

# 공통의 1차 구조를 가진 우유 지방구막 구성단백질의 당쇄 구조에 관한 생화학적 연구

석진석  
세종대학교 생명공학부 식품공학과

## Biochemical Studies on the Sugar Chain Structure of Glycoproteins with the Same Protein Core of Bovine Milk Fat Globule Membrane

J. S. Seok  
Department of Food Science and Technology, Sejong University

### ABSTRACT

We here analyzed and proposed the structures of the N-linked sugar chains of PAS-7 from bovine milk fat globule membrane. The N-linked sugar chains were liberated from PAS-7 by hydrazinolysis and, after modifying the reducing ends with 2-aminopyridine (PA), were separated into one neutral (7N, 55%) and two acidic (7M, mono-, 43%; 7D, di-, 2%) sugar chain groups. The latter were converted into neutral groups (7MN and 7DN) by sialidase digestion. The structure of each of these PA-neutral sugar chains was determined by sugar analysis, sequential exoglycosidase digestion, partial acetolysis, and 1H-NMR spectroscopy. The results show that the 10 sugar chains were of the biantennary complex type with and without fucose. The structure of 7N2A, one of the major sugar chains, was proposed as; [structure: see text] A structural comparison between PAS-6 and -7 indicated that, although they shared the same protein core, their sugar moiety was markedly different, involving the existence of a different pathway during the post-transcriptional modification.

(**Keyword** : Glycoprotein, Sugar chain, Bovine milk fat globule membrane)

### I. 서론

인간을 비롯한 수많은 동물의 세포 표면막이나 혈청 단백질은 대부분 당단백질로 구성되어 있으며, 항체, 수용체, 호르몬, 효소 또한 그 실태는 단순단백질이 아닌 당단백질인 경우가 대부분이다. 그럼에도 불구하고 이러한 분자들의 생리활성은 각각의 polypeptide 구조만으로 설명되는 경우가 대부분으로, 당쇄 부분의 역할에 대해서는 거의 논의 되어지지 않고 있다. 포유동물의 세포의 세포막을 구성하는 당단백질은 세포

인식, 세포접착, 면역인식 혹은 virus나 호르몬의 수용체로서 중요한 역할을 수행하고 있다<sup>(1-5)</sup>.

우유의 지질은 지방구로서 존재하고 있다. 그 지방구가 안정한 형태를 유지가능한 것은 유선 세포막유래의 유지방구막(milk fat globule membran, MFGM)에 의해 피복되어 있기 때문이다. MFGM은 주로 지질과 단백질로 구성되어 있는 구조리포 단백질이다. Bovine MFGM은 SDS-PAGE에 의해 주요 단백질 성분 16개, 당성분 7개로 검출되며<sup>(6-9)</sup>, 주요 당단백질의 구조 및 생화학적 특성이 밝혀져 있으나, 당쇄의 구조 및 역할은 아직 명확하게 밝혀지지 않은 것이 많다.

MFGM의 7개의 주요 당단백질 중 PAS-6(50kDa) 과

Corresponding author : J. S. Seok, Dept. of Food Science and Technology, Sejong University, 98 Kunja-dong, Kwangjin-ku, Seoul, 143-747, Korea

PAS-7(47kDa)은 서로 분자량이 유사한 것뿐만 아니라, MFGM에서의 국제성, 각종 염에 대한 추출성, 단백질 분해효소에 의한 소화성 등도 아주 유사하지만, Con A에 대한 친화성이 다른 것으로 알려져 있다<sup>(10)</sup>. 그리고 그 분자량의 차이는 두 당단백질의 N-결합 당쇄의 상이에 기인하는 것이 시사되고 있다<sup>(11)</sup>. 더욱이, cDNA로부터 PAS-6/7의 409 아미노산 배열이 발표되어 PAS-6과 PAS-7은 공통의 아미노산 배열을 가진 것이 증명되었다<sup>(12)</sup>.

한편, MFGM의 주요 당단백질 중에서 PAS-4(CD36), PAS-5(butyrophilin), 및 PAS-6의 N-결합 당쇄 구조는 이미 밝혀져 있다<sup>(13-15,16,17)</sup>. PAS-4의 중성당쇄 및 asialo- 중성당의 N-결합 당쇄의 구조는 2-4 branched complex type(약 30%) 당쇄와 high mannose type(약 30%)로 구성되어 있고, complex type 당쇄의 약 30%가 비환원 말단에 N-acetylglucosamine unit(Gal  $\beta$  1-4GlcNAc) 및 GalNAc  $\beta$  1-4GlcNAc unit를 가지고 있다. 그리고 PAS-5는 Asn-55와 Asn-215의 두개의 N-glycosylation site의 당쇄 구조가 밝혀져, 그 구조가 CD36와 유사해 2-4 branched complex type 당쇄와 high mannose type 로 구성되어 있고 비환원 말단에 N-acetylglucosamine unit 및 GalNAc  $\beta$  1-4GlcNAc unit를 가지고 있다. 그러나 이미 보고된 PAS-6의 N-결합 당쇄의 구조는 약 70%가 비환원 말단에 치환되지 않은 mannose 잔기를 가진 N-결합 당쇄의 core 구조이며, 그외의 30%는 비환원 말단에 Gal  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc 구조를 가진 모두 biantennary complex type 구조이다. 그래서 MFGM의 주요 당단백질의 구성 당단백질의 하나인 PAS-6의 N-결합 당쇄 구조는 다른 MFGM의 당쇄 구조와는 상이성이 있을 가능성이 있다.

본 연구는 PAS-7의 N-결합 당쇄를 중심으로 막유래 당단백질의 당쇄구조 해석법에 대해서 설명하며, 또한 MFGM의 각 당단백질의 당쇄구조 및 역할에 대해서 술하였다.

