

식물 유래 당단백질의 당질 구조 분석

배재우 · 박병태 · 윤두천 · 김주영 · 황혜성 · 박현주 · 나종천 · 김하형#
중앙대학교 약학대학

(Received September 30, 2010; Revised October 7, 2010; Accepted October 12, 2010)

Structural Analysis of Oligosaccharides of a Plant Glycoprotein

Jae Woo Bae, Byung Tae Park, Doo Chun Yoon, Joo Young Kim, Hye Sung Hwang,
Hyun Joo Park, Jong Chun Na and HaHyung Kim#
College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract — The glycosylation of glycoproteins from mammalian or plants can affect their efficacy, stability, solubility, and half-life. In the present study, we investigated plant glycosylation and their relative intensity (%) in a plant carbohydrate-binding protein with the hemagglutination and antiproliferative activities. The hemagglutination activity on the deglycosylated protein was decreased as a 16-fold than that of intact glycoprotein. Using the HPLC with fluorescence detector and mass spectrometer, the major eight bi- or triantennary oligosaccharides containing xylose, fucose, mannose, galactose, and N-acetylglucosamine were identified and structurally characterized. The present results indicate that the oligosaccharides on this plant glycoprotein is necessary for their own property.

Keywords □ plant glycoprotein, oligosaccharide, structure

단백질 의약품은 신약 허가 품목의 약 20%를 점유하는 급성장을 이루고 있으며, 2006년 기준으로 2,500여 품목이 연구 개발 중이고, 그 중 900여 품목은 전임상실험, 1,600여 품목은 임상시험중에 있는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 단백질 의약품은 주로 Chinese hamster ovary(CHO), baby hamster kidney(BHK)와 같은 동물세포, *Bacillus subtilis*와 같은 박테리아, *Pichia pastoris*와 같은 효모 및 곤충 세포에서 주로 생산되고 있으며,²⁻⁴⁾ 최근에는 병원균의 오염에 대한 위험 감소, 단백질 정제의 용이함, 동물세포에 비해 상대적으로 저비용, 고수율로 단백질을 발현할 수 있는 벼(rice), 옥수수(maize), 밀(wheat), 감자(potato)와 같은 식물 세포를 이용한 시도가 이루어 지고 있다.^{2,5,6)} 사람 성장 호르몬(human growth hormone)이 식물에서 최초로 재조합 단백질 생산에 성공한 이래 항체 의약품, 백신, 사람 혈청 알부민(human serum albumin), 글로코세로브로시다제(glucocerebrosidase), 사람 단백질 C 혈청 프로테아제(human protein C serum protease) 등이 식물세포에서 생산되고 있다.⁵⁻⁷⁾

식물 유래 당단백질은 동물세포 유래와 비교하여 결합된 올리고당이 단백질 발현 시스템에 따라 분지된 당의 수와 길이가 다른 이질성을 나타내며 단백질의 구조,⁸⁾ 기능,⁹⁾ 세포인식^{10,11)} 등에 있어서 중요한 역할을 하는 공통점을 갖고 있으나, 올리고당의 조성과 구조가 다른 것으로 보고되고 있다.^{12,13)} 즉, 동물유래 당단백질은 주로 fucose(Fuc)(α 1,6), galactose(Gal), mannose(Man), N-acetylglucosamine(GlcNAc), N-acetylgalactosamine(GalNAc), 시알산으로 구성된 반면, 식물 유래 당단백질은 주로 Gal, Man, GlcNAc 이외에 arabinose, Fuc(α 1,3), xylose(Xyl)가 추가적으로 구성되어 있다.

