

실리카 분말과 젤 여과 크로마토그래피를 이용한 효과적인 융합 페리틴의 정제

허윤석·*김인호
충남대학교 공과대학 화학공학과
(접수 : 2002. 5. 23., 게재승인 : 2002. 8. 2.)

Efficient Purification of Fused Ferritin(F_H+F_L) using Silica Powder and Gel Filtration Chromatography

Yun-Suk Huh and In-Ho Kim†
Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
(Received : 2002. 5. 23., Accepted : 2002. 8. 2.)

An iron-storage protein, ferritin is a spherical shell consisting of 24 H-and L-chain subunits. Soluble form of fused(F_H+F_L chain) ferritin was separated from disrupted recombinant *E. coli* cells, followed by silica powder adsorption. Ferritin was recovered from silica-powder by distilled water, which was applied to gel filtration chromatography(GFC). Collected ferritin fractions from the GFC were assayed via iron-uptake and its molecular weight determined using GF-HPLC. Fused ferritin showed a higher activity than the H- or L- chain ferritin by two times.

Key Words : Ferritin, purification, gel filtration chromatography

서론

철 원소는 생체에 미량 존재하는 무기 물질이지만 꼭 필요한 원소이다. 철은 필수적인 요소이지만, 이온형태의 철은 산소의 존재하에서 자유 라디칼을 형성하여 생체에 해를 미치기 때문에 일반적으로, 동물에서 유리 철의 독성에 대한 대사는 transferrin과 철 저장단백질인 페리틴(ferritin)에 의하여 이루어진다. 철은 산소의 운반, 산화-환원, 효소 반응, 골수에서의 조혈 작용에 관여하며 DNA 대사나 생태계의 질소 순환에도 관여한다. 1937년 Lauffberger에 의해 처음으로 말의 비장과 간에서 최초로 분리가 이루어졌으며, 그 후 페리틴에 대한 연구는 균류, 박테리아, 동식물(1) 등으로 연구가 확대되었고 최근에는 유전자 재조합 기술을 이용하여 안전성이 검증된 재조합 페리틴이 연구되고 있다(2-4). 일반적으로 철 저장 단백질은 두 가지 형태가 있다. 동물과 식물에 있는 페리틴과 *Escherichia coli*와 같은 원핵생물에서 얻을 수 있는 bacterioferritins으로 구분할 수 있다. bacterioferritins은 제 2철($Fe(II)$)로 형성되어 있는데 최근에는 인간 페리틴과 유사하며 부작용이 없는 bacterioferritins을 재조합에 의해 대량생산을 위한 분리정제가 많이 이뤄지고 있다. 페리틴은 24개의 유사한 단백질 소단위로 결합되어 있으며 평균 분자량이

450,000 정도이다. 1분자의 페리틴은 헤모글로빈 1,200분자를 생합성할 수 있는 4,500개의 철 원자를 수용할 수 있으며 heavy(H)-chain(21 kd) 및 light(L)-chain(19 kd)으로 구별된다.(5,6).

본 연구에서는 heavy-chain과 light-chain이 융합된 페리틴을 쉽게 정제하기 위해 분말상의 실리카에 흡착 시킴으로 오염물질을 제거하였고, 흡착된 페리틴을 탈착시킨 후 GFC를 이용하여 페리틴을 정제하였다. 정제된 융합 페리틴 샘플을 GF-HPLC를 이용하여 분자량을 측정하고 철분 결합 능력을 측정함으로써 융합 페리틴의 활성도를 조사하였다.

재료 및 방법

정제용 대장균 세포

본 연구에 사용된 재조합 대장균은 H-와 L-사슬이 융합된 페리틴을 발현하며, 생명공학연구소 생물 공정실에서 배양된 것을 정제에 이용하였다.

