

## 재조합 효모를 이용한 사람 H-chain 및 L-chain Ferritin의 생산

서향임·전은순·정윤조·\*김경숙  
전북대학교 자연대 생물과학부 및 유전공학 연구소  
(접수 : 2002. 2. 18., 게재승인 : 2002. 4. 16.)

### Heterologous Expression of Human Ferritin H-chain and L-chain Genes in *Saccharomyces cerevisiae*

Hyang-Yim Seo, Eun-Soon Jeon, Yun-Jo Chung, and Kyung-Suk Kim\*  
Faculty of Biological Sciences, Institute for Molecular Biology and Genetics, Chonbuk National University,  
Chonju 561-756, Korea  
(Received : 2002. 2. 18., Accepted : 2002. 4. 16.)

Human ferritin H- and L-chain genes(*hfh* and *hfl*) were cloned into the yeast shuttle vector YEp352 with various promoters, and the vectors constructed were used to transform *Saccharomyces cerevisiae* 2805. Three different promoters fused to *hfh* and *hfl* were used: galactokinase 1(GAL1) promoter, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GPD) promoter and alcohol dehydrogenase I(ADH1) promoter. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting analyses displayed expression of the introduced *hfh* and *hfl*. In the production of both ferritin H and L subunits GAL1 promoter was more effective than GPD promoter or ADH1 promoter. Ferritin H and L subunits produced in *S. cerevisiae* were spontaneously assembled into its holoproteins as proven on native polyacrylamide gels. Both recombinant H and L-chain ferritins were catalytically active in forming iron core. When the cells were cultured in the medium containing 10 mM ferric citrate, the cell-associated concentration of iron was 174.9  $\mu\text{g}$  per gram(dry cell weight) for the recombinant yeast YG-H and 148.8  $\mu\text{g}$  per gram(dry cell weight) for the recombinant yeast YG-L but was 49.4  $\mu\text{g}$  per gram(dry cell weight) in the wild type, indicating that the iron contents of yeast is improved by heterologous expression of human ferritin H-chain or L-chain genes.

**Key Words** : human ferritin H-chain gene, L-chain gene, yeast expression

#### 서론

Ferritin은 세포 내에서 대표적인 철 저장 단백질이다. 이 단백질은 단백질 외피(protein shell)와 내공(core)으로 구성되어 있는데, 단백질 외피는 24개의 subunit이 조합되어 구형을 이루고 이렇게 해서 생긴 내공(직경 약 8 nm)에는 분자 당 최대 4,500개 원자까지 축적할 수 있다. Ferritin은 내공에 철을 Fe(III) 상태로 보유함으로써 유리된 철에 의한 세포 내 독성으로부터 세포를 보호할 수 있고 또한, 철을 필요로 할 때는 Fe(II) 상태로 환원시켜 공급한다(1-2).

Ferritin은 거의 모든 생물 종에 존재하며 지금까지 사람을 포함해서 동물, 식물 및 미생물 등 여러 생물체로부터 분리

되었다(1-2). 그 중에서도 사람 ferritin의 경우, ferritin은 2 종류의 subunit 즉, H(heart; heavy)형과 L(liver; light)형으로 이루어져 있는데, 조직에 따라서 그 조성 비율이 달라 여러 isoform이 존재한다. 그리하여, 심장과 뇌에 존재하는 isoform(H-rich ferritin)은 H subunit의 조성 비율이 높고 비교적 적은 철 함량을 보인다. 반면에, 간이나 비장에 있는 isoform(L-rich ferritin)은 L subunit의 함량이 높고 비교적 높은 철 함량을 보인다(1). 각 조직에 존재하는 isoform의 기능상의 차이는 subunit의 조성 비율의 차이와 무관하지 않을 것으로 보인다. 특히, H-rich ferritin은 철 저장의 기능 외에 myelopoiesis의 조절(3)이나 세포내 철 운반(4) 등의 기능도 가지는 것으로 유추되었다. 조직 내에서 H 또는, L subunit으로만 이루어진 ferritin 동형집합체(homopolymer)는 분리된 바 없으며, 아직까지 ferritin subunit의 세포내 기능은 명확하지 않다(1,4).

이전에 사람 ferritin H-와 L-chain 유전자가 분리되어 대장균에서 재조합 H-chain ferritin(H-ferritin)과 L-chain ferritin(L-ferritin)이 생산되었다(5-7). 정제된 재조합 H-ferritin은

\*Corresponding Author : Faculty of Biological Sciences, Institute for Molecular Biology and Genetics, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea  
Tel : +82-63-270-3341, Fax : +82-63-270-3345  
E-mail : sukchim@moak.chonbuk.ac.kr

ferroxidase 활성이 있어 L-ferritin 보다 철 흡수율(iron uptake rate)이 빠르고(5), L-ferritin은 H-ferritin 보다 더욱 안정하며 core 형성에 우월함이 보고되었다(6). 대장균에서 H와 L subunit으로 혼합된 ferritin 이형집합체(heteropolymer)를 생산하여 실험한 결과, L-ferritin은 세포 내에서 철 흡수 능력이 없었으며 제조함 ferritin에 결합된 철의 양은 ferritin 내의 H subunit의 함량과 비례 관계에 있었다(7).