일반적인 단백질 의약품의 한계점은 합성 의약품에 비해 비교적 낮은 활성과 생체 내에서 빠르게 소실되는 것이며, 이를 극복하기 위하여 당단백질에 결합된 올리고당의 구조적 역할 및 그 올리고당의 변형에 따른 단백질의 활성 증가가 주목받기 시작하였다.^{14,15)} 한편, 식물 유래 당단백질의 특징적인 구성당인 Xyl, Fuc(α 1,3)와 같은 당화의 미묘한 차이가 실험동물에 따라서는 면역원 혹은 알러지 유발 원인으로 작용될 가능성이 제기되면서 올리고당 연구의 중요성이 더욱 부각되고 있다.¹⁶⁾

올리고당 분석에는 pulsed amperometric detection이 연결된 high-performance anion exchange chromatography(HPAEC-

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

PAD),¹⁷⁾ 질량분석기,¹⁸⁾ 형광검출기에 의한 HPLC¹⁹⁾ 등을 이용한 분석이 주로 이용되고 있다. 이 중 HPAEC-PAD법은 올리고당의 검출 감도는 높은 편이나 구조 해석이 어렵고, 질량분석법은 감도는 우수하나 불순물 혼입에 따른 해석의 곤란함과 정량성이 떨어지는 반면, 형광 분석은 시료 전처리 과정이 복잡한 편이나 그 결과의 신뢰성이 높은 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 식물 유래 단백질에 결합된 올리고당이 당단백질의 활성에 미치는 영향을 확인하고, 질량분석기와 형광검출기에 의한 HPLC 방법을 올리고당의 구조를 분석하였으며, 시료는 본 연구실에서 이미 분리, 보고하고 단당 조성을 제시한^{20,21)} 식물 유래 당단백질인 솔비나무 유래 탄수화물 결합 단백질을 이용하였다.

실험방법

당단백질 분리, 분자량, 순도확인 및 단백질 정량

식물 유래 당단백질인 솔비나무 유래 탄수화물 결합 단백질은 본 연구자들이 이미 문헌에 보고한 방법에 따라 분리하였다.²⁰⁾ 분리된 단백질의 분자량과 순도를 확인하기 위해 Laemmli법²²⁾에 따라 12% polyacrylamide gel을 제작 후 전기영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)을 실시하였으며, 분자량 표준물질(10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 kDa)은 Bio-Rad사에서 구입하여 사용하였다. 단백질 정량은 이미 농도를 알고 있는 소 혈청 알부민(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, 당단백질 용액을 microplate well에 10 μ l씩 넣고, 여기에 1:4(v/v) 비율로 희석하여 Whatman #1 여과지로 여과한 염색시약(Bio-Rad)을 각 well에 200 μ l씩 넣은 후 microplate mixer에서 혼합하였다. 37°C에서 5분 동안 반응시킨 후 595 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하여 검량선의 Y축에 대응하는 X축의 값으로 Bradford법²³⁾에 따라 단백질을 정량하였다.

당단백질중 올리고당 제거

당단백질에 공유결합된 올리고당을 제거하기 위하여 당단백질 1 mg을 0.5 M citrate-phosphate 완충액(pH 5.0) 40 μ l에 용해 후 Glycoamidase A(Seikagaku)를 30 μ l 가하여 37°C에서 18시간 반응시키고, 10 mM phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.2)에 대해 투석하였다.

적혈구응집반응

당단백질의 적혈구 응집반응 활성은 이미 보고한 방법에 따라 실시하였다.²⁰⁾ 즉, 당단백질용액 1 mg/ml을 0.15 M NaCl로 1,024 배 까지 2배씩 희석 후 96-well U bottom microplate(NUNC)에

20 μ l씩 넣고 2%로 현탁시킨 흰쥐의 적혈구 20 μ l와 각각 반응시켰다. 1시간 동안 실온에 방치한 후 당단백질을 가하지 않은 대조군과 비교하여 적혈구 응집반응이 일어 나지 않는 최소농도의 희석배수를 구하였으며, 2회 반복하여 실시하였다.

