

해양 천연물에서 분리한 면역기능 조정제 렉틴 MLA의 림프구 자극분열효과 및 면역화학적 특성

전경희* · 김장환 · 정시련[†]

*영남대학교 이과대학, 영남대학교 약학대학

(Received March 21, 1995)

Lymphocytes Mitogenic and Immunochemical Characteristics of the Immunomodulating Lectins, MLA, from Marine Natural Products

Kyung Hee Jeune*, Jang Hwan Kim and See Ryun Chung[†]

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

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

Abstract Isolation, purification and characterization of biophysicochemical properties of the three new lectins, MLA-I, MLA-II, MLA-III from the hemolymph of *Meretrix lusoria* have been reported previously. A series of immunochemical studies were investigated in this work. The three lectins were revealed as having partial identity each other by immunodiffusion and immunoelectrophoresis. These results suggest that MLA lectins are isolectins having similar biophysicochemical properties. Particularly, MLA-I proved to be a potent mitogen for murine splenic as well as human peripheral lymphocytes, and the optimum mitogenic dose were 62.5 and 1.95 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

Keywords □ Lectins, MLA-I, MLA-II, MLA-III, Hemolymph of *Meretrix lusoria*, Immunodiffusion, Immunoelectrophoresis, Lymphocytes mitogen, Immunostimulants, Marine natural products.

렉틴의 중요한 기능중 대표적인 몇가지를 예로 들면 우선 림프구를 자극분열 증식시키는 효과가 그 하나이다. 이의 정확한 기전은 아직 다 밝혀지지 않았지만 T cell의 경우 렉틴이 macrophage를 자극하면 이때 유리되는 interleukin-I (IL-1)의 영향으로 helper T cell이 활성화되고 이에 따라 유리되는 interleukin-2가 cytotoxic T cell을 자극하여 증식되며 B-cell의 경우 mitogen으로 렉틴이 직접 작용하여 증식되거나 혹은 helper T cell에 의해 유리되는 γ -interferon, B cell growth factor(BCGF-1 2 = IL-4, 5 = BSF-1)와 B cell differentiation factor(BCDF = BSF-2) 등의 영향으로 증식되어지는 것으로 이해되고 있다.¹⁻⁴⁾

또한 렉틴은 몇종의 암에 대해 항암효과가 있다는 사

실이다. Tumor cell antigen으로 조제한 monoclonal antibody에 렉틴(ricin, abrin 등)을 binding시켜 만든 immunotoxin을 tumor cell에 작용시켰을때 tumor cell의 단백질 합성이 저해되어 종양세포의 성장이 저해되는 직접적인 작용⁵⁻⁷⁾과 macrophage나 polymorphonuclear leukocyte 같은 effector cell이 렉틴 존재하에서 (lectin dependent cell cytotoxicity) target cell (tumor cell)을 파괴시켜 항암 효과를 나타내는 기전⁸⁻¹⁰⁾, human T cell 혹은 macrophage에 lectin을 적용하여 이들 cell로 부터 유리되는 cytokines (γ -interferon, interleukin-2, tumor necrosis factor)에 의해 항암 효과를 나타내는 기전 등으로 보고되고 있다.¹¹⁻¹⁵⁾

그 외에 인슈린 유사효과 (insulinomimetic activity)를 들수 있다. 렉틴이 adipocytes의 insulin

[†] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

receptor에 결합하여 당 수송과 대사를 촉진, lipogenesis와 pyruvate dehydrogenase 활성 촉진, glycogen 합성과 Mg-ATPase의 활성촉진, lipolysis 억제와 adenylylase의 활성저해 등을 일으키는 것등이 보고되고 있다.¹⁶⁻²²⁾

이 연구에서는 백합조개 (*Meretrix lusoria*)로 부터 전보와 같은 방법으로 분리 정제하고^{23,24)} 그 생물물리 화학적 특성을 밝힌바²⁵⁾ 있는 3종의 렉틴, MLA-I, MLA-II, MLA-III를 대상으로 이들의 면역기능 조정제로서의 응용방안을 구명하여 신물질 개발에 기여하도록 시도하였다.

