

해양칠게 혈립프로부터 렉틴의 분리 및 당 결합특성

김하나 · 정우혁 · 배찬형 · 황광우 · 김하영[#]

중앙대학교 약학대학

(Received February 23, 2006; Revised May 16, 2006)

Isolation and Carbohydrate Binding Specificity of a Lectin from the Hemolymph of Coastal Crab *Macrocephthalmus Japonicus*

Ha Na Kim, Woo Hyuk Chung, Chan Hyung Bae, Kwang Woo Hwang and HaHyung Kim[#]

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

Abstract — A calcium-dependent sialic acid-binding lectin has been isolated by thyroglobulin-affinity chromatography from the coastal crab *Macrocephthalmus Japonicus*. This lectin, *Macrocephthalmus Japonicus* lectin (MJL), was eluted with 50mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 10 mM EDTA, and the recovery yield from the crude protein extract was about 5.6%. The molecular weight of MJL was estimated as 65 kDa in SDS-PAGE both under reducing and non-reducing conditions. MJL induced an agglutination reaction in rabbit, rat, and mouse erythrocytes, but not in human ABO types. This activity was effectively inhibited by sialoglycoproteins such as fetuin, bovine submaxillary mucin, and thyroglobulin.

Keywords □ lectin, crab, sialoglycoprotein

렉틴은 동물, 식물, 바이러스, 미생물 등에서 분리, 정제되며 세포표면에 특이적으로 발현되는 당과 결합하는 단백질로, 당이 결합된 당단백질 전체를 특이적으로 인식하거나 당단백질의 특정부위 및 서열을 인식하는 것으로 보고되고 있다.¹⁻⁴⁾ 당단백질은 단백질의 아스파라긴(asparagine), 세린(serine), 트레오닌(threonine)에 결합하며, 당의 종류로는 글루코스(glucose), 글루코사민(glucosamine), 갈락토스(galactose), 갈락토사민(galactosamine), 만노스(mannose), 푸코오스(fucose), 시알산(sialic acid) 등이 있다.

시알산은 엔-아세틸뉴라민산(*N*-acetylneuraminic acid, NeuAc), 엔-글리코릴뉴라민산(*N*-glycolylneuraminic acid, NeuGc)과 같은 20개 이상의 유도체를 포함하며, 대부분의 시알산은 C-4, C-7, C-9에서 하나 이상의 O-acetyl 치환체를 갖는다.⁵⁾ 시알산은 각종 조직 및 세포에서 발견되는데, 사람의 시알산단백질(sialoglycoprotein)과 갱글리오사이드(ganglioside)에서는 NeuAc가 가장 흔하게 발견되며 신경세포에서는 변형된 시알산이 발견된다.⁶⁻⁸⁾ 또한, 사람의 악성 흑색종(melanoma)에서는 9-O-acetyl-NeuAc

와 같은 시알산을 가지며 대장암(colon carcinoma)에서는 NeuGc 를 갖는 것으로 보고되고 있다.^{9,10)} 시알산의 종류와 인접당과의 당결합방식은 병원성 박테리아와 사람의 암세포 표면의 시알산 콘쥬게이트(sialoconjugate)에서 시알릴 에피토프(sialyl epitope)의 변화에 영향을 미치기도 한다.^{6,10)} 그러므로 시알산에 특이적으로 결합하는 렉틴은 병원균과 악성 종양의 시알릴 에피토프를 확인하는데 유용하게 이용될 수 있다.¹⁰⁾

현재까지 알려진 렉틴의 대부분은 만노스, 갈락토스를 특이적으로 인식하며 일부 렉틴만이 구조적, 기능적으로 중요한 역할을 하는 시알산과 특이적으로 결합한다고 알려져 있다.¹¹⁻¹³⁾ 더욱이 시알산을 특이적으로 인식하는 렉틴 중 대량 생산할 수 있는 것은 매우 한정적이다.¹⁴⁾

