

Soybean Hemagglutinin의 精製中 分離되는 Glycoprotein에 關한 研究

金 秀 一 · 李 春 寧

서울대학교 農科大學

(1969年 7月 31日 受理)

A study on several new glycoproteins isolated from
crude soybean hemagglutinin.

S.I. Kim and C.Y. Lee

College of Agriculture, Seoul National University

Summary

1. The purified soybean hemagglutinin isolated from Korean soybean through the calcium phosphate column chromatography was found to contain mannose (4.9%) and glucosamine (1.1%) added to the protein portion.

2. The fractions I,II,III, the impurities accompanied by hemagglutinin during the final purification were proved to be new plant glycoproteins that were seemingly paper electrophoretically homogeneous and had the same mobility.

3. The carbohydrate and nitrogen contents of I, II,III were 4.5%, 1.13%, 1.1% in mannose, 0.5%, 1.2%, 1.22% in glucosamine and 12.8%, 15.5%, 13.9% in nitrogen respectively.

緒 言

生大豆의 Antinutritional factor의 하나로 알려진 Soybean hemagglutinin은 1952年 Liener⁽¹⁵⁾ 등에 의하여 그 特性인 赤血球 凝集反應을 主眼點으로 한 소량의 不純物이 섞인 Crude soybean hemagglutinin으로서 分離되었다. 이것은 그후 Wada⁽¹⁶⁾, Lis⁽²⁾

등에 의하여 精製되어 炭水化物 組成과 carbohydrate-protein linkage에 있어서 Ovalbumin⁽²¹⁾, Ribonuclease B⁽²²⁾와 같은 Animal glycoprotein에 유사한 Plant glycoprotein임이 밝혀졌다.

한편 Crude soybean hemagglutinin의 生理的 性質로는 Hemagglutinating Activity 외에 쥐에 대한 복막내 주사로서 毒性을 나타냈고,^(15,23) 쥐, 닭에 급여 하였을때 生長阻害가 일어남이 報告되었으나⁽¹⁾, 毒性의 理由는 아직 밝혀지지 않았으며 生長阻害에 대하여도 報告가 잇갈려 있고^(24,25) 免疫學的으로는 이것을 抗原으로써 토끼에 注射하였을때 소량의 不純物에 의한 抗體生成이 훨씬 強하여 失敗하였음이 알려졌다.⁽²⁶⁾

著者들은 이들 性質의 理由를 究明하여 보기위한 첫 단계로 Crude Soybean hemagglutinin을 分離하여 Calcium phosphate column chromatography로 精製하고 여기서 分離되는 不純物인 세가지 minor fraction들도 收集하여 實驗한 結果 새로운 Plant glycoprotein들로서 糖組成, 含量이 Soybean hemagglutinin과 비슷하고 Paper electrophoresis 결과 各其 單一物質이며 Mobility가 同一하게 나타났으므로 여기 報告하는 바이다.

實驗方法

(1) 試料

風乾大豆 長端白目を Willey mill 을 使用하여 20 mesh 로 磨碎하고 Ethyl ether (b.p 34~35°C) 로 3 時間 脂肪抽出한뒤 脫脂된 것을 Crude Soybean hemagglutinin 調製用 試料로 하였다.

(2) Crude Soybean hemagglutinin 의 調製

大體로 Liener⁽¹⁾ 方法에 따랐지만 Lis⁽²⁾ 등의 方法을 참작하여 硫酸飽和度를 0.4~0.7 로 하여 Crude soybean hemagglutinin 을 다음과 같이 調製하였다.

脫脂試料 500 g 에 증류수 6l 를 加하고 진탕하여 현탁시킨후 5N-NaOH 로써 pH 6.7 로 조정한후 다시 1 時間 진탕하고 上澄液만을 모아서 6N-HCl 로써 pH 4.6 으로 조정, 4°C 에서 하룻밤 방치하였다. 상등액 1l 당 300g 의 Ammonium sulfate 를 加하여 生成된 沈澱을 除去하고 나머지 上澄液에 다시 1l 당 225g 의 Ammonium sulfate 를 加하여 녹인뒤 또다시 4°C 에서 하룻밤 放置시켰다. 生成된 沈澱을 원심분리하여 採取하고 이 沈澱을 소량의 (30~50 ml) 증류수에 녹인 다음 4°C 에서 증류수에 對하여 36 시간 透析한 후 生成된 沈澱을 除去하고 여액을 2N-HCl 로 pH 4.6 이 되게 정확히 조정 하였다. 이液 100 ml 당 52.5g 의 Ammonium sulfate 를 加하여 포화시키고 沈澱을 분리하여 0.05 M phosphate buffer (pH 6.1) 30~40 ml 에 용해시킨후 60% Ethanol 에 對하여 24 시간 透析하였다. 沈澱을 -5°C 에서 원심분리로 分離하여 20 ml 의 증류수에 녹이고 4°C 에서 증류수에 對하여 24 시간 透析에 걸여 沈澱을 除去하고 여액을 冷凍乾燥하여 白色 結晶狀의 Crude Soybean hemagglutinin 을 얻었다.

