

FMOC 표식에 의한 Sugar Chain의 분석

김동현 · 황보식* · 정구용*

일본동경농공대학, *상지대학교 생명자원과학대학

Application of FMOC-Cl for the Quantitative Determination of N-linked Oligosaccharides

Dong-Hyun Kim, Sik Hwangbo* and Gu-Yong Chung*

Department of Agriculture Science, Tokyo University of Agriculture and Technology,

*Department of Animal Science, Sangji University

Abstract

A fluorescence tagging agent, FMOC-Cl (9-fluorenylmethyl chloroformate) was used for the determination of 1-amino-oligosaccharide intermediates generated from glycoproteins by peptide-N (N-acetyl-β-D-glucosaminyl) asparagine amidase (N-Glycanase, PNGase F). The derivatives were separated on an Amido 80 column by HPLC using a gradient system with 25 to 51% aqueous acetonitrile and monitored by a fluorometric detector. The detection limit of FMOC-amino-oligosaccharides was 0.05~1.5 pmol with fluorometric detection at 278 nm.

Key words: FMOC, sugar chain, glycoprotein, PNGase

서론

당쇄는 핵산이나 단백질과 같이 그 구조 자체가 생물학적인 정보를 담당하고 있다. 그러나, 당쇄는 그 구조가 가장 복잡하기 때문에 정보를 담당하고 있는 용량도 가장 많다고 할 수 있다. 당쇄의 구성 요소인 단당은, 그의 분자 중에서 다른 단당과 결합하는 위치가 여러 곳이 있기 때문에, 다양한 분지 구조나 직쇄 구조를 형성할 수 있다. 따라서 단백질을 구성하는 아미노산이나 핵산을 구성하는 뉴클레오티드는 직쇄 구조를 갖고 있기 때문에 구조의 다양성은 제한되어 있으나, 다양한 구조를 갖고 있는 당쇄는 생체 내에서 여러가지 기능을 가지고 있다.

당단백질에 있어서 당쇄의 기능은, 당단백질의 물리적, 화학적 성질, 생체막과 상호작용, 단백질의 안정성, 미생물 항체의 표적, 세포간의 접촉 등의 역할을 담당하고 있다. 당쇄에는 N-결합형 당쇄(N-linked sugar chain) 와 O-결합형 당쇄(O-linked sugar chain)로 나눈다. N-결합형 당쇄는 폴리펩티드Asn-X-Thr/

Ser배열의 Asn잔기에 N-아세틸 글루코사민을 통해서 결합한 당쇄이며, O-결합형 당쇄는 폴리펩티드 Ser또는 Thr잔기에 N-아세틸 갈락토스아민을 통해서 결합한 당쇄이다⁽¹⁻³⁾.

당단백질의 N-결합형 당쇄 유리 방법에는 화학적 수단과 효소학적 수단이 사용되고 있다. 화학적 방법으로는 히드라진 분해, trifluoroacetic acid에 의한 분해 등이 있으며, 효소학적 수단으로는 glycopeptidase인 PNGase F (N-glycanase)와 PNGase A 등을 들 수 있다⁽⁴⁻¹⁰⁾. 화학적 수단에 의한 당쇄의 유리(절단)는 당쇄의 환원 말단인 N-아세틸 글루코사민과 펩티드와 결합하고 있는 아민기가 유리된 당쇄가 형성된다. 효소학적 수단으로 당쇄를 유리시키면 환원 말단의 N-아세틸 글루코사민의 C-1에 아민기가 결합된 상태의 당쇄가 형성되나, C-1의 아민기는 불안정하여 분해되기 쉽다. 예로써, PNGase A의 경우는 최적 pH가 5.0 전후이므로 당단백질로부터 유리된 당쇄의 환원 말단이 N-아세틸 글루코사민 C-1의 아민기가 존재한다⁽¹¹⁾. 2-aminopyridine에 의한 형광 표식법이 많이 사용되고 있으나 표식 시간 및 잔류물질의 제거에 많은 어려움이 있는 것으로 나타나 있으며⁽¹²⁾, 불안정한 상태를 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한 그 회수량도

Corresponding author: Sik Hwangbo, Department of Animal Science, Sangji University, San 41 Usan-dong, Wonju-si, Kangwon-do 220-702, Korea

