

## 표고버섯에서 분리한 렉틴의 적혈구 응집활성

김영신 · 임치환<sup>1\*</sup> · 조남석

충북대학교 농과대학 인산공학과, <sup>1</sup>충남대학교 농업생명과학대학 농화학과

### Hemagglutinative Activity of Lectin Isolated from Shiitake, *Lentinula edodes*

Young-Shin Kim, Chi-Hwan Lim<sup>1\*</sup> and Nam-Seok Cho

School of Forest Resources, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

<sup>1</sup>Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences,  
Chungnam National University, Taejeon, 305-764, Korea

(Received October 8, 2001)

**ABSTRACTS:** Since lectin condense more easily cancer cell than normal cell, it has been investigated very actively. Recently, a lot of researchers gave attention to lectin in natural products especially because lectin has effects on T-cell activation and anticancer activity, and specificity on polysaccharide. The specificity is useful to confirm kind of polysaccharide of the cell surface and to study the polysaccharide. In this research, we purified lectin from shiitake, *Lentinula edodes*, and then characterized it. The molecular weight of the lectin was 23 kDa, and it was stable only under the 40°C and in a alkaline solution. As for the specificity of polysaccharide, the lectin had specificity on galactose, fucose, glucose, lactose and N-acetyl-D-galactosamine. In addition, it was confirmed to be a glycoprotein.

**KEYWORDS:** Glycoprotein, Hemagglutinative activity, Lectin, *Lentinula edodes*

렉틴은 식물체로부터 발견한 적혈구 응집성물질로서 phytohemagglutinin, hemagglutinin, protectin 등으로 불려져 왔으며, Boyd와 Shapleigh(1954)는 이 물질이 적혈구뿐만 아니라 lymphocyte, fibroblast, bacteria, fungi 등의 세포도 응집시킬수 있다는 특이성을 근거로, 라틴어 *legre*(= to pick or choose)로부터 “렉틴(Lectin)”이란 용어를 창안하였다.

렉틴이 정상세포보다 종양세포를 더 잘 응집시킨다는 사실이 보고된 이래로 생물학자, 암연구학자, 면역학자 등 생명과학 연구부문의 많은 연구자들의 상당한 관심을 불러 일으켜 이에 대한 연구가 급증하고 있다(Lis and Sharon, 1977). 렉틴은 주로 식물을 대상으로 연구되어져 왔으며, 이러한 연구결과, 렉틴은 단백질성 물질이라는 공통점을 제외하고는 생화학적, 면역학적 성질이 매우 다양한 것으로 나타났다(Lis and Sharon, 1977). 현재 100여종 이상의 순수한 렉틴이 정제되었고 이 중 40여종이 상품화되어 고가로 거래되면서, 최근에 생명과학연구 도구로서 뿐만 아니라 각종 암의 진단 및 치료에 응용되고 있는 예가 상당히 많고, 그 외 면역성질환 치료제 개발에의 기대가 크게 대두되고 있어 천연물 성분 중 크게 주목되는 분야이다(Chung *et al.*, 1994).

버섯류의 경우 주름 버섯(*Agaricus campestris*), 양송

이 버섯(*Agaricus bisporus*), 팽나무버섯(*Flammulia velutipes*), 자주줄각버섯(*Laccaria amethystina*) 그리고 청버섯(*Russula cutefracta*) 등의 렉틴이 연구·보고 되었으며, 그 중에는 림프구 자극 효과를 나타내었다는 보고도 있다(Jeune-Chung, 1987).

본 연구에서는 표고버섯을 부위별로 구분하여 그 화학적 조성 분석과 단백질 분리를 하였다. 또한 렉틴을 정제하여 적혈구 응집활성에 미치는 영향을 구명하였다.

### 재료 및 방법

#### 시료

표고버섯(*Lentinula edodes*)을 청원버섯농장(충북 청원군 가면 한계리 산33번지)에서 1996년 10월에 구입하여 실험재료로 사용하였다.

표고버섯은 구입 즉시 균산과 균병으로 나누어 일부는 냉동 보존하여 신선도를 유지하여 시료로 사용하였고, 그 나머지는 음건하였다. 건조된 시료는 마쇄하여 시료로 사용하였으며, 그중 250~425 μm 크기의 시료를 선별하여 화학적 조성 분석에 사용하였다.

