해빙하부의 광이용 및 기후변화가스 전환 미생물의 다양성 연구



충북대학교

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 "서남극 아문젠해역 생태계와 해양순환 변동 연구"의 위탁연구 "해빙하부의 광이용 및 기후변화가스 전환 미생물의 다양성 연구"과제의 최종보 고서로 제출합니다.



2017. 01 . 27

(본과제) 총괄연구책임자 : 이 상 훈

위탁연구기관명 : 충북대학교

위탁연구책임자 : 이 성 근

위탁참여연구원 : 김 소 정

위탁참여연구원 : 홍 희 지

위탁참여연구원 : 김 설 희

보고서 초록

| 위탁연구과제명 | 해빙하부의 광이용 및 기후변화가스 전환 미생물의 다양성 연구 | | | | | | | |
|--|-----------------------------------|----------------|-------|-------------|-----------|----|--|--|
| 위탁연구책임자 | 이성근 | 해당단계 참여연구원수 | 4명 | 해당단계 연구비 | 60,000,00 |)원 | | |
| 연구기관명 및 소속부서명 | 충북대학교 | | 참여기업명 | | | | | |
| 국제공동연구 | 상대국명 : | | | | | | | |
| 요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내) 보고서 면수 26 | | | | | | | | |

- 1. Meta-Omics분석을 통한 bloom시기별 미생물 군집 및 생리학적 분석
- Metagenome분석을 통한 Amundsen polynya의 주요 미생물 genome bin확보
- 확보한 bin의 genome분석을 통한 생리적 특성 유추
- 시기별 transcriptome발현 비교를 통한 주요 미생물의 생리활성 예측
- 2: Metagenome을 기반으로 한 polynya내 주요 미생물 자원 확보
- Metagenome분석시 확보한 미생물의 생리적 특성을 이용하여 배양 조건 수립
- 배양조건을 통한 polynya내 주요 미생물 배양체 확보

| 색 인 어 | 한 글 | 메타오믹스, 유전체 및 전사체 해독 기술, 빙호, 생리 특성 |
|-----------|-----|--|
| (각 5개 이상) | 영 어 | Meta-omics, Metagenome, Metatranscriptome, Polynya, Physiological characteristic |

요 약 문

I. 제 목

해빙하부의 광이용 및 기후변화가스 전환 미생물의 다양성 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

지구 표면의 2/3를 차지하고 있는 해양의 물질 순환을 이해하는 것은 전 지구적기후 변화와 관련되는 중요한 과학적 연구가 된다. 특히 극지는 미답의 생태계로기후 변화와 관련한 중요한 지표로써 선진국을 중심으로 활발한 연구가 진행되고있다 (Screen et al., 2010). 남극의 주요 1차 생산자인 phytoplankton의 봄철 bloom에 따라 생물학적 일차 생산성이 가장 높다고 알려진 장소 중 하나인 남극 Amundsen Sea의 polynya는 bloom에 따라 종속영양생물에 의한 상당한 탄소 remineralization이 이루어지는 곳이다. 또한 해빙 하부는 기체 교환과 및 투과에 대한 한계가 있어 독특한 생태계를 형성하고 있을 것으로 추정되는 곳이다.

본 연구실은 시기에 따른 polynya 수층시료의 획득과 pyrosequencing을 통한 metagenome 및 transcriptome data의 확보를 통하여 군집의 변화를 관찰함과 미생물의 다양성을 확인하고 동시에 주요 미생물 종의 생리학적 특성을 연구함으로써 그들의 역할을 규명하여 서남극해 생태계와 물질 순환을 이해하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

남극 수층 시료의 확보와 생체 시료의 획득을 실시하고, pyrosequencing 기술을 이용하여 metagenome 및 transcriptome 분석을 실시하였다. 이를 통해 빙호 내환경의 주요 미생물 종의 genome 정보와 군집 비율, 그리고 phytoplankton bloom과 관련한 미생물의 생리학적 특성을 확인한다.

또한 미생물 군집 분석결과 배양 가능한 미생물의 screening전략을 수립하고 high-throughput screening을 통해 순수 분리하여 미생물 자원을 확보하고 그들의 생리/생화학적 특성을 배양을 통해 확인하여 생태학적 역할을 규명하고자 한다.

Ⅳ. 연구개발결과

남극 시기별 지역별 수층 시료 및 생체 시료의 확보와 동시에 Pyrosequencing

분석 기술을 통해 분석함으로써 남극의 다양한 환경에서 미생물의 군집 차이를 확인하였다.

생체시료는 실험실에서 DNA와 RNA 핵산 분리 및 정제에 사용되어, 이후 illumina Hiseq sequencing을 통하여 metagenome 및 metatranscriptome raw data로 재생산되었다. 이후의 추가적인 sickle을 통한 raw read의 재처리와 IDBA_UD를 통한 assembly 과정 및 coverage plot을 토한 binning 과정을 진행하여, 서남극해 주요 시기별 주요 미생물의 genome 정보를 재구성 하였다.

확보한 coverage > 100x의 주요 미생물 bin은 총 12개로 각 문별로 Bacteroidetes가 5개 Gammaproteobacteria가 6개 Alphaproteobacteria가 1개 binning되었으며, raw read mapping을 통하여 우점도를 확인 하였다.

각 대표 bin의 transporter의 종류와 tanscriptome을 통한 발현양상의 확인으로 polynya 지역 내 미생물의 주요 생리학적 순환을 연구하여 최우점종인 BC1_Pol의 digested protein과 oligosaccharide, thiamin를 uptake하는 TBDT의 높은 발현과 GM4_SAR92의 arabinose를 uptake하는 TBDT등의 식물성플랑크톤 유래 고분자물질을 기질로 사용할 수 있는 미생물 종의 genomic property를 확인 하였으며, 이를 통해 Bloom의 정점시기에 식물성플랑크톤(특히, Phaeocystis)의 debris를 이용하여 주요 미생물인 Polaribacter, SAR92, Ant4D3가 carbon remineralization에 관여함을 살펴볼 수 있었다.

