BSPE91900-1754-3

# 극한환경 유전자원 및 바이오 신소재 개발

Development of Genetic Resources and
Biomaterials from Extreme Environment

2006. 2.

한 국 해 양 연 구 원

# 제 출 문

한국해양연구원장 귀하

본 보고서를 " 극한환경 유전자원 및 바이오 신소재 개발"과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006. 2.


총괄연구책임자 : 이정현

참 여 연 구 원 : 김상진, 현정호, 권개경, 강성균, 최현우
이현숙, 배승섭, 우정희, 양성현, 임재규
전정호, 김윤재, 조요나, 목진숙, 조혜연
김준태, 변기득, 김현욱, 이윤호, 김충곤
서현석, 김고은, 정다금, 남기웅, 김 성
오지나, (故)홍경표, 김종만, 명정구, 노충환
강래선, 장요순, 이희승, 신희재, 노정래
정성윤, 김태식, 정현선, 홍현경, 이택견
장 만, 최진우, 권석재, 오위영, 박성욱
이미진, 최정민, 강성호, 강재신, 정웅식
주형민, 홍성수

위탁연구기관명 : 서울대학교
위탁연구책임자 : 신종헌
참 여 연 구 원 : 송주은, 신대혁

위탁연구기관명 : 한양대학교
위탁연구책임자 : 진언선
참 여 연 구 원 : 박승혜

# 요 약 문

## Ⅰ. 제 목

극한환경 유전자원 및 바이오 신소재 개발

## Ⅱ. 연구개발의 필요성 및 목적

해양환경은 거대한 계통학적인 생물다양성, 즉 진핵생물류(Eucarya), 세균류(Bacteria), 고세균류(Archaea) 등이 존재하는 생명자원의 보고이다. 지구상의 식물, 동물, 미생물의 주요한 분류군들이 해양에 존재하여 수천만에서 수억까지의 생물종이 서식할 것으로 예측된다. 해양원핵생물의 경우 탄소 기준으로 지구의 총 바이오매스 중 55 - 85% 를 차지하는 것으로 보고되었다. 이러한 생물자원은 새로운 유전학적인 정보와 특이적 생명기능을 보유하고 있어 유용한 자원으로 개발할 가치가 매우 높다.

1995년에 미생물인 *Haemophilus influenzae*의 유전체, 2003년 인간 유전체 해독 완성 이후 바이오테크시대가 본격화되었고, 정보기술, 장비기술의 발달과 더불어 전 지구적 환경을 대상으로 유전자원 확보, 탐색, 유용소재를 선점하기 경쟁이 진행 중이다. 이러한 상황에서 유전체 분석 기술 등의 첨단 생물공학적 기법 및 분자생물학 기법을 이용한 해양생물의 생명현상 규명과 새로운 유용생물 품종 개발을 위한 어류의 성장관련 혹은 생체물질 생산에 관여하는 유용형질 관련 유전자와 소재 발굴 및 이용기술 개발이 필요하다. 또한 세계적으로 정밀 화학의 급속한 발달에 힘입어 해양생물로부터 고부가 가치를 창출할 수 있는 신기능성 소재 및 항생·항암제와 같은 대체 의약품 개발연구 개발이 경쟁적으로 진행되고 있다. 해양생물로부터 신물질 개발 연구는 비교적 짧은 역사에도 불구하고 신규 물질을 발견할 확률이 육상생물에 비해 훨씬 높아 각국에서 도전적으로 연구 투자를 하고 있는 형편이다.

극한생물은 지구상 독특한 환경에 적응하면서 진화해 왔다. 생명공학산업이 차세대 성장동력산업으로 평가되면서 생물자원을 확보하기 위한 국가 간 경쟁이 치열해지고 있다. 우리나라는 극지 과학기지를 십분 활용하여 새로운 생물자원과 유전자 자원을 확보하고 이를 활용함으로써 국가 생물산업의 경쟁력를 제고해야 한다. 극한환경 무척추동물의 유전체 분석과 유전자원 확보 분야는 극지의 성게와 곤충 등 무척추동물의 발현유전자를 대량 분석하고 저온환경 고유의 유용유전자 확보를 목표로 연구가 수행되었다.



해양 생물자원의 효율적인 이용과 활용기반 구축, 해양산업으로의 장기적 발전 가능성, 지구적 해양탐사 프로그램을 통해 얻어지는 생물자원의 지속적 이용 방안 연구를 수행할 필요성이 선진국 연구그룹에서 이미 제기되었다. 특히 국내외적으로 바이오산업의 중요성이 강조되고, 국가의 미래산업으로 부각되고 있는 싯점에 해양생물다양성 확보와 유전자원의 활용기술의 개발은 시급한 과제로 판단된다.

이러한 배경을 바탕으로 본 연구를 통해 다음과 같은 연구를 수행하였다.

첫째, 해양 극한 미생물 1종 유전체 해독, 해양생물 및 유전자원과 생물정보의 관리, 해양 유래 기능성 유전자 발굴 및 이용기술 개발을 통해 해양·극한환경 생물 유전체 해석 기술을 확보하여 해양생물자원/유전정보 관리 기반을 구축하고

둘째, 연근해 및 대양의 무척추동물로부터 의약품으로 개발 가능한 선도 물질, 항산화 기능물질, 극한 효소 유전자 개발을 통해  해양생물유래 유용신소재 개발을 시도하였다.

## Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. 초고온성 미생물 확보
   - 초고온성 미생물 분리 및 배양
   - 초고온성 미생물 특성 분석 및 동정

2. 초고온성 미생물 유전체 해독
   - 유전자 라이브러리 구축
   - 대량 염기서열 결정
   - 유전체 정보 분석

3. 극한 효소 유전자 발굴
   - 극한 유전자 발굴
   - 극한 유전자 발현 및 특성 분석

4. 극지환경 무척추동물 유전체 분석 및 유전자원 확보
   - 남극 성게의 진화 특성과 발현유전자 분석: 분자계통분석, ESTs 대량 분석, 유용

유전자 확보

- 북극 성게의 진화 특성과 발현유전자 분석: 분자계통분석, ESTs 대량 분석, 유용 유전자 확보
- 극지 곤충의 미토콘드리아 유전체 분석 및 발현유전자 분석: Long-Range PCR, 미토게놈 전체 염기서열 분석, EST 대량분석과 유용유전자 확보

5. 어류 유용유전자 확보
  - 상업적으로 유용한 고유 어류의 서식 특성관련 자료수집
  - 유용 유전자 발굴 대상 어종 선정 및 유전적 특성파악
  - 기능성 유전자 탐색 및 확보
  - 기능성 유전자의 이용기술 개발

6. 신규 해양천연물 분리
  - 해양생물 시료 채집 및 배양
  - 천연물 생리활성 검사
  - 신규 물질 탐색, 분리, 구조 결정

7. 항동결물질 분리
  - 얼음결합 단백질 생산 미세조류 탐색
  - 결빙방지 물질 분리, 활성 검증, 생성 특성 조사

8. 해양생명공학 국내외 연구 동향 및 정책 제언
  - 해양생명공학의 정의
  - 해양생명공학의 국내외 정책



# Ⅳ. 연구개발결과

1. 초고온성 미생물 확보

- 새로운 초고온성, 혐기성, 종속영양 고세균(NA1$^{T)}$을 파푸아뉴기니 해역의 PACMANUS 심해 열수구 지역(깊이, 1,650 m)에서 분리하였었다. 분리된 균주는 극성 편모(flagella)들로 운동하며, 대략 0.5-1.0 ㎛ 지름을 갖는 구형의 모양이며 단일 세포로 이루어졌다. 최적 생육 온도, pH 그리고 NaCl 농도는 각각 80℃, pH 8.5 그리고 3.5 %이었다. 분리된 균주는 절대 종속영양균이며 탄소원과 에너지원으로서 yeast extract, beef extract, tryptone, peptone, casein 그리고 starch를 이용한다. 황은 생육을 위해 꼭 필요하며 전자 수용체로 작용하여 황화수소로 전환된다. 분리된 균주의 G+C content는 52.0 mol%이다. 16S rRNA 염기서열을 토대로한 계통분석은 균주 NA1$^{T}$가 *Thermococcus* 속(genus)에 속하며, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermococcus peptonophilus* 그리고 *Thermococcus celer* 종들과 가장 가까운 것으로 나타났다. 그러나 DNA-DNA hybridization 분석에 의한 분리된 균주와 이들 종들의 상동성은 적은 것으로 관찰되었다. 따라서 분리된 균주 NA1$^{T}$는 연구선 온누리호 명을 이용하여 *Thermococcus onnurineus* 라 명명하였다. 타입균주는 NA1$^{T}$이며 KCTC 10859$^{T}$, JCM 13517 $^{T}$ 기탁번호을 받았다.

2. 초고온성 미생물 유전체 해독

- 서태평양 팩마뉴스 열수구에서 분리된 고세균 NA1은 16S 라이보좀 RNA 유전자 염기서열에 기초하여 *Thermococcus* 속에 속함을 알 수 있었다. 이속에 속하는 균주들은 열수구 환경 특히 해양열수구에 광범위하게 서식하는 종으로 알려졌다. 분리된 균주는 혐기적 조건에서 섭씨 80도에 잘 자라는 미생물로 단백질 분해산물인 펩타이드를 에너지원으로 잘 이용하였다. 이 균주의 genomic DNA를 추출하였고 이로부터 대량염기서열 결정을 위한 두 종류의 즉 short insert DNA(2-10 kb)와 large insert DNA(30-40 kb) 라이브러리를 구축하였다. 구축된 라이브러리를 이용하여 약 20 mb에 해당하는 염기서열을 얻고 어셈블리를 시도하였다. 결과적으로 형성된 NA1 게놈의 크기는 여러 contig 합인 약 1,850,000 bp로 판단되었다. 이 게놈의 GC 함량은 51.85%이었으며 유전체 정보 분석을 통해 유전자로 예측되는 ORF 1,980 여개를 확인하였다.

3. 극한 효소 유전자 발굴

- *Thermococcus* NA1 균주의 유전체 결과에서 예측된 유전자들로부터 유용성 검색을 실시하였다. 유용성이 있다고 판단된 후보 유전자 7 종 즉, putative aminopeptidase

P(APP), α-amylase, thermostable carboxypeptidase 1, DNA ligase, thermostable DNA polymerase, methionyl aminopeptidase, prolyl oligopeptidase(POP) 효소를 코딩하는 ORF들을 선별하고 서열 비교를 실시하였다. PCR 방법으로 유전자를 얻고 대장균의 발현 벡터에 클로닝하였다. 발현된 재조합 단백질효소를 분리하고 각각의 활성을 조사하고 활성도, 특이성, 열안정성 등을 비교하였다. 그리고 유전체의 정보를 분석하기 위해 유전체가 해독된 종으로 가장 가까운 균주인 종인 *T. kodakaraensis* KOD1의 결과와 비교 분석을 진행하고 있다.

4. 극지동물 유전체 분석

- 남극 성게, *Sterechinus neumayeri*는 12SrDNA-tRNA(gln)과 COI 유전자의 염기서열을 이용한 분자계통 분석에서 남미 대륙의 *Loxechinus albus* 성게와 공통조상에서 분화된 것으로 드러났다. 종분화 시기는 약 2천4백만년에서 3천4백만년 전으로 추정되었다. 이 성게의 유전자가 배아 단계에서 분석되어 약 1000여개의 ESTs가 확보되었다. 확보된 유전자 중에는 epoxide hydrolase, caspase, catalase, phenylpyruvate tautomerase, MAGO-NASH protein, antibacterial peptide 등 유용유전자가 다수 포함되어 있어 산업적 활용성이 크게 예상된다. 북극해 성게 중에는 북극가시성게, *Strongylocentrotus droebachiensis*가 대상이 되어 그 분자계통과 발현유전자가 분석되었다. 북극가시성게는 우리나라 연안에 서식하는 새치성게와 진화적으로 가까우며 약 400만-1000만년 전에 공통조상에서 분화되었다. 북극가시성게의 유전자는 내장기관에서 발현되는 것들이 약 2000여개 분석되었다. 이 중에는 lipase, beta-glucan endohyrolase, phospholipase, carbonic anhydrase I, ketol-acid reductoiso- merase, DNase I, acetylcholine esterase 등 다수의 효소단백질이 포함되어 있다. 본 연구에서 분석된 극지 곤충은 남극에 서식하는 원시곤충 *Cryptopygus antarcticus*로서 이 종의 미토콘드리아 유전체와 발현유전자가 연구되었다. 미토게놈은 총 약 15kb의 염기서열 중 13kb가 현재까지 밝혀졌으며, 이를 근거로 한 분자계통 분석에서 *C. antarcticus*는 *Folsomia candia, Folsomia bisetosa* 등과 진화적 유연관계가 가까운 것으로 드러났다. 이 극지 곤충에서 발현되는 유전자가 약 2000여개 확보되었으며, 이 유전자 목록에는 delta-9 desaturase, mannosidase, endo-glucanase, trypsin, delta-5 desaturase, laminarinase 등의 효소단백질 유전자와 interneukin-4, neuropeptide-like protein, lipocalin 등이 포함된다. 이들은 생물산업적, 의학산업적 활용성이 높을 것으로 예상된다.



5. 어류 유용유전자 확보

- 어종별 DNA 시료확보 및 유전적 특성 분석; 참돔, 감성돔, 조피볼락, 볼락의 생육특성에 관한 자료를 수집하였고, 혈액으로부터 genomic DNA를 분리·정제하여 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 분석을 실시하였다. 200개의 random primer를 사용하여 참돔의 유전적 특성을 조사한 결과, 뚜렷한 다형성을 나타내는 19개의 random primer로부터 76개의 다형단편을 확인하였다. 참돔을 비롯하여 감성돔, 볼락, 조피볼락의 기초적인 유전적 특성을 분석한 결과, 각 어류의 개체간 변이율이 높았으며, 특히 한국해양연구원에서 선발하여 관리하고 있는 참돔 선발집단 특이적인 다형도 확인되었다. 참돔 *LPL* 유전자 내의 다형성을 탐색하고 분석한 결과, *LPL* 유전자의 exon 2번을 포함하는 영역에서 3개의(*Msp* I, *Alu* I 및 *Hsp*92 II) 다형성을 확인하였다. *Msp* I 다형성은 2,235번의 염기 C가 G로 transversion이 되어 절단되지 않는 형태의 유전자형이 존재하였으며, 2개의 대립 유전자에 의해 3개의 유전자형을 확인하였고, 유전자형의 빈도가 집단 간에 뚜렷한 차이를 보였다. 한국산 선발집단 및 일본 양식집단에서 *Alu* I 다형성을 분석한 결과, 3곳의 염기치환으로 인한 5개의 대립유전자(A, B, C, D, 및 E) 및 12개의 유전자형 빈도에 있어 집단간에 뚜렷한 차이를 나타냈으며, 1,727번 염기가 A→G, 2,319번 염기가 C→T 그리고 2,362번 염기가 T→C로 모두 transition이 일어난 형태이었다. 12개의 유전자형 중 AC와 BD는 절단된 단편의 크기가 동일한 것으로 인하여 PCR-RFLP 패턴으로는 구분이 불가능하였다. 한국산 선발집단에서는 빈도에 있어 차이를 보이지만, 5개의 대립유전자가 발견되었고, 12개의 유전자형이 존재하는 것을 확인하였다.

- 어류의 기능성 유전자 탐색; 어류의 성장 관련 기능성 유전자를 탐색하기 위하여 6개월령 및 18개월령 볼락 근육조직을 사용하여 subtracted cDNA library 제작하였다. 6개월령(6M-18M) 및 18개월령(18M-6M) 특이적인 cDNA library를 구축하였다. 6M-18M 및 18M-6M subtracted cDNA library를 screening 하여 6개월령 및 18개월령 볼락 근육조직에서 특이적으로 발현되는 것으로 추정되는 202개의 cDNA clone을 확보하였다. 볼락의 성장단계(6-18-30-42개월령)에 따른 발현양상을 조사하였다. Subtracted cDNA library로부터 선발한 49개의 cDNA clone 중 발현량 차이가 뚜렷한 clone의 발현양상을 semi-quantitation으로 비교분석 한 결과, dot blot analysis로 확인한 발현양상 결과와 다른 clone도 존재하였다. RT-PCR 분석에서 발현량이 많았던 유전자에 대해서 northern hybridization으로 발현양상을 재확인한 결과, RT-PCR 분석결과와 크게 다르지 않았다. 또한 ACP-based GeneFishing™ PCR 방법으로 Arbitrary ACP 100개를 screening하여 6개월령 특이적인 DEG 22개와 18개월령 특이적인 43개의 DEG를 확보하였다. 각 DEG의 염기서열을 분석한 결과, 밝혀진 유전자는 근육형성에 관련된 유전자이

었고, 대부분은 기능과 이름이 밝혀지지 않은 유전자들이었다. DEG60은 6개월령과 18개월령 간 발현량 차이가 뚜렷하지 않았고, 볼락이 성장함에 따라 근육조직에서 발현량이 감소하는 양상을 나타냈다. DEG의 염기서열을 근거로 5′ 및 3′ RACE를 실시하여 볼락의 parvalbumin 유전자를 cloning하였고, cDNA 전체 염기서열을 분석한 결과, 볼락 parvalbumin mRNA의 크기는 659bp이었으며, 110개의 아미노산을 암호화 할 것으로 추정되었다.

6. 신규 해양천연물 분리

- 육상에 비해 극한 환경에 서식하는 해양생물은 종의 다양성 측면에서 생명공학연구의 무한 가능성을 가진 보고이다. 따라서 해양생물의 대사물질에 관한 연구는 학문적, 산업적인 면에서 아주 중요하다. 본 연구는 우리나라와 남태평양의 마이크로네시아 축주 연안에서 채집한 해양 생물로부터 생리활성물질을 분리하여 화학구조를 분석하고, 이의 응용성을 타진하는 것을 목적으로 하였다. 아울러 이 과정에서 극한 환경에 서식하는 해양생물의 대사물질에 관한 생물학적, 화학적 기술의 향상, 특히 복잡한 유기물질의 분리 및 구조결정, 천연물의 구조변환 등의 기술의 향상이 중점적으로 추구되었다. 우리나라 동해의 여러 지역, 마이크로네시아의 축주 인근 도서 등에서 해조류 및 저서군체동물 시료를 채집하였다. 특히 2003년과 2005년에 마이크로네시아에서 채집한 열대 해양생물시료는 국내에서 구하기 어려운 시료들로서 현지에서 동결건조 후 국내 반입되었다. 이들 시료로부터 조추출물을 얻은 후 생리활성 검색 결과를 바탕으로 연구대상 시료를 선정하였고, 선정된 시료에 대하여 다양한 크로마토그래피 기법을 사용하여 이차대사물질이 분리하였다. 해조류와 해면으로부터 분리된 신물질의 구조가 분광학과 화학적 방법에 의하여 규명되었다. 해면에서 유래한 생리활성 퀴논계 화합물에 대하여 구조를 변환시켜 유도체를 합성하였다.

본 연구사업의 수행을 통하여 해양생물시료의 채집, 천연물의 분리정제 및 구조결정, 유도체의 합성 등 일련의 천연물 연구를 수행할 수 있는 역량을 키웠다. 본 연구사업으로 개발된 기술과 정보는 관련 분야의 연구에 활용될 것이다. 특히 해양천연물이 갖는 생리활성은 생화학 또는 의약학 분야의 연구에 중요한 정보가 될 것이다. 아울러 본 연구사업 중 채집된 해양생물 시료는 향후 해양생명공학 연구의 중요한 소재로 사용될 수 있으며, 천연물의 관련 정보는 신물질의 산업적 개발 연구를 위한 우수한 소재가 될 것이다.



7. 항동결물질 분리

- 이 연구는 2000년 남극 하계연구 기간 동안 채집한 *Porosira pseudodenticulata* (Hust.)에 대한 기초적인 생리실험과 유사결빙방지 물질의 확인에 관한 것이다. *Porosira pseudodenticulata*의 필수 성장 영양염으로서 질산염과 인산염이 요구됨을 관찰하였고 규산염은 다른 종들과 비교시 제한요소로 작용하지 않았다. 또한 이 종은 유사결빙방지 물질을 분비할 것으로 예상된다.

8. 해양생명공학 국내외 연구 동향 및 정책 제언

- 해양생명공학기술은 인구증가와 경제성장으로 인하여 발생되는 식량문제, 에너지 수급의 불균형, 환경파괴와 오염문제 등을 해결할 수 있을 뿐 만 아니라 산업과 연계시킴으로서 국가 경제력을 견인할 수 있는 중요한 해양과학기술이다. 전문기관(DRI)에 의하면 2010년 세계 생명공학의 시장규모는 1,540억불을 상회할 것으로 예측하고 있다(연평균 11%의 성장률을 가정). 따라서 해양생명공학의 시장을 선점하기위한 각국의 R&D 투자가 증가하고 있는 추세이다.

- 해양생명공학 연구의 기반이 취약한 국내에서 연구 활성화를 위해서는 다음과 같은 전략이 필요하다. 첫째, 국가적 지원정책을 통해 벤처 기업을 활성화 시키고, 민간자본의 투자 유인을 통하여 연구개발투자규모를 확대시킨다. 둘째, 경제적 파급효과가 큰 해양생명공학기술개발의 집중투자와 관리를 통해 해양생명공학의 시장을 확장시킨다. 셋째, 해양생명공학산업의 확장으로 생긴 이익의 일부는 해양생명공학의 기초기술에 지속적으로 투자함으로써 장기적 경쟁력을 제고 한다. 넷째, 연구결과의 성과확산을 극대화시키기 위하여 법률자문, 특허대행과 같은 연구지원시스템을 구축한다. 다섯째넷째, 우수인력 확보와 육성을 위한 인센티브제도, 교육프로그램개발 등과 같은 제도를 마련한다.

# V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통해 확보된 유전체자원 및 정보 결과는 유전자 기능예측 및 확인 연구, 마이크로어레이를 이용한 유전자 기능분석을 통해 고온에서의 생명현상 규명에 활용될 예정이다. 그리고 국내에서는 처음으로 초고온성의 극한미생물을 분리, 배양하는 기술을 확보하여 극한미생물 기반을 마련한 계기가 되었고, 국내 최초의 고세균 유전체 해독 사례가 되며, 향후 유전자예측을 통해 유용유전자를 발굴하여 클로닝, 발현, 특성분석을 통

해 정밀화학, 생물공정, 분자연구재료 개발 등에 이용될 수 있을 것이다.

극한생물의 무척추동물 유전체 분석 및 유전자원 개발 분야에서 확보된 유용유전자는 재조합단백질의 대량 생산을 통해 산업적으로 활용될 예정이다. 재조합단백질의 발현에 대장균과 같은 기초적인 발현시스템뿐만이 아니라, 분자농장(molecular farming) 기술에서 이용하는 식물체 발현시스템도 이용한다. 한편, Mannanase, glucanase 등 다당류의 분해에 작용하는 효소단백질의 유전자는 미세조류 발현시스템으로 발현이 이루어진 후 그 단백질이 동물 사료첨가제나 세제첨가제로 활용될 수 있다. 극지 생물에 얻은 유용유전자의 정보는 이 밖에도 분자셔플링 기술이나 펩타이드 합성 등 다양한 방법으로 활용되어 바이오신소재 개발의 소재로 활용될 것이다. 또한 극지생물에서 확보된 저온 활성 효소유전자 (aqualysin, glucanase, mannosidase, desaturase, trypsin 등)로부터 재조합단백질을 생산하여 산업적으로 활용할 계획이며, 또한 저온 대사물질 유전자(neuropeptide, lipocalin, interleukin4 등)를 활용하여 재조합단백질을 생산하고 그들의 유용성을 조사할 예정이다.

어류의 성장관련 유전자의 특성을 분석하여 기능이 밝혀지지 않은 유전자의 기능을 해석하고 확보한 유전자를 이용하여 양식대상 어종 및 열대서식어류 등 특정수온서식 어종을 대상으로 비교분석하는 연구방향으로 공동연구 확대를 계획하고 있다.

해양생물시료는 향후 대규모의 신물질 개발연구와 post-genome 시대의 chemical 또는 biological library를 만들기 위한 소재로 사용가능하며, 본 연구에서 분리된 다수의 생리활성 물질은 향후 산업적 신물질 개발을 위한 연구에 활용될 수 있다.

# S U M M A R Y

## I. Title

- Development of Genetic Resources and biomaterials from Extreme Environment

## II. The aim of the project

- Marine environment is a great biological resource, retaining biological diversity covering all taxa of Eucarya, Bacteria, and Archaea. It is estimated over billion species consist of marine ecosystem, and it has been reported that the proportion of carbon mass of Marine prokaryotes were corresponding to 55~85% of whole carbon mass on earth. The marine bio-resources are of value due to the novelty of genetic information as well as the functionalityof new life forms.

Since the genomic sequence of Haemophilus influenzewas determined in 1995, the biotechnological researches opened a new era and drawed much attention worldwide, which led to R&D activities for developing useful bio-resources by the help of the state of the art technology.Many countries are investing competitively a lot of money into the biotechnological research to collect bio-resources and develop useful material. In this circumstances, a genome sequencing technique, more efficient high-throughput screening technique, and the technique for screening new genes are on demand. The recent advances in fine chemistry allowed researches to develop a new material of high value from various bio-resources including marine organisms, and a lot of research activities to develop new medical or pharmaceutical products such as anti-viral, anti-bacterial and anti-cancer from marine bio-resources are under process. In spite of the short history of R&D activity of marine bio-resources, marine bio-resources may give more probability than that of terrestrial bio-resources.

Organisms in extreme environments have evolved through adaptation to their unique habitats in the earth and thus developed valuable genetic repertoire. As the bio-technology is considered as one of the major driving force for economic growth in the next century, international competition to secure bio- and genetic resources becomes harsher. Korea needs to utilize the arctic and antarctic research stations in order to develop new bio-/genetic resources, which will enhance competitiveness of national biological industries. In the theme of genome analysis and genetic resource securement of extreme environment invertebrates, we aim to analyze in mass the expressed sequence tags (ESTs) of an antarctic sea urchin, Sterechinus neumayeri, an arctic sea urchin, Strongylocentrotus droebachiensis, and an antarctic collembola hexapod, Cryptopygus antarcticus and to secure some low-temperature adapted genes for industrial application.

The leading research groups using marine bio-resources raised several issues to maximize the efficiency of developing useful biomaterials such as the share of world-wide cruz program, a systematic storage of marine bio-resources, development of efficient screening system, and so on. Especially, judging from the impact of biotechnology on the economy in the future, the establishment of bio-resource libraries collected from diverse marine environment and the development of efficient screening technique are much on demand.

In this respect, the aims of this project are as follows.

Firstly, the whole genome sequencing of a marine extremophile, the systematic storage and management of marine bio-resources including genetic material, high-through put screening of valuable genes will be carried out and the established techniques will be applied to the various R&D activities related to the development of useful material from marine bio-resources.

Secondly, new useful materials will be developed through the development of pharmaceutical compound from marine invertebrates, screening antioxidants and screening new enzymes from extremophiles.

## III. Scope of the study

**1. Isolation of A Hyperthermophilic Archaeon**

- Isolation and cultivation of a hyperthermophilic archaeon
- Characterization and taxomomy of a hyperthermophilic archaeon, NA1

**2. Genomics on a Hyperthermophilic archaeon**

- Construction of libraries
- Mass sequencing
- Anaysis of a hyperthermophilic archaeal genome

**3. Characterization of Extreme Enzymes**

- Archaeal genes encoding enzymes
- Expression and characterization of extreme enzymes

**4. Genome analysis and genetic resource securement of extreme environment invertebratess**

- Analysis of ESTs and characterization of evolutionary history with the antarctic sea urchin, *Sterechinus neumayeri*
- Analysis of ESTs and characterization of evolutionary history with the arctic sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*
- Analysis of ESTs and mitochondrial genome with the antarctic hexapod, *Cryptopygus antarcticus*

**5. Characterization And Identification Of Functional Genes Of Marine Fishes**

- Habitability and genetic characterization of commercial marine fishes
- Determination of the fishes for a functional gene analysis
- Search and identification of the functionl gene
- Characterization and application of the functional gene

**6. Novel Marine Natural Products**

- Collection of marine organisms
- Bioassay of organic materials
- Isolation and chemical analysis of novel Organic materials

**7. Marine Antifreezing Protein**

- Screening of polar microalgae producing ice-binding protein
- Physiological anaylsis of an antifreeze like ice-binding molecules

**8. Policy and Study Trends in Marine Biotechnology**

- Definition of marine biotechnolgy



- International and national policies in marine biotechnolgy

## IV. Results

**1. Isolation of A Hyperthermophilic Archaeon**

- A novel hyperthermophilic, anaerobic, heterotrophic archaeon, strain NA1$^{T}$, was isolated from a deep-sea hydrothermal vent area (depth, 1650 m) on the Pacmanus field. Cells of this strain were motile by means of polar flagella, coccoid-shaped of approximately 0.5-1.0 ㎛ in diameter and occurred as single cells. Optimal temperature, pH, and NaCl concentration for growth are 80℃, pH 8.5, and 3.5%, respectively. The new isolate was an obligate heterotroph and utilized yeast extract, beef extract, tryptone, peptone, casein and starch for as carbon and energy source. Elemental sulfur was required for growth and was reduced to hydrogen sulfide. The G+C content of the genomic DNA was 52.0 mol%. Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequences indicated that the strain NA1$^{T}$ belongedto the genus *Thermococcus*, and the organism was most closely related to *Thermococcus gorgonarius*, *Thermococcuspeptonophilus*, and *Thermococcus celer*. However, no significant homology was observed between them by DNA-DNA hybridization. Strain NA1$^{T}$therefore represents a novel species, for which the name *Thermococcus onnurii* sp. nov. is proposed. The type strain is NA1$^{T}$(=KCTC 10859$^{T}$, =JCM 13517 $^{T}$).

**2. Genomics on a Hyperthermophilic archaeon**

- An extremely thermophilic archaeal strain, NA1 was classified into be a member of genus *Thermococcus* by 16S rRNA gene sequences. It has been known that the members of *Thermococcus* are ubiquitously present in thermal ecosystems, especially in marine environnments. The NA1 strain was able to grow anaerobically at a hyperthermophilic range (70 - 90℃) by reducing sulfur. We have carried out the whole genome shotgun sequencing of the *Thermococcus*sp. NA1 to search for thermostable enzymes and to understand the physiological characteristics of hyperthermophilic archae. The genome was composed of a single circular chromosome of which size and G+C content to be 1,846,670 bp and 51.85%, respectively. These

values were very similar to those of typical *Thermococcus* species. The ORF prediction revealed that the NA1 genome contains annotatable 1,983 ORFs.

### 3. Characterization of Extreme Enzymes

- Genomic analysis of a hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. NA1 revealed the presence of several ORFs, encoding proteins such as putative aminopeptidase P (APP), α-amylase, thermostable carboxypeptidase 1, DNA ligase, thermostable DNA polymerase, methionyl aminopeptidase, and prolyl oligopeptidase (POP). Those genes encoding hyperthermophilic enzymes were cloned, expressed and characterized. And the comparative genomics is under way by comparison with the nearest neighbor, *T. kodakaraensis* KOD1 whole genome sequence was determined recently.

### 4. Genome analysis and genetic resource securement of extreme environment invertebratess

- Molecular phylogenies of 12SrDNA-tRNA(gln) and COI genes reveal that the antarctic sea urchin, *Sterechinus neumayeri* diverged from the common ancestor with an South American sea urchin *Loxechinus albus*. Their divergence could have occurred 24 to 34 million years ago. From the embryos of the antarctic sea urchin, about 1000 ESTs are analyzed, within which a number of useful genes such as epoxide hydrolase, caspase, catalase, phenylpyruvate tautomerase, MAGO-NASH protein, antibacterial peptide are included. The arctic sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis* turns to be a close relative to *S. intermedius,* a dominant species in the East Sea. They could have diverged 4-10 million years ago. About 2000 ESTs are analyzed from the intestine of the arctic sea urchin. They contain a variety of enzyme genes of lipase, beta-glucan endohyrolase, phospholipase, carbonic anhydrase I, ketol-acid reductoisomerase, DNase I, acetylcholine esterase. The mitogenome of the antarctic collembola hexapod, *Cryptopygus antarcticus* is almost determined: about 13kb out of a total of 15kb DNA is analyzed. In the mtDNA molecular phylogeny, the species locates its position close to *Folsomia candia* and *Folsomia bisetosa*. Within approximately 2000 ESTs obtained from the collembola, a number of enzyme genes and biomedically applicable genes such as delta-9 desaturase, mannosidase, endo-glucanase, trypsin, delta-5 desaturase, laminarinase, interneukin-4, neuropeptide-like protein, and lipocalin are included.



### 5. Characterization and Identification of Functional Genes of Marine Fishes

- Genomic DNA samples were obtained from several commercial fishes. To obtain growth-related functional genes, genetic variation of red sea bream, *Pagrus major* was examined by RAPD-PCR and analyzed polymorphism of *LPL*(lipoprotein lipase) gene. Seventy-six reproducible RAPD fragments, generated by 19 random primers, were polymorphic. The three polymorphisms observed analyzing a DNA fragment(1,091bp) including exon 2 region of the *LPL* gene, and difference of allele frequencies was significant among red sea bream groups.

Using subtractive hybridization and ACP-base PCR on skeletal muscle of dark-banded rock fish, *Sebastes inermis* many novel growth-related genes were cloned. We determined the nucleotide sequence of these clones and identified individual sequences. We verified the level of expression of the growth-related genes during the growth stages using a semiquantitative RT-PCR approach and quantitation real-time PCR. As expected, all of the selected clones showed their specific expression patterns during growth stage. Some clones and DEGs that specific expression pattern during the growth stages were further analysed by northern blot analysis and tissue-specific expression patterns. To understand the mechanisms of regulation of parvalbumin gene expression in skeletal muscle, full cDNA of parvalbumin gene by 5′-rapid amplification of cDNA ends(RACE) analysis. 5′RACE analysis revealed that parvalbumin consists of 659bp and one intact open reading frame which encode a polypeptide with 110 amino acid residues. Characterizing of the role of these growth-related genes including parvalbumin gene will be important to increase our development of the application program that apply the functional genes.

### 6. Novel Marine Natural Products

- A study on metabolites of marine organisms has importance on both academic and industrial fields. The objective of this project is the isolation and structural elucidation of bioactive compounds from marine organisms. In addition, improvement on the biological and chemical techniques dealing with marine organism and their metabolites is also studied such as isolation and structure determination of organic molecules and screening methods for bioactivity.

Marine organisms have been collected from various locations of Korea and Micronesia. Primary target organisms for chemical investigation have been selected by combined results of chemical analysis and bioassay screening of the crude extracts. Organic materials have been extracted from the selected organisms. Bioactive secondary metabolites have been isolated by utilizing various chromatographic techniques. The structures of natural products have been determined by combined chemical and spectroscopic methods.

In conclusion, this study has successfully demonstrated the biotechnological potential of marine organism of Korean and tropical waters. In the meanwhile, this study has built research capacity for extensive chemical and biochemical investigation of marine organisms. This project provides not only materials for industrial development but also technical basis for the advanced research on marine biotechnology.

### 7. Marine Antifreezing Protein

- We performed the basic physiological experiments and identified the antifreeze like ice-binding molecules (IBMs) on *Porosira pseudodenticulata* at the summer season in Antarctica, 2000. The growth rates of this species were increased adding nitrate and/or phosphorus nutrients. However, no astonishing change of *P. pseudodenticulata* growth rates was not detected putting silicates. In addition, this species were predicted to release the IBMs.

### 8. Policy and Study Trends in Marine Biotechnology

- Marine biotechnology(MBT) is considered as an important marine technology(MT) not only to solve shortage of food and energy, destroy of environment, pollution problem, etc. due to increase in population and economic growth but also to increase nation's competitive power as to connect with industry.

- According to DRI, the forecast for market size of biotechnology(BT) will be around $ 154 billion when it is assumed that average annual growth rate of BT is 11 percentage. Thereby, the R&D investment of each nation is increased to do prior occupation for a marine MBT market.

- The strategies of nation level is required to dynamize a research for MBT as follows: 1) bring venture companies up through a supporting policy, and expand R&D



investment by participation of private sector, 2) extend a market of MBT by as concentrated investment and management of MBT development, which has huge impact of forward and backward industries, 3) increase a long-term competitive power by re-investment of partial profits gained from MBT market to basic MBT research, 4) maximize a spread of research results through establishing research supporting system such as legal advice and patent administration, and 5) acquire and bring up man power for MBT by preparing a incentive system and training program.

## V. The future plan

The information on the whole genome sequencing will be further applied to the study related with the functional analysis of the genetic information, the transcriptome analysis of the hyperthermophile to understand the mechanism how the hyperthermophile can survive in such a high temperature. This result is the first case of isolating and cultivating a hyperthermophile in Korea and also the first case of determining whole genome sequence of a hyperthermophile. Accordingly, the information will be analyzed by bioinformatic technique and useful enzymes will be developed by conventional genetic engineering.

The low-temperature adapted enzyme genes and biomedically applicable genes obtained from the study of genome analysis and genetic resource securement of extreme environment invertebrates will be utilized for biotechnological application. The genes are to be recombined with expression vectors for mass production of the proteins. As for expression systems, not only the basic *E. coli* system but also a plant system using molecular framing technology will be applied. Carbohydrate-degrading enzyme genes such as mannanase and glucanase genes will be incorporated into microalgae and their expressed enzymes be used as additives to animal food and the detergent. Other than these direct uses of the genes, the genetic information of the arctic and antarctic organisms can be used in gene shuffling and peptide synthesis for development of new bio-materials. The psychrophilic genes collected from artic or antartic (aqualysin, glucanase, mannosidase, desaturase, trypsin etc) will be genetically engineered and the recombinant proteins will be produced. In addition, the recombinant neuropeptide, lipcalin, and interleukin 4 will be also purified and the bioactivity of those will be tested.

The functional analysis of unknown genes related with the growth of fish and

the information will be applied to the study on fishery

The collected bio-resources will be stored systematically and used for the study of developing a new bio-material. The bio-materials will be further tested whether it can be suitable for the market and get patented.

Keywords : Marine genomics, Hyperthermophilic archaeon, Extreme organisms, Expressed genes, Extreme enzymes, Molecular phylogenySubtracted cDNA library, Differentially expressed gene (DEG), Marine natural products, Bioactive compounds, Algae, Microalgae, Sponges, Marine biotechnology, Marine biotechnological policy

주요어; 해양 유전체학, 초고온성 고세균, 극한 효소, 극한생물, 발현유전자, 분자계통, 발현차이 유전자 라이브러리, 특이발현 유전자, 해양천연물, 생리활성물질, 해조류, 미세조류, 해면동물, 해양생명공학, 해양생명공학정책

# C O N T E N T S

List of Tables ····· 27

List of Figure ····· 31

**Chapter I Introduction** ····· 43

Section 1 Necessity of the Project ····· 43

Section 2 The aims of the Project ····· 50

Section 3 Research Contents and Range ····· 52

**Chapter II State of the Art** ····· 57

Section 1 Domestic State of the Art ····· 57

Section 2 Overseas State of the Art ····· 60

**Chapter III Results** ····· 71

Section 1 Isolation of Hyperthermophiles ····· 71

Section 2 Genomics on a Hyperthermophilic Archaeon ····· 81

Section 3 Characterization of Extreme Enzymes ····· 110

Section 4 Genome analysis and Genetic Resource Securement of Extreme Environment, Invertebrate ····· 186



Section 5 Characterization and Identification of Functional Genes of Marine Fishes ····· 220

Section 6 Novel Marine Natural Products ····· 254

Section 7 Marine Antifreezing Protein ····· 325

Section 8 Policy and Study Trend in Marine Biotechnology ····· 333

**Chapter IV Accomplishment and Contribution** ····· 381

Section 1 Accomplishment of this Study ····· 381

Section 2 Contribution of this Study ····· 384

**Chapter V the Future Plan** ····· 393

**Chapter VI Reference** ····· 399

**Chapter VII Consigned Study I** ····· 429

**Chapter VII Consigned Study II** ····· 464

# 목 차

표목차 ····· 27

그림목차 ····· 31

**제 1 장 서론** ····· 43

제 1 절 연구 필요성 ····· 43

1. 초고온성 미생물 확보 ····· 43
2. 초고온성 미생물 유전체 해독 ····· 44
3. 극한 효소 유전자 발굴 ····· 44
4. 극지환경 해양동물 유전체 분석 ····· 45
5. 어류 유용유전자 확보 ····· 46
6. 신규 해양천연물 분리 ····· 46
7. 저온활성물질 분리 ····· 48
8. 해양생명공학 국내외 동향 및 정책 제언 ····· 49

제 2 절 연구 목표 ····· 50

제 3 절 연구 내용 및 범위 ····· 52

**제 2 장 국내외 기술개발 현황** ····· 57

제 1 절 국내 기술개발 현황 ····· 57

1. 고호열성 극한 미생물 연구 ····· 57
2. 초고온성 미생물 유전체 해독 ····· 57
3. 극한 효소 유전자 발굴 ····· 57
4. 극지환경 무척추동물의 유전체 분석, 유전자원 확보 ····· 58
5. 어류로부터 유용유전자 확보 ····· 58



6. 신규 해양천연물 분리 ····· 59

제 2 절 국외 기술개발 현황 ····· 60

1. 초고온성 미생물 확보 ····· 60
2. 초고온성 미생물 유전체 해독 ····· 60
3. 극한 효소 유전자 발굴 ····· 60
4. 극지환경 무척추동물의 유전체 분석, 유전자원 확보 ····· 66
5. 어류로부터 유용유전자 확보 ····· 67
6. 신규 해양천연물 분리 ····· 68

**제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과** ····· 71

제 1 절 초고온성 미생물 확보 ····· 71
1. 연구 재료 및 방법 ····· 71
2. 연구결과 ····· 75
3. 결론 ····· 80

제 2 절 초고온성 고세균 NA1 유전체 해독 ····· 81
1. 연구방법 ····· 81
2. 결과 ····· 85

제 3 절 극한 효소 유전자 발굴 ····· 110
1. 연구 재료 및 방법 ····· 110
2. 연구 결과 ····· 116

제 4 절 극지환경 무척추동물의 유전체 분석, 유전자원 확보 ····· 186
1. 연구 재료 및 방법 ····· 186
2. 연구 개발 결과 ····· 189
3. 결론 및 토의 ····· 193

제 5 절 어류 유용유전자 확보 ····· 220
1. 연구 재료 및 방법 ····· 220

2. 연구 개발 결과 ····· 232
3. 결론 및 토의 ····· 249

제 6 절 신규 해양천연물 분리 ····· 254
1. 연구 재료 및 방법 ····· 254
2. 연구 개발 결과 ····· 254
3. 결론 및 토의 ····· 324

제 7 절 항동결물질 분리 ····· 325
1. 재료 및 방법 ····· 325
2. 결과 및 토의 ····· 326

제 8 절 해양생명공학기술 국내외 연구 동향 및 정책 제언 ····· 333
1. 해양생명공학의 의의 ····· 333
2. 국가별 생명공학 정책 분석 ····· 341
3. 국내 해양생명공학 육성정책 및 현황 ····· 365
4. 국내 해양생명공학 정책 제언 및 토의 ····· 376

**제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도** ····· 381

제 1 절 연구개발목표 달성도 ····· 381
1. 달성도 ····· 381
2. 총연구기간 목표달성도 ····· 383

제 2 절 대외기여도 ····· 384
1. 주요 연구성과의 우수성 ····· 384
2. 연구실적 ····· 386

**제 5 장 연구개발결과의 활용계획** ····· 393
1. 기대효과 ····· 393
2. 활용계획 ····· 395

**제 6 장 참고문헌** ····· 399



**제 7장 위탁과제** ····· 429
1. 해면동물의 천연물화학적 중요성 ····· 429
2. 해면 Pellina sp.의 생리활성물질 ····· 432
3. 결 론 ····· 446
4. 참고문헌 ····· 452

**제 8 장 위탁과제** ····· 464
1. 서론 ····· 464
2. 국내외 기술개발 현황 ····· 465
3. 연구개발 수행 내용 및 결과 ····· 466
4. 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도 ····· 474
5. 연구개발결과의 활용계획 ····· 475
6. 참고문헌 ····· 476

# List of Tables

Table 3-1-1. Physiological characteristics of strain NA1T and its phylogenetic relatives ····· 78
Table 3-2-1. The colony contig on differents library ····· 88
Table 3-2-2. Lists of cell stock plate of cosmid library ····· 88
Table 3-2-3. Lists of cell stock plate of shotgun library ····· 88
Table 3-2-4. The sequencing reaction numbers and average read length. ····· 89
Table 3-2-5. The sequencing results for the first assembly ····· 89
Table 3-2-6. The results of the first assembly ····· 90
Table 3-2-7. Ordered Contig ····· 91
Table 3-2-8. The tRNA scanning results ····· 94
Table 3-2-9. The rRNA length ····· 95
Table 3-2-10. The ORF number and coding region of *Thermococcus* sp. NA1 ····· 98
Table 3-2-11. General Feature of *Thermococcus* sp. NA1 ····· 98
Table 3-2-12. The search results of metabolic pathway ····· 100
Table 3-3-1 Isolation of TNA1_pol from *E. coli* ····· 117
Table 3-3-2 The effect of metal ions and EDTA in TNA_POP ····· 138
Table 3-3-3. Substrate specificity of TNA_CP and P. furiosus CP toward Z-Ala-X substrate ····· 156
Table 3-3-4. The comparison of general biochemical characterization of α-amylase from TNA1_amyl and Thermococcales ····· 176
Table 3-4-1. PCR primers used for the 6kb fragment amplification ····· 196
Table 3-4-2. PCR primers used for the 9kb fragment amplification ····· 196
Table 3-4-3. PCR primers used for the 3kb fragment amplification ····· 196
Table 3-4-4. Some of ESTs of the antarctic sea urchin, Sterechinus neumayeri ····· 197
Table 3-4-5. Some of ESTs of the arctic sea urchin, Strongylocentrotus droebachiensis ····· 199
Table 3-4-6. Some of ESTs of an antarctic hexapod, Cryptopygus antarcticus ····· 201
Table 3-5-1. Setting up the first hybridization ····· 224



Table 3-5-2. Preparation of the primary PCR master mix ····· 225
Table 3-5-3. Preparation of the secondary PCR master mix ····· 225
Table 3-5-4. Sequences of the PCR-selected cDNA synthesis primer, adaptors and target PCR primers ····· 225
Table 3-5-5. Primers for semiquantitative RT-PCR ····· 228
Table 3-5-6. Primers for real time quantitative PCR ····· 231
Table 3-5-7. Primers and primer sequences used for the detection of polymorphisms in red sea bream, Pagrus major ····· 233
Table 3-5-8. Frequency of 10 genotypes obtained with primer OPA-11 in offspring from selected korean, cultured japanese and their reciprocal intraspecific hybrids of red seabream, Pagrus major ····· 237
Table 3-5-9. Allelic fragments in inton 1, exon 2 and intron 2 of the red sea 234 bream LPL gene ····· 238
Table 3-5-10. Allele frequencies of Msp I , Alu I and Hsp 92Ⅱ polymorphisms in inton 1, exon 2 and intron 2 of the LPL gene in four red sea bream groups ····· 238
Table 3-5-11. Putatively identified cDNA clones from the subtracted cDNA library of dark-banded rockfish, S. inermis, skeletal muscle ····· 241
Table 3-5-12. Growth-stage related genes identified in a cDNA library prepared by suppression subtract hybridization using skeletal muscle *S.inermis* ····· 242
Table 3-5-13. Semiquantitative RT-PCR analysis of selected genes ····· 244
Table 3-5-14. Identified skeletal muscle cDNA of dark-banded rock fish that were selected in the ACP-based PCR ····· 247
Table 3-6-1. 13C-and 1H-NMR Data for 99J-6-A and 99J-6-B in DMSO-d6 ····· 287
Table 3-6-2. 13C-and 1H-NMR Data for 980K-17-A and 980K-17-B in CD3OD-d4 ····· 302
Table 3-6-3. Results of antimicrobial tests ····· 314
Table 3-7-1. Chlorophyll a concentrations adding different amounts of each nutrient ····· 328
Table 3-8-1. Definition of Marine Biotechnology ····· 335
Table 3-8-2. Development of Biotechnology ····· 337
Table 3-8-3 Growth rate by industries(1995～2005) ····· 338

Table 3-8-4. Forecast of growth rate in biotechnology industry ····· 338
Table 3-8-5. R&D budget of federal government in the United States340
(2000～2002) ····· 344
Table 3-8-6. Policies for biotechnology by states ····· 348
Table 3-8-7. Research fund for scientific researches in Japan ····· 350
Table 3-8-8. Budget of main 6 agencies in Japan(2005) ····· 350
Table 3-8-9. Number of employees and R&D investment by sector of
biotechnologyin the United Kingdom ····· 354
Table 3-8-10. Support policy for biotechnology in Korea ····· 365
Table 3-8-11. Budget of master plan for biotechnology support ····· 367
Table 3-8-12. Actual budget of MOMAF for marine biotechnology ····· 367
Table 7-1-1. Phyletic distribution of marine natural products - recent trend ····· 430

# List of Figures

Figure 3-1-1. Electron micrographs of strain NA1T ····· 76
Figure 3-1-2. Effects of temperature, pH, and NaCl on growth of strain NA1T ····· 77
Figure 3-1-3. Neighbor-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences, showing relationships between strain NA1T andclosely related taxa ofthe genus *Thermococcus* ····· 79
Figure 3-2-1. The length of the 2kb shogun library ····· 86
Figure 3-2-2. The length of the cosmid library ····· 87
Figure 3-2-3. The 'contig ordering' by using 'Consed' ····· 90
Figure 3-2-4. The methods for the finishing *Thermococcus* sp. NA1 genomics 92
Figure 3-2-5. The gene annotation files provided by Macrogen ····· 96
Figure 3-2-6. The contents of the metabolic Pathway ····· 101
Figure 3-2-7. Genome Browser log in A ····· 104
Figure 3-2-8. Genome Browser log in B ····· 104
Figure 3-2-9. Genome Browser log in C ····· 105
Figure 3-2-10. Zoom in/out in 'Genome Browser' (A) ····· 106
Figure 3-2-11. Zoom in/out in 'Genome Browser' (B) ····· 106
Figure 3-2-12. The search for genes, clone ids, symbols products in 'Genome browser' ····· 107
Figure 3-2-13. Search in 'Genome Browser' ····· 107
Figure 3-2-14. Identification of ORFs information ····· 108
Figure 3-2-15. Circular map ····· 109
Figure 3-3-1. Amino acids sequence comparison of the family B type DNA polymerases from *Thermococcus* sp. NA1 (TNA1), *T. kodakarensis* KOD1(TkKOD1, gi:52696275), *Pyrococcus furiosus* (Pfu, gi:18892147), and *Pyrococcus* sp. GB-D (PGBD, gi:436495) ····· 121
Figure 3-3-2. SDS-PAGE analysis of TNA1_pol ····· 122
Figure 3-3-3. Effect of pH variation on DNA polymerase activity of TNA1_pol. Activity assays were performed under standard conditions with the following buffers (each at 50 mM): MES, pH 6.0 - 7.0; Tris-HCl, pH 7.0 - 9.0; Glycin, pH 9.0 - 10.0 ····· 123
Figure 3-3-4. (A) Effect of temperature variation on DNA polymerase activity and (B) measurement of thermostability of TNA1_pol ····· 124
Figure 3-3-5. The effect of magnesium ions (A), ammonium ions (B), and potassium ions (C) on DNA polymerase activity of TNA1_pol. Activity assays were performed in the presence of various concentrations of $MgCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$, and KCl ····· 125
Figure 3-3-6. Measurement of exonuclease activity of the recombinant TNA1_pol. 3′→5′ exonuclease activity was measured in the absence (○) or presence (●) of dNTPs ····· 126
Figure 3-3-7.(A) Application of the recombinant TNA1_pol to PCR amplification in 20mM MES, 20mM Tris-HCl and 20mM glycine buffer at indicated pHs ····· 127
Figure 3-3-8. Amino acid sequence comparison of the DNA ligases from *Thermococcus* sp. NA1 (TNA1), T. kodakaraensis KOD1 (TkKOD1), *Pyrococcus abyssi* GE5 (PaGE5), and *P. furiosus* DSM3638 (PfDSM3638) ····· 130
Figure 3-3-9. SDSPAGE of the purified enzyme ····· 131
Figure 3-3-10. The effects of (A) pH and (B) temperature on the activities of TNA1_lig. A ····· 132
Figure 3-3-11. The effects of (A) various divalent cations and (B) MgCl2 concentration on the activities of TNA1_lig ····· 133
Figure 3-3-12. The effects of (A) NaCl and (B) KCl concentration on the activities of TNA1_lig ····· 134
Figure 3-3-13. Ligation assay of TNA1_lig in the presence of ATP and NAD+ using a radiolabeled substrate ····· 135
Figure 3-3-14. (A) The determination of cofactor requirement of TNA1_lig, (B) the effect of ATP increase on the activities of TNA1_lig, and (C) the effect of NAD+ increaseon the activities of TNA1_lig ····· 136
Figure 3-3-15. Sequence comparison of the POPs from Thermococcus sp. NA1 (TNA1), *T. kodakarensis* KOD1 189 (TkKOD1, gi:57640358),

*P. abyssi* GE5 (PaGE5, gi:14521352), *P. furiosus* DSM 3638 (PfDSM, gi: 77197) and *P. horikoshii* OT3 (PhOT3, gi:14591079) ····· 140
Figure 3-3-16. SDS-PAGE (12%) of the purified enzyme ····· 141
Figure 3-3-17. The effects of temperature (A) and pH (B) on the activities of TNA1_POP ····· 142
Figure 3-3-18. Effect of temperature on TNA1_POP stability ····· 143
Figure 3-3-19. The effect of increasing substrate concentration on the activity of TNA1_POP ····· 144
Figure. 3-3-20. Sequence comparison of *Thermococcus* sp. NA1 aminopeptidase P (TNA1APP), *E. coli* aminopeptidase P (EcAPP, gi:113751), *P. furiosus* prolidase (PfProl, gi:17380168), and E. coli methionine aminopeptidase (EcMetAP, gi:113740) ····· 148
Figure 3-3-21. SDS-PAGE (12%) of the purified enzyme ····· 149
Figure 3-3-22. The effects of temperature (A) and pH (B, C) on the activities activity of APP ····· 150
Figure 3-3-23. Thermal inactivation of APP ····· 151
Figure 3-3-24. The effects of metal ions on the APP activities. Activity assays were performed under standard conditions while the concentration of divalent metal ions was varied ····· 152
Figure. 3-3-25. The effect of increasing substrate concentration on the activity of APP. ····· 153
Figure 3-3-26. Sequence comparison of the peptidase family M32. Dashes indicate gaps and numbers on the right represent the position of the last residue in the original sequence ····· 158
Figure 3-3-27. SDS-PAGE (12%) of the purified enzyme ····· 159
Figure 3-3-28. The effects of temperature (A) and pH (B) on the activities of TNA1_CP ····· 160
Figure 3-3-29. The effects of metal ions on the activities of TNA1_CP ····· 161
Figure 3-3-30. Effect of temperature on TNA1_CP stability ····· 162
Figure 3-3-31. The effect of increasing substrate concentration on the activity of TNA1_CP ····· 163
Figure 3-3-32. Sequence comparison of the TNA1_MetAP, *Thermococcus kodakarensis* KOD1 (TkKOD1, GenBank accession no. YP_183596), *Pyrococcus abyssi* GE5 (PaGE5, GenBank accession no. NP_127098), Pyrococcus horikoshii OT3 (PhOT3, GenBank accession no. NP_142587), and P. furiosus DSM3638 (PfDSM, GenBank accession no. NP_578270) ····· 168
Figure 3-3-33. SDS-PAGE (12%) of the purified TNA1_MetAP ····· 169
Figure 3-3-34. The effects of temperature (A) and pH (B) on the activities of TNA1_MetAP ····· 170
Figure 3-3-35. Thermal inactivation of TNA1_MetAP ····· 171
Figure 3-3-36. The effects of metal ions on the activities of TNA1_MetAP ····· 172
Figure 3-3-37. The effect of increasing substrate concentration on the activity of TNA1_MetAP ····· 173
Figure 3-3-38. Sequence comparison of the -amylase from *Thermococcus* sp. NA1 (TNA1), *T. kodakarensis* KOD1 (TkKOD1, gi:57641390), and *T. hydrothermalis* (PaGE5, gi:14521082), and P. furiosus (PhOT3, gi:14590819. ····· 178
Figure 3-3-39. Expression of -amylase gene in E. coli (A) and SDS-PAGE of purified enzyme (B) ····· 179
Figure 3-3-40. The effects of temperature (A) and pH (B) on TNA1_amyl activity ····· 180
Figure 3-3-41. Thermal inactivation of α-amylase ····· 181
Figure 3-3-42. The effect of metal ions on -amylase activity ····· 182
Figure 3-3-43. Estimation of kinetic constants using Lineweaver-Burk plot ····· 183
Figure 3-3-44. Thin-layer chromatogram of the products of TNA1_amyl reaction on various substrates ····· 184
Figure 3-4-1 Organisms studied in this study ····· 203
Figure 3-4-2. The flow chart for construction of cDNA library by using Clontech's Creator SMART cDNA Library Construction Kit ····· 204
Figure 3-4-3. 12S rDNA-tRNA(gln) sequences of *S. neumayeri* ····· 205
Figure 3-4-4. The maximum likelihood (ML) tree (1) and the molecular clock-enforced tree (2) of the 12SrDNA-tRNA(gln) sequences from the Antarctic (*S. neumayeri*), the South American (*L. albus andP. magellanicus*), the Mediterranean (*P. lividus*) and three strongylocentrotid sea urchins ····· 207
Figure 3-4-5. COI (A) and 12SrDNA-tRNA(gln) (B) sequences of *S.*

*droebachiensis* ····· 208
Figure 3-4-6. Molecular phylogenies of the Arctic and other related sea urchins ·· 209
Figure 3-4-7. Composition of the Arctic sea urchin ESTs with regards to their molecular functions (A) and their cellular localizations (B) ····· 210
Figure 3-4-8. Long-range PCR products of the antarctic hexapod ····· 211
Figure 3-4-9. A putative gene arrangement in the mitochondrial genome of *Cryptopygus antarcticus* ····· 212
Figure 3-4-10. Sequences of the mitochondrial genome of *Cryptopygus antarcticus*: about 13kb is determined ····· 213
Figure 3-4-11. Phylogenetic trees of the collembola specie, *Cryptopygus antarcticus* based on 518-bp 16SrDNA (A) and 667-bp COI (B) genes ····· 219
Figure. 3-5-1 Schematic diagram of PCR-selected cDNA subtraction ····· 224
Figure 3-5-2. RAPD profiles for the detection of polymorphisms in red sea bream, Pagrus major by using random primers ····· 233
Figure 3-5-3. RAPD profiles for the detection of polymorphisms in red sea bream, Pagrus major by using random primers OPG-07, OPGB-15, OPG-20, OPH-14, OPI-07 and OPI-08 ····· 234
Figure 3-5-4. RAPD profiles for the detection of polymorphisms in red sea bream, Pagrus major by using random primers OPI-19, OPI-20, OPJ-01, OPJ-03, OPJ-11 and OPJ-14 ····· 234
Figure 3-5-5. RAPD patterns of 10 genotypes (a,b,c,d,e,f,g,h,I and j) within the red sea bream, Pagrus major obtained with primer OPA-11 ····· 235
Figure 3-5-6. Nucleotide sequences of the polymorphic DNA fragments, 619bp and 647bpobtained with primer OPA-11 ····· 235
Figure 3-5-7. PCR-RFLP patterns in inton 1, exon 2 and intron 2 of the red sea bream LPL gene ····· 236
Figure 3-5-8. The diagram outlines the partial genomic structure of the red sea bream LPL gene including parts of intron 1, exon 2 and intron 2 as amplified by PCR ····· 237
Figure 3-5-9. Results of the dark-banded rockfish(S. inermis ) skeletal muscle subtraction according to the Suppression Subtractive Hybridization ····· 239
Figure 3-5-10. Differential screening results of dark-banded rockfish (S. inermis) skeletal muscle subtracted cDNA libraries ····· 240
Figure 3-5-11. Northern blot analysis of differential expressed genes in various growth stage of dark-banded rockfish (S. inermis) skeletal ] muscle ····· 245
Figure 3-5-12. Results of ACP-based PCR for identification of differentially expressed genes (DEGs) from two developmental stages of the dark-banded rockfish ····· 246
Figure 3-5-13. Relative gene expression measured by quantitative RT-PCR. ····· 248
Figure 3-5-14. Tissue-specific expression patterns of DEGs in dark-banded rock fish. M, skeletal muscle; L, liver; K, Kidney, S; spleen ····· 248
Figure 3-5-15. Complete cDNA and predicted amino acid sequencd of dark-banded rock fish parvalbumin ····· 249
Figure 3-6-1. Examples of bioactive natural products from brown algae ····· 257
Figure 3-6-2. Proton NMR spectrum of 00KH-12-A ····· 260
Figure 3-6-3. Carbon NMR spectrum of 00KH-12-A ····· 261
Figure 3-6-4. Proton NMR spectrum of 00KH-12-B ····· 262
Figure 3-6-5. Carbon NMR spectrum of 00KH-12-B ····· 263
Figure 3-6-6. Proton COSY spectrum of 00KH-12-B ····· 264
Figure 3-6-7. Gradient HSQC spectrum of 00KH-12-B ····· 265
Figure 3-6-8. Gradient HMBC spectrum of 00KH-12-B ····· 266
Figure 3-6-9. Examples of bioactive natural products from sponges ····· 269
Figure 3-6-10. Proton NMR spectrum of 03CH-10-A ····· 273
Figure 3-6-11. Carbon NMR spectrum of 03CH-10-A ····· 274
Figure 3-6-12. Proton COSY spectrum of 03CH-10-A ····· 275
Figure 3-6-13. Gradient HSQC spectrum of 03CH-10-A ····· 276
Figure 3-6-14. Gradient HMBC spectrum of 03CH-10-A ····· 277
Figure 3-6-15. Proton NMR spectrum of 03CH-10-B ····· 278
Figure 3-6-16. Carbon NMR spectrum of 03CH-10-B ····· 279
Figure 3-6-17. Proton COSY spectrum of 03CH-10-B ····· 280
Figure 3-6-18. Gradient HSQC spectrum of 03CH-10-B ····· 281
Figure 3-6-19. Gradient HMBC spectrum of 03CH-10-B ····· 282
Figure 3-6-20. The structure of 99J-6-A ····· 285
Figure 3-6-21. The structure of 99J-6-B ····· 285
Figure 3-6-22. 1H-1H and 13C-1H correlation of 99J-6-A ····· 286
Figure 3-6-23. Proton NMR spectrum of 99J-6-A ····· 288
Figure 3-6-24. Carbon NMR spectrum of 99J-6-A ····· 289
Figure 3-6-25. Proton COSY spectrum of 99J-6-A ····· 290
Figure 3-6-26. Gradient HSQC spectrum of 99J-6-A ····· 291

Figure 3-6-27. Gradient HMBC spectrum of 99J-6-A ····· 292
Figure 3-6-28. ROESY spectrum of 99J-6-A ····· 293
Figure 3-6-29. Proton NMR spectrum of 99J-6-B ····· 294
Figure 3-6-30. Carbon NMR spectrum of 99J-6-B ····· 295
Figure 3-6-31. Proton COSY spectrum of 99J-6-B ····· 296
Figure 3-6-32. Gradient HSQC spectrum of 99J-6-B ····· 297
Figure 3-6-33. Gradient HMBC spectrum of 99J-6-B ····· 298
Figure 3-6-34. The structure of 980K-17-A ····· 300
Figure 3-6-35. The structure of 980K-17-B ····· 301
Figure 3-6-36. 1H-1H correlation of 980K-17-A,B ····· 301
Figure 3-6-37. Proton NMR spectrum of 980K-17-A ····· 304
Figure 3-6-38. Carbon NMR spectrum of 980K-17-A ····· 305
Figure 3-6-39. Proton COSY spectrum of 980K-17-A ····· 306
Figure 3-6-40. Gradient HSQC spectrum of 980K-17-A ····· 307
Figure 3-6-41. CIGAR spectrum of 980K-17-A ····· 308
Figure 3-6-42. Proton NMR spectrum of 980K-17-B ····· 309
Figure 3-6-43. Carbon NMR spectrum of 980K-17-B ····· 310
Figure 3-6-44. Proton COSY spectrum of 980K-17-B ····· 311
Figure 3-6-45. Gradient HSQC spectrum of 980K-17-B ····· 312
Figure 3-6-46. CIGAR spectrum of 980K-17-B ····· 313
Figure 3-6-47. Proton NMR spectrum of 05CH-9-A ····· 317
Figure 3-6-48. Carbon NMR spectrum of 05CH-9-A ····· 318
Figure 3-6-49. Proton COSY spectrum of 05CH-9-A ····· 319
Figure 3-6-50. Gradient HSQC spectrum of 05CH-9-A ····· 320
Figure 3-6-51. Gradient HMBC spectrum of 05CH-9-A ····· 321
Figure 3-6-52. Proton NMR spectrum of 05CH-9-A-1 ····· 322
Figure 3-6-53. Carbon NMR spectrum of 05CH-9-A-1 ····· 323
Figure 3-7-1. Optical microscopic picture of *P. pseudodenticulata* ····· 329
Figure 3-7-2. Scanning electron micrographs (SEM) of *Porosira pseudoden ticulata* (Hust.) ····· 330
Figure 3-7-3. Fluctuating growth pattern adding N of different concentrations to *P. pseudodenticulata* ····· 331
Figure 3-7-4. Fluctuating growth pattern adding P of different concentrations to *P. pseudodenticulata* ····· 331
Figure 3-7-5. Fluctuating growth pattern adding Si of different concentrations to *P. pseudodenticulata* ····· 332
Figure 3-7-6. A picture for IBMs activity of *P. pseudodenticulata* ····· 332



Figure 3-8-1. Elements of Marine Biotechnology ····· 334
Figure 3-8-2. Increase in social welfare due to development of marine biotechnology ····· 338
Figure 3-8-3. Per capita GDP in the world ····· 339
Figure 3-8-4. Economic Impacts of biotechnology industry in the United States (1999) ····· 340
Figure 3-8-5. The supporting plan for biotechnology in the United States ····· 346
Figure 3-8-6. Framework for bio-venture cluster in Boston area ····· 348
Figure 3-8-7. Technology development strategy of new marine products with added functions ····· 370
Figure 3-8-8. Conceptual framework of marine biotechnology ····· 371
Figure 3-8-9. New medicine development system with marine natural materials ····· 374
Figure 3-8-10. Strategies & Projects of「Marine Bio 21」 ····· 375
Figure 3-8-11. 3 Step Plan of 「Marine Bio 21」 ····· 375
Figure 7-1-1. Pyridoacridine alkaloids from marine invertebrates. ····· 437
Figure 7-1-2. Partial structures of compound 1 based on HMBC analysis ····· 442
Figure 7-1-3. Possible structure of compound 1 ····· 444
Figure 7-1-4. 13C NMR spectrum of compound 1 ····· 447
Figure 7-1-5. 1H NMR spectrum of compound 1 ····· 448
Figure 7-1-6. HSQC spectrum of compound 1 ····· 449
Figure 7-1-7. 1H COSY spectrum of compound 1 ····· 450
Figure 7-1-8. HMBC spectrum of compound 1 (downfield region) ····· 451
Figure 8-1-1. The development of transformed *Chlamydomonas* ····· 467
Figure 8-1-2. Analysis of pigment content for the transformed *Chlamydomonas* ····· 468
Figure 8-1-3. Funtional classification of *Dunalliela* EST ····· 469
Figure 8-1-4. RNA blot analysis of Fe-SOD. The loading of an equal amount of total RNA in each lane was verified by α-tublin gene probe. The transcription level of SOD was enhanced by light stress ····· 469
Figure 8-1-5. The expression of recombinant proteins ····· 470
Figure 8-1-6. The activity of recombinant Fe-SOD determined by

theinhibition of auto-oxidation of 1mM pyrogallol ····· 471
Figure 8-1-7. The example of antioxidant activities ····· 471
Figure 8-1-8. The effects of temperature and addition of glycerol
on antioxidation activities ····· 472

# 제 1 장 서론

제1절 연구 필요성

제2절 연구 목표

제3절 연구 내용 및 범위

# 제1절 연구 필요성

## 1. 초고온성 미생물 확보

1979년 심해열구수의 발견 이후 다양한 미생물들이 전 세계 심해 열수구 환경에서 분리되고 있다. 특히 심해 열수구 고온 환경에서 생장 가능한 초고온성균(extremophile)에 대한 연구가 현재 미국, 독일, 프랑스, 일본 같은 심해저 탐사장비를 보유한 국가들에서 활발히 진행되고 있다. 이런 초고온성 균주들은 대부분 생장온도가 75-110℃인 고세균(Archaea)이다. 초고온성 균에서 유래한 초고온성 효소는 내열성, 계면활성제 및 유기용매 등에 대한 안정성이 매우 우수하고 소량의 효소로도 장기간 사용이 가능하기 때문에 중온성 효소의 단점을 극복 할 수 있고 학문적으로도 내열성의 원인 규명, 구조생물학 등의 재료로서 매우 중요하며 그 응용범위가 계속적으로 넓혀지고 있다(김현규, 2002).

2002년 '서태평양 종합 대양연구' 프로그램을 통해 탐사된 파푸아뉴기니의 PACMANUS 열수구 지대는 1991년 발견되었으며 최근까지 그 지역의 지질학적 구조와 열수구의 지구화학적 특성 그리고 생물학적 조사가 활발히 이루어지고 있다. Takai등의 (2001) 보고에 의하면 파푸아뉴기니의 PACMANUS 열수구지대의 chimney 구조에는 초고온성, 초호염 등의 다양한 Archae의 군집들이 분포하며, 특히 그 chimney 표면에는 Thermococcus속들 풍부하게 존재한다고 한다.

*Thermococcus* 속은 *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Korarchaeota*, 그리고 최근에 보고된 *Nanoarchaeota* 네 개의 문(phylum)중 *Euryarcheaota*에 문에 *Thermococcales*목(order)에 속한다. *Thermococcales*목은 최적생장온도(*Thermococcus*와 *Palaeococcus,* 80-90℃; *Pyrococcus,* 95-100℃)와 16S rRNA 염기서열 그리고 G+C content에 따라 *Thermococcus* (Zillig *et al*., 1983), *Pyrococcus* (Fiala & Stetter, 1986), 그리고 *Palaeococcus* (Takai *et al*., 2000) 세 개의 속들로 나누어진다(Zillig and Reysenbach, 2001). *Thermococcales*목에 속하는 종들은 절대혐기성이고 yeast extract, meat extract, peptone, bacterial 그리고 archaeal cell homogenates와 같은 proteinaceous 기질들과 casein, gelatin, starch, chitin 그리고 xylan 와 같은 폴리머에서 자라는 종속영양세균들이다. 이들은 또한 발효대사과정에서 생성되는 수소분자(밀폐된 용기에서 성장을 저해함)를 제거하기위하여 전자수용체로서 황을 환원한다(Schönheit and Schäfer 1995). 이 *Thermococcales*목 중 *Thermococcus*는 심해나 얕은 해양 열수구(Stetter, 1999), 온천지대 담수(Ronimus *et al.,*1997) 그리고 최근에는 유류저장고(Miroshnichenko *et al*., 2001)에서 발견되고 있다. 이들의 대부분은 유사한 생리적, 형태학적 특징들을 가지고 있으며



G+C content 에 따라 두 개의 그룹으로 나눌 수 있다(Godfroy *et al*., 1997).

## 2. 초고온성 미생물 유전체 해독

고세균은 다양성 분석에서 정밀 추정조차 되어 있지 않은 분류군으로 기본적 생명현상(transcription, translation, replication)에 있어서는 세균류(Bacteriya) 보다는 진핵생물류(Eukrya)와 더 유사하며 형태적 특성과 물질대사에 관련된 단백질은 세균류의 것과 가깝다. 또한 현재까지 연구된 주요한 고세균은 초호열성, 혐기성의 특수미생물로 고세균 유래의 단백질은 기초학문과 산업적 응용의 주요 연구대상으로 자리잡고 있다. 2003년 인간 게놈 해독이 완성되면서 유전체 해독 기술과 초고속, 자동화 기기의 발달로 알려지지 않았던 미생물 유전자 자원에 대한 분석 기술이 발전되었고 미이용 유전체자원, 생명기능 활용기법이 발전되고 있다. 즉, 환경으로부터 직접 유전자를 분리하고, 대량으로 염기서열을 결정하여 기존에 알려지지 않았던 새로운 생명기능, 생명체, 유전정보 등을 확보하는 것이 가능하여 졌다. 이러한 유전체 해독 기술은 생명공학의 핵심 및 기초 기술로 인정되었으며, 2005년 3월 1일 현재, 게놈프로젝트 DB (http://www.genomesonline.org/)에 따르면 완성된 미생물유전체 해독 프로젝트 227건중, 206건이 일반 세균 그리고 21건이 고세균이다. 현재 진행되고 있는 미생물게놈 프로젝트의 경우도 전체 654건에서 고세균 유전체 해독 프로젝트가 28건에 이를 정도로 활성화 되어 있다.

## 3. 극한 효소 유전자 발굴

게놈 연구의 최근 진보는 막대한 양의 서열 정보를 생산했다. 종래의 유전자 공학 및 게놈의 연구 기술의 일반적인 조합과 함께, 몇몇의 고호열성 미생물의 게놈 서열은 생물 공학 분야에서 열에 강한 효소 때문에 관심을 받고 있으며, 많은 매우 열안정적 효소가 생물 공학의 목적으로 개발되고 있다. 미국, 일본, 프랑스 등은 일찍이 해양생물 특히 극한미생물함유 유전정보·단백질자원의 유용성을 인지, 많은 탐사와 연구를 통해 극한환경으로 부터 미생물들을 보유하고 있으며, 이들 미생물중 일부의 게놈정보분석을 완료한 상태이다. 또한 게놈 서열을 바탕으로 유용한 단백질을 연구하고, 특허등의 지적재산권을 확보하고, 산업화하는 단계에까지 이르렀다. 미국의 효소시장은 꾸준한 성장세를 보이고 있으며, 그중 극한 환경 유래의 단백질은 우선 고온, 고압, 저온, 고염등의 환경에 안정한 특성으로 화학공정에 적합한 특성을 내포하고 있으며, 또한 단백질 결정연

구 등의 용이함으로 단백질공학의 주요 연구대상이 되고 있다.

## 4. 극지환경 해양동물 유전체 분석

남극과 북극 지역에 서식하는 생물들은 오랜 세월 동안 저온환경에 적응한 지구상 독특한 생물자원이다. 남극대륙은 남아메리카대륙과 분리된 약 3,370만 년 전 이후 온도가 점차 내려가는 독특한 환경을 거치면서 지구상 다른 지역과 분리된 독립된 생태계로 발달하였다. 남극해 연안에는 일년 내 온도변화가 거의 없는 차가운 환경에 적응한 다양한 생물이 나타났으며, 육상에는 온도변화가 큰 초저온 극한 환경에서도 살아갈 수 있는 소수의 생물만이 생존하였다. 저온의 바다에서 decapoda와 같은 생물은 멸종되었지만, notothenioid 어류나 spatangoid 극피동물은 오히려 크게 번성하여 많은 종들이 새롭게 분화되었다. 육상에는 소수의 원시곤충류와 지의류가 적응, 진화하였다. 최근, 지구온난화와 오존홀의 형성 등 전 지구적 기후변화가 극지방에서 강화되면서 극지 생물의 변화가 예상되고 있다. 이러한 극지 환경은 생물진화 연구와 새로운 생물자원을 개발할 수 있는 대상지역으로서 최적조건을 제공한다. 극지생물학 연구자들은 2004년 "남극 생물의 진화와 생물다양성"이라는 국제 공동연구 프로그램 (Evolution and Biodiversity in the Antarctic, EBA)을 남극과학위원회에 제출하고 연구를 시작하였다 (SCAR report, 2005).

저온환경에 적응한 극지생물은 유전자와 유전체의 변화를 통하여 생화학적, 생리적 기능의 변화를 겪으며 진화하였다. 결빙방지당단백질이라는 새로운 소재, 저온에서도 활성이 높은 효소단백질, 대형 근섬유, 다중불포화지방산, 저온충격 도메인, 적혈구 퇴화 등 극지 생물 특유의 생리적 특징이 나타났다. 과학자들은 오래 전부터 극지 생물의 특성에 관심을 기울여 왔으며, 21세기 생명공학시대가 도래하면서 새로운 생물소재 및 유전자 자원의 원천으로서 극지생물을 주목하기 시작하였다. 특히, 체액의 어는 온도 (-0.7℃) 보다도 낮은 -1.7℃나 -1.8℃에 이르는 해수에서도 얼지 않고 신진대사를 유지하며 활동을 계속하는 남극해와 북극해의 어류들이 호기심의 대상이 되어 왔다. Dr. Scholarnder 등은 북극해 근처에 서식하는 어류의 혈액을 조사해 보고 그 속에 어는 온도를 내려주는 물질이 함유된 것을 밝히고 그 물질을 결빙방지 물질(Antifreeze molecule)이라고 불렀다. 이후 결빙 방지 물질에 대한 많은 연구가 이루어지다가 1971년 마침내 미국의 Dr. DeVries가 남극대구류 (Notothenioids)에서 이 물질의 구조를 밝히게 되었다.



최근 생물자원이 산업의 기초 재로로서 그 중요성이 부각되면서 세계 여러 나라가 극지의 독특한 생물/유전자원을 선점하려는 경쟁이 치열해졌다. 생물의 유전자를 대량으로 분석하는 분자생물학 실험기술이 발달하면서 극지 생물 연구에도 새로운 방법이 적용되고 있다. 유전체 전체를 분석하는 게놈 분석이나 발현유전자를 대량 분석하는 ESTs 분석법이 적용된다. ESTs 분석법은 특정 생물이 갖고 있는 유전자가 발현될 때 만들어지는 mRNA를 cDNA로 만든 후 그 염기서열을 대량으로 분석하는 방법으로서 게놈이 큰 다세포 동식물의 유전자원을 확보하는 간편한 방법으로 널리 이용된다. 본 연구에서는 먼저 북극 성게 및 남극 성게, 남극 곤충을 대상으로 분자마커를 이용하여 진화적으로 가까운 종들과의 계통진화적인 관계를 밝혔으며, ESTs의 대량 분석으로 그 유전자원과 유용한 유전자를 탐색하였다.

## 5. 어류 유용유전자 확보

생물공학 기법 및 분자 육종학 기법을 이용한 유용 어류자원의 확보 및 보존에 관한 연구 및 새로운 양식대상 어종 개발이 필요하며, 어류의 성장 및 질병 관련, 생체물질 생산 등 유용형질 관련 기능성 유전자 발굴 및 이용기술 개발이 필요하다.

## 6. 신규 해양천연물 분리

해양 천연물은 해양 생물체 내의 대사 작용에 의하여 만들어지는 유기 화합물을 일컫는 말로써 좁게는 이들 유기물질 중에서 생물체의 골격을 유지하거나 에너지 대사에 관련되는 일차대사물질을 제외한 나머지 이차대사물질로 정의된다. 해양 천연물 연구는 해양생명공학의 핵심 분야로써 해양생물 산업의 기반기술이다. 천연물의 산업적 중요성은 현재 시판되고 있는 의약품의 약 50%가 천연물 자체이거나 이들을 기반으로 한 합성유도체라는 점에서 쉽게 인식할 수 있다. 예를 들면 현재 널리 시판되는 ara-A, ara-C, AZT 등 nucleoside계 항암, 항바이러스제 약품은 카리브해에 서식하는 해면동물에서 발견된 세포독성물질에서 비롯되었다는 사실이다(Rinehart, 1988). 의약품에 외에도 농약, 건강보조제, 기능성화장품, 기타 화학적 혹은 생물학적 신소재의 개발에도 천연물은 직·간접으로 널리 이용되고 있다. 천연물연구의 경제적인 효과는 매우 커서 특이한 화학적 구조와 강한 생리활성을 가진 천연물이나 이를 생산하는 생물소재가 상업적으로 개발될

경우, 창출되는 이익은 막대하다. 이러한 사실은 오랜 기간 연구개발이 이루어진 육상천연물로부터 잘 알려져 있으며 최근에는 해양 천연물의 의약품 및 소재 개발에 있어서의 중요성도 널리 인식되고 있다. 해양 천연물의 이용은 육상 천연물의 일반적인 이용방안 뿐만 아니라 양식수산물의 질병치료제, 방오제의 개발에 응용되기도 하여 해양천연물의 중요성이 알려져 있다. 학술적인 측면에서 해양 천연물화학은 의・약학, 화학, 해양생물・생태학, 환경학 등 여러 학술분야와 밀접한 관계를 형성하고 있어 서로의 발전에 중요한 영향을 준다(Fautin, 1988). 천연물 연구 결과의 주요 이용분야는 의.약학 분야로써 천연 생리활성물질과 이들에 대한 관련 지식은 생체 내에서 일어나는 여러 생명현상의 규명에 관여하는 연구에 크게 기여한다. 이는 생리활성물질들이 생체내의 특정한 유전체, 분자나 효소, 혹은 세포내 신호전달체계에 매우 선택적으로 결합하거나 이온들의 통로를 봉쇄하기 때문이다. 이와 같이 천연물 연구는 여러 학문 분야와 밀접한 관계를 맺고 발전하였으며, 식물, 토양미생물, 진균 등 육상생물을 주된 대상으로 산업적인 면에서도 막대한 기여를 하여왔다. 그러나 암, AIDS, 말라리아, 조류독감을 비롯한 난치성 질병의 창궐과 당뇨 등의 질환의 증가는 의약품을 비롯한 산업적 신소재에 대한 수요를 지속적으로 증가시키고 있다. 인간게놈 프로젝트의 종결로 많은 유전 질환의 정복 가능성은 제시되고 있지만 아직 수많은 연구 과정이 수반되어야 하고, 인간의 유전자와 무관하게 외부에서 침투하는 바이러스, 박테리아 등에 의해 유발되는 질병에 대한 치료약의 필요성은 날이 갈수록 증가하고 있는 실정이다. 그 결과로 유용물질의 새로운 원천으로서 해양생물을 주목하게 되었다. 해양생물 유래의 천연물들은 그 구조와 생리활성에서 육상천연물에 비하여 상이한 점이 많아 무한한 개발가능성을 드러내고 있다. 해양환경은 공간적으로 지구표면의 70%를 차지하고 있을 뿐만 아니라 조간대에서 심해저, 열대에서 극한지에 이르기까지 대단히 다양한 물리적 환경을 망라하고 있다. 이에 따라 생물상도 다양하여 지구상에 현존하는 생물의 약 80%에 해당하는 생물이 서식하고 있다. 그럼에도 불구하고 의약품으로 이용된 해양생물은 해인초에서 추출해 낸 kainic acid(구충제), 갯지렁이에서 분리한 nereitoxin (농약), 해삼에서 분리한 holotoxin(항진균제) 등에 불과할 정도로 극히 미미한 수준에 머물러 있다. 따라서 대부분의 생물이 전인미답으로 남아있는 해양에서 강력한 생리활성과 특이한 구조를 가진 신물질이 발견될 가능성은 육상을 능가할 것으로 예측되고 있다 (Fenical, 2002; Blunt, 2005). 해양천연물 연구의 중요성을 인식한 선진국에서는 1960년대 초부터 해양생물을 생리활성 신물질의 원천으로 주목하고 천연물 탐색과 함께 새로운 부가가치의 창출을 위하여 첨단 생명공학기법을 접목하는 등 해양천연물과 이들을 생산하는 생물소재의 개발을 위한 많은 연구 투자를 하여 왔다. 미국의 NCI(National Cancer Institute), SIO (Scripps Institution of Oceanography), 러시아의 PIBOC(Pacific Institute of Bioorganic Chemisty), 호주의 AIMS(Australian Institute of Marine Sciences), 뉴질



랜드의 NIWA (National Institute of Water & Atmospheric Research)등 거대 공공 연구기관이나 다국적 제약기업을 중심으로 산・학・연 협동으로 생리활성물질의 탐색에서 신의약품의 개발에 이르는 전과정에 대한 체계적인 연구를 집중적으로 하고 있다. 이와 관련하여 1980년대 후반 이후에는 생물다양성협약 발효에 따라 자국의 고부가가치 산업을 보호하고 21세기 국가간 자원경쟁에서의 우위를 점하기 위하여 자국연안의 해양생물자원에 대한 배타적 보호주의를 천명하는 국가가 급증하고 있다. 그 결과로 신물질 개발이 가능한 자본과 기술의 보유국과 생물자원의 보유국간의 마찰도 드물지 않다. 이러한 경향은 최근 더욱 심화되고 있으며 이미 호주와 ASEAN국가 등에서는 외국 연구기관의 자국 근해진입을 원천적으로 봉쇄하고 있는 실정이며 역으로 미국, 일본, 러시아, 호주 등에서는 외국의 영해의 해양생물시료를 체계적으로 확보하기 위하여 다양한 형태의 공동연구를 시도하는 등 많은 노력을 기울이고 있다. 이러한 시점에 한국해양연구원이 남태평양의 마이크로네시아에 남태평양 연구센터를 설치하고 열대해양생물에 대한 연구를 수행할 기본 여건을 갖추기 시작했다는 점은 시사하는 바가 매우 크다. 외국에서의 활발한 해양천연물 연구개발과는 대조적으로 국내에서는 삼면이 바다로 둘러싸여 다양한 해양생물자원을 보유하고 있음에도 불구하고 해양천연물에 대한 연구가 미진한 상태였다. 그리고 과거 천연물이나 관련분야 연구진의 관심은 육상생물에만 집중되어 있고, 식품이 아닌 유용물질의 소재로서 해양생물에 접근하려는 노력이 미흡한 실정이었다. 다행히 본 연구 사업이 시작된 이후인 2004년부터 해양수산부에서 시작한 '마린바이오 21' 연구사업을 통해 해양천연물 본격적인 개발을 시작한 것은 의미가 크다. 이러한 시점에서 다양한 해양생물로부터 생리활성 신물질을 탐색, 규명하고 산업적 이용가능성을 분석하며 이를 기초로 산업적 이용방안이 강구된 신물질을 개발하려는 본 연구는 향후의 본격적인 해양생명공학 기반 신물질 개발연구를 수행하기 위한 기술적 기반의 조성을 위하여 매우 중요하다.

## 7. 저온활성물질 분리

남극의 해양은 태양광의 변화가 크고, 일정하게 낮은 수온과 높은 무기염분의 농도 그리고 년중 해빙의 형성과 제거 등이 반복되는 특징을 가지고 있다. 이러한 환경은 남극에 독특한 생물상과 그 생물들이 살아갈 수 있게 하는 특이한 물질 등이 만들어질 수 있는 원인이 될 수 있다 (강 등 2000). 남극에 서식하는 생물들은 추운 주위환경을 극복하기 위해 각각 독특한 물질들을 만들어낸다. 남극대구 (*Nototheniidae*) 등 극지 해역과 그곳과 접해있는 해역에 서식하는 어류들은 얼음결정의 표면에 결합하여 결정의 성장을 조절하는 단백질을 만들어 낸다 (Jia and Davies 2002). 또한 남극의 저온환경과 심해와 같

은 고압의 환경에서 사는 박테리아들은 그들의 생존을 위해 불포화 지방산이나 복합다당류들을 만들어내기도 한다 (Bowman *et al.* 1998; Nichols 2003; Nichols *et al.* 2004). 남극해는 또한 일사량의 큰 변화량으로 인해 해빙 (sea ice) 분포의 계절적 변화가 커서 식물플랑크톤의 생물량 및 성장률이 시간적, 공간적으로 해빙의 분포에 큰 영향을 받는다 (강 등 2000). 식물플랑크톤 중 해빙에 존재하는 미세조류를 호냉성 미세 규조류 (cryophilic diatom)이라 하고 이 규조류는 해수 유빙의 아래표면 또는 내부에 노란색에서 갈색을 나타내고, 중심목 (centric form) 보다 우상목 (pennate form) 형태를 가지고 있다. 우리나라에서는 호냉성 미세 규조류인 *Navicula glaciei*와 *N. perminuta*에 대한 형태학적, 생태학적 연구가 이루어졌다 (Kang *et al.* 1999). *Navicula* 종들 뿐만 아니라 다른 호냉성 미세 규조류들 역시 남극의 어류나 박테리아처럼 저온의 해양환경에서 살아가기 위한 방법으로서 특이한 물질들을 만들어낸다고 생각한다. *P. pseudodenticulata* (Figure 3-7-1) 역시 남극 해양에서 발견되는 미세조류로서 현재까지 활발하게 연구되지 않고 있다. 그것의 형태와 분포, 그리고 다른 미세조류의 분포 연구 중 발견되고 있는 것이 전부이다 (Scott and Marchant 2005, Kang *et al.* 2001, Kang and Fryxell 1993). 이 호냉성 미세조류의 특성을 알아보고자 광학현미경 및 주사전자현미경을 이용하여 형태적인 특징을 관찰하였고 기초적 생리실험인 배지 및 영양염에 관한 실험을 실시하였다. 또한 극지역에서 생활하는 생물이 분비할 것으로 예상되는 유사결빙방지 물질의 존재를 확인하기 위하여 그 활성을 확인하였다. 현재 한국해양연구원 부설 극지연구소 저온배양실에서 배양중인 *P. pseudodenticulata*에 대한 기초적인 생태조사와 더 나아가 유사결빙방지 물질의 동정이 수행되어야 할 것이다.

## 8. 해양생명공학 국내외 동향 및 정책 제언

해양생명공학이 국가의 차세대동력산업으로 자리매김을 하기 위해서는 연구개발 시기의 적절성, 효과적인 연구비 지원, 최적 연구 인프라 구성, 국내 및 세계 경쟁국가의 육성정책 등이 조사·분석 되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 해양생명공학(MBT)과 생명공학(BT)의 관계(연계성)를 규명, 생명공학의 시장 현황 조사, MBT(혹은 BT)의 국가육성 정책을 분석한 후 시사점 및 정책방향을 제시하고자 하였다.



## 제2절 연구 목표

해양생물을 대상으로 첨단의 생명공학적 방법론을 적용하고, 해양생물 및 유전자원의 가치를 확보하기 위한 수단으로 극한미생물, 극지동물, 어류를 대상으로 유전체 해독과 유용유전자 탐색을 목표로 하였다. 게놈 해독의 대상생물은 유전체 구조가 비교적 단순하고 방법론이 확립된 해양 초고온성 고세균을 선정하였고, 유전체 해독의 비용이 많이 드는 전체 게놈해독 대신 발현유전자 라이브러리만을 확보하여 유용유전자 검색을 실시하였고, 활용하기 위한 대상생물로는 남극의 무척추동물(성게)과 경제적 가치가 중요한 어류를 선정하였다. 특히, 해양의 극한미생물 및 유전자원은 유전적, 생태적 다양성이 증명된 자원으로 산업적 활용가치가 높고 이중에서 초고온성 아케아는 생명현상규명, 초호열성 효소개발의 중요한 원천이므로 본 연구에서 2002년 '서태평양 종합 대양연구' 프로그램을 통해 분리된 *Thermococcus*속에 속하는 NA1 균주를 분리하여 그에 대한 분리 동정 실험을 수행하고 유전체 해독의 대상 생물로 선정하였다.

극한환경 무척추동물 (남극 성게, 북극 성게, 남극 곤충)의 유전체 분석, 유전자원 확보연구는 극한생물 유전자의 구조적 특징을 규명하고 유용유전자를 생명공학적으로 활용하려는 목표를 갖고 있다. 급속히 발전하는 분자생물학적 기술을 적용함으로써 수행 가능한 연구이며, 국제적으로 새로운 유전자원을 확보하려는 경쟁이 치열해져 가는 21세기 생명공학 시대에 적절한 연구 주제로 판단된다. 또한 극한 환경 서식 어류로부터 유용 유전자원을 확보하기 위하여 어류의 기능성 유전자 탐색과 분석은 반드시 요구되는 과제이다.

해양생물 유래 천연물 확보를 위해, 국내연안 및 한국해양연구원의 남태평양연구센터가 있는 마이크로네시아 축주 인근도서 연안에 서식하는 저서군체동물 및 해조류를 채집하고 이들의 조추출물에 대한 brine shrimp 독성, 세포독성, 항미생물활성, 효소작용 저해활성 등의 생리활성을 검색한 다음 선정된 시료로부터 새로운 생리활성 천연물이 분리하여 구조를 규명하고자 하였다. 아울러 본 연구 사업은 의약품, 건강보조제 등 산업적 개발을 위한 선도물질이나 이들을 고효율로 생산하는 생물소재를 창출하고 대량생산 방안을 강구하는 산업적 목표와 독자적인 해양신물질 개발역량을 확보하고 주요 연구과정-생물의 채집 및 배양, 천연물의 분리정제, 신물질의 구조결정, 생리활성 검색, 천연물로부터 신규 활성유도체의 합성 등-의 기술수준을 선진국수준에 도달하는 기술적 목표를 함께 추구하였다. 본 연구 사업의 목표달성을 위한 연구대상 천연물은 분자량 2,000 이하의 소형 이차대사물질을 선정하였으며 생리활성은 brine-shrimp 독성, 세포독성, 항진균 및 항박테리아 활성을 일차적으로 검색하였다. 연구대상 생물은 해면동물, 강장동물 등 저서 군체동물과 해조류를 일차적인 대상으로 하였다. 약 10여 년 전부터 수행된 한국해양연구원의 기초연구에서 우리나라 근해 및 열대해역에 서식하는 저서 군체동물의 연구 가치를 확인

한 바 있다. 본 연구를 위한 생물의 채집 지역은 우리나라 동해안의 연안과 마이크로네시아 축주 주변의 연안으로 정하였다. 육상생물과 마찬가지로 해양에 있어서도 열대지역의 생물이 기타 지역의 생물에 비하여 생리활성물질의 출현빈도와 물질의 농도에 있어서 탁월하다는 점은 널리 알려져 있다. 따라서 본 연구 사업에서 열대 해양생물시료를 확보에 중점을 두었으며 특이한 구조의 신물질을 화학적으로 규명함과 동시에 열대시료에 대한 독자적인 분석기술의 향상을 함께 도모하였다. 본 연구과제에서 수행하는 연구내용은 생물시료의 현장채집에서 천연물의 분리정제, 구조 및 화학적 특성의 분석, 생리활성 검색, 천연물의 화학적 구조변환, 활성유도체의 합성 등 일반적인 천연물연구의 전 과정을 망라하고 있으며 이들 중에서 대부분의 과정을 자체적으로 수행하는 것을 목표로 하였다.

해양미세조류를 이용한 항산화제 개발에 관한 연구는 국가의 차세대 성장동력산업의 일부인 바이오신약개발 및 기능성물질의 개발이란 국가차원의 핵심 연구 목표에 부합되고 산업자원으로 해양미세조류를 효과적으로 이용할 수 있다는데 큰 의의가 있으며, 척박한 환경에서 적응하는 미세조류가 갖는 항산화 효능을 항산화제로 분리하여 상업적으로 이용할 토대를 마련하는 목표는 지극히 타당하고 높은 실현가능성 있는 것으로 판단되었다.

| 년 차 | 목 표 |
|---|---|
| 1 (‘03)년도 | ○초고온성 극한미생물 1종 유전체 해독; 대상생물선정, 생리적 특성 분석 |
| | ○ 극지방 성게의 분자계통, 진화시기, 발현유전자 분석 |
| | ○ 어류 유전자원 탐색 및 자료수집 |
| | ○ 해양천연물 후보물질 발굴; 시료채집 및 배양, 기본 생리활성 검사 |
| | ○ 남극환경에서 얼음결합 단백질(Ice-binding protein) 생성 미세조류 탐색 |
| | ○ 해양미세조류로부터 항산화 물질 개발; 해양 미세조류의 탐색 및 분리, 항산화물질의 탐색 및 물질 분리 |
| 2 (‘04)년도 | ○ 초고온성 아케아 유전자 라이브러리 구축 및 대량 염기서열 결정, 서열 결과분석 |
| | ○ 남극성게 유전자 기능 분석 및 극지곤충 유전자 확보 |
| | ○ 어류의 기능성 유전자 탐색 |
| | ○ 신물질 탐색, 물질 분리, 구조 결정, 생리활성 검사 |
| | ○ 결빙방지물질 분리 및 활성 검증, 생성특성 조사 |
| | ○ 미세조류의 발현유전자(EST) 디비 구축 및 항산화관련 유전자 분석, 발현 유도 |
| 3 (‘05)년도 | ○ 초고온성 아케아(*Thermococcus*) 유전체 지도 완성; 개별 유전자 기능예측, 분석, 유전자원 정보시스템 구축 |
| | ○ 북극성게의 유전자 확보 기능분석; 극지곤충의 미토콘드리아 유전체 분석, 발현유전자 기능 분석 |
| | ○ 어류의 기능성 유전자 활용 |
| | ○ 물질 대량분리 및 특성; 신물질 5종 이상 분리, 구조결정 |
| | ○ 대장균에서 발현된 SOD를 정제, SOD의 활성측정, 스케일 업(scale up) 조건 확립 |
| | ○ 해양생명공학기술의 국내외 현황 및 정책 |



## 제3절 연구 내용 및 범위

| 년 차 | 내 용 | 범 위 |
|---|---|---|
| 1 (‘03) 년도 | ○ 초고온성 극한미생물 1종 유전체 해독<br>- 대상생물선정<br>- 생리적 특성 분석 | - 열수구에서 분리된 초고온성 균주 2종 배양<br>- 고체배지배양법을 이용한 순수분리 및 배양<br>- 바이오마커(16S rDNA) 염기서열 분석을 통한 계통분석<br>- 주사현미경을 이용한 형태 특성 규명 |
| | ○ 극지방 성게의 분자계통, 진화시기, 발현유전자 분석 | - 미토콘드리아 유전자 염기서열에 근거한 극지방 성게의 분자계통 및 진화시기 분석<br>- 남극성게 배아의 발현유전자 라이브러리 확보 |
| | ○ 어류 유전자원 탐색 및 자료수집 | - 서식환경별 어류의 총유전물질(genomic DNA) 시료에서 집단의 유전적 특성 파악 및 표현형 data 확보 |
| | ○ 해양천연물 후보물질 발굴<br>- 시료채집 및 배양<br>- 기본 생리활성 검사 | - 데이터베이스(STN, SCI-finder) 검색 이용 신의약품 관련자료 수집<br>- 연근해에서 해양무척추 동물 30여종 채집, 극한지 생물 20여종 채집<br>- 기 추출물로부터 세포독성, 효소저해효과 검색<br>- 해면동물과 극한지 생물로부터 물질분리 및 정제 |
| | ○ 남극환경에서 얼음결합 단백질(Ice-binding protein) 생성 미세조류 탐색 | - 남극 저온성미세조류종별 합성 얼음결합 단백질(IBP)의 활성 확인 및 차이 규명 |
| | ○ 해양미세조류로부터 항산화 물질 개발; 해양 미세조류의 탐색 및 분리, 항산화물질의 탐색 및 물질 분리 | - 10여종 이상의 미세조류 무균배양 조건 확립 및 이들의 단일배양을 통한 항산화 물질 탐색<br>- 항산화 기능이 우수하고 산토필(xanthophyll)의 함량이 높은 미세조류(*Dunaliella*와 *Chlamydomonas)* 분석<br>- 미세조류(*Chlamydomonas)*의 형질전환 라이브러리 구축 |

| 년차 | 내 용 | 범 위 |
|---|---|---|
| 2 ('04) 년도 | ○ 초고온성 아케아 유전자 라이브러리 구축 및 대량 염기서열 결정, 서열 결과분석 | - 다량의 총유전물질(genomic DNA)를 얻기 위한 대량 배양법 (700ml 규모) 확립<br>- 길이 2.5-3 kb 및 30-45kb의 라이브러리 구축<br>- 염기서열결정, 조합, 및 갭채우기 과정을 통한 물리적 일차 유전체지도 작성 |
| | ○ 남극성게 유전자 기능 분석 및 극지곤충 유전자 확보 | - 남극성게의 발현유전자 특성과 기능 분석<br>- 극지곤충의 분자계통 분석과 발현유전자 확보 |
| | ○ 어류의 기능성 유전자 탐색 | - 어류의 유용형질에 기초한 기능성 유전자의 목록화 및 카탈로그 작성<br>- 성장관련 형질 기능성 유전자 탐색 및 확보를 위한 특정발현유전자 라이브러리 구축과 유전자 확보 |
| | ○ 신물질 탐색, 물질 분리, 구조 결정, 생리활성 검사 | - 생리활성이 뛰어난 생물에 대한 신물질 탐색<br>- 다양한 크로마토그래피법(ODS, silica open coulmn, HPLC, CCC등)을 이용한 물질분리<br>- 분광기(NMR, IR, UV, optical rotation, MS)를 이용한 물질 구조 분석<br>- 분리 정제된 물질에 대한 세포독성, 효소저해 효과 검색 |
| | ○ 결빙방지물질 분리 및 활성 검증, 생성특성 조사 | - 극지 저온성 미세조류의 순수분리 및 배양<br>- 미세조류종에 따른 IBPs의 활성 확인 |
| | ○ 대상 미세조류의 발현유전자(EST) 디비 구축 및 항산화관련 유전자 분석, 발현 유도 | - 항산화유도 조건에서 배양된 조류(D. salina)의 EST 구축 및 분석(1,000개 이상)<br>- 항산화 관련 유전자모니터링을 통한 SOD (superoxide dismutase) 등의 항산화 효소 클로닝 |



| 년차 | 목 표 | 내 용 |
|---|---|---|
| 3 ('05) 년도 | ○ 초고온성 아케아(*Thermococcus*) 유전체 지도 완성<br>- 개별 유전자 기능예측, 분석<br>- 유전자원 정보시스템 구축 | - 약 2,000,000 염기쌍에 해당하는 유전체 일차배열 완성<br>- 유전체의 특성, 구조 분석<br>- 예측유전자 분석을 통한 유전자 기능 예측<br>- 고온성 생명현상, 고온성 유용 효소 관련 유전자 확보 및 기능 분석과 활용<br>- 유전체 정보 DB 및 활용 체계 구축 |
| | ○ 북극성게의 유전자 확보 기능분석<br>- 극지곤충의 미토콘드리아 유전체 분석<br>- 발현유전자 기능 분석 | - Long-Range PCR 기법을 사용하여 극지곤충의 미토콘드리아 유전체 분석<br>- 발현유전자 라이브러리를 구축하고 대용량EST를 분석하여 각 발현유전자의 기능을 검색 |
| | ○ 어류의 기능성 유전자 활용 | - 성장 관련 기능성 유전자의 특성규명 및 활용<br>- 다양한 어류에서의 성장관련 유전자 발현양상 분석 |
| | ○ 물질 대량분리 및 특성<br>- 신물질 5종 이상 분리, 구조결정 | - 신규 구조와 뛰어난 활성을 갖는 물질에 대한 대량 채집과 대량분리 시도<br>- 특이 활성 물질 대량 확보, 구조변환으로 유도체 합성, 선도물질 선정<br>- 생리활성 물질의 in vivo 활성, 독성 및 안전성 검색<br>- 생리활성에 기초한 산업화 후보물질 선정 |
| | ○ 대장균에서 발현된 SOD를 정제, SOD의 활성측정, 스케일 엎(scale up) 조건 확립 | - 대장균에서의 재조합 단백질 최적발효 및 대량배양조건 확립<br>- 발현단백질, 융합단백질과 상품화된 다른 단백질과의 활성비교<br>• 특허출원 근거자료로 활용<br>- 200L 규모 파일롯(pilot) 실험을 통한 대량배양에서의 수율비교 및 경제성 확인과 특허출원 |

# 제 2 장 국내외 기술개발 현황

## 제1절 국내 기술개발 현황

## 제2절 국외 기술개발 현황

## 제1절 국내 기술개발 현황

### 1. 고호열성 극한 미생물 연구

심해환경을 대상으로 광물자원탐사가 이루어졌으며, 이를 통해 생태학적 연구가 일부 수행되었고, 2001년부터 인도네시아 서태평양해역 조사연구를 통해 심해의 생물시료를 확보하였고, 고온성 균주 분리 및 미생물다양성 해석 작업을 진행하였다. '심해생물자원 확보 및 이용기술 개발'사업을 통해 2001년에 일본 JAMSTEC의 공동탐사에 참여하여 심해 6,000미터의 퇴적물시료를 확보하였고, 저온성미생물 및 미생물다양성 해석 연구를 진행하였다.

### 2. 초고온성 미생물 유전체 해독

국내에서 진행되고 있는 미생물유전체 해독 연구가 주로 병원성 미생물, 산업용 미생물, 식물병원성 미생물, 식품미생물, 환경미생물 등이다. 그리고 최근에 해양 미생물 등으로 확대되고 있으나, 극한미생물은 제한적으로 이루어지고 있다. 주요 연구기관으로는 한국생명공학연구원, 농업과학기술원, KAIST, 대학(서울대, 경상대, 충북대, 포항공대 등), 그리고 바이오벤쳐가 있으며, 이들은 미생물 유전체 분석능력을 보유하고 있다. 국내의 타 연구기관 및 대학에서는 일반 연안환경에서 미생물 생태학적 연구에서 유전자원의 분석과 활용에 대한 연구가 시작되었다. 그러나 초고온성의 극한미생물을 자체적으로 분리하여 연구한 예는 없으며, 외국에서 미생물 균주를 분양받아 분자생물학적 연구가 한국과학기술원, 성균관대, 포항공대에서 진행되고 있다.

### 3. 극한 효소 유전자 발굴

열안정성 효소를 이용한 연구용, 산업용 효소시장은 대부분 외국의 개발제품에 의존하고 있는 실정이며 특히 DNA-polymerase는 국내 시장 규모는 70억 ~ 100 억규모로 추정되며, 이중 80% 이상이 외국회사의 polymerase에 의해 점유하고 있는 실정이다. 국내 BT분야의 성장속도로 미루어 NA-polymerase 국내 시장 규모 또한 빠른 성장이 이루어지고 있다. 따라서 원천소재의 개발과 이를 이용한 다양한 소재의 개발은 시급한 과제의 하나로서 현재 국내에서는 외국에서 개발된 균주를 이용하여 학문적으로 접근하는 연구그룹은 있지만, 체계적인 원천소재의 확보, 유전체 해독, 소재 개발의 연구는 해양연구원이 독보적이라고 할 수 있다.



### 4. 극지환경 무척추동물의 유전체 분석, 유전자원 확보

극지생물에 대한 연구는 그동안 생태 관련 연구가 주로 수행되어 왔으며 생리대사 물질과 유전자에 대한 연구가 간헐적으로 이루어졌다. 남극 크릴의 지방산 분석을 통하여 크릴이 다량의 EPA와 DHA를 함유하고 있음이 밝혀졌으며, 남극 박테리아에서 DNA 합성효소가 정제되었다. 또한, 남극 대구의 결빙방지단백질 유전자 연구가 시도되기도 하였다. 그러나, 극지 생물의 유전자를 대량으로 분석하여 유용유전자를 개발하는 연구는 이루어지지 않았으며, 게놈 연구 또한 실시되지 않았다. 최근 한국해양연구원 부설 극지연구소가 설립되어(2004년 7월) 국내 극지연구의 활성화, 극한환경 생물연구의 활성화가 예상된다. 극지연구소는 2004년부터 극지 미세조류를 활용하여 결빙방지단백질을 개발하는 연구를 수행하고 있으며, 2006년부터는 소위 P-Science를 시작하여 극지 생물 특성 및 신물질 개발 연구를 보다 적극적으로 수행하고 있다. 한편, 우리나라는 남극 세종과학기지와 북극 다산과학기지를 운영하고 있어 극지생물 연구의 인프라가 구축되어 있다. 2008년에는 쇄빙선이 건조될 예정이어서 극지생물 연구가 더욱 다양화될 것으로 예상된다.

### 5. 어류로부터 유용유전자 확보

국립수산과학원에서는 우리나라 주요양식생물인 넙치, 조피볼락, 전복, 대하의 각 조직별 cDNA를 제작하고 EST(Expressed Sequence Tag) 데이터베이스를 구축하였으며, 뱀장어류, 전복류, 굴류, 농어류, 민어류, 돔류 및 연어류의 유전학적 특성 분석이 이루어지고 있다. 부경대학교에서는 사람 유전자의 염기서열 정보에 기초한 어류의 유용 유전자 탐색에 관한 연구가 진행되고 있다. 또 충남대학교를 비롯한 몇몇 연구팀은 어류를 모델생물로 이용하기 위한 연구 및 멸종위기의 어류를 보존하기 위한 연구도 시도하고 있다.

## 6. 신규 해양천연물 분리

국내의 해양생물 유래 신물질에 대한 연구는 2000년 이후 점차로 활성화되는 경향을 보이고 있으나 아직 선진국에 비하여 전반적인 연구수준이 낙후되어 있다. 이는 국내의 생명공학분야 연구대상 관심이 해양생물을 배제하여온 것에서 중요한 원인을 찾을 수 있다. 또한 국내 천연물 연구진의 주된 연구대상은 육상생물에 머물러 있었고, 최근에 해양생물을 대상으로 하는 연구진이 활성화되고 있다. 정부 출연기관인 한국해양연구원을 중심으로 10여 년간 해양천연물 연구가 지속되어 왔고, 지난 2005년 말 한국과학기술연구원의 강릉분원이 완공되어 천연물 연구진이 연구를 시작하는 등 연구기관을 중심으로 천연물연구가 활성화 되고 있다. 그리고 일부의 대학을 중심으로 해양천연물에 대한 관심이 점차 고조되고 있다. 서울대, 부산대, 부경대, 제주대, 한국해양대, 한밭대, 성균관대, 순천향대, 인하대 등의 대학에서도 국내연안의 해양생물에 대한 생리활성신물질의 탐색이 활기를 띄고 있다. 연구의 대상 생물은 저서군체동물과 대형해조류를 중심에서 다변화되어 적조플랑크톤, 방선균, 남조류 등으로 확산되고 있으며, 연구의 대상물질도 소형의 생리활성물질에 다당류와 효소 등 고분자물질로 확대되고 있다.

그러나 아직 해양천연물 연구의 전반적인 수준은 생리활성의 검색과 활성물질의 탐색에 그치고 있고, 단기적인 성과의 획득과 제품화에 관심이 집중되어 있어서 의약품이나 고부가가치 신소재보다는 조추출물을 대상으로 하는 식품첨가제나 건강보조제의 개발에 치중되는 경향이 있다.

국내의 해양 천연물 개발에 있어서 기술의 축적은 연구의 방향이 물질의 탐색에 주력하고 있고 개별적인 기술에 있어서 해양선진국에 비하여 낙후되어 있고 연구진의 층이 두텁지 않다. 그러나 최근에 인접 생명공학 연구 분야와 해양 관련 연구 분야의 전문가들 간의 네트워크가 확대되고 있어 많은 문제점들이 해소되고 있다.

요약하면, 국내의 해양천연물 연구개발은 아직 전반적으로 활성화되지 못하고 있으며 선진국에 비하여 기술적인 격차도 적지 않다. 그러나 최근 학계와 연구계를 중심으로 관심이 고조되고 있고 기술축적도 빠르게 진행되고 있으며 공동연구를 통해 시너지 효과를 얻고 있어 해양 천연물 분야의 연구개발이 활성화될 것으로 생각된다.



# 제2절 국외 기술개발 현황

## 1. 초고온성 미생물 확보

고온성 세균은 50-110℃ 사이에 적정 성장온도를 가지는 그룹으로 유기물을 생산 또는 소비할 수 있으며, 초고온성 미생물은 호기성 또는 혐기성 원핵생물(세균, 고세균)이며, 일반적으로 온천, terrestrial solfataric field, 해양 화산분화구, 그리고 40 MPa 의 고압을 가지는 열수구 등에 존재한다. 초고온성 아케아는 주로 고압에서 견딜 수 있는 열수구로부터 분리되었으며, 지질학적으로 광범위하게 존재한다. 이제까지 밝혀진 배양 가능한 고세균 종은 10개의 과, 17개의 속, 총 80개 이상의 종이 알려져 있으며, 2000년 이후로도 분리 및 동정된 아케아가 28 종이나 이를 정도로 새로운 종의 분리와 배양이 주요한 연구주제이다.

## 2. 초고온성 미생물 유전체 해독

Hyperthermophilic archaea 는 학문적, 학술적 중요성과 유용성으로 인해 유전체 해독 사업이 활발히 진행 중에 있으며, 2004년 12월 현재 20 종의 archaea 에 대해서 genome project 가 완성되었고, 진행 중인 유전체 사업도 27 개에 이른다. 일본해양과학기술센터의 심해미생물 연구팀은 호알칼리성 미생물인 *Bacillus halodurans* C-125의 게놈 해독 연구를 통해 생리, 생화학, 유전학적 특성을 밝혔고 이후에도 해양미생물 2종의 유전체 해독을 완성하였다. 게놈 연구의 최근의 진보는 막대한 양의 서열 정보를 생산했다. 종래의 유전자 공학 및 게놈의 연구 기술의 일반적인 조합과 함께, 몇몇의 고호열성 미생물의 게놈 서열은 생물 공학 분야에서 열에 강한 효소 때문에 관심을 받고 있으며, 많은 매우 열안정적 효소가 생물 공학의 목적으로 개발되고 있다.

## 3. 극한 효소 유전자 발굴

### 가. 열안정적 DNA 중합효소

열안정적 DNA 중합효소를 사용하는 PCR는, 단백질 및 유전자 연구에서 중요한 기여를 하고 있으며, 현재 넓은 생물학의 응용 분야에서 사용이 된다. 50개 이상의 DNA 중합효소 유전자가 호열성 생물 및 고세균을 포함한 여러 가지 생물체로부터 클론 되었다. 최근, 일반적으로 사용되는 *Taq* 중합효소 보다 프로프리딩(proof reading) 활성도에 기초하여 PCR에서 높은 충실도(fidelity)를 가지기 때문에, 고호열성 고세균(*Pyrococcus*와 *Thermococcus*)로부터의 B 패밀리 DNA 중합효소가 넓게 사용되었다. 그렇지만, 높은 충실도의 효소는 낮은 DNA 신장 능력(elongation ability) 때문에 개선이 요구되고 있다. 또한 전체 DNA 중합효소는 미국시장에서 $260이상이며, 2009년에는 $370수준이 될것으로 예상되어 단일 효소시장으로는 큰 시장을 형성하고 있다. 따라서 전세계적으로 Merck, Invitrogen, Qiagen, NEB, Roche등의 생명공학 관련 회사들이 경쟁적으로 DNA 중합효소 개발분야에 노력을 경주하고 있으며, 시장점유율을 높이기 위한 연구를 지속하고 있다.

### 나. 고호열성 DNA ligase

DNA 리가아제(EC 6.5.1.1 및 EC 6.5.1.2)는 이중나선 DNA에서 단일가닥의 쪽에서 5′-인산과 3′-하이드록시기 말단을 연결하거나, 상보적인 단일가닥 또는 블런트(blunt) 말단을 가지고 있는 두개 분절을 연결시킨다. 이런 기능이 DNA 복제, 재조합, 및 수선(Lehman 1974, Jessberger 1991, Li 1984, Wood 1988)에서 매우 중요하다. DNA 리가아제는 활성에 조효소를 필요로 하는가에 따라 두개의 그룹으로 나눈다. ATP를 요구하는 그룹(Kletzin, 1992) 및 $NAD^+$를 요구하는 그룹(Thorbjarnardottir 1995)이 있다. 높은 유사성이 ATP-의존적 그룹(Kletzin 1992) 또는 $NAD^+$ 의존적 그룹(Thorbjarnardottir 1995)에서 발견되었다. 진핵세포(Johnsosn 1997, Robins 1996, Knopf 1977), 바이러스(odell 1996, Parks 1994), 및 박테리오파아지(Coherty 1996, Knopf 1977)가 ATP-의존적 효소를 가지고 있다. 반면에 세균으로부터의 여러 가지 DNA 리가아제(Ishino 1986, Takahashi 1984, Thorbjarnardottir 1995)가 조효소로서 $NAD^+$를 이용한다는 것을 보였다. 생물의 제 3 계인 고세균으로부터의 DNA 리가아제는 거의 알려져 있지 않다. 그러나 최근에 열안정적 리파아제가 호열성 고세균으로부터 알려졌다 (Sriskanda 2000). *Methanobacteium thermoautotrophicum* △H (Sriskanda 2000), *Pyrococcus abysii* (http://www.genescope.cns.fr/pab/) *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk 1997), 및 *Methanococcus jannaschii* (Bult 1996)으로부터의 DNA 리가아제에 대한 보고가 고세균 효소는 ATP 의존적 이라는 것을 나타낸다(Kletzin 1992). 그러나, *Thermococcus*에 속하는 고세균 리가아제는 아마도 조효소로서 $NAD^+$ 및 ATP 모두를 요구할 것이라고 보고되었다(Nakatani et al. 2000; Rolland et al. 2004)



라이게이션(ligation) 분석은 단일 뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 결정하는데 이상적인 면이 있다. 그리고 열안정적 DNA 리가아제는 단일-염기 유전 질환을 증폭 및 검출하기 위한 리가아제 연쇄 반응(Ligase chain reaction; LCR)의 핵심 성분이다(Barany 1991).

### 다. 프로릴(prolyl) 올리고펩티다아제

프로릴(Prolyl) 올리고펩티다아제(POP, EC 3.4.21.26)은 프로릴 엔도펩티다아제(prolyl endopeptidase; PEP)라고 불리며, 단백질 잔기의 C-말단에서의 프롤린-포함 펩타이드의 가수분해를 선호하는 효소이다(Wilk 1983). 촉매 트라이어드의 순서의 면에서 볼 때 잘 알려진 트립신 또는 서브틸리신 패밀리와는 관련이 없고, 다른 세린 펩티다아제 분류에 속한다(Clan SC, 패밀리 S9), 이 분류에는 디펩티딜 펩티다아제 IV, 아크릴아미노아킬 펩티다아제, 및 올리고펩티다아제 B가 속한다(Rawlings and Barret 1994; Rawling et al. 1994). 이들 효소는 전체 약 30 아미노산 잔기 이하의 기질을 선택하고 절단하는 방식을 공유하고 있다. 돼지의 POP의 결정 구조 및 이 돌연변이 유도체는 α/β-하이드롤라아제 접힘의 펩티다아제 도메인을 가지고 있고, 이것의 촉매 트라이어드(Ser554, Asp641, His680)은 특수한 β-프로펠러의 중심 터널에 의해서 덮혀 있었다. 이것은 큰 구조의 펩타이드를 배제시키는 활성부위에 대한 입구 필터로서 작용한다(Fulop et al, 2000; Fulop et al. 2001; Polar 2002; Szeltner 2000).

이 프롤린-특이적 효소는 세균, 고세균, 곰팡이, 동물 및 식물에 넓게 분포되어 있다(Harwood et al. 1997; Kabashima et al. 1998; Rennex et al. 1991; Yoshimoto et al. 1980; Yoshimoto et al. 1991). 여러개의 POP의 분리, 클로닝, 이종 발현이 *Flavobacterium meningosepticum* (Yoshimoto et al. 1980), *Sphingomonas capsulate* (Kabashima et al. 1998), *Aeromonas hydrophila* (Kanatani et al. 1993), 돼지의 뇌(Rennex et al1991) 및 인간의 T-림프구 (Vanhoof et al. 1994)에서 보고되었다. 이것은 건망증 (Yoshimoto et al. 1987), 우울증 (Maes et al. 1994), 및 알츠하이머 병(Shinoda et al. 1997) 뿐만아니라, 펩타이드 호르몬 및 뉴로펩타이드의 성숙 및 분해(Wilk 1983)에도 관여할 것이다. 이들 POP는 생리적 과정에서 중요할 뿐만아니라, 생화학 및 임상적 적용에서 상당한 잠재성을 가지고 있다(Diefenthal et al. 1993). 대부분의 세린 엔도펩티다아제가 프롤린 잔기를 가수분해하지 못하기 때문에, 프롤린-특이적 단백질 분해효소은 코에릭 스푸루(coeliac sprue) 및 위장간의 소화에 상대적으로 잘 견뎌서, 유전적으로 감수성인 사람에서 면역질환을 일으키도록 장내에 남아있는 밀, 호밀 및 보리로부터의 프롤린-풍부 글루텐의 소화관련 질병에의 치료에서 중요하다(Sollid 2002). 이와 같은 해로운 펩타이드의 POP-촉매 단백질내 분해는 이들의 제거를 촉진하기 위해 제안되었다

(Hausch et al. 2002; Shan et al. 2002).

### 라. 아미노펩티다제 P

아미노펩티다제 P (APP; X-Pro 아미노펩티다제 EC 3.4.11.9)는 말단에서 두 번째 잔기가 프롤린(proline)인 펩티드로부터 N-말단의 아미노산을 제거하는 펩티다아제이다. APP의 특이성을 갖는 효소가 처음으로 *Escherichia coli*로부터 정제된 이래로, APP는 세균, 선충 및 몇몇의 포유류의 조직을 포함하는 광범위한 생물원으로부터 특징이 분석되었다. 세균에서의 APP의 생리학적 역할은 명백하지 않지만, 포유류의 APP는 콜라겐의 단백질 재편성 및 물질 P 및 브라디키닌(bradykinin) 같은 생물학적으로 활성이 있는 펩타이드의 조절에 관련이 있다. 상당수의 lactococcal 균주들로 부터의 APP는 펩타이드를 분해하여 이를 치즈 기질에 방출하는데 관여함으로써 치즈의 성숙과정에서 쓴맛을 없애는데 기여하는 것으로 보고되었다. 그러나, 현재까지 고세균 또는 고호열성세균 로부터의 APP의 성질대한 보고가 없다.

### 마. 카르복시펩티다아제 (CP)소개

카르복시펩티다아제 (CP)는 폴리펩타이드의 C-말단에 작용하여 단일의 아미노산 또는 다이펩타이드(dipeptide)을 만든다. 카르복시펩티다아제는 세 개의 카테고리로 나눌 수 있다. 상기 효소의 활성 부위에서 아미노산 잔기의 성질에 기초하여 세린 카르복시펩티다아제, 메탈로카르복시펩티다아제, 및 시스테인 카르복시펩티다아제이다.

메탈로카르복시펩티다아제는 그들의 활성에 2가의 금속 이온이 요구되는 것이 특징이다. 펩티다아제 패밀리 M32에 속하는 열안정성 카르복시펩티다아제 I (EC 3.4.17.19)는 HEXXH 금속 결합 모티프를 포함하고 있어 다른 메탈로펩티다아제와는 구별된다. 여러 개의 열안정적 카르복시펩티다아제 I 유전자는 모든 세 생물계 즉 고세균, 세균 및 진핵생물에 걸쳐 나타난다. 이들 중에, *Thermus aquaticus*(카르복시펩티다아제 Taq), *T. thermophilus* 및 고호열성 고세균 *Pyrococcus furiosus*으로부터 단 세 개의 열안정적 카르복시펩티다아제가 분리되어졌고, 특성이 연구되었다. 열안정적 카르복시펩티아제 I은 최적온도가 80-100℃여서 매우 열안정적인 것으로 알려졌다. 활성에 대한 높은 최적 온도는 각각 최적온도가 60 및 85℃로서, 세균 *Thermoactinomyces vulgaris* 및 고세균 *Sulfolobus solfataricus*로부터 분리되어진 다른 카르복시펩티다아제들에게서 보고되었다.

열안정적 카르복시펩티다아제 I는 넓은 기질 특이성을 보인다. 예를 들어, *P. furiosus* 카르복시펩티다아제는 C-말단에 Gly, Pro 또는 산성 잔기(Asp 및 Glu)을 가지는 펩타이드는 분해를 못하지만, C- 말단의 염기성, 방향족성, 중성 및 극성 아미노산은



분해를 한다. 카르복시펩티다아제 Taq의 경우에는 Pro를 제외하고, C-말단의 중성, 염기성, 및 산성 아미노산을 분해하며, 긴 사이드 체인을 가진 아미노산을 가장 빠르게 분해한다.

미생물의 메탈로카르복시펩티다아제의 생리적 역할은 아직 정해지지 않았다. 포유류의 메탈로카르복시펩티다아제는 카르복시펩티다아제 A 및 B에 의한 소화적인 단백질 분해에서 카르복시펩티다아제 N 및 엔케팔린 컨버타아제에 의한 생물학적 활성 펩타이드의 성숙과 같은 특정한 단백질분해 과정에 이르기까지 다양한 생물학적 과정에서 중요한 역할을 한다. 한편 합성 또는 자연의 펩타이드 기질에 대한 *P. furiosus* 카르복시펩티다아제의 넓은 특이성은, 고등생물에서 보이는 특이한 번역 후 변형에 대조되게, 단백질의 재순환에서 역할을 할 것이라고 제시되었다. 카르복시펩티다아제 I의 넓은 기질 특이성은 단백질의 C-말단 서열 결정에서 유용하다. N-아세틸-레닌 기질을 이용하여, *P. furiosus* 카르복시펩티다아제가 Leu, Val, Phe, Tyr, Ser 및 His 잔기를 내보내면서 C-말단으로부터 7개의 잔기까지 서열을 결정할 수 있다.

### 바. 메티오닐 아미노펩티다제

메티오닐 아미노펩티다제 (MetAP; EC 3.4.11.18)는 진행되지 않는 방식으로 발생초기의 폴리펩타이드 사슬로부터 N-말단 메티오닌 잔기의 가수분해적 제거가 가능한 독특한 종류의 프로테아제를 나타낸다. 이것은 원핵생물 및 진핵생물 모두에서 발견되는 도처에 존재하는 효소이며, 기능 조절, 세포내 타켓팅 및 단백질 재편성에 관계된 N-말단 변형을 위한 중요한 효소이다(Bradshaw et al., 1998; Lowther and Matthews, 2000; Prchal et al., 1986; Varshavsky, 1997).

서열 정렬 및 엑스레이 결정 데이타에 기초하여 MetAP는 두 가지 유형으로 나뉘어 지고(I 및 II 유형), II 유형 효소내에는 C-말단 도메인 내에 삽입된, 기능이 알려지지 않은 추가의 62 아미노산 나선형 서브도메인이 있다(Afrin et al., 1995). 세균은 오직 I 유형 MetAP 만을 갖으며, 고세균은 오직 II 유형만을 갖는다. 이와는 대조적으로 진핵생물은 I 유형 및 II 유형 MetAP의 둘 다를 갖는다(Bradshaw et al., 1998).

인식/결합체로서 기능할 것으로 보이고, 단백질-단백질, 단백질-DNA 또는 단백질-RNA 상호작용을 통하여 리보솜 또는 다른 세포내 동반자와 부착하는 N-말단 도메인 확장의 부존재(하부유형 a) 또는 존재(하부유형 b)에 의하여 이러한 효소들이 더욱더 분화되어진다. *E. coli* (Roderick and Mattews, 1993) 및 *Staphylococcus aureus*(Oefner et al., 2003)으로 부터의 Ia 유형 MetAP, *Pyrococcus furious*(Tahirov et al., 1998)로부터의 IIa 유형 MetAP 및 *Homo sapiens*(Liu et al., 1998)로부터의 IIb 유형 MetAP 는 결정학기술에 의하여 특성규명이 되었고, 두 개의 금속이온은 엄격하게 보존된 잔기(두 개

의 글루탐산, 두 개의 아스파트산, 한 개의 히스티딘 및 두 개의 물 분자)와 배위결합되어 있는 유사한 촉매 도메인을 포함하는 것으로 보였다((Lowther et al., 1999).

고호열성 고세균에서는 *P. furious*로부터 단하나의 MetAP가 클론 되었고, 생화학적으로 특성이 규명되었다(Tsunasawa et al., 1997). *Thermococcaceae* 과에 속하는 *Thermococcus* 및 *Pyrococcus* 구성원들은 최적 생장 온도가 상당히 다름에도 불구하고, 게놈 크기, 유전자 밀도, 유전자의 수, GC 함량 같은 많은 게놈 특징을 공통으로 가지고 있다(Fukui et al., 2005).

*Thermococcus* spp.로부터의 대부분의 효소들은 *Pyrococcus* spp.로부터의 효소들보다 활성에 대한 조금 낮은 최적온도를 나타내는 경향이 있는데, 이것은 아마도 두 속이 살고 있는 곳의 주변 온도에 기인하는 것으로 추정된다. 일반적으로 높은 유사성을 보여주는 두 속으로부터의 단백질들 간의 생화학적 차이는 고세균 단백질의 열안정성 기작을 이해하는 단서를 제공할 수 있으며 열안정성에 대하여 책임이 있는 잔기들을 확정적으로 알아 낼 수 있다.