실리카 분말을 이용한 전처리 분리

배양액을 원심분리(8,000 rpm, 30 min)하여 균체를 수확하였으며, 얻어진 세포들은 세척완충액 A(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.0 mM EDTA, 0.1 N NaCl)에 의해 세척 후 초음파 파쇄기로 세포 파쇄를 수행하였다. 세포 파쇄 후 원심분리를 통해 얻어진 상등액에 실리카분말을 넣어 페리틴을 흡착하여 오염물질을 제거하였고, 실리카 분말에 흡착된 페리틴을 증류수로 두 차례 세척하여 전처리 분리를 수행하였다. 그 정

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
Tel: +82-42-821-5685, Fax: +82-822-8995
E-mail : ihkim@cnu.ac.kr

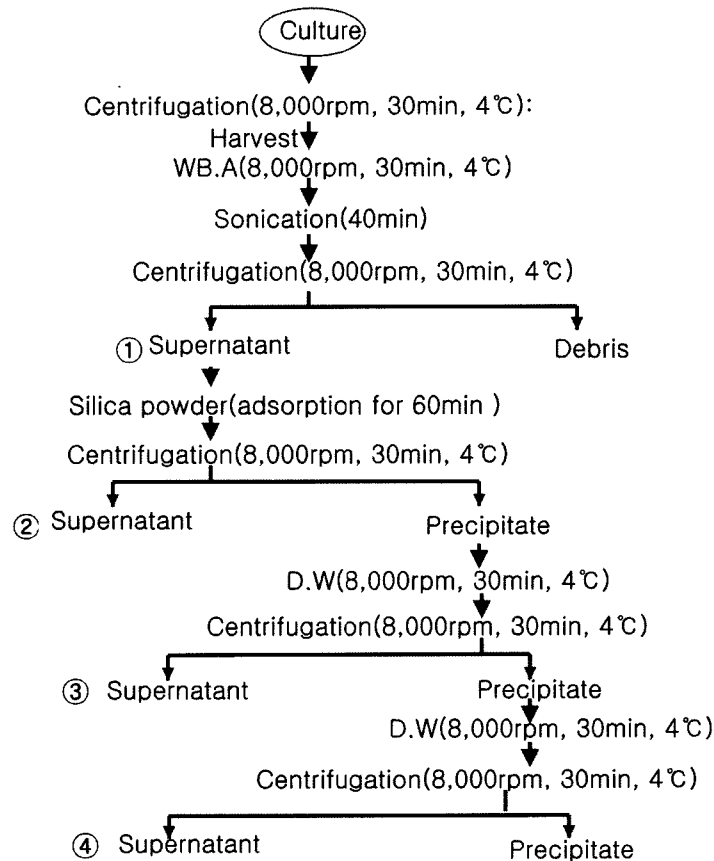


Figure 1. Scheme of the ferritin purification; WB. A: washing buffer A(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.0 mM EDTA, 1.0 mM NaCl).

제 단계는 Figure 1과 같다

젤 여과 크로마토그래피

전처리단계를 통해 얻어진 샘플속의 용합 페리틴의 순도를 높이기 위해 겔여과 크로마토그래피를 이용하였다. 사용한 겔은 천연고분자인 Levan을 가교 결합시켜 만든 겔 여과용 크로마토그래피 담체인 LevaSep(LevaSep G-L, Bioprogen, Korea)을 사용하였으며, 겔의 분자량 분획 범위는 3,000-90,000이다. 겔 여과 크로마토그래피는 공칼럼(4 cm×50 cm)에 수지를 채웠고, 장치는 UV-검출기(Spectrum), Digital multimeter(Proteck 506), notebook 컴퓨터로 구성되어 있다. 주입한 샘플의 양은 35 mL이고 이동상으로 사용한 완충액은 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)이었다.

분석법 분자량 측정

정제된 용합 페리틴의 분자량측정을 위하여 분석용 GF-HPLC 칼럼을 이용하였다. 분석용 GF-HPLC장치는 펌프(영인 과학, M910), UV-검출기(영린기기, M720)로 구성되어 있고 칼럼은 BIOSEP SEC-S3000(Phenomenex, 300 mm×4.60 mm)를 사용하였다(7). 주입한 샘플의 양은 20 μ L이었고, 이동상은 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)을 이용하였다. 분자량을 이미 알고 있는 단백질 시료를 이용하여 검량 곡선을 만들었다. 사용된 단백질은 Bovine serum albumin(67 k dalton), Ovalbumin (45.0 k dalton), Carbonic anhydrase(29 k dalton)이었다.