#### 화학적 조성분석

**추출물 정량:** 온수 추출은 시료 2g과 증류수 100 ml를 환류냉각기를 연결한 삼각플라스크에 넣어 3시간

\*Corresponding author <E-mail: phthora@hanmail.net>

동안 끓이고 IG3(glass filter)로 여과·세정한 후, 전건하여 다음 식에 의거하여 계산했다.

$$\text{온수 추출물(\%)} = (D - R/D) \times 100$$

D : 전건시료의 무게(g), R : 추출잔유물의 무게(g)

유기용매 추출의 경우에는 시료 2 g을 원통여과지에 첨가하고 속슬랫 추출기를 이용하여 에탄올·벤젠혼합액(1:2, v/v)으로 10분에 1회 비율로서 용매가 사이펀관을 통과하여 환류하는 정도로 6시간 추출하고 용매를 증류 회수하여 전건된 사용 전·후의 플라스크의 그 무게 차로써 추출물의 양을 계산하였다.

**Holocellulose 정량:** Holocellulose의 정량은 아염소산염법(Wise법)을 개량한 방법으로 사용하였다. 탈지시료 2.5 g을 300 ml 삼각플라스크에 넣고 0.2 M 초산 완충액(아염소산나트륨 1 g과 0.2 ml 빙초산 포3함) 150 ml를 첨가하여, 70~80°C의 온탕에서 1시간 가온했다. 그후 아염소산나트륨 1 g과 0.2 ml 빙초산을 첨가하여 30분간 반응시킨 후 IG3 (glass filter)로 여과·전건하여 칭량하고 다음식에 의해 산출했다.

$$H(\%) = (W/S) \times 100$$

H : Holocellulose의 %, S : 탈지전건시료의 무게(g),

W : Holocellulose의 무게(g)

**지방 정량:** 속슬랫추출기를 이용하여 ether로서 16 시간 추출하였다. 전건된 사용 전·후의 플라스크의 무게 차로써 추출된 지방성분을 정량하였다.

**회분 정량:** 시료 2 g을 회화로에 넣고 서서히 가열하여 600±25°C에서 완전히 탄화시킨 후 칭량하였다.

#### 렉틴의 정제 및 당단백질의 확인

**단백질 추출:** 균산과 균병으로 나누어 생표고는 100 g, 진표고는 50 g에 대하여 각각 EDTA를 포함한 250 ml의 phosphate-buffered saline(PBSE : 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, and 2 mM EDTA, pH 7.4)을 첨가하여 4°C에서 mixer로 5분간 분쇄한 후 5000 rpm(20 min, 4°C)으로 원심분리하여, 상등액을 분리하는 작업을 2회 반복하였으며, 2회의 경우에는 150 ml의 PBSE를 사용하였다. 그 상등액을 모아 조렉틴(crude lectin)을 추출하기 위한 전단계 준비를 하였다(단백질 추출 1; Chung and Jeune-Chung, 1981).

위와 같은 방법으로 상등액을 모은 후 다시 56°C에서 30분간 처리하여 5000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액만을 다시 모았다(단백질 추출 2; Yoshida 등, 1994).

**조렉틴의 분리:** 위의 각각의(단백질 추출 1, 2) 원심분리 상등액에 solid ammonium sulfate를 80% 농도로 첨가하여 4°C에서 1시간 반응시킨 후 원심분리(12,000

rpm, 20 min, 4°C)하여 침전을 모은 다음 소량의 PBSE로 재용해시켜 400배의 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4, containing 2 mM EDTA)로 4시간 썩 반복 투석을 실시하고, 원심분리한 상등액을 동결 건조하여 조렉틴으로 하였다(Chung and Jeune-Chung, 1981).

**렉틴의 정제:** 동결 건조한 조렉틴 150 mg을 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4) 500 μl에 용해시키고 0.45 μm의 syringe filter를 통과시켜 컬럼에 loading하였다. 컬럼은 DEAE Sephadex A-50의 Anion exchanger(2.5×7.2 cm)를 사용하였고, 용매는 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)에 0 M NaCl에서 0.3 M NaCl의 농도로 증가시키면서 49 ml/hr(3 ml/tube)의 유속으로 용출하였다. 단백질은 Pharmacia LKB Optical Unit UV-1을 이용하여 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 확인하였다.

활성을 나타낸 분획을 Amicon pressure ultrafilter(cut off 10 kDa)로 농축한 후, 각각 5 mM phosphate buffer(pH 6.8)로 평형시킨 hydroxyapatite column(2.5×0.6 cm)에 주입하였다. Buffer 농도를 gradient(0~0.15 M NaCl)로 증가시키면서 29 ml/hr(1 ml/tube)로 용출하였다. 분리된 분획들은 위와 같은 방법으로 단백질을 측정하고 농축하였다.

