

미생물 유래 세포외 입자 (Extracellular Vesicles)의 특성 규명

Characterization of Extracellular vesicles produced by microorganisms

2015.02.27

한국해양과학기술원

주 의

1. 이 보고서는 한국해양과학기술원에서 수행한 주요 사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.

제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “미생물 유래 세포외 입자 (Extracellular vesicles)의 특성 규명에 관한 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2015. 2.

총괄연구책임자 : 김 상 진

참 여 연 구 원 : 권 용 민

참 여 연 구 원 : 최 동 희

보고서 초록

과제고유 번호		해당단계 연구기간	2014. 1 - 12	단계 구분	
연구사업명	중사업명	기관주요사업			
	세부사업명	창의연구사업			
연구과제명	대과제명	Lab 창의과제			
	세부과제명	미생물유래 세포외 입자 extracellular vesicles (EVs) 의 특성규명			
연구책임자	김 상 진	해당단계 참여연구원수	총 : 3 명 내부: 1 명 외부: 2 명	해당단계 연구비	정부: 50,000 천원 기업: 천원 계 : 50,000 천원
		총연구기간 참여연구원수	총 : 3 명 내부: 1 명 외부: 2 명	총 연구비	정부: 50,000 천원 기업: 천원 계 : 50,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원 해양생물연구본부		참여기업명		
국제공동연구					
위탁연구					
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	37
색인어 (각 5개 이상)	한 글	초고온성고세균, 세포외입자, DNA 전달, 유전자, 서열분석			
	영 어	hyperthermophilic archaea, extracellular vesicle, DNA packaging genome, sequence analysis			

요 약 문

I. 제 목

미생물유래 세포외 입자 Extracellular vesicles (EVs) 의 특성규명

II. 연구개발의 목적 및 필요성

EVs에 대한 연구는 1966-7년 *Vibrio cholerae*에서 Outer Membrane Vesicle (OMV)이라는 이름으로 처음 발견되었다. 그러나 당시 OMV는 세포사멸로 인해 생성된 인공적 세포물질이라는 비판으로 연구가 진행되지 않았다. 최근에는 많은 연구를 통해 vesicle에 대한 다양한 기능들이 밝혀지고 있다. 한편 자연환경의 생물은 환경변화에 따라 생존을 이어가기 위해 필요한 유전적 특성을 받아들이는 능력을 가지고 있다는 것은 주지의 사실이다. 그러나 현재 알고 있는 유전자전달과정만으로는 자연계에서 일어나는 수평적 유전자전달 (horizontal gene transfer: HGT)을 설명하는데는 한계가 있다. 따라서 우리는 생물체에서 생산되는 vesicle이 HGT에 중요한 역할을 할 수 있다는 가설을 갖고 vesicle 연구를 수행하였다. 그러나 vesicle의 proteome 연구는 그동안 많이 진행되었으나 genome 연구는 매우 적다. 따라서 본 연구에서 초고온성 archaea의 vesicle 생성, vesicle의 형태학적, 생화학적 특성, 특히 genome DNA 분석을 통해 vesicle DNA 특성규명을 목적으로 수행하였다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- EVs 농축 및 순수분리 정제기술 확립
- EVs의 형태학적, 생화학적 특성규명
- EVs DNA 분석 및 특성규명

IV. 연구개발결과

- 3종의 *Thermococcales* 균주를 분리하여 vesicle 생성을 확인하였고, 그중 2종인 *T. onnurineus* NA1^T 와 *Thermococcus* sp. KBA1로부터 vesicle 생성을 확인하였다.
- *T. onnurineus* NA1^T 균주는 모두 4종류의 밀도가 다른 vesicle을 생성하고, 그중 우점적으로 생산하는 band B, C vesicle은 각각 밀도값 1.2434, 1.2648 g cm⁻³을 나타냈다.
- 두 종류의 vesicle형태는 모두구형이고, tail이 없다. 크기는 80-210 nm이고, 평균값은 140 nm이다. B, C vesicle의 평균 생산량은 각각 2.7 x 10¹⁰, 3.7x 10¹⁰ L⁻¹로 확인되었고, band B:C의 비율은 약 2:3으로 나타났다.
- Vesicle 내에 DNA가 존재함을 확인하였고, DNA size 는 약 14 kb이다.
- 36 종류의 biochemical markers를 이용하여 검색한 결과 vesicle DNA에는 TON_0544가 전달되지 않는 것을 확인하였다.
- Vesicle DNA의 sequence reads를 모세포인 *T. onnurineus* NA1^T reference genome과 비교분석한 결과 TON_0536-TON_0544 부분의 유전자가 vesicle로 이동되지 않는다는 사실을 알게 되었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

연구개발결과는 vesicle의 DNA packaging 과정을 이해할 수 있는 단초를 제공하였다는 면에서 매우 의미가 있다. 따라서 후속연구를 통해 발전시킨다면 자연환경에서의 horizontal gene transfer의 이해를 높일 수 있을 뿐 아니라, 질병진단 및 치료에도 활용가능한 기술을 개발하는데 공헌을 할 것이다.

S U M M A R Y

Extracellular vesicles (EVs) produced by a sulfur-reducing, hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus onnurineus* NA1^T (To), were purified and characterized. A maximum of four EV bands, showing buoyant densities between 1.1899 and 1.2828 g cm⁻³, were observed after CsCl ultracentrifugation. The two major EV bands, B ($\rho^{25}=1.2434$ g cm⁻³) and C ($\rho^{25}=1.2648$ g cm⁻³), were separately purified and counted using a qNano particle analyzer. The EVs showing different buoyant densities were identically spherical in shape, and their size varied from 80 to 210 nm in diameter, with the 120 and 190 nm sizes predominant. The average size of DNA packaged into EVs was about 14 kb. The DNA of the EVs in band C was sequenced and assembled. The mapping of the ToEV DNA sequences on the reference genome of the parent archaeon revealed that most genes of *T. onnurineus* NA1^T were packaged into EVs, except for an approximately 9.4kb region encoded from TON_0536 to 0544. The absence of this specific region of the genome in the EVs was confirmed from band B of the same culture and from bands B and C purified from a different batch culture. The presence of the 5'-termina lsequence and the absence of the 3'-terminal sequence of TON_0536 were repeatedly confirmed. On the basis of those results, we hypothesize that the unpackaged part of the *T. onnurineus* NA1^T genome might be related to the process that delivers DNA into ToEVs and/or the mechanism generating the ToEVs themselves.

(KEYWORDS : 초고온성고세균, 세포외입자, DNA 전달, 유전자, 서열분석, hyperthermophilic archaea, extracellular vesicle, DNA packaging, genome, sequence analysis)

C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction	1
Section 1. Objectives and Necessity of Resarch	1
Section 2. Scope of Research	2
Chapter 2. Status of arts for related technology	3
Section 1. Domestic and International Research States	3
Chapter 3. Contents and range of the research	6
Section 1. Materials and methods of the research	6
Section 2 . Contents and Results of the research	12
Chapter 4. Contents and range of the research	27
Chapter 5. Contents and range of the research	27
Chapter 6. References	28

목 차

제 1 장 서론	1
제 1절 연구개발 목적 및 필요성	1
제 2절 연구개발의 범위	2
제 2 장 국내외 기술개발 현황	3
제 1절 국내외 관련분야 기술개발 현황 및 본 연구결과의 위치	3
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	6
제 1절 재료 및 방법	6
제 2절 연구내용 및 결과	12
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	27
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	27
제 6 장 참고문헌	28

제 1 장 서론

제 1절 연구개발 목적 및 필요성

1. 자연환경에서의 EVs의 생리생태학적 역할과 EVs DNA의 분자생물학적인 기능을 이해하기 위해 해양미생물 특히 초고온성 고세균의 Extracellular vesicles (EVs) 생성 및 특성을 규명하는 것을 본 연구의 목적으로 한다.
2. Extracellular vesicles (EVs)에 대한 연구는 1966-7년 *Vibrio cholerae*에서 Outer Membrane Vesicle (OMV)이라는 이름으로 처음으로 발견되면서 시작되었다. 당시 OMV는 세포사멸로 인해 생성된 인공적 세포물질이라는 비판으로 연구가 한동안 진행되지 않았으나, 최근 많은 연구를 통해 다양한 기능들이 밝혀지고 있다.
 - 가. 숙주세포의 독성과 항생제 전달, 단백질과 유전물질 전달, 화학적 분자를 통해 세포와 세포간의 신호 전달, 외래인자에 대한 방어, 숙주의 발병과 생존 등에 관여하고 있음을 알게 되었으며, 최근에는 질병 진단 kit, 백신, 병원성미생물에 대한 항생제 개발 등에 적용하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다.
 - 나. 앞으로 EVs에 대한 연구는 전 세계에 살아가는 인간과 동물에게 저항하는 병원성 미생물에 대한 효과적인 신개념의 백신 발견과 개발에 커다란 역할을 할 것이라 사료된다.
3. 자연환경의 prokaryotes는 환경변화에 따라 생존을 이어가기 위해 필요한 유전적 특성을 받아들이는 능력을 가지고 있다.
 - 가. Prokaryotes내에 전달된 유전적 정보의 규모가 계통발생적으로 점점 증가함으로써 다양한 박테리아들 사이에서 horizontal gene transfer (HGT)의 중요성이 부각되면서 지난 20년간 국내외적으로 수많은 연구들이 진행되었다.
 - 나. 그 중에서 바이러스와 유사한 virus-like particles (VLPs, 최근에는 Extracellular vesicles (EVs)로 명명)의 유전자 정보 전달 가능성 (conjugation, transduction, transformation, GTA)과 다양한 기능들이 보고되고 있지만, 현재까지 EVs의 생태계 혹은 인체 내에서 구체적인 역할과 메카니즘은 규명되지 않은 상태이다.
 - 다. 따라서 유전체 정보 분석을 이용하여 EVs의 유전적 특성을 규명하고 이를 바탕으로 구체적인 메카니즘을 제시할 수 있는 근거를 제시하는 것이 필요하다.

제 2절 연구개발의 범위

1. EVs 농축 및 순수분리 정제기술 확립

- 가. Tangential membrane concentrator 방식을 도입하여 30-300nm의 EVs 농축
- 나. CsCl 구배 초원심분리기를 이용한 EVs의 순수정제 및 분리 실시 후 refractometer를 통한 density 측정

2. 정제된 EVs의 계수 및 크기 측정

- 가. TEM & qNano를 이용한 정확한 크기 및 수 관찰 및 측정

3. EVs의 DNA, RNA 등 특성규명

- 가. Pulsed-field gel electrophoresis 방법을 통한 핵산의 존재 및 DNA의 크기 측정 조사
- 나. DNA 존재시 illumina sequencing을 통해 packaging 된 유전자서열을 parent cell 과 비교 분석

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내외 관련분야 기술개발 현황 및 본 연구결과의 위치

1. 국내

가. 포항공대, 건국대, 경북대 등의 의대연구팀 등이 ISEV (International Society of Extracellular Vesicles)학회 중심의 연구와 유사한 질병치료 등에 연구를 활발하게 진행하고 있음. 예를 들어 *Streptococcus* 와 같은 Gram positive 세균이 생성하는 EVs가 아토피 등 피부질환 발병과의 상호관계에 대한 연구가 진행되고 있음. 이중 포항공대 고용송 박사 연구팀은 세균 EVs의 proteomics 연구를 집중적으로 수행하고 있으며, 특히 병원성세균의 백신개발에 집중하고 있다.

