

OGS RAAM2000을 이용한 유지방구막 PAS-7 당단백질의 당쇄구조 해석

석진석

동경농공대학 연합농학연구과

Analysis of Sugar Chain Structure of PAS-7 Glycoprotein from Bovine Milk Fat Globule Membrane by OGS RAAM 2000

J. S. Seok

United Graduate School of Agricultural Science,
Tokyo University of Agriculture and Technology

Abstract

Glycoproteins PAS-6(50 kDa) and -7(47 kDa) from the bovine milk fat globule membrane share a common protein core but differ in their carbohydrate moiety. We have analyzed and proposed the structures of the *N*-linked sugar chains of PAS-7 by Oxford Glyco System(OGS) RAAM2000. The *N*-linked sugar chains were liberated from PAS-7 by hydrazinolysis and, after modifying the reducing ends with 2-aminobenzamide(2-AB), were separated into one neutral(7N, 55%) and two acidic(7M, mono-, 43%; 7D, di-, 2%) sugar chain groups. 7N was finally separated into 5 chains(a, b, c, d, and e), respectively. The structure of this 2AB-neutral sugar chain was determined by sugar analysis, exoglycosidase digestion with OGS glycosidase Kit and OGS RAAM2000 system. The results show that fraction e was the same of reported 7N1A, the biantennary complex type with a fucose on reducing end and two *N*-acetylglucosamine branch on non-reducing end. Therefore, it was proved that OGS RAAM2000 method is in conformity with conventional analysis of sugar chain structure from bovine PAS-7.

Key words : glycoprotein, *N*-linked sugar chain, OGS RAAM2000.

서론

인간을 비롯한 수많은 동물의 세포 표면막이나 혈청단백질은 대부분 당단백질로 구성되어 있으며, 항체, 수용체, 호르몬, 효소 또한 그 실체는 단순단백질이 아닌 당단백질인 경우가 대부분이다. 그럼에도 불구하고 이러한 분자들의 생리활성은 각각의 polypeptide구조만으로 설명되는 경우가 대부분으로, 당쇄부분의 역할에 대해서는 거의 논의되어지지 않고 있다. ABO 식 혈액형항원의 특이성이 미묘한 당쇄의 차이

에 의해 결정되어진다는 보고는 다세포 생물의 성립과 유지에 필요한 여러가지 식별현상의 signal로써 당쇄의 역할이 주목되어지는 계기가 되었다⁽¹⁾. 더구나, 포유동물의 세포의 세포막을 구성하는 당단백질로서 세포인식, 세포접착, 면역인식 혹은 virus나 호르몬의 수용체로서 중요한 역할을 수행하고 있다⁽²⁻⁶⁾. 당쇄가 단백질과 결합하는 경우, 그 결합양식은 2가지가 있으며, 각각 Asn잔기와 결합하고 있는 *N*-결합형과, Ser잔기나 Thr잔기와 결합하고 있는 *O*-결합형 당쇄가 있다.

유즙 중의 당단백질, 특히 막성분을 구성하고 있는 성분은 당단백질이 많다. 유선세포에서 합성되는 유성분 중에서 단백질이나 유당은 소포체에서 골지체로 이동하여 농축, 수식되어 분비세포에 의해 정단 세포막측까지 운반되어,

Corresponding author : J. S. Seok, United Graduate School of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchuu-city, Tokyo 183-8509, Japan, E-mail : jseok2000@yahoo.ac.kr

