

면역글로부린 G 생성에 대한 아이오타-카라기난의 어쥬번트 효과

구본웅 · 이광재 · 김만석 · 김하형[#]

중앙대학교 약학대학

(Received September 29, 2000)

Adjuvant Effects of Iota-Carrageenan on the Immunoglobulin G Production

Bon-Woong Koo, Kwang Jae Lee, Man Suk Kim and HaHyung Kim[#]

College of Pharmacy, Chung-Ang University Seoul 156-756, Korea

Abstract - To investigate the effects of iota-carrageenan (CAR) and/or alum on the adjuvancity as well as the structural difference of oligosaccharide on the IgG2b in the adjuvant effect, C57BL/6 mice were immunized twice with fetuin as a model antigen. CAR alone showed no significant effect on induction of antibody except IgG1. In contrast, Alum-CAR (after mixing of antigen-Alum, CAR adjuvant was prepared) and CAR-Alum (after formulation of antigen-CAR, Alum adjuvant was prepared) enhanced production of antibody, especially, IgG2b. After separation of IgG2b, changes of glycosylation were investigated using enzyme-linked lectin assay. High affinity of IgG2b to *N*-acetylneuraminic acid, galactose and mannose-specific lectin were induced by CAR-Alum adjuvant, however, the affinity of IgG2b induced by CAR-Alum to GlcNAc and GalNAc-specific lectin were much less than that induced by Alum-CAR.

Keywords □ Carrageenan, adjuvant, IgG production, IgG2b, glycosylation.

면역글로부린 G(IgG)를 동물로부터 효과적으로 생성시키기 위하여서는 면역반응에 대한 비특이적 촉진제로서 가용성 항원에 대한 강력한 항체 반응을 나타내는 어쥬번트(adjuvant)가 필요하며, 그 작용은 신속한 분해 대사로부터 항원을 보호하는 침착물(deposit)을 형성하는 것과 비특이적으로 면역반응을 자극하는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 침착물을 형성하는 경우, 항원을 저장하고 시간이 지남에 따라 유리할 수 있기 때문에 항원 용량이 훨씬 적으면서도 항체반응은 보다 더 지속적으로 유지될 수 있고, 림포카인의 레벨을 높임으로서 면역반응을 자극하는 작용도 있게 된다.³⁾

현재 보고되고 있는 어쥬번트중 가장 대표적인 것은 Freund's adjuvant와 aluminum salt이다. Freund's adjuvant는 가장 널리 이용되는 어쥬번트지만 인체에

는 사용할 수 없으며,⁴⁾ aluminum hydroxide, aluminum phosphate, potassium aluminum sulfate 등을 포함한 aluminum salt는 어쥬번트로서의 효과는 Freund's adjuvant에 비해 떨어지지만 인체에 사용할 수 있는 유일한 어쥬번트로 알려져 있다.⁵⁾ 또한, 최근에는 saponin, ISCOMs, LPS, MPL 등이 개발되어 보고되고 있다.^{5,6)}

Carrageenan(CAR)은 *chondrus crispus*에서 유래하는 물질로 그 구조는 α -1,3 혹은 β -1,4 결합의 헥소오스를 갖는 3,6-anhydrous-D-galactose와 D-galactose의 potassium, sodium, magnesium, calcium, ammonium sulfate ester의 copolymer로, 헥소오스 구조의 황산기의 위치와 수에 따라 iota, kappa, lambda로 나눌 수 있다.^{7,8)} Iota-CAR은 헥소오스의 2번 위치에 황산기를 갖고 있고, kappa-CAR은 각각의 disaccharide unit에 한개의 황산기를 갖고 있으며, lambda-CAR은 2번 또는 2,6번위치에 황산기를 포함하며, 분자량은 모

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-820-5612 (팩스) 02-820-5612

두 10~35 kDa로 보고되고 있다.⁹⁾ 그 중 *iota*-CAR은 정상적인 겔을 형성하고, *kappa*-CAR은 단단한 겔을 형성하는 반면, *lambda*-CAR은 겔을 형성하지 않는 것으로 알려져 있다.^{10,11)}

