

2020.12.31

해양생물 기반 생리활성 화합물의 확보와 응용·평가 기술 개발 (2년차)

www.kiost.ac.kr

The development of the technologies for the production, application, and evaluation of small molecules from marine organisms (2nd year)

제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “해양생물 기반 생리활성 화합물의 확보와 응용·평가 기술 개발”과제의 연차보고서로 제출합니다.

2020. 12. 31

총괄연구책임자 : 이 연 주

참 여 연 구 원 : 이종석, 이희승, 이균우, 이지훈, 최영웅, 신현호, 권개경, 이현숙, 임재규, 이종민, 박범수, 강혜민, 최한솔, 조연우, 김혜경, 김민진, 최재형, 최민주, 성단비, 최두봉, 김수정, 김예진, 신아영, 변은정, 김연아, 안영준, 박미정, 유지현, 윤주연, 곽경윤, 한경하, 김현정, 박준상, 한정훈, 박예은, 전우진, 김대현, 남지영, 이의수, 김근형, 박영준, 임재영, 임태경, 서유미, 이지훈, 정혜진, 박노영

요 약 문

I. 제 목

해양생물 기반 생리활성 화합물의 확보와 응용·평가 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 필요성

해양생물은 화학적 자기 방어수단으로서의 생태학적 기능을 가지는 물질을 생산하는 경우가 많음. 특히 조직이나 세포 수준에서 독성을 나타내는 물질의 출현이 빈번한데 이러한 독성은 심각한 중독을 초래하기도 하고 적절히 활용되어 항암제, 항생제 개발로 연결되기도 함. 이러한 해양 천연물의 특성을 적절히 관리/활용하는 연구 필요

2. 연구개발의 목적

해양생물 유래의 생리활성 저분자 화합물을 유용성을 지닌 화합물과 독성을 지닌 화합물로 분류, (1) 활용이 가능한 유용 화합물의 경우 천연물 분리/규명과 생합성 경로 규명, (2) 관리가 필요한 독성 화합물 (해양생물독) 의 경우 표준시료를 확보하여 정성/정량 분석 방법론을 확립하고 해양생물 활용의 생산기술 개발. 지속적인 생리활성 물질의 발굴을 위해 (3) 독성평가, (4) 형광 분자소재 응용 기술 개발

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 연구기간

2020년 1월 1일 ~ 2020년 12월 31일

2. 연구내용 및 범위

- 유효 추출물 유래 활성 천연물 규명
- 해면 메타게놈으로부터 유용 천연물 생합성 유전자군 도출
- 마비성 독소 합성 기술 개발 및 표준시료로써 재현성 평가
- 유독 와편모조류의 독소 생산에 관여하는 환경 조건 (빛 과장의 영향) 탐색
- 독성 화합물에 대한 미소동물플랑크톤의 생태적 반응조사
- 형광 유도체 물성 개선

IV. 연구개발결과

- 6종의 고역가 생리활성 천연물 발굴 (암세포독성 2종, 이온 채널 억제 6종)
- 해면 메타게놈으로부터 PKS-TPS hybrid 유전자군 발굴, terpene cyclase 유전자 그룹 도출
- dcSTXol 합성 및 구조분석 완료
- (비공개종)의 독소 생산에 영향을 주는 과장 확인 (control보다 약 10배 높음), 독소 생산 수율 300 ug/L 이상 달성
- 독성화합물 노출에 의한 생태적 종말점 발굴, 독화된 패류와 유독 와편모조류 노출에 의한 생태적 반응조사
- 개선 형광 유도체 3 종 확보

V. 연구개발결과의 활용계획

- 생리활성 천연물 발굴
 - 발굴된 고역가 생리활성 천연물 기반의 의약소재 개발
 - 천연물의 기능에 주목하는 화학생태학 연구주제 발굴
- 해면 천연물 생합성 유전자군 발굴
 - 생리활성 해양 천연물 생산에 활용하여 개발 연구 진행
- 마비성 독소 정성, 정량 분석 방법론 확립
 - 마비성 독소 활용, 개발 연구를 위한 소재 공급
 - 마비성 독소 모니터링 사업에 분석 툴 제공
- 마비성패독 원인종의 독소 생산 조건 규명
 - 마비성 독소의 활용, 개발 연구를 위한 소재 공급
 - 생성 메커니즘 이해를 통한 마비성 패독의 관리 방법 확립
- 화합물 독성 평가기법 개발
 - MBA를 보완할 수 있는 생물독 평가기법으로 활용
 - 활성 천연물 발굴·개발 연구에서 생리활성/독성 검정에 활용

목 차

제 1 장 서론

제1절 연구개발의 개요	-----	1
제2절 연구개발 목표	-----	2

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내/외 연구동향	-----	5
제 2 절 연구개발의 중요성	-----	8
제 3 절 연구개발과제의 중복성	-----	9

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 생리활성 천연물 발굴	-----	13
제 2 절 해면 천연물 생합성 유전자군 도출	-----	22
제 3 절 마비성 독소 분석 방법론 확립	-----	44
제 4 절 마비성 독소 생산 조건 규명	-----	51
제 5 절 화합물 독성 평가기법 개발	-----	57
제 6 절 생체분자, 금속이온 탐지용 형광물질 도출	-----	61

제 4 장 연구개발목표 달성도

제 1 절 목표 달성도	-----	69
제 2 절 대표적 우수성과	-----	70
제 3 절 정량적 연구성과	-----	73

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제1절 연구성과의 의의	-----	77
제2절 연구개발 성과의 중요성과 활용방안	-----	78
제3절 연구개발의 기대효과	-----	80

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 개요

○ 연구개발 개요

해양생물 유래의 생리활성 저분자 화합물을 유용성을 지닌 화합물과 독성을 지닌 화합물로 분류, (1) 활용이 가능한 유용 화합물의 경우 천연물 분리/규명과 생합성 경로 규명, (2) 관리가 필요한 독성 화합물 (해양생물독) 의 경우 표준시료를 확보하여 정성/정량 분석 방법론을 확립하고 배양생물 활용의 생산기술 개발. 지속적인 생리활성 화합물의 발굴을 위해 (3) 평가(독성평가), (4) 응용(기능성 형광 분자소재) 기술 개발 (그림 1)

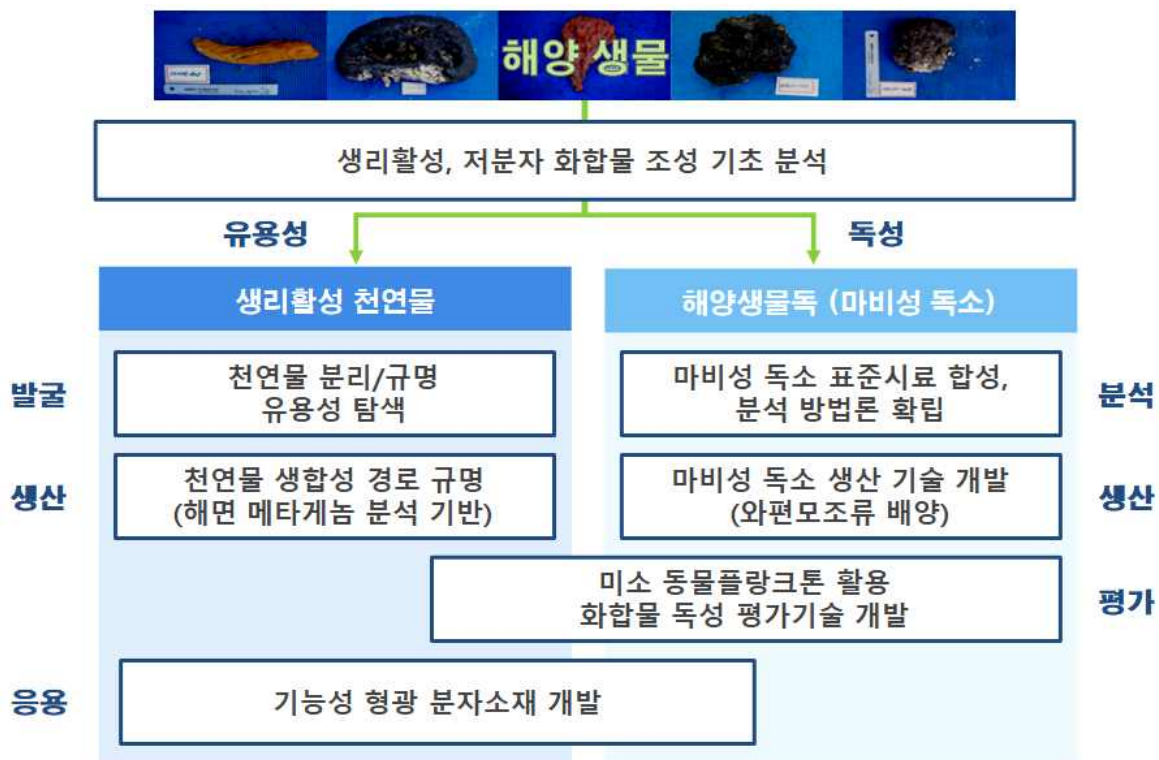


그림 1. 연구개발 개요 (개념도)

○ 핵심기술

- 생리활성 천연물 발굴: 컬럼 크로마토그래피 (HPLC 등)을 활용한 천연물 분리, 분광학적 방법을 이용한 천연물 구조 규명, 세포나 효소를 활용한 화합물의 생리활성 탐색

- 해면 메타게놈 분석과 생합성 유전자 발굴, 이형발현: 천연물 분석 결과 기반 유용 해면 선정, 메타게놈 추출 및 염기서열 분석과 해독, 생물정보학 기술 활용 천연물 생합성 유전자군 발굴, 미생물 숙주를 활용한 실험실 규모 수준의 생합성 유전자군의 이형발현
- 마비성 독소 표준시료 확보: 생합성 중간체를 와편모조류에 투여하는 반합성 방법과 합성을 통한 패류독소와 유도체 제조, 독성 해양생물로부터 크로마토그래피를 이용한 정성, 정량 분석방법 개발과 이를 응용한 독소 분리
- 와편모조류 활용 마비성 독소 생산 방법론 확립: 마비성 패독의 원인종 선별을 위한 분류학적 분석 방법 (형태적 특징 및 분자계통학적 위치), 배양 세포의 안정화 기술, 와편모조류 대량 배양에 관여하는 생리, 생태학적 환경 조건 탐색 기술
- 미소 동물플랑크톤 활용 화합물 독성 평가기술 개발: 마우스 독성평가법의 한계성을 극복하기 위한 독성실험생물로써의 미소 동물플랑크톤 확보, 독성 화합물에 특이적으로 반응하는 독성종말점 (toxicity endpoint) 조사를 통한 독성평가기술 개발
- 기능성 형광 분자소재 개발: 금속이온, 유기물질 등 분석 대상 물질과 선택적으로 결합하여 물질 존재 여부나 농도를 측정할 수 있는 유기형광 화합물 설계/합성

제 2 절 연구개발의 목표

(1) 최종목표

해양생물을 이용하여 관리/활용이 필요한 저분자 화합물 분석/발굴하고, 화합물 평가/생산/응용 기술의 기초를 확립

- 유용 천연물; 활성 천연물 규명과 생물학적 합성 방법론 구축
- 독성 천연물 (생물독); 화학적, 생물학적 생산과 분석 방법론 구축
- 해양생물 활용 화합물 생리활성 평가기술 개발
- 형광 소재 개발을 통한 천연물 응용 기술 개발

(2) 연구원의 비전 및 기능, 중기전략계획 등과의 연계성

○ 해양과기원 임무 및 경영목표 등과의 연계성

- 천연물 발굴, 응용, 평가기술 개발은 해양생물소재의 활용 가능성을 높이는 연구로 '해양 신산업 발굴, 육성 및 산업화 기반 기술 개발' 실현의 기반 구축
- 유용 천연물 발굴, 생산 연구, 특히 해면 메타게놈 기반 연구의 경우 '연구성과계획서' 평가 당시 도전성이 높은 과제로 선정된 내용으로서 우리 원 경영목표 '도전적 융복합연구로 선도적 해양과학기술 역량 강화' 실현에 일조
- 마비성 독소 표준시료 확보와 생산 기술 확립 연구는 생물독에 대한 이해도와 관리 역량을 높여 경영목표 '국가·사회 현안 해결을 위한 체계적 해양과학기술 지원' 실현

○ 해양과기원 연구성과계획서 성과목표와의 부합성

'한국해양과학기술원 2018-2022 연구성과계획서'에 제시된 성과목표 '해양생물·유전자원 활용기술 개발', 특히 성과목표 2-1-1의 '생리활성 성분 발굴·분석 기술 개발'의 달성을 위해 제시된 세부 성과목표 (마비성패독 생산, 분석 기술연구, 활성 천연물 분리와 규명, 활성 천연물 생합성 경로 규명과 이형발현 조건 탐색, 생체 분자 탐지용 형광센서 도출) 를 포괄하는 연구개발사업을 진행할 필요가 있음

○ 국가적 아젠다와의 연계성

- '제2차 해양수산발전기본계획(2011-2020)'은 지구온난화로 인한 해양생태계 교란 발생에 주목함과 동시에 해양과학기술을 이용한 유망 신산업의 발굴에 초점을 맞추고 있음. 생리활성 천연물과 생물독 연구는 제시된 5대 추진전략 중 '신성장 동력 창출을 위한 해양과학기술 개발'을 위한 '해양생물, 유전자원 개발', '국내외 다양한 생물소재 탐색 및 유전자원 발굴'에 해당
- 생리활성 해양 천연물 발굴과 유기형광소재 개발은 '제4차 과학기술기본계획(2018-2022)'에서 열거한 중점과학기술 목록 중 '유기·바이오소재' 분야 '기능성 유기소재, 친환경 바이오소재 기술'과 '융복합소재' 분야 '다기능 융복합소재 기술'에 해당
- 제4차 과학기술기본계획(2018-2022)에서 정한 과제 '생활 속 위협 요인에 대한 예방 및 관리, 일상생활 유해요인을 관리하여 안심하고 잘 살 수 있는 생활환경 조성'에 '신종 유해물질 측정기술 개발 및 위해성 검증 안전기준 마련'이 명시. 수산 식품 안전을 위협하는 마비성 패독에 대한 기초 연구와 독성 평가기법 개발이 이에 해당
- 천연물 생산, 분석 기술은 생명공학 융합형 산업(화학·의학·환경·식품·바이오매스·에너지)에서 활용되는 범용 기반기술로 생물 유래 물질의 제품화 토대를 구축. 과기정통부가 '2019년도 정부연구개발투자 방향과 기준'에서 제시한 정부 R&D

투자영역 중 '산업선도'에 해당하며, 기술분야 중 우주·항공·해양 분야의 투자방향인 '고부가가치 핵심기술 및 산업기반 기술 투자 강화'에 해당

- 해양생물로부터 생리활성 성분(천연물, 생물독)을 발굴하고 분석하는 연구는 '제3차 생명공학육성기본계획 (바이오경제 혁신전략 2025)'에 제시된 전략 '동식물, 미생물, 해양생명자원 등 농림·수·축산자원의 고부가가치화 및 유망 신소재 개발'을 구현하며, 전략분야 중 '기능성 소재 개발 및 식품안전·품질향상'에 해당
- 유전자원 접근에 대한 국제규제 강화에 체계적으로 대응하고 생명자원 주권 강화를 위해 수립된 '제1차 해양수산생명자원 관리기본계획(2019-2023)'은 해양수산생명자원의 확보·관리 및 이용 등에 관한 범위를 포함하고 있으며 본 과제의 생리활성화합물 연구는 전략별 추진과제 중, '전략적 자원 확보 체계 마련', '활용과 연계한 자원관리역량 제고', '자원 이용가치 제고 및 업계 지원기반 마련' 등에 해당

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내/외 연구동향

○ 생리활성 천연물 연구 개발 현황

- NCI(미국, National Cancer Institute)의 전임상 세포독성 측정 검색을 활용한 암 세포 억제 물질 확인 연구에서 육상 천연물은 0.1%가, 해양 천연물은 1%가 개발 가치 있음이 확인됨. 특히 해면 등의 해양동물은 세포독성 물질의 발견 비율이 2%에 육박하여, 육상생물이나 해양식물, 미생물에 비해 월등한 것으로 확인됨 (그림 2)

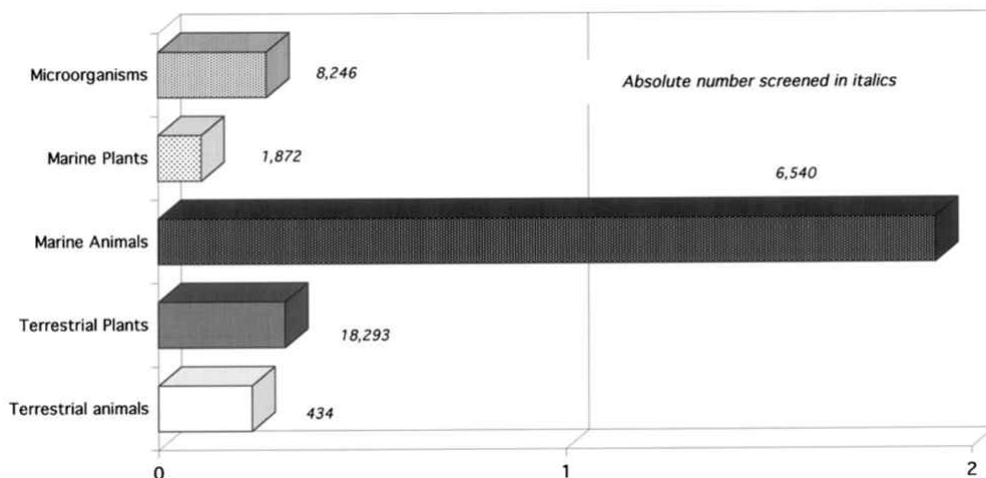


그림 2. 생물근원별 세포독성 물질 발굴 비율 (NCI)
Journal of Biotechnology, 1999, 70, 15

- 천연물 연구개발 초기단계에서부터 화합물 지속/대량 확보 가능 여부의 문제가 대두되는데, 해양 천연물의 경우 이로 인해 개발이 좌절되는 경우가 대부분. 천연물 대량 생산을 가능하게 하는 기반 기술이 확립될 경우 해양 천연물의 개발 가능성이 증가할 것으로 예상됨 (그림 3)
- 해양 천연물 개발에 있어 치명적인 한계로 작용해온 물질량 확보의 문제를 해결하기 위한 생합성 연구가 늘어나는 추세에 있음. 특히 미생물이나 동물 전생체의 유전자 염기서열로부터 천연물 생합성과 관련된 유전자군을 찾아 이를 이형발현에 활용하는 연구가 증가하고 있음

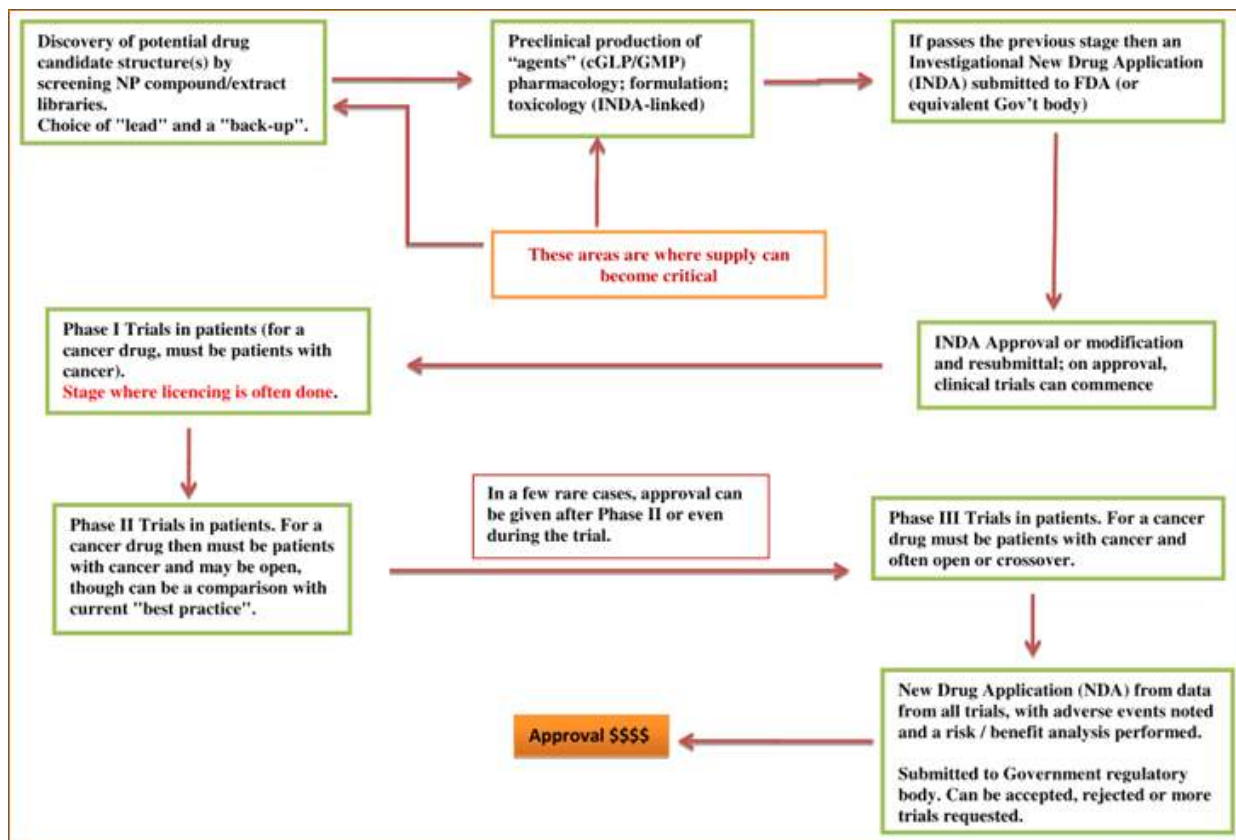


그림 3. 천연물 발굴에서 개발까지의 연구 과정과 화합물 수급 문제 발생 단계
Pharmacology & Therapy 2015, 162, 1

- 국내에서 해양생물 추출물이나 천연물로부터 의약품이 개발된 예는 없고, 특정 지표 물질을 함유하는 해조류, 미세조류 추출물을 활용하여 기능성 식품, 화장품 등을 개발하는 연구가 활발하게 진행되어 상품으로 개발되고 있음. 다양한 생물로부터 여러 기능의 지표물질과 활성 성분을 지속적으로 발굴하는 것이 필요한 상황

○ 해양생물독 분석과 생산 연구 현황

- 생물독은 자연에서 소량으로 존재하기 때문에 독성해양생물 채집, 분리를 통한 자연계에서 확보에는 한계가 있고 지속가능한 생산은 화학적, 생물학적 합성에 의존해야 함. 독성 천연물의 확보에 가장 선도적인 연구기관은 캐나다 NRC (National Research Council)로 자세한 연구내용은 알려져 있지 않으나, 여러 독성 천연물을 보급하고 있음
- 가장 독성이 강한 마비성 패독의 분석과 확보는 미국, 일본이 선도하고 있는데, 화학적 합성을 통한 생산과 이에 기반한 의약소재 개발 연구가 진행되고 있음. 국내에서는 군산대에서 미세조류 대량배양을 통해 펙테노톡신 계열의 설사성 패독을 생산한 바 있으나, 독성이 가장 강한 알칼로이드 계열 마비성 독소 생산에

대한 연구는 전무한 상황

- 마비성 패독(Paralytic Shellfish Poisoning; PSP)의 발생은 패류의 먹이원인 유독 플랑크톤의 종류와 섭취량에 의해 결정됨. 마비성 패독으로 인해 피해가 발생한 미국, 노르웨이, 뉴질랜드, 일본 등에서는 패독의 원인종인 와편모조류와 패류독화의 상관관계를 규명하기 위한 연구(독이 생산되는 환경조건 탐색)를 수행하고 있음. 국내에서는 연안에 출현하는 다양한 유독 플랑크톤의 생리, 생태적 특성에 관해서는 많은 연구가 진행되었으나, 마비성 패독의 원인종 탐색과 생산에 관여하는 환경 조건 규명은 진행되지 않음 (그림 4)



그림 4. 2015년까지 기록된 마비성패독(PSP) 발생 해역
Woods Hole Oceanographic Institution Website

- 해양생물독의 독성평가에 있어, 표준 독소의 이용성 및 복합 독성 평가의 한계성을 지닌 화학적 분석기법을 보완하기 위한 독성평가기법으로 마우스 독성평가법(MBA, Mouse-based assay)가 사용되고 있으나 결과의 오류가 많고 윤리적 문제도 제기되고 있어 이를 대체할 평가기법의 개발이 요구되고 있음. 미국, 유럽 등에서 이를 위해 다양한 해양생물독에 대해 척추/무척추동물, 미세조류 및 미생물의 생태적 독성종말점을 조사한 바 있음. 최근 배양세포를 이용한 시험관(in vitro) 분석법이 주목받고 있으나 정확성이 낮아 실용화되기는 어려운 상황

○ 천연물 기반 기능성 형광 소재 연구 현황

- 형광 프로브, 형광 화학센서 연구개발은 생명공학과 진단의학 분야에서 활발하게 이루어지고 있으며 상품으로 개발된 물질이 다수 존재. 그러나 해양과학 분야에서 형광화학센서 기술은 아직 도입 단계로 국가별 기술격차가 크지 않기 때문에 과감한 투자와 기술 선점을 통해 해당 분야의 선도가 가능

- 해양미생물 배양액으로부터 분리된 형광물질 에피코코논(epicocconone)은 최초 보고된 이래 약 5년 정도의 짧은 상품화 과정을 거쳐 'FluoroProfile'이라는 상품명(시그마 알드리치, 단백질 정량 키트)으로 성공적인 시장 진입. 이는 긴 연구개발 기간과 막대한 비용을 필요로 하는 신약개발연구와 비교되는 좋은 성공사례이며, 해양생물자원을 활용한 연구개발이 의약품 개발과 소재 개발의 투트랙 전략을 구사해야 하는 당위성을 제공

제 2 절 연구개발의 중요성

○ 생리활성 천연물의 개발 가능성과 필요성

- 해양생물은 화학적 자기 방어수단으로서의 생태학적 기능을 가지는 물질을 생산하는 경우가 많음. 특히 조직이나 세포 수준에서 독성을 나타내는 물질의 출현이 빈번한데 이러한 독성은 심각한 중독을 초래하기도 하고 적절히 활용되어 항암제, 항생제 개발로 연결되기도 함. 이러한 해양 천연물의 특성을 적절히 관리/활용하는 연구가 필요
- 해면은 해양생물 중 생리활성 천연물의 출현빈도가 가장 높은 동물이지만 물질 함유량과 확보 가능한 개체량이 적어 지속적인 물질 공급의 문제가 개발의 걸림돌이 되고 있음 (그림 5). 생합성 연구를 통하여 물질 수급의 문제를 극복할 수 있다면 해양 천연물을 다양한 소재로 개발할 수 있을 것으로 기대됨

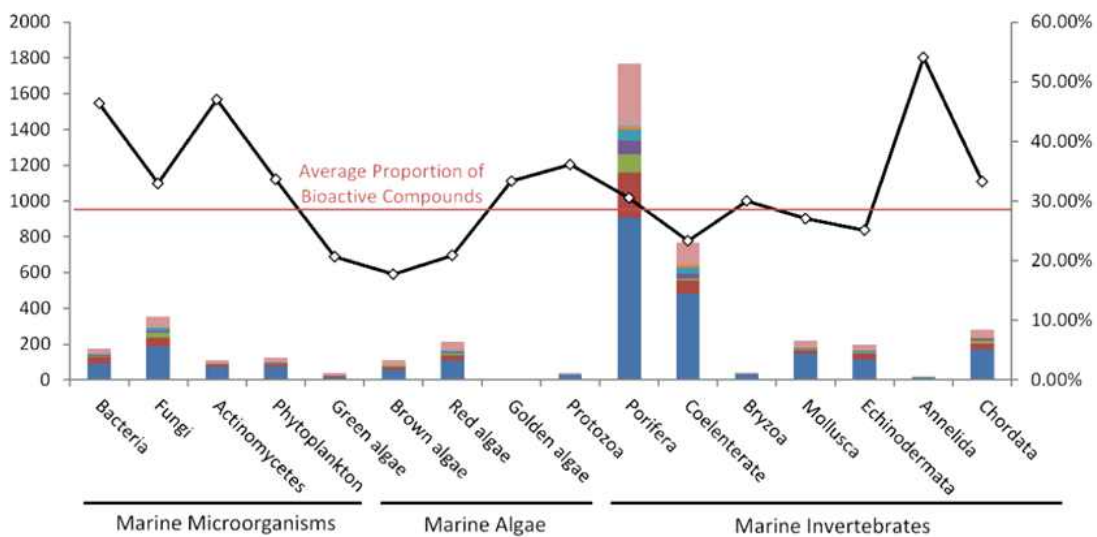


그림 5. 해양생물 분류군별 생리활성 천연물 발굴 현황
Marine Drugs 2015, 13, 202

○ 해양생물독의 분석, 확보 기술 개발의 필요성

- 인간에게 가장 큰 피해를 입히는 해양독은 마비성 패독으로 빈번하게 중독사고를 일으켜 2018년에는 시중에 납품된 홍합이 전량 회수되었음. 기후변화로 인한 연안 수온 상승과 더불어 해양생물독에 의한 사고는 증가할 것으로 예상됨
- 해양생물독의 정성, 정량 분석은 표준물질과의 상대적인 비교에 의해 이루어지므로 이의 확보가 분석가능 여부를 결정함. 현재 국내에서는 표준 독소를 구할 수 없어 캐나다 정부기관인 NRC (National Research Council)에서 수입하고 있음. 일본은 삭시톡신을 제외한 표준 독소를 정부차원에서 자국 내에 공급하고 있음
- 독성 천연물 확보의 중요성은 표준물질로서의 가치 외에도 이들 천연물이 특이한 생리활성을 나타낸다는 사실에 있음. 저분자물질 의약품 개발의 선도국가인 미국에서는 패류 독소의 마비증상을 이용하여 새로운 진통제를 개발하고 있음
- 해양생물독의 독성평가에 있어, 표준 독소의 이용성 및 복합 독성 평가의 한계성을 지닌 화학적 분석기법을 보완하기 위한 독성평가기법으로 마우스 독성평가법이 사용되고 있으나 결과의 오류가 많고 윤리적 문제도 제기되고 있어 이를 대체할 평가기법의 개발이 요구되고 있음

○ 천연물 기반 기능성 형광소재 개발의 필요성

- 저분자 유기형광물질은 생명공학, 의료진단, 신약개발, 환경공학 등에 광범위하게 적용이 가능한 유망 소재. 저분자 유기형광물질을 이용하여 특정 생물체, 세포기관 또는 단일 분자 (단백질, 유기분자, 금속이온 포함)에 대한 높은 상호결합 선택성을 갖는 형광화학센서의 제작이 가능하며, 이는 다양한 자연현상에 대한 새로운 분석도구로 응용될 수 있음

제 3 절 연구개발과제의 중복성

○ 생리활성 천연물 발굴/생산 관련

- 생리활성 천연물의 발굴은 지속적으로 수행하여 신규 화합물 분리/규명과 기지 화합물의 활성 확장 탐색을 수행할 필요가 있음.
- 메타게놈 기반 천연물 생합성 연구의 경우 토양 미생물 유래 herboxidien의 생산을 연구가 진행된 바가 있으나 (표 1), 해양 천연물의 경우 국내에서 시도된 바가 없음
- 포스트게놈다부처유전체사업 중 '해양수산생물 유전체정보 분석 및 활용기반 연

구' 과제의 제4세부과제가 '메타유전체(메타게놈)'로 설정됨. 이 과제의 최종 목표는 국내 (광양만, 남해, 서해 (갯벌)) 정점에서 해수 또는 해양퇴적토를 채집하여 이로부터 해양 메타유전체/전사체를 분석하는 것으로 설정됨. 해양 천연물 생합성 경로 규명과 관련한 이 사업의 일부 내용은 포스트게놈다부처유전체 사업 내 해양메타유전체 세부과제와 비교하여 메타게놈 분석을 포함한다는 공통점이 있으나 연구개발목표, 최종성과물, 분석대상생물 등이 상이하며 연구개발의 성격에 있어서도 큰 차이가 있어 유사성이 없는 것으로 판단됨. 각 항목별 차이를 표로 정리하면 표 2와 같음

표 1. 토양 미생물 유래 herboxidien 생합성 유전자 규명과 이형발현 관련 연구사업

부처명/연구기간	연구기관	과제명
농림수산식품부/2012	이화여자대학교	친환경 미생물제조제 herboxidiene의 생합성 유전자 확보 및 유도체 개발
	국립농업과학원	토착 미생물 메타게놈을 이용한 고효율 천연제조제 herboxidien 유도체 생산 및 제형 개발
미래창조과학부/2014-2016	선문대학교	미생물제조제 herboxidiene 유도체 생합성 연구

표 2. 포스트게놈다부처유전체사업과의 비교

	해양생물 기반 생리활성 화합물의 확보와 응용·평가 기술 개발 (해면 메타게놈 기반 천연물 생합성 경로 규명)	포스트게놈다부처유전체사업 (제4세부과제)
연구개발목표	해면 메타게놈 분석을 통한 생리활성 천연물 생합성 유전자 규명과 이형발현 조건 탐색	해양메타유전체/전사체 분석
최종성과물	해면동물 메타게놈 분석 자료, 생리활성 천연물 생합성 유전자군 규명과 이형발현 조건	해양 메타유전체/전사체 자료, 미생물 균집 분석, 유용 유전자 발굴, 생리활성물질 발굴
연구개발성격	항암물질의 산업적 생산에 적용될 수 있는 원천기술 개발	자료수집, 모델정립 등 기초연구
분석대상생물	생리활성 천연물 함유 열대 해면	해수, 해양퇴적토, 갯벌 내 미생물 균집 (국내 40개 정점)

○ 마비성 독소 분석/생산 관련

- 국립수산물품질관리원, 식품의약품안전청에서 수행했던 패류독소 관련 과제들은 (표 3)

마비성 패독의 분석법에 관한 내용을 포함하고 있으나, 수산식품 관리를 위한 모니터링 목적의 사업으로서 표준물질 확보를 위한 합성, 발생에 대한 생태학적 이해를 도모하기 위한 원인종 탐색, 개발/활용 목적의 생산 연구 등은 포함하지 않음

- 본원에서 수행했던 '해양유독 식물플랑크톤의 유전자 자원화 기술개발 연구'는 마비성 패독 외 3종의 생물독에 대한 바이오센서개발 및 생합성 유전자 분석이 주된 내용으로 최종적으로 생산을 목표로 하며 화학적 합성이나 원인종 배양기술 확립 등의 기술적 접근을 도모하는 본 과제와는 차이가 있음

표 3. 수산 식품 안전 확보를 위한 모니터링 목적의 마비성 독소 분석 연구사업

부처명/연구기간	연구기관	과제명
식품의약품안전청/2004	식품의약품안전청	식품 중 패류독 모니터링 연구
	경상대학교	
해양수산부/2005	신라대학교	양식패류독의 저감을 위한 생물전환기술개발
식품의약품안전청/2006	경상대학교	패류독소류 분석법 확립 및 실태조사
해양수산부/1996-2015	국립수산과학원	독물학적 위생안전 위해 관리
해양수산부/2007-2999	국립수산과학원	수산물 위해요소 제어기술 개발
해양수산부/1977- 2037	국립수산과학원	수출패류 생산해역 및 수산물 위생조사
과학기술부/2004-2005	한국해양과학기술원	해양유독 식물플랑크톤의 유전자 자원화 기술개발 연구

○ 저분자 유기 형광소재 개발 관련

- 국가과학기술 지식정보서비스(NTIS)에서 유사과제를 검색해본 결과 기 수행과제, 타인등록과제, 공공 R&D과제에서 유사과제는 없다는 검색결과가 나왔음. 이는 유기형광 화학, 형광 센서를 이용한 해양생명공학, 해양환경 연구는 전례가 없었다는 것을 보여줌.

- 지금까지 수행되었던 형광프로브, 형광센서, 바이오센서 관련 연구과제들은 주로 기초연구, 질병진단과 치료, 특정 생체물질의 검출 기술과 관련된 것들을 중심으로 일부 대학과 출연연에서 수행되었음.

- 수질 모니터링과 관련된 과제로서 '미래지향형 물관리 체계를 위한 형광 chemometrics 모니터링 기법 개발과 적용(허진, 세종대학교)'이 있으나 이 과제는 BOD, COD, 질소농도등 도시하천의 수질 모니터링을 위한 기술개발이었음.

