

벼 렉틴 유전자의 클로닝 및 대장균에서의 발현

홍성관 · 전상훈 · 김하형* · 공광훈#

중앙대학교 자연과학대학 화학과, *중앙대학교 약학대학

(Received May 23, 2002; Revised June 10, 2002)

Molecular Cloning and Expression of Rice Lectin in *Escherichia coli*

Sung-Gwan Hong, Sang-Hoon Jeon, Ha-Hyung Kim* and Kwang-Hoon Kong#

Department of Chemistry, College of Natural Science, Chung-Ang University, Seoul, 156-756, Korea

*College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul, 158-097 Korea

Abstract — The lectin gene from rice was amplified by the polymerase chain reaction. The amplified DNA was inserted into the expression vector pET26b and expressed it as a fusion protein with polyhistidine sequences in *Escherichia coli*. The recombinant protein was produced by induction with 0.4 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside at 37°C and purified by an immobilized metal affinity chromatography. The recombinant protein was found to have lectin activity by the hemagglutination inhibition assay. The hemagglutination activity of the recombinant protein was optimal at pH 4.0-7.0 and was dependent on Ca^{2+} and Mn^{2+} .

Keywords □ Lectin, rice, gene cloning, expression in *E. coli*

렉틴은 세포를 응집시키거나 다당류와 glycoconjugates를 침전시키며 탄수화물과 결합하는 단백질 또는 당단백질이다.^{1,2)} 렉틴은 포유동물에서 미생물에 이르기까지 대부분의 생물체에서 발견되며,³⁾ 각 생물체에서 매우 다양한 기능을 가지고 있다. Agglutinin과 phytohemagglutinin이라고 불리는 렉틴은 많은 식물에 분포되어 있으며, 그들은 적어도 legume lectins, chitin-binding lectins composed of hevein domains, type-2 ribosome-inactivating proteins, monocot mannose-binding lectins, amaranth family, Cucurbitaceae phloem lectins, jacalin-related lectins의 7종류로 분류하고 있다.⁴⁾

렉틴의 기능으로는 세포와 세포, 세포와 당류를 포함한 분자들 사이의 인식으로 생리작용을 조절하는데 관여하며, 생체 방어에 주요한 작용을 한다.⁵⁾ 식물에서 렉틴의 생리적 기능은 아직 밝혀지지 않았지만, 당류의 이동, 세포 성장조절과 세포외 기질 성분으로서의 기능과 특이 혈액형과의 작용, lymphocyte 증식의 자극, 암세포 응집 등에 관여하는 것으로 알려져 있다.⁵⁻⁷⁾ 특히 렉틴이 세포표면의 차이에 의해 암세포와 정상세포를 구별할 수 있다고 발표된 이후 암연구 분야에서 많은 관심의 초

점이 되어 왔으며, 최근에는 렉틴이 암세포 인식, 세포부착 및 세포독성, apoptosis 및 세포 신호전달에 관여한다는 많은 보고가 있으며, 또한 이러한 기능과 특징을 이용하여 암의 진단 및 치료에 사용하기 위한 많은 연구가 보고되고 있다.⁸⁾ *Abrus precatorius* abrin, *Ricinus communis* ricin-A, *Visum album* agglutinin과 같은 식물 렉틴들은 단백질 합성을 저해하면서 강력한 세포독성을 가진다.⁹⁾ 지금까지 많은 식물로부터 100종 이상의 렉틴을 동정하였으며, 이 들 중 많은 렉틴들이 leguminosae family에서 분리되었다.¹⁰⁾ *Legume lectin* family는 상당히 유사한 일차구조를 갖는 반면에 탄수화물 결합에서는 다양한 특이성을 나타내고 있다.^{11,12)}

본 연구에서는 벼의 게놈 서열분석 결과로부터 식물 렉틴의 유전자와 상동성이 높은 유전자를 동정하였으며, *Oryza sativa*의 cDNA library로부터 polymerase chain reaction법을 이용하여 이 유전자를 클로닝하였다. 또한 재조합 단백질을 대량으로 생산하기 위해, 클로닝한 벼 렉틴의 구조 유전자를 이용하여 대장균 발현계를 작성하였으며, 발현된 재조합 효소의 정제과정과 특성을 조사하였다.

