

## L-PHA 렉틴의 分離 精製 및 免疫學의 研究

鄭時鍊 · 徐玲雅 · 蘇明淑 · 全瓊姬\*

嶺南大學校 藥學大學 · 理科學大學\*

(Received March 15, 1984)

### Purification and Immunochemical Studies on L-PHA Lectin

See Ryun Chung, Young Ah Suh, Myung Suk So and Kyung Hee Jeune-Chung\*

College of Pharmacy and College of Science\*, Yeungnam University, Gyeongsan 632, Korea

**Abstract**—L-PHA, a lectin having lymphoagglutinating activity but devoid of erythroagglutinability which is contained in Korean white kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.), was isolated and purified through several techniques such as ion exchange chromatography, hydroxyapatite column and affinity chromatography. Purified L-PHA was identified as a single band by polyacrylamide disc gel electrophoresis. The molecular weight of the L-PHA was estimated about 125,000 daltons by polyacrylamide gel electrophoresis and it was turned out having one subunit (probably dimer of the Yachnin's model) of  $Mr \sim 60,000$ . Immunochemical studies also tried and these results reconfirmed the purity of this L-PHA.

렉틴(lectin)은 콩과(Leguminosae)의 種子에서 많이 발견되고 있는데 그 중 *Phaseolus vulgaris* L.의 種子에 含有된 렉틴인 PHA는 사람의 모든 血液에 대하여 非特異적으로 凝集現象을 일으킬 뿐만 아니라 림프球를 刺戟하여 分裂시키는 등의 성질을 가지고 있어 일찍부터 렉틴研究 및 免疫學의 研究의 중요한 道具로서 利用되어 왔다.<sup>1)</sup>

1972年 Yachnin等은 PHA에 대한 여러가지 研究結果를 토대로 PHA는 生物活性이 서로 다른 2種類의 subunit로 構成되어 있는 tetramer로서 5種類的 isolectin의 混合體라는 劃期的인 假設을 設定하기에 이르렀다. 즉, 2種類的 subunit는 lymphocyte 凝集能力이 있는 L-subunit와 erythrocyte 凝集能力이 있는 E-subunit를 말하고 있는데 이들은 生物學의 活性의에도 등전점, 아미노산 배열이 서로 다른 物質이다.<sup>1~2)</sup> Yachnin의 이러한 model은 많은 變種을 가진 kidney bean의 多樣한 生物學的 性質을 說明하는데 適切하게 利用될 수 있었다. 특히, 렉틴자체의 生物學的 特性을 研究하고 免疫學的 研究에 렉틴을 利用하기 위해서는 純粹한 E-PHA와 L-PHA의 分離가 필요하게 되었다.

1960年 Nowell<sup>3)</sup>이 red kidney bean에서 lymphocyte 凝集能力만 가진 렉틴을 分離한 이후 1973年 Räsänen<sup>4)</sup>과 1974年 Harms Ringdahl等이 역시 red kidney bean에서  $L_4E_0$ 를 純粹하게 分離해 냈다.<sup>1~2)</sup> 또한 Leavitt等<sup>5)</sup>은 1977年, 역시 같은 sample에서 5種類的 isolectin을 完全 分離하고 各各의 生物學的 特性을 究明하기에 이르렀다.

以上과 같은 사실을 바탕으로 본 研究陣은 kidney bean의 한 變種(*Phaseolus vulgaris* L.는 23種에 달하는 變種을 가지고 있다.)인 韓國產 white kidney bean으로부터 렉틴의 分離 精製 및 生物物理化學的 研究를 數年間 實施하여<sup>6~8)</sup> 이미 EL-PHA의 分離 精製 方法과 E-PHA의 分離 精製 및 그 生物物理化學的 性狀과 免疫化學的인 特性의 일부<sup>8)</sup>는 발표한 바 있다. 본 研究에서

는純粹한 L-PHA의分離精製 및 그特性研究를 위해 DEAE Sephadex A-50과 hydroxyapatite column을 거쳐分離된 crude L-PHA를 affinity column인 Con A-Sepharose로 더욱精製하고 이를利用하여 몇가지生物物理化學의研究를實施하였다.

