

## *Maackia fauriei* 유래 렉틴에 대한 IgY 항체의 생성 및 분리

정영윤 · 정의차 · 이현정 · 김하형<sup>#</sup>

중앙대학교 약학대학

(Received November 3, 2004; Revised December 4, 2004)

### Production and Isolation of IgY Antibody Raised Against a Lectin Obtained from *Maackia fauriei*

Young Yun Chung, Eui Cha Jung, Hyun Jung Lee and HaHyung Kim<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

**Abstract** — Immunoglobulin Y (IgY) obtained from chicken as the immunization host brings several advantages to antibody production, such as improved yield, lower cost, longer stability, and higher specificity than mammalian immunoglobulin. In the present study, we attempted to produce IgY against a sialic acid-binding lectin, *Maackia fauriei* agglutinin (MFA), from egg yolk of white Leghorn hens. For the isolation of IgY from egg yolk, we applied a water dilution method. The weekly yield of IgY was determined by enzyme-linked immunosorbent assay, with a final yield of anti-MFA IgY from total IgY of approximately 1%. The yielded IgY were used to prepare IgY-affinity column conjugated with CNBr-activated Sepharose 4B, which resulted in the lectin being successfully purified in a single step from *Maackia fauriei*. This purified lectin exhibited the same hemagglutination activity as lectin purified using conventional purification methods.

**Keywords** □ IgY, lectin, *Maackia fauriei*, production, isolation

렉틴(lectin)은 단당 혹은 올리고당과 특이적으로 결합하는 탄수화물 결합 단백질의 총칭으로 주로 식물에서 발견되고 있으나, 척추동물, 미생물, 바이러스 등 다양한 유래에서도 발견되는데, 적혈구를 응집시켜 침강시키는 작용이 잘 알려져 있으며, 혈액형을 분류하기도 하고, 최근에는 암세포를 특이적으로 응집시키는 기능이 밝혀지는 등 다양한 기능을 갖고 있다.<sup>1-4)</sup> 렉틴이 결합할 수 있는 특정 당으로는 생체를 구성하고 있는 중요 당 성분인 D-galactose, D-mannose, N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine, L-fucose, N-acetylneuraminic acid와 N-glycolylneuraminic acid와 같은 시알산(sialic acid) 유도체들을 들 수 있다. 이 중에서도 올리고당의 비환원 말단에서 기능발현에 가장 중요한 역할을 하고 있고, 질병시 그 비율의 극적인 변화가 보고되고 있는 시알산 유도체를 인식하는 렉틴은 현재까지 보고된 많은 렉틴 중에서도 그 희소성이 대단히 높으며, 암을 포함한 각종 질병관련 연구와 연계할 수 있는 좋은 재료가 될 수

있다. 본 연구실에서는 최근 제주도 특산식물인 솔비나무의 줄기로부터 시알산만을 선택적으로 인식하는 렉틴 MFA(*Maackia fauriei* agglutinin)를 처음으로 분리, 정제하고 그 특성을 보고하였다.<sup>5)</sup>

한편, 항원과 특이적으로 결합하는 면역글로부린은 주로 생쥐, 토끼, 양 등에서 얻어진 항체가 이용하고 있으나, 최근에는 항체의 다량 획득이 가능한 조류의 난황(egg yolk)이 좋은 동물모델로 알려지기 시작하였다.<sup>6,7)</sup> IgY는 포유류 IgG와 구조적으로는 유사하나,<sup>8)</sup> 분자량이 더 크며(180 kDa), 보체, protein A와의 결합력이 없는 것으로 알려져 있다.<sup>9,10)</sup> 또한, 조류의 난황에는 약 100~150 mg 정도의 IgY를 함유하고 있으며,<sup>11)</sup> 항원에 대해 생쥐 유래 항체에 비해 보다 큰 친화력과 선택성을 갖는 것으로 알려져 있다.<sup>12,13)</sup>

본 논문에서는, 이미 보고한 바 있는 단백질 모델 항원에 대한 IgY 항체 생성 및 분리의 최적 실험방법<sup>14)</sup>을 적용하여, 본 연구실에서 솔비나무로부터 분리한 시알산 인식 렉틴 MFA<sup>5)</sup>와 결합하는 anti-MFA IgY 항체의 생성 및 그 분리를 시도하였다. 즉, 렉틴 MFA를 항원으로 한 IgY의 생성을 시도하고 난황으로부터 water dilution법<sup>14,15)</sup>과 친화성 컬럼(affinity column)에 의해

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-820-5612 (팩스) 02-823-5612  
(E-mail) hahyung@cau.ac.kr

anti-MFA IgY를 분리하고 항원에 대한 결합력을 확인하였으며 그 항체의 응용성을 검토하였다.