실험재료 및 방법

벼 cDNA library의 작성 - 발아 후 약 일주일이 경과된 벼의

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5205 (팩스) 02-825-4736

뿌리(품종: Yamahousi)와 배양한지 4일째의 벼 세포로부터 *Oryza sativa* subsp. japonica의 cDNA library를 각각 작성하였다. Uni-ZAP XR(Stratagene, EcoR I과 *Xho* I으로 절단한 lambda ZAP II vector) 벡터를 이용하여 작성하였으며, 증폭된 cDNA는 벡터의 *EcoRI*과 *Xho* I의 클로닝 자리에 삽입하였다. 생성된 파지는 10^6 plaque/ μ l 이었으며, 클로닝을 위한 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하기 위한 phage DNA는 phage 현탁액 50 μ l에 멸균수 450 μ l를 가하여 섞은 500 μ l를 95°C에서 10분간 7열하여 추출하였으며, 사용할 때까지 4°C에 보관하였다.

벼 렉틴 유전자의 클로닝 - 일차배열의 상동성 조사로부터 렉틴 발현 가능성이 시사된 *Oryza sativa* subsp. japonica cultivar javanica lectin gene의 염기 서열을 기준으로 합성한 oligonucleotide primer(primer N: 5'-GGAATTCATATGGCGCAA CGTGC GGGAAGCAGAACGAC-3', primer C: 5'-ATCCGC-TCGAGCACAAGCTCAGCCACTGACTCGAT-3')를 DNA thermal cycler(Bio-Rad, Gene cycler)를 이용하여, 렉틴 유전자를 증폭하였다. 이 때 발현벡터 pET26b 벡터를 사용하기 위해 5' 쪽의 primer에는 *Nde* I의 제한효소 자리를, 3' 쪽의 primer에는 *Xho* I의 제한효소 자리를 디자인하였다. Polymerase chain reaction (PCR) 반응 혼합물의 조성은 phage DNA 20 μ l, primer 각 0.5 μ l씩, 25 mM MgCl₂ 3 μ l, 2 mM dNTP 5 μ l, 10×PCR buffer 5 μ l KOD polymerase(Toyobo) 1 μ l, 멸균수 15 μ l 이며, PCR의 반응 조건은 94°C 1분, 50°C 1분, 72°C 3분을 1 cycle로 하여 30 cycles 까지 증폭하였다. 반응이 끝난 후 1.0% agarose gel 전기영동에 의해 확인하고 분리하였다. 겔에서 분리한 유전자는 ULTRAFREE®-MC(Millipore)로 정제하였다.

발현벡터의 작성과 재조합 벼 렉틴의 발현 - 정제된 벼 렉틴 유전자와 발현벡터 pET26b를 제한효소 *Nde* I(Takara)과 *Xho* I(Takara)으로 37°C에서 1시간 정도 반응시켜 절단한 다음, ligase(Takara)를 이용하여 재조합 렉틴 발현플라스미드를 작성하였다. 그 결과 생성된 pET-rLectin을 대장균 BL21에 형질전환하였다. pET-rLectin으로 형질전환시킨 대장균을 kanamycin(Sigma) 30 μ g/ml이 포함된 LB 배지에서 37°C로 약 2-3시간 정도 배양하였다. OD₆₀₀이 0.6이 되었을 때 발현유도체인 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside(Promega, IPTG)를 투여하여 8시간 더 배양한 후, 10,000 g로 10분동안 원심분리하여 집균하였다.

재조합 벼 렉틴의 정제 - pET-rLectin으로 형질전환시킨 대장균을 대량 배양하여 얻은 균체는 10,000 g에서 15분 동안 원심분리하여 집균하였고, 정제 전까지는 -20°C에서 보관하였다. 불용성 분획에 포함된 단백질을 정제하기 위해 2,000 g에서 10분 동안 원심분리기를 이용하여 1차 정제한 후, 0.3 mg/ml의 lysozyme이 포함된 20 mM Tris-HCl(pH7.5) 완충용액으로 녹인 후, 겔을 위에서 1시간정도 방치하였다. 1M MgCl₂와 DNase I (7 μ g/ml)을 첨가한 후, 초음파 파쇄기(Sonics & Materials INC.)

