

효모에서 생산한 재조합 human L-ferritin의 생화학적 특성 및 나노입자의 철산화물 합성

김경숙*

Recombinant Human L-ferritin from *Saccharomyces cerevisiae*: Molecular Characterization and Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles

Kyung-Suk Kim*

접수: 2011년 2월 21일 / 게재승인: 2011년 4월 8일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In the synthesis of nanoparticles, much attention has been paid to regulating the particle size. There has been a possible evident that using the central cavity (core) of the protein ferritin has a greatly significant influence on it because the core can generate the nanometer-sized mineral particles of variable metal ions. In this report, recombinant human L-ferritins produced from *Saccharomyces cerevisiae* were purified and their molecular properties were characterized. The cDNA for human ferritin L chain was also expressed in another host such as *Escherichia coli*, and the properties of recombinant L-ferritins were compared. From isoelectric focusing experiment, the L-ferritin from the recombinant yeast showed no indication of N-glycosylation. Some post-translational modifications other than N-glycosylation were speculated in the L-ferritins from yeast. A difference was made in the L-ferritins in their iron uptake rates and the initial rate of the L-ferritin from yeast was slightly increased. The reconstitution yield and size distribution of the core minerals were analyzed in the L-ferritins by transmission electron microscopy. The L-ferritin from yeast with higher reconstitution yield (54.5%) showed slightly larger sizes (mean 6.92 nm) with narrower size distribution than the L-ferritin from *E. coli*. It is, in conclusion, speculated that

L-ferritin from yeast is relatively superior to the other, in view of the size of nanoparticle and its relative homogeneity.

Keywords: L-ferritin, iron kinetics, core reconstitution, yeast, *E. coli*

1. 서론

무기물을 나노입자 형태로 합성하는 것은 나노 기술에 해당하는데, 이 기술은 기존 산업의 전 분야는 물론 특히, IT, BT 및 ET 분야에 기술 혁신을 가져올 것으로 예측된다. 이들 나노입자들은 구조적, 자기적 또는 광학적으로 특이한 성질을 가져 촉매제 또는 전자-광학제로써 그 응용이 기대되기 때문이다. 이들 나노입자의 합성을 위해 surface-bound organic group, 고분자, 다공성 유리, zeolite, phospholipid vesicle 및 역상 미셀 (reverse micelle)과 같은 여러 환경에서 많은 시도가 있었다 [1-3]. 이들 반응계는 성공적인 결과를 얻기도 하였지만, 종종 응집이나 가수분해 등에 의해 미립자의 안정도가 떨어지는 게 흠이다. 대신에, 나노입자의 합성에 생체 고분자인 구형의 단백질인 ferritin을 이용할 수 있음이 입증되었다. Meldrum 등은 ferritin 외피를 이용하여 iron sulfide, uranium oxide를 *in situ* 반응으로 합성하였다 [4,5]. 자연계에 존재하는 생미네랄화 (biomineralization) 현상을 모방하여 신소재에 응용할 수 있음을 보였다.

생물체에서 대표적인 철 저장 단백질인 ferritin은 이 단백질 core (중공) 내에 iron oxyhydroxide 또는 oxyphosphate를 합성함으로써 그 기능이 철 저장, 운반 및 금속의 독성 방

전북대학교 자연대학 생물과학부 및 유전공학연구소
Faculty of Biological Sciences, Institute for Molecular Biology and Genetics, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
Tel: +82-63-270-3341, Fax: +82-63-270-3345
e-mail: sukkim@jbnnu.ac.kr

지 등에 이르기까지 다양하다 [6,7]. Ferritin은 24개의 subunit이 서로 조합되어 비교적 단단한 구형 단백질을 이룬다. 이 단백질은 그 내부에 약 8 nm 직경의 빈 공간을 만들며, 이 공간속에 나노입자의 무기물을 합성한다. 이와 같이 한정된 영역 내에 분자의 조절에 의해 무기물이 침전되는 현상은 용액 내에서 무기물이나 나노입자가 일반적으로 합성되는 반응과 흡사하다. 합성된 무기물은 안정한 상태로 단백질 내부에 남게 된다 [8,9]. Ferritin이 생체 내에서 기본적으로 철 저장 단백질이지만, 이 단백질로 Fe^{3+} 뿐만 아니라 +2가 내지는 +3가의 여러 금속 이온들과 (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , 및 Al^{3+}) 결합할 수 있음이 *in vitro* 실험으로 보고된 바 있다 [2,10]. 척추동물에서 분리한 ferritin은 일반적으로 heavy chain (H)과 light chain (L)으로 구성되어져 있다. 조직에 존재하는 isoferritin들은 서로 기능이 약간 다른데 이는 각 조직에 있는 단백질의 subunit 함량이 서로 다른 것과도 깊은 관련이 있다. 그리하여 심장 등에 존재하는 H-rich isoferritin은 간, 비장 등에 존재하는 L-rich isoferritin보다 낮은 등전점을 가지며 철 함량이 적다고 보고되었다. 대장균에서 발현된 재조합 ferritin의 생화학적 기능에 대해서 그동안 많은 보고가 있었다 [6,11,12]. 재조합 H-chain ferritin (H-ferritin)은 그 자신의 ferroxidase 활성도로 인해 단백질 내부로의 철 흡수가 빨라 효율적으로 iron-core를 만든다 [12]. 반면에, 재조합 L-chain ferritin (L-ferritin)은 H-ferritin에 비해 중공내 철 미네랄화에 있어서 우월한 기능을 가지며 변성제 등의 처리에 단백질이 더욱 안정하다 [7]. 단백질 기능과 관련하여 subunit 간의 차이가 중공내 미네랄의 결정화에 미치는 영향에 대한 보고도 있었다 [6,7]. 그러나 아직까지 서로 다른 숙주세포에서 동일한 ferritin cDNA를 발현시킨 후, 중공내 나노 입자의 무기물을 합성하고 이렇게 합성된 core 미네랄을 비교 분석하여 보고된 바 없다.

