(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
C12N 15/63

(11) 공개번호 특2002-0008530
(43) 공개일자 2002년01월31일

(21) 출원번호 10-2000-0041859
(22) 출원일자 2000년07월21일

(71) 출원인 주식회사 바이오프로젠
정봉현
대전 유성구 어은동 52 생명공학연구소 미생물공정연구실

(72) 발명자 강환구
대전광역시유성구전민동464-1번지엑스포아파트210동1503호
이병욱
부산광역시영도구동삼동149-1번지고신대학교생명과학과
유병일
대전광역시대덕구오정동133번지한남대학교화학공학과

(74) 대리인 이덕록

심사청구 : 있음

# (54) 훼리틴 유전자 발현을 위한 형질전환된 재조합 효모균주및 이를 이용한 재조합 훼리틴 생산방법

## 요약

본 발명은 훼리틴 유전자 발현을 위한 형질전환된 재조합 효모균주 및 이를 이용한 재조합 훼리틴 생산방법에 관한 것으로 훼리틴 H-형태와 L-형태를 암호화하는 유전자가 각각 도입된 재조합 벡터에 의해 형질전환된 재조합 효모균주를 배양하여 체내 철분 보존 기능을 담당하는 재조합 훼리틴 H-형태와 L-형태를 대량으로 생산하여 철분결핍 예방 및 치료용 기능성 식품, 건강보조제, 보조영양제, 의약품, 화장품을 비롯한 생체 건강을 위한 기능성 제제로 사용할 수 있는 뛰어난 효과가 있다.

## 대표도

도 3

## 색인어

재조합 훼리틴, 사카로마이세스 세레비지아에, 철분 저장, 효모, 발현, 철분결핍 예방 및 치료

## 명세서

## 도면의 간단한 설명

도 1은 인간 훼리틴 유전자의 아가로즈 젤 확인 과정을 나타낸다.

도 2는 인간 훼리틴 H-형태를 발현하는 재조합 벡터 pYFRH-1 제조과정 및 효모의 형질전환 과정을 나타낸 모식도이다.

도 3은 인간 훼리틴을 발현하는 발현벡터로 형질전환된 재조합 효모균주에서 발현되는 훼리틴의 SDS-PAGE 분석 결과이다.

도 4는 인간 훼리틴 L-형태를 발현하는 재조합 벡터 pYFRL-1 제조과정 및 효모의 형질전환 과정을 나타낸 모식도이다.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 훼리틴 유전자 발현을 위한 형질전환된 신규한 재조합 효모균주 및 이를 이용한 재조합 훼리틴 생산방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 훼리틴 유전자 라이브러리(cDNA library)로부터 중합 연쇄 반응(polymerase chain reaction) 방법에 의해 클로닝된 훼리틴 유전자에 의해 형질전환된 재조합 효모균주 및 이를 이용한 재조합 훼리틴 생산방법에 관한 것이다.

훼리틴은 체내에 존재하는 잉여의 철분(iron)을 보관하는 기능을 갖는 단백질 분자로서 세균을 비롯하여 식물계와 동물계에 널리 존재하고 있음으로 생명현상의 영위에 필수적인 물질로 생각되고 있다. 포유류의 훼리틴은 췌장과 간에 고농도로 존재하는 것으로 밝혀졌는데 H-형태와 L-형태로 구성된 것이 밝혀졌으며, 1개의 훼리틴이 약 500kDa의 거대분자로서 4,500개의 철분자를 보유할 수 있는데 이는 헤모글로빈 약 1,200 분자를 생성할 수 있는 양이다. 생체 내에 존재하는 훼리틴의 구조와 크기는 다 동일하지 않은 것으로 생각되고 있으며 이는 순수 정제 후에 폴리아크릴라마이드 젤 전기영동 시에 다양한 크기의 훼리틴 밴드(band)를 관찰함으로서 알 수 있다. 체내에 존재하는 1분자의 훼리틴은 분자량이 약 21kDa인 Heavy (H)-형태와 약 19kDa인 Light(L)-형태로 불리우는 서브유니트(subunit)들이 24개 모여서 구성되는데 훼리틴의 24개의 서브유니트를 구성할 때에 H-형태와 L-형태의 혼합 구성비가 항상 일정하지 않으므로 구조와 크기의 다양성을 나타내게 된다.