### 실험 방법

#### 실험재료

White Leghorn hen은 독일 Lohmann사에서 입수하였다. Peroxidase-labeled anti-chicken IgG(토끼유래), Freund's complete adjuvant, Freund's incomplete adjuvant, peroxidase type VI-A는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였으며, CNBr-activated Sepharose 4B는 Pharmacia로부터 구입하였다. 그 외 분석용 시약은 모두 특급을 사용하였다.

#### MFA의 분리

항원으로 사용한 렉틴 MFA는 이미 보고한 논문에서 제시한 방법<sup>5)</sup>에 따라 분리 정제하였다. 순도는 Laemmli법<sup>16)</sup>에 따른 12%의 polyacrylamide 겔을 이용하여 전기영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)을 실시하였으며, 단백질 정량은 BSA를 표준물질로 하여 Bradford법<sup>17)</sup>에 의해 실시하였다.

#### 면역방법

실험동물에 대한 면역방법은 이미 보고한 논문에서 나타난 방법<sup>14)</sup>에 따라 실시하였다. 즉, 항원 MFA 100 µg을 10 mM phosphate buffer(pH 7.4), 0.15 M NaCl(PBS) 70 µl에 용해하고 그 9배 용량에 해당하는 Freund's complete adjuvant와 혼합 후 emulsion 상태를 확인하고, 그 중 560 µl(80 µg)를 비교적 건강상태가 양호하고 규칙적인 산란을 하는 White Leghorn hen의 가슴부위 4~5군데에 피하 주사하였다. 1차 면역 후 12일째에 Freund's complete adjuvant 대신에 Freund's incomplete adjuvant를 이용하여 동일한 방법으로 2차 면역을 실시하였다.

#### 난황 및 IgY의 분리

1차 면역 후 6주 동안 얻은 달걀로부터 난황을 얻기 위하여 난 껍질을 조심스럽게 깨고 증류수로 지질 등을 제거 후 종이타월 위에 깔려 흰자위를 최대한 제거하였다. 그리고 난황의 막에 23 게이지 주사기로 구멍을 뚫어 난황만을 취하여 실험에 이용하였다. 하나의 난으로 부터 약 10~12 ml의 난황을 얻을 수 있었으며, IgY의 분리에는 water dilution법을 적용하였고, 그 상세한 방법은 이미 보고한 논문의 실험방법<sup>14)</sup>에 나타났다.

#### Anti-MFA IgY 생성확인

면역 후 1~6주간 water dilution법에 의해 얻어진 water soluble fraction(WSF)을 시료로 하여 anti-MFA IgY의 생성을 enzyme-

linked immunosorbent assay(ELISA)법에 의해 확인하였다. 렉틴 MFA(1 mg/ml)을 microplate well에 코팅하고 37°C에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 10배 희석한 WSF 50 µl을 well에 코팅하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 aspiration으로 제거하고, 0.1% Tween 20을 포함하는 PBS(PBST)로 3회 세척하였다. 그리고 PBS에 용해시킨 1% BSA 100 µl를 가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 aspiration으로 제거하고, PBST로 3회 세척하였다. 여기에 peroxidase-labeled anti-chicken IgG를 PBS로 30,000배 희석하여 가한 뒤 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 aspiration으로 제거하고, PBST로 3회 세척하였다. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) 55 mg을 PBS 100 ml에 녹인 용액에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 µl를 넣고 각 well에 100 µl씩 넣은 뒤 microplate reader를 이용하여 415 nm에서 흡광도 값을 측정하고 10분 후 다시 측정하여 얻어지는 상대값을 구하여 측정오차를 줄였다.