본 논문에서는 먼저 L subunit으로만 조합된 L-ferritin을 이용하여 나노 입자의 철산화물을 합성하고 그들의 물리·화학적 특성을 연구함으로써 나노물질 특성에 맞는 새로운 응용 분야를 찾는 데 기본 자료로 활용하고자 한다. 그리하여 각기 다른 미생물 숙주 즉, 원핵세포와 진핵세포들로부터 사람 ferritin의 L subunit으로 이루어진 L-ferritin을 생산하고 각각 분리 정제하였다. 그리고 이들 두 종류의 L-ferritin을 이용하여 나노 크기의 철 합성 실험을 동일 반응조건하에서 수행하였다. 그리하여 합성된 철 산화물에 대한 전자현미경 (TEM), UV-Vis 흡수 스펙트럼 및 전자회절 (electron diffraction) 기술을 분석함으로써 단백질의 철 흡수율, 나노 무기물의 크기 분포, 화학적 조성, 상 (phase) 등을 비교 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재조합 대장균 및 재조합 효모의 배양

본 실험에서 사용된 효모 숙주 세포는 *S. cerevisiae* 2805 (*MATa pep4 :: HIS3 prb1 Acan1 GAL2 his3 ura3-52*)를 사용하였다. 형질 전환시킨 효모 균주로는 사람 ferritin L-chain

유전자가 삽입된 재조합 효모 균주 YGL1을 사용하였다 [13]. 효모 균주 YGL1을 2% galactose가 첨가된 YEP 배지에서 30°C, 200 rpm으로 4일간 배양한 후 원심분리 (6,000 rpm, 5 min, 4°C)하여 균체를 수확하였다. 그 외 효모 배양이나 재조합 단백질 발현에 관한 자세한 실험 방법은 Seo 등 [13]에 기술한 바와 같다. 비교 실험을 위해 사람 ferritin L-chain 유전자가 삽입된 재조합 대장균 HFL을 배양하였다. Ampicillin (50 µg/mL)이 들어있는 LB 배지에서 37°C, 16시간동안 키워진 대장균 HFL은 0.1 mM IPTG를 첨가하여 4시간동안 다시 배양하였고, 인간 ferritin L subunit 유전자가 성공적으로 발현됨이 확인되었다 [14]. 그리하여 전체 수용성 단백질중 약 55%에 해당하는 재조합 L-ferritin을 생산하였다.

2.2. 재조합 L-ferritin의 정제

재조합 인간 L-ferritin의 정제 방법은 Santambrogio 등 [15]의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 재조합 효모는 bead beater (pellet : glass bead : buffer = 1 : 2 : 1)를 이용하여 세포를 파쇄한 후 원심분리 (10,000 × g, 10 min, 4°C)를 수행하여 수용성 단백질을 회수하였다. 세포 추출물은 열 변성 처리 (75°C, 10분간)하고 원심분리 (12,000 × g, 10 min, 4°C)하여 열 변성된 단백질을 제거하고 상층액만 얻었다. 상층액은 80% ammonium sulfate를 포화되도록 넣은 후 4°C에서 12시간 동안 반응시켜 원심분리 (10,000 × g, 10 min, 4°C)한다. 상층액은 제거하고 침전물을 20 mM Tris buffer에 녹여 회수하였다. 세포추출물을 열 변성 처리한 다음 20 mM Tris (pH 7.4)에서 Sephacryl S-200 크로마토그래피와 DEAE-Sephacel (0-500 mM NaCl) 이온교환크로마토그래피를 수행하여 정제하였다. 재조합 대장균 균주로부터 L-ferritin의 정제도 세포추출물로부터 위에 기술한 것과 동일하게 수행하였다. 정제된 L-ferritin의 순도는 7.5% 비변성 전기영동을 수행하여 확인하였다.

2.3. 전기영동

재조합 L-ferritin의 전기영동상의 이동성은 12% (w/v) SDS-PAGE를 수행하여 분석하였다. SDS-PAGE를 위한 시료는 10% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS 및 5% (v/v) 2-mercaptoethanol을 함유한 0.1 M Tris-HCl (pH 6.8)에서 100°C (10 min)로 가열하여 준비하였다. 단백질을 염색하기 위해서 0.2% (w/v) Coomassie brilliant blue를 사용했고 철을 염색하기 위해서는 $K_4Fe(CN)_6$ (2%)과 HCl (2%)를 1 : 1 (v/v)로 혼합하여 사용하였다. SDS-PAGE에 있어서 L-ferritin의 subunit 분자량을 검정하기 위한 표준 단백질로는 phosphorylase B (113 kDa), bovine serum albumin (92 kDa), ovalbumin (52.3 kDa), carbonic anhydrase (35 kDa), soybean trypsin inhibitor (28.9 kDa) 및 lysozyme (21 kDa)를 사용하였다. 인간 L-ferritin에 대한 쥐 항체는 효모로부터 생산한 재조합 L-ferritin을 확인하는데 사용하였다. Western blotting은 Burnette 등 [16]의 방법을 따라 nitrocellulose막 위에서 수행하였다.