훼리틴 분자에 의한 철분 보존의 과정은 Fe(Ⅱ)의 산화, Fe(Ⅲ)의 이동, 결정핵 생성, 그리고 철분 코어(core)의 성장으로 이루어지는데 H-형태는 Fe(Ⅱ)의 산화과정에 L-형태는 코어의 성장에 관여하는 것으로 밝혀졌다. H-형태는 퍼록시다아제(ferroxidase)의 활성이 있어 철분의 결합을 촉진한다. L-형태는 H-형태와 약 55% 동질성을 보이며 페록시다아제 활성이 없다.

인간 훼리틴 H-형태 유전자는 코스탄조 등(Costanzo, F.,et al., EMBO J. 3:23-27, 1984)에 의해서 최초로 클로닝되었고, 레비 등(Levi, S.,et al., Gene 51:269-274. 1987)에 의해서 대장균에서 재조합 형태로 생성되었다. 레비 등의 실험에서는 PL 프로모터를 사용하였으며, 총 수용성 세포 단백질의 15%를 재조합 인간 훼리틴 H-형태가 차지하였다. 또한 인간 훼리틴 H-형태에 특이성을 갖는 항체는 재조합 인간 훼리틴 H-형태를 인식하지만, 인간 훼리틴 L-형태와 특이적으로 반응하는 항체를 사용한 경우 인간 훼리틴 H-형태를 인식하지 못하는 것으로 밝혀졌다. 이후 프로지 등 (Prozzi D.,et al., FEMS letter 234 : 61-4, 1988)에 의해서 인간 훼리틴 H-형태의 변이체들이 대장균에서 발현되었다. 이 경우에는 재조합 H-형태의 변이체들이 철분에 결합능을 보유했으며 인간 훼리틴 H-형태에 특이성을 갖는 항체에 의해 인식되었다.

인간 훼리틴 L-형태 유전자는 산토로 등(Santoro, C.,et al., Nucl. Acids. Res. 14:2863-2867. 1986)에 의해서 최초로 클로닝되어 레비 등(Levi, S.,et al., Biochemistry 28:5179-5184. 1989)에 의해서 대장균에서 재조합 형태로 생성되었다. 레비 등의 실험에서는 λ 프로모터를 사용하였으며, 총 수용성 세포 단백질의 15%를 재조합 인간 훼리틴 L-형태가 차지하였다. 재조합 인간 훼리틴 L-형태는 철분을 보유하는 능력이 있는 것으로 밝혀졌다.

레비 등(Levi S.,et al., J. Mol. Biol. 238:649-654, 1994)은 독립적으로 밝혀진 재조합 인간 훼리틴 H-형태와 L-형태가 혼합된, 즉 인체에서 형성되는 자연적 훼리틴과 유사한 재조합 훼리틴을 만들었는데, 이 경우에 H-형태 혹은 L-형태가 혼합된, 즉 인체에서 생성되는 자연적 훼리틴과 유사한 재조합 훼리틴을 만들었는데, 이 경우에 H-형태 혹은 L-형태가 단독으로 존재하는 훼리틴보다 철분의 보유력이 3  4배 증가하는 것을 발견하였다.

사카로마이세스 세레비지아에(Saccharomyces cerevisiae)를 사용하여 재조합 인간 단백질을 생산하는 경우의 최대의 장점은 사카로마이세스 세레비지아에 자체가 인간에게 매우 안전하다는 점이다. 사카로마이세스 세레비지아에는 제과, 제빵 및 포도주 등을 비롯한 알코올 음료의 생산에 수천년 동안 사용되어 왔으며, 대장균 등에서 생산된 재조합 단백질에 불순물로 존재할 가능성이 있는 파이로젠 (pyrogen)등의 존재 가능성이 매우 낮다. 특히 철분을 보충하기 위한 음식물의 일부로 재조합 훼리틴을 섭취할 경우에 사카로마이세스 세레비지아에서 생산된 형태는 안정성이 탁월하다.

