

해양동물 구멍밤고둥의 렉틴 성분 연구

정시련 · 최일식 · 전경희*
영남대학교 약학대학 · *이과대학

Studies on Lectins from Marine Animal *Chlorostoma argyrostoma turbinatum*

See Ryun Chung, Il Shik Choi and Kyung Hee Jeune*

College of Pharmacy and *College of Science, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

Abstract—Two kinds of new lectins, CATL-I and CATL-II, were partially purified from the intestine of *Chlorostoma argyrostoma turbinatum* by physical saline extraction, salt fractionation, ion exchange chromatography and gel filtration. CATL-I and CATL-II were purified 39.4 and 15.8 fold with a yield of 8.8 and 7.4%, respectively. On polyacrylamide gel electrophoresis, CATL-I demonstrated one major and one minor bands. This lectin agglutinated human and other animal erythrocytes nonspecifically and also agglutinated murine splenic lymphocytes. Carbohydrate specificity of the lectins was determined by inhibition of the agglutinability by methyl- α -D-galactopyranoside and L-rhamnose at a final concentration of 6 mM. The lectins contained relatively high amounts of acidic amino acids, but the contents of sulfur containing amino acids were very low or was not estimated. Immunochemical studies were carried out to identify some properties of marine animal lectins.

Keywords—Lectins · cell agglutination · carbohydrate specificity · *Chlorostoma argyrostoma turbinatum*

천연물 성분중에서 렉틴이 最近들어 흥미의 焦點이 된데는 몇가지 이유가 있겠는데 그 중 가장 탁월한 점은 細胞表面이나 溶液內에 存在하는 糖類의 確認 및 研究에 有用하게 쓰이는 점이라 하겠다.¹⁻⁸⁾ 이 特性 때문에 렉틴은 많은 種類의 生命科學 研究分野에 있어서 필요불가결의 도구로 등장하게 되었고, 또 다른 이유는 렉틴이 微生物, 植物, 動物 등 生物界에서 廣範圍하게 recognition determinant로 활약한다는 점에서라고 본다. 이를테면 bacterial lectin은 bacteria가 어떤 다른 細胞의 表面에 附着함으로써 疾病을 發病시키게 되는데, 이때 다른 細胞에 附着함에 필요한 仲介役割을 擔當하며, 또 植物렉틴은 fungal phytopathogen으로부터 保護

防禦 기구의 役割 등도 한다.⁹⁻¹¹⁾

動物에 있어서 膜結合 렉틴은 循環器系로부터 糖蛋白의 調節, 細胞간 糖蛋白의 輸送, 固定 등의 役割을 하며, 下等動物에 있어서는 高等動物의 antibody와 같은 役割을 하는 등 이와 같은 기능 외에도 海洋動物에 있어서는 海水에 溶存하는 微量元素라든가, 酵素, 糖蛋白 등 營養物質의 吸着, Ca^{++} 의 輸送과 貯藏 등으로 밝혀져 있다.^{2-8,11)}

이상과 같은 점들로 인해 근래 렉틴은 급격한 研究增加 趨勢에 있으며 오늘날 100여 종 이상의 순수한 렉틴이 精製되었고 이중 40여 종이 商品化되어 高價로 去來되면서 최근엔 生命科學 研究 도구로서 뿐만 아니라 각종 癌의 診斷 및

治療에 應用되고 있는 例가 상당히 많고, 그의 免疫性 疾患 등 治療劑 開發에의 期待가 크게 擡頭되고 있어 天然物 成分중 크게 주목되는 分野라고 하겠다.^{7,12)}

본 연구는 陸地의 生物과는 그 生活環境이 대단히 다른 海洋動物의 生體組織으로부터 lectin 成分을 研究하여 海洋 天然物로부터 有用한 新物質의 創出로 疾病의 診斷 및 治療에 應用될 수 있는 약의 開發뿐만 아니라, 또한 各種 生命科學 研究道具로 利用될 生理活性이 큰 新物質(lectin)의 開發에 寄與하고자 시도하였다.

실험재료 및 방법

실험재료—해양동물 구멍뱀고둥은 뱀고둥과 (Trochida)에 속하는 *Chlorostoma argyrostoma turbinatum*으로 평균 크기는 3×2 cm 정도의 흑

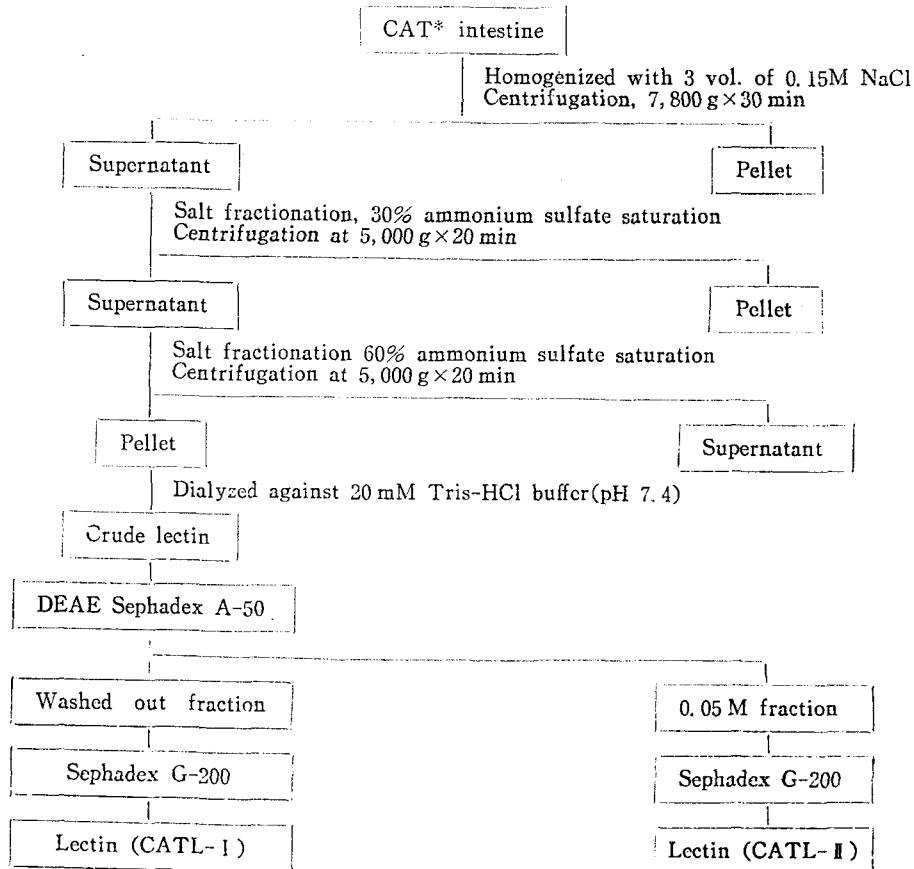
색을 띠는 夜行性 동물이며 우리나라 해안의 바위나 자갈 등에서 살고 있는 것을 동남 해안에서 채집하였다.

