

철 결합 단백질 유전자의 발현 및
세포 내 기능조절에 관한 연구
(Studies on the expression of iron binding protein genes
and its functional regulation)

전 북 대 학 교

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “철 결합 단백질 유전자의 발현 및 세포내 기능조절에 관한 연구”과제의 보고서로 제출합니다.

2003. 7.

주관연구기관명 : 전북대학교

주관연구책임자 : 김 경 숙

연 구 원 : 장 유 정

” : 김 상 준

” : 이 기 민

” : 조 민 영

보고서 초록

과제관리번호	M1-0016-00-0029	해당단계 연구기간	2000. 8. 1. ~ 2003. 5. 31.	단계 구분	3 / 3
연구사업명	중 사업명	중점국가연구개발사업			
	세부사업명	생명현상 및 기능연구사업			
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	철결합 단백질 유전자의 발현 및 세포내 기능조절에 관한 연구			
연구책임자	김 경 숙	해당단계 참여연구원수	총 : 18 명 내부 : 1 명 외부 : 17 명	해당단계 연구비	정부: 15,000 천원 기업: 천원 계: 15,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	전북대학교 생물과학부		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위 탁 연 구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
<ul style="list-style-type: none"> - 인간 철 결합 단백질 ferritin(FN) H- 및 L-chain 유전자의 대장균 및 효모에서 활성이 있는 단백질로의 발현 - 효모에서 재조합 인간 FN H- 및 L-chain 유전자 발현의 최적화 - 효모에서 생산된 재조합 인간 H- 및 L-chain FN의 정제 및 물리화학적 특성 규명 - 효모에서 인간 FN 변이체 및 이형집합체 (H- 및 L-chain으로 구성됨)의 생산 - 효모에서 생산된 인간 FN 변이체 및 이형집합체의 특성 분석 - 재조합 효모에서 철 이온과의 흡수 반응의 특성 조사 (균체 농도, 철 산화수 및 철화합물의 종류, 철 이온의 농도, 반응시간 등) - 재조합 효모에서 증진된 철 함량과 FN 유전자의 발현과의 관계 - 효모에서 FN H- 및 L-chain의 발현 조절 과 세포 내 기능의 차이 및 조절 기전 규명 - Oxidative stress에 대한 재조합 효모의 특성 분석 - 실험동물을 이용한 철 결핍 회복효과 규명 					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	인간 페리틴 H-chain, 인간 페리틴 L-chain, 효모, 유전자 발현, 기능조절			
	영 어	human ferritin H-chain, human ferritin L-chain, yeast, gene expression, functional regulation			

여 백

요 약 문

I. 제 목

철결합 단백질 유전자의 발현 및 세포내 기능조절에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구 과제의 궁극적 목적은 효모에서 인간의 철 결합 단백질인 ferritin(FN) H-chain 및 L-chain 유전자 및 변이체 유전자를 발현시킴으로써 진핵 세포내에서 FN으로의 철 축적(accumulation) 및 FN으로 부터의 재활용(remobilization) 기작을 규명하여 세포내 기능의 조절 기전을 연구하고자 함에 있다. 이를 위하여 본 연구에서는 효모 세포 내에서의 FN의 생리적인 기능을 연구함으로써 FN의 두 subunit의 세포 내 기능을 이해하고, 이것은 H-chain 또는 L-chain FN을 철 결핍시 발생하는 빈혈치료에 활용했을 때 분자 생물학적인 이해를 가능케 할 것이다. 그리고 여러 형태의 FN 즉, H-chain과 L-chain의 함량이 서로 다른 FN을 생산하고, 이들의 세포내 기능을 분석하고 비교함으로써 세포 내에서의 기능이 서로 어떻게 조절되는지 이해하고자 한다. 효모에서의 발현 시스템은 진핵세포에 있어서 세포 기능의 조절 기전을 연구하는데 좋은 모델을 제시해 줄 것이다. 지금까지 FN의 분자 생물학적인 연구는 거의 대장균에서의 발현 시스템을 이용하였다.

식품으로부터의 철의 섭취는 제한되므로 인체는 장벽으로부터의 철의 흡수에 대한 조절기전을 갖는다. 장에서의 철의 흡수에 대하여 몇 가지 가설이 있지만 아직 철의 세포 내 경로, 산화상태, transferrin receptor 및 transferrin 등과의 관

계라든지 등에 관하여 상세히 연구되어야만 세포 내 철의 작용 메카니즘을 완전히 이해할 수 있다. 세포 내 철분 대사 기작은 iron-protein 합성과 분해, transferrin receptor를 경유한 철 흡수 및 방출, FN으로의 철 축적 및 저장 단백질로부터의 재활용 등을 포함한다. 이 대사 과정은 세포의 기능과 증식 속도에 따라 큰 차이를 보이기 때문에 철분 대사의 조절은 세포마다 개별적인 조절 시스템을 가질 것으로 보인다. FN은 철분 대사에 있어서 세포 내 철분의 농도를 조절하는 데 필수적인 단백질로서 FN의 생리적인 기능을 이해하는 것은 매우 중요하다.

효모에 있어서 철의 흡수는 ferrireductase에 의해 시작되어진다. 세포 내에서의 철은 대부분 단백질과 결합되어 있지만 ferric citrate등의 소분자와 결합되어 있기도 한다. 효모에서는 FN, transferrin 또는, transferrin receptor가 합성되지 않는다. 효모에 있어서 철 이온의 주요 저장 기관은 액포(vacuole)이며 여러 다른 이온들도 저장한다(Raguzzi *et al.*, 1988). 액포로의 철 저장에 관련된 유전자는 아직까지 확인된 바 없다. 세포 내 철 이온의 또 다른 중요한 경우는 미토콘드리아인데 이곳에서 철 이온이 heme 합성이나 non-heme 철 단백질의 합성에 사용되어진다. 미토콘드리아로의 철 흡수에 관련된 전달 단백질에 관하여 거의 알려진 바가 없으나, 효모는 FN의 생리적인 기능을 규명하는데 유리한 조건을 제공한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

세포 내 철분의 농도에 따른 조절 기작은 매우 복잡하다. 뿐만 아니라, 이 조절 기작은 세포 각각의 기능과 증식 속도에 따라 큰 차이를 보인다. 본 연구에서는 FN의 H-chain과 L-chain에 초점을 맞추었다. FN은 세포내 철분의 농도를 조절하는데 필수적인 단백질로서 FN의 두 subunit의 세포내 생물학적 기능과 그 조절 작용 메카니즘을 이해하는 것이 본 연구의 핵심이다. 이러한 연구 목표의 달성하기 위하여 본 연구는 총 3차 년도의 연구로 수행되었다. 1차년도에서는 철분 결합 단백질 FN H-chain 및 L-chain 유전자 및 돌연변이형 유전자 제조와 효모에서의 발현, 2차년도에서는 FN 항체의 형성과 효모에서 발현된 FN 유전자 산물의 확인, 단백질 정제 및 특성 규명, 3차 년도에서는 효모에 있어서 FN의 발현 조절 및 세포내 기능의 조절 기전 규명을 연구하였다.

IV. 연구개발결과

인간 철 결합 단백질 FN H-chain 및 L-chain 유전자를 분리하여 대장균 및 효모에서의 발현 백타를 제조하였다. 그리고 돌연변이형 유전자 제조와 효모에서의 형질전환체를 획득하였다. 그리하여 단백질의 발현양이 증진된 재조합 효모 균주는 물론, 철 함량이 증진된 효모 균주를 개발하였다. 이렇게 제조된 재조합 대장균에서 H-FN (H-chain FN) 및 L-FN (L-chain FN)을 분리·정제하여 두 단백질에 대한 FN 항체를 형성하고 효모에서의 발현된 FN 유전자 산물을 확인하였다. 재조합 효모에서 발현된 H-FN 및 L-FN 단백질을 정제하고 단백질은 물론 단백질 내 biomineral에 대한 물리·생화학적 특성을 각종 기술을 이용하여 규명하였다. 재조합 H-와 L-ferritin을 생산하는 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.

인간 FN 이형집합체를 효모에서 생산하고자 양방향 promoter 하류에 인간 FN H-chain 유전자(*hfH*) 및 L-chain 유전자(*hfL*)를 교대로 삽입하여 재조합 plasmid를 구축하고, 이들을 *S. cerevisiae* 2805에 형질 전환시켜 외래 유전자를 성공적으로 발현시켰다. H와 L subunit의 총 발현양은 각각 전체 수용성 단백질의 약 20%와 15%에 해당하였다. 각 균주에 있어서 H subunit의 상대적인 발현양은 각각 22%와 38%이었으며, 발현된 H 및 L subunit들은 자발적으로 holoprotein으로 조합되어 졌다. 재조합 효모 균주 Y1H10L과 Y1L10H를 14.3 mM Fe^{2+} 와 반응시켰을 때, 세포 내 철 함량은 각각 24.9 $\mu\text{mol/g(wet wt)}$ 과 28.2 $\mu\text{mol/g(wet wt)}$ 이었고 야생형 효모 균주에 있어서는 12.0 $\mu\text{mol/g(wet wt)}$ 이었다. 이 값은 인간 FN 유전자를 효모 균주에 발현시킴으로써 효모의 철 함량이 각각 2.1 배, 2.4 배 증진되었음을 보인다.

Ferroxidase 활성 부위(Gly-62, His-65)를 치환시킨 재조합 H- 및 L-FN의 변이체를 효모로부터 정제하여, 철 흡수 속도를 측정하였다. 철 흡수에 있어서 변이

체의 철 흡수 속도가 야생형에 비해 감소하였으며 특히, 이 반응에 있어서 Gly-62 잔기가 His-65 잔기보다 더 큰 영향을 보였다. 생체내에서 FN이 isomer 형태 즉, H와 L subunit의 조성비가 조직에 따라 각기 어떻게 조절되는지 이해하고자 하였다. 예를 들면, 심장조직의 FN은 H subunit의 비율이 높으며, 간 조직의 FN은 L subunit의 비율이 훨씬 높다. 그리하여 여러종류의 H- 또는 L-FN 동형집합체, 이형 집합체 및 변이체 등을 효모에서 생산할 수 있는 시스템을 구축하고, 그 기능이 세포내에서 어떻게 차이가 나는지 확인하였다. 효모에서 재조합 H 및 L-FN의 이형집합체를 생산하도록 시스템을 구축한 경우, 동일한 유전자 배열에 의해서도 생육 조건에 따라 각기 서로 다른 subunit 조성비를 보였다. 이들 isomer 들은 철 축적이나 ascorbate에 의한 영향에서도 차이를 보였다.

효모에 있어서 H-FN 및 L-FN의 발현량과 철 이온과의 반응의 조건(세포의 농도, 반응시간, 철화합물의 종류, 철의 산화상태)에 따른 특성을 조사하여 재조합 단백질의 세포내 기능을 조사하였다. 재조합 효모는 세포의 농도에 따라 철 축적에 큰 차이를 보였으며, 100 mg/ml의 균체 농도에서 철 축적이 유리하였다. Fe^{2+} 상태의 철이 세포내 흡수에 매우 유리하였으며, ferrous sulfate와 ferrous ammonium sulfate는 유사한 결과를 보였다.

철 결핍을 유도한 흰 쥐 모델을 사용하여 H-FN을 생산하는 재조합 효모에 의해 철 결핍이 회복됨을 확인하였다. 이것은 H-FN을 생산하는 재조합 효모나 말비장 FN을 공급한 경우에 철화합물을 공급한 경우보다 철 결핍 회복에 더 효과적으로 활용할 수 있음을 증명한다. 효모를 ascorbate와 같이 공급한 경우에는 철 저장에 비해 철 이온의 세포내 유용율을 높이는 것으로 보인다. 또한, H-FN을 생산하는 효모에 있어서 oxidative stress(H_2O_2 , menadione)에 대한 susceptibility는 L-FN을 생산하는 효모와 서로 다르게 나타났다. 이것은 이 단백질의 생리적 기능과 밀접한 관련이 있는 것으로 유추되며, 앞으로 이들 균주에서 황산화 효소의 활성도 차이를 분석함으로써, 그 까닭을 좀더 명확히 이해할 수 있을 것이다. H-FN 동형집합체는 H 및 L 이형집합체와 유사하게 세포 내에서 철 축적활성이 있다. 반면에 L-FN 동형 집합체는 세포내에서 활성이 거의 없으며, FN에 있어서 철흡수의 기능은 H subunit의 함량비와 밀접한 관련을 보였다. 이것은 이 단백질의 기능에 H-subunit이 modulator로써 작용함을 의미한다.

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구 과제에의 결과를 통하여 다음과 같은 활용 방안을 기대할 수 있다.

1. 분자의 안정성이 뛰어난 철 단백질에 의해 철 이온의 함량이 증진된 효모를 개발함으로써 의약품 원료나 식품첨가물로 활용할 수 있다.
2. 소, 닭, 돼지와 같은 가축에 사료 첨가제로 활용함으로써, 잡식성의 동물에게는 철분 보강을 피하고, 채식성의 동물에 있어 흔히 나타나는 철 결핍 회복을 유도할 수 있다. 이것은 철 보강으로 불임개선, 면역 증강 등의 부가 효과도 얻게 한다.
3. 재조합 효모 균주의 철 이온과의 축적 경로를 이해함으로써 재조합 효모 균주의 철 이외의 중금속 원소와의 축적을 연구하고, 나아가 bioremediation에의 활용을 가능케 함으로써 환경 오염을 해결하는데 크게 기여할 것이다.
4. 세포내에서 활성이 있는 철 결합 단백질을 발현시킴으로써 효모 세포를 이용하여 철 이온과 oxidative stress와 관련된 새로운 단백질을 찾는 데 있어서 본 연구 결과가, 크게 활용될 것이다.

S U M M A R Y

Iron is an essential trace element for most living organisms. At physiological pH, Fe^{2+} and Fe^{3+} are the normal oxidation states, with Fe^{2+} being readily oxidized by oxygen to Fe^{3+} . Fe^{3+} is extremely insoluble and tends to form insoluble hydroxides. Fe^{3+} is handled by specific transport and storage proteins, transferrin and ferritins.

Ferritin is the major intracellular iron storage protein. The protein is found in all living kingdoms. Its ability to sequester iron gives ferritin the dual function of iron reserve and supply. The other major cellular function is to prevent cells from toxicity that is caused by intracellular free iron. Ferritin consists of a hollow protein shell (apoferritin) of 24 subunits and an core capable of storing up to 4500 Fe(III) atoms. In mammalian ferritins, there are two main subunits known as H (heavy; heart) and L (light; liver). The amino acid sequences of the two subunits show about 54% identify. Tissue ferritins are composed of a mixture of isoferritins with a range of subunit compositions. Because of these heterogeneity functional differences of the two subunits are less understood.

Genes encoding ferritin subunits have been isolated from a wide range of sources including human, animals, amphibia, plants and bacteria. In yeast, it is well known that iron is an essential element for the growth. Iron requires a specific organic ligand for its dissolution and subsequent transport. In this aspect of metal ion regulation, a number of identified proteins are located mainly in the plasma membrane of yeast. In the cytoplasm UTR1 is only known to involve in the iron metabolism of yeast. In *Saccharomyces cerevisiae* the cells do not produce ferritin. The major iron storage compartment is the vacuole, the vacuolar iron can be mobilized and utilized by the cell.

In order to evaluate physiological significance of mammalian ferritin H- and

L-chains, we utilized the yeast expression system as *Saccharomyces cerevisiae* 2805 do not produce ferritin. Human ferritin H- and L-chain genes(*hfH* and *hfL*) were expressed under the control of various promoters and a GAL1 promoter resulted in the highest expression in *S. cerevisiae*. Recombinant H- and L-ferritin homopolymers were successfully produced in the cells. Enhanced expression of the human ferritin H- and L-chain genes was also achieved in yeast by modifying the N-terminal region of the structural genes. In this report we examined the iron-carrying capacity and factors affecting the amount of iron uptake by the transformed cells. The study leads comparison of iron incorporation by H- or L- ferritins *in vivo*.

The *hfH* and *hfL* were cloned into the yeast shuttle vector YEp352 with galactokinase 1(GAL1) and GAL 10 divergent promoters, and the vectors constructed were used to transform *Saccharomyces cerevisiae* 2805. It enabled to produce recombinant human H- and L-ferritin heteropolymers as proven by SDS-PAGE. Ferritin H and L subunits, produced as ca. 20%, 15% of the soluble proteins in the transformed cells Y1H10L and Y1L10H, were spontaneously assembled into ferritin heteropolymers. The H subunit content of the recombinant human ferritin heteropolymers was analyzed to be 22 and 38% for Y1H10L and Y1L10H, respectively. Both recombinant H and L-chain ferritins were catalytically active in forming iron core.

Recombinant human H- and L-ferritin variants were produced by the substitution of the proposed ferroxidase active sites, i.e. Gly-62, His-65. Among the ferritin variants, H-62K and H-KG showed a significant decrease in the initial iron uptake rate compared to the wild type.

When the cells were cultured in the medium containing 10 mM ferric citrate, the cell-associated concentration of iron was 174.9 μg per gram(dry cell weight) for the recombinant yeast YG-H and 148.8 μg per gram(dry cell weight) for the recombinant yeast YG-L but was 49.4 μg 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.

Furthermore, iron uptake was performed in the cultured cells and reaction parameters affecting the rate and amount of iron uptake by *S. cerevisiae* were examined. These included the concentration of cells, oxidation states of Fe, Fe complexes and reaction times. When the cells were incubated with 14.3 mM ferrous sulfate, the cellular iron concentration was 17.8 $\mu\text{mol/g}$ wet wt for YGH2, 12.4 $\mu\text{mol/g}$ wet wt for YGL1 and 12.9 $\mu\text{mol/g}$ wet wt for YGT. In heteropolymer, this value was increased to be 27.5 μg per gram(wet cell weight) for the recombinant yeast Y1L10H and 28.2 μg per gram(wet cell weight) in the Y1H10L, indicating that the iron contents of yeast are improved about 2 times by heterologous expression of human ferritin H- and L-chain genes. Ascorbate somewhat increases the iron uptake in the recombinant yeasts. Therefore, human ferritin heteropolymers were produced for the first time in *S. cerevisiae* and iron enrichment was further achieved by establishing the iron uptake method. It was also determined whether the iron enrichment of the recombinant microbes is due to the expressed ferritin in *S. cerevisiae*.

Rats induced anemic by iron-deficient diets were treated with equivalent amounts of iron as ferrous ammonium sulfate, horse spleen ferritin or iron-enriched recombinant yeast. Full recovery from anemia and increased tissue iron occurred in our experiments, indicating that iron-enriched yeast could contribute to worldwide problem of iron-deficient anemia. The production of an iron enriched food additive is of commercial use. As such, the iron fortified recombinant yeast can be used in livestock feeds for poultry, domestic animals and a food supplement for humans.

On the basis of our results that human ferritins are active in the transformed cells, we applied oxidative stress using H_2O_2 or a superoxide generating agent menadion to the transformed cells to examine how yeasts response to oxidative stress. Treatment of yeast cells (YGT, YGH2 and YGL1) of exponential-phase with H_2O_2 resulted in differences in susceptibility to H_2O_2 .

The YGH2 producing ferritin H-chain was very sensitive at low concentrations of H_2O_2 and more susceptible than YGL1. However, such

variance was not observed in the cells treated with menadione and all cells grown until stationary phase($OD_{600}=2$) were more susceptible to menadion than those grown until exponential phase($OD_{600}=0.3$). This phenomenon is in contrast to the results obtained from the H_2O_2 stress. The reason is not clear at this point and further studies on analyzing activities of antioxidant enzymes in the cells which are susceptible to the oxidative stress are underway.

In summary, we manipulated several kinds of human ferritin H- and L-chain homopolymers and heterpolymers in *S. cerevisiae*. By investigating their cellular functions and comparing them we tried to understand how the tissue isoferritins are formed to function their specific roles at their locations. For example, H-chain composition is much higher in ferritin present in heart, whereas L-chain composition is far higher in ferritin present in liver. In the present study we could analyze capacity of iron accumulation, effect of ascorbate on iron uptake, susceptibility to oxidative stress and other cellular characteristics in those recombinant yeasts and these provide us to more understanding on the iron storage and iron metabolism in eukaryotes.

C O N T E N T S

Chapter 1. Overview of the research proposal	16
Chapter 2. State of the arts	18
Chapter 3 Contents and results of research	
A. Experimental Methods	
(1) Production of human ferritin heteropolymers and its iron uptake in <i>E. coli</i>	20
(2) Expression of human ferritin H- and L-chain genes in yeast and characterization of the recombinant ferritin homopolymers	22
(3) Production of the human H- and L-chain ferritin variants in yeast	26
(4) Enhanced expression of human ferritin H-and L-chain genes in yeast, and its characterization	28
(5) Characterization of iron accumulation in the recombinant <i>S. cerevisiae</i> producing human ferritins and its application on recovering from iron deficiency	32
(6) Effect of oxidative stress on the recombinant <i>S. cerevisiae</i> that producing human H- and L-chain ferritins	34
B. Results	
(1) Production of human ferritin heteropolymers and its iron uptake in <i>E. coli</i>	35
(2) Expression of human ferritin H- and L-chain genes in yeast and characterization of the recombinant ferritin homopolymers	41
(3) Production of the human H- and L-chain ferritin variants in yeast	50

(4) Enhanced expression of human ferritin H-and L-chain genes in yeast, and its characterization	52
(5) Characterization of iron accumulation in the recombinant <i>S. cerevisiae</i> producing human ferritins and its application on recovering from iron deficiency	64
(6) Effect of oxidative stress on the recombinant <i>S. cerevisiae</i> that producing human H- and L-chain ferritins	72
Chapter 4 Accomplishments and contribution to the society	77
Chapter 5 Plans for the use of R&D results	80
Chapter 6 Research trends of world frontiers	81
Chapter 7 References	83

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	16
제 2 장 국내외 기술개발 현황	18
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	
가. 실험방법	
(1) 대장균을 이용한 인간 ferritin(FN) 이형집합체의 생산 및 활성화도 연구	20
(2) 재조합 효모를 이용한 인간 H- 및 L-chain FN(H- & L-FN)의 생산 및 재조합 H- 및 L-FN의 특성 연구	22
(3) 효모에서 재조합 효모를 이용한 인간 H- 및 L-chain FN의 변이체 생산	26
(4) 효모에서 인간 FN H- 및 L-chain 유전자의 과발현 균주, 이형집합체의 개발과 생육특성	28
(5) FN을 생산하는 효모 균체에 있어서 철 축적의 특성 및 흰쥐에 있어서 철 결핍 회복에의 효과	32
(6) 인간 H- 및 L-chain FN을 생산하는 재조합 효모에 있어서 oxidative stress에 대한 영향	34
나. 실험결과	
(1) 대장균을 이용한 인간 FN 이형집합체의 생산 및 활성화도 연구	35
(2) 재조합 효모를 이용한 인간 H- 및 L-chain FN의 생산 및 재조합 H- 및 L-FN의 특성 연구	41
(3) 효모에서 인간 H- 및 L-chain FN 변이체의 생산 및 재조합 H- 및 L-FN의 기능 연구	50
(4) 효모에서 인간 FN H- 및 L-chain 유전자의 과발현 균주, 이형집합체의 개발과 생육특성	52

(5) FN을 생산하는 효모 균체에 있어서 철 흡수의 최적화 및 환귀에 있어서 철 결핍 회복에의 효과	64
(6) 인간 H- 및 L-chain FN을 생산하는 재조합 효모에 있어서 oxidative stress에 대한 영향	72
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	77
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	80
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	81
제 7 장 참고문헌	83

제 1 장 연구개발과제의 개요

본 연구 과제의 궁극적 목적은 효모에서 인간의 철 결합 단백질인 ferritin(FN) H-chain 및 L-chain 유전자 및 변이체 유전자를 발현시킴으로써 진핵 세포내에서 FN으로의 철 축적 및 FN으로부터의 재활용 기작을 규명하여 세포내 기능의 조절 기전을 연구하고자 함에 있다. 이를 위하여 본 연구에서는 효모 세포 내에서의 FN의 생리적인 기능을 연구함으로써 FN의 두 subunit의 세포 내 기능을 이해하고, 이것은 H-chain 또는 L-chain FN을 철 결핍시 발생하는 빈혈치료에 활용했을 때 분자 생물학적인 이해를 가능케 할 것이다. 인간의 경우, FN은 거의 모든 조직에 존재하는데 조직에 따라 subunit의 함량비가 다르며 이것은 subunit의 기능과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다. 각 조직에 있어서 FN의 발현 시 번역 단계에서 그 조절이 있을 것으로 유추되었으나, 포유동물에 있어서 세포의 종류, 기능 및 증식 속도에 따라 철 대사 기전이 다르기 때문에 효모에서의 발현 시스템은 진핵세포에 있어서 세포 기능의 조절 기전을 연구하는데 좋은 모델을 제시해 줄 것이다. 지금까지 FN의 분자 생물학적인 연구는 거의 대장균에서의 발현 시스템을 이용하였다.

철(Fe)은 세포에서의 기본적인 대사 과정에 필수 불가결하다. 철은 호흡계에서 전자 운반체로 작용하며 고등동물에서는 분자상의 산소를 운반한다. 이들 양 기능을 나타내는 것은 철이 서로 다른 산화상태로 착물을 형성하여 존재하기 때문이다. 체내의 철 이온의 대부분은 두 종류의 단백질과 결합되어 있는데 그 하나는 heme 단백질이고, 다른 하나는 철 저장 및 운반 단백질이다. 이 중 철 저장 또는 결합 단백질인 FN은 거의 모든 조직에 존재하나 특히, 간, 비장 및 골수에 많이 함유되어 있다. FN은 apoferritin과 콜로이드성 수산화제2철-인산제2철 복합체의 micelle로 구성된, 수용성이며 결정성인 단백질이다. FN내에 저장된 철 이온은 3가의 상태로 저장되나 세포 내에서 철이 요구되어질 때 2가의 상태로 방출된다.

인체는 파괴된 적혈구로부터 얻어지는 철을 효율적으로 재이용한다. 그 결과 1인당 철 권장량은 낮아서 연령에 따라 차이가 있으나 남녀 모두 10-18 mg인데, 그 중의 5-10% 만 흡수된다. 그 외의 철은 세포괴사, 출혈, 생리 및 담즙 등의 분비물로 상실된다. 남자보다 여자의 경우 사춘기이후 생리등으로 1인당 1.2-1.8 mg 이 상실된다. 대개의 경우 음식물이 철의 공급원인데, 철분의 함량이 많다고 해서

반드시 흡수율이 높은 것은 아니다. 식품으로부터의 철의 섭취는 제한되므로 인체는 장벽으로부터의 철의 흡수에 대한 조절기전을 갖는다. 장에서의 철의 흡수에 대하여 몇 가지 가설이 있지만 아직도 철의 세포 내 경로, 산화상태, transferrin receptor 및 transferrin 등과의 관계라든지 등에 관하여 상세히 연구되어야만 세포 내 철의 작용 메카니즘을 완전히 이해할 수 있다. 세포 내 철분 대사 기작은 iron-protein 합성과 분해, transferrin receptor를 경유한 철 흡수 및 방출 및 FN으로의 철 축적 및 저장 단백질로부터의 재활용 등을 포함한다. 이 대사 과정은 세포의 기능과 증식 속도에 따라 큰 차이를 보이기 때문에 철분 대사의 조절은 세포마다 개별적인 조절 시스템을 가질 것으로 보인다. FN은 철분 대사에 있어서 세포 내 철분의 농도를 조절하는 데 필수적인 단백질로서 FN의 생리적인 기능을 이해하는 것은 매우 중요하다.

효모에 있어서 철의 흡수는 ferrireductase에 의해 시작되어진다. 세포 내에서의 철은 대부분 단백질과 결합되어 있지만 ferric citrate등의 소분자와 결합되어 있기도 한다. 효모에서는 FN, transferrin 또는, transferrin receptor가 합성되지 않는다. 효모에 있어서 철 이온의 주요 저장 기관은 액포(vacuole)이며 여러 다른 이온들도 저장한다(Raguzzi *et al.*, 1988). 액포로의 철 저장에 관련된 유전자는 아직까지 확인된 바 없다. 세포 내 철 이온의 또 다른 중요한 경우는 미토콘드리아인데 이곳에서 철 이온이 heme 합성이나 non-heme 철 단백질의 합성에 사용되어진다. 미토콘드리아로의 철 흡수에 관련된 전달 단백질에 관하여 거의 알려진 바가 없으나, 효모는 FN의 생리적인 기능을 규명하는데 유리한 조건을 제공한다.

