate buffer(pH 3, 4, 5), 100 mM Na-phosphate buffer(pH 6, 7), 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8, 9), 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> buffer(pH 10, 11)을 사용하였다.

**온도에 대한 안정성**

PBS에 녹인 렉틴을 25~95°C까지의 여러 온도에서 5분동안 열처리한 후, 얼음물에서 즉시 냉각하고, 혈구 응집반응을 통하여 남아있는 렉틴활성을 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**렉틴의 정제**

*Flammulina velutipes* lectin(FVL)의 정제는 조 추출물을 ammonium sulfate fractionation, ethanol treatment, DEAE-TOYOPEARL 650M ion-exchange chromatography, TSK-Gel HW-55F gel chromatography을 순차적으로 행하여 정제하였으며 정제한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. Summary of the purification of *Flammulina velutipes* lectin

	Total protein (mg)	Total activity (titer)	Specific activity (titer/mg protein)	Protein recovery (%)	Purification fold
Crude extract with PBSE	1347.5	N.D.*	N.D.	100	---
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation (0~70%)	324	N.D.	N.D.	24.1	---
Ethanol treatment	292	25600	87.5	21.7	1.0
DEAE-TOYO PEARL 650M chromatography					
(FVL-1, unadsorbed)	74.1	9600	130	5.5	1.5
(FVL-2, adsorbed)	48	9600	200	5.5	2.3
HW-55F Gel chromatography					
(FVL-1)	1.8	940	1567	0.13	18
(FVL-2)	2.8	1920	688	0.2	7.9

\*N.D. The hemagglutinating activity of this fraction could not be determined because it showed strong hemolytic activity against human erythrocyte type A.

The purification started with 100g of *Flammulina velutipes*.

음이온 교환수지에서 얻은 렉틴 활성이 있는 분획중에서 비흡착분획을 FVL-1이라 명명하고 흡착분획을 FVL-2라 명명하였다.

FVL-1과 FVL-2를 각각 동결건조하여 농축한 후 10 mM PBS(pH 7.1)로 평형화된 TSK-Gel HW-55F column (1.6×65 cm)에 주입하여 시간당 3 ml의 속도로 용출시켰다. FVL-1의 specific activity는 1567 titer/mg protein이었으며 정제도 18배이며 FVL-2는 688 titer/mg protein이었으며 정제도는 7.9배로써 SDS-PAGE에서 각각 단일밴드를 나타내었다(Fig. 1, 2). Tsuda<sup>13)</sup>는 *F. velutipes* lectin정제시 5.3배의 정제도를 보고하였으며, Yatohgo등<sup>14)</sup>은 10배의 정제도를 보고하였다.

#### 전기영동 및 분자량

렉틴의 정제여부와 분자량을 판단하기 위해 SDS-PAGE 전기영동(Fig. 1, 2)을 사용하여 표준 단백질로부터 확인한 결과 FVL-1과 FVL-2의 분자량은 각각 10.6 kDa와 37 kDa로 산출되었다. Tsuda등<sup>13)</sup>은 팽이버섯의 렉틴 분자량이 12 kDa와 8

kDa의 두개의 subunit으로 이루어졌음을 보고하였고, Yatohgo등<sup>14)</sup>은 분자량 11 kDa의 두개의 동일한 subunit으로 이루어진 분자량 19 kDa의 팽이버섯 렉틴을 보고하였는데 FVL-1의 경우 위의 보고와 유사하였다. 그리고 FVL-1은 non-glycoprotein, FVL-2는 glycoprotein이었다(data 미제시).

#### 렉틴의 혈액형 특이성

정제된 렉틴 FVL-1과 FVL-2의 혈액형에 따른 적혈구의 응집실험을 행한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같이 FVL-1의 경우 A형과 AB형에 대한 O형 혈액형의 상대적인 혈구응집활성이 높게 나타났으며, FVL-2의 경우 혈액형 A, B, AB, O형 모두에 대해 응집이 나타나, 사람의 혈액형에 관계없이 거의 같은 상대활성도 값을 갖는 응집기를 나타내었으며 특이성이 낮음을 보여주었다.