당단백질에 결합된 올리고당 분석

당단백질에 결합된 올리고당의 구조를 확인하고자 문헌에 제시된 방법²⁴⁾을 일부 변형하여 적용하였다. 당단백질 1 mg을 0.1 M Tris-HCl(pH 8.2) 200 μ l에 용해하고 trypsin 50 μ l씩을 가하고, 37°C에서 18시간 반응하였다. 반응액을 건조 후 0.5 M citrate-phosphate 완충액(pH 5.0) 40 μ l를 가하고 Glycoamidase A(Seikagaku)를 추가로 30 μ l 가하여 37°C에서 18시간 반응시켰다. 효소반응액을 원심분리하여 침전을 제거하고, 상층액을 Bio-Gel P-4 컬럼(Bio-Rad, 10 \times 400 mm)을 이용하여 겔 여과 후 분획을 1 ml씩 eppendorf tube에 모아 얻어진 올리고당 부분을 건조시켰다.

올리고당의 형광 표지

건고된 올리고당에 150 μ l glacial acetic acid를 350 μ l DMSO가 들어 있는 바이알에 가한 뒤 혼합하고 2-aminobenzamide(2-AB, Sigma) 7.5 mg을 가하여 완전히 용해될 때까지 혼합 후 sodium cyanoborohydride 9 mg을 가하고 완전히 용해시켰다. 이 용액 5 μ l를 건조된 올리고당에 가한 뒤 65°C에서 3시간 반응시키고, 원심 후 2-AB 표지 올리고당을 얻어 분석에 사용하였다.

HPLC 및 MALDI-TOF mass spectrometer 분석

2-AB 표지 올리고당을 TSK-GEL Amide 80 컬럼(4.6 \times 250 mm, TOSOH)을 이용하여 형광 검출기를 연결한 HPLC를 이용하여 30°C, 유속 0.4 ml/min 조건에서 실시하였다. 이동상 A는 50 mM ammonium formate(pH 9.5), 이동상 B는 100% acetonitrile 용액을 사용하였다. 분리조건은 132분 동안 이동상 A가 20~53% 되도록 기울기 용리를 주었고, 그 후 3분 동안 이동상 A가 53~100%가 되도록 하였으며, 이때는 유속을 1.0 ml/min 으로 하였다. 형광검출시 λ_{ex} =330 nm, λ_{em} =420 nm에서 측정하였으며, 2-AB가 표지된 glucose homopolymer 표준품(Sigma)과 비교하여 glucose units(GU) 값을 구하였다.²⁵⁾ MALDI-TOF mass spectrometer는 Bruker Ultraflex(Bruker Daltonics)를 이용하여 측정하였으며, 분석 프로그램은 FlexControl 3.0 software를 이용하였다. Reflector voltage는 26.3 kV, repetition rate는 100 Hz로 하였고, matrix는 2,5-dihydroxybenzoic acid 1 mg을 0.1 ml 50% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid에 용해 후 MS plate에 시료 1 μ l를 가하고 1 μ l matrix 용액을 넣은 뒤 건조시킨 후 분석하였다.

실험결과 및 고찰

단백질의 분리, 순도 및 활성

식물 유래 당단백질은 본 연구자들이 보고한 방법에 준하여 실시하였으며, 전기영동 결과, 30 kDa에서 문헌²⁰⁾에 보고된 양상과 동일한 순도 98% 이상의 단일 밴드의 결과를 얻었으며(Fig. 1, lane 2), 정제된 당단백질에 대해 Bradford 법을 이용하여 단백질 정량을 실시하고 다음 실험에 적용하였다. 분리된 당단백질의 보고된 기능중 하나인 적혈구 응집반응을 실시한 결과, 활성이 1 mg/ml을 256배 희석한 3.9 µg/ml에서도 활성을 유지하여 기존에 보고된 결과²⁰⁾와 유사한 결과를 확인하였다(Table I). 이에 따라 분리된 식물 유래 당단백질은 고순도로 활성을 유지하고 있음을 확인하였다.