뱀고둥 렉틴의 分離 및 精製—Lectin의 分離 및 精製는 Scheme I과 같이 행하였으며, 모든 buffer에는 0.02% sodium azide를 함유시켜 4°C에서 實施하였다.^{5,8)}

Crude extract—살아있는 구멍뱀고둥의 內藏組織을 0.15M NaCl로 lectin 成分을 抽出하여 遠心分離한 다음 上澄液을 crude extract로 하였다.

Salt fractionation—Crude extract를 ammonium sulfate로 30~60% 飽和沈澱시켜 얻은 pellet을 透析시켜 이를 crude lectin으로 하였다.

DEAE-Sephadex A-50 column chromatography—Crude lectin을 Jeune 등⁵⁾과 So 등⁸⁾의 방법을 준용하여 anion exchanger인 DEAE-



Scheme I. The purification procedure of the CAT lectins (*CAT; *Chlorostoma argyrostoma turbinatum*)

Sephadex A-50을 통과시켜, lectin 활성을 나타낸 분획을 얻고 이를 Collodion-bag SM 13200과 Amicon Pressure Cell and Diaflo Ultrafilter PM10, Centricon 10 microconcentrator 등을 이용한 ultrafiltration이나凍結乾燥 등의 방법으로濃縮하였다.

Sephadex G-200 gel filtration—DEAE—Sephadex A-50 column에서 lectin 활성을 나타낸試料를 Sephadex G-200 column을 이용하여 더욱 정제하고 이를 前項과 동일한 방법으로 確認,濃縮하였다.

Polyacrylamide disc gel electrophoresis (PAGE)에 의한 순도 검정—각 精製段階에서 얻은 lectin 分劃의 純度を 檢定하기 위해 Davis¹³⁾의 方法에 따라 pH 8.3에서 PAGE를 實施하였다. 이때 7.5% polyacrylamide gel을 使用하였으며, 電流는 1mA/tube로 시작하여 tracking dye (0.001% bromophenol blue)가 stacking gel을 通過하는 瞬間부터 4 mA/tube로 하였다. 蛋白質 部位는 0.1% Coomassie brilliant blue R-250으로 染色하였다.

렉틴의 赤血球 및 림프구 凝集 效果—Lectin의 赤血球凝集 효과는 Chung 등¹¹⁾의 方法에 따라 實施하였다. Microtiter plate(Nunc Co.)에서 試料(50 μ l)를 2배수 稀釋한 후, 3% 赤血球溶液(50 μ l)을 加하여 凝集 활성을 알아보았다.

各種 動物血液은 3.8% sodium citrate 溶液을 가하여 洗滌하여 3% 赤血球를 調劑하여 使用하였으며 림프球는 mouse의 脾臟(spleen)으로부터 分離하여 5×10^7 cells/ml로 調劑 하여 使用하였다.¹⁴⁾

pH의 影響—구멍밥고둥 lectin을 4°C에서 pH 2~12 사이의 여러가지 buffer로 2時間 透析시킨 후, 남아있는 lectin 활성을 조사하였다. 이때 使用한 buffer는 20 mM glycine-HCl buffer(pH 2.2), 20 mM citrate buffer(pH 3.0, 4.0), 20 mM acetate buffer(pH 5.0), 20 mM phosphate buffer(pH 6.0, 7.0), 20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0, 9.0), 20 mM glycine buffer-KOH(pH 10.0), 20 mM Na_2HPO_4 -NaOH buffer(pH 11.0, 12.0) 이었다.

溫도의 影響—구멍밥고둥 lectin을 여러 範圍

의 溫度에서 30分間 incubation시킨 후, 즉시 얼음으로 식힌 다음 남아 있는 lectin 활성을 調査하였다.

糖 特異性—糖에 의한 血球凝集力 沮害效果는 통상의 方法^{5,8,14)}으로 實施하였다. 즉 여러종의 糖溶液(200 mM, 30 μ l)을 microtiter plate에서 2배수 희석한 후 各 well에 16HU의 凝集力을 나타내는 lectin 溶液(30 μ l)을 加하고 3% 赤血球溶液(30 μ l)을 加한 후, 糖에 의한 血球凝集力 沮害效果를 알아보았다.