비교적 낮은 편이며(75% 전후) 검출 감도도 낮기 때문에⁽⁴⁾ 새로운 형광 물질에 의한 표식법의 개발이 절실히 요구되어 지고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 새로운 표식법의 개발을 위하여, 당단백질 RNase B를 중심으로 N-glycanase를 사용하여 당쇄를 유리시키는 방법의 확립, 형광 물질인 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC)로 표식 시키는 방법의 개발, 그리고 HPLC에 의한 분석 방법 등을 검토했다. 또한 기존의 방법과 비교 분석하여 새로운 분석 방법을 확립하기 위하여 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

공시 재료

L- α -Fucose, D-galactose, D-glucose, D-mannose, N-acetyl- α -galactosamine (GalNAc)³, N-acetyl- α -D-glucosamine (GlcNAc), ammonia water (28%), methanol, 그리고 ammonium bicarbonate, Dowex AG50W-X12 (H⁺), FMOC-Cl은 Sigma Chem. Co. (USA)로부터 구입하였다. Sodium phosphate dibasic과 sodium phosphate monobasic monohydrate는 Mallinckrodt Specially Chemicals Co. (USA)로부터 구입했다. Amido 80은 Tosho (Japan)로부터 구입했다. 그 이외의 시약은 생화학 분석용을 사용하였다.

당단백질의 환원 및 Carboxymethylation

1 mg의 당단백질을 시알산 분해 효소(neuraminidase Type V, Sigma)를 이용하여 37°C에서 16시간 가수분해한 후, 0.36 M Tis-HCl (pH 8.6, 8.0 M 요소와 2.0 mM EDTA함유)를 이용하여 실온에서 24시간 투석하였다. 그 후 최종 농도 10 mM이 되도록 Dithiothreitol (DTT)을 첨가하여 실온에서 4시간 환원시킨 후 25 mM이 되도록 요오드 초산을 첨가하여 실온의 암실에서 30분간 처리한 후, 최종 농도 50 mM이 되도록 DTT를 첨가하여 0.1 M 탄산 암모니아를 이용하여 실온에서 24시간 투석하였다.

당단백질로부터 1-amino oligosaccharides의 유리

환원 및 메틸화한 당단백질을 1.0 mL의 20 mM 인산 완충액(pH 8.6, 0.5 M 요소)에 녹인 후 40 U의 N-glycanase를 첨가하여 37°C에서 16시간 가수분해한 후, 3배 량의 차가운 에탄올을 첨가하여 혼합한 후 10,000×g에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 옮겼다. 침전물을 8.0 mL의 75%에탄올에 현탁시킨 후 위와 똑같은 방법으로 원심 분리하여 상등액은 위에서 분

리시킨 용액과 같이 혼합한 다음 감압 원심 분리를 이용하여 20°C에서 메탄올을 제거하였다.

농축시킨 oligosaccharides 시료는 2 mM 인산 완충액 (pH 8-6)을 이용하여 Sephadex HR-10 column (21×580 mm)을 이용하여 정제하였다. 건조물은 75% (w/w) 아세토니트릴 200 mL에 용해시킨 후 20~50 mL의 시료를 HPLC로 분석하였다.

1-Amino oligosaccharides의 FMOC의 표식

농축시킨 oligosaccharides를 에탄올을 이용하여 최종 농도가 50%가 되도록 희석하였다. 200 μ L의 oligosaccharides분획에 0.01% FMOC-Cl (w/v) 20 μ L를 첨가하여 실온의 암실에서 1시간 반응시켰다. 반응물 중의 과다한 시약을 제거하기 위하여 같은 양의 methylene chloride를 첨가하여 3번 농축시킨 후, 상등액을 모은 다음 질소 가스를 이용하여 건조시켰다.

HPLC

HPLC 시스템은 Jasco 880-PU를 사용하였다. 분석 조건은 최초에는 아세토니트릴 25%로 하였으며 그 후 60분까지 직선 농도 변화(59%까지)로 하여 분리하였으며, Amido 80 column (250×4.6 mm, 5 μ m)을 사용하여 유속 1.0 mL/min로 분석하였다. FP-920 형광 검출기 (일본 분광, Japan)를 이용하여 excitation wavelength 278 nm, emission wavelength 333 nm에서 검출하였으며, Jasco 807-IT를 사용하여 기록하였다.

