

## 겨우살이 Lectin의 정제 및 생화학적 특성

<sup>1</sup>장 철 수 · 오 미 정 · 노 광 수  
<sup>1</sup>김천대학 임상병리과, 계명대학교 생물학과  
(접수 : 1999. 9. 2., 게재승인 : 1999. 10. 18.)

### Purification and Biochemical Characterization of Lectin from *Viscum album*

Choul Soo Chang<sup>1</sup>, Mi Jung Oh, and Kwang Soo Roht<sup>†</sup>  
<sup>1</sup>Dept. of Clinical Pathology, Kimcheon College, Kimcheon, Kyungbuk 740-200, Korea  
Dept. of Biology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea  
(Received : 1999. 9. 2., Accepted : 1999. 10. 18.)

The lectin was purified through 0.15 M NaCl extraction, ammonium sulfate precipitation, sepharose 4B affinity chromatography and gel filtration using sephadex G-150 from the leaves of *Visum album* collected in Mt. Duk Yu. The final gel filtration step resulted in 11.64 folds purification with 0.14% of recovery yield. We also performed biochemical characterization of the purified *Visum album* lectin. HPLC analysis of lectin purified by gel filtration revealed a single peak. The analysis of the purified lectin by SDS-PAGE showed a tetramer composed of two identical subunits with molecular weights of 32 and 30 kDa. The lectin was a glycoprotein containing 14.4% carbohydrate, which consist of glucose, fructose, arabinose and xylose, and the amino acids such as phenylalanine, lysine and tyrosine. The purified lectin agglutinated human red blood cell types with similar potency, but when tested against red blood cells from mouse, bovine, rabbit, chicken and porcine, significant difference in potency were observed. Hemagglutinating activity was inhibited by D-galactose, D-mannose, D-lactose and D-raffinose, but not by D-glucose, D-glucosamine, D-mannosamine, L-fructose, D-xylose, D-arabinose, D-galacturonic acid, D-fructose, L-rhamnose and N-acetyl-D-galactosamine. The optimal pH and thermal stability of the purified lectin were pH 4.0-7.0 and 20-50°C, respectively.

**Key Words** : hemagglutinating activity, lectin, purification, *Visum album*

#### 서 론

자연에는 적혈구 및 여러 종류의 세포를 응집시키는 능력을 지닌 단백질이 널리 분포 하고 있다. 이러한 응집소(agglutinin)는 처음 식물의 종자에서 발견 되었지만 그외 뿌리, 잎, 표피는 물론 달팽이, horseshoe crab의 무척추동물 그리고 어류와 같은 척추동물과 미생물등에서도 발견된다(1, 2). 이러한 lectin계 물질을 비면역계 기원성의 세포응집 단백질 혹은 당단백질로 정의하고 있다(3). 그러나 구조적으로 유사한 항체는 달리 조성, 분자량, 구조, 및 당-결합부위의 수등에 있어 매우 다양하며, concanavalin A, soybean agglutinin, wheat germ agglutinin, red kidney bean lectin, castor bean lectin, peanut agglutinin 등의 식물성 lectin(4,

5)과 selectin 및 galactin 등의 동물성 lectin(6)이 있다.

Jack bean에서 처음으로 결정형태로 순수 분리한 식물성 agglutinin인 concanavalin A를 말의 적혈구 응집을 통해 hemagglutinin을 확인할 수 있었다(4). 또한 castor bean 종자의 ricin이 적혈구를 응집시키는 독성 단백질을 확인하였고, jequirity bean에서는 abrin이라는 또다른 lectin을 발견하였다(1, 2). 동일한 종자 추출물을 서로 다른 종류의 적혈구에 사용하였을때 응집활성이 다르다는 것을 관찰하였으며(7), 어떤 종자에는 사람의 적혈구 항원에 특이적인 agglutinin이 포함되어 있다는 것이 발견되었다(8, 9).

Lectin은 세포와 결합하여 여러가지 다양한 생물학적 활성을 나타낸다. 세포표면에 결합한 lectin은 fluorescein, ferritin, peroxidase 및 hemocyanin 등을 사용하여 관찰하거나, radio isotope로 표지한 lectin을 사용하여 증명한다(10). 이 발견으로 lectin이 세포 표면의 당과 특이적으로 결합하거나 또는 당에 의해 특이적으로 저해됨을 알게 되었다(11).

Lectin에 의한 세포응집은 lectin의 특성, 세포막 수용체의 화학

<sup>†</sup> Corresponding Author : Dept. of Biology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea  
Tel : 053-580-5207, Fax : 053-580-5164  
E-mail : rks@kmucc.keimyung.ac.kr

적구조, 세포막의 특성, 세포구성성분, 반응온도, 세포농도, 세포 사이 다양한 응집 등의 여러인자들에 의해 영향을 받는데(12), lectin이 세포표면의 당에 결합한 후 세포막 구조와 기능에 변화를 가져오고, 이로인해 세포의 내부로 전달되어 세포의 성장이나 증식 등 생화학적 반응들을 일어나게 한다(13). 정상세포에서는 수용체들이 분산되어 있는 반면 악성세포는 수용체 부위가 서로 결합되어 세포응집이 일어나기 쉽도록 배열한다(14).

대부분의 식물성 lectin은 림프구의 thymus 의존성 세포인 T-cell만을 자극하며 다른 종류의 thymus 비의존성 림프구들인 B cell에 저해성 작용을 갖는다(15, 16). Concanavalin A는 화분관이 나오기 전의 휴지기를 줄여서 시험관내에서 화분발아를 자극한다(17).