분비소포의 막과 정단 세포막이 융합하여 그 내용물이 유선 선포강으로 방출된다⁽⁷⁾. 한편 유지방적은 유선 세포내에서 피복물질에 의해 피복되어 정단부로 이동하여 정단 세포막으로 피복되어 유선세포로부터 유선 선포강으로 유지방구의 형태로 분비된다⁽⁸⁾. 분비된 우유지질의 대부분은 지방구의 형태로 분산되며, 안정된 emulsion의 형태로 유지 가능한 것은 유선의 세포막 유래의 양친매성 물질인 유지방구막(milk fat globule membrane, MFGM)에 의해 피복되어 있기 때문이다. MFGM은 약 45%의 단백질과 55%의 지질로 구성되어 있는 구조리포 단백질이며, 유선세포가 지방구를 둘러싼 형태로 세포막이 세포외로 이출되는 것은 생물계에서 유선에서만 볼 수 있는 현상이다⁽⁷⁾. MFGM은 SDS-PAGE에 의해 주요 단백질 성분 16개, 당성분 7개로 검출되며⁽⁷⁻¹⁰⁾, 주요 당단백질(PAS-1~PAS-7, periodic acid-Schiff 시약에 염색되는 당단백질)의 구조 및 생화학적 특성이 밝혀져 있으나, 당쇄의 구조 및 역할은 아직 명확하게 밝혀지지 않은 것이 많다. 그 중에서 PAS-7은 PAS-6와 분자량이 유사하며, Con A에 대한 친화성이 상이한 것을 이용하여 분리정제되었으며, 409 아미노산으로 구성되어 있는 당단백질이다. 또한 PAS-6와 PAS-7의 유사한 분자량의 차이가 같은 아미노산구조를 가지며 당쇄의 차이에 기인하는 것이 명확하게 밝혀졌다⁽¹¹⁾.

본 연구에서는 이전 보고된 PAS-7 당단백질의 당쇄구조⁽¹¹⁾를 OGS RAAM2000 system을 이용하여 해석하는 방법을 시도하여, MFGM 구성 당단백질의 간편하고 정확한 당쇄구조 분석 및 해석방법을 증명하였다.

재료 및 방법

MFGM의 조제

MFGM은 홀스타인으로부터 채취한 우유로부터 조제하였다. 신선한 우유를 37°C로 가온하여 Cream separator로 크림과 탈지유로 분리하였다. 크림은 탈이온 증류수로 세정하여 metal churn에 의해 막물질을 분리하여, 4°C, 3,000×g로 15분간 원심분리하여 MFGM을 조제하였다⁽¹²⁾.

PAS-7의 정제

조제한 MFGM은 1N 염산으로 pH를 4.6으로 조정하고 실온에 15분간 산침전 후, 4°C로 30,000×g에서 30분간 원심분리한 후, 침전물을 탈이온 증류수에 분산하여 1N 수산화나트륨으로 pH를 6.8로 조정하고, 4°C로 100,000×g에서 60분간 초원심분리하여 농축하고, MFGM의 탈지는 Kanno의 방법에 의해 메탄올/클로로포름 혼합액(1:2, v/v)을 이용하여 행하였다⁽¹³⁾. MFGM으로부터 Sephacryl S-200HR (superfine, Pharmacia Fine Chemicals, Inc, USA) column을 이용하여 PAS-6/7을 분리하였다. 분리한 PAS-6/7은 Con A-agarose(Seikagaku Kogyo, Japan) column affinity chromatography에 의해 PAS-7을 선택적으로 정제하였다⁽¹⁷⁾.

N-결합 당쇄의 절단 및 표시

정제한 PAS-7 당단백질에서 N-결합 당쇄의 절단은 OGS Prep1000(Oxford Glyco System, UK)을 이용하여 행하였다^(14,15). P₂O₅ 존재하의 진공건조기에서 3일간 건조시킨 PAS-7을 2개의 반응 vial에 약 2mg씩 넣어 Prep 1000에 장착하고, program set을 N mode에 설정하여 20시간 처리하는 것에 의해 N-결합 당쇄를 절단하였다. 실제의 hydrazine (Oxford Glyco System, UK) 분해조건은 100°C에서 6시간동안 가열하며, N-acetyl화도 자동적으로 행하였다. 20시간 후 회수한 당쇄 부분을 0.2μm filter(Bio-Rad, USA)로 여과하고 감압 건조하여 아세트산을 제거하였다. 당쇄 부분의 표시는 50nmol의 PAS-7에 대해 1 vial의 2-aminobenzamide(2-AB, OGS, UK)에 의해 65°C에서 2시간 가열하여 행하였다. 가열 후 GlycoClean S clean-up cartridge(OGS, UK)로 과잉의 시약을 제거하였다.