2.4. 등전점 (Isoelectric focusing)

효모로부터 생산한 재조합 ferritin의 등전점을 결정하기 위해

Isoelectric focusing을 수행하였다. Pre-made polyacrylamide 젤 (5%)은 pH 3-10 (Bio-Rad, USA)의 범위를 가지며 50% (w/v) glycerol과 혼합한 시료 (단백질 50-100 µg)는 100 V (1시간), 250 V (1시간) 및 500 V (1.5시간, 4°C)하에 focusing을 수행하였다. 표준 단백질로는 lentil lectin (pI 7.8), human hemoglobin C (pI 7.5), human hemoglobin A (pI 7.1), human carbonic anhydrase (pI 6.5), bovine carbonic anhydrase (pI 6.0), β-lactoglobulin B (pI 5.1) 및 phycocyanin (pI 4.65)을 사용하였다.

2.5. Ferritin에 의한 철 흡수 실험

재조합 효모에서 생산된 L-ferritin으로부터 중공 내부를 비운 apoferritin의 제조는 이전에 보고된 바와 같이 중공 내 철을 환원시킴으로써 이루어졌다 [17]. Apoferritin의 단백질 농도는 modified Lowry method를 사용하여 정량하였다 [18]. 철 이온이 단백질과 반응하는 속도를 알아보기 위해 Chang 등 [5]이 발표한 바와 같이 철 흡수 실험을 수행하였다. Apoferritin에 있어서 Fe^{2+} 이온의 흡수 실험은 25 mM MOPS [3-(N-morpholino) propane sulfonic acid] 완충용액 (pH 9.0) 내에서 Fe^{2+} 이온을 단백질 한 분자 당 400개 되도록 첨가시킴으로써 진행하였다. 그리하여 실험 직전 25 mM MOPS 완충용액 (pH 9.0)에 용해시킨 2 mM $Fe(NH_4)_2SO_4$ 를 apoferritin (0.5 mg/mL)에 첨가하였다. 철 흡수는 310 nm 파장에서 흡수도의 변화를 측정함으로써 얻어졌으며 흡수도가 최대 값에 이를 때까지 측정하였다 (Hitachi U-3300 Spectrometer). 철 이온의 산화 반응을 위해 부가적인 산화제는 첨가하지 않았으며 철 이온은 용액 내의 산소에 의해 산화되었다.

2.6. Ferritin 중공 내 철 산화물 합성 및 전자현미경 (Transmission Electron Microscopy) 연구

Apoferritin 단백질 (1.0 mg/mL, 3 mL)내에 철 산화물의 나노입자를 합성하는 반응은 25 mM MOPS 완충용액 (pH 7.0)에서 진행하였다. 먼저 단백질 한 분자 당 100개의 철 이온이 되도록 Fe^{2+} 를 첨가하고 15분 동안 실온에 정치하였다. 동일한 방법으로 Fe^{2+} 이온을 20회 반복하여 단백질 한 분자 당 2000개 금속이온이 되도록 하였다. 반응 종결 후 4°C에서 18시간 동안 정치하였고 3차 증류수로 투석을 수행하였다. 반응이 종료된 시료는 원심분리 (5,000 × g, 10 min, 4°C)하여 ferritin과 결합하지 않은 금속이온과 침전물을 제거하였다. Ferritin 내 금속 이온의 양을 확인하기 위해 원자흡광 광도계 (AAS; SpectrAA-800, Varian) 분석을 수행하였다. 그리고 합성된 나노입자는 전자현미경 (TEM; Jeol JEM 2010)을 이용하여 분석하였다. 염색하기 위해 2% phosphotungstic acid (pH 6.0) 5 µL과 단백질 시료 2 µL를 섞어 10분간 반응시켰다. Formvar-coated Cu grid에 1-2 방울 떨어뜨려 상온에서 건조시킨 후 전자현미경에서 160 KeV (또는, 100 KeV)로 관찰하였다. Ferritin 내에 합성된 나노입자의 크기, 구조 및 결정성을 확인하기 위하여 염색 시약을 처리하지 않은 시료도 Formvar-coated Cu grid에 수집하여 같은 방법으로 관찰하였다. 그리고 ferritin core들이 밀집된 영역으로부터 전자회절 (electron diffraction) 패턴을 구하였다. 입자의 크기는 확대

시킨 현미경 사진으로부터 50개의 산화물 입자의 크기를 측정함으로써 결정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 효모로부터 재조합 L-ferritin의 발현 및 활성도

재조합 효모 YGL1에서 L-ferritin의 발현은 Seo 등 [14]의 방법에 따랐다. 배양된 효모로부터 재조합 L-ferritin을 분리하는 방법은 Kim 등 [19]에 기술한 바와 같다. 사람 ferritin L-chain의 발현 및 정제를 확인하기 위해 15% SDS-PAGE와 Western blotting을 수행하였고 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 전기영동 젤의 결과를 보면, 효모 YGL1로부터 정제한 단백질 시료에서 사람 ferritin L-chain의 분자량 (19 kDa)에 해당하는 위치에서 단백질 띠를 확인하였으며, 이 띠는 대장균에서 생산된 재조합 ferritin L-chain과 유사한 위치에서 보였다. 이 균주에 있어서 L-chain의 발현율은 전체 수용성 단백질 중 약 10%에 해당하였고 Western blotting을 수행한 결과, ferritin L-chain임이 확인되었다 (Fig. 1(a)). 효모에서 생산한 재조합 L-ferritin이 당질화되어 있는지 확인하고자 재조합 효모를 tunicamycin을 함유한 배지에서 배양한 후 분리 정제하였다. 전기 영동상에서 비교해볼 때 tunicamycin을 처리하지 않은 효모에서 분리한 경우와 차이를 구별할 수 없었다. 즉, 효모에서 생산한 사람 L-ferritin의 경우 N-당질화되지 않았음을 미루어 알 수 있었다. 효모 *S. cerevisiae*에서 발현된 사람 재조합 L-ferritin의 번역후 수식과정에 대한 실험 결과가 발표된 바 없다. 이전의 보고에 따르면, 생체 조직에서 분리한 ferritin의 경우 당질화가 되지 않았고 단지 혈청에서 분리

