

누에(*Bombyx mori*)로부터 분리한 렉틴의 생화학적 특성

김세진 · 이상용 · 전경희*

영남대학교 이과대학

Biochemical Properties of the Lectin Isolated from *Bombyx mori*

Se Jin Kim, Sang Yong Lee and Kyung Hee Jeune*

Dept. Biology, College of Sciences, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

Abstract – A new lectin was purified from *Bombyx mori* (BML) by physiological saline extraction, ammonium sulfate precipitants, anion exchange column chromatography on DEAE Sephadex A-50 and gel filtration column chromatography on Sephadex G-200. BML agglutinated trypsinized and glutaraldehyde-fixed erythrocytes, and was observed the most high activity with rabbit, chicken erythrocytes and rat splenic lymphocytes. Agglutinability was markedly affected at highly acidic pH, but was relatively stable with high temperature. The effect of metal ions was observed and BML was affected by bivalent cations, especially depending on Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , whereas, inhibited by Mg^{2+} . Agglutination was strongly inhibited by heparin and glucuronic acid. BML was proved to be a glycoprotein which contains 17.16% of sugars. By mass spectrometry analysis, we found 2 bands that were considered as lectin subunits.

Key words – *Bombyx mori*, Lectins, Hemagglutination

렉틴은 두 개 이상의 당과 결합부위를 갖는 단백질 또는 당단백질¹⁾로서 식물뿐만 아니라 미생물, 무척추동물, 하등 척추동물에서도 발견되는 등 매우 다양하게 분포되어 있다.²⁾

곤충렉틴은 생식기관과 혈구세포, 세포막 등에서 생성되어 지방세포에 저장되고,³⁾ 미생물들을 응집시켜서 nodule 형성 과정에 관여하며, 감염 미생물 표면에 결합하여 오폜소닌 (opsonin)으로서의 역할과 pattern molecule을 인식함으로써 곤충 혈림프에 존재하는 다양한 생체 방어 반응물질⁴⁾로서 보고되었다.

누에의 렉틴성분은 Suzuki 등에 의해 탈피 직전인 5령 유충에서 hemagglutinin이 일시적으로 증가하는 반면에 체벽의 상처에는 증가하지 않으며, 유충 cuticle 재생에 관여하고 유충조직을 분해해서 성충세포로 변화시키는 즉, 번데기 발생에 관계한다고 보고되었다.^{5,6)} 이 렉틴은 혈림프 뿐만 아니라 견사샘 (silk gland)에서도 발견되었고, 혈림프에서 기원을 같이 한다고 보고되었다.⁷⁾ N. Koizumi 등에 의해 보고된 바에 따르면 누에로부터 분리되어진 LPS-binding protein은 innate immune recognition에서 중요한 역할을 하

는 C-type lectin family임이 확인되었다.⁸⁾ 또한 렉틴 유사물질로써 β -1,3-glucan binding protein이 분리되어 당 특이성 인식부위가 보고되었고, 이들이 prophenoloxidase system을 활성화한다고 보고되었다.⁹⁻¹¹⁾

렉틴에 대한 연구는 다양한 재료를 이용해 다방면으로 이루어져왔으며, 렉틴의 세포에 대한 독성 뿐만 아니라, 생물 화학적, 면역학적 연구와 항암효과 등 생리활성물질로서의 특징이 밝혀졌다.¹²⁾ 새로운 성질의 렉틴에 대한 탐색이 활발히 진행되는 가운데 장수풍뎅이 (*Allomyrina dichotoma*), 누에 (*Bombyx mori*), 넓적시슴벌레 (*Serrognathus platymelus castanicolor*) 등의 곤충에서 분리한 렉틴은 분열촉진인자 (mitogen)으로서 작용하여 *in vitro* 상에서 면역증강효과를 나타낸다¹³⁻¹⁵⁾고 보고된 바 있다.

본 연구에 사용된 누에는 당뇨병과 간질환 치료제로서 많은 연구가 되어왔으나, 누에의 렉틴성분은 면역증강물질로서의 가능성¹⁴⁾과 이후 몇 가지 생화학적 특성에 대한 연구에도 불구하고 정확히 구명된 바 없었다. 본 연구는 전보⁵⁾에서 보고된 누에 유충의 hemagglutinin과, 본 연구에서 보고하고자 하는 정제 후의 렉틴성분과의 비교를 통해 전보¹⁴⁾에서 보고된 면역증강물질로서의 가능성에 대한 생화학적 뒷받침을 마련하고자 한다.

*교신저자 (E-mail): khjeune@ynu.ac.kr
(Tel): +82-53-810-2375

재료 및 방법

실험재료 - 누에나방과에 속하는 누에나방 (*Bombyx mori*)의 5령 유충을 경북 상주시에서 구입하여 실험재료로 사용하였다.

렉틴(BML)의 분리 및 정제 - 누에에서 분리한 렉틴 (이하 BML)은 Chung 등²⁾의 방법에 따라 ammonium persulfate로 추출한 후, DEAE Sephadex A-50 column을 통해 NaCl의 농도를 0.05 M, 0.1 M, 0.15 M, 0.2 M, 0.3 M까지 증가시켜 단백질 성분을 유출시켰고, 얻어진 각각의 분획은 280 nm에서 흡광도를 측정하고 렉틴 활성을 시험하였다. 렉틴 활성이 나타난 분획을 Sartorius ultramembrane과 Aquacid 등을 이용하여 농축하였고, 이를 Sephadex G-200 column에 통과시켜 더욱 순수하게 정제를 수행하였으며, 각 분획을 렉틴 활성실험을 통해 확인하고 농축하였다.

