

Maackia fauriei 유래 렉틴의 중성당 및 아미노당 조성

나광흠 · 박병태 · 박재완 · 한경진 · 박현주 · 김하형[#]

중앙대학교 약학대학

(Received January 13, 2009; Revised February 2, 2009; Accepted February 11, 2009)

Neutral and Amino Sugars Composition of a Lectin from *Maackia fauriei*

Kwang Heum Na, Byung Tae Park, Jae Wan Park, Kyong Jin Han, Hyun Joo Park and HaHyung Kim[#]

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

Abstract — The glycosylation of therapeutic glycoproteins can affect their efficacy, stability, solubility, and half-life. Analyzing the composition of monosaccharides, such as that of neutral and amino sugars, is the first step for elucidating the structure of glycan attached to glycoproteins. In the present study, neutral and amino sugars of lectin obtained from *Maackia fauriei* were analyzed using an enzyme-linked lectinsorbent assay (ELLA) and high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). Peroxidase-labeled lectins such as concanavalin A, *Ricinus communis* agglutinin, and soybean agglutinin were used for ELLA, since they specifically bind to the monosaccharide residue most frequently encountered in a glycan. The hydrosylate of lectin was prepared by treatment with trifluoroacetic acid, which resulted in the lectin mainly possessing the N-glycan consisting of 98.1 pmol Fuc, 342.1 pmol GlcN, 51.9 pmol Gal, 678.9 pmol Man, and 330.7 pmol Xyl. The present results demonstrate that ELLA and HPAEC-PAD are very effective methods for rapidly estimating the types and relative amounts of monosaccharides in intact glycoproteins.

Keywords □ glycoprotein, enzyme-linked lectinsorbent assay, HPAEC-PAD, monosaccharide

단백질에 결합된 올리고당은 N-acetylglucosamine(GlcNAc)의 환원 말단이 Asn의 아미드기에 결합된 N-글리칸(glycan)과 N-acetylgalactosamine(GalNAc)의 환원 말단이 Ser 혹은 Thr의 히드록실기에 결합된 O-글리칸으로 구분된다. 동물유래 당단백질의 당화(glycosylation)는 fucose(Fuc), galactose(Gal), glucose(Glc), mannose(Man), GlcNAc, GalNAc과 같은 10개 내외의 단당이 단백질에 연결된 형태로 이루어져 있고, 단백질 발현 시스템에 따라 부위별 분지된 당의 수와 길이가 다른 이질성(microheterogeneity)을 나타내 분석이 대단히 어려운 실정이다. 또한, 당화는 단백질의 구조적 성질,¹⁾ 생물학적 기능,²⁾ 반감기,³⁾ 세포인식,⁴⁾ 단백질의 세포내 위치 결정 및 분비신호⁵⁾ 등에 있어서 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

최근 단백질 의약품은 암, 자가면역 질환 등 다양한 질병의 치료제로 개발 및 연구되고 있으나, 비교적 낮은 활성과 생체 내에서 빠르게 소실되는 성질은 의약품 개발의 한계점으로 인식되고

있으며, 이를 극복하기 위하여 당단백질에 결합된 당의 역할이 주목을 받고 있다.⁵⁾ 특히, 당단백질 호르몬인 erythropoietin(EPO)의 경우,⁶⁾ 기존의 EPO에 2개의 추가적인 N-글리칸이 포함된 Darbepoetin alfa가 개발 되었으며, 이는 혈장내 반감기를 약 3배 증가시키고, 재조합 사람 EPO보다 생체내 활성이 높아진 것으로 알려졌다. EPO외에도 인터페론, 인터루킨-2, GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor), tPA(tissue plasminogen activator)의 경우 재조합 단백질의 활성에 당화가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁷⁾ 또한 식물 유래 당단백질의 경우 동물세포 유래 당단백질과 달리 arabinose(Ara), xylose(Xyl)가 부가된 당화의 미묘한 차이로 인해 면역원성이 나타날 가능성이 보고⁸⁾되면서 관련 연구의 중요성이 더욱 부각되고 있다.

단당 분석에는 주로 기체 크로마토그래피-질량 분석법(gas chromatography-mass spectrometry),⁹⁾ pulsed amperometric detection이 연결된 high performance anion exchange chromatography(HPAEC-PAD),¹⁰⁾ 모세관 전기영동(capillary electrophoresis),¹¹⁾ 형광검출기에 의한 HPLC¹²⁾를 이용한 분석이 주로 이용되고 있다. 이 중에서 HPAEC-PAD법이 가장 감도가 높고

