

## 솔비나무 유래 렉틴의 정제 효율

배찬형 · 김주철 · 김유정 · 김상구 · 나광흠 · 박병태 · 김하형\*

중앙대학교 약학대학

(Received May 16, 2007; Revised June 21, 2007)

### Purification Efficiency of a Lectin from *Maackia fauriei*

Chan Hyung Bae, Ju Cheol Kim, Yu Jeong Kim, Sang Gu Kim, Kwang Heum Na,  
Byung Tae Park and HaHyung Kim\*

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

**Abstract** — We previously reported the isolation of a sialic acid-specific lectin eluted from the bark of *Maackia fauriei* using alkaline buffer on a fetuin-affinity column. Application of a borate-based elution buffer in the present study increased the specific activity of purified lectin from crude protein extract by 2.6-fold, whilst only slightly decreasing the recovery by 1.13%. The biological properties of the lectin eluted with borate buffer were the same as those of the lectin eluted with alkaline buffer, such as in terms of the hemagglutination activity, hemagglutination inhibition activity, molecular mass, purity, and cytotoxicity to human breast cancer cells. A prepared biotin-labeled lectin conjugate was used to investigate the binding to various glycoproteins. Our results indicate that eluting with borate buffer is more efficient than using alkaline buffer to isolate the lectin adsorbed in a fetuin-affinity column.

**Keywords** □ lectin, *Maackia fauriei*, specific activity, glycoprotein

렉틴(lectin)은 탄수화물 결합 단백질로 주로 식물에서 발견되고 있으며, 적혈구를 응집시키는 작용이 알려져 있고, 혈액형을 분류하기도 하며, 암세포를 특이적으로 응집시키는 기능 등 다양한 활성을 갖고 있다.<sup>1-3)</sup> 렉틴이 결합하는 특정 당으로는 D-galactose, D-mannose, N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine, L-fucose와 같은 단당류, N-acetylneuraminic acid와 N-glycolylneuraminic acid와 같은 시알산(sialic acid) 유도체, 혹은 특정 배열의 올리고당을 들 수 있으며, 당단백질과 결합하는 경우도 보고되고 있다.<sup>4-6)</sup> 특히 당단백질에 결합된 올리고당의 비환원 말단에서 기능발현에 중요한 역할을 하고 있고, 질병시 그 비율의 극적인 변화가 보고되고 있는 시알산 유도체를 인식하는 렉틴은 현재까지 보고된 많은 렉틴 중에서도 그 활용도가 가장 높으며, 시알산 및 시알산이 결합된 당단백질의 분리 혹은 암을 포함한 각종 질병 관련 연구에 이용되고 있다.<sup>7-9)</sup>

본 연구실에서는 최근 제주도에서 자생하는 콩과식물인 솔비나

무의 줄기로부터 얻어진 단백질 용액을 fetuin-affinity column에 흡착시키고 pH 11.0의 alkaline buffer로 분리, 정제하여 시알산과 특이적으로 결합하는 렉틴 MFA(*Maackia fauriei* agglutinin)의 특성을 처음 보고하였다.<sup>10,11)</sup> 본 논문에서는, 솔비나무 유래 렉틴 MFA의 분리 정제 효율을 높이기 위하여 fetuin-affinity column에 흡착된 단백질을 분리할 때 pH 8.0의 borate buffer로 분리하여 그 비활성도와 수율을 비교하였으며, 적혈구응집반응, 적혈구응집 저해반응, 분자량, 정제 순도, 사람 유방암세포에 대한 세포독성을 기존의 방법으로 얻어진 렉틴과 비교하였다. 또한, MFA 렉틴의 당단백질에 대한 결합력을 확인하기 위하여 MFA를 화학적으로 biotin으로 표지한 후 시알산이 결합된 당단백질과의 반응성을 연구하였다.

