

재조합 *Saccharomyces cerevisiae*에 있어서 반응조건에 따른 수용성 철의 생체 흡수

¹김 상 준 · ¹장 유 정 · ¹박 총 웅 · ²정 용 섭 · † ¹김 경 속
¹전북대학교 자연대 생물과학부 및 유전공학연구소, ²농대 응용생물공학부
(접수 : 2004. 9. 8., 게재승인 : 2004. 12. 2.)

Cellular Iron Uptake from Aqueous Solutions depending on Reaction Conditions by genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae*

Sang-Jun Kim¹, Yu-Jung Chang¹, Chung-Ung Park¹, Yong-Seob Jeong², and Kyung-Suk Kim^{1†}

¹Faculty of Biological sciences, Institute for Molecular Biology and Genetics,

²Faculty of Biotechnology, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

(Received : 2004. 9. 8., Accepted : 2004. 12. 2.)

Cellular iron uptake was performed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* that transformed with human ferritin H- and L-chain genes. The recombinant yeasts were enriched in YEP medium supplemented with 2% galactose for 3 days and the iron uptake was followed by incubating the cells with iron in 20 mM MOPS buffer (pH 6.5). The reactions were examined under different conditions including the iron compounds of Fe(II) and Fe(III), the concentration of iron, the concentration of cells and the reaction time. From our results, the recombinant yeast YGH2 producing H-chain ferritin showed higher cellular iron concentration at the cell concentration of 100 mg/ml than 200 mg/ml. Iron presented as Fe(II) rather than Fe(III) was taken up more efficiently. Iron uptake increased slightly when iron was added up to 14.3 mM Fe(II) and then its cellular iron concentration was $16.7 \pm 0.7 \mu\text{mol/g}$ cell wet wt. In addition, the iron uptake reaction reached to maximum at about 2 hr incubation.

Key Words : Cellular iron uptake, recombinant yeast, ferritin gene

서 론

철, 구리, 망간, 아연과 같은 전이 금속은 생물학적 대사 과정에 있어서 핵심 요소이다. 특히, 철이나 구리는 전자 전달이나 전자 전달계에 있어서 조효소 및 metalloenzyme에서 그 중요한 의미를 갖는다. 그럼에도 불구하고, 이들 금속 원소가 세포 내 과잉 축적되었을 때는 활성 산소종을 생성함으로써 독성을 가진다. 그리하여, 금속 원소의 항상성 유지에 세포 내 금속 원소의 흡수 및 조절 기작은 정교하게 이루어져 있다(1). 철이 세포막을 통과하여 효모 *Saccharomyces cerevisiae* 내로 이동되는 경로는 이미 많은 연구를 통해서 확인된 바 있다(2). 이 과정은 외부에서 +3

가의 철을 ferri-reductase에 의해 +2가의 철로 환원한 후, permease에 의한 전달 기작을 통하여 세포 내로 운반한다. 이 전달 기작에는 두 종류가 있는데, 하나는 고친화 시스템으로서 ($K_m \approx 0.15 \mu\text{M}$) 철이 부족할 때 작용하며, 단백질 복합체인 Fet3p/Ftr1p가 세포막에서 철 흡수 촉매작용을 하고 있다. 이와는 다른 기작으로써 효모 세포는 철이 풍부한 조건에서 저친화 시스템이 작용하게 되는데, K_m 은 약 $30 \mu\text{M}$ 에 해당하며, 막 단백질 Fet4p의 활성이 증대하게 된다. Fet4p는 저친화 Fe(II) 운반 단백질로 알려지고 있다(3). 이러한 철 흡수 과정은 효모 뿐만 아니라 일부 박테리아, 곰팡이, 식물체에서도 확인되었다(2, 3). 일단, 효모 내로 흡수된 철은 독성에 대한 방어 기작으로써, 또는 세포 내 철이 부족할 경우 대사 과정에 활용하기 위해서 일단 리간드나 킬레이터 등에 결합되고 축적된다. 거의 모든 생물체에 있어서는 철 저장 단백질 ferritin이 존재하여 철을 포집한다. 반면에, 효모에서는 ferritin을 발현하지 않는다. 그 대신에 액포 내에 철을 저장하여 철이 부족할 경우 대사 과정에 활용한다(2-4).