#### Polyacrylamide Gel 전기영동에 의한 순도 검정 및 분자량 측정:

전기영동은 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하였다. 12.5%와 15%의 polyacrylamide gel을 이용하여 100 V에서 실시하였으며 buffer는 Tris-glycine buffer(pH 8.3, 25 mM Tris, 250 mM glycine, 0.1% SDS)를 이용하였다. 단백질을 변성시키기 위해 SDS gel-loading buffer(50 mM Tris; pH 6.8, 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol)를 시료에 첨가한 후 5분간 끓인 다음 가하였다. 단백질 부위는 0.25%의 Coomassie brilliant blue R-250 용액(10% acetic acid in methanol : H<sub>2</sub>O = 1 : 1, v/v, 0.25% Coomassie brilliant blue R-250)으로 1시간 염색한 후, 탈색용액(methanol : acetic acid : distilled water, 5 : 1 : 5)을 이용하여 반복 세척을 실시하였다.

**단백질 정량:** 분리된 단백질의 양은 BCA(Bicinchoninic acid) Protein Assay로 정량하였다. 96 well Nunc-Immuno Plate에 시료 10 μl, BCA protein assay reagent A 200 μl, BCA protein assay reagent B 4 μl을 순서대로 주입하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로서 albumin standard(PIERCE)를 사용하였다.

**당의 정량:** 당정량은 Phenol-Sulfuric acid법으로 실시하였다(Dubois et al., 1956). 5% phenol(w/v) 50 μl과 시료 50 μl를 넣고 혼합하여, 96%의 sulfuric acid 250 μl을 주입하고 20분간 반응시킨 후, 490 nm에서 정량하였다. 표준물질로서 glucose(Sigma)를 사용하였다.

**PAS 염색:** PAS(Periodic acid, Schiff's reagent)를 사용하여 glycoprotein의 탄수화물을 확인하였다(Ravindranath *et al.*, 1985). 전기영동 시료를 돌려 나누어 단백질 염색과 당염색을 실시하여 비교 확인하였다. 전기영동 시료를 7.5% acetic acid(room temperature)에 1시간 침지한 후, 0.2% aqueous periodic acid(4°C)에 45분간 반응시켰다. 세척하지 않은 상태로 Schiff's reagent로 45분간 4°C에서 염색하였다. 탈색은 실온에서 10%의 acetic acid로 반복해서 세척하였다.

**적혈구 응집활성 검정**

**렉틴의 활성:** 렉틴의 활성검정은 적혈구를 이용한 agglutination test로 실시하였다(Celis, 1994). 녹십자 EDTA-K2의 채혈병에 담겨져 있는 토끼의 적혈구를 PBS로 세척하여 4%로 조제하고 1% trypsin용액을 10 : 1로 혼합하여 36.7°C에서 1시간 반응시킨 뒤 PBS 용액으로 trypsin을 완전히 제거하여 회색액으로 사용하였다.

50 µl의 렉틴 용액을 96 well Falcon U-plate에 넣고, PBS 용액으로 희석한 적혈구 회색액 50 µl를 첨가한 후 Titer plate shaker로 1시간 진탕하여 응집여부를 확인하였다. 응집이 일어난 well은 적혈구의 응집 덩어리가 산포되어져 있으며, 응집이 없는 부분은 적혈구들이 U-plate의 가운데로 모여 하나의 선명한 점으로 보여진다.

**렉틴의 활성에 미치는 pH 및 온도의 영향:** 활성을 나타내는 렉틴 용액을 pH 2.6~10.6 사이의 여러 완충용액 4°C에서 2시간 동안 투석시킨 후 남아 있는 lectin의 활성을 조사하였다. 이때 buffer는 20 mM의 citrate-phosphate buffer(pH 2.6, 3.6, 4.6, 5.6, 6.6), Tris-HCl buffer(pH 7.6, 8.6), carbonatebicarbonate buffer (pH 9.6, 10.6)를 사용하였다. 또한, 활성을 나타내는 렉틴 용액을 0~80°C에서 30분간 water bath에서 배양한 후 ice bath로 식힌 후 남아 있는 렉틴의 활성을 조사하였다.

**당특이성:** 적혈구응집력 저해 효과는 응집력을 나타내는 렉틴 용액으로 실시하였다(Yun *et al.*, 1995). 각종 당 용액(100 mM, 50 µl)과 활성이 있는 렉틴 용액 50 µl를 96 well Falcon U-plate에 가하여 1시간 동안 4°C에서 반응시킨 후, 적혈구 회색액을 이용한 적혈구 응집 저해 효과로서 당 특이성을 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**화학적 조성 분석**

신선한 생표고버섯의 전체무게에서 약 80%는 균산부분이, 약 20%는 균병부분이 차지하며, 표고버섯 무게의 대부분은 수분으로 이루어져 있음을 알 수 있었다.