### 實驗方法

**實驗材料**—콩과(Leguminosae)에屬하는韓國產 덩굴 강남콩(White kidney bean, *Phaseolus vulgaris* L.)을 렉틴分離用材料로 하였고, 試藥中 DEAE Sephadex A-50, Con A-Sepharose, High & Low Molecular weight (HMW & LMW) calibration kit는 Pharmacia Fine Chemicals에서, hydroxyapatite, D-mannose는 Sigma에서, D-galactose, L-fucose, N-acetylneuraminic acid, N-acetyl-D-galactosamine, N-acetyl-D-glucosamine等은 Junsei, Tokyo Kasei, Shinyo Chemicals 등에서, 기타 試藥은 특급 내지 일급 試藥을 購入하여 使用하였다.

**L-PHA Lectin의分離 및精製**—1) Crude lectin 및 EL-, L-PHA의分離는 전보<sup>8)</sup>와 같이實施하였다.

2) Affinity chromatography에 의한 L-PHA lectin의精製; DEAE Sephadex A-50 column과 hydroxyapatite column을 거쳐流出된粗 L-PHA (CL-PHA)를 collogion bag SM 132,000 (Sartorius Membrane Filter Co.)으로濃縮시킨 후, starting buffer (0.15M NaCl含有 1mM phosphate buffer, pH 7.0)로透析시킨 다음, Con A-Sepharose를利用하여 전等<sup>9)</sup>의方法으로 더욱精製하였다. starting buffer로平衡시킨 column에 sample을注入시킨 후, 먼저 starting buffer로 column을 세척하여 LI fraction (LI-PHA)을 얻고, 0.15M NaCl과 0.1M mannose를含有한 5mM glycine-HCl buffer (pH 3.0)로流出시켜 LII fraction (LII-PHA)을 얻어 즉시 0.15M NaCl로透析시킨 후濃縮시켜 다음과 같은 여러가지實驗에利用하였다.

**L-PHA Lectin의 確認**—1) Agglutinating Activity Test; 앞의 여러단계에서 얻은各 fraction에 대하여 常法<sup>7,10)</sup>에 따라 2倍數 稀釋法 (Serial 2-fold dilution method)으로凝集力을檢査하였다. 赤血球는 human blood A type를, lymphocyte는 전보<sup>11)</sup>와 같은方法으로調製된 mouse spleen lymphocyte를利用하였다.

2) Polyacrylamide disc gel electrophoresis (PAGE); Davis等<sup>12)</sup>의方法에 따라 7.5% polyacrylamide gel을使用하였다.

**L-PHA Lectin의 分子量 測定**—HMW calibration kit를 표준품으로 하여 전항과 같은方法으로實施하였으며 L-PHA의 subunit의數와 分子量을測定하기 위하여 Laemmli's<sup>13)</sup> discontinuous buffer system도利用하였다. Separating gel의濃度は 12.5%로 하였으며, 표준품으로는 HMW & LMW calibration kit를利用하였다. kit와 sample은 gel에 적용하기 전에 sodium dodecyl sulfate (SDS, 2.5%)와  $\beta$ -mercaptoethanol (5%)를 넣어 100°C에서 5分間 가열하여變性시켰다.

**L-PHA Lectin의 免疫學의 研究**—Affinity chromatography에서分離한 두 fraction을各各 2마리의 토끼에 전보<sup>8)</sup>와 같은方法으로注射하여 immunization시키고 그結果生成된 antiserum을分離하여, Ouchterlony<sup>14)</sup>의 two-dimensional double diffusion方法으로 여러가지 lectin에 대하여實驗하였다.

**L-PHA Lectin과 糖類와의 關係**—1) 凝集效果에 미치는 糖類의 影響; 精製된 LII-PHA에 대하여 D-galactose, D-mannose, L-fucose, N-acetylneuraminic acid, N-acetyl-D-galactosamine, N-acetyl-D-glucosamine等の糖과 mouse spleen lymphocyte를利用하여 전보<sup>8)</sup>와 같은方法으로

實施하였다.

2) 糖類의 確認; LII-PHA에 存在하는 糖을 確認하기 위해 전보<sup>8)</sup>와 같이 paper partion chromatography와 anthrone test를 實施하였다.