### 실험 방법

#### 렉틴의 분리

솔비나무 줄기 20 g을 4°C에서 20 mM Tris-HCl(pH 8.0) 400 ml에 용해 한 후 polyvinylpyrrolidone 2 g을 첨가하여 단백질 용액을 추출하고, 4°C에서 16시간 교반 후 12,000 g에서 30 분간 원심분리하였다. 상층액을 0.45 µm 필터로 여과 후, 미리

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

20 mM Tris-HCl(pH 8.0)으로 평형화한 fetuin-agarose(Sigma)로 충전시킨 affinity column(1×3 cm)에 흘러 같은 완충액으로 280 nm에서 흡광도가 0이 될 때까지 용출시켰다. 흡착된 단백질은 100 mM borate buffer(pH 8.0) 혹은 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH(pH 11.0)로 각각 용출시켜 렉틴을 분리하였다.

### 전기영동

분리된 렉틴의 분자량 및 정제 순도를 확인하기 위해 Laemmli의 방법<sup>12)</sup>에 따라 12% polyacrylamide gel을 제작후 전기영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)을 실시하였다. 분자량 표준물질(20~250 kDa)은 Bio-Rad사에서 구입하여 사용하였다.

### 단백질 정량

단백질 정량은 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml의 bovine serum albumin(Bio-Rad)을 표준물질로 하여 Bradford 법<sup>13)</sup>에 따라 실시하였다.

### 적혈구응집반응

렉틴용액을 0.15 M NaCl로 2<sup>0</sup>~2<sup>10</sup>배까지 희석 후 96-well U bottom microplate(NUNC)에 50 μl씩 넣고 2%로 현탁시킨 사람 ABO, 토끼, 랫트, 흰쥐의 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.

### 적혈구응집 저해반응

렉틴의 당 결합특이성을 확인하기 위하여 적혈구응집 저해반응을 실시하였다. 렉틴의 적혈구응집 반응 결과 확인된 최대 희석배수보다 한 배수 적게 0.15 M NaCl에 희석하여 사용하였다. 저해제로 사용한 당당, 이당류 및 당단백질을 각각 50 μl와 렉틴 50 μl를 96-well U bottom microplate에 넣고 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 각 well에 0.15 M NaCl로 현탁시킨 2% 토끼 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 반응시키고 당과 반응하는 최소저해농도(minimal inhibition concentration)를 구하였다. 당당, 이당류 및 당단백질은 모두 Sigma에서 구입하였다.

### 암세포독성

렉틴의 암세포에 대한 독성은 사람 유방암세포(MCF-7, Korean

Cell Line Bank)에 대해 실시하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양한 암세포(1×10<sup>5</sup> cells/ml)에 렉틴 농도를 달리하여 50 μl를 96 well culture plate(Nunc)에 첨가 후 72시간 동안 배양하고 살아있는 암세포의 비율은 CCK-8(Dojindo) assay법에 의해 제조회사의 매뉴얼에 따라 계산하였다.

### 렉틴-biotin 콘쥬게이트

렉틴(3 mg)을 100 mM phosphate buffer(pH 7.5) 2 ml에 용해 후 biotin N-hydroxysuccinimide ester(8.5 mg/ml) 용액을 dimethylformide에 용해 후 가하였다. 실온에서 2시간 동안 반응시키고 50 mM glycine을 100 mM phosphate(pH 7.5) 1 ml에 용해한 용액을 가하였다. 미결합 biotin을 제거하기 위하여 최종 반응액을 fetuin-agarose에 용출시킨 후 렉틴-biotin 콘쥬게이트를 분리하였다.

### Hapten Inhibition Assay

Fetuin(2 mg/ml)을 20 mM Tris-HCl(pH 8.0) 100 μl에 용해 후 희석하여 96-well U microplate에 100 μl씩 각각 넣고 4°C에서 16시간 반응시켰다. 코팅된 용액은 aspiration에 의해 제거하고 각 well은 Tris-HCl(pH 8.0)-0.1% Tween 20(TBST) 200 μl로 3회 세척하였다. 그 후 2.5% casein을 포함한 TBST 100 μl를 well에 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 후 aspiration에 의해 제거하고 각 well을 100 μl TBST로 3회 세척하였다. 그 후 여러 농도의 당단백질(0.02~2 mg/ml)을 50 μl씩 가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 aspiration에 의해 제거하고 각 well을 100 μl TBST로 3회 세척하였다. 최종적으로 Extravidin(Sigma) 100 μl를 가하고 37°C에서 1시간 반응시킨 후 aspiration에 의해 제거하고 각 well을 100 μl TBS로 3회 세척 후 ABTS(Sigma) 0.55 mg/ml 용액 100 ml에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 μl를 넣고 각 well에 100 μl씩 넣은 후 즉시 microplate reader를 사용하여 405 nm에서 각 well의 흡광도 값을 측정하고 10분 후 재측정하여 각각의 상대값을 구하여 시약을 넣는 순서에 의한 흡광도 오차를 줄였다.