실험방법

렉틴과 시약 - MLA-I, MAL-II, MLA-III 3종의 렉틴은 살아있는 백합조개 (*Meretrix lusoria*)로 부터 전보^{23, 24)}와 같은 방법으로 분리 정제하였다. [³H] thymidine (specific activity 2.0 Ci/mmol)은 Amersham International Plc. (Buckinghamshire, England) 에서, Freund's adjuvant complete와 incomplete는 Difco Lab. (Detroit, MI., USA)에서, RPMI 1640, fetal bovine serum, trypan blue, penicillin, streptomycin은 Gibco Lab. (Grand Island, N.Y., USA)에서, Con. A (from *Canavalia ensiformis*), PHA (from *Phaseolus vulgaris*), Histopaque-1077, HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid), POPOP (1,4-bis [2-(5-phenyloxazolyl)] benzene), 2,5-diphenyloxazole, ammonium chloride, 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA)에서, Tris-barbiturates, Ampholine PAG plate (pH 3.5~9.5), Agarose-M은 LKB (Sweden), methanesulfonic acid, 3-(2-aminoethyl) indole (tryptamine)은 Fluka, 기타 일반 시약은 시중에서 구입한 특급품을 사용하였다.

기기 - 실험에 사용한 주요 기기는 High speed centrifuge: Hitachi (Hitachi koki Co. Ltd.), Japan; Spectrophotometer: Perkin Elmer, USA & Hitachi Model 200-20, Japan; Freeze-Dryer: DURADRY (FTS System, Inc.); Electrophoresis apparatus: LKB 2001: Vertical Electrophoresis system (Sweden); Electrofocusing apparatus: LKB 2117-004 Multiphor II, Sweden; Scintillation

spectrometer: MINAXI Tri-Carb 4000, Packard, USA; Amino acid analyzer: LKB 4150 ALPHA, Sweden; CO₂-air incubator: Shel-Lab., USA 등 이었다.

면역화학적 실험 - (1) Immunization 및 Antiserum의 분리: Immunization은 Shannon과 Mills²⁶⁾ 및 Howard와 Shannon²⁷⁾의 방법으로 실시하였다. MLA I, II, III 각각 500 µg/ml를 0.15 M NaCl에 투석시키고 Millipore(0.45 µm Millipore Co.)를 통과시켜 불순물을 제거한 후, Freund's adjuvant complete 또는 incomplete와 1:1로 섞어 현탁액으로 만든다음 체중 2 kg의 건강한 집토끼의 림프선 가까운 곳에 Table I과 같은 방법으로 근육주사하였다. Antiserum은 immunization 27일째 귀정맥으로부터 채취한 혈액을 상온에서 1시간 방치한 후 3,000 rpm 에서 30분간 원심분리하여 얻었다. 모든 immunoassay는 1% agarose gel 에서 실시하였다. Gel 용액은 1 g의 agarose-M(LKB)을 Tris-barbiturate buffer (24.3 mM diethylbarbituric acid, 73.2 mM Tris, 0.5 mM Ca-lactate, 2 mM sodium azide, pH8.6) 100 ml에 넣어 water bath에서 녹여 준비하였으며, glass plate(84 mm×94 mm LKB)는 0.1 M HCl, soap, 70% alcohol, 증류수 순으로 세척하여 사용하였다.

(2) Immunodiffusion: Ouchterlony와 Nilsson²⁸⁾의 double diffusion method로 실시하였다. 먼저 12 ml의 1% agarose 용액으로 agarose plate를 만든후 template, well puncher(LKB) 및 aspirator를 이용하여 well(d=3.5 mm)을 만들었다. Well에는 antiserum(10~15 µl)과 각종 antigen(3~5 µl)을 넣은 다음, humidity chamber내에서 상온으로 12시간 diffusion시켰다. 그 다음 미반응 antigen, antibody를 0.1 M NaCl로 잘 씻은 후 여지로 gel plate를 덮고 건조시켰다. Gel plate 염색은 0.5% Coomassie brilliant blue R-250(in 45% ethanol and 10% acetic acid)으로 하였으며 탈색은 45% ethanol과 10% acetic acid(9:2) 용액으로 실시하였다.

(3) Immunoelectrophoresis: LKB manual²⁹⁾의 방법으로 실시하였다. 전향과 같은 방법으로 gel plate를 만들고, template-puncher와 aspirator를 이용하여 well을 만들고, 길다란 홈(trough)의 위치를 scalpel로 표시하였다. Well에 각종 antigen(10~15 µl)을

냉고 10°C에서 10 v/cm로 1시간동안 electrophoresis를 실시한 후 scalpel로 표시한 위치의 gel을 제거하고 흡에 antibody(50 μ l)를 넣고 상온에서 12시간동안 전향과 같은 방법으로 확산, 세척, 건조, 염색, 탈색시켰다.

