

재조합 효모에 의한 Ferritin 이형집합체의 발현과 철 흡수

장유정 · 박충웅 · †김경숙
전북대학교 자연대 생물과학부 및 유전공학연구소
(접수 : 2004. 8. 11., 게재승인 : 2004. 10. 18.)

Iron Uptake by the Recombinant Yeasts Producing Ferritin Heteropolymers

Yu-Jung Chang, Chung-Ung Park, and Kyung-Suk Kim†
Faculty of Biological Sciences, Institute for Molecular Biology and Genetics,
Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea
(Received : 2004. 8. 11., Accepted : 2004. 10. 18.)

Human ferritin H- and L-chain genes (*hfH* and *hfL*) were cloned into the yeast shuttle vector YEp352 containing the GAL1 (galactokinase) and GAL10 (epimerase) divergent promoters and the vectors constructed were used to transform *Saccharomyces cerevisiae* 2805. SDS-PAGE displayed expression of the introduced *hfH* and *hfL* in both recombinant strains of Y1H10L and Y1L10H. The ferritin subunits, that represented ca. 22% and 15% of the soluble proteins in Y1H10L and Y1L10H, were spontaneously assembled into active ferritin heteropolymers. The H subunit content of the purified recombinant human ferritin heteropolymers was proven to reflect the relative expression yield of the subunits. When the cells of 2d culture were incubated with 14.3 mM Fe(II), the cellular iron concentration of Y1H10L and Y1L10H was 1.7 and 2.0 times, respectively, that of the control strain. It is assumed that increase in the iron uptake of the recombinant yeasts is closely related to ferritin expression and H subunit content.

Key Words : Iron uptake, yeast, ferritin heteropolymers

서 론

Ferritin은 세포 내에서 철 항상성 조절에 수반되는 대표적인 철 저장 단백질이다. 이 단백질은 구조적으로 동등한 24개의 subunit이 조합되어 구형을 이루는 단백질 외피와 이렇게 해서 생긴 내공 (직경 약 8 nm)으로 구성되어 있다. Ferritin 내공에는 분자 당 최대 4,500개의 철 원자를 ferric oxyhydroxide 중합체로 축적할 수 있다. Ferritin의 주요 기능은 내공에 철을 Fe(III) 상태로 보유함으로써 유리된 철에 의한 세포 내 독성으로부터 세포를 보호하고 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 분리되었다(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. 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(3). 각 조직에 존재하는 isoform의 기능상의 차이는 subunit의 조성 비율의 차이와 무관하지 않을 것으로 보인다.

이전에 사람 ferritin H-와 L-chain 유전자가 분리되어 대장균에서 재조합 H-와 L-chain ferritin (H-ferritin & L-ferritin)이 생산되었다(4-6). 정제된 재조합 H-ferritin은 ferroxidase 활성이 있어 L-ferritin보다 철 흡수율 (iron uptake rate)이 빠르고(4), L-ferritin은 H-ferritin보다 더욱 안정하며 core 형성에 우월함이 보고되었다(5). 대장균에서 H와 L subunit으로 혼합된 ferritin 이형집합체 (heteropolymer)를 생산하여 실험한 결과, ferritin 이형집합체는 세포 내에서 철 흡수 기능을 보였으며 재조합 ferritin에 결합된 철의 양은 ferritin 내의 H subunit의 함량과 비례 관계에 있었다(6). 효모에서도 사람 ferritin 유전자를 삽입하여 성공적인 발현이 이루어졌으며

† 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@chonbuk.ac.kr

대장균에서 생산된 재조합 단백질과 마찬가지로 자발적으로 holoprotein으로 조합되어졌다. H-ferritin을 생산하는 재조합 효모는 철 축적의 활성을 보인 반면, L-ferritin을 생산하는 재조합 효모는 철 축적의 활성을 보이지 않았다(7).

최근에 효모 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 유전자의 고발현을 위한 숙주 세포의 변이주나, 고발현 벡터 개발 또는, 신기능 효모의 개발 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(8-10). 거의 모든 생물체에 있어서 ferritin이 발견되는 것과는 달리, 효모는 ferritin을 생산하지 않는다(11). 척추동물에 있어서 철 대사 기전이 세포의 종류나 증식 속도에 따라 달라지는 점을 감안할 때 효모는 철 대사 기전을 이해하는데 용이한 모델을 제공한다.