**사. 전분분해효소**

전분을 분해하는 효소는 여러 종류의 미생물에 분포하고 있고, 섬유, 식품, 발효, 제지, 주조 및 증류 산업, 당분의 당화뿐만 아니라 임상, 약학 및 분석화학과 같은 넓은 분야의 산업적 적용에 이용되고 있다(Pandey et al., 2000; Vihinen et al., 1989). 온도, 고농도 전분의 이용, 기질 특이성 및 pH 면에서 공정이 경제적이게 하는 특이한 적용에 있어서 적절한 효소의 높은 요구가 있다. 80~90℃에서 되어지는 전분의 당화 및 액화공정에 있어서, 효소가 고온에서 안정적일 필요가 있다. 때문에, 호열성 및 열안정성의 효소가 필요하였다. 열안정성뿐만 아니라 고호열성 효소는 변성제, 용매, 단백질 분해 효소에 대한 저항성 때문에 유리해질 수 있다. α-아밀라아제를 포함하는 열안정성 아밀로오스 분해 효소는 중온성의 *Bacillus* sp., 호열성의 고세균 및 진정세균에서 보고되었다 (Brown and Kelly 1993; Chung et al., 1995; Dong et al., 1997; Frillingos et al. 2000; Morgan and Priest, 1981; Tachibana et al., 1996). 그들 대부분은 아미노산 상동성에 기초하여, 글리코실 하이드롤라아제 집단 13 (Henrissat, 1991)에 속한다. 이 집단은 비록 전체의 서열 유사성은 낮지만, 4개의 보전되어진 촉매부위 및 공통의 $(\alpha/\beta)_8$-배럴 구조를 가지고 있다(van der Maarel et al., 2002). 유용한 효소의 탐색외에도, 상업화에 대한 중요한 기준에 맞추기 위하여 유용한 효소의 조작이 효소의 안정성을 향상시킬 수 있다.

일반적인 유전자 조작 및 게놈의 연구 방법의 조합으로, 고호열성 미생물의 유전자 서열이 열안정적 효소 때문에 생물공학적 관심을 받고 있고, 많은 매우 열안정적인 효소가 생물공학적 목적으로 개발되고 있다. 최근에, 본 발명자들은 고호열성 고세균 *Thermococcus sp.* NA1을 분리하였고, 많은 유용한 극히 열적으로 안정한 효소를 찾기 위하여 전체 게놈 서열을 결정하였다. 게놈 정보의 분석은 상기 균주가 α-아밀라아제, α-글루코시다아제, 플루란아제(pullanase) 및 시클로덱스트리나아제와 같은 전분-분해활성 효소를 가지고 있음을 보였다.



## 4. 극지환경 무척추동물의 유전체 분석, 유전자원 확보

극지생물에 고유한 단백질로 알려진 결빙방지단백질 분야에서 10년 이상 연구를 수행해 온 미국과 캐나다는 남극의 맥머도기지에 여름학교를 개설하여 남극생물의 연구인력을 확충하고 연구개발 과제를 발굴하여 왔다. 두 나라에 설립된 A/F Protein이라는 벤처 회사는 결빙방지단백질을 어류에서 추출하여 고가에 판매하고 있다 (약 1200만원/그램). 얼음결정 표면에 흡착되어 이를 자라지 못하게 함으로서 생물체 체액의 빙점강하를 유도하는 결빙방지단백질(antifreeze protein)은 극지방 어류에서 처음 발견된 이래 (DeVries, 1971), 육상의 다양한 절지동물에서도 발견되었다 (Duman, 1977, 2001). 최근, ice-affinity chromato-graphy 방법이 개발되어 그동안 간과되었던 새로운 결빙방지물질들이 발견되고 있다 (Marshall, 2004). 결빙방지물질은 장기(臟器) 및 혈액 보관, 냉동배아 보존의 첨가제와 같은 의학적 용도뿐만 아니라 냉동냉장 식품의 첨가제로서도 사용될 수 있어 상품성이 높은 고가의 바이오소재로 평가된다 (Fletcher et al., 2001). 이 분야 관련 연구로서 빙점강하를 지표로 한 새로운 단백질 발견은 물론, 구조 분석 (Liou et al, 2000), 반복 구조 펩타이드와 얼음결정의 상호작용 (Liu et al, 2005), 결빙방지단백질 유전자가 도입된 형질전환 식물체의 결빙내성 측정 (Huang, 2002) 등이 수행되고 있다.

미국은 2003년에 "Polar Biology in the Genomic Era" (NRC, 2003) 보고서를 발간하고 극지생물의 게놈 및 유전자 연구의 중요성을 강조하면서 이에 대한 지원을 확대하고 있다. 한편, 극지생물학 연구자들은 2004년 "남극 생물의 진화와 생물다양성"이라는 국제 공동연구 프로그램 (Evolution and Biodiversity in the Antarctic, EBA)을 남극과학위원회에 제출하고 연구를 시작하였다 (SCAR report, 2005). EBA 공동연구 프로그램에서는 해양, 육상과 호수 생태계 생물을 대상으로 진화과정과 생물다양성 분석, 생태계 동태와 특성 변화 분석, 현재와 미래 환경변화에 대한 각 생물과 생태계의 반응 예측 등이 이루어질 예정이다. 지구전체 생물권(Biome) 내에서 극지에서 이루어진 생물의 진화와 저온적응 과정을 비교 분석함으로써 생물이 환경변화에 반응하는 방식을 분자수준에서부터 생물체, 생물권 수준까지 총체적으로 이해하게 될 것이다. 이 연구를 통해 극지 생물자원을 활용할 수 있는 기초 자료가 축적될 것이다.

극지생물의 저온환경에 대한 생리화학적 연구는 미국과 유럽, 러시아 과학자 그룹을 중심으로 활발히 이루어지고 있다. 저온환경에서 발생관련 유전자 발현량의 변화, 온도충격 유전자들의 발현 차이, 에너지 대사 관련 효소(LDH, MDH 등)의 활성과 구조적 특징 등 분자생리 수준의 연구가 수행되고 있으며 (Somero, 2004, 2005), 한편으로 극지방 설치류와 여우의 호흡생리와 동면 등 생물체 수준의 연구도 수행되고 있다 (Wierzbicki et al, 2005).

저온활성 효소단백질은 극지생물에서 상업적으로 활용가능한 주요 소재로 간주된다. 극지생물의 유전자 분석을 통하여 극지생물 특유의 저온활성 효소단백질 유전자를 확보하려는 연구가 경쟁적으로 진행된다. 영국, 프랑스, 독일, 일본, 미국 등 선진국뿐만 아니라 세계 효소시장을 지배하고 있는 Novozyme(덴마크)과 Genencor International(미국) 등과 같은 기업이 낮은 온도에서도 활성이 뛰어난 효소단백질을 찾기 위해 많은 연구를 하고 있다. 저온활성의 단백질분해효소, 지질분해효소, 녹말당화효소 등은 제지 및 펄프, 식품, 사료, 섬유 및 피혁 산업에 활용성이 높으며, 가정용 세제의 첨가제로서도 널리 이용된다. 남극생물의 생리대사 및 대사 물질에 대한 연구가 미국과 캐나다, 영국, 벨기에, 프랑스, 이태리를 중심으로 이루어졌다.

영국은 British Antarctic Survey에서 BIOFLAME이라는 프로그램을 시작하면서 Polar Genomics 워크숍을 개최하는 등 극지생물의 유전체-유전자 연구를 적극 지원하고 있으며, 미국은 국가인간유전체연구소(National Human Genome Research Institute, NHGRI)가 중심이 되어 남극해 대표적 어류의 유전체를 분석하기 위해 Chaenocephalus aceratus (icefish)와 Notothenia coriiceps (rockcod)의 BAC 라이브러리 제작을 지원하기 시작하였다. 중국도 최근 들어 극지생물학 분야의 연구를 강화하면서 극지 생물의 효소유전자 개발에 많은 연구를 진행하고 있다.

## 5. 어류로부터 유용유전자 확보

송사리(medaka) 및 복어(puffer fish)의 유전체 분석에 관한 연구가 진행되어 database를 구축하였으며, 모델생물로 활용하기 위한 연구 또한 활발하다. 태국은 새우(black tiger shrimp) 유전체 분석관련 연구가 국가의 지원으로 연구소와 대학이 연계하여 진행되고 있다.



## 6. 신규 해양천연물 분리

해양생물에서 유래한 생리활성물질에 대한 연구를 주도하여온 국가는 미국이며 현재 미국의 정부와 민간의 산·학·연에서는 21세기를 주도할 미래과학의 한 분야로서 해양생물공학 연구의 필요성을 강조하고 있다. 미국에서 해양생물유래 신물질 개발에 대한 공공연구는 NIH와 그 산하의 NCI등의 기관에 의하여 주로 지원되고 있다. 이들은 자체의 연구진에 의하여 신물질 개발연구를 직접 수행할 뿐만 아니라 외부 대학 및 민간 연구소와의 공동연구를 광범위하게 수행하고 있다. 또한 연구방향의 제시, 새로운 연구방법 및 기술의 제공, 연구결과의 응용 등 신물질 개발의 전반적인 과정에 직접 참여하고 있다. 해양신물질 연구에 있어서 NIH는 1990년대에 Philippine남부 Cebu섬에 임해기지를 건설하여 서태평양에 서식하는 해양생물자원의 조직적인 확보와 이를 대상으로 신물질연구를 장기적으로 수행하고 있고, NCI는 전 세계에 서식하는 36,000여 육·해상의 동·식물과 미생물에 대한 screening program을 진행한 바 있다.

일본의 해양 천연물연구를 비롯한 해양생명공학 연구는 1980년대부터 주로 정부 주도하에 수행되고 있으며 과학기술청, 농림수산성, 통산성 등의 부처에서 지원하고 있다. 중요과제로는 통산성에서는 '해양생물로부터 고기능 정밀화학제품의 연구개발' 과제를 수행하였고, 과학기술청에서는 일본 해양과학 기술센터(Japan Marine Science and Technology Center, JAMSTEC)를 중심으로 심해 미생물의 산업적 이용, 농림수산성의 수산업에 있어서의 신기술 개발과 실용화 및 Marine Frontier Project 등 해양생물로부터 유용물질을 개발하는데 관여하는 중요 과제를 수행하고 있다. 한편 민간연구 개발에 있어서 1988년 24개 민간기업이 연합하여 설립한 해양생물공학연구소(Marine Biotechnology Institute Co, MBI) 등이 있으며 특히 해양생물공학연구소는 1988년부터 "Fine Chemicals from Marine Organisms" 프로그램을 통하여 해양신물질 개발에 직접 참여하고 있다.

러시아의 해양생물 유래 유용물질에 대한 연구는 과학 아카데미 극동 branch 산하의 Pacific Institute for Bioorganic Chemistry(PIBOC)에서 주도하고 있다. 이들은 다양한 해양생물 시료의 채집을 위하여 열대 태평양등 외국의 해역에까지 영역을 넓힌 바 있다.

호주는 1970년대 중반 거대 다국적 제약기업인 Hoffman La Roche가 세계 최초로 임해연구소를 설립하여 해양천연물 연구를 시작한 영향으로 미국, 일본, 이태리와 더불어 초기의 해양천연물 연구를 주도한 국가이다. 1980년대 후반 호주 정부의 "New Investment Promotion Program"의 일환으로 연구가 활성화되었고, 공공 연구소인 Australian Institute of Marine Sciences(AIMS)가 설립되어 연구가 매우 활발하다. 해양생명공학 분야에 특화된 AIMS는 호주정부의 적극적 지원 하에 자국의 연안 외에 ASEAN 국가에까지 진출하여 생리활성 신물질과 기능성 유용물질에 대한 연구를 수행하고 있다.

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 초고온성 미생물 확보

제2절 초고온성 미생물 유전체 해독

제3절 극한 효소 유전자 발굴

제4절 극지환경 무척추동물의 유전체 분석, 유전자원 확보

제5절 어류 유용유전자 확보

제6절 신규 해양천연물 분리

제 7절 항동결물질 분리

제 8절 해양생명공학 국내외 연구동향 및 정책 제언

# 제 1 절 초고온성 미생물 확보

## 1. 연구 재료 및 방법

### 가. 시료 채취

본 실험에 사용한 퇴적물 시료는 2002년 '서태평양 종합 대양연구' 프로그램을 통해 파푸아뉴기니의 PACMANUS 열수구 지역(03°44′S, 151°40E; 1650m)탐사를 통해 다중주상퇴적물 채취기(multiple corer)를 이용하여 채취하였다. 채취한 퇴적물은 현장에서 바로 anaerobic chamber에 옮긴 후 혐기적 조건에서 20 ㎕에 멸균된 인공해수가 들어있는 25ml-serum bottle($N_2/CO_2$ 혼합가스로 위부분의 공간을 채워짐)에 분산 시킨 후 butyl rubber로 밀폐했다. 시료가 들어있는 serum bottle은 실험실에서 초고온성 균주 분리 실험을 하기 위하여 4℃에 냉장 보관하였다.

### 나. 순수분리

확보된 시료는 각각 1/1, 1/10, 1/100 희석하여 1 ml 주사기를 이용하여 20 ml의 Yeast-Peptone-Sulfur (YPS)배지 (Holden 등, 2001)가 들어있는 25 ml-serum bottle ((N2/$CO_2$)혼합가스로 위부분의 공간을 채워짐)에 넣은 후 80℃에서 3일간 배양하였다. 배양여부는 탁도와 현미경관찰로 확인하였다. YPS 배지는 NaCl 19.6 g, $Na_2SO_4$ 3.3 g, KCl 0.5 g, KBr 0.05 g, $H_3BO_3$ 0.02 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 8.8 g을 3차 증류수 970 ㎖에 녹인 다음 100× Trace element solution ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0.01 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.1 g, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0.005 g, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 0.2 g, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 0.1 g, KBr; 0.05 g, KI; 0.05 g, $H_3BO_3$;0.1 g, NaF; 0.05 g, LiCl; 0.05 g, $Al_2(SO_4)_3$; 0.05 g, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$; 0.01 g, $VOSO_4 \cdot 2H_2O$; 0.005 g, $H_2WO_4$; 0.005 g, $Na_2SeO_4$; 0.005 g, $SrCl \cdot 6H_2O$ ; 0.005 g, $BaCl_2$; 0.005 g per liter) 10 ㎖, 200× 1% $CaCl_2 \cdot 2H_20$ 5 ㎖, 100× N-P 혼합액 10 ㎖, 500× Fe EDTA 2 ㎖, 0.1% resazurin (1000×) 1 ㎖를 첨가하여 만든 다음 멸균된 Sulfur가 포함된 serum bottle에 배지를 20 ㎖ 분주한 다음에는 산소가 없는 질소가스로 purging면서 capping을 하고 reducing agent (5% $Na_2S \cdot 9H_2$)를 0.1 ㎖ 씩 주사기로 넣어주어 산소를 완전히 제거하였다. 균주분리는 1%에 phytagel(Sigma)이 들어있는 YPS 평판배지에 도말하여 80 ℃에서 2일간 배양하였다. 형성된 단일 콜로니는 무작위로 선별하여 재차 동일한 배양조건으로 순수분리가 될 때 까지 수행하였다. 순수분리된 균주는 serial dilution 방법을 이용하여 현미경상에서 확인하였으며 NA1이라고 명명하였다. 순수분리된 NA1은 장기관보관하기위하여 지수성장기까지 배양 후 냉동보존시약으로 5%(v/v) dimethyl sulfoxide(Sigma) 넣은 후 -80 ℃ 보관하였다.



### 다. 최적 생장 조건

순수분리된 NA1의 최적성장온도 조건은 YPS 배지에 60-100℃ 범위에서 5 ℃ 간격으로 온도 차이를 두어 spectrophotometer (UV-2401PC, Shimadzu)를 이용하여 600 nm에서 OD(optical density)를 시간대 별로 측정한 값과 동시에 배양액을 NaCl (30%), formalin (2.5%), 4'-6-diamidino-2-phenlyindole (0.01%)이 들어있는 멸균 수에 희석하여 black polycarbonate membrane filters (pore size, 0.2 ㎛; Whatman)로 여과한 후 phase-contrast 현미경으로 세포 수를 측정한 값의 상관관계공식을 아래와 같이 구한 후 성장속도를 계산하여 결정하였다(Zeiss Axioplan; Porter & Feig, 1980).

cells $ml^{-1}$ = 9.2 × $10^8$ × $OD_{600}$ (n=7, $r^2$ = 0.99)

최적생장 pH는 YPS배지에 sigma buffer[pH 3.5 - 4.5, no buffer; pH 5.0 - 6.0, MES; pH 6.5 - 7.0, PIPES; pH 7.5 - 8.5, HEPES; and pH 9.0 - 10.0, no buffer]를 pH에 따라 최종농도가 각각 20 mM이 되도록 넣어 주었다. 최적생장 NaCl 농도는 YPS 배지에 pH를 8.5로 조절한 다음 NaCl 농도가 0-6%가 되게 넣어주었다. 최적생장 pH와 NaCl의 결정은 최적생장 온도결정 방법과 동일하게 수행하였으며 모든 최적생장조건 실험은 두 번 수행하였다.

### 라. 생장요구측정

다양한 기질이용도는 yeast와 peptone이 제거되고 1%(v/v) vitamin solution이 첨가된 YPS 배지에 최적생장배양조건으로 측정하였다. 기질이용도 측정에서 starch, maltose, gelatin, glycogen, sucrose, cellobiose, xylose, lactose 기질은 최종농도가 0.5%(w/v)가 되도록 넣어주었으며, yeast extract, peptone, tryptone, casein, beef extract, casamino acids, succinate, propionate, pyruvate, acetate 기질은 최종농도가 0.2%(w/v)되도록 첨가했다. 무기영양 생장은 최소배지 YPS (yeast와 peptone이 제거, 1% (v/v) vitamin solution 첨가)에 유일한 탄소원으로 $H_2/CO_2$ (80:20, 200 kPa) 혼합가스를 넣어 준 후 최적생장조건에서 배양하면서 확인하였다. 20개의 혼합 아미노산의 생장을 확인하기위하여 20개의 아미노산 각각을 2 mM이 되도록 하여 여과지(pore size, 0.22 ㎛; Whatman)를 이용하여 멸균한 다음 각각의 아미노산을 최소배지 YPS에 최종농도가 0.2 mM이 되도록 넣어 혼합 아미노산을 만든 다음 최적생장조건에서 배양하면서 확인하였다. Elemental sulfur의 요구도는 YPS 배지와 sulfur를 넣지 않은 YP 배지를 만든 다음 최적생장조건에서 배양하면서 각 배지에 생장유무의 확인을 통해 조사하였다. 분리된 균주의 다른 전자수용체 사용유무를 확인하기위해 elemental sulfur 대신 cystine (10 %),

polysulfide (10 mM), sodium thiosulfate (10 mM), sodium sulfate (20 mM), and sodium sulfite (3 mM) 대체하여 조사하였다. chloramphenicol, ampicillin, kanamycin, vancomycin, streptomycin, 그리고 rifampicin에 대한 항생제 sensitivity 측정은 각 항생제를 150 μg/ml 농도로 하여 최적생장조건에서 배양하면서 수행하였다. T. celer (Zillig et al., 1983)와 T. peptonophilus (González et al., 1995) 균주는 80℃에서 항생제의 효율성을 증명하기위해서 참고균주로 사용하였다.

### 마. 세포형태와 운동성

세포형태와 운동성은 phase-contrast 현미경 (Zeiss Axioplan)으로 1000 배율에서 관찰하였다.

### 바. 전자현미경관찰 (SEM/TEM)

SEM(scanning electron microscope)관찰을 위하여 NA1균주는 지수성장기까지 배양한 후 원시분리를 통해 균체를 얻은 다음 2%(w/v) glutaraldehyde가 첨가된 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.5)을 넣어 4℃에서 2 시간 동안 고정한 후 여과지로 여과하였다. 여과된 여과지는 순차적으로 알코올농도를 증가시켜 탈수과정을 거친 다음 critical-point dryer(SCD040, Balzers)장치로 gold 코팅을 한 후 scanning electron microscope (JSM-840A; Jeol)로 관찰하였다. TEM(transmission electron microscope)관찰을 위하여 NA1균주는 지수성장기까지 배양한 후 배양액 500 μl를 2.5%(w/v) glutaraldehyde가 첨가된 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.5)을 넣어 4 ℃에서 2 시간 고정한 후 Formvar/carbon-coated grid (300 mesh)에 한 방울을 떨 군 다음 2 % phosphotungstic acid (w/v)로 염색하였다. TEM 관찰은 JEM 1010 electron microscope (Jeol)를 이용하였다.

### 사. 16S rDNA의 염기서열결정과 계통분석

Genomic DNA는 Godfroy 등의(1997) 방법을 이용하여 얻었다. 16S rDNA은 두 개의 archaeal primer: Arch21F (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGG-3')와 Arch1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'; Delong, 1992)사용을 제외하곤 Sohn 등의(2004) 방법을 이용하여 얻었다. PCR 산물은 pGEM T-easy vector (Promega) kit로 제조사의 방법에 따라 클로닝 하였으며 클로닝된 PCR 산물의 염기서열결정은 BigDye terminator cycle sequencing kit (PE Applied Biosystems)와 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer 염기서열장치(Applied Biosystems)를 이용하였다. 16r DNA 진의 중앙 단편들은 Arch533F(5'-GTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3')와 Arch958R (5'-YCCGGCGTTGAMTC



CATTT-3') primer를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 16S rDNA의 계통분석은 유전자의 염기서열이 결정된 균주들은 염기서열 정렬 프로그램인 clustal W(Thompson *et al.*, 1997)를 이용하여 정렬한 후, PHYDIT(Chun, 1995)과PAUP* 4.0(Swofford, 1998)프로그램을 이용하여 가장 상동성이 높은 참고균주와 pairwise alignment하여 정렬하였다. 계통도를 그리기위해 Evolutionary distance matrices는 Juke and Cantor(1969), Fitch-Margoliash method(Fitch and Margoliash, 1967)를 사용하였으며 Tree algorithm은 Neighbor-Joining(Saitou and Nei, 1987), maximum-parsimony(Fitch, 1972) and maximum-likelihood(Felsenstein, 1993)을 이용하였다. 그려진 계통도는 Bootstrap analysis(Felsenstein, 1985) resampling을 1,000번 수행하여 각각의 clade 지지도를 확인하였다.

### 아. G+C %mol값과 DNA-DNA hybridization

G+C %mol 값은 Mandel 등(1970) 과 Marmur 등(1962)의 melting temperature방법으로 결정하였으며 DNA-DNA hybridization 는 De Ley 등 (1970)의 방법으로 수행하였다.

## 2. 연구결과

### 가. 순수분리

PACMANUS 열수구 지역의 퇴적물로부터 여러 번의 현미경 관찰과 계대배양을 통해 순수분리된 균주를 확보하였으며 순수분리된 균주 명을 NA1이라고 했다. 80 ℃에서 2 일간 배양된 NA1의 콜로니 형태는 원형이며, 크림색깔을 띄었다.

### 나. 세포형태와 운동성 및 전자현미경관찰

NA1은 polar flagella 이용하여 운동성을 가지며, 세포크기는 대략적으로 0.5에서 1.0 $\mu$m 갖는 구형이다(Figure 3-1-1).

### 다. 최적 생장 조건

NA1 균주는 최적생육온도는 80 ℃ (63-90℃, 생육온도 범위), 최적생육 pH는 8.5 (5.0-9.0, 생육pH 범위)이며, 최적생육 NaCl 농도는 3.5% (1.0-5.0%, 생육 NaCl 범위)이다(Figure 3-1-2).

### 라. 생장요구측정

NA1 균주는 종속영양세균이며 유일한 탄소원으로 $H_2/CO_2$(80:20, 200 kPa) 혼합가스를 넣어 준 무기영양배지에서는 생장하지 않는다. 생장하기위해서는 elemental sulfur를 요구하며 elemental sulfur수소로 환원한다. 분리된 NA1균주의 다른 전자수용체 사용유무를 확인하기위해 elemental sulfur 대신 cystine (10 %), polysulfide (10 mM), sodium thiosulfate (10 mM), sodium sulfate (20 mM), and sodium sulfite (3 mM)첨가한 배지에서는 생장하지 않는다. 또한, 20개의 아미노산이 0.2 mM이 농도가 되도록 첨가한 YPS 최소배지에서는 생장하지 않는다. NA1 균주는 chloramphenicol, ampicillin, kanamycin, vancomycin, streptomycin 그리고 rifampicin과 같은 항생에 저항성이 있다. 기질요구도 조사에 NA1은 beef extract, casein, peptone, tryptone, yeast extract, 그리고 starch와 같은 기질에서는 생장하지만 maltose, lactose, sucrose, cellobiose, xylose, gelatin, glycogen, casamino acids, acetate, succinate, propionate, 그리고 pyruvate에서는 생장하지 않는다. NA1과 계통적으로 가까운 *Thermococcus* 참고균주와의 생리적 특징의 비교는 Table 3-1-1에 요약하였다.

### 마. 16S rDNA의 염기서열결정과 계통분석

NA1의 16S rDNA 진은 총 1,457 bp 염기서열이 결정했다. 염기서열분석 결과 분리된 NA1 균주는 *Thermococcus* 속에 속하는 것으로 나타났다(Figure 3-1-3). 16S rDNA 염기서열을 토대로 계통분석을 한 결과 NA1은 *T. gorgonarius* (99.7 %), *T. kodakaraensis* (99.5 %), *T. peptonophilus* (99.5 %) 그리고 *T. celer* (99.4 %)와 가장 높은 상동성을 나타냈다.

(a) (b)

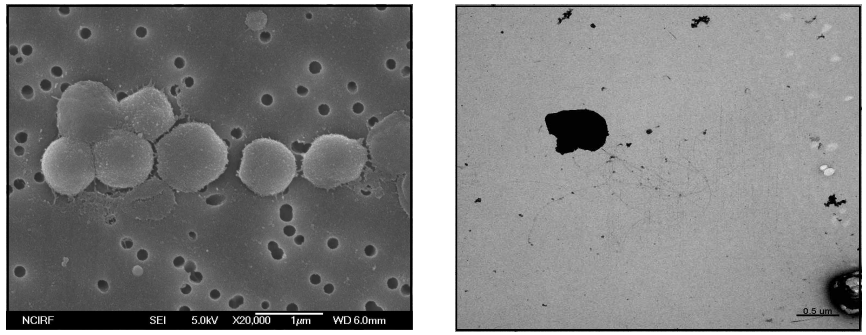
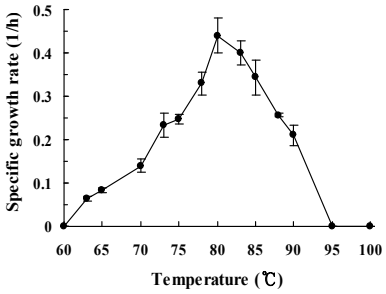
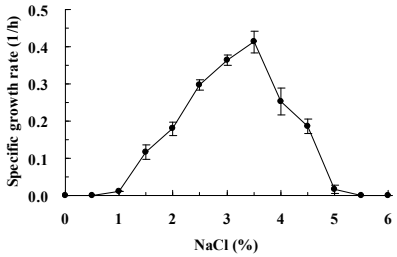



Figure 3-1-1. Electron micrographs of strain NA1$^T$: (a), scanning electron micrograph; (b), transmission electron micrograph. Scale bar represents 1 $\mu$m in (a) and 0.5 $\mu$m in (b).

(a)




(b)




(c)

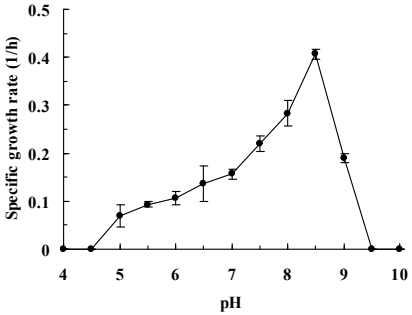



Figure 3-1-2. Effects of temperature, pH, and NaCl on growth of strain NA1$^T$.



Table 3-1-1. Physiological characteristics of strain NA1$^T$ and its phylogenetic relatives. Strains: 1, NA1$^T$ 2, *T. gorgonarius* (Miroshnichenko et al., 1998); 3, *T. celer* (Zillig et al., 1983) 4, *T. kodakarensis* (Atomi et al., 2004); 5, *T. peptonophilus* (González et al., 1995). +, positive; -, negative; W, weak reaction; ND, not determined; NR, not reported; R, required; S, stimulatory

| Property | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| Growth substrate | | | | | |
| Casein | + | ND | + | ND | + |
| Amino acids | + | - | ND | + | - |
| Starch | + | - | NR | + | - |
| Maltose | - | - | NR | + | - |
| Pyruvate | - | W | + | + | - |
| Sulfur requirement | R | R | S | R | S |
| Rifampicin resistance | + | ND | + | ND | - |
| Growth temperature (°C) | | | | | |
| Range | 63-90 | 68-95 | =93 | 60-100 | 60-100 |
| Optimum | 80 | 80-88 | 88 | 85 | 85 |
| NaCl concentration (%) | | | | | |
| Range | 1-5 | 1-5 | ND | 1-5 | 1-5 |
| Optimum | 3.5 | 2-3.5 | 4 | 3 | 3 |
| pH | | | | | |
| Range | 5-9 | 5.8-8.5 | NR | 5-9 | 3-8 |
| Optimum | 8.5 | 6.5-7.2 | 5.8 | 6.5 | 6 |
| G+C content (mol%) | 52 | 50.6 | 56.6 | 52 | 52 |

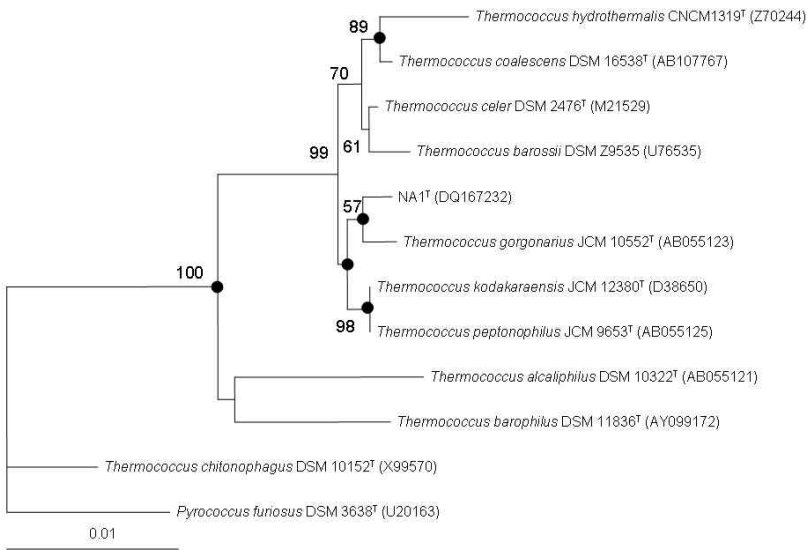



Figure 3-1-3. Neighbor-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences, showing relationships between strain NA1$^{T}$ and closely related taxa of the genus Thermococcus. Bootstrap percentage values higher than 50 % based on neighbor-joining analyses of 1000 replications were included at nodes, and solid circles indicate that corresponding nodes (groupings) were also recovered in Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, and maximum-likelihood trees. Bar, 0.01 nucleotide substitution per position.



**바. G+C %mol값과 DNA-DNA hybridization**

NA1의 G+C %mol 값은 52.0이다. 16S rDNA의 계통분석을 토대로 가장 상동성이 높은 *T. gorgonarius*, *T. kodakaraensis* (99.5 %), *T. peptonophilus* (99.5 %) 그리고 *T. celer* (99.4 %)에 대해 DNA-DNA hybridization한 결과 reassociation 값이 각각 26.4%(*T. peptonophilus*), 24.0%(*T. gorgonarius)*, 15.5 %(*T. celer*) 그리고 6.8%(*T. kodakaraensis*)로 분석 되었다.

## 3. 결론

16S rDNA 염기서열 토대로 계통분석을 한 결과 분리된 NA1은 *Thermococcus* 속에 속하는 것으로 종임이 확인되었지만, 참고균주와의 너무 높은 상동성을 나타내기 때문에 분리된 NA1균주의 분류학적 위치를 규정할 수 없었다. 따라서 본 연구에서는 16S 염기서열 상에서 NA1 균주에 대해 높은 상동성을 갖는 참고균주와 DNA-DNA hybridization 실험을 수행하였으며 그 결과 70% 이하의 낮은 DNA-DNA reassociation 값을 갖는 것을 확인 할 수 있었다. 이와 같은 결과는 Wayne 등 (1987)과 Stackebrant와 Goebel (1994)의 보고에서 16S rDNA 염기서열 상동성이 97% 이상이거나 DNA-DNA reassociation 값이 70% 이상이면 동일종으로 판단한다는 분류학적 종의 정의에 따라 분리된 NA1이 비록 16S rDNA 염기서열 상동성이 다른 참고균주와 99.4% 이상의 높은 상동성을 갖지만 DNA-DNA reassociation 값이 70% 이하임으로 *Thermococcus* 속내에 새로운 종임을 의미한다. 더욱이, 계통학적으로 가장 NA1 균주와 가까운 *T. gorgonarius*는 형태학적으로 NA1균주에서는 관찰되지 않는 protrusion (prostheca-like structure)구조를 가지고 있으며, 생리학적으로도 *T. gorgonarius*는 혼합 아미노산과 starch를 기질로 이용하지 못하지만 NA1 균주는 이 기질들을 모두 이용하며 *T. gorgonarius*의 최적생장 pH(pH6.5-7.2)도 NA1 균주(pH 8.5)보다 낮다. 더욱이 다른 참고균주에 대해서도 최적생장온도와 pH가 NA1 균주와 차이점을 갖는다(Table 3-1-1). 따라서 생리 생화학적 특성과 유전학적 분석을 토대로 분리된 NA1은 *Thermococcus* 속내에 새로운 종임을 확인 할 수 있었다.

# 제 2 절 초고온성 고세균 NA1 유전체 해독

## 1. 연구방법

### 가. Random shotgun library 제작

(1) Pure Culture

가장 중요하나, 가장 소홀히 하기 쉬우며 미생물 자체의 동정과 Mycoplasma에 의한 오염도 조심하여야 한다. Purity가 확실할 경우 충분히 culture하여 한번에 DNA prep을 끝내야 하며 최적 배양 조건에서 culture 하여 스트레스로 인한 돌연변이 유발의 가능성 최소화하여야 한다.

(2) Random Shearing

최대한 무작위도를 높일 수 있도록 다양한 조건에서 수행하여 그 결과를 취합하여야 하며 제한 효소를 이용하는 방법보다는 Sonication 또는 Shearing과 같은 물리적 힘에 의한 방법이 가장 적당하다. 일반적으로 짧은 시간에 높은 에너지를 사용하여 shearing 하는 것이 고른 분포도를 보인다.

(3) Sizing

정확한 크기의 insert의 준비가 매우 중요한데 이는 대규모 염기서열 분석 후 assembly 과정에서repeat sequence, chimera sequence 등 문제점 해결의 가장 중요한 실마리가 된다. 이 프로젝트를 위해서는 2Kb library를 준비하여 진행한다. 2Kb 와 10Kb insert의 정확한 크기 조절을 위해서는 최소한 2번 이상의 연속적인 gel purification 과정이 필요하며 이때 샘플 over loading이 일어나지 않도록 하며 Agarose gel 상에서의 충분한 분리가 일어나도록 전기 영동의 조건을 확립하는 것이 중요하다.

(4) Cloning

Bias가 유발되는 확률이 가장 높은 단계로서 X-gal을 이용한 blue/white selection 시 insert의 expression이 강제적으로 일어남으로 인하여 이때 발현되는 insert의 성질에 의하여 colony 형성의 경향성이 나타날 수 있다. 즉 insert sequence가 발현될 때 세포에 toxic한 경우 colony 자체가 형성되지 않을 수 있다. 또는 Insert의 불안정성으로 인해 Vector가 대장균 안에서 복제되지 못하여 Colony가 형성되지 못하기도 한다. 따라서 이를 최대한 억제하기 위하여 X-gal 및 IPTG를 이용하지 않아야 하며 가능하면 cloning site에 프로모터가 존재하지 않는 cloning vector를 사용하여야 한다. 이러한 경우 cloning efficiency가 문제화 될 수 있는데 이는 vector와 insert가 ligation된 것들만 gel purifiy하여 transformation을 수행함으로써 극복할 수 있다. 그런데 이 경우 분리된 ligated recombinant DNA가 매우 적게 얻어짐으로 인한 충분한 library colonies titre를 얻기 어려운 문제가 생길 수 있음으로 transformation efficiency를 높일 수 있는 방법이 요구된다. 일반적으로 electrophoration 방법에 의한 transformation 방법 확립이 요구된다. 한편 transformation 과정에서도경향성이 증가할 수 있는데 특히 regeneration 과정에서 그 확률이 가장 높다. 따라서 transformation의 일반적인 과정인 전기 충격 또는 열 충격 이후 SOB 또는 LB 배지에 의한 1시간 동안의 배양은 수행하지 않는 것이 좋다.

(5) Quality Control

일단 mass sequencing에 들어가면 마지막 assembly 단계에서만 확인이 가능하다. 따라서 mass sequencing 전에 라이브러리에 대한 확실한 QC가 진행되어야 한다. QC의 단계에서 가장 중요한 것은 라이브러리의 중복성 (redundancy)를 체크 하는 것인데 무작위로 선발한 384개 클론에 대한 염기서열 분석을 수행하여 최소한 90% 이상이 독립적으로 나와야 한다. 만약 10% 이상의 클론들이 한번 이상이라도 중복된 것으로 나타나면 다시 라이브러리를 제작하여야 한다.

### 나. 대규모 염기서열 분석

(1) Colony picking & Cell culture

colony picking 시 실험자에 의한 오차를 줄이기 위하여 마크로젠은 Genetix사의 Q-bot 시스템을 이용하며, 이는 colony picking 시의 경향성을 최대한 방지할 수 있으며, 샘플 관리를 위하여 Applied Biosystems 사의 LIMS (Laboratory Information Manage System)을 이용하여 샘플의 colony picking 단계에서부터 일관된 labeling 시스템을 유지하는가를 실시간으로 모니터링하고 있다.

(2) DNA extraction

DNA 추출은 완전 자동화 로봇 시스템을 이용하여 수행함으로써 수작업에 의한 샘플 quality 차이를 최소화하고 있다.

(3) Sequencing

마크로젠은 현재 6대의 ABI 3730을 보유하고 있으며(하루 3.5Mb의 염기서열 분석 능력), 마크로젠의 sequencing quality는 현재 Phred score 16 이상을 기준으로 trim할 때 평균 550bp의 read length를 보이고 있으며 최종 분석 완료된 염기 서열의 정확도는 99.99% 이상 (phred score 40 이상)으로서 국제 발표 수준을 충족시킬 수 있다.

### 다. Contig assembly 및 Gap filling

(1) Contig assembly

분석된 염기서열 정보는 Phred 프로그램에 의하여 base calling을 수행하며 이후 Arachne 프로그램을 이용하여 contig assembly를 수행한다. 이때 프로그램 실행 과정에 필요한 수많은 파라미터들에 대한 정확한 이해와 Reporting 파일에 나오는 결과들의 정확한 이해가 필요하다. 생성된 contig 들은 cosmid, phrap view 등의 프로그램을 사용하여 repeated sequence, chimera sequence 등의 문제점을 파악 해결하며 각각 clone 들의 sequence mate 정보 등을 이용하여 contig 들의 순서를 결정한다. 순서가 확실히 결정된 contig 들로 이루어진 scaffold map은 향후 gap filling 단계로 접어들게 된다. 즉 이 단계를 성공적으로 마치기 위해서는 단순 assembly 프로그램만을 돌리는 능력이 아니라 그 과정에서 발생하는 수많은 데이터의 정확한 의미를 파악하고 Consed, phrap view등을 이용, 효과적으로chimera sequence 등 잘못된 정보를 제거할 수 있어야 한다. 이를 위해서 충분한 computer 설비와 함께 숙련된 생물정보학 전문가가 있어야한다

(2) Gap filling

생성된 contig 및 unitig 들이 순서대로 정렬된 scaffold map을 바탕으로 각각의 contig 양 끝 단에서 PCR primer를 디자인하여 합성한 뒤 PCR 과정을 거쳐 이웃한 두 개의 contig 순서를 확인하고 이들 PCR product의 염기서열 분석을 통하여 염기서열 분석이 이루어지지 않은 부분을 채운다. 한편 PCR에 의하여 채워지지 않는 gap은 primer를 합성하여 chromosome walking 등의 방법을 수행함으로써 완전히 gap을 메운다.

### 라. ORF finding 및 annotation : Bioinformatics

모든 Coding region을 찾기 위해서 Glimmer, Gene Mark와 같은 gene-finding software를 training시켜서 사용한다. 또한 위에서 나온 결과를 기존의 알려진 유전자 염기서열 또는 단백질 아미노산 서열 데이터 베이스와 homologues 검색을 통해 기능을 추정한다. 여기서 homologues 검색 기준들을 어떻게 설정하느냐에 따라서 잘못된 유전자



기능을 최소화할 수 있다. 한편 Hypothetical protein과 unknown protein 에 대해서는 motif search를 이용하여 기능을 다시 추정한다. 마크로젠은 유전자 예측과 기능 찾기를 향상시키기 위해 자체 툴(tool)을 개발했으며, annotator가 정확 한 결정을 할 수 있도록 데이터를 그래픽 interface가 가능하도록 하였다.

### 마. Metabolic Pathway 분석

Gene Annotation 결과를 가지고 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Site의 Metabolic pathway를 기본으로한 *Thermococcus* sp. NA1의 Metabolic pathway를 구성한다. 각각의 pathway별로 유전자 정보를 따로 구분하는 표를 Excel형식으로 작성한다.

### 바. Genome Browser 구성

*Thermococcus* sp. NA1의 유전정보 유전정보를 확인할 수 있도록 제작되며 jdk1.5.0_02(Java Swing, 2D) 언어를 이용하여 구성한다. Database management로는 MySQL Server 4.1을 사용한다. Genome Browser의 상세내용으로는 유전자 정보, 해당 Metabolic pathway 그리고 각각 유전자의 상동성 검색과 기능성 검색의 결과를 확인 할 수 있도록 설계된다.

## 2. 결과

### 가. Whole Genome Sequencing을 위한 library 제작

(1) Random shotgun Library의 제작

최대한 무작위도를 높일 수 있도록 하는 방법 중 물리적인 방법을 선택하여 2kb Shotgun Library의 경우는 Nebulizer를 이용한 방법으로 진행하였다. 대규모 염기서열 분석 후 assembly 과정에서 repeat sequence, chimera sequence 등 문제점 해결을 위해 정확한 크기의 insert의 준비가 매우 중요하므로 최소한 2번 이상의 연속적인 gel purification 과정을 수행하였다. 이렇게 Sizing되어진 Insert들은 2kb의 경우 pCR4-Blunt TOPO Vector (Invitrogen사)에 Cloning하였다. 두 개의 Shotgun library를 제작하였으며 Insert의 길이를 조사한 결과 2kb shotgun library는 각각 1.973kb (stdev=439)와 1.692kb (stdev=570) 이었다(Figure 3-2-1).

(2) Cosmid Library의 제작

전기영동시 High Molecular Weight DNA를 40kb Size로 분포하도록 Random Shearing하고 Pulse-Field Gel Electrophoresis를 이용하여 40kb Insert를 분리하고 이를 λ phage의 특성을 이용한 Cosmid Library를 제작하였다. 벡터로는 pWEB:TNC (Epicentre)를 사용하였다. Assembly 상의 Cosmid의 길이는 37.691kb(stdev=3.5)이었다 (Figure 3-2-2).

### 나. 대규모 염기서열 분석

(1) Colony picking & Cell culture

colony picking 시 실험자에 의한 오차를 줄이기 위하여 마크로젠은 Genetix사의 Q-bot 시스템을 이용하였으며, 총 12,816개의 Colony를 Picking하였다. 각 Library의 colony picking의 수는 종류별로 아래 표1과 같으며 이는 샘플의 colony picking 단계에서부터 일관된 labeling 시스템과 Cell Stock을 관리하였다. 2kb Insert를 가진 Shotgun library의 경우 ORWS라는 Project ID로 Label하여 진행하였으며 Cosmid library의 경우 ORWC라는 Project명으로 관리되었다.



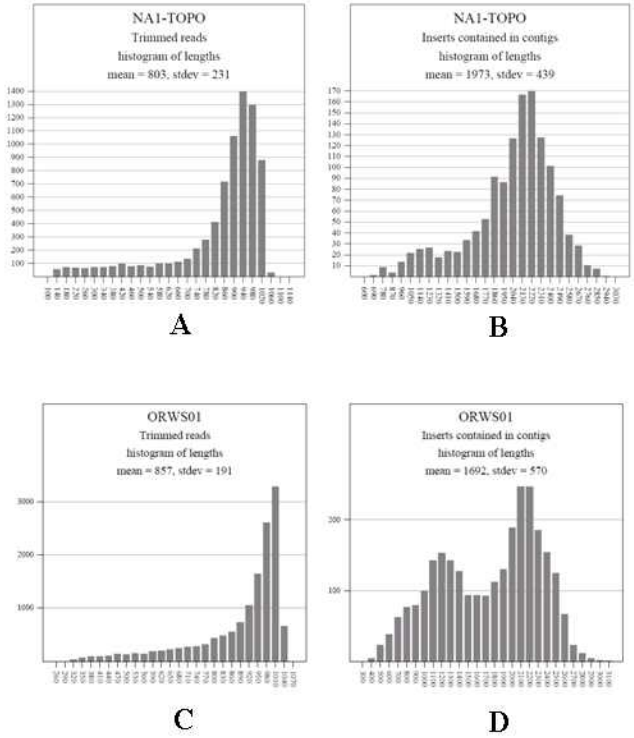



Figure 3-2-1. 2kb shotgun library의 Read Length(A)와 ARACHNE에서 추정되는 Insert의 길이(B) 이경우의 Insert의 길이는 각각 1.973kb (stdev=439)와 1.692kb (stdev=570) 이다.

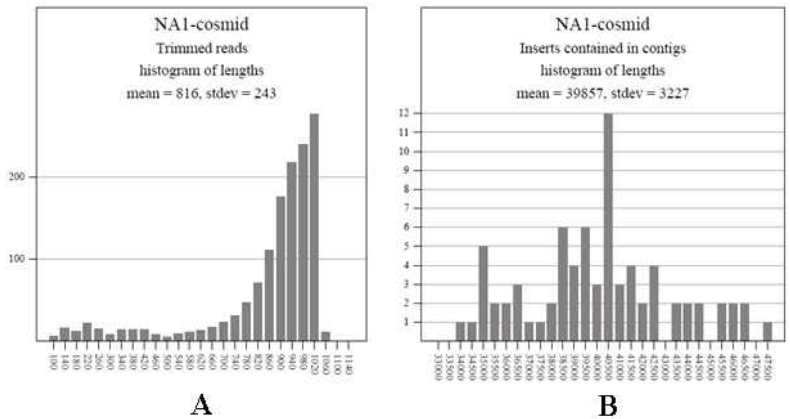



Figure 3-2-2. Cosmid library의 Read Length(A)와 ARACHNE에서 추정되는 Insert의 길이(B) 이경우의 Insert의 길이는 39.857kb(stdev=3.227kb)이다.



(2) DNA extraction

DNA 추출은 반 자동화 로봇 시스템을 이용하여 수행함으로써 수작업에 의한 샘플 quality 차이를 최소화하였으며 Table 3-2-1에 나와있는 Clone중 shotgun library의 경우는 11,232EA의 DNA가 Chaotrophic Salt상태에서 DNA와 Binding하는 성질을 가지는 Sillica-based resin을 가지고 있는 Multi-Screen FB Plate (Millipore) 를 이용하여 정제되었으며, Cosmid library의 경우 Montage BAC Prep kit (Millipore) 을 이용하여 1,584EA의 DNA가 Prep 되었다. Picking한 colony들은 모두 20% glycerol을 첨가한 cell stock을 제조하였으며 아래의 Table 3-2-2와Table 3-2-3과 같다.

Table 3-2-1. The colony contig on differents library.

| | Library 종류 | Picking한 Colony 수 |
|---|---|---|
| 1 | 2kb Random Shotgun Library | 11,232 |
| 2 | 40kb Cosmid Library | 1,584 |
| | 합계 | 12,816 |

Table 3-2-2. Lists of cell stock plate of cosmid library.

| | Cell Stock Plate |
|---|---|
| 1 | [ORWC01] *Thermococcus* sp. NA1 cosmid #1~24 |
| Total | 24 Plate (96 형식) |

Table 3-2-3.Lists of cell stock plate of shotgun library.

| | Cell Stock Plate |
|---|---|
| 1 | [ORWS01] *Thermococcus* sp. NA1 TOPO #1~152 |
| Total | 152 Plate (96 형식) |

(3) Sequencing

마크로젠이 보유한 5대의 3730 DNA analyzer를 이용하여 (하루 3.5Mb의 염기서열 분석 능력), 염기서열분석을 진행하였으며 Base-caller로는 KB basecaller를 사용하였다. Phred score 20 이상을 기준으로 trim할 때 평균 838bp의 read length를 보이는 결과를 얻을 수 있었다(Table 3-2-4). 전체 진행되어진 Sequencing 수는 22,306개로 이는 염기서열 분석 길이로만 20.36Mb이며 유전체 길이를 2.0Mb로 예측할 경우 10.04배수이다.

Table 3-2-4. The sequencing reaction numbers and average read length.

| | Library 종류 | Picking한 Colony 수 | Sequencing한 Colony 수 | 평균 Read length (Phred score 20이상) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2kb Random Shotgun Library | 11,232 | 22,464 | 858 (stdev=191) |
| 2 | 40kb Cosmid Library | 1,584 | 3,168 | 816 (stdev=244) |
| | 합계 | 12,816 | 25,528 | 838 (stdev=209) |

### 다. Contig assembly 및 Gap filling 완료 : Bioinformatics

(1) Contig assembly

22,306개의 분석된 염기서열 정보는 KB base-caller를 통하여 base calling을 수행하였으며, Phrap (Phil Green) 프로그램을 이용하여 contig assembly를 수행하였다. 아래의 Table 3-2-5는 Assembly결과를 통한 제작된 Library별 Sequencing Quality와 Coverage에 참여되는 것을 보여주고 있다. Shotgun library의 경우 총 9배수를 이루고 있으며 Cosmid library의 경우 1배수의 Sequencing이 이루어졌음을 확인할 수 있다.

Table 3-2-5. The sequencing results for the first assembly.

| Library | Average Insert Size (kb) | Vector | No. of Filtered Reads (Average Q>20) | Average Trimmed Read length (Q>20) | Total Input Reads (Mbp) | Coverage (based on the genome size of *Thermococcus kodakarensis* KOD) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| NA1-TOPO 1 | 2 | PCR4-Blunt TOPO (Invitrogen) | 7,729 EA | 723 base | 5.59 | 2.79X |
| ORWS | 2 | PCR4-Blunt TOPO (Invitrogen) | 14,700 EA | 845 base | 12.42 | 6.21X |
| NA1-cosmid | 40 | pWEB:TNC (Epicentre) | 1,029 EA | 667 base | 1.39 | 0.34X |
| ORWC | 40 | pWEB:TNC (Epicentre) | 2,070 EA | 673 base | 0.68 | 0.69X |
| Total | | | 25,528 EA | | | 10.04X |



Assembly 수행결과 총 146개의 Contig가 생성이 되었으며 Contig의 길이의 합은 1,856,626 bases이다. 이중 2kb이상의 contig는 112개이며 이를 Consed (Version 14.0)를 사용하고 (Figure 3-2-3), 각 clone의 Forward와 Reverse의 정보를 이용하여 Editing하였다. 이중 90개의 Contig가 Ordering되었으며, 이는 7개의 Scaffold를 구성하였다. 형성된 Contig에 대하여는 Table 3-2-6에 정리하였다. 또한 7개의 Scaffold의 경우 Table 3-2-7에 정리하였다.

Scaffold 1# : 35 ordered contigs : 719kb

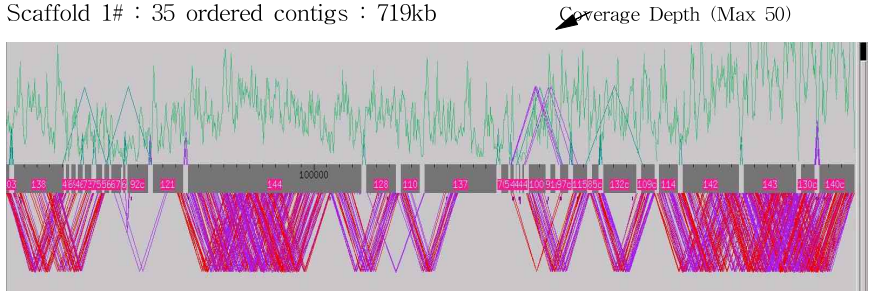



Figure 3-2-3.The length of the cosmid library.

Table 3-2-6. The results of the first assembly.

| 항목 | 내역 |
|---|---|
| 전체 Contig수 | 146 EA |
| 2kb 이상의 Contig | 112 EA |
| Total contig Length (bp) | 1,856,626 |
| Ordered Contigs | 90 EA |
| Scaffold의 수 | 7 EA |
| Total Gap의 수 | 145 EA |
| Scaffold내에 존재하지 않는 Gap의 수 | 56 EA |

Table 3-2-7. Ordered Contig

| Scaffold # | Ordered Contig |
|---|---|
| 1 | 72-123c-103-138-47-69-46-73-75c-56-67-6-92c-121-144-128-110-137-70c-54c-40-49-44-100-91c-97c-115-85c-132c-109c-114-142-143-130c-140c |
| 2 | 122c-109-95c-84-118-125c-133c-68-111-131-116-59-57-102-106-87-50-77-93-63 |
| 3 | 127-134c-80c-72-66-135-98-120-35-117c-65c-112c-101c-38-31-62 |
| 4 | 139-129c-119-113-34-52-94 |
| 5 | 79-33c-74-55-82-81c-28 |
| 6 | 41-136 |
| 7 | 99-61-42c |



(2) Gap filling; Finishing

생성된 contig 및 Supercontig들의 양끝에서 Consed의 Auto finish의 기능을 이용하여Design되어진 Primer를 이용하여 Genomic DNA를 Template로 한 direct genome sequencing과 Assembly상의 정보를 이용하여 Gap을 가지고 있는 clone들을 선별하여 수행하는 Clone Walking또는 Gap Size가 5kb 이상인 경우는 시간을 단축시키기 해당 Clone에 대해 shotgun library를 제작하였으며, 다음 방법으로 scaffold map을 바탕으로 각각의 contig 양 말단에서 합성된PCR primer를 디자인하여 합성한 뒤 PCR 과정을 거쳐 이웃한 두개의 contig 순서를 확인하고 이들 PCR product의 염기서열 분석을 통하여 염기서열 분석이 이루어지지 않은 부분을 Sequencing하였다. 한편 Scaffold가 형성되지 않는 contig들에 대해서는 Combination PCR에 의하여 Ordering과 Gap filling을 실시하였다 (Figure 3-2-4). 이렇게 하여 얻어진 Sequencing파일을 이용하여 Reassembly하여 오류가 없음을 확인하였다. 이렇게 하여 형성되어진 circular Single contig의 길이는 1,846,559 bases이며 51.85%의 GC content를 나타내었다. Quality가 Phred score 40이하인(99.99%)인 부분에 대하여 보완을 하기위해 해당부분에 Primer를 Design하여 제작하였으며 PCR로 해당부분을 얻어내어 Sequencing을 진행하였다. 전체적인 Genome finishing에 사용되어진 Primer수는 대략 평균 25mer로 495EA이다.

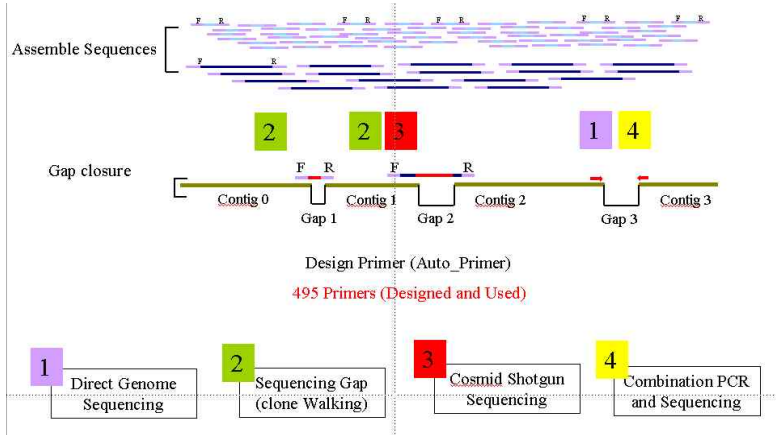



Figure 3-2-4. The methods for the finishing *Thermococcus* sp. NA1 genomics.

### 라. ORF finding 및 annotation : Bioinformatics

(1) ORF finding

Glimmer2.0이라는 프로그램을 이용하여 ORF를 예측하였으며 전체 2,118개의 ORF가 있음을 확인할 수 있었다. 또한 tRNA-scanSE라는 프로그램을 사용하여 46개의 tRNA 유전자 (Table 3-2-8)와 상동성 검색을 기본으로 하여 각각 2개의 5S rRNA와 각 1개의 7S, 16S, 23S rRNA를 확인할 수 있었다(Table 3-2-9).



Table 3-2-8 The tRNA scanning results.

| tRNA # | Start | End | tRNA Type | Anti Codon |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 325726 | 325802 | His | GTG |
| 2 | 329615 | 329692 | Tyr | GTA |
| 3 | 389907 | 389984 | Ala | CGC |
| 4 | 452773 | 452849 | Ala | TGC |
| 5 | 489953 | 490030 | Val | CAC |
| 6 | 582697 | 582773 | Phe | GAA |
| 7 | 582786 | 582863 | Gly | TCC |
| 8 | 764939 | 765046 | Undet | ??? |
| 9 | 768863 | 768950 | Leu | GAG |
| 10 | 844214 | 844290 | Arg | TCT |
| 11 | 1029804 | 1029890 | Ser | GGA |
| 12 | 1055420 | 1055496 | Thr | CGT |
| 13 | 1537019 | 1537095 | Thr | TGT |
| 14 | 1582877 | 1582953 | Thr | GGT |
| 15 | 1582981 | 1583058 | Pro | TGG |
| 16 | 1627760 | 1627837 | Gly | GCC |
| 17 | 1636958 | 1637035 | Arg | CCT |
| 18 | 1772483 | 1772560 | Pro | CGG |
| 19 | 1773534 | 1773609 | Gln | CTG |
| 20 | 1833396 | 1833319 | Glu | CTC |
| 21 | 1833305 | 1833228 | Ile | GAT |
| 22 | 1742709 | 1742632 | Asp | GTC |
| 23 | 1742274 | 1742197 | Lys | TTT |
| 24 | 1646609 | 1646523 | Ser | TGA |
| 25 | 1644252 | 1644165 | Leu | CAG |
| 26 | 1642647 | 1642570 | Pro | GGG |
| 27 | 1640682 | 1640595 | Leu | TAA |
| 28 | 1627654 | 1627577 | Arg | GCG |
| 29 | 1570697 | 1570622 | Arg | TCG |
| 30 | 1536844 | 1536769 | Asn | GTT |
| 31 | 1536763 | 1536686 | Met | CAT |
| 32 | 1522613 | 1522528 | Ser | GCT |
| 33 | 1522507 | 1522433 | Cys | GCA |
| 34 | 1441312 | 1441225 | Leu | CAA |
| 35 | 1405841 | 1405764 | Ala | GGC |
| 36 | 1405753 | 1405676 | Val | GAC |
| 37 | 1392701 | 1392614 | Ser | CGA |
| 38 | 1255310 | 1255232 | Undet | ??? |
| 39 | 1155154 | 1155078 | Val | TAC |
| 40 | 1103245 | 1103168 | Glu | TTC |
| 41 | 767928 | 767851 | Lys | CTT |
| 42 | 509431 | 509344 | Leu | TAG |
| 43 | 490724 | 490646 | Arg | CCG |
| 44 | 363061 | 362975 | Pseudo | ??? |
| 45 | 345640 | 345563 | Gly | CCC |
| 46 | 231476 | 231401 | Gln | TTG |

Table 3-2-9.The rRNA length.

| rRNA Type | Length | Start | End |
|---|---|---|---|
| 5S_ribosomal | 126 | 625716 | 625841 |
| 5S_ribosomal | 126 | 1742841 | 1742716 |
| 16S_ribosomal_RNA | 1498 | 451231 | 452729 |
| 23S_ribosomal_RNA | 3029 | 452982 | 455988 |

(2) ORF fitting

NR(Non redundant protein databases : GenBank, SwissProt, Pir) database와 TIGR, MACROGEN의 미생물 Database에 blastX를 수행한 결과를 가지고 기존의 database의 annotation정보를 이용하여 Glimmer2.0으로부터 나온 *Thermococcus* sp. NA1의 ORF를 fitting하였다. 기존의 데이터베이스에 유사성이 높은 ORF들은 유사성에 근거하여 Fitting을 실시하였으며 유사성이 낮아서 판단의 근거가 빈약한 것들은 ORF를 변경하지 않았다.

(3) Annotation

위에서 Fitting되어진 ORF들은 기존의 알려진 유전자 염기서열 또는 단백질 아미노산 서열 데이터 베이스 (Non redundant protein databases : GenBank, SwissProt, Pir)와 Blast를 통한 homologues를 검색하고 E-value가 $10^{-5}$ 이상인 결과만을 통해 기능을 추정하였다 (Figure 3-2-5). 여기서 homologues 검색 기준들을 어떻게 설정하느냐에 따라서 잘못된 유전자 기능을 최소화할 수 있다. 한편 Hypothetical protein과 unknown protein 에 대해서는 motif search중 Pfam (Protein families database of alignments and HMMs) 또는 COG를 이용하여 기능을 추정하였다(Figure 3-2-5 참조). 상동성 검색과 기능성 검색에서 E-value가 기준 이상인 것들은 ORF에서 제거하였다. 또한 Glimmer결과상 다른 ORF에 포함되어지는 ORF는 상동성 검색과 기능성검색의 E-value를 기준으로 둘 중 하나의 ORF를 선택하였다. 또한 검색 결과상 Frame이 맞지 않는 ORF역시 제거하였다. 이러한 기준으로 *Themococcus* sp.의 경우 Glimmer를 통하여 얻어진2,118 개의 ORF중 1,867개의 ORF의 경우 기능을 할당할 수 있었으며, 251개의 ORF에는 기능을 확인할 수 없었다. (Table 3-2-10). 1,867개의 ORF의 경우 91.59%의 Coding Region을 갖는다.



A. gene annotation 부분

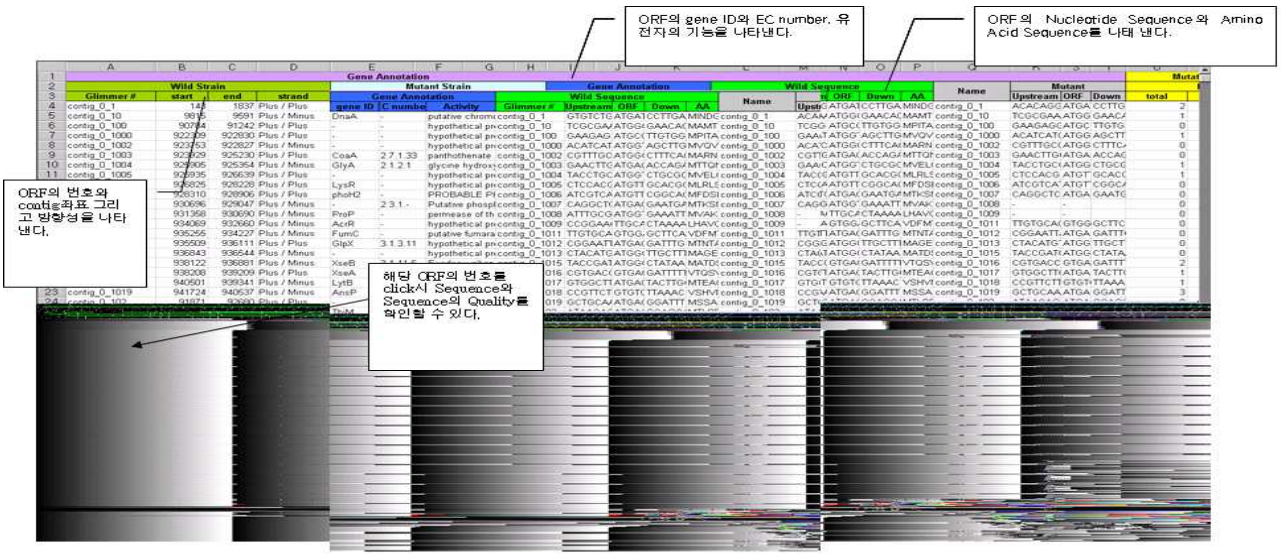
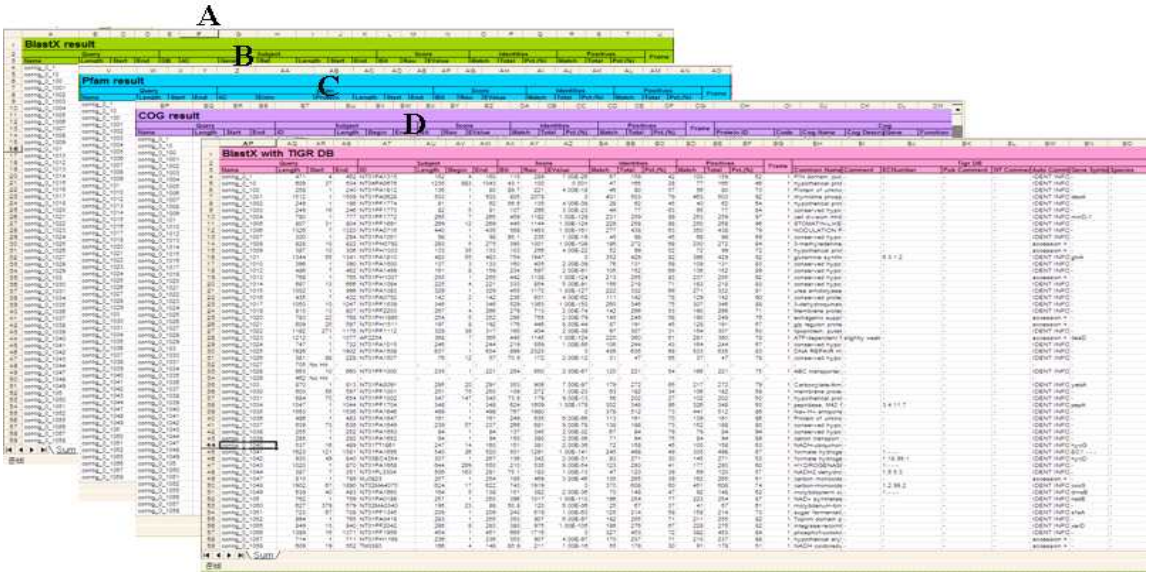



Figure 3-2-5. The gene annotation files provided by Macrogen.

B. 검색 결과 부분




a. BlastX b. Pfam c. COG d. blastX with TIGR DB

Figure 3-2-5. -continued



Table 3-2-10. The ORF number and coding region of *Thermococcus* sp. NA1.

| | Methods | ORF 수 | Coding Region |
|---|---|---|---|
| 1 | Glimmer 2.0 Result | 2,118 | 95.0% |
| 2 | Annotatable | 1,867 | 91.59% |
| 3 | Non-Annotatable | 251 | 3.41% |

(4) General Feature

*Themococcus* sp. NA1의 General feature는 아래와 같다. *Thermococcus kodakarensis* KOD와 비교해 보았을 때 mobile element에서 차이를 보였으며 Stable RNA의 경우는 거의 유사함을 보였다. 또한 *Thermococcus* sp. NA1의 ORF의 . *Thermococcus kodakarensis* KOD단백질과의 blastP결과 84.53%의 단백질이E-Value 1e-20 이상의 Homology를 보였다(Table 3-2-11).

Table 3-2-11. General Feature of *Thermococcus* sp. NA1.

| *Thermococcus* sp. NA1 | | |
|---|---|---|
| Genome size | 1,846,559 nt | |
| GC Content | 51.85 % | |
| Coding Region | 91.9% (Annotatable) | |
| ORF | 1,867 EA | |
| Mobile Element | Transposases | 1 EA |
| | Virus-related regions | 0 EA |
| Stable RNA | 5S | 2 EA |
| | 7S | 1 EA |
| | 16S | 1 EA |
| | 23S | 1 EA |
| | tRNA | 46EA |

## 마. Metabolic Pathway 분석

Gene Annotation 결과를 가지고 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Site의 Metabolic pathway에 Search한 결과를 기본으로 하는 *Thermococcus* sp. NA1의 Metabolic pathway를 구성하였다. Gene annotation Table을 기초로 하여 각각의 pathway별로 유전자 정보를 따로 구분하는 표를 Excel형식으로 작성하였다. 총 124개의 Pathway에 대해서 검색 (Table 3-2-12) 이 되었으며 각각 다른 시트로 구성이 되어진 Excel 파일을 형성하였다.



Table 3-2-12. The search results of metabolic pathway.

| | Pathway | | Pathway |
|---|---|---|---|
| 1 | tko00010 Glycolysis / Gluconeogenesis | 63 | tko00532 Chondroitin / Heparan sulfate biosynthesis |
| 2 | tko00020 Citrate cycle (TCA cycle) | 64 | tko00540 Lipopolysaccharide biosynthesis |
| 3 | tko00030 Pentose phosphate pathway | 65 | tko00550 Peptidoglycan biosynthesis |
| 4 | tko00031 Inositol metabolism | 66 | tko00561 Glycerolipid metabolism |
| 5 | tko00040 Pentose and glucuronate interconversions | 67 | tko00562 Inositol phosphate metabolism |
| 6 | tko00051 Fructose and mannose metabolism | 68 | tko00564 Glycerophospholipid metabolism |
| 7 | tko00052 Galactose metabolism | 69 | tko00600 Glycosphingolipid metabolism |
| 8 | tko00053 Ascorbate and aldarate metabolism | 70 | tko00601 Blood group glycolipid biosynthesis-lactoseries |
| 9 | tko00061 Fatty acid biosynthesis (path 1) | 71 | tko00602 Blood group glycolipid biosynthesis-neolactoseries |
| 10 | tko00062 Fatty acid biosynthesis (path 2) | 72 | tko00603 Globoside metabolism |
| 11 | tko00071 Fatty acid metabolism | 73 | tko00604 Ganglioside biosynthesis |
| 12 | tko00072 Synthesis and degradation of ketone bodies | 74 | tko00620 Pyruvate metabolism |
| 13 | tko00100 Biosynthesis of steroids | 75 | tko00621 Biphenyl degradation |
| 14 | tko00120 Bile acid biosynthesis | 76 | tko00622 Toluene and xylene degradation |
| 15 | tko00130 Ubiquinone biosynthesis | 77 | tko00623 2,4-Dichlorobenzoate degradation |
| 16 | tko00150 Androgen and estrogen metabolism | 78 | tko00624 1- and 2-Methylnaphthalene degradation |
| 17 | tko00190 Oxidative phosphorylation | 79 | tko00625 Tetrachloroethene degradation |
| 18 | tko00193 ATP synthesis | 80 | tko00626 Nitrobenzene degradation |
| 19 | tko00195 Photosynthesis | 81 | tko00627 1,4-Dichlorobenzene degradation |
| 20 | tko00220 Urea cycle and metabolism of amino groups | 82 | tko00628 Fluorene degradation |
| 21 | tko00230 Purine metabolism | 83 | tko00630 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism |
| 22 | tko00240 Pyrimidine metabolism | 84 | tko00631 1,2-Dichloroethane degradation |
| 23 | tko00251 Glutamate metabolism | 85 | tko00632 Benzoate degradation via CoA ligation |
| 24 | tko00252 Alanine and aspartate metabolism | 86 | tko00640 Propanoate metabolism |
| 25 | tko00260 Glycine, serine and threonine metabolism | 87 | tko00642 Ethylbenzene degradation |
| 26 | tko00271 Methionine metabolism | 88 | tko00643 Styrene degradation |
| 27 | tko00272 Cysteine metabolism | 89 | tko00650 Butanoate metabolism |
| 28 | tko00280 Valine, leucine and isoleucine degradation | 90 | tko00660 C5-Branched dibasic acid metabolism |
| 29 | tko00290 Valine, leucine and isoleucine biosynthesis | 91 | tko00670 One carbon pool by folate |
| 30 | tko00300 Lysine biosynthesis | 92 | tko00680 Methane metabolism |
| 31 | tko00310 Lysine degradation | 93 | tko00710 Carbon fixation |
| 32 | tko00311 Penicillins and cephalosporins biosynthesis | 94 | tko00720 Reductive carboxylate cycle (CO2 fixation) |
| 33 | tko00330 Arginine and proline metabolism | 95 | tko00730 Thiamine metabolism |
| 34 | tko00340 Histidine metabolism | 96 | tko00740 Riboflavin metabolism |
| 35 | tko00350 Tyrosine metabolism | 97 | tko00750 Vitamin B6 metabolism |
| 36 | tko00351 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) degradation | 98 | tko00760 Nicotinate and nicotinamide metabolism |
| 37 | tko00360 Phenylalanine metabolism | 99 | tko00770 Pantothenate and CoA biosynthesis |
| 38 | tko00361 gamma-Hexachlorocyclohexane degradation | 100 | tko00780 Biotin metabolism |
| 39 | tko00362 Benzoate degradation via hydroxylation | 101 | tko00790 Folate biosynthesis |
| 40 | tko00363 Bisphenol A degradation | 102 | tko00791 Atrazine degradation |
| 41 | tko00380 Tryptophan metabolism | 103 | tko00860 Porphyrin and chlorophyll metabolism |
| 42 | tko00400 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis | 104 | tko00900 Terpenoid biosynthesis |
| 43 | tko00401 Novobiocin biosynthesis | 105 | tko00903 Limonene and pinene degradation |
| 44 | tko00410 beta-Alanine metabolism | 106 | tko00910 Nitrogen metabolism |
| 45 | tko00430 Taurine and hypotaurine metabolism | 107 | tko00920 Sulfur metabolism |
| 46 | tko00440 Aminophosphonate metabolism | 108 | tko00930 Caprolactam degradation |
| 47 | tko00450 Selenoamino acid metabolism | 109 | tko00940 Stilbene, coumarine and lignin biosynthesis |
| 48 | tko00460 Cyanoamino acid metabolism | 110 | tko00950 Alkaloid biosynthesis I |
| 49 | tko00471 D-Glutamine and D-glutamate metabolism | 111 | tko00960 Alkaloid biosynthesis II |
| 50 | tko00473 D-Alanine metabolism | 112 | tko00970 Aminoacyl-tRNA biosynthesis |
| 51 | tko00480 Glutathione metabolism | 113 | tko01051 Biosynthesis of ansamycins |
| 52 | tko00500 Starch and sucrose metabolism | 114 | tko01053 Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides |
| 53 | tko00510 N-Glycan biosynthesis | 115 | tko01055 Biosynthesis of vancomycin group antibiotics |
| 54 | tko00511 N-Glycan degradation | 116 | tko01056 Biosynthesis of type II polyketide backbone |
| 55 | tko00512 O-Glycan biosynthesis | 117 | tko01057 Biosynthesis of type II polyketide products |
| 56 | tko00513 High-mannose type N-glycan biosynthesis | 118 | tko02040 Flagellar assembly |
| 57 | tko00520 Nucleotide sugars metabolism | 119 | tko03020 RNA polymerase |
| 58 | tko00521 Streptomycin biosynthesis | 120 | tko03030 DNA polymerase |
| 59 | tko00522 Biosynthesis of 12-, 14- and 16-membered macrolides | 121 | tko03060 Protein export |
| 60 | tko00523 Polyketide sugar unit biosynthesis | 122 | tko03070 Type III secretion system |
| 61 | tko00530 Aminosugars metabolism | 123 | tko03090 Type II secretion system |
| 62 | tko00531 Glycosaminoglycan degradation | 124 | tko04070 Phosphatidylinositol signaling system |

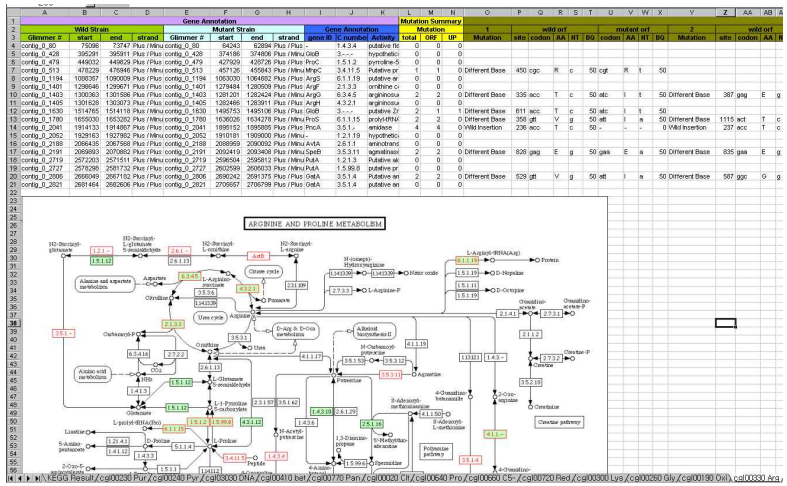



Figure 3-2-6. The contents of the metabolic Pathway.

각각의 Metabolic Pathway에 해당되는 Gene Annotation정보와 KEGG에 검색하여 나온 결과를 확인할 수 있도록 작성하였다.

* 2.2.3.2 *Thermococcus* sp. NA1의 EC number

* 2.2.3.4 *Thermococcus* KOD의 EC number

* 2.2.3.4 *Thermococcus* sp. NA1와 *Thermococcus* KOD이 일치하는 EC number

Gene Annotation의 내용은 위의 분석결과와 동일하다.

## 바. Genome Browser 구성

(1) 프로그램 개발 정보

| | |
|---|---|
| 소 요 기 간 | 약 12개월 |
| 개 발 인 원 | 2명(데이터 작업 1, 브라우저 개발 1) |
| 운 영 서 버 | Intel P4 3.0C, RAM 512M 3200X2EA |
| 사 용 언 어 | jdk1.5.0_02(Java Swing, 2D) |
| Database Management System | MySQL Server 4.1 |
| Web Server | resin-2.1.13 |
| 필수 utility | jre1.5.0_02, Adobe Acrobat Reader |

(2) 프로그램 개발 Flow.

① Sequencing 결과인 AB1 Data를 수집.

② Phred Program을 이용해서, AB1을 ACTG 형태의 Text 형태로 전환.

--> 이때 Low Quality Region을 제거.

③ blast program을 이용해서, 위 db에 대해서, text형태의 sequence를 blast.

④ 각각의 sequence파일의 best hit을 excel file형태로 reporting.

⑤ reporting된 excel file에서 필요한 데이터를 자동 추출모듈을 이용해 DB에 저장.

⑥ 각각의 start, end 데이터를 DB에서 가져와 화면의 해당 좌표에 출력.

⑦ 출력시 cog category를 이용해 ORF의 color를 설정.
⑧ DB에 저장된 EC number를 이용해 ORF를 클릭 시 KEGG와 연결.

(3) 화면 구성 및 기능

(i). Log in 부분 (Figure 3-2-7~9 참조)

Genome Browser는 *Thermococcus* sp. NA1 를 브라우징 가능 하도록 각각 개발 되었으며, site 메뉴를 통해 볼 수 있습니다. site에는 genome browser를 사용하기 위한 필수 utility인 jre1.5.0_02와 Adobe Acrobat Reader를 다운 받을 수 있게 했으며, jre1.5.0_02의 경우 다운을 받아 설치를 하지 않았다면 genome browser 실행 시 자동으로 설치가 진행된다. DATA를 확인하기 위해서는 ID를 부여 받아야 하며 Password 도 설정하여 볼 수 있는 정보의 단계를 구분하였다. 또한 내부 관리자가 User의 등록과 삭제 허가 등을 할 수 있도록 설정하였다. Genome Browser는 *Thermococcus* sp. NA1 를 브라우징 가능 하도록 각각 개발 되었으며, site 메뉴를 통해 볼 수 있습니다. site에는 genome browser를 사용하기 위한 필수 utility인 jre1.5.0_02와 Adobe Acrobat Reader를 다운 받을 수 있게 했으며, jre1.5.0_02의 경우 다운을 받아 설치를 하지 않았다면 genome browser 실행 시 자동으로 설치가 진행된다. DATA를 확인하기 위해서는 ID를 부여 받아야 하며 Password 도 설정하여 볼 수 있는 정보의 단계를 구분하였다. 또한 내부 관리자가 User의 등록과 삭제 허가 등을 할 수 있도록 설정하였다. genome browser 화면은 2개의 항목으로 위에서부터 *Thermococcus* sp. NA1의 ORF, *Thermococcus* sp. NA1 GC-contents로 구성된다. 전체 화면은 zoom in/out 기능을 이용해 확대/축소가 가능하다. (Figure 3-2-10~12.) ORF는 cog category 데이터를 기준으로 색상을 구별하였으며, click시 다음과 같은 기능을 제공한다. genome browser상에서 ORF 표기 부분을 클릭하면 해당 ORF에 대한 정보가 나오며 Menu부분을 클릭할 경우, 해당Blast 검색결과 또는 Sequence가 표기된다. gene과 clone은 id, symbol, product로 검색 가능하며, 검색된 후 출력된 리스트를 클릭할 경우 해당 위치의 ORF 또는 clone으로 화면이 자동 전환된다. (Figure 3-2-11~13) ORF Information은 아래 Figure 3-2-14 과 같이 다양하게 확인할 수 있다. 각각의 ORF에 대하여 아래와 같은 차이 뜨고 해당 Manu를 Click시 아래와 같은 결과를 확인할 수 있다.

- Menu 내역

1. blast결과
2. ORF sequence
3. Metabolic pathway table
4. Metabolic pathway map



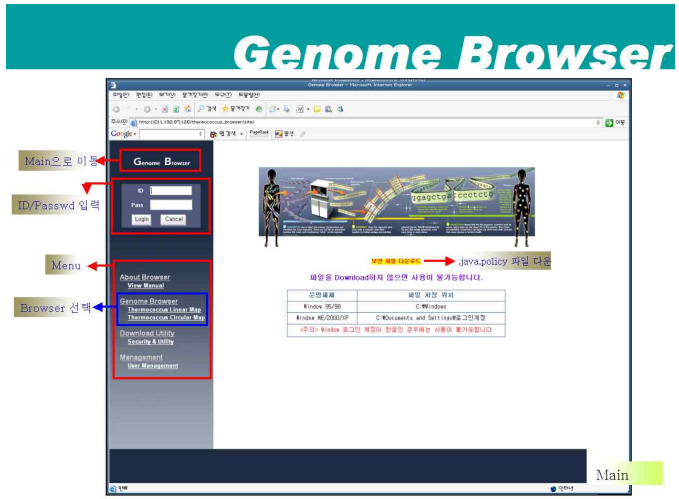



Figure 3-2-7. Genome Browser log in A.

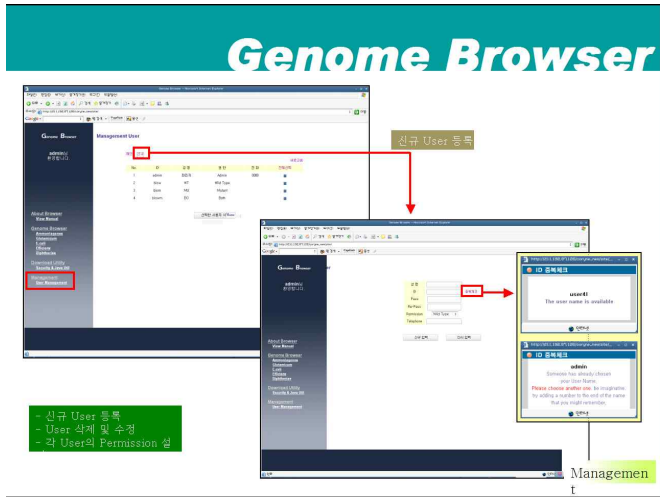



Figure 3-2-8. Genome Browser log in B.

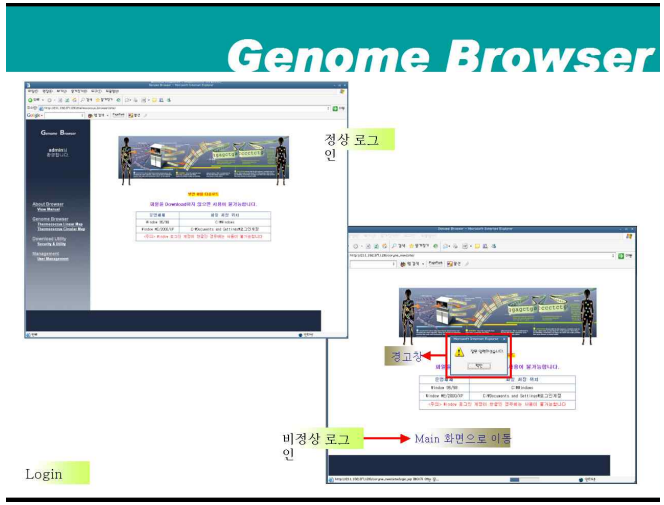



Figure 3-2-9. Genome Browser log in C.



Linear Map 부분

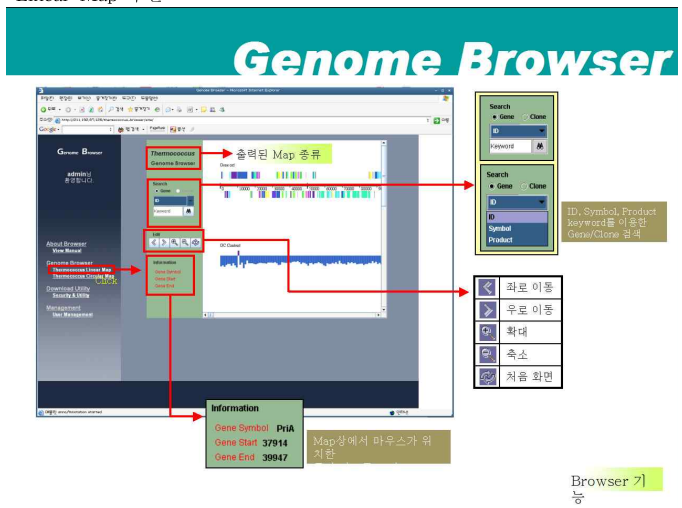



Figure 3-2-10. Zoom in/out in 'Genome Browser' (A).

Figure 3-2-11. Zoom in/out in 'Genome Browser' (B).

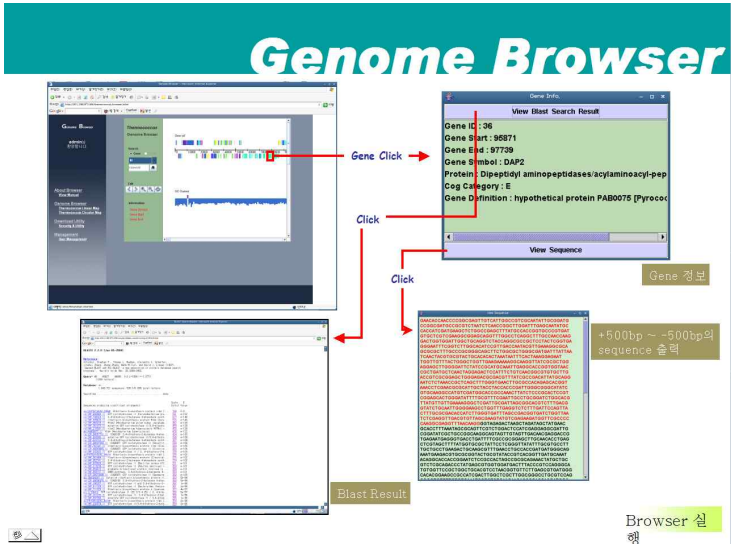



Figure 3-2-12. The search for genes, clone ids, symbols products in 'Genome browser.

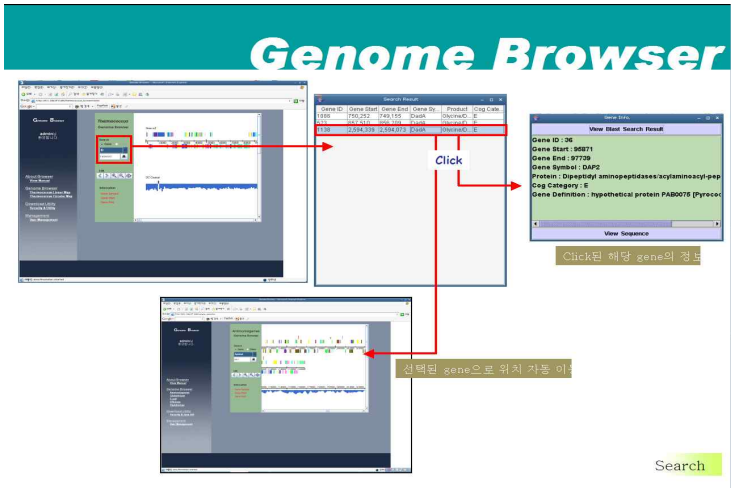



그림 7.
Figure 3-2-13. Search in 'Genome Browser'.



(ii) Circular Map

Main 창에서 Linear와 Circular map을 선택할 수 있으며, Circular map 역시 Linear Map 과 같은 방식으로 DATA가 확인 가능하다(Figure 3-2-15).

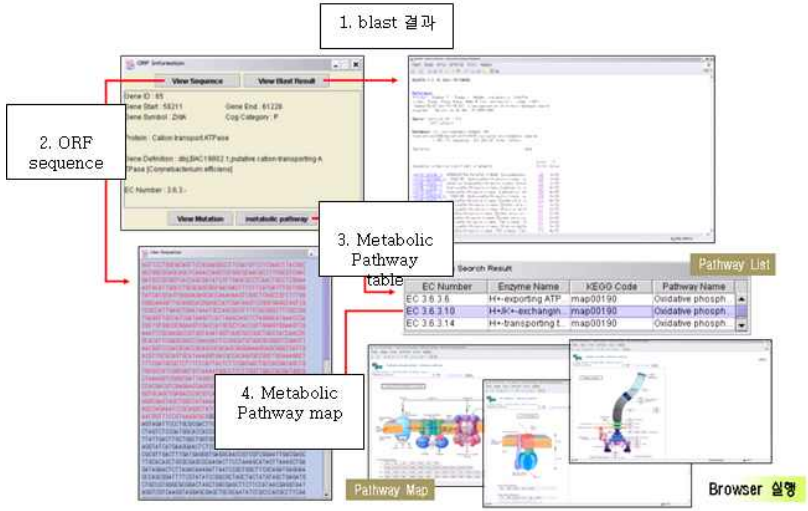
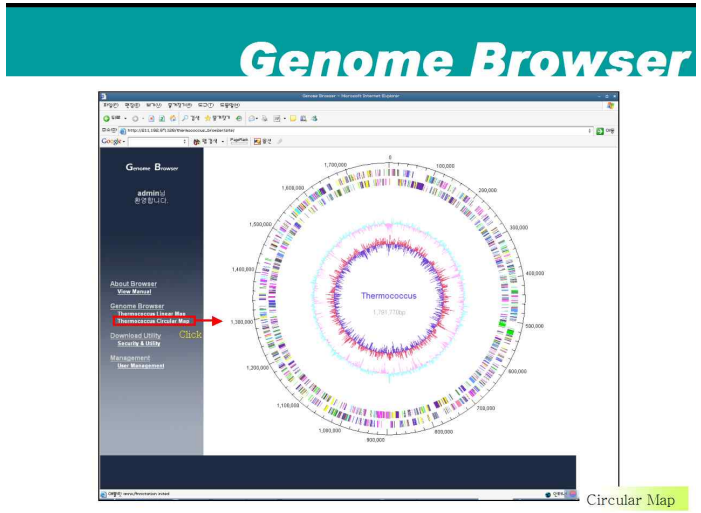



Figure 3-2-14. Identification of ORFs information.



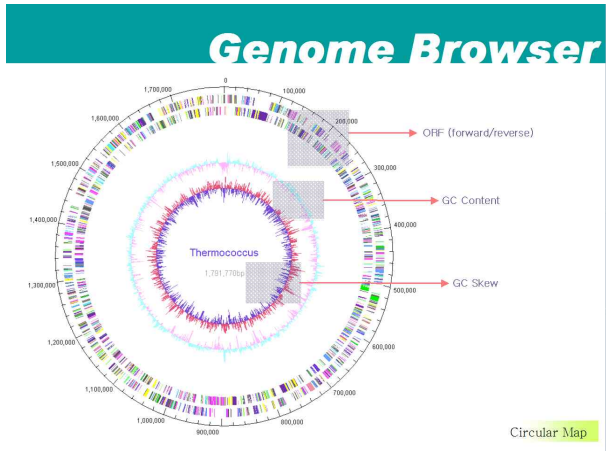




Figure 3-2-15. Circular map.



# 제 3 절 극한 효소 유전자 발굴

## 1. 연구 재료 및 방법

### 가. 고호열성 미생물 유래 열안정성 효소 개발

(1) TNA1_pol 유전자의 클로닝 및 특성분석

(i) TNA1-pol 유전자 제조를 위한 균주배양

*Thermococcus* sp. NA1은 이스트 마뉴스 바신(East Manus Basin)에 있는 파크마누스 지역(3° 14′ S, 151° 42′ E)에 있는 지역의 심해 열수 분출구로부터 분리되었다. YPS 배지가 DNA 조작을 위해서 *Thermococcus* sp. NA1을 배양하기 위하여 사용되었고, *Thermococcus* sp. NA1의 배양 및 균주 유지는 표준적인 방법에 의하여 행하여졌다. *Thermococcus* sp. NA1 시드(seed) 배양을 준비하기 위하여, 25 ml 혈청 병에 있는 YPS 배지에 파타겔 플레이트(phytagel plate) 위에 형성된 단일 콜로니을 접종하였고, 20시간 동안 90 ℃에서 배양하였다. 시드 배양은 혐기적 단지(jar)에서 YPS 배지 700 ml을 접종하는데 사용되었고, 20시간동안 90 ℃에서 배양되었다.

(ii) 성숙한(mature) TNA1-pol 유전자의 제조

*E. coli* DH5α가 플라스미드 증식 및 핵산 서열분석을 위해 사용되었다. *E. coli* BL21-Codonplus(DE3)-RIL 세포(스트라타진, 라졸라, 캘리포니아) 및 플라스미드 pET-24a(+)(노바젠, 메이디슨, 위스콘신)이 유전자 발현을 위해 사용되었다. *E. coli* 균주는 37 ℃에서 루리아-베르타니(Luria-Bertani) 배지 안에서 배양되었고, 카나마이신이 최종농도 50 ㎍/ml이 되도록 배지에 첨가되었다. DNA 조작은 샘브록 및 러셀에 의해 기술된 것처럼 표준적인 방법으로 행하여졌다. *Thermococcus* sp. NA1의 게놈 DNA는 표준적인 방법으로 분리되었다. 제한효소 및 다른 변형시키는 효소는 프로메가(메이디슨, 위스콘신)으로부터 구매하였다. *E. coli* 세포로부터 플라스미드 DNA의 적은 양의 제조는 플라스미드 미니 키트(퀴아겐, 힐덴, 독일)을 이용하여 행하여졌다. DNA 서열분석은 빅다이 터미네이터 키트(PE Applied Biosystems, 포스터 시, 캘리포니아)를 이용하여 자동 서열분석기(AB3100)로 행하여졌다.

(iii) TNA1-pol의 발현 및 분리

매우 강하고, 엄격한 T7/lac 프로모터를 가진 pET 시스템이, *E. coli*에서 외래의 단백질의 클로닝 및 발현을 위해 개발되어진 가장 강력한 시스템 중의 하나이고, TNA1-po1 유전자가 재조합 TNA1-pol의 과다발현 및 His-태그 분리를 촉진하기 위해서 증폭되어 pET-24a(+)의 *Nde*I 및 *Xho*I 사이트로 도입되었다. 결과의 발현 플라스미드는 pETNAPm으로 지정되었다. 재조합 TNA1_pol은 pETNAPm을 가지고 있는 *E. coli* BL21-codonPlus(DE3)-RIL의 세포질에서 용해성 형태로 발현이 되었다 상기 얻어진 발현 플라스미드, pETNAPm은 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL로 형질전환되었다. TNA1_pol 유전자의 과량발현은 이소프로필-β-$_D$-티오갈락토피라노사이드(IPTG)를 중간 기학급수적 성장기에 첨가하고, 37 ℃에서 3시간 동안 항온 배양함으로써 유도되었다. 세포는 원심분리(4 ℃에서 20분간 6,000 x g)를 통하여 얻어졌고, 0.1 M KCl 및 10% 글리세롤을 포함하는 50mM 트리스-HCl 완충용액(pH 8.0)에서 재현탁시켰다. 세포는 초음파에 의해서 분쇄되어지고, 원심분리(4 ℃에서 30분간 20,000 x *g*)에 의해서 분리되었고, 조효소 샘플은 20분간 80 ℃에서 열처리되었다. 얻어진 상등액은 TALON$^{TM}$ 금속 친화성 레진(BD Bioscience Clontech, 파우로 알토, 캘리포니아)의 컬럼에 처리되고, 0.1 M KCl 및 10% 글리세롤을 포함하는 50 mM 트리스-HCl 완충용액(pH 8.0)안의 10 mM 이미다졸(시그마, 세이트 루이스, 미주리)로 세척되었고, TNA1_pol는 완충용액내의 300 mM 이미다졸으로 용출되었다. 모아진 분획은 50 mM 트리스-HCl(pH 7.5), 1 mM DTT, 1mM EDTA, 및 10% 글리세롤을 포함하는 저장 완충용액으로 투석되어졌다. 단백질 농도는 브래드포드의 비색분석 방법에 의해 결정되었다. 단백질의 정제도는 표준 방법으로 수행되어진 소디움 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 분석에 의해서 조사되었다.

(iv) TNA-pol의 성질 (DNA 중합효소 활성도 분석)

분리되어진 효소의 DNA 중합효소 활성도는 약간의 변형으로 최 및 권에 의해 기술되어진 것처럼 측정되었다(Choi and Kwon, 2004). 상기 효소는 20 mM 트리스-HCl(pH 7.5), 10 mM $MgCl_2$, 1 mM 2-머캅토에탄올, 100 μM의 각각의 dATP, dCTP 및 dGTP, 0.25 μCi의 [methyl-$^3$H]티미딘 5′-트리포스페이트, 및 625 ng의 소 sperm DNA(프로메가)로 구성되어진 반응 혼합액(25 ㎕)안에서 10분간 75 ℃에서 항온반응되었다. 반응은 얼음 위에서 중지되었고, 일부량은 DE81 여과 종이 디스크(23 mm, 와트만, 영국)위에 점으로 찍었다. 상기 디스크는 히트블락 위에서 건조되고, 0.5 M 소디움 포스페이트 완충용액(pH 7.0)에서 10분 및 70% 에탄올에서 5분 세척되고, 건조 되었다. 건조된 여과 종이 디스크의 포함된 방사선 활성도가 베크만 LS6500 스킨틸레이션 카운터(미국)을 이용하여 세어졌다. TNA1_pol의 1 단위는 1분동안, 75 ℃에서, 1 pmole의 [$^3$H]TTP를 산-불수용성 생성물로 포함시키는 중합효소의 양으로 정의되었다.



(v) 엑소뉴클리아제 활성도 분석

3′ 말단-레이블된 DNA 기질을 준비하기 위하여, *Not* I에 의해 선형화된 pBluescript SK-DNA가 [α-$^{32}$P]dCTP의 존재하에서 클레노우(Klenow) 분절물에 의해 채워졌다. 5′-말단 레이블된 DNA 기질을 준비하기 위하여, 2kb PCR 생성물이 [γ-$^{32}$P]ATP의 존재하에 T4 폴리뉴클레오타이드 키나아제에 의해 인산화되었다. 레이블 후에, 각각의 DNA 기질은 에탄올 침전에 의해 정제되었다. 엑소뉴클리아제 활성도 분석을 위해, 각각의 DNA 기질은, dNTPs의 존재 또는 부존재에서 10분동안 75 ℃에서 20 mM 트리스-HCl (pH 7.5), 10 mM $MgCl_2$, 1 mM 2-머캅토에탄올, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$ 및 0.01% BSA 로 구성된 반응물 혼합액(25 ㎕)에서 효소와 함께 항온반응되었다. 반응은 얼음위에서 중지되었고, 운반체로서 BSA의 존재하에서 5% 트리클로로아세트산 1 ml을 첨가하여 침전시켰다. 원심분리 후에, 상등액은 회수되었고 이의 방사능 활성도는 베크만 LS6500 스킨틸레이션 카운터(미국)을 이용하여 세어졌다.

(2) TNA1_lig 유전자의 클로닝 및 특성분석

(i) 리가아제 기질

DNA 결합 및 라이게이션 분석에 사용되어진 기질은 중앙에 닉(nick)이 있는 70bp의 DNA 듀플렉스(duplex)이다. DNA 듀플렉스는 다음과 같이 70단위 주형 가닥에 35단위의 올리고데옥시뉴클레오타이드 두 개를 어닐링함으로써 형성되었다. 주형의 5′ 사이드에 상보적인 3NA-Com올리고머(5′-GGT CTA GAG GAG CGT CGA GTA CCG TGG TTC GCG TC-3′(서열번호 5), 20 pmol)는 37 ℃에서 1시간 동안 200μCi[γ-$^{32}$P]ATP (3000 Ci/mmol, 암스테르담 바이오사이언스, 영국)의 존재하에서 T4 폴리뉴클레오타이드 키나아제에의해서 라디오 레이블되었다. 레이블된 올리고머는 어닐링 완충용액(20mM 트리스-HCl, pH 8.0, 및 10 mM KCl)에서 주형 가닥(NA-Tem, 5′-GAC GCG AAC CAC GGT ACT CGA CGC TCC TCT AGA CCC GAC CTG TTG GCA TGC AGC TAC GGA TCC GGA CTC G-3′(서열번호 6))에 주형 가닥의 3′ 사이드에 상보적인 5NA-com 올리고머((5′-CGA GTC CGG ATC CGT AGC TGC ATG CCA ACA GGT CG-3′(서열번호 7)가 재결합되었다. 혼합물은 95 ℃로 5분 동안 가열한 후에 대기온도로 서냉 되었다. 상기 성분들의 몰비는 3NA-com, 5-NA-com, 및 NA-Tem이 어닐링 혼합물에서 각각 1:1:1 이었다.

(ii) 닉-연결 활성도 분석

DNA 리가아제의 닉-연결 활성도에 대한 분석은 쏘올브자아나르도티어 등

(Thorbjarnardottir, 1995)의 방법에 의하여 수행하였다. 닉-연결 활성도 분석을 위한 기질 준비에 사용된 올리고데옥시뉴클레오타이드의 서열은 상기 설명된 바와 같다. 그러나, 3NA-Com 올리고머가 3′-말단에 바이오틴으로 레이블되었고, 5′-말단에 인산화되었다. 그리고 5NA-com 올리고머는 5′-말단에서 형광물질로 레이블되었다. TNA1-lig (0.2 pmol)이 20 ㎕의 표준 분석 완충용액(20 mM 트리스-HCl, pH 8.0, 10 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP 및 0.01% BSA)에서 5 pmole의 재결합된 기질과 혼합되었다. DNA 리가아제의 활성은 15분간 80 ℃에서 분석되었다. 반응은 2.0 ㎕의 0.1M EDTA를 첨가하여 종결되었고, 얼음에서 10분간 항온보관되었다. 각각 반응된 시료로부터 세벌의 20㎕의 일부량이 스트렙타비딘 코팅된 96-웰 마이크로타이터 플레이트(MaxiSorp; Nunc, 덴마아크)에 30 ㎕의 세척 완충용액(100 mM 트리스-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl 및 0.05% 트윈20)과 함께 웰들에게 올려졌다. 플레이트는 1시간동안 37℃ 에서 항온보관 되었고, 멸균수로 두 번 세척되고, 변성 완충용액(0.1 N NaOH 및 0.05% 트윈20)으로 한 번 더 세척하고, 50 ㎕의 세척 완충용액에서 1:3000 희석된 항-플루레신알카라인 포스페이트 컨쥬게이트(뵈링거-만하임, 독일)로 30분간 37℃에서 항온보관 되었다. 세척 완충용액으로 6번 세척한 다음에, 50 ㎕의 새로운 기질 용액(5 mM p-니트로페닐 포스페이트, 100 mM 트리스-HCl, pH 9.0, 1 mM $MgCl_2$ 및 0.5 mM $ZnCl_2$)이 첨가되고 1시간 동안 37 ℃에서 항온보관되었다. 얻어진 황색이 분광기로 405 nm에서 읽어졌다.

(iii) 라이게이션 분석

DNA 라이게이션 분석을 위해, 20 mM 트리스-HCl, pH 8.0, 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, 1 mM ATP, 0.2 pmol 의 $^{32}$P-레이블된 닉(nick)되어진 듀플렉스 기질반응 혼합물(20 ㎕) 및 1 pmol TNA1_lig가 20분안 80℃에서 항온보관 되었다. 항온보관 후에, 반응은 EDTA 및 포름아마이드의 첨가에 의해 정지되었다. 반응되어진 샘플은 5분 동안 95 ℃에서 가열되었고, 다음으로 TBE안에 7 M 우리아를 포함하는 15% 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동 되었다. 라이게이션 산물은 건조된 젤의 오토라디오그라피에 의해 가시화 되었다.

(3) TNA1_POP 효소 활성 분석

TNA1_POP 활성도는 Suc-Ala-Pro-*p*-NA(Bachem AG, 부벤도르프, 스위스)의 가수분해를 측정함으로써 분석되었다. 50 mM 트리스-HCl 완충용액에 포함된 분석 혼합물(800 ㎕) 및 1mM 기질이 5분동안 80 ℃에서 항온보관되었다. 반응은 효소의 첨가에 의해서 시작되었다. 혼합액은 80 ℃에서 추가 5분동안 항온보관되었다. 그리고 반응은 1 M 트리클로로아세트산(100 ㎕)의 추가에 의해서 정지 되었다. 방출된 *p*-니트로아닐린의 흡광도는 405 nm에서 측정되었고, 405 nm에서 $\varepsilon_{405\ nm}$ =10,500 $M^{-1}$ $cm^{-1}$의 몰 흡광 계수가 효소 활성의 계산에 사용되었다. 프로릴올리고펩티다아제 활성 1단위는 이들 분석 조건에서 분당 1 μmole의 p-니트로아닐린을 방출하는 효소 양으로 결정되었다.



(4) TNA1_APP 효소 분석

Lys(N-Abz)-Pro-Pro-pNA(Bachem AG, Bubendorf, Switzerland)의 APP-촉매 가수분해는 Lys(N-Abz)-OH의 방출에 의해서 관측되었다. 이것은 F-2000 형광분광기(Hitachi, 도쿄, 일본)을 이용하여 80℃에서 417 nm의 방출파장 및 320 nm의 흥분파장에서 관측되었다. 반응물 혼합액(1 ml)은 50 mM의 소디움 아세테이드 완충용액(PH 5.0), 15 μM Lys(N-Abz)-Pro-Pro-pNA 및 1.2 mM의 $CoCl_2$ 로 구성되었다. 반응은 2 ㎍의 APP를 첨가함으로써 시작되었다. Met-Pro(Bachem AG, 부벤도르프 ) 디펩타이드의 가수분해로부터 떨어져 나오는 프롤린의 양에 기초한 분석방법이 일반적으로 사용되었다. 프롤린 농도는 야론 및 밀이나르에 의한 비색 닌하이드린 방법의 변형에 의하여 측정하였다. 닌하이드린제가 60%(v/v) 빙식초 및 40%(v/v)의 인산에 3%(w/v)의 닌하이드린을 첨가하고, 70 ℃에서 30분간 항온보관하여 제조되었다. 50 mM 소디움 아세트산 완충용액(pH 5.0), 4 mM의 Met-Pro, 및 1.2 mM $CoCl_2$를 포함하는 APP 분석 혼합액(300 ㎕)이 5분동안 80 ℃에서 항온보관되었다. 반응은 효소의 첨가로 시작되었고, 혼합액은 추가의 5분동안 80 ℃에서 항온반응되었다. 그리고 반응은 빙초산(300 ㎕)을 첨가함으로써 종결되었고, 닌하이드린제(300 ㎕)가 첨가되었다. 10분동안 80 ℃에서 가열된 후, 반응물은 얼음에서 식혀졌고, 515 nm에서의 흡광도가 측정되었다. 방출되어진 프롤린의 양은 닌하이드린-프롤린 복합체에 대한 4,579 $M^{-1}cm^{-1}$의 몰 흡광 계수를 이용하여 계산되었다. APP 1 단위는 상기 분석 조건에서 분당 1 μmole의 프롤린을 방출하는 효소의 양이다.

(5) 카르복시펩티다아제 효소 활성 측정방법

TNA1_CP 활성도는 N-Cbz-알라닐-아르기닌 (Z-Ala-Arg) (Bachem AG, 부벤도르프, 스위스)의 분해를 측정하여서 분석하였다. 분석 혼합액(250 ㎕)에는 50 mM KMES(포타슘 2-[N-모르포리노]에탄설폰산) 완충용액(pH 6.5), 0.4 mM $CoCl_2$ 및 8 mM 기질이 포함된다. 반응은 효소의 첨가로 시작되고 80℃에서 10분간 항온보관되었다가 얼음위에서 반응 정지되었다. 연속해서, 카드뮴-닌히드린 리전트가 첨가되어지고, 시료는 발색을 위해서 추가로 80 ℃에서 5분간 항온배양되었고, 얼음에서 반응정지되었다. 흡광도는 500 nm에서 읽어졌고, 효소활성은 아르기닌 표준 커브를 사용하여 계산되었다. 활성의 1 단위는 80 ℃에서 Z-Ala-Arg에서 아르기닌 1 μmole을 방출하는 양으로 정의된다. 다른 Z-Ala-X 아미노산 기질(X=Ala, Asp, His, Leu, Met, Asn, Pro, Val 및 Tyr) 다른 것은 같은 조건에서 행하여졌고, 적절한 아미노산이 표준 커브를 만드는데 이용되었다.

(6) methionine aminopeptidase 효소 활성 측정방법

MetAP의 활성은 Met-pNA (Bachem AG)의 가수분해를 측정하여 분석하였다. 50 mM 소디움 포스페이트 완충용액 (pH 7.0), 4 mM Met-pNA, 및 0.2 mM $MnCl_2$을 함유하는 분석 혼합물(800 ㎕)은 5분동안 80 ℃에서 항온보관 되었다. 반응은 본 발명의 효소의 첨

가에 의하여 개시되었다. 상기 혼합물을 80 ℃에서 5분간 더 항온반응되었으며, 반응은 1 M 트리클로로아세트산(100 $\mu\ell$)의 첨가로 중지되었다. 방출되는 p-니트로아닐린의 흡광도를 405 nm에서 측정하였다. 405nm에서 p-니트로아닐린의 몰 흡광 계수인 $\varepsilon_{405\ nm}$ = 10,500 $M^{-1}$ $cm^{-1}$을 사용하여 효소의 활성을 계산하였다. MetAP 활성의 1 단위는 상기 분석조건하에서 일분 당 1 μmol의 p-니트로아닐린을 방출하는 효소의 양으로 정의하였다.

(7) 고호열성 α-아밀라아제의 활성측정

(i) α-아밀라아제의 활성의 탐색

*Thermococcus sp.* NA1 α-아밀라아제(TNA1_amyl)의 활성도는 80 ℃에서 15분간 50 mM의 소디움 아세테이트 완충용액(pH 6.0) 1%의 가용성 전분의 효소적 분해 동안에 유리되어지는 환원당의 양을 측정하여 결정되었다. 환원당의 양은 수정된 디니트로살리실릭산(dinitrosalicylic acid) 방법(Bernfeld, 1955)으로 측정되었다. α-아밀라아제 활성의 1 단위는 상기 분석 조건에서 분당 말토오스와 등가의 1 μmole의 환원당의 유리시키는 효소의 양으로 정하였다.

(ii) TLC 및 아가 플레이트에서의 α-아밀라아제의 활성의 탐색

열안정성 α-아밀라아제를 발현하는 재조합 *E. coli* 클론이 50 $\mu g$ $ml^{-1}$ 카나마이신, 1% 가용성 전분 및 1 mM IPTG가 보충되어진 LB 아가 플레이트 위에서 성장 후 및 12 내지 18시간 동안 60 ℃에서 연속적으로 항온 배양하여 동정되었다. 포지티브 콜로니는 루골(Lugol) 용액($I_2$ 5 g $l^{-1}$; KI 10 g $l^{-1}$)으로 뿌린 후에 어두운 바탕에 대한 흰 할로(halo)로서 보이는 전분 분해 지역을 만들었다.

G1 내지 G7의 올리고사카라이드의 분석은 실리카 겔 코팅된 TLC 플레이트(유형 K6F; 와트만, UK; Dong et al., 1997)위에서 상승 기술로서 수정된 박층 크로마토그라피(TLC)에 의해 수행되었다. 용매 혼합액(이소프로필 알코올:에틸 아세테이트: 물 = 3:1:1, v/v/v)으로 전개한 후에, TLC 플레이트는 완전히 건조되고, 염색 용액(N-(1-나프틸)-에틸렌디아민 3 g, 설폰산 50 ml, 메탄올로 1 L로 맞춤) 안으로 재빠르게 담가주어 발색시켰다. 상기 TLC 플레이트는 10분 동안 110 ℃에서 항온 보관되었다.



## 2. 연구 결과

### 가. 고호열성유래 열안정성 효소 개발

(1) 고호열성 DNA 중합효소.

(i) TNA1_pol 유전자의 클로닝 및 일차적 서열 분석

게놈 서열 분석에 의하여, 1,308 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하는 오픈 리딩 프레임(3,927 bp)이 발견되었고, B 패밀리 타입 DNA 중합효소와 매우 높은 유사성을 보였다. 유추되어진 아미노산 서열로부터 얻어진 단백질의 분자량은 151.9 kDa 이었고, 이것은 평균적인 열안정적 DNA 중합효소에 대하여 예측되어지는 사이즈보다 훨씬 컸다. 서열 분석은 상기 DNA 중합효소 유전자가 추정의 3′-5′ 엑소뉴클리아제 도메인, α-유사 DNA 중합효소 도메인, 및 진핵생물 및 고세균의 α-유사 DNA 중합효소 사이에 보존된 중간지역(Pol III)에 위치한 1605 bp(535 아미노산)의 하나의 인프레임된 介在서열(intervening sequence) 을 포함하고 있는 것을 보였다(Figure 3-3-1). 유추된 인테인(intein)의 아미노산 서열은 또한 다른 고세균 중합효소의 인테인에 매우 유사함을 보였고, pol_1 인테인 1(*Thermococcus* sp. strain GE8로 부터의 DNA 중합효소 기원, 537 아미노산, AJ25033, )에 81.0%의 상동성, IVS-B(KOD DNA 중합효소 기원, 537 아미노산, D29671)에 69.0% 상동성 및 인테인(Deep vent DNA 중합효소 기원, 537 아미노산, U00707)에 67.0%의 상동성을 보였다. 인테인의 스플라이싱 사이트는 인테인의 N-말단에서의 Cys 또는 Ser 및 C-말단 스플라이스 연결부에서 His-Asn-Cys/Thr가 잘 보존되어 있어서 서열분석에 의하여 예측될 수 있었다. 따라서, 인테인을 포함하지 않는 성숙한 형태의 중합효소 유전자(TNA1_pol)이 예상되어질 수 있고, 이것은 773 아미노산 잔기로 구성된 단백질을 암호화 하는 2,322 bp 일 것이다. TNA1_pol의 추정되어진 서열은 다른 DNA 중합효소의 것들과 비교되었다 (Figure 3-3-1). 페어와이즈 어라인먼트에서, 유추되어진 성숙한 TNA1_pol 아미노산 서열은 KOD DNA 중합효소(gi:52696275)와 91.0% 상동성, 딥 벤트 DNA 중합효소(gi:436495)와 82.0% 상동성, 및 *pfu* DNA 중합효소(gi:18892147)과 79.0% 상동성을 보였다. PCR 증폭에 있어서 TNA1_pol의 성능을 보기 위하여, TNA1_pol DNA를 상기 언급한 바와같이 중합효소 전장길이로부터 인테인을 제거하여서 제조되었다. 인테인(intein)을 포함하지 않는 DNA 중합효소의 성숙한 형태는 다음과 같이 제조되었다. 오버랩핑 서열을 포함하도록 디자인된 프라이머를 이용하여, TNA1-pol의 N-말단 부분(센스 [5-CGA CCC GG*C ATA TG*A TCC TCG ACG TCG ATT ACA TCA CAG-3′] 및 안티센스 [5′- GCC GTA GTA CCC GTA ATA GCT GTT CGC TAA GAT TTT TAT TGC CCG CTG-3′]및 C-말단 부분(센스 [5-CAG CGG GCA ATA AAA ATC TTA GCG AAC AGC TAT TAC GGG TAC TAC

GGC-3′] 및 안티센스 [5′-CTC CAC AT*C TCG AG*T TTC TTC GGC TTC AAC CAA GCC CC-3′]을 각각 증폭하였다. 그리고나서, *Nde*I 및 *Xho*I 사이트에 의해 플랭크(flank)된 성숙한 TNA1_pol유전자의 전장 길이가 두개의 프라이머(센스 [5′-CGA CCC GGC *ATA TG*A TCC TCG ACG TCG ATT ACA TCA CAG-3′]및 안티센스 [5′-CTC CAC AT*C TCG A*GT TTC TTC GGC TTC AAC CAA GCC CC-3′] 및 주형으로서 상기 N-말단 및 C-말단 부분 증폭된 PCR 분절의 혼합물을 이용하여 증폭되었다. 증폭되어진 서열은 *Nde*I 및 *Xho*I로 다이제스트되었고, *Nde*I/*Xho*I 다이제스트된 pET-24a(+)에 연결되었다. 연결물(ligate)는 *E. coli* DH5α에 형질전환되었다. 정확한 구조체를 가진 후보자들이 제한 효소 다이제스천에 의해 선택되었고, 클론의 DNA 서열을 분석하여 성숙된 DNA 중합효소를 가지고 있음이 확인되었다.

(ii) TNA1-pol의 발현 및 분리

Figure 3-3-2에 보인바와 같이, 20분 동안 80℃에서의 열처리는 몇몇의 *E. coli* 단백질을 효과적으로 제거할 수 있었다. 그러나, 어떤 *E. coli* 단백질들은 열처리 후에 안정된 형태로 남아 있었다. 열처리 풀(pool)의 용해성 상등액은 TALON$^{TM}$ 금속 친화성 레진의 컬럼위에서 크로마토그래피 되었고, Table 3-3-1 및 Figure 3-3-2에서 보이는 바와 같이 정제되었다. 정제되어진 단백질의 비활성(specific activity)는 231.33 단위 $mg^{-1}$로 결정되었고, 정제 수율은 대략 26.155%이었다. SDS-PAGE는 분자량 80 kDa으로 주요한 단백질 밴드를 보였다. 정제되어진 단백질은 반복적인 얼림과 녹임 순환에서 용해성으로 남아있었다.

Table 3-3-1 Isolation of TNA1_pol from *E. coli.*

| 정제 단계 | 총 단백질 (mg) | 총 활성도 (U) | 비활성도 (U/mg) | 회수율 (%) |
|---|---|---|---|---|
| 조 추출물 | 46.6 | 2918.26 | 62.62 | 100 |
| 열 변성 | 19.7 | 2518.62 | 127.85 | 86.31 |
| His-태그된 친화 컬럼 | 3.3 | 763.37 | 231.33 | 26.15 |



(iii) TNA-pol의 성질

TNA1-pol의 pH 의존성은 pH 6.0-10.0의 범위에서 조사되었다. 최적의 활성도는 pH 7.5에서 나타났다(Figure 3-3-3). 온도에 대한 중합효소의 의존성은 40-90 ℃의 범위에서 결정되었고, TNA1_pol의 최적의 활성도는 소의 흉선 DNA 주형을 이용한 분석에서 75 ℃로 나타났다 (Figure 3-3-4A). TNA1_pol이 아래와 같이 95 ℃에서 열에 안정하였기 때문에, 최적 온도는 소 흉선 DNA 주형이 75 ℃이상에서 변성되는 것에 영향을 받았다. TNA1_pol의 열안정성은 95 ℃ 및 100 ℃에서 전-항온반응 후에 중합효소의 활성을 측정함으로써 시험되었다. 100 ℃에서 효소의 반감기($t_{1/2}$)가 3.5 시간이었고, 95℃에서의 반감기는 12.5시간이었다 (Figure 3-3-4B). TNA1_pol의 활성도에 대한 $MgCl_2(NH_4)_2SO_4$ 및 KCl 농도의 효과가 조사되었다 (Figure 3-3-5). TNA1_pol은 $MgCl_2$의 존재에 의해 의존적이었고, 6 mM $MgCl_2$의 농도에서 최고의 활성도를 보여서, 다른 DNA 중합효소에 대한 양이온의 효과와 일관성이 있었다. DNA-의존성 DNA 중합효소를 포함한 대부분의 DNA 결합 효소는 $Mg^{2+}$가 있는 것을 선호하는 경향이 있다. 중합효소의 활성에 대한 $Mg^{2+}$ 이온의 최적 농도가 PCR 증폭에 대한 최적 농도와 다를 수 있는 점에 주목할 필요가 있고, TNA1_pol의 실질적인 PCR 증폭은 $Mg^{2+}$이 많이 낮은 농도에서 행하여졌다. 최적의 $(NH_4)SO_4$ 농도는 20 mM으로 결정되었으나, KCl는 TNA1_pol의 활성도에 많은 영향을 주지 않았다(Figure 3-3-5B 및 C).

(iv) TNA1_pol의 엑소뉴클리아제 활성도

TNA1_pol의 서열분석은 추정되는 3′->5′ 엑소뉴클리아제 도메인(ExoI, ExoII, 및 ExoIII)의 존재를 보이고, TNA1_pol이 연결되어진 3′->5′ 엑소뉴클리아제를 가질 것이라는 것을 의미한다. 이 점을 밝히기 위해서, TNA1_pol의 3′->5′ 및 5′->3′ 엑소뉴클리아제의 활성도가 3′ 및 5′ 말단의 DNA 기질로부터 $^{32}P$의 방출을 측정함으로써 정량화되었다. 결과적으로, TNA1_pol 3 말단-레이블된 DNA로부터 1시간내에 68%의 $^{32}P$를 방출하였으나, 5 말단-레이블된 DNA로부터 방출된 $^{32}P$의 양은 매우 낮았고, dNTP로 증가되지 않았다(Figure 3-3-6). 이것은 TNA1_pol이 세 개의 모티프(ExoI, ExoII, 및 ExoIII)의 도메인 구조에의해 지지되어지는 3′->5′ 엑소뉴클리아제 활성을 가졌음을 보인다. 그러나 5′->3′ 엑소뉴클리아제 활성은 가지지 않았다. 대부분의 고세균 B 패밀리 DNA 중합효소는 연결되어진 3′->5′ 엑소뉴클리아제 활성을 가진 것으로 알려졌다. *Thermococcales*에 속하는 고세균의 밀접하게 관련된 고호열성(hyperthermophilic) 종의 비교 게놈 분석은 밀접하게 관련된 세균사이에서 관찰되는 유연성(plasticity)과 비교될 정도로 높은 게놈 유연성을 보였다. 더구나, 단백질 프로파일의 비교는 많은 양의 차별적인 획득 및 손실이 일어났음을 보이고, 이와같은 종들에서 다형성은 이들 자유롭게 사는 개체가 다른 환경 제약에 적응하는 것과 아마 관련되어 있을 것이다. 그럼에서 불구하고, 고호열성 고세균의 종들안에서 보전되어진 오쏘로고스(orthologous) 유전자 집합은 높은 3′->5′ 프로프리딩(proofreading) 엑소뉴클리아제 활성을 가진 DNA 중합효소는 강한 진화적 압력

에 대하여 고호열성 세균들의 생존에 중요한 핵심 유전자에 심각한 돌연변이를 최소화하기 위해서 필요했던 것을 나타낸다.

(v) TNA1_pol을 이용한 PCR

열안정성 DNA 중합효소의 주된 사용은 DNA 분절의 시험관내 증폭이다. 시험관내 증폭에 대한 재조합 TNA1_pol의 성능을 조사하기 위하여, 효소는 상기 효소는 PCR 반응에 적용해 보았다. 재조합 TNA1_Pol을 이용한 PCR 증폭이 시도되었고 상업적인 *Ex Taq*(다카라), *pfu Turbo* (스트라타진) 및 KOD (노바진) DNA 중합효소의 PCR 증폭과 비교하였다. 2.5 U의 여러 가지 DNA 중합효소가, 주형으로 *Thermococcus* sp. NA1로부터의 50 ng의 게놈 DNA, 10 pmole의 각각의 프라이머, 200 μM의 dNTP 및 PCR 반응 완충용액을 포함하는 50 ㎕의 반응 혼합액에 첨가되었다. *Thermococcus* sp. NA1의 게놈 DNA로부터 2 kb를 증폭하기 위한 프라이머[센스 5′-ACT AAA TTG GTG ATA CCG TTA TGA G-3′, 및 안티센스 ′-GGA ACA TAA AAT GTA AGG GAC TTC-3′]가 디자인되었다. 제조자에 의해 공급되는 PCR 완충용액이 상업적 중합효소의 PCR 증폭에 사용되었고, 재조합 TNA1_Pol의 PCR 증폭을 위하여 20 mM 트리스-HCl (pH 8.5), 30 mM $(NH_4)_2SO_4$, 60 mM KCl, 및 1 mM $MgCl_2$로 구성된 완충용액이 이용되었다. 95 ℃에서 단일의 변성 단계 후에, 94 ℃에서 1분, 55 ℃에서 1분, 72 ℃에서 2분의 온도 프로파일로 30 사이클하고, 72 ℃에서 최종의 7분 연장이 뒤따랐다. PCR 생산물은 0.8% 아가로즈 겔 전기영도에서 분석되었다. 긴사슬의 DNA 증폭에서 재조합 TNA1_pol의 성능을 시험하기 위하여, PCR 반응이 주형으로서 50ng의 *Thermococcus* sp. NA1로부터의 게놈 DNA, 200μM dNTP 및 PCR 반응 완충용액를 포함하는 50 ㎕ 반응 혼합액에서 행해졌다. 프라이머가 2 kb, 4 kb(센스 5′-ACT AAA TTG GTG ATA CCG TTA TGA G-3′, 및 안티센스 5′-GTC TCT GAT GCT CAT GAT GTA GTT C-3′] 및 8kb[센스 5′-ACT AAA TTG GTG ATA CCG TTA TGA G-3′, 및 안티센스 5′- GAG GAG CTC TTT AGA ATT CTC AAG C-3′]의 Thermo*coccus* sp. NA1 (DQ223723)으로부터의 DNA 절편을 증폭하기 위해서 디자인되었다. Figure 3-3-7A에서 보이듯이, TNA1_pol은 2kb 목적 유전자를 성공적으로 증폭하였고, PCR 증폭의 수율은 제조자에 의해 공급되어지는 자신의 PCR 완충용액에서 수행되어진 *Ex Taq*, *Pfu*, 및 KOD 중합효소 것과 비교할 만한 것이어서, TNA1_pol이 최적화되면 산업적으로 매우 가치가 있을 것임을 보인다(Figure 3-3-7A). 흥미롭게도, PCR 증폭에 대한 실제의 pH는 TNA1_Pol의 중합효소 활성에 대한 최적의 pH와는 다른 것으로 보였다. DNA 분절의 시험관내 증폭은 높은 충실도(fidelity) DNA 중합효소의 경우에 엑소뉴클리아제 활성과 중합효소 활성사이의 밸러스에 의존하는 것으로 생각된다. *Pfu* DNA 중합효소(pH 8.8), KOD DNA 중합효소 (pH 8.8) 및 벤트 DNA 중합효소 (pH 8.8) 같은 PCR에 일반적으로 사용되는 다른 상업적인 고-충실도(high-fidelity) DNA 중합효소는 또한 알칼리 pH 값에서 반응을 수행하는 것이 추천된다. 고-충실도 DNA



중합효소는 그들의 강한 엑소뉴클리아제 활성도 때문에 긴 DNA 분절의 증폭에는 적당하지 않다고 보고되었다. 재조합 TNA1_pol이 긴 DNA 분절을 증폭할 수 있는지를 테스트하기 위해서, 재조합 TNA1_pol이 *Thermococcus* sp. NA1의 게놈 DNA를 이용하여 긴 DNA 분절을 증폭하도록 PCR 반응에 적용하였다. 도 7B에서 보이듯이, TNA1_pol은 DNA 분절을 8kb까지 증폭할 수 있었다. 그러나 8kb DNA 증폭의 수율은 4kb 또는 2kb 의 것보다 낮았다. 이것은 TNA1_pol의 야생형 단백질은 PCR 반응을 최적화하거나 긴 DNA 증폭을 위하여 돌연변이의 도입이 필요하다는 것을 의미한다.

