

극지요각류의 자외선 및 염분도 변화에 따른
단백질체 변화 양상에 관한 연구

Expression patterns of proteomes in response to
UV-B and salinity in the Antarctic copepod *Tigriopus*

kingsejongensis



성균관대학교 산학협력단

제 출 문

극지연구소장 귀하

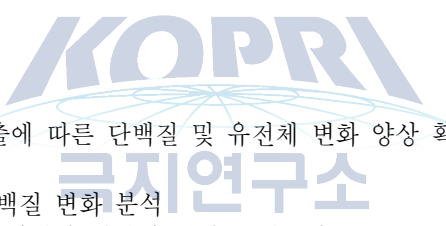
본 보고서를 “극지생물 유래 유용 대사체 활용기반 구축에 관한 연구” 과제의 위탁연구 “극지요각류의 자외선 및 염분도 변화에 따른 단백질체 변화 양상에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



2017. 1. 16.

총괄연구책임자 : 임 정 한
위탁연구기관명 : 성균관대학교 산학협력단
위탁연구책임자 : 이 재 성
위탁참여연구원 : 정 창 범
“ : 강 혜 민

보고서 초록

위탁연구과제명	극지요각류의 자외선 및 염분도 변화에 따른 단백질체 변화 양상				
위탁연구책임자	이재성	해당단계 참여연구원수	2	해당단계 연구비	35,000,000 원
연구기관명 및 소속부서명	성균관대학교 산학협력단		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 : 상대국연구기관명 :				
				보고서 면수	
<p>○ 연구목적</p> <p style="padding-left: 20px;">본 연구과제의 목적은 <극지요각류의 자외선 및 염분도 변화에 따른 단백질체 변화 양상 분석>에 있다.</p> <p>○ 연구 수행 내용</p> <p style="text-align: center;">  극지요각류의 자외선 노출에 따른 단백질 및 유전체 변화 양상 확인 </p> <p style="padding-left: 20px;"> - 자외선 변화에 따른 단백질 변화 분석 - 극지요각류에 미치는 자외선의 영향에 대한 독성검사 - 극지요각류의 자외선 노출에 따른 유전자 발현 변화 - 극지요각류의 자외선 노출에 의한 항산화 효소 변화 </p> <p>○ 연구개발결과의 활용</p> <p style="padding-left: 20px;">본 연구를 통해 확보된 해양생물의 발현 단백체를 활용하여 극지 해양 환경변화에 따른 생명 현상에 대한 연구 및 분자수준에서 관찰되는 생물 영향과 개체수준에서의 변화에 대한 비교 연구는 국내외 다양한 분야의 연구자들에게 극지생물의 극한 환경 적응기작 규명 및 극지 생태환경 연구를 위한 기초자료로 활용될 것이며, 향후 생태계의 변화를 이해하는데 중요한 자료로 활용될 수 있을 것이다.</p>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	극지 요각류, 자외선, 단백질체학, 항산화 효소			
	영 어	Antartic copepod, Ultraviolet B (UV-B), proteomics, antioxidant enzyme			

요 약 문

I. 제 목

극지요각류의 자외선 및 염분도 변화에 따른 단백질체 변화 양상

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구과제의 목적은 극지요각류의 자외선 및 염분도 변화에 따른 단백질체 변화 양상 분석 데에 있다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 극지요각류의 자외선 노출에 따른 단백질 및 유전체 변화 양상 확인
- 자외선 변화에 따른 단백질 변화 분석
- 극지요각류에 미치는 자외선의 영향에 대한 독성검사
- 극지요각류의 자외선 노출에 따른 유전자 발현 변화
- 극지요각류의 자외선 노출에 의한 항산화 효소 변화

IV. 연구개발결과

- 극지요각류에서 대규모 발현유전체 정보를 확보하고, 자외선 노출에 따른 단백질체 및 유전체 변화를 분석하였다.
- 극지요각류를 활용하여 자외선에 따른 영향연구 및 분자기작을 규명하였다. 즉 stress 및 antioxidant response 관련유전자의 발현 양상을 분석하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

극지 해양 환경변화에 따른 극지 해양생물의 생태학적 영향 분석에 대한 기초 자료를 제공 및 환경변화가 극지 해양생물에 미치는 영향에 대해 개체수준 및 분자기작에 미치는 영향에 대한 기초 자료 제공

S U M M A R Y

I. Title

Expression patterns of proteomes in response to UV-B and salinity in the Antarctic copepod *Tigriopus kingsejongensis*

II. Purpose of R&D

Investigation of proteomic responses in response to UV-B radiation and salinity changes in the antarctic copepod *T. kingsejongensis*.

III. Contents and Extent of R&D

- Proteome analysis in response to UV-B radiation
- Toxicity assessment of UV-B radiation
- Transcriptome analysis in response to UV-B radiation
- Measurement of antioxidant enzymatic activities in response to UV-B radiation

IV. R&D Results

- Proteome and transcriptome in response to UV-B radiation were analyzed
- Defense mechanisms to UV-B radiation has been proposed

V. Application Plans of R&D Results

The data obtained are fundamental to future studies on physiological mechanisms to environmental changes and will be helpful to understand the effects of environmental factors including UV-B radiation on antarctic organisms

목 차

제 1 장 서론	
1-1. 연구개발의 목적	6
1-2. 연구개발 필요성	6
제 2 장 국내외 기술개발 현황	
1-1. 국내 동향	7
1-2. 국외 동향	7
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	
3-1. 연구개발 목표 및 내용	8
3-2. 연구개발 내용 및 범위	11
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	
3-1. 연구개발목표 달성도	20
3-2. 연구개발목표 대외기여도	21
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	22
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	23
제 7 장 참고문헌	23

제 1장 서론

제 1절. 연구개발 목적

극지생물을 이용하여 염분 및 자외선에 의해 유도되는 해양생물의 단백질 체 변화를 분석하고자 한다.

제 2절. 연구개발의 필요성

1. 극지역의 환경 변화가 생태계 및 생물체에 미치는 영향을 확인하기 위하여 이들 극지 생물 종이 환경변화 및 환경스트레스에 대한 생태생리학적 및 생화학적 반응에 대한 연구는 매우 중요하다. 이를 통해 특정 생물체 내에서 생태·생리학적 변화들에 우선되어 나타나는 분자신호를 바탕으로 환경 변화를 조기에 진단할 수 있다. 또한, 극지의 환경변화에 따른 스트레스에 의한 서식 생물체의 변화를 분자수준에서 이해하기 위해 대상 생물들의 유전체 및 단백질체 정보가 필요하다. 이를 통해 다수의 유전자를 이용한 transcriptomics 및 proteomics, 대사체를 이용한 metabolomics 적 접근법을 충분히 활용한다면 환경 변화 및 스트레스로 인해 나타날 수 있는 생물체에 직간접적인 영향을 이해할 수 있으리라 사료된다.