## II. 본론

### 1. PAS-7 당단백질의 생화학적 특성

Bovine MFGM의 주요 7종 당단백질중에서 PAS-6과 PAS-7은 PAS-1과 PAS-5 다음으로 많은 구성 성분이다. PAS-6과 PAS-7은 표재성 단백질로서, MFGM에서 다

른 성분과 비교적 약하게 결합하고 있어 염용액(KCl, MgCl<sub>2</sub>)으로 추출하기 쉬운 성질을 가지고 있다<sup>(8,19)</sup>. PAS-6과 PAS-7의 분자량은 각각 50, 47kDa으로 유사해 단리의 어려움이 있으나, Con A에 대해 친화성이 다른 것을 이용하여 PAS-6과 PAS-7을 단리하였다(Fig. 1).

공통의 단백질 1차구조를 가진 PAS-6/7의 아미노산 배열은 409 아미노산으로 구성되어 있으며 Asn41, Asn209, Ser9, 및 Thr16의 4부분의 glycosylation site를 함유하고 있다<sup>(12)</sup>.

PAS-6과 PAS-7의 당 조성은 GalNAc, GlcNAc, Man, Fuc, Gal, 및 Sialic acid가 검출되며, 각각 당 함량은 약 16.5%와 10.6%이다. PAS-6과 PAS-7의 당 조성에서 각 단당의 비율은 유사하지만, Man 잔기의 비율은 PAS-7이 PAS-6보다 현저히 적었다. 두 당단백질에서 검출되는 sialic acid는 N-acetylneuraminic acid로 판명되었다. 그리고 lectin 염색후의 western blotting의 결과, N-결합 당쇄를 인식하는 RCA120, LCA, Con A와 친화성을 보였고, O-결합 당쇄를 인식하는 DBA와 친화성을 가진 것이 확인되어 두 당단백질은 N-결합 당쇄와 O-결합 당쇄를 모두 가지고 있는 것이 확인되었다(Table 1).

MFGM을 N-Glycanase로 탈당하여 PAS-6과 PAS-7

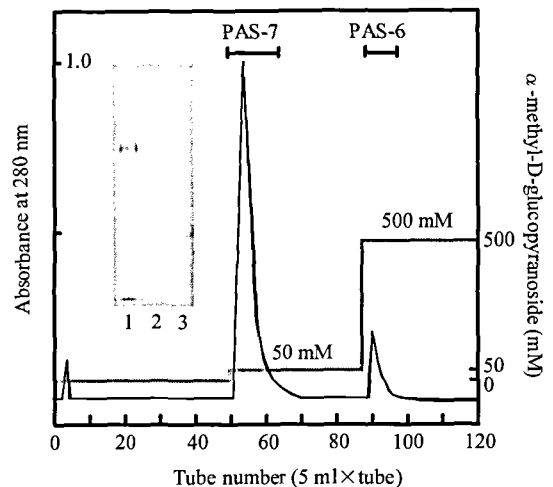


Fig. 1. Elution profile of purified PAS-6/7 on Con A-agarose column affinity chromatography and SDS-PAGE patterns (PAS-stain). Absorbed materials were eluted stepwisely by 50 mM and 500 mM  $\alpha$ -methyl-D-glucopyranoside starting buffer. Lane 1, MFGM; lane 2, PAS-6; lane 3, PAS-7.

Table 1. Carbohydrate Composition of PAS-7 Glycoprotein in Comparison with PAS-6 Glycoprotein from bovine MFGM. Values in parentheses are relative ratios to GlcNAc. Amounts are given as the average of two preparations.

| Mono-saccharides                            | PAS-7            | PAS-6            |
|---|------------------|------------------|
|   | Amount (nmol/mg) | Amount (nmol/mg) |
| GalNAc                                      | 64.4 (0.4)       | 50.0 (0.2)       |
| GlcNAc                                      | 151.6 (1.0)      | 247.4 (1.0)      |
| Man   | 165.2 (1.1)      | 462.8 (1.9)      |
| Fuc   | 20.0 (0.1)       | 41.2 (0.2)       |
| Gal   | 128.4 (0.8)      | 143.0 (0.6)      |
| NeuAc                                       | 44.6 (0.3)       | 53.4 (0.2)       |
| Total ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein) | 117.8            | 198.2            |

의 band 위치가 조금 sift되어 하나의 band로 된 것이 확인되어 PAS-6과 PAS-7의 미묘한 분자량의 차이가 두 당단백질의 당쇄 부분, 특히 N-결합 당쇄에 기인하는 것이 판명되었다.

2. PAS-7 당쇄 구조의 해석

MFGM으로부터 단리한 PAS-7 당단백질의 N-결합 당쇄의 구조 해석은 먼저, OGS Prep 1000(Oxford

GlycoSystem, U.K.)을 이용하여 hydrazine으로 당쇄 부분을 분리하고, acetyl기가 유리된 glucosamine 및 sialic acid를 N-acetyl화한 후 환원말단을 2-aminopyridine으로 형광 표식 하였다. 겔 여과에 의해 과잉시약을 제거 후 HPAEC-PAD HPLC(Dionex, U.S.A.) 분석에 의해 중성 당쇄와 산성 당쇄를 분리 하였다(Fig. 2).