아미노산 分析—Crude lectin 및 各 精製段階에서 나온 試料 2 mg을 질소 gas를 채워 봉한 tube에서 0.2% tryptamine을 含有한 4N-methanesulfonic acid 1ml와 함께 115°C에서 22時間 加水分解시켰다. 加水分解產物은 glass filter 濾過후, 3.5N-NaOH 1ml로 中和한 다음, 다시 蒸溜水로 洗滌하여 vacuum evaporator로 乾燥시켰다. 이를 loading buffer(0.2 M sodium citrate buffer, pH 2.2) 1 ml에 녹여 Millipore(0.2 μ m)를 通過시킨 후, cation exchange column, integrator, recorder를 갖춘 LKB 4150 ALPHA amino acid analyzer로 아미노산 造成과 含量을 分析하였다.^{5,8)}

蛋白質 含量 分析—蛋白質 含量은 bovine serum albumin을 標準品으로 하여 Lowry 등¹⁵⁾의 方法으로 測定하였다.

糖含量 分析—Lectin의 糖含量은 glucose를 標準品으로하여 phenol-sulfuric acid method¹⁶⁾로 測定하였다.

免疫化學的 試驗—렉틴 試料(1 mg/ml)를 0.15 M NaCl에 透析후, Millipore(50 μ m, Millipore Co.)를 通過시켜 不純物을 除去한 후, Frenud's adjuvant complete 또는 incomplete와 1:1로 攪섞어 현탁액으로 만들어 體重 2 kg의 健康한 집토끼의 lymph node에 Table I과 같은 過程으로 注射하여 면역시켰다.^{17,18)}

항혈청은 면역시작 27日째 귀의 靜脈으로부터 採取한 血液을 常溫에 1時間 放置한 후 3,600 rpm에서 30分間 遠心分離하여 얻었다.¹⁹⁾

免疫擴散—Ouchterlony와 Nilsson²⁰⁾의 double diffusion method로 實施하였다. 먼저 12 ml의 1% agarose 溶液으로 plate를 만든 후, template,

Table I. Immunization with washed out fraction of DEAE Sephadex A-50 column

Dates (day)	Sample dose (ml)	Freund's adjuvant(ml)		Route
		Complete	Incomplete	
1	0.5	0.5		popliteal node
2	0.5	0.5		popliteal node
3	0.5	0.5		popliteal node
		Rest, No injection		
21	0.5		0.5	popliteal node
22	0.5		0.5	popliteal node
23	0.5		0.5	popliteal node
		Rest, No injection		
27		Bleeding		

well puncher(LKB) 및 aspirator를 利用하여 well 을 만들었다. 中央의 well에는 antiserum(10~15 μ l)을 넣고, 바깥 well에는 各種 antigen(8~12 μ l)을 넣은 다음, humidity chamber(LKB) 內에서 24時間 diffusion시켰다. 그 후 未反應 antigen 및 antibody는 0.15M NaCl로 잘 씻은 다음(12~24時間), filter paper로 gel plate를 덮고 乾燥시킨 후, 0.5% Coomassie brilliant blue R-250 용액(0.5% Coomassie brilliant blue R-250 in 45% ethanol and 10% acetic acid)으로 染色시키고, 45% ethanol과 acetic acid(9:2)로 脫色시켰다.

免疫電氣泳動—먼저 前項과 같은 方法으로 gel plate를 만들고, template, puncher와 aspirator를 利用하여 well을 만든 후 길다란 홈(trough)의 위치를 scalpel로 表示하였다. Well에 各種 antigen(10~15 μ l)을 넣고 10°C에서 10 V/cm로 90分間 電氣泳動을 實施한 후, 길다란 홈의 gel을 除去하고 antibody(100 μ l)를 넣은 다음 常溫에서 前項과 같은 方法으로 diffusion, 洗滌, 乾燥, 染色, 脫色시켰다.⁵⁾

결과 및 고찰

Crude lectin의 分離—*Chlorostoma argyrostoma turbatum*의 crude extract를 ammonium sulfate로 여러 범위에서 飽和沈澱시켰을 때, 30~60% 飽和沈澱物에서 가장 높은 lectin 活性을 나타내었으므로 이를 crude lectin으로 하였다. Crude CAT lectin은 crude extract에 비해 2.3배

精製 되었으며 60% 回收되었다(Table II).

DEAE Sephadex A-50 column chromatography에 의한 精製—Crude CAT lectin을 anion exchanger인 DEAE Sephadex A-50 column으로 chromatography하여 Fig. 1과 같은 結果를 얻었다. 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)에서 stepwise NaCl gradient로 流出시켰을 때 washed out fraction(W)과 0.05M fraction에서 活性이 나타났다. 이때 washed out fraction은 26.1배 精製되었고 15.0% 回收되었으며, 0.05M fraction은 13.4배 精製되었고, 28.5% 回收되었다(Table II). 이상 두 분획을 모두 Sephadex G-200 column으로 더욱 精製하였다.

