

후보문 JS1의 서식처별 분포 양상 및
대사기작 분석을 통한 생리생태학적 특성 규명

Distribution of candidate phylum JS1 according to the habitats
and physiological and ecological characteristics inferred from JS1
genomes



2018. 03. 30

한국해양과학기술원
부설 극지연구소

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “후보문 JS1의 서식처별 분포 양상 및 대사기작 분석을 통한 생리생태학적 특성 규명”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 03. 30.

연구책임자 : 이영미

참여연구원 : 김경모, 양재영

극지연구소

보고서 초록

과제관리번호	PE17320	해당단계 연구기간	2017.04.01. ~ 2018.03.31	단계 구분	1단계
연구사업명	중 사업명	창의연구사업			
	세부사업명	신진연구자 지원사업			
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	후보문 JS1의 서식처별 분포 양상 및 대사기작 분석을 통한 생리생태학적 특성 규명			
연구책임자	이 영 미	해당단계 참여연구원수	총 : 3명 내부 : 2명 외부 : 1명	해당단계 연구비	정부: 3,000 천원 기업: 천원 계: 3,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	극지연구소 극지생명과학연구부		참여기업명	해당사항 없음	
국제공동연구	해당사항 없음				
위탁연구	해당사항 없음				
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	
<p>○ 후보문 JS1의 서식처별 분포 파악</p> <ul style="list-style-type: none"> - JS1에 포함되는 대부분의 16S rRNA 염기서열이 cold-seep, 진흙 화산 (mud volcano), 또는 열수구과 같이 메탄 분출과 관련된 해양환경의 퇴적물에서 관찰됨 <p>○ 후보문 JS1 유전체 분석을 통한 대사 기작 예측</p> <ul style="list-style-type: none"> - 생물학적으로 메탄이 생성되는 지역이나 메탄이 분출될 것으로 예상되는 지역의 JS1 유전체 분석 결과, 해당 환경에서 JS1은 혐기 결과 생성된 다양한 유기물을 발효하고, 발효 산물은 메탄 생성균의 기질로 사용될 수 있어 풍부하게 서식 할 것으로 예측됨 					
색인어 (각 5개 이상)	한글	후보문, 계통 분석, 유전체, 해양 퇴적물			
	영어	Candidate phylum, phylogeny, genome, data mining			

요 약 문

I. 제 목

후보문 JS1의 서식처별 분포 양상 및 대사기작 분석을 통한 생리생태학적 특성 규명

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 후보문 JS1의 생리생태적 역할 규명 필요
- 후보문 JS1의 분포 양상 및 계통학적 분석을 위한 파이프라인 구축 필요
- 새로운 생물자원과 유전자원의 확보 필요
- 생물자원 이용의 한계 극복 및 대안 필요

III. 연구개발의 내용 및 범위

- JS1 그룹 계통다양성과 메타데이터 연관성 분석
 - JS1 16S rRNA 유전자 염기서열 및 환경 데이터 확보
 - 계통학적 분석 및 분포 양상 분석
 - 염기서열과 메타데이터(서식처 및 환경변수) 연관성 분석
- JS1 그룹 유전체 비교 분석
 - 후보문 JS1의 유전체 확보 및 대사기작 분석

IV. 연구개발결과

- 후보문 JS1의 계통학적 관계 및 서식처별 분포 파악
- 후보문 JS1 유전체 분석을 통한 대사 기작 예측

V. 연구개발결과의 활용계획

- JS1을 포함한 후보문 미생물의 기능연구를 위한 네트워크 확립용 자료로 활용
- 배양을 위한 정보 제시

S U M M A R Y

I. Title

Distribution of candidate phylum JS1 according to the habitats and physiological and ecological characteristics inferred from JS1 genomes

II. Purpose and Necessity of R&D

- Necessity for determination of ecological functions of candidate phylum JS1
- Necessity for the establishment of pipeline for the analysis of distribution and phylogeny of candidate phylum JS1
- Necessity for getting new biological and genetic resources
- Necessity to overcome the limitation of utilization of biological resources and search for the alternatives

III. Contents and Extent of R&D

- Correlation of the phylogenetic diversity of JS1 with environmental factors
- Comparative analysis of JS1 genomes

IV. R&D Results

- Phylogeny and the distribution pattern of JS1
- Potential metabolism of JS1 through the genome analysis

V. Application Plans of R&D Results

- Provision of data for establishment of network for understanding candidate division including JS1
- Provision of information for cultivation of JS1

C O N T E N T S

Chapter 1 Introduction	7
Chapter 2 Current R&D Status in Korea and Other Nations	8
Chapter 3 R&D Implementation Contents and Results	11
I. Final goal of research	11
II. Contents and Results	11
Chapter 4 Degree of R&D Achievement and Degree of Contribution to Outside Research Institute	18
Chapter 5 Application Plans of R&D Results	19
Chapter 6 References	20

목 차

제 1 장 서론	7
제 2 장 국내외 기술개발 현황	8
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	11
가. 연구개발의 최종목표	11
나. 연구수행 내용 및 결과	11
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도.....	18
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	18
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보	19
제 7 장 참고문헌.....	20

제 1 장 서론

○ 후보문의 분포 양상 및 분류학적 위치 확립을 위한 파이프라인 구축 필요

- ▶ 분자적 기법을 통해 확보한 16S rRNA 유전자의 염기서열은 아직까지 배양되지 않은 다양한 계통내 100개 이상의 후보문의 존재를 나타내고 있음
- ▶ 희석-소멸법에 의한 난배양성 미생물 분리기술 또는 단일세포 분리를 통한 후보문의 배양 시도에도 불구하고, 배양을 통해 획득된 미생물은 전체 세균 다양성의 1% 내외임
- ▶ 다양한 후보문 중, JS1은 메탄 하이드레이트나 유기물이 풍부한 혐기 환경에서 풍부하게 발견 되어왔으나, 현재까지 배양체가 획득되지 않아 이들의 분류학적 위치가 불분명하고, 이들의 생리생태학적 기능 검증이 어려움. 따라서 이들의 생리생태학적 특성을 이해하기 위해 배양이 아닌 접근법 필요
- ▶ 차세대 염기서열분석기술(NGS)의 비약적인 발전 및 이로 인한 비용 감소로, 여러 지역의 다양한 환경내 세균의 16S rRNA 유전자 염기서열 및 유전체 자료들이 공개된 데이터베이스에 급격히 축적 되고 있어, 생물정보학적인 접근을 통해 후보문 JS1의 16S rRNA 유전자의 염기서열 및 유전체 확보 가능
- ▶ 방대한 양의 염기서열 자료로부터 후보문 JS1의 염기서열을 추출하고, 이들의 생리생태학적 기능을 이해하기 위해 분류학적인 개념을 적용한 분석 파이프라인 정립 필요