*Saccharomyces cerevisiae*는 사람에게 안전한 생물체이고, 유전학적 내지는 분자생물학적 정보가 많이 축적되어 있어서 외래 단백질 생산을 위한 숙주 세포로서 매우 유용하다. 그리하여, 효모를 이용한 외래 단백질의 상업적인 생산이 크게 강조되고 있으며 그에 관한 많은 연구가 보고되어 있다(8-12). 최근에는 유전자의 고발현을 위한 숙주 세포의 변이 주나, 고발현 벡터 개발 또는, 신기능 효모의 개발 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(10-12). 효모에서의 철 저장 단백질에 관한 이전의 발표(13)와는 달리 효모는 ferritin을 생산하지 않는다(14). 최근에 tadpole ferritin 유전자를 효모에 발현시킨 결과, 효모의 철 결합 능력이 증진됨이 확인되었다(7). 그러므로 사람 ferritin을 효모 내에서 발현시킴으로써 철 함량이 증진된 효모를 개발하여 이를 철 결핍성 빈혈 등에 활용할 수 있을 것으로 보여진다.

본 연구에서는 분자 당 많은 양의 철을 저장할 수 있는 단백질인 사람 ferritin 유전자를 galactose에 의해 그 유도 반응이 빠르고 유전자 조절 기작 등 이미 많은 연구가 수행된 유도성 promoter인 GAL1(galactokinase 1) promoter와 상시성 promoter인 GPD(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) promoter와 ADH1(alcohol dehydrogenase I) promoter를 이용하여 ferritin 발현에 미치는 promoter의 영향을 밝히고, 이렇게 해서 개발된 제조함 효모의 철과의 결합 능력을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 plasmid

Plasmid 증식 및 대량 추출을 위한 숙주로는 *E. coli* JM 109를 사용하였다. 사람 ferritin 유전자 발현을 위한 효모 숙주 세포로는 *S. cerevisiae* 2805 (MAT  $\alpha$  pep4:: HIS3 prb1  $\Delta$ can1 GAL2 his3 ura3-52)를 사용하였다. 유전자 제조함 plasmid는 yeast shuttle vector인 YEp352를 사용하였으며, 사람 ferritin H-chain 유전자(hfH) 및 L-chain 유전자(hfL)를 포함하는 DNA 단편은 이들의 대장균 발현 벡터인 pVUHFH와 pVUHFL로부터 각각 얻었다(7). 전북대학교 양문식 박사로부터 YEp352에 GAL1 promoter, GPD promoter 및 GAL7 terminator가 각각 삽입되어진 YEp352-GAL, YEp352-GPD 및 pGAL7-TER2를 제공받았으며, ADH1 promoter와 ADH3' terminator가 들어있는 플라스미드는 박옥순 박사로부터 제공받았다. 사람 ferritin H-chain 발현을 위한 플라스미드 pYG-H, pYGP-H 및 pVD-H(Figure 1)로 형질 전환시킨 효모세포는 YG-H, YGP-H 및 YVD-H로 각각 명명하였고, ferritin L-chain 발현을 위한 플라스미드 pYG-L, pYGP-L 및 pVD-L(Figure 1)로 형질 전환시킨 효모세포는 YG-L, YGP-L 및 YVD-L로 각각 명명하였다.

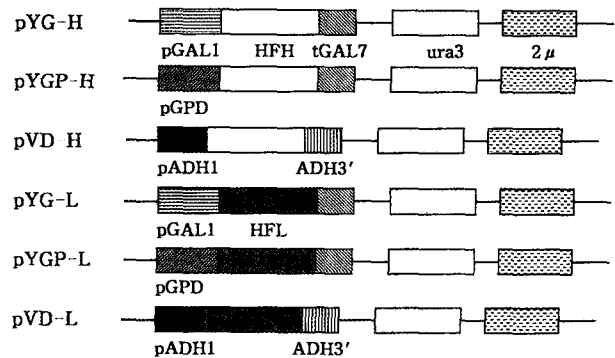


Figure 1. Schematic diagram of recombinant plasmids. The line represents the plasmid DNA and the boxes represent the gene or their corresponding functional domains. Open boxes are HFH and dark boxes are HFL gene, respectively.

### 배지 및 배양 방법

효모 숙주 세포와 제조함 효모의 배양을 위한 일반 배지로 복합 영양 배지인 YEPD(1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% glucose)를 사용하였고 효모의 형질 전환체를 선별하기 위한 선별 배지로는 uracil 결핍 최소 배지(0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% casamino acid, 2% glucose, 0.03 g/L adenine and tryptophan)를 사용하였으며, 발현 유도 배지에 ferritin 유전자 발현을 위해 glucose 대신에 2%의 galactose를 첨가하였다. 제조함 효모 균주는 300 mL flask (working volume; 40 mL)로 30°C, 200 rpm에서 3일간 배양하였다. 효모 세포의 균체 증식은 300 mL flask에 transfer 후 24시간마다 채취한 배양액을 적당한 비율(10-100배)로 희석하여 UV/Vis spectrophotometer(Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech.)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였으며, pH meter를 이용하여 효모 세포의 성장에 따른 pH 변화를 측정하였다. 세포 수는 일정 시간마다 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 counting chamber(hemocytometer)를 이용하여 측정하였다. 기초 실험을 위한 전 배양과 플라스크 배양 조건은 Lee 등의 방법을 따랐다(15). 효모내 단백질 양은 modified Lowry method(16)에 의해 분석하였다. Plasmid 안정성은 하루 간격으로 채취한 배양액을 적당히 희석(100-200배)하여 복합 영양 평판배지에 도말 후 자란 100개의 colony를 uracil 결핍 평판배지로 toothpicking한 다음 형성된 colony 수의 비(백분율)로 측정하였다.