한편, 마우스 IgG는 분자량 50 kDa의 heavy chain과 두 heavy chain간의 disulfide 결합의 수에 의해 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3와 같은 subclass로 분류된다. 이는 백신접종이나 감염에 의해 B세포가 활성화되어 constant 영역의 변화에 의해 항체의 종류가 바뀌는 class switch recombination(CSR)의 결과이며, 어떤 종류의 항체가 만들어지는 가는 주로 사이토카인에 의해 결정된다. 즉, interleukin 4에 의해 활성화된 B세포는 IgG1, interferon γ 에 의해 활성화된 B세포는 IgG2a, TGF- β 에 의해 활성화된 B세포는 IgG2b가 생성되는 것으로 알려져 있다.¹²⁾

또한, IgG의 heavy chain의 Asn-297의 N에는 GlcNAc이 *N*- β -glycoside 결합되고, *N*-acetylneuraminic acid, galactose, GlcNAc, mannose의 유무에 따라 다양한 구조의 *N*-linked oligosaccharide가 존재하는 당단백질이며, 이 다양한 당쇄의 존재비는 정상적인 사람에게는 항상 일정하고, 종의 구별 없이 존재하여 IgG의 생물학적 활성에 중요한 의의를 갖는 것으로 보고되고 있다.^{13,14)} 그러나, 만성관절염 류머티즘 환자의 IgG는 Asn-297에 존재하는 당쇄에 galactose가 감소된 보고가 있으며, 이와 같은 현상은 결핵, 클론병등과 같은 질환에서도 인정되고 있다.^{15,16)} 골수종 환자유래의 모노클로날 항체에서는 *N*-linked oligosaccharide의 함유율이 IgG에 따라 다른 구조의 당쇄를 포함하고 있는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾

당단백질의 Ser 혹은 Thr의 OH기의 O에는 GalNAc이 *O*- α -glycoside 결합한 *O*-linked oligosaccharide도 보고되고 있으나, 최근 마우스 IgG2b의 경우 hinge영역 Thr-221A에 GalNAc, Galactose, *N*-glycolylneuraminic acid로 구성된 *O*-결합형 올리고당이 결합된 것으로 보고되었으며, neuraminic acid를 포함하는 당의 결합에 차이가 나는 3종류의 phenotype(HS·HS, HS·HR, HR·HR)이 존재하는 것으로 보고되고 있다.¹⁸⁾

본 연구에서는 모델 항원으로 fetuin을 사용하여 C57BL/6 마우스에 대한 항체 생성시, CAR중 정상적인 겔을 형성하는 *iota*-CAR의 어쥘런트로서의 효과를 확인하였다. 특히, 단백질을 항원으로 하여 aluminum

hydroxide(alum)를 이용한 경우의 최대 포접율이 약 80%인 보고¹⁹⁾로부터 alum과 CAR과의 복합 어쥘런트를 형성하여 면역글로부린의 생성양상을 분석하였다. 또한, 각 어쥘런트에 의해 생성된 IgG중 결합당의 구조가 비교적 잘 알려진 IgG2b를 효율적으로 분리할 수 있는 방법을 Protein A-affinity column에 의해 실시하였다. 그리고, 분리된 IgG2b에 결합된 당쇄의 구조를 확인하였다. 당쇄의 구조분석에는 주로 당기수분해 효소를 이용하여 당단백질로부터 당쇄를 가수분해후, HPLC, NMR, MS등에 의해 이루어지나, 식물에서 얻어지는 당결합 단백질(carbohydrate binding protein, lectin)을 이용한 방법에 의해서도 일차적으로 확인할 수 있으며,²⁰⁾ 본 연구에서는 이 방법을 응용하였다.

실험방법

시약 - 본 실험에서 사용한 C57BL/6 마우스는 대한 실험동물센터에서 구입하였으며, fetuin, *iota*-CAR, Freund's complete adjuvant, Freund's incomplete adjuvant, polyethylene sorbitan monolaurate(Tween 20), tris(hydroxymethyl)aminomethane, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), ABTS), *N*-ethylmaleimide, molecular marker, sodium azide, ELISA에 사용된 mouse monoclonal antibody isotyping reagent(IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3)과 monoclonal anti-goat/sheep IgG clone GT-34 peroxidase conjugate, Protein A agarose는 Sigma사로부터 구입하였다. Potassium aluminum sulfate는 Lancaster, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt는 Yakuri Pure Chemicals, Affi-gel Protein A agarose는 Bio-rad에서 구입하였다. 그 외에 분석용 시약은 모두 일급시약을 사용하였다.