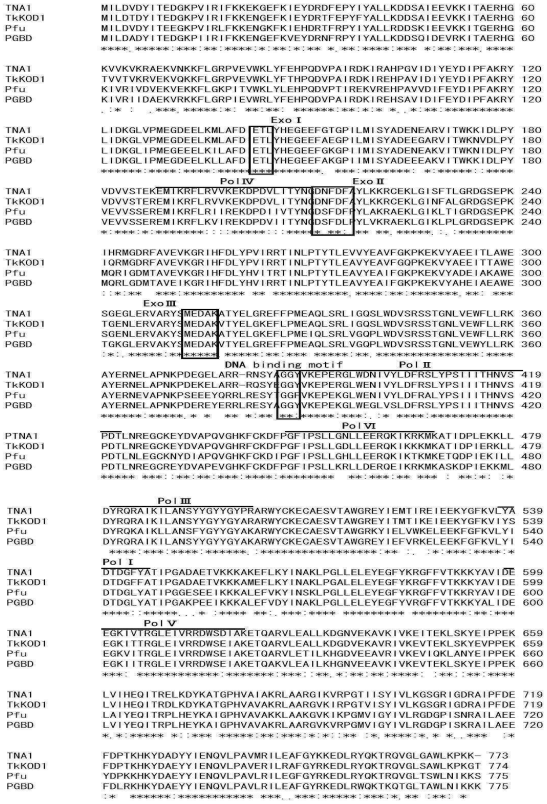



Figure 3-3-1. Amino acids sequence comparison of the family B type DNA polymerases from *Thermococcus* sp. NA1 (TNA1), *T. kodakarensis* KOD1 (TkKOD1, gi:52696275), *Pyrococcus furiosus* (Pfu, gi:18892147), and *Pyrococcus* sp. GB-D (PGBD, gi:436495). Dashes indicate gaps and numbers on the right represent the position of the last residue in the original sequence. Identical residues among the four enzymes are marked as * and residues with conserved substitutions and semi-conserved substitutions are marked as: and., respectively. PolI through PolIV, the conserved regions of family B DNA polymerases; ExoI through ExoIII, conserved motifs of the 3′->5′ exonuclease domain; and the DNA-binding motif are marked.



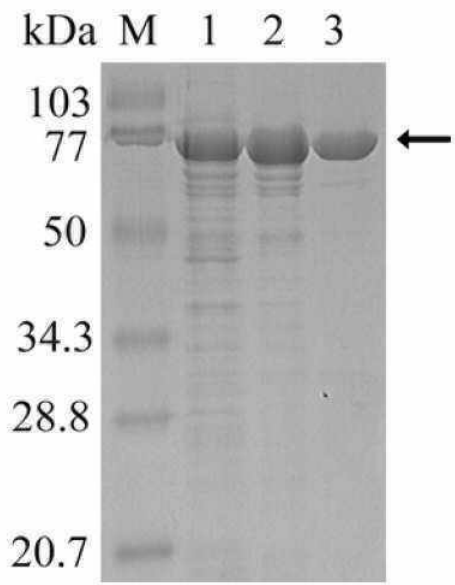



Figure 3-3-2. SDS-PAGE analysis of TNA1_pol. M, standard; 1, crude extract; 2, after heat treatment; 3, purified by His-tagged affinity chromatography. The molecular mass standards (lane M) were phosphorylase *b* (103 kDa), bovine serum albumin (77 kDa), ovalbumin (50 kDa), carbonic anhydrase (34.3 kDa), soybean trypsin inhibitor (28.8 kDa), and lysozyme (20.7 kDa).

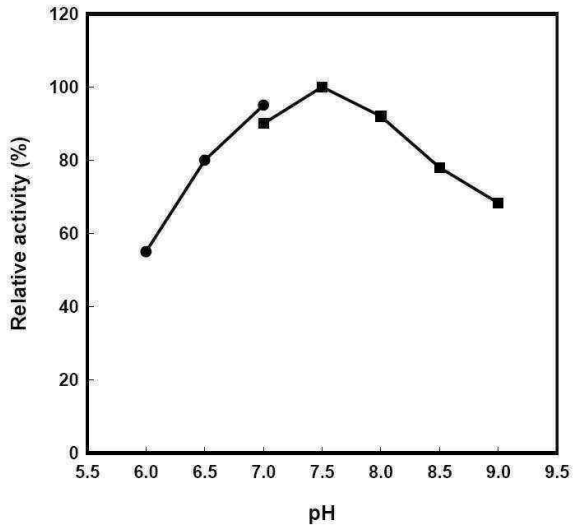



Figure 3-3-3. Effect of pH variation on DNA polymerase activity of TNA1_pol. Activity assays were performed under standard conditions with the following buffers (each at 50 mM): MES, pH 6.0 - 7.0; Tris-HCl, pH 7.0 - 9.0; Glycin, pH 9.0 - 10.0.



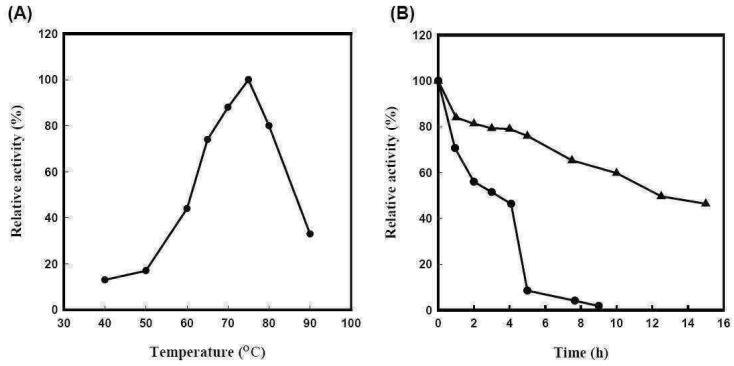



Figure 3-3-4. (A) Effect of temperature variation on DNA polymerase activity and (B) measurement of thermostability of TNA1_pol. The recombinant TNA1_pol was preincubated at 95 and 100 ℃ (●) and remaining activities were assayed at 75 ℃.

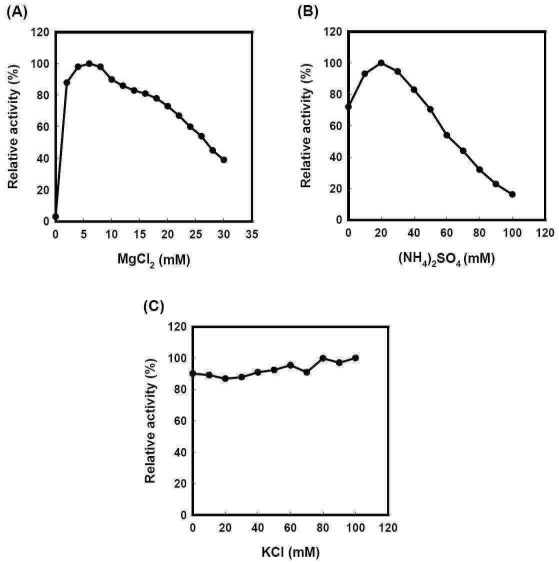



Figure 3-3-5. The effect of magnesium ions (A), ammonium ions (B), and potassium ions (C) on DNA polymerase activity of TNA1_pol. Activity assays were performed in the presence of various concentrations of $MgCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$, and KCl.



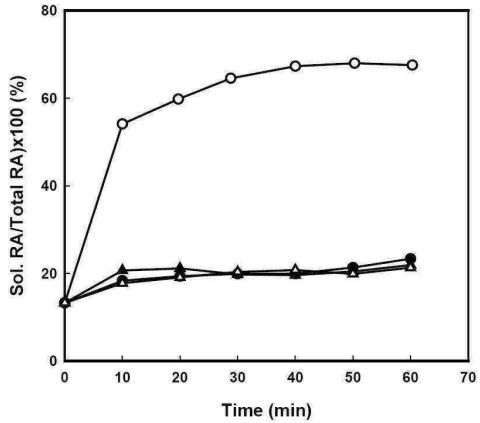



Figure 3-3-6. Measurement of exonuclease activity of the recombinant TNA1_pol. 3′→5′ exonuclease activity was measured in the absence (○) or presence (●) of dNTPs. 5′-3′ exonuclease activity was measured in the absence (△) or presence (▲) of dNTPs.

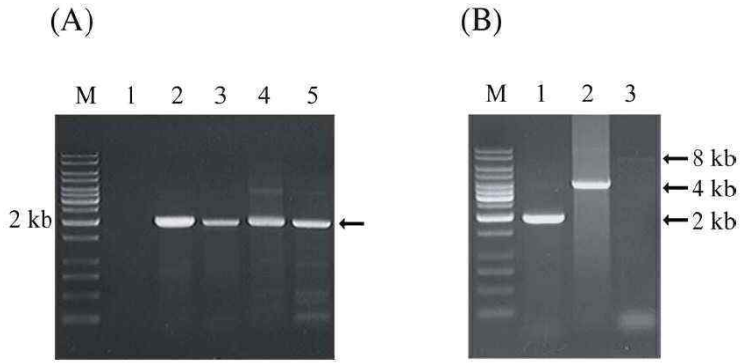



Figure 3-3-7.(A) Application of the recombinant TNA1_pol to PCR amplification in 20mM MES, 20mM Tris-HCl and 20mM glycine buffer at indicated pHs. (B) Effect of dNTP variation on PCR amplification of the recombinant TNA1_pol. (C) Effect of $MgCl_2$ variation on PCR amplification of the recombinant TNA1_pol.



(2) 고호열성 DNA ligase

(i) TNA1_lig 유전자의 클로닝 및 발현

*Nde* I 및 *Sal* I 사이트로 플랭크(flank)된 전장의 *Thermococcus* sp. NA1 리가아제 유전자가 게놈 DNA 및 두 개의 프라이머(센스 [5′- CGACC CGG CAT ATG GGA GAC ATG AAA TAC ACT GAA CTC-3′] 및 안티센스[5′- CT CCA CAT GTC GAC CTT TTT AGC CTT GAA CCT CTC CTG -3′]; 센스 프라이머의 밑줄친 곳이 *Nde* I 사이트를 나타내고, 안티센스 프라이머의 밑줄친 곳이 *Sal* I 사이트를 나타낸다)을 이용하여 PCR 증폭되었다. 게놈 서열 분석에 의해 *T. Kodakarensis* (Nakatani 200)로부터의 리가아제와 비슷한 562개의 아미노산으로 이루어진 단백질을 암호화하는 오픈 리딩 프레임(1,689 bp)이 발견되었다. 리가아제의 활성에 필수적이고 모든 고세균의 서열 사이에서 보존되어져 있는 대부분의 잔기는 TNA1_lig에 잘 보전되어져 있었다(Figure 3-3-8). TNA1_lig에서 Phe182에서 Ala206 및 6개의 모티프(I, III, IIIa, IV, V, VI) (subramanya 1996), ATP 분자와 반응하는 잔기는 또한 보존되어져 있었다. AMP Lys252 (AMP 결합), Arg257, Arg272, 및 Glu302 (리보스 결합), Phe342 (퓨린 끼움) 및 Lys423 (인산 결합), 이는 TNA1_lig가 리가아제 활성을 위해서 조효소로 ATP가 필요하다는 것을 의미한다. 그러나, Asn416 잔기는 사람 효소에서의 Lys737에 상응하는 위치를 대체했다(Tomkinson 1990). 페어와이즈 어라인먼트에서, TNA1_lig의 아미노산 서열은 *Thermococcus kodakaransis* KOD1 (82.0% 동일성, gi:7160399), *Pyrococcus abyssi* (75.0% 동일성, gi:5457975), *Pyrococcus furiosus* DSM3638 (72.0% 동일성, gi:18893788), 및 *Archaeoglobus fulgidus* DSM4304 (50.5% 동일성, gi:11498231)로부터 높은 유사성을 보였다. TNA1_lig 유전자는 PCR 증폭에 의해서 클론되었고, 발현된 효소는 상기 전술한 바와같이 분리되었다. SDS/PAGE의한 분석은 63-kDa 단백질(Figure 3-3-9)이었고, 이것은 62-kDa 단백질 및 C-말단에서의 LEH6-(His-Tag)1-kDa 펩타이드로 구성된 융합 생산물의 예상되었던 사이즈이고, 이것이 분리되어진 시료의 주된 성분이었다.

(ii) 효소의 생화학적 성질

TNA1_lig의 리가아제 활성은 전술한 바와 같이 측정되었다. 활성은 고온에서 강하게 촉진되었고, 최적 온도가 80 ℃ 이었고, 40-50 ℃에서는 최대 활성의 40%보다 적었다 (Figure 3-3-10). TNA1_lig에 대한 pH의 영향은 pH 6.0 내지 10.0 사이에서 측정되었고, 최적 활성도는 pH 7.5 이었다. $Mg^{2+}$ 및 $Zn^{2+}$의 첨가는 활성을 상당히 증가시켰지만 이들 이온은 $Ca^{2+}$, $Mn^{2+}$, 및 $Ni^{2+}$에 의해서 대체되어질 수 없었다(Figure 3-3-11). $Mg^{2+}$의 최적 농도는 0.5mM으로 결정되었다. 흥미롭게도, 리가아제 활성은 $Mg^{2+}$가 없어도 관측이

되었다. TNA1_lig 활성을 위해서 염을 필요로 하지 않는 것으로 보였으나, 40 mM의 NaCl 및 6 mM KCl은 활성도를 각각 20% 및 30% 증가시켰다(Figure 3-3-12). ATP 분자와 결합하는 잔기의 존재는 APT을 필요로 하는 것을 의미할 수 있으나, 고세균 리가아제의 $NAD^+$ 요구가 있다는 보고들은 서열 분석이 고세균 리가아제에서 조효소의 요구을 예측하는데 충분하지 않다는 것을 제시한다. 이점을 명확히하기 위해, TNA1_lig의 조효소 요구가 시험되었다. Figure3-3-13에서 보이는 것처럼 ATP 및 $NAD^+$가 TNA1_lig 활성도를 농도 의존적으로 촉진한다. 상기 리가아제의 활성도는 ATP 및 $NAD^+$가 없으면 매우 낮았다. 재조합 TNA1_lig 준비동안에 ATP의 오염 논란을 없애기 위하여, TNA1_lig가 오염된 ATP를 소모시키기 위해서 레이블되지 않은 기질과 전-항온반응 되었으나, 전-항온보관되어진 TNA1_lig의 리가아제 활성은 변하지 않았다. 더욱더, 32P-레이블된 기질을 이용한 분석에서도 확인되었다. Figure 3-3-14에서 보이듯이, 70단위 올리고뉴클레오타이드인 라이게이션 산물은, ATP 뿐만아니라 NAD+로 보충되어진 반응에서 나타났다. 이들 결과는 TNA1_lig가 두개의 조효소와 함께 같은 촉매 잔기를 사용 할 것 같다는 것을 제시한다. $NAD^+$로 보충되어진 효소 활성은 ATP가 라이게이션 분석에서 이용되었을 때 보다 효소 활성이 높았고, 이것은 $NAD^+$가 더 선호되는 조효소임을 가르킨다. 그러나, $NAD^+$ 의 효과는 닉-연결 분석에서 ATP의 효과의 것과 비슷하였다.



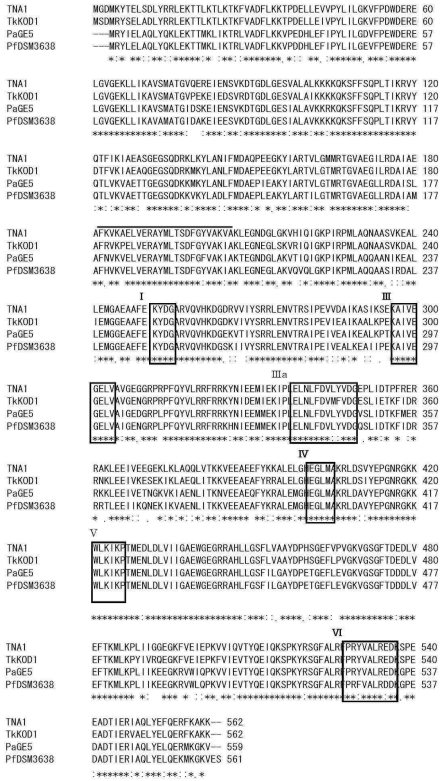



Figure 3-3-8. Amino acid sequence comparison of the DNA ligases from *Thermococcus* sp. NA1 (TNA1), *T. kodakaraensis* KOD1 (TkKOD1), *Pyrococcus abyssi* GE5 (PaGE5), and *P. furiosus*DSM3638 (PfDSM3638). The dashes indicate gaps, and the numbers on the right represent the position of the last residue in the original sequence. Identical residues among the four enzymes are marked as "*", and residues with conserved substitutions and semi-conserved substitutions are marked as ":" and ".", respectively. The residues found in only archaeal ligases are marked by an overline. Regions IVI are boxed and indicated. The (a) AMP binding residue, (b) ribose binding residue, (c) purine stacking residue, and (d) phosphate binding residue are marked above the corresponding residues.

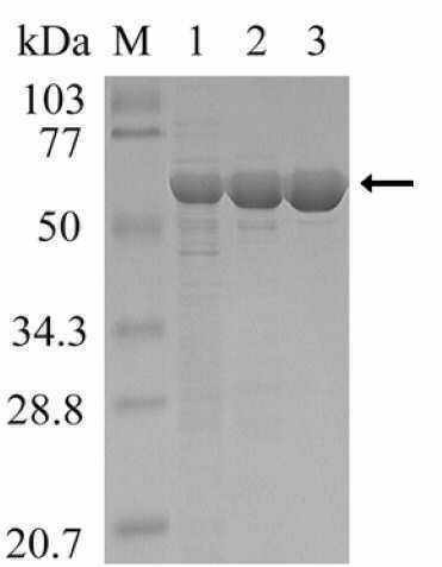



Figure 3-3-9. SDSPAGE of the purified enzyme. M, standard 1, crude extract; 2, after heat treatment; and 3, purified by His-tagged affinity chromatography. The molecular mass standards (lane M) were phosphorylase *b*(103 kDa), bovine serum albumin (77 kDa), ovalbumin (50 kDa), carbonic anhydrase (34.3 kDa), soybean trypsin inhibitor (28.8 kDa), and lysozyme (20.7 kDa).



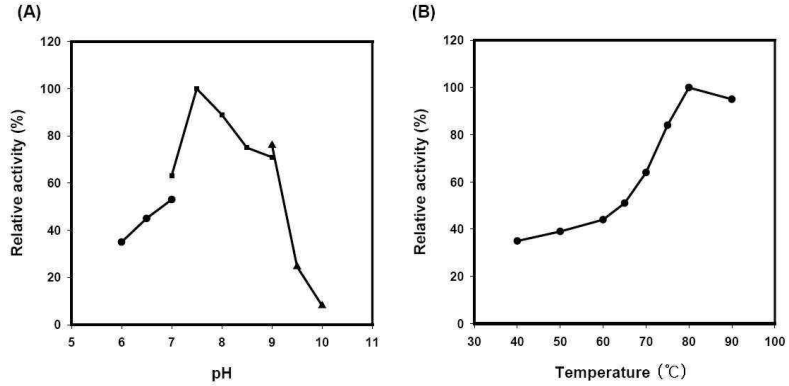



Figure 3-3-10. The effects of (A) pH and (B) temperature on the activities of TNA1_lig. A: Activity assays were performed under standard conditions with the following buffers (each at 50 mM): MES, pH 6.0 - 7.0; Tris-HCl, pH 7.0 - 9.0; Glycin-NaOH, pH 9.0 - 10.0. B: Activity assays were performed under standard conditions as the sample temperature was increased from 40 to 80 ℃.

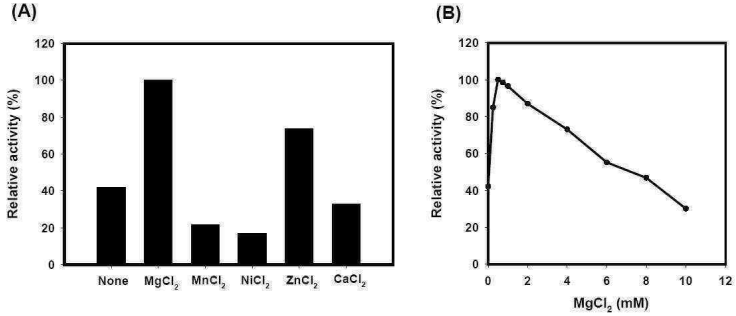



Figure 3-3-11. The effects of (A) various divalent cations and (B) MgCl2 concentration on the activities of TNA1_lig. **A**: Each substance was tested at concentration of 1 mM in standard nick-closing activity assay buffer. **B**: Activity assays were performed in the presence of various concentrations of MgCl2.



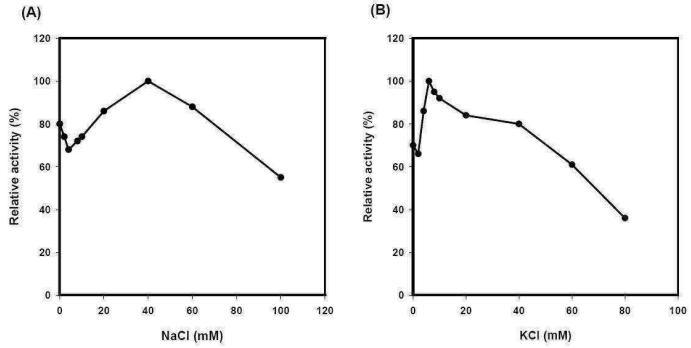



Figure 3-3-12. The effects of (A) NaCl and (B) KCl concentration on the activities of TNA1_lig. **A**: Activity assays were performed in the presence of various concentrations of NaCl. **B**: Activity assays were performed in the presence of various concentrations of KCl.

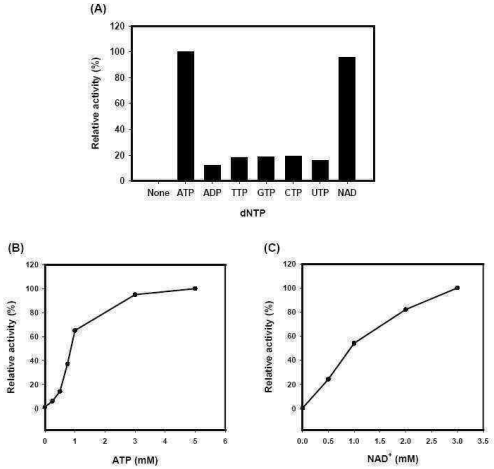



Figure 3-3-13. Ligation assay of TNA1_lig in the presence of ATP and NAD+ using a radiolabeled substrate. The nick-closing activity was determined by ligating 32P-labeled nicked substrate as described in materials and methods. This change in size was monitored on denaturing 15% polyacrylamide-7 M urea gels. Lane 1 (ATP), after reaction with ATP as a cofactor at 80 ℃ for 20 min; lane 2 (NAD+), after reaction with NAD+ as a cofactor at 80 ℃ for 20 min; lane 3 (C), before reaction with ATP as a cofactor.



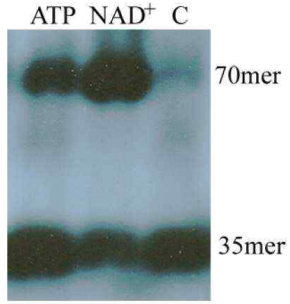



Figure 3-3-14. (A) The determination of cofactor requirement of TNA1_lig, (B) the effect of ATP increase on the activities of TNA1_lig, and (C) the effect of $NAD^+$ increaseon the activities of TNA1_lig. Assays were performed under standard buffer of nick-closing activity assay (A), in the presence of various dNTPs and $NAD^+$ (B), as ATP concentration increased; (C), as $NAD^+$ concentration increased.

(3) 고호열성 프로릴올리고펩티다아제 효소

(i) TNA1_POP의 일차적 구조 및 재조합 효소의 발현

최근에, 발명자들은 고온(70-90 ℃)에서 자라는 고세균 *Thermococcus sp.* NA1을 분리하였고, 지놈 서열분석을 통하여, 1,851 bp으로 구성되어진 오픈 리딩 프레임을 발견하였고, 이것을 TNA1_POP이라 명명하였고, *T. kodakarnsis* KOD1(83% 상동성, Fukui et al. 2005), *P. abyssi* GE5 (79% 상동성, Cohen et al, 2003). *P. horikoshii* OT3 (76% 상동성, Kawarabayashi et al. 1998) 및 *P. furiosus* DSM 3638(76% 상동성, Robb et al. 2001)의 프로릴 올리고펩티다아제에 유사한 단백질를 암호화 하고 있었다(Figure 3-3-15). 암호화된 단백질은 70,380 Da 및 4.98의 PI을 가진 616 아미노산으로 구성되었다. 아미노산 서열의 정렬에 기초하여, Ser477, Asp559, 및 His591은 TNA1_POP의 촉매 잔기로 예상되었다. TNA1_POP 유전자는 PCR을 이용하여 증폭되었고, 발현되어진 효소는 용해성 세포 추출물으로부터 정제되었다. SDS/PAGE의 분석에 의해 72- kDa의 단백질이 분리된 시료의 주된 성분으로 보였다(Figure 3-3-16). 이것은 70.4 kDa POP 단백질과 단백질의 C- 말단 부분의 -VDKLAAALEH$_6$-(His-태그)에 상응하는1.7 kDa의 결합 생성물의 예상된 크기이다.

(ii) 효소의 생화학적 특성연구

TNA1_POP의 기능은 Suc-Ala-Pro-*p*NA을 가수분해할 수 있는 능력으로부터 확인되었다. 이들 기질은 보통의 분석에 사용되었다. 프로릴올리고펩티다아제의 활성은 고온에서 강하게 촉진되었으며, 80 ℃에서 최적 활성을 보였으며, 최대활성의 10% 미만의 활성이 30-50 ℃ 및 100 ℃에서 관찰되었다(Figure 3-3-19). 프로릴 올리고펩티다아제 활성에 대한 pH의 영향은 pH 범위 4-10에서 다른 완충용액을 이용하여 평가되었고, 최적값은 pH 7.5 이었다(Figure 3-3-17). 100분까지 50 mM 트리스-HCl 완충용액(pH 7.5)안에서 80 ℃ 및 90 ℃에서 항온배양한 후, 열안정성 및 열 활성화를 결정하기 위하여 80 ℃에서 TNA1_POP의 상대적인 활성을 측정하였다. 상대적인 활성은 각각 80 ℃ 및 90 ℃에서 10 분 및 6분 항온반응한 후 거의 6배 증가하는 것으로 보였다(Figure 3-3-18A). 짧은 시간내에 열처리에 의한 효소의 활성화는 *P. furiosus* POP(Harwood et al. 1997), *P. horkkoshii*로부터의 아킬아미노산-방출 효소(Ishikawa et al. 1998), *Sulfolobus solfataricus*로부터의 세포내 단백질 분해효소(Guagliardi et al. 2002) 및 *Thermococcus* sp. NA1으로부터의 아미노펩티다아제같은 다른 단백질 분해효소와 함께 관찰되었다. 90 ℃에서의 긴 항온보관에 의해서, TNA1_POP은 반감기($t_{1/2}$) 221분으로 활성을 잃어버렸다(Figure 3-3-18B). TNA1_POP의 불활성화 비율은 95℃에서 24시간 후에는 초기의 POP 활성의 24% 미만인 *P. furiosus* 프로릴 올리고펩티다아제(Harwood et al. 1997)의 것과 매우 비슷하였다. 하아우드(Harwood) 등은 고온에서 관찰되는 *P. furiosus 프로릴* 올리고펩티다아제의 불활성화는 고농도에서 자가분해에 많은 부분 기원할 것이라고 설명하였다. 실제로 TNA1_POP는 열안정성 실험에서 사용한 *P. furiosus* POP의 것보다 70배 적은 매우 낮은 농도(1.25 ㎍/ml)로 사용되었고, *P. furiosus*의 희석된 효소 조제물(5.4 ㎍/ml)은 매우 안정하였고, 95 ℃에서 20 시간 후의 초기 활성도의 약 80%를 유지하였다. TNA1_POP이 고농도에서 자가 분해 되는 지에 대해서는 테스트되지 않았다. TNA1_POP 및 *P. furiosus* 프로릴 올리고펩티다아제 성분에서 단 하나의 프롤린 차이가 있었고, 매치되지 않는 3개의 프롤린이 있었다: 각각 Pro168에 대한 Ala168에서 , Ala242에 대한 Pro242 및 Pro545에 대한 Glu545. Table 3-3-2는 TNA1_POP의 활성이 $Zn^{2+}$ 및 $Cu^{2+}$에 의해 강하게 억제되는 것을 보이고, $Co^{2+}$ 및 $Ni^{2+}$에 의해서 약간 억제 받는 것을 보인다.

Table 3-3-2 he effect of metal ions and EDTA in TNA_POP.

| 금속이온 또는 EDTA 1mM | 상대적 활성도(%) |
|---|---|
| $Ba^{2+}$ | 133.5 |
| $Ca^{2+}$ | 133.8 |
| $Co^{2+}$ | 46.2 |
| $Cu^{2+}$ | 16.7 |
| $Mg^{2+}$ | 128.7 |
| $Mn^{2+}$ | 98.3 |
| $Ni^{2+}$ | 46.5 |
| $Zn^{2+}$ | 3.4 |
| EDTA | 145.7 |
| Control | 100.0 |

$Ba^{2+}$, $Ca^{2+}$ 및 $Mg^{2+}$에 의한 증가된 활성은 사용되어진 시료가 모든 금속이온이 제거되도록 적절하게 교환되지 않았고, 그래서 EDTA-처리된 시료에서는 그 정도로 활성의 증가가 일어난 것이라고 설명되어질 수 있다. 동력학적 분석은 Suc-Ala-Pro-pNA을 이용하여 수행되었고, $K_m$(0.4 mM), $V_{max}$(18.4 μmole/분/mg) 및 $k_{cat}$ (22.5 $S^{-1}$) 값이 측정된 활성도로부터 계산되었다(Figure 3-3-19). 효소활성은 *F. meningosepticum*, *Sphingomonas capsulate* 및 *Myxococcus xanthus* (Shan et al, 2004)로부터의 세균의 POP의 것들과 비교할 정도의 Suc-Ala-Pro-pNA에 대한 활성도를 보였다. *Thermoncoccus* sp. NA1로부터의 프로릴 올리고펩티다아제는 세균의 프로릴 올리고펩티다아제보다 낮은 $K_m$ 및 $k_{cat}$을 가졌다. Suc-Ala-Pro-pNA의 가수분해에 대한 $k_{cat}$ 값은 다양한 프롤린-함유 올리고펩타이드에 대한 램의 뇌 프로릴 올리고펩티다아제, 양 신장 프로릴 올리고펩티다아제, 및 *P. furiosus* 프로릴 올리고펩티다아제의 것들과 비교할 만한 것이었다(Harris et al. 2001; Polgar 1991; Walter 및 Yoshimoto 1978; Yoshimoto et al. 1983).

(iii) 특성분석

본 연구에서는 *T. kodakarensis* KOD1, *P. abyssi* GE5, *P. furiosus* DSM 3638 및 *P. horikoshii* OT3에 강하게 연관되어 있는 프로릴 올리고펩티다아제를 암호화하고 있는 *Thermococcus* sp. NA1 유전자를 서열분석 및 기능적 발현을 통해 발견하였다. 데이터베이스 검색은 *Thermococcus* sp. NA1으로부터의 프로릴 올리고펩티다아제의 아미노산 서열은 *Flavobacterium meningosepticum* (27%)(Yoshimoto et. al. 1991) 및 돼지의 뇌로부터의 포유류 프로릴 올리고펩티다아제 (29%) (Rennex et al. 1991) 및 인간의 T 림프구 (29%)로부터의 프로릴 올리고펩티다아제와 서열이 비교되었을 때 낮은 동일성을 보였다. 비록 이들 효소간의 전체적인 유사성은 낮은 편이지만, 촉매 트라이어드 잔기를 가지고 있는 C-말단에서는 높은 보존이 있었다.

활성에 대한 pH 프로파일은 간단하지 않았다. 이것은 이중의 종-모양 커브 같았고, 두 개의 pH-의존성 효소 형태에 상응하는 것처럼 보였다. 높은 pH 형태가 더 활성적이었고, 이것은 돼지의 프로릴 올리고펩티다아제 및 *P. furiosus* 프로릴 올리고펩티다아제의 양 프로파일에서 또한 관찰되었다. 반면에, 상기 효소의 *F. meningosepticum* 및 버섯의 최적 pH는 각각 6.5 및 6.8이었다(Kreig and Wolf 1995; Yoshimoto et al. 1988). 해리스(Harris) 등은(2001) 열안정성 프로릴 올리고펩티다아제의 pH 활성화와 관련된 이중 만곡 모양의 특징은 ~4.5의 $pK_a$을 가진 기능성 그룹(아마도 P. *furiosus* 프로릴 올리고펩티다아제의 카르복실 그룹)의 이온화로부터 기원할 것이다고 주장했다. 효소활성은 EDTA, 메탈 킬레이터에 의해 억제받지 않기 때문에, TNA1_POP은 금속계열 단백질분해효소 아닌 것으로 보인다. 효소활성에 대한 다른 금속이온의 영향 연구을 통해, 발명자들은 TNA1_POP가 $Co^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Ni^{2+}$ 및 $Zn^{2+}$에 의해 억제 받았다.



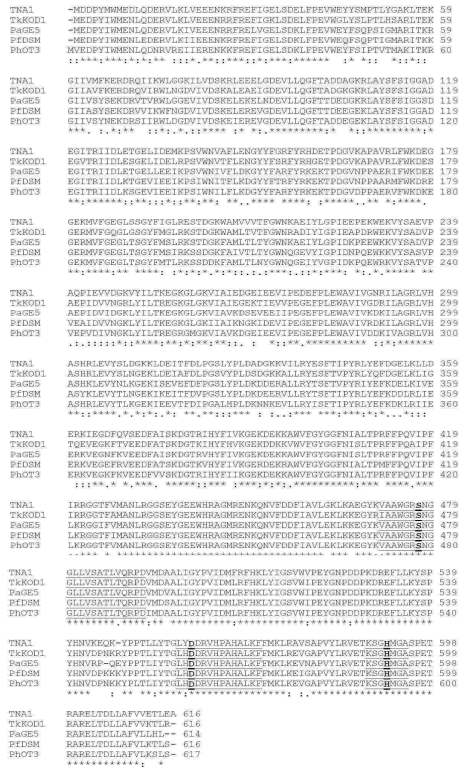


Figure 3-3-15. Sequence comparison of the POPs from *Thermococcus* sp. NA1 (TNA1), *T. kodakarensis* KOD1 189 (TkKOD1, gi:57640358), *P. abyssi* GE5 (PaGE5, gi:14521352), *P. furiosus*DSM 3638 (PfDSM, gi: 77197) and *P. horikoshii* OT3 (PhOT3, gi:14591079). Dashes indicate gaps and numbers on the right represent the position of the last residue in the original sequence. Identical residues among the four enzymes are marked as * and residues with conserved substitutions and semi-conserved substitutions are marked as : and ., respectively. The underlined regions are the residues composing the active site predicted based on the crystal structure of porcine POP and the sequence alignment. The signature Ser-Asp-His catalytic triad is in bold.

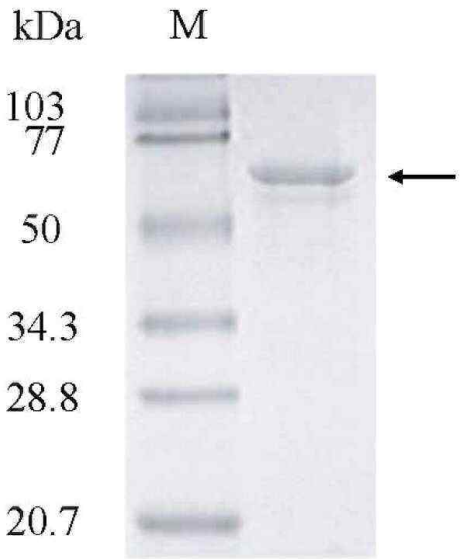



Figure 3-3-16. SDS-PAGE (12%) of the purified enzyme. The molecular mass standards (lane M) were phosphorylase *b*(103 kDa), bovine serum albumin (77 kDa), ovalbumin (50 kDa), carbonic anhydrase (34.3 kDa), soybean trypsin inhibitor (28.8 kDa), and lysozyme (20.7 kDa). The band corresponding to the enzyme is indicated by the arrow



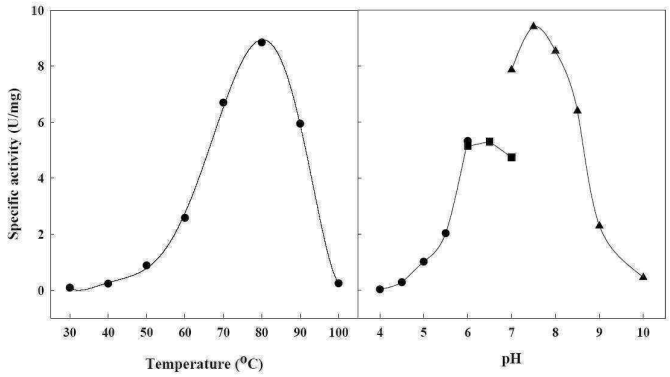



Figure 3-3-17. The effects of temperature (A) and pH (B) on the activities of TNA1_POP. **A**: Activity assays were performed under standard conditions as the sample temperature was increased from 30 to 100 °C. **B**: Activity assays were performed under standard conditions with the following buffers (each at 50 mM): sodium acetate (circle), pH 4.0 - 6.0; sodium phosphate (square), pH 6.0 - 7.0; Tris-HCl (triangle), pH 7.0-10.0.

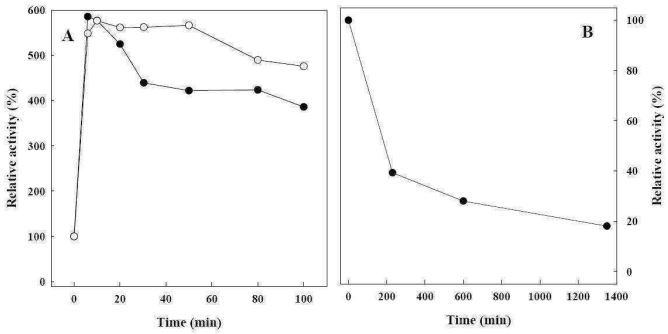



Figure 3-3-18. Effect of temperature on TNA1_POP stability. TNA1_POP (1.25 g/ml) was incubated at 80 or 90 ℃ in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. At the time shown, aliquots were taken out, and the activities were measured in the same buffer at 80 ℃ using Suc-Ala-Pro-*p*NA as substrate

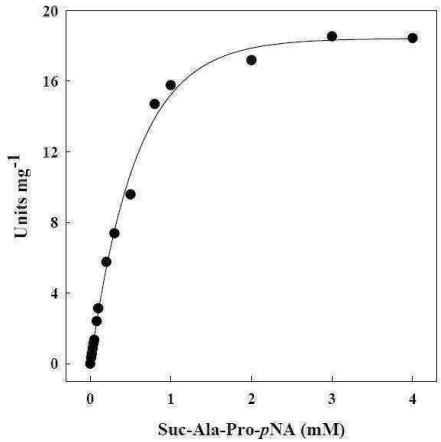



Figure 3-3-19. The effect of increasing substrate concentration on the activity of TNA1_POP. Activity assays were performed under standard conditions while the concentration of Suc-Ala-Pro-*p*NA was varie.

(4) 고호열성 아미노펩티다아제 P

(i) 아미노 펩티다아제 P (APP) 유전자의 일차 구조 및 재조합 효소의 발현

*Nde*I 및 *Xho*I에 의해 플랭크(flank)된 *Thermococcus* sp. NA1의 APP 유전자의 전장 길이는 게놈 DNA와 두 개의 프라이머(센스 [5′-CGA CCC GGC ATA TGC GCC TCA ACA AGC TCA CTT CTC TG-3′; 서열번호 3] 및 안티센스 [5′-CTC CAC ATC TCG AGC ACG ATT ATC AGC TCC CTC GGT GCC-3′; 서열번호 4]; 상기 센스 프라이머 안에 이탤릭로된 서열이 *Nde*I 사이트이고, 안티센스 프라이머 안에 이탤릭체로 된 서열이 *Xho*I이다)를 이용하여 증폭되었다. 증폭되어진 서열은 *Nde*I 및 *Xho*I로 다이제스트되었고, *Nde*I/*Xho*I 다이제스트된 pET-24a(+)에 연결되었다. 연결물(ligate)는 *E. coli* DH5α에 형질전환되었다. 정확한 구조체를 가진 후보자들이 제한 효소 다이제스천에 의해 선택되었고, 클론의 DNA 서열을 분석하여 APP를 가지고 있음이 확인되었다. 본 연구에서는 70-90 °C의 높은 온도에서 생장하는 고호열성 고세균 *Thermococcus* sp. NA1을 분리하였다. 게놈 염기서열을 분석함으로써, 356 아미노산으로 구성되며 예측분자량이 39,714 Da 인 단백질을 암호화하는 1,071 bp로 구성되는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 발견하였다. 염기서열 비교분석은 *T. kodakaraensis* KOD1 (75% 동일성) *Pyrococcus abyssi* GE5 (74% 동일성)의 추정적 APP 유전자 및 *Pyrococcus horikoshii* OT3의 디펩티다제(74% 동일성)와 단백질의 높은 유사성을 보여준다(Figure 3-3-20). 아미노산 서열분석은, *E. coli* APP의 결정구조에서 금속 이온 배위에 관련된 활성 부위 잔기들로 모두 처음 확인된, 두 개의 아스파르트산 잔기, 한 개의 히스티딘 잔기 및 두 개의 글루탐산 잔기가 TNA1_APP에서 완벽하게 보존된다는 것을 보여준다. 두 개의 다른 결정적인 잔기들도 또한 모두 높은 비율로 보존된다; 이러한 두 개의 히스티딘은 용매로 양성자를 교환하는 역할을 할 것으로 추정된다. 상기한 분석에 기초해 볼 때 오픈 리딩 프레임(ORF)은 APP인 것으로 추정되나, 다른 모든 고세균의 APP가 추정된 것으로 기재되고 있기 때문에 이러한 사실을 효소 활성을 밝힘으로써 재확인하는 것이 필요하였다. 이것을 확인하기 위하여, APP 유전자를 PCR 기법을 사용하여 증폭하였고, 발현된 효소를 가용성의 세포 추출물로부터 상기한 방법에 의하여 정제하였다. SDS-PAGE에 의한 분석은, C-말단에서 LEH $_6$-(His-태그)에 상응하는 1-kDa 펩타이드 및 40-kDa APP 단백질로 구성된 융합물의 기대된 크기인, 41-kDa 단백질이 본 발명의 정제된 시료의 주요 구성요소라는 것을 보여준다(Figure 3-3-21).

(ii) 아미노펩티다아제 P 효소의 생화학적 특성 규명



본 발명의 정제된 단백질을 전형적인 APP 기질에 대하여 그 활성을 실험하였으며, 이것은 Lys($N^{\varepsilon}$-Abz)-Pro-Pro-pNA을 가수분해하는 것에 의하여 APP 활성을 보여준다. APP는 비록 많은 경우에 있어서 C-말단 부위에서 프롤린을 갖는 디펩타이드를 가수분해할 수는 없지만, 말단에서 두 번째 잔기가 프롤린인 펩타이드로부터 N-말단 아미노산을 특이적으로 제거하는 단백질분해효소이다. 재조합 효소가 디펩타이드 및 Lys($N^{\varepsilon}$-Abz)-Pro-Pro-pNA를 가수분해할 수 있는지를 보기 위하여, Met-Pro에 대한 가수분해 활성도를 실험하였다. 이 재조합 효소는 Met-Pro 디펩타이드를 명백하게 가수분해할 수 있었다. Figure 3-3-22A에 나타난 바대로, Met-Pro에 대한 APP 활성은 높은 온도에서 강하게 촉진되었고, 100 °C 이상에서 최적활성온도를 보여주었고, 40-50°C에서 관찰된 최대활성보다 10% 적은 정도이었다. 동일한 경향이 Lys($N^{\varepsilon}$-Abz)-Pro-Pro-pNA와의 실험에서 또한 나타나고 있다. APP 활성에 대한 pH의 영향은 pH 범위 4-8에서 다양한 완충용액을 이용하여 측정하였다. 흥미롭게도, APP 활성의 최적 pH 는 Met-Pro (Figure 3-3-22B) 및 Lys($N^{\varepsilon}$-Abz)-Pro-Pro-pNA (Figure 3-3-22C) 에 대하여, 각각 pH값 5 및 6.5-7로 다르게 나타났다. 열 안정성은 본 발명의 효소를 50 mM 소디움 아세테이트 완충용액, pH 5, 80 및 90 °C에서 배양함으로 측정하였다. APP는 열에 매우 안정적으로써, 효소활성 반감기가 80 °C에서 100분 이상이었고 90 °C 이상에서 49분 이상이었다(Figure 3-3-23). 흥미롭게도, 80 °C에서 항온보관된 APP는 상대적인 활성이 20분내에 20%까지 증가하는 것으로 나타났다(Figure 3-3-23의 삽입도면).금속 결합을 위한 보존된 아미노산 잔기의 존재는 TNA1_APP가 금속이온의 첨가에 의해 영향을 받을 수도 있다는 것을 암시한다. Figure 3-3-24에 나타난바 대로, 본 발명의 투석여과된 효소에 대한 $Co^{2+}$ 이온의 첨가는 그 효소활성을 25배 증가시켰으며, $Mn^{2+}$ 및 $Zn^{2+}$ 은 활성을 각각 5배 및 4배 증가시켰다. 이러한 이온들은 다른 2가 양이온들로 교체될 수 없었다($Ba^{2+}$, $Ca^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Fe^{2+}$, $Mg^{2+}$ 및 $Ni^{2+}$). APP 활성에 대한 $Co^{2+}$, $Mn^{2+}$ 및 $Zn^{2+}$ 농도의 효과는 3 mM $CoCl_2$, 20 mM $MnCl_2$ 및 0.4 mM $ZnCl_2$ 에서 최대활성을 보여 매우 다른 반응을 보여주었다. 그러나, 이러한 양이온들은 그들의 최적농도 이상으로 첨가되었을 때 억제 현상을 야기하였다. 반응속도분석은 Met-Pro을 사용하여 수행하였고, $K_m$ (0.96 mM), $V_{max}$ (796 μmol $min^{-1}$ $mg^{-1}$) 및 $k_{cat}$ (541 $s^{-1}$) 같은 반응속도 상수는 측정된 활성으로부터 계산하였다(Figure 3-3-25). 본 연구의 금속-APP 유전자는 염기서열 분석을 통하여 동일성을 확인하였고, 예측되는 기능은 *E. coli*에서 발현된 재조합 효소의 생화학적 특성규명을 통하여 재확인하였다. 데이터베이스 분석은 TNA1_APP의 아미노산 서열이 각각 고세균 *T. kodakaraensis* KOD1, *P. abyssi* GE5 및 *P. horikoshii* OT3의 게놈 염기서열에서의 두 개의 추정적 APP 및 한 개의 추정적 디펩티다아제와 매우 밀접한 관계가 있다는 것을 보여준다. 그것은 또한 고세균 *Sulfolobus tokodaii* str. 7 (39%) 및 *E. coli* O157 (26%)의 APP 및 *Drosophila melanogaster* (17%), 인간 (19%), 쥐(21%) 및 *Caenorhabditis elegans* (20%)의 세포질 APP와의 유사성을 보여준다. 결론적으로, 본 발명의 정제된 효소는 Met-Pro 및 Lys($N^{\varepsilon}$-Abz)-Pro-Pro-pNA 의 가수분해에 의해 예측

되는 것처럼 APP 활성을 나타낸다. 중온성의 근원으로부터의 모든 다른 APP 는 최대 55 °C의 온도에서 최적활성을 나타낸다. *T. kodakaraensis* KOD1의 세포외 분획으로부터 정제된 열에 안정적인 티올 프로테아제(TT protease)를 제외하고, *Thermococcus* spp.로부터 분리된 대부분의 프로테아제 및 펩티다아제가 보통의 높은 온도인 70-85 °C에서 증가된 활성을 갖는 다는 것을 고려할 때, TNA1_APP가 100 °C 이상에서 최적 온도를 나타낸다는 것은 놀라운 일이다. TNA1_APP가 열에 극히 안정적인 효소라는 사실은 이 효소가 80 °C에서 $t_{1/2}$ 이 100 분 이상이라는 것에 의해 증명된다. 더 나아가 TNA1_APP가 높은 온도에서의 항온보관에 의하여 상당히 활성화 되는 것처럼 나타난다. 짧은 시간 동안의 열에 의해 야기된 활성화는 아실아미노산-방출 효소, 세포내 프로테아제, 프롤릴 엔도펩티다제 및 카르복시펩티다아제를 포함하여 *P. horikoshii*, *Sulfolobus solfataricus* 또는 *Thermococcus* sp. NA1 로부터 정제된 다른 단백질 분해 효소에서 또한 관찰되었다. 비록 그 메커니즘은 연구되지 않았지만, 본 발명의 효소에서 열에 의한 형태변화가 그 활성을 증가시킨 것으로 추측된다. 구아글리아르디(Guagliardi) 등은 전-열처리에 의한 활성의 증가가 호열성 생물원으로부터의 몇몇 효소의 특징이며, 그리고 이것은 보통 온도에서 이러한 효소들이 채용한 낮은 활성 상태의 활성화를 반영하는 것이라고 본다. TNA1_APP의 최적 pH는 다른 APP와 구별되는 약산성 범위 내에(pH 5, 6.5-7) 있다. 비록 소의 폐에서 분리된 막결합 APP가 브라디키닌(bradykinin) 가수분해에서 6.5의 최적 pH를 보여주고 있으나, 대부분의 APP는 pH 7-9에서 최적 활성을 나타낸다. 더 나아가, 최적 pH값은 Met-Pro 및 Lys($N^{\varepsilon}$-Abz)-Pro-Pro-pNA 의 가수분해에서 다르게 나타났다. *Lactococcus lactis* 로부터의 효소 및 다른 근원으로부터의 효소들처럼, *Thermococcus* sp. NA1로부터의 APP는 $Co^{2+}$ 및 $Mn^{2+}$에 의해 자극을 받는 금속효소이다. $Zn^{2+}$ 또한 자극 효과를 보였는데, 이것은 모든 포유동물 및 *C. elegans* 의 APP의 $Zn^{2+}$ 억제와 반대된다.



```
TNA1     MRLNKLTSLLKEKAFDGALISPGTNLYYLTSLHIHEAGERLTVLAVNSNGEYHLLAPSLY  60
TkKOD1   MRIEKLAALMEEKGFSGALVSPGANFYYLTGLHIHEAGERLTVLAVNPDGEYHILAPSLY  60
PhOT3    MRLEKFIHLLGERGFDGALISPGTNLYYLTGLRLHEVGERLAILAVSAEGDYRFLAPSLY  60
PaGE5    MRIDRFVKLLNEMNFDGAFISPGSNLYYLTGLKLHEVGERPTILVVSADGEYKLLAPSLY  60
         **::::  *: *  *.**::***:*:****.*::**.*** ::*.*..:*:*::******

TNA1     ENVIRDFPATFWRDGENPYGKLAEILKELDLSSGRILVENTMRADWLIGILKLGS-FEPH 119
TkKOD1   QNVIKDFPVTFWRDGENPYSKLGTIMKELGIG-GKVLVENTMRADWLIGIFHSDNRFDPY 119
PhOT3    ENVVNNFPATFWHDGENPYAKLREILEELGISKGRILIEDTMRADWLIGIMKLGK-FTFQ 119
PaGE5    SNVITNFPVTFWRDGENPYAKLSTILGELKLYRGRFLVEDTMRADWLIGILKLGN-FEPH 119
         .**: :**.***:******.**  *: ** :  *:.*:*:*********:: .. *

TNA1     PLSILMRELRMRKDAEEIRLMEKAAKIVDEVFEEIIGMDLIGMREKDLALKIELLIRERS 179
TkKOD1   PLNVLMRELRMRKDKEELKLMQKAAEVADRVFEEILSWDIVGMTEKELALKIELRIRELS 179
PhOT3    PLSSLIKELRMIKDKEEVKMMEHASRIADKVFEEILTWDLIGMKERELALKIELLIRELS 179
PaGE5    PLSSLIRLMRMRKDREEIENMKHAARIADKVFEEILSWDILGMSEKELALKIEVRIRELS 179
         **. *:: :** ** **:. *::*:.:.*.*****:  *::** *::******: *** *

TNA1     DGISFEPIVASGENGANPHHAPGERKLGEGDLVILDYGAKWEGYCSDITRTIALGKPDKK 239
TkKOD1   DGISFQPIVASGENGANPHHEPGNRKIRKGDMVILDYGARWKGYCSDITRTVAIGKPDEK 239
PhOT3    DGIAFEPIVASGENAANPHHEPGERKIRKGDIIILDYGARWKGYCSDITRTIGLGELDER 239
PaGE5    DGVSFSPIVASGENSANPHHEPGERKIRKGDIVILDYGARWRGYCSDITRTIAVGRPDEK 239
         **::*.********.***** **:**: :**::******:*.*********.:*. *::

TNA1     LLEIYEVVKNAQEGAFQTVREGLKAKEVDKAARNYIAEAGYGEYFTHRTGHGLGLDVHEE 299
TkKOD1   LLEIYRIVKEAQEDAFQSVREGIKAKEVDRAARETISKAGYGEYFTHRTGHGLGLDVHEE 299
PhOT3    LVKIYEVVKDAQESAFKAVREGIKAKDVDSRAREVISKAGYGEYFIHRTGHGLGLDVHEE 299
PaGE5    LIEVYEIVKEAQEKAYRAVREGIKAKEVDKVAREVISEAGYGEYFTHRTGHGLGLDVHEE 299
         *:::*.:**:*** *:::****:***:**  **: *::******* **************

TNA1     PYIGPDGEVILKNGMTFTIEPGIYVPGLGGVRIEDDVVVEGGKGRRLTKAPRELIIV    356
TkKOD1   PYIGPDGEVVLKNGMTFTIEPGIYLPGLGGVRIEDDVAVINGRGKRLTRADRELVIL    356
PhOT3    PYIGPDGEVILKNGMTFTIEPGIYVPGLGGVRIEDDIVVDEGKGRRLTKAERELIIL    356
PaGE5    PYIGPDGEVTLENGMTFTIEPGIYIPGLGGVRIEDDVVVE-GKGKRLTKAGRELITV    355
         ********* *:************:***********:.*  *:*:***:* ***: :
```

Figure 3-3-20. Sequence comparison of *Thermococcus* sp. NA1 aminopeptidase P (TNA1APP), *E. coli*aminopeptidase P (EcAPP, gi:113751), *P. furiosus* prolidase (PfProl, gi:17380168), and *E. coli* methionine aminopeptidase (EcMetAP, gi:113740). Dashes indicate gaps, and numbers on the right representing the position of the last residue in the original sequence. Identical residues among the four enzymes are marked with an asterisk (*), and residues with conserved substitutions and semi-conserved substitutions are marked with two dots (:) and one dot (.), respectively. The putative active site residues participating in metal ion coordination and in proton shuffling are bolded and underscored, respectively.

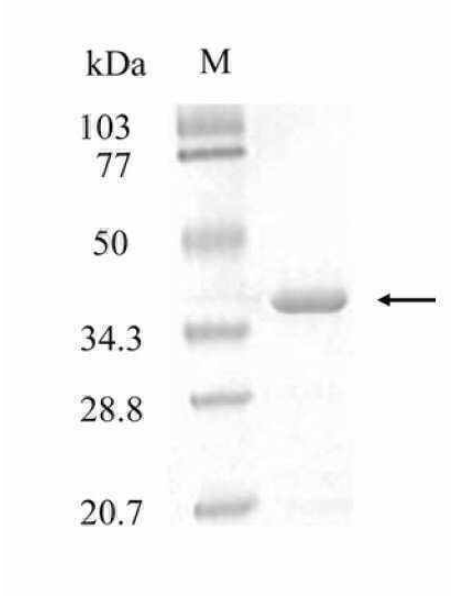



Figure 3-3-21. SDS-PAGE (12%) of the purified enzyme. The molecular mass standards (lane M) were phosphorylase *b* (103 kDa), bovine serum albumin (77 kDa), ovalbumin (50 kDa), carbonic anhydrase (34.3 kDa), soybean trypsin inhibitor (28.8 kDa), and lysozyme (20.7 kDa). The band corresponding to the enzyme is indicated by the arrows.



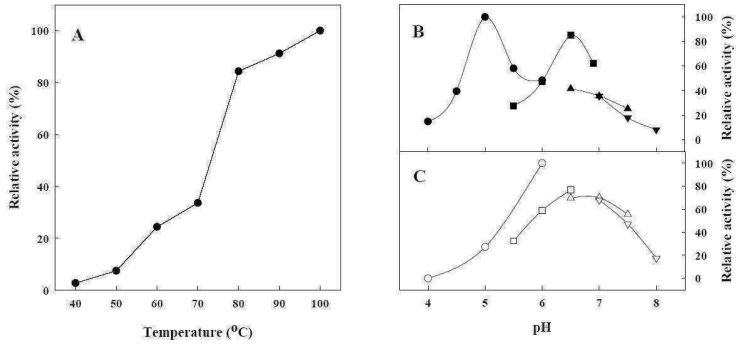



Figure 3-3-22. The effects of temperature (A) and pH (B, C) on the activities activity of APP. A:Activity assays were performed under standard conditions as the sample temperature was increased from 40 to 100C ℃. B, C: Activity assays were performed under standard conditions for the hydrolysis of Lys(*N*-Abz)-Pro-Pro-pNA (open symbols) and Met-Pro (closed symbols) with the following buffers (each at 50 mM): sodium acetate (circle) , pH 4.0 - 6.0 KMES (square), pH 5.5 - 7.0 MOPS (triangle up), pH 6.5 7.5 HEPES (triangle down), pH 7.0-8.0.

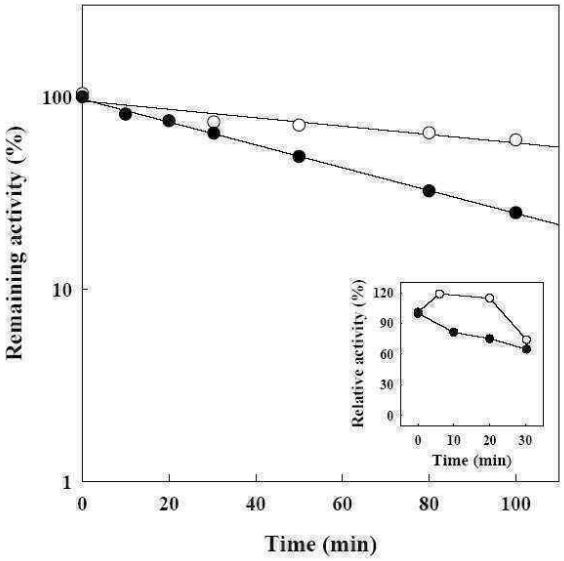



Figure 3-3-23. Thermal inactivation of APP. Semilog plots of the remaining activity versus incubation time are shown. APP (4 nM) was incubated at 80 ℃ or 90 ℃ in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5,.0 containing 1.2 mM $CoCl_2$. At the time shown, aliquots were removed, and the the activitiesy were was measured in the same buffer at 80 ℃ using Met-Pro as the substrate.The lines were obtained by linear regression of the data.



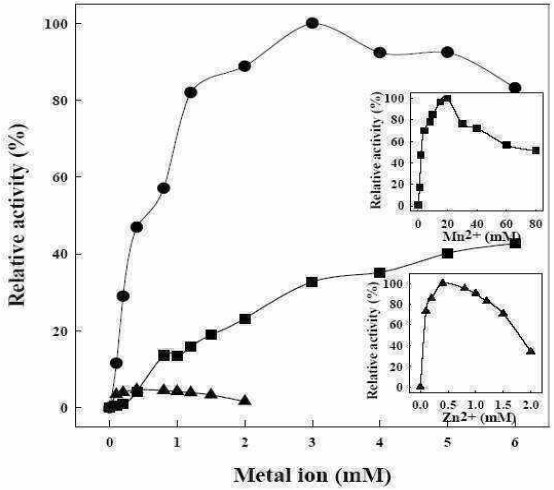



Figure 3-3-24. The effects of metal ions on the APP activities. Activity assays were performed under standard conditions while the concentration of divalent metal ions was varied: $Co^{2+}$ (filled circle), $Mn^{2+}$ (filled square), and $Zn^{2+}$ (filled triangle).

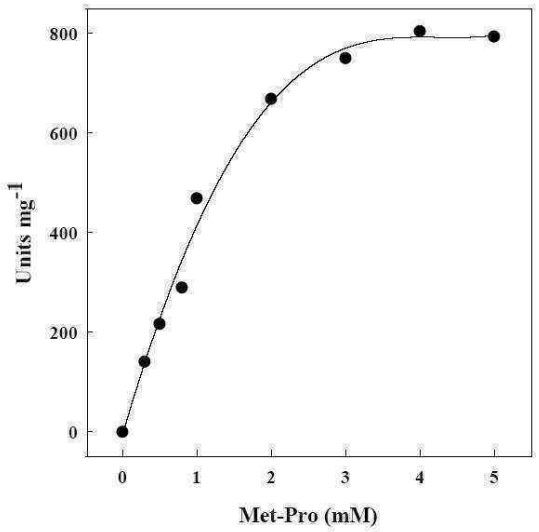



Figure 3-3-25. The effect of increasing substrate concentration on the activity of APP. Activity assays were performed under standard conditions while the concentration of Met-Pro was varied.



(5) 고호열성 carboxypeptidase

(i) TNA1_CP 유전자의 일차적 구조 및 재조합 효소의 발현

*Nde*I 및 *Hind*III에 의해 플랭크(flank)된 *Thermococcus* sp. NA1(TNA1_CP)의 카르복시펩티다아제의 유전자의 전장 길이는 게놈 DNA와 두 개의 프라이머(센스 [5′-CGA CCC GGC ATA TGG AGG AAG TTT TCC AGA ACG AAA CC-3′; 서열번호 3] 및 안티센스 [5′-CTC CAC ATA AGC TTG AGG TAC CTC TCC TTC ACC CAG CG-3′; 서열번호 4]; 상기 센스 프라이머 안에 이탤릭로된 서열이 *Nde*I 사이트이고, 안티센스 프라이머 안에 이탤릭체로 된 서열이 *Hind*III이다)를 이용하여 증폭되었다. 증폭되어진 서열은 *Nde*I 및 *Hind*III로 다이제스트되었고, *Nde*I/*Hind*III 다이제스트된 pET-24a(+)에 연결되었다. 연결물(ligate)는 *E. coli* DH5α에 형질전환되었다. 정확한 구조체를 가진 후보자들이 제한 효소 다이제스천에 의해 선택되었고, 클론의 DNA 서열을 분석하여 카르복시펩티다아제를 가지고 있음이 확인되었다.

상기 지놈 서열분석을 통하여, 1,500 bp으로 구성되어진 오픈 리딩 프레임이 열안정성 카르복시펩티다아제 1에 유사한 단백질을 암호화하고 있는 것을 발견하였다. 이것은 TNA1_CP라 명명되었고, *P. furiosus* DSM 3638 (84% 상동성), *T. aquaticus* YT-1 (35% 상동성) 및 *T. thermophilus* HB27 (35% 상동성)과 비교되었다 (Figure 3-3-27). 암호화된 단백질은 59,198 Da의 예상되어진 분자량 및 pI 5.61을 가지는 499개의 아미노산으로 구성되어 있다. 시그널 펩타이드가 없기 때문에 세포내 단백질인 것으로 보였고, 다른 패밀리 M32와 일관되었다. 비슷한 분석은 다른 고세균의 게놈 서열에서 카르복시펩티다아제와 상동성의 유전자가 존재하는 것을 보였고 이들의 유추된 아미노산 서열은 TNA1_CP(33 내지 93%)에 매우 높은 상동성을 보였다. 특별하게, *Thermococcus kodakaraensis*, *Pyrococcus horikoshii*, 및 *Pyrococcus abyssi*을 포함하는 *Thermococcales*로부터 것과 TNA_CP (83에서 92%)와 매우 비슷하였다. 반대로, 상동성은 TNA1_CP 및 세균 오쏘로고 (29 내지 37% 상동성) 사이에 매우 낮았다. TNA1_CP와 이의 상동체의 서열 어라인먼트는 *P. furiosus* CP로부터 얻어진 데이터에 기초하여 HEXXH 모티프에 부가하여 5개의 모티프을 보였다. 그리고 IRXXAD로부터의 하나의 아미노산 A354가 S354로 교환되어진 것을 제외하고는 잘 보존되었다. TNA_CP의 촉매부위를 형성하는 양성자 셔틀(E270) 및 단백질 리간드(H269, H273, 및 E299)가 잘 보전되어 있었다. TNA1_CP 유전자는 PCR로 증폭되어졌고, 발현된 효소는 용해성 세포 추출액으로부터 정제되어졌다. SDS/PAGE에 의한 분석은 61 kDa 단백질을 보이고(Figure 3-3-27), 이것은 59.2 kDa CP 단백질 및 단백질의 C-말단에 있는 KLAAALEH6-(His6-태그)에 상응하는 1.5kDa 펩타이드로 구성되는 융합 생성물의 예상되어진 사이즈이었고,

정제된 샘플의 주된 성분이었다.

(ii) 카르복시펩티다아제 효소의 생화학적 성질

TNA1_CP의 기능성은 Z-Ala-Arg을 가수분해할 수 있는 능력에 의해서 확인되었고, 상기 기질은 모든 보통의 분석에서 사용되었다. 카르복시펩티다아제 활성은 고온에서 강하게 촉진되었고, 70-80 ℃에서 최적 활성을 보였다. 그러나, 80 ℃을 넘어가게 되면 급격하게 활성이 감소하였다(Figure 3-3-28 참조). TNA1_CP의 pH에 대한 영향은 다른 완충용액을 이용하여 측정되었다. 즉, 소디움 아세테이트 (pH 4.0-5.0), KMES (pH 5.5-6.5), HEPES(N-[2-hydroxyethyl]piperaznie-N′-[2-ethanesulfonic acid) (pH 7-7.50, 트리스-HCl (pH 8-10)을 사용하였다. 최적 pH는 6.5 이었다(Figure 3-3-28B 참조). 진정세균 *T. aquaticus*로부터의 카르복시펩티다아제 *Taq*는 최적 pH가 8인 반면에, *P. furiosus* CP 및 TNA1_CP는 최적 pH가 6.5이라는 것에 주목할 필요가 있다.

Figure 3-3-26에서 보여주듯이, 금속 결합을 위한 단백질 리간드는 HEXXH 모티프 및 HESQ 서열에 보존되어 있었다. 이것은 TNA1_CP는 금속이온에 영향을 받을 것이라는 것을 의미한다. 효소 용액에 $Co^{2+}$의 첨가는 효소 활성을 3.7 배 증가시켰다. 그러나, $Co^{2+}$ 이온의 효과는 다른 2가 이온($Ba^{2+}$, $Ca^{2}$+, $Cu^{2+}$, $Fe^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Mn^{2+}$, $Ni^{2+}$, 및 $Zn^{2+}$)에 의해 대체되지 않았다(Figure 3-3-29). 대조구는 $Co^{2+}$의 첨가전에 잔류 활성을 보였는데, 아마도 $Co^{2+}$와 강한 결합 또는 완충 용액 교환 후에 잔류하는 금속 이온에 의한 것일 것이다. 카르복시펩티다아제 활성도는 EDTA (1mM)의 금속 킬레이트제가 있는 곳에서는 관찰되지 않았다. 카르복시펩티다아제 Taq는 $Co^{2+}$>$Ca^{2+}$>$Mg^{2+}$>$Cu^{2+}$>$Zn^{2+}$의 순서로 금속이온에 의해 활성화 되었고, *T. thermophilus* 카르복시펩티다아제는 이것의 활성을 위하여 $Zn^{2+}$ 또는 $Co^{2+}$ 같은 2가 금속이온이 필요했다. 반면에, *P. furiosus* CP는 $Co^{2+}$에 의해 활성화되었고, $Zn^{2+}$에 의해 활성화되지 않았다. TNA1_CP의 금속 요구는 *P. furiosus* 카르복시펩티다아제의 것과 비슷하였다. *P. furiosus* CP 및 *T. thermophilus* CP는 결정구조에서 $Pb^{2+}$, $Yb^{2+}$, $Mg^{2+}$ 및 $Zn^{2+}$같은 여러종류의 금속 이온과 결합되어 있었고, TNA1_CP를 포함한 이들 카르복시펩티다아제의 생물학적으로 관련된 금속이온이 어떤 것인지에 대한 추가 연구가 필요하다.

$Cu^{2+}$, $Fe^{2+}$, $Ni^{2+}$ 및 $Zn^{2+}$가 50% 이하로 잔류 활성을 감속시키는 결과를 바탕으로(Figure 3-3-29), TNA1_CP는 금속이온으로 처리되었고, $Co^{2+}$ 가 금속이온에 대한 억제효과를 보기위해서 첨가되었다. Figure 3-3-29에서 보이듯이, $Cu^{2+}$, $Fe^{2+}$, $Ni^{2+}$ 및 $Zn^{2+}$의 억제 효과는 $Co^{2+}$의 존재에 의해서 극복되지 않았고, 이것은 억제 금속 이온이 $Co^{2+}$의 자리에 TNA1_CP에 강하게 결합하고, 아마도 구조적 변화를 동반할 것이라는 것을 제시한다. 한편 $Ba^{2+}$ 및 $Mn^{2+}$는 거의 영향이 없었으며, $Ca^{2+}$와 $Mg^{2+}$는 TNA1_CP의 활성에 거의



영향이 없었다. TNA1_CP의 열안정성은 0.2 mM $CoCl_2$를 포함하는 KMES 완충용액(pH 6.5)에서 80 ℃ 및 90 ℃에서 100분까지 효소를 항온반응하여서 평가하였다. TNA1_CP는 80 ℃에서 84분의 반감기(t1/2)로 활성을 잃어버렸고(Figure 3-3-30), 이것은 *P. furiosus* CP(40분)보다 더 안정적이었다. TNA1_CP의 열안정성은 $Co^{2+}$의 존재에 의해서 영향을 받았다. 가열 동안에 반응에서 $Co^{2+}$의 결핍은 TNA1_CP의 반감기를 80 ℃ 및 90 ℃에서 반감기를 각각 7.4분 및 5.0분으로 감소시켰으며, 이것은 $Co^{2+}$가 결합된 TNA1_CP의 구조가 더 안정적이라는 것을 의미한다. $Co^{2+}$가 없이는, 열처리(80 ℃에서 20분까지)에 TNA1_CP 활성화가 관찰되지 않았고, 80 ℃에서 효소가 급격하게 불활성화된다는 것을 의미한다. 쳉(Cheng) 등은 *P. furiosus* CP가 사이클릭-2,3-디포소포글리세레이트, 디-미오-이노시톨-1,1-포스페이트 및 만노실 글레세레이트 같은 염에 의해 생체내에서 안정화된다고 주장하였다. 그러나, 시험관내에서 12.5% 글리세롤의 보충은 양 온도에서 TNA1_CP의 불활성화를 보호하지 못했다. TNA1_CP는 염기성, 지방성, 및 방향성의 C-말단 아미노산에 대하여 선호하는 상대적으로 넓은 특이성을 보였다(Table 3-3-3).

Table 3-3-3. Substrate specificity of TNA_CP and P. furiosus CP toward Z-Ala-X substrate

| 기 질 | 가수분해 비율(%) | |
|---|---|---|
| | TNA1_CP | *P. furiosus* CP [4)] |
| Z-Ala-Arg | 100 | 100 |
| Z-Ala-Leu | 62 | 27 |
| Z-Ala-Met | 49 | 61 |
| Z-Ala-Tyr | 24 | 12 |
| Z-Ala-Ala | 16 | 14 |
| Z-Ala-Val | 12 | 6 |

* 모든 값은 각각의 단백질에 대하여 Z-Ala-Arg(100%)의 가수분해 속도의 상대적인 비

율로 표선되었다.

Z-Ala-Asp, Z-Ala-Pro, Z-Ala-His 및 Z-Ala-Asn에 대하여, 표준 조건에서 어떤 활성도 관찰되지 않았다. *P. furiosus*와 비교하면, 선호도는 비슷한 패턴이었으나, 같지는 않았다. TNA1_CP는 Arg>Leu>Met>Tyr>Ala>Val의 선호도를 가졌으나, *P. furiosus*는 Arg>Met>Leu>Ala>Tyr>Val의 선호도를 가졌다. 우메추(Umetsu) 등에 따르면, 가수분해 속도는 기질의 C-말단의 두 번째 위치의 아미노산에 두드러지게 영향을 받는다. 따라서, Z-Ala-X(X=Asp, Pro, His 및 Asn) 의 Ala 대신에 다른 아미노산 기질은 기질의 분해를 촉진시킬 수 있다. 넓은 기질 특이성을 보이는 많은 카르복시펩티다아제가 보고되었다. C-말단에서의 아미노산의 선호도에 기초하여, *Penicillium janthinellus* CP, 세린 카르복시펩티다아제의 일종 및 *Thermoactinomyces* sp.로부터의 카르복시펩티다아제 T는 염기성 및 소수성 C-말단 아미노산 잔기로 구성되어진 펩타이드 결합를 절단하고, 반면에, 카르복시펩티다아제 A 및 카르복시펩티다아제 C 및 카르복시펩티다아제 B 및 카르복시펩티다아제 D는 각각 소수성 및 염기성 잔기에 대하여 강한 선호도를 보였다. Z-Ala-Arg을 사용하여 동력학적 분석이 행하여졌고, Km(1.4 mM), Vmax(11.4 μmole/분/mg), 및 Kcat (11.6 s-1) 값 같은 동력학적 수치는 측정된 활성도로부터 계산되었다 (Figure 3-3-31). *P. furiosus*의 것(Km= 0.9mM, Vmax = 2300 μmole/분/mg 및 kcat= 600 $s^{-1}$)과 비교하면, TNA1_CP는 Z-Ala-Arg에 대하여 80배 낮은 촉매 효율을 보였다.



```
T. NA1          MEEVFQNETIKQILAKYRRIWAISHARSVLGWDMEVNMPREGIFERSVAQGELSVLSQEF 60
P. furiosus     MEEVFQNETIKQILAKYRRIWAIGHAQSVLGWDLEVNMPKEGILERSVAQGELSVLSHEL 60
T. aquaticus    ---MTPEAAYQNLLEFQRETAYLGSLGALAAWDQRTMIPRKGHGHRARQMAALARLLHER 57
T. thermophilus ---MTPEAAYQNLLEFQRETAYLASLGALAAWDQRTMIPRKGHEHRARQMAALARLLHQR 57
                   :  : : :::*   *.   :.   :: .** .. :*::*  .*:   . *: * ::

T. NA1          LLKPEFVELVEKAKG---IEDLNEYERGVVRVLDRSIRISKSFPPEFLREMSEVTSQATK 117
P. furiosus     LLHPEFVNLVEKAKG---LENLNEYERGIVRVLDRSIRIARAFPPEFIREVSETTSLATK 117
T. aquaticus    ATDPRIGEWLEKVEGSSLVEDPLSDAAVNVRAWRRAYERARAIPERLAVELAQARSEGET 117
T. thermophilus MTDPRIGEWLEKVEGSPLVQDPLSDAAVNVREWRQAYERARAIPERLAVELAQAESEAES 117
                .*.: : :**.:*   :::  .     **   :: . :::* .:  *::: . * . .

T. NA1          AWEEAKRTNDYSKFEPWLDRIIDLAKRAADYLGYE---------DEPYDALLDLFEEGTT 168
P. furiosus     AWEEAKAKDDFSKFEPWLDKIISLAKRAAEYLGYE---------EEPYDALLDLYEEGLR 168
T. aquaticus    AWEALRPRDDWQGFLPYLKRLFALAKEEAEILMAVGPDPLDPPYGELYDALLDGYEPGAR 177
T. thermophilus FWEEARPRDDWRGFLPYLKRVYALTKEKAEVLFALPPAPGDPPYGELYDALLDGYEPGMR 177
                 **  :  :*:  * *:*.::  *:*. *: *            * ****** :* *

T. NA1          TRDVERMFKKLEKELKPLLEKIMDEGKVPQSHPLEKEKYKREQMERVNLWILEKFGFPLG 228
P. furiosus     TRDVEKMFEVLEKKLKPLLDKILEEGKVPREHPLEKEKYEREWMERVNLWILQKFGFPLG 228
T. aquaticus    ARDLEPLFRELSSGLKGLLDRILGSGRRPDVGVLHR-HYPKEAQRAFALELLQACGYDLE 236
T. thermophilus ARELLPLFAELKEGLKGLLDRILGSGKRPDTSILHR-PYPVEAQRRFALELLSACGYDLE 236
                :*::  :*  *.. ** **::*: .*: *    *.:  *  *  . . * :*.  *: *

T. NA1          VRSRLDVSAHPFTTEFGIRDVRITTRYEGYDFRRTILSTVHEFGHALYELQQDERFMFSP 288
P. furiosus     TRARLDVSAHPFTTEFGIRDVRITTRYEGYDFRRTILSTVHEFGHALYELQQDERFMFTP 288
T. aquaticus    AG-RLDPTAHPFEIAIGPGDVRITTRYYEDFFNAGIFGTLHEMGHALYEQGLPEAHWGTP 295
T. thermophilus AG-RLDPTAHPFEIAIGPGDVRITTRYYEDFFNAGIFGTLHEMGHALYEQGLPKEHWGTP 295
                .  *** :****   :*  ********    *.  *:.*:**:******    : .  :*

T. NA1          IAGGVSLGIHESQSRFWENVIGRSREFAELIHPVLKENLPFMANYTPEDVYLYFNMVRPD 348
P. furiosus     IAGGVSLGIHESQSRFWENIIGRSKEFVELIYPVLKENLPFMSNYTPEDVYLYFNIVRPD 348
T. aquaticus    RGEAASLGVHESQSRTWENLVGRSLGFWERFFPRAKEVFSSLADVRLEDFHFAVNAVEPS 355
T. thermophilus RGDAVSLGVHESQSRTWENLVGRSLGFWERFFPRAREVFASLGDVSLEDFHFAVNAVEPS 355
                 . ..***;****** ***::***  * * :.*  :* :. :.:   **.:: .* *.*.

T. NA1          FIRTESDVVTYNFHILLRFKLERMMLNEGVKAKDLPELWNEEMERLLGIRPKTYAEGILQ 408
P. furiosus     FIRTEADVVTYNFHILLRFKLERLMVSEEIKAKDLPEMWNDEMERLLGIRPRKYSEGILQ 408
T. aquaticus    LIRVEADEVTYNLHILVRLELELALFRGELFLEDLPEAWREKYRAYLGVAPRDYKDGVMQ 415
T. thermophilus LIRVEADEVTYNLHILVRLELELALFRGELSPEDLPEAWAEKYRDHLGVAPKDYKDGVMQ 415
                :**.*:* ****:***:*::**  :.   :  :**** * :: .  **: *: * :*::*

T. NA1          DIHWAHGTVGYFPTYSIGTLLSAQIYYHMKRDIPDFEEKVARAEFEPIKAWLREKIHRWG 468
P. furiosus     DIHWAHGSIGYFPTYTIGTLLSAQLYYHIKKDIPDFEEKVAKAEFDPIKAWLREKIHRWG 468
T. aquaticus    DVHWSGGMFGYFPTYTLGNLYAAQFFAKAQEELGPLEPLFARGEFTPFLDWTRRKIHAEG 475
T. thermophilus DVHWAGGLFGYFPTYTLGNLYAAQFFQKAEAELGPLEPRFARGEFQPFLDWTRARIHAEG 475
                *:**: * .******:;*.* :**:; : ; ;;  :*  .*:.** *:  * * :**  *

T. NA1          SIYPPKDLLKKAIGEELNPEYFVRWVKERYL----- 499
P. furiosus     SIYPPKELLKKAIGEDMDAEYFVRWVKEKYL----- 499
T. aquaticus    SRFRPRALVERVTGSPPGAQAFLRYLEAKYGALYGF 511
T. thermophilus SRFRPRVLVERVTGEAPSARPFLAYLEKKYAALYG- 510
                * : *: *:::. *.  ... *: ::: :*
```

Figure 3-3-26. Sequence comparison of the peptidase family M32. Dashes indicate gaps and numbers on the right represent the position of the last residue in the original sequence. Identical residues among the four enzymes are marked as * and residues with conserved substitutions and semi-conserved substitutions are marked as : and ., respectively. Conserved motifs appear at 238-240 (HPF), DXRXT (248-252), HESQ (298-301), HEXXH (269-273), IRXXAD (350-355) AND GXXQDXHW (405-412). Accession numbers with percent identity to carboxypeptidase from *Thermococcus* sp. NA1 (*T.* NA1) are as follows: *P. furiosus* DSM 3638 (NP_578185), 84%, *T. aquaticus* YT-1 (P42663), 35% and *T. thermophilus* HB27 (YP_005684), 35%

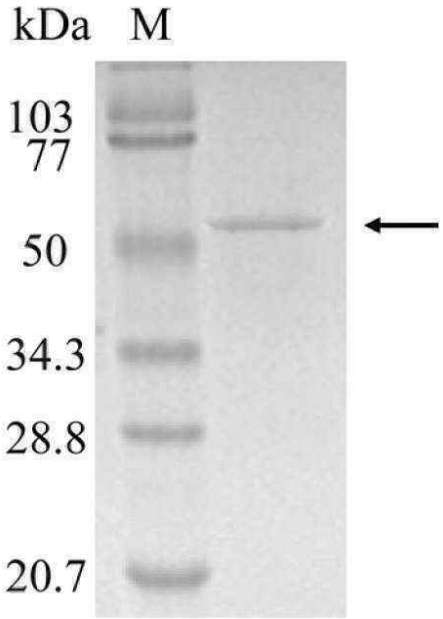



Figure 3-3-27. SDS-PAGE (12%) of the purified enzyme. The molecular mass standards (lane M) were phosphorylase *b*(103 kDa), bovine serum albumin (77 kDa), ovalbumin (50 kDa), carbonic anhydrase (34.3 kDa), soybean trypsin inhibitor (28.8 kDa), and lysozyme (20.7 kDa). The band corresponding to the enzyme is indicated by the arrow.



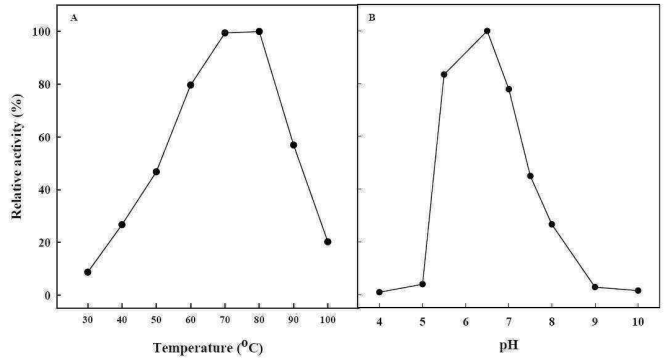



Figure 3-3-28. The effects of temperature (A) and pH (B) on the activities of TNA1_CP. A: Activity assays were performed under standard conditions as the sample temperature was increased from 30 to 100 ℃. B: Activity assays were performed under standard conditions with the following buffers (each at 50 mM): sodium acetate, pH 4.0-5.0; KMES, pH 5.5-6.5; HEPES, pH 7.0-7.5 Tris-HCl, pH 8.0-10.0.

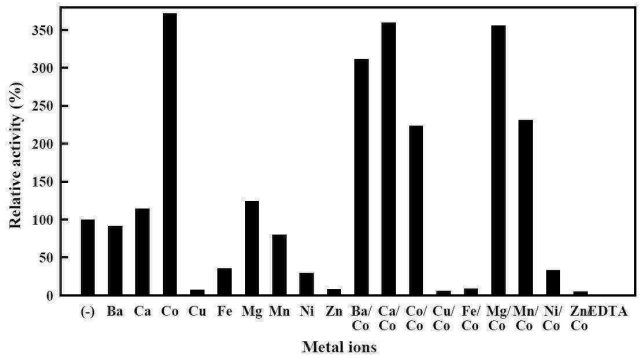



Figure 3-3-29. The effects of metal ions on the activities of TNA1_CP. Activity assays were performed under standard conditions while various divalent metal ions (0.2 mM) and EDTA (1 mM) alone or in combination with $Co^{2+}$ (0.2 mM) were added to the diafiltered enzyme solution. (-) means control without any metal ion.



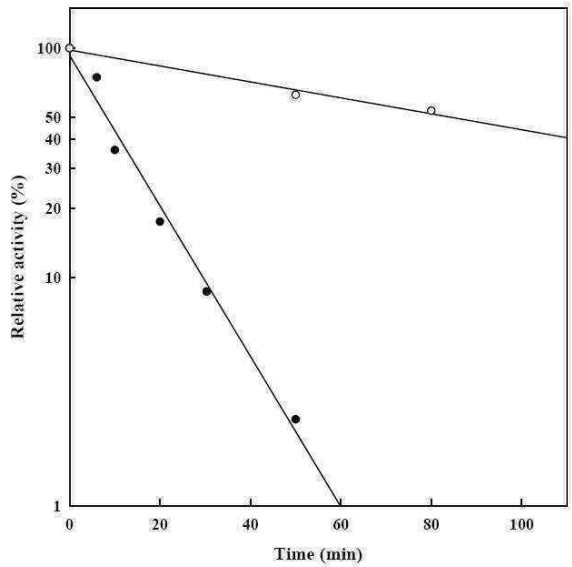



Figure 3-3-30. Effect of temperature on TNA1_CP stability. TNA1_CP (0.8 g/ml) was incubated at 80 ℃ and 90 ℃ in 50 mM KMES buffer, pH 6.5, containing 0.2 mM $CoCl_2$. At the time shown, aliquots were taken out, and the activities were measured in the same buffer at 80 ℃ using Z-Ala-Arg as substrate.

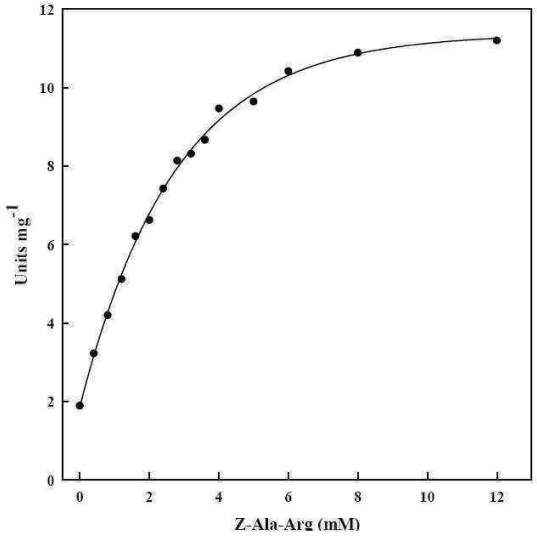



Figure 3-3-31. The effect of increasing substrate concentration on the activity of TNA1_CP. Activity assays were performed under standard conditions while the concentration of Z-Ala-Arg was varied.



(6) 고호열성 메티오닐아미노펩티다아제 효소

(i) 메티오닐 아미노펩티다아제(MetAP) 유전자의 일차 구조 및 효소의 발현

*Nde*I 및 *Sal*I에 의해 플랭크(flank)된 *Thermococcus* sp. NA1 (TNA1_MetAP)의 메티오닐 아미노펩티다아제의 유전자의 전장 길이는 게놈 DNA와 두 개의 프라이머(센스 [[5′-CGA CCC GGC ATA TGG ATG AAA GGG AGG CCC TCA TAA AAG-3′; 서열번호 3] 및 안티센스 [5′-CTC CAC ATG TCG ACG GTG GTT ATG TAA GCC CCC TCC TTC-3′; 서열번호 4]; 상기 센스 프라이머 안에 이탤릭로된 서열이 *Nde*I 사이트이고, 안티센스 프라이머 안에 이탤릭체로 된 서열이*Sal*I이다)를 이용하여 증폭되었다. 증폭되어진 서열은 *Nde*I 및 *Sal*I로 다이제스트되었고, *Nde*I/*Hind*III 다이제스트된 pET-24a(+)에 연결되었다. 연결물(ligate)는 *E. coli* DH5α에 형질전환되었다. 정확한 구조체를 가진 후보자들이 제한 효소 다이제스천에 의해 선택되었고, 클론의 DNA 서열을 분석하여 메티오닐 아미노펩티다아제를 가지고 있음이 확인되었다. 최근에 본 연구에서는 고호열성 범위 (70-90℃)에서 생장하는 고호열성 고세균 *Thermococcus* sp. NA1를 분리하였고, *Thermococcus* sp. NA1의 게놈 서열을 분석함으로써 발린을 N-말단에 갖으며,예측되는 분자량이 32,981 Da인 295 아미노산으로 구성되는 단백질을 암호화하는 888 bp로 구성되는 오픈 리딩 프레임을 발견하였다. 이것을 TNA1_MetAP라고 지정하였으며, *T. kodakarensis* KOD1 (85% 동일성) (Fukui et al., 2005), *P. abyssi* GE5 (72% 동일성) (Cohen et al., 2003), *P. horikoshii* OT3 (71% 동일성) (Kawarabayasi et al., 1998), 및 *P. furiosus* DSM 3638 (71% 동일성) (Robb et al., 2001) 으로 부터의 추정적 MetAP 유전자와 높은 유사성을 나타낸다(Figure 3-3-32). 추정된 아미노산 서열의 분석은, *E. coli* (Roderick and Mattews, 1993) 및 *P. furiosus* (Tahirov et al., 1998)의 MetAP 결정구조로부터 금속이온 조절에 관련된 활성 부위 잔기로서 원래 확인되어진, 두 개의 아스파틱산 (Asp83, Asp94), 한 개의 히스티딘 (His154) 및 두 개의 글루탐산 (Glu188, Glu281)이 완벽하게 TNA1_MetAP 에서 보존되어 있다는 것을 보인다. 두 개의 양전하를 띤 잔기들, His63 및 His162 도 또한 보존되어 있었으며, 촉매작용에서 이들의 역할은 *E. coli* 아미노펩티다제 P 로부터 얻은 자료에 기초할 때 핵의 중심으로부터 용매로 양성자를 교환하는 것으로 보인다(Wilce et al., 1998). 본 연구의 단백질은 다음의 두 범주에서 *P. furiosus* MetAP에 유사한 IIa 유형 MetAP 도메인 구조인 것으로 나타났다 - i) C-말단 도메인내에 삽입된 추가의 62 아미노산 나선형 서브도메인 및 ii) 고세균 MetAP가 진화적으로 진핵생물과 세균의 경계에 위치한다는 것을 제시하는, N-말단 확장부의 부재. 본 연구의 TNA1_MetAP 유전자는 PCR에 의하여 증폭되었고, 발현된 효소를 상기 방법 및 재료에 기재된 것처럼 용해 가능한 세포 추출물로부터 정제하였다. SDS/PAGE에 의한

분석은 33-kDa MetAP 단백질 및 단백질의 C-말단에서 VDKLAAALEH6-(His-태그)에 상응하는 1.7-kDa 펩타이드로 구성되는 융합물의 기대된 크기인 34-kDa의 단백질이 정제된 시료의 주요 구성성분이라는 것을 보여준다(Figure 3-3-33).

(ii) 메티오닐 아미노펩티다제 효소의 생화학적 특성규명

본 연구의 정제된 재조합 단백질은 Met-pNA 의 가수분해에 의하여 MetAP 활성을 보여주었고 이 기질은 모든 반복되는 분석에서 사용되었다. Met-pNA에 대한 MetAP 활성은 높은 온도에서 강하게 촉진되었고, 최적 온도는 80-90 ℃를 나타내으며, 30℃-50 ℃에서는 최대활성의 12% 이하였다(Figure 3-3-34). MetAP 활성에 대한 pH영향을 pH범위 4-10의 다양한 완충용액을 사용하여 측정하였고 최적활성을 pH 7.0에서 관찰하였다(Figure 3-3-34). TNA1_MetAP의 열에 대한 안정성은 본 효소를 0.2 mM $CoCl_2$를 함유한 50 mM 소디움 포스페이트 완충용액 (pH 7.0)내에서 80 ℃ 및 90 ℃로 항온반응함으로써 측정하였다. 놀랍게도, TNA1_MetAP는 80 ℃ 및 90 ℃에서 5분내에 효소활성을 완전히 상실하였다(Figure 3-3-35). 고호열성 고세균으로부터의 대부분의 효소들이 일반적으로 높은 열안정성을 보여주고 있기 때문에 이러한 결과는 매우 특이한 것이다. 이와는 대조적으로, *P. furiosus* MetAP는 높은 열안정성을 보여준다(90 ℃, pH 7.5에서 4.5시간의 반감기) (Tsunasawa et al., 1997). Figure 3-3-32에 보인바와 같이, TNA1_MetAP 의 추정된 아미노산 서열과 *P. furiosus* MetAP 와의 비교는 TNA1_MetAP가 단하나의 시스테인 잔기(Cys53)를 가지는 반면, *P. furiosus* MetAP에서는 시스테인 잔기가 전혀 없었다는 것을 보인다. 높은 온도에서(Larrabee et al., 1999) 또는 정제과정에서(Chang et al., 1990) MetAP의 불안정성은 시스테인 잔기의 산화에 기인하는 것으로 보고되고 있다. TNA1_MetAP의 시스테인 잔기가 열안정성에서 핵심 조절자인지 아닌지 실험하기 위하여, 본 단백질을, 온화한 산화제로서 시스테인 티올을 설폐닉산으로 바꾸는 p-하이드록시머큐리벤조에이트를 처리하였다. 밀리몰 범위의 p-하이드록시머큐리벤조에이트가 0.2 μM의 TNA1_MetAP를 완전히 저해하였는데, 이것은 TNA1_MetAP 및 *P. furiosus* MetAP 간에 측정된 열안정성의 차이가 산화에 민감한 시스테인 잔기에 기초한 것이라는 것을 암시한다. 금속 결합을 위한 보존된 아미노산 잔기는 TNA1_MetAP가 금속이온의 첨가에 의하여 영향을 받을 수 있다는 것을 암시한다. TNA1_MetAP의 금속이온 요구도를 실험하기 위하여 내부적인 금속이온을 금속이 없는 Tris-HCl 완충용액에 대한 투석에 의하여 제거하였다. 금속이 없는 MetAP를 0.2 mM $MnCl_2$, $NiCl_2$, $CoCl_2$ 및 $FeSO_4$ 와 함께 항온반응한 후에 MetAP 의 효소 활성이 각각 28, 5, 4 및 3배 증가하였다. $BaCl_2$, $CaCl_2$, $CuCl_2$, $MgCl_2$,및 $ZnCl_2$ 과 함께 항온반응한 경우에는 활성이 거의 또는 전혀 촉진되지 않았다. MetAP 의 활성에 대한 $Mn^{2+}$, $Ni^{2+}$, $Co^{2+}$ 및 $Fe^{2+}$농도의 효과는 Figure 3-3-36에 나타나 있다. TNA1_MetAP 는 $CoCl_2$ 및 $FeSO_4$에 대한 값이 $MnCl_2$의 것보다 10%미만이기는 하였으나, 0.2-0.3 mM $MnCl_2$ 및 $CoCl_2$, 그리고 0.5-0.8 mM $NiCl_2$ 및 $FeSO_4$의 농도에서 최대활성을 나타내었다. $Co^{2+}$ (Meng et al., 2002; Tsunasawa et al., 1997), $Mn^{2+}$ (D'souza et al., 2002) 및 $Fe^{2+}$ (Copik et al., 2005; Meng et al., 2002)의 첨가에 따라서 *P. furiosus* MetAP 가 활성화되는 것이 알려져 있다. 반응속도분석은 Met - pNA 을 사용하여 수행되었고, Km (0.68 mM), Vmax (4.8 μmol $min^{-1}$ $mg^{-1}$) 및 kcat (168 $s^{-1}$) 같은 반응속도 상수는 측정된 활성으로부터 계산하였다(Figure 3-3-37).

TNA1_MetAP는 *E. coli*에서 유전자의 과량발현 및 클론닝에 의하여 확인되어진 *P. furiosus* DSM 3638로부터 MetAP에 84%의 유사도 및 71%의 동일성을 보였다(Tsunasawa et al.,1997). *Thermococcus* 속에서 기능성이 있다는 것의 발견은 이들 효소활성이 *Thermococaceae*의 패밀리 및 그 이상에서 일반적으로 존재할 것이라는 것을 가르키고, *P. furiosus* 및 TNA1_MetAP 사이의 C-말단의 삽입 및 N-말단 확장부의 부존재의 보존은 고호열성 고세균 MetAP가 진화적으로 진핵생물-세균 경계에 있다는 것을 제시한다. 아미노산 서열에서 높은 상동성(84%), 중요한 도메인 구조의 보존, 비슷한 최적 온도 및 pH에도 불구하고, *P. furiosus* MetAP가 열에 안정한 반면에, TNA_MetAP가 열에 불안정하다는 점은 흥미롭다. TNA1_MetAP의 열 안정성은 상승된 온도에서 빠르게 활성을 잃어버리는 *E. coli* MetAP와 비교할 만하다. *S. cerevisiae*에서 분리되어진 MetAP 유형 I은 분리과정 동안 및 머큐릭 콜로라이드 및 설프하이드릴-변형제인 p-하이드록시머큐리벤조산의 처리에 의해서 불활성화되어질 수 있고, 이것은 촉매 잔기 또는 활성부위 금속 이온 결합하기 위한 배위 결합 자리에 있는 설프하이드릴기가 MetAP의 안정성에 중요한 역할을 한다는 것을 제시한다. 라라비(Larrabee) 등은 시스테인 잔기를 DTNB(5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산)) 및 TCEP-HCl (트리스(2-카르복시에틸)-포스핀 하이드로클로라이드)으로 처리한 실험에 의해서 7개의 시스테인 잔기 중에 하나 이상의 산화가(아마도 Cys59 및 Cys70) *E. coli* MetAP를 불활성화시킨다고 제안했다. *E. coli* MetAP의 결정학적 연구에서 소수성 기질 결합 포켓이 Cys59, Cys70, Tyr62, Tyr65, Phe177 및 Trp221에 의하여 만들어진다는 것을 보였다(Lowther et al., 1999). 아미노산 서열을 비교해보면, 효모 MetAP의 Cys193은 *E. coli* MetAP안의 Cys70과 배열되었다(Tahirov et al. 1998: Tsunasawa et al., 1997). TNA1_MetAP의 경우에, 전체 분자에서 단 하나의 시스테인 잔기(Cys53)가 있었고, TNA1_MetAP가 p-하이드록시머큐리벤조산에 의해 불활성화 된다는 결과는 시스테인 잔기가 TNA1_MetAP의 안정성 조절에 관여한다는 것을 제시한다. 더욱더, P. furiosus MetAP는 매우 열안정적이고(Tsunasawa et al., 1997), 전체 분자에 시스테인 잔기를 가지고 있지 않다는 것을 주목할 필요가 있다. 돼지의 간에서 분리된 포유류 MetAP는 4 ℃에서 몇 개월동안 전

체 활성이 유지되었다고 보고되고, 이것 또한 시스테인 잔기를 가지고 있지 않았다 (Kendall and Bradshaw 1992). 그러나, TNA1_MetAP안에 있는 Cys53은 하나의 아미노산 차이에 의해서 아미노산 서열 어라인먼트에서 *E. coli*의 Cys70과 정확하게 맞지는 않았다(Tahirov et al., 1998; Tsunasawa et al., 1997). 지금까지 조사되어진 모든 형태의 MetAP는 메탈로단백질인 것으로 보이고, $Mn^{2+}$, $Co^{2+}$, $Fe^{2+}$ 및 $Zn^{2+}$ 같은 금속이온에 의해 활성화 되거나, 감수성이었다. 활성도는 *E. coli* MetAP에 대하여 $Co^{2+}$, $Mn^{2+}$, 및 $Zn^{2+}$(BenBassat et al., 1987; Larrabee et al., 1999; Lowther et al., 1999); 효모의 MetAP 유형 1b에 대하여 $Co^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Mn^{2+}$ 및 $Ni^{2+}$(Walker 및 Bradshaw, 1998); 효모의 MetAP 유형 IIb에 대하여 $Co^{2+}$(chang et al., 1992); *P. furiosus* MetAP에 대하여 Co2+, $Mn^{2+}$ 및 $Fe^{2+}$(D′souza et al.,2002); 인간의 MetAP 유형 IIb에 대하여 $CO^{2+}$ 및 $Mn^{2+}$(Li 및 Chang, 1996)를 포함하여 다른 2가 이온의 존재에서 관찰되었다. 본 결과에 의하면 TNA1_MetAP는 $Mn^{2+}$, $Ni^{2+}$, $Fe^{2+}$ 및 $Co^{2+}$에 의존한다. 기질로 Met-pNA을 사용한 동력학적 분석에 의하여 동력학적 인자는 상기 기질이 TNA1_MetAP의 좋은 기질이었고, *E. coli* MetAP는 트라이펩타이드(tripeptide) 또는 보다 큰 기질에 대하여만 활성이 있었다. Met-pNA에 대한 TNA1_MetAP은 인간의 MetAP(Km=0.67 mM)의 것과 비슷한 미켈리스(Michaelis) 상수를 보였으나, 인간의 MetAP($K_{cat}$ = 9.5 $min^{-1}$)의 것보다 상당히 높은 전환속도(turn over rate)을 보였다(Yang et al., 2001). 문헌에서, 비록 테트라펩타이드에 대한 이들의 MetAP의 Km 값은 8.5, 3.16 및 0.34 mM (Copik et al., 2003; Meng et al. 2002; Yang et al., 2001)이었지만, *P. furiosus* MetAP가 테트라펩타이드 기질, Met-Gly-Met-Met에 대하여 *E. coli* ($K_{cat}$=2340 $min^{-1}$) 및 사람(Kcat=170 $min^{-1}$)의 것보다 높은 전환속도($K_{cat}$, 27,600 min-1)를 보였다. 때문에, 고호열성 고세균으로부터의 TNA1_MetAP 및 *P. furiosus* MetAP 가 인간의 MetAP 보다 높은 촉매적 전환속도를 보이고 있다. 구조적 정보 및 아미노산 서열의 어라인먼트는 인간의 MetAP 유형 IIb (Liu et al., 1998) 및 *P. furiosus* MetAP (Tahirov et al., 1998)는 ′피타브레드(pitabread)′ 접힘을 가지고 있다. 이것은 시트의 오목한 면의 대략적인 중심에 위치한 활성부위를 가진 중심의 β-병풍 구조를 가지고 있다. 인간의 MetAP 유형 IIb와 고세균 MetAP 사이의 구조상의 전체적인 유사성에도 불구하고, 인간의 MetAP 유형 IIb의 β4 및 β5 (잔기 312에서 319)안에 작은 삽입물 및 소수성 S1 사이트를 형성하는 잔기 같은 약간의 차이가 발견된다. 반면에, *P. furiosus* MetAP의 S1 사이트를 형성하는 7 잔기중에 4개 (Pro51, Leu60, Met207, 및 Tyr265)는 인간의 MetAP유형 IIb (Pro220, Ile338, Met384 및 Tyr444)에 동일하거나 보전되어져 있고, 인간의 MetAP의 Gly222 잔기는, *P. furiosus* MetAP안에 있는 Phe50과 정렬되는 Phe219 대신에 기질의 인식에 관여할 것으로 보인다.



```
TNA1      VDEREALIKAGEIARQVKKEVISLIKPGTKLYDIAEFVERRIIELGGKPAFFCNLSINEI 60
TkKOD1    MDEREALIKAGEIARQVKKEVVDLIKPGAKLYDIAEFVERRIVELGGKPAFFCNLSINEI 60
PaGE5     -MDVDKLIEAGKIAKKVREEAVKLAKPGVSLLELAEKIEGRIIELGAKPAFFVNLSLNEI 59
PhOT3     -MDVDKLIEAGKIAKKVREEAVKLAKPGVSLLELAEKIESRIVELGGKPAFFANLSLNEV 59
PfDSM     -MDTEKLMKAGEIAKKVREKAIKLARPGMLLLELAESIEKMIMELGGKPAFFVNLSINEI 59
            : : *::**:**::*:::.:.* :**  * ::** :*  *:***.***** ***:**:

TNA1      AAHYTPYKGDETVLKEGDYLKVDIGVHVDGYIADTALTFRVGMEEDDLVTAAREALENAI 120
TkKOD1    AAHYTPYKGDGTVLKEGDYLKLDIGVHVDGYIADTAVTFRVGMEEDELMEAAREALENAI 120
PaGE5     AAHYTPYKGDETTLKEGDYLKIDIGVHIDGYIADTAVTVRVGMEEDDLMEAAREALESAI 119
PhOT3     AAHYTPYKGDQTVLKEGDYLKIDLGVHIDGYIADTAVTVRVGMDFDELMEAAKEALESAI 119
PfDSM     AAHYTPYKGDTTVLKEGDYLKIDVGVHIDGFIADTAVTVRVGMEEDELMEAAKEALNAAI 119
          ********** *.********:*:***:**:*****:*.****: *:*: **:***: **

TNA1      KVIRAGIKINEIGKAIEETIRGYGFNPIVNLSGHKIERYKLHAGISIPNIYRPADSYVLK 180
TkKOD1    ATVRAGVMIRDVARAIEETIRGKGFNPIVNLSGHKVERYKLHAGVSVPNVYREADTYVLQ 180
PaGE5     SVARAGVEIKELGRAIEDEIRKRGFNPIVNLSGHKIERYKLHAGISIPNIYRPHDNYKLR 179
PhOT3     SVARAGVEVKELGKAIENEIRKRGFNPIVNLSGHKIERYKLHAGVSIPNIYRPHDNYVLQ 179
PfDSM     SVARAGVEIKELGKAIENEIRKRGFKPIVNLSGHKIERYKLHAGISIPNIYRPHDNYVLK 179
           . ***: :.::.:***: **  **:*********:********:*:**:**  *.* *:

TNA1      EGDVIAIEPFATTGAGQVIEVPPALIFMYLRDRPVRMAQARRVLMHIKREYNGLPFAYRW 240
TkKOD1    EGDVFAIEPFATTGAGQVIEVPPALIFMYLRDRPVRMLQARRLLMHIKKNYKTLPFAYRW 240
PaGE5     EGDVFAIEPFATTGAGQVIEVPPTLIYMYVRDAPVRMVQARFLLAKIKREYKTLPFAYRW 239
PhOT3     EGDVFAIEPFATTGAGQVIEVPPTLIYMYVRDAPVRMAQARFLLAKIKREYKTLPFAYRW 239
PfDSM     EGDVFAIEPFATIGAGQVIEVPPTLIYMYVRDVPVRVAQARFLLAKIKREYGTLPFAYRW 239
          ****:******* **********:**:**:** ***: *** :* :**::*  *******

TNA1      LQGFMPEGQLKLALAQLDRVGAIYSYPILREVRGGLVAQFEHTVIVEKEGAYITT- 295
TkKOD1    LQDFLPEGQLKLALAQLEKAGAIYAYPILREVRGGMVAQFEHTVIVEKEGAYITT- 295
PaGE5     LQGEMPEGQLKLALRTLEKSGALYGYPVLREIRNGLVTQFEHTIIVEKDSVIVTTE 295
PhOT3     LQGEMPEGQLKLALRSLERSGALYGYPVLREIRGGMVTQFEHTIIVEKDSVTVTTE 295
PfDSM     LQNDMPEGQLKLALKTLEKAGAIYGYPVLKEIRNGIVAQFEHTIIVEKDSVIVTTE 295
          **. :*********  *:: **:*.**:*:*:*.*:*:*****:****:.. :**
```

Figure 3-3-32. Sequence comparison of the TNA1_MetAP, *Thermococcus kodakarensis* KOD1 (TkKOD1, GenBank accession no. YP_183596), *Pyrococcus abyssi* GE5 (PaGE5, GenBank accession no. NP_127098), *Pyrococcus horikoshii* OT3 (PhOT3, GenBank accession no. NP_142587), and *P. furiosus* DSM3638 (PfDSM, GenBank accession no. NP_578270). Dashes indicate gaps and numbers on the right represent the position of the last residue in the original sequence. Identical residues among the four enzymes are marked with * and residues with conserved substitutions and semi-conserved substitutions are marked with : and ., respectively.The putative active site residues participating in metal ion co-ordination and proton shuffling are in bold and underscored, respectively and the residues comprising the substrate recognition pocket are in italic.

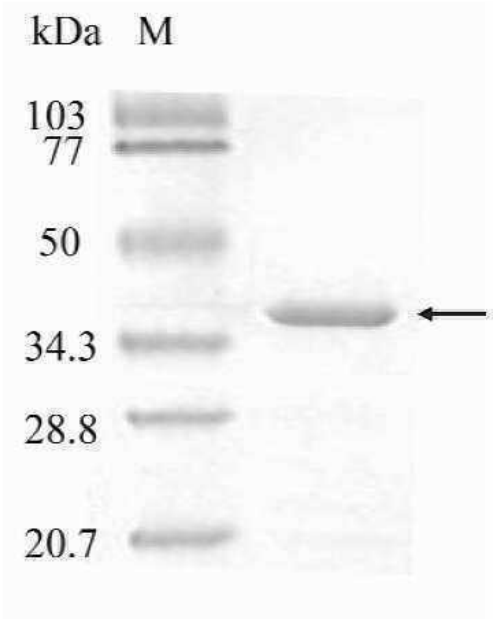



Figure 3-3-33. SDS-PAGE (12%) of the purified TNA1_MetAP. The molecular mass standards (lane M) were phosphorylase *b* (103 kDa), bovine serum albumin (77 kDa), ovalbumin (50 kDa), carbonic anhydrase (34.3 kDa), soybean trypsin inhibitor (28.8 kDa), and lysozyme (20.7 kDa). The band corresponding to the enzyme is indicated by the arrow.



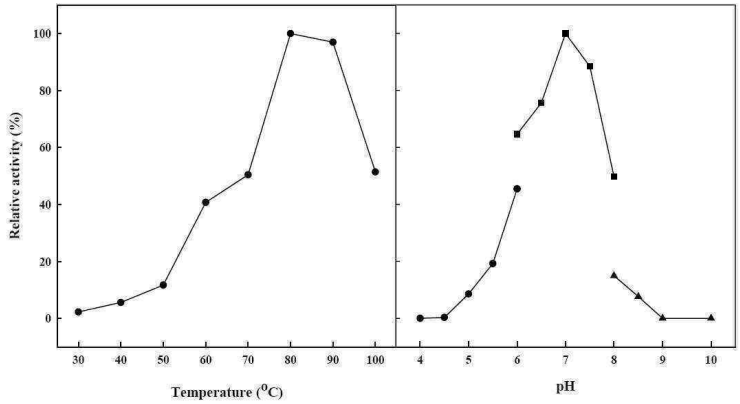



Figure 3-3-34. The effects of temperature (A) and pH (B) on the activities of TNA1_MetAP. A: Activity assays were performed under standard conditions as the sample temperature was increased from 30 to 100 °C. B: Activity assays were performed under standard conditions for the hydrolysis of Met-*p*NA with the following buffers (each at 50 mM): sodium acetate, pH 4.0 - 6.0; sodium phosphate, pH 6.0 - 8.0; Tris-HCl, pH 8.0 10.0.

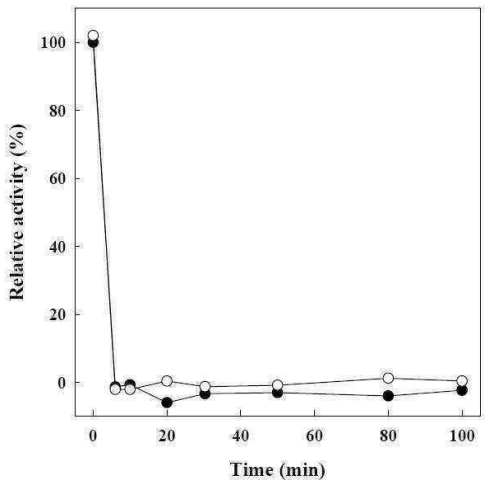



Figure 3-3-35. Thermal inactivation of TNA1_MetAP. TNA1_MetAP(4 nM) was incubated at 80 or 90 ℃ in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 containing 0.2 mM $MnCl_2$. At the time shown, aliquots were taken out, and the activities were measured in the same buffer at 80 ℃ using Met-*p*NA as substrate.



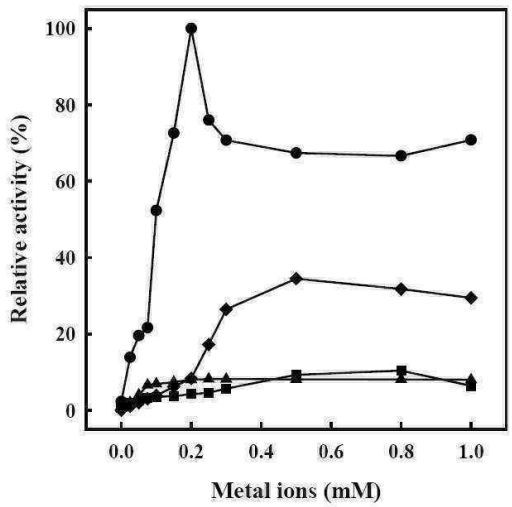



Figure 3-3-36. The effects of metal ions on the activities of TNA1_MetAP. Activity assays were performed under standard conditions while the concentration of divalent metal ion was varied: $Co^{2+}$, $Mn^{2+}$, $Ni^{2+}$ and $Fe^{2+}$.

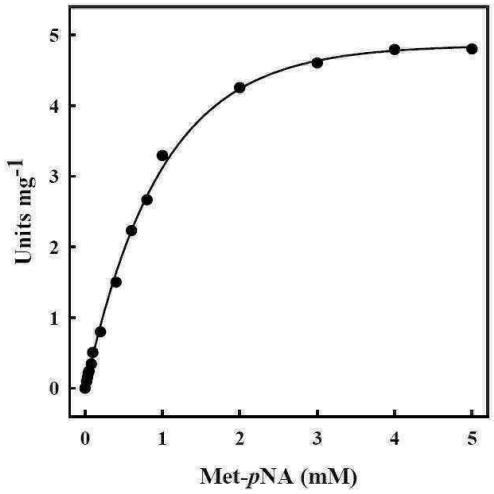



Figure 3-3-37. The effect of increasing substrate concentration on the activity of TNA1_MetAP. Activity assays were performed under standard conditions while the concentration of Met-*p*NA was varied.



(7) 고호열성 아밀라아제

(i) TNA1_amyl 유전자의 일차적 구조 및 재조합 효소의 발현

*Nde*I 및 *Xho*I에 의해 플랭크(flank)된 *Thermococcus* sp. NA1(TNA1_amyl)의 α-아밀라아제의 유전자의 전장 길이는 게놈 DNA와 두 개의 프라이머(센스 [5′-CG ACC CGG CAT ATG GCC AGA AAA GCA GCC GTT GCA GTT TTG -3′] 및 안티센스 [5′-CT CCA CAT CTC GAG GCC AAC ACC ACA GTA GCT CCA GAC-3′]; 상기 센스 프라이머 안에 밑줄친 서열이 *Nde*I 사이트이고, 안티센스 프라이머 안에 밑줄친 서열이 *Xho*I이다)을 이용하여 증폭되었고, 성숙한 형태의 α-아밀라아제는 α-아밀라아제의 유전자의 전장 길이는 게놈 DNA와 두 개의 프라이머(센스 [5′-CG ACC CGG CAT ATG GCG GAA ACA CTG GAA AAC GGC GGA GTC -3′] 및 안티센스 [5′-CT CCA CAT CTC GAG GCC AAC ACC ACA GTA GCT CCA GAC′]; 상기 센스 프라이머 안에 밑줄친 서열이 *Nde*I 사이트이고, 안티센스 프라이머 안에 밑줄친 서열이 *Xho*I이다)를 이용하여 증폭되었다. 증폭되어진 서열은 *Nde*I 및 *Xho*I로 다이제스트되었고, *Nde*I/*Xho*I 다이제스트된 pET-24a(+)에 연결되었다. 연결물(ligate)는 *E. coli* DH5α에 형질전환되었고, 결과적으로 나온 플라스미드는 pET-amylf(전장길이) 및 pET-amylm(성숙된 형태)이고, 서열분석 및 발현을 위해 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 및 *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS로 각각 형질전환되었다. *Thermococcus* sp. NA1의 게놈 염기서열 분석에서, 본 발명의 발명자들은 458 아미노산(서열번호 4)으로 구성되며 예측분자량이 51,948 Da인 단백질을 암호화하는1,377 bp로 구성된 단백질을 암호화하는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 발견하였다. 염기서열 비교분석은 *T. hydrothermalis* (85% 동일성; Leveque et al., 2000a) 및 *T. kodakarensis* KOD1 (82% 상동성; Tachibana et al., 1996), 및 *P. furiosus* 또는 *P. woesei* (82% 상동성; Dong et al., 1997)로부터의 아밀라아제와 높은 유사성을 보였다. α-아밀라아제를 암호화하는 지역의 유추되어진 아미노산 서열은 25 아미노산의 추정적인 시그널 펩타이드 및 433 아미노산(예상된 분자량이 50,531 Da)의 성숙된 효소를 포함하였다(Figure 3-3-38). 서열분석은 글리코실 하이드롤라아제 집단 13 (Nakajima et al., 1986)의 4개의 활성 사이트 합치 지역이 TNA1_amyl안에 보였다. 아미노산 조성에 관한 데이터는 Asp 및 Gln의 양이 TNA_amyl(47개의 *Bacillus licheniformis* α-아밀라아제에 비하여 31개)에서 낮았고, 이것이 고온에서 단백질의 안정성에 기여할 것이다. TNA_amyl은 낮은 Lys 및 Arg 잔기(35개의 P. furiosus α-아밀라아제와 비슷한 32개)를 가지고 있고, 이것이 상기 효소의 등전점(4.61의 등전점)에 대한 설명이 될 것이다. 린덴(Linden et al., 2003)이 *P. woesei*에서 활성부위의 틈 근처에 가까운 $Ca^{2+}$ 결합 중심이라 주장한 아미노산 잔기에 상응하는 잔기가 보전되어 있었다.

TNA1_amyl 유전자의 전장 길이가 PCR에 의하여 pET-23a(+) 벡터에 클론되었고 (pET-amylf) 대장균 BL21-Codonplus(DE3)-RIL에 형질전환되어서 발현되었다. 전분 배지 플레이트에서 배양되어지면, 빈 벡터로 형질전환되어진 대장균은 60℃에서 항온배양 후에 이 기질을 분해할 수 없었으나, pET-amylf로 형질전환되어진 대장균은 TNA1_amyl 유전자의 효과적인 전분 분해을 나타내는 뚜렷한 할로를 형성하였다(Figure 3-3-39A). α-아밀라아제의 활성은 pET-amylf를 가지고 있는 재조합 대장균의 세포외 분획에서 관찰되었다. 발명자들은 시그널 펩타이드가 없는 플라스미드 pET-amylm를 제조하였다. α-아밀라아제의 성숙된 형태가 유도되어진 대장균(pET-amylm)의 가용성 분획에서 분리되었고, 분리되어진 단백질은 반복적인 얼림과 녹임 후에도 가용성으로 남아 있었다. SDS-PAGE에서, 분리되어진 효소의 밴드는 His6-태그를 포함하는 성숙된 형태의 아미노산 서열로부터 추정되어진 51 kDa보다 작은 사이즈에서 관찰되었다(Figure 3-3-39B)

(ii) α-아밀라아제 효소의 생화학적 성질

분리되어진 TNA1_amyl의 비활성은 7238 U $mg^{-1}$ 이었다. 상기 효소는 80 ℃에서 최적 활성을 보였으며, 40 내지 50 ℃에서 최대 활성의 20% 보다 작았다(Figure 3-3-40A). 상기 효소에 대한 최적 pH는 5.5 내지 6.0(Figure 3-3-40B)이었다. TNA1_amyl의 열안정성은 80 및 90 ℃에서 50 mM 소디움 아세테이드 완충용액(pH 6)안에서 효소를 항온 반응함으로써 측정되었다. TNA1_amyl은 열안정적이었고, 각각 80 ℃에서 30 분 및 90 ℃에서 10분의 반감기($t_{1/2}$)를 가지고 있었다(Figure 3-3-41). TNA1_amyl의 열안정성은 0.5mM의 $Ca^{2+}$의 존재 하에서 80 ℃에서 7,581분 및 90 ℃에서 153분으로 각각 상당히 의미 있게 증가하여(Figure 3-3-41), $Ca^{2+}$ 결합이 열안정성을 증가시키는데 필요하다는 것을 의미한다. 향상된 열안정성에 대하여 $Ca^{2+}$ 이온의 요구와는 대조되게, 0.5 mM의 $Ca^{2+}$의 첨가가 효소활성을 증가시키지는 않았다(Figure 3-3-42). 그러나 TNA1_amyl은 1 mM의 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 처리로 처리되었을 때, 활성이 4% 까지 감소하였고, EDTA에 의해 감소되어진 활성은 $Ca^{2+}$의 추가로 회복되었기 때문에, 효소의 활성에 $Ca^{2+}$의 존재에 의존적 이었다. 다른 2가 이온은 TNA1_amyl 활성에 대하여 $Ca^{2+}$를 대체하지 못하였다. $Zn^{2+}$와 $Cu^{2+}$는 TNA_amyl 활성을 상당히 억제하였다. 가용성 전분을 이용하여 동력학적 분석이 행하여졌고, $K_m$(4.57 mg $ml^{-1}$) 및 $V_{max}$(10,000 μmole $min^{-1}$ $mg^{-1}$) 값이 라인위버-버크 플롯을 이용하여 측정되었다(Figure 3-3-43).

TNA1_amyl은 말토스(G2)에서 말토헵타오스(G7)까지의 가용성 전분을 주된 산물로 만들며 아밀로오스, 올리고말토사카라이드, 아밀로펙틴 및 가용성 전분 같은 여러 기질을 가수분해하였다. 플루란(pullulan) 및 시클로덱스트린(cyclodextrin)을 분해하는 활성은 관찰



되어지 않다. 결론적으로, TNA1_amyl은 *P. furiosus* 같은 액화하는 효소로 분류되어질 수 있다(Figure 3-3-44). TNA1_amyl의 생화학적 성질은 다른 *T. profundus* 및 *T. hydrothermalis*로 부터의 *Thermococal* α-아밀라아제와 pH 최적값, 온도 및 기질 프로파일에서 비교 되었고, Table 3-3-4에서 나타내어진 증가된 가수분해 활성은 약간 증가되어진 것으로 보인다(Chung et al., 1995; Lee et al., 1996; Leveque et al., 2000b; Tachibana et al., 1996)

Table 3-3-4. The comparison of general biochemical characterization of α-amylase.

| | TNA1[a] | TK | TH | TP | PF |
|---|---|---|---|---|---|
| [c]$K_m$ (%) | 0.46 | 0.7 | ND[b] | 0.23 | 0.36-0.68 |
| $V_{max}$ (μmol $min^{-1}$ $mg^{-1}$) | 10,000 | 5672 | ND | 1807 | |
| Optimum Temp (°C) | 80 | 90 | 75-85 | 80 | 100 |
| Optimum pH | 5.5-6 | 6.5 | 5-5.5 | 5.5 | 6.5-7.5 |
| Ion requiremement | $Ca^{2+}$ | none | $Ca^{2+}$ | $Ca^{2+}$,$Cs^{2+}$ $Mg^{2+}$ | none |

[a]TNA1_amyl, this study; TK, α-amylase from *Thermococcus kodakaresis* (Tachibana et al., 1996); TH, α-amylase from *T. hydrothermalis* (Leveque et al., 2000a); TP, α-amylase from *T. profundus* (Lee et al., 1996); PF, α-amylase from *Pyrococcus furiosus* (Dong et al., 1997).

[b]ND, not determined.

[c]$K_m$ and $V_{max}$ toward soluble starch.

$Ca^{2+}$가 α-아밀라아제의 아밀로 분해 활성 및 열안정성을 증가시키는 것으로 보고되었다. 그러나, 이들 효소 대부분은 $Ca^{2+}$의 부존재에서도 활성형이었다. *P. furiosus* α-아밀라아제에서는 $Ca^{2+}$ 이온이 효소에 매우 단단히 붙어 있어, EDTA가 이것을 제거하지 못하고, 1 mM EDTA에서도 95%의 α-아밀라아제를 유지하였고(11.5 ng) 심지어 5 mM EDTA에서도 86%의 활성도가 유지되었다(Linden et al., 2003). 그러나 *P. furiosus*에서 칼슘 결합 잔기의 존재에 대한 최근의 보고 및 금속이 없는 완충용액에 대해 많은 투석 후에 고온에서 EDTA의 처리 데이터는 *P. furiosus* α-아밀라아제의 아밀로분해 활성에 칼슘 결합이 필수적인 것이라는 것을 제시한다(Savchenko et al. 2002). *P. furiosus*의 아밀라

아제와 비교하여, EDTA으로의 TNA1_amyl의 억제는 꽤 의미가 있었고, $Ca^{2+}$의 존재에 의해서 가역적이었다. 결론적으로, 칼슘 결합은 TNA1_amyl의 열안정성에 있어서 주요한 인자인 것으로 보인다. 시스테인의 양이 열안정성에 아마 영향을 준다고 보고되었고 (Tomazic and Kilbanov, 1988) 사브켄코(Savchenko et al., 2002)는 *P. furiosus*의 α-아밀라아제의 5개의 시스테인(Cys 152, Cys 153, Cys165, Cys387, alc Cys430)중에서 Cys165가 열안정성에 주요한 역할을 한다고 주장하였다.



```
TO_amyl     --MARKAAVAVLMAILISMSL---FAVPARAETLENGGVIMQAFYWDVPMGGIWWDTIRA 55
TK_amyl     --MKKFVALLITMFFVVSMAAVAQPASAAKYSELEEGGVIMQAFYWDVPAGGIWWDTIRS 58
TH_amyl     --MARKVLVA-LLVFLVVLSV---SAVPAKAETLENGGVIMQAFYWDVPGGGIWWDTIAQ 54
PW_amyl     MNIKKLTPLLTLLLFFIVLAS---PVSAAKYLELEEGGVIMQAFYWDVPRGGIWWDHIRS 57
              : : . :   : :.: ::      . .*:   **:************* ****** *

TO_amyl     KVPEWSQAGIAAIWLPPASKGMSGNYSMGYDPYDYFDLGEYDQKGTVETRFGSKDELISL 115
TK_amyl     KIPEWYEAGISAIWIPPASKGMGGAYSMGYDPYDFFDLGEYNQKGTVETRFGSKQELINM 118
TH_amyl     KIPDWASAGISAIWIPPASKGMSGGYSMGYDPYDFFDLGEYYQKGSVETRFGSKEELVNM 114
PW_amyl     KIPEWYEAGISAIWLPPPSKGMSGGYSMGYDPYDYFDLGEYYQKGTVETRFGSKEELVRL 117
            *:*:* .***:***:**.****.* *********:****** ***:********:**: :
                          Region I
TO_amyl     INTAHAYNMKVVADIVINHRAGGDLEWNPFVNDYTWTDFSGVASGKYTACYLDFHPNDVS 175
TK_amyl     INTAHAYGIKVIADIVINHRAGGDLEWNPFVGDYTWTDFSKVASGKYTANYLDFHPNEVK 178
TH_amyl     INTAHAHNMKVIADIVINHRAGGDLEWNPFTNSYTWTDFSKVASGKYTANYLDFHPNELH 174
PW_amyl     IQTAHAYGIKVIADVVINHRAGGDLEWNPFVGDYTWTDFSKVASGKYTANYLDFHPNELH 177
            *:****:.:**:**:****************...******* ******** *******::
                                                          Region II
TO_amyl     YADEGTFGGFPDIDHDKEWNQYWLWKSNESYAAYLRSIGIIAWRFDYVKGYPAWVVNSWL 235
TK_amyl     CCDEGTFGGFPDIAHEKEWDQHWLWASDESYAAYLRSIGVIAWRFDYVKGYGAWVVKDWL 238
TH_amyl     AGDSGTFGGYPDICHDKSWDQHWLWASNESYAAYLRSIGIIAWRFDYVKGYAPWVVKNWL 234
PW_amyl     CCDEGTFGGFPDICHHKEWDQYWLWKSNESYAAYLRSIGFIGWRFDYVKGYGAWVVRDWL 237
              *.*****:*** *.*.*:*:*** *:***********.*.********* .***..**
                     Region III
TO_amyl     SYWGGWAVGEYWDTNVDALLNWAYSSGAKVFDFPLYYKMDEAFDNNNIPALVDALRYGQT 295
TK_amyl     NWWGGWAVGEYWDTNVDALLNWAYSSGAKVFDFPLYYKMDEAFDNTNIPALVDALQNGGT 298
TH_amyl     NRWGGWAVGEYWDTNVDALLSWAYDSGAKVFDFPLYYKMDEAFDNNNIPALVDALKNGGT 294
PW_amyl     NWWGGWAVGEYWDTNVDALLSWAYESGAKVFDFPLYYKMDEAFDNNNIPALVYALQNGQT 297
            . ******************.***.********************.****** **: * *
                        Region IV
TO_amyl     VVSRDPFKAVTFVANHDTDIIWNKYPAYAFILTYEGQPMIFYRDYEEWLNKDKLINLIWI 355
TK_amyl     VVSRDPFKAVTFVANHDTDIIWNKYPAYAFILTYEGQPVIFYRDYEEWLNKDKLNNLIWI 358
TH_amyl     VVSRDPFKAVTFVANHDTNIIWNKYPAYAFILTYEGQPAIFYRDYEEWLNKDRLRNLIWI 354
PW_amyl     VVSRDPFKAVTFVANHDTDIIWNKYPAYAFILTYEGQPVIFYRDFEEWLNKDKLINLIWI 357
            ******************:******************* *****:*******:* *****

TO_amyl     HDNLAGGSTDIVYYDSDELIFVRSGYGSKPGLITYINLGSSKAGRWVYVPKFAGSCIHEY 415
TK_amyl     HDHLAGGSTSIVYYDSDELIFVRNGDSKRPGLITYINLGSSKVGRWVYVPKFAGACIHEY 418
TH_amyl     HDHLAGGSTDIIYYDSDELIFVRNGYGDKPGLITYINLGSSKAGRWVYVPKFAGSCIHEY 414
PW_amyl     HDHLAGGSTTIVYYDNDELIFVRNGDSRRPGLITYINLSPNWVGRWVYVPKFAGACIHEY 417
            **:****** *:***.*******.* . :*********... .***********:*****

TO_amyl     TGNLGGWIDKWVDSSGWVYLEAPAHDPANGQYGYSVWSYCGVG 458
TK_amyl     TGNLGGWVDKYVESSGWVYLEAPAYDPASGQYGYTVWSYCGVG 461
TH_amyl     TGNLGGWIDKWVDSSGRVYLEAPAHDPANGQYGYSVWSYCGVG 457
PW_amyl     TGNLGGWVDKRVDSSGWVYLEAPPHDPANGYYGYSVWSYCGVG 460
            *******:** *:*** ******.:***.* ***:********
```

Figure 3-3-38. Sequence comparison of the -amylase from *Thermococcus* sp. NA1 (TNA1), *T. kodakarensis* KOD1 (TkKOD1, gi:57641390), and *T. hydrothermalis* (PaGE5, gi:14521082), and *P. furiosus* (PhOT3, gi:14590819). Dashes indicate gaps and numbers on the right represent the position of the last residue in the original sequence. Identical residues among the four enzymes are marked as *and residues with conserved substitutions and semi-conserved substitutions are marked as : and ., respectively. The four conserved active site residues are boxed and noted as region *. The residues participating in Ca2+ binding which is importantfor thermostability are bolded and underlined. The identified or putative signal peptides are indicated by underlines.