Lectin은 *Trichoderma viride* 균사의 종단부와 균사격벽에 특이적으로 결합하여 균사 성장을 저해하며, *Aspergillus ochraceus*의 어린 균사에서 N-acetylglucosamine 및 galactose의 incorporation을 저해한다(18). Lectin은 이외에도 인슐린유사 활성, 효소막 활성의 변이, 생체 방어물질, 영양물질의 수송 및 저장, 수정억제 등의 많은 생물학적 활성을 가지고 있으며(19), 이를 이용하여 생명과학 분야의 연구에서 중요한 도구로 사용되고 있다.

본 연구에 사용한 겨우살이(*Viscum album*)는 기생식물로 아프리카, 유럽, 아시아 등 전 세계적으로 널리 분포하며, 약용 및 식용자원으로 이용되어 왔다(20-22). 한방 및 민간요법에서 잎과 줄기는 진통, 고혈압, 산후, 동상, 동맥경화 등의 약재로 사용하고 있으며, 겨우살이 추출물은 간치로제로 사용되고 있다. 본 연구에서는 국내 참나무류 등에 기생하는 겨우살이에서 lectin을 추출 및 정제하고 분자량 측정, 탄수화물 및 단백질 분석, 혈액 및 탄수화물 특이성, 온도 및 pH 안정성 등의 생화학적 특성들을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

덕유산 백련사 부근에 서식하는 겨우살이(*Viscum album*)의 잎을 가을 (10-12월)에 채취한 후, 동결 저장하여 사용하였다.

### Lectin의 분리 및 정제

#### 1. Crude extract

추출방법은 Ziska(23) 등의 방법을 변형하여 사용하였다. 겨우살이 잎 100 g을 액체질소를 사용하여 분쇄한 후, 700 mL의 0.15 M NaCl을 가하여 실온에서 3시간 동안 교반한 다음 4겹의 cheesecloth와 1겹의 miracloth로 여과한 용액을 6000 g로 30분간 원심분리하여 상등액인 crude extract를 얻었다.

#### 2. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 분획

Crude extract에 60%의 농도가 되게 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 서서히 첨가하여 완전히 용해시킨 후, 10,000 g에서 30분간 원심분리하였다. 침전물을 0.15 M NaCl에 완전 용해하고 4°C에서 24시간 투석한 후, 냉동 건조시켜 crude lectin을 얻었다.

#### 3. Affinity chromatography

Errson등(24)의 방법으로, crude lectin을 0.15 M NaCl로 평형시킨 sepharose 4B column(2.5×30 cm)에 주입하여 280 nm에서

흡광도가 0.04가 될때까지 세척하였다. 이어 D-galactose가 함유된 0.15 M NaCl(pH 7.0)을 사용하여 0.5mL/min의 유속으로 각 분획 당 3mL를 채취하였다. Lectin의 활성을 가진 분획을 모아 투석하였다.

#### 4. Gel filtration

전 과정에서 시료를 0.15 M NaCl에 평형시킨 sephadex G-150 column (2.8×60 cm)에 주입하고 0.15 M NaCl(pH 7.0)을 사용하여 0.15 mL/min의 유속으로 각 분획당 3 mL씩을 채취하였다. Lectin의 활성이 있는 분획을 모아 투석하고 냉동건조하였다.

### Lectin의 순도 검정

Lectin의 순도를 검정하고자 HPLC를 사용하였다. 0.1% trifluoroacetic acid(pH 2.2)로 평형시킨 hi-pore reversed phase column (Bio-rad, C18, RP-318, 250 mm×4.6 mm)에 lectin을 주입하여 1 mL/min의 유속으로 분리하였으며, 표준용액으로서 european mistletoe lectin을 사용하여 retention time을 비교하였다.

### 분자량 측정

순수 lectin의 분자량 측정에는 0.15 M NaCl(pH7.0)로 평형시킨 sephadex G-150 column (2.0×80 cm)을 이용한 Andrews(25) 방법을 이용하였다. 분자량을 구하기 위한 표준 단백질로서는  $\beta$ -amylase (200,000), alcohol dehydrogenase (150,000), bovine serum albumin (66,000), carbonic anhydrogenase (29,000), cytochrome C (12,400)를 사용하였다.

### SDS-PAGE

Weber와 Osborn(26) 방법에 따라 12.5% SDS-polyacrylamide gel을 사용하였다. Gel 당 20 mA에서 1.4시간 전기영동한 후, coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 acetic acid로 탈색하였다.

### 탄수화물 분석

탄수화물 분석은 Bochartd와 Piper(27), Bochartd와 Easty(28) 및 Vidal 과 Colom(29)의 방법에 따라 gas chromatography(Shimadzu, GC-14A, 190 cm×0.4 cm column)하였다.

### 아미노산 분석

순수정제된 lectin을 Simpson 등(30)의 방법에 따라 6 N HCl로 가수분해시킨 후, 0.2 M sodium citrate (pH 2.2)에 녹이고 3 N NaOH로 중화한 다음 amino acid analyzer로 사용하여 아미노산을 분석하였다.

### 적혈구 응집력 시험

적혈구 응집력 시험(haemagglutinating activity)은 Takatsy(31)의 방법을 변형시켜 하였다. 0.01 M phosphate buffered saline (pH 6.8)와 정제된 lectin을 2-fold serial dilution method로 연속 희석한 후, 생리식염수로 세척한 2% 적혈구용액을 가하여 반응시킨 후, 적혈구의 응집 여부를 현미경 (100X)을 사용하여 확인하였다. Lectin의 활성은 혈구 최종 응집을 나타내는 최종 희석 배수의 역수를 응집력 단위로 나타내었다.