(4) Crossed Immunoelectrophoresis: LKB manual²⁹⁾의 방법으로 two dimensional immunoelectrophoresis를 실시하였다. 먼저 gel plate에 well을 만들고 antigen (20 ml)을 넣은 다음 10 v/cm 1.5 시간동안 10°C에서 전기영동 시켰다. 1차 electrophoresis한 gel을 90° 회전시켜 antigen을 포함한 gel plate(8 ml의 5% agarose gel과 0.9 ml의 antiserum을 섞어 즉시 gel plate를 만든것)내로 2차 electrophoresis하였다. 2차 전기영동후의 조작은 전향과 동일한 방법으로 실시하였다.

림프구 분리 및 자극분열 효과 - (1) 림프구 분리: 실험동물(murine) 림프구는 Wvsocki and Sato³⁰⁾와 Mishell³¹⁾등의 방법에 따라 ICR mouse의 비장(spleen)을 분리하여 파쇄하고 탈지면으로 여과시킨 후 1,500 g에서 5분간 원심분리하였다. 이 침전물에 Tris-buffered NH₄Cl sol'n.(0.168 M NH₄Cl: 0.17 M Tris-HCl, pH 7.65=9:1)을 가하여 적혈구를 반복하여 파괴시킨 후, 원심분리하고 RPMI(Roswell Park Memorial Institute)1640 medium을 가해 petri-dish(Bacterial grade)에 넣어 37°C에서 1시간 동안 incubation 시켜 macrophage 및 adherence cell을 제거한 것을 이용하였다.

사람 림프구는 Callard³²⁾, Ly and Mishell³³⁾등의 방법으로 분리하였다. 주사기로 혈액을 채취하여 즉시 항응고제(heparin 10 IU/ml)를 RPMI 1640 medium과 1:1로 희석하고, 희석한 혈액 8 ml를 3 ml의 Histopaque-1077 medium에 조심스럽게 loading 시키고 400 g에서 30분 동안 원심분리하였다. 이 때 mononuclear cell을 조심스럽게 취하여 10 ml RPMI 1640 medium을 가하여 250 g에서 10분간 원심분리하여 반복 washing하고 5% FBS(fetal bovine serum)를 함유한 RPMI 1640으로 다시 한번 원심분리한 후, Sephadex G-10 column을 통과시켜 macrophage나 adherence cell을 제거하여 얻었다.

(2) 실험동물(murine) 림프구 자극분열 효과: 렉틴의 mitogenic activity는 Peacock and Tomer³⁴⁾의 방법을 응용하여 측정하였다. 실험에 사용한 렉틴 MLA-

I, Con A, PHA를 500 μ g/ml로, RPMI 1640에 녹여 Millipore(0.22 μ m)를 통과시켜 불순물을 제거한 후 사용하였다. 전향과 같이 분리한 림프구는 0.4% trypan blue로 viability test를 한 후, 2×10^6 cells/ml로 조제하였고, medium은 25 mM HEPES, 100 μ g/ml streptomycin과 100 units/ml penicillin을 함유한 RPMI 1640(pH 8.0)으로 준비하였다. 림프구 배양은 flat bottom microtiter plate(Nunc Co.)에서 triplicate로 실시하였다. 즉, lectin 용액 100 μ l를 넣고 동량의 medium으로 2배수 희석한 후, 동량의 림프구(2×10^6 cells/ml) 및 20% fetal bovine serum을 각 well에 넣었다. 이를 CO₂-incubator(5% CO₂/95% air)에서 37°C로 48시간 배양시킨 후, 1 μ Ci의 [³H]thymidine을 각 well에 넣고 18시간 더 배양시켰다. 배양이 끝난 림프구는 polypropylene filter funnel(d=225 mm, Gelman Inc., Mich. USA)로 glass microfibre filter(GF/C, Whatman Co.)상에서 여과 수집하고 cold PBS(phosphate buffered saline), 5% TCA(trichloroacetic acid) 10 ml absolute methyl alcohol 10 ml로 세척, 건조시켰다. 건조된 filter paper는 18ml의 scintillation cocktail solution에 넣어 scintillation spectrometer로 radioisotope의 양을 측정하였다.