를 이용하여 균체를 파괴하였다. 이것을 8,000 g에서 10분 동안 원심분리하여 불용성 분획을 얻은 후, 1% Triton X-100이 포함된 Tris-HCl(pH7.5) 완충용액 1 L로 실온에서 1시간동안 2회 정도 씻은 후, 8,000 g에서 10분 동안 원심분리한 후, 불용성 분획은 혼탁 시키기 전까지 -20°C에서 보관하였다. 불용성 분획을 6M urea와 10 mM imidazole이 포함된 20 mM Tris-HCl(pH7.5) 완충용액으로 혼탁 시킨 후, 1시간동안 실온에서 저어주었다. 그리고, 1 mM CaCl₂와 MnCl₂가 포함된 20 mM Tris-HCl(pH7.5) 완충용액으로 투석하였다. 투석 시, 생성된 침전물질은 8,000 g에서 15분 동안 원심분리하여 제거하였다. 이렇게 얻어진 재조합 단백질 용액을 20 mM Tris-HCl(pH7.5) 완충용액으로 평형 시킨 immobilized metal affinity 컬럼(Boehringer Mannheim)에 흡착시켰다. 컬럼내의 불필요한 단백질을 제거하기 위해 20 mM Tris-HCl(pH7.5) 완충용액으로 충분히 세척한 다음, 10 mM imidazole을 포함하고 있는 20 mM Tris-HCl(pH7.5) 완충용액으로 용출시켰다. 용출된 분획 중 렉틴 활성을 갖는 분획만을 모아서 20 mM Tris-HCl(pH7.5) 완충용액으로 투석하였다. 이렇게 정제된 효소들의 순수도를 SDS-PAGE에 의해 확인하였다.

활성도 측정과 단백질 정량 - 렉틴의 hemagglutination 활성은 Adar과 Sharon의 방법¹³⁾을 변형한 microtiter plate에서의 serial dilution법을 사용하여 측정하였다. 활성 측정은 정제 과정을 통해 얻은 렉틴 25 μ l 150 mM NaCl, 50mM CaCl₂와 혈액(사람의 B형) 25 μ l를 실온에서 1시간정도 반응시킨 후, 혈액의 비응고 과정을 관찰함으로써 확인하였다. Tris-HCl(pH 7.5) 완충용액으로 효소를 2배씩 희석시킴으로서 효소의 최소 혈액응고 저해 농도를 측정하였다. 활성의 1 unit는 응고를 보이는 렉틴의 최소한의 농도로 정의하였다. 단백질 농도는 Bradford 방법¹⁴⁾에 의해 측정하였으며, 정량 시약은 Bio-Rad 제품을 사용하였다. γ -Globulin을 표준단백질로 사용하여 595 nm에서의 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다.

생화학적 특성 연구 - 렉틴의 탄수화물 결합 특이성은 다양한 당과 당단백질에 대한 hemagglutination 저해 효과를 측정하여 결정하였다. 렉틴에 대한 양이온의 효과는 CaCl₂와 MnCl₂를 이용하여 조사하였다. 렉틴을 150 mM NaCl과 다양한 농도의 양이온 용액을 포함하는 20 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충용액에서 4°C에서 24시간 방치한 다음, 150 mM NaCl을 포함하는 20 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충용액으로 투석하였다. 투석한 렉틴 용액에 대해 양이온이 없을 때와 양이온을 넣고서 각각 hemagglutination 활성을 측정하였다. Hemagglutination 활성에 대한 재조합 벼 렉틴에 대한 pH의 효과는 다음의 완충용액들(20 mM)을 사용하여 결정하였다: sodium acetate buffer, pH 4.0~6.0; sodium phosphate buffer and potassium phosphate buffer, pH 6.0~8.0; Tris-HCl buffer, pH 8.0~10.0; glycine-NaOH buffer, pH 8.0~10.0. 각각의 pH에서 표준 활성 측정 조건으로 활성을 측정

하였다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) – 12.5% SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 Laemmli의 방법¹⁵⁾에 따라 전기영동하였으며, 영동이 끝난 겔은 coomassie brilliant blue R-250(Sigma)으로 염색하였다. 이 때 분자량 표준 단백질로 phosphorylase B(92.5 kDa), bovine serum albumin(66.2 kDa), ovalbumin(45.0 kDa), soybean trypsin inhibitor(21.5 kDa), lysozyme(14.4 kDa)을 포함하고 있는 SDS molecular weight standard markers(Bio-Rad, USA)를 사용하였다.