화학적 조성분석은 Table 1에 나타낸 바와 같이 추출물에서 온수, 유기용매 추출물 모두가 균산이 균병에 비해 1.4배 정도 높게 함유되어 있음을 알 수 있었다. 지

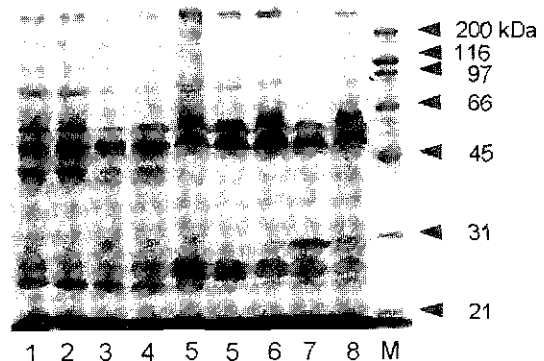
방 성분은 균산과 균병에 거의 같은 양이 존재하는 것으로 나타났다. 회분함량은 2배 정도 균산이 높았으며 holo-cellulose의 함량은 균산 48%, 균병 62%로 균병이 높게 나타났다.

**단백질의 추출 및 조렉틴 분리**

조렉틴의 분리 후 전기 영동을 실시한 결과를 Fig. 1에 나타냈다. No. 1-4는 단백질 추출 1의 방법에 따른 것이고, No. 5-8는 단백질 추출 2의 방법으로 분리한 것이다. 분리된 각각의 조렉틴의 단백질량을 BCA protein assay method로 정량하였고 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 단백질 추출 2로부터 얻은 조렉틴 시료들은 단백질량이 다소 적으며 No. 1-4의 것보다 좀더 정제된 양상을 보이는 것에서 그 감소의 원인을 찾을 수 있다. 또한, Molecular mass marker proteins을 기준으로 추측된, 약 21.5 kDa과 31 kDa 사이의 분자량을 지니는 부분이 No. 5-8에 비교적 많이 함유된 것을 알 수 있다 (Fig. 1). 이에 비해 No. 1-4는 약 50 kDa의 분자량을 지니는 부분이 비교적 많이 함유되어 있는 것으로 나타났

**Table 1.** Chemical composition (%) of *Lentinula edodes*

Composition	Pileus	Stalk
Moisture content (%)		
Dried <i>Lentinula edodes</i> (Fresh <i>Lentinula edodes</i> )	10.72 (86.51)	12.91 (79.64)
Dried <i>Lentinula edodes</i>		
Hot water extract	38.73	27.04
Organic solvent extract	7.18	5.16
Grease	3.79	3.53
Ash	5.22	2.81
Holocellulose	47.63	62.48



**Fig. 1.** SDS-Polyacrylamide electrophoresis (12.5% polyacrylamide gel) of crude lectin from *Lentinula edodes*. 1 = F1, 2 = F2, 3 = D1, 4 = D2, 5 = HF1, 6 = HF2, 7 = HD1, 8 = HD2, M : Molecular mass (in kDa) marker proteins, F : Fresh sample, D : Dried sample (1 : Pileus, 2 : Stalk), F1, F2, D1, D2 : Samples prepared by method of protein extraction 1, HF1, HF2, HD1, HD2 : Samples prepared by method of protein extraction 2.

추출해 낼 수는 있지만, 이에 관해 Yoshida 등(1994)은 활성자체는 감소된다고 보고하고 있다. Table 2의 전건 시료 1 g 당 단백질량을 비교해 보면 알 수 있듯이 표고 버섯은 신선한 상태가 건조된 것보다 단백질의 추출이 용이하며, 분리 과정에서 손실을 가져온 F2를 제외한 다른 모든 시료의 경우를 살펴보면 균산이 균병에 비해 단백질량이 2배 정도 많은 것으로 나타났다.

**렉틴의 정제**

DEAE Sephadex A-50을 이용하여 1차 정제한 결과는 Fig. 2에 나타낸 바와 같다. NaCl을 첨가하지 않은 부분을 A(Fraction No. 0-27), 0~0.3 M NaCl의 농도로 gradient elution을 하여 얻은 두 개의 peak를 각각 B(Fraction No. 28-59), C(Fraction No. 60-87)로 하였으며, 나머지는 0.3 M NaCl만으로 elution하여 D(Fraction No. 88-166)로 표시하였다. 각각의 활성을 알아보기 위해 A, B, C, D 중에서 몇 개의 fraction tube를 선정하여 agglutination test를 실시하였다.