2. 극지생물로 부터 유전체 정보 및 대사체를 확보하여 극지생화학 및 분자생물학 분야 내 우수 경쟁력 확보 국내 기술력을 이용한 극지생물의 유전체 및 대사체 정보의 생화학 및 분자생물학적 활용법 개발

3. 극지생물들의 유전체 및 대사체 정보를 선점함으로써 국내 연구진의 위상 확보 및 동 중분야 내 국제적 경쟁력 확보 극지생물들 내 특이 유전체와 대사체 발견 및 활용을 통한 경제·산업적 이득 예상

제 2장 국내외 기술개발 현황

제 1절. 국내 동향

1. 극지 연구 중 기후학, 대기학, 지질학 등에 대비하여 생태 및 생물학 분야는 상대적으로 많은 연구가 이루어지지 않고 있다. 생태 및 생물학 분야들의 연구는 현재 극지 생태계에 서식하는 생물들의 종 동정 및 분류에 집중되고 있으며, 유전체 정보는 계통분류학에 필요한 수준의 marker DNA나 mitochondrial DNA 등 소수 정보가 활용되고 있다.

2. 극지 생물체 연구에 필요한 안정적인 배양 시설을 갖춘 곳 역시 극지연구소 외에는 없는 실정이며, 기반 인프라와 정부 투자의 부족으로 대학이나 연구소 등 다양한 연구기관의 시설 투자는 현재까지 미지한 수준이다.

3. 극지 생물들을 이용하여 생태계와 환경을 연구하기 위해서는 이미 생태·생리학 및 유전학적으로 잘 밝혀진 모델 생물종이 아닌 비모델생물들에 대한 지식과 연구 경험이 풍부해야 하지만, 모델 생물들이 아닌 비생물종을 이용하여 다양한 측면에서 접근하는 연구 방법을 보유한 연구 기관은 극히 드물다.

제 2절. 국외 동향

1. 극지 연구는 현재 선진국들을 중심으로 (영국, 미국, 독일 등) 대규모의 다양한 연구들이 수행되고 있으며, 정부 주도 및 기업체 차원에서의 연구 자금 투자가 이루어져 여러 측면에서 방대한 연구결과를 생산하고 있다.

2. 극지연구자들은 주기적으로 “국제극지의 해 (IPY)” 프로그램을 이용하여 극지 뿐 아니라 전 지구적 환경 변화 관련 연구를 수행한다. 이들 프로젝트들 중 상당수는 환경생태 및 생물 관련 연구에 집중되어 있으며, 극지환경 적응에 필요한 생리·생태적 뿐만 아니라 생화학 및 분자생물학적 적응 기작을 밝히고, 극지의 환경 변화에 대한 생물들의 반응과 스트레스 등을 연구하는 것이 중요한 주제이다.

3. 극지 온난화로 인해 발생할 수 있는 환경변화에 따라 나타나는 생물체의 변화 및 생화학적, 대사학적 변화에 대한 연구는 국제적으로도 미진한 수준에 있다.

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절. 연구개발 목표 및 내용

최종목표

- 극지요각류 *Tigriopus kingsejongensis*의 자외선 및 염분도 변화에 따른 단백질체 변화 양상을 규명한다.

연차별 연구목표

연차	연구 목표	연구 내용
1차년 도(2016)	극지요각류의 자외선 및 염분도 변화에 따른 단백질 변화 양상	극지 요각류의 자외선 변화에 따른 단백질 변화 분석
		극지 요각류의 염분도 변화에 따른 단백질 변화 분석

이미 분석된 극지요각류의 RNA-seq 정보 중 NCBI NR Blast에서 hit된 23,918개의 유전자 정보 (그림 1)에서 protein DB를 구축하고 이를 I-TRAQ을 활용하여 약 5,000개 이상의 protein spot의 발현 양상을 분석한다.

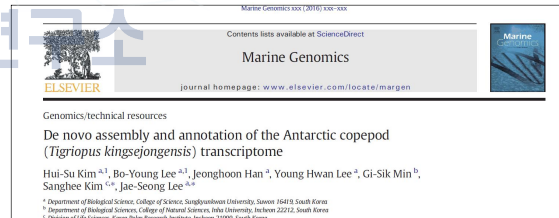


그림 1. 극지요각류 RNA-seq 분석 논문

극지 요각류의 단백질체 변화 양상은 자외선 및 염분도에 따라 LD₅₀ 또는 EC₁₀ 값을 기준으로 분석하고 세포내 분자 기작에 대한 연구를 수행한다.

1. 자외선과 다양한 염분 노출: 자외선과 다양한 농도의 염분 노출 실험은 본 연구팀에서 수행한 바 있는 요각류 *Tigriopus japonicus*와 *Paracyclops nana*의 결과를 바탕으로 극지요각류 서식환경을 고려하여 실험을 진행한다(그림 2). 남극의 염분은 계절별로 평균 34psu 으로 나타나며 큰 변화가 없다(그림 3). 하지만 요각류 생활사를 고려한 해빙이 녹으면서 일어나는 다양한 염분변화에 따른 영향을 고려하여 34psu 이하의 조건에서의 영향을 확인한다. 남극해의 자외선은 오존층의 영향으로 다른 지역에 비해 매우 높은 것으로 보고되고 있으며, 향후 기후 변화로

인해 자외선의 증가 할 것으로 예측되고 있다(그림 4). 따라서 이를 고려하여 극지 요각류 자외선 노출 값을 선정하여 EC₅₀ 값을 구하고, 이에 따른 영향을 관찰한다. 수조의 수온 및 염분은 매일 측정하여 그 변화를 점검하며 8°C, 32psu을 유지하고, 실험기간 동안 먹이 급여는 하지 않는다.

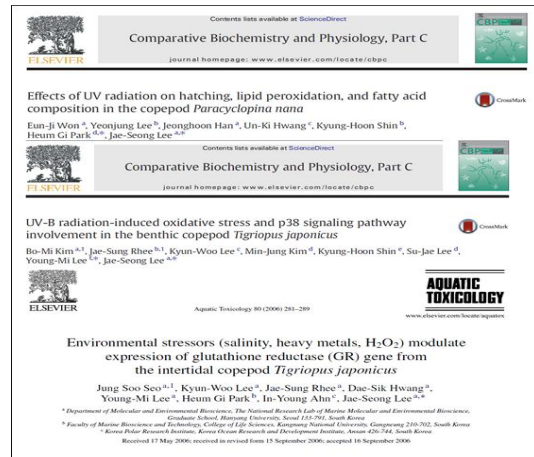


그림 2. 요각류에서의 자외선 및 염분에 따른 영향 연구 논문

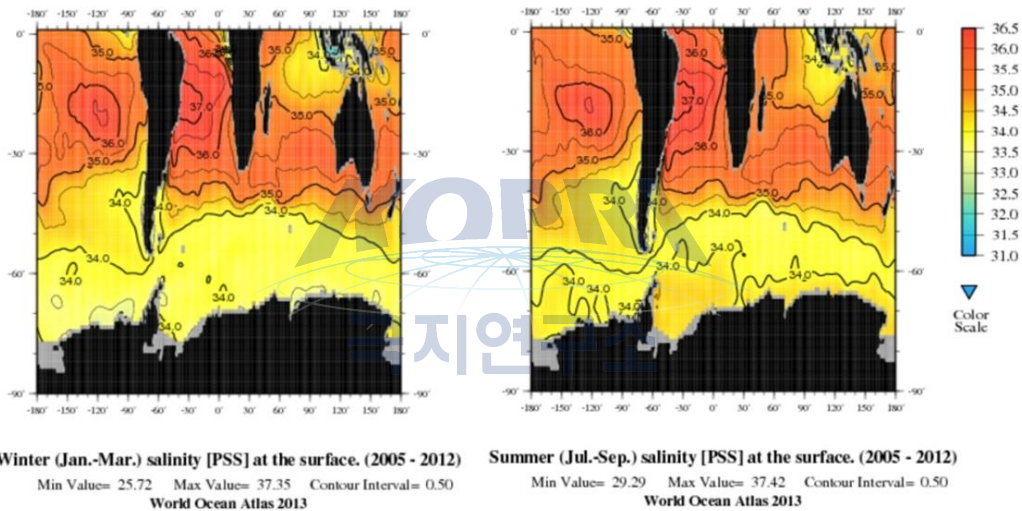


그림 3. 남빙해 계절별 염분도(NODC; <http://www.nodc.noaa.gov/>)