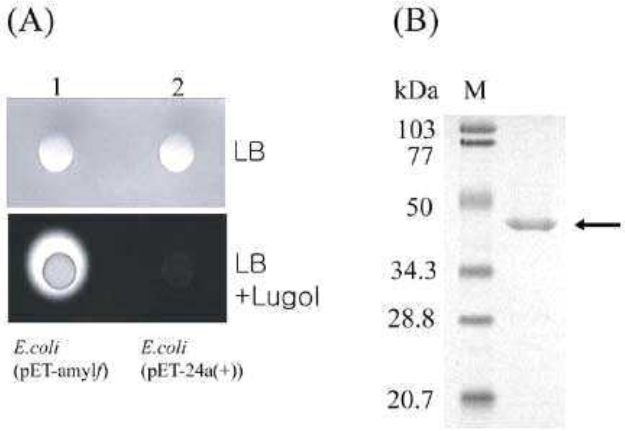



Figure 3-3-39. Expression of -amylase gene in *E. coli* (A) and SDS-PAGE of purified enzyme (B). A: Plate assay of -amylase activity of *E. coli* transformants. B: Coomassie blue staining of the purified TNA1_amyl*m* enzyme. The molecular mass standards (lane M) were phosphorylase *b* (103 kDa), bovine serum albumin (77 kDa), ovalbumin (50 kDa), carbonic anhydrase (34.3 kDa), soybean trypsin inhibitor (28.8 kDa), and lysozyme (20.7 kDa). The band corresponding to the enzyme is indicated by the arrow.



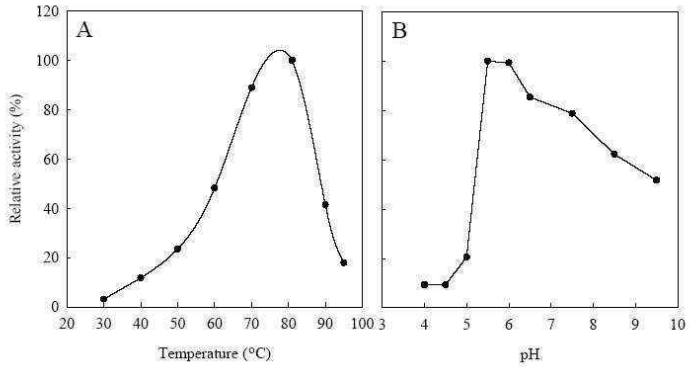



Figure 3-3-40. The effects of temperature (A) and pH (B) on TNA1_amyl activity. A: Activity assays were performed under standard conditions as the sample temperature was increased from 30 to 95 °C. B: Activity assays were performed under standard conditions with the following buffers (each at 50 mM): sodium acetate, pH 4.0 - 6.0; Tris-HCl, pH 6.5 - 9.5.

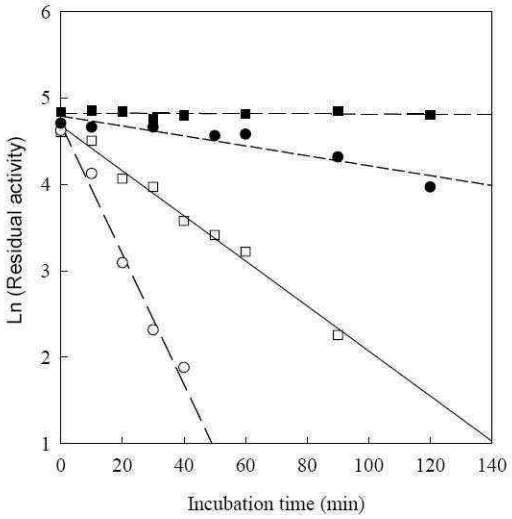



Figure 3-3-41. Thermal inactivation of α-amylase. Semilog plots of the remaining activity versus incubation time are shown. α-amylase (2nM) was incubated at 80 (square) or 90 ℃ (circle) in 50 mM sodium acetate buffer (pH 6.0) in the absence (open symbol) or presence (filled symbol) of 0.5 mM $Ca^{2+}$. At the time indicated, aliquots were taken out, and the activities were measured in the same buffer at 80 ℃ using soluble starch as substrate. The lines were obtained by linear regression of the data.



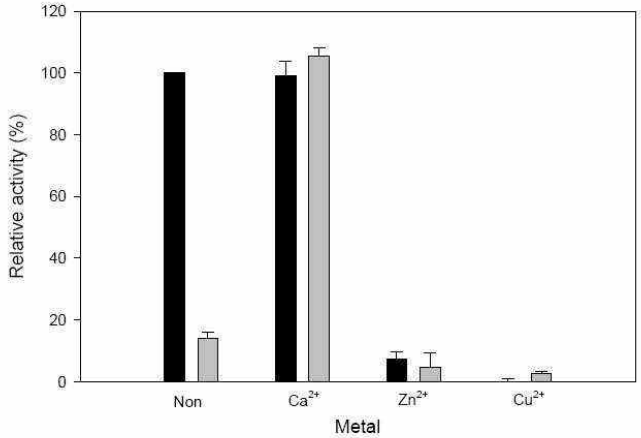



Figure 3-3-42. The effect of metal ions on -amylase activity. Activity assays were performed under standard conditions while divalent metal ions were varied.

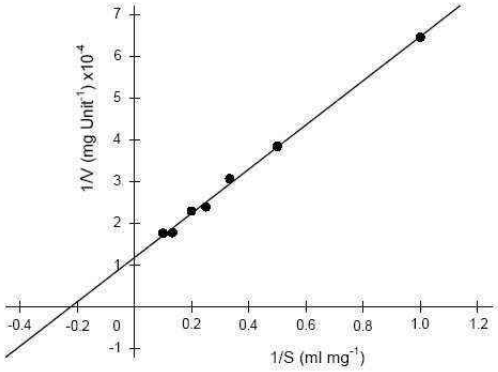



Figure 3-3-43. Estimation of kinetic constants using Lineweaver-Burk plot. Activity assays were performed under standard conditions while substrate concentrations were varied.



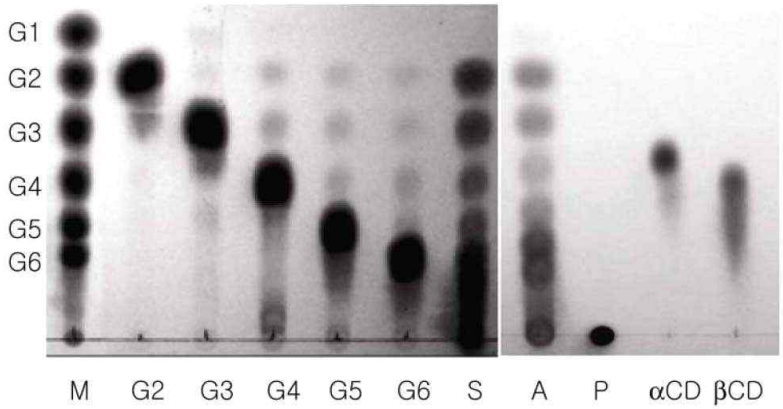



Figure 3-3-44. Thin-layer chromatogram of the products of TNA1_amyl reaction on various substrates. The reaction products from maltooligosaccharides (G2, G3, G4, G5, G6), starch (S), amylopectin (A), pullulan (P), cyclodextrins (CD and CD) were analyzed. M represents a standard mixture containing glucose(G1), maltose (G2), maltotriose (G3), maltotetraose (G4), maltopentaose (G5), and maltohexose (G6).

### 다. 결론

고호열성 미생물 유래 열안정성 효소 개발

일반적으로, 고호열성 고세균으로부터의 패밀리 B 타입 DNA 중합효소는 3′->5′ 엑소뉴클리아제 활성을 가지고, 이들 DNA 중합효소가 높은 충실도로 DNA 분절 증폭할 가능성이 있다. 그러나 대부분의 3′->5′ 엑소뉴클리아제 활성도를 가진 패밀리 B 타입의 DNA 중합효소는 세균의 엑소뉴클리아제 활성이 없는 A 타입 DNA 중합효소보다 DNA 신장 능력이 떨어졌다. 연결되어진 3′-5′ 엑소뉴클리아제 활성을 가진 DNA 중합효소의 단점은 완충용액의 최적화에 의해서, 3′->5′ 엑소뉴클리아제의 활성을 떨어뜨리는 돌연변이에 의해서,엑소뉴클리아제 활성이 없는 DNA 중합효소와 매우 프로프리딩하는 DNA 중합효소의 혼합물의 사용에 의해서 극복되어질 수 있다. 더불어서, 생물 시료안의 여러 가지 성분들의 PCR-억제 효과가 성질에서 약간 차이가 나는 중합효소들 중에서, 적당한 열안정성의 DNA 중합효소의 사용으로 어느 정도까지는 제거될 수 있는 것이 알려졌다. KOD DNA 중합효소는 높은 수행력 및 높은 신장 속도로 단점을 극복하는데 성공적이었다. 본 연구의 실험결과는 TNA1-pol은 높은 충실도를 유지할 뿐만 아니라 KOD DNA 중합효소에 비교할 만한 신장율을 가지고 있다는 것을 보인다. 또한 DNA ligases는 다른 eubacteria, eukaryote에서 보고된 DNA ligase와 달리 cofactor로 ATP와 NAD를 동시에 사용하는 독특한 특성을 보였으며, 이러한 특성과 열안정성은 중요한 특성이며. 한편 분리된 prolyl oligopeptidase, carboxypeptidase, APP, methionylaminopeptidase, amylase는 모두 뛰어난 열안정성을 보여 새로운 호열성 효소로서 개발 가능성을 보였다.



## 제4절 극지환경 무척추동물의 유전체 분석, 유전자원 확보

### 1. 연구 재료 및 방법

#### 가. 시료의 확보

우리나라 남극 세종과학기지와 북극 다산과학기지를 활용하여 극지생물 시료를 채집하였다. 남극 성게, *Sterechinus neumayeri*와 북극 성게, *Strongylocentrotus droebachiensis* 시료를 기지 주변의 해안에서 스쿠버다이빙으로 채집하였고, 극지 곤충 (*Cryptopygus antarcticus*, a species of Acari) 은 시료 기지 주변의 이끼와 자갈 밑에서 채집하였다 (Figure3-4-1). 채집된 시료는 알코올에 바로 고정되어, 한국해양연구원 본원으로 운반되어 DNA 및 RNA 추출 실험에 이용되었다.

#### 나. 분자계통과 진화 분석

대상 생물의 미토콘드리아 DNA의 염기서열을 밝히기 위하여 먼저 genomic DNA를 추출하였다. 이를 위해 MN NucleoSpin Tissue (Macherey- Nagel) kit나 DNeasy kit를 사용하였다. 성게의 경우 알코올에 보관되어 있는 수컷 생식소 약 25mg을 취해 사용하였으며, 극지곤충의 경우 성체 전체를 사용하였다. DNA 추출은 kit가 제공하는 프로토콜에 따라 이루어졌다.

계통진화 분석에 사용될 유전자로서 COI, 12SrDNA-tRNA(gln) 등을 선정하고 이 유전자를 PCR로 증폭하였다. COI 유전자 단편을 증폭하기 위해 LCOI1490ERCH (5′-ACA CTA TAT TTG ATT TTT GG-3′; 20mer), HCOINE RCH (5′-CGA CTA CGT AGT ATG TGT CA-3′; 20mer)를 사용하였고, 12Sr DNA-tRNA (gln)을 증폭하기 위해서는 12SrDNA gene의 중간 부분에 해당하는 L12S (5-AAA CCA GGA TTA GAT ACC C-3)와 tRNA-gln 유전자에 해당하는 HtRNA(gln) (5-GGA AAA ACG ARG ARC TTT GA-3)을 사용하였다. PCR 반응을 수행하기 위해, 10X PCR buffer 5 ㎕, 2.5 mM each dNTPs mix 4 ㎕, HotStar Taq DNA polymerase (Qiagen) 0.5㎕ (2.5 units), forward와 reverse 프라이머 각각 2.5㎕, template DNA (gDNA) 5㎕, 그리고 3차 증류수 30.5 ㎕를 섞어 총 50 ㎕의 반응용액을 만들었다. PCR 조건은 95℃ initial activation 5분을 하고 난 후, 95℃ 1분 denaturation, 50℃ 1분 annealing, 72℃ 1분 extension 과정을 37회 반복하고, final extension 72℃에서 10분간 수행한 후 4℃로 온도를 떨어뜨려 반응을 종료하였다. 반

응 종료 후 0.8% agarose gel로 전기영동하여 PCR 산물을 확인하였다. PCR 산물은 정제 후 바로 시퀀싱 반응을 통해 염기서열이 결정되거나, TOPO TA Cloning Kit (Life Technologies)를 이용한 클로닝과 스크리닝 과정을 거쳐 염기서열이 결정되었다.

극지 곤충에서는 미토콘드리아 전체 염기서열이 분석되었다. 이를 위해 먼저 게놈 DNA를 MN (Macherey -Nagel) NucleoSpinTissue Kit로 추출하였다. 확보된 게놈DNA로부터 Long-Range PCR 기법을 이용하여 미토콘드리아 유전체를 아래와 같이 2개의 커다란 절편 6kb 와 9kb 로 증폭하였다. 증폭된 DNA를 벡터에 삽입하고 electroporation 기술을 이용하여 클로닝 한 후 DNA-walking 방법으로 전체 염기서열을 결정하였다. 6Kb 단편의 증폭과 염기서열 결정은 i) 게놈 DNA에서 O-COILF를 forward primer로, O-ND4LF를 reverse primer로 사용하여 증폭하고, ii) PCR product를 O-COILF1, O-ND4LF1을 이용하여 재 증폭함으로써 종 특이성을 확보하고, iii) 이 product를 클로닝하고, iv) 플래즈미드 DNA를 정제하여 시퀀싱하는 과정을 거쳤다. 9Kb 단편의 증폭과 염기서열 결정은 i) 게놈 DNA에서 O-COILR과 O-ND4LR1으로 증폭하고, ii) 이 PCR product를 클로닝한 후 플래즈미드 DNA를 정제하여 시퀀싱하는 과정을 거쳤다. 그런제, 9Kb 단편의 클로닝이 쉽게 이루어지지 않아 이를 O-CytBF와 O-COI5LR2을 이용하여 증폭하거나, O-COI5LR2 ~HexaU16S-R, O-CytBF~O-HexaU16S-R로 증폭하여 시퀀싱하였다. 한편, internal 프라이머로서 cytBF-605, Hexa 16U-635, cytBF-1500 등도 이용하였다 (Table 3-4-1 ~ 3-4-3).

위에서 얻은 염기서열을 바탕으로 극지 생물과 남아메리카나 북태평양에 서식하는 생물 간의 분자계통을 분석하였다. 12SrDNA-tRNA(gln)과 COI 염기서열을 각각 분자계통수 작성에 이용하였고, 두 시퀀스를 합친 COI-12SrDNA-tRNA(gln) 염기서열도 이용하였다. 서로 다른 생물 간의 염기서열을 Clustal W 프로그램으로 정렬하였다. 삽입과 결실이 된 위치는 계통분석에서 제외시켰다. 분자계통수는 Neighbor-Joining(NJ) 프로그램, PAUP* 프로그램 (version 4.0b10; Swofford, 1998)에 있는 minimum-evolution (ME), maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) 방법과 MrBayes 프로그램 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001)의 Bayesian Inference 방법으로 작성하였다. NJ, ML, MP, ME로 작성된 계통수의 통계적 유의성은 1,000회 반복된 Bootstrapping 방법으로 검증하였다. Bayesian 분석에서는 4개의 chains을 500,000회 반복하였고, 평형상태에 이르기 전 중간단계에서 만들어지는 1,000개의 계통수를 제외시키고 나머지 4,000개 계통수를 종합하여 최종 결과를 얻었다 (burnin=1,000). 종 간의 분화시기는 분자시계를 가정하여 ML 계통수를 작성하고



과거 한 시점을 기준점으로 삼아 염기서열의 진화속도를 산정한 후 이로부터 추정하였다. Log likelihood ratio test로 분자시계를 가정한 ML 계통수의 유의성을 평가하였으며, 이 계통수가 test를 통과하지 못할 경우 분자시계를 가정하지 않은 계통수에서 분지가 특히 긴 종을 제외시키고 다시 test를 실시하였다.

**다. 발현유전자 (ESTs) 분석**

극지 생물에서 발현된 유전자를 분석하기 위해 먼저 전체 RNA를 Trizol (Invitrogen)로 추출하였다. 먼저 알코올에 고정된 배아, 내장기관, 성체 조직 약 700-800 mg을 Trizol 10ml에 넣고 분쇄 막대로 완전히 분쇄하였다. 이 후 클로로포름 추출과정을 반복하고, RNA가 들어 있는 상등액에 isopropanol을 처리하여 RNA를 침전시켰다. RNA pellet을 DEPC로 처리한 물로 희석한 70% 에탄올을 세척한 후 에탄올을 따라버리고 물에 용해하였다.

전체 RNA에서 cDNA library 제작은 Clontech의 Creator SMART cDNA Library Construction Kit로 실시되었다. 실험 과정은 Figure 3-4-1의 각 단계를 따라 순차적으로 이루어졌다. RNA에서 전환된 cDNA는 플래즈미드 벡터 pDNR-LIB에 삽입되어 *E. coli*에 전이되었다. 벡터-cDNA를 포함하는 *E. coli*가 고체 배지에서 각 각의 콜로니로 자란 후 385well plate에 옮겨져 보관되었다. 각 콜로니가 포함한 cDNA의 염기서열을 분석하기 위해 콜로니를 액체 배지에서 배양한 후 플래즈미드를 추출하였다. 플래즈미드 DNA를 5'쪽에서 시퀀싱함으로써 ESTs 유전자 데이터베이스를 구축하였다.

발현유전자의 염기배열순서가 결정되면 이를 유전자 데이터베이스(GenBank)에 들어 있는 유전자들과 비교하여 상동유전자의 존재 유무를 검색하고, protein family DB(pfam)를 검색하여 특정 단백질의 모티브가 존재하는지 여부를 분석하였다. 우연에 의한 상동의 가능성 P가 $10^{-12}$ 보다 작으면 상동유전자가 확실하다고 할 수 있으며, $10^{-12}$보다 크고 $10^{-6}$보다 작으면 상동일 가능성이 있으며, $10^{-6}$보다 크면 상동일 가능성이 거의 없다고 할 수 있다. 유전자 데이터베이스에 존재하는 상동유전자의 기능으로부터 본 연구에서 얻은 ESTs의 기능을 유추하였다.

## 2. 연구 개발 결과

### 가. 남극 성게의 분자계통과 발현유전자

남극 성게(*S. neumayeri*)의 분자계통을 분석하기 위해 남극 세종과학기지 앞 마리안 소만에서 채집된 시료를 이용하여 미토콘드리아 유전자, COI과 12SrDNA-tRNA(gln)의 염기서열을 결정하였다. COI유전자는 1079개 염기가 분석되었으며, 12SrDNA-tRNA(gln)유전자는 877개 염기가 분석되었다 (Figure 3-4-3). 12SrDNA-tRNA(gln) 염기서열을 대상으로 남극 성게와 남미 대륙의 성게들, *Loxechinus albus. Pseudechinus magellanicus,* 세 종의 둥근성게과 성게들 *S. purpuratus, S. intermedius, Hemicentrotus pulcherrimus,* 그리고 지중해 성게, *Paracentrotus lividus*의 분자계통수를 작성하였다 (Figure 3-4-4). 12SrDNA-tRNA(gln) 분자계통수에서 남극 성게는 남미 대륙 연안의 *L. albus*와 지중해 성게 *P. lividus*의 공통조상과 진화적으로 가장 가까운 관계에 있는 것으로 드러났다. 이 세 종으로 이루어진 단계통군은  둥근성게과 종들과 뚜렷이 구분되었다 (bootstrap value, 100). 그런데, 다른 남미 대륙의 또 다른 성게인 *P. magellanicus*는 남극 성게 및 다른 성게들과 진화적으로 먼 관계로 나타났다. 한편, 분자시계(molecular clock)를 가정하여 분자계통수를 작성하고 (Figure 3-4-4), 각 종의 종분화 시기를 추정한 결과 남극 성게는 남미 대륙의 종과 약 2천4백만년에서 3천4백만년 전에 서로 분리된 것으로 나타났다. 이러한 분화 시기는 남극 대륙이 남미 대륙에서 분리된 시기와 일치한다.

남극 성게가 저온환경에 적응하면서 발달시킨 저온 특유의 유용유전자원을 확보하기 위해 남극 성게의 배아에서 발현되는 유전자를 분석하였다. 발생 중의 배아는 외부 환경에 그대로 노출되어 환경의 영향을 크게 받는 시기로서 이에 대한 적응이 필요할 것으로 여겨진다. 따라서, 남극 성게의 배아에서 발현되는 유전자는 저온환경에 적응된 독특한 유전자를 탐색할 수 있는 좋은 자원일 것으로 판단된다. 발현유전자 분석은 배아에서 추출한 mRNA로부터 만들어진 cDNA 라이브러리에서 약 1,000개의 클론을 무작위로 선정하여 그 염기서열을 결정하였다. 각 cDNA의 시퀀싱을 5'쪽에서 실시하여 ORF가 가능한 많이 포함되로록 하였다. 이 염기서열을 GenBank와 protein family DB에 수록된 유전자와 비교하여 각 유전자의 상동유전자가 밝혀졌는지를 확인하고, 상동유전자의 기능에서 각 유전자의 기능을 유추하였다. 기능이 밝혀진 유전자들 중 특별히 주목할 만한 유전자들을 Table 3-4-4에 정리하였다. 분석된 약 1,000 여개의 유전자 중에서 상동유전자가 알려진 경우가 약 14%이었고, 24%는 미토콘드리아나 리보솜을 구성하는 단백질 유전자이었으며, 나머지 약62%는 기능이 알려지지 않은 미지의 유전자이었다. 이들 발현유전자 중에서 그 기능이 특기할 만한 것들로서 epoxide hydrolase, caspase, MAGO-NASH protein, catalase, carbonyl reductase, phenylpyruvate tautomerase, antibacterial peptide 등 다수의 효소단백질과 의학 관련 중요 단백질 유전자 등이 있다.



### 나. 북극 성게의 분자계통과 발현유전자

북극가시성게(*S. droebachiensis*)의 분자계통을 분석하기 위해 북극 다산과학기지 앞 Kongsfjorden 소만에서 채집된 시료를 이용하여 미토콘드리아 유전자, COI과 12SrDNA-tRNA(gln)의 염기서열을 결정하였다. COI유전자는 1,080개 염기가 분석되었으며, 12SrDNA-tRNA(gln)유전자는 877개 염기가 분석되었다 (Figure 3-4-5). COI 유전자 염기서열과 12SrDNA-tRNA(gln) 염기서열을 대상으로 북극 성게류와 관련된 성게들, 특히 북태평양 연안에 서식하는 *S. purpuratus, S. franciscanus*와 우리나라 동해안에 주로 서식하는 새치성게(*S. intermedius*), 말똥성게(*Hemicentrotus pulcherrimus*), 둥근성게(*S. nudus*) 사이의 분자계통수를 작성하였다 (Figure3-4-6). 12SrDNA-tRNA(gln) 분자계통수에서 북극가시성게는 북극이랑성게(*S. pallidus*)가 진화적으로 가장 가까운 자매종의 관계에 있는 것으로 드러났다. 이 두 종으로 이루어진 단계통군은 다시 새치성게와 *S. purpuratus*와 자매종의 관계를 보인다. 즉 이 네 종으로 이루어진 단계통군의 공통조상이 *H. pulcherrimus*와 종분화를 거쳐 분화되었음을 보여준다. 이 종들은 둥근성게나 *S. franciscanus*와는 다소 유연관계가 먼 것으로 드러났다. 한편, 분자시계(molecular clock)를 가정하여 분자계통수를 작성하고 (Figure 3-4-6), 각 종의 종분화 시기를 추정한 결과 북극가시성게와 북극이랑성게는 약 2-3백만년 전에 서로 분리된 것으로 나타났다. 또한, 이 두 종의 공통조상은 새치성게 및 *S. purpuratus*의 공통조상으로부터 4-10백만년 전에 갈라진 것으로 드러났다.

북극가시성게로부터 유용유전자원을 확보하기 위해 내장기관에서 발현되는 유전자를 분석하였다. 내장기관은 각 종 섭식물의 소화를 담당하는 기관으로서 북극해 저온 환경에 서식하고 있는 성게의 경우 저온에서 활성이 높은 효소단백질을 다량 분비할 것이라 생각되었다. 따라서, 내장기관의 발현유전자는 새로운 저온활성 효소단백질 유전자를 탐색할 수 있는 좋은 자원일 것으로 판단되어 분석대상으로 삼았다. 발현유전자 분석은 내장기관에서 추출한 mRNA로부터 만들어진 cDNA 라이브러리에서 약 2,000개의 클론을 무작위로 선정하여 그 염기서열을 결정하였다. 각 cDNA의 5'쪽에서 시퀀싱을 실시하여 길이가 대체로 500bp-1000bp인 염기서열을 얻었다. 이 염기서열을 GenBank와 protein family DB를 검색하여 각 유전자의 상동유전자가 등록되

어 있는지 유무를 확인하고, 상동유전자가 있을 경우 그로부터 각 유전자의 기능을 유추해 보았다 (Table 3-4-5). 분석된 약 2,000개의 유전자 중에서 상동유전자가 알려진 경우가 약 20%이었고, 12%는 미토콘드리아나 리보솜을 구성하는 단백질 유전자이었으며, 나머지 약68%는 기능이 알려지지 않은 미지의 유전자이었다. 상동유전자가 알려진 유전자들은 기능적으로 볼 때 oxidoreductase activity 유전자가 27.3%로 가장 많고, ion transporter activity 유전자 14.8%, hydrolase activity 유전자 14.4% 등의 순으로 나타났다 (Figure3-4-7A). 이 외에 electron transporter activity, carrier activity, lipid binding 등 다양한 기능의 유전자 들이 밝혀졌다. 한편, 이 유전자들을 그에 해당하는 단백질의 세포내 위치에 따라 분류하면, 세포질 내에 위치하는 단백질 유전자가 36.5%로 가장 많았고 막 단백질 유전자가 22.7%, 세포내 소기관의 단백질 유전자가 16.4%를 차지하였다 (Figure 3-4-7B). 이들 발현유전자 중에서 그 기능이 특기할 만한 것들로서 lipase, beta-glucan endohyrolase, phopholipase, carbonic anhydrase I, ketol-acid reductoisomerase, DNase I, acetylcholine esterase 등 다수의 효소단백질 유전자와 DAD-1, Cat eye syndrome protein 등 의학 관련 중요 단백질 유전자 등이 있다 (Table 3-4-5). 이러한 유전자들은 산업적으로 막대한 가치를 갖는 잠재적 자원이라고 볼 수 있다.

**다. 극지 곤충의 미토케놈과 발현유전자**

남극 곤충 *C. antarcticus*의 전체 미토콘드리아 게놈을 분석하기 위하여 O-COILF~O-ND4LF과 O-COILR~O-ND4LR 프라이머 조합으로 PCR하여 6kb DNA 단편과 3kb 단편을 얻었다 (Figure 3-4-8). 이 중 6kb 단편은 기대하였던 COI-COII-COIII-ND3-ND5-ND4 시퀀스를 갖고 있었다 (Figure 3-4-9). 그런데, 기대하였던 9kb 단편 대신에 얻어진 3kb 단편은 재조합 DNA로 드러났으며 이로부터 ND2//CytB-ND6-ND4 시퀀스가 얻어졌다. O-COILR~O-ND4LR 프라이머 조합으로 PCR을 다시 시도하여 9kb DNA 단편을 얻었고 이로부터 internal 프라이머들의 조합인 O-COI2LR2~HexaU16S-R과 CyB-F~HexaU16S-F를 이용한 PCR에서 다시 약 6kb와 3kb DNA단편을 얻었다 (Figure 3-4-8). 이를 DNA로부터 미토콘드리아 게놈 전체 염기서열을 결정할 수 있다. 현재 A+T rich region, ND2, 12S rRNA 유전자의 일부분을 제외한 약 15,000-bp 의 염기서열이 확보되었다 (Figure3-4-10). 남극 곤충의 유전자 순서와 숫자는 다른 곤충들과 거의 같았으나 Drosophila와는 유전자의 순서가 약간 차이를 보였다(Crease 1999). 남극 곤충의 미토게놈은 전체적으로 13개의 코딩유전자(COI-COIII, ND1-6, ND4L, Cytb, Atp6, Atp8)와, 두 개의 리보솜 RNA 코딩유전자(12S rRNA, 16S rRNA), 그리고 22개의 tRNA로 구성될 것으로 예상된다.



미토게놈의 염기조성은 아데닌(A) 37.4%, 티민(T) 32.4%, 시토신(C) 17.2%, 구아닌(G) 12.0% 로서 A+T의 비율이 69.8%로 다른 곤충들에 비해서 낮은 것으로 나타났다. 다른 곤충의 A+T 염기 비율은 초파리 76.9-78.6%(Clary and Wolstenholme 1985, Lewis et al. 1995), 메뚜기 75.3%(Flook et al. 1995), 꿀벌 84.9 %(Crozier and Crozier 1993) 등이다. 그러나 갑각류 대부분의 A+T 비율 보다는 톡토기의 비율이 약간 높았다. Figure3-4-10의 미토콘드리아 염기서열에서 각 유전자의 위치는 COI, 631-2154; CO2, 2228-2917; ATP8, 3046-3250; ATP6, 3204-3885; CO3, 3885-4678; ND3, 4754-5108; ND5, 5504-7213; ND4, 7271-8631; ND4L, 8637-8925; Cytb, 9047-9535; ND1, 9598-10727; 16S,11871- 와 같다.

미토게놈 DNA 염기서열을 이용하여 남극 곤충의 분자계통을 분석하였다. COI (667 nucleotides)과 16S (519 nucleotides) 유전자를 이용하여 남극 곤충을 다른 톡토기류 및 곤충 들과 분자계통을 분석하였을 때, 남극 곤충은 *Folsomia candia*, *Folsomia bisetosa*와 유연관계가 가장 가까운 것으로 드러났다. 분자계통수에서 이 곤충은 남극대륙과 남아메리카 대륙이 분리될 때 (약 23-20 만년 전) 다른 종으로부터 분화된 것으로 추정된다.

남극 곤충은 육상에 서식하는 생물로 겨울철에는 영하 20-30도에 이르는 초저온환경에 노출된다. 따라서, 저온 특이적인 유용유전자를 다수 발달시켰을 것으로 예상된다. 남극 곤충에서 유용유전자원을 확보하기 위해 개체 전체를 재료로 삼아 전체 RNA를 추출하였다. 이로부터 cDNA 라이브러리를 만들고 약 2,000개의 클론을 무작위로 선정하여 그 염기서열을 결정하였다. 각 cDNA의 시퀀싱을 5'쪽에서 실시하여 가능한 ORF가 포함되도록 하였다. 이 염기서열을 GenBank와 protein family 모티브 DB에 수록된 유전자와 비교하여 각 유전자의 상동유전자가 등록되어 있는지 유무를 확인하였다. 상동유전자가 있을 경우 그로부터 각 유전자의 기능을 유추하였다. 분석된 약 2,000개의 유전자 중에서 상동유전자가 알려진 경우가 미토콘드리아나 리보솜을 구성하는 단백질 유전자 약 24%를 포함하여 모두 57%에 달하였고, 나머지 약 43%는 기능이 알려지지 않은 미지의 유전자였다. 상동유전자가 알려진 발현유전자 중에서 그 기능이 특기할 만한 것들은 delta-9 desaturase, mannosidase, endo-glucanase, trypsin, delta-5 desaturase, laminarinase 등의 효소단백질 유전자와 interneukin-4, neuropeptide-like protein, lipocalin 등 의학 관련 중요 단백질 유전자 등이다. 이 유전자들은 산업적 활용 가치가 막대할 것으로 예상된다.

## 3. 결론 및 토의

### 가. 남극 성게의 진화와 유용유전자

12SrDNA-tRNA(gln) 염기서열을 이용한 분자계통수에서 남극 성게는 남미 대륙 연안의 *L. albus*와 지중해 성게 *P. lividus*의 공통조상과 진화적으로 가장 가까운 관계에 있는 것으로 드러났다. 이들의 종분화 시기는 약 2천4백만년에서 3천4백만년 전으로 추정되었다 (Figure3-4-4). 이 시기는 남극 대륙이 남미 대륙에서 분리된 시기와 일치하여 남극 성게의 종분화가 지구조 변화 (tectonic change)에 수반되어 진행되었음을 시사한다.

남극 성게는 연 중 온도가 -2°C에서 2°C에 머무는 남극해 저온환경에 서식한다. 따라서, 남극 성게의 유전자는 일정한 저온환경에 오랜 기간 적응하면서 진화된 특성을 갖고 잇을 것으로 예상된다. 발생 중인 배아에서 분석된 유전자는 약 1,000여개의 ESTs 중에서 상동유전자가 이미 알려진 경우가 약 14%에 불과하였다. 나머지 24%는 미토콘드리아나 리보솜을 구성하는 단백질 유전자이었으며, 나머지 약 62%는 기능이 알려지지 않은 미지의 유전자이었다. 상동유전자가 알려진 발현유전자 중에서 그 기능이 특기할 만한 것들은 epoxide hydrolase, caspase, MAGO-NASH protein, catalase, carbonyl reductase, phenylpyruvate tautomerase, antibacterial peptide 등이다. 이 유전자들은 재조합단백질의 생산을 통해 산업적으로 이용할 가치가 높다고 판단된다.

### 나. 북극 성게의 진화와 유용유전자

북극가시성게(*S. droebachiensis*)는 분자계통 분석 결과, 우리나라 동해안에 서식하는 새치성게와 북태평양 동쪽 해안에 서식하는 *S. purpuratus*의 공통조상으로부터 4-10백만년 전에 갈라진 것으로 드러났다. 이 시기는 아시아와 북미대륙이 갈라지면서 베링해협이 열린 4.8-7.5백만년 전(Marincovich and Gladenkov, 2001)과 어느 정도 일치하여 북극가시성게의 종분화가 베링해협이 열리는 tectonic event와 관련되어 있을 가능성을 시사한다. 북극해에 서식하는 이 종은 오랫동안 북태평양에 서식하던 성게가 지구 환경변화에 따라 베링해협이 열리면서 북극해로 퍼져 나가 분화된 것으로 예측되어 왔다. 즉, 북극가시성게는 북태평양에 서식하던 한 집단이 베링해협을 통해 북극해로 진출하고, 이 후 일어난 해수면 변동(Haq et al. 1987) 과정에서 다른 성게들과 분리되면서 독립된 종으로 진화해 나갔을 것이라 추론된다. 이렇게 형성된 북극해의 독립된 종은 다시 약 2-3백만년 전에 종분화를 거치게 된다. 현재 북극해 연안에는 북극가시성게와 북극이랑성게 두 종이 우점하고 있으며 분자계통수에서 이 두 종은 진화적으로 가장 가까운 자매종의 관계를 보인다 (Figure 3-4-6). 이와 같은 계통적 관계는 정자단백질 유전자 Bindin의 결과와 대체로 일치하며 (Biermann, 1998), 12SrDNA 약 270개 염기서열로 밝힌 둥근성게과 분자계통수 (Lee, 2003)와 일치한다.

북극가시성게 내장기관에서 발현되는 유전자를 ESTs로 분석한 결과 다수의 새로운 유전자를 발견하였다. 분석된 약 2000개의 유전자 중에서 상동유전자가 알려진 경우는 미토콘드리아와 리보솜 유전자를 포함해 약 32%에 불과하였고, 나머지 약 68%는 기능이 알려지지 않은 미지의 유전자이었다. 상동유전자가 알려진 유전자들 중에는 그 기능을 볼 때 산업적으로 활용 가능한 것들이 많다. 특히, lipase, beta-glucan endohyrolase, phopholipase, carbonic anhydrase I, ketol-acid reductoisomerase, DNase I, acetylcholine esterase 등 다수의 효소단백질은 저온에서 활성이 뛰어날 것으로 예상되어 잠재적 가치가 높을 것으로 생각된다. 이러한 유용유전자는 단백질 발현시스템을 이용하여 각 유전자가 만드는 단백질을 대량 생산할 수 있을 것이며, 이 물질들은 새로운 산업용 소재로서 쓰일 수 있을 것이다.

### 다. 극지 곤충의 미토게놈과 유용유전자

극지 생물만이 가지고 있는 저온적응 유전자 특성을 파악하기 위해 대표적인 남극 곤충인 *Cryptopygus antarcticus*의 미토콘드리아 게놈을 분석하였다. *C. antarcticus*는 원시곤충인 톡토기의 일종으로 남극을 대표하는 종이라고 할 수 있다. 남극 대륙 생물들의 진화경로는 주로 세 가지로 알려져 있다. 첫째는 초대륙인 곤도와나 대륙에서부터 살아남은 생물, 둘째는 남미 대륙과 남극이 분리될 때 남극에 이동해온 생물, 그리고 마지막으로 최근에 바람이나 해류의 흐름 또는 대륙을 이동하는 동물들에 의해 옮겨진 생물 등이다 (Ashowrth and Kuschel 2003, Ashworth and Preece 2003, Lawver and Gahagan 2003). 본 연구결과 남극의 톡토기는 남극대륙이 남미와 분리 될 시점인 지금으로부터 약 2,300 만년 전에 다른 종으로부터 분화된 것으로 나타났다. 이 시기에 살아남은 생물은 일부 진드기류(Pugh 1997, Greenslade 1995, Hogg and Stevens 2002), 선충류(Courtright et al. 20003), 완보동물(McInnes and Pugh 1998) 정도이며, 톡토기류(Stevens and Hogg 2002, Hogg and Hebert 2004)는 이들 중 가장 몸체 구조가 복잡한 생물로서 저온적응 유전자에 대한 귀중한 정보를 제공한다. 남극 곤충 미토게놈의 유전자 순서와 숫자는 Drosophila를 제외하고 (Crease, 1999) 다른 곤충들과 거의 유사한 것으로 추정된다. 전체적으로 13개의 코딩유전자(COI-COIII, ND1-6, ND4L, Cytb, Atp6, Atp8)와, 두 개의 리보솜 RNA 코딩유전자(12S rRNA, 16S rRNA), 그리고 22개의 tRNA로 구성될 것으로 예상된다.

미토게놈의 염기조성은 아데닌(A) 37.4%, 티민(T) 32.4%, 시토신(C) 17.2%, 구아닌(G) 12.0% 로서 A+T의 비율이 69.8%로 다른 곤충들에 비해서 낮은 것으로 나타났다 (초파리 76.9-78.6%, Clary and Wolstenholme 1985, Lewis et al. 1995; 메뚜기 75.3%, Flook et al. 1995; 꿀벌 84.9%, Crozier and Crozier 1993). 미토게놈 DNA 염기서열을 이용한 분자계통 분석에서 남극 곤충은 *Folsomia candia, Folsomia bisetosa*와 유연관계가 가장 가까운 것으로 드러났다. 이들의 종분화는 남극대륙과 남아메리카 대륙이 분리될 때 (약 23-20 만년 전)와 일치하는 것으로 나타났다.

남극 곤충은 육상에 서식하는 생물로 겨울철에는 영하 20-30도에 이르는 초저온환경에 노출된다. 남극 곤충에서 유용유전자원을 확보하기 위해 시도한 발현유전자 분석에서 약 2000개의 cDNA 클론이 얻어졌다. 이 클론들의 염기서열을 GenBank와 protein family 모티브 DB에 수록된 유전자와 비교하여 각 유전자의 상동유전자가 등록되어 있는지 유무를 확인한 결과 약 2,000개의 유전자 중에서 상동유전자가 알려진 경우가 미토콘드리아나 리보솜을 구성하는 단백질 유전자 약 24%를 제외하고 33%에 달하였다. 상동유전자가 알려진 발현유전자 중에서 그 기능이 특기할 만한 것들은 delta-9 desaturase, mannosidase, endo-glucanase, trypsin, delta-5 desaturase, laminarinase 등의 효소단백질 유전자와 interneukin-4, neuropeptide-like protein, lipocalin 등 의학 관련 중요 단백질 유전자 등이다 (Table 3-4-6). 이 유전자들은 산업적 활용 가치가 막대할 것으로 예상된다.



Table 3-4-1. PCR primers used for the 6kb fragment amplification.

| PRIMER 이름 | SEQUENCE | TARGET GENE | PRODUCT LENGTH |
|---|---|---|---|
| COILF | 5'- CGC AAT AAT AGC AAT CGG GCT CCT AGG AT -3' | COI~ND3 ~ND4 | 6527bp |
| ND4LF | 5'- GTA GCG GGT TCA ATG ATT TTG GCT G -3' | | |
| O CO1LF1 | 5'- GAC TAT AAT CAT TGC GGT ACC CAC AGG AG-3 | CO~ND3 ~ND4 | 6414bp |
| O ND4LF1 | 5'- GAT TTT GGC TGG GGT TTT ACT TAA GTT AG -3' | | |

Table 3-4-2. PCR primers used for the 9kb fragment amplification.

| PRIMER 이름 | SEQUENCE | TARGET GENE | PRODUCT LENGTH |
|---|---|---|---|
| O CO1LR | 5'- GCG AAT ACT GCT CCC ATA GAT AAA ACA TAG -3' | COI~Ctrl~ND4 | ≃9.3Kb |
| O ND4LR1 | 5'- TCA AGC GAC AAC AGA TGA AAC CCA C -3' | | |
| O COI5LR2 | 5'- AAG CAT GCG CAG CCA CTA TTA CGT TG -3' | COI~Ctrl~CoB | ≃6.4Kb |
| O CytBF | 5'- ATG TAA GAC TAG CCT TCA ACA GAG TAG -3 | | |
| O COI5LR2 | 5'- AAG CAT GCG CAG CCA CTA TTA CGT TG -3' | COI~Ctrl~16S | ≃4Kb |
| HexaU 16S-R | 5' - AgA TAg AAA CCA ACC Tgg CT - 3' | | |
| O CytBF | 5'- ATG TAA GAC TAG CCT TCA ACA GAG TAG -3 | CoB~ND1~16S | 2384bp |
| HexaU 16S-F | 5' - TAC CTT Agg gAT AAC AgC gT - 3 | | |

Table 3-4-3. PCR primers used for the 3kb fragment amplification.

| PRIMER 이름 | SEQUENCE |
|---|---|
| cybF-605 | 5'-CCC TAg TTA CAC CAg TAC AT- 3' |
| HEXA 16U-635 | 5'-gTT gCA CAA gAT TCg gCg TT-3' |
| cyBF-1500 | 5'- ggC gTA Cga TTA gTT TCT gC-3' |

Table 3-4-4. Some of ESTs of the antarctic sea urchin, *Sterechinus neumayeri*

| | Sequence ID | Gene name | Protein size | Function | Full or Partial |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | ORCD02U.Contig103 14-A01 | Probable antibacterial peptide polyprotein precursor. | 678 | Has antibacterial activity in vitro | 5'lack |
| 2 | ORCD02U.Contig104 14-A10 | hypothetical RNA-binding region RNP-1 (RNA recognition motif) | 233 | | 3'lack |
| 3 | ORCD02U.Contig128/203 , 18-C11/ 09-B10, 05-C03 18-H10,17-H08 | Calponin | 187 | An actin binding protein that inhibits actomyosin ATPase activity in vitro | full |
| 4 | ORCD02U.Contig182 03-F11, 05-E08 | Cyclophilin A. | 164 | A cellular protein | full |
| 5 | ORCD02U.Contig29/69,0 4-G07/ 10-C12 | Metallothionein(MT) | 64 | metabolise and regulate metals | full |
| 6 | ORCD02U.Contig3 01-B08 | Caspase 3. | 316 | asparate-specific cysteinyl proteases | 5'lack |
| 7 | ORCD02U_01-C09 | Soluble epoxide hydrolase(EC 3.3.2.3) | 555 | detoxifications of xenobiotic epoxides | 5',3'lac k |
| 8 | ORCD02U_01-G03 | Cystatin | 98 | an inhibitor of the elastin-degrading cysteine proteases | full |
| 9 | ORCD02U_02-A07 | Exogastrula-inducing polypeptide precursor (EGIP) | 325 | Factors effective to extrude the archenteron toward outside of embryos. | availabl e full |
| 10 | ORCD02U_05-F08 | D-dopachrome tautomerase (EC 5.3.3.-) (Phenylpyruvate tautomerase II). | 117 | a homologue of macrophage migration inhibitory factor | full |
| 11 | ORCD02U_06-F01 | Nucleolin | 667 | A nucleolar protein, which function as a shuttle protein | full |
| 12 | ORCD02U_08-E01 | Dehydrin-cognate | 216 | Highly abundant in desiccation-tolerant seed embryos | full |
| 13 | ORCD02U_09-B11 | Deafness dystonia protein | 90 | mitochondrial protein-import systme | full |
| 14 | ORCD02U_09-G12 | Profilin | 139 | Promotes actin assembly on the barbed ends | full |
| 15 | ORCD02U_09-H03 | SPARC precursor | 291 | Appears to regulate cell growth through interactions with the extracellular matrix and cytokines | full |
| 16 | ORCD02U_11-B12 | Prohibitin protein Wph | 273 | Regulate cell survival and growth | 3'lack |
| 17 | ORCD02U_11-G10 | MAGO protein | 146 | potential signal transduction protein | full |
| 18 | ORCD02U_12-A06 | Catalase(EC1.11.1.6). | 505 | conversion of hydrogen peroxide into water and oxygen. | 3'lack |
| 19 | ORCD02U_12-C05 | Arylsulfatase | 551 | hydrolysis of 4-sulfate groups | 5',3' lack |
| 20 | ORCD02U_12-E01 | TCTP/HRF | 172 | Be associated with histamine secretion from RBL-2H3 | full |



| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | cells. | |
| 21 | ORCD02U_13-D02 | Carbonyl reductase | 276 | A cytosolic, monomeric, NADPH-dependent oxidoreductase | availabl e full |
| 22 | ORCD02U_14-H06 | Putative tumor suppressor | 214 | tumor suppressor | 5'lack |
| 23 | ORCD02U_17-B02 | Beta-thymosin | 42 | Polypeptides that bind monomeric actin | full |
| 24 | ORCD02U_17-B06 | Ferritin GF1 | 171 | ferric iron binding | full |

Table 3-4-5. Some of ESTs of the arctic sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*

| | Sequence ID | Gene name | Protein size | Function | Full or Partial |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | ESDro04.Contig111/187/21 07-D11 /12-E03 / 22-A04 | Aqualysin I precursor(EC3.4.21.-) | 513 | Unique precursor structure of an extracellular protease | 3'lack |
| 2 | ESdro04.Contig125 /582/650 08-D09 / 14-G06,05-G08 | Calmodulin | 149 | a calcium transducer | full |
| 3 | ESdro04.Contig152 /2 10-C02 / 04-A12 | Putative secreted serine protease | 537 | Putative secreted serine protease | 5'lack |
| 4 | ESdro04.Contig291 23-A02 | 15kDa selenoprotein SeP15 | 153 | protein that contain the essential trace element selenium. | 5'lack |
| 5 | ESdro04.Contig33 03-D01 | Aquaporin 8 | 261 | a water channel | 5'lack |
| 6 | ESdro04.Contig350/639 18-D07/ 11-A12, 03-F05 | Major autolysin | 272 | An enzyme, that is capable of destorying the cells or tissues | 5'lack |
| 7 | ESdro04.Contig356 / 580/602, 18-G02 / 05-E05, 07-G04 | Beta1,3-glucanase | 499 | glycosyl hydrolase family | 5'lack |
| 8 | ESdro04.Contig410 / 655 / 662 22-F03/ 16-F07,13-C07 | Intestinal fatty acid-binding protein | 132 | obtain fatty acids from phospholipid memebranes | full |
| 9 | ESdro04.Contig422 14-G08, 03-E03 | Extracellular serine proteinase precursor (EC 3.4.21.-). | 408 | a protease capable of cleaving pepsin A and human coagulation factor | 5',3'lack |
| 10 | ESdro04.Contig463 16-F04,08-C02 | Galectin-14 | 162 | carbohydrate binding proteins. Involved in a cell-cell recognition | 5'lack |
| 11 | ESdro04.Contig472/638, 19-A06, 09-A04/ 19-H03,01-G05 | Retinol-binding protein II, cellular(CRBP-II). | 133 | intracellular transport of retinol | full |
| 12 | ESdro04.Contig48 04-A10 | Cysteine proteinase | 338 | an enzyme that destroys proteins by hydrolysis | 5',3'lack |
| 13 | ESdro04.Contig490 10-E11, 10-G07 | Extracellular alkaline serine protease2. | 629 | an enzyme that destroys proteins by hydrolysis | 5',3'lack |
| 14 | ESdro04.Contig505/665/668 13-A05, 12-D04 / 06-A03 | Ferritin | 172 | a protein that stores iron in the body | full |
| 15 | ESdro04.Contig506 12-E08, 13-C04 | Caveolin-1 | 177 | regulates neurotrophin signaling pathways | full |
| 16 | ESdro04.Contig532 24-E05, 15-F03 | Ly-6/neurotoxin-like protein 1 precursor(GC26). | 116 | a protein that causes damage to nerves or nerve tissue. | full |
| 17 | ESdro04.Contig560 22-C03, 18-D10 | Fructose 1,6 bisphosphate aldolase | 363 | an enzyme that is involved in the breakdown of fructose | 5'lack |
| 18 | ESdro04.Contig576 17-F01,04-D11,05-E01 | 6-4 photolyase | 519 | Repairs Uvlight-induced cyclobutane-type pyrimidine dimers in DNA | 5'lack |
| 19 | ESdro04.Contig592 14-F05, 20-H05, 08-F12 | Carboxypeptidase B(EC 3.4.17.2) | 303 | catalyze hydrolysis of the basic amino acids lysine, arginine and ortnithine | 5'lack |
| 20 | ESdro04.Contig661 18-C01,14-F07,07-H06,07-G06 | Reverse transcriptase-like protein(Fragment) | 315 | DNA polymerase that uses RNA as its template | full |
| 21 | ESdro04_01-H09 | Superoxide dismutase[Cu-Zn](EC 1.15.1.1) | 151 | catalyzes the reduction of superoxide anions to hydrogen peroxide. | 5'lack |
| 22 | ESdro04_04-H07 | Triglyceride lipase(EC3.1.1.3). | 470 | The enzyme that catalyzes the hydrolysis of triglycerides in the fat cells of adipose tissue | 5'lack |
| 23 | ESdro04_08-H03 | Basic salivary proline-rich protein 1 precursor | 392 | to bind to plant polyphenols(tannins)and the binding is a hydrophobic stacking | 5',3'lack |
| 24 | ESdro04_11-G12 | Defender against cell death1(DAD-1). | 113 | defending a cell death | full |
| 25 | ESdro04_11-H07 | Selenoprotein W1 | 86 | selenium binding | full |
| 26 | ESdro04_12-H11 | Salivary gland growth factor-2 | 506 | salivary gland growth | 3'lack |
| 27 | ESdro04_13-G08 | Related to cofilin | 154 | a potent regulator of actin filament dynamics | full |
| 28 | ESdro04_13-H04 | Metallothionein-A(MTA) | 64 | metal ion binding | full |
| 29 | ESdro04_18-E10 | D-2-hydroxy-acid dehydrogenase-like(Fragment) | 113 | hydroxyacid dehydrogenase | 5'lack |
| 30 | ESdro04_21-D07 | Mitochondrial processing peptidase beta subunit, (Beta-MPP) | 489 | Cleaves presequences(transit peptides)from mitochondrial protein precursors | 5',3'lack |
| 31 | ESdro04_21-D08 | Epididymis-specific alpha-mannosidase precursor | 1009 | Can digest both p-nitro-phenyl-alpha-D-mannoside and high mannose oligosaccharide | 5'lack |
| 32 | ESdro04_22-G12 | Deafness dystonia protein | 90 | may play a role in mitochondrial protein-import systm | full |

Table 3-4-6. Some of ESTs of an antarctic hexapod, *Cryptopygus antarcticus*

| | Sequence ID | Gene name | Protein size | Function | Full or Partial |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | ORCD02_02-B04 | Dehydrin COR15. | 137 | cold tolerance | 5'-3' lack |
| 2 | ORCD02_02-B05 | delta-9 desaturase | 367 | lipid desaturation | 5'lack |
| 3 | ORCD02_02-C01 | Alpha-crystallin cognate protein 25. | 185 | lens, DNA, membrane, peptide binding | full |
| 4 | ORCD02_02-D03 | Death-associated protein | 102 | tumor necrosis factor | full |
| 5 | ORCD02_02-D11 | CG4362-PA (LP24064p) | 233 | inflamation network protein | full |
| 6 | ORCD02_02-F09 | nuclear DNA- binding protein | 141 | transcription activation | full |
| 7 | ORCD02_02-F10,05-C08, 13-E03 | mannan endo1,4 beta mannosidase | 367 | mannan hydrolysis | 3'lack |
| 8 | ORCD02_02-F11, 06-F11, 14-B01 | Glutathione S-transferase | 216 | glutathione S-transfer | full |
| 9 | ORCD02_02-G11, 10-F07 | Endo-glucanase RCE2 | 360 | glucanase | 5'lack |
| 10 | ORCD02_03-F02, 07-H08, 09-D06 | Neuropeptide-like protein | 78 | salivary gland protein antibacterial? Q6B8G6 | full |
| 11 | ORCD02_03-F07 | Neuropeptide-like protein 31 | 75 | antibacterial? O44662 | full |
| 12 | ORCD02_03-H08 | Nucleic acid- associated protein36 | 346 | nucleic acid binding | 3'lack |
| 13 | ORCD02_04-A11 | Proteosome subunit, alpha type5 | 241 | protein hydrolysis | 3'lack |
| 14 | ORCD02_04-E10 | Trypsin I (EC 3.4.21.4). | 237 | serine protease (P00765) | 3'lack |
| 15 | ORCD02_05-B09 | retinoic acid/retinol binding protein. | 136 | retinol binding | 5'lack |
| 16 | ORCD02_05-F09 | Interleukin-4 | 102 | cytokine | full |
| 17 | ORCD02_06-A02 | Trypsin | 245 | proteinase (Q6R671) | full |
| 18 | ORCD02_06-C08 | Ubiquitin-conjugating enzyme | 147 | ubiquitin-proteinase | full |
| 19 | ORCD02_06-H11 | SD12036p, lipocalin | 142 | hydrophobic molecule bind, immune response | full |
| 20 | ORCD02_07-D09 | Peroxiredoxin V protein. | 188 | redox protein | full |
| 21 | ORCD02_07-F06 | Delta-5 fatty acid desaturase. | 439 | lipid desaturation | 3'lack |
| 22 | ORCD02_08-D10 | Cyclophilin A. | 164 | neural development | full |
| 23 | ORCD02_09-C01 | Selenoprotein W1. | 86 | selenium containing | full |
| 24 | ORCD02_10-D01 | tumor protein | 172 | tumor related | 3'lack |
| 25 | ORCD02_11-B05 | Split hand/foot deleted gene 1. | 70 | developmental defect | full |
| 26 | ORCD02_11-B12 | Cystatin | 98 | cystein protease inhibition | full |
| 27 | ORCD02_12-D10, 16-D04, 23-G12 | Laminarinase | 276 | laminarine hydrolysis | full |
| 28 | ORCD02_12-E05 | Ficolin4 | 341 | defensin, immune response | 5'lack |
| 29 | ORCD02_13-A07 | Defender against cell death | 112 | apoptosis regulation | full |



| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (DAD-1). | | | |
| 30 | ORCD02_14-B08 | Lethal(2) | 187 | essential for life(P82147) | 5'lack |
| 31 | ORCD02_16-F12 | Iron-sulfur cluster scaffold protein Nfu | 254 | Iron-sulfur binding | 3'lack |
| 32 | ORCD02_21-G02 | Excretory/secretory mucin MUC-4. | 191 | RNA binding | 3'lack |

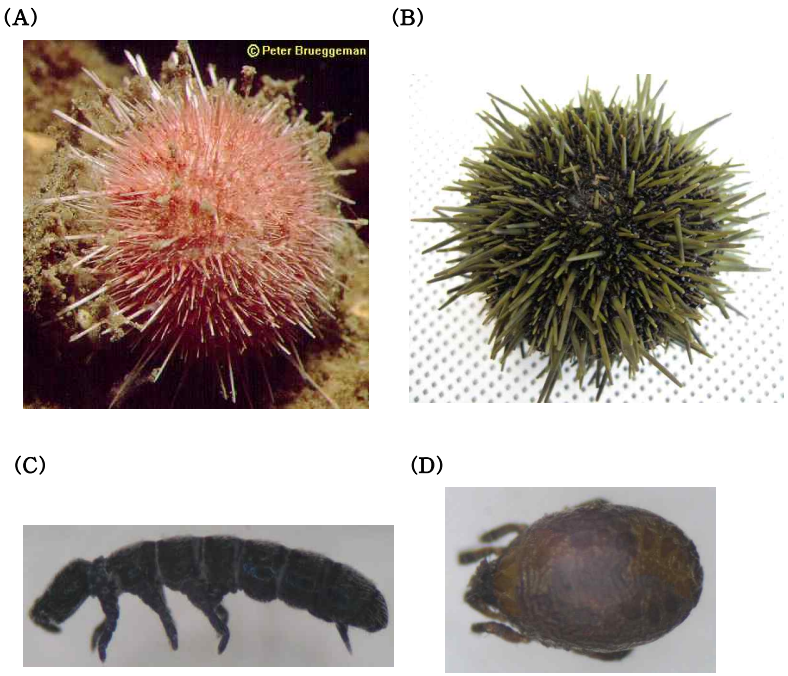



Figure 3-4-1 Organisms studied in this study: (A) Antarctic sea urchin, *Sterechinus neumayeri*; (B) Arctic sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*; (C) Antarctic hexapod, *Cryptopygus antarcticus*; (D) Antarctic acari



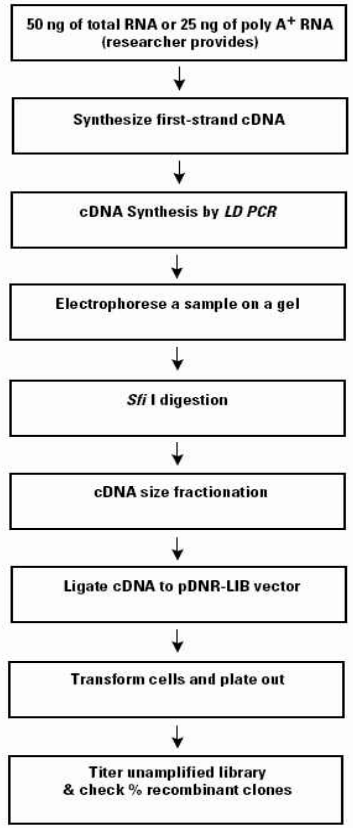



Figure 3-4-2. The flow chart for construction of cDNA library by using Clontech's Creator SMART cDNA Library Construction Kit

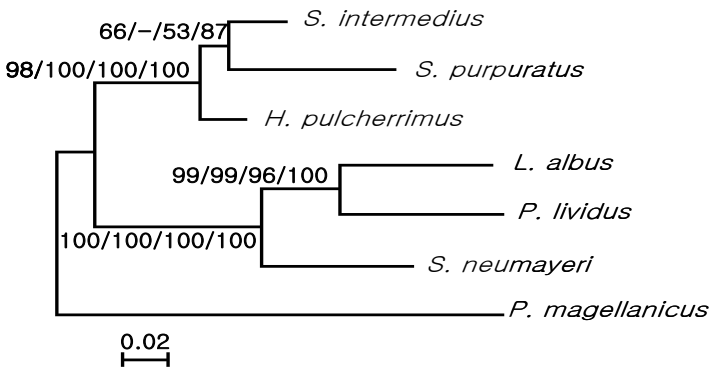
```
                                                                          75
Sn TGTTATACTTAGACGTAAACAACCT-AAGCACCAGAGAACTACGAACCTAAAGTTTAAAACTCAAAGGACTTGGC
La .A...........T...........A.GC..............................................
Pl .AC......................-.................A...TA..........................
Si .............A..G........T.................................................
Sp .............A..GT.AC..-----------------------.........C....T........T.....
Hp .............A..G........T.................................................
Pm ???........CG-........A..A.GC-.........T.....G..A....C.....................
                                                                         150
Sn GGTTTTCCAAACCTCCCTGGAGGAGCTTGCCATTGAATCGATAATCCACGAAATACCTCACCAGCTTTTGTATA-
La ........................................................................AT-
Pl .........T............-..............................C.........A........A--
Si ..........................C.................C..................A........AT-
Sp ......................-..T..................C......TCC.........AT.......AC-
Hp .................................C..........C........C.........A........AC-
Pm ...........T..T...................A............................CTCC.....ATA
                                                                         225
Sn ATCAGCTTGTATACCATCGTCGTAAGTCTACTTCTCAAGAAAGTTGACCCCAAGGAAATATTCCTAGACGTCAGA
La T..................................TG...........A.........A.....CC.........
Pl ...................................T..........G.T..T...G..A.....C..........
Si .A....................C............TG...........TTA....G.GA.C-.............
Sp .C.................................TG...........TTT....G.GA.C-...G.........
Hp .A.................................TG...........TTT...AG.GA.C-.............
Pm .A................................C.G...........TTT.....GGACC-..C..........
                                                                         300
Sn TCAAGGTGCAGCATATGGGCTGGGGATAGGTGAGCTACAATGTTTGAATAAACCAGC--AAAAATAGAAATGAAA
La .................AA.....A.....................T.A.......T--G....C..........
Pl .............C..AA......A..GA................TT.ACG......--G...............
Si ............C...AA.T....A.......................C.......T-G...G.AG.-G......
Sp ............C...AA.T............................C.......TTGG..GGAG.-G......
Hp ............C...AA.T....A.......................C.......T-G...G.AG.-.......
Pm ............CA....AGC..CA..C...............C...TA..G....T-GG..GTAG.-.......
                                                                         375
Sn -AACTCTCTAGAAGTTGGATTCAGCAGTAAGCCCCAAATAGATAGTGGGGCTGAAAAGAGCTCTGGAATGCGTAC
La -..T..C......A..........T........T........A.A..A...........................
Pl C..T...T..................................A.A..............................
Si -T..C.CTCG...A......................TTA...G.A..............................
Sp -T..C.CTCG...T...............G....-.CTA...G.A..............................
Hp -T.TC.CTC....A............A.........T.A...A.A...A..........................
Pm -...CT.GCC...A..........T....GTG...C..A...A.AA.A.CAC.......................
                                                                         450
Sn ACATCGCCCGTCACTCTCGCCTAGCTTGTC--TAAGTAAGGGGAGAAAAGTCGTAACACAATAGGCACACCGGAA
La ...........................AA.-TC....G............................G........
Pl ...........................AA.-T...........................................
Si ........................T.AAGA-T..C.C......................................
Sp ........................T.AAGA-T..CAC.........C...........................-
Hp ........................T.AAGA-T..CAC......................................
Pm ...........................ACAAT....C.............................T........
                                                                         525
Sn GGTGTGCCTGGAAAATGCCCCTATAGTTGAATAACAAC-AAGAGCTTTTCACGCTCT-AAGTTTGAGTTAAAATC
La .-.............................CT.....-..................-.............-...
Pl .-----............T............CT.....-..................-.................
Si ...........-.....-.............-T.....-..................-.................
Sp -------.GC.....................AC.....C..................T.................
Hp ...............................AC.....-..................-.G............G..
Pm ....A.......G..................AC.....-G.................-..............G..
                                                                         600
Sn TCAATAGGAGCTTAGAA--GCCTTGAAAGCCCAATAGTAAGAGCGCCTGGTCTTGTAAACCAGGAGAGAGAGGGT
La .......A-...-GA..--..-....-...T.-....AC........GA...........TT........--...
Pl .......A....A.C..--A.......G..T.......T........AA...........TT........--...
Si ............--A.T--...........T.-.C.A.T......TT................-......--...
Sp ............-TA.G--...........T...C.ACT.....-TT.......................--...
Hp ...........C-.A.G--...........T...C.ACT......T........................--...
Pm ............G...GAG..T.....G..T...A...T......T............T....A......--...
```

Figure 3-4-3. 12SrDNA-tRNA(gln) sequences of *S. neumayeri*

```
                                                                         675
Sn TAAATCCCCTC-TCAAGGCTTCTACAGTCTCGCATCAGGACTTATCCCC-TCTCTCCTG--TCGTCGGTCGGGTG
La ....A..-...-...--....TAGT.T....A.....C...........-......TGT---.....A.....CA
Pl ....GT.....-.........T-TGTA.T..C.....CA..A.G.....C........CGTC...........C.
Si ....CT.-...T.........T-.G...T..-...T.C....C-.A...-.T.T.T..T---T..-........T
Sp -...CT.....-........A--.G.A..C.-.....CAG..CCCA...C........T---.....T......T
Hp ....CT.....-.........T-.G.A.T..C.....CA...C-.G...C........T---.....T......T
Pm ....C......-........C.-........C.....CT...CC.....-......TGCGTCGA...---.....
                                                                         750
Sn TTCC-AGTATTATCTCTTTTGCATAT-GGGGGGGGGGGGGGGGGGGTCTTCTTTATGT-ATGTTTA---------
La ....-..-....C..T...GCT....T.................-------.C.TCT.T..T.A..TTTA-----
Pl ..T.-T......C..T....-.T...-...................GGGGGGG-..T.-..A....---------
Si .C.TGG......C......-......-.................----------.CTCT.-AA...---------
Sp .CT.-G......C.............-...................G-------.CTCT.-AA.A.---------
Hp ...T-G......C.......-.....-...................A-------..TCT.-AA...---------
Pm A.T.TG......C..T.....TT...T...................G--.G..CCGTCG.-AA...TTTTAACAG
                                                                         825
Sn TATATAACACACG-TAAAACAGGGGATAGTTTTAATAAAAAACAACAGCTTTGGGAGTTGTAGATGTAGGTGAAA
La .......T..G.ATGTTGC..A..A...........G....CA-....................C...A......
Pl .............--TT.C..AA.A.......-..G.....CA-....................C...A......
Si .......T.A..AA.CT.T....A........-........C.-G...............C.A.....A...TG.
Sp .......TGA.GAACC--T....A..A.....-..........CG...............C.A-....A.-.T..
Hp .......T.A.TAA.CT.T..A.A........-........C.-G...............C.A.....A...T..
Pm ......TATA.A.A-.TGT..A.A.G......-...GT....T...................A.C...A...CG.
                                                 877
Sn ACCTTACTTCCTTGAA-TTAAAGAGGTGGGAATTGAACCCACAACAAGGAAG
La C.........T.....T.A.GG-..A................G.........
Pl ..........T.....T.A.GG-..A..........................
Si G.....T.CT......T...GG...A....G.............T..A....
Sp G.....T.CT......T....G...-....G.A..G.....AGCAG.A....
Hp G.....T.CT.....-T....G.........................A....
Pm GT.....CCTG.....T.A.GG-..AC...GC.........A.C...?????
```

Figure 3-4-3. (continued)

(1)




(2)

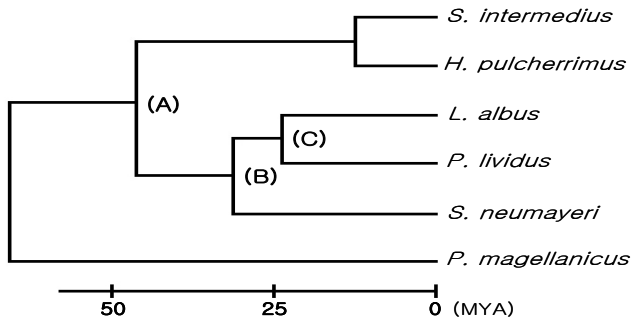



Figure 3-4-4. The maximum likelihood (ML) tree (1) and the molecular clock-enforced tree (2) of the 12SrDNA-tRNA(gln) sequences from the Antarctic (*S. neumayeri*), the South American (*L. albus and P. magellanicus*), the Mediterranean (*P. lividus*) and three strongylocentrotid sea urchins. The phylogeny is reconstructed by PAUP* program (version 4.0b10; Swofford, 1998). The branch support values are from ML, MP, and ME (LogDet distances) bootstrap analyses with 1000 repetitions and from BI credibility values. The scale bar represents the divergence time calibrated by the use of separation between Strongylocentrotidae and Parechinidae as the reference time point (35-50 MYA; Smith, 1988).



(A)

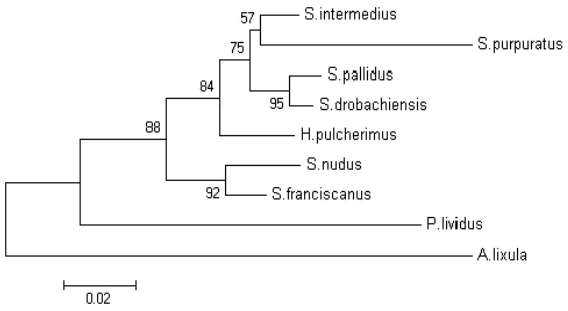
```
TCTACAAACCACAAGGACATTGGAACACTTTATTTGATTTTTGGAGCCTGAGCTGGCATG
GTAGGCACAGCTATGAGTGTGATTATCCGTGCCGAATTGGCACAGCCTGGTTCTCTACTA
AAAGACGATCAGATATACAAAGTGGTCGTTACCGCACATGCGCTAGTCATGATTTTCTTC
ATGGTAATGCCAATAATGATTGGTGGATTTGGGAATTGACTCATTCCACTGATGATCGGT
GCACCAGATATGGCCTTCCCCCGTATGAAAAATATGAGCTTTTGACTTATTCCTCCTTCC
TTTATATTACTTTTAGCCTCTGCAGGAGTAGAAAGGGGAGCAGGTACTGGCTGAACTATT
TACCCCCCTCTCTCTAGTAAAATAGCACACGCCGGAGGGTCCGTTGATTTAGCGATCTTC
TCCCTACACCTTGCCGGTGCCTCTTCTATCTTGGCCTCAATTAAATTTATAACAACAATT
ATTAATATGCGGACACCAGGAATGTCTTTTGATCGTCTTCCTTTATTTGTCTGGGCCGCC
TTTGTTACCGCGTTCTTACTGCTCCTTTCTCTCCCAGTCTTAGCAGGAGCAATCACAATG
CTTCTTACAGACCGTAAAATAAATACAACTTTCTTCGATCCAGCAGGGGGAGGTGACCCA
ATTCTATTTCAACACTTATTCTGATTTTCTGGTCACCCAGAAGTATACATTCTCATCTTG
CCGGGATTTGGTATGATCTCACACGTTATAGCTCACTACTCTGGTAAGCGGGAGCCTTTT
GGGTACCTGGGAATGGTTTACGCCATGATTGCAATTGGGGTTTTGGGATTCCTTGTCTGA
GCCCACCATATGTTTACAGTAGGAATGGATGTTGATACACGAGCATACTTCACTGCCGCC
ACGATGATCATTGCTGTTCCAACAGGAATTAAGGTTTTCAGATGAATGGCAACGCTCCAA
GGGTCTAATCTACAATGGGAAACTCCCTTACTATGGGCCTTAGGATTTGTTTTTTTATTC
ACGTTAGGAGGACTCACAGGTATTGTTCTTGCCAATTCCTCCATTGACGTTGTTCTTCAT
GATACCTACTACGTAGTGGCTCACTTTCACTACGTTCTTTCAATGG
```

(B)

```
AAACCAGGATTAGATACCCTGTTATACTTAGAAGTGAACAACCTTAAGCACCAGAGAACT
ACGAACCTAAAGTTTAAAACTCAAAGGACTTGGCGGTTTTCCAAACCTCCCTGGAGGAGC
TTGCCATTGAATCGATAACCCACGAAACACCTCACCAACTTTTGTAACAACAGCTTGTAT
ACCATCGTCGTAAGTCTACTTCTTGAGAAAGTTGACTTTAAGGGAGAGCCTTAGACGTCA
GATCAAGGTGCAGCCTATAGGTTGGGAATAGGTGAGCTACAATGTTTGAACAAACCAGTG
AAAGAAGGGATGAAATACCCCTCGGAAATTGGATTCAGCAGTAAGCCCCATTAAGAAAAT
GGGGCTGAAAAGAGCTCTGGAATGCGTACACATCGCCCGTCACTCTCGCCTAGTTAAGAT
TACGCAAGGGGAGAAAAGTCGTAACACAATAGGCACACCGGAAGGTGTGCCTGGGAAAAT
GCCCCTATAGTTGAAACACAACAAGAGCTTTTCACGCTCTAAGTTTGAGTTAAAGTCTCA
ATAGGAGCTAAAGGCCTTGAAAGCTCAACAAATAGAGCGTTTGGTCTTGTAACCAGGAGA
GAGGGTTAAACTCCCTCTCAAGGCTTTAGAGTCTCCCATCACAGCTTCCTACCCCTCTCT
CCTTCGTCGTTCGGGTTCCCTGGTATTACCTCTTTTGCATATGGGGGGGGGGGGGGGGGA
CTCTAAATTATATATAATAAACGATCTATCAAGGGATAGTTTAATAAAAAACCGCAGCTT
TGGGAGTTGCAAATGTAAGTGTGAACCTTATTCTCTTGAACTTAAGGAGATGGGGATTGA
ACCCACAACAAAGAAGTCAAAGCTCCTCGTTTTTCC
```

Figure 3-4-5. COI (A) and 12SrDNA-tRNA(gln) (B) sequences of *S. droebachiensis*

(A)




(B)

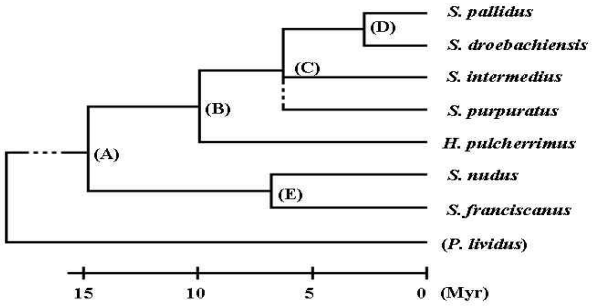
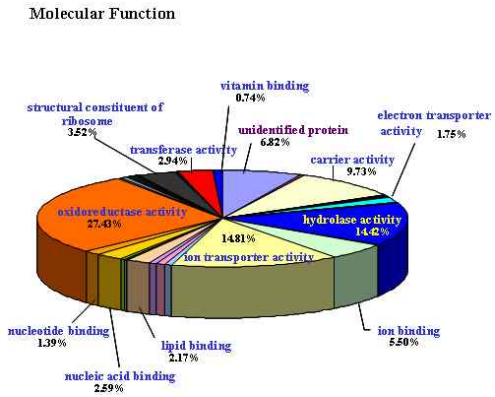



Figure 3-4-6. Molecular phylogenies of the Arctic and other related sea urchins: (A) A minimum evolutionary tree of 12SrDNA; (B) A molecular clock-enforced tree among the species showing their divergence times.



(A)




(B)

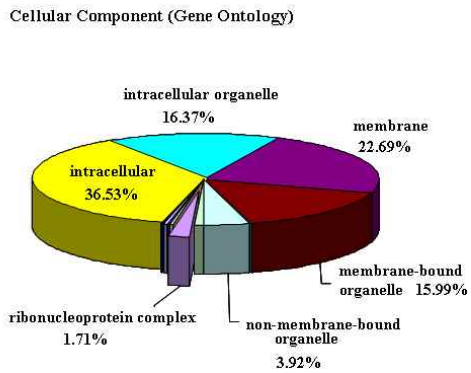



Figure 3-4-7. Composition of the Arctic sea urchin ESTs with regards to their molecular functions (A) and their cellular localizations (B)

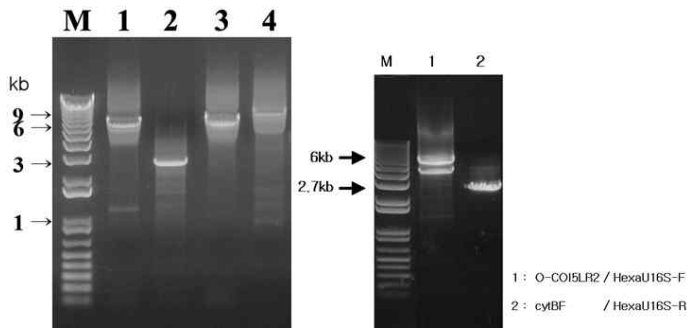



Figure 3-4-8. Long-range PCR products of the antarctic hexapod, *Cryptopygus antarcticus*: lane 1 and 3, O-COILF~O-ND4LF; lane 2 and 4, O-COILR~ O-ND4LR. (HexaU16S-F and HexaU16S-R primers are reversed)



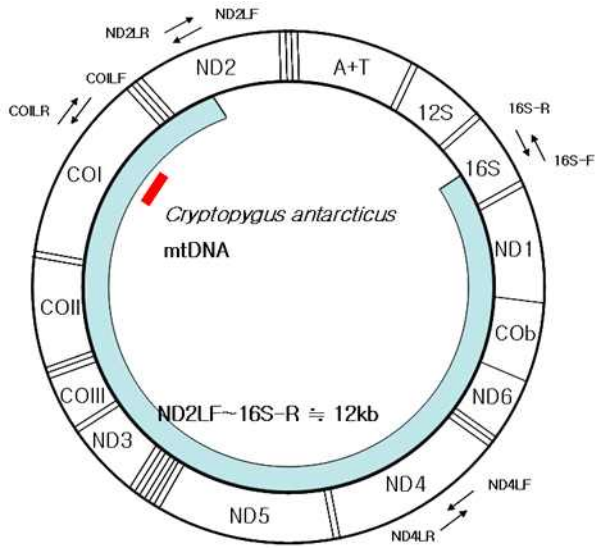



Figure 3-4-9. A putative gene arrangement in the mitochondrial genome of *Cryptopygus antarcticus*. (the directions of 16S primers are reversed.)

60

AATTACTATCTAATCTATTCACTAATCTCTACATCATTAATTGTACCTTTTTATCTAATA
AATATAAATAGATTCACCGAAATCTCTAAAAAATTTAGAAAAAAAATTTTTAAACTTAGA
CTAATTTTTAGTGTTATATCACTAGGAGGACTCCCTCCTTTATTAGGATTTTCGGCCAAA
TTCTTAGCAATTAAATTGAGATTATATTTTTTCCCCATTTACGTTATTTTAGTTTTAATT
TTGTCGTCCTTAATTTCTTTATTTTATTATTTTAAAATAATTTATAGAAGACTATTTCTA
AATACATATGACTTTAAAATAATTAAACCAAAAAACTTTATACTAGTAAATATTTTTCTT
TATATCTCAATAGCCGGTAATCTAATTATCCCTTATGTAGTTTTATTAACTTAAAATTTT
AAGTTAATAAAACTAAAAGCCTTCAAAGCTTAAATTAAGAGTTTAACCCCTTAAATTTTA
AGTCTTAGGTTGTACCACTTTAAGATCTGCAATCAAATTTCATAATTTTGAATATAAGAC
CTAAGTATACTGGAAATAAAATTTTAACAAGAGAGGAAACCTCGTAATTAAATTTACAGT
TTAAGGCCTAAAATCAGCCACCTTGCTTTAATGAATCGTTGACTTTATTCAACAAATCAC
AAAGACATCGGAACTATGTATCTCATTTTTGGTGTTTGATCGGCCATAGTAGGAACAGCA
TTTAGAATATTAATCCGCTTAGAGTTAGGACAACCTGGGTCATTTATTGGGGACGACCAA
ATTTACAACGTAATAGTGGCTGCGCATGCTTTCGTAATAATTTTCTTCATAGTTATGCCA
ATTATAATTGGAGGGTTTGGTAATTGACTAATCCCTTTAATAATTGGAGCCCCCGATATA
GCTTTCCCCGAATAAATAATATAAGTTTTTGACTTCTACCCCCRTCTCTTATTTTACTAC
TATCAGGAGGRTTAGTTGAAAGAGGAGCCGGGACTGGGTGGACAGTTTAYCCCCCTCTTT
CTGCCGGTATTGCTCACGCTGGGGCRTCAGTAGATCTTTCAATTTTTAGTCTACATCTAG
CCGGGGCGTCTTCAATTCTAGGTGCCGTAAATTTTATTACTACWATTATTAACATACGTT
CGTCKGGTATAACATGAGAYCGCACACCATTAYTTGTATGGTCTGTATTTTTAACCGCAA
TTTTACTTTTACTTTCTCTCCCAGTATTAGCAGGGGCTRTTACCATACTTCTCACCGATC
GTAACTTAAATACATCTTTTTTCGACCCCGCAGGAGGGGGTGACCCTATTTTGTACCAAC
ATTTATTTTGATTTTTTGGGCACCCAGAAGTTTATATTCTAATTTTACCAGGATTTGGRA
TRGTGTCGCACATCATTACTTTCGAAAGAGGTAAAAAACAAACATTTGGTCAATTAGGAA
TGATTTATGCAATAATAGCAATTGGACTTCTAGGATTTATTGTATGAGCCCATCATATAT
TTACAGTAGGAATAGATGTAGATACACGAGCTTACTTTACAGCCGCGACTATAATCATTG
CGGTACCCACAGGAGTAAAAATTTTTAGATGGGTAGCTACTTTACAAGGTAGTGCCTTAG
TTATAACACCAGCTTTAATATGAGCCATAGGATTTGTTTTCTTATTCACAGTAGGAGGAT
TAACAGGAATCATTTTGGCTAATTCATCTATTGATATTGTACTTCATGACACTTATTATG
TAGTAGCCCACTTCCACTATGTTTTATCTATGGGGGCAGTATTCGCTATTATAGGAGGGT
TAATCCACTGGTTTCCTTTATTTACAGGGGTAAATCTAAATCCCAAATGACTTAAAATTC
AATTTATAACAATATTTATTGGGGTTAATATAACCTTTTTCCCCCAACATTTTTTAGGTT
TAAATGGTATACCTCGTCGATACTCCGATTACCCAGATGCATACACTACATGAAATGTTG
TATCCTCATTAGGAAGATACACATCTGTTGTAGCTGTTCTTATATTTAGATTTATTATTT
GAGAGTCTATGACTTCAAGCCGCCCTGCCTTATCTAATTTTATTTATTCTCCGTCTATTG
AATGACTTCAAAACACACCCCCATCAGAACATTCATACTCTGAATTAACTCTAATTTCTA

Figure 3-4-10. Sequences of the mitochondrial genome of *Cryptopygus antarcticus*: about 13kb is determined.



2220

ATTTCTAAAATGGCAGATTAGTGCAATGAGTTTAAGCTTCGTAAATGAATAACTTATTCT
TTTAGAAATCCCCACATGAGCTTCTTTAGGGTTCCAAAACGCAGCTTCTCCTCTTCTAGA
GCAATTAATTTTTTTTTCATGATCACACACTAACTATTTTGATTCTAATAATTACAATTG
TATCTTTTAACTTAGTGTCGACAGTGTTTAACCTAAATATTGATCAATATATAATAGAGT
CCCAAGACTTAGAGTTATTTTGAACTATTGTCCCTAGATTTATTTTAATTTTTATTGGGC
TTCCTTCAATTCGCCTCCTATATTTAATAGATGAAGTATACAAACCTGATATTACTATTA
AAACAATTGGCCACCAATGGTATTGATCATATGAATACTCAGACTTTTGTAATGTAGAAT
TTGATGCTTATATAATCCCAAGAAACGAAATAAACCCAAACATATTTCGCTTACTGGATG
TAGACAATCGCACAGTAATTCCGATAAACTCCCAAATTCGAACTTTAATTTCTGCTGCGG
ATGTTTTACATTCATGGACTGTGCCAAGAATAGGTGTAAAAGCAGATGCTGTCCCGGGAC
GTCTTAACCAAGTAAACTTCTACAGAAACCGACCTGGATTATTTTTTGGCCAATGTTCAG
AAATTTGTGGGGCTAACCATAGATTCATACCAATTGTTATTGAAAGAGTTACTACTAAAA
ATTTTATTTCATGGGTTAAAAAGATAATTTACATTAAATGGCTGAAAGTAAGCGCCGGTC
TCTTAAACCGCAAGATATCACTTTCACACGTGATTTTAATGATAAAAATTAGTTAATACA
TAACATAGTTTTGTCAAAACTAAATAACTTATTAAAGTATTTTTTTATCCCTCAAATAGC
CCCATTAAGATGATTAATTCTATTTTTTATATTTTCTATTTTATTTCTTTTTAGAATAGC
TAAAATATTTTTTTCTAAAATAAATCTTTCATTTACTTATACACCCGCTAATAAAACAGA
AACCAAATCTCTCCTAACCTGAAAATGATAACTAATTTATTTTCGGTTTTTGACCCATCT
TCTTCTTTAAGAATACCTATAAATTGAGTAAGAGCCCTAATCTTTATTTTAGTAGTTATC
CCCACATTTTGGGTAACCCCTACCAAAGCTGCTACTGGGTTAAACACCATGTCAGAAAAA
TTACACTACGAATTTAAGACCCTTTTAGGAAATACATCTTTTCAAGGGAGAACACTTCCT
TTTATTGCCTTATTTATATTTATTTTAATTAATAATTTTATAGGACTATTTCCTTATATC
TTTACAGCATCTAGACATATAATTTTAACACTAACATTAAGAATACCTCTTTGATTAACA
TTCATAATATTTGGGTGAATTAATCAAACAAAGCACATATTTGCCCATTTAGTTCCACAA
AGCACCCCAGGTGCATTAATACCATTTATAGTTTTAATTGAGTCAATTAGAAATGTAATT
CGACCTCTAACTTTGGCAGTTCGTCTTATAGCAAATATAGTTGCCGGACATCTATTAATA
ACTCTATTAGGAAATCAAACTGCGTCTGCCTCAGGAATTATTTTAGCAGGACTTCTAGCA
ACTCAAATCATACTATTAACTCTAGAATCAGCGGTAGCCGTTATTCAATCATACGTATTT
GCCGTTCTTTCAACTTTATATGCTAGAGAAGTAACATCACACTAATGATAATTAAAAGAA
ATCATTCATTCCACCTAGTAGATCAAAGCCCGTGACCTCTTACTGGGGCAACTGCCGCCT
TAACAATAGCTACAGGAATTGTAAAATGATTTCAAGAATTCGACAATAAGCTATTTTTAT
TTGGCTTGTTAATTTTATTAATTACTTGTGTACAATGGTGACGAGACATCAGACGTGAAG
GAGCCTTTCAAGGTCTTCACACATCTATTGTAATAATAGGACTTCGATGAGGTATAATTC
TATTTATTACGTCTGAGATTTTATTTTTTTTTTCATTTTTCTGATCATTTTTCCATAGAA
GACTATCCCCTTCAATAGAAATCGGACTACAATGACCACCCAGAGGAATTTTACCATTTA

(Figure 3-4-10. Continued)

4320

ATCCATTTCAAGTACCTCTTTTAAATACAATTATTCTTCTATCGTCAGGAGTAACAGTTA
CATGAGCCCATCATAGTCTTATAGAAAATAACCACTCTCAAACAACAATAGGCCTACTAA
TAACAGTAATTCTAGGATTTTATTTTACCTCCCTCCAAGCTTTAGAATATTGAGAAGCTT
CTTTTACAATTTCAGACTCAGCATACGGCTCAACATTTTTTATGGCAACTGGGTTTCATG
GTATTCACGTAATCATCGGAACTACATTTTTGCTAGTGTGTCTCACACGTCACATCTCGC
ATCAATTTTCTAAAAACCACCATTTCGGGTTTGAAGCGGCTGCGTGATACTGACATTTTG
TAGATGTGGTATGACTATTTTTATATATAAGAATTTATTGATGAGGGAGATAGAATAAGC
TTTATTTACCCCTAGTAATTATAGTATATTGTATATTTGACTTCCAATCAAAAGGATCCG
GTAGGATAATTATAATTACCACTACTATTATCACATCTCTAGGACTACCCCTAGCTTTAA
TTATATTAAATACAACAATCTCCAAAAAATCTCTCATAGAACGAGAAAAACCGTCAGCAT
TTGAATGCGGGTTTGACCCTAAAAGATCAGCTCGATTAGCATTTTCTCTTCGATTCTATT
TAATCGCAGTAATTTTTTTAATCTTCGACGTTGAAATTACCCTAATTATACCTATCCCAG
TTATTATATTATTAAATAACACTCTAGTAGTAATCAGAATGGCTTGTTTTTTTATATTTA
TTTTAATTACTGGCCTATACCACGAATGAAACCAAGGAGCTCTTGAATGAAAATAGAATT
GTAGTTAAATATAACATCTGGGTTGCATTCAGAAAGTACTATAAAGTCTATTTTTAATAA
GAAGTGAAACATTGCAGTCAGTTTCGGCCTGGAGGTTGGAATTTTATTCCCTTATTTTAA
GAGAAGCCAAATTGTAGGCTTACCACTGTTAATGGTAGATAGGAGACTTACCCTTTTAAT
GAGAAAAGAGGTTCAAATTTAAGCTGCTAACTTATAATTTTAGCGGTTAAACCCCGTTAT
TTTCTTTAGTTATTTTAGTTTAGACAAAACCACACATTTTCAATGTGTAAACGGGACAAA
CCCCTTATAATTTTTGAGTTATTATATCTAAAACTCTGGGATATTTATCTAAAGACAAGA
GTCATCCCCATATCTTCAATATGATGCTCTTTTTGAGCTATTTAAATTAAGGGAGTAAAA
AAACTAGACTAATTAAAATAAAAATTAAGAATAAATAAAATTTAAGATTAGAAATTCTTA
AAATATCTAAACTCAACGCTGAAGACCCTATCTTATTAATTGCCCCCTGACCTCCTGCGT
ATTCCATTCAACCCTGATCAGCGTATTTTAAAATAAAAGACCCCAATTTTAATAATGGTA
TAAATATGATACTAGATAGAAACGGAAGAAACCATATAGAACCTATATAATTAAATAAAA
TTTTACAATTTGAGCCTAACACCGGTGATTTATTTTCCATTACAAAAAAAATCAACCAAG
AAAAAAATATTAATCCCACTAAAATTATAGTTTTTAAAAATATGGGAAGATTAATTAAAT
AAACTGGAAATATATTAACACTTATTCATCCACCTGCAAATAAAGATATTATAAGCAAAA
GGCTTATTGGGCTAATTATACCAACGTGCTCAGCCAAATTTAGTAAACCTCGGGAACCTA
TATTATTAAAAAAAATAAAATATACTAAGCGAACAGAATATGTGAGAGTAAATATAGTAG
CACCAAACACCACTAATAATATAAAAAAATTAGACCCGCCCATAAAAAACAATTCTAAAA
TTATATCCCTTGAGTAAAATCCTGATAAAAAGGGAAACCCACATAAAGCTAAAGAAGCTC
TTATAAAATAAAAGGAAGTAACAGGACAAGAAATATTTAAACACCCTATAAATCGAATAT
CTTGGGTATCCCCTATAGAACGAATATAAACTCCCGCGCATAAAAACAATAGCGATTTAA
ATATAGCATGGGTCATTAAATGAAAAAAGGAAAACTCGTAAAACCCTAGTCTCAATGTTA

(Figure 3-4-10. Continued)



6420

TTATTATTAAACCTAATTGACTAAGGGTGGATAAAGCAATAATTTTTTTTAAGTCGTTTT
CTAAATTAGCCCCAAGGCCAGACATGAATATAGTTAAGACCCCAATACAAAATAAAAATC
TGTTACACCCTATTATATAATTAAATCGAATTAAAAGATACATGCCGGCAGTAACTAACG
TAGAAGAATGAACTAAAGCTGAAACTGGAGTAGGGGCCGCTATAGCTGCTGGGAGCCAAG
CAGAAAAGGGTATTTGGGCTCTTTTAGTTATAGCCGCTAAAACTACTAATCCTATTAATA
TCAAATTTTCGTTTGGGTTAAAAATAAACTGGAAATAATAAAAATTTCATCTTCCGTAAT
TTAATAACCACGCGATCCCTAATAAAATTGCTACGCCTCCGATTCGGTTAGAAAGAATAG
TAATTATACCTGCGTTAGCAGATTTATTATTTTGGTAATAAATAACTAAACAATAAGAAA
CTAACCCTAACCCATCCCAACCTAATAAGATTCTAATTAAGTTGGGGCTAAGAATTAAAA
AAACTATTGATAAAACAAATAAATAAACTAACAAGATAAACCGCACAAAAAATTTATCTC
CCTCTATATAAAAAGTTCTATAGAATATAACCATAGAAGAAATTAATAAAACTAAGCCTA
TAAATATTAAACTCATTCAATCAAAAATTAAAGTTATAATAATAGAAACTGAACCAAAAT
CTATAATTTCTCATTCCACAAATAAAACTTTTGTTATAAAATAGTGGGAATAGCTATAAT
AAATTCTCATAAGACCAAAAACACTAAGTATAAACCCCACATAATATGTAATAGATAAAA
ATAATTTAATTATCAAGAGGATATAACCATCTATAGCTCCACAAACTAAAATTTTAATTT
AAACTACCTAGATTAAAATACTATAAATAAAGAAGGATTTAAAATAATAAAATTTAATGG
AATAATATGAAGAGCTAAAACATGTAATTCTCGGTAATTAGAAGACCCAACTCCGTAACT
AGTAAAATAAATCCTCCCGTGCTGAGAATACGAAAATATAAAAATTGTAAACACCGCCCC
TAAAAAAGATCCAATGGGGAATACTAAGACTATCAATAAATCAAATCTTATAATTCTCCC
CATTAAAAAAATTTCAGCTAAAAGATTTATAGTGGGAGGAGCTGCCATATTAGAAGCTCT
TAATATAAAAATTATTAAACTAAGGGTAGGTATAATTAATAAAAGTCCTTTGTTAATATA
AAAACTTCGTCTACCAAGTCGCTCATAATATATATTAACGATACAAAATAAACCTGATGA
AGAAACACCATGACCGATTATTATAATTAATCTCCCTTCATAACCCCAATTAAATAATGT
TGAACCCCCACAAATTACCATGCCCATATGTGCTACTGAAGAATAAGCAACTAAAGCTTT
AAAATCATTCAAGCGACAACAGATGAAACCCACATAAATTATACCAAAAAGTCTTAATCC
GATAAAATAAGAATTAAAAATTCTGTAATAAAAATAAATAATAGAATAAAATCGTATTAA
CCCATACCCCCCTAACTTAAGTAAAACCCCAGCCAAAATCATTGAACCCGCTACCGGGGC
CTCAACATGAGCCTTAGGTAACCATAAATGTGTAAAATAYATAGGAAGTTTAACTAAAAA
AGCTCTTATTACTATTAAGCAAAAATAAAATTTAAAATTAACTAAATTAGMTGACGTATG
GRTAAATATTAACCCAAATCTCAAATCTGAGTAGCAATAATAAACATAAATAATAGAAAC
CAAAAGAGGTAAAGAGGCTGTTAAAGTATAAAATATAAAATAAACCCCGGCCTGAAGACG
TTCGGGTTGGTAACCCCACCCTATAATAATAAGYAATGTGGGGATAAGAGAGACCTCGAA
AAAAAAATAAAATAAAAGATARTCACCKACGTAAAAAGTAATTAAAAGAACCGTTATAAG
ACCTACTACCAAGAATAAAAATAACCCAACTCTTTCCCTATTTTTTGCAATTTTATAACT
AGAAGAAATTATTAATAAACTAATTCAAATACTTAAAAACACTAATCTTCTTCTTATAGA

(Figure 3-4-10. Continued)

8520

ATCAGAATARGTGTTTAATTCGCCAATATAATAAAACTCTCTGAAATTGAATACACATAA
GATCATTAAAYTAAGTATCAAGCCMCCAACGAAGTATATAATACTCCTAGAGCCCAAAAA
TAACATATAGAAAAGACTAAATAAAGAGTTAAAAATAAAAATAAATATCATTAATAATTA
AAACAAACTAAATCTTTTAAAATAATCACCTCCGTGRGTACGTCTTATTATAACTAAAAT
TGATAATCCTAAAGCCCCCTCGCAAGCAGTAAACGTAATATAAATCAAAGAAAAAAATAT
ATCTAAATTGGTCAATAAGAGTAAAAGTAAAAGATATACACCTAAACTAATAAATTCAAG
ACTCAATAAGACAGAAAGAAGATGTTCACGCTTGGAACAAAAAATTCATAGGCCTGAAGA
AAAAATAAAAAATCTTATTATTATAGAAAGAGAAAAAATAAGTTTATATAGTTTAAAAAA
AACATTAGTTTTGTAAACTAAAATTTGGTGAGCCATAAAAACTTCAAGAATAAACAAATT
TATCTTAAACTTCCAAAGCCCAAATTTTTAACTTAAACTAATTCTTGATATTAAATTAGT
ATTTATCTCGTCAGTTTTTAGTAGTATAATAATTATATCAAGCTCACATCCGGTAGCTAT
CATGGCGTACATTCTCATACAAACAATTATTGTATGTTTAATAGCCTGGCTATTTTTAAA
AACAAGTTAGTTTTCATTTATTTTATTCTTAGTATTTTTAGGGGGGCTTATGGTCCTATT
TATTTATATTACTAGATTAGCGTCTAATGAAATAATTAAATTAAACTTAAATAATATGCT
TATAACCCTTTTTACTACAGTGGGCCTAGTAATAATTGTAATAAAATATTTAAACCACCA
AATAGATCTAAAAATAGATTTACTAAACCAAACCAAAACATTTTTTAATATATATTCTTT
TGAATCTTTAACTATAACCGGGCTAGCTATAATTTATCTTCTTTTAACATTAATCGTAGT
AGTAAAAATTTCTAATAAATTTAATGCCCCTATTAAAAATTTAATTTTTGAGTAAAAATA
AGTTGTAAAACAATTAATAATTAGAAAACCCCCTCAGTATAACATATAATTAATTGTAAT
GATAAGAATACGAAAAACACACCCCCTGATTAAAATTGCTAATAATGCTTTAGTAGACCT
GCCCGCCCCTATTAATATCCCAGCGTGGTGAAATTTCGGGTCAATTTTAGGTTTATGCTT
AGTAACACAAATCCTAACTGGTTTATTTTCAGCTATGCACTACACCGCTGATGTAAGACT
AGCCTTCAACAGAGTAGCCCATATCACCCGTGATGTAAATTACGGGTGACTCCTACGAGT
AATTCATGCTAACAGAGCTTCTTTTTGTCGCCCTATATTTACATGTTGGGCGGGGGATAT
ATTATGCCTCATATATATACACCAATACTTGAATAGTGGGCGTATTAATTTTATTTTTAG
TTATAGCAACTGCGTTCATAGGGTACGTACTTATTTGGGGACAAATATCATTTTGAGCGG
CTACTGTTATTACTAATCTTTTGTCTGCTATTCCTTATTTAGGTAATATGCTAGTACAAT
GAATTTGAGGGGGATTTGCGGTGGATAACGCCACACTAACCCGGTTTTTTACTTTCCATT
TCGTTCTACCTTTTATTATTGCAGGTATAGTTATAGTACACTTACTATTCCTACACCAAA
CGGGGTCTAATAACCCCTTGGGAATTAAATCTAATGTAGATAAAATCCCATTCCACCCAT
ATTTTTCATTTAAGGATCTATTTGGTTTTACTTTAATTATATGATCTTTAATGTCATTAG
CTTTAATTAGACCGTATCTATTAGGAGACACAGAAAATTTCATCCCCGCCAACCCCCTAG
TTACACCAGTACATATTCAACCAGAATGATACTTCTTATTCGCGTATGCTATTTTACGCT
CAATCCCTAATAAACTAGGGGGAGCTGCCGCTCTTGTAGTGTCAATCGCTATTTTATTTA
TTTTACCATTTTCGACTAAATGTAATCTCCAAGGAACACAATTTTACCCTATGAGACAAT

(Figure 3-4-10. Continued)

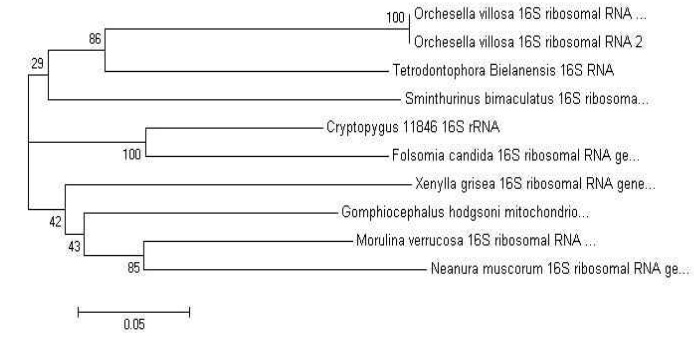


10620

TTATTTTTTGGGCTTTAATTAATATTGTGATTCTTCTTACATGAATCGGGGCACGACCAG
CCGAAGACCCGTATATTTTAGTCGGGCAAATTTTAACAATTGTATACTTTATATATTTTG
CGTTAAACCCCCTTATAATAAATATATGAGACAAGATTAACCGCTAATTAATTAATTAGC
TTAGTGATTAAGCACTTACCTTGAAAGCAAGCTACAAGAGTTTAATTCTCTTATTAATTT
ATCTCCAAAAGGTTGTGATTTAAAGGGTACTTCCCTCCCATATAGTGTATAATTATACAG
TGTTACCCGCACAAGCAACAGTTTAATTCCTAAATTAAACCTGACAATTTTAATAGCAAA
CTAGGTAAAAATAGAAACCAAAAAATTAAATATAATAAAATTTAAAGATACCGGCAAAAA
ACTTTTTCAAGCCAAGTATATTAATTTATCATAACGAAACCGGGGTAAAGTACCCCGAAC
CCAAATAAATCAATAACAAAAAAAAGAGCCTATTAAATTAATTAAAATTAAATTAAAAGA
ACCCCCCATAAATATAACAGAAACCAAATATCTCATAAAAATAATTCTACCATACTCGGC
TAAAAATAAAAAAGCAAACCCTCCTCTTCCATATTCAATATTAAACCCAGAGACTAACTC
AGACTCCTCCTCAGAAAAATCAAATGGCGTACGATTAGTTTCTGCTAAAATAGATCTAAC
CCAACATAAAAAAATTGGAAATAAAATTAAAAAAAACCAAATATAAGTTTGTCCTAATCC
CATCAATATGATTTTATAACCCCCCACTAAGAAAATAACAGATAAAAAAATTAATGCCAT
TCTCACCTCATAAGAAATAGTCTGGGCAACTCCGCGAGTTGCCCCCAGTAGGGCATAATT
TCTATTAGAGGACCAACCTCTCGATATTAATGTATAAACGCCGAATCTTGTGCAACAAAA
AAAAAATAGGCCCCCAAAAATATAGTTAACTAAATTTCTTCTTAAAGGAAAGACAGATCA
AAGAAGAATAACTATAAAAAGAGAAATTACTGGAGAAAAATAATAAGGGATAATATTAGA
AAAAAGGGGGATAGTCTGCTCCTTAATAAATAATTTAATTGCATCCCCGAAAGACTGAAC
TACCCCCACTAATCCCACCTTATTAGGACCCTTACGAATTTGGATATAACCAAGAATTTT
ACGCTCAAATAAAACTATAAAAGCCACTCTAATTAGAACCCCCACCACTAAAATTAGGTA
AGATAAAAATAAGCTAATAATTTCTTTTAACACTGTTAAATGAAAGAAATTTCATATAAA
GATTCTAAATCAATTGCACTAATCTGCCAATTTAACAGATAAAAATTTTAAAATTTAATT
GGTCCTTTCGTACTAAATTATAACCCAAATCTTTAAGATAGAAACCAACCTGGCTCACGC
CGATTTGAACTCAAATCATGTAAAAATTTTATAGTCGAACAGACTATCTAATAGAAAATC
TACCCCCTAAAGAATTTTTAATTCAACATCGAGGTCGCAAACTAAAATGTCGATAAGAAC
TCTTAATTTTAATAACGCTGTTATCCCTAAGGTAGTTTTTTATAAAATTTCAAATTAAAG
TTAATTAATAATATTAAAAAAAAAATAAACAGAAGTTTTTTATATTCTTTCGTTGCTCCAA
CAAAATTTAAATTTAAAAATTAATACTATAACAAATTATAATCGTATAAAATAAATAAAA
CTCTATAGGGTCTTATCGTCTTTAAAGTAAACAGAGCATTTTCACTCTAAATTCAAATTC
ATTAATTAAATTTAAAAAAACTAAACTACGTAAAACCATTCATACAATTCCCTAATTAAG
AGACTAATGATTATGCTACCTTTGCACGGTCATAATACCGCGGCCCTTTATATATACAGT
GGGCAGGCCTTACTTTAAATGAATCCTTAAAGAAATGTTTTTGTTAAACAGACGAAATTT
GTATTGTCGAATTTTTAAAATTAAAATTTTTAATACAAAAAATAAAAAAAAATTAAACTA
CTAATAAAATTATTAAAAAAATTTTTTTGTTGGTAAAAAATTCTAGAATTTAAATTAAAC
AAAAAATAAATTACAAATTAAATTTATTAAATATAACTTTATAAAAAAGGCTGATTTAAA
GCCTATAAGTAAAAAAATAAAATTTTTAATTTTGAATAAAATA (12763)

(Figure 3-4-10. Continued)

(A)




(B)

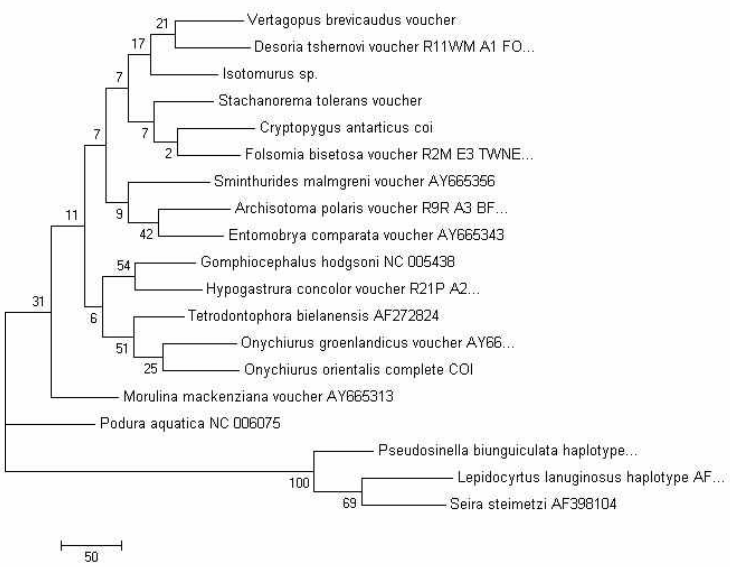



Figure 3-4-11. Phylogenetic trees of the collembola specie, *Cryptopygus antarcticus* based on 518-bp 16SrDNA (A) and 667-bp COI (B) genes.



# 제 5 절 어류 유용유전자 확보

## 1. 연구 재료 및 방법

### 가. 어류 시료 확보

(1) 회유성 어종

참돔은 한국해양연구원에서 선발집단 및 선발에 이용한 시료를 확보하였고, 감성돔은 전남 여수시 소재의 어시장에서 자연산으로 구입하였다.

(2) 정착성 어종

조피볼락과 볼락은 통영시 소재 어시장에서 자연산으로 각각 100개체씩 구입하였다.

### 나. 유전적 특성 분석

(1) Genomic DNA 분리 및 정제

각 어종에서 채혈한 혈액 20㎕를 사용하여 lysis buffer[10mM Tris-HCl pH7.5, 125mM NaCl, 10mM EDTA, 0.5% SDS, 5M Urea, 0.1㎎/㎖ proteinase K]를 첨가하여 혈구세포를 용해한 후, binding buffer와 isopropanol을 사용하여 genomic DNA를 분리하였고, *Accuprep*® Genomic DNA Extraction Kit(Bioneer Co., Korea)의 column을 이용하여 정제하였다. 분리·정제한 genomic DNA는 전기영동으로 확인한 후, NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer(NanoDrop Technologies, USA)를 사용하여 농도를 측정하고 -80℃에 보관하였다.

(2) RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 분석

분리·정제한 genomic DNA 20ng을 PCR buffer[10mM Tris-HCl(pH8.3), 50mM KCl, 2.0mM $MgCl_2$], dNTP mix, random primer 10pM, *TaKaRa EX Taq*™ DNA polymerase(TaKaRa Co., Japan) 1U을 첨가하여 최종 부피가 25㎕가 되도록 혼합액을 조

제한 후, 94℃에서 5분간 미리 변성 후, 94℃에서 1분, 40℃에서 1분, 72℃에서 2분 동안 40회 반응시킨 후(PTC-200, MJ Research, USA), 증폭산물은 1.5% agarose gel 전기영동으로 확인하였으며, 다형을 나타내는 DNA 단편을 분석하였다.

(3) *LPL*(lipoprotein lipase) 유전자의 증폭 및 PCR-RFLP 분석

*LPL* 유전자 분석에는 참돔시료를 이용하였으며, 참돔 *LPL* 유전자를 증폭하기 위한 primer는 Oku 등(2002)이 발표한 *Pagrus major LPL* 전체유전자(GenBank accession No. AB054063) 염기서열을 토대로 제작하였다. *LPL* 유전자의 exon 2번 영역을 증폭하기 위하여 Rsb/LPL-1451U (5′-AGG AGA TAC TAC GTA TCA CG-3′)와 Rsb/LPL-2541L (5′-TAT CTG CAC TTT ATG ACT C-3′) primer를 사용하였다.

증폭반응은 genomic DNA 50ng, PCR buffer[10mM Tris-HCl(pH9.0), 40mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$], dNTPs 200μM, 각각의 primer 20pM 및 *Taq* DNA polymerase(Bioneer Co, Korea) 0.5U을 첨가하고 최종 25㎕가 되도록 멸균수를 첨가하였으며, 94℃에서 5분간 미리 변성시킨 후, 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 1분으로 35회 반응시켰다(PTC-200, MJ Research, USA). 증폭산물은 1.0% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

RFLP(restriction endonuclease length polymorphism) 분석은 PCR 증폭산물 3㎕에 제한효소 *Msp*Ⅰ, *Alu*Ⅰ 및 *Hsp*92Ⅱ를 3U 첨가하여 전체량을 10㎕로 조정한 후, 37℃에서 3시간 반응시켰다. 각 제한효소에 의해 절단된 PCR 증폭산물은 2.5% metaphor agarose gel 전기영동으로 유전자형을 분석하였다.

(4) DNA 단편 클로닝 및 염기서열 분석

RAPD 분석 결과에서 확인한 DNA 다형단편을 agarose gel로부터 회수하여, Power Gel Extraction Kit(DyneBio, Korea)을 이용하여 DNA를 elution한 후, pGEM T-easy vector system(Promega, USA)을 사용하여 클로닝을 실시하였다. 재조합 된 clone으로부터 plasmid DNA를 회수한 후, BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열 결정반응을 실시하였다. 반응이 끝난 산물은 알코올 정제 후, ABI 377 DNA Sequencer(Applied Biosystems, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였으며, Chromas 2.30 (Technelysium Pty Ltd, Australia) 및 DNAstar(DNASTAR, Inc., USA) 프로그램을 이용하여 염기변이를 비교 분석하였다.



**다. 어류의 기능성 유전자 탐색**

(1) 실험재료

경남 통영시 소재의 해상가두리에서 일반적인 관리방법으로 사육된 6개월령 및 18개월령 볼락을 각 10개체씩 구입하여 근육조직, 간 조직 신장조직, 비장조직을 확보하였다.

(2) Total RNA 분리 및 정제

볼락의 근육조직, 간 조직, 신장조직 및 비장조직을 각각 100mg씩 취하여 액체질소를 이용하여 파쇄하였다. TRIzol® Reagent(Invitrogen, USA) 1㎖을 첨가하여 상온에서 5분간 방치하면서 완전히 섞어 준 다음, chloroform을 0.2㎖ 넣는다. 상온에 3분간 두었다가 원심분리(12,000x*g*, 4℃, 15분) 하였다. 상층액에 isopropyl alcohol을 첨가하여 상온에 10분간 두었다가 원심분리(12,000x*g*, 4℃, 10분)하여 RNA pellet만 취했다. 75% 에탄올로 세정 후에 RNA pellet을 건조시킨 후, 멸균수에 녹여 실험에 이용하였다.

(3) mRNA 분리 및 정제

Total RNA로부터 oligo(dT)-latex bead를 사용하는 NucleoTrap®mRNA Purification Kits(Clontech, USA)을 이용하여 mRNA를 회수하였다. 볼락 근육조직에서 회수한 total RNA 250㎍에 RM0 buffer 300㎕를 넣어 혼합하고, oligo(dT)-latex bead를 40㎕ 넣어 68℃에서 5분간 가열한 후, 상온에서 2분마다 튜브를 뒤집어 주면서 10분간 반응시켰다. 원심분리하여 pellet만 취하고 RM2 buffer 600㎕로 헹구어 낸 후, RM3 buffer 500㎕로 bead를 2번 반복하여 씻었다. 68℃로 미리 데워 둔 eluting buffer 80㎕ 첨가하여 68℃에서 7분간 가열 후. 원심분리하여 약 3.5㎍의 mRNA를 회수하였다.

(4) Subtracted cDNA library 제작 및 분석

① Subtracted cDNA library 제작

6개월령 및 18개월령 볼락 근육조직 특이적인 cDNA library는 PCR-selected cDNA subtraction kit(Clontech, USA)을 사용하여 Figure 3-5-1의 방법으로 제작하

였다. 볼락 근육조직 각 월령별 mRNA 2㎍에 cDNA 합성 primer(10μM) 1㎕를 첨가하여 70℃에서 2분간 반응시켜 얼음에 2분간 두었다. 5x first-strand buffer 2㎕, dNTPmix(각10mM) 1.6㎕, AMV reverse transcriptase(20U/㎕) 1㎕를 섞어 42℃에서 90분간 반응시킨 후, 얼음에 꽂아 한 가닥 cDNA 합성을 정지시켰고, 합성된 한 가닥 cDNA에 5x second-strand buffer 16㎕, dNTP mix(각10mM) 1.6㎕, 20x second strand enzyme cocktail 4.0㎕ 및 멸균수를 첨가하여 최종 80㎕가 되도록 조정하여, 16℃에서 2시간 반응시킨 후, T4 DNA polymerase 2㎕(6U)를 첨가하여 16℃에 30분간 둔 다음, 20x EDTA/glycogen 4㎕를 첨가하여 두 가닥 cDNA를 합성하였다. 합성된 두 가닥 cDNA는 Phe/Chl/Iso (25:24:1)로 추출하여 얻은 pellet을 멸균수 50㎕에 녹인 후, 전기영동하여 PolyA$^+$ RNA의 합성률을 비교·분석하여 실험에 이용하였다.

합성한 두 가닥 cDNA(ds cDNA) 양 말단을 blunt-end로 만들기 위해, ds cDNA 43.5㎕에 10x *Rsa* I restriction buffer 5㎕와 *Rsa* I (10U/㎕) 1.5㎕를 첨가하여 37℃에서 90분간 반응시킨 후 Phe/Chl/Iso (25:24:1)로 추출하였고, 상층액을 회수하여 침전시킨 후, 멸균수 5.5 ㎕에 녹였다. 5배 희석한 *Rsa* I 으로 절단된 cDNA 2㎕에 adaptor 1(10μM)과 adaptor 2R(10μM) 각각 2㎕씩, T4 DNA ligase(400U/㎕) 1㎕를 첨가하여 16℃에서 하룻밤 동안 반응시키고 EDTA/glycogen mix 1㎕를 첨가하여 adaptor-ligated tester cDNA를 만들었다.

Subtractive hybridization은 2단계로 실시하였으며, 먼저 1차 hybridization은 Table 3-5-1과 같이 준비하여 98℃에서 90초간 반응시킨 후 68℃에서 8시간 동안 반응시켰다. 1차 hybridization 반응이 끝나면 driver cDNA 1㎕, 4x hybridization buffer 1㎕, 멸균수 2㎕를 첨가하여 98℃에서 90초 동안 반응시킨 후, hybridization sample # 1과 # 2(Table 3-5-1)를 혼합하여 68℃에서 하룻밤 동안 반응시키는 것으로 2차 hybridization을 실시하였다. 반응이 끝난 2차 hybridization mixture는 dilution buffer 200㎕를 첨가하여, 68℃에서 7분간 반응시켜 실험에 사용하였다. 2차 hybridization이 끝난 각각의 subtraction 시료를 1차 및 2차 PCR을 수행하였으며, 1차 PCR은 Table 3-5-2와 같은 조성으로 94℃에서 10초, 66℃에서 30초, 72℃에서 90초의 조건으로 27회 반응시켰다. Table 3-5-3과 같은 조건으로 2차 PCR을 수행하였으며, 1차 PCR 산물을 10배 희석하여 2차 PCR 수행을 위한 template로 사용하였고, Table 3-5-3과 같은 조성으로 94℃에서 10초, 68℃에서 30초, 72℃에서 5분의 조건으로 12회 반응시켜 PCR을 수행하였다. 2차 PCR까지 수행하여 얻은 증폭 cDNA (subtracted cDNA)는 전기영동하여 kit 내의 unsubtracted control 및



각각의 unsubtracted cDNA와 비교하고, 정상적으로 subtraction이 된 것을 확인한 후, pGEM-T easy vector system(Promega, USA)을 이용하여 subtracted cDNA library를 구축하였다. Subtracted cDNA library 제작시 사용한 PCR primer 및 adpator의 서열은 Table 3-5-4와 같다.

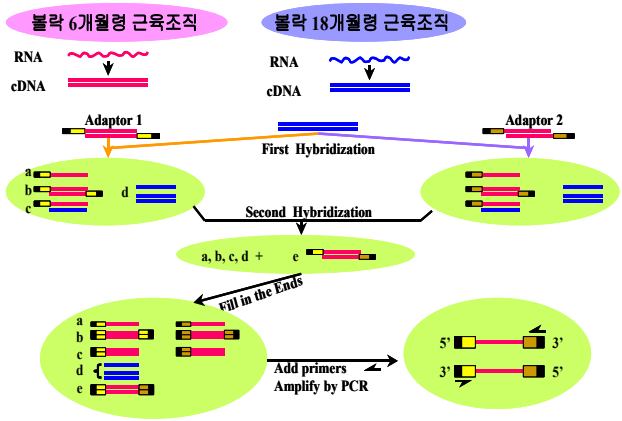



Figure 3-5-1 Schematic diagram of PCR-selected cDNA subtraction.

Table 3-5-1. Setting up the first hybridization

| Component | Hybridization sample # 1 (㎕) | Hybridization sample # 2 (㎕) |
|---|---|---|
| *Rsa* I digested driver cDNA | 1.5 | 1.5 |
| Adaptor 1 ligated tester 1-1 | 1.5 | - |
| Adaptor 2R ligated tester 1-2 | - | 1.5 |
| 4x hybridization buffer | 1.0 | 1.0 |
| Total volume | 4.0 | 4.0 |

Table 3-5-2. Preparation of the primary PCR master mix.

| Reagents | Amount per reaction (㎕) |
|---|---|
| Each subtracted cDNA | 1.0 |
| 10x PCR reaction buffer | 2.5 |
| dNTP mix (10mM) | 0.5 |
| PCR primer (10μM) | 1.0 |
| 50x Advantage cDNA polymerase mix | 0.5 |
| sterile $H_2O$ | 19.5 |
| Total volume | 24.0 |

Table 3-5-3. Preparation of the secondary PCR master mix,

| Reagents | Amount per reaction (㎕) |
|---|---|
| diluted primary PCR product | 1 |
| 10x PCR reaction buffer | 2.5 |
| dNTP mix (10mM) | 0.5 |
| Nested PCR primer 1 (10μM) | 1.0 |
| Nested PCR primer 2R (10μM) | 1.0 |
| 50x Advantage cDNA polymease Mix | 0.5 |
| Sterile $H_2O$ | 18.5 |
| Total volume | 24 |

Table 3-5-4. Sequences of the PCR-selected cDNA synthesis primer, adaptors and target PCR primers.

| Primers | Sequence |
|---|---|
| cDNA synthesis primer | 5′- TTTTGTACAAGCTT$_{30}$N$_1$N - 3′ |
| Adaptor 1 | 5′- **CTAATACGACTCACTATAGGGC***TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT* - 3′<br>*3′- GGCCCGTCCA- 5′* |
| Adaptor 2R | 5′- **CTAATACGACTCACTATAGGGC***AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT* - 3′<br>*3′- GCCGGCTCCA- 5′* |
| PCR primer 1 | 5′- CTAATACGACTCACTATAGGGC - 3′ |
| Nested PCR primer 1 | 5′- TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT - 3′ |
| Nested PCR primer 2R | 5′- AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT - 3′ |
| G3PDH 5′primer | 5′- ACCACAGTCCATCAC - 3′ |
| G3PDH 3′primer | 5′- TCCACCACCCTGTTGCTGTA - 3′ |
| M13 Forward (-20) primer | 5′- GTAAAACGACGGCCAG - 3′ |
| M13 Reverse primer | 5′- GTCCTTTGTCGATACTG - 3′ |



② Subtracted cDNA library의 differential screening

제작한 볼락 근육조직 subtracted cDNA library를 PCR-Selected Differential Screening Kits(Clontech, USA)을 사용하여 분석하였다. Digoxigenin-dUTP(Roche, Germany)을 이용하여 합성한 4개의 probe로 forward-subtracted(6개월령-18개월령) cDNA library 및 reverse-subtracted(18개월령-6개월령) library를 분석하였다. Probe는 각 subtraction 단계에서 얻은 2차 PCR 산물을 정제하여 16㎕를 98℃에서 10분간 끓여 변성시켜 DIG High Prime[random hexamers, 1mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dGTP, 0.65mM dTTP, 0.35mM alkali-label-digoxigenin-11-dUTP, 1U/㎕ labeling grade Klenow enzyme, 5x reaction buffer in 50% (v/v) glycerol] 4㎕과 섞어 37℃에서 19시간 반응시킨 후, 0.2M EDTA를 2㎕ 넣어 합성을 정지시켰다. 각 subtracted cDNA library로부터 확보한 colony를 template로 하고, nested primer 1과 2R을 이용하여 cDNA만 증폭시켰고, 0.6N NaOH와 1:1로 혼합하여 DNA를 변성시킨 후, nylon membrane에 1㎕씩 옮겼다. cDNA가 옮겨져 있는 nylon membrane은 0.5M Tris-HCl(pH7.5)에 4분 동안 두어 중화시켰고, 멸균수로 헹구어 물기를 제거하여 UV-crosslinker (UVP CL-1000, USA)로 cDNA를 고정시켰다. cDNA dot blot은 4개의 probe를 사용하여 비교분석하고, 반복 실험을 위하여 동일 blot를 8장 준비하였다.

각 blot을 hybridization bottle로 옮겨 hybridization buffer(5x SSC, 2% blocking reagent, 0.1% N-lauroyl sarcosine, 0.02% SDS, formamide 50%)를 membrane 100㎠당 20㎖을 넣고, 42℃에서 3시간 동안 pre-hybridization 반응을 실시하였다. 합성하여 chroma spin-100(Clontech, USA)을 이용하여 정제하고, 농도를 측정해 두었던 4개의 probe[unsubtracted tester probe(6M), unsubtracted driver probe(18M), forward-subtracted probe(6M-18M), reverse-subtracted probe(18M-6M)]를 98℃에서 10분간 가열하여 변성시킨 후, 25ng/㎖ 농도로 첨가하여 42℃에서 18시간 hybridization 반응을 실시하였다. Hybridization이 끝난 blot을 maleic acid buffer로 헹구고, washing solution(2x SSC - 0.1% SDS, 0.5x SSC - 0.1% SDS, 0.1x SSC - 0.1% SDS)으로 blot을 세정하였다. 세정이 끝난 blot은 maleic acid buffer (0.1M maleic acid, 0.15M NaCl, pH 7.5)에 1분간 방치시킨 후, 1% blocking 용액에서 1시간 동안 반응시켰다. 용액을 버리고 1% blocking 용액(Roche, Germany) 200㎖에 Anti-DIG-AP 10㎕를 첨가한 antibody 용액에서 30분간 반응시켰다. Antibody 용액을 버리고 washing buffer(0.3% tween 20/maleic acid buffer)로 15분간 2회 세정하였고, blotdmd detection buffer

[100mM Tris-HCl (pH 9.5), 100mM NaCl]에 2분간 두었다. Detection buffer로 100배 희석한 CDP-Star[25mM disodium 4-chloro-3 (4-metoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2′-(5′-chloro)tricyclo[3.3.1.13,7]decan}-4-yl)phenyl phosphate]에 blot을 5분간 담근 후, 여분의 물기를 제거하여 ChemiGenius 2( Syngene, UK)에 5분간 노출시켜 signal을 확인하였다. Imager를 이용하여 비교분석 한 blot의 signal은 NBT/BCIP 용액(Roche, Germany)을 이용하여 염색하여 분석하였다.

③ Differential screening으로 확보한 유전자의 semi-quantitative RT-PCR

볼락의 각 조직으로부터 분리 정제한 total RNA를 SuperScript™First-Strand Synthesis System(Invitrogene, USA)을 이용하여 한 가닥 cDNA로 전환한 후, RT-PCR을 수행하였다. Total RNA 2㎍을 10mM dNTPmix와 oligo$(dT)_{12-18}$ 0.5㎍을 혼합하여 65℃에서 5분간 반응시킨 다음 얼음에 1분 동안 두었다. 10x RT buffer[200mM Tris-HCl(pH8.4), 50mM KCl], 25mM MgCl2, 0.1M DTT, RNaseOUT™Recombinant Ribonuclease Inhibitor를 첨가하여 42℃에서 2분간 반응시킨 후, SuperScript™Ⅱ Reverse transcriptase를 첨가하여 42℃에서 50분간 반응시켰다. 70℃에서 15분간 반응시켜 반응을 정지시키고 난 다음 얼음에 두었다가 RNase H를 첨가하여 37℃에서 20분간 반응시켜 한 가닥 cDNA로 전환하였다. Dicentrarchus labrax의 GAPDH 염기서열(GenBank accession No. AY863148)을 기초로 하여 제작한 primer를 이용하여 한 가닥 cDNA의 합성여부 및 합성효율을 확인하였으며, semi-quantitation을 위하여 한 가닥 cDNA량을 정량화하였다. 적정량의 cDNA와 target primer를 사용하여(Table 3-5-5) 15-18 cycle 반응시킨 산물을 agarose gel 전기영동하여 확인하였고, 각각의 PCR 산물에 대한 band의 intensity를 densitometer (Vilber Lourmat, France)를 이용하여 정량하고 분석하였다.