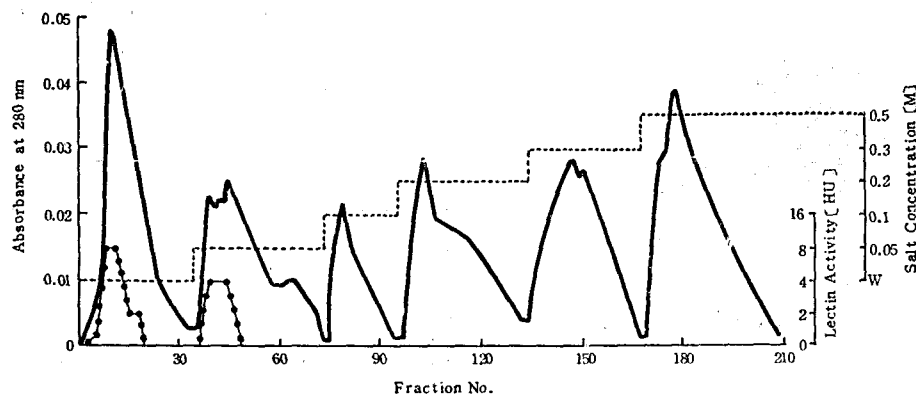
Sephadex G-200 gel filtration에 의한 精製—Anion exchange column DEAE-Sephadex A-50을 通過시켰을 때, 렉틴 活性을 나타낸 washed out fraction과 0.05M fraction을 Sephadex G-200 column으로 더욱 精製하여 Fig. 2 및 Fig. 3과 같은 結果를 얻었다. 이때 이들 分劃을 各各 CATL-I, CATL-II라 稱하였다(Scheme I). CATL-I은 39.4배 精製와 8.8% 回收되었으며, CATL-II는 15.8배 精製와 7.4% 回收되었다(Table II).

Polyacrylamide disc gel electrophoresis에 의한 純度 確認—렉틴의 여러 精製 段階에서 얻은 各 분획을 PAGE(pH 8.3)하여 Fig. 4와 같은 結果를 얻었다. Crude lectin은 多數의 band를 나타내었지만 精製 段階에 따라 band의 數가 줄어들어 들으므로써 점차 精製 되어 감을 알 수 있었

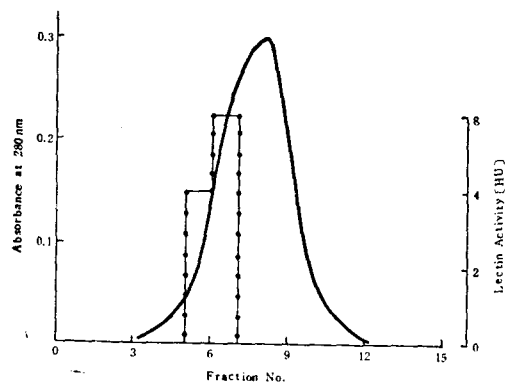
Table II. Purification of lectins from the CAT intestine

Steps	Total proteins (mg)	Total activity (units $\times 10^{-3}$)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude extract	1,033.00	256.00	247.82	1.0	100
Salt fractionation	269.40	153.60	570.16	2.3	60
DEAE-Sephadex A-50 washed out fraction	5.94	38.40	6,464.65	26.1	15.0
Sephadex G-200(CATL-I)	2.31	22.53	9,753.25	39.4	8.8
DEAE-Sephadex A-50 0.05M fraction	22.06	72.96	3,307.34	13.4	28.5
Sephadex G-200(CATL-II)	4.82	18.82	3,904.56	15.8	7.4

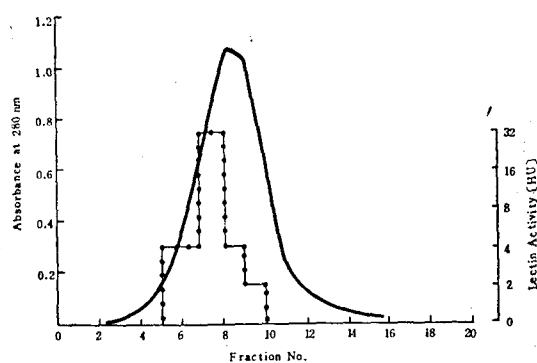
* CAT crude extract : 50 mg

**Fig. 1.** Elution profiles of *Chlorostoma argyrostoma turbinatum* crude lectin on DEAE-Sephadex A-50 column

Column, 1.6×20 cm; Eluent, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) with a stepwise salt gradient; Flow rate, 24 ml/hr; Fraction vol., 8 ml/tube; Absorbance at 280 nm, —; Lectin activity, -●-●-; Salt gradient,

**Fig. 2.** Elution profiles of washed out fraction from DEAE-Sephadex A-50 column on Sephadex G-200 column

Column, 1.0×19 cm; Eluent, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.15 M NaCl; Flow rate, 2.5 ml/hr/tube; Absorbance at 280 nm, —; Lectin activity; -●-●-.

**Fig. 3.** Elution profiles of 0.05M fraction from DEAE-Sephadex A-50 column on Sephadex G-200 column

Column, 1.0×19 cm; Eluent, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.5 M NaCl; Flow rate, 2.5 ml/hr/tube; Absorbance at 280 nm, —; Lectin activity; -●-●-.

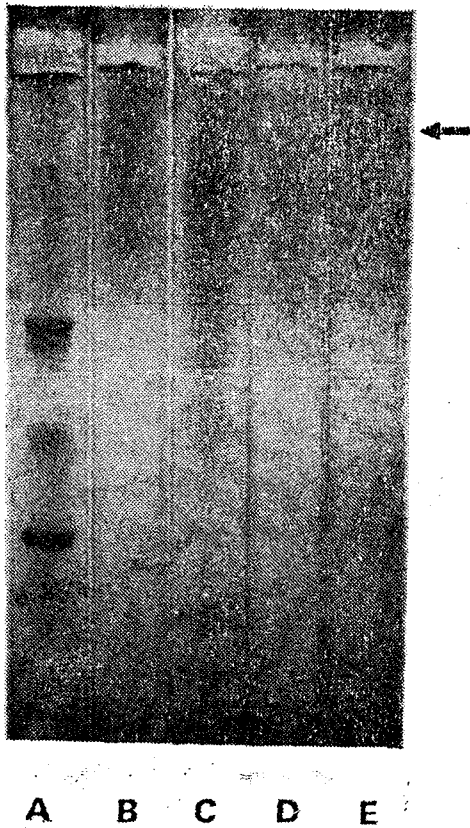


Fig. 4. Polyacrylamide disc gel electrophoresis patterns of CAT lectins

Electrophoresis was carried out in 7.5% polyacrylamide disc gel at pH 8.3. A, crude CAT lectin; B, DEAE A-50 washed out fr.; C, DEAE A-50 0.05M fr.; D, CATL-II; E, CATL-I. Proteins were stained with 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 solution.