HPAEC-PAD HPLC에 의해 분리한 중성 당쇄와 산성 당쇄는 Reversed-phase HPLC로 분리하여 N-결합

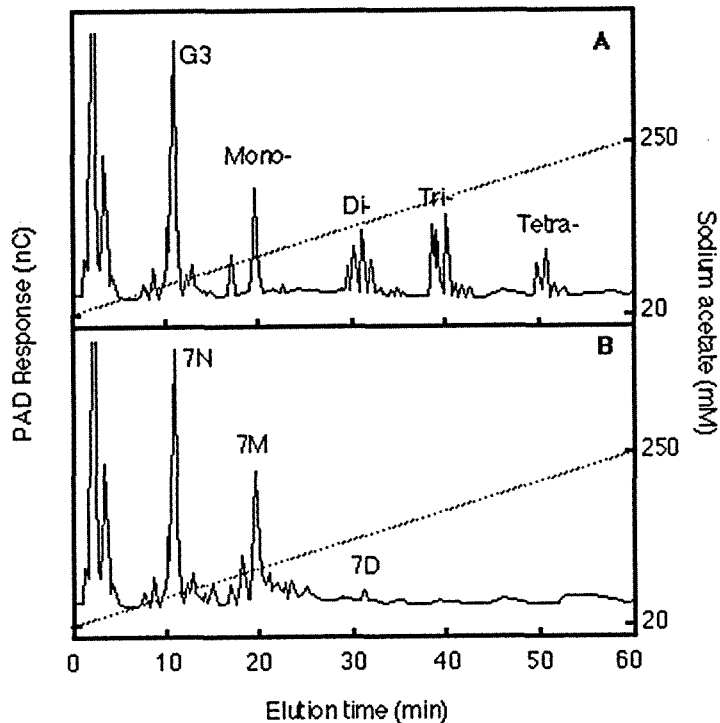


Fig. 2. Sugar chain analysis of PAS-7 glycans by HPAEC-PAD in comparison with bovine serum fetuin glycan pool from OGS Prep 1000. A, fetuin as a standard; B, N-linked sugar chains of PAS-7. G3, isomaltotriose.

PAS-7은 4개의 성분(7N2A, 7N2B, 7N1A, 7N1B)으로 분리되어 8.1, 8.5, 9.6, 10.1GU의 용출위치에 29:30:25:16의 비율로 검출되었다. 한편 sialic acid를 제거한 asialo-올리고당의 reverse-phase HPLC에 의한 분석에서는 3개의 성분(7MN1, 7MN2, 7MN3)으로 분리되었다(Fig. 3).

Reversed-phase HPLC에서 분리 회수한 각 성분을

Amide-80 HPLC에 의해 분석한 결과 7N1A는 7.4GU, 7N2A는 7.0GU, 7N2B는 6.3GU에 검출되었지만, 7N1B는 5.1GU(7N1B-1)과 7.0GU(7N1B-2)의 2개의 성분으로 검출되었다. 이것은 7N1B가 reversed-phase HPLC에서 분리되기 어려운 구조를 가진 당쇄임을 나타냈다. 그리고 7N2A와 7N1B-2의 상이성을 시사했다(Fig. 3).

PAS-7의 N-결합 당쇄의 각 PA화 올리고당에 대한

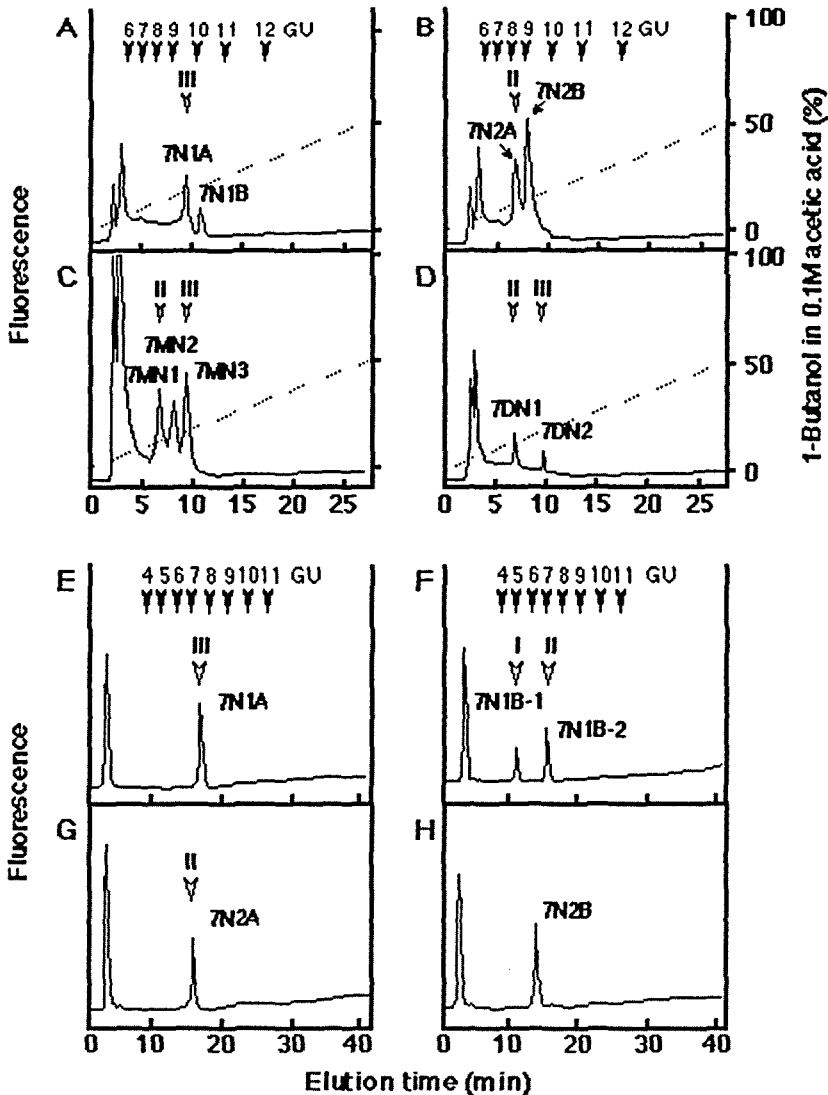


Fig. 3. Separation of the Neutral PA-Sugar Chains Obtained from PAS-7 Glycoprotein by Reversed-phase HPLC in a C18 Column (A-D) and by Size-fractionation HPLC in an Amide-80 Column (E-H). The closed arrowheads indicate the eluting position of the glucose oligomers indicated by GU (glucose units). The open arrowheads indicate the positions of the standard sugar chains, I, II, and III, which are described in the Material and Methods section. The peaks eluted at 3-5 min were due to contaminating materials from the reagents.