이외에 laminarin을 분해하는데 관여하는 PUL의 transcriptome 발현과 exopeptidase가 transporter와 결과와 동일하게 Bacteroidetes목에 해당하는 bin들에서 많이 발견되고 발현됨을 확인하였으며, Glycine betaine과 DMSP를 이용하는데 관한 유전자들의 발현역시 확인할 수 있었다.

Metagenome분석결과 Polynya지역에서 bloom정점 시기에 주요 미생물은 Polaribacter, SAR92, Gammaproteobacterium Ant4D3 였으며, 이들 신규 미생물 자원 확보를 위한 배양조건을 수립하였다. 각 주요 미생물의 확보를 위한 배양조건을 이용하여 high-throughput screening을 통해 확보한 신규 미생물 자원은 생태학적으로 중요한 미생물이 다수 포함되어 있어 추후 연구를 통하여 이들의 특성을 규명하는데 사용하고자 한다.

V. 연구개발결과의 활용계획

서남극해는 지구의 다른 지역에 비해서 인위적인 영향이 적어 지구의 기후 변화를 모니터링하기에 최적의 조건을 제공한다. 따라서 다양한 생물의 활동이 지구에 어떤 영향을 미치는지를 연구하기에 적합하며, 특히 극지방의 미생물의 변화양상을 분석하는 것은 향후 지구의 생태계 변화 양상을 예측하기에 좋은 과학적자료가 될 것이다. 확보된 metagenome과 transcriptome data는 추후 장기적인연구에 기초적인 자료로써 필수적이며, 더욱이 극한 환경으로부터의 생물자원의확보는 과학적 선진화가 진행되고 있다는 것을 나타낸다. 이에 따라 국내 신진연구 인력에게 과학자적 자부심을 심어 줄 수 있을 것이다. 또한 이러한 연구 개발은 각 연구 분야 간 공동연구를 유도할 것이고 이에 따라 국내 과학의 선진화에 큰 도움이 될 것이다.

S U M M A R Y (영 문 요 약 문)

I. Title

Diversity of phototrophs and hetetrotrophs involved in greenhouse gas transformation in ocean water under seaice.

II. Purpose and Necessity of R&D

Research of ecosystems in polar oceans which constitute tow-thirds of Earth will be helpful to understand the effect of polar oceans to the global climate exchange. Researches of advanced countries have been focusing on the change of ecosystems and climate changes in polar regions.

Ocean below sea ice is an interesting environments for microorganisms with limited light and atmospheric gas exchange, which also provides key nutrients for great primary production in the Antarctic Ocean polynyas.

Therefore, studies on diversity and ecological role of microorganisms of seaice and polynyas will be helpful to understanding cycle of materials in Antarctic polynyas associated with climate exchange.

III. Contents and Extent of R&D

For the analysis of diversity and abundance of the microorganisms involved in biogeochemistry of matter cycles, next generation sequencing technology (NGS) was employed.

-DNA and mRNA were sequenced in oder to analysis of microbial community and activity of physiological properties involved with biogeochemistry of matter cycles.

-Change of bacterial community and physiological activity in polynya was observed at peak and declining of the bloom and under the seaice.

-We isolated heterotrophic bacteria which are abundant at late phase of phytoplankton bloom. And we attempted to examine their potential for their carbon remineralization for better understanding of the biogeochemical carbon cycle in the highly productive Antarctic Ocean.

IV. R&D Results

- -Pyrosequencing data showed differences in bacterial community at different phases of phytoplankton bloom.
- -At the initial phytoplankton bloom, Proteobacteria and Bacteroidetes were abundant. Especially, bacterial community was dominated by Polaribacter and AM402959 (ARCTIC96BD).
- -We suggest that the difference of bacterial community was derived from their biochemical potential to utilize different types of substrates.
- -To isolate representative heterotrophs in the polynya at initial phtoplnkton bloom, extinction-dilution method was used. Strains belonging to following genera: Polaribacter, Bizionia, Leeuwenhoekiella, Pseudoalteromonas, Pseudomonas, Sulfitobacter were obtained.
- -Metagenomic analyses of bacterioplankton community were performed to observe the relation between bacterioplankton community and the phase of phytoplankton bloom. The most frequently recovered 16S rRNA gene sequences were affiliated with the phylum Bacteriodetes and Proteobacteria (especially Gammaproteobacteria) as result of pyrosequencing analysis.
- -After assembling using raw reads, binning of scaffolds was performed by differential coverage plotting method and tetranucleotide frequency using coverage data obtained from peak and declining bloom. Finally, major 12 bins were selected from the metagenomes.
- -All bins were classified into Alphaproteobacteria, Bacteroidetes, and Gammaproteobacteria. The number of metagenomic DNA and cDNA reads mapping to scaffolds in each bin was quantified to indicate its abundance and activity.
 - -Reads associated with a bin of Polaribacter (BT13) were

predominantly recruited in the peak bloom (upto 24% of total reads). Following Polaribacter (BT13), Bin of Gammaproteobacterium Ant4D3 (GM1) was dominant at peak of bloom (about 7 %). Between two microorganisms, preference of substrates is different. Polaribacter prefered polysaccharide while Gammaproteobacterium Ant4D3 prefered amino acid and DMSP.