(3) Calcium phosphate column chromatography에 의한 Crude soybean hemagglutinin 의 精製⁽²⁾

Column 用 Calcium phosphate 는 Tieselius⁽³⁾ 등의 方法에 依하여 만들고 0.001 M phosphate buffer (pH 6.8) 에 貯藏하였다.

Crude soybean hemagglutinin 750 mg 을 秤取하여 0.001 M phosphate buffer (pH 6.8) 20 ml 에 용해시켜 Column (2.8×15cm) 에 가하고 同一 phosphate buffer 0.01 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M, 0.5 M 을 各各 150 ml 씩 使用하여 段階의으로 溶출시켰으며 10 ml 씩의 劃分을 時間當 40 ml 의 速度로 Automatic fraction collector (Rico) 를 使用하여 各分液을 모았다. 各分液은 Beckman spectrophotometer

DU-2 로 280 m μ 에서 吸光度를 測定하여 各各의 O.D 를 plot 하여 Peak 를 決定하였고 또한 Hemagglutinating Activity 를 調査하였다. 分離된 Fraction I, II, III, IV 는 各其 모아서 4°C 증류수에 透析하여 鹽을 除去한후 冷凍乾燥하였으나 Fraction V 는 그 量이 적어 實驗에 供하지 못하였다.

(4) 分析方法

窒素定量은 Micro-kjeldahl 方法⁽⁴⁾ 을 使用하였고 Neutral sugar 는 Mannose 를 標準溶液으로한 Dubois⁽⁵⁾ 등의 Phenol 方法으로, Glucosamine 은 Elson-Morgan 反應을 利用한 櫛田秀雄⁽⁶⁾ 등의 變法으로 各各 定量하였으며 Glucosamine 定量時 加水分解는 2N HCl 로 100°C 에서 14 時間 處理하였다.

Hemagglutinating Activity 의 測定은 主로 Liener⁽⁷⁾ 方法을 採되 다음과 같이 變改하여 行하였다. 즉, Sample 로는 Crude hemagglutinin, Fraction I, II, III, IV 의 Saline 0.1% 溶液을 使用하였으며 各各 0.5 ml 씩 取하여 Kobayashi, Meyer⁽⁸⁾ 方法에 따라 順次的으로 10 tube 까지 2 倍 희석한 후 1.5% Trypsinated rabbit red blood cell⁽⁹⁾ 액을 0.2 ml 씩 注射하고 36°C 에서 3 시간 incubation 시키 血球凝集 反應을 調査하였다.

各 Fraction 의 여지전기영동에 있어서 장치로는 Horizontal type⁽¹⁰⁾ 을, Buffer 용액은 ① phosphate buffer⁽¹¹⁾ (pH 7.6 μ =0.18) 와 ② Acetate buffer⁽¹¹⁾ (pH 4.1 μ =0.1) 를, 濾紙로는 Whatman No. 1 을 使用하였다.

冷凍乾燥한 Fraction I, II, III, IV 를 buffer 용액에 녹인液 200 λ 程度를 濾紙片(7×20 cm) 의 Anode 또는 Cathode 附近에 band spotting 하고 4°C 에서 Voltage gradient 5 volt/cm 로 12 時間 展開시킨후 꺼내어 105°C 에서 15 分間 乾燥, Amido black 10 B 液으로 30 分間 染色 시킨후 Methanol: Acetic acid(9:1) 용액으로 脫色 하였다. 各 Fraction 의 糖類同定은 Paper chromatography 로 하였으며⁽¹⁰⁾ 各 Sample 은 IN-H₂SO₄ 로 100°C 에서 6 時間 加水 分解하여 BaCO₃ 로 中和시키고 生成된 沈澱 BaSO₄ 를 여과하여 除去, 洗滌液을 합쳐 濃縮하여 同定에 供하였다. 溶媒는 主로 Butanol: Acetic acid: H₂O=5:1:4 를, 補助的으로 Butanol: Pyridine: H₂O=6:4:3, Butanol: ethanol: H₂O=10:1:2 를 使用하였고 發色試藥은 AgNO₃ Acetone 용액⁽¹²⁾ p-Anisidine HCl 용액⁽¹³⁾ 을, Amino sugar 에는 Acetyl acetone-Dimethyl amino benzaldehyde Reagent⁽¹⁴⁾ 로 發色 同定하였다.