실험결과 및 고찰

벼 렉틴 유전자의 클로닝과 대장균 발현벡터의 작성

벼 suspension 세포의 cDNA library를 주형으로 벼 렉틴 유전자를 PCR로 증폭했을 때 아가로스 겔 전기영동에서 크기가 약 600 뉴클레오티드 정도의 DNA 밴드를 얻을 수 있었다. 그러나 벼 뿌리세포의 cDNA library를 PCR 반응의 주형으로 하였을 때는 거의 증폭이 되지 않았다. 따라서 렉틴 유전자는 벼 suspension 세포의 cDNA library를 주형으로 PCR법으로 클로

닝하였으며, 클로닝한 벼 렉틴 유전자의 대장균 발현체는 다음과 같이 작성하였다. PCR로 증폭한 벼 렉틴의 구조 유전자와 T7 promoter를 가진 대장균 발현벡터 pET26b를 제한효소 *NdeI*과 *XhoI*으로 37°C에서 12시간 정도 반응시켜 절단한 다음, 아가로스 겔 전기영동을 통하여 분리하였다. 분리된 벡터와 구조 유전자를 T4 DNA ligase를 이용하여 연결시켜 재조합 렉틴의 발현 plasmid를 작성하였다. 그 결과 생성된 pET-rLectin을 대장균 XL-1 blue로 형질전환하였다. 형질전환된 XL-1 blue의 배양된 균체로부터 pET-rLectin 플라스미드를 얻을 수 있었다. 이 때 얻어진 pET-rLectin은 아가로스 겔 전기영동과 DNA 서열분석을 하여 서열을 확인하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, 분리한 벼 렉틴 유전자는 GCG의 개시코돈과 TAG의 종결코돈을 갖는 603 뉴클레오티드로 구성된 완전한 coding region을 포함하고 있었다. 벼 렉틴의 추론된 아미노산 서열과 다른 종 렉틴의 일차 배열에 대한 유사성을 조사해 본 결과, 콩과식물 렉틴과는 40~60%의 상동성을 보이는 반면에 동물 렉틴과는 거의 상동성이 없었다.

재조합 벼 렉틴의 대장균 대량 발현 및 정제

작성한 발현벡터 pET-rLectin의 대량발현 조건을 설정하기 위

1	GCG CAG ACG TGC GGG AAG CAG AAC GAC GGC ATG ATC TGC CCG CAC AAC CTG TGC TGC AGC	60
	A Q T C G K Q N D G M I C P H N L C C S	
61	CAG TTC GGG TAC TGC GGC CTC GGC CGC GAC TAC TGC GGC ACG GGG TGC TAG AGC GCG GCC	120
	Q F G Y C G L G R D Y C G T G C Q S G A	
121	TGC TGC TCC AGC CAG CGC TGC GGC AGC CAG GGC GGC GGC GCC ACC TGC TCC AAC AAC CAG	180
	C C S S Q R C G S Q G G G A T C S N N Q	
181	TGC TGC AGC CAG TAC GGC TAC TGC GGC TTC GGC TCC GAG TAC TGC GGC TCC GGG TGC CAG	240
	C C S Q Y G Y C G F G S E Y C G S G C Q	
241	AAC GGG CCG TGC CGC GCC GAC ATC AAG TGC GGC CGC AAC GCC AAC GGC GAG CTC TGC CCC	300
	N G P C R A D I K C G R N A N G E L C P	
301	AAC AAC ATG TGC TGC AGC CAG TGG GGA TAC TGC GGC CTC GGC AGC GAG TTC TGC GGC AAC	360
	N N M C C S Q W G Y C G L G S E F C G N	
361	GGA TGC CAG AGC GGC GCT TGC TGC CCG GAG AAG CGG TGC GGC AAG CAG GCC GGC GGG GAG	420
	G C Q S G A C C P E K R C G K Q A G G D	
421	AAG TGC CCC AAC AAC TTC TGC TGC AGT GCC GGC GGC TAC TGC GGC CTC GGC GGC AAC TAT	480
	K C P N N F C C S A G G Y C G L G G N Y	
481	TGC GGC TCC GGC TGC CAG AGC GGC GGC TGC TAC AAG GGT GGC GAC GGC ATG GCG GCC ATC	540
	C G S G C Q S G G C Y K G G D G M A A I	
541	CTG GCT AAC AAC CAG AGC GTC TCT TTC GAA GGG ATC ATC GAG TCA GTC GCT GAG CTT GTG	600
	L A N N Q S V S F E G I I E S V A P L V	
601	TAG	
	STOP	

Fig. 1 – The nucleotide sequence (GeneBank accession No. AF140679) and derived amino acid sequence of *Oryza sativa* lectin cDNA.