인간 훼리틴은 24개의 H-형태 및 L-형태가 참여하여 형성된 고분자 거대물질이므로 높은 철분 흡수율을 위해서는 정확히 24개의 서브유니트(subunit)을 조립하여 완전한 구조인 재조합 훼리틴을 생산하는 점이 매우 중요하다. 사카로마이세스 세레비지아에는 진핵 생명체로서 세포의 크기가 대장균 등 원핵 생명체에 비하여 월등히 크고, 생산된 단백질을 정확하게 폴딩(folding) 하는 체계 및 서브유니트 조립체계가 발달되어 있다. 다수의 서브유니트로 구성된 거대 단백질의 경우 대장균에서는 생산을 실패하였으나 사카로마이세스 세레비지아에는 발현을 성공한 사례가 많다.

본 발명자들은 훼리틴 유전자를 중합연쇄반응의 방법으로 증폭하여 사카로마이세스 세레비지아에(S. cerevisiae)의 GAPD 프로모터에 연결한 후에 발현시킴으로서 인체에 존재하는 천연 훼리틴과 동일한 아미노산 서열을 갖는 재조합 훼리틴 생산 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

특히 효모류인 사카로마이세스 세레비지아에(Saccharomyces cerevisiae), 한세눌라 폴리모르파(Hansenula polymorpha) 또는 피치아 파스토리스(Pichia pastoris)를 이용한 인간 훼리틴 H-형태 및 L-형태의 발현은 아직까지 기술된 바가 없었다.

따라서, 본 발명의 목적은 훼리틴 유전자가 도입된 재조합 벡터를 제공함에 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 재조합 효모균주를 제공함에 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환된 재조합 효모균주를 배양하여 재조합 훼리틴을 생산하는 방법을 제공함에 있다.

## 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 상기 목적은 훼리틴 H-형태 유전자와 훼리틴 L-형태 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제작하고 이들을 사카로마이세스 세레비지아에를 비롯한 효모균주에 각각 형질전환시켜 재조합 효모균주를 제조하고 이들을 배양하여 재조합 훼리틴 H-형태와 L-형태를 생산함으로써 달성하였다.

이하, 본 발명의 구성을 설명한다.

## 발명의 구성 및 작용

본 발명은 훼리틴을 구성하는 H-형태의 발현 유전자를 중합연쇄반응에 의해 클로닝하고 상기 클로닝된 유전자가 훼리틴 H-형태 유전자임을 자동 염기서열 분석기에 의해 확인한 후 이 클로닝된 유전자가 도입된 재조합 발현벡터를 제조하는 단계; 상기 재조합 발현벡터를 효모균주에 형질전환시켜 재조합 효모균주를 제조하는 단계; 상기 재조합 효모균주를 배양하여 재조합 효모균주내 유전자를 발현시켜 재조합 훼리틴 H-형태를 생산하는 단계; 훼리틴을 구성하는 L-형태의 발현 유전자를 중합연쇄반응에 의해 클로닝하고 상기 클로닝된 유전자가 훼리틴 L-형태 유전자임을 자동 염기서열 분석기에 의해 확인한 후 이 클로닝된 유전자가 도입된 재조합 발현벡터를 제조하는 단계; 상기 재조합 발현벡터를 효모균주에 형질전환시켜 재조합 효모균주를 제조하는 단계; 및 상기 재조합 효모균주를 배양하여 재조합 효모균주내 유전자를 발현시켜 L-형태 재조합 훼리틴을 생산하는 단계로 구성된다.

본 발명에서 훼리틴 유전자는 인간의 간 cDNA 라이브러리로부터 중합연쇄반응으로 클로닝한 것을 사용하거나 말, 소, 식물 유래의 훼리틴 유전자를 사용할 수 있다.

본 발명에서 형질전환된 재조합 효모균주를 제조하기 위해 사용한 효모균주는 사카로마이세스 세레비지아에(Saccharomyces cerevisiae), 한세눌라 폴리모르파(Hansenula polymorpha) 또는 피치아 파스토리스(Pichia pastoris) 등이며 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지아에이다.

본 발명에 의해 생산된 재조합 훼리틴은 철분결핍 예방 및 치료용 기능성 식품, 건강보조제, 보조영양제, 의약품, 화장품을 비롯해 생체 건강을 위한 기능성 제제로 사용할 수 있다.