**혈액의 특이성 시험**

Heparin을 처리한 사람의 혈액, 생쥐, 소 토끼 닭 및 돼지혈액을 0.85% saline으로 세척하여 2% 적혈구 부유액을 만들어 사용하였다. 이때 사용된 0.02% lectin의 최종 희석 배수는 8이 되도록 하였다. 정제된 lectin을 2-fold serial dilution method로 희석하고 적혈구 응집의 최종 희석배수의 역수로 나타내었다.

**탄수화물 특이성 시험**

Allen 등(32)의 방법에 따라 탄수화물 특이성을 측정하였다. 100 mM 농도의 탄수화물(D-lactose, D-galactose, D-mannose, D-glucose, D-glucosamine, D-mannosamine, D-fructose, D-xylose, D-arabinose, D-galacturonic acid, D-fructose, D-rhamnose, N-acetyl-D-galactosamine) 용액을 2-fold serial dilution method으로 희석한 다음, 적혈구 응집력을 가진 lectin 용액과 2% 적혈구 부유액을 가하였다. 특이성은 lectin에 의한 혈구 응집력을 저해하는 최소 농도를 당의 농도로 나타내었다.

**pH와 열 안정성**

pH변화에 따른 lectin의 활성을 조사하기 위해서 pH 2-10 사이 완충액을 사용하여 4°C에서 4시간 투석시킨 후, 잔존하는 상대적인 lectin 활성능을 조사하였다.

사용한 완충액은 glycine-HCl buffer (pH 2.2), acetate buffer (pH 3.2), phthalate-sodium hydroxide buffer (pH 4.21), phosphate buffer (pH 6.0, 7.0), barbital buffer (pH 8.0, 9.0), sodium carbonate-bicarbonate buffer (pH. 10)이다.

열안정성을 조사하기 위해 10°C-70°C 사이 온도에서 10분 및 30분간 열처리한 후, 혈구 응집 반응을 이용하여 잔존하는 상대적인 lectin의 활성능을 조사하였다.

**결과 및 고찰**

**Lectin의 분리, 정제 및 순도 검정**

겨우살이는 숙주로부터 수분과 무기질만 공급 받으며 스스로 광합성을 하여 당을 생성하는 기생식물로서(33), 인간에 대한 생리적 효과를 갖는 화합물을 포함하고 있을 뿐만 아니라 독성을 주는 화합물도 포함되어 있어 이에 따른 위험성에도 불구하고 약용으로 이용되고 있다(34).

겨우살이의 성분인 lectin의 분리과정은 일반적으로 salt, buffer, methanol 혹은 ethanol 등 유기용매를 이용하여 추출하고, 이렇게 얻은 crude lectin을 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 침전시킨 후 ion exchange chromatography, absorbant chromatography, affinity chromatography, gel filtration 및 electrophoresis 등에 의해 정제하는데, 본 연구에서는 sepharose에 부착된 D-galactose에 lectin이 특이적으로 결합하는 acid-treated sepharose 4B affinity chroma-

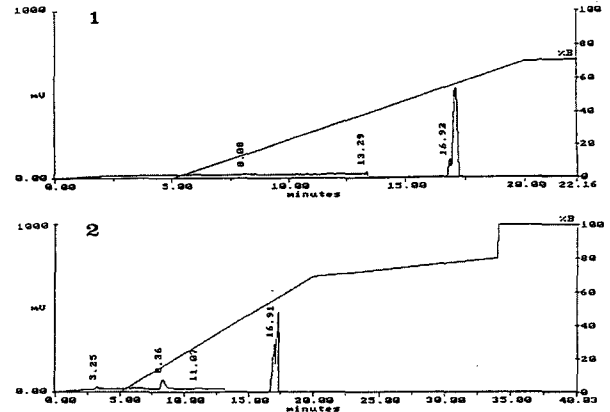


Figure 1. HPLC chromatogram of lectin purified by gel filtration (1) and standard lectin (2) on hi-pore reversed phase column.

tography를(24) 변형하여 실시하였다. 첫 번째 단백질 peak에서 혈구응집 반응이 나타났는데, 이는 lectin을 충분히 흡착시키지 못하였기 때문이다. Sepharose 4B affinity chromatography 정제과정에서 여러 유사한 peak 및 band가 나타났다. 따라서 이를 정제하고자 sephadex G-150 gel filtration를 한 후, 순도를 검정하기 위해 HPLC를 하였다. 정제 단계의 시료와 표준용액의 retention time을 비교하여 lectin의 위치를 확인한 결과, 마지막 정제 단계인 gel filtration에서의 retention time은 16.92로써 이는 표준용액인 european mistoletoe lectin의 retention time 16.91과 일치하였다 (Figure 1). 또한 전기영동으로서도 lectin이 순수하게 분리되었음을 확인하였는데(미계제), Wistaria lectin에서도 전기영동에 의한 single protein band의 존재에 의해 순도를 확인하였다(32).