#### Anti-MFA IgY의 분리

Anti-MFA IgY의 분리 시에는 4주 째에 얻어진 난황으로부터 WSF를 얻고, 이를 PBS로 투석후 시료로 사용하였다. 제조사가 제시한 방법에 따라 렉틴 MFA를 CNBr-activated Sepharose 4B에 결합 시킨 MFA 친화성 겔 4 ml를 컬럼에 충전하고 PBS로 세척하여 미리 평형화한 후 WSF 2 ml를 컬럼에 흘리고 동일 완충액으로 유출시켜 1 ml씩 분취하면서 280 nm에서 흡광도를 확인하였다. 컬럼에 흡착된 IgY는 50 mM glycine-HCl buffer(pH 2.0)로 용출시켜 얻었으며, 분취액은 즉시 1 M Tris-HCl(pH 8.5)을 가하여 중성화하였다.

#### Anti-MFA IgY의 검출

Anti-MFA IgY를 Harlow등의 방법<sup>18)</sup>에 따라 horseradish peroxidase에 결합시키고 렉틴 MFA에 대한 anti-MFA IgY의 검출감도를 상기 anti-MFA IgY의 생성확인 방법 중 WSF용액을 가하는 단계를 생략하고 peroxidase-labeled anti-chicken IgG대신 peroxidase-labeled anti-MFA IgY를 사용하여 동일한 방법으로 실시하였다.

#### Anti-MFA IgY 친화성 컬럼의 제작 및 MFA의 분리

분리된 anti-MFA IgY에 제조사가 제시한 방법에 따라 CNBr-activated Sepharose 4B에 결합시킨 anti-MFA IgY 친화성 겔 3 ml를 컬럼에 충전하여 친화성 컬럼을 제작하였다. PBS로 컬럼을 평형화하고, 솔비나무 줄기 원액 1 ml를 컬럼에 흘리고 동일 완충액으로 유출시켜 1 ml씩 분취하면서 280 nm에서 흡광도를 확인하였다. 컬럼에 흡착된 단백질은 50 mM glycine-HCl buffer(pH 2.0)로 용출시켜 얻었으며, 분취액은 즉시 1 M Tris-HCl(pH 8.5)을 가하여 중성화하였다.

## 결과 및 고찰

본 연구에서 항원으로 사용한 렉틴 MFA는 분자량 30 kDa의 사량체(tetramer)이며,<sup>5)</sup> 전기영동에서 단일밴드를 나타내고, 음이온 교환 컬럼에 의한 HPLC 그로마토그램에서 단일 피크를 나타내는 결과(data not shown)로부터 더 이상 정제하지 않고 그대로 사용하였다.

렉틴 MFA로 면역 후 얻어진 난황으로부터 IgY를 분리 하는 방법은 문헌에 의해 여러 방법들이 보고되고 있으나, 본 연구실에서 이미 보고한 바와 같이 그 중 가장 효율이 좋은 것으로 확인된 water dilution법을 적용하였다.<sup>14)</sup> 렉틴 MFA로 면역 후 1~6주 동안 white Leghorn hen의 난황으로부터 얻어진 WSF를 이용하여 각 단계별로 Laemmli법에 따라 12%의 polyacrylamide 겔을 이용하여 전기영동을 실시한 결과, 약 180 kDa에서 IgY의 밴드를 lane 2~7에서 확인하였다(Fig. 1). 또한, 전기영동 상에서 IgY 이외에 기타 수용성 단백질로  $\alpha$ -livetin(chicken serum albumin),  $\beta$ -livetin( $\alpha$ 2-glycoprotein) 및 여러 지단백질의 존재를 확인하였다.