Table 2. Summary of the Sequential Exoglycosidase Digestion of the N-Linked PA-Oligosaccharides of PAS-7 glycoprotein. Values indicate glucose units by Amide-80 HPLC and the number of monosaccharides released. Numerals in parentheses shows glucose units by reversed-phase HPLC.

| Code of sugar chain | Sequential exoglycosidase digestion |                |   |               |       |                 |       |                           |          |               |       |
|---------------------|-------------------------------------|----------------|---|---------------|-------|-----------------|-------|---------------------------|----------|---------------|-------|
|                     | A                                   | Original chain | → | α-Fucosidase  | →     | β-Galactosidase | →     | β-N-Acetylhexosaminidase  |          |               |       |
|                     | Glucose units on Amide-80 HPLC      |                |   |               |       |                 |       |                           |          |               |       |
| 7N1A                |                                     | 7.4 (9.6)      |   | 7.0           | 1 Fuc | 5.1             | 2 Gal | 4.3 <sup>a</sup> 2 GlcNAc |          |               |       |
| 7N1B                |                                     | - (10.1)       |   |               |       |                 |       |                           |          |               |       |
|                     | 7N1B-1                              | 5.1 (7.4)      |   | -             |       | -               |       | 4.3 2 GlcNAc              |          |               |       |
|                     | 7N1B-2                              | 7.0 (8.1)      |   | -             |       | 5.1             | 2 Gal | 4.3 2 GlcNAc              |          |               |       |
| 7N2A                |                                     | 7.0 (8.1)      |   | -             |       | 5.1             | 2 Gal | 4.3 2 GlcNAc              |          |               |       |
| 7N2B                |                                     | 6.3 (9.2)      |   | 5.9           | 1 Fuc | 5.1             | 1 Gal | 4.3 2 GlcNAc              |          |               |       |
| 7MN1                |                                     | 7.0 (8.1)      |   | -             |       | 5.1             | 2 Gal | 4.3 2 GlcNAc              |          |               |       |
| 7MN2                |                                     | 6.3 (9.2)      |   | 5.9           | 1 Fuc | 5.1             | 1 Gal | 4.3 2 GlcNAc              |          |               |       |
| 7MN3                |                                     | 7.4 (9.6)      |   | 7.0           | 1 Fuc | 5.1             | 2 Gal | 4.3 2 GlcNAc              |          |               |       |
| 7DN1                |                                     | 7.0 (8.1)      |   | -             |       | 5.1             | 2 Gal | 4.3 2 GlcNAc              |          |               |       |
| 7DN2                |                                     | 7.4 (9.6)      |   | 7.0           | 1 Fuc | 5.1             | 2 Gal | 4.3 2 GlcNAc              |          |               |       |
|                     | B                                   | Original chain | → | α-Mannosidase | →     | β-Galactosidase | →     | β-N-Acetylhexosaminidase  | →        | α-Mannosidase |       |
| 7N1B                | 7N1B-2                              | 7.0            |   | 5.9           | 1 Man | 4.0             | 2 Gal | 3.2                       | 2 GlcNAc | 2.0           | 1 Man |

<sup>a</sup> 4.3 glucose units was eluted at the same position as that of Man $\alpha$ 1-6 (Man $\alpha$ 1-3) Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc-PA.

당의 배위와 anomeric 배위를 결정하기 위하여 준차적으로 exoglycosidase 소화하여 reversed-phase 및 Amide-80 HPLC 분석을 행하였다. 그 결과 7N1A는 ( $\alpha$  Fuc) $_1$ ( $\beta$  Gal) $_2$ ( $\beta$  GlcNAc) $_2$ 와 trimannosyl core, 7N2A는 ( $\beta$  Gal) $_2$ ( $\beta$  GlcNAc) $_2$ 와 trimannosyl core, 7N2B는 ( $\alpha$  Fuc) $_1$ ( $\beta$  Gal) $_1$ ( $\beta$  GlcNAc) $_2$ 와 trimannosyl core, 7N1B-1는 ( $\beta$  GlcNAc) $_2$ 와 trimannosyl core 구조의 배열을 가진 것으로 추정되었다. 한편 7N1B-1은 단당 분석에서는 7N2A와 같은 결과를 보이고 있으나 Amide-80 HPLC의 결과 및 준차적 exoglycosidase 소화후의 HPLC의 결과 ( $\alpha$  Man) $_1$ ( $\beta$  Gal) $_2$ ( $\beta$  GlcNAc) $_2$  ( $\alpha$  Man) $_1$ 의 구조로서 7N2A와 서로 다른 구조의 당쇄로 추정되었다(Table 2).

Oligomannose type 당쇄를 acetolysis하면, Man  $\alpha$  1-3 결합보다 Man  $\alpha$  1-6 결합쪽이 더욱 선택적으로 절단되기 쉬운 것을 이용하여 7N1B-2 비환원 말단의 1개의 Man 잔기와 2개의 Gal 잔기의 결합양식을 확인하였다. 그 결과 acetolysis 후의 환원말단 당쇄의 구조는 ( $\beta$  Gal) $_2$ ( $\beta$  GlcNAc) $_2$ ( $\alpha$  Man1-3) $_1$ ( $\beta$  GlcNAc) $_1$ ( $\beta$  GlcNAc) $_1$ -PA의 배열을 가진 것이 확인되었다(Fig. 4).