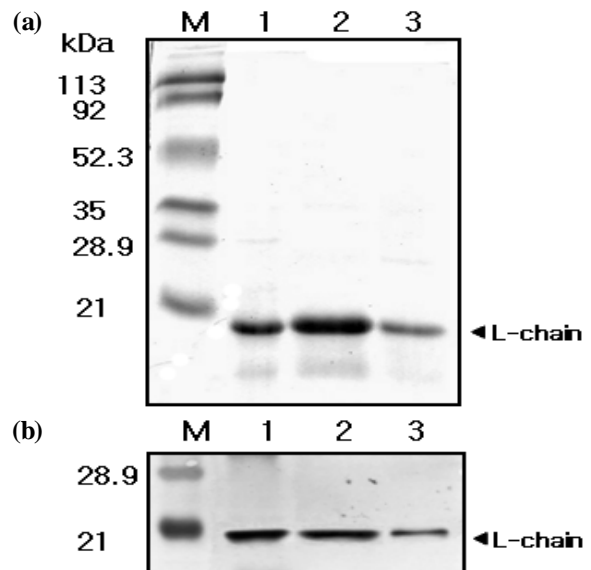


Fig. 1. Electrophoresis of human L-ferritins expressed in yeast. (a) 12% SDS-PAGE and (b) Western blot of purified human L-chain ferritins produced from *E. coli* and yeast. M, protein size marker; 1, recombinant human L-ferritin from *E. coli*; 2, recombinant human L-ferritin from yeast; 3, yeast human L-ferritin purified from the tunicamycin-treated cells.

한 ferritin에서 당질화가 보고된 바 있다 [20]. 또한, *Pichia pastoris*에서 생산한 재조합 사람 H- 및 L-ferritin의 경우 당질화되어 있다고 발표된 바 있다 [21,22]. 이 경우 tunicamycin의 존재하에 배양된 효모로부터 정제한 H- 및 L-ferritin에 대해 각각 전기영동을 수행하였고 사라진 단백질 띠를 확인함으로써 이는 당질화 때문으로 유추하였다.

효모에서 발현된 각각의 사람 ferritin L subunit이 24개씩 서로 조합되어 native 형태의 holoprotein으로 이루어지는지 비변성 젤을 이용하여 PAGE를 수행한 결과, L-ferritin holoprotein의 분자량에 해당되는 위치에서 발현된 단백질 띠를 확인할 수 있었다. 여기에서도 말 비장 ferritin을 포함하여 생체조직에서 ferritin을 분리 정제했을 때 보이는 ferritin 멀티머의 띠를 볼 수 있었다. 그리하여 발현된 단백질 subunit들은 native protein과 유사하게 조합되어 짐을 알 수 있었고 또한 단백질 내부에 철을 축적할 수 있음을 철 염색 젤에 의해 확인하였다 (Fig. 2). 대장균에서 생산된 재조합 L-ferritin과 비교해 볼 때 차이점을 발견할 수 없었다.

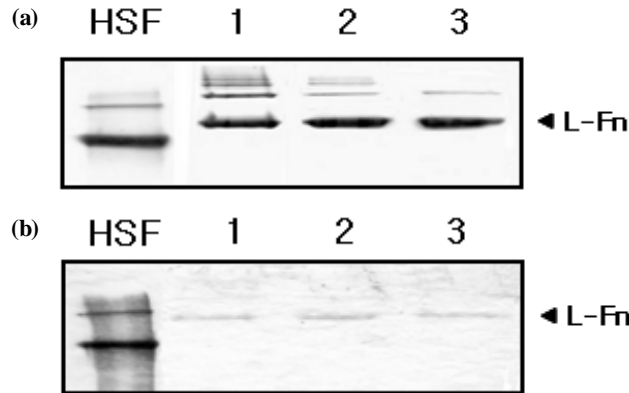


Fig. 2. 7.5% native PAGE of recombinant ferritins. (a) Coomassie blue-stained gel and (b) Prussian blue-stained gel. HSF, horse spleen ferritin; 1, *E. coli* L-ferritin; 2, yeast L-ferritin; 3, yeast L-ferritin purified from the tunicamycin-treated cells.

3.2. L-ferritin의 등전점

효모에서 활성이 있는 포유동물의 재조합 단백질을 생산하는 경우 종종 번역후 수식과정이 문제점으로 대두된다. 본 연구에서는 이러한 수식과정이 재조합 사람 L-ferritin을 생산하는데 관여되었는지 확인하고자 L-ferritin의 등전점을 분석하였다. 왜냐하면 이 수식과정은 단백질의 구조와 기능 및 철이온과의 결합에 영향을 미칠 것이기 때문이다. 정제된 L-ferritin의 isoelectric focusing 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 재조합 L-ferritin은 pI 값이 5.3-5.5으로 분석되었고 tunicamycin의 존재하에 배양된 효모로부터 정제된 경우 이 값은 변동이 없었다. 한편 대장균에서 생산한 재조합 L-ferritin의 경우 pI 값이 6.1-6.3으로 분석되었다. 이 결과로부터 효모에서 생산된 L-ferritin은 적어도 N-당질화는 일어나지 않았음을 알 수 있었다. 그러나 재조합 L-ferritin의 등전점은 대장균에서 생산된 L-ferritin의 등전점과 다르다. 따라서 효모에서 생산된 L-ferritin이 합성과정에서 N-당질화외에 다른 번역후 수식과정이 포함되었을 가능성을 유추할 수 있다. 컴퓨터 데이터