WSF 중에 존재하는 총 IgY에서 MFA에만 특이적으로 결합하는 anti-MFA IgY의 존재를 확인하고자, MFA로 코팅한 96 well 플레이트에 water dilution 법으로 분리한 WSF를 결합시키고

peroxidase-labeled anti-chicken IgG로 반응시켜 그 생성을 확인한 결과, 면역 후 2주째부터 5주째까지 단계적으로 흡광도 값이 증가하였고, 5주 후에는 큰 변화가 없었다(data not shown). 이 결과로부터 MFA에 대한 IgY 항체가 면역시킨 white Leghorn hen을 통해 난황에 성공적으로 생성되었음을 확인하였고, 그 생성시기는 면역 후 2주 후부터 임을 확인하였으며, 이 결과는 이미 보고한 다른 단백질 항원에 대한 IgY 생성 시기<sup>14)</sup>와 유사한 결과임을 확인하였다.

렉틴 MFA로 면역시킨지 4주째 되는 난황에서 얻은 WSF를 미리 제작한 MFA 친화성 컬럼에 결합시키고 컬럼에 미결합한 물질의 흡광도값이 완전히 0이 된 것을 확인 후 컬럼에 흡착된 IgY는 50 mM glycine buffer(pH 2.0)로 용출시켜 크로마토그램을 작성하였다(Fig. 2). 컬럼에 시료를 반응시키고 29번까지 얻어진 분액들은 MFA 컬럼에 결합하지 않은 단백질들이며, 30번부터는 pH 2.0의 완충액을 흘려 친화성 컬럼으로부터의 분리를 시도하고 흡광도값을 갖는 30~39번 분액을 얻었다. 이들 분액을 모아 2, 4, 8, 16, 32배로 각각 희석하고 MFA로 코팅한 96 well 플레이트에서 anti-MFA IgY 생성확인 실험과 동일한 방법으로 실험한 결과, 흡광도값이 희석비가 커질수록 저하하는 것으로 나타나 이들 단백질이 MFA에 특이적으로 결합하는 anti-MFA IgY임을 알 수 있게 되었다(Fig. 3). 또한, 전기영동에 의해 친화성 컬럼에 미결합한 물질(lane 2, 3)에서 확인 되는 IgY 이외의 단백질들이 분취액 30~39에서는 anti-MFA IgY 이외의 물질이 제거된 단일밴드(lane 4, 5)의 분자량 약 180 kDa의 IgY임을 확인하였다(Fig. 4). 이는 친화성 컬럼에 의해 anti-MFA IgY 이외의 IgY와 기타 수용성 단백질들이 제거되고, 최종적으로 고

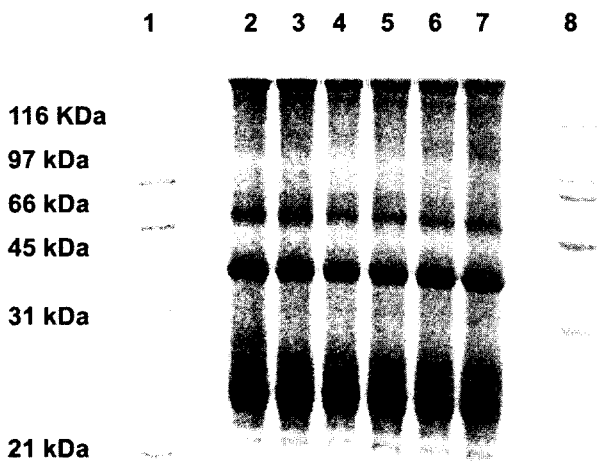


Fig. 1 - SDS-PAGE of IgY obtained from egg yolk with water dilution method. Lane 1 and 8, molecular weight marker ( $\beta$ -galactosidase, 116 kDa; phosphorylase b, 97 kDa; bovine serum albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; carbonic anhydrase, 31 kDa; soybean trypsin inhibitor, 21 kDa); lane 2~7, WSF obtained after 1-6 weeks from first immunization, respectively.