기기 - IgG의 생성 확인과 IgG2b의 당분포확인을 위해서는 Microplate reader(Model 550, Bio-Rad)와 ELISA plate(Corning 96 well, round bottom)를 사용하였다. Protein A affinity column제작에는 Econo-Pac[®] Disposable chromatography column(Bio-Rad)을 사용하였다.

면역방법 - 실험동물은 6~8주된 암컷 C57BL/6를 사용하였으며, 각 군에는 3수의 마우스를 각각 이용하였다. 대조군으로는 0.9% saline 400 μ l만을 복강주사한 경우와 fetuin 50 μ 을 0.9% saline 400 μ 에 녹

인 것을 어쥬번트 없이 복강주사한 경우로 실시하였으며, 각각 3주후 추가면역을 실시하였다.

Freund's adjuvant의 제작 - Fetuin 200 µg을 0.9% saline 160 µl에 녹이고 0.9% saline 용량의 9배의 Freund's complete adjuvant와 혼합하여 ependorf tube 에서 10분간 vortexing하여 유제상태로 만들었다. 그리고 이 유제가 5분이상 유지되는 것을 현미경상에서 확인한 후, 복강주사하였다. 추가면역은 3주일 후에 실시하였으며, 그 때는 Freund's complete adjuvant 대신에 Freund's incomplete adjuvant를 동량사용하여 실시하였다.

Alum adjuvant의 제작 - 50 ml tube에 10% potassium aluminum sulfate 5ml를 넣고 교반하면서 0.25N NaOH 11.4 ml를 소량씩 가하고 10분간 실온에서 방치한 후, 20°C에서 10분간 1,000 g로 원심분리하였다. 상층액을 제거하고, 침전물에 25 ml 3차 증류수를 넣어 재현탁한 후, 20°C에서 10분간 1,000 g로 원심한 후, 상층액을 제거하여 alum을 얻었다. Alum을 0.9% saline 용액에 녹여 4.57 mg/ml로 만들고, 이 용액 1,400 µl에 1 mg/ml의 fetuin용액 200 µl를 넣어 최종적으로 항원의 농도를 50 µg/400 µl로 하고 교반하였다. 1차 면역시에는 마우스 3마리에 이 용액 400 µl씩을 각각 복강주사하였고, 추가면역은 3주 후에 동일한 방법으로 실시하였다.

CAR adjuvant의 제작 - 1.5 ml tube에 CAR 3.2 mg을 0.9% saline 1.4 ml에 녹인후, 1 mg/ml의 fetuin 200 µl를 넣고 교반하였다. 60°C의 수욕상에서 5분간 가열한 후 실온에서 방치하고 400 µl씩 복강주사하였다. 추가면역은 3주 후에 동일한 방법으로 실시하였다.

CAR과 Alum 복합 adjuvant의 제작 - 1.5 ml tube에서 CAR 3.2 mg을 0.9% saline 1.4 ml에 녹인 후, 1 mg/ml의 fetuin 200 µl를 넣고 교반후, 60°C 수욕상에서 5분간 가열하여 실온에서 방치하고, 미리 만들어 둔 alum 6,400 µg을 0.9% saline 400 µl에 녹인 것을 넣어 교반하여 제조하였다. 이하 이를 CAR-Alum으로 약한다. 1차 면역에는 각각 500 µl씩을 복강주사하였고, 추가면역은 3주일후에 동일한 방법으로 실시하였다.

Alum과 CAR 복합 adjuvant의 제작 - Alum adjuvant제작 방법에 의해 미리 만들어둔 항원이 포함된 alum에 CAR 3.2 mg을 0.9% saline 1.4 ml에 녹

인 것을 넣고 교반후 60°C 수욕상에서 5분간 가열하여 제조하였다. 이하 이를 Alum-CAR로 약한다. 1차 면역시에는 각각 500 µl씩을 복강주사하였고, 추가면역시에는 3주후에 동일한 방법으로 실시하였다.

마우스의 혈액에서 혈청의 분리 - 추가면역을 실시하고 10일이 지난 후, 마우스의 혈액을 heparin처리하여 취한 후 혈액을 10,000 g로 10분간 원심분리하여 상층액을 취하고 1 mM NEM, 0.1 mM EDTA, 0.02% NaN₃를 넣어 4°C에서 보관하였다.