V. Application Plans of R&D Results

Polynya is a very unique environment and known most biologically productive regions in the world oceans. Also, the ecosystems of polar regions has had a major impact on polynya. Therefore, analysis of microorganism community will be helpful to understanding climate change. And This kind of research project is typical in advanced countries. Therefor, this study will induce the pride of scientist to internal researcher. finally, the microbial resources obtained in this project will be heplful to bioindustries related to development of biofuels



목 차

| 제 1 | . 장 서론 | 10 |
|-----|--|----|
| | 제 1 절 연구개발의 목적 및 개요 제 2 절 연구개발의 필요성 제 3 절 연구개발의 범위 | 10 |
| 제 2 | 2 장 국내외 기술개발 연구 현황 | 12 |
| | 제 1 절 국내 연구 현황 ··································· | |
| 제 3 | 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과 | 13 |
| | 제 1 절 Meta-Omics 분석을 통한 bloom시기별 미생물 군집 및 생리학적 분석 ·· | |
| 제 4 | 극지연구소 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도 | 23 |
| | 제 1 절 목표달성도 | |
| 제 5 | 5 장 연구개발결과의 활용계획 | 25 |
| | 제 1 절 연구 개발 시 경제·산업적 활용계획 및 타 연구의 응용 가능성 | 25 |
| 제 6 |) 장 참고문헌 ······ | 26 |

제 1 장 서론

제 1 절. 연구개발의 목적 및 개요

1. 연구개발의 목적

서남극해를 대상으로 수층 시료 및 미생물 생체 시료를 확보하고, metagenome 및 transcriptome을 진행하여 bloom시기별 미생물 군집의 다양성과 주요 미생물 유전체의 생리적 특성의 분석을 통해 빙호 환경에의 영향을 확인한다.

2. 연구개발의 개요

| 구분 | 연구 개발 목표 |
|----------------|--|
| 4차년도 (2016) | - Meta-Omics분석을 통한 Phytoplankton bloom시기별 미생물 군집 및 생리학 적 분석 - Binning을 통한 군집 내 주요 미생물의 genome정보 확보 - 획득한 bin으로부터 세포내 생리 생화학적 특성 분석 및 transcriptome 분석을 통한 각 세균의 환경 내 활성에 따른 생태계의 영향을 유추 |

제 2 절. 연구개발의 필요성

- 1. 연구개발의 과학기술적 중요성
- 지구상에서 가장 많은 미생물을 보유하고 있는 해양 생태계의 물질 순환을 이해하는 것은 나아가 지구 온난화에 따른 기후 변화와 관련되어 중요한 과학적자료가 될 것이다. 특히 polynya는 phytoplankton bloom에 따라 생물학적 생산성이 높으며 탄소 remineralization에 관련해 관심을 받고 있는 장소 중의 하나이다. 따라서 이 지역에서 phytoplankton bloom의 시기에 따라 (bloom 초기와후기) 변하는 군집의 양상을 확인하는 것은 해양 생태계의 물질 순환을 이해하는데 큰 도움이 될 것이다.
- 또한, 시료의 접근성에 어려움이 있는 만큼, 환경 시료로부터 유전체를 확보함

으로써 다양한 빙호 환경에서 군집의 차이를 확인하는 것은 이후의 장기적인 연구에서 해양 생태계를 규명/이해하는데 중요한 과학적 근거가 될 것이다.

● 더욱이 군집 분석에서 우점하고 있는 종을 분리해 내 그 생리/생태학적 역할을 규명하는 것은 유전자 분석의 한계를 보안하는 동시에 polynya의 생태를 이해하는데 중요한 과학적 근거가 될 것이다.

제 3 절. 연구개발의 범위

| 구분 | 연구개발내용 및 범위 |
|----------------|---|
| 4차년도 (2016) | - 남극 빙호 내 다양한 환경으로부터 유전체 확보 Revisit을 통한 비슷한 샘플링 시기에 미생물 군집 차이 확인 Meta-Omics분석을 통한 bloom시기별 미생물 군집 및 생리학적 분 - Metagenome을 기반으로 한 polynya내 주요 미생물 자원 확보 |

극지연구소

제 2 장. 국내외 연구 현황

제 1 절. 국내 연구 현황

● 쇄빙선 Araon호의 도입과 함께 극지역에 접근이 가능하게 됨으로써 지속적인 크루즈 연구를 통하여 Polynya의 시기별, 지역별 등 다양한 시료를 확보 할 수 있었다. 또한 다양한 분야의 전문 연구 팀의 연구 교류를 통해 미생물과 빙호 생태계간의 상호관계를 밝히는 실마리를 찾는데에 심도 있는 분석을 가능하게 하고 있다.

본 연구실에서 최근 새로운 pyrosequencing 기술을 통해 극지의 빙호 환경에서 미생물의 군집을 비교 분석 논문이 발표된 바 있으나 (Kim et al, 2014; Choi et al., 2015) 국내 대부분의 극지 관련 논문은 미생물학적 접근방법보다는 지질 학적이나 물리학적 접근 방법을 통해 이루어져 온 것이 사실이다. 지구 온난화와 관련하여 물질과 미생물간의 상호 작용에 따른 연구가 보고 되었으나 아직연구 결과의 발표가 미흡한 실정이다. 최근에 미생물 자원을 확보를 바탕으로한 연구가 진행되었으나 이 또한 아직까지는 국내의 미생물학적 접근 방법 연구는 미비한 실정이며 본 연구에서 진행한 서남극해 meta-omics연구는 시료의확보와 분석의 어려움으로 국내에서는 거의 시도되지 않은 연구이다.