Table 3-5-5. Primers for semiquantitative RT-PCR.

| Clone name | Primer sequence(5′→3′) | Annealing temp(℃) | PCR cycle |
|---|---|---|---|
| 6M05A3-40 | FW: CAGAGTGAACAGATATGGAAC<br>RV: TACGAAGGGGATAGTGCTGA | 59 | 18 |
| 6M05A3-55 | FW: TCATCCGCAGTGAGGCTGCT<br>RV: CTCATCACTGCCTACCACCA | 55 | 15 |
| 6M05A3-58 | FW: CTTACGGATGTCGACATCAC<br>RV: GACTACCTCATGAAGATCCTG | 63 | 17 |
| 6M05A3-89 | FW: CACGAAATATTCAGCCTCCG<br>RV: CTCGATGGTCTTGATCAGGA | 59 | 18 |
| 6M05A4-02 | FW: TGATCGCTGATCACTTCCTG<br>RV: TCTCTTACCATCAGCTTGAC | 56 | 18 |
| 6M05A4-06 | FW: TCTGTCCAGGTTTTTGGACG<br>RV: ATTAACGGTAGGACTTCTGG | 65 | 16 |
| 6M05A4-69 | FW: TCATCGATGGGCTCGATCAT<br>RV: TACTACGAGCAGTTCGCCAA | 65 | 18 |
| 6M05A4-71 | FW: GCTCCGACGTGGAGAAAGGA<br>RV: TTCGTGATGTCCAGGAAGTC | 65 | 18 |
| 18M05A1-13 | FW: TATCGGTCTCCTCTGTGCAC<br>RV: TCAGATTCCCACATGTGCAG | 55 | 18 |
| 18M05A1-22 | FW: TGACTTTGACTTCGCTGGCC<br>RV: GACAGGGTGAGTTTCACACC | 57 | 17 |
| 18M05A1-26 | FW: CAAGGACATCTACAACAAGC<br>RV: GTACGAACACGGCTGGACAG | 57 | 18 |
| 18M05A1-90 | FW: ATGGGAGAGAAGCTCAACAT<br>RV: GCGCTCTTCACCAGCTGCTT | 59 | 16 |
| 18M05A2-09 | FW: TCACACACGTGGAGTCATAT<br>RV: GAGATTGAAGACCTGAGGATC | 61 | 18 |
| 18M05A2-74 | FW: GGTATGGTGGGAAGATGAGT<br>RV: TGAGCCTTGAGAGACTGGAG | 58 | 17 |
| 18M05A2-84 | FW: ATCGTCGGTCACGAGCACTA<br>RV: AGGATGCTCTGGAAGCCCTT | 59 | 18 |
| 18M05A3-04 | FW: ATGGCCTTCGCTGGTTTCCT<br>RV: CCTGGTTTTCACTCTTCCTC | 63 | 18 |
| GAPDH | FW: ACGACAACGAGTTCGCATAC<br>RV: CTCACACCTTTACTCCATCTC | 62 | 15 |

④ Northern blot analysis

연령별 볼락 근육조직으로부터 분리 정제한 total RNA 30㎍(5㎕)을 RNA sample buffer(64.5% deionized formamide, 8.35% formaldehyde, 0.64x MOPS) 15㎕와 섞어 65℃에서 15분간 변성시킨 다음, formaldehyde gel-loading buffer[50% glycerol, 1mM EDTA(pH8.0), 0.25% Xylene cyanol FF, 0.25% bromophenol blue) 2㎕를 넣어 1.2% formaldehyde gel에 loading하였고, 5x formaldehyde gel-running buffer[0.1M MOPS(pH7.0), 40mM sodium acetate, 5mM EDTA(pH8.0)]로 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel을 멸균수로 formaldehyde를 충분히 제거한 후, capillary transfer 방법으로 nylon membrane에 RNA를 옮기고 UV-crosslinker(UVP CL-1000, USA)를 사용하여 고정시킨 후, high SDS hybridization buffer[5x SSC, 0.1% N-lauroylsarcosine, 7% SDS, 2% blocking reagents, 50% formamide, 50mM sodium phosphate buffer(pH7.0)]를 이용하여 hybridization을 실시하였다. Probe DNA는 subtracted cDNA library를 분석하여 확보한 cDNA를 DIG High Prime을 이용하여 합성하였고, 98℃에서 10분간 가열하여 한 가닥으로 변성시킨 후, 25 ng/㎖농도로 hybridization 반응에 사용하였다. 반응이 끝난 membrane은 Southern blot 분석에서 같이 동일하게 세정한 다음, CDP-star (Roche, Germany)를 사용하였고, X-ray film에 노출시켜 signal을 확인하고 분석하였다.

(5) ACP(Anealing Control Primer)-based PCR 방법을 이용한 GeneFishing™ DEG(differentially expressed gene) discovery

① First-strand cDNA Synthesis

볼락 6개월령과 18개월령 근육조직으로부터 분리 정제한 total RNA 3㎍을 Reverse Transcription System(Promega, USA)을 이용하여 한 가닥 cDNA를 합성하였다. Total RNA 3㎍, 5x reaction buffer 4㎕, dNTPmix(각 2mM) 5㎕, 10μM dT-ACP1(5′-CGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIIT(18)-3′, Seegene, Korea) 2㎕, RNasin®RNase Inhibitor 0.5㎕, M-MLVRTase(200U/㎕) 1㎕를 첨가하여 42℃에서 1시간 30분 동안 반응시켜 GeneFishing™ PCR을 수행하기 위한 한 가닥 cDNA를 합성하였다. 합성된 한 가닥 cDNA는 5배의 희석하여 실험이 -20℃에 보관하였다.

② ACP-based GeneFishing™ PCR



GeneFishing™ DEG Kits(Seegene, Korea)을 사용하여, ACP-based PCR 방법 (Kim 등, 2004)에 따라 발현량 차이를 나타내는 유전자를 screening하였다. 두 가닥 cDNA는 PCR의 첫 번째 단계에서 합성하였으며, 희석된 한가닥 cDNA 50ng, dT-ACP2(10μM) 1㎕, 10μM arbitrary ACP 1㎕, 2x Master Mix 10㎕를 혼합하여 94℃에서 1분, 50℃에서 3분, 72℃에서 1분간 반응시켰다. 두 가닥 cDNA의 합성이 끝난 다음 두 번째 단계의 PCR은 94℃에서 40초, 65℃에서 40초, 72℃에서 40초의 조건으로 40회 반응하였다. 증폭산물은 2% agarose gel에 전기영동하고, EtBr로 염색하였다.

③ DEG(differentially expressed gene)의 염기서열 결정

증폭산물을 전기영동하여 발현량 차이를 확인한 cDNA 밴드를 재 증폭시켜 GENCLEAN II Kit(Q-BIO gene, USA)을 사용하여 정제하였고, ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 cDNA 단편의 염기서열을 분석하였다.

(6) Real-time quantitative PCR 분석

Total RNA 2㎍을 이용하여 한 가닥 cDNA를 20㎕ 합성하였다. PCR에 사용할 target 유전자의 primer(Table 3-5-6)는 poly(A)+ 부근이 증폭되고, 증폭할 단편의 크기가 70-200bp이며, $T_M$ 값이 58-60℃가 되도록 설계하였다. Pre-PCR로 primer 및 cDNA 상태를 확인한 후, cDNA 5ng, primer(forward+reverse, 10pM) 0.8㎕, SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems, USA) 10㎕를 첨가하여 최종 부피가 20㎕가 되도록 조정하여 95℃에서 30초, 60℃에서 30분, 72℃에서 30초의 조건으로 40회 반응시켰다. 양적인 분석을 위하여 동일 유전자에 대해 3회 반복실험을 수행하였으며, real-time PCR 분석은 Applied Biosystem prism 7900 Sequence Detection System(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 수행하였다.

Table 3-5-6. Primers for real time quantitative PCR.

| DEG No. | Target gene | Primer sequence(5′→3′) |
|---|---|---|
| DEG 14 | Unknown | FW: CAGAGTGAACAGATATGGAAC<br>RV: TACGAAGGGGATAGTGCTGA |
| DEG 38 | Parvalbumin | FW: TCATCCGCAGTGAGGCTGCT<br>RV: CTCATCACTGCCTACCACCA |
| DEG 60 | Unknown | FW: CTTACGGATGTCGACATCAC<br>RV: GACTACCTCATGAAGATCCTG |

(7) Rapid Amplification cDNA ends(RACE) 방법으로 cDNA cloning

cDNA의 5′ 및 3′ 의 말단 염기서열을 분석하기 위하여, BD SMART$^{TM}$RACE cDNA Amplification Kit(Clontech, USA)을 사용하여 cDNA 말단 염기서열을 포함하는 단편을 얻었다. RACE 수행에 사용한 primer는 GC 함량이 50-70%, 길이는 23-28염기, $T_M$ 값은 70℃ 이상이 되도록 설계하였으며, 5′ 및 3′-RACE-Ready cDNA는 total RNA 1㎍을 5′- CDS primer(5′-$(T)_{25}$VN-3′) 및 3′- CDS primer A(5′-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA $C(T)_{30}$VN-3′)와 SMART Ⅱ A oligo(5′-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3′)를 이용하여 합성하였다. 5′ 및 3′-RACE PCR은 10배 희석한 cDNA 2.5㎕, target 유전자의 염기서열을 근거로 제작한 primer 10pM, 10x Universal Primer A(5′-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT ACG CGG G-3′) 5㎕, dNTP mix 10mM, 50xBD polymerase mix를 최종부피가 50㎕가 되도록 조정하여, 먼저 94℃에서 30초, 72℃에서 3분간 5회 반응시켰고, 94℃에서 30초, 70℃에서 30초, 72℃에서 3분의 조건으로 5회 추가로 반응시킨 후에 94℃에서 30초, 68℃에서 30초, 72℃에서 3분의 조건으로 25회 반응시켰다. PCR 산물을 2% agarose gel 전기영동으로 확인하였고, target 밴드를 회수하여 TA cloning하였다.



## 2. 연구 개발 결과

### 가. 실험대상 어종 선정을 위한 어종별 DNA 시료확보 및 유전적 특성 분석

(1) 어종별 DNA 시료확보

참돔, 감성돔, 조피볼락, 볼락의 생육특성에 관한 자료를 수집하였고, 혈액으로부터 genomic DNA를 분리·정제하여 일정한 농도(50ng/㎕)로 조정하였으며, 장기간 사용을 위하여 -70℃에 보관하였다.

(2) RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 분석

상업적으로 유용하고 양식이 활발히 이루어지고 있는 참돔의 유전적 특성을 조사하기 위하여, 10mer로 이루어진 random primer를 사용하여 분석하였다. 200개의 random primer를 분석하여 뚜렷한 다형성을 나타내는 19개의 random primer로부터 76개의 다형 단편을 확인하였고(Table 3-5-7), 재현성을 확인하였다(Figure 3-5-2 ~ 4) 이들 중 OPA-11 primer는 크기가 각각 619bp, 647bp 및 1,200bp인 3개의 DNA 단편으로 인해 10개의 genotype이 나타났으며(Figure 3-5-5), 각 genotype의 빈도는 분석한 집단간 차이를 보였고(Table 3-5-8), OPA-11 primer 유래의 polymorphic DNA 단편 2개의 염기서열을 분석하였다(Figure 3-5-6). 참돔을 비롯하여 감성돔, 볼락, 조피볼락의 기초적인 유전적 특성 분석결과, 각 어류의 개체간 변이율이 높았으며, 특히 한국해양연구원에서 선발하여 관리하고 있는 참돔 선발집단 특이적인 다형도 확인되었다.

Table 3-5-7. Primers and primer sequences used for the detection of polymorphisms in red sea bream, *Pagrus major*.

| Primer | Sequence | No. of total bands | No. of polymorphic bands |
|---|---|---|---|
| OPA-11 | 5′-CAATCGCCGT-3′ | 10 | 4 |
| OPA-16 | 5′-AGCCAGCGAA-3′ | 13 | 5 |
| OPB-01 | 5′-GTTTCGCTCC-3′ | 11 | 6 |
| OPB-14 | 5′-TCCGCTCTGG-3′ | 10 | 6 |
| OPC-09 | 5′-CTCACCGTCC-3′ | 10 | 3 |
| OPD-01 | 5′-ACCGCGAAGG-3′ | 12 | 3 |
| OPE-08 | 5′-TCACCACGGT-3′ | 7 | 3 |
| OPG-07 | 5′-GAACCTGCGG-3′ | 9 | 3 |
| OPG-15 | 5′-ACTGGGACTC-3′ | 12 | 5 |
| OPG-20 | 5′-TCTCCCTCAG-3′ | 13 | 4 |
| OPH-14 | 5′-ACCAGGTTGG-3′ | 13 | 4 |
| OPI-07 | 5′-CAGCGACAAG-3′ | 14 | 3 |
| OPI-08 | 5′-TTTGCCCGGT-3′ | 9 | 3 |
| OPI-19 | 5′-AAAGTGCGGG-3′ | 6 | 2 |
| OPI-20 | 5′-AATGCGGGAG-3′ | 10 | 3 |
| OPJ-01 | 5′-CCCGGCATAA-3′ | 12 | 5 |
| OPJ-03 | 5′-TCTCCGCTTG-3′ | 16 | 4 |
| OPJ-11 | 5′-ACTCCTGCGA-3′ | 10 | 5 |
| OPJ-14 | 5′-CACCCGGATG-3′ | 12 | 4 |

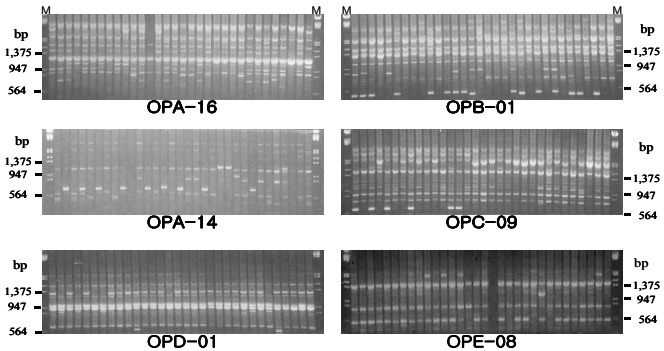



Figure 3-5-2. RAPD profiles for the detection of polymorphisms in red sea bream, *Pagrus major* by using random primers. OPA-16, OPB-01, OPB-14, OPC-09, PD-01 and OPE-08. M, molecular weight marker digested with *EcoR* I and *Hind* III.



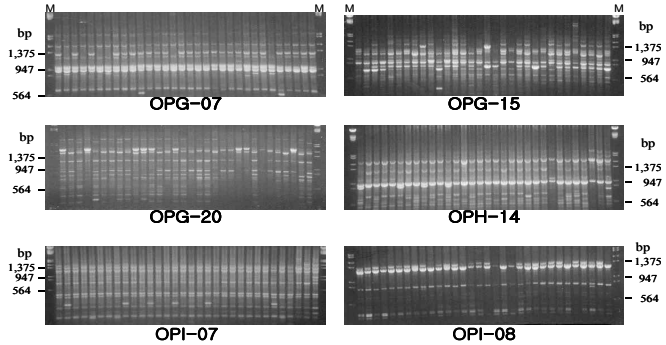



Figure 3-5-3. RAPD profiles for the detection of polymorphisms in red sea bream, *Pagrus major* by using random primers OPG-07, OPGB-15, OPG-20, OPH-14, OPI-07 and OPI-08. M, molecular weight marker digested with *EcoR* I and *Hind* III.

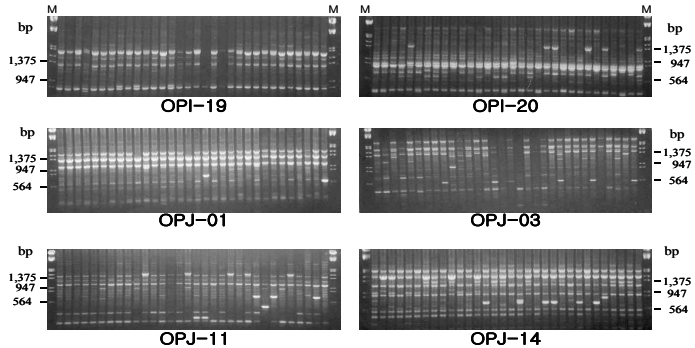
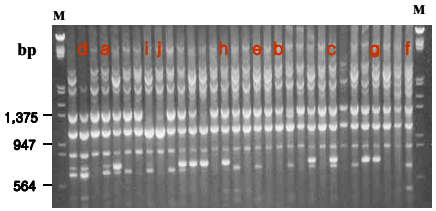



Figure 3-5-4. RAPD profiles for the detection of polymorphisms in red sea bream, *Pagrus major* by using random primers OPI-19, OPI-20, OPJ-01, OPJ-03, OPJ-11 and OPJ-14. M, molecular weight marker digested with *EcoR* I and *Hind* III.




OPA-11

Figure 3-5-5. RAPD patterns of 10 genotypes (a,b,c,d,e,f,g,h,I and j) within the red sea bream, *Pagrus major* obtained with primer OPA-11. M, molecular weight marker digested with *EcoR* I and *Hind* III.

```
  1 caatcgccgtagtgagggaggtggccgtggtcttggtgagagacagaaagagagaatcgccctccgggggaagc  75
 76 aagaactaatgagtgagctaaaaaggacaagatggagtgatcctctataaaaagaccagcagtaatctctccctc 150
151 tcctccctctcctctcctctcccccttaatgtcctaagagatcttggctcctccgtaaagcctgctgcctctgcac 225
226 atcaaacagggctgattagagctgcacaccttgccggtgctggagctttggacagggtgcagaccaagttcaagg 300
301 gagactgagtgttagaaaaaccaaagaggaaaaactcttcaagttagtggacatctctctggactatacacattt 375
376 gaacagctaccactgaatcagcatgcccgacttcagtatccacttaccatatctctaacccaatgcctcggagct 450
451 caaataacagcagtgtctttcaaattagggccagtgtgctgctttggattcttctgtcatgtcagatgatatcag 525
526 tg[illegible]ccccagaggtgcaagcggcgcttgaatctaatcgtcatcaacagatcgtcctgttcattcacattagcg 600
601 taaatggtcacggcgattg                                                         619
```

```
  1 caatcgccgtgtagacatctgttttatcattttctggaagttgccatcaccaacagcttcatcattcacaaagaa  75
 76 ctctgtgcactccggcaaacaaagcccatgacacagagcgtttagaggagctgactgctgagctttttaacatgc 150
151 ctctccacacacctcctgctctggcacctgcaggtcatcttcctgtgcctgtcattgatatcagtgaattaggac 225
226 cctgtgagagagcccccatgggtcgcaagaggtgtgaacattgccacaaccaaggccagcgaaaggacacaccgt 300
301 ggtaatgcatggagtgtggtgtttgcctgtgcctgcagctggatgatattcatttgcacacactgtatgaagctt 375
376 aatctgtggtatgacatcattattcagtccctcttacatttgatgaaagtagagtgacagacaacactactcaaa 450
451 aaactgtaactgtcagatttgggaaaaaacagcacgctctgacctttgatagtatctcctgtgaccttcttggtta 525
526 agtcggtgacaggactccaggtgtctccgtcgtcagtgctgcagatgtagcaaagacgggtcacattctttcccg 600
601 tcaccagctgataggacttctgatgtgtgggcgaaagaccgcgattg                             647
```

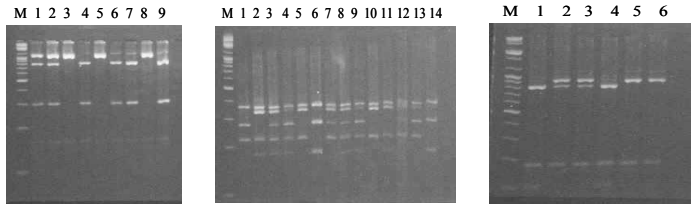
Figure 3-5-6. Nucleotide sequences of the polymorphic DNA fragments, 619bp and 647bp obtained with primer OPA-11.

(3) 참돔 *LPL* 유전자 내의 다형성 탐색 및 분석

참돔의 *LPL* 유전자 내의 다형성을 탐색하고 분석하였다. *LPL* 유전자의 exon 2번을 포함하는 영역을 증폭시켜 제한효소를 사용하여 RFLP 분석으로 3개의(*Msp* I, *Alu* I 및 *Hsp*92 II) 다형성을 확인하였다(Figure3-5-7, Table 3-5-9). 증폭한 PCR 산물의 크기는 1,091bp이었으며, exon 2번을 포함하는 영역의 대략적인 genomic 구조 및 다형을 나타낸 제한효소 절단부위의 위치는 Figure3-5-8과 같다. *Msp* I 다형성은 2,235번의 염기 C가 G로 transversion이 되어 절단되지 않는 형태의 유전자형이 존재하였으며, 2개의 대립 유



전자에 의해 3개의 유전자형을 확인하였고, 유전자형의 빈도가 집단 간에 뚜렷한 차이를 보였다(Table 3-5-10). 한국산 선발집단에서는 *Msp* I 에 의해 절단되는 형태인 유전자형 AA의 빈도는 0.69인 반면, 일본 양식집단에서는 AA의 빈도가 0.29에 불과하였고, 유전자형 AB의 빈도는 0.68이었으며, BB의 빈도는 한국산 선발집단 및 일본 양식집단에서 각각 0.02와 0.03이었다. 대립유전자의 빈도를 살펴보면, 한국산 선발집단에서는 A가 0.84, B가 0.16이었으며, 일본 양식집단은 각각 0.63, 0.37이었다. 한국산 선발집단 및 일본 양식집단에서 *Alu* I 다형성을 분석한 결과, 3곳의 염기치환으로 인한 5개의 대립유전자(A, B, C, D, 및 E) 및 12개의 유전자형 빈도에 있어 집단간에 뚜렷한 차이를 나타냈으며, 1,727번 염기가 A→G, 2,319번 염기가 C→T 그리고 2,362번 염기가 T→C로 모두 transition이 일어난 형태이었다. 12개의 유전자형 중 AC와 BD는 절단된 단편의 크기가 동일한 것으로 인하여 PCR-RFLP 패턴으로는 구분이 불가능하였다. 한국산 선발집단에서는 빈도에 있어 차이를 보이지만, 5개의 대립유전자가 발견되었고, 12개의 유전자형이 존재하는 것을 확인하였다. 이들 5개의 대립유전자의 빈도는 각각 0.21, 0.45, 0.29, 0.04, 0.02로 대립유전자 B의 빈도가 0.45로 가장 높았으며, 일본 양식집단은 A, B 및 C 대립유전자가 각각 0.19, 0.36, 0.45의 빈도로 나타났으며, 대립유전자 D와 E는 일본 양식집단에서는 나타나지 않았다. 한국산 선발집단에서 확인한 12개의 유전자형 중 AC와 BD는 동일한 크기로 절단된 단편으로 인하여 PCR-RFLP 패턴으로는 구분이 불가능하였다.




A B C

Figure 3-5-7. PCR-RFLP patterns in inton 1, exon 2 and intron 2 of the red sea bream *LPL* gene. (A) *Msp*I PCR-RFLP analysis. Lane 1 & 2, AB; lane 2, 5 & 8, BB; lane 4, 6, 7 & 9, AA (B) *Alu*I PCR-RFLP analysis. Lane 1 & 13, BB; lane 2 & 11, CD; lane 3 & 8, AC; lane 4 & 9, AB; lane 5 & 10, CC; lane 6 & 14, AA; lane 7 & 12, BC (C) *Hsp*92 II PCR-RFLP analysis. Lane 1 & 4, AA; lane 2 & 3, AB; lane 5 & 6, BB. M, 100bp Plus DNA ladder.

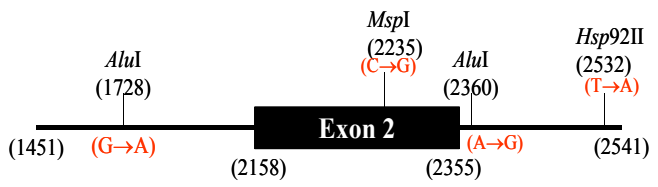



Figure 3-5-8. The diagram outlines the partial genomic structure of the red sea bream *LPL* gene including parts of intron 1, exon 2 and intron 2 as amplified by PCR. The *Msp*I, *Alu*I and *Hsp*92II sites are shown with their positions (numbers below the diagram).

Table 3-5-8. Frequency of 10 genotypes obtained with primer OPA-11 in offspring from selected korean, cultured japanese and their reciprocal intraspecific hybrids of red sea bream, *Pagrus major*

| Genotype | Frequency of genotypes | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Experimental groups | | | | |
| | K* (94**) | J* (72**) | KK* (96**) | JJ* (64**) | KJ* (93**) | JK* (96**) |
| a | 0.04 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 |
| b | 0.40 | 0.81 | 0.45 | 0.63 | 0.52 | 0.76 |
| c | 0.03 | 0.01 | 0.11 | 0.00 | 0.01 | 0.01 |
| d | 0.03 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 |
| e | 0.25 | 0.00 | 0.22 | 0.01 | 0.06 | 0.07 |
| f | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.03 | 0.00 |
| g | 0.20 | 0.13 | 0.19 | 0.28 | 0.27 | 0.15 |
| h | 0.00 | 0.03 | 0.00 | 0.08 | 0.10 | 0.00 |
| i | 0.03 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| j | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

* K: Korean line (KORDI-F4), J: Cultured japanese line (JPN), KK: KORDI-F4♀x KORDI-F4♂
JJ: JPN♀x JPN♂, KJ: KORDI-F4♀x JPN♂, JK: JPN♀x KORDI-F4♂
** Number of DNA samples



Table 3-5-9. Allelic fragments in inton 1, exon 2 and intron 2 of the red sea bream *LPL* gene.

| Restriction enzyme | Allele | Fragment length (bp) |
|---|---|---|
| *Msp* I | A | 785, 306 |
| | B | 1091 |
| *Alu* I | A | 278, 66, 63, 31, 60, 370, 42,181 |
| | B | 278, 66, 63, 31, 60, 370, 223 |
| | C | 344, 63, 31, 60, 370, 223 |
| | D | 344, 63, 31, 60, 370, 42,181 |
| Hsp92 II | A | 176, 907,8 |
| | B | 176, 915 |

Table 3-5-10. Allele frequencies of *Msp* I , *Alu* I and *Hsp* 92 II polymorphisms in inton 1, exon 2 and intron 2 of the *LPL* gene in four red sea bream groups.

| | *Msp* I | | | *Alu* I | | | | | *Hsp 92* II | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Allele frequencies | | | Allele frequencies | | | | | Allele frequencies | |
| Groups | N | A | B | N | A | B | C | D | N | A | B |
| KORDI(F4) | 21 | 0.70 | 0.30 | 20 | 0.20 | 0.35 | 0.43 | 0.02 | 21 | 0.45 | 0.55 |
| Japan | 21 | 0.71 | 0.29 | 19 | 0.31 | 0.11 | 0.58 | 0.00 | 21 | 0.21 | 0.79 |
| K♀ x K♂ | 27 | 0.82 | 0.18 | 27 | 0.22 | 0.35 | 0.37 | 0.06 | 26 | 0.40 | 0.60 |
| J♀ x J♂ | 25 | 0.70 | 0.30 | 23 | 0.15 | 0.28 | 0.57 | 0.00 | 25 | 0.40 | 0.60 |
| K♀ x J♂ | 22 | 0.66 | 0.34 | 23 | 0.00 | 0.37 | 0.63 | 0.00 | 21 | 0.57 | 0.43 |
| J♀ x K♂ | 24 | 0.75 | 0.25 | 23 | 0.13 | 0.37 | 0.48 | 0.02 | 23 | 0.59 | 0.41 |

## 나. 어류의 기능성 유전자 탐색

(1) Subtracted cDNA library 제작 및 differential screening

어류의 성장 관련 기능성 유전자를 탐색하기 위하여 6개월령 및 18개월령 볼락 근육조직을 사용하여 subtracted cDNA library 제작하였다. 6개월령(6M-18M) 및 18개월령(18M-6M) 특이적인 cDNA library를 구축(Figure 3-5-9)하여 differential screening하였다(Figure 3-5-10). 6M-18M 및 18M-6M subtracted cDNA library를 screening 하여 6개월령 및 18개월령 볼락 근육조직에서 특이적으로 발현되는 것으로 추정되는 cDNA clone(6개월령 특이적 발현: 112개, 18개월령 특이적 발현:90개) 확보하였으며, 발현량 차이를 나타내는 49개의 cDNA clone 염기서열 분석한 결과, 유전자 단편의 크기는 약 300-1,200bp로 다양하였다. cDNA 단편의 염기서열을 토대로 상동성을 Blastn 검색결과, troponin, tropomyosin, pyruvate kinase, NADH dehydrogenase 유전자에 해당하는 clone과 기능이 밝혀지지 않은 유전자에 해당하는 clone이었다(Table 3-5-11 , Table 3-5-12).

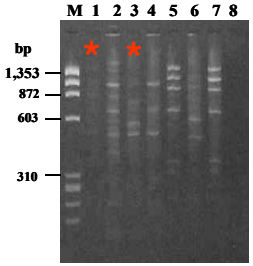



Figure 3-5-9. Results of the dark-banded rockfish(*S. inermis* ) skeletal muscle subtraction according to the Suppression Subtractive Hybridization. M: X174 DNA/*Hae*Ⅲ marker, 1: 18M-6M(subtraction), 2: Unsubtracted(18M), 3: 6M-18M(subtraction),4: Unsubtracted (6M), 5: Subtracted control skeletal muscle cDNA, 6: Unsubtracted tester control for the control subtraction, 7: PCR control subtracted cDNA(positive control), 8: Negative control.



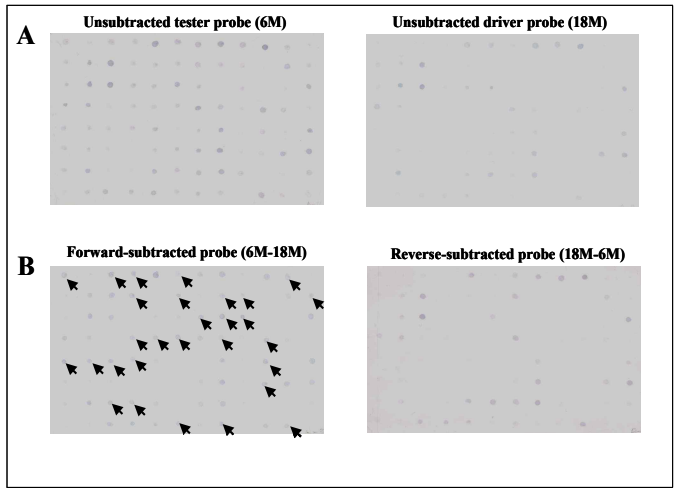



Figure 3-5-10. Differential screening results of dark-banded rockfish (*S. inermis*) skeletal muscle subtracted cDNA libraries.

Table 3-5-11. Putatively identified cDNA clones from the subtracted cDNA library of dark-banded rockfish, *S. inermis*, skeletal muscle.

| Clone | Putative identification (Assesion no.) | Species | Matched (%) | Subtracted cDNA library |
|---|---|---|---|---|
| A-01 | Unknown (CR668999) | *T. nigroviridis* | 84 | 6M-18M |
| A-05 | Unknown (CR735062) | *T. nigroviridis* | 82 | ″ |
| A-06 | Unknown (AY491978) | *S. schlegeli* | 98 | ″ |
| A-07 | Unknown (CR652354) | *T. nigroviridis* | 90 | ″ |
| A-08 | Unknown (AL928875) | *D. rerio* | 99 | ″ |
| A-09 | Unknown (CR733592) | *T. nigroviridis* | 85 | ″ |
| A-13 | Unknown (CR668999) | *T. nigroviridis* | 85 | ″ |
| A-17 | Unknown (CR659501) | *T. nigroviridis* | 85 | ″ |
| A-21 | Unknown (CR668999) | *T. nigroviridis* | 93 | ″ |
| A-22 | Unknown (AY491978) | *S. schlegeli* | 98 | ″ |
| A-23 | Unknown (CR668999) | *T. nigroviridis* | 83 | ″ |
| A-25 | Unknown (CR675533) | *T. nigroviridis* | 84 | ″ |
| A-26 | Unknown (CR725263) | *T. nigroviridis* | 832 | ″ |
| A-27 | Unknown (CR670801) | *T. nigroviridis* | 86 | ″ |
| A-28 | Unknown (CR668999) | *T. nigroviridis* | 85 | ″ |
| A-29 | Unknown (CR668999) | *T. nigroviridis* | 83 | ″ |
| A-30 | Unknown (CR668999) | *T. nigroviridis* | 83 | ″ |
| A-31 | Unknown (CR735062) | *T. nigroviridis* | 84 | ″ |
| A-34 | Troponin (AF304559) | *S. aurata* | 89 | ″ |
| A-35 | Tropomyosin (AB045645) | *P. argentata* | 94 | ″ |
| A-36 | Unknown (CR668999) | *T. nigroviridis* | 86 | ″ |
| A-37 | Troponin (AY316303) | *P. olivaceus* | 90 | ″ |
| A-38 | Pyruvate kinase (AB073361) | *T. rubripes* | 88 | ″ |
| A-44 | Unknown (CR668999) | *T. nigroviridis* | 84 | ″ |
| A-46 | Unknown (CR670801) | *T. nigroviridis* | 91 | ″ |
| A-48 | Unknown (CR668999) | *T. nigroviridis* | 83 | ″ |
| A-51 | Unknown (CR659501) | *T. nigroviridis* | 86 | ″ |
| A-54 | Troponin (AY316303) | *P. olivaceus* | 92 | ″ |
| A-58 | Unknown (CR668999) | *T. nigroviridis* | 83 | ″ |
| A-59 | Unknown (CR675533) | *T. nigroviridis* | 82 | ″ |
| A-60 | Unknown (CR670801) | *T. nigroviridis* | 89 | ″ |
| A-64 | Unknown (CR735062) | *T. nigroviridis* | 83 | ″ |
| A-66 | Unknown (CR675533) | *T. nigroviridis* | 81 | ″ |
| A-67 | Unknown (CR668999) | *T. nigroviridis* | 84 | ″ |
| A-69 | Unknown (BT009458) | *T. aestivum* | 95 | ″ |
| A-70 | Unknown (CR716246) | *T. nigroviridis* | 83 | ″ |
| A-72 | Unknown (CR696151) | *T. nigroviridis* | 86 | ″ |
| A-74 | Unknown (AL591593) | *D. rerio* | 96 | ″ |
| A-75 | NADH dehydrogenase (AY522586) | *O. mossambicus* | 83 | ″ |
| A-76 | Troponin I (AF425744) | *D. rerio* | 93 | ″ |
| A-77 | Unknown (CR735062) | *T. nigroviridis* | 83 | ″ |
| A-78 | Unknown (CR735062) | *T. nigroviridis* | 83 | ″ |
| A-81 | Unknown CR735062 | *T. nigroviridis* | 84 | ″ |
| A-83 | Unknown (AL928695) | *T. nigroviridis* | 92 | ″ |
| A-85 | Myosin (AY525077) | *G. aculeatus* | 94 | ″ |
| A-87 | Unknown (BX294167) | *D. rerio* | 99 | ″ |
| A-88 | Unknown (CR675533) | *T. nigroviridis* | 83 | ″ |
| A-90 | Unknown (CR735062) | *T. nigroviridis* | 82 | ″ |
| A-92 | Unknown (CR680097) | *T. nigroviridis* | 87 | ″ |



Table 3-5-12. Growth-stage related genes identified in a cDNA library prepared by suppression subtract hybridization using skeletal muscle *S.inermis*

| Clone Name | Length (bp) | Accession no. | Best BLASThit | Degree of identity(%) | E-value |
|---|---|---|---|---|---|
| 6M05A3-40 | 349 | CAG04268 | unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis] | 26/42 (61%) | 3e-06 |
| 6M05A3-55 | 390 | CAF99065 | unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis] | 88/124 (70%) | 5e-42 |
| 6M05A3-58 | 470 | BAA95143 | myosin light chain 1 [Theragra chalcogramma] | 64/99 (64%) | 9e-28 |
| 6M05A3-61 | 465 | AAH80261 | Zgc:91930 [Danio rerio] | 75/93 (80%) | 2e-32 |
| 6M05A3-66 | 289 | AAL24504 | F1 ATP synthase beta subunit [Gillichthys mirabilis] | 60/76 (78%) | 1e-23 |
| 6M05A3-74 | 371 | XP_645802 | hypothetical protein DDB0216854 [Dictyostelium discoideum] | 15/44 (34%) | 4.4 |
| 6M05A3-89 | 618 | CAF97694 | unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis] | 38/54 (70%) | 5e-15 |
| 6M05A3-94 | 386 | AAH67675 | Hypothetical protein MGC66097 [Danio rerio] | 52/68 (76%) | 2e-26 |
| 6M05A4-02 | 457 | CAG12938 | unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis] | 43/44 (97%) | 3e-16 |
| 6M05A4-06 | 455 | AAH64309 | Hypothetical protein MGC77831 [Danio rerio] | 27/38 (71%) | 1e-07 |
| 6M05A4-14 | 302 | CAG80142 | unnamed protein product [Yarrowia lipolytica CLIB99] | 15/44 (34%) | 4.3 |
| 6M05A4-69 | 392 | AAG13336 | nuclease diphosphate kinase B [Gillichthys mirabilis] | 35/44 (79%) | 7e-14 |
| 6M05A4-71 | 384 | CAF98216 | unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]. | 27/52 (51%) | 8e-04 |
| 1805A1-13 | 333 | CAF95595 | unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis] | 50/66 (75%) | 9e-22 |
| 1805A1-21 | 561 | NP_571038 | desmin [Danio rerio] | 20/26 (76%) | 0.081 |
| 1805A1-22 | 609 | AAK56448 | muscle-type creatine kinase CKM2 [Oreochromis mossambicus] | 136/145 (93%) | 1e-77 |
| 1805A1-26 | 287 | CAI21043 | heat shock protein 90-alpha [Danio rerio] | 53/58 (91%) | 2e-24 |
| 1805A1-30 | 358 | AAH76020 | Ubiquitin fusion degradation 1-like [Danio rerio] | 76/83 (91%) | 1e-33 |
| 1805A1-47 | 806 | AAO24739 | creatine kinase muscle isoform 2 [Chaenocephalus aceratus] | 50/77 (64%) | 8e-18 |
| 1805A1-53 | 418 | AAP47138 | chaperone protein GP96 [Danio rerio] | 47/94 (50%) | 2e-12 |
| 1805A1-84 | 292 | CAA44737 | calcium-transporting ATPase; fast skeletal muscle Ca-ATPas [Rana esculenta] | 17/28 (60%) | 0.40 |
| 1805A1-90 | 310 | AAH56290 | Transducer of ERBB2, 1a [Danio rerio] | 40/43 (93%) | 4e-16 |
| 1805A2-09 | 284 | BAD69801 | cathepsin D1 [Takifugu rubripes] | 18/19 (94%) | 0.004 |

Table 3-5-12. (Continued)

| Clone Name | Length (bp) | Accession no. | Best BLASThit[1] | Degree of identity[2](%) | E-value |
|---|---|---|---|---|---|
| 1805A2-17 | 757 | XP_418010 | PREDICTED: similar to AMP deaminase 1 (Myoadenylate deaminase) (AMP deaminase isoform M) [Gallus gallus] | 39/57 (68%) | 4e-15 |
| 1805A2-22 | 510 | AAQ94582 | voltage-dependent anion channel 2 [Danio rerio] | 69/134 (51%) | 6e-22 |
| 1805A2-69 | 343 | AAO25756 | creatine kinase [Ictalurus punctatus] | 73/106 (68%) | 7e-33 |
| 1805A2-74 | 332 | AAH49059 | Translationally controlled tumor protein [Danio rerio] | 57/101 (56%) | 2e-24 |
| 1805A2-84 | 319 | AAR17084 | calreticulin [Oncorhynchus mykiss] | 20/27 (74%) | 2e-04 |
| 1805A2-86 | 540 | AAQ01147 | cathepsin [Paralabidochromis chilotes] | 34/41 (82%) | 4e-14 |
| 1805A2-92 | 275 | CAE00502 | TPA: desmin [Takifugu rubripes] | 45/60 (75%) | 5e-14 |
| 1805A3-04 | 475 | AAP44528 | lactate dehydrogenase-A; NAD+:lactate oxidoreductase; LDH-A [Chromis xanthochira] | 81/151 (53%) | 2e-28 |
| 1805A3-09 | 279 | AAU22411 | conserved protein YfkD [Bacillus licheniformis ATCC 14580] | 19/64 (29%) | 5.6 |

[1] Best result obtained by BLASTAX analysis using the cDNA sequence as a query in the nr database at NCBI
[2] Number of (percentage) amino acid sequence identities to the best BLAST hit in the segement compared

(2) Subtracted cDNA library로부터 선발한 기능성 유전자의 발현양상

① Semiquantitative RT-PCR

Dot blot hybridization 기법을 이용하여 subtracted cDNA library로부터 선발한 유전자의 발현양상을 확인하기 위하여 semiquantitative RT-PCR 분석을 실시하였다. 볼락 성장단계에 따른 발현양상을 조사하기 위하여, 6-18-30-42개월령 근육조직을 이용하여 발현양상을 비교하였다. Table 3-5-13은 subtracted cDNA library로부터 선발한 49개의 cDNA clone 중 발현량 차이가 뚜렷한 clone의 발현양상을 semi-quantitation으로 비교분석한 결과, dot blot analysis로 확인한 발현양상 결과와 다른 clone도 존재하였다. 몇몇 clone은 northern blot 분석으로 발현양상을 재확인을 하기도 했다. 본 연구결과로 확인된 성장단계에 따라 발현량 차이를 보이는 유전자에 대해서 유전자의 전체 염기서열을 분석



하는 등 특성해명을 연구를 수행하고자 한다.

Table 3-5-13. Semiquantitative RT-PCR analysis of selected genes.

| Clone name | Relative expression levels[a] | | | | Clone name | Relative expression levels[a] | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 6M[b] | 18M[b] | 30M[b] | 42M[b] | | 6M[b] | 18M[b] | 30M[b] | 42M[b] |
| 6M05A3-40 | +++ | + | − | − | 18M05A1-13 | ++ | +++ | ++ | ++ |
| 6M05A3-55 | +++ | ++ | ++ | ++ | 18M05A1-22 | + | +++ | +++ | +++ |
| 6M05A3-58 | +++ | ++ | + | + | 18M05A1-26 | − | +++ | + | + |
| 6M05A3-89 | +++ | + | + | − | 18M05A1-90 | − | +++ | + | − |
| 6M05A4-02 | +++ | − | − | − | 18M05A2-09 | ++ | +++ | +++ | +++ |
| 6M05A4-06 | +++ | ++ | + | − | 18M05A2-74 | − | +++ | ++ | ++ |
| 6M05A4-69 | +++ | ++ | + | + | 18M05A2-84 | ++ | +++ | + | − |
| 6M05A4-71 | +++ | − | +++ | +++ | 18M05A3-04 | ++ | +++ | ++ | − |

[a] For each gene, 100% corresponds to its hghest expression level in the different stages analyzed. Relative expression levels between : 0-20%, 21-50%, 51-80% and 81-100% are indicated as −, +, ++ and +++, respectively.
[b] Growth stages

② Northern hybridization

RT-PCR로 발현양상을 확인 clone 중 추가분석이 요구되거나 발현량이 많은 유전자에 대해서는 northern hybridization으로 발현양상을 재확인하였다(Figure 3-5-11). 발현양상은 RT-PCR 분석결과와 크게 다르지 않았으며, cDNA clone 6M05A4-71에 해당하는 유전자는 볼락의 성장초기에 발현량이 많다가 성장의 정점이라 할 수 있는 18개월령에는 발현량이 감소하였고, 이후의 성장단계에서는 발현량이 증가된 패턴을 나타내었다. 염기서열 분석결과는 그 기능이 알려져 있지 않은 유전자로서 향후 추가분석이 이루어져야 할 것이다. 또한 42개월령에 발현량이 많은 6M05A4-14 clone의 특성도 분석되어져야만 한다.

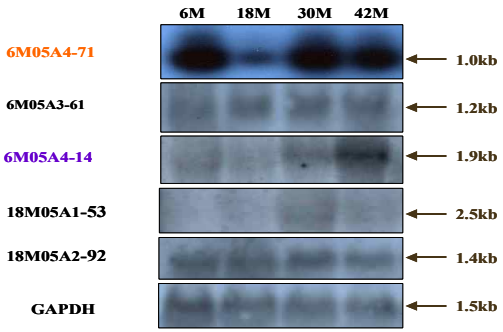



Figure 3-5-11. Northern blot analysis of differential expressed genes in various growth stage of dark-banded rockfish (*S. inermis*) skeletal muscle. The internal control gene *GAPDH* was preformed on samples.

(3) ACP-based GeneFishing$^{TM}$ PCR을 이용한 기능성 유전자 확보

① ACP-based GeneFishing$^{TM}$ PCR을 이용한 DEG 확보

Arbitrary ACP 100개를 screeing하여 6개월령 특이적인 DEG 22개와 18개월령 특이적인 43개의 DEG를 확보하였다(Figure 3-5-12). 각 DEG의 염기서열을 분석한 결과(Table 3-5-14) 5개의 DEG가 한 개의 유전자로 서로 다른 ACP로 존재하였으며, 근육형성에 관련된 유전자와 기능과 이름이 밝혀지지 않는 유전자들이었다.

② DEG clone의 발현양상 확인

65개의 DEG 중 6개월령 근육조직과 18개월령 근육조직간 발현량 차이가 뚜렷한 3개의 DEG(DEG14,DEG60, parvalbumin)의 발현양상을 real-time quantitative PCR 분석으로 확인한 결과, DEG14와 parvalbumin 유전자는 볼락 6개월령 근육조직 특이적인 발현패턴을 가지고 있고, 18개월령 이상의 근육조직에서는 발현량이 극히 미미하였다. DEG60 유전자는 6개월령 근육조직에서도 발현하고 있고, 발현량 차이가 뚜렷하지 않았지만, 볼락이 성장함에 따라 근육조직에서는 발현량이 감소하였다(Figure 3-5-13). 또한 조직 특이적인 발현 여부를 조사하기 위하여 간, 신장, 비장 조직에서 발현여부를 확인한 결과(Figure 3-5-14), DEG14와 DEG37은 근육조직을 포함하여 간조직, 신장조직, 비장조직에서도 모두 발현되었으며, parvalbumin 유전자는 근육조직



과 신장에서만 발현되었고, DEG60은 간 조직에서는 발현되지 않았으며, DEG47은 근육조직에서만 발현되었다.

③ Rapid Amplification cDNA ends(RACE) 방법으로 cDNA cloning

DEG의 염기서열을 근거로 5′ 및 3′ RACE를 실시하여, 볼락의 parvalbumin 유전자를 cloning하고 cDNA 전체 염기서열을 분석한 결과(Fig.3-5-15), 볼락 parvalmin mRNA의 크기는 659bp이었고, 110개의 아미노산을 암호화 할 것으로 추정하였다. Parvalbumin은 칼슘이온과 결합하는 단백질로 fast-contracting muscle에서만 많이 발현되는 것으로 알려져 있다(Berchtold et al., 1987).

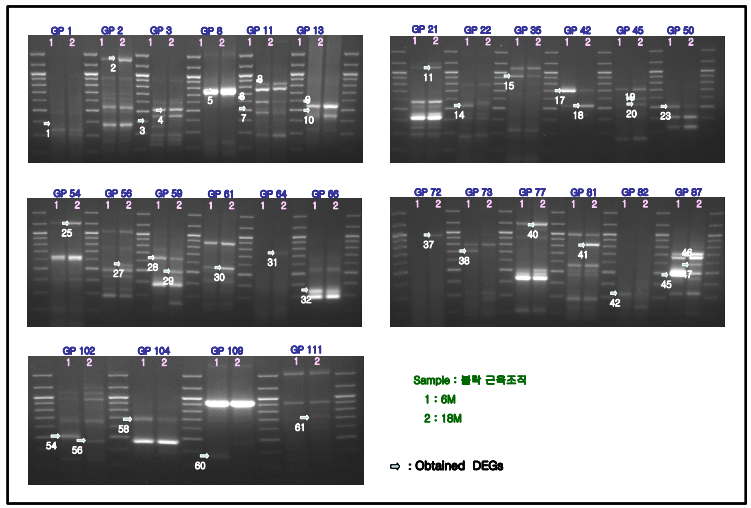



Figure 3-5-12. Results of ACP-based PCR for identification of differentially expressed genes (DEGs) from two developmental stages of the dark-banded rockfish

Table 3-5-14. Identified skeletal muscle cDNA of dark-banded rock fish that were selected in the ACP-based PCR.

| DEG No. | Specificity | GeneBank Accession No. | Sequence homology search |
|---|---|---|---|
| DEG1 | 6M | AY626067 | Lates calcarifer isolate UKM/01 parvalbumin mRNA |
| DEG2 | 18M | AY863148 | Dicentrarchus labrax glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA |
| DEG3 | 6M | | NO EST |
| DEG4 | 18M | | NO EST |
| DEG5 | 18M | AY034098 | Oreochromis mossambicus muscle-type creatine kinase CKM2 mRNA |
| DEG6 | 6M | AB045645 | Pennahia argentata mRNA for tropomyosin |
| DEG7 | 6M | AY316303 | Paralichthys olivaceus putative fast skeletal muscle troponin mRNA |
| DEG8 | 18M | CR724420 | Tetraodon nigroviridis full-length cDNA |
| DEG9 | 18M | | NO EST |
| DEG10 | 18M | | NO EST |
| DEG11 | 18M | | NO EST |
| DEG14 | 6M | | NO EST |
| DEG15 | 6M | | NO EST |
| DEG17 | 6M | AY550962 | Sparus aurata parvalbumin-like protein mRNA |
| DEG18 | 18M | | NO EST |
| DEG19 | 18M | | NO EST |
| DEG20 | 18M | | NO EST |
| DEG23 | 6M | AY550962 | Sparus aurata parvalbumin-like protein mRNA |
| DEG25 | 18M | AY436787 | Rhabdosargus sarba inducible heat shock protein 70 (hsp70) mRNA |
| DEG27 | 18M | | NO EST |
| DEG28 | 6M | | NO EST |
| DEG29 | 18M | | NO EST |
| DEG30 | 18M | | NO EST |
| DEG31 | 18M | AY034098 | Oreochromis mossambicus muscle-type creatine kinase CKM2 mRNA |
| DEG32 | 6M | | NO EST |
| DEG37 | 18M | | NO EST |
| DEG38 | 6M | AY550962 | Sparus aurata parvalbumin-like protein mRNA |
| DEG40 | 18M | | NO EST |
| DEG41 | 18M | | NO EST |
| DEG42 | 6M | | NO EST |
| DEG45 | 6M | AY550962 | Sparus aurata parvalbumin-like protein mRNA, complete cds |
| DEG46 | 18M | AB042040 | Pennahia argentata mRNA for myosin light chain 1 |
| DEG47 | 18M | MNU65229 | Makaira nigricans sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1B mRNA |
| DEG54 | 6M | AY550962 | Sparus aurata parvalbumin-like protein mRNA |
| DEG56 | 18M | | NO EST |
| DEG60 | 18M | | NO EST |



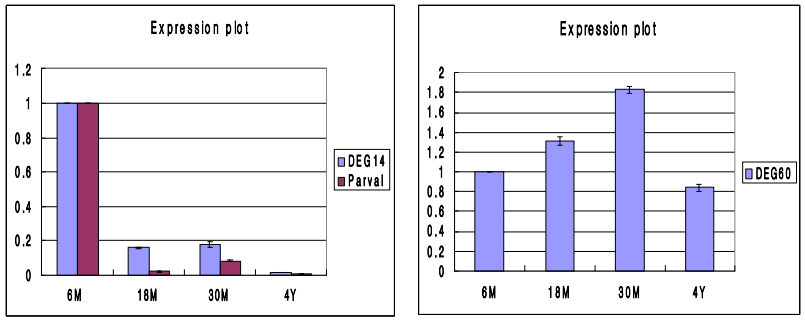



Figure 3-5-13. Relative gene expression measured by quantitative RT-PCR

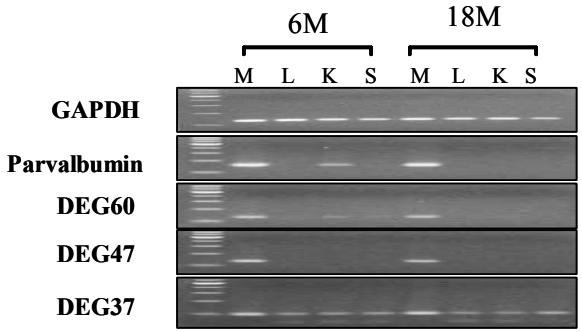



Figure 3-5-14. Tissue-specific expression patterns of DEGs in dark-banded rock fish. M, skeletal muscle; L, liver; K, Kidney, S; spleen.

```
  1 TGGCGGGCCGTCCTCGCCCTCACGCACCCCAAAGAATAAAAAAATGGCCTTCGCTGGTTT  60
                                              M  A  F  A  G  F
 61 CCTCAGTGGTACTGATATCAAAGCCGCCCTGGCTGGCTGCTCTGCTGCTGACTCCTTCAG 120
     L  S  G  T  D  I  K  A  A  L  A  G  C  S  A  A  D  S  F  S
121 CCACAAGACCTTCTTCAAGGCATGCGGCCTGGCCAGCAAGTCCGCCGATGAGTTGAAAAA 180
     H  K  T  F  F  K  A  C  G  L  A  S  K  S  A  D  E  L  K  K
181 GGCCTTCGCCATCATTGACCAGGACAACAGCGCCTACATTGAGGAGGAGGAGCTCAAACT 240
     A  F  A  I  I  D  Q  D  N  S  A  Y  I  E  E  E  E  L  K  L
241 GTTCCTGCAGAACTTCGCTGCTGGAGCCAGAGCTCTCACCGACAAGGAGACCAAGACTTT 300
     F  L  Q  N  F  A  A  G  A  R  A  L  T  D  K  E  T  K  T  F
301 CCTCGCCGCTGGAGACAGCGATGGTGATGGCAAGATTGGAGTCGATGAGTTCACTGCACT 360
     L  A  A  G  D  S  D  G  D  G  K  I  G  V  D  E  F  T  A  L
361 TGTAAAGGCATAAATTTCCACTGACCAAGATCCACTTCTTTTCATGGAACGGAGAGCTCC 420
     V  K  A  *
421 TTGCAAGATTCCGTAACCACCAGCTGAAAGAATATTTTTTTATATCTTATTTATGAGTTG 480

481 CCTGCGGATTATTTCTTAACATGGTACACATAATTTTACTGTGAATGTTATCCTCAGATG 540

541 TGTTAAATGTTCTGAATGACTCTTGCAAACTGTATAACACCATATGCACTTTTGAGGAAG 600

601 AGTGAAAACCAGGAATAAATACTCTTTTGGTTTAAAAGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  659
```

Figure 3-5-15. Complete cDNA and predicted amino acid sequencd of dark-banded rock fish parvalbumin. The start and stop codons are bloded. The open reading frame contains 330 residues.

## 3. 결론 및 토의

### 가. 실험대상 어종 선정 및 유전적 특성

어류의 기능성 유전자를 탐색하여 확보하고 활용하기 위한 실험 대상 어종을 선정하기 위하여 상업적으로 가치가 있고, 양식대상 어종 중에서 회유성 어종과 정착성 어종으로 구분하여 어류시료를 확보하였다. 또한 각 어종의 생육조건 및 성장패턴을 중심으로 자료를 수집하였다. 참돔은 주요 양식대상 어종임과 동시에 일본에서는 고가의 어종으로 연구 또한 활발하게 이루어지고 있다. 본 연구에서는 한국해양연구원의 통영 해상가두리에서 성장형질이 우수한 개체를 선발하여 친어집단으로 관리하고 있는 집단 중 일부의 시료를 확보하여 참돔의 유전적 특성을 기초로 하여 어류의 다양성을 대략적으로 파악하며, 대상어종 선정에 활용하였다. 본 연구에서 활용한 어류집단의 유전적 특성파악에 이용한 RAPD(Random amplification of polymorphic DNA) 법은 PCR 기법을 이용하여



arbitrary oligonucleotide primer에 의해 생성된 DNA 증폭산물을 분석하는 방법으로, DNA sequence diversity에 기초하여 genetic heterogeneity 결정에 유용한 방법이다(Welsh 와 McClelland, 1990). 목적으로하는 DNA sequence에 관한 사전정보 없이 arbitrary sequence의 single primer 만을 이용하여 genomic DNA 증폭이 가능하며, RAPD 방법은 신속하고 좀 더 간편하게 RAPD marker를 얻고, nucleotide polymorphism을 규명할 수 있다(Menard 등, 1992). 참돔의 성장특성을 비교분석하기 위한 연구의 접근방법으로 후보유전자 분석(candidated gene approach)을 실시하였으며, 지방축적에 관여하는 *LPL* 유전자를 후보유전자로 선정하였다. Lipoprotein lipase(LPL)은 지방축적과 대사에 있어 중요한 enzyme(Nilsson-Ehle 등, 1980)으로 지방조직과 근육내로의 지방산 유입을 조절한다. LPL protein은 secretion, glycosylation, catalysis, lipid와 heparin binding에 필요한 다양한 functional domain을 가지고 있으며, 이들 functional domain은 다른 species 간에 잘 보존 되어있다(Wion 등, 1987; Enerback 등, 1989). LPL은 여러조직에서 합성되고, LPL 유전자의 발현은 조직특이적인 방법으로 동물의 생리상태, 영양상태 및 발달단계에 따라 조절된다(Enerback 등, 1988; Cooper 등, 1989: Semenkovich 등, 1989). 어류의 *LPL* 유전자에 관한 연구는 zebrafish와 rainbow trout에서 이루어졌으며, cDNA 및 genomic structure의 일부가 밝혀졌고(Arnault 등, 1996), 최근에는 참돔 LPL 유전자의 전체영역이 보고되기도 하였다(Oku 등, 2002).

참돔 집단의 유전적 특성 분석에서 23개의 random primer로 75개의 다형 DNA 단편을 확인한 결과로부터 어류의 개체간 변이율이 큰 것으로 판단하였고, 기능성 유전자 탐색에는 개체간의 차이를 줄이기 위하여 어류 시료는 10개체 섞어 한 개의 처리구로 만들었다.

정착성 어종의 성장특성에 관한 자료를 수집하는 과정에서 같은 *sebastes* 속 어종인 볼락과 조피볼락의 성장속도의 차이가 두드러짐을 확인하였다. 볼락은 쏨뱅이 목(Scorpaeniformes)의 양볼락과(Scopaenidae)에 속하며, 연안 바위지역에서 무리지어 생활하는 난태성 경골어류로서 난생어류와 달리 어미의 체내에서 부화하고, 약 3-4일간 어미의 생식소 내에서 물질대사를 하며 머물다가 산출하는 번식특성을 갖고 있으며(Shimizu 등, 1991), 볼락은 낮은 수온에 강하며, 우리나라 전해역에서 월동이 가능한 어종이다. 이에 볼락을 분석 대상어종으로 선정하고 초기성장단계인 6개월령과 성장이 급격하게 이루어지는 18개월령의 근육조직에서 발현되는 유전자를 비교분석하고자 하였다. 기능성 유전자 탐색은 성장형질에 근거하여 성장단계 특이적으로 발현하는 유전자를 발굴하고, 이 유

전자들의 특성 및 기능을 밝히고자 하였으며, 낮은 수온에서 강한 자료를 토대로 *sebastes* 속의 다른 어종을 비롯한, 저온 생육 가능한 어종 및 열대성어종을 중심으로 성장관련 기능성 유전자를 비교분석하고 이용기술 개발에 기초자료로 제공하고자 하였다.

**나. 어류의 기능성 유전자 탐색**

어류도 다른 동물과 같이 1년을 단위주기로 성장속도에 변이가 생기며, 어류의 성장에 따른 형태변화나 생활사 등은 일반적으로 체장을 기준으로 하고 있다. 어류의 체장 또는 체중의 증가는 다른 생물과 같이 환경요인, 특히, 수온의 고저, 섭이량의 다소 등에 따라 좌우된다. 어류의 성장은 수온에 의해 지배되며, 어류가 몸을 유지하기 위해 필요한 에너지는 수온에 따라 달라진다. 어류의 활동이 왕성할수록 식욕이 증가하고, 많은 양의 먹이를 먹고, 결과적으로 성장이 빠르다(김용억, 1978). 어류 성장의 지표가 되는 체장 및 체중의 증가는 근육량 증가를 초래할 것으로 보아 본 연구에서는 연령이 다른 볼락의 근육조직으로부터 mRNA의 변화를 조사하고, 이로부터 성장관련 기능성 유전자를 발굴하기 위하여, 두 집단의 발현 유전자를 비교분석하여 발현량 차이를 나타내는 유전자를 확보하는 differential screening을 이용하였다. Subtractive cDNA hybridization 방법과 ACP(Annealing Control Primer)-base PCR 방법을 적용하였다.

Subtractive cDNA hybridization은 발현유무 및 발현정도에 차이를 나타내는 유전자의 cDNA를 분리하는데 있어 강력한 접근방법으로 알려져 있다(Duguin과 Dinauer, 1990; Hara 등, 1991). mRNA differential display(Liang 등, 1992)와 arbitrary primed PCR에 의한 RNA fingerprinting (Welsh 등, 1992)은 발현양상이 다른 유전자를 찾아내는 빠른 방법들이긴 하지만, 이들 두 방법은 false positive가 많고 , 많은 copy수를 갖는 mRNA일 경우에 가능한 방법이다(Bertioli 등, 1995). 본 연구에서는 하나의 집단(tester)에서 유래된 cDNA를 다른 집단(driver)에서 유래한 cDNA를 hybridization을 실시하여 동일한 유전자는 제거하고, hybridization 되지 않은 fraction(target)을 분리해내는 과정으로 크게 나눌 수 있으며, 6개월령 근육조직 및 18개월령 특이적인 cDNA library를 구축하고 분석하였다. Dot blot 분석으로 확인된 성장단계에 따라 특이적으로 발현되는 유전자의 염기서열을 분석한 결과, 기능이 밝혀지지 않은 유전자가 많았고, 볼락의 성장초기단계인 6개월령 특이적인 유전자들은 myosin, tropomyosin, tronin 등 근육의 분화나 수축에 관여하는 유전자 그룹과 pyruvate kinase, NADH dehydrogenase 등 에너지 대사관련 유전자들이었다. 볼락의 성장초기단계인 6개월령에는 근육의 분화가 활발히 이루어지고, 에너지 대사율 또한 높을 것으로 사료된다. 18개월령 특이적 발현 유전자에는 heat shock protein 90, chaperone protein GP 96, cathepsin, translationally control tumor protein 등의 유전자가 있었으며, 이 시기에는 면역관련 유전자를 포함하여 외부의 환경변화에 적응에 필요한 유전자들이 발현될 것으로 추정이 가능하다. 기능이 알려져 있지 않은 유전자의 성장단계에 따른 발현양상을 분석한 결과와 성장단계 특이적 발현 유전자의 발현양상 재확인을 위하여 실시한 northern blot 분석결과로부터, 성장초기부터 성장의 정점 도달시기까지 발현량이 많다가 18개월령 이후에는 급속도로 발현량이 감소하는 유전자 그룹이 볼락의 근육조직에 존재함을 알 수 있었다. Subtraction library로부터 확보한 특이발현 유전자들은 clone의 염기서열을 기초로하여, *sebastes*속 어종 중 빠른 성장패턴을 가지고 있는 조피볼락을 비교대상 어종으로 정하여 비교분석 중에 있으며, 유전자의 특성을 밝히고자 한다. 비교하고자 하는 두 개 이상의 시료간 mRNA 발현 차이를 보이는 유전자를 일컫는 DEG(differentially expressed gene)를 찾는 방법인 ACP-base PCR은 ACP(Annealing Control Primer)를 이용하여 첫 번째 PCR(annealing temperature, Ta=50℃)에서는 target 영역만 primer 기능을 하도록 하고, 비 target 영역은 기능을 차단하게 하고, 두 번째 PCR(Ta=65℃)단계에서는 비 target 영역만 특이적으로 annealing하여 많은 DNA를 얻을 수 있도록 하는 방법이다. 본 연구에서는 이러한 ACP를 이용하여 DEG를 확보하였으며, 이 방법이 기존의 DD-PCR(Differential Display-PCR)과 다른점은 3개 이상의 anchor dT(A anchored dT, G anchored dT, C anchored dT)를 사용하여 cDNA를 3개 이상의 sub-population으로 구성한다는 점이다. 또 arbitary ACP와 oligo-dT ACT 조합으로 PCR을 수행하여 발현량 차이가 정확한 PCR 산물만 얻을 수 있으며, 그 PCR 산물을 agarose gel 상에서 쉽고 간편하게 확인이 가능하다는 점이다. 본 연구에서는 100개의 ACP primer를 screening하여 65개의 DEG를 얻었으며, 염기서열을 분석하여 상동성 검색을 실시한 결과 subtracted cDNA library에서 확보한 유전자들과 대체로 유사하였다. 발현량 차이가 뚜렷한 3개의 DEG(DEG14, DEG38, DEG60)를 1차적으로 real time PCR 기법으로 발현량 차이를 재확인하였으며, DEG14와 DEG60은 기능이 알려지지 않은 유전자이었고, DEG38은 *Sparus aurata*의 parvalbumin-like protein을 암호화하는 유전자와 87%의 identity를 갖고있었으며, 근육조직과 신장조직에서는 발현이 되는 반면에, 간과 비장에서는 발현되지 않았다.

Parvalbumin은 근육의 수축시 많이 발현되는 유전자로, 뇌와 몇몇 내분비관련 조직에서는 소량발현되는 것으로 보고되었고(Berchtold, 1987), Chauvigne(2005) 등은 troponin, myosine-binding protein C와 같은 근육특이적인 유전자들과 함께 embryo 후기단계에서만 transcription이 시작된다고 보고하였다. 또한 parvalbumin은 물고기가 성장함에 따라 형태가 다르며, 유어시기에는 isoform인 PAⅡa와 PAⅡb가 발현되며, 성어기에는 PA Ⅴ 형태로 발현된다고 알려졌다(Focant, 2000).

볼락 근육조직에서 발현되는 parvalbumin 유전자의 mRNA크기는 659bp이었으며, 염기서열로부터 110개의 아미노산을 암호화 하는 것으로 판단하였다. 전체 유전자의 구조를 분석하고, 다른 어종의 시료를 이용하여 발현량 및 transcript 크기 등을 비교분석 중에 있다.

본 연구의 수행으로 볼락의 성장단계 특이발현 유전자들을 확보할 수 있었고, 발현양상 분석 등 기능해석에 관한 지속적인 연구수행으로 어류의 특정형질관련 기능성 유전자 확보를 위한 토대가 될 것으로 판단한다.



# 제 6 절 신규 해양천연물 분리

## 1. 연구 재료 및 방법

본 연구사업의 연구목적은 극한 환경에 서식하는 해양생물의 생리활성물질을 탐색하는 것으로써 해양생물시료의 채집, 생리활성물질의 분리, 구조결정, 생리활성 검색 등의 과정을 주된 연구과정으로 수행하였다.

연구에 사용된 해양생물은 본 연구실에서 1990년대 이후 지속적으로 채집한 시료들 가운데 1999년 제주도 모슬포 인근 해역, 2000년 동해안 일대에서 채집한 시료를 포함하였으며, 본 연구사업이 시작한 이후인 2003년과 2005년 한국해양연구원의 남태평양 해양연구센터가 있는 마이크로네시아의 축섬 연안에서 채집한 열대 해양생물시료를 주로 다루었다. 특히 두 차례의 열대 생물시료의 채집은 열악한 현지의 여건과 생물시료의 국내반입이라는 어려움 속에 수행되었으며, 채집된 23종의 열대 해양생물은 현지에서 부분 동결건조 후 저온 상태로 항공 운반되었다.

채집된 저서군체동물과 해조류의 유기 조추출물에 대하여 세포독성, 항미생물, 효소저해활성 등을 검색하였고, 천연물 연구를 위한 시료를 선정하였다. 마이크로네시아에서 채집한 일부 해양생물 시료의 경우 우수한 활성을 보임에도 불구하고 채집 후 국내 반입된 시료의 양이 적어 계속적인 천연물 탐색연구를 수행하지 못했으며 이들은 향후 추가 채집 이후 연구가 계속될 것이다. 충분한 양의 시료가 확보된 6종을 일차적인 연구대상으로 하여 유기물질의 추출과 분획, 크로마토그래피 방법을 활용한 천연물의 분리, 분광학 및 유기화학적 방법을 활용한 천연물의 구조결정 등 생리활성물질의 탐색이 이루어졌다.

이들의 분리 및 구조결정방법과 생리활성은 생물의 종류별로 나누어 본 장의 2, 3절에 요약되었다. 일부 생리활성 신물질의 경우 현재 구조의 확인과 생리활성 검색 등 추가적인 연구가 진행 중이고, 특허출원에 의한 지적재산권 획득의 가능성을 지니고 있어 본 보고서에는 자세한 내용의 기술을 생략하였음을 밝힌다.

## 2. 연구 개발 결과

### 가. 해조류의 천연물

(1) 연구의 배경

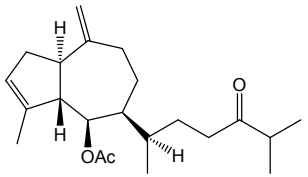
해양천연물 연구에서 해조류가 차지하는 비중은 약 30%를 상회하는 것으로 알려져 있다. 초기의 해양 천연물 연구는 채집이 용이한 갈조류와 홍조류 등 대형 해조류에 집중되었

으며 이들로부터 많은 천연물이 분리되어 보고되었다. 대형 해조류가 생리활성 천연물을 생산하는 이유는 해양 초식동물에 대한 화학방어를 위한 수단을 포함하는 것으로 알려져 있으며 이들 중 많은 수가 항미생물, 항진균, 항바이러스 등의 생리활성을 가지고 있어 신약개발뿐 아니라 기능성 식품으로의 개발 가능성이 크다(신 등, 1992).
최근에는 대형 해조류 외에도 남조류와 식물성 플랑크톤이 차지하는 생태학적 중요성으로 인해 이들에 대한 천연물 연구도 활발히 진행되고 있으나 전반적으로 해양 식물의 천연물 연구는 위축되는 양상을 보이고 있다. 이는 기존의 많은 연구결과로 인해 신물질을 찾기 힘들어진 것에 기인한 결과로 보인다. 그러나 동일한 종의 식물이라도 서식환경에 따라 생산하는 천연물의 종류가 다를 수 있고, 대형 해조류는 다른 해양생물과 달리 양식이 용이하여 대량생산이 가능하기 때문에 해양식물의 천연물 연구는 지속적으로 수행되어야할 것이다.
육상 식물이 생산하는 천연물에 비해 해양 식물의 천연물은 짧은 역사로 인해 발견된 화합물의 수는 훨씬 적음에도 불구하고 몇 가지 구조적 특성을 발견할 수 있다. 즉, 알칼로이드 화합물이 적은 대신 할로겐 화합물의 발견빈도가 높고, 터피노이드 화합물의 다양하게 발견된다. 따라서 육상 식물에 비해 연구의 역사가 짧아 상대적으로 신물질의 출연빈도에 높고, 구조적인 다양함을 나타내고 있다.
해양식물에서 추출되어 분리, 정제된 천연물중 오랜 역사를 지닌 화합물은 cartenoids 계의 화합물이다. 이들 pigment는 해양 동물 전반에 걸쳐 광범위하게 발견되고 있으며, 해양식물에서도 다량 존재하는 것으로 보고되고 있다. 또한 이 색소chlorophyll에 의한 광합성을 돕는 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 대부분의 해양식물에서 발견되는 cartenoids와 같은 화합물을 제외한 천연물은 생합성의 기원을 배경으로 살펴보면 terpenoids와 polyketides 그리고 terpene을 포함한 혼합된 생합성 화합물이 대부분이다. 그리고 일반적으로 amino acid 유래 질소화합물은 식물성 플랑크톤에서 주로 발견되는 것으로 알려져 있다. 편의상 식물에 분류되기도 하지만 실제로  박테리아인 남조류를 제외한 해양식물의 천연물의 분포를 간단히 살펴보면 다음과 같다.
홍조류는 해양식물 가운데 가장 많은 연구가 진행된 종이다. 그 이유는 해조류의 대부분이 홍조류로써 그 종의 수는 홍조류를 제외한 다른 해조류를 합한 것보다 많기 때문이다. 그리고 갈조류와 녹조류가 많은 일부 고위도 지방을 제외한 대부분의 위도에서 홍조류가 많으며, 저위도로 갈수록 더욱 많아지기 때문이다. 홍조류는 일반적으로 색깔에 의해 구별되는데 phycoerythrin이라는 색소에 의해 붉은 색을 띤다.
특히 홍조류 가운데 Laurencia 속으로부터 가장 많은 종류의 화합물이 발견되었다. 홍조류의 천연물은 구조적으로 아주 다양한 화합물을 함유하고 있으나 주로 terpenoids와 fat에서 기원한 화합물이 많다. 이와 더불어 홍조류 천연물의 특징은 할로겐 화합물이 많다는 점이다. 이들 할로겐 원자는 천연물의 구조결정이라는 관점에서 보았을 때 탄소골격뿐 아니라 입체화학 구조를 밝히는데 커다란 장애요인이 되기도 한다. 그래서 할로겐이 포함된 홍조류의 terpene 화합물은 X선 분광학을 이용하여 구조를 결정하는 경우가 많다.

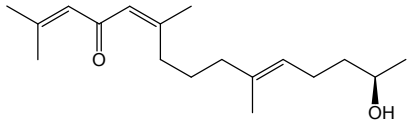


갈조류는 홍조류에 비해 종류가 적고 상대적으로 위도가 높은 지역에 다량 서식한다. 그리고 군체나 단세포 등 간단한 구조를 가진 갈조류가 없기 때문에 대부분 육안으로 관찰할 수 있고 fucoxanthin이 클로로필을 덮고 있어 갈색을 나타낸다. 많은 종류의 갈조류가 상업적으로 재배되는데 이들의 주성분은 polysaccharide이다. 이외에도 lipid로부터 복잡한 구조의 다양한 천연물을 함유하고 있다. 해양천연물 연구의 관점에서 보았을 때 갈조류는 홍조류와 함께 가장 많은 연구가 수행된 해조류에 속한다. 갈조류의 천연물의 특징은 alkaloid 화합물과 할로겐화 물질이 아주 적고, terpene 화합물이 대부분이라는 것이다.

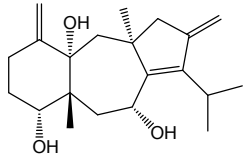
녹조류는 바다보다 주로 열대 및 온대의 담수에 많이 서식한다. 해양 녹조류는 대부분 다핵세포로 유생생식을 하는 것으로 알려져 있고, 클로로필 a, 클로로필 b, 크산토필 및 카로틴계 색소를 함유하고 있어 초록색을 띤다. 녹조류 대사물질의 특징은 여러 개의 이중결합을 보유한 terpenoids 화합물이 많이 발견된다는 점이다. 이들은 간혹 고리를 형성하거나 삼중결합의 형태를 가진 유도체로 발견되기도 하며 어류에 대하여 독성을 보인다.
본 연구과제와 관련하여 우리나라 동해안에서 채집한 다수의 해조류에 대하여 생리활성물질을 얻기 위한 천연물 연구가 수행되었으나 신물질을 발견하기 쉽지 않았다. 그중 다양한 terpene 화합물을 함유하고 있는 것으로 밝혀진 갈조류 Dictyopteris divaricata의 천연물 연구에 관하여 아래에 기술한다.



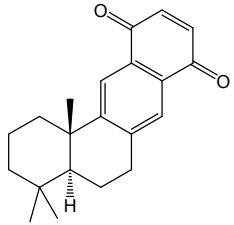
dictyone acetate (*Cystoseira myrica*)



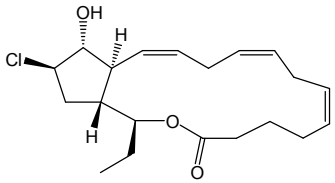
hedaol A (*Sargassum* sp.)



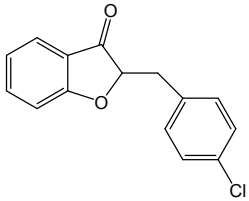
dichotenone A (*Dictyota dichotoma*)



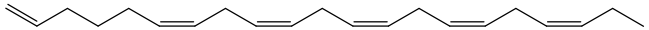
cyclozonarone (*Dictyopteris undulata*)



eiseniaiodide B (*Eisenia bicyclis*)



4'-chloroaurone (*Spatoglossum variabile*)



(all-Z)-henicosa-1,6,9,12,15,18-hexaene (*Fucus vesicuosus*)

Figure 3-6-1. Examples of bioactive natural products from brown algae



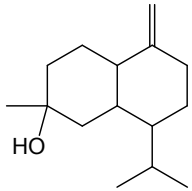
(2) 갈조류 Dictyopteris divaricata의 천연물

갈조류 Dictyopteris divaricata (시료번호 00KH-15)는 2000년 6월 동해안 공현진 앞바다의 수심 5-15m에서 스킨스쿠바로 채집되었고, 시료의 분류는 한국해양연구원의 강래선 박사에 의하여 이루어졌다. 채집된 시료는 현장에서 음지에서 잠시 말린 뒤에 드라이아이스로 냉동되어 연구실로 운송되어 영하 25 ℃에서 보관되었다. 이 시료를 연구대상으로 선정한 이유는 유기용매를 이용하여 얻어진 조추출물(crude extract)에 대한 생리활성검색결과 인체의 백혈병 세포주 K562에 대하여 중간정도의 세포독성을 나타내었고 약한 항바이러스 활성이 있는 것으로 나타났으며 비교적 많은 양의 시료가 확보되었기 때문이다.

채집에서 얻어진 시료를 동결건조 하여 수분을 제거하고 잘게 자른 후 methanol과 dichloromethane을 순차적으로 이용하여 유기물질을 추출하였다. 합한 조추출물은 n-BuOH와 물을 이용하여 극성에 따른 분배를 하였고, n-BuOH 층의 용매를 제거한 후에 남은 잔류물은 다시 15% aqueous MeOH와 hexane으로 분배하였다. 감압증류한 aqueous MeOH 층의 잔류물질을 C18 reversed-phase vacuum flash chromatography를 하였고 용리 용매는 순서에 따라 50%, 40%, 30%, 20%, 10% aqueous MeOH, 100% MeOH를 사용하였다. 각각의 분획에 대한 1H NMR 분석과 세포 독성검사를 한 결과 중정도 극성의 분획에 terpene계의 이차대사물질이 함유되어 있음이 드러났다. 분획 중 10% aqueous MeOH 분획을 소량의 20% aq. MeOH에 녹인 후에 Sepak으로 여과한 다음, 용출물을 20% aq. MeOH을 용리용매로 하여 C18 reversed-phase HPLC로 분리하여 compound A(00KH-15-A)와 B(00KH-15-B)를 얻었다. 이어 분획 중 100% MeOH 분획을 위와 동일한 방법으로 HPLC하여 다수의 terpene 화합물을 얻었으며 문헌조사와 database 검색결과 대부분 알려진 화합물로 밝혀졌다.

주 대사물질(major metabolite)인 물질 00KH-15-B는 백색의 gum 상태로 분리되었다. 고해상질량분석과 탄소 NMR에 의하여 이 물질의 분자식은 $C_{15}H_{26}O$로 결정되었다. 화합물 00KH-15-B의 NMR 자료는 여러 가지 면에서 terpene의 특징을 잘 드러내고 있다. 먼저 13C NMR자료에서 δ47.4 - 20.8에 나타난 열 두 개의 탄소와 이에 상응하는 1H NMR δ 2.37 - 0.90 ppm의 신호는 이 화합물이 terpene계임을 나타내었고, 0.90, 0.98, 1.14 ppm의 methyl 시그널은 이를 뒷받침하였다. 13C NMR δ149.9, 101.8 ppm의 peak와 1H NMR δ 4.79, 4.67 ppm의 신호는 exo-olefine의 존재를 나타내었고, 13C NMR δ71.2 ppm의 신호는 한 개의 hydroxy 기가 있음을 짐작하게 하였다. 이상의 일차적인 정보를 바탕으로 하여 물질 00KH-15-B의 개략적 구조는 1H COSY, gradient HSQC, gradient HMBC 등 NMR 실험에 의하여 밝혀졌다. 먼저 gradient HSQC 실험에 의하여 이 화합물의 모든 수소와 이들이 직접 결합된 탄소가 정확히 지정되었고, 1H COSY 실험으로 수소원자로 구성된 여러 개의 spin system이 규명되었다. 특히 1H COSY 실험 결과의 해석에 의하여 다수의 연결 구조가 밝혀졌다. 즉, δ0.98 및 0.90과 1.94 ppm, δ1.20과 2.30 ppm, δ 1.40과 1.78 ppm, δ1.58과 2.07 및 2.16 ppm 등이 그것이다. 그리고 1H NMR 자료에서

각각 δ0.90, 0.98 ppm에 나타난 signal을 중심으로 한 spin system에서 gHMBC 실험 결과로부터 13C NMR의 δ28.1, 47.3 ppm의 두 methine 탄소가 인접해 있음을 알 수 있었고, exo-olefine 수소와 13C NMR의 δ32.6, 38.4 ppm의 탄소가 역시 인접해 있음을 알 수 있었다. 이들 결과를 종합하여 00KH-15-B의 이차원 구조를 밝혔으며, 구조는 아래와 같은 cyclic sesquiterpenoid로 밝혀졌다.




추가로 다수의 sesquiterpenoid가 분리되었고 정확한 구조 분석을 위한 연구가 진행 중이다.



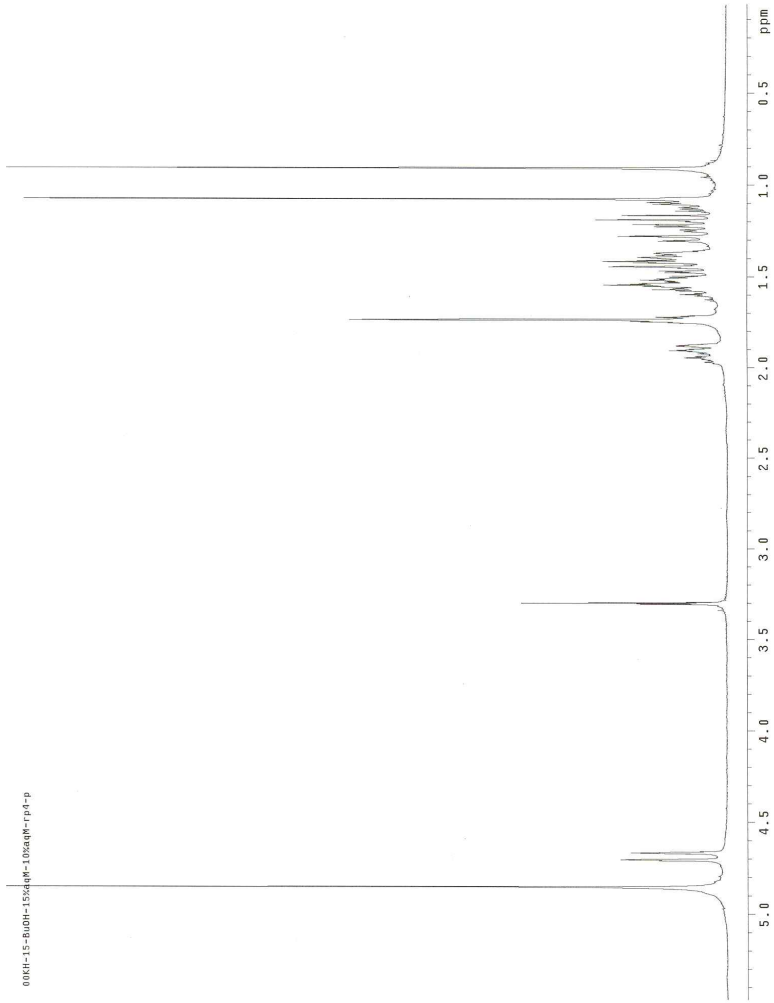



Figure 3-6-2. Proton NMR spectrum of 00KH-12-A.

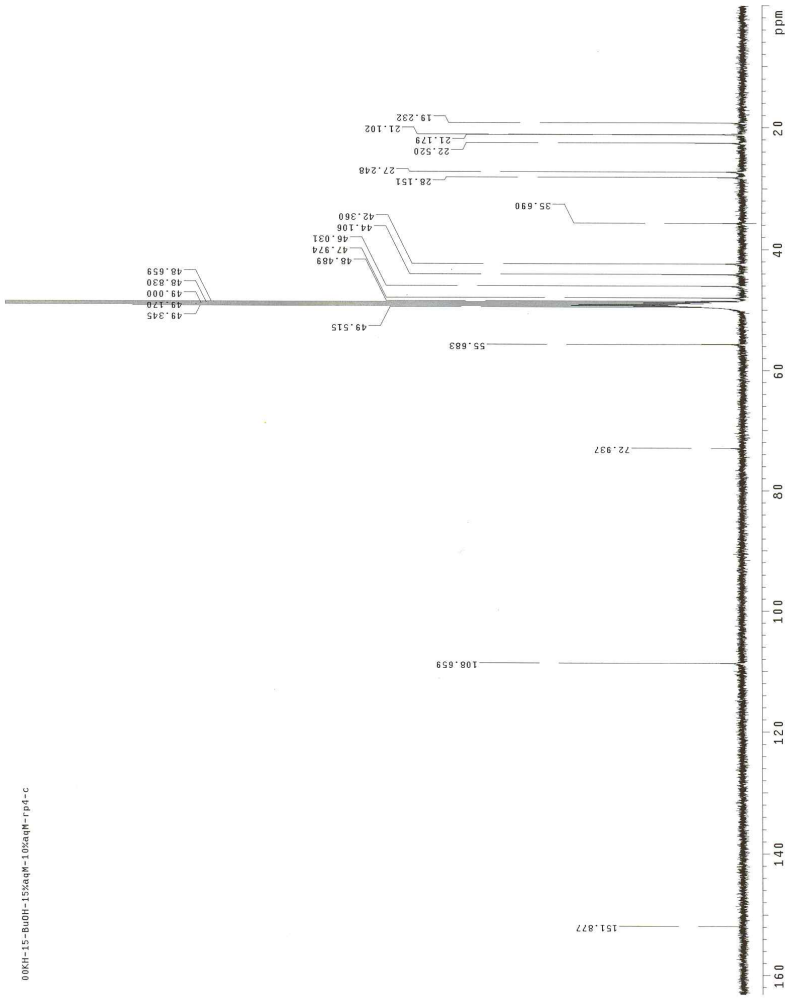



Figure 3-6-3. Carbon NMR spectrum of 00KH-12-A.

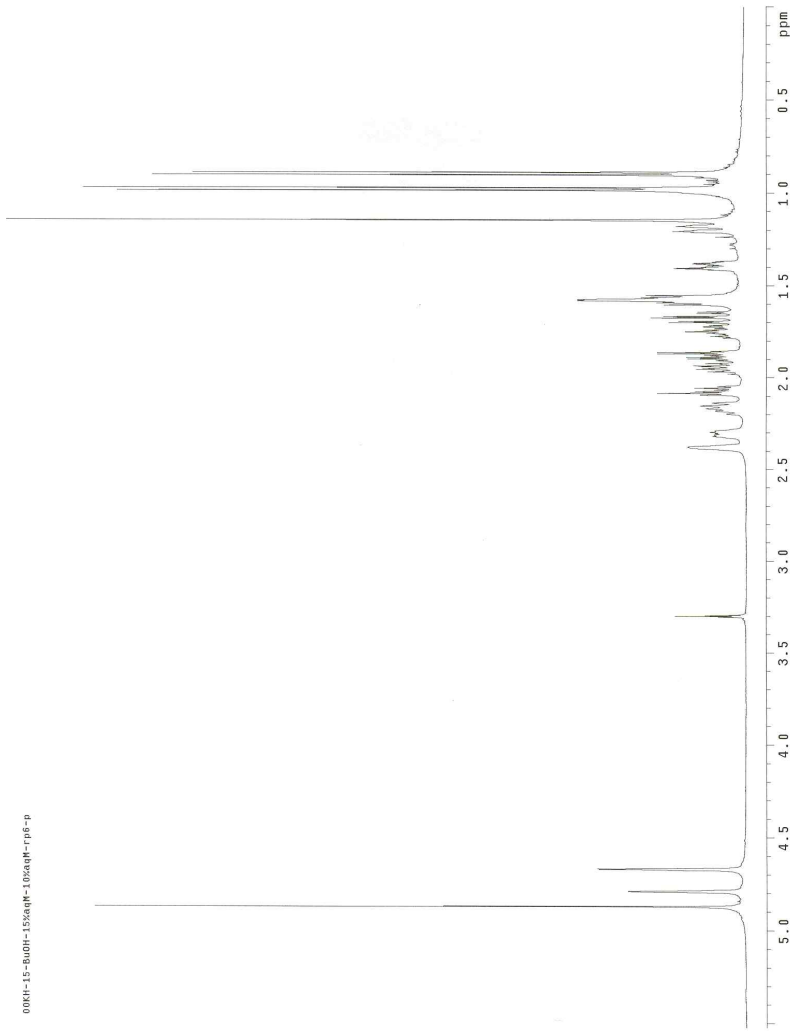



Figure 3-6-4. Proton NMR spectrum of 00KH-12-B.

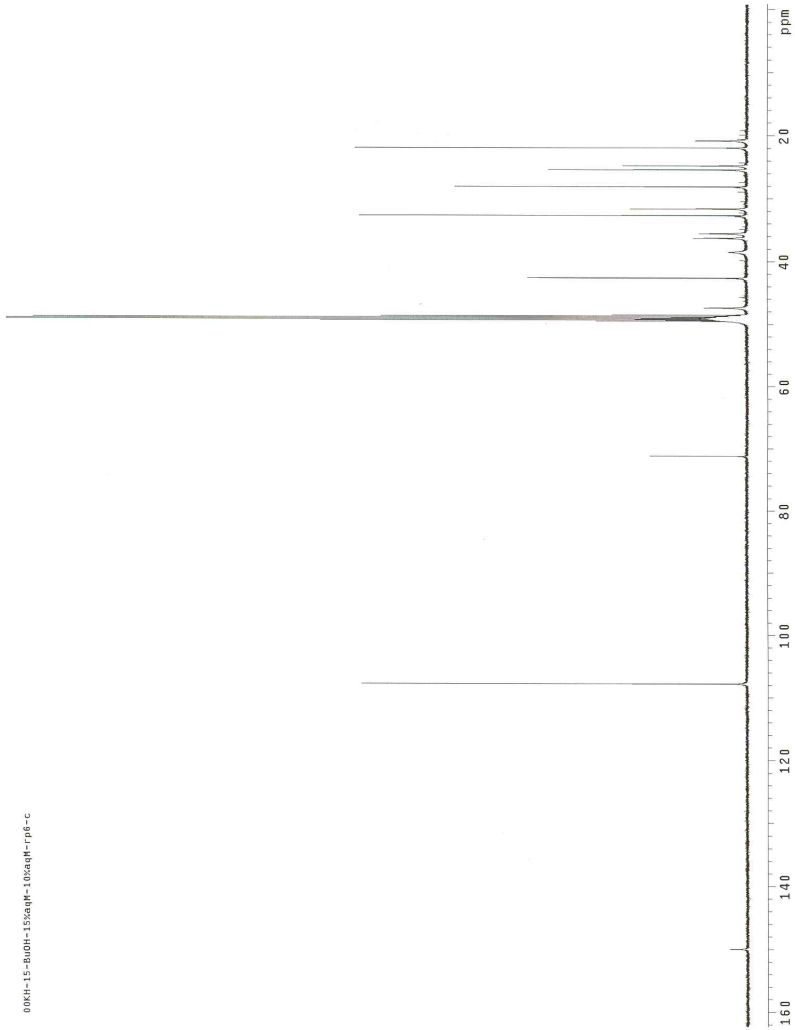



Figure 3-6-5. Carbon NMR spectrum of 00KH-12-B.

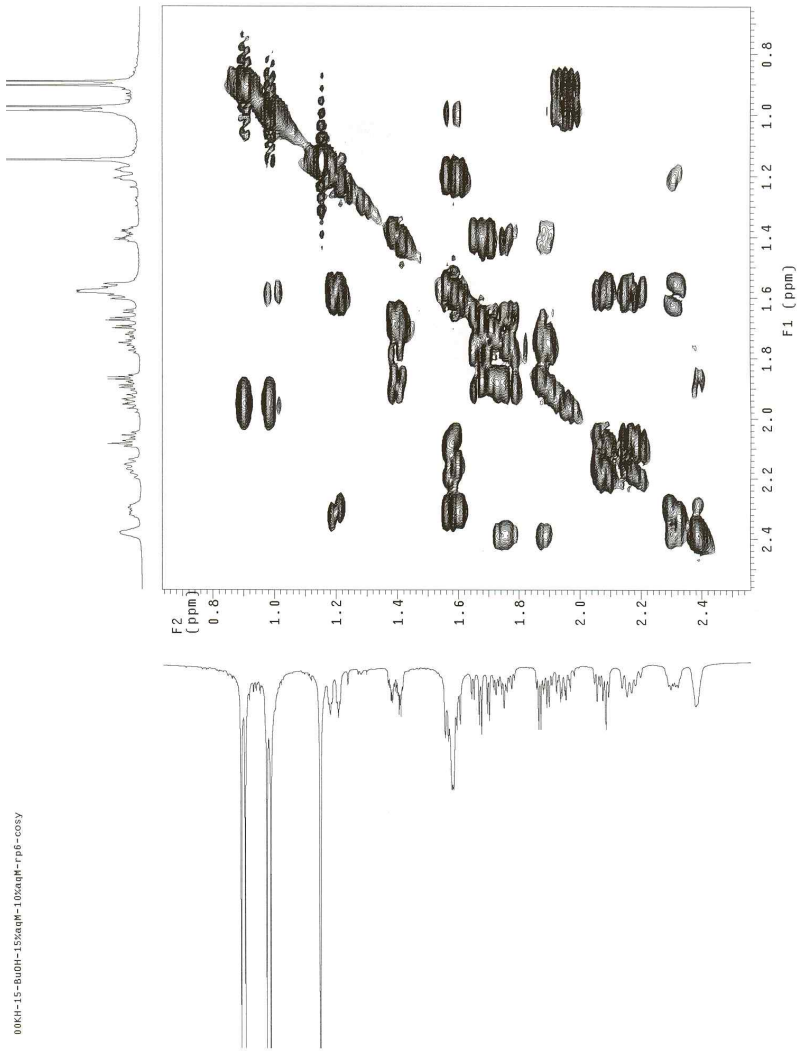



Figure 3-6-6. Proton COSY spectrum of 00KH-12-B.

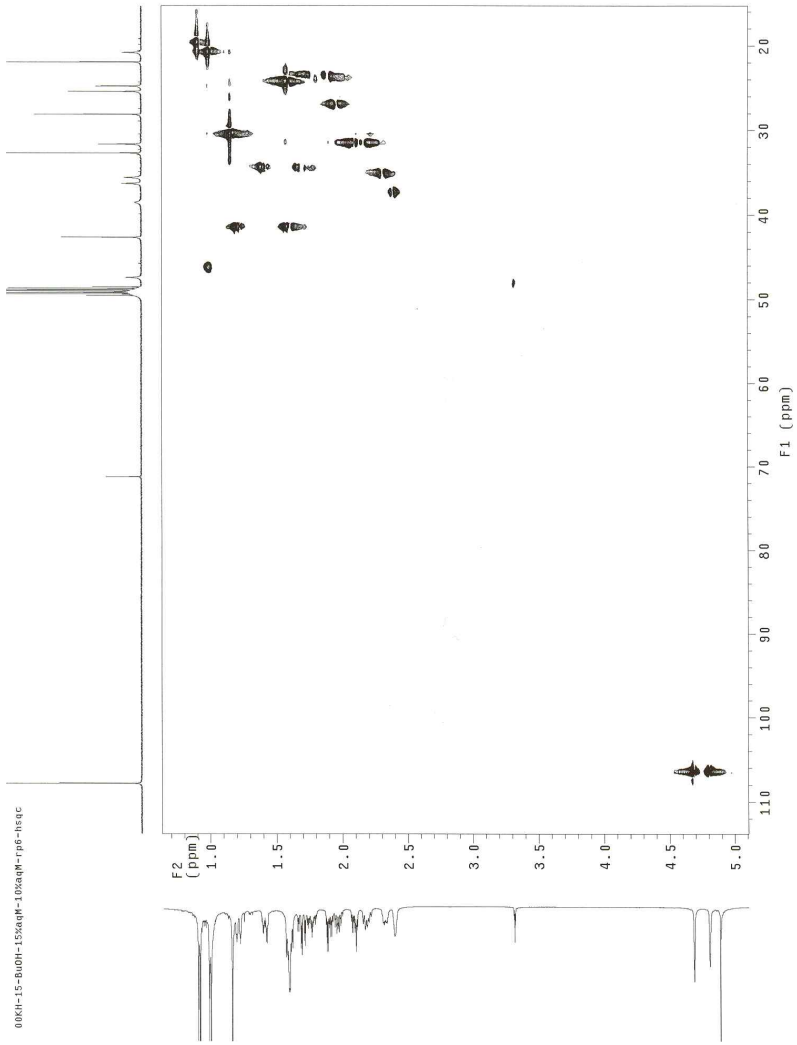



Figure 3-6-7. Gradient HSQC spectrum of 00KH-12-B.



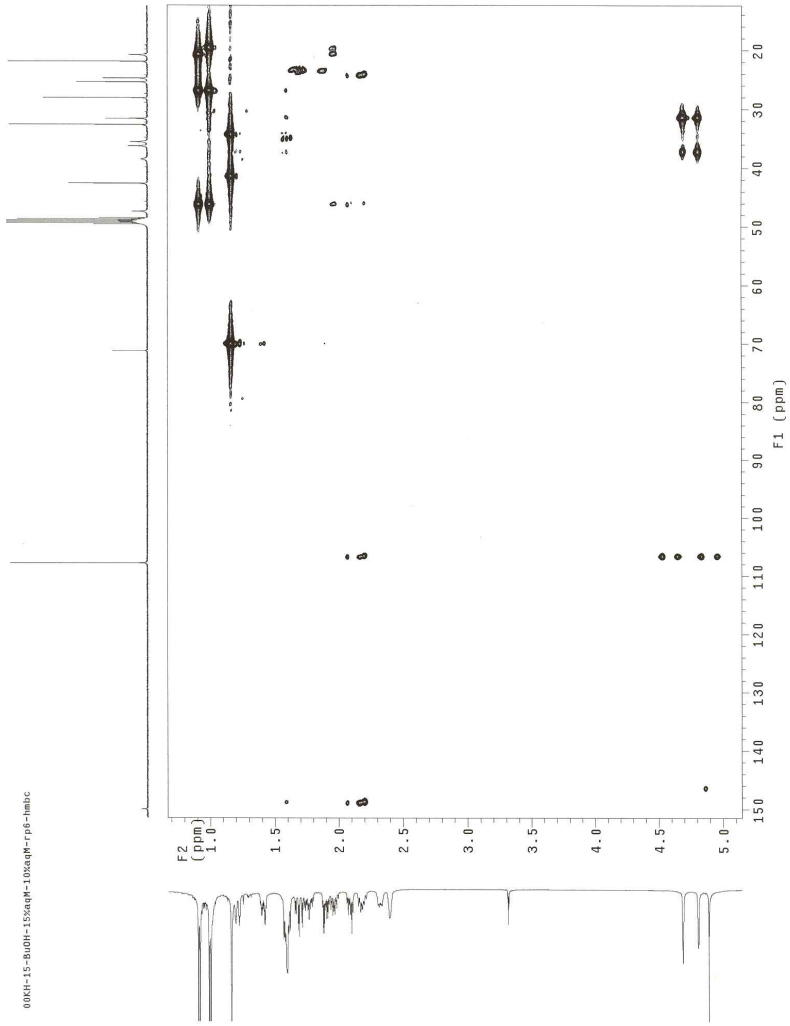



Figure 3-6-8. Gradient HMBC spectrum of 00KH-12-B.

## 나. 해면동물의 천연물

(1) 연구의 배경

해면동물은 약 6억 년 전부터 지구상에 생존한 생물로서, 미분화된 다세포 동물이다. 조간대에서 심해까지, 그리고 열대해역에서부터 극지까지 널리 분포하고 있고, 약 10,000종이 현존하는 것으로 알려져 있다. 해면이 이와 같이 오랜 기간 동안 잘 번성하고 있는 것은 여러 가지 요인이 있겠지만 그중 중요한 하나는 포식자로부터 스스로를 방어할 수 있는 화합물을 많이 함유하고 있기 때문이다. (홍 등, 1995)

해면동물은 종류가 다양하고, 채집의 용이할 뿐만 아니라 생리활성 물질을 함유하는 빈도가 높아 해양천연물 연구의 주요한 대상이 되어 왔다. 해면동물이 생산, 함유하는 천연물은 종류가 아주 다양하고, 여러 생화학적 기원을 가진 물질들을 망라하고 있다. 실제로 해면으로부터 분리한 다수의 천연물이 세계적인 연구그룹에 의해 항암제, 항진균제, 항바이러스제, 효소저해제, 소염진통제 등으로 개발 중에 있다. 현재 의약품으로 개발되고 있는 대표적인 예를 들면 Discodermia dissoluta로부터 분리된 항진균 항암물질 discodermide, Luffariella 속의 소염, 진통물질 manoalide, Halichondria okadai의 항암물질 halichondrin B, Jaspis의 항진균, 항암물질 jaspamide, Topsentia 속의 항암, 소염물질 topsentins, Theonella 속의 항혈전물질 cyclotheonamides 등이 있다. 현재 항바이러스제 혹은 항암제로서 상업적으로도 이용되는 ara-A, ara-C, acyclovir, AZT 등의 생리활성물질은 Caribbean Sea의 해면으로부터 추출된 세포독성물질에서 유래했다는 점은 신약개발에서 해면동물의 가능성을 보여주는 중요한 예이다. 현재까지 해면동물로부터 추출된 천연물은 4,000 종 이상이 알려져 있다. 이들은 구조적으로 매우 다양하여 terpenoids, steroids, amino acids, peptides. polycyclic heteroaromatics, polyketides, nucleosides, mixed biogenetic products 등 모든 생합성적 기원에서 비롯된 물질들을 포함하고 있다. 해면동물로부터 분리된 이와 같이 많은 생리활성물질이 전기한 유명한 화합물처럼 산업화에 성공하지 못한다 하더라도 그들이 가지는 독특한 구조와 생리활성은 유기화학, 생화학, 의・약학, 생물・생태학 등 인접학문의 발전에 큰 영향을 줄뿐만 아니라 관련분야의 응용연구에 기여를 하고 있어 자체로도 큰 의미를 갖는다.

해면은 플랑크톤과 같은 작은 유기물을 여과해서 영양원으로 삼고, 남조류나 박테리아 등의 공생 미생물을 많이 갖고 있다. 그래서 해면동물이 가지고 있는 천연물은 플랑크톤의 대사물질이 체내에 농축되어 있거나 공생 미생물의 생산물일 가능성이 없지 않다. 그러나 해면동물로부터 추출된 생리활성물질이 해면의 대사물질인지 공생하는 미생물 혹은 플랑크톤의 대사 물질인지를 구분하는 것은 쉽지 않다. 예를 들면 해면 Theonella swinhoei의 추출물에서 분리한 천연물인 macrolides와 cyclic peptides는 모두 해면에 의하여 합성되지 않고 공생하는 박테리아에 의하여 합성된다는 사실이 밝혀졌다. 이러한 점에 착안하여 생리활성물질을 함유하는 해면으로부터 이들 미생물을 분리, 배양하여 산업적 가치가 높은 신물질의 대량생산을 위한 시도가 진행되고 있으나 숙주와 선택적으로 공생하는 것으로 알려진 이들 박테리아를 독립적으로 배양하여 천연물을 생산하는 과정은 쉽지 않아 아직 가시적인 성과가 나오지 않고 있다.



현재까지 해면동물에서 추출된 천연물은 전체 해양천연물의 30%에 이르러 4,000 종 이상이 알려져 있으나 현존하는 해면 10,000여종 중에서 불과 수백 종만이 연구결과, 새로운 생리활성물질을 발견할 가능성은 여전히 높다. 그리고 분류학적으로 동일한 해면이라도 서식장소에 따라 다른 천연물을 함유하는 경우도 흔해 해면이 해양천연물 연구에서 차지하는 비중은 더욱 증가될 것으로 보인다. 따라서 향후 상당기간 해양천연물의 주요 연구대상이 될 해면동물의 천연물에 관한 연구는 생리활성 선도물질의 발굴과 함께 국내의 천연물 연구대상의 확대에도 크게 기여할 것이다(신 등 1993).

본 연구과제에서는 2003년과 2005년 한국해양연구원의 남태평양 연구센터가 있는 마이크로네시아의 축섬 연안에서 채집한 해면동물을 기초로 하였고 본 연구과제가 시작되기 이전인 1999년 제주도 1998년 거문도 연안에서 채집한 해면동물을 포함하여 생리활성 물질을 얻기 위한 천연물 연구가 수행되었다.

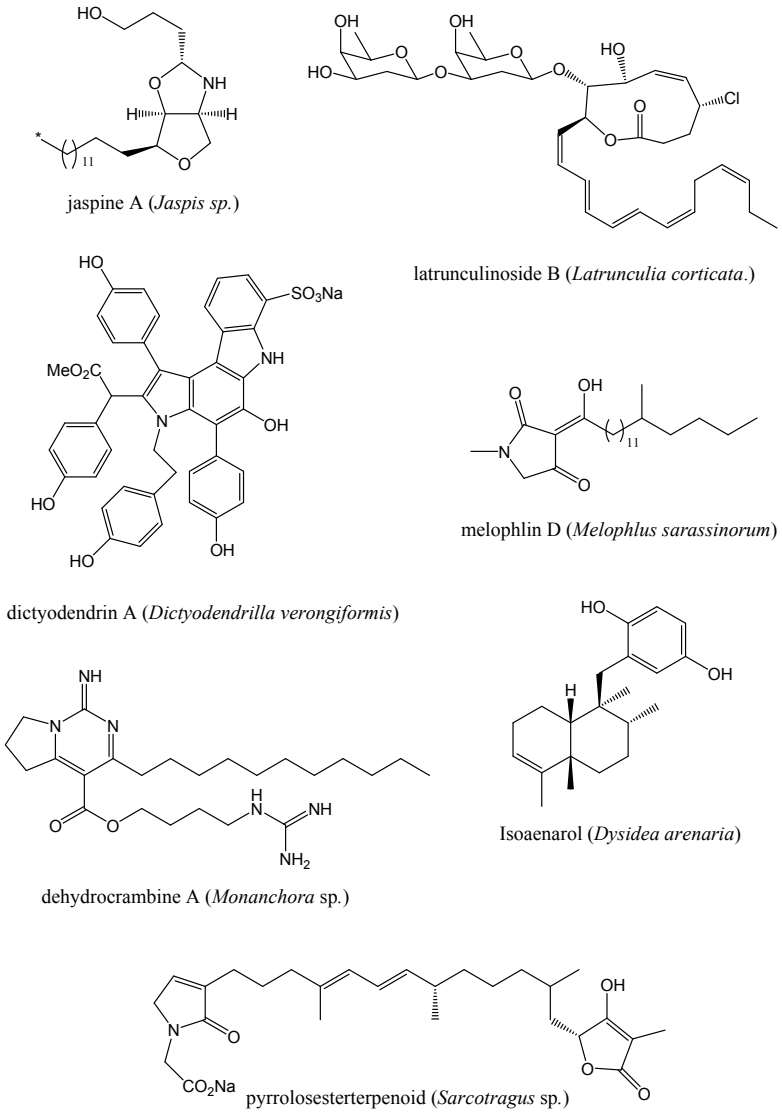


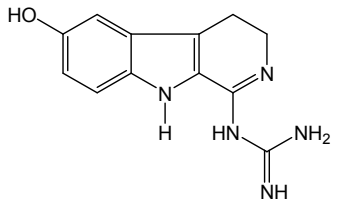

Figure 3-6-9. Examples of bioactive natural products from sponges.



(2) 해면 03CH-10의 천연물

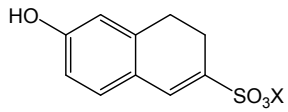
해면 03CH-10은 2003년 6월 한국해양연구원의 남태평양연구센터가 있는 마이크로네시아의 축섬 연안 수심 20-30m에서 스킨스쿠바로 채집되었고, 현장에서 부분 동결 건조된 다음 냉동 상태로 연구실로 운송되어 영하 25oC에서 보관되었다. 화학적 분석을 위하여 시료를 완전 동결건조 하여 수분을 제거하고 잘게 자른 후 methanol과 dichloromethane을 순차적으로 이용하여 유기물질을 추출하여 약 52g의 추출물을 얻었다. 조추출물은 n-BuOH와 물을 이용하여 극성에 따른 분배를 하였고, n-BuOH 층의 용매를 제거하여 약 16g의 유기물을 얻었다. 유기물을 다시 15% aqueous MeOH와 hexane으로 극성에 따라 분배하여 각각 12.5g과 3.0g의 혼합물을 얻었다. 감압 증류한 aqueous MeOH 층의 잔류물질을 C18 reversed-phase vacuum flash chromatography를 하였고 용리 용매는 순서에 따라 50%, 40%, 30%, 20%, 10% aqueous MeOH, 100% MeOH, 50% MC/MeOH을 사용하였고 각각 3.71, 0.82, 0.47, 0.68, 2.30, 2.10g의 혼합물을 얻었다. 각각의 분획에 대한 1H NMR 분석을 한 결과 50%와 40% aqueous MeOH의 극성의 분획에 특이 이차대사물질이 함유되어 있음을 확인하였다. 분획 중 40% aqueous MeOH 분획을 65% aq. MeOH을 용리용매로 하여 C18 reversed-phase HPLC로 분리하여 compound A(03CH-10-A)를 얻었고 50% aqueous MeOH 분획을 다시 65% aq. MeOH을 용리용매로 하여 C18 reversed-phase HPLC로 분리하여 compound B (03CH-10-B)를 얻었다.
주 대사물질(major metabolite)인 물질 03CH-10-A는 붉은색의 분말상태로 분리되었다. 질량분석과 탄소 NMR에 의하여 이 물질의 분자식은 $C_{12}H_{12}N_4O$로 결정되었다. 화합물 03CH-10-A의 NMR 자료는 여러 가지 면에서 aromatic 고리와 amine 또는 alcohol 기를 가진 특징을 드러내고 있다. 먼저 13C NMR자료에서 δ151.8 - 102.2에 나타난 열 개의 탄소와 이에 상응하는 1H NMR δ6.85 - 7.46 ppm의 신호는 이 화합물이 하나의 aromatic 고리를 가지고 있음을 나타내었고, 이들 중 13C NMR의 δ151.8는 phenol 성 hydroxy 기의 존재를 짐작하게 하였다. 그리고 1H NMR 의 갈라진 형태는 전형적인 ABX 위치에 각각 수소를 가지고 있는 양상을 보였다. 또 upfield 쪽의 두 개의 신호 1H NMR δ3.10과 3.83은 cosy 실험에서 서로 강하게 correlation을 보여 이웃함을 짐작할 수 있었다. 이상의 일차적인 정보를 바탕으로, 물질 03CH-10-A의 정확한 구조는 이어진 gradient HSQC, gradient HMBC 등 종합적인 NMR 실험에 의하여 밝혀졌다. 먼저 1H COSY 실험으로 수소원자로 구성된 여러 개의 spin system이 규명되었고, gradient HSQC 실험에 의하여 이 화합물의 모든 수소와 이들이 직접 결합된 탄소가 정확히 지정되었다. 그리고 1H NMR 자료에서 각각 δ6.85, 6.95, 7.46 ppm에 나타난 signal을 중심으로 한 spin system에서 gHMBC 실험 결과로부터 13C NMR의 δ151.88, 120.68, 114.93, 136.6, 124.5, 102.4 ppm의 여섯 개 탄소가 하나의 고리를 형성하고 있음을 밝힐 수 있었고, 1H NMR δ11.62 ppm에 신호를 강하게 보인 signal을 중심으로 한 gHMBC의 실험결과는 새로운 pyrrole 고리의 가능성을 제시하였다. 또 1H NMR δ3.83과 3.10의 수소신호와 연결된 탄소는 pyrrole 고리에 연결되어 dihydropyridine 고리를 형성하는 것으로 나

타났다. 이로서 13C NMR의 δ158.3에 신호를 보이는 한 개의 탄소를 제외하고 모든 탄소의 위치가 결정되었다. 이 골격은 전형적인 trypargine alkaloid계 화합물이었으며 문헌조사결과 화합물 03CH-10-A와 동일한 물리적 성질을 보인 화합물은 알려지지 않은 것으로 나타났다. 추가 실험을 통해 나머지 하나 탄소의 작용기의 구조를 밝혔으며, 전체적인 구조는 아래와 같다.




이어진 실험에서 얻은 대사물질(major metabolite)인 물질 03CH-10-B는 무색의 분말상태로 분리되었다. 질량분석과 탄소 NMR에 의하여 이 물질의 분자식은 C10H9SO4X로 결정되었다. 화합물 03CH-10-B의 1H NMR 자료는 여러 가지 면에서 03CH-10-A와 유사한 양상을 보였다. 먼저 7ppm 근처 신호들의 갈라진 양상과 upfield 3ppm 부근의 aliphatic 신호양상이 동일하였다. 그러나 13C NMR자료에서 03CH-10-A 에서 보이던 δ 158.7, 158.2 ppm의 두 개의 신호가 사라져 질소원자의 존재가 불확실한 것으로 보였다. 먼저 13C NMR자료에서 δ151.4 - 103.1에 나타난 여덟 개의 탄소와 이에 상응하는 1H NMR δ7.20 - 6.71 ppm의 신호는 이 화합물이 하나의 aromatic 고리와 여분의 이중결합을 가지고 있음을 나타내었다. 이들 중 13C NMR의 δ151.4는 phenol성 hydroxy 기의 존재를 짐작하게 하였다. 그리고 1H NMR의 갈라진 형태는 03CH-10-A 와 마찬가지로 전형적인 ABX 위치에 각각 수소를 가지고 있는 양상을 보였다. 또 upfield 쪽의 두 개의 신호 1H NMR δ3.20과 3.05 ppm은 cosy 실험에서 서로 강하게 correlation을 보여 이웃함을 보였다. 이상의 일차적인 정보를 바탕으로 하여 물질 03CH-10-B의 정확한 구조는 이어진 gradient HSQC, gradient HMBC 등 종합적인 NMR 실험에 의하여 밝혀졌다. 먼저 1H COSY 실험으로 수소원자로 구성된 여러 개의 spin system이 규명되었고, gradient HSQC 실험에 의하여 이 화합물의 모든 수소와 이들이 직접 결합된 탄소가 정확히 지정되었다. 그리고 1H NMR 자료에서 각각 δ6.85, 6.95, 7.46 ppm에 나타난 signal을 중심으로 한 spin system에서 gHMBC 실험 결과로부터 13C NMR의 δ151.5, 112.8, 113.0, 133.2, 128.9, 103.1 ppm의 여섯 개 탄소가 하나의 고리를 형성하고 있음을 밝힐 수 있었고, 1H NMR δ7.11 ppm에 신호를 보인 signal을 중심으로 한 gHMBC의 실험결과로부터 새로운 탄소 연결을 확인하였고, 이들은 δ3.20과 3.05 ppm의 수소신호와 연결되어 하나의 고리를 형성하고 있음을 확인하였다. 추가 실험을 통해 나머지 작용기의 구조를 밝혔으며, 03CH-10-B의 구조는 아래와 같은 것으로 확인하였다.






해면 03CH-10로부터 추가 분리를 통해 더 많은 화합물이 분리될 것으로 추정되지만 현재까지 모두 5종의 화합물이 분리되었고, 구조가 밝혀졌다. 다만 이 보고서를 통해 대표적인 두 개의 화합물만의 구조를 제시하는 이유는 향후 이어질 '다양한 화학반응을 이용한 구조-활성 관계연구'를 통해 새로운 결과들이 도출되고 이들의 종합적인 생리활성결과를 모아 특허출원과 논문 작성이 이루어질 것이기 때문임을 밝힌다.

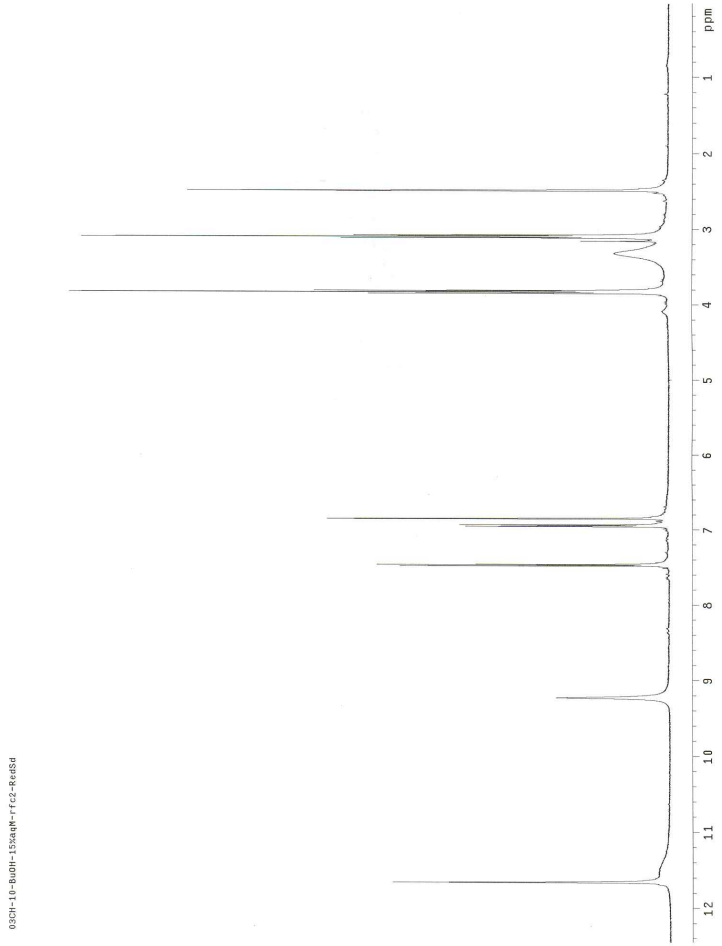



Figure 3-6-10. Proton NMR spectrum of 03CH-10-A.

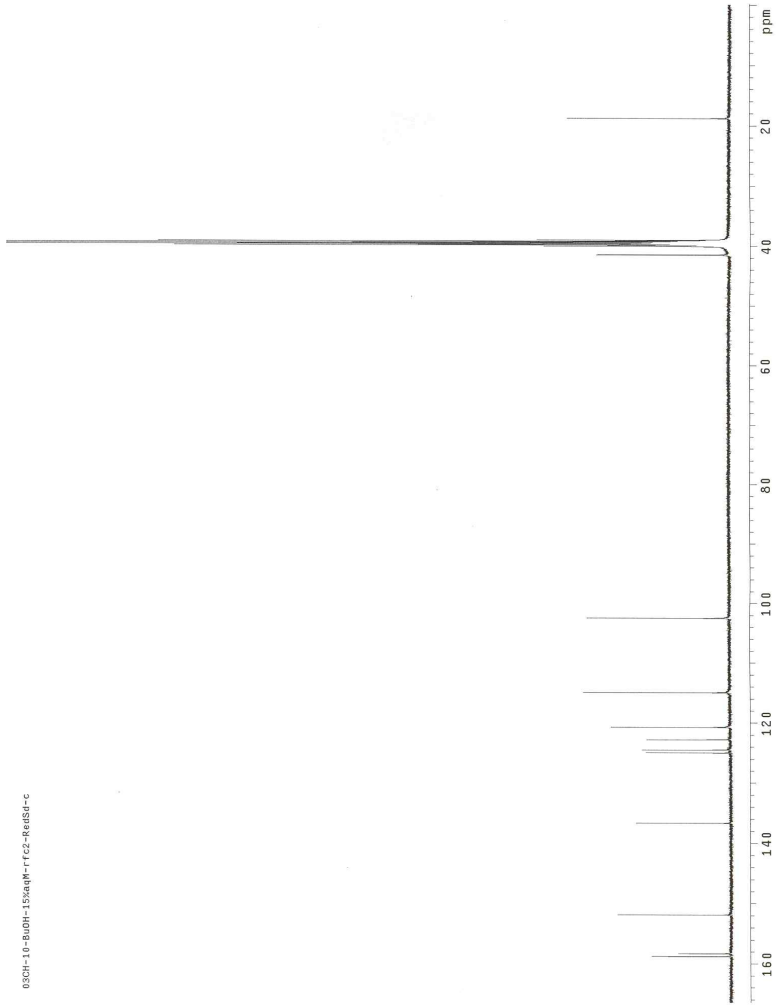



Figure 3-6-11. Carbon NMR spectrum of 03CH-10-A.

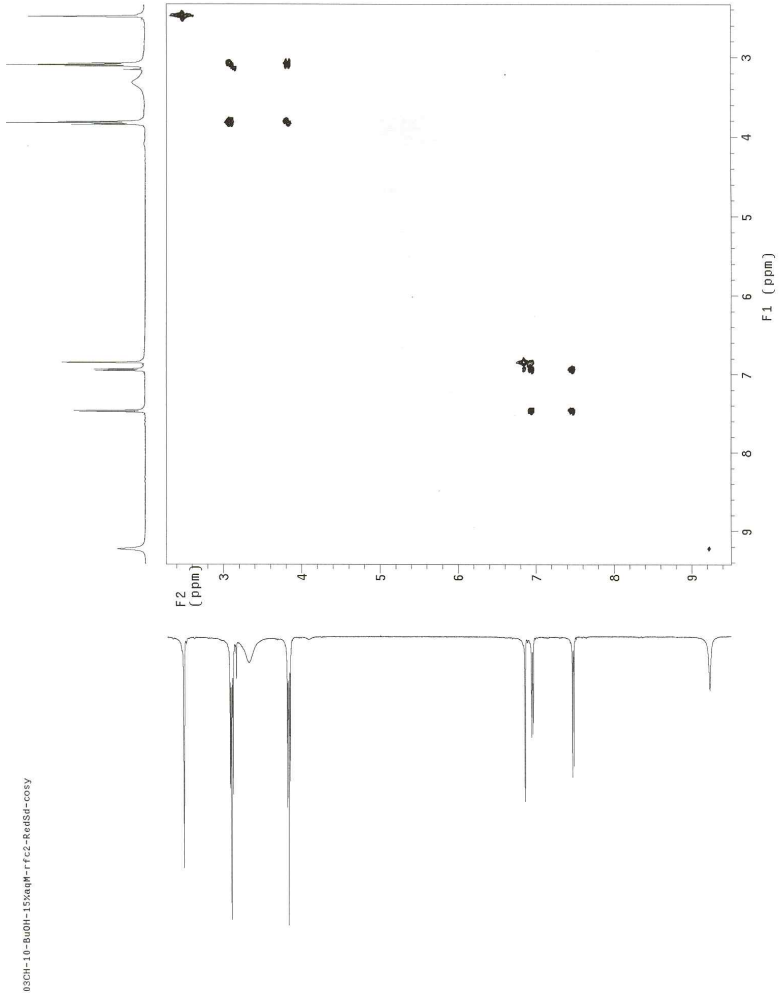



Figure 3-6-12. Proton COSY spectrum of 03CH-10-A.

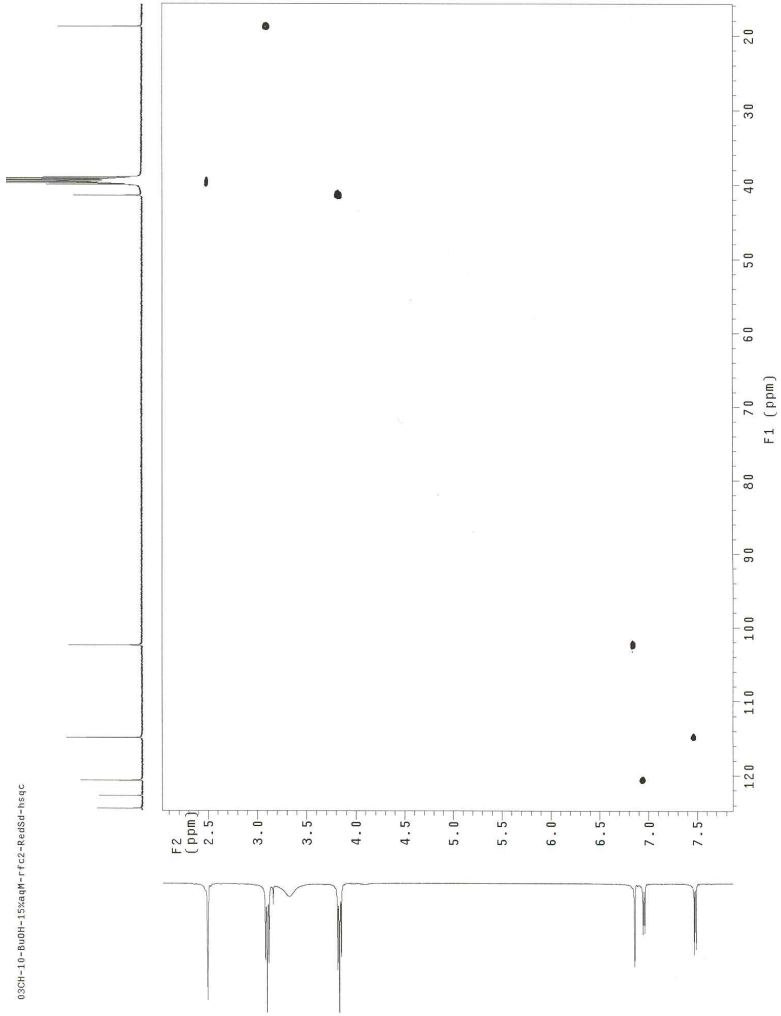



Figure 3-6-13. Gradient HSQC spectrum of 03CH-10-A.

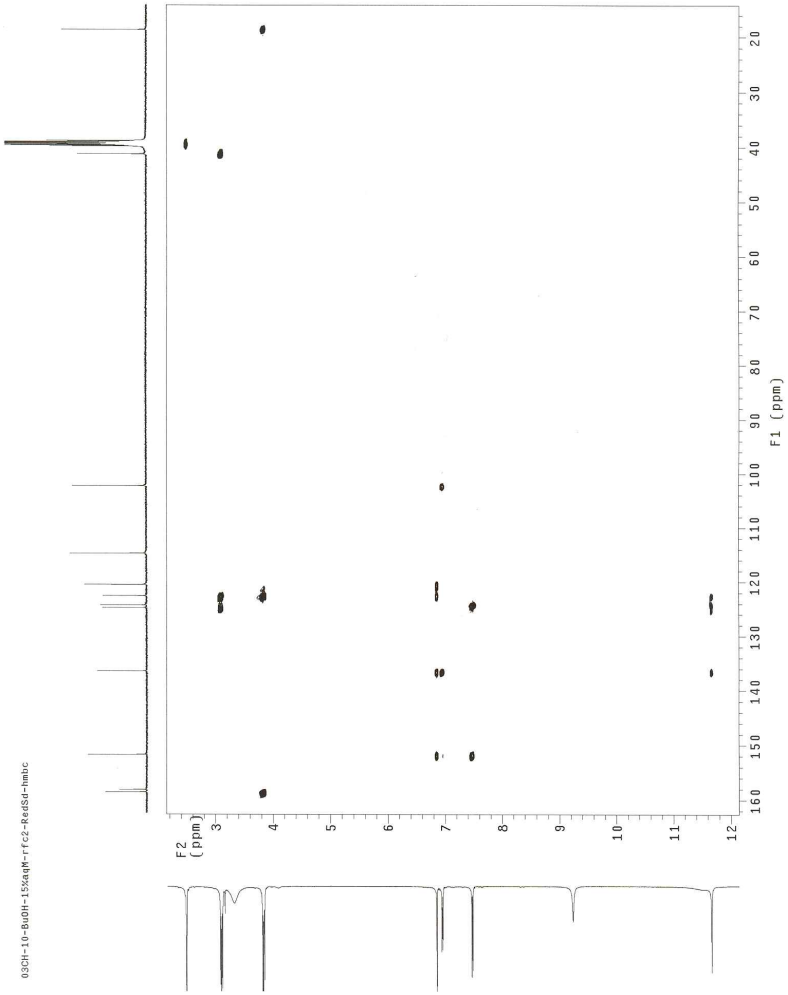



Figure 3-6-14. Gradient HMBC spectrum of 03CH-10-A.