혈구 응집력 시험 - 실험에 사용한 모든 적혈구는 Nowak 등의 방법¹⁶⁾에 따라 trypsin-glutaraldehyde로 고정하였는데 생리식염수로 세척한 4% 적혈구에 0.1% trypsin을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS로 4번 세척하여 1% glutaraldehyde가 첨가된 20% 용액으로 만들었다. 부드럽게 흔들면서 37°C에서 1시간동안 반응시켜 PBS buffer (0.1 M glycin)로 두 번 세척하여 PBS에 10% 용액으로 만들어 저장하였고 사용직전에 PBS buffer (0.1 M glycin)로써 3% 용액으로 만든 뒤 사용하였다. 렉틴의 적혈구 응집력 시험은 U-shape microtiter plate (Falcon) 각각의 well에 생리식염수 50 μ l를 첫 번째 well에서부터 연속 2배수 희석한 후, 채혈한 혈액을 생리식염수로 세척하여 조제한 3% 적혈구 용액을 가한 뒤 상온에서 1시간 정도 방치시킨 후 육안 또는 현미경으로 관찰하였다.¹⁷⁾ 또한 림프구 용액은 Chung 등의 방법¹⁸⁾을 응용하여 조제하였다. 먼저 생쥐로부터 비장을 분리하여 PBS (phosphate buffered saline)용액 내에서 잘게 부순 뒤 탈지면으로 여과시켜 비장조직을 제거하였다. 이것을 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 침전물을 취하고, Tris-buffered ammonium chloride 용액 (0.168 M NH_4Cl : 0.17 M Tris-HCl, pH 7.65 = 9 : 1)을 가하여 잔류된 적혈구를 파괴시킨 뒤 PBS로 3~4회 세척하여 RPMI 1640 배지에 부유시켜 5×10^7 cells/ml로 조제하여 사용하였다.

pH의 영향 - 렉틴을 pH 2~11사이의 여러 가지 완충액으로 4시간 동안 4°C에서 투석시킨 후 렉틴 활성을 조사하였다. 완충용액은 25 mM KCl-HCl Buffer (pH 2.18), 25 mM Glycine-HCl Buffer (pH 3.18), 25 mM Citrate Buffer (pH 4.16, 5.35), 25 mM Phosphate Buffer (pH 6.54), 25 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.40, 8.71), 25 mM Carbonate Buffer (pH 9.62, 10.08) 등을 사용하였다.

온도의 영향 - 렉틴의 열 안정성을 조사하기 위해 10~90°C 범위의 온도에서 30분간 가온 한 후, 즉시 얼음으로 식힌

다음 적혈구 응집 반응을 이용하여 렉틴 활성을 측정하였다.

금속이온의 영향 - $\text{Ba}(\text{OH})_2$, CaCl_2 , FeCl_2 , HgCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 , ZnCl_2 등과 착물 형성제인 EDTA를 0.05 mM~10 mM로 조제한 뒤 렉틴을 50 μ l씩 연속 2배수 희석법으로 희석한 well에 금속이온 용액을 50 μ l씩 가하였다. 그 위에 3% 적혈구 용액 50 μ l를 가하여 상온에서 30분간 방치한 뒤에 세포 응집력을 조사하였다²⁾.

당 특이성 - 적혈구 응집력 저해 효과는 Iglesias 등¹⁹⁾의 방법에 따라 여러 당류를 사용하여 실시하였다. 200 mM로 조제한 당 용액을 30 μ l씩 취하여 U-shape microtiter plate에서 연속 2배수 희석법으로 희석한 뒤, 각 well에 64 HU (Hemagglutination Unit)의 응집력을 나타내는 렉틴 용액을 30 μ l 가하고, 그 위에 3% 토끼 적혈구 용액을 30 μ l씩 가하였다. 이때 적혈구 응집력 저해 효과는 응집력의 50% 저해를 유발하는 당의 최저농도 (IC_{50})로 표시하였다.

단백질 함량 분석 - Lowry 등²⁰⁾의 방법에 따라 소 혈청 알부민 (BSA)을 표준품으로 사용하였으며, 각각의 시료는 540 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검정 곡선으로부터 단백질 함량을 분석하였다.

당 함량 분석 - 렉틴의 당 함량은 만노오스를 표준품으로 하여 Anthron 방법²¹⁾으로 실시하였다. 480 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검정 곡선으로부터 당 함량을 측정하였다.

SDS-PAGE - Laemmli²²⁾방법으로 discontinuous buffer system으로 실시하였다. 4~12% polyacrylamide gel을 이용하여 100 volt에서 2 hr 동안 running시켰고, 전기영동 후 gel은 Coomassie blue를 이용하여 염색하였다. 표준 단백질로는 10~175 kDa의 broad range를 사용하였다.

Mass Spectrometry Analysis - 단백질 단편들은 modified porcine trypsin을 이용하여 작은 단편으로 분해하였고, 젤 조각으로부터 SDS, 유기용매, 염색시약 등의 불순물을 제거하기 위하여 50% acetonitrile로 세척하였으며, 단백질 분해반응은 0.5% trifluoroacetic acid를 5 μ l 첨가함으로써 종결시켰다. Trypsin에 의해 잘려진 단백질 단편들은 수용액 상태로 회수하였고, C18ZipTips를 이용하여 1~5 μ l 부피로 탈염 및 농축하였다. 이 농축액을 동량의 50% aqueous acetonitrile에 포화된 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid와 혼합하였고, 질량분석을 위하여 target plate에 적하하였다. 적하된 단백질 단편들은 337 nm의 N_2 laser조사에 의해 기화된 다음, 20 Kv injection pulse에 의해 가속되었다. 300 laser shots의 누적 peaks에 의해 각각의 단백질 단편에 대한 mass spectrum을 구하였다.