ELISA - 1 mg/ml의 fetuin을 50 µl씩 microplate well에 코팅하고 37°C에서 1시간 반응시키고, 코팅된 용액은 aspiration으로 제거후, 각 well은 PBS와 0.1% Tween(이하 PBST로 약함) 100 µl로 3회 세척하였다. 그 후, 1% BSA를 포함한 PBS 100 µl를 blocking solution으로 하여 1시간 동안 37°C에서 반응시키고, 반응액은 aspiration으로 제거후, 각 well을 100 µl의 PBST로 3회 세척하였다. 여기에 각 어쥬번트에 의해 얻어진 혈청을 각각 PBS로 100배 희석하여 100 µl씩 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 코팅된 용액은 aspiration으로 제거하고 각 well은 100 µl의 PBST로 3회 세척하였다. 여기에 mouse monoclonal isotype(IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3)을 각각 PBS로 1,000배 희석하여 100 µl씩 넣어서 37°C에서 1시간 반응시켰다. 다시 반응액을 aspiration으로 제거하고, 100 µl의 PBST로 3회 세척하였다. Goat/Sheep IgG peroxidase를 PBS로 30,000배 희석하여 100 µl씩 각 well에 가하여 37°C에서 1시간 반응시키고, PBST 100 µl로 5회 세척하였다. PBS에 녹인 ABTS 1 ml에 H₂O₂ 1 µl를 넣어서 각 well에 100 µl씩 넣고 즉시 microplate reader를 사용하여 UV파장 415 nm에서 각 well의 흡광도 값을 측정하고, ABTS를 가하는 시간차에 의한 각 well의 오차를 제거하기 위하여 10분후에 다시 측정하여 흡광도의 차이값을 구하였다.

Protein A affinity column에 의한 IgG2b의 분리 - Affi-gel Protein A agarose 1 ml를 disposable chromatography column에 공기가 들어가지 않게 조심스럽게 충전하고 약 10분간 안정화시켰다. 그 후 PBS를 20 ml씩 3회 천천히 흘려 보내고, PBS가 거의 다 빠져 나가면 코크를 잠그고 upper bed를 넣어 Protein A affinity column을 제작하였으며 4°C에 보관하였다. IgG2b의 분리를 위하여 적절한 binding

buffer를 선택하기 위해 두가지의 완충액을 사용하여 항체를 분리하였다. 먼저 혈청 100 μ l를 PBS 혹은 glycine buffer(pH 8.9)에 녹여 1 ml로 하고 0.45 μ m filter로 여과한 후, PBS 혹은 glycine buffer(pH 8.9)로 평형화한 Protein A affinity column에 가하고 미결합의 단백질을 PBS 혹은 glycine buffer(pH 8.9)로 제거 후 acetate buffer(pH 4.3)로 elution시켰으며, 그 후 계속해서 glycine buffer(pH 2.8)를 가하여 elution시켰다. 분취한 용액은 신속하게 0.02% Na₂S₂O₃를 가한 1.5M Tris-HCl(pH 8.5)를 가하여 중성으로 하고 4°C에서 보관하였다. 최종적으로 glycine buffer로 elution된 분획은, 재정제를 위해 Protein A affinity column에 의해 위와 동일한 방법으로 재설시하였다. Elution이 모두 끝난 후에는 Protein A affinity column에 column 용적의 10배가량의 PBS를 흘려서 중성으로 한 후 4°C에서 보관하였다. 분취된 각 분획은 파장 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

IgG2b 결합당의 분포 확인 - Protein A affinity column을 통하여 분리한 IgG2b 100 μ l를 코팅한 후 1시간동안 37°C에서 반응시켰다. 코팅된 용액은 aspiration에 의해 제거하고 각 well은 PBST 100 μ l로 3회 세척하였다. 그 후 1% BSA를 포함한 PBS 100 μ l를 blocking solution으로 하여 1시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 반응액은 aspiration으로 제거하고, 각 well을 100 μ l의 PBST로 3회 세척하였다. *Triticum vulgare* 유래, ConA, RCA₁₂₀, BS-II, *Glycine max* 유래 lectin에 peroxidase가 label된 용액을 7.00 μ g/ml, 3.50 μ g/ml, 1.75 μ g/ml의 농도로 하여 100 μ l씩 가한 후 1시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 그 후 PBST 100 μ l로 5회 세척하고, PBS에 녹인 0.55% ABTS 1 ml에 H₂O₂ 1 μ l를 넣고 각 well에 100 μ l씩 넣어 microplate reader를 이용하여 415 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하고 10분 후에 다시 한번 측

정하여 각 well에 대한 오차를 제거하였다.