## 결과 및 고찰

### 렉틴의 분리 및 효율 확인

최근 본 연구자들이 보고한 솔비나무 유래 렉틴 MFA의 정제 효율을 보다 높이기 위하여 fetuin-affinity column에 흡착된 렉틴에 대해 성분이 다른 용출액으로 분리를 시도하였다. 먼저 fetuin-agarose를 충전시킨 column을 제작하고 솔비나무 유래 단백질 원액을 결합시켜 미결합 물질의 흡광도값이 완전히 0이 된 것을 확인하고, 컬럼에 흡착된 단백질은 두 종류(borate buffer, alkaline buffer)로 용출시켜 얻어진 크로마토그램을 각각 작성하였다(Fig. 1). 컬럼에 시료를 반응시키고 20번까지 얻어진 분액

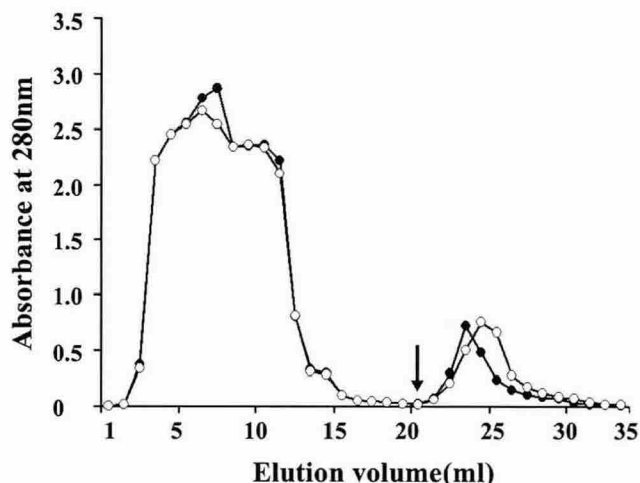


Fig. 1 - Elution profile of MFA using fetuin-affinity column chromatography. Arrow indicates the point elution with alkaline (pH 11.0) (○) and borate buffer (pH 8.0) (●), respectively.

들은 fetuin 컬럼에 결합하지 않은 단백질들이며, 21번부터는 용출 완충액을 각각 흘려 친화성 컬럼으로부터의 분리를 시도하고 흡광도값을 갖는 21~29번 분액들을 각각 얻었다. 이들은 각각 후술하는 렉틴 MFA 특유의 적혈구 응집반응과 전기영동 결과에 의해, 문헌에 보고된 양상<sup>10</sup>과 동일한 결과를 얻어, 이 분획들이 렉틴 MFA임을 확인하게 되었다.

정제된 렉틴에 대해 Bradford 법을 이용하여 각 단계별로 단백질 정량과 회수율을 비교 확인하였다. Borate buffer를 사용하여 용출한 경우 총 단백질로부터 얻어진 렉틴은 2.30 mg이며 정제 회수율은 3.83으로 alkaline buffer에 의해 얻어진 렉틴 2.98 mg, 회수율 4.97보다 약간(1.13%) 저하된 결과를 나타내었으나, 적혈구응집반응과 비활성도(specific activity)는 borate buffer의 경우 32, 13.91로 alkaline buffer에 의해 얻어진 적혈구응집반응 16, 비활성도 5.37보다 각각 2배, 2.6배 상승하였다(Table I). 이는 fetuin-affinity column에 대한 분리과정에서 borate buffer가 용출 완충액으로 alkaline buffer에 비해 회수율의 큰 변화없이 비활성이 높은 MFA를 얻는데 보다 효율적인 방법임을 나타내는 결과이다.