### 實驗結果 및 考察

**L-PHA Lectin의 分離, 精製 및 確認**—1) Crude L-PHA Lectin의 分離 및 確認: Crude Lectin을 DEAE Sephadex A-50 column에 통과시켜 얻은 各 fraction (0.05M, 0.1M, 0.2M, 1M NaCl)中 0.2M fraction이 吸光度와 活性가 가장 強하게 나타났으므로(Fig. 1 & Table 1),<sup>8)</sup> 이를 濃縮, 透析시켜 hydroxyapatite column에 注入시켰다. 이 column에서 流出된 各 fraction中 0.05 M과 0.3M fraction은 erythrocyte와 lymphocyte 모두를 凝集시키는 EL-PHA의 混合物임에 비해, 0.1M fraction은 lymphocyte만을 凝集시키는 L-PHA로 判明되었다(Fig. 1 & Table I).<sup>7,8)</sup> 그러나 이 L-PHA를 PAGE하였을 때 3개의 band (Fig. 3)를 나타냈으므로 純粹하지 못한 것으

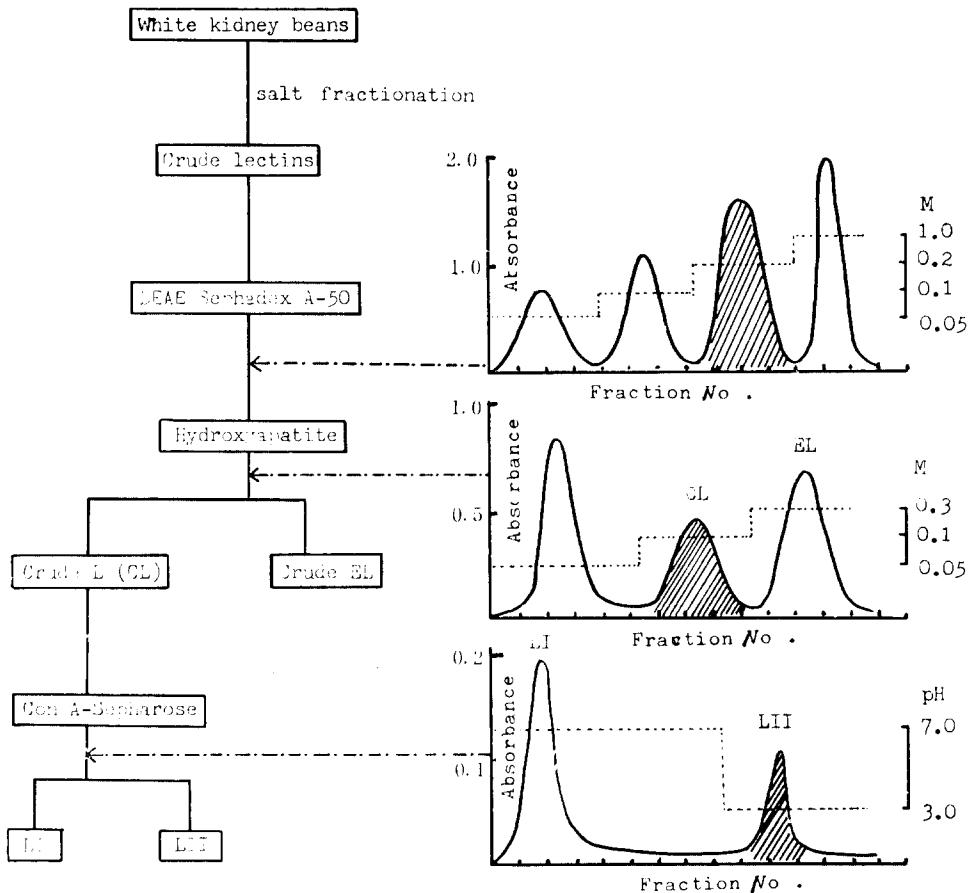


Fig. 1—Isolation and purification of L-PHA lectin.

E: Erythroagglutination L: Lymphoagglutination.