올리고당이 적혈구응집 활성에 미치는 영향

올리고당이 당단백질의 활성에 미치는 영향을 확인하기 위하

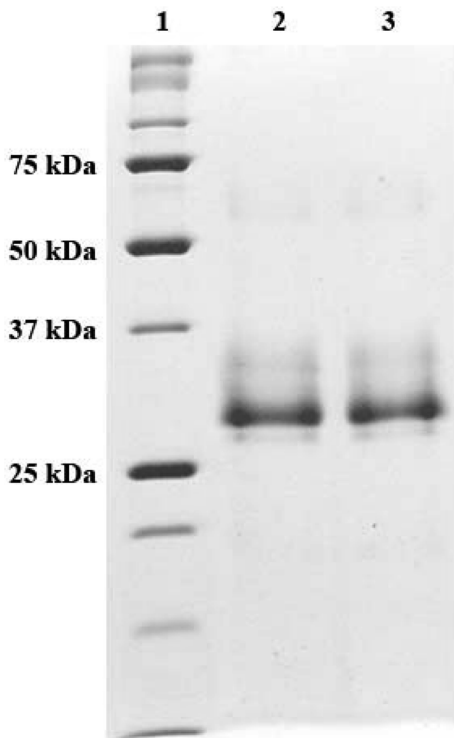


Fig. 1 – SDS-PAGE of a plant glycoprotein (lane 2) and a deglycosylated protein (lane 3). Lane 1, molecular mass marker.

Table I – Hemagglutination titer of plant-derived glycoprotein and deglycosylated protein

Sample	Hemagglutination titer
Plant-derived glycoprotein	256
Deglycosylated protein	16

여 올리고당이 제거된 단백질(deglycosylated protein)을 제조 후 올리고당이 제거되지 않은 당단백질과 비교하였다. 당단백질의 올리고당을 제거하는 것으로 보고²⁶⁾된 Glycoamidase A 효소 처리하고 적혈구응집 반응을 실시한 결과, 1 mg/ml을 16배로 희석한 62.5 µg/ml로 나타났다(Table I). 이는 위에서 언급한 올리고당이 제거되지 않은 경우(3.9 µg/ml)에 비해 약 16배 활성이 감소되었음을 나타내며, 전기영동을 실시하여 효소 처리전과 유사한 분자량 30 kDa를 유지하고 있음을 확인하고 Glycoamidase A에 불순물로 혼입될 가능성이 있는 단백질 가수분해제에 의한 부반응은 없음을 확인하였다(Fig. 1, lane 3). 이는 올리고당이 당단백질의 활성에 영향을 미칠 가능성을 시사한다.

올리고당 분석

당단백질에 결합된 올리고당 분석을 위하여 당단백질로부터 올리고당 부분을 효소처리로 가수분해후 분리하고 이를 2-AB 시약에 의해 형광표지를 한 후 Amide 컬럼을 이용한 HPLC에 의해 크로마토그램을 실시하였다(Fig. 2). 그 결과 유지시간 (retention time) 70분에서 110분 사이에 올리고당 주 피크 8개를 확인하였으며, 이는 GU 표준품에 대해 4.93, 5.44, 5.52, 5.92, 6.19, 7.09, 7.26, 7.98임을 표준품과의 비교에 의해 확인하였다. 또한, 올리고당을 HPLC로 분리하지 않은 상태의 2-AB 형광표지 올리고당을 MALDI-TOF mass spectrometer로 분석한 결과, Fig. 3과 같은 질량(m/z)값을 갖는 피크를 얻었다.

이 결과를 Pauline Rudd 등이 보고한 논문,^{24,25)} 데이터 베이스(GlycoBase) 검색 및 2-AB 표지 올리고당의 질량(m/z)값에 의해 다음과 같은 결과를 얻었다. 즉, HPLC의 피크 중 피크 1은 Man(α1-6)[Man(α1-3)][Xyl(β1-2)]Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc-AB, 피크 2는 GlcNAc(β1-2)Man(α1-6)[GlcNAc(β1-