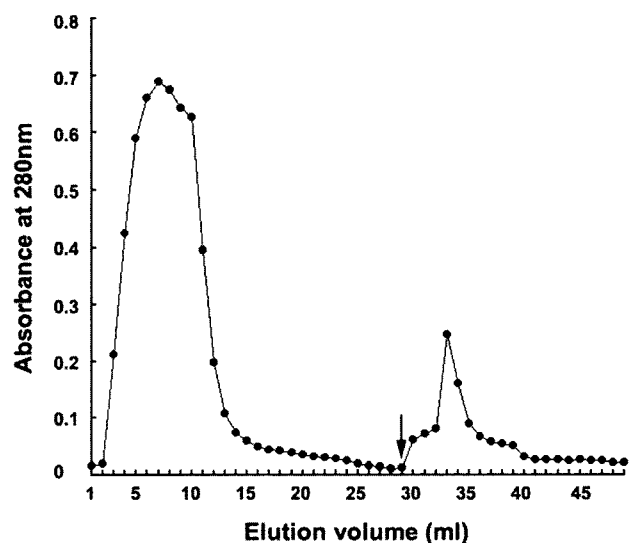


Fig. 2 - Elution profile of anti-MFA IgY using MFA-affinity chromatography. Arrow indicates the point elution with 50 mM glycine-HCl buffer (pH 2.0).

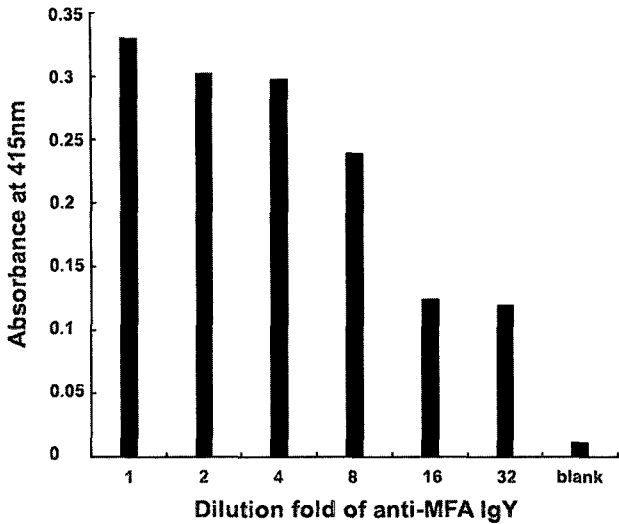


Fig. 3 – ELISA absorbances on the detection of peroxidase labeled anti-chicken IgG to various dilution folds of anti-MFA IgY.

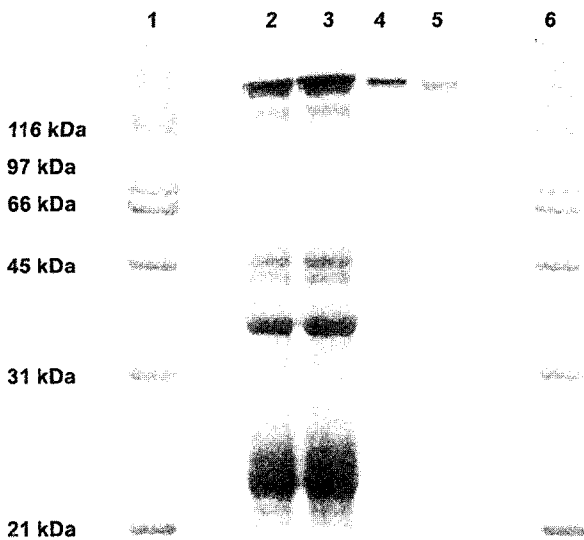


Fig. 4 – SDS-PAGE of purified anti-MFA IgY from MFA-affinity column. Lane 1 and 6, molecular weight marker; lane 2 and 3, unbound fractions; lane 4 and 5, bound fractions (anti-MFA IgY).

순도의 anti-MFA IgY가 얻어진 것을 나타내는 결과이다.

IgY는 280 nm에서의 흡광도값이 1.33인 경우 1 mg/ml임이 보고되어 있는 것<sup>19)</sup>과 Bradford법에 의한 단백질 정량에 의해 하나의 난황으로부터 얻어진 시료에서 분리한 anti-MFA IgY는 약 2.5 mg이었으며, 이는 총 IgY 28.0 mg 중 약 1%에 해당하는 양으로, 이미 문헌에<sup>19)</sup> 보고된 바와 같이 특정항원을 인식하는 IgY