HPLC 분석

HPLC분석에는 SP 8800 pump (Spectra-Physics, USA), F-1050 fluorescence spectrophotometer (Hitachi, Japan)와 SP 4290 integrator (Spectra-Physics, USA)를 사용하였다. 정제한 PAS-7는 GlycoSep C column (4.6mm×100mm, OGS, UK)에 의해 중성당쇄와 산성당쇄로 분리하였다. 용출액 A는 20% acetonitrile을 사용하였으며, 용출액 B는 20%

acetonitrile과 80%의 pH 4.5로 조정된 250mM ammonium formate를 사용하였다. 두 용출액의 농도 gradient는 용출액 A로 평형화 한 후 시료를 주입하고 5분부터 용출액 B의 농도를 40분까지 직선적으로 100%까지 상승시킨 후 45분까지 100%로 유지하였다. GlycoSep C로 분리한 중성당쇄는 GlycoSep H column (3.0 mm×100mm, OGS, UK)에 의해 각 성분을 분리하였다. 용출액 C는 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)를 포함한 5% acetonitrile을 사용하였으며, 용출액 D는 100% acetonitrile을 사용하였다. 두 용출액의 농도 gradient는 용출액 C로 평형화 한 후 시료를 주입하고 5분부터 용출액 D의 농도를 10분까지 직선적으로 5%까지 상승시킨 후 30분까지 40%로 상승시킨 후 35분까지 40%로 유지하였다. 두 column의 측정 유속은 0.3ml/min, 온도는 25°C, 흡광도는 330nm/420nm이었다.

효소 소화

GlycoSep H column에 의해 분리한 성분은 OGS Enzyme Kit(exoglycosidases mixture, OGS, UK)에 의해 37°C에서 18시간 가열하였다. Exoglycosidase의 혼합물은, 0.1 unit의 *Aspergillus niger* 유래의 β -galactosidase, 0.1 unit의 jack bean 유래의 β -N-acetylhexosaminidase, 1 unit의 jack bean 유래의 α -mannosidase, 0.03 unit의 bovine kidney 유래의 α -fucosidase로 구성되어 있다. 반응물은 100°C로 3분간 가열하여 효소를 실활시켰다.

OGS RAAM2000 분석

Exoglycosidase mixture에 의해 절단된 당쇄 절편을 calibration standard(dextran)과 동시에 주입(시료 80 μ l + calibration standard 20 μ l)하여 산출된 당쇄의 크기를 OGS RAAM2000의 data library(Oxford Glyco System사의 각 당쇄 표준물질을 RAAM2000에 의해 분석한 결과가 분석 프로그램에 포함되어 있음)와 비교하여 당쇄구조를 추측하였다. OGS RAAM2000 system은 OGS GlycoPure Water (1,000 ml, OGS, UK)를 용출액으로 사용하였으며, 5°C에서 250 μ l/min의 유속으로 18시간동안 측정하였다.

결과 및 고찰

PAS-7의 분리

Kanno와 Kim의 방법⁽¹²⁾에 의해 조제한 MFGM으로부터 Sephacryl 200HR gel permeation chromatography(GPC) 및 Con A-agarose affinity chromatography에 의해 PAS-7을 분리하였다(Fig. 1). PAS-7는 Con A와 약하게 결합하여 50mM α -methyl-D-mannopyranoside에 의해 용출되고, 반면 PAS-6는 500mM α -methyl-D-mannopyranoside에 의해 용출되어 두 당단백질을 분리하는 것이 가능하였다. 이것은 두 당단백질의 당쇄가 mannose 잔기의 상이성을 가진 것이 보고되고 있다⁽¹⁶⁾. 분리한 두 당단백질의 SDS-PAGE pattern을 Fig. 1에 나타냈다. PAS-6와 PAS-7는 각각 단일한 band로 나타나 두 당단백질이 단일한 물질로 정제되었음이 확인되었다.