Mass spectrum의 분석을 위해서 trypsin의 자가분해에 의해 생성된 peptide의 ion peak m/z (842.510, 2211.1046)를 표준 peaks로 이용하였고, 분석이 완료된 mass spectrum으로부터 단백질 동정을 위하여 MASCOT program (<http://www.matrixscience.com/>)을 이용하였다

결과 및 고찰

렉틴의 분리 및 정제 - 누에 유충 혈림프를 대상으로 발달 단계에 따른 혈구 응집력에서 5령의 유충이 가장 높은 응집력을 나타낸다는 보고⁵⁾에 따라 선택하였다. 누에 렉틴을 음이온 교환수지인 DEAE Sephadex A-50 column으로 정제하여 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다. 25 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.4)에 NaCl의 농도를 단계적으로 증가시켰을 때 0.05 M 분획에서 가장 강한 렉틴 활성을 나타내 0.05 M 분획물을 대상으로 다음 정제 단계의 시료로 사용하였다. Sephadex G-200 column으로 최종 정제한 결과는 Fig. 2와 같았다. 실험결과 0.1 M NaCl을 포함한 25 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.4) 분획에서 가장 강한 응집력을 나타내었고 이 분획을 BML로 명명하였다. 이는 전보¹⁴⁾에서 사용한 것과 동일한 시료로 면역증강 물질로 가능성을 확인했던 BML을 대상으로 생화학적 특성을 조사하였다.

혈구 응집력 시험 - BML에 대하여 사람 및 토끼 적혈구, Rat의 림프구로 렉틴 활성도를 조사한 결과 사람 적혈구에서는 용혈현상 (hemolysis)을 나타내었고, 닭과 토끼 적혈구,

Rat의 림프구 등에서 응집을 나타내었다 (Table I). 누에 혈구 응집 물질에 대한 이전 보고에 따르면 sheep RBC를 응집시키는 결과가 있었는데⁵⁻⁷⁾ 누에는 사람이 아닌 동물 적혈구에 강한 응집력을 나타낸다는 것을 알 수 있으며, 적혈구뿐만 아니라 림프구에도 응집력이 있음이 확인되었고, 본 연구에서 사람 적혈구에 용혈현상을 보인 점과 유사성이 있었다. 한편, 곤충렉틴 중에서도 장수풍뎅이 (*Allomyrina dichotoma*, 이하 ADL)¹³⁾의 경우 사람적혈구 AB형에, 넓적사슴벌레 (*Serrognathus platymelus castanicolor*, 이하 SPL)¹⁵⁾의 경우에는 사람 적혈구 A형에 강한 특이성이 있었다. 균류 렉틴인 표고버섯 (*Lentinus edodes*)²¹⁾은 누에처럼 사람에서는 응집을 나타내지 않은 반면에 mouse와 rat, 토끼 적혈구에서 응집을 나타낸다고 보고되었다. 이는 렉틴이 분리되는 생물의 종에 따라 응집시키는 혈구의 종류가 다르다는 것을 의미하며, 렉틴의 혈구 응집 특이성은 종에 따른 특이성을 나타낸다는 것을 확인하였다.

pH의 영향 - pH 변화에 따른 BML의 적혈구 응집력 변화는 Table II와 같다. 강산 (pH 2-4)에서는 활성이 없거나 매우 불안정한 활성을 나타내고, 약산성 (pH 5)과 강염기 (pH 10)에서는 비교적 안정함을, 중성 및 약염기 (pH 6-9)

Caption

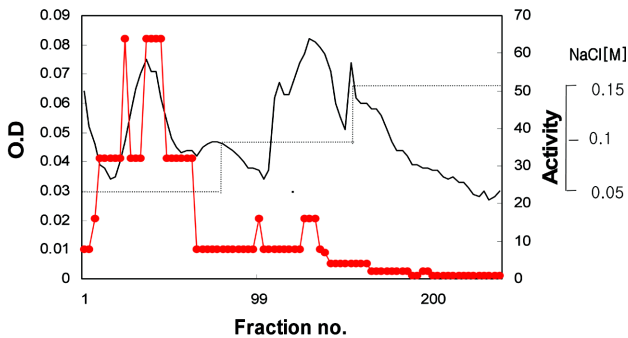


Fig. 1. Elution profile of crude lectins from *Bombyx mori* on DEAE Sephadex A-50 column (2.6 × 40 cm) chromatography (absorbance at 280 nm : —, lectin activity: —●—, salt gradient: ----, flow rate: 24 ml/hr).

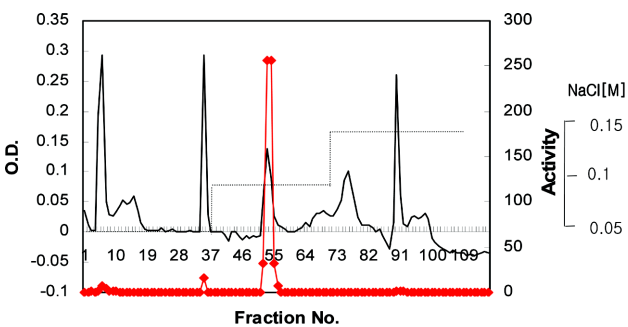


Fig. 2. Elution profile of BML from DEAE Sephadex A-50 column on Sephadex G-200 column (1.6 × 40 cm) chromatography (absorbance at 280 nm: —, lectin activity: —●—, salt gradient: ----, flow rate: 24 ml/hr).