다. DEAE-Sephadex A-50 column에서 활성을 나타낸 washed out fraction과 0.05M fraction을 Sephadex G-200 column으로 gel filtration 한 결과, CATL-I은 각각 1개의 major band와 minor band를 나타내어 상당히精製되었음을 알 수 있었다. 또한 이의 렉틴 띠(band) 부분 gel을 얇게 끊어 렉틴 활성을測定하였을 때, major band (Fig. 4의 arrowed portion)에서만 lectin 활성을 나타내었다. 한편 CATL-II의境遇, 앞의 Table II에 나타난精製도로 보나 PAGE에 의한結果에서 보거나 이의精製는 별로 의미가 없었다.

無脊椎動物의境遇, 한 個體內에서 여러 종류의 lectin이存在하는例는 흔한 바, *Megavalanus volcano*에서 MVA-I, II²¹⁾, *Saxidomus purpuratus*에서 SPA-I, II²²⁾, *Homarus americanus*에서 LAg-1, 2²³⁾, *Limulus polyphemus*에서 polyphemmin, limulin²⁴⁾, *Megavalanus rosa*에서 BRA-1, 2, 3²⁵⁾, *Neptunea intersculpta*에서 NIB, NIC 등²⁶⁾이分離,精製되어 이들의特性이 보고되어 있다. 이 연구의 경우도 해양동물체에는 2종이상 다수의 렉틴분자가 존재함을 알 수 있다. 그러나 이 과정에서 얻은 CATL-I과 CATL-II가 서로 어떤 다른 특성의 것인가를判明하기 위해서는 앞으로 더 많은 研究가 隨伴되어야 할 것으로 思料된다.

赤血球 및 림프球凝集力—CAT lectin의精製分劃인 DEAE-Sephadex A-50 washed out fraction에 대하여 사람 및 各種動物의赤血球와 mouse의 splenic lymphocyte로 렉틴 활성을 調査하여 Table III과 같은結果를 얻었다. 이 렉틴은實驗에 使用한 모든血球細胞에 대하여 활성을 나타내었으며, 사람血球의境遇 B型에서 가장 강한凝集現象을 나타내었다. Trypsin으로處理한境遇, 모든細胞에서 활성이增加하였으며, 그 중 특히 rat의血液에서 강한 활성을 나타내었다. 또한 mouse의 splenic lymphocyte에 대해

Table III. Specificity of CAT lectin in agglutination with various mammalian erythrocytes and mouse splenic lymphocytes

Species	Cell agglutinating activity(HU)*	
	Untreated	Trypsinized
Human A type	16	32
Human B type	16	64
Human O type	16	32
Human AB type	16	32
Bovine	2	8
Rabbit	32	32
Rat	128	1,024
Mouse	32	32
Pig	32	32
Mouse splenic lymphocytes	16	—

* A unit is the reciprocal of dilution end point with agglutinating cells.

서도 사람 血液과 類似한 現象을 나타내었다.

pH의 影響—pH에 따른 CAT lectin의 赤血球凝集力은 Table IV와 같았다. 赤血球凝集力은 酸性과 中性(pH 2~7)의 範圍에서는 상당히 安定한 것으로 나타났으며, 鹽基性 範圍인 pH 8 부터는 50%로 減少하여 pH 12에서는 完全히 消失되었다.

Table IV. Effect of pH on hemagglutinating activity of the CAT lectin

Buffer	pH	Hemagglutinating activity(HU)
20mM Glycine-HCl buffer	2.2	16
20mM Citrate buffer	3.0	16
20mM Citrate buffer	4.0	16
20mM Acetate buffer	5.0	16
20mM Phosphate buffer	6.0	16
20mM Phosphate buffer	7.0	16
20mM Tris-HCl buffer	8.0	8
20mM Tris-HCl buffer	9.0	8
20mM Glycine-NaOH buffer	10.0	8
20mM Na ₂ HPO ₄ -NaOH buffer	11.0	8
20mM Na ₂ HPO ₄ -NaOH buffer	12.0	0

溫도의 影響—CAT lectin의 溫度變化에 따른 活性은 80°C 까지도 活性이 消失되지 않는 것으로 보아 溫度變化에 상당히 安定한 것으로 나타났다. 이와같은 현상은 버섯 *Agaricus campestris* 에서 얻은 렉틴의 境遇에도 볼 수 있어 특수한 역할이나 환경에서 나타나는 특이한 렉틴으로 생각된다.²⁷⁾

糖 特異性—렉틴에 의해 細胞가 凝集되는 現象은 細胞表面에 있는 糖과의 結合에 의한 것이므로 糖에 의한 赤血球凝集反應의 沮害現象은 血球를 凝集시키는 物質이 lectin이라는 것을 究明하는 指標가 된다. 구멍밥고등 lectin의 糖에 의한 赤血球凝集力 沮害現象을 調査한 結果는 Table V와 같았다. 試驗에 使用한 44種의 糖중에서 5種이 沮害現象을 나타내었으며, 그 중 L-rhamnose와 methyl α -D-galactopyranoside가 대단히 낮은 濃度인 6 mM에서, N-acetylneuraminic acid, trehalose, D-glucosamine은 12 mM, 25 mM,

Table V. Inhibition of CAT lectin activity for human B erythrocytes by sugars

Sugar	Minimum concentration [mM] of sugars completely inhibiting 16 hemagglutinating doses*
N-Acetylgalactosamine	>200**
N-Acetylneuraminic acid	12
D-Galactosamine	>200
D-Glucosamine	50
D-Glucose	>200
Lactose	>200
D-mannose	>200
Melibiose	>200
Methyl α -D-galactopyranoside	6
Methyl β -D-glucopyranoside	>200
Raffinose	>200
L-rhamnose	6
Trehalose	25

* Hemagglutinating inhibition tests were performed with DEAE-Sephadex A-50 0.05M fraction.