**렉틴의 적혈구응집반응 및 응집저해반응**

정제된 단백질에 대해 적혈구 응집반응을 실시한 결과, 기존에 보고한 결과<sup>10</sup>와 동일한 결과를 확인하였으며, 적혈구 응집

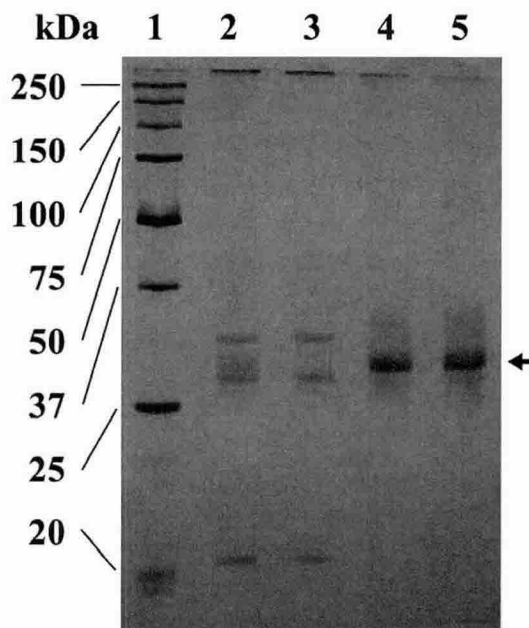


Fig. 2 - SDS-PAGE stained by silver nitrate of a lectin eluted with borate buffer on a fetuin-affinity column. Lane 1, molecular mass marker; lane 2, crude protein extract; lane 3, unbound fraction from fetuin-affinity column; lane 4, *Maackia fauriei* lectin without 2-mercaptoethanol; lane 5, *Maackia fauriei* lectin with 2-mercaptoethanol.

반응 결과로부터 당 결합특성을 보다 정확히 확인하고자 적혈구 응집저해반응에 의해 각종 단당, 이당류 및 당단백질과의 반응성을 확인하여 기존의 보고와 동일한 결과를 얻었다(data not shown). 특히 당단백질인 bovine thyroglobulin(0.48 mg/ml), bovine submaxillary mucin(BSM)(0.32 mg/ml), fetuin(0.16 mg/ml)에서 결합특이성이 나타났다. 당 결합력은 일반적인 렉틴의 특성과 비슷하게 단당 보다는 당단백질을 특이적으로 인식하고 일반적으로 최소저해농도가 낮을수록 당단백질에 대한 특이성이 높은 것으로 알려져 있는 것으로부터 fetuin에 대한 결합력이 가장 높은 것으로 나타났다.

**렉틴의 순도확인**

분리된 렉틴의 순도와 분자량을 확인하기 위하여 12% polyacrylamide gel상에서 전기영동을 실시하고 AgNO<sub>3</sub>로 염색하였다(Fig. 2). 그 결과, 단백질 원액(lane 2)으로부터 fetuin-affinity column에 흡착되지 않은 부분(lane 3)을 제거 후 borate

Table I - Purification efficiency of MFA on a fetuin-affinity column

	Total protein (mg)	Recovery (%)	Hemagglutination titer	Specific activity <sup>a</sup>
Crude protein extract	60	100	4	0.07
Elution with borate buffer (pH 8.0)	2.30	3.83	32	13.91
Elution with alkaline buffer (pH 11.0)	2.98	4.97	16	5.37

<sup>a</sup>Specific activity expressed as the hemagglutination titer per milligram of lectin.

buffer에 의해 용출되면서 농축된 렉틴은 30 kDa 부근에서 단일 밴드를 나타냈다(lane 4). 분자내 disulfide bond의 존재여부를 확인하기 위해 2-mercaptoethanol로 처리하여 전기영동 상에서 밴드를 확인한 결과 동일한 위치에서 밴드를 나타냈다(lane 5).

