

## Ionizing Radiation Effect on the Carbohydrate Moiety of Chicken Ovomucoid

Young-Keun Lee, Jin Kyu Kim, Jae Sung Kim, Hi Sup Song,  
Saovapong Charoen\* and Kitti Amornraksa†

*Korea Atomic Energy Research Institute,*

*\*Office of Atomic Energy for Peace, †Thammasat University*

### 계란 ovomucoid의 탄수화물 부분에 미치는 이온화방사선의 영향

이영근 · 김진규 · 김재성 · 송희섭 · Saovapong Charoen\* · Kitti Amornraksa†

한국원자력연구소, \*Office of Atomic Energy for Peace, †Thammasat University

**Abstract**—Radiation effects on carbohydrate moiety of chicken ovomucoid, a protease inhibitor as a typical allergenic glycoprotein of egg white, was observed. The trypsin inhibitory activity of chicken ovomucoid decreased exponentially and the inactivation was more significant irradiated in N<sub>2</sub> than in O<sub>2</sub>. From the protein blotting, radiation caused protein degradation in O<sub>2</sub> and protein aggregation also in N<sub>2</sub>. The patterns of carbohydrate blotting were also similar with that of protein blotting. Sugar chains in low molecular weight fraction (MW<5,000) were released by radiation and those in O<sub>2</sub> were higher than in N<sub>2</sub>. From the HPLC patterns of the degradation of sugar chains, all peaks of oligosaccharides have the tendency to decrease with the increase of radiation dose and more remarkable in O<sub>2</sub> than in N<sub>2</sub>. These results suggest that ionising radiation could cause the overall conformational changes of ovomucoid by the degradation and release of oligosaccharides.

*Key words* : radiation, chicken ovomucoid, carbohydrate moiety

**요약**—계란 흰자내에 존재하면서 전형적인 알레르기원이며 단백질분해효소 저해물질인 ovomucoid의 탄수화물 결사슬에 대한 방사선의 조사효과를 관찰하였다. Trypsin 저해 활성은 방사선 조사선량의 증가에 따라 급격히 손실되었는데 질소환경과 비교하였을 때, 산소환경에서 방사선 조사한 경우 ovomucoid의 불활성화가 현저히 보호되었다. Protein blotting 결과 산소환경에서 방사선을 조사한 경우는 단백질이 일부 파괴되었고, 질소환경하에서는 단백질 응집 현상이 일어났다. Carbohydrate blotting 결과로 나타난 밴드의 위치 및 형태 역시 protein blotting 결과와 유사하였다. HPLC 분석 결과 조사선량의 증가에 따라 모든 올리고당 분획이 감소하는 경향을 보였는데 산소환경하에서 더욱 현저하였다.

위의 결과로 보아, 방사선에 의해서 탄수화물 결사슬의 파괴 및 유리로 인한 전반적인 구조적 변화가 초래되어 ovomucoid의 활성도 변화를 좌우한 것으로 생각된다.