結果 및 考察

Crude Soybean hemagglutinin 의 calcium phosphate column chromatography 에 의한 精製는 Fig 1

에 表示된 것과 같이 5 Fraction 으로 나누어졌으며 이중 0.2 M buffer 에 용출되는 Fraction IV 에만 Hemagglutinating Activity 가 集積됨을 알 수 있고 이것은 Lis⁽²⁾ 등의 報告와 同一한 結果이다.

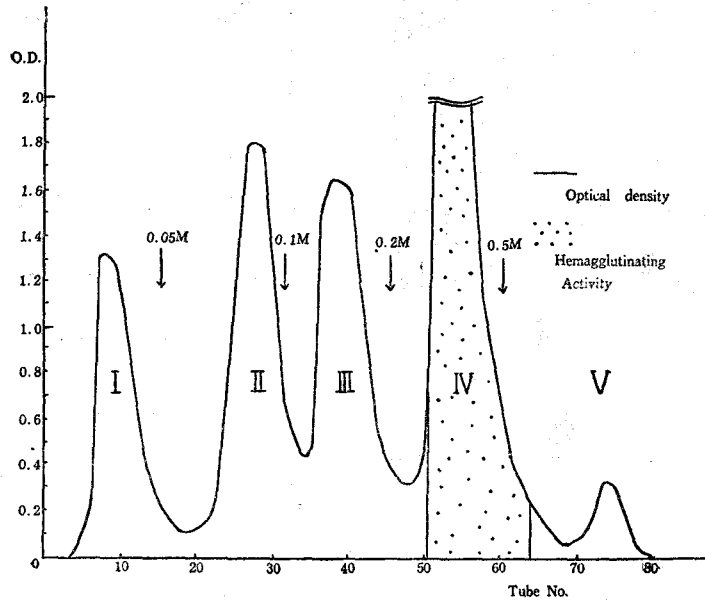


Fig. 1 Chromatography of Crude Soybean Hemagglutinin on Calcium phosphate

이 方法에 依한 soybean hemagglutinin 의 精製 度는 Table I 에서 다음과 같이 計算할 수 있다.⁽⁷⁾

$$\text{H.U./mg} = \frac{D_a \times D_b \times S}{V} \text{에서}$$

$$\text{C-S.B.H}^* = \frac{1 \times 8}{0.5} = 16 \text{ H.U./mg}$$

$$\text{P-S.B.H}^{**} = \frac{1 \times 128}{0.5} = 256 \text{ H.U./mg}$$

$$\text{C-S.B.H} : \text{P-S.B.H} = 1 : 16$$

* Crude soybean hemagglutinin

** Purified soybean hemagglutinin

즉 P-S.B.H 는 Hemagglutinating Unit 로 보아 16 배 精製되었음을 나타내며 Lis⁽²⁾ 등의 報告인 3.5 배와 다르나 이것은 Hemagglutinating Unit 의 決定方法이⁽⁶⁾ 다르기 때문이다.

各 Sample 의 濾紙電氣泳動을 行한 結果는 Fig. 2 와 같으며 여기서 acetate buffer 를 사용하기보다 phosphate buffer 를 사용함이 良好하였다.

Liener⁽¹⁶⁾ 등은 Crude soybean hemagglutinin 이 濾紙電氣泳動 上으로 單一 peak 를 이루며 소량의 不純物로 低分子량의 物質이 存在 한다고 報告하였는데 이 結果로 보면 不純物이 적어도 濾紙電氣泳

Table I C-S.B.H 와 P-S.B.H 의 Hemagglutinating activity 의 比較

Tube No.	Dilution factor	Control	C-S.B.H	P-S.B.H
1	1 : 1	•	4+	4+
2	2	•	3+	4+
3	4	•	2+	4+
4	8	•	1+	3+
5	16	•		3+
6	32	•		2+
7	64	•		2+
8	128	•		+
9	256	•		0

* Control = 0.5 ml saline + 0.2 ml red blood cells solution

動 上으로 各 單一物質이며 移動度가 1.66~1.70 $10^{-5} \text{cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 으로서 거의 同一한 移動度를 갖고 있음을 알 수 있다.