이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 인간 훼리틴 H-형태를 발현시키는 재조합 벡터 pYFRH-1 제조

본 발명은 인간 훼리틴을 구성하는 H-형태를 발현하는 유전자를 인간의 간 cDNA 리이브러리에서 중합연쇄반응 방법으로 증폭한 후에 클로닝하였다. 증폭된 H-형태는 대장균의 플라스미드인 pBlueScript KS $^{+}$에 삽입하였다. 중합연쇄반응 방법에 의한 프라이머의 제조시에 원할한 클로닝을 위하여, 각 사슬(chain)의 유전자 내에서 존재하지 않는 제한효소 부위가 프라이머 내에 삽입되었다. H-형태를 클로닝할 경우에는 하기와 같은 프라이머가 사용되었다.

5'-ATTGAATTCACGATGACGACCGCGTCCACCTCG-3'와

5'-AATTCTCGAGCAGGAAGTCACCCCACGGCATTGG-3'

중합 연쇄 반응 방법은 다음과 같다. 100㎕의 반응 용액에 1㎕의 cDNA 라이브러리(Clontech), dATP, dCTP, dGTP, 및 dTTP 각각 200μM. 프라이머 각각 200nM, 벤트 폴리머라아제(Vent polymerase)(New England Biolab) 1 Unit, 효소 회사에서 제공한 반응 버퍼(buffer) 10㎕를 혼합한 후에 50㎕ 미네랄 오일로 상층을 덮은 후에 95℃에서 5분간 전처리 하고, 이후에 95℃ 1분, 65℃ 1분, 72℃ 2분의 연속 반응을 30회 반복하여 DNA를 증폭한 후에, 72℃에서 10분간 처리하여 반응을 마무리 지었다. 중합 연쇄반응 방법 후 1.2% 아가로즈 젤(TBE 완충용액) 전기영동으로 DNA 절편의 생산을 확인하고(도 1) 이를 PCR 정제 키트(purification kit;Promega)를 사용하여 정제하였다. 정제된 DNA는 제한효소EcoRI과XhoI으로 절단하고 동일한 제한효소들로 절단된 pBlueScirpt KS $^{+}$로 삽입한 후에E. coliXL1-Blue로 형질전환하여 IPTG(Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside) 1mM, X-gal(5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β-D-galactopyranoside) 40μg/mL 및 엠피실린 100μg/mL 가 포함된 LB(Yeast Extract 0.5%, Tryptone 1%, NaCl 0.5%) 아가 (Agar) 배지에서 도말하여 37℃에서 하룻밤동안 배양한 후에 흰색 콜로니의 성장을 관찰하였다. 흰색 콜로니로부터 플라스미드를 정제한 후에 제한효소EcoRI 과XhoI으로 절단하여 1.2% 아가로스 젤 전기영동함으로서 DNA 절편의 삽입을 확인하였다. 이후에 자동 염기서열 분석기에 의해 DNA 서열을 분석하여 클로닝된 DNA가 인간 훼리틴 H-형태 유전자이고 돌연변이를 포함하지 않는다는 것을 확인하였다.

이어서, 자동염기 서열 분석에 의해 돌연변이가 없는 것으로 확인된 인간 훼리틴을XhoI으로 절단한 뒤 Klenow 1㎕와 dNTP Mix 0.5mM이 포함된 상태에서 37℃, 15min간 반응하여 블런트 말단(blunt end)로 만들고 70℃에서 20min 간 처리하여 Klenow 활성을 제거한 뒤,EcoRI으로 다시 잘라 유전자를 준비하였다. 발현 벡터는 GAPDH 프로모터와 GAL 터미네이터를 포함하는 발현벡터로 멀티클로닝 사이트 중XbaI을 절단한 뒤 Klenow 1㎕와 dNTP Mix 0.5mM이 포함된 상태에서 37℃, 15min간 반응하여 블런트 말단으로 만든 뒤 70℃에서 20min 간 처리하여 Klenow 활성을 없애고,EcoRI으로 다시 잘라 준비하였다. 준비된 훼리틴 H-형태 유전자나 벡터의 잔존 효소 활성을 없애기 위해 70℃에서 20min간 처리한 뒤 리가아제(Ligase) 효소를 사용하여 접합시켜E. coliXL1-Blue로 형질전환하고 엠피실린 100 ㎍/mL이 포함된 항생 배지에서 1일간 배양하였다. 얻어진 균주를 형질전환에 확인을 위해 균에서 DNA를 다시 추출하여 잘라 확인하여 pYFRH-1이라고 명명하였다(도 2).