본 연구에서는 galactose에 의해 그 유도 반응이 빠르고 양방향 promoter인 GAL1 (galactokinase)과 GAL10 (epimerase) promoter를 이용하여 사람 ferritin H 및 L subunit 유전자 (*hFH* & *hFL*)를 동일 세포내에서 발현시켰다. 그리하여 생체 내에서와 같이 두 subunit으로 이루어진 사람 ferritin 이형집합체를 효모에서 생산하였다. 발현된 ferritin 이형집합체의 활성 여부, 그리고 개발된 재조합 효모에 있어서 철 함량 증진 여부 및 subunit의 비율에 따른 철 이온 흡수의 영향 등을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 플라스미드

플라스미드 증식 및 대량 추출을 위한 숙주로는 *E. coli* JM 109를 사용하였다. 사람 ferritin 유전자 발현을 위한 효모 숙주 세포로는 *S. cerevisiae* 2805 (*MATa pep4::HIS3 prb1 Δcan1 GAL2 his3 ura3-52*)를 사용하였다. 유전자 재조합 플라스미드는 yeast shuttle vector인 YEp352를 사용하였으며, 사람 ferritin H- 및 L-chain 유전자 (*hFH* & *hFL*)를 포함하는 DNA 단편은 이들의 효모 발현 벡터인 pYGH2와 pYGL1으로부터 각각 얻었다(7). 사람 ferritin H- 및 L-chain 발현을 위한 플라스미드 pY1H10L과 pY1L10H로 형질 전환시킨 효모 균주는 Y1H10L과 Y1L10H로 각각 명명하였다. 대조균주로는 플라스미드 pYGT로 형질 전환된 재조합 효모인 YGT를 사용하였다(12).

배지 및 배양 방법

효모 숙주 세포와 재조합 효모의 배양을 위한 일반 배지로 복합 영양 배지인 YEPD (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% dextrose)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 glucose대신에 2%의 galactose를 첨가하였다. Glucose/galactose 농도에 따른 균체 증식과 ferritin 발현량을 분석하기 위하여 먼저 uracil 결핍 최소배지에서 전 배양한 배양액을 1.0×10^7 cells/mL로 희석하여 2% galactose, 1% glucose/1% galactose, 1% glucose/ 2% galactose가 각각 첨가된 YEP 배지 (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone) 하에 30°C, 200 rpm에서 5일간

배양하였다. 대조균으로서 uracil 결핍 최소 배지에서 배양한 전 배양액을 위와 동일한 농도로 희석하여 2% glucose대신 2% galactose가 첨가된 uracil 결핍 최소배지에서 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 측정하였다. 기초 실험을 위한 전 배양과 플라스크 배양 조건은 Lee 등의 방법(13)을 따랐다. 효모 내 단백질 양은 Bio-Rad protein assay에 의해 분석하였다(14).

Ferritin 발현 재조합 플라스미드 구축

우선, 효모에서의 ferritin L-chain 발현 벡터인 pYGL1을 *Xba* I과 *Shp* I로 절단한 후, Klenow fragment로 처리하여 GAL7 terminator를 갖는 *hFL* DNA 단편을 얻었다. 그리고 GAL1-GAL10 promoter에 의해 발현되는 벡터를 제작하기 위하여 pYGH2 플라스미드의 GAL1-GAL10 promoter 뒷부분을 *EcoR* I으로 절단하여 blunting한 후 *hFL-tGAL7*을 삽입하였다. 그 결과 ferritin heteropolymer를 발현시킬 수 있는 tGAL7-*hFL*-pGAL10-pGAL1-*hFH*-tGAL7의 유전자 서열을 갖는 플라스미드 pY1H10L을 구축하였다. 또한, ferritin subunit의 유전자의 위치가 서로 바뀐 pY1L10H 플라스미드를 구축하기 위해 pYGH2 플라스미드를 *Xba* I과 *Shp* I로 절단하고 blunting 처리하여 GAL7 terminator를 갖는 *hFH* DNA 단편을 얻었다. 그리고 pYGL1 플라스미드의 GAL1-GAL10 promoter의 뒷부분을 *EcoR* I으로 절단하여 blunting한 후 *hFH-tGAL7*을 삽입하였다. 그 결과 tGAL7-*hFH*-pGAL10-pGAL1-*hFL*-tGAL7의 유전자 서열을 갖는 플라스미드 pY1L10H를 구축하였다(Fig. 1).