중심어 :  $\gamma$ -선, 계란 오보뮤코이드, 탄수화물 결사슬

## 서 론

조류의 ovomucoid는 분자량이 28,000 정도이며, 등전점이 4.0-4.6이고, 약 25%의 탄수화물이 함유되어 있고 전체 흰자위 단백질의 약10%에 달하는 당단백질로서, 열에 매우 강하고 화학물질에 안정하다고 알려져 있다<sup>(1, 2, 3)</sup>. 계란의 ovomucoid는 트립신 분자에 대한 하나의 작용부위(domain II)만을 갖고 있으며, 잘 알려져 있지는 않으나 작용 가능한 활성 부위가 더 있으며(domain I and III), 4개 혹은 5개의 탄수화물 결사슬이 단백질 주변에 부착되어 있는 구조로 알려져 있다<sup>(4)</sup>. 대부분의 탄수화물 결사슬은 galactose, mannose 및 N-acetylglucosamine으로 조성된 N-glycan으로서 glucose 12 분자보다 큰 결사슬 구조를 하고 있다<sup>(4)</sup>. 그러나 계란 ovomucoid의 탄수화물 결사슬이 항원성 및 트립신 저해활성에 관여하는지는 잘 알려지지 않고 있다. 다만 ovomucoid의 항원성이 열처리할 경우 쉽게 손실되는 것으로 보아 탄수화물 결사슬 자체는 항원성과는 연관이 거의 없는 것으로 생각되나 단백질 분해효소에 대한 보호제 역할을 할 것으로 추정하고 있다<sup>(5)</sup>. 일반적으로 이온화 방사선은 각종 결합을 깨든지 혹은 구조적인 변화를 초래함으로써 생물활성물질의 불활성화에 효과를 갖는 것으로 생각되고 있다. 그런데 위와 같이 화학적 구조 및 진화론적인 측면에서는 많은 연구가 되어왔으나<sup>(6)</sup>, 탄수화물부분에 대한 이온화방사선의 영향에 대한 연구는 아직까지 미진한 상태이다. 실제로 ovomucoid의 항원성에 대한 실험결과 산소환경에서는 방사선에 의한 항원성손실이 보호되는 데, 이는 방사선이 직접 단백질의 활성부위에 있는 아미노산을 손상시키는 것이 아니라 우선 탄수화물 결사슬에 작용하여 구조적인 변화를 초래하는 것으로 여겨지고 있다<sup>(7)</sup>. 본 연구는 산소 혹은 질소환경하에서 방사선에 의한 계란 ovomucoid 탄수화물 결사슬의 변화를 관찰하고 트립신 저해활성과의 관련성을 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재 료

Chicken ovomucoid(type III-O) 및 bovine panc-

reas로부터 추출된 trypsin(type III)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### 방사선 조사

인산 완충용액(pH 7.0)으로 0.01%의 계란 ovomucoid 용액을 조제한 후 상온 상압하에서 산소 혹은 질소를 통과하면서 방사선 조사하였다(Co-60, 약 70,000 Ci 용량, Atomic Energy of Canada Ltd.). Fricke dosimeter로 측정된 조사선량률은 0.76 kGy/hr 였다<sup>(8)</sup>.

### Trypsin 저해 활성

Trypsin 저해 활성은 420nm에서 기질로 benzoyl-L-arginine-P-nitroanilide (Peptide Institute, Osaka, Japan)를 사용하여 흡광도의 증가율을 측정함으로써 분석하였다<sup>(9)</sup>.

### Western blotting

15 mA로 약 2시간 반동안 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 행하였다 (12% T, resolving gel; 4% T, stacking gel)<sup>(10)</sup>. 위와 같이 분리된 단백질을 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immobilion-P, Millipore Co.)에 gel 당 48 mA로 약 30분 동안 옮겼다<sup>(11)</sup>. 단백질은 Coomassie brilliant blue로 염색하고 상온에서 말린 뒤 보관하였다. 탄수화물은 Konica Immuno Staining HRP-1000 Kit로 염색한 후 분석하였다<sup>(12)</sup>.

### 당량 분석

방사선 조사 및 여과(분자량<5,000, Millipore Co.)한 후 phenol-sulfate method로 당량을 분석하였다<sup>(13)</sup>.

### 탄수화물 결사슬의 HPLC 분석

Ovomucoid의 탄수화물 결사슬은 oligosaccharide chain preparation system (Honen Hydraclub S-204, Tokyo)을 이용하여 hydrazinolysis에 의해 유리시켰으며 amino group은 N-acetylation 시켰다. Palstation Pyridilamination Reagent Kit (Takara Shuzo Co., Ltd., Japan)을 이용하여 coupling reaction (pyri-

dilamination)을 수행하였고, PALPAK Type S column (Takara Biochemicals, Japan)으로 탄수화물 겔사슬을 분석하였다.