제 2 절. 국외 연구 현황

● 서남극해의 생태학적 중요성의 대두에 따라 국외에서는 비교적 다양한 접근방식을 통하여 극지역의 미생물의 생태계에 대해 연구하고 있다. 주로 pyrosequencing 기술을 통해 미생물의 군집이 어떻게 변화해 가는지를 분석하는 연구 발표된 바 있으며(Hahnke et al., 2014), 최근 PNAS와 Frontier in Microbiology에 아문젠해의 metagenome과 metatranscriptome을 이용해 미생물의 기능 유전자를 분석하고 생태학적으로 이들이 미치는 영향 관련한 연구가 보고 되었다 (Delmont et al., 2015; Bertrand et al., 2015). PNAS논문은 cobalamin과 iron의 결핍이 phytoplankton의 군집에 어떠한 영향을 끼치는지이때 세균과 phytoplankton의 상호관계의 변화를 살피며, Frontier in Microbiology에서는 Polynya bloom의 정점 시기일 때 세균의 metagenome을 살펴보는 연구가 진행되었다. 또한 극지에서 순수분리를 바탕으로 미생물을 분리하고 genome과 transcriptome분석을 통해 이 미생물이 생태계에 미치는 역할에 대한 연구가 발표된 바 있다 (Xing et al., 2014).

제 3장. 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. Meta-Omics분석을 통한 bloom시기별 미생물 군집 및 생리학적 분석

1. 연구 접근 방법 및 내용

서남극해의 Polynya는 Amundsen Sea에서 phytoplankotn에 의한 생물학적 생산성이 가장 높다고 알려진 장소 중 하나로 탄소 remineralization에 관한 관심이 집중되고 있는 곳이다. 그리고 극지의 해빙(海氷) 하부 대양 생태계 또한 기체 교환과 및 투과에 대한 한계가 있어 독특한 생태계를 형성하고 있어 중요한 연구 장소이다. 따라서 빙호 내 다양한 환경과 식물성 플랑크톤의 bloom의 최정점 및 전후 생체시료를 확보하고, illumina Hiseq 기반의 Massive parallel sequencing기술을 이용해 유전체 정보를 획득함으로써, 빙호 환경의 미생물의 생리학적 영향을 연구함과동시에 이를 통해 해양 생태계의 물질 순환을 이해하고자 한다.

또한, metagenome에서 확보한 미생물의 genome정보는 신규 미생물 자원의 확보에 사용하며, 확보된 미생물자원과 metagenome 및 transcriptome 정보는 추후 장기적인 연구에 기초적인 자료로써 활용될 것이다.

가. 미생물 DNA 추출 및 서열 분석

빙호 환경 내 군집의 변화를 확인하기 위해 총 3회에 걸쳐 빙호 환경에서 샘플링을 실시하였다. 확보한 각 환경 시료로 부터 DNA/RNA를 추출하였다.

작년도 pyrosequencing결과를 통해 bloom의 정점시기(peak, 2014년 Araon cruise)와 후기(declining, 2012년 Araon cruise), 해빙하부 (seaice, 2012년 araon cruise)를 본 연구의 분석 대상으로 선정하였다. 선정된 3개의 시료에서부터 DNA/RNA를 동시에 추출하였다. Qiagen의 AllPrep DNA/RNA Mini kit을 이용하여, DNA와 RNA를 분리 하였다. 분리된 DNA와 RNA는 Illumina Hiseq 2000으로 sequencing을 진행하였다.

나. Assembly, binning 및 annotation

Raw reads로부터 genome정보를 획득하기 위해 sickle을 통한 read 재처리를 진행한 뒤, IDBA_UD assembler를 통해 assembly를 진행하였다. 획득한 scaffold에 bowtie2를 이용하여 DNA mapping을 진행하였으며, 이를 통해 각 scaffold의 coverage를 계산하였다. 계산된 coverage를 이용하여 coverage ploting방법으로 binning을 진행하였다. 획득한 bin의 completeness를 높이기 위해 mapping된 read들을 이용하여 재 assembly를 진행하였다. Genome의 completeness분석은 checkM을 이용해 분석되었다. 획득한 bin의 scaffold는 prodigal을 통해 gene prediction을 진행한 후 NCBI의 protein NR database의 blast match결과를 이용하여 annotation을 실시하였다.

다. Transcriptome분석

RNA특성상 rRNA의 오염으로 인해 scaffold의 발현률을 비교하기가 어려운 특징이 있다. rRNA의 영향을 배제하기 위하여 scaffold로부터 cds서열만 추출하여 RNA read mapping을 실시하였다.

라. 생리적 특성 분석

선정된 주요 미생물의 genome에서부터 pfam, COG, TIGR, KEGG등 분석을 통해 transporter, Cazyme, central metabolism등을 분석하였다.

2. 연구 결과

가. Meta-Omics분석을 통한 bloom시기별 미생물 군집 및 생리학적 분석

(1) binning을 통한 Amundsen polynya의 주요 미생물 genome bin확보

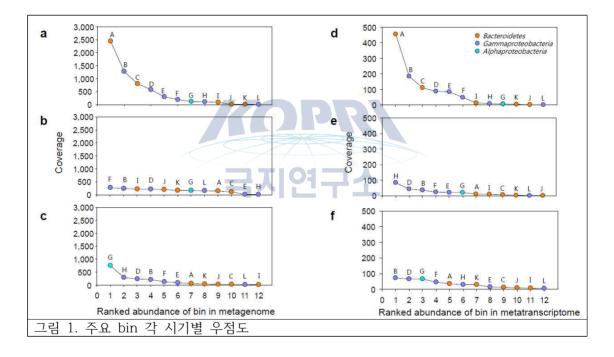
빙호의 bloom 정점과 후기 시기의 시료로부터 메타지놈 서열(raw read)을 확보하였고 assembly를 통해 확보한 scaffold로부터 bloom시기에 우점하는 미생물의 genome을 binning하였다. 이를 통해 총 12개의 주요 미생물 genome bin을 확보하였다 (기준: coverage > 100 x). 확보한 bin의 genome completeness, contamination 및 phylogenetic정보는 아래와 같다.