GlycoSep C column에 의한 당쇄의 분리

정제한 MFGM의 N-결합당쇄 부분을 hydrazine에 의해 화학적으로 절단하여 N-acetyl화 시킨 후, 2-AB로 형광 표식하였다. 이 2AB-표식 당쇄를 GlycoSep C column을 이용

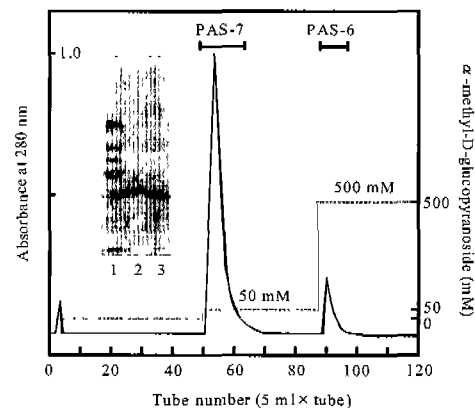


Fig. 1. Elution profile of purified PAS-6/7 on Con A-agarose column affinity chromatography and SDS-PAGE patterns (PAS-stain). Absorbed materials were eluted stepwisely by 50 mM and 500 mM α -methyl-D-glucopyranoside starting buffer. Lane 1, MFGM; lane 2, PAS-6; lane 3, PAS-7.

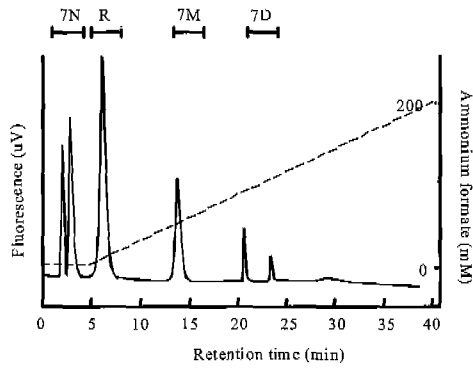


Fig. 2. Separation by GlycoSep C column chromatography of the 2AB-sugar chains of PAS-7. 7N, neutral 2AB-sugar chains; 7M, monosialo 2AB-sugar chains; 7D, disialo 2AB-sugar chains; R, material from reagents.

하여 중성당쇄와 산성당쇄로 분리한 결과를 Fig. 2에 나타냈다. PAS-7의 N-결합당쇄는 중성당쇄(7N)와 2종의 산성당쇄(monosialo-, 7M; disialo-, 7D)로 분리되었다. 산성당쇄는 *Clostridium perfringens* 유래의 sialidase 소화 후 재분석에 의해 중성당쇄 용출부분에서 검출되는 것을 확인하였다. 성분R은 과잉의 시약으로부터 유래한 물질임이 확인되었다. 분리된 7N: 7M: 7D의 3성분의 올리고당 비율은 각각 61: 33: 6으로 확인되었다. 이러한 결과는 이전의 보고의 DEAE-5PW column HPLC의 결과와 잘 일치되었다⁽¹¹⁾. 회수한 중성당쇄(7N)를 다음 실험의 시료로 사용하였다.

GlycoSep H column에 의한 중성당쇄의 분리 중성당쇄(7N)는 GlycoSep H column에 의해 5성분(a, b, c, d, and e)으로 분리되어, 각 성분의 비율은 35: 9: 2: 13: 41로 나타났다(Fig. 3). 용출시간 10분대의 peak는 시약으로부터 유래한 것임을 당분석 실험에 의해 확인하였다. 그 중에서 상대량이 제일 높은 비율의 성분 e를 이용하여 OGS RAAM2000을 이용한 분리해석 시료로 사용하였다.

효소 소화한 성분 e의 OGS RAAM2000에 의한 분리 및 해석

OGS Enzyme Kit를 사용하여 37°C에서 18시간 효소 소화한 성분 e는 Chelex, Dowex

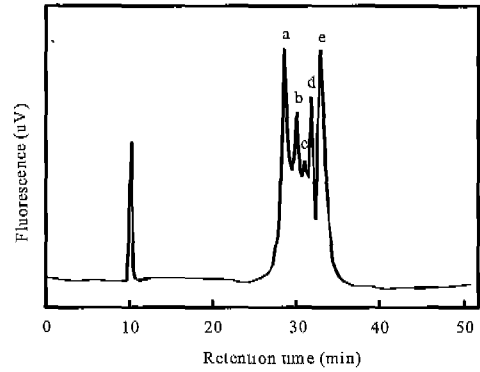


Fig. 3. Separation by GlycoSep H column HPLC of neutral 2AB-sugar chains obtained from GlycoSep C column HPLC.

