

다중 환경스트레스에 대한
남극 무척추동물의 스트레스 방어 및 적응
기작 규명

A Mechanistic study on Multi-Abiotic Stresses
Tolerance and Adaptation in Antarctic Invertebrates



인천대학교 산학협력단

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지유전체 101 프로젝트: 극지생물 유전체 정보 분석 및 활용 기반 구축” 과제의 위탁연구 “다중 환경스트레스에 대한 남극 무척추동물의 스트레스 방어 및 적응 기작 규명에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



(본과제) 총괄연구책임자 : 김 진 형
위탁연구기관명 : 인천대학교
위탁연구책임자 : 김 연 정
위탁참여연구원 : 조 은 아
“ : 서 도 연
“ : 하 유 나
“ : 최 영 은
“ : 박 아 현
“ : 정 재 우
“ : 김 영 진
“ : 김 종 희
“ : 이 원 휘

보고서 초록

위탁연구과제명	다중 환경스트레스에 대한 남극 무척추동물의 스트레스 방어 및 적응 기작 규명				
위탁연구책임자	김 연 정	해당단계 참여연구원수	9	해당단계 연구비	200,000,000원
연구기관명 및 소속부서명	인천대학교 해양학과		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	
<p>본 위탁 과제의 최종 목표는 다중 환경 스트레스(온도차, 자외선, 독성원 노출 등)에 따른 남극 서식 무척추동물의 생활사별 생리적 반응 및 유전체 그리고 후성유전체 변이를 추적하여, 남극 무척추동물의 체내 방어 및 적응 반응을 이해함으로써, 최종적으로 이들 반응 Key signature 및 작용 기전들을 기후변화 및 해양환경오염에 노출되어있는 개체군의 건강성 유지를 제어할 수 있는 바이오마커를 활용함으로써 환경 대응 전략을 제시하고, 스트레스 방어기작에 관여하는 신규 분자 발굴을 통해 산업적 활용가치를 제고하고자 하였음</p> <p>이를 위해 1차년도에는 남극 채집 무척추동물 중 실험실내에서 사육가능한 생물로서 윤충류와 요각류를 대상으로 종들을 선별하여 다양한 환경 스트레스 노출조건을 확립하였으며, 이들 스트레스에 대한 생리적 반응을 분석하였음. 이중 온도 스트레스에 대한 윤충류와 요각류 두 종에 대한 전사체 프로파일을 확보하여 고온 스트레스에 대한 적응 관련 유전자 정보를 확보하였음</p> <p>2차년도에는 확립된 환경 스트레스 노출 조건에서 추가 종들에 대한 노출실험을 통해 생리적 변화 및 전사체 변화를 분석하였으며, 고온 스트레스 조건에 대한 후성유전체 (DNA methylation) 관련 유전자들의 변화를 확인함으로써 남극 무척추동물의 고온에 대한 저항 혹은 스트레스 관련 기작을 규명하였음</p> <p>3차년도에는 남극 서식 요각류를 대상으로 다중스트레스 조건에서의 영향을 파악하고 DNA 메틸화 양상을 비교함으로써 가장 유해한 다중스트레스 조건을 파악하였으며, 또한 비극지권 요각류와의 전사체 결과를 비교함으로써 남극 생물종 특이 스트레스 방어 유전자를 선별하고, 이를 통해 관련 기작을 규명할 수 있는 자료를 확보할 수 있었음</p>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	남극 요각류, 남극 윤충류, 다중 환경 스트레스, 전사체, DNA 메틸화			
	영 어	Antarctic Copepod, Antarctic Rotifer, Multi-abiotic stress, Transcriptomics, DNA methylation			

요 약 문

I. 제 목

다중 환경스트레스에 대한 남극 무척추동물의 스트레스 방어 및 적응 기작 규명

II. 연구개발의 목적 및 필요성

다중 환경 스트레스(온도차, 자외선, 독성원 노출 등)에 따른 남극 서식 무척추동물의 생활 사별 생리적 반응 및 유전체 그리고 후성유전체 변이를 추적하여, 남극 무척추동물의 체내 방어 및 적응 반응을 이해함으로써, 최종적으로 이들 반응 Key signature 및 작용 기전들을 기후변화 및 해양환경오염에 노출되어있는 개체군의 건강성 유지를 제어할 수 있는 바이오마커를 활용함으로써 환경 대응 전략을 제시하고, 스트레스 방어기작에 관여하는 신규 분자 발굴을 통해 산업적 활용가치를 제고하고자 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 남극 서식 무척추동물 확보 및 다중 환경스트레스에 대한 전사체 프로파일 확보
2. 다중 환경스트레스와 스트레스 방어 및 적응 기작 관련 유전자들의 상호작용 연구
3. 비극지권 생물과의 비교연구를 통한 차별화된 스트레스 방어 기작 도출 및 key signature 발굴

IV. 연구개발결과

1. 남극 서식 무척추동물 확보 및 다중 환경스트레스에 대한 전사체 프로파일 확보
 - 남극 서식 로티퍼와 요각류 중 각각 2종 확보 및 단일 환경스트레스 조건에서의 생리적 반응 분석
 - 온도스트레스 조건에서의 로티퍼 및 요각류의 전사체 프로파일 확보
2. 다중 환경스트레스와 스트레스 방어 및 적응 기작 관련 유전자들의 상호작용 연구
 - 온도+3종의 독성원 다중 노출시 남극 서식 요각류의 생리적 반응 분석을 통한 유해성 등급화 완료
 - 남극 서식 로티퍼 및 요각류의 후성유전체 관련 유전자 목록 확보
3. 비극지권 생물과의 비교연구를 통한 차별화된 스트레스 방어 기작 도출 및 key signature 발굴
 - Functional study를 통해 남극 서식종과 차별화된 스트레스 방어 기작 발굴 및 Key signature 유전자 발굴

V. 연구개발결과의 활용계획

기후변화와 다른 환경 스트레스가 노출되었을 때 남극 무척추생물들의 방어 및 적응 가능성을 사전에 타진해봄으로써 남극 환경 보호를 위한 관리방안을 제시할 수 있을 것임.

S U M M A R Y

I. Title

A Mechanistic study on Multi-Abiotic Stresses Tolerance and Adaptation in Antarctic Invertebrates

II. Purpose and Necessity of R&D

The major goal of the study is to provide the integrated understanding about the defense and adaptation responses of Antarctic invertebrates exposed to multiple environmental stresses (temperature, UV, toxicants, etc.) through analysis of the physiological responses, genomic and epigenomic changes. By using key signatures and mechanisms of action to maintain the health of Antarctic invertebrates exposed to climate change and marine environmental pollution, we propose environmental control strategies and discover new molecules involved in stress defense mechanisms.

III. Contents and Extent of R&D

1. Acquisition of Antarctic Invertebrates and analysis of transcriptomic Profiles for Multiple Environmental Stresses
2. Study on interaction between multiple environmental stresses and stress defense/adaptation mechanism related genes
3. Derivation of extinct stress defense mechanisms and key signatures through comparative research with non-polar species

IV. R&D Results

1. Acquisition of Antarctic Invertebrates and analysis of transcriptomic Profiles for Multiple Environmental Stresses
 - 2 species of Antarctic rotifers and 2 species of Antarctic copepods
 - Analysis of physiological responses under single environmental stress conditions
 - Analysis of transcriptomic profile of rotifers and copepods under thermal stress
2. Study on interaction between multiple environmental stresses and stress

defense/adaptation mechanism related genes

- Analysis of Physiological Responses under multi-stressor (Temperature + 3 Toxicants) and Hazard rating
 - List of genes related to epigenomics of Antarctic rotifers and copepods
3. Derivation of extinct stress defense mechanisms and key signatures through comparative research with non-polar species

V. Application Plans of R&D Results

When climate change and other environmental stresses are exposed, the possibility of protection and adaptation of Antarctic invertebrates can be inspected in advance, suggesting management plan for Antarctic environmental protection.



목 차

제출문	1
보고서 초록	2
요약문	3
Summary	4
목차	6
제 1 장 서론	7
제 1 절 연구개발의 목적	7
제 2 절 연구의 필요성	9
제 2 장 국내외 기술개발 현황	11
제 1 절 관련 연구 동향	11
제 2 절 본 과제와의 연계성	14
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	15
제 1 절 남극 서식 무척추동물 종확보 및 다중 환경스트레스 노출 조건 확립	15
제 2 절 다중 환경스트레스 조건별 생리적 변화 분석	22
제 3 절 다중 환경스트레스 노출에 따른 전사체 프로파일 확보 및 분석	34
제 4 절 다중 환경스트레스와 스트레스 방어 및 적응 기작 관련 유전자들의 상호작용 연구	36
제 5 절 비극지권 생물과의 비교연구를 통한 차별화된 스트레스 방어 기작 도출 및 key signature 발굴	49
제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	53
제 1 절 연구개발 목표 달성도	53
제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도	55
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	56
제 6 장 참고문헌	57

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적

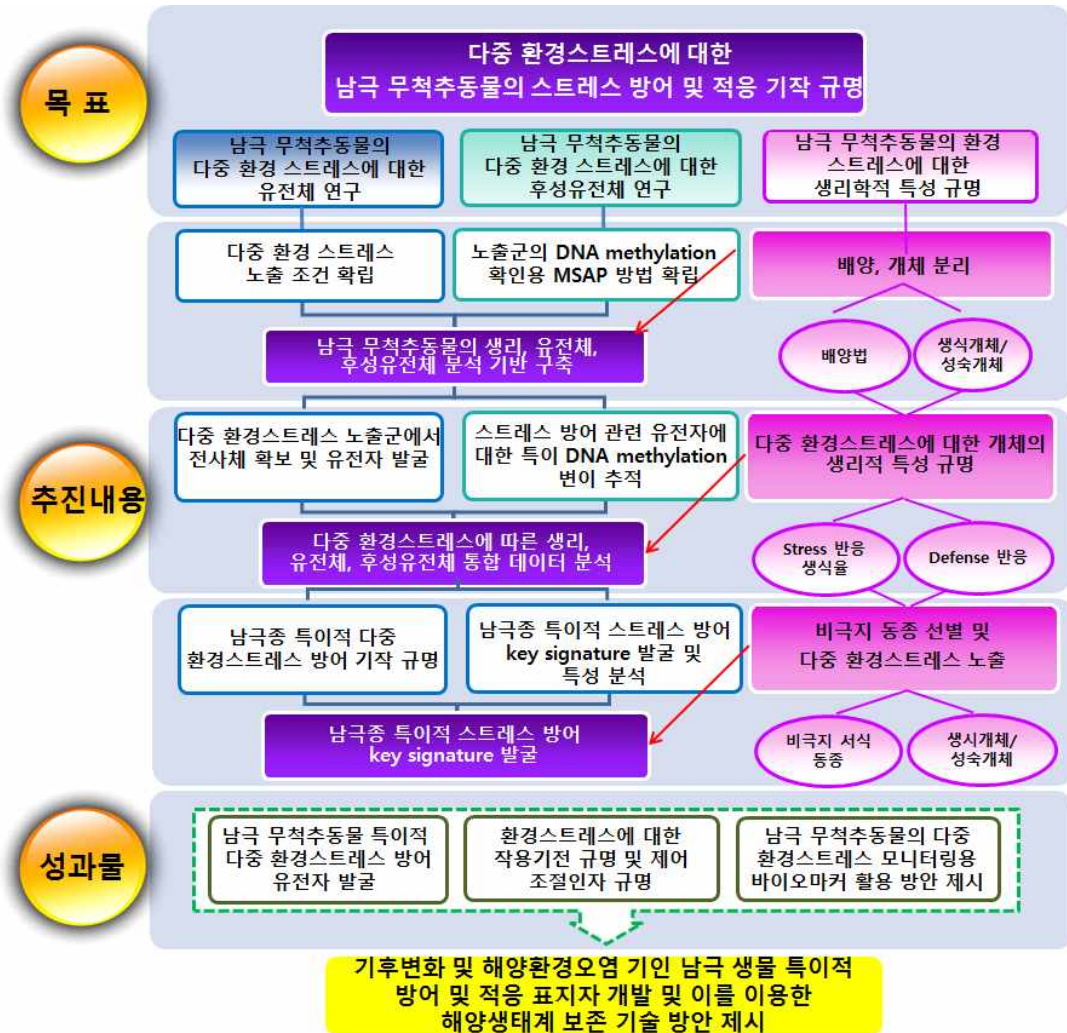
1. 최종 목표

- 본 위탁 과제 of 최종 목표는 다중 환경 스트레스(온도차, 자외선, 염농도차, 독성원 노출 등)에 따른 남극 서식 무척추동물의 생활사별 생리적 반응 및 유전체 그리고 후성유전체 변이를 추적하여, 남극 무척추동물의 체내 방어 및 적응 반응을 이해함으로써, 최종적으로 이들 반응 Key signature 및 작용 기전들을 기후변화 및 해양환경오염에 노출되어있는 개체군의 건강성 유지를 제어할 수 있는 바이오마커를 활용함으로써 환경 대응 전략을 제시하고, 스트레스 방어기작에 관여하는 신규 분자 발굴을 통해 산업적 활용가치를 제고하고자 함.

