

*Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 재조합 인간 웨리틴 발현 연구강환구, 이충열, 김원철, 윤지선, 박형수, 이지원¹, 정봉현²한남대학교 화학공학과, 생명공학연구원 생물공정연구실¹, 바이오프로젠²

전화 (042) 629-8009, FAX (042) 623-9489

Abstract

Ferritin, an iron-storage protein, is found in bacteria and some animal tissues such as liver, spleen and bone marrow. It is more effective and causes less side reactions than traditional ferrous sulfate, which has been used primarily to treat iron deficiency in pregnancy anemia. Currently, the ferritin extracted from bovine and equine spleens are sold as a commercial product. Its markets are several hundreds of million US dollars. However, because of recent warnings against the viral diseases of animal origins such as mad cow disease, a safer ferritin is sought after. In this study, a production process for human ferritin was successfully developed. The amount of its produced in yeast is high enough to be economically viable.

서 론

웨리틴은 체내에 존재하는 잉여의 철분을 (iron)을 보관하는 기능을 갖는 단백질 분자로서 세균을 비롯하여 식물계와 동물계에 널리 존재하고 있음으로 생명현상의 영위에 필수적인 물질로 생각된다. 웨리틴은 박테리아, 동물 및 인간에 존재하며 간이나 비장, 골수 등에서 그 존재가 확인된다. 생체 내에 존재하는 웨리틴의 구조와 크기는 다 동일하지 않은 것으로 생각되고 있으며 이는 순수 정제 후에 폴리아크릴라미드 젤 전기영동 시에 여러 크기의 웨리틴 밴드(band)를 관찰함으로써 알 수 있다. 그 이유로는 체내에 존재하는 1 분자의 웨리틴은 분자량이 약 21 kDa인 Heavy (H)-chain과 약 19 kDa인 Light (L)-chain이라고 불리우는 subunit들이 24개 모여서 구성되어 있기 때문이다. 즉 웨리틴의 24개의 subunit을 구성할 때에 H-chain과 L-chain의 혼합구성비가 항상 일정하지 않으므로 구조와 크기의 다양성을 나타내게 된다. 최근 동물조직으로부터 추출 및 제조한 의약품 및 건강식품의 경우 동물조직으로부터 유래된 바이러스 및 광우병등의 위험요소들의 유입 가능성이 경고되고 있다. 따라서 안전한 것으로 알려진 (GRAS)효모를 이용하여 높은 발현율의 공정을 개발하여 웨리틴을 생산할 경우 동물조직으로부터 바이러스 문제, 광우병의 위험 요소 배제, 냄새제거등의 장점을 지닌 세계적으로 신규한 제품의 개발이 가능하다. 즉, 재조합 웨리틴 단백질 개발로 현재 사용되고 있는 동물조직으로부터 추출된 바이러스 및 광우병등

위험요소가 있는 추출 웨리틴을 대체할 제품으로 개발하게 된다. 그래서 본 연구에서는 *S. cerevisiae*를 이용한 고농도 배양을 통하여 상업적으로 경쟁력 있는 재조합 웨리틴의 발현공정을 연구하였다.

재료 및 방법

균주

발현실험을 위한 균주로 *S. cerevisiae* Y2805 (his- & ura-)를 사용하였다.

배양

최소배지(Minimal media)를 통하여 얻어진 균주들의 발현량 확인을 위한 기초적인 회분식 실험을 위한 flask 배양은 500ml의 baffled flask를 이용하였는데 100ml의 배지에 균주를 접종한후 250rpm, 30℃의 진탕배양기에서 실험하였다.

Fermenter에서의 실험은 5L fermenter(한국발효기(주))를 사용하였다. batch culture시에는 glucose 10g/L, yeast extract 20g/L로 조성된 배지에 종배양액을 5% 접종하여 실험을 진행하였다. 이때 배양조건은 30℃, 300~800rpm, pH 5.5내지 6 이었고 발효기에서의 Fed-batch시 발효기에 peristaltic pump를 이용하여 미리 준비된 배지를 컴퓨터를 이용하여 공급하는 방법으로 실험을 진행하였다.

분석방법

세포 농도는 채취한 배양액을 적당한 배율로 희석하여 spectrophotometer (Spectronic 21D, Milton Roy)를 이용하여 660nm에서의 흡광도(O.D. : optical density)로 측정 하였으며, 웨리틴 양을 정량 분석하기 위하여 SDS PAGE/Silver, Coomassie staining 방법으로 확인 하였으며 포도당 농도는 배양액을 13,000g로 2분간 원심분리하여 얻은 상등액을 취하여 1.0g/L 이하가 되도록 희석한 후 glucose assay kit(Glucopate, Kagaku)을 이용하여 분석하였다

결과 및 고찰

Saccharomyces cerevisiae 발현

*S. cerevisiae*를 이용한 인간 웨리틴 H-chain 발현은 최소배지를 통하여 선택된 다양한 콜로니를 플라스크 배양을 통해 발현율이 높은 콜로니를 선택하여 fed-batch 배양 결과 Fig. 1 과 같이 O.D. 63에서 발현된양은 0.8 g/L이었다.

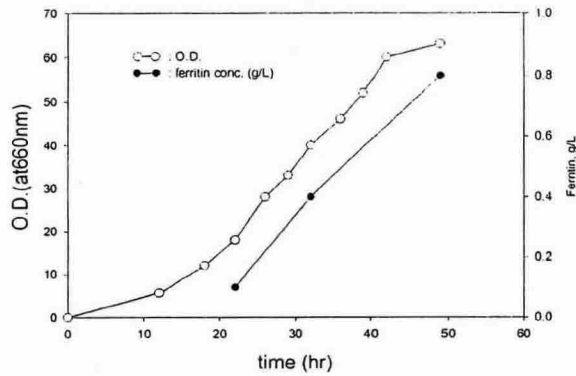


Fig. 1 Fed-batch fermentation profile for H-chain ferritin in *S. cerevisiae*



Fig. 2 Gel analysis for expressed H-chain ferritin in flask batch culture

참고문헌

1. Klausner, R. D., Rouault, T. A. and Harford, J. B. (1993) *Cell* 72, 19-28
2. Hentze, M. W. and Kuhn, L. C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 8175-8182
3. Harrison, P. M. and Arosio, P. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 161-163
4. Lawson, D. M., Artymiuk, P. J., Yewdall, S. J., Livingstone, J. C., Treffry, A., Luzzago, A., Levi, S., Arosio, P., Cesareni, G., Thomas, C. D., Shaw, W. and Harrison, P. M. (1991) *Nature* (London) 349, 541-544
5. Levi, S., Luzzago, A., Cesareni, G., Cozzi, A., Franceschinelli, F., Albertini, A. and Arosio, P. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 18086-18092