나. 기초과학지원연구원의 연구팀은 proteome 분석기술을 이용하여 위의 group 들과 공동연구를 진행하며 주로 세균으로부터 생산되는 EVs의 proteomics 연구를 수행하고 있다. 한편, 항생제내성세균이 생산하는 EVs가 보유하고 있는 항생물질 내성에 관련된 단백질의 역할에 대한 연구를 최근 진행하고 있다.

2. 국외

가. 2014년 미국 MIT의 Chisholm group이 Science에 발표한 논문에 의하면 해양생태계의 우점종인 *Prochlorococcus*가 단백질, DNA, RNA를 함유한 EVs를 지속적으로 생산하며, *Prochlorococcus* EVs는 해양탄소순환에 중요한 heterotrophic 세균 증식에 중요한 역할을 한다는 보고를 하였다. 또한 연안 혹은 외해에 다양한 세균으로부터 DNA를 갖고 있는 EVs가 많이 존재한다. 따라서 별도의 세포에 다양한 화합물을 전달할 수 있는 EVs의 능력이 해양미생물군집의 정보, 에너지, 생체물질의 흐름에 또 다른 하나의 중요한 복잡계 역할을 시사하고 있다.

나. 프랑스 Pasteur 연구소 Forterre 박사 연구팀은 초고온성 고세균 EVs에 대한 다양한 연구를 진행하고 있으며, 특히, EVs의 형태적, 생화학적 특징 및 DNA 전달에 대한 연구를 중점적으로 수행하고 있다. 일본 동경대 대기해양연구소 Chiura 박사 연구팀은 초고온성, 저온성 세균의 EVs에 의한 DNA transfer에 대한 연구 및 transferred 세포의 phenotype, genotype의 변화에 대한 연구를 집중적으로 수행하고 있다. 해양미생물 EVs에 대한 연구는 프랑스 Forterre 박사 group과 일본 Chiura 박사 group이 각각 hyperthermophile의 EVs, Psychrophile의 EVs에 대한 연구를 주도적으로 수행하고 있다. 두 연구 간에 매우 상이한 연구결과가 발표되어 해양미생물의 EVs에 대한 혼란이 가중되고 있으나 해양환경에서의 EVs의 역

할 등을 조명할 수 있는 매우 흥미로운 연구결과가 보고되었다. 현재까지 일부 *Thermococcus* 종에서는 EVs에 약 3-5 kb 크기의 plasmid DNA 가 발견되었고, 유전자전달이 가능한 것으로 보고되었다. 다양한 일반 해양미생물에서는 매우 큰 크기의 DNA (100-400kb)가 EVs에 packaging 된다고 보고되었고, 모두 transduction이 가능한 것으로 확인되었다. 특히 저온성 세균인 *Polaribacter* EVs를 *E. coli*에 gene transfer 시킨 후 *E. coli* 성장온도가 저온화 된다는 것을 발표 한바 있다.

다. 미국 Massachusetts대학병원 연구팀은 암에서 유래된 상피세포를 암환자의 혈액 으로부터 암표지자로 동정하는 활용연구를 수행하고 있으며 대상암은 폐, 전립선, 대장, 유방, 간, 자궁암 등이 포함되어 있다. Mayo clinic에서는 신장결석 생성과 EVs 간의 관계 규명을 연구하여, 신장결석, 비뇨기계 암 등을 소변으로 배출되는 EVs를 이용하여 진단하는 기술개발을 진행하고 있다. Duke 대학 Kuehn 박사 연구팀은 세균 EVs의 biogenesis에 대한 연구를 중점적으로 수행하고 있다.

라. 네델란드 VU 대학 medical centre에서는 전립선암, 신장암 등을 진단하는 방법으로 암환자의 소변을 채취하여 암세포로부터 생성된 EVs를 농축, 정제하여 암세포 유래 특이 DNA, 단백질 등을 검출하여 사전진단 방법으로 활용하는 연구를 진행하고 있다.

마. 아래와 같은 EVs를 이용한 백신 및 치료제개발 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 일부는 전 임상 및 임상시험을 성공적으로 진행하고 있음.

- 뇌수막염을 일으키는 *Neisseria meningitidis*
- 코인두에 기생하는 *N. lactamica*
- 콜레라를 일으키는 *Vibrio cholerae*
- 폐렴, 수막염, 혈관염을 일으키는 *Acinetobacter baumannii*
- 백일해, 급성호흡기감염을 일으키는 *Bordetella pertussis*
- 동남아시아, 호주의 북쪽 지방, 최근에는 인도에서 환경 부생풍토병을 일으키는 *Bukholderia pseudomallei*
- 치주염 원인균인 *Porphyromonas gingivalis*
- 장티프스 원인균인 *Salmonella typhimurium*
- 적리 원인균인 *Shigella flexnerii*
- 매독균인 *Treponema pallidum*

바. ISEV 학회를 중심으로 주로 medical 분야의 연구자들에 의해 EVs에 대한 활용 연구가 진행되고 있으며, 특히 병원성미생물, 인체와 동물의 EVs 특성에 대한 기

초연구와 이를 활용하여 진단 및 질병치료에 적용하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

2. 본 연구결과의 의미

가. 국내·외적으로 EVs에 대한 연구방법은 일부 group을 제외한 대부분이 주로 proteome 분석을 기초로 단백질의 기능에 대해 진행되어 왔다. 다양한 해양미생물이 생산하는 EVs에 대한 연구는 극히 일부 진행되고 있고, 본 연구결과에서 제시한 EVs 생성시 DNA packaging에 관련된 연구결과는 최초로 발표하였다. 이와 같은 연구결과는 EVs의 기원 및 기능규명을 하는데 결정적 역할을 할 것으로 예상되며, 이를 통하여 생태계 물질순환 및 생물진화에 대한 이해에 대한 가능성이 높아질 것이다.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1절 재료 및 방법

1. 고세균 균주의 분리 및 *Thermococcus onnurineus* NA1^T의 배양

EVs 생산 고세균을 탐색하기 위해 PACMANUS 열수구 지역 (3°44'S, 151°40'E) Manus Basin과 일본 Kagoshima만 caldera region (31°39.749'N, 130°46.290'E) 수심 1,650 m, 200 m 로부터 sediment 시료를 채취하였다. Sediment 시료를 yeast extract-peptone-sulfur (YPS) medium 20ml를 넣은 25ml serum vials에 접종한 후 혐기성 조건 하에서 80-90°C로 3일간 농후 배양하였다 (Bae et al., 2006). Colony를 random 하게 선별하여 YPS-phytagel 에 연속적으로 4회 streaking하여 순수분리하였다. 순수하게 분리된 colony를 연속적으로 dilution하여 현미경 관찰을 통해 순수여부를 확인하였다. Manus Basin 시료로부터는 NA1, NA2 균주, Kagoshima만 시료로부터는 KBA1 균주 총 3개의 균주를 확보하였다. 이중 NA1 균주는 신종균주로 확인되어 *Thermococcus onnurineus* NA1^T로 명명되었고, 나머지 2개 균주의 분류학적 위치를 확인하기 위하여 16S rRNA를 추출정제하여 sequence를 얻었다. NA2 및 KBA1 균주는 각각 1,384, 1,231 bp의 염기서열을 얻어 Neighbor-Joining방법으로 phylogenetic tree를 분석하였고, evolutionary distances는 Jukes-Cantor 방법으로 MEGA5를 이용하여 계산하였다 (Saitou and Nei, 1987; Jukes and Cantor, 1969; Tamura et al., 2011).

T. onnurineus NA1^T 균주는 항상 yeast extract-peptone-formate medium로 80°C에서 배양하였고, EVs를 농축정제하기 위해서는 1.0 g l⁻¹ yeast extract, 13.6 g l⁻¹ sodium formate, 35 g l⁻¹ NaCl이 포함된 modified formate medium I 에 배양하였다 (Kim et al., 2013). 미량원소 및 비타민을 첨가하였고, pH는 6.0-7.0으로 조절하였다. 별도의 기술이 없는 경우 모든 배양은 80°C, 혐기조건하에서 8시간에서 수행하였다.

2. EVs의 순수정제

배양 후 15L의 배양액을 high-speed centrifuge (2236HR, Gyrogen) 와 GRF-500-6 rotor 를 사용하여 10,000xg로 25° C에서 30분간 centrifuge하여 cell pellet을 제거 후, 상등액을 100 kDa cut-off membrane (Millipore)이 장착된 ultra-filtration system 으로 약 100 배 농축하였다. 이때 혹시 상등액에 존재하는 cell 혹은 cell debris를 제거하기 위하여 0.45 µm, 0.2 µm pore size의 membrane filters (Advantec)를 전 filter로 사용하였다. 농축 시료는 0.2 µm syringe filter를 사용하여 다시 한번 filter하였다. 이 시료는 4°C에서 88,000 x g로 30분간 ultra-centrifugation (HimacCS120GXL, Hitachi)하였다. 이렇게 얻은 centrifuge tube 바닥에 침전된 vesicle pellet에 1X TBT buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH7.4) 500 µl를 첨가하여 4°C 조건에서 slow rotator로 12시간 이상 resuspension 시켰다. 이 vesicle 시료에 DNase, RNase A (Sigma)를 각각

10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 넣어 25°C에서 12 시간 정도 반응을 시킨 후 70°C에서 10분간 nucleases를 열처리하였다. vesicle 시료를 1X TBT buffer, 35% CsCl (Sigma)를 첨가하여 swing bucket rotor (S52ST-0352, Hitachi)를 이용하여 4°C, 174,000 x g 로 20시간 동안 CsCl-density gradient equilibrium ultra-centrifugation을 수행하였다. 이 과정 후 tube 바닥에서 표면까지의 거리와 EV band 층의 거리를 각각 측정하였고, 멸균된 1 ml 주사기를 사용하여 0.5 cm 간격으로 CsCl 농도구배 용액을 side puncture 방법으로 채취하였고, 동시에 각 EV bands를 같은 방법으로 채취하였다. 각각 채취된 sub-samples은 Abbe-refractometer (Atago)를 이용하여 Refractive Index (RI)를 측정하였고, 아래와 같은 방정식 (1)을 이용하여 buoyant densities (ρ^{25})를 계산하였다.