2. 연차별 연구목표 및 연구범위

연차	연구 목표	연구 범위
1차년도 (2017)	다중 환경스트레스에 의한 남극 서식 무척추동물 확보 및 전사체 프로파일 확보	· 실험실내 사육가능 무척추동물종 선별 및 개체 확보
		· 다중 환경스트레스 노출 조건 및 시스템 확립
		· 스트레스 조건별 노출 후 생식률, 스트레스 반응 조사 및 RNA 및 DNA 확보
		· RNA-Seq 방법을 이용한 전사체 프로파일 확보 및 스트레스 조건별 유전자 변화 해석
2차년도 (2018)	다중 환경스트레스와 스트레스 방어 및 적응 기작 관련 유전자들의 상호작용 연구	· 다중스트레스 조건별 생리적 변화 및 전사체 분석
		· 전사체 정보로부터 스트레스 방어 (Stress defense, SD) 및 적응 기작 관련 유전자 확보
		· 스트레스 조건별 후성유전체(DNA methylation) 변화 확인
		· 전사체 및 후성유전체 통합분석을 통한 개체 방어 및 적응 기작 규명
· 다중 환경스트레스 조건별 유해성 등급화 분석을 통해 생물정보를 이용한 환경관리 방안 제시		
3차년도 (2019)	비극지권 생물과의 비교연구를 통한 차별화된 스트레스 방어 기작 도출 및 key signature 발굴	· 비극지권 서식 동일 종(속) 선별 및 환경 스트레스 노출후 전사체 분석 및 비교
		· Functional study를 통해 남극 서식종과 차별화된 스트레스 방어 기작 발굴 및 Key signature 유전자 발굴
		· Key signature 유전자/단백질에 대한 특성 분석 및 산업적 활용 가능성 타진

3. 연구 추진 체계



제 2 절 연구의 필요성

1. 남극 서식 생물들의 특이 환경스트레스 방어 및 적응 기작 이해를 통한 생태적, 환경적 & 산업적 활용 연구의 필요성

- 해양 환경오염과 기후변화는 범지구적 현안으로, 특히 남극지방의 경우 지리적, 환경적, 생태적 특이성 및 중요성 때문에 남극 해양생태계라는 거시적 관점에서 각 지위에 해당하는 생물종들을 대상으로 환경 변화에 대한 영향 평가가 다양하게 시도되고 있음.
- 남극 해양생태계에 가해지는 환경 스트레스 및 오염원의 종류가 점차 다양해지고 있어, 해양 생물종들은 이러한 환경변화에도 불구하고 항상성(hometostasis)을 유지하기 위해 좁게는 세포내에서 발생하는 생리적 반응에서부터 크게는 개체 수준에서 발생하는 형태적인 변화, 적응 및 후성유전학적 변화 (epigenetic change)등을 통해 진화에 이르기까지 다양한 기작들이 관여하게 된다. 특히 성장, 생식, 방어 등의 생활사의 시기별로 내외부적 자극이 달라짐에 따라 반응하는 양상이 달라지게 됨. 따라서 생활사 전략에 따른 환경 스트레스에 대한 반응을 연구할 필요가 있음.

Tissues	Experimental groups	Hazard Quotients (HQ)	Class of Hazard	Level
Digestive glands	Cd	8.9	Moderate	
Digestive glands	Ac	7.99	Slight	
Digestive glands	W	5.92	Slight	
Digestive glands	Ac+Cd	8.62	Moderate	
Digestive glands	W+Cd	6.13	Moderate	
Digestive glands	W+Ac	1.9	Slight	
Digestive glands	W+Ac+Cd	5.5	Moderate	

그림 1. Weight of Evidence (WOE) classification of biomarkers data, in scallops exposed to different laboratory conditions. The quantitative Hazard Quotients (HQ) and the assigned classes of hazard are given.

- 또한 그림 1은 이매패류의 일종인 *Adamussium colbecki*을 대상으로 중금속, 산성화, 건조 스트레스를 단일 혹은 다중으로 노출시키고 그에 따른 산화적 스트레스 관여 효소들의 발현 정도를 이용하여 아래와 같이 유해성을 등급화하고 (Benedetti et al.(2016)) 이를 통해 남극의 각 지역별 해양환경 조건에 따라 생태계 관리 방안을 제시하는 방법을 응용하여, 본 연구에서 적용할 무척추동물 종에 대해 온도차, 산성화, 자외선, 건조, 염농도차, 독성원 노출 등과 같은 다양

한 환경 스트레스를 조합하여 노출 시키고 그에 따른 영향을 조사하고 환경관리 정책에 활용될 수 있는 형태의 자료를 제공하는 노력이 필요하다고 판단됨.

2. 남극 해양생태계에서 무척추동물의 중요성 및 연구재료로서 유용성 제언

- 담수 및 해수 서식 무척추동물은 먹이사슬에서 중요한 niche를 차지하고 있어, 다양한 분야에서 연구되어 왔음. 특히 남극 해수에 서식하는 것으로 알려진 무척추동물로는 물곰으로 알려진 완보동물(Tardigrada), 갑각류 (Daphnia, Copepod, Amphipod 등), Rotifer, 해면 및 복족류, 가리비 등 다양한 형태로 존재함. 이들은 남극의 극한 환경에서 서식하며 다양한 스트레스에 대한 방어 및 적응 기작을 갖추고 있는 것으로 보고되며, 생태학적 중요성 및 유용성 물질 탐색을 위한 연구대상으로 활용되고 있음. 그러나 대부분의 연구들은 단일 환경 스트레스 (예; 저온 스트레스)에 대한 생리적, 분자적 수준에서의 변화 탐색 위주로 국한되어 있어, 다중의 환경 스트레스(온도차, 산성화, 자외선, 건조, 염농도차, 독성원 노출 등)가 복합적으로 가해지는 남극 해양 환경의 실제 상황을 반영하기 어렵고, 또한 개체의 생존 혹은 생리적 특성 분석 수준에서 조사한 경우가 대부분으로 통합적 유해 작용 기작을 규명하기 어려움.
- 또한 일부 남극 서식 무척추동물 종들 (soft-shelled clam *Laternula elliptica*, sea cucumber *Cucumaria georgiana*, sea urchin *Sterechinus neumayeri*, seastar *Odontaster validus*)은 유생이 성체보다 고온 스트레스에 저항성이 높으며 이는 생활사별 산소이용에 대한 제한때문이라고 추정하며 추가적 기전 규명이 필요하다고 보고함. 따라서, 다중 환경스트레스에 대한 생활사별 개체의 노출에 대한 연구가 필요함 (Peck et al., 2013).
- 극지 해양생물자원을 이용한 산업화에 적용할 때 가장 큰 Bottleneck은 대상 극지 서식 생물종의 배양 혹은 사육 기술이 정착되지 않은 점으로 배양을 획기적으로 개선할 수 있는 기술 개발을 위해서는 실험실 수준에서 환경 변화에 따른 생활사에 따른 개체의 변화 및 적응 기작을 규명을 통한 배양 기술의 확립이 필요함.
- 이에 남극 해양 환경이라는 다양하고 독특한 환경에서 우점하고 있고, 먹이사슬에서 생산자 바로 위 단계에서 중요한 역할을 수행하고 있으며, 각종 해양동물의 먹이가 되며, 특히, 크기가 작은 무척추동물의 경우 생활사가 비교적 단순하여 배양 기술이 확립될 경우, 다른 생물종에 비해 다중 환경 스트레스에 대한 생리적 및 분자적 수준의 영향을 평가하기에 유용한 모델이라고 판단됨.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 관련 연구 동향

1. 남극 서식 무척추동물에 대한 유전체 분석 연구 현황

- 남극의 해양 무척추동물의 종 판별 및 Phylogeny 분석을 위한 barcode 서열을 구축하고 이를 이용하여 남극 지역내에 종분포도를 조사하였으며 이를 이용하여 진화적 유전자 흐름 양상을 파악하기 위해 활용하는 연구도 진행중임 (Riesgo et al.,2015).
- 다양한 무척추동물들의 보고되어진 haploid Genome size를 조사한 표 1 (출처: www.genomesize.com)를 보면, 사람의 genome size가 3.5 pg인 것을 감안하면 Size가 큰것부터 작은 것까지 다양한 것을 알 수 있음. 남극의 최고등인 *Antarctic whelk*와 성게인 *Sterechinus neumayeri* 이외의 남극 무척추동물들의 genome size 분석 결과가 많지 않음을 알 수 있음. 환경 스트레스에 의한 전사체 및 후성유전체 분석을 위해서는 Genome size가 작은 종으로 우선 선별하여 연구를 수행하고자 하였음.

표 1. 무척추동물들의 haploid Genome size

Taxonomy (강/목)	Species	Genome size (pg)
Mollusca/ Gastropoda	<i>Antarctic whelk</i>	5.88
Echinodermata/ Echinoidea/sea urchin	<i>Sterechinus neumayeri</i>	0.69
Rotifer/Bdelloidea	<i>Habrotrocha constricta</i>	0.50
Arthropoda/ Copepoda	<i>Acanthocyclops robustus</i>	0.75
Arthropoda/ Branchiopoda	<i>Daphniopsis ephemeralis</i>	0.28
Arthropoda/ Branchiopoda	<i>Branchinecta paludosa</i>	2.77
Tardigrada/ Heterotardigrada	<i>Pseudechiniscus juanita</i>	0.60

- Genome size가 작은 개체를 중심으로 whole genome sequencing이 이뤄지고 있으나, 아직 많은 결과들이 보고되지 않은 상황이므로 추후 이들 생물종의 활용 가능성을 높이기 위해서는 유전체 분석이 필요하며, 이 과제에서 다루게 될 생물종의 whole genome 정보에 대해서는 본과제 연구팀과 협조하여 제공받아 연구에 활용하였음.
- 실제로 환경오염물질 스트레스에 대한 남극 서식 무척추동물의 전사체 수준의 분석 사례는 많지 않으나 한 예로, PCB, PFOS, PFOA 노출에 따른 amphipod인 *Gondogeneia antarctica*에서의 전사체를 분석하여 바이오마커로 활용 가능한 유전자를 발굴하였음 (Kang et al (2015)).

2. 남극 서식 무척추동물에 대한 후성유전체 분석 연구 현황

- 후성유전학(Epigenetics)은 DNA 염기서열 자체의 변화가 아닌 DNA 주변환경에 의해 유전자의 발현에 영향을 미치는 양상을 연구하는 분야로 이를 전체 유전체 차원에서 연구하는 것을 후성유전체학(Epigenomics)이라 하고, DNA 염기서열의 변화가 아닌, 외부 주위환경에 의한 변이는 크게 2가지로 DNA methylation과 Histone modification이 대표적이다. 후성유전적 코드는 염기서열보다 환경의 영향을 더 많이 받아 쌍둥이들의 후성유전적 프로파일을 비교해 보면, 비슷한 환경에서 함께 자란 쌍둥이에 비해서 멀리 떨어져 자란 쌍둥이 사이에서 그 프로파일의 차이가 크게 나타난다. 최근 질환과 후성유전체의 연관연구가 활발히 추진되고 있다. 하지만, 후성유전체학의 해양생물 적용 연구는 도입단계로 일부 연구진에 의해 몇 종의 남극 서식 해양생물종에서의 결과가 도출되고 있으나, 인간이나 식물처럼 응용되지 못하고 있음. 보다 다양한 해양생물의 유전체 정보가 보다 축적된 이후에 발전할 것으로 사료됨.
- 남극 서식 다모류인 *Spiophanes tcherniai*를 대상으로 온도 스트레스와 CpG 부위에서 DNA methylation 양상과의 상관성을 분석한 연구가 있음(Marsh et al. 2014). 발현 양상에서 차이는 관찰되었지만 gene 구조에 대한 명확한 정보의 부재로 조절 target 유전자를 찾기 어려웠으며 추가적인 연구가 필요하다고 제안하였음.
- 이에 본 연구에서는 유전체 구조에 대한 정보가 잘 갖춰진 생물종을 대상으로 전체 methylation 발현 profile 비교와 더불어 methylation에 관여하는 유전자들의 발현정도를 다른 생물종과 비교함으로써 후성유전학적 차이를 규명하고자 하였음.

3. 남극 서식 무척추동물에 대한 환경스트레스 영향 평가 연구 현황

- 해양 환경의 비정상적인 거동에 따라 공존 해양생물 군집의 구조와 기능이 변형되는 등 해양생태계가 큰 영향을 받고 있으므로 남극에 서식하며, 환경 스트레스에 민감한 종을 대상으로 생리 및 유전체의 융합연구를 통해 스트레스 방어 기작 및 적응 기작을 규명하는 것은 범세계적으로 어려운 현안을 해결하기 위해 반드시 필요한 선행과제임.
- 극지 서식 무척추동물들에 대한 환경스트레스 중 온도 및 건조 스트레스에 대한 영향 연구들의 보고사례는 많음. 이들 문헌을 보면, 일반적인 결빙에 의해 발생되는 여러 문제들을 해결하기 위해 결빙 내성 혹은 결빙 회피 전략을 통해 무척추동물이 생리적, 분자적 수준의 변화를 겪게 됨을 알 수 있음. 특히 물곰을 이용하여 연구한 보고들이 많음.

- Teets and Denlinger, (2014)는 문헌조사를 통해 남극 서식 arthropods 들을 대상으로 다양한 환경 스트레스에 따라 발현이 증가하는 유전자들을 발굴하였고 이들 유전자를 functional category에 따라 분류하고 각 유전자 발현을 야기하는 각 스트레스 조건을 함께 **그림 2**에 나타낸 것처럼 분석하였음. 이러한 결과들을 통해 스트레스 방어기작에 관여하는 유전자들에 대한 정보를 확보하고, 이를 추후 본 연구에서 관련 유전자 선별시 활용하였음. 일반적으로 보고된 Heat shock protein 및 defense mechanism에 관련된 유전자들이 다수 포함되어 있음 (Forster et al., 2009).

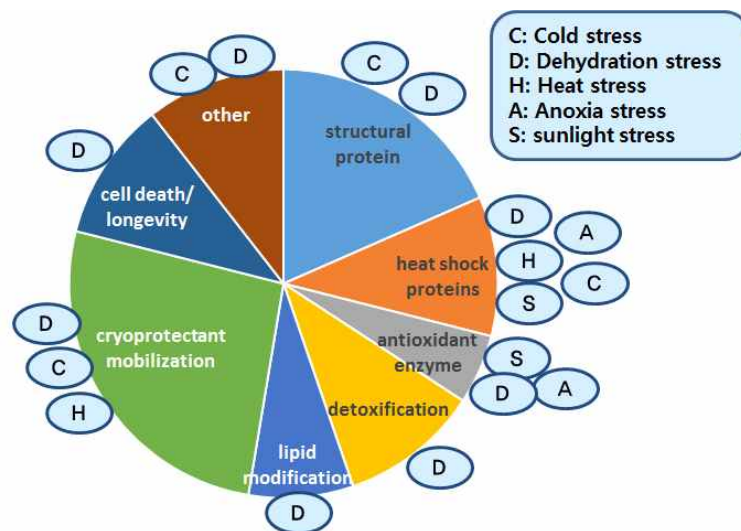


그림 2. Functional category of Stress-upregulated genes identified in Antarctic arthropods

- 남극대륙에 서식하는 생물종들에서 다양한 인간 활동 기인 유해화학물질의 농도가 높게 측정되고, 이와 관련된 생리적 영향 평가들이 최근 이뤄지고 있다. 예를 들어 선박을 통한 이동과정중 유류 오염, 연구 지역에서의 활동을 통한 중금속 오염 등 해수 및 저질에서 측정되는 주요 오염원임. 펭귄, 성게, 어류 등에서 과불화화합물 (perfluorinated compounds) 및 카드뮴 등의 중금속이 조직에서 유의한 수준으로 측정되고, 이들 생물들의 독성 반응(예; 산화적 스트레스, 지질 과산화, DNA 손상 등)에 대한 평가도 이뤄지고 있다. 이에 본 과제에서도 남극에서 노출 우려가 높은 PFOS 혹은 중금속 중 납(Pb)을 대상으로 무척추동물에 환경 스트레스의 조건으로 노출하고 독성 반응을 조사하였음.
- 또한 극지방이 아닌 해양 산성화와 온도 스트레스를 무척추동물에서 관찰한 문헌들도 다수 보고되었고, 이와 관련된 자료를 **표 2**에 제시하였다. 이러한 문헌들을 참고하여 환경스트레스 노출을 위한 조건 설정(노출 시기, 스트레스 조건, 다중 스트레스 조합 조건 등) 및 비교 대상 생물종 선정시 참고하였음 (Byrne & Przeslawsk 2013).