겨우살이 잎으로부터 0.15 M NaCl로 추출한 crude extract에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 90%까지 다양하게 첨가 하였을때 0~60% 농도에서 가장 높은 활성을 보였으며 60~90%에서는 큰 변화가 없었다(미계제). Crude extract에서 2492.8 mg이었으나, crude extract를 기준으로 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 분획에서는 1.7배 정제되었고 회수율은 13.73%이었다. Sepharose 4B affinity chromatography에 의해서는 8.68배의 정제와 0.86%의 회수율을 보였다. 최종적으로 sephadex G-150 gel filtration을 이용하여 정제한 결과, 3.57 mg의 단백질을 획득하여 총 lectin의 85.6%에 해당되었는데, sunn hemp seed lectin의 25 mg(24)과 유럽산 lectin의 40 mg(23)과는 차이가 있다. 활성은 1,600 unit로서 448.3 units/mg의 비활성을 나타냈으며, 정제율과 회수율은 11.64배와 0.14%이었다(Table 1).

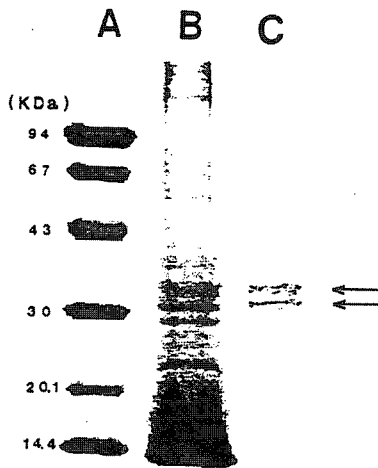
**분자량**

Lectin의 분자량은 대단히 다양하여 wheat germ agglutinin은 26,000, lima bean lectin은 269,000, horseshoe crab lectin은 400,000으로 존재한다(35). 또한 동일한 lectin인 경우라도 서로

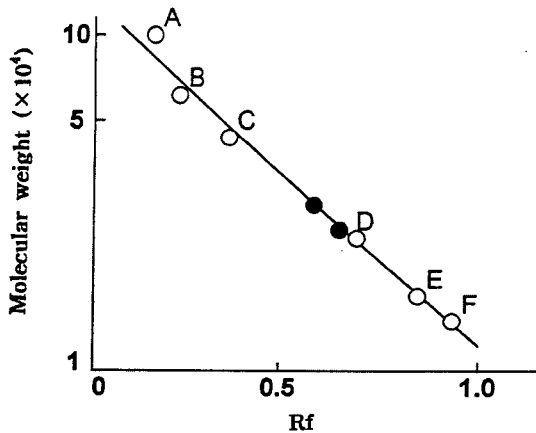
Table 1. Purification of *Viscum album* lectin.

Steps	Total protein activity* (mg)	Total activity* (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	2492.8	96000	38.51	1	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fraction	342.26	22400	65.5	1.7	13.73
Sepharose 4B	21.53	7200	334.3	8.68	0.86
Sephadex G-150	3.57	1600	448.3	11.64	0.14

\*Activity is expressed as an inverse of the maximum dilution of hemagglutinating activity in blood red cell O type.



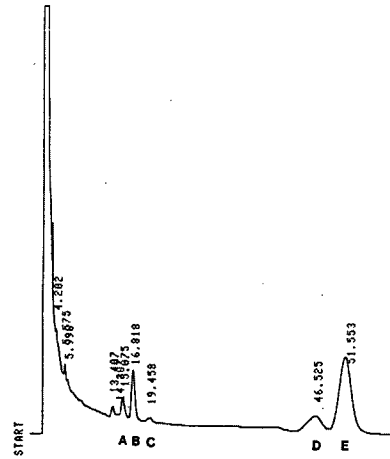
**Figure 2.** 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of *Viscum album* lectin. The gels were run at 20 mA for 1.4 h and stained with Coomassie brilliant blue R 250. Arrows indicate lectin purified by sephadex G-150 gel filtration. Lane A, markers; lane B, crude lectin; Lane C, purified *Viscum album* lectin. The molecular weight markers were phosphorylase b (94,000), bovine serum albumin (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), soybean trypsin inhibitor (20,000),  $\alpha$ -lactalbumin (14,000).



**Figure 3.** Determination of molecular weight of *Viscum album* lectin on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Closed black circles (●) indicate lectin purified by sephadex G-150 gel filtration. The molecular weight markers were phosphorylase b (A, 94,000), bovine serum albumin (B, 67,000), ovalbumin (C, 43,000), carbonic anhydrase (D, 30,000), soybean trypsin inhibitor (E, 20,000),  $\alpha$ -lactalbumin (F, 14,000).

다른 값을 갖는데 concanavalin A는 55,000에서 100,000까지 다양하다(36). 본 실험에서 sephadex G-150 gel filtration으로 얻어진 겨우살이 lectin의 총 분자량은 124,000(미계제)으로 115,000의 유럽산 mistletoe lectin에 비해 약간 작았다(23).

대부분 lectin의 subunit는 monomer이거나 dimer로 구성되어 있으며, SDS 존재 하에서 비가역적이다. 본 실험에서 순수분리된 lectin은 0.1% SDS를 포함하는 12.5% PAGE에 의해 2개의 band로 나타났으며(Figure 2), 2개의 band에 대한 각각의 분자량을 측정 한 결과, 각각 32,000 및 30,000 분자량을 갖는 2종류의 subunit로 구성된 tetramer로 이루어져 있음을 알 수 있었다(Figure 3). 본 실험의 겨우살이 lectin은 5,000과 18,000의 garden pea lectin, 6,000과 18,000의 lentil lectin, 그리고 34,000과 29,000(23),



**Figure 4.** Gas chromatogram of carbohydrate of *Viscum album* lectin. A, arabinose, B, fructose, C, xylose, D, glucose, E, myo-inositol (standard material).