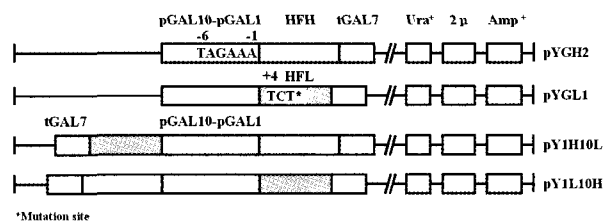


Figure 1. Schematic diagram of recombinant plasmids. Line represents the plasmid DNA and the boxes represent the gene or their corresponding functional domains. Open boxes are *hFH* and dark boxes are *hFL* gene, respectively.

효모 형질 전환체의 선별과 ferritin의 세포내 발현 효율

Fig. 1에서 구축된 플라스미드 각각을 Ito 등의 방법(15)으로 *S. cerevisiae* 2805에 형질 전환시킨 후, uracil 결핍 최소배지에서 형질 전환체들을 1차 선별하였다. 선별된 재조합 효모는 glass bead를 이용하여 DNA 추출 후 대장균에 형질 전환하여 효소 절단으로 DNA를 확인하여 2차 선별하였다. 그리고 선별된 colony에 있어서 ferritin의 세포내 발현을 확인하기 위해 uracil 결핍 최소 배지에서 3일간 배양한 다음 SDS-polyacrylamide 겔 전기영동 (SDS-PAGE)을 수행하였다. 플라스미드 안정성은 선택된 colony를 대상으로 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.

전기영동

재조합 플라스미드에 의한 발현을 분석하기 위해 SDS-PAGE는 Lamml의 방법(16)을 따라 수행하였다. 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-PAGE를 수행하였고, densitometry (Molecular Dynamics PC-120, USA)를 이용하여 분석하였다. 그리고 발현된 ferritin H 및 L subunit이 서로 조합되어져 ferritin 이형집합체를 만드는지, 그리고 조합된 단백질이 철과 *in vitro*에서 반응하는지 확인하기 위해 세포 추출물을 1 mM ferrous ammonium sulfate와 반응시킨 후 비변성 겔을 이용하여 전기영동을 수행하였다. 또한 재조합 ferritin 이형집합체가 *in vivo*에서 YEP (2% galactose 함유) 배지에 함유된 철을 축적하는지 확인하기 위해 세포 추출물을 heat denaturation 시킨 후, Sephacryl S-300 (2.6 × 100 cm)을 이용한 겔 크로마토그래피를 수행하여 분리한 다음 비변성 겔을 이용하여 전기영동을 수행하였다. 단백질 염색을 위해서는 0.25% Coomassie brilliant blue R-250을 사용하였고, Fe(III)를 염색하기 위해서는 2% K₄Fe(CN)₆와 2% HCl 용액을 1 : 1로 혼합하여 바로 사용하였다(17).

Y1H10L과 Y1L10H 균체에서 생산된 ferritin 이형집합체의 subunit의 조성 비율과 각 균주에서의 subunit 발현양의 관계를 분석하였다. 각 균체 추출물로부터 분리된 ferritin 이형집합체를 비변성 겔을 이용하여 전기영동을 수행한 다음 ferritin 단백질의 단량체에 해당하는 밴드를 Model 422 Electro-Eluter (Bio-Rad)를 이용하여 추출하였다. 이 추출물을 다시 변성시킨 다음 SDS-PAGE를 수행하였고, densitometry로 subunit의 상대적인 함량을 분석하였다.

철 이온의 흡수 및 원자 흡광 광도계

재조합 미생물에 있어서 철 흡수를 유도하기 위해 uracil 결핍 최소배지에서 전배양한 효모를 YEP (2% galactose 함유) 배지에서 30℃, 이틀간 배양한 후, 원심 분리 (5,000 × g, 5 min)하여 세포들을 수확한 다음 20 mM MOPS [3-(N-morpholino)propanesulfonic acid] buffer (pH 6.5)로 2번 세척하였다. 효모 세포들 (100 mg/mL)을 5% (w/v) glucose를 함유한 위의 완충용액에서 30분간 반응시킨 다음, 14.3 mM ferrous sulfate를 첨가하여 빛이 통과하지 않는 공기 중에서 2시간 반응시켰다. 그 후, 원심 분리하여 세포를 수확한 다음 증류수로 2회 세척하였다. 철 이온의 함량 분석을 위하여 질산과 염산 (5 : 2, vol/vol) 용액에서 250℃, 8시간 반응시킨 다음, 원자 흡광 광도계 (SpectrAA-880, Varian)를 사용하여 철의 농도를 분석하였다.