(2) bloom시기별 주요 bin 우점도 조사

12개의 bin의 각 시기별 우점도를 살펴보면, bloom의 정점시기에 BC1_Pol (*Polaribacter* sp.) GM1_Ant (*Gammaproteobacterium* AntD3)가 가장 우점하는 미생물임을 확인 할 수 있었다. Bloom 후기시기에는 두드러진 우점종이 관찰되지

| Property | BC1_ Pol | BC5_ Pol | GM1_ Ant | GM2_ Ant | AL1_ pel | BC2 | BC3 | BC4 | GM4_S AR92 | GM6_S UP05 | GM3 | GM5 |
|--|------------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------------|--------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------------|-----------------|
| Completeness | 87.3 | 18.4 | 73.8 | 79.8 | 78.4 | 53.9 | 93.6 | 77.5 | 54.7 | 55.8 | 57.6 | 54.4 |
| Contamination | 4.2 | 0 | 0.9 | 1.6 | 98.9 | 0.2 | 0.1 | 0.4 | 10.6 | 6.0 | 1.1 | 2.8 |
| Heterogeneity | 89.5 | 0 | 100 | 80 | 72.6 | 0 | 0 | 100 | 73.7 | 79.0 | 14.3 | 93.3 |
| Total scaffold length (contig length) (Mb) | 3.0 (2.6) | 2.0 (1.1) | 2.1 (1.5) | 2.3 (1.7) | 11.3 (4.1) | 2.1 (1.4) | 2.8 (2.8) | 1.8 (1.7) | 3.6 (1.8) | 2.9 (1.4) | 3.8 (2.0) | 1.5 (0.9) |
| Number of scaffolds | 154 | 280 | 36 | 68 | 1931 | 297 | 13 | 29 | 490 | 281 | 200 | 127 |
| N50 | 60,958 | 11,663 | 138,520 | 96,141 | 7,407 | 15,726 | 354,639 | 126,418 | 11,881 | 16,782 | 34,087 | 20,307 |
| Phylogenetic affiliation | Polarib acter | Polarib acter | Ant4D3 clade | Ant4D3 Clade | Pelagib acter | Flavob acteriu m | Flavob acterac eae | Ulvibac ter | SAR92 clade | SUP05 clade | Gamma proteob acteria | Methyl phaga |

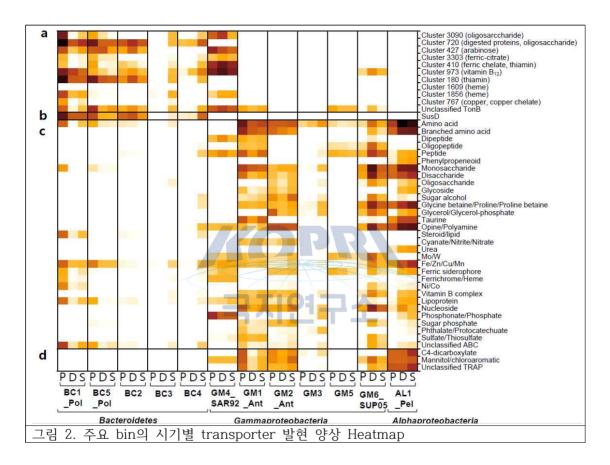
않았고, seaice하부의 해수는 AL1_Pel (Pelagibacter sp.)이 우점종으로 관찰되나 bloom의 정점시기에 비해서는 두드러지지 않았다.



(3) bloom시기별 transcriptome을 통한 생리학적 분석

12개의 대표 bin의 transporter종류와 이것의 transcriptome발현양상을 살펴보았다. Bin내 유기탄소 및 주요 transporter의 분석은 Polynya지역에 미생물이 주는 생지 화학적 영향을 간접적으로 살펴볼 수 있다. 특히 탄소 remineralization에 관하여 직 간접적으로 살펴볼 수 있다. Polaribacter를 포함한 Bacteroidetes목에 속하는 bin 과 SAR92 에 해당하는 GM4_SAR92의 경우 TonB dependent transporter(TBDT) 가 주요 transporter이다. Bloom정점 시기에 가장 우점종인 BC1_Pol의 genome상에 서 digested protein과 oligosaccharide, thiamin를 uptake하는 TBDT의 발현률이 높 았다. 이는 이 시기에 식물성플랑크톤 유래 기질로 추정되는 고분자물질을 기질로

사용할 수 있는 가능성을 확인 하였다. SAR92 family에 속하는 GM4_SAR92는 arabinose를 uptake하는 TBDT가 transcriptome발현이 높았는데, 이 arabinose는 Amundsen polynya의 주요 식물성 플랑크톤인 Phaeocystis의 주요한 당중의 하나이다. 반면 GM4_SAR92를 제외한 Gammaproteobacteria에 속하는 bin과 Pelagibacter bin은 ABC transporter를 가짐이 확인되었다. 또한 주로 저분자(amino acid, monosaccharide등)을 uptake하는 transporter의 transcriptome발현이 높았다.