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

재현성이 우수한 방법으로 알려져 있다.¹³⁾ HPAEC-PAD는 알칼리 이동상을 이용하여 분리하며, 중성당, 아미노당은 pKa 값이 12~14이므로 알칼리 pH에서 이온화가 되고 이를 이온교환 크로마토그래피법을 통해 분리하는 방법이다.¹⁴⁾ 기존의 실리카를 이용한 음이온교환 크로마토그래피로는 산성을 나타내는 당이나 당펩타이드의 분석은 가능하나 이동상으로 높은 pH를 요구하는 중성당의 경우는 분석하기 어려운 실정이었다. 그러나 고분자 중합체, 비다공성의 특징을 가지는 MicroBead pellicular resin으로 구성된 CarboPac PA 컬럼은 이동상의 높은 pH에서도 안정적이고 내구성이 뛰어나며 압력이 4000 psi까지도 분석이 가능한 특징을 가지며, 특히 중성당을 효과적으로 분석 할 수 있는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁾

본 연구실에서는 제주도에서 자생하는 솔비나무(*Maackia fauriei*)의 줄기로부터 얻어진 단백질 용액을 fetuin-affinity column에 흡착시키고 분리 조건을 pH 11.0의 alkaline buffer 혹은 pH 8.0의 borate buffer로 분리, 정제하여 시알산과 특이적으로 결합하는 단백질 MFA(*Maackia fauriei* agglutinin)의 특성과 사람 유래 암세포에 대한 사멸 효과를 보고한 바 있다.¹⁵⁾

본 논문에서는 이 식물 유래 단백질인 MFA에 결합된 당당의 조성을 확인하기 위하여, peroxidase가 표지된 3 종류 렉틴의 특정 당에 대한 결합 특성을 이용한 enzyme-linked lectinsorbent assay(ELLA)법과 당단백질을 산 가수분해 처리후 얻어진 당당을 PAD가 연결된 HPAEC법을 적용하여 분석하였으며, 당의 구조 및 조성이 잘 알려진 당단백질인 소 유래 페투인(bovine fetuin)을 표준물질로 사용하였다.

실험 방법

단백질의 분리

M. fauriei 유래 단백질의 분리는 본 연구자들이 이미 문헌에 보고한 방법에 준하여 실시하였다.¹⁵⁾ 즉, 솔비나무 줄기 20 g을 4°C에서 20 mM Tris-HCl(pH 8.0) 400 ml에 용해하여 단백질 용액을 추출하고, 4°C에서 16시간 교반 후 12,000×g에서 30분간 원심분리하였다. 상층액을 0.45 µm 필터로 여과 후, 미리 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)으로 평형화한 페투인-agarose(Sigma)로 충전시킨 affinity column(1×3 cm)에 흘려 같은 원층액으로 280 nm에서 흡광도가 0이 될 때까지 용출시켰다. 흡착된 단백질은 100 mM borate buffer(pH 8.0)로 각각 용출시켜 당단백질을 분리하였다.

단백질의 분자량 및 순도확인

본 연구에 사용한 당단백질의 분자량 및 정제 순도를 확인하기 위해 Laemmli법¹⁶⁾에 따라 15% polyacrylamide gel을 제작 후 전기영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel

electrophoresis, SDS-PAGE)을 실시하였다. 분자량 표준물질(20~250 kDa)은 Bio-Rad사에서 구입하여 사용하였다.

단백질 정량

이미 농도를 알고 있는 bovine serum albumin(BSA, Bio-Rad)을 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 0.5 mg/ml 표준 농도로 하여 검량선을 작성한 후, microplate well에 1 mg/ml로 조제한 당단백질 용액을 0, 2, 4, 8, 16배 희석하여 각 well에 10 µl씩을 넣고, 여기에 1:4 (v/v) 비율로 희석하여 Whatman #1 filter paper로 여과한 dye reagent(Bio-Rad)를 각 well에 200 µl씩 넣은 후 microplate mixer로 혼합하였다. 37°C에서 5분 동안 반응시킨 후 595 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하여 검량선의 Y축에 대응하는 X축의 값으로 Bradford법¹⁷⁾에 따라 단백질을 정량하였다.

단백질 활성

분리된 당단백질 MFA의 활성 확인은 적혈구응집 및 응집저해반응을 이미 보고한 방법에 준하여 실시하였다.¹⁵⁾ 즉, 당단백질 용액을 0.15 M NaCl로 2배씩 희석 후 96-well U bottom microplate(NUNC)에 50 µl씩 넣고 2%로 현탁시킨 토끼 적혈구 각각 50 µl와 반응시켰다. 1시간 동안 실온에 방치한 후 0.15 M NaCl 50 µl와 2% 적혈구 50 만을 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.