이러한 결과는 FVL-2가 사람의 적혈구 표면의 당잔기에 대하여 특이성이 낮은 receptor로 되어 있는 것으로 추측된다. 반면 FVL-1은 혈액형 O형에 대하여 높은 상대활성도를 나타내

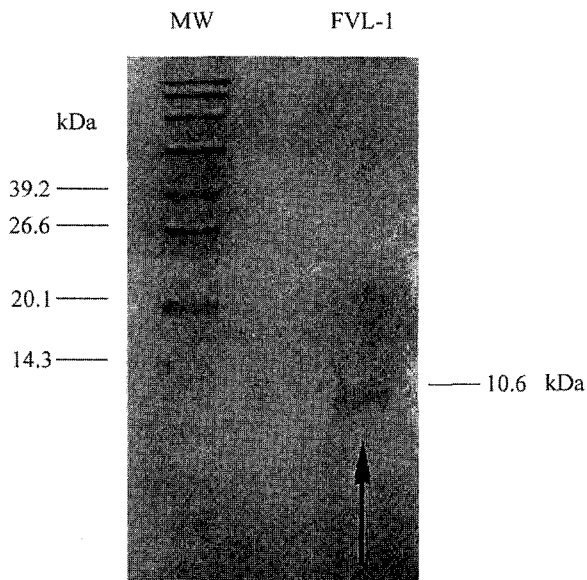


Fig. 1. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified FVL-1. SDS-PAGE was performed according to the method of Zahler<sup>11)</sup> using 15% resolving gel. Arrow indicates the FVL-1.

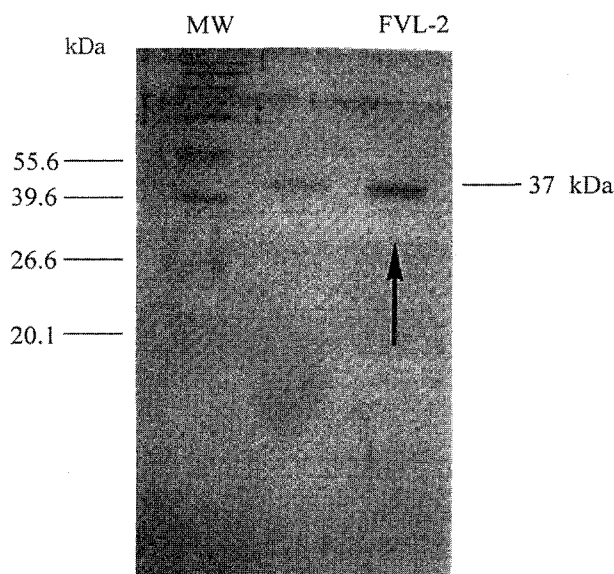


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the FVL-2. SDS-PAGE was performed according to the method of Zahler<sup>11)</sup> using 15% resolving gel. Arrow indicates the FVL-2.

**Table 2. Agglutination of erythrocytes by the purified lectins**

Lectins	Human erythrocytes	Relative activity <sup>a</sup> (%)
FVL-1	Type A	25
	Type B	50
	Type AB	25
	Type O	100
FVL-2	Type A	100
	Type B	100
	Type AB	100
	Type O	100

a: The hemagglutinating activity with human type O was taken as 100.

**Table 3. Inhibition by some glycoproteins of hemagglutinating activity of *F. velutipes* lectins**

Lectins	Glycoproteins	Minimum concentrations (μg/ml) needed for complete inhibition 4 hemagglutinating doses*
FVL-1	Fetuin	31
	Asialofetuin	16
	Bovine submaxillary glands mucin type I	< 2
	Porcine stomach mucin type III	8
FVL-2	Fetuin	31
	Asialofetuin	8
	Bovine submaxillary glands mucin type I	< 2
	Porcine stomach mucin type III	4

\*: Hemagglutination inhibition tests were performed by using lectin with concentration that was four times higher than the dilution endpoint and a 4% suspension of human A erythrocytes.