- 한국해양과학기술원에서 선행연구를 통해 발굴한 화학골격이 참신하고 다양한 화

학적 변형이 가능한 기능을 갖고 있는 KIOST-Fluor를 연구의 출발점으로 해양생명공학과 해양환경 연구에 응용이 가능한 유기형광화학센서와 형광바이오센서 개발연구를 수행하고자 함.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 생리활성 천연물 발굴

○ *Theonella swinhoei* (163PIL-102, 153PIL-101)로부터 세포독성 천연물 발굴

- 163PIL-102는 2016년 3월 필리핀 보홀에서 대량(2.7 Kg)으로 채집되었으며 *Theonella swinhoei*로 동정 (형태 분류)
- 163PIL-102의 메탄올 추출물의 6개의 암세포주 (A549-폐, ACHN-신장, MCF7-유방, A375SM-흑색종, HCT116-대장, Hela-자궁)에 대한 세포 사멸률을 측정한 결과 폐암에 대해 가장 높은 세포독성을 보이는 것으로 나타남 (표 4)

표 4. 163PIL-102 추출물의 암세포성장 억제 활성 (IC₅₀, ug/mL)

	A549	ACHN	MCF7	A375SM	HCT116	HeLa
IC ₅₀	6.12	16.08	22.28	12.09	10.34	14.25

- 153PIL-101의 경우 상기의 암세포주들에 대한 활성은 보통 수준이었으나, 간암세포 (Hep3B)에 대한 사멸 (apoptosis와 DNA damage, cell cycle arrest)을 강하게 유도하는 것이 확인됨 (그림 6)

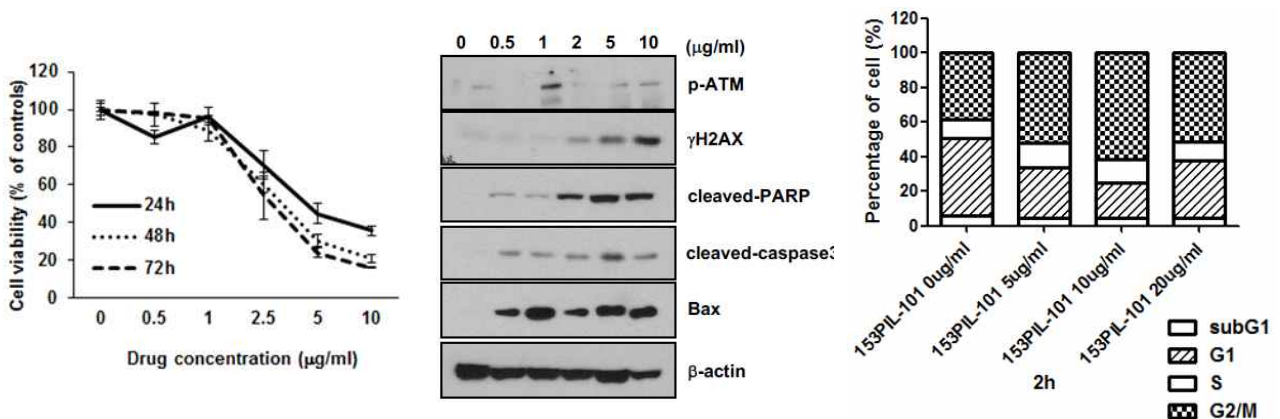


그림 6. 153PIL-101 해면 추출물의 간암세포 (Hep3B) 성장 억제 활성

- 채집된 해면의 양과 측정된 암세포에 대한 활성을 고려할 때, 163PIL-102, 153PIL-101 함유 해양 천연물의 화학구조를 확인하고 세포독성 물질을 확보하는 것이 필요할 것으로 판단
- 163PIL-102는 2016년 3월 필리핀 보홀에서 대량(2.7 Kg)으로 채집되었으며 *Theonella swinhoei*로 동정 (형태 분류)
- 해면 (163PIL-102, 1.8 kg, wet wt.)을 동결건조한 후 추출/농축하였으며, n-BuOH/water, n-hexane/15%aqM으로 순차적 분획. n-hexane층을 농축한 후 silica로 분획 (그림 7)

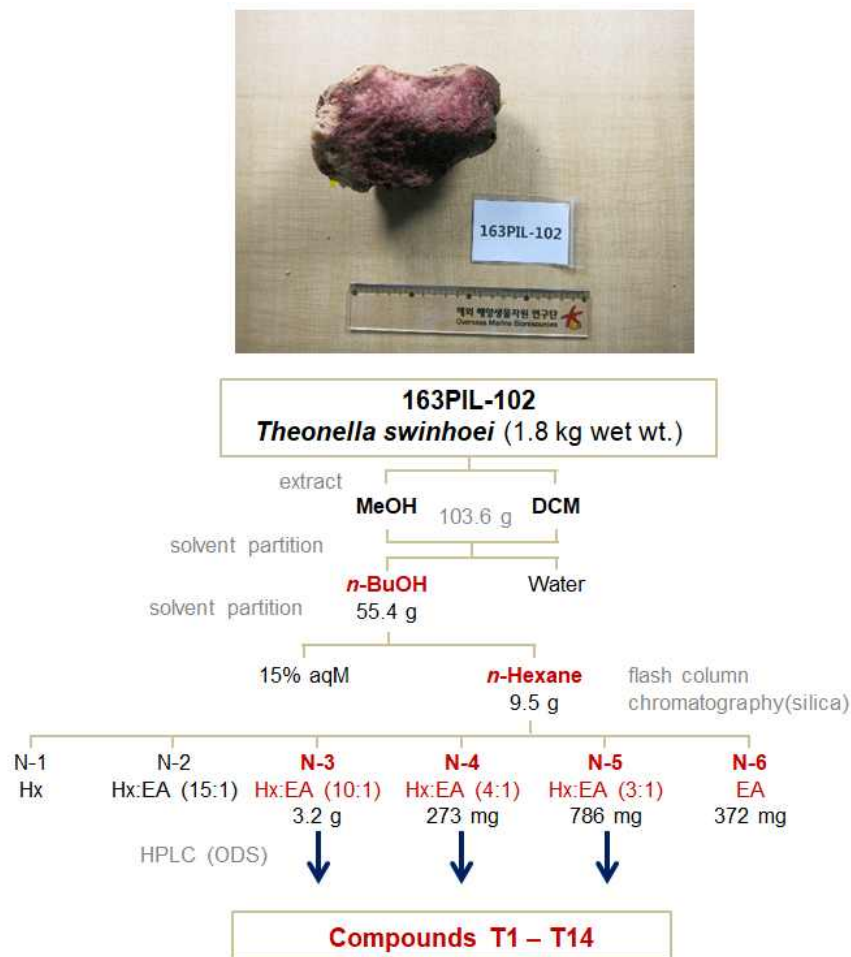


그림 7. *T. swinhoei*와 이로부터 비극성 천연물 분리 과정

- 각각의 분획(N-1~N-6)의 ¹H NMR을 확인한 결과 N-1, N-2에는 지방산 계열의 화합물이 존재함을 확인할 수 있었음. N-3~N-6는 여러 가지 steroid 계열 화합물의 혼합물로 예상되어 HPLC를 이용하여 분리 진행 (그림 8)
 - N-3 (3.2 g)로부터 HPLC를 통해 theonellasterol A (T10, 1 g), 8β-hydroxythenellasterol (T2, 8.9 mg), theonellasterol-5,8-oxide (T1, 3.5 mg)를 분리
 - N-4 (273 mg)를 HPLC로 분리하여 28-homoswinhoeisterol (T8, 31.4 mg), 8α

-hydroxy-14,15-b- epoxy-theonellasterol (T5, 1.2 mg)을 분리

· N-5 (786 mg)를 HPLC로 분리하여 swinhosterol C (T9, 1.7 mg), theonellasterol K (T13, 30 mg), 8 α -hydroxytheonellasterol (T4, 1.2 mg), swinhosterol A (T14, 12 mg), 8 β -hydroxy-7-formyl-B-northeonellasterol (T7, 1.6 mg), 15 β -hydroxytheonellasterol(T3, 3.5 mg), 7 α -hydroxytheonellasterol (T6, 3.1 mg), theonellasterol G (T12, 5.9 mg)을 얻음

· N-6 (372 mg)를 HPLC로 분리하여 thonellasterol E (T11, 5.0 mg)을 얻음

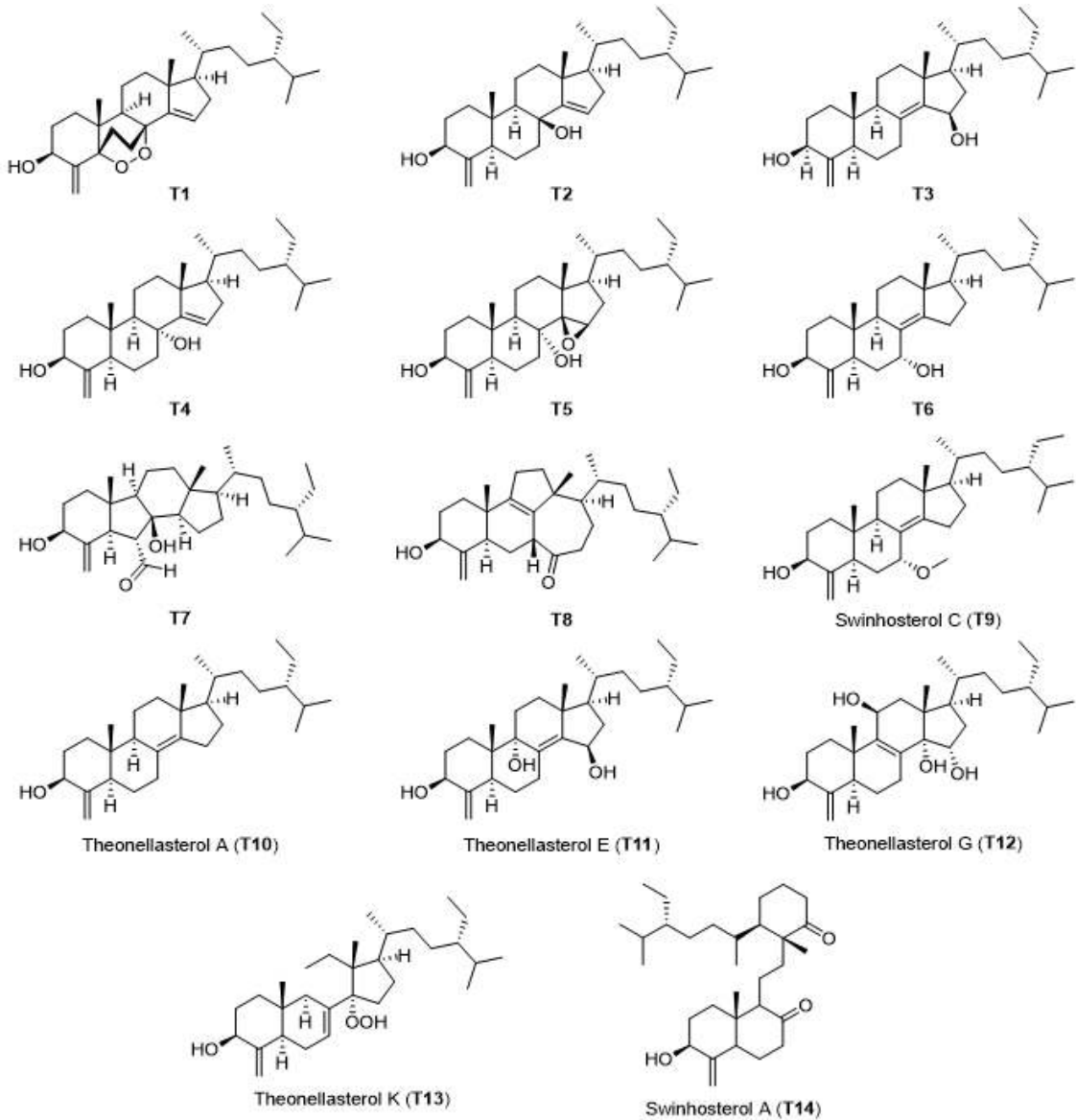


그림 8. T. swinhoei로부터 분리된 steroid 계열 화합물

- 14종 steroid 계열 화합물의 항염증효과를 mouse macrophage cell line인 RAW264.7세포를 이용하여 확인 (LPS로 염증 유발 후, 화합물 처리, IL-6 농도 변화 측정); theonellasterol

A(T10), G(T12), K(T13)에서 활성이 나타남. 이 세 가지 화합물을 1, 5, 10 ug의 농도로 희석하여 항염증효과를 재확인 (그림 9)

· IC50 값을 계산한 결과 T10, T12, T13 은 각각 20 uM, 9 uM, 35 uM로 확인됨. 모든 경우에서 기준 이상의 활성을 나타내지는 못했지만, T10의 경우 1 g 분리되었으므로 후속 구조-활성관계 연구를 통해 활성의 증가를 기대할 수 있음

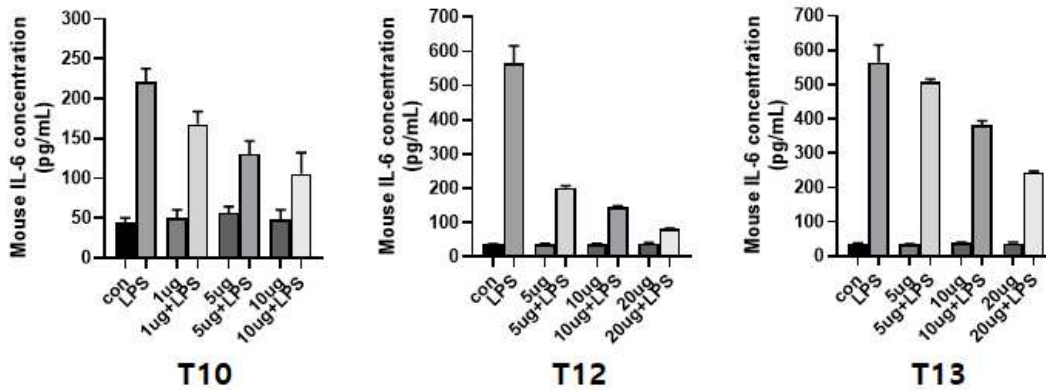


그림 9. T. swinhoei로부터 분리된 steroid 계열 화합물의 항염증 효과

- T. swinhoei로부터 획득된 15%-aqueous methanol 층은 간암 세포주 (Hep3B) 사멸 유도 활성을 보여, ODS resin을 활용하여 분획 수행. 6개의 분획을 분석한 결과 10% aqM과 methanol 분획에서 강한 세포 독성 확인. 각 분획으로부터 peptide 계열의 theonegramide (T15)와 polyketide 계열의 swinholide A (T16)을 분리하여 동정 (그림 10)

· T15 화합물 (theonegramide)는 3.0, 6.0 uM의 농도에서 두 가지 암세포주 (A375SM (흑색종), MCF-7 (대장암))에 대해, 0.6 uM 농도에서 Hep3B (간암) 세포주에 대해 50% 사멸율을 나타냄 (IC50 = 3.0, 6.0, 0.6 uM (A375SM, MCF-7, Hep3B), 그림 11)

· T16 화합물 (swinholide A) 은 0.2 uM 농도에서 Hep3B 세포에 대해 50% 사멸율을 나타냄. (IC50 = 0.2 uM, 그림 12)

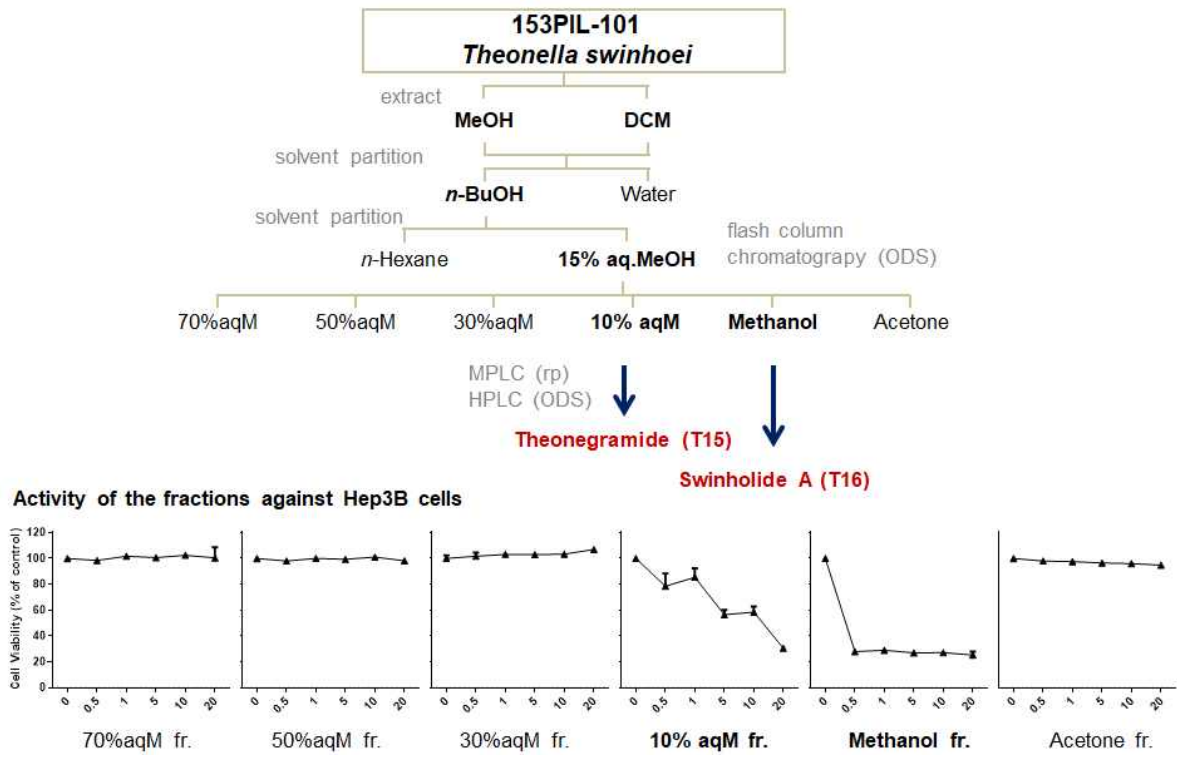


그림 10. *T. swinhoei*로부터 세포독성 천연물 추적 과정

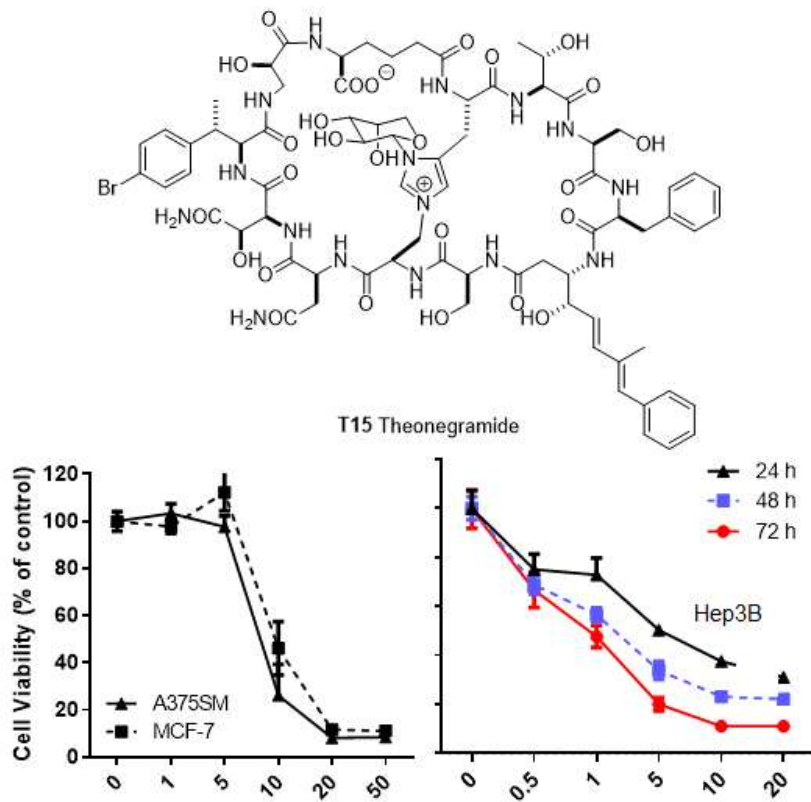


그림 11. Theonegramide (T15)의 구조와 암세포 사멸률 측정 결과

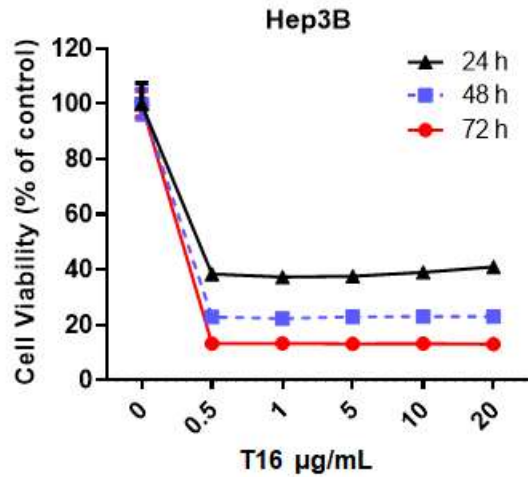
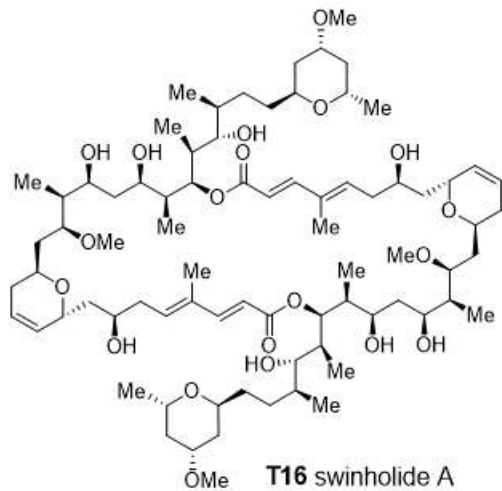


그림 12. Swinholide A (T16)의 구조와 암세포 사멸률 측정 결과

○ *Bohadschia vitiensis*로부터 TRPA 기능 억제 천연물 발굴

- TRP (Transient receptor potential) 채널은 동물 세포막에 존재하는 이온 채널로 칼륨, 나트륨, 마그네슘의 세포 내/외 이동을 매개함으로써 온도, 맛, 통증, 압력, 시야 등과 관련한 감각 신호의 전달에 관여
- TRP 중 하나인 TRPA (TRP ankyrin)은 신경계를 구성하는 일차 감각 뉴런과 신경 아교를 형성하는 다양한 세포들에서 발현되어 통증 형성을 위한 이온 이동을 매개하는 것으로 알려져짐
- 현재까지 밝혀진 TRPA와 관련된 병리학적 증상에는 냉과민증 (cold hypersensitivity), 자극성 화합물이나 조직 손상으로 인한 통증, 세균 감염이나 염증으로 인한 통증, 편두통 (migraine) 이나 내장통 (visceral pain) 뿐만 아니라 당뇨, 외상, 항암 화학요법 등으로 인한 신경병증 등이 포함됨
- 특히 TRPA 저해제들은 당뇨성 신경병증 (diabetic neuropathy), 항암 화학요법으로 인한 신경병증 (chemotherapy-induced painful neuropathy), 염증 수반 통증 치료제로서의 개발이 유망 (그림 13)
- 당뇨나 화학요법으로 인한 신경병증성 통증에 대해서는 현재 삼환계 항후울제, 항경련제 등이 사용되고 있으나 다양한 형태의 부작용이나 금단 증상, 제한적인 환자에 대해서만 사용 가능하거나 효능이 나타나는 등의 한계로 인해 대안적인 약물의 개발 필요
- 마이크로네시아 축 해양무척추동물 추출물 393종에 대한 TRPA 억제 효능에 대한 검색 수행 (그림 14), 이 중 가장 높은 역가를 나타낸 해삼 추출물 (151KO-610)에 대한 천연물 분리/정제와 구조 규명 수행하고 개별 정제 화합물의 TRPA 억제 효능을 확인

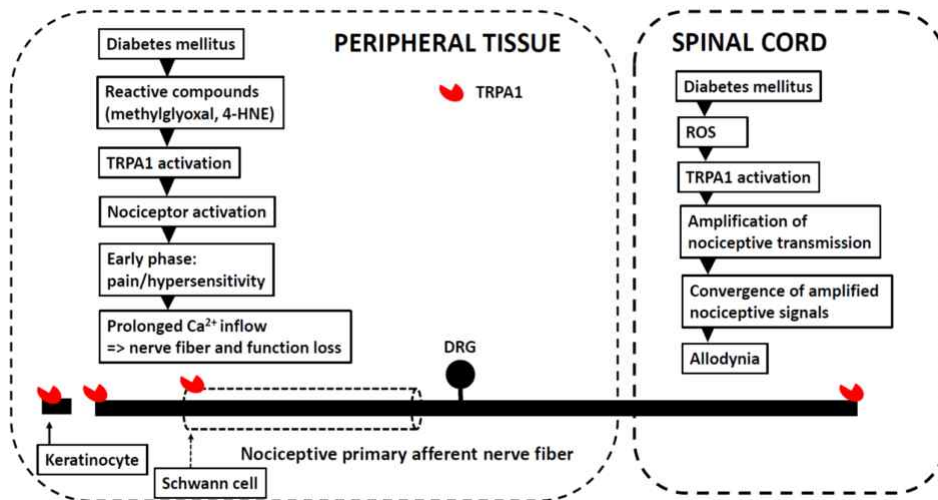


그림 13. TRPA 작용으로 인한 당뇨병성 신경병증 발생 기전
(Koivisto, A et al. *Pharmaceuticals*, 2018, 11, 117)

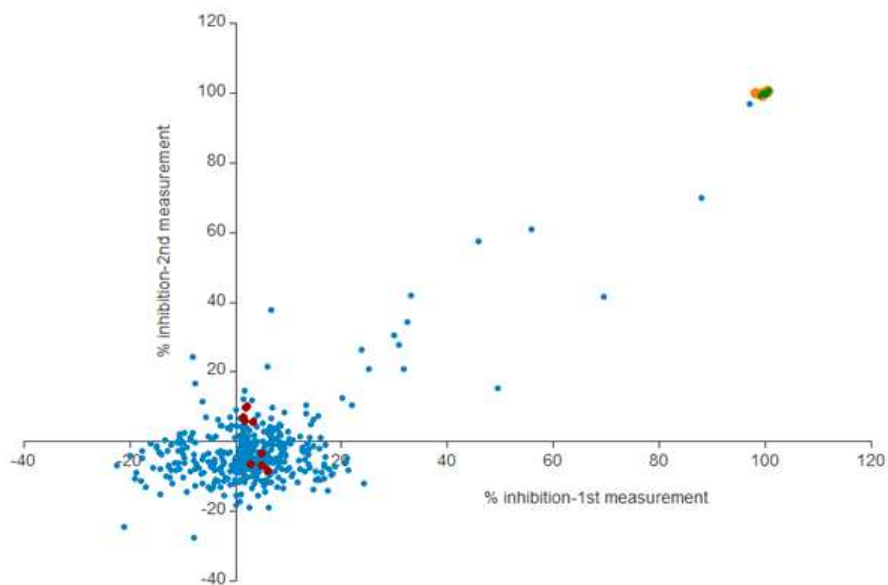


그림 14. 열대 해양생물 393종 추출물의 TRPA 억제 활성 측정 결과

- TRPA 억제 효능 해삼은 mitochondrial COI 유전자 염기서열을 활용한 분자 동정 결과 식용으로 활용되는 *Bohadschia vitiensis* 임이 확인됨 (그림 15)
- 해삼을 1cm³크기로 자른 후 동결 건조하고 이를 methanol과 dichloromethane으로 추출/농축. 수득 추출물을 n-butanol/water, 15% aqueous methanol/n-hexane으로 순차적으로 용매 분획. 15% aqueous methanol 층에서 수득된 분획물을 methanol과 물의 혼합 용매로 농도 구배 분

획 (그림 16)

- 수득된 6개의 분획 (70% aqM, 50% aqM, 30% aqM, 10% aqM, methanol, acetone)에 대하여 TRPA 억제 활성을 확인한 결과 10% aqM과 methanol 분획에서 각각 IC50 0.43, 0.62 ug/mL의 높은 활성이 나타남

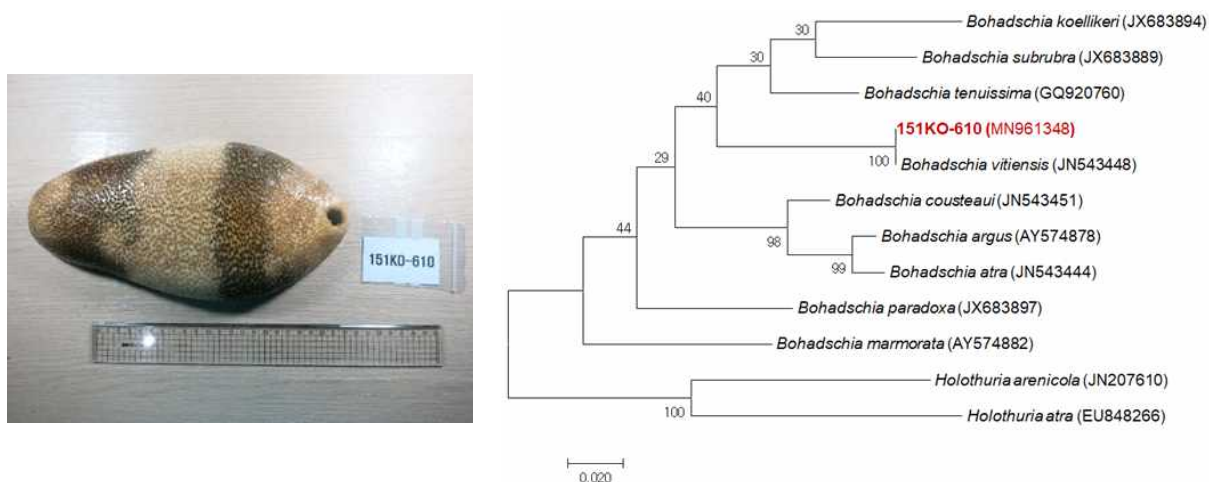


그림 15. *B. vitiensis* 사진과 분자 동정 결과

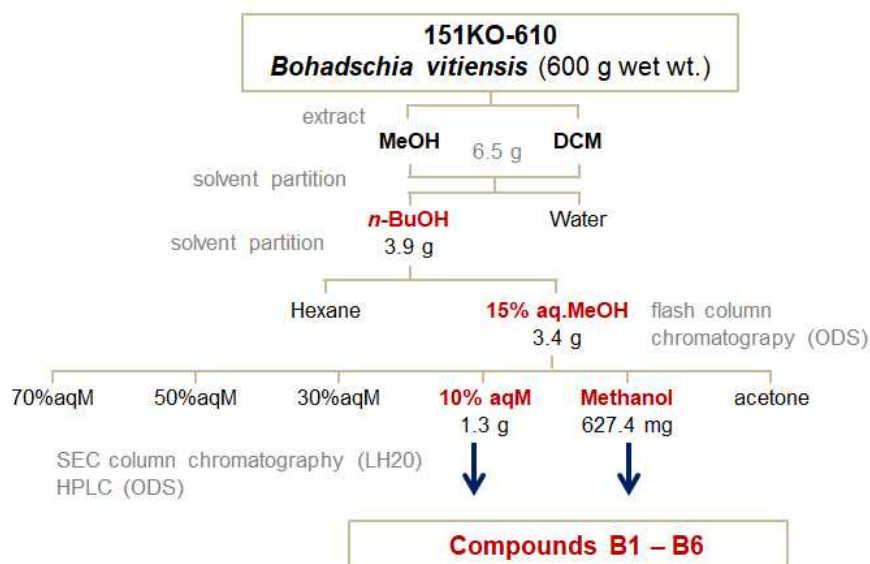


그림 16. *B. vitiensis*로부터 TRPA 억제 활성 천연물 분리 과정

- 두 활성 분획에 대하여 SEC (size-exclusion column chromatography), HPLC 등을 수행하여 6종의 화합물(B1 - B6)을 분리, NMR, HRMS 분석을 통해 triterpene glycoside (saponin)으로 동정 (그림 17)

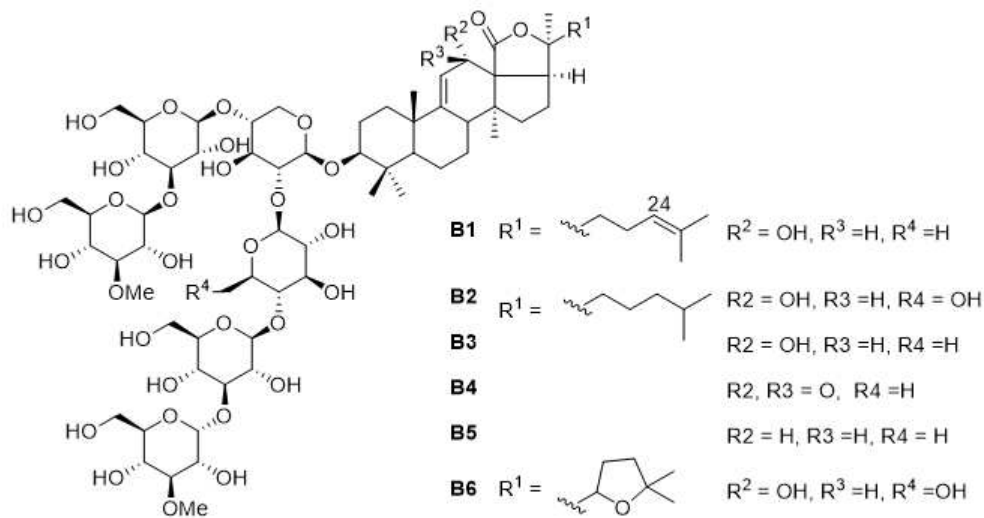


그림 17. *B.vitiensis*로부터 분리된 saponin 계열 화합물

- 신규 유도체로 확인된 B4 화합물의 경우, ¹H, ¹³C NMR과 함께 2D NMR (HSQC, HMBC, COSY)을 분석하여 aglycone 부분의 구조를 확정하였으며, NMR과 함께 MALDI-TOF MS/MS를 확인하여 여섯 개 당의 배치 순서를 확인함 (그림 18, 19)

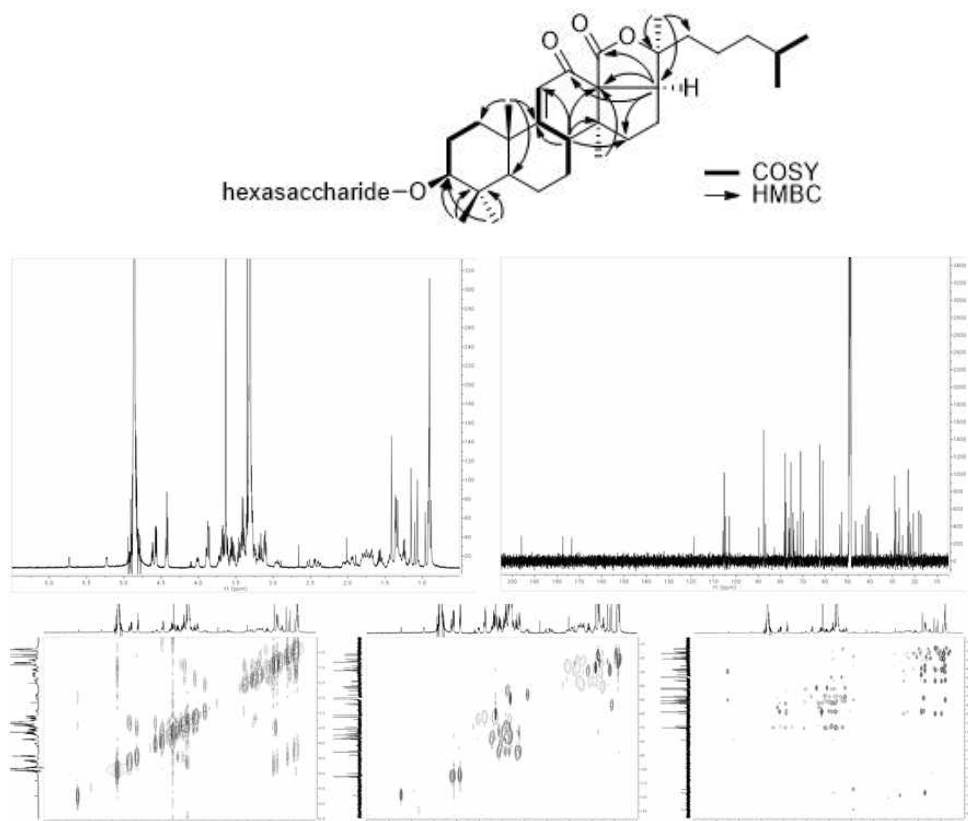


그림 18. *B. vitiensis* 유래 신규 saponin 화합물 (B4)의 2D NMR 분석 결과

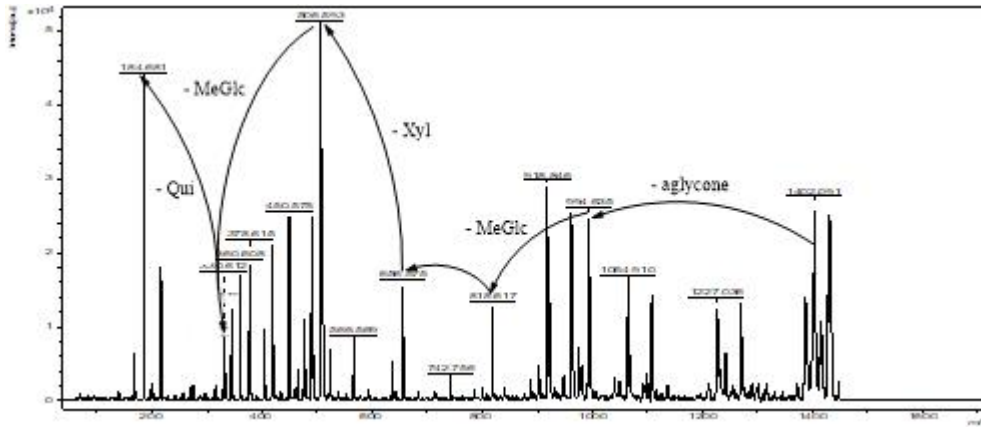


그림 19. *B. vitensis* 유래 신규 saponin 화합물 (B4)의 MALDI-TOF MS/MS 분석 결과

- 분리된 화합물 6종에 대한 TRPA 억제 활성 확인 결과 IC₅₀ 0.6 - 2.3 uM의 높은 활성이 확인됨 (표 5), 400 mg 이상으로 다량 분리된 B5 화합물의 경우 동물 모델에서의 통증 억제 활성을 확인중

표 5. *B. vitensis* 유래 화합물 (B1-B6)의 TRPA 억제 활성 (IC₅₀, uM)

Cpd	B1	B2	B3	B4	B5	B6	A-967079
IC ₅₀	0.60	1.07	1.26	2.26	1.36	1.33	0.80

제 2 절 해면 메타게놈 데이터 확보

○ 생합성 유전자군 발굴 전략

- 1차년도 확보된 4종 (해면 3종)의 메타게놈 데이터로부터 조립된 염기서열 (표 6)에서 천연물 생합성 유전자군을 찾기 위해 polyketide와 non-ribosomal peptide (NRP) 생합성과 관련된 sequence 탐색
- Polyketide synthase (PKS)와 관련해서는 PF00109, PF02801 (keto-synthase), PF00698 (acyltransferase)와 PF08659 (ketoreductase), NRP synthase (NRPS)에 대해서는 PF00501 (AMP-binding module)과 PF00668 (condensation module) 등의 Pfam profile pattern을 사용하는 hmmscan으로 sequence 탐색 진행 (그림 6, 7); PKS, NRPS gene sequence를 보유한 contig 194개가 확인됨
- PKS 및 NRPS gene cluster를 찾기 위해 antiSMASH 활용의 탐색 진행, 상기의 HMMER

search hit이 포함된 105개의 PKS와 6개의 NRPS gene (cluster)가 확인됨

· 대부분의 PKS gene cluster는 기보고 PKS들과는 낮은 similarity를 보임. 대부분의 gene cluster들은 2개 이하의 module들로 구성되어 있으며 (그림 22), 일부 gene sequence들은 micromonolactam 생합성과 연관이 있을 것으로 예상됨.