단백질에 결합된 당 분포 분석

당단백질에 결합된 당의 분포를 확인하고자 다음과 같은 실험을 적용하였다.¹⁸⁾ 즉, 당단백질 0.1 mg/ml을 50 µl씩 microplate well에 각각 코팅 후 37°C에서 1시간 반응시키고, 코팅된 용액은 aspiration으로 제거한 후, 각 well은 PBS와 0.1% Tween 20 혼합용액(PBST) 100 µl로 3회 세척하였다. 여기에 1% BSA를 함유한 PBS 100 µl를 blocking solution으로 하여 1시간 동안 37°C에서 반응시키고, 반응액은 aspiration으로 제거한 후, 각 well을 100 µl의 PBST로 3회 세척하였다. 여기에 concanavalin A (ConA), *Ricinus communis* agglutinin(RCA₁₂₀), soybean agglutinin(SBA)에 horseradish peroxidase로 표지된 렉틴(Sigma) 용액(20 µg/ml)을 100 µl씩 각 well에 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 코팅된 용액은 aspiration으로 제거하고 각 well은 100 µl의 PBST로 5회 세척하였다. PBS에 녹인 0.55% 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS) 1 ml에 H₂O₂ 1 µl를 넣은 용액 100 µl를 각 well에 넣고 즉시 microplate reader를 사용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하고, ABTS를 가하는 시간차에 의한 각 well의 오차를 최소화하기 위하여 5분 후에 다

시 측정하여 그 차이값을 산출하였다.

중성당 및 아미노당 분석

제조사인 Sigma에서 구입한 Fuc, Ara, Gal, Glc, Man, Xyl, galactosamine(GalN), glucosamine(GlcN)의 혼합물을 각각 100 pmol 혹은 혼합액 800 pmole을 제조후 희석하여 이동상을 NaOH(Fischer)로 하여 농도를 20 mM로 하고 실온에서 AminoTrap(Dionex) 컬럼이 연결된 CarboPac PA10(Dionex) 컬럼을 이용하였으며 유속은 0.5 ml/min로 하였다. 아미노당의 경우에는 GlcNAC, GalNAC의 농도를 100 pmol 제조 후 산가수분해 조건인 2 M trifluoroacetic acid(TFA)를 첨가후 100°C에서 4 시간 처리하고 0.2 µm PVDF syringe filter를 이용하여 여과후 분석을 실시하였다.

단백질의 산가수분해 처리

중성당, 아미노당 분석시에는 당단백질을 2 M TFA를 첨가후 100°C에서 4시간 처리하고 0.2 PVDF syringe filter를 이용하여 여과후 분석을 실시하였다. 산가수분해 반응 시킨 후 Rotary evaporator(Eyela)를 사용하여 산을 제거하였으며, 남아있는 산을 완전히 제거하기 위하여 3차 증류수 350 µl를 가한 후 Rotary evaporator를 이용하여 제거하는 과정을 2번 반복하였다. 완전히 건조된 바이알에 3차 증류수 150 µl를 가하여 당단백질 산가수분해 용액의 당단백질 농도가 0.2 mg/ml가 되도록 하였으며, 시료는 최종적으로 0.2 µm PVDF syringe filter를 사용하여 여과하였다.

HPAEC-PAD 조건 및 컬럼

크리마토그램 시스템은 ICS-300(Dionex)를 이용하였다. 분석시에는 AgCl을 작동 전극으로 하였으며 integrated amperometric quadruple 모드(E1=+0.1 V, E2=-2.0 V, E3=+0.6 V, E4=-0.1 V)로 하여 산가수분해 당단백질 시료 25 µl를 주입하고 Aminotrap(Dionex)이 연결된 Carbopac PA10(Dionex) 컬럼을 이용하여 측정하였다. 데이터는 Chromelon 6.80 소프트웨어(Dionex)를 이용하여 분석하였다.

실험결과 및 고찰

단백질의 분리, 순도 및 활성

솔비나무 유래 단백질 MFA의 분리는 본 연구자들이 보고한 방법에 준하여 실시하였다.¹⁵⁾ 즉, fetuin-agarose를 충전시킨 컬럼을 제작하고 단백질 원액을 결합시켜 미결합 물질의 흡광도값이 완전히 0이 된 것을 확인하고, 컬럼에 흡착된 단백질을 alkaline buffer로 용출시켜 얻어진 단백질이 당단백질 MFA 특유의 적혈구 응집반응과 전기영동 결과에 의해, 문헌에 보고된 양성¹⁵⁾과

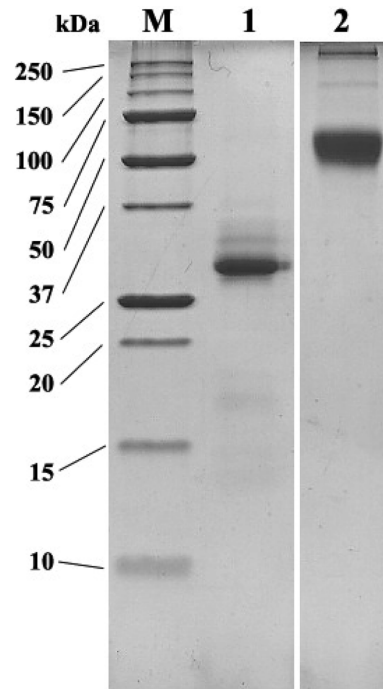


Fig. 1 – SDS-PAGE of purified MFA (lane 1) and fetuin (lane 2) used in this study. Lane M, molecular mass marker.