시알산 결합 렉틴은 주로 무척추동물에서 발견되고 있으며, 무척추동물에서 분리된 렉틴은 식물과 같은 다른 유래에서 분리된 렉틴과 유사하게 당의 일부분 혹은 당 전체를 인식하는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁾ 무척추동물 중 갑각류는 시알산을 합성하지는 못하지만 다양한 시알산 콘쥬게이트를 발현하는 세균에 대한 방어수단으로 시알산 결합 렉틴을 만들어 내는 것으로 알려져 있다. 시알산 결합 렉틴은 *Homarus americanus*,¹⁵⁾ *Macrobrachium rosenbergii*,¹⁶⁾ *Cancer antennarius*,¹⁷⁾ *Scylla serrata*,¹⁸⁾ *Penaeus monodon*¹⁹⁾ 등에서 보고되고 있으며, *C. antennarius* 유래 렉틴

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5612 (팩스) 02-823-5612
(E-mail) hahyung@cau.ac.kr

은 9-O-NeuAc와 4-O-NeuAc, *S. serrata* 유래 렉틴은 NeuGc를 특이적으로 인식하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 세균 방어수단과 암세포와의 결합 등에 유용한 물질로 확인된 렉틴의 유용성을 확인하고 우리나라 자원생물로부터 신규 렉틴 확보를 위해 달랑개과의 갑각류에 속하는 칠계 (*Macrophthalmus Japonicus*)를 서해안 대부분 갯벌에서 채취하고 그 혈립프로부터 새로운 기능의 렉틴이 존재함을 확인하였으며, 이를 단일물질로 분리하고 당 결합특성에 대해 연구하였다.

실험 방법

해양칠계 채집 및 단백질원액 추출

해양칠계 *M. Japonicus*는 4~5월 대부분 갯벌에서 채집하였으며, 장기를 제외한 혈립프(hemolymph)를 채취하고 2,000×g, 4°C에서 40분간 원심분리 후 다양한 고형 불순물을 제거하였다. 상정액을 취하여 10,000×g, 4°C에서 120분간 원심분리한 후, 0.45 μm membrane filter로 여과하여 불순물과 색소가 제거된 단백질원액을 얻을 수 있었다. 단백질원액은 1 mL씩 분취하여 -20°C에서 보관하였다.

적혈구 응집반응

단백질원액을 0.15 M NaCl로 2⁰~2¹⁰배까지 희석 후 96-well U bottom microplate에 50 μL씩 넣고 2%로 혼탁시킨 사람 ABO, 토키, 랙트, 훈쥐의 적혈구 각각 50 μL와 반응시켰다. 1시간동안 실온에 방치한 후 0.15 M NaCl 50 μL와 2% 적혈구 50 μL만을 반응시킨 것을 대조군으로 하여, 4°C에서 24시간 동안 방치한 후 최종적으로 응집반응을 확인하였다. 대조군과 비교하여 적혈구 응집반응이 일어난 경우를 음성반응, 적혈구 응집반응이 일어나지 않는 경우를 양성반응으로 판정하였다.

적혈구 응집저해반응

렉틴의 당 결합특이성을 확인하기 위하여 적혈구 응집저해반응을 실시하였다. 단백질원액 혹은 렉틴의 적혈구 응집반응 결과 확인된 최대 희석배수보다 한 배수 적게 0.15 M NaCl에 희석하여 사용하였다. 저해제로 사용한 단당, 이당류 및 당단백질을 각각 50 μL와 단백질원액 혹은 렉틴 50 μL를 96 well U bottom microplate에 넣고 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 각 well에 0.15 M NaCl로 혼탁시킨 2% 토키 적혈구 50 μL를 넣고 1시간 동안 실온에 방치하고, 저해제를 넣지 않은 대조군과 비교하였다. 이 때, 적혈구 응집반응이 일어난 경우를 저해활성이 있는 것으로 판단하였으며, 저해반응이 확인된 경우에는 저해제를 희석하여 렉틴과 반응시켜 당과 반응하는 최소저해농도(minimal inhibition concentration)를 구하였다. 단당, 이당류 및 당단백질은 모두 Sigma Chemical Co(St. Louis, MO, USA)에서 구입하

였으며, 시알산이 제거된 당단백질은 이미 보고한 방법에 따라 제조하였다.¹¹⁾

Sphacryl S-200 컬럼 크로마토그래피

단백질원액을 Centrikon T-1170(Kontron Instruments, USA)을 이용하여 22,000×g, 4°C에서 6시간 원심분리한 후, 상정액을 제거한 침전물을 10 mM PBS(pH 7.3)로 흡착하여 실험에 사용하였다. Sephacryl S-200(Amersham Biosciences, Stockholm, Sweden) 12 mL로 충진시킨 Econo-Pac chromatography column (Bio-Rad, USA)에 단백질원액 약 700 μL를 10 mM PBS (pH 7.3)로 흘려 1 mL씩 분획을 받고 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Thyroglobulin-affinity 컬럼 크로마토그래피