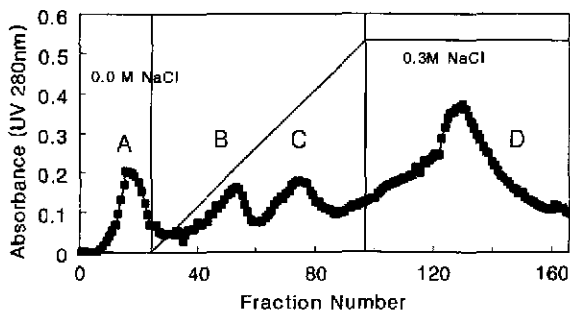
그 결과 A와 B 시료가 활성이 있는 것으로 나타나 이들을 각각 Amicon pressure ultrafilter(cut off 10 kDa)

**Table 2.** BCA (Bicinchoninic acid) protein analysis of crude lectin from *Lentinula edodes*

Samples <sup>a</sup>	Amount of protein (mg)	Samples	Amount of protein (mg)
F1	538 (41) <sup>b</sup>	HF1	382 (29)
F2	209 (10)	HF2	317 (16)
D1	1140 (25)	HD1	859 (19)
D2	490 (11)	HD2	445 (10)

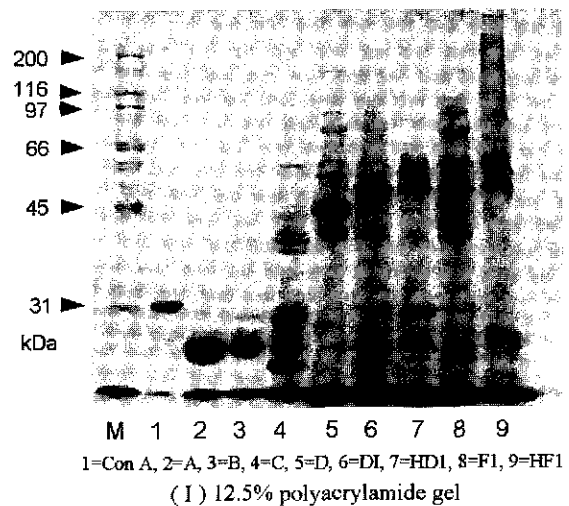
<sup>a</sup>F1 : Fresh pileus of *Lentinula edodes*, F2 : Fresh stalk of *Lentinula edodes*, D1 : Dried pileus of *Lentinula edodes*, D2 : Dried stalk of *Lentinula edodes*, H : Heating treatment (56°C, 30 min).

<sup>b</sup>( ) : Protein amount per gram of perfect dried sample.

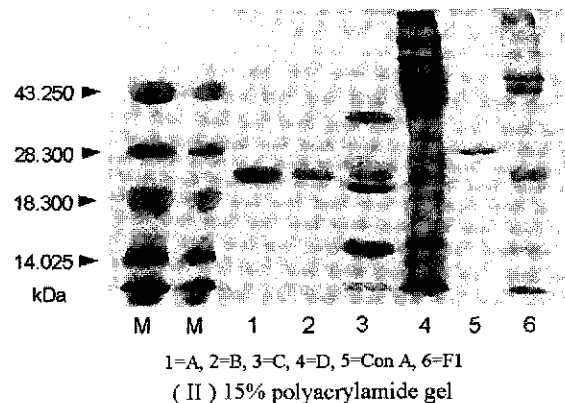


**Fig. 2.** The DEAE Sephadex A-50 chromatogram of crude lectine from *Lentinula edodes*. The column operation were carried out at the following conditions. The eluent was a linear gradient of NaCl increasing to 0.3 M NaCl. (flow rate: 49 ml/hr, volume: 3 ml/tube, temperature: 4°C, sample loaded: 146 mg). A : Fraction No. 1-27, B : Fraction No. 28-59, C : Fraction No. 60-87, D : Fraction No. 88-166.