$$\text{Buoyant density (g cm}^{-3}\text{)} = 10.8601 \times \text{RI} - 13.4974 \text{ ----- (1)}$$

방정식 (1)에서 구한 buoyant densities 값과 tube 바닥으로부터 CsCl 시료층까지의 실측한 거리 간에 상관관계를 방정식 (2)와 같이 구하였다.

$$F_{\text{density}}(d) = -0.001d^3 + 0.0123d^2 - 0.064d + 1.2402 \text{ (R}^2 = 0.9996) \text{ ----- (2)}$$

d: tube 바닥으로부터 CsCl 시료층까지의 실측한 거리 (cm)

R²: 상관관계 방정식의 유의정도를 나타내는 coefficient 값

회수한 EVs 시료로부터 CsCl를 제거하기 위하여 멸균된 Spectra/Por 4 dialysis membrane (molecular weight cut-off, MCWO = 12,000 - 14,000 Da, Spectrum, CA)에 넣어 4°C에서 멸균된 1X TBT buffer 로 dialyze 시켰다. 이와 같이 정제한 EVs는 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

3. 전자현미경 관찰

3종류의 *Thermococcales* cells의 바깥표면에서 EVs의 생성 및 존재 유/무를 확인하기 위해 주사전자현미경 (scanning electron microscopy: SEM)과 투과전자현미경 (transmission electron microscopy: TEM)으로 관찰하였다. 대수기 시점까지 배양한 각 cells을 2% glutaraldehyde으로 하루 동안 고정하여 0.2 μm polycarbonate membrane filter로 여과한 후 TBT 용액으로 세정하였다. 금으로 코팅된 시료들을 5kV에서 15,000배율의 주사전자현미경 (JSM-840A, JEOL)으로 관찰하였다.

3종류의 *Thermococcales* 중 *T. onnurineus* NA^{T1} cells을 위와 같이 배양 후 2% glutaraldehyde으로 2시간 동안 고정하여 carbon으로 코팅된 grid에 옮겼다. Negative 형식으로 2% (w/v) uranyl acetate로 10초 동안 염색한 후 초순수로 세정한 시료들을 80kV의 투과전자현미경 (JEM1010, JEOL)으로 관찰하였다 (Børshiem et al., 1990).

4. EVs의 크기와 계수 측정

투과전자현미경과 qNano system의 두 가지 방법을 이용하여 EVs의 정확한 계수와 크기를 측정하였다. 순수 정제된 EVs을 10mM EDTA가 포함된 2.5% glutaraldehyde로 하루 동안 고정된 후 초원심분리기 (46,000g, 90분, 20°C)를 사용하여 carbon으로 코팅된 grid에 옮겼다. Negative 염색을 위해 2% (w/v) uranyl acetate로 10초 동안 염색한 후 초순수로 세정한 시료들을 80kV의 투과전자현미경 (JEM1010, JEOL)으로 관찰하였다.

qNano system은 nano 수준의 Coulter 이론을 바탕으로 개발된 기술로서 nanopore를 통과하는 작은 입자들을 용이하게 측정할 수 있는 신개념 분석 장비로 보다 정확한 EVs의 계수 측정을 위해 사용하였다. 정제된 EVs을 멸균된 TBT 용액에 1000배로 희석하여 1시간 동안 vortexing 한 후 Nano Pore (NP) 150 (70-250nm 측정 가능)으로 측정하였으며, 표준입자로 Calibration Particle (CP) 100을 사용하여 계산하였다.

5. Epifluorescence microscopy

DNA 함유 EVs를 계수하기 위하여 시료를 SYBR Gold (SYBR[®]GOLD nucleic acid gel stain, Invitrogen)로 염색한 후 형광현미경 (ZEISS)을 이용하여 1600 X 배율로 관찰하여 계수하였다 (Patel et al., 2007). ToEVs 시료 10 μ l에 STBR gold 용액을 첨가한 후 실온에서 빛을 차단하여 15 분간 염색하고, 시료를 0.015 μ m pore-size polycarbonate membrane filter (Whatman International, UK) 로 여과하였다. Filter를 건조시킨 후 slide glass에 올려놓은 후 녹색형광과장 하에서 DNA 함유 ToEVs를 계수하였다.

6. ToEVs DNA의 추출과 분석

EVs에 결합된 DNA를 제거하기 위해 pUC19의 plasmid DNA와 혼합하거나 혼합하지 않은 EVs을 16시간 동안 37°C에서 10 μ g의 nuclease로 처리하였다. Nuclease의 비활성화를 위해 10분 동안 70°C에서 열처리 후 EV DNA를 vRD kit (Geneall)로 추출하였으며, 1% agarose gel로 확인하였다.

EVs의 DNA를 추출하기 전 10 μ g의 DNase I와 RNase A로 16시간 동안 37°C에서 처리한 후 10분 동안 70°C에서 열처리하였다. 추출된 EV DNA는 10 μ g의 DNase I와 RNase A로 16시간 동안 37°C에서 처리한 정제된 DNA와 비교실험 하였다. 추출된 DNA들은 1% agarose gel로 확인하였으며, PCR marker와 서열 분석에 사용하였다.

7. EV DNA 서열 분석

ToEVs의 DNA를 vRD kit으로 추출하여 약 100 ng을 library 제작을 위해 사용하였으며, Ion Torrent machine을 이용하여 서열을 분석하였다. CLC Genomics Workbench (v.5.5.1)을 사용하여 *T. onnurineus* NA1^T genome과 비교하였으며, 전체 약 521.82 Mb의 서열 중 양질의 420.79 Mb (2,578,006 reads) 서열만을 reference genome assembly에 사용하였다.

8. Biochemical marker primer 제작 및 PCR 증폭

정제된 ToEVs에서 *T. onnurineus* NA1^T 유전자들의 존재 유/무를 확인하기 위해 이미 알고있는 *T. onnurineus* NA1^T의 전체 genome을 기반으로 약 50kb 간격의 36개 primer들을 제작하였다 (Tab. 1). ToEVs와 *T. onnurineus* NA1^T의 정제된 DNA들을 PCR (94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 2분, 35 cycles)을 사용하여 증폭하였으며, 1% agarose gel로 확인하였다.

(Tab. 1) List of specific primers

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	PCR product size (bp)
TON_0003	F	GACCATGATTACGAATTGGATCCTTTCCCGAATG	999
	R	CGGAGGTGGGATATCCCGGATCGCGTATCACCTA	
TON_0092	F	GACCATGATTACGAATTGGATCCACCTCTGCCC	999
	R	CGGAGGTGGGATATCCCGGATCGCCATCACCAA	
TON_0153	F	CTCTAGGTGATATATAGTGA	1730
	R	CCGTCGCATAGGCACTTTAC	
TON_0200	F	CTCCGCGGATGTGGGAGTGG	780
	R	GTCCGAGGACGATAACCCTA	
TON_0261	F	ACTGCCCCCGTTGGTGGTGA	460
	R	CGAGGGTCTATGGCTATCAT	
TON_0297	F	TCGCTGGTTGGTGATATAAG	987
	R	GCGGTAGGAGAATTCCAGGT	
TON_0328	F	GACCATGATTTACGAATTGGATCCAGGTACTIONCCT	999
	R	CGGAGGTGGGATATCCCGGATCACCAATCACCTC	
TON_0399	F	TCTGGGGGTGTTGAAATGAA	1260
	R	GTAAGAGAGGAAAGAAGCTC	
TON_0469	F	GACCATGATTACGAATTGGATCCTTAATGAAGAC	999
	R	CGGAGGTGGGATATCCCGGATCAGAGCATCGAAT	
TON_0494	F	GAAGAAACGCCCCGGGTGGTGGTG	760
	R	CGCACCAAAGTAGTAGACGC	
TON_0544	F	TGAACACATTTGGAGGGATG	1270
	R	GAAAAATAGAGGTGAAGCAG	
TON_0598	F	GTTGAATTCTGTTAGGGTGG	1030
	R	AGTTGGGAGAAAGGAAAGGC	
TON_0650	F	ATAACTCCGTAGGTGATACC	710
	R	GGTTCAGTGGAGGGAACCTT	
TON_0702	F	GACCATGATTACGAATTGGATCCTTTATTGGGCT	999