표 2. 해양 산성화와 온도스트레스에 따른 무척추동물 영향 평가 사례 예

Phylum, species	Stage placed in treatments	Levels of pH/pCO ₂ tested and level with significant effects on development	Temperatures tested and level with significant effects on development	Combined effects of warming+ acidification	Reference
Arthropoda					
<i>Amphibalanus improvus</i>	Juveniles	C: 8.08/388; E: 7.2/4000-7.8/1120; enhanced growth at 7.8; weaker skeleton at 7.4	C: 20°C; E: 24°C; increased shell strength at 24°C	ND	Pansch et al. (2013)
<i>Elminius modestus</i>	Juveniles	C: 7.96/413; E: 7.7/1076; decrease in growth at 7.7	C: 14°C; E: 19°C; ND	ND	Findlay et al. (2010a)
<i>Hyas araneus</i> ^a	Zoea	C: 8.1/380; E: 7.3/3000-7.8/710; increased developmental time and smaller larvae at 7.3	C: 3°C; E: 9-15°C; decreased developmental time and increased calcification at 9°C	IA low pH narrows range of thermal tolerance	Walther et al. (2010, 2011)
<i>Pandanus borealis</i>	Larvae	C: 8.1/380; E: 7.6/710; increased developmental time at 7.6	C: 6.7°C; E: 9.5°C; faster development, increased metabolic rate, and reduced survival at 9.5°C	ND	Åmberg et al. (2013)
<i>Semibalanus balanoides</i>	Juveniles	C: 8.05/410; E: 7.7/1100; decrease in growth at 7.7	C: 14°C; E: 19°C; ND	IA reduction in calcification and survival	Findlay et al. (2010a, 2010b)

The control (C) and experimental (E) treatments are indicated. Stressor levels with significant deleterious effects are stated. pH was determined as pH_{NST}. IA, significant interaction; ND, deleterious effect not detected. The impacts of acidification or warming as a sole stressor on invertebrate life histories are reviewed by Byrne (2011, 2012).

^aThis study also included light (full spectrum, UV-blocked, dark) as a stressor in a three-way factorial design.

^bThis study contained only descriptive statistics and no significant effects could thus be determined.

제 2 절 본 과제와의 연계성

- 본 과제 “극지유전체 101 프로젝트: 극지생물 유전체 정보 분석 및 활용기반 구축”의 연구목표는 극지생물 유전체의 특성 규명과 극지 유용 유전자원을 발굴하는 것으로, 세부내용 중 극지 대표 생물의 환경적응과 진화 특성 규명 분야 목표 달성을 위해 본 위탁과제와 연계하여 연구를 수행하고자 하였음.
- 구체적인 추진 계획은 본 과제에서 선정한 대표 생물 100종 중 남극 서식 무척추동물을 대상으로 다중 환경스트레스를 유전체 및 후성유전체 수준에서 분석하여 환경적응 기작 및 관련 유전자의 기능을 규명하고 이 정보들을 본 과제에서 활용하여 극지 서식 생물들의 독특한 환경 적응 방식을 비교 분석하고, 이를 통해 환경적 진화가 발생한 기작을 발굴하는 데 중요한 자료를 제공할 것임.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 남극 서식 무척추동물 종 확보 및 다중 환경 스트레스 노출 조건 확립

1. 실험실내 사육가능 남극 무척추동물 종 선별 및 개체 확보

가. 연구 내용

- 주관 연구책임자와 협의하에 남극에서 채집한 무척추동물종 중 실험실내 사육가능하며 개체 확보가 용이한 종을 선별하여 이들에 대한 종분석 및 추가 연구를 수행하기 위해 실험실내 배양 방법을 구축하였다.

나. 연구 방법 및 연구 결과

- 남극 King George Island의 King Sejong Station 근처에서 발견된 종으로 담수 rotifera(윤충류)와 해수 copepoda(요각류)를 대상으로 단일종 선별 및 배양방법을 확립하였다. 또한 추가적으로 과거에 분리동정한 로티퍼인 *Philodina gregaria*과 요각류인 *Boeckella poppei*을 대상으로 온도 스트레스 조건에 맞춰 노출시키기 위한 개체군들을 수집하였다.

(1) 남극 무척추동물 수집종에 대한 단일종 선별 및 배양방법 확립

(가) Rotifer (윤충류) 단일종 선별 및 배양 방법 확립

- ① Rotifer (윤충류) 단일종 선별 : 현미경을 이용하여 형태학적 특성을 파악함으로써 Rotifer로 추정되는 종들을 분리하였고, 이들을 단일 배양하여 개체군 형성 여부 및 생활 특성을 추가적으로 조사하였다. 그 결과, 여러종들이 혼합되어 있는 것을 확인하였고, 그 중 다른 종으로 추정되는 2종류의 개체들을 확보하였다 (그림 3).
- ② Rotifer (윤충류) 종분석 진행 : 추가적으로 이들에 대한 종분석을 진행하여 서로 다른 종인지를 확인하는 과정을 거쳤다. 종분석을 위한 Universal gene으로는 무척추생물에 종분석에 널리 사용되는 COI 유전자를 사용하였으며, 해당 유전자 primer 서열은 기존 연구에서 사용한 서열을 사용하였다(Alejandro Velasco-Castrillon et al., 2014)(표 3).

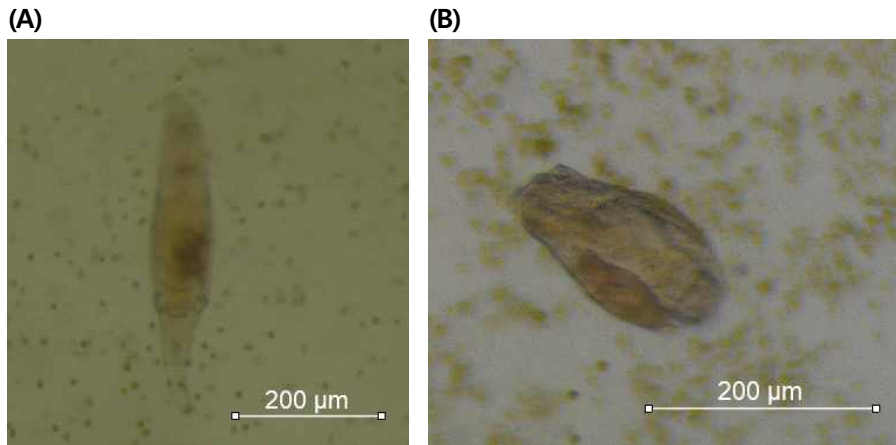


그림 3. 단일종으로 분리된 2종류의 Rotifer 종들의 현미경 모습

표 3. Rotifer (윤충류) 종분석시 사용한 Universal gene의 sequence 서열

Primer name	Primer Sequence
LCO1490	5'-ggcaacaatcataaagatattgg-3'
HCO2198	5'-taaacttcagggtgaccaaaaaatca-3'

③ Rotifer (윤충류) 종분석 결과 : 종분석을 진행하기 위하여 해당 생물종(A)와 (B) 뿐만아니라 단일배양을 진행한 모든 생물에서 DNA를 추출한 뒤 EmeraldAmp PCR Master Mix (TaKaRa)를 이용하여 DNA 중 COI gene에 해당하는 부분을 증폭하였으며 1% agarose gel에 전기영동을 하여 해당 DNA의 quality를 확인하였다. 추 후 LaboPass PCR kit (COSMO GENETECH Co, LTd.)를 이용하여 PCR product에 대하여 purification을 진행한 뒤 sequencing을 진행하였다.

④ Rotifer (윤충류) BLAST 검색 결과 : NCBI BLAST를 이용하여 각 두 개의 sequence서열을 선정하여 비교분석하였다. 임의대로 해당 샘플들 모두 Bdelloid rotifer로 확인되었으며, 더 자세한 증정보는 얻을 수 없다. 샘플의 이름은 분리 배양을 진행한 plate의 well 위치에 따라 A1, A2, B3, C1, C2, D2, D3로 명명하였으며, 검색 결과 1:1로 비교하여 sequence 서열의 유사정도를 확인하였다. BLAST 검색결과, 총 21개의 비교 중에서 HCO2198와 LCO1490 모두에서 94% 이상의 높은 유사도를 보인 것은 다음의 표 4와 같다. A1, B3, C1는 그림 3 (A)에 해당하며, D2와 D3는 그림 3 (B)에 해당하는 생물종이다.

BLAST 검색결과, 그림 3 (A)와 (B)가 다른 종인지를 확인하기 위해서 각 그룹별로 1:1로 비교한 결과는 아래의 표 5로 나타내었다. 비교한 결과, HCO2198와 LCO1490 모두에서 상대적으로 낮은 90-95% 정도의 유사도를 보였다. 결과를 종합적으로 보았을 때, 그림 3 (A)와 (B)에 해당하는 종은 서로 다른 종으로 예상되어진다.

표 4. Rotifer (윤충류) BLAST 검색 결과 중 sequence 서열의 유사도가 높은 생물종

Query	Subject		Query	Subject	
A1_HCO 2198	B3_HCO 2198	core1214bits(657) Expect0.0 Identities671/677(99%) Gaps4/677(0%) StrandPlus/Plus	B3_HCO 2198	C1_HCO 2198	Score1203bits(651) Expect0.0 Identities661/665(99%) Gaps4/665(0%) StrandPlus/Plus
A1_LCO 1490	B3_LCO 1490	Score1136bits(615) Expect0.0 Identities676/703(96%) Gaps13/703(1%) StrandPlus/Plus	B3_LCO1 490	C1_LCO 1490	Score1158bits(627) Expect0.0 Identities642/649(99%) Gaps2/649(0%) StrandPlus/Minus
A1_HCO 2198	C1_HCO 2198	Score1216bits(658) Expect0.0 Identities663/665(99%) Gaps2/665(0%) StrandPlus/Plus	D2_HCO 2198	D3_HCO 2198	Score1201bits(650) Expect0.0 Identities655/657(99%) Gaps1/657(0%) StrandPlus/Plus
A1_LCO 1490	C1_LCO 1490	Score1136bits(615) Expect0.0 Identities671/695(97%) Gaps15/695(2%) StrandPlus/Plus	D2_LCO 1490	D3_LCO 1490	Score1090bits(590) Expect0.0 Identities690/732(94%) Gaps32/732(4%) StrandPlus/Plus

표 5. Rotifer (윤충류) BLAST 검색 결과 중 sequence 서열의 유사도가 낮은 생물종

Query	Subject		Query	Subject	
A1_HCO 2198	D2_HCO 2198	Score1062bits(575) Expect0.0 Identities643/676(95%) Gaps3/676(0%) StrandPlus/Plus	A1_HCO 2198	D3_HCO 2198	Score1048bits(567) Expect0.0 Identities627/657(95%) Gaps0/657(0%) StrandPlus/Plus
A1_LCO1 490	D2_LCO1 490	Score894bits(484) Expect0.0 Identities648/722(90%) Gaps32/722(4%) StrandPlus/Plus	A1_LCO1 490	D3_LCO1 490	Score965bits(522) Expect0.0 Identities638/694(92%) Gaps 7/694(1%) Strand Plus/Plus
B3_HCO 2198	D2_HCO 2198	Score1040bits(563) Expect0.0 Identities649/690(94%) Gaps8/690(1%) StrandPlus/Plus	B3_HCO 2198	D3_HCO 2198	Score1044bits(565) Expect0.0 Identities632/665(95%) Gaps2/665(0%) StrandPlus/Plus
B3_LCO1 490	D2_LCO1 490	Score881bits(477) Expect0.0 Identities604/661(91%) Gaps26/661(3%) StrandPlus/Plus	B3_LCO1 490	D3_LCO1 490	Score1024bits(554) Expect0.0 Identities653/700(93%) Gaps10/700(1%) StrandPlus/Plus
C1_HCO 2198	D2_HCO 2198	Score1038bits(562) Expect0.0 Identities625/656(95%) Gaps2/656(0%) StrandPlus/Plus	C1_HCO 2198	D3_HCO 2198	Score1040bits(563) Expect0.0 Identities626/657(95%) Gaps1/657(0%) StrandPlus/Plus
C1_LCO1 490	D2_LCO1 490	Score896bits(485) Expect0.0 Identities606/660(92%) Gaps26/660(3%) StrandPlus/Plus	C1_LCO1 490	D3_LCO1 490	Score1007bits(545) Expect0.0 Identities645/692(93%) Gaps11/692(1%) StrandPlus/Plus

(나) Copepod(요각류) 단일종 선별 및 배양 방법 확립

- ① Copepod(요각류) 단일종 선별 : 현미경을 이용하여 형태학적 특성을 파악함으로써 Copepod로 추정되는 종들을 분리하였고, 이들을 단일 배양하여 개체군 형성 여부 및 생활 특성을 추가적으로 조사하였다. 그 결과, 1종류의 개체를 확보하였고 (그림 4), 이 종은 형태적으로 *Tigriopus kingsejonensis*와 매우 유사한 것을 확인하였음