실시예 2: 인간 훼리틴 H-형태를 발현을 위한 재조합효모 균주 제조

상기 실시예 1에서 제조한 재조합 벡터 pYFRH-1는E. coliXL1-Blue 균주를 배양하여 5㎍농도로 DNA를 준비해 놓고, 또한 하루 전에 30℃조건으로 YPD(YE 1%, Peptone 2%, Glucose 2%)에서 배양된 사카로마이세스 세레비지아에 Y2805WT(S. cerevisiaeY2805WT)는 다시 1/100 volume으로 YPD broth 배지에 계대 배양하여 3 4시간 배양한 후 4℃로 냉각된 멸균수로 2회, 최종적으로 4℃로 냉각된 1M 솔비톨(Sorbitol)로 1회 세척하여 미생물을 준비하였다. 준비된 미생물에 냉각된 1M 솔비톨로 현탁하여 70㎕ volume으로 만든 뒤 DNA와 잘 섞어서 Electroporater (Bio-rad Gene Pulser II)용 2mm 간극을 가진 큐벳(Cuvette)에 넣고 200Ω, 250V, 1,5㎌ 조건에서 전기 충격(shock)을 주어 형질전환하였다. 재빨리 1mL YPD로 현탁하여 멸균 튜브(tube)에 담은 후 30℃ 진탕배양기에서 한시간 동안 배양하고, 최소 아가배지(w/o Nitrogen base 6.7g/L, 20mg/L Histidine, Agar 1.5%)에 200㎕를 접종하여 30℃ 진탕배양기에서 2 3일 자라게 한 뒤 인간 훼리틴이 형질 전환된 사카로마이세스 세레비지아에 균주를 선별하고 이를 사카로마이세스 세레비지아에 Y2805/pYFRH-1로 명명하였다.

본 실시예에서 제조한 재조합 효모 사카로마이세스 세레비지아에 Y2805/ pYFRH-1은 2000년 7월 21일 생명공학연구소 미생물기탁센터 유전자은행에 수탁번호 KCTC 0832BP로 수탁하였다.

실시예 3: 재조합 인간 훼리틴 H-형태 생산

본 실시예에서는 인간 훼리틴 생산을 위해 인간 훼리틴 H-형태 유전자가 형질전환된 본 발명 재조합 효모균주 사카로마이세스 세레비지아에 Y2805/pYFRH-1(KCTC 0832BP)를 30℃의 액체 $URA^-$ 최소배지(w/o Nitrogenbase 0.67%, Glucose 2%, Histidine 20㎍/ml)에서 O.D. 0.5(at 660nm)까지 자라게 한 형질전환 균주를 50배 희석하여 YPD (Yeast extract 2%, Peptone2%, Glucose 2%) broth 배지로 계대 배양하였다. 배양액의 $OD_{660}$ 이 6 7에 대수생장기까지(약 20시간)배양 후에 균주를 수거하였다. 수거된 균주를 원심분리하여 얻은 후 SDS가 포함된 버퍼를 전체 양에 1/2 (v/v)로 넣어 5분간 끓인 후 마커(Marker)와 함께 15% 폴리아크릴라마이드젤 SDS-PAGE (15% Tris-Glycine gel, Novex)로 전기영동하여 실버(Silver) 염색을 한 후 확인하였다(도 3).

실시예 4: 인간 훼리틴 L-형태를 발현시키는 재조합 벡터 pYFRL-1의 제조

본 실시예에서는 인간 훼리틴을 구성하는 L-형태를 발현하는 유전자를 인간의 간 cDNA 라이브러리에서 중합연쇄반응 방법으로 증폭한 후에 클로닝하였다. 증폭된 L-형태는 대장균의 플라스미드인 pBlueScript $KS^+$에 삽입하였다. 중합연쇄반응 방법에 의한 프라이머의 제조시에 원할한 클로닝을 위하여, 각 형태의 유전자 내에서 존재하지 않는 제한효소 부위가 프라이머 내에 삽입되었다. L-형태를 클로닝할 경우에는 하기와 같은 프라이머를 사용하였다.