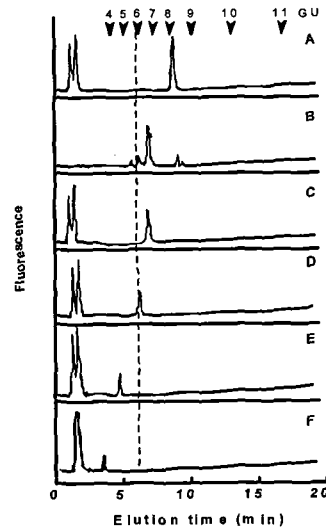
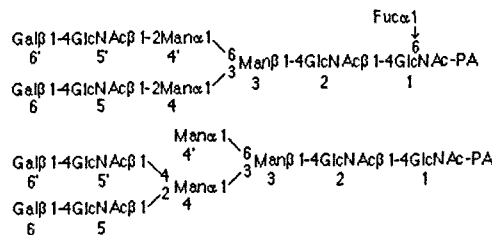


Fig. 4. Sequential Exoglycosidase Digestion of 7N1B-2 after Partial Acetolysis Analyzed by Reversed-phase HPLC. A, 7N1B-2; B, reducing end of A after acetolysis; C,  $\alpha$ -mannosidase digest of B; D,  $\beta$ -galactosidase digest of C; E,  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase digest of D; F,  $\alpha$ -mannosidase digest of E. The closed arrowheads indicate the eluting position of the glucose oligomers as GU values. The peak eluted at 1-2 min is due to contaminating materials from the reagents.

Table 3. 600 MHz <sup>1</sup>H-NMR Chemical Shifts (ppm) to the Structural Reporter Groups of Constituent Monosaccharides of the PAS-7 Glycoprotein isolated from MFGM.

◇, GlcNAc; ●, Man; †, Gal; ■, Fuc. a, not detectable due to the limited amount of sample. nd, not detected., GlcNAc-1 is the pyridylaminated residue. Data spectra was measured in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O at 23°C (in parentheses, measured at 60°C).

| Reporter groups | Residue   | Chemical shift |        |         |       |       |
|-----------------|-----------|----------------|--------|---------|-------|-------|
|                 |           | 7N1A           | 7N1B   |         | 7N2A  | 7N2B  |
|                 |           |                | 7N1B-1 | 7N1B-2  |       |       |
|                 |           |                |        |         |       |       |
| H-1             | GlcNAc-2  | a              | a      | 4.677   | a     | a     |
|                 | Man-3     | a              | a      | (4.763) | a     | a     |
|                 | Man-4     | 5.101          | 5.105  | 5.125   | 5.099 | 5.105 |
|                 | Man-4'    | a              | a      | 4.917   | 4.913 | 4.913 |
|                 | GlcNAc-5  | 4.569          | 4.543  | 4.578   | 4.571 | 4.546 |
|                 | GlcNAc-5' | 4.569          | 4.543  | 4.578   | 4.571 | 4.572 |
|                 | Gal-6     | 4.458          | nd     | 4.466   | 4.463 | nd    |
|                 | Gal-6'    | 4.458          | nd     | 4.466   | 4.463 | 4.459 |
|                 | Fuc       | a              | nd     | nd      | nd    | a     |
| H-2             | Man-3     | 4.218          | 4.222  | 4.232   | 4.217 | 4.232 |
|                 | Man-4     | 4.172          | 4.177  | 4.177   | 4.177 | 4.185 |
|                 | Man-4'    | 4.117          | 4.116  | 4.112   | 4.116 | 4.115 |
| NAc             | GlcNAc-1  | 1.958          | 1.950  | 1.933   | 1.931 | 1.932 |
|                 | GlcNAc-2  | 2.063          | 2.059  | 2.063   | 2.058 | 2.067 |
|                 | GlcNAc-5  | 2.042          | 2.050  | 2.044   | 2.039 | 2.043 |
|                 | GlcNAc-5' | 2.032          | 2.039  | 2.039   | 2.031 | 2.032 |
| CH <sub>3</sub> | Fuc       | 1.168          | nd     | nd      | nd    | 1.167 |



PAS-7의 당쇄 구조를 결정하기 위해 *Vliegenthart* 등의 방법으로 이제까지 보고된 당쇄의 spectra에 귀속하는 것에 의해 분석하였다<sup>(20)</sup>. 그 결과 7N1B-2 이외의 4개의 성분에 나타나는 Man H-2 atom resonance는 Asn-결합 올리고당의 전형적 core 구조를 가지고 있으며, Man-4 및 Man-4'의 C2에 β-결합한 GlcNAc잔기를 함유한 biantennary 올리고당의 존재를 나타냈다<sup>(20,21)</sup>. 한편 7N1B-2는 H-1 proton의 Man-4(5.125 ppm)의 화학 시프트의 결과로부터 다른 올리고당과 틀린 구조인 것이 추정되었다. 7N1B-2의 H-1 proton의 Man-4(5.125 ppm)과 Man-4'(4.917 ppm) 화학 시프트의 결과로부터 Man-4' 쪽이 비치환되어 있는 것이 확인되었다.