### 결과 및 고찰

#### Trypsin 저해 활성

그림 1에 산소 및 질소환경하에서 방사선을 조사하였을 때의 ovomucoid의 불활성화 곡선을 나타내었다. 일반적으로 용액상의 생체물질은 주로 물분자의 방사선 분해에서 생겨나는 산물들의 영향으로 불활성화가 가능하다고 알려져 있다<sup>(14)</sup>. 즉 질소환경하에서는 hydroxyl radical(OH), hydrogen atom(H) 및 hydrated electron( $e_{aq}^-$ ) 등에 의해 불활성화가 가능한데 더우기 방사선 조사중에는  $e_{aq}^-$ 이 재빨리 OH로 전환되어 불활성화가 가속화 된다. 그렇기 때문에 그림 1에서 보는 바와 같이 질소환경하에서 ovomucoid의 불활성화가 극심하게 일어난 것을 알 수 있다. 반면에 산소환경하에서는 산소가 H 및  $e_{aq}^-$ 과 작용하여 OH와 superoxide를 생성하기 때문에 즉, 위의 두 환원종을 제거함으로써 불활성화를 보호하는 역할을 하는 것으로 생각된다<sup>(15)</sup>. 그림1에서 보면, 산소환경하에서의 ovomucoid의 불활성화의 정도가 질소환경하에서 보다 현저히 작음을 알 수 있다.

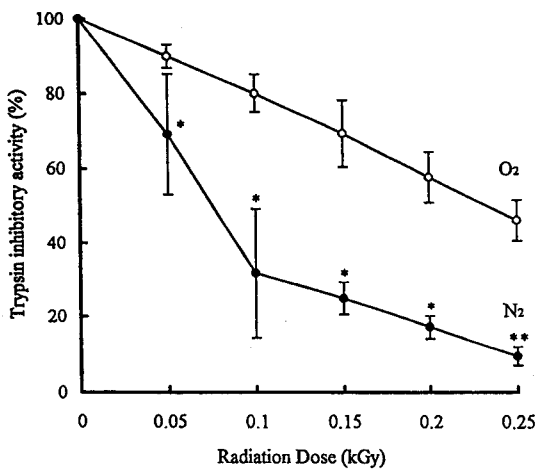


Fig. 1. Trypsin inhibitory activity of chicken ovomucoid irradiated in phosphate buffered solution(0.01%). \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ ,  $n = 3$ .

#### Western blotting

그림 2에 산소 및 질소환경하에서 방사선 조사 후 SDS-PAGE 및 western blotting 결과를 나타내었다. Protein blotting 실험결과, 방사선 조사선량의 증가에 따라 산소환경하에서는 단백질의 파괴가 일어났으며, 질소환경하에서는, 모든 조사시료에서, 불분명하지만 유동성이 낮은 단백질들의 응집현상이 나타나는 것으로 보였다. 또한 carbohydrate blotting의 경우 역시 protein blotting 결과와 유사한 band pattern을 보였다. 즉, 탄수화물 부분과 단백질 부분은 구조적으로 밀접한 연관성을 갖고 있으며, 이는 ovomucoid 활성 부위 주변의 탄수화물 구조가 쉽게 해체되지 않을 수 있다는 것을 시사해 준다.

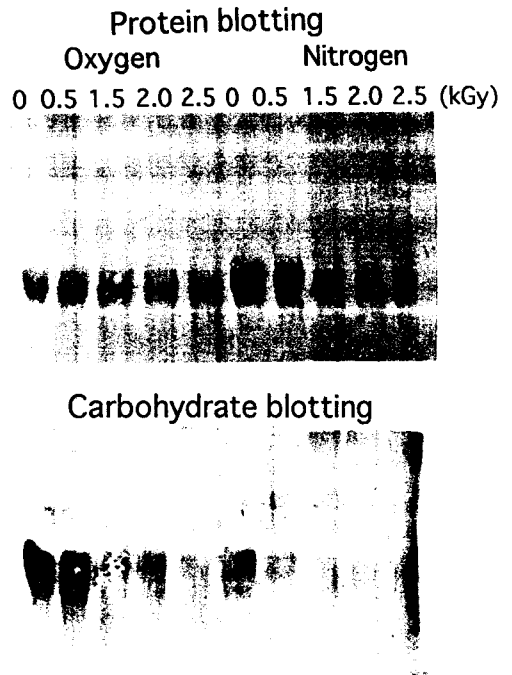


Fig. 2. Western blotting of irradiated chicken ovomucoid. Ovomucoid separated by SDS-PAGE was transferred onto a PVDF membrane(Towin et al., 1979) and proteins were stained by Coomassie brilliant blue and carbohydrates by Konica Immuno Staining HRP-1000 Kit.