동일한 결과를 얻어, 이 분획들이 당단백질 MFA임을 확인하였다. 또한, 정제된 당단백질에 대해 Bradford 법을 이용하여 각 단계별로 단백질 정량을 실시하고 분리된 당단백질의 순도와 분자량을 확인하기 위하여 15% polyacrylamide gel상에서 전기영동을 실시하였다(Fig. 1). 그 결과, 30 kDa에서 단일 밴드를 나타냈으며(lane 1), 그 순도는 98% 이상임을 확인하였다. 정제된 단백질에 대해 적혈구 응집반응을 실시한 결과, 기존에 보고한 결과¹⁵⁾와 동일한 결과를 확인하였으며, 적혈구 응집저해반응 결과로부터 시알산을 인식하는 당단백질임을 확인하였다(데이터는 제시하지 않음). 표준물질로 사용한 페투인은 제조사(Sigma)로부터 구입하였으며 단백질 분자량은 48 kDa이나 당화에 의한 약 60 kDa에서의 밴드를 확인하였으며, 이는 이미 문헌에 보고된 바와 동일하고,¹⁹⁾ 순도는 약 98% 이상으로 더 이상 정제하지 않고 그대로 사용하였다.

당분포 확인

단백질에 결합된 당 특이성과 그 분포를 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다. 먼저 N-글리칸과 결합하는 렉틴으로 Man와 결합하는 ConA²⁰⁾와 Gal와 결합하는 RCA₁₂₀,²¹⁾ O-글리칸과 결합하는 렉틴으로 GalNAC과 결합하는 SBA²²⁾를 이용하였으며, 이들 이 각각 peroxidase로 표지된 컨쥬게이트를 당단백질과 96 well에서 반응시킨 후, 415 nm에서의 흡광도를 측정하여 반응성을 확인하였다(Fig. 2).

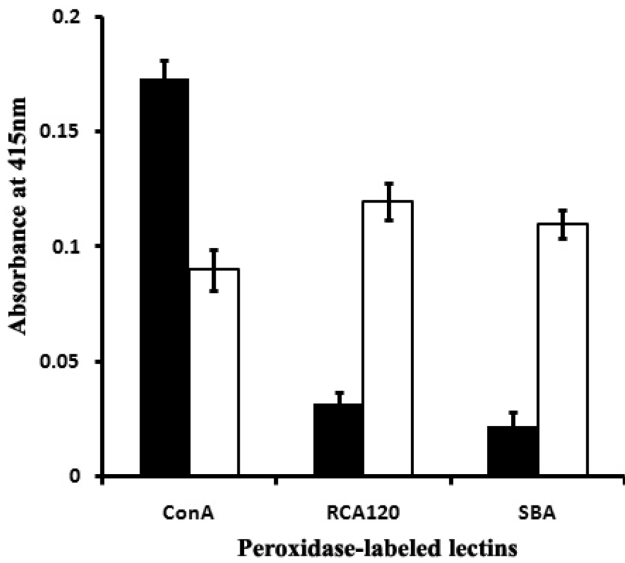


Fig. 2 – Binding of peroxidase-labeled three lectins to MFA (■) and fetuin (□).

그 결과, 페튜인의 경우에는 ConA, RCA₁₂₀, SBA에 대해서 유의성 있는 반응을 나타내었으며, 이는 페튜인의 표면에 Man, Gal, GalNAc이 각각 노출된 글리칸을 함유하고 있음을 나타낸다. 반면, MFA에서는 ConA에 대해서는 반응성을 나타내고 RCA₁₂₀, SBA에 대해서 반응이 현저히 저하된 결과를 나타냈으며, 이는 MFA 표면에는 Man가 노출되어 있으나 Gal와 GalNAc은 거의 존재하지 않음을 나타낸다. 이 결과로부터 페튜인은 문헌에 보고된 바와 같이 N-과 O-글리칸이 결합되어 있으며,^{23,24} MFA에는 N-글리칸은 존재하지만 O-글리칸은 존재하지 않을 가능성을 확인하였다.