더욱이 7N2B 및 7N1A는 각각 1.167, 1.168 ppm의 CH<sub>3</sub> proton의 화학 시프트(Table 3), 그리고 structural-reporter group의 GlcNAc-2(NAc proton 2.063 ppm)에 나타나는 전형적 공명위치에 의해 GlcNAc-1잔기에 α-1-6결합한 Fuc 잔기를 하나씩 가진 것을 나타냈다. 7N2B는 비환원 말단에 Gal잔기를 하나 가지고 있지만, 7N1B-1은 검출되지 않았다. 성분 7N2B는 GlcNAc-5'에 결합되어 있는 Gal잔기를 함유한 것을 확인했다. 성분 7N1A, 7N1B-2 및 7N2A의 비환원 말단의 N-acetylglucosamine의 치환으로 GlcNAc-5 및 GlcNAc-5', Gal-6 및 Gal-6'의 H-1 proton의 화학 시프트가 각각 일치했다. 성분 7N2A와 7N1B-2에서 성분 7N1B-2의 H-1 proton의

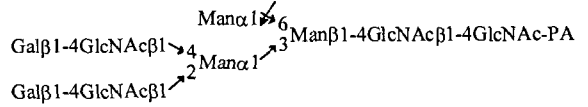
Man-3 및 Man-4' 에서 명백한 차이를 보여,  $\alpha$  1-6Man 당쇄가 치환되지 않은 것을 나타냈다.

### 3. PAS-7의 N-결합 당쇄구조의 결정

당쇄의 HPLC에 의한 size 분획, 준차적 exoglycosidase 소화, 부분 acetolysis 및 NMR 분석의 결과에 의해 PAS-7의 N-결합 당쇄의 구조를 결정하였다(Fig. 5).

PAS-7의 N-결합 당쇄 구조는 5종의 중성 당쇄와 5종의 산성 당쇄로 구성되어 있으며, 중성 당쇄는 7N1A, 7N1B-1, 7N1B-2, 7N2A 및 7N2B의 성분으로 구성되어 있고, 전성분이 biantennary complex type 당쇄인 것이 확인되었다. 산성 당쇄의 비환원 말단에는  $\alpha$ 2-6 sialic acid로 치환되어 있으며, 특히 중성 당쇄의 7N1B-2는 7N2A와 동일한 단당 조성을 가지고 있으나

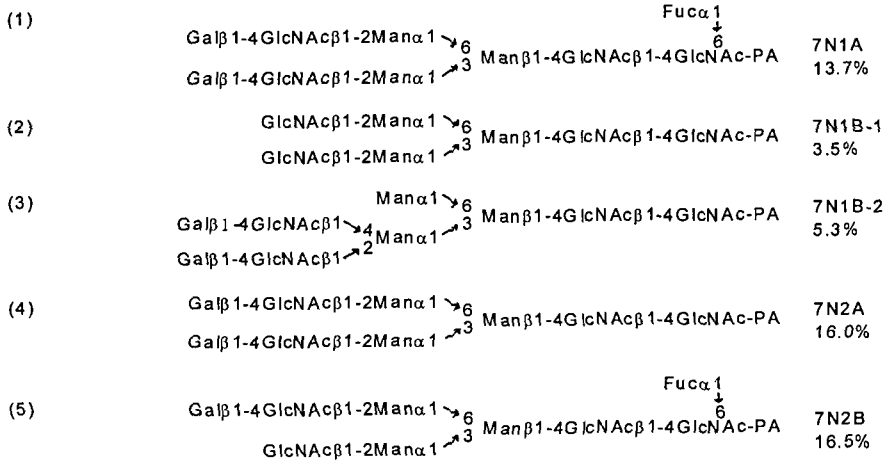
구조적 상이성을 나타냈다. 7N1B-2는 준차적 exoglycosidase 소화후의 HPLC 분획, 부분 acetolysis 후의 분석, NMR분석에 의해 다음과 같은 구조를 결정했다.



## III. 결론

PAS-6과 PAS-7은 MFGM을 구성하는 주요 당단백질이며, 공통의 1차 구조를 가지면서도 분자량이 상이해, 그 차이가 당의 차이에 기인하는 것이 보고 되고 있다. 여기에서 본 연구는 생물계에서 거의 찾아볼 수 없

#### Neutral-sugar chains



#### Sialo-sugar chains

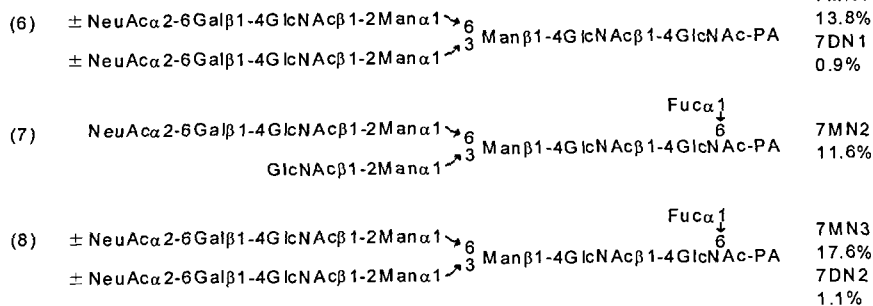


Fig. 5. Proposed Structures of the N-Linked PA-Sugar Chains of PAS-7 Glycoprotein. In 7MN1 and 7MN3, one NeuAc residue is added to either outer Gal, and in 7DN1 and 7DN2, two NeuAc residues are in both outer Gals.

는 PAS-6과 PAS-7의 차이를 밝히기 위해 아직 보고 되지 않은 PAS-7의 당쇄 구조를 해석하고, 이미 결정되어진 MFGM의 다른 당단백질의 당쇄와 비교하여 유선에서의 PAS-6과 PAS-7의 역할 및 다른 당단백질과의 연관성을 살펴보았다.

MFGM으로부터 겔여과 및 Con A affinity chromatography를 이용해 PAS-6과 PAS-7을 정제하여, 각각의 N-결합 당쇄의 구조를 해석한 결과, PAS-6과 PAS-7의 당합량은 각각 16.5%와 10.6%였으며, 당조성과 lectin 친화성의 결과 PAS-6과 PAS-7 모두 N-과 O-결합 당쇄를 함유하고 있다. 특히 중성당쇄 7N1B-2의 구조는 7N2A와 동일한 단당조성을 가지고 있으나 구조적 상이를 나타내어, 비환원말단에 비치환된 Man 잔기를 한 개 가진 것이 확인되어 그 구조는 사람의 간세포 유래의  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase의 당쇄 중 하나의 성분과 일치했다<sup>(22)</sup>.