5'-ATTGAATTCACGATGAGCTCCCAGATTCGTCAG-3'와

5'-AATTCTCGAGGTGGGCTCAAGAAGGCTCTTAGTC-3'

중합 연쇄 반응 방법은 다음과 같다. 100㎕의 반응 용액에 1㎕의 cDNA library (Clontech), dATP, dCTP, dGTP, 및 dTTP 각각 200μM. primer 각각 200nM, Vent polymerase(New England Biolab) 1 Unit, 효소 회사에서 제공한 반응 버퍼 10㎕를 혼합한 후에 50㎕ 미네랄 오일로 상층을 덮은 후에 95℃에서 5분간 전처리 하고, 이후에 95℃ 1분, 65℃ 1분, 72℃ 2분의 연속 반응을 30회 반복하여 DNA를 증폭한 후에, 72℃에서 10분간 처리하여 반응을 마무리 지었다. 중합 연쇄반응 방법 후 1.2% 아가로즈 젤(TBE 완충용액) 전기영동으로 DNA 절편의 생산을 확인하고(도 1) 이를 PCR purification kit (Promega)를 사용하여 정제하였다. 정제된 DNA는 제한효소EcoRI과XhoI으로 절단하고 동일한 제한효소들로 절단된 pBlueScirpt KS $^{+}$ 로 삽입한 후에E. coliXL1-Blue로 형질전환하여 IPTG(Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside) 1mM, X-gal(5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β-D-galactopyranoside) 40㎍/mL 및 엠피실린 100㎍/mL 가 포함된 LB(Yeast Extract 0.5%, Tryptone 1%, NaCl 0.5%) 아가 (Agar) 배지에서 도말하여 37℃에서 하룻밤동안 밤새 배양한 후에 흰색 콜로니의 성장을 관찰하였다. 흰색 콜로니로부터 플라스미드를 정제한 후에 재한효소EcoRI과XhoI으로 절단하여 1.2% 아가로스 젤 전기영동함으로서 DNA 절편의 삽입을 확인하였다. 이후에 자동 염기서열 분석기에 의해 DNA 서열을 분석하여 클로닝된 DNA가 인간 훼리틴 L-형태 유전자이고 돌연변이를 포함하지 않는다는 것을 확인하였다.

이어서, 자동염기 서열 분석에 의해 돌연변이가 없는 것으로 확인된 인간 훼리틴을XhoI으로 절단한 뒤 Klenow 1㎕와 dNTP Mix 0.5mM이 포함된 상태에서 37℃, 15min간 반응하여 블런트 말단(blunt end)으로 만들고 70℃에서 20min 간 처리하여 Klenow 활성을 없앤 뒤,EcoRI으로 다시 잘라 유전자를 준비하였다. 발현 벡터는 GAPDH 프로모터와 GAL 터미네이터를 포함하는 발현벡터로 멀티클로닝 사이트 중XbaI을 절단한 뒤 Klenow 1㎕와 dNTP Mix 0.5mM이 포함된 상태에서 37℃, 15min간 반응하여 블런트 말단으로 만든 뒤 70℃에서 20min 간 처리하여 Klenow 활성을 없애고,EcoRI으로 다시 잘라 준비하였다. 준비된 훼리틴 L-형태 유전자나 벡터의 잔존 효소 활성을 없애기 위해 70℃에서 20min간 처리한 뒤 리가아제(Ligase) 효소를 사용하여 접합시켜E. coliXL1-Blue로 형질전환하고 엠피실린 100㎍/mL이 포함된 항생 배지에서 1일간 배양하였다. 얻어진 균주를 형질전환에 확인을 위해 균에서 DNA를 다시 추출하여 잘라 확인하여 pYFRL-1이라고 명명하였다(도 4).