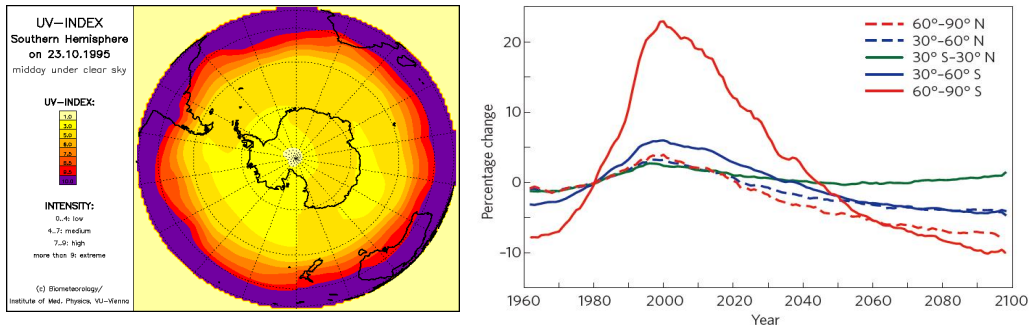


그림 4. 남극지역 UV-index 및 기후변화를 고려한 UV 변화예측도 (Williamson CE et al., 2014)

2. RNA sequencing data base를 활용한 지표 유전자군 검색:

proteome DB를 확보한 후 database 내에서 DNA replication이나 DNA-repair mechanism에 관련된 유전자의 sequence들을 선별한다. 자외선과 이들 유전자의 상관관계를 알아보기 위해 다양한 기작들에 포함된 유전자들을 선별하여 annotation을 한다. 생물체에 대한 radiation의 가장 큰 문제점이 DNA damage와 DNA mutation으로 알려져 있기에 DNA와 직접적으로 관련이 있으며, radiation에 영향을 받는 DNA 손상 관련된 유전자를 선별한다. 그 중 DNA 손상과 관련된 기작 및 유전자의 예를 **그림 5**과 같이 정리하였다. 또한, Heat shock protein (*Hsp*)은 다양한 스트레스 원으로부터 (고열, 저열, 약물, 환경오염물질, UV 등) 세포를 보호하기 위한 molecular chaperone 기능을 지닌 단백질로서, 세포가 스트레스를 받을 때 세포 내 단백질과 기관을 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 Heat shock protein은 UV나 gamma irradiation에 의한 세포 내 damage를 완화시켜주는 것으로 알려져 있는데, 이에 관한 연구가 1990년대 후반부터 현재까지 진행되고 있으며, in vivo 또는 in vitro 연구에서 heat shock protein이 세포가 받는 damage를 감소시킨다는 연구결과가 꾸준히 논문들을 통해 발표되었다. 이와 관련하여, 극지 요각류 *T. kingsejongensis*에서 총 5개의 *Hsp* 유전자 (*Hsp10*, *Hsp20*, *Hsp40*, *Hsp70*, *Hsp90*)를 확보하였다.

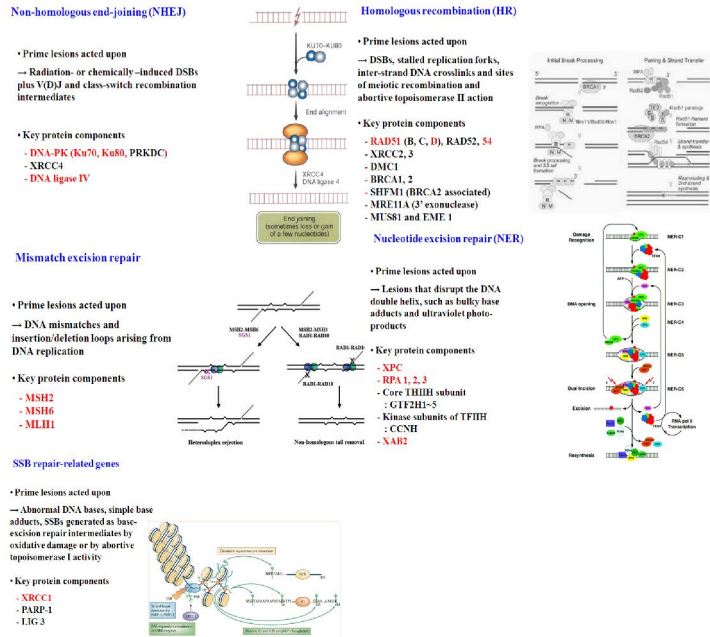


그림 5. 자외선 및 염분에 따른 영향 연구 논문

3. 자외선과 염분도 변화에 따른 극지 요각류 *Tigriopus kingsejongensis*의 biomarker gene 및 단백질 분석:

자외선과 염분도 변화로 인한 해독기작과 관련된 potential biomarker 유전자의 발현양상을 분석을 위하여 본 연구팀에서 수행한 바 있는 요각류 *Tigriopus japonicus*와 *Paracyclops nana*의 결과를 바탕으로 (**그림 6**) 자외선과 염분도 대하여 time-course 및 dose-response 실험을 수행한다. 자외선과 다양한 염분에 노출 시킨 뒤 total RNA를 추출 하고, 각각의 자외선과 다양한 염분의 노출에 의한 생물체 내의 특정 유전자의 time-course 및 dose-response 영향을 측정하기 위하여 proteome 분석 및 real-time RT-PCR을 수

행한다. 이를 위하여 우선적으로 각 시간대별 및 농도별로 total RNA를 추출하고 추출된 total RNA를 정량하여 각 구간별 동일 농도 당 1차 cDNA를 superscript reverse transcriptase III를 이용하여 RT를 실시한 후, real-time RT-PCR을 수행한다. 최종 데이터의 분석은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법으로 하며, one-way ANOVA test와 Student's t-test를 사용하여 통계 분석을 수행한다.