결과 및 고찰

어쥘벤트에 의한 IgG subclass 생성확인 - Fetuin 항원을 이용한 어쥘벤트에 따른 IgG의 subclass별 생성양상은 ELISA에 의해 확인하였다. 그 결과는 Table I에 나타난 것과 같이, IgG1의 경우, Alum에 의한 경우가 가장 높은 결합력을 나타내었으며 Alum-CAR, CAR, CAR-Alum의 경우에도 Freund에 비해 높은 결합력을 나타내었다. IgG2a의 경우에는, CAR-Alum에 의한 경우 결합력이 월등히 높았으며, Alum-CAR, Freund's adjuvant, Alum의 순이었으나 CAR의 경우에는 현저하게 결합력이 저하하였다. IgG2b의 경우에는, Alum-CAR, CAR-Alum, Alum의 순으로 결합력이 높았으며, IgG2a와 같이 CAR에 의해서는 결합력이 저하하였다. IgG3의 경우에는 생성률이 낮아 유의성있는 차이가 보이지 않았다.

즉, IgG1, IgG2b는 Alum 혹은 Alum-CAR 어쥘벤트를 사용한 경우가 생성률이 가장 높았으며, IgG2a의 경우에는 CAR-Alum 어쥘벤트를 사용한 경우에서 가장 높은 생성률을 나타내었고, IgG3의 경우에는 모든 어쥘벤트의 경우에서 낮은 수치를 보여 큰 차이를 확인할수 없었다. 또한, CAR 어쥘벤트를 사용한 경우에는 IgG2a, IgG2b의 생성률이 현저하게 저하하였다. 어쥘벤트를 포함하지 않고 항원만을 사용한 대조군의 경우에는 IgG가 거의 생성되지 않았다.

이 결과로부터, IgG1 이외에는 Alum이나 CAR을 단독으로 사용했을 경우에 비해서 Alum-CAR이나 CAR-Alum처럼 두 어쥘벤트를 함께 사용하였을 경우에 유의성 있는 항체생성의 증가를 나타냄을 알 수 있었다.

Protein A affinity column에 의한 IgG2b의 분리 - IgG의 subclass별로 분리·정제를 위하여서는

Table I - Comparison of the adjuvant effect on the antigen-specific IgG subclass

IgG subclass	Adjuvants					
	Control	Freund	Alum	CAR	Alum-CAR	CAR-Alum
IgG1	0.009	0.185 \pm 0.011	0.309 \pm 0.004	0.229 \pm 0.172	0.298 \pm 0.051	0.212 \pm 0.004
IgG2a	0.008	0.075 \pm 0.038	0.062 \pm 0.015	0.017 \pm 0.012	0.102 \pm 0.095	0.201 \pm 0.059
IgG2b	0.007	0.074 \pm 0.033	0.194 \pm 0.160	0.063 \pm 0.023	0.276 \pm 0.011	0.201 \pm 0.092
IgG3	0.008	0.012 \pm 0.004	0.016 \pm 0.015	0.011 \pm 0.004	0.016 \pm 0.009	0.017 \pm 0.009

Each value represents the absorbance at 415 nm based on the ELISA, and represents the mean \pm SD. of 3-6 mice. Control means the result of serum antibody immunized with antigen/saline

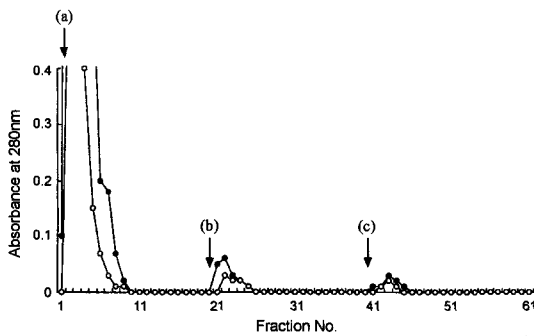


Fig. 1 – Elution profile of antibody fraction eluted from Protein A affinity column using 10 mM PBS (●) and 1.5 M glycine buffer (○) as a binding buffer. Arrow indicate the position eluted with binding buffer(a), 50 mM acetate buffer(b), and 50 mM glycine buffer(c).