† 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 : sukkim@chonbuk.ac.kr

Ferritin은 철 대사 기작에 수반되는 대표적인 철 저장 단백질이다(5). 이 단백질은 일반적으로 24개의 subunit이 조합되어 구형의 단백질 외피 (직경 약 13 nm)를 이루고 이렇게 해서 생긴 내공 (직경 약 8 nm)에는 분자 당 최대 4,500 철 원자까지 축적할 수 있다. 사람 ferritin은 2 종류의 subunit 즉, H (heart; heavy)형과 L (liver; light)형으로 이루어져 있는데, 조직에 따라서 그 조성 비율이 달라 여러 isoform들이 존재한다. 사람 ferritin H-와 L-chain은 서로 55% 아미노산 상동성을 가지고 있지만, 크기, 표면 전하, 면역 반응성 및 철 결합 성질 등에서 서로 다른 특징을 가지고 있다. 특히, H-chain ferritin (H-ferritin)의 경우 ferroxidase 부위가 존재하여 내공에 철을 축적하도록 촉매한다. L-chain ferritin (L-ferritin)은 저장된 철 이온의 안정화와 미네랄화 등의 기능을 가진다고 보고되었다(5-9). 세포 내에서 ferritin은 철 이온을 단백질 내에 축적함으로써 철 저장과 동시에 독성으로부터 방어 작용의 두 가지 기능을 가진다. 그리하여 ferritin은 세포 내 철 농도가 높으면 내공에 철을 저장함으로써 유리된 철과 O₂와의 반응에 의한 활성 산소종 생성으로부터 세포를 보호할 수 있다. 철을 내공에 Fe(III) 상태로 보유함으로써 철을 필요로 할 때는 10⁻³-10⁻⁵M의 범위 내에서 Fe(II) 상태로 환원시켜 공급한다 (5, 7).

이전에 효모 *S. cerevisiae*에서 사람 ferritin H- 및 L-chain 유전자를 재조합하여 성공적으로 발현하였으며, 발현된 재조합 H-ferritin은 전체 수용성 단백질 중 약 6%에 해당하였고 L-ferritin은 전체 수용성 단백질 중 약 21%에 해당하였다(10). 본 연구에서는 이들 재조합 균주에서의 철의 생체 흡수 특성을 분석하고자 반응 균체 농도, 철 화합물 종류, 철 농도 및 반응 시간 등의 조건하에서 철 흡수 반응을 수행한 후 비교 분석하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

본 실험에서 사용된 효모 숙주 세포는 *S. cerevisiae* 2805 (*MATa pep4::HIS3 prb1 Δcan1 GAL2 his3 ura3-52*)를 사용하였다(10). 형질 전환시킨 효모 균주로는 사람 ferritin H- 및 L-chain 유전자가 각각 삽입된 재조합 효모 균주 YGH2와 YGL1을 사용하였다. 대조 균주로는 ferritin 유전자가 삽입되지 않은 플라스미드 pYGT로 형질 전환된 YGT를 사용하였다. 효모 숙주 세포와 재조합 효모의 배양을 위한 일반 배지로는 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 glucose 대신에 2%의 galactose를 첨가하였다. 이전 연구에서 2% galactose를 배지에 첨가했을 때 각 효모 균주에서의 유전자 발현이 가장 효과적인 것으로 밝혀졌다(11). 각각의 효모 균주는 5 ml uracil 결핍 선별 배지에서 전배양한 후 1.0 x 10⁷ cells/ml이 되도록 희석하여 40 ml YEP

(2% galactose 함유) 배지에 희석하여 30°C, 200 rpm 조건으로 3일 동안 진탕 배양하였다. 대조균주도 동일한 조건에서 배양되었다. 배양된 효모 균체에 있어서 플라스미드의 안정성은 Shin 등(12)에서 확인되었다.