로 농축하여 전기 영동을 하였으며, 그 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 일반적으로 잘 알려진 콩으로부터 분리된 렉틴인 Con A의 분자량이 31 kDa 부근인 것에 비해 group A, B는 31 kDa과 21.5 kDa 사이에 속하는 Con A 보다 낮은 분자량을 나타내었으며, 분자량을 더 자세히 확인하기 위하여 15% polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다(Fig. 3). Con A의 분자량은 28 kDa으로 나타났으며, Group A, B는 약 23 kDa 부근으로 추정할 수 있었다. 활성이 약한 group C는 Fig. 3에 나타난 것처럼 여러 단백질이 섞여있으며 활성을 가지는 23 kDa 부근의 band가 다른 band에 비해 약하다는 것을 알 수 있었다. 이것으로서 LEL(*Lentinula edodes* lectin)은 group A와 B이며, 특히 group A의 전기영동 밴드가 단일 한 것으로 보아 그곳에 집중되어 있음을 알 수 있다. 또한, 이들의 단백질 함량은 Table 3에



( I ) 12.5% polyacrylamide gel



( II ) 15% polyacrylamide gel

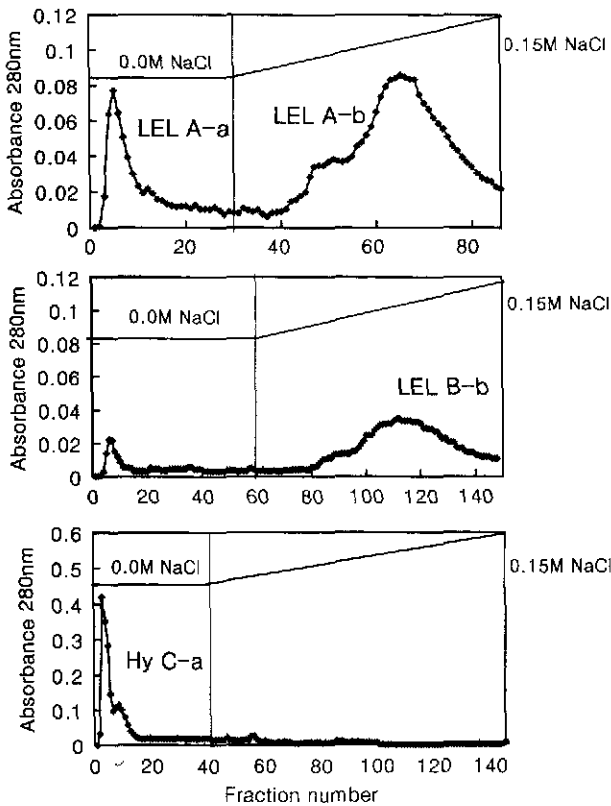
**Fig. 3.** SDS-polyacrylamide electrophoresis of the crude lectin purified by DEAE Sephadex A-50 column. M : Molecular mass (in kDa) marker proteins, Con A : Concanavalin A (lectin from jack bean), A-D : Concentrated samples (by Amicon pressure ultrafilter; cut off 10 kDa) of the fractions from DEAE Sephadex A-50, See Fig. 2, D1, HD1, F1, HF1 : See Fig. 1 (Crude lectin).

**Table 3.** BCA (Bicinchoninic acid) protein analysis of crude lectin purified by DEAE Sephadex A-50 column

Sample	Amount of protein ( $\mu\text{g}$ )
A	1,880
B	1,330
C	4,326
D	11,944

A : group A of fractions (No. 1-27) from DEAE Sephadex A-50, B : group B of fractions (No. 28-59) from DEAE Sephadex A-50, C : group C of fractions (No. 60-87) from DEAE Sephadex A-50, D : group D of fractions (No. 88-166) from DEAE Sephadex A-50.

나타난 바와 같으며, 조렉틴의 약 2%가 LEL로서 정제되었음을 알 수 있었다. Group A, B 그리고 C를 다시 Hydroxyapatite column을 이용하여 한번 더 정제를 실시하였다(Fig. 4). 이들을 LEL A-a, LEL A-b, LEL B-a, LEL B-b로 구분하여 전기영동으로 분자량을 검색한 결과는 Fig. 5에 나타내었다. LEL A-b의 경우 밴드의 명확성과 단백질의 집중된 양으로 한층 정제된 LEL임



**Fig. 4.** The hydroxyapatite chromatogram of the fractions from DEAE Sephadex A-50. The column operation were carried out at the following conditions. The eluent was a linear gradient of NaCl increasing to 0.15 M NaCl. (flow rate: 29 ml/hr, volume: 1 ml/tube, temperature: 4°C). LEL : lentinula edodes lectin, LEL A-a : Fraction No. 1-36, LEL A-b : Fraction No. 37-86, LEL B-b : Fraction No. 67-150, Hy C-a : Fraction No. 1-38, See Fig. 2 (group A, B, C).