철 결합 활성측정

정제된 용합 페리틴의 활성을 철분 결합능력을 분석함으로써 검증하였다(8,9). 먼저표준 페리틴 50 mg/L (Horse spleen, Sigma)과 정제된 용합 페리틴 50 mg/L에 0.1 M HEPES buffer(pH 7.0)을 혼합 후 0.4 mM ferric chloride(FeCl_3)용액내에서 철분을 포화 시키는 실험을 항온조(18h, 4°C)에서 수행하였다. 페리틴이 철 이온과 결합 후 용액 속에 남아있는 단백질을 완전히 제거하기 위하여 95% ammonium sulfate로 포화 후 원심 분리된 상등액을 다시 Centricron(YM-3000, Amicon)으로 여과시켜 잔존 단백질을 제거하였다. 이렇게 얻은 단백질 미흡착 철용액 내의 철 이온농도를 ICP(Thermo Jarrell, IRIS-DUO, USA)를 이용하여 측정하였다(10,11).

결 과

실리카 분말을 이용한 전처리

Figure 2의 SDS-PAGE상에서 보는 바와 같이 균주를 초음파 파쇄 후 파쇄액에 용해된 페리틴을 얻기 위해서 실리카 분말을 이용한 흡·탈착 전처리 과정은 정제에 효과가 좋을 수 있었다. Lane 1은 균주를 초음파 파쇄 후 원심분리를 통해 얻은 상등액이며 40 k dalton에서 용합 페리틴이 잘 발현되어 나타나고 있지만, 다른 오염 물질들도 함께 존재함을 볼 수 있다. Lane 2는 상등액에 실리카 분말로 페리틴을 흡착 후 원심분리를 통해 얻은 상등액이며, 실리카에 용합 페리틴보다 큰 분자량을 갖고 있는 오염 물질들은 실리카 분

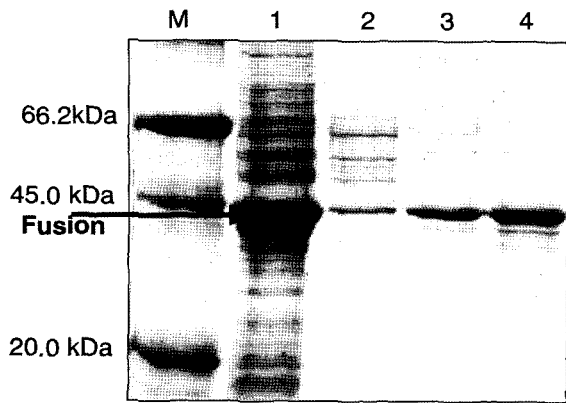


Figure 2. 15% SDS-PAGE of primary separation samples on Fig. 1 Scheme of the ferritin purification(1 : Sup after sonication, 2 : Suspension after adsorption silica powder, 3 : The 1st D.W. washing, 4 : The 2nd D.W. washing).

말에 흡착이 잘 이루어지지 않았고 이러한 오염 물질들은 50-66 k dalton에 위치한 여러 개의 밴드로 나타나고 있음을 확인할 수 있었다. Lane 3과 4는 페리틴이 흡착되어 있는 실리카 분말을 증류수 1차, 2차 탈착을 수행한 것이다. 증류수로 분말에서 페리틴을 탈착할 때, 40 k dalton보다 작은 오염 물질들은 실리카 표면에 더욱 강하게 결합을 하고 있으므로 탈착이 잘 이루어지지 않고, 40 k dalton의 융합 페리틴은 증류수에 깨끗하게 탈착됨을 알 수 있었다. 따라서 실리카 분말의 흡착표면에 분자량이 큰 물질은 흡착이 잘 이루어 지지 않는 반면에 분자량이 작은 물질들은 흡착표면에 강하게 결합되는 현상을 이용하여 융합 페리틴을 효과적으로 분리 회수할 수 있음을 확인할 수 있었다.