Thyroglobulin-agarose(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 1 mL을 Econo-Pac chromatography column(Bio-Rad, USA)에 충진시킨 후, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂가 포함된 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)을 결합완충액(binding buffer)으로 하여 50 mL씩 3회 세척하여 컬럼을 평형화 후 Sephacryl S-200 컬럼에서 분리된 활성분획을 컬럼에 흘려 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 결합완충액(binding buffer)으로 280 nm에서 흡광도값이 0.01 이하로 저하될 때까지 세척하고 thyroglobulin과 결합하지 않고 컬럼에 남아 있는 불순물들을 제거하기 위해 HSB(high salt buffer, 50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 1 M NaCl, 10 mM CaCl₂), LSB(low salt buffer, 50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 0.3 M NaCl, 10 mM CaCl₂) 순으로 세척하였다. 추출완충액(elution buffer)으로 0.3 M NaCl, 10 mM EDTA가 포함된 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)을 사용하였으며 1 mL씩 분획을 받은 후 각 분획에 100 mM CaCl₂ 100 μL를 가하였다.

전기영동

분리된 렉틴의 순도를 확인하기 위해 Laemmli의 방법에 준하여 12% polyacrylamide gel을 이용한 전기영동(sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)을 실시하였다.²⁰⁾ Myosin(200 kDa), β-galactosidase(116 kDa), phosphorylase b(97.4 kDa), bovine serum albumin(66.2 kDa), ovalbumin(45 kDa), carbonic anhydrase(31 kDa), soybean trypsin inhibitor(21.5 kDa), lysozyme(14.4 kDa), aprotinin(6.5 kDa)을 분자량 표준물질로 이용하였다.

단백질 정량

단계별 단백질의 정량을 위하여 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/mL의 bovine serum albumin(Bio-Rad, USA)을 표준물질로 하여 Bradford 법에 따라 단백질 정량을 실시하였다.²¹⁾

금속이온이 활성에 미치는 영향

금속이온이 렉틴 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 렉틴을 Amicon MWCO 10000(Amicon Inc. USA)에 옮긴 후 0.1 M EDTA로 투석하고 10 mM Tris-HCl(pH 7.5)로 재투석하여 금속이온이 제거된 시료를 준비하였다. 96 well U bottom microplate에 0, 6.25 mM Ca²⁺ 이온과 Mn²⁺ 이온이 각각 포함된 용액 50 μl를 넣고 투석한 시료 50 μl와 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후, 0.15 M NaCl 50 μl와 2% 토키 적혈구 50 μl를 넣은 대조군과 비교하여 응집반응을 확인하였다. 실험은 3회 반복하였으며 그 평균값을 활성도로 나타냈다.

결과 및 고찰

적혈구 응집반응

대부분 갯벌에서 채취한 칠개 118마리의 혈립프에서 약 18 ml의 단백질원액을 얻었으며, 이는 마리당 약 0.15 ml에 해당한다. 단백질원액에 대해 적혈구 응집반응을 실시한 결과, 사람 ABO형에 대해서는 각각 음성반응을 나타냈으나, 토끼, 랙트, 흰쥐에서는 양성반응을 나타냈다(Table I). 특히, 토끼 적혈구는 256배, 랙트 적혈구는 32배, 흰쥐 적혈구는 16배로 희석한 경우까지 양성반응을 나타냈다. 사람의 적혈구에는 주로 NeuAc가 존재하며 토끼, 랙트, 흰쥐의 경우에는 NeuAc 이외에 NeuGc, O-acetylsialic acid 등이 존재하는 보고로부터 칠개 원액에는 렉틴이 존재할 가능성이 높은 것으로 확인되었다.