전기영동

재조합 플라스미드에 의한 효모 세포 내 ferritin 발현을 분석하기 위하여 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Laemmli의 방법(13)에 따라 수행하였다. 배양된 효모 균체는 5,000 rpm (4°C)에서 10분 동안 원심 분리하여 증류수로 2회 세척한 후 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)로 1회 세척하였다. 효모는 glass bead를 이용하여 3분 동안 파쇄하고, 10,000 ×g에서 10분 동안 원심 분리하였다. 상층액은 12% (w/v) SDS-PAGE를 수행하였고, gel은 0.2% Coomassie brilliant blue로 염색되었다. 그리고, 각 효모 세포 내 ferritin의 발현양은 densitometry (Molecular Dynamics PD-120, USA)를 이용하여 확인하였다.

재조합 효모 균체 배양에 대한 cell weight

재조합 효모 균체 배양에 대한 습윤중량 (wet cell wt)과 건조중량 (dry cell wt)과의 관계를 확립함으로써 철 흡수량의 정량 분석에 활용하였다. 실험에는 재조합 효모 균주 YGH2를 사용하였다. 앞에서 기술한 바와 같이 배양된 균체를 수확하여 증류수로 2회 세척하고 원심 분리하여 상층액을 제거한 후 습윤중량을 구하였다. 그 후, 이 균체를 항량 용기에 옮겨 105°C에서 12시간 동안 건조시키고 desiccator에서 15분간 방냉시킨 후 건조중량을 측정하였다.

재조합 효모 균주의 철 이온 흡수

재조합 미생물에 있어서 철 흡수를 유도하기 위해 uracil 결핍 최소배지에서 전배양한 효모를 YEP (2% galactose 함유) 배지에서 30°C, 3일간 배양한 후, 원심 분리 (5,000 rpm, 5 min)하여 세포들을 수확한 다음 20 mM MOPS [3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid] buffer (pH 6.5)로 2회 세척하였다. 철 흡수 실험에 MOPS buffer (pH 6.5)를 선택한 이유는 철 이온이 buffer 용액과 반응하여 착물을 형성하지 않기 때문이다(14, 15). Buffer 용액 (pH 6.5) 내에서 Fe의 산화 상태의 유지는 100 μM BPS (bathophenanthroline disulfonic acid)의 첨가와 함께 535 nm 파장에서 생성된 Fe(II) 화합물에 의한 색의 변화를 측정함으로써 확인하였다. 효모 세포들 (100 mg/mL)을 5% (w/v) glucose를 함유한 위의 완충용액에서 30분간 반응시킨 다음, 철을 첨가하여 빛이 통과하지 않는 공기 중에서 200 rpm (30°C)하에 정해진 시간 동안 반응시켰다. 철 흡수 실험에 대한 개략적인 모식도를 Fig. 1에 나타내었다. 효모 균체는 20 mM MOPS buffer에서 100 mg/ml 또는 200 mg/ml로 희석하여 반응 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 철 화합물은 (NH₄)₂Fe(SO₄)₂, FeSO₄ 및 ferric citrate이었으며, 0-14.3 mM 범위에서 수행하였다. Fe(II) 이온과의 흡수 반응시 철 용액은 N₂ 가스로 충분히 포화시킨 다음 사용하였다. 철 흡수 반응은 0-150분 동안 진행시켜 분석하였다. 반응이 끝난 효모 균체들은 5000 rpm에서 5분 동안 원심분리해서

수확한 후 증류수로 2회 세척하였다. 철 이온의 함량 분석을 위하여 질산과 염산이 5 : 2 (v/v)로 함유된 용액에서 250℃, 8시간 반응시킨 다음, 원자 흡광 광도계(SpectrAA-880, Varian)를 사용하여 철의 농도를 분석하였다.