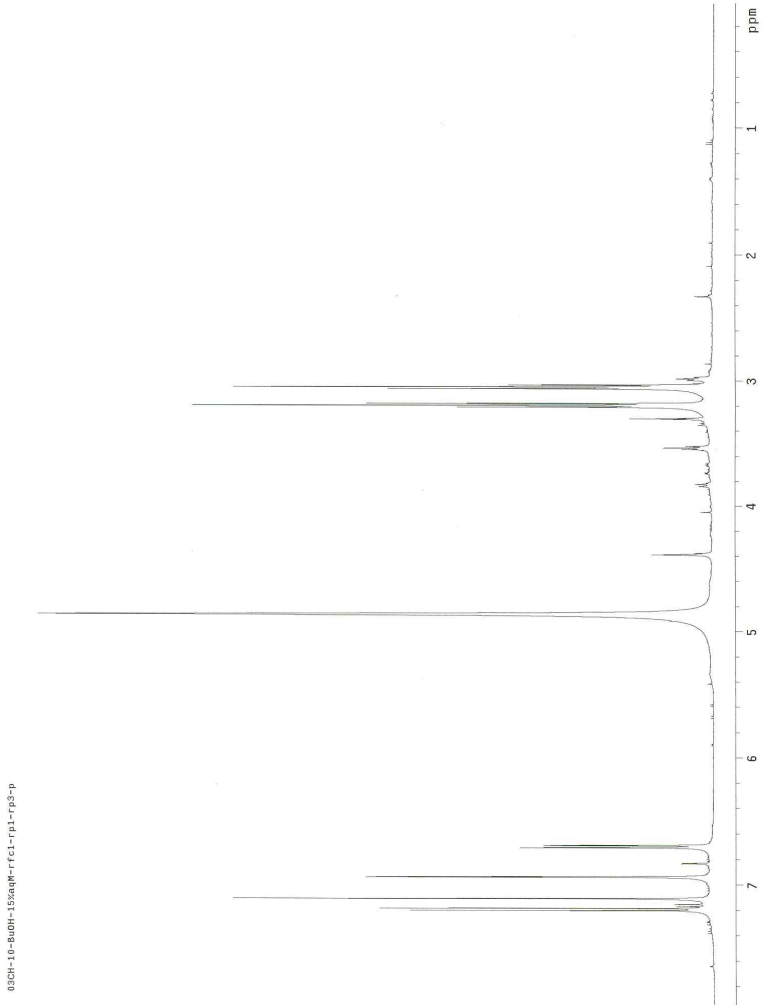



Figure 3-6-15. Proton NMR spectrum of 03CH-10-B.

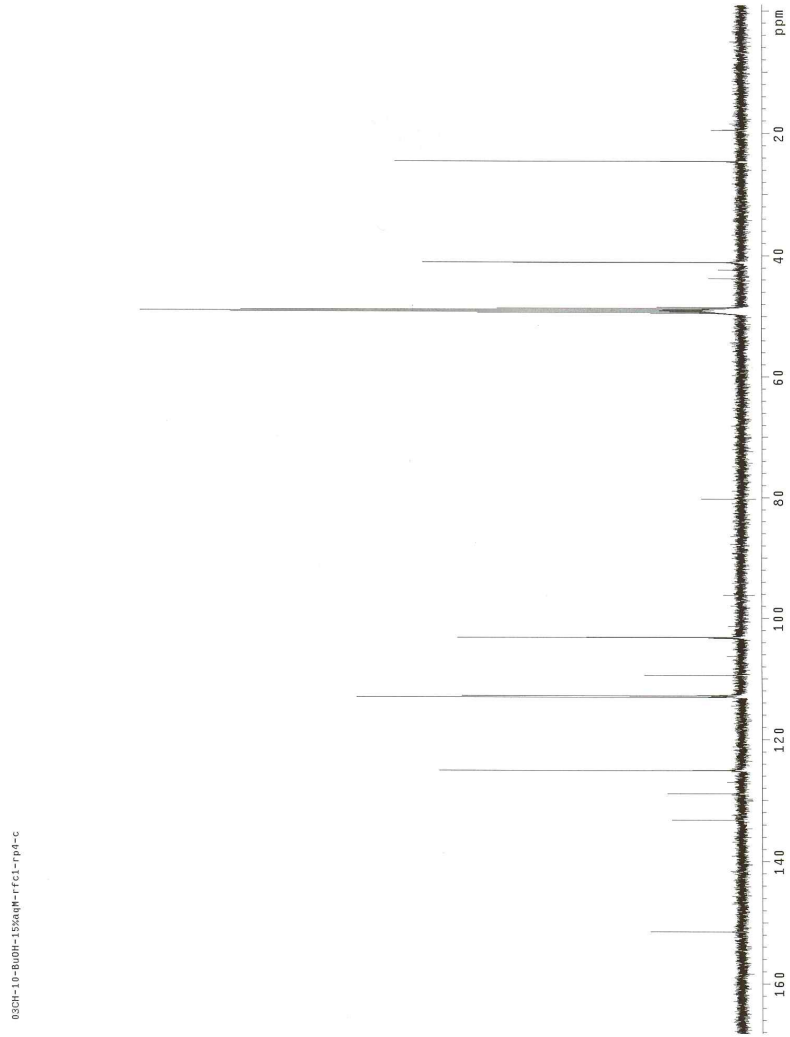



Figure 3-6-16. Carbon NMR spectrum of 03CH-10-B.

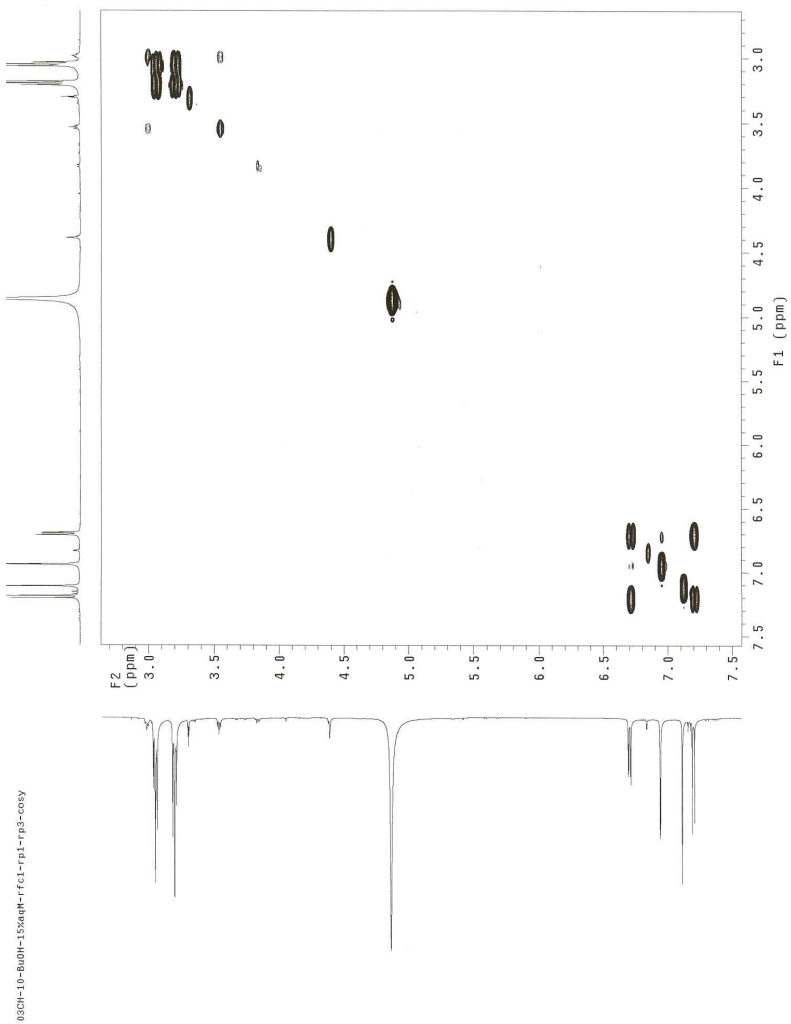



Figure 3-6-17. Proton COSY spectrum of 03CH-10-B.

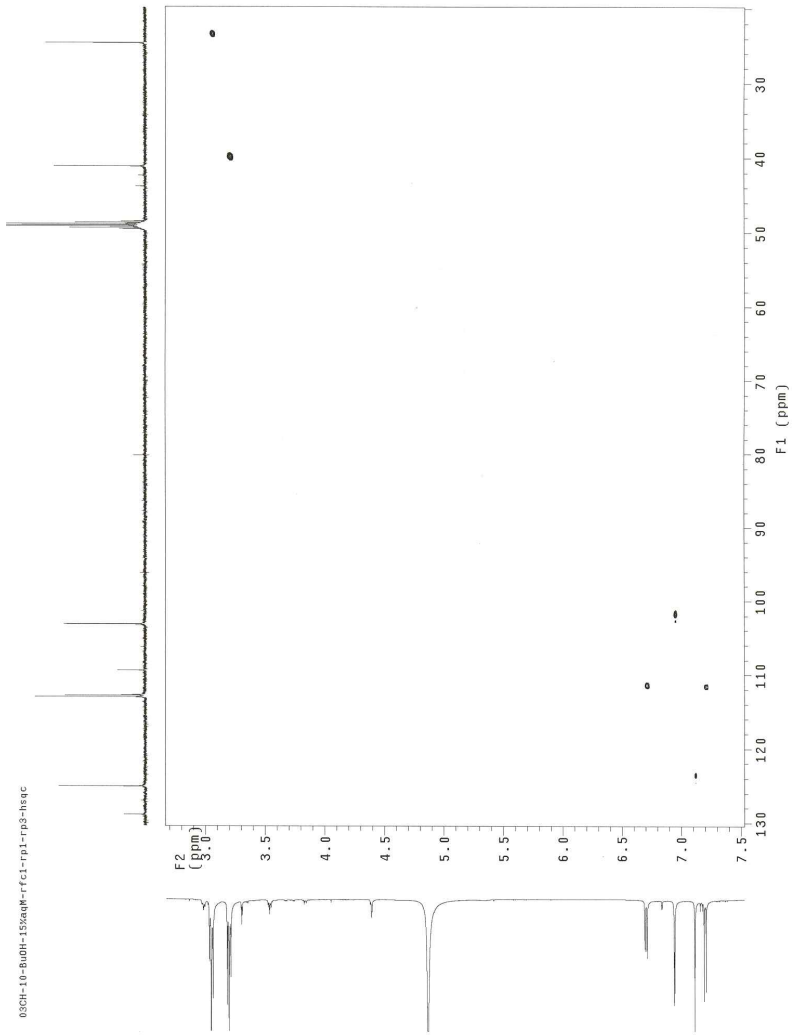



Figure 3-6-18. Gradient HSQC spectrum of 03CH-10-B.

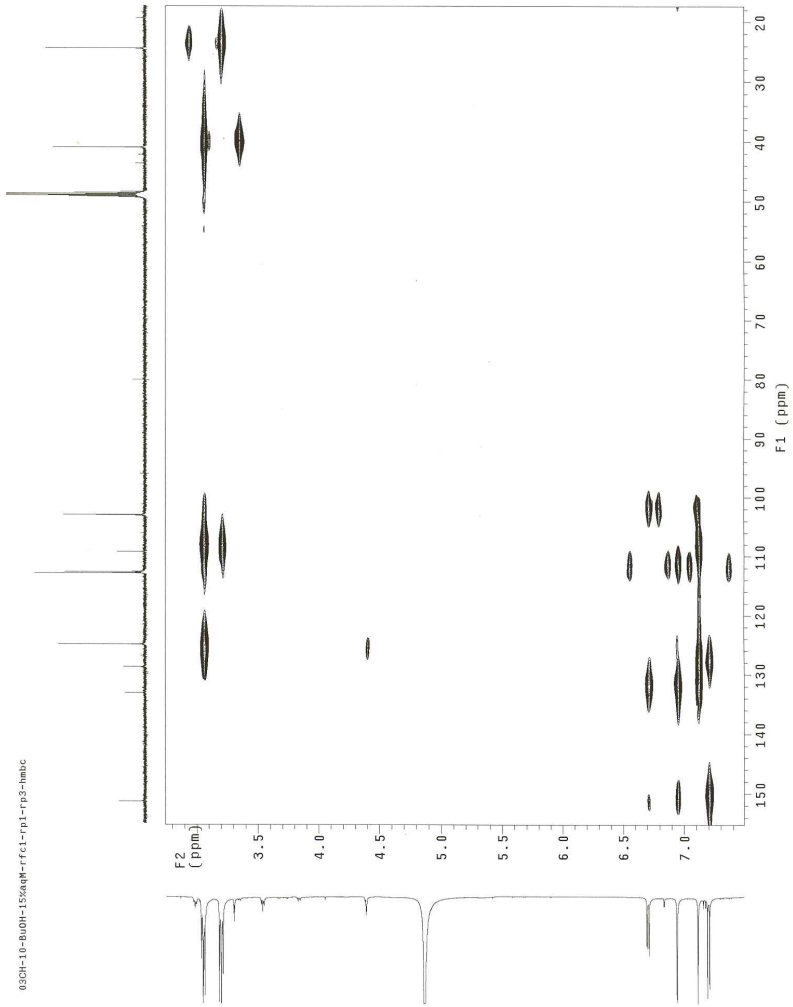



Figure 3-6-19. Gradient HMBC spectrum of 03CH-10-B.

(3) 해면동물 99J-6의 천연물

(가) 시료의 채집, 유기물질의 추출 및 분획

해면동물(시료번호 99J-6)은 1999년 제주도 앞 바다의 수심 20-30 m에서 SCUBA 다이빙에 의하여 채집되었다. 시료를 채집한 현장에서 드라이아이스를 이용하여 냉동시켰고, 실험 전까지 영하 25℃ 저온에서 보관하였다. 시료를 그늘진 곳에서 해동한 후 이를 3-4 cm의 크기로 잘게 잘라 3일간 동결 건조하여 수분을 제거하였다. 건조된 시료는 유기용매로서 MeOH와 M.C.를 순차적으로 사용하여 유기물질을 추출하였다. 추출된 전체 무게는 116.19 g이었다. 이 추출물을 $H_2O$와 n-BuOH로 먼저 분배한 다음, n-BuOH에 있는 혼합물은 계속하여 15% aqueous MeOH와 n-Hexane을 이용하여 재분배하였다. 15% aqueous MeOH층은 10.16 g이고 n-Hexane층은 9.86 g이었다.

(나) 크로마토그래피를 이용한 천연물의 분리정제

15% aqueous MeOH층의 1/2을 취하여 ODS silica에 흡착시킨 후 reversed- phase vacuum flash chromatography를 하였다. 용출 용매는 MeOH과 물의 혼합액(v/v)으로서 50%, 40%, 30%, 20%, 10% aqueous MeOH로부터 시작하여 100% MeOH, 100% Acetone, 100% EtOAc를 순차적으로 이용하였다. 모든 분획에 대하여 Candida albicans에 대하여 생리활성을 검색한 후 생리활성이 있는 것으로 나타난 10% aqueous MeOH로 용출한 분획에 대하여 저온 감압건조를 하여 용매를 제거하였다. 남은 고체물질(3.82 g)을 모두 취하여 20% aqueous MeOH에 녹인 뒤 SPARTAN filter를 사용하여 불용성 물질을 제거하였다. 남은 용액을 C18 reversed-phase HPLC(20% aqueous MeOH, YMC-ODS-A column 1 cm × 25 cm, Shodex RI detector, 2.0 ml/min)를 하여 천연물 99J-6-A와 99J-6-B를 분리하였다.

(다) 99J-6-A와 99J-6-B의 구조 결정

물질 99J-6-A는 노란색의 무정형 고체로 분리되었다. 고해상질량분석과 13C NMR에 의하여 이 물질의 분자식은 $C_{20}H_{14}Br_2N_4O$로 결정되었다.

이상의 일차적인 정보를 바탕으로 하여 물질의 개략적 구조는 1H COSY, gradient HSQC 및 gradient HMBC 등의 NMR 실험에 의하여 밝혀졌다. 문헌조사 결과 이 화합물은 Hamacanthin A로 밝혀졌다. Specific rotation을 포함한 각종 분광 자료는 기존의 보고된 값과 잘 일치하였다(Table 3-6-1).

13C NMR 시그널을 분석한 결과 이 화합물은 17개의 불포화 탄소를 포함하고 있음을 확인하였다. δ 158.1에서 amide 탄소와 δ 54.1와 δ 46.8에서 C-5, C-6 위치의 탄소를 확인하였다. 1H NMR과 13C NMR을 포함하여 1H-1H COSY, HSQC, HMBC, ROESY 데이터로 6-bromoindolyl-3-yl의 부분 구조를 기지 물질인 bromoindole 데이터와 비교함으로써 확인 할 수 있었다. Amide group에 콘쥬게이트 된 olefinic 탄소가 δ 158.2에서 확인되었고, 3,6-disubstituted-5,16-dihydro-1(2H)-pyrazinone의 구조는 1H NMR과 13C NMR, 1H-1H COSY 및 ROESY 데이터로 해석되었다. COSY 스펙트럼에서 δ 8.78의 NH 수소는 δ 4.98의 methine 수소 및 δ 4.98과 δ 4.08의 methylene 수소와 커플링하고 있음을 확인하였다. Long-range C-H correlation으로 H-1(NH, δ 8.78)와 C-2(C=O, δ 158.1)가 연결되어 있고, H-5(δ 4.08)와 C-3(C=N-, δ 158.2)가 연결되어 있음을 확인하여, disubstituted dihydropyrazinone 구조를 해석할 수 있었다. 또한 H-1및 H-5가 C-3″(δ 113.8)와 Long-range correlation하고 있고, H-6(δ 4.98)가 C-3″및 C-2″(δ 123.9)와 시그널을 내었고, H-2′(δ 8.40)가 C-3(δ 158.2)와 시그널을 내었다. 그렇게 해서 dihydropyrazinone ring과 2개의 6-bromoindol-3-yl 구조가 C-3와 C-6에 연결되어 있음을 알 수 있었다.

물질 99J-6-B는 노란색의 무정형 고체로 분리되었다. 고해상질량분석과 13C NMR에 의하여 이 물질의 분자식은 $C_{20}H_{14}Br_2N_4O$로 결정되었다. 99J-6-A의 NMR 데이터와 비교하여 이 화합물은 같은 dihydropyrazinonediylbisindole임을 알 수 있었다. 문헌조사 결과 이 화합물은 Hamacanthin B로 밝혀졌다. 99J-6-A와 다른 점은 1H NMR에서 보여지는 H-5와 H-6의 화학이동값과 커플링 패턴이 다르다는 것이다. 1H COSY 스펙트럼에서 δ 8.78의 NH(H-1) 수소가 δ 3.47 및 δ 3.61의 methylene 수소와 커플링하고 있고, δ 5.25의 methine 수소와도 커플링하고 있음이 관찰되었다. HMBC 실험으로 H-5(δ 5.25)가 C-3, C-2″ 및 C-3a″와 시그널을 내는 것을 확인하였다. 또한 δ 3.61의 methylene 수소도 C-2과 C-3″에 시그널을 내었다. 이 결과로 dihydropyrazinone ring을 확인할 수 있었고, C-5에 연결되었음을 확인할 수 있었다.

99J-6-A: Yellow powder; [α]24D 84°(c 0.1, MeOH); IR ν max 3225 br, 2925, 1672, 1585, 1437 cm-1 ; UV ν max(MeOH) 219(ε76500), 280(20600), 325(13300) nm; 1H and 13C NMR spectra, see Table 3-6-1 ; HRFABMS m/z 486.9605 [M+H] (calcd for C20H15Br2N4O, m/z 486.9605)

99J-6-B: Yellow powder; [α]24D 172°(c 0.1, MeOH); IR ν max 3250 br, 2925, 1672, 1585, 1437 cm-1 ; UV ν max(MeOH) 219(ε76500), 280(20600), 325(13300) nm; 1H NMR (CDCl3/10% CD3OD) δ 3.47(1H, ddd, J=12.9 and 9.5 and 1.0 Hz, H-6), 3.61(1H, ddd, J=12.9 and 4.8 and 1.5 Hz, H-6), 5.25(1H, dd, J=9.5 and 4.8 Hz and 1.0, H-5), 7.13(1H, dd, J=8.6 and 1.6 Hz, H-5″), 7.28(1H, s, H-2″), 7.17(1H, dd, J=8.7 and 1.6 Hz, H-5′), 7.65(1H, d, J=8.6 Hz, H-4″), 7.59(1H, d, J=1.6 Hz, H-7″), 7.63(1H, d, J=1.6 Hz, H-7′), 8.41(1H, s, H-2′), 8.30(1H, d, J=8.7 Hz, H-4′); 13C NMR (CDCl3/10% CD3OD) δ 44.2(t, C-6), 53.6(d, C-5), 111.0(s, C-3′), 114.1(d, C-7′), 114.2(d, C-7″), 114.8(s, C-3″), 113.9(s, C-6″), 114.8(s, C-6′), 120.8(d, C-4″), 121.4(d, C-5″), 123.6(d, C-2″),

123.3(d, C-5′), 124.1(d, C-4′), 125.0(s, C-3a″), 125.0(s, C-3a′), 132.7(d, C-2′), 136.9(s, C-7a′), 137.2(s, C-7a″), 157.0(s, C-3), 157.2(s, C-2); HRFABMS m/z 486.9606 [M+H] (calcd for C20H15Br2N4O, m/z 486.9606)

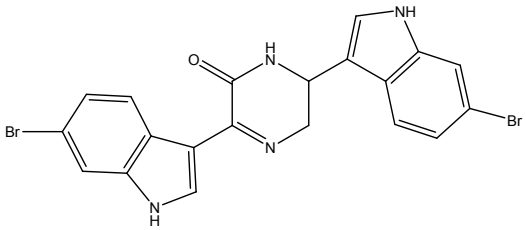



Figure 3-6-20. The structure of 99J-6-A.

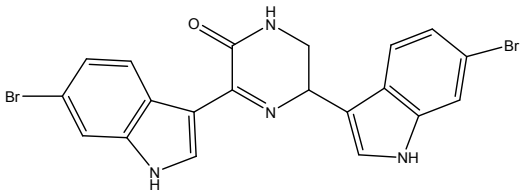



Figure 3-6-21. The structure of 99J-6-B.



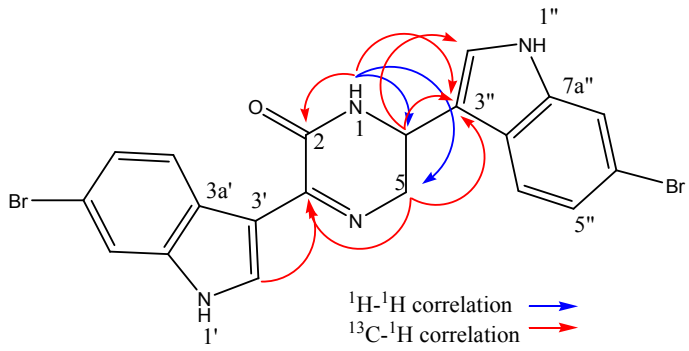



Figure 3-6-22. 1H-1H and 13C-1H correlation of 99J-6-A.

Table 3-6-1. 13C-and 1H-NMR Data for 99J-6-A and 99J-6-B in DMSO-d6.

| Position | 99J-6-A | | 99J-6-B | |
|---|---|---|---|---|
| | $^{13}C$ | $^{1}H$ | $^{13}C$ | $^{1}H$ |
| 1 | | 8.78(d.1.0) | | 8.49(t.1.5) |
| 2 | 158.1 s | | 157.2 s | |
| 3 | 158.2 s | | 157.0 s | |
| 5 | 54.1 t | 4.08(dd, 16.2, 5.1)<br>4.10(dd, 16.2, 8.5) | 53.6 d | 5.25(dd, 9.5, 4.8) |
| 6 | 46.8 d | 4.98(ddd, 8.5, 5.1 1.0) | 43.2 t | 3.47(ddd, 12.9, 9.5, 1.0)<br>3.61(ddd, 12.9, 4.8, 1.5) |
| 1′ | | 11.59(d, 2.7) | 11.62 s | |
| 2′ | 133.3 d | 8.40(d, 2.7) | 132.7 d | 8.41(s) |
| 3′ | 111.7 s | | 111.0 s | |
| 3a′ | 125.7 s | | 125.0 s | |
| 4′ | 124.8 s | 8.28(d, 8.5) | 124.1 d | 8.30(d, 8.7) |
| 5′ | 123.9 d | 7.21(dd, 8.5, 2.0) | 123.3 d | 7.17(dd, 8.7, 1.6) |
| 6′ | 114.7 s | | 114.8 s | |
| 7′ | 114.9 d | 7.62(d, 2.0) | 114.1 d | 7.63(d, 1.6) |
| 7a′ | 137.7 s | | 136.9 s | |
| 1″ | | 11.15(d, 2.3) | | 11.12(s) |
| 2″ | 125.2 d | 7.31(d, 2.3) | 123.6 d | 7.28(s) |
| 3″ | 113.8 s | | 114.8 s | |
| 3a″ | 125.3 s | | 125.0 s | |
| 4″ | 121.4 d | 7.67(d, 8.5) | 120.8 d | 7.65(d, 8.6) |
| 5″ | 122.2 d | 7.14(dd, 8.5, 2.0) | 121.4 d | 7.13(dd, 8.6, 1.6) |
| 6″ | 115.4 s | | 113.9 s | |
| 7″ | 114.8 d | 7.56(d, 2.0) | 114.2 d | 7.59(d, 1.6) |
| 7a″ | 137.9 s | | 137.2 s | |

(라) 99J-6-A,B의 항진균활성 실험 결과

Candida albicans를 평판배지에 도말한 후 순수 분리된 물질을 paper disc에 흡수시켜 배지 plate 위에 올려놓고 30℃로 맞춰진 incubator에 넣은 후 24시간 뒤에 관찰하여 생성된 clear zone의 지름을 측정하였다. 99J-6-A와 B는 각각 Candida albicans에 대해 25 ㎍에서 13 mm, 25 mm의 clear zone을 형성하였다.



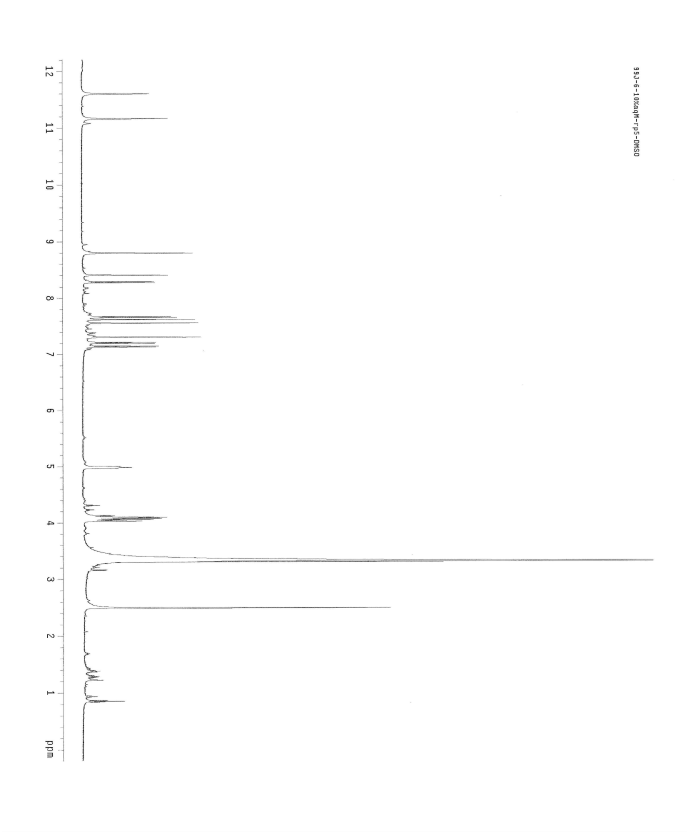



Figure 3-6-23. Proton NMR spectrum of 99J-6-A

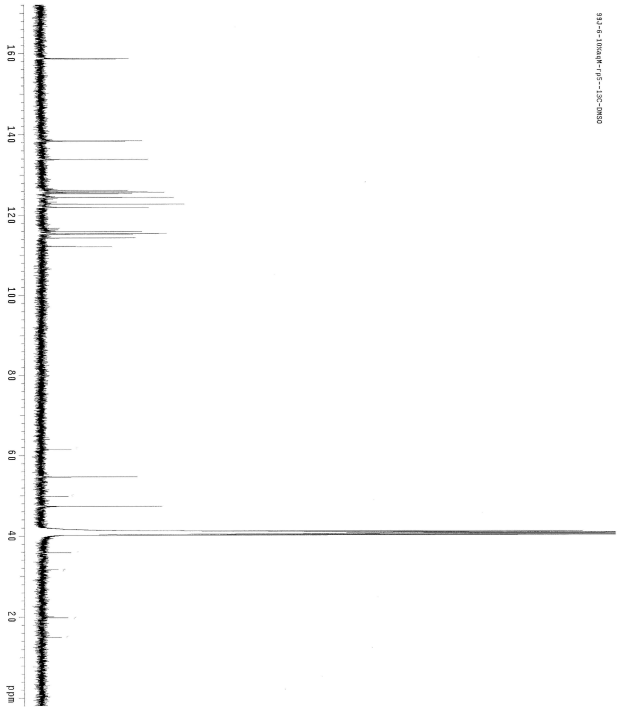



Figure 3-6-24. Carbon NMR spectrum of 99J-6-A

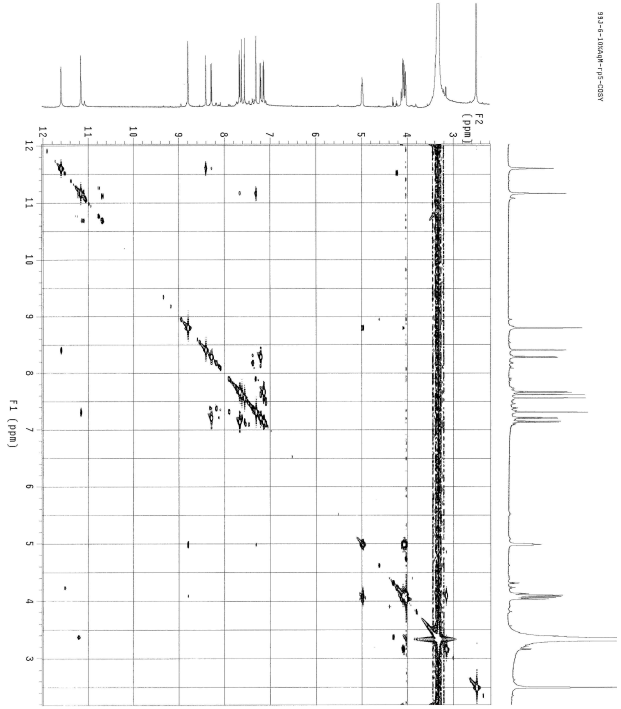



Figure 3-6-25. Proton COSY spectrum of 99J-6-A

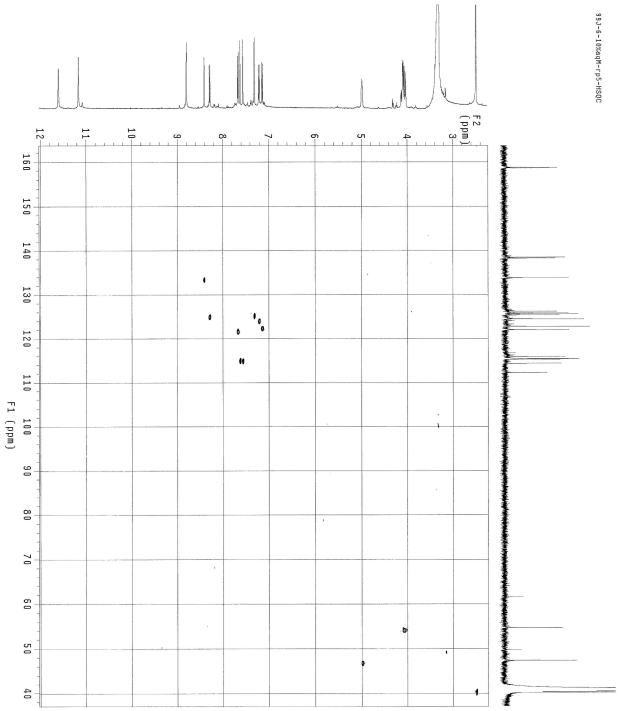



Figure 3-6-26. Gradient HSQC spectrum of 99J-6-A

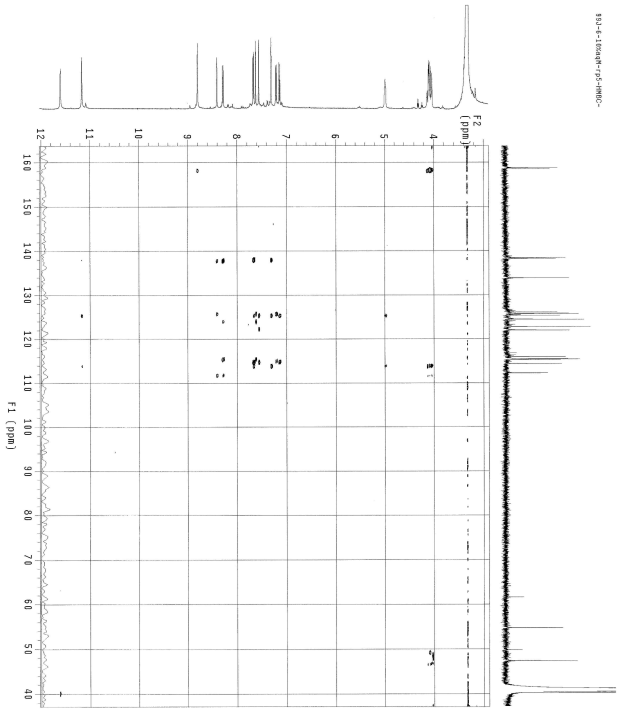



Figure 3-6-27. Gradient HMBC spectrum of 99J-6-A

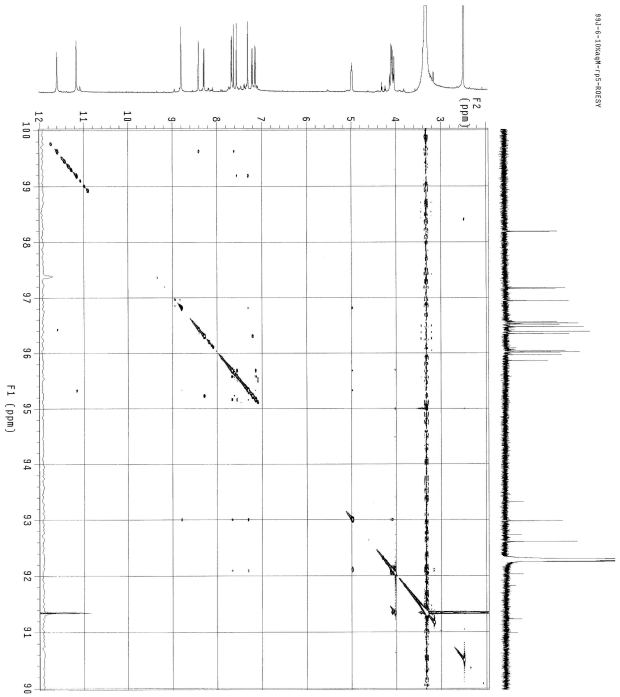



Figure 3-6-28. ROESY spectrum of 99J-6-A.

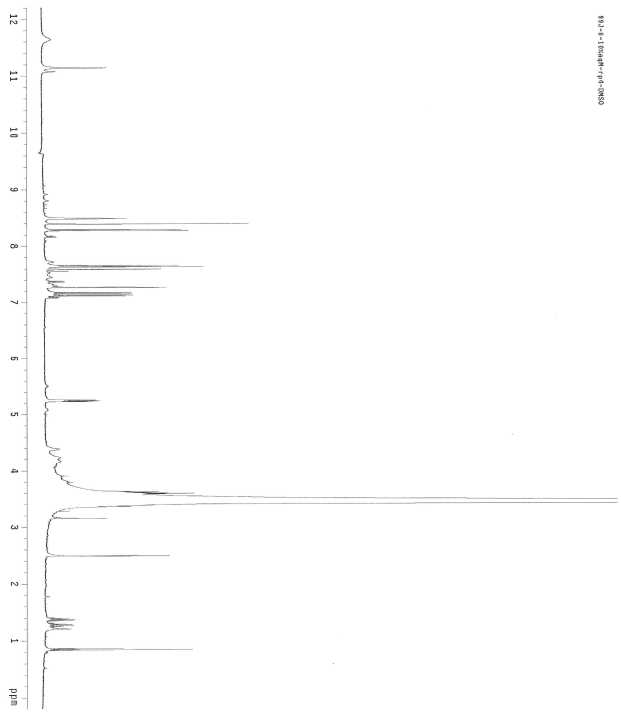



Figure 3-6-29. Proton NMR spectrum of 99J-6-B

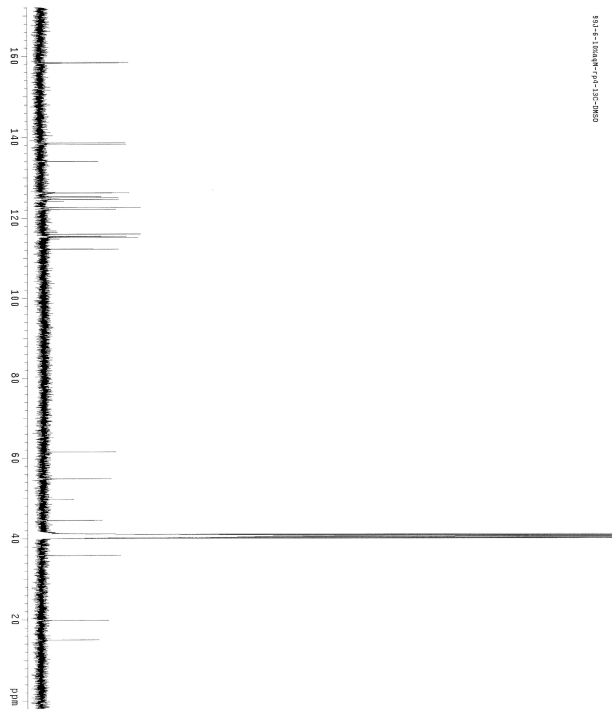



Figure 3-6-30. Carbon NMR spectrum of 99J-6-B.

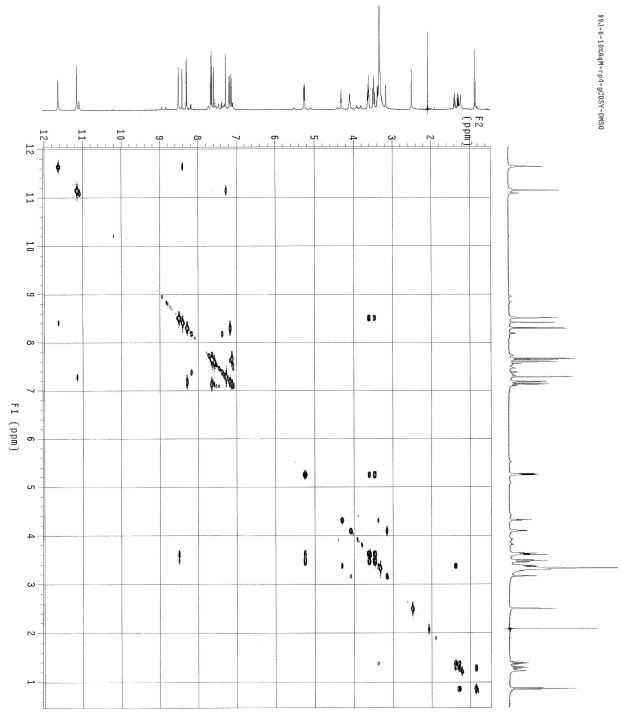



Figure 3-6-31. Proton COSY spectrum of 99J-6-B.

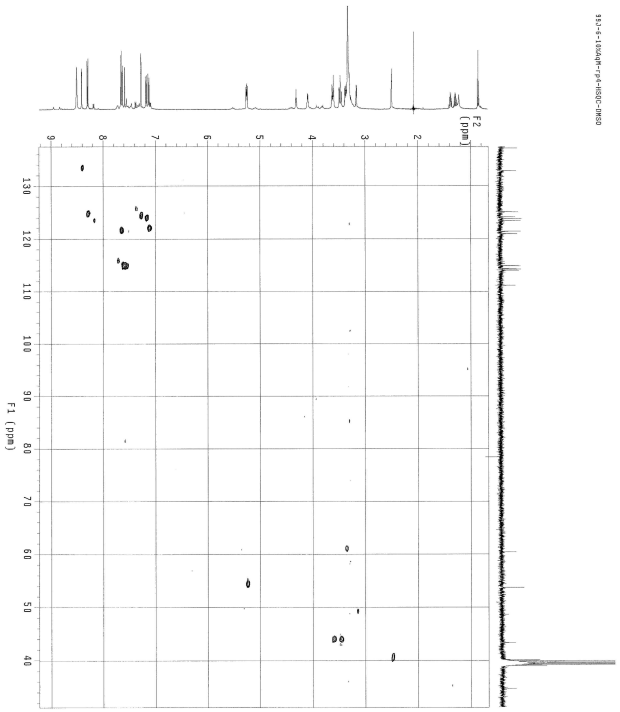



Figure 3-6-32. Gradient HSQC spectrum of 99J-6-B.

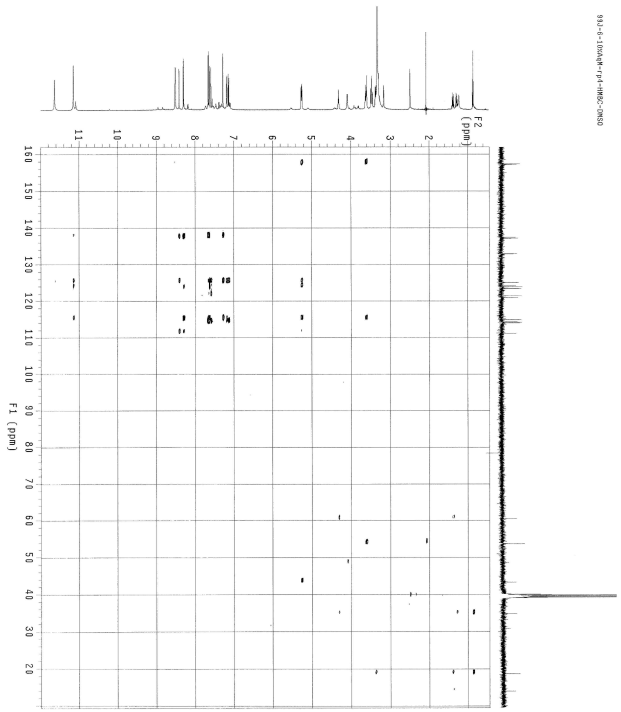



Figure 3-6-33. Gradient HMBC spectrum of 99J-6-B.

(4) 해면동물 980K-17의 천연물

(가) 시료의 채집, 유기물질의 추출 및 분획

본 연구에 사용된 미확인 해면(시료번호 980K-17)은 1998년 거문도 연안 해역 수심 25-30 m에서 SCUBA 다이빙에 의해 채집되었다. 이 시료는 변질을 막기 위해 추출할 때까지 영하 25℃에서 건조 냉동 보관되었다. 시료를 해동하여 2-3 cm 길이로 절단하여 실온에서 MeOH(5 ℓ)와 M.C.(5 ℓ)를 순차적으로 각 2회 추출하여 유기물질을 얻었다. 용매를 감압증류하여 얻은 잔류물을 물과 n-BuOH로 분획하여 NaCl과 기타의 수용성 염을 제거하였다. n-BuOH 분획을 감압증류하여 얻은 유기물질은 다시 n-Hexane과 15% aqueous MeOH의 분획을 이용하여 15.35 g의 비극성 물질과 30.99 g의 극성물질로 나누었다. 15% aqueous MeOH층의 약 1/5(6 g)에 대해 다음과 같은 조건으로 reversed-phase vacuum flash chromatography를 실행하였다. 용출 용매는 MeOH과 물의 혼합액(v/v)으로서 50%, 40%, 30%, 20%, 10% aqueous MeOH로부터 시작하여 100% MeOH, 100% Acetone, 100% EtOAc(각 분획당 500 ml)를 순차적으로 이용하였다. 이렇게 얻어진 각 분획들을 1H NMR로 측정한 결과 30% aqueous MeOH(300 mg)에서 유용한 이차대사물질의 존재가 발견되었으며 각각의 분획에 대한 Aspergillus niger에 대한 항진균활성 실험결과도 이를 뒷받침하였다.

(나) 크로마토그래피를 이용한 천연물의 분리정제

15% aqueous MeOH 분획의 잔류물질을 reversed-phase vacuum flash chromatography를 하였고, 용리용매는 순서에 따라 50%, 40%, 30%, 20%, 10% aqueous MeOH, 100% MeOH, 100% Acetone, 100% EtOAc를 사용하였다. 항진균활성이 있는 것으로 나타난 30% aqueous MeOH층을 감압증류한 다음, 소량 의 40% aqueous MeOH에 녹인 후에 Sepak으로 여과한 후, 용출물을 40% aqueous MeOH을 용리용매로 하여 C18 reversed-phased HPLC(50% aqueous MeOH, YMC ODS-A 1.0 cm × 25 cm, RI detector, 2.0 ml/min)로 분리하여 980K-17-A와 980K-17-B를 무정형의 고체 형태로 얻었다.

(다) 980K-17-A와 980K-17-B의 구조 결정

980K-17-A와 980K-17-B는 백색의 무정형의 고체 형태로 얻어졌다. 고해상질량분석과 13C NMR에 의하여 이 물질의 분자식은 $C_{15}H_{31}NO$으로 결정되었다.

여러 종류의 1D, 2D NMR 실험 등의 분광학적 실험과 문헌조사 결과, 이 화합물은 Halaminol C로 밝혀졌다.

1H NMR에서 두 개의 분리된 수소의 공명이 δ 5.41와 δ 5.59에서 나타났다. 이것은



amino alcohol에 의해 down field 쪽으로 이동되어진 것이다. δ 1.23과 δ 0.88에서 methyl 수소가 나타났다. 13C NMR 스펙트럼은 δ 125.2와 δ 134.1에서 두 개의 CH의 alkene이 나타나고, 산소와 질소에 이웃한 두 개의 methine 탄소는 δ 71.7와 δ 51.9에서 나타났다. 8개의 methylene과 두 개의 methyl 시그널은 δ 11.8과 δ 14.4에서 나타났다. COSY 스펙트럼에서는 δ 2.20의 methylene 수소가 δ 5.39의 alkene 수소와 δ 3.74의 carbinol 수소와 시그널을 내었다. 그래서 980K-17-A는 C-5에 이중 결합을 가짐을 알 수 있었다.

물질 980K-17-B는 백색의 무정형고체로 분리되었다. 고해상질량분석과 13C NMR에 의하여 이 물질의 분자식은 C15H31NO으로 결정되었다. 980K-17-A의 NMR 데이터와 비교하여 이중결합의 위치만 다른 것을 확인하였다. 문헌조사 결과 Halaminol A로 밝혀졌다.

980K-17-A: colorless oil; [α]24D 1.9°(c 0.025, M.C.); 1H and 13C NMR, see Table 3-6-2; HREIMS m/z 228.2329 [M+H] (calcd for C14H30NO, m/z 228.2322)

980K-17-B: colorless oil; [α]24D 1.9°(c 0.025, M.C.); 1H and 13C NMR, see Table 3-6-2; HREIMS m/z 228.2329 [M+H] (calcd for C14H30NO, m/z 228.2322)

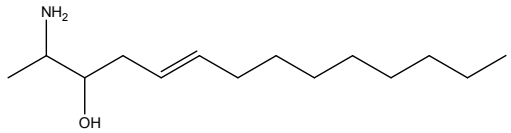



Figure 3-6-34. The structure of 980K-17-A.

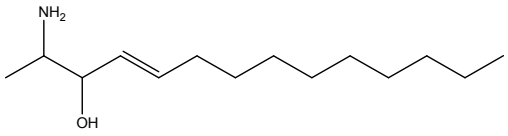



Figure 3-6-35. The structure of 980K-17-B.

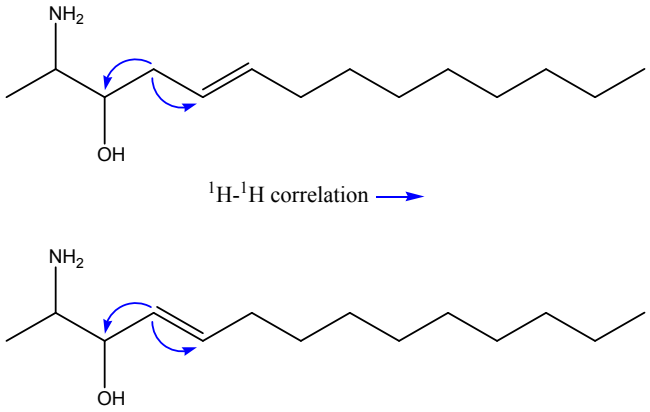



Figure 3-6-36. 1H-1H correlation of 980K-17-A,B.



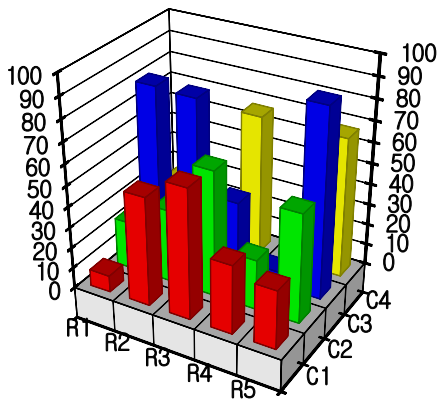



Table 3-6-2. 13C-and 1H-NMR Data for 980K-17-A and 980K-17-B in CD3OD-d4.

| Position | 980K-17-A | | 980K-17-B | |
|---|---|---|---|---|
| | $^{13}C$ | $^{1}H$ | $^{13}C$ | $^{1}H$ |
| 1 | 11.8 q | 1.23(d, 7) | 17.7 | 1.20(d, 7) |
| 2 | 51.9 q | 3.29(dq, 3, 7) | 51.4 | 3.22(dq, 3, 7) |
| 3 | 71.7 q | 3.74(dt, 3, 7) | 74 | 3.8(dt, 3, 7) |
| 4 | 32.3 t | 2.20(dd, 6, 7) | 128.8 | 5.48(dd, 6, 7) |
| 5 | 125.2 d | 5.41(td, 7, 11) | 136.8 | 5.82(td, 7, 11) |
| 6 | 134.1 d | 5.59(td, 7, 11) | 34.0 | 1.26(td, 7, 11) |
| 7 | 28.5 t | 2.08(q, 7) | 30.0 | 1.26(q, 7) |
| 8 | 30.7 t | 1.29-1.37 | 29.8 | 1.29-1.51 |
| 9 | 30.6 t | 1.29-1.37 | 29.8 | 1.29-1.51 |
| 10 | 30.5 t | 1.29-1.37 | 29.7 | 1.29-1.51 |
| 11 | 30.5 t | 1.29-1.37 | 29.4 | 1.29-1.51 |
| 12 | 33.1 t | 1.27 | 38 | 1.29 |
| 13 | 23.7 t | 1.29 | 24 | 1.23 |
| 14 | 14.4 q | 0.88(t, 7) | 12.1 | 0.96(t, 7) |

(라) 980K-17-A,B의 항진균활성 실험 결과

표준 paper disc 실험에서 980K-17-A와 980K-17-B는 *Aspergillus niger*에 대해 강한 항진균활성을 나타내었다. 980K-17-A와 B는 50 ㎍으로 *Aspergillus niger*에 대해 실험

한 테스트 plate에서 17 mm의 clear zone을 형성하였다.

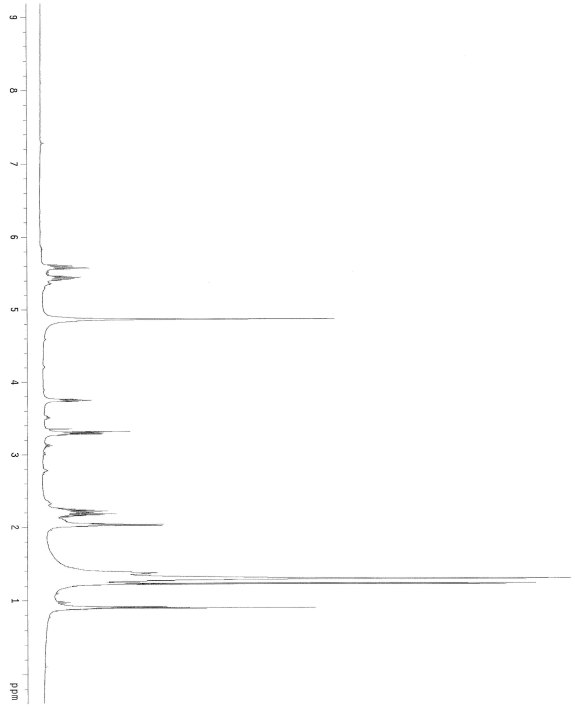



Figure 3-6-37. Proton NMR spectrum of 980K-17-A.

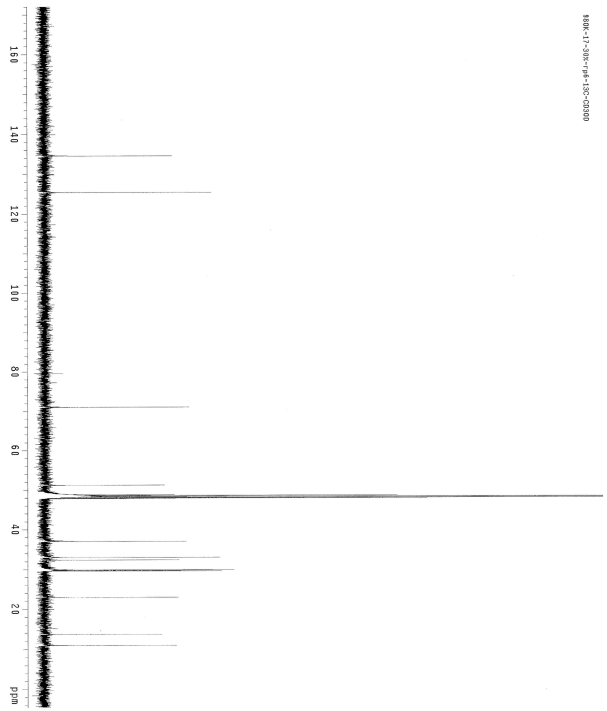



Figure 3-6-38. Carbon NMR spectrum of 980K-17-A.

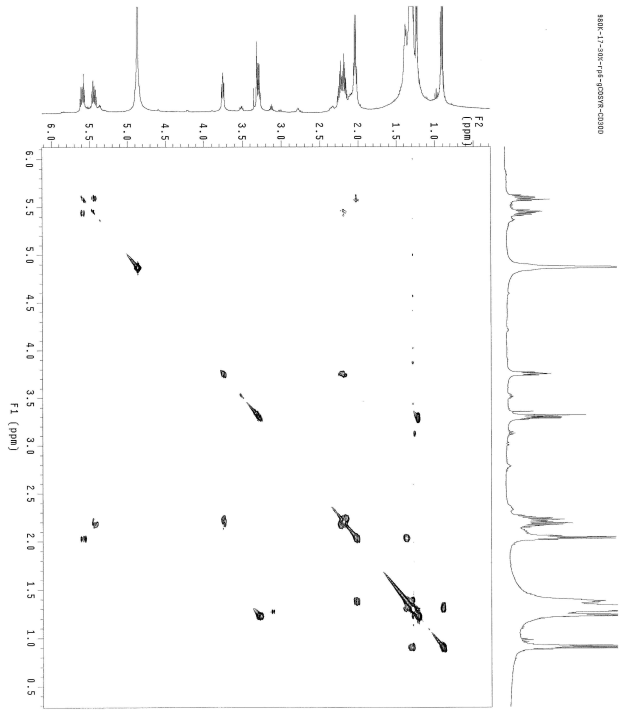



Figure 3-6-39. Proton COSY spectrum of 980K-17-A.

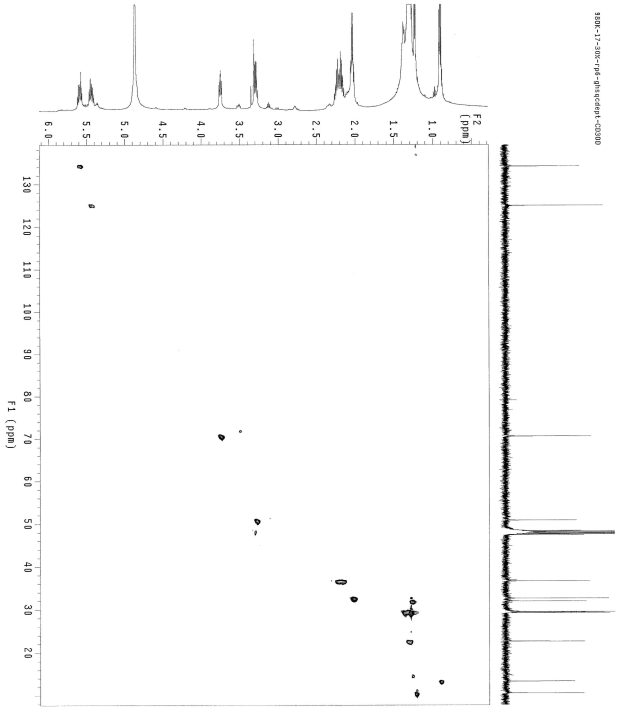



Figure 3-6-40. Gradient HSQC spectrum of 980K-17-A.



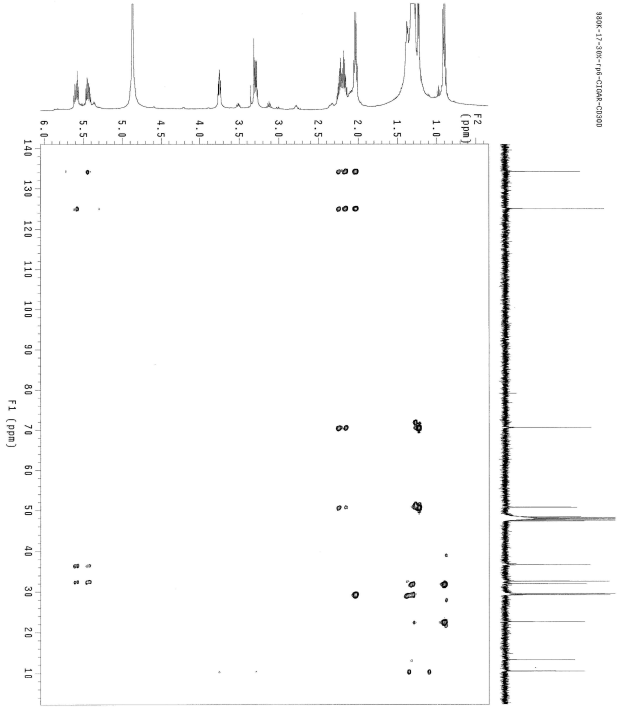



Figure 3-6-41. CIGAR spectrum of 980K-17-A.

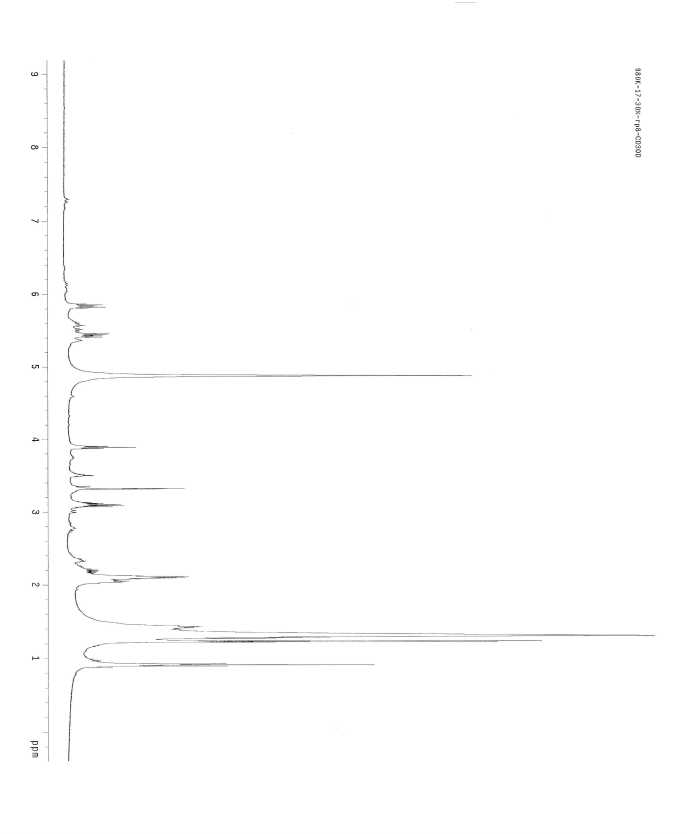



Figure 3-6-42. Proton NMR spectrum of 980K-17-B.

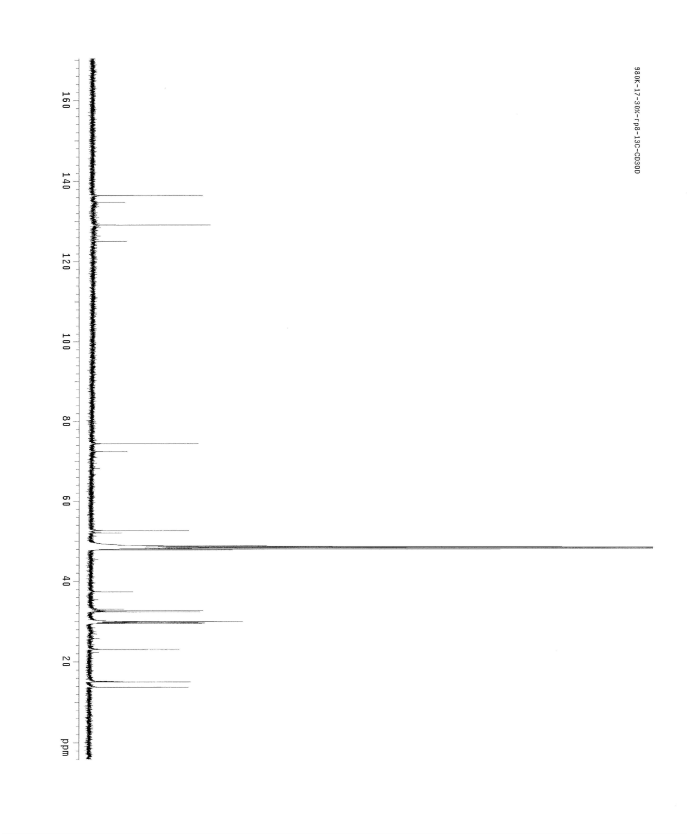



Figure 3-6-43. Carbon NMR spectrum of 980K-17-B.

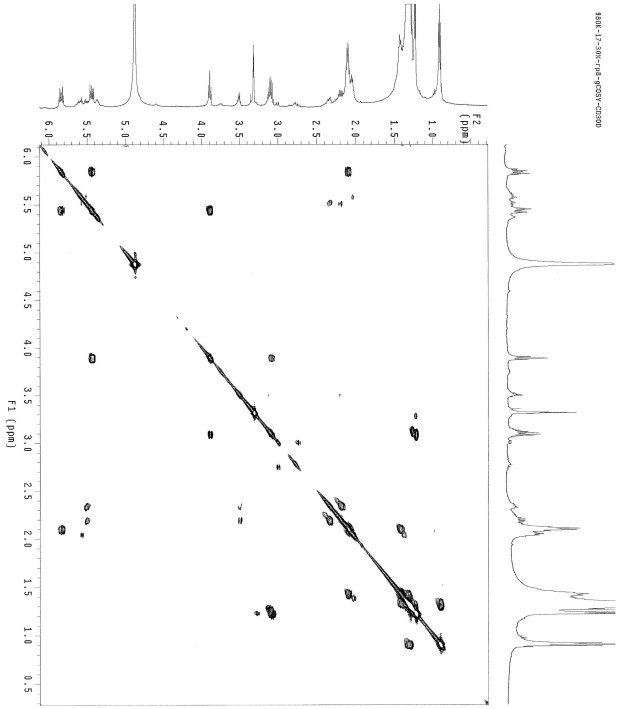



Figure 3-6-44. Proton COSY spectrum of 980K-17-B.

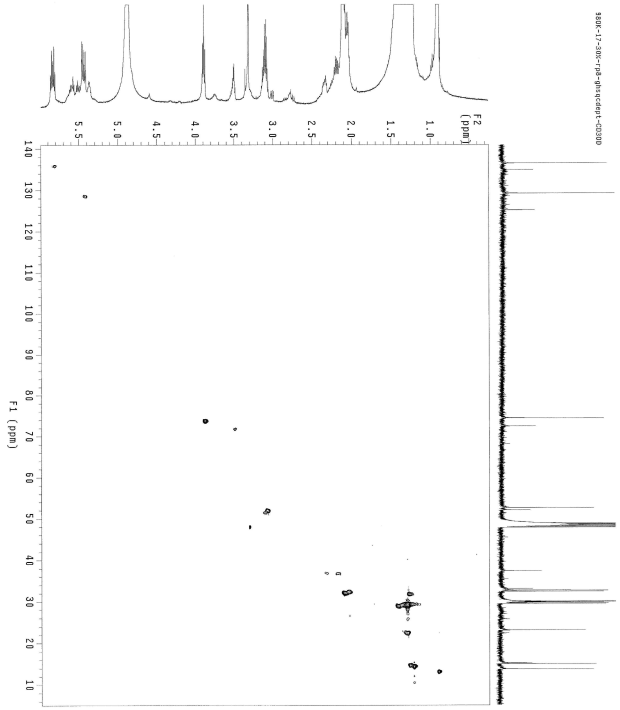



Figure 3-6-45. Gradient HSQC spectrum of 980K-17-B.

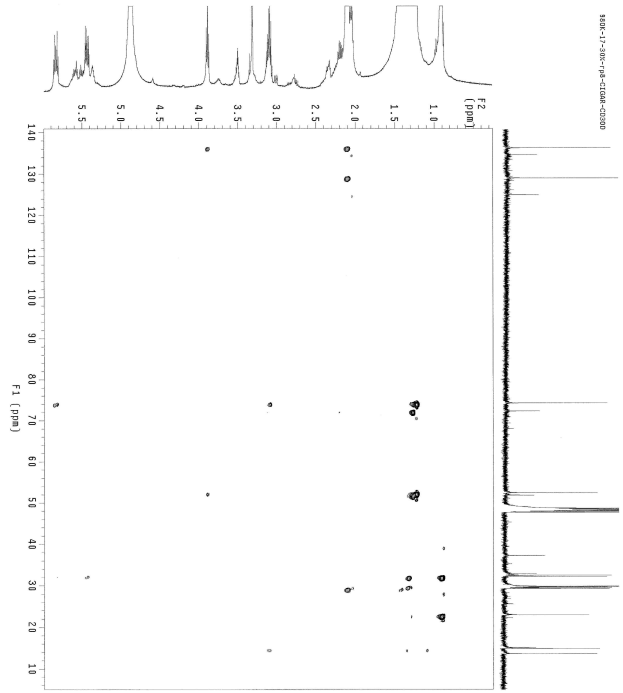



Figure 3-6-46. CIGAR spectrum of 980K-17-B.



(5) 해면 05CH-9의 천연물

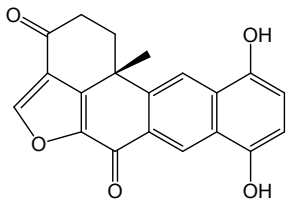
본 연구를 위하여 2005년 6월 마이크로네시아의 축섬 일대 연안 수심 20-30m에서 스킨스쿠바로 11종의 생물시료를 채집하여 부분 동결 건조한 다음 냉동 상태로 연구실로 운송하여 영하 25oC에서 보관하였다. 화학 분석을 하기 전에 11종의 생물에 대하여 항미생물 및 항진균 활성을 평가하였다. (Table 3-6-3)

Table 3-6-3. Results of antimicrobial tests.

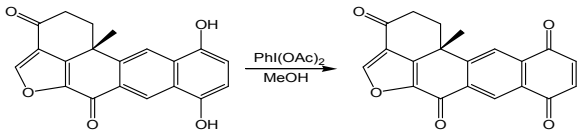
| Strain | 05CH 1 | 05CH 3 | 05CH 5 | 05CH 9 | 05CH 21 | 05CH 23 | 05CH 31 | 05CH 32 | 05CH 33 | 05CH 41 | 05CH 43 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Aspergillus niger* | 8.5 | 17 | 9 | 8 | - | 20 | - | - | - | 8.5 | 9.0 |
| *C. albicans* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *Aspergillus fumigatus* | 8.5 | 17.5 | 8.0 | 9.0 | - | 23 | - | 8.5 | 10.0 | 8.0 | 8.3 |
| *Bacillus cereus* | 9.0 | 15.5 | 12.0 | 8.5 | - | 9.0 | - | - | - | 10.0 | 8.5 |
| *Salmonella typhimurium* | - | + | 15.0 | + | - | - | - | - | - | - | - |
| *S. cerevisiae* | 9.0 | 14.0 | 13.0 | 13.0 | 10.0 | - | - | - | - | - | 12.0 |
| *Citrobacter freundii* | 9.0 | 9.0 | 17.0 | 10.0 | - | - | - | - | - | - | - |
| *Staphylococcus epidermis* | 9.0(+) | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - |
| *Listeria monocytogens* | 14.0 | 18.0 | 17.0 | 9.0 | - | - | - | - | - | 9.5 | 8.0 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 8.0 | - | 8.0 | 9.5 | - | - | 9.0 | - | - | 8.0 | - |
| *E. coli* | + | - | + | + | + | + | + | - | + | + | - |

상기의 시료 중 다양한 미생물 및 진균에 활성을 보이고 채집량이 충분한 해면 05CH-9에 대하여 화학분석을 시작하였다. 부분 건조된 채 냉동 보관되어있던 시료 05CH-9를 동결건조 하여 수분을 제거하고 잘게 자른 후 methanol과 dichloromethane을 순차적으로 이용하여 유기물질을 추출하여 각각의 용매를 증발시킨 후에 약 152g의 추출물을 얻었다. 추출물을 물과 n-butanol의 분획을 이용하여 염과 기타의 수용성 불순물을 제거하였다. 감압 건조하여 얻은 n-butanol층 41g는 다시 n-hexane과 15% aqueous methanol의 분획으로 극성에 따라 분리하여 각각 12.8g과 21.7g의 혼합물을 얻었다. 이어 약 9g의 15% aqueous methanol 층을 다시 normal-phased vacuum flash chromatography하여 극성에 따라 분리하였다. 용리용매는 dichloromethane과 methanol의 혼합용매(10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50% DCM/MeOH)와 100% methanol을 사용하였고, 각 분획에서 320, 470, 500, 1570, 680, 580, 1840 mg의 시료를 얻었다. 1H NMR 실험 결과 이들 분획 중

20%, 30%, 40% DCM/MeOH 영역에서 특이 신호를 보이는 화합물이 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 이들 중 30% DCM/MeOH 분획의 혼합물을 40% 물/MeOH 혼합용액으로 reverse-phased HPLC (ODS-A)하여 05CH9-A 화합물을 얻었다.
조추출물로부터 분리된 화합물 05CH09-A에 대하여 종합적인 NMR 실험이 진행되었다. 13C NMR 실험결과로부터 05CH09-A는 스물두개의 탄소를 가지고 있으며, 그중 열일곱개는 δ100 ppm 이하의 downfield에 위치하여 다수의 이중결합과 고리를 형성하고 있는 화합물임을 짐작할 수 있었다. 그리고 1H NMR 실험결과는 δ6 ppm 이하의 downfield 영역에 단지 다섯 개의 수소 신호만이 나타나 복잡한 고리구조가 중첩되어 있음을 짐작할 수 있었다. 이어진 정밀 2-D NMR 실험 중 COSY 결과에서 두 개의 메틸렌기가 인접해 있음을 알 수 있었고, downfield의 7.46, 6.78 ppm 신호가 강한 correlation을 보여주었다. 이어진 HSQC 실험에서 탄소와 수소 사이의 연결에 대한 정보를 얻을 수 있었고, COSY 실험 결과에서 예상할 수 있었던 것처럼 δ3.05, 2.72 ppm의 두 수소 신호가 δ37.6 ppm에 신호를 보이는 하나의 탄소에 연결되어 있었고, δ2,93, 2.22 ppm의 두 수소 신호는 34.9 ppm에 신호를 보이는 탄소에 연결되어 있었다. 한편 천연물 분자의 탄소 사이의 연결에 대한 정보를 제공하는 HMBC 실험으로 부분구조에 대한 정보를 얻을 수 있었다. 이러한 정보를 종합하여 화합물 03CH09-A의 부분 구조를 확인 할 수 있었다. 화합물 03CH09-A의 구조는 다음과 같았고 데이터베이스 조사결과 알려진 화합물 Halenaquinol(Sutherland et al 2001, Nakamura et al 2003)으로 밝혀졌다.




약 1.6g 분리한 화합물 05CH09-A를 이용하여 구조-활성 관계연구를 수행하기위해 화합물의 구조 변환을 시도하였다. 다량의 halenaquinol을 이용하여 유도체를 만들기 전에 유사한 구조인 halenaquinone을 다량 확보하기 위하여 hydroquinone 고리를 benzoquinone 고리로 산화시키는 반응을 수행하였다.




05CH-9-A (halenaquinol) 05CH-9-A-1 (halenaquinone)



화합물 05CH-9-A (halenaquinol) 23 mg을 10ml round bottomed flask에 넣고 5ml MeOH에 녹인 다음 (diacetoxyiodo)benzene (Andrew, 1988) 15mg을 넣고 상온에서 14시간 교반하였다. TLC로 반응의 종료를 확인한 다음 농축하고 분리하여 생성물 05CH-9-A-1 (halenaquinone) 18mg을 얻었다. 두 종의 생리활성 물질을 다량 확보한 다음 각각의 작용기에 화학반응을 진행한 다음 유도체를 얻고 구조-활성 관계에 대하여 연구를 수행할 계획이다.
구조 확인을 위하여 halenaqunone의 proton과 carbon NMR을 첨부하였으며 이중 carbon NMR은 반응의 진행을 확인할 수 있는 명확한 증거를 제공하고 있다. 화합물 05CH-9-A의 carbon NMR에서 보이지 않던 δ186.8과 186.4ppm의 두 신호가 새로운 두 개의 ketone 기의 존재를 보여 주고 있다.

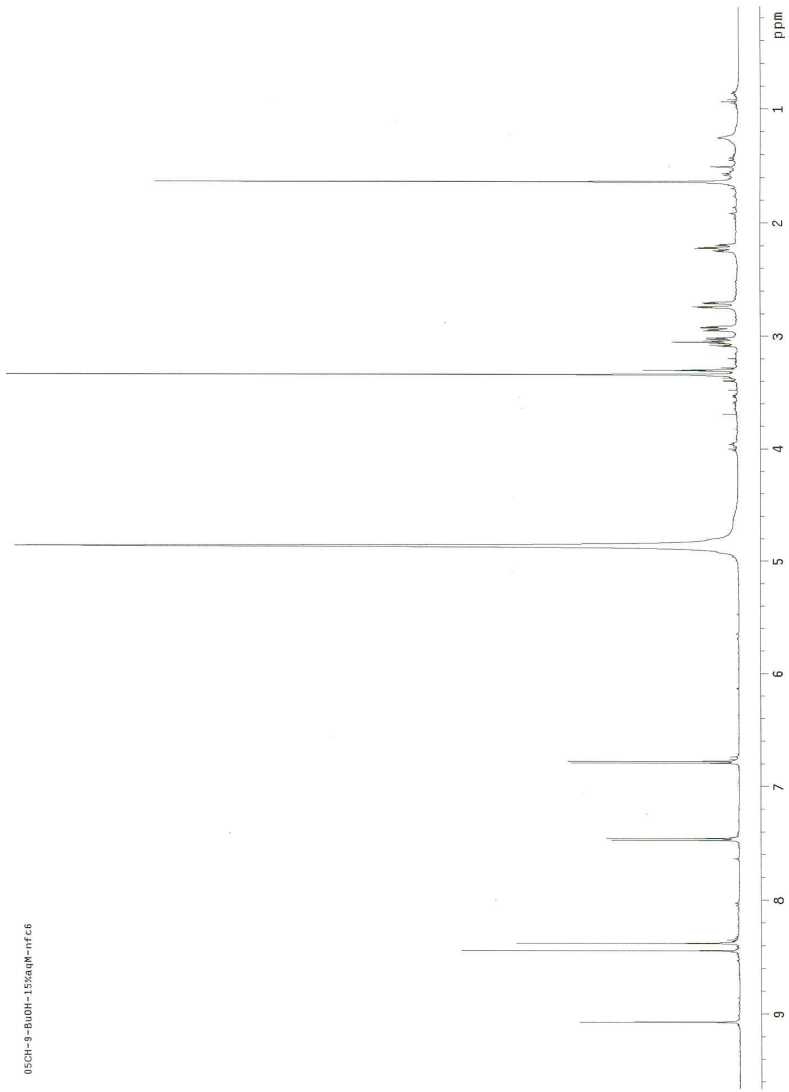



Figure 3-6-47. Proton NMR spectrum of 05CH-9-A.



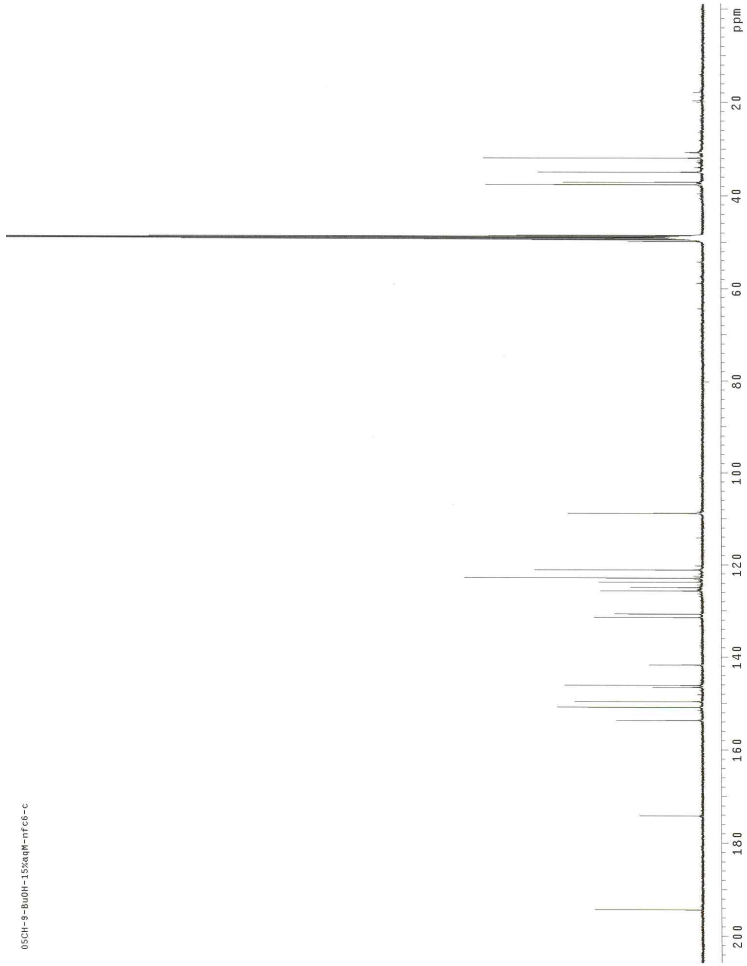



Figure 3-6-48. Carbon NMR spectrum of 05CH-9-A.

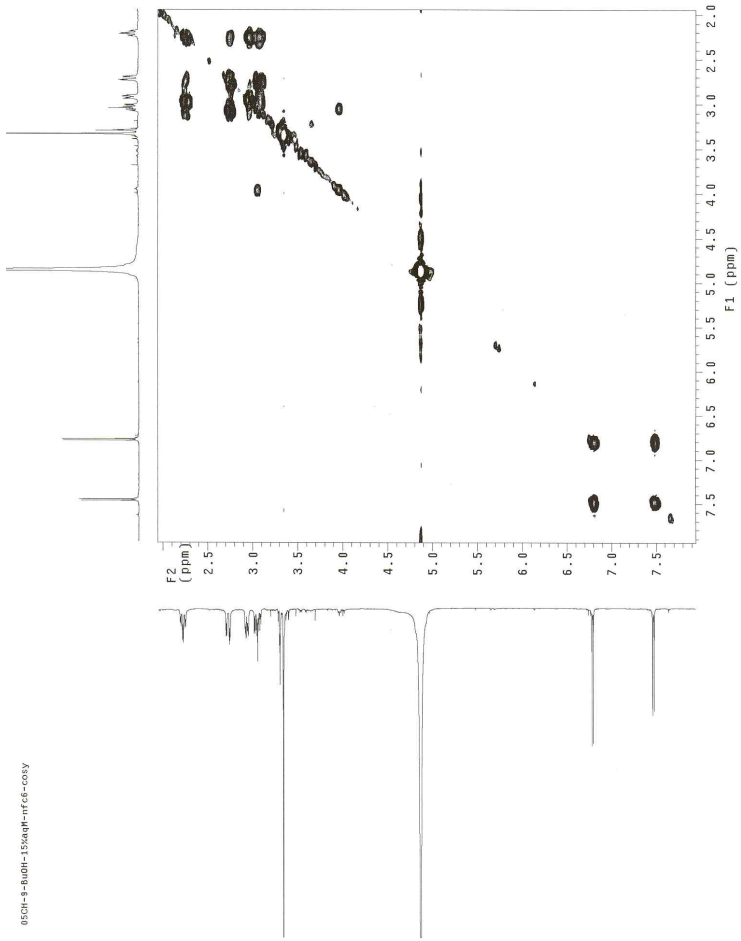



Figure 3-6-49. Proton COSY spectrum of 05CH-9-A.

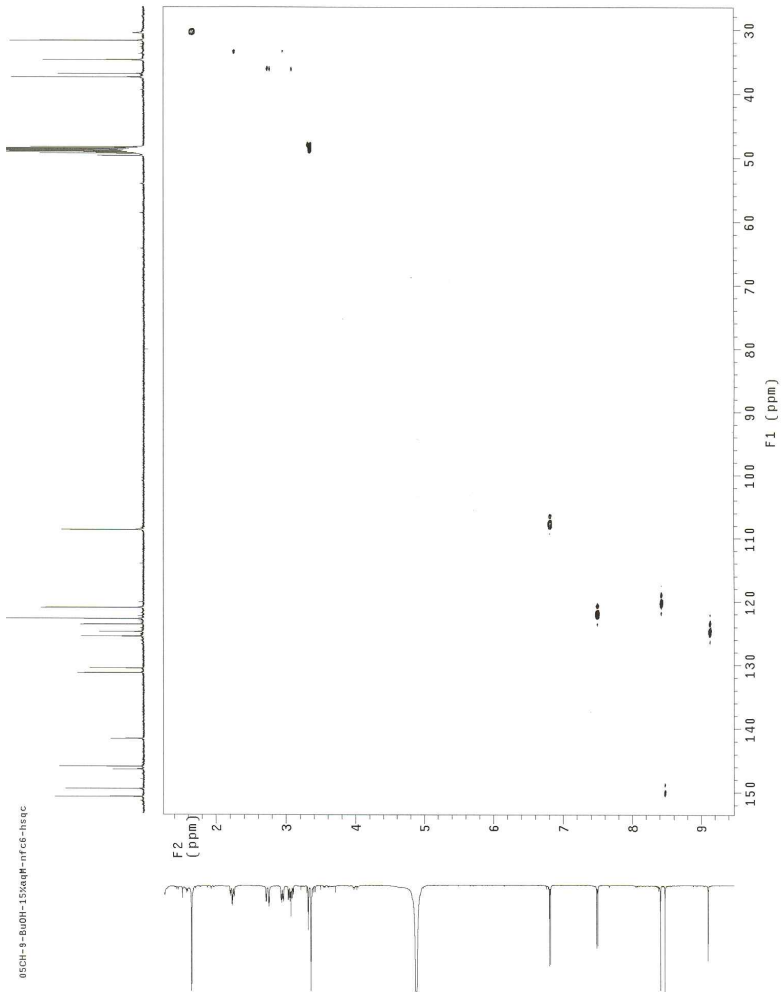



Figure 3-6-50. Gradient HSQC spectrum of 05CH-9-A.

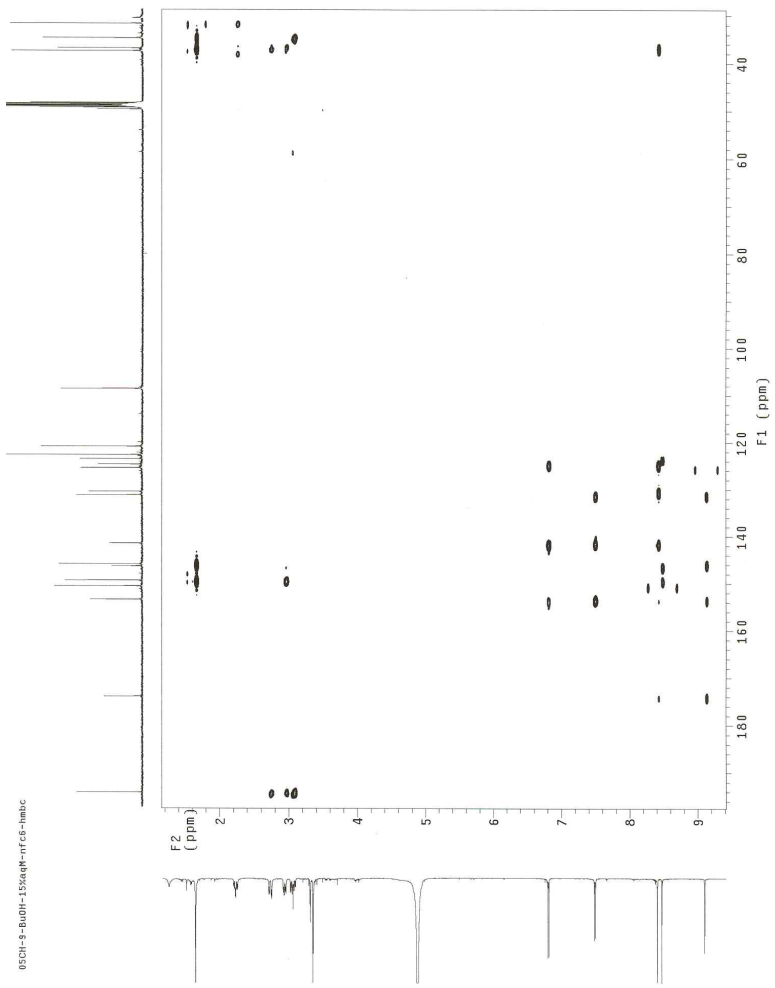



Figure 3-6-51. Gradient HMBC spectrum of 05CH-9-A.

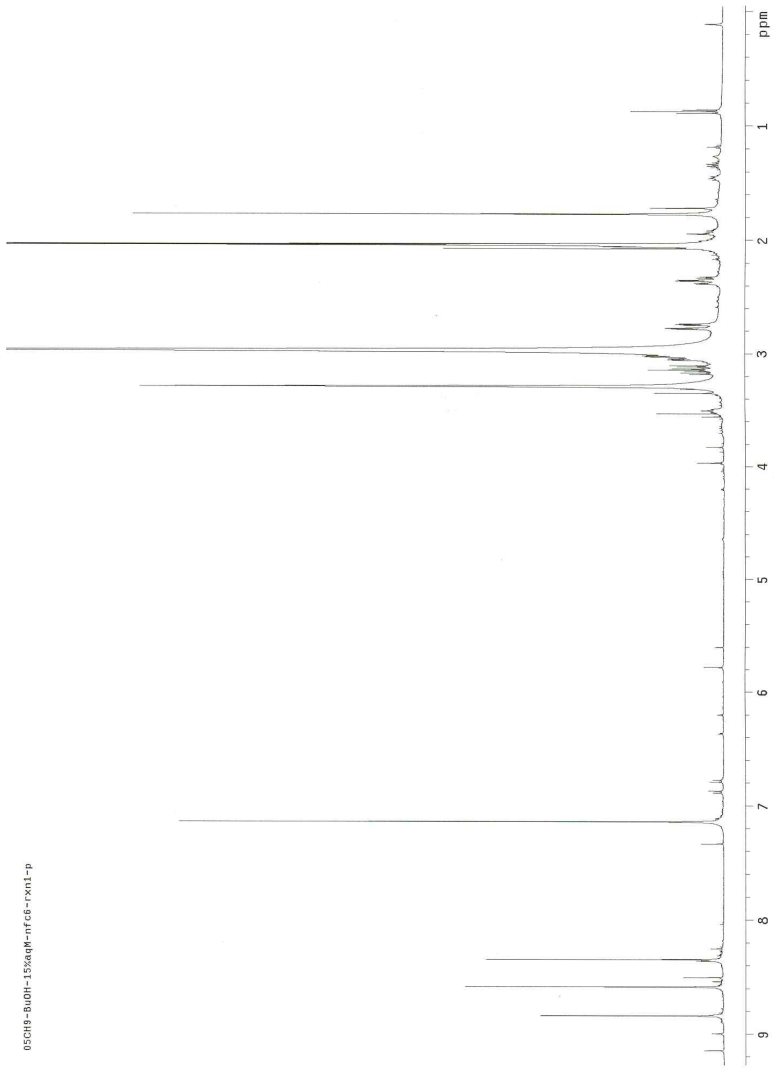



Figure 3-6-52. Proton NMR spectrum of 05CH-9-A-1.

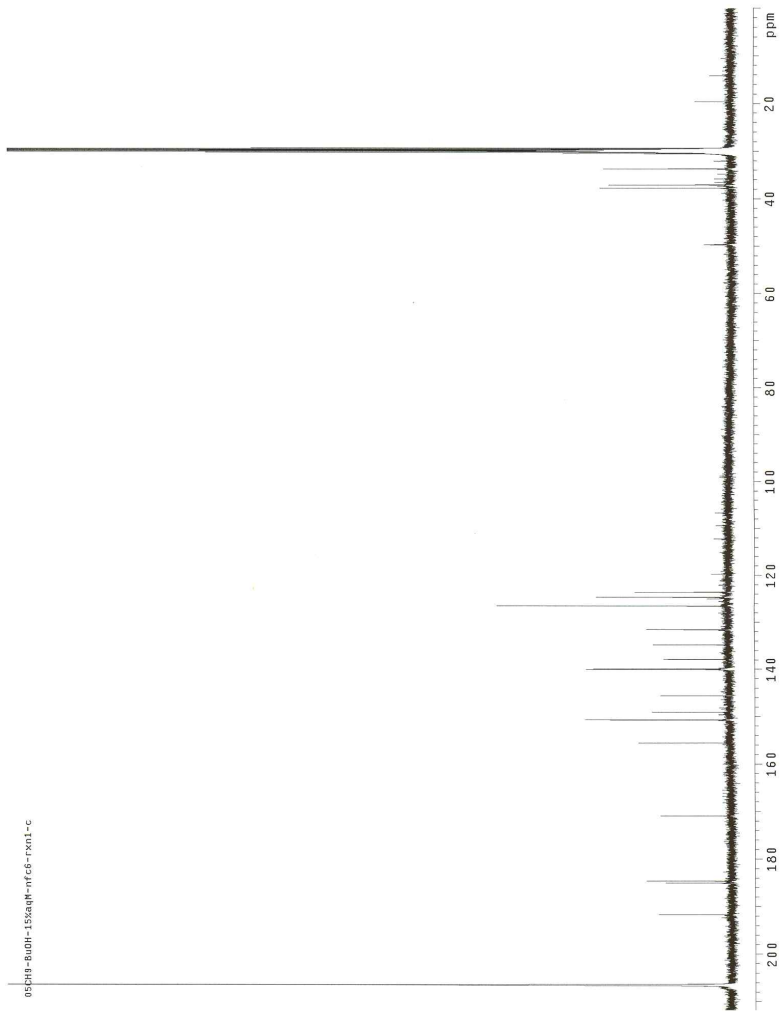



Figure 3-6-53. Carbon NMR spectrum of 05CH-9-A-1.



## 3. 결론 및 토의

본 연구는 우리나라 동해안의 고성, 강릉, 울진 등 여러 지역에서 채집한 해조류와 남태평양의 마이크로네시아의 축주 인근 도서 등에서 채집한 저서군체동물을 대상으로 생리활성물질을 탐색하는 과정을 통해 수행되었다. 특히 2003년과 2005년에 마이크로네시아에서 채집한 열대 해양생물시료는 국내에서 연구 대상으로 채집되기 어려운 시료들로서 20여 종의 해면동물, 강장동물을 채집하였고, 현지에서 일부 동결건조하여 국내로 반입되었였다. 이들 시료의 조추출물에 대한 생리활성 검색 결과를 바탕으로 연구대상 시료를 선정하였고, 선정된 시료에 대하여 다양한 크로마토그래피 기법을 사용하여 이차대사물질을 분리하였다. 해조류와 해면으로부터 분리된 10 종 이상의 신물질이 분리되었고, 분광학과 화학적 방법에 의하여 구조가 규명되었다. 일부의 신물질은 향후 정밀한 생리활성과 구조-활성관계 연구 이후 지적재산권 취득의 가능성을 가지고 있어 본 보고서에 자세한 내용의 기술을 생략하였다. 이들 중 일부는 세포독성과 항진균 및 효소활성에 대한 강한 저해능을 나타내었다. 해면에서 유래한 생리활성 퀴논계 화합물은 화학적 방법으로 구조를 변환시켜 유도체를 합성하였다. 이 과정에서 천연물의 구조와 활성간의 상관관계 연구를 시도하였다.

본 연구사업의 수행을 통하여 해양생물시료의 채집, 천연물의 분리정제 및 구조결정, 유도체의 합성 등 천연물 연구의 자체적 역량을 키웠다. 또 해양천연물 연구는 여러 학문 분야와 밀접한 관계를 맺고 있어 서로의 발전에 기여하는 바가 크기 때문에 본 연구사업으로 개발된 정보는 관련 분야의 연구에 활용될 것이다. 특히 해양천연물이 갖는 생리활성, 구조-활성 관계 등은 생화학 또는 의약학 분야의 연구에 중요한 정보가 될 것이다. 아울러 본 연구사업 중 채집된 해양생물 시료는 향후 해양생명공학 연구의 중요한 소재로 사용될 수 있으며, 천연물의 관련 정보는 신물질의 산업적 개발 연구를 위한 우수한 소재가 될 것이다.

# 제 7 절 항동결물질 분리

## 1. 재료 및 방법

### 가. *Porosira pseudodenticulata* 의 채집

시료는 2000년 12월 남극 세종기지 부두 앞에서 망목 크기 20 μm의 식물플랑크톤 네트로 채집하였다. 이 시료는 한국으로 이송시켜 현재 한국해양연구원 부설 극지연구소 저온배양실에서 배양중이다.

### 나. *Porosira pseudodenticulata*의 형태적 특성

식물플랑크톤의 동정 및 이미지를 얻기 위해 광학현미경과 주사전자현미경을 이용하여 실시하였다. 시료를 동정은 배양된 시료를 슬라이드 글라스 위에 일정량을 떨어뜨린 뒤 커버 글라스를 덮고 광학현미경 BX-51 (OLYMPUS, 한국해양연구원 부설 극지연구소)에서 400~1000배의 배율로 검경 및 동정을 하였다. 또한 시료의 미세구조 및 이미지를 얻기 위하여 시료를 4~5회 탈염을 한 뒤 임계점 건조(Critical point drying)를 실시하였다. 건조된 시료는 specimen mounts에 고정하여 gold-palladium으로 코팅 (BIO-RAD, SEM Coating System, P5100) 후 주사전자현미경 (Philips, SEM 515; 한국해양연구원 부설 극지연구소)으로 검경 및 동정하였다.

### 다. *Porosira pseudodenticulata*의 생리적 특성 실험

배지의 인공해수를 제작하기 위해 인공염분을 ddw에 1 L당 40g씩 용해시켰다. 완전히 용해된 배지의 염분을 측정하기 위해 VAPRO 5520 (Wescor)를 사용하였다. 남극해수에 가까운 염분인 1000 mmol/kg (34 psu)으로 맞추기 위해 인공해수의 염분도를 1010 mmol/kg으로 하였다.

배지는 총 20개로 각 배지당 3회 측정을 실시하였다. 배지들은 배양 플라스크(Corning)에 40 ml씩 분주하였으며 각각 규산염 ($SiO_2$), 질산염 ($NaNO_3$), 인산염 ($N_2H_2PO_4$), 그리고 비타민($Vitamin_{12}$+Biotin)의 농도구배를 달리하여 제작되었다. 규산염은 46, 310, 575, 839 umol의 순서로 농도의 변화를 주었고, 질산염은 0.02, 3, 6, 10 mmol의 순서로, 마지막으로 인산염은 0.4, 40, 79, 118 umol로 농도구배를 주었다. 배지 내에는 500 ml 삼각 플라스크에서 대량 배양하던 시료 중 5 ml을 접종하였다. 실험은 4주간 5일 간격으로 실시하였으며 클로로필의 양은 10-AU (Turner Designs)로 측정하였다.

### 라. *Porosira pseudodenticulata*의 유사 결빙방지 물질 확인



유사 결빙방지 물질 확인 실험은 Raymond (2000)의 방법으로 수행하였다.

## 2. 결과 및 토의

### 가. *Porosira pseudodenticulata*의 형태적 특성

한국해양연구원 부설 극지연구소 내의 주사 전자 현미경으로 *Porosira pseudodenticulata*를 촬영하였다 (Figure 3-7-1).

*P. pseudodenticulata*는 단독, 혹은 뚜껑면에 점액성분의 실에 의해 서로 연결되어 사슬형태의 모양을 가지고 있다. 뚜껑면은 원형이고 직경은 36 - 80 um이며, 두께축(pervalvar axis)은 10 -30 um이다 (Scott and Marchant 2005). 10 um 내에 망목(areolae)은 10 - 12개가 있고, 외부에 노출된 입술돌기는 그 길이가 짧다 (Tomas 1997). Figure 3-7-2. 는 *P. pseudodenticulata*의 상부면 (Figure 3-7-2. (a)), 내부면 (Figure 3-7-2. (b), 측면 (Figure 3-7-2. (c)을 주사 전자 현미경으로 촬영한 사진이다.

*P. pseudodenticulata*는 동남극의 Davis 기지, 호주 남부의 남해, 남대서양과 남극 (44-69°S / 0-6°30′E), Ross Sea의 Terra nova Bay, 남극 주변부에 분포하는 것으로 알려져 있다 (Scott and Marchant 2005).

### 나. *Porosira pseudodenticulata*에 대한 성장률 실험

2000년 12월 세종기지 부두 앞에서 식물플랑크톤 네트로 채집한 *Porosira pseudodenticulata* (Hust.)는 현재 극지연구소 저온배양실에서 배양 중이다. 남극에 서식하는 이 미세 규조류에 대한 기본적인 생리적 특성을 알아보고자 다양한 배지실험을 수행하였다.

미세 규조류가 주로 이용하는 영양염들의 농도를 달리하여 배지내에 넣었을 때 이들이 어떠한 성장패턴을 보이는지 알아보았다 (Table 3-7-1). Table 3-7-1의 수치들은 3회 반복 실험하여 평균한 값이다. 10-AU (Turner Designs)로 클로로필을 측정한 결과 측정시일이 지날수록 대체로 클로로필의 양의 증가하는 패턴을 나타내었다. 질산염 실험에서는 배양 개시후 가장 높은 클로로필의 증가를 보인 10일 후에, 질산염이 인공해수 자체에 들어있을 때의 농도보다 3 mmol $l^{-1}$, 6 mmol $l^{-1}$, 10 mmol $l^{-1}$ 의 질산염을 첨가하였을 때 클로로필의 양이 각각 21.8%, 17.0%, 17.4% 증가하는 것을 볼 수 있었고 (Figure 3-7-3), 인산염의 경우도 인공해수 자체 농도인 0.4 umol $l^{-1}$ 일 때보다 40 umol $l^{-1}$, 79 umol $l^{-1}$, 118 umol $l^{-1}$ 의 인산염이 첨가된 배지에서 34.1%, 34.2% 그리고 37.2% 의 클로로필 증가분을 확인할 수 있었다 (Figure 3-7-4). 그리고 질산염과 인산염, 규산염의 경우 15일 후부터는 클로로필의 농도가 감소하는 것으로 보아 *P. pseudodenticulata*의 최적 배양일은 약 10일로 보여진다. 규산염 실험의 경우 규산염이 기본적으로 들어있을 때보다 농도

를 달리하여 첨가하였을 때 클로로필의 양이 감소하는 현상을 볼 수 있었는데 (Figure 3-7-5), 이는 인공해수에서 배양시 그 자체의 규산염 농도에서 *P. pseudodenticulata*가 최적으로 성장한다고 할 수 있다. 오히려 인공해수에 과량의 규산염은 이 종이 성장하는데 장해 요인으로 보인다. 앞으로 성장률에 대한 실험은 10-AU를 이용한 클로로필 값을 측정한 데이터를 축적하여 일관된 영양염에 대한 *P. pseudodenticulata*의 성장률을 측정할 계획이다.

### 다. *Porosira pseudodenticulata*의 유사 결빙방지 물질 확인

남극 호냉성 미세조류인 *Porosira pseudodenticulata*가 유사 결빙방지 물질 (Antifreeze like ice-binding molecules, IBMs)을 만들어내는지 확인하기 위하여 3주간 3℃에서 배양한 뒤 세포들은 원심분리기를 이용하여 분리해내고 배양액내의 IBMs의 존재를 관찰하였다. 그 결과 이 종은 다량의 IBMs를 합성하는 것으로 확인되었다 (Figure 3-7-6).앞으로 산업적으로 유용하게 사용될 IBMs가 어떤 것이고 주요 활성이 무엇인지 반드시 연구하여야 한다.



Table 3-7-1. Chlorophyll a concentrations adding different amounts of each nutrient.

| | | 1 day | 5 days | 10 days | 15 days | 20 days | 25 days |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Si (umol) | 46 | 93.76 | 923.33 | 1223.94 | 1189.35 | 1146.73 | 1155.38 |
| | 310 | 93.76 | 710.63 | 1007.13 | 1003.42 | 983.86 | 926.00 |
| | 575 | 93.76 | 798.55 | 1074.25 | 1046.66 | 994.77 | 983.66 |
| | 839 | 93.76 | 754.70 | 1070.13 | 997.25 | 921.68 | 933.00 |
| N (mmol) | 0.02 | 93.76 | 815.02 | 922.71 | 895.12 | 846.32 | 871.23 |
| | 3 | 93.76 | 844.67 | 1178.23 | 1117.90 | 1063.13 | 1010.01 |
| | 6 | 93.76 | 803.08 | 1111.31 | 1050.57 | 960.18 | 935.27 |
| | 10 | 93.76 | 776.93 | 1117.08 | 1062.31 | 1000.95 | 979.74 |
| P (umol) | 0.4 | 93.76 | 731.63 | 744.40 | 767.05 | 777.34 | 767.05 |
| | 40 | 93.76 | 886.88 | 1129.43 | 1107.81 | 1086.61 | 989.83 |
| | 79 | 93.76 | 900.27 | 1131.49 | 1117.70 | 1070.55 | 1011.25 |
| | 118 | 93.76 | 870.20 | 1184.41 | 1132.52 | 1074.05 | 1038.43 |
| Vitamin§ | Limited† | 93.76 | 713.10 | 1024.42 | 1046.46 | 1019.89 | 894.71 |
| | Enriched‡ | 93.76 | 841.79 | 1101.43 | 1156.20 | 1165.67 | 1143.02 |

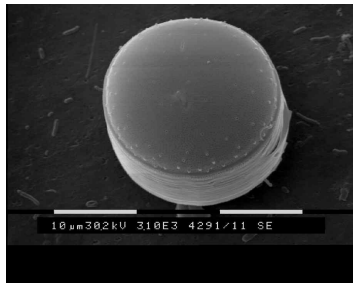
* days : Measuring dates.

† Limited - Vitamin in artificial sea water

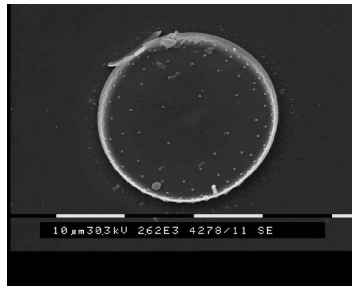
‡ Enriched - Unknown-adding vitamin to artificial sea water

Figure 3-7-1. Optical microscopic picture of *P. pseudodenticulata*.

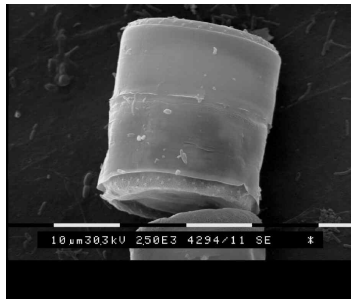





(a)

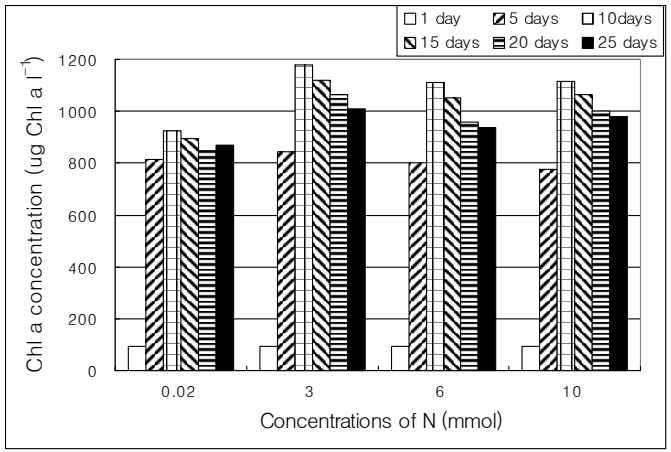


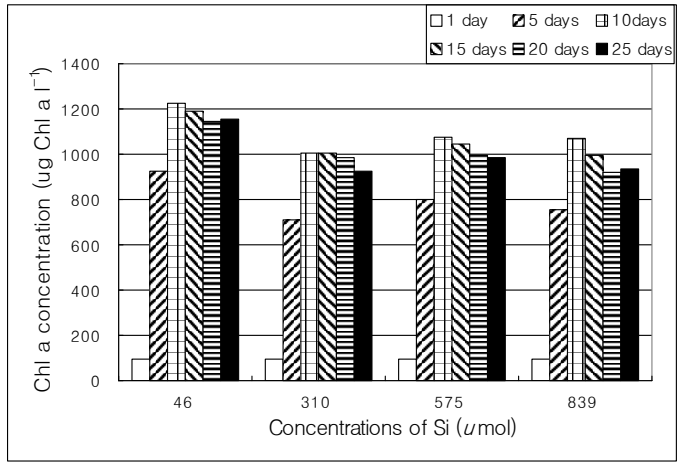

(b)

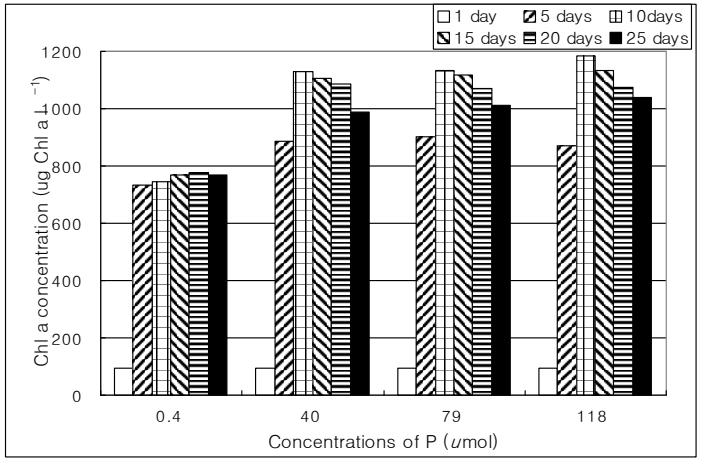



(c)

Figure 3-7-2. Scanning electron micrographs (SEM) of *Porosira pseudodenticulata* (Hust.). (a) upper view, (b) inner view, (c) side view


1 day
5 days
10days
15 days
20 days
25 days
Chl a concentration (ug Chl a l⁻¹)
1200
1000
800
600
400
200
0
0.02
3
6
10
Concentrations of N (mmol)


1 day
5 days
10days
15 days
20 days
25 days
Chl a concentration (ug Chl a l⁻¹)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
46
310
575
839
Concentrations of Si (μmol)


1 day
5 days
10days
15 days
20 days
25 days
Chl a concentration (ug Chl a l⁻¹)
1200
1000
800
600
400
200
0
0.4
40
79
118
Concentrations of P (μmol)

# 제 8 절 해양생명공학기술 국내외 연구 동향 및 정책 제언

## 1. 해양생명공학의 의의

해양은 수압, 염도, 수온 등과 같은 다양한 물리적 환경요인을 지니고 있으며, 이러한 물리적 요소의 결합 형상인 극한적 해양환경은 육상생물과는 다른 대사물질을 생산하거나 생리작용을 지닌 해양생물을 탄생시키고 유지시켜왔다. 따라서 해양생물의 생태기능이나 유용물질을 연구하여 식품, 의약, 환경, 수산, 정밀화학 분야 등에 적용하려는 해양생명공학(MBT) 분야가 최근 주목받고 있으며, MBT산업을 미래 첨단 국가 기간산업으로 육성하기 위해서는 국가차원의 정책이 요구된다(해양과학총서9, 2005).

해양생명공학은 환경친화형, 자원절약형 과학기술을 이용한 산업구조의 고도화와 지식 집약적인 산업으로 고급기술인력의 활용으로 벤처기업육성이 가능하고 부존자원이 부족한 우리나라의 여건에 가장 적합한 산업이다. 또한 해양생명공학은 상업적으로 활용할 수 있는 잠재력이 가장 큰 분야중의 하나이며, 고도기술 주도형의 미래지향적인 산업으로 선진국과의 기술격차가 비교적 작아 집중적인 육성시 세계적 수준에 도달 가능하고, 기존의 산업과는 달리 인간의 지식이라는 무형의 자산이 투입되어 부가가치를 창출하는 첨단산업이라고 할 수 있다(이홍동, 1999).

해양생명공학이 국가의 차세대동력산업으로 자리매김을 하기 위해서는 연구개발 시기의 적절성, 효과적인 연구비 지원, 최적 연구 인프라 구성, 국내 및 세계 경쟁국가의 육성정책 등이 조사·분석 되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 해양생명공학(MBT)과 생명공학(BT)의 관계(연계성)를 규명, 생명공학의 시장 현황 조사, MBT(혹은 BT)의 국가육성 정책을 분석한 후 시사점 및 정책방향을 제시하였다.

### 가. 해양생명공학의 정의

해양생명공학은 "해양 생물 연구자에 의해 인류에게 유용한 상품 및 서비스를 공급하기 위해 과학적·공학적 이론(기술)을 물질처리(the processing of materials)의 적용 하는 것"으로 정의된다(OECD, 1982). Figure 3-8-1은 해양생명공학의 구성요소를 보여 주는



것으로 예를 들면 DNA의 재조합, 하이브리도마/단일클론생산과 같은 분자생물학이 양식, 어류 등과 같은 분야의 연구나 개발에 이용될 때, 해양생명공학의 범주에 이들 구성요소가 포함된다고 본다. 하지만 이러한 정의 및 구분은 관점에 따라 달라 질 수 있다.

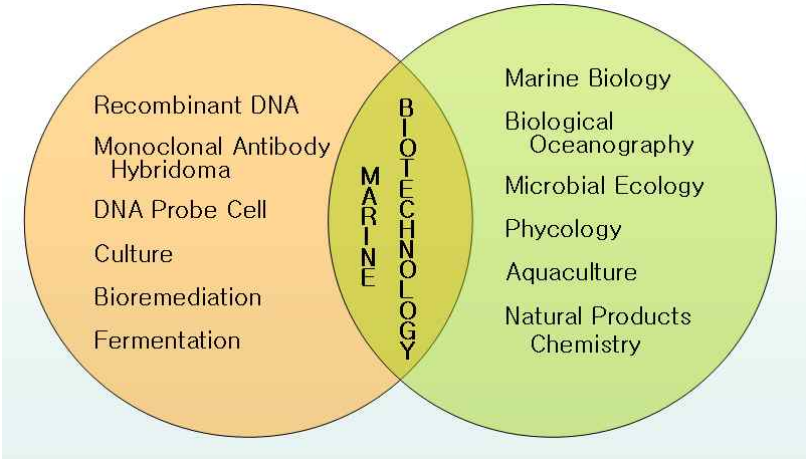



Figure 3-8-1. Elements of Marine Biotechnology

Table 3-8-1은 각 나라의 해양생명공학 연구를 수행하는 연구자가 생각하고 있는 해양생명공학의 정의를 나열한 것으로 세계은행(the World Bank)이 수행한 "개발도상국을 위한 해양공학에 관한 연구"의 일부분이다. 다양한 의견을 종합하면 "해양생명공학(MBT)은 생명공학(BT)[1] 관련기술을 바탕으로 해양에 존재하는 물질 및 생명체가 가지고 있는 기능 및 정보를 활용하여 인류에게 도움을 줄 수 있는 유용물질을 생산하는 첨단산업"으로 정의 할 수 있다.

1) MBT와 BT간의 차이가 유용물질 추출의 공간적 구분 정도라고 정의한다면 MBT 관련 정책 수립은 BT의 기반에서 시작된다고 볼 수 있다. 또한 선진국가의 경우에도 정책수립이나 수행과정에서 BT와 MBT를 굳이 구분하지 않고 있어 본 연구에서는 해양생명공학과 일반 생명공학과는 차별성을 두지 않았다. 또한 국내의 경우 해양생명공학의 발현시기가 오래되지 않은 관계로 자료(예: 연구기금, 연구동향, 연구실적, 경제적 효과 등)가 부재하거나 미미하여 일반 생명공학의 현황파악으로 대체하였다.

Table 3-8-1. Definition of Marine Biotechnology.

| 해양생명공학의 정의 | 저자 & 출처 |
|---|---|
| 분자의 응용생물학적 기술/방법의 생산이나 잠재적 상업 생산품 변형에 적용, 응용을 위한 해양 종의 사용이나 해양환경에서의 분자 생명기술의 사용을 포함 | David L. Nebert, Assistant Director for Research and Administration, Institute of Marine Science, University of Alaska-Fairbanks, Alaska |
| 해양 유기체(marine organism)의 연구를 위한 생명공학의 사용이나 생명공학의 분야에서 응용을 위한 해양 유기체의 사용 | Bert Ely, Director Institute for Biological Research and Technology, University of South Carolina, S.C. |
| 인류에게 또는 인류를 위하여 원하는 결과를 생산하기 위하여 생명과학에서 모든 도구와 지식을 사용하는 것 | Robert S. Jones, Director Marine Science Institute, University of Texas at Austin, Texas |
| 인류를 위하여 유익한 산물을 생산하기 위한 해양 유기체의 조작 | Kent S. Price, Associate Dean, College of Marine Studies, Lewes, Delaware |
| 현대의 분자 생물학의 기술을 해양 생물학에의 적용 (해양 유기체로부터 끌어낸 분자의 실용적인 응용을 개발하는 것뿐만 아니라 해양 유기체의 생물학을 연구하는 기술의 사용을 포함) | Norman R. Wainwright, Director of Research, Associates of Cape Cod, Inc., Massachusetts |
| 매력 있는 생산물과 서비스를 제공하기 위한 해양의 살아 있는 자원이나 이것을 구성하고 있는 성분의 효율적 활용 | M. Chandrasekaran, Microbiology Laboratory, Department of Applied Chemistry, Cochin University of Science and Technology, Kochi 682022, India |
| 해양 생물학의 연장, 광범위한 산업적·상업적 사용을 위한 해양 유기체의 대량 생산과 공정을 위한 방법을 개발하기 위한 과학과 기술의 혼합 | Saipin Chaiyanan, Department of Microbiology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Thonburi, Bangmod, Rasburrana Bangkok 10140, Thailand |
| 인류의 개선(betterment)을 위하여 식품, 먹이 그리고 화학제품의 생산을 향상하기 위한 해양유기체를 취급하는 해양과학의 부문 | N.B. Bhosle, National Institute of Oceanography, Dona Paula, Goa-403 004, India |
| 생물학적 시스템에 의해서 원조된 어떠한 입증된 기술도 생명공학으로 불릴 수 있다. 따라서 이 정의를 해양 생명공학에 적용할 수 있다. | M.S. Andhale, Department of Microbiology, Government Institute of Science, Nipatniranjan, A'bad Caves Road, Aurangabad 431 004, India |
| 수확이나 해양 생산을 증가시키는데 적용될 수 있는 모든 생물학적 지식 | Twee Hormchong, Director Institute of Marine Science, Burpha University, Bangsaen, Chonburi 20131, Thailand |
| ● 생명공학: 응용과학의 유기체에 대한 적용<br>● 해양생명공학: 유전적 공학의 해양 과학에의 적용 | Shanta Achuthankutty, National Institute of Oceanography, Dona Paula, Goa 403 004, India |
| 효용과 서비스를 생산하기 위하여 살아있는 해양 유기체, 그들의 세포 혹은 세포의 부분을 활용하는 응용생물학의 적용 | S.T. Chang, Department of Biology, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, N.T., Hong Kong |



Table 3-8-1. (continued)

| 해양생명공학의 정의 | 저자 & 출처 |
|---|---|
| 생산을 증가시키기 위해서 사용된 모든 기술. 이러한 점에서, 미국과 캐나다에서는 이 개념이 더욱 제한되고 사용이 단지 DNA가 조작되는(manipulated) 기술에만 적용되어 오고 있다. | Patricio Bernal Pence, Executive Director, Instituto de Fomento Pesquero, Jose Domingo Canas 2277, Casilla 1287, Santiago, Chile |
| 양식, 약물학 그리고 환경규제에 적용하기 위한 해양유기체나 이것들의 유전적 정보의 사용 | M.L. Lizarraga-Partida, Centro de Investigation Cientifica y de Education Superior de Ensenada, Av. Espinoza No.843, Apartado Postal 2732, Ensenada, Baja California, Mexico |
| 해양 미생물학, 해양 생화학(세포 생물학, 분자 생물학, 그리고 분자 유전학을 포함하여), 해양 생물학 그리고 융기 공학에서 발전의 통합 & 식량과 먹이 산업, 제약산업, 환경오염과 에너지, 의학의 진단, 발효산업, 그리고 화학산업과 같은 분야에 적용을 위한 것 | Gideon Abu, Department of Microbiology, Box 274, University of Port Harcourt, Nigeria |
| 인간의 복지를 위하여 해양 (수생의) 생물에 대한 우리들 이해의 적용과 개량·향상을 위한 발전도상의 더 새롭고 더 낳은 연구 도구뿐만 아니라 이용할 수 있는 생체고분자를 사용한 해양 (수생의) 자원의 연구와 개발 | S.O. Emejuaiwe, Imo State University, P.M.B.2000, Okigwe, Imo State, Nigeria |
| 생명공학의 과업은 현대의 이론과 기술과 생물학을 종합하는 것, 다양한 수준에서 생물학적 구조와 기능의 변화를 연구하는 것, 그리고 유전학적 기술, 세포 기술, 효소 기술, 미생물 기술, 생화학적 기술 그리고 생물적 자원을 위한 포괄적인 활용의 기술과 같이 큰 규모의 새로운 생물학적 생산품이나 산업의 새로운 유형을 개발하기 위하여 공학과 기술을 이용하여 인공적으로 이러한 변화를 통제하는 것 | Chen Dou, Institute of Oceanology, Academia Sinica, 7 Nan-Hai Road, Qingdao, Shandong, Peoples Republic of China |
| 해양과 민물 유기체로부터 유도된 상품들을 확인, 개발, 그리고 향상 하기 위한 목적으로 분자와 세포의 해양과 민물 유기체에 대한 적용 | Marine Biotechnology Investment Act of 1993-H.R. 1916 |

자료 : the World Bank

## 나. 생명공학의 발전단계

생명공학의 발전단계를 살펴보면 생물학을 기본으로 하여 생화학, 의학, 농학 등을 포함한 학문적 차원의 연구가 생명공학의 발현시기로 볼 수 있으며, 연구 업적으로는 DNA 이중나선구조 규명을 들 수 있다. 다음은 생명공학기술 단계로 볼 수 있으며, 유전자조작기술 등과 같은 산업화 이전의 기반·기초·생산기술을 개발하는 단계라 볼 수 있다. 생명공학단계는 생명공학기술을 현실세계에 적용하여 이익을 창출할 수 있는 산업군이 형성되는 시기라 할 수 있으며, 마지막으로는 사회·문화적으로 생명공학제품 및 서비스가

일상화 되는 시기를 말하며, 결국 생명공학자들의 추구하는 최종단계로 볼 수 있다(Table 3-8-2).

Table 3-8-2. Development of Biotechnology.

| 발전 단계 | 특 징 | 비 고 |
|---|---|---|
| 생명과학 (Life Science) | 학문(과학)차원 : 생물학에 기초하여 생화학, 의학, 농학 등 포함 | '53년 Watson과 Crick이 DNA 이중나선구조 규명 |
| 생명공학 기술 (Biotechnology) | 기술차원 : 기반기술, 기초기술, 생산기술 등으로 구분 | '73년 Cohen과 Boyer가 유전자조작기술 개발 |
| 생명공학산업 (Biotechnology Industry) | 산업차원 : 생명공학사업이라는 새로운 산업군 형성 | '93년 미국은 사업차원의 생명공학산업이라는 용어 사용 |
| 생명공학 사회 (Biosociety) | 사회·문화차원 : 생명공학제품 및 서비스가 일상화 | 미래학자들은 생명공학 사회 도래를 예측 |

자료 : http://www.ksbc.or.kr

생명공학의 경우 기술단계를 넘어 산업단계에 들어섰으며, 해양생명공학의 경우 출발이 늦었음에도 불구하고 생명공학이 이룩해 놓은 기반기술을 바탕으로 빠른 속도로 기술단계와 산업단계를 동시에 점유하고 있는 상황이다.

해양으로부터 인간에게 유용한 물질을 추출하고 개발하기 위해서는 자본이 필요하고 자본의 유입을 위해서는 기술발전이 산업과 연계되어야만 한다. 즉, 기술개발을 위해서는 자본이 투입되어야 하고, 투입된 자본에 대해서는 경제성이 고려되어야 한다.

### 다. 해양생명공학 산업의 발전과 사회적 후생의 증가

Figure 3-8-2는 해양생명공학이 산업에 응용되어 특정상품의 생산량이 증가됨으로서 소비자 잉여와 생산자 잉여가 증가하는 모습을 보여주고 있다. 즉, 수산양식에 생명공학이 접목됨으로서 생산자에게는 최소의 비용으로 생산을 최대화시킴으로써 이익이 발생되고, 소비자에게는 질적 변화 없이 저렴한 가격으로 소비할 수 있어 이익이 될 수 있다[2]. 즉,

2) 가격이 변하지 않은 상태에서 기능이 첨부되거나 질 자체가 향상됨으로써 소비자의 후생을 증가시키는



가격이 하락됨으로써 사회적 후생이 증가하게되어 모두에게 이익이 발생하게 된다.

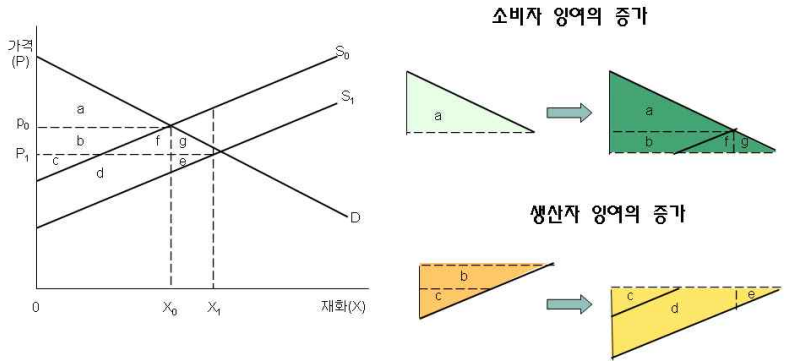



Figure 3-8-2. Increase in social welfare due to development of marine biotechnology.

세계의 각국은 IT 시대 이후 생명공학산업이 세계경제를 견인할 것으로 예측하고 있다. Table 3-8-3은 10년간(1995년~2005년) 세계 산업별 평균 성장률을 보여주는 것으로 반도체와 메카트로닉스가 9%대의 성장률을 보이는 반면 생명공학산업의 경우 약 20%의 높은 성장을 보이고 있다. Table 3-8-4는 세계생명공학산업의 성장을 예측한 것으로 2010년에는 산업규모가 1,540억불 규모로 성장할 것이며, 5년간(2005년~2010년) 평균 성장률은 10%를 상회할 것으로 전망하고 있다.

Table 3-8-3 Growth rate by industries(1995~2005).

(단위 : %)

| BT산업 | 반도체 | 메카트로닉스 | 신소재 | 자동차 | 항공기 |
|---|---|---|---|---|---|
| 22.1 | 9.4 | 9.1 | 6.9 | 3.5 | 1.4 |

자료 : DRI

Table 3-8-4. Forecast of growth rate in biotechnology industry.

경우도 많이 존재한다.

| | '00년('00~'04) | '05년('05~'10) | '10년 |
|---|---|---|---|
| 바이오시장규모(성장율) | 540억불(11.0%) | 910억불(11.1%) | 1,540억불 |

자료 : 산업자원부

Figure 3-8-3은 세계 1인당 국민소득을 견인하는 산업을 시대별로 나열한 것으로 21세기는 생명공학산업이 전세계 1인당 GDP를 견인하는 주요 산업이 될 것으로 예측하고 있다.

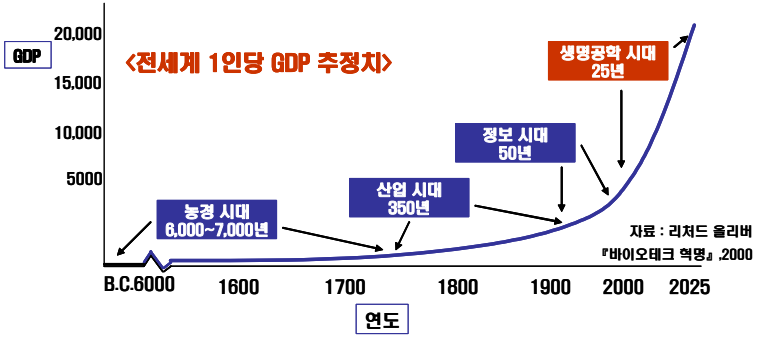



Figure 3-8-3. Per capita GDP in the world.

생명공학산업은 대부분의 경우 생명현상과 관련된 제품과 서비스를 생산하므로 개발-안전성시험-인증이라는 복잡하고도 엄격한 규제의 과정을 거쳐야 하는데, 첨단 바이오신약의 경우 개발주기를 보면 평균 15년에 5억불 정도의 투자비용이 소요된다. 또한 1만개중 하나만이 상품화에 성공하는 고위험-고수익의 특성을 지녔으며, 일단 제품개발에 성공하면 세계시장 단위에서 규모의 경제가 발생된다.

Figure 3-8-4는 생명공학산업이 유발하는 경제적 효과를 보여주고 있으며, 경제적 효과에는 직접 효과, 간접효과, 유발효과로 나눌 수 있다. 미국의 경우 1999년 직접 경제효과로 200억불의 수익 및 15만명의 고용창출이 발생되었으며, 경제적 파급효과(간접 및 유발효과)로는 250억불의 수익과 28만명의 고용창출이 발생되었다. 각국이 생명공학을 육성하려는 이유 중의 하나는 생명공학산업의 경제적 효과가 타산업에 비하여 높기 때문이라고 해석할 수 있다.



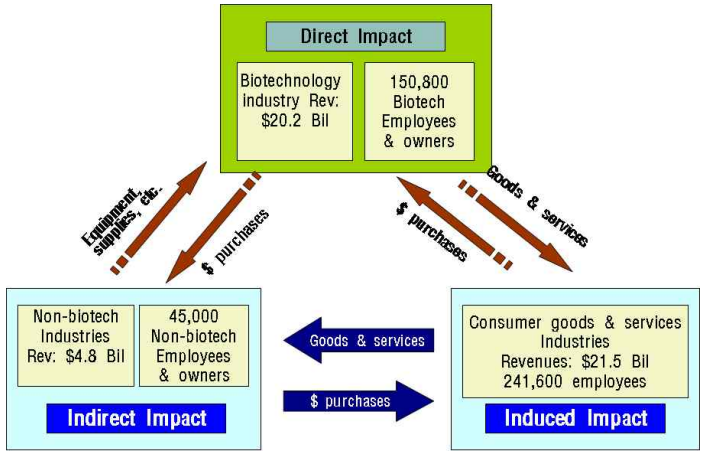



Figure 3-8-4. Economic Impacts of biotechnology industry in the United States (1999).

국내 해양생명공학의 경우 유용물질의 채취를 남극, 북극, 및 남태평양에서 하는 경우가 많아 생물다양성협약을 유의할 필요가 있다. 1992년 브라질의 리우데자네이루에서 세계지도자들은 건강하고 살아 있는 지구를 후손들에게 물려줄 수 있도록 하기 위한 유엔환경개발회의를 개최한 바 있는데, 여기에서 지속가능한 개발을 위한 포괄적인 계획에 합의하였다. 리우에서 채택된 협약 중의 하나가 생물다양성협약(Convention on Biological Diversity)이다.

### 라. 생물다양성협약과 유전자원으로부터의 이익 공유

생물다양성협약의 3대 목표는 1) 생물다양성의 보존, 2) 다양한 생물다양성 자원의 지속적인 이용, 3) 유전자원의 상업적 이용이나 그 밖의 활용으로 창출된 이익을 공평하고 균등하게 분배하는 것이다. 특히 3)의 경우 자국의 천연자원에 대한 주권적 권리의 하나로서 모든 유전자원을 명시하고 있으며, 상호 합의된 조건과 원산국의 사전통고 승인을 받는 경우에 한해서만 유전자원의 이용이 가능하도록 제시하고 있다. 미생물과 식물 그리고 동물종도 역시 상업적으로 사용될 경우에 마찬가지로 원산국이 그 이익을 공유할 권리가 있다. 현금분만 아니라 생명공학 장비나 노하우 등을 이전 또는 전문인력 양성 등의 형태로 이익을 받아야 한다.