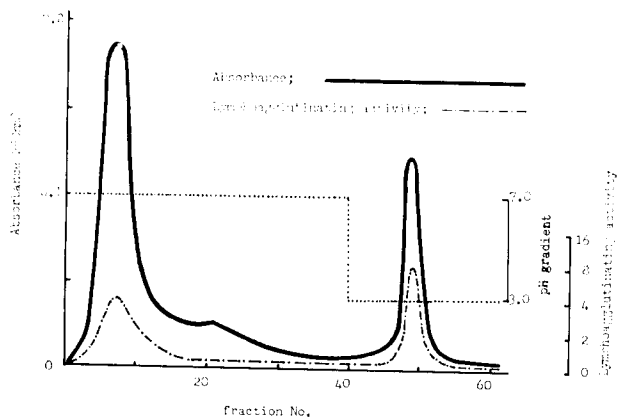
**Table I**—Stages in the purification of the lectins from W.K.B.

Various steps lectins	Agglutination*		The No. of bands in PAGE
	Erythrocytes	Lymphocytes	
Crude extract	4096		
DEAE Sephadex A-50 ion-exchange chromatography	0.05M: 64 0.10M: 512 0.20M: 512 1.00M: 128		
Hydroxyapatite chromatography	0.05M: 4 0.10M: 0 0.30M: 256	256 512 512	5 3 2
Con A-Sepharose affinity chromatography	L I: 0 L II: 0	4 8	3 1

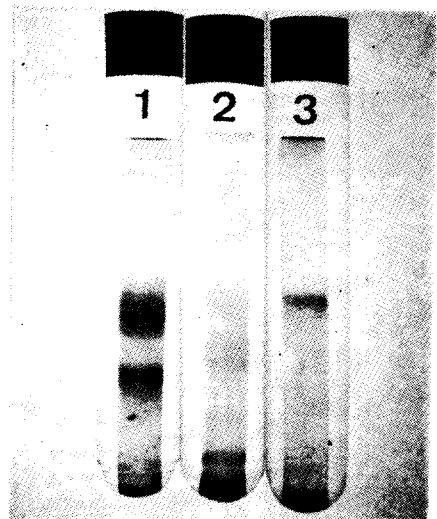
\* Numbers from 0 to 4096 indicates the activity of agglutination by serial two fold dilution method. Agglutination is defined as the reciprocal of the dilution endpoint.

로 判明되어 다음과 같이 더욱 精製하였다.

2) Affinity Chromatography에 의한 L-PHA Lectin의 精製 및 確認: Crude L-PHA lectin을 Con A-Sepharose column에 통과시켜 Fig. 2와 같은 結果를 얻었다. pH 7.0에서 流出된 LI-PHA



**Fig. 2**—Affinity chromatography on Con A-Sepharose of 100 mM fraction eluted from the hydroxyapatite. (column size:  $2.4 \times 13$ , fraction volume: 4.5ml, flow rate: 9ml/hour). Elution of the column with 0.15M NaCl, 1mM phosphate buffer (pH 7.0) (LI) and then with 0.5M NaCl, 5mM glycine-HCl buffer, 0.1M mannose (pH 3.0) (LII).