· 예측된 NRPS gene cluster 역시 알려진 sequence들과는 낮은 similarity를 보임. 대부분의 gene (cluster)들은 2개 이하의 module들로 구성 (그림 23)

표 6. 해면 메타게놈 de novo assembly 결과 (1차년도 결과)

	No. of contigs	Total size (bp)	GC ratio	Size of max. contig	N50	N90
194CH-01	38,294	89,532,356	56.86	169,778	2,610	1,138
194CH-03	116,900	230,614,909	45.00	311,960	2,025	1,137
194CH-07	85,623	346,460,911	63.08	3,575,507	9,518	1,367
194CH-09	140,613	357,303,635	55.65	755,827	2,783	1,215

ContigID	GenomeBinID	COG_ID	CogCode	194CH1	194CH3	194CH7	194CH9	SubsystemLevel_1	SubsystemLevel_2	SubsystemLevel_3
NODE_1	MGC_C17	COG3321	Q	0.0000	0.0000	7.1434	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_6	MGC_B4	COG3321	Q	0.0000	0.0000	5.3871	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_8	MGC_B80	COG3321	Q	0.0000	0.0000	7.1544	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_23	MGC_B119	COG3321	Q	0.0200	0.0000	5.9272	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_29	MGC_B79	COG3321	Q	0.0000	0.0000	27.7994	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_34	MGC_B114	COG3321	Q	0.0000	0.0000	7.0781	0.0000	Cell Wall and Capsule	Capsular and extracellular polysaccharide	Capsular_heptose_biosynt
NODE_42	MGC_B141	COG3321	Q	0.0000	0.0000	7.6887	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_48	MGC_B142	COG3321	Q	0.0207	0.0000	17.6789	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_65	MGC_B140	COG3321	Q	0.0219	0.0000	5.4987	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_86	MGC_B114	COG3321	Q	0.0000	0.0000	6.5337	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_134	MGC_B142	COG3321	Q	0.0000	0.0000	14.8113	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_151	MGC_B84	COG3321	Q	0.0200	0.0000	6.6780	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_155	MGC_C172	COG3321	Q	0.0000	0.0000	4.3276	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_170	MGC_B42	COG3321	Q	0.0201	0.0000	9.3570	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_193	MGC_B147	COG3321	Q	0.0000	0.0000	9.1618	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_253	MGC_B119	COG3321	Q	0.0294	0.0000	6.0875	0.0000	Cell Wall and Capsule	Capsular and extracellular polysaccharide	Capsular_heptose_biosyn
NODE_269	MGC_B155	COG3321	Q	0.0000	0.0000	3.4419	0.0000	Cell Wall and Capsule	Capsular and extracellular polysaccharide	Capsular_heptose_biosynt
NODE_296	MGC_B152	COG3321	Q	0.0000	0.0000	6.8108	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_303	MGC_B87	COG3321	Q	0.0217	0.0000	3.6920	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_307	MGC_B139	COG3321	Q	0.0000	0.0000	6.8230	0.0000	Cell Wall and Capsule	Capsular and extracellular polysaccharide	Capsular_heptose_biosynt
NODE_347	MGC_B80	COG3321	Q	0.0264	0.0000	3.5736	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_435	MGC_B133	COG3321	Q	0.0000	0.0000	10.2453	0.0000	Cell Wall and Capsule	Capsular and extracellular polysaccharide	Capsular_heptose_biosynt
NODE_437	MGC_B122	COG3321	Q	0.0000	0.0000	3.4616	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_445	MGC_B155	COG3321	Q	0.0000	0.0000	3.4920	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_453	MGC_B133	COG3321	Q	0.0000	0.0000	6.1541	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_453	MGC_B133	COG3321	Q	0.0000	0.0000	5.3122	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_489	MGC_C172	COG3321	Q	0.0000	0.0000	4.5577	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F
NODE_530	MGC_B11	COG3321	Q	0.0000	0.0000	6.3259	0.0000	Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	Fatty acids	Fatty_Acid_Biosynthesis_F

그림 20. HMMER search 결과 (일부) - PKS

A	B	C	D	F	G	H	I	M	O
CDS_ID	ContigID	GenomeBinID	COG_ID	194CH1	194CH3	194CH7	194CH9	Functions	AntiSMASH
SPNG_0067797	NODE_360	MGC_B42	COG1020	0.1491	0.0000	13.3606	0.0000	.	Detected
SPNG_007945C	NODE_504	MGC_B83	COG1020	0.0000	0.0000	2.9121	0.0000	Enterobactin synthetase component F, serine activating enzyme (EC 2.7.7)	Detected
SPNG_0311043	NODE_19035	.	COG1020	0.0367	2.8084	0.0000	0.0000	.	Detected
SPNG_0397717	NODE_37970	MGC_A168	COG1020	0.0000	0.0000	2.0102	0.0000	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase (EC 6.2.1.3)	Not detected
SPNG_0528794	NODE_77909	.	COG1020	0.0000	2.1276	0.0000	0.0000	.	Not detected
SPNG_0572976	NODE_94738	.	COG1020	0.2366	0.0000	0.0000	1.5045	.	Not detected
SPNG_058482E	NODE_99613	.	COG1020	0.0000	0.0000	0.0000	0.5303	.	Detected
SPNG_0639715	NODE_123688	.	COG1020	0.0000	2.2761	0.0000	0.0000	.	Detected
SPNG_0722007	NODE_163934	.	COG1020	0.0000	1.4654	0.0000	0.0000	.	Detected
SPNG_0832862	NODE_225677	.	COG1020	0.0000	0.0000	0.0000	0.6307	.	Not detected

그림 21. HMMER search 결과 - NRPS

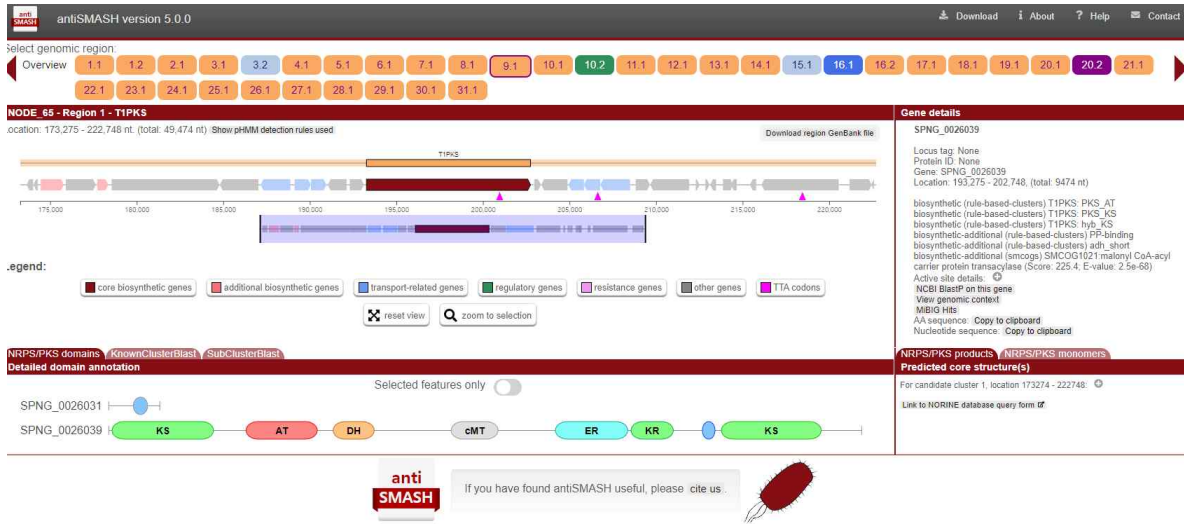


그림 22. 해면 메타게놈으로부터 예측된 PKS gene cluster (일부)

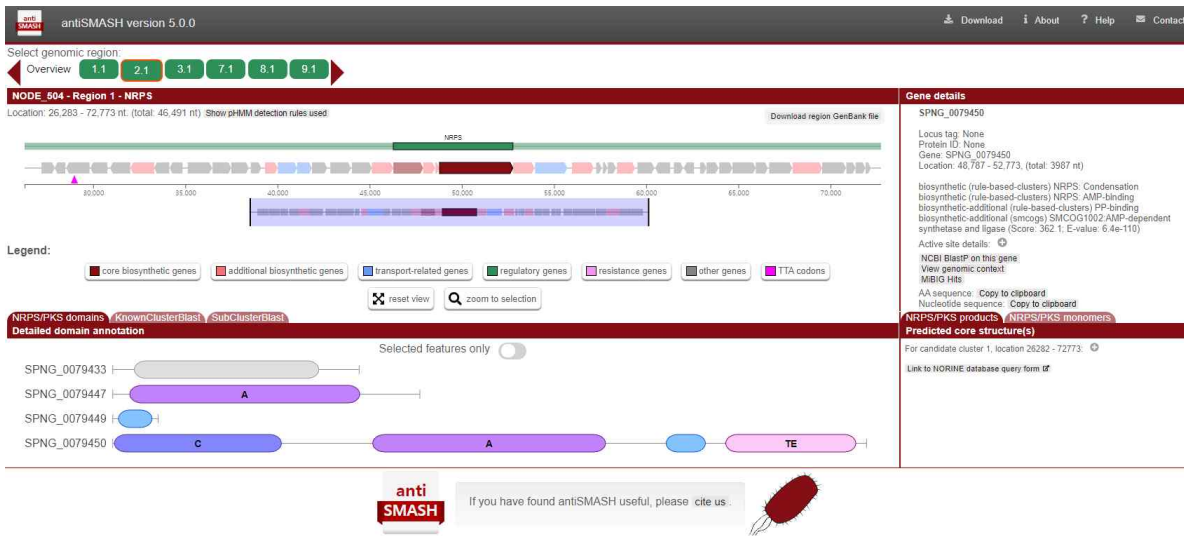


그림 23. 해면 메타게놈으로부터 예측된 NRPS gene cluster (일부)

- 모든 PKS, NRPS gene (cluster)들이 194CH-07에서 확인되었으므로, 이를 중심으로 천연물 생합성 관련 gene cluster 발굴/검증 연구를 진행

○ 해면 분자 동정 (194CH-07 해면 분자 동정 결과)

- 분석 대상 해면으로 선정된 194CH-07의 분자 동정 수행; 해면의 동정 및 분류는 해면의 성장 형태, 모양, 색 등을 기준으로 이루어지나, 해면의 외형적 특징은 서식지에 따라 다양화 될 수 있으므로 추가적 분자 동정 필요

- 194CH-07은 형태분류 (한남대 자연사박물관, 김영아 박사)에서는 *Faciospongia* sp.

(Demospongiae - Dictyoceratida - Thorectidae)로 확인되었으며, 18S rRNA 분석 (1422 bps, complete deletion)에서는 *Dactylospongia elegans* (Thorectidae)와 유사한 종으로 확인됨 (1차년도 결과)

- Sponge Barcoding Project (spongebarcoding.org)의 지침에 따라 28S rDNA C-region과 COI mtDNA extension region을 활용한 분자동정을 추가적으로 수행
 - * Sponge Barcoding Project(SBP); 모든 해면군의 정확한 동정을 위해 2010년에 시작, 34,000개의 표본에서 얻어진 시퀀스를 바탕으로 28S rRNA와 COI sequence target barcode primer 공개
- 냉동 보관되어 있던 해면 시료를 파쇄하고 proteinase K가 첨가된 lysis buffer에 침지, NucleoSpin® Tissue kit의 animal tissue를 위한 추출 protocol에 따라 유전자 추출 진행
- 추출된 DNA는 1.6kb~8kb의 size를 보임; DNA degradation 저해용 버퍼에 침장하지 않고 냉동 보관하여 degradation이 발생한 것으로 판단됨 (그림 24)

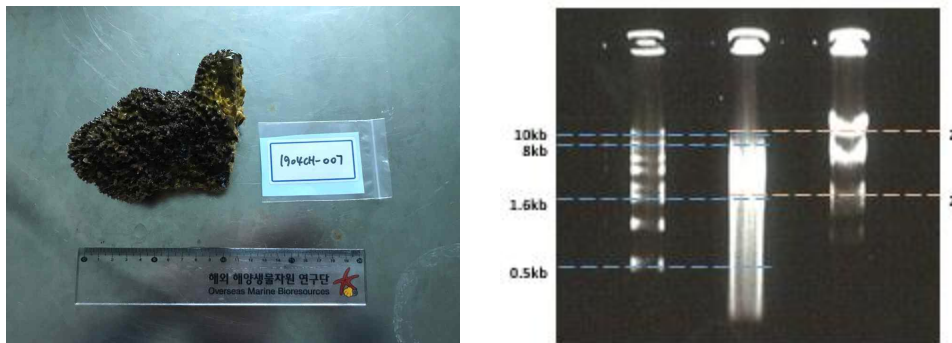


그림 24. 194CH-07 시료와 이로부터 추출된 gDNA

- dgLCO1490, dgHCO2198 primer set을 이용하여 COI 유전자 sequence를 증폭, 증폭된 COI 샘플은 purification 후 sanger sequencing하여 660bp 길이의 시퀀스 획득
- NCBI BLAST 결과 Demospongiae sp. strain들 (GW3268, 3273, 5790, 5935, 5954)의 COI gene 이 77%의 coverage를 보이나 E-value 0.00 으로 100%의 similarity를 보여 가장 유사한 종으로 나타나며, 정식으로 보고된 종 중 중 *Dactylospongia elegans* (Porifera-Demospongiae-Keratosa-Dictyoceratida-Thorectidae-Thorectinae-Dactylospongia)와 98.62%로 가장 유사 (표 7)
- 28S rRNA 시퀀스 정보를 얻기 위해 Sponge Barcoding Project에서 제공하는 28S rRNA target primer set인 28S-C2-fwd, 28S-D2-rev primer set을 사용 증폭을 시도하였으나 실패
- 근연종들의 28S rRNA sequence를 이용하여 multiple alignment를 진행하였을 때 forward primer 결합부위의 nucleotide 1base가 기존 primer서열과 차이나는 것을 확인하여 이를 치환한 primer를 새로 제작 (그림 25)

표 7. 194CH-07 근연종 (COI, similarity 98% 이상)

Description	Query cover	E value	Per. Ident	Accession
<i>Demospongiae</i> sp. GW5954 COI	77%	0.0	100%	KU060741.1
<i>Demospongiae</i> sp. GW5935 COI	77%	0.0	100%	KU060735.1
<i>Demospongiae</i> sp. GW5790 COI	77%	0.0	100%	KU060716.1
<i>Demospongiae</i> sp. GW3273 COI	77%	0.0	100%	KU060605.1
<i>Demospongiae</i> sp. GW3268 COI	77%	0.0	100%	KU060603.1
Cf. <i>Hippospongia</i> sp. G313261 COI	87%	0.0	99.83%	JQ082792.1
<i>Demospongiae</i> sp. GW5791 COI	77%	0.0	99.81%	KU060717.1
<i>Thorectinae</i> sp. GW26644 COI	75%	0.0	99.80%	LR699430.1
<i>Dactylospongia</i> sp. DAS.1 COI	100%	0.0	99.70%	KX894492.1
<i>Dactylospongia</i> sp. DAS.2 COI	96%	0.0	99.69%	KX894493.1
<i>Demospongiae</i> sp. GW3534 COI	77%	0.0	98.83%	KU060695.1
<i>Dactylospongia elegans</i> strain SCS1 COI	87%	0.0	98.62%	KY979509.1
<i>Dactylospongia elegans</i> isolate G313054 COI	87%	0.0	98.62%	JQ082802.1
<i>Dactylospongia</i> sp. QM G311348 COI	75%	0.0	98.59%	LR699408.1

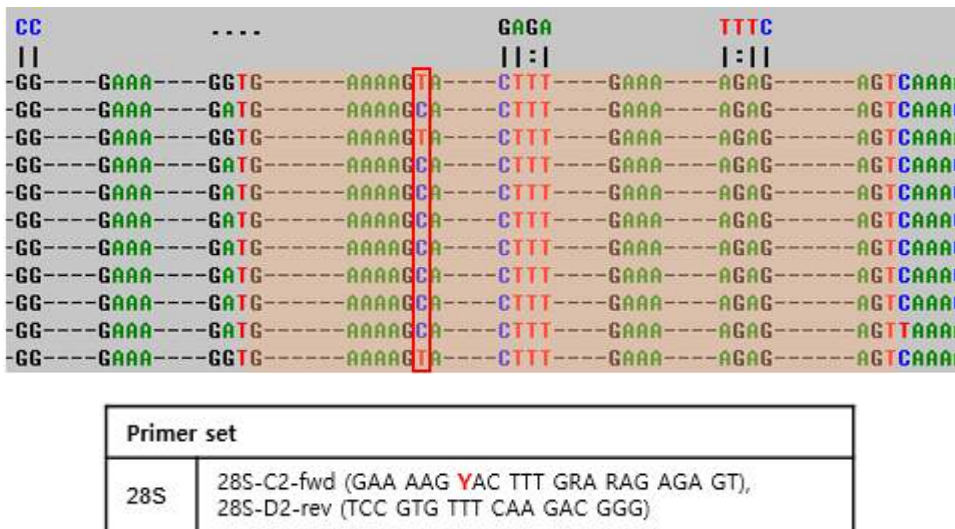


그림 25. 194CH-07 28S rRNA sequencing을 위한 primer 설계

(상) Forward primer 서열 부분(주황박스)과 일치하지 않는 nucleotide (빨간테두리박스)

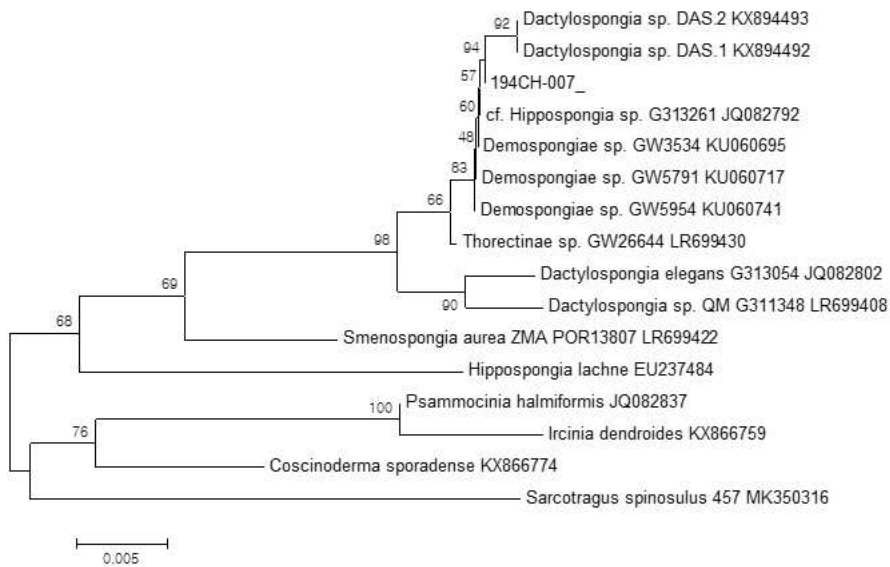
(하) A를 Y(C or T)로 바꾸어 제작한 primer

- 설계/제작된 primer set에 적절한 PCR condition 탐색 하여 증폭에 성공. 증폭된 28S rRNA 유전자는 정제 후 sanger sequencing 하여 318bp 길이의 시퀀스를 얻음
- BLAST 결과 *Demospongiae* sp. strains의 28S rRNA gene들과 99.69%의 similarity를 보여 가장 유사한 종으로 나타나며 정식으로 보고된 종 중 *Dactylospongia elegans* T3과 98.11%로 가장 유사함 (표 8)

표 8. 194CH-07 근연종 (28S rRNA, similarity 98% 이상)

Description	Query cover	E value	Per. Ident	Accession
<i>Demospongiae</i> sp. GW5954 28S rRNA	100%	3e-162	99.69%	KU060520.1
<i>Demospongiae</i> sp. GW5935 28S rRNA	100%	3e-162	99.69%	KU060514.1
<i>Demospongiae</i> sp. GW5884 28S rRNA	100%	3e-162	99.69%	KU060502.1
<i>Demospongiae</i> sp. GW5791 28S rRNA	100%	3e-162	99.69%	KU060486.1
<i>Demospongiae</i> sp. GW5790 28S rRNA	100%	3e-162	99.69%	KU060485.1
<i>Demospongiae</i> sp. GW3547 28S rRNA	100%	3e-162	99.69%	KU060474.1
<i>Demospongiae</i> sp. GW3540 28S rRNA	100%	3e-162	99.69%	KU060470.1
<i>Demospongiae</i> sp. GW3534 28S rRNA	100%	3e-162	99.69%	KU060466.1
<i>Demospongiae</i> sp. GW5798 28S rRNA	94%	3e-153	99.67%	KU060488.1
<i>Demospongiae</i> sp. GW3268 28S rRNA	100%	6e-160	99.06%	KU060393.1
<i>Dactylospongia elegans</i> strain T3 28S rRNA	100%	1e-156	98.11%	MK554863.1

- 계통분석 결과 194CH-07이 COI, 28S rRNA 기반 계통수 모두에서 *Dactylospongia* 속의 상위 분류군 (*Demospongiae* sp., *Thorectinae* sp.)과 같은 그룹으로 묶였으며 이를 통해 *Dactylospongia* 속에 속하는 미동정 종 인 것을 알 수 있음 (그림 26)



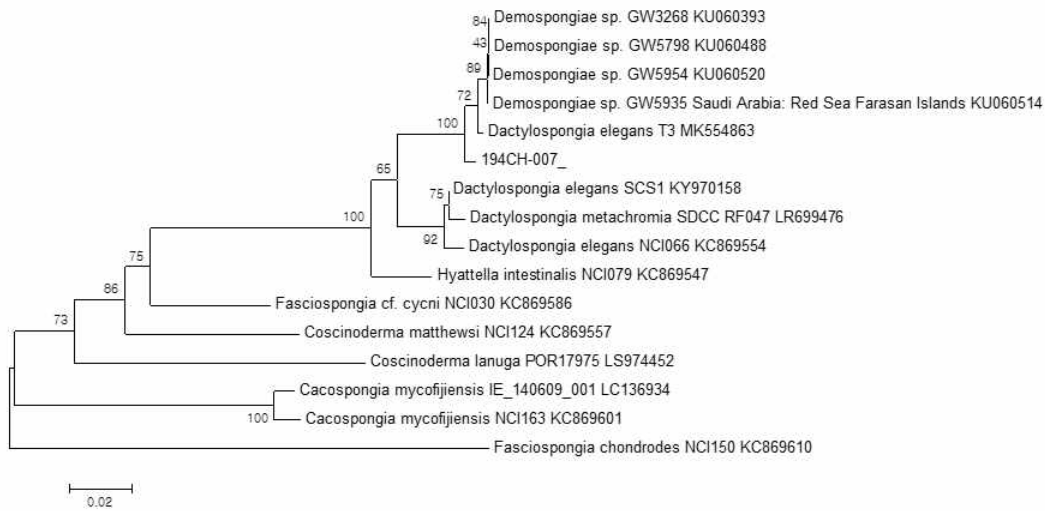


그림 26. 194CH-07 계통분석 결과

COI 기반 phylogenetic analysis (상)/ 28S rRNA기반 phylogenetic analysis (하)

○ 194CH-07 해면 함유 천연물 분리/분석

- 메타게놈으로부터 추출되는 천연물 생합성 유전자군들의 기능 분석을 위해 194CH-07이 함유하고 있는 천연물 분리/분석을 수행. 일반적인 해양무척추동물 추출-분획 과정을 수행한 결과 특히 극성이 낮은 분획의 수율이 높게 나타났으며, 이로부터 화합물 10종 (D1-D8)이 분리됨 (그림 27)

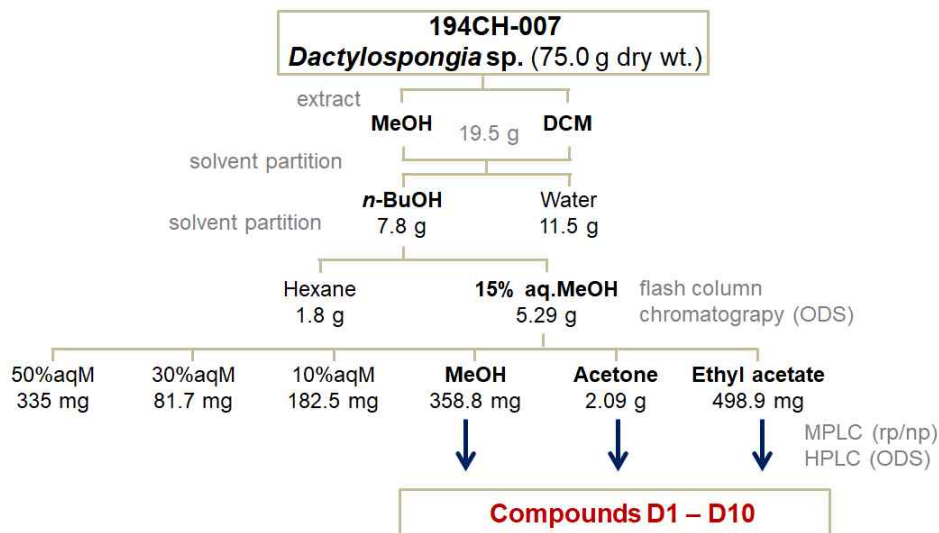


그림 27. 194CH-07로부터 천연물 분리 과정

- ¹H NMR, ¹³C NMR과 HRMS를 활용한 분리 화합물의 동정 결과 분리된 D1-D8은

smenospongine, ilimaquinone, 5-epi-ilimaquinone, langcoquinone C, nakijiquinone L, smenospongidine, smenospongiarine, smenospongorine으로 확인되었으며, 2종은 미보고의 meroterpenoid로 예상됨 (그림 28, 29)

- 미보고 meroterpenoid에 대해서는 구조분석 수행 중이며 ilimaquinone과 동일 골격의 유도체로 예상됨

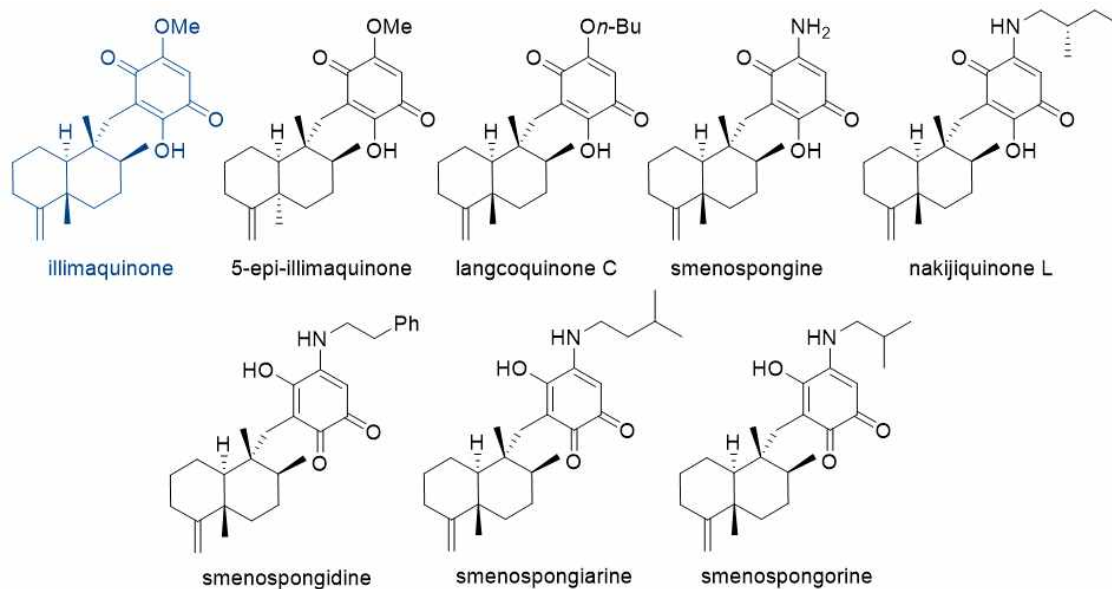


그림 28. 194CH-07로부터 분리된 기지 meroterpenoid 8종

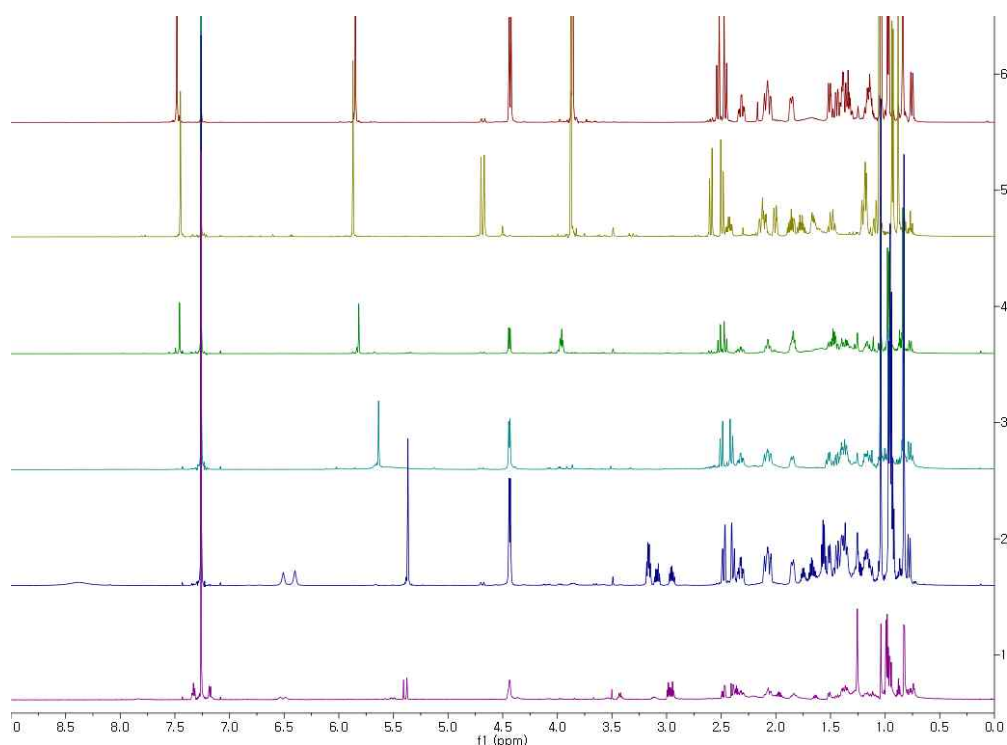


그림 29. 194CH-07로부터 분리된 기지 meroterpenoid의 ¹H NMR

- Ilimaquinone 화합물은 HIV의 RNase를 억제하는 항바이러스 활성, G1 phase arrest 및 CHOP/GADD153 nuclear translocation을 통한 항암활성 등을 나타내는 것이 보고됨. (Loya, S. et al. Antimicrob. Agents Chemother. 1990, 34, 2009; De Clercq, E. Med. Res. Rev. 2000, 20, 323; Takizawa, P. A. et al. Cell 1993, 73, 1079; Lu, P.-H. et al. Eur. J. Pharmacol. 2007, 556, 45); 천연물 효용성이 높아 생합성 분석 가치가 있을 것으로 판단
- 주로 진균 계통에서 발견되는 meroterpenoid 생합성 유전자군 30 - 50 kbp 길이 내에 polyketide 부분의 생합성과 관련된 PKS gene과 terpenoid 부분의 생합성 관련된 terpene synthase gene을 함께 함유하고 있으며, 그 외 전구체 합성과 추가적인 구조 변형에 필요한 prenyltransferase, oxidoreductase, P450 관련 gene 등을 포함
- PKS-TPS(terpene synthase) hybrid 형태의 유전자군 발굴을 목표로 194CH-07의 메타게놈 자료를 분석/검증하기로 결정

○ 194CH-07 메타게놈으로부터 meroterpenoid 생합성 유전자군 발굴

- Meroterpenoid계 화합물은 주로 진균 (fungi) 배양체에서 분리되는 경우가 많으며, 이들 genome에 대한 분석으로 생합성 유전자군이 발굴된 연구 결과들이 다수 보고되어 있음 (ascofuranone, ascochlorin, anditomin, arthropenoid, berkeleyacetals, andrastin A, terretinin, eupenifeldin, paxilline, pyripyropene, terpentecin 등)
- Fungal meroterpenoid 생합성 유전자군은 30 - 50 kbp 길이의 sequence 내에 polyketide 부분의 생합성과 관련된 PKS gene과 terpenoid 부분의 biosynthesis와 관련된 terpene cyclase gene을 함께 함유하고 있으며, 그 외 전구체 합성과 추가적인 구조 변형에 필요한 prenyltransferase, oxidoreductase, P450 관련 유전자들을 포함하고 있음 (그림 30)

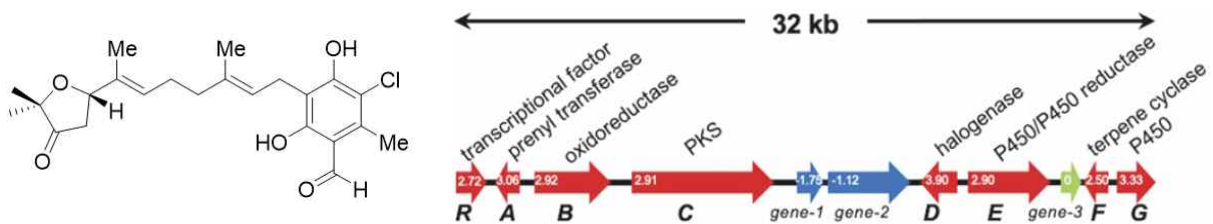


그림 30. Fungal meroterpenoid 생합성 유전자군 구조 (예) ;