결과 및 고찰

Ferritin 이형집합체 발현 재조합 플라스미드의 구축

본 연구에서는 효모에서 사람 ferritin H- 및 L-chain 유전

자 (*hfH* & *hfL*)를 함께 발현시킬 수 있는 벡터를 제조하기 위해 유도성이며 양방향 promoter인 GAL1-GAL10 promoter를 사용하였다. 효모에서 ferritin 발현을 향상시킨 pYGH2와 pYGL1(7) 플라스미드로부터 사람 ferritin H- 및 L-chain (*hfH* & *hfL*) 유전자를 사용하였다. 그리고 GAL1-GAL10 promoter를 선택하여 *hfH* 및 *hfL*를 동일 균주 내에서 발현시킬 수 있는 재조합 플라스미드 pY1H10L과 pY1L10H를 Fig. 1과 같이 구축하였다. 이들은 각각 GAL1 promoter와 GAL10 promoter 하류에 ferritin 유전자를 교대로 연결한 플라스미드이며 GAL7 terminator를 ferritin 유전자 하류에 각각 연결하였다. Promoter와 terminator를 제외한 나머지 염기 부분 (2- μ origin, URA3, Amp^r)은 유전자 source와 방향면에서 모두 동일하다(Fig. 1).

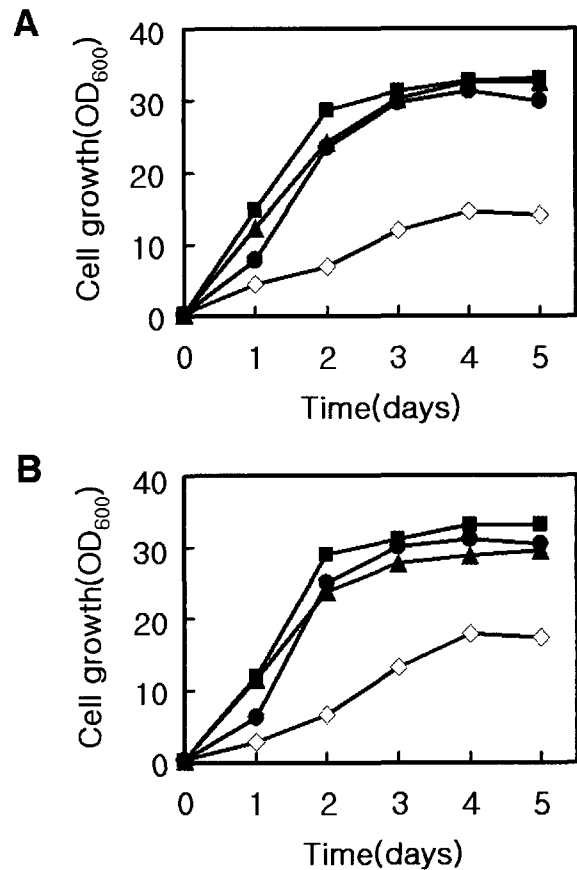


Figure 2. Effect of the concentration of galactose and glucose on the cell growth in Y1H10L(A) and Y1L10H(B). ●, YEP medium containing 2% galactose; ▲, YEP medium containing 1% glucose and 1% galactose; ■, YEP medium containing 1% glucose and 2% galactose; ◇, uracil deficient selective medium.

Glucose/galactose 농도에 따른 균체 증식과 ferritin 발현

유전자 산물의 생산성은 플라스미드 안정성, 재조합 효모의 배양조건 등을 포함한 여러 인자들에 의해 좌우된다(18). 이전에 Seo 등(12)은 glucose에 의해 억제되고 galactose에 의해 유도되는 promoter인 GAL promoter를 이용하며 ferritin 동형집합체를 생산하는데 있어서 glucose와 galactose 농도에 따라 증식속도와 ferritin 발현양의 차이를 보였다. 이에 근거

하여 본 실험에서는 ferritin 이형집합체를 생산하는 재조합 효모 Y1H10L과 Y1L10H에 있어서 glucose와 galactose의 농도에 따른 증식속도와 ferritin 발현양을 조사하였다.