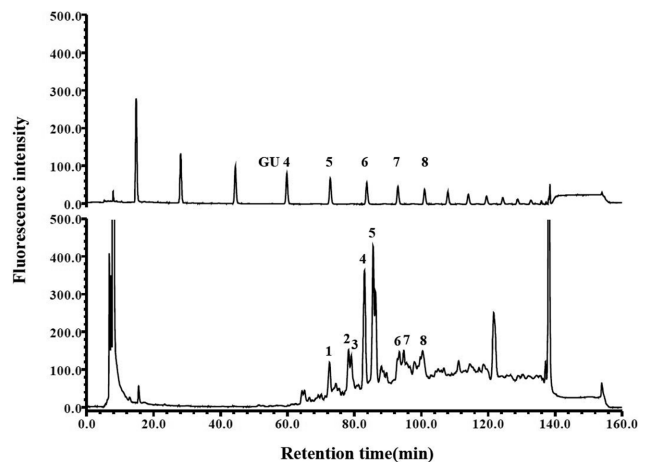


Fig. 2 – Normal phase Amide 80 HPLC chromatogram of 2-AB-labeled glucose homopolymer (up) and oligosaccharide profiling from plant glycoprotein (down).

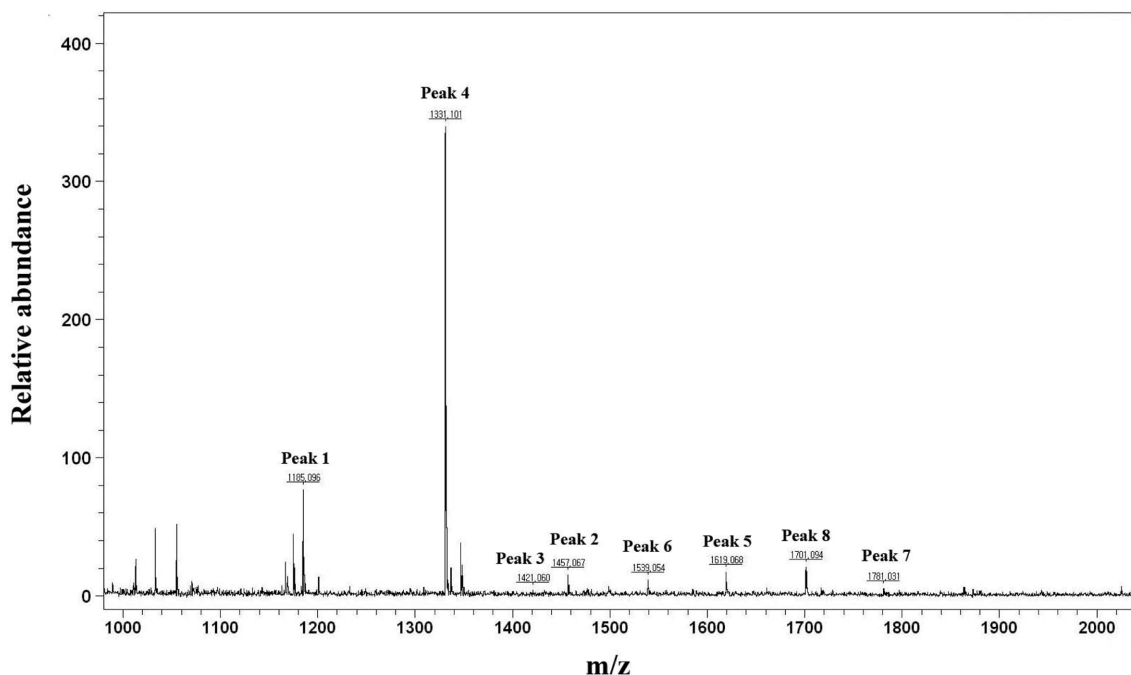


Fig. 3 – Positive ion MALDI-TOF mass spectrum of mixture of 2-AB labeled oligosaccharides from plant glycoprotein.