젤 여과 크로마토그래피를 이용한 정제

전처리공정을 통하여 얻은 샘플 35 mL을 젤 여과 크로마토그래피 칼럼에 주입 후, 이동상의 변화에 따른 페리틴 크로마토그램은 Figure 3A와 같다. Figure 3A에서 보는 바와 같이 이동상이 210 mL 정도 흘러나왔을 때부터 시작되는 큰 peak가 융합 페리틴이며(Figure 3B), 또한 크로마토그램상에서 용출량 310 mL 위치의 뒤쪽으로 끌리는 작은 peak들은 lane ⑨(Figure 3B)에서 보는바와 같이 융합 페리틴은 확인되지 않았고, 단지 19, 25 k dalton 위치에 약한 밴드가 나타남을 통하여 분자량이 작은 불순물들이 용출 되어 나옴을 확인할 수 있었다. 젤여과 크로마토그래피 칼럼은 총 칼럼부피의 1/3이 공극 부피이므로 충전된 칼럼의 공극에 채워져 있던 이동상이 모두 흘러나오고 난후 끝 융합 페리틴이 용출 되어 나옴을 알 수 있다. Figure 3B의 lane ⑧은 lane ⑦이 정제된 후 48시간이 경과된 후 샘플이며, 20 k dalton의 분자량 위치에 융합 페리틴이 분해된 페리틴 밴드가 나타남을 확인할 수 있었다.

분자량 측정 및 활성도 측정

정제된 융합 페리틴 20 μL를 분석용 GF-HPLC칼럼에 주입하였고, 이동상으로는 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)을 이용하여 0.6 mL/min의 유속으로 흘러 보냈다. 그 결과 Peak는 3.65분대에 크게 하나가 확인된 후 5.8분대에 또 다른 peak가 갈라

져 나옴을 볼 수 있었다(Figure 4). 검광곡선(Figure 5)을 통해 융합 페리틴의 분자량을 확인한 결과 체류시간이 3.65분대의 융합 페리틴(120 k dalton)은 monomer(40 k dalton)가 3개로 결합된 trimer 형태로 존재하고, 체류시간이 5.8분대의 융합 페리틴(38.5 k dalton)은 시간이 지나면서 trimer 형태가 분해되어 monomer형태로 나타남을 알 수 있었다. Figure 4에서 보는 바와 같이 peak가 3.65, 5.8분대에 두개로 나뉘어서 나오는 이유는 정제된 융합 페리틴이 안정된 형태로 존재하지 않고, 시간이 지남에 따라 분해되는 불안정한 형태로 존재하기 때문이다. 이는 정제된 페리틴을 48시간이 경과된 후의 SDS-PAGE를 통해 확인할 수 있었다(Figure 3B). 따라서

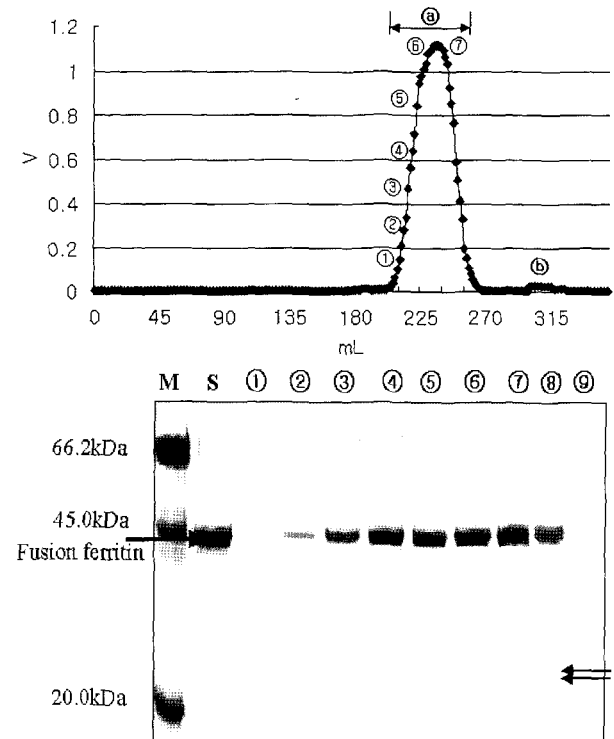


Figure 3. A: Gel filtration chromatogram; Buffer: 50 mM Tris-HCl(pH8.0), ①: sample fractions ①~⑦, B: 15% SDS-PAGE of gel filtration chromatography fractions (see Figure 3A); lane M : Standard marker, lane ①~⑦ : eluted fractions ①, lane ⑧: eluted fraction⑦ after 48 hours, lane ⑨: eluted fraction ①.