### Ferritin 발현 제조함 plasmid 구축

*E. coli*에서의 ferritin H-chain 발현 벡터인 pVUHFH를 EcoR I과 Hind III로 절단한 후, Klenow fragment로 처리하여 560 bp의 hfH DNA 단편을 얻었다. 그리고, *E. coli*에서의 ferritin L-chain 발현 벡터인 pVUHFL로부터 EcoR I과 Sma I으로 절단하고 blunting 처리하여 530 bp의 hfL DNA 단편을 얻었다. 그리고, 효모 발현 벡터를 제작하기 위하여 먼저 pGAL7-TER2의 GAL7 terminator를 Sal I과 Hind III로 절단하여 얻은 후, 각각의 다른 promoter를 포함하는 YEp352-GAL, YEp352-GPD 플라스미드를 Sal I과 Hind III로 잘라낸 위치에 삽입하여 각각 YEpGAL-T와 YEpGPD-T를 제작하였다. 그런 다음, YEpGAL-T와 YEpGPD-T 플라스미드의

Sal I 위치를 잘라서 blunting 시킨 후 *hfH* 또는, *hfL* DNA 단편을 삽입하였다. ADH1 promoter를 포함하고 있는 pVT-U 플라스미드의 경우에는 Xba I으로 자르고 blunting시킨 후 *hfH* 또는, *hfL* DNA 단편을 삽입하여 발현벡터를 제작하였다. 그 결과, *hfH*를 발현시키기 위해 GAL1 promoter-*hfH*-GAL7 terminator의 유전자 서열을 갖는 pYG-H, GPD promoter-*hfH*-GAL7 terminator의 서열을 갖는 pYGP-H 및 ADH1 promoter-*hfH*-ADH3' terminator의 서열을 갖는 pVD-H를 구축하였다. 또한, *hfL*를 발현시키기 위해 GAL1 promoter-*hfL*-GAL7 terminator로 유전자 서열을 갖는 pYG-L, GPD promoter-*hfL*-GAL7 terminator의 서열을 갖는 pYGP-L 및 ADH1 promoter-*hfL*-ADH3' terminator의 서열을 갖는 pVD-L을 구축하였다 (Figure 1).

#### 효모 형질전환체의 선별과 ferritin의 세포내 발현 효율

Figure 1에서 구축된 plasmid 각각을 Ito 등의 방법(17)으로 *S. cerevisiae* 2805에 형질 전환시킨 후, uracil 결핍 최소배지에서 형질 전환체들을 1차 선별하였다. 선별된 재조합 효모는 glass bead를 이용하여 DNA 추출 후 대장균에 역 형질 전환하여 효소 절단으로 DNA를 확인하여 2차 선별하였다. 그리고, uracil 결핍 최소배지와 복합 영양배지에서의 균체 증식, ferritin 발현양 및 plasmid 안정성을 조사하여 효모에서 ferritin 유전자의 발현에 미치는 promoter의 영향을 비교 조사하였으며 ferritin의 세포 내 발현 효율을 확인하기 위해 SDS-polyacrylamide 젤 전기영동 후 densitometry(Molecular Dynamics PC-120, USA)로 전체 발현된 단백질 중 ferritin의 양을 분석하였다.

#### 전기영동

재조합 plasmid에 의한 발현을 분석하기 위해 SDS-polyacrylamide 젤은 Laemmli의 방법(18)을 따라 수행하였다. 그리고 발현된 ferritin H-chain 또는, L-chain이 holoprotein으로 조합되어 지는지, 조합된 단백질이 철과 반응하는지 확인하기 위해 세포 추출물을 1 mM ferrous ammonium sulfate와 반응시킨 후 비변성 젤을 이용하여 전기영동을 수행하였다. 단백질 염색을 위해서는 0.25% Coomassie brilliant blue R-250을 사용하였고, Fe(III)을 염색하기 위해서는 사용 즉시 1:1로 혼합한 2%  $K_4Fe(CN)_6$ 와 2% HCl 용액을 사용하였다 (19).

#### Western blotting

사람 간 ferritin(85% L-chain, 15% H-chain)에 대해 토끼로부터 생산한 항체는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였다. Nitrocellulose지를 사용한 Western blotting 실험은 Burnette의 방법(20)을 따랐다.

#### Atomic absorption spectrometry

재조합 미생물에 있어서 세포 생장과 철 흡수 정도를 분석하기 위해 uracil 결핍 최소배지에서 효모를 전배양하고 각기 다른 농도(0, 10 and 19mM)의 ferric citrate가 첨가된 YEP (containing 2% galactose) 배지에서 30°C, 4일간 배양한 후, 원심 분리(3,500×g, 10 min)하여 세포들을 수확한 다음 2%

EDTA로 3번 세척하고 50°C에서 48시간 건조시켰다. 건조된 효모 세포들을 14 M 질산과 10 M perchloric acid(2:1, vol/vol) 용액에서 250°C, 8시간 반응시킨 다음 원자흡광 광도계 (SpectrAA-880, Varian)를 사용하여 철의 농도를 분석하였다 (21).