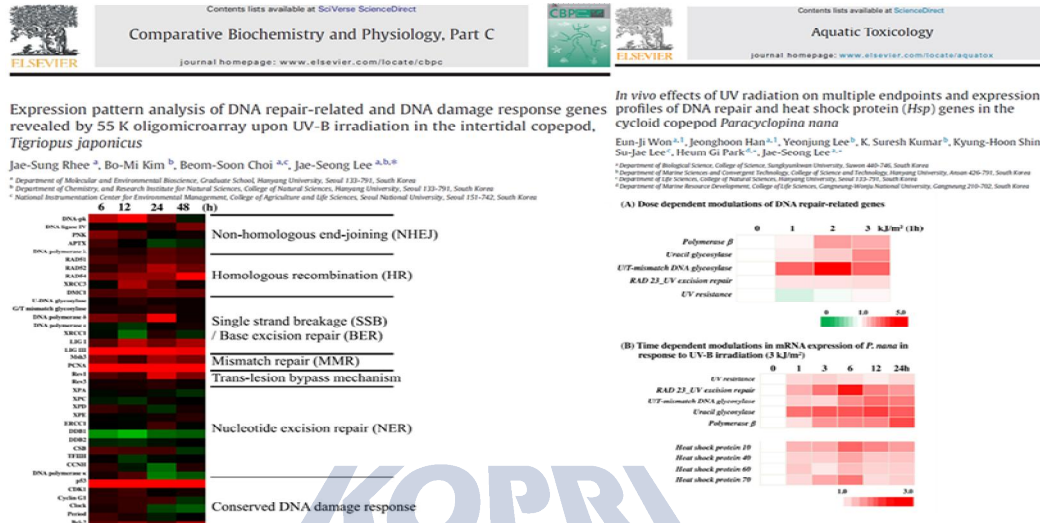


그림 6. 요각류에서의 자외선에 반응하는 유전체 연구 논문

극지연구소

제 2절 연구개발 내용 및 범위

1. 자외선 변화에 따른 단백질 변화 분석: 자외선 변화에 따른 단백질 변화 분석을 위해, 아래 논문의 분석 방법을 바탕으로 하여 (그림7), 극지 요각류 *T. kingsejongensis*에 12 kJ/m²의 자외선에 노출후 (Control, 0, 6, 12, 24, 48h), 현재 홍콩 BGI로 보내 샘플 의뢰 및 분석 중이며, Proteomics 결과의 비교 연구를 위해 먼저, 자외선에 대한 극지요각류의 독성 평가와 중요 기작에 대한 유전자 발굴 및 유전자 발현 변화 실험을 실시하였다.

High-quality genome assembly of channel catfish, *Ictalurus punctatus*



Xiaohui Chen^{1,2†}, Liqiang Zhong^{1,2†}, Chao Bian^{3†}, Pao Xu^{4†}, Ying Qiu^{3†}, Xinxin You^{3†}, Shiyong Zhang^{1,2}, Yu Huang³, Jia Li³, Minghua Wang^{1,2}, Qin Qin^{1,2}, Xiaohua Zhu^{1,2}, Chao Peng³, Alex Wong⁵, Zhifei Zhu^{6,7}, Min Wang^{3,6,7}, Ruobo Gu^{4,6}, Junmin Xu^{3,6,7*}, Qiong Shi^{3,6,7,8,9*} and Wenji Bian^{1,2*}

그림 7. 실험 방법 참고 논문의 예

2. 극지요각류에 미치는 자외선의 영향에 대한 독성검사: 자외선에 대한 급성 독성 실험은 극지요각류의 성체를 사용하였고, 12 wells tissue culture plate의 각 well당 4 ml의 인공 해수 내 10마리를 수용하여 32%, 8 ± 1°C에서 생존율 및 독성 영향을 조사하였다. 자외선의 노출 dose는 0, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 kJ/m²로 설정하였으며, 급성독성실험은 노출 뒤 96시간 방치 후 광학현미경 하에서 생존유무를 확인하였다. 실험 결과는 probit분석법에 의해 LD10 및 LD50을 얻었고 Dunnett's test에 의해 NOED (no observed effect dose)를 계산하였다. 그 결과, 자외선의 노출 세기가 커질수록 *T. kingsejongensis*의 생존율이 낮아지는 것을 확인할 수 있었으며, 유사종에서 관찰되는 자외선의 영향으로 요각류 *Tigriopus japonicus*를 이용한 노출 실험을 통해 동일한 요각류에서 보여지는 민감도의 차이를 비교 한 결과 *T. kingsejongensis*가 *T. japonicus*에 비해 낮은 dose에 대해서 치사율이 관찰되는 결과를 확인함으로써 극지 환경에서 서식하는 요각류가 자외선 노출에 대해 더 민감한 결과를 확인할 수 있었다(그림 8).

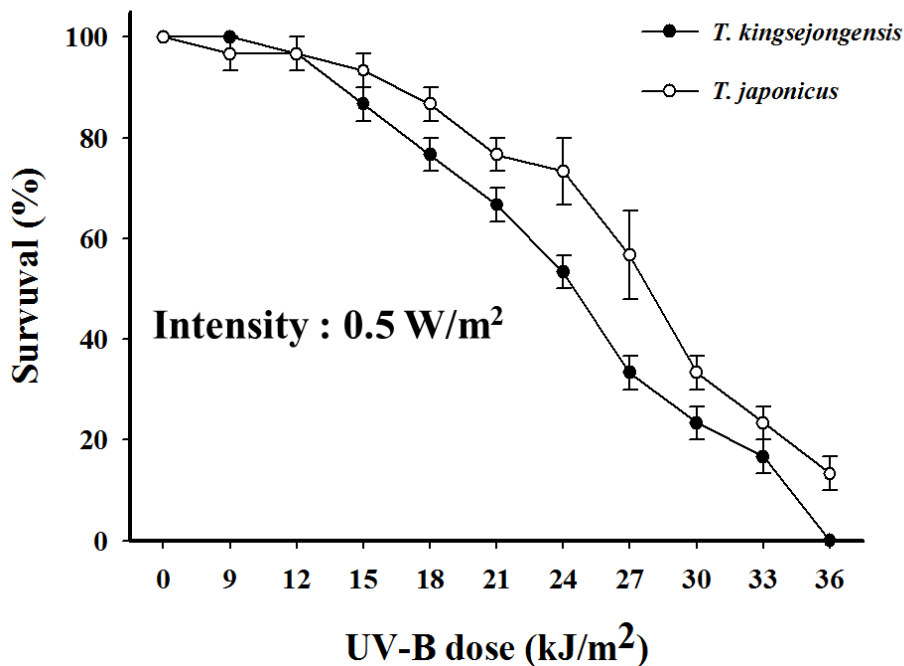


그림 8. *T. kingsejongensis*의 자외선 노출에 대한 치사율

3. 극지요각류의 자외선 노출에 따른 유전자 발현 변화

가. 극지요각류의 자외선 노출: 자외선 노출 실험에 사용한 극지요각류는 실험군 당 약 30 개체를 사용하였으며, 50 ml tube에서 자외선 12 kJ/m² 노출 후 (Control, 1, 3, 6 h)의 sample군을 수확하여 total RNA를 추출하였다.

나. Total RNA 추출 및 First-strand cDNA의 합성: Total RNA 추출은 Trizol (Invitrogen)을 이용하여 제조사 manual에 따라 추출하였으며, 역전사 효소를 이용하여 first-strand cDNA를 합성하였다. 역전사 반응을 1.5시간 동안 42°C 에서 최종 반응액 총량 20 μl로 하여 실시하였으며, 이때 반응액은 정제된 RNA 2 μg, 5X 반응 완충용액 (Promega, Madison, WI, USA) 4μl, dNTP (각각 2 mM) 5μl, 10 uM dT-ACAP1 (5'CTGTGAATGCTGCGACTACGAT-A(18)-3') 2 μl, RNasin® RNase Inhibitor (40 U/μl; Promega) 0.5 μl, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (200 U/μl; Promega) 1 μl로 제조되었다. First-strand cDNA는 GeneFishing™ PCR을 위해 80 μl의 3차 증류수로 희석한 다음, 사용 전까지 -20°C에 보관하였다.