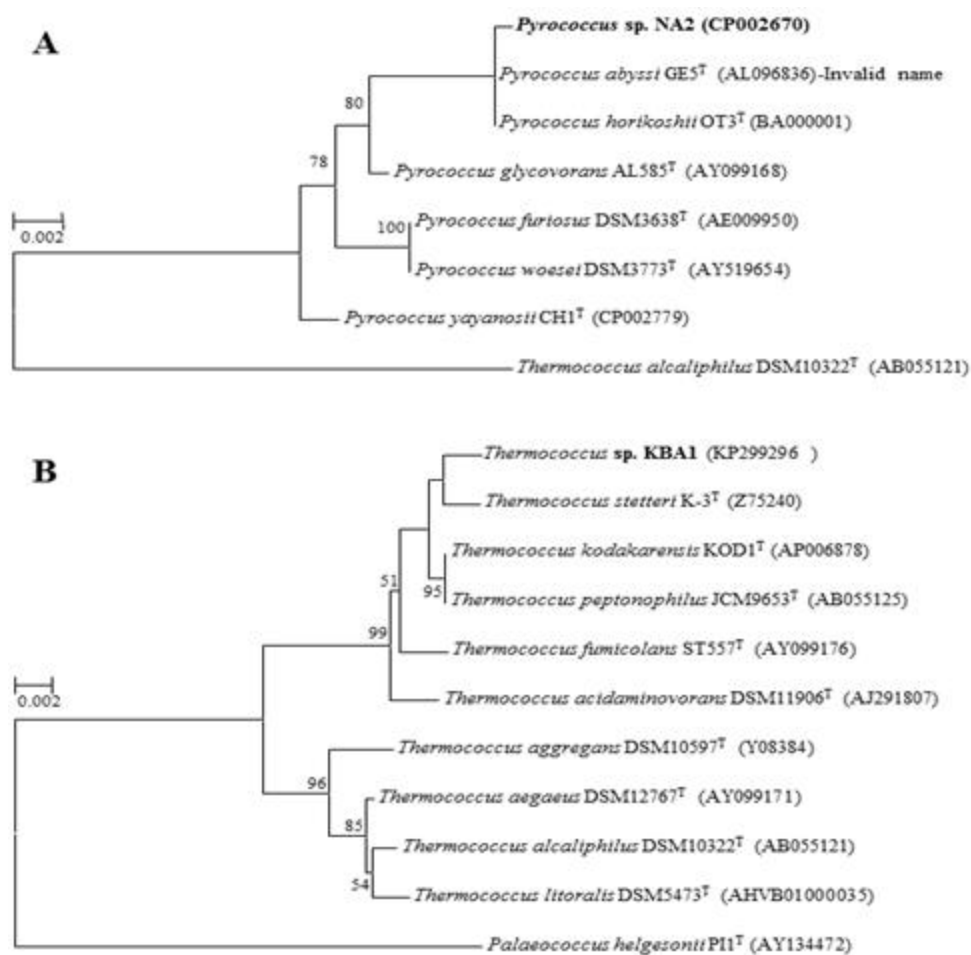
	R	CGGAGGTGGGATATCCCGGATCGATCGTTTCTTC	
TON_0746	F	TGTTTCCTGGAGGGACATAA	684
	R	TGAGTTTTGTGGCCCTCAAC	
TON_0828	F	GCTCGATGATAAGTGAGGTT	1900
	R	TGATAGGCAGACCCGTTGCC	
TON_0878	F	TCAAAAGTTCTCGGAGGGGT	930
	R	TGGGCAGAACAAACCTCATT	
TON_0945	F	AACGTTTCCAGGTGGTGGAG	1050
	R	TCATCGCCGGGATTCCCTCT	
TON_0999	F	GACCATGATTACGAATTGGATCCTCTCCTACTTC	999
	R	CGGAGGTGGGATATCCCGGATCTGGTATCCCTCC	
TON_1051	F	TCGAAATGAACCCCGGTGGT	810
	R	TTGAACTCGACCATGCTCTC	
TON_1100	F	AGCCGGCCGGTTGGGGGTGT	970
	R	GTCGACGCTCGAGAGCTGGT	
TON_1141	F	ATAAGGGAGGAGGTAGAATG	810
	R	CGAGGCGGTAAGGAGTATTT	
TON_1197	F	AAGCTAAGGGTGGGTTAGAT	1149
	R	CCTCGCATCGGCAAGGAACT	
TON_1283	F	GACCATGATTACGAATTGGATCCTCGACTGTTGT	999
	R	CGGAGGTGGGATATCCCGGATCAGGAACACCCCC	
TON_1329	F	GACCATGATTACGAATTGGATCCCCCGACGTTGC	999
	R	CGGAGGTGGGATATCCCGGATCTGCCCATGGGTG	
TON_1399	F	TTTTAACTTCAGGTGGAATC	650
	R	TGAAGGTCAGATGGGCGAGC	
TON_1453	F	AGGGCTGTTGTTGGGGGATT	1340
	R	CTTACCGAGGGGATACAGGT	
TON_1508	F	GACCATGATTACGAATTGGATCCTTCTCCTAACT	1000
	R	CGGAGGTGGGATATCCCGGATCTTTTCTCACCGA	
TON_1582	F	AAGAATTCGATTCTTGGACATTATCGAGGAGCA	500
	R	AACTGCAGTATGCTATTACCGCCGAGAACACCA	
TON_1638	F	GTCCCTCAGCCTAATTTAG	530
	R	TATGTATCAATAACATGGGG	
TON_1690	F	CTAACCTTTTTCGGTGGTCAT	640
	R	TGTCTTAAAAAGGTTATCAG	
TON_1750	F	TCTTCGGGTGAGGCTAATGG	1140
	R	CTTGTCTCCGAGCACCGCTA	
TON_1801	F	GCTGGATATTAACGGCCATG	810
	R	TAATTAACGCTTTCCCTCAA	

TON_1851	F	AACTAGGCTTGGTGATGTCC	910
	R	CTCCAATATCTCTTTAGGTG	
TON_1886	F	GACCATGATTACGAATTGGATCCCGGCTATTTGA	999
	R	CGGAGGTGGGATATCCCGGATCGTTCTCACCTAG	
TON_1979	F	TCCGGTTGATCCTGCCGG	1500
	R	GGTTACCTTGTTACGACTT	

제 2절 연구내용 및 결과

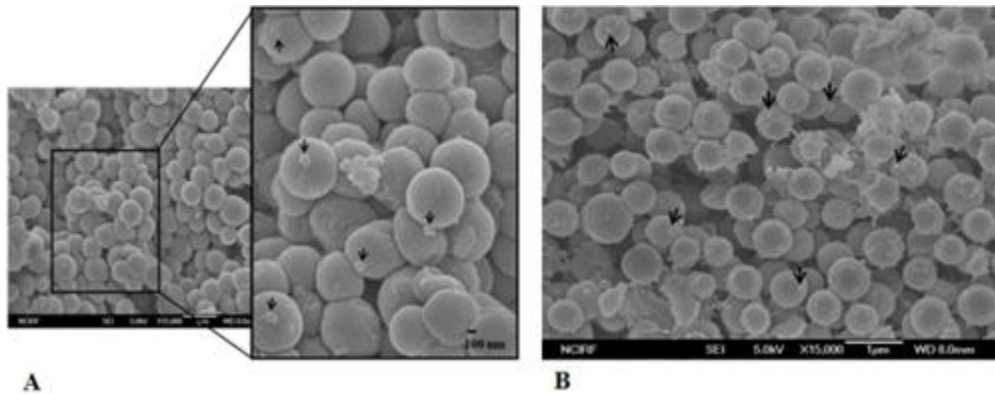
1. ToEVs의 형태학적 관찰

EVs 생성균주 탐색을 위해 분리 배양한 3 종류의 초고온성 archaea 중 1종은 이미 분류학적 연구를 보고하였으나 (Bae et al., 2006), 나머지 두 종은 본 연구에서 분류학적 위치를 검토한 결과 공히 신종으로 확인하였고, 잠정적으로 *Pyrococcus* sp. NA2, *Thermococcus* sp. KBA1로 명명하였다 (Fig. 1).



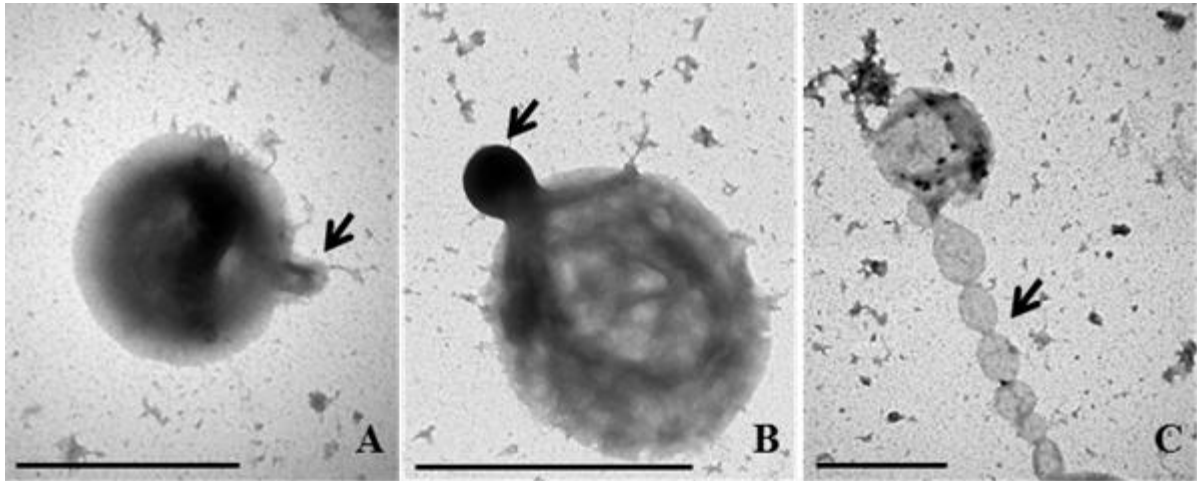
(Fig. 1) Phylogenetic tree highlighting the position of *Pyrococcus* sp. NA2 (A) and *Thermococcus* sp. KBA1 (B) within family *Thermococcaceae*. Bootstrap values are based on 1,000 replicates and those above 50% are indicated at the nodes (Felsenstein, 1985). *Palaeococcus helgesonii* PI1^T and *Thermococcus alcaliphilus* DSM10322^T were used as outgroup. Scalebar; 0.002 changes per nucleotide position.

3종의 *Thermococcales* 균주를 배양하여 SEM으로 세포표면을 관찰한 결과 EVs로 추정되는 bud-like 구조가 *Pyrococcus* sp. NA2에서는 관찰되지 않았으나, *T. onnurineus* NA1^T 과 *Thermococcus* sp. KBA1에서는 관찰이 되었다 (Fig. 2).



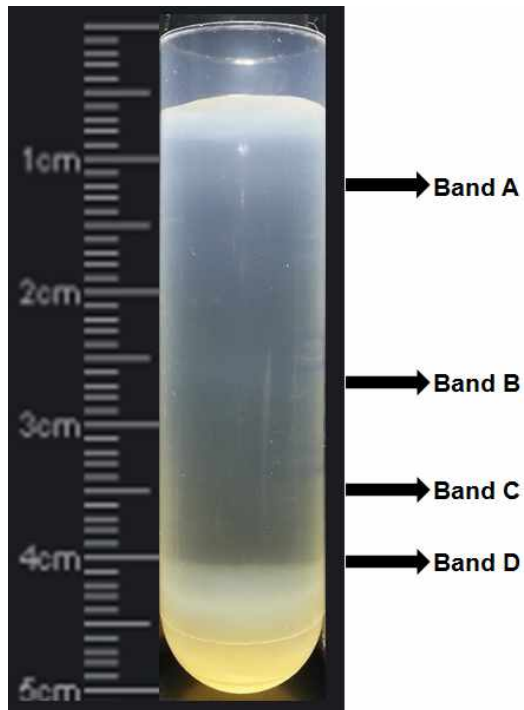
(Fig. 2) SEM image of two *Thermococcales* strains. (A) *T. onnurineus* NA1^T and (B) *Thermococcus* sp. KBA1. Arrows indicate EVs. Scalebar: 100nm.

EVs 구조는 NA1^T 균주보다 KBA1 균주에서 더 많이 관찰할 수 있었으나 두 종의 vesicle 생성균주인 *Thermococcus* 균주 중 본 실험의 재료로 NA1^T 균주를 선택하였다. 그 이유는 NA1^T 균주가 분류학적으로 이미 보고 완료되었고, genomic, proteomic 연구가 진행되어 비교분석하기 용이하기 때문이다 (Bae et al., 2006; Lee et al., 2008; Yun et al., 2011). negative stain한 TEM 사진에 의하면 모세포 표면으로부터 budding된 vesicle을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3-A, B). Lumen-like 구조로 bud가 모세포 표면으로부터 돌출되어 (Fig. 3-A) 최종적으로는 모세포로부터 주위 환경으로 떨어져 나가게 된다 (Fig. 3-B). Vesicle이 budding 되는 과정에서 electron dense body (EDB)가 모세포로부터 vesicle로 이동되는 것도 관찰할 수 있었다 (Fig. 3-C).



(Fig. 3) TEM images of *T. onnurineus* NA1^T cells negatively stained. (A) A vesicle protruding from the parent cell surface, early stage. (B) Avesicle bud almost pinched off from the surface of parent cell, about to be released as an EV. (C) Vesicles connected to the parent cell as a chain. The highly electron-dense cytoplasmic materials appear as a dark color inside the cell and EV. Arrows indicate ToEVs. Scalebar: 1 μ m.