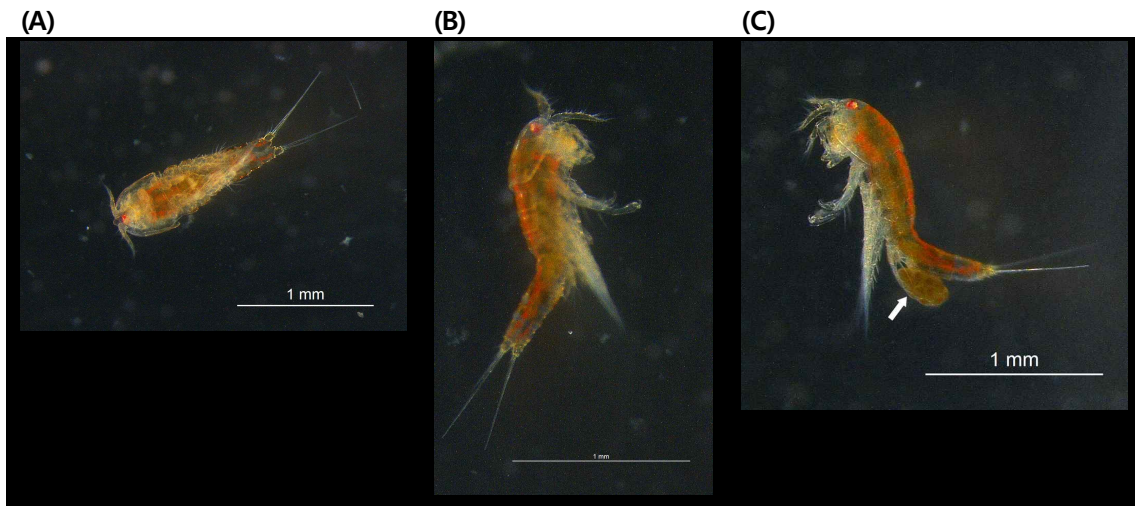


그림 4. 단일종으로 분리된 Copepod 생물종의 모습 (A, B)과 알주머니(화살표)를 지닌 mature female의 모습(C)

(다) 남극 서식 로티퍼와 요각류의 배양방법 확립

- ① 로티퍼와 요각류의 배양방법 확립 : 담수 로티퍼의 배양액의 경우 1 L 증류수에 NaCl 100 mg, KCl 4 mg, CaCl₂ 6 mg을 넣어 제조하였으며, 해양 요각류의 배양액은 인공 해수염을 이용하여 염분을 35 psu로 맞춘 인공해수를 만들어 사용하였다. 두 생물의 배양액 모두 Autoclave를 통해 121°C에서 15분 동안 고온고압멸균을 진행함. 고온고압 멸균을 진행한 배양액은 혹시 모를 이물질을 걸러내기 위하여 0.22 μm filter system(Corning, USA)를 이용하여 여과를 진행하여 사용함. 배양액 환수는 1주일에 1번 pore size 200 μm, 40 μm sieve (한결랩소프트, Korea)와 100 μm nylon mesh를 이용하여 생물을 걸러서 전액 환수를 진행함.윤충류와 요각류 배양에 사용한 먹이생물로는 (주)아쿠아넷에서 구입한 담수산 농축 클로렐라를 사용하였으며, 급여 방법은 배지와 클로렐라 농축액을 100:1로 섞어 기존 배양액에 200 ml plant petri dish (SPL, Korea) 기준 20 ml씩 충분한 먹이량이 되도록 급여하였다. 로티퍼 및 요각류의 배양 및 사육조건을 아래 표 6에 요약하였다.

표 6. 극지 로티퍼 및 요각류 배양 및 사육조건

조건	설정	
	로티퍼 (담수)	요각류 (해수)
Temperature	10±1℃	10±1℃
Salinity	-	35 psu
Photoperiod	16:8 h (Light:Dark)	16:8 h (Light:Dark)
Intensity of light	120 lux	120 lux
Culture chamber volume	200 ml	1000 ml
Culture solution volume	100 ml	800 ml
Renewal period	7 day	7 day
Feeding	<i>chlorella</i> sp.	<i>chlorella</i> sp.

2. 다중 환경스트레스 노출 조건 및 시스템 확립

가. 연구내용

- 남극 무척추생물종이 처할 수 있는 다중 환경스트레스에 대한 종류 및 노출 조건을 설정하고 이를 위한 노출 방법을 확립하기 위하여 기존의 연구에 대한 문헌조사를 하여, 실험실에서 디자인할 수 있는 범위의 다중 환경스트레스 조건을 설정하였다. 또한 노출 실험에서 가장 중요한 온도 스트레스 노출을 위해 최적의 배양 온도를 확립하였음

나. 연구 방법 및 연구 결과

(1) 로티퍼와 요각류를 대상으로 개별 환경 스트레스 노출 조건 확립

- 온도 스트레스 조건: 저온 (2℃) vs 최적 (10℃) vs 고온 (20℃)
- UV 스트레스 조건: UV-B 61 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ vs 88 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ vs 100 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ vs 136 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$
- 독성원 스트레스 조건: Pb, perfluorooctane sulfonate(PFOS) 및 perfluorooctanoic acid(PFOA) (계 획서 상에 hexachlorobenzene을 노출시키기로 했으나, 해수에 대한 용해도가 낮아 노출실험 진행이 어려워 남극 생태계에서 중요한 오염원으로 고려중인 PFOS를 대상 독성원으로 변경하였음)

(2) 다중환경스트레스 노출 조건 확립

○ 온도 스트레스 + 독성원 (Pb or PFOS or PFOA) 스트레스

(3) 극지 로티퍼와 요각류의 최적 온도 조건 확립

(가) 극지 로티퍼의 최적 온도 조건 확립

○ 극지 로티퍼를 대상으로 최적 온도인 10°C와 15°C에서 배양했을때 개체수 변화를 분석하였다.

○ 10°C에 노출한 경우, 20일이 경과한 시점부터 개체수가 지속적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 15°C에서는 10일이 경과한 시점부터 개체수 증가가 더 빨리 관찰되었으며, 1달 이후의 개체수의 증가율도 15°C에서 2배이상 높았다. **그림 3**의 (B)에 해당하는 로티퍼 종이 (A)보다 10°C와 15°C에서 더 잘 성장하는 것을 관찰할 수 있었다 (**그림 5**). 이를 통해 개체수 확보 방법으로 최적온도를 15°C로 변경하여 배양하였으나, 추가적인 스트레스 노출 실험을 하기에 충분한 개체수 확보가 이루어지지 않아, 신규로 채집한 로티퍼에 대한 스트레스 노출 실험은 본 연구에서 제외하였음.

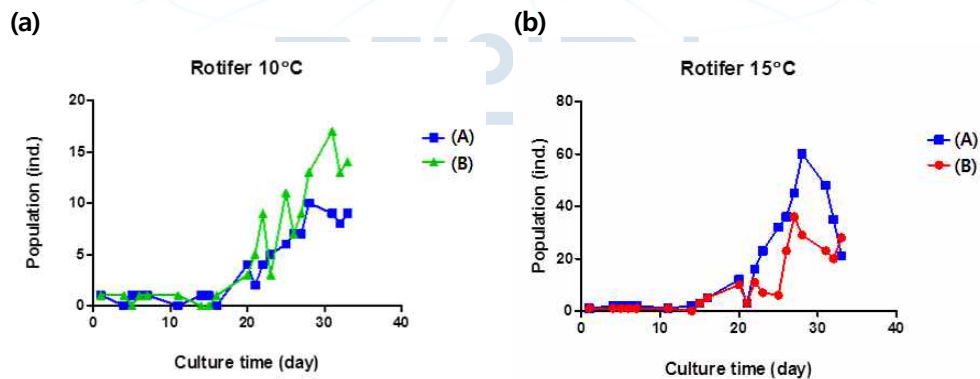


그림 5. 단일종으로 분리된 로티퍼의 온도 조건에 따른 일별 개체수 증가율
(a) 10°C에서 배양한 경우 (b) 15°C에서 배양한 경우

(나) 극지 요각류의 최적 온도 조건 확립

○ 10°C 및 15°C 두 온도에서 요각류를 1, 2, 3 마리씩 분주하여 개체수 증가율을 관찰한 결과, 개체수가 배양일에 따라 증가하지 않고, 처음 seeding 했을 때의 개체수 수준을 17일동안 유지하는 것을 관찰할 수 있었다 (**그림 6**). 요각류는 성별이 구분되어 있으므로, seeding시 성별을 조절하는 과정을 추가해야 할 것으로 사료된다.

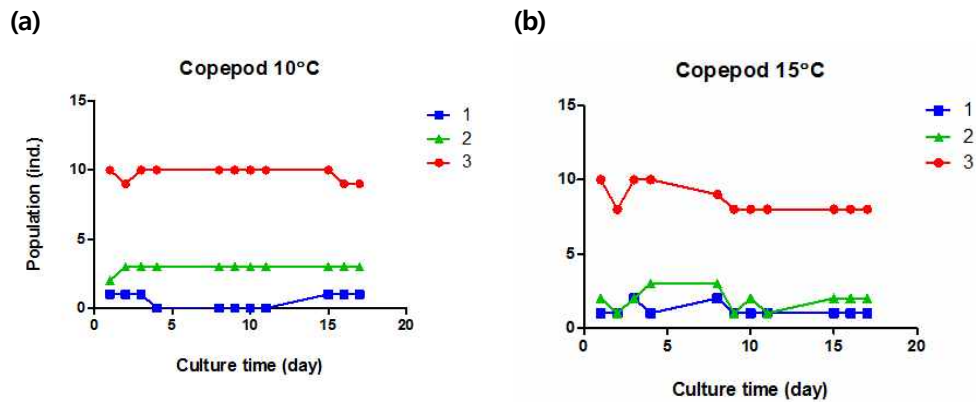


그림 6. 단일종으로 분리된 요각류의 온도 조건에 따른 일별 개체수 증가율
 (a) 10°C에서 배양한 경우 (b) 15°C에서 배양한 경우

제 2 절 다중 환경 스트레스 조건별 생리적 변화 분석

1. 극지 요각류 대상 개별 환경 스트레스 노출에 따른 생리적 변화 관찰

가. 연구 내용

- 온도, 독성원 (납, PFOS 및 PFOA), UV 조건에 따른 극지 요각류의 유영저해율 및 생존율을 분석함으로써 개별 환경 스트레스 조건에서의 영향을 파악하고자 하였음.
 - ① 온도 스트레스 조건: 2°C vs 10°C vs 20°C로 선정
 - ② 독성원 스트레스 조건:
 - 납(Pb)
 - 과불화옥산술폰산 (perfluorooctyl sulfonate; PFOS) : 계획서상에 hexachlorobenzene을 노출시키기로 했으나, 해수에 대한 용해도가 낮아 노출 실험 진행이 어려워 남극 생태계에서 중요한 오염원으로 고려중인 PFOS를 대상 독성원으로 변경하였음
 - 과불화옥탄산 (Perfluorooctanoic acid, PFOA) : 남극 생태계에서 중요한 오염원인 과불화화합물 중 PFOS와 마찬가지로 대표적인 독성원으로 고려중인 PFOA를 대상 독성원으로 추가함
 - ③ UV-B 스트레스 조건 : 61 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ vs 88 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ vs 100 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ vs 136 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$

나. 연구 방법 및 연구 결과

(1) 온도 스트레스(2°C vs 10°C vs 20°C)에 대한 유영저해율 및 생존율 분석

(가) 연구 방법

- 요각류를 대상으로 저온스트레스인 2°C와 고온스트레스인 20°C에서 노출되었을 때의 요각류의 유영저해율 및 치사율에 미치는 영향에 대하여 분석하였다. 대조군의 경우에는 기존 배양조건 10°C에서 진행하였다. 총 노출기간은 5일로 온도 스트레스에 대한 생리적 반응을 관찰하였다. 세 개의 단일 온도 조건에서 요각류를 1마리씩 분주하였고, 총 5개의 반복수를 두었다. 각 온도에서의 요각류의 유영저해율 및 생존율을 관찰하였다. 유영저해율의 경우, 일회용 스포이드를 이용하여 배양액을 흔들어준 후, 30초 이상 유영을 보이지 않는 개체의 경우 유영이 저해되었다고 판단하였다. 치사한 개체의 경우에도 유영이 저해된 것으로 판단하여 유영저해율을 측정하였다.

(나) 연구 결과

- 2°C vs 10°C vs 20°C 조건에서 실험한 결과, 고온스트레스 조건인 20°C에서 관찰한지 3일차부터 유영저해개체가 발견되기 시작하였으며 관찰한지 5일차에는 20%의 개체에서 유영저해를 보였다. 저온스트레스인 2°C 조건에서는 관찰 중에 유영저해 및 치사한 개체는 존재하지 않았다(그림 7).

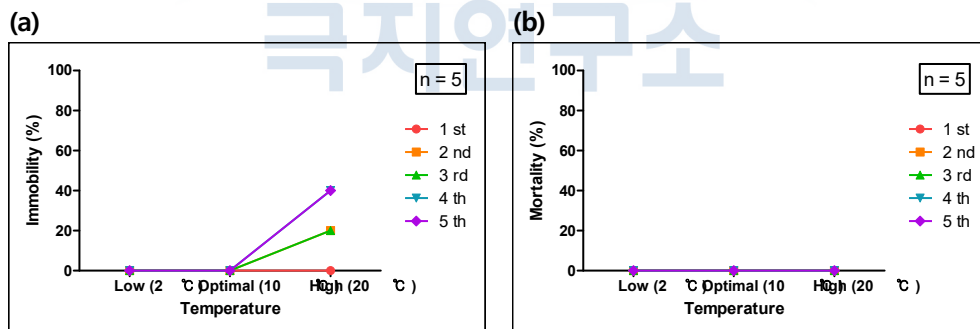


그림 7. 요각류에서의 온도 스트레스에 대한 유영저해율 및 치사율 분석

(a) 성체 - 유영저해율 (b) 성체 - 치사율

(2) 독성원 스트레스에 대한 유영저해율 및 생존율 분석

- 요각류를 대상으로 독성원인 납(Pb)과 과불화옥산술포산 (PFOS), 과불화옥산산 (PFOA)에 농도별로 노출되었을 때의 요각류의 유영저해율 및 치사율에 미치는 영향에 대하여 분석하였다. 해당 실험은 본 실험에 앞서 독성원의 처리농도 설정을 위한 스크리닝 실험으로 진행되었다.