** Showing no inhibition at more than 200 mM concentration.

50 mM에서 凝集 沮害現象을 나타내었다. 나머지 糖은 200 mM 以上の 濃度에서도 沮害現象을 나타내지 않았다.

無脊椎動物에서 分離된 多數의 lectin들은 N-acetylneuraminic acid(sialic acid)에 特異性이 있는 것으로 報告되고 있다. 즉, Indian horseshoe crab *Carcinoscorpius rotunda cauda*²⁸⁾, Slug *Limax flavus*²⁹⁾, Horseshoe crab *Limulus polyphemus*³⁰⁻³²⁾, Crab *Cancer antennarius*³³⁾ 등이다.

아미노산 分析—各 精製段階에서 얻은 分획들의 아미노산 分析 結果는 Table VI과 같았다. Crude CAT lectin과 DEAE-Sephadex A-50 washed out fraction의 境遇, 酸性 아미노산인 aspartic acid와 glutamic acid의 含量이 比較的 많았으며, DEAE-Sephadex A-50 0.05M fraction의 경우, 鹽基性 아미노산인 histidine, lysine, arginine 등의 含量이 많았고, cystine과 methionine 등 유황을 含有하는 아미노산은 그 含量이 微量이거나 確認할 수 없었다.

糖含量 分析—Phenol-sulfuric acid method로 CATL-I, CATL-II의 糖含量을 알아본 結果, 各

Table VI. Amino acid analysis of various CAT lectins^a

No.	Amino acid	Crude CAT lectin	DEAE-Sephadex A-50	
			washed out (CATL-I)	0.05M (CATL-II)
1	Asp ^c	11.59	10.99	9.03
2	Thr	7.90	8.29	6.26
3	Ser	5.74	5.93	5.50
4	Glu ^c	11.00	8.09	ND
5	Pro	6.33	11.86	9.16
6	Gly	7.89	9.82	7.80
7	Ala	7.23	5.86	3.59
8	Cystine	ND	ND	ND
9	Val	6.23	7.63	6.30
10	Met	2.80	0.59	ND
11	Ile	5.58	3.63	2.55
12	Leu	8.46	5.77	4.03
13	Tyr	4.15	4.52	ND
14	Phe	4.80	3.12	ND
15	His	0	4.84	16.52
16	Try	1.02	1.11	5.23
17	Lys	5.85	7.41	9.70
18	Arg	3.42	3.75	14.34
Total amino acid amount ^b		196.16	75.44	27.76

a. Amount % = $\frac{\text{Each amino acid amount}}{\text{Total amino acid amount}} \times 100$

b. Total amino acid amount per 40 μ l sample (2 mg protein/ml) nmol

c. Asp+Asn, Glu+Gln; ND, not determined

각 40%와 23.7%의 糖을 含有한 glycoprotein으로 밝혀 졌다. 렉틴은 蛋白質 또는 糖蛋白質로서, potato lectin의 境遇 처럼 55%의 많은 糖을 含有한 특이한 것도 있지만 대부분의 렉틴은 소량의 糖을 含有한 당단백질이다. 그러나, concanavalin A, wheat germ agglutinin 및 peanut agglutinin 등은 糖이 전혀 없는 純粹 蛋白質로 報告되어 糖蛋白質의 糖과 蛋白質과의 比率은 대단히 多樣함을 나타내고 있다.²⁻¹²⁾

免疫化學的 試驗: 免疫擴散—DEAE-Sephadex A-50 column의 washed out fraction을 토끼에 免疫시켜 얻은 항혈청으로 면역확산시험을 實施하여 Fig. 5와 같은 結果를 얻었다. 中央 well에는 antiserum을 넣고, 바깥 well에는 精製 段階

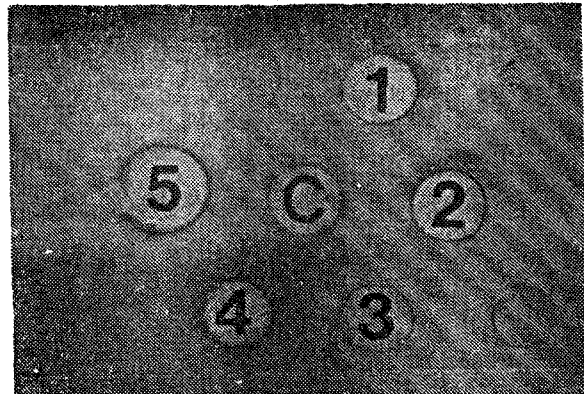


Fig. 5. Double immunodiffusion patterns of *Chlorostoma argyrostoma turbinatum* lectins
well C; antiserum
well 1; crude CAT lectin
well 2 and 4; DEAE-Sephadex A-50 column washed out and 0.05M fraction, respectively
well 3 and 5; CATL-I and CATL-II, respectively

Diffusion was carried out at room temperature for 24 hours and precipitin bands were stained with 0.5% Coomassie brilliant R-250 solution.