HPTLC

HPTLC plate silica 60은 Merck사의 Spectro line (Model CC-80)을 사용하였다. 65% 아세토니트릴을 용매로 사용하여 전개시킨 후, 유리된 1-amino-oligosaccharides 및 FMOC-oligosaccharides를 365 nm 및 254 nm의 파장에서 형광 검출기를 이용하여 Kimura 등⁽¹⁾의 방법에 의하여 측정하였다.

결과 및 고찰

Oligosaccharide의 유리

Fig. 1은 N-glycanase에 의해 당단백질로부터 N-결합 당쇄가 유리되는 메커니즘을 나타내고 있다. RNase B와 N-glycanase를 0.05 mU/mg protein농도로 하여 37°C에서 16시간 가수분해를 하면 Fig. 1의 a와 같이 N-결합형 당쇄가 분해된다. RNase B에서 유리된 oligosaccharides⁽¹⁾를 이용하여 FMOC로 표식하여 1-amino-oligosaccharides를 만들었다(Fig. 1. b). 생성된 FMOC-

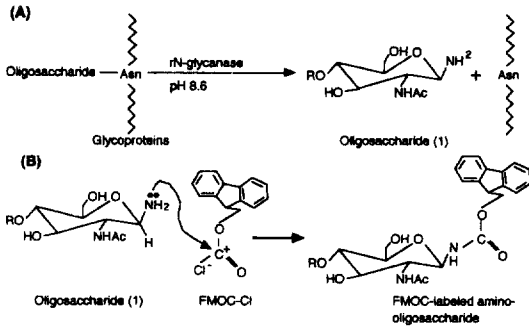


Fig. 1. Reaction scheme of rN-glycanase and FMOCl. The release of 1-amino-oligosaccharides by recombinant N-glycanase [A, rN-glycanase (15)] and a step to trapping of 1-amino-oligosaccharides with FMOCl (B). R: H or glycosides.

oligosaccharides를 HPLC로 분석한 결과, N-결합형 당쇄는 완전히 유리되어진 것이 확인되었다(Fig. 2). 환원 메칠화시킨 당단백질의 경우, 일정량의 RNase B (μg)에 대한 N-glycanase의 양이 0.04 mU까지 증가시키면 거의 직선적으로 oligosaccharides가 유리되었으며, 효소의 양을 그 이상 첨가하여도 유리되는 oligosaccharides의 양은 변화가 없는 등, 그후 일정한 양상을 나타내었으므로 N-glycanase에 의해 전부 유리되었음이 확인되었다. 그러나, Hirani 등⁽¹²⁾에 의한 보고(Fig. 2)와 비교할 경우, N-glycanase의 양이 0.14 mU 이상이 되어야만 유리되는 oligosaccharides의 양이 일정하게 되므로, 본 연구에 의해 새롭게 시도된 방법이 매우 효과적인 것이 입증되었다. 즉, 환원 메칠화법을 이용할 경우 당단백질로부터 1-amino-oligosaccharides의 유리 량도 기존의 방법보다 감도가 약 4배 높게 나타나

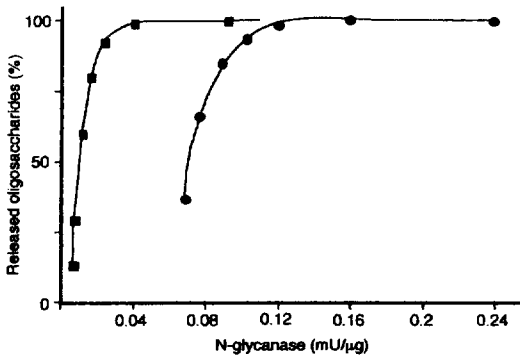


Fig. 2. Concentrations of N-glycanase for releasing oligosaccharides from RNase B. Released 1-amino-oligosaccharides were with FMOCl, and separated by HPLC. ■—■: reducing methylation method (see materials and methods), ●—●: the method of Hirani *et al.*⁽¹²⁾.

는 것이 확인되었다.