실제 사례를 살펴 보면 몇몇 국가는 자국의 유전자원에 접근하는 것에 대한 규제를 이미 마련하고 있다.

- 필리핀의 경우 1995년 생물발굴자들에게 지역주민과 정부측에 사전통고하고 승인을 바을 것을 요구했다.
- 코스타리카 국립생물다양성연구소는 대형 제약업체와 협정을 맺어 자국의 자연자원을 상업화하여 얻은 혜택을 나누어 기금의 형태로 이익을 분배받고 있다.
- 안데스 지역의 나라(콜럼비아, 에콰도르, 페루, 볼리비아, 베네수엘라)들은 자국의 유전자원으로서의 접근을 규제하는 법령과 조치를 취하고 있다. 또한 가지고 있는 모든 정보를 공유해야 하고 국가의 지정된 주무관청에 연구결과를 보고해야 하며, 이로 인해 생기는 모든 이익을 공유해야 한다.

생물다양성협약의 하나인 “유전자원으로부터의 이익 공유”를 실행하고 있는 몇몇 국가의 실례는 국내 해양생명공학을 연구하는 연구자들이 지속적으로 관찰해야 될 중요한 사안이라고 할 수 있다.

## 2. 국가별 생명공학 정책 분석

### 가. 미국

(1) 연구현황 및 여건



미국은 현재 생명공학의 선두주자로서 의약, 농업, 식품 등 전 분야에 걸쳐 세계적으로 가장 잘 발달되어 있다. 특히 보건의료 분야의 발전이 두드러지게 나타나고 있으며, 정부 및 지방정부의 강력한 지원과 인력, 자본, 제도 등의 연구 여건이 잘 조성되어있다.

(가) 자본시장

미국 생명공학의 가장 큰 활력소는 잘 발달된 자본시장과 풍부한 모험 자본 pool이다. 한 제품의 상업화를 위해서 많은 시간이 소요되는 생명공학 특성으로 인해, 생명공학 연구에는 상당 기간 동안의 투자가 소요됨에도 불구하고 연구를 유지시켜 줄 수 있는 막대하고 지속적인 자본 투자가 필수적이다. 미국의 자본 시장은 이러한 생명공학 연구자들에게 가장 우호적인 환경을 제공하고 있다고 볼 수 있다

미국은 세계적으로 모험 자본 시장이 가장 잘 발달한 나라로, 신기술 창업 기업들이 자금을 모을 수 있는 매우 다양하고 풍부한 원천이 존재한다. 벤처캐피탈과 비즈니스 엔젤에 의한 모험 자본 투자가 활발하고, 기업공개(IPO: Initial Public Offering), 증자, M&A 등을 통해서도 기업들은 막대한 자금을 이자 부담 없이 끌어 모을 수 있다. NASDAQ과 같은 주식시장과 M&A 시장의 발달은 투자자들의 자금회수경로를 다양하게 보장해줌으로써 생명공학 기업과 같이 위험 부담이 큰 기업들에 대한 투자를 촉진시켜주고 있다

(나) 규제제도

미국은 식품, 농업, 환경 분야에서 연구개발 활동에 대한 불확실성을 증가시켰고, 결과적으로 해당 분야의 발전을 지체시키는 결과를 낳았다. 미국 연방정부가 생명공학 관련 규제 제도를 강화한 것은 생명공학 연구 결과가 제품으로 산출되기 시작한 1980년대로서, 규제의 주체와 기준에 있어 불확실성이 증가하였고, 이는 농업, 식품, 환경 분야에서의 생명공학 기술개발과 상업화를 지체시키는 결과로 이어졌다. 제품에 따라 중복 규제가 이루어지기도 했으며, 부처간 기준의 불일치로 기업들을 혼란스럽게 했다. 이러한 분위기는 결국 농업과 식품 분야에 대한 투자자들의 투자를 저하시켰고, 기업들에게는 연구개발과 상업화를 수년씩 지연시키는 결과를 가져왔다.

(다) 산학연계 및 인력육성

미국에서의 활발한 산학 연계는 실질적인 생명공학의 중요한 역할을 한다. 미국 생명공학 기업들의 혁신은 대부분 대학과의 연계에 그 뿌리를 두고 있다. 생명공학산업은 대표적인 과학기반 산업으로 과학지식 기반을 상업화로 연계해주는 것이 매우 중요한데, 미국

의 대학은 그러한 고리 역할을 성공적으로 수행하고 있다.

미국의 생명공학 기업과 대학은 다양한 방식의 인적 교류를 통해 긴밀한 유대를 형성하고 있다. 교수창업, 기업에서 대학의 유명 과학자들 자사의 기술자문위원으로 위촉, 기업의 박사 후 연구과정(post-Doc.) 지원 등의 방법으로 유능한 연구자원을 활용하고, 젊은 과학자들이 대학을 떠나지 않고서도 산업계를 경험할 수 있게 하고 있다.

이러한 인력 교류가 가능한 것은 미국의 유연한 노동시장 환경 때문이다. 대학 연구자의 입장에서 산업계 진출은 그의 학문적, 직업적 경력 경로에 전혀 위험 요소가 되지 않는다.

(라) 지적재산권 제도

미국의 강력한 지적재산권 보호 정책은 생명체에 대한 광범위한 특허권 인정 방침과 어우러져 미국 생명공학의 발전에 중요한 제도적 기반을 제공하고 있다.



Table 3-8-5. R&D budget of federal government in the United States(2000～2002).

| 분야 | 2000 | 2001 | 2002 |
|---|---|---|---|
| Life sciences | 17,964,701 | 21,118,070 | 22,204,285 |
| Biological(excluding environmental) | 10,740,022 | NA | NA |
| Environmental biology | 740,025 | NA | NA |
| Agricultural | 894,956 | NA | NA |
| Medical | 4,463,771 | NA | NA |
| 그 외 생명공학 | 1,125,927 | NA | NA |
| Psychology | 1,626,660 | 1,870,795 | 2,075,313 |
| Biological aspects | 7,807 | NA | NA |
| Social aspects | 56,401 | NA | NA |
| 그 외 심리학 | 1,562,452 | NA | NA |
| Physical sciences | 4,787,950 | 5,162,941 | 5,144,764 |
| Environmental sciences | 3,328,771 | 3,660,562 | 3,644,175 |
| Mathematics & computer sciences | 2,205,594 | 2,458,276 | 2,617,871 |
| Engineering | 6,346,381 | 7,090,594 | 7,031,485 |
| Social sciences | 1,050,312 | 1,216,180 | 1,271,044 |
| 그 외 과학 | 1,160,181 | 1,258,562 | 1,337,971 |
| 총 계 | 38,470,550 | 43,835,980 | 45,326,908 |

자료 : NSF(2002)

(2) 국가정책

(가) 국가계획

미국은 1992년 대통령산하국가경쟁력강화위원회에서 생명공학분야를 경쟁력 강화분야 중의 하나로 선정하였으며, 구체적인 정책으로 Biotechnology for the 21st Century를 수립하여 범부처적인 지원을 하고 있다.

이 정책은 생명공학분야를 세계적인 우수 경쟁력을 가질 수 있는 산업으로 육성하기 위하여 생명공학연구육성계획(Biotechnology Research Initiative)을 수립하고, 연방과학기술조정자문위원회(Federal Coordinating Council for Science, Engineering and Technology)에서 이 계획을 작성하여 대통령에게 보고하도록 하고 있다.

이 정책의 기본목표는 21세기를 대비하여 생명공학산업분야를 세계적으로 우위에 올려놓고, 생명공학기술을 이용한 국민의 삶의 질 향상뿐만 아니라 국가의 경제성장을 촉진하고자 하는데 있다. 추진전략으로는 생명공학의 지속적 발전을 위한 과학기술기반 및 인적자원기반의 확대추진, 생명공학 연구결과의 상업적 이용활성화, 생명공학기술을 이용한 국민의 보건의료 및 복지, 환경보호 및 자원재생을 실현하는 것이다. 생명공학연구 육성계획은 Figure 3-8-5에서와 같이 생명공학연구분야, 사회적 영향분석, 기술개발기반 구축의 3개 그룹 으로 나누어지고 있다. 연구분야는 생산 등의 응용가능한 분야로 농업, 에너지, 환경, 보건, 생산/공정, 기초기술의 6개 주요 분야가 있으며, 기술개발의 기반구축에는 연구시설, 연구기기 및 장비, 데이터베이스, 유전자은행, 기술훈련센 터의 5개 분야로 구성되어 있다. 미국정부는 해양생명공학을 21세기의 4대 생명공학과제로 선정하여 연구개발과 산업화를 위한 지원을 하고 있으며, 이는 해양대기청(NOAA), 국가과학재단(NSF)이 중심이 되어 해양생명공학 연구개발프로그램을 지원 및 진행하고 있다.



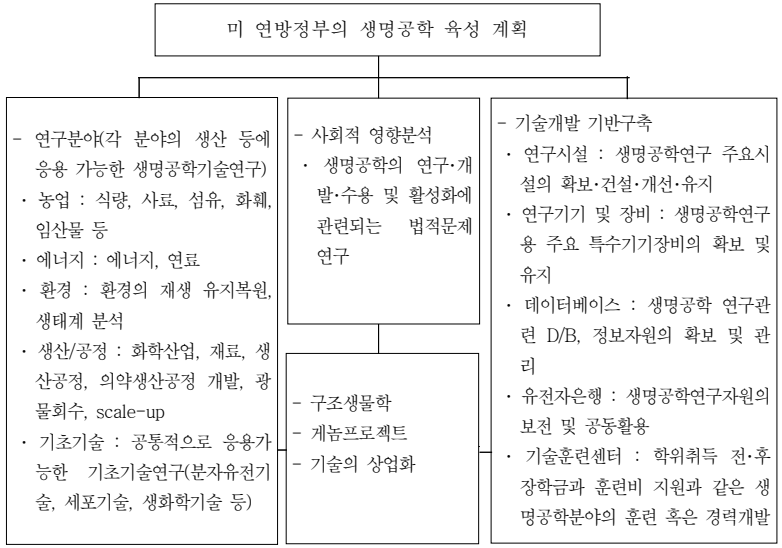



Figure 3-8-5. The supporting plan for biotechnology in the United States.
자료 : 이홍동(2002)

(나) 민간 R&D 지원

미국에서 민간 R&D 직접지원정책은 크게 세 가지 방향으로 이루어지고 있다. 이는 세계시장에서 자국산업의 기술 리더쉽을 지속적으로 보유할 것을 목적으로 주로 경쟁 전 연구단계를 지원하는 시장지향형 전략적 R&D 프로그램(Market Oriented Strategic R&D Program), 산업이나 기술분야에 관계없이 주로 중소기업들의 상업적 연구를 지원하는 중소기업 혁신견인형 R&D 프로그램(R&D Program for Small Business), 기존의 공공기관 중심의 임무지향적 R&D 프로그램에 상업적 응용이라는 새로운 목적을 추가하거나 공공부문과 민간부문의 연계를 목적으로 하는 R&D 프로그램이 이러한 형태이다.

(3) 주정부의 정책

(가) 바이오클러스터 육성

미국에서 생명공학 기업이 가장 밀집해 있는 곳은 이른바 샌프란시스코만으로 불리는 캘리포니아 인근 지역으로 미국내 제약 생명공학 기업의 25%가 밀집해 있다. 보스턴지역은 미국에서 두 번째로 생명공학 기업이 많은 지역으로서 미국 생명공학 기업의 약 10%가 보스턴지역에 위치해 있다. 두 지역은 반도체, 컴퓨터와 같은 첨단산업의 붐으로 실리콘밸리에서 형성된 벤처캐피탈이 잘 갖추어져 있었고, 성숙기에 접어든 많은 하이테크 기업들이 있었다. 또한 활발한 교류와 강력한 인적 네트워크가 존재하였으며, 지역내 최고의 대학과 정부연구 기관 역시 이 지역에 위치하고 있었다. 이러한 배경으로 바이오클러스터의 성공적인 사례로 남고 있으며, 두 지역의 바이오클러스터 주요 육성정책은 다음과 같다.

○ 샌프란시스코만의 바이오클러스터 육성정책
- 반도체, 컴퓨터 등 첨단산업의 실리콘밸리에서 형성된 벤처자금 활성화
- 우수연구기관(Stanford, UCSF, Caltech 등)과의 연계
- Bayh Dole법 : 연구성과를 상업화할 경우 인센티브 및 창업 지원

○ 보스턴지역의 바이오클러스터 육성정책
- 환경, 의료, 에너지 분야의 연구성과 및 자금 투자 연구인력 및 기반 확충
- 유수연구기관(MIT, 하버드, 보스턴대학 등)과의 연계
- 생명공학 연구관리 기구 조성

MBC(Massachusetts Biotechnology Council)
: 교육 및 연구 진흥정책 수행(산,학,연으로 구성)

MassMedic(Massachusetts Medical Device Industry Council)
: 제조업체와 연구기관과의 협력을 지원

이에 반해 애틀란타 지역은 의과대학으로 유명한 에모리대학, 질병통제센터 등 바이오메티칼 연구기반이 형성되었을 뿐만 아니라 민간기업들도 많았음에도 불구하고 벤처자금의 부재, 첨단기술을 가진 신생기업의 부재, 코카콜라와 같은 대기업의 전통을 답습하는 지역문화의 한계 등에 의해 바이오클러스터 구성에 실패사례를 보여준다.



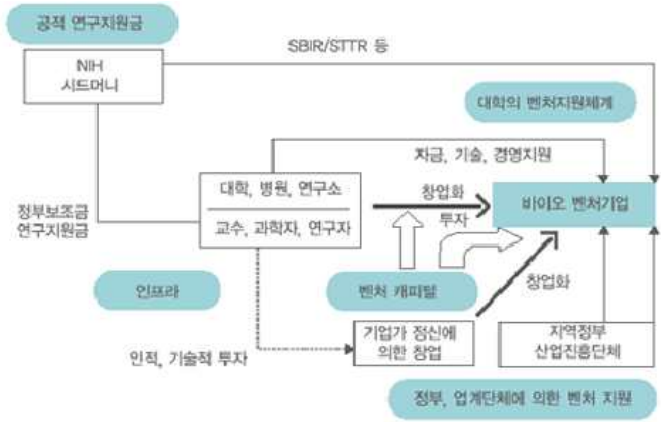



Figure 3-8-6. Framework for bio-venture cluster in Boston area.

(나) 기금조성

미국의 16주에서는 담배회사 부담금의 일부를 생명공학 관련된 분야에 사용할 수 있게 하는 법안이 통과되어 시행중이며, 미주리주에서는 이미 2002년도에 2천2백만달러를 바이오과학 관련 연구에 사용할 수 있도록 승인된 바 있다. 생명공학 연구를 위한 주정부의 담배회사 부담금 사용 정책에는 대학 이외에 연방정부 연구기관 및 비영리 연구기관이 참여하고 있다.

Table 3-8-6. Policies for biotechnology by states.

| 연구지원 내용 | 시행중인 주 |
|---|---|
| 담배판매기금 바이오육성 관련 연구비 사용 | 16 |
| 생명공학 기업의 종자돈 및 벤처자본의 확보가 용이하도록 지원 | 6 |
| 생명공학 기업이 관련시설을 이용할 때 세제혜택을 부여 | 9 |
| 생명공학 기업의 네트워킹을 지원 | 35 |
| 생명공학 산업에 대한 개인 투자가 용이하도록 각종 세제감면 조치를 시행하고 있고, 연구단지 및 창업보육시설을 육성 | 일부 |

(다) 주정부간의 네트워킹

대부분의 주에는 현재 바이오산업협회와 같은 조직이 있어서 바이오산업의 성장에 따른 교육, 법적인 문제해결, 정보교환이나 홍보를 담당하고 있다. 서로 유기적인 네트워크를 구성하고 있으며, 대부분 조직된 지 1년 이상 경과한 상태로서 현재 조직 확장이나 담당 권역 확대를 위한 활동을 하고 있다.

(4) 시사점

○ 생명공학 연구결과의 불확실성에도 불구하고 미국에서는 많은 벤처자금과 비즈니스 엔젤에 의한 모험 자본 투자가 활발한 것이 연구의 확대를 가져오고 인력양상의 원동력이 되어 생명공학연구를 크게 활성화 시키고 있다.
○ 미국이 생명공학을 주도하는 원인은 정부와 주정부의 적극적 연구개발지원에서 비롯된다고 볼 수 있다. 연구개발자금에 대한 감세정책과 적극적 바이오클러스터 육성정책 등은 미국의 생명공학의 중요한 역할을 하고 있으며, 애틀란타의 실패사례에서와 같이 바이오클러스트의 조성을 위해서는 단순한 기반조성으로만 가능한 것이 아니라 자금, 연구기반, 하이테크 기술, 선진연구문화 등이 필요하다.
○ 담배회사에서 제공된 기금을 생명공학 관련 연구개발에 활용하고 있어 우리나라에서도 이의 긍정적 검토가 필요하겠다. 현재 우리나라에서는 담배소비세 28.3%, 교육세 14.2%, 환경세 0.2%, 건강부담금 0.1%, 부가가치세 9.1% 등이 세금으로 부과되고 있다.

## 나. 일본

(1) 연구현황 및 여건

(가) 정부지원

일본의 국가 전체 과학기술 관련 연구비 규모는 2005년도에 약 3조 5,785억엔으로 전년대비 0.8%의 소폭 증가에 그치고 있다(표 1). 그러나 생명과학분야(BT)는 과학기술 관련 전체 연구비 중에서 차지하는 비중이 2001년도의 20.3% (4,060억엔)에서 2005년도에는 22.7%(4,502억엔)로 계속 확대되고 있다.
2004년도 예산을 기준으로 생명과학 분야 정부 연구개발 총지원액은 4,362억엔이었는데



문부과학성, 후생노동성, 농림수산성, 경제산업성의 4개부처가 전체 예산의 99.5%를 차지하였다.

Table 3-8-7. Research fund for scientific researches in Japan

(단위 : 억엔)

| | 2002년 예산 | 2003년 예산 | 2004년 예산 | 2005년 예산 |
|---|---|---|---|---|
| 일본정부의 과학기술 연구비 | 35,444 (전년 대비 2.2% △) | 35,974 (전년 대비 1.5% △) | 36,084 (전년 대비 0.3% △) | 35,785 (전년 대비 0.8% ▽) |

자료 : 김민화 외 (2005)

Table 3-8-8. Budget of main 6 agencies in Japan(2005).

(단위: 100만엔)

| 구 분 | 04년도 예산 | 05년도 요구 | 증감 | 증감율 |
|---|---|---|---|---|
| 경제산업성 | 26,338 | 30,690 | 4,352 | 17% 증가 |
| 농림수산성 | 19,637 | 34,025 | 14,388 | 73% 증가 |
| 후생노동성 | 124,045 | 144,722 | 20,677 | 17% 증가 |
| 문부과학성 | 76,408 | 107,782 | 31,374 | 41% 증가 |
| 환경성 | 5,982 | 8,069 | 2,087 | 35% 증가 |
| 경찰청 | 276 | 765 | 489 | 177% 증가 |
| 계 | 252,686 | 326,053 | 73,367 | 29% 증가 |

자료 : 일경BP사, 2005 바이오 연감

(나) 규제사항

여러 규제가 급속하게 성장하는 생명공학 연구 활성화에 저해되기 때문에 한편으로 규제를 완화하지만 다른 한편으로 외국의 사례를 비추어 적절한 지침을 마련하고 있다. 그 예로 지적 재산권보호를 위해 2003년 일본 국무회의 산하에 「지적 재산권 정책 본부」를 두고 체계적인 특허처리와 재산권 보호에 관한 세계 표준을 도입하고 있고, 유전자 변형 표기 의무화, 복제 배아의 이식이나 배아의 다른사람이나 동물의 자궁으로 이식 금지 등을 시행하고 있다.

(다) 바이오클러스터 육성

8개 지역에 바이오클러스터를 구축하여 생명공학 연구와 산업화를 도모하고 있다. 동경이 포함된 Kanto 지역에는 「Genomic Bay」를 비롯한 여러 바이오 벤처들이 활동하고 있다. 그리고 Kansai와 Osaka 지역에는 「Spriong-8」을 비롯하여 여러 연구소와 보육센터들이 활발한 연구를 진행하고 있다. 그리고 일본 전역을 연결하는 「생물정보 익스프레스」를 구축하여 대량의 유전자와 단백질을 동시에 분석할 수 있도록 하였다.

(라) 벤처지원

일본의 거품경제가 가라앉으면서 창업하는 생명공학 회사에 대한 재정지원을 늘리고, 동경 주식 거래소에서 「Mothers[3]」를 개설하여 벤처들이 자금지원을 받을 수 있도록 하였다. 하지만 벤처 금융 전문가와 주식 시장에 상장된 벤처 수가 절대 부족한 일본은 여러 벤처 자금 회사를 설립할 뿐 아니라 대학의 실험실 창업을 적극 지원하고 있다.

(2) 국가정책

일본정부는 21세기 과학발전과 국제적 우위성을 확보하기 위하여 1993년 6월의 생명공학종합육성정책수립이 있었으며, 자원부족과 인구의 급속한 노령화에 대응하기 위한 1995년 과학기술기본법을 제정하였다. 1997년 생명과학에 관한 연구개발 기본계획, 1998년 게놈과학에 관한 연구개발 기본계획이 마련되었으며, 1999년 1월에는 생명공학 산업의 창조를 위한 기본방침이 마련되어 게놈을 중심으로 BT분야를 '유용유전자를 이용한 응용분야와 산업을 창출해 내는 중요한 분야'로 나누어 강조하였다. 1999년 7월 BT를 이용하여 식량, 의료, 에너지, 환경 등의 문제를 극복하고 세계를 선도하는 BT국가를 목표로 하는 기본전략이 발표되었으며, 이러한 전략이 2000년 밀레니엄프로젝트로 집중되었다. 이는 인간게놈해석에서는 미국에 뒤졌지만, 유전자와 단백질 기능을 밝히는 포스트게놈시대는 앞서겠다는 계획으로서, 전체예산 1,206억엔 중 절반이 넘는 640억엔을 게놈 연구에 배정하였다. 2002년 일본정부는 「BT전략회의」및 「BT전략대강」을 통하여 의약품, 의료기기, 농업, 기능성식품, 미생물 등의 생명공학 분야 연구개발을 활성화하여 그 성과를 산업으로 활용시키고 21세기 주요산업으로 육성하자는 국가전략을 세웠다.

3) 1999년 개장한 일본의 벤처기업 대상 증권거래소(market of the high-growing and emerging stocks)



김주혁. 2004. 일본의 생명공학 산업 정책현황. 한국보건산업진흥원.
「BT전략대강」의 내용을 요약하면 다음과 같다.

(가) 연구개발의 충실・강화

○ 다양한 BT 인재의 육성 등을 통한 인재공급의 증대와 질적 향상을 목표로 한 대학 등에서의 체제촉진과 지원
○ 의료・의약품, 미생물・생명공학 프로세스, 기능성 식품・농업바이오분야에의 집중적 투자
○ BT와 IT, NT등 異분야와의 연대추진
○ 바이오툴・바이오인포메틱스에의 중점 투자
○ 연구개발의 기반이 되는 생물유전자원을 자원 소유국과 함께 협조하면서 전략적으로 정비
○ 테일러메이드의료의 실현을 향한 대규모 환자샘플을 수집하고 SNPS와 약제반응성과의 관계 해명 등의 추진
○ 재생의료 등의 실현을 위하여 장기재생등의 연구, 간세포뱅크, 면역거부반응 메카니즘의 해명과 거부반응을 없애는 방법개발 등 추진
○ BT를 활용한 획기적 신약 등의 개발을 목표로 한 단백질 구조・기능해석, 유전자발현해석등의 포스트게놈연구의 추진
○ 벼 게놈의 성과를 기초로 획기적인 신품종개발, 불량환경에서도 강한 벼의 생산 등에 활용할 수 있는 유용유전자의 기능해명연구
○ BT를 활용한 폐기물의 처리기술, 토양과 수질정화 등 환경수복기술과 유해물질의 평가기술등의 개발추진
○ 바이오프로세스를 활용한 획기적인 신제품의 생산기술과 에너지 절약형 환경부하가 적은 생산시스템을 확립하기 위한 연구개발의 추진

(나) 산업화 프로세스(process)의 근본적 강화

○ 창업지원 세제의 개선 검토 등을 통하여 벤처기업의 활성화
○ BT산업을 집적한 거점을 정비하고 지역으로부터 BT산업의 경쟁력을 강화
○ 약가・의료기기에 관한 산정제도를 적절히 운용하고 신약등의 개발에 대한 인센티브 향상
○ 첨단의료연구의 성과가 의료현장에 조기에 확대 활용되도록 임상연구 실시체제의 정

비

○ 식물신품종의 권리침해대책을 위하여 법정비와 품종식별기술향상 등에 의해 농약·종묘산업의 활성화

○ 보다 알기 쉬운 식품표시에의 개선과 건강기능식품의 보급개발을 추진

○ 바이오매스의 유효활용, 원활한 도입을 위한 조치의 실시

○ 생분해성 플라스틱 등 BT관련제품 보급을 위하여 환경정비 실시

(다) 국민이해의 철저한 실시

○ 각 府·省연대와 더불어 국민과의 커뮤니케이션의 충실강화

○ 유전자 변환작물에 관한 국민이해행동계획을 수립

○ 안전·윤리에 관한 체제에 만전을 기하고 그 체제를 국민에 적극적으로 공개·제공

○ 학교교육, 사회교육등에 의해 국민이 적절히 판단하고 선택할 수 있는 환경을 정비

○ 심사기간의 단축화, 심사프로세스의 투명화등 의약품·의료기기에 관한 안전확보의 강화 등

(3) 시사점

○ 일본은 미국의 벤치마킹을 통하여 생명공학의 경쟁력을 끌어 올리려 하고 있으며, 그러한 노력으로 미국의 연구기관 및 회사들과 전략적 제휴를 적극 시도하고 있다.

○ 연구개발사업 관리체제 개선방안으로 연구성과를 평가하고, 그 결과를 공개하도록 하였다. 연구보고서를 DB화하고 홈페이지에 공개하며, 중점 과제를 명시하도록 개선하였다. 이러한 연구 평가 및 그 결과의 공개는 투자자들에게 좋은 정보를 제공하게 되고, 자금 확보에 긍정적인 요인이 될 것이다.

○ 일본 역시 미국과 같이 바이오클러스트를 집중 육성하고 있으며, 8개 지역에서 대학, 연구기관, 산업계, 벤처자금의 원할한 협력체계를 구축하며 규모의 확대를 시도하고 있다.

○ 「BT전략대강」을 통해 밝힌 국가 생명공학 육성정책에서는 연구개발에 집중하도록 여건을 마련하고 산업화를 추구하도록 하고 있으며, 생명공학의 안전과 윤리 문제 해결을 위해 국민에게 연구결과를 공개하고 공감대 형성을 유도하도록 하고 있다.



## 다. 영국

(1) 연구현황 및 여건

영국은 많은 생명공학 연구그룹과 우수 연구기관의 본거지로서 창업시설 지원, 산학연계가 발전되어 생명과학의 선도자로 인식되고 있다.

(가) 과학기반

대부분 영국의 생명공학 전문지식이 제약 및 의료와 관계가 있지만 농업생명공학과 산업생명공학 분야에도 강점이 있다. 산업생명공학 분야의 주요 연구개발 그룹 및 센터로는 캠브리지 대학의 Institute of Biotechnology, Bath 대학의 Centre for Extremorphile Research, Cranfield 대학 Biotechnology Centre, Exeter 대학 Henry Wellcome Centre for Biocatalysis, York 대학의 Centre for Novel Agricultural Products 등이 있다.

연구협의회는 서로 다른 분야 및 기관의 사람들을 함께 모으고 새로운 과학기술 분야를 탐구하기 위해 학제간 연구협력(IRC) 사업을 지원하고 있다.

(나) 활발한 기업부문

영국은 생명공학분야 기업 수가 유럽에서 가장 많으며, 유럽 생명과학기업의 1/4이상 보유(미국에 이어 세계 2위)하고 있다. 이들 기업들은 의료분야가 큰 비중을 차지하고 있으며 서비스 및 바이오진단분야도 일정부분을 차지하고 있다. 그러나, 산업생명공학분야의 많은 활동은 Oxford Chemicals, Syngenta, Tate & Lyle, Unilever 등에서 집중되어 나타난다.

Table 3-8-9. Number of employees and R&D investment by sector of biotechnology in the United Kingdom

| 분야 | 고용인력(유럽전체의 비중) | R&D 투자(백만유로) |
|---|---|---|
| agbio | 1,900(35%) | 99 |
| biodiagnostics | 2,450(23%) | 120 |
| environment | 770(31%) | 23 |
| human healthcare | 13,600(28%) | 2,250 |
| service provider | 6,400(39%) | 252 |
| technology service provider | 730(17%) | 54 |
| 계 | 25,850 | 2,798 |

자료 : Industrial Biotechnology Task Force(2004)

산업생명공학분야 중 영국은 지난 수년간 표면처리, biocleaning, 바이오센서 등 분야에서 발전했다. 특히 biocleaning 분야는 영국이 유럽 전체매출액의 69%, 고용인력의 60%를 차지하고 있다. 영국은 100여개 이상의 산업생명공학관련 소기업이 있으며, 식품, 화학, 의료, 농업, 엔지니어링, 건설부분을 지원하고 있다.

(다) 정부의 지원

National Non-Food Crops Centre in York, The National Centre of Excellence in Biocatalysis, Biotransformations and Biocatalytic Manufacture 등 국가기관을 통한 투자가 활발하다. 또한 Faraday Partnership/Knowledge Transfer Networks와 같은 과학계와 기업을 연계한 지식이전 네트워크가 잘 구성되어 있으며, 생명공학 확대 사업으로서 1999-2004년 동안 생명공학 기술이전, 시장개혁 등에 14.5백만 파운드를 정부에서 지원했다.

(2) 국가정책

영국에서는 정부의 관계 전문가로 구성된 Bioscience Innovation and Growth Team이 2003년도에 작성한「Bioscience 2015」를 통해 영국 생명과학 발전계획을 수립하였으며, 그 내용은 다음과 같다.

(가) NHS(영국국립보건원)와 산업간 호혜적 협력

○ NCTA (National Clinical Trials Agency) 창설
  - 전문적이고 효율적인 임상 실험 인프라 개발
  - 임상 연구 프로그램과 프로젝트에 투자
○ NHS 내 인센티브제와 경력 체계 마련
○ NHS 내 R&D 펀드를 총비용의 0.9% 수준에서 1.5% 수준으로 증대

(나) 기술혁신을 지원하는 공공 및 규제환경 조성

○ 혁신적 의약품 개발, 승인, 사용에 대한 지원 규정 마련
  - EU 임상시험 지침을 임상연구에서 세계적 리더가 되려고 목표에 맞춰 효과적인 방법으로 시행
  - 영국과 EU에 의약품 잠정승인제도 도입, 3차 임상시험 완료전에 새로운 치료법을 공공보건 수요가 있는 환자에게 시행
  - EU와 영국의 의약승인규제기관과 생명과학 산업간 협력관계를 구축
○ 제약 연구에 있어서 책임있고 규제적인 동물 이용
  - 합법적 제약 연구에 반하는 극단주의자를 대처할 수 있는 새롭고 전문적 법안 도입
  - Coalition for Medical Progress 활동 지원
○ 바이오사이언스 규정에 대한 진보적 접근

(다) 자금 지원

○ 신생 바이오사이언스 기업의 유동성 향상을 위한 지원 조치
  - 영국 상장 생명과학기업들이 3년기간 중 비선매 조건으로 회사주식의 20%까지 발행할 수 있도록 선매지침(Pre-emption Guidelines)을 개정
  - 투자회사가 회사자본 참여에 따라 해당회사로부터 받은 조세손실자산(tax loss asset)을 이용할 수 있도록 현행 기업벤처제도(Corporate Venturing Scheme)의 범위 확대
○ 아이디어와 상업화 자본간의 연계 투자
  - 기술이전 사무소 강화
    · 주요 기술이전사무소의 기술, 시설 확충을 위해 20백만파운드 지원
    · 기존의 소규모 사무소 통합
    · 벤처기업 창업 숫자보다는 창조한 가치를 중시하는 새로운 성과 평가 도입
  - 고등교육혁신기금(HEIF)과 공공부문 연구결과 이용기금(PSRE)을 통한 적절한 투자 확보
○ 영국 바이오사이언스 기업의 EU 펀드 접근성 향상

(라) 바이오프로세스 기반 마련

○ 영국내 4개 바이오프로세스 센터 네트워크 구축
  - HEIs 센터(Centres of Excellence) 설립
  - 바이오프로세스 연구 주제 집중
  - 훈련 프로그램 개발
○ 바이오프로세스 자산에 대한 내부 투자 유인
○ 바이오프로세스 커뮤니티 개발 지원

(마) 고급과학기술 및 경영인력 개발

○ 새로운 다재다능한 인재 육성 프로그램

- Bachelor of Medicine Mb-PhD를 위한 펀드 프로그램 마련
- 박사급 과학자 및 엔지니어들을 지원하는 펀드 프로그램 마련

○ 기존 학제적 교육을 심화시키는 기회 확대 및 지원

- 젊은층에게 생명공학에 대한 관심 유발
- 대학원 과정에서 학제적 훈련 프로그램 확대

○ 기존 인재에 대한 지원책 향상

(바) 생명과학지도자위원회 설치

○ 생명과학지도자위원회(Bioscience Leadership Council) 설치

- 기업대표 6명, NHS 및 대학 등 이해관계자 6명으로 구성
- 정부와 산업계 협조 촉진
- BIGT 제안 방안의 이행 촉구
- 이슈 관리 토론을 위한 포럼 마련
- 성공 가능성 향상

(3) 시사점

○ Faraday Partnership/Knowledge Transfer Networks와 같이 영국은 주요 연구기관을 중심으로 여러 생명공학 관련기업들과의 네트워크 구성이 잘 되어 있고, 연구협의회에에서 학제간 연구협력 사업을 지원하고 있다.

○ 「Bioscience 2015」에서 밝힌 생명공학 국가정책에서는 생명공학의 주무 부처인 NHS에서 각종 인센티브제도 및 R&D펀드 조성 등 혁신적인 체계를 조성, 정부의 생명공학 연구관련 법제도 또한 정비. 인재 육성 및 우수인력 지원하는 펀드 프로그램 등을 마련, 지속적인 연구의 이행여부를 감독하는 기구인 생명과학지도자위원회(BLC) 창설 등이 인상적이다.

**라. 독일**



(1) 연구현황 및 여건

독일은 과학기술기반과 연구기관 인프라가 잘 구축되어 있으나, 생명공학연구 발전에 있어서 미국과 영국에 비해서 상당히 늦은 편이며, 자본 투자 문제 및 유전공학 연구에 비호의적인 정부정책 등으로 독일 유수 제약회사 및 농화학 기업(Bayer, BASF, Hoechst, Schering)의 생명공학 연구플랫폼을 미국으로 전부 이전하거나 일부 기관이 이동하는 사례가 있었다. 이에 독일 연방 정부는 이 같은 문제점을 타계하고자 정책적으로 생명공학 산업 발전을 모색하고 생명공학 육성정책에 적극 힘쓰고 있다.

(가) 정부지원

독일 연방교육과학부는 2002년 생명공학라운드를 선언하고, 100백만유로(약 1350억원)규모의 재원으로 생명공학 중소기업을 지원하여 새로운 일자리 창출과 경제성장을 위한 생명공학 전망을 개선하는 방안을 모색하고 있다. 또한 생명공학분야의 후학그룹 경쟁력 배양과 기초혁신 능력제고를 위한 BioFuture 상을 수여하고 있다. BioFuture는 경쟁을 통해 선정된 독일 및 해외의 후학그룹 또는 프로젝트 책임자에게 5년 동안 기업을 창업하거나 연구자질을 확보하도록 지원하는 사업으로 확대하고 있다.

(나) 생명공학 네트워크 구축

독일은 생명공학전문네트워크 구축과 후학그룹 육성을 위한 구조적 조치로서 BioChance, BioRegio, BioProfile 사업들이 연방교육과학부에 의해서 추진되고 있다.

BioChance 사업은 신생 생명공학기업설립 등 기술의 상업화를 위한 기반조성일환으로 산업연구 및 경쟁 전 개발계획을 지원하였다. 후속사업인 BioChancePlus는 생명공학공정 및 제품을 개발·이용하는 중소기업 지원에 초점을 맞추고 있다. BioRegio는 생명공학 지식을 생산 및 제품에 활용을 지원하는 사업으로 뮌헨, Rhein-Neckar-Dreiek, 라인란트, 예나 등 4개의 지역이 표본지역으로 선정하고 있고, BioProfile 사업은 국제적인 경쟁력을 갖춘 생명공학 지역육성을 위해 추진 중이다.

(2) 국가정책

(가) 최고 수준의 연구 개발

○ 매년 10억 유로의 연방 예산을 생명과학 연구에 할당.

- 예산의 3분의 2는 독일연방 교육연구부(BMBF)가 지원

○ 국립 게놈 연구 네트워크로 산업 개발 프로그램 완성

- 프로젝트에 투입된 투자금액 중 1억8천유로는 UMTS 인허가 판매금으로

○ 유럽 투자 펀드와 공동으로 5백억 유로의 자금 조성

○ 적자를 내고 있는 분야에 1백만 유로-5백만 유로의 자금 지원책 마련

○ 연구 개발 지원 펀드 구축

○ 연구 개발 준비 기간 동안 지급되는 정부 보조금 정책 수정

○ 벤처 기업 재정 지원은 보류

(나) 산학 연계

○ 기초 연구 개발 분야 육성과 전략적 기술 플랫폼 구축

○ 연구 개발 성과와 상업화 연계 작업(벤처 기업 창립 지원 및 바이오클러스터 구축)

○ 바이오클러스터 개발: Bio Regio, Bio Profile

- Bio Regio: 독일 정부가 생명공학 산업 부흥을 위해 마련한 정책으로 독일 내 17개 주요 지역을 선정해 산업기술혁신체제가 원활히 진행될 수 있도록 산・학・정 협동연구 시스템 운영

(3) 시사점

○ 독일은 생명공학의 산업화 분야에서 미국과 영국에 비해 뒤처져있으나, 기초과학분야에서의 강점을 바탕으로 정부에서 적극적인 생명공학 육성정책을 수립하고 있으며, 무엇보다도 우수 연구에는 BioFuture상을 통해 혁신적인 혜택을 부여하고 있다.

○ 독일의 연방교육과학부에 의해 생명공학 네트워크구축 및 연구육성정책으로서 바이오벤처 육성 프로그램인 BioChance, 생명공학 중소기업 육성프로그램인 BioChancePlus, 바이오클러스터 조성을 통한 생명공학 상업화 지원프로그램인 BioRegio, 국제경쟁력 갖춘 연구분야 집중육성 프로그램인 BioProfile 등을 개발한 것이 특징적이다.

## 마. 중국

(1) 연구현황 및 여건



현재 중국의 생명공학기술의 전체 수준은 개도국 선진수준에 도달하였고, 일부는 세계 선진수준에 도달하였다. 개혁개방 후, 중국에서는 분자유전학, 유전자공정, 세포융합 등 새로운 분야의 기술연구에 종사해왔고, 최근 첨단기술 및 지식 기초산업에 대대적인 투자를 단행하면서, 생명공학분야에 2000년부터 5년간 50억위엔 투자계획을 수립하였다. 현재 정부, 부처, 지방정부가 재정지원하는 생명공학 실험실 200개와 기술 및 제품 연구원 2만명을 보유하고 있으며, 많은 대학에 생명과학 및 생명공학 기술과 관련한 학과가 개설되어 있다. 중국에는 현대 생명공학 기술과 관련한 기업이 약 500개 있으며, 종사자수는 5만 명을 넘어섰고, 아울러 매년 100개의 기업이 증가하고 있다. 베이징, 상하이, 광저우, 선전 등지에는 이미 20개의 생명공학 기술단지가 건설되었다.

그러나 전반적으로 산업규모가 작고, 혁신제품이 부족하며, 과학기술성과 산업화율이 낮다. 특히 중국 생명공학산업의 기초연구수준은 선진국과 5년밖에 차이가 나지 않지만, 산업화수준은 15년 이상 차이가 나타나고 있다. 그러한 원인으로는 중간실험, 생산 확대, 집적화 등의 공업화 수준이 낮고 투자융자 루트가 원활하지 못하며 과학기술 중개기관이 발달하지 못했기 때문으로 보여진다.

최근에는 중국의 잠재력과 방대한 시장성을 바라보고 다국적기업들의 R&D 센터설립이 급증함에 따라 중국의 기술발전과 산업구조 고도화에 큰 변화가 일고 있다.

(2) 국가정책

중국은 3단계 국가과학발전계획(2001～2010) 중에 정보산업·생명공학·신소재분야에 역량을 집중할 것을 공고히 하였으며, 10차 5개년 계획 기간(2001～2005)에 중국 국가 중점 연구개발 프로젝트인 「863 계획」에서 세계 최첨단 기술 발전 추세를 목표로 혁신성을 강화하고 과학기술 발전 전략을 '중점 추적 전략'에서 '도약식 발전 전략'에로 전환하는 것을 목표로 하였다. 또한 「863 계획」 실행을 통해 국가 중・장기 발전 및 국가 안보와 관련된 전략적이고 최첨단적이며 선행적인 과학기술 과제를 중점적으로 해결하고 중국 자체의 지식 재산권을 소유한 첨단기술을 발전시켰을 뿐만 아니라 중국 자체의 첨단 기술 산업을 육성하는 정책을 수립하였다. 이에 따라 정보기술, 생명공학 및 현대 농업기술, 신소재, 선진제조 및 자동화 기술, 에너지 기술, 자원환경 기술 등 6개 첨단기술 분야 19개 세부 과제와 부분적인 중대 전문 과제를 중점으로 수립하였다.

이에 따른 중국의 생명공학육성정책을 살펴보면 다음과 같다.

(가) 바이오클러스트 조성

○ 현재의 국가급 첨단기술산업개발구를 결합하여 가능한한 기술역량이 비교적 심도있고 투자환경이 좋은 생명공학기술 산업기초가 갖추어진 상해, 북경, 광동, 장춘 등을 생명공학기술산업화 기지로 선택하여 우대정책과 세제지원정책을 부여

(나) 생명공학기술상품개발 장려정책 수립

○ 국가과학기술, 공업성 실험, 기술개조계획을 통해 각각 생명공학기술 개발을 적극 장려하고 특히 지적재산권을 보유한 연구개발과 산업화 지원

○ 연구개발에 의해 지적재산권이 있는 생명공학기술 신상품을 연구개발한 유학생 혹은 해외거주 과학자 등의 고급인력확보

○ 연구개발에 공로가 있거나 신상품 개발 성적이 좋은 단위에 대해서 포상

(다) 지적재산권제도정비

○ 유전자 특허신청에 대한 보호조건, 범위, 절차를 명확히 규정해 특허법 수정

○ 생명공학기술, 공업 생산과 상품특허의 심사비준 절차를 간소화

(라) 투자체계에 대한 보험장치마련

○ 투자위험 보장 이행관리 법규 및 정책을 조속히 제정함으로써 투자은행, 신탁투자공사, 보험공사 등 기구에 생명공학 보험투자기금의 설립 장려

○ 해외보험투자기금을 도입해 생명공학에 적극 투자

○ 생명공학기업의 주식발행 조건을 완화하여 생명공학기업이 주식시장의 참여 기회제공

(마) 생물자원관리법규 및 체계 확립

○ 중국의 강점인 생물다양성 및 생물자원을 적극 보호하기 위해 생물자원관리법규와 관리 체계를 확립

○ 생물자원관리를 강화하는 방안과, 유관 동식물, 미생물자원관리법규도 정리·제정하여 적시에 입법하는 동시에 현 기구기초위에서 유관생물자원관리체계 정비

(바) 생명공학 중개조직육성

○ 생명공학 정보, 기술평가, 특허(특히 국제특허대리), 투·융자등 방면에서 국외의 성공경험을 컨설트해주는 중개기구발전을 적극 육성

○ 중국 생물공정개발중심인 생명공학 산업협회를 설립하여 과학연구단위, 대학, 기업, 금융기구 간의 정보통신 및 기술교류사업을 강화한다.

(사) 생명공학 및 산업발전 자문회의설립

○ 국무원에 전문기구로서「생명공학 및 산업발전자문회의」설치

- 구성원은 기업 고급간부, 기술전문가, 유학 및 해외거주 전문가 정부 주관부서관리 등을 포함
- 기능은 중국의 생명공학 및 산업발전을 위한 정책 결정 및 자문 담당
- 국가생명공학발전계획 및 중대항목에 대해 심의 담당

(3) 시사점

○ 중국의 개방화 이후 막대한 해외 자금이 유입되고 있으며, 국가에서는 첨단산업을 육성하고자 노력하고 있어 중국의 풍부한 생물종다양성을 배경으로한 생명공학분야에서 활발한 연구가 수행되고 있으며, 우리나라와는 서해를 마주하고 인접해있는 국가로서 생명공학분야에서도 큰 경쟁상대이다.

○ 생명공학기술 산업기초가 갖추어진 상해, 북경, 광동, 장춘 등에 바이오클러스트를 집중육성하고 있으며, 이곳은 다국적기업의 R&D 연구센터가 집적된 곳으로 이를 적극 활용할 계획을 갖고 있다.

○ 중국의 과학기술 발전전략인 「863 계획」의 생명공학 분야 육성정책에서는 투자위험을 보장할 수 있는 보험장치를 마련하고 있으며, 해외보험투자기금을 도입해 생명공학에 적극 투자할 수 있는 방안을 마련 중이며, 연구기관에 정보제공, 기술평가, 특허대행, 투자・융자 등을 컨설트해주는 생명공학의 중개조직을 육성하는 것이 인상적이다.

## 바. 싱가포르

(1) 연구현황 및 여건

싱가포르는 2000년 경제발전 전략 Industry21의 일환으로 바이오메디컬 이니시어티브(biomedical Initiative)를 발족하여, 정부주도의 바이오산업에 특화된 산업육성 정책을

시행해왔으며, 이를 통해 생산액 기준으로 2002년에 48%라는 고성장을 보이는 등 동아시아 바이오메디컬 허브로서 부상하고 있다.

연구개발 부문 육성을 위해서는 「싱가포르 게노믹스 프로그램(SGP)」이 수립되어 게놈과학에 관련된 대학과 공공 연구기관의 인적·물적자원을 결집하고 있으며, 또한 일본과 480억원의 자금을 공동출자하여 싱가포르에 「아시아 태평양 생명과학연구소(APLSL)」를 설립하여 지역 내 국제적인 혁신 역량을 증대하고 있다. 그 외 화이자, 벡튼디킨스, 쉐링 플아우, 그락소 스미스 크라인, 존스 홉킨스 대학, 벡스타 등의 기업이 싱가포르에 진출하는 등 해외자본의 바이오 기업체가 싱가포르에 집적되고 있다.

(2) 국가육성정책

싱가포르의 바이오산업 육성정책은 1988년 싱가포르 경제개발청(The Economic Development Board ; EDB)이 '국가BT계획'을 수립함으로서 시작되었으며, 2000년에 바이오메디컬 이니시어티브(biomedical Initiative)가 발족되면서부터 본격화되었다. 국가 바이오 육성적챙으로 해외에서 세계적 일류의 바이오 기업과 인재를 유치하여 동남아시아 지역에서의 임상실험이나 신약개발의 거점이 되는 것을 목표로 하고 있으며, 이를 바탕으로 장기적으로 국내에서 인재와 연구능력을 육성할 계획을 갖고 있다. 그 세부 실천방안은 다음과 같다.

○ 「바이오폴리스」 생명과학 복합단지를 건설하여 공공연구기관 및 민간 연구기관을 집적하며, 산학간, 기업간의 공동개발과 협력을 위한 시설과 연구인력 및 그 가족들을 위한 제반 편의시설 등을 제공

○ 해외인력유치를 위해서 인력 정책을 조율하는 교육자와 산업대표자들로 구성된 바이오메디컬 과학인력 자문위원회, 해외 인재를 식별하고 유치를 계획하는 바이오메디컬 연구회, 정보제공 및 실무를 담당하는 인력청 산하의 컨택 싱가포르 등을 구성하여 각기 역할을 담당

○ 기업지원은 싱가포르 경제개발청(EBD)에서 전담하며, 미국 및 유럽의 바이오메디칼 기업에 투자하면서, 이들 기업과 지속적인 협력관계 구축으로 이들 기업이 해외진출을 시도할 때 싱가포르로 적극 유치해옴. 또한 기관투자자와 공동으로 해외 연구개발 주체에 대해서 투자하여 이로 인해 발생한 소득을 국내 연구개발비로 환원

(3) 시사점



○ 인적·물적 자원이 부족함에도 불구하고 2000년 이후 싱가포르에서 바이오산업이 급속하게 성장하게 된 이유는 개방적인 태도로 해외 인력, 기업, 주자기관, 대학 등을 적극적으로 유치하여 국내 역량 및 국제적 감각을 배양하는 정책적 지원이 있었기 때문이다.

○ 우리나라에서도 해외 우수인력 유치를 위해서는 국제적 마인드를 지닌 인력 유치를 위한 기구와 프로그램 개발이 우선적으로 필요하며, 이와 함께 매력적인 환경을 제공해주는 지원 방안도 모색되어야 하겠다.

## 3. 국내 해양생명공학 육성정책 및 현황

### 가. 국내 생명공학 육성정책

우리나라의 생명공학 육성정책은 1980년대에 생명공학육성법을 제정하여, 이에 근거한 생명공학육성기본계획을 범정부적 차원에서 수립 시행하고 있다.

Table 3-8-10. Support policy for biotechnology in Korea.

| | |
|---|---|
| 1980년대 | <기술도입 및 육성정책 착수><br>○「생명공학육성법」제정('83) ○생명공학연구원 설립('85)<br>○유전자재조합기술 등 바이오분야 R&D 지원 시작 |
| 1990년대 | <범부처 종합계획 수립 · 추진><br>○생명공학육성기본계획(Biotech 2000) 수립('94)<br>○뇌연구촉진기본계획(Braintech 21) 수립('98) |
| 2000년대 초반 | <세계화 도전 · 산업화 촉진><br>○8개 부처 공동「바이오산업발전방안」수립('00.10)<br>○과학기술기본계획(2002~2006) 확정('01.12)<br>- BT를 21C 신산업 창출을 위한 핵심전략기술로 추진<br>○생명공학육성제3단계기본계획 수립('01년말)<br>○국가기술지도 작성(5개 비전분야 90개 핵심기술)<br>○차세대성장동력 "바이오신약/장기" 선정 집중육성('04) |

자료 : 2005 생명공학 육성시행계획

현재 3단계 기본계획(2002~2007년)이 수행중이며, 바이오기술 · 산업위원회에서 정책의 수립 및 집행체계를 담당하고 있다. 육성정책은 연구개발 및 산업육성 강화 부분과 기반구축 및 환경조성 부분으로 구분하여 그에 따라 세부 실천계획을 세웠다.

○ 연구개발 및 산업육성강화

- 신기술분야(유전체, 프로테옴, 시스템 생물학, 구조생물학 등의)와 융합기술분야(생물정보, 나노바이오텍, 의료정보시스템, 신생물화학기술, IT-BT 융합기술 등)로의 연구개발 분야 확대

- 고부가가치 창출분야(유전체기반 신약, 발생생물공학, 기능성 작물, 신생물소재, 뇌과학, 유전자치료 및 예방 등)와 고유생물자원 이용분야(생물다양성 활용기술, 고유식품개발 등)의 선택과 집중

- BT 벤처 · 중소기업의 전략적 육성, 실용화시책의 강화, 권역별 BT 집적지 구축, 국내 벤처 · 중소기업의 국제와 지원강화, 벤처 · 중소-대기업 협력 시스템 강화 등을 통한 BT 산업육성

○ 기반구축 및 환경조성

- 다학제 교육시스템 정비, 시급분야 인력양성 프로그램 확대, 국제적 인력교류 지원 확대, 산업현장 수요 인력확충, BT의 정책, 기획, 경영분야 전문가 양성 등으로 BT 인력 양성

- 생명공학 연구기관의 전문기능 강화, 유전체관련 연구센터 설립, 생물산업 산업화지원센터 기능 활성화 등의 연구개발 기구 확충

- cGMP, Bio-Plant 확충, 국제적 전임상/임상 연구기반 확충, LMOs 안정성 인증기반 확충 등을 통한 연구개발 인프라 확충

- Bio 안전 · 윤리 제도정비, 지적재산권 보호제도 정비, 생물/유전자원 보호대책 강화, BT 산업화 기술 표준화, 산학연 협력 거점 정비, 거시적 국제 협력 틀 마련 등을 통한 연구환경 조성

### 나. 국내 해양생명공학 예산지원 현황

생명공학육성 기본계획에서는 융합생명공학, 기초생명과학, 보건의료 생명공학, 농축산 및 식품생명공학, 환경생명공학, 제조 및 생물공정, 해양생명공학, 생물정보 분야별로 과학기술부, 농림부, 산자부, 보건복지부, 환경부, 해양수산부 등의 정부부처에서 프로젝트 단위로 예산을 지원하고 있다.

Table 3-8-11. Budget of master plan for biotechnology support.

(단위 : 억원)

| 구 분 | 제1단계 ('94-'97) | 제2단계 ('98-01) | 제3단계(2002~2007) | | | | | | | 계 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 소계 | |
| 과학기술부 | 2,150 | 4,418 | 2,059 | 2,482 | 3,232 | 4,076 | 4,892 | 5,957 | 22,698 | 29,266 |
| 교육인적자원부 | 197 | 823 | 414 | 521 | 679 | 856 | 1,027 | 1,251 | 4,748 | 5,768 |
| 농림부 | 723 | 887 | 576 | 725 | 945 | 1,192 | 1,430 | 1,741 | 6,609 | 8,219 |
| 산업자원부 | 167 | 1,299 | 635 | 856 | 1,114 | 1,405 | 1,686 | 2,053 | 7,749 | 9,215 |
| 보건복지부 | 448 | 886 | 609 | 822 | 1,070 | 1,349 | 1,620 | 1,972 | 7,442 | 8,776 |
| 환경부 | 93 | 196 | 117 | 146 | 192 | 242 | 290 | 354 | 1,341 | 1,630 |
| **해양수산부** | **78** | **149** | **90** | **113** | **148** | **186** | **224** | **272** | **1,033** | **1,260** |
| 총 계 | 3,856 | 8,658 | 4,500 | 5,665 | 7,380 | 9,306 | 11,169 | 13,600 | 51,620 | 64,134 |

자료 : 2005 생명공학 육성시행계획

생명공학육성기본계획에 제시된 중앙부처의 국가연구개발 바이오 투자에서 3단계 기간에 전체 총 예산은 51,620억원에 달하나 해양수산부의 바이오 예산은 1,033억원으로 전체의 2.0%에 불과한 실정이다. 현재 해양수산부에서 추진 중인 대표적인 해양바이오 사업으로는 해양생물로부터 유용 신물질 연구개발 등을 포함하는「마린바이오 21사업」과 인프라 구축사업인 「해양생명공학기술개발 및 산업화」가 있다.

Table 3-8-12. Actual budget of MOMAF for marine biotechnology.

(단위 : 억원)

| 사업명 | 사업기간 | 2004실적 | 2005예산 | 주관기관 |
|---|---|---|---|---|
| 마린바이오21사업 | 2004~2013 | 46.4 | 62.0 | 해양연, 부경대, 서울대 |
| 해양생명공학 기술개발 및 산업화 | 2002~계속 | 18.0 | 20.8 | 국립수산과학원 |
| 총 계 | | **64.4** | **82.8** | |

마린바이오 21사업은 새로운 해양산업으로서 해양바이오 산업 육성을 위한 해양바이오 기술의 선진화를 목표로 2004~2013년까지 10년간 산·학·연이 합동으로 수행하고 있으며, 1단계 원천기술개발(2004~2006), 2단계 응용기술개발(2007~2009), 3단계 산업화기술개발(2010~2013) 로 구분하여 추진하고 있다. 인프라 사업으로는 2002년 이후로 국립수산과학원에서 해양생물 유전체 연구 및 활용, 담수생물 유전자 보존 연구, 주요 양식종에



대한 종보존 및 유전자원 은행 구축 등 양식 생물 고유종 보존과 우량품종 개발을 위한 연구를 지속적으로 수행하고 있다.

## 다. MT개발계획과 해양생명공학

### (1) MT 개발계획상의 해양생명공학

해양생명공학의 육성정책은 「해양과학기술(MT) 개발 계획」에도 반영되어 있다.
「해양과학기술(MT) 개발 계획」은 국내 해양과학기술에 대한 투자와 개발을 본격화하기 위해 해양수산부에서 추진하고 2004년 국가과학기술위원회에서 지정하였으며, 이 계획에 따라 3개 분야 14개 중점 추진분야를 선정하고, 2013년까지 10년간 총 3조 1천억원을 집중적으로 투자할 예정이다.
그 중 해양생명공학 분야는 해양생물·유전자 자원개발 및 이용기술[4]에 대한 내용으로 다음과 같이 계획되었다.

(가) 정의
해양환경에 서식하는 생물자원의 특이한 생명현상과 유전자 기능을 이용하여 신소재 및 생물공정을 개발하고 해양생물자원의 지속가능한 활용과 해양생명공학산업의 발전을 도모

(나) 국가해양정책 목표
○ 해양의 다양한 생물을 이용하여 신 고부가가치 기능 유전자, 유용 신소재 등 해양생명공학 기술의 실용화로 신 해양산업 창출
- 인류의 삶에 혁명적 변화를 가져올 생명공학테크 시대에 대비하기 위한 해양생물·유전자원을 적극적으로 발굴
- 21세기 생명공학의 핵심 분야에 해양생물공학을 포함시켜 국가적인 차원에서의 연구개발 적극 추진

4) 해양생물·유전자 자원개발 및 이용기술은「MT 개발 계획」의 3대 기술축의 하나인 해양자원 개발 및 이용기술 분야에 중분류 되며, 전체 71개 중점추진과제중 5개과제가 포함되어 있음.

(다) 중점추진과제 및 핵심기술

| 중점추진과제 | 핵심기술 |
|---|---|
| 해양생물·유전자원 확보 | 유용생물/유전자 자원 분리, 배양, 보존, 관리 기술 |
| | 유용해양생물・유전자원의 발굴, 분석, 이용기술 |
| 해양생명현상 규명 | 해양생물 유전체/단백질체 기능해석기술 |
| | 해양환경유전체분석기술(Environmental Genomics) |
| | 해양생물정보학 기술 |
| 우량 신품종 개발 | 유용유전자 분리 및 이용기술 |
| | 분자육종 및 형질전환 기술 |
| | 해양 LMOs 안전성 평가기술 |
| 해양 신의약 개발 | 해양신의약 분리, 정제, 분석, 합성 기술 |
| | 해양천연물소재은행 및 조합화학기술 |
| 해양생물공정개발 | 해양 신소재 탐색 및 분리 기술 |
| | 분자생물공정 및 분자진화기술 |
| | 신소재 생산기술 |

(라) 추진방향

○ 기능성 물질, 의약 신소재 등 일반산업 및 공업용 소재로서의 이용도 정밀 검토로 고도 활용기술 개발

○ 형질전환 기술을 이용한 신기능성 수산생물 개발

○ 해양생물자원 국가종합관리 정보망 구축(유전자원은행)

(2) MT 로드맵(MTRM)에서의 해양생명공학 분야

「MT 개발 계획」수립 이후 2005년도에는 국가해양과학기술의 로드맵 작성 프로젝트인 「MT 로드맵(MTRM) 」이 진행되었으며, 여기에는 해양생명공학 관련 내용으로 「해양생물자원을 이용한 신기능성 품종 개발」이 블루스타과제로 선정되었으며, 「마린바이오 21」사업이 우선추진중점과제로 선정되었다.

(가) 해양생물자원을 이용한 신기능성 품종 개발(블루스타 과제)

① 정의

해양생물로부터 특수 유용 유전자 소재를 발굴하고 목적 유전자의 기능을 해양생물에서



직접 실현시킴으로서 해양생물산업의 획기적인 생산성 증대와 신규 부가가치의 창출을 가능케 하는 초기능 해양 신품종 개발 기술

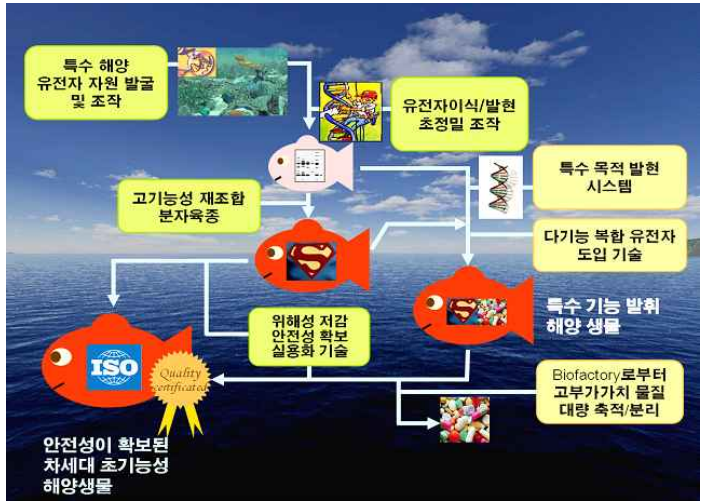



Figure 3-8-7. Technology development strategy of new marine products with added functions.

② 기술개발 내용

○ 초기능 해양신품종 개발 기술

- 형질전환 유전자 발굴 및 발현 정밀 제어 기술
- 차세대 유전자 이식 및 고효율 계통확립 기술
- 초기능 해양생물 계통 개발
- 신기능성 해양생물의 다기능・다목적 복합 육종 기술

○ 해양생물 안전성 확보 기술

- 해양 LMO 정밀 동정 및 분석 기술
- 해양 LMO 생태학적 위해성 평가/안전성 확보 기술
- 해양 LMO 생식생물학적 제어 기술
- 해양 LMO 물리학적 제어 관리 기술

(나) 마린바이오 21 사업(우선추진중점과제)

(나) - 1 해양·극한생물 분자유전체연구

① 정의

해양·극한생물 분자유전체 분석을 통해 해양·극한생물(동물, 식물, 미생물)을 대상으로 유전자 및 단백질 수준에서 생명기능과 현상을 해석하고, 해양유전자원 및 정보 데이터베이스를 구축하여 효율적 관리와 활용을 극대화하며 유용한 유전자 및 단백질 발굴 기술을 통해 실질적 활용기술을 개발

Figure 3-8-8. Conceptual framework of marine biotechnology.

② 기술개발 내용

○ 해양·극한생물 유전자원 이용 기술

- 해양·극한생물 분리, 배양, 동정기술
- 유전자 및 환경유전체 라이브러리 생산 기술
- 생리활성 초고속스크리닝 기술

○ 해양생물 유전체 해독 유전체/단백질체 정보 뱅크 운영 기술

- 고속염기서열 해독· 유전자 annotation 기술
- 단백질 구조예측 및 가상탐색기술
- 구조유전체학; 단백질 기능 예측



- 대용량 유전체/단백질체 DB 구축 및 정보처리 기술
- 해양·극한생물의 분자인식 기술

○ 해양생물 핵심유전자 발굴 및 이용 기술

- 해양동물 뇌기능, 신경계 가소성 관련 유전자 발굴 및 단백질기능 분석 기술
- 해양동물 특이 발현유전자 발굴 기술
- 유용 해조류 유전자원 확보 및 활용
- Full length cDNA 라이브러리 구축 기술
- 유전자 발현벡터 개발 및 유전자 주입 기술
- 해조류 재분화 기술 및 형질전환 기술
- 생촉매 탐색 및 발굴 및 이용 기술
- 특이유전자 발굴 및 재조합단백질 생산 기술
- 생물정보학을 이용한 data mining 기술
- 생촉매 유전자 탐침 개발과 적용 기술
- 생촉매 고효율, 초고속 검색 기술
- 생촉매유전자 분석기술
- 활성기반 유전자 확보 기술
- 난발현성 생체촉매 발현 기술
- 효소 생산, 정제 기술
- 생물공정시스템 개발 및 제품화
- 돌연변이주 생산 기술

(나) - 2 해양바이오프로세스 연구

① 정의

해양생물 유래의 고부가가치형 유용선도 신물질·신소재 개발, 해양바이오프로세싱기술 및 산업화에 필요한 대량 생산공정 기술개발을 통하여 해양바이오산업을 육성하고 해양바이오 기술의 선진화

② 기술개발 내용

| 구 분 | 기 술 내 용 | 관련제품 |
|---|---|---|
| 핵심기술 | - 해양생물로부터 유용 신물질 탐색 기술<br>- 친환경적 유용 생리활성물질의 분리 및 정제 기술<br>- 유용 생리활성물질의 화학구조 결정 기술<br>- 해양생물로부터의 추출물에 대한 생리활성 검정 기술<br>- 고효율 탐색시스템 기술<br>- 해양바이오프로세스를 이용한 생산 기술<br>- 유용 신물질 및 신소재의 대량배양 기술 | - 한약소재개발<br>- 건강보조식품<br>- 식품의약<br>- 의약물질<br>- 식품첨가물<br>- 신기능성 미생물 효소<br>- 면역증강물질<br>- 항생제<br>- 항염증제<br>- 항암제 |
| 기반기술 | - 시제품 모델 개발 및 설계 제작 기술<br>- 유용 유전자의 분리 및 기능분석 기술<br>- 유용 생리활성물질의 이화학적 특성분석 기술<br>- 생리활성물질에 대한 *in vitro* 및 *in vivo* 약리효능 검정 기술<br>- 최적화를 통한 pilot 플랜트 공정개발 기술 | |
| 관련기술 | - 유용 해양생물자원(생물체, 유전자, 생리활성물질)의 D/B 구축<br>- 해양생물자원의 자원화 및 기능성 검정평가 기술<br>- 식품 및 의약품 용도의 안전성 평가기술<br>- 유용물질 성능시험 기술 | |

(나) - 3 해양천연물 신약 개발

① 정의

해양바이오 산업을 국가 전략산업으로 육성하기 위한 중장기 첨단 해양신약 개발로 2015년까지 해양신약 분야에서 세계 정상급 핵심기술 확보

② 기술개발 내용

○ 유용해양생물탐사 기술

○ 해양천연물 특성라이브러리 구축・분석기술

○ 유용해양생물자원 선발・검증기술

○ 해양활성물질 대량검색 및 응용기술

○ 기능성물질 동정・합성 및 공정기술

○ 해양신약 개발기술

Figure 3-8-9. New medicine development system with marine natural materials.

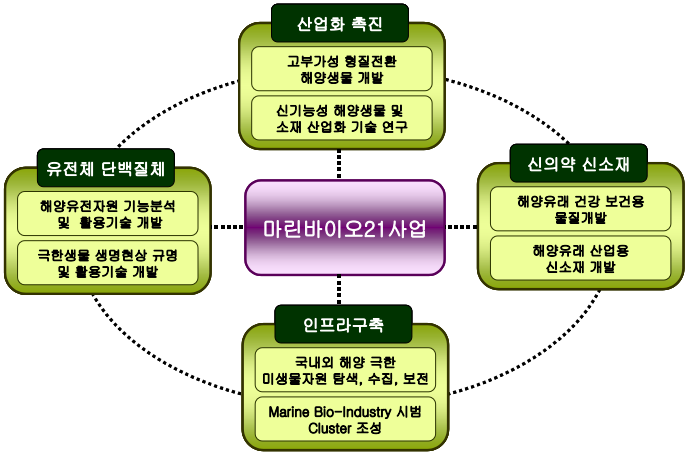



Figure 3-8-10. Strategies & Projects of 「Marine Bio 21」.

| 구 분 | 목 표 | 내 용 |
|---|---|---|
| 1단계 (2004~2006) | 원천기술개발 | 해양생물자원의 기능 구조 분석 기술개발<br>-해양생물자원 확보, 분리 및 장기보존 기술개발<br>-해양생물 유전체 기능 분석기반 기술<br>-유용물질 탐색 기술개발 |
| 2단계 (2007~2009) | 응용기술개발 | 해양생물자원의 활용 기술개발<br>-게놈기능/프로테옴 기술을 이용한 진단,치료제 개발<br>-형질전환 해양생물 개발 |
| 3단계 (2010~2013) | 산업화기술개발 | 해양유래 소재/물질 상용화 기술개발<br>-해양 생체기능 이용 및 공정기술 개발<br>-기능성 해양 생물자원 창출 |

Figure 3-8-11. 3 Step Plan of 「Marine Bio 21」.



## 4. 국내 해양생명공학 정책 제언 및 토의

전지구 표면적의 70% 이상을 차지하는 해양은 육상과는 달리 다양한 물리적 환경과 그곳에 서식하는 해양생물을 내포하고 있어, 인간에게 유용한 물질을 추출하여 산업과 연계할 수 있는 무한한 잠재력을 지니고 있다. 또한 인구증가와 경제성장으로 인하여 발생되는 식량문제, 에너지 수급의 불균형, 환경파괴와 오염문제 등이 심각해지고 있는 상황에서 문제해결을 위한 과학·기술적 수요에 부응할 수 있는 해양생명공학의 중요성은 강조되지 않을 수 없다.

현재까지는 정보과학기술이 세계의 경제를 견인해 왔지만 21세기는 생명공학이 주도할 것이라는 것이 세계 각국의 전문가들이 예측이다. 특히, 해양생명공학은 기존 완성되었거나 개발 중인 생명공학기술과 정보화기술을 접목시킴으로써 아주 빠른 속도로 성장하고 있는 것이 세계적 추세라고 할 수 있다. 전문기관(DRI)의 예측에 의하면 2010년 세계 생명공학의 시장규모는 1,540억불을 상회할 것으로 보고 있으며, 이것은 2005년부터 연평균 11%의 성장률을 가정하고 있다.

해양생명공학기술이 산업에 접목이 될 경우 창출되는 편익의 폭이 타 산업에 비해서 높지만 인증과정이 엄격하고 복잡할 뿐 아니라 개발주기가 타산업의 상품보다 길고, 투자비용에 비해 산업화 성공률이 낮아 고수익과 고위험성을 같이 내포하고 있다. 또한 해양생명공학기술 결과물에 대한 시장의 규모는 개발상품의 특성에 따라 지역적 규모에서 세계적 규모까지 다양할 수 있어 기술개발시 목정성이 명확해야하고 대상 시장도 구체적으로 고려되는 되어야 하며, 경쟁국가의 기술수준을 항상 모니터링을 할 필요가 있다[5]. 따라서 국가의 정책은 해양생명공학의 특성이 내재화된 상황에서 불확실성에 의한 피해를 최소화시키며, 국가의 성장동력 산업으로 육성시키는 전략이 필요하다.

현재 생명공학 육성기본계획에 의해 우리나라 생명공학 전분야의 정책이 수립되고 있으며, 해양생명공학은 해양수산부와 과학기술부에서 추진하는 해양생물을 이용한 연구사업별로 그 계획이 수립되고 있는 실정이다. 따라서 해양생명공학의 연구기반 육성을 위해서는 국내 생명공학의 전체 틀에서 그 방안을 모색해야 하며, 연구개발 방향은 최근 해양생물유용신물질 개발사업 통합하여 산·학·연이 함께 참여하는 「마린바이오 21」사업을 통해 고려할 수 있겠다.

5) 해양생명공학의 영역을 크게 인프라(기반)구축 및 기초기술과 산업응용기술로 나누었을 때, 전자의 기술 부분은 상업적 이익과 연계되어 분석하는 것은 무리가 있을 수 있다.

연차별 생명공학육성시행계획에 의하면 생명공학육성 정책시스템 체계화, 투자확대, 인프라구축, 규제제도 정비, 국제협력 등의 내용이 포함되어 있으며, 연구기반 육성을 위해서 다음의 내용도 고려되어야겠다.

○ 경쟁력있는 신기술 핵심분야 집중 육성

선진국에 비해 인프라 및 예산지원 등이 열악한 상황에서 성과중심의 연구개발을 위해서는 단기간의 산업화가 가능한 MBT 대표 중점과제 선정 후 집중 투자를 통해 육성해야한다. 이를 위해서는 사회적 요구와 기술동향에 대한 면밀한 분석을 바탕으로 명확한 기술개발 목표를 도출하고 정밀 기술수준을 예측 및 분석, 산업화 시기 예측 등을 통해 과제를 선정해야 한다. 국가핵심역량과 바이오기술의 융합이 가능한 분야, 즉 한국의 강점인 전자/정보/소재산업과 생명공학산업이 접목되는 분야에 집중 투자함으로써 산업의 국가 경쟁력을 조기에 확보하도록 해야한다.

○ 자금지원 활성화

우리나라의 생명공학부분 예산은 정부지원금이 대부분이며, 벤처 자금이 많이 활성화 되지 못한 상황이다. 생명공학 분야가 높은 투자 위험을 안고 있어 생명공학벤처로 원활한 자금 유입이 되지 않고 있다. 따라서 민간투자유치를 활성화 할 수 있도록 일본과 같이 벤처기업 대상 증권거래소를 대상으로 연구 과정 및 중간결과 등을 지속적으로 공개하여 연구의 투명화가 선행되어야겠다. 또한 이와 함께 산업화 유도를 위해 창업시장을 만드는 동시에 지적재산권 교역시장 및 장외(場外)시장도 완벽하게 정비해야 한다. 또한 벤처육성을 위한 다양한 세금우대정책도 필요하다.

○ MBT연구 지원 시스템 개발

기초분야 연구 외에 연구기관의 기업화, 기술혁신의 산업화 및 산학연 연계를 위한 시스템 구축이 필요하다. 이러한 시스템 구축을 위해서는 연구소와 대기업간 전략적 협력과 중소기업과의 긴밀한 협력이 필요하며, 아울러 연구성과 중개평가기관, 연구성과 인큐베이터, 산업화 전단계의 중간평가(공정센터), 기업 및 연구기관간의 정보유통 루트를 구축하는 동시에 생명공학정보 자문, 기술평가(특히 생명공학안정성 평가), 특허(특히 외국특허)대리, 투자/융자 및 법률분야 관련 중개서비스기구등이 연구지원시스템 내에 내제화되어 연구성과가 순조롭게 상업화로 전환되도록 지원해야 한다.

○ 인력육성

해양생명공학의 전문인력 양성을 위해서는 국가 과학기술 인력정책을 반영하여 추



진해야 한다. 교육기관과 연계하여 신규 전문인력 양성을 강화하고 연구인력 인턴쉽제도 등으로 기존 연수기관을 최대한 활용하여 연구경험을 다양화 시키고, 또한 해외우수연구인력을 유치할 수 있도록 파격적 조건을 마련하고, 기존연구인력은 해외교육프로그램확대 및 미국의 인력 POOL제도와 같이 국내 인적네트워크를 구성하여 기존 연구인력의 파악 및 상호 인적교류가 활발히 일어날 수 있도록 시스템을 갖추어야 한다.

경제적인 논리에 의하면 투입물이 있으면 산출물이 존재하며, 산출물의 양은 투입에 비해 많아야 경제적 효율성이 있다고 말한다. 생명공학의 경우 AHP 기법과 Delphi 기법을 사용하여 미래유망기술의 우선순위를 알아보았는데, 평가항목은 기술성, 시장성, 공공성으로 하였고, 결과는 시장성이 가중치 0.479를 보여 가장 중요한 고려요소로 평가되었고, 공공성이 상대적으로 낮은 중요도(0.137)를 보였다. 또한 시장성의 세부평가항목에서는 투자수익성이 시장규모성이나 시장성에 비해 상대적으로 중요한 것으로 나타났다(조용곤과 조근태, 2004). 이러한 결과는 R&D 연구비가 경제적 이익을 창출하는 분야로만 모여 장기적으로는 오히려 기술개발 속도를 늦추는 결과를 야기할 수 있다. 따라서 향 후 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 연구비 규모에 따른 적정 연구주제 및 연구 성과에 대한 평가방법을 도출하는 하는 것도 중요하다고 할 수 있다.

# 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제1절 연구개발목표 달성도

제2절 대외기여도

# 제1절 연구개발목표 달성도

## 1. 달성도

| 연구목표 및 달성도 평가 | 달성도(%) |
|---|---|
| ○ 해양의 극한미생물 및 유전자원은 유전적, 생태적 다양성이 증명된 자원으로 산업적 활용가치가 높다. 이중에서 초고온성 아케아는 생명현상규명, 초호열성 효소개발의 중요한 원천이므로 본 연구에서 유전체 해독의 대상으로 선정하였다.<br>○ 초고온성 아케아는 게놈 크기가 보통 2백만쌍으로 염기서열을 결정하는데 비교적 적은 비용으로 완성할 수 있고 고온에서의 생명현상 규명과 같은 기초연구와 호열성 생촉매를 얻을 수 있는 잇점을 가지고 있다.<br>○ 또한 유전체 해독은 현대 생명공학의 핵심기술로 다음 단계의 연구수준 확보를 위해서 필수적인 기술로 본 연구를 통해 해양/극한 미생물 유전체 분석 핵심기술을 보유하게 되었다. | 100 |
| ○ 극지동물의 발현 유전자 라이브러리 구축을 통한 자원 확보; 극한환경 무척추동물(성게와 곤충을 중심으로)의 유전체 분석과 유전자원 확보 연구 분야는 전체적으로 3단계 9년을 연구기간으로 예정하였다. 본 연구의 제1단계(03-05년)에서는 연구대상 생물(극지역 성게 및 곤충)의 진화과정과 진화시기를 파악함으로써 유전자 분석의 기본 틀을 마련하며, 발현유전자의 대량 분석을 통하여 다량의 유전 자원을 확보하는 것을 목표로 삼았다. 현재, 연구사업의 전체적인 수행계획에 맞게 연구목표가 달성되었고, 북극성게의 발현유전자 2258개를 분석하여 저온활성 관련후보 유전자를 발굴하였고, 남극 절지동물을 대상으로는 발현유전자 2048개를 분석하였다. 미토콘드리아게놈 분석에서는 남극절지동물 1종의 미토게놈 분석을 완성하였고, 다른 1종은 90% 완성하였다.<br>○ 극한환경 무척추동물의 유전체 분석과 유전자원 확보 분야에서는 극지 저온환경에 적응하여 진화한 남극 성게, 북극 성게, 남극 곤충을 대상으로 분자계통을 분석하고 발현유전체 분석을 통하여 유용유전자를 확보함을 목표로 삼았다. 연구목표는 앞의 연구결과에서 기술하였듯이 대부분 100% 달성되었다. 다만, 남극 곤충의 미토게놈 전체 분석의 경우 현재까지 약 15kb로 예상되는 전체 DNA 중에서 약 13kb가 결정되었다. 아직 염기서열이 결정되지 않은 부분도 DNA 클론을 확보하고 있어 조만간 분석이 완료될 것으로 예상된다. | 100 |
| ○ 어류의 성장관련 유전자 확보 등에 필요한 요소기술, 자원 확보 | 100 |
| ○ 해양천연물 연구의 결과 이미 15,000종이상의 신물질이 보고되었고, 탄수화물, 단백질, 효소를 비롯한 고분자 활성물질에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다. 해양생물에서 유용물질을 추출하여 산업화 하려는 시도는 활성물질의 낮은 함유 농도, 화학적 불안정성 등의 문제점 때문에 당초의 기대와는 달리 많은 어려움을 가지고 있으나, 해양생물유래 유용물질의 산업적 개발은 지속적으로 진행되고 있다. 한국해양연구원에서도 1990년대 중반이후 시도된 기반연구를 바탕으로 본 연구과제에 이르기까지 해양천연물 연구개발을 위한 기술수준의 향상과 해양천연물의 실제적인 개발에 의한 후보물질의 창출이라는 두 가지 목표를 가지고 꾸준히 진행되어 왔다. 이러한 두 가지 목적을 달성하기 위하여 미흡한 국내의 여건에도 불구하고, 지속적으로 선행정보와 기술축적을 하여 왔으나 연구기간 중 핵심 참여 연구 인력의 유출 등 연구 환경의 변화로 적지 않은 어려움을 겪었다. 이러한 상황을 고려하지 않고도 연구과정의 수준향상은 획득된 것으로 판단된다. 연구대상 물질은 산업적 개발가치가 있는 선도물질의 창출을 분자량 2,000 이하의 소형유기물질로 하였으며, 대상생물은 저서군체동물과 해조류, 생물의 분포지역은 우리나라 연안과 열대 남태평양, 그리고 생리활성은 항암, 항미생물, 항산화, 효소활성저해 등을 검색하였다.<br>○ 상기의 목표를 달성하기 위하여 1999년 이후 우리나라 연안에서 채집하여 냉동 보관해온 생물시료와 2003년, 2005년 남태평양에서 채집한 시료를 대상으로 연구를 수행하였다. 향후 장기적인 해양생명공학 연구의 기반을 위하여 채집 생물을 체계적으로 확보하였고, 실제적인 신물질 탐색에 주력하였으며 천연물유래 유도체의 합성을 부분적으로 시도하였다. 이러한 연구결과를 국내외 저명학술지에 게재하고 특허를 출원함으로서 기술수준은 검증될 것으로 예측된다.<br>○ 본 연구 사업에서는 시료의 확보에서 물질의 규명에 이르는 해양천연물 연구의 전 과정에 대한 연구가 순조롭게 진행되었다. 본 연구사업의 대부분 연구과정은 자체적으로 수행되었고, 전문성을 요구하는 천연물에 활성 검색, 일부의 구조-활성 관계연구 등은 외부기관에 위탁하여 수행하였다(위탁연구 참조). 이와 같이 구조가 결정된 천연물의 수와 구조적 다양함, 생리활성의 검색 등 정량적인 면에서 당초의 목표에 대부분 도달하거나 초과하는 성과를 달성한 것으로 생각된다. | |
| ○ 극지미세조류로부터 항동결단배질 개발 연구의 경우 과기부 핵심연구개발 사업과 연계해서 계속진행 | 100 |

## 2. 총연구기간 목표달성도

| 총연구기간내 년차별 연구내용 대비 달성율(%) | | |
|---|---|---|
| 년차 | 년차별 달성내용 | 년차별 계획대비 연구실적 달성율 |
| 2003 | ○ 초고열성 균주(*Thermococcus*)계통분석, 생리특성, 유전물질 확보 | 20% |
| | ○ 남북극의 성게를 대상으로 분자마커를 이용하여 분자계통 및 진화분석 | |
| | ○ 어류 유전자원 분리 및 배양, 기본생리활성검사, 신물질 탐색 | |
| | ○ 천연물 연구를 위한 시료채집, 분리, 배양, 기본 생리활성검사 및 탐색 | |
| | ○ 남극미세조류 확보 및 얼음결합단백질 생성 균주 탐색 | |
| | ○ 해양미세조류의 탐색 및 분리 (10여종), 항산화물질의 탐색 분리 | |
| 2004 | ○ 게놈 해독용 라이브러리 구축, 염기서열 대량 결정 | 50% |
| | ○ 남극성게의 발현유전자(ESTs)에서 저온활성 특이유전자 확보 | |
| | ○ 어류의 기능성 유전자 탐색 | |
| | ○ 생리활성물질 분리/정제, 신규물질의 분리 및 구조결정, 활성검색 | |
| | ○ 남극 저온 적응 미세조류 종 합성하는 IBP의 activity 차이 규명 | |
| | ○ *Dunaliella* 항산화 유전자(SOD) 유전자 클로닝 및 발현 | |
| 2005 | ○ 해양초고온성아케아 게놈 열기배열완성 및 유전자 예측 | 100% |
| | ○ 북극성게 발현유전자 분석, 남극곤충의 미토게놈 완성 | |
| | ○ 어류의 기능성 유전자 확보 및 발현양상 분석 | |
| | ○ 특이활성물질에 대하여 화학적 구조 변환을 통한 구조-활성 관계연구 | |
| | ○ 발현률에 따른 효소활성의 극대화에 대한 연구; 발현 SOD의활성도검증 | |
| | ○ 호열성 유전자 7종 발굴과 발현, 특성분석을 통해 특허화 | |



# 제2절 대외기여도

## 1. 주요 연구성과의 우수성

해양 및 극한환경의 특성을 지닌 초고온성의 미생물, 저온성의 극지생물, 천연물의 주요 원인 생물인 해양생물체를 연구 대상 생물로 선정하여 온도와 관련된 극한생명현상을 집중적으로 해석하고, 해양생명공학의 핵심기술인 유전체 해독과 분석기술을 통하여 유용한 바이오소재인 유전자, 단백질소재(효소), 해양천연물을 확보하고자 하였으며 세부적으로 다음과 같은 결과를 도출하였다.

가. 해양·극한 미생물 유전체 해석 및 극한효소 개발

(1) 일차적 염기배열 결정 및 유전자 지도 완성

· 극한미생물 분리 및 배양 기술 개발

· 초고온성 극한미생물 1종 유전체 해독 기술 확보

· 약 2,000,000 염기쌍에 해당하는 유전체 일차배열 완성

· 유전체의 특성, 구조 분석

(2) 생물정보학적 분석 결과

· 예측유전자 분석을 통한 유전자 기능 예측

· 해양생물 및 유전자원 DB 구축

· 고온성 유전체 자원 활용 방안 마련

(3) 유용 극한유전자 탐색과 확보

· 초고온성의 극한기능유전자 5종 이상 분리 및 단백질 발현

· 고온성 생명현상, 고온성 유용 효소 관련 유전자 확보 및 기능 분석과 활용

나. 극지생태계 고유 생물자원 및 유전자원 확보

(1) 남극곤충의 미토콘드리아 전체 염기서열 결정

· Long-Range PCR 기법을 사용하여 극지곤충의 미토콘드리아 유전체 분석

· 남극생물의 발현유전체, 미토콘드리아 염기서열 결정

(2) 극지 생물로부터 저온활성유전자 확보

· 발현유전자 라이브러리를 구축하고 대용량EST를 분석

· 특이유전자(저온활성, 분자마커) 1,000건 이상 발굴 및 해석

다. 해양생물 유래 천연물 분리 및 구조 해석

(1) 해양천연물 분리 및 구조 규명

· 해양생태계(극지, 남태평양, 심해)를 대상으로 생물 시료 채집

· 해양천연물 5종 이상 분리, 구조 규명, 생리활성 측정

· 신규 구조와 뛰어난 활성을 갖는 물질에 대한 대량 채집과 대량분리 시도

(2) 천연물 유도물질 합성

· 특이 활성 물질 대량 확보, 구조변환으로 유도체 합성을 위한 선도물질 선정

· 유도체 합성기술 확보

(3) 해양천연물질의 생리기능 활성 검색

· 생리활성 물질의 in vivo 활성, 독성 및 안전성 검색



## 2. 연구실적

| 구 분 | | | 2003 | | 2004 | | 2005 | | 최종실적 합계 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 목표 | 실적 | 목표 | 실적 | 목표 | 실적 | |
| 논문 게재 | SCI | | 4 | 6 | 6 | 6 | 10 | 11 | 23 |
| | 기타 국외학술지 | | | | | | | | |
| | 국내 학술지 | | 2 | 3 | 3 | 3 | 5 | 7 | 13 |
| 학회 발표 | 국외 | | 2 | 12 | 3 | 3 | 5 | 8 | 23 |
| | 국내 | | 2 | 4 | 3 | 7 | 5 | 15 | 26 |
| 특허 | 국외 | 출원 | | | | | | | |
| | | 등록 | | | | | | | |
| | 국내 | 출원 | 1 | 0 | 2 | 0 | 3 | 10 | 10 |
| | | 등록 | | 1 | | | | | 1 |
| 기타(세미나개최) | | | 2 | 3 | 4 | 9 | 6 | 6 | 18 |
| 기타(인트라넷) | | | | | - 홈페이지 구축 | - http://mbt.krodi.re.kr 구축<br>- 신문, 방송, 잡지 홍보 5 건 | - 정보자원링크 | - 해양미생물자원관리 (http://micro.kordi.re.kr/microinfo/index.html)<br>- 극한유전자기능분석체계 (http://210.219.60.180/mbc)<br>- 신문기사제공 1건 | 인터넷개설 신문,방송,잡지,홍보 6건 |

## 가. SCI 논문

1. *Bacillus alveayuensis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from deep-sea sediments of the Ayu Trough
2. *Photobacterium frigidiphilum* sp. nov., a psychrophilic, lipolytic bacterium isolated from deep-sea sediments of Edison Seamount
3. Dissemination of Transferable AmpC-type Beta-lactamase (CMY-10) in a Korean Hospital
4. Phylogenetic Analysis of Harmful Algal Blooming (HAB)-causing Dinoflagellates Along the Korean Coasts Based on SSU rRNA gene
5. Monitoring of microorganisms added into oil-contaminated microenvironments by terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis
6. Cloning, expression, and characterization of an aminopeptidase P from the hyperthermophilic Archaeon archaeon *Thermococcus* sp. NA1
7. Cloning, expression, and characterization of a DNA ligase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. NA1.
8. Overexpression and characterization of a carboxypeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. NA1
9. *Flavobacterium antarticum* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium isolated from the Antartic
10. *Photobacterium aplysiae* sp. nov., a lipolytic marine bacterium isolated from eggs of the sea hare Aplysia kurodai
11. Molecular phylogenies and Divergence times of sea urchin species of Strongylocentrotidae, Echinoida
12. Molecular phylogeny and divergence time of the Antarctic sea urchin (*Sterechinus neumayeri*) in relation to the South American sea urchins
13. New Sesterterpene Sulfates from the Sponge *Darwinella australensis*
14. New Sesterterpenes from the Antarctic sponge *Suberites* sp.
15. New Macrolides from the Sponge *Chondrosia corticata*
16. New Sesterterpenes from the Sponge *Smenospongia* sp.
17. Cyclic Peptides of the Nocardamine Class from a Marine-Derived Bacterium of the Genus *Streptomyces*
18. Chromenes from the Brown Alga *Sargassum siliquastrum* (no acknowledgement)
19. The 2-aminogluconate isomer of *Rhizobium sin*-1 lipid A can antagonize TNF-α production induced by enteric LPS



20. Reduction of freeze-thaw-induced hemolysis of red blood cells by an algal ice-binding protein
21. Xanthophylls in Microalgae: From Biosynthesis to Biotechnological Mass Production and Application
22. Purification and characterization of an anionic isoperoxidase from scented-geranium callus
23. Up-regulation of photoprotection and PSII-repair gene expression by irradiance in the unicellular green alga *Dunaliella salina*

## 나. SCIE 논문

1. Molecular characterization of TEM-type β-lactamases identified in cold-seep sediments of Edison Seamount (South of Lihir Island, Popua New Guinea)
2. Freezing seawater for the long-term storage of bacterial cells for microscopic enumeration

## 다. 비SCI논문

1. 16S rDNA 분석을 이용한 강화도 장화리 갯벌 퇴적물내 미생물 군집구조 및 다양성
2. 하계 강화도 갯벌의 혐기성 유기물 분해능 및 황산염 환원력
3. Lipase 유전자의 보존적 영역 탐색
4. Uridylate kinase 를 이용한 원핵생물의 분류
5. 국내미생물 유전체 연구현황
6. 갯벌 퇴적물내 병원성 Vibrio vulnificus의 신속하고 특이적인 검출
7. 참돔의 lipoprotein lipase 유전자 다형성
8. 유전적 형질에 의한 북태평양 연어 (chum salmon, Oncorhynchus keta)의 계군 구분
9. 포항 주변해역에서 채집된 한국미기록종 Nettenchelys gephyra 댓잎뱀장어
10. 남극 저온 적응 미세조류의 중요성
11. Biotechnology of Microalgal Products: Carotenoid Production from Dunaliella

**라. 국내특허등록**

1. EPA 또는 DHA를 포함하는 인지질의 제조방법

**마. 국내특허출원**

1. 메타게놈 라이브러리로부터 분리한 신규 유전자를 보유한 EML1이 생산하는 신규 저온성 리파제와 리파제를 암호화하는 유전자 및 대장균에서의 대량 생산법
2. 고호열성 DNA 중합효소 및 이의 제조방법
3. 고호열성 리가아제 효소 및 이의 제조 방법
4. 고호열성 신균주 KCTC 10859BP 및 이로부터 생산되는 고호열성 아밀라제
5. 고호열성 아미노펩티다아제 P 및 이의 제조 방법
6. 고호열성 카르복시펩티다아제 효소 및 이의 제조 방법
7. 고호열성 메티오닐아미노펩티다아제 및 이의 제조 방법
8. 고호열성 프로일올리고펩티다아제 및 이의 제조 방법
9. 항암물질과 이것의 추출방법 및 이를 포함하는 항암제 조성물
10. 항암물질을 생산하는 방선균 스트렙토마이세스 속 균주, 이의 분리방법을 이용한 항암제 조성물

# 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

## 1. 기대효과

2003년 인간 유전체 해독 완성 이후 정보기술, 장비기술의 발달과 더불어 다양한 생물을 대상으로 유전자원 확보, 탐색, 유용소재를 선점하기 경쟁이 진행 중에 본 연구사업을 통해 체계적인 해양유전자원 확보와 활용 능력을 보유하게 되었다. 향후, 유전체 해독, 유전자원의 분석을 통해 얻은 자원 및 정보 결과는 유전체시대 이후를 대비하여 유전자 기능예측 및 확인 연구, 마이크로어레이를 이용한 유전자 기능분석, 세포공장설계, 단백질체 분석 등에 응용할 수 있다. 특히, 본 연구에서 분리, 채집된 해양생물 및 해양미생물은 향후 유사연구를 위한 아주 원천으로 활용될 수 있으며, 본 연구를 통해 분리된 신규물질은 의약학용 및 생화학적 시약으로서도 이용될 수 있는 가능성이 있으며, 이들 신물질이 산업화로 발전하게 되면 엄청난 경제적인 파급효과를 가져올 수 있다.

해양생물은 생명공학소재의 중요한 원천으로 본 연구에서 해양생물을 대상으로 첨단 생명공학기법인 유전체 분석 기술을 도입하여 국내에서는 처음으로 극한미생물 유전체 해독을 완성하는 결과를 낳았으며, 이를 통해 호열성 PCR효소인 DNA polymerase, DNA ligase, peptidase 등과 같은 유용한 바이오소재로의 개발을 완료하였고 추후 산업화 연구를 통해 국가적으로 원천기술을 확보하게 되었다.

극한환경 무척추동물의 유전체 분석과 유전자원 확보 분야의 연구 결과는 유전자원 확보 경쟁이 점차 치열해지고 있는 극지 생물에서 대량의 유전자를 확보하였다는 점에서 국가 생물산업 경쟁력 확보에 크게 기여하였다. 미국, 영국, 일본 등 과학 선진국들은 지구상 마지막 남은 미개척지인 극지에서 새로운 생물자원과 유전자원을 찾기 위해 게놈 연구, 유전자 연구를 본격적으로 시작하고 있다. 우리나라가 본 연구사업을 통하여 극지 생물의 유전자를 다량 확보하고 다수의 유용유전자를 발굴한 것은 생물산업 경쟁에서 우위에 설 수 있는 기초 소재를 확보한 것이라 할 수 있다. 또한, 극지 생물의 분자계통을 밝힘으로써 극지생물이 저온환경에 적응해 간 역사적 과정을 이해하고, 비교생물학적 접근을 통해 저온적응 유전자의 특성을 보다 정확히 분석할 수 있는 기본 틀이 마련되었다. 확보된 저온활성 효소단백질 유전자는 재조합단백질의 생산과정을 통해 산업적으로 활용될 수 있다. 특히, 기존에 알려진 유전자와 본 연구에서 확보된 유전자 정보를 이용하여 molecular shuffling 방법을 활용한다면, 저온에서 활성이 높고 상온에서도 안정성이 있는 새로운 효소유전자의 개발도 가능할 것으로 판단된다. 이러한 연구 개발은 효소산업의 성장뿐만이 아니라 이와 연관된 섬유, 피복, 제지, 식품, 세제 산업의 발전에 기여할 것이다. 한편, 결빙방지단백질 유전자나 항생제 펩타이드 유전자들은 냉동생물 산업과 의약품 소재로 활용 가능성이 높다. 냉동생물 산업은 인공장기 보관과 이송, 복제배아 보관, 제대혈 보관 등에 필요한 차세대 의약 산업의 기반 산업으로 떠오르며 그 중요성이 더해 가고 있다. 본 연구에서 확보된 저온 특이 생물소재 유전자는 냉동생물 산업의 기초 자원으로 활용성이 높다.



다양한 해양생물시료 특히 국내에서 취급하기 어려운 열대 생물시료를 체계적으로 확보하였고, 이들에 함유된 신규 생리활성물질을 확보하였다. 아울러 이 과정에서 해양천연물 연구개발의 기술적 기반을 구축하여 독자적인 해양신물질 연구역량을 확보하고 핵심 연구과정을 선진화 하였다. 본 연구사업으로 국내 해양신물질 연구의 기술수준의 향상에 기여하여 해양생물유래 신의약품의 개발을 달성할 토대를 제공할 것이다. 해양신물질 개발의 최종목표는 의약품을 비롯한 고부가가치 산업소재의 개발이므로 향후 추가적인 연구를 통해 육상생물에 머물러있는 국내 생물 산업계에 새로운 소재를 제공할 수 있다. 시료의 채집, 천연물의 분리정제, 신물질의 구조결정, 천연물 유래의 유도체의 합성, 생리활성의 검색 등 천연물연구의 제반 과정에 있어서 많은 기술적 발전이 있었다. 전술한 바와 같이 천연물 연구는 여러 과학기술분야와 밀접한 관계를 맺고 있어서 해당분야의 연구에 기여하는 바가 막대하다. 본 연구사업에 의하여 개발된 주요기술과 정보는 관련분야의 연구에 활용될 가치를 갖고 있는 바 향후 구체적인 계획이 수립 될 예정이다.

지금까지 알려진 결빙방지물질은 4종류이며, 주로 고등생물로부터 분리되었기 때문에 하등한 단세포 극지 미세조류 특히, 호냉성 미세조류로부터 새로운 결빙방지물질을 검색, 특허출원하여 산업 재산권을 확보할 수 있는 수단을 마련한 의미가 있다. 세대가 짧은 극지 미세조류가 합성하는 결빙방지물질의 순수분리 기술 확보는 대량생산과도 직접적으로 연결되므로 가격경쟁력과 활용도를 높일 수 있는 가능성을 확인할 수 있었고 현재 특허권을 위해 새로운 결빙방지물질을 찾는 노력이 각국에서 이루어지고 있기 때문에 극지 미세조류를 이용한 결빙방지 물질 검색 및 이용 기술은 선진 각국의 어떤 연구보다 선행되어야 할 시급한 과제로 인식되며, 결빙방지 물질을 이용한 의약품 및 기능성 식품외 고부가가치 상품 개발가능성이 충분하다.

또한 미세조류 연구 결과로 얻어진 항산화 단백질인 Fe-SOD의 경우 일본에서는 화장품의 재료로 사용되어 활용되고 있고, 실제 화장품 시장에서의 기능성 화장품은 일반 화장품 가격의 4-5배에 이르므로 미세조류유래의 Fe-SOD를 화장품 원료로 사용하기 위한 용도개발의 연구가 진행되면 시장성은 매우 클 것으로 판단된다.

## 2. 활용계획

극한생물의 유전체 분석 및 유전자원 개발 분야에서 확보된 유용유전자는 산업적 활용이 계획되고 있다. 초고온 및 저온활성 효소단백질 유전자는 재조합유전자로 만들어져 재조합단백질의 대량 생산으로 이어질 것이다. 재조합단백질의 발현에 대장균과 같은 기존의 발현시스템이 이용된다. 극지생물 유래 저온활성 단백질은 분자농장(molecular farming) 기술에서 이용하는 식물체 발현시스템뿐 아니라 내한성 작물개발에도 활용될 수 있을것이다. Mannanase, glucanase 등 다당류의 분해에 작용하는 효소단백질의 유전자는 미세조류 발현시스템으로 발현이 이루어진 후 그 단백질이 동물 사료첨가제나 세제 첨가제로 활용될 수 있다. 한편, 확보된 유용유전자 염기서열 정보를 활용하여 분자셔플링(molecular shuffling) 방법을 이용하면 기존에 알려진 유전자와 새로운 조합을 이룬 신규 유전자의 개발도 가능할 것이다. 이 방법을 통하여 저온활성 효소단백질과 상온활성 효소단백질의 장점을 고루 갖춘 새로운 효소단백질 개발이 이루어질것이다. 결빙방지단백질 유전자와 항생제 펩타이드 유전자들도 재조합단백질의 생산을 통해 의약품 소재로서 활용될 예정이다. 한편, 본 연구에서 밝혀진 극지생물의 계통분석 결과는 향후 극지생물의 유전자 특성을 진화적으로 유연관계가 높은 생물과 비교분석하고자 할 때 유용하게 이용될 것이다.

본 연구의 수행으로 확보한 어류의 성장관련 기능성 유전자는 대부분이 기능이 밝혀지지 않은 유전자로서 정확한 기능과 메커니즘을 설명하기 위해서는 유전자의 특성 해석에 관한 연구가 추후에도 지속되어야 하며, 다수의 유전자를 확보하였기에 다른 연구자와의 공동연구가 필수적이다. 또한 서식지, 수온 등에 따른 어종을 선정하여 비교분석 연구가 수행되어야만 한다.

본 연구사업에 의하여 획득한 제반 화학물질과 생물시료는 향후의 해양천연물의 산업적 개발연구나 관련분야의 연구를 위한 소재로 다음과 같이 이용될 예정이다. 우선 우리나라 연안 및 열대태평양 연안에서 채집된 저서동물 시료는 향후의 대규모 신물질 개발연구를 위한 소재로 이용될 것으로서 현재 이들을 활용하는 연구를 계획하고 있다. 그리고 본 연구에서 분리된 소형 유기분자들은 신물질의 산업적 개발을 위한 선도물질로 이용될 수 있을 정도로 충분한 구조적인 특이성과 생리활성을 함께 갖고 있는 물질이 있다. 뿐만 아니라 향후 진행 예정인 합성유도체를 이용한 구조 활성 관계연구는 선도물질 발견의 가능성을 더욱 증가시킨다.

요약하면, 본 연구 과제를 통해 발전된 여러 연구 기술은 향후의 본격적인 해양생명공학 기반기술 및 유전자, 단백질, 신물질 개발을 위한 중요기술로 활용될 것이며 관련분야의 연구에 폭넓게 활용될 것이다. 그리고 확보된 생물시료와 물질은 신물질의 산업적 개발연구를 위한 우수한 소재로 이용될 것이다.

# 제 6 장 참고문헌

제 3 장 1절

김현규. 2002.심해 열수 유래 초고온성 효소의 산업화. 생물산업.15, 25-31.

Atomi, H., Fukui, T., Kanai, T., Morikawa, M. & Imanaka, T. 2004. Description of *Thermococcus kodakarensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archeaon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1. Archaea. 1, 263-267

Bae, S. S., Lee, J. -H. & Kim, S. -J. 2005. Bacillus alveayuensis sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from deep-sea sediments of the Ayu Trough. Int J Syst Bacteriol. 55, 1211-1215.

Balch, W. E. & Wolfe, R. S. 1976. New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethane-sulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of Methanobacterium ruminantium in a pressurized atmosphere. Appl Environ Microbiol. 32, 781-791.

Bazylinski, D. A., Wirsen, C. O. & Jannasch, H. W. 1989. Microbial utilization of naturally-occurring hydrocarbon at the Guaymas Basin hydrothermal vent site. Appl Environ Microbiol. 55, 2832-2836.

Chun, J. 1995. Computer-assisted classification and identification of actinomycetes. Ph.D. Thesis, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK.

De Ley, J., Cattoir, H. & Reynaerts, A. 1970. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. Eur J Biochem 12, 133-142.

Delong, E. 1992. Archaea in coastal marine environments. Proc Natl Acad Sci USA. 89, 5685-5689.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution. 39, 783-791.

Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny inference package), version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA, USA.

Fiala, G. & Stetter, K. 1986. *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a new genus of marine heterotrophic archaebacteria growing optimally at 100 ℃. Arch Microbiol. 145, 338-349.

Fitch, W. M. & Margoliash, E. 1967. Construction of phylogenetic trees. Science. 155, 279-284.

Fitch, W. M. 1972. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. Syst Zool. 20, 406-416.

Godfroy, A., Lesongeur, F., Raguénès, G., Quérellou, J., Antoine, E., Meunier, J.-R., Guezennec, J. & Barbier, G. 1997. *Thermococcus hydrothermalis* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. Int J Syst Bacteriol. 47, 622-626.



González, J. M., Kato, C. & Horikoshi, K. 1995. *Thermococcus peptonophilus* sp. nov., a fast-growing, extremely thermophilic archaebacterium isolated from deep-sea hydrothermal vents. Arch Microbiol. 164, 159-164.

Holden, J. F., Takai, K., Summit, M., Bolton, S., Zyskowski, & Baross, J. 2001. Diversity among three novel groups of hyperthermophilic deep-sea *Thermococcus* species from three sites in the Northeastern Pacific Ocean. FEMS Microbiol Ecol. 36, 51-60.

Jukes, T. H. & Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. In Mammalian Protein Metabolism, vol. 3, pp.21-32. Edited by H. N. Munro. New York: Academic Press.

Mandel, M., Igambi, L., Bergendahl, J., Dodson, M. L., Jr & Scheltgen, E. 1970.Correlation of melting temperature and cesium chloride buoyant density of bacterial deoxyribonucleic acid. J Bacteriol. 101, 333-338.

Marmur, J. & Doty, P. 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J Mol Biol. 5, 109-118.

Miroshnichenko, M. L., Gongadze, G. M., Rainey, F. A., Kostyukova, A. S., Lysenko, A. M., Chernyh, N. A. & Bonch-Osmolovskaya, E. A. 1998. *Thermococcus gorgonarius* sp. nov. and *Thermococcus pacificus* sp. nov.: heterotrophic extremely thermophilic archaea from New Zealand submarine hot vents. Int J Syst Bacteriol. 48, 23-29.

Miroshnichenko, M. L., Hippe, H., Stackebrandt, E., Kostrikina, N. A., Lysenko. A. M., Chernyh, N. A., Jeanthon, C., Nazina, T. N., Belyaev, S. S. & Bonch-Osmolovskaya, E. A. 2001. Isolation and characterization of *Thermococcus sibiricus* sp. nov., from a Western Siberia high-temperature oil reservoir. Extremophiles. 5, 85-91.

Porter, K. G. & Feig, Y. S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting microflora. Limnol Oceanogr. 25, 943-948.

Ronimus, R. S., Reysenbach, A.-L., Musgrave, D. R. & Morgan, H. W. 1997. The phylogenetic position of the *Thermococcus* isolate AN1 based on 16S rRNA gene sequence analysis: a proposal that AN1 represents a new species, *Thermococcus zilligii* sp. nov. Arch Microbiol. 168, 245-248.

Schönheit, P. & Schäfer T. 1995. Metabolism of hyperthermophiles. World J Microbiol Biotechnol. 11, 26-57

Sohn, J. H., Kwon K. Y., Kang, J.-H., Jung, H. B. & Kim, S.-J. 2004.

*Novosphingobium pentaromativorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment. Int J Syst Evol Microbiol. 54, 1483-1487.

Stackebrandt, E. & Goebel B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int J Syst Bacteriol. 44, 846-849.

Stetter, K. O. 1999. Extremophiles and their adaptation to hot environments. FEBS Lett. 452, 22-25.

Swofford, D. L. 1998. Phylogenetic analysis using parsimony(PAUP). Version 4. Suderland, MA: Sinauer Associates.

Takai, K., Komatsu, T., Inagaki, F. & Horikoshi, K. 2001. Distribution of archaea in a black smoker chimney structure. Appl Environ Microbiol. 67, 3618-3629.

Takai, K., Sugai, A., Itoch, T. & Horikoshi, K. 2000. Palaeococcus ferrophilus gen. nov., sp. nov., a barophilic hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. Int J Syst Evol Microbiol. 50, 489-500.

Thompson, J. D., Gibson, T. J. Plewniak, F. Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. 1997.The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 24, 4876-4882.

Wayne, L. G., Brenner, D. J. Colwell, R. R. & 9 other authors 1987. Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches of bacterial systematics. Int J Syst Bacteriol. 37, 463-464.

Zillig, W. & Reysenbach, A.-L. 2001. Class IV. Thermococci class. nov. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 1, pp. 342-346. Edited by D. R. Boone & R. W. Castenholz. New York: Springer.

Zillig, W., Holz, I., Janekovic, D., Schäfer, W. & Reiter, W. D. 1983. The archaebacterium *Thermococcus celer* represents a novel genus within the thermophilic branch of the archaebacteria. Sys Appl Microbiol. 4, 88-94

제 3 장 3절

Afrin SM, Kendall RL, Hall L, Weaver LH, Stewart AE, Matthews BW, Bradshaw RA (1995)Eukaryotic methionyl aminopeptidases: two classes of cobalt-dependent enzymes. Proc Natl Acad Sci USA 92, 7714-7718

Arndt, J. W., Hao, B., Ramakrishnan, V., Cheng, T., Chan, S. I., and Chan, M. K., Crystal structure of a novel carboxypeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Structure (Camb). 10, 215-224 (2002).

Barany F (1991) Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189193.

Barnes WM (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λbacteriophage templates. Proc Natl Acad Sci USA 91, 2216-2220.

Bazan, J. F., L. H. Weaver, S. L. Roderick, R. Huber, and B. W. Matthews.1994. Sequence and structure comparison suggest that methionine aminopeptidase, prolidase, aminopeptidase P, and creatinase share a common fold. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2473-2477.

Ben-Bassat A, Bauer K, Chang SY, Myambo K, Boosman A, Chang S (1987) Processing of the initiation methionine from proteins: properties of the Escherichia colimethionine aminopeptidase and its gene structure. J Bacteriol 169, 751-757

Bernfeld, P. 1955. Amylases, and . Meth. Enzymology 1, 149-158.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Bradshaw RA, Brickey WW, Walker KW (1998) N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and N alpha-acetyl transferase families. Trends Biochem Sci 23, 263-267

Breddam, K., Carboxypeptidase S-1 from Penicillium janthinellum: enzymatic properties in hydrolysis and aminolysis reactions. Carlsberg Res. Commun. 53, 309-320 (1988).

Brown, S. H., Kelly, R. M., 1993. Characterization of amylolytic enzymes, having both -1,4 and -1,6 hydrolytic activity, from the thermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. Appl. Environ. Microbiol. 59, 2614-2621.

Chang YH, Teichert U, Smith JA (1990) Purification and characterization of a methionine aminopeptidase from Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 265, 19892-19897

Chang YH, Teichert Y, Smith JA (1992) Molecular cloning, sequencing, deletion, and overexpression of a methionine aminopeptidase gene from Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 267, 8007-8011

Chen Y.-S., J.E. Christensen, J.R. Broadbent and J.L. Steele 2003. Identification and Characterization of Lactobacillus helveticus PepO2, an Endopeptidase with Post-Proline Specificity. Appl. Environ. Mirobiol. 69:1276-1282.

Chen, K. C., and T. M. Buchanan. 1980. Hydrolases from Neisseria gonorrhoeae. The

study of gonocosin, an aminopeptidase-P, a proline iminopeptidase, and an asparaginase. J. Biol. Chem. 255:1704-1710.

Cheng, T. C., Ramakrishnan, V., and Chan, S. I., Purification and characterization of a cobalt-activated carboxypeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Protein Sci. 8, 2474-2486 (1999).

Choi JJ, Kwon S-T (2004) Cloning, expression, and characterization of DNA polymerase from hyperthermophilic bacterium Aquifex pyrophilus. J Microbiol Biotechnol 14, 1022-1030.

Chung, Y. C., Kobayashi, T., Kanai, H., Akiba, T., Kudo, T., 1995. Purification and properties of extracellular amylase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus* DT5432. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1502-1506.

Cohen GN, Barbe V, Flament D, Galperin M, Heilig R, Lecompte O, Poch O, Prieur D, Querellou J, Ripp R, Thierry JC,Van der Oost J, Weissenbach J, Zivanovic Y, Forterre P (2003)An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. Mol Microbiol 47, 1495-1512

Colombo, S., D'Auria, S., Fusi, P., Zecca, L., Raia, C. A., and Tortora, P., Purification and characterization of a thermostable carboxypeptidase from the extreme thermophilic archaebacterium *Sulfolobus solfataricus*. Eur. J. Biochem. 206, 349-357 (1992).

Copik AJ, Swierczek SI, Lowther WT, D'Souza VM,Matthews BW, Holz RC (2003) Kinetic and spectroscopic characterization of the H178A methionyl aminopeptidase from *Escherichia coli*. Biochemstry 42, 6283-6292

Copik AJ, Waterson S, Swierczek SI, Bennett B, Holz RC (2005) Both nucleophile and substrate bind to the catalytic Fe(II)-center in the type-II methionyl aminopeptidase from *Pyrococcus furiosus*. Inorg Chem 44, 1160-1162

Cottrell, G. S., N. M. Hooper, and A. J. Turner.2000. Cloning, expression, and characterization of human cytosolic aminopeptidase P: a single manganese(II)-dependent enzyme. Biochemistry 39:15121-15128.

Cowan, D., Daniel, R., and Morgan, H., Thermophilic proteases: Properties and potential applications. Trends Biotechnol. 3, 68-72 (1985).

Cunningham, D. F., and B. O'Connor. 1997. Proline specific peptidases. Biochim. Biophys. Acta. 1343:160-186.

D'souza VM, Swierczek SI, Cosper NJ, Meng L, Ruebush S, Copik AJ, Scott RA, Holz RC (2002)Kinetic and structural characterization of manganese(II)-loaded methionyl aminopeptidases. Biochemistry 41, 13096-13105



Diefenthal, T., H. Dargatz, V. Witte, G. Reipen and I. Svendsen 1993.Cloning of proline-specific endopeptidase gene from *Flavobacterium meningosepticum*: expression in Escherichia coli and purification of the heterologous protein. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:9097.

Doherty AJ, Ashford SR, Subramanya HS, Wigley DB (1996) Bacteriophage T7 DNA ligase. Overexpression, purification, crystallization, and characterization. J. Biol. Chem. 271:11083-11089.

Doherty AJ, Wigley DB (1999) Functional domains of an ATP-dependent DNA ligase. J. Mol. Biol. 285:6371.

Doi, E., Shibata, D., and Matoba, T., Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. Anal. Biochem. 118, 173-184 (1981).

Dong, G.., Vieille, C., Savchenko, A., Zeikus, J. G., 1997. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular -amylase from P*yrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. Appl. Environ. Microbiol. 63, 35693576.

Folk, J. E., Carboxypeptidase B, p. 57-79. In P. D. Boyer (ed.), The enzymes, 3rd ed. Vol. 3. Academic Press, New York. (1971).

Fricker, L. D., and Snyder, S. H., Enkephalin convertase: purification and characterization of a specific enkephalin-synthesizing carboxypeptidase localized to adrenal chromaffin granules. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 79, 3886-3890 (1982).

Frillingos, S., Linden, A., Niehaus, F., Vargas, C., Nieto, J. J., Ventosa, A., Antranikian, G., Drainas, C., 2000. Cloning and expression of alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata*. J. Appl. Microbiol. 88, 495-503.

Fukui T, Atomi H, Kanai T, Matsumi R, Fujiwara S, Imanaka T (2005) Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes. Genome Res 15, 352-363

Fulop, V., Z. Szeltner and L. Polgr 2000. Catalysis of serine oligopeptidases is controlled by a gating filter mechanism. EMBO Rep. 1:277-281.

Fulop, V., Z. Szeltner, V. Renner and L. Polgr 2001.Structures of prolyl oligopeptidase substrate/inhibitor complexes. Use of inhibitor binding for titration of the catalytic histidine residue. J. Biol. Chem. 276:1262-1266.

Ghosh, M., A. M. Grunden, D. M. Dunn, R. Weiss, and M. W. W. Adams.1998. Characterization of native and recombinant forms of an unusual cobalt-dependent proline dipeptidase (prolidase) from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus*

*furiosus*. J. Bacteriol. 180:4781-4789.

Guagliardi, A., L. Cerchia and M. Rossi 2002. An intracellular protease of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*, which has sequence similarity to eukaryotic peptides of the CD clan. Biochem. J. 368:357-363.

Harbeck, H.-T., and R. Mentlein. 1991. Aminopeptidase P from rat brain. Purification and action on bioactive peptides. Eur. J. Biochem. 198:451-458.

Harris, M.N., J.D. Madura, L.J. Ming and V.J. Harwood 2001. Kinetic and mechanistic studies of prolyl oligopeptidase from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. J. Biol. Chem. 276:19310-19317.

Hartsuck, J. A., and Lipscomb, W. N., Carboxypeptidase A, p. 1-56. InP. D. Boyer (ed.), The enzymes, 3rd ed. Vol. 3. Academic Press, New York. (1971).

Harwood, V.J., J.D. Denson, K.A. Robinson-Bidle and H.J. Schreier 1997. Overexpression and characterization of a prolyl endopeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. J. Bacteriol. 179:3613-3618.

Hausch, F., L. Shan, N.A. Santiago, G.M. Gray and C. Khosla 2002. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. 283:G996G1003.

Hauser, F., J. Strassner, and A. Schaller. 2001. Cloning, expression, and characterization of tomato (Lycopersicon esculentum) aminopeptidase P. J. Biol. Chem. 276:31732-31737.

Henrissat, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 1991 280 (Pt 2), 309-316.

Hodges RA, Perler FB, Noren CJ, Jack WE (1992) Protein splicing removes intervening sequences in an archaea DNA polymerase. Nucleic Acids Res 20, 6153-6157.

Holden JF, Takai K, Summit M, Bolton S, Zyskowski J, Baross JA (2001) Diversity among three novel groups of hyperthermophilic deep-sea *Thermococcus* species from three sites in the northeastern Pacific Ocean. FEMS Microbiol Ecol 36, 51-60.

Hooper, N. M., J. Hryszko, and A. J. Turner. 1990. Purification and characterization of pig kidney aminopeptidase P. A glycosyl-phosphatidylinositol-anchored ectoenzyme. Biochem. J. 267:509-515.

Ishikawa, K., H. Ishida, Y. Koyama, Y. Kawarabayasi, J. Kawahara, E. Matsui, and I. Matsui. 1998. Acylamino acid-releasing enzyme from the thermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. J. Biol. Chem. 273: 17726-17731.

Ito J, Braithwaite DK (1991) Compilation and alignment of DNA polymerases. Nucleic Acids Res 19, 4045-4057.



Jeon SJ, Ishikawa K (2003) A novel ADP-dependent DNA ligase from *Aeropyrum pernix* K1. FEBS Lett. 550:6973.

Jessberger R, Berg P (1991) Repair of deletions and double-strand gaps by homologous recombination in a mammalian in vitro system. Mol. Cell. Biol. 11:445457.

Jorgensen S., Vorgias, C. E., Antranikian, G., 1997. Cloning, sequencing, characterization, and expression of an extracellular α-amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. 272, 16335-16342.

Kabashima, T., M. Fujii, Y. Meng, K. Ito and T. Yoshimoto 1998. Prolyl endopeptidase from *Sphingomonas capsulata*: isolation and characterization of the enzyme and nucleotide sequence of the gene. Arch. Biochem. Biophys. 358:141148.

Kahler M, Antranikian G (2000) Cloning and characterization of family B DNA polymerase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum islandicum*. J Bacteriol 182, 655-663.

Kanatani, A., T. Yoshimoto, A. Kitazono, T. Kokubo and D. Tsuru 1993.Prolyl endopeptidase from *Aeromonas hydrophila*: cloning, sequencing, and expression of the enzyme gene, and characterization of the expressed enzyme. J. Biochem. (Tokyo) 113:790796.

Kawarabayasi Y, Sawada M, Horikawa H, Haikawa Y, Hino Y, Yamamoto S, Sekine M, Baba S, Kosugi H, Hosoyama A,Nagai Y, Sakai M, Ogura K, Otsuka R, Nakazawa H, Takamiya M, Ohfuku Y, Funahashi T, Tanaka T,Kudoh Y, Yamazaki J, Kushida N, Oguchi A, Aoki K, Kikuchi H (1998) Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaebacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. DNA Res 30, 55-76

Kendall RL, Bradshaw RA (1992)Isolation and characterization of the methionine aminopeptidase from porcine liver responsible for the co-translational processing of proteins. J Biol Chem 267, 20667-20673

Kletzin A (1992) Molecular characterization of a DNA ligase gene of the extremely thermophilic archaeon *Desulfurolobus ambivlaens* shows close phylogenetic relationship to eukaryotic ligases. Nucleic Acids Res. 20:53895396.

Koch, R., Spreinat, K., Lemke, K., Antranikian, G.., 1991. Purification and properties of a hyperthermoactive α-amylase from the archaeobacterium *Pyrococcus woesei*. Arch. Microbiol. 155, 572-578.

Kong H, Kucera RB, Jack WE (1993) Characterization of a DNA polymerase from the hyperthermophile archaea *Thermococcus litoralis*. Vent DNA polymerase, steady state kinetics, thermal stability, processivity, strand displacement, and exonuclease activities. J Biol Chem 268, 1965-1975.

Krieg, F. and N. Wolf 1995. Enzymatic peptide synthesis by the recombinant proline-specific endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum* and its mutationally altered Cys-556 variant. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42:844-852.

Kulkarni, G. V., and D. D. Deobagkar. 2002. A cytosolic form of aminopeptidase P from *Drosophila melanogaster*: molecular cloning and characterization. J. Biochem. 131:445-452.

Laderman, K. A., Davis, B. R., Krutzsch, H. C., Lewis, M. S., Griko, Y. V., Privalov, P. L.,Anfinsen, C. B., 1993. The purification and characterization of an extremely thermostable α-amylase from the hyperthermophilic archaebacterium *Pyrococcus furiosus*. J. Biol. Chem. 268, 24394-24401.

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

Larrabee JA, Thamrong-nawasawat T, Mon SY (1999) High-pressure liquid chromatographic method for the assay of methionine aminopeptidase activity: application to the study of enzymatic inactivation. Anal Biochem 269, 194-198

Laurent, V., D. R. Brooks, D. Coates, and R. E. Isaac.2001. Functional expression and characterization of the cytoplasmic aminopeptidase P of *Caenorhabditis elegans*. Eur. J. Biochem. 268:5430-5438.

Lecompte O, Ripp R, Puzos-Barbe V, Duprat S, Heilig R, Dietrich J, Thierry JC, Poch O(2001) Genome evolution at the genus level: comparison of three complete genomes of hyperthermophilic archaea. Genome Res 11, 981-993.

Lee, J. T., Kanai, H., Kobayashi, T., Akiba, T., Kudo, T., 1996. Cloning and nucleotide sequence and hyperexpression of -amylase gene from an archaeon, *Thermococcus profundus*. J. Ferment. Bioeng. 82, 432-438.

Lee, S. H., Minagawa, E., Taguchi, H., Matsuzawa, H., Ohta, T., Kaminogawa, S., and Yamauchi, K., Purification and characterization of a thermostable carboxypeptidase (carboxypeptidase Taq) from *Thermus aquaticus* YT-1. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56, 1839-1844 (1992).

Lee, S. H., Taguchi, H., Yoshimura, E., Minagawa, E., Kaminogawa, S., Ohta, T., and Matsuzawa, H., Carboxypeptidase Taq, a thermostable zinc enzyme, from *Thermus aquaticus* YT-1: molecular cloning, sequencing, and expression of the encoding gene in Escherichia coli. Biosci Biotechnol Biochem. 58, 1490-1495 (1994).

Lehman IR (1974) DNA ligase: structure, mechanism, and function. Science 186:790797.

Leveque, E., Janecek, S., Haye, B. and Belarbi, A., 2000a. Cloning and expression of an -amylase encoding gene from the hyperthermophilic archaebacterium *Thermococcus hydrothermalis* and biochemical characterisation of the recombinant enzyme. FEMS Microbiol. Lettes, 186, 67-71.

Leveque, E., Janecek, S., Haye, B., Belarbi, A., 2000b. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. Enzyme Microb. Technol. 26, 314.

Levin, Y., Skidgel, R. A., and Erdos, E. G.., Isolation and characterization of the subunits of human plasma carboxypeptidase N (kininase i). Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 79, 4618-4622 (1982).

Li X, Chang YH (1996)Evidence that the human homologue of a rat initiation factor-2 associated protein (p67) is a methionine aminopeptidase. Biochem Biophys Res Commun 227, 152-159

Linden A., Mayans, O., Klaucke, W. M., Antanikian, G., Wilmanns, M., 2003. Differential regulation of a hyperthermophilic α-amylase with a novel (Ca,Zn) two-metal center by zinc.J. Biol. Chem. 278, 9875-9884.

Liu S, Widom J, Kemp CW, Crews CM, Clardy J (1998) Structure of the human methionine aminopeptidase-2 complexed with fumagillin. Science 282, 1324-1327

Lowther WT, Matthews, BW (2000)Structure and function of the methionine aminopeptidases. Biochim Biophys Acta 1477, 157-167

Lowther WT, Orville AM, Madden DT, Lim S, Rich DH, Matthews BW (1999) *Escherichia coli* Methionine Aminopeptidase: Implications of crystallographic analyses of the native, mutant, and inhibited enzymes for the mechanism of catalysis. Biochemstry 38, 7678-7688

Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. Gene 108, 1-6.

Maes, M., F. Goossens, S. Scharpe, H.Y. Meltzer, P. D'Hondt and P. Cosyns 1994. Lower serum prolyl endopeptidase enzyme activity in major depression: further evidence that peptidases play a role in the pathophysiology of depression. Biol. Psychiatry 35:545-552.

Mars, I., and V. Monnet. 1995. An aminopeptidase P from Lactococcus lactis with original specificity. Biochim. Biophys. Acta. 1243:209-215.

Mattila P, Korpela J, Tenkanen T, Pitkanen K (1991) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase – an extremely heat stable enzyme with proofreading activity. Nucleic Acids Res 19, 4967-4973.

Mc Donnell, M., R. Fitzgerald, I. N., Fhaolain, P. V. Jennings, and G. O'Cuinn. 1997. Purification and characterization of aminopeptidase P from Lactococcus lactis subsp. cremoris. J. Dairy Res. 64:399-407.

Meng L, Ruebush S, D'souza VM, Copik AJ, Tsunasawa S, Holz RC (2002) Overexpression and divalent metal binding properties of the methionyl aminopeptidase from *Pyrococcus furiosus*. Biochemistry 41, 7199-7208

Morgan, F. J., Priest, F. G., 1981. Characterization of a thermostable -amylase from *Bacillus licheniformis* NCIB6346. J. Appl. Bacteriol. 50, 107-114.

Morikawa, M., Y. Izawa, N. Rashid, T. Hoaki, and T. Imanaka. 1994. Purification and characterization of a thermostable thiol protease from a newly isolated hyperthermophilic *Pyrococcus* sp. Appl. Environ. Microbiol. 60:4559-4566.

Nagata, K., Tsutsui, S., Lee, W. C., Ito, K., Kamo, M., Inoue, Y., and Tanokura, M., Crystallization and preliminary X-ray analysis of carboxypeptidase 1 from *Thermus thermophilus*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 60, 1445-1446 (2004).

Nakajima R., Imanaka, T., Aiba, S., 1986. Comparison of amino acid sequences of eleven different -amylases. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23, 355360.

Nakatani M, Ezaki S, Atomi H, Imanaka T (2000) A DNA ligase from a hyperthermophilic archaeon with unique cofactor specificity. J. Bacteriol. 182:64246433.

Nishioka M, Mizuguchi H, Fujiwara S, Komatsubara S, Kitabayashi M, Uemura H, Takagi M, Imanaka T (2001) Long and accurate PCR with a mixture of KOD DNA polymerase and its exonuclease deficient mutant enzyme. J Biotechnol 88, 141-149.

Oefner C, Douangamath A, D'Arcy A,Hafeli S, Mareque D, MacSweeney A, Padilla J, Pierau S, Schulz H, Thormann M, Wadman S,Dale GE (2003) Structure of the *Staphylococcus aureus* methionyl-aminopeptidase and complexes with triazole-based inhibitors, J Mol Biol 332, 13-21

Osterman, A. L., Stepanov, V. M., Rudenskaia, G. N., Khodova, O. M., and Tsaplina, I. A., Carboxypeptidase T-intracellular carboxypeptidase of Thermoactinomycetes-a distant analog of animal carboxypeptidase. Biokhimiia. 49, 292-301 (1984).

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., Mohan, R., 2000. Advances in microbial amylases. Biotechnol. Appl. Biochem. 31, 135-152.

Perler FB, Kumar S, Kong H (1996) Thermostable DNA polymerases. Adv Protein Chem 48, 377-435.

Perler FB, Olsen GJ, Adam E (1997) Compilation and analysis of intein sequences. Nucleic Acids Res 25, 1087-1093.

Polgr, L. 1991. pH-dependent mechanism in the catalysis of prolyl endopeptidase from pig muscle. Eur. J. Biochem. 197:441-447.

Polgr, L.2002 The prolyl oligopeptidase family. Cell Mol. Life Sci. 59:349362.