다. **Real-time RT-PCR:** 자외선 노출에 의한 antioxidant defense mechanism 및 molecular chaperone 관련 유전자들의 발현변화를 측정하기 위하여 Real-time RT-PCR을 수행하였다. 이를 위하여 우선적으로 각 농도별 및 시간대별로 total RNA를 측정하였으며, total RNA 2 μ g을 이용하여 cDNA를 합성하였다. Real-time PCR은 Bio-Rad CFX96 multiplex real-time RT-PCR과 Bio-Rad의 MyIQ™ single color real-time RT-PCR detection system에서 수행하였으며, SYBR의 증감을 실시간으로 detection 하였다. Internal control 유전자는 18S ribosomal DNA를 이용하였고, 각 실험은 3회 반복하였다. 도출된 결과로부터 Anova 및 unpaired Student's t-test를 이용하여 유의성을 조사하였다(그림 9).

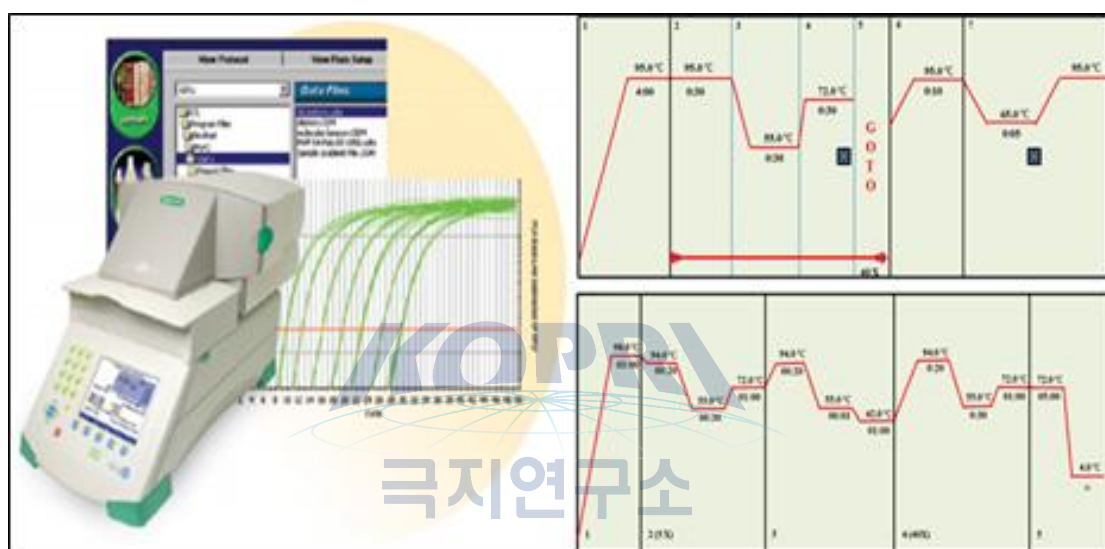


그림 9. Real-time RT-PCR

라. **중요 유전자 발굴:** 자외선이 극지 요각류에 미치는 영향 및 적응하는 기작을 알아보기 위하여, 발현 유전체 database를 이용하여 많은 수의 biomarker 후보 유전자군을 발굴함. 관련 유전자는 요각류 *T. kingsejongensis*의 genome DB 내에서 손쉽게 그 sequence를 retrieve 할 수 있어 유전자군을 확보하였다.

Radiation에 의한 세포 내 ROS (reactive oxygen species) 생성이나 oxidative stress 발생에 관한 연구는 최근에 들어서 세포나 어류의 조직 등을 이용해 ROS를 측정하는 수준에 있다. 대부분의 연구 결과는 radiation에 의해 ROS가 생성되며, 이들이 oxidative stress를 일으켜 antioxidant defense mechanism을 유도한다고 보고하였으나, 명확하게 radiation에 의해 ROS가 직접적으로 생성되는 것을 증명한 연구 보고는 미미하다. 따라서 본 연구진은 극지요각류에 자외선 stress를 가한 후 antioxidant defense mechanism에 관련된 유전자들의 mRNA 발현을 확인하여 자외선 노출에 의한 oxidative stress 유발을 확인하였다. 그 결과, 전반적으

로 자외선 12 kJ/m²에 노출시켰을 때, 대부분의 oxidative stress 관련 유전자들의 발현이 감소하는 경향을 보였다 (그림 10).