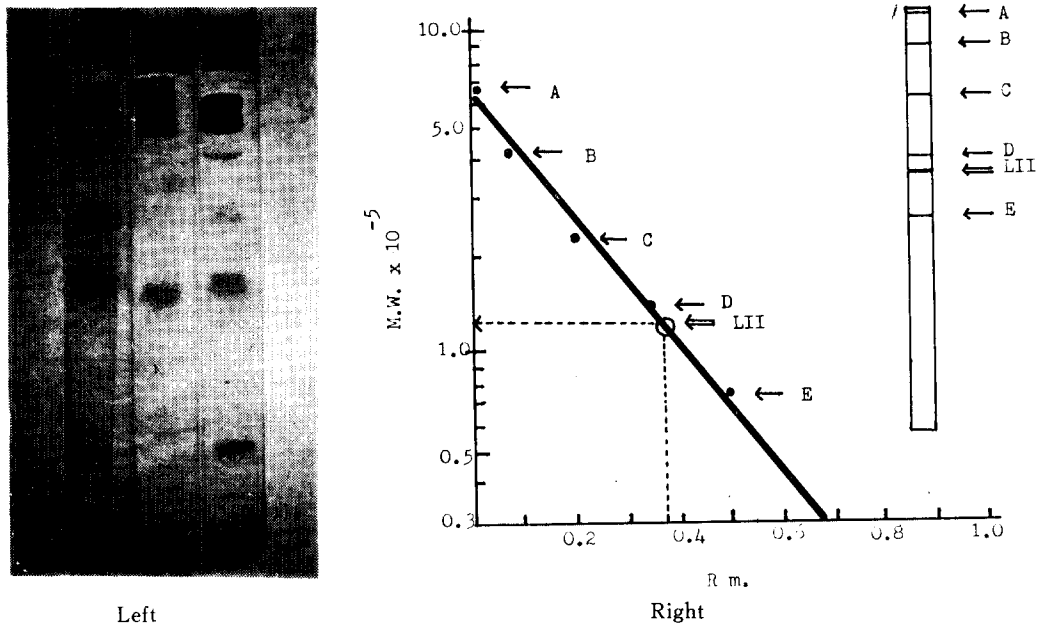
**Fig. 3**—Polyacrylamide disc gel electrophoresis of various lectins using 7.5 % separating gel.

- 1: CL(crude lectin), 0.1M fraction of hydroxyapatite column.
- 2: LI-PHA lectin.
- 3: LII-PHA lectin.

는 吸光度는 비교적 強하였으나, lymphocyte 凝集力은 낮았으며 (Table 1), PAGE에서 3개의 band (Fig. 3)를 나타내는데 비해, pH 3.0에서 流出된 LII-PHA는, dialysis시켜 pH를 조정하였을 때 吸光度는 낮으나 activity는 強하게 나타났고 (Table 1), PAGE에서 한 개의 band를 나타냈다 (Fig. 3-3). 이로서 LII-PHA는 純粹한 L-PHA, 즉 Yachnin model<sup>1,2)</sup>의 L<sub>4</sub>E<sub>0</sub>에 해당하는 物質로 判明되었다.

**L-PHA Lectin의 分子量 測定**—1) PAGE: HMW Calibration kit와 함께 electrophoresis한 結果는 Fig. 4와 같았다. 이들 結果로서 LII-PHA의 分子量은 125,000 daltons으로 推定되었는데, 이는 Harms-Ringdahl等이 red kidney bean에서 分離한 100,000 daltons<sup>2)</sup>보다는 큰 값을 나타냈으나, Räsänen等<sup>4)</sup>의 같은 材料로 分離한 L<sub>4</sub>E<sub>0</sub>의 分子量인 126,000과 Leavitt等<sup>5)</sup>의 115,000 (± 4,130) daltons과는 거의 一致하였다.

2) SDS-PAGE: LII-PHA를 HMW calibration kit와 함께 SDS-PAGE 한 結果 (Fig. 5), 한 개의 band를 나타냈으므로 한 種類의 subunit로 構成된 純粹한 物質임이 判明되었으며, 그 分子量은 60,000 daltons으로 推定되었다. 또한 LMW calibration kit와 함께 SDS-PAGE를 實施한 結



**Fig. 4**—left: Polyacrylamide disc gel electrophoresis of LII and HMW calibration kit using 7.5% separating gel.

1: HMW calibration kit.

2: LII-PHA lectin.

3: HMW calibration kit and LII-PHA lectin.

right: Determination of molecular weight of LII by PAGE with kit. Standard proteins used were HMW calibration kits of Pharmacia Fine Chemicals.