34,500과 29,000(37)의 유럽산 겨우살이 lectin과는 차이가 있었으나, concanavalin A와 soybean agglutinin의 tetramer와 같았다.

단일 종류에 존재하는 lectin은 서로 밀접하게 연관된 isolectin으로 존재한다. Soybean의 경우 주요 soybean agglutinin 외에도 3 종류의 소집단으로 혈액 응집 성분이 존재하나 이들 3 종류의 lectin은 모두 당단백질로 분자량 120,000으로 아미노산 및 탄수화물 조성이 서로 비슷하다(38). Wheat germ agglutinin은 N-acetylglucosamine에 대해 특이적이다(39). 이처럼 lectin은 서로 유사한 group이 존재하나 이들의 생물학적 활성 및 분자적인 특성이 현저히 다르므로 isolectin으로 불리지 않는다. 또한 common pokeweed인 *Phytolacca americana*로부터 5 종류의 lectin을 얻었는데, 이는 유사 분열을 일으키는 능력에서 현저히 다르며 분자 크기도 다르다(40). 이는 여러 가지 방법을 통해 다른 lectin으로부터 파생되지 않고 유전적인 기반에 의해 생겨났음이 증명되고 있다. Locust tree에 기생하는 유럽산 mistletoe에서 분리한 lectin에서 3 종류의 subtype을 분리 하였으나(41), 본 연구에서는 다른 형태의 isolectin을 발견할 수 없었다.

**탄수화물 분석**

겨우살이 lectin은 당단백질로서(37), 탄수화물 함량은 최종 0.6 mg으로 총량의 14.4%를 차지하였는데(미계제), 이는 indian strawberry lectin의 3%에 비해 높고 potato lectin의 50%에 비해서는 현저히 낮았으나(33), 유럽산 겨우살이 lectin의 10.1%(23) 및 11%(37)와 유사하다. 유럽산 겨우살이 lectin은 1.4%의 glucose, 6.2%의 mannose, 2.1%의 N-acetyl-D-glucosamine으로 구성된 반면(37), 본 실험에서 정제된 lectin의 당 조성은 glucose 45.19%, fructose 38.48%, arabinose 14.2% 및 xylose 5.13%를 함유하고 있다(Figure 4).

**아미노산 분석**

대부분의 lectin은 aspartic acid, serine, threonine이 전체 아미노산의 30% 이상 차지하며, 황 함유 아미노산은 소량으로 존재한다(10). 본 연구의 겨우살이 lectin은 단백질함량이 85.6%로서, phenylalanine, lysine, tyrosine, aspartic acid가 비교적 풍부하였으나 alanine, arginine, isoleucine은 상대적으로 소량 존재하였다

Table 2. Amino acid composition in *Viscum album* lectin.

Amino Acid	Content(%)
Alanine	1.657
Cystine	4.436
Aspartic acid	6.938
Glutamic acid	5.827
Phenylalanine	18.465
Glycine	3.000
Histidine	5.329
Isoleucine	2.462
Lysine	15.369
Leucine	3.232
Methionine	0.994
Proline	3.295
Arginine	2.059
Serine	4.372
Threonine	3.316
Valine	3.514
Tyrosine	10.640
Ammonia	4.751

Table 3. Hemagglutinating activity of red blood cell by *Viscum album* lectin.

Red blood cell	Residual activity(%) *
Human	
A	25
AB	25
B	25
O	25
Animal	
Mouse	100
Bovine	3.125
Rabbit	50
Chicken	12.5
Porcine	25

\*Residual activity was taken as 100 in 2% mouse red blood cell with lectin solution.

(Table 2). 특히 황 함유 아미노산인 methionine은 미량으로 존재하였으며, cystine은 wheat germ, potato, pokeweed lectin(38)에서와는 달리 소량으로 존재하였다.

### 혈액의 특이성

Lectin 활성의 측정은 적혈구응집 반응, 단당류 및 복합 당류에 의한 저해여부를 조사함으로써 가능하다. Hemagglutination은 정상 적혈구 혹은 변화시킨 적혈구를 사용하여 확인한다. 일반적인 세포의 변화는 trypsin을 포함하는 proteolytic enzyme이나 neuramidase를 이용한 digestion에 의하는데, 이들은 세포에 손상을 주지 않고 세포응집 반응을 민감하게 일으키므로 많이 이용된다(42). 가장 일반적인 혈구응집 반응 측정은 serial dilution법으로 end point는 육안, photometry 또는 현미경 하에서 측정될 수 있으며, 그 외에도 fragiligraph 및 aggregometer를 이용하여도 가능하다. Lectin은 적혈구와 종 특이성을 나타내는데 bean, pea, lentil, vetch lectin은 사람, 토끼, 양, 말등의 적혈구와 반응시

Table 4. Hemagglutinating inhibition test by various carbohydrates in *Viscum album* lectin.

Carbohydrates	Minimum carbohydrates concentration (mM)*
D-glucose	>100
D-glucosamine	>100
D-galactose	50
D-galactosamine	>100
D-mannose	25
D-mannosamine	>100
L-fructose	>100
D-lactose	12.5
D-xylose	>100
D-arabinose	>100
D-galacturonic acid	>100
D-raffinose	25
D-fructose	>100
L-rhamnose	>100
N-acetyl-D-galactosamine	>100

\*Carbohydrate specificity test was performed with 25  $\mu$ l *Viscum album* lectin and 25  $\mu$ l of 2% human erythrocyte suspension. Using an initial concentration of 100 mM, each carbohydrate was tested 2-fold serial dilution.