세포 내 철분의 농도에 따른 조절 기작은 매우 복잡하다. 뿐만 아니라, 이 조절 기작은 세포 각각의 기능과 증식 속도에 따라 큰 차이를 보인다. 본 연구에서는 FN의 H-chain과 L-chain에 초점을 맞추었다. FN은 세포내 철분의 농도를 조절하는데 필수적인 단백질로서 FN의 두 subunit의 세포내 생물학적 기능과 그 조절 작용 메카니즘을 이해하는 것이 본 연구의 핵심이다. 이러한 연구 목표의 달성하기 위하여 본 연구는 총 3차 년도의 연구로 수행되었다. 1차년도에서는 철분 결합 단백질 FN H-chain 및 L-chain 유전자 및 돌연변이형 유전자 제조와 효모에서의 발현, 2차년도에서는 FN 항체의 형성과 효모에서 발현된 FN 유전자 산물의 확인, 단백질 정제 및 특성 규명, 3차 년도에서는 효모에 있어서 FN의 발현 조절 및 세포내 기능의 조절 기전 규명을 연구하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

철 결합 단백질은 세포 내에 많이 발현되어도 독성이 없으며, 필수 미량금속 원소를 보유하여 필요시 제공할 수 있는 특성이 있다. 철 결합 단백질 (human FN)은 분자량이 매우 큰 분자로서 그동안 분자 수준에서 많은 연구가 이루어져 왔다(Harrison & Arosio, 1998). 그리하여 FN의 분자적 특성이 밝혀짐에 따라 이 단백질의 유용성이 주목을 받게 되었다.

기능적으로 활성을 가지는 FN분자는 24개의 subunit이 432 대칭축으로 조합되어 구성된 구형의 단백질이다. FN holoprotein분자는 8개의 3-fold 친수성 통로와 6개의 4-fold 소수성 통로가 존재하여 철 원자의 출입에 관여한다. FN subunit은 보통 H-chain과 L-chain의 두 가지 형태가 있으며 이들 subunit의 아미노산 서열 및 그 기능에는 차이가 있다(Harrison et al., 1989; Arosio et al., 1978). 따라서 FN 분자의 기능은 H 또는 L subunit의 구성 비율의 영향을 받는다. 예를 들어서 H-chain (Heart 또는 Heavy 형)은 분자량이 약 21 kDa이며, 심장에서 비교적으로 다량으로 관찰된다. 또한 L-chain (Liver 또는 Light 형)은 약 19 kDa이다. 이 두가지 subunit은 모두 6 helix와 1 loop으로 구성된다. 그러나 H와 L subunit의 아미노산 서열을 비교해보면 그 상동성은 50-60 % 정도이며, 세포내 철 농도 조절 과정에서 H subunit은 L subunit과 달리 Sf-21 세포 성장에 억제효과가 있다고 보고되었다(Guo 등, 1998).

이러한 다양성은 있으나 많은 생명체에 있어서 FN 분자의 작용은 다량의 철을 그 안에 보유하여, 철을 필요로 하는 기관에 운반함으로써 생리학적 상태에서 철의 공급원이 되는 것은 잘 알려져 있다. 구조적으로 봐도 여러 동물들 유래의 FN subunit의 상동성을 살펴보면, 말, 사람, 쥐, 토끼 사이의 L-chain subunit에서 85 % 이상이며, 말, 쥐, 닭의 H-chain subunit의 상동성도 80 %이상에 이르고 철의 공급원으로서의 기능은 매우 일반적이라고 할 수 있다. 실제 FN은 5 가지 전체 생명체 Kingdom에 존재한다(Theil 등, 1987). 현재까지 박테리아 및 동.식물 등 여러 생명체에서 FN 유전자가 분리되어 그 염기서열이 밝혀졌다.

이러한 유용성이 높은 FN 단백질은 인간의 FN H subunit이 대장균에서 발현된 보고 등 (Levi 등, 1978; Prozzi 등, 1988) 유전 공학적 방법으로 대량생산되어

그 특성의 연구 및 활용을 위한 연구가 진행되고 있다. 사람 FN L-chain의 N-말단 아미노산을 유전공학적 기술로 변형시켜 대장균에서 대량 발현하는 등 단백질의 구조 및 기능의 관련성을 연구한 보고도 있다.

한편 본 연구 과제와 관련하여 본 연구진은 FN을 이용한 질병의 진단법 및 치료법의 개발에 관심을 가지고 이를 위해 tadpole FN H-chain 및 L-chain 유전자를 재조합하여 생체내 시스템인 대장균에서 대량 발현시켰으며 *in vivo*에서 그 생육의 특성을 조사하였다. 또한 이 유전자들로부터 합성되어진 각 단백질의 안정성 및 철 흡수 능력등을 조사하였다. 그 결과 H-chain 유전자만 포함한 경우나 H- 및 L- chain 유전자를 모두 갖는 경우에서만 철 흡수 능력을 나타냈으며 L-chain 유전자만을 포함하고 있는 경우에는 이 능력을 나타내지 않았다. 이는 FN H-chain 유전자 산물이 L-chain 유전자 발현 조절에 modulator로 작용할 수 있음을 시사한다. 이 사실은 Harrison 등의 *in vitro* 실험 결과와 일치하는 것이다. 현재 생합성 되어진 L-chain FN의 iron uptake 능력을 향상시키는 방법 (ceruloplasmin, ascorbic acid 또는 desferrioxamine 등의 첨가)이 연구되고 있다.

현재까지 사람 FN 유전자를 효모에서 발현시킨 연구는 없다. 본 연구에서는 사람 FN H-chain 및 L-chain 유전자를 효모에 도입하고 생산하여 이 단백질에 있어서 각 subunit의 생리적인 기능을 규명하고 철 대사기전을 밝히고자 한다. FN이 생리적인 기능을 갖기 위해서는 24개의 subunit이 구형으로 서로 조합되어져야만 하고 효모에서 잘 일어나는 glycosylation이 방해가 되지 않아야 한다. 뿐만 아니라, 외래 유전자의 숙주가 될 효모에 있어서 도입된 FN 유전자의 발현율이 높은 것이 요구된다.

국내의 철 결핍성 빈혈 빈도(FN 수치기준)는 성인 남자 4.7%, 성인 여자 4.5%, 10대 남자 2.5%, 10대 여자 5.9%로서 선진국의 경우보다 상당히 높다. 이 빈혈의 치료제로서 현재 시판되고 있는 철분 제제(FeSO_4 , ferrous ammonium citrate, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 등)는 단백질 침전 작용이 있고 소화기계에 부작용이 있으며, 또한 FN을 포함하는 철분 제제인 말의 비장 FN은 거의 수입에 의존하고 있고 FN의 체내 흡수율등에 관한 정보는 전무한 상태이다. 그리하여 국내 기술에 의한 FN 제제로의 전환이 요구되며 FN에 의한 빈혈치료의 분자생물학적인 연구가 절실히 필요한 실정이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

가. 실험방법

(1) 대장균을 이용한 인간 ferritin(FN) 이형집합체의 생산 및 활성화도 연구

(1)-1. 균주 및 플라스미드

Plasmid 증식 및 대량 추출을 위한 숙주로는 *E. coli* JM109를 사용하였다. 유전자 재조합을 위하여 plasmid pUC18과 pACY184를 벡터로 사용하였으며, tac promoter가 들어있는 pVUCH-1은 우석대 오석홍 교수로부터 얻었다. Bacto-ager, bacto-trypton, yeast extract 등은 Difco에서 구입하였으며, 제한 효소들은 bio-rad, pharmacia, sigma에서 구입하였다. 재조합된 plasmid인 pVUHFH, pVHFH-L, pVHFL-H, pVUHFH/pACHFL, pVUHFL/pACHFH를 가지는 균주는 각각 HFH, HFL, H-L, H/L, L/H로 명명하였다.

(1)-2. 발현 벡터의 제조

인간 FN H- 및 L-chain을 코딩하는 유전자 (*hfH* and *hfL*)를 얻기 위해 인간의 간 cDNA 라이브러리에서 중합연쇄반응 방법으로 증폭한 후 먼저, 대장균에 클로닝하여 발현 벡터 pVUHFH와 pVUHFL를 제조하였다. 대장균 내에서 FN 동형 또는 이형집합체를 발현시키기 위하여, 여러 발현시스템을 적용하였다 (Fig 1). Plasmid pVUCH-1은 인간 FN 유전자를 발현시키기 위한 발현 벡터로 사용하였다. EcoR I/ Hind III의 제한효소 부위를 갖는 인간 FN H-chain 유전자를 얻은 후, pVUCH-1에 삽입하였으며, 이 plasmid를 pVUHFH로 명명하였다. 또한 인간 FN L-chain 유전자의 경우도 제한효소 EcoR I/Sma I 부위를 잘라 얻은 다음 벡터에 삽입하여 pVUHFL라고 명명하였다. 두 유전자가 동일 대장균 균주 내에서 발현되도록 각각을 교대로 재조합 하여, *hfH-hfL*, *hfL-hfH*의 유전자 배열이 되도록 하였다. 이러한 작업을 통하여 얻어진 plasmid를 각각 pVHFH-L, pVHFL-H라 명명하였으며, 발현 plasmid는 모두 IPTG에 의하여 발현이 유도될 수 있도록 하였다.

(1)-3. FN 이형 집합체의 발현

인간 FN H 및 L-chain 유전자를 대장균 내에서 발현시킬 수 있도록 하기 위

하여 plasmid pVUHFH, pVUHFL, pVHFH-L, pVHFL-H, pVUHFH/pACHFL, pVUHFL/pACHFH를 대장균 안으로 형질전환시켰다. Ampicillin (50 μ g/ml) 혹은 chloramphenicol (34 μ g/ml)이 들어있는 LB 배지에서 37°C, 16시간동안 키워진 대장균은 0.1mM IPTG를 첨가하여 4시간동안 배양하여 인간 FN 유전자가 잘 발현될 수 있도록 하였다. 대장균을 원심분리를 이용하여 수확한 다음 단백질의 발현 양상을 SDS-PAGE와 non-denaturing gel을 이용하여 확인하였다. SDS-PAGE를 위한 시료는 SDS-gel loading buffer와 섞은 후 100°C에서 10분 동안 가열한 후 원심 분리하여 사용하였다. 75°C에서 10분간 열처리하여 부분적으로 정제된 FN 단백질도 SDS-gel loading buffer와 섞은 후 100°C에서 10분 동안 가열한 후 원심 분리하여 사용하였다. FN 유전자의 발현 정도는 densitometry (Molecular Dynamics PD-120, USA)를 이용하여 분석하였다 .

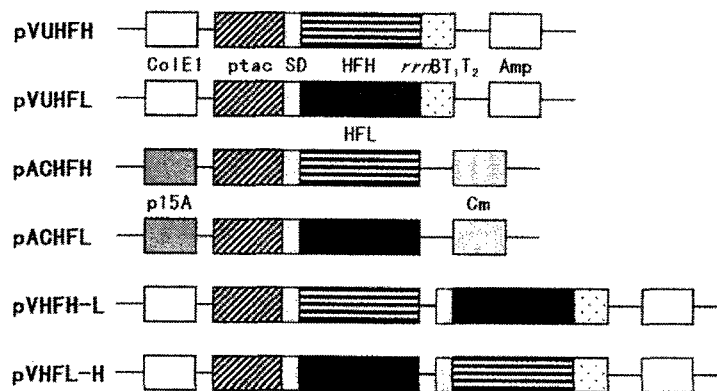


Fig. 1. Schematic diagram of the plasmids constructed. Line represents the plasmid DNA and the boxes represent the gene or their corresponding functional domains.

(1)-4. Western blotting

인간의 간에 있는 FN (85% L-chain, 15% H-chain)을 토끼에 주입하여 항체를 형성하게 하여 토끼의 피로부터 항체를 얻었다. 일반적인 Western blotting 과정은 Burnette(1981)의 과정에 준하여 실험하였다.

(1)-5. 철 결합 단백질의 확인

재조합 대장균을 selection marker로 ampicillin 혹은 chloramphenicol를 첨가한 5ml LB 배지에 접종하여 37°C에서 하룻밤 전배양하였다. 이것을 2mM Fe-nitrilotriacetic acid(NTA)를 첨가한 300ml LB배지에 transfer 한 후 37°C에서 4시간 키웠다. FN은 0.1mM IPTG를 첨가하여 induction하여 4시간 더 배양하였다. 균체를 수확한 후 20mM Tris-HCl(pH 7.4)로 washing하였다. 세포 파쇄물들의 aliquot는 Sephacryl S-300 (2.6×100 cm) 크로마토그래피를 수행하였다. 각각의 모든 분획들은 원자흡광광도계(SpectrAA-880, Varian)를 사용하여 철 함량을 분석하였다.

(2) 재조합 효모를 이용한 인간 H- 및 L-chain FN(H- & L-FN)의 생산 및 재조합 H- 및 L-FN의 특성 연구

(2)-1. 사용 균주 및 plasmid

Plasmid 증식 및 대량 추출을 위한 숙주로는 *E. coli* JM 109를 사용하였다. 인간 FN 유전자 발현을 위한 효모 숙주 세포로는 *S. cerevisiae* 2805 (MAT α *pep4:: HIS3 prb1 Δcan1 GAL2 his3 ura3-52*)를 사용하였다. 유전자 재조합 plasmid는 yeast shuttle vector인 YEp352를 사용하였다. 인간 *hFH* 및 *hFL*를 포함하는 DNA 단편은 pVUHFH와 pVUHFL로부터 각각 얻었다. 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.

(2)-2. 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 FN 유전자 발현을 위해 2%의 galactose를 첨가하였다. 재조합 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 24 시간마다 채취한 배양액을 적당한 비율(10-100배)로 희석하여 UV/Vis spectrophotometer(Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech.)를 이용하여 600nm에서 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. 효모내 단백질 양은 modified Lowry method에 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.

(2)-3. FN 발현 재조합 plasmid 구축

*E. coli*에서의 FN H-chain 발현 벡터인 pVUHFH를 EcoR I과 Hind III로 절단한 후, Klenow fragment로 처리하여 560 bp의 *hfH* DNA 단편을 얻었다. 그리고, *E. coli*에서의 FN 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*을 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(Fig. 2).

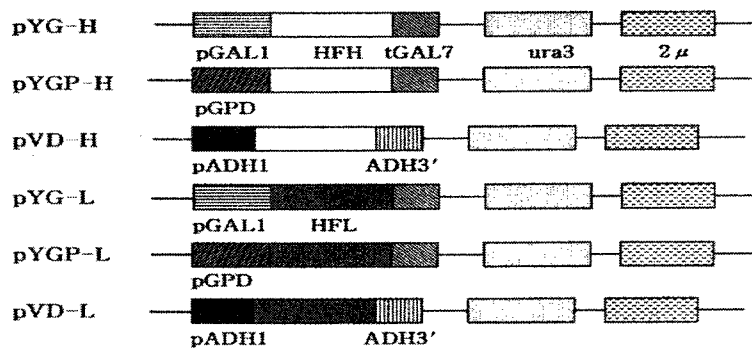


Fig. 2. Schematic diagram of recombinant plasmids. Line represents the plasmid DNA and the boxes represent the gene or their corresponding functional domains. Open boxes are HFH and dark boxes are HFL gene, respectively.

(2)-4. SDS-PAGE

재조합 plasmid에 의한 발현을 분석하기 위해 SDS-polyacrylamide 겔은 Laemmli의 방법을 따라 수행하였다. 그리고 발현된 FN H-chain 또는, L-chain이 holoprotein으로 조합되어 지는지, 조합된 단백질이 철과 반응하는지 확인하기 위해 세포 추출물을 1 mM ferrous ammonium sulfate와 반응시킨 후 비변성 겔을 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.

(2)-5. 효모로부터 재조합 사람 H-chain 및 L-chain FN의 정제

효모에서 H-chain 및 L-chain FN의 정제 방법은 Raguzzi 등의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 재조합 H-chain FN의 정제는 세포 추출물을 열변환 처리 (75°C, 10분간)를 한 후 원심분리하여 열로 인해 변성된 단백질을 제거하여 초원심 분리(105000×g, 2hr)하고, 80% ammonium sulfate로 침전시킨 다음 20mM Tris (pH7.4)에서 평형을 맞춘 Sephacryl S-300 column (2.5×100 cm) 또는 Mono Q column을 통과시켜 정제하였다.

H-chain FN과는 달리, 재조합 L-chain FN의 정제는 먼저 세포 추출물을 열

변환 처리한 다음, 80% ammonium sulfate로 침전시킨 후 Sephacryl S-200 (2.6×60 cm) 와 Sephadex DEAE (0-0.5 M NaCl) 크로마토그래피를 수행하여 정제하였다.

(2)-6. 발현된 사람 H-chain, L-chain FN 및 돌연변이체의 물리적, 생물학적 특성

재조합 및 변이체 효모로부터 정제한 재조합 사람 H-chain 및 L-chain FN을 Fe와 반응시킨 후 native PAGE를 수행하여 *in vitro*에서의 Fe 결합능력을 확인하였다. 또한 H-chain 및 L-chain FN의 ferroxidase 활성도를 조사하였다. UV/Vis 흡수 스펙트럼은 실온에서 Spectrophotometer (Hitachi)를 이용하여 측정하였다. 재조합 H-FN 및 L-FN의 분자량 측정은 Shodex KW-804 컬럼을 장착한 HPLC를 이용하여 측정하였으며, 표준 분자량 시료는 thyroglobulin(Mr 669000), horse spleen ferritin (476000), catalase (232000), aldolase (158000) 등을 사용하였다. 등전점의 측정은 모세관 전기영동 장치(BioFocus 3000, Biorad)를 이용하여 수행하였으며, coated fused silica tubing (50 μ m×24 cm)를 이용하여 정제된 FN 시료(100-200 ng)를 1% ampholyte(pH3-10)과 섞어 200 psi로 20초 동안 시료를 주입한 다음, 15kV로 4분간 등전점으로 이동하는 작업을 수행하였다.

(2)-7. Atomic absorption spectrometry

재조합 미생물에 있어서 세포 성장과 철 흡수 정도를 분석하기 위해 uracil 결핍 최소배지에서 효모를 전배양하고 각기 다른 농도(0, 10 and 20mM)의 ferric citrate가 첨가된 YEP(containing 2% galactose) 배지에서 30℃, 4일간 배양한 후, 원심 분리(3,500×g, 10 min)하여 세포들을 수확한 다음 2% EDTA로 3번 세척하고 50℃에서 48시간 건조시켰다. 건조된 효모 세포들을 14 M 질산과 10 M perchloric acid(2:1, vol/vol) 용액에서 250℃, 8시간 반응시킨 다음 원자흡광광도계 (SpectrAA-880, Varian)를 사용하여 철의 농도를 분석하였다.

(3) 효모에서 재조합 효모를 이용한 인간 H- 및 L-chain FN의 변이체 생산

(3)-1. 효모에서 FN 변이체 제조

FN H 및 L-chain 각 subunit 유전자를 pSELET-1 vector에 cloning 후 Table 1의 oligonucleotide를 사용하여 ferroxidase 활성부위로 알려진 62번과 65번 아미노산을 각각 또는 한꺼번에 치환한 FN 유전자를 획득하였다. FN H-chain의 경우 62번 Glu를 Lys로 치환하기 위해 Table. 1의 h1을, 65번 His를 Gly로 치환하기 위해 h2를, 62와 65번 Glu와 His를 Lys와 Gly로 동시에 치환하기 위해 h3를 forward primer로 사용하였으며 reverse primer로 HR 사용하였다. FN L-chain의 경우 62번 Lys를 Glu로 치환하기 위해 l1을, 65번 Gly를 His로 치환하기 위해 l2를, 62와 65번 Lys와 Gly를 Glu와 His로 동시에 치환하기 위해 l3를 forward primer로 사용하였으며 reverse primer로 LR 사용하여 site-directed mutagenesis를 수행하였다. 이 변이 유전자를 효모에서 발현시키기 위해 GAL promoter를 가지고 있는 yeast shuttle vector인 YEp352에 cloning하여 H-chain의 경우 62번을 치환시킨 pYGh62K, 65번을 치환시킨 pYGh65G, 62번과 65번을 한꺼번에 치환시킨 pYGhKG, L-chain ferritin의 경우 62번을 치환시킨 pYGl62E, 65번을 치환시킨 pYGl65H, 62번과 65번을 한꺼번에 치환시킨 pYGl62EH 변이체 플라스미드를 획득하였다(Fig. 3). 이들 ferritin 변이체 플라스미드 각각을 Ito의 방법에 따라 효모균주 *S. cerevisiae* 2805에 형질전환하여 HFH의 경우 YGh62K, YGh65G, YGhKG라 하였으며 HFL의 경우 YGl62E, YGl65H, YGl62EH 재조합 효모 균주를 얻었다.

(3)-2. 변이체 발현 및 전기영동

재조합 효모 균주는 uracil 결핍 배지(0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% casamino acid, 2% glucose, 0.03g/L adenine and tryptophan)에서 30°C, 200rpm에서 12시간 동안 전배양 후 ferritin 변이체 발현을 위해 galactose가 첨가된 YEP(1% yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% galactose)배지에서 30°C, 200rpm로 3일간 배양하였다.

재조합 효모 균주로부터 FN 변이체 발현을 확인하기 위해 12% SDS-polyacrylamide 젤을 Laemmli의 방법에 따라 수행하였다. 세포 추출물을 얻기 위해 위의 배양액을 일정액을 원심분리하여 침전물을 증류수로 2회 씻어 준 후 pellet:

glass bead: extract buffer를 1:2:1 비율로 첨가하였다. 최대 스피드로 30초간 vortexing 한 후 ice에서 cooling 하는 과정을 6회 반복한 후 원심분리하여 상층액을 취한다. 효모 세포 추출물을 2×SDS sample loading buffer와 1:1로 섞어 100°C에서 10분간 열을 가해준 후 상층액을 12% SDS-polyacrylamide 겔에 전기영동하였다.

Table. 1. Primer sequences for site-directed mutagenesis of ferritin H- and L-chain gene.

	Primer sequences	Substitutions
H-chain Variants	h1: CAA TCT CAT GAG <u>AAG</u> AGG GAA CAT GCT GAG	Glu62→Lys
	h2: TCT CAT GAG GAG AGG GAA <u>GGT</u> GCT GAG	His65→Gly
	h3: CAA TCT CAT GAG <u>AAG</u> AGG GAA <u>GGT</u> GCT GAG AAA CTG ATG	Glu62→Lys & His65→Gly
	HR: CGC AAG CTT TTA GCT TTC ATT ATC ACT	
L-chain Variants	l 1: CTG GCC GAG GAG <u>GAA</u> CGC GAG GGC TAC GAG	Lys62→Glu
	l 2: GAG AAG CGC GAG <u>CAC</u> TAC GAG CGT CTC CTG	Gly65→His
	l 3: CTG GCC GAG GAG <u>GAA</u> CGC GAG <u>CAC</u> TAC GAG CGT CTC CTG	Lys62→Glu & Gly65→His
	LR: TCC CCC GGG TTA GTC GTG CTT GAG AGT	

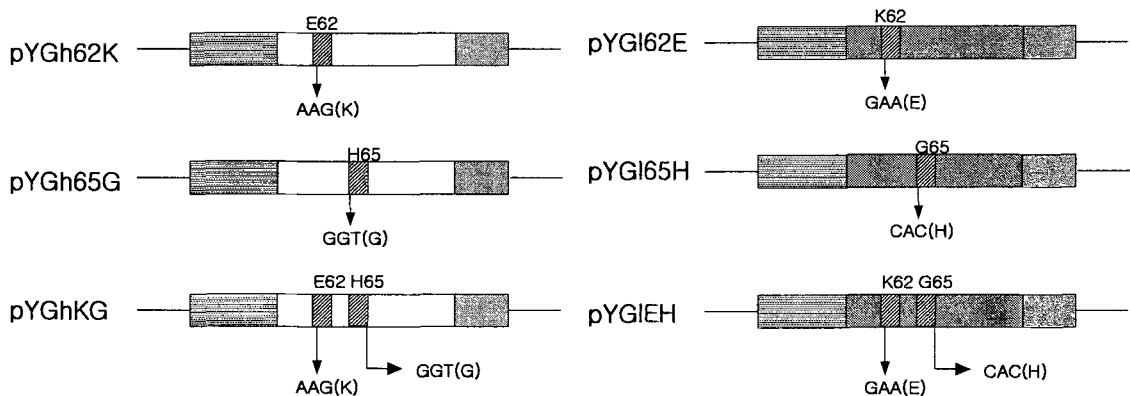


Fig. 3. Schematic diagram of recombinant ferritin variant plasmids.

(3)-3. 재조합 FN 변이체에 의한 Fe 흡수

수확된 효모 변이체 균주로부터 각 FN 변이체를 정제하여 FN으로부터 철이 제거된 apoferritin을 만들기 위해 1% thioglycolic acid(pH5.0)을 이용하여 철을 화학적으로 환원시킨 다음 0.1M sodium bicarbonate(pH8.0)와 20mM imidazole 완충용액(pH7.0)으로 투석하였다. 반응은 실온에서 apoferritin 용액에 질소 가스로 충분히 포화시킨 Fe(II)이온이 들어있는 20mM imidazole 완충용액(pH7.0)을 주어진 당량비로 첨가하여 반응시켜 UV/vis spectrometry에서 310nm 파장에서 생성된 철 산화물에 의한 흡수도 변화를 측정함으로써 재조합 ferritin 변이체의 철 축적기작을 조사하였다. 실험에 사용한 단백질 농도는 0.5mg/mL로써 일정하게 유지하였고 본 실험에서 Fe(II) 이온의 수는 단백질 분자당 200개 이었다.

(4) 효모에서 인간 FN H- 및 L-chain 유전자의 과발현 균주, 이형집합체의 개발과 생육특성

(4)-1. 사용 균주 및 plasmid

Plasmid 증식, 대량 추출 및 유전자 발현을 위한 숙주로 사용한 대장균과 효모 세포는 앞에서(1) & (2)) 언급한 바와 같다. 유전자 재조합 plasmid는 yeast shuttle 벡터인 YEp352를 사용하였다. 인간 FN H-chain 및 L-chain 발현을 위한 플라스미드 pY1H10L과 pY1L10H로 형질 전환시킨 효모세포는 Y1H10L과 Y1L10H로 각각 명명하였다. 균체 배양을 위한 배지 및 배양 방법은 (2)에서 기술한 바와 같다.

(4)-2. FN 발현 재조합 plasmid 구축

효모에서 인간 *hfH* 와 *hfL*를 과발현시키는 벡터를 제조하기 위해 유도성 promoter인 GAL1를 이용하여 *hfH* 와 *hfL*의 N-말단의 코돈 또는, 상위부분 유전자를 변형하여 발현 벡터 pYGL1과 pY1H10L를 제조하였다. 이를 위하여 FN H-chain의 상위 primer는 start condon앞의 GAATTC를 TTTAAA로 치환하였다: 5'-AGCTTTGTTTAAAATGACGACCGCGTCC-3', 하위 primer는 5'-CGC AAGCTTTTAGCTTTCATTATCACTGTCTC-3'로 제작하였다. L-chain의 경우에 있어서 상위 primer는 start condon 다음의 코돈인 AGC(Ser)를 TCT(Ser)로 치환하도록 제작하였다: 5'-CGAATTCATGTCTTCCCAGATTCGTCAG-3', 하위

primer는 5'-TCCCCCGGGTTAGTCGTGCTTGAGAGT-3'. 이들 상하위 primer를 이용하여 중합 연쇄 반응을 수행하였고, 얻어진 반응물을 blunting한 후 pUC18에 삽입하여 유전자 서열을 확인하였다. 그런 다음 이 벡터로부터 BamH I과 Sal I으로 자른 *hfH* 단편을 얻었고, GAL1 promoter와 GAL7 terminator를 포함하는 효모 발현 벡터인 pYGT에 삽입하여 pYGH2를 제조하였다. L-chain의 경우에는 유전자 서열을 확인한 벡터로부터 EcoR I과 Sma I으로 자른 *hfL* 단편을 얻어 pYGT에 삽입하여 pYGL1를 제조하였다(Fig. 4).