AgNO<sub>3</sub>로 염색하는 경우에는 일반적인 Coomassie blue에 의한 염색보다 100배 가량 감도가 향상되어 극소량의 불순물도 확인할 수 있으나 본 연구에 의해 얻어진 렉틴은 순도 98% 이상으로 분자간에 disulfide bond를 갖지 않는 분자량 30 kDa의 단백질임을 확인하였다. 또한, 음이온 교환 컬럼(Resource Q, Pharmacia)에 의한 HPLC 크로마토그램에서도 단일 피크를 나타냈다(data not shown).

#### 암세포독성

렉틴의 유방암세포에 대한 활성을 조사한 결과 100 µg/ml에서 40.0±3.2%, 10 µg/ml에서 4.7±1.6%, 1 µg/ml에서 1.2±0.2%의 세포사멸효과를 나타냈다. 이 결과는 alkaline buffer에 의해 분리된 MFA의 유방암에 대한 사멸효과와 유사한 결과<sup>10)</sup>이며, borate buffer에 의해 얻어진 렉틴이 유방암세포에 대한 사멸효과가 유지되고 있음을 확인하였다.

#### 당단백질에 대한 결합

렉틴의 당단백질에 대한 결합력을 재확인하기 위하여 biotin으로 표지한 렉틴을 제작하고 이를 이용하여 MFA와 가장 강한 결합을 하는 fetuin과의 결합에 대한 저해양상을 fetuin, BSM, thyroglobulin에 의해 확인하였다(Fig. 3). 그 결과 fetuin은 예상

대로 첨가 농도가 높아짐에 따라 흡광도가 감소하여 fetuin과 MFA와의 반응을 저해함을 확인하였으며, BSM과 thyroglobulin도 거의 동등한 농도의 비율로 저해함을 확인하였다. 특히 비교적 고농도에서는 fetuin, thyroglobulin>BSM, 저농도에서는 BSM>fetuin>thyroglobulin의 순으로 저해함을 확인하였으나 결합을 저해하는 데에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났으며 MFA가 시알산이 결합된 당단백질과 결합하는 것을 확인하였다.

## 결론

Fetuin-affinity column에 흡착된 솔비나무 유래 렉틴 MFA는 일반적인 affinity column의 용출조건인 hapten, acidic(pH 2~4) buffer, 0.1 M EDTA용액 등에서는 전혀 용출이 안 되어 그동안 alkaline buffer로 만 용출하였으나, 본 연구에 의해 MFA를 분리하는데 보다 효율적인 용출 완충액을 확인하였다. 즉, 단백질의 일부 변성을 일으킬 수 있으킬 가능성이 있는 기존의 alkaline buffer에 의해 분리하는 경우보다 borate buffer에 의해 얻어진 경우가 column에 흡착된 렉틴의 회수율의 큰 변화없이 비활성도는 더 높아진 결과를 얻었다. 최근 lectin-affinity column에 흡착된 올리고당을 용출시키는데 borate buffer를 사용한 예가 보고되고 있으며, 이는 올리고당과 렉틴과의 결합을 방해하는 성질을 이용한 것으로 알려져 있으며,<sup>14,15)</sup> 본 연구에서는 이를 역으로 렉틴을 분리하는데 적용하여 렉틴으로서의 활성을 유지하는 MFA를 효율적으로 분리할 수 있게 되었다. 이렇게 얻어진 MFA는 기존의 방법에 의해 얻어진 바와 같이 적혈구응집반응, 적혈구응집 저해반응, 분자량이 동일한 물질임을 확인하였으며, MFA의 당단백질에 대한 결합력을 확인하였다. 또한 사람 유방암세포에 대한 세포독성을 나타내 렉틴으로서의 활성이 유지되고 있음을 확인하였다. 한편, 당단백질에 대한 결합력을 확인할 수 있는 콘주게이트 MFA 재료를 확보하게 되었다.

MFA는 시알산과 결합하는 특성과 그 희귀성으로 다양한 관련 연구에 활용될 수 있으며, 현재는 특정 올리고당에 대한 결합특성과 렉틴의 구조적 특성을 연구하고 있고, 사람 암세포 표면의 시알산 콘주게이트에서 시알릴 에피토프<sup>16,17)</sup>에 대한 결합력 차를 확인하는 연구를 진행하고 있다.