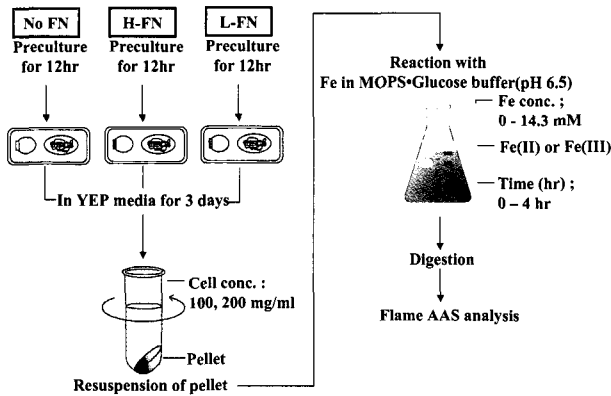


Figure 1. Schematic diagram of the iron uptake by the recombinant *Saccharomyces cerevisiae*.

결과 및 고찰

본 연구에서는 사람 ferritin H-chain 유전자를 함유한 플라스미드 pYGH2와 사람 ferritin L-chain 유전자를 함유한 플라스미드 pYGL1로 형질 전환된 재조합 효모 YGH2와 YGL1을 사용하였다(10). 실험에 사용한 각 균주에서의 ferritin 발현양을 SDS-PAGE로 확인한 결과, H-ferritin의 경우 전체 수용성 단백질 중 약 6%의 발현율을 보였으며, L-ferritin은 전체 수용성 단백질 중 약 21%에 해당하였다. 발현된 L-ferritin과는 달리 H-ferritin은 세포 내에서 철 축적의 활성을 보였다(10). 이들 재조합 균주에서의 철의 생체 흡수 특성을 분석하고자 반응 균체 농도, 철 화합물 종류, 철 농도 및 반응 시간 등의 조건하에서 철 흡수 반응을 수행한 후 비교 분석하였다. 효모를 배양함에 있어서 배지 내에 철 이온을 첨가하여 발현 유도 배양하는 경우, 철 이온의 비특이적 산화 과정으로 인한 침전물 생성과 그에 따른 세포 내 철 농도 분석시 오류 등의 문제가 제기되었다. 따라서, 본 연구에서는 균체를 배양하여 수확한 후 철 화합물과 반응시킴으로써 철 이온의 비특이적 산화 과정을 배제하였다.

재조합 효모 균체 배양에 대한 cell weight

습윤중량과 건조중량을 각각 8회 측정된 결과 건조중량은 습윤중량의 21.5% (Mean value)로 나타났다. 이 관계를 식으로 나타내면,

$$\text{Dry cell wt.} \times 1 / 0.215 = \text{wet cell wt.}$$

이 식을 적용시켜 세포 내 철 함량 분석에 활용하였다. 그리하여, ferritin 유전자가 삽입된 재조합 미생물을 이용하여 발표된 결과와 비교 분석하였다.

균체 농도에 따른 철 이온 흡수

재조합 균주 YGH2와 YGL1을 균체 농도 100 mg/ml 및 200 mg/ml에서 2시간 동안 철 이온과 반응시킨 후 분석하였다(Fig. 2). 균주 YGH2의 경우, 균체 농도 100 mg/ml에서 철 이온과 반응시킨 경우의 철 함량이 균체 농도 200 mg/ml에서의 철 함량보다 반응시킨 모든 철 농도에서 2.1-3.0배 높게 나타났다(Fig. 2A). YGH2의 균체 농도 100 mg/ml에서 세포 내 철 농도는 반응시킨 철의 농도가 4.5 mM에서 14.3 mM로 증가할 때 전체적으로 증가하는 경향을 보였다. 그리하여 14.3 mM (NH₄)₂Fe(SO₄)₂와 반응시켰을 때 세포 내 철 농도는 16.7 ± 0.7 μmol/g cell wet wt.이었다. 이때 균체 농도 200 mg/ml에서는 철 농도가 6.1 ± 0.1 μmol/g wet wt.로 흡수되는 정도가 매우 낮게 나타났다. 균주 YGL1의 경우에는 세포 내 철 농도가 반응시킨 철 농도에 따라 증가의 폭이 둔화되었다. 그리하여 14.3 mM (NH₄)₂Fe(SO₄)₂와 반응시켰을 때 세포 내 철 농도는 12.1 ± 0.9 μmol/g wet wt.이었다. 이 경우에서도 균체 농도 200 mg/ml에서는 반응시킨 철 농도에 무관하게 세포내 철 농도가 매우 낮았다(Fig. 2B).