그리고, GAL1-GAL10 promoter에 의해 발현되는 벡터를 제작하기 위하여 먼저, 효모에서의 FN L-chain 발현 벡터인 pYGL1을 Xba I과 Sph I으로 절단한 후, Klenow fragment로 처리하여 GAL7 terminator를 갖는 *hfL* DNA 단편을 얻었다. 그 후, pYGH2 plasmid의 GAL1-GAL10 promoter 뒷부분을 EcoR I으로 절단하여 blunting한 후 *hfL*-tGAL7을 삽입하였다. 그 결과 FN heteropolymer를 발현시킬 수 있는 tGAL7-*hfL*-GAL10-GAL1-*hfH*-tGAL7의 유전자 서열을 갖는 pY1H10L을 구축하였다. 또한, FN subunit의 유전자의 위치가 서로 바뀐 pY1L10H plasmid를 구축하기 위해 pYGH2 plasmid를 Xba I과 Sph I으로 절단하고 blunting 처리하여 GAL7 terminator를 갖는 *hfH* DNA 단편을 얻었다. 그리고, pYGL1 plasmid의 GAL1-GAL10 promoter의 뒷부분을 EcoR I으로 절단하여 blunting한 후 *hfH*-tGAL7을 삽입하였다. 그 결과 tGAL7-*hfH*-GAL10-GAL1-*hfL*-tGAL7의 유전자 서열을 갖는 pY1L10H를 구축하였다 (Fig. 5).

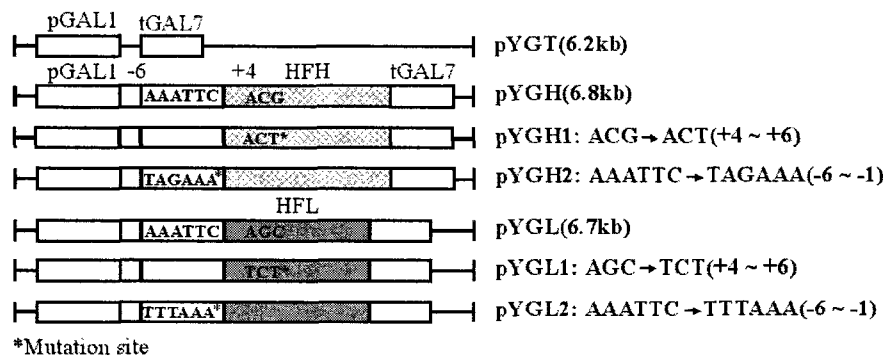


Fig. 4. A schematic diagram of recombinant plasmids constructed. The line represents the plasmid DNA and the boxes represent the gene or their corresponding functional domains. The genes of the 2 *ori* and the selection markers (*ura3*, *Amp*) are omitted for simplicity in the diagrams.

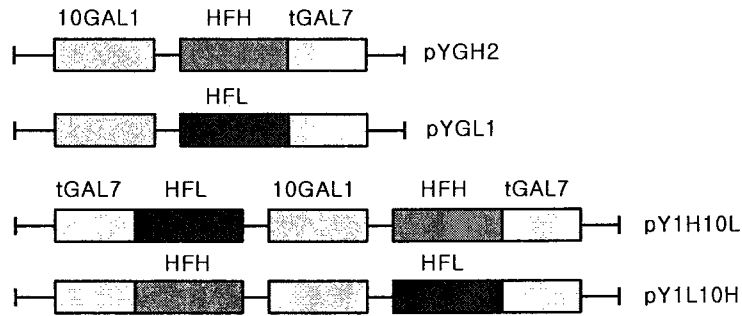


Fig. 5. Schematic diagram of recombinant plasmids. Line represents the plasmid DNA and the boxes represent the gene or their corresponding functional domains. Green boxes are *hfH* and blue boxes are *hfL* gene, respectively. The genes of the 2 *ori* and the selection markers (*ura3*, *Amp*) are omitted for simplicity in the diagrams.

(4)-3. 효모 형질 전환체의 선별과 FN의 세포내 발현 효율

Fig. 4와 5에서 구축된 plasmid 각각을 Ito 등(1983)의 방법으로 *S. cerevisiae* 2805 에 형질 전환시킨 후, uracil 결핍 최소배지에서 형질 전환체들을 1차 선별하였다. 선별된 재조합 효모는 glass bead를 이용하여 DNA 추출 후 대장균에 역형질 전환하여 효소 절단으로 DNA를 확인하여 2차 선별하였다. 그리고, uracil 결핍 최소배지와 복합 영양배지에서 균체 증식, FN 발현양 및 plasmid 안정성을 조사하였으며 FN의 세포 내 발현 효율을 확인하기 위해 SDS-polyacrylamide 젤 전기영동 후 densitometry로 전체 발현된 단백질 중 FN의 양을 분석하였다.

(4)-4. 전기영동

재조합 plasmid에 의한 발현을 분석하기 위해 SDS-polyacrylamide 젤은 Laemli(1970)의 방법을 따라 수행하였다. 그리고 발현된 FN H-chain과 L-chain이 서로 조합되어서 FN 이형집합체를 만드는지, 그리고 조합된 단백질이 철과 반응하는지 확인하기 위해 세포 추출물을 1 mM ferrous ammonium sulfate와 반응시킨 후 비변성 젤을 이용하여 전기영동을 수행하였다. 그리고 단백질과 iron 염색을 수행하였다(Kim and Kim, 1994.).

Y1H10L과 Y1L10H 균체에서 생산된 인간 FN의 subunit의 조성 비율을 확인하기 위하여 비변성 젤을 이용하여 전기 영동을 수행한 후, FN 단백질의 단량체에 해당하는 밴드를 추출하여 다시 변성시킨 다음 SDS-PAGE를 수행하였고,

densitometry로 subunit의 상대적인 함량을 분석하였다.

(4)-5. FN 내 Fe 흡수

H-FN 및 L-FN의 기능을 연구하기 위해 재조합 *E. coli* 균주 HFH과 HFL 및 재조합 효모 균주 YGH2와 YGL1 균주로부터 각각의 FN을 정제하여 apoferritin을 만든 후 iron uptake 실험을 수행하였다. H-FN의 경우에는 Sephacryl S-300 column (2.5×100 cm)을 수행하였으며, L-FN의 경우에는 Sephacryl S-200 (2.6×60 cm) 와 Sephadex DEAE (0-0.5 M NaCl) 크로마토그래피를 수행하여 정제하였다. 정제된 FN으로부터 철 흡수 속도는 (3)-3과 같이 수행하였다. 이 반응에서는 단백질 분자당 100, 200 및 400개를 첨가하였다. 실험에 사용한 단백질은 0.5mg/mL의 농도를 사용하였다.

(4)-6. 철 이온의 축적 및 원자 흡광 광도계

재조합 미생물에 있어서 철 흡수를 유도하기 위해 uracil 결핍 최소배지에서 전배양한 효모를 YEP (2% galactose 함유) 배지에서 30℃, 2일간 또는, 3일간 배양한 후, 원심 분리 (5,000×g, 5 min)하여 세포들을 수확한 다음 20 mM MOPS (3- [N-morpholino] propane sulfonic acid) buffer (pH 6.5)로 2번 세척하였다. 효모 세포들 (100 mg/mL)을 5% (w/v) glucose를 함유한 위의 완충용액에서 30 분간 반응시킨 다음, 14.3 mM ferrous sulfate를 첨가하여 빛이 통과하지 않는 공기 중에서 2 시간 반응시켰다. 그리고, 철 이온과 반응시 0.2 mM ascorbate를 첨가하여 철 이온의 흡수도 비교 조사하였다. 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, 원자흡광광도계 (SpectrAA-880, Varian)를 사용하여 철의 농도를 분석하였다. 이 방법은 앞의 (2)-7에서 사용한 방법을 보완함으로써 실험 중 발생할 수 있는 철 이온에 의한 비 특이적 침전을 배제하고자 하였다. Data의 통계적 분석은 statistical analysis system으로 나타냈다.

재조합 효모로부터 FN 이형집합체를 분리한 다음 투과전자현미경(Jeol JEM 2010)을 이용하여 단백질을 확인하였다. 염색 시료를 위하여 2% phosphotungstic acid(pH 6.0) 5 μ L와 시료 2 μ L를 섞어 10분간 반응시킨 다음 건조시켜 전자현

미경에서 관찰하였다.

(5) FN을 생산하는 효모 균체에 있어서 철 축적의 특성 및 환경에 있어서 철 결핍 회복에의 효과

(5)-1. 효모에 있어서 각 반응조건에 따른 철 축적

인간 FN H-chain 과 L-chain 유전자를 발현하는 효모 균주로부터 철 화합물에 따른 철 이온의 흡수 조건 (균체의 수; 100 & 200 mg/ml, 철화합물의 종류; ferrous ammonium sulfate, ferrous sulfate & ferric citrate), 반응시간 (0-150 min) 및 흡수량(yield & iron uptake in $\mu\text{mol Fe/wet wt}$)등을 분석함으로써 이 균주에 있어서 철 이온의 함량을 최적화하였다. 그리고 철 흡수 반응에 있어서 ascorbate의 영향을 분석하였고, 나아가 H-chain 및 L-chain 유전자가 삽입된 균주에 있어서 각각 철 이온과의 반응을 분석함으로써 FN H subunit과 L subunit의 생물학적 기능을 비교 검토하였다. 그리고 이 실험 결과를 바탕으로 반응표면 분석법을 이용하여 재조합 효모 배양시에 FN 생산에 영향을 주는 세 가지 요인인 cell 농도, FS(ferrous sulfate)의 농도, 그리고 FS 반응시간에 따라 실험하고, 철 함량을 분석하여 위의 세 요인의 최적 조건을 찾고자 하였다.

(5)-2. 배양 조건 및 실험 방법

재조합 균주 배양을 위하여 250 ml 삼각플라스크의 uracil 최소결핍배지 40 mL에 균주를 1 colony접종하여 30°C와 200 rpm에서 12시간 진탕 배양하였다. 생산배지의 초기 균 농도를 10^7 cell/mL 이 되도록 250 mL 삼각 플라스크의 40 mL 배지에 종배양의 적절량 접종하여 30°C와 200 rpm에서 3일간 진탕 배양하였다. 배양이 끝나면 배양액을 100배 희석하고 spectrophotometer를 이용하여 600nm에서 OD를 측정하여 WW를 구하였다. 5000 rpm에서 5분간 균체를 분리하고, 여기서 분리한 균체를 철과 반응시키기 위해 5% glucose를 함유하고 있는 50 mM MOPS buffer를 균체 wet weight 100 mg 당 1 mL 씩 첨가하여 100 mL 삼각플라스크에 30°C와 200 rpm에서 30분간 preincubation하였다. 그리고 미리 30분 이상 N_2 gas로 degasing한 5% glucose를 함유하고 있는 50 mM MOPS buffer에 FS를 50 mM이 되도록 녹인다. Cell 농도, FS 농도와 반응시간에 따라 3번 반복하여 실험하였다. 그리고 이 들 균체에 있어서 철 함량을 원자 흡광광도계로 분석

하였다.

(5)-3. 동물 실험을 위한 대량 균체 배양

동물 실험을 위한 효모 균체의 배양을 위하여 위에서 얻은 철 흡수 최적화 조건으로부터 동물 실험에 사용할 대조군 효모 균체 YGT와 인간 H-FN을 생산하는 균체 YGH2를 각각 150 g 씩 배양한 후, 철이온과 반응시켜 철 함량이 증진된 효모 균체를 준비하였다.

(5)-4. 동물실험을 이용한 철 흡수 조사

생후 1개월 된 수컷(Sprague-Dawley) 쥐를 구입하여 그룹 당 8마리로 나눈 후, 생후 4주부터 8주까지 4주간을 실험사육기간으로 하였다. 표준그룹에는 30 mg Fe/kg diet(normal diet, Harlen, Madison, USA)를 공급하였으며, 실험그룹은 2주간 철 결핍상태의 사료(2 mg Fe/kg, AIN-76, Harlen, Madison, USA)를 공급한 다음 다시 나누어 그 중 제 1팀(8 마리/팀)은 철 결핍 상태의 사료를 계속 공급하였고, 제 2팀은 기본 결핍 영양에 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (30 mg Fe/Kg)를 첨가하였다. 제 3팀은 기본 결핍 영양에 horse spleen FN (30 mg/kg diet)을 첨가하였고 제 4팀은 야생형 효모 균주 YGT를 첨가한 사료를 공급하였다. 제 5팀은 재조합 인간 H-chain FN을 생산하는 효모 균주 YGH2에 V-2의 방법으로 철을 흡수시켜 기본 결핍 영양과 함께 2주간 공급하였다. 그리고 제 6팀은 기본 결핍 영양에 H-FN을 생산하는 재조합 효모(제 5팀과 동일한 효모)와 ascorbate(0.9 g/Kg)를 동시에 2주간 공급하였다. 마지막으로 제 7팀은 철 결핍 영양에 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (50 mg Fe/Kg)을 첨가하여 공급하였다. 그리고 1주일 간격으로 3주간 꼬리로부터 혈액을 채취하여 hematocrit 수치와 hemoglobin 농도(혈액중 g/L)를 Beard 등의 방법에 따라 측정하였다. 사육 후 4주일(28일)이 되는 날 쥐를 희생시켜 간, 비장, 전뇌, 신장 조직을 얻어내어 균질화 시킨 후 digest시켜 AAS(원자 흡광 광도계)를 이용하여 철분 함량을 측정하였다.

(6) 인간 H- 및 L-chain FN을 생산하는 재조합 효모에 있어서 oxidative stress에 대한 영향

(6)-1. 실험 재료

실험에 사용된 균주는 YGT, YGH2 및 YGL1이다. 균주 성장 배지로는 uracil 결핍 최소 배지(YNB(0.67%), casamino acid(0.5%), adenine(0.03g/L), tryptophan (0.03g/L), dextrose(2%))와 YEP배지(yeast extract(1%), bacto-pepton(2%), galactose(2%))를 사용하였다. H₂O₂는 1M로 희석해서 사용하였고, menadione sodium bisulfite(Sigma)를 사용하였다. 균체의 배양 방법은 (5)-2에서 기술한 바와 같다.

(6)-2. 재조합 효모의 H₂O₂와 menadione에 대한 민감성

성장 말기의 균체 배양: 재조합 효모 균주를 YEP(2% Gal 포함) 5 ml에 하나의 colony만을 접종하여 shaking incubator(30°C, 200 rpm)에서 24시간 배양 후 (OD₆₀₀=3.0) 원심분리에 의해 효모 균주를 분리하여 washing 후 OD₆₀₀ = 0.1 (3X10⁶cells/ml)이 되도록 PBS를 첨가하였다. 다양한 H₂O₂ 농도를 처리하여 1시간 후, 적당히 희석하여 YEP(2%Gal) plate에 10 μl씩 spotting하여 incubator(30°C)에서 3일간 배양하였다. 또한 다양한 농도의 menadione이 첨가된 YEP(2% Gal) plate에 PBS에 3X10⁶cells/ml로 희석된 효모 세포들을 10 μl씩 spotting하여 incubator(30°C)에서 3일간 배양하였다.

성장 초기의 균체 배양: 재조합 효모 균주를 uracil 결핍 최소 배지(2% Glu 포함) 5ml에 하나의 colony만을 접종하여 shaking incubator (30°C, 200 rpm)에서 12시간 배양 후 2% galactose가 포함된 YEP 40 ml에 1/100로 희석하여 shaking incubator(30°C, 200 rpm)에서 8시간 키운 후(exponential growth culture, OD₆₀₀=0.3) 원심분리에 의해 효모 균주를 분리하여 washing 후 OD₆₀₀ = 0.1 (3X10⁶cells/ml)이 되도록 PBS를 첨가하였다. 다양한 농도의 H₂O₂로 처리하여 10분 또는 1시간 간격으로 YEP(2% Gal) plate에 10 μl씩 spotting하여 3일간 30°C incubator에서 키웠다. 또한, 다양한 농도의 menadione(superoxide 생성 인자)이 첨가된 YEP(2% Gal) plate에 3X10⁶cells/ml로 희석된 효모 세포들을 10 μl씩 spotting하여 incubator (30°C)에서 3일간 배양하였다(Jaekwon Lee et al., 1999).

나. 실험 결과

(1) 대장균을 이용한 인간 FN 이형집합체의 생산 및 활성화 연구

(1)-1. 발현백터의 제조

세포내에서 subunit 조성비율이 다른 재조합 사람 FN를 생산하기 위해 *hfH*와 *hfL*에 대한 상대적인 발현 시스템을 구상하였다 (Fig. 1). 이 시스템은 세포내에서 FN 동형 및 이형집합체의 발현을 초래하도록 했다. *hfH*와 *hfL* 모두는 각각 monocistronic 발현 시스템에 의해 발현되었다. FN 이형집합체의 생산을 위해, *hfH*는 앞쪽에 *hfL*는 뒷 쪽에 삽입한 bicistronic 발현 시스템을 이용하여 *hfH*와 *hfL* 모두를 동일 균주내에서 발현시켰다. 여기에서 *hfH-hfL*과 *hfL-hfH*의 structural 유전자들 순으로 두 가지의 백터를 얻었다. 그 다음, 각각의 유전자를 coplasmid 발현 시스템을 이용하여 양립할 수 있는 plasmid들 속에 subcloning 하였다.

(1)-2. 대장균에서의 FN H-와 L-subunit의 발현

*hfH*와 *hfL*에 대한 발현 plasmid를 가지는 세포들을 발현 유도하였다. 세포 파쇄물을 15% SDS-PAGE와 Western blotting으로 분석하였다(Fig. 6). SDS-PAGE gel에서 HFH와 HFL를 induction한 세포에서의 추출물은 densitometry에 의해 분석한 결과, HFH의 경우 전체 수용성 단백질 중 25%에 해당하는 H-subunit(21kDa)의 띠를 보였다. HFL의 경우는 전체 수용성 단백질 중 55%에 해당하는 L-subunit(19kDa)를 보였다. 유도 발현시킨 세포에서 관찰된 band들은 열 변환 처리시켰을 경우, 같은 intensity를 보였다. 이것으로 발현된 FN H-와 L-subunit가 야생형 폴리펩티드(Fig. 6A; lane 4 and 6)처럼 열에 안정하다는 것을 보여준다. 이러한 결과를 바탕으로, 발현 수준을 서로 비교하는 실험을 수행하는 데 있어서 열 변환처리에 의해 부분적으로 정제한 sample들을 사용하였다. 이전에 대장균에서 생산된 재조합 tadpole FN이 native FN처럼 열에 안정하다는 것을 보고했다. 또한 외부 단백질의 과잉생산은 tac promoter를 사용하여 대장균에서 얻은 바 있다. 발현된 FN H-와 L-subunit들은 native human liver FN에 대한 항원-항체 반응에 있어서 서로 인식됨이 Western blotting에 의해 확인되었다 (Fig. 6B).

Bicistronic 발현 시스템(H-L)로부터의 세포 파쇄물을 SDS-PAGE으로 분석하

였다(Fig. 7). 유도 발현시킨 세포들로부터의 추출물은 두 개의 subunit의 major band들을 보였다. 또한 발현된 단백질의 major band들은 Western blotting으로 확인하였다(Fig. 7B).

사람 FN H-와 L-subunit의 발현 수준은 transformant에서 비교하였다(Fig. 8). bicistronic 발현 시스템의 경우, L-subunit의 발현 수준은 H-subunit의 발현 수준보다 약 3배 더 높다(Fig. 8; lanes 2 and 3). 두 개의 subunit의 coding region의 순서의 변화는 이들이 발현에 영향을 거의 주지 않았다. 이유는 명확하지 않지만 *hfL* 유전자 자체의 translational efficiency에 관계된 것 같다. 실례를 들면, codon 성향 index가 *hfL*에 대해서는 0.28이고 *hfH*는 0.17이다. 더욱이 subunit 구성은 plasmid copy number에서 변화와 함께 coplasmid 발현 시스템을 사용을 변화시켰다(Fig 8; lane 4 and 5). 두 개의 subunit의 발현 수준은 13배 높게 더 많은 차이를 보였다. 종합적으로 coplasmid 발현 시스템은 확실히 bicistronic 발현 시스템에서 보다 subunit에서 다양한 변화를 만드는데 더 효과적이다. 두 subunits의 발현은 Northern blotting에 의해 transcriptional level에서 재조합 세포들을 확인하였다(data not shown). 우리의 결과는 Rucker와 그 동료에 의해 보고된 것과 일치한다.

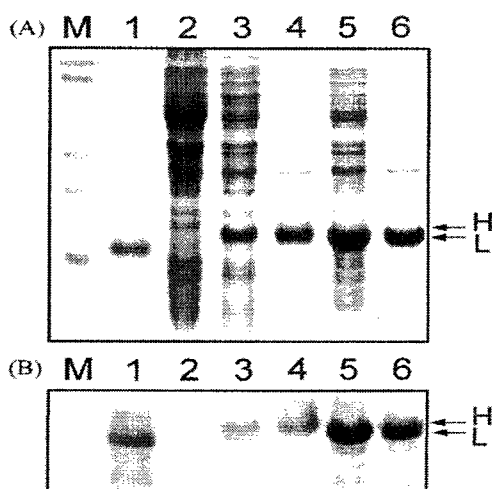


Fig. 6. 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (A) and Western blotting (B) of human H- and L-ferritin expressed in *E. coli*. The lanes are: M, size marker; (1) horse spleen ferritin; (2) JM109; (3) HFH; (4) heat-treated HFH; (5) HFL; (6) heat-treated HFL.

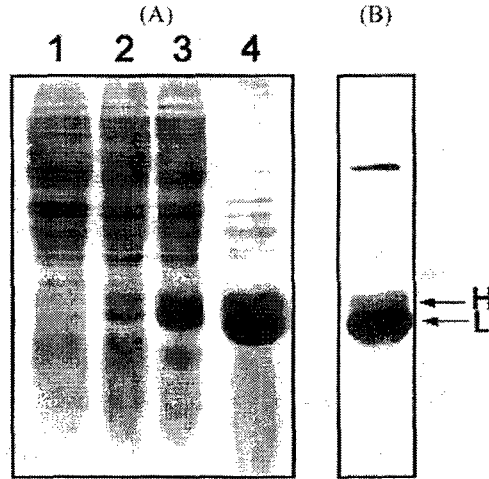


Fig. 7. 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (A) and Western blot analysis (B) of ferritin heteropolymer expressed in the H-L (*E. coli* cells transformed with the plasmid pVHFH-L). The lanes are: (1) JM109; (2) no induction; (3) induction with 0.1 mM IPTG; (4) heat-treated sample of the transformed cells being induced.

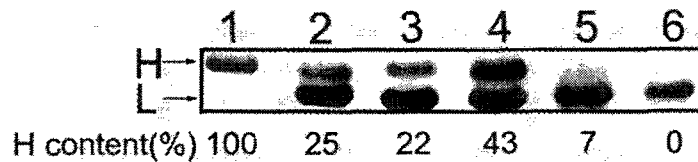


Fig. 8. 12% SDS-PAGE of ferritin heteropolymer expressed using both a bicistronic and a coplasmid expression systems. Subunit contents were estimated by densitometric analysis. Strain names are given in Materials and Methods. The lanes are: (1) HFH; (2) H-L; (3) L-H; (4) H/L; (5) L/H; (6) HFL.

부분적으로 정제된 FN은 PAGE에 의해 분석하였다(Fig. 9). 발현된 H-와 L-subunit이 holoprotein으로 조합되어졌는데 이 band는 non-denaturing gel에서 horse spleen ferritin과 비교하여 약간의 이동을 보였다(Fig. 9). 또한 FN oligomer로 여겨지는 minor band들도 보였다. Control cell에서는 단백질과 철 staining gel 모두에서 FN과 비슷한 위치에서 어떠한 band도 관찰되지 않았다. bacterioferritin의 약한 band는 heat denaturation 후 나타나지 않았다. 재조합

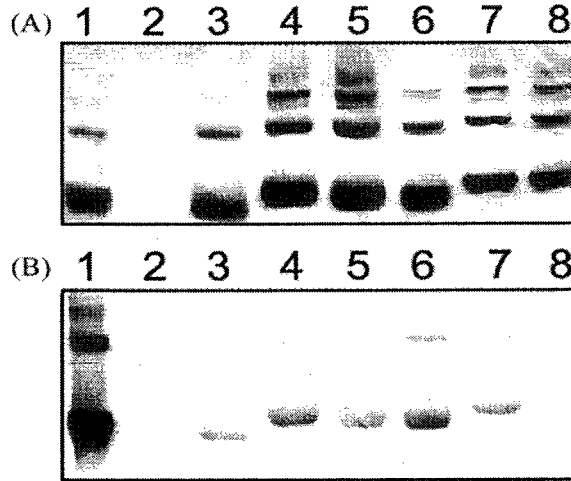


Fig. 9. Native PAGE analysis of ferritin heteropolymers. Cells were grown in the LB medium without additional iron. The crude cell extracts were heated at 75C for 10 min. A, stained for protein with Coomassie blue; B, stained for iron with Prussian blue. The lanes are: (1) horse spleen ferritin; (2) JM109; (3) HFH; (4) H-L; (5) L-H; (6) H/L; (7) L/H; (8) HFL.

H-FN은 재조합 L-FN보다 약간 더 빨리 이동했다. 재조합 사람 H-FN의 band는 철에 대해 양성반응이나 재조합 L-FN은 철에 의해 염색된 band를 볼 수 없었다. 이것은 발현된 H-FN은 *in vivo*에서 안정하게 철 core를 형성하지만 L-FN은 그러지 못함을 암시한다(Fig. 9; lane 8). 우리의 결과는 대장균으로부터 정제한 재조합 사람 L-ferritin이 특유의 갈색을 보이는 철 원소를 거의 포함하지 않는 단백질이므로 색이 없다는 것과 일치한다. bicistronic 발현(Fig. 9; lanes 4 and 5) 혹은 coplasmid 발현 시스템(Fig. 9; lane 6 and 7)에서 생산된 재조합 FN은 heteropolymers에서 H-subunit content에 관계되어지는 단백질의 이동에 약간의 차이를 보였다. 이처럼 7% H-subunit content를 포함하는 FN heteropolymer는 L-FN 보다 느리게 이동했다. 전에 Rucker와 그 동료들은 박테리아에서 합성된 heteropolymer가 세포내 subunit population에 의해 주로 지시되어지는 final subunit 구성의 상대적으로 homogeneous protein으로 assembly된다. 재조합 FN homo-와 heteropolymer를 생산하는 세포들이 철 첨가 없이 배양 되었을 때, H-FN은 물론 재조합 FN heteropolymer는 그들의 core에 철을 잘 저장한다. 이것은 H-FN과 heteropolymer가 natural tissue FN처럼 활성화되었다는 것을 제시한다. 특히 7% H-subunit와 93% L-subunit로 구성(약 2 H-subunit와 22

L-subunit)된 FN heteropolymer는 iron core형성을 할 수 있다(Fig. 9; lane 7). 이 결과들은 *in vivo*에서는 단일분자로써 비활성인 L-FN이 세포 내에서는 H-subunit과 결합하여 철을 저장한다는 것을 확인시켜준다. 이것은 H-subunit의 ferroxidase activity에 의해 산화되는 철이 *in vitro*에서 관찰된 것처럼 FN heteropolymer에서 축적되어진다는 것을 제시한다(Levi et al., 1992; Santambrogio et al., 1996). 세포에서 L-FN의 생물학적 기능은 아직 확실하지 않다. 그러나 H-FN의 과잉발현은 transfectant HeLa 세포에서 세포의 성장을 감소시켰다(Cozzi et al., 2000)

(1)-3. 재조합 세포에서의 철 결합 단백질의 확인

대장균에서 발현된 인간 FN의 *in vivo*에서의 활성을 알아보기 위해 2 mM Fe-NTA를 포함한 배지에서 배양한 세포들의 철 결합 단백질을 분석하였다. 대장균 HFH, HFL, H-L, H/L 그리고 L/H를 파쇄하여 원심분리한 후 상등액을 Sephacryl S-300 젤 크로마토그래피(2.6×100cm)를 이용하여 Fig. 10에서처럼 분석하였다. 결과는 각 세포 모두 주요 철 결합 부위가 FN을 함유하는 것으로 유추되는 위치에서 나타났다. 대장균 JM109 세포에서 주요 철 결합 peak는 FN과 유사한 elution volume에서 보여졌고, 이것은 bacteroferritin혹은 FN 유사 단백질에 기인된 것이라고 유추된다(Abdul-Tehrani 1999). HFH에서는 전체 철 함량의 90%에 이르는 iron peak가 확인되었으며, 이것은 사람 H-FN이 대장균 내에서 기능적으로 활성이 있음을 암시한다(Fig. 10B). HFL의 elution profile은 대장균 JM109와 비슷하나 HFH와는 상당한 차이를 보였다(Fig. 10C). 이 결과는 native PAGE에서 정상적으로 L-FN이 나타나지 않은 것으로 보아 *in vivo*에서 안정한 iron core를 형성하지 못하는 것으로 생각된다(Fig. 9B).