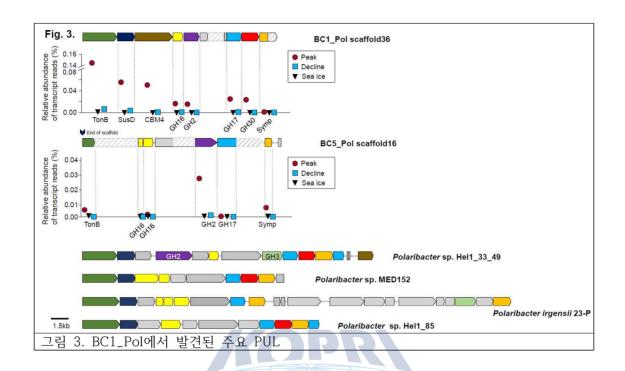


이는 Bloom의 정점시기에 식물성플랑크톤(특히, *Phaeocystis*)의 debris를 주요 미생물인 *Polaribacter*, SAR92, Ant4D3가 carbon remineralization에 관여함을 살펴볼 수 있었다.

(4) 주요 bin 생리학적 특성 분석

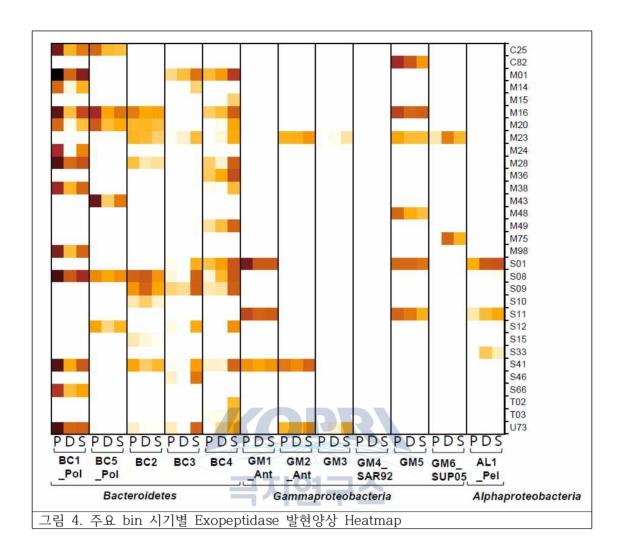
Transcriptome 및 genome정보를 살펴보았을 때 *Polaribacter*가 polymer분해에 관여함을 알 수 있었다. 12개의 bin중 *Polaribacter*가 2개가 확보되었는데, BC1_Pol은 genome상에 27개의 glycoside hydrolase(GH)가 발견되었다. 특히, laminarin, chitin, mannose가 포함된 polysaccharide를 분해하는데 관여하는 GH가 4 copy가 관찰되었다. 이런 분해 유전자들은 보통 TBDT와 SusD등 polysaccharide를 uptake하는데

관여하는 유전자들과 gene complex를 이루는 경우가 많은데 이를 polysaccharide utilization loci(PUL)이라 한다. BC1_Pol에서 발견된 주요 PUL은 아래와 같다.



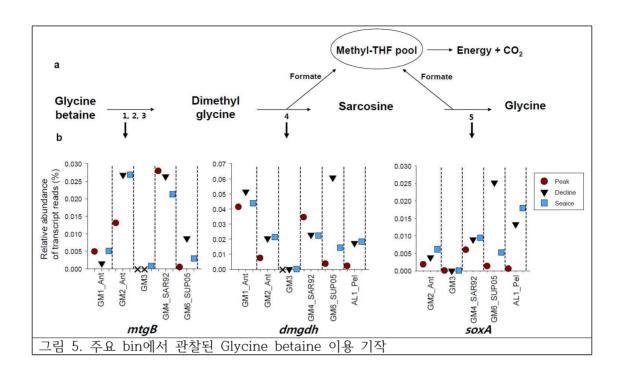
그 중 laminarin을 분해하는데 관여하는 PUL의 transcriptome발현률이 Bloom의 정점시기에 높았다. Chrysolaminarin은 Phaeocystis의 주요 저장탄소원으로 저장기관도 따로 가지고 있다. Chrysolaminarin과 laminarin 모두 탄소결합은 β -1-3, β -1-6 결합의 조합으로 이루어져 있어 chrysolaminarin을 분해하기 위해 PUL의 발현률이 높은 것으로 추정하였다. 하지만, bloom후기에서는 PUL의 발현이 현저히 낮았다. Phaeocystis의 환경에 따라 solitary또는 colonial cell형태를 가지는데 bloom의 정점시기에는 solitary cell형태가 후기에는 colonial cell형태가 주로 발견된다. 이때 chysolaminaran의 구조 또한 변하는데, 후기에는 다양한 탄소결합 및 당이 추가 되어 분해가 어렵기 때문에 상대적으로 발현률이 낮음을 알 수 있다.

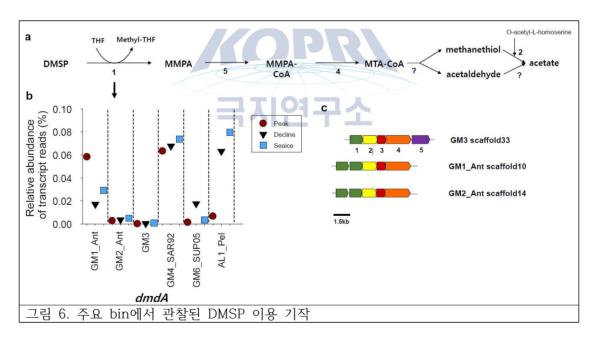
Protein과 peptide는 해양 미생물들이 아주 중요한 에너지원이자 질소원이다. Exopeptidase를 조사한 결과 transporter와 결과와 동일하게 Bacteroidetes목에 해당하는 bin들에서 많은 유전자가 발견되고 발현률 또한 높았다.