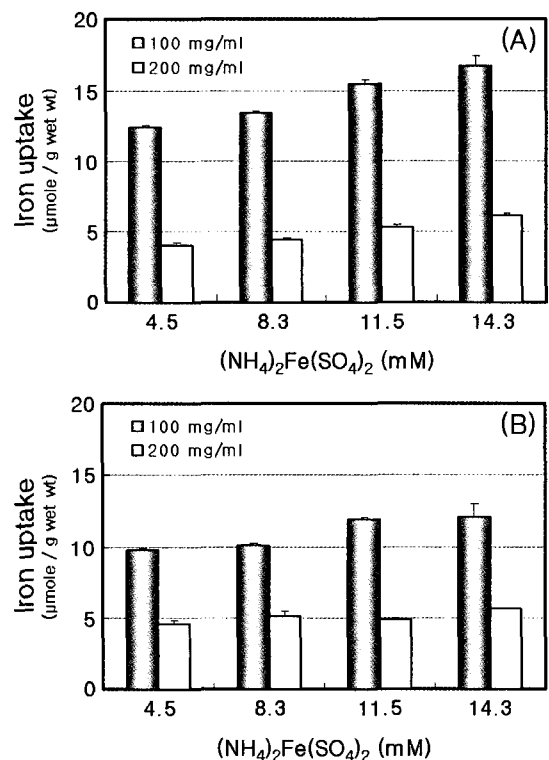


Figure 2. The iron content of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to iron reacted. Iron uptake values are expressed in micromoles per gram wet weight. Values are the means of three independent experiments ((A) YGH2 (B) YGL1).

이전에 크로마토그래피를 이용한 실험 결과로부터 재조합 효모 YGH2에 발현된 H-ferritin은 세포내에서 철 축적의 활성을 보인 반면, 재조합 효모 YGL1에 발현된 L-ferritin은 철 축적의 활성을 보이지 않았다(10). 따라서,

YGH2에 있어서 철 흡수의 증가는 세포 내 발현된 H-ferritin의 활성화에 기인됨을 유추할 수 있다.

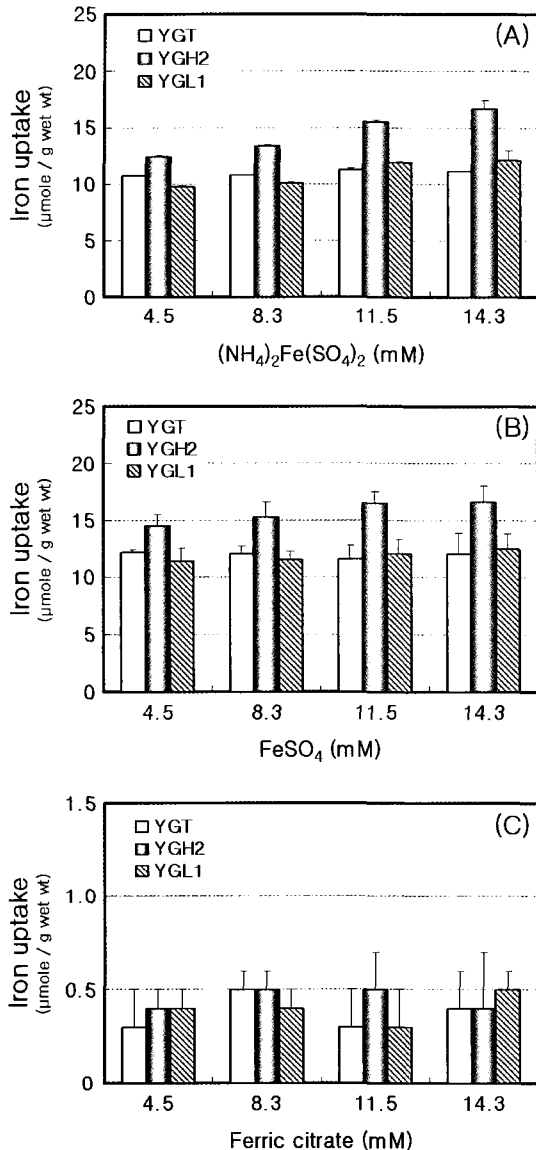


Figure 3. The iron content of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to iron reacted. Different iron compounds such as ferrous ammonium sulfate (A), ferrous sulfate (B), and ferric citrate (C) were compared in the reaction. The iron uptake experiments were performed at the cell concentration of 100 mg/ml for 2 hr. Iron uptake values are expressed in micromoles per gram wet weight.