(가) 독성원 납(Pb)(1-10 ppm)

① 연구 방법

- 독성원인 납(Pb)의 처리농도 설정을 위하여 대조군을 포함하여 (대조군, 1 ppm, 2.5 ppm, 3.75 ppm, 5 ppm, 10 ppm) 총 6개의 농도에서 실험을 진행하였다. 실험방법은 온도스트레스와 동일한 방법으로 관찰하였다. 독성원 스트레스를 제외한 모든 조건은 배양조건과 동일하게 진행하였다.

② 연구 결과

- 실험시작 1일차에서는 모든 농도에서 별다른 변화를 보이지 않았으나, 실험 2일차부터 고농도인 5 ppm, 10 ppm의 경우 유영저해율이 40%로 관찰되었다. 5일차가장 고농도인 10 ppm의 경우, 노출시간이 길어질수록 유영저해를 보이는 개체가 증가하였으며 실험종료일인 5일차에는 유영저해율 100%로 모든 개체에서 유영저해를 보였다. 4일차 농도 및 노출시간에 비례하여 유영저해를 보이는 개체가 증가하는 경향을 보였다 (그림 8).

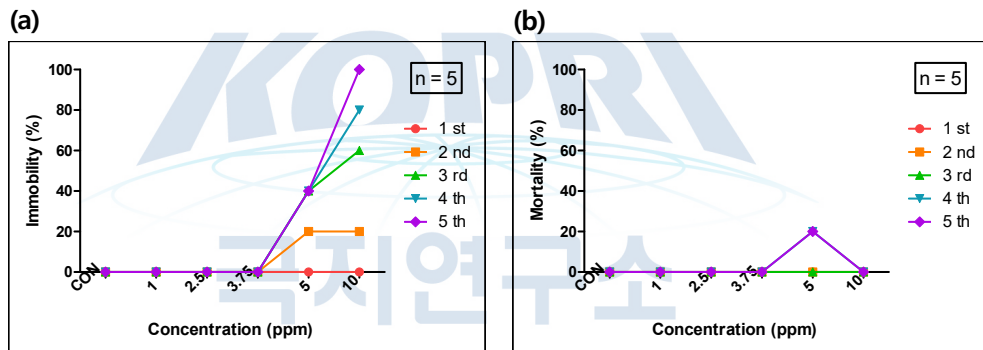


그림 8. 요각류에서의 독성원 납(Pb) 스트레스에 대한 유영저해율 및 치사율 분석 (a) 성체 - 유영저해율 (b) 성체 - 치사율

(나) PFOS (1-10 ppm)

① 연구 방법

- 독성원인 과불화옥산술폰산(PFOS)의 처리농도 설정을 위하여 대조군을 포함하여 (대조군, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm) 총 6개의 농도에서 실험을 진행하였다. PFOS의 경우 1차 증류수에 2000배 stock을 제조하여 실험에 사용하였다. 실험방법은 납 (Pb) 독성원 스트레스 실험과 동일한 방법으로 진행하였으나, 추가적으로 유생에서의 독성평가도 추가적으로 진행하고 비교분석하였다.

② 연구 결과

○ 성체의 경우 모든 농도에서 실험종료일까지 치사율은 보이지 않았다. 그러나 유영저해율의 경우, 실험시작 1,2일차에는 유의한 변화가 없었으나 실험 시작 3일차부터 고농도인 40 ppm 과 50 ppm 에서 각각 40%, 20%로 유영저해가 관측되었다. 4일차부터는 30 ppm 농도에서도 유영저해개체가 관측되었다. 실험종료일인 5일차에서는 20 ppm에서 20%, 30 ppm에서 40%, 40 ppm과 50 ppm에서 100%의 유영저해율을 관측하였다 (그림 9). 유생의 경우, 실험종료일인 5일차에 25 ppm 과 50 ppm 농도에서 33.3%가 치사하였으며 최고농도인 100 ppm에서 66.6% 개체가 치사하였다. 유영저해율 또한 4일차에서 25 ppm 농도에서 66.6% 이상의 유영저해를 보이기 시작하여, 실험 5일차에서 25 ppm 이상의 농도에서 100%의 유영저해율을 보였다. 최종적으로 유생에서의 EC₅₀ 값은 이었으나, 성체에서의 EC₅₀은 5.17 ug/ml 으로, 유생에서의 EC₅₀이 상대적으로 높은 것으로 보아 성체보다 유생에서의 해당 독성원인 납(Pb)에 더 민감한 것으로 나타났다 (그림 9).

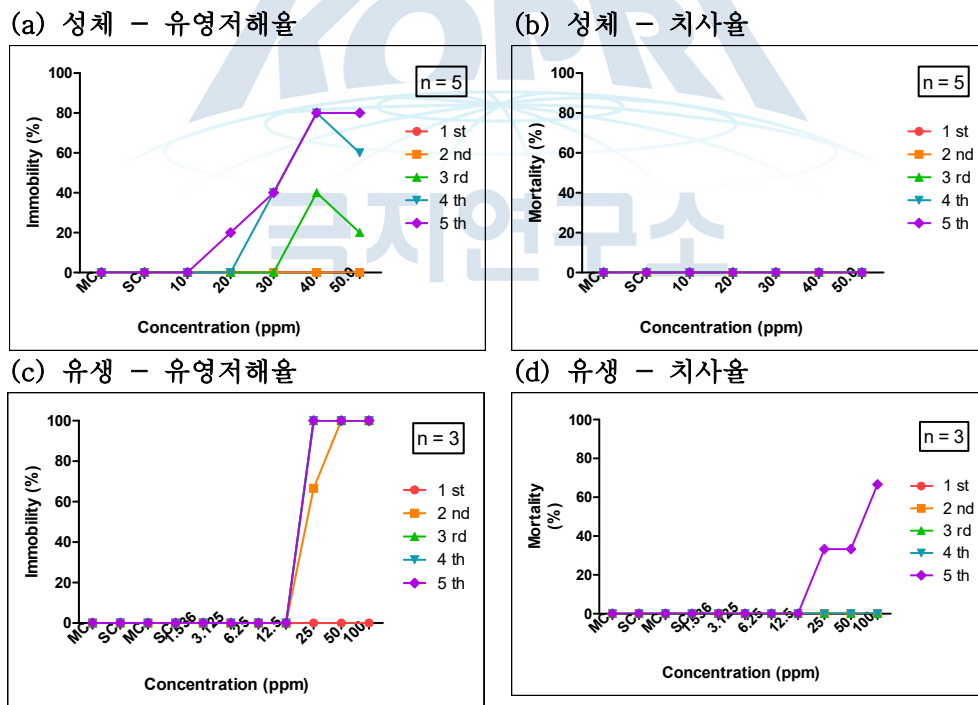


그림 9. 요각류에서의 독성원 PFOS 스트레스에 대한 유영저해율 및 치사율 분석 그래프

(a) 성체 - 유영저해율 (b) 성체 - 치사율 (c) 유생 - 유영저해율 (d) 유생 - 치사율

(다) 과불화옥탄산(PFOA)(100-500 ppm)

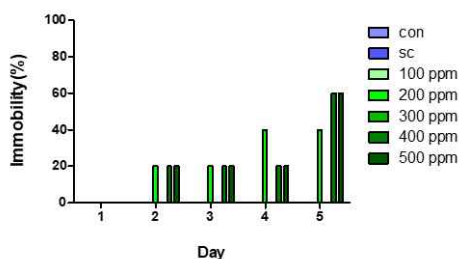
① 연구 방법

- 독성원인 과불화옥탄산(PFOA)의 처리농도 설정을 위하여 대조군을 포함하여 (대조군, 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm) 총 6개의 농도에서 실험을 진행하였다. 실험방법은 UV-B 스트레스와 동일한 방법으로 관찰하였다. 독성원 스트레스를 제외한 모든 조건은 배양조건과 동일하게 진행하였다.

② 연구 결과

- 실험시작 1일차에서는 모든 농도에서 별다른 변화를 보이지 않았으나, 실험 2일차부터 유영저해율이 관찰되었다. 고농도인 400 ppm, 500 ppm의 경우 실험종료 일인 5일차에서 유영저해율 60%를 보였다(그림 10).

(a) 성체 - 유영저해율



(b) 성체 - 치사율

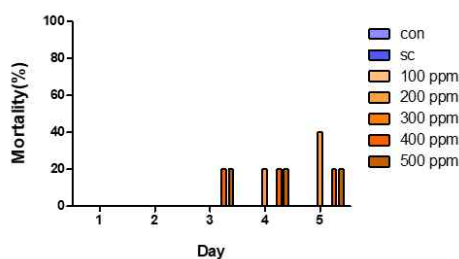


그림 10. 요각류에서의 독성원 과불화옥탄산(PFOA) 스트레스에 대한 유영저해율 및 치사율 분석 그래프 (n=5)

(3) UV-B 스트레스에 대한 유영저해율 및 생존율 분석

(가) 연구 방법

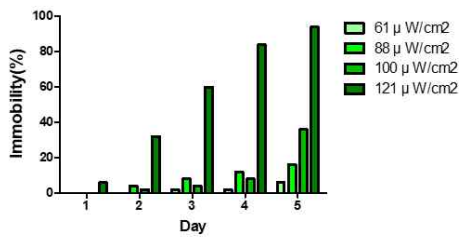
- 요각류를 대상으로 UV-B에 노출 되었을 때 요각류의 유영저해율 및 치사율에 미치는 영향에 대하여 분석하였다. UV-B는 대조군을 포함하여 ($61 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ vs $88 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ vs $100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ vs $136 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) 총 5개 농도에서 실험을 진행하였다. 실험은 기존 배양조건 10°C 에서 진행하였으며 총 노출기간은 5일로 UV-B 스트레스에 대한 생리적 반응을 관찰하였다. 유영저해율의 경우, 일회용 스포이드를 이용하여 배양액을 흔들어준 후, 30초 이상 유영을 보이지 않는 개체의 경우 유영이 저해되었다고 판단하였다. 치사한 개체의 경우에도 유영이 저해된 것으로 판단하여 유영저해율을 측정하였다.

(나) 연구 결과

- 실험 시작 1일차에서는 모든 처리군에서 별다른 변화를 보이지 않았으나 2일차

부터 UV-B 136 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 에서 유영저해율이 30%로 관찰되었으면 노출 시간이 길어질수록 유영저해를 보이는 개체가 증가하였으며 실험 종료일인 5일차에서는 유영저해율 94%로 대부분의 개체에서 유영저해를 보였다. 또한 유영저해율이 조사량 및 노출시간에 비례하여 증가하는 경향을 보였다(그림 11). 이러한 결과를 바탕으로 50% 유영저해율을 나타내는 UV-B 조사량 EC_{50} 은 108.00 uW/cm^2 으로, EC_{20} 은 89.78 uW/cm^2 으로 결정되었다.

(a) 성체 - 유영저해율



(b) 성체 - 치사율

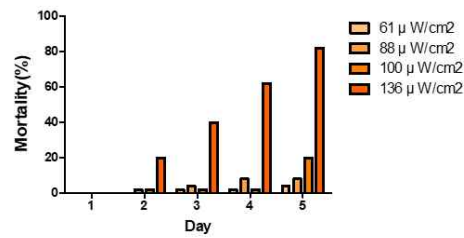


그림 11. 요각류에서의 UV-B 스트레스에 대한 유영저해율 및 치사율 분석 그래프 (n=5)

2. 극지 요각류 대상 다중 환경 스트레스 노출에 따른 생리적 변화 관찰

가. 연구 내용

- 극지 요각류를 대상으로 온도 + 독성원 동시 노출 스트레스 조건에서 유영저해율과 치사율을 관찰하여 가장 유해성이 높은 다중 스트레스 조건을 파악하고자 하였음.

- ㉠ 온도 + Pb 스트레스
- ㉡ 온도 + PFOS 스트레스
- ㉢ 온도 + PFOA 스트레스

나. 연구 방법 및 연구 결과

- (1) 온도 + 납(Pb) 스트레스에 대한 유영저해율 및 치사율 분석

(가) 연구 방법

- 온도 스트레스와 독성원인 납(Pb) 스트레스에 동시다발적으로 노출되었을때의 요각류에서의 유영저해율 및 치사율을 관찰하였다. 온도 스트레스는 저온 조건(2℃)와 고온 조건(20℃)로 설정하였으며, 대조군으로는 optimal 조건인 (10℃)로 하여 실험을 진행하였다. 독성원인 납(Pb)의 처리농도의 경우 앞서 실시한 실험을 바탕으로 얻은 EC_{20} (4.66 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 EC_{50} (5.17 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도를 이용하

여 실험을 진행하였다.

(나) 연구 결과

- 저온 스트레스 조건(2℃)에서는 납(Pb) 단일 스트레스 결과와 달리 EC₂₀과 EC₅₀ 모든 농도에서 개체 치사 및 유영저해가 나타나지 않았다. 고온 스트레스 조건(20℃)에서는 EC₂₀에서는 치사 및 유영저해가 관측되지 않았으나, EC₅₀인 농도에서 4일차에 33.3%가 관측되었고 5일차에 66.6%의 유영저해가 관측되었다. 치사율의 경우 단일 스트레스 조건과 동일하게 치사한 개체는 관측되지 않았다. PFOS 단일 스트레스 EC₅₀ 농도에서 다중스트레스에 노출된 경우 66.6%로 상대적으로 더 높은 유영저해율을 보이는 것으로 보아 독성이 가중된 것으로 예상된다. 그러나 치사율에서는 별다른 영향이 없어 개체를 치사시킬 정도의 높은 독성은 나타나지 않는 것으로 보인다 (그림 12).