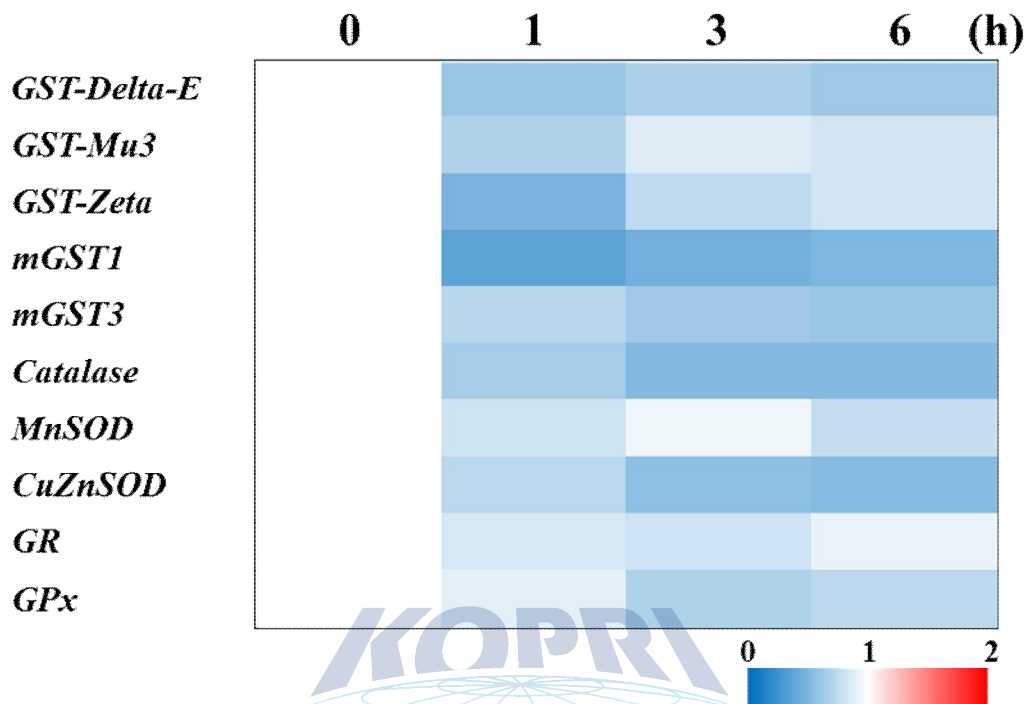


그림 10. 산화스트레스 관련 유전자들의 mRNA 발현양상 분석

Heat shock protein은 다양한 스트레스 원으로부터 (고열, 저열, 약물, 환경오염물질, UV 등) 세포를 보호하기 위한 molecular chaperone 기능을 지닌 단백질로서, 세포가 스트레스를 받을 때 세포 내 단백질과 기관을 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 Heat shock protein은 UV나 gamma irradiation에 의한 세포 내 damage를 완화시켜주는 것으로 알려져 있는데, 이에 관한 연구가 1990년대 후반부터 현재까지 진행되고 있으며, in vivo 또는 in vitro 연구에서 heat shock protein이 세포가 받는 damage를 감소시킨다는 연구결과가 꾸준히 논문을 통해 발표되었다. Molecular chaperone 및 cell stress 관련 유전자들은 Heat shock protein family을 대상으로 하였으며, 자외선 12 kJ/m²의 dose에 노출시킨 뒤 시간대별 (control, 1, 3, 6 h) mRNA의 발현변화를 측정하였다. 그림 11에서 나타난 것처럼 자외선 12 kJ/m²의 dose에 노출시켰을 때, 작은 분자량의 heat shock protein (hsp10, hsp20)들을 제외하고 발현 빈도가 낮은 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해 자외선 노출에 의한 극지요각류의 세포 내 단백질들에 데미지가 일어날 수 있다는 것을 간접적으로 알 수 있었으며, 자외선 노출에 의해 생성된 데미지로부터 세포 내 단백질이나 소기관을 보호하기 위해 heat shock

protein들의 발현이 증가하였음을 유추할 수 있었다. 또한 발현양상 결과를 바탕으로 극지요각류 heat shock protein들이 자외선 영향에 대한 potential biomarker로 사용될 수 있으리라 사료된다.

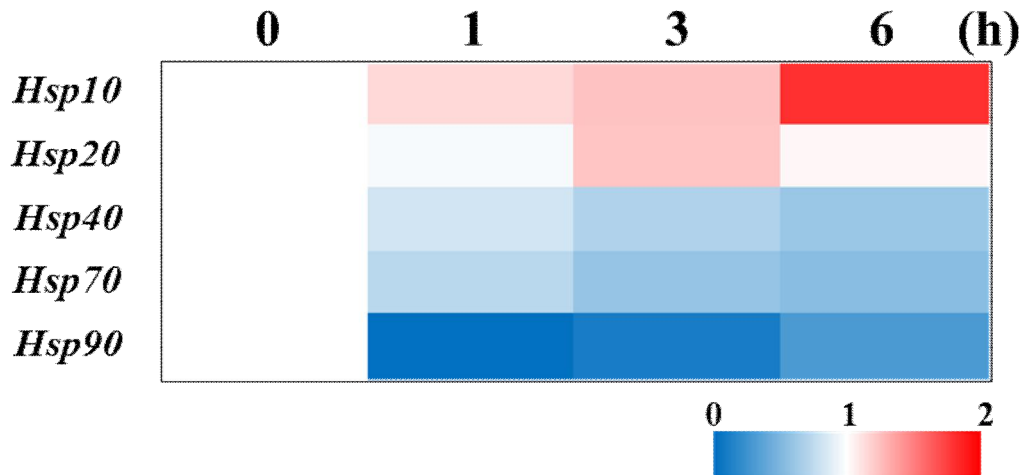


그림 11. Heat shock protein 유전자들의 mRNA 발현양상 분석

제 4절 극지요각류의 자외선 노출에 의한 항산화효소 변화

1. 극지요각류의 자외선 노출: 자외선 노출 실험에 사용한 극지요각류는 실험군 당 약 30 개체를 사용하였으며, 50 ml tube에서 자외선 12 kJ/m² 노출 후 (Control, 1, 3, 6 h)의 sample군을 수확하여 ROS 및 항산화 효소 활성을 측정하였다.

2. ROS 및 효소 활성 분석: 2',7'-dichlorodihydro- fluorescein diacetate (H2DCFDA, molecular probes, Eugene, OR, USA) method를 이용하였다. 이는 세포내 ROS level을 측정을 가장 정확하고 빠르게 정량화 할 수 있는 가장 보편적인 방법으로 형광 probe인 H2DCFDA가 ROS의해 DCF로 산화되면서 형광을 내는 원리를 이용한 방법이다. 자외선에 노출 시킨 극지요각류를 균질화 buffer (0.32mM sucrose, 20mM HEPES, 1mM MgCl₂, 5mM PMSF (pH 7.4))를 넣고 테프론 균질기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 균질화 된 용액은 4°C에서 20분 동안 10,000g로 원심분리하고, 상등액을 취하여 96-well black plate에 PBS(phosphate-buffered saline) buffer, 시료(원심분리 후 분리해 낸 상등액) 그리고 최종농도가 40µM이 되도록 형광물질(H2DCFDA)을 넣어 200µl로 맞춘 후 37°C에서 5분 동안 배양 후 3회 반복실험을 통해 결과를 얻었다. 형광(DCF)측정은 여기 파장 485nm, 방출파장

520nm에서 형광분광기(Thermo™ VARIOSKAN FLASH)를 이용하여 측정하였다. ROS level은 DCF의 형광 %로 나타내었다. 항산화 효소 활성은 Superoxide dismutase (SOD; EC 1.11.1.9) assay kit and Glutathione Peroxidase cellular activity assay kit (GPx; EC 1.11.1.9) (Sigma - Aldrich Co)를 사용하여 측정하였다. 시료 내의 총 단백질은 균질화된 상등액을 취하여 Bradford 방법을 따라 측정하였으며, standard는 BSA(bovine serum albumin)를 사용하였다(Bradford, 1976).