A: Thyroglobulin (669,000)

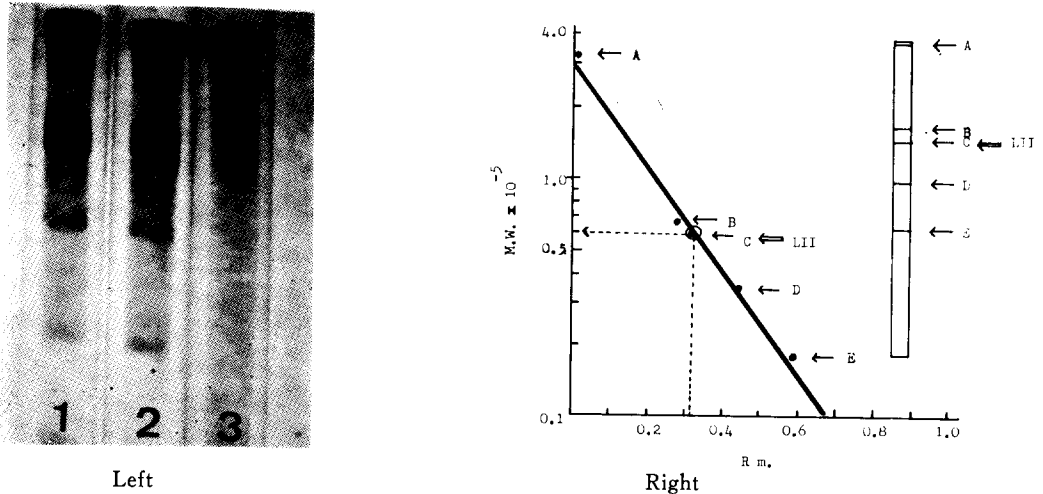
B: Ferritin (440,000)

C: Catalase (232,000)

D: Lactase dehydrogenase (140,000)

E: Albumin (67,000)

O: LII



**Fig. 5**— left: SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis of LII and HMW calibration kit using 12.5% separating gel.

- 1: HMW Calibration kit.
- 2: HMW Calibration kit and LII-PHA lectin.
- 3: LII-PHA lectin

right: Determination of molecular weight of LII by SDS-PAGE. The method of Laemmli was used. Standard proteins used were HMW calibration kits of Pharmacia Fine Chemicals.

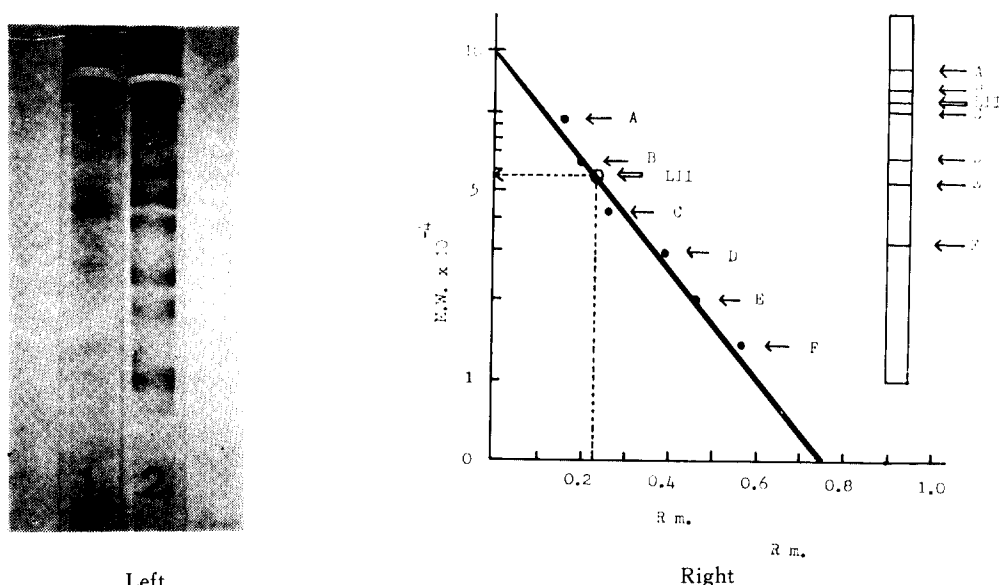
- A: Thyroglobulin (330,000)
- B: Bovine serum albumin (67,000)
- C: Catalase (60,000)
- D: Lactase dehydrogenase (36,000)
- E: Ferritin (18,500)
- O: LII

果(Fig. 6), 그 分子量은 59,500 daltons으로 推定되었는데, 이는 HMW calibration kit와 함께 SDS-PAGE한 結果와 거의 一致하였다. 이 값들은 完全한 LII-PHA의 分子量인 125,000 daltons (Fig. 4)과 비교해 볼 때, Yachnin model<sup>1-2)</sup>의 tetramer가, monomer가 아닌 dimer로 分離된 것으로 推論할 수 있었다.