Protein A 혹은 Protein G를 agarose 혹은 Sepharose 4B 등에 의해 결합시킨 친화 크로마토그래피에 의한 방법이 주로 이용되고 있으며, 겔 여과를 이용한 방법도 시도되고 있다. 본 연구에서는 Protein A affinity column을 이용하여 buffer의 pH 변화에 따른 분리 양상을 확인하였다. 먼저, affinity 컬럼에 대한 binding buffer로 pH 7.4의 PBS 혹은 pH 8.9의 glycine buffer, elution buffer로 pH 4.3의 acetate buffer와 pH 2.8의 glycine buffer를 이용하여 분리한 분획에 대한 280 nm에서의 흡광도를 Fig. 1에 나타내었다. PBS 혹은 pH 8.9의 glycine buffer를 통해서 Protein A 컬럼 미결합 물질이 용출되었으며, acetate buffer(pH 4.3), glycine buffer(pH 2.8)에 의해 각각 Protein A 컬럼에 흡착된 물질이 용출되었음을 확인하였다.

이들 분획을 각각 ELISA에 의해 IgG subclass를

확인한 결과를 Table II에 나타내었다. PBS로 결합시킨 후 acetate 혹은 glycine buffer로 분리한 분획에서는 IgG1, IgG2b가 검출되어 IgG2b만의 분리에는 적절하지 않음을 알 수 있었다. 그러나, binding buffer로 1.5M Glycine buffer(pH 8.9), elution buffer로 acetate 혹은 glycine buffer로 분리한 분획에서는 PBS로 결합시킨 경우에 비교하여 볼 때 IgG1의 양이 현저하게 줄어들고 IgG2b가 다량으로 검출되었다. 이 결과로부터 혈청을 1.5M glycine buffer(pH 8.9)에 용해후 Protein A affinity 컬럼에 용출시키고 pH 4.3의 acetate buffer로 일부를 제거한 후 pH 2.8의 glycine buffer에 의해 얻어지는 물질은 비교적 순도가 높은 IgG2b임을 알 수 있게 되었다.

ELLA에 의한 IgG2b 결합당의 분포확인 – 각 어쥬먼트에 의해 생성된 항체로부터 IgG2b를 각각 분리, 정제하고 그를 이용한 당의 구조적 차이를 비교분석하기 위하여 본 연구에서는 lectin의 당에 대한 선택적 결합력을 이용한 ELLA(Enzyme-linked lectin assay) 법을 적용하였다. 즉, *N*-acetylneuraminic acid를 인식하는 *Triticum vulgare* 유래의 lectin, galactose를 인식하는 RCA₁₂₀(*Ricinus communis* 유래), GlcNAc을 인식하는 BS-II(*Bandeiraea simplicifolia* 유래), mannose를 인식하는 Con A(*Canavalia ensiformis* 유래), GalNAc을 인식하는 *Glycine max* 유래의 lectin을 이용하여 lectin의 농도에 따른 결합력을 Table III에 나타내었다.

Triticum vulgare 유래의 lectin에 의해서는 CAR-Alum의 경우 결합력이 현저하게 증가하였다. RCA₁₂₀ lectin과 Con A lectin에 의해서는 Freund, CAR, CAR-Alum이 현저하게 증가하였으며, Alum, Alum-CAR에 의해서는 결합력이 저하하였다. BS-II에 의해

Table II – ELISA results of fractions eluted from Protein A affinity column using 10 mM PBS (pH 7.4) and 1.5 M glycine buffer (pH 8.9) as a binding buffer, and 50 mM acetate buffer (pH 4.3) and 50 mM glycine buffer (pH 2.8) as an elution buffer

IgG subclass	Control	PBS binding buffer			Glycine binding buffer		
		PBS binding buffer Fr.	Acetate elution buffer Fr.	Glycine elution buffer Fr.	Glycine binding buffer Fr.	Acetate elution buffer Fr.	Glycine elution buffer Fr.
IgG1	0.010	0.190	0.031	0.040	0.504	0.017	0.013
IgG2a	0.008	0.013	0.006	0.006	0.141	0.018	0.010
IgG2b	0.008	0.057	0.032	0.013	0.241	0.019	0.130
IgG3	0.009	0.011	0.006	0.006	0.116	0.016	0.014

Each value represents the absorbance at 415 nm based on the ELISA.