었는데, Yatohgo 등의 혈액형에 관계없이 같은 응집역가를 갖는 팽이버섯 렉틴과 일치하였다.

**당, 당단백질 및 금속이온의 저해**

FVL-1과 FVL-2에대한 당결합 특이성과 금속이온의 렉틴활성에 대한 영향을 시험하기 위한 혈구응집반응(혈액형 A)저해성 실험을 행한 결과는 Table 3과 Table 4에 나타난 바와같다.

당단백질저해는 Table 3에 나타난 바와같이 fetuin은 FVL-1과 FVL-2에공통적으로 31 μg/ml의 농도에서 저해는 시작되었고, bovine submaxillary glands mucin(BSM) type III는 2 μg/ml이하의 농도에서도 FVL-1과 FVL-2의 혈구응집을 저해하였다.

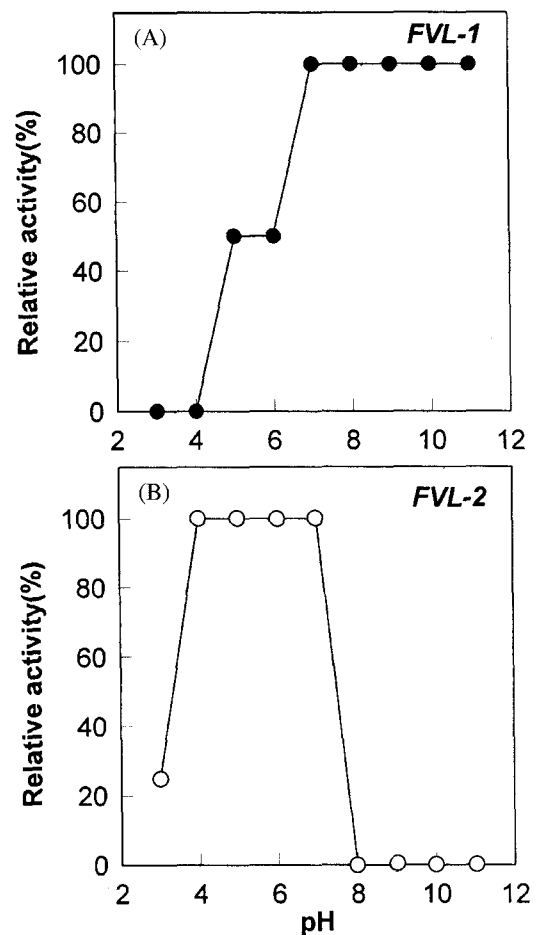
렉틴들은 금속이온에 의해 활성을 나타내거나 활성이 증가되어 금속이온이 렉틴의 결합부위에 기여한다. FVL-1과 FVL-2에대한 금속이온의 저해결과는 Table 4에 나타난 바와 같이 FVL-2에 의한 혈구응집은 200 mM 이상의 농도에서도 저해효과가 나타나지 않았고, FVL-1의 경우 Cu<sup>2+</sup>이온은 Mg<sup>2+</sup>이온보다 32배 높은 저해효과를 나타내었으며, Fe<sup>2+</sup>이온에 의해서도 약간 저해되었다.

**Table 4. Inhibition by various cations of hemagglutinating activity of *F. velutipes* lectins**

Lectins	Cations	Minimum concentration (mM/ml) needed for complete inhibition*
FVL-1	Mg <sup>2+</sup>	50
	Co <sup>2+</sup>	12.5
	Cu <sup>2+</sup>	1.56
	Ca <sup>2+</sup>	6.25
	Fe <sup>2+</sup>	3.13
FVL-2	Mn <sup>2+</sup>	6.25

The following cations were not inhibitory at a concentration of 200 mM. Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>

\*: Hemagglutination inhibition tests were performed by using a concentration of the lectin that was four times higher than the dilution endpoint and a 4% suspension of human A erythrocytes.