Table I. Specificity of BML on agglutination of erythrocytes from various animals and rat splenic lymphocytes

Species	Cell agglutinating activity[HU]*	
	BML	
Human A Type	8H	
B	8H	
O	8H	
AB	8H	
Chicken	2,048	
Rabbit	2,048	
Rat splenic lymphocytes	2,048	

*[H.U] : Hemagglutination unit

Table II. Effect of pH on hemagglutinating activity of BML

Buffer	pH	Hemagglutinating activity[HU]
25 mM KCl-HCl Buffer	2.18	0
25 mM Glycine-HCl Buffer	3.18	0
25 mM Citrate Buffer	4.16	8
25 mM Citrate Buffer	5.35	128
25 mM Phosphate Buffer	6.54	256
25 mM Tris-HCl Buffer	7.40	256
25 mM Tris-HCl Buffer	8.71	256
25 mM Carbonate Buffer	9.62	512
25 mM Carbonate Buffer	10.08	128

에서는 렉틴 활성이 매우 안정되었다. 이 결과에서 뽕나무 잎만 먹는 누에와는 달리 부식물이 섞인 토사와 목재 등에서 서식하는 곤충인 장수풍뎅이 (*Allomyrina dichotoma*) 등은 pH에 영향을 거의 받지 않는 점을 발견하였고, 이와 비교하였을 때 매우 다르다는 것을 확인할 수 있는 결과였다. 한편 완두콩 (*Pisum sativum*)²³은 pH 5~10에서 안정함을, 방울토마토 (*Lycopersicum esculentum ver*)²⁴는 pH 6~8에서 안정성을 나타내는 등, 많은 식물성 렉틴이 대체로 중성에서 안정성을 보이는 점에서 서식환경이 렉틴의 특성에 영향을 미치는 것으로 사료되어진다.

온도의 영향 - BML의 온도에 따른 적혈구 응집력의 변화는 Fig. 3과 같다. 20~40°C에서는 매우 안정되었고, 50°C 이상에서도 계속 안정 되었으나 90°C에서는 다소 감소하였다. 이와는 달리 다른 곤충렉틴을 보면 장수풍뎅이 렉틴 (ADL)은 40°C 이하에만 활성이 안정되었고, 균류인 버섯렉틴의 경우, 표고버섯 (*Lentinus edodes*)²¹은 40°C, 후추버섯 (*Lactarius piperatus*)²⁵은 55°C, 그리고 차가버섯 (*Arimillaria luteo-virens*)²⁶은 70°C 이하에서 열 안정성을 나타내는 다양성을 보였으며, 식물성 렉틴의 경우 방울토마토 (*Lycopersicum esculentum ver*)²⁴는 50°C, 완두콩 (*Pisum sativum*)²³은 60°C, 그리고 바나나 (*Musa acuminata*)²⁷는 80°C 이하에서 열 안정성을 나타냈다. 이외 동물성 렉틴 중에서 새우류인 대하 (*Fenneropenaeus chinensis*)²⁸는 70°C, 바나나 새우 (*Fenneropenaeus merguensis*)²⁹는 55°C 이하에서 안정성을 나타냈고, 별불가사리 (*Asterina pectinifera*)³⁰에서는 40°C에서 안정성을 나타냈음이 보고되었다. 이는 렉틴의 열 안정성이 종 다양성이 있음을 보여주는 결과이며, 누에는 특히 높은 온도에서 열 안정성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 고온에서의 렉틴의 안정성에 대한 보고로는 열대성 다육식물인 호접무 (*Kalanchoe crenata*)³¹에서도 보고되었다. 하지만 Suzuki and Natori⁵에 따르면 분리한 누에 hemagglutinin은 70°C에서 활성이 완전히 사라졌음이 보고되었다. 이에 비해 본 연구에서 분리된 렉틴이 높은 온도에서도 계속 열 안정성이 있음이 확인된 본 연구 결과는 매우 흥미로운 것이었다.

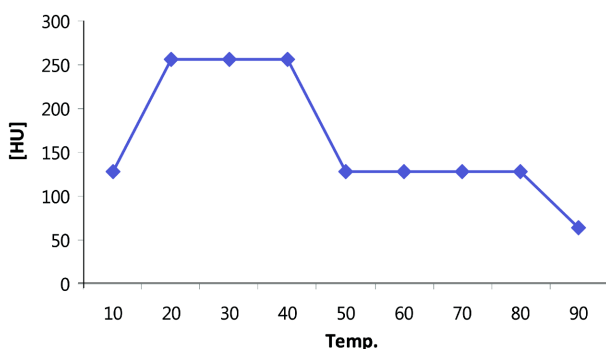


Fig. 3. Effect of temperature on hemagglutinating activity of BML.

Table III. Effect of metal ions on hemagglutinating activity of BML

Metal ion & Chelating agent	Relative activity
Control	256
≥10 mM Ba ²⁺	4096
≥1 mM Ca ²⁺	4096
≥1 mM Fe ²⁺	4096
≥10 mM Hg ²⁺	hemolysis
≥10 mM Mg ²⁺	*I.H.
≥1 mM Mn ²⁺	4096
≥2.5 mM Zn ²⁺	4096
EDTA	**N.E.

*I.H.: Inhibition,

**N.E. : No effect

The test was performed with chelating agent and metal ions with various concentrations of BML(from 0.05 to 10 mM).