H-L 순서로 단백질이 발현되는 대장균에서 주 iron peak는 FN으로 유추되는 위치에서 나타났으며, 이러한 양상은 L-H에서 core내에 철이 축적이 되어 지는 양상과 유사했다(Fig. 10D). H/L(43% H-subunit와 57% L-subunit)의 coplasmid 시스템에서는 FN peak가 주요 철 저장 단백질이었으며(Fig. 10E), 또한 FN peak는 L/H(7% H-subunit와 93% L-subunit)에서도 같은 위치에서 발견되었다(Fig. 10F). 이것은 대장균에서 생산된 FN 이형집합체가 기능적으로 활성이 있고, PAGE의 iron staining에 의해 증명한 것처럼 그들의 core에 철을 저장할 수 있음

을 증명한다(Fig. 9). FN 이형집합체의 생물학적 활성도를 비교하기 위해 단백질 분자와 결합된 철의 양을 H subunit 함량과 대비하여 작성한 결과(Fig. 11), H subunit의 함량에 비례하여 *in vivo*에서 재조합 FN과 철과의 결합이 증가하였다.

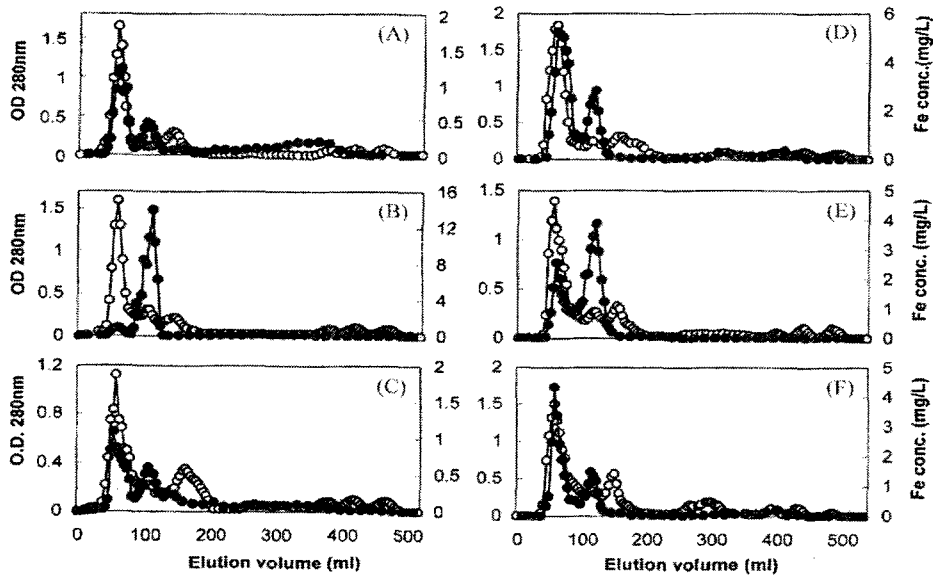


Fig. 10. Chromatography on Sephacryl S-300 of the sonic extract of the transformed cells which were cultured in the medium containing 2 mM Fe-NTA. (○), Optical density at 280 nm; (●), Fe concentration (mg/L). (A) JM 109; (B) HFH; (C) HFL; (D) H-L; (E) H/L; (F) L/H.

철의 결합 정도는 43% H-subunit까지는 완만한 기울기로 증가하고 그 이후 더 가파른 기울기로 증가하는 것을 알 수 있으며, 이런 현상은 자가촉매 현상을 보이는 것으로서, 세포 내 FN이 철 흡수시 두 subunit의 협동에 의해 작용됨을 암시한다. 그러나 이전의 *in vitro*에서 FN 이형집합체 실험에서는 철 흡수의 초기 반응 속도가 H-chain의 함량이 0-35%까지는 증가하고 35-100% 일 때는 증가하지 않는 것으로 보아(Santambrogio et al., 1993), FN의 철 흡수 기전이 여러 단계로 진행되는 점을 감안할 때 그 기전이 매우 복잡함을 알 수 있다. 그렇지만 우리의 이형집합체 발현 시스템은 FN의 각 subunit의 기능과 *in vivo*에서 철 흡수 기전을 잘 설명하고 있다.

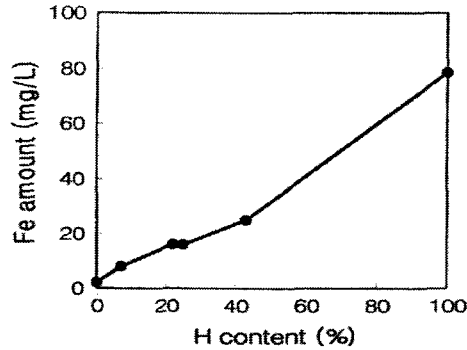


Fig. 11. Biological activity of ferritin heteropolymers. Ferritin heteropolymers were analyzed by both gel filtration chromatography and atomic absorption spectrometry. Fe amounts bound to the ferritin molecule were obtained by adding up the iron contents of the ferritin peak area in Fig. 10.

(2) 재조합 효모를 이용한 인간 H- 및 L-chain FN의 생산 및 재조합 H- 및 L-FN의 특성 연구

(2)-1. FN 발현 재조합 plasmid의 구축

본 연구에서는 효모에서 사람 FN 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 FN H-chain의 발현을 위한 pYG-H, pYGP-H 및 pVD-H plasmid와 사람 FN L-chain 발현을 위한 pYG-L, pYGP-L 및 pVD-L plasmid를 Fig. 2와 같이 구축하였다. 이들은 각각 GAL1, GPD 또는 ADH1 promoter 하류에 FN 유전자를 연결한 plasmid이며 GAL1 promoter와 GPD promoter의 경우에는 GAL7 terminator를, ADH1 promoter의 경우에는 ADH3' terminator를 FN 유전자 하류에 연결하였다. Promoter와 terminator를 제외한 나머지 염기 부분(2- μ m origin, URA3, Amp^r)은 유전자 source와 방향면에서 모두 동일하다(Fig. 2).

(2)-2. GAL promoter에서의 FN 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 3-5시간만에 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. 본 실험에서는 이 중 세 번째 방법을 이용하여 galactose와 glucose 농도가 FN의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. Uracil 결핍 최소배지에서 전 배양한 배양액을 1.0×10^7 /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 1.0×10^7 /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 FN의 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(Fig. 12a). 특히, YEP 배지에 1% glucose/ 2% galactose를 첨가한 경우에 있어서 균체 성장 곡선이 가장 증가하였다. 사람 L-FN을 생산하는 균주 YG-L의 경우에도 YG-H의 경우와 유사하게 나타났다(data not shown). 균체 내의 총 단백질 양을 분석한 결과, 전체 단백질 양이 균체 성장에 비례하여 배양 4일까지 점차적으로 증가하였으며 배양 4일 이후에 급격하게 감소하였다(Fig. 12b). 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 상태로서 세포내의 활성화된 단백질 분해효소에 의해 많은 단백질들이 분해된 것으로 유추된다.

전체 수용성 단백질 중 FN의 발현양을 측정하기 위해 재조합 효모의 추출물을 SDS sample loading buffer와 1:1(v/v)로 섞어 100°C, 10분간 열처리한 후 12% SDS-polyacrylamide 겔을 수행하여 Fig. 13에 나타내었다. 그리고, 이 결과를 densitometry를 이용하여 분석한 결과, YG-H와 YG-L의 두 균주 모두 FN의 band가 uracil 결핍 최소배지에서 전체 수용성 단백질 중 각각 6.1%와 13.2%로 높은 발현양을 보였다. 그러나 uracil 결핍 최소배지에서 키운 균체는 cell mass가 적기 때문에 전체적인 발현양에 있어서는 두 균주 모두 2% galactose에서 키

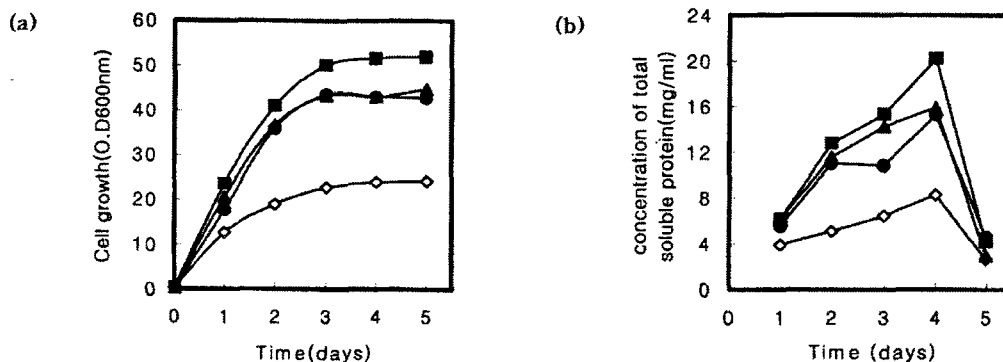


Fig. 12. Effect of the concentration of galactose and glucose on cell growth(a) and amount of total soluble protein(b) in YG-H. ●, YEP medium containing 2% galactose; ■, YEP medium containing 1% glucose and 2% galactose; ▲, YEP medium containing 1% glucose and 1% galactose; ◇, uracil deficient selective medium.

운 균체에서 가장 높았다. 그리하여, GAL promoter를 이용한 YG-H와 YG-L 균주는 재조합 FN을 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.

(2)-3. 균체 증식과 plasmid 안정성

유전자 산물의 생산성은 plasmid 안정성, 재조합 효모의 배양조건, promoter 세기 등을 포함한 여러 인자들에 의해 좌우되므로 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.D₆₀₀)과 plasmid 안정성을 Table 2에 나타내었다. 두 균주 모두 배양 말기까지 균체 증식이 점차적으로 증가하였으며, YG-H의 경우 복합 영양 배지에서 최종 균체 농도가 43-44 O.D₆₀₀에 도달하였고, YG-L의 경우 44-48 O.D₆₀₀에 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 약간 높은 안정성을 유지하였다(Table 2).

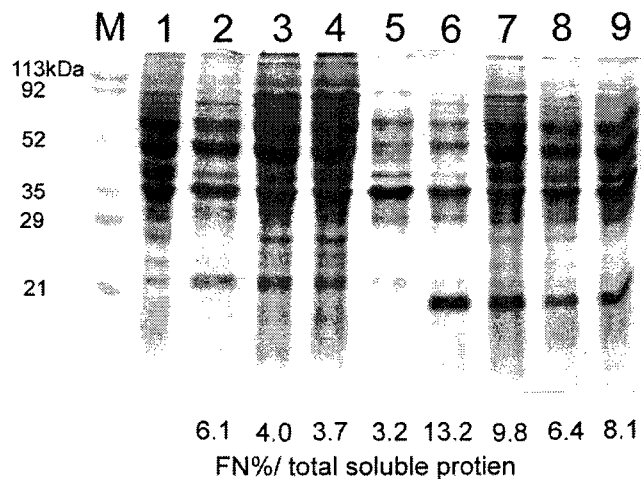


Fig. 13. 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of human ferritin H- and L-chain expressed in yeasts grown in media containing different concentration of carbon source. The lanes are: M, size marker; 1, cell extract of the host cell; 2, 6, cell extract of the transformant YG-H(lane 2) or YG-L(lane 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.

(2)-4. 효모에서 FN H- 및 L-chain의 발현

*hfH*와 *hfL*의 발현을 확인하기 위해 12% SDS-polyacrylamide 겔과 Western blotting을 수행하였다(Fig. 14). 전기 영동 겔의 결과를 보면, 효모 균주 YG-H를 galactose로 발현유도를 했을 때 전기 영동 상에 사람 FN H-chain의 분자량(21 kDa)에 해당되는 위치에서 발현된 단백질 밴드를 확인하였으며, 이 밴드는 대장 균에서 생산된 재조합 HFH와 유사한 위치에서 보였다(Fig. 14, lane 1). 효모 균주의 총 수용성 단백질 중 HFH의 발현율은 densitometer를 이용하여 분석한 결

과 4.5%에 해당하였다. 세포 추출물을 75°C에서 10분간 열변환(heat denaturation) 처리 후 전기영동을 수행한 결과, 이 밴드는 native protein과 마찬가지로 열에 안정하였으며(Fig. 14, lane 4) Western blotting을 수행한 결과, HFH의 발현이 확인되었다. 효모 균주 YG-L을 수확하여 세포 추출물을 얻은 다음 전기영동을 수행한 결과, 사람 FN L-chain의 분자량(19 kDa)에 해당하는 위치에서 발현된 단백질 밴드를 역시 확인하였으며, 이 밴드는 대장균에서 생산된 재조합 HFL과 유사한 위치에서 보였다(Fig. 14, 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(Lee et al., 2002). 그 이유로서 *hfH*와 *hfL*의 codon usage 차이를 포함한 유전자 내부의 번역 효율성 때문인 것으로 유추되었다. Western blotting을 수행한 결과, 사용한 항체가 간 FN 즉, L-rich FN으로부터 생산된 것이기 때문에 발현된 HFL에 대해 면역 반응성이 HFH보다 높게 확인되었다(Fig. 14b).

Promoter에 따른 *hfH*와 *hfL*의 발현량을 비교하여 요약한 결과를 Table 2에 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.

효모에서 발현된 각각의 사람 FN H- 및 L-subunit이 24개씩 서로 조합되어 native 형태의 holoprotein으로 이루어지는지 비변성 젤을 이용하여 전기영동을 수행한 결과, H-FN(Fig. 15a)과 L-FN(Fig. 15b) 각각의 holoprotein의 분자량에 해당되는 위치(H-FN, 507 kDa; L-FN, 479 kDa)에서 발현된 단백질 밴드를 확인할 수 있었다. 발현된 단백질은 대장균에서 발현된 재조합 H-FN 또는 L-FN(7)과 마찬가지로 Prussian blue 염색에 양성반응을 보였다. 이 결과는 효모에서 생산된 재조합 FN이 *in vitro*에서 철을 산화시켜 내공에 축적하였음을 의미한다.

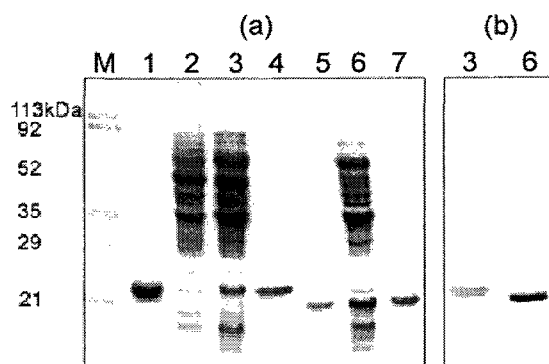


Fig. 14. 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(a) and Western blot analysis(b) of human ferritin H-chain and L-chain expressed in yeasts. The SDS-PAGE gel was stained with Coomassie blue R-250. The lanes are: M, size marker; 1, partially purified HFH(human ferritin H-chain) expressed in *E. coli*; 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.

Table 2. Comparison of cell growth and human ferritin(FN) expression level by recombinant yeast cells.

Human ferritin subunit	Strain	Promoter	Cell growth (O.D ₆₀₀)	Plasmid stability (%)	FN expression (FN/total protein, %)
HFH	YG-H	GAL1	35.5	85	4.0
	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

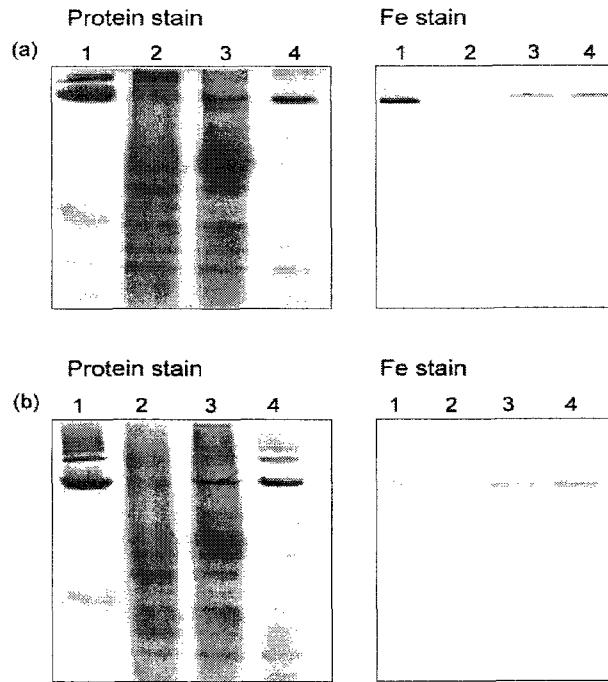


Fig. 15. 7.5% Native-polyacrylamide gel electrophoresis of recombinant human H-ferritin(a) and human L-ferritin(b). The acrylamide gels were stained for protein using Coomassie blue R-250 and for iron using Prussian blue. The lanes are: 1, partially purified *E. coli*-derived H-ferritin or L-ferritin; 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.

(2)-5. 재조합 H- 와 L-FN의 물리적 특성 규명

FN의 기능 및 물리적인 특성을 연구하기 위하여 2-(5)의 실험방법에 따라 재조합 효모 균주 YG-H로부터 H-FN 및 L-FN을 각각 정제하였다. 정제된 재조합 H- 및 L-FN의 UV/Vis 흡수스펙트럼을 측정된 결과, 이 두 단백질에 있어서 유사하게 나타났다(data not shown). 그리하여 그 스펙트럼은 전형적인 FN 양상으로서 280 nm에서 peak를 보이고 가시광선 영역에서는 넓은 부분에 걸쳐 흡수를 보인다. 각 H- 및 L-FN을 HPLC를 이용하여 분자량 측정 실험을 수행하였다. HPLC를 이용한 재조합 H-FN 및 L-FN의 분자량 측정 실험에서 각각의 FN은 retention time 9.54 분과 9.68 분에서 peak를 형성하는 것을 확인하였다. 이것은 효모에서 발현시킨 재조합 H- 및 L-FN이 당질화나 인산화 등이 일어나지 않았음을 의미하며, *E. coli*에서 발현된 FN과 동일한 분자량(H-FN, 507 kDa; L-FN, 479

kDa)을 가짐을 나타낸다. 효모에서 발현된 재조합 H-FN의 등전점(pI)은 pH 5.3이었으며 *E. coli*에서 발현된 H-FN은 pH 6.8로 나타났다. 효모에서 발현된 재조합 L-FN의 경우에는 pH 5.9로 측정되었다. 같은 조건 하에서 *E. coli*에서 발현된 L-FN은 pH 5.7로 측정되어 효모에서 발현된 경우와 유사한 값을 보였다. 이 결과 역시 효모에서의 재조합 FN이 당질화 등이 일어나지 않았음을 보인다.

Table. 3. Summary of the molecular properties of recombinant human H- and L-ferritins in *S. cerevisiae*

host	yeast		<i>E. coli</i>	
protein	H-ferritin	L-ferritin	H-ferritin	L-ferritin
M_r	(507 kDa)	(479 kDa)	507kDa	479kDa
retention time	9.54 min	9.68 min	9.54 min	9.76 min
pI	pH 5.3	pH 5.9	pH 6.8	pH 5.7

(2)-6. Atomic absorption spectrometry

H-FN 과 L-FN을 생산하는 재조합 효모 균주에 있어서 ferric citrate가 첨가된 배지에서의 세포 성장과 철 흡수 정도를 분석하였다(Table 4). 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 상당히 증가하였다. 그리고 H-FN과 L-FN을 생산하는 효모 균주를 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-FN 이나 L-FN의 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 성공

적으로 생산할 수 있는 시스템을 구축하였으며, 생산된 재조합 H-FN과 L-FN은 철 결합의 활성을 가지는 것으로 밝혀졌다. 그리고 사람 FN 유전자를 효모 균주에 발현시킴으로써 효모의 철 함량이 증진되었음을 유추할 수 있었다. 그리하여 발현된 재조합 FN을 분리 정제하여 이 단백질의 내공에 함유된 철의 양을 분석함으로써 증가된 철 함량과 발현된 단백질과의 상관 관계를 명확하게 규명하고자 한다.

Table 4. Atomic absorption spectrometry for intracellular iron content.

Cell type	Ferric citrate (mM)	No. of cells/ml	Iron content (ppm)
Recipient strain (2805)	0	$1.0 \times 10^9 \pm 1.7 \times 10^8$	3.8 ± 0.5
	10	$1.1 \times 10^9 \pm 3.6 \times 10^8$	49.4 ± 10.2
	20	$0.9 \times 10^9 \pm 3.2 \times 10^8$	147.0 ± 16.5
Transformant 1 (YG-H)	0	$1.3 \times 10^9 \pm 0.9 \times 10^8$	1.6 ± 0.3
	10	$1.2 \times 10^9 \pm 1.1 \times 10^8$	174.9 ± 7.2
	20	$1.2 \times 10^9 \pm 1.4 \times 10^8$	221.2 ± 37.9
Transformant 2 (YG-L)	0	$1.5 \times 10^9 \pm 3.0 \times 10^8$	3.3 ± 1.5
	10	$1.4 \times 10^9 \pm 1.7 \times 10^8$	148.8 ± 15.5
	20	$1.1 \times 10^9 \pm 1.4 \times 10^8$	227.3 ± 27.8

(3) 효모에서 인간 H- 및 L-chain FN 변이체의 생산 및 재조합 H- 및 L-FN의 기능 연구

(3)-1. FN 변이체 재조합 plasmid 구축

FN H- 및 L-chain의 기능을 연구하기 위해 각 유전자를 pSELECT-1에 cloning 한 후 ferroxidase 활성도와 관련이 있는 아미노산 부위 62번과 65번을 Table. 1의 primer를 가지고 site-directed mutagenesis를 이용하여 각각 또는 동시에 치환하였다. FN H-chain의 경우 62번 Glu를 Lys로, 65번 His를 Gly로, 또는, 62번 Glu와 65번 His를 Lys와 Gly로 치환된 재조합 효모 균주 변이체 YGh62K, YGh65G 및 YGhKG를 얻었다. FN L-chain의 경우 62번 Lys를 Glu로, 65번 Gly를 His로, 그리고 62번 Lys와 65번 Gly를 Glu와 His로 치환하여 YGh62E, YGh65H, 및 YGhEH를 각각 얻었다. 이들은 모두 GAL1 promoter 하류에 FN 유전자를 연결하였으며 terminator로써 GAL7 terminator를 가지고 있다.

(3)-2. FN H- 및 L-chain 변이체의 발현

재조합 효모 균주로부터 FN H- 및 L-chain 변이체의 발현을 확인하기 위해 2% galactose가 첨가된 YEP 배지에서 30°C에서 200rpm으로 3일간 배양한 후 효모 균주로부터 추출물을 획득하여 12% SDS-polyacrylamide 겔을 수행하였다. 전기영동 결과 YGh62K, YGhKG 재조합 효모 균주로부터 효모에서 발현시킨 FN H-chain과 같은 위치에서 단백질이 발현됨을 확인하였으며 YGh65H에서 효모에서 발현시킨 FN L-chain과 같은 위치에서 단백질이 발현됨을 확인하였다(Fig. 16). YGh65G, YGh62E 및 YGhEH에서는 위의 발현조건에서는 단백질이 발현되지 않은 것으로 보여졌다. 이전에 올챙이 FN H-chain의 65번 아미노산 잔기를 치환시킨 경우에 있어서는 단백질이 발현은 되었으나 대부분 비수용성 분획에서 얻어졌다(Kim, 1998). 발현된 FN 변이체 subunit들이 24개로 조합되어 native 형태의 holoprotein으로 이루어지는지 확인하기 위하여 75°C에서 10분간 열처리하여 부분 정제한 후 비변성 겔을 이용하여 전기영동을 수행하였다. 그 결과 각각 holoprotein 분자량에 해당하는 위치(H-ferritin, 507kDa; L-ferritin, 479kDa)에서 발현된 단백질 밴드를 확인할 수 있었으며 각 변이체는 native FN과 마찬가지로 열에 안정함이 확인되었다(Fig. 17).

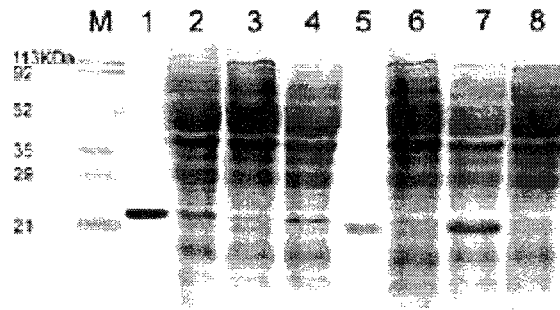


Fig. 16. 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of human ferritin H- and L-chain variants expressed in yeast. Cell extracts of each strain were lysed with glass bead. M; size marker, 1; yeast derived FN H-chain, 2; YGh62K, 3; YGh65G, 4; YGhKG, 5; yeast derived FN L-chain, 6; YGl62E, 7; YGl65H, 8; YGlEH

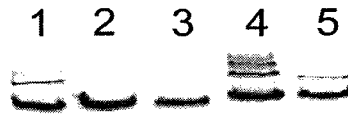


Fig. 17. 7.5% Native-polyacrylamide gel electrophoresis of human ferritin H- and L-chain variants expressed in yeast. 1; yeast derived H-FN, 2; partially purified variant of H-FN from YGh62K, 3; partially purified variant of H-FN from YGhKG, 4; yeast derived L-FN, 5; partially purified variant of L-FN from YGl65H.

(3)-2. FN 변이체에 의한 Fe 축적

재조합 효모균주로부터 FN 변이체를 각각 분리 정제하여 apoferritin을 만든 후 Fe(II)이온 축적 반응의 특성을 조사하고 효모에서 발현시킨 wild type H-FN 및 말 비장 FN과 비교하였다. 그리하여 각 apoferritin 분자당 200개의 Fe(II)이온과 반응시키고 그 흡수도 변화를 조사하였다(Fig. 18). 62K와 KG는 ferroxidase 활성 부위가 변이된 H-FN 변이체 즉, 62K는 62번 Glu를 Lys로 치환시킨 변이체이고, KG는 62번 Glu를 Lys로 치환함과 동시에 65번 His를 Gly로 치환시킨 변이체이다. Control은 FN 단백질이 없는 시료를 사용하였다. 단백질에 의한 Fe의 축적에 있어서 H-FN이 말 비장 FN이나 control 보다 빨랐으며 흡수율이 가장 컸다. 효

모에서 발현시킨 H-FN은 H subunit으로만 구성되어 있으며, 말 비장 FN은 15% H subunit과 85% L subunit으로 구성되어 있다. 이 결과는 이전에 발표된 결과(Levi et al., 1994)와 유사하게 나타난 것이다. 62K와 KG의 경우에 있어서는 H-FN에 비해 초기 반응속도뿐만이 아니라 최종 철 축적양에 있어서도 상당히 감소함을 보였으며, 말 비장 FN에 유사한 값을 나타내었다. 이것은 H-FN에 있어서 62번 Glu 잔기가 65번 His 잔기보다 철 축적에 더욱 큰 영향을 끼침을 의미한다(Fig. 18). 이전에 보고된 결과에 따르면 이 두 잔기를 모두 치환시킨 경우 ferroxidase 활성이 완전히 소멸되었으나 iron core는 형성됨이 보고된 바 있다(Sun et al., 1993).