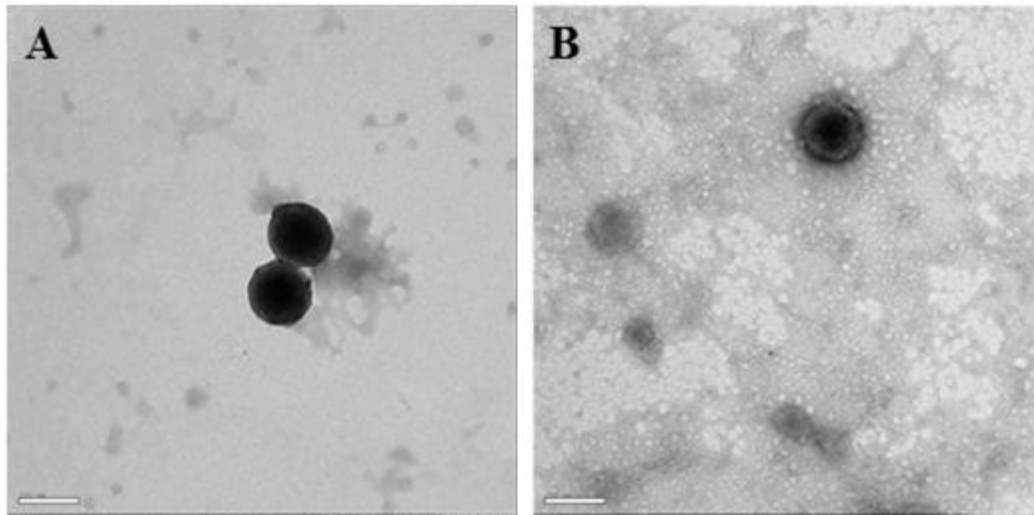
EVs를 순수분리 정제하기 위하여 재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 15L의 *T. onnurineus* NA1^T 균주배양액을 centrifuge로 모세포를 제거하고, 상등액을 membrane filter system을 이용하여 농축하였고, CsCl-density gradient equilibrium ultracentrifugation 방법으로 정제하였다. CsCl-density gradient equilibrium ultra-centrifugation 결과 각각 buoyant densities 값 1.2434 and 1.2648 g cm⁻³ 인 band B 와 C를 얻었다 (Fig. 4). 또한 두 개의 추가 bands를 대량배양시 (100-150L) 관찰할 수 있었으나 양이 매우 적어 본 연구에서는 실험재료로 사용할 수 없었다. 추가로 관찰된 band A는 band B보다 가벼운 $\rho^{25}=1.1899$ 값을, band D는 band C보다 무거운 $\rho^{25}=1.2828$ 값을 나타내었다.



(Fig. 4) CsCl density gradient ultracentrifugation profile of ToEVs produced by *Thermococcus onnurineus* NA1^T.

Arrows indicate the position of four EV bands.

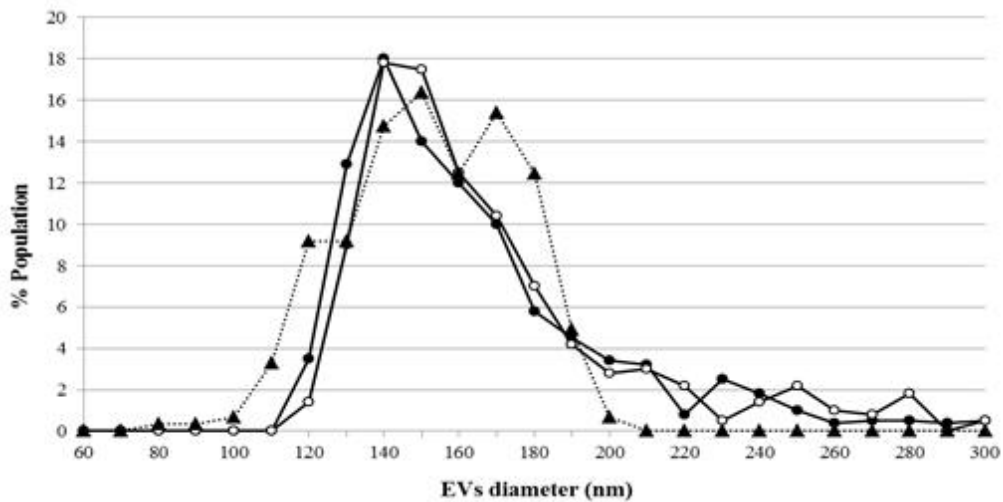
Bands B, C의 ToEVs를 negative stain 후 TEM으로 관찰한 결과, 형태학적 차이는 확인할 수 없이 공히 구형 모양을 갖고 있고, tail은 갖고 있지 않아 virus-like 구조와 차이가 있음을 알 수 있었다 (Fig. 5).



(Fig. 5) TEM images of ToEVs negatively stained. (A) ToEVs in band B. (B) ToEVs in band C. ToEVs were suspended in TBT buffer, adsorbed to a carbon-coated grid and negatively stained for 30s with 2% uranylacetate. Scalebar: 100nm.

최종 정제한 bands B, C의 개체수를 qNano로 측정한 결과 각각 2.7×10^{10} , $3.7 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 로 확인되었고, band B:C의 비율은 약 2:3으로 나타났다. 두 개 bands의 EVs 크기와 계수를 qNano, TEM 두가지 방법으로 수행하여 비교한 결과 크기의 분포는 120-550 nm, 80-210 nm로 각각 나타났다 (Fig. 6). 비록 qNano로 측정한 EVs의 크기 분포가 TEM방법 측정치에 비해 약간 큰 것으로 보이나, T-test ($P > 0.05$) 결과 두 방법상의 차이는 없는 것으로 확인되었다. Band B ToEVs의 크기 분포는 band C와 매우 유사한 것으로 qNano로 확인되었다. 두 bands의 vesicle 크기 평균값은 공히 140 nm로 나타났다. qNano방법의 장점은 vesicle 계수에 노동과 시간이 절약된다는 점이다. 그러나 vesicle이 aggregate되면 qNano는 한 개의 vesicle로 인식하고, 부정확한 크기와 계수를 나타낸다. 시료를 정제하는 과정에서 0.2 μm membrane filter로 통과하였음에도 불구하고 qNano방법으로 계수한 결과에서는 TEM 결과에서 관찰할 수 없는 200 nm 보다 큰 vesicle이 수개 나타났다. 특히 qNano로 측정한 크기분포 결과에서 200 nm 보다 큰 2-3개의 peaks가 나타난 것은 2-3개 혹은 많은 vesicles이 aggregate되어 나타난 것으로 추정한다. 그러므로 본 연구에서는 210 nm 보다 작은 크기의 측정치만 결과로 반영하였다. 만일 vesicle aggregation이 심각하면 qNano 측정치는 과소평가 될수 있으며, 이와 같은 문제점은 강력한 shaking과 non-ionic detergent 처리를 통하여 vesicle을 disaggregation을 향상 할 수 있다. qNano 제조사의 정보에 의하면 본 실험에서 사용한 NP150 nanopore로 75-300 nm 크기의 입자를

계수할 수 있다고 하였으나, 실제로는 120 nm 이하 크기의 vesicle은 확인할 수 없었다. 반면 TEM 측정결과에 의하면 전체 vesicle 계수치의 약 5% 정도가 이 크기에 속하는 것으로 나타나, qNano의 측정치는 약 5% 해당되는 만큼 총 개체수의 과소평가가 일어난 것으로 추정한다. 이와 같은 qNano 방법의 단점은 Momen-Heravi et al. (2012)에 의해서 논의된 바 있다.

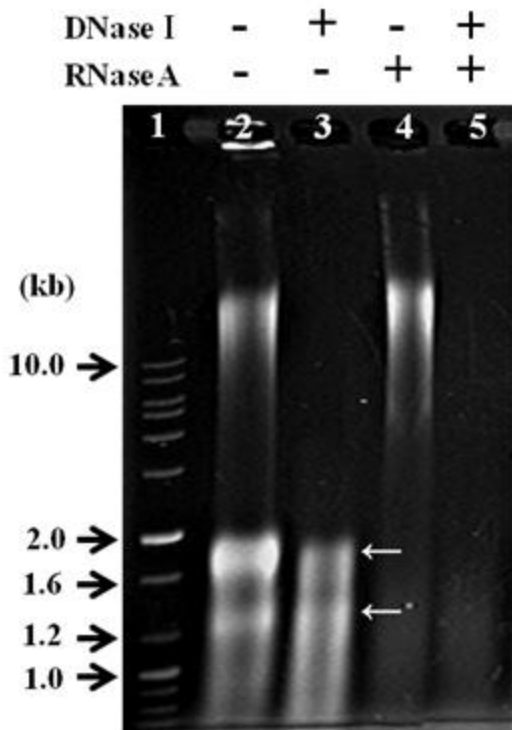


(Fig. 6) Size distribution of ToEVs estimated by qNano and TEM. —●—: qNano/ToEVs of band B; —○—: qNano/ToEVs of band C; ···▲···: TEM/ToEVs of band C. The figure depicts the diameter of vesicles (nm) vs. normalized counts of vesicles (%). The size distribution of ToEVs bigger than 300nm is not presented.

Bands B, C의 핵산함유 ToEVs의 수를 SYBR Gold 염색법을 이용하여 epifluorescence microscopy 방법으로 계수한 결과, qNano로 계수한 총 vesicle 수 대비 SYBR Gold로 염색된 vesicles 수의 비율은 각각 $58\% \pm 6\%$, and $81 \pm 4\%$ ($n=3$)로 나타났다.

2. ToEVs의 생화학적 특징

ToEVs가 DNA를 함유하고 있는지를 test하기 위하여 band C ToEVs로부터 DNA를 추출하였다. ToEVs로부터 추출한 DNA를 DNase, RNase 처리 후 electrophoretic 분석을 하였다 (Fig. 7).

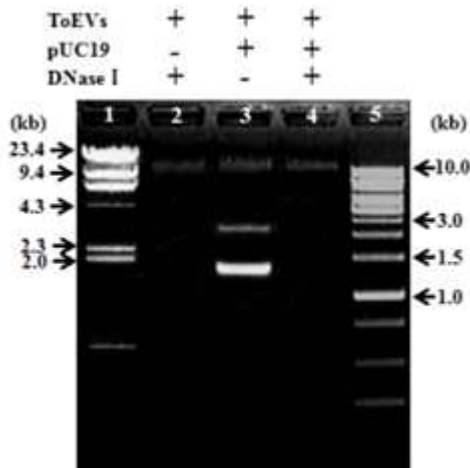


(Fig. 7) Electrophoretic analysis of ToEV nucleic acids without or with DNase and RNase treatment. Lane 1: 1 kb DNA ladder, lane 2: no treatment with DNase and RNase, lanes 3 and 5: Nucleic acids of ToEVs treated with DNase1, lanes 4 and 5: Nucleic acids of ToEVs treated with RNase A. White arrows indicate two rRNAs in lanes 2 and 3.