**L-PHA Lectin의 免疫學的인 研究**—LI과 LII antiserum을 여러가지 단계에서 分離 精製된 lectin과 immunodiffusion한 結果는 Fig. 7과 같았다. 이때 LI antiserum은 粗 lectin, 粗 L-PHA, LI-PHA와는 各各 3~4개의 band를 나타냈고, LII-PHA와는 LI-LI precipitin band中の 하나와 만나는 한 개의 날카로운 band를 나타냈으며, LII antiserum은 LI-, LII-PHA와 한 개의 서로 만나는 band를 形成하였으나, 나머지 다른 antigen과는 band를 形成하지 않았다. 이로서 LI-PHA에는 LII-PHA가 混在하지만, LII-PHA는 免疫學的으로 純粹하여 하나의 antigen으로 作用함이 밝혀졌다. 그리고 이 純度는 전기영동의 結果와도 一致했다.

또한 antibody의 生成與否와 存續期間을 알아보려고 免疫접종하기 전의 血清(pre-LI serum)과 免疫접종후 3개월 경과하여 採取한 血清(post-LI serum)으로 LI antigen과 immunodiffusion을 實施하였다. 그 結果(Fig. 8), pre-LI serum에서는 antibody의 存在를 確認할 수 없었으나 post-LI serum에서는 antibody의 存在가 確認되었으므로, LI-PHA에 의해 生成된 antibody는 3개월까지도 體內에 存在함을 알 수 있었다.

**L-PHA Lectin과 糖類와의 關係**—1) 糖類에 의한 凝集力效果; 精製된 LII와 糖과의 關係를



Left  
**Fig. 6**— left: SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis of LII and LMW calibration kit using 12.5% separating gel.  
 1: LII-PHA Lectins.  
 2: LMW Calibration kit.  
 right: Determination of molecular weight of LII by SDS-PAGE. The method Laemmli was used. Standard proteins used were LMW calibration kits of Pharmacia Fine Chemicals.  
 A: Phosphorylase b (94,000)      B: Bovine serum albumin (67,000)  
 C: Ovalbumin (43,000)        D: Carbonic anhydrase (30,000)  
 E: Trypsin inhibitor (20,100)    F: Lactalbumin (14,400)  
 O: LII

알기 위해 여러가지 糖을 利用하여 mouse spleen lymphocyte의 凝集效果에 미치는 影響을 實驗한 結果, 그 凝集力은 實驗方法에서 言及한 濃度의 糖 6개 모두로 인해 顯著하게 增加되었다. 이는 酵素에 의한 作用이거나 糖의 濃度에 기인된 것으로 思料되어지나, 그 正確한 理由는 現在로서는 밝혀낼 수 없어 앞으로의 研究대상이 된다.

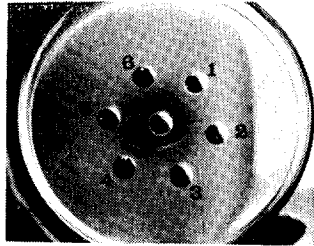
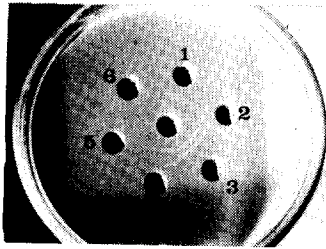
2) 糖類의 確認; LII-PHA를 P.P.C.한 結果, 糖이 確認되지 않았으나 anthrone試驗結果, 그 淸色은 dextrose 0.001% 溶液보다 더 微弱했지만 確認되었다.

## 結 論

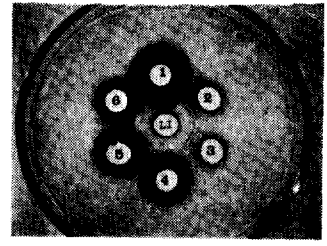
1. 韓國產 덩굴 강남콩 *Phaseolus vulgaris*로부터 ion exchange chromatography와 hydroxyapatite column 그리고 affinity chromatography 등의 分離 精製 方法을 응용하여 淸과구凝集力만 지닌 L-PHA를 얻을 수 있었다.