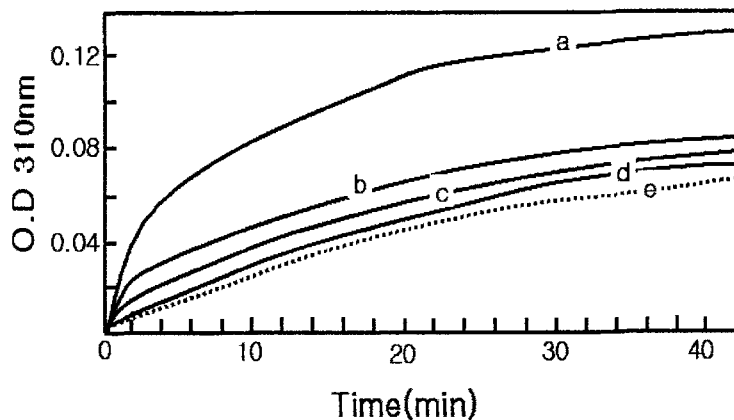


Fig. 18. Kinetics of recombinant ferritin variants. a, H-FN expressed in yeast; b, H-FN variant from YGh62K; c, H-FN variant from YGhKG; d, horse spleen ferritin; e, control.

(4) 효모에서 인간 FN H- 및 L-chain 유전자의 과발현 균주, 이형집합체의 개발과 생육특성

(4)-1. FN 이형집합체 발현 재조합 plasmid의 구축

본 연구에서는 먼저 효모에서 인간 FN H- 및 L-chain 유전자 (*hfH* and *hfL*)를 과발현시키는 벡터를 제조하기 위해 유도성 promoter인 GAL1를 이용하였다. 그리고 *hfH*의 경우에는 상위부분의 유전자인 GAATTC를 TTAAAA로 치환하였고, *hfL*의 경우에는 시작 코돈 다음의 AGC(Ser)를 TCT(Ser)로 치환하여 발현 벡

터 pYGH2과 pYGL1을 제조하였다(Fig. 4). 그리고 GAL1-GAL10 promoter를 선택하여 *hfH* 및 *hfL*를 동일 균주 내에서 발현시킬 수 있는 재조합 plasmid pY1H10L과 pY1L10H를 Fig. 5과 같이 구축하였다. 이들은 각각 GAL1 promoter와 GAL10 promoter하류에 FN 유전자를 교대로 연결한 plasmid이며 GAL7 terminator를 FN 유전자 하류에 각각 연결하였다. Promoter와 terminator를 제외한 나머지 염기 부분 (2- μ m origin, URA3, Amp^r)은 유전자 source와 방향면에서 모두 동일하다.

(4)-2. 균체 증식과 plasmid 안정성

유전자 산물의 생산성은 plasmid 안정성, 재조합 효모의 배양조건 등을 포함한 여러 인자들에 의해 좌우되므로(Romanos et al. 1992) 위에서 제조한 재조합 plasmid들을 이용하여 plasmid 안정성과 배양조건에 따른 성장속도를 조사하였다. 두 균주 모두 배양 말기까지 균체 증식이 점차적으로 증가하였으며, Y1H10L의 경우 복합 영양 배지에서 최종 균체 농도가 36-38 O.D₆₀₀에 도달하였고, Y1L10H의 경우 35-36 O.D₆₀₀에 도달하였다. Uracil 결핍 최소배지에서 키운 대부분의 균체는 복합 영양 배지에서보다 낮은 균체 증식을 보이며 3-4일경에 최고치에 도달하였고 그 이후에는 감소하는 경향을 보였다. 특히, YEP 배지에 1% glucose/ 3% galactose를 첨가한 경우에 있어서 균체 성장 곡선이 가장 증가하였다. 균주 Y1L10H의 경우에도 Y1H10L의 경우와 유사하게 나타났다. Plasmid 안정성에 있어서는 Y1H10L나 Y1L10H 균주 모두 배양 3일까지 약 80%이상으로 plasmid가 비교적 안정하게 유지되었다.

(4)-3. FN 발현 및 발현에 대한 배지의 영향

전체 수용성 단백질 중 FN의 발현량을 측정하기 위해 재조합 효모의 추출물을 SDS sample loading buffer와 1:1(v/v)로 섞어 100°C, 10분간 열처리한 후 12% SDS-polyacrylamide 겔을 수행하여 Fig. 19과 20에 나타내었다. 과발현을 위한 재조합 효모균주의 경우 2% galactose가 첨가된 YEP 배지에서 가장 발현율이 높았으며 그 발현양은 Fig. 19과 같이 HFH의 경우에는 YGH2가 가장 발현율이 높았으며 전체 수용성 단백질중 FN H-chain이 6%의 발현율을 보였다. HFL의 경우에는 YGL1이 21%로 가장 발현율이 높았으며 *E. coli*에서 FN을 발현시켰을 때와

마찬가지로 L-FN이 H-FN보다 더 높은 발현율을 보였다. 이형집합체의 FN 발현에 있어서 배지의 영향을 조사하여 본 결과, 균주 Y1H10L의 경우 2% galactose를 포함하는 배지에서 H와 L subunit의 총 발현양이 가장 높게 나타났다. 테스트한 모든 배지에서 이틀 간의 배양시 발현양이 가장 높았다. 그리하여 균체 성장을 고려하여 2% galactose를 포함하는 YEP 배지에서 이틀간 배양했을 때 전체 수용성 단백질의 약 20%에 해당하는 H와 L subunit의 총 발현양을 얻었다. 이 때 H subunit의 상대적인 발현양은 22%로 분석되었다(Fig. 20).

균주 Y1L10H의 경우에는 uracil 결핍배지에서 배양 첫째 날에 FN의 두 subunits의 발현양이 18%로 가장 높았고 배양일이 지날수록 발현양이 감소함을 보였다. 배지에 따른 H와 L subunit의 총 발현양은 Y1H10L의 경우에서와 같이 2% galactose를 포함하는 YEP 배지에서 배양했을 때 가장 높게 나타났다. 이 경우에도 테스트한 모든 배지에서 이틀간 배양시 총 발현양이 가장 높았다. 그리하여 이 균주의 경우에도 균체 성장을 고려하여 2% galactose를 포함하는 YEP 배지에서 이틀간 배양했을 때 전체 수용성 단백질의 약 15%에 해당하는 H와 L subunit의 총 발현양을 얻었다. 이 때 H subunit의 상대적인 발현양은 38%로 분석되었다(Fig. 20).

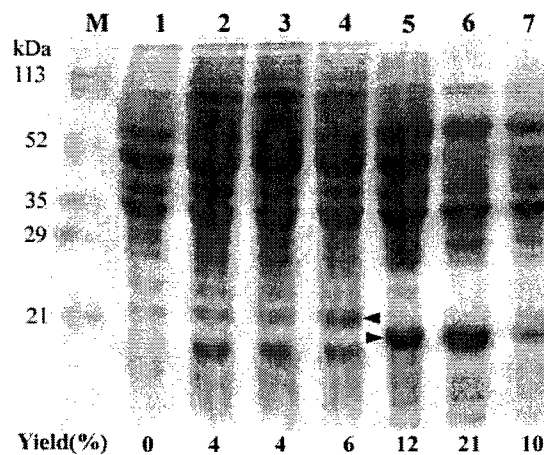


Fig. 19. 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of human ferritin H- and L-chain expressed in yeasts. Expression yields are estimated by densitometric analysis. The lanes are: M, size marker; 1, cell extract of the host cell *SC2805*; 2, *YGH*; 3, *YGH1*; 4, *YGH2*; 5, *YGL*; 6, *YGL1*; 7, *YGL2*.

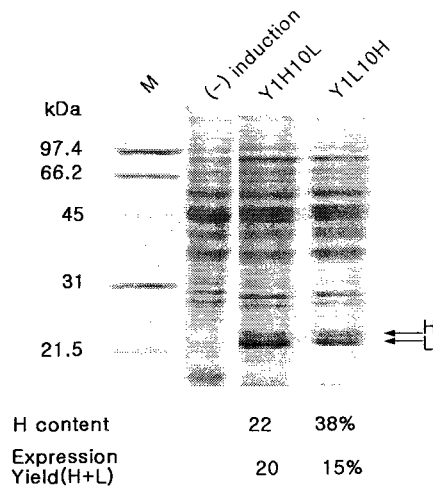


Fig. 20. 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of human ferritin H- and L-chain expressed in yeasts grown in media containing 2% galactose. The SDS-PAGE gel was stained with Coomassie blue R-250. The lanes are: M, size marker; (-) induction, cell extract of the transformant Y1H10L without induction; Y1H10L, cell extract of the transformant Y1H10L; Y1L10H, cell extract of the transformant Y1L10H.

*E. coli*로부터 발현시킨 HFH와 HFL 단백질로부터 mouse와 rabbit에서 얻은 각각의 항체를 이용하여 Western blot을 수행하여 효모에서 발현시킨 FN H- 및 L-chain에 대한 항체의 특징을 조사하였다. 그 결과 Fig. 21에서 같이 anti H-FN은 *E. coli* 및 효모에서 발현된 FN H-chain은 인식하나 L-chain은 인식하지 못하였다. Anti L-FN의 경우에는 *E. coli* 및 효모에서 발현된 FN L-chain과 *E. coli* 및 효모에서 발현된 FN H-chain을 인식하여 이들 사이에 일부 cross-reactivity가 있음을 확인하였다. Anti L-FN의 경우 *E. coli*보다 효모에서 발현된 FN H-chain에 특이성이 높게 나타났다(Fig. 21b).

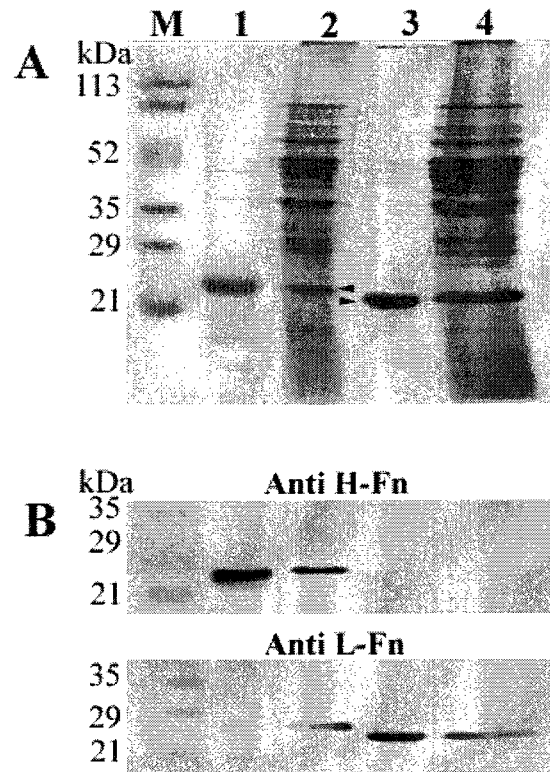


Fig. 21. 12%SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (A) and Western blot (B) against anti human H-ferritin (top) and L-ferritin (bottom). The lanes are: M, size marker; 1, *E. coli*-derived recombinant human ferritin H-chain; 2, cell extract of the yeast YGH2; 3, *E. coli*-derived recombinant human ferritin L-chain; 4, cell extract of the yeast YGL1.

(4)-4. 효모에서 생산된 인간 FN H 및 L subunit의 조합

재조합 단백질에 대하여 비변성 젤을 이용하여 전기영동을 수행한 결과, 효모에서 발현된 각각의 인간 FN H 및 L subunit이 서로 조합되어 이형집합체 형태로 이루어진 FN 단백질 밴드를 확인하였다. 발현된 단백질은 대장균에서 발현된 재조합 H-FN 또는 L-FN(Lee et al. 2001)과 마찬가지로 Prussian blue 염색에 양성 반응을 보였다. 이 결과는 효모에서 생산된 재조합 FN 이형집합체가 *in vitro*에서 철을 산화시켜 내공에 축적하였음을 의미한다(Fig. 22).

Y1H10L과 Y1L10H 균체에서 생산된 인간 FN의 subunit의 조성 비율을 알아보기 위해 비변성 젤을 이용하여 전기 영동을 수행 후, FN 단백질의 단량체에 해당하는 밴드로부터 단백질을 추출하여 다시 변성시킨 다음 SDS-PAGE를 해 본

결과, H:L subunit의 조성율이 두 균주에서 동일한 유전자 배열에 의해서도 생육 조건에 따라 각기 서로 다른 subunit 조성비를 보였다(Fig. 23). 따라서 본 연구를 통하여 두 균체에서 생산된 재조합 인간 FN은 H와 L subunit으로 조합된 FN 이형집합체임을 증명한다. 위에서 얻은 subunit의 상대적인 함량과 비교해 볼 때, Y1H10L 균주의 경우에는 배지의 농도에 상관없이 H subunit의 함량이 70 %로 나왔으며, Y1L10H의 경우는 배지의 농도와 배양 기간에 따라 다르게 보였으며 H subunit의 함량이 50-70 %로 나왔다. 이 전에 발표된 보고에 따르면 발현된 subunit의 상대적인 양과 생산된 재조합 단백질에 있어서의 subunit의 조성 비율과는 밀접한 관계에 있으며, 비교적 제한된 범위의 subunit 조성비를 보였다 (Rucker et al., 1997).

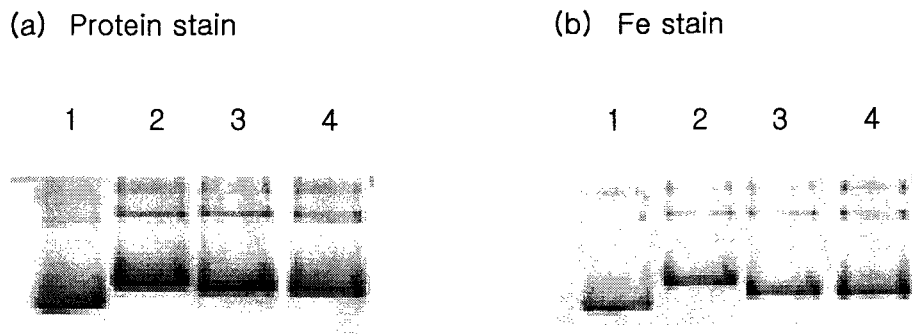


Fig.. 22. 7.5% Native-polyacrylamide gel electrophoresis of recombinant human ferritin heteropolymers. The acrylamide gels were stained for protein using Coomassie blue R-250(a) and for iron using Prussian blue(b). The lanes are: 1, cell extract of the transformant YGH2; 2, cell extract of the transformant YGL1; 3, purified ferritin heteropolymer from the transformant Y1H10L; 4, purified ferritin heteropolymer from the transformant Y1L10H.

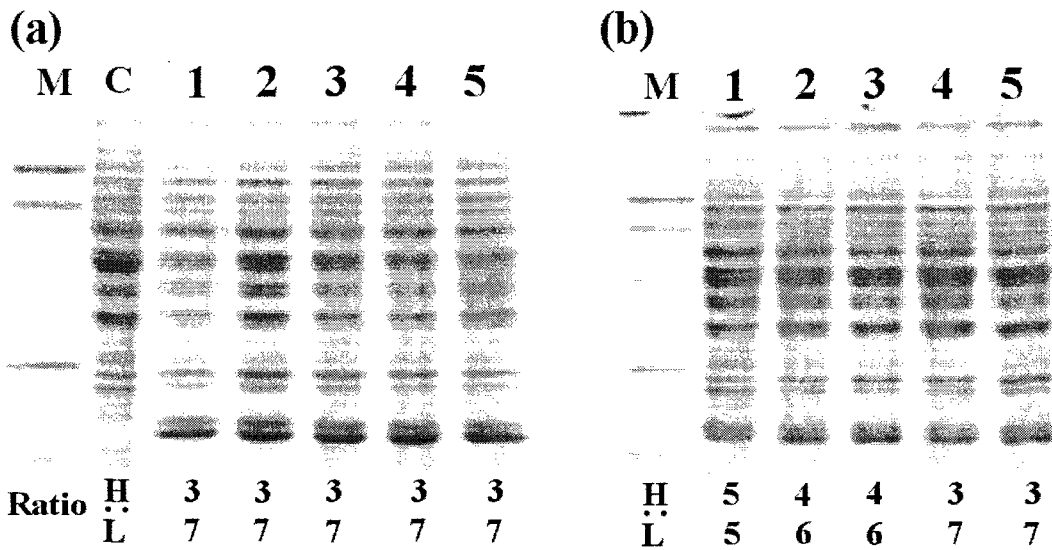


Fig. 23.. 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of human ferritin heteropolymers produced in the transformants Y1H10L(a) and Y1L10H(b). M. molecular marker; C. negative control strain YGT; 1. 1 d culture; 2. 2 d culture; 3. 3 d culture; 4. 4 d culture.

(4)-5 FN 내 Fe 흡수

E. coli 및 효모로부터 정제된 H-FN 및 L-FN을 이용하여 iron uptake 실험을 수행하였다. Fig. 24에서 보듯이 H-FN은 L-FN에 비해 그 초기 반응 속도가 빨랐으며 반응시작 후, 5 min 정도에서 반응이 종결되었다. Fe 원자 100 개와 반응시켰을 때는 이 보다 빨랐으며 반응시작 후, 2 min경에 반응이 종결되었다. 흥미롭게도 *E. coli*에서 생산된 재조합 H-FN의 경우에는 400 개의 철 원자와 반응시켰을 때에도 이 보다 빨리 반응 시작 후, 2-3 min경에 반응이 종료되었다. 반면에 L-FN의 경우에는 효모에서 생산된 재조합 L-FN의 반응 속도가 철 원자 200 개 또는, 400 개와 반응시 S자 형상을 이루며 더욱 빨랐다. 이 결과는 대장균과 효모에서 각기 발현시킨 각각의 H- 및 L-FN에 있어서 그 반응속도에 차이가 있음을 보인 결과로써, 현 시점에서 그 이유는 명확하지 않으나 FN에 있어서 단백질이 발현되는 숙주에 따라 기능상에 차이가 있음을 알 수 있다.

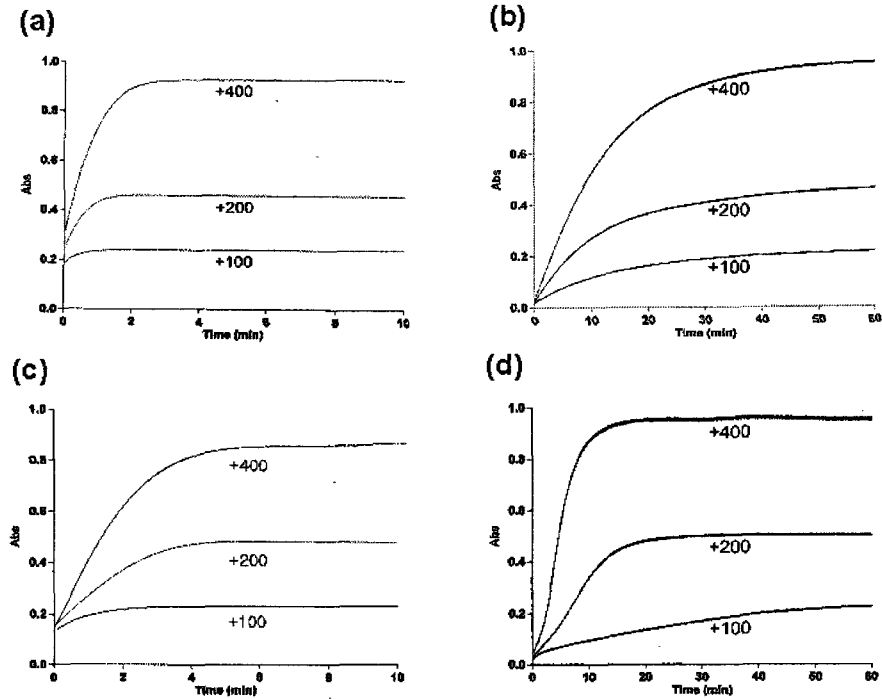


Fig. 24. Absorbance of iron uptake with various numbers of Fe(II) ions/molecule of apoferritin. The apoferritin concentration was 0.5 mg/mL in 20 mM imidazole (pH 7.0). The number of Fe(II) ions added per molecule of apoferritin was 100, 200 and 400. (a) *E. coli*-derived recombinant human H-FN; (b) *E. coli*-derived recombinant human L-FN; (c) yeast-derived recombinant human H-FN; (d) yeast-derived recombinant human L-FN;

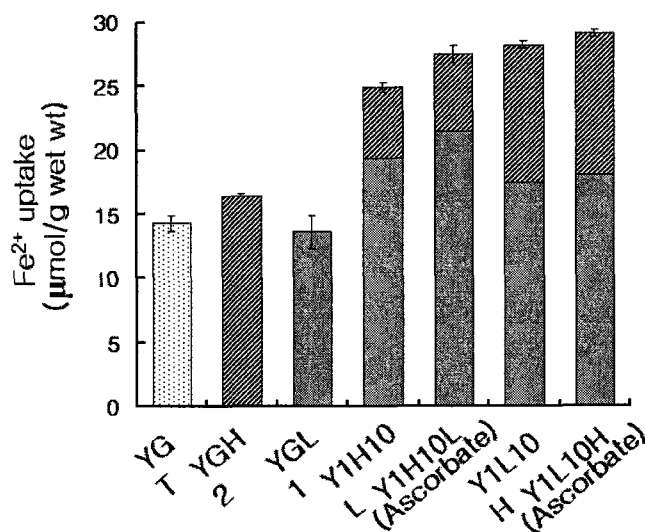
(4)-6. Atomic absorption spectrometry

FN 이형집합체를 생산하는 재조합 효모 균주에 있어서 철 흡수 정도를 분석하였다(Table. 5 & Fig. 25). 효모 균주를 Fe^{2+} 과 반응시켜 세포 내 철의 함유량이 증가하였음을 확인할 수 있었다. 효모 균주 Y1H10L과 Y1L10H를 14.3 mM Fe^{2+} 과 반응시켰을 때의 세포 내 철의 농도는 각각 17.8 μ mol per gram(wet wt)과 21.3 μ mol per gram(wet wt)이었고 효모 숙주세포에 있어서의 철의 농도는 12.0 μ mol per gram(wet wt)이었다. 이 농도는 숙주세포에 비해서 철의 함량이 각각 약 1.5배와 1.8배 증가한 값이다. 효모 균주 Y1H10L과 Y1L10H를 이틀간 배양했을 때 이 값은 각각 24.9 μ mol per gram(wet wt)과 28.2 μ mol per gram(wet

wt)이었다. 이 농도는 숙주세포에 비해서 철의 함량이 각각 약 2.1배와 2.4배 증가한 값으로써 FN의 상대적인 발현양이 높을 때 철 이온의 흡수가 증가함을 알 수 있다. 또한, 효모 Y1L10H에서의 철의 흡수가 Y1H10L에서보다 13-20% 증가하였는데 이것은 H subunit의 상대적인 발현양과 관련있는 것으로 유추된다(Fig. 23). Fe^{2+} 과 반응에 있어서 0.2 mM ascorbate를 첨가한 경우 이 값은 각각 27.5 μ mol per gram(wet wt)과 29.1 μ mol per gram(wet wt)으로써 철의 흡수가 약간 증가하였다. Ascorbate는 세포 내 많은 대사 반응에 있어서 중요한 조효소로서, Hoffman 등(Hoffman et al. 1991)은 ascorbate가 세포내 철 이온의 대사기전과 밀접한 관련이 있으며 특히, FN 분해를 억제하고 철 이온을 생물학적으로 유용한 상태로 유지한다고 보고한 바 있다. 10mM ferrous ammonium sulfate가 첨가된 배지에서 재조합 효모균주를 배양한 후 Sephacryl S-300을 수행하였으며 각 fraction을 원자흡광광도계를 이용하여 철의 양을 측정하였다. 그 결과 FN 유전자가 들어 있지 않은 YGT의 경우에는 거대분자에 대부분의 철이 결합한 것을 확인할 수 있었으며 YGH2의 경우에는 H-FN에 다량의 철이 축적되어 있는 것으로 보아 세포내에서 거대분자 보다 철에 대한 친화력이 높음을 확인하였다. YGL1의 경우에는 L-FN의 주된 기능이 철의 미네랄화임을 감안할 때 상대적으로 적은 양의 철을 결합하고 있음을 확인하였다. 이형질체인 Y1L10H의 경우는 YGH2와 유사하게 나타났으며 다량의 H-chain의 발현에 의해 철의 친화력이 높음을 확인하였다(Fig. 26). 이것은 철이 첨가된 배지에서 키운 재조합 효모의 증가된 철이 직접적으로 FN 단백질 내에 축적됨으로써 효모내에 철의 축적을 증가시키는 주요한 이유로 판단된다.

Table. 5. Atomic absorption spectrometry for iron uptake and intracellular iron

Cell type	Fe ²⁺ (mM)	Ascorbate (mM)	Yield (%)	Fe ²⁺ uptake ^a	Culture (day)
YGT	0			0.1	3
	14.3	0	8.4±2.0	12.0±2.9	3
		0	10.0±0.4	14.3±0.6	2
		0.2	7.8±0.1	11.2±0.2	3
YGH2	0			0.1	3
	14.3	0	11.6±1.0	16.6±1.4	3
		0	11.6±0.1	16.5±0.1	2
		0.2	12.2±1.0	17.4±1.5	3
YGL1	0			0.1	3
	14.3	0	7.8±2.0	12.5±2.3	3
		0	9.5±1.0	13.6±1.3	2
		0.2	9.6±0.3	13.7±0.4	3
Y1H10L	0			0.1	3
	14.3	0	12.5±0.6	17.8±0.9	3
		0	17.4±0.3	24.9±0.4	2
		0.2	19.2±0.5	27.5±0.7	2
Y1L10H	0			0.1	3
	14.3	0	14.9±0.8	21.3±1.2	3
		0	19.7±0.5	28.2±0.3	2
		0.2	20.3±0.2	29.1±0.3	2



a The unit is μmol per gram (wet cell weight).

Values were obtained from three replicates. Values are means \pm standard deviation.

Fig. 25. Comparison on the amount of iron taken up by *S. cerevisiae* described as μmol per gram(wet cell weight).

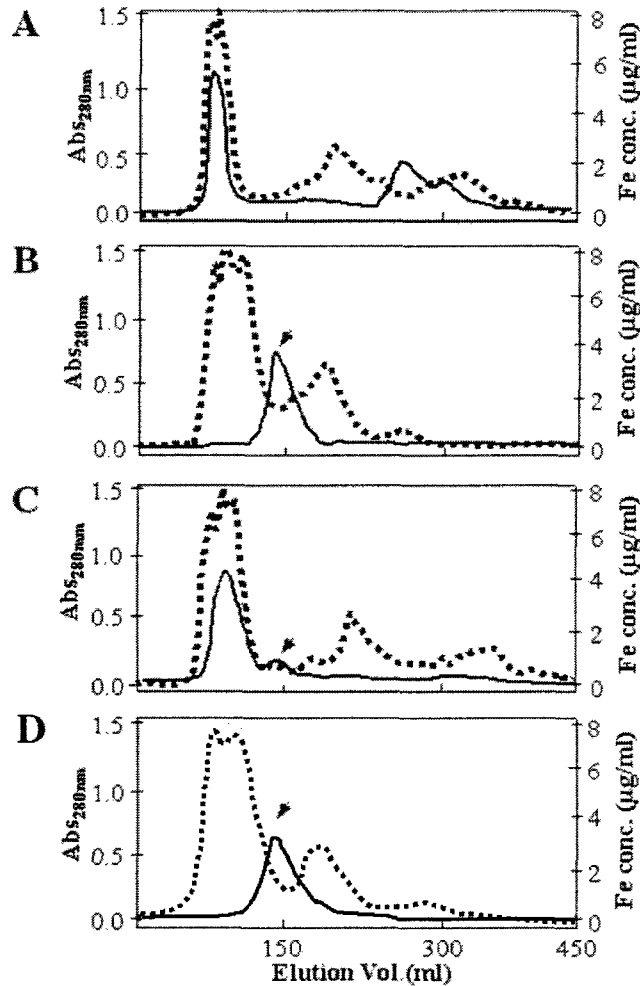


Fig. 26. Chromatography on Sephacryl S-300 of the sonic extract of the transformed yeasts that were incubated with 10 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$. (---), optical density at 280 nm; (), Fe concentration (g/ml). A YGT; B YGH2; C YGL1; D Y1L10H

재조합 효모로부터 FN 이형집합체를 분리하여 전자현미경에서 관찰한 결과를 Fig. 27에 나타냈다. 두 균주에서 분리한 FN 이형집합체의 이미지로부터 전자 밀도가 높은 FN core를 각각 확인할 수 있었다. 이들의 염색 시료로부터 관찰한 결과, FN core들은 전자 밀도가 낮은 단백질 띠로 둘러싸인 것을 확인할 수 있었다. 이는 효모에서 생산된 재조합 FN 이형집합체가 철을 저장할 수 있는 기능을 유지하고 있음을 증명한다.