Ascofuranone과 생합성 유전자군 구조

(Araki, Y. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 2019, 116, 8269)

- PKS-TPS(terpene synthase) hybrid 형태의 gene cluster 발굴을 목표로 194CH-07의 메타게놈 자료를 분석/검증하기로 결정
- Ilimaquinone 생합성 경로는 크게 네 단계로 구성되어 있을 것으로 예상됨; (1) polyketide

synthesis; quinone 전구체인 benzoic acid 생합성, (2) polyprenylation; polyketide와 terpenoid 연결, (3) linear terpene cyclization (terpene cyclase), (4) functional group modification (accessory enzymes). (1)의 과정 이후 (2)-(4)의 과정이 어떠한 순서로 발생할지에 대해서는 유전자 기능 분석 이후 정확한 결론을 내릴 수 있음 (그림 31)

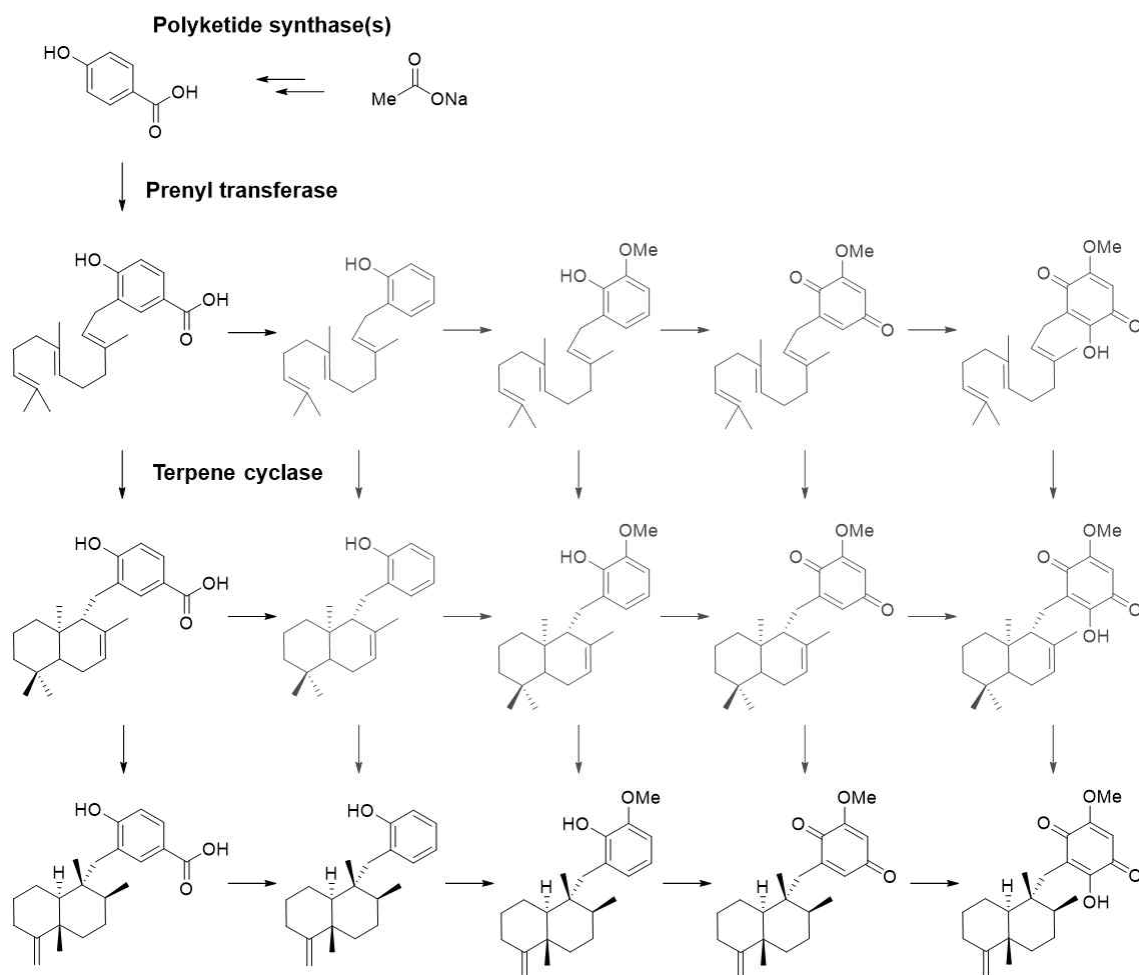


그림 31. Ilimaquinone의 생합성 경로 예측

- 194CH-07 유래 메타게놈 데이터의 antiSMASH 분석; 77개의 node에서 PKS, 86개의 node에서 TPS (terpene synthase), 34개의 node에서 NRPS (non-ribosomal peptide synthase) 관련 유전자군이 확인됨. (그림 32, 33)

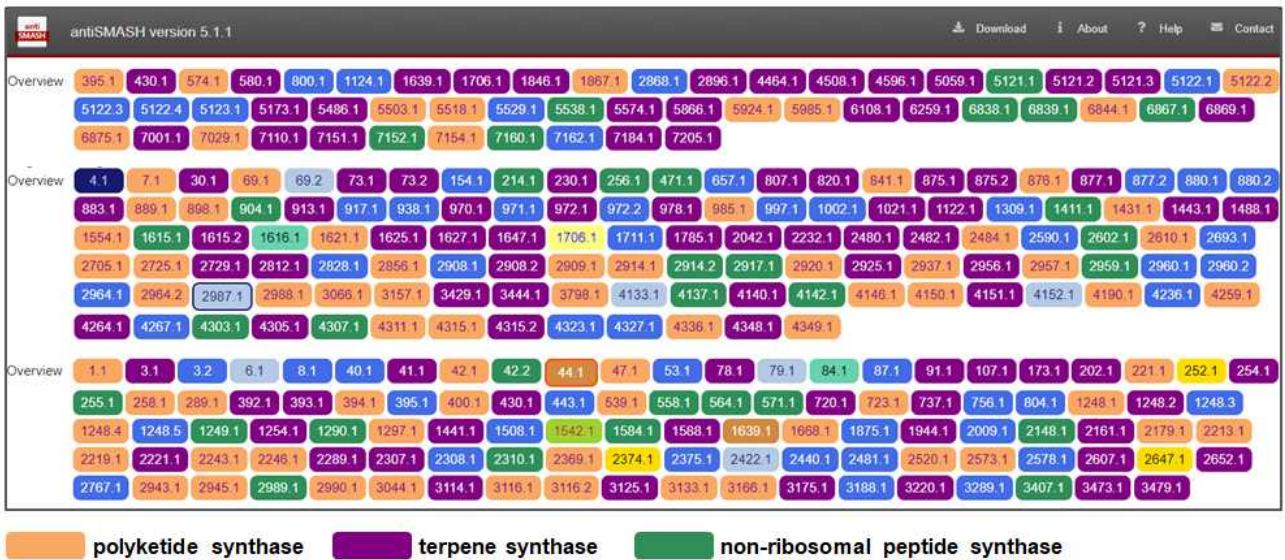


그림 32. 194CH-07 메타게놈의 antiSMASH 결과 개요

	Genome bin ID	Node	Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
1								
248	MGC_C172	NODE_155	Region 3116.2	T3PKS	104,458	145,561		
249	MGC_C172	NODE_218	Region 3125.1	terpene	57,848	79,794		
250	MGC_C172	NODE_499	Region 3133.1	T1PKS	1	27,744		
251	MGC_C226	NODE_1191	Region 3166.1	T1PKS	3,636	44,989		
252	MGC_C226	NODE_2667	Region 3175.1	terpene	10,363	23,665		
253	MGC_C226	NODE_3150	Region 3188.1	bacteriocin	11,502	20,939		
254	MGC_C226	NODE_5159	Region 3220.1	betalactone	18	14,306		
255	MGC_C226	NODE_10136	Region 3289.1	bacteriocin	57	8,574		
256	MGC_C246	NODE_2725	Region 3407.1	NRPS-like	1	23,343		
257	MGC_C246	NODE_14649	Region 3473.1	terpene	1	6,748	hopene; Terpene	15%
258	MGC_C246	NODE_15797	Region 3479.1	terpene	1	6,458		
259	MGC_B141	NODE_42	Region 1.1	T1PKS	249,940	299,536		
260	MGC_B141	NODE_64	Region 3.1	terpene	123,632	167,941		
261	MGC_B141	NODE_64	Region 3.2	bacteriocin	215,678	226,547		
262	MGC_B142	NODE_10	Region 40.1	bacteriocin	277,579	287,830		
263	MGC_B142	NODE_41	Region 41.1	terpene	23,328	45,423		
264	MGC_B142	NODE_48	Region 42.1	T1PKS	154,707	204,798		
265	MGC_B142	NODE_48	Region 42.2	NRPS-like	232,535	276,956	VEPE / AEPE / TG-1; Other:Nucleoside	40%
266	MGC_C17	NODE_1	Region 1248.1	T1PKS	32,152	79,012		
267	MGC_C17	NODE_1	Region 1248.2	terpene	329,313	351,234		
268	MGC_C17	NODE_1	Region 1248.3	bacteriocin	1,844,068	1,852,532		
269	MGC_C17	NODE_1	Region 1248.4	T1PKS	2,426,177	2,472,656	meridamycin; NRP + Polyketide	5%
270	MGC_C17	NODE_1	Region 1248.5	bacteriocin	3,095,222	3,105,917		
271	MGC_C17	NODE_84	Region 1249.1	NRPS-like	185,850	229,560		
272	MGC_C172	NODE_75	Region 3114.1	terpene	173,214	194,131		
273	MGC_C6	NODE_6645	Region 804.1	bacteriocin	1	7,019		
274	MGC_C69	NODE_102	Region 2161.1	terpene	66,499	87,566		
275	MGC_C69	NODE_808	Region 2179.1	T1PKS	1	33,134		

그림 33. 194CH-07 메타게놈 유래 천연물 생합성 유전자 목록 (일부)

- MGC B139 bin에서 가장 많은 생합성 유전자 (NRPS, TPS, type 1 PKS, type 3 PKS)들이 발

견되었는데, 특히 84 kbp 의 크기로 type 1 PKS와 TPS를 함께 함유한 유전자군 (SPNG_0062717, ctg. 4315_1 -2)이 확인됨 (그림 34)

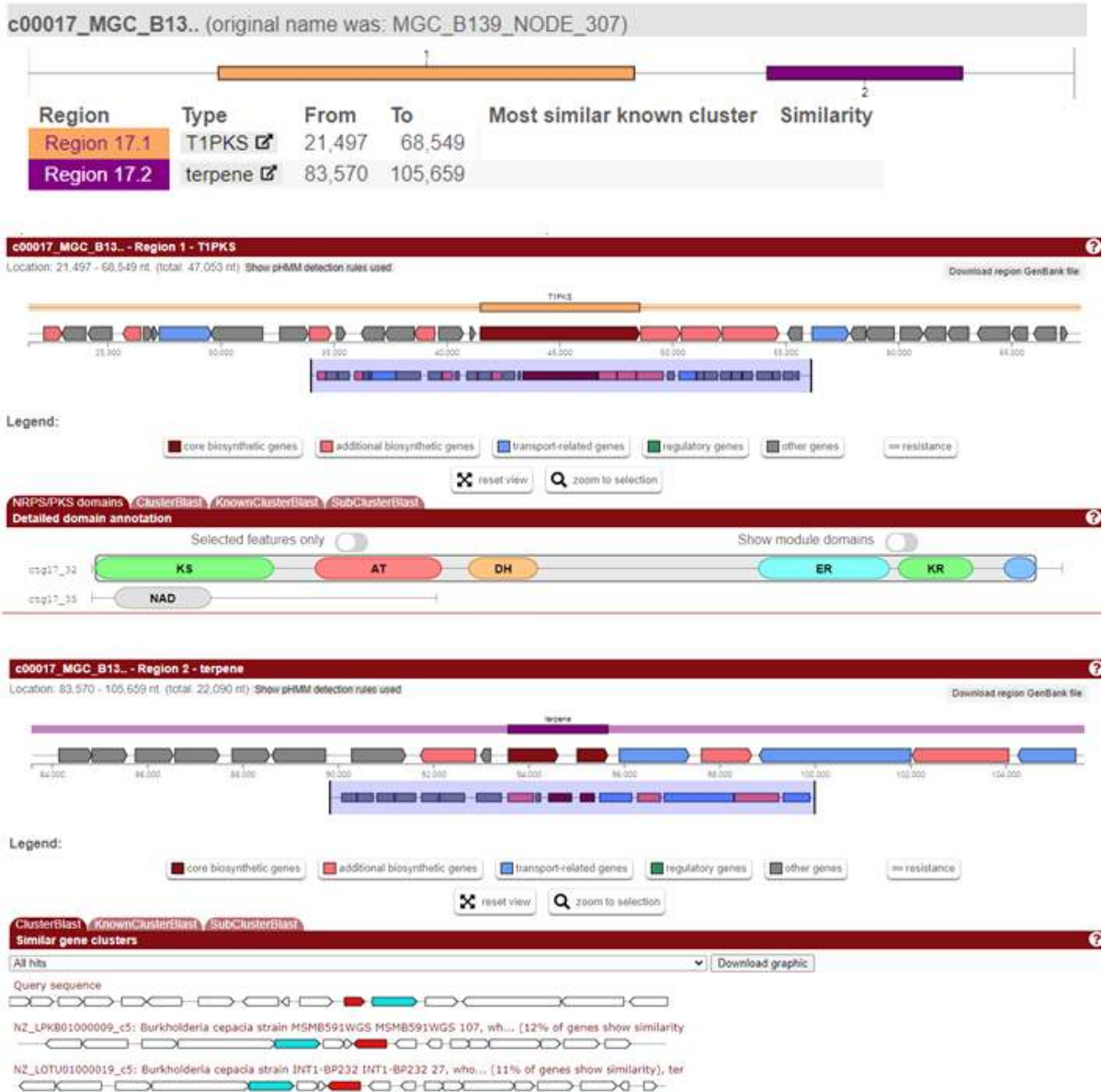


그림 34. 194CH-07 메타게놈 유래 PKS-TPS hybrid 예측 유전자군

- PKS의 각 모듈이 잘 보존되어 있고, PKS 및 TPS 주변에 ilimaquinone 생합성에 필요한 다양한 추가 유전자들 (methyltransferase, oxidoreductase 등) 다양한 생합성 유전자들이 존재하여 ilimquinone 생합성 유전자군의 강력한 후보로 예상되나 (그림 35) 기존 유전자군들과의 상동성이 높지 않아 이형발현을 통한 기능 확인이 필요; 차년도 이형발현 대상 유전자로 선정

target name	query name	accession	Function	BLASTp	full sequence			best 1 domain		
					E-value	score	bias	E-value	score	bias
B139_NODE_307_orf00051	MazE_antitoxin	PF04014.18			0.0000011	29.3	0.1	0.0000016	28.7	0.1
	PrIF_antitoxin	PF15937.5			7.1E-08	33.6	0	7.7E-08	33.5	0
B139_NODE_307_orf00054	Acyl_transf_1	PF00698.21	AT		1.3E-63	216.3	0	2.5E-63	215.4	0
	adh_short	PF00106.25			0.0000037	30.7	0	0.0000067	26.6	0
	ADH_zinc_N	PF00107.26	DH		7.8E-19	68.8	0.1	5.9E-18	66	0.2
	ADH_zinc_N_2	PF13602.6			5.4E-17	64	0	2.3E-16	61.9	0
	KAsynt_C_assoc	PF16197.5			1.5E-14	55.3	0	3.3E-14	54.2	0
	ketoacyl-synt	PF00109.26	KS		4E-51	174.9	0	8.2E-51	173.9	0
	Ketoacyl-synt_C	PF02801.22			2.6E-27	96.1	0.5	6E-27	94.9	0.5
B139_NODE_307_orf00056	KR	PF08659.10	KR		1.9E-50	172.2	0	5.6E-50	170.6	0
	PS-DH	PF14765.6	DH	ACP	3.7E-37	129.1	0	2.6E-36	126.3	0
	B12-binding	PF02310.19			0.0000008	30	0	0.0000029	28.2	0
B139_NODE_307_orf00058	DUF4070	PF13282.6			3.9E-23	83	1	7.6E-23	82.1	0.2
	Radical_SAM	PF04055.21			1E-16	62.6	0	2.6E-16	61.3	0
B139_NODE_307_orf00061	B12-binding	PF02310.19			0.00000019	32	0	0.0000021	28.7	0
	DUF4070	PF13282.6			1.2E-23	84.6	0.4	2.3E-23	83.7	0.4
B139_NODE_307_orf00062	Radical_SAM	PF04055.21			5E-16	60.4	0	1.2E-15	59.2	0
	Sulfotransfer_3	PF13469.6	epimerase/dehydrata		2.9E-36	126.8	0.9	7.7E-36	125.4	0.9
B139_NODE_307_orf00065	STAS	PF01740.21	sulfate transporter		8.1E-09	36	0	1.3E-08	35.4	0
	MFS_1	PF07690.16			2.1E-50	172.5	45.7	2.1E-50	172.5	45.7
B139_NODE_307_orf00067	Sugar_tr	PF00083.24			2E-09	37.7	10.5	2E-09	37.7	10.5
	TRI12	PF06609.13			8.2E-16	58.4	20.4	1.1E-15	58	20.4
B139_NODE_307_orf00069	CCP_MauG	PF03150.14			4.5E-40	138.6	0	6.8E-36	125	0
	Cytochrom_C	PF00034.21			0.00000039	32	0.5	0.0008	21.4	0.1
B139_NODE_307_orf00070	dCache_2	PF08269.11			6.2E-12	46.2	0	0.0000041	27.1	0
	sCache_2	PF17200.4			4.8E-10	40.4	0	0.000012	26.1	0
B139_NODE_307_orf00071	OMP_b-brl	PF13505.6			3.2E-10	41.3	0.1	8.6E-09	36.6	0.1
B139_NODE_307_orf00073	Peptidase_U32	PF01136.19			0.0000013	28.6	0	0.0000023	27.8	0
B139_NODE_307_orf00075	Peptidase_M23	PF01551.22			3.8E-24	85.6	0.1	5.8E-24	85	0.1
B139_NODE_307_orf00077	RadC	PF04002.15			2.4E-42	144.6	0	3.4E-42	144.1	0
B139_NODE_307_orf00078	FAA_hydrolase	PF01557.18			1.2E-67	228.7	0	1.4E-67	228.4	0
B139_NODE_307_orf00078	YCII	PF03795.14			7.7E-08	33.5	0	0.0000009	33.3	0

그림 35. 194CH-07 메타게놈 유래 MGC B139 (node 307) 유전자 기능 예측 (일부)

○ 194CH-07 메타게놈으로부터 terpenoid 생합성 유전자 발굴

- PKS, NRPS에 비하여 크기가 작아 발현이 쉬운 terpenoid 생합성 관련 유전자를 다양하게 발굴하기 위한 연구를 추가적으로 수행
- 86개의 TPS 함유 node에서 발굴된 96개의 terpene synthase 유전에 대하여 기보고된 박테리아 유래 terpene cyclase와 함께 multiple alignment 분석 및 계통수 분석 실시; 4가지 그룹
 - (1) squalene synthase family, (2) farnesyl-diphosphate farnesyltransferase, (3) phytoene/squalene synthase family, (4) squalene-hopene cyclase-으로 분류됨을 확인 (그림 36)
- 4개의 TPS 유전자 그룹 중 linear terpene metabolism과 (1)-(3) 그룹을 제외, terpenoid (cyclic terpene)의 생합성과 관련된 cyclase 관련으로 예측되는 유전자는 23종 (squalene-hopene cyclase) 으로 기보고 terpene cyclase와 유사한 기능을 가질 것으로 예상
- Terpene cyclase 예측 유전자 23종 중 19종은 HMMER search에서도 같은 기능이 확인되었으며, 주변에 polyprenyl synthase, methyltransferase, epimerase, P450과 같은 생합성 관련 유전자들을 함께 보유하고 있는 것으로 확인 (표 9) - entry 9, 10, 12, 22는 contig edge에 위치하여 불완전한 시퀀스일 가능성 있음

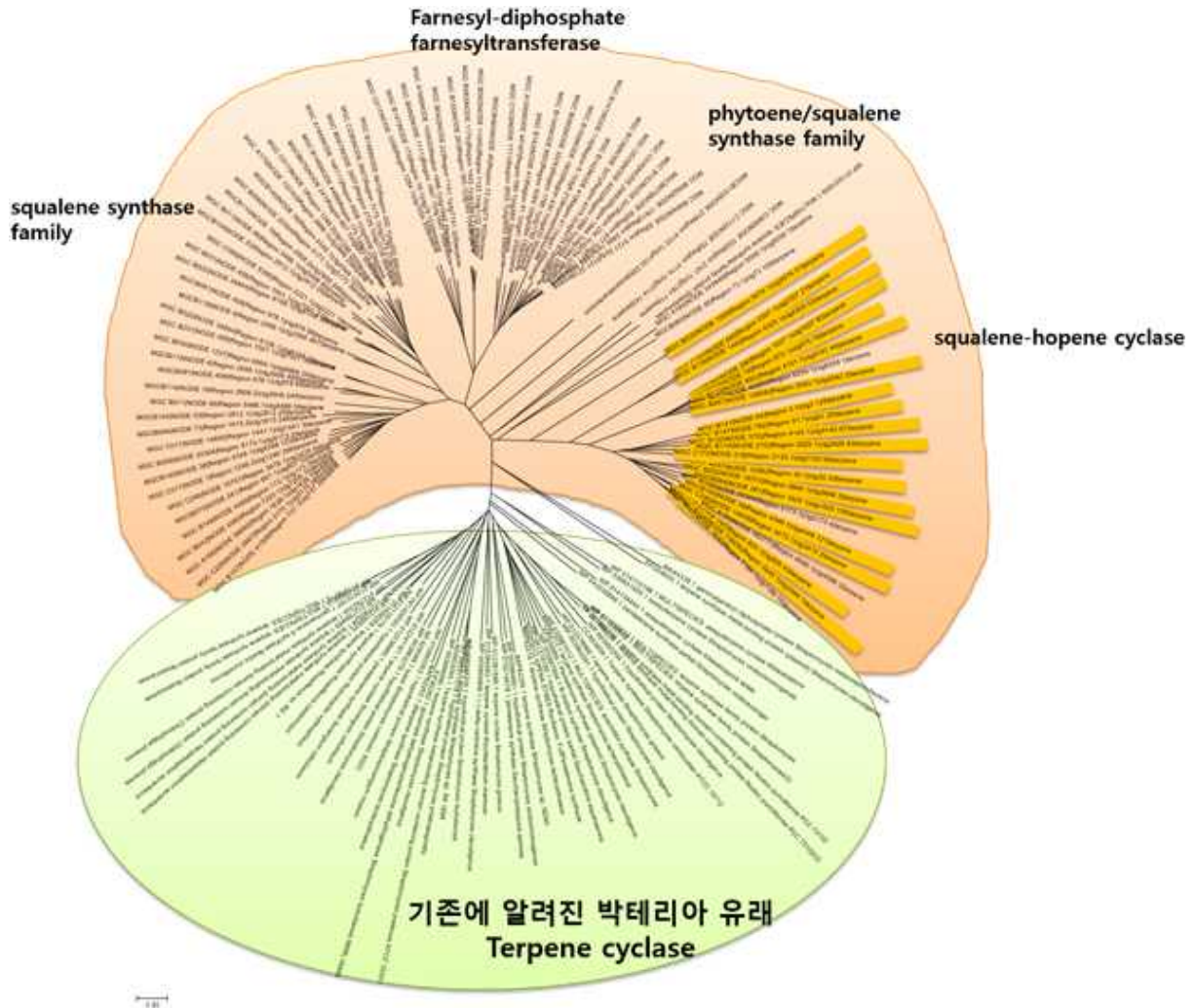


그림 36. 194CH-07 메타게놈 유래 TPS 예측 유전자 배열 분석 결과

표 9. 194CH-07 메타게놈 유래 terpene cyclase - HMMER search 결과

	Genome bin	Node	Region	size (bp)	Additional biosynthetic gene	etc.
1	MGC_B020	1005	5574.1	1,743		
2	MGC_B022	18372	5866.1	1,962	polyprenyl synthetase	
3	MGC_B057	1256	30.1	1,887	polyprenyl synthetase	
4	MGC_B075	797	820.1	1,998		
5	MGC_B079	18	875.1	3,462	methyltransferase, epimerase, P450	
6	MGC_B084	261	1625.1	2,004	dehydrogenase	
7	MGC_B084	290	1627.1	3,378	methyltransferase, epimerase, P450	
8	MGC_B087	13904	2042.1	3,357	P450	on edge
9	MGC_B114	210	2925.1	1,974	dehydrogenase	
10	MGC_B124	73929	3444.1	1,128	epimerase	on edge
11	MGC_B133	480	4151.1	3,435	methyltransferase, epimerase, P450	
12	MGC_B133	370	4140.1	1,995	phytoene synthase	

13	MGC_B139	149	4305.1	1,917	polyprenyl synthatase	
14	MGC_B140	38	4348.1	1,974	phytoene synthase, dehydrogenase	
15	MGC_B141	64	3.1	3,390	methyltransferase, epimerase, P450	
16	MGC_B147	762	91.1	2,025	dehydrogenase	
17	MGC_C103	840	2307.1	1977	polyprenyl synthatase	
18	MGC_C172	218	3125.1	1,947	epimerase	
19	MGC_C246	14649	3473.1	2,058	epimerase, polyprenyl synthatase	on edge

- Squalene-hopene cyclase (SHC)로 예측되는 유전자들에 대하여 계통수 분석을 실시한 결과 5개의 그룹으로 분류됨을 확인 (그림 37); 이들 중 PCR primer 영역의 G/C 함유율을 바탕으로 12개의 클로닝 타겟 선정 (표 10)

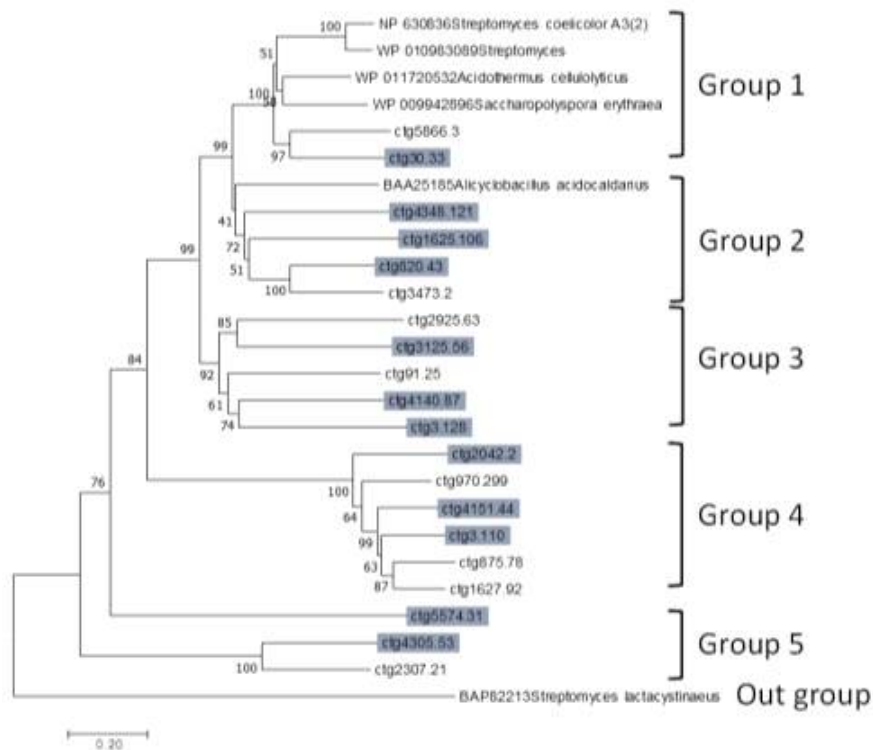


그림 37. Squalene-hopene cyclase 유전자들의 계통수 분석 결과

- 문헌 분석 결과 SHC는 보존된 QW-motif [(K/R)(G/A) X2-3 (F/Y/W) L X3 QX2-5 GX W]를 포함하고 있어 194CH-07의 Squalene-hopene cyclase 유전자들과 multiple alignment 분석 실시
 - Group 1, 2의 경우 QW-motif가 conserve 되어 있음; SHC activity를 보일 것으로 예상 됨
 - Group 3는 일부 motif가 불일치; 다른 substrate를 사용할 가능성이 있음
 - Group 4, 5는 motif가 conserve 되어 있지 않음; SHC activity가 없을 것으로 예상됨

표 10. 발현/검증 대상 terpene cyclase 유전자

	Node	Region	locus tag (contig)	size (bp)	5'- 20mer GC%	3'- 20mer GC%
1	1005	5574.1	5574.31	1743	20	50
2	1256	30.1	30.33	1887	65	65
3	797	820.1	820.43	1998	60	75
4	261	1625.1	1625.106	2004	75	65
5	13904	2042.1	2042.2	3357	60	60
6	480	4151.1	4151.44	3435	70	50
7	370	4140.1	4140.87	1995	65	65
8	149	4305.1	4305.53	1917	55	65
9	38	4348.1	4348.121	1974	70	75
10	64	3.1	3.110	3342	60	50
11	64	3.1	3.128	2082	60	65
12	218	3125.1	3125.56	1947	70	70

- 194CH-07 메타게놈 유래 terpene cyclase 유전자 클로닝과 단백질 발현, 기능 분석
 - Terpene cyclase로 기능 예측되는 증폭, 클로닝, 이형 발현하여 기능 검증 (그림 38)

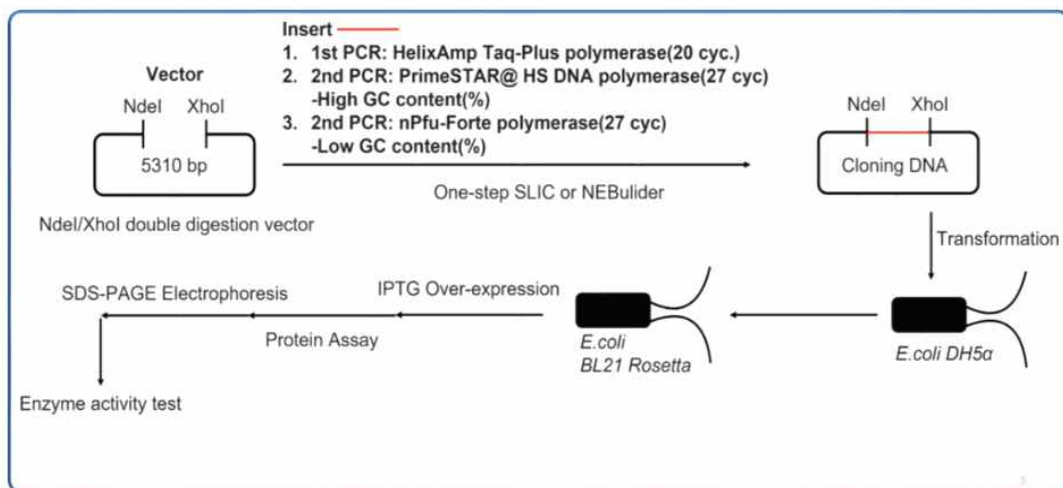


그림 38. Terpene cyclase 예측 유전자 이형 발현 과정

- 발현 대상 유전자 증폭; 다양한 PCR 조건 검색 후 도출된 최적 조건 (HelixAmp Taq-plus polymerase (1차), PrimeSTAR HS DNA polymerase 등 (2차)) 사용하여 유전자 증폭 (그림 39)
- ctg 5574_31 유전자 클로닝

- pET-24a(+) (벡터), E. coli DH5a (호스트)를 사용하여 클로닝
- 두 가지 제한효소(NdeI, XhoI)을 이용하여 double digestion한 DNA를 pET-24a(+)에 삽입
- E. coli DH5a 형질 전환, 배양 후 추출하여 증폭 결과 (~ 2 kb) 확인 (그림 40)

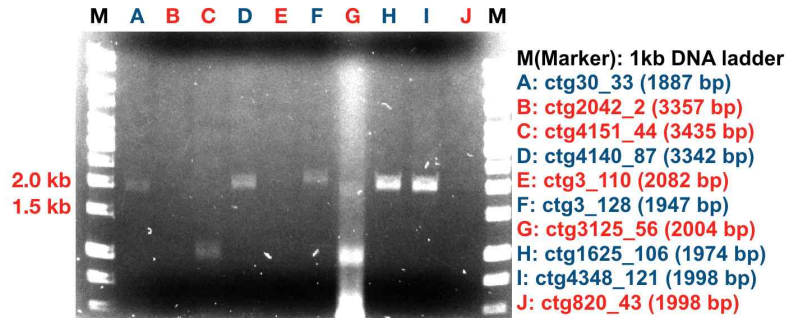


그림 39. Terpene cyclase 예측 유전자 PCR 결과

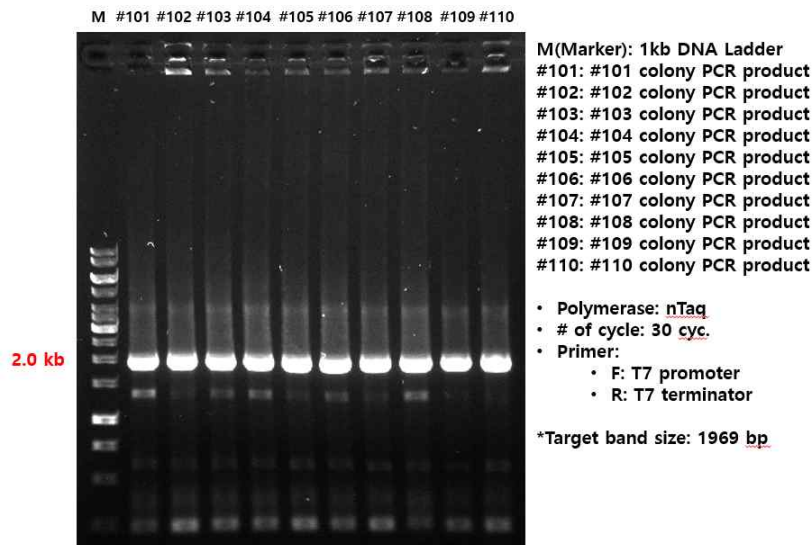
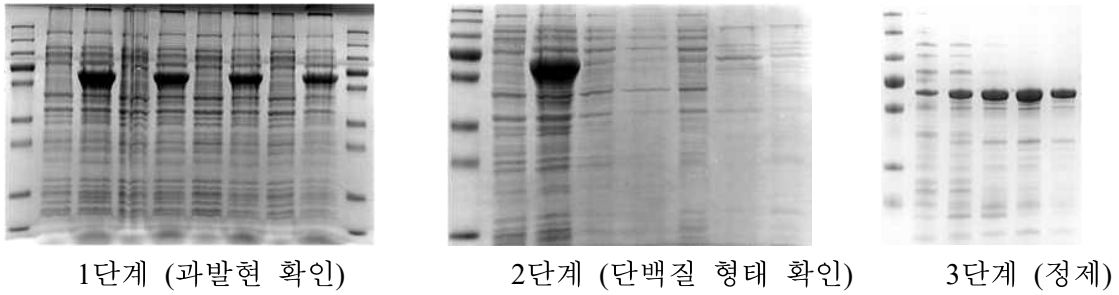


그림 40. ctg5574_31 클론의 PCR 확인 결과

- ctg5574_31 단백질 발현; 3단계로 단백질 발현/정제 수행 (그림 41)
 - 1단계 - induction; IPTG를 이용하여 단백질 과발현이 이루어지는지 확인 (IPTG lac operon)
 - 2단계 - solubility test; 단백질 과발현이 가능한 것을 확인한 샘플들에 대해서, 사용할 수 없는 inclusion body form으로 가는지 혹은 이용 가능한 soluble form으로 가는지 확인하는 과정, 대부분 inclusion body로 형성됨을 확인한 후 온도, IPTG 농도 조절하여 soluble form의 단백질 발현
 - 3단계 - purification; imidazole gradient의 elution buffer 활용하여 단백질 정제

- 단백질의 기능을 검증하기 위한 in vitro assay 반응 설계/진행 (그림 42)
 - 반응 1, 2의 경우 HPLC-PDA, 3-5 반응은 UPLC-HRMS를 통해 결과물 분석; ctg 5574_31 단백질을 사용하였을 때, 1, 2, 5 반응은 진행되지 않았으며, 3, 4의 substrate에 대해서는 cyclization이 아닌 mono-dephosphorylation이 일어난 것이 확인됨 (그림 43, 44)
- ctg30_33 단백질도 유사한 방법으로 발현/정제 완료, 기능 검증 진행 중



1단계 (과발현 확인)