를 활용한 아미노산 서열 분석에 따르면 ferritin H-chain이 2곳의 공통 당질화 부위를 갖는 반면, L-chain은 한 곳의 공통 당질화 부위를 갖는다. 특히, 아미노산 서열 분석 결과 L-chain에는 O-당질화의 가능성이 있는 부위가 존재하지 않는다. 이것으로 볼 때 L-chain에는 당질화외의 수식과정이 포함되었을 가능성이 크다. 한편, 이전에 tunicamycin을 첨가하여 수행한 실험 결과를 보면 효모에서 생산한 H-ferritin이 N-당질화되었음을 알 수 있었으며 이 결과는 필자에 의해 다른 논문에 기술하였다. 그 결과, 단백질의 철 흡수 반응속도를 감소시켰고 core 크기는 증가되는 것을 볼 수 있었다. 아직까지 *S. cerevisiae*에서 생산한 재조합 ferritin의 번역후 수식과정에 대한 결과가 보고된 바 없다. 이전에 tunicamycin을 함유한 배지에서 *P. pastoris*로 부터 생산한 재조합 L-ferritin의 경우, SDS-PAGE 실험 결과 19 kDa과 21 kDa의 위치에서 각각의 띠를 얻음으로써 당질화를 보고하였다 [22]. 말 비장 ferritin의 경우, 약간 산성의 등전점 값을 보였는데 이것은 Harrison 등 [23]이 발표한 값과 유사하다.

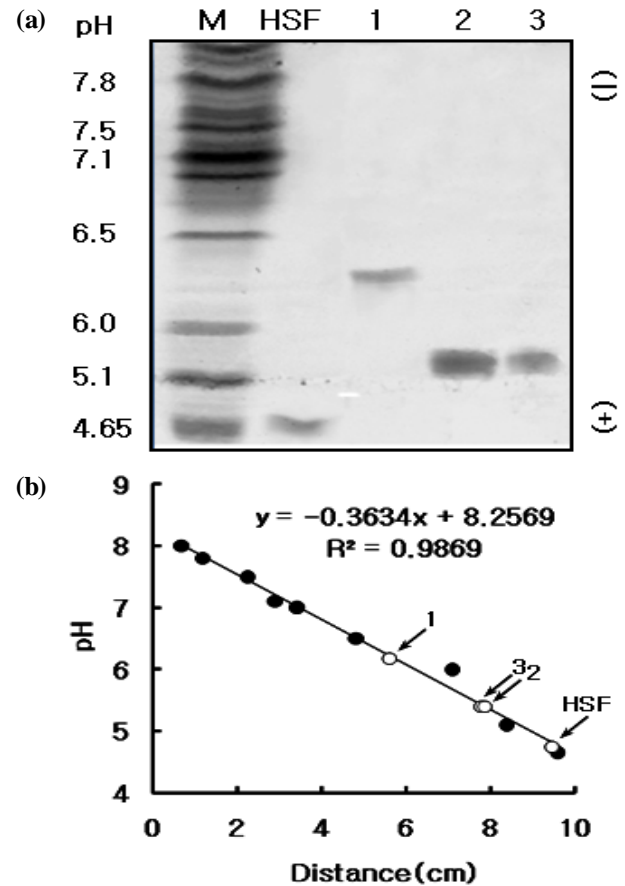


Fig. 3. Isoelectric focusing of recombinant ferritins. (a) Pre-made polyacrylamide IEF gel (5%) and (b) linear regression of the above isoelectric focusing results. M, marker proteins; HSF, horse spleen ferritin; 1, *E. coli* L-ferritin; 2, yeast L-ferritin; 3, yeast L-ferritin purified from the tunicamycin-treated cells.

3.3. 재조합 L-ferritin의 초기 철흡수율

재조합 L-ferritin을 Fe²⁺ 이온과 반응시켜 310 nm에서 흡수

도를 측정함으로써 철 흡수율을 측정하였다. Fig. 4는 단백질 분자당 400개의 Fe 원자와 반응시켰을 때 산화된 Fe³⁺ 양을 나타내는 곡선이다. L-ferritin에 의한 반응속도를 보면 초기에는 비교적 빠른 반응으로 진행하다가 약 10분이 경과되면서 안정화되는 것을 볼 수 있었다. 대장균에서 생산한 L-ferritin의 경우, 철 흡수율이 완만하게 증가하는 양상을 보였고 이 반응은 반응이 시작된 지 30분이 경과할 때까지도 계속되었다. 그리고 효모에서 생산한 L-ferritin은 흥미롭게도 말 비장 ferritin과 비교하여 동일 조건에서 매우 유사한 철 흡수 곡선을 보였다 [24]. 사람과 말 비장의 L-ferritin 사이에는 약 80% 이상의 아미노산 상동성을 보이고, 말 비장 ferritin이 85% L-chain과 15% H-chain으로 이루어진 점을 감안하면, ferritin 분자를 이루는 전체 24개의 subunit 중 3-4개의 H subunit 함량이 철 흡수반응에 미치는 영향은 극히 제한적인 것으로 보인다. 철 흡수량에 있어서는 숙주에 관계없이 두 단백질 모두 비슷한 값을 보였다. 그리하여 철 흡수율에 있어서의 차이는 효모에서 생산된 L-ferritin이 상대적으로 긍정적인 반응을 보임으로써 번역후 수식과정에 의해 철 흡수가 오히려 유리해 졌다고 할 수 있을 것이다. 이전에 보고한 H-ferritin에 의한 측정결과와 비교해 보면 L-ferritin에 있어서 철 흡수 반응이 느린 것을 알 수 있는데 바로 이 점으로 인해 core내 나노 입자의 미네랄을 균질한 상태로 얻는 데 있어서는 L-ferritin이 유리하게 작용할 것으로 유추된다.