균주 Y1H10L의 경우, 복합 영양 배지에서 배양 말기까지 균체 증식 (OD₆₀₀)이 점차적으로 증가하여 배양 2일째 거의 최고치에 도달하였으며 최종 균체 농도가 30-33 OD₆₀₀에 도달하였다(Fig. 2). Uracil이 결핍된 최소 배지에서 키운 균체는 복합 영양 배지에서보다 상대적으로 낮은 균체 증식을 보이며 4일경에 최대치에 도달하였다. Y1L10H 균주의 경우에도 Y1H10L과 거의 유사한 균체 증식 양상과 최종 균체 농도를 보였다. 특히, 두 균주 모두 1% glucose/2% galactose가 첨가된 YEP 배지에 있어서 다소 높은 균체 증식을 보였다. 플라스미드 안정성에 있어서는 Y1H10L나 Y1L10H 균주 모두 배양 3일까지 약 82% 이상으로 플라스미드가 비교적 안정하게 유지되었다(data not shown).

재조합 효모 균주들을 배양하는 동안 전체 단백질 중 발현된 ferritin의 양을 측정하였다. Ferritin 발현에 있어서 배지의 영향을 조사한 결과, 균주 Y1H10L과 Y1L10H 모두 2% galactose를 포함하는 배지에서 이틀간 배양했을 때 H와 L subunit의 총 발현양이 22%와 15%로 가장 높게 나타났다(Fig. 3). 이 때 균주 Y1H10L에 있어서 H와 L subunit의 상대적인 발현양은 1 : 2.8로 분석되었다. Ferritin 발현양에 있어서는 배양기간에 따라 차이 (14-22%)를 보였으나 subunit의 상대적인 발현양은 거의 일정하게 유지되었다. 균주 Y1L10H의 경우에는 이틀간 배양했을 때 H와 L subunit의 상대적인 발현양은 1 : 2.3으로 분석되었다. 이 경우에도 ferritin 발현양에 있어서는 배양 사흘째부터 약간 감소하였으나 H subunit의 상대적인 발현양은 증가하는 경향을 보였다. 또한, 두 균주에서 subunit의 상대적인 발현양을 서로 비교해 보면 *hfH*의 발현에는 GAL10 promoter가 GAL1 promoter보다 상대적으로 우월함을 보였으며 H-ferritin 동형집합체의 생산에 있어서도 GAL10 promoter를 이용했을 때 발현양이 더 증가됨을 보였다(personal communication).

효모에서 생산된 사람 ferritin H 및 L subunit의 조합

재조합 단백질에 대하여 비변성 겔을 이용하여 전기영동을 수행한 결과, 효모에서 발현된 각각의 사람 ferritin H 및 L subunit이 서로 조합되어 이형집합체 형태로 이루어진 ferritin 단백질 밴드를 확인하였다(Fig. 4). 각 균체에서 H-ferritin 또는 L-ferritin의 동형집합체에 대한 단백질 밴드는 확인되지 않았다. 이것은 ferritin 이형집합체의 형성이 단일 subunit으로 구성된 동형집합체의 형성보다 열역학적으로 우월함을 암시한다. 이 결과는 거의 모든 생체 조직에 있어서 발견되는 ferritin이 H와 L subunit이 서로 조합된 ferritin 이형집합체인 것에 대한 그 가능한 이유를 설명할 수 있을 것이다(1). 발현된 단백질은 *in vivo* 및 *in vitro* 실험에서 모두 Prussian blue 염색에 양성 반응을 보였다. 이 결과는 효모에서 생산된 재조합 ferritin 이형집합체가 특히, *in vivo*에서 철을 산화시켜 내공에 축적하였음을 의미하는 것으로써 재조합 ferritin이 효모 세포내에서 당질화가 거의 일어나지 않았거나 또는, 철 축적 반응에 제약을 주지 않을 정도로 제한적으로 일어났음을 유추하게 한다. 이전에 ferritin 이형집합체를 생산하는 대

장균에 있어서도 *in vivo* 실험에서 철 축적 활성이 있음이 보고되었다(6). 최근에는 사람 ferritin H-chain 유전자를 *Pichia pastoris*에서 발현시켜 생산된 재조합 ferritin의 경우 당질화의 증거가 제시되었다(19).