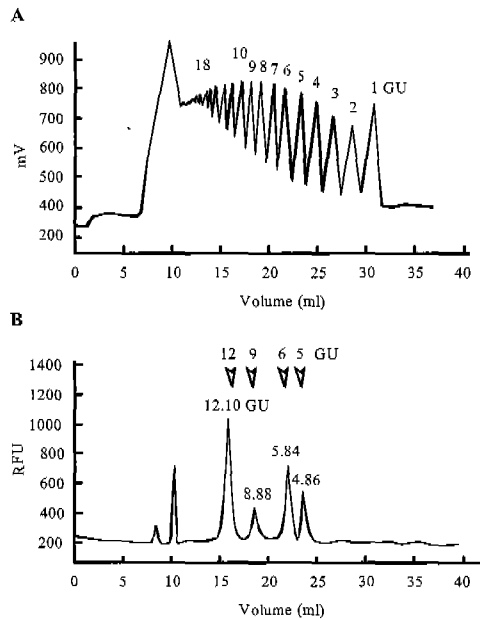


Fig. 4. Separation by OGS RAAM 2000 gel filtration of Fr. e for enzyme digest of 2AB- sugar chain obtained by GlycoSep H column HPLC. A, calibration standard (dextran); B, sample (Fr. e). Arrowheads indicate the positions of calibration standard.

AG50, Dowex AG3-X4, QAE resin(Oxford Glyco System, UK)을 순서대로 충전한 column을 통과시킨 후 농축하여 80 μ l Glyco-Pure water에 용해 시켜 20 μ l calibration standard와 혼합한 후 RAAM2000으로 분석하였

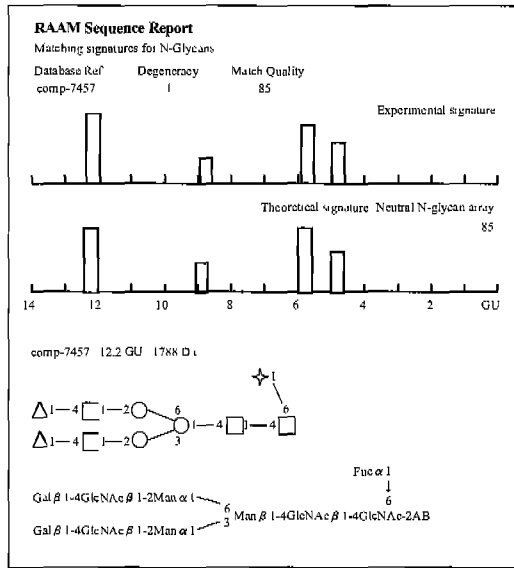


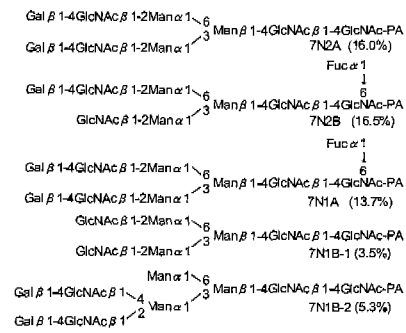
Fig. 5. The result of OGS RAAM GlycoSequence report of Fr. e obtained from GlycoSep H column HPLC.

다. 성분 e의 용출 pattern을 Fig. 4에 나타냈다. Fig. 4-A는 calibration standard의 용출 pattern을 나타내며, glucose unit(GU) 1부터 23까지 용출 peak로 나타났다. Fig. 4-B는 성분e의 용출 pattern을 나타내며, 12.10, 8.88, 5.84 및 4.86GU의 4개의 peak로 용출되었다. 이 4개의 peak는 data library의 component-7457과 85%의 상동성(70% 이상의 상동성을 나타내면 동일물질로 판단할 수 있음)을 보여, 분자의 크기 12.2GU의 분자량 1788Da의 당쇄로 사료되었다(Fig. 5). 성분 e의 당쇄구조는 환원말단에 α1-6결합된 fucose잔기를 1개 함유하며, core 부분 외부의 비환원말단에 N-acetylactosamine branch를 2개 함유하고 있는 전형적인 biantennary 당쇄인 것이 확인되었다(Fig. 5).