로 다른 혈구응집 반응을 나타낸다(9).

본 실험에 사용한 lectin의 활성 측정에는 정상 적혈구를 이용하여 2-fold serial dilution 법으로(43) 응집여부를 육안으로 검색한 후 현미경 하에서 최종 확인하였다. 겨우살이에서 혈구응집 반응은 Lectin과 쥐 혈액간의 응집력을 100으로 했을 때 사람의 A, AB, B 및 O 혈액형과 상대적인 응집력은 25로 사람 혈액형 간에는 차이를 보이지 아니하였으며, 소의 응집력은 3.125로 가장 낮았고 쥐의 응집력은 100으로 가장 높았으므로(Table 3) 사람 혈액형에 대한 특이성은 없고 각 동물 혈액형에 대한 특이성은 뚜렷하였다.

사람의 주된 혈액형 특이성 결정인자가 A형에는  $\alpha$ -N-acetyl-galactosamine, B형에는  $\alpha$ -galactose, O형에는  $\alpha$ -L-fructose가 특이적이다. 이처럼 혈액형에 대해 특이적 또는 비특이적인 lectin의 성질을 이용하여 다당류, 당단백질 및 당지질 등의 측정, 분리 및 특성연구에 사용되고 있다(10).

### 탄수화물의 특이성

Lectin의 탄수화물 특이성은 혈구 응집 억제능에 의해 측정되는데, 각기 다른 탄수화물을 이용하여 lectin에 의한 다당류 혹은 단당류의 응집을 저해하는 능력을 측정함으로써 알 수 있다. 당저해제에 의해 lectin을 분류할 수 있으며 또한 한 가지 당특이성을 갖는 단일 lectin 혹은 isolectin도 존재하며, 여러 가지 다른 당에 대해서 특이성을 갖는 여러 lectin을 구별할 수도 있다(44).

Lectin이 갖는 탄수화물 특이성은 실험한 총 15종의 탄수화물 중 D-lactose, D-galactose, D-mannose 및 D-raffinose의 4종류에서 적혈구응집력이 억제되었으나, D-glucose, D-glucosamine, D-galactosamine, D-mannosamine, L-fructose, D-xylose, D-arabinose, D-galacturonic acid, D-fructose, D-rhamnose, N-acetyl-D-galactosamine의 100 mM 이상 농도에 대해서는 어떠한 특이성도 보이지 아니하였다(Table 4).

Gorse 종자의 2가지 lectin 중 하나는 N-acetylglucosamine에 특이적이고 또 다른 하나는  $\alpha$ -L-fructose에 특이적이며, *B. simplicifolia*에서 분리된 lectin은 N-acetylglucosamine과  $\alpha$ -galactoside에, lentil과 fava

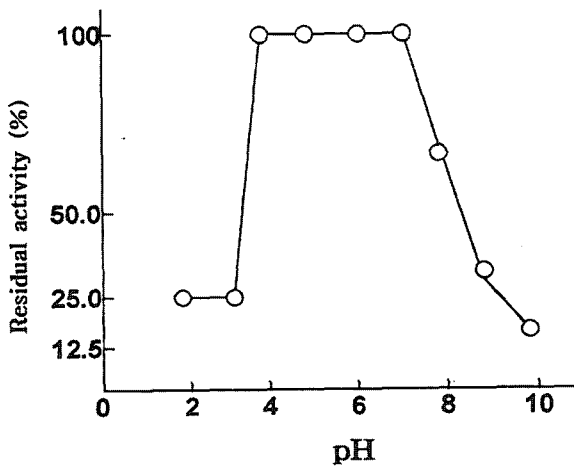


Figure 5. The pH stability of *Viscum album* lectin. Purified lectin was dialyzed in different pH for 4 hr at 4°C. Residual activity was compared to that of the observed standard condition (Tris-HCl buffer, pH 7.2).

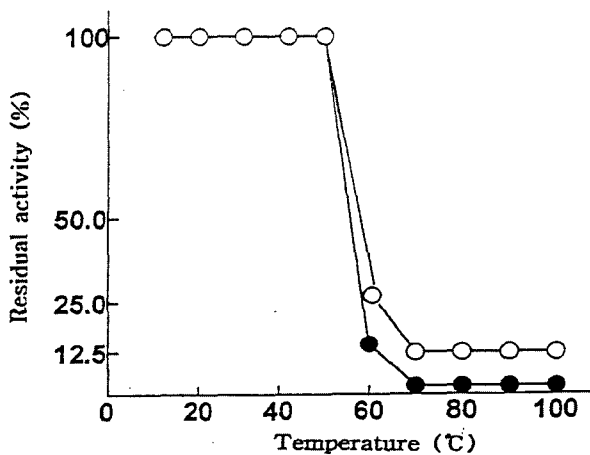


Figure 6. Thermal stability of *Viscum album* lectin. Purified lectin was heated for 10 min (○-○) and 30 min (●-●), respectively.

bean 등은  $\alpha$ -mannose와  $\alpha$ -glucose에 특이적이다. 이처럼 대부분의 lectin은 대부분의 당단백질과 당지질의 구성 성분인 당에 특이적이거나 wheat germ agglutinin은 당에 대해 비특이적이며, datura stramonium lectin의 경우 단당류 저해제가 발견되지 않으며 N-acetylglucosamine의 oligosaccharide에 의해 저해될 뿐이다(45). 또한 concanavalin A는  $\alpha$ -D-aminopyranoside,  $\alpha$ -D-glucopyranoside 및  $\alpha$ -N-acetyl-D-glucosaminide에 대해, soybean agglutinin은 N-acetyl-D-galactosaminide에 대해, ricin은 D-galactose에 대해 당특이성을 갖는다(43).