적혈구 응집저해반응

적혈구 응집반응 결과로부터 당 결합특성을 보다 정확히 확인하고자 적혈구 응집저해반응에 의해 각종 단당, 이당류 및 당단백질과의 반응성을 확인하였다(Table II). 적혈구 응집저해반응 결과, 단백질원액에서는 단당 및 이당류에 대해서는 저해반응을 나타내지 않았으나 당단백질에 대해서는 저해반응을 나타냈다. 특히 bovine thyroglobulin의 경우 최소 저해농도가 1.95 μg/ml로 가장 낮은 결과를 나타냈다. 일반적으로 최소저해농도가 낮을수록 당단백질에 대한 렉틴의 특이성이 높다고 보고되어 있는

Table I – Hemagglutination of erythrocytes by *M. Japonicus* lectin

Erythrocytes ^a	Common species of sialic acid	Hemagglutination titer ^b
human A	NeuAc	-
human B	NeuAc	-
human O	NeuAc	-
rabbit	NeuAc/NeuGc/50%O-AcSia	256
rat	NeuAc/NeuGc/25%O-AcSia	32
mouse	NeuGc/20%O-AcSia	16

^aErythrocytes were prepared for 2% suspension in 0.15 M NaCl.

^bHemagglutination titer was defined as the maximum dilution fold causing agglutination.

Table II – Inhibition of hemagglutination activity of *M. japonicus* lectin

Inhibitors	Minimal inhibition concentration
D-(+)-glucose	NI ^a
sucrose	NI ^a
maltoose	NI ^a
methyl α-D-glucopyranoside	NI ^a
α-lactose	NI ^a
β-lactose	NI ^a
D-lactose	NI ^a
D(+)-mannose	NI ^a
D(+)-raffinose	NI ^a
D(+)-cellobiose	NI ^a
D(+)-galactose	NI ^a
L(-)-fucose	NI ^a
thyroglobulin	1.95 μg/ml
asialothyroglobulin	62.5 μg/ml
bovine submaxillary mucin	62.5 μg/ml
bovine submaxillary asialomucin	125 μg/ml

2% rabbit erythrocytes was used for this assay.

^aNo inhibition activity was exhibited at 100 mM.

점으로부터 현재 보고된 렉틴 중 *S. serrata* 유래 렉틴¹⁸⁾과 *Paratelphusa jacquemontii* 유래 렉틴²²⁾의 thyroglobulin에 대한 최소저해농도가 각각 2.4 μg/ml, 625 μg/ml인 것과 비교하면 매우 낮은 값으로 thyroglobulin에 대한 결합력이 특히 높은 것을 알 수 있었다. Thyroglobulin에서 시알산을 제거한 asialothyroglobulin의 경우에는 최소 저해농도가 62.5 μg/ml로 1.95 μg/ml의 thyroglobulin에 비해 60배나 증가하는 것을 확인하였다. 또한 bovine submaxillary mucin은 62.5 μg/ml로 thyroglobulin에 비해서는 약한 결합을 나타냈으나, 시알산을 제거한 경우에는 125 μg/ml로 최소저해농도가 2배 증가하였다.

이 결과로부터 칠개 유래의 단백질원액에는 시알산을 특이적으로 인식하는 렉틴이 존재함을 확인하였으며, 당 결합력은 일반적인 렉틴의 특성과 비슷하게 단당 보다는 당단백질을 특이적으로 인식하고 그 중에서도 bovine thyroglobulin에 대한 결합성이 가장 높은 것으로 나타났다.

단백질원액의 분리 및 렉틴의 정제

단백질원액으로부터 렉틴을 분리하기 위하여 먼저 원액을 22,000×g, 4°C에서 원심분리한 후 10 mM PBS(pH 7.3)를 완충액으로 하여 Sephadryl S-200 컬럼으로 분리하여 1 ml/씩 분획 후 280 nm에서 흡광도를 측정하고 전 분획에 대해 적혈구 응집반응을 실시였다. 그 결과, 분획 8-14에서는 흡광도값이 높으면서 적혈구 응집반응에 양성 반응을 나타냈으나, 그 외의 분획에서는 응집반응을 나타내지 않았다. 특히 분획 8, 9는 64배 희석한 경우까지 양성반응을 나타냈다(Fig. 1).