## 감사의 말씀

이 논문은 2006학년도 중앙대학교 교내 학술연구비 지원에 의한 것이며, 이에 감사드립니다.

## 문헌

- 1) Lis, H. and Sharon, N. : Lectins as molecules and as tools,

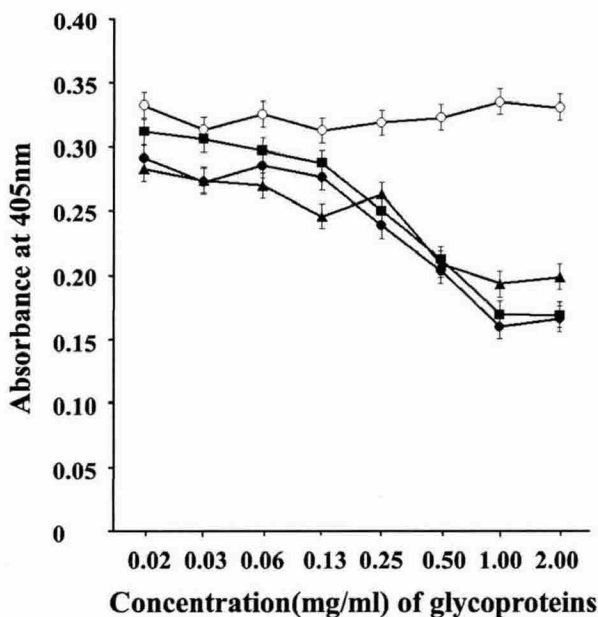


Fig. 3 - Inhibition on the binding of fetuin and biotin-labeled MFA. Control, (○); thyroglobulin, (■); fetuin, (●); and BSM, (▲).

- Annu. Rev. Biochem.* **55**, 35 (1986).
- 2) Cummings, R. D. : Use of lectins in analysis of glycoconjugates. *Methods in Enzymology* **230**, 66 (1994).
  - 3) Abdullaev, F. I. and de Mejia, E. G. : Antitumor effect of plant lectins. *Nat. Toxins* **5**, 157 (1997).
  - 4) Kocaurek, 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) Blake, D. A. and Goldstein, I. J. : Resolution of carbohydrates by lectin affinity chromatography. *Methods Enzymol.* **83**, 127 (1982).
  - 6) Sharon, N. : Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *Trends in Biochem. Sciences* **18**, 221 (1993).
  - 7) Rudiger, H. : Plant lectins - more than just tools for glycoscientists; occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta. Anat. (Basel)* **161**, 130 (1998).
  - 8) Gabius, H. J. : Animal lectins. *Eur. J. Biochem.* **243**, 543 (1997).
  - 9) Mandal, C. and Mandal, C. : Sialic acid binding lectins. *Experientia.* **46**, 433 (1990).
  - 10) 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 *Maackia fauriei*: comparison with lectins from *M. amurensis*. *Plant Science* **167**, 1315 (2004).
  - 11) Chung, Y. Y., Jung E. C., Lee, H. J. and Kim, H. H. : Production and isolation of IgT antibody raised against lectin obtained from *Maackia fauriei*. *Yakhak Hoeji* **49(1)**, 6 (2005).
  - 12) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 (1970).
  - 13) 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).
  - 14) Paiva, P. M. G., Souza, A. F., Oliva, M. L. V., Kennedy, J. F., Cavalcanti, M. S. M., Coelho, L. C. B. B. and Sampaio, C. A. M. : Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. *Bioresource Tech.* **88**, 75 (2003).
  - 15) Kennedy, J. F. and Rosevear, A. : An assessment of the fractionation of carbohydrates on concanavalin A-Sepharose 4B by affinity chromatography. *J. Chem. Soc. (Perkin 1)* **19**, 2041 (1973).
  - 16) Warren, L. : The distribution of sialic acids in nature. *Comp. Biochem. Physiol.* **10**, 153 (1963).
  - 17) 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).