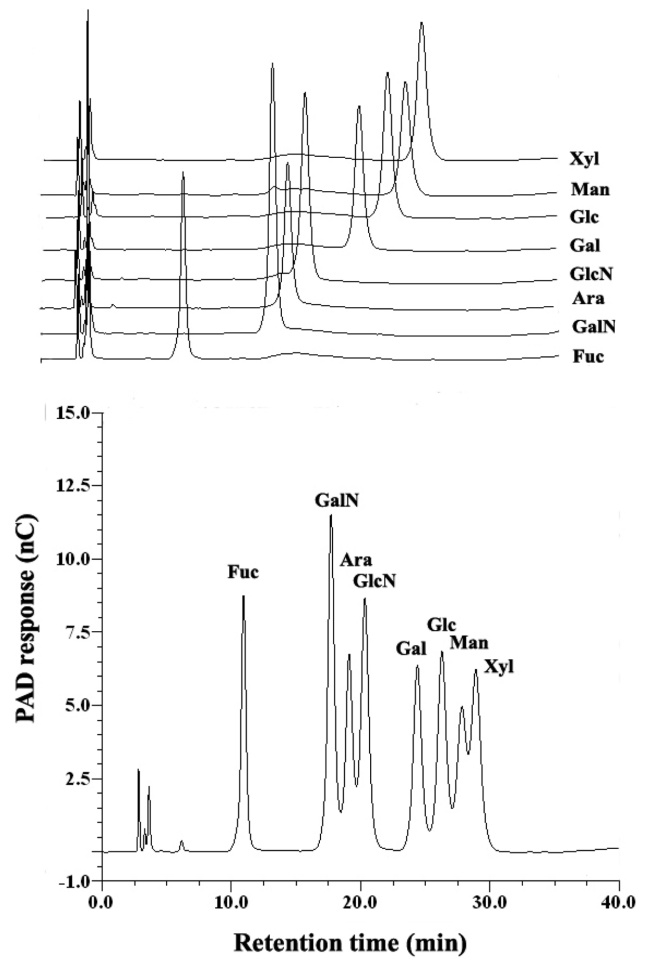


Fig. 4 – Chromatogram of HPAEC-PAD of each (upper) and mixture (down) of neutral and amino sugars on the CarboPac PA10 column.

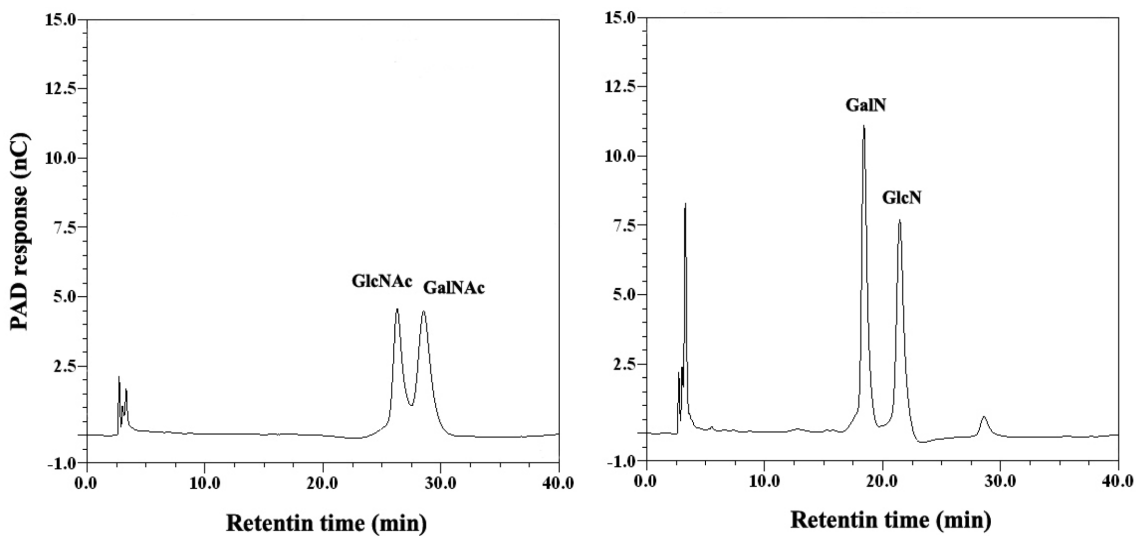


Fig. 3 – Chromatogram of HPAEC-PAD of GlcNAc and GalNAc (left) and acid hydrolysate (GalN and GlcN) of GalNAc and GlcNAc (right) on the CarboPac PA10 column.

아미노당의 deacetylation

당단백질 중에 존재하는 중요한 아미노당인 GlcNAc과 GalNAc은 당단백질로부터 산가수분해 반응을 실시하면 acetyl기가 탈리되는 deacetylation 현상이 보고되고 있다.²⁵⁾ 이를 HPAEC-PAD에서 적용가능한지 여부를 확인하기 위하여 GlcNAc과 GalNAc 표준물질 100 pmol 혼합액을 산가수분해 반응을 실시한 것과 실시하지 않은 2 종류를 AminoTrap을 연결한 CarboPac-PA10 칼럼을 사용하여 비교 분석하였다(Fig. 3). 그 결과, 산가수분해 반응을 거치면서 100 pmol GlcNAc과 100 pmol GalNAc의 피크가 완전히 소실되고 각각 N-acetyl기가 탈리된 GlcN과 Gal이 각각 검출되었으며 그 대부분(98%)이 deacetylation됨을 확인하였다.

중성당 및 아미노당 분석

8가지 당당 표준물질을 100 pmol씩 CarboPac-PA10 칼럼으로 분석함으로써 각 당당의 용출시간을 확인하였다(Fig. 4). 중성당과 아미노당 표준물질 Fuc, GalN, GlcN, Gal, Glc, Man, Xyl, Ara를 각각 100 pmol 혼합액을 시료로 하여 분석하였다. 중성당

과 아미노당 혼합액을 이동상의 NaOH 농도를 20 mM로 한 경우 그 분리를 확인하였으며, 유속을 0.5 ml/min으로 분석한 결과, Fuc, GalN, Ara, GlcN, Gal, Glc, Man, Xyl의 순서로 당당 표준물질이 검출되었으며, 30분 이내에 모든 당이 분석됨을 알 수 있었다. 특히, 일반적으로 Ara와 GlcN, Man와 Xyl은 각각 pKa 값이 유사하여 분리가 대단히 어려운 것으로 알려져 있으나²⁶⁾ 본 방법에 의해 분리가 가능함을 확인하였다.