또한, PAS-6의 N-결합 중성 당쇄는 전형적인 trimannosyl core 구조가 당쇄의 70%를 차지하여 PAS-6과 PAS-7의 정제 단계에서 Con A에 대한 결합력의 차이로 분리 가능한 것이 구조적으로 확인되었다. PAS-7은 Con A와 친화력이 비교적 약한 당쇄 구조를 가지고 있으며 PAS-6은 대부분의 당쇄가 친화력을 가지고 있다.

PAS-6과 PAS-7의 N-결합 당쇄의 국제성은 PAS-6은 Asn41에 2종 및 Asn209에 1종, PAS-7은 Asn41에 1종의 당쇄가 결합되어 있고, Asn-209에는 trimannosyl core 구조의 당쇄만이 결합되어 있다.

본 연구에서 명백하게 증명된 PAS-6과 PAS-7의 N-결합 당쇄 구조는 두 당단백질 모두 중성과 산성 당쇄가 존재하며, sialic acid는 전부 biantennary 당쇄의 비환원 말단에  $\alpha$ 2-6 결합하고 있는 것이 밝혀져, 그 유사성은 물론 공통의 단백질 core를 가지고 있는 것으로부터 유래한다고 해도 glycosylation site의 상이에 대한 설명으로는 부족하다. 이것은 각각의 glycosylation site에서 역할이 다른 당쇄의 존재를 시사한다. PAS-6의 N-결합 당쇄의 전부가 biantennary complex type이고, 그 70%가 비치환의 비환원 말단 Man를 가지고 있는 것과 Asn209의 PAS-6만이 그 당쇄를 함유하고 있는 것을 증명했다.

PAS-6과 PAS-7의 N-결합 당쇄의 구조는, bovine

MFGM의 다른 주요 당단백질인 PAS-4 및 PAS-5에서 보여지는 비환원 말단의 GalNAc  $\beta$ 1-4GlcNAc unit는 나타나지 않았다. 이 당쇄의 합성에 관여하는 효소는 bovine 뇌하수체에서 추정적 glycosylation site로부터 6-9 아미노산 잔기 떨어져 있는 tripeptide 배열(Pro-Xaa-Lys/Arg)을 인식하고, N-결합 당쇄의 GlcNAc 잔기에 GalNAc을 전이하는 N-acetyl-galactosaminyl transferase가 존재하는 것이 보고 되었다<sup>(23)</sup>. GalNAc  $\beta$ 1-4GlcNAc unit를 함유하는 N-결합 당쇄는 아주 적으며, bovine 당단백질에서는 CD36, butyrophilin, lactoferrin 및 bovine 뇌하수체에 의해 합성되는 호르몬등에 국한되어 존재한다<sup>(24-26)</sup>. 그러나 MFGM의 PAS-4 및 PAS-5는 자신의 아미노산 배열에 Pro-Xaa-Lys/Arg tripeptide 배열을 함유하지만, 뇌하수체 유래의 호르몬과는 다른 site-specific manner를 보여주고 있다<sup>(27)</sup>. 이것은 PAS-4와 PAS-5가 bovine 뇌하수체 유래의 호르몬과는 다른 당쇄 합성 경로를 가진 것의 의미이다. PAS-6/7의 아미노산 배열에는 Pro-Xaa-Lys/Arg tripeptide 배열도 없고, GalNAc  $\beta$ 1-4GlcNAc unit를 함유한 당쇄도 없는 것이 확인되어, PAS-6과 PAS-7는 하수체 유래의 호르몬이나 다른 MFGM 구성 당단백질과는 틀린 glycosylation manner를 가진 것으로 사료된다. 공통의 1차 구조를 가지면서 PAS-6과 PAS-7의 N-결합 당쇄가 상이한 이유는 첫째, N-결합 올리고당의 생합성에서 필수적인 지질-올리고당 중간체가 유선 분비세포에서의 후기-전사성 수식의 경로에서 PAS-7의 Asn209에 전사되지 않았을 가능성이 있으며, 이것은 골지체에서 이들 단백질의 다른 국제성에 기인할 수가 있다. 그리고 PAS-6에서의 O-glycosylation site에서 당쇄가 PAS-7의 Thr15의 O-glycosylation site에서의 당쇄와 상이한 것도 지적될 수 있을 것이다.

PAS-6/7는 많은 선상피세포나 몇몇의 체액에 폭 넓게 존재하지만, bovine 혈장과 적혈구에는 존재하지 않는다<sup>(28)</sup>. 따라서 PAS-6/7의 생물학적 기능은 유선에서 뿐만 아니라 그 당단백질의 생합성은 다른 장기나 장관의 당단백질을 연구하는데 있어서 좋은 연구 모델로서 흥미 있는 당단백질이라 사료된다.