이상의 실험 결과를 종합해 보면, 본 연구를 통해서 효모에서 인간 FN 이형집

합체를 성공적으로 생산할 수 있는 시스템을 구축하였으며, 생산된 재조합 FN 이형집합체는 철 결합의 활성을 가지는 것으로 밝혀졌다. 그리고 인간 FN 유전자를 효모 균주에 발현시킴으로써 효모의 철 함량이 증진되었음을 유추할 수 있다. FN은 동·식물은 물론, 인간에게 철분의 영양공급원이다(Beard et al. 1996). 따라서 본 연구를 통해서 개발된 철 함량이 증진된 효모를 산업적으로 매우 다양하게 활용할 수 있을 것이다.

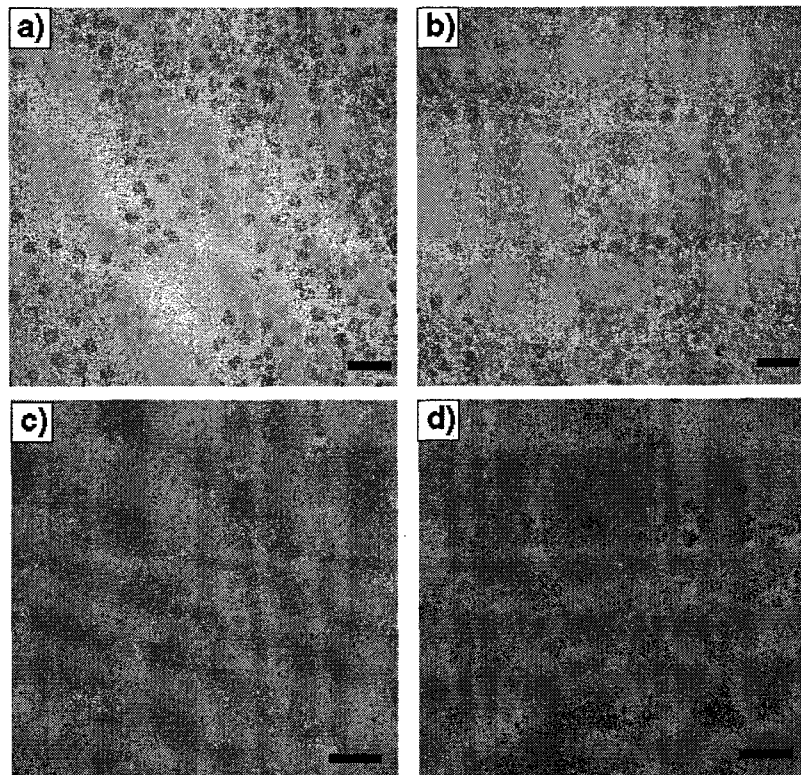


Fig. 27. Ultrastructure of purified recombinant human ferritin heteropolymers. (a) unstained ferritin heteropolymer from Y1H10L, (b) unstained ferritin heteropolymer from Y1L10H, (c) negatively stained image of ferritin heteropolymer from Y1H10L, (d) negatively stained image of ferritin heteropolymer from Y1L10H.

(5) FN을 생산하는 효모 균체에 있어서 철 흡수의 최적화 및 현취에 있어서 철 결핍 회복에의 효과

(5)-1. 균체 농도에 따른 철 흡수

효모가 철을 흡수함에 있어서 세포의 농도(수)와 관련이 있는지 알기 위하여 2가지 세포의 농도(100mg/ml or 200mg/ml)에서 철의 흡수량을 비교하였다. Fe^{2+} 을 위해서 화합물 ferrous ammonium sulphate를 사용하였으며, 철을 흡수하는 동안 효모세포의 생존을 위하여 5% glucose를 첨가하였다. 실험은 20mM MOPS buffer(pH6.5)에서 진행되었다 (이 buffer에서 Fe^{2+} 상태가 2시간 동안에는 유지됨을 확인하였다). 실험 결과, 전반적으로 세 균주 모두에서 100mg/ml의 세포 농도에서 철의 흡수량이 200mg/ml의 세포 농도보다 2배 이상 증가하였음을 확인할 수 있었으며, 특히 YGH2는 14.3mM ferrous ammonium sulphate에서 흡수된 철의 양이 $16.7 \pm 0.7 \mu\text{g/g(wet wt)}$ 로 얻어졌다. 이는 YGT의 $11.1 \pm 0.1 \mu\text{g/g(wet wt)}$, YGL1의 $12.1 \pm 0.9 \mu\text{g/g(wet wt)}$ 보다 약 1.5배 증가한 값이다(Fig. 28).

세포 농도와 Fe^{2+} 와의 반응을 고려할 때, 세포 농도 200 mg/ml에서 흡수되는 철의 양이 현저히 저하되는 것으로 보아 세포 자체가 철을 흡수하는 데 있어서 일종의 저해 작용을 하는 것으로 유추된다. 일정 공간 안에 녹을 수 있는 산소의 양은 철의 흡수와 밀접한 관련이 있을 것이다. 실제로 효모 내로 유입되는 산소의 양이 적을 경우 철 이온을 흡수하는 과정에 필요한 여러 효소의 활성이 저해됨을 알 수 있다(Hassett RF, 1998). YGH2의 경우 세포 농도 100 mg/ml에서는 반응시킨 철 이온의 농도가 증가할수록 세포에 저장되는 철의 양이 증가하는 것으로 보아 H-chain FN이 효모내에서 정상적으로 기능을 발휘하는 것으로 보여진다. YGL1의 경우는 효모 안에서 정상적으로 잘 발현되는 것을 확인하였으나, 철의 양이 증가하지 않는 것으로 보아 정상적으로 기능을 발휘하지 못하거나 철 저장 능력이 없는 것으로 판단된다.

효모 균체와 철을 반응시킨 후 반응여액 내의 철 함량과 세포 내로 흡수된 철 함량을 비교분석 하였다(Fig 29). 처음 첨가했던 철의 양과 비교하였을 때 세포 안으로 축적된 철의 양과 반응 buffer 내에 남아 있는 철의 양을 합하면 거의 회수(97% 이상)되고 있음을 보인다.

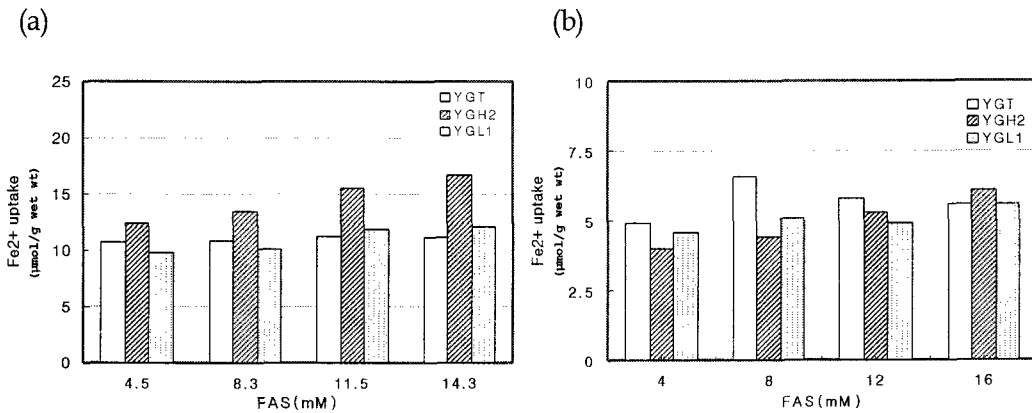


Figure. 28. Iron uptake using ferrous ammonium sulphate at different cell concentration (a)100mg/ml and (b)200mg/ml. Detailed reaction condition are described in the text.

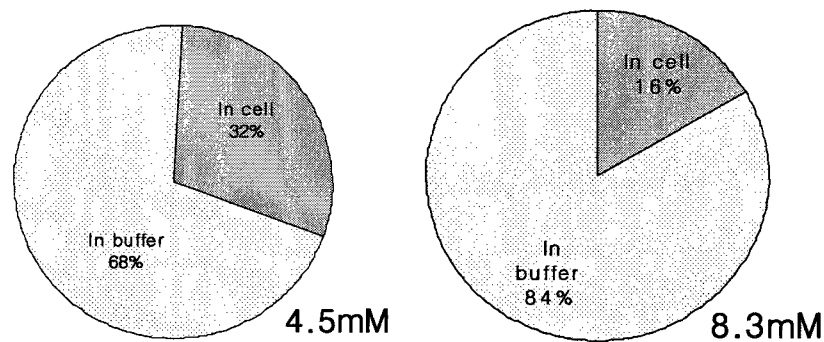


Figure. 29. Iron within the yeast cells and buffer solution after reaction to Fe²⁺. Reacted Fe²⁺ concentrations were 4.5mM and 8.3mM. These were calculated as yield(%) that indicated iron concentration in cells and buffer soln. to initially treated iron concentration.

(5)-2. 철 화합물에 따른 철 이온의 흡수

효모 내로의 철 이동과정에서 볼 때, Fe²⁺가 Fe³⁺보다 흡수율이 훨씬 좋은 것으로 알려져 있다. 따라서 철 이온의 효모 내로의 흡수는 철 화합물의 종류에 따라 많은 영향을 미칠 것으로 생각된다. 이 실험에서는 Fe²⁺ 화합물로 ferrous ammonium sulphate(FAS)와 ferrous sulphate(FS)를 사용하였으며, Fe³⁺ 화합물로는 ferric citrate를 사용하였다. 그 결과 Fe²⁺ 화합물인 FS와 FAS가 Fe³⁺ 화합물인 ferric citrate에 비하여 효모에서의 흡수율이 15 배정도 증가한 것을 확인하였

다(Fig 30). YGH2 경우에는 균체 농도 100 mg/ml에서 ferrous sulphate 농도가 증가함에 따라 흡수되는 철 농도가 증가하지만, YGT와 YGL1은 철 농도가 그대로 유지되는 경향을 보였다. 특히, YGH2의 경우 14.3 mM FAS 첨가 후 흡수된 철 농도는 16.7 $\mu\text{g/g}$ 이지만, 14.3 mM FS에서는 17.8 $\mu\text{g/g}$ 로 약간 높게 나타났다. 이러한 약간의 차이는 FAS의 ammonium이 미소하게 철의 흡수에 영향을 미치는 것으로 유추된다. (Fig 28, 30). 이와 유사하게 YGT에서는 11.1 $\mu\text{g/g}$ 과 12.9 $\mu\text{g/g}$, YGL1 경우엔 12.1 $\mu\text{g/g}$ 과 12.4 $\mu\text{g/g}$ 로 조금씩 높게 나타나는 경향을 보였다. 앞의 실험에서와 마찬가지로 YGH2의 H-chain FN은 정상적인 기능을 하는 것으로 보여지며, YGL1의 경우는 그렇지 않은 것으로 생각된다. 특이한 점은 FAS를 이용하여 200 mg/ml의 세포 농도에서 철 이온을 흡수시키는 과정에서 YGH2가 YGT에 비하여 초기에 yield가 5% 적게 나오는 경향성을 보이는데, 이 결과는 YGH2가 반응용액에 녹아 있는 산소의 양에 더욱 민감함을 말해준다.

Table. 6은 균체 농도 100 mg/ml 조건에서 FS를 농도별로 처리하여 흡수된 철의 양을 나타낸 것이다. 여기에서 yield는 처음 반응시킨 Fe^{2+} (μg)에 대한 반응 후 효모 균체 내의 철 이온 함량(μg)을 백분율로 나타낸 것으로 낮은 철 농도에서 반응시켰을 때 세포 내로의 수율이 가장 높았다(Besevler. et. al., 2001). 이 표에서 보면 FS의 농도가 증가함에 따라 대조군 균주와 재조합 된 균주 모두에서 yield가 급속히 감소함을 볼 수 있다. 이것은 실험에 사용한 철 농도 범위에 있어서 효모로의 철 흡수 반응이 확산 속도보다는 kinetic rate에 의존함을 의미한다. 흡수된 철의 양을 비교해 볼 때, YGT는 8.3 mM까지는 12.5 $\mu\text{mol/g}$ wet wt 이었다가 11.5 mM의 철 이온 농도에는 10.5 $\mu\text{mol/g}$ wet wt로 감소 되었고, 다시 14.3 mM에서는 종전의 상태로 회복되는 것을 볼 수 있다. YGH2의 경우는 처리된 철의 농도에 비례하여 조금씩 흡수되는 철의 양이 증가하여, 14.3 mM에서는 YGT에 비하여 철의 양이 1.5배 증가하였다. YGL1의 경우에는 YGT에 비하여 11.5 mM까지는 철의 흡수량이 적다가 14.3 mM에서는 YGT와 비슷한 수준으로 철을 흡수함을 보였다.

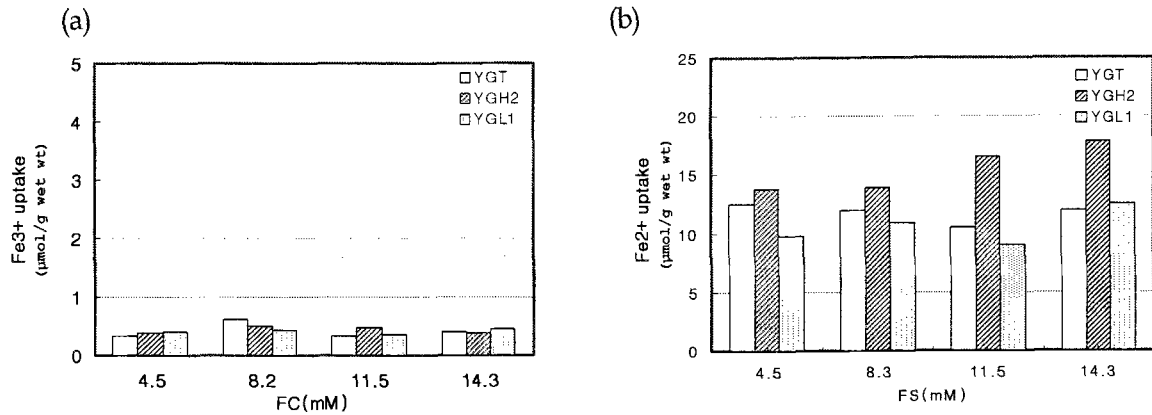


Figure. 30. Iron uptake from (a) ferrous sulphate and (b) ferric citrate at the cell concentration 100 mg/ml. The experiments were carried out at 3 days culture-2h reaction, with agitating to 200rpm, 30°C in the darkness.

Table. 6. The iron content of *S. cerevisiae* in relation to Fe concentration. Detailed reaction conditions are described in the text.

Cell type	Cell conc. (mg/ml)	FS (mM)	In cells	
			Yield (%)	Fe ²⁺ uptake (µmol/g wet wt)
YGT	100	0	0	0.1
		4.5	27.8	12.5
		8.3	14.4	12.0
		11.5	9.1	10.5
		14.3	9.0	12.9
YGH2	100	0	0	0.1
		4.5	30.7	13.8
		8.3	16.7	13.9
		11.5	14.3	16.5
		14.3	12.5	17.8
YGL1	100	0	0	0.1
		4.5	21.5	9.7
		8.3	13.1	10.9
		11.5	7.8	9.0
		14.3	8.7	12.4

FS ferrous sulfate

(5)-3. 반응 시간에 따른 철 이온의 흡수

효모가 철 이온을 흡수하는 과정은 배지에 철이 결핍된 상태에서의 흡수과정인 high-affinity system과 철의 양이 많을 경우인 low-affinity system으로 나뉜다. 이 과정을 통하여 철의 흡수는 재조합 된 효모균주의 생리 상태에 따라서 일정량을 흡수하고 더 이상은 흡수하지 않을 것으로 생각된다. 따라서 14.3 mM의 FS를 처리하여 시간별로 재조합 효모가 얼마나 철 이온을 흡수하는지 조사하였다. Fig. 31에서 보여지는 것처럼 철 이온의 흡수는 세 균주 모두에서 반응 시작 후 120 분까지는 약 1.3~1.5 배로 지속적으로 증가세를 보이다가 반응 120 분 이후에는 그 증가율이 약 1.0 배로 정지 구간이 나타났다. 이는 H-chain 및 L-chain 유전자가 삽입된 효모 내로의 철 이온 흡수가 정지되었거나 흡수된 철 이온 함량과 효모 균주로부터 방출되는 철 이온 함량과 같아 일정하게 철 함량을 유지하는 것으로 생각된다(Donmez, 2001). YGH2의 경우 YGT나 YGL1에 비하여 어느 반응시간에서나 높은 철 함량을 보이며, 시간이 경과함에 따라 점점 그 차이가 커지는 것을 볼 수 있다. 최근 논문에 의하면 YGH2에서의 철 저장 경로가 액포(vacuole)에서 효모 내에 발현된 H-chain FN쪽으로 이동하는 것으로 유추하였는데, YGH2가 세포막까지 철을 통과시키는 과정이 YGT와 동일함을 감안한다면, Fig. 31에서 점점 철의 함량 차이가 시간이 지남에 따라 커지는 결과는 결국 세포 내의 철 이온에 대하여 액포 보다는 FN이 affinity가 더 높다는 것을 의미한다(Seo et al, 2003).

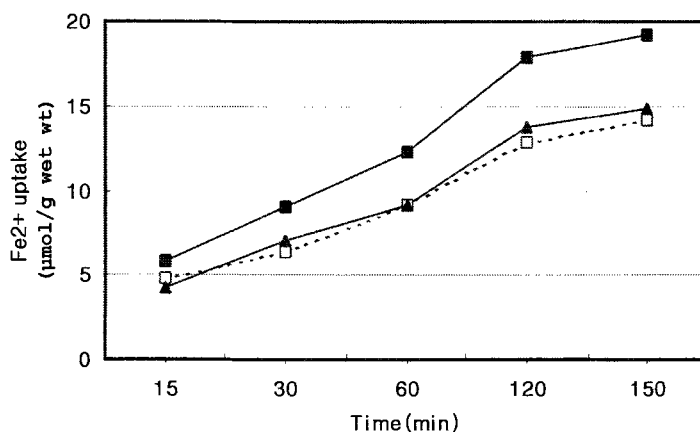


Fig. 31. Fe^{2+} uptake by the yeasts with 14.3mM $Fe(SO_4)_2$ in relation to the reaction time. YGT(□); YGH2(■); YGL1(▲)

(5)-4. Ascorbate의 첨가에 따른 철 이온의 흡수

Ascorbate는 환원제로써 Fe^{3+} 를 Fe^{2+} 로 만들어 철 이온의 bioavailability를 증가시키며, 철의 흡수 또한 증가시키는 역할을 한다. 실제로 FN이 재조합된 대장균에서 ascorbate는 대장균 내로의 철 유입을 증가시켰으며(Lee et al, 2001), 재조합된 효모 내에서도 같은 역할을 할 것으로 예측되어진다. 이 실험에서는 각각의 인간 FN 유전자가 삽입된 효모를 3일간 배양한 후 철 이온 첨가와 함께 $200 \mu M$ ascorbate가 처리되어 비교 분석하였다.

YEP(Gal 함유) 배지 내에서 효모 균주의 배양일을 2일과 3일의 변화 조건에서 관찰하였을 때, YGH2는 2일 이나 3일 모두 비슷하게 철을 저장하고 있으나, YGT나 YGL1의 경우는 저장된 철의 양이 3일째 감소하는 것을 알 수 있다. 또한 3일 동안 배양한 후 ascorbate를 처리하면, YGT는 철의 함량이 약간 감소하였지만, YGH2나 YGL1의 경우는 미미하게 증가함을 알 수 있었다(Fig. 32). Fe^{3+} 이 FN 안으로 들어가기 위해서는 cytosol 내에서 Fe^{2+} 로 변환되어야 한다는 점을 고려하여 볼 때, 효모 내에서 철 이온의 대부분이 Fe^{2+} 상태를 유지함으로써 ascorbate가 큰 역할을 하지 못한 것으로 유추되며 앞으로 높은 농도의 ascorbate를 처리하여 그 기능을 확인하고자 한다.

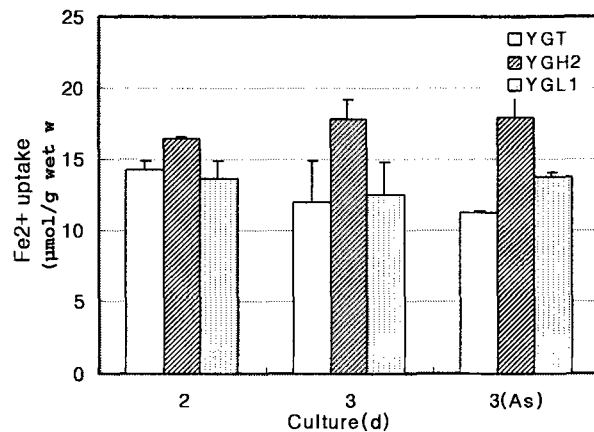


Fig. 32. Effect of ascorbate on the iron uptake by the yeasts.

(5)-5. 동물실험을 이용한 철 흡수 조사

흰쥐를 동물 모델로써 FN에 있는 철 또는, FN을 생산함으로써 철 함량이 증진된 효모가 철 결핍 회복에 있어서 생물학적으로 그 효능이 유용한가를 실험하였다. 철 결핍 실험군(2 mg Fe/Kg)에 대조하여 철 공급원으로 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (FAS, 표준 철분 공급원)와 horse spleen FN(HSF), 그리고 재조합 사람 FN H-chain을 생산하는 효모(YGH2)를 사용하였다(Table 7-9). 철 결핍 실험군에 있어서 실험기간 동안 헤모글로빈의 농도와 hematocrit 수치가 표준 그룹에 비해 약 40%가 지속적으로 낮은데 비해, 철이 공급된 실험군들의 헤모글로빈 농도와 hematocrit 수치는 점차적으로 표준 그룹에 가까워져 28일이 되었을 때는 표준 그룹과 거의 유사한 값을 갖게 되는 것을 알 수 있다. 특히, FN이나 FN을 생산하는 효모를 공급한 경우 철 결핍 회복에 더 우월한 효과를 보였다. 이는 쥐의 철 결핍 증상이 회복되었음을 나타내며 세 가지의 철 공급원(FAS, HSF, YGH2)이 모두 철 결핍 회복에 효과적임을 말해준다(Table 7). 대조군에 있어서는 이들 값이 철 결핍 집단과 유사하게 나타났다. Ascorbate를 효모와 같이 공급한 경우에는 효모 자체만을 공급한 경우와 비교하여 헤모글로빈 농도와 hematocrit의 값에서 약간 낮게 나타남으로써 이 경우 ascorbate의 영향이 미미함을 보였다.

Table 7. Recovery of rats from dietary iron deficiency anemia with iron from purified ferritin(horse spleen, HSF) or recombinant yeast(YGH2).

Group	Dietary (mg/kg)	Hemoglobin (g/L)			Hematocrit (volume fraction)		
		14d	21d	28d	14d	21d	28d
Control	30	102±40 ^a	113±8 ^a	124±16 ^a	0.49±0.03 ^a	0.3±0.01 ^a	0.44±0.08 ^a
Iron deficient	2	69±19 ^c	69±31 ^c	67±15 ^c	0.36±0.04 ^b	0.25±0.02 ^b	0.26±0.10 ^b
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$	30	73±28 ^c	99±19 ^b	121±8 ^a	0.37±0.05 ^b	0.36±0.06 ^a	0.37±0.06 ^a
HSF	35	62±9 ^c	70±3 ^c	142±11 ^a	0.37±0.08 ^b	0.47±0.07 ^a	0.46±0.04 ^a
YGT	2	56±8 ^c	59±10 ^c	63±10 ^c	0.41±0.04 ^b	0.30±0.05 ^a	0.26±0.05 ^b
YGH2	35	97±27 ^b	112±27 ^a	132±13 ^a	0.44±0.02 ^b	0.41±0.09 ^a	0.48±0.03 ^a
YGH2+ascorbate	35	60±2 ^c	70±3 ^c	111±5 ^a	0.42±0.06 ^b	0.44±0.12 ^a	0.42±0.03 ^a
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$	50	74±20 ^c	87±28 ^b	124±10 ^a	0.35±0.05 ^b	0.23±0.01 ^b	0.45±0.02 ^a

Values are means ± SD, n=8

Significantly different at P<0.05 during experimental periods in the same diet group
abc values indicate significantly different among the groups in the same period

또한, 쥐에서 체중 증감을 분석한 결과 FN이나 FN을 생산하는 효모를 공급한 경우에 체중증가치가 가장 컸으며, 이 값은 표준그룹과 유사했다(Table 8). 철 결핍군에 있어서는 이보다 낮은 체중증가치를 보였다. 그러나, FAS를 공급한 경우 그 공급량에 무관하게 체중증가치가 FN을 공급한 동물군보다 낮았다. 이것은 FAS에 의해 철 결핍은 회복되었으나 동물의 성장에는 다소 부정적인 영향을 미쳤음을 의미한다.

Table 8. Body weight gain of rats during experimental periods

Group	Body weight (g)		Body weight gain (g)
	initial	final	
Control	102.5±20.5	255.0±28.8	152.5±19.8 ^a
Iron deficient	100.0±24.5	216.0±48.3	116.0±28.0 ^b
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	96.0±8.9	228.0±8.4	132.0±14.8 ^b
HSF	95.0±13.1	241.3±39.8	146.3±31.6 ^a
YGT	94.1±7.6	228.6±17.7	134.5±15.7 ^b
YGH2	106.7±15.1	253.3±25.0	146.7±17.5 ^a
YGH2+ascorbate	103.3±21.6	173.3±27.3	70.0±14.1 ^c
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	92.9±16.0	218.6±27.3	125.7±12.7 ^b

Values are means ± SD, n=8

쥐에서 조직 내의 철분이 FN이나 재조합 효모 내의 철에 의해서도 보충됨을 알 수 있다(Table 9). 예를 들어 HSF를 첨가하여 사육한 쥐의 간과 비장의 철 함량은 공급량에 대비하여 표준 집단보다 높았다. 또한 재조합 효모(YGH2)에 의해 철이 공급된 집단의 역시 간과 비장의 철 함량이 철 결핍 집단에 비해 2배 가량이 높으며 FAS가 공급된 집단의 경우에는 표준그룹의 약 80%에 해당하는 값을 보였다. 이는 조직 내의 철 저장을 위한 철 공급원으로 HSF나 YGH2가 FAS보다 유용하게 쓰일 수 있음을 가리킨다. 흥미롭게도 효모와 ascorbate를 동시에 공급한 경우에는 신장에 있어서의 철 농도는 표준그룹과 유사하였으나 간과 비장에 있어서의 철 농도는 표준그룹에 훨씬 미치지 못했다. 이 결과는 ascorbate가 주요 철 저장조직에서는 철 저장에 오히려 불리하게 작용함을 보이며 이것은 ascorbate가 철의 유용성을 높이기 때문인 것으로 유추된다(Hoffman et. al., 1991).