Bloom정점시기에 S08과 S09 group의 exopeptidase의 발현이 높았는데, 이는 protein을 효과적으로 자르는 peptidase로 알려져 있다. 또한 S08과 M23은 cell-wall degradaion으로 이도 발현률이 높았다.

- -Compatible solute은 gammaproteobacteria의 주요 기질로 밝혀졌다.
- -Glycine betaine과 DMSP를 이용하는데 관한 유전자들의 발현률이 높았다.

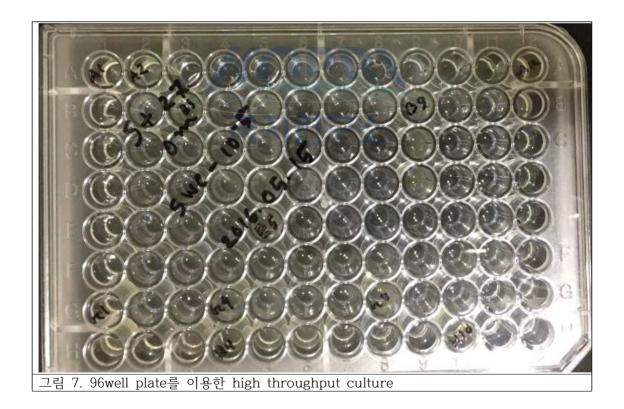




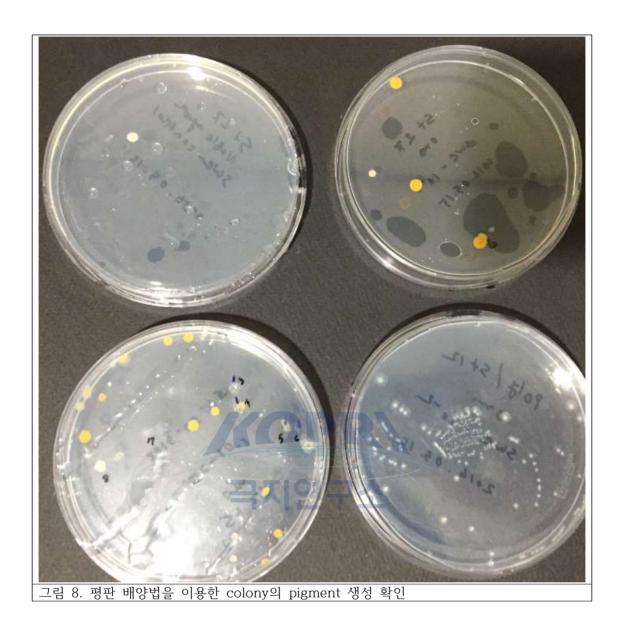
- 나. Metagenome을 기반으로 한 polynya내 주요 미생물 자원 확보
- (1) Metagenome 장보를 이용한 polynya내 미생물 자원 확보

Metagenome분석결과 Polynya지역에서 bloom정점 시기에 주요 미생물은 Polaribacter, SAR92, Gammaproteobacterium Ant4D3였다. 이들을 확보하기 위함과 동시에 신규 미생물 자원 확보를 위한 배양조건을 수립하였다. Polaribacter의 경우

기존에 알려진 SWC medium외에 North sea의 diatom bloom시 주요 Flavobacteria 를 분리하는데 사용된 HaHa medium을 동시에 사용하여 다양한 종류의 Polaribacter를 확보하고자 하였다. SAR92와 Gammaproteobacterium Ant4D3는 metagenome상에서 DSMP와 Glycine betaine을 주요 기질로 사용하는 것으로 추정되어 artificial seawater medium에 glycine betaine과 dmsp를 기질로한 배양배지를 사용하였다. Polaribacter, SAR92, Gammaproteobacterium Ant4D3을 확보하기 위한조건 모두 액체배양과 고체배양을 동시에 실시함으로써 미생물 배양 가능성을 높혔다. 특히, 본 연구 그룹에서 해양의 주요 미생물 중의 하나인 암모니아 산화 고세균이 hydrogen peroxide에 민감함을 확인한바가 있어 이를 배지내에서 제거해주어 난배양성인 암모니아 산화 고세균의 배양을 효과적으로 할 수 있는 조건을 수립하였다. 이를 기반으로 본 배양 실험 시 hydrogen peroxide의 scavenger인 DMTU 또는 pyruvate를 처리해 줌으로써 미생물의 배양 가능성을 높이고자 하였다. 액체 배양의 경우 농화배양을 먼저 거치지 않고 high throughput culture방법을 이용하여 환경내 우점 미생물을 확보하고자 노력하였다.



Polaribacter 및 Flavobacteria의 경우 pigment를 가지는 특성을 이용하여 pigment 를 띄는 colony를 우선적으로 확보하고자 하였다.



확보한 colony는 isolation작업을 거쳐 16S rRNA유전자 분석을 실시하였다. 그 결과 수십종의 polynya미생물을 확보할 수 있었다. 하지만, metagenome상에서 우점하였던 미생물 확보에는 어려움이 있었다. 이렇듯 실제 환경에서는 매우 중요한 미생물이지만 배양으로는 확보하기에 어려움이 있어 metagenome을 통한 polynya의생태 예측은 매우 중요한 연구 결과 이다. 하지만 획득한 미생물들은 신종을 비롯하여 생태학적으로 중요한 미생물들이 다수 포함되어 있어 추후 연구를 진행하여이들의 특성을 밝히고자 한다.