유도화의 최적화

유리 되어진 1-amino-oligosaccharide에 대한 FMOCl의 몰 농도의 영향을 측정하였다. 1-amino-oligosaccharide에 대한 FMOCl의 몰 농도를 2:1에서 50:1로 하여 몰 농도와 반응 시간의 영향을 실온에서 측정하였다(Fig. 3). RNase B로부터 유리되어진 1-amino-oligosaccharides에 대한 FMOCl의 양은 약 60분에서 20배 이상 높게 검출되었으며, 60분 이상에서는 일정한 흡광치를 나타내었다. 그러나, 50:1의 비율인 경우, 10분 이상에서는 거의 일정한 수치를 나타내었으며, 그 흡광치는 60분 이후 20:1과 같은 수준이 되었다. 1-amino-oligosaccharides와 FMOCl의 반응액 (몰 비율 20:1)을 실온에서 60분간 반응시킨 후 HPTLC plate로 전개시킨 결과, oligosaccharides가 FMOCl에 의해 표식된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4. A, lanes 1과 3). 또한, HPTLC plate를 orcinol-sulfuric acid에 의해 발색시킨 후, 형광 검출기를 이용하여 1-amino-oligosaccharides와 FMOCl-oligosaccharides의 감도를 비교한 결과, 95%이상이 합성된 것이 확인 되었다(Fig. 4. B, lanes 1과 2). 따라서 2-aminopyridine를 이용하여 90°C에서 8시간 표식할 경우 71%가 합성된다는 Suzuki 등⁽¹³⁾의 결과보다 매우 우수하다는 것이 입증되었다.

HPLC에 의한 FMOCl 표식 amino-oligosaccharides의 분석

FMOCl 표식 oligosaccharides를 Amido 80 column을

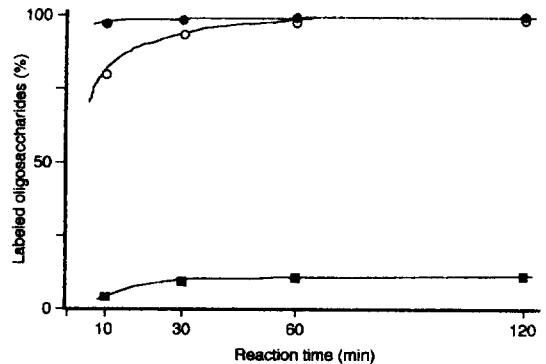


Fig. 3. Effect of reaction time and a molar ratio of FMOCl to 1-amino-oligosaccharides on derivatization reaction at room temperature. Oligosaccharides were obtained from RNase recombinant N-glycanase digestion. A molar ratio of FMOCl/1-amino-oligosaccharides. ●—●: 50:1, ○—○: 20:1, ■—■: 2:1.

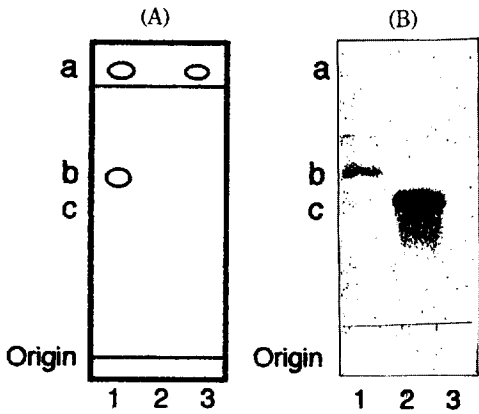


Fig. 4. The extend of the FMOC-labeled oligosaccharide formation on HPTLC plates. HPTLC was performed with 65% (v/v) acetonitrile. (A), exposed under UV light, 365 nm to detect fluorescence; (B), stained by a spray of orcinol/sulfuric acid reagent and heating. Lanes 1, FMOC-labeled oligosaccharides from RNase B; 2, 1-amino-oligosaccharides released from RNase B; 3, FMOC-Cl; a, FMOC-Cl; b, FMOC-labeled oligosaccharides; c, 1-amino-oligosaccharides from RNase B.