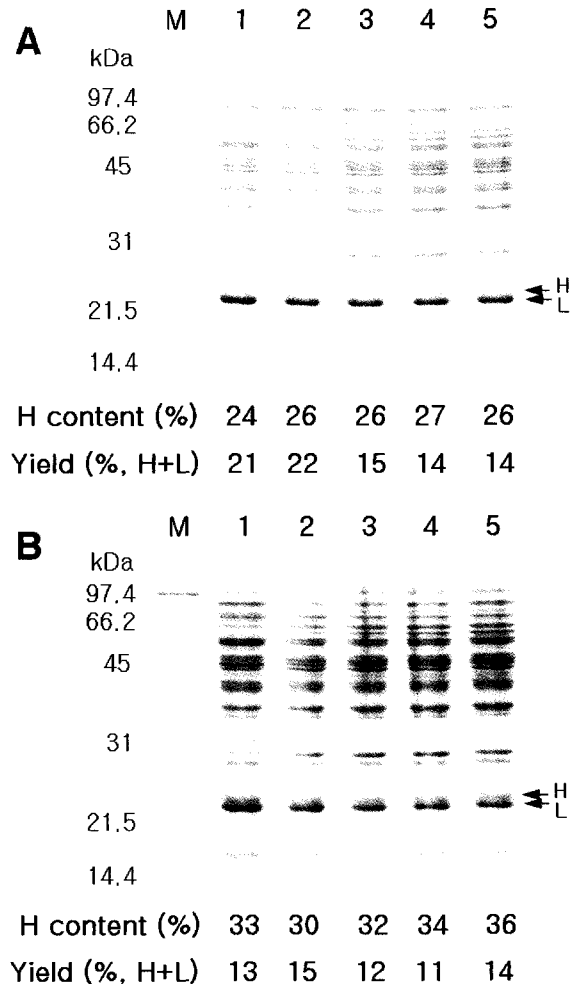


Figure 3. 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of human ferritin H- and L-chains expressed in yeasts Y1H10L(A) and Y1L10H(B) that grown in media containing 2% galactose. The SDS-PAGE gel was stained with Coomassie blue R-250. Expression yields and relative H subunit contents are estimated by densitometric analysis. The lanes are: M, size marker; 1-5, each number indicates culture days.

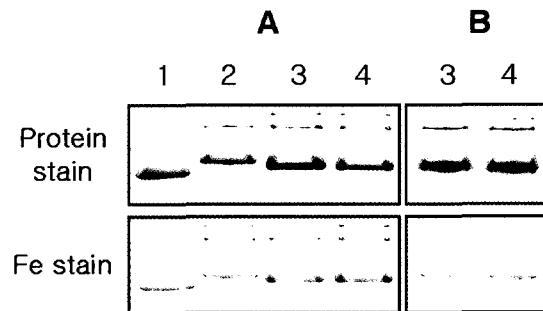


Figure 4. Electrophoresis on 7.5% polyacrylamide gel of the recombinant human ferritin heteropolymers that reacted with Fe(II) *in vitro*(A) and *in vivo*(B). The acrylamide gels were stained for protein using Coomassie blue R-250 and for iron using Prussian blue. The lanes are: 1, H-chain ferritin; 2, L-chain ferritin; 3, ferritin heteropolymer from Y1H10L; 4, ferritin heteropolymer from Y1L10H.

이들간 배양된 Y1H10L과 Y1L10H 균체로부터 재조합 ferritin 이형집합체의 단량체를 각각 분리한 후 SDS-PAGE를 수행하여 H subunit의 조성을 분석한 결과, 각각 26%와 30%임을 확인하였다(Fig. 5). 이것은 Fig. 3에서처럼 두 균체에서 발현된 subunit의 조성 비율을 나타낸 결과와 일치하는 것으로서 발현된 subunit 모두가 이형집합체로 조합되었음을 증명한다. 이전에 Rucker 등(20)은 대장균에서 생산된 ferritin 이형집합체는 일정한 범위 내에서의 subunit 조성비를 가진다고 보고하였다.