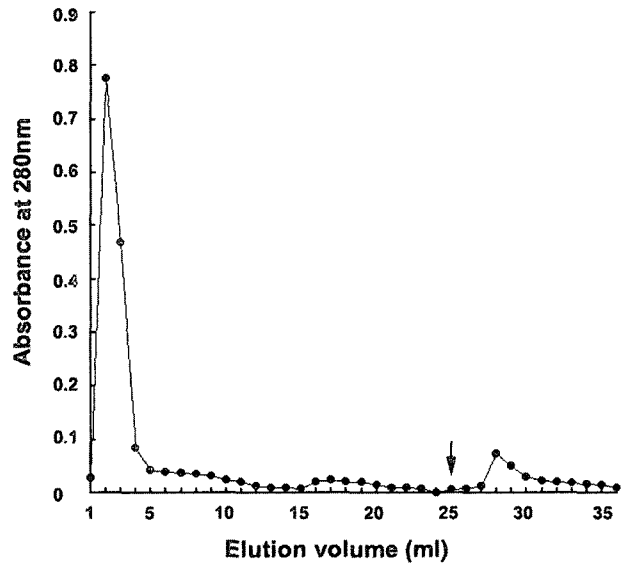


Fig. 5 – Elution profile of MFA using anti-MFA IgY-affinity chromatography. Arrow indicates the point elution with 50 mM glycine-HCl buffer (pH 2.0).

의 양이 총 IgY 중 항원에 따라 2~10%의 범위를 감안할 때에는 약간 미치지 못하였으나 근접한 결과를 얻었다.

MFA 친화성 컬럼에 의해 얻어진 anti-MFA IgY의 응용성은 여러 실험에 이용할 수 있다 그 응용성의 하나로 이미 문헌에<sup>5)</sup> 보고한 바와 같이 솔비나무 줄기 원액로부터 MFA를 분리하는데 어려움이 있으며 이를 극복하고자 anti-MFA IgY를 이용한 친화성 컬럼을 제작하여 MFA의 분리를 시도하였다. 먼저 anti-MFA IgY 친화성 컬럼을 제작하고 솔비나무 원액을 결합시켜 미결합한 물질의 흡광도값이 완전히 0이 된 것을 확인하고, 컬럼에 흡착된 단백질은 50 mM glycine buffer(pH 2.0)로 용출시켜 크로마토그램을 작성하였다(Fig. 5). 컬럼에 시료를 반응시키고 24번까지 얻어진 분액들은 anti-MFA IgY 컬럼에 결합하지 않은 단백질들이며, 25번부터는 pH 2.0의 완충액을 흘려 친화성 컬럼으로부터의 분리를 시도하고 흡광도값을 갖는 28~32번 분액을 얻었다. 여기서 얻어진 28~32번 분액들의 렉틴 MFA 특유의 적혈구 응집반응과 전기영동을 실시한 결과, 이미 문헌에 보고한 값<sup>5)</sup>과 동일한 결과를 얻어(data not shown), 이 분획들이 렉틴 MFA임을 확인하게 되었다.

## 결 론

본 연구에 의해 난황으로부터 IgY를 분리하는 방법 중 water dilution법을 적용하여, 항체로서의 활성을 잃지 않는 anti-MFA IgY를 순수하게 분리, 정제하였다. 항원으로 면역시킨 후 2주째부터 anti-MFA IgY가 생성되기 시작하여 5주째에 최대량이 되는 것을 확인하였으며, 총 IgY중 anti-MFA IgY의 생성비율은 약

1%이었다. 또한 이 항체를 적용하여 렉틴으로서의 활성을 유지하고 있는 MFA를 보다 간단하게 분리할 수 있게 되었다.

IgY는 이미 보고된 바와 같이 항체 생성이 비교적 용이하며, 포유동물 유래 항원에 대해 특이성이 높고 다량으로 얻을 수 있어 다양한 분야에서 이용 가능하며, 최근에는 암 연구,<sup>20,21)</sup> 프로그 형성억제,<sup>22)</sup> 진단분야,<sup>23)</sup> 경구투여용 약물<sup>24)</sup> 등의 개발에 주로 이용되고 있다. 현재는 이 anti-MFA IgY 항체를 이용하여 면역침강반응, western blotting, MFA의 분리 정제 및 항암활성등의 기전을 연구하는 재료로 활용되고 있다.