이용하여 분석하였다. RNase B의 oligosaccharides를 FMOC-Cl로 표식한 후 HPLC로 분석한 결과, Man 5~9 GlcNAc2 amines의 5개의 성분이 용출 시간 22분에서 38분 사이에서 검출되었으며(Fig. 5), 또한 약 3~4분 사이에 용출되는 시약 성분과는 완전히 분리되어 검출되었다. 이것은 Hirani 등⁽¹²⁾의 결과와 일치하였으

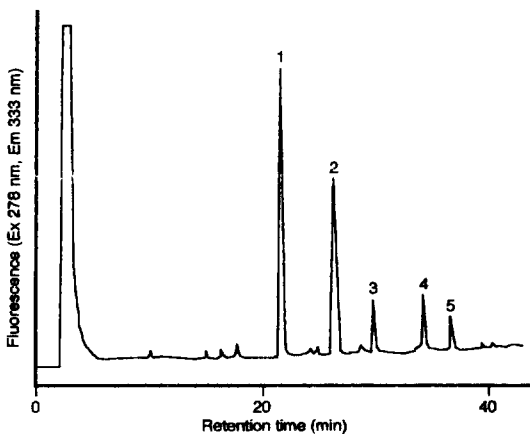


Fig. 5. Separation of RNase B oligosaccharides on an Amido 80 column. Oligosaccharide profile was obtained by recombinant N-glycanase digestion and labeling with FMOC-Cl. Peaks 1: ManGlcNAc2 amine, 2: Man6GlcNAc2 amine, 3: Man7GlcNAc2 amine, 4: Man8GlcNAc2 amine, 5: Man9GlcNAc2 amine.

며, 검출 감도 및 분석 가능한 시료의 양으로 비교하였을 경우, 본 연구에 의한 방법이 약 1.5배 우수한 감도로 분석할 수 있음이 확인되었다. 따라서, FMOC표식 oligosaccharides는 기존에 사용되던 방법과 거의 유사한 결과를 나타내면서, 그 보다 더 좋은 감도에서 미량의 당쇄를 분석할 수 있는 방법임이 확인되었다.

검량 곡선과 검출 감도

RNase B로부터 분리시킨 1-amino-oligosaccharides (Man 5~9 GlcNAc2 amines)를 FMOC로 표식한 후 Amido 80 column을 이용하여 HPLC에 의해 분석하였다. Man 5~9 GlcNAc2 amines의 각각의 성분을 분석한 결과, 0.05 pmol에서 1.5 pmol 사이에서는 직선적으로 증가하였다(Fig. 6). FMOC를 이용한 올리고당의 분석은, 기존의 2-aminopyridine형광 표식 등^(12,14)과 비교했을 때, 안정된 화합물을 구성하며, Suzuki 등⁽¹³⁾에 의해 보고된 것(0.5~10 pmol에서 직선 관계)보다 약 10배의 검출 감도를 나타내었으므로, 미량의 올리고당 분석에는 매우 적합하다고 생각된다.

또한 사람의 IgG 중의 올리고당을 분석한 결과, 기존의 방법보다 표식의 시간을 단축할 수 있었으며(1시간의 반응으로 충분한데 반하여 기존의 방법^(13,14)으로는 5-8시간이 소요), 장기간 안정된 화합물로 보존할 수 있다는 결과를 얻었으며(-20°C에서 3개월간 보존 가능하나, 2-aminopyridine의 경우 1개월 전후

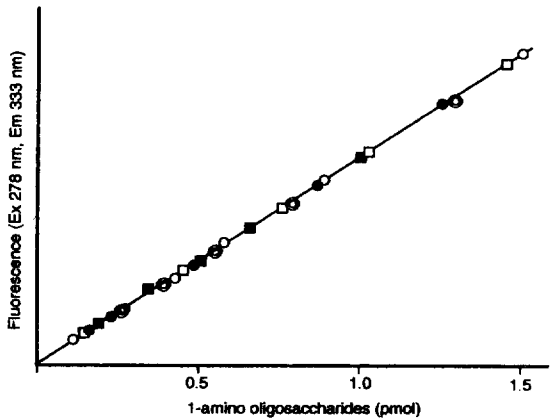


Fig. 6. Calibration curve for FMOC-labeled amino oligosaccharides. Oligosaccharide derivatives from RNase B were prepared as Fig. 3. Oligosaccharide mixtures were diluted serially with absolute ethanol. Ten microliters of oligosaccharide mixture was derivatized with FMOC-Cl according to the molar ratio of FMOC-Cl to oligosaccharide 20:1 at room temperature for 60 min. ○: Man5GlcNAc2 amine, ■: Man6GlcNAc2 amine, □: Man7GlcNAc2 amine, ●: Man8GlcNAc2 amine, ⊙: Man9GlcNAc2 amine.