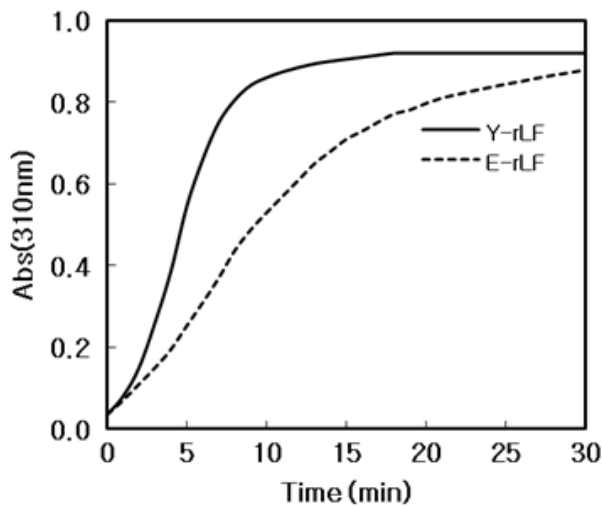


Fig. 4. Iron uptake by recombinant human L-ferritins. Protein concentrations were 0.5 mg/mL and the reaction was performed with 400 Fe atoms per protein molecule. Y-rLF, yeast L-ferritin; E-rLF, *E. coli* L-ferritin.

3.4. L-ferritin의 재치환율 및 나노입자 크기

Table 1에 재조합 L-ferritin을 단백질 분자당 2000개의 철 원자와 반응시킨 후, 단백질 core내 철 함량과 재치환율을 나타냈다. 재조합 L-ferritin의 core내 철 함량은 1089 ± 17 Fe atom으로써 54.5%의 치환율을 보였다. 대장균에서 생산한 L-ferritin의 경우 이 값은 929 ± 24 Fe atoms로 떨어졌고 이때의 치환율은 46.5% 이었다. 효모에서 발현시켰을 때의 재조합 L-ferritin이 대장균에서 발현시켰을 때보다 약 1.17배

높은 재치환율을 보였다. 즉, 단백질을 생산하는 숙주 생물체에 따라 L-ferritin의 재치환율이 달라짐을 알 수 있다. 재조합 H-ferritin에서도 이와 유사한 경향이 나타나, 효모에서 발현시켰을 때의 H-ferritin이 대장균에서 발현시켰을 때보다 약 1.2배 높은 재치환율을 보였다 (인쇄중). 다양한 환경요인들은 나노입자를 합성하는데 영향을 미친다. 이전 연구에서 효모에서 생산한 재조합 사람 H- 및 L-ferritin을 반응버퍼 (MOPS)의 농도, 단백질의 농도 및 반응용액의 부피 등 다양한 조건에서 철 이온과 반응시키고 재치환율을 비교 분석한 바 있다 [24,25]. 그 결과, H- 및 L-ferritin 모두 반응 조건에 따라 37-72%의 다양한 재치환율을 보였다. 또한, 분석에 사용한 단백질 농도와 반응 부피에 있어서 H-ferritin이 L-ferritin보다 상대적으로 높은 재치환율을 나타냈다. 그러나 동일한 cDNA로부터 숙주 세포가 다른 재조합 ferritin을 이용하여 재치환 실험 결과를 비교한 바는 없다. 특히, 이 실험은 원핵세포와 진핵세포에서 각각 생산하였고 단백질 중공내 합성된 미네랄을 전자현미경을 이용하여 분석 비교하였다. 진핵세포를 이용하여 재조합 단백질을 생산할 경우 종종 나타나는 번역후 수식과정이 때로는 미미할지라도 단백질과 다른 기질과의 반응에 큰 영향을 미칠 수 있다는 점을 간과할 수 없기 때문이다.

Table 1. Reconstitution yields of L-ferritins with 2000 Fe atoms per protein molecule (yeast L-ferritin data from [24])

Protein type	Theoretical amount	Analytical amount	Yield (%)
L-ferritin (<i>E.coli</i>) 1.0 mg/mL	2000	929 ± 24	46.5
L-ferritin (yeast) 1.0 mg/mL	2000	1089 ± 17	54.5

재치환된 L-ferritin의 미네랄 core를 투과전자 현미경을 이용하여 관찰하였다 (Table 2 & Fig. 5). 단백질을 역상으로 염색하여 관찰해 본 결과 잘 알려진 것처럼 미네랄 core는 전자밀도가 낮은 폴리펩티드 껍질에 둘러 싸여 있음을 확인하였다 (data not shown). 미네랄 입자들은 거의 분리된 형태로 관찰이 용이하였고 그 입자 크기에 대한 분석 결과를 Table 2에 나타내었다. 미네랄 크기는 효모로부터 얻은 재조합 L-ferritin의 경우 5.71-9.70 nm (평균 6.92 nm)로 분석되었고 대장균으로부터 얻은 재조합 L-ferritin의 경우 4.65-8.82 nm (평균 6.60 nm)로 분석되었다. 이 결과로부터 단백질 중공내 더 많은 철을 함유하고 있는 효모유래의 L-ferritin의 미네랄 크기가 대장균유래의 L-ferritin보다 약간 커진 것을 알 수 있다. H-ferritin의 미네랄 크기에서도 이와 유사한 경향이 나타났다. 이 경우 효모유래의 L-ferritin에 있어서의 빠른 초기 철흡수가 미네랄 형성에 긍정적으로 작용하여 철함량이 증가하였고 미네랄 크기 또한 증가하였음을 의미한다.