적혈구 응집저해반응에 의해 thyroglobulin과 결합하는 결과를 응용하여 Sephadryl S-200 컬럼으로 분리한 분획 8-14에 대해

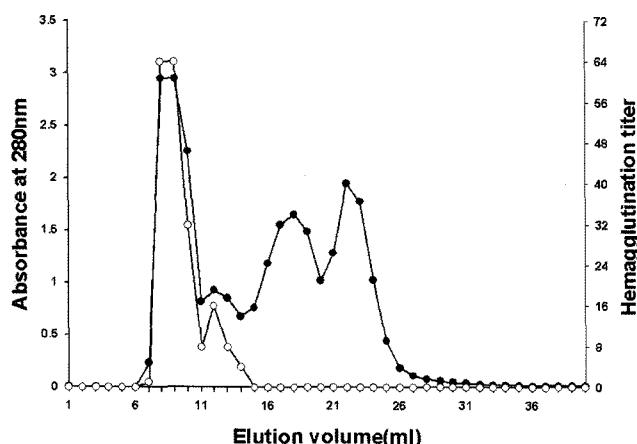


Fig. 1 – Elution profile of the crude protein extract obtained from the hemolymph of *M. Japonicus* on the Sephadryl S-200 column. ●, absorbance at 280 nm; ○, hemagglutination titer against rabbit erythrocytes.

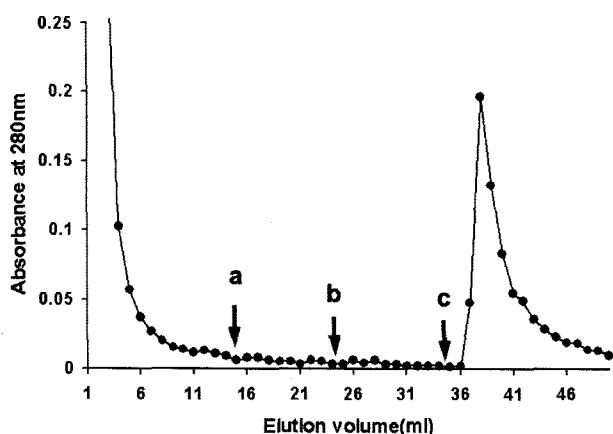


Fig. 2 – Elution profile of *M. japonicus* lectin on the thyroglobulin-agarose affinity column. Elution buffer was used as (a), 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 10 mM CaCl₂; (b), 50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 10 mM CaCl₂; and (c), 50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 10 mM EDTA.

thyroglobulin-affinity 컬럼을 이용한 정제를 시도하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 컬럼에 결합하지 않은 물질인 분획 1-15까지는 제거하였으며, 비특이적으로 결합된 물질을 제거하기 위해 HSB(high salt buffer, 50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 1 M NaCl, 10 mM CaCl₂), LSB(low salt buffer, 50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 0.3 M NaCl, 10 mM CaCl₂) 순으로 세척하였으나 흡광도값이 높은 분획이 없는 것으로부터 분획 36부터는 0.3 M NaCl, 10 mM EDTA가 포함된 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)를 이용하여 1 ml/씩 분획을 받은 후 100 mM CaCl₂ 100 μl를 가하였다.

모든 분획에 대해 적혈구 응집반응을 실시한 결과 분획 37-41에서 양성반응을 나타내어 렉틴이 정제되었음을 확인하고 이를 MJL(*M. Japonicus* lectin)로 명명하였다. 정제된 MJL을 이용하

여 적혈구 응집저해반응을 실시하고 단백질원액에서의 결과와 동일한 결과를 얻어, 단백질원액에서 나타낸 당결합특성이 MJL에 의한 것임을 확인하였다.

전기영동

정제된 MJL의 순도와 분자량을 확인하기 위하여 12% polyacrylamide gel상에서 전기영동을 실시하였다(Fig. 3). 그 결과 MJL은 65 kDa 부근에서 95% 이상의 순도를 가지는 단일밴드를 나타냈다(Lane 3). 분자내 disulfide bond의 존재여부를 확인하기 위해 2-mercaptoethanol로 MJL을 처리하여 전기영동 상에서 밴드를 확인한 결과 동일한 위치에서 밴드를 나타냈다(결과는 제시하지 않음). 이 결과로부터 MJL은 분자간에 disulfide bond를 갖지 않는 분자량 65 kDa의 단백질임을 확인하였다.