임), 현재 류마치스 환자의 당쇄를 분리·정제하여 기존의 방법들과 비교 분석 중에 있다.

요 약

N-glycanase 처리에 의해 얻어진 1-amino-oligosaccharide를 FMOC-Cl로 표식 하는 방법을 확립하였다. 이 방법에 의해 얻어진 FMOC-표식 oligosaccharides는 기존의 방법보다 약 4배의 감도를 나타내었다. Amido 80 column을 사용한 분석에 의하여, Man 5-9 GlcNAc 2 amines의 5개의 성분은 각각 분리되어 용출 되었으며, 회수율은 기존의 방법과 거의 같았다. 1-amino-oligosaccharides는 0.05 pmol에서 1.5 pmol 사이에서 직선적인 관계를 나타내었으며, 2-aminopyridine 에 의한 표식과 비교하였을 때, 안정된 화합물을 형성하고 있으며, 감도가 높아 미량의 oligosaccharides의 분석에 매우 적합한 것이 확인되었다.

문 헌

- Drickamer, K. and Carver, J.: Carbohydrates and glycoconjugates; Upwardly mobile sugars gain status as information-bearing molecules. In *Current Opinion in Structural Biology*, Academic Press, Vol. 2, p.653 (1992)
- Sharon, N. and Lis, H.: Lectins as cell recognition molecules. *Science*, **246**, 227 (1989)
- Takuchi M., Takasaki, S., Miyazaki, H., Kayo, T., Hoshi, S., Kochibe, N. and Kobata, A.: Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, **263**, 3657 (1988)
- Takasaki, S., Mizuuchi, T. and Kobata, A.: Structural study of the sugar chains with enzymatic method. In *Methods in Enzymology*. Academic Press, Vol. 83, p.263 (1982)
- Hase, S., Ikenaka, T. and Matsushima, Y.: A highly sensitive method for anlysis of sugar moiety oglycoproteins by fluorescence labeling. *J. Biochem.*, **90**, 407 (1981)
- Wang, W.T., LeDanne, N.C., Ackerman, B. and Sweeley, C.S.: Structural characterization of oligosaccharide by high performance liquid chromatography, fast atom bombardment-masspectrometry, and exoglycosidase digestion. *Anal. Biochem.*, **141**, 366 (1984)
- Natsuka, S., Hase, S. and Ikenaka, T.: Fluorescence method for the structural analysis of oligomannose-type sugar chains by partial acetolysis. *Anal. Biochem.*, **167**, 154 (1987)
- Tomiya, N., Kurono, M., Ishihara, H., Tejima, S., Endo, S., Arata, Y. and Takahashi, N.: Structural analysis of N-linked oligosaccharide by a combination of glycopeptidase, exoglycosidases, and high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **163**, 489 (1987)
- Hase, S., Hara, S. and Matsushima, Y.: Tagging of sugars with a fluorescent compound, 2-aminopyridine. *J. Biochem.*, **85**, 217 (1979)
- Takemoto, H., Hase, S. and Ikenaka, T.: Microquantitative analysis of neutral and amino sugars as fluorescent pyridylamino derivatives by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **145**, 245 (1985)
- Kimura, T., Takagi, T., Itsumi, K., Kim, D.H. and Umitsu, I.: A novel analysis of FMOC-labeled oligosaccharides released from human IgG by rN-glycanase. 1994年度 日本臨床學會年會誌草線, p.178b (1994)
- Hirani, S., Bernasconi, R.J. and Rasmussen, T.R.: Use of N-glycanase to release asparagine-linked oligosaccharides for structural analysis. *Anal. Biochem.*, **162**, 485 (1987)
- Suzuki, S., Kondo, A., Kato, I., Hase, H. and Ikenaka, T.: Analysis by high-performance anion-exchange chromatography of component sugars as their fluorescent pyridylamino derivatives. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 283 (1991)
- Kondo, A., Suzuki, Z. and Hase, S.: Improved method for fluorescence labeling of sugar chain with sialic acid residues. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2169 (1990)
- Greenwalt, D.E., Watt, K.W.K., Hasler, T., Howard, R.J. and Patel, S.: Structural, functional, and antigenic differences between bovine heart endothelial CD36 and human platelet CD36. *J. Biol. Chem.*, **265**, 16296 (1990)

(1996년 11월 26일 접수)