○ 새로운 생물자원과 유전자원의 확보 필요

- ▶ 선진국의 자원무기화로 유전자원 선점 및 독점에 대한 경쟁이 치열해짐
- ▶ 탐사를 통해 직접 채취한 시료로부터의 생물 및 유전자원 확보는 시료에 대한 접근성의 한계 및 비용적인 문제로 새로운 자원을 확보하는데 제약이 많음
- ▶ 공개된 데이터베이스에 저장 및 공개된 세균의 유전체 정보는 잠재적 이용 가능성을 지닌 신규 유전자의 보고로, 이를 활용한 연구는 시료 확보 등의 어려움을 극복하게 하여 전지구적으로 연구 영역을 확장시켜 새로운 유전자원 탐색의 효율성 극대화 가능

○ 후보문의 생리생태적 역할 규명 필요

- ▶ 세균은 물질 순환 등의 중요한 생태학적인 역할을 수행하고 있어, 이들의 전지구적 분포 양상 및 지역 또는 환경에 따른 이들의 분포 특성을 이해하는 것은 세균이 생태계에 미치는 영향을 규명하는데 중요한 기초 자료 제공 가능

○ 후보문의 배양을 위한 대사과정 정보 제공 필요

- ▶ 세균의 생리생태적 특성을 규명하는 연구는 배양체의 획득이 최선이나, 비배양 세균의 경우, 생리 특성 규명이 어려움
- ▶ 비배양 세균이라도, 단일세포분리나 메타지노믹 분석을 통해 확보한 유전체 분석을 통해 대사 기작 정보 획득이 가능하고, 이를 통해 후보문에 최적화된 배양 조건 모색 가능

○ 생물자원 이용의 한계 극복 및 대안 필요

- ▶ ‘생물다양성협약’ 및 ‘유전자원 접근 및 이익 공유’ 의정서 발효로, 전세계 생물자원 이용의 한계 발생
- ▶ 이러한 한계를 극복하기 위해 공개된 유전체 정보를 활용하는 것이 합리적인 대안임

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내외 기술 수준

가. 세계적 수준

개념정립 단계	●	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

□ 후보문 JS1의 전지구적 분포 양상 및 서식처 특성에 대한 연구 부재

- 전체 세균 군집의 적은 양을 차지하는 후보문 OP8의 전지구적 분포에 대한 연구가 보고 [Farag et al., 2014]된 반면, 메탄 하이드레이트 부존 지역과 같은 특정한 지역에서 풍부하게 (최대 53%, Parkes et al., 2015) 발견되어 온 후보문 JS1의 지역 및 서식처 특성에 따른 분포 연구는 현재까지 수행되지 않음

□ 현재까지 확보된 후보문 JS1 유전체의 지역적 한계

- 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석을 통해 후보문 JS1이 풍부하게 관찰된 지역은 많으나, 현재까지 확보된 유전체는 총 5개 환경 - Adelie Basin (남극), Sakinaw lake (캐나다), Etoliko Lagoon (그리스), Aarhus Bay (덴마크) 및 유기물 분해 생물 반응기 [Nobu et al., 2015a]-으로, 현재까지 후보문 JS1 유전체가 확보된 지역은 JS1이 풍부하게 보고된 지역을 커버하지 못함
- 메탄 하이드레이트 부존 지역에서 후보문 JS1의 비율이 높게 나타나므로, 극지연구소가 현재까지 탐사를 통해 확보한 시료 또는 기존에 JS1 비율이 높다고 알려진 시료로부터 후보문 JS1 유전체 추가 확보 필요

□ 남극지역 유래 JS1 유전체의 낮은 커버리지

- 남극에서 확보한 후보문 JS1 유전체는 극지역에서 확보된 유일한 JS1 유전체이나 커버리지가 2% 미만 [Carr et al., 2015]으로, 전체 세균 군집의 높은 비율 (최대 51%)을 차지하는 후보문 JS1의 대사기능 및 생태학적 역할을 유추하기에는 한계가 있음

나. 국내수준

- 차세대 염기서열 분석법의 비약적인 발전으로 유전체 분석에 대한 연구는 활발히 진행되고 있는 단계이나, 해양 퇴적물에 풍부하게 존재하는 JS1에 대한 유전체 분석은 수행된 바 없음.