해서 대장균 BL21에 형질전환 시킨 후, kanamycin이 포함된 LB 배지에서 약 2-3시간 정도 37°C에서 배양하였다. 배양액의 OD₆₀₀이 (0.7~0.8) 되었을 때 단백질 유도제인 IPTG를 최종농도 0.4 mM이 되도록 투여하여 단백질이 가장 많이 유도되도록 하였다. 발현 벡터 pET-rLectin에 의해 발현된 재조합 벼 렉틴 단백질의 분자량은 SDS-PAGE에서 22 kDa 위치에서 확인되었다. IPTG 투여 후의 배양시간을 설정하기 위하여 2시간, 4시간, 8시간, 10시간, 12시간, 24시간 배양한 후 각 시간에 따른 재조합 벼 렉틴의 발성과 발현 양을 조사해 보았다. 그 결과 10시간까지는 발현 양이 증가하였으나, 12시간동안 배양하였을 때에는 활성이나 발현 양이 급격히 감소하였으며 10시간 배양시보다 활성이 약 50% 정도 낮아지는 결과를 나타내었다. 따라서 재조합 벼 렉틴의 대장균에서의 최적 발현 조건은 배양액의 OD₆₀₀이 0.7~0.8 정도 되었을 때 단백질 유도제인 0.4 mM IPTG를 투여 후, 10시간 배양하는 것이 가장 최적이었다.

재조합 벼 렉틴의 정제

용합 단백질은 대장균 내에서 단백질이 유도되는 과정에서 불활성화 상태인 불활성체(inclusion body)로 형성되는 경우가 많이 있는데, 재조합 벼 렉틴 역시 상당량이 불용성 분획에서 회수되었다. 집균한 균체를 lysozyme과 초음파 파쇄기로 세포막을 파괴한 후, 원심분리에 의해 분리하였다. 그 결과 발현된 재조합 벼 렉틴의 일부분만이 가용성 분획(0.1 mg/L)에 남아 있을 뿐, 대부분은 불활성체의 형태로 불용성 분획에 남아있었다. 불용성 분획에 있는 재조합 벼 렉틴은 전 불용성 단백질의 약 50% 이상을 차지할 정도로 상당히 정제되어 있었다(Fig. 2의 lane 3). *Erythrina corallodendron* lectin에 대한 대장균 발현 연구에서도 유사한 결과를 나타내었다.¹⁶⁾ 이러한 불용성 분획을 가용화하기 위하여 실험 방법이 나타낸 바와 같이 6M urea 로 혼탁 시킨 후, 1시간동안 실온에서 방치한 후, 1 mM CaCl₂와 MnCl₂이 포함된 20 mM Tris-HCl(pH7.5) 용액으로 투석하여 urea를 제거하였다. 이러한 refolding 단계로부터 얻어진 가용화 분획은 히스티딘 분자가 Zn²⁺ 또는 Ni²⁺ 이온에 흡착되는 His-bind resin 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 배양액 1 L당 1 mg의 정제된 효소를 얻을 수 있었으며, SDS-PAGE상에서 분자량은 22 kDa으로 확인되었다(Fig. 2의 lane 2). 한편 지금까지 알려진 모든 legume 렉틴의 분자량은 약 30 kDa으로, 250개의 아미노산으로 이루어져 있다.⁴⁾ 반면에 아열대 낙엽수인 *Erythrina corallodendron* 렉틴과 토마토 렉틴은 각각 56 kDa과 70 kDa의 비교적 큰 분자량을 가진다고 보고되었다.^{4,16)}

재조합 벼 렉틴의 생화학적 특성

Adar과 Sharon의 방법¹³⁾을 변형한 microtiter plate에서의 serial dilution법을 사용하여 렉틴의 hemagglutination 활성은 측