別 分割을 넣어 immunodiffusion 하였다. 그 結果 하나로 이어지면서 점점 가늘어 지는 precipitin band를 形成하였는데, 2와 4번 well의 DEAE 0.05M fraction의 境遇, 굵은 precipitin band가 더 形成되어, 앞에서 PAGE를 통해 그 精製도를 알아 본 結果와 마찬가지로 3번과 5번 well의 gel 여과법으로 얻은 분획보다 그 純도가 상당히 낮음을 알 수 있었다. Fig. 6은 구멍뚫고등과 조각매물고등 렉틴(*Neptunea intersculpta*; NI lectin)⁵⁾과의 免疫學的 相關성을 알아보기 위한 實驗 結果이다. A well에는 CAT lectin과 NI lectin의 antiserum을 混合(1:1)하여 넣고, 1번 well에는 구멍뚫고등의 DEAE-Sephadex A-50 column washed out fraction을, 2번 well에는 NI의 DEAE-Cellulose 52 column의 0.2M fraction을 넣어 immunodiffusion하였다. 그 結果 1번과 2번 well은 A well과 部分的으로 交叉하는 precipitin band를 形成하였으므로, 구멍뚫고등 lectin과 조각 매물고등 lectin은 異種의 蛋白質이지만 免疫化學的으로 보면 이들은 構造 내지 機能에서 部分的 類似성의 可能性이 있는 것

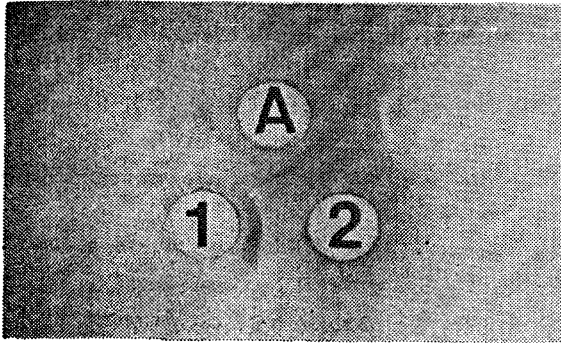


Fig. 6. Double immunodiffusion patterns of *Chlorostoma argyrostoma turbinatum* lectin and NI lectin
 well A; CAT and NI lectin antiserum(1 : 1)
 well 1; CAT DEAE A-50 washed out fraction
 well 2; NI DEAE-cellulose 52 0.2M fraction

으로 推定되어 진다. 그리고 1번과 2번 well 사이에 形成된 굵은 precipitin band는, lectin 自體가 糖과 結合하여 糖化合物을 沈澱反應에 의해 band가 形成된 것으로 思料된다.

免疫電氣泳動—精製한 렉틴 分割의 純度를 確認하기 위해 면역전기영동을 實施하여 Fig. 7과 같은 結果를 얻었다. 4개의 trough에는 100 μl의 antiserum을 넣고, 1번 well에는 Crude CAT lectin을, 2번과 4번 well에는 DEAE-Sephadex A-50 washed out fraction과 0.05M fraction을, 3번과 5번 well에는 Sephadex G-200 Column을 通過하여 얻은 CATL-I 과 CATL-II 을 넣어 electrophoresis 및 diffusion을 實施하였을 때, crude lectin은 굵은 두 서너개의 band를, DEAE washed out fraction과 CATL-I 은 各各 굵고, 가는 하나의 band를 形成하였으며, DEAE 0.05 M fraction과 CATL-II 는 多數의 band를 形成하였다. 이 結果를 PAGE의 結果와 比較해 볼 때, DEAE washed out fraction과 CATL-I 은 PAGE에서는 electrophoretic mobility가 서로 다른 두 서너개의 band로 確認되었지만 免疫化學의 으로는 同質性物質로 作用하는 것으로 생각할 수 있다.

이상의 실험을 토대로 새로운 렉틴의 개발이 가능하게 되었으며, 앞으로의 과제는 이들 해양 동물 렉틴의 면역기능 조절제로서의 역할이나,

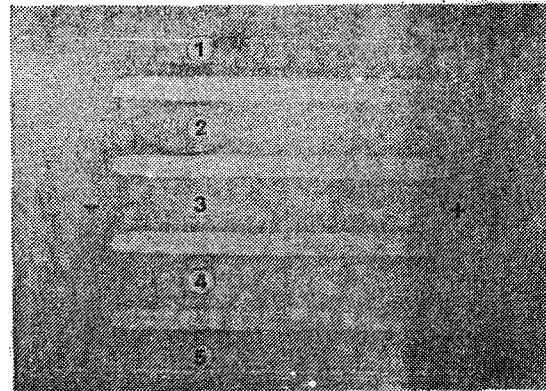


Fig. 7. Immunoelectrophoresis of CAT lectins
 well 1; crude CAT lectin
 well 2 and 4; DEAE-Sephadex A-50 column washed out and 0.05M fraction, respectively
 well 3 and 5; CATL-I and CATL-II, respectively
 Electrophoresis was carried out at 10 V/cm for 90min and diffusion was performed for 15 hours.

항암제 등 임상적 응용과 한편, 생명과학 연구용 시약으로의 개발연구가 추진될 필요성이 요청된다.

結 論

Chlorostoma argyrostoma turbinatum(CAT)으로 부터 새로운 lectin을 分離, 精製하고, 몇가지 特性을 研究하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. CAT 內臟으로 부터 0.15M 生理食鹽水 抽出, salt fractionation, anion exchange column chromatography, gel filtration을 利用하여 lectin을 分離, 精製하여 CATL-I, CATL-II 을 얻었으며, 이들은 各各 39.4배, 15.8배 精製되었다.