**pH와 열 안정성**

*S. japonica* lectin은 pH 8.5과 그 이상에서, lima bean과 *D. biflorus* lectin은 pH 7.0~7.5에서 최대를 나타내며(32), *Neptunea intersculpta* lectin의 경우 pH 3 이하 pH 9 이상에서 활성이 소멸하였고, winged bean lectin은 산성에서도 안정하다고 보고하였으나(46), 본 실험의 겨우살이 lectin은 pH 2~10에서 상대적 활성능을 측정할 결과, glycine-HCl buffer와 acetate buffer의 pH 4 이하 및 barbital buffer와 sodium carbonate-bicarbonate buffer를 사용한 pH 9 이상에서 75%가 소실되었고, phthalate-sodium hydroxide buffer와 phosphate buffer를 사용한 pH 4-7의 약산성 및 중성에서 안정하였다(Figure 5).

열안정성은 winged bean lectin은 70°C까지 안정하였으나 95°C에서 소멸되었고 uterine luminal fluid mitogen은 100°C에서도 활성이 유지되었다(46). 또한 유럽산 겨우살이 lectin은 50°C까지는 안정성을 가지나 60°C 이상에서는 활성이 파괴된다고 보고하였는데(23), 본 실험에서도 10~70°C에서 10 분간과 30 분간 각각 열처리 후 상대적 활성능을 측정할 결과, 정제된 lectin은 50°C까지 활성이 유지되었으며 그 이상에서는 활성이 억제되었다(Fig. 6). 따라서 본 연구의 lectin은 비교적 열에 안정한 열안정성 당단백질이다.

**요약**

겨우살이가 가지고 있는 lectin의 약리작용의 가능성에 대한 연구의 일환으로, lectin을 분리·정제하였으며, 분자량, subunit 수, 탄수화물의 조성, 단백질의 아미노산 조성, 적혈구 응집력, 탄수화물 특이성, pH 및 열 안정성등의 생화학적 특성을 연구하였다. Lectin의 분리는 0.15 M NaCl에 의한 추출, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 침전, sepharose 4B affinity chromatography 및 sephadex G-150 gel filtration에 의해 11.64배 정제에 0.14%의 수율을 획득하였으며, HPLC와 전기영동을 이용하여 순도를 검정하였다. Gel filtration에 의해 분석된 lectin의 분자량은 124,000 Da이었고, SDS-PAGE에 의해 분자량이 30,000과 32,000 Da인 2개의 band로 나타나서 각각 2개의 subunit를 갖는 tetramer로 확인되었다. 겨우살이 lectin의 탄수화물은 glucose, fructose, arabinose 및 xylose를 함유하고 있다. 또한 phenylalanine, lysine, tyrosine, aspartic acid가 비교적 풍부하였고 methionine, alanine, arginine은 비교적 적었다. Lectin은 적혈구에 종 특이성을 나타내는데 겨우살이의 혈구응집 반응에서는 사람혈액형간의 차이는 없었으며, 쥐에서 가장 높았고 소에서 가장 낮았으므로 동물 종간에 대한 특이성은 뚜렷하였다. Lectin은 당 특이성을 가지는데, D-galactose, D-mannose, D-lactose 및 D-raffinose에 대해 특이성을 나타내었다. 겨우살이 lectin은 pH4~7에서 안정하였으며, 50°C까지는 10~30분 열처리해도 활성이 유지되는 열 안정성 단백질이었다.

**참고 문헌**

- Bird, G. W. G. (1959), Haemagglutinins in seeds. *Brit. Med. J.* **15**, 165-168.
- Toms, G. C., and A. Western. (1971), Chemotaxonomy of the Leguminosae, pp. 367-463, Academic Press, New York.
- Goldstein, I. J., R. C. Hughes, M. Monsigny, T. Osawa, and N. Sharon (1980), What should be called a lectin? *Nature* **285**, 66-70.
- Sumner, J. B., and S. F. Howell. (1936), The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. *J. Bacteriol.* **32**.
- Aub, J. C., C. Tieslau, and A. Lankester (1963), Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes. I. Wheat germ lipase and associated mucopolysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **50**, 613-619.
- Ashwell, G., and J. Harford (1982), Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Ann. Rev. Biochem.* **51**, 531-554.
- Landsteiner, K., and H. Raubitschek (1908), Beobachtungen über hamolyse und hamagglutination. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* **45**, 660-667.
- Renkonen, K. O. (1948), Studies on hemagglutinins present in