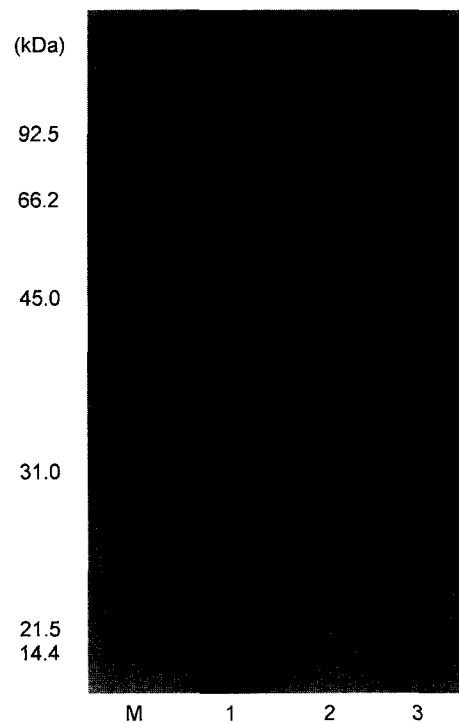


Fig. 2 – SDS-PAGE analysis of the recombinant rice lectin produced by *E. coli*. Lane M, molecular weight standard markers (Bio-Rad); lane 1, total protein from *E. coli* cell lysates of pET-rLectin vector transformants; lane 2, the purified protein; lane 3, the precipitated protein.

정하였다. 그 결과, 세포 추출물에서는 128 units/mg의 비활성(specific activity)을 나타낸 반면에 정제된 재조합 벼 렉틴에서는 1024 units/mg의 비활성을 나타내었다. 재조합 벼 렉틴의 당 결합특이성은 대표적인 단당류, 이당류, 다당류와 당단백질에 대한 저해반응을 이용하여 조사하였다. 그 결과 20 mM β -D(+)-glucose, sucrose, D(+)-galactose, D(+)-mannose, L(-)-fucose, α -lactose, β -lactose, D-lactose, methyl- α -D-glucopyranoside, maltose, D(+)-raffinose, D(+)-cellobiose, 10 mM *N*-acetylneuraminic acid, fetuin, asialo fetuin, tyroglobulin, bovine submaxillary mucin, ribonuclease B, ribonuclease A를 반응시켜 보았으나 재조합 벼 렉틴에 대한 결합력이 뚜렷이 나타나지 않았다.

재조합 벼 렉틴의 hemagglutination 활성에 대한 pH 의존성을 조사해 보았다. 재조합 벼 렉틴의 최적 활성은 pH 4-7에서 나타났으며, pH 8에서는 활성이 50%이상 감소하였고 pH 11에서는 거의 모든 활성을 잃었다. Silva-Lucca 등은 *Artocarpus integrifolia* 렉틴의 열역학적, 구조적 연구로부터 높은 pH에서 활성을 잃는 것은 단백질의 2, 3차 구조의 변화에 기인한 변성 때문이라고 보고하고 있다.¹⁷⁾

재조합 벼 렉틴의 hemagglutination 활성도 금속이온이 없을 때는 나타나지 않았으며, Ca²⁺이나 Mn²⁺를 첨가한 후 활성을

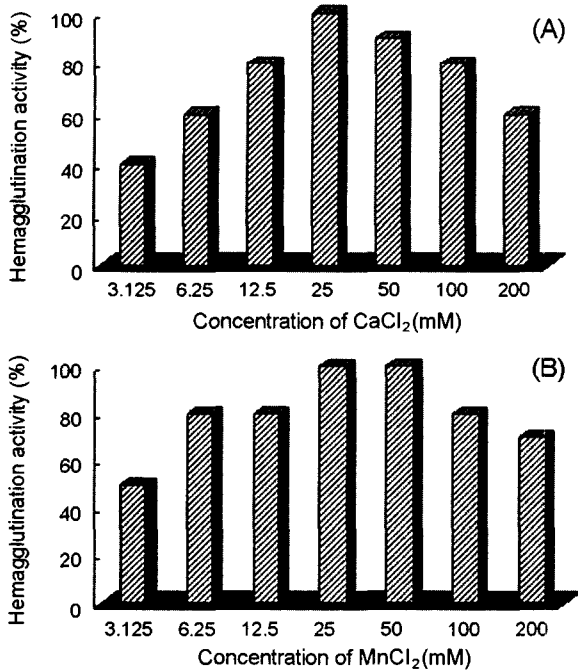


Fig. 3 – Effects of metal ions on the hemagglutination activity of the recombinant rice lectin. (A) Effect of Ca²⁺, (B) Effect of Mn²⁺.