2. 국내외 연구현황

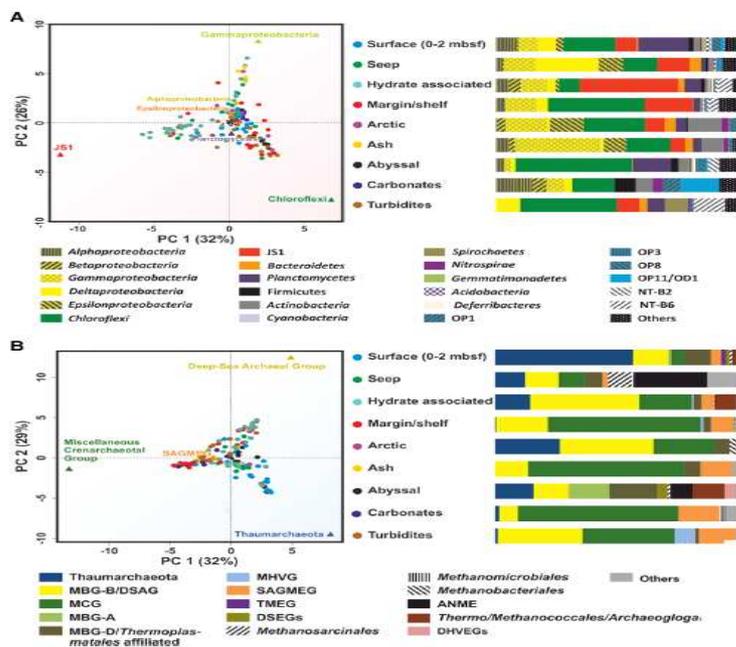
가. 국내 동향

- 배양체 수준의 유전체 분석은 활발히 보고 되고 있으나, 연구에 많은 시간과 시료 확보 등에 많은 비용이 소모되는 후보문에 대한 연구 미진함

나. 국외 동향

□ 생물정보학적 접근을 통한 미생물 군집 구조 및 후보문의 전세계적 분포 연구

- 공개된 데이터베이스로부터 16S rRNA 유전자 염기서열 정보를 추출하여 퇴적물의 특성에 따른 세균 및 고세균 군집 연구 사례
 - 후보문 JS1은 해양 퇴적물에 풍부하게 존재하고, 특히 메탄 하이드레이트 부존 지역에 풍부하게 존재함을 보고 [Parkes et al., 2014]



- 배양체가 획득되지 않은 후보문에 대해 전지구적 분포 연구 사례
 - 후보문 OP8의 계통 분석 및 서식처에 따른 분포 양상 분석을 통해, 이들은 전체 세균 군집에서 적은 비율을 차지(대부분 0.01% 미만)하는 문이고, 후보문 OP8에 속하는 세균 군집은 환경 인자 보다는 서식처 차이에 의해 결정됨을 밝힘 [Farag et al., 2014]

Table 1. Classification and overall patterns of *Aminicenantes* relative abundance in various habitats and sub-habitats¹.

Dataset type	Total datasets	Datasets with <i>Aminicenantes</i> (%)	Average <i>Aminicenantes</i> abundance (%)	Maximum relative abundance
Total datasets	3,141	918 (29.22%)	0.20% ²	10.20%
Total 16S rRNA sequences	1,820,857,401	47,315	0.0026%	
Marine datasets	1,154	248 (21.50%)	0.28%	5.28%
Deep marine sediments	32	30	0.50%	2.89%
Coral associated microbiome	19	10	0.89%	4.67%
Pelagic	390	40	0.20%	2.46%
Hydrothermal vents	101	60	0.23%	5.28%
Coastal	612	107	0.20%	1.87%
Aquatic non-marine datasets	1,665	645 (38.74%)	0.15%	10.20%
Spring and ground water	25	10	2.80%	10.20%
Temperate freshwater	1569	587	0.11%	2.50%
Salt marshes	71	48	0.03%	0.67%
Soil datasets	276	14 (5.072%)	0.07%	0.80%
Agriculture	28	2	0.03%	0.06%
Grassland	140	10	0.00%	0.00%
Heavy metal/hydrocarbon contaminated	8	1	0.00%	0.01%
Arid and Semi-arid	46	0	0%	0%
Permafrost	54	1	0.01%	0.01%
Hydrocarbon-impacted datasets	14	10 (71.43%)	0.32%	0.95%
Herbivorous gut and other datasets ³	32	1 (3.125%)	0.02%	0.02%

¹A detailed description of every dataset is provided as supplementary material (Table S1 in File S1).

²Average abundance values in datasets where *Aminicenantes* sequences were identified.

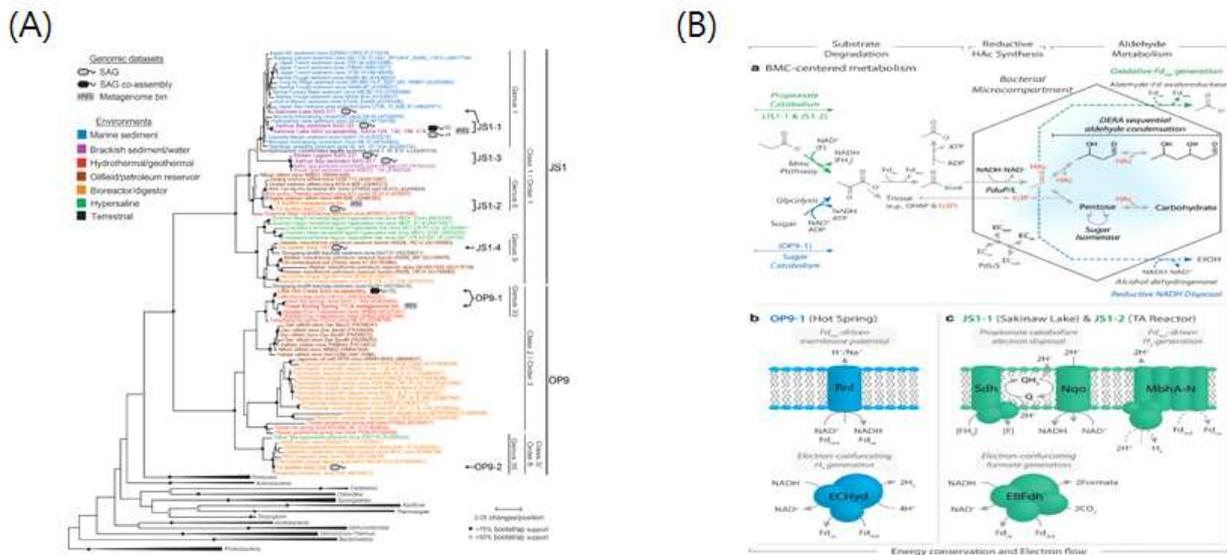
³26 Datasets were designated "other"; these datasets originated from dust, air and animal associated habitat. See Supplementary Table S1 in File S1 for details.

doi:10.1371/journal.pone.0092139.t001

□ 후보문 JS1과 OP9의 유전체 비교 분석을 통한 생리학적 특성 유추

○ 유전체 분석

- 단일세포로부터 증폭된 유전체 및 메타지놈 분석을 통해 획득한 JS1과 OP9 유전체의 비교 분석을 통해 해당 후보문의 계통학적 지위 및 이들의 생리학적 특성 보고 [Nobu et al., 2015a]