ToEVs로부터 추출 정제한 핵산시료를 DNase, RNase 처리하지 않은 경우 DNA, RNA bands를 확인할 수 있었으나 (lane 2), 두가지 효소를 모두 처리한 경우에는 band를 확인 할 수 없었다 (lane 5). 또한 DNase, RNase 한 가지만 전처리한 경우 각각 RNA (lane 3) 혹은 DNA band (lane 4)를 확인할 수 있었다. 이 결과는 ToEVs가 DNA, RNA를 함유하고 있음을 시사하고 있는 것이다.

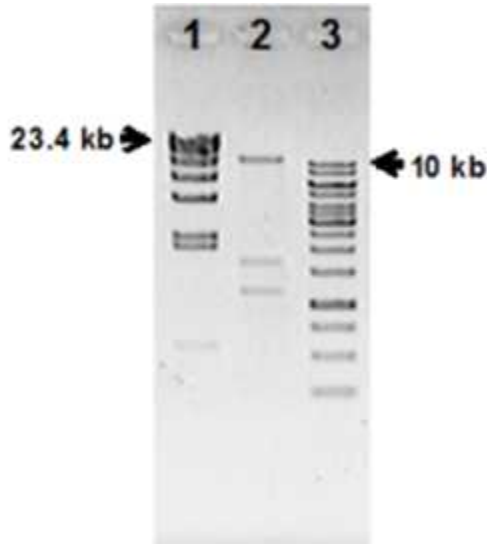
Vesicles에서 분리한 DNA는 vesicle 내부에 packaging 된 경우와 외부 표면에 오염된 경우 혹은 주변에 오염된 free DNA에서 유래될 수 있다. 앞 실험에서 확인한 핵산이 EVs 내부에 packaging 된 경우인지를 확인하기 위하여 순수정제한 ToEVs에 pUC19 DNA를 첨가 혹은 무첨가 한 경우에 DNase I을 처리하여 그 결과를 보았다 (Fig. 8). pUC19 DNA를 첨가한 시료에 DNase I을 처리하지 않고, ToEVs의 전체

DNA를 추출한 결과 세 개의 분명한 bands를 확인할 수 있었다 (lane 3). 그러나 DNase를 처리한 경우에는 한 개의 band 만을 확인할 수 있었다 (lane 2, 4).



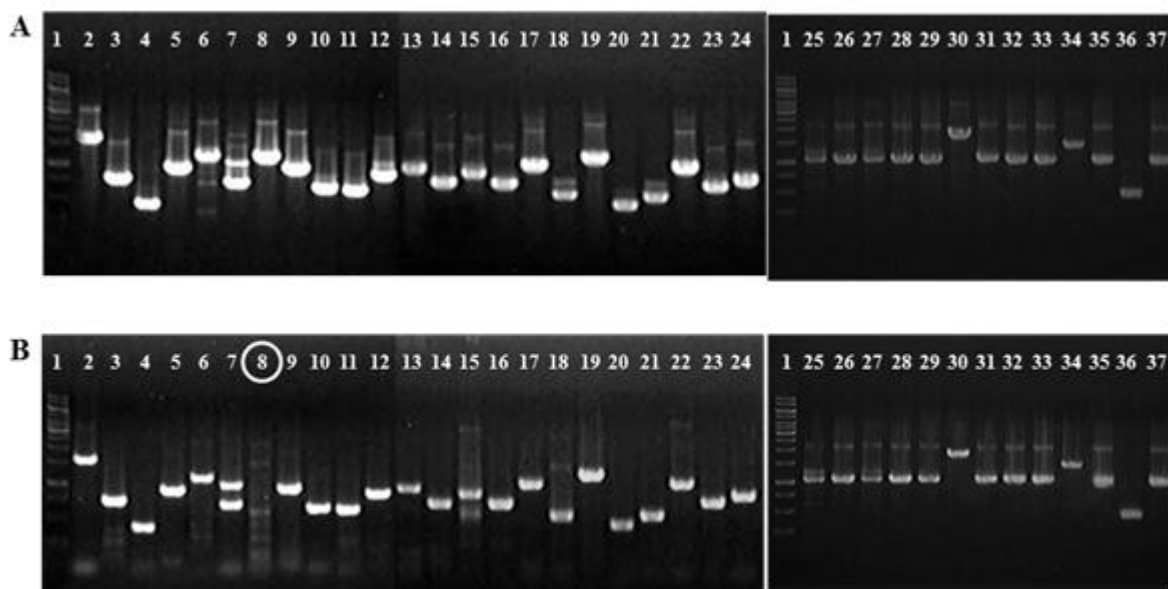
(Fig. 8) Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from ToEV with/without plasmid DNA as a contaminant. Lambda/HindIII DNA ladder (lane 1) and 1kb DNA ladder (lane 5) were used as markers. The purified EVs alone (lane 2) and EVs mixed with pUC19 DNA (lane 3, 4) were untreated (lane 3) or treated (lane 2, 4) with 10 μ M of DNase I for 16 h at 37°C. After heat inactivation of DNase I, DNA was extracted using a vRD kit (Geneall). The three bands in lane 3 are EV DNA (upper) and pUC19 DNA (middle and lower).

T. onnurineus NA1^T genome에서 EVs로 packaging 된 vesicle 내에 있는 DNA의 size를 측정하기 위하여 DNA 추출 및 정제를 하여 1 % agarose gel로 분리하였다 (Fig. 9). 한편 endonuclease로 처리한 vesicle DNA와 처리하지 않은 경우의 gel electrophoresis 상의 mobility 차이가 없는 것으로 미루어 vesicle DNA는 linear double strand form 으로 판단된다. 이와 같은 결과에 미루어 ToEVs의 DNA size는 약 14 kb로 측정되었다. 이 크기는 모세포인 *T. onnurineus* NA1^T의 genome size (1,848 kb)에 비해 100의 1보다 작은 크기의 DNA를 packaging 시킨다는 것을 알 수 있다.

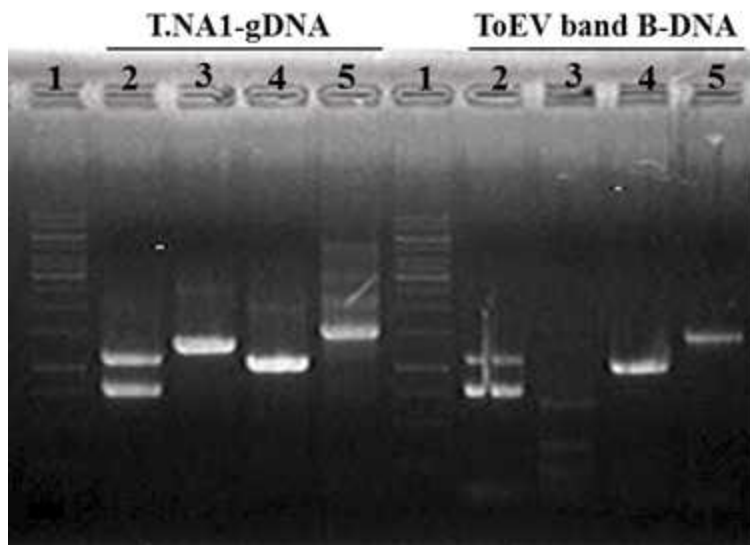


(Fig. 9) Size estimation of DNA from ToEVs. Lane 1: Lambda/HindIII DNA ladder, lane 2: Total nucleic acids isolated from ToEVs, lane 3: 1 kb DNA ladder. Molecular sizes are indicated in kb. Lower two discrete bands in lane 2 represent RNA bands as shown in Fig. 4.

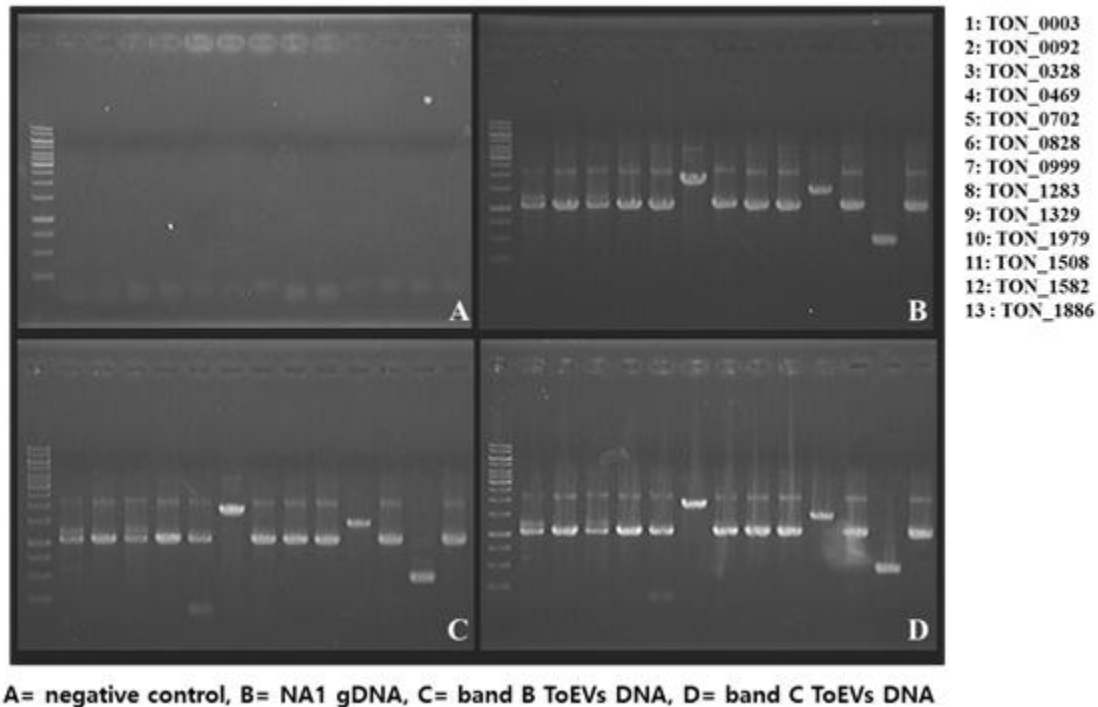
순수정제한 ToEVs가 *T. onnurineus* NA1^T 세포에서 생성된 것을 확인하기 위하여 ToEVs로부터 16S rDNA를 추출하여 16S rRNA를 coding하는 TON_1979 biochemical marker로 증폭시킨 후 sequence한 결과 EVs는 모세포와 같은 16S rDNA sequence를 갖고 있었다. 이 관찰은 모세포 archaeal cell로부터 vesicle이 생성되었음을 확인한 결과이다. 따라서 vesicle이 모세포로부터 유리되기 전에 bud가 돌출될 때 lumen 구조에 DNA가 packaging되는 것으로 추정한다. 모세포로부터 ToEVs로 packaging 될 때 genome의 어떤 부위가 우선적으로 packaging 되는지를 확인하기 위하여 *T. onnurineus* NA1^T genome으로부터 선정된 약 50 kb 간격의 36 biochemical sequence markers의 paired primers를 이용하여 추출한 ToEVs DNA를 증폭하였다. 36 개의 makers 중 band C의 DNA에 한 개의 marker (TON_0544)를 제외한 35 개 markers가 존재함을 알 수 있었다 (Fig. 10). 이와 같은 결과를 다른 band B의 ToEVs에서 확인결과 같은 결과를 얻었다 (Fig. 11). 한편 이와 같은 결과가 모세포인 *T. onnurineus* NA1^T 균주가 genome상에 변화가 일어나 vesicle에 그 부분이 전달되 않을 경우를 확인하기 위하여 ToEVs를 생산한 모세포의 gDNA도 동시에 같은 biochemical makers를 확인한 결과 모든 부분이 존재하였음을 다시 확인하였다 (Fig. 12).