2)Man(α 1-3)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc-AB, 피크 3은 Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-6)[Man(α 1-3)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc-AB 혹은 Man(α 1-6)[Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc-AB, 피크 4는 Man(α 1-6)[Man(α 1-3)][Xyl(β 1-2)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc-AB, 피크 5는 Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-6)[GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc-AB 혹은 GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-6)[Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc-AB, 피크 6은 Man(α 1-6)[Man(α 1-3)]Man(α 1-6)[Man(α 1-2)Man(α 1-3)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc-AB, 피크 7은 Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-6)[Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc-AB, 피크 8은 Man(α 1-2)Man(α 1-6)[Man(α 1-3)]Man(α 1-6)[Man(α 1-2)Man(α 1-3)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc-AB 임을 확인하였다. 또한 그 분포 비율은 각각 6.0%, 8.1%, 6.9%, 18.6%, 21.9%, 7.5%, 7.7%, 7.7%이며, 이 외 15.6%에 해당하는 올리고당이 미량으로 약 10 종류 분포하고 있음을 확인하였다.

결론

당단백질중 올리고당의 수식은 소포체와 골지체에서의 글리칸 부가효소(glycan-modifying enzyme)의 발현 양과 촉매 효과, 발현 시스템에 따라 달라지며, 단백질의 접힘(folding)과도 관련이

있는 것으로 보고되고 있다.¹³⁾ 특히 Man가 결합된 high-Man 올리고당의 존재는 식물 뿐만 아니라 동물유래에서도 보고되고 있으나, xylosyltransferase와 fucosyltransferase가 발현되어 β 1,2-Xyl, α 1,3-Fuc가 GlcNAc에 결합된 형태로 독특한 구조로 발현되는 것으로 알려져 있으며, 시알산은 결합하지 않는 것으로 알려져 있다.²⁾ 또한, 당단백질에 결합된 올리고당은 단백질의 구조와 기능에 큰 영향을 미치는 것으로부터 단백질의 구조적, 기능적 연구와 더불어 올리고당의 구조적 정보가 중요한 정보를 제공하게 된다.

본 연구에서는 식물유래 당단백질로 본 연구실에서 분리한 탄수화물 결합 단백질을 이용하였으며, 적혈구 응집 활성에 영향을 미치는 것으로 확인된 올리고당을 구조를 확인한 결과 서로 구조가 다른 8 종류를 확인하였다. 즉, Xyl가 결합된 올리고당이 피크 1(6.0%), 피크 4(18.6%)에서 총 24.6%로 나타났으며, high-Man 형태의 올리고당이 피크 6(7.5%), 피크 8(7.7%)로 총 15.2%로 나타났다. 특히, 피크 4는 Xyl와 함께 Fuc(α 1,3)가 결합되어 있는 식물유래 당단백질의 특징적인 올리고당 구조를 나타냈다. 또한, 피크 2(8.1%), 피크 3(6.9%), 피크 5(21.9%), 피크 7(7.7%)은 총 44.6%로 complex 형태의 올리고당임을 나타냈다.

본 연구 결과는 식물 유래 당단백질을 의약품으로 개발시 Xyl와 Fuc(α 1,3)가 면역원 혹은 알러지를 유발할 가능성이 제기된 보고로부터 당단백질 발현시 xylosyltransferase와 fucosyltransferase의 활성 저해제의 첨가 혹은 galactosyltransferase의 첨가를 통해 올리고당 부분의 구조가 사람과 유사하게 변형된 재조합 단백질 제조의 필요성을 시사하며, 추가적으로 당결합부위 해

Table II – Summary of Amide GU, mass, oligosaccharide structure and relative intensity (%) of plant glycoprotein used in this study from each peaks of HPLC

Peak	Amide GU		Mass (m/z) [M+Na] ⁺		Oligosaccharide structure	Relative intensity (%)
	Reported	Observed	Theoretical	Observed		
1	4.90	4.93	1185.427	1185.096		6.0
2	5.45	5.44	1459.544	1457.067		8.1
3	5.66	5.52	1418.518	1421.060		6.9
4	5.90	5.92	1331.485	1331.101		18.6
5	6.24	6.19	1621.597	1619.068		21.9
6	7.06	7.09	1539.544	1539.054		7.5
7	7.11	7.26	1783.650	1781.031		7.7
8	8.02	7.98	1701.597	1701.094		7.7
Others						15.6