실시예 5: 인간 훼리틴 L-형태 발현을 위한 재조합 효모균주의 제조

상기 실시예 4에서 제조한 재조합 벡터 pYFRL-1는E. coliXL1-Blue 균주를 배양하여 5㎍ 농도로 DNA를 준비해 놓고, 또한 하루 전에 30℃조건으로 YPD(YE 1%, Peptone 2%, Glucose 2%)에서 배양된 사카로마이세스 세레비지아에 Y2805WT(S. cerevisiaeY2805WT)를 다시 1/100 volume으로 YPD broth 배지에 계대 배양하여 3 4시간 배양한 후 4℃로 냉각된 멸균수로 2회, 최종적으로 4℃로 냉각된 1M 솔비톨(Sorbitol)로 1회 세척하여 미생물을 준비하였다. 준비된 미생물에 냉각된 1M 솔비톨로 현탁하여 70㎕ volume으로 만든 뒤 DNA와 잘 섞어서 Electroporater (Bio-rad Gene Pulser II)용 2mm 간극을 가진 큐벳(Cuvette)에 넣고 200Ω, 250V, 1,5μF 조건에서 전기 충격(shock)을 주어 형질전환하였다. 재빨리 1ml YPD로 현탁하여 멸균 튜브(tube)에 담은 후 30℃ 진탕배양기에서 한 시간 동안 배양하고, 최소 아가배지(w/o Nitrogen base 6.7g/L, 20㎎/L Histidine, Agar 1.5%)에 200㎕를 접종하여 30℃ 진탕배양기에서 2 3일 자라게 한 뒤 인간 훼리틴이 형질 전환된 사카로마이세스 세레비지아에 균주를 선별하고 이를 사카로마이세스 세레비지아에 Y2805/pYFRL-1로 명명하였다.

본 실시예에서 제조한 재조합 효모 사카로마이세스 세레비지아에 Y2805/ pYFRL-1은 2000년 7월 21일 생명공학연구소 미생물기탁센터 유전자은행에 수탁번호 KCTC 0833BP로 수탁하였다.

실시예 6: 재조합 인간 훼리틴 L-형태 생산

본 실시예에서는 인간 훼리틴 생산을 위해 인간 훼리틴 L-형태 유전자가 형질전환된 본 발명 재조합 효모균주 사카로마이세스 세레비지아에 Y2805/pYFRL-1(KCTC 0833BP)를 30℃의 액체 URA $^{-}$ 최소배지(w/o Nitrogenbase 0.67%, Glucose 2%, Histidine 20㎍/㎖)에서 O.D. 0.5(at 660nm)까지 자라게 한 형질전환 균주를 50배 희석하여 YPD (Yeast extract 2%, Peptone2%, Glucose 2%) broth 배지로 계대 배양하였다. 배양액의 $OD_{660}$ 이 6 7에 대수생장기까지(약 20시간)배양 후에 균주를 수거하였다. 수거된 균주를 원심분리하여 얻은 후 SDS가 포함된 버퍼를 전체 양에 1/2 (v/v)로 넣어 5분간 끓인 후 마커(Marker)와 함께 15% 폴리아크릴라마이드젤 SDS-PAGE (15% Tris-Glycine gel, Novex)로 전기영동하여 실버(Silver) 염색을 한 후 확인하였다(도 3).

## 발명의 효과

이상 상기 실시예를 통하여 설명한 바와 같이, 본 발명은 훼리틴 유전자 발현을 위한 형질전환된 재조합 효모균주 및 이를 이용한 재조합 훼리틴 생산방법에 관한 것으로 훼리틴 H-형태와 L-형태를 암호화하는 유전자가 각각 도입된 재조합 벡터에 의해 형질전환된 재조합 효모균주를 배양하여 체내 철분 보존 기능을 담당하는 재조합 훼리틴 H-형태와 L-형태를 대량으로 생산하여 철분결핍 예방 및 치료용 기능성 식품, 건강보조제, 보조영양제, 의약품, 화장품을 비롯한 생체 건강제제로 사용할 수 있는 뛰어난 효과가 있으므로 생물의약 및 식품산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

## (57) 청구의 범위

### 청구항 1.

훼리틴 H-형태를 구성하는 DNA가 도입된 훼리틴 발현용 재조합 벡터.

### 청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 훼리틴 H-형태를 구성하는 DNA는 인간, 소, 말, 식물로부터 유래된 것임을 특징으로 하는 훼리틴 발현용 재조합 벡터.

### 청구항 3.

제 1 항 기재의 재조합 벡터를 효모균주에 도입하여 형질전환시킨 것을 특징으로 하는 재조합 효모균주.

### 청구항 4.

제 3 항에 있어서, 상기 효모균주는 사카로마이세스 세레비지아에 (Saccharomyces cerevisiae), 한세눌라 폴리모르파(Hansenula polymorpha) 또는 피치아 파스토리스(Pichia pastoris) 임을 특징으로 하는 재조합 효모균주.