### 감사의 말씀

이 논문은 2004학년도 중앙대학교 분자조절신약개발연구소 학술연구비 지원에 의한 것이며, 이에 감사드립니다.

### 문헌

- 1) Sharon, N. : Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *Trends in Biochem. Sciences* **18**, 221 (1993).
- 2) Lis, H. and Sharon, N. : Lectins as molecules and as tools. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 35 (1986).
- 3) Cummings, R. D. : Use of lectins in analysis of glycoconjugates. *Methods in Enzymology* **230**, 66 (1994).
- 4) Abdullaev, F. I. and de Mejia, E. G. : Antitumor effect of plant lectins. *Nat. Toxins* **5**, 157 (1997).
- 5) Kim, B. S., Oh, K. T., Cho, D. H., Kim, Y. J., Koo, W. M., Kong, K. H. and Kim, H. H. : A sialic acid-binding lectin from the legume *Maaackia fauriei* : comparison with lectins from *M. amurensis*. *Plant Science* **167**, 1315 (2004).
- 6) Zhang, W. W. : The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. *Drug Discovery Today* **8**, 364 (2003).
- 7) Parham P. : Antibody structure. The duck's dilemma. *Nature* **374**, 16 (1995).
- 8) Warr, G. W., Magor, K. E. and Higgins, D. A. : IgY, clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today* **16**, 392 (1995).
- 9) Jensenius, J. C., Andersen, I., Hau, J., Crone, M. and Koch, C. : Eggs; conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J. Immunol. Methods* **46**, 63 (1981).
- 10) Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M. and Yamamoto, T. : Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 450 (1993).
- 11) Mine, Y. and Kovacs-Nolan, J. : Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease. *J. Med. Food* **5**, 159 (2002).
- 12) Patterson, R., Youngner, J. S., Weigle, W. O. and Dixon, F. J. : Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J. Immunol.* **89**, 272 (1962).
- 13) Gassmann, M., Thommes, P., Weiser, T. and Hubscher, U. : Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* **4**, 2528 (1990).
- 14) Jung, B. W., Chung Y. Y., Kim, Y. J., Park, J. H., Koo, W. M., Kim, B. S., Kim, K. D. and Kim, H. H. : Production of anti-fetuin immunoglobulin Y and its isolation using an affinity column. *Yakhak Hoeji* **47**(6), 438 (2003).
- 15) Akita, E. M. and Nakai, S. : Immunoglobulins from egg yolk; Isolation and Purification. *J. Food Sci.* **57**, 629 (1992).
- 16) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 (1970).
- 17) 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).
- 18) Harlow, E. D. and Lane, D. : Antibodies. Cold Spring Harbor Lab., New York p. 346 (1988).
- 19) Schade, R., Burger, W., Schoneberg, T., Schniering, A., Schwarzkopf, C., Hlinak, A. and Kobilke, H. : Avian egg yolk antibodies. The egg laying capacity of hens following immunisation with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies. *Altex Alternativen Zu Tierexp.* **11**, 75 (1994).
- 20) Lemany, G., Roger, P., Mani, J. C., Robert, M., Rocheport, H. and Brouillet, J. P. : High-affinity antibodies from hen's-egg yolk against human mannose-6-phosphate/insulin-like growth-factor-II receptor(M6P/IGF II-R); Characterization and potential use in clinical cancer studies. *Int. J. Cancer* **80**, 896 (1999).
- 21) Yang, J., Jin, Z., Yu, Q., Yang, T., Wang, H. and Liu, L. : The selective recognition of antibody IgY for digestive system cancers. *Chin. J. Biotechnol.* **13**, 85 (1997).
- 22) Hatta, H., Tsuda, K., Ozeki, M., Kim, M., Yamamoto, T., Otake, S., Hirasawa, M., Katz, J., Childers, N. K. and Michalek, S. M. : Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* **31**, 268 (1997).
- 23) Gross, M. and Speck, J. : Avian yolk antibodies in diagnosis and research. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **103**, 417 (1996).
- 24) Shimizu, M. : Encapsulation of chicken egg yolk immunoglobulin G (IgY) by liposomes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 1445 (1993).