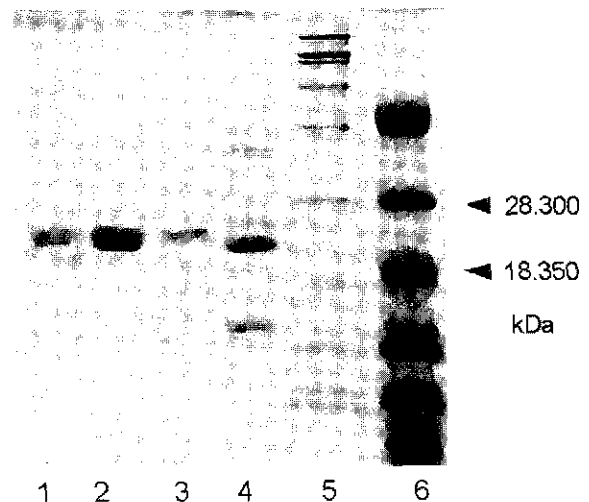
을 알 수 있었다.

**렉틴의 활성에 미치는 pH 및 온도의 영향**

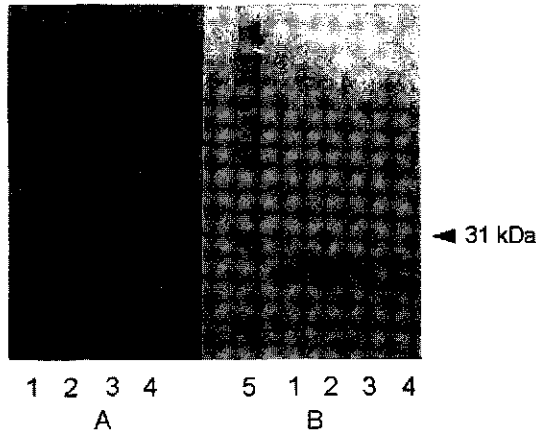
DEAE Sephadex A-50 column을 이용하여 분리한 분획중 활성을 지니는 group A와 B의 일부를 합하여 pH 및 온도의 영향을 살펴보았다. 온도를 변화시켜 활성을 검정한 결과 40°C에서부터 활성을 조금씩 잃어 50°C 이상에서는 활성이 나타나지 않았다. 이러한 결과로서 단백질 추출 2의 방법에 의해 분리된 조렉틴의 활성부분(23 kDa 부근)은 단백질 추출 1에 비하여 그 추출이 용이한 것으로 보여지기는 하나(Fig. 1), 추출 과정 중의 열처리에 의해 그 활성을 상실할 우려가 있음을 알 수 있다. 또한, pH의 영향을 살펴본 결과 산성부분인 2.6~5.6까지는 약간의 영향을 받으나, 알칼리영역으로 갈수록 안정된 활성을 나타내었다. 따라서, LEL(Lentinula edodes lectin)은 40°C 이하에서 그리고 산성보다는 알칼리성에서 더 안정함을 알 수 있었다.

**렉틴의 당 특이성**

당 특이성에 대한 실험의 결과는 galactose, fucose, mannose, glucosamine, lactose 및 N-acetyl-D-galactosamine에 의해 활성이 크게 저해되는 것으로 나타났다. Yun 등(1995)에 의하면 C-3와 C-4위치에 hydroxyl group이 같은 방향으로 있을 경우 저해를 나타낸다고 보고하였다. 또한 대부분의 보고된 바에 의하면 glucosamine, galactosamine이 lectin에 저해제 역할을 하는



**Fig. 5.** SDS-Polyacrylamide electrophoresis (15% polyacrylamide gel) of the fractions from hydroxyapatite column. 1=LEL A-a, 2=LEL A-b, 3=LEL B-b, 4=Hy C-a, 5=HM, 6=LM, HM : High molecular mass (in kDa) marker proteins, See Fig. 3, LM : Low molecular mass (in kDa) marker proteins, See Fig. 3, LEL A-a, LEL A-b, LEL B-b, Hy C-a : See Fig. 4, LEL : *Lentinula edodes* lectin.



**Fig. 6.** PAS stain for carbohydrate content of glycoprotein. 1 = LEL A-a, 2 = LEL A-b, 3 = LEL B-b, 4 = Hy C-a, 5 = HM, HM : High molecular mass (in kDa) marker proteins, See Fig. 3, LEL A-a, LEL A-b, LEL B-b, Hy C-a : See Fig. 4, LEL : *Lentinula edodes* lectin, A : Stain for carbohydrates, B : Stain for protein.

**Table 4.** Amount of carbohydrate of lectin from *Lentinula edodes*

Sample	Amount of protein ( $\mu\text{g}$ )	Amount of carbohydrate ( $\mu\text{g}$ )
LEL A-a	90	19
LEL A-b	240	5
LEL B-b	28	1

LEL (*Lentinula edodes* lectin) : Activity group of lectin purified by hydroxyapatite chromatography.