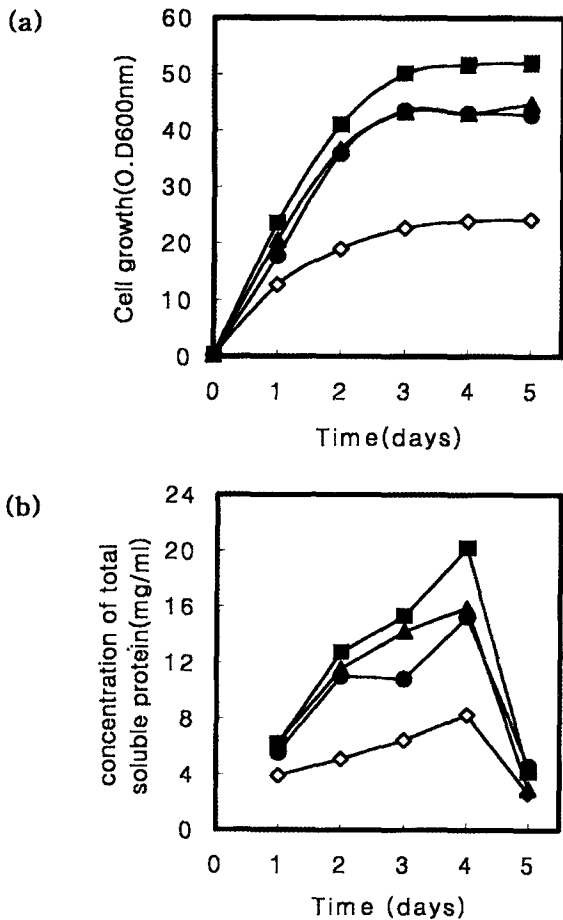
## 결과 및 고찰

### Ferritin 발현 재조합 plasmid의 구축

본 연구에서는 효모에서 사람 ferritin H- 및 L-chain 유전자를 발현시키는 벡터를 제조하기 위해 유도성 promoter인 GAL1 promoter와 상시성 promoter인 GPD 또는 ADH1 promoter를 선택하여 재조합 plasmid를 구축하였다. 그리하여, 사람 ferritin H-chain의 발현을 위한 pYG-H, pYGP-H 및 pVD-H plasmid와 사람 ferritin L-chain 발현을 위한 pYG-L, pYGP-L 및 pVD-L plasmid를 Figure 1과 같이 구축하였다. 이들은 각각 GAL1, GPD 또는 ADH1 promoter 하류에 ferritin 유전자를 연결한 plasmid이며 GAL1 promoter와 GPD promoter의 경우에는 GAL7 terminator를, ADH1 promoter의 경우에는 ADH3' terminator를 ferritin 유전자 하류에 연결하였다. Promoter와 terminator를 제외한 나머지 염기 부분 (2- $\mu$ m origin, URA3, Amp<sup>r</sup>)은 유전자 source와 방향면에서 모두 동일하다(Figure 1).

### GAL promoter에서의 ferritin 발현에 대한 배지의 영향

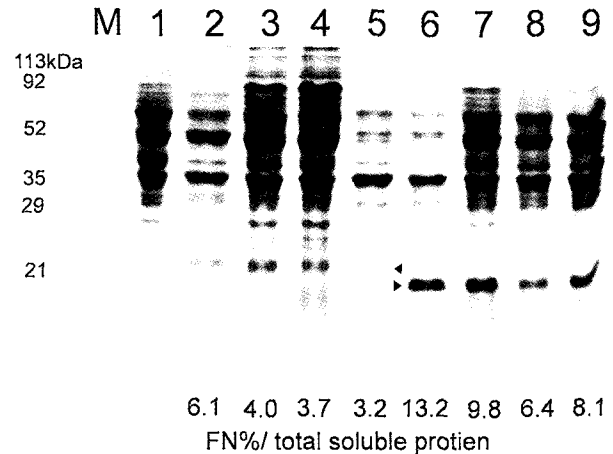
GAL1 promoter는 glucose에 의해 강하게 억제되며 galactose에 의해 유도되는 promoter이다. Galactose에 의해 유도되는 방법에는 non-repressing, non-inducing sugar에서 성장시킨 후 galactose에 의해 발현 유도를 빠르게 하는 방법, glucose가 첨가된 배지에서 성장시킨 후 원심분리 등에 의해 glucose를 제거하고 galactose 배지에서 키우는 방법(이 방법은 3-5시간 만에 lag phase에 이른다.), glucose와 galactose가 들어있는 배지에서 키우는 방법으로 이 경우 glucose가 완전히 소비된 다음에 galactose가 이용된다. 처음 두 방법은 small-scale에서 사용되는 방법으로 large-scale에서는 사용이 불가능하다(22). 본 실험에서는 이 중 세 번째 방법을 이용하여 galactose와 glucose 농도가 ferritin의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. Uracil 결핍 최소배지에서 전 배양한 배양액을  $1.0 \times 10^7$  /mL로 희석하여 2% galactose, 1% glucose/1% galactose 또는, 1% glucose/2% galactose가 첨가된 YEP 배지(1% yeast extract, 2% Bacto-peptone)에서 배양하였다. 대조군으로써는 uracil 결핍 최소 배지에서 배양한 전 배양액을  $1.0 \times 10^7$  /mL로 희석하여 2% glucose 대신에 2% galactose가 첨가된 uracil 결핍 최소배지에서 배양하였다. 그리고 이들을 배양하는 동안 균체 성장, 전체 단백질의 양 및 전체 단백질 중 발현된 ferritin의 양을 측정하였다. 균주 YG-H의 경우, 균체 성장이 배양 3일까지 점차적으로 증가하다가 배양 3일 경에 최고치에 도달하였으며 uracil 결핍배지에서 보다 YEP 배지의 경우에 균체 성장이 증가하였다(Figure 2a). 특히, YEP 배지에 1% glucose/2% galactose를 첨가한 경우에 있어서 균체 성장 곡선이 가장 증가하였다. 사람 L-ferritin을 생산하는 균주 YG-L의 경우에도 YG-H의 경우와 유사하게 나타났다(data



**Figure 2.** Effect of the concentration of galactose and glucose on cell growth(a) and amount of total soluble protein(b) in YG-H. ● YEP medium containing 2% galactose; ■ YEP medium containing 1% glucose and 2% galactose; ▲ YEP medium containing 1% glucose and 1% galactose; ◇ uracil deficient selective medium.

not shown). 균체 내의 총 단백질 양을 분석한 결과, 전체 단백질 양이 균체 성장에 비례하여 배양 4일까지 점차적으로 증가하였으며 배양 4일 이후에 급격하게 감소하였다(Figure 2b). 균체 성장에서와 마찬가지로 YEP 배지에서 성장시킨 경우가 uracil 결핍 최소배지에서 보다 총 단백질 양이 많았다. 균주 YG-L의 경우에는 총 단백질 양이 배양 3일 경에 최고치에 도달했고, 그 후 급격히 감소하였다. 세포 배양 3-4일째는 stationary 상태로써 세포내의 활성화된 단백질 분해효소에 의해 많은 단백질들이 분해된 것으로 유추된다(23).