糖類 同定은 Paper chromatography 에 依하여 行한 結果 Table 2 와 같이 Mannose 와 Glucosamine 으로 나타났다. 發色試藥으로서 AgNO_3 를 사용했을 때는 특수성이 없이 不良하였으며 p-Anisidine 용

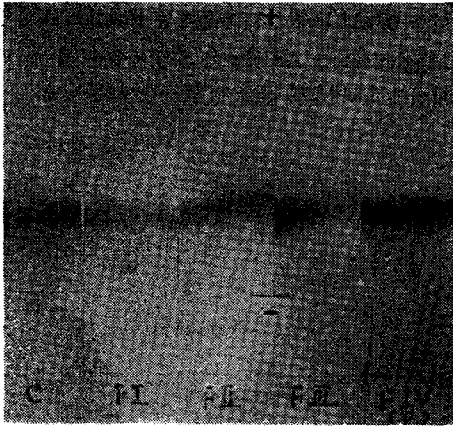


Fig. 2 Paper electrophoretograms of crude soybean hemagglutinin and each of its isolated fractions.

액을 사용하였을때 결과가確實히 나타났고 Ketopentose의存在如否는 Anthrone⁽¹⁸⁾ 시약으로 하였으며 Amino sugar에는 Acetyl acetone-Dimethyl amino benzaldehyde 시약으로 同定할 수 있었다.

Neutral sugar의 定量에서 Mannose를 標準溶液으로 한 Dubois 등의 Phenol 方法에 의한 표준곡선은 Fig. 3에 Amino sugar에선 glucosamine을 標準溶液으로 취한 橋田秀雄 등의 方法⁽⁶⁾에 의한 標準曲선은 Fig. IV에 표시된 바와 같으며 各各의 定量結

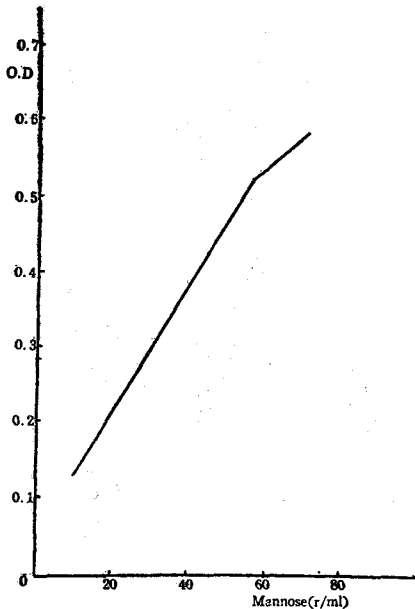


Fig. 3 Standard curve of Mannose

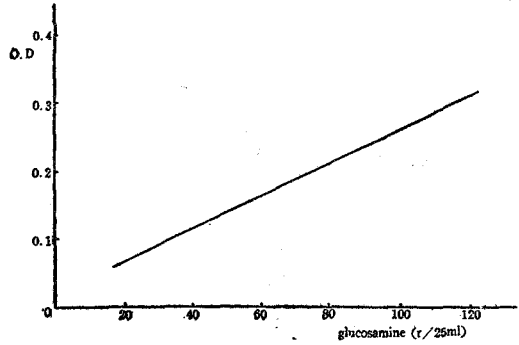


Fig. 4 Standard curve of Glucosamine

果는 Table 2에 表示한 바와 같다.

Table 2 各 Fraction의 窒素, Mannose, Glucosamin의 含量

%*	C-S.B.H	F I.	F II.	F III.	P-S.B.H
窒素	15	12.8	15.5	13.9	13.2
Mannose	5.9	4.5	1.13	1.1	4.9
Glucosamine	0.8	0.5	1.2	1.22	1.1

* moisture free

窒素의 含量에 있어서는 C-S.B.H는 Liener⁽¹⁾ 등은 16.6%로 報告하였고 Pallansh⁽¹⁷⁾ 등은 14.6%로 報告하여 서로 相異하나 여기서 15%로 나타났으며 이것은 飽和度가 0.4~0.53과 달리 0.4~0.7인 때 分이다.