Prchal JT, Cashman DP, KanYW (1986)Hemoglobin Long Island is caused by a single mutation (adenine to cytosine) resulting in a failure to cleave amino-terminal methionine. Proc Natl Acad Sci USA 83, 24-27

Quinto, B.M., M.A. Juliano, I. Hirata, A.K. Carmona, L. Juliano and D.E. Casarini 2000. Characterization of a prolyl endopeptidase (kininase) from human urine using fluorogenic quenched substrates. Int. J. Biochem. Cell Biol. 32:1161-1172.

Rawlings, N. D., and Barrett, A. J., Evolutionary families of metallopeptidases. Methods Enzymol. 248, 183-228 (1995).

Rawlings, N.D. and A.J. Barrett 1994. Families of serine peptidases. Methods Enzymol. 244:19-61.

Rawlings, N.D., L. Polgr and A.J. Barrett 1994. A new family of serine-type peptidases related to prolyl oligopeptidase. Biochem. J. 279:907-911.

Remington, S. J., and Breddam, K., Carboxypeptidases C and D. Methods Enzymol. 244, 231-248 (1994)

Rennex, D., B.A. Hemmings, J. Hofsteenge and S.R. Stone 1991.cDNA cloning of porcine brain prolyl endopeptidase and identification of the active-site seryl residue. Biochemistry 30:21952203.

Robb FT, Maeder DL, Brown JR, DiRuggiero J, Stump MD, Yeh RK, Weiss RB, Dunn DM (2001) Genomic sequence of hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*: implications for physiology and enzymology. Methods Enzymol 330, 134-157

Robb FT, Place AR, Sowers KR, Schreier HJ, DasSarma S, Fleischmann, EM (1995) Archaea: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Robb, F. T., Maeder, D. L., Brown, J. R., DiRuggiero, J., Stump, M. D., Yeh, R. K., Weiss, R. B., and Dunn, D. M., Genomic sequence of hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*: implications for physiology and enzymology. Meth. Enzymol. 330, 134-157 (2001).

Robb, F.T., D.L. Maeder, J.R. Brown, J. DiRuggiero, M.D. Stump, R.K. Yeh, R.B. Weiss and D.M. Dunn 2001. Genomic sequence of hyperthermophile, *Pyrococcus*

*furiosus*: implications for physiology and enzymology. Meth. Enzymol. 330:134-157.

Roderick SL, Mattews BW (1993) Structure of the cobalt-dependent methionine aminopeptidase from *Escherichia coli*: a new type of proteolytic enzyme. Biochemistry 32, 3907-3912

Rolland J, Gueguen Y, Persillon C, Masson J, Dietrich J (2004) Characterization of a thermophilic DNA ligase from the archaeon *Thermococcus fumicolans*. FEMS Microbiol. Lett. 236:267273.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Higuchi R, Horn G, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487-491.

Sambrook, J., Russell, D. W., 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

Savchenko, A., Vieille, C., Kang, S., Zeikus, J. G.., 2002. *Pyrococcus furiosus* α-amylase is stabilized by calcium and zinc. Biochemistry 41, 6193-6201.

Schoenlein, C., J. Heins and A. Barth 1990. Purification and characterization of prolyl endopeptidase from pig brain. Biol. Chem. Hoppe Seyler371:1159-1164.

Shan, L., O. Molberg, I. Parrot, F. Hausch, F. Filiz, G.M. Gray, L.M. Sollid and C. Khosla 2002. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. Science 297:2275-2279.

Shan, L., T. Marti, L.M. Sollid, G.M. Gray and C. Khosla 2004. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. Biochem. J. 383:311-318.

Shinoda, M., K. Toide, I. Ohsawa and S. Kohsaka 1997. Specific inhibitor for prolyl endopeptidase suppresses the generation of amyloid beta protein in NG108-15 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 235:641-645.

Shirasawa, Y., T. Osawa and A. Hirashima 1994. Molecular cloning and characterization of prolyl endopeptidase from human T cells. J. Biochem. 115:724-729.

Simmons, W. H., and A. T. Orawski. 1992. Membrane-bound aminopeptidase P from bovine lung. Its purification, properties, and degradation of bradykinin. J. Biol. Chem. 267:4897-4903.

Sollid, L.M. 2002. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. Nat. Rev. Immunol. 2:647655.

Sonnleitner, B., and Fiechter, A., Advantages of using thermophiles in biotechnological processes: expectations and reality. Trends Biotechnol. 1, 74-80 (1983).



Southworth MW, Kong H, Kucera RB, Ware J, Jannasch HW, Perler FB (1996) Cloning of thermostable DNA polymerases from hyperthermophilic marine Archaea with emphasis on *Thermococcus* sp. 9 degrees N-7 and mutations affecting 3′-5′ exonuclease activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 93, 5281-5285.

Sriskanda V, Kelman Z, Hurwitz J, Shuman S (2000) Characterization of an ATP-dependent DNA ligase from the thermophilic archaeon Methanobacterium thermoautotrophicum. Nucleic Acids Res. 28:22212228.

Stckel, A., B. Stiebitz, and K. Neubert. 1997. Specific inhibitors of aminopeptidase P. Peptides and pseudopeptides of 2-hydroxy-3-amino acids. Adv. Exp. Med. Biol. 421:31-35.

Stepanov, V. M., Carboxypeptidase T. Methods Enzymol. 248, 675-683 (1995).

Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J Mol Biol 189, 113-130.

Subramanya HS, Doherty AJ, Ashford SR, Wigley DB (1996) Crystal structure of an ATP-dependent DNA ligase from bacteriophage T7. Cell 85:607615.

Szeltner, Z., V. Renner and L. Polgr 2000. The noncatalytic -propeller domain of prolyl oligopeptidase enhances the catalytic capability of the peptidase domain. J. Biol. Chem. 275:1500015005.

Tachibana, Y., Leclere, M. M., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., 1996. Cloning and Expression of the -amylase gene from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD1, and characterization of the enzyme. J. Ferment. Bioeng. 82, 224-232.

Tahirov TH, Oki H, Tsukihara T, Ogasahara K, Yutani K, Ogata K, Izu Y, Tsunasawa S, Kato I (1998)Crystal structure of methionine aminopeptidase from hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*. J Mol Biol 284, 101-124

Takagi M, Nishioka M, Kakihara H, Kitabayashi M, Inoue H, Kawakami B, Oka M, Imanaka T (1997) Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR. Appl Environ Microbiol 63, 4504-45

Taylor, I. N., R. C. Brown, M. Bycroft, G. King, J. A. Littlechild, M. C. Lloyd, C.Praquin, H. S. Toogood, and S. J. C. Taylor. 2004. Application of thermophilic enzymes in commercial biotransformation processes. Biochem. Soc. Transact. 32:290-293.

Thorbjarnardottir SH, Jonsson ZO, Andresson OS, Kristjansson JK, Eggertsson G, Palsdottir A (1995) Cloning and sequence analysis of the DNA ligase-encoding gene of *Rhodothermus marinus*, and overproduction, purification and characterization of

two thermophilic DNA ligases. Gene 161:16.

Timson DJ, Wigley DB (1999) Functional domains of an NAD+-dependent DNA ligase. J. Mol. Biol. 285:7383.

Tomazic, S. J., Klibanov, A. M., 1988. Mechanisms of irreversible thermal inactivation of *Bacillus* alpha-amylases. J Biol. Chem. 263, 3086-3096.

Tsunasawa S, Izu Y, Miyagi M, Kato I (1997) Methionine aminopeptidase from the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*: molecular cloning and overexpression in Escherichia coliof the gene, and characteristics of the enzyme. J Biochem (Tokyo) 122, 843-850

Turner, A. J., R. J., Hyde, J. Lim, and N. M. Hooper.1997. Structural studies of aminopeptidase P. A novel cellular peptidase. Adv. Exp. Med. Biol. 421:7-16.

Umetsu, H., Hishinuma, K., Wake, H., and Ichishima, E., Production, purification, and properties of serine carboxypeptidase from *Paecilomyces carneus*. Curr. Microbiol. 33, 44-48 (1996).

van der Maarel, M. J., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L., 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. J. Biotechnol. 94, 137-155.

Vanhoof, G., F. Goossens, L. Hendriks, I. De Meester, D. Hendriks, G. Vriend, C. Van Broeckhoven and S. Scharpe 1994. Cloning and sequence analysis of the gene encoding human lymphocyte prolyl endopeptidase. Gene 149:363366.

Varshavsky A (1997)The N-end rule pathway of protein degradation. Genes Cells 2:13-28

Vihinen, M., Mantsala, P., 1989. Microbial amylolytic enzymes. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 24, 329418.

Walker KW, Bradshaw RA (1998) Yeast methionine aminopeptidase I can utilize either $Zn^{2+}$ or $Co^{2+}$ as a cofactor: a case of mistaken identity? Protein Sci 7, 2684-2687

Walter, R. and T. Yoshimoto 1978. Postproline cleaving enzyme: kinetic studies of size and stereospecificity of its active site. Biochemistry 17:4139-4144.

Wilce MC, Bond CS,Dixon NE, Freeman HC, Guss JM, Lilley PE, Wilce JA (1998) Structure and mechanism of a proline-specific aminopeptidase from *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 95, 3472-3477

Wilk, S. 1983. Prolyl endopeptidase. Life Sci. 33:2149-2157.

Wood RD, Robins P, Lindahl T (1988) Complementation of the xeroderma pigmentosum DNA repair defect in cell-free extracts. Cell 53:9710



Yang G, Kirkpatrick RB, Ho T, Zhang GF, Liang PH, Johanson KO, Casper DJ, Doyle ML, Marino JP Jr.,Thompson SK, Chen W, Tew DG, Meek TD (2001) Steady-state kinetic characterization of substrates and metal-ion specificities of the full-length and N-terminally truncated recombinant human methionine aminopeptidases (type 2). Biochemistry 40, 10645-10654

Yaron, A., and D. Mlynar. 1968. Aminopeptidase-P. Biochem. Biophys. Res. Commun. 32:658-663.

Yaron, A., and F. Naider. 1993. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 28:3181.

Yokosawa, H., M. Miyata, H. Sawada and S. Ishii 1983. Isolation and characterization of a post-proline cleaving enzyme and its inhibitor from spermof the ascidian, Halocynthia roretzi. J. Biochem. 94:1067-1076.

Yoshimoto, T., A. Kanatani, T. Shimoda, T. Inaoka, T. Kokubo and D. Tsuru 1991. Prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*: cloning and sequencing of the enzyme gene. J. Biochem. (Tokyo) 110:873878.

Yoshimoto, T., A. T. Orawski, and W. H. Simmons. 1994. Substrate specificity of aminopeptidase P from *Escherichia coli*: comparison with membrane-bound forms from rat and bovine lung. Arch. Biochem. Biophys. 311:28-34.

Yoshimoto, T., A.K. Sattar, W. Hirose and D. Tsuru 1988. Studies on prolyl endopeptidase from shakashimeji (*Lyophyllum cinerascens*): purification and enzymatic properties. J. Biochem. (Tokyo) 104:622-627.

Yoshimoto, T., K. Kado, F. Matsubara, N. Koriyama, H. Kaneto and D. Tsura 1987. Specific inhibitors for prolyl endopeptidase and their anti-amnesic effect. J. Pharmacobiodyn. 10:730-735.

Yoshimoto, T., K. Miyazaki, N. Haraguchi, A. Kitazono, T. Kabashima and K. Ito 1997. Cloning and expression of the cDNA encoding prolyl oligopeptidase (prolyl endopeptidase) from bovine brain. Biol. Pharm. Bull. 20:1047-1050.

Yoshimoto, T., N. Murayama, and D. Tsuru.1988. A novel assay method for aminopeptidase P and partial purification of two types of the enzyme in Escherichia coli. Agric. Biol. Chem. 52:1957-1960

Yoshimoto, T., R. Walter and D. Tsuru 1980. Proline-specific endopeptidase from Flavobacterium. Purification and properties. J. Biol. Chem. 255:4786-4792.

Yoshimoto, T., T. Nishimura, T. Kita and D. Tsuru 1983. Post-proline cleaving enzyme (prolyl endopeptidase) from bovine brain. J. Biochem. (Tokyo) 94:1179-1190.

Yoshimoto, T., W.H. Simmons, T. Kita and D. Tsuru 1981. Post-proline cleaving

enzyme from lamb brain. J. Biochem. 90:325-334.

### 3장-4절

Ashworth, A.C., and Kuschel (2003) Fossil weevil (Coleoptera: Curculionidae) from latitude 85 S Antarctica. Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol. 191:191-202.

Ashworth,A.C., and R.C.Preece.2003. The first freshwater molluscs from Antarctica. J.Mollusc.Stud. 69:97-100

Biermann, C. H. 1998. The molecular evolution of sperm bindin in six species of sea urchins (Echinoida: Strongylocentrotidae). Mol. Biol. Evol. 15:1761-1771.

Clary, D.O., and D.R. Wolstenholme (1985) The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. J. Mol. Evol. 22: 252-271.

Courtright, E.M., D.H. Wall, R.A. Virginia, L.M. Frisse, J.T. Vida, and W.K. Thomas (2000) Nuclear and mitochondrial DNA sequence diversity in the Antarctic nematode *Scottnema lindsayae*. J. Nematol. 32: 142-153.

Crease, T.J. (1999) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). Gene 233: 89-99.

Crozier, R.H., and Y.C. Crozier (1993) The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and gennome organization. Genetics 133: 97-117.

DeVries, A.L. 1971. Glycoproteins as biological antifreeze agents in antarctic fishes. Science 172, 1152-1155.

Duman, J.G. 1977. The role of macromolecular antifreeze in the darkling beetle *Meracantha contract*. J. Comp. Physiol. 115B, 279-286.

Duman. J.G. 2001. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. Annu. Rev. Physiol. 63, 327-357.

Fletcher, G.L., Hew, C.L., Davies, P.L. 2001. Antifreeze proteins of teleost fishes. Annual Review of Physiology 63, 359-390.

Flook, P.K., C.H.F. Rowell, and G. Gellissen (1995) The sequence, organization, and evolution of the **Locusta migratoria** mitochondrial genome. J. Mol. Evol. 41: 928-941.

Greenslade,P (1995) Collembola from the Scotia Arc and Antarctic Peninsula including descriptions of two new species and notes on biogeography. Pol. Pismo. Entomol. 64: 305-319.



Haq, B. U., J. Hardenbol, and P. R. Vail. 1987. Chronology of fluctuating sea level since the Triassic. Science 235:1156-1166.

Hogg, I.D., and M.I. Stevens (2002) Soil Fauna of Antarctic Coastal Landscapes. Pp. 265-278 in L. Beyer and M. Bolter, eds. Geoecology of Antarctic Ice-Free Coastal Landscapes. Ecological Studies Analysis and Synthesis, Volime 154. Springer-Verlag, Berlin.

Hogg, I.D., and P.D.N. Hebert (2004) Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes, Can.J.Zool. 82: 749-754.

Huelsenbeck, J. P. and F. R. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. Distributed by the authors. Department of Biology, University of Rochester, New York.

Lawver, L.A., and L.M. Gahagan (1998) The initiation of the Antarctic Circumpolar Current and its impact on Cenozoic climate. Pp. 213-226 in T. Crowley and K. Burke, eds. Tectonic Boundary Couditions for Climate Model Simulations. Oxford University Press.

Lee, Y. H. 2003. Molecular phylogenies and divergence times of sea urchin species of *Strongylocentrotidae*, Echinoida. Mol. Biol. Evol. 20:1211-1221.

Lewis, D., C. Farr, and L. Kaguni (1995) *Drosophila mellanogaster* mitochondrial DNA: completion of the nucleotide sequence and evolutionary comparisons. Insect Mol. Biol. 4: 263-278.

Liou, W-C., Tocilj, A., Davies, P.L., Jia, Z. 2000. Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a B-helix antifreeze protein. Nature 406, 322-324.

Liu, K. Jia, Z., Chen, G., Tung, C., Liu, R. 2005. Systematic size study of an insect antifreeze protein and its interaction with ice. Biophysical Journal 88, 953-958.

Marincovich, L. and A. Y. Glandenkov. 2001. New evidence for the age of Bering Stgrait. Quatern. Sci. Rev. 20:329-335.

Marshall, C.B., Fletcher, G.L., and Davies, P.L. 2004. Hyperactive antifreeze protein in a fish. Nature 429, 153.

McInnes, S.J., and P.J.A. Pugh (1998) Biogeography of limno-terrestrial Tardigrada, with particular reference to the Antarctic fauna. J. Biogeogr. 25: 31-16.

NRC. 2003. Frontiers in Polar Biology in the Genomic Era. National Academy Press: Washington, DC (http://www.nap.edu/catalog/10623.html).

Pugh, P.J.A. 1997. A synonymic catalogue of the Acari from Antarctica, the sub-Antarctic Islands and Southern Ocean. J. Nat. Hist. 27:323-421.

Scientific Committee on Antarctic Research (SCAR). 2005. Evolution and biodiversity in the Antarctic Science Plan SCAR 2004. SCAR report. No. 24, 37-47.

Somero, G.N. 2004. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic "strategies". Comp. Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 139(3), 321-333.

Somero, G.N. 2005. Linking biogeography to physiology: Evolutionary and acclimatory adjustments of thermal limits. Frontiers in Zoology 2(1), 1.

Stevens, M.I., and I.D. Hogg (2002) Expanded distributional records of Collembola and Acari in southern Victoria Land, Antarctica, Pedobiologia 46:485-496.

Swofford, D. L. 1998. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony(*and other methods). Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Wierzbicki, H., Przysiecki, P., Gorajewska, E., Filistowicz, A. 2005. Adaptation of arctic fox (Alopex lagopus) to the new environmental conditions. Medycyna Weterynaryjna 61(8), 914-918.

### 3장-5절

Arnault, F., Etienne, J., Noe, L., Raisonnier, A., Brault, D., Harney, J. W., Berry, M. J., Tse C., Fromental-Ramain, C., Hamelin, J. and Galibert, F. 1996. Human lipoprotein lipase last exon is not translated, in contrast to lower vertebrates. J Mol Evol 43: 109-115.

Berchtold, M. W., Epstein, P., Beaudet, A. L., Payne, M. E. Heizmann, C. W. Means, A. R. 1987. Structural organization and chromosomal assignment of the parvalbumin gene. J Biol Chem 262: 8696-8701

Bertioli D. J., Schichter U. H. A., Adams M. J., Burrows P. R., Steinbiss H. H. and Antoniw J. F. 1995. An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. Nucleic Acids Res 23: 4520-4523.

Chauvigne F. Cauty C. Ralliere C. Rescan P.Y. 2005. Muscle fiber differentiation in fish embryos as shown by in situ hybridization of a large repertoire of muscle-specific transcripts. Developmental Dynamics 233(2): 659-666

Duguin J. L. and Dinauer M. C. 1990. Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. Nucleic Acids Res 18: 2789-2792.

Focant B. Vandewalle P. and Huriaux F. 2003. Expression of myofibrillar proteins and parvalbumin isoforms during the development of a flatfish, the common sole Solea solea: comparison with the turbot Scophthalmus maximus. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 135(3): 493-502.



Hara E., Kato T., Nakada S., Sekiya L. and Oda K. 1991. Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)30-latex and PCR: isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells. Nucleic Acids Res 19: 7097-7104.

Kim, Y. J., C. I. Kwak, Y. Y. Gu, I. T. Hwang and J. Y. Chun. 2004. Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. Bio Techniques 36: 424-426, 428, 430.

Liang P., Averboukh L., Keyomarsi K., Sager R., and Pardee A. B. 1992. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. Cancer Res 52(24): 6966-6968

Menard C., Brousseau R. and Mouton C. 1992. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primer(AP-PCR) to strain identification of Porphyromonas(Bacteroides) gingivalis. FEMS Microbiol Lett 74(2-3): 163-168.

Nilsson-Ehle, P., Garfinkel, A. S. and Schotz, M. C. 1980. Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism. Annu Rev Biochem 49: 667-693.

Oku, H., Ogata, H. Y. and Liang, X. F. 2002. Organization of the lipoprotein lipase gene of red sea bream Pagrus major. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 131: 775-785.

Shimizu M, Kusakari M., Yoklavich M.M., Boehlert G.W. and amada J. 1991. Ultrastructure of the epidermis and digestive tract in Sebastes embryos with special reference to the uptake of exogenous nutrients. Environ Bio Fish 30: 15-22.

Welsh J. and McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers.Nucleic Acids Res 18(24): 7213-7218.

Welsh J., Chada K., Dalal S. S., Ralph D., Cheng L. and McClelland M. 1992. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. Nucleic Acids Res 20: 4965-4970.

김용억. 1978. 어류학 총론. 태화출판사. p159-170.

### 3장-6절

신종헌, 서영완, 해양식물의 천연물에 관한 연구 (문헌중심), 한국해양연구소 1992, 194pp.

신종헌, 정지형, 서영완, 백은주, 해양동물로부터 추출한 천연물에 관한 연구 (문헌중심), 한국해양연구소, 1993, 16-35.

홍재상, 전중균, 해양생물의 화학적 신호, 전파과학사, 1995, 95-99

Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep,. M. R. Marine Nat. Prod. 2005, 22, 15-61.

Faulkner, D. J. Nat. Prod. Rep. 2002, 19, 1-49 and references cited therein.

Fautin, D. G. ed. Biomedical Importance of Marine Organisms, California Academy of Sciences; San Francisco, 1988, 159pp.

Nakamura, M.; Kakuda, T.; Oba, Y.; Ojika, M.; Nakamura, H. Bioorg. Med. Chem. 2003, 11, 3077-3082.

Pelter A; Elgendy S. Tetrahedron Lett. 1998, 29, 677-680.

Rinehart, K. L. Screening to Detect Biological Activity, 13-22, Fautin, D.G. ed., Biomedical Importance of Marine Organisms, California Academy of Science, San Francisco, 1988.

Sutherland, H. S.; Souza, F. E. S.; Rodrigo, R. G. A. J. Org. Chem., 2001, 66, 3639-3641.

## 3장-7절

Bowman, J. P., Gosink, J. J., McCammon, S. A., Lewis, T. E., Nichols, D. S., Nichols, P. D., Skerratt, J. H., Staley, J. T. and McMeekin, T. A. 1998. Colwellia demingiae sp. nov., Colwellia hornerae sp. nov., Colwellia ressensis sp. nov. and Colwellia psychrotropica sp. nov. : psychrophilic Antarctic species with the ability to synthesize docosahexaenoic acid (22:6ω3). Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 1171-1180.

Jia, Z. and Davies, P. L. 2002. Antifreeze proteins : an unusual receptor-ligand interaction. TRENDS in Biochemical Sciences. 27 (2), 101-106.

Kang, S.-H. and Fryxell, G. A. 1993. Phytoplankton in the Weddell Sea, Antarctica : composition, abundance and distribution in water-column assemblages of the marginal ice-edge zone during austral autumn. Mar. Biol. 116, 335 - 348.

Kang, Sung-Ho, Kang, Jae-Shin, Lee, Sang-Hoon, Chung, Kyung-Ho, Kim, Dong-Seon and Park, Myung-Gil. 2001. Antarctic phytoplankton assemblages in the marginal ice zone of the northwestern Weddell Sea. Journal of Plankton Research. 23 (4), 333 -352.

Nichols, C. A. M., Garon, S., Bowman, J. P., Raguénès, G. and Guézennec, J. 2004. Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. Journal of Applied microbiology. 96, 1057 - 1066.

Nichols, D. S. 2003. Prokaryotes and the input of polyunsaturated fatty acids to the marine food web. FEMS Microbiology Letters. 219, 1-7.

Raymond, J. M. 2004. Distribution and partial characterization of ice-active molecules associated with sea-ice diatoms. Polar Biol., 23, 721-729.

Scott, F. J. and Marchant, H. J. (eds.). 2005. Antarctic marine protists. ABRS & AAD., pp. 87- 89.

강성호, 강재신, 이상훈, 김동선, 김동엽. 2000. 전 지구 환경변화에 대한 극지 식물플랑크톤의 중요성. Korean J. Environ. Biol. 18 (1), 1-20.

## 3장-8절

과기부 외. 2005. 2005생명공학육성시행계획

김민화, 민경민. 2005. 일본 생명과학분야 연구개발 정부정책동향, 보건산업기술동향.

김석관. 2004. 미국 생명공학 혁신체제의 특징. 과학기술정책연구원.

김주혁. 2004. 일본의 바이오산업 정책현황. 한국보건산업진흥원.

산업연구원. 1994. 「2000년대 첨단기술산업의 비전과 발전과제 - 생명공학」,

신창호. 2005. 미국의 바이오산업 육성정책: 보스턴지역 사례

이홍동. 2002. 미국 해양생명공학산업의 최근동향.

조양희·김용우·장원석·이경민. 2003. 미국의 보건산업 정책 / 한국보건산업진흥원[정책동향]

조용곤, 조근태. 2004. Delphi와 AHP를 이용한 생명공학분야 미래유망기술의 R&D 전략수립. 대한산업공학회.

한국해양연구원. 2005. 해양과학총서9 해양바이오.

해양수산부. 2004. 해양과학기술 개발계획.

해양수산부. 2003. 해양바이오 기술개발사업 기획연구.

Bioscience Innovation and Growth Team. 2003. Bioscience 2015,

biotechnology group, 2003, Competitive Positioning Strategies for Japanese Biotech Companies, Frost & Sullivan

Biozine. 2003. 미국의 바이오테크 산업 동향.

Ernest & Young. 2003. 독일생명공학보고서.

IBTF(Industrial Biotechnology Task Force). 2004. Industrial Biotechnology: Delivering Sustainabilityand Competitiveness.

La politique publique allemande d'aide aux biotechnologies /프랑스 재정경제산업부 (2005)

# 제 7 장 위탁과제 1

## 생리활성 천연물의 대량 분리 및 구조-활성 상관관계 연구

신종헌

서울대학교 약학대학 천연물과학연구소

제 출 문

한국해양연구원장 귀하

본 보고서를 위탁연구과제 '생리활성 천연물의 대량 분리 및 구조-활성 상관관계 연구'의 최종보고서로 제출합니다.

2005. 10.

위탁연구기관: 서울대학교 약학대학 천연물과학연구소

연구책임자: 신 종 헌
연 구 원: 송 주 은
신 대 현
이 동 하

요 약 문

I.제목

생리활성 천연물의 대량 분리 및 구조-활성 상관관계 연구

II.연구개발의 목적 및 중요성

천연생리활성물질 연구에 있어서 생물체내에 함유된 이차대사물질에 대한 효과적인 분리정제 및 구조결정은 모든 응용화, 고부가가치화 연구를 위한 첫 단계라는 점에서 가장 중요한 일차적 탐색과정이다. 본 연구에서는 해양생물 중에서 신물질 발견의 가능성이 매우 높은 해면동물로부터 생리활성물질을 효과적으로 분리, 정제하여 그 실체를 규명하여 향후의 구조-활성간의 상관관계를 연구하는 기초를 확립한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1) 한국해양연구원에서 공여하는 국내 혹은 외국연안의 해양생물 시료로부터 유기물질을 추출.
2) 추출된 유기혼합물에 대하여 탈염, 분획, 다양한 크로마토그래피 과정을 거쳐 생리활성물질을 분리, 정제.
3) 정제된 천연물에 대하여 분광자료의 종합적 해석과 유기반응에 의거, 화학적 구조를 결정.
4) 주관기관과 공동으로 천연물의 생리활성을 검색.
5) 필요한 경우 천연물을 화학적으로 변화시킨 새로운 생리활성 유도체를 합성.

IV. 연구개발결과 및 활용에 관한 건의

Guam 대학 해양생물연구소에서 공여한 열대해면 Pellina 속 시료의 추출물을 대상으로 생리활성을 추적한 결과 1종의 새로운 pyridoacridine계 화합물이 분리되어 구조를 부분적으로 규명하였으며 일차적인 활성검색결과 우수한 활성을 보여주었음. 이 화합물은  향후의 결정구조 분석에 의한 완전한 구조결정, 유도체의 합성 및 보다 다양한 생리활성 검색결과에 따라 신물질의 산업적 개발을 위한 선도물질로 활용될 가능성이 매우 높다고 사료됨.

SUMMARY





In the research of marine natural products for industrial development, chemical investigation of metabolites, which includes the isolation and structure determination of bioactive compounds, is one of the most preliminary and essential parts for advanced and/or applied research.

In this study, a new nitrogenous salt of the pyridoacridine alkaloids was isolated from the tropical sponge Pellina sp. using various chromatographic methods. The structures of novel compounds were mostly defined by combined spectral analyses. The preliminary bioactivity test showed potent activity of this compound. With the aid of crystallographic analysis, advanced bioassay, and derivative synthesis, the isolated metabolite will have potential to be developed as a new lead for industrial development.

# 1. 해면동물의 천연물화학적 중요성

해면동물(phylum Porifera)은 현존하는 다세포생물 중에서 역사가 매우 오랜 부류에 속한다. 고생대 초기에 이미 지구상에 출현하였으며 기후와 환경의 변화에 적응하며 진화를 거듭하여 왔다. 그 결과 이들은 분류학적인 측면에서 해양동물 중에서 가장 다양한 생물의 하나로 전세계에 10,000종 이상이 서식하는 것으로 알려져 있다. 이들의 지역적 분포는 대단히 넓어 열대에서 극한지에 이르는 거의 모든 해역에 서식하며 연안의 조간대로부터 수심 9,000 m의 심해저에서도 발견된다. 또한 드물기는 하나 우리나라의 담수호나 러시아의 Baikal 호와 같은 내륙의 호수저에 서식하는 종도 있다. 우리 나라 근해에서는 석회해면강(Calcacea) 9종, 육방해면강 (Hexactinellida) 2종, 보통해면강(Demospongiae) 114종 등 모두 125 종이 보고되어 있으나 미보고 혹은 미분류의 속과 종이 지속적으로 발견되어 실제로는 1,000 종을 훨씬 상회할 것으로 추정되고 있다 (심정자, personal commun.).

해면동물은 그 종류 및 서식 환경의 다양함과 채집의 용이함으로 인하여 해양천연물 연구의 초기부터 많은 주목을 끌어 왔다. 더욱이 초기에 발견된 해면의 천연물 중에서 생리활성 물질의 출현빈도가 매우 높아 집중적인 연구의 대상이 되어 왔으며 그 결과 현재 모든 해양생물 중에서 천연물화학적으로 가장 중요한 위치를 차지하고 있다. '70-'80년대에 보고된 해양신물질 중 30% 이상이 해면동물로부터 추출되었으며 이는 동·식물을 포함한 전 해양생물중 단일 문(phylum)으로서는 단연 최대의 추출 빈도이다(Ireland, et al, 1988). 해면동물의 중요성은 근래에 더욱 증가하고 . 이러한 경향은 날이 갈수록 더욱 심화되고 있어서 해면동물이 해양 천연물에서 차지하는 비중은 지속적으로 증가하고 있다. 본 연구와 관련하여 최근에 조사한 바로는 2000년대 초반의 경우 전체 해양천연물의 40%를 상회하고 있다 (Table 7-1-1). 또한 천연물연구 뿐만 아니라 이들 상호간 혹은 다른 생물과의 화학생태(chemical ecology)적 제반현상에 대한 연구 또한 최근에 매우 활발히 이루어지고 있다(Paul, 1987; Pawlik, 1993; Proksch, 2002).

Table 7-1-1에서 나타난 바와 같이 해면동물의 천연물은 4,500 종 이상이 보고되었는 바 이들은 구조적으로 매우 다양하여 lipids, polyketides, terpenoids, steroids, amino acids, linear and cyclic peptides. polycyclic heteroaromatics, nucleosides, mixed biogenetic products 등 모든 생합성적 기원에서 비롯된 물질들이 망라되어 있다. 일개의 문 (phylum)의 생물이 이렇게 다양한 천연물을 함유하고 있는 것은 육상과 해양을 막론하고 현존하는 생물에서는 유례가 없는 일이다. 뿐만 아니라 이들은 어떤 특정한 부류의 물질의 추출빈도가 다른 천연물을 압도하지 않고 각각의 생합성적 기원을 가진 물질들이



상당히 고른 추출빈도를 보여 준다 (Ireland, et al, 1988; Attaway & Zaborsky, 1993).

Table 7-1-1. Phyletic distribution of marine natural products - recent trend.

| Organisms | Number of Metabolites[a] | % | Number of Publications[b] | % |
|---|---|---|---|---|
| Microbes (bacteria and fungi) | 694 | 5.5 | 174 | 6.4 |
| 'Algae' (include cyanobacteria) | 2,272 | 18.1 | 366 | 13.3 |
| Bryozoans | 167 | 1.3 | 28 | 1.0 |
| Coelenterates | 2,283 | 18.2 | 442 | 16.2 |
| Echinoderms | 729 | 5.8 | 123 | 4.5 |
| Molluscs | 909 | 7.2 | 193 | 7.1 |
| Sponges | 4,677 | 37.2 | 1,222 | 44.7 |
| Tunicates | 845 | 6.7 | 184 | 6.7 |
| Total | 12,573 | 100.0 | 2,734 | 100.0 |

areported in the period of 1977-2000. Compiled from Faulkner, D. J. (2002) and references cited therein.
breported in the period of 1991-2002.12. Compiled from Chemical Abstracts 118~137 (Shin, personal commun.).

일반적인 생물의 진화와 환경에 대한 생화학적 적응에 위배되는 이러한 현상은 불가피하게 해면의 천연물의 진정한 생산주체에 대한 의문을 야기시킨다(Haslam, 1986; Giner, 1993; Garson, 1993). 해면동물은 플랑크톤을 주로 섭취하므로 이들의 대사물질이 체내에 농축되어 있을 가능성이 매우 높다. 잘 알려진 예로서 강력한 DSP toxin인 okadaic acid는 해면 *Halichondria okadai* 에서 처음 추출되었으나 실제로는 dinoflagellate *Prorocentrum lima*의 대사 물질임이 규명되었다(Faulkner, 1996). 또한 해면은 많은 경우에 다량의 착생 생물(epiphytes)이나 microalgae, eubacteria, cyanobacteria, fungi등을 체내에 다량으로 보유하고 있으므로(Aplysina cavernicola의 경우는 조직 부피의 38%가 bacteria, Bergquist & Wells, 1983) 추출된 물질이 해면의 고유한 대사물질인지 공생하는 미생물 혹은 미세조류의 대사 물질인가의 구분이 어렵다. 대표적인 예로 가장 연구가 많이 된 해면의 일종인 Dysidea속의 경우를 보면 terpenoids,

chlorinated diketopiperazines, diphenyl ethers등 생합성적으로 관련이 전혀 없고 기원도 서로 상이한 물질들을 함께 보유하고 있는데 이들 중에서 최소한 일부의 천연물은 공생하는 광합성 생물에 의하여 합성된 것으로 추측되고 있으며 증거도 보고되고 있다 (Unson & Faulkner, 1993; Faulkner, 1997). 또한 *Theonella swinhoei*의 천연물인 macrolides와 cyclic peptides는 모두 해면에 의하여 합성되지 않고 각각 공생하는 unicellular heterotrophic bacteria와 filamentous heterotrophic bacteria에 의하여 합성된 사실이 밝혀졌다 (Bewley, et al, 1996). 이러한 점에 착안하여 생리활성 물질을 함유하는 해면으로부터 이들 미생물을 분리, 배양하여 산업적 가치가 높은 신물질의 대량생산을 위한 시도가 최근에 전세계의 주요 해양천연물 연구진을 중심으로 매우 활발하게 진행되고 있다. 그러나 숙주와 선택적으로 공생하는 것이 분명한 이들의 독립적인 배양과 천연물 생산의 어려움으로 인하여 beta-carboline계 천연물 manzamines를 제외하고는 현재까지 가시적인 성과를 얻지는 못하고 있다(Hill, personal commun.).

해면동물의 천연물은 물질의 출현빈도 뿐만 아니라 생리활성을 나타내는 비율도 여타 대부분의 해양생물의 대사물질에 비하여 탁월하게 높아 항암제, 항진균제, 항바이러스제, 효소저해제, 소염진통제, 면역억제제 등 신규의 의약품으로으로 개발중인 해양천연물에는 해면유래의 물질이 다수 포함되어 있다. 현재 해면의 천연물로서 특허를 획득하여 산업화의 가능성이 탐색되고 있거나 산업화 과정이 진행중인 물질중 대표적인 예를 살펴보면 *Halichondria okadai*와 *Lissodendryx* 속으로부터 분리된 항암물질 halichondrin B, *Luffariella* 속으로부터 분리된 소염, 진통물질 manoalide, Topsentia 속의 항암, 소염물질 topsentins, *Xestospongia exigua*로부터 분리된 항암물질 halenaquinone, *Jaspis* 속으로부터 분리된항진균, 항암물질 jaspamide, *Discodermia dissoluta*로부터 얻어진 항진균, 항암 및 면 역억제물질 discodermolide, *Hymeniacidon* 속의 관절염치료제 debromohymenialdisin, *Theonella* 속의 항혈전물질 cyclotheonamides 등이 널리 알려져 있다(de Silva and Scheuer, 1980; Hirata and Uemura, 1986; Bartik, et al, 1987; Zabriskie, et al, 1986; Crews, et al, 1986; Gunasekera, et al, 1991; Pettit, et al, 1993; Fusetani, et al, 1990; Faulkner, 1997). 이들의 산업화를 저해하는 가장 큰 요인인 활성물질의 대량생산의 어려움을 해소하기 위한 노력의 일환으로 미국의 NCI와 New Zealnd의 NIWA는 공동으로 halichondrins를 생산하는 해면 *Lissodendryx*의 해양목장화를 시도하여 상당한 성과를 거두고 있다. (Suffness & Thompson, 1988; Munro, personal commun.)

유용천연물 특히 신의약품 개발을 위한 선도물질로서의 신물질 탐색연구에 있어서의 해면동물의 중요성을 단적으로 드러내는 한 가지 예는 현재 항바이러스제 및 항암제로서 각광을 받고 연구가 집중되고 있으며 상업적으로도 이용되는 ara-A, ara-C,



acyclovir, AZT 등 modified nucleosides계 생리활성물질의 개발이 1950년대 후반 Caribbean Sea의 해면으로부터 추출된 광범위 세포독성물질 ara-T(spongothimidine)와 ara-U(spongouridine)에 기원하고 있다는 사실이다(Rinehart, 1988). 상기한 물질을 포함하는 여러 해면유래 신의약품 후보물질들 중에서 천연물 그 자체로 상업화에 성공하는 것은 비록 소수에 그친다 하더라도 이들의 특이한 구조와 강력한 생리활성 및 독특한 생체내 활성기작은 의약품이나 기타 산업적 소재의 개발에 필수적인 정보로 많이 이용되고 있다. 일례로 *Verongida*목의 해면에서 발견되는 psammaplin을 비롯한 bromotyrosine계 물질은 histone deacetylase (HDAc)저해활성을 이용한 신의약품의 개발을 위한 소재로서 combinatorial chemistry의 소재로 급부상하고 있다 (Nicholas, et al, 2002;Nicolaou, et al, 2001a, 2001b). 산업적 개발의 측면뿐만 아니라 이들은 학문적인 면에서 유기전합성, 생화학, 생유기화학, 의・약학, 생물・생태학 등 여러 관련분야의 기초 및 응용연구에 필수적인 정보와 연구수단을 제공하여 막대한 기여를 하여 왔으며 이러한 연구가치는 미래에도 더욱 증대할 것이 확실시된다(Fautin, 1988; Narahashi, 1988; Paul 1988; Pawlik, 1993; Taylor, et al, 1988).

해면동물의 천연물은 5,000 종 이상이 알려져 있으나 현존하는 종 중에서 불과 5% 미만만이 연구되었으므로 신물질을 발견할 가능성은 여전히 매우 높다 (Fenical, 1988). 이들은 화학적 구조의 다양함과 강력하고 독특한 생리활성으로 인하여 오랜 기간 해양천연물 연구의 핵심적인 위치를 차지하고 있으며 제반 관련분야의 연구에 미치는 영향 또한 지대하다. 더욱이 현재 생명공학(biotechnology), 유기화학(combinatorial chemistry), 수산학 (aquaculture) 등 다양한 측면에서 시도되고 있는 해면유래 천연물의 대량 생산과 상업화가 성공할 경우 해면은 해양천연물 뿐만 아니라 육상을 포함한 전 천연물 연구의 핵심적인 위치를 차지할 것으로 기대된다.

결론적으로 현재는 물론 미래에도 상당기간 해양천연물 연구를 주도할 해면동물의 천연물에 관한 연구는 생리활성 선도물질의 발굴과 함께 국내의 천연물 연구수준의 향상과 연구대상의 확대에도 크게 기여할 것이다.

## 2. 해면 *Pellina* sp.의 생리활성물질

### 가. 연구의 배경 - 해양동물의 pyridoacridines

Anthracene의 가운데 고리에 위치한 두 탄소원자 중의 하나가 질소로 치환된 이원자방향족 화합물 (heteroaromatic) 을 acridine이라고 부른다. 해양동물의 천연물에는 acridine을 기본골격으로 하여 여기에 pyridine이 덧붙여 형성된 4중고리 혹은 5, 6 중 고리 방향족 화합물이 때로 발견되는데 이들을 pyridoacridine계 alkaloids라고 부른다. 이들

은 여타의 이차대사물질이 한 부류의 생물에서 주로 발견되는데 비하여 특이하게 해면동물과 군체멍게 (colonial tunicates) 라는 두 종류의 완전히 다른 생물군으로부터 자주 발견될 뿐만 아니라 구조적인 유사성도 크지 않아 그 생합성적 기원에 대한 의문이 남는다 (Faulkner, 2002; Munro et al, 2004).

해양동물 유래의 pyridoacridines는 출현빈도가 높고 세포독성, 항진균, 항바이러스, 효소활성저해 등 다양한 생리활성을 나타낸다 (Molinski, 1993; Ding et al, 1999). 따라서 이들의 생리활성기작에 대한 많은 연구가 이루어지고 있는데 특히 항암(세포독성)에 대한 연구가 가장 활발하다. 현재까지 밝혀진 바로는 항암활성의 대부분은 DNA intercalation이나 nucleic acid intercalation에 주로 기인하는 예가 많으나 때로는 topoisomerase II에 결합하여 효소활성을 증가시키는 작용에 기인하는 바도 있다 (McDonald et al, 1994; Delfourne et al, 2001). 천연물화학적 측면에서 이들은 수소원자 수가 적음에 기인한 NMR 분석의 어려움으로 처음 제시되었던 구조가 이후에 수정되는 예가 너무나 많아 x-선 결정분석자료에 의해서만이 화학적 구조가 완벽히 규명되는 경우가 일반적이다. 그러나 이들의 뛰어난 생리활성과 함께 입체이성질체가 존재하지 않아 유기 전합성의 과정이 매우 짧고 전체의 수율이 높은 등 유기화학적 방법에 의한 대량생산이 여타의 천연물 보다 훨씬 용이하여 천연물의 산업적 개발을 위한 유력한 선도물질 (lead compounds)로 여겨져 연구가 매우 활발하다 (Delfourne & Bastide, 2003).

이들 pyridoacridine계의 대표적인 물질들을 편의상 해면동물에서 분리된 물질들부터 살펴보면 먼저 해면동물 *Amphimedon* sp.로부터 분리된 amphimedine은 강한 항암효과를 나타내었다 (Schmitz et al, 1983). 이 물질의 구조는 13C-13C coupling constant의 분석으로 규명되었으며 3가지 다른 경로로 전합성 되었는데 모두가 최대 8 steps 이하의 짧은 과정을 거쳤으며 수율도 매우 높다 (>21%) (Echavarren & Stille, 1988; Prager & Tsopelas, 1989). 필리핀 근해에서 채집된 해면 *Xestospongia* sp.와 *Xestospongia* cf. *carbonaria*로부터 분리된 neoamphimedine은 포유류의 topoisomerase II의 작용을 방해하여 결과적으로 DNA의 고리화를 유도하는 것이 밝혀졌다 (de Guzman et al, 1999). 반면에 동일한 시료에서 분리된 deoxyamphimedine의 경우는 활성산소의 생산을 촉진시켜 DNA의 손상을 야기시키는 것으로 보고되었다 (Tasdemir et al, 2001).

Dercitin은 심해에 서식하는 해면 Dercitus sp.로부터 얻어진 보라색의 물질로서 항종양, 항바이러스, 면역조절 (immunomodulation) 등의 효과를 나타내었으며 이들 중에서 항종양 효과는 동물실험에서도 입증되었다 (Gunawardana et al, 1988). 이 화합물의 구조는 분광자료의 해석으로 제시되었으나 후에 thiazol 부분의 질소와 황의 위치가 바뀐 것으로 수정되었다. Dercitin과 더불어 얻어진 6중고리 화합물 cyclodercitin의 구조 역시 NMR 자료의 종합적인 해석으로 규명되었으나 동일한 thiazole 형태로 수정되었다



(Gunawardana et al, 1988). 심해에서 채집된 *Steletta* sp.로부터 dercitin의 유도체들인 nordercitin, dercitamine, dercitamide 등이 분리되었는데 이들은 모두 in vitro 실험에서 암세포에 대한 독성을 나타내었다(Gunawardana et al, 1989). 이들은 모두 뒤이어 미크로네시아에서 채집된 미동정 tunicate와 이를 포식하는 연체동물 *Chelynotus semperi*에서 분리된 kuanoniamines A-D와 유사한 구조를 갖고 있으며 kuanoniamines와의 분광자료 비교에 의하여 황과 질소의 위치가 정정되었으며 이 과정에서 dercitamide는 kuanoniamine C와 동일한 물질임이 드러났다(Carroll et al, 1990; Gunawardana et al, 1992). *Stelletta* sp.의 동일한 시료에서 분리된 stellettamine도 kuanoniamine계열에 속한다. 이후에 tunicate *Cystodytes* sp.로부터 분리된 얻어진 dehydrokuanoniamine B 및 미크로네시아에서 채집된 *Oceanapia* sp.의 생리활성 천연물도 모두 kuanoniamine 의 유도체 들이다 (McDonald et al, 1994; Eder, et al, 1998)

카리브해에 서식하는 해면 *Petrosia* sp.로부터 얻어진 petrosamine의 구조는 x-선 결정구조분석으로 규명되었는데 이 화합물은 용매에 따라 녹색 (THF)에서 자주색 ($H_2O$)으로 바뀌는 특성이 있다(Molinski et al, 1988). 최근에 호주 연안에서 채집된 해면 *Oceanapia* sp. 의 추출액으로부터 petrosamine 과 같은 용액별 색상변화를 나타내는 acridine alkaloid가 분리되어 분광자료 해석에 의하여 petrosamine과 유사한 구조의 alkaloidal salt임이 정의되었고 petrosamine B로 명명되었다. 생리활성 검색결과 이 화합물은 위궤양을 일으키는 *Helicobacter pylori*의 체내 중요효소인 ASD (aspartyl semialdehyde dehydrogenase)의 작용을 억제함이 보고되었다 (Carroll et al, 2005).

Tunicates에서 분리된 polycyclic heteroaromatics 중에서 먼저 발견된 것은 열대 태평양에서 채집된 *Leptoclinides* sp.로부터 분리된 2-bromoleptoclinidinone이다(Bloor & Schmitz, 1987; de Guzman & Schmitz, 1989). 5중고리 화합물인 이 천연물의 구조는 long-range H-C coupling에 의하여 제시되었으나 이후에 화학적 구조변환반응에 의하여 ascididemnin의 브롬화 유도체로 정정되었다. Ascididemnin은 오키나와에서 채집된 *Didemnum* sp.로부터 분리되었으며 강한 항암작용을 나타내는 이 물질은 quinoline-5,8-quinone으로부터 4 steps 만에 전합성에 성공하였다(Kobayashi et al, 1988; Bracher, 1989). 이후에도 ascididemnin 및 유사체들은 무수한 방법으로 합성이 되었으며 in vivo 활성에 대한 검색결과도 빈번히 보고되었다 (Defourne & Bastide 2003). 또한 생체내 활성기작 연구에 의하여 이 화합물의 항암작용이 단순한 DNA intercalation이나 topoisomerase II의 저해가 아니라 thiol-dependent reductive DNA cleavage에 기인하는 것이 밝혀졌다 (Matsumoto et al, 2000). 지중해에서 채집된 tunicate *Cystodytes delle chiajei*로부터 ascididemnin과 유사한 phenanthroline의 부분구조에 4-aminopyridine moiety가 접합된 5중고리 화합물 cystodamine이 분리되었으며 백혈병 세포에 대한 활성

이 보고되었다 (Bontemps et al, 1994). 그러나 이 천연물은 전합성에 의하여 보고된 구조가 의심되었으며 분광자료의 재해석에 의하여 11-hydroxy-ascididemnin으로 정정되었다 (Kitahara et al, 1998; Delfourne et al, 2000).

Guam에서 채집된 *Trididemnum* sp.로부터 분리된 shermilamine A의 구조는 x-선 결정구조분석에 의하여 완전히 규명되었다 Debromoshermilamine A는 같은 시기에 *Trididemnum* sp.로부터 얻어진 shermilamine B와 동일한 물질임이 확인되어 두 이름이 혼용되고 있다(Cooray et al, 1988). 이후 유사한 물질인 shermilamines C-E 및 cycloshermilamine이 *Cystodytes violatincus*로부터 분리되었는데 모두 세포독성을 나타내며 활성이 탁월한 shermilamine D는 특허가 등록되었다 (Koren-Goldshlager et al, 1998; ibid 2000; Kashman et al, 1999). 이들의 세포독성의 차이는 DNA intercalating 능력의 차이에 기인하는 것으로 추정된다. 이후 유사한 물질인 shermilamines C-E 및 cycloshermilamine이 *Cystodytes violatincus*로부터 분리되었는데 모두 세포독성을 나타내며 활성이 탁월한 shermilamine D는 특허가 등록되었다 (Koren-Goldshlager et al, 1998; ibid 2000; Kashman et al, 1999). 이들의 세포독성의 차이는 DNA intercalating 능력의 차이에 기인하는 것으로 추정된다. Shermilamine과 구조적으로 관련이 있는 계열의 alkaloids인 segoline A, segoline B, isosegoline A, norsegoline, eilatin, debromoshermilamine A 등이 잇달아 홍해에서 채집된 *Eudistoma* sp.로부터 분리되었다 (Rudi et al; 1988; ibid 1988; Rudi & Kashman, 1989). 이들 중에서 segoline A와 eilatin은 x-선 결정구조분석으로 구조가 밝혀졌으며 다른 천연물은 이들과의 분광자료 비교에 의하여 정의되었다.

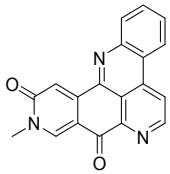
Tunicate *Cystodytes dellechiajei*로부터 추출된 4중고리 alkaloids cystodytins A-C는 모두 강력한 항종양효과를 나타낸다. 이들의 화학적 구조는 분광 자료의 종합적 분석에 의하여 규명되었다(Kobayashi et al, 1988). Varamines A와 B는 *Lissoclinim vareau*로부터 얻어진 항암물질이다(Molinski & Ireland, 1989). 이들의 구조결정은 분광데이타 분석에 더하여 varamine A를 상응하는 iminoquinone으로 변화시킴으로서 완성되었는데 이 iminoquinone은 이후에 diplamine이라는 이름으로 *Diplosoma* sp.로부터 분리되었다 (Charyulu et al, 1989).

Tunicate *Amphicarpa meridiana*로부터 분리된 5중고리 화합물 meridine과 11-hydroxyascididemnin은 강력한 항암 및 항진균 활성을 갖는 것으로 보고되었다 (Schmitz, et al, 1991; McCarthy et al, 1992; Longly, et al, 1993). Meridine은 뒤이어 해면 *Corticium* sp. 로부터도 발견된 바 있다(McCarthy et al, 1992). 최근에 meridine의 분자구조의 우측에 위치한 hydroxypyridine을 변화시킨 25종의 유도체를 합성하여 다양한 항암효과를 측정한 결과 meridine보다 활성이 높은 물질을 다수 발견하여 meridine에 기초한 의약 선도물질의 발굴에 청신호를 보여준 바 있다 (Delfourne et al, 2001).

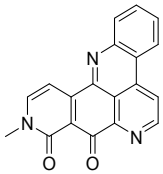


마샬아일랜드 근해에서 채집된 *Cystodytes* sp.로부터 분리된 arnoamines A와 B는 pyridoacridine에 5각형의 pyrrole이 결합된 화합물로서 이러한 탄소골격의 물질로는 최초로 발견된 예이다 (Plubrukan & Davidson, 1998). 이들은 topoisomerase II에 대한 저해활성에 기초한 세포독성을 갖고 있으며 전합성으로 구조가 증명되었다 (Delfourne et al, 2000). 인도네시아에서 채집된 tunicate *Eusynstyela latericius*로부터 분리된 styelsamines 는 암세포에 대하여 중간 정도의 활성을 갖는 것으로 보고되었으며 biomimetic 합성으로 구조가 입증되었다 (Copp et al, 1998; Skyler & Heathcock, 2001).

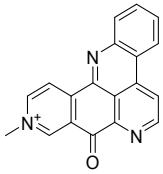
해면동물과 원색동물을 제외한 다른 해양동물에서 acridine alkaloid가 발견된 예는 거의 없으며 보고된 경우에도 주로 이들을 포식하는 prosobranch류의 연체동물에서 발견된 것들인데 예외적인 물질로서는 1940년에 말미잘 (sea anemone) *Calliactes parasitica*로부터 분리된 색소물질 calliactine이다 (Lederer et al, 1940). 이물질의 구조는 아직 완전히 입증된 것은 아니나 분광 데이터 및 화학적 분석에 의하여 acridine alkaloid로 제시된 바가 있다 (Cimino et al, 1987).



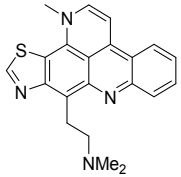
amphimedine



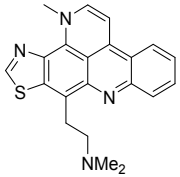
neoamphimedine



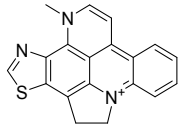
deoxyamphimedine



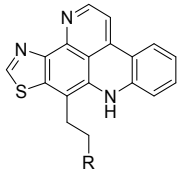
dercitin(original)



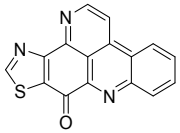
dercitin(revised)



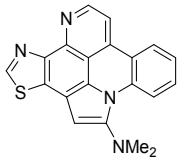
cyclodercitin



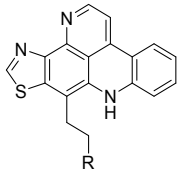
nordercitin (R = $NMe_2$) and
dercitamine (R = NHMe)



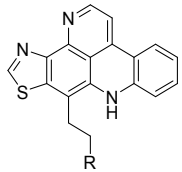
kuanoniamine A



stelletamine



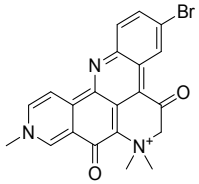
dehydrokuanoniamine B (R = $NHCOCH{=}CMe_2$)
and a derivative from *Oceanapia* sp.(R = $NH_2$)



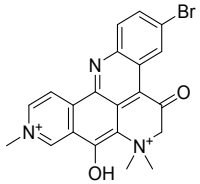
kuanoniamines B(R = $NHCOCH_2CHMe_2$),
C (R = NHCOEt) and D (R = NHCOMe)

Figure 7-1-1. Pyridoacridine alkaloids from marine invertebrates.

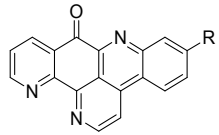




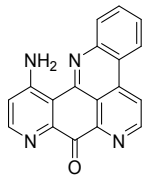
petrosamine



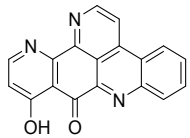
petrosamine B



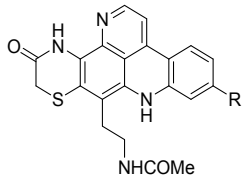
2-bromoleptoclinidinone (R = Br)
and ascididemnin (R = H)



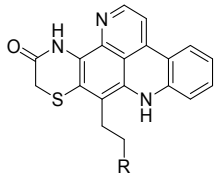
cystodamine
(original)



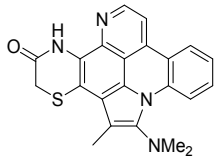
cystodamine
(revised)



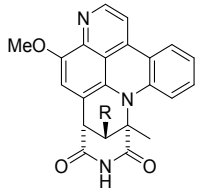
shermilamines A (R = Br)
and B (R = H)



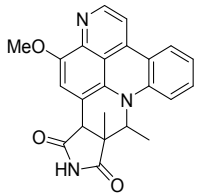
shermilamines C
(R = $NHCOCH{=}CHCMe_2$),
D (R = $NMe_2$),
and E (R = $N(O)Me_2$)



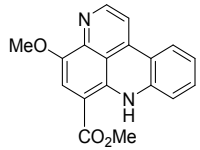
cycloshermilamine



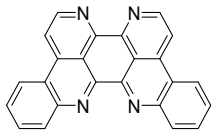
segolines A (R = H)
and B (R = Me)



isosegoline A



norsegoline



eilatin

Figure 7-1-1. Continued.

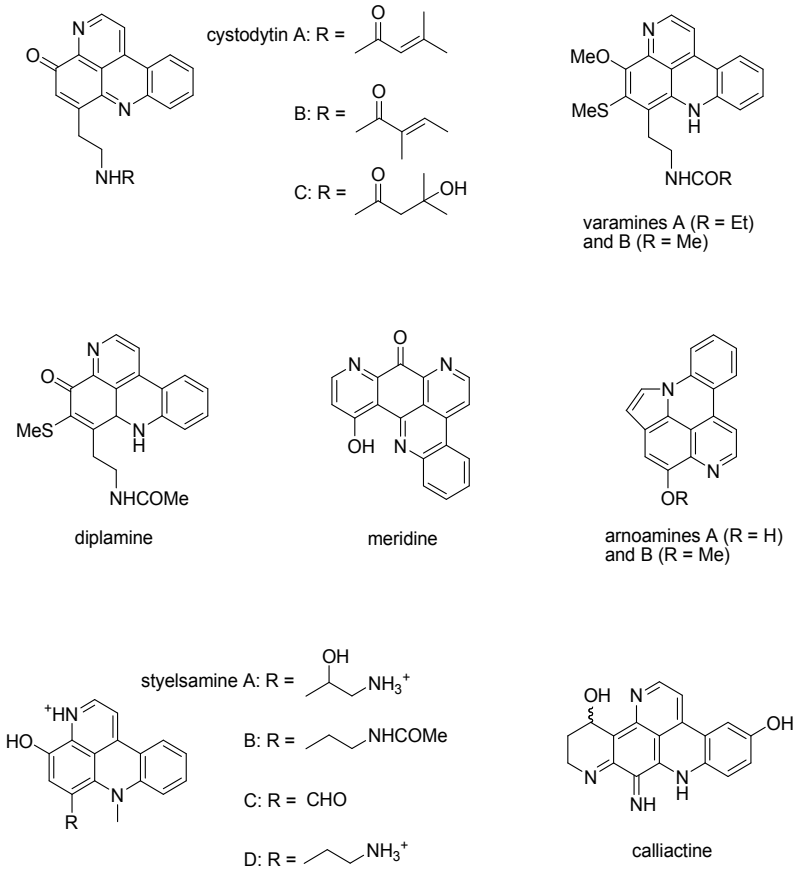



Figure 7-1-1. Continued.



## 나. 천연물의 분리 및 구조결정

본 연구를 위한 시료 *Pellina* sp. (시료번호 VJP-14)는 국제공동연구를 수행하고 있는 미국령 Guam의 Guam 대학 Marine Laboratory의 Valerie J. Paul 교수가 1999년 Guam섬의 Western Shoal 연안에서 직접 채집한 것으로 현장에서 냉동하여 Marine Laboratory에서 동결 건조하여 보관하던 것을 2001년에 항공우송한 것이다.

획득한 시료에 대하여 추출, 분획, HP20 adsorption chromatography, Sephadex LH-20 gel-permeation chromatography, ODS HPLC 등 여러 크로마토그래피 과정을 거쳐 compound 1을 노란색의 무정형 고체 형태로 분리하였다. 이 화합물은 현재까지 분광자료 해석의 한계로 인하여 완전한 구조결정이 이루어지지 못하였으며 몇 종의 가능한 후보구조만 제시된 상태이다. 완벽한 구조결정을 위한 궁극적인 수단인 x-선 결정구조 분석을 위한 결정 형성이 시도중이다. 현재까지의 구조결정 진행상황은 다음과 같다.

Compound 1은 물질의 극성이 매우 높아 대부분의 유기용매에 대한 용해도가 크지 않아 NMR 분석을 DMSO-d6에서 행하였다. 이 화합물의 13C NMR 자료에서 19개의 시그널이 나타났는데 하나의 carbonyl 탄소 (δ 178.4)와 upfield에 위치한 하나의 methyl 탄소 (δ37.8)를 제외한 모든 탄소의 chemical shifts가 δ 160-99에 위치하는 것으로 보아 이 물질의 주된 골격이 aromatic rings임이 드러났다. 13C NMR 스펙트럼과 상응하게 1H NMR 스펙트럼에서도 δ 3.60 (3H, s)에 나타난 하나의 시그널을 제외한 모든 피크가 δ 9.3-7.6 에 나타났다. 이러한 downfield 시그널 모두가 J=6-9 Hz의 doublet 혹은 double-doublet의 형태로 나타난 것은 compound 1이 방향족 화합물이라는 사실을 지지하는 중요한 증거로 생각되었다.

HSQC 스펙트럼에서 화합물에 존재하는 모든 수소와 이들 수소를 가진 탄소간의 direct H-C correlation이 명확히 드러났다. 이 정보를 바탕으로 1H COSY 스펙트럼을 해석한 결과 δ 8.36, 8.06, 7.97, 8.98에 위치한 4개의 수소가 서로 연결된 ortho-disubstituted phenyl 기의 존재가 드러났다. 그리고 δ 9.26 과 9.01에 위치한 두 수소 및 δ 8.35와 7.66 의 수소가 직접 연결되어 있음이 밝혀졌다. HMBC 스펙트럼에서는 long-range correlations에 의하여 전기한 ortho-disubstituted phenyl ring을 이루는 나머지 두 탄소의 위치가 d 144.7 및 122.3으로 지정되었다 (Figure 7-1-2).

한 편 δ 147.2, 136.8, 117.5에 위치한 세 개의 quaternary 탄소들은 모두 δ 9.26 과 9.01에 나타난 수소들 중의 하나 혹은 모두와 long-range correlations을 나타내어 이들이 하나의 H-C spin system을 이루고 있음이 드러났다. 특히 δ 147.2의 탄소는 δ 9.26의 수소와 correlation을 보여주었는데 이들 탄소의 낮은 chemical shift (δ 9.26의 수소가 결합된 탄소의 위치는 HSQC 스펙트럼에서 δ 150.1로 지정)는 이들 사이에 하나의 질소원자

가 존재한다는 사실 즉 이들이 1,2,3-trisubstituted pyridine의 부분구조를 이루고 있다는 사실을 드러내었다. 이 pyridine과 전기한 benzene ring과의 연결은 두 부분구조에 위치한 δ136.8과 122.3의 탄소가 각각 δ 8.98 및 9.01의 수소와 long-range correlation을 이룸으로서 pyridine의 C-3 위치와 benzene의 ortho 위치가 직접 결합하는 것으로 결정되었다.

HMBC 스펙트럼에서 δ 158.5, 148.2, 119.2 의 세 quaternary 탄소들은 δ 8.35 및 7.66의 두 수소의 하나 혹은 모두와 long-range correlations을 이루어 이들이 서로 연결되어 있음을 보여주었다. 특히 H-C correlations 상에서 마주보고 있는 두 탄소인 δ 158.5와 146.1 (δ 8.35의 수소가 접합된 탄소)의 낮은 chemical shifts는 이들 사이에 질소로 추정되는 hetero atom이 위치하여 하나의 pyridine 고리를 이루고 있음을 의미하였다. 이 pyridine의 C-3에 해당하는 δ 148.2의 quaternary 탄소의 낮은 chemical shift로 미루어 이 탄소에 OH 혹은 NH2 등과 같은 electron withdrawing group이 접합되어 잇는 것으로 추정되었다. 마지막으로 δ 3.60에 나타난 methyl 수소는 pyridine의 C-1 및 C-5에 각각 해당하는 δ 146.1, 158.5 의 탄소들과 long-range correlations를 나타내어 유일하게 가능한 접합위치인 pyridine의 질소에 접합된 것으로 해석되었다. 이 해석을 지지하는 유력한 증거는 NOESY 실험에서 δ 3.60의 methyl proton과 δ 8.35의 H-1 사이에 나타난 spatial proximity 이었다. 이와 같이 이 pyridine은 3-substituted-N-methyl- pyridinium의 염으로 추정되었다. 그러나 δ 158.5의 탄소와 δ 148.2의 탄소의 작용기가 뒤바뀐 2-substituted-N-methyl-pyridinium의 가능성도 완전히 배제할 수는 없다 (Figure 7-1-2).



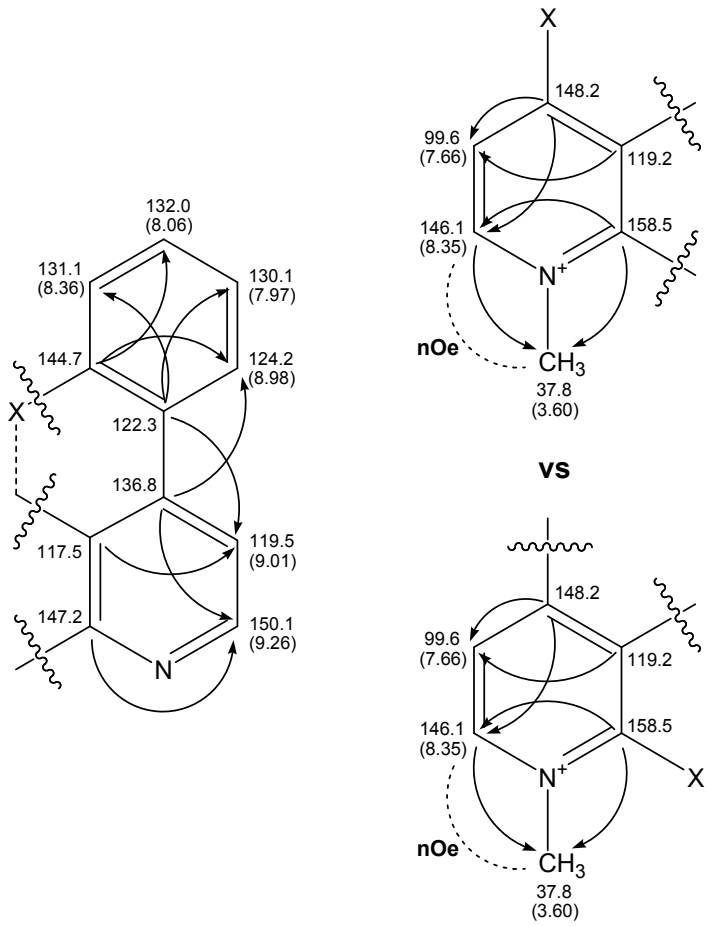



Figure 7-1-2. Partial structures of compound 1 based on HMBC analysis.

13C NMR 스펙트럼에서 현재까지 미지정된 탄소는 δ 178.4와 147.6에 위치한 두 개의 quaternary carbons 이었다. 이들은 어떤 수소와도 거리가 멀어 아무런 스펙트럼 상에서의 correlations가 나타나지 않아 부득이 문헌조사를 하여 유사한 물질과의 chemical shifts의 비교를 하였다. 그 결과 전기한 pyridophenyl기를 가진 물질은 해면을 비롯한 해양동물에서 발견되는 pyridoacridine이 유일하여서 δ 147.6의 탄소는 pyridoacridine의 중앙 고리에 위치한다는 것을 추론하였다 (Figure 7-1-2).

그러나 기존의 보고된 pyridoacridines에서 나타난 바와 같이 δ 178.4의 carbonyl carbon을 가지는 고리는 두 가지 형태가 가능하고 이에 따라 좌측의 pyridinium의 위치도 변화하게 되어 실제로 가능한 고리의 수는 훨씬 많아지게 된다. 실제로 pyridinium의 가능성과 이들의 acridine에의 접합가능성을 모두 고려한 결과 compound 1의 가능한 구조는 전체적으로 8개로 추론된다 (Figure 7-1-3). 이들 모두가 기존에 보고가 되지 않은 것으로 미루어 compound 1은 신물질로 생각된다. 그러나 문헌조사 결과 이들 여러 가지 가능한 구조를 구분하여 화합물의 실제구조를 완전히 결정지을 분광학적 방법은 x-선 결정구조분석이 유일한 것으로 드러났다. 본 보고서의 서론에서 나타난 바와 같이 보고가 된 pyridoacridines의 상당수가 이후에 전합성이나 x-선 결정구조분석에 의하여 구조가 정정된 것은 모두가 compound 1에서 나타난바와 같이 pyridoacridine고리와 다른 부분구조 사이를 연결지을 합리적 수단이 결여되어 구조를 막연히 추론한데서 기인하는 것이다. 현재 이 문제를 규명하기 위하여 compound 1의 결정 형성을 다양한 조건에서 시도중이다.

한 편 이 화합물의 생리활성을 검색한 결과 놀랍게도 기존의 pyridoacridines의 세포독성이 나타나지 않는 반면에 오히려 세포의 증식을 촉진한다는 새로운 사실이 밝혀졌으며 현재 이를 정량화하는 실험이 진행중이다. X-선 결정구조분석에 의한 compound 1의 완전한 구조와 함께 생리활성은 국제학술지에 투고될 예정이다.



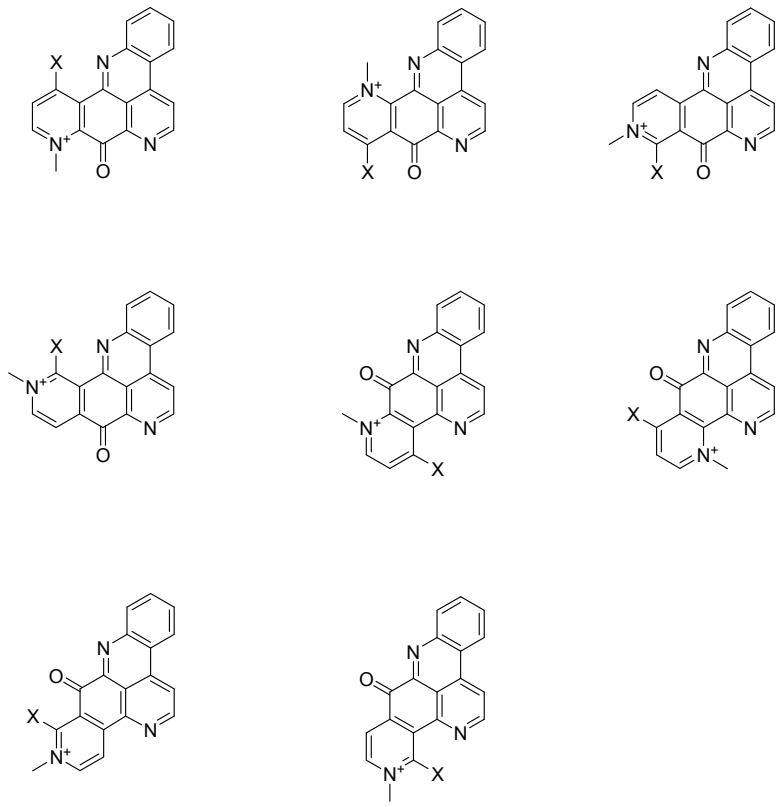


Figure 7-1-3. Possible structures of compound 1.

**다. 실험방법**

(1) 시료의 채집, 동정, 유기물질의 추출과 분획

해면 *Pellina* sp. (시료번호 VJP-14)은 1999년 11월 미국령 Guam 섬 Western Shoal 연안의 수심 20-25 m에서 Guam 대학 Marine Laboratory의 Valerie J. Paul 교수팀에 의하여 SCUBA로 채집되었다. 이 시료는 형태, 색깔, spicule의 모양 및 분포 등 형태학적 특징에 의거하여 현지 전문가에 의하여 중부태평양의 자생종인 *Pellina* sp.로 동정되었으며 현재 그 표본은 Guam대학 Marine Laboratory의 해면동물 표본실에 보존되어 있다.

채집된 시료는 현지에서 즉시 냉동되어 보존되었으며 후에 동결 건조(건조 중량 65 g), 분쇄 등의 일반적인 전처리 과정을 거친 후 항공으로 배달되었다. 동결건조된 시료에 대하여 MeOH(1 L x 2)와 $CH_2Cl_2$ (1 L x 2)로 반복하여 유기물질을 추출하였다. 추출액을 합한 후 용매를 감압건조하여 얻어진 잔류물(19.1 g)을 물과 $CH_2Cl_2$ 분획을 이용하여 비극성 스테로이드와 지질을 제거하였다.

(2) 천연물의 분리정제

Proton NMR 스펙트럼 상에서 흥미로운 peak가 나타난 물층 (16.4 g)에 대하여 HP-20 adsorption chromatography를 하였다. 용출 용매의 순서는 물, 50% aqueous MeOH, 50% aqueous acetone, MeOH, acetone을 각 300 mL 씩 사용하였다. 50% Aqueous acetone 층 (250 mg)에 대해서 Sephadex LH-20 gel-permeation 크로마토그래피(용리액; hexane: $CH_2Cl_2$: MeOH = 2:3:5)를 하여 용출된 순서대로 6개의 분획(fraction;fx)으로 나누었다. 수소 NMR 검색과 fx-1에 유의한 물질이 함유된 것이 드러나 이 분획에 대하여 semi-preparative 역상 HPLC (YMC-ODS-A column, 35% aqueous MeOH, UV detector, 297 nm)를 하여 용출시간 16.9분에서 compound 1을 획득하였다. 최종적인 정제는 역상 HPLC (25% aqueous MeOH)로서 이루어졌는데 분리된 물질의 양은 17.9 mg 이었다.

Compound 1: 1H NMR (DMSO-d6) δ 9.26 (1H, d, J = 5.7 Hz), 9.01 (1H, d, J = 5.7 Hz), 8.98 (1H, d, J = 8.3 Hz), 8.36 (1H, d, J = 7.3 Hz), 8.35 (1H, m), 8.06 (1H, dd, J = 7.3, 6.8 Hz), 7.97 (1H, dd, J = 8.3, 6.8 Hz), 7.66 (1H, d, J = 6.8 Hz), 3.60 (3H, s); 13C NMR (DMSO-d6) δ 178.5 (C), 158.5 (C), 150.1 (CH), 148.2 (C), 147.6 (C), 147.2 (C), 146.1 (CH), 144.7 (C), 136.8 (C), 132.0 (CH), 131.1 (CH), 130.1 (CH), 124.2 (CH), 122.3 (C), 119.5 (CH), 119.2 (C), 117.5 (C), 99.6 (CH), 37.8 (CH3).



## 3. 결 론

해양생물공학이 미래의 생물산업과 정밀화학산업의 주요한 원천임은 주지의 사실이다. 생물공학의 한 가지 요소로서 해양생물의 체내 생화학적 제반 과정에 의하여 합성되는 천연물에 대한 연구는 해양생물의 산업적 이용뿐만 아니라 여러 관련 기술분야의 연구에 미치는 영향이 실로 막대하다. 이러한 천연물연구에서는 항상 물질에 대한 효과적인 분리정제과정과 활성물질의 실체를 규명하는 탐색과정이 선행되어야 하며 모든 천연물의 응용화, 산업화 과정은 이러한 탐색의 기초 위에 존재하는 것이다.

해양천연물연구에 있어서 해면동물은 신물질의 발견빈도, 생리활성물질의 비율, 생합성적 기원과 탄소골격의 다양함 등 모든 측면에 있어서 여타의 생물들을 압도하고 있으며 이들은 모두 육상의 주요 생물군에 비해서도 전혀 손색이 없는 실로 신물질의 보고 역할을 충실히 하고 있어서 국내외를 막론하고 전세계 주요연구진의 가장 중요한 연구대상이다. 본 연구에서는 비록 우리나라의 자생생물은 아니지만 천연물의 보고인 열대해역의 1종의 해면동물로부터 1종의 생리활성 신물질을 분리하여 화학적 구조를 정의하게 된 것은 해면동물의 천연물화학적 중요성을 여실히 증명한 것으로 사료되며 향후에도 이러한 연구가 보다 광범위하고 지속적으로 수행될 필요성을 보여준 것으로 생각된다.

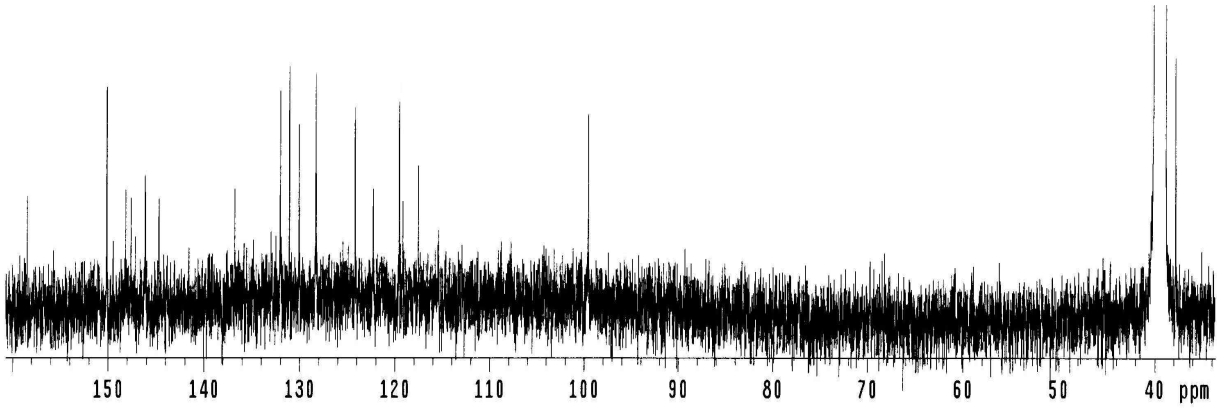



Figure 7-1-4. 13C NMR spectrum of compound 1.



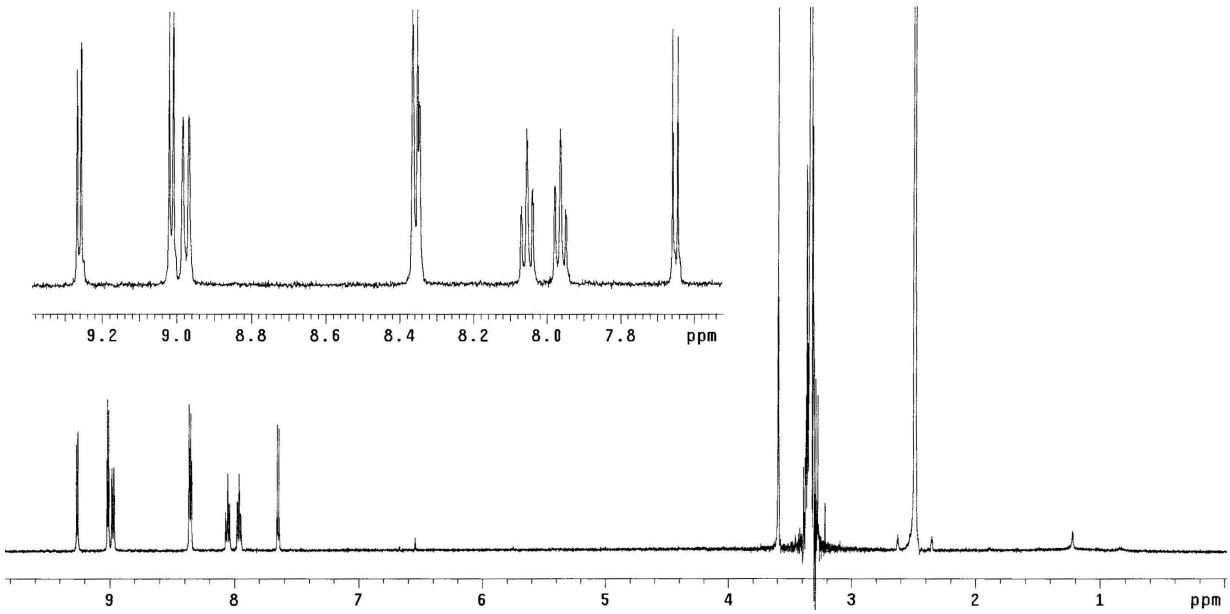



Figure 7-1-5. 1H NMR spectrum of compound 1.

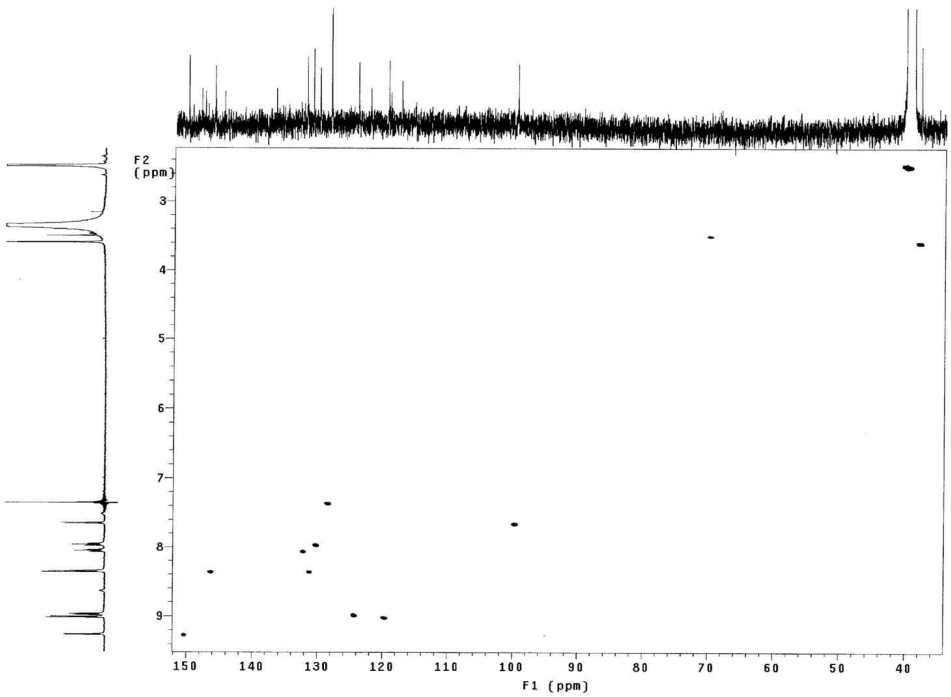



Figure 7-1-6. HSQC spectrum of compound 1.



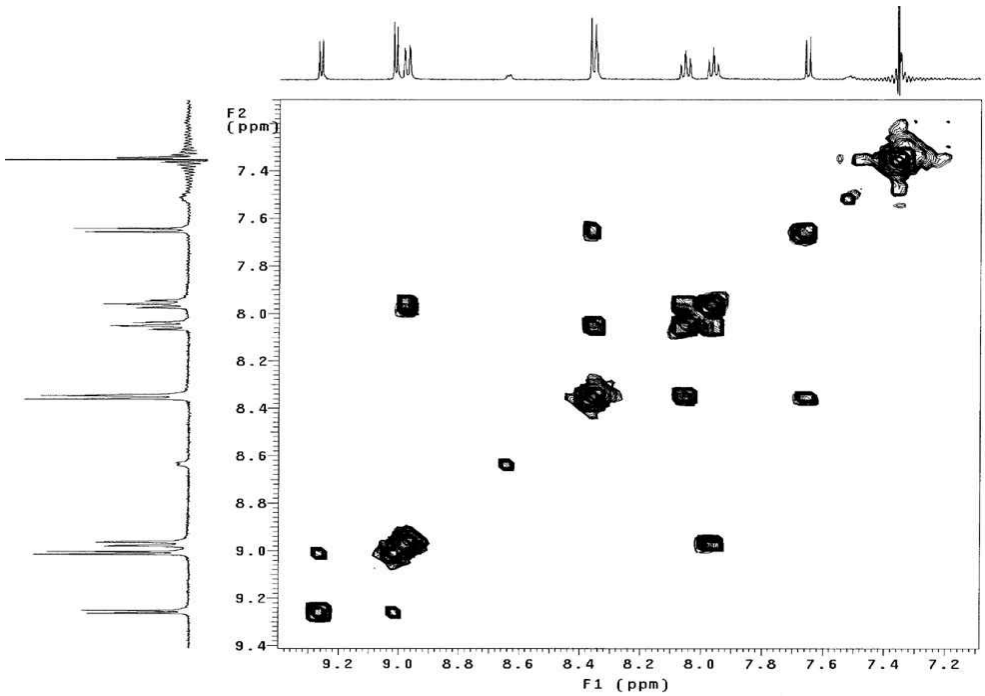



Figure 7-1-7. 1H COSY spectrum of compound 1.

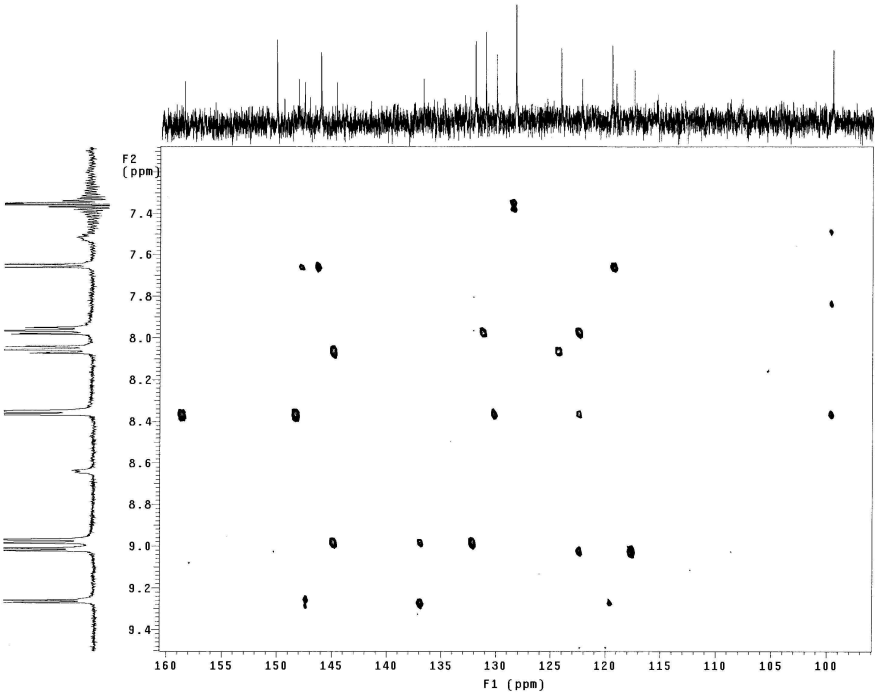



Figure 7-1-8. HMBC spectrum of compound 1 (downfield region).



## 4. 참고문헌


신종헌, 정지형, 서영완, 백은주, 해양동물의 천연물에 관한 연구 (문헌중심), 한국해양연구소 1993, 417 pp.

한국해양연구소, 한국근해 저서군체생물로부터 신물질 추출연구, 과학기술처 1994, 340 pp.

Attaway, D. H.; Zaborsky, O. R. Eds. Marine Biotechnology; Plenum Press, New York, 1993, 500 pp.

Bergquist, P. R.;Wells, R. J. Chemotaxonomy of the Porifera: The Development and Current Status of the Field, In Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives, Scheuer, P. J. Ed. Vol V. Academic Press; New York, 1983, 1 pp.

Bewley, C. A.; Holland, N. D.; Faulkner, D. J. Experientia 1996, 52, 716.

Bloor, S. J.; Schmitz, F. J. J. Am. Chem. Soc. 1987, 109, 6134.

Bontemps, N.; Bonnard, I.; Banaigs, B.; Combaut, G.; Francisco, C. Tetrahedron Lett. 1994, 38, 7023.

Bracher, F. Heterocycles 1989, 29, 2093.

Carroll, A. R.; Ngo, A.; Quinn, R. J.; Redburn, J.; Hooper, J. N. A. J. Nat. Prod. 2005, 68, 804.

Carroll, A. R.; Scheuer, P. J. J. Org. Chem. 1990, 55, 4426.

Charyulu, G. A.; McKee, T. C.; Ireland, C. M. Tetrahedron Lett. 1989, 30, 4201.

Cimino, G.; Crispino, A.; de Rosa, S.; de Stefano, S.; Gavagnin, M.; Sodano, G. Tetrahedron 1987, 43, 4023.

Cooray, N. M.; Scheuer, P. J.; Parkanyi, L; Clardy, J. J. Org. Chem. 1988, 53, 4619.

Copp, B. R.; Jompa, J.; Tahir, A.; Ireland, C. M. J. Org. Chem. 1998, 63, 8024.

D'Auria, M. V.; Minale, L.; Riccio, R. Chem. Rev. 1993, 93, 1839.

De Guzman, F. S.; Carte, B.; Troupe, N.; Faulkner, D. J.; Harper, M. K.; Concepcion, G. P.; Mangalindan, G. C.; Matsumoto, S. S.; Barrows, L. R.; Ireland, C. M. J. Org. Chem. 1999, 64, 1400.

De Guzman, F. S.; Schmitz, F. J. Tetrahedron Lett. 1989, 30, 1069.

Delfourne, E.; Bastide, J. Med. Res. Rev. 2003, 23, 234.

Delfourne, E.; Bontemps-Subielos, N.; Bastide, J. Tetrahedron Lett. 2000, 41, 3863.

Delfourne, E.; Darro, F.; Bontemps-Subielos, N.; Decaestecker, C.; Bastide, J.; Frydman, A.; Kiss, R. J. Med. Chem. 2001, 44, 3275.

Delfourne, E.; Roubin, C.; Bastide, J. J. Org. Chem. 2000, 65, 5476.

Ding, Q.; Chichak, K.; Lown, J. W. Current Med. Chem. 1999, 6, 1.

Echavarren, A. M.; Stille, J. K. J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, 4051.

Eder, C.; Schupp, P.; Proksch, P.; Wray, V.; Steube, K.; Muller, C. E.; Frobenius, W.; Herderich, M.; Van Soest, W. M. J. Nat. Prod. 1998, 61, 301.

Faulkner, D. J. Nat. Prod. Rep. 2002, 19, 1 and references cited therein.

Fautin, D. G. Ed. Biomedical Importance of Marine Organisms, California Academy of Sciences; San Francisco, 1988, 159 pp.

Fenical, W. Concluding Remark, In Biomedical Importance of Marine Organisms, Fautin, D. G. Ed., California Academy of Sciences; San Francisco, 1988, 159.

Fusetani, N.; Matsunaga, S.; Matsumoto, H.; Takebayashi, M. J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 7053.

Garson, M. J. Chem. Rev. 1993, 93, 1699.

Giner, J.-L. Chem. Rev. 1993, 93, 1735.

Gunamardana, G. P.; Koehn, F. E.; Lee, A. Y.; Clardy, J.; He, H. Y.; Faulkner, D. J. J. Org. Chem. 1992, 57, 1523.

Gunasekera, S. P.; Gunasekera, M.; Longley, R. E. J. Org. Chem. 1991, 56, 1346.

Gunatilaka, A. A. L.; Gopichand, Y.; Schmitz, F. J.; Djerassi, C. J. Org. Chem. 1981, 46, 3860.

Gunawardana, G. P.; Kohmoto, S.; Burres, N. S. Tetrahedron Lett. 1989, 30, 4359.

Gunawardana, G. P.; Kohmoto, S.; Gunasekera, S. P.; McConnell, O. J.; Koehn, F. E. J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, 4856.

Haslam, E. Nat. Prod. Rep. 1986, 3, 217.

Hattori, T.; Adachi, K.; Shizuri, Y. J. Nat. Prod. 1997, 60, 411.

Hirata Y.; Uemura, D. Pure Appl. Chem. 1986, 58, 701.

Ireland, C. M.; Roll, D. M.; Molinski, T. F.; McKee, T. C.; Zabriskie, T. M.; Swersey, J. C. Uniqueness of the Marine Chemical Environment: Categories of Marine Natural Products from Invertebrates, In Biomedical Importance of Marine Organisms; Fautin D. G. Ed. California Academy of Sciences: San Francisco, 1988, 41 pp.

Kitahara, Y.; Tamura, F.; Kubo, A. Tetrahedron Lett. 1998, 54, 8421.

Kobayashi, J.; Cheng, J.; Nakamura, H.; Ohizumi, Y.; Hirata, Y.; Sasaki, T.; Ohta, T.; Nozoe, S. Tetrahedron Lett. 1988, 29, 1177.



Kobayashi, J.; Cheng, J.; Wa'lchli, M. R.; Nakamura, H.; Hirata, Y.; Sasaki, T.; Ohta, T.; Ohizumi, Y. J. Org. Chem. 1988, 53, 1800.

Koren-Goldshlager, G.; Aknin, M.; Gaydou, E. M.; Kashman, Y. J. Nat. Prod. 2000, 63, 830.

Koren-Goldshlager, G.; Aknin, M.; Gaydou, E. M.; Kashman, Y. J. Org. Chem. 1998, 63, 4601.

Lederer, E.; Teissier, G.; Hutter, C. Bull. Soc. Chim. Fr., Mem. 1940, Ser. 5, Vol 7, p 608.

Longley, R. E.; McConnell, O. J.; Essich, E.; Harmody, D. J. Nat. Prod. 1993, 56, 915.

Manes, L. V.; Crews, P.; Kernan, M. R.; Faulkner, D. J.; Fronczek, F. R.; Gandour, R. D. J. Org. Chem. 1988, 53, 570.

Manes, L. V.; Naylor, S.; Crews, P.; Bakus, G. J. J. Org. Chem. 1985, 50, 284.

Matsumoto, S. S.; Sidford, M. H.; Holden, J. A.; Barrows, L. R.; Copp, B. R. Tetrahedron Lett. 2000, 41, 1667.

McCarthy, P. J.; Pitts, T. P.; Gunawardana, G. P.; Kelly-Borges, M.; Pomponi, S. A. J. Nat. Prod. 1992, 55, 1664.

McDonald, L. A.; Eldridge, G. S.; Barrows, L. R.; Ireland, C. M. J. Med. Chem. 1994, 37, 3819.

Molinski, T. F. Chem. Rev. 1993, 1825.

Molinski, T. F.; Fahy, E.; Faulkner, D. J.; Van Duyne, G. D.; Clardy, J. J. Org. Chem. 1988, 53, 1340.

Molinski, T. F.; Ireland, C. M. J. Org. Chem. 1989, 54, 4256.

Müller, E.; Faulkner, D. J. Tetrahedron 1997, 53, 5373.

Nakanishi, K.; Solomon, P. H. Infrared Absorption Spectroscopy, 2nd ed. Holden-Day, San Francisco, 1977, 287 pp.

Narahashi, T. Marine Organisms as Models for the Study of Neuropharmacology In Fautin, D. G. Ed. Biomedical Importance of Marine Organisms, California Academy of Sciences; San Francisco, 1987, 97 pp.

Nicholas, G. K.; Eckman, L. L.; Ray, S.; Hughes, R. O.; Pfefferkorn, J. A.; Barluenga, S.; Nicolaou, K. C.; Bewley, C. A. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2002, 12, 2487.

Paul, P. J. Marine Chemical Ecology and Natural Products Research. In Biomedical Importance of Marine Organisms, Fautin, D. G. Ed. California Academy of

Sciences; San Francisco, 1987, 23 pp.

Pawlik, J. R. Chem. Rev. 1993, 93, 1911.

Pettit, G. R.; Cichacz, Z. A.; Gao, F.; Herald, C. L.; Boyd, M. R.; Schmidt, J. M.; Hooper, J. N. A. J. Org. Chem. 1993, 58, 1302.

Plubrukan, A.; Davidson, B. S. J. Org. Chem. 1998, 63, 1657.

Prager, R. H.; Tsopelas, C. Heterocycles 1989, 29, 847.

Rinehart, K. L. Screening to Detect Biological Activity, In Biomedical Importance of Marine Organisms, Fautin, D. G. Ed. California Academy of Sciences; San Francisco, 1987, 13 pp.

Rudi, A.; Benahayu, Y.; Goldberg, I.; Kashman, Y. Tetrahedron Lett. 1988, 29, 3861.

Rudi, A.; Benahayu, Y.; Goldberg, I.; Kashman, Y. Tetrahedron Lett. 1988, 29, 6655.

Rudi, A.; Kashman, Y. J. Org. Chem. 1989, 54, 5331.

Schmitz, F. J.; Agarwal, S. K.; Gunasekera, S. P.; Schmidt, P. G.; Shoolery, J. N. J. Am. Chem. Soc. 1983, 105, 4835.

Schmitz, F. J.; De Guzman, F. S.; Hossain, M. B.; van der Helm, D. J. Org. Chem. 1991, 56, 804.

Skyler, D.; Heathcock, C. H. Org. Lett. 2001, 3, 4323.

Suffness, M.; Thompson, J. E. National Cancer Institute's Role in the Discovery of New Antineoplastic Agents In Fautin, D. G. Ed. Biomedical Importance of Marine Organisms, California Academy of Sciences; San Francisco, 1987, 151 pp.

Tasdemir, D.; Marshall, K. M.; Mangalindan, G. C.; Conception, G. P.; Barrows, L. R.; Harper, M. K.; Ireland, C. M. J. Org. Chem. 2001, 66, 3246.

Taylor, P.; Culver, P.; Abramson, S.; Wasserman, L.; Kline, T.; Fenical, W. Use of Selective Toxins to Examine Acetylcholine Receptor Structure In Fautin, D. G. Ed. Biomedical Importance of Marine Organisms, California Academy of Sciences; San Francisco, 1987, 109 pp.

Tsujii, S.; Rinehart, Jr., K. L.; Gunasekera, S. P.; Kashman, Y.; Cross, S. S.; Lui, M. S.; Pomponi, S. A.; Diaz, M. J. Org. Chem. 1988, 53, 5446.

Unson, M. D.; Faulkner, D. J. Experientia 1993, 49, 349.

Wright, A. E.; McCarthy, P. J.; Schulte, G. K. J. Org. Chem. 1989, 54, 3472.

Zabriskie, T. M.; Klocke, J. A.; Ireland, C. M.; Marcus, A. H.; Molinski, T. F.; Faulkner, D. J.; Xu, C.-F.; Clardy, J. J. Am. Chem. Soc. 1986, 108, 3123.

# 제 8 장 위탁과제 2

해양미세조류의 항산화 물질 개발을 위한 생명공학적 연구

진언선

한양대학교

제 출 문

한국해양연구원장 귀하

본 보고서를 “ 해양미세조류의 항산화 물질 개발을 위한 생명공학적 연구”과제의 (최종)보고서로 제출합니다.

2005. 12 .

위탁연구기관명 : 한양대학교

위탁연구책임자 : 진언선

요 약 문

Ⅰ. 제 목

해양미세조류의 항산화 물질 개발을 위한 생명공학적 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

심화되는 환경오염과 각종 스트레스에 의해 발생되는 활성산소의 양이 크게 증가하게 되고 외부에서 공급되는 항산화물질의 요구는 더욱 더 커지게 되었다. 세계적으로 미세조류의 색소를 이용한 항산화물질 개발 연구는 활발하며, 크산토필, 베타카로텐 등과 같은 색소를 이용한 항산화제 개발 연구는 시장성이 증가하고 있다. 그러나 개발가능한 미세조류의 탐색 및 보존 기술 및 생화학적/유전학적 연구가 부족하여 만족할 만한 연구결과를 얻기 어려우며, 특히 함량증진을 위한 생리학적, 분자생물학적 연구는 극히 일부종에서만 이루어져 있다. 따라서 항산화제 생성을 위한 미세조류의 유전공학적, 대사공학적 기법의 정립 및 활용은 최근의 microalgal biotechnology에 있어서 가장 중요한 연구분야 중의 하나로 인식되고 있다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

해양미세조류 유래 항산화제를 탐색하였으며 항산화제 생합성 유전자 분리 및 항산화 단백질 유전자 분리를 위해 돌연변이 유도와 형질전환을 위한 벡터 개발 및 항산화유도조건에서 배양된 미세조류에서 EST를 제작분석하여 항산화관련 유전자 DB를 확보, 얻은 항산화관련 유전자를 E. coli 내에서의 발현을 유도한 후 정제하여 활성을 측정하고 대량배양의 가능성을 타진하였다.

Ⅳ. 연구개발결과

10여종의 해양미세조류를 무균 단일 배양하여
먼저 항산화 기능이 우수하고 잔토필(xanthophyll) 함량이 높은 미세조류 Dunalliela와 Chlamydomonas를 비교 분석하였다. 미세조류 Chlamydomonas를 이용한 형질전환이 진행되어 mutant library 구축하였다.



항산화 유도조건 (고광도)에서 배양한 대상 미세조류의 EST DB를 구축하기위해 D. salina의 cDNA를 제작하였으며 EST를 1000개 이상 구축 및 분석하였는데, 항산화관련 유전자를 모아 활성산소를 제거해주는 효소 중 상업적으로 활용 가능한 SOD(superoxide dismutase) 유전자(cDNA)를 클로닝하였다. Fe SOD orf를 pET와 pMal 등의 expression vector에 클로닝하여 대장균에서 발현시킨 후 SOD를 시험관 내외에서 항산화활성을 측정하였다. E. coli에서 발현된 Fe-SOD의 순화 정제 및 항산화 활성 분석결과 구입한 항산화효소 (CuZn SOD)와 비교했을때도 발현된 재조합 Fe-SOD 활성이 매우 우수하였다. 1L 배양 시 Fresh weight 14.45g/L, 34.8mg total protein/L, Expressed Fe-SOD 15.7mg protein/ L의 수율을 얻을 수 있었다. 발현된 항산화 단백질의 안정성연구결과는 온도 및 glycerol의 첨가 효과에 대한 활성변화 실험으로 Fe-SOD가 열 스트레스 조건에서 10-15%의 활성을 잃어버리긴 해도 글리세롤 첨가로 열 스트레스에 대한 활성저해를 회복시켰다.

Ⅴ. 연구개발결과의 활용계획

발현단백질의 온도 및 글리세롤첨가 결과는 화장품의 보습효과를 위해 첨가되는 글리세롤과 같은 다량의 화학물질과 온도 반응에서도 활성을 잃지 않고 오히려 온도에 대한 민감성을 극복해 줄 수 있다는 자료를 제공해 주고 있어 화장품 및 항산화 패취등으로의 활용가능성을 보여주고 있다. 따라서 화장품 및 항산화 제품으로의 용도에 활용될 수 있다.

Key wards: 미세조류, EST,녹조류, 항산화제, Fe-SOD

S U M M A R Y 및 KEYWORDS

Recently, increased environmental pollution and various stresses resulted in the generation of the reactive oxygen species. Therefore the demand of external antioxidant are largely increased. Since, the result of research suggested that antioxidant and antioxidant proteins are very effective on protection of aging and disease. Therefore, the research related to antioxidant has been investigating in worldwide. However, only a few study has been attempted to begin the research of microalgal antioxidant. Microalgae are abundant in marine and fresh water habitats, and attractive for commercial exploitation, because they grow fast, require rich organic supplements for growth. They can produce natural products such as pigments, enzymes, unique fatty acids, antioxidant, vitamins, etc.
In this study, 10 species of microalgae were obtained either from culture collection or donated. They were cleaned and mono-cultured. From these microalgae, Chlamydomonas reinharditt was investigated to improve antioxidant activity by insertional mutation. One of mutant showed the increased amount of antioxidant pigment such as xanthophyll in the cell. In addition, light stressed Dunaliella salina was subjected to generate EST (expressed sequence tag). Among the 1000 EST, the group of anti-oxidant protein genes were analyzed, and the Fe-SOD was cloned and expressed in E. coli. Activity of the antioxidant recombinant protein was assayed and compared with the commercial anti-oxidant enzyme. During the pilot experiment, 34.8mg/L, total protein was yielded and 15.7mg Fe-SOD recombinant protein/ L was resulted. The stability of Fe-SOD was further examined. When the recombinant Fe-SOD was treated with 30oC for 1hr, activity of Fe-SOD was decreased by 85% of control, which means relatively stable, however, the addition of 25% of glycerol can fully recover the activity of recombinant Fe-SOD. From these results, E. coli expressed microalgal antioxidant protein shows possibility of application in the field of cosmetic industry, such as antioxidant cosmetics.

Key wards: microalgae, EST, green algae, antioxidant, Fe-SOD



## 1. 서론

생명공학산업의 하나인 해양바이오테크놀로지분야의 개발과 참여는 단순히 세계화추세에 따라가는 것이 아닌 선도할 수준의 기술적 진보가 필요하다. 해양미세조류를 탐색하여 개발하여 산업화하려는 항산화제의 연구는 유용물질을 지니는 미세조류의 탐색과 보존, 생화학적 유전학적 연구를 토대로 이물질 생산의 극대화를 도모하며 또한 생명공학적인 방법을 통한 변종과 품종개발을 통해 신물질 생산의 최대화를 유도함으로써 산업화의 기틀을 잡고, 대량생산을 위한 발효공학 또는 광발효공학 등의 분야에 대한 연구기술도 촉발할 수 있는 총체적인 기술적 발전을 신장할 수 있는 연구과제라 할 수 있다.

문명이 발달하고 생활이 윤택할수록 질병과 노화로부터 해방되고 싶은 인간의 욕구와 비례하여 노화와 질병예방과 연관된 항산화제의 개발은 세계적으로 경쟁력있는 연구분야로 활발한 연구가 진행되고 있다. 항산화제의 치료효과의 예는 혈관내피세포를 강화시키고 저밀도 콜레스테롤 생성을 방지, 고혈압·심장병·뇌졸중등 순환기질환을 예방·치료한다는 것 이외에도 면역기능의 강화로 자연살해세포나 T임파구와 같은 면역세포를 증강시켜 병에 대한 저항력을 키우고 콜라젠과 같이 인대등을 구성하는 결체조직이 유해산소에 손상되는 것을 차단하며, 퇴행성관절염 등을 예방하는 기능등 많은 임상 자료들이 보고되어있다. 따라서 이분야의 연구는 생명 연장등의 질적인 삶의 영위를 추구하는 현대인의 사회생활에 안정과 안녕을 보장할 수 있겠다.

활성산소는 세포의 호흡과정에서 생성되며 세포내 모든 소기관 및 구성성분과 반응하여 세포의 기능을 파괴시키고 최종적으로는 세포의 사멸을 유도할 수 있는 물질이다. 세포내에서는 활성산소의 제거를 위해 superoxide dismutase, catalase, peroxidase 등과 같은 항산화 효소뿐만 아니라 ascorbic acid, tocopherol, carotenoid 등과 같은 항산화물질을 합성 하고 있다. 그러나 심화되는 환경오염과 각종 스트레스에 의해 발생되는 활성산소의 양이 크게 증가하게 되고 외부에서 공급되는 항산화물질의 요구는 더욱 더 커지게 되었다. 세계적으로 미세조류의 색소를 이용한 항산화물질 개발 연구는 활발하며, 크산토필, 베타카로텐 등과 같은 색소를 이용한 항산화제 개발 연구는 시장성이 증가하고 있다. 그러나 개발 가능한 미세조류의 탐색 및 보존기술 및 생화학적/유전학적 연구가 부족하여 만족할 만한 연구결과를 얻기 어려우며, 특히 함량증진을 위한 생리학적, 분자생물학적 연구는 극히 일부종에서만 이루어져 있다. 따라서 항산화제 생성을 위한 미세조류의 유전공학적, 대사공학적 기법의 정립 및 활용은 최근의 microalgal biotechnology에 있어서 가장 중요한 연구 분야 중의 하나로 인식되고 있다.

현대생활이 윤택해짐에 따라 노화를 방지하기 위한 항산화제에 대한 요구가 증대되고 있다. 이에 대응하여 극한 환경에서 살아남기 위한 전략으로 우수한 항산화제를 생산하는 해양미세조류를 발굴하여 산업적으로 이용할 가치가 충분하다. 따라서 해양미세조류의 항산화 물질 개발을 위한 연구를 위해 문헌조사 및 기초 자료를 수집한 후 10여종의 해양미세조류를 탐색하여 항산화 단백질을 분리 및 정제하여 항산화 단백질의 실용화 가능성을 도모하였다. 항산화 단백질의 유전자 분석을 위해 먼저 대상 미세조류의 EST DB를 구축하고 항산화관련 유전자 DB를 분석하여 얻은 항산화관련 유전자를 *E. coli* 내에서의 발현을 유도한 후 정제하여 활성을 측정하고 대량배양의 가능성을 타진하였다.

## 2. 국내외 기술개발 현황

국내의 항산화관련 연구와 생산은 주로 항산화제를 고등식물에서 추출하거나 인공적으로 합성하는 하는 예가 대표적이었다. 외국의 경우는, 미세조류 특유의 천연 항산화제를 개발하여 미세조류의 대량배양을 통해 분리하고 있는 실정이고 대량배양과 수확공법 등 일련의 공정과정도 특허를 출원하고 있다. 또한 특정 항산화물질의 생합성 과정전반에 걸친 유전자를 찾아내어 특허를 걸고 metabolic flow를 제어하여 생산의 극대화할 수 있는 대사공학적인 접근 방법을 시도하여 그 예를 보고하고 있는 실정이다.

국내에서는 미세조류의 대량배양기술도 열악한 형편이고 천연물질의 분리, 정제는 우수하다고 하지만 고가의 공정과정이 경제성문제에 걸려 결국 시판하는 제품은 미국과 일본 등지에서 수입하는 정도이다.

미국의 경우는 미세조류 특유의 천연 항산화제를 미세조류의 대량배양을 통해 분리하고 생산하여 단일 종으로의 단위가격이 2500$/Kg 으로 시장규모는 1.9억불 정도로 연간 8% 성장을 보이고 있다. 그밖에 호주 인도 이스라엘 스페인 일본 등지에서도 미세조류를 이용하여 천연 항산화제의 생산을 시도하고 있다. 이스라엘과 호주등지에서 생산되는 베타카로텐은 해양미세조류인 *Dunaliella*를 대량으로 옥외 배양하여 생산해내고 있으며 이와 같이 자연에서 추출된 천연 제품은 화학적으로 합성된 인공적인 제품에 비하여 시장가에 있어서 합성된 것보다 5배 비싼 가치로 시판되고 있는 현황이다. 합성공정이 천연생산공정보다 경제적으로 나을 것도 없었음에도 천연 (natural) 제품을 선호하는 소비자들의 취향에 초점을 맞추고 있다.



## 3. 연구개발 수행 내용 및 결과

해양미세조류의 항산화 물질 개발을 위한 생명공학적 연구로서 먼저 문헌 조사 및 기초자료를 수집하고 10여종의 해양미세조류를 무균배양을 위해 항생제처리와 계대배양을 하여 1종의 미세조류를 선택하였다. 이 과정에서 10종이상의 우리나라 연근해 및 해외에서 분주 받은 미세조류를 무균 단일 배양하여 차후에 이 미세조류의 지속적 연구에 이용 될 수 있게 하였다.

먼저 항산화 기능이 우수하고 잔토필(xanthophyll) 함량이 높은 미세조류 *Dunalliela*와 *Chlamydomonas*를 비교 분석하였다. 항산화 물질을 분석을 위해 HPLC 와 Specto-photometer를 사용하였다. 미세조류 *Chlamydomonas*를 이용한 형질전환이 진행되어 mutant library 구축하였다. Mutant의 Southern blot 분석과 inverse PCR을 수행하였다. *Dunalliela*는 항산화 유도조건에서 배양하였는데 항산화 유도조건으로 고광도로 산화적 스트레스를 유발하였다. 대상 미세조류의 EST DB를 구축하고 항산화관련 유전자 DB를 분석하여 얻은 항산화관련 유전자를 *E. coli* 내에서의 발현을 유도한 후 정제하여 활성을 측정하고 대량배양 및 실용화 가능성을 도모하는 것이 연구목적이므로 지금까지 *D. salina*의 cDNA를 제작하였으며 EST를 1000개 이상 구축 및 분석하였는데 EST란 *D. salina*의 RNA를 추출하여 cDNA library를 제작하고 무작위로 선별된 cDNA를 한쪽방향으로 염기를 읽어 Gene Bank에 저장되어있는 유전자와 상동관계를 분석함으로써 얻은 정보로 대상 미세조류 유전자의 정체를 예측할 수 있다.

이러한 방법으로 분석된 유전자발현 단편 (EST)을 분류하고 그 가운데 항산화관련 유전자를 모아 활성산소를 제거해주는 효소 중 상업적으로 활용 가능한 SOD(superoxide dismutase) 유전자(cDNA)를 클로닝하였다. 생체내 알려진 SOD 는 6가지로 금속을 함유한 보효소로 Mn Zn Cu Fe등이 결합되어 효소의 활성을 나타내게 되어있다. 본 연구의 방법으로 얻은 SOD는 Fe SOD로 주로 엽록체에서 발현되는 효소이다. Fe SOD orf를 pET와 pMal 등의 expression vector 발현시켜 대장균에서 발현시킨 후 SOD의 시험관 내외의 항산화활성을 측정하였다.

이후 *E. coli*에서 발현된 SOD의 대량배양 조건을 확립하기 위하여 재조합 단백질이 대장균에서 최적으로 발현되는 온도, IPTG의 농도 등의 조건을 정립하였으며 발현 SOD의 활성도를 검증하기위해 상온에서의 활성 및 글리세롤과 같은 첨가제에 대해서도 활성이 유지되는지 실용화 전단계의 실험을 하였다.

가. Chlamydomonas를 이용한 항산화물질 탐색 및 관련 유전자 확보를 위해 Arg gene 이 결핍된 종을 유전자 삽입방법으로 돌연변이를 제작하였다. 성공적으로 삽입된 Arg유전자를 회복한 돌연변이는 Arg이 결핍된 배지에서도 성공적으로 배양이되고 (Figure 8-1-1의 왼쪽) 이렇게 돌연변이된 변이주를 HPLC로 분석한결과 (Figure 8-1-2) 항산화색소의 색소 구성의 변화를 초래하였다.

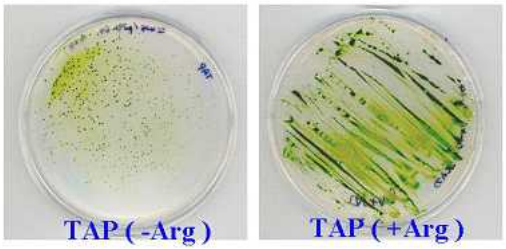



Figure 8-1-1. The development of transformed *Chlamydomonas*



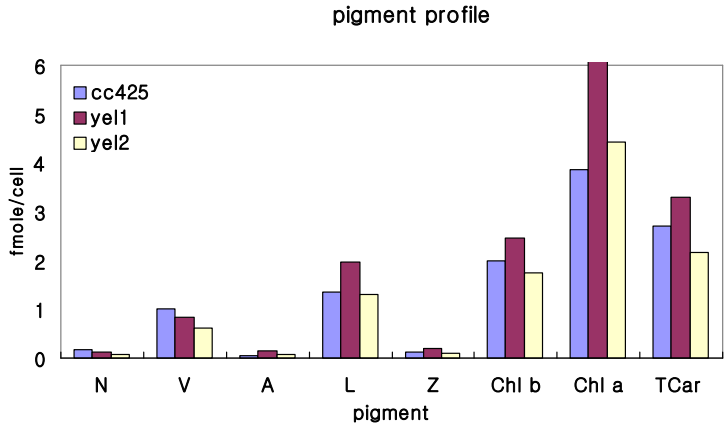



Figure 8-1-2. Analysis of pigment content for the transformed *Chlamydomonas.*

나. *Dunalliela* ESTs data의 분석 결과

- total sequence의 개수 : 1112개
- 분석에 사용된 sequence : 1038개
- consensus sequence : 184개
- singleton sequence : 572개
- 기능을 나타내는 유전자로 추정되는 sequence : 72%
- 가장 높은 비율을 차지하는 sequence : metabolism 관련 유전자 (46%)
- signaling에 관련되는 유전자 : 1%(CBR : carotenoid biosynthesis related등)
- defence 및 항산화 : 4%(SOD 등)
- 기능이 밝혀지지 않은 유전자 : unknown (14%)
- 아직 sequencing 된 적이 없는 유전자 : no hit (2%)

다. *Dunalliela* EST의 기능적 분류

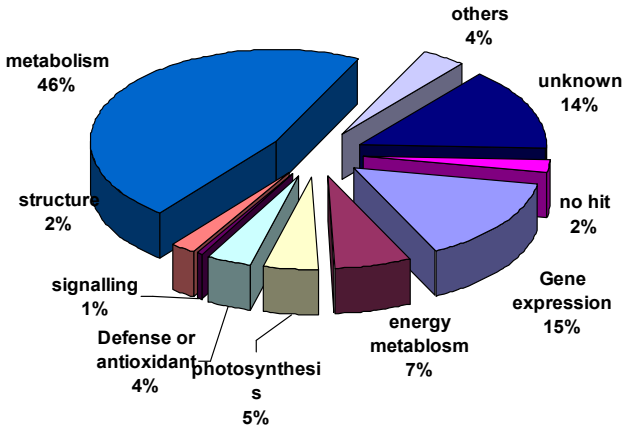



Figure 8-1-3. Funtional classification of *Dunalliela* EST.

라. Fe-SOD가 활성산소를 방출하는 조건에서 유전자발현정도를 알아보는 Northern blot분석결과이다.

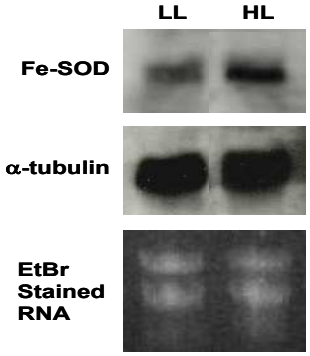



Figure 8-1-4. RNA blot analysis of Fe-SOD. The loading of an equal amount of total RNA in each lane was verified by α-tublin gene probe. The transcription level of SOD was enhanced by light stress.



Figure 8-1-4 의 결과는 Fe-SOD 유전자가 light stress조건에서 발현이 뚜렷하게 증가되는 양상을 보여주고 있다.

마. 미세조류 SOD 유전자를 박테리아 (E. coli)에서 발현시킨 결과 ; 재조합 단백질의 발현정도를 IPTG첨가 여부에 따라 발현정도의 차이를 보여주고 있다.

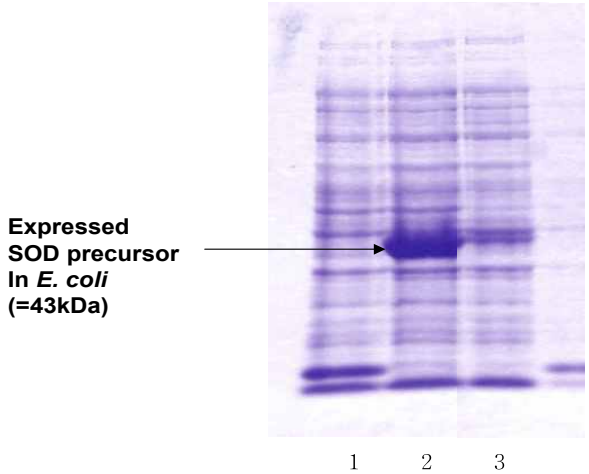



Figure 8-1-5. The expression of recombinant proteins.

1. no insert
2. insert with IPTG induction
3. insert without IPTG induction

바. *E.coli*로부터 Fe-SOD purification 및 항산화 활성 분석 : pyrogallol의 auto-oxidation inhibition 비율

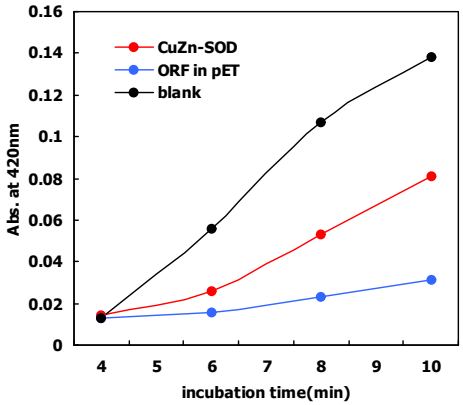



Figure 8-1-6. The activity of recombinant Fe-SOD determined by the inhibition of auto-oxidation of 1mM pyrogallol.

Figure 8-1-7. The example of antioxidant activities.

항산화활성을 눈으로 확인할 수 있을 정도로 구입한 항산화효소 (CuZn SOD)보다 발현한 Fe-SOD 활성이 월등하였다.



사. Solubility를 높이기 위한 방법

①vector의 교체 ②IPTG 농도 변화 ③induction 온도변화 및 활성측정 등 다양하게 시도하였다.

아. 리터규모의 배양으로 수율계산

1L 배양 시 Fresh weight 14.45g/L,
34.8mg total protein/L,
Expressed Fe-SOD 15.7mg protein/ L의 수율을 얻을 수 있었다.

자. 온도 및 glycerol의 첨가 효과에 대한 활성변화

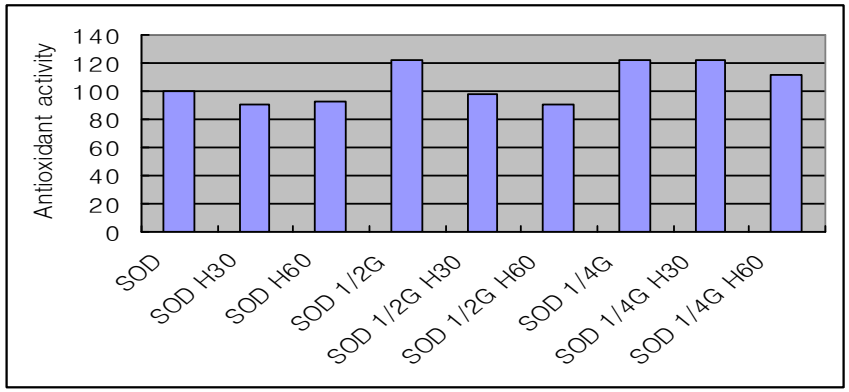



Figure 8-1-8. The effects of temperature and addition of glycerol on antioxidation activities.

H : heat stress (H30 : 30℃ for 30min, 30℃ for 1hr)
G : glycerol addition(1/2G : 50% Glycerol, 1/4 25% Glycerol)

Soluble Fe-SOD의 활성은 30℃에서 각각 30분, 1시간의 열 스트레스 조건에서 10-15%의 활성을 잃어버린 결과를 얻었다. 그러나 글리세롤을 각각 25%, 50%를 넣었을 때 열 스트레스에 대한 활성저해를 회복시킬 뿐 아니라 특히 25% 글리세롤 효과를 그대로 유지하였다.

이 결과는 항산화 화장품으로 제작될 때 온도에 대한 민감성을 해결할 수 있는 기초데이터일 뿐만 아니라 화장품의 보습효과를 위해 첨가되는 글리세린과 같은 다량의 화학물질과 의 반응에서도 활성을 잃지 않고 오히려 온도에 대한 민감성을 극복해 줄

수 있다는 자료를 제공해 주고 있다.



## 4. 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도

| 총연구기간내 년차별 연구내용 대비 달성율(%) | | |
|---|---|---|
| 년차 | 년차별 달성내용 | 년차별 계획대비 연구실적 달성율 |
| 1 | - 해양미세조류의 항산화 물질 개발을 위한 생명공학적 연구 데이터 구축을 위한 실험· 해양미세조류의 탐색 및 분리 (10여종)<br>· 항산화물질의 탐색 및 대상조류의 항산화 물질의 분리<br>· *Chlamydomonas*를 이용한 항산화물질 탐색 및 관련 유전자 확보<br>- 형질전환 벡터 고안, 형질전환, 항산화물질 고 함유 돌연변이세포 확보 | 95 |
| 2 | - *Dunaliella*를 이용한 항산화 유전자 탐색 및 항산화 물질 대량생산체제 구축<br>· 항산화 활성유도 및 EST 분석 및 항산화 유전자 클로닝<br>· Fe-SOD 유전자 클로닝 및 *E. Coli* 세포내에서의 발현<br>· *E. coli*로 부터 Fe-SOD purification 및 항산화 활성(*in vivo* & *in vitro*) 분석 | 95 |
| 최종년도 | - *E coli* 에서 발현된 SOD를 정제<br>· 정제된 SOD의 활성을 비교하여 기존에 상품화된 SOD와 활성 비교<br>· 대량 생산을 할 수 있는 대량배양의 조건을 정립하여 scale up조건에서도 활성측정 | 100 |

10여종의 미세조류를 탐색 및 분리하여 선택된 Dunalliela의 EST를 이용하여 항산화물질 관련 유전자(Fe-SOD)를 탐색하였다. 이후 이 유전자를 클로닝하여 *E. coli* 세포내에서 발현시키고 다시 *E. coli*로 부터 Fe-SOD를 purification하여 in vivo & in vitro에서의 항산화 활성을 확인하였다. 또한 리터규모의 배양으로 수율을 계산함으로써 물질의 대량생산체제 구축할 수 있도록 기초자료를 제공하였다.

항산화단백질의 발현은 주로 대장균과 식물의 항산화단백질이 주로 발현되어 연구되어왔으나 미세조류의 항산화단백질인 Fe-SOD는 최초로 클로닝되어 대장균에서 발현되고 활성이 증명되었기 때문에 대량배양으로 생산성과 경제성이 결정되면 실용화될

가능성이 매우 높은 연구개발결과가 된다.
현재 일본과 국내기업에서 화장품의 재료로 사용되고 있는 SOD의 경우 화장품의 재료로 사용되어 활용되고 있으나 정제상태가 아닌 곡물의 현탁액 수준으로 배합된 수준이다. 실제 화장품 시장에서의 기능성 화장품은 일반 화장품 가격의 4-5배에 이르므로 미세조류 유래의 Fe-SOD를 화장품 원료로 사용하기 위한 용도개발의 연구가 진행되면 시장성은 매우 클 것으로 판단된다.

## 5. 연구개발결과의 활용계획

Fe-SOD에 대한 연구는 실제 식물유래 항산화 단백질과 더불어 이 분야 연구의 활성화를 촉진시키고, 항산화 단백질인 SOD의 경우 일본에서는 화장품의 재료로 활용되고 있는데 실제 화장품 시장에서의 기능성 화장품은 일반 화장품 가격의 4-5배에 이르러 시장성이 높다. 또한 연구결과로 얻어진 미세조류유래의 Fe-SOD는 화장품 원료뿐만 아니라 순수 시약용인 항 엘러지용 패취 등으로 활용될 가능성이 높다.
산업화에 이르기에는 용도에 따른 임상실험 등 복잡한 테스트 등이 요구되므로 산업체와의 긴밀한 협력연구가 절실하며 앞으로 미세조류유래의 Fe-SOD를 화장품 원료 및 의약용 등으로 활용하기 위한 용도개발의 연구가 진행되어야 하겠다.



## 6. 참고문헌

Alberecht M, Misawa N, Sandmann G (1999) Metabolic engineering of the terpenoid biosynthetic pathway of *Escherichia coli* for production of the carotenoids beta-carotene and zeaxanthin. Biotechnol Lett 21: 791-795.
Apt KE, Berhrens PW (1999) Commercial developments in microalgal biotechnologe. J Phycol 35: 215-226.
Ben-Amotz A, Avron M (1990) The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. Trends in Biotech 8: 121-128.
Borowitzka MA (1995) Microalgae as sources of phamaceuticals and other biologically active compounds. J App Pycol 7: 3-15.
Borowitzka MA, Huisman M, Osborn A (1991) Cultures of astaxanthin-producing green algae *Haematococcus pluvialis*. I. Effect of nutrients on growth and cell types. J Appl Phycol 3: 295 304.
Boussiba S, Vonshak A (1991) Astaxanthin accumulation in the green alga. *Haematococcus pluvialis*. Plant Cell Physiol 32:1077-1082.
Bouvier F, Backhaus RA, Camara B (1998) Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. J Biol Chem 273: 30651-30659.
Fjerdingstad E, Fjerdingstad KKE, Vanggaard L (1974) Chemical analyses of red snow from East-Greenland with remarks on *Chlamydomonas nivalis* (Bau) Wille. Arch Hydrobiol 73: 70-83.
Jin ES, Polle J, Melis A(2001) Involvement of zeaxanthin and of the Cbr protein in the repair of photosystem-II from photoinhibition in the green alga *Dunaliella salina*. Biochim Biophys Acta 1506: 244-259.
Johnson EA, An GH (1991) Astaxanthin from microbial sources. Crit Rev Biotechnol 11: 297- 326.
Katayama T, Yokoyama H, Chichester CO (1970) The biosynthesis of astaxanthin, 1. The structure of alpha-doradexanthin and beta-doradexanthin. Int J Biochem 1: 438 444.
Krinky NI (1989) Carotenoids in medicine p279-291 In N I Krinsky MM Mathews-Roth and RF Taylor (ed), Carotenoids. Chemistry and Biochemistry. Plenum Press, New York.
Miki W, Otaki A, Shimidzu N, Yokoyama (1994) Carotenoids as free radical scavengers in marine animals. J Mar Bactechnol 2: 35-37.
Palozza P, Krinsky NI (1992) Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. Arch Biochem Biophys 297: 291 295.

Yamaguchi K (1997) Recent advances in microalgal bioscirnce in Japan with special reference to utilization of biomass and metaboilites: review. J App. Phyco 8: 487-503.
Young AJ, Lowe MG (2001) Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. Arch Bioch Biophys 385:20-27.

주 의

1. 이 보고서는 한국해양연구원에서 수행한 기관고유사업의 연구결과보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국해양연구원에서 수행한 기관고유사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.