- 하지만, 해당 연구에서 JS1에 대한 대사 기작은 대부분 생물반응기내의 바이오필름이나 호수에서 보고된 커버리지가 높은 유전체 기반으로 해석을 하고 있음 [Nobu et al., 2015a]. 해양 퇴적물 내에서 보고된 유전체는 커버리지가 22% 이하로, 해양 퇴적물에서의 JS1의 풍부도를 고려할 때, 해당 커버리지는 중요한 대사 기작을 이해하기에는 한계가 있음

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

가. 연구개발의 최종목표

- 후보문 JS1의 서식처별 분포 양상 및 대사가작 분석을 통한 생리생태학적 특성 규명

나. 연구수행 내용 및 결과

□ 후보문 JS1의 계통학적 위치 및 서식처별 분포

- JS1에 속하는 염기서열 추출 및 계통도 작성
- JS1의 16S rRNA 유전자로 보고된 염기서열(accession no.: AY197406)을 사용하여, GenBank에서 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 수행하여 유사도 기준 상위 100개의 염기서열(기준 염기서열과의 유사도는 94%에서 100%)을 추출하여 계통도 작성 (그림 1).

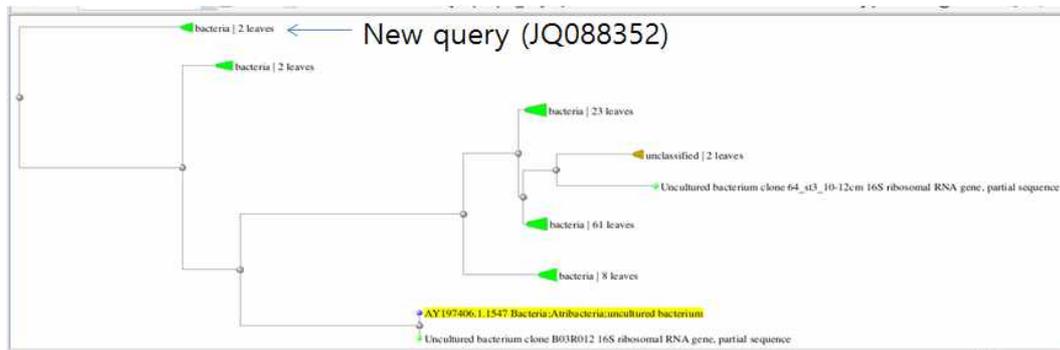


그림 1. 16S rRNA 유전자염기서열 (accession no.: AY197406)을 사용하여 작성한 계통도

- 이 중, AY197406 염기서열과 계통학적으로 가장 멀게 나타난 염기서열(accession no.: JQ088352)를 기준으로 하여 다시 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 수행하여 유사도 기준 상위 100개의 염기서열(기준 염기서열과의 유사도는 93%에서 100%)을 추출하여 계통도 작성

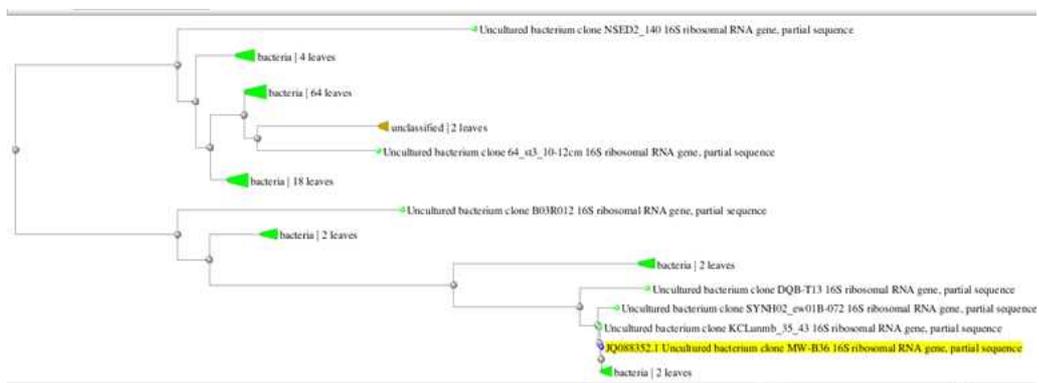


그림 2. 16S rRNA 유전자염기서열(accession no.: JQ088352)을 사용하여 작성한 계통도

- BLAST용 기준 염기서열 및 이를 통해 추출한 총 202개의 염기서열 중, 중복된 염기서열을 제외하고, USEARCH(Edgar et al., 2010)를 통해 클러스터링을 수행한 결과, 총 51개의 클러스터 생성
- 이를 염기서열 및 유전체가 확보된 염기서열을 MEGA6 (Tamura et al., 2013) 이용하여 다중 염기서열 정렬(multiple sequence alignment)를 사용하여 정렬하여 MEGA7에서 Maximum likelihood 알고리즘(Felsenstein 1981)을 사용하여 계통도 작성 (그림 3)