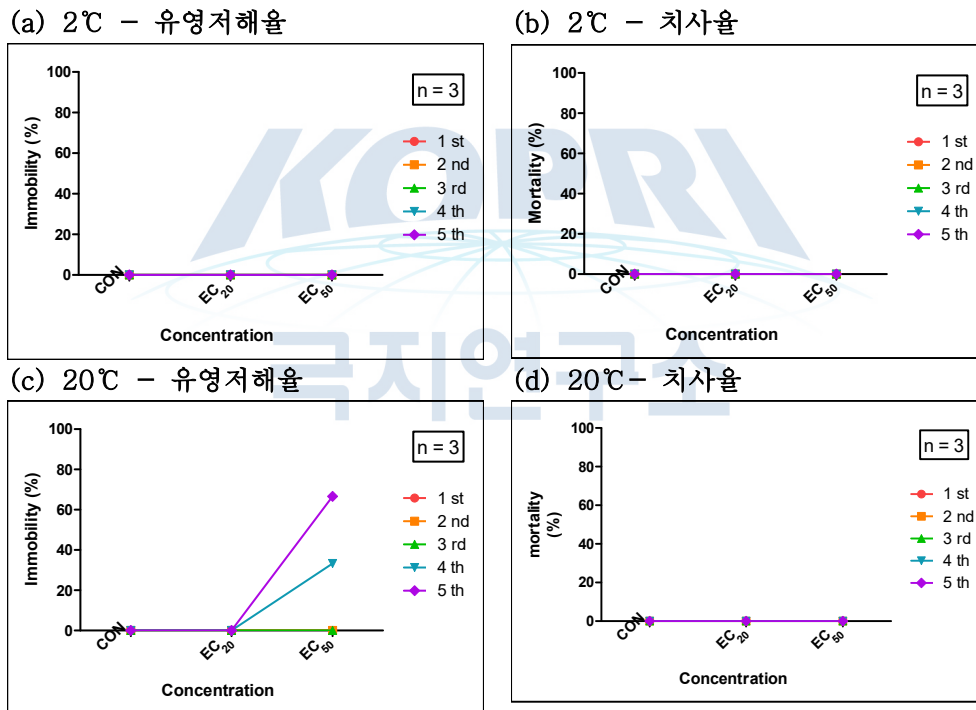


그림 12. 요각류에서의 온도 + 납(Pb) 스트레스에 대한 유영저해율 및 치사율 분석 그래프

(a) 2℃ - 유영저해율 (b) 2℃ - 치사율 (c) 20℃ - 유영저해율 (d) 20℃- 치사율

(2) 온도 + PFOS 스트레스에 대한 유영저해율 및 치사율 분석

(가) 연구 방법

- 온도 스트레스와 독성원인 PFOS 스트레스에 동시다발적으로 노출되었을 때 요각류에서의 유영저해율 및 치사율을 관찰하였다. 앞선 실험과 동일하게 진행하

였으며, 독성원인 PFOS의 처리농도의 경우 앞서 실시한 실험을 바탕으로 얻은 EC20 (22.26 ug/ml)과 EC50 (33.57 ug/ml) 농도를 이용하여 실험을 진행하였다.

(나) 연구 결과

- 저온 스트레스 조건(2°C)에서는 PFOS 단일 스트레스 결과와 달리 50%의 개체가 영향을 받았으나 저온스트레스를 함께 주었을 경우 66.6%로 더 높은 수치의 유영저해율을 보였다. 또한, 치사율 또한 단일 스트레스 조건과 별다른 차이가 없었다. 고온 스트레스 조건(20°C)에서는 EC20과 EC50인 농도에서 불구하고 단일 스트레스 조건에 비하여 유영저해율이 높게 나타났으며, 5일차에서는 100%의 유영저해율을 보였다. 또한 단일 스트레스조건에서는 치사한 개체가 없었으나 납(Pb)과 동시에 처리한 경우에는 EC20과 EC50 농도에서 33.3%의 치사율을 보였다. 종합적으로 단일스트레스에 노출되었을 때보다 다중 환경스트레스에 노출되었을 경우, 독성이 더 가중되는 경향을 보이는 것으로 확인되었다 (그림 13).

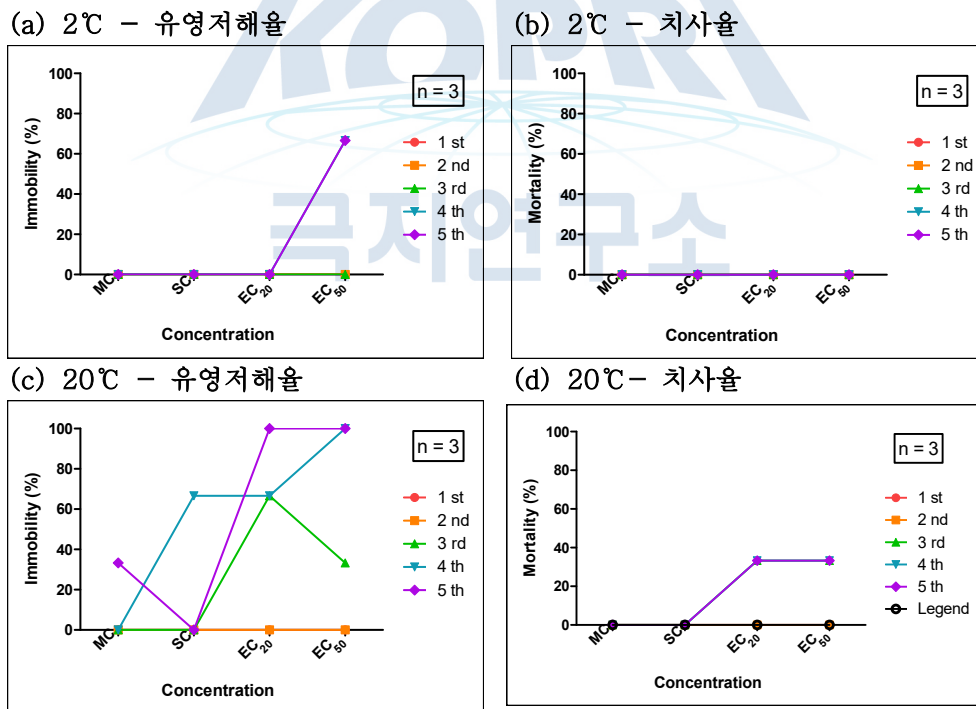


그림 13. 요각류에서의 온도 + PFOS 스트레스에 대한 유영저해율 및 치사율 분석 그래프

(a) 2°C - 유영저해율 (b) 2°C - 치사율 (c) 20°C - 유영저해율 (d) 20°C - 치사율

(

3) 온도 + PFOA 스트레스에 대한 유영저해율 및 치사율 분석

(가) 연구 방법

- 온도스트레스와 독성원인 PFOA 스트레스에 동시에 노출 되었을 때의 요각류에서의 유영저해율 및 치사율을 관찰하였다. 온도 스트레스는 저온 조건 (2℃)와 고온 조건(20℃)로 설정하였으며, 대조군으로는 optimal 조건인 (10℃)로 하여 실험을 진행하였다. 독성원인 PFOA의 처리농도의 경우 앞서 실시한 실험을 바탕으로 얻은 EC₂₀(230 µg/ml), EC₅₀(435 µg/ml) 농도를 이용하여 실험을 진행하였다.

(나) 연구 결과

- 저온 스트레스 조건(2℃)에서는 PFOA 단일 스트레스 결과와 비슷하게 EC₅₀에서 50% 개체가 유영저해를 받았으나 EC₂₀에서는 유영저해가 관측되지 않았으며 EC₂₀과 EC₅₀농도에서 치사한 개체가 관측되지 않았다. 고온 스트레스 조건(20℃)에서는 EC₂₀과 EC₅₀인 농도에서 불구하고 단일 스트레스 조건에 비하여 유영저해율이 높게 나타났으며, 2일차부터 100%의 유영저해율이 관측되었다. 또한 단일 스트레스 조건보다 치사율이 높게 관측되었다. 종합적으로 PFOA 단일 스트레스에 노출 되었을 때보다 저온 스트레스 조건(2℃)에서는 독성이 다소 저감된 것으로 보였으나, 고온 스트레스 조건(20℃)에서는 높은 유영저해율과 치사율을 보이는 것으로 보아 독성이 가중된 것으로 사료된다(그림 14).

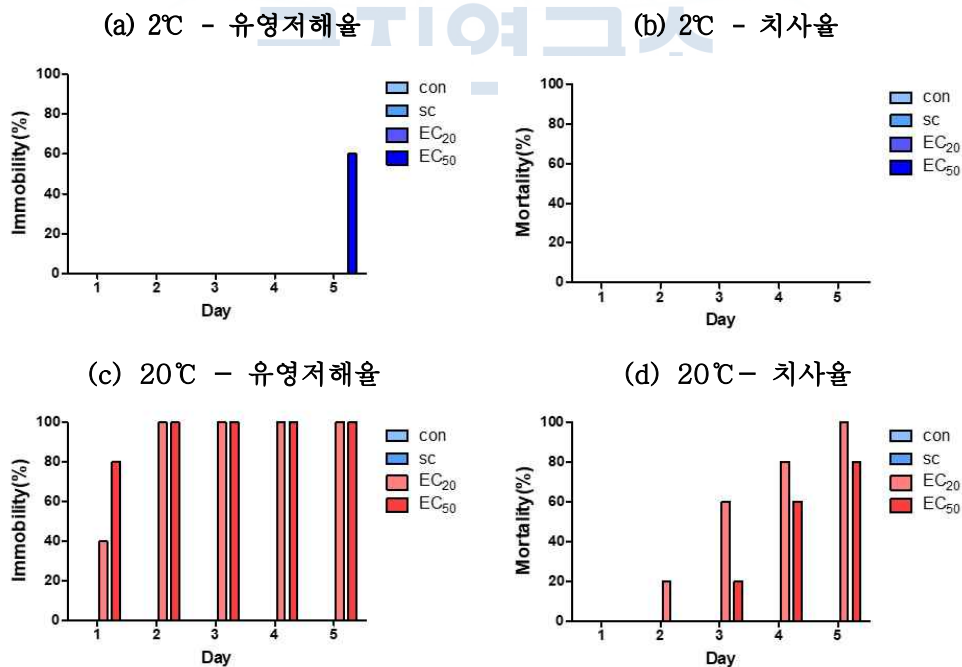


그림 14. 요각류에서의 온도 + 과불화옥탄산(PFOA) 스트레스에 대한 유영저해율 및 치사율 분석 그래프 (n=5)

(4) 요각류를 대상으로 다중 환경 스트레스 노출에 따른 독성 수준 변화 확인

(가) 온도 + 납(Pb) 스트레스의 경우

- 고온 스트레스에서 납을 노출했을 때 최적 조건(10℃)에서 50% 유영저해를 나타낸 것과 달리 더 높은 유영저해율이 관찰되었으며 이는 고온 스트레스에서 독성원에 더 민감하게 반응하는 것을 의미함 (그림 15a, b). 또한 저온에서는 오히려 독성이 저감되었고, 이는 저온에서 납의 용해도 및 생체흡수율의 감소 등의 원인을 혹은 저온에서 생체저항성이 증대되어 독성원의 흡수율 및 분포용적의 감소 등의 원인 등 어떠한 기작이 관련된 것인지 확인하기 위하여 유전자 발현을 분석할 계획임.

(나) 온도 + PFOS 스트레스의 경우

- 저온 스트레스와 고온 스트레스와 동시에 EC₅₀ 농도의 PFOS를 노출했을 때 최적 조건(10℃)에서 50% 유영저해를 나타낸 것과 달리 더 높은 유영저해율(100%)이 관찰되었음 (그림 15c, d). 특히 고온 스트레스 조건에서는 더 낮은 농도에서도 독성 반응이 높게 관찰되어 이에 대한 기작을 확인할 계획임.

(다) 온도 + PFOA 스트레스의 경우

- 고온 스트레스에서 PFOA를 노출했을 때 최적 조건(10℃)에서의 유영저해율 보다 높은 결과를 나타냈으며 이는 고온 스트레스에서 독성원에 더 민감하게 반응하는 것을 의미함 (그림 15e, f). 또한 저온에서는 납과 마찬가지로 오히려 독성이 저감되었고, 이는 저온에서 PFOA의 용해도 및 생체흡수율의 감소 등의 원인을 혹은 저온에서 생체저항성이 증대되어 독성원의 흡수율 및 분포용적의 감소 등의 원인 등 어떠한 기작이 관련된 것인지 확인하기 위하여 유전자 발현을 분석할 계획임.