(3) 사람 림프구 자극분열 효과: 실험에 사용한 렉틴은 전향과 같은 농도로 조제, 처리하여 사용하였다. 앞에서와 같은 방법으로 분리한 림프구는 0.4% trypan blue로 viability test를 한 후, 1.2×10^6 cells/ml로 조제하여 사용하였으며, 그 이후 방법은 전향과 같은 방법으로 수행하였다.

결 과

면역화학적 실험 - MLA 렉틴 500 μ g/ml를 각각 집토끼의 lymph node에 근육주사하여 얻은 antibody를 이용하여 MLA-I, II, III의 구조 내지 기능상의 상관성을 알아보기 위해 몇가지 면역화학적 방법을 시행하였다.

Immunodiffusion - MLA-I과 MLA-II 렉틴의 상관성을 알아보기 위해 실험한 결과는 Fig. 1. A와 같았다. 1번 well에 MLA-I lectin 용액을, 2번 well에 MLA-II lectin 용액을 넣고, Ab번 well에는 MLA-I, II, antiserum을 동량 넣고 diffusion시켰다. 이 때 MLA-I

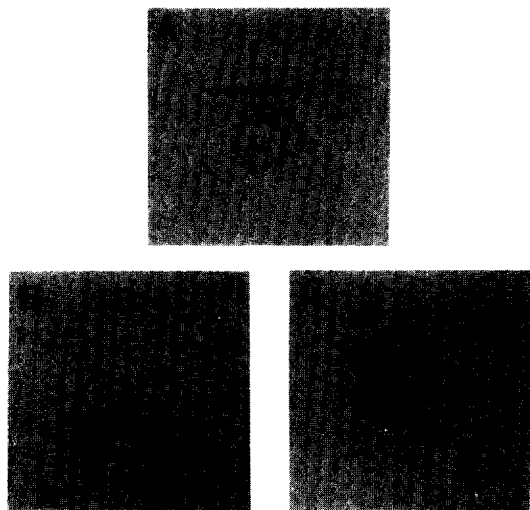


Fig. 1—Double immunodiffusion of MLA lectins. A: Ab, MLA-I antisera + MLA II antisera (1:1) ①. MLA-I: ②. MLA-II, B: Ab MLA-II antisera + MLA-III antisera(1:1) ②. MLA-II: ③. MLA-III, C: Ab, MLA-I antisera + MLA-III antisera (1:1) ①. MLA-I: ③. MLA-III.

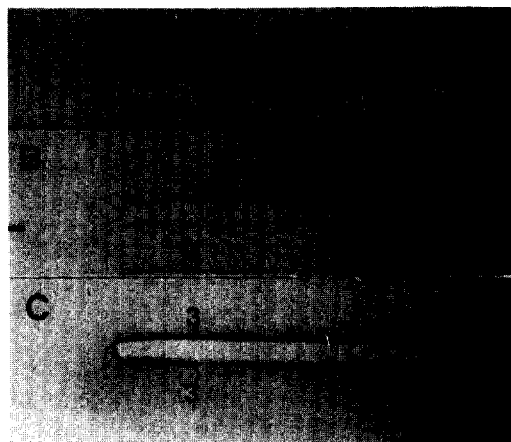


Fig. 2—Immunoelectrophoresis of MLA lectins. A: MLA-I antisera: B: -MLA-II antisera: C: MLA-III antisera: ①. MLA-I: ②. MLA-II: ③. MLA-III.

과 MLA-II에 의해 형성된 침전 band가 하나의 돌출부만을 형성하는 것으로 보아 MLA-I과 MLA-II는 부분적으로 유사한 것으로 판명되었다.

Fig. 1, B는 MLA-II와 MLA-III lectin의 특성을 비교한 것이다. 전술한 것과 같은 방법으로 MLA-II와 MLA-III 렉틴 용액을 놓고 비교하였을 때 MLA-II와