Table 2. Particle size data of the reconstituted L-ferritins

Protein	Reaction condition	Particle mean (nm)	Particle range (nm)
L-ferritin (<i>E.coli</i>)	1 mg/mL, 3 mL	6.60	4.65-8.82
L-ferritin (yeast)	1 mg/mL, 3 mL	6.92	5.71-9.70

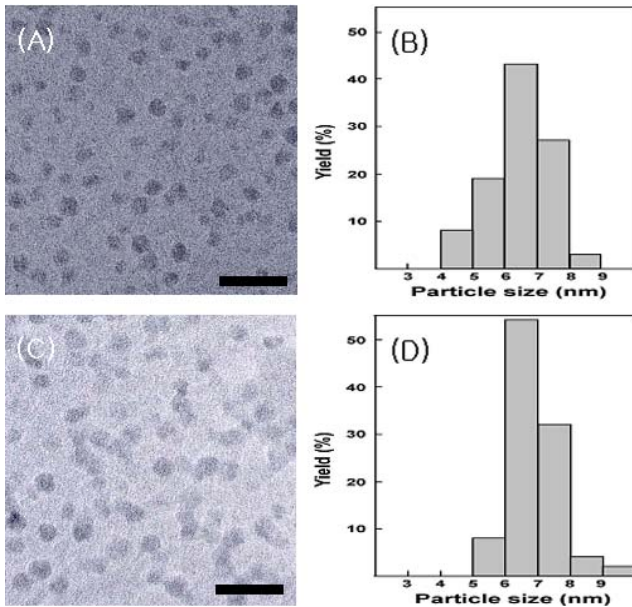


Fig. 5. Transmission electron micrographs and particle size distribution of the iron cores of reconstituted L-ferritins. The scale bar presents 20 nm in the micrographs. (A) and (B) *E. coli* L-ferritin (1.0 mg/mL); (C) and (D) yeast L-ferritin (1.0 mg/mL).

미네랄의 크기 분포도를 살펴보면, 두 시료 모두 다양한 크기의 나노미네랄이 혼재함을 알 수 있었다 (Fig. 5). 효모유래의 L-ferritin의 경우 대장균유래 L-ferritin에 비해 상대적으로 좁은 분포도를 보였다. 즉, 아주 적거나, 또는 매우 큰 입자의 미네랄이 많이 감소하여 전체 core 중 약 86%가 6-8 nm 크기의 범위에 해당하였다. 이는 미네랄 크기 및 균질성의 관점에서 볼 때 효모유래의 L-ferritin이 대장균에서 생산한 것보다 다소 유리한 것으로 보인다. 이와 유사한 결과가 효모와 대장균으로부터 생산한 사람 H-ferritin을 이용하여 각각 재치환 실험을 수행함으로써 얻어졌다. 이 경우 단백질 공동 내에 일단 미네랄이 형성되면 이것이 결정핵으로 작용하여 미네랄화를 자가 촉진하는 것으로 유추되었다. 재조합 ferritin의 전자회절 패턴은 퍼진 형태로 나타났고 두 시료 모두에서 0.25, 0.21, 및 0.12의 세 개의 *d*-spacing 퍼진 링 패턴이 확인되었다. 이 결과는 합성된 미네랄이 모두 ferrihydrite로써 비결정성이거나 결정성이 낮음을 의미하는 것이며 이전의 연구 결과와도 일치한다 [26,27].

요약하면, 본 연구는 균질한 크기와 안정성을 가진 나노 물질을 생산하기 위해 L-ferritin을 사용하였다. 그리하여 재조합 L-ferritin을 이용하여 미네랄을 합성하였고 합성된 core 미네랄에 대한 전자 현미경 연구를 수행하였다. 이 단백질은 나노입자 합성과 관련하여 여러 가지 장점을 가지고 있어 많은 연구가 수행되고 있다. 근래 균질한 크기의 나노 입자를 용이하게 합성하는 것이 재료과학자들에게 중요한 관심 사항인 바, 이러한 분자생물학적 내지는 생화학적 실험 결과 들은 ferritin 단백질을 이용하여 더욱 균질한 크기의 나노 입자를 합성하는데 밑거름이 될 것이다. 또한, 유전자조작을 통하여 재조합 ferritin 변이체를 생산하고 이로부터 나노 입자를 합성하여 단일 입자의 구조와 결정성 등의 특성을

규명함으로써 각각의 목적에 부합하는 다양한 시도가 가능하게 될 것이다.

4. 결론

나노 입자의 합성에 있어서 중요한 관점은 균질한 입자를 얻는 것이다. 다양한 금속 이온의 나노 입자 미네랄을 합성하기 위하여 여러 기술이 제안되었으며 생체 분자의 하나인 ferritin 단백질을 사용하는 방법도 일찍이 도입되었다. 이러한 관점에서 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)에서 생산한 재조합 인간 L-ferritin을 정제하였고 그 분자적 특성을 규명하였다. 동일한 단백질의 cDNA를 다른 숙주 즉, 대장균 (*Escherichia coli*)에서 생산하였고 비교실험을 수행하였다. 전기 영동적 이동상과 등전점 실험을 수행한 결과, 효모에서 생산한 재조합 L-ferritin은 N-당질화는 일어나지 않았고, N-당질화외에 다른 번역후 수식과정이 포함되었을 것으로 유추되었다. 이 두 단백질은 철 흡수 실험에서도 차이를 보였으며 재조합 효모 유래의 L-ferritin에서 철 흡수 반응이 상대적으로 빠르게 나타났다. 단백질내 합성된 미네랄에 대한 재치환율, 입자 크기 분포를 전자현미경을 이용하여 분석하였다. 효모에서 생산한 재조합 L-ferritin은 대장균에서 생산한 L-ferritin에 비해 높은 재치환율 (54.5%)을 가졌으며 상대적으로 좁은 영역의 입자의 크기 분포도와 함께 입자의 크기는 다소 큰 (평균 6.92 nm) 것으로 분석되었다. 이 결과는 입자의 크기와 상대적인 균질성 관점에서 볼 때 효모에서 생산한 L-ferritin이 상대적으로 우월한 것임을 의미한다.