철 화합물에 따른 철 이온 흡수

재조합 효모 균주 YGH2, YGL1 및 YGT를 배양 후, 산화 상태가 다른 철과 각각 반응시키고 세포 내 철 함량을 비교 분석하였다(Fig. 3). 에너지원인 glucose가 함유된 MOPS (pH 6.5) 용액에서 대조 균주와 재조합 균주 모두 세포내 철이 흡수되었다. 이들 세 균주를 철과 반응시키기 전의 세포내 철 농도는 모두 0.1 μmol/g wet wt.로 분석되었다. Fe(II) 화합물인 (NH₄)₂Fe(SO₄)₂의 농도를 4.5 mM에서 14.3 mM로 증가시키기에 따라 YGH2에 의해 흡수된 세

포내 철 농도도 증가하였다(Fig. 3A). 그리하여 균주 YGH2를 14.3 mM Fe(II)과 반응시켰을 때 세포내 철 농도 (16.7 μmol/g wet wt.)는 대조 균주 (11.1 μmol/g wet wt.)에 비해 약 1.5 배 높게 나타났다. 용액 내의 철 농도가 증가함에 따라 세포 내 철 농도가 증가하는 현상은 용액 내의 철 이온과 세포 내의 철 이온 사이에 일련의 평형 상태가 유지됨을 의미한다. 이 결과는 효모 *Candida sp.*에 있어서 Cu(II)와 Ni(II)의 세포 내 흡수 실험을 수행한 결과, 반응시킨 금속 이온의 농도가 증가함에 따라 세포 내 흡수량이 증가한 것과 유사하다(16). 대조 균주 YGT의 경우, 재조합 플라즈미드를 함유하고 있으나 ferritin은 발현하지 않는다. 효모 *Candida sp.*에 있어서 낮은 농도의 금속 이온에 의해 1차 적용된 균체가 금속 이온의 흡수에 있어서 적용시키지 않은 경우보다 증가된 값을 보였다(16). 이 경우 YEP 배지에 포함된 철 (0.5-0.6 μg/ml)에 의해 1차 적용된 까닭에 YGT에 있어서 세포 내 철 농도가 상대적으로 높게 분석된 것으로 생각된다. 효모 *Pichia pastoris*(17)에서 보고된 경우 (fed-batch system)와 비교해 보면 batch system임에도 불구하고 YGH2에 의해 흡수된 세포 내 철 농도가 상대적으로 증진되었음을 알 수 있다. 이 때, YGL1의 철 함량 (12.1 μmol/g wet wt.)은 대조균주에서와 유사한 값을 보였다. 특히, 철 흡수에 있어서 YGH2와 YGL1이 차이를 보이는 것은 앞에서 언급했듯이, 재조합 H-ferritin의 세포내 철 축적의 활성화 때문이다. Fe(II) 화합물인 FeSO₄와 반응시켰을 때는 (NH₄)₂Fe(SO₄)₂와의 경우와 별 차이를 보이지 않았다(Fig. 3B). 반응 용액 내에서 두 화합물에 있어서 Fe(II) 상태가 유사하게 잘 유지되었고 또한, 암모늄기가 철 이온의 이동에 영향을 끼치지 않았음을 암시한다. Fe(III) 화합물인 ferric citrate와 반응시켰을 때에는 반응시킨 모든 철 농도에서 대조 균주 및 재조합 균주 모두 철 흡수가 미미하였다(Fig. 3C). 그리하여 효모균주 YGH2에서의 Fe(II) 또는, Fe(III) 화합물에 의한 철 흡수 결과는 각각 16.7 μmol/g wet wt. 및 0.5 μmol/g wet wt.로써 Fe(II) 화합물에 의한 철 흡수 농도가 30 배 이상 높게 나타났다. 이 결과를 보면, 철 흡수에 Fe(II) 이온 상태가 Fe(III) 상태보다 훨씬 우월함을 의미한다. 효모는 외부 환경의 철 농도에 따라 서로 다른 경로로 철을 흡수한다. 이 실험에서 사용한 철 농도 (4.5-14.3 mM)의 경우, 저산화 시스템이 작동할 것으로 생각되는데 이 경우 활성화되는 Fet4p는 저산화 Fe(II) 운반 단백질이다(3). 따라서 YGH2에 있어서 Fe(II) 이온의 흡수가 활성화된 Fet4p에 의해 증진되었음을 알 수 있다.