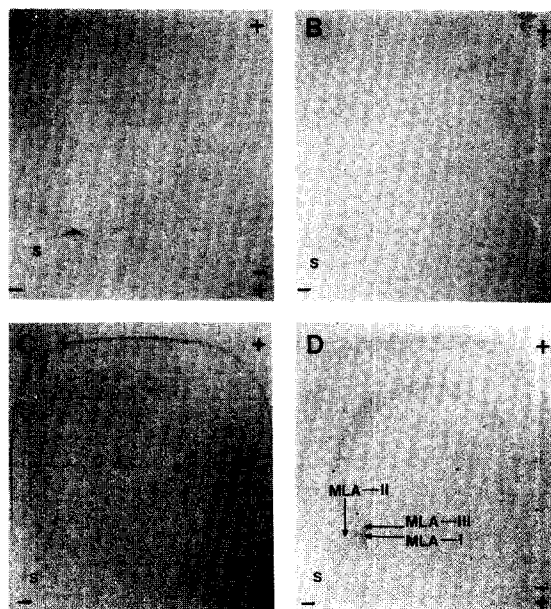


Fig. 3—Cross immunoelectrophoresis of MLA lectins. A: MLA-I: B: MLA-II: C: MLA-III: D: MLA-I, MLA-II, MLA-III (1:1:1).

MLA-III에 의해 형성된 침전 band가 하나의 돌출부만이 형성된 것으로 보아 MLA-II와 MLA-III도 서로 부분적으로 유사한 물질인 것으로 판명되었다. 한편 Fig. 1, C는 MLA-I과 MLA-III를 같은 방법으로 실시한 결과이다. MLA-I과 MLA-III도 또한 부분적으로 유사함이 판명되었다. 이로써 MLA-I, II, III는 서로 비슷한 구조내지 기능을 가진 것으로 추정된다.

Immunoelectrophoresis - Immunodiffusion에서 MLA-I, II, III 3종의 렉틴이 서로 부분적으로 유사한 구조를 가진 것임이 추정되었으므로, 이들의 순도 확인은 물론 mobility로 3종 렉틴의 상관관계를 알아보고자 immunoelectrophoresis를 실시하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 이 결과 3종의 mobility는 서로 비슷하였으며 차이점을 찾기는 어려웠다.

Cross immunoelectrophoresis - Immunoelectrophoresis로 3종 MLA 렉틴의 비교, 구분을 명확히 하기 어려워서 cross immunoelectrophoresis를 수행한 결과는 Fig. 3과 같았다. Fig. 3, A는 ⑤ well에 MLA-I lectin을 넣고() → (+)로 electrophoresis를 실시하여 1차 전개시킨 후, 그 gel을 옮긴 다음 MLA-I antiserum을 함유한 gel로 plate를 만든 2차 전개를 시켜 얻은 결과이다. Fig. 3, B, C는 MLA-II, MLA-III를

Table I—Immunization with MLA lectins

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

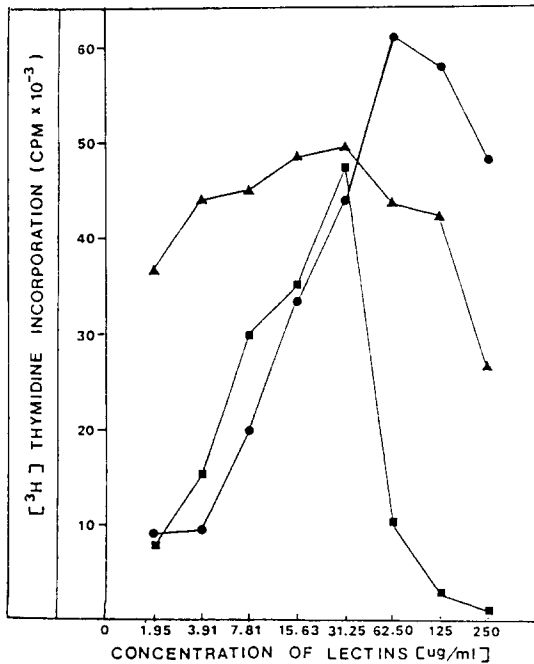


Fig. 4—Effects MLA-I lectin on mitogenic responses of murine splenic lymphocytes. MLA-I. (●—●): Con A. (▲—▲): PHA. (■—■)

각각 전술한 방법으로 cross immunoelectrophoresis한 결과이다. 그 결과 MLA-I, II, III는 mobility와 antibody 친화력으로 구별되었으므로, 서로 다른 isolectin임을 추정할 수 있었다. 또한 Fig. 3, D는 ㉔ well에 MLA-I, II, III 3종의 렉틴을 동량씩 혼합해서 넣고 1차 전개시킨 후, 그 gel을 옮긴 다음 MLA-I, II, III의 antiserum을 동량씩 혼합한 gel로 plate를 만든 후 2차 전개시켜 얻은 결과이다. 그 결과 MLA-I, II, III는 그들의 mobility와 antibody 친화력은 유사하지만 서로 다른 렉틴임이 다시 한번 확인되었다.