Table 9. Efficacy of ferritin(horse spleen, HSF) and recombinant yeast(YGH2) in establishing tissue iron stores after induced iron deficiency in rats(28 d of test diets)

Group	Dietary (mg/kg)	Iron concentration (μ mol/g)		
		Liver	Spleen	Kidney
Control	30	1.03 \pm 0.08 ^a	3.56 \pm 0.26 ^a	1.48 \pm 0.11 ^a
Iron deficient	2	0.56 \pm 0.03 ^c	1.95 \pm 0.21 ^c	0.97 \pm 0.08 ^b
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	30	0.84 \pm 0.10 ^c	3.03 \pm 0.50 ^a	1.49 \pm 0.06 ^a
HSF	35	1.10 \pm 0.33 ^a	3.66 \pm 0.21 ^a	1.39 \pm 0.09 ^a
YGT	2	0.50 \pm 0.02 ^c	2.02 \pm 0.25 ^b	1.00 \pm 0.03 ^b
YGH2	35	1.13 \pm 0.12 ^a	3.51 \pm 0.40 ^a	1.56 \pm 0.07 ^a
YGH2+ascorbate	35	0.62 \pm 0.10 ^c	2.77 \pm 0.29 ^b	1.27 \pm 0.06 ^a
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	50	0.86 \pm 0.08 ^c	3.31 \pm 0.14 ^a	1.37 \pm 0.16 ^a

Values are means \pm SD, n=8

Values not sharing a superscript are significantly different(P<0.05)

ab values indicate significantly different among the group in the same period

(6) 인간 H- 및 L-chain FN을 생산하는 재조합 효모에 있어서 oxidative stress에 대한 영향

(6)-1. 성장기에서 재조합 효모의 H₂O₂에 대한 민감성

성장말기(OD₆₀₀ = 3)까지 배양시킨 야생형 효모 균주 YGT와 재조합 효모 균주 YGH2, YGL1에 있어서 H₂O₂에 대한 민감성을 시험하였다(Fig. 33). 그 결과 성장말기의 모든 균주는 H₂O₂에 대해 민감성을 보였다. 야생형 효모 균주인 YGT의 경우 H₂O₂의 농도가 증가할수록 균주의 생존율이 점차 감소하였으며 20 mM H₂O₂를 처리했을 때는 비교적 적은 수의 세포만을 관찰하였다. YGH2의 경우에 있어서는 이 감소율은 더욱 급격하였으며 20 mM H₂O₂에서는 생존율이 거의 희박하였다. YGL1에 있어서는 낮은 농도의 H₂O₂에서는 저항성을 보이나, 20 mM H₂O₂에 이르러서는 YGH2와 거의 유사하게 생존율이 희박하였다.

성장초기(OD₆₀₀ = 0.3)까지 배양시켜 H₂O₂에 대한 민감성을 조사하였다. 그 결과 성장초기에서 모든 균주들은 성장 말기보다 H₂O₂에 더욱 높은 민감성을 보였다(Fig. 34). 특히 YGH2의 경우에는 아주 낮은 H₂O₂농도(1 mM)에서도 생존율이 극히 희박하였다. YGT와 YGL1의 경우에도 5mM 이상의 H₂O₂농도에서는 세포가

거의 살아남지 못했다. 이상의 결과를 보면 성장 말기까지 배양시킨 효모에 있어서 H_2O_2 에 대한 저항성이 증가하는 것을 알 수 있다. 이것은 미생물들이 외부 스트레스에 대한 방어 기전 또는 이와 관련 단백질들을 성장 초기보다는 말기에 형성 또는 생성하고 *S. cerevisiae* 역시 성장 말기에 H_2O_2 에 대한 저항성을 갖는다는 보고(Jamieson, 1992)와 일치하는 결과이다. 흥미로운 점은 세포 내 철 저장 활성이 있는 H-FN을 생산하는 YGH2에 있어서 H_2O_2 에 대한 민감성이 철 저장 활성이 없는 L-FN을 생산하는 YGL1보다 월등히 높았다. 그 가능한 이유로서 YGH2에 있어서 발현된 재조합 H-FN은 철 이온을 저장하는 기능을 보이며, 이 철이 어느 경로로 방출됨으로써 유리된 철 이온에 의해 반응성이 있는 산소종(reactive oxygen species, ROS)의 형성을 촉매하고, 지질 과산화를 촉진시켜 세포를 죽이는 것으로 유추된다(Aust, 1989).

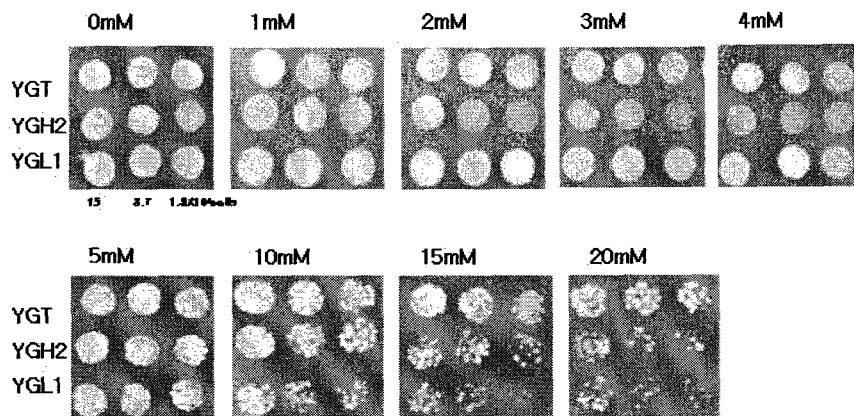


Figure 33. Susceptibility to H_2O_2 stress of the cells grown until stationary-phase. Cells in stationary phase($OD_{600}=3$) were harvested and resuspended in PBS at a density of OD_{600} of $0.1(3 \times 10^6 \text{ cells/ml})$ and then treated with various concentrations of H_2O_2 for 1 h. For each strain, 10ul of cells diluted to $1.5, 3.7, \text{ or } 1.8 \times 10^3 \text{ cells}$ (from left to right) were spotted on YEP(2% Gal) plates.

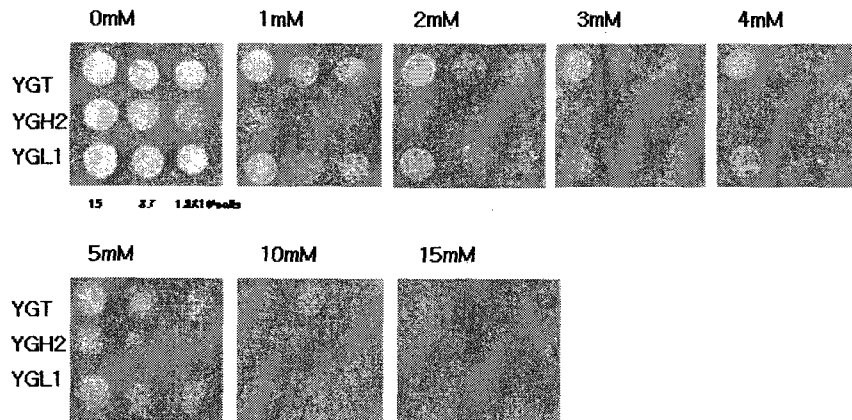


Figure 34. Susceptibility to H_2O_2 stress of the cells grown until exponential-phase. Cells in exponential phase($OD_{600}=0.3$) were harvested and resuspended in PBS at a density of OD_{600} of 0.1(3×10^6 cells/ml) and then treated with various concentrations of H_2O_2 for 1 h. For each strain, 10ul of cells diluted to 15, 3.7, or 1.8×10^3 cells (from left to right) were spotted on YEP(2% Gal) plates.

(6)-2. 재조합 효모에 있어서 H_2O_2 의 반응시간에 따른 민감성

야생형 효모 균주 및 재조합 효모의 H_2O_2 에 대한 민감성을 반응시간에 따라 조사하였다. 앞 실험에서 성장 초기의 모든 균주의 생존율이 낮은 5 mM H_2O_2 에 대해 시간별로 관찰했다. 그 결과 YGH2의 경우, YGT와 YGL1 보다 빠른 속도로 시간에 비례하여 생존율이 감소했다. 반면에 YGT와 YGL1의 경우에는 30분까지 유지되던 생존율이 30-40분 사이에 급격하게 떨어졌다. 이 현상은 5-20 mM H_2O_2 의 농도에서도 비슷하게 나타났다(Fig. 35). 이 결과는 YGH2의 경우에 H_2O_2 와의 반응시간에 더욱 민감함을 보였으며, YGT의 경우에 있어서도 30분간 유지되던 방어 기전이 많이 고갈되었음을 암시한다(Ngo, E.O., 1994). YGL1의 경우는 YGT와 유사하게 나타났는데, 이것은 H-FN을 생산하는 YGH2에 있어서는 민감성이 높은 반면, YGL1의 경우 L-FN을 생산하더라도 이 재조합 단백질이 세포내에서 철 저장과 무관한 것으로 보아 FN의 발현에 의한 민감성이 아니라 이 단백질의 세포 내 기능 즉, 세포 내 철 저장 기능과 H_2O_2 에 의한 민감성이 밀접한 관련이 있을 것으로 유추된다.

5mM H₂O₂

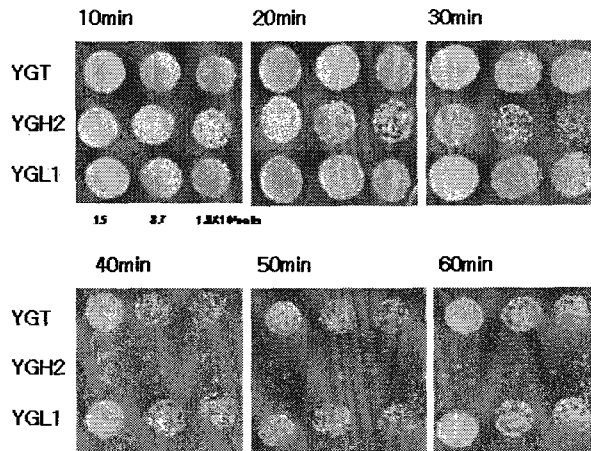


Figure 35. Susceptibility to H₂O₂ stress of the cells grown until exponential-phase. Cells in exponential phase(OD₆₀₀=0.3) were harvested and resuspended in PBS at a density of OD₆₀₀ of 0.1(3X10⁶cells/ml) and then treated with various concentrations of H₂O₂. For each strain, 10ul of cells diluted to 15, 3.7, or 1.8X10³cells(from left to right) were spotted on YEP(2% Gal) plates.

(6)-3. 성장기에서 재조합 효모의 menadione에 대한 민감성

효모에 대한 menadione의 영향은 이들 세 균주 모두 성장 말기에서 보다 성장 초기에서 생존율이 더 높았다. 성장 말기에서 세 균주는 10 µM의 menadione까지 높은 생존율을 유지하지만 20 µM menadione에서 생존율이 급격하게 감소했다. 특히 YGH2의 경우는 YGT와 YGL1에 비하여 더 민감함을 보였다(Fig. 36). 이와 다르게 성장초기에서는 세 균주 모두 20 µM menadione까지 생존율이 높았다(Fig. 37). 이러한 현상은 menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K3)에 포함된 quinone의 영향으로 생각되어진다. Quinone은 일전자 환원(one-electron reduction) 혹은 이전자 환원(two-electron reduction)에 관여하게 되는데 일전자 환원에서는 semiquinone radical들을 형성하여 산소와 용이하게 반응함으로써 ROS를 형성하게 되는데(Nutter et al., 1992), 이전자 환원에서는 Semiquinone free radical intermediates의 형성 없이 DT-diaphorase(NAD(P)H:quinone oxidoreductase)에 의해 무독화 기전을 거치게 된다(Radjendirane et al., 1998). 따라서 모든 균주가 성장말기에서보다 성장 초기에서 생존율이 높은 이유

는 성장 초기에 활발한 전자 전달계의 활동으로 인해 DT-diaphorase의 활성도가 증가하게 되어 menadione의 무독화가 일어나는 것으로 유추된다. 앞으로 이 부분은 DT-diaphorase나 glutathione S-transferase의 활성도를 측정함으로써 menadione 저항성을 확인하고자 한다. 성장 말기에서 YGH2가 다른 두 균주에 비하여 menadione에 더 민감한 이유는, menadione이 일전자 환원에 의해 생성된 ROS가 H-chain FN으로부터 철 이온을 어느 경로로 방출하도록 유도하기 때문인 것으로 생각되어진다.

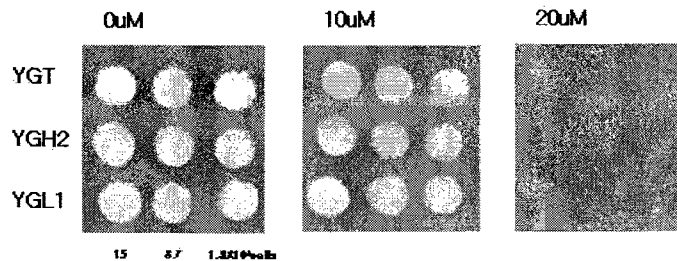


Figure 36. Susceptibility to menadione stress of the cells grown until stationary-phase. Cells in stationary phase($OD_{600}=2$) were harvested and resuspended in PBS at a density of OD_{600} of 0.1(3×10^6 cells/ml). For each strain, 10ul of cells diluted to 15, 3.7, or 1.8×10^3 cells (from left to right) were spotted on YEP(2% Gal) plates containing various concentration of menadione.

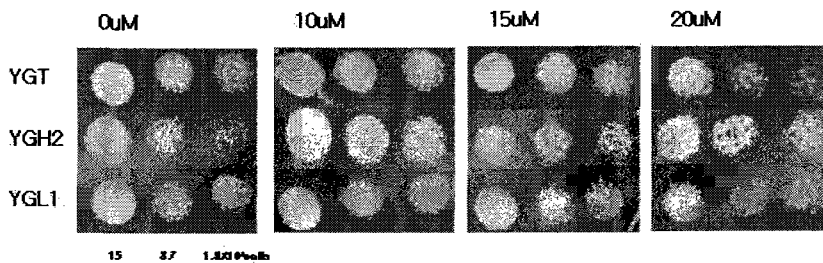


Figure 37. Susceptibility to menadione stress of the cells until exponential-phase. Cells in exponential phase($OD_{600}=0.3$) were harvested and resuspended in PBS at a density of OD_{600} of 0.1(3×10^6 cells/ml). For each strain, 10ul of cells diluted to 15, 3.7, or 1.8×10^3 cells (from left to right) were spotted on YEP(2% Gal) plates containing various concentration of menadione.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 계획대비 달성도

번호	세부연구개발목표 (선정시 계획서상의 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
1	<ul style="list-style-type: none"> ◦ FN H-chain 및 L-chain 유전자의 분리 ◦ 효모에서 FN 발현 벡터 제조 ◦ FN H-chain 및 L-chain site-directed mutagenesis ◦ 효모에 FN 야생형 및 돌연변이형 유전자의 형질전환 및 확인 	<ul style="list-style-type: none"> - 두 유전자 <i>hfH</i> (552 bp)와 <i>hfL</i> (528 bp)를 인간의 간 cDNA library로부터 분리한 후, 대장균에서의 발현벡터 pVUHFH와 pVUHFL을 제조 - 두 유전자를 이용하여 효모에서의 발현 벡터를 세 종류의 promoter를 이용하여 각각 제조 - Site-directed mutagenesis를 수행하여 mutant 유전자 6 종을 제조하였고 그 염기서열을 확인 - 효모에서 FN 형질 전환체를 획득 	100
2	<ul style="list-style-type: none"> ◦ FN 유전자의 대장균에서의 발현 및 정제 ◦ FN H-chain 및 L-chain을 이용한 항체 형성 ◦ 효모로부터 FN유전자의 발현 확인 ◦ 효모로부터 재조합 H-chain 또는 L-chain FN의 정제 ◦ 생산된 단백질의 물리·화학적 특성 규명 	<ul style="list-style-type: none"> - FN H-chain 및 L-chain 유전자 2종의 대장균 JM109에서의 발현 - 재조합 대장균에서 재조합 단백질 2종의 정제 - Mouse 및 rabbit을 이용한 polyclonal antibody 2종 형성 - 대장균 및 효모에서 생산한 재조합 단백질의 면역 활성도와 cross activity 측정 - Western blotting을 이용한 유전자 산물의 확인 - Ferroxidase 부위치환 변이체 6종의 효모에서의 발현 - 면역 효율을 증진시킨 변이체 중 YG-HN2와 YG-LN1 선택 - Promoter 에 따른 재조합 효모의 생육 특성 - H-FN 또는 L-FN 발현양 - 재조합 균주 YG-HN2와 YG-LN1의 대량 생산 - 재조합 사람 H-FN 및 L-FN의 정제 - 재조합 효모들의 철 이온과의 반응 - 재조합 효모와 그 변이체 효모 균주로부터 재조합 단백질의 생산 및 분리 - 재조합 단백질과 그 변이체 단백질의 물리·생화학적 특성 규명 	100
3	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 효모에서 철 함량 확인 ◦ 증진된 철 함량과 FN 유전자 발현과의 관계 확인 ◦ 철 대사에 영향을 미치는 외부 요인에 의한 세포기능의 조절 기전 규명 ◦ 실험 동물에 의한 철 흡수기작 규명 	<ul style="list-style-type: none"> - FN의 발현이 증진된 재조합 효모의 세포내 금속 이온과의 반응 확인 - FN 동형 또는, 이형집합체를 생산하는 재조합 효모에 있어서 철 축적량의 분석 및 비교 - Oxidative stress에 대한 각각의 균주(YGT, YGH2 & YGL1)의 차이 - H-FN을 생산하는 재조합 효모 및 다양한 철 이온 형태로 철을 rat에 구강 투여후 철 결핍의 회복 여부조사 	100

철 결합 단백질은 세포 내에 많이 발현되어도 독성이 없으며, 필수 미량금속 원소를 보유하여 필요시 제공할 수 있는 특성이 있다. 철 결합 단백질 (human FN)은 분자량이 매우 큰 분자로서 그 동안 분자 수준에서 많은 연구가 이루어져 왔다(Harrison & Arosio, 1998). 그리하여 FN의 분자적 특성이 밝혀짐에 따라 이 단백질의 유용성이 주목을 받게 되었다.

기능적으로 활성을 가지는 FN분자는 24개의 subunit이 432 대칭축으로 조합되어 구성된 구형의 단백질이다. FN holoprotein분자는 8개의 3-fold 친수성 통로와 6개의 4-fold 소수성 통로가 존재하여 철 원자의 출입에 관여한다. FN subunit은 보통 H-chain과 L-chain의 두 가지 형태가 있으며 이들 subunit의 아미노산 서열 및 그 기능에는 차이가 있다(Harrison et al., 1989; Arosio et al., 1978). 따라서 FN 분자의 기능은 H 또는 L subunit의 구성 비율의 영향을 받는다. 예를 들어서 H-chain (heart 또는 heavy 형)은 분자량이 약 21 kDa이며, 심장에서 비교적으로 다량으로 관찰된다. 또한 L-chain (liver 또는 light 형)은 약 19 kDa이다. 이 두가지 subunit은 모두 6 helix와 1 loop으로 구성된다. 그러나 H와 L subunit의 아미노산 서열을 비교해보면 그 상동성은 50-60 % 정도이며, 세포내 철 농도 조절 과정에서 H subunit은 L subunit과 달리 Sf-21 세포 성장에 억제효과가 있다고 보고되었다(Guo 등, 1998).

이러한 다양성은 있으나 많은 생명체에 있어서 FN 분자의 작용은 다량의 철을 그 안에 보유하여, 철을 필요로 하는 기관에 운반함으로써 생리학적 상태에서 철의 공급원이 되는 것은 잘 알려져 있다. 구조적으로 봐도 여러 동물들 유래의 FN subunit의 상동성을 살펴보면, 말, 사람, 쥐, 토끼 사이의 L-chain subunit에서 85 % 이상이며, 말, 쥐, 닭의 H-chain subunit의 상동성도 80 %이상에 이르고 철의 공급원으로서의 기능은 매우 일반적이라고 할 수 있다. 실제 FN은 5 가지 전체 생명체 Kingdom에 존재한다(Theil 등, 1987). 현재까지 박테리아 및 동·식물 등 여러 생명체에서 FN 유전자가 분리되어 그 염기서열이 밝혀졌다.

이러한 유용성이 높은 FN 단백질은 인간의 FN H subunit이 대장균에서 발현된 보고 등 (Levi 등, 1978; Prozzi 등, 1988) 유전 공학적 방법으로 대량생산되어 그 특성의 연구 및 활용을 위한 연구가 진행되고 있다. 사람 FN L-chain의 N-말

단 아미노산을 유전공학적 기술로 변형시켜 대장균에서 대량 발현하는 등 단백질의 구조 및 기능의 관련성을 연구한 보고도 있다.

한편 본 연구 과제와 관련하여 본 연구진은 FN을 이용한 질병의 진단법 및 치료법의 개발에 관심을 가지고 이를 위해 tadpole FN H-chain 및 L-chain 유전자를 재조합하여 생체내 시스템인 대장균에서 대량 발현시켰으며 *in vivo*에서 그 생육의 특성을 조사하였다. 또한 이 유전자들로부터 합성되어진 각 단백질의 안정성 및 철 흡수 능력등을 조사하였다. 그 결과 H-chain 유전자만 포함한 경우나 H- 및 L- chain 유전자를 모두 갖는 경우에서만 철 흡수 능력을 나타냈으며 L-chain 유전자만을 포함하고 있는 경우에는 이 능력을 나타내지 않았다. 이는 FN H-chain 유전자 산물이 L-chain 유전자 발현 조절에 modulator로 작용할 수 있음을 시사한다. 이 사실은 Harrison 등의 *in vitro* 실험 결과와 일치하는 것이다. 현재 생합성 되어진 L-chain FN의 iron uptake 능력을 향상시키는 방법 (ceruloplasmin, ascorbic acid 또는 desferrioxamine 등의 첨가)이 연구되고 있다.

2. 관련분야에의 기여도

인체에 빈번하게 초래되는 빈혈은 후천성 철 결핍증이다. 후천적 빈혈은 철의 안정적인 공급에 의해 예방과 치료가 가능하다. 그렇지만 철만의 과잉 공급 또한, 생체에 있어서 라디칼 형성, 지질 과산화등을 유도하여 매우 해독하다. 생체내에서 FN 은 철저장의 기능과 공급의 역할을 동시에 한다. 현재까지 철 이온의 함량이 증진된 효모의 개발에 관해서는 국내외를 막론하고 보고되어진 바가 없다. 분자의 안정성이 뛰어난 철단백질에 의해 철이온의 함량이 증진된 효모 균주를 개발하면 전세계적으로 특허 출원이 가능할 것으로 보여 그 시장은 수백억원 대에 달할 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구 과제에의 결과를 통하여 다음과 같은 활용 방안을 기대할 수 있을 것이다.

1. 분자의 안정성이 뛰어난 철 단백질에 의해 철 이온의 함량이 증진된 효모를 개발함으로써 의약품 원료나 식품첨가물로 활용할 수 있을 것이다. 2001년도 보건복지부 국민건강·영양조사에 따르면 철결핍성 빈혈 환자의 수가 10대에서 남자 25%, 여자 50%로 추산되고 있으며, 성인의 경우는 남자 4.7%, 여자 45%로 추산되고 있다. 따라서 철 이온의 안정적인 공급에 의해 국민보건 향상에 그 효과가 매우 크다고 할 수 있다.
2. 닭, 돼지 및 소와 같은 가축에 사료 첨가제로 활용함으로써 잡식성의 동물에게는 철분 보강을 꾀하고, 채식성의 동물에 있어 흔히 나타나는 철 결핍 회복을 유도할 수 있다. 그렇지만 철만의 과잉 공급 또한, 생체에 있어서 라디칼 형성, 지질 과산화등을 유도하여 매우 해독하다. 철 이온의 함량이 증진된 효모 제재를 활용함으로써 이런 단점을 해소하고 철 보강을 통해 불임개선, 면역 증강 등의 부가 효과도 얻게 한다. 앞으로 이 부분의 연구를 수행하여 철만의 공급에 의한 효과 외에 부가적인 부분을 강조함으로써 기업화에 큰 촉진제가 될 것이다.
3. 재조합 효모 균주의 철 이온과의 축적 경로를 이해함으로써 재조합 효모 균주의 철 이외의 중금속 원소와의 축적을 연구하고 나아가 bioremediation에의 활용을 가능케 함으로써 환경 오염을 해결하는데 크게 기여할 것이다.
4. 세포내에서 활성이 있는 철 결합 단백질을 발현시킴으로써 효모 세포를 이용하여 철 이온과 oxidative stress와 관련된 새로운 단백질을 찾는데 있어서 본 연구 결과가 크게 활용될 것이다

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

2000년도에 밝혀진 yeast genome project의 결과 ;

- *Saccharomyces cerevisiae* nuclear genome은 16개의 chromosome으로 구성되어 있음.
- Nuclear genome은 전체 1.3×10^7 개 이상의 염기로 이루어짐.
- Nuclear genome 외에 미토콘드리아 genome을 가짐.
- MIPS (Munich Information center for Protein Sequences)에서 분석한 바에 따르면, nuclear genome으로부터 6275개의 단백질을 코딩하는 ORF가 확인됨.
- 이중 87개의 ORF는 약 13 kDa보다 적은 분자량을 가짐.
- 미토콘드리아 genome은 32개의 ORF를 가지는데 그중 4개의 ORF는 약 13 kDa보다 적은 분자량을 가짐.
- *S. cerevisiae* genome data 분석 결과 ferritin이나 ceruloplasmin 또는, bacterioferritin의 ORF는 없는 것으로 조사됨. 최근 Aust등은 일련의 논문에서 생체에서 ferritin내로 철을 축적시키는데 ceruloplasmin이 필요하다는 내용을 보고하였음.
- 효모에 있어서 철 이온의 주요 저장 기관은 액포(vacuole)이며 액포로의 철 저장에 관련된 유전자는 아직까지 확인된 바 없음(Raguzzi *et al.*, 1988).
- 최근 연구에 따르면 효모와 사람의 미토콘드리아 내 철 축적의 조절기작이 매우 유사함이 알려졌다. 이 유사성은 사람의 신경분열 질환인 Friedreich's ataxia (FRDA)를 초래하는 유전자와 이에 상응하는 효모 유전자 *YFH1* 가 밝혀졌다. 사람에게 있어서 FRDA를 초래하는 유전자가 분리되어졌으며(Campuzano *et al.*, 1996), 이 단백질인 frataxin은 210개의 아미노산으로 이루어져 있으며 기능이 알려지지 않았으나 이와 유사한 단백질이 *Caenorhabditis elegans*(49%의 상동성)와 *S. cerevisiae*(31%)로부터 확인되었다. Frataxin과 미토콘드리아의 기능과 밀접한 관련이 있음이 보고되었다. 사람, 선충류, 효모 단백질은 모두 미토콘드리아로의 신호 서열을 가진다. 사람 frataxin은 미토콘드리아가 많은 조직에서 높은 농도로 발현된다. 더 나아가 *YFH1*과 FRDA 단백질들은 모두 미토콘드리아에 존재한다(Babcock *et al.*, 1997). *YFH1* 유전자가 결실된 효모 세포는 감소된 호흡율(O_2 consumption)을

보였으며(Babcock *et al.*, 1997) 세포 성장이 급속히 중단되는데 이것은 미토콘드리아 DNA 손실과 밀접한 관련이 있다. Frataxin과 철 대사 기작과의 핵심적인 연계성은 열성 유전자인 *yfh1* 변이체에 있어서 미토콘드리아가 야생형과 비교해서 10배 이상의 철 이온을 축적함이 확인됨으로써 밝혀졌다(Babcock *et al.*, 1997; Foury and Cazzalini, 1997). 이 결과는 미토콘드리아 내 철 축적이 FRDA의 병인임을 암시하며 이것은 DNA 손실이 철 이온의 축매에 의한 oxidative damage의 결과로 일어났음을 의미한다. Frataxin이 미토콘드리아의 철 대사 기전에 어떠한 역할을 하는지는 정확히 밝혀지지 않았다. 미토콘드리아의 철 흡수에 (-)조절자로서 작용하거나 철 방출에 (+)조절자로서 작용하는 것으로 유추되었다. Frataxin은 미토콘드리아에서 heme 생합성 및 Fe-S cluster 형성에 철 이온이 활용되도록 하는 기능도 있을 것으로 유추되었다. 최근에 미토콘드리아에서 분리된 frataxin이 철 저장 단백질임이 보고되었으며 FN 과의 연계성에 대한 연구가 진행중 이다(Gakh *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2003).

제 7 장 참고문헌

Arosio P, T. G. Adelman, J. W. Drysdale (1978) On ferritin heterogeneity. Further evidence for heteropolymers, *J. Biol. Chem.* **253**(12), 4451-4458

Aust, S. D. (1989) Methal ions, oxygen redicals and tissue damage. *Bibl. Nutr. Dieta* **43**, 266-277

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.

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.

Chang, S.-R., Y.-T. Kim, K.-S. Kim (1995) Purification and characterization of recombinant tadpole H-chain ferritin in *Escherichia coli*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **3**, 238-242

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.