2단계 (단백질 형태 확인)

3단계 (정제)

그림 41. ctg5574_31 단백질 과발현, 용해도, 정제 확인

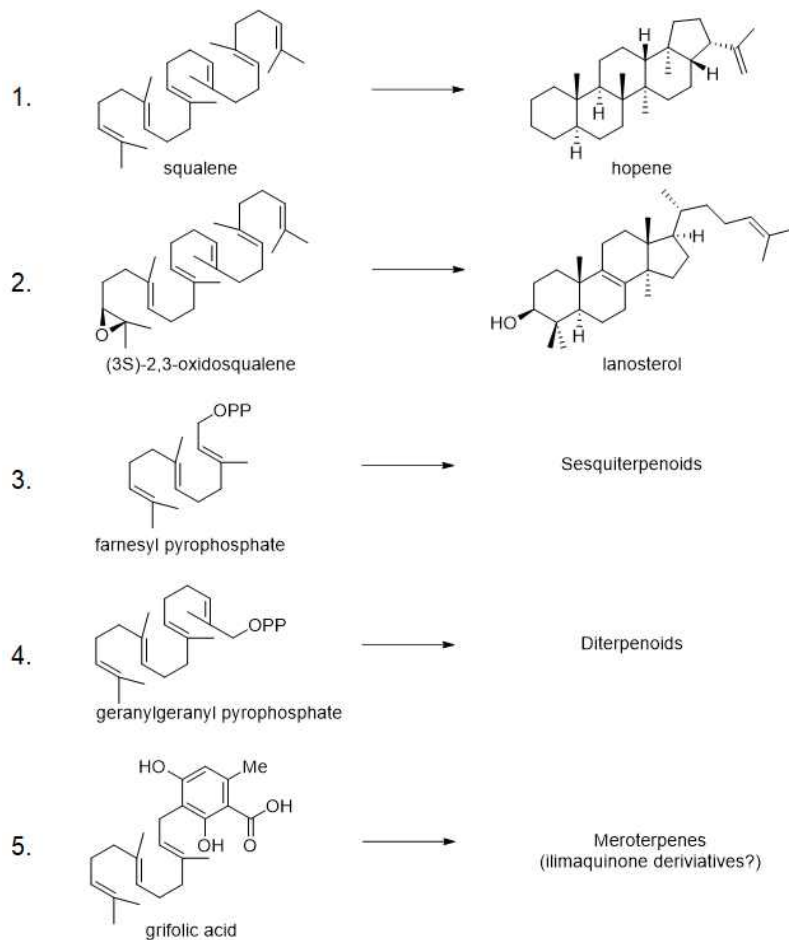


그림 42. Terpene cyclase 기능 확인을 위한 in vitro assay 반응

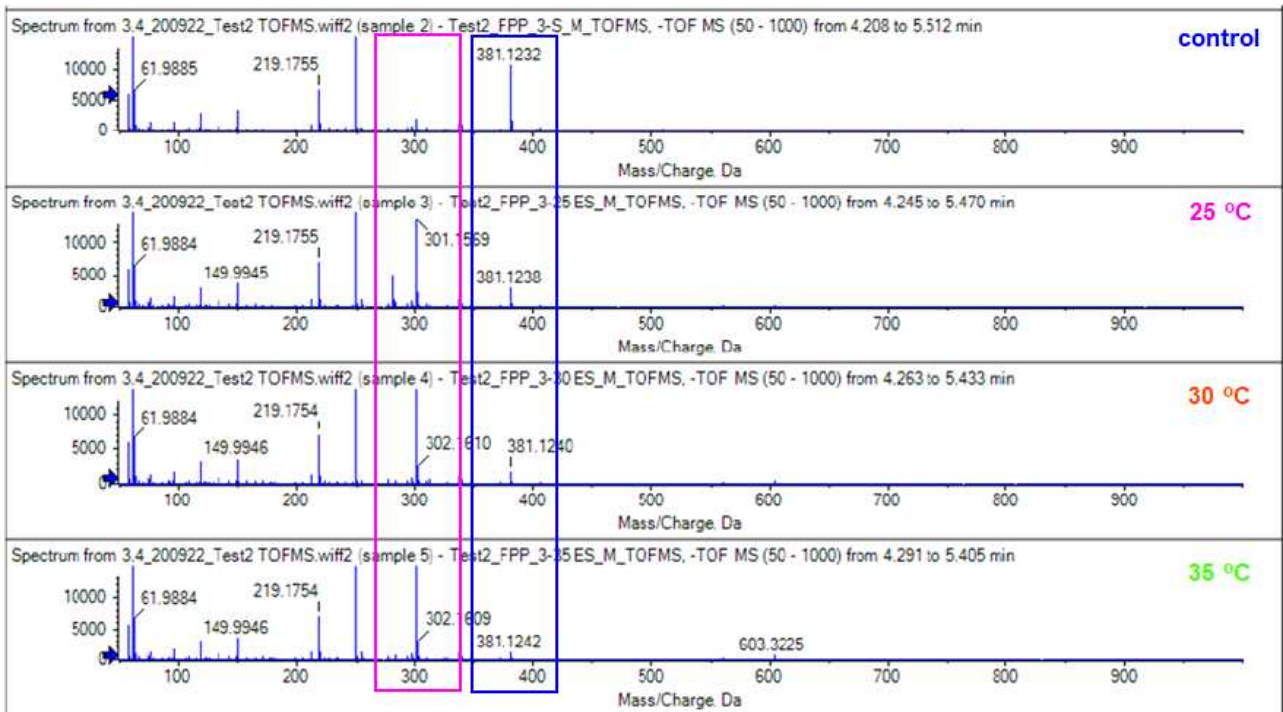
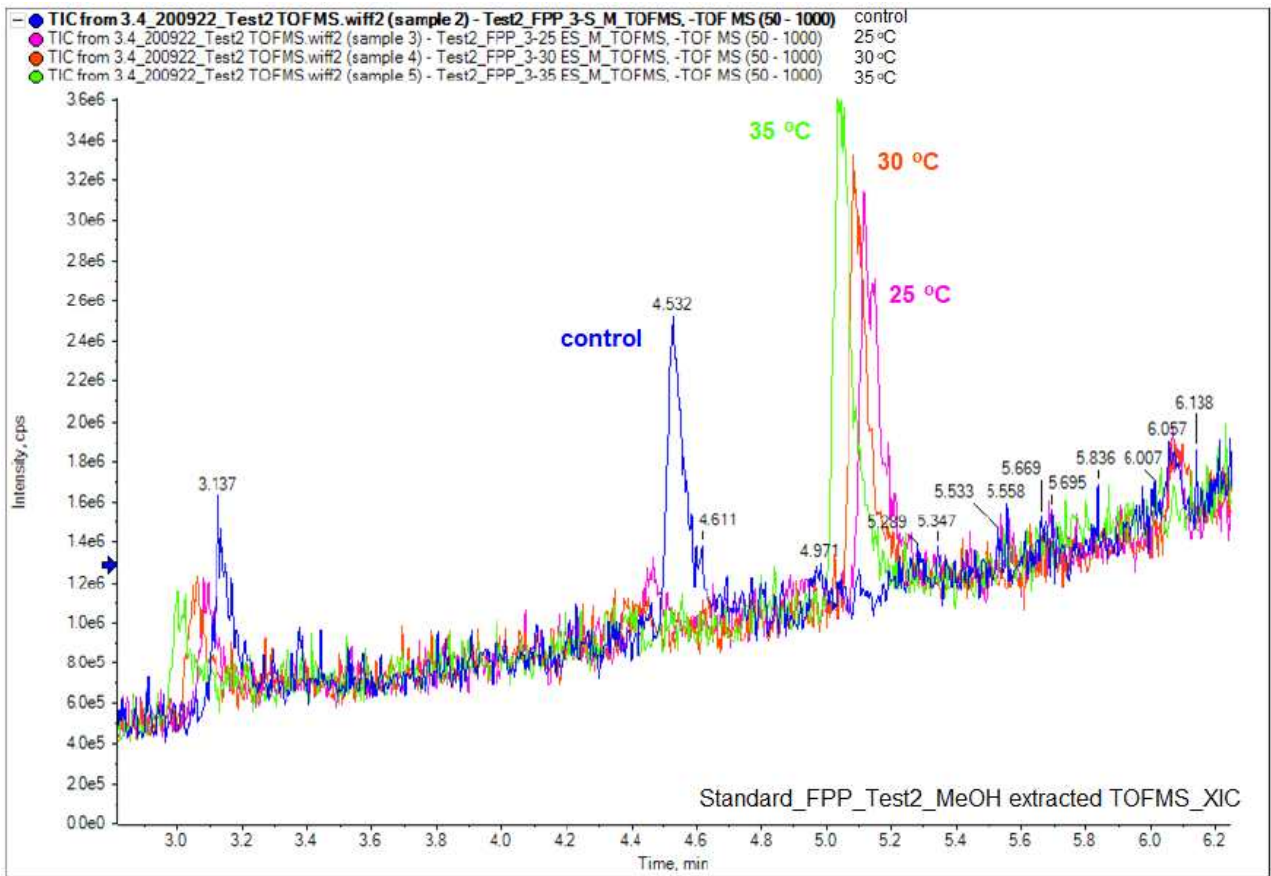


그림 43. Faranesyl pyrophosphate의 ctg 5574_31 활용 반응 결과 분석 (UPLC-HRMS)

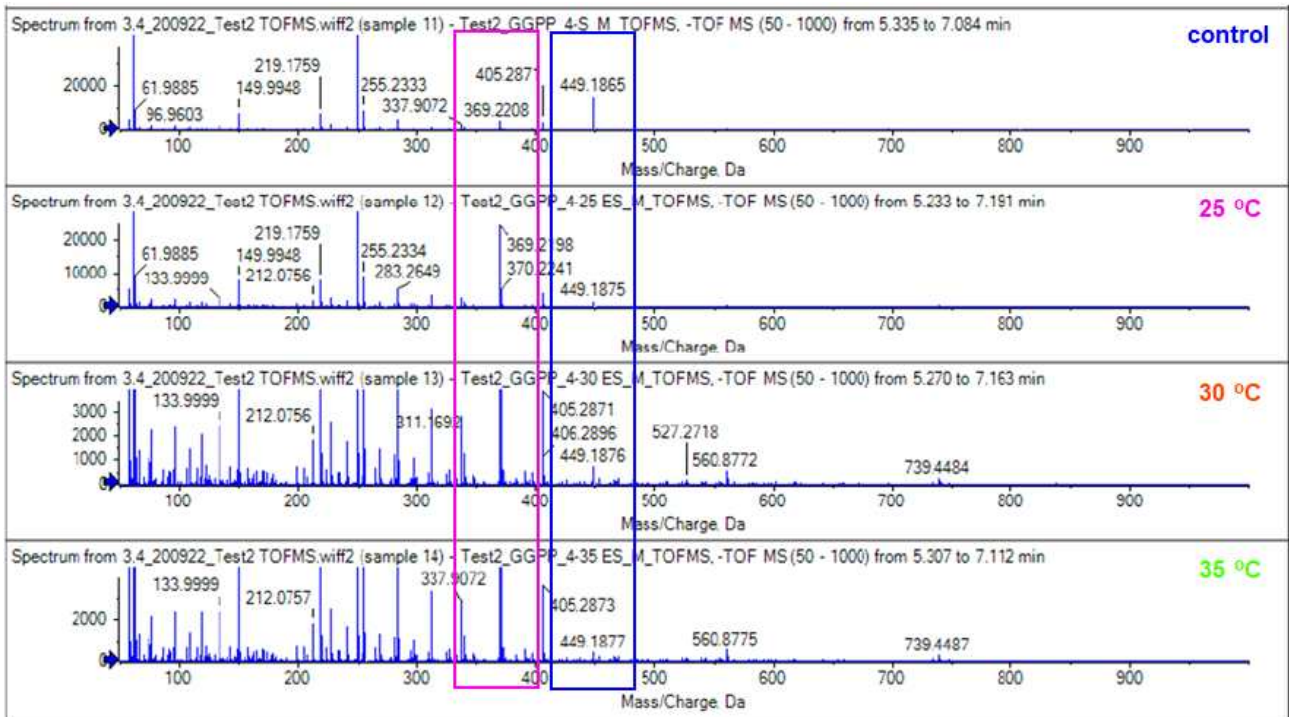
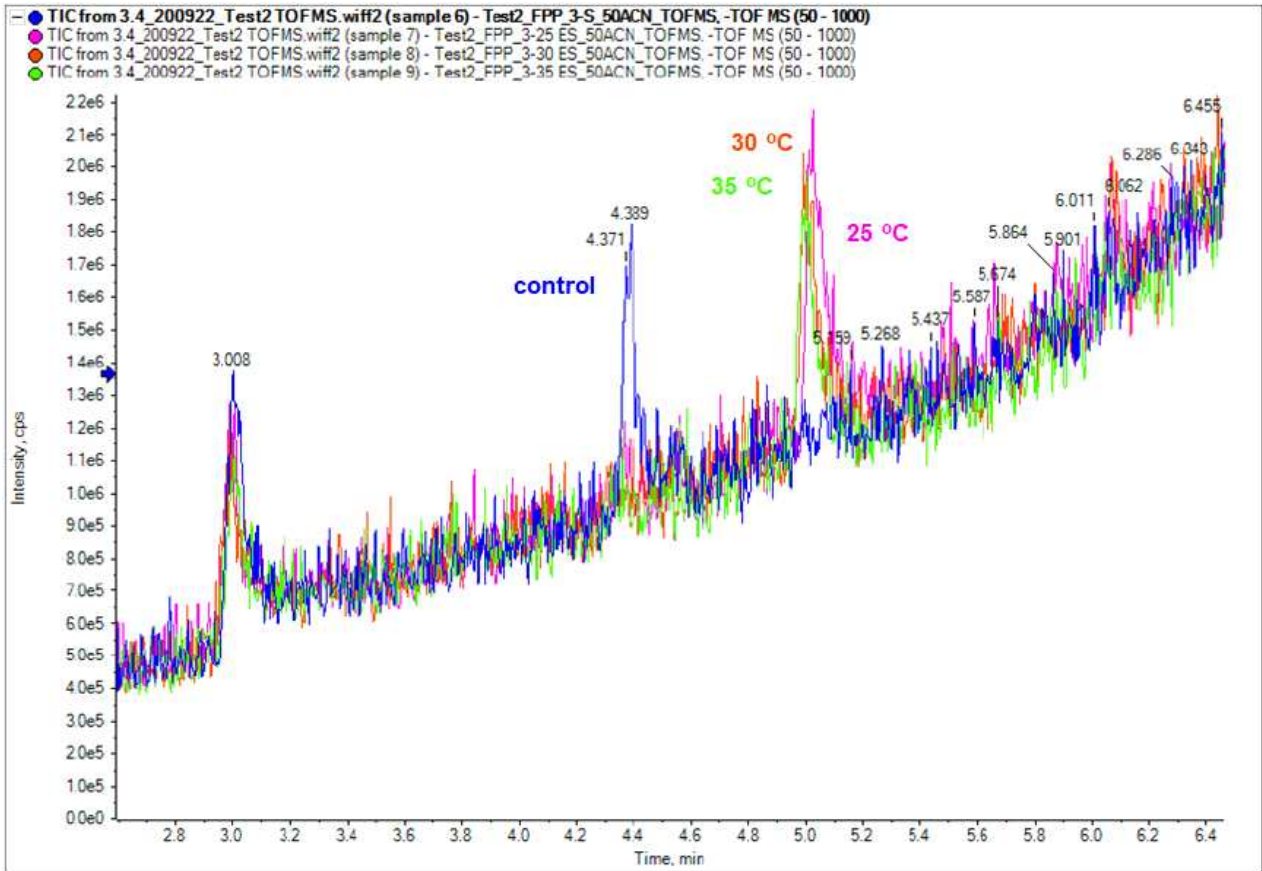


그림 44. Geranylgeranyl pyrophosphate의 ctg 5574_31 활용 반응 결과 분석 (UPLC-HRMS)

- Isoprenoid pyrophosphate에서 하나의 phosphate group만 제거되는 반응은 세균의 peptidoglycan cell wall 합성과 관련이 있어 항생제 bacitracin에 대한 내성 발현을 조절한다는 것이 알려져 있음. 지금까지 bacA, uppP 등이 알려져 있으며, 게놈 분석을 통해 발굴된 예가 많고 토양 메타게놈으로부터 bacA 유전자가 확인된 예가 보고 되어 있음 (Chalker, A. F. et al. Microbiology, 2000, 146, 1547; Manat, G. et al. Microbial Drug Resistance, 2014, 20, 199)
- 현재 후보로 선정된 다양한 terpene cyclase 유전자 (표 10)에 대한 발현과 기능 검증 연구 진행중

○ 메타게놈 데이터 추가 확보

- 194CH-07을 제외한 다른 해면들의 경우 생합성 유전자군 탐색을 진행할 만한 메타게놈 데이터를 얻는 데 있어 가장 큰 문제가 유전자 추출과정 중 DNA degradation인 것으로 판단
- 194CH-02, 05, 06, 08 시료 (SSD, 20% glycerol 침장 보관, -80℃)에 대해 DNA 추출 진행; NucleoSpin® Tissue kit의 microbial DNA추출 protocol 사용; 194CH-02, 05, 08에서 10kb이상 size의 DNA band를 확인 (그림 45, 46, 표 11)
- Illumina Miseq을 이용하여 염기서열 해독; 3개 시료로부터 각각 18백만, 12백만, 15백만개의 reads 획득, 저품질 reads 제거 후 각각 3.96, 2.26, 2.84 Gbps의 서열을 확보함 (표 12) - 확보된 reads의 assemble을 통해 83138, 132165, 122214개씩의 contig를 얻었으며 contig에 포함된 유전자수는 각각 354, 242, 304 Mbps



그림 45. 메타게놈 추가 확보 해면 (좌)과 DNA 장기보존용 시료 (우) 사진

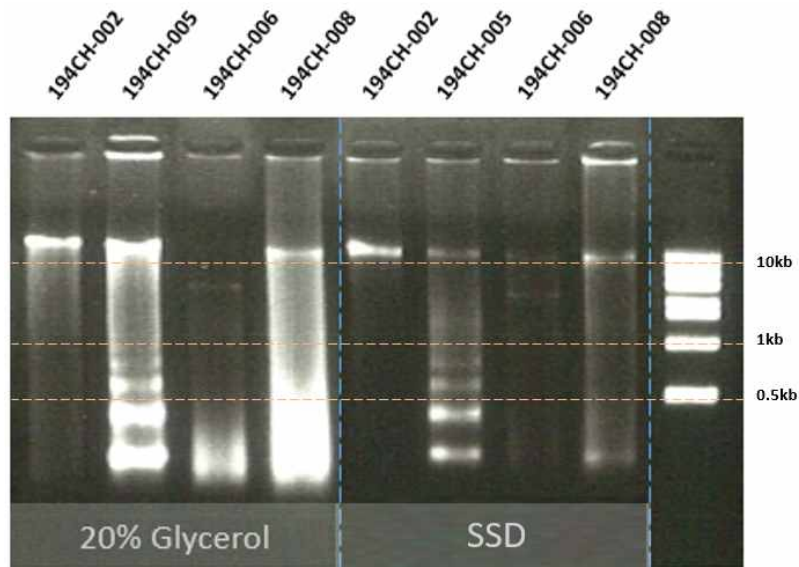


그림 46. 해면 메타게놈 DNA 추출 결과

표 11. 해면 메타게놈 DNA 추출 결과

Sample	20% glycerol			SDS		
	DNA conc. (ng/uL)	A260/280	A260/230	DNA conc. (ng/uL)	A260/280	A260/230
194CH-02	54.8	1.89	1.26	59.3	2.12	1.62
194CH-05	311.1	1.97	1.93	125.2	2.04	1.98
194CH-06	76.8	1.91	1.44	42.1	2.03	1.15
194CH-08	720.7	2.08	2.08	200.9	2.12	2.04

표 12. 해면 시료에 대한 추가 메타게놈 분석 결과 통계

	194CH-002	194CH-005	194CH-008
Total Reads	18,020,024 (100%)	11,711,653 (100%)	15,360,387 (100%)
Low quality	3,733,457 (20.7%)	3,665,499 (31.3%)	4,638,630 (30.2%)
Short reads	228,570 (1.3%)	158,206 (1.4%)	269,120 (1.8%)
Coliphage	7	0	0
Available reads	14,057,990 (78%)	7,887,948 (67.3%)	10,453,120 (68%)
Average length	281.9	286.5	271.4
Available size	3,963 Mbps	2,260 Mbps	2,837 Mbps
Assembled contigs	83,138	132,165	122,214
Assembled size	353,593,356 bp	242,172,722 bp	304,014,970 bp

- 메타게놈 분석 결과로부터 rRNA 유전자를 추출하였을 때 194CH-005 시료의 경우에는 해면 유전자가 대부분을 차지하는 것으로 나타나 천연물 생합성 관련 유전자의 추가 확보가 어려울 것으로 예측 (그림 47)

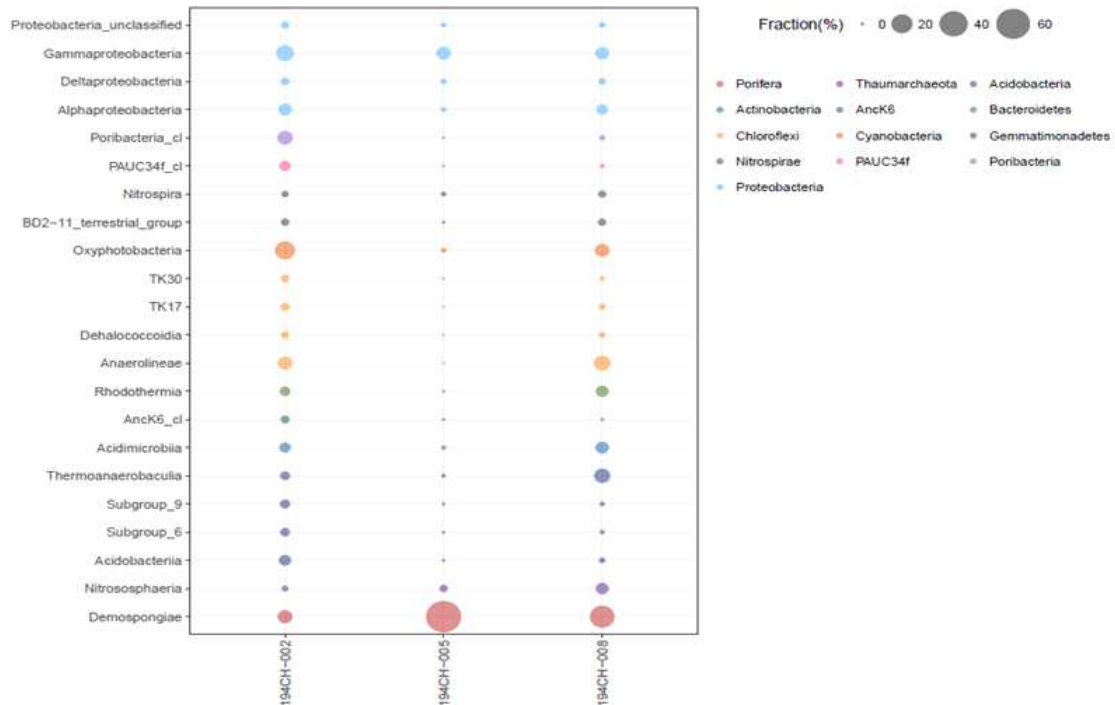


그림 47. 해면 메타게놈 유래 rRNA 유전자 기반 종조성 분석 결과

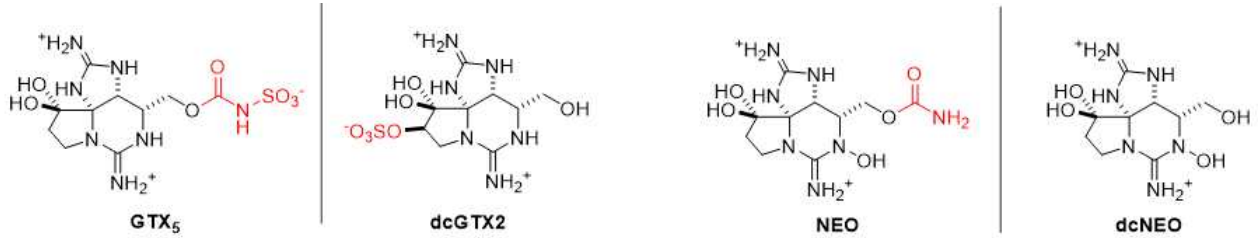
제 3 절 마비성 독소 분석 방법론 확립

○ 마비성 패류독소의 HPLC 분석법 개선

- 마비성 패류독소의 post-column oxidation HPLC-FLD 분석방법이 1년차 연구를 통해 확립되었고 9개 독소에 대한 정량, 정성분석이 가능하나, 각각 독소의 화학 구조적인 유사성 때문에 분리능에 한계가 있어 더 자세한 분석조건에 대한 연구가 필요; GTX5와 dcGTX2, dcNEO와 NEO 유도체의 신호 중첩 문제 해결 필요 (그림 48)
- GTX5와 dcGTX2의 분리를 위해 컬럼 오븐 온도를 조절하며 표준 독소의 분석 진행 (그림 49)
 - 25 °C와 30 °C에서는 분리가 이루어지지 않았으며 기존과 동일한 분석결과를 얻음
 - 35 °C에서는 전체 분석시간은 줄어들었지만 10~15분 사이에 용출되는 GTX 독소들의 분

리능이 향상되었으며 분리가능성이 관찰됨

· 40 °C에서 진행된 실험에서는 GTX5와 dcGTX2가 분리가 이루어지고 전체 분석시간이 2 분 정도 빨라졌으나 STX 등 다른 독소의 분리능에는 영향을 주지 않음



GTX5 & dcGTX2

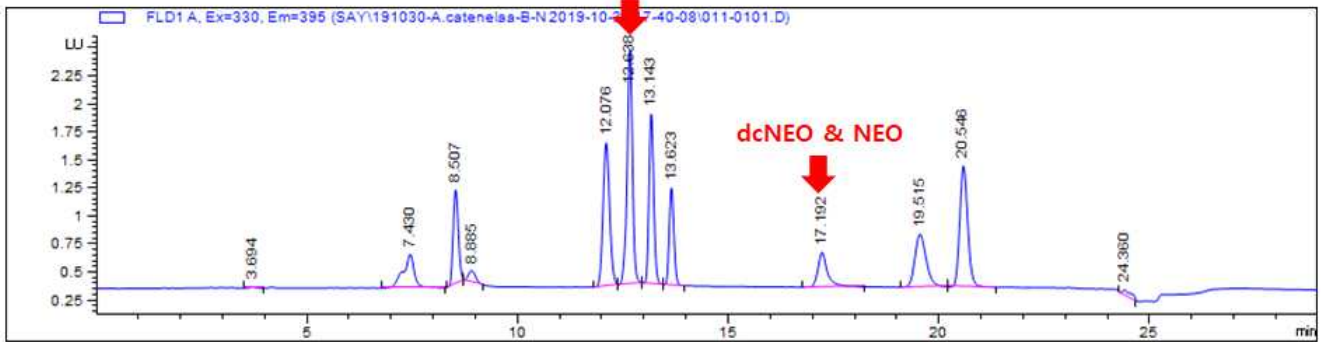
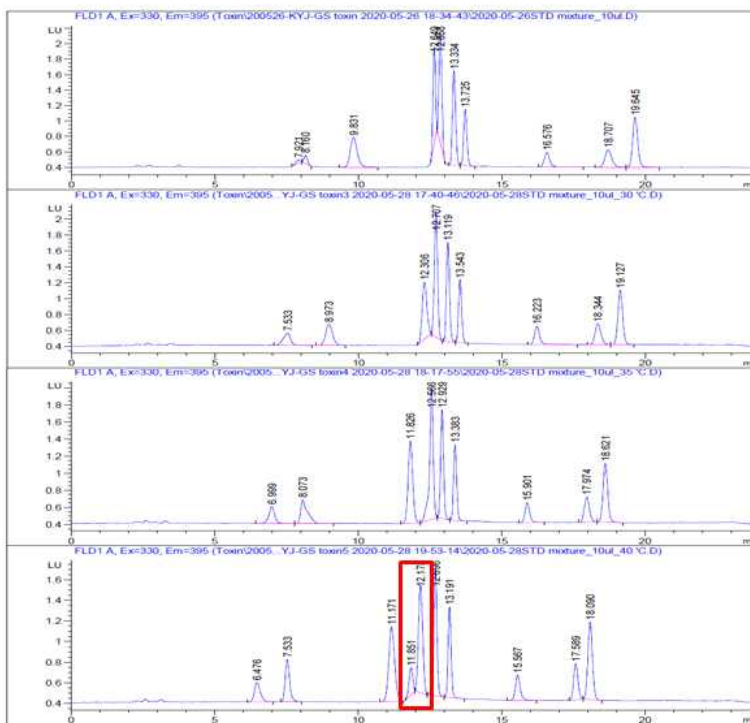


그림 48. HPLC 상에서 마비성 패류독 유도체 신호의 중첩



Temp:	GTX5 & dcGTX2 separation
Not control (22-25 °C)	N
30 °C	N
35 °C	N
40 °C	separable

그림 49. 온도 조절을 통한 GTX 계열 독소의 분리능 향상

- 미세조류에 포함된 독성분의 정확한 정량 분석을 위해 현재 사용중인 HPLC-PCOX-FLD 방법의 LOD(정성한계), LOQ(정량한계)를 계산함. 혼합분석과 다르게 미세조류는 기준이 되는 매트릭스가 없기 때문에 분석을 위해 추출에 사용된 미세조류의 총 독량이 기준이 됨
- 세 개의 다른 농도로 표준물질이 제조 되었으며 regression 분석을 이용하여 LOD, LOQ를 계산함. LOD는 $3 \times Sa/m$ 의로 정의되며, LOQ는 $10 \times Sa/m$ 으로 정의됨 (SD: 표준편차, m: 최적직선에서 기울기) (표 13)

표 13. 마비성 패류 독소의 LOD와 LOQ

STD		n=1	n=2	n=3	RSD	gradient (m)	LOD (ng)	LOQ (ng)
GTX5	ng	2.11	4.22	6.33	0.16794	0.4616	1.09	3.64
	area	1.60	2.80	4.10				
dcNEO	ng	2.07	4.14	6.20	0.06189	0.1838	1.01	3.37
	area	0.89	1.60	2.30				
dcGTX2	ng	1.36	2.72	4.08	0.07235	3.2071	0.07	0.23
	area	6.30	11.7	15.9				
dcGTX3	ng	0.40	0.80	1.20	0.04466	13.548	0.01	0.03
	area	4.40	8.70	13.1				
GTX6	ng	0.25	0.74	1.48	0.04022	0.4939	0.24	0.81
	area	0.10	0.37	0.60				
NEO	ng	0.26	0.77	1.54	0.0517	0.5999	0.26	0.86
	area	0.26	0.79	1.40				
GTX1	ng	0.09	0.27	0.54	0.0621	0.893	0.21	0.70
	area	0.24	0.59	1.00				
GTX4	ng	0.03	0.08	0.17	0.0146	0.7785	0.06	0.18
	area	0.09	0.20	0.46				
dcSTX	ng	0.10	0.31	0.62	0.02507	1.97228	0.04	0.13
	area	0.21	0.67	0.13				
STX	ng	0.12	0.37	0.74	0.03635	2.4943	0.04	0.15
	area	0.04	0.12	2.10				
GTX3	ng	0.09	0.17	0.26	0.18185	2.9702	0.18	0.61
	area	8.60	16.5	24.8				
GTX2	ng	0.06	0.12	0.17	0.18237	2.8546	0.19	0.64
	area	5.80	11.1	16.5				
C1	ng	2.15	4.30	6.45	0.15327	1.8137	0.25	0.85
	area	3.60	7.50	11.6				
C2	ng	0.64	1.28	1.92	0.25934	5.35948	0.15	0.48
	area	2.20	4.90	7.80				

- 계산된 값에 따르면 GTX5(1.09 ng), dcNEO(1.01 ng)가 가장 높은 LOD값을 보였으며 민감도가 가장 낮음을 알 수 있음. dcGTX3(0.01 ng), dcSTX (0.04 ng), STX (0.04 ng)는 상대적으로 낮은 LOD를 보였으며 민감도가 가장 높음을 알 수 있음

○ 마비성 패류 독소의 합성법 개발

- 캐나다 NRC 및 몇몇 화학회사에서 마비성 패류독소의 분석 표준시료를 구입할 수는 있지만 표준시료의 희소성은 독 분석 분야에 있어서 상시적인 걸림돌로 존재. 표준시료의 제조 방법은 크게 원인생물에서 분리방법과 화학적인 합성 두 가지 방법이 존재하지만 현재까지 대량생산이 가능한 정형화된 방법이 존재하지 않음
- 구조적인 복잡성과 분자의 크기를 고려할 때, 마비성 패류독소인 saxitoxin과 유도체는 화학합성을 통해 제조가 가능할 것으로 예측됨. 또한 마비성 패류독소의 독특한 생리활성을 고려할 때도 유도체 합성법 구축을 통해 패류독소 기반 진통제, 항암제 등 의약 후보물질로서 개발의 필요성이 존재함
- 마비성 패류독소 중 dcSTXol의 경우 STX, GTX, C toxin의 합성 중간체로 사용될 수 있는 물질로서 합성경로 개발 시 다양한 마비성 패류독소로 변형될 수 있으므로 dcSTXol의 합성법에 대한 연구가 우선적으로 필요 (그림 50)

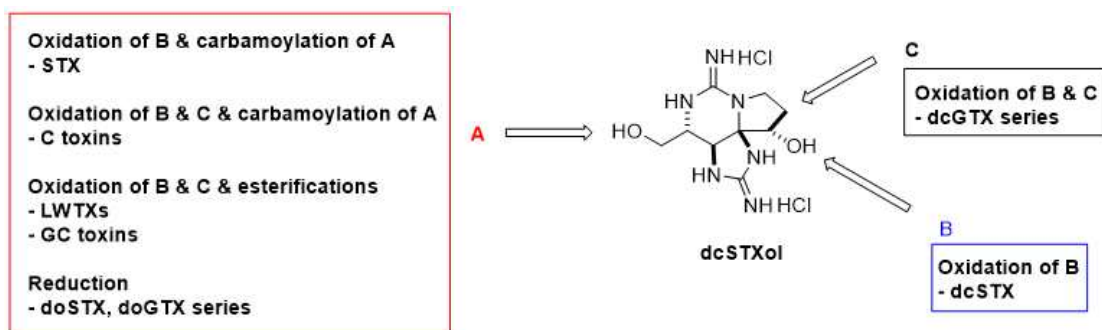


그림 50. 중간체 dcSTXol로부터 마비성 유도체 합성 전략

- 유타대학의 Loper 교수에 의해 발표된 합성법 (J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 20172.; Org. Lett. 2019, 21, 7999.)을 기반으로 합성경로 설계
- 첫 번째 타겟물질로 dcSTXol을 선정함. dcSTXol은 여러 마비성 패류독소들의 합성 중간체로 사용될 수 있기 때문에, 대량 합성법 확립을 통해 현재 시판되지 않는 패류독소 유도체를 제조할 수 있는 기회를 제공할 수 있음
- 합성경로는 크게 linear 합성, cyclization, deprotection 세 개의 phase로 계획하였음. 실용적인 합성을 위해 처음 두 phase의 마지막 화합물인 S4, S5는 g scale 반응을 통해 최소 1 g 이상의 양이 한번의 합성을 통해 확보가 되어야 함
- Phase I의 합성경로는 총 4단계의 합성으로 계획하였고 dcSTXol에 필요한 모든 탄소골격을 만드는 단계로 구성됨. Phase II는 총 4개의 합성단계로 구성되며 고리화 반응을 통해 A, B, C링을 형성하고 주요 중간체인 S5의 합성을 계획함. Phase III에서는 deprotection을 통해 최종적으로 dcSTX의 합성을 계획함 (그림 51)