**Fig. 3. Effect of pH on the stability of lectins. A: FVL-1, B: FVL-2.** The hemagglutinating activity with human type O was taken as 100.

당에 의한 혈구응집 저해는 FVL-1과 FVL-2 모두에서 일어나지 않았으며, D(+)-maltose, D(+)-galactose, D(-)-fructose, D(+)-glucosamine, D(+)-mannose, lactose, 및 N-acetyl-D-glucosamine의 각 당 농도 200 mM에서 혈구응집이 저해되지 않았다. 응집소와 적혈구 표면에 노출되어 있는 당잔기와의 receptor-ligand 관계를 더 분석하기 위하여 여러가지 당과 당단백질 및 금속원소 이온으로 적혈구 응집 억제 반응을 시도하여

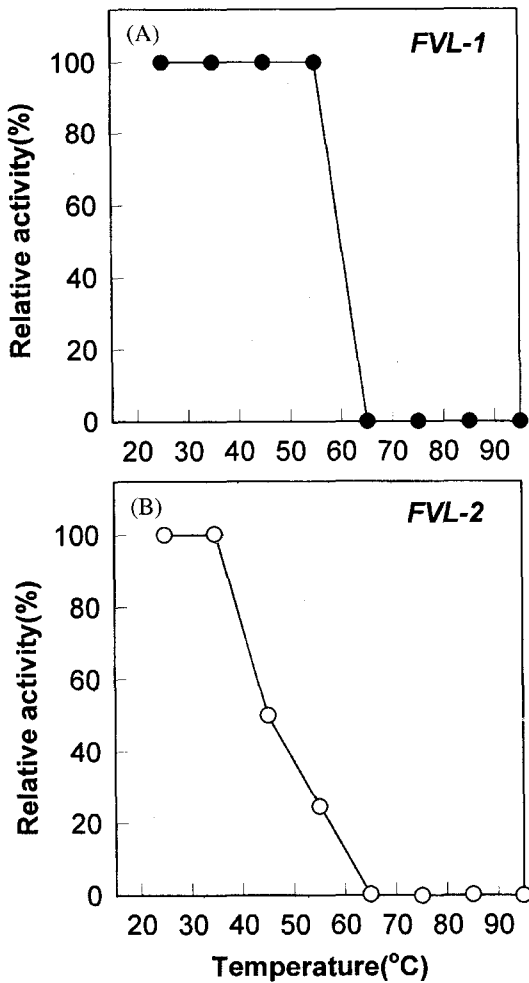


Fig. 4. Effect of temperature on the stability of lectins. A: FVL-1, B: FVL-2.

본 결과 여러가지 당 중에서 어느것도 혈구응집을 저해하지는 못하여 FVL의 당 결합 특이성을 알 수 없었지만 Table 3에 나타난, 특히 asialofetuin과 porcine stomach mucin의 혈구응집저해로 볼때 *Pleurotus cornucopiae* 렉틴<sup>15)</sup>과 같으며 이것은 Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)GalNAc 구조가 FVL과의 상호작용에 있어서 중요하다고 추측되었다. FVL은 아마도 말단에  $\beta$ -D-galactosyl group을 부분을 갖는 carbohydrate의 당 배열의 안쪽과 특이적으로 결합하고, FVL-2는 L-fructose, D-mannose, D-galactose, 그리고 uronic acid같은 당을 주로 갖는 acidic glycoprotein으로 추측된다.