(Fig. 10) Gel electrophoresis of the amplicon products for g-DNA from parent cells (A); and from ToEV band C (B); using paired primers for 36 different biochemical markers. Lane 8 of the lower panel (B) in a circle indicates no band was found. Lane 1, 100 bp DNA ladder; lane 2, TON_0153; lane 3, TON_0200; lane 4, TON_0261; lane 5, TON_0297; lane 6, TON_0399; lane 7, TON_0494; lane 8, TON_0544; lane 9, TON_0598; lane 10, TON_0650; lane 11, TON_0746; lane 12, TON_0878; lane 13, TON_0945; lane 14, TON_1051; lane 15, TON_1100; lane 16, TON_1141; lane 17, TON_1197; lane 18, TON_1399; lane 19, TON_1453; lane 20, TON_1638; lane 21, TON_1690; lane 22, TON_1750; lane 23, TON_1801; lane 24, TON_1851; lane 25, TON_0003; lane 26, TON_0092; lane 27, TON_0328; lane 28, TON_0469; lane 29, TON_0702; lane 30, TON_0828; lane 31, TON_0999; lane 32, TON_1283; lane 33, TON_1329; lane 34, TON_1979; lane 35, TON_1508, lane 36, TON_1582; lane 37, TON_1886.



(Fig. 11) Gel electrophoresis for PCR products of *T. onnurineus* NA1^T gDNA and bandB ToEV DNA amplified by specific primers. Lane1: 10kb DNA ladder, lane2: TON_0494, lane3: TON_0544 (band C ToEVs deletion region), lane4: TON_0598, lane5: TON_1979 (16S rDNA).

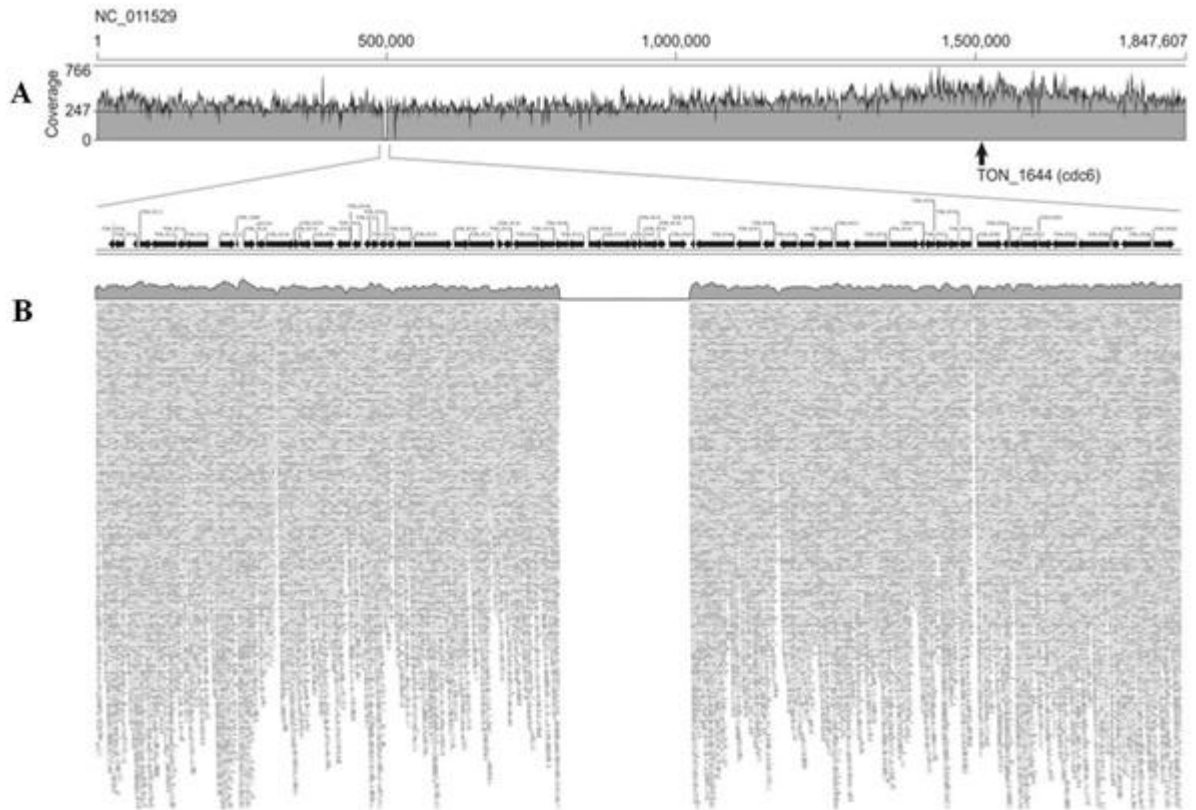


(Fig. 12) Gel electrophoresis for PCR products of *T. onnurineus* NA1^T gDNA (B), and

DNA from ToEV bands B and C (C, D in Fig), with negative control amplified by specific primers.

3. ToEVs DNA의 분석

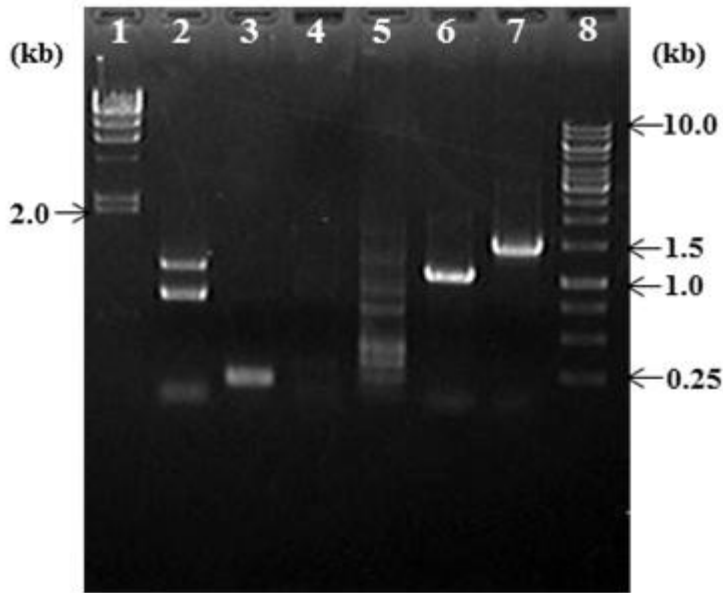
위에서 확인한 ORF TON_0544만 ToEVs의 genome에서 발견되지 않은 것인지 혹은 DNA packaging 과정 중에 다른 gene 도 전달되지 않았는지를 확인하기 위하여 band C ToEVs에 존재하는 전체 DNA 염기서열을 sequencing하였다. 총 258 만개의 sequence reads를 *T. onnurineus* NA1^T reference genome (1,847,607 bp, NC_011529; Lee et al., 2008) 에 assemble하였다. 얻어진 모든 ToEVs DNA sequence는 모세포로부터 유래된 것으로 확인하였다. Reference genome에 reads mapping 결과 *T. onnurineus* NA1^T genome의 99.5 %가 확인되었고 (평균 coverage: 246.8 X, SD: 56.4 X, maximum: 766 X) 0.5 %가 어떤 sequence read와 일치하지 않았다 (Fig. 13). ToEVs의 genome에서 발견되지 않은 0.5 % 부분은 한 곳에만 존재하고 총 길이는 ca. 9,400 bp으로 NC_011529의 TON_0536-TON_0544 부분이다. TON_0536 (875 bp)에서 TON_0544 (1221 bp) 부분의 ORF는 hydrogenase (gamma subunit), sulfhydrogenase (beta subunit), hypothetical formate transporter, hypothetical formate dehydrogenase (alpha subunit), oxidoreductase iron-sulfur protein, 4Fe-4S cluster-binding protein, glutamate synthase (beta chain-related oxidoreductase) and alcohol dehydrogenase로 각각 규명되었다.



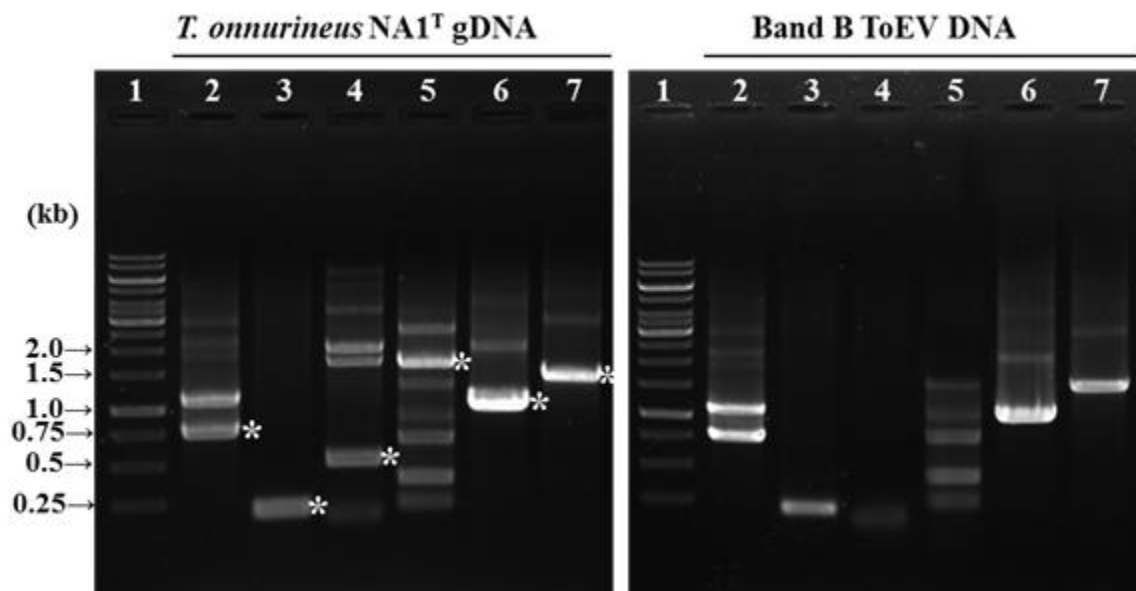
(Fig. 13) (A) Coverage of *T. onnurineus* NA1^T genome by DNA sequencing reads for ToEVs. The mean coverage was about 247X with a 56.4X standard deviation (S.D.) and maximum coverage of 766X. Arrow indicates the predicted chromosomal replication origin (*oriC*) of *T. onnurineus* NA1^T at the specific genomic position of 1,508,116bp. Unrecovered region (ca. 9.4kb) of the *T. onnurineus* NA1^T genome is expanded below. (B) Distribution of ToEV reads on ORFs of the *T. onnurineus* NA1^T genome.