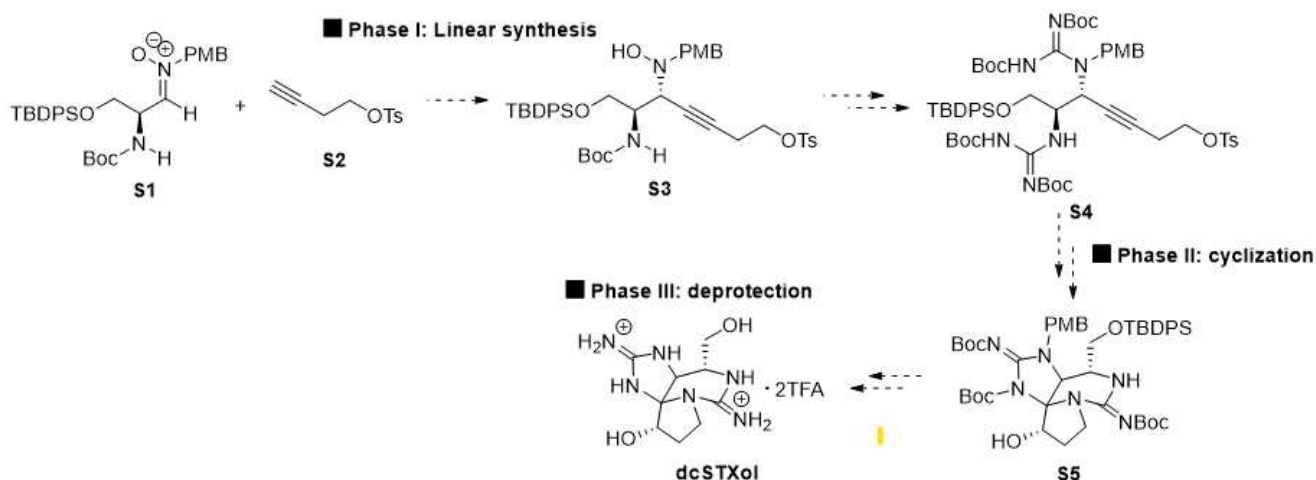


그림 51. dcSTXol의 합성 전략

- dcSTXol 합성을 위한 Phase I 합성 (그림 52)

- S1, S2는 보고된 방법으로 합성되었으며 g scale 합성이 가능함. S3는 무수염기조건에서 nitrone에 alkyne 첨가반응을 통해 82%의 수득률로 합성되어졌으며 g scale 반응에서도 같은 수득률이 유지됨
- Zn/Cu를 이용한 환원조건에서 S3의 N-O bond cleavage를 통해 S6가 합성되었으며, 이후 산조건에서 Boc이 deprotection 되어 2차아민 S7을 형성함
- S7을 isothioureia와 반응하여 Phase I의 타겟화합물인 guanidine S-4를 71%의 수득률로 합성함. S4는 큰 어려움 없이 최대 10 g 정도로 합성될 수 있으므로, 계획된 Phase I 합성경로는 dcSTXol 전합성에 매우 적합한 수준으로 평가됨

- dcSTXol 합성을 위한 Phase II 합성 (그림 53)

- S4를 이용하여 Ag-mediated 고리화 반응 조건하에서 5원환인 B링을 형성하였으며 S8을 94% 수득률로 합성할 수 있었음. 이후 S8은 iodocyclization 조건에서 6원환인 A링을 효율적으로 형성하였으며 S9을 85%의 수율로 얻음
- S9은 Ag염하에 N-1의 Boc그룹이 intramolecular SN2 반응을 일으켜 cyclic carbamate를 형성하고 C-12 위치에 효과적으로 산소원자를 도입하며 S10을 합성. 이 반응의 수득률은 65% 수준으로 향상이 필요하기 때문에 여러 가지 다른 Ag 염을 사용하여 반응을 진행하였으나, CF₃CO₂Ag이 가장 효과적인 염으로 확인됨
- S4를 이용하여 Ag-mediated 고리화 반응 조건하에서 5원환인 B링을 형성하였으며 S8을 94% 수득률로 합성할 수 있었음. 이후 S8은 iodocyclization 조건에서 6원환인 A링을 효율적으로 형성하였으며 S9을 85%의 수율로 얻음
- S10을 염기조건에서 반응하여 cyclic carbamate를 분해하는 동시에 N-1과 C-10 사이에 intramolecular SN2 반응을 일으켜 C링을 합성하였고 Phase II의 목표 화합물인 S5를 90%의

수율로 합성. S5는 모든 마비성패류독소에 공통적으로 존재하는 A,B,C링 구조를 가지고 있으며 이후 산화수 조절과 deprotection, carbamylation, esterification을 통해 여러 가지 패류독소로 변환 가능

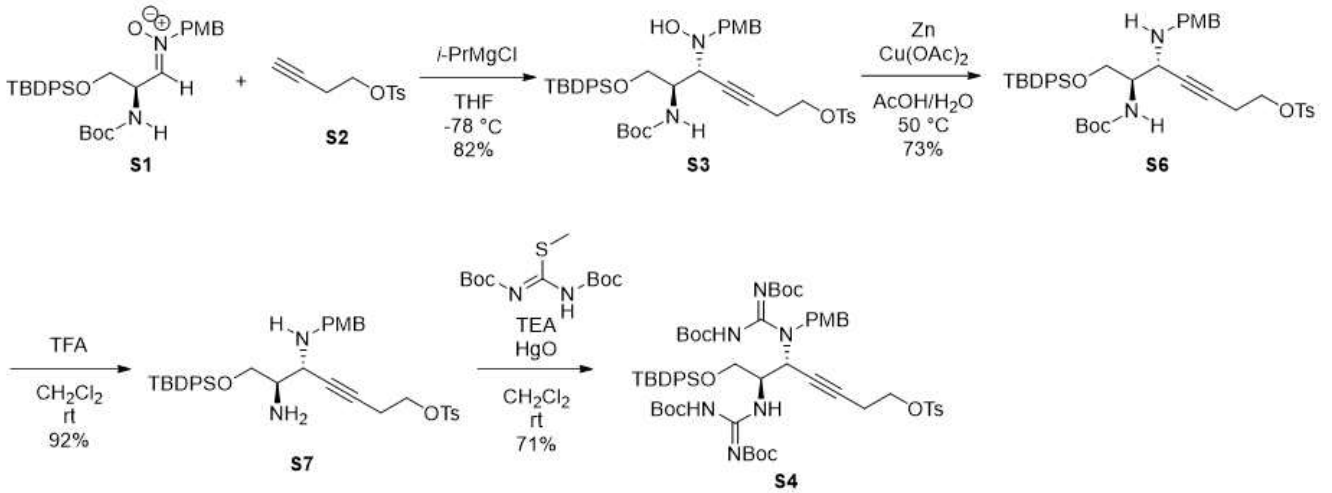


그림 52. 중간체 S4 합성을 위한 Phase I 합성 경로

- dcSTXol 합성을 위한 Phase III 합성 (그림 54)

- S5의 t-butyldiphenylsilyl (TBDPS) 그룹은 tetrabutylammonium fluoride (TBAF)를 이용하여 제거될 수 있으며 85%의 수득률로 S11을 형성
- S11의 N-9에 위치한 p-methoxybenzyl (PMB)의 제거는 DDQ, CAN 등 여러 조건에서 시험되었으나 원하는 화합물이 생성되지 않았음. 수소화 반응조건에서는 반응이 느리게 진행되었으나 S12를 출발물질 회수후 58%의 수득률로 생성. 이 반응은 전체 합성경로의 효율성 재고를 위해 개선될 필요가 있음
- S12에 존재하는 세 개의 Boc은 trifluoroacetic acid (TFA)를 이용하여 쉽게 제거될 수 있으며, 이 반응은 정량적인 수득률로 dcSTX을 형성
- 본 합성법은 총 S2의 S1에 첨가반응으로부터 총 11 단계의 합성으로 구성되어있으며, 전체 수득률은 9%로 계산됨. 현재까지 약 4 mg의 dcSTXol가 합성되었으며, 이론적으로 1 g의 S1을 이용하면 56 mg의 dcSTXol이 합성될 수 있음
- 합성된 dcSTXol의 확인을 위해 기존에 보고된 NMR 데이터와 비교분석 한 결과 같은 화합물로 판명되었음 (그림 55). 자체적인 2D NMR 분석에서도 dcSTXol의 구조가 확인이 되었으며 HRMS 분석에서 241.1418 (m/z [M+H]⁺ calcd 241.1413)이 확인됨
- PCOX HPLC-FLD 방법을 통해 용출시간을 분석한 결과 dcSTX 및 STX와 비슷한 시간에 용출되는 것을 확인 (그림 56). 다른 농도에서 5번의 반복실험을 진행했을 때 뛰어난 직선성 ($r^2 = 0.99976$)을 보이므로 분석 표준물질로서 이용이 가능함

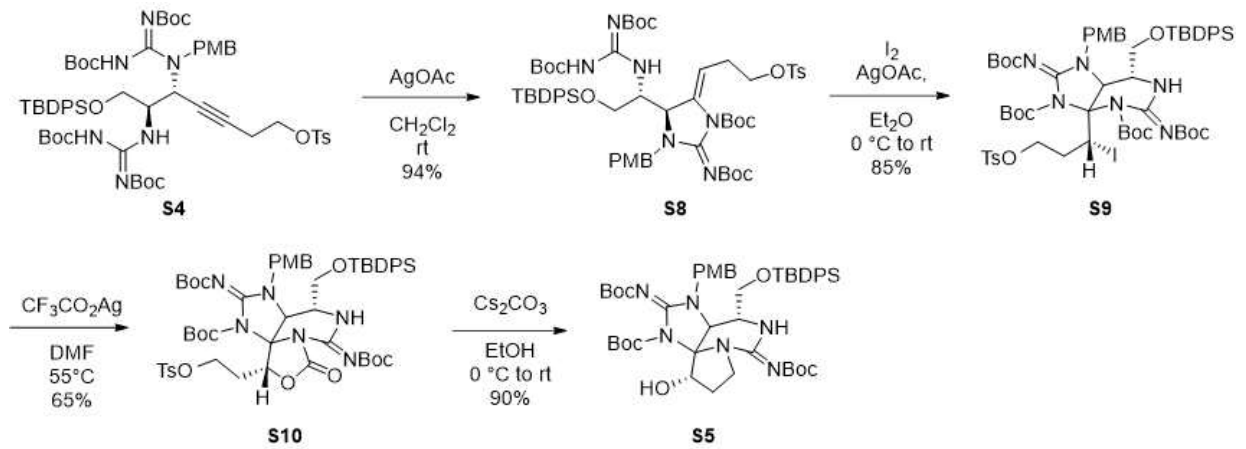


그림 53. 중간체 S5 합성을 위한 Phase II 합성 경로

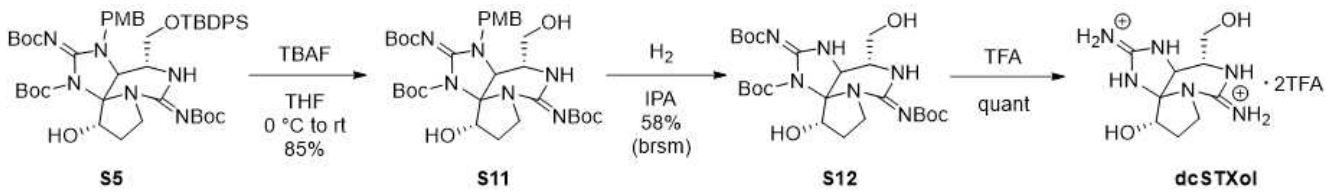


그림 54. dcSTXol 합성을 위한 Phase III 합성 경로

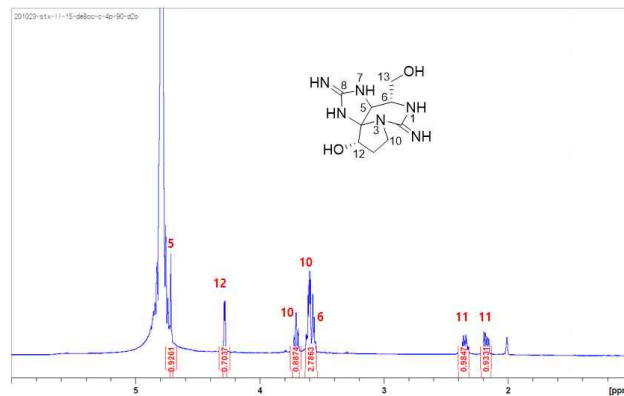


그림 55. 합성된 dcSTXol의 ^1H NMR spectrum (D_2O w/4% acetic acid- d_4)

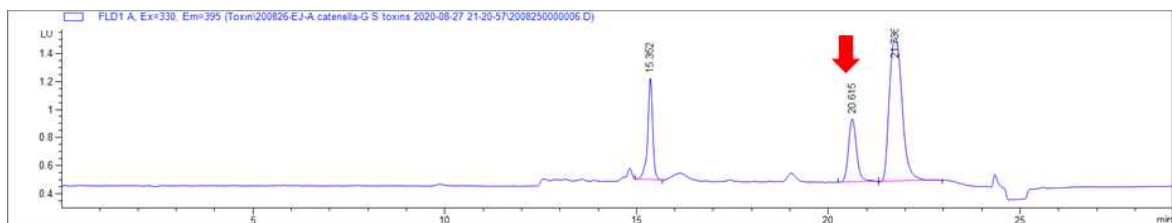


그림 56. 합성된 dcSTXol의 HPLC 분석

제 4 절 마비성 독소 생산 조건 규명

○ 마비성 독소 원인종과 독소 생산 조건 규명

- 마비성 독소 원인종의 성장과 독소 생산에는 다양한 해양환경 요인이 작용하기 때문에 자연환경에서 나타날 수 있는 환경 조건 중 빛의 영향을 탐색 할 필요가 있음
- 마비성 독소의 원인종인 와편모조류는 광합성을 통해 성장을 하고 증식 과정에서 독소를 생산하는 것으로 알려져 있으나, 광합성을 할 때 가시광선 영역대의 파장을 모두 이용하는 것은 아니기 때문에, 특정 파장에 대한 성장과 독소 생산능을 확인 할 필요가 있음
- 1차년도 사업을 통해 선정된 마비성 독소 원인종 (*Gymnodinium catenatum*, (비공개종), *Centrodinium punctatum*)을 대상으로, 세포의 성장과 독소생산에 영향을 미치는 파장을 탐색하기 위해 LED 배양기를 이용하여 연구 수행 (그림 57); 가시광선 영역대를 구현 할 수 있는 형광등을 control로 하여, 세포의 성장과 독소 생산을 비교

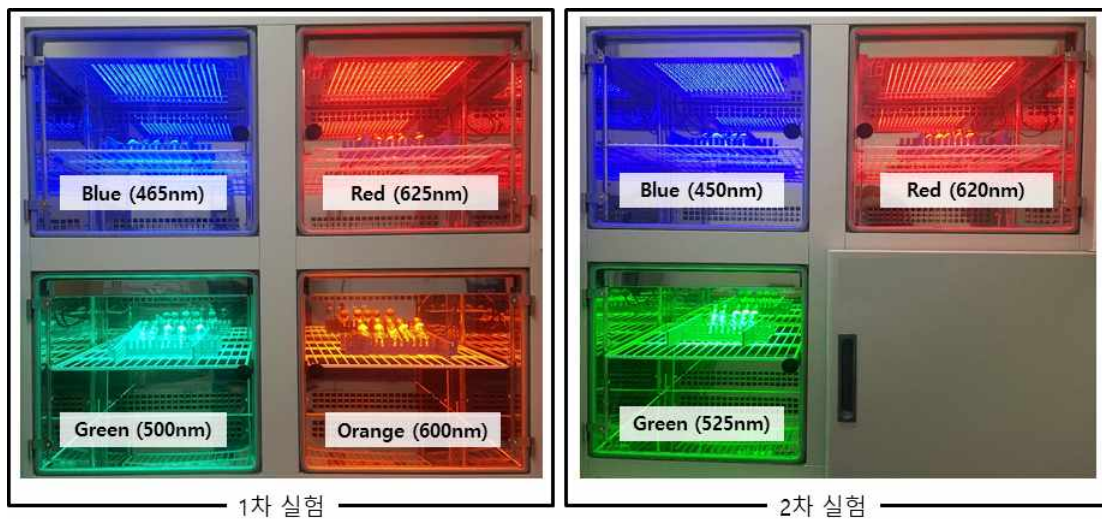


그림 57. 세포의 성장과 독소 생산을 확인하기 위해 사용된 빛의 파장대

○ 세포 성장과 독소 생산을 위한 빛의 파장 선정

- 1차년도 연구 결과로 선정된 3종은 광합성을 하기 때문에, 가시광선 영역대의 특정 파장에 대한 세포의 성장과 독성 변화를 파악할 필요가 있음
- 빛의 파장을 이용한 세포의 성장과 독소생산 수율 증가는 빛의 강도도 밀접한 연관이 있기 때문에, 실험실에서 구현 가능한 다양한 파장대의 LED에 대해 빛의 강도를 측정하여 적용 가능성을 평가하여야 함
- LED에 의해 구현된 파장대별 빛의 강도 실험은 청색, 녹색, 황색, 적색 파장대를 대표 할

수 있는 14개를 선정하여 실험을 진행 하였고, 그 중 400nm, 500nm, 600nm에서 대표 될 수 있는 7개의 파장을 통해 세포성장 유도가 가능한 빛의 강도를 확인 (그림 58)

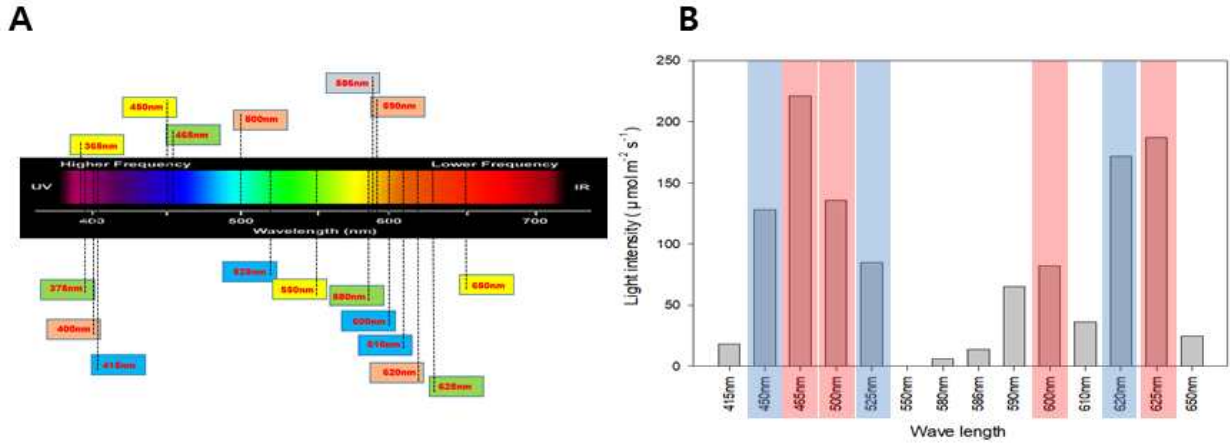


그림 58. 세포성장과 독소 생산 실험을 위해 선정된 빛의 파장 (A)과 강도 (B)

- 7개의 파장 중, 청색 파장과 적색 파장에서 가장 높은 빛의 강도가 측정 되었고, 황색 파장 대에서는 비교적 낮은 빛의 강도가 측정되었음
- 선정된 7개의 파장대의 적용을 위해, 1차년도 연구결과에서 보여진 세포의 성장 환경(온도, 염분, 영양염 등)을 고려한 배양 환경에서 실험 진행

○ 7개의 파장대에 노출된 *Gymnodinium catenatum*의 성장과 독소 생산

- 배양기간은 control (복합파장)에서 나타나는 성장 패턴을 기준으로 하였으며, red (625nm), orange (600 nm), green (500 nm), blue (465 nm) 파장대에서는 30일, blue (450nm), green (525 nm), red (620 nm)의 다른 파장대에서는 40일간의 배양을 통해 결과 확인 (그림 59)
 - *G. catenatum*의 성장은 control에서 가장 높게 나타났으며, 다른 특정 파장대에 노출된 세포는 성장이 뚜렷하게 나타나지 않음. 하지만, 625 nm의 red 파장대에서는 성장속도가 느리긴 하지만, 배양기간 동안 지속적인 성장이 관찰됨
 - Red 파장대 중에서도 625 nm와는 달리 620 nm에서는 세포가 성장 하지 않은 것은 세포 성장에 영향을 미치는 파장은 매우 특정되어 있음을 나타냄
 - *G. catenatum*의 성장에 대한 red 파장대 실험을 구체화 하여 진행 해볼 필요가 있으나, control에서 세포의 뚜렷한 성장이 확인되었기 때문에 *G. catenatum*의 대량 배양을 위한 빛은 복합파장이 효율적인 것으로 판단
- *G. catenatum*의 독소 생산 평가는 성장이 나타나는 control과 red 파장대 (625 nm)에 노출된 세포의 확보로 수행 되었으며, control에서 dcGTX-3, GTX-3, GTX-2, C2 독소가 검출되었으

나 red 파장대에서는 GTX-2가 검출 되지 않았음 (그림 60)

- 배양을 통해 나타난 독소 중 가장 높게 나타난 것은 GTX-3으로 약 14 ug/L 임
- control과 실험구에서 독소가 다르게 나타나는 것은 빛의 파장으로 독소 다양성을 조절할 수 있다는 것을 나타냄. 하지만, 독성은 G. catenatum의 성장이 높게 나타난 control에서도 높게 나타났기 때문에, G. catenatum의 배양을 통한 독소 생산은 복합파장이 효율적일 것으로 판단됨

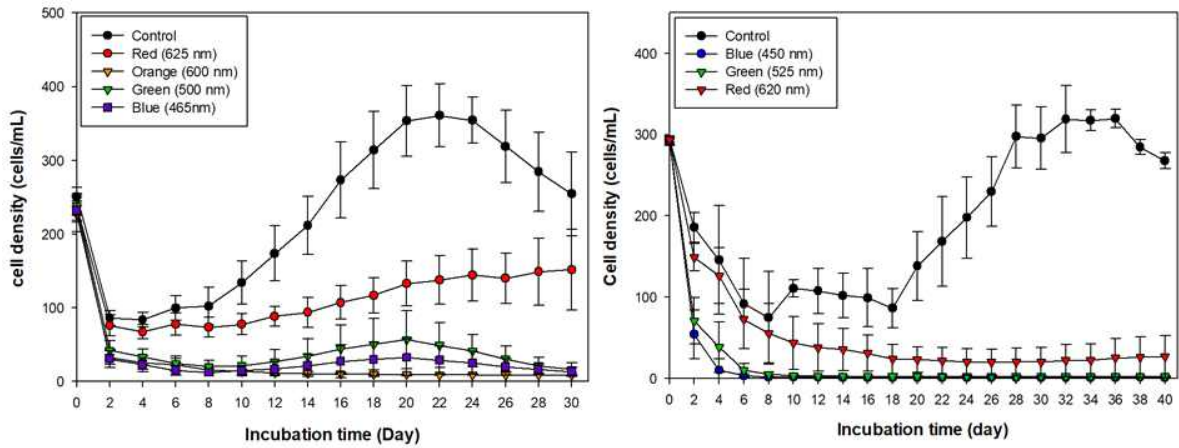


그림 59. 다양한 빛의 파장대에 노출된 G. catenatum의 성장 곡선

Toxin profile and concentration

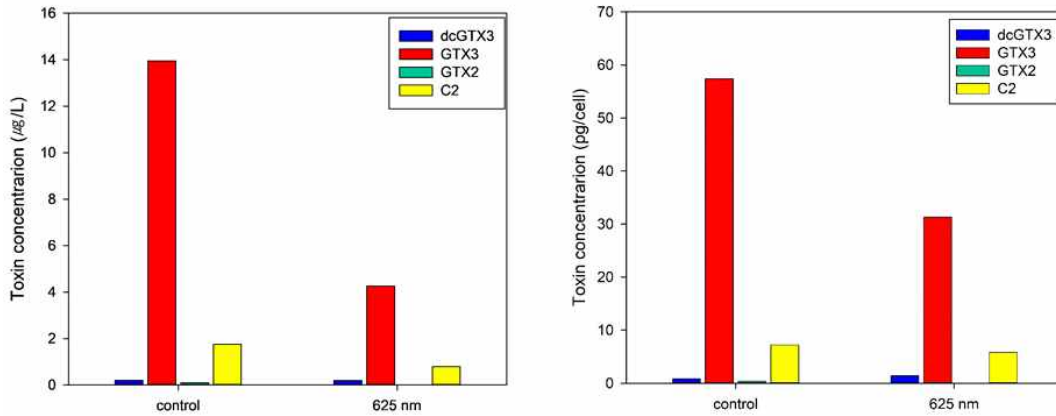


그림 60. 복합파장과 red 파장에서 확보된 G. catenatum의 독소 농도

○ 7개의 파장대에 노출된 (비공개종)의 성장과 독소 생산

- 배양기간은 G. catenatum과 같이 control에서 나타나는 (비공개종)의 성장 패턴을 기준으로 설정
- Control에서 (비공개종)는 46일까지 성장을 하다가 사멸기에 진입하였으며, 이 패턴은 (비

공개) 과장대에서도 유사하게 나타남

- (비공개종)의 독소 생산 평가는 성장이 나타나는 control과 (비공개) 과장대에 노출된 세포의 확보로 수행 되었으며, 독소는 GTX-6, GTX-4, GTX-3, C2가 검출되었음 (그림 61)

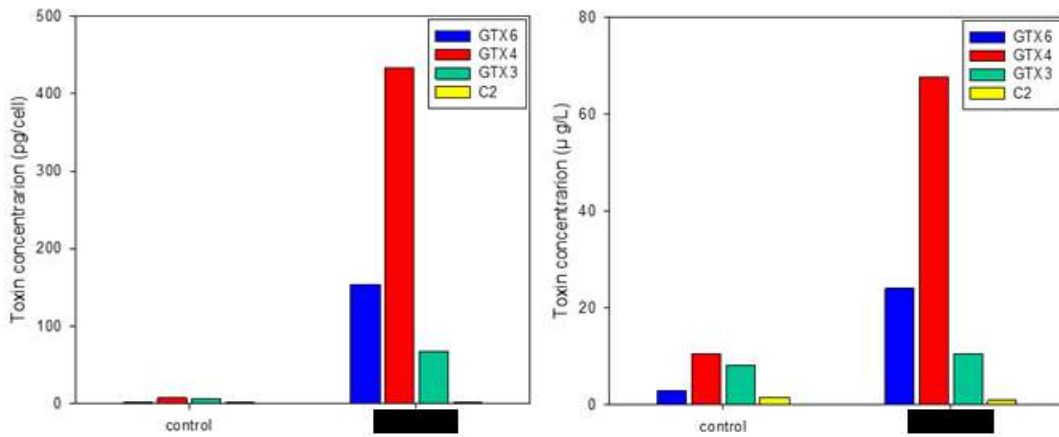


그림 61. 복합과장과 (비공개) 과장에서 확보된 (비공개종)의 독소 농도

- (비공개종)는 *G. catenatum*과 달리 control보다 (비공개) 과장대에서 높은 독소를 생산함.
- 독소는 (비공개) 과장대에서 GTX-6가 23.97 ug/L, 이고, GTX-4가 67.66 ug/L로 나타났으며, GTX-6의 경우 control보다 약 10배, GTX-4의 경우, control보다 약 7배 높게 나타남
- (비공개종)의 대량 배양을 위해 성장은 복합과장을 이용하고, 독소 생산의 효율을 높이기 위해서는 (비공개) 과장을 사용하는 것이 효율적일 것으로 판단됨

○ 다양한 온도와 염분에 노출된 *Centrodinium punctatum*의 성장과 독소 생산

- *C. punctatum*은 전 세계에서 유일하게 KIOST가 보유하고 있는 배양주 자원으로, 이 자원에 대한 생리, 생태학적 정보는 전무함
- *C. punctatum*의 성장 특성을 파악하기 위해, 당해 연도에는 온도와 염분에 대한 영향과 독성 평가를 진행하였음
 - 다양한 온도와 염분 변화 실험에서 *C. punctatum*의 성장은 특정되어 나타났음. 성장이 나타나는 온도는 15°C-25°C이고, 이 온도 구간들에서 성장은 염분 25 psu이상에서 나타났음 (그림 62)
 - 15°C 온도 구간에서, 여러 염분 농도에 노출된 *C. punctatum*은 초기 접종 세포 농도와 비교하여 뚜렷한 성장을 보이지 않았으며, 염분 30psu에서 배양기간 동안 접종 초기 세포가 유지되는 정도 였음
 - 세포의 성장이 뚜렷하게 관찰되는 온도 구간은 20°C로, 이 온도 구간에서 염분 35psu에

노출된 *C. punctatum*이 배양 기간 동안 지속적으로 성장하였음. 하지만, 염분 25, 30, 40 psu에서는 배양기간 동안 성장도 느리고, 세포의 농도에서 증가도 관찰 되지 않았음

- 25°C의 온도 구간에서 *C. punctatum*의 성장은 15°C에 노출된 *C. punctatum*의 성장 패턴과 매우 유사하였으며, 배양 기간 동안 세포의 초기접종 농도에서 변화를 나타내지 않았음

- *C. punctatum*이 생산하는 독소는 (비공개종)와 *G. catenatum*이 생산하는 독소보다 다양하고, 농도 또한 매우 높았음; 현재까지 보고된 외편모조류 중 가장 높은 농도와 다양성의 독소 생산 (그림 63)

- *C. punctatum*은 모든 온도, 염분 실험 구간에서 독소를 생산하였지만, 높은 성장을 나타내는 구간에서 독소 또한 높게 나타나, 대량 배양에 성공한다면, 독소 생산도 원활할 것으로 판단됨

- 주로 GTX-3,4가 모든 온도, 염분 실험 구간에서 높게 나타났음. 특히, 독성이 높은 STX와 NeoSTX가 높게 검출되는 것은 다른 배양주에서 생산되기 어려운 독소의 생산까지도 가능해질 것으로 판단됨

- 가장 높은 독성을 나타내는 성장 구간은 온도 20°C, 염분 35 psu로, 검출되는 독소 또한 다양하게 나타났음

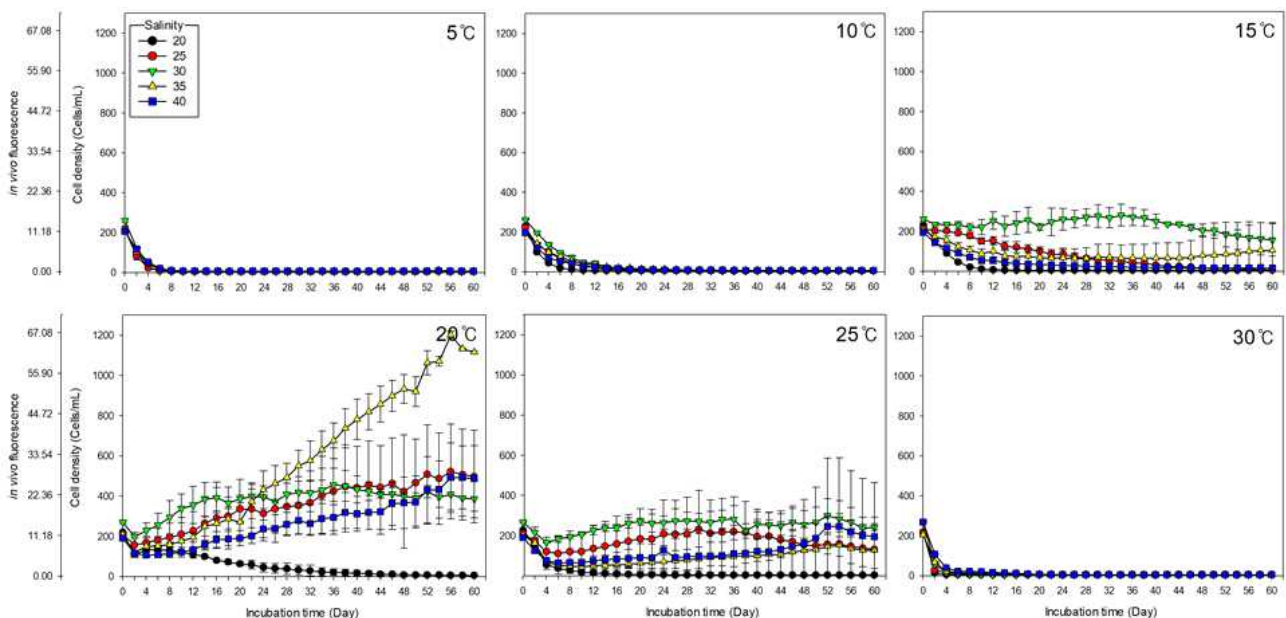


그림 62. 여러 온도, 염분구간에 노출된 *C. punctatum*의 성장 곡선

○ 마비성 독소 생산을 위한 대량 배양 시스템 설계

- 마비성 독소 원인종의 독소 생산을 위해서, 세포의 대량 배양 환경을 찾고자 배양용기, 배양장치와 시설 설계

- 20L 규모의 대량 배양 용기에 다양한 공조 장치를 설치하고, 세포를 접종하여 실험을 진

행 한 결과, 마비성 독소 원인종(접종 세포)의 성장이 느려지고, 사멸 되는 경우가 발생하여, 세포의 성장 유도과 독소 생산에는 효율성이 떨어짐을 확인 함 (그림 64)

- 5L의 배양용기에서는 접종 세포의 지속적인 성장이 확인되었고, 소규모 배양용기를 통한 대량의 세포 확보를 통해 독소 생산이 가능 할 것으로 판단되어, 배양 시설을 설계 (그림 65)
- 공조 장치는 빛의 강도와 조사 시간, 해수의 온도와 염분, 영양염 등의 유지와 소모 등을 고려하여 적용할 예정

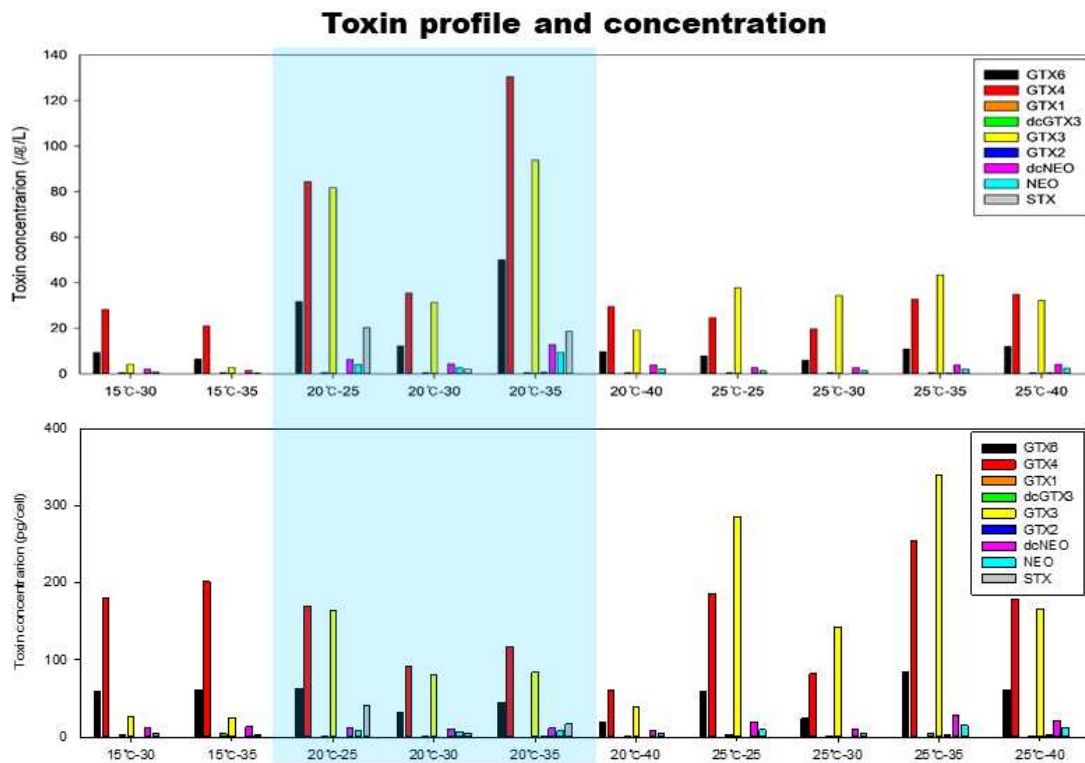


그림 63. *C. punctatum*의 성장 구간에서 나타난 독소와 농도



그림 64. 20L의 배양용기와 공조 장치



그림 65. 소규모 배양용기를 이용하여 설계한 대량 배양 시설

제 5 절 화합물 독성 평가기법 개발

○ 독성화합물 노출에 의한 생태적 독성종말점 발굴

- 유독미세조류 독성시험을 위해 1차년도에 선정된 동물플랑크톤은 요각류인 *Tigriopus japonicus*와 새각류 *Artemia franciscana*로 실험생물확보의 용이성, 만성독성 및 행동추적실험 측면에서 적합한 것으로 나타남; 이들을 대상으로 단일독, 유독미세조류 및 독화 이매패류에 대한 생태적 반응을 확인하고 이용 가능한 endpoint 조사
- 독성화합물의 노출에 대한 *T. japonicus*의 적정 endpoint를 조사하기 위해 시판중인 단일독 (saxitoxin, neosaxitoxin) 및 유독미세조류 (*G. catenatum*, *C. punctatum*) 추출물에 대한 만성독성시험을 수행
- 1차년도에 유독미세조류에 유의적 반응을 보였던 행동추적시험기법을 사용하여 *Artemia*를 대상으로 독화된 패류 (진주 담치) 추출물에 대한 급성독성실험 진행. 진주 담치는 올해 4월 수산과학원의 패류독소 조사결과에 근거, 기준치 초과 검출된 거제도 북서부 3개 정점을 선정하여 채집하였고 각 추출물은 염산 독성을 제거하기 위해 비염산 추출법을 이용하여 수행 (그림 66)
- 단일독 (saxitoxin 및 neosaxitoxin)과 유독 미세조류 추출물 (*G. catenatum*, *C. punctatum*)은 급성 독성 시험에서 *Tigriopus japonicus*의 생존에 영향을 주지 않음을 확인 (그림 67)
- 부화 후 12시간 이내의 nauplius를 이용한 성장 속도를 관찰하는 만성 독성 시험은 두 종의 유독 미세조류 추출물 100% 노출시, nauplius에서 copepodid까지 성장하는데 걸리는 기간은 약 4.5일로 다른 실험구에 비해 빠른 성장 결과를 보임. 이는 유독 미세조류 추출물의 영양성분이 *T. japonicus*의 성장에 영향을 미친 것으로 추측됨