2. Polyacrylamide disc gel electrophoresis에서 CATL-I 은 各各 1個의 major band와 minor band를 나타내어 比較的 純粹하게 精製된 것을 알 수 있었다.

3. 이 렉틴은 各種 細胞를 非特異的으로 凝集시켰으며, 活性은 pH 2~7까지의 酸性 및 中性에서는 安定하였고 溫度變化에 대해서는 80°C까지에서도 活性이 消失되지 않는 것으로 보아 상당히 熱에 安定한 것으로 나타났다.

4. 赤血球凝集力은 methyl α -D-galactopyranoside와 L-rhamnose와는 상당히 낮은 濃度인 6mM 濃法에서 沮害되었다.

5. CAT crude lectin과 DEAE-Sephadex A-50 washed out fraction의 境遇, 酸性 아미노산의 含量이 比較的 많았으며, DEAE-Sephadex A-50 0.05M fraction의 境遇, 鹽基性 아미노산의 含量이 많았고, 유황을 含有한 아미노산의 含量은 微量이거나 種認 할 수 없었다.

6. CAT lectin은 各各 40%와 23.7%의 糖을 含有한 glycoprotein으로 밝혀 졌다.

7. Immunodiffusion과 immunoelectrophoresis의 免疫化學的 試驗結果, CATL-I은 比較的 純粹하게 精製된 것으로 판명되었으며, 조각매물고동 lectin과는 免疫化學的으로 部分的 類似性이 있는 것으로 判明되었다.

감사의 말씀—본 연구는 1993년도 영남대학교 교비연구비의 지원에 의해 이루어 졌기에 이에 감사드립니다.

(1994년 3월 16일 접수 : 4월 4일 수리)

참 고 문 헌

- Chung, S.R., Jeune-Chung, K.H. and Kim, K.A.: *Arch. Pharm. Res.* 3, 31 (1980).
- Lis, H. and Sharon, N.: in *The Antigen*, Sela, M. ed., Academic Press, N.Y., p. 529 (1977).
- Chung, S.R. and Jeune-Chung, K.H.: in *Review of Biochem.*, Biochem. Soc. Kor., 1, 371 (1986).
- Jeune, K.H., Kim, M.K. and Chung, S.R.: *Proc. Int. Sym. on New Drug Development from Natural Products*, Kor. Soc. Pharmacogn. p. 32 (1989).
- Jeune, K.H., Suh, Y.A. and Chung, S.R.: *Korean Biochem. J.* 24, 240 (1991).
- Chung, S.R., Jeune, K.H. and Suh, Y.A.: *Proceedings of the 2nd Symposium on the Biochemical Methodology for the Research and Development of the Bioactive*. The Biochemical Society of Korea, p. 349 (1991).
- Chung, S.R., So, M.S. and Jeune, K.H.: *Proceedings of the International Congress of New Drug Development*, The Pharmaceutical Society of Korea, p. 345 (1991).
- So, M.S., Jeune, K.H. and Chung, S.R.: *Yakhak Hoeji* 37, 254 (1993).
- Chung, S.R. and Jeune-Chung, K.H.: *Korean Biochem. J.* 14, 199 (1981).
- Chung, S.R., Hong, S.S. and Jeung-Chung, K.H.: *Yakhak Hoeji* 27, 221 (1983).
- Jeune, K.H., Lee, I.K., Ko, S.J. and Chung, S.R.: *J. Natural Science* 13, 297 (1993).
- Chung, S.R. and Jeune, K.H.: *Proceedings of the Symposium for the New Drug Development*, Chungbuk National University, p. 25 (1993).
- Davis, B.J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404 (1964).
- Chung, S.R., Son, K.S., So, M.S. and Jeune-Chung, K.H.: *Korean Biochem. J.* 20, 247 (1987).
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Robers, P.A. and Smith, F.: *Anal. Chem.* 28, 350 (1956).
- Shannon, L.M. and Mills, S.E.: *Eur. J. Biochem.* 63, 563 (1976).
- Howard, J. and Shannon, L.M.: *Anal. Biochem.* 79, 234 (1977).
- Chung, S.R., Kim, J.H. and Jeune, K.H.: *Korean Biochem. J.* 18, 429 (1985).
- Cuchterlony, O. and Nilsson, L.A.: in *Handbook of Experimental Immunology*, Blacwell Scientific Publications, 19 (1973).
- Kamiya, H., Muramoto, K. and Goto, R.: *Dav. Comperat. Immunol.* 11, 297 (1987).
- Tatsumi, M., Arai, Y. and Itoh, T.: *J. Biochem.* 91, 1139 (1982).
- Hall, J.L. and Rowlands, D.T.: *Biochemistry* 13, 828 (1974).
- Brandin, E.R. and Pistole, T.G.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 113, 611 (1983).
- Muramoto, K., Ogata, K. and Kamiya, H.: *Agric. Biol. Chem.* 49, 85 (1985).
- Suh, Y.A., Jeune-Chung, K.H. and Chung, S.R.: *Korean Biochem. J.* 21, 46 (1988).
- Sage, H.J. and Vazquez, J.J.: *J. Biol. Chem.* 242, 120 (1967).
- Bishayee, S. and Dorai, D.T.: *Biochem. Biophys.*

- Acta* 623, 89 (1980).
29. Miller, R.L., Collawn, J.F. and Fish, W.W.: *J. Biol. Chem.* 257, 7574 (1982).
30. Cohen, E., Rose, A.W. and Wissler, F.C.: *Life Sci.* 4, 2009 (1965).
31. Cohen, E., Rozenberg, M. and Massaro, E.J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 234, 28 (1974).
32. Pardoe, G.I., Uhlenbruck, G. and Bird, G.W. G.: *Immunology* 18, 73 (1970).
33. Ravindranath, M.H., Higa, H.H., Cooper, E.L. and Paulson, J.C.: *J. Biol. Chem.* 260, 8850 (1985).