2. 이 L-PHA는 전기영동에 의해 純粹한 物質로 判明되었다.

3. 分子量은 125,000 daltons으로 推定되었다. 한편 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 結



〈Fig. 7〉



〈Fig. 8〉

**Fig. 7**—Two dimensional double immunodiffusion patterns of LI (left) and LII (right) antiserum against various lectins of W.K.B.

center well: L-I & L-II antiserum of rabbit.

- 1 : Crude lectin, 0.2M fraction of DEAE Sephadex A-50 column.  
 2 : Crude L, 0.1M fraction of hydroxyapatite column.  
 3 : LI-PHA lectin. 4 : LII-PHA lectin.  
 5 : Crude EL, 0.3M fraction of hydroxyapatite column.  
 6 : L isolated from crude EL.

**Fig. 8**—Two dimensional double immunodiffusion patterns of LI-PHA lectin against various antisera.

center well: LI-PHA lectin.

- 1 : preimmune serum, that is the serum of rabbit before LI-PHA lectin injection.  
 2 and 3 : antisera of LI-PHA lectin.  
 4 and 5 : antisera of LII-PHA lectin.  
 6 : postimmune serum, that is the antiserum of rabbit 3 months after immunization with LI-PHA.

果 이 L-PHA는 60,000 daltons의 한 개의 subunit로 나타났으므로 이는 Yachnin model<sup>1-2)</sup>의 monomer가 아닌 dimer로 구성된 것이라 생각된다.

4. 免疫化學的으로도 L-PHA가 純粹함이 判明되었고 實驗家兔의 경우 L-PHA antibody는 상당히 오랫동안(3개월 까지) 持續되었다.

## 文 獻

1. I.E. Liener, Phytohemagglutinins (Phytolectins), *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27, 291(1976).
2. W.G. Jaffé, Hemagglutinins (Lectins), in *Toxic constituents of plant Foodstuffs* (Academic Press, Inc.), 73(1980).
3. N. Sharon, Lectins, *Sci. Am.* 6, 108(1977).
4. V. Räsänen, T.H. Weber and R. Gräsbeck, Crystalline Kidney-Bean Leucoagglutinin, *Eur. J. Biochem.* 38, 193(1973).
5. R.D. Leavitt, R.L. Fenster and N.R. Bachur, Biological and Biochemical Properties of *Phaseolus vulgaris* Isolectins, *J. Biol. Chem.* 252(9), 2961(1977).
6. S.R. Chung, K.H. Jeune-Chung and K.A. Kim, Isolation, purification and Characterization of Phytohemagglutinating Proteins from Korean natural products. *Arch. Pharm. Res.* 3, 31(1980).
7. 정시련, 전경희, 한국산 식물자원으로부터 새로운 렉틴성분의 분리 정제. *한국생화학회지* 14, 199(1981).
8. 전경희, 채영흠, 서영아, 정시련, 콩과식물에서 분리 정제한 렉틴의 생물물리화학적 연구(E-PHA 렉틴). *한국생화학회지* 16(1), 51(1983).



9. 전경희, 정시련, PHA 렉틴이 림프구 자극분열에 미치는 영향. 기초과학연구소보(영남대학교) 1, 183 (1981).
10. M. Monsigny, K.H. Jeune-Chung and Y. Perrodon, Separation and biological properties of *Phaseolus vulgaris* isolectins. *Biochimie* 60, 1315(1978).
11. 鄭時鍊, 洪勝洙, 全瓊姬, 綠豆로부터 렉틴成分의 分離 精製. 약학회지 27, 221(1983).
12. B.J. Davis, Disc electrophoresis II, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404(1964).
13. J. King and U.K. Laemmli, Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T-4. *J. Mol. Biol.* 62, 465(1971).
14. O. Ouchterlony and L. Nilsson, Immunodiffusion and immunoelectrophoresis, in *Handbook of Experimental Immunology*, D.M. Weil ed., Blackwell Scientific Publications, pp. 19.1-19.39(1973).