단백질 정량 및 회수율

정제된 MJL에 대해 Bradford 법을 이용하여 각 단계별로 단백질 정량과 회수율을 확인하였다. *M. japonicus* 혈립프로부터 얻은 단백질원액에서 Sephadryl S-200 컬럼과 thyroglobulin-agarose affinity 컬럼을 순차적으로 거치면서 최종적으로 비활성

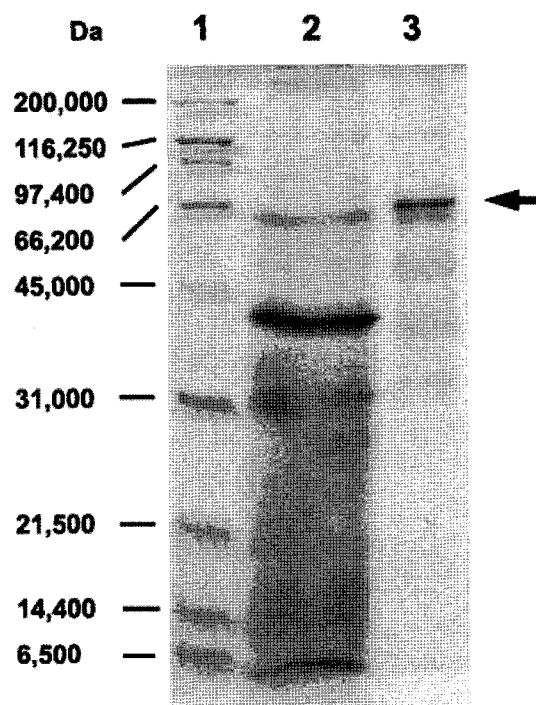


Fig. 3 – SDS-PAGE of *M. japonicus* lectin. Lane 1, molecular weight standard; lane 2, crude protein extract from *M. japonicus* hemolymph; lane 3, purified MJL. Myosin (200 kDa), β-galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), soybean trypsin inhibitor (21.5 kDa), lysozyme (14.4 kDa), aprotinin (6.5 kDa) were used as molecular weight standards.

Table III – Summary of purification of *M. japonicus* lectin

Purification step	Hemagglutination titer ^a	Total protein (mg)	Specific activity ^b	Recovery (%)
Crude protein extract	128	27	4.7	100.
Sephadryl S-200 fr.	128	18	7.1	66.8
Thyroglobulin agarose affinity fr.	256	1.5	170.7	5.6

^a2% rabbit erythrocytes was used for this study.^bSpecific activity is expressed as the ratio of hemagglutination titer/protein mg.

(specific activity)이 170.7로 증가된 렉틴 1.5 mg을 얻었고 회수율은 5.6%로 나타냈다(Table III). 이 회수율은 *P. jacquemontii*로부터 affinity 컬럼을 이용하여 렉틴을 정제한 회수율 0.1%와 비교하면 5.6%로 50배 이상 높은 회수율을 나타낸다.²²⁾ 이는 강한 결합을 나타낸 thyroglobulin에 의한 친화성 컬럼이 분리과정에서 효율적인 방법이었음을 나타내는 결과이다.

금속이온이 활성에 미치는 영향

일반적으로 금속이온은 렉틴의 활성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, *Cajanus cajan* 렉틴의 경우 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 의 농도가 증가 할수록 활성이 증가하는 것으로 보고되고 있다.^{14,23)} 반면에 *Artocarpus integer* 렉틴은 금속이온에 의해 활성이 영향을 받지 않는 것으로 보고되고 있다.²⁴⁾ 본 연구에서 금속이온이 MJL의 활성에 미치는 영향을 확인한 결과, 렉틴을 EDTA 처리한 경우에는 반응이 급격히 감소되었으나 6.25 mM Ca^{2+} 을 첨가한 경우 활성이 100% 유지되었으며 Mn^{2+} 이온의 경우에는 25% 유지되는 결과를 얻었다(Fig. 4). 이 결과로부터 MJL은 단백질 중에 금속이온이 존재하며 이를 제거시 활성이 없어지나 금

속이온을 첨가함에 따라 다시 활성이 부활하는 것으로 확인되었다.