중성당, 아미노당, 시알산의 검량선

중성당과 아미노당의 산가수분해 후 정량성을 확인하기 위하여 농도별 검량선을 작성하였다. 중성당과 아미노당 표준물질로 Fuc, GalN, GlcN, Gal, Glc, Man, Xyl, Ara 혼합액을 각각 800 pmol로부터 시작하여 2배씩 희석을 하였다. 희석한 표준물질 혼합액을 산가수분해 반응 조건에 따라서 반응시킨 후 산제거 과정을 거쳐 AminoTrap을 연결한 CarboPac-PA10칼럼을 이용하여 분석하였다.

각 표준물질의 농도별 피크 높이(nC)에 따라 검량선을 작성한

Table I – Retention time and peak height of various concentrations of neutral and amino sugars on the CarboPac PA10 column using HPAEC-PAD

Carbohydrate	Retention time	Peak height										R ²
		800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	
Fuc	10.95	62.64	33.13	17.17	7.80	4.04	2.02	1.21	0.75	0.34	ND	0.999
GalN	17.80	76.66	39.39	19.89	8.86	4.54	2.29	1.37	0.63	0.46	ND	0.999
Ara	19.15	12.89	7.13	3.88	2.88	1.56	0.74	0.47	0.12	0.07	ND	0.990
GlcN	20.42	52.93	26.44	13.48	6.12	3.12	1.59	0.98	0.66	0.43	ND	0.999
Gal	24.47	32.60	16.82	8.96	4.13	2.21	1.15	0.65	0.59	0.21	0.10	0.999
Glc	26.38	36.25	18.94	10.56	4.83	2.62	1.35	0.84	0.56	0.60	ND	0.998
Man	27.93	27.04	14.17	7.92	3.62	1.95	1.05	0.56	0.36	0.07	ND	0.998
Xyl	28.98	31.26	16.27	8.34	3.78	2.22	0.94	0.67	0.19	0.08	0.03	0.999

ND : Not detected.

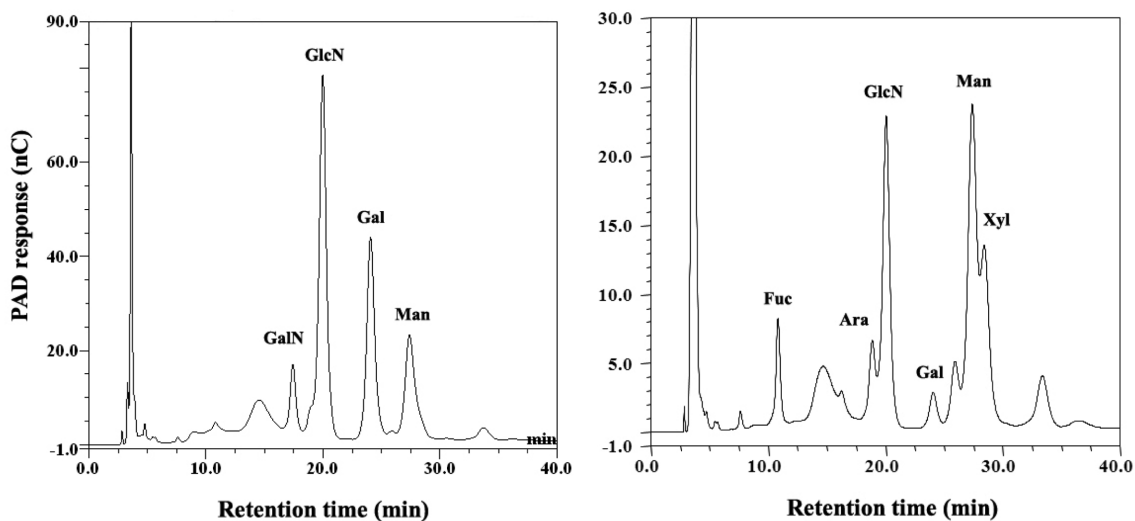


Fig. 5 – Chromatogram of HPAEC-PAD of acid hydrolysate of fetuin (left) and MFA (right) on the CarboPac PA10 column.