금속 이온의 영향 - Ba(OH)₂, CaCl₂, FeCl₂, HgCl₂, MgCl₂, MnCl₂, ZnCl₂ 등과 EDTA를 0.05 mM 농도에서부터 10 mM 까지의 범위에서 시험한 결과, BML의 활성은 금속 이온 의존성으로 특히 Ca²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺에 강한 의존성을 보이는 반면 Mg²⁺에 억제되고, Hg²⁺에 용혈현상을 나타냈다. Ca²⁺의존성이 높은 BML은 C-type lectin이라 사료되어지며, 이는 C-type lectin family gene으로 알려진 BmLBP⁸처럼 C-type lectin이 pattern recognition에서 중요한 역할을 하는 물질로서 곤충의 선천성 면역에 중요한 역할을 하는 것으로, 특히 Lepidopteran류의 곤충에서 발견되는 렉틴이 두 개의 CRDs를 지니고 LPS결합으로 PPO cascade활성을 통한 옵소닌으로서의 작용이 보고되어진 바,^{4,8,11} BML이 누에 유충에 있어 생체 방어 기능에 참여하는 물질로 사료되어진다. 앞서 보고된 일본산 누에 렉틴^{6,7}의 경우는 Mg²⁺이온에 대해 강한 의존을 보이는 것과는 달리 본 연구의 BML은 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 일본산 누에와 본 연구에서 사용된 국내산 누에와의 종과 환경의 차이로 보여지는 바 현재 국내에서 누에고치 생산을 위해 사육되는 종은 대부분 중국과 일본종의 교잡을 사용한다³²고 알려져 있는 것에서 추정할 수 있고, 또한 서식환경과 뽕나무 재배를 위한 토양의 차이가 결국 체내에서 만들어지는 단백질의 성질에 영향을 미치는 것으로 사료되어진다.

당 특이성 - 당에 의한 적혈구 응집력저해 현상을 조사한 결과 (Table IV), 단당류에 의한 저해 현상이 나타났다. Galactose와 glucose에 의해 비교적 약한 저해를 나타냈으나 mannose와 galacturonic acid에 보다 강한 저해를 나타냈으며 glucuronic acid에 의해 가장 강한 저해를 보였다. 또한 특이적으로 헤파린 (heparin) 저해가 강하게 나타남을 확인하였다. 이는 Suzuki and Natori의 보고⁵와 동일하였으며,

Table IV. Carbohydrates inhibition of hemagglutinating activity with BML

Sugar	Concentration(mM)*	Sugar	Concentration(mM)*
N-acetylgalactosamine	NI**	Lactulose	NI
N-acetylglucosamine	NI	Rhamnose	NI
Fructose	NI	Ribose	NI
Galacturonic acid	6.25	Sorbose	NI
Glucuronic acid	1.5	Sucrose	NI
Galactose	50	Trehalose	NI
Glucose	50	Glycosaminoglycan Concentration(μ g/ml)	
Maltose	200	Heparin	0.5
Mannose	6.25		

*Minimal concentrations of carbohydrates causing 50% inhibition of the hemagglutinating activity.

**NI; No inhibition.

Table V. Purification of the lectin from *Bombyx mori*

Purification step	Volume [ml]	Total Protein [mg]	Total Activity [units x ml]	Specific Activity [units/mg]	Purification [fold]	Recovery [%]
Extraction	1205.0	4148.57	617.01	148.73	1.0	100.0
Salt fractionation	56.0	1773.68	286.72	646.61	4.35	46.5
0.05 M fraction of DEAE Sephadex A50	39.3	45.21	100.60	2225.15	14.96	16.3
0.1 M fraction of Sephadex G200	4.0	6.9	40.44	5860.87	39.41	6.5

*The procedure was started with 700g of *Bombyx mori*.

Kitagaki 등,³³⁾ Amanai 등⁶⁾과는 유사한 결과였다. 이러한 당 특이성은 다른 곤충류에서는 쉽게 발견할 수 없는 누에 렉틴만의 특이성으로서 다른 곤충렉틴과는 생물학적 역할에서 분명한 차이가 있음을 반영하는 것으로 체벽의 손상에도 렉틴의 증가가 나타나지 않았음을 보고하였다.^{3,5,6)} 헤파린에 특이적인 성분은 주로 포유류 렉틴에서 많이 발견되어지는 것으로, human platelets에서 발견된 TPS나 사람의 림프구와 내피세포 (endothelial cell)에서 발견되는 PECAM-1, mammalian NK cell에서 발견된 neural cell adhesion molecule등이 있다. 그리고 쥐의 뇌에서 발견된 heparin binding p30등이 있으나 타 곤충류에서는 찾아볼 수 없었던 것이며, 매우 이례적으로 하등무척추 동물인 조개류의 꼬막에서 혈림프 렉틴인 Anadarin MS가 조직 발달과정에서 그 기능을 하고 있음이 보고된 적은 있다.³⁴⁾

단백질 함량 분석 - 누에 유충 700 g을 extraction한 렉틴은 4.35배 정제되었고 46.5% 회수되었고, DEAE Sephadex A-50의 0.05 M 분획에서는 14.96배 정제되었으며, 16.3% 회수되었다. 최종 정제된 BML에서는 39.41배 정제되었고 6.5% 회수되었다 (Table V). 이는 Suzuki and Natori에 의한 정제⁵⁾에 의해 6~10%의 회수율과 비교하였을 때 유사함을 보였고, Amanai *et al.*⁶⁾의 보고에서는 30%의 높은 회수율을 보고했지만 이는 non-specific binding proteins을 포함

한 결과였으므로 비교에 의미를 둘 수가 없는 것이었다. 동일한 정제방법으로 추출된 ADL¹³⁾의 경우, 2.7%의 회수율을 나타냈으며 SPL¹⁵⁾의 경우는 9.41%의 회수율을 나타냈다. 따라서 회수율에 있어 SPL과 BML이 유사한 반면 ADL은 상대적으로 낮았음을 알 수 있었다.