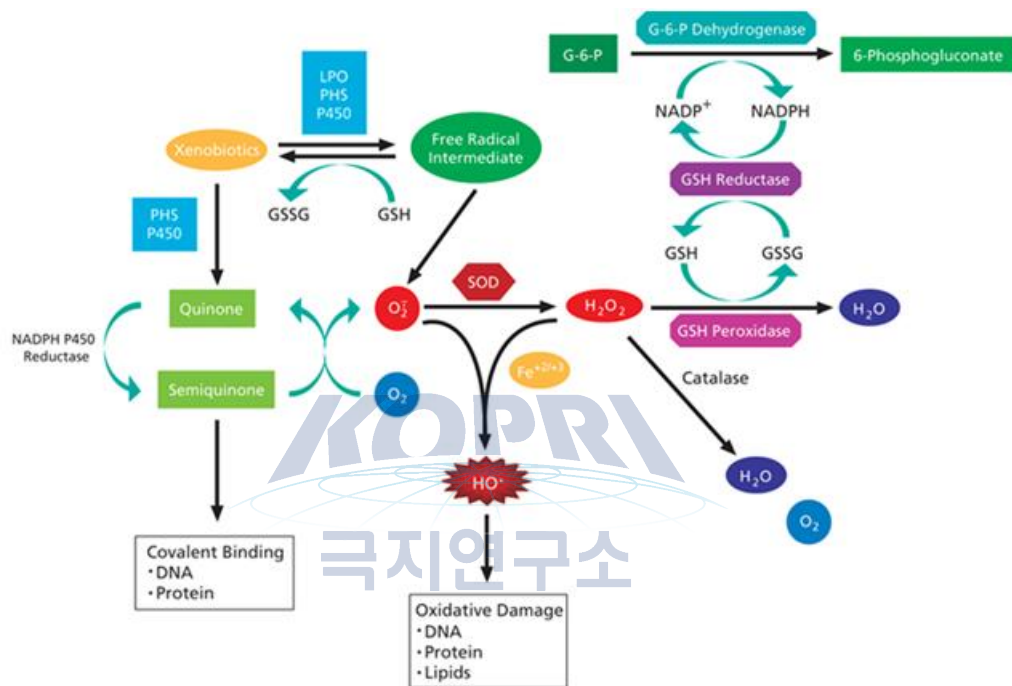


그림 12. 항산화 방어기작 모식도

환경오염 및 환경스트레스 노출에 대한 체내 활성산소종과 항산화효소 활성의 증가는 이미 다양한 생물 및 농도에 대해서 확인된 바 있는 개체 및 세포 영향 연구의 지표로 활용되어왔으며(그림 12), 운충류 *Brachionus koreanus*에서의 자외선 노출에 대한 활성산소종(ROS)의 증가와 이를 방어하기 위한 기작으로의 효소의 활성도 증가(Kim et al., 2013), 유류 추출물에 노출된 요각류 *Tigriopus japonicus*의 활성산소종의 증가와 함께 관찰되는 개체 수준에서의 성장 저해 (Han et al., 2014)의 결과를 통해 ROS의 세포 내 활성도 역시 민감함 생리지표로서 활용될 수 있음이 발표된 바 있다. 그림 13에서는 자외선 노출에 의해 노출에 의해 극지요각류 *T. kingsejongensis*의 활성 산소종과 항산화 방어기작으로의 항산화효소들이 증가하는 것을 보여주고 있다. 이와 같은 결과는 자외선 노출에 의해 산화스트레스와 이를 방어하기 위한 세포내 항산화 효소의 활성을 유도하는 것으로 볼 수 있다.

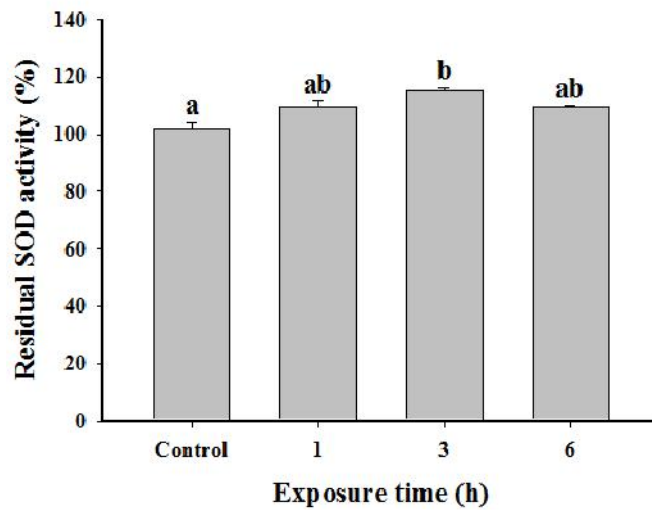
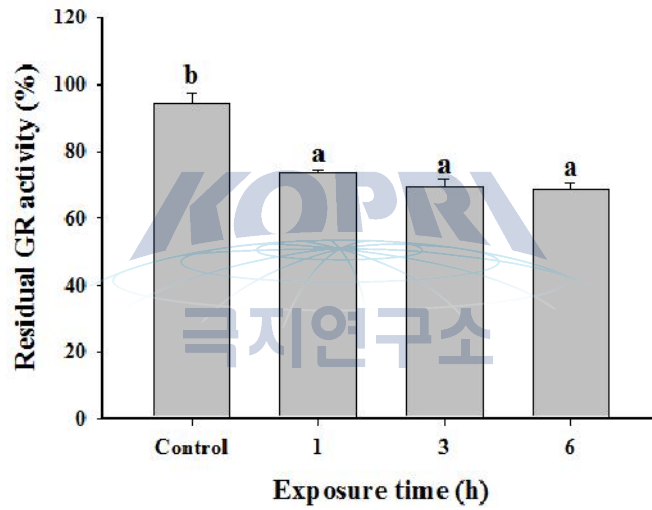
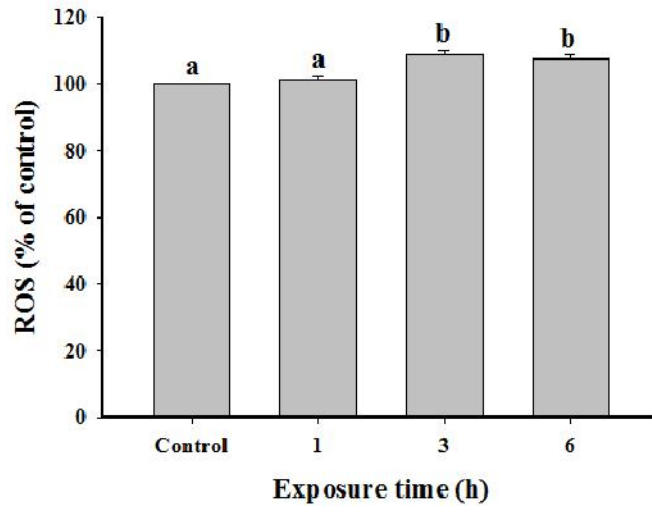


그림 13. 활성산소종 및 황산화 효소 활성 분석

종합적으로, 자외선변화에 의한 극지요각류에서의 급성독성 영향과 분자적 수준에서의 Stress response 및 antioxidant defense 기작과 관련하여 극지요각류 *T. kingsejongensis*에서 glutathione S-transferase family (GST Δ -E1, GST-Mu3, GST-Zeta, mGST1, mGST3) Catalase, MnSOD, CuZnSOD, glutathione reductase, glutathione peroxidase와 heat shock proteins (hsp10, hsp20, hsp40, hsp70, hsp90)를 확보 및 자외선에 반응하는 기작을 분석하고, 이 결과를 통해 국제 학회지 **Marine Ecology Progress Series**에 논문 1편을 출판하였다(그림 14).