Deak, M., G.V. Horvath, S. Davletova, K. Torok, L. Sass, I. Vass, B. Barna, Z. Kiraly, and D. Dudits (1999) Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens, *Nat. Biotechnol.* **17**, 192-196.

Eide, D. J. (1998), The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Annu. Rev. Nutr.* **18**, 441-69.

Fleming, J. and J. G. Joshi (1991) Ferritin: the role of aluminum in ferritin function, *Neurobiol Aging* **12**(5), 413-418

Gakh, O., Adamec, J., Gacy, A.M., Twesten, R.D., Owen, W.G. and Isaya, G. (2002) Physical

evidence that yeast frataxin is an iron storage protein. *Biochem* **41**, 6798-6804

Goto, F., T. Yoshihara, N. Shigemoto, S. Toki and F. Takaiwa (1999) Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene, *Nat. Biotechnol.* **17**(3), 282-286

Guo, J.-H., S.-H. Juan and S. D. Aust (1998) Suppression of cell growth by heavy chain ferritin, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **242**, 39-45

Harrison, P. M. and P. Arosio (1996), The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation, *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 161-203.

Harrison, P. M., Artymiuk, P. J., Ford, G. C., Lawson, D. M., Smith, J. M. A., Treffry, A. and White, J. L. (1989) Ferritin: function and structural design of an iron-storage protein, In: *Biom mineralization* (Mann, S., Webb J. and Williams, R. J. P. eds.) PP 257-294 VCH Weinheim

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.

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.

Hoffman, K.E., Yanelli, K. and Bridges, K.R. (1991) Ascorbic acid and iron metabolism: alterations in lysosomal function. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, 1188S-1192S

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.

Ito, H., Y. Fukuoka, K. Murata, A. Kimura (1983), Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations, *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.

Jaekwon Lee, Daniel Spector, Christian Godon, Jean Labarre, and Michel B. (1999) Toledano A New Antioxidant with Alkyl Hydroperoxide Defense Properties in Yeast. *J. Biol. Chem.* **274**,

4537-4544

Jamieson, D. J. (1992) *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J. Bacteriol.* **174**, 6678-6681

Kim, Y.-T. and K.-S. Kim (1994) Synthesis of active tadpole H-chain ferritin in *Escherichia coli*, *Mol. Cells* **4**, 125-129

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.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 ...

Lawson, D.M., Treffry, A., Artymiuk, P.J., Harrison, P.M., Yewdall, J., Luzzago, A., Cesareni, G., Levi, S. and Arosio, P. (1989) Identification of the ferroxidase centre in ferritin. *FEBS Lett.* **254**, 207-210

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.

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.

Lesuisse, E., F. Raguzzi and R. R. Crichton (1987) Iron uptake by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Involvement of a reduction step, *J. Gen. Microbiol.* **133**, 3229-3236.

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., Corsi, B., Rovida, E., Cozzi, A., Santambrogio, P., Albertini, A., and Arosio, P. (1994) Construction of a ferroxidase center in human ferritin L-chain *J. Biol. Chem.* **269**, 30334-30339.

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.* **288**, 591-596

Levi, S., Salfeld, J., Franceschinelli, F., Cozzi, A., Dorner, M. H. and Arosio, P. (1989) Expression and structural and functional properties of human ferritin L-chain from *E. coli*, *Biochemistry*, **28**, 5179-5184

Mateos, F., C. Gonzalez, C. Dominguez, J. E. Losa, A. Jimenez, and J. L. Perez-Arellano (1999), Elevated non-transferrin bound iron in the lungs of patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia, *J. Infect.* **38**, 18-21.

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.

Ngo, E.O. and Nutter, L.M., (1994) Status of glutathione and glutathione-metabolizing enzymes in menadione-resistant human cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 421-424

Nutter, L.M., Ngo, E.O., Fisher, G.R. and Gutierrez, P.L., (1992) DNA strand scission and free radical production in menadione-treated cells: correlation with cytotoxicity and role of NAD(P)H quinone acceptor oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **267**, 2474-2479

Paguzzi, F., E. Lesuisse, and R. Crichton (1988), Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.* **231**, 253-258.

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.

Park, S., Gakh, O., O'Neill H.A., Mangravita, A., Nichol, H., Ferreira, G.C. and Isaya, G. (2003) Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation. *J. Biol. Chem.* in press

Pead, S., Durrant, E., Webb, B., Larsen, C., Heaton, D., Johnson, J., and Watt, G.D. (1995) Metal ion binding to apo, holo, and reconstituted horse spleen ferritin *J. Inorg. Biochem.* 59, 15 - 27

Radjendirane, V., Joseph, P., Lee, Y.H., Kimura, S., Klein-Szanto, A.J., Gonzalez, F.J. and Jaiswal, A.K., (1998) Disruption of the DT diaphorase (NQO1) gene in mice leads to increased menadione toxicity. *J. Biol. Chem.* 273, 7382-7389

Romanos, M. A., C. A. Scorer, and J. J. Clare (1992), Foreign gene expression in yeas, *Yeast* 8, 423-488.

Sanger, F. (1981) Determination of nucleotide sequence in DNA. *Science* 214, 5463-5467

Santambrogio, P., Levi, S., Cozzi, A., Corsi, B., and Arosio, P. (1996) Evidence that the specificity of iron incorporation into homopolymers of human ferritin L- and H-chains is conferred by the nucleation and ferroxidase centres *Biochem. J.* 314, 139-144

Santambrogio, P., Levi, S., Cozzi, A., Rovida, E., Albertini, A., and Arosio, P. (1993) Production and characterization of recombinant heteropolymers of human ferritin H and L chains *J. Biol. Chem.* 268, 12744-12748.

Santoro, C., Marone, M., Ferrone, M., Costanzo, F., Colombo, M., Minganti, C., Cortese, R., and Silego, L. (1986) Cloning of the gene coding for human L apoferritin, *Nucleic Acids Res.* 14, 2863-2876

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.

Sun, S., P. Arosio., S. Levi and N.D. Chasteen (1993) Ferroxidase kinetic of human liver apoferritin, recombinant H-chain apoferritin and site-directed mutants. *Biochemistry* **32**, 9362-9369

Theil, E. C. (1987) Ferritin; structure, gene, regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms, *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 289-315

[첨부1]

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

본 연구 과제의 궁극적 목적은 효모에서 인간의 철 결합 단백질인 ferritin(FN) H-chain 및 L-chain 유전자, 그리고 변이체 유전자를 발현시킴으로써 진핵 세포 내에서 FN으로의 철 축적(accumulation) 및 FN으로부터의 재활용(remobilization) 기작을 규명하여 세포 내 기능의 조절 기전을 연구하고자 함에 있다. 이를 위하여 본 연구에서는 효모 세포 내에서의 FN의 생리적인 기능을 연구함으로써 FN의 두 subunit의 세포내 기능을 이해하고 이는 H-chain 또는 L-chain FN을 철 결핍시 발생하는 빈혈치료에 활용했을 때 분자 생물학적인 이해를 가능케 할 것이다. 그리고 여러 형태의 FN 즉, H-chain과 L-chain의 함량이 서로 다른 FN을 생산하고, 이들의 세포내 기능을 분석하고 비교함으로써 세포 내에서의 기능이 서로 어떻게 조절되는지 이해하고자 한다. FN을 생산하지 않는 효모에서의 발현 시스템은 진핵 세포에 있어서 세포 기능의 조절 기전을 연구하는데 좋은 모델을 제시해 줄 것이다.

2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원번호	공고일자 출원일자	발명자 (출원인)	출원 국	비고
페리틴 이형집합체를 효모 내에서 발현시키기 위한 벡터 및 상기 발현 벡터로 형질전환시킨 재조합 효모	10-2003-0018579	2003/03/25	김경숙, 정용섭	KR	등록중

나. 프로그램 등록목록

프로그램 명칭	등록번호	등록일자	개발자	비고

다. 노하우 내역

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

*는 본 연구로부터 직접적으로 얻어진 실적임

학술지 명칭	제목	게재 연월일	호	발행 기관	국명	SCI게재 여부
Appl. Environ. Microbiol.	* Enhanced iron uptake of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by heterologous expression of a tadpole ferritin gene	2001년 3월 1일	67	Am. Soc. Microbiol	US	Y
Immunopharm. Immunotoxicol.	Inhibitory effects of mast cell-mediated allergic reactions by cell cultured siberian ginseng	2001년 10월 1일	23(1)	Marcel Dekker, Inc.	US	Y
J. Biochem. Mol. Biol	* Cooperative activity of subunits of human ferritin heteropolymers in <i>Escherichia coli</i>	2001년 7월 1일	34(4)	Elsevier Science Pub	US	Y
Immunopharm.	Effect of allergina on mast cell-mediated allergic reactions	2001년 11월 1일	23(4)	Marcel Dekker, Inc.	US	Y
Inflamm.	Effects of allergina on the treatment of otitis media with effusions	2002년 4월 1일	26(2)	Plenum Publishing Corporatio	US	Y
Cell. Signal.	Role of Ca ²⁺ on TNF- α and IL-6 secretion from RBL-2H3 mast cells	2002년 2월 1일	14	Elsevier Science Pub.	US	Y
Kor. J. Biotech. Bioeng.	* Heterologous expression of human ferritin H-chain and L-chain genes in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2002년 4월 16일	17(2)	한국생물공학회	KR	N
Vascular Pharmacology	Yangkyuk-Sanhwa-Tang induces changes in serum cytokines and improves outcome in focal stroke patients	2002년 6월 1일	39	Elsevier Science Pub.	US	Y
Clinica Chimica Acta	CancerB increases production of nitric oxide and tumor necrosis factor- α in peritoneal macrophages	2002년 5월 1일	322	Elsevier Science Pub	US	Y
Cytokine	Inhibition of TNF- α and IK-6 production by aucubin through blockade of NF- κ B activation in RBL-2H3 mast cells	2002년 6월 1일	18(5)	Elsevier Science Pub	US	Y

학술지 명칭	제목	게재 연월일	호	발행 기관	국명	SCI게재여부
Immunopharm. Immunotoxicol.	Regulatory effect of cytokine production in asthma patients by SOOJI CHIM(Koyo hand acupuncture therapy)	2002년 4월 1일	24(2)	Marcel Dekker, Inc.	US	Y
Pharmacol. Res.	Effect of sinpo-tang on the mast cell-mediated anaphylactic reactions	2002년 7월 1일	46(5)	Elsevier Science Pub.	US	Y
Appl. Microbiol. Biotech.	* Enhanced expressed and functional characterization of the human ferritin H- and L-chain genes in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2003년 5월 24일	in press	Elsevier Science Pub.	US	Y
계: 13건수						

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

*는 본 연구로부터 직접적으로 얻어진 실적임

학술회의 명칭	제목	게재연월일	호	발행 기관	국명
한국분자생물학회 추계학술대회	* Biological function of the H- and L-subunits of human ferritin in <i>Escherichia coli</i>	2000년 10월 12일		한국분자생물학회	KR
한국분자생물학회 추계학술대회	Inhibition of IgE-induced proinflammatory cytokine production through blockade of I κ B kinase β activation by BAPTA-AM in RBL-2H3 cells	2000년 10월 12일		한국분자생물학회	KR
한국생화학학회 춘계학술대회	* Heterologous expression of human ferritin H- and L-chain genes in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2001년 5월 17일		한국생화학학회	KR
한국분자생물학회 추계학술대회	* On-line nano-electrospray coupled with ion trap MS for proteomic analysis	2001년 10월 11일		한국분자생물학회	KR
Int. Convention of the Pharm. Soc. of Korea	Inhibition of TNF- α and IL-6 production by aucubin through blockade of NF- κ B activation in RBL-2H3 mast cells	2001년 10월 17일		대한약학회	KR

학술회의 명칭	제목	개재연월일	호	발행기관	국명
A Sym. of Osaka Univ. Med. School/ Grad. School of Frontier Bios.	Role of Ca ²⁺ on TNF- α and IL-6 secretion from mast cells	2002년 5월 15일		Osaka Univ. Med. School/ Grad. School of Frontier Bios.	JP
한국생화학회 춘계학술대회	* Increased concentration of iron by the recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> expressing human ferritin genes	2002년 5월 16일		한국생화학회	KR
한국생화학회 춘계학술대회	* Purification and characterization of recombinant human H- and L-chain ferritins produced in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2002년 5월 16일		한국생화학회	KR
Asian Inst. of nano-biosc. and Tech.: Foundation Ceremony and Celebratory Int. Sym.	* Electron microscopic characterization of nano-structured iron oxides synthesized in recombinant ferritins	2002년 11월 22일		Asian Institute of nano bioScience and Technology	KR
한국생화학분자 생물학회 학술대회	* Effects of mutation on the expression of human ferritin H- and L-chain genes in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2003년 5월 14일		한국생화학회	KR
한국생화학분자 생물학회 학술대회	* Expression and characterization of human ferritin heteropolymer in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2003년 5월 14일		한국생화학회	KR
계: 11건수					

3. 연구성과

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획

세포 내에서 활성이 있는 철 결합 단백질을 발현시킴으로써 효모 세포에 있어서 철 이온 및 철 대사와 관련된 새로운 단백질을 찾는데 본 연구 결과가 크게 활용될 것이다.

나. 활용방법

생체에서 철 이온은 필수미량원소이다. 인체에 빈번하게 초래되는 빈혈은 후천성 철 결핍증으로 국내의 철 결핍성 빈혈 빈도는 선진국의 경우보다 상당히 높다. 후천성 빈혈은 철의 안정적인 공급에 의해 예방과 치료가 가능한데 철만의 과잉 공급 또한 생체에 있어서 라디칼 형성, 지질 과산화 등을 유도하여 매우 유독하다. FN은 철 저장의 기능과 공급의 역할을 동시에 하기 때문에 이를 이용한 철 함량이 증진된 효모의 개발은 국내외적으로 그 의미가 크며 이를 이용하여 빈혈치료제와 같은 의약품이나 요즘 유행되고 있는 철분 증진 빵 등과 같은 식품 산업에의 사용등으로 국민 보건 향상을 꾀할수 있다. 뿐만 아니라 소와 같은 가축에 사료 첨가제로 활용함으로써 채식성의 동물에 있어서 철 결핍회복을 유도할 수 있다. 이것은 철 보강으로 불임 개선, 면역증강 등의 이중효과도 얻을 수 있기 때문에 철의 함량이 증진된 효모를 활용함으로써 효모산업이 고부가가치 산업으로 변화되어질 수 있다. 뿐만 아니라, 재조합 효모 균주의 철 이온과의 축적 경로를 이해함으로써 재조합 효모 균주의 철 이외의 중금속 원소와의 축적을 연구하고 나아가 bioremediation에의 활용을 가능케 함으로써 환경 오염을 해결하는데 크게 기여할 것이다.

다. 차년도이후 활용계획

효모에 있어서 철 이온과 oxidative stress에 의한 proteomic profile을 구축함으로써 철 이온과 oxidative stress에 의한 세포 사멸에 있어서의 기능을 밝히고 유용 단백질 또는 대사 질환의 표적인자를 발굴하여 그 기능을 규명할 수 있게 한다. Oxidative stress는 세포사멸 나아가 세포 노화의 유도제로 알려져 있으며, 효모는 간단한 진핵세포 시스템으로써 좋은 모델을 제공한다. 따라서 효모에서 유리 산소종에 의해 진행되는 과정을 연구 함은 사람의 노화과정을 이해하는 데 실마리를 제공할 것으로 기대된다.

5. 기대효과

가. 기술적 효과

세포내 철분 대사 기작은 iron-protein 합성과 분해, transferrin receptor를 경유한 철 흡수 및 방출 및 FN으로의 철 축적 및 저장 단백질로부터의 재활용 등을 포함한다. 이 대사 과정은 세포의 기능과 증식 속도에 따라 큰 차이를 보이기 때문에 철분 대사 과정을 연구하는 것은 매우 복잡하다. 효모는 자체적으로 FN을 생산하지 않는다. 포유동물의 철 대사 과정에 있어서 주요 철 결합 단백질인 FN은 세포 내에서 많은 양이 발현되어도 독성이 없으며 안정성이 뛰어나 효모에서의 발현은 그 활용 범위가 크다. 그리하여 효모에서 FN 유전자를 발현시킴으로써 세포 내에서의 철 이동 경로 H- 및 L-FN의 기능 및 조절기전에 관한 이해를 높인다. 철 이온과의 흡수반응에 대한 최적화 실험결과는 다른 금속 이온과의 반응성을 연구하는데 활용되어지고 oxidative stress를 통해 밝혀질 새로운 단백질을 찾는 것은 세포내 철 대사를 이해할 수 있게 한다. 이러한 FN H-chain 및 L-chain에 대한 기능연구 및 조절 기전에 대한 연구결과를 바탕으로 척추 동물에 있어서의 철이온의 흡수 및 대사과정을 이해할 수 있게 될 것이다.

고용창출 및 인력 양성면에서 보면, 3년 동안 박사 후 연구 인력을 포함하여 총 17명의 보조 연구원의 고용창출을 획득하였고, 이 중 10여명의 석사 학위자를 배출하였다.

나. 경제적 효과

생체에서 철 이온은 필수미량원소이다. 인체에 빈번하게 초래되는 빈혈은 후천성 철 결핍증으로 국내의 철 결핍성 빈혈 빈도는 선진국의 경우보다 상당히 높다. 후천성 빈혈은 철의 안정적인 공급에 의해 예방과 치료가 가능한데 철만의 과잉공급 또한 생체에 있어서 라디칼 형성, 지질 과산화 등을 유도하여 매우 유독하다. FN은 철 저장의 기능과 공급의 역할을 동시에 하기 때문에 이를 이용한 철 함량이 증진된 효모의 개발은 국내외적으로 그 의미가 크며 이를 이용하여 빈혈치료제와 같은 의약품이나 요즘 유행되고 있는 철분 증진 빵 등과 같은 제빵에의 이용에 그 활용가치가 크다. 뿐만 아니라 닭, 돼지나 소와 같은 가축에 사료 첨가제로 활용함으로써 채식성의 동물에 있어서 철 결핍회복을 유도할 수 있다. 이것은 철 보강으로 불임 개선, 면역증강 등의 이중효과도 얻을 수 있기 때문에 철의 함량이 증진된

효모를 활용함으로써 효모산업이 고부가가치 산업으로 변화되어 질 수 있다. 그러나 그 시장 규모를 추산하는 것은 어렵다. 그 일례로 빈혈제제 및 보조제의 수요가 될 수 있는 빈혈 환자들을 보면, 2001년도 보건복지부에서 발표한 국민건강·영양조사에 따르면 평균 10세 이상 인구의 7% (남자 2.7%, 여자 10.3%)가 빈혈로 나타났다. 철 결핍성 빈혈 환자의 수가 10대에서 남자 25% 여자 50%로 추산되고 있으며, 성인의 경우는 남자 4.7% 여자 45%로 추산되고 있다. 이 환자의 약 10%가 수요라고 가정한다면 세계 인구의 2억명이 제품에 대한 수요자가 될 수 있을 것으로 예상된다.

[첨부2]

기술 요약서

■ 기술의 명칭

※기술이란? 과제 수행결과 확보된 신기술, 산업재산권, 기술적 노하우 등 개발된 성과중 수요자에게 공급할 수 있는 형태의 기술을 의미함

페리틴 이형집합체를 효모내에서 발현시키기 위한 벡터 및 상기 발현벡터로 형질전환시킨 재조합 효모

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	M1-0016-00-0029			
과제명	철결합 단백질 유전자의 발현 및 세포내 기능조절에 관한 연구			
사업명	중점국가연구개발사업			
세부사업명	생명현상 및 기능연구사업			
연구기관	전북대학교	기관유형		
참여기관(기업)				
총연구기간	2000. 8. 1. ~ 2003. 5. 31. (3년)			
총연구비	정부(150,000)천원	민간()천원	합계(150,000)천원	
연구책임자 1	성명	김경숙	주민번호	570426-2481518
	근무기관 부서	전북대학교 생물과학부	E-mail	sukkim@moak.chonbuk.ac.kr
	직위/직급	교수/정교수	전화번호	063-270-3341
연구책임자 2	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
실무연락책임자	성명	김경숙	소속/부서	전북대학교 생물과학부
	직위/직급	교수/정교수	E-mail	sukkim@moak.chonbuk.ac.kr
	전화번호	063-270-3341	FAX	063-270-3345
	주소	(561-756) 전북 전주시 덕진구 덕진동 1가 664-14		

■ 기술의 주요내용

본 발명은 진핵세포로부터 유래된 페리틴 H 서브유닛 유전자 및 L 서브유닛 유전자를 효모균주에서 작동하는 소정의 단일 프로모터 또는/ 및 프로모터들의 조합과 함께 기능적으로 결합시켜 재조합 페리틴 H/L 서브유닛 이형체를 형성하도록 제작된 효모를 숙주로 하는 발현벡터 및 이로부터 형질전환 된 재조합 효모를 제공한다. 상기 구성에 의한 재조합 효모는 페리틴 이형집합체를 발현시켜 철 이온을 세포내에 다량 축적할 수 있으므로 의학적인 용도는 물론, 식품산업 및 동물의 사료 조성물의 철분 급여원으로 제공될 수 있다.

[기술의 개요]

플라스미드 증식 및 대량 추출을 위한 숙주로는 대장균 JM 109가 이용되었으며, 인간 페리틴 유전자 발현을 위한 효모 숙주 세포로는 사카로마이세스 세레비지에 2805 (MAT α *pep4::HIS3 prb1 Δ can1 GAL2 his3 ura3-52*)가 이용되었다. 유전자 재조합 플라스미드는 효모 셔틀 벡터인 YEp352가 이용되었다.

인간 페리틴 H 및 L 서브유닛을 코딩하는 유전자(*hfh* 및 *hfl*)를 얻어 효모에서 인간 *hfh*와 *hfl*를 고발현시키는 벡터를 제조하기 위해 유도성 프로모터인 GAL1를 이용하여 *hfh*와 *hfl*의 N-말단의 코돈 또는, 상위부분 유전자를 변형하여 발현 벡터 pYGH2와 pYGL1을 제조하였다. 그리고 GAL1-GAL10 프로모터에 의해 발현되는 벡터를 제작하기 위해 먼저, 효모에서의 페리틴 L 서브유닛 발현 벡터인 pYGL1을 Xba I과 Shp I 으로 절단한 후, 크레노프 프레그먼트(Klenow fragment)로 처리하여 GAL7 터미네이터를 갖는 *hfl* DNA 단편을 얻었다. 그 후, pYGH2 플라스미드의 GAL1-GAL10 프로모터 뒷부분을 EcoR I으로 절단하여 블런팅한 후 *hfl*-tGAL7을 삽입하였다. 그 결과 페리틴 이형집합체를 발현하는 tGAL7-*hfl*-GAL10-GAL1-*hfh*-tGAL7의 유전자 서열을 갖는 pY1H10L을 구축하였다. 또한, 페리틴 서브유닛의 유전자 위치가 서로 바뀐 pY1L10H 플라스미드를 구축하기 위해 pYGH2 플라스미드를 Xba I과 Shp I으로 절단하고 블런팅 처리하여 GAL7 터미네이터를 갖는 *hfh* DNA 단편을 얻었다. 그리고, pYGL1 플라스미드의 GAL1-GAL10 프로모터의 뒷부분을 EcoR I으로 절단하여 블런팅한 후 *hfh*-tGAL7을 삽입하였다. 그 결과 tGAL7-*hfh*-GAL10-GAL1-*hfl*-tGAL7의 유전자 서열을 갖는 pY1L10H를 구축하였다.

상기 발현벡터의 효모로의 형질전환 과정은 통상적인 방법(Ito, H., Y. Fukuoka, K. Murata, A. Kimura (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations, *J. Bacteriol.* 153, 163-168.)에 따라 실시 되었다. 이에 따라 인간 페리틴 H 서브유닛 및 L 서브유닛 발현을 위한 상기 플라스미드 각각은 사카로마이세스 세레비지에 2805에 형질 전환시킨 후, 우라실(uracil) 결핍 최소배지에서 형질 전환체들을 1차 선별하였다. 선별된 재조합 효모는 글래스 비드를 이용하여 DNA를 추출하였으며, 이를 대장균에 역 형질 전환시킨 후에 효소 절단하여 DNA를 확인한 후 최종 선별하였다. 이와 같이 선별된 pY1H10L과 pY1L10H로 형질 전환시킨 효모세포는 Y1H10L과 Y1L10H로 각각 명명하였다. 상기 과정으로 제조된 형질전환 효모는 페리틴 이형집합체를 효모 내에서 발현시켜 철 이온을 세포내에 다량 축적할 수 있으므로 의학적인 용도는 물론, 식품산업 및 동물의 사료조성물의 철분 공급원으로 제공될 수 있다.

본 발명에 따라 생산되는 인간 페리틴은 효모 배양액으로부터 순수 분리하여 이용될 수도 있으나, 보다 바람직하게는 배양된 효모 자체 또는 그 건조 분말과 같은 형태로 첨가될 수도 있으며, 이 경우 특별한 정제 과정을 거치지 않고도 즉시 이용될 수 있는 장점이 있다. 상기 철분 공급 제제는 철분 공급을 위한 기능성 식품 첨가물 또는 철분 부족 증상의 치료를 위한 빈혈 치료제의 목적으로 이용될 수 있으며, 경구 또는 비경구 투여를 위한 일반적인 약학 제제의 제조 방법에 따라 제형화 될 수도 있다.

<기술적 특징>

본 발현벡터는 바람직하게는 효모에서 유효하게 작동하는 GAL1, GAL10 또는 GAL10/GAL1 프로모터를 이용한 발현벡터를 제공한다.

(1) 본 발명의 상기 발현벡터는 효모에서 발현 가능한 공지의 벡터에 5' 에서 3' 방향으로 L 서브유닛 유전자, GAL10/GAL1 프로모터, H 서브유닛 유전자를 순차적으로 삽입시킨 발현 벡터를 제공한다.

(2) 본 발명의 상기 발현벡터는 효모에서 발현가능한 공지의 벡터에 5' 에서 3' 방향으로 H 서브유닛 유전자, GAL10/GAL1 프로모터, L 서브유닛 유전자를 순차적으로 삽입시킨 발현 벡터를 제공한다.

(3) 본 발명은 상기 제 1측면 또는 제 2측면에 의한 발현벡터로 형질전환된 재조합 효모를 제공한다.

[용도 · 이용분야]

본 발명은 철 이온 함량이 증진된 의료용, 식품산업용 또는 가축 등의 사료용 소재로서의 효모를 생산하기 위한 재조합 벡터 및 이로부터 제조되는 재조합 효모를 제공한다. 위와 같은 페리틴 유전자는 진핵세포 즉, 사람, 가축(소, 말 등을 포함) 등의 동물세포는 물론, 대두 등의 식물세포로부터 유래되어 분리한 유전자로서 H 서브유닛과 L 서브유닛 DNA를 포함한다.

■ 기술의 분류

[기술코드] 412 (3 Digit) (KISTEP 홈페이지 기술요약서용 기술분류표 참조)

[기술분야] (1개만 선택(√로 표시)하여 주십시오)

- 정보산업 기계설비 소재 정밀화학·공정 생명과학
 원자력 자원 에너지 항공·우주 해양
 교통 보건·의료 환경 기초·원천 기타

[기술의 활용유형] (1개만 선택(√로 표시)하여 주십시오)

권리유형	명 칭	국가명	출원단계	일자	등록번호
특 허	페리틴 이형집합체를 효모 내에서 발현시키기 위한 벡터 및 상기 발현 벡터로 형질전환시킨 재조합 효모	KR	출원	김경숙, 정용섭	10-2003-0018579

* '권리유형'란에는 특허, 실용신안, 의장, 컴퓨터프로그램, 노하우 등을 선택하여 기재

* '출원단계'란에는 출원, 공개, 등록 등을 선택하여 기재

■ 기술이전 조건

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술

[기술개요]

기술명	
개발단계	<input type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	

[기술을 도출한 과제현황]

과제관리번호			
과제명			
사업명			
세부사업명			
연구기관		기관유형	
참여기관(기업)			
총연구기간			
총연구비	합계 : ()백만원 - 정부 : ()백만원 민간 : ()백만원		
연구책임자	소속		성명
	전화번호		E-mail
연구개발 주요내용			