전체 수용성 단백질 중 ferritin의 발현양을 측정하기 위해 재조합 효모의 추출물을 SDS sample loading buffer와 1:1(v/v)로 섞어 100℃, 10분간 열처리한 후 12% SDS-polyacrylamide 겔을 수행하여 Figure 3에 나타내었다. 그리고, 이 결과를 densitometry를 이용하여 분석한 결과, YG-H와 YG-L의 두 균주 모두 ferritin의 band가 uracil 결핍 최소배지에서 전체 수용성 단백질 중 각각 6.1%와 13.7%로 높은 발현양을 보였다. 그러나 uracil 결핍 최소배지에서 키운 균체는 cell mass가 적기 때문에 전체적인 발현양에 있어서는 두 균주 모두 2% galactose에서 키운 균체에서 가장 높았다. 그리하여, GAL promoter를 이용한 YG-H와 YG-L 균주는 재조합 ferritin



**Figure 3.** 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of human ferritin H- and L-chain expressed in yeasts grown in media containing different concentration of carbon source. The lanes are: M, size marker; 1, cell extract of the host cell; 2, 6, cell extract of the transformant YG-H(lane 2) or YG-L(lane 6) grown in uracil deficient selective medium containing 2% galactose; 3, 7, YG-H(lane 3) or YG-L(lane 7) grown in YEP medium containing 2% galactose; 4, 8, YG-H(lane 4) or YG-L(lane 8) grown in YEP medium containing 1% glucose and 2% galactose; 5, 9, YG-H(lane 5) or YG-L(lane 9) grown in YEP medium containing 1% glucose and 1% galactose.

을 생산하기 위해 2% galactose가 첨가된 YEP 배지에서 배양하였으며 YG-L의 경우 3일 이후 급격히 단백질의 분해가 일어나기 때문에 YG-H와 같은 조건에서 생육시키기 위해 3일간 배양하였다.

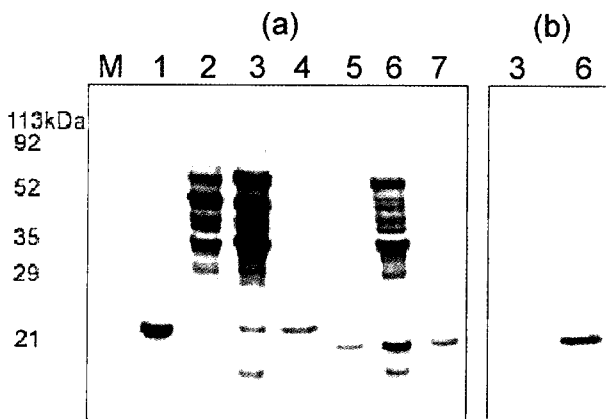
**균체 증식과 plasmid 안정성**

유전자 산물의 생산성은 plasmid 안정성, 재조합 효모의 배양조건, promoter 세기 등을 포함한 여러 인자들에 의해 좌우되므로(22), 위에서 제조한 재조합 plasmid들을 이용하여 plasmid 안정성과 배양조건에 따른 성장속도를 GAL1, GPD 및 ADH1 promoter 별로 비교하였다. 각 재조합 효모를 복합 영양배지(YEPD 또는, GAL promoter를 가지는 재조합 효모의 경우 2% galactose가 첨가된 YEP 배지 사용)와 uracil 결핍 최소배지(glucose 대신에 2% galactose가 첨가된)에서 각각 회분 배양하여 효모세포의 균체 증식(O.D<sub>600</sub>)과 plasmid 안정성을 Table 1에 나타내었다. 두 균주 모두 배양 말기까지 균체 증식이 점차적으로 증가하였으며, YG-H의 경우 복합 영양 배지에서 최종 균체 농도가 43-44 O.D<sub>600</sub>에 도달하였고, YG-L의 경우 44-48 O.D<sub>600</sub>에 도달하였다. Uracil 결핍 최소배지에서 키운 대부분의 균체는 복합 영양 배지에서보다 낮은 균체 증식을 보이며 3-4일경에 최고치에 도달하였고 그 이후에는 감소하는 경향을 보였다. Plasmid 안정성에 있어서는 YG-H나 YG-L 균주 모두 배양 말기(5일)까지 약 80% 이상으로 plasmid가 비교적 안정하게 유지되었다. GPD나 ADH1 promoter를 가지는 재조합 효모 모두(YGP-H, YVD-H, YGP-L 및 YVD-L) 복합 영양 배지에서는 GAL1 promoter에 비해 약 70%의 낮은 균체 증식을 보이나 uracil 결핍 최소배지에서는 차이를 보이지 않았다(data not shown). Plasmid 안정성에 있어서는 GPD나 ADH1 promoter가 GAL1 promoter에 비해 약

**Table 1.** Summary of cell growth and human ferritin(FN) expression level by recombinant yeast cells

Human ferritin subunit	Strain	Promoter	Cell growth (O.D <sub>600</sub> )	Plasmid stability(%)	FN expression (FN/total protein, %)
HFH	YG-H	GAL1	35.5	85	4.5
	YGP-H	GPD	26.4	91	N.D
	YVD-H	ADH1	26.6	91	N.D
HFL	YG-L	GAL1	37.6	87	9.8
	YGP-L	GPD	24.3	86	8.3
	YVD-L	ADH1	23.4	90	8.8

All measurements were performed at 72 hr cultivation on selective medium. Expression level of human ferritin was measured by densitometry. N.D means "not detectable".