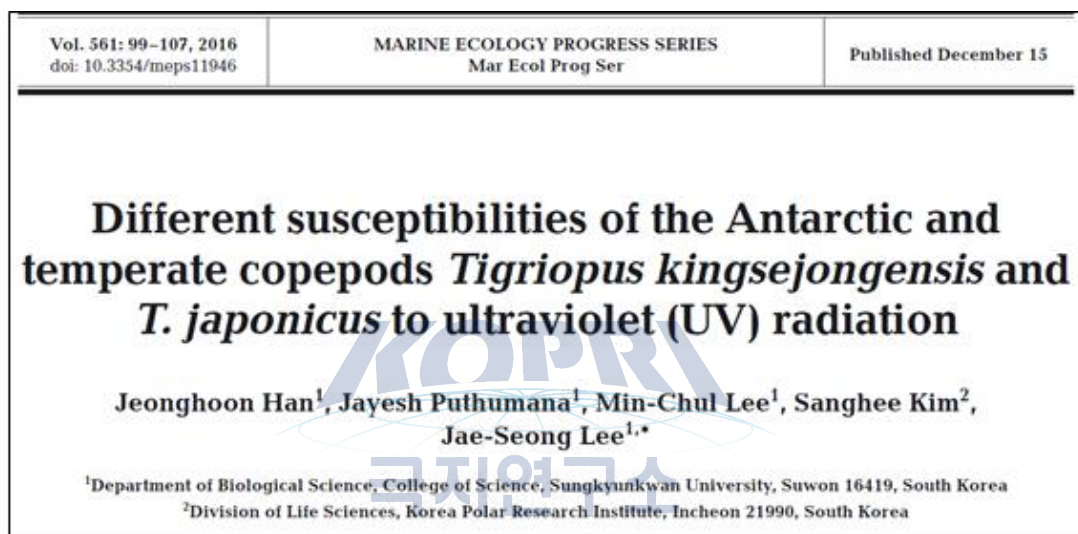


그림 14. 극지요각류의 자외선 노출에 대한 영향연구 논문

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1절 연구개발 목표 달성도

1. 연구개발 최종 목표

극지요각류 *Tigriopus kingsejongensis*의 자외선 및 염분도 변화에 따른 단백질체 변화 양상 규명

2. 연구개발 세부 목표

연구 내용	연구 결과
극지 요각류의 자외선 변화에 따른 독성 평가 및 유전자 변화 분석	RNA seq.을 이용한 대량 유전체 정보 확보 후 노출 실험을 통해 중요 유전자의 발현 변화를 확인하였다.
극지 요각류의 자외선 변화에 따른 단백질 변화 분석	극지 요각류의 자외선 변화에 따른 단백질 변화를 분석하였다.

3. 연구개발목표 및 달성도

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도(%)
극지요각류의 자외선 및 염분도 변화에 따른 단백질 변화 양상	1-1 극지 요각류의 자외선 변화에 따른 단백질 변화 분석	-극지 요각류의 자외선 변화에 따른 독성 평가 및 유전자 변화 분석	100 %
	1-2 극지 요각류의 자외선 변화에 따른 단백질 변화 분석	-극지 요각류의 자외선 변화에 따른 단백질 변화 분석	100 %

4. 정량적 논문성과

게재일	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2016-12-15	Different susceptibilities of the Antarctic and temperate copepods <i>Tigriopus Kingsejongensis</i> and <i>T. japonicus</i> to ultraviolet (UV) radiation	한정훈	이재성	Jayesh Puthumana, 이민철, 김상희	Marine Ecology Progress Series	561	국외	SCI

5. 연구수행에 따른 문제점 및 개선방향

문제점 또는 원인	개선방향 또는 대책
극지요각류의 특성상 배양에 있어 시간이 다소 오래 걸림	자외선 변화 연구를 중점적으로 하며 단백질 변화 분석에 앞서 극지요각류의 자외선에 변화에 따른 생물 독성 영향 및 유전자 발현 변화 확인
Protein 샘플분석 시료의 양이 많이 필요함	자외선 및 염분변화에 따른 단백질 변화분석에 대한 계획을 수정하여 자외선 변화에 따른 단백질 변화 분석을 중점적으로 우선시 함

6. 주요 연구변경 사항

극지 요각류의 자외선 변화에 따른 단백질 변화 분석 결과를 분석하기에 앞서, 먼저 자외선이 극지요각류에 미치는 in vivo 및 in vitro 영향 연구를 통해 급·만성독성 뿐만 아니라 유전자 수준에서의 반응, 즉 antioxidant response, stress response 등에 대해 중요 역할을 하는 유전자들의 gene battery system의 발현 양상을 분석하였다. 그리고 현재 홍콩 BGI로 보내 샘플 의뢰 및 분석 중에 있다.

제 2절 대외 기여도

1. 극지생물체들로부터 유전체 정보 및 대사체를 확보하여 극지생화학 및 분자생물학 분야 내 우수 경쟁력 확보

2. 국내 기술력을 이용한 극지생물들의 유전체 및 대사체 정보의 생화학 및 분자생물학적 활용법 개발

3. 극지생물들의 유전체 및 대사체 정보를 선점함으로써 국내 연구진의 위상 확보 및 동종 분야 내 국제적 경쟁력 확보

제 5장 연구개발결과의 활용계획

1. 본 기술을 통해 향후 극지의 해양 환경변화가 극지 해양생물에 미칠 수 있는 영향을 환경 proteome 및 유전체의 global expression pattern 분석뿐 아니라 이를 통한 새로운 분자생체지표 유전체 또는 단백질체를 분리할 수 있고, 이는 feedback 되어 극지 해양생물을 연구하는데에 기초 자료를 제시 할 수 있다.

2. 극지 해양 환경변화가 극지 해양생물에 미치는 영향을 자외선 초기단계에서부터 매우 미세한 수준에서 검출하고 이들 환경요인이 극지 해양생물의 개체수준 및 분자기작에 미치는 영향을 심도있게 연구하는데 중점을 둘 수 있다.

3. 최근 빠르게 진행되고 있는 극지 해양 환경변화에 따른 극지 해양생물의 생태학적 영향 분석에 대한 기초 자료를 제공할 수 있다.

4. 극지 해양 환경변화에 반응하는 극지 요각류 유전자의 클로닝 및 이들을 토대로 한 자외선 특이 환경감시체계의 수립에 기초자료를 제공할 수 있다.

5. 극지 요각류 *Tigriopus kingsejongensis*의 분자생체지표용 유전체의 개발뿐 아니라 이를 이용한 단백질의 생산 및 항체 제작 등으로 이어가 이를 이용한 상업적인 연구도 가능하다.

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

제 7장 참고문헌

1. Williamson, C.E., Brentrup, J.A., Zhang, J., Renwick, W.H., Hargreaves, B.R., Knoll, L.B., Overholt, E.P., Rose, K.C.2014. Lakes as sensors in the landscape: Optical metrics as scalable sentinel responses to climate change. *Limnol. Oceanogr.*,59: 840 - 850

2. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 7, 248-254.

3. Kim, R.-O., Rhee, J.-S., Won, E.-J., Lee, K.-W., Kang, C.-M., Lee, Y.-M., Lee, J.-S., 2011. Ultraviolet B retards growth, induces oxidative stress, and modulates DNA repair-related gene and heat shock protein gene expression in the monogonont rotifer, *Brachionus sp.* *Aquat. Toxicol.* 101: 529-539.

4. Han, J., Won, E.-J., Hwang, D.-S., Shin, K.-H., Lee, Y.S., Leung, K.M., Lee, S.-J., Lee, J.-S., 2014. Crude oil exposure results in oxidative stress-mediated dysfunctional development and reproduction in the copepod *Tigriopus japonicus* and modulates expression of cytochrome P450 (CYP) genes. *Aquat. Toxicol.* 152, 308-317.

5. Han, J., Puthumana, J., Lee, M.-C., Kim, S., Lee, J.-S., 2016. Different susceptibilities of the Antarctic and temperate copepods *Tigriopus kingsejongensis* and *Tigriopus japonicus* to ultraviolet B (UV-B) radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 561: 99 - 107.

주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.