PAS-7의 N-결합 당쇄구조

PAS-7의 N-결합 당쇄구조는 Fig. 6에 나타난 것과 같이 5종의 중성당쇄(7N2A, 7N2B, 7N1A, 7N1B-1, 7N1B-2)와 5종의 산성당쇄(7MN1, 7MN2, 7MN3, 7DN1, 7DN2)로 구성되어 있으며⁽¹¹⁾, PAS-6의 N-결합 당쇄구조의 대부분을 차지하는 N-결합 당쇄의 core구조와는 상이한 당쇄구조를 나타내어, PAS-6와

[Neutral-sugar chains]



[Sialo-sugar chains]

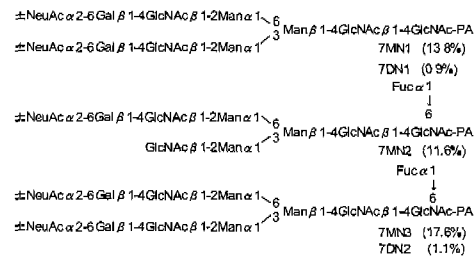


Fig. 6. The structures of the N-linked PA-sugar chains of PAS-7⁽¹¹⁾. In 7MN1, 7MN3, one NeuAc residue is added to either outer Gal, and in 7DN1, 7DN2, two NeuAc residues are in both outer Gals.

PAS-7 당단백질의 정제과정에서 Con A와의 결합강도의 차이를 결정짓는 중요한 역할을 한 것으로 사료되었다. Con A는 lectin의 하나로 C-3, C-4, C-6의 수산기가 치환되지 않은 α-Mannose를 2잔기 이상 가지고 있는 당쇄구조를 특이적으로 인식하는 성질이 있다. 특히 PAS-7의 당쇄구조 중 7N1B-2의 구조는 생물계에서는 거의 발견되지 않는 당쇄구조로서 인간의 간과 위장에서 발견되는 당쇄구조와 동일한 것으로 보고되었다^(11,18). 한편, 당분석 결과 PAS-7의 O-결합 당쇄는 비교적 단순한 구조를 가진 당쇄로 추정되며, PAS-7의 N-결합 당쇄의 생합성 과정에 어느 정도의 영향을 미칠 가능성이 있는 것으로 사료되어 O-결합당쇄도 해석 중에 있다.

본 연구에서 사용한 OGS RAAM2000 당쇄구조 해석법은 성분 e가 이전의 보고⁽¹¹⁾에서 밝혀진 7N1A와 동일한 성분인 것을 확인되어, MFGM 당단백질의 하나인 PAS-7의 당쇄구

조 해석법으로서 간편하고 정확한 또다른 하나의 훌륭한 당쇄해석법으로 판단되었다.

요 약

MFGM 당단백질의 하나인 PAS-7을 GPC 및 affinity chromatography에 의해 정제하여 2-AB로 형광 표식한 후, anion-exchange column 및 reversed-phase column을 이용해 5개의 성분을 분리하였다. 그 중 가장 상대량이 많은 성분 e에 대하여 RAAM2000을 이용한 당쇄구조 해석을 실시하여, 성분 e는 RAAM 2000 GPC에 의하여 4개의 성분으로 분리되어 각각 calibration standard 12.10, 8.88, 5.84 및 4.86GU의 용출위치에 검출되었다. 이 용출위치와 당쇄구조는 library의 component-7457과 일치하며, 12.2GU의 크기로 분자량은 1788로 판단되며 library의 당쇄와 약 85%의 확률로 일치했다. 그 결과 성분 e의 당쇄구조는 환원말단에 α 1-6결합된 fucose를 1개 함유하며, core부분의 비환원말단에 N-acetyllactosamine branch를 2개 함유한 전형적인 biantennary 당쇄구조인 것으로 추측되어, 이전 HPLC, acetolysis, sequential exoglycosidase 소화, NMR분석에 의해 보고된 성분 7N1A의 구조와 일치함으로써, OGS RAAM2000을 이용한 PAS-7의 당쇄구조 해석의 유용성이 증명되었다.