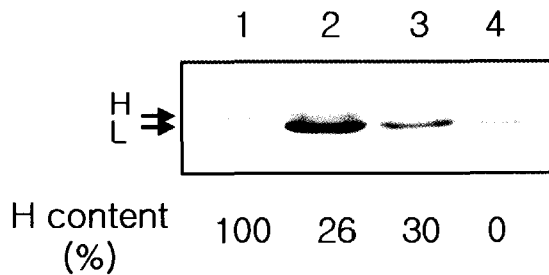


Figure 5. 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of recombinant human ferritin heteropolymers. The proteins were eluted from the main monomer band of the gels performed in Fig. 4. Relative H subunit contents are estimated by densitometric analysis. The lanes are: 1, H-chain ferritin; 2, ferritin heteropolymer from Y1H10L; 3, ferritin heteropolymer from Y1L10H; 4, L-chain ferritin.

철 이온의 흡수 및 원자 흡광 광도계

Ferritin 이형집합체를 생산하는 재조합 효모 균주에 있어서 철 흡수 정도를 알아보기 위해 효모 균주를 배양하여 Fe(II)와 반응시킨 후 세포내 철 농도를 비교 분석하였다. 그 결과, 균주 Y1H10L과 Y1L10H를 이들간 배양한 후 즉, ferritin 발현양이 최대값을 보일 때 균체를 수확하여 14.3 mM Fe(II)와 반응시킨 세포 내 철의 농도 (cellular iron concentration)는 각각 24.9 $\mu\text{mol per gram (wet wt)}$ 과 28.2 $\mu\text{mol per gram (wet wt)}$ 이었다. 이때 대조균주에 있어서의 철의 농도는 14.3 $\mu\text{mol per gram (wet wt)}$ 이었다(Fig. 6). 이 농도들은 대조균주에 비해서 철의 함량이 각각 약 1.7배와 2.0배 증가한 값이다. 균체 Y1L10H에서의 철의 흡수는 Y1H10L에서보다 약 13% 증가하였다. 이 농도들은 H-ferritin을 생산하는 YGH2 균주 [16.5 $\mu\text{mol per gram (wet wt)}$]보다 각각 약 1.5와 1.7배 증가한 값이다. L-ferritin을 생산하는 YGL1 균주는 철 흡수에 있어서 대조균주와 유사한 값을 보였다. 그리하여 효모에 ferritin 이형집합체를 생산함으로써 H-ferritin을 생산하는 균체보다 세포내 철의 농도가 증가된 결과를 얻었다. Seo 등(7)은 재조합 효모를 철과 반응시켰을 때 90% 이상의 철이 ferritin에 결합함을 확인하였다. 그러나 ferritin 이형집합체를 생산함으로써 증진된 ferritin 발현양이 철 농도의 증가를 초래하였는지 혹은 subunit 조성 비율의 변화가 철 농도의 증가를 초래하였는지 이 실험에서는 명확하지 않다. 그럼에도 불구하고 재조합 효모에서의 철 흡수량의 증가는 ferritin 발현율이나 subunit의 상대적 발현양과 밀접한 관련이 있을 것으로 유추된다. 이전에 Santambrioglio 등(21)은 *in vitro*에서 ferritin의 H subunit 함량을 0-35% 증진시킴에 따라 철 축적의 초기 반응 속도가 빨라진다고 보고하였다. Ferritin에 의한

철 축적의 초기 반응 속도와 재조합 효모에 의한 철 함량과는 서로 무관하지 않을 것으로 보인다. 또한, 재조합 대장균을 철과 *in vivo*에서 반응시킨 후 크로마토그래피를 수행한 결과 H subunit의 함량이 증가함에 따라 재조합 ferritin에 결합된 철의 양이 증가함을 보였다(6).

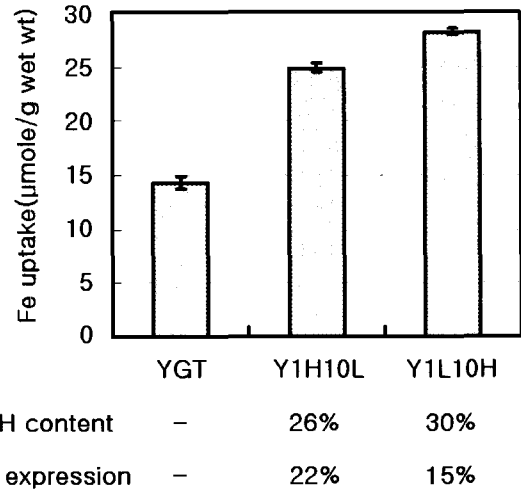


Figure 6. Iron content of the yeasts Y1H10L and Y1L10H incubated with 14.3 mM Fe(II) for 2hr. Values are obtained from three replicates.