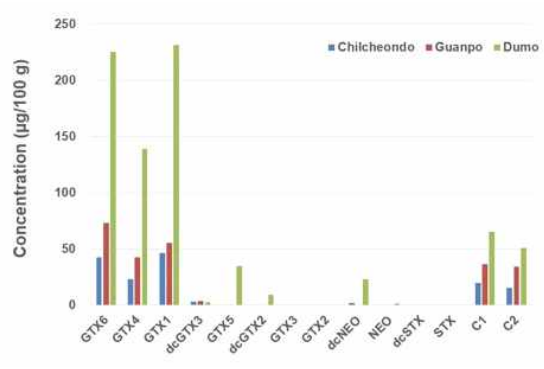


그림 66. 독화 진주담치 채집 지역 및 saxitoxin 함량 분석 결과

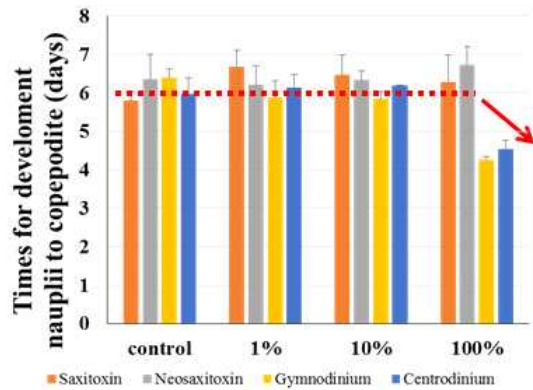
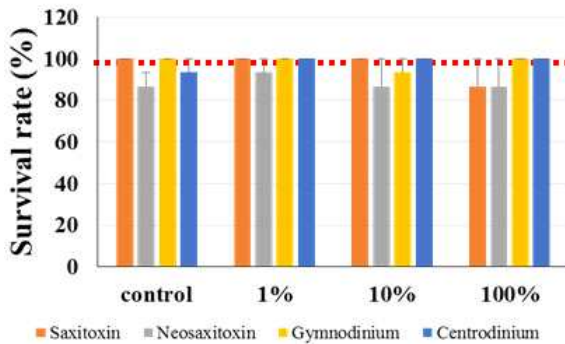


그림 67. 독성 화합물 및 추출물이 T. japonicus의 생존 및 성장에 미치는 영향

○ 독화된 패류 시료 확보와 독소 분석

- 담치(Mytilus edulis)는 두모, 관포 및 칠천도지역에서 채취 하였으며, 각 시료에 대해 해수를 첨가하여, 열처리, 분쇄 후 고속원심분리기를 이용하여 추출물을 제조 (그림 68)



그림 68. 독화된 패류 시료와 추출물

- 각 지역에서 채취한 담치에서 GTX6, GTX4, dcGTX3, C1과 C2의 독소가 검출 되었으며, 특

히, 두모 지역에서 채취한 담치가 다른 두 지역에서 채취한 담치보다 독소의 농도가 높은 것으로 나타남 (그림 69)

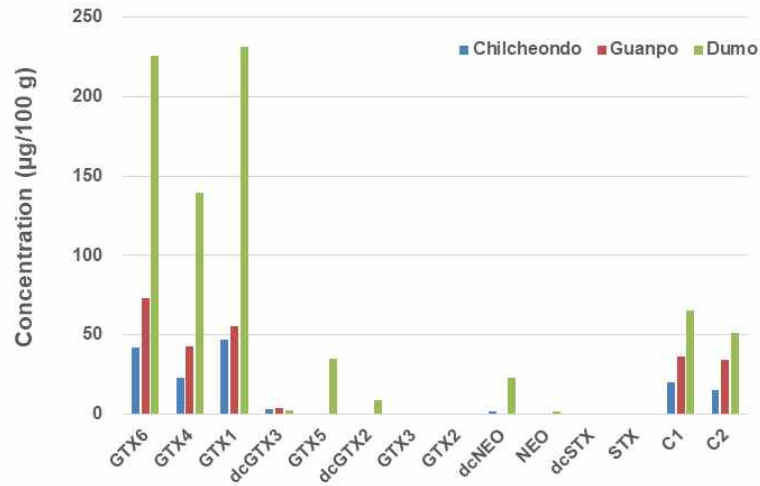


그림 69. 독화 패류 시료 함유 독소 분석

○ 독화된 패류 노출에 의한 생태적 반응 조사

- 각 지역에서 채취한 담치의 추출물 노출에 의해 동물 플랑크톤 (*Artemia franciscana*)의 속도 및 이동거리가 감소하는 경향을 보임 (그림 70)
- 특히 두모 지역에서 채취한 담치 추출물에서 동물플랑크톤의 속도 및 이동거리가 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보임. 이는 담치 패류독소로 인한 마비 증세 때문인 것으로 판단됨.

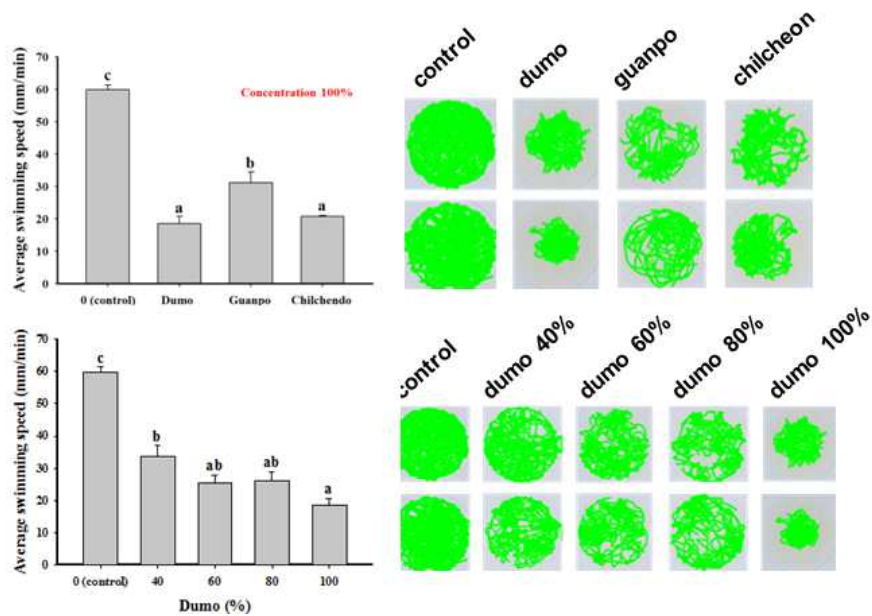


그림 70. 담치 추출물에 대한 *A. franciscana* 행동 변화

○ 유독 와편모조류 2종에 대한 생태 및 분자 독성 조사

- 분자생물학적 반응 연구를 위한 예비실험으로 유독미세조류에 의한 *T. japonicus*의 유전자 발현반응조사를 2개 (CYP 및 GST)의 해독 관련 유전자군 선정
- *G. catenatum* 노출에 의해 *T. japonicus*의 유영 속도 및 이동 거리가 감소하는 경향을 보였으나, *A. minutum*에서는 특이적인 영향을 보이지 않음. 이로부터 *G. catenatum*이 *A. minutum* 보다 독성이 더 강한 것이 확인됨 (그림 71, 72)
- CYP 및 GST 유전자들의 발현 증가 또는 감소; *T. japonicus*의 해독 기능과의 관련성

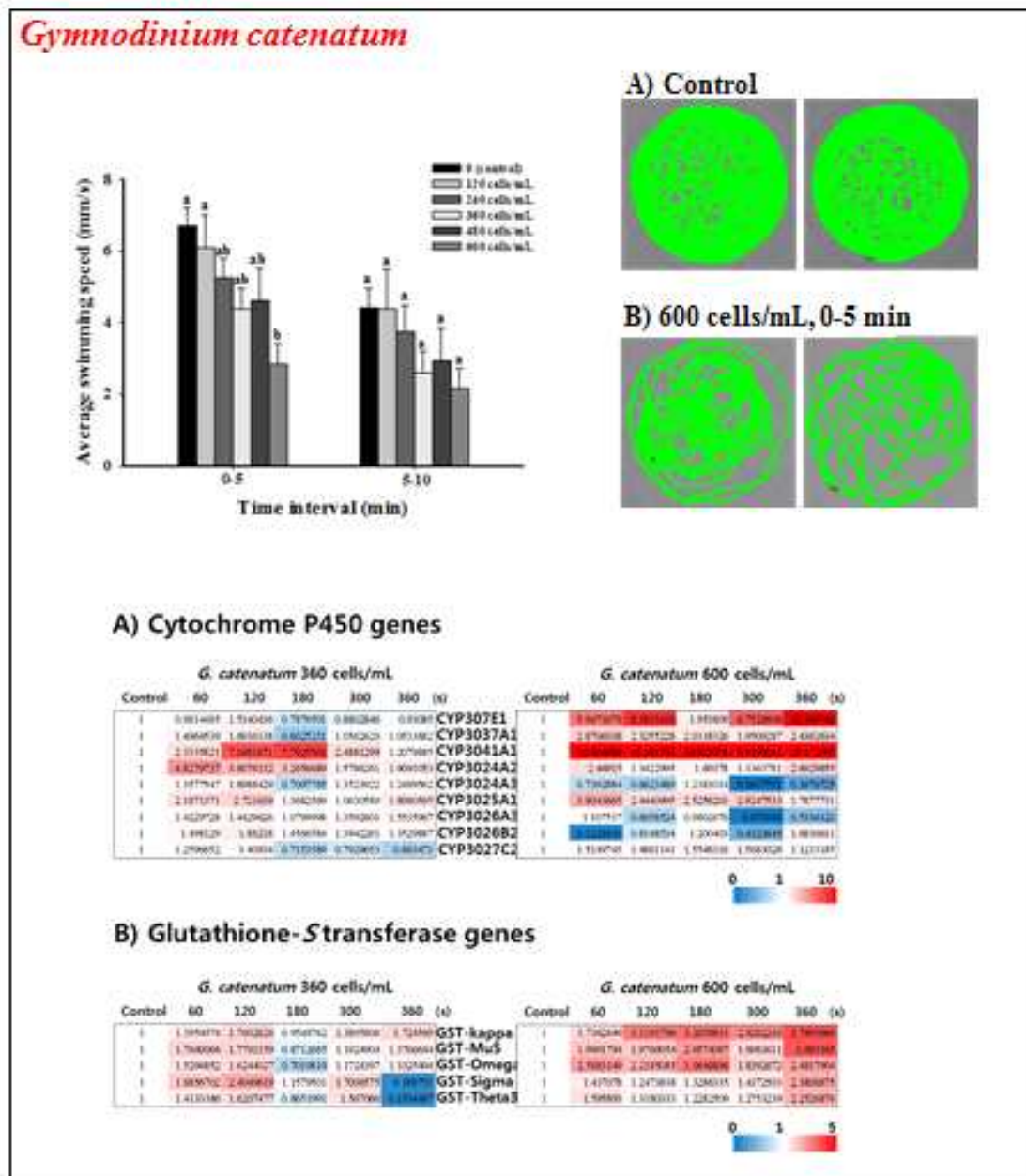


그림 71. *G. catenatum*에 의한 *T. japonicus*의 행동 및 유전자 발현 변화

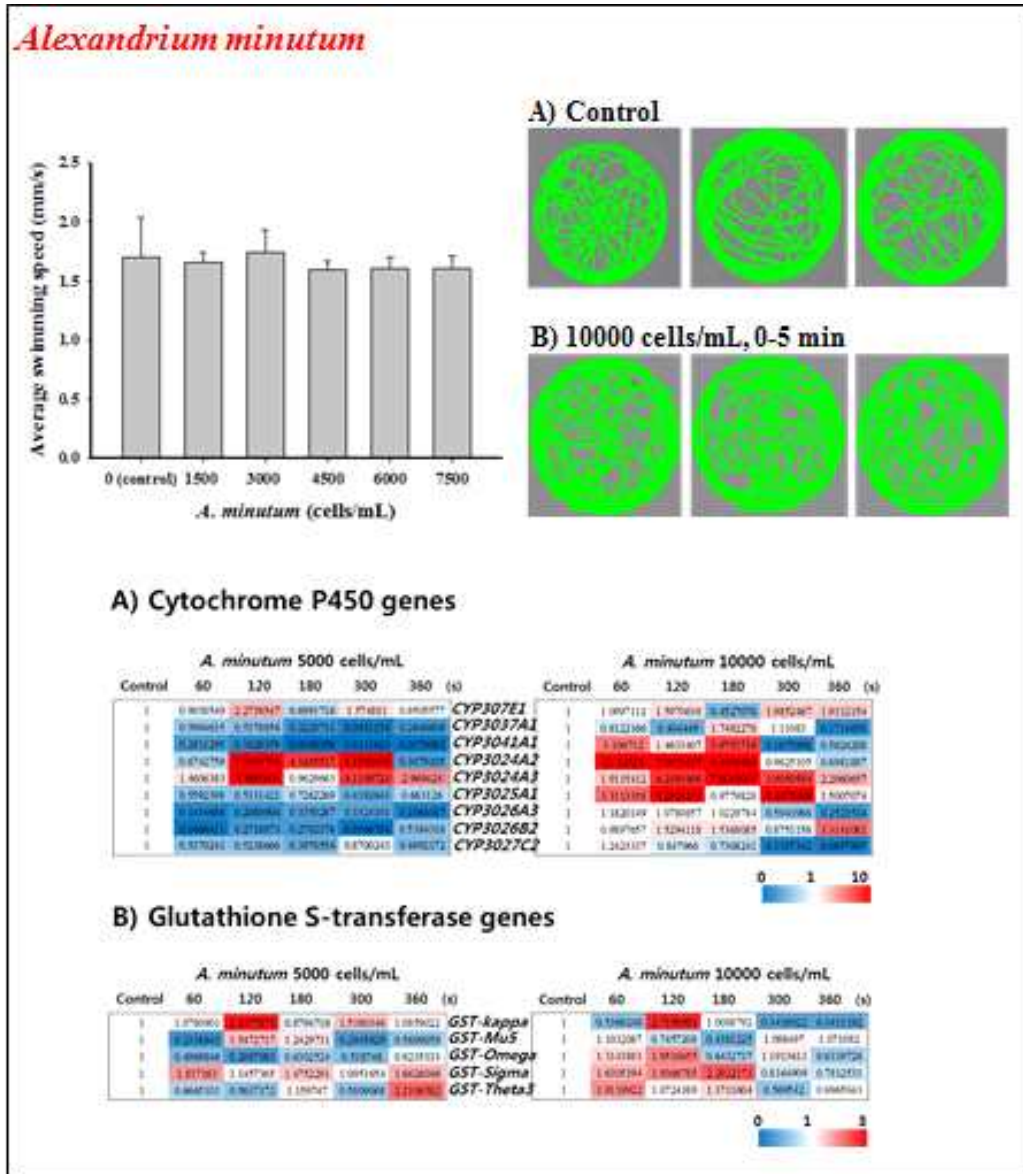


그림 72. *A. minutum*에 의한 *T. japonicus*의 행동 및 유전자 발현 변화

제6절 생체분자, 금속이온 탐지용 형광물질 도출

○ 천연물 phalloidin 기반 F-actin 선택적 형광 단백질 표지시약 개발

- F-actin과 선택적으로 결합하는 천연물 phalloidin을 KIOST-fluor와 중합하여 세포 내 F-actin을 염색할 수 있는 형광 표지시약 도출
- 지난해 합성했던 KF-P1에 이어 형광물성이 개선된 KF-P2를 상이한 방법으로 합성 (그림

73-75)

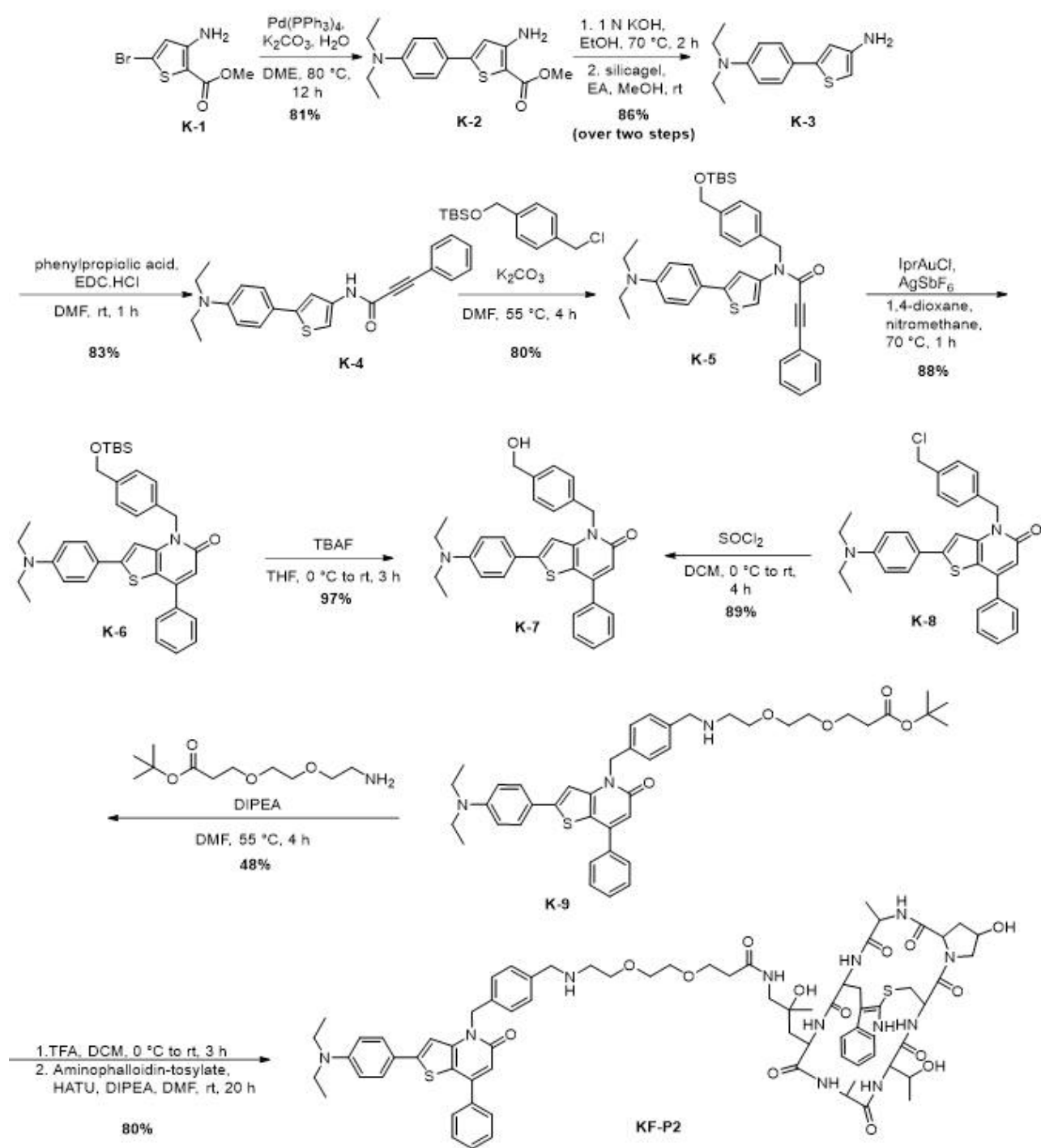


그림 73. KF-P2의 합성

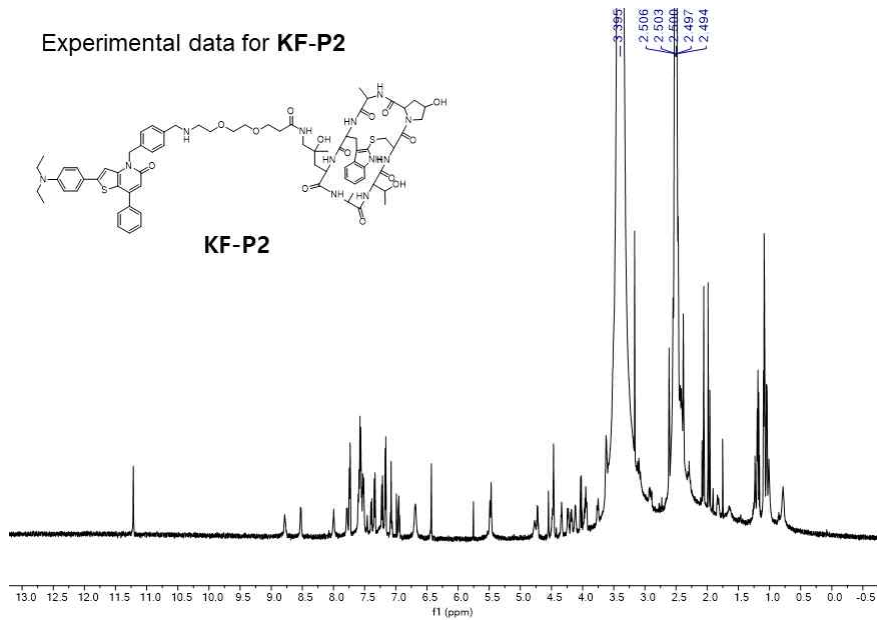


그림 74. KF-P2의 ¹H NMR data

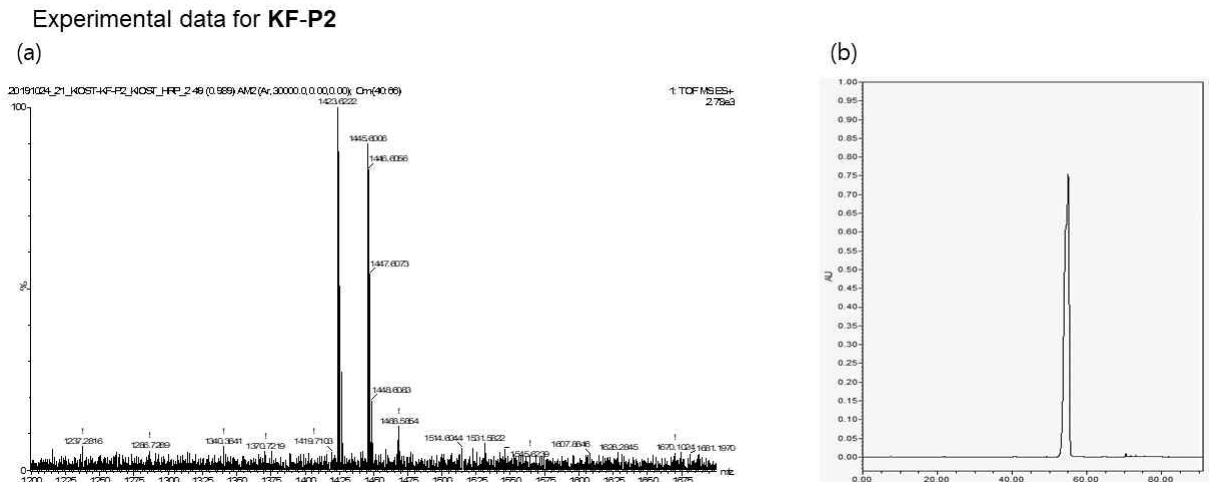


그림 75. KF-P2의 고분해능 질량분석 (HRMS) 데이터(a)와 HPLC를 이용한 순도측정 데이터(b)

- HBEC 세포주에서 KF-P1과 KF-P2의 F-actin에 대한 형광표지 비교실험: 세포핵 표지시약인 DAPI와 형광과장이 상이하여 co-staining에 유리하고, 적은 농도 (KF-P1: 5 μ M, KF-P2: 3 μ M)에서 염색이 가능하다는 장점을 갖고 있는 KF-P2가 KF-P1보다 우수하다는 것을 실험적으로 증명 (그림 76)
- 형광표지 성능이 우수함이 입증된 KF-P2를 이용하여 HBEC 세포주에서 F-actin 고화질 표지 이미지 도출 (그림 77)
- 세포핵 F-actin 형광염색실험: F-actin은 세포질에 고농도로 존재하지만 세포핵에서 극미량 존재하고 외부의 스트레스에 의해 세포핵 DNA 손상이 일어나고 세포가 사멸할 때 한시적으로 염색이 가능

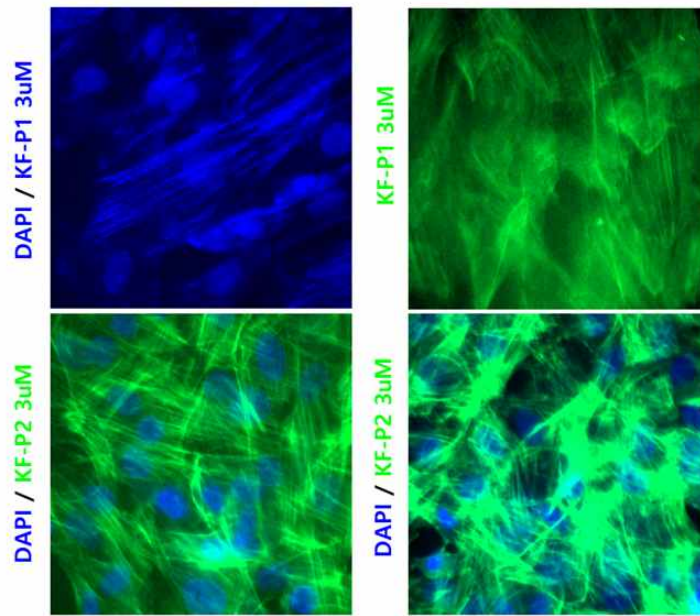


그림 76. HBEC 세포주를 이용한 KF-P1, KF-P2의 F-actin 형광표지 비교

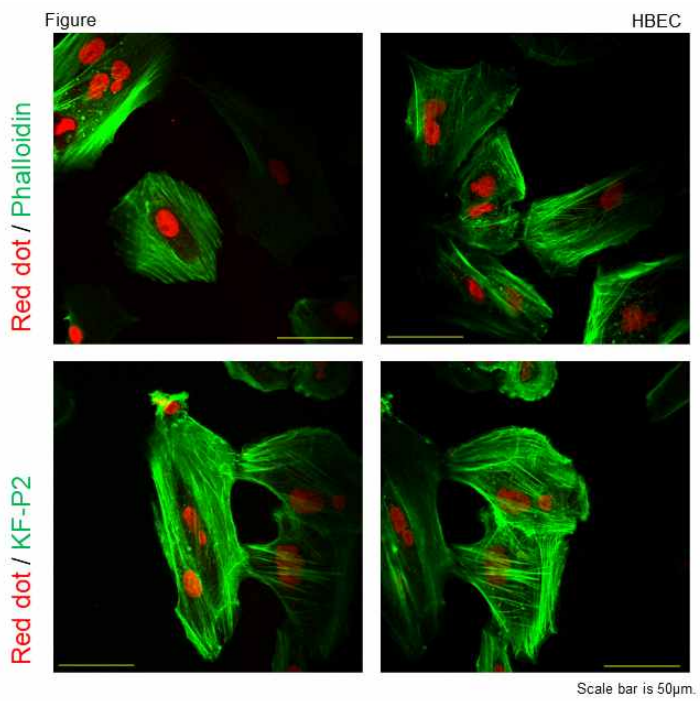


그림 77. HBEC 세포주를 이용한 KF-P2의 F-actin 공초점 레이저 주사 현미경 형광표지 이미지

- HBEC 세포주에 DNA 파괴를 유발하는 MMS (methyl methanosulfonate)를 주입하여 세포핵 F-actin 형광염색을 시도하였으나 기대했던 양질의 이미지 획득 실패 (그림 78)

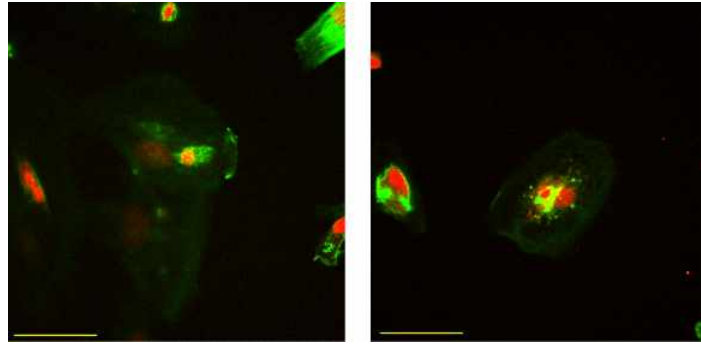


그림 78. KF-P2를 이용한 HBEC 세포주 세포핵 형광염색 실험
(HBEC 세포주를 40-50% confluence로 배양 후 0.01% (v/v)농도로 MMS 첨가) 형광표지 이미지

○ Caged-thienopyridinone 형광단을 이용한 혈액 내 황화수소 검출용 형광 센서의 개발

- 황화수소 (H₂S)는 산화질소 (NO), 일산화탄소 (CO)와 더불어 생체내 주요 중개인자로서 알츠하이머병, 고혈압, 당뇨, 천식 환자에서 비정상적 혈중 황화수소 농도가 관찰되므로 간편하고 신속한 혈중 황화수소 검출법 개발이 요구됨.
- 기존의 혈중 황화수소 검출법은 혈액 내 존재하는 다양한 단백질에 의한 신호교란으로 정확한 진단이 기술적으로 어렵지만 HSA에 결합 시 형광증폭 효과가 있는 KF를 기반으로 하는 KF-DNBS로 기술적 한계 극복 가능 (그림 79)
- KF-DNBS의 가리움 시약으로 작동하기 위해서는 dinitrobenzenesulfonyl group이 KF-DNBS로부터 이탈하여 KF로 변환될 때만 HSA와 결합하여 형광증폭이 발생되어야 하는데 KF-DNBS가 이런 조건을 충족하는 것으로 증명 (그림 80)
- KF-DNBS의 nitrobenzenesulfonyl group은 serum에 존재하는 biothiol인 Cys, Hcy, GSH 등과도 반응하여 형광신호의 교란을 초래할 수 있으므로 이들에 존재하는 thiol기의 반응성을 제거할 수 있는 2-FBBA (2-formyl benzene boronic acid)를 추가하여 실험을 진행 (그림 81)
- KF-DNBS는 황화수소에 대해 시간대별, 농도의 증가에 비례해서 형광세기가 증가하고, pH 5부터 pH 9까지의 범위에서 황화수소에 선택적으로 감응함을 실험적으로 증명 (그림 82)
- KF-DNBS의 혈액 내에 존재할 수 있는 다양한 이온과 황화수소에 대한 형광신호의 비교 실험 결과 황화수소에 대해 선택적으로 형광신호를 생산하고 있음을 증명 (그림 83)
- KF-DNBS의 황화수소 검출의 신뢰성을 확인하기 위해 진행한 실제 첨가된 황화수소와 검출된 황화수소의 수치 비교 실험에서 결과의 신뢰성을 확인 (표 14)

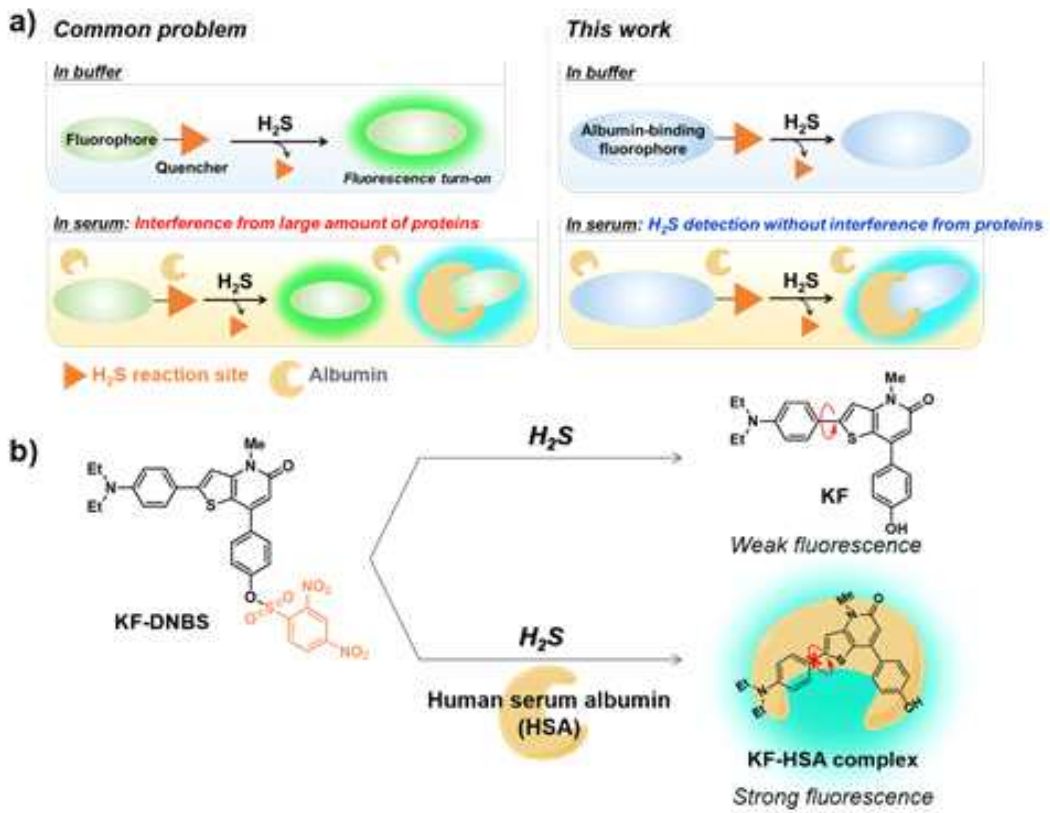


그림 79. 혈중 황화수소 검출법 비교

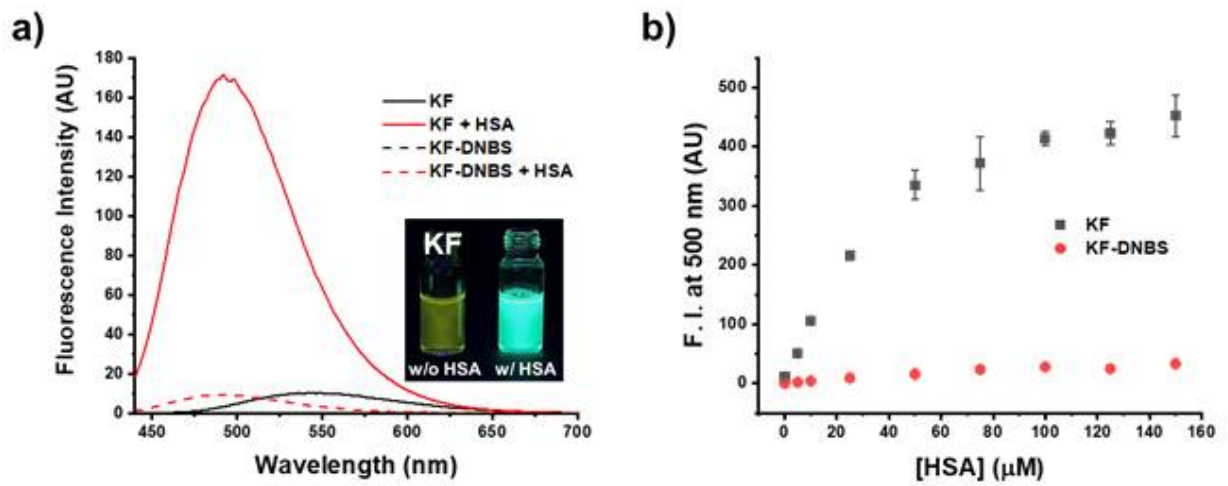


그림 80. KF와 KF-DNBS의 HSA결합 형광증폭 비교실험
(KF, KF-DNBS 25 μ M, 10% DMSO, HSA 100 μ M)