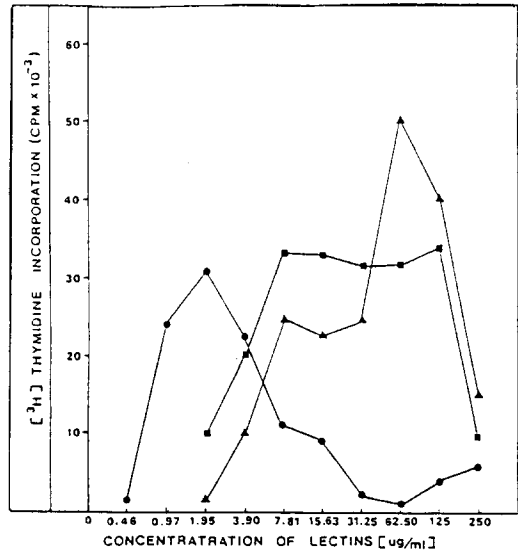


Fig. 5—Effects of MLA-I lectin on mitogenic responses of human peripheral lymphocytes. MLA-I. (●—●): Con A. (▲—▲): PHA. (■—■)

림프구 자극 분열 효과—렉틴의 몇가지 생리 활성중 가장 흥미 있는 림프구 자극 분열효과(mitogenic activity)를 알아보기 위해 MLA-I을 대상으로 다른 렉틴 즉 Con A, PHA와 함께 비교 조사하였다.

실험동물(murine)림프구 자극 분열효과—실험동물 림프구에 대한 MLA-I의 mitogenic activity는 Fig. 4와 같았다. MLA-I 렉틴은 63.5 ug/ml의 농도에서 최대의 mitogenic activity가 나타났다. 이는 비교 시료로 사용한 대표적인 mitogenic lectin인 Con A와 PHA의 최대 mitogenic activity가 나타난 농도인 31.25 ug/ml보다 높은 농도에서 최대의 효과가 확인되었지만, 증식정도는 다소 더 높은 것으로 밝혀졌다.

사람 림프구 자극 분열효과—사람 말초 림프구에 대

한 MLA-I의 mitogenic activity는 Fig. 5와 같았다. 비교 시료로 사용한 Con A가 7.81~62.5 µg/ml 농도에서 PHA가 7.81~125 µg/ml에서 최대활성을 나타내는데 비하여 MLA-I은 훨씬 낮은 19.5 µg/ml에서 mitogenic activity를 나타내었다. 그러나 증식정도는 실험동물 림프구의 결과와는 반대로 MLA-I이 더 낮은 것으로 밝혀졌다.

고 찰

렉틴의 몇 가지 생리활성중 가장 흥미있는 림프구 자극분열 효과를 알아보기 위해 MLA-I을 시료로 실험동물과 사람 림프구를 대상으로 연구한 결과 실험동물에서는 MLA-I의 mitogenic activity를 나타내는 최적 농도는 62.5 µg/ml였으며, mitogenic lectin으로 가장 널리 알려진 Con A와 PHA는 32.25 µg/ml에서 최대의 mitogenic activity가 나타났다. 이런 결과를 볼 때 MLA-I은 Con A와 PHA 보다는 높은 농도에서 mitogenic activity가 일어났지만, 림프구의 증식 정도를 보면 약간 더 효과가 큰 mitogen임을 알 수 있었다. 이 실험에서 비교 시료로 사용된 Con A와 PHA의 mitogen으로서의 효과를 나타내는 최적 농도는 지금까지 보고된 것들과 일치하였다^{36,37)}.

한편 사람 림프구에 대한 MLA-I의 mitogenic activity는 1.95 µg/ml에서 최대효과를 나타내었으며 비교 시료로 사용한 Con A는 62.50 µg/ml에서, PHA는 7.81~125 µg/ml에서 최대의 mitogenic activity가 나타났다.

이 결과는 MLA-I 렉틴에 의한 실험동물 림프구에 대한 효과와는 차이가 있는 현상이었으며, MLA-I은 실험한 동물 림프구보다 사람 림프구에 대해 더 낮은 농도에서 mitogenic activity를 나타내었다.