석과 부위 선택적 올리고당 구조해석을 실시하면, 보다 활성이 개선된 당단백질 생산에 효율적인 정보를 제공할 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 2010년도 식품의약품안전평가원 용역연구개발과제의 연구개발비 지원(10172첨단평333)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Walsh, G. : Biopharmaceutical benchmarks. *Nat. Biotechnol.* **24**, 769 (2006).
- Karg, S. R. and Kallio, P. T. : The production of biopharmaceuticals in plant systems. *Biotechnol. Advances.* **27**, 879 (2009).
- Thiel, K. A. : Biomanufacturing, from bust to boom...to bubble? *Nat. Biotechnol.* **22**, 1365 (2004).
- Butler, M. : Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 283 (2005).
- Sijmons, P. C., Dekker, B. M., Schrammeijer, B., Verwoerd, T. C., van den Elzen, P. J. and Hoekema, A. : Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Biotechnology* **8**, 217 (1990).

- 6) Zhu, Z., Hughes, K. W., Huang, L., Sun, B. L., Liu, C. M. and Li, Y. : Expression of human alpha-interferon cDNA in transgenic rice plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **36**, 197 (1994).
- 7) Cramer, C. L., Weissenborn, D. L., Oishi, K. K., Grabau, E. A., Bennett, S. and Ponce, E. : Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. *Ann. NY Acad. Sci.* **792**, 62 (1996).
- 8) Matsumoto, S. : Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol. Biol.* **27**, 1163 (1995).
- 9) Sairam, M. R. : Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction. *FASEB J.* **3**, 1915 (1989).
- 10) Sinclair, A. M. and Elliott, S. : Glycoengineering : The effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *J. Pharm. Sci.* **94**, 1626 (2005).
- 11) 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).
- 12) Liu T. Y. : Natural and biotech-derived therapeutic proteins : What is the future ? *Electrophoresis* **21**, 1914 (2000).
- 13) James, W. L. and Thomas, D. W. : Producing proteins in transgenic plants and animals. *Protein Technol. Commercial Enzymes* **12**, 411 (2001).
- 14) Wyss, D. F. and Wagner, G. : The structural role of sugars in glycoproteins. *Curr. Opin. Biotech.* **7**, 409 (1996).
- 15) Lisowska, E. : The role of glycosylation in protein antigenic properties. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 445 (2002).
- 16) Ueda, H. and Ogawa, H. : Glycobiology of the plant glycoprotein epitope : structure, immunogenicity and allergenicity of plant glycotopes. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **11**, 413 (1999).
- 17) 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).
- 18) Kaji, H., Yamauchi, Y., Takahashi, N. and Isobe, T. : Mass spectrometric identification of N-linked glycopeptides using lectin-mediated affinity capture and glycosylation site-specific stable isotope tagging. *Nature Protocols* **1**, 3019 (2006).
- 19) Geyer, H. and Geyer R. : Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochimica. Biophysica. Acta* **1764**, 1853 (2006).
- 20) 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).
- 21) Na, K. H., Park, B. T., Park, J. W., Han, K. J., Park, H. J. and Kim, H. H. : Neutral and amino sugar composition of a lectin from *Maackia fauriei*. *Yakhak Hoeji* **53**, 34 (2009).
- 22) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 (1970).
- 23) 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).
- 24) Triguero, A., Cabrera, G., Royle, L., Harvey, D. J., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Bardor, M., Lerouge, P. and Cremata, J. A. : Chemical and enzymatic N-glycan release comparison for N-glycan profiling of monoclonal antibodies expressed in plants. *Anal. Biochem.* **400**, 173 (2010).
- 25) Campbell, M. P., Royle, L., Radcliffe, C. M., Dwek, R. A. and Rudd, P. M. : GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis. *Bioinformatics* **24**, 1214 (2008).
- 26) Takahashi, N., Nakagawa, H., Fuhikawa, K., Kawamura, Y. and Tomiya, N. : Three dimensional elution mapping of pyridylaminated N-linked neutral and sialyl oligosaccharides. *Anal. Biochem.* **226**, 139 (1995).