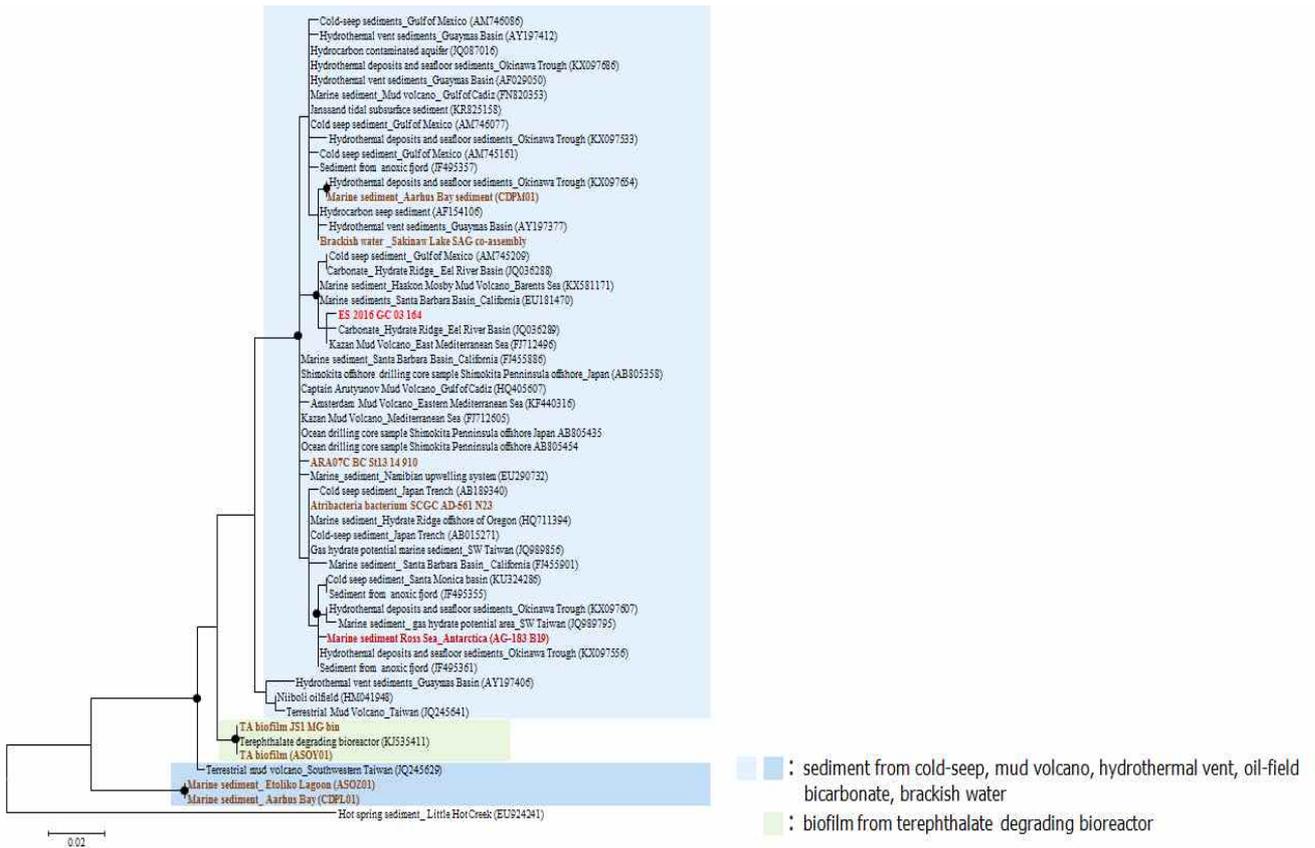


그림 3. JS1 계통도 및 서식처 특성

○ JS1의 서식처 특성 분석

- 추출된 염기서열의 서식처를 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 데이터베이스로부터 추출한 결과, 대부분의 염기서열이 cold-seep, 진흙 화산 (mud volcano), 열수구과 같이 메탄 분출과 관련된 해양환경의 퇴적물에서 관찰되었음 (그림 3)
- 반면, terephthalate를 분해하는 반응기내의 바이오필름에서 기인한 JS1 염기서열은 대부분의 염기서열이 포함된 클레이드와 독립된 클레이드를 형성함 (그림 3)

□ 후보문 JS1 유전체 분석을 통한 대사 기작 파악

- 유전체 분석을 위한 시료 선정 및 다양성 분석
 - 메탄 하이드레이트가 관찰된 동해 퇴적물 시료(Lee et al., 2013), 지구 물리 탐사를 통해 메탄 발생 증거가 보고된 로스해 퇴적물 시료(Geletti R & Busetti, 2011) 및 기존의 메탄 방출 지역에서 보고된 JS1에 비해 16S rRNA 유전자유사도는 낮으나, 확보된 유전체의 커버리지가 22%로 낮은 Aarhus Bay 시료(Webster et al., 2011 및 Nobu et al., 2015a)를 관련 연구자로부터 받아, 16S rRNA 유전자 염기서열 기반 다양성 분석(그림 4)

표 2. 다양성 및 유전체 분석 시료 목록

시료명	위치	서식처
Aarhus bay_M5	Aarhus bay, Denmark	해양 퇴적물
2016ES-GC01-16	East Sea, Korea	해양 퇴적물
NHJ120211-05	Ross Sea, Antarctica	해양 퇴적물

- 전체 세균 군집 중, JS1은 동해, 로스해, Aarhus Bay시료에서 각각 76.0%, 32.2%, 및 9.7%를 차지함을 확인하였고(그림 4), 해당 시료에 대한 메타지놈 분석 수행

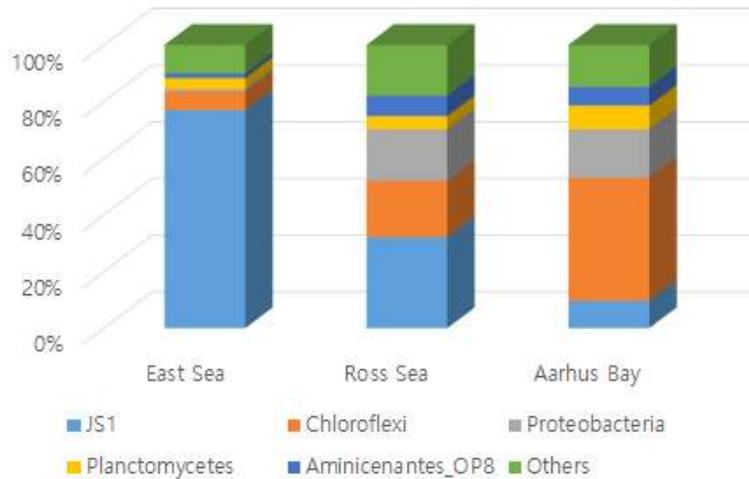


그림 4. 16S rRNA 유전자 기반 세균 군집

- MiSeq (2 x 300 bp)을 통해 획득된 메타지놈의 염기서열 분석
 - 1) 염기서열 품질 체크
 - Skewer v0.2.2 프로그램 (Jiang et. al., 2014)을 활용하여 각 시료로부터 생산된 metagenomic reads들을 Q30 및 최소 read 길이 200 bp를 기준으로 1차 QC 진행
 - BWA 및 BLAST 방법을 활용하여 phiX 염기서열과 관련된 reads를 추출하고 제거하여 2차 QC 진행
 - 2차 QC를 통해 East Sea, Ross Sea, Aarhus Bay data 각각은 약 12.27 Gb, 11.57 Gb, 11.18 Gb, (84.88%, 77.30%, 72.39%, of total reads)의 고품질의 paired reads data를 확보 (표 3)