앞으로 더 나아가 T-cell과 B-cell을 분리하여 mitogenic activity를 조사, 연구하고 더 자세한 물리화학적 성성과 cytokines 분비양상, 항암효과, 인슈린 유사 효과 등에 관한 더 많은 실험의 수행이 요망된다.

감사의 말씀

본 연구는 1993-94년도 한국과학재단 핵심전문 연구과제(931-0700-016-2) 연구비 지원에 의해 수행된 것

중의 하나이기에 이에 감사드리는 바입니다.

문 헌

- 1) Robb, R.J. Interleukin 2: The molecule and its function. *Immunol. Today* **5**, 203-k209 (1984).
- 2) Liener, I.E., Sharon, N. and Goldstein, I.J. Properties, function and application in biology and medicine. in biology and medicine. in *The Lectins*. Academic press, New York, pp. 1-600 (1986).
- 3) Chung, S.R., Jeune, K.H. and Suh, Y.A. lectins from the Ocean. Proceedings of the 2nd Symposium on the Biochemical Society of Korea, 349-371 (1991).
- 4) Chung, S.R., So, M.S. and Jeune, k.H. Bioactive marine natural substance, lectins. *Proceedings of the International Congress of New Drug Development*. The Pharmaceutical Society of Korea, 345-256, August (1991).
- 5) Blakey, D.C., Wawrzynszak, E.J., Wallace P. M. and Trope, P.E Antibody toxin conjugates: A perspective. in *Monoclonal antibody Therapy*. Progress in allergy, Waldmann, H. (eds). Basel publications. **45**, 50-90 (1988).
- 6) Vitetta, E.S., Krolick, K.A., Miyama-Inaba, M., Cushley, W. and Uhr, J.W. Immunotoxin: A new approach to cancer therapy. *Science* **219**, 644-649 (1993).
- 7) Olsnes, S., Refsnes, K. and Pihl, A. Mechanism of action of the toxic lectin abrin and ricin. *Nature* **249**, 627-631 (1974).
- 8) Yamazaki, M., Ikenamin, M., Komano, H., Tsunawaki, S.Kamiya, H., Natori, S. and Mizuno, D. Polymorphonuclear leukocytemediated cytotoxicity induced by animal lectin. *Gann*. **74**, 576-583 (1983).
- 9) Nakijima, H., Kamano, h., Esumi-Kurusu, M. Abe, S., Yamazaki, M., Natori, S. and Mizuno, D. Induction of macrophagemediated tumourlysis by an animal lectin. *Sacophaga peregrina agglutinin*. *Gan*. **73**, 627-632 (1982).
- 10) Ohkuma, Y., Komano, H. and Natori, S. Comparison of bindion protein's on the surface of