**Figure 4.** 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(a) and Western blot analysis(b) of human ferritin H-chain and L-chain expressed in yeasts. The SDS-PAGE gel was stained with Coomassie blue R-250. The lanes are: M, size marker; 1, partially purified HFH(human ferritin H-chain) expressed in *E. coli*; 2, cell extract of the host cell; 3, cell extract of the transformant YG-H; 4, partially purified HFH from the YG-H; 5, partially purified HFL(human ferritin L-chain) expressed in *E. coli*; 6, cell extract of the transformant YG-L; 7, partially purified HFL from the YG-L.

간 높은 안정성을 유지하였다(Table 1).

#### 효모에서 ferritin H- 및 L-chain의 발현

사람 ferritin H- 및 L-chain 유전자의 발현에 미치는 각 promoter의 영향을 살펴보기 위해 GAL1, GPD 및 ADH1 promoter를 이용하였다. 각 promoter에 subcloning된 *hfH*와 *hfL*의 발현을 확인하기 위해 12% SDS-polyacrylamide 겔과 Western blotting을 수행하였다(Figure 4). 전기 영동 겔의 결과를 보면, 효모 균주 YG-H를 galactose로 발현유도를 했을 때 전기 영동 상에 사람 ferritin H-chain의 분자량(21 kDa)에 해당되는 위치에서 발현된 단백질 밴드를 확인하였으며, 이 밴드는 대장균에서 생산된 재조합 HFH와 유사한 위치에서 보였다(Figure 4, lane 1). 효모 균주의 총 수용성 단백질 중 HFH의 발현율은 densitometer를 이용하여 분석한 결과 4.5%에 해당하였다. 세포 추출물을 75°C에서 10분간 열변환(heat denaturation) 처리 후 전기영동을 수행한 결과, 이 밴드는 native protein과 마찬가지로 열에 안정하였으며(Figure 4, lane 4) Western blotting을 수행한 결과, HFH의 발현이 확인되었다. 효모 균주 YG-L을 수확하여 세포 추출물을 얻은 다음

전기영동을 수행한 결과, 사람 ferritin L-chain의 분자량(19 kDa)에 해당하는 위치에서 발현된 단백질 밴드를 역시 확인하였으며, 이 밴드는 대장균에서 생산된 재조합 HFL과 유사한 위치에서 보였다(Figure 4, lane 5, 7). 이 균주에 있어서 *hfL*의 발현율은 9.8%로써 *hfH*보다 약 2배 높다. 이러한 경향은 대장균에 있어서도 유사하게 나타나 *hfL*의 발현율이 *hfH*보다 높았다(7). 그 이유로써 *hfH*와 *hfL*의 codon usage 차이를 포함한 유전자 내부의 번역 효율성 때문인 것으로 유추되었다(7,22). Western blotting을 수행한 결과, 사용한 항체가 간 ferritin 즉, L-rich ferritin으로부터 생산된 것이기 때문에 발현된 HFL에 대해 면역 반응성이 HFH보다 높게 확인되었다(Figure 4b).

Promoter에 따른 *hfH*와 *hfL*의 발현량을 비교하여 요약한 결과를 Table 1에 나타내었다. 효모 균주에 있어서 HFH의 생산은 상시성 promoter인 GPD나 ADH1에 비해 유도성 promoter인 GAL1에 의해서 효율적으로 생산되었으며, HFL을 생산하는 경우에도 GAL1 promoter가 GPD나 ADH1 promoter에 비해 더 효율적이었다. 이 결과는 효모에서의 inulinase 발현에 GAL1 promoter가 다른 promoter를 이용했을 때보다 효율적이었다는 이전의 결과와 유사하다(8).

효모에서 발현된 각각의 사람 ferritin H- 및 L-subunit이 24 개씩 서로 조합되어 native 형태의 holoprotein으로 이루어지는지 비변성 겔을 이용하여 전기영동을 수행한 결과, H-ferritin(Figure 5a)과 L-ferritin(Figure 5b) 각각의 holoprotein의 분자량에 해당되는 위치(H-ferritin, 507 kDa; L-ferritin, 479 kDa)에서 발현된 단백질 밴드를 확인할 수 있었다. 발현된 단백질은 대장균에서 발현된 재조합 H-ferritin 또는 L-ferritin(7)과 마찬가지로 Prussian blue 염색에 양성 반응을 보였다. 이 결과는 효모에서 생산된 재조합 ferritin이 *in vitro*에서 철을 산화시켜 내공에 축적하였음을 의미한다.