결 론

본 연구에서는 대부분 갯벌에서 채취한 달랑개과 해양칠게 *M. japonicus*의 혈립프로부터 얻어진 단백질원액으로부터 렉틴을 분리, 정제하고 당 결합특성을 연구하였다. *M. japonicus* 혈립프에서 적혈구 응집반응으로 렉틴의 존재여부를 확인하고, 적혈구 응집저해반응에서 높은 결합력을 나타낸 bovine thyroglobulin을 이용한 친화성 컬럼에 의해 최종적으로 MJL을 분리하였다. MJL은 적혈구 응집반응에서 사람의 ABO 적혈구와는 반응하지 않으나 동물 적혈구에 대해서는 토끼>랫트>흰쥐 순으로 반응을 나타냈다. 사람의 적혈구에는 NeuAc가 주로 존재하며 토끼, 뱃트, 흰쥐의 적혈구는 사람의 적혈구에는 거의 존재하지 않는 NeuGc, O-acetylsialic acid을 함유하는 것과 bovine thyroglobulin에 NeuAc 이외에 NeuG을 포함한 시알산유도체가 존재하는 것으로부터 MJL은 NeuGc 혹은 O-acetylsialic acid와 같은 시알산을 인식하는 것으로 확인되었다. 정제순도는 95% 이상이며 분자 간에 disulfide 결합을 갖지 않는 65 kDa의 단백질임을 알 수 있었으며, 정제효율은 5.6%로 나타나 기존에 보고된 렉틴의 정제 방법에서의 회수율과 비교하여 높은 회수율임을 확인하였다.

MJL은 시알산과 결합하는 특성과 그 희귀성으로 다양한 관련 연구에 활용될 수 있으며, 현재는 올리고당에 대한 결합특성과 보다 상세한 렉틴 특성을 확인하고 있으며, 사람 암세포 표면의 시알산 콘쥬게이트에서 시알릴 에피토프의 변화^{25,26)}를 확인하는 효과를 기대하며 이를 위한 연구를 진행하고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 2005년도 해양한국발전프로그램(KSGP)연구개발사업의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Lis, H. and Sharon, N. : Lectins as molecules and as tools. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 35 (1986).

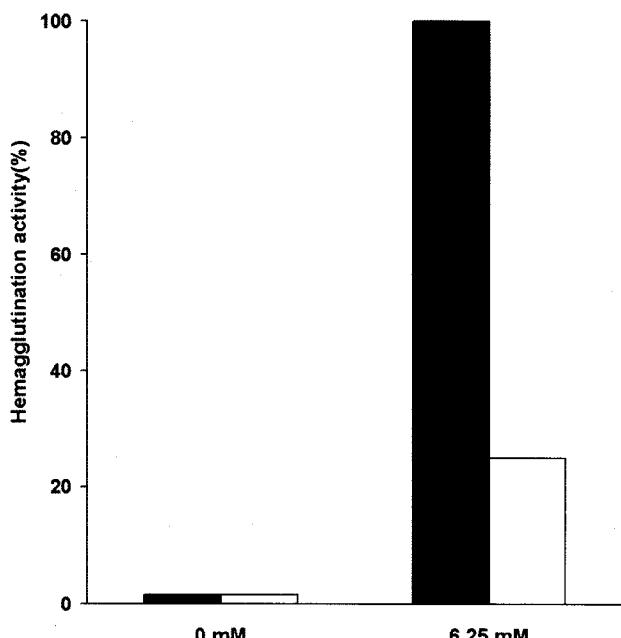


Fig. 4 – Effect of CaCl_2 (■) and MnCl_2 (□) on the hemagglutination activity of MJL.