#### IV. 참고문헌

1. Woodruff, J. and B. M. Gesner, 1969, The effect of neuraminidase on the fate of transfused lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 129, 551-567.
2. Cuatrecasas, P., 1973, Identification of concanavaline A and wheat germ agglutinine with the insulin receptor of fat cells and liver. *J. Biol. Chem.*, 248, 3528-3534.
3. Rademacher, T. W., R. B. Parekh and R. A. Dwek, 1988, *Glycobiology. Annu. Rev. Biochem.*, 57, 785-838.
4. Sharon, N. and H. Lis, 1993, *Carbohydrates in Cell Recognition. 日經サイエンス*, 4, 16-55.
5. Ashwell, G. and H. Harford, 1982, Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu. Rev. Biochem.*, 51, 531-554. Sharon, N. and H. Lis, 1989, Lectins as cell recognition molecules. *Science*, 246, 227-234.
7. 菅野 長右エ門, 1980, 乳脂肪球膜に関する最近の研究, *日畜會報*, 51, 75-88.
8. Keenan, T. W., D. J. Morre and C. M. Huang, 1974, In *Lactation*, vol. 2, (Larson B L., Smithed V. R.) Academic Press, New York and London, 191-233.
9. Deeney, J. T., H. M. Valivullah, C. H. Dapper, D. P. Daniel, P. Dylewski and T.W. Keenan, 1985, 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, 16-26.
10. Kanno, C., 1986, Receptor proteins for concanavalin A and wheat germ agglutinin of bovine milk fat globule membrane probed by affinity chromatography in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2997-3003.
11. Aoki, N., M. Ujita, H. Kuroda, M. Urabe, A. Noda, T. Adachi, R. Nakamura and T. Matsuda, 1994, Immunologically cross-reactive 57 kDa and 53 kDa glycoprotein antigens of bovine milk fat globule membrane: isoforms with different N-linked sugar chains and differential glycosylation at early stages of lactating. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1200, 227-234.
12. Hvarregaard, J., Andersen, M. H., Berglund, L., Rasmussen, J. T. and Petersen, T. E., 1996, Characterization of glycoprotein PAS-6/7 from membranes of bovine milk fat globules. *Eur. J. Biochem.*, 240, 628-636.
13. Nakata, N., K. Furukawa, D. E. Greenwalt and A. Kobata, 1991, Bovine milk epithelial glycoprotein IV (CD36) contains novel sialylated tri- and tetraantennary complex-type sugar chains having a  $\beta$ -N-acetylgalactosamine linked to an N-acetylglucosamine residue. *Glycoconjugate. J.*, 8, 250.
14. Nakata, N., K. Furukawa, D. E. Greenwalt, T. Sato and A. Kobata, 1993, Structural study of the sugar chains of CD36 purified from bovine mammary epithelial cells: Occurrence of novel hybrid-type sugar chains containing the Neu5Ac  $\alpha$  2-6GalNAc  $\beta$  -4GlcNAc and the Man  $\alpha$  1-2Man  $\alpha$  1-3Man  $\alpha$  1-6Man groups. *Biochemistry*, 32, 4369-4383.
15. Smith, P. L. and J. U. Baenziger, 1990, Recognition by the glycoprotein hormone-specific N-acetylgalactosamintransferase is independent of hormone native conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 7275-7579.
16. Sato, T., K. Takio, A. Kobata, D. E. Greenwalt and K. Furukawa, 1995, Site-specific glycosylation of bovine butyrophilin. *J. Biochem. (Tokyo)*, 117, 147-157.
17. D-H Kim, N. Azuma, H. Tanaka and C. Kanno, 1998, Structures of the N-linked sugar chains in the PAS-6 glycoprotein from the bovine milk fat globule membrane. *Glycoconjugate J.*, 15, 361-369.
18. Kanno, C., S. Nakamura and K. Yamauchi, 1980, Selective solubilization of glycoproteins of milk fat globule membrane with KCl and MgCl<sub>2</sub>. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1193-1194.
19. Shimuzu, M., C. Kanno and K. Yamauchi, 1978, Selective solubilization of bovine milk fat globule membrane proteins with guanidine hydrochloride and disposition of some of the proteins. *Agric. Biol. Chem.*, 42, 2309-2314.
20. Vliegthart, J. F. G., Dorland, L. and Halbeek, H., 1983, High-resolution, <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrates related to glycoproteins. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 41, 209-374.
21. Dorland, L., Halbeek, H. and Vliegthart, J. F. G., 1984, The identification of terminal  $\alpha$ (1-3)-linked galactose in N-acetylglucosamine type of glycopeptides by means of 500-MHz <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun., 122, 859-866.
22. K. Yamashita, K. Totani, Y. Iwaki, I. Takamisawa, N. Tateishi, T. Higashi, Y. Sakamoto and A. Kobata, 1989, Comparative study of the sugar chains of  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidases purified from human hepatocellular carcinoma and from human liver. J. Biochem. (Tokyo), 105, 728-735.
23. Smith, P. L. and J. U. Baenziger, 1992, Molecular basis of recognition by the glycoprotein hormone-specific N-acetylgalactosamine-transferase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89, 329-333.
24. Sato, T., K. Takio, A. Kobata, D. E. Greenwalt and K. Furukawa, 1995, Site-specific glycosylation of bovine butyrophilin. J. Biochem. (Tokyo), 117, 147-157.
25. Coddeville, B., Strecker, G., Wieruszski, J. M., Vliegthart, J. F. G., Egge, H. & Spik, 1992, G.Heterogeneity of bovine lactotransferrin glycans. Characterization of  $\alpha$ -D-Galp-(1-3)- $\beta$ -D-Gal- and  $\alpha$ -NeuAc-(2-6)- $\beta$ -D-GalpNAc-(1-4)- $\beta$ -D-GlcNAc-substituted N-linked glycans. Carbohydr. Res., 236, 145-164.
26. Sato, T., K. Takio, A. Kobata, D. E. Greenwalt and K. Furukawa, 1995, Site-specific glycosylation of bovine butyrophilin. J. Biochem. (Tokyo), 117, 147-157.
27. Hvarregaard, J., Andersen, M. H., Berglund, L., Rasmussen, J. T. and Petersen, T. E., 1996, Characterization of glycoprotein PAS-6/7 from membranes of bovine milk fat globules. Eur. J. Biochem., 240, 628-636.
28. Andersen, M. H., Berglund, L., Rasmussen, J. T. and Petersen, T. E., 1997, Bovine PAS-6/7 binds  $\alpha_v\beta_3$  integrin and anionic phospholipids through two domains. Biochemistry, 36, 5441-5446.