#### 당량 및 탄수화물 겔사슬의 HPLC 분석

계란의 ovomucoid를 방사선조사한 후 당량의 변

화를 그림 3에 나타내었다. 산소환경이나 질소환경 공히 방사선조사한 ovomucoid로부터 저분자량분획의 탄수화물 결사슬이 유리되었다. 그 양은 산소환경하에서가 질소환경하에서 보다 더 큰 경향으로 나타났다.

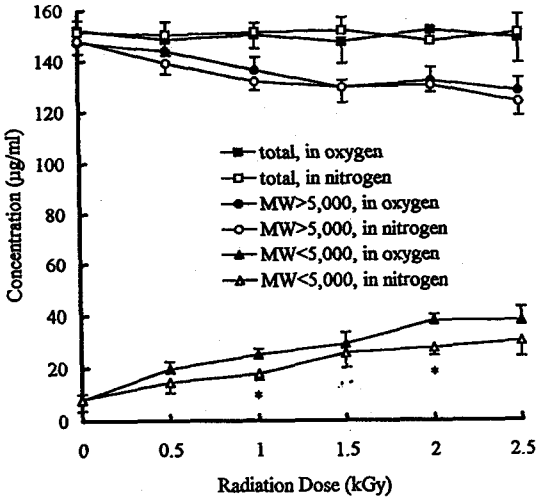


Fig. 3. Sugar contents of irradiated chicken ovomucoid. Sugar contents were measured by phenol-sulphate method (Dubois et al., 1956) after irradiation and molecular weight filtration (MW<5,000). \* : p<0.05, n = 3.

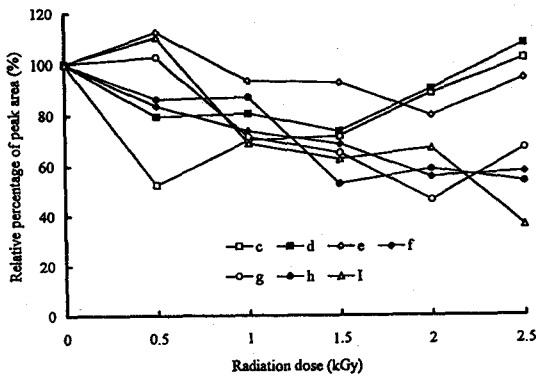


Fig. 4. Degradation of sugar chains of chicken ovomucoid in oxygen. Sugar chains of ovomucoid were analysed by the PALPAK Type S column after hydrazinolysis, N-acetylation and pyridilamination.

이것은 방사선에 의해 탄수화물 결사슬의 배당체결합이 파괴되어 그 결과로 올리고당이 유리되었음을 시사해 준다. 계란의 ovomucoid를 방사선조사한 후 탄수화물 결사슬의 유리를 HPLC로 분석한 결과를 그림 4 및 그림 5에 나타내었다. 모든 시료군에서 탄수화물 결사슬의 유리되는 peaks(c, d : 3 antenna, e : 4 antenna, f, g, h, I : 5 antenna ; Takara Biochemicals 에서 제공한 대조군)의 형태는 방사선조사선량의 증가에 따라 감소하는 경향을 보였으며, 산소환경하에서 그 정도가 뚜렷하였다(그림 4). 이는 방사선에 의한 계란 ovomucoid로부터의 올리고당의 유리가 산소환경하에서 더욱 효과가 있음을 시사해 준다.

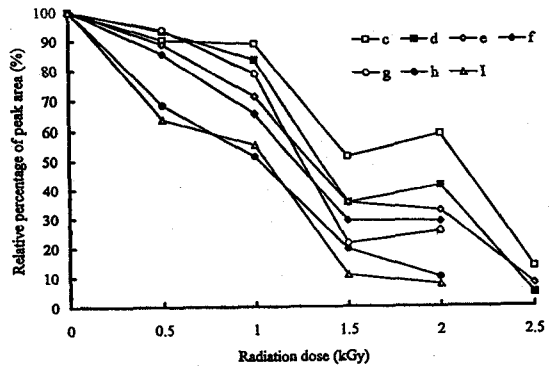


Fig. 5. Degradation of sugar chains of chicken ovomucoid in nitrogen. Sugar chains of ovomucoid were analysed by the PALPAK Type S column after hydrazinolysis, N-acetylation and pyridilamination.