- seeds of some representatives of the family of leguminosae. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* **26**, 66-72.
9. Boyd, W. C., and R. M. Reguelra (1949), Hemagglutinating substances in various plants. *J. Immunol.* **62**, 333-339.
  10. Sharon, N., and H. Lis. (1972), Lectins : Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* **177**, 949-959.
  11. Novogrodsky, A., R. Lotan, A. Ravid, and N. Sharon (1975), Peanut agglutinin, a new mitogen that binds to galactosyl site exposed after neuraminidase treatment. *J. Immunol.* **115**, 1243-1248.
  12. Nicolson, G. L. (1974), The interaction of lectins with animal cell surfaces. *Int. Rev. Cytol.* **39**, 89-190.
  13. Lis, H., and N. Sharon (1977), Lectins. Their chemistry and application to immunology, in the antigens. Sela M. ed., Academic Press. New York, pp. 429-529.
  14. Gordon, J. A., and M. D. Marquardt (1972), Immunological mechanism of action of the tumor reducing receptor from concanavalin A. *Biochim. Biophys. Acta* **332**, 136-144.
  15. Nirmul, G., C. Seeverin, and R. N. Taub (1972), In vivo effects of concanavalin A. *Transplantation* **14**, 91.
  16. Fleischer, B. (1984), Activation of human T lymphocytes : involvement of the T 3 antigen in polyclonal T cell activation by mitogenic lectins and oxidation. *Eur. J. Immunol.* **14**, 748.
  17. Southworth, D. (1975), Lectins stimulate pollen germination. *Nature* **258**, 600-602.
  18. Mirelman, D., E. Galun, N. Sharon, and R. Lotan (1975), Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. *Nature* **256**, 414-416.
  19. Howard, M. K., P. V. Pasquale, A. M. Richard, and G. G. Barbara. (1981), Evidence that the insulin-like activities of concanavalin A and insulin are mediated by a common insulin receptor linked effector system. *Biochemistry* **20**, 5800-5809.
  20. Lamont, B. (1983), In: M. Calder and P. Bernhardt eds., The biology of mistletoes. Academic Press, Sydney.
  21. Griggs, P. (1991), Mistletoe, myth magic and medicine. *Biochemistry* **13**, 3-4.
  22. Paine, L., and H. Harrison (1992), Mistletoe: Its role in horticulture and human life. *Hort Technology* **2**, 324-329.
  23. Ziska, O., H. Franz, and A. Kindt. (1978), The lectin from *Viscum album* L. purification by bispecific affinity chromatography. *Experientia* **34**, 123-124.
  24. Ersson, B., K. Aspberg, and J. Porath (1973), The phytohemagglutinin from sunn hemp seeds (*Crotalaria juncea*). Purification by biospecific affinity chromatography. *Bioch. Biophys. Acta* **310**, 446-452.
  25. Andrews, P. (1964), Estimation of the molecular weights of proteins by sephadex gel filtration. *Biochem. J.* **91**, 222-233.
  26. Weber, K., and M. Osborn. (1969), The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.
  27. Bochart, L. G., and C. V. Piper (1970), A gas chromatographic method for carbohydrates as alditol acetate. *Tappi* **53**, 257-260.
  28. Bochart, L. G., and D. B. Easty (1983), Improvement of chromatographic method for carbohydrates as alditol acetate. *Tappi* **65**, 127-128.
  29. Vidal, T., and P. J. F., Colom. (1984), Determination of carbohydrates by gas chromatography. *Tappi* **70**, 132-137.
  30. Simpson, R. J., M. R. Neuberger, and T. Y. Lieu. (1976), Complete amino acid analysis of protein's from a single hydrolysate. *J. Biol. Chem.* **251**, 1936-1940.
  31. Takatsy, G. (1967), The use of a microtitrator in serological procedures. In: International symposium on immunological method of biological study, **4**, 275-280.
  32. Allen, H. J., and E. A. Johnson (1976), The isolation of lectins on acid-treated agarose. *Carbohydrate. Research* **50**, 121-131.
  33. Calder, D. M. (1983), Mistletoes in focus: An introduction. pp. 19-46. In: M. Calder, and P. Bernhardt eds., The biology of mistletoes. Academic Press, Sydney.
  34. Kanner, L. (1939), Mistletoe, magic and medicine. *Bul. Hist. Med.* **7**, 875-936.
  35. Sharon, N., and H. Lis. (1989), Lectins as cell recognition molecule. *Science* **246**, 227-246.
  36. So, L. L., and I. J. Goldstein. (1968), Protein-carbohydrate interaction. XIII. The interaction of concanavalin A with  $\alpha$ -mannans from a variety of microorganisms. *J. Biol. Chem.* **243**, 2003-2007.
  37. Luther, P., H. Theise, B. Chatterjee, D. Karduck, and G. Uhlenbruck (1980), The lectin from *Viscum album* L. Isolation, characterization, properties and structure. *Int. J. Biochem.* **11**, 429-435.
  38. Lis, H., and N. Sharon (1973), The biochemistry of plant lectins (Phytohemagglutinins). *Plant lectin* **832**, 541-574.
  39. Irvin, H. (1968), Some physical and chemical properties of wheat germ, the phytohemagglutinin of the wheat germ agglutinin. *Biochemistry* **5**, 101-109.
  40. Borjeson, J., R. A. Reisfeld, L. N. Chessin, P. D. Welsh, and S. D. Douglas (1966), Studies on human peripheral blood lymphocytes *in vitro* I. Biological and physicochemical properties of the pokeweed mitogen. *J. Exp. Med.* **124**, 859-872.
  41. Franz, H., P. Ziska, and A. Kindt (1981), Isolation and properties lectins from mistletoe. *Biochem. J.* **195**, 481-484.
  42. Burger, M. M. (1967), Assays for Agglutination with Lectins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **57**, 359.
  43. Lis, H., and N. Sharon (1981), Lectin in higher plant. *Biochemistry of plant.* Academic Press, pp. 371-477.
  44. Walkins, A. H. (1972), Carbohydrates in cell recognition. *Sci. Amer.* **1**, 74-81.
  45. Osawa, T., and I. Matsumoto (1972), Gorse phytohemagglutinins. *Methods Enzymol.* **28**, 323-327.
  46. Higuchi, M., and K. Iwai (1985), Purification and some properties of the basic lectin from winged bean seeds. *Agr. Biol. Chem.* **49**, 391-398.