이상을 종합하면, 본 연구를 통해서 효모 *S. cerevisiae*에서 사람 ferritin 이형집합체를 양방향성인 GAL1-GAL10 promoter를 이용하여 동일 세포내에서 성공적으로 생산할 수 있는 시스템을 구축하였으며, 생산된 재조합 ferritin 이형집합체는 세포내에서 철 결합의 활성을 가지는 것으로 밝혀졌다. 그리고 효모 균주에서 ferritin 이형집합체를 생산함으로써 대조균주에서보다 세포내 철 농도가 증가된 결과를 얻었다.

요약

본 연구에서는 유도성이며 양방향성 promoter인 GAL1-GAL10 promoter에 사람 ferritin H- 및 L-chain 유전자 (*hfH* & *hfL*)를 연결하여 재조합 플라스미드를 구축하고 이들을 *S. cerevisiae* 2805에 형질 전환시켜 두 외래 유전자를 동일 세포내에서 성공적으로 발현시켰다. 균주 Y1H10L과 Y1L10H에 있어서 ferritin 발현은 여러 시험 배지 중 2% galactose를 포함하는 배지에서 가장 높게 나타났으며 이들간 배양 시 subunit의 총 발현양이 각각 전체 수용성 단백질의 약 22%와 15%에 해당하였다. 각 균주에서 발현된 H 및 L subunit들은 비변성 겔을 사용한 전기영동의 결과 자발적으로 이형집합체로 조합되어짐이 확인되었고, 또한 철 축적의 활성을 보였다. 재조합 ferritin 이형집합체를 분리하여 H:L subunit의 함량을 분석한 결과 발현된 subunit의 비율과 일치하였다. 재조합 효모 균주 Y1H10L과 Y1L10H를 14.3 mM ferrous sulfate와 반응시켰을 때, 세포 내 철의 농도는 대조균주의 농도에 비해 각각 1.7배와 2.0배 증진되었음을 보였다. 재조합 효모에서의 철 흡수량의 증가는 ferritin 발현율이나 subunit의 상대적 발현양과 밀접한 관련이 있을 것으로 유추되었다.

감 사

본 연구는 2003년도 과학재단 우수여성과학자 도약지원연구 과제 (R04-2002-000-00132-0)의 지원으로 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.
- Powell, L. W., E. Alpert, K. J. Isselbacher, and J. W. Drysdale (1975), Human isoferritins: organ specific iron and apoferritin distribution, *Br. J. Haematol.* **30**, 47-55.
- 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.
- Seo, H. Y., Y. J. Chung, S. J. Kim, C. U. Park, and K. S. Kim (2003), Enhanced expression and functional characterization of the human ferritin H- and L-chain genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 57-63.
- 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.
- Eide, D. J. (1998), The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Annu. Rev. Nutr.* **18**, 441-69.
- Seo, H. Y., E. S. Jeon, Y. J. Chung, and K. S. Kim (2002), Heterologous expression of human ferritin H- and L-chain genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 162-168.
- 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.
- Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Ito, H., Y. Fukuoka, K. Murata, and A. Kimura (1983), Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations, *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
- Lammli, 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.
- Romanos, M. A., C. A. Scorer, and J. J. Clare (1992), Foreign gene expression in yeast, *Yeast* **8**, 423-488.
- Lee, J. L., H. S. Song, H. J. Kim, J. H. Park, D. K. Chung, C. S. Park, D. Jeoung, and H. Y. Kim (2003), Functional expression and production of human H-ferritin in *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Lett.* **25**, 1019-1023.
- Rucker, P., F. M. Torti, and S. V. Torti (1997), Recombinant ferritin: modulation of subunit stoichiometry in bacterial expression systems, *Protein Eng.* **10**, 967-973.
- Santambrogio, P., S. Levi, A. Cozzi, E. Rovida, A. Albertini, and P. Arosio (1993), Production and characterization of recombinant heteropolymers of human ferritin H and L chains, *J. Biol. Chem.* **68**, 12744-12748.