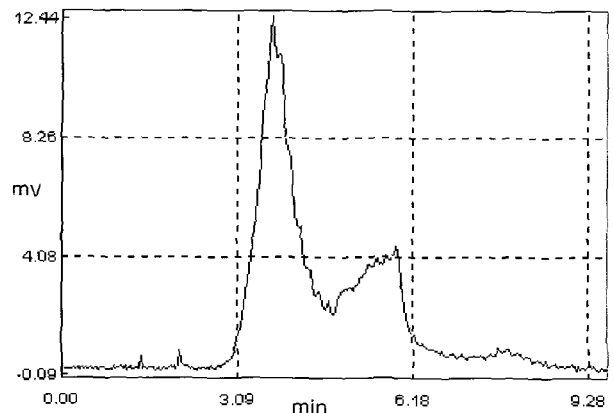


Figure 4. GF-HPLC chromatogram of fraction ⑧ from GFC.

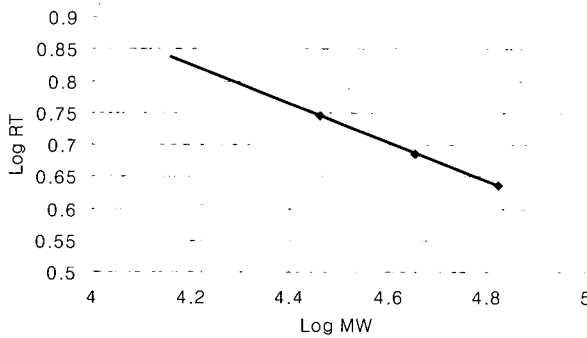


Figure 5. Calibration curve to determine ferritin's molecular weight; ①: BSA(66.2 kd), ②: Ovalbumin(45.0 kd), ③: Carbonic anhydrase (29.0 kd).

Table 1. Iron (Fe^{3+}) Storage Capacity of Standard Ferritin and Purified fused Ferritin

Protein	Molar iron (Fe^{3+}) storage capacity
Standard ferritin	160 moles Fe^{3+} per mole subunit
Purified fusion ferritin	320 moles Fe^{3+} per mole subunit

GF-HPLC에 lane ⑧의 샘플을 주입해서 분석해본결과 Figure 4와 같이 두 개의 peak가 나타남을 확인할 수 있었다.

표준 페리틴과 정제된 융합 페리틴의 활성도는 철분 결합능력을 분석함으로써 확인하였다. 표준 페리틴(20 k dalton)의 철분결합능력은 160 moles Fe^{3+} /mole이었고, 융합 페리틴의 활성도는 320 moles Fe^{3+} /mole이었다(Table 1). 따라서 정제된 융합 페리틴의 활성도가 표준 페리틴에 비해 2배로 나타났고, 이는 표준 페리틴보다 융합 페리틴의 분자량이 2배이어서 mole당 더 많은 철 이온과 결합하게 되기 때문이다.

고 찰

지금까지 연구되어진 페리틴의 정제공정은 샘플을 깨어서 원심분리를 통해 얻은 상등액을 포화시켜 단백질을 침전시키는 전처리 과정이 먼저 수행되었다. 전처리를 통해 얻어진 샘플은 페리틴이 열에 안정한 성질을 이용하여 75°C 열처리를 통한 정제나 이온교환 크로마토그래피를 이용한 1차 정제 과정을 거친 후 2차 정제과정으로 젤 여과 크로마토그래피나 2차 이온교환크로마토그래피를 수행하는 공정을 통해 정제된 페리틴을 얻는 것이 일반적인 방법이었다(1,7,12,13). 그러나 이러한 방법들은 전처리 단계에서 많은 시간들이 소요되며 정제 공정을 1, 2차로 수행 해야하는 복잡함이 있었다. 본 실험에서는 이러한 정제공정을 보다 신속하고 간단한 방법을 이용하여 정제된 페리틴을 얻는 것을 목표로 하였다. 본 연구에서는 전처리 단계에서 단백질을 침전시키는 공정대신 세 포파쇄 후 원심분리를 통해 얻은 상등액에 직접 실리카 파우더를 넣어 페리틴이 실리카 파우더에 선택적으로 흡·탈착하는 성질을 이용하여 신속한 전처리 공정을 수행할 수 있었다. 이렇게 전처리를 통해 얻은 샘플을 직접 젤 여과 크로마토그래피를 통해 정제된 융합 페리틴을 얻을 수 있었다. 척추동물의 페리틴 분자량은 대략 440 k dalton이며, 18~24 k dalton의 소단위를 갖는다고 알려졌다(14,15). 사람의 serum