- 2) Sharon, N. : Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *Trends in Biochem. Sciences* **18**, 221 (1993).
- 3) Cummings, R. D. : Use of lectins in analysis of glycoconjugates. *Methods in Enzymology* **230**, 66 (1994).
- 4) Kocourek, J. : *The Lectins; Properties, function, and applications in biology and medicine* (Leiner, I. E., Sharon, N. and Goldstein, I. J.). Academic Press p.1 (1986).
- 5) Schauer, R. : *Sialic Acids; Chemistry, Metabolism and Function*, Springer-Verlag, New York, p.323 (1982).
- 6) Higashi, H., Hirabayashi, Y., Fukui, Y., Naiki, M., Matsumoto, M., Ueda, S. and Kato, S. : Characterization of N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides as tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human colon cancer. *Cancer Res.* **45**, 3796 (1985).
- 7) Cheresh, D. A., Reisfeld, R. A. and Varki, A. P. : O-acetylation of disialoganglioside GD3 by human melanoma cells creates a unique antigenic determinant. *Science* **225**, 844 (1984).
- 8) Cheng, T. C. : Evolution of receptors. *Comp. Pathol.* **5**, 33 (1984).
- 9) Ravindranath, M. H., Paulson, J. C. and Irie, R. F. : Human melanoma antigen O-acetylated ganglioside GD3 is recognized by Cancer antennarius lectin. *J. Biol. Chem.* **260**, 8838 (1985).
- 10) Kawai, T., Kato, A., Higashi, H., Kato, S. and Naiki, M. : Quantitative determination of N-glycolylneuraminic acid expression in human cancerous tissues and avian lymphoma cell lines as tumor-associated sialic acid by gas chromatography mass spectrometry. *Cancer Res.* **51**, 1242 (1991).
- 11) Kim, B. S., Oh, K. T., Cho, D. H., Kim, Y. J., Kong, K. H. and Kim, H. H. : A sialic acid-binding lectin from the legume *Maackia fauriei*: comparison with lectins from *M. amurensis*. *Plant Sci.* **167**, 1315 (2004).
- 12) Park, J. H., Ryu, C. S., Kim, H. N., Na, Y. J., Park, H. J. and Kim, H. H. : A sialic acid-specific lectin from the mushroom *Paecilomyces Japonica* that exhibits hemagglutination activity and cytotoxicity. *Protein Pept Lett.* **11**, 563 (2004).
- 13) Bhavanandan, V. P. and Katlic, A. W. : The interaction of wheat germ agglutinin with sialoglycoproteins. The role of sialic acid. *J. Biol. Chem.* **254**, 4000 (1979).
- 14) Mandal, C. and Mandal, C. : Sialic acid binding lectins. *Experientia* **46**, 433 (1990).
- 15) Charland, N., Kellens, J. T., Caya, F. and Gottschalk, M. : Agglutination of *Streptococcus suis* by sialic acid-binding lectins. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2220 (1995).
- 16) Vasta, G. R., Warr, G. W. and Marchalonis, J. J. : Serological characterization of humoral lectins from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Dev. Comp. Immunol.* **7**, 13 (1983).
- 17) Ravindranath, M. H., Higa, H. H., Cooper, E. L. and Paulson, J. C. : Purification and characterization of an O-acetylsialic acid-specific lectin from a marine crab *Cancer antennarius*. *J. Biol. Chem.* **260**, 8850 (1985).
- 18) Mercy, Sr. P. D. and Ravindranath, M. H. : An agglutinin with unique specificity for N-glycolylneuraminic acid residues of thyroglobulin in the hemolymph of a marine crab *Scylla serrata* (Forskal). *Experientia* **48**, 498 (1992).
- 19) Cheng, W., Liu, C. H., Tsai, C. H. and Chen, J. C. : Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* **18**, 297 (2005).
- 20) Laemmli U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 (1970).
- 21) Bradford, 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).
- 22) Maghil E. P. D., Mercy P., Renuka B. N. and Jeya S. S. : Purification and characterization of a sialic acid specific lectin from the hemolymph of the freshwater crab *Paratelphusa jacquemontii*. *Eur. J. Biochem.* **270**, 4348 (2003).
- 23) Ahmad, S., Khan, R. H. and Ahmad, A. : Physicochemical characterization of *Cajanus cajan* lectin: effect of pH and metal ions on lectin carbohydrate interaction. *Biochim. Biophys Acta.* **1427**, 378 (1999).
- 24) Lim, S. B., Chua, C. T. and Hashim, O. H. : Isolation of a mannose-binding and IgE- and IgM-reactive lectin from the seeds of *Artocarpus integer*. *J. Immunol. Methods* **209**, 177 (1997).
- 25) Warren, L. : The distribution of sialic acids in nature. *Comp. Biochem. Physiol.* **10**, 153 (1963).
- 26) Segler, K., Rahmann, H. and Rosner, H. : Chemotaxonomical investigations on the occurrence of sialic acids in protostomia and deuterostomia. *Biochem. Syst. Ecol.* **6**, 87 (1978).