표 3. 메타지놈 염기서열 QC 결과

	East Sea	Ross Sea	Aarhus Bay
No. of total pairs	24,905,893	25,649,780	26,885,713
No. of pairs filtered out by QC	2,957,117	5,517,895	6,991,268
No. of short read pairs (<200bp) after QC	799,325	291,327	417,568
No. of empty read pairs after QC	62	8	3
No. of available pairs	21,141,034	19,826,005	19,461,319
Average size of reads after QC (bp)	290.17	291.78	287.29
Total size after QC (Gbp)	12.27	11.57	11.18

2) 메타지놈 어셈블리

: QC 완료된 read를 활용하여 k-mer size 31, 41, 51, 61, 71, 81을 각각 활용하여 시료별 어셈블리 진행

▪ 동해 시료

표 4. k-mer 길이를 이용한 동해 시료 어셈블리 결과

Samples	K-mer size	No. of contigs	Assembled size (bp)	GC ratio	Maximum contig size (bp)	N50	No. of more than 5kb	Size of more than 5kb (bp)
East Sea	31	33,273	77,737,130	39.73	65,271	2,598	2,396	21,964,866
East Sea	41	32,349	78,646,660	39.27	70,218	2,819	2,631	24,432,170
East Sea	51	32,182	79,045,339	38.79	77,655	2,851	2,691	25,293,703
East Sea	61	30,133	74,592,150	38.57	113,189	2,912	2,516	24,140,380
East Sea	71	27,114	68,592,886	38.39	77,748	3,016	2,350	23,330,297
East Sea	81	24,955	63,270,510	38.25	94,925	2,999	2,107	21,678,719

- 약 63 ~ 79 Mb 가량으로 조립되며, 전체 G+C 함량은 38 ~ 39%를 보임
- 조립된 서열은 k-mer 71에서 가장 높은 N50 값을 보였음. 하지만, 이는 k-mer 51에 비하여 assembled size가 8 Mb 이상 적으며, 또한, contig binning 등을 수행 시 error율이 낮아지는 5kb 이상의 contig 수도 51에 비하여 현저히 낮음
- 또한, 기존 시료에서 확보한 JS1 16S rRNA 염기서열과 비교한 결과, k-mer 51에서 생산된 조립 서열에서 가장 높은 score 값 (373)을 보임. 여러 정보를 바탕으로 k-mer 51을 사용하여 조립된 서열을 최종 조립 서열로 선정

▪ 로스해 시료

표 5. k-mer 길이를 이용한 로스해 시료 어셈블리 결과

Samples	K-mer size	No. of contigs	Assembled size (bp)	GC ratio	Maximum contig size (bp)	N50	No. of more than 5kb	Size of more than 5kb (bp)
Ross	31	43,298	125,326,188	45.07	132,356	3,868	4,530	54,191,731
Ross	41	45,302	130,066,719	44.79	226,745	3,904	4,758	57,487,764
Ross	51	45,459	128,559,744	44.58	226,745	3,816	4,455	56,232,231
Ross	61	44,145	122,915,426	44.36	249,147	3,666	4,156	53,121,388
Ross	71	42,459	116,766,487	44.18	252,593	3,562	3,768	49,436,252
Ross	81	40,692	110,535,198	44.03	316,896	3,453	3,407	45,876,789

- 조립된 서열은 k-mer 41에서 가장 높은 N50을 보이며, 또한 가장 큰 조립 서열 크기를 지님. 이를 최종 조립 서열로 선정

▪ Aarhus Bay 시료

표 6. k-mer 길이를 이용한 동해 시료 어셈블리 결과

Samples	K-mer size	No. of contigs	Assembled size (bp)	GC ratio	Maximum contig size (bp)	N50	No. of more than 5kb	Size of more than 5kb (bp)
Aarhus	31	33,953	97,402,057	50.32	101,631	3,887	3,570	42,616,344
Aarhus	41	34,781	100,110,684	50.39	148,936	4,082	3,711	45,463,659
Aarhus	51	34,792	98,043,122	50.52	158,610	3,925	3,601	43,820,670
Aarhus	61	33,968	93,764,009	50.55	175,770	3,752	3,407	40,430,473
Aarhus	71	32,667	87,783,556	50.48	230,950	3,512	3,147	36,003,563
Aarhus	81	30,968	80,006,266	50.5	280,488	3,147	2,735	30,238,228

- Aarhus Bay 데이터는 약 80 ~ 100 Mb 가량으로 조립되며, 전체 GC 함량은 50.3 ~ 50.6%를 유지 하는 것으로 계산됨
- 조립된 서열은 k-mer 41에서 가장 높은 N50을 보이며, 또한 가장 큰 조립 서열 크기를 지님 따라서 이를 최종 조립 서열로 선정

3) JS1 유전체 확보, 유전자 정보 추출

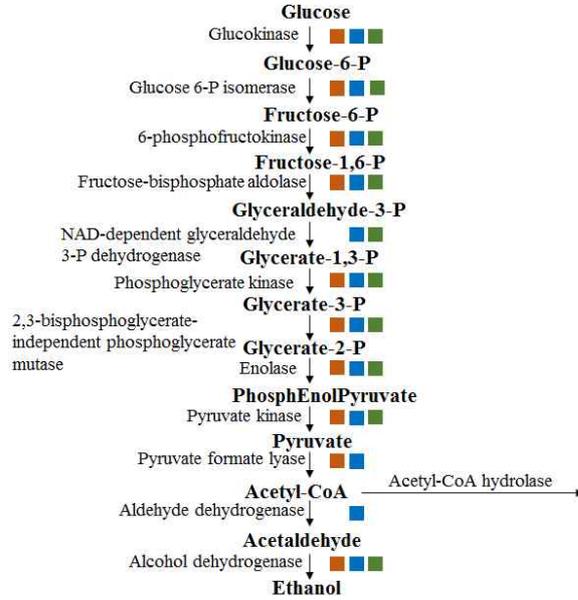
- 조립된 서열로부터 GC 함량과 coverage를 기반으로 JS1 유전체 확보 (표 7)
- 확보된 JS1 유전체의 GC 함량은 34.2%~35.6% 범위로, 확보된 지역과 관계없이 유사한 값을 나타냄