Table III – Binding difference of peroxidase-labeled lectins to the purified antigen-specific IgG2b

Lectins	Conc. of lectins (µg/ml)	Adjuvants				
		Freund	Alum	CAR	Alum-CAR	CAR-Alum
<i>T. vulgaris</i>	7.00	0.124	0.125	0.179	0.161	0.213
	3.50	0.087	0.108	0.111	0.112	0.131
	1.75	0.083	0.093	0.089	0.097	0.113
RCA ₁₂₀	7.00	1.241	0.486	0.916	0.383	0.900
	3.50	0.610	0.259	0.548	0.188	0.490
	1.75	0.314	0.143	0.301	0.085	0.276
BS-II	7.00	0.084	0.072	0.079	0.067	0.034
	3.50	0.062	0.065	0.073	0.041	0.032
	1.75	0.047	0.066	0.066	0.030	0.024
Con A	7.00	1.010	0.483	0.829	0.444	0.834
	3.50	0.525	0.235	0.438	0.273	0.491
	1.75	0.310	0.131	0.304	0.201	0.290
<i>G. max</i>	7.00	0.081	0.091	0.125	0.107	0.051
	3.50	0.066	0.076	0.110	0.075	0.043
	1.75	0.043	0.113	0.110	0.068	0.031

Each value represents the absorbance at 415nm based on the ELLA.

서는 전체적으로 비슷한 양상을 나타내었으나 CAR-Alum의 경우 결합력이 약간 저하하였으며, *Glycine max* 유래의 lectin에 의해서는 CAR, Alum-CAR의 결합력이 증가하고 CAR-Alum의 결합력은 저하하였다. 이들 결과는 각 lectin의 농도가 낮아짐에 따라 유의성있게 감소하였다.

이상과 같은 결과로부터 IgG2b는 각 어쥘번트에 의해 당의 분포가 다른 당이 결합되었으며, 특히 CAR-Alum adjuvant에 의해 생성된 경우에는 *N*-acetylneuraminic acid, Freund's adjuvant에 의해서는 galactose, mannose의 생성이 가장 높은 것을 알 수 있었으며, CAR에 의해서는 *O*-linked oligosacchride 구성당의 특징인 GalNAc의 생성이 가장 높았으며, CAR-Alum에 의해서는 GalNAc의 생성이 오히려 저하하였다.

결 론

Fetuin을 모델항원으로 하여 Freund's adjuvant와 Alum, CAR, Alum-CAR, CAR-Alum 어쥘번트에 의한 IgG의 생성을 subclass별로 비교하고, Protein A

affinity column에 의해 분리된 IgG2b의 어쥘번트에 의한 당의 구조적 변화를 연구한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

어쥘번트의 종류에 따라 생성되는 IgG의 subclass 별 양상이 서로 다르며, 생성된 IgG중 IgG2b의 경우 Alum-CAR, CAR-Alum, Alum, Freund's adjuvant, CAR의 순으로 생성되었다. 또한, 당의 구조적 변화도 어쥘번트가 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 특히, GalNAc이 *O*-결합형 올리고당에서만 주로 검출되는 점 으로부터 CAR-Alum에 의한 경우에는 다른 어쥘번트를 이용한 경우와 달리 IgG2b의 생성율은 높지만 *O*-결합형 올리고당의 존재가 현저하게 감소된 것을 알 수 있었다. 또한, CAR 어쥘번트에 의한 경우에는 IgG2b의 생성율이 낮음에도 불구하고, *N*-acetylneuraminic acid, galactose, GlcNAc, mannose의 경우에는 고른 반응성을 나타내었으며 GalNAc의 반응성은 현저하게 증가하였다. Alum-CAR의 경우에는 IgG2b의 생성율이 가장 높았으나 결합하고 있는 당의 microheterogeneity에 의해 galactose와 mannose를 포함하는 *N*-결합형 올리고당의 존재가 저하된 것으로 사려된다. 결론적으로, CAR을 단독으로 어쥘번트로 이용한 경우에는 IgG2b의 생성은 가장 낮지만 당의 구조는 다양성을 유지하고 있고, Alum과의 복합 어쥘번트를 이용하면 항체의 생성율은 높아지나 당의 구조가 현저하게 변화한 것을 확인하게 되었다.