반응 시간에 따른 철 이온의 흡수

반응 시간에 따른 효모 균주의 철 흡수 함량을 비교하기 위하여 각 균주를 14.3 mM Fe(II) 이온과 15-150분 동안 반응시킨 후, 세포내 철 함량을 분석하였다(Fig. 4). 모든 반응 시간에 있어서 YGH2 균주가 YGL1 균주나 대조 균주에 비해 세포 내 철 함량이 높게 나타났다. 철 흡수 속도를 보면 세 균주 모두 반응 초기에 빨랐으며 그 이후 속도는 다소 떨어졌으나 철 함량이 계속 증가하는 양상을 보였다. 반응 시작 후 약 120분 경에 세포내 철 함량

이 거의 최대치에 이르렀고 그 이후에는 증가폭이 둔화되거나 거의 최대치와 유사한 값을 보였다. 그리고, 이 반응 시간까지 Fe(II) 이온의 산화 상태가 그대로 유지됨을 확인하였다. 뿐만 아니라, 철 흡수 반응 후 균체를 분리하고 균체와 반응 여액내의 철 함량을 각각 분석하여 반응 초기의 철 양과 비교한 결과, 초기에 첨가된 철 양의 약 97% 이상에 달하는 값을 얻었다(data not shown). 이것은 철 흡수 실험과정 중 소실되는 철 양이 미미함을 입증한다. 최대치에 이르렀을 때의 철 함량을 보면, YGH2 균주는 약 17.0 $\mu\text{mol/g}$ wet wt.를 보였고, YGL1 균주와 대조균주 YGT는 각각 약 13.3 $\mu\text{mol/g}$ wet wt.와 12.9 $\mu\text{mol/g}$ wet wt.를 보였다. 그리하여 재조합 효모 YGL1 균주의 철 함량은 대조 균주 YGT와 거의 유사한 값을 보였다. 이 결과는 이전에 크로마토그래피 실험을 통해서 재조합 효모 YGL1 세포 내 발현된 L-ferritin이 철 저장의 활성이 없음을 밝힌 결과와 일치한다(10).

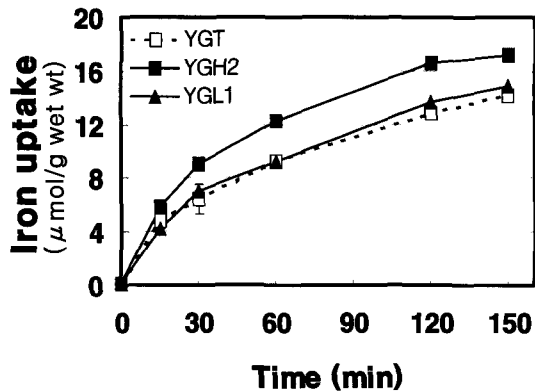


Figure 4. Time course of Fe(II) uptake by the recombinant yeasts. The reactions were performed by adding 14.3 mM FeSO_4 at the cell concentrations of 100 mg/ml.