참고문헌

1. Watkins, W. M. : Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis, and P blood group systems. *Adv. Hum. Genet.*, 10, 1-136 (1980).
2. Woodruff, J. and Gesner B. M. : The effect of neuraminidase on the fate of transfused lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 129, 551 (1969).
3. Cuatrecasas, P. : Identification of concanavaline A and wheat germ agglutinine with the insulin receptor of fat cells and liver. *J. Biol. Chem.*, 248, 3528 (1973).
4. Rademacher, T. W., Parekh, R. B. and Dwek, R. A. : Glycobiology. *Annu. Rev. Biochem.*, 57, 785 (1988).
5. Sharon, N. and Lis, H. : Carbohydrates in cell recognition. *Nikkei Science*, 4, 16 (1993).
6. Sharon, N. and Lis, H. : Lectins as cell recognition molecules. *Science*, 246, 227 (1989).
7. Kanno, C. : 乳脂肪球膜に関する最近の研究. *日畜會報*, 51, 75 (1980).
8. Deeney, J. T., Valivullah, H. M., Dapper, C. H., Daniel, D. P., Dylewski, P. and Keenan, T. W. : Microlipid droplets in milk secreting mammary epithelial cells. : Evidence that they originate from endoplasmic reticulum and are precursors of milk lipid globules. *Eur. J. Cell Biol.*, 38, 16 (1985).
9. Valivullah, H. M. and Kennan, T. W. : Butyrophilin of milk fat lipid globule membrane contains N-linked carbohydrates and cross-linked with xanthine oxidase. *Int. J. Biochem.*, 21, 103 (1989).
10. Anderson, M. and Cawston, T. E. : Reviews of the progress of dairy science, the milk-fat globule membrane. *J. Dairy Res.*, 42, 459 (1975).
11. Seok, J. S., Shimoda, M., Azuma, N. and Kanno, C. : Structures of the N-linked sugar chains in PAS-7 glycoprotein sharing the same protein core with PAS-6 glycoprotein from the bovine milk fat globule membrane. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 901 (2001).
12. Kanno, C. and Kim, D. H. : A simple procedure for the preparation of bovine milk fat globule membrane and a comparison of its composition, enzymatic activities, and electrophoretic properties with those prepared by other methods. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2845 (1990).
13. Kanno, C. : Antigenic identity between the soluble glycoprotein of milk fat globule membrane and a heat-stable protein fraction of whey. *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1697 (1978).

14. 池谷 徳治, 長谷 純宏 : 續生化學實驗講座 4, 複合糖質研究法 I (日本生化學會編). 東京科學同人, p. 141 (1985).
15. Patel, T., Bruce, J., Merry, A., Bigge, C., Wormald, M., Jaques, A. and Parekh, R. : Use of hydrazine to release in intact and unreduced form both N- and O-linked oligosaccharides from glycoproteins. *Biochemistry*, 32, 679 (1993).
16. Kim, D. H. : 牛乳脂肪球皮膜の主要糖タンパク質である PAS-6 と PAS-7 に関する生化學的研究, 博士論文 (1991).
17. Yamashita, K., Totani, K., Iwaki, Y., Takamisawa, I., Tateishi, N., Higashi, T., Sakamoto, Y. and Kobata, A. : Comparative study of the sugar chains of γ -glutamyltranspeptidases purified from human hepatocellular carcinoma and from human liver. *J. Biochem. (Tokyo)*, 105, 728 (1989).
18. Treumann, A., Lively, M. R., Schneider, P. and Ferguson, M. A. : Primary structure of CD52. *J. Biol. Chem.*, 270, 6088 (1995).

(2001년 11월 26일 접수)