당 함량 분석 - 당 함량을 측정한 결과 crude 렉틴은 0.72%, DEAE Sephadex A-50 분획은 3.72%, Sephadex G-200에 의해 정제된 BML은 17.16%의 당을 함유한 당단백질로 밝혀졌다. 당의 함량은 렉틴의 열 안정성과 관련이 있는 것으로 사료되어지는 바, 표고버섯(*Lentinus edodes*)²¹⁾은 8.96%의 당을 함유하고 있고 40°C까지 안정한 응집력을 가지고, 후추버섯(*Lactarius piperatus*)²⁵⁾은 9.8%의 당을 함유하고, 55°C까지 열 안정성을, 별불가사리(*Asterina pectinifera*)³⁰⁾에서는 8.96%에, 40°C까지 열 안정성을 가지며, ADL은 0.47%의 매우 미비한 양의 당을 함유하고 있고 40°C 이하에서 열 안정성을 나타내는 것으로 확인 되었다. 또한 *Glossina* 내에서 발견되어진 여러 종의 hemolymph lectin 중에서 단백질성 렉틴은 50°C 미만에서 열 안정성을 가지는 반면 당단백질인 렉틴 종류에서는 65°C 이상에서 열 안정성을 가지는 것을 확인할 수가 있었다.³⁾ 따라서 앞서 관찰한 BML의 높은 열 안정성은 다른 종에 비해 비교적 높은 당의 함량이 영향을 미치는 것으로 사료되어진다.

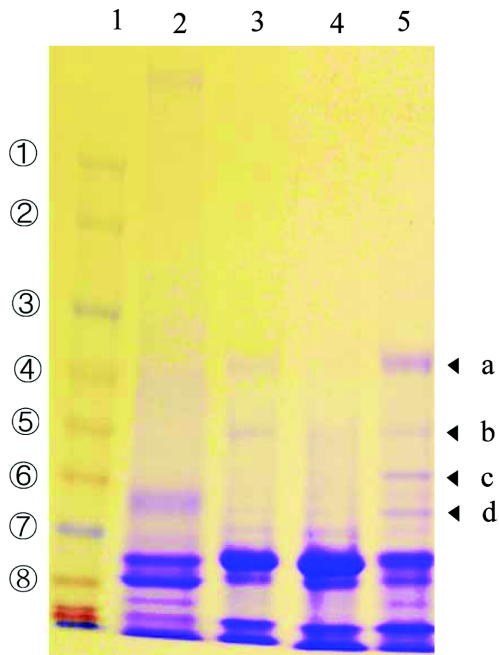


Fig. 4. Electrophoretic patterns of BML on SDS-polyacrylamide gel.

Arrows indicate as follows :

a, b : transferrin ; c, d : BML subunits

1. Molecular weights of standard were given as follows :

- ① 175 kDa ⑤ 62 kDa
- ② 130 kDa ⑥ 51 kDa
- ③ 95 kDa ⑦ 42 kDa
- ④ 70 kDa ⑧ 29 kDa

2. Crude Letins

3. 0.05 M fraction of DEAE Sephadex A-50

4. 0.1 M fraction of Sephadex G-200 (inagglutinating fraction)

5. 0.1 M fraction of Sephadex G-200 (agglutinating fraction, BML)

Mass spectrometry analysis를 통한 단백질 동정 - 누에 렉틴의 정제 단계에 따른 각 분획을 SDS-PAGE한 결과 Fig. 4과 같이 나타났다. Sephadex G-200 column chromatography에서 활성이 나타나지 않은 분획을 대조군으로 하여 활성이 있는 분획과 함께 loading하였고, 그 결과 활성이 있는 분획에만 존재하는 4개의 band를 확인할 수 있었다. 이 4개의 band (a, b, c, d)를 추출한 뒤 mass spectrometry 분석을 이용하여 단백질 동정을 하였다. 이들 중에 두 개의 band (a, b)는 Fig. 5에서 나타난 것처럼 peptide mass fingerprinting 되었고, 이들은 각각 트랜스페린 (transferrin)임이 밝혀졌으며, a-band는 28%, b-band는 12%의 sequence coverage를 보이는 것으로 동정되었다. 따라서 이 b-band는 truncated form임을 확인할 수 있었다. 트랜스페린은 다양한 기능을 가진 철 결합 단백질 (iron-binding protein)으로 다양한 조직 사이에서 철 (iron)을 운반하는 iron shuttle로서 작용할 뿐만 아니라 선천성면역계 (innate immune system)에서 면