Ovomucoid의 탄수화물 결사슬은 일종의 complex-type N-glycans으로 분류될 수 있는 데 이는 trimannosyl core를 제외하고는 mannose가 없으며, 대신 N-acetyl glucosamine 잔기가 존재하는 구조로 설명될 수 있다. 당단백질내에서는 일반적으로 탄수화물 결사슬이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 즉 계란의 ovomucoid 분자내의 탄수화물은 그 양이 총분자량의 25% 이상으로 그만큼 더 단백질 표면을 감싸줄 수 있는 구조를 만들 수 있다. 더우기 편평하면서도 견고한 구조인 기능적 올리고당의 구조

특성( $C_1-N-C=O$  배당체 결합)과 asparagine 결사슬의 유동성을 고려해 보면, 탄수화물 결사슬은 더욱 더 단백질의 외부를 지킬 수 있음을 알 수 있다<sup>(16)</sup>.

Watanabe 등은 circular dichroism 분광조사를 통하여 탄수화물 결사슬이 ovomucoid의  $\beta$ -구조 및  $\beta$ -turn의 측정에 영향을 준다고 하였다<sup>(17)</sup>. 즉, 방사선에 의해서 탄수화물 결사슬로부터 올리고당이 유리됨으로써 분자의 전체적인 구조가 변하게 되어, 특히 asparagine 결사슬의 공간적 변화 및 아마도  $\beta$ -구조 및  $\beta$ -turn, 분자의 활성을 변화시킬 수 있다고 생각된다.

### 참 고 문 헌

1. Kato I., Kohr W.J. and Laskowski Jr. M.(1977) Evolution of avian ovomucoids. (In) *Regulatory proteolytic enzymes and their inhibitors*, FEBS Federation of European Biochemical Societies 11th Meeting, Copenhagen. 47, 197.
2. Kume T. and Ishigaki I.(1987) Functional molecular size of trypsin inhibitors as determined by radiation inactivation analysis. *Biochim. Biophys. Acta* 914, 101.
3. Matsuda T. and Nakamura R.(1994) Molecular structure and immunological properties of food allergens. *Trend Food Sci.* 4, 289.
4. Yamashita K., Kamerling J. P. and Kobata A. (1982) Structural study of the carbohydrate moiety of the ovomucoid. *J. Biol. Chem.* 257, 12809.
5. Matsuda T., Watanabe T. and Nakamura R. (1982) Immunochemical studies in thermal denaturation of ovomucoid. *Biochim. Biophys. Acta* 707, 121.
6. Laskowski, Jr. M., et al.,(1987) Ovomucoid third domains from 100 Avian species : Isolation, sequences, and hypervariability of enzyme-inhibitor contact residues. *Biochemistry* 26, 202.
7. Yang J.-S., Kim J.-H., Matsuhashi S. and Kume T.(1996) Changes in biochemical properties of ovomucoid by radiation. *Rad. Phys. Chem.* (in press).
8. Niels W.H. and Roger J. B.(1970) *Manual on Radiation Dosimetry*, Marcel Dekker Inc., New York.
9. Waheed A. and Salahuddin A.(1975) Isolation and characterization of a variant of ovomucoid. *Biochem. J.* 147, 139.
10. Laemmli U. K.(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680.
11. Towbin H., Staehelin T. and Gordon J.(1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350.
12. Kondo M., Harada H., Sunada S. and Yamaguchi T.(1991) Increased selectivity in the detection of glycoproteins on nitrocellulose membranes by washing with sodium hydroxide solution. *Electrophoresis* 12, 685.
13. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F.(1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350.
14. Okada S.(1970) *Radiation chemistry* (Altman K.I., Gerber G.B. and Okada S., eds.), Academic Press, New York.
15. Spinks J. W. T. and Woods R. J.(1976) *An introduction to radiation chemistry*, Jhon Wiley and Sons Inc., New York.
16. Dwek Raymond A.(1996) *Glycobiology : Toward understanding the function of sugars*. *Chem. Rev.* 96, 683.
17. Watanabe K., Matsuda T. and Sato Y.(1981) The secondary structure of ovomucoid and its domains as studied by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* 667, 242.