References

- Meldrum, F. C., V. J. Wade, D. L. Nimmo, B. R. Heywood, and S. Mann (1991) Synthesis of inorganic nanophase materials in supramolecular protein cages. *Nature* 349: 684-687.
- Douglas, T. (1996) Biomimetic synthesis of nanoscale particles in organized protein cages. pp. 91-115. In: S. Mann (ed.). *Biomimetic Materials Chemistry*. VCH Publishers, Inc., NY, USA.
- Cölfen H. (2007) Bio-inspired mineralization using hydrophilic polymers. *Top. Curr. Chem.* 271: 1-77.
- Meldrum, F. C., T. Douglas, S. Levi, P. Arosio, and S. Mann (1995) Reconstitution of manganese oxide cores in horse spleen and recombinant ferritins. *J. Inorg. Biochem.* 58: 59-68.
- Mann, S. and F. C. Meldrum (1991) Controlled synthesis of inorganic materials using supramolecular assemblies. *Adv. Mater.* 3: 316-318.
- Harrison, P. M. and P. Arosio (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1275: 161-203.
- Chasteen, N. D. and P. M. Harrison (1999) Mineralization in ferritin: An efficient means of iron storage. *J. Struct. Biol.* 126: 182-194.
- Joshi, J. G., S. R. Sezekan, and J. T. Fleming (1989) Ferritin-a general metal defoxycant. *Biol. Trace Element Res.* 21: 105-110.
- Fleming, J. T. and J. G. Joshi (1991) Ferritin: the role of aluminum in ferritin function. *Neurobiol. Aging.* 12: 413-418.

10. Pead, S., E. Durrant, B. Webb, C. Larsen, D. Heaton, J. Johnson, and G. D. Watt (1995) Metal ion binding to apo, halo, and reconstituted horse spleen ferritin. *J. Inorg. Biochem.* 59: 15-27.
11. Arosio, P. and S. Levi (2002) Ferritin: Iron homeostasis and oxidative damage. *Free Rad. Biol. Med.* 33: 457-463.
12. Cozzi, A., B. Corsi, S. Levi, P. Santambrogio, A. Albertini, and P. Arosio (2000) Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells: In vivo role of ferritin ferroxidase activity. *J. Biol. Chem.* 18: 25122-25129.
13. Seo, H.-Y., Y.-Y. Chung, S.-J. Kim, C.-U. Park, and K.-S. Kim (2003) Enhanced expression and functional characterization of the human ferritin H- and L-chain genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 57-63.
14. 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.
15. Santambrogio, P., S. Levi, A. Cozzi, E. Rovida, A. Albertini, and P. Arosio (1993) Production and characterization of recombinant heteropolymers of human ferritin H and L chains. *J. Biol. Chem.* 268: 12744-12748.
16. 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.
17. Kim, K.-S., H.-R. Mun, and J.-H. Lee (2000) Iron cores of tadpole ferritin: native, reconstituted and recombinant H-chain ferritins. *Inorg. Chim. Acta.* 298: 107-111.
18. Hess, H. H., M. B. Less, 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.
19. Chang, S.-R., Y.-T. Kim, and K.-S. Kim (1995) Purification and characterization of recombinant tadpole H-chain ferritin in *Escherichia coli*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 28: 238-242.
20. Cragg, S. J., M. Wagstaff, and M. Worwood (1981) Detection of a glycosylated subunit in human serum ferritin. *J. Biochem.* 199: 565-571.
21. Lee, J.-L., H.-S. Song, H.-J. Kim, J. H. Park, D. K. Chung, C.-S. Park, D. Jeoung, and H.-Y. Kim (2003) Functional expression and production of human H-ferritin in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Letters* 25: 1019-1023.
22. Lee, J.-L., S.-N. Yang, C.-S. Park, D. Jeoung, and H.-Y. Kim (2004) Purification and glycosylation pattern of human L-ferritin in *Pichia pastoris*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 68-73.
23. 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. pp. 82-101. In: P. Ponka, H. M. Schulman, R. C. Woodworth (eds.). *Iron Transport and Storage*. CRC press.
24. Kim, S.-W., M.-Y. Jo, Y. Yokoda, Y.-J. Chung, C.-U. Park, and K.-S. Kim (2004) Reconstitution of iron cores in horse spleen and yeast-derived recombinant human H- and L-chain ferritins. *Bull. Korean Chem. Soc.* 25: 237-242.
25. Wade, V. J., S. Levi, P. Arosio, A. Treffry, P. M. Harrison, and S. Mann (1991) Influence of site-directed modifications on the formation of iron cores in ferritin. *J. Mol. Biol.* 221: 1443-1452.
26. Janney, D. E., J. M. Cowley, and P. R. Buseck (2000) Structure of synthetic 2-line ferrihydrite by electron nanodiffraction. *Am. Mineral.* 85: 118-1187.
27. Kim, S.-W., H.-Y. Seo, Y.-B. Lee, Y.-S. Park, and K.-S. Kim (2008) Crystal structure of ferrihydrite nanoparticles synthesized in ferritin. *Bull. Korean Chem. Soc.* 29: 1969-1972.