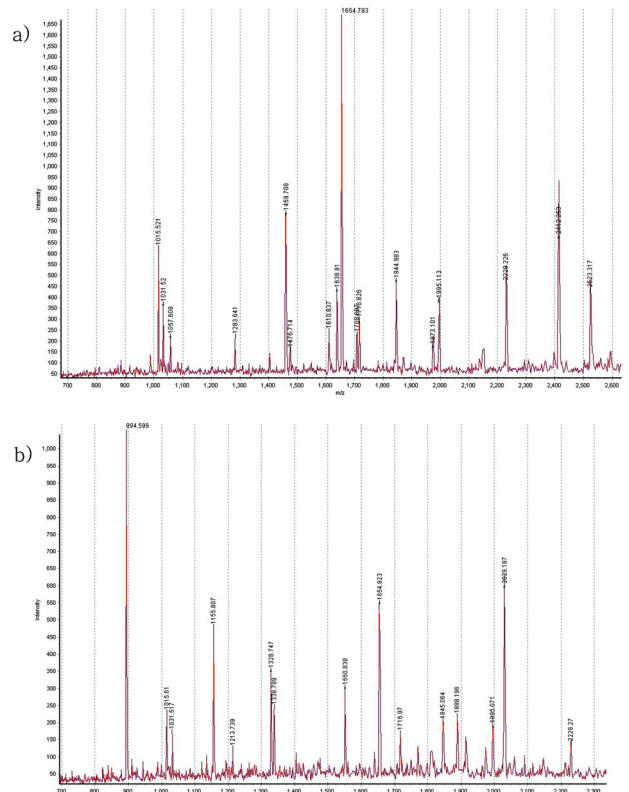


Fig. 5. Peptide fingerprints of band 'a' and 'b' obtained by MALDI-TOF mass spectrometry : Band 'b' is form of truncating band 'a'

역학적 기능을 가진다고 알려져 있다.^{35,36)} 특히 *Bombyx mori*의 트랜스페린의 경우 laminarin, LPS, peptidoglycan 등 다양한 microbial 성분에 의해 정상상의 경우보다 16배 이상의 증가를 나타낸다고 알려져 있다.³⁶⁾ 따라서 본 연구에서 BML이 Fe^{2+} 의 의존성을 나타낸다는 결과와 LPS binding에 대한 보고⁸⁾가 있는 것으로 종합하여 볼 때 트랜스페린이 BML에서 분리되지 않고 모종의 역할을 하는 물질로 추정되어진다. 또 다른 두 개의 band는 알려지지 않은 미동정 단백질로 밝혀졌다. 따라서 미동정 단백질들이 혈구 응집력을 가지는 렉틴이라고 사료되어지는 바, 약 51 kDa, 42 kDa의 분자량으로 추정되는 이 두 개의 band (c, d)는 렉틴성분의 subunit으로 간주된다. 그러나 추후 이들의 amino acid sequence 및 분자량 등을 조사하는 연구를 계속 수행하여야 할 것이다.

결 론

한국산 누에 유충으로부터 ammonium sulfate와 anion exchange column chromatography인 DEAE Sephadex A-50, gel filtration column chromatography인 Sephadex G-200를 이용하여 letin을 분리 정제하였고, 이를 BML이라고

명명하였다. BML은 사람의 적혈구에는 응집현상을 나타내지 않았고, rabbit과 chicken의 적혈구, Rat의 림프구에서 높은 응집현상을 나타냈다. pH에 대한 활성 효과는 강산과 강염기에서 억제되었고, 다른 렉틴보다 높은 열 안정성을 보였는데, 이는 17.16%의 당 함량으로 인한 열 안정성이 생성되는 것으로 보였으며, 다른 렉틴들과는 달리 BML은 90°C까지 렉틴의 활성이 관찰되었다. 금속이온 중에서 특히 Ca^{2+} 과 Fe^{2+} , Mn^{2+} 의존성을 나타낸 반면, Mg^{2+} 에 의해 억제되었다. 당에 의한 응집 저해 효과는 heparin과 glucuronic acid에서 강한 특이성을 나타내었다. 추후 누에 렉틴의 amino acid sequence와 구조를 밝히는 작업 등, 누에의 렉틴 성분에 대한 생화학적 성질 규명에 관한 연구가 계속되어야 할 것이다.