제 4 장. 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절. 목표달성도

| 성과목표 | | 세부목표 | 달성 주요내용 | 달성도(%) |
|---|-----|--|---|--|
| Meta-Omics 분석을 통한 bloom시 기별 미생물 군집 및 생리학 적 분석 | 1-1 | Meta-Omics 분석을 통한 bloom시 기별 미생물 군집 및 생리학적 분석 | -Metagenome분석을 통한 Amundsen polynya의 주요 미 생물 genome bin확보 -확보한 bin의 genome분석을 통 한 생리적 특성 유추 -시기별 transcriptome발현 비교를 통한 주요 미생물의 생리활성 예측 | 분석결과 제 시논문투고학술회의 발 표 |
| Metagenome 을 기반으 로 한 polynya 내 주요 미생물 자원 확보 | 2-1 | Metagenome 을 기반으로 한 polynya 내 주요 미생물 자원 확보 | -Metagenome분석시 확보한 미생 물의 생리적 특성을 이용하여 배양 조건 수립 -배양조건을 통한 polynya내 주요 미생물 배양체 확보 -주요 미생물의 phylogeny분석 | - 분석결과 제 시 |

제 2 절. 관련분야에 기여도

● 서남극해의 Polynya와 같은 빙호는 매우 특이한 환경으로 높은 일차생산을 보이며 생태계의 다변성이 적은 곳로 Metagenome을 통해 주요 미생물, 식물성플랑크톤의 genome의 library를 구축하여 추후 장기적인 생태계 모니터링의 기초적인 자료로써 활용가능한 연구 자료를 생산하였다.

● 국내에서 metagenome분석을 통한 연구보고는 거의 전무하지만, 전세계적으로 metagenome기술을 통한 생태학적으로 중요하나 배양이 되지 않았던 미생물의 genome이 science, nature등에 속속들이 보고되고 있다. 본 연구를 통해 축적된 metagenome 및 metatranscriptome분석의 know-how는 생명공학 분야의 다양한 곳에서 응용이 가능하다 (Metavirome, Gut microbiome 등). 이러한 빅데이터 분석은이 분야 뿐만 아니라 사회 전반적 트랜드로써 앞으로 반드시 갖추어야 할 분석 tool에 될 것이다. 이를 tool을 시스템화함과 동시에 수 많은 데이터 안에서 중요한 생태학적 의미를 찾아내고, 밝혀내었다는 것이 이 연구의 매우 중요한 연구 결과이다.이 연구 결과가 우수한 논문으로 이어져 국내 극지 연구의 수준을 선진화를 국내외에 알릴 수 있을 것이다.



제 5 장. 연구개발결과의 활용계획

제 1 절. 연구 개발시 경제·산업적 활용계획 및 추가 연구의 필요성과 타연구의 응용

- 본 연구에서 생산한 서남극해 빙호의 metagenome과 transcriptome data는 생태계 다변성이 지구의 다른 지역에 비해 적어 지구의 기후 변화를 조사하는데 적합하며, 디지털화하여 저장되어서 추후 장기적인 생태계 변화 및 미생물의 영향에 대한 연구에 기초적인 자료로써 활용될 수 있다.
- 더욱이 극한 환경으로부터의 생물자원 확보는 과학적 선진화가 진행되고 있다는 것을 나타내며, 이에 따라 국내 신진 연구 인력에게 과학자적 자부심을 심어 줄 수 있을 것이다. 또한 이러한 연구 개발은 각 연구 분야 간 공동연구를 유도할 것이고 이에 따라 국내 과학의 선진화에 큰 도움이 될 것이다.
- 본 연구에서 획득한 미생물의 genome들의 일부는 현재 배양체를 획득하지 못한 종류로써 우점종이면서도 배양의 어려움으로 그 생리학적 특성의 연구가 진행되지 못한 것이다. 이번 연구에서 획득한 미생물의 정보를 통해 시도한 배양조건의 수립과 High-throughput screening을 통해 확보한 새로운 미생물 자원은 추후 관련 미생물의 연구에 주요한 기초 자료로써 재활용할 수 있다.
- 또한, 이번 연구를 통하여 확보한 유전체 정보는 빙호 환경에 적응된 특이 enzyme의 대량 분석에 사용되어, 산업적으로 이용 가능한 생물자원의 확보에 이용될 수 있다.
- 이러한 다학제 간공동연구를 통하여 국내 지구미생물학과 관련된 우수한 신진연 구인력을 양성할 수 있으며, 국내의 BT 발전에 중요한 기여를 할 것으로 기대된다.

제 6 장. 참고문헌

- Kim., at al. (2014). Unveiling abundance and distribution of planktonic Bacteria and Archaea in a polynya in Amundsen Sea, Antarctica. Environmental microbiology 16.6: 1566–1578.
- Delmont, Tom O., et al. (2015). Genome reconstructions indicate the partitioning of ecological functions inside a phytoplankton bloom in the Amundsen Sea, Antarctica. Frontiers in microbiology 6.
- Bertrand, Erin M., et al. (2015). Phytoplankton-bacterial interactions mediate micronutrient colimitation at the coastal Antarctic sea ice edge. Proceedings of the National Academy of Sciences 112.32: 9938–9943.
- Choi and Kim., et al. (2015). Cultivation and biochemical characterization of heterotrophic bacteria associated with phytoplankton bloom in the Amundsen sea polynya, Antarctica. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography.
- Screen et al. (2010). The central role of diminishing sea ice in recent Arctic temperature amplification. Nature 464: 1334–1337.
- Hahnke et al. (2014) Dilution cultivation of marine heterotrophic bacteria abundant after a spring phytoplankton bloom in the North Sea. Environ. Microbiol; doi: 10.1111/1462-2920.12479
- Xing et al. (2014) Niches of two polysaccharide-degrading Polaribacter isolates from the North Sea during a spring diatom bloom. ISME J; doi: 10.1038

주 의

- 1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과보 고서 입니다.
- 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지 연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임 을 밝혀야 합니다.
- 3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대 외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.