### 청구항 5.

제 3 항 기재의 재조합 효모균주를 배양하여 훼리틴 H-형태 유전자를 발현시킴을 특징으로 하는 재조합 훼리틴 H-형태 제조방법.

### 청구항 6.

제 5 항의 방법에 의해 제조된 재조합 훼리틴 H-형태.

### 청구항 7.

제 6 항 기재의 재조합 훼리틴 H-형태를 유효성분으로 함유하는 철분결핍 예방 및 치료용 건강 기능성 제제.

### 청구항 8.

훼리틴 L-형태를 구성하는 DNA가 도입된 훼리틴 발현용 재조합 벡터.

### 청구항 9.

제 8 항에 있어서, 상기 훼리틴 L-형태를 구성하는 DNA는 인간, 소, 말, 식물로부터 유래된 것임을 특징으로 하는 훼리틴 발현용 재조합 벡터.

## 청구항 10.

제 8 항 기재의 재조합 벡터를 효모균주에 도입하여 형질전환시킨 것을 특징으로 하는 재조합 효모균주.

## 청구항 11.

제 10 항에 있어서, 상기 사카로마이세스 세레비지아에(Saccharomyces cerevisiae), 한세눌라 폴리모르파(Hansenula polymorpha) 또는 피치아 파스토리스(Pichia pastoris) 임을 특징으로 하는 재조합 효모균주.

## 청구항 12.

제 10 항 기재의 재조합 효모균주를 배양하여 훼리틴 L-형태 유전자를 발현시킴을 특징으로 하는 재조합 훼리틴 L-형태 제조방법.

## 청구항 13.

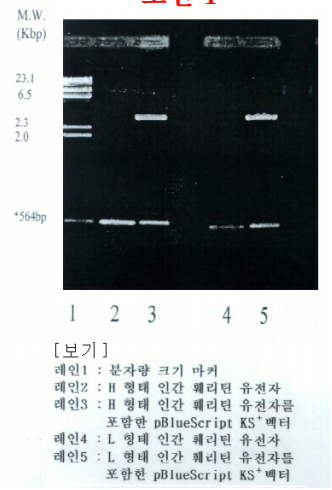
제 12 항의 방법에 의해 제조된 재조합 훼리틴 L-형태.

## 청구항 14.

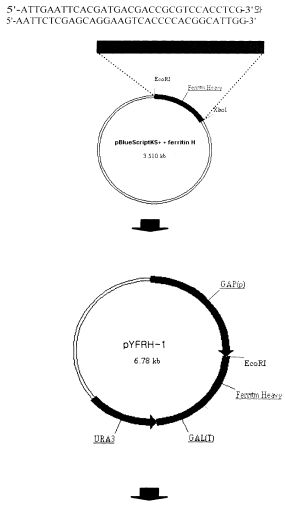
제 13 항 기재의 재조합 훼리틴 L-형태를 유효성분으로 함유하는 철분결핍 예방 및 치료용 건강 기능성 제제.

## 도면

### 도면 1

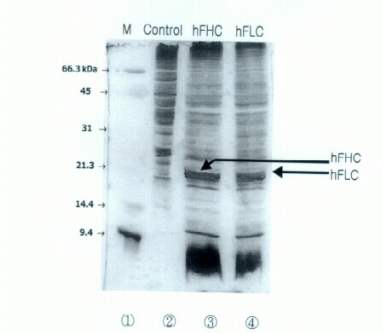


## 도면 2




*S. cerevisiae*

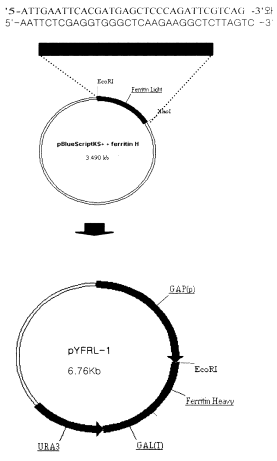
## 도면 3




[보기]

레인1 : 분자량 크기 마커
레인2 : 헤리틴 발현벡터로 형질전환되지 않은 효모 대조구
레인3 : H 형태 인간 헤리틴 발현벡터(pYFRH-1)로 형질전환된 재조합 효모
레인4 : L 형태 인간 헤리틴 발현벡터(pYFRL-1)로 형질전환된 재조합 효모

## 도면 4




*S. cerevisiae*