나타내었다. 칼슘이온의 최적 농도를 측정하기 위해 CaCl₂의 농도를 3 mM에서 200 mM까지 변화시키면서 재조합 벼 렉틴의 활성을 측정해 보았다. 그 결과 Fig. 3A에서 나타난 바와 같이 25 mM CaCl₂에서 가장 높은 활성을 보였다. 반면에 MnCl₂에 대한 재조합 벼 렉틴의 최적 농도는 25 mM-50 mM을 나타내었다(Fig. 3B). 이러한 결과로부터 재조합 벼 렉틴의 hemagglutination 활성은 대부분의 렉틴과 마찬가지로 가역적으로 금속의 제거에 의해 저하되며, 2가 금속 양이온의 첨가에 의해 완전한 활성을 갖는다는 사실을 알 수 있었다. 모든 legume 렉틴들은 렉틴의 탄수화물 결합 활성에 필수적인 Mn²⁺와 Ca²⁺를 보조인자로 가지고 있다.⁴⁾ 반면에 열대 해면동물인 *Genus aplysina lectin*에서는 Ca²⁺이나 Mg²⁺ 이온의 첨가에 의해 hemagglutination 활성을 나타내었다.¹⁸⁾

결 론

본 연구에서는 *Oryza sativa* cDNA library로부터 polymerase chain reaction 법을 이용하여 렉틴의 구조유전자를 클로닝한 후, 발현 벡터 pET26b에 삽입시켜 대장균에서 효과적으로 발현시켰으며, refolding 과정과 metal binding affinity 크로마토그래피를 이용하여 간단한 정제법을 확립하였다. 재조합 단백질은 hemagglutination 활성을 나타내었으며, 최적 pH는 4-7 이었다. 재조합 벼 렉틴의 활성은 25 mM CaCl₂ 또는 25 mM-50 mM

MnCl₂를 첨가하였을 때 가장 높았다. 이러한 재조합 벼 렉틴에 대한 대장균 발현계는 부위특이적 변이법과 X-선 결정 구조 해석에 의한 당 인식 기구의 해명에 중요한 수단으로 사용될 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2000-000-00131-0) 지원으로 수행되었음.

문 헌

- 1) Elgavis, S. and Shanan, B. : Lectin-carbohydrate interactions; different folds, common recognition principles. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 462 (1997).
- 2) Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. and Sharon, N. : What should be called a lectin? *Nature*, **285**, 66 (1980).
- 3) Gabius, H. J. : Animal lectins. *Eur. J. Biochem.*, **243**, 543 (1997).
- 4) Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Barre, A. and Rouge, P.: Plants lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **17**, 575 (1998).
- 5) Peumans W. J., and Van Damme E. J. : The role of lectins in plant defence. *Histochem. J.*, **27**, 253 (1995).
- 6) Sharon N. : Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *Tends Biochem. Sci.*, **18**, 221 (1993).
- 7) Sharon N., and Lis H. : A century of lectin research (1888-1988). *Trends Biochem. Sci.*, **12**, 488 (1987).
- 8) Van Damme, E. J., Leuven, F. V. and Peumans W. J.: Isolation, characterization and molecular cloning of the bark lectins from *Maackia amurensis*. *Glycoconjugate J.*, **14**, 449 (1997).
- 9) Lord J. M., Hartley M. R., and Roberts L. M. : Ribosome inactivating proteins of plants. *Semin. Cell Biol.*, **2**, 15 (1991).
- 10) Rüdiger H. : Plant lectins more than just tools for glycoscientists; occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta. Anat. (Basel)*, **161**, 130 (1998).
- 11) Rini J. M. : Lectin structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomole. Struct.*, **24**, 551 (1995).
- 12) Weis W. I. : Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 441 (1996).
- 13) Adar, R. and Sharon, N. : Mutational studies of the amino acid residues in the combining site of *Erythrina corallodendron lectin*. *Eur. J. Biochem.*, **239**, 668 (1996).
- 14) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).

- 15) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 (1970).
- 16) Arango, R., Adar, R., Rozenblatt, S. and Sharon, N. : Expression of Erythrina corallodendron lectin in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 205, 575 (1992).
- 17) Silva-Lucca, R. A., Tabak, M., Nascimento, O. R., Roque-Barreira, M. C. and Beltramini, L. M. : Structural and thermodynamic studies of KM⁺, a D-mannose binding lectin from *Artocarpus integrifolia* seeds. *Biophys. Chem.*, **79**, 81 (1999).
- 18) Miarons, P. B. and Fresno, M. : Lectins from tropical sponges: Purification and characterization of lectins from *Genus aphysina*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 29283 (2000).