요약

본 연구에서는 사람 ferritin H- 및 L-chain 유전자가 재조합된 효모 *S. cerevisiae*에 있어서 철의 생체 흡수 반응을 수행하였다. 재조합 효모는 2% galactose가 첨가된 YEP 배지에서 3일간 batch culture한 후, 20 mM MOPS buffer (pH 6.5)에서 반응 균체 농도, 철 화합물 종류, 철 농도, 및 반응 시간 등을 고려하여 반응을 진행하였다. 이 실험 결과, ferritin H-chain 유전자를 발현하는 균주 YGH2에 있어서 균체 농도 100 mg/ml에서 균체 농도 200 mg/ml보다 높은 철 농도를 보였다. 그리고, 철 흡수 반응에 있어서 Fe(II)의 산화 상태가 Fe(III)보다 훨씬 유리하였다. 철 농도의 증가에 따라 철 흡수량도 증가하였으며, 14.3 mM Fe(II)과 반응시 YGH2의 세포 내 철 농도는 $16.7 \pm 0.7 \mu\text{mol/g}$ cell wet wt.로 분석되었다. 철 흡수는 반응 시작 후 약 120분 경에 거의 최대치에 이르렀다.

감사

본 연구는 2003년도 과학재단 우수여성과학자 도약지원연구 과제 (R04-2002-000-00132-0)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Eide, D. J. (1998), The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Annu. Rev. Nutr.* **18**, 441-469.
- Jeane, D. F., H. Wintz, J. H. Kim, H. Poynton, T. Fox, and C. Vulpe (2003), Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies, *Biomaterials*, **16**, 185-197.
- Dix, D., J. Bridgham, M. Broderius, and D. Eide (1997), Characterization of the FET4 protein of yeast: Evidence for a direct role in the transport of iron, *J. Biol. Chem.* **272**, 11770-11777.
- Lesuisse, E., F. Raguzzi, and R. R. Crichton (1987), Iron uptake by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Involvement of a reduction step, *J. General Microbiol.* **133**, 3229-3236.
- Harrison, P. M. and P. Arosio (1996), The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation, *Biochim. Biophys. Acta.* **1275**, 161-203.
- Carrondo, M. A. (2003), Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint, *EMBO. J.* **22**, 1959-1968.
- Arosio, P. and S. Levi (2002), Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage, *Free rad. Biol. Med.* **33**, 457-463.
- Levi, S., A. Luzzago, G. Cesareni, A. Cozzi, F. Franceschini, A. Albertini, and P. Arosio (1988), Mechanism of ferritin iron uptake: Activity of the H-chain and deletion mapping of the ferro-oxidase site, *J. Biol. Chem.* **263**, 18086-18092.
- Levi, S., P. Santambrogio, A. Cozzi, E. Rovida, B. Corsi, E. Tamborini, S. Spada, A. Albertini, and P. Arosio (1994), The role of the L-chain in ferritin iron incorporation, *J. Mol. Biol.* **238**, 649-654.
- 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.
- Seo, H.-Y., E.-S. Jeon, Y.-J. Chung, and K.-S. Kim (2002), Heterologous expression of human ferritin H-chain and L-chain genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 162-168.
- 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.
- Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685.
- Aslamkhan, A. G., A. Aslamkhan, and G. A. Ahearn (2002), Preparation of metal ion buffers for biological experimentation: A methods approach with emphasis on iron and zinc, *J. Exp. Zool.* **292**, 507-522.
- Yu, Q., A. Kangdegedara, Y. Xu, and D. B. Rorabacher (1997), Avoiding interferences from Good's buffers: a contiguous series of noncomplexing tertiary amine buffers covering the entire range of pH 3-11, *Anal. Biochem.* **253**, 50-56.
- Donmez, G. and Z. Aksu (2001), Bioaccumulation of copper(II) and Nickel(II) by the non-adapted and adapted growing *Candida sp.*, *Wat. Res.* **35**, 1425-1434.
- Lee, J.-L., H.-S. Song, H.-J. Kim, J.-H. Park, D.-K. Chung, C.-S. Park, D.-J. Jeoung, and H.-Y. Kim (2003), Functional expression and production of human H-ferritin in *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Lett.* **25**, 1019-1023.