#### Atomic absorption spectrometry

H-ferritin과 L-ferritin을 생산하는 재조합 효모 균주에 있어서 ferric citrate가 첨가된 배지에서의 세포 성장과 철 흡수 정도를 분석하였다(Table 2). 철 이온이 함유된 배지에서 배양한 모든 세포는 배양한 다음 EDTA를 사용하여 비 특이적으로 결합한 철을 제거하였다. 효모 균주를 ferric citrate를 함유하는 배지에서 배양했을 때 철의 함유량이 증가하였음을 확인할 수 있었다. 효모 숙주세포에 있어서 배지에 철 이온을 첨가하여 배양하였을 때 철의 농도가 약 39배까지 증가하였다. 그리고 H-ferritin과 L-ferritin을 생산하는 효모 균주를

Table 2. Atomic absorption spectrometry for intracellular iron content

Cell type	Ferric citrate(mM)	No. of cells/mL	Iron content(ppm)
Recipient strain (2805)	0	$1.0 \times 10^9 - 1.7 \times 10^8$	$3.8 \pm 0.5$
	10	$1.1 \times 10^9 - 3.6 \times 10^8$	$49.4 \pm 10.2$
	19	$0.9 \times 10^9 - 3.2 \times 10^8$	$147.0 \pm 16.5$
Transformant 1 (YG-H)	0	$1.3 \times 10^9 - 0.9 \times 10^8$	$1.6 \pm 0.3$
	10	$1.2 \times 10^9 - 1.1 \times 10^8$	$174.9 \pm 7.2$
	19	$1.2 \times 10^9 - 1.4 \times 10^8$	$221.2 \pm 37.9$
Transformant 2 (YG-L)	0	$1.5 \times 10^9 - 3.0 \times 10^8$	$3.3 \pm 1.5$
	10	$1.4 \times 10^9 - 1.7 \times 10^8$	$148.8 \pm 15.5$
	19	$1.1 \times 10^9 - 1.4 \times 10^8$	$227.3 \pm 27.8$

Values were obtained from three replicates and each experiment was repeated twice. Values means  $\pm$  standard deviation. ppm, parts per million of cell mass.

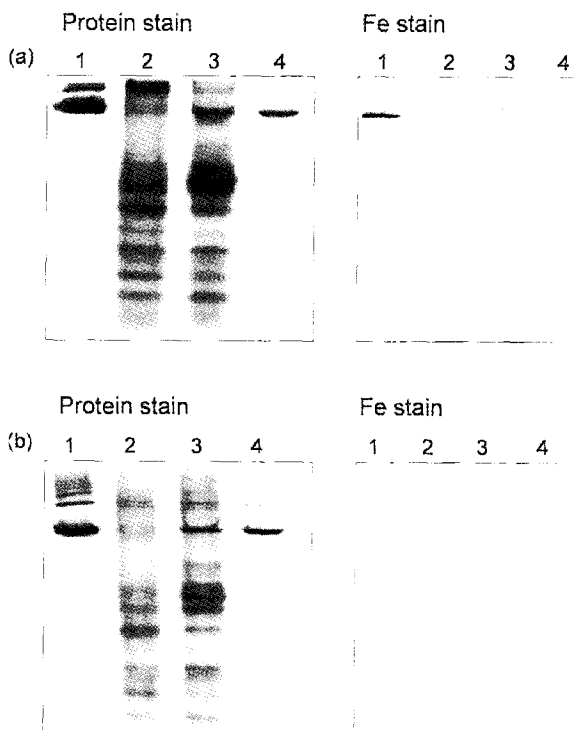


Figure 5. 7.5% Native-polyacrylamide gel electrophoresis of recombinant human H-ferritin(a) and human L-ferritin(b). The acrylamide gels were stained for protein using Coomassie blue R-250 and for iron using Prussian blue. The lanes are: 1, partially purified *E. coli*-derived H-ferritin(a) or L-ferritin(b); 2, cell extract of the host cell; 3, cell extract of the transformant YG-H(a) or YG-L(b); 4, partially purified H-ferritin(a) or L-ferritin(b) expressed in yeasts.

10 mM ferric citrate를 함유한 배지에서 배양했을 때의 세포 내 철의 농도는 각각  $174.9 \mu\text{g per gram(dry cell weight)}$ 과  $148.8 \mu\text{g per gram(dry cell weight)}$ 이었고 효모 숙주세포에 있어서의 철의 농도는  $49.4 \mu\text{g per gram(dry cell weight)}$ 이었다. 이 농도는 숙주세포에 비해서 철의 함량이 각각 3.5배와 3.0배 증가한 값이다. 앞으로 이렇게 증진된 철 함량이 세포 배양 시 첨가한 철 화합물에 따라 달라지는지, 또는 H-ferritin이나 L-ferritin의 세포 내 기능과 관련이 있는지 밝힐 수 있을 것이다. 세포의 생장은 모든 균주에 있어서 배지의 철 함량이 증가함에 따라 약간 감소하는 경향을 보였다. 이상의

실험 결과를 종합해 보면, 본 연구를 통해서 효모에서 사람 HFH와 HFL을 성공적으로 생산할 수 있는 시스템을 구축하였으며, 생산된 재조합 H-ferritin과 L-ferritin은 철 결합의 활성을 가지는 것으로 밝혀졌다. 그리고 사람 ferritin 유전자를 효모 균주에 발현시킴으로써 효모의 철 함량이 증진되었음을 유추할 수 있었다. 그리하여 발현된 재조합 ferritin을 분리 정제하여 이 단백질의 내공에 함유된 철의 양을 분석함으로써 증가된 철 함량과 발현된 단백질과의 상관 관계를 명확하게 규명하고자 한다.