이 결과에 대해 *T. onnurineus* NA1^T genome에서 같은 위치 (약 9.4 kb)가 반복해서 발견되지 않은지를 재확인하기 위하여 다른 batch의 배양을 하여 정제한 DNA를 확인하였다. 만일 genome에 특정부위가 우연히 ToEVs로 packaging되지 않은 것이라면 이 부위가 다시 확인될 것으로 사료된다. 다른 batch의 배양을 통해 얻은 DNA를 다음과 같은 primers를 사용하여 확인하였다. 전 결과에서 ToEV DNA에 존재하였던 부분의 TON_0494, TON_0536- 3'-region (F: 5'-CGGCGTTGATACTATGTC-3', R: 5'-GATGTATAAGGCGGTCTTC-3', size 200 bp), TON_0598, TON_1979와 존재하지

않았던 부분인 TON_0536- 5'-region (F: 5'-GAGATCCTTCATGGCTTC-3', R: 5'-CATGTGTCACGACAATCC-3', size 500 bp), TON_0544의 primers를 사용하였다. 다른 batch의 배양에서 얻은 band C ToEVs DNA를 확인한 결과 전 실험과 동일하게 해당 부분의 genome이 vesicle에 전달되지 않았음을 나타냈다 (Fig. 14). 이와 같은 결과는 band B ToEVs에서도 동일하게 확인할 수 있었다 (Fig. 15).



(Fig. 14) Gel electrophoresis for PCR products of ToEVs amplified by specific primers. Lane 1: Lambda/HindIII DNA ladder, lane 2: TON_0494, lane 3: 3'-region of TON_0536, lane 4: 5'-region of TON_0536, lane 5: TON_0544, lane 6: TON_0598, lane 7: TON_1979 (16S rDNA), lane 8: 1kb DNA ladder. Molecular sizes are indicated.



(Fig. 15) Gel electrophoresis for PCR products of *T. onnurineus* NA1^T gDNA and ToEV DNA from band B amplified by specific primers. Lane 1: 1kb DNA ladder, lane 2: TON_0494, lane 3: 3'-region of TON_0536, lane 4: 5'-region of TON_0536, lane 5: TON_0544, lane 6: TON_0598, lane 7: TON_1979 (16S rDNA). Molecular sizes are indicated. Asterisk symbols on the right shoulder of bands indicate the relevant amplicon products by specific primers.

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

세부연구내용		추진계획												달성도 (%)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
EVs 생성 및 특성 규명	EVs 농축 및 순수분리 정제기술 확립													100	
	EVs의 형태학적, 생화학적 특성규명														100
	EVs DNA 분석 및 특성규명														

- 본 연구의 결과 한편의 SCI논문을 게재하였고, 현재 1편이 투고되어 심사중이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 본 연구결과에서 얻은 결과는 vesicle의 DNA packaging 과정을 이해할 수 있는 단초를 제공하였다는 면에서 매우 의미가 있다. 후속연구를 통해 발전시킨다면 자연 환경에서의 horizontal gene transfer의 이해를 높일 수 있을 뿐 아니라, 질병진단 및 치료에도 활용가능한 기술을 개발하는데 공헌을 할 것이다.

제 6 장 참고문헌

1. Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
2. Felsenstein J. 1985. Limits on Phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution.* 39:783-791.
3. Jukes T, Cantor CR. 1969. Evolution of protein molecules. *Mamm. Protein Metab.* 3:21-132.
4. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731-2739.
5. Deatherage BL, Cookson BT. 2012. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect. Immun.* 80:1948-1957.
6. Prangishvili D, Holz I, Stieger E, Nichell S, Kristjansson JK, Zillig W. 2000. Sulfolobins, specific proteinaceous toxins produced by strains of the extremely thermophilic archaeal genus *Sulfolobus*. *J. Bacteriol.* 182: 2985 - 2988.
7. Ellen AF, Albers SV, Huibers W, Pitcher A, Hobel CF, Schwarz H, Folea M, Schouten SM, Boekema EJ, Poolman B, Driessen AJ. 2009. Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal *Sulfolobus* species reveals the presence of endosome sorting complex components. *Extremophiles.* 13: 67 - 79.
8. Rachel R, Wyschkony I, Riehl S, Huber H. 2002. The ultrastructure of *Ignicoccus*: evidence for a novel outer membrane and for intracellular vesicle budding in an archaeon. *Archaea.* 1: 9 - 18.

9. Chiura HX. 2004. Novel broad-host range gene transfer particles in nature. *Microbes Environ.* 19: 249–264.
10. Soler N, Marguet E, Verbavatz J-M, Forterre P. 2008. Virus-like vesicles and extracellular DNA produced by hyperthermophilic archaea of the order *Thermococcales*. *Res. Microbiol.* 159:390–399.
11. Chatterjee SN, Chaudhuri K. 2012. Outer membrane vesicles of bacteria. Springer, Heidelberg.
12. Sugitate T, Chiura HX. 2005. Functional gene transfer towards a broad range of recipients with the aid of vector particles originating from thermophiles. *Proceedings of Intern. Symp. on Extrem. and their Appli.* p141–147.
13. Kulp A, Kuehn MJ. 2010. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 64:163 - 184.
14. Manning AJ, Kuehn MJ. 2013. Functional advantages conferred by extracellular prokaryotic membrane vesicles. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 23:131 - 141.
15. Renelli M, Matias V, Lo RY, Beveridge TJ. 2004. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiol.* 150: 2161–2169.
16. Hagemann S, Stöger L, Kappelmann M, Hassl I, Ellinger A, Velimirov B. 2013. DNA-bearing membrane vesicles produced by *Ahrensia kielensis* and *Pseudoalteromonas marina*. *J. Basic Microbiol.* 53: 1 - 11.
17. Biller SJ, Schubotz F, Roggensack SE, Thompson AW, Summons RE, Chisholm SW. 2014. Bacterial vesicles in marine ecosystems. *Science.* 343:183–186.
18. Soler N, Gaudin M, Marguet E, Forterre P. 2011. Plasmids, viruses and

- virus-like membrane vesicles from *Thermococcales*. *Biochem. Soc. Trans.* 39: 36-44.
19. Gaudin, M, Gaudiard E, Le Normand P, Marguet E, Forterre P. 2013. Hyperthermophilic archaea produce membrane vesicles that can transfer DNA. *Environ. Microbiol. Rep.* 5: 109 - 116.
 20. Kwon SO, Gho YS, Lee JC, Kim SI. 2009. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol. Lett.* 297: 150-156.
 21. Bae SS, Kim YJ, Yang SH, Lim JK, Jeon JH, Lee HS, Kang SG, Kim SJ, Lee JH. 2006. *Thermococcus onnurineus* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent area at the PACMANUS field. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 1826-1831.
 22. Kim MS, Bae SS, Kim YJ, Kim TW, Lim JK, Lee SH, Choi AR, Jeon JH, Lee JH, Lee HS, Kang SG. 2013. CO-dependent H₂ production by genetically engineered *Thermococcus onnurineus* NA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 2048-2053.
 23. Børshem KY, Bratbak G, Heldal M. 1990. Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:352-356.
 24. Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Tigges J, Toxavidis V, Ericsson M, Distel RJ, Ivanov AR, Skog J, Kuo WP. 2012. Alternative methods for characterization of extracellular vesicles. *Front. Physiol.* 3:354.
 25. Patel A, Noble RT, Steele JA, Schwalbach MS, Hewson I, Fuhrman JA. 2007. Virus and prokaryote enumeration from planktonic aquatic environments by epifluorescence microscopy with SYBR Green I. *Nat. Protoc.* 2:269 - 276.

26. Lee HS, Kang SG, Bae SS, Lim JK, Cho Y, Kim YJ, Jeon JH, Cha SS, Kwon KK, Kim HT, Park CJ, Lee HW, Kim SI, Chun J, Colwell RR, Kim SJ, Lee JH. 2008. The complete genome sequence of *Thermococcus onnurineus* NA1 reveals a mixed heterotrophic and carboxydrotrophic metabolism. *J. Bacteriol.* 190: 7491–7499.
27. Yun S-H, Kwon SO, Park GW, Kim JY, Kang SG, Lee J-H, Chung Y-H, Kim S, Choi J-S, Kim SI. 2011. Proteome analysis of *Thermococcus onnurineus* NA1 reveals the expression of hydrogen gene cluster under carboxydrotrophic growth. *J Proteomics* 74: 1926 - 1933.
28. Cortez D, Quevillon-Cheruel S, Gribaldo S, Descoues N, Sezonov G, Forterre P, Serre MC. 2010. Evidence for a Xer/*dif* system for chromosome resolution in archaea. *PLoS Genet.* 6 (10): e1001166.doi:10.1371/journal.pgen.1001166.
29. Prangishvili D, Forterre P, Garrett RA. 2006. Viruses of the Archaea: a unifying view. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:837–848.
30. Reysenbach AL, Liu Y, Banta AB, Beveridge TJ, Kirshtein JD, Schouten S, Tivey MK, Von Damm KL, Voytek MA. 2006. A ubiquitous thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents. *Nature.* 442:444–447.
31. Perez-Cruz C, Carrion O, Delgado L, Martinez G, Lopez-Iglesias C, Mercadea E. 2013. New type of outer membrane vesicle produced by the Gram-negative bacterium *Shewanella vesiculosa* M7^T: Implications for DNA content. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:1874 - 1881.
32. Levine SM, Lin EA, Emara W, Kang J, DiBenedetto M, Ando T, Falush D, Blaser MJ. 2007. Plastic cells and populations: DNA substrate characteristics in *Helicobacter pylori* transformation define a flexible but

conservative system for genomic variation. FASEB J. 21: 3458 - 3467.

33. Morrison DA, Guild WR. 1972. Activity of deoxyribonucleic acid fragments of defined size in *Bacillus subtilis* transformation. J. Bacteriol. 112: 220 - 223.