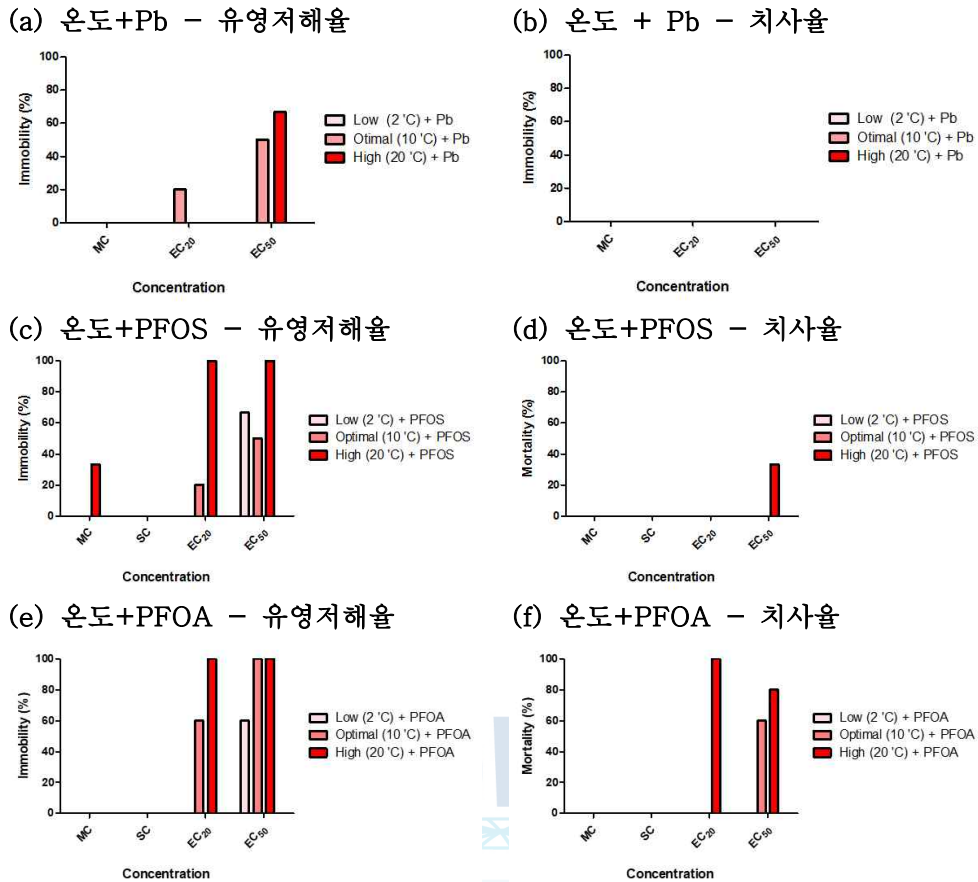


그림 15. 요각류에서의 다중 환경 스트레스(온도+독성원)에 대한 유영저해율 및 치사율 분석 그래프

(5) 다중 환경 스트레스 노출에 따른 극지 요각류의 독성 수준 요약

- 다중 환경 스트레스 노출에 따른 극지 요각류의 독성 수준 증감의 정도를 표로 나타내었음 (표 7). 온도, 독성원(Pb, PFOS, PFOA) 및 UV-B 개별 스트레스 조건에 대한 유영저해율 종말점을 대상으로 EC₅₀과 EC₂₀ 데이터를 도출하였으며, 이들 스트레스 조건들을 조합한 다중 환경 스트레스 조건에 대한 극지 요각류의 독성 수준의 변화를 분석하고 있으며, 그중 온도스트레스와 독성원 다중 노출에 따른 독성 수준 증감을 요약하였다.
- 다른 문헌 (Han et al., Fisheries Sciences, 2018)에서 역시 극지 요각류의 고온 스트레스 조건에서 치사율의 증가가 보고된 바 있어서 본 연구의 결과와 일치하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 본 연구와 같이 온도 스트레스 조건에서 다양한 독성원을 동시에 노출하는 경우는 보고된 바가 없으며, 특히 고온 스트레스와 독성원이 함께 노출되는 경우 유영저해율 뿐만 아니라 치사율도 크게 증가되는 것으로 관찰되어, 남극의 수온의 변화와 함께 수질의 오염도 역시 남극 생물의 건강성에 중요한 영향을 미칠수 있음을 확인할 수 있었음.

- 향후 추가적인 다중 환경 스트레스 노출 조건들에 대해서도 실험을 수행할 계획이며, 도출된 결과들은 전사체 결과와 통합적으로 분석함으로써 방어 혹은 적응 기작을 추적하고자 함.

표 7. 다중 환경 스트레스 노출에 따른 극지요각류의 독성 수준 변화

환경스트레스 노출조건	EC ₅₀ 에서의 반응	독성 증감	비고
저온 스트레스 (2℃)	유영저해 없음		
고온 스트레스 (20℃)	40% 유영저해		
단일	Pb	50%의 유영저해를 보임	EC ₂₀ - 4.66 ug/ml EC ₅₀ - 5.17 ug/ml
	PFOS	50%의 유영저해를 보임	EC ₂₀ - 22.26 ug/ml EC ₅₀ - 33.57 ug/ml
	PFOA	50%의 유영저해를 보임	EC ₂₀ - 230.00 ug/ml EC ₅₀ - 435.00 ug/ml
	UV-B 스트레스	50%의 유영저해를 보임	EC ₂₀ - 89.78 uW/cm ² EC ₅₀ - 108.00 uW/cm ²
다중	저온(2℃) + 납(Pb)	0%의 유영저해를 보임	↓↓↓
	고온(20℃) + 납(Pb)	66.6%의 유영저해를 보임	↑
	저온(2℃) + PFOS	66.6%의 유영저해를 보임	■
	고온(20℃) + PFOS	100%의 유영저해를 보임	↑↑
	저온(2℃) + PFOA	50%의 유영저해를 보임	↓
	고온(20℃) + PFOA	100%의 유영저해를 보임	↑↑

제 3 절 다중 환경스트레스 노출에 따른 전사체 프로파일 확보 및 분석

1. 고온 스트레스 노출에 따른 남극 로티퍼 및 요각류의 전사체 프로파일 확보 및 분석

가. 연구 내용

- 남극 무척추생물종에 대해 개별 및 다중 환경스트레스를 노출시키고 각 생물종의 RNA 시료를 확보하여 전사체 프로파일을 분석함으로써, 환경 조건에 따라 차등 발현되는 유전자들을 선별하고 이를 통해 스트레스에 대한 방어 혹은 적응 기작에 관여하는 유전자들을 규명하기 위한 실험을 수행하였다. 1차년도에는 우선, 기존 선행연구에서 확보한 남극 로티퍼 및 요각류인 *Philodina gregaria* & *Boeckella poppei* 두 종을 대상으로 개별 환경스트레스 중 고온스트레스 조건에서 전사체 프로파일을 확보하여 차등 발현유전자를 선별하였다.

나. 연구 방법 및 연구 결과

- (1) 온도 스트레스에 따른 남극 로티퍼 (*Philodina gregaria*) 및 요각류 (*Boeckella poppei*) 두종의 전사체 프로파일 확보 및 분석

(가) 연구 방법

① 온도 스트레스 조건 노출

- 남극 서식지 온도인 2℃와 고온 스트레스 온도인 20℃에 노출시키고 두 종에서 total RNA를 확보하였다.

② RNA-Seq 방법을 이용한 전사체 프로파일 확보

- Total RNA로부터 HiSeq 장비를 이용한 Next generation sequencing (NGS) 기법을 이용하여 RNA sequencing을 수행하였음.

(나) 연구 결과

① 두종의 전사체 서열 정보 분석

- 남극 로티퍼 (*Philodina gregaria*) 및 요각류 (*Boeckella poppei*) 두 종의 전사체 서열 분석을 통해 아래 표 8와 같은 결과를 얻을수 있었음. 이렇게 확보된 전사체 서열 결과를 이용하여 각 종에서 고온 스트레스에 따라 특이적으로 발현되는 유전자 (DEG)를 선별하고 이를 통해 고온에 대한 적응 유전자 및 기작을 규명하기 위해 Functional study를 수행하였음.

표 8. 극지 로티퍼 및 요각류의 온도 스트레스에 따른 전사체 서열 분석 결과

구분	<i>P. gregaria</i> (로티퍼)	<i>B. poppei</i> (요각류)
Number of total reads	32,069,603	40,846,103
Number of assembly contigs	61,505	66,892
Maximum contig length	25,655	15,172
Mean contig length	521	610
Contigs with BLAST matches	8,559	8,310
Contigs with Gene Ontology terms (cellular component)	23,581	28,860
Contigs with Gene Ontology terms (molecular function)	26,626	19,012
Contigs with Gene Ontology terms (biological process)	51,736	49,569

② 고온 스트레스 노출에 따른 남극 로티퍼 *Philodina gregaria* 전사체 분석

- *P.gregaria*에서 확보된 서열을 이용하여 BLAST 분석을 통해 서열상 유사한 유전자를 지니는 종들을 분석한 결과 아래 그림 16와 같이 *C. lusitaniae*, *F. catus*가 가장 높은 유사성을 보였으며, 이들 중 윤충강에 속하는 종들을 살펴보면, *A. vaga* 및 *P. roseola*의 유전자와 유사한 서열들이 분석된 것을 확인할 수 있었다.
- 온도 스트레스 조건으로 남극 서식지 온도인 2°C와 20°C에서 각각 분석된 contig들의 RPKM 값에 대한 Fold change 값을 이용하여 각 조건에서 차등발현되는 contigs를 발굴하였고 그림 16에 제시된 벤다이어그램과 같이 고온 조건(20°C)에서 발현이 2배 이상 증가되는 contigs 수가 624개 발현이 2배 이상 감소하는 contigs 수가 1,138개로 분석되었으며, 이들 contigs들은 차등발현 유전자로 동정될 가능성이 높은 서열들로서 추가적인 분석을 수행하였다.

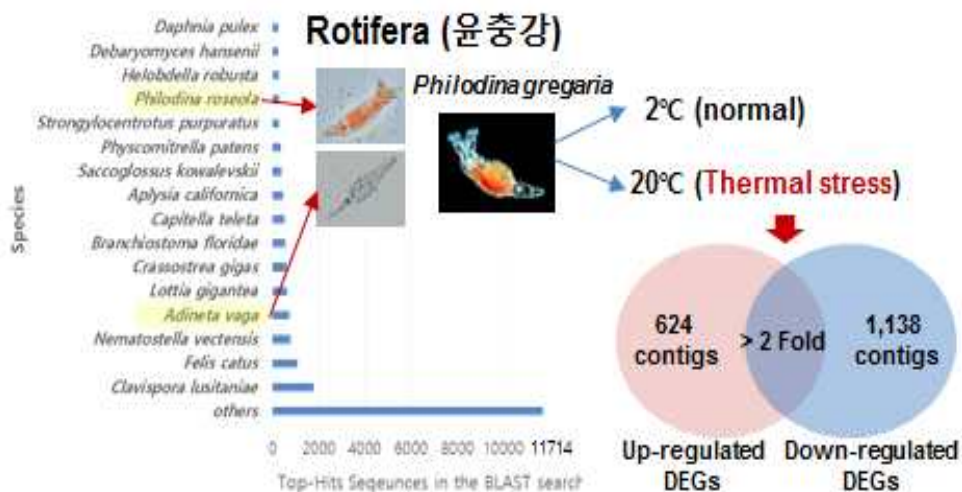


그림 16. *Philodina gregaria*에서 온도 스트레스에 따른 전사체 프로파일 분석 결과

제 4 절 다중 환경스트레스와 스트레스 방어 및 적응 기작 관련 유전자들의 상호작용 연구

1. 남극 무척추동물에서 다중 환경 스트레스 방어 혹은 적응 유전자 정보 확보

가. 연구내용

- 남극 무척추동물종에 대해 개별 및 다중 환경스트레스를 노출시키고 각 생물종에서 특이하게 발현되는 유전자들을 선별하여, 이들이 관여하는 생체내 기능에 대해 조사하고, 이들 중 환경 스트레스에 대한 방어 혹은 적응 기작에 관여하는 유전자들을 규명하고자 하였다. 본 연구에서는, 기존 선행연구에서 확보한 남극 로티퍼인 *Philodina gregaria*를 대상으로 고온 스트레스 방어 혹은 적응 기작에 관여하는 유전자를 선별하였다.

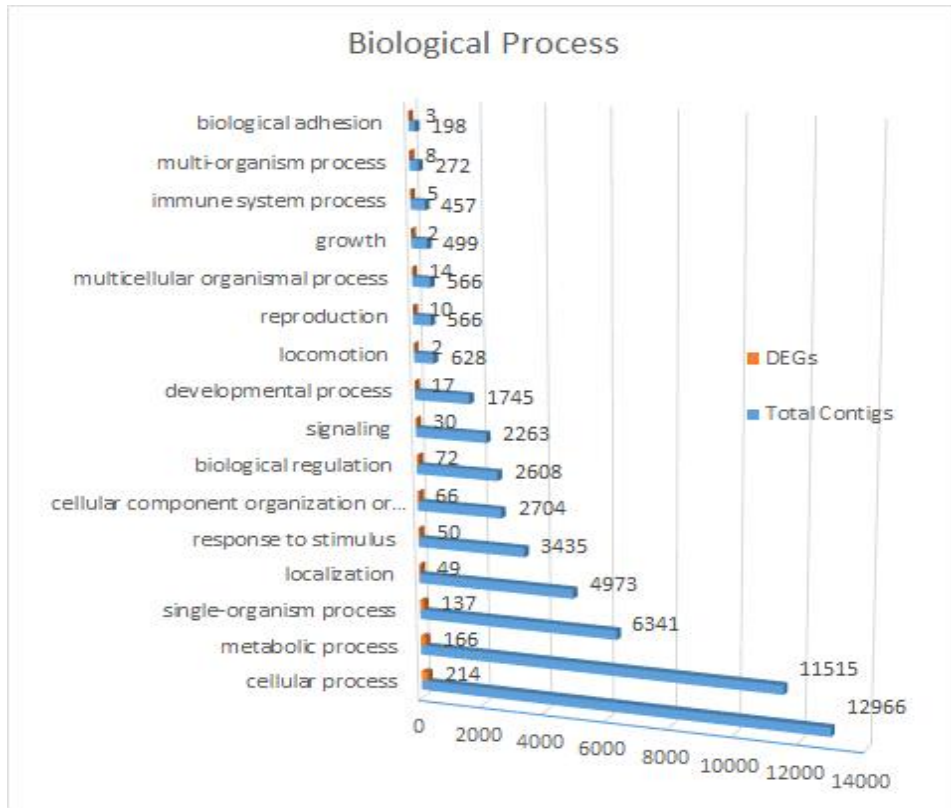
나. 연구 방법 및 연구 결과

- (1) *Philodina gregaria*에서 고온 스트레스에 따른 차등발현유전자(DEGs) 선별을 위한 Functional study

(가) GO (Gene Ontology) 분석

- 고온 스트레스 조건에서 GO terms을 분석한 결과, biological process 부분에서는 주로 metabolic process와 response to stimulus, localization 관련 유전자들의 발현이 변화되었다 (그림 17A). Molecular function 부분에서는 catalytic activity, binding, transporter activity 관련 유전자들의 발현이 변화됨을 확인할 수 있었다(그림 17B).