요 약

본 연구에서는 유도성 promoter인 GAL1과 상시성 promoter인 GPD와 ADH1 promoter 하류에 사람 ferritin H-chain 유전자(hfH) 및 사람 ferritin L-chain 유전자(hfL)를 연결하여 재조합 plasmid를 구축하고 이들을 *S. cerevisiae* 2805에 형질 전환시켜 외래 유전자를 성공적으로 발현시켰다. Ferritin 발현에 미치는 promoter의 영향을 비교한 바, 이 두 단백질 생산에 있어서 GAL1 promoter가 GPD나 ADH1 promoter 보다 더 효율적이었다. GAL1 promoter를 사용한 형질 전환체(YG-H와 YG-L)에서 H-chain의 발현율은 전체 수용성 단백질 중 4.5%에 해당하였고, L-chain의 발현율은 9.8%에 이르렀다. 각 균주에서 발현된 H 및 L subunit들은 비변성 젤을 사용한 전기 영동의 결과 대장균에서 생산된 재조합 단백질과 마찬가지로 자발적으로 holoprotein으로 조합되어졌다. 재조합 H-와 L-ferritin들은 단백질 내공에 철을 축적할 수 있음이 Prussian blue 염색으로 확인되었다. 그리고 효모 세포를 10 mM ferric citrate를 함유한 배지에서 배양했을 때, H-ferritin과 L-ferritin을 생산하는 재조합 효모 균주에 있어서의 철의 농도는 각각  $174.9 \mu\text{g per gram(dry cell weight)}$ 과  $148.8 \mu\text{g per gram(dry cell weight)}$ 이었고 야생형 효모 균주에 있어서의 철의 농도는  $49.4 \mu\text{g per gram(dry cell weight)}$ 이었다. 이것은 사람 ferritin 유전자를 효모 균주에 발현시킴으로써 효모의 철 함량이 증진되었음을 유추하는 결과이다.

감 사

본 연구는 과학기술부 중점국가연구 개발사업 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Harrison, P. M. and P. Arosio (1996), The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation, *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 161-203.
- Theil, E. C. (1987), Ferritin; structure, gene, regulation and cellular function in animals, plants and microorganism, *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 289-315.
- Broxmeyer, H. E., J. Bognacki, M. H. Dorner, M. deSousa, and L. Lu (1981) Acidic isoferritins as feedback regulators in normal and leukemic myelopoiesis, *Hamatol. Bluttransfus.* **26**, 243-245.
- Harrison, P. M., S. C. Andrews, P. J. Artymiuk, G. C. Ford, D. M. Lawson, J. M. A. Smith, A. Treffry, and J. L. White (1990), Ferritin; in Iron Transport and Storage, Ponka, P., Schulman, H. M., Woodworth, R. C. (eds.), 82-101, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Levi, S., A. Luzzageo, G. Cesareni, A. Cozzi, F. Franceschinelli, A. Albertini, and P. Arosio (1988), Mechanism of ferritin iron uptake: Activity of the H-chain and deletion mapping of the ferroxidase site, *J. Biol. Chem.* **263**, 18086-18092.
- Levi, S., S. J., Yewdall, P. M., Harrison, P., Santambrogio, A. Cozzi, E., Rovida, A., Albertini, and P., Arosio (1992), Evidence that H- and L-chains have cooperative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin, *Biochem. J.* **288**, 591-596.
- Lee, J., H.-Y. Seo, E.-S. Jeon, O. S. Park, K.-M. Lee, C.-U. Park, and K.-S. Kim (2001), Cooperative activity of subunits of human ferritin heteropolymers in *Escherichia coli*, *J. Biochem. Mol. Biol.* **34**, 365-370.
- Nam, S. W., H. J. Lim, B. H. Chung, and Y. K. Chang (1996), Expression and secretion of recombinant inulinase under the control of GAL or GAP promoter in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biotechnol. Bioeng.* **11**, 445-452.
- Chun, B.-W., D.-H. Kim, B.-W. Chung, H.-C. Lee, and M.-S. Yang (1996), Production of glucose oxidase using recombinant yeast, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **11**, 270-275.
- Hovland, P., J. Flick, M. Johnston, and R. A. Sclafani (1989), Galactose as a gratuitous inducer of GAL gene expression in yeasts growing on glucose, *Gene* **83**, 57-64.
- Park, E.-H., Y.-M. Shin, Y.-Y. Lim, T.-H. Kwon, D.-H. Kim, and M.-S. Yang (2000), Expression of glucose oxidase by using recombinant yeast, *J. Biotech.* **81**, 35-44.
- Shin, Y.-M., T.-H. Kwon, K.-S. Kim, K.-S. Chae, D.-H. Kim, J.-H. Kim, and M.-S. Yang (2001), Enhanced iron uptake of *Saccharomyces cerevisiae* by heterologous expression of a tadpole ferritin gene, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1280-1283.
- Paguzzi, F., E. Lesuisse, and R. Crichton (1988), Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.* **231**, 253-258.
- Eide, D. J. (1998), The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Annu. Rev. Nutr.* **18**, 441-69.
- Lee, D. H., J. H. Seo, J. H. Sohn, E. S. Choi, and S. K. Rhee (1994), Optimization of environmental conditions for hirudin production from recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **9**, 8-15.
- Hess, H. H., M. B., Lee, and J. E. Derr (1978), A linear Lowry-Folin assay for both water-soluble and sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins, *Anal. Biochem.* **85**, 295-300.
- Ito, H., Y. Fukuoka, K. Murata, A. Kimura (1983), Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations, *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
- Lamml, U. K. (1970), Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685.
- Kim, Y. T. and K. S. Kim (1994), Synthesis of active tadpole H-chain ferritin in *Escherichia coli*, *Mol. Cells* **4**, 125-129.
- Burnette, W. N. (1981), Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.
- Mateos, F., C. Gonzalez, C. Dominguez, J. E. Losa, A. Jimenez, and J. L. Perez-Arellno (1999), Elevated non-transferrin bound iron in the lungs of patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia, *J. Infect.* **38**, 18-21.
- Romanos, M. A., C. A. Scorer, and J. J. Clare (1992), Foreign gene expression in yeast, *Yeast* **8**, 423-488.
- La Count, W., G. An, and J. M. Lee (1997), The effect of polyvinyl pyrrolidone (PVP) on the heavy chain monoclonal antibody production from plant suspension cultures, *Biotechnol. Lett.* **19**, 93-96.