본 연구결과는 마우스 IgG의 각 subclass의 항체가 나타내는 생체내에서의 역할이 다른 점을 고려할 때, 특정 기능을 갖는 항체를 보다 많이 생성시키기 위한 각종 어쥘번트를 이용한 본 연구의 시도는 중요한 의미를 갖으며, 생성된 IgG에서 IgG2b를 분리하고 결합 당의 구조적 차이를 확인한 것은, 당단백질에 있어서의 당이 단백질의 구조 및 기능에 미치는 영향 및 당의 생합성등을 연구하는데 중요한 결과인 것으로 사려된다. 현재는 보다 정확한 당 구조해석을 위하여 PAD(pulsed amperometric detection)에 의한 HPAEC (high performance anion exchange chromatography), PA(pyridylamino) 유도체화후 fluorescence detector에 의한 검출등을 실시하고 있다.

감사의 말씀

이 연구는 1999학년도 중앙대학교 학술연구비 지원

에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Ivan, R., Jonathan, B., and David, M. : *Immunology* (Fourth Edition), Mosby, New York, 4.1 (1998).
- 2) Milstein, C. : Monoclonal antibodies. *Sci. Am.* **243**, 66 (1980).
- 3) Harlow, E. and Lane D. : *Antibodies (A Laboratory Manual)*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 96 (1988).
- 4) Freunds, J., Casals, J. and Hosmer, E. P. : Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **37**, 509 (1937).
- 5) Gupta, R. K., Relyveld, E. H., Lindblad, E. B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S. and Gupta, C. K. : Adjuvants-a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* **11**, 293-306 (1993).
- 6) Hilleman, M. R. : Critical appraisal of emulsified oil adjuvants applied to viral vaccines. *Prog. Med. Virol.* **8**, 131 (1966).
- 7) Anderson, W. : Carrageenan structure and biological activity. *Cand. J. Pharm. Soc.*, **2**, 81 (1967).
- 8) Rees, R. : Shapely polysaccharides. *Biochem. J.* **126**, 257 (1972).
- 9) Tobacmann, J. K. : Filament disassembly and loss of mammary myoepithelial cells after exposure to λ -Carrgeenan. *Cancer Research.* **57**, 2823 (1997).
- 10) Mancino, D. and Minucci, M. : Adjuvant Effects of ι , κ , and λ carrageenans on antibody production in Balb/c mice. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* **72**, 359 (1983).
- 11) Nicklin, S., Atkinson, H. and Miller, K. : Iota-carrageenan induced reaginic antibody production in the rat-I. Characterisation and kinetics of the response. *Int. J. Immunopharmac.* **7**, 677 (1985).
- 12) Tian, M. and Alt F. W. : Transcription-induced cleavage of immunoglobulin switch regions by nucleotide excision repair nucleases *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **275**, 24163 (2000).
- 13) Goochee, C. F., Gramer, M. J., Andersen, D. C., Bahr, J. B. and Rasmussen, J. R. The oligosaccharides og glycoproteins : bioprocess factors and affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. *Bio/technology* **9**, 1347 (1991).
- 14) Dunn-Walters, D, Boursier, L., Spencer, J. : Effect of somatic hypermutation on potential N-glycosylation sites in human immunoglobulin heavy chain variable regions. *Mol. Immunol.* **37** 107 (2000).
- 15) Parekh, R., Isenberg, D., Rook, G., Roitt, I., Dwek, R. A. and Rademacher, T. A. : Comparative analysis of disease-associated changes in the galactosylation of serum IgG. *J. Autoimmu.* **2**, 101 (1989).
- 16) Alavi, A., Arden, N., Spector, T. D, Axford J. S. : Immunoglobulin G glycosylation and clinical outcome in rheumatoid arthritis during pregnancy. *J Rheumatol.* **27** 1379 (2000).
- 17) Masuda, K., Yamaguchi, Y., Kato, K., Takahashi, N., Shimada I., Arata Y. : Pairing of oligosaccharides in the Fc region of immunoglobulin G. *FEBS Lett.* **473** 349 (2000).
- 18) Kim, H. H., Yamanguchi, Y., Masuda, K., Matsunaga, C., Yamamoto, K., Irimura, T., Takahashi, N., Kato, K. and Arata, Y. : O-glycosylation in hinge region of mouse immunoglobulin G2b. *J. Biol. Chem.* **269**, 12345 (1994).
- 19) Skea, D. L. and Barber, B. H. : Adhesion-mediated enhancement of the adjuvant activity of alum. *Vaccine* **11**, 1018 (1993).
- 20) Nagai, T. and Yamada, H. : Assay of sialidase using erythrocytes and peroxidase-labeled peanut lectin, *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2243 (1989).