표 7. JS1 유전체 정보 요약

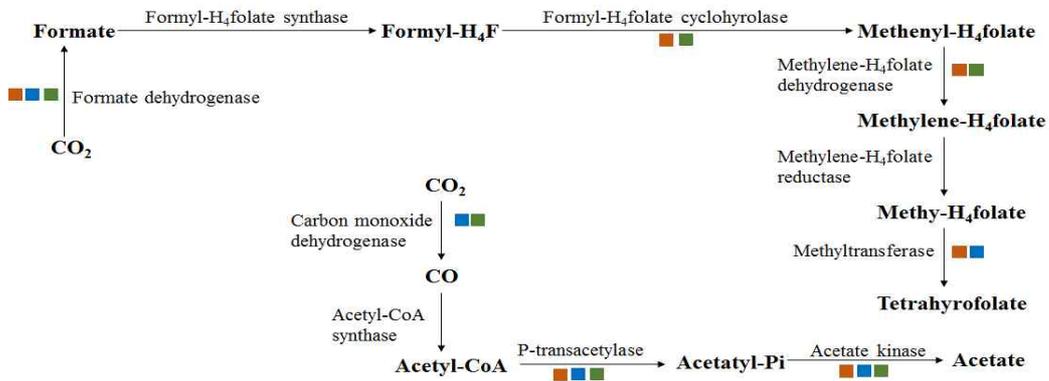


- RAST 서버(<http://rast.nmpdr.org/>)를 통해 유전자 정보 추출 및 대사 기작 분석
- : 혐기환경에서 유기물을 발효를 통해 분해하는 해당과정에 관련된 대부분의 유전자 보유하고 있는 것으로 나타남(그림 5a). 이는 기존에 호수와 생물반응기에서 MethylMalonyl-CoA (Mmc) pathway를 통해 propionae를 pyruvate로 분해한다고 알려진 JS1 유전체와 다른 특성임(Nobu et al., 2015a)
- : 역반응을 통해 Wood-Ljungdahl pathway를 통해 생성한 수소나 이산화탄소를 메탄생성 고세균이 활용한다는 기존의 보고(Gies et al., 2014)와 달리 해당 pathway의 유전자는 모두 관찰되지 않음(그림 5b). 대신 Nobu et al(2015b)이 제안한 공생 아미노산 분해(syntrophic amino acid degradation) pathway를 활용하여(그림 5c) 메탄생성 고세균에 필요한 기질을 공급하는 것으로 생각됨

(A) Fermentation



(B) Wood-Ljungdahl pathway



(C) Syntrophic amino acid pathway

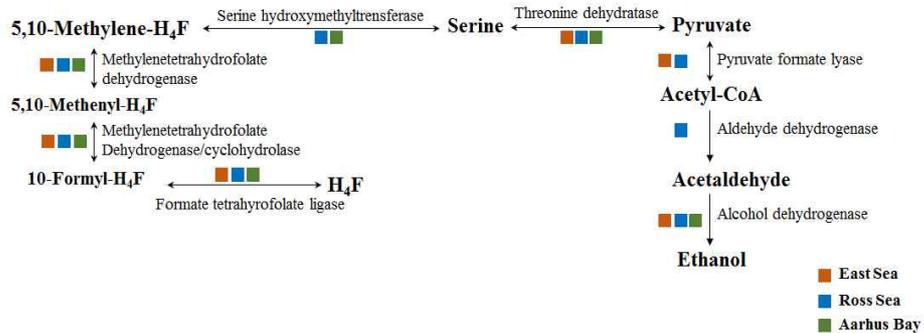


그림 5. JS1 유전체의 대사기작 유전자 정보.

(A) 발효 기작 (B) Wood-Ljungdahl pathway (C) Syntrophic amino acid degradation pathway

4) 획득한 JS1 유전체의 분포 환경에서 대사 기작 유추

- 메탄 분출 지역이나 분출의 증거가 예측되는 해양 퇴적물에서 JS1은 다양한 아미노산, 올리고당 또는 단당을 발효시키고, 이 결과 생성된 아세트산이나, 이산화탄소나 수소를 메탄생성 고세균이 이용하여 메탄을 생성할 것으로 예측됨

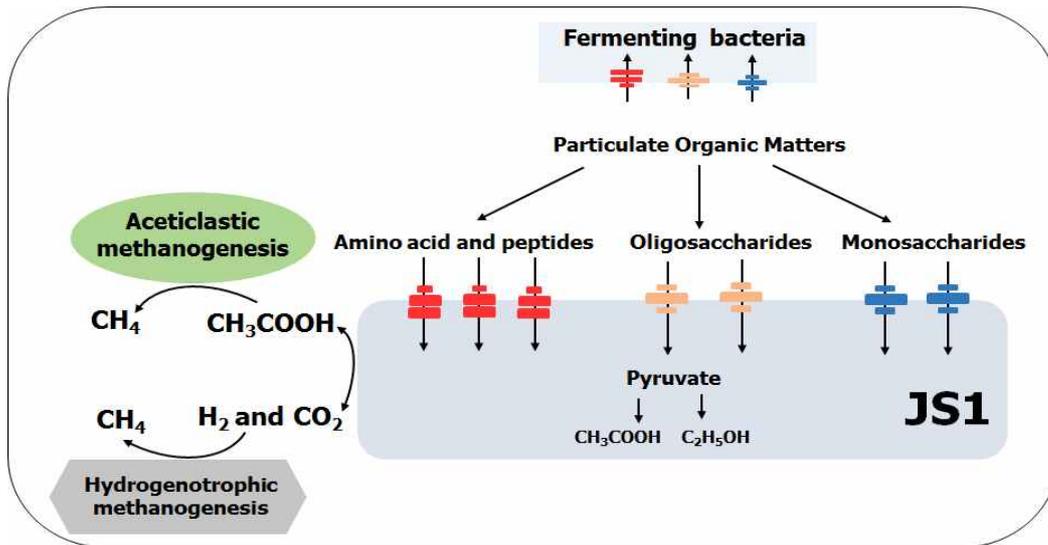


그림 6. 메탄 분출 지역이나 메탄 분출의 증거가 예측되는 해양 퇴적물에서 JS1의 기능



제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

가. 연구기간 :총 1년 (2017.04.01. ~ 2018.03.31.)