페리틴은 440 k dalton의 분자량과 19, 21 k dalton의 소단위를 가지며 어류과의 고등어는 380 k dalton의 분자량에 21 k dalton의 단일 소단위 페리틴을 갖고(7) 자주개자리식물은 540-572 k dalton의 분자량에 28 k dalton의 소단위 페리틴을 갖고 있다고 알려졌다(1). 이렇게 페리틴은 종에 따라서 다양한 분자량크기를 갖으며 소단위도 단일로 존재하는 것에서 2, 3개로 존재하는 것까지 다양하게 존재하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 정제된 페리틴의 분자량 크기는 120 k dalton과 38.5 k dalton의 크기를 보였으며 소단위는 40 k dalton으로 존재함을 전기 영동상에서 확인할 수 있었다. 이런 소단위들은 안정되게 결합하여 존재하기보단 시간이 지날수록 소단위들이 해리됨을 통하여 불안정하게 결합되어있음을 알 수 있었다. 또한 38.5 k dalton의 페리틴 분자량은 소단위의 분자량보다(40 k Dalton) 작음을 알 수 있는데, 이는 단백질의 정제과정에서 단백질분해가 일어나기 때문임을 알 수 있다(15-17). 콩의 페리틴도 소단위가 28 k dalton이지만 단백질분해에 의해 26.5 k dalton의 소단위보다 작은 분자량이 존재함을 보여주고 있다(1). 정제된 융합 페리틴의 분자량은 다른 연구자들의 페리틴 분자량에 비해 약 4배 정도가 작은 것이며 이는 융합 페리틴의 소단위들이 안정되게 결합하지 못하고 해리되기 때문에 다른 연구자들의 페리틴 분자량에 비해 작은 것으로 알 수 있었다. 정제된 페리틴의 활성은 철분 결합능력으로 분석하였는데, 열처리 공정을 통하여 재조합 대장균에서 정제된 페리틴의 경우 128 Fe^{3+} /mole의 철분과 결합함을 볼 수 있었고(10), 본 연구에서 정제된 융합 페리틴의 철분 결합능력은 320 moles Fe^{3+} /mole로 나타났다. 융합 페리틴의 철분결합능력이 우수함은 다른 페리틴에 비해 소단위가 큰 분자량으로 존재하기 때문이며, 앞의 실험에선 열처리 공정을 통해 정제한 반면 본 실험에서는 열처리 공정을 거치지 않은 것이 페리틴의 활성도에 영향을 준 것으로 알 수 있었다. 본 실험을 통하여 재조합 대장균으로부터 페리틴을 정제하는 공정을 기존의 방법보다 간단하고 신속하며 활성도 또한 우수한 융합 페리틴을 효율적으로 정제하는 공정을 개발할 수 있었다.

요 약

수용성 형태로 존재하는 융합 페리틴을 정제함에 있어서 실리카 분말을 이용한 전처리 공정은 전체 정제 공정효율 증가에 기여하였다. 전처리 공정을 통해 정제된 융합 페리틴의 순도를 높이기 위해 젤 여과 크로마토그래피를 통해 보다 정제된 융합 페리틴을 얻을 수 있었다. 이렇게 정제된 융합 페리틴의 철분결합능력을 분석해본결과 320 moles Fe^{3+} /mole로 활성이 우수함을 알 수 있었으며, 분자량 분석을 통해 융합 페리틴(40 k dalton)은 trimer와 monomer형태로 존재함을 확인할 수 있었다.