P-S.B.H의 Mannose 含量은 4.9%로 Lis⁽²⁾ 등의 4.5%와 거의 一致하였다고 생각할 수 있고 Glucosamine 含量에 있어서는 1.1%로 定량되어 Lis⁽²⁾ 등의 1%와 일치 하지만 Wada⁽¹⁸⁾ 등의 10%와는 판이하게 달랐는데 分析方法이 前者에서는 Blix⁽¹⁹⁾에 의한 것이고 後者は Anastassiadis⁽²⁰⁾에 의한 것이다. 여기서는 加水分解 條件에 있어서 兩者가 發表한 最適범위에서 하고 定量은 最近에 確定된 橋田秀雄⁽⁶⁾ 등의 方法에 따랐으므로 1%의 Glucosamine이 含有되었다고 보는 것이 옳을 것이다.

이상의 結果로서 볼때 濾紙電氣泳動上으로는 同一한 Mobility를 갖고 各各單一物質이라 할 수 있는 새로운 세가지 Plant glycoprotein들이 發見되었으며 이들은 糖組成이 Mannose, Glucosamine으로 되어 있다는 것을 알 수 있었다. 그러나 이들 각기의 生理的 作用으로서 Hemagglutinating activity는 없지만 복막내 주사로서 독성을 나타내느냐 하는 것은 앞으로 더 研究하여야 할 것으로 생각되며 抗體

形成 能力은 정제된 soybean hemagglutinin 보다는
 强할 것이라고 추측이 가나 어느것이 强力한 것인
 지 이것도 장차 연구되어야 할 과제이다.

要 約

1. 韓國産 大豆에서 soybean hemagglutinin 을 分
 離 精製하였으며 이것의 糖組成이 mannose(4.9%)
 glucosamine(1.1%)인을 確認하였다.

2. Crude soybean hemagglutinin 의 Column chro-
 matography 에 의한 精製도중 分離되는 不純物인
 Fraction I,II,III 는 여지전기영동 상으로는 같은 移
 動度를 갖고 있는 새로운 Plant glycoprotein 들로서
 糖部分은 mannose 4.5%, 1.13%, 1.1%, glucos-
 amine 0.5%, 1.2%, 1.22%이고 질소함량은 12.8
 %, 15.5%, 13.9%이었다

參 考 文 獻

1. Liener, I.E., J. Nutr. **49**, 527(1953)
2. Lis, H., Sharon, N., and Katchalski, E., J. Biol. Chem. **241**, 684(1966)
3. Tieselius, A., Hjerten, S., and Levin O., Arch. Biochem. Biophys. **65**, 132(1956)
4. J. Assoc. Offic. Agr. Chemists. **43**, 689(1960)
5. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilltin, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F., Anal. Chem. **28**, 350(1956)
6. 楠田秀雄, 尾藤龍哉, 志多三郎 日農化 **35**, 33 (1961)
7. Liener, I.E., and Eldon G. Hill., J. Nutr. **49**, 609(1953)
8. Kabat, E.A., and Meyer, M., Exp. Imm. Chem. 114(1948) C.C. Thomas Publ., Spring-

field.

9. Liener, I.E., Arch. Biochem. Biophys. **54**, 223 (1955)
10. Block, R.J., and Zweig, G. A., Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis (1955) Academic press, New York
11. Lyttleton, J.W., Biochem. J. **64**, 70(1956)
12. Trevelyan, W. E., and Procter, D. P., and Harrison, J.S., Nature **166**, 444(1950)
13. Makherjee, S., and Srivastava, H.C., Nature **169**, 330(1952)
14. Partridge, S.M., Nature **164**, 443(1949)
15. Liener, I.E., and Pallansch, M.J., J. Biol. Chem. **197**, 29(1952)
16. Johanson, R., Nature **172**, 956—957(1953)
17. Michael, J., Pallansch, M.J. and Liener, I.E., Arch. Biochem. Biophys. **45**, 366(1953)
18. Wada, S., Pallansch, M.J., and Liener, I.E., J. Biol. Chem. **233**, 395(1958)
19. Blix, G., Acta Chem. Scand., **2**, 467(1945)
20. Anasstasiadis, P.A., and Common, R.H., Can. J. Chem. **31**, 1093(1953)
21. Fletcher, A.P., Marles, G.S., Marshall, R.D., and Neuverger, A., Biochem. J. **67**, 265(1963)
22. Plummer, T.H., J.R., and Hirs, C. H. W. J. Biol. Chem. **239**, 2530(1964)
23. Liener, I.E., J. Biol. Chem. **193**, 183(1951)
24. Birk, Y., and Gertler, A., J. Nutr. **75**, 375 (1961)
25. Garlich, J.D., and Neisheim, M. C., J. Nutr. **88**, 100(1966)
26. Liener, I.E., and Rose, J.E., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **83**, 539(1953)