나. 목표 달성도

총연구기간내 연차별 목표 대비 달성율(%)					
구분	연차별 달성내용				연차별 계획대비 연구실적 달성율(B) (%)
	세부연구목표	연구내용	가중치 (A)	달성실적	
1년차 (2017)	○ JS1 그룹 세균의 지역 및 서식처에 따른 분포 양상	<ul style="list-style-type: none"> - NCBI, EzTaxon, RDP 등의 공개DB에서 JS1 16S rRNA 유전자 염기서열 및 메타데이터 추출 - 유사도 분석을 통한 클러스터링 및 계통학적 분석 - 지역별 서식처별 분포 - 패턴 분석 	0.5	<ul style="list-style-type: none"> - NCBI에서 JS1 16S rRNA 유전자의 메타 데이터 추출 완료 - 계통학적 분석 완료 - 지역별 또는 서식처별 분포 패턴 분석 완료 	90
	JS1 그룹 세균의 대사 기작 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 단일세포분석 또는 메타지놈 분석을 통해 확보된 JS1 유전체의 대사 기작 분석 	0.5	<ul style="list-style-type: none"> - 유전체 분석을 통한 대사 기작 분석 완료 	100
	계		1.0		95

다. 대외기여도

(1) 과학 분야

후보문 JS1의 생태적 기능에 대한 이해 확대

- 본 연구를 통해 파악한 후보문 JS1의 분포 분포 및 유전체 분석 결과를 통해 혐기 환경 중, 메탄 분출 지역에서 풍부하게 관찰되는 JS1의 생태적 기능에 대한 이해 확대
- 차세대 염기서열을 활용하는 바 생물정보학적 기술 발전에 기여하고, 생물정보학적 기반 정보는 배양체 확보를 위한 정보로 사용되어 미확보 미생물의 배양체 획득에 기여

(2) 사회/경제적 분야

새로운 생물자원과 유전자원의 확보 기여

- 공개 데이터베이스의 활용으로, 시료 확보에 대한 비용 절감 및 연구범위 확대를 통해 신생명자원 부가가치를 지닌 유전자원 확보 및 생명공학 발전에 기여

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

가. 연구개발결과의 국제 사회 활용 방안

본 연구에서 도출된 결과의 국제 학회 발표 및 논문화

나. 연구개발결과의 추후 연구 활용 방안

JS1을 포함한 후보문 미생물의 기능연구를 위한 네트워크 확립용 자료로 활용

- 차세대 염기서열분석법의 비약적인 발전과 함께 그동안 알려져 있지 않은 후보문의 범위가 확대되고 있고, 이들의 기능을 이해하기 위해 연구자들의 관심도 높아지고 있음
- 후보문의 기능을 이해하기 위해서는 시료 획득부터, 배양, 유전체 분석등 다양한 연구 분야의 협력이 필요한데, 후보문에 대한 연구를 국제 학회 후, 연구자들의 관심과 함께 기존에 연구해왔던 지역의 시료를 제공 받을 수 있었음
- 따라서 본 과제에서 획득한 연구결과의 국제 사회 보고는 해당 연구자들과의 협력을 증진하는 토대가 될 것으로 생각되고, 이러한 네트워크는 후보문 미생물의 기능에 대한 이해를 향상시킬 것으로 생각됨

본 연구를 통해 파악된 대사기작 특성을 배양에 활용

- 본 연구를 통해 JS1은 다양한 기질을 사용하여 발효를 통해 성장할 뿐 아니라, 다른 메탄 생성 고세균과 공생관계를 통해 성장하는 것으로 예측됨
- 이러한 대사기작을 바탕으로, 다양한 기질 첨가 또는 메탄생성 고세균과 함께 배양 (co-culture)하는 것을 배양률을 높이기 위한 방법으로 활용할 수 있을 것으로 판단됨

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음

제 7 장. 참고문헌

- Parkes et al (2014) A review of prokaryotic populations and processes in sub-seafloor sediments, including biosphere:geosphere interactions. *Marine Geology* 409-425.
- Farag et al. (2014) Global patterns of abundance, diversity and community structure of the Aminicenantes (candidate phylum OP8). *PLoS ONE* e92139
- Carr et al. (2015) Abundant Atribacteria in deep marine sediment from the Adélie Basin, Antarctica. *Frontiers in Microbiology*
- Nobu et al. (2015a) Phylogeny and physiology of candidate phylum 'Atribacteria' (OP9/JS1) inferred from cultivation-independent genomics. *The ISME journal*
- Dhillon etl al (2012) Molecular Characterization of Sulfate-Reducing Bacteria in the Guaymas Basin. *Appl. Applied and Environmental Microbiology* 2765-2772
- Edgar et al. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 2460-2461
- Tamura et al (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 2725-2729
- Felsenstein (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 368-376
- Jiang et. al. (2014) Skewer: a fast and accurate adapter trimmer for next-generation sequencing paired-end reads. *BMC bioinformatics* 182
- Lee et al. (2013) Microbial community structures of methane hydrate-bearing sediments in the Ulleung Basin, East Sea of Korea. *Marine and Petroleum Geology* 136-146
- Geletti R & Buseti, (2011) A double bottom simulating reflector in the western Ross Sea, Antarctica. *Journal Of Geophysical Research*
- Webster et al (2011) Enrichment and cultivation of prokaryotes associated with the sulphate - methane transition zone of diffusion-controlled sediments of Aarhus Bay, Denmark, under heterotrophic conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 248-263
- Gies et al (2014) Illuminating microbial dark matter in meromictic Sakinaw Lake. *Applied and Environmental Microbiology* 6807-6818
- Nobu et al (2015b) Microbial dark matter ecogenomics reveals complex synergistic networks in a methanogenic bioreactor *The ISME journal* 1710-1722

주 의

1. 이 보고서는 극지연구소에서 수행한 기본연구사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 수행한 기본연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.