#### 렉틴의 pH에 대한 안정성

팽이버섯 렉틴의 pH 3에서 pH 11까지에 이르는 활성변화는 Fig. 3과 같다. 렉틴(10  $\mu$ l)은 여러 다른 pH의 buffer(10  $\mu$ l)에 녹인 후 1시간 동안 방치한 후 PBS(pH 7.2) 40  $\mu$ l를 넣어서 pH를 맞춘 후, 연속 2배 희석법에 의하여 희석한 다음 혈구응집반응을 관찰한 결과 FVL-1의 경우 pH 7에서 11까지 안정하였고, FVL-2의 경우에는 pH 4~7범위에서 안정하였다.

#### 렉틴의 온도에 대한 안정성

FVL-1, 2의 온도에 따른 렉틴 활성의 변화는 Fig. 4과 같다. FVL-1은 25~55°C까지 안정한 반면 FVL-2는 25~35°C 범위에서 안정하였으며, 45°C에서 55°C사이에서는 활성이 반감되었다.

#### 감사의 글

본 연구는 1995년도 고려대학교 특별연구비에 의하여 수행된 연구 결과의 일부이며, 이에 깊은 감사드립니다.

#### 참고문헌

- Sharon, N. and Lis, H. (1972) Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* **177**, 949-958.
- Barondes, S. H. (1981) O-glycosyl polyacrylamide gels: application to phytohemagglutinins. *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 207-231.
- Sharon, N. (1977) Lectins. *Sci. Amer.* **236**, 108-119.
- Kery, V. (1991) Lectin-carbohydrate interactions in immunoregulation. *Int. J. Biochem.* **23**, 631-640.
- Vitetta, E. S., Krolick, K. A., Cushley, M. W. and Uhr, J. W. (1983) Immunotoxins: a new approach to cancer therapy. *Science* **219**, 644-650.
- Sage, H. J. and Connett, S. L. (1969) Studies on a hemagglutinin from the meadow mushroom. *J. Biol. Chem.* **244**, 4713-4719.
- Sueyoshi, S., Tsuji, T. and Osawa, T. (1985) Purification and characterization of four isolectins of mushroom (*Agaricus bisporus*). *Biol. Chem.* **366**, 213-221.
- Horejsi, K. and Kocourek, J. (1978) Studies on lectins. *Biochim. Biophys. Acta* **538**, 299-315.
- Guillot, J. L., Guegunot, G. J. and Damez, M. (1983) Purification and properties of two hemagglutinins of the mushroom *Laccaria amethystina*. *Biochem.* **22**, 5365-5369.
- Lin, J. Y. and Chou, T. B. (1984) Isolation and characterization of a lectin from edible mushroom, *Volvariella volvacea*. *J. Biochem.* **96**, 35-40.
- Zahler, W. L. (1974) Analytical polyacrylamide gel electrophoresis and molecular weight determination. *Methods Enzymol.* **32**, 70-81.
- Stoscheck, C. M. (1990) Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* **182**, 50-68.
- Tsuda, M. (1979) Purification and characterization of a lectin from the mushroom, *Flammulina velutipes*. *J. Biochem.* **86**, 1463-1468.
- Yatohgo, T., Nakata, M., Tsumuraya, Y., Hashimoto, Y. and Yamamoto, S. (1988) Purification and properties of a lectin from the fruitbodies of *Flammulina velutipes*. *Agri. Biol. Chem.* **52**, 1485-1493.
- Yoshida, M., Kato, S., Oguri, S. and Nagata, Y. (1994) Purification and properties of lectins from a mushroom, *Pleurotus cornucopiae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 498-501.
- Kawagishi, H., Abe, Y., Nagata, T., Kimura, A. and Chiba, S. (1991) A lectin from the mushroom *Pholiota aurivella*. *Agri. Biol. Chem.* **55**, 2485-2489.

17. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, H. K., Robert, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-356.
18. Matsumoto, I. and Osawa, T. (1969) Purification and characterization of an anti-H(O) phytohemagglutinin of *Ulex europaeus*. *Biochim. Biophys. Acta* **194**, 180-189.
19. Kochibe, N. and Matta, K. L. (1989) Purification and properties of an N-acetylglucosamine-specific lectin from *Psathyrella velutina* mushroom. *J. Biol. Chem.* **264**, 173-177.
20. Sueyoshi, S., Tsuji, T. and Osawa, T. (1985) Purification and characterization of four isolectins of mushroom (*Agaricus bisporus*). *Biol. Chem., Hoppe-Seyler* **366**, 213-221.
21. Presant, C. A. and Kornfeld, S. (1972) Characterization of the cell surface receptor for the *Agaricus bisporus* hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* **247**, 6937-6945.
22. Kawagishi, H. and Mizuno, T. (1988) Purification and properties of an  $\alpha$ -galactosyl-specific lectin from the fruiting bodies of *Ischnoderma resinosus*. *FEBS Letter* **227**, 99-102.
23. Horejsi, V. and Kocourek, J. (1973) Studies on phytohemagglutinins. *Biochim. Biophys. Acta* **297**, 346-351.
24. Kawagishi, H. and Mori, H. (1991) Chemical modification and NMR studies on a mushroom lectin *Ischnoderma resinosum* agglutinin (IRA). *Biochim. Biophys. Acta* **1076**, 179-186.
25. Ersson, B., Aspberg, K. and Porath, J. (1973) The phytohemagglutinin from sunn hemp seeds (*Crotalaria Juncea*). Purification by biospecific affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* **310**, 446-452.
26. Tsuda, M. (1979) Purification and characterization of a lectin from rice bran. *J. Biochem.* **86**, 1451-1460.
27. Yagi, F. and Tadera, K. (1988) Purification and characterization of lectin from *Auricularia polytricha*. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 2077-2079.
28. Kwon, D. H., Rheu, B. H., Kim, H. S., Kim, K. S., Yi, S. Y. and Park, J. O. (1993) Effects of *Trichosanthis radix* lectin on cell agglutination and immune function. *Kor. Biochem. J.* **26**, 503-510.
29. Yoon, D. H., Park, E. J., Lee, Y. H., Seo, J. K., Ryu, S. H., Suh, P. G. and Kim, H. S. (1995) Purification and characterization of a new galactoside specific lectin from *Trichosanthes kirilowii* root. *J. Biochem. Mol. Biol.* **28**, 6-11.

---

#### Purification and Characterization of the Lectins from Mushroom *Flammulina velutipes*

Hyung-Suk Kim, Seung-Yeol Son<sup>1</sup>, Se-Young Hwang and Bumshik Hong\* (Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul, 136-701, Korea; <sup>1</sup>Dept. of Microbiology, College of Natural Sciences, Dankook University, Cheonan, 330-714, Korea)

**Abstract :** Two Lectins, designated FVL-1 and FVL-2, were isolated and purified from the fruiting bodies of edible mushroom *Flammulina velutipes* using ammonium sulfate fractionation, ethanol treatment, DEAE-TOYPEARL ion-exchange column chromatography, and TSK-Gel HW-55F column chromatography. Specific activity increased 18 folds for FVL-1 and 7.9 folds for FVL-2 from ethanol treated sample. SDS-PAGE of FVL-1 and FVL-2 gave apparent molecular mass of 10.6 kDa and 37 kDa, respectively. FVL-2 agglutinated all type of human erythrocytes (A, B, AB, and O). However, FVL-1 agglutinated more human erythrocyte type O than type A, B, and AB. The hemagglutination activities of the FVL-1 were effectively inhibited by bovine submaxillary and porcine stomach mucins (BSM and PSM), fetuin, asialofetuin and cations, such as Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Fe<sup>2+</sup>. However, FVL-2 was not inhibited by any cations. The hemagglutination activities of the two lectins were not inhibited by the sugar, such as lactose, galactose and sugar derivatives. FVL-1 and FVL-2 were stable at pH 5~11 and pH 4~7, respectively. FVL-1 was stable below 55°C and FVL-2 was below 45°C.

---

Key words : *Flammulina velutipes*, lectin, glycoprotein

\*Corresponding author