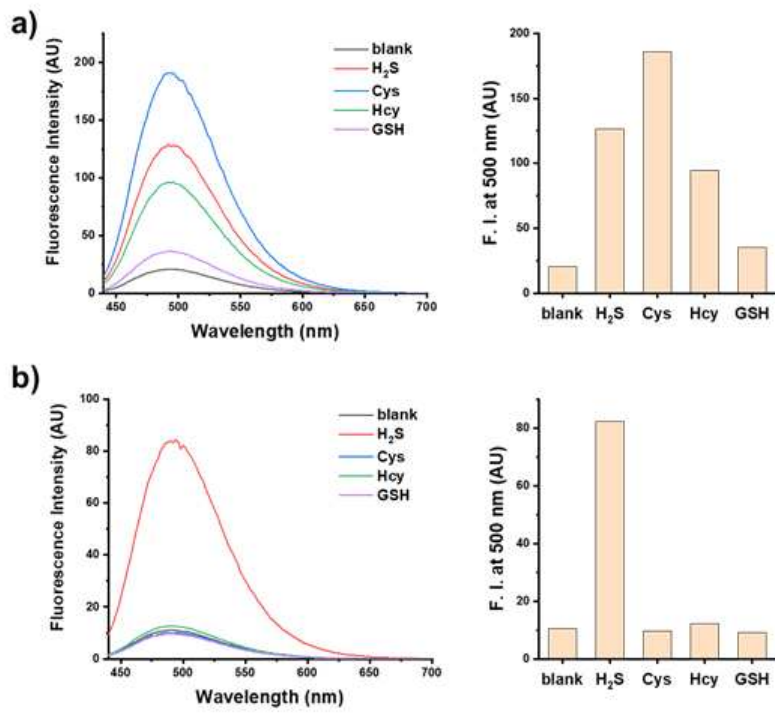


그림 81. 2-FBBA 첨가로 biothiol의 신호교란 방지

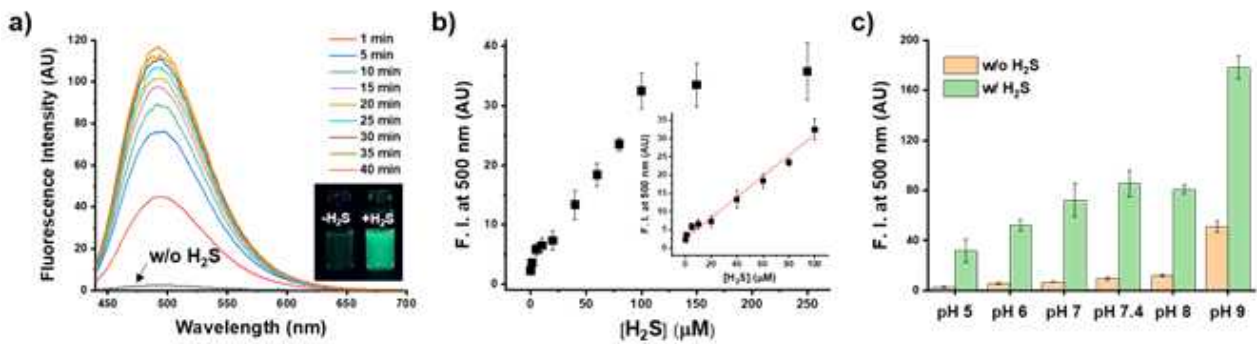


그림 82. KF-DNBS의 시간대(a), 황화수소 농도(b), pH 변화(c)에 따른 형광세기 변화

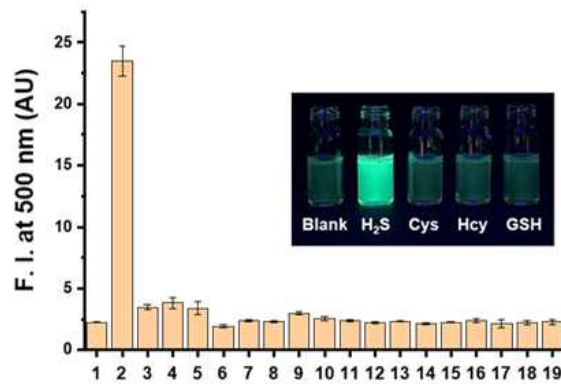


그림 83. KF-DNBS의 다양한 이온에 대한 형광신호 비교 실험

표 14. KF-DNBS의 황화수소 검출 신뢰성 검증 실험

	Added (uM)	Found (uM)	Recovery (%)	RSD (%)
Human serum	25	26	106	13
	50	51	101	10
	100	95	95	11
	150	163	109	12

○ 칼슘 (Ca^{2+}), 납 (Pb^{2+}) 형광센서의 디자인과 합성

- 칼슘 이온 인지단인 BAPTA와 납이온 선택성을 보이는 (pyridin-2-ylmethyl)amino기의 도입 위치를 형광강도와 파장에 민감하게 영향을 주는 thienopyridinone의 2번 탄소로 변경하여 합성을 진행중 (그림 84)

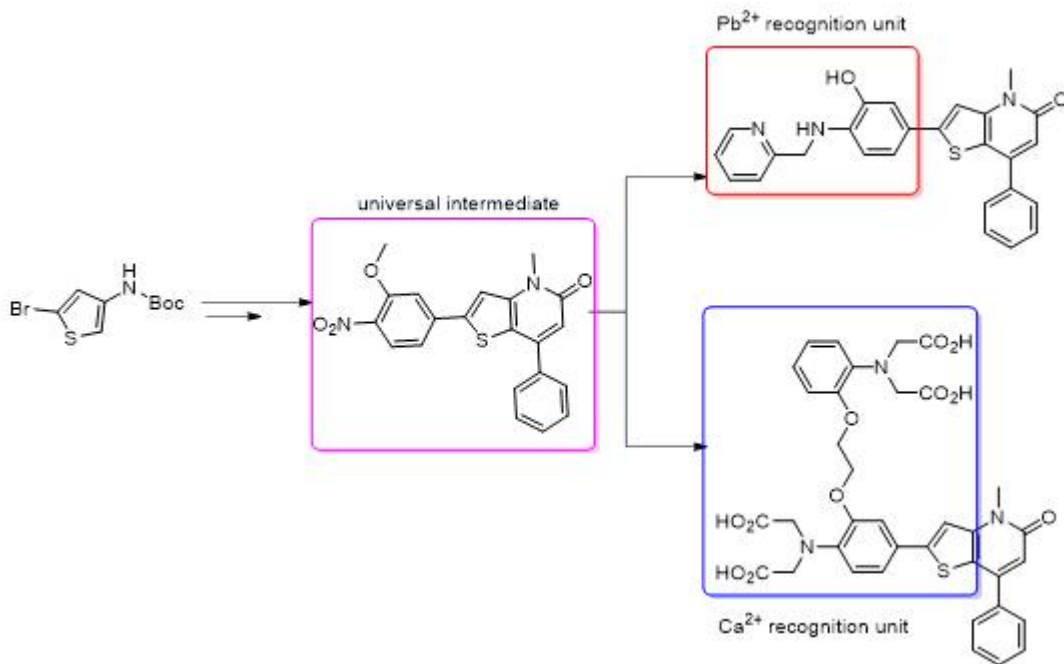


그림 84. 칼슘 이온, 납 이온 센서 합성 (진행중)


제 4 장 연구개발목표 달성도

제 1 절 목표 달성도

성과목표	연구 내용	가중치	달성 실적	달성율 (%)
생리활성 천연물 발굴	유용 추출물 유래 활성 천연물/유도체 발굴 (8종)	0.20	6종의 고역가 생리활성 천연물 발굴 (암세포독성 2종, 이온 채널 억제 (통증) 6종) (그림 21)	100
해면 메타게놈 데이터 확보	해면 메타게놈으로부터 유용 천연물 생합성 유전자군 도출 (1종)	0.15	PKS-TPS hybrid 유전자군 발굴 (그림 22), terpene cyclase 유전자 그룹 도출 (그림 23)	100
마비성 독소 분석법 확립	마비성 독소 생산기술 개발 (STX 1종) 및 표준시료로써 재현성 평가	0.12	dcSTXol 합성 및 구조분석 완료 (그림 24)	100
마비성 독소 원인종과 독소 생산 조건 규명	유독 와편모조류의 독소 생산에 관여하는 환경 조건 (빛 파장의 영향) 탐색	0.20	(비공개종)의 독소 생산에 영향을 줄 수 있는 파장 확인 (control보다 약 10배 높음) (그림 25), 독소 생산 수율 300 ug/L 이상 달성 (목표수율 30 ug/L) (그림 26)	100
화합물 독성 평가기법 개발	독성 화합물에 대한 미소동물플랑크톤의 생태적 반응조사	0.13	독성화합물 노출에 의한 생태적 종말점 발굴, 독화된 패류와 유독 와편모조류 노출에 의한 생태적 반응조사 (그림 27)	100
생체분자 탐지용 형광물질 도출	형광 유도체 물성 개선 (3종)	0.20	개선 형광 유도체 3 종 확보 (그림 28)	100
계		1.00		100

제 2 절 대표적 우수성과

우수성과 - 1	통증 관련 이온채널 TRPA 억제 천연물 발굴
성과 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 열대 해삼 <i>Bohadschia vitiensis</i>로부터 통증 관련 이온채널 억제 물질 발굴 - TRPA 저해제는 당뇨병성 신경병증, 항암화학요법 유래 신경병증, 염증 등으로 인한 통증을 완화하는 것으로 보고됨 - 열대 해삼으로부터 6종의 saponin 계열 화합물 분리/규명, 이들 화합물은 TRPA 저해능이 강해 진통제 개발 연구 소재로 효용성이 높음
성과의 우수성	<ul style="list-style-type: none"> - TRPA는 신경병증 등 다양한 만성 통증 치료제 개발에 있어 유효한 표적으로 평가되고 있으나 아직 관련 의약품이 개발된 사례가 없음 - 천연물, 합성 유도체들로부터 TRPA 저해제를 발굴하고자 하는 연구가 활발하나 해양 천연물로부터 저해 활성이 확인된 보고가 없음 - 열대 해양생물 추출물에 대한 고효율 약효탐색에 기반한 활성 천연물 발굴로서 향후 이와 같은 방식으로 다양한 TRPA 저해제 발굴이 기대됨 - 관련 내용으로 상위 5% 이내 저널 (<i>J. Agric. Food Chem.</i>) 발표, 물질에 대한 국내 특허와 PCT 출원



pubs.acs.org/JAFC Article

Triterpene Glycosides Isolated from the Edible Sea Cucumber *Bohadschia vitiensis* and Their Antagonistic Activity against Transient Receptor Potential Ankyrin 1

Hansol Choi, Chulhong Oh, JeongMi Hyun, Jeungeun Yang, Myung Jin Song, Hyi-Seung Lee, and Yeon-Ju Lee*

Cite This: *J. Agric. Food Chem.* 2020, 68, 5349–5355 Read Online

ACCESS | Metrics & More | Article Recommendations | Supporting Information

ABSTRACT: Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is a cation channel that plays a critical role in the occurrence and transmission of pain. By screening 393 marine invertebrate extracts for their antagonistic activity against TRPA1, it was found that the extract of the edible sea cucumber *Bohadschia vitiensis* had a remarkable potency. Bioassay-guided separation of the extract resulted in the isolation of six triterpene glycosides, including a novel analog. All six isolated compounds exhibited high inhibitory potency against TRPA1 (IC₅₀ values ranging from 0.60 to 3.26 μM), which is comparable to that of a previously developed synthetic antagonist (A-967079). The discovery of TRPA1 antagonists, originated from this edible sea cucumber, opens the door for the elaboration of the valuable triterpene scaffold for the development of novel safe analgesics.


KEYWORDS: transient receptor potential ankyrin 1, sea cucumber, *Bohadschia vitiensis*, triterpene glycoside, pain

INTRODUCTION

Transient receptor potential (TRP) channels are a group of nonselective cation channels that respond to a wide variety of mechanical, thermal, and chemical stimuli. In mammals, the TRP family, comprising 28 isoforms in 6 different subfamilies, mediates a multitude of physiological and pathophysiological processes, including pain.^{1–3} Among them, TRP ankyrin 1 (TRPA1) is a nonselective calcium channel, predominantly expressed in primary afferent sensory neurons, that mediates somatosensory processes and nociceptive transmissions. In the peripheral terminals of these neurons, TRPA1 is involved in

efficient TRPA1 antagonists, either by using xanthine as the chemical scaffold¹⁰ or by focusing on the development of novel structures, with the arylsulfonamide-acetamide conjugate,¹¹ alkenone oxime,^{12,13} indazole,¹⁴ and piperidine carboxamide¹⁵ scaffolds being successful examples.

Efforts also have been made to discover TRPA1 modulators from living organisms. Since the early stages of research in the field, it has been known that the pungent taste of mustard, cinnamon, and garlic derive from the activation of TRPA1 by allyl isothiocyanate (AITC),¹⁶ cinnamaldehide,¹⁷ and allicin,¹⁸ respectively. Some terpenoids found in various edible plants and mushrooms are also known to activate human TRPA1

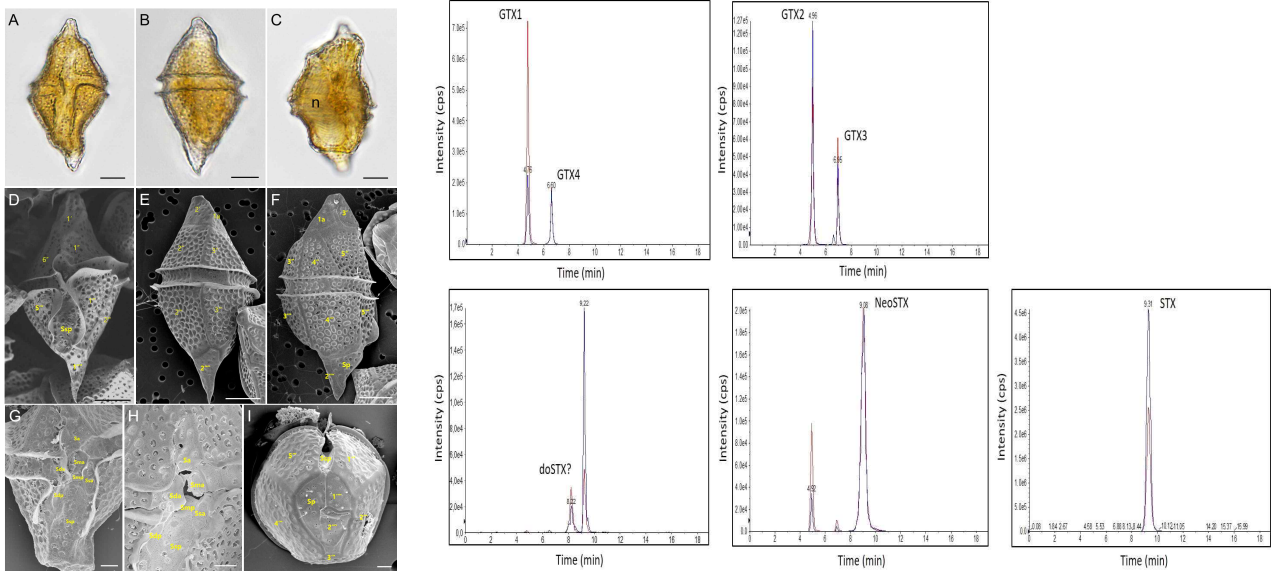


전자 제출 접수증

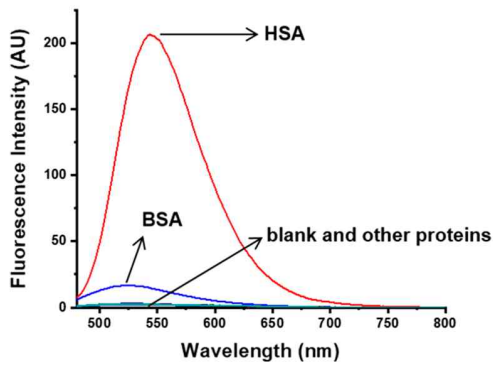
ePCT-Filing을 통해 제출한 PCT 국제출원을 수리관청(RO/KR)에서 접수하였음을 알려드립니다. 출원번호와 접수일이 자동으로 부여되었습니다(행정지침 제7부).

접수번호:	612020005323879														
국제출원번호:	PCT/KR2020/009363														
접수일:	16 July 2020														
수리관청:	Korean Intellectual Property Office														
참조기호:	X20R22C0129														
출원인:	한국해양과학기술원														
출원인 수:	1														
발명의 명칭:	해삼 유래 사포닌 화합물을 포함하는 신경병증의 예방, 완화 또는 치료를 조성물														
제출된 문서:	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>X20R22C0129-appb.xml</td> <td>59924</td> </tr> <tr> <td>(X20R22C0129.xml)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>X20R22C0129-dpcf-000001.rar</td> <td>312973</td> </tr> <tr> <td>X20R22C0129-fees.xml</td> <td>1920</td> </tr> <tr> <td>X20R22C0129-post-000001.xml</td> <td>2511</td> </tr> <tr> <td>X20R22C0129-requ.xml</td> <td>16242</td> </tr> <tr> <td>X20R22C0129-vlog.xml</td> <td>433</td> </tr> </table>	X20R22C0129-appb.xml	59924	(X20R22C0129.xml)		X20R22C0129-dpcf-000001.rar	312973	X20R22C0129-fees.xml	1920	X20R22C0129-post-000001.xml	2511	X20R22C0129-requ.xml	16242	X20R22C0129-vlog.xml	433
X20R22C0129-appb.xml	59924														
(X20R22C0129.xml)															
X20R22C0129-dpcf-000001.rar	312973														
X20R22C0129-fees.xml	1920														
X20R22C0129-post-000001.xml	2511														
X20R22C0129-requ.xml	16242														
X20R22C0129-vlog.xml	433														
제출자:	최에윤 (고객 아이디: user_KR_0711_주 0 8640)														
접수 타임스탬프:	16 July 2020 14:16 UTC+9 (KST)														
제출에 관한 공식 요약:	C7:02:B4:C6:0B:D4:C8:41:3F:81:D2:C4:B2:9F:C6:46:AC:50:FC:7D														

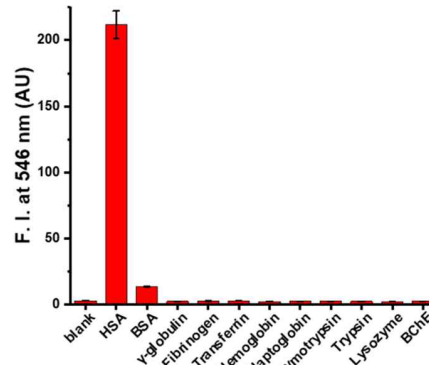
증빙 자료	<p>Triterpene Glycosides Isolated from the Edible Sea Cucumber <i>Bohadschia vitiensis</i> and Their Antagonistic Activity against Transient Receptor Potential Ankyrin 1. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> 2020, 68, 5349</p> <p>국내특허 (10-2020-0033900), PCT (PCT/KR2020/009363)</p>
-------	--

우수성과 -2	<i>Centrodinium punctatum</i> 의 배양을 통한 독소 생산 가능
성과 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>C. punctatum</i> 배양을 통해 Toxicity level이 높은 다양한 독소 생산 가능성 확인 - 전 세계 연안에서 마비성 독소를 생산하는 와편모조류 주요 종 중, 독성이 가장 강하고, 다양한 독소를 생산할 수 있음을 확인 - 전 세계 유일한 배양주 <i>C. punctatum</i>의 성장과 독소 생산 환경 규명 - 강한 독성을 가진 새로운 와편모조류의 학계 보고
성과의 우수성	<ul style="list-style-type: none"> ○ 마비성 독소 분석을 위한 표준물질 확보 가능성 확인 - 현재까지 마비성 독소 분석을 위한 표준물질은 일본과 캐나다 등에서 수입하여 사용하고 있으나, <i>C. punctatum</i>의 대량배양을 통해 표준물질 제조가 가능해질 수 있음 (자원의 국산화 실현) - 특히, 기존의 마비성 독소 원인종에서 생산이 어려웠던 STX, neoSTX의 생산 가능성을 확인 ○ 의학 분야에 활용 가능성 확인 - 의학 분야에 활용 될 수 있는 약품 등의 생산에 해양생물의 적용 가능성 제시 ○ 강한 마비성 독소를 생산하는 <i>C. punctatum</i>의 한국연안에서 모니터링 필요성 제시
	
증빙 자료	<p><i>Centrodinium punctatum</i> (Dinophyceae) produces significant levels of saxitoxin and related analogs (<i>Harmful Algae</i>, 2020, in press)</p>

우수성과 -3	HSA (human serum albumin)에 선택적으로 감응하는 형광프로브 개발
성과 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 혈액에 존재하는 단백질에 대한 형광감응 검색 - 신규 구조의 형광소재로서 KIOST가 기술을 보유 - 합성된 KIOST-fluor 유도체의 HSA, BSA (bovine serum albumin), globulin, fibrinogen, transferrin 등 혈액 내 주요 단백질에 대한 형광감응 검색 결과 약 160배의 형광증폭을 보이는 유도체 도출
성과의 우수성	<ul style="list-style-type: none"> ○ 형광 진단법으로의 활용 가능성 - pH 9에서 유사한 구조를 갖는 HSA와 BSA를 8 nM의 검출한계로 구분가능 - 소변에 존재하는 극미량의 HSA 검출가능 - 다양한 단백질이 존재하는 혈액에서 특정 타겟을 검출하는 형광소재로 이용가능



(a)



(b)

증빙 자료	Development of Human Serum Albumin Selective Fluorescent Probe Using Thieno[3,2-b]pyridine-5(4H)-one Fluorophore Derivatives, <i>Sensors</i> 2019 , <i>19</i> , 5298.
-------	--

제 3 절 정량적 연구성과

구분		가중치 (%)	과제 설정 목표(건)		세부 가중치 (%)	달성(건)	달성도 (%)
과학적 성과	논문	60	mrnIF 81점 이상	1	20	4	200
			mrnIF 61~80	3	60	6	
			mrnIF 41~60	1	8	2	
			mrnIF 40점 이하	1	7	1	
			KCI/SCOPUS	1	5	1	
			소계	7	100	14	
	학술발표	10	학술대회 발표	3	100	8	266
기술적 성과	특허	25	국제특허 출원	1	40	2	100
			국제특허 등록	-	-	-	
			국제특허 추가등록	-	-	-	
			국내특허 출원	1	20	1	
			국내특허 등록	1	40	0	
기타	대외활동	5	사업 관련 대외/홍보 활동	1	100	3	300
계	-	100			-		>100

1. 연구논문

번호	논문명	저자명 (KIOST 저자)	게재일	학술지명	학술지 구분	ISSN	mrnIF
1	Triterpene Glycosides Isolated from the Edible Sea Cucumber <i>Bohadschia vitiensis</i> and Their Antagonistic Activity against Transient Receptor Potential Ankyrin 1	이연주 외	2020.08	Journal of Agricultural and Food Chemistry	SCI(E)	0021-8561	95
2	Potential effects of bacterial communities on the formation of blooms of the harmful dinoflagellate <i>Prorocentrum</i> after the 2014 Texas City “Y” oil spill (USA)	박범수 외	2020.05	Harmful Algae	SCI(E)	1568-9883	95
3	Revision of the life cycle of the harmful dinoflagellate <i>Margalefidinium polykrikoides</i> (Gymnodiniales, Dinophyceae) based on isolates from Korean coastal waters	신현호 외	2020.10	Journal of Applied Phycology	SCI(E)	0921-8971	90

4	Influence of salinity on population growth, oxidative stress and antioxidant defense system in the marine monogonont rotifer <i>Brachionus plicatilis</i>	이균우 외	2020.08	Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology	SCI(E)	0305-0491	86
5	Development of human serum albumin selective fluorescent probe using thieno[3,2-b]pyridine-5(4H)-one fluorophore derivatives	이종석 외	2019.12	Sensors	SCI(E)	1424-8220	78
6	Therapeutic Potential of (–)-Agelamide D, a Diterpene Alkaloid from the Marine Sponge <i>Agelas</i> sp., as a Natural Radiosensitizer in Hepatocellular Carcinoma Models	이연주 외	2020.10	Marine Drugs	SCI(E)	1660-3397	75
7	Reclassification of <i>Gyrodinium flavescens</i> Kofoid & Swezy as <i>Torquentidium flavescens</i> comb. nov. (Ceratomyxidae, Dinophyceae), based on morphology and phylogeny	신현호 외	2020.02	Phycologia	SCI(E)	0031-8884	74
8	Morphology, ultrastructure, and molecular phylogeny of the unarmoured dinoflagellate <i>Kirithra sigma</i> sp. nov. (Ceratomyxidae, Dinophyceae)	신현호 외	2020.07	Phycologia	SCI(E)	0031-8884	74
9	Reclassification of <i>Gonyaulax verior</i> (Gonyaulacales, Dinophyceae) as <i>Sourniaea diacantha</i> gen. et comb. nov.	신현호 외	2020.08	Phycologia	SCI(E)	0031-8884	74
10	The Influence of Dissolved Organic Carbon on the Microbial Community Associated with <i>Tetraselmis striata</i> for Bio-Diesel Production	박범수 외	2020.05	Applied Sciences	SCI(E)	2076-3417	66
11	Effects of Different Nutrient and Trace Metal Concentrations on Growth of the Toxic Dinoflagellate <i>Gymnodinium catenatum</i> Isolated from Korean Coastal Waters	신현호 외	2020.06	Sustainability	SCI(E)	2071-1050	55
12	Taxonomy and Molecular Phylogenetics of <i>Ensiculiferaceae</i> , fam. nov. (Peridiniales, Dinophyceae), with Consideration of their Life-history	신현호 외	2020.09	Protist	SCI(E)	1434-4610	28

13	Antioxidant properties of the Manzamenones from the Tropical Marine Sponge <i>Plakortis</i> sp.	이희승 외	2020.01	Natural Product Communications	SCI(E)	1934-578X	8
14	Morpho-molecular characterization of diatom <i>Skeletonema pseudocostatum</i> (Thalassiosirales, Bacillariophyta) from the Korean coast	신현호 외	2020.03	한국환경생물학회	등재	1226-9999	-

2. 학술발표

번호	논문명	저자명 (KICST 자자)	발표일	학술대회명	구분	국내/외
1	한국 연안의 규조류 기반 생태지역 구분과 생물지표종	이균우 외	2020.07.24	한국산학기술학회	프로시딩(A)	국내
2	독성 와편모조류 <i>Alexandrium minutum</i> 이 해수산 요각류 <i>Tigriopus japonicus</i> 에서 해독 관련 유전자의 발현에 미치는 영향	이균우 외	2020.07.24	한국산학기술학회	프로시딩(A)	국내
3	<i>Centrodinium punctatum</i> (Dinophyceae) produces significant levels of saxitoxin and related analogs	신현호 외	2020.07.23	한국해양과학기술협의회공동학술대회	프로시딩(A)	국내
4	<i>Gonyaulax</i> species (Dinophyceae) from Korean coastal waters: Morphology, phylogeny, and effects of temperature and salinity on growth	신현호 외	2020.07.23	한국해양과학기술협의회공동학술대회	프로시딩(A)	국내
5	Reclassification of <i>Gyrodinium flavescens</i> Kofoid & Swezy as <i>Torquentidium flavescens</i> comb. nov. (Ceratomyxidae, Dinophyceae), based on morphology and phylogeny	신현호 외	2020.07.10	한국환경생물학회	프로시딩(A)	국내
6	Effects of different nutrient and trace metal concentrations on growth of the toxic dinoflagellate <i>Gymnodinium catenatum</i> isolated from Korean coastal waters	신현호 외	2020.07.10	한국환경생물학회	프로시딩(A)	국내
7	Metagenomic analysis of marine sponges-associated microbiome isolated from Chuuk lagoon, Micronesia	권개경 외	2020.11.16	International Union of Microbiological Societies Congresses	프로시딩(A)	국외
8	<i>Artemia franciscana</i> 의 유영행동을 이용한 유독 와편모조류의 독성평가 기법	이균우 외	2020.10.17	2020 한국해양생명과학회 정기총회	프로시딩(A)	국내

3. 산업재산권

번호	특허명(SW명)	등록국가	출원번호	출원일	등록번호	등록일
1	Composition comprising saponins or sea cucumber extract for pain treatment	PCT	PCT/KR2020/009363	20.07.29		
2	A composition comprising ageloxime D for increasing radiation sensitivity of cancer cells	PCT	PCT/KR2020/013927	20.10.13		
3	해삼 유래 추출물 또는 사포닌 화합물을 함유하는 통증의 치료, 완화 또는 예방용 조성물	한국	10-2020-0033900	20.03.19		

4. 기타(대외 및 홍보활동)

번호	활동명	유형	활동/시행일	계약 체결일
1	SBS 취재협조와 자문 (정글의 법칙-411-415) 팔라완 해양생물 동정 및 정보 제공	홍보(방송)	2020.04.06	2020.04.01
		홍보(방송)	2020.05.16	2020.05.12
		홍보(방송)	2020.05.23	2020.05.19
		홍보(방송)	2020.05.30	2020.05.26
		홍보(방송)	2020.06.06	2020.06.02
2	SBS 취재협조와 자문 (정글의 법칙-416-420) 국내연안 서식 해양생물 동정 및 정보 제공	홍보(방송)	2020.08.29	2020.08.25
		홍보(방송)	2020.09.05	2020.09.01
		홍보(방송)	2020.09.12	2020.09.08
		홍보(방송)	2020.09.19	2020.09.15
		홍보(방송)	2020.09.26	2020.09.22
3	SBS 취재협조와 자문 (세상에 이런 일이)	홍보(방송)	2019.12.11	2019.12.10

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제1절 연구성과의 의의

○ 총괄

- 모든 지표에 있어 성과 목표 달성 완료
- 생리활성 천연물 발굴과 해면 메타게놈 데이터 확보가 유기적으로 진행됨 (활성 천연물 발굴 해면에 대한 메타게놈 데이터 확보; 194CH-07, *Dactylospongia* sp.)
- 마비성 독소 분석법 확립, 마비성 독소 생산 외편모조류 배양, 화합물 독성 분석법 확립 연구들이 유기적으로 진행되어 수월성 제고 (시료와 분석 결과 공유)

○ 생리활성 천연물 발굴

- 천연물 발굴 성과 목표 (IC50 5 μ M 이하 활성 천연물 5종 발굴) 달성 (8종)
- TRPA 억제 활성의 saponin 화합물들은 식용으로도 활용되는 해삼 *B. vitiensis*로부터 분리되어 향후 의약소재로 개발함에 있어 독성으로 인한 실패 확률이 낮을 것으로 기대됨
- 향후 국내 식용 해삼으로 활성 검색 범위를 확장하여 다양한 TRPA 조절제를 발굴할 수 있음

○ 해면 천연물 생합성 유전자군 규명

- Ilimaquinone 생합성 관련이 유력한 PKS-TPS hybrid 유전자군 발굴 - 성과목표 달성
- 다양한 terpene cyclase 예상 유전자 발굴, terpenoid, meroterpenoid 화합물 생성과 관련한 cryptic gene 발굴이 기대됨
- 항생제 내성 관련 유전자 발굴 - 향후 관련 기능에 대한 후속 연구 진행 예정

○ 마비성 독소 생산기술 개발 (STX 1종) 및 표준시료로써 재현성 평가

- 분석방법의 개선을 통한 GTX계열 독소의 분리능 향상
- 다양한 종류의 마비성 독소의 합성에 중간체로 사용될 수 있는 dcSTXol의 합성법을 확립
- 분석표준독소 생산 및 마비성 패류독의 약리학적 성질의 확인이 가능해짐

○ 마비성 독소 생산 조건 규명

- 마비성 독소 생산을 위한 다양한 환경 조건 중, 특정 파장대의 빛을 이용해 독소 생산을 증가시킬 수 있는 기술 개발 가능
- 마비성 독소 원인 중 중, 독성이 가장 높은 *Centrodinium punctatum*의 최적 성장 조건과 독소 생산 환경을 최초로 규명함
- 패독 분석을 위한 표준 시료의 독자적 생산이 가능 할 것으로 판단됨

○ 독성 화합물에 대한 미소동물플랑크톤의 생태적 반응조사

- 유독 미세조류에 의해서 생산된 독성 물질이 해양생물에 미치는 영향을 매우 빠르게 검출하고 이들 해양생물독이 해양생물의 개체 및 군집수준에 미치는 영향을 심도있게 연구하는데 기초자료 제시

○ 형광 유도체 물성 개선

- F-actin 형광프로브 KF-P1과 KF-P2를 도출하여 형광비교실험을 수행한 결과 KF-P2가 형광 파장, 감도에서 우수함을 규명
- KF-P2를 이용해 양질의 F-actin의 공초점 레이저 주사 현미경 (confocal microscopy) 이미지 획득
- KF의 HSA에 대한 선택적 형광증폭 현상을 이용하여 혈중 황화수소 (H₂S)를 검출할 수 있는 KF-DNBS 유도체 도출

제2절 연구개발 성과의 중요성과 활용방안

성과물	중요성	활용방안
생리활성 천연물 발굴	신약, 기능성 소재 개발을 위해 지속적인 활성·지표 성분 발굴 필요	개발, 활용 연구가 기대되는 천연물 타겟 발굴
	천연물의 기능 규명을 통해 해양 생태계에 대한 이해 증진	화학생태학 연구주제 발굴

해면 메타게놈 기반 천연물 생합성 경로 규명	생물소재 개발의 가장 큰 걸림돌인 화합물 수급의 문제 해결 시도	생리활성 해양 천연물 생산에 활용하 여 개발 연구 진행 (다양한 활성·독성 평가, 전임상/임상 연구, 제형/제제연 구)
마비성 독소 표준시료 확보	마비성 독소 분석의 난점으로 작용했 던 표준시료 공급	마비성 독소 생산, 활용 연구의 분석 수단으로 활용 마비성 독소 모니터링 사업에 표준시 료 공급
와편모조류 활용 마비성 독소 생산 방법론 확립	마비성 독소 생산 방법론 확립을 통 한 연구용 시료 공급 마비성 독소의 생산 메커니즘 이해	마비성 독소의 활용, 개발 연구를 위 한 소재 공급 생성 메커니즘 이해를 통한 마비성 패독의 관리 방법 확립
미소 동물플랑크톤 활용 화합물 독성 평가기술 개발	해양 천연물/유도체의 활성/독성 평가 방법론 확립	MBA를 보완할 수 있는 생물독 평가 기법으로 활용 활성 천연물 발굴·개발 연구에서 생 리활성/독성 검정에 활용
기능성 형광 분자소재 개발	저분자형광소재를 활용한 해양생명공 학, 해양환경 적용 성공사례 도출	활성 해양 천연물 타겟 단백질 발굴 에 활용 해양환경 내 중금속 등 독성물질의 검출에 활용

제3절 연구개발의 기대효과

[기술적 측면]

○ 해양생명공학 연구수준 향상

- 천연물/생물독의 생산기반 확립으로 천연물 소재개발 연구와 생물독 활용성 발견 연구 촉진
- 마비성 독소 표준시료의 국내 공급 기반을 구축하여 다양한 목적의 분석 연구 활성화

○ 화학생태학 연구 주제 발굴

- 천연물/생물독 물질 공급을 통해 이들의 화학생태학적 기능에 대한 연구 가능
- 해양생물을 활용한 독성평가 기법 확립으로 화합물의 생태학적 기능에 대한 이해 증진
- 마비성 독소의 생합성 메커니즘에 기반하여 생물, 생태계에 대한 이해 증진

[경제·산업적 측면]

○ 신규 소재 발굴로 부가가치 창출

- 개발/생산 단계에서 요구되는 화합물양을 확보의 기술적 기반을 구축함으로써 천연물 유래 신규 의약품 개발 가능성과 비용 효율성을 높임
- 마비성 독소 활용의 의약소재 (진통제 등) 개발 연구의 초기 개념을 정립
- 생명공학, 진단의학, 환경 등의 분야에 활용되는 분석용 형광소재 제품화

○ 수산식품 안정성 확보를 위한 관리/분석 역량 증대

- 표준 시료의 안정적 국내 공급으로 패독 발생 모니터링의 효율성과 자료의 신뢰성 증진
- 신규 독성 평가기법, 화학적 정량 분석법을 MBA의 보완 수단으로 활용하여 분석의 효율성 증진
- 독성원인물질 생합성 저해인자 파악으로 해양생물독 발생의 근본적인 저감기술 개발

[사회적 측면]

- 국가R&D 정책수립 및 성과활용·환류에 활용
- 천연물/생물독 생산기술 개발이 신약개발로 연결, 이에 따라 국민 보건·복지, 식품/의약품 안전 등과 관련한 국가 연구개발 정책 수립 및 이행에 활용 가능
- 해양생물독의 체계적이고 장기적인 관리와 활용, 중독현상 발생시 신뢰성 높은 원인분석 자료를 국민에게 제공하고 축적된 해양생물독 관련 정보를 기반으로 선진화된 국가 연안 관리와 해양수산 전략 마련