것으로 알려져 있다.

### 당 단백질

Lectin은 일반적으로 당 단백질로 알려져 왔다. 그래서 PAS(Periodic acid, Schiff's reagent)를 사용하여 당 단백질의 당을 확인하고, Phenol-Sulfuric acid법으로 당을 정량하였다. Fig. 6을 살펴보면 단백질 밴드와 일치하는 곳에 당의 밴드를 확인함으로써 당 단백질임을 알 수 있었다. 또한 정제된 LEL(LEL A-b)의 당 비율은 약 2%를 차지하고 있음을 알 수 있었다(Table 4).

위의 실험 결과들을 요약하면, 표고버섯으로부터 추출한 단백질은 균산 부분이 균병에 비해 2배 정도 많았으며, 그로부터 정제된 렉틴은 23 kDa으로 40°C 이하의 저온에서 그리고 알칼리성에서 안정성을 나타내었다. 그리고 galactose, fucose, mannose, glucosamine, lactose, N-acetyl-D-galactosamine과 같은 당에 특이성을 지니는 것으로 나타났다. 또한, 소량의 당을 포함하고 있는 당단백질이였다. 본 실험에서 밝혀진 결과는 이 렉틴이 고부가가치의 상품화가 될 수 있는 단계까지 앞으로의 연구의 좋은 기초자료가 되리라 사려된다.

### 적 요

렉틴은 T-cell 자극 분열효과 및 항종양효과 이외에도 당특이성에 의한 세포표면이나 용액내에 존재하는 당류의 확인 및 연구에 유용하게 쓰이고 있어 최근들어 특히 홍미의 대상이 되고 있다. 렉틴은 주로 식물을 대상으로 연구되어져 왔으며, 이러한 연구결과, 렉틴은 단백질성 물질이라는 공통점을 제외하고는 생화학적, 면역학적 성질이 매우 다양한 것으로 나타났다. 본 연구에서는 표고버섯을 부위별로 구분하여 그 화학적 조성분석과 단백질 분리를 실시하고, 렉틴을 정제하여 생리활성의 특성을 구명하였다. 표고버섯은 신선한 것일수록 단백질 추출이 용이하며, 균산이 균병에 비해 단백질 양이 2배 정도 많았다. 렉틴은 40°C 이하에서 그리고 산성보다는 알칼리성에 더 안정하였다. 당 특이성에 있어서는 galactose, fucose, glucosamine, lactose, N-acetyl-D-galactosamine에 특이성을 지니는 것으로 나타났으며, 분리한 렉틴은 당 단백질임을 알 수 있었다.

### 감사의 말씀

본 연구는 1996년도 학술진흥재단의 박사후 연수과정의 지원에 의해 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

### 참고문헌

- Boyd, W. C. and Shapleigh, E. 1954. Specific precipitating activity of plant agglutinins (Lectins). *Science* **119**: 419.
- Celis, J. E. 1994. Cell Biology (a Laboratory handbook) Volume 3. Pp. 332-338. Academic press.
- Chung, S. R., Choi, I. S. and Jeune, K. H. 1994. Studies on lectins from marine animal *Chlorostoma argyrostoma turbinatum*. *Kor. Pharm.* **25**(2): 121.
- \_\_\_\_\_ and Jeune-Chung, K. H. 1981. Isolation, purification and partial characterization of new lectins from Korean plant resources (I). *Kor. Biochem.* **14**(3): 199.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. *Anal. Chem.* **28**: 350.
- Jeune-Chung, K. H., Kim, M. K. and Chung, S. R., 1987. Studies on lectins from mushrooms, *Yakhak Hoeji* **31**(4): 213
- Lis, H. and Sharon, N. 1977. Lectins : Their chemistry and application to immunology in the antigens. Pp. 429-529. Sela, M. ed. Academic Press, New York.
- Ravindranath, M. H., Higa, H.H., Cooper, E. L. and Paulson, J. C. 1985. Purification and characterization of an O-acetylsialic acid specific lectin from marine crab. *J. Biol. Chem.* **260**: 8850-8856.
- Yoshida, M., Kato, S.-I., Oguri, S. and Nagata, Y. 1994. Purification and properties of lectins from a mushroom, *Pleurotus cornucopiae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**(3): 498-501.
- Yun, D. H., Park, E. J., Park, J. O., Lee, Y. H., Seo, J. K. and Ryu, S. H. 1995. Purification and characterization of a new galactoside specific lectin from *Trichosanthes kirilowii* root, *J. Biochem. Mol. Biol.* **28**(1): 6-11.