감 사

본 과정은 생물공학연구원과 인하대 초정밀 생물분리기술 연구센터의 지원에 의해 연구가 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Barcelo, F., F. Miralles, and C. O. Arean (1997), Purification and Characterization of Ferritin from Alfalfa Seeds, *J. Inorg. Biochem.* **66**, 23-27.
2. Levi, S., A. Salfeld, F. Franceschinelli, A. Cozzi, M. H. Dorner, and P. Arosio (1989), Expression and Structural and Functional Properties of Human Ferritin L-Chain from *Escherichia coli*, *Biochem.* **28**, 0162-0134.
3. Hossein, A. T., J. H. Aron, and R.T. Andrew (1999), Ferritin Mutants of *Escherichia coli* are Growth Impaired and fur Mutants are Iron Deficient, *Appl. J. Bacterial.* **181(5)**, 1415-1428.
4. Seo, H. Y., E. S. Jeon, Y. J. Chung, and K. S. Kim (2002), Heterologous Expression of Human Ferritin H-Chain and L-Chain Genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17(2)**, 162-168.
5. Hudson, A. J., S. C. Andrews, C. Hawkins, J. M. Williams, M. Izuhara, F. C. Meldrum, S. Mann, P. M. Harrison, and J. R. Guest (1993), Overproduction, Purification and Characterization of the *Escherichia coli* Ferritin, *Eur. J. Biochem.* **218**, 985-995.
6. Theil, E. C (1987), Ferritin: Structure, Gene Regulation and Cellular Function in Animals, Plants and Microorganisms, *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 289-315.
7. Geetha, C. and V. Deshpande (1999), Purification and Characterization of Fish Liver Ferritins, *Biochem. Physiol.* **123**, 285-294.
8. 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.
9. Kim, K. S., H. R. Mun, and J. H. Lee (1999), Iron Cores of Tadpole Ferritin: Native, Reconstituted and Recombinant H-Chain Ferritins, *Inorg. Chim. Acta.* **298**, 107-111.
10. Kim, S. W., Y. H. Kim, and J. W. Lee (2001), Thermal Stability of Human Ferritin: Concentration Dependence and Enhanced Stability of an N-Terminal Fusion Mutant, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **289**, 125-129.
11. Santambrogio, P., S. Levi, A. Cozzi, E. Rovida, A. Albertini, and P. Arosio(1988), Production and Characterization of Recombinant Heteropolymers of Human Ferritin H and L Chains, *J. Biol. Chem.* **263**, 18086-18092.
12. Kim, C. W (1981), Isolation and Characterization of Ferritin from Rat Intestinal Mucosa, *J. Biochem.* **14(4)**, 303-314.
13. Kim, R. A., S. G. Lee, and C. Y. Yun (1996), Purification of Ferritin of Larval Haemolymph from Fall Webworm, *Hyphantria cunea*, *J. Entomol.* **26(2)**, 135-141.
14. Arosio, P., T. G. Adelman, and J. W. Drysdale(1978), On Ferritin Heterogeneity, Further Evidence for Heteropolymers, *J. Biol. Chem.* **253**, 4451-4458.
15. Arosio, P., S. Levi, E. Gabri, S. Stefanini, A. A. Finazzi, and Chinancone (1984), Properties of Ferritin from the Earthworm *Octolasmus complanatum*, *J. Cell. Sci.* **58**, 225-240.
16. Sczekan, S. R. and J. G. Joshi (1987), Isolation and Characterization of Ferritin from Soyabeans (Glycine max), *J. Biol. Chem.* **262**, 13780-13788.
17. Laulhere, J. P., A. M. Lescure, and J. F. Briat (1988), Purification and Characterization of Ferritins from Maize, Pea, and Soya Bean Seeds. Distribution in various Pea Organs, *J. Biol. Chem.* **263**, 10289-10294.
18. Laulhere, J. P., A. M. Laboure, and J. F. Briat (1989), Mechanism of the Transition from Plant Ferritin to Phytosiderin, *J. Biol. Chem.* **264**, 3629-3635.