Table II – Summary of monosaccharide contents of the acid hydrolysate of bovine fetuin and MFA

Sample	Monosaccharide contents (pmol)								mol sugar/ mol protein	% w sugar/w protein
	Fuc	GalN	Ara	GlcN	Gal	Glc	Man	Xyl		
Fetuin	-	143.9	-	1157.6	1033.1	-	618.3	-	70	11.6
MFA	98.1	-	198.6	342.1	51.9	-	678.9	330.7	10	6.0

결과, 모든 표준물질에서 R²값이 0.99 이상으로 신뢰할 만한 수준의 분석 방법임을 확인하였으며(Table I), 검출한계는 각각 크라마토그램상에서 신호대 잡음비(S/N ratio)를 10으로 한 경우, 3.13 pmol 이었고, 그 이하의 농도인 1.56 pmol에서는 Gal와 Xyl를 제외하고는 검출이 되지 않았다. 즉, HPAEC-PAD법을 이용한 단당분석은 약 3 pmol까지 검출이 가능한 방법임을 확인하였다.

당단백질의 당 분석

식물유래 당단백질의 경우에는 Ara, Xyl가 결합된 당이 보고된 바가 있으며,^{8,26)} 이를 위해 동물유래 당단백질의 주요 단당 이외에 Ara, Xyl를 추가하여 분석을 실시하였다. 그 결과, 페튜인의 경우에는 GalN, GlcN, Gal, Man가 검출되었으며, MFA에서는 Fuc, Ara, GlcN, Gal, Man, Xyl가 검출되었다(Fig. 5). 이를 정량곡선에 대입하여 수치를 구한 결과는 Table II에 나타났다. 페튜인은 143.9 pmol GalN, 1157.6 pmol GlcN, 1033.1 pmol Gal, 618.3 pmol Man가 검출되었으며, 단당 mol당 단백질 mol의 비율은 70, 단당 중량대 단백질 중량은 11.6%의 값을 얻었다. 이 값은 이미 문헌에 보고된 값²⁴⁾과 유사한 값으로 본 분석법이 당단백질 분석에 적용 가능함을 확인하였다.

한편, 식물유래 당단백질인 MFA는 98.1 pmol Fuc, 198.6 pmol Ara, 342.1 pmol GlcN, 51.9 Gal, 678.9 pmol Man, 330.7 pmol Xyl가 검출되었으며, 단당 mol당 단백질 mol 비율은 10, 단당 중량대 단백질 중량은 6.0%의 값을 얻었다. MFA는 식물유래 단백질에서 특징적으로 검출되는 Ara와 Xyl가 검출되었으며, N-글리칸의 주요 구성당인 GlcN, Gal, Man가 검출된 반면 O-글리칸의 구성당인 GalN은 검출되지 않았다.

결 론

단백질을 구성하는 폴리펩티드중 Asn의 N- 혹은 Ser/Thr의 O-에 결합된 글리칸은 단백질의 구조와 기능에 큰 영향을 미치는 것으로부터 그 중요성이 최근 부각되고 있다. 당단백질에 결합된 글리칸의 역할을 이해하기 위해서는, 단백질의 구조적, 기능적 연구와 더불어 글리칸을 구성하는 단당의 조성과 그 비율을 확인할 필요가 있다.

본 연구에서는 MFA에 결합된 글리칸의 종류를 렉틴의 당 결합 특이적 반응을 이용한 ELLA법에 의해 확인하고, HPAEC-PAD에 의해 글리칸의 단당 조성을 정량적으로 확인하였다. 그

결과, 페튜인은 Man, Gal, GlcNAc로 구성된 N-글리칸을 포함하고 있으며 이는 주로 hybrid type의 글리칸이며, GalNAc으로 구성된 O-글리칸이 혼재되어 있음을 확인하였다. 식물 유래 MFA는 Man, Gal, GlcN외에 Fuc, Xyl, Ara가 검출된 N-글리칸이 결합되어 있음을 확인하였다. HPAEC-PAD에 의해서는 Gal가 검출되었으나 ELLA에 의해서는 Gal와 결합하는 RCA₁₂₀와의 반응성이 낮은 것은 Gal가 51.9 pmol로 페튜인(1033.1 pmol)에 비해 약 20배 적으며, 정성적 분석인 ELLA법의 감도가 HPAEC-PAD에 비해서는 낮은 것에 기인한 것으로 사료된다.

식물 유래 당단백질 MFA는 시알산을 인식하는 당단백질로 암세포 사멸등의 기능을 갖으며,¹⁵⁾ 시알산과 결합하는 희귀성으로 다양한 관련 연구에 활용될 수 있고, 특히 암세포 표면의 시알산 콘주게이트에서 시알릴 에피토프²⁷⁾에 대한 결합력 차를 확인하는 연구를 가능하게 하고 있다. 특히, 렉틴은 탄수화물과 결합하는 특성을 가지고 있는 반면, 렉틴 단백질 자체가 당단백질이 알려지면서 렉틴에 결합된 당의 조성, 구조 및 기능에 미치는 영향에 대해 관심이 모아지고 있다. 또한, 암, 류머티즘, 에이즈와 같은 다양한 환자로부터 채취한 세포와 정상세포에서 그 표면에 결합된 당의 구조적 변화가 보고되기 시작하면서,²⁸⁾ 그 구조적 차이를 비교적 간단하게 파악 할 수 있는 본 방법이 적용될 것으로 기대된다. 결론적으로, 렉틴의 당 결합 특이성을 이용한 ELLA법과 HPAEC-PAD를 적용한 본 연구의 결과는 단당을 복잡한 형광유도체 과정을 거치지 않고도 그 분포 및 조성 확인에 적절하며 보다 상세한 글리칸 구조를 해석하는 데에 유용한 정보를 제공할 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 2007학년도 중앙대학교 교내 학술연구비 지원에 의한 것이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Wyss, D. F and Wagner, G. : The structural role of sugars in glycoproteins. *Curr. Opin. Biotech.* **7**, 409 (1996).
- 2) Lisowska, E. : The role of glycosylation in protein antigenic properties. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 445 (2002).
- 3) Matsumoto, S. : Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol.*