인용문헌

- Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. and Sharon, N. (1980) What should be called a lectin? *Nature* **285**: 66.
- Chung, S. R. and Jeune, K. H. (1986) Lectins. *Review of Biochem. Biochem. Soc. Kor.* **1**: 371-382.
- Ingram, G. A. and Molyneux, D. H. (1991) Insect lectins: Role in parasite-vector interactions. In Kilpatrick, D. C., Van Driessche, E. and Bøg-Hansen, T. C. (eds.) *Lectin Reviews* Vol. 1, 103-127, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA.
- Kim, J. H. and Lee, I. H. (2003) 곤충의 생체방어 단백질로서의 lectin. *BioWave* **5**(6): 1-8.
- Suzuki, T. and Natori, S. (1983) Identification of a protein having hemagglutinating activity in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biochem.* **93**: 583-590.
- Amanai, K., Sakurai, S. and Ohtaki, T. (1990) Purification and characterization of hemagglutinin in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* **97B**: 471-476.
- Amanai, K., Sakai, M., Sakurai, S., Mori, T., Nikaido, O. and Ohtaki, T. (1991) Occurrence of lectin in the silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Develop. Growth & Differ.* **33**(4): 421-427.
- Koizumi, N., Imamura, M., Kadotani, T., Yaoi, K., Iwahana, H. and Sato, R. (1999) The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains. *FEBS Letters* **443**: 139-143.
- Ochiai, M. and Ashida, M. (1988) Purification of a β -1,3-Glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* **263**(24): 12056-12062.
- Yoshida, H., Kinoshita, K. and Ashida, M. (1996) Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* **271**(23): 13854-13860.
- Ochiai, M. and Ashida, M. (2000) A pattern-recognition protein for β -1,3-Glucan. *J. Biol. Chem.* **275**(7): 4995-5002.
- Lis, H. and Sharon, N. (1986) Biological properties of lectins. In Liener, I.E., Sharon, N. and Goldstein, I. J. (eds.), *The Lectins*, 266, Academic Press, New York.
- Jeune, K. H., Jung, M. Y., Choi, S. J., Lee, J. W., Park, W. H., Cho, S. H., Lee, S. H. and Chung, S. R. (2001) Immunomodulating effect of the lectin from *Allomyrina dichotoma*. *Kor. J. Pharmacogn.* **32**(1): 31-38.
- Jeune, K. H., Kim, S. J. and Chung, S. R. (2005) Cytokine expressions with lectins from *Allomyrina dichotoma* and *Bombyx mori*. *Kor. J. Pharmacogn.* **36**(2): 129-135.
- Jo, S. H., Kim, S. J., Chung, S. R. and Jeune, K. H. (2006) Effect of lectin isolated from *Serrognathus platymelus castanicolor* larvae on the various cytokine expressions. *Kor. J. Pharmacogn.* **37**(4): 221-228.
- Nowak, T. P., Kobilae, D., Rael, L. E. and Barondes, S. H. (1977) Developmentally regulated lectin from embryonic chick pectoral muscle. *J. Biol. Chem.* **252**: 6026-6030.
- Chung, S. R., Jeune, K. H. and Kim, K. A. (1980) Isolation, purification and characterization of phytohemagglutinating proteins from Korean natural products. *Arch. Pharm. Res.* **3**: 31-36.
- Chung, S. R., Hong, S. S. and Jeune-Chung, K. H. (1983) Isolation, purification of lectin from *Phaseolus radiatus*. *Yakhak Hoeji* **27**: 221-227.
- Iglesias, J. L., Lis, H. and Sharon, N. (1982) Purification and properties of a D-galactose/N-acetyl-D-galactosamine specific lectin from *Erythrina cristagalli*. *Eur. J. Biochem.* **123**: 247-252.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265.
- Moon, I. J. (1995) Biochemical characteristics, lymphocytes mitogenicity and cancer cell agglutinability of the lectin from *Lentinus edodes*. *Ph. D. Thesis*, 1-88, Yeungnam university.
- Laemmli, G. U. K. and King, J. (1970) Polypeptides of the tail fibers of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **62**: 465-477.
- Sitohy, M., Doheim, M. and Bahr, H. (2007) Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. *Food Chemistry* **4**(3): 971-979.
- 박나영, 이삼빈, 노광수 (2007) Biochemical characterization of lectin isolated from cherry tomato fruit. *J. Life Science* **17**(2): 254-259.
- Kim, M. K. (1990) Studies on lectins from Korean higher fungi - Isolation, purification and biochemical properties of lectins from *Lactarius piperatus*. *Ph. D. Thesis*, 1-79, Yeungnam university.

26. Feng, K., Liu, Q. H., Ng, T. B., Liu, H. Z., Li, J. Q., Chen, G., Sheng, H. Y., Xie, Z. L. and Wang, H. X. (2006) Isolation and characterization of a novel lectin from the mushroom *Armillaria luteo-virens*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**: 1573-1578.
27. Cheung, A. H. K., Wong, J. H. and Ng, T. B. (2009) *Musa acuminata* (Del Monte banana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity. *Phytomedicine* **16**: 594-600.
28. Sun, J., Wang, L., Wang, B., Guo, Z., Liu, M., Jiang, K., Tao, R. and Zhang, G. (2008) Purification and characterization of a natural lectin from the plasma of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunology* **25**: 290-297.
29. Rittidach, W., Pajjit, N. and Utarabhand, P. (2007) Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* hemolymph. *Biochim. Biophys. Acta* **1770**: 106-114.
30. Park, C. S. (1995) Cancer cell agglutinability and biochemical properties of the lectins from starfish, *Asterina pectinifera*. *Ph. D. Thesis*, 1-88, Yeungnam university.
31. KuKu, A. and Eretan, O. B. (2004) Purification and partial characterization of a lectin from the fresh leaves of *Kalanchoe crenata* (Andr.) How. *J. Biochem. Mol. Biol.* **37**: 229-233.
32. Nho, S. K and Lee, J. M. (2000) Characteristics of Korean native strains in the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *Korean J. Seric. Sci.* **42**(1): 10-13.
33. Kitagaki, H., Iida, N., Matsumoto, I. and Seno, N. (1986) Carbohydrate-binding specificity of silkworm lectin. *Carbohydrate Research* **151**: 271-278.
34. Kilpatrick, D. C. (1991) Alphabetical directory of animal lectins. In kilpatrick, D.C.(eds.) Handbook of animal lectins: Properties and biomedical applications. 79-4567, John Wiley & Sons, Ltd.
35. Yun, E. Y, Kang, S. W., Hwang, J. S., Goo, T. W., Kim, S. H., Jin, B. R., Kwon, O. Y and Kim, K. Y. (1999) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a transferrin homolog from *Bombyx mori*. *Biol. Chem.* **380**: 1455-1459.
36. Yun, E. Y, Lee, J. K., Kwon, O. Y, Hwang, J. S., Kim, I. S., Kang, S. W., Lee, W. J., Ding, J. D., You, K. H. and Goo, T. W. (2009) *Bombyx mori* transferrin: Genomic structure, expression and antimicrobial activity of recombinant protein. *Dev. Comp. Immunol.* **33**: 1064-1069.
- (2010. 12. 6 접수; 2010. 12. 27 심사; 2010. 12. 27 게재확정)