- murine tumor cells for two lectins active in the lectin-dependent macrophage-mediated cytotoxic reaction. *Cancer Res.* **45**, 4397-4400 (1985).
- 11) Aggarwal, B.B., Traquina, P.R. and Eessalu, T.E. Modulation of receptor and cytotoxic response of tumor necrosis factor-L by various lectins. *J. Biol. Chem.* **261**, 13652-13656 (1986).
 - 12) Itoh, a., Iizuka, K. and Natori, S. induction of TNF-like factor by murine macrophage-like cell line J 774.1 on treatment with Sarcophaga lectin. *FEBS Lett.* **175**, 59-62 (1984).
 - 13) Itoh, A., Iizuka, K. and Natori, S. Antitumor effects of Sarcophaga lectin on murine transplanted tumors. *Jpn. J. Cancer Res.* **76**, 1027-1033 (1985).
 - 14) Tamura, M. and natori, S. Induction of human interferon by Sarcophaga peregrina lectin. *FEBS Lett.* **175**, 325-328 (1984).
 - 15) Jacobs, D.B. and poretz, R.D. Lectin induction of lymphokines in cultured murine leukocytes. *Cell. Immunol.* **51**, 424-429 (1980).
 - 16) Cuatrecasas, P. interaction of Concanavalin A and Wheat germ agglutinin with the insulin receptor of fat cells and liver. *J. Biol. Chem.* **248**, 3528-3531 (1973).
 - 17) Chang, K.J. and Cuatrecasas, P. Adenosine-triphosphate-dependent inhibition of insulin-stimulated glucose transport in fat cells. *J. Biol. Chem.* **249**, 3170-3180 (1974).
 - 18) Czech, M.P., Lawrence, J.C. and Lynn, W.S. - Activation of hexose transport by Concanavalin A in isolated brown fat cells. *J. Biol. Chem.* **249**, 7499-7505 (1974).
 - 19) Kahn, C.R., Baiad, K.R. and Von Obberghen, E. Role of valence and the cytoskeleton in the cytoskeleton in the insulin-like activity of Concanavalin A. *FEBS Lett.* **129**, 131-134 (1981).
 - 20) Shechter, Y. and Sela, B.A., Insulin-like effects for wax bean agglutinin in rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **98**, 367-373 (1981).
 - 21) Suya, h., Abe, y., tonaka, I., Ishii, S.I. and Itaya, K. insulin-like activity of photochemically obtained monovalent monomeric Concanavalin A antibodies: dependence on multivalency for stimulation of glucose oxidation of fat cells. *J. Biochem.* **92**, 1251-1257 (1982).
 - 22) Roth R.A., Cassell, D.J., Maddux, B.A. and Goldfine, I.O. Regulation of insulin receptor kinase activity by insulin mimicker and an insulin antagonist. *biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**, 245-252 (1983).
 - 23) Kim, J.H., Chung, S.R. and Jeune, K.H. Lectins from Marine Shells. IX. Purification and Carbohydrate Specificities of a Lectin, MLA-1, from the Hemolymph of *Meretrix lusoria*. *Korean Biochem. J.*, **23**, 328-334 (1990).
 - 24) Kim J.H., Chung, S.R. and Jeune, K.H. purification of New Lectins, MLA-II and MLA-III, from the Hemolymph of *Meretrix lusoria*. *Yakhakhoeji*, **38**, 284-400 (1994).
 - 25) Chung, S.R., Kim, J.H. and Jeune, K.H. Immunostimulation Lectins from Marine Natural products: Characteristics of the MLA-I, MLA-II and MLA-III. *Yakhak hoeji*, submitted (1995).
 - 26) Shannon, L.M. and Mills S.E. Purification by immunoabsorption chromatography of the normal and a mutant form of the B2-sybybut of *E. coli* tryptophan synthesis. *Eur. J. Biochem.* **63**, 563-568 (1976).
 - 27) Howard, J. and Shannon, L.M. A rapid quantitative and highly specific assay for carbohydrate-binding proteins. *Anal. Biochem.* **79**, 234-239 (1977).
 - 28) Ouchterlony, O. and Nilsson, L.A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. in Handbook of Experimental Immunology. weill, D.M. (eds). Blackwell Scientific Publications 19-1-19-39 (1973).
 - 29) LKB manual, Immunoelectrophoretic techniques with the LKB 2117 multiphor. *Application note* **249**, 1-10 (1978).
 - 30) Wysocki, L.J. and Sato, V.L. "Panning" for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. natl. Acad. Sci. USA.* **75**, 2844-2848 (1978).
 - 31) Mishell, B.B., Shiigi, S.M., Henry, C., Chan E. L., Norht, J., Gallily, R., Slomich, M., Miller, K., Marbrook, J., parks, D. and Good, A.H

- preparation of mouse cell suspensions in selected methods. *in* cellular immunology.. Mishell and Shiigi (eds). Freeman Co., San Francisco, 3-27 (1980).
- 32) Callard, R.E., Shields, J.C. and Smith, S.H. Assay for human B cell growth and differentiation factors. *in* lymphokines and interferons. Clemens, Morris and interferons. Clemens, Morris and Gering (eds). LRL press. Oxford, 345-354 (1987).
- 33) Ly, I.A. and Mishell, R.I. Separation of mouse spleen cells by passage through columns of Sephadex G-10. *J. Immunol. Methods* **5**, 239-247 (1974).
- 34) Peacock, J.E. and Tomar, R.H. Manual of laboratory immunology. Peacock and Tomar (eds.), Lea and Febiger Publication. Philadelphia, 1-228 (1980).
- 35) So, M.S., Jeune, K.H. and Chung, S.R. Lymphocytes mitogenic and immunochemical properties of the lectins from marine animal *Lunella coronata coreensis*. *Yakhak Hoejk*, **37**, 254-261 (1993).
- 36) Suh, Y.A., Jeune-Chung, K.H. and Chung, S.R. Lectins from marine shells. VIII. Characterization of the NIC lectin isolated and purified from *Neptunea intersculpta*. *Korean biochem., J.*, **21**, 46-52 (1988).