- Biol.* **27**, 1163 (1995).
- 4) Sairam, M. R. : Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction. *FASEB J.* **3**, 1915 (1989).
 - 5) Sinclair, A. M. and Elliott, S. : Glycoengineering : The effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *J. Pharm. Sci.* **94**, 1626 (2005).
 - 6) Dube, S., Fisher, J. W. and Powell, J. S. : Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion, and biological function. *J. Biol. Chem.* **263**, 17516 (1988).
 - 7) Liu, T. Y. : Natural and biotech-derived therapeutic proteins : What is the future ? *Electrophoresis* **21**, 1914 (2000).
 - 8) Ueda, H. and Ogawa, H. : Glycobiology of the plant glycoprotein epitope : structure, immunogenicity and allergenicity of plant glycotopes. *Trends Glycosci. Glyc.* **11**, 413 (1999).
 - 9) Rumpel, C. and Dignac, M. : Gas chromatographic analysis of monosaccharides in a forest soil profile : analysis by gas chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis and reduction-acetylation. *Soil Biol. Biochem.* **38**, 1478 (2006).
 - 10) Cataldi, T. R. I. and Campa, C. : Carbohydrate analysis by high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection : The potential still growing. *J. Anal. Chem.* **368**, 739 (2000).
 - 11) Guttman, A. : Analysis of monosaccharide composition by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **763**, 271 (1997).
 - 12) Wu, W., Hamase, K., Kiguchi, M., Yamamoto, M. and Zaitu, K. : Reversed-phase HPLC of monosaccharides in glycoproteins derivatized with aminopyrazine with fluorescence detection. *Anal. Sci.* **16**, 919 (2000).
 - 13) Jahnelt, J. B., Ilieva, P. and Frimmel, F. H. : HPAEC-PAD-a sensitive method for the determination of carbohydrates. *Fresen. J. Anal. Chem.* **360**, 827 (1998).
 - 14) Lee, Y. C. : Carbohydrate analyses with high-performance anion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* **720**, 137 (1996).
 - 15) 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 Sci.* **167**, 1315 (2004).
 - 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) Leriche, V., Sibille, P. and Carpentier, B. : Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1851 (2000).
 - 19) Baenziger, J. V. and Fiete, D. : Structure of the complex oligosaccharides of fetuin. *J. Biol. Chem.* **254**, 789 (1979).
 - 20) Gunther, G. R., Wang, J. L., Yahara, I., Cunningham, B. A. and Edelman, G. M. : Concanavalin A derivatives with altered biological activities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70**, 1012 (1973).
 - 21) Lin, T. T. and Li, S. L. : Purification and physicochemical properties of ricins and agglutinins from *Ricinus communis*. *Eur. J. Biochem.* **105**, 453-459 (1980).
 - 22) Lotan, R., Siegelman, H. W., Lis, H. and Sharon, N. : Subunit structure of soybean agglutinin. *J. Biol. Chem.* **249**, 1219 (1974).
 - 23) Karakasa, I. I., Iwase, H. and Hotta, K. : Structural determination of the O-linked sialyl oligosaccharides liberated from fetuin with endo- α -N-acetylgalactosaminidase-S by HPLC analysis and 600-MHz ¹H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **247**, 709 (2004).
 - 24) Nilsson, B. and Svensson, S. : Structural studies on the carbohydrate portion of fetuin. *J. Biol. Chem.* **254**, 4545 (1979).
 - 25) Kim, S., Kim, S. I., Ha, K. S. and Leem, S. H. : An improved method for quantitative sugar analysis of glycoproteins. *Exp. Mol. Med.* **32**, 141 (2000).
 - 26) Currie, H. A. and Perry, C. C. : Resolution of complex monosaccharide mixtures from plant cell wall isolates by high pH anion exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* **1128**, 90 (2006).
 - 27) Aubery, M., Reynier, M., Lopez, M., Ogier-Denis, E., Font, J. and Bardin, F. : WGA binding to the surface of two autologous human melanoma cell lines: different expression of sialyl and N-acetylglucosaminyl residues. *Cell. Biol. Int. Rep.* **14**, 275 (1990).
 - 28) Mody, R., Joshi, S. and Chaney, W. : Use of lectin as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J. Pharmacol. Toxicol.* **33**, 1 (1995).