(A)



(B)

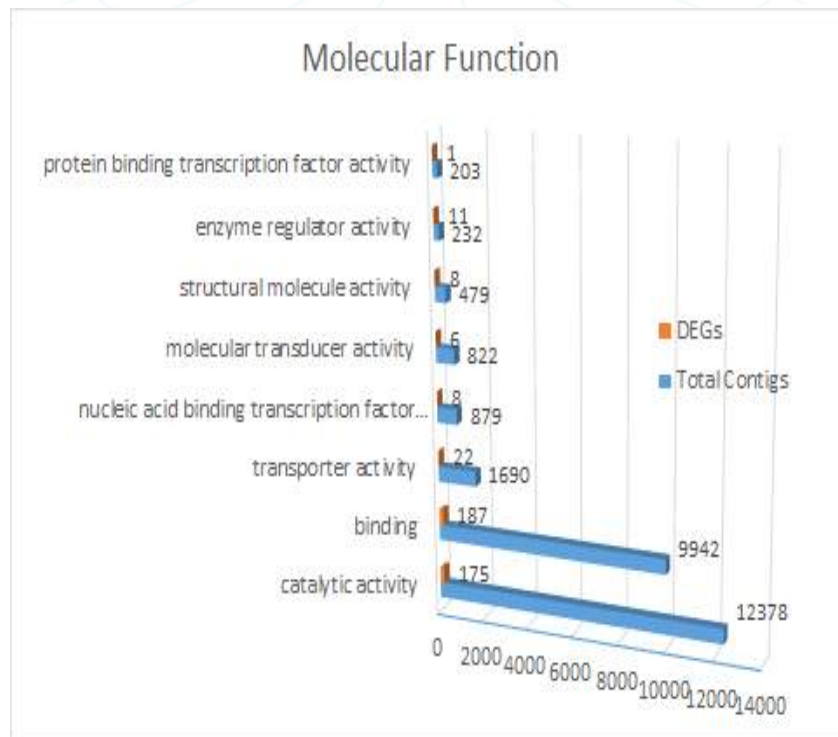


그림 17. *Philodina gregaria*에서 온도 스트레스에 따라 차등발현된 유전자들의 GO 분석 결과

(나) 온도 스트레스에 의해 영향을 받는 것으로 알려진 Functional category 선정

- 기존 문헌조사를 통해 온도 스트레스에 관여하는 것으로 알려진 functional category 들중 본 연구 결과에서 의미있게 변화된 것으로 분석된 유전자들의 발현양 변화를 살펴본 결과, 아래 그림 18과 같이 8개 category, 총 41개 유전자들에 대해 발현이 유의하게 변화하는 것을 확인하였다.

Seq. Description	FC(20/2)
Ubiquitination and proteasome	
proteasome activator complex subunit 1	5.39
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	3.24
ubiquitin 1 isoform 1	2.16
signal transduction	
mitogen-activated protein kinase 4	3.78
calcium channel	3.24
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	3.24
metabolism and sterol synthesis	
sterol desaturase	87.94
neutral triphosphatase	-2.33
sterol 6-oxidase	-2.65
enzyme-linked protein(CYP5A26)	-2.78
sterol-binding protein 5	-7.41
sterol 6-oxidase	-7.98
Electron transport-respiratory chain	
cytochrome c oxidase polypeptide VIIb	2.37
cytochrome c oxidase subunit 1b	-2.55
cytochrome b-c1 complex subunit 9 like	-2.78
cytochrome c oxidase subunit 8	-3.21
cytochrome b-c1 complex	-3.24
cytochrome c oxidase subunit 1	-4.22
cytochrome c oxidase subunit 8c	-4.63
Heat shock Protein	
hsp70	21.58
heat shock subfamily B member 8-like(GSP10)	3.24
heat shock protein 70	-2.16
heat shock protein beta 11	-2.47
heat shock cognate 71 like protein	-2.69
heat shock 70 kDa protein 1-like	-2.78
heat shock protein 90α class B class A containing protein 1	-2.78
heat shock protein 70	-6.49
sigma-crystallin 2 (sigma-crystallin 2)	-30.12
antioxidant defense	
glutathione synthetase	24.82
uracil-DNA glycosylase	4.32
glutathione	3.24
glutathione 2	2.16
uracil-DNA glycosylase	2.16
glutathione reductase	-2.09
glutathione S-transferase omega 2	-2.27
glutathione S-transferase omega 2	-3.24
glutathione transferase omega 1	-4.94
carbon metabolism	
isocitrate dehydrogenase	3.24
DNA protection	
tau-dependent decetylation	3.24
telomerase protein component 1-like	3.24
direct protein dsb10 protein	3.24

그림 18. *Philodina gregaria*에서 온도 스트레스에 대한 functional category 및 관련 유전자들 (Blue=down expressed, Red=up expressed)

(다) *Philodina gregaria*에서 온도스트레스에 대한 방어/적응기작 관여 유전자 규명

- 특히 이들 41개 유전자들 중에서 heat shock response, 단백질 분해, lipid 합성, 항산화 기작에 관여하는 유전자들을 선별하여 각각이 어떠한 기작으로 온도스트레스에 반응하는지 **그림 19**에 나타내었다. 일반적인 고온 스트레스에서 주로 발현되는 heat shock protein인 Hsp90 및 Hsp40은 발현이 증가하였고, PMSD10의 조절을 받는 Ub-protein ligase와 Ubiquilin-1의 발현이 함께 증가하는 것을 통해 고온 스트레스 조건에서 손상된 단백질들의 제거를 위해 proteasome degradation pathway가 작용하는 것으로 분석되었다.

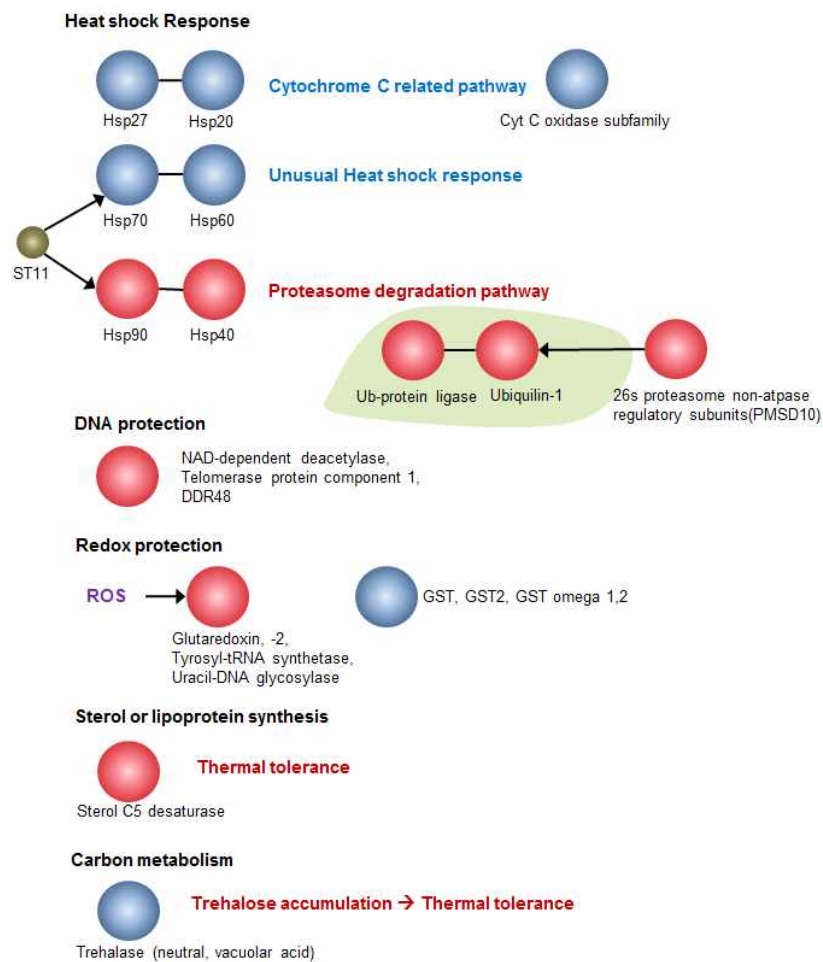


그림 19. *Philodina gregaria*에서 온도 스트레스에 대한 방어/적응 기작 관여 유전자들 (Blue=down expressed, Red=up expressed)

- 또한 sterol C5 desaturase 유전자의 증가는 세포내 지질의 불포화도를 증가시킴으로써 고온에 대한 저항성을 증가시키며, 동시에 곤충의 체액 및 난에서 관찰되며 이들의 에너지원과 저장 탄수화물로서 중요한 역할을 하고 있는 Trehalose를 분해하는 효소인 Trehalase의 발현이 특이하게 감소하는 것을 통

해 체내 trehalose 함량을 높임으로써 고온에 대한 저항성을 증가키는 것으로 사료된다. 이러한 결과들은 “온도 스트레스에 대응하는 남극 윤충류, *Philodina gregaria*의 유전자 및 이를 이용한 남극 생태계 진단 방법”으로 국내 특허를 출원할 계획이다.

(2) 온도 스트레스에 따른 남극 요각류 (*Boeckella poppei*)의 전사체 프로파일 분석

- *Boeckella poppei*에서 온도 스트레스에 따른 전사체 분석을 위한 전사체 발현 profile 확보하였으며, 향후 극지 로티퍼 결과 분석 방법을 이용하여 GO 및 pathway 분석할 계획임

2. 남극 채집 무척추동물종의 후성유전체 관련 유전자 분석

가. 연구내용

- 1차년도에 확보한 남극 채집 *Philodina gregaria*과 *Boeckella poppei*에 대한 전사체 분석 결과로 부터 후성유전체 주요 기작인 Histone 단백질, Histone acetylation 및 deacetylation, Histone methylation 및 demethylation에 관여하는 것으로 보고된 유전자 목록을 작성하여, 두 종에서 발현되는 유전자들을 확인하였고, 이들을 실험모델로 주로 사용되는 종들과 비교하였다.

나. 연구 방법 및 연구 결과

(1) 남극 채집 *Philodina gregaria*과 *Boeckella poppei* 각 종에서 발현되는 후성유전체 관련 유전자 목록 작성

(가) 문헌조사를 통해 확보한 후성유전체 관련 유전자 목록과 두종의 전사체 결과와의 비교 연구

- 문헌조사를 통해 후성유전체 관련 유전자들을 작용 기작에 따라 분류하여 작성하였음 (표 9, 표 10). 1차년도에 확보한 *Philodina gregaria*과 *Boeckella poppei*에 대한 전사체 분석 결과를 이용하여 이들 표에 제시된 유전자들의 발현 여부를 확인한 결과, rotifer 문인 *Philodina gregaria*은 총 24종의 유전자들이, Arthropoda문의 *Boeckella poppei*는 총 64종의 유전자들이 발현됨을 확인하였음. *Philodina gregaria*의 경우, *Boeckella poppei*에 비해 전반적으로 발현되는 유전자들의 개수가 적었음.

(나) 각 종에서 발현되는 DNA methylation 관련 유전자 목록 작성

- 기존 문헌에서 보고된 바와 같이 rotifer 문인 *Philodina gregaria*은 cytosine (5mC) 및 adenine (6mA) methylation machinery 관련 유전자들 (예; DNMT1, 2, DAMT1, Alkb 등)이 발현되지 않는 것을 확인하였음 (표 9). 반면 Arthropoda문의 *Boeckella poppei*는 *Homo sapiens*와 같은 고등생물에서 발현되는 유전자들이 대부분 발현되는 것을 확인하였음.

표 9. 남극 무척추동물에서 발현되는 DNA methylation과 demethylation 기작 관련 유전자 목록

			<i>Philodina gregaria</i>	<i>Boeckella poppei</i>
Type	Family	Lineage	Nb Sequences	Nb Sequences
5mC DNA methylation	DNMT	DNMT1		5 DNMT1
		DNMT2		1 DNMT2
		DNMT3		
6mA DNA methylation	MTA70 like (methylation)	DAMT1		2 N6AMT2
				2 MTA70
	AlkB (demethylation)	NMAD1		
		AlkBH		1 ALKBH5

(다) 각 종에서 발현되는 Histone 단백질 및 Histone modifying enzyme 관련 유전자 목록 작성 (표 10)

- histone 단백질의 경우, *Philodina gregaria*는 H3를 제외한 H1, H2A, H2B, H4 4가지 종류가 발현되었으며, *Boeckella poppei*는 5종 모두 발현되었고, 종마다 다양한 linker (H1)를 지니는데 *Boeckella poppei*의 경우, delta form을 지니고 있음.
- histone modifying 기작을 살펴보면, histone acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination 과정이 주로 일어나며, 이와 관련된 유전자들을 조사하였음. 이중 본 연구에서는 histone acetylation과 methylation에 연관하는 유전자들에 초점을 맞춰 목록화 하였음 (표 10). Histone 단백질에 hyperacetylation이 발생시 염색질이 풀어지게 되어 이웃 유전자들의 전사가 일어나게 되며, 반대로 hypoacetylation이 발생시 gene silencing이 촉진되는 것으로 보고됨. 또한 Histone의 methylation은 acetylation이나 phosphorylation으로 표지된 부위가 안정화되며 이를 통해 세대를 통한 유전이 가능함. 특히, H3K9, H3K36, H4K20 지점에서의 methylation은 gene inactivation과 관련되며, H3K4, H3K79 지점의 methylation은 gene activation과 관련됨.

표 10. 남극 무척추동물에서 발현되는 histone acetylation과 methylation 관련 유전자

			REFERENCE SPECIES						
			<i>Philodina gregaria</i>	<i>Boeckella poppei</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
Histone	Linker	H1	2 H1	2 H1-delta	11 H1, H1.0/1/2/3/4/5 H1.R0, H1t, H1.ea, H1.x	9 H1L-1/2/3/4/5/6/7/8/ H1S-24	H1s1-3, H1s1C G33861, H1s1C G33834, H1s1C G33807, H1s1C G33801, B1gH1	1 H1	
	Core	H2A	1 H2AV	8 H2A 1 H2A1 1 H2A2 1 H2A4	H2A1, H2A1, H2AV, H2AZ, H2A1A/B/D/H/J, H2A2A/B/C, H2A3, H2AB1, H2AFB1, H2AG, H2AX, H2AW, H2B1A/B/C/L/U/E/F/G/H /I/K/L/M/N/O, H2B2C/D/E/F, H2B3B, H2BRM, H2BFS, H2BWT	5 H1S-3/35, HTA5-1, HTZ-1, ZC155.2	3 H2A, H1s2A, H2A.v	2 H2A.1/2, H2AZ	
		H2B	5 H2B	7 H2B	22 H2B2C/D/E/F, H2B3B, H2BRM, H2BFS, H2BWT	5 H1S-4/11/39/41/48	1 H2B	2 H2B.1/2	
		H3		11 H3 2 H3.1	6 H3, H3.1/2/3, H3.1t, H3.3C	11 C/PAR-1, HCP-3, H1S- 2/40/69/70/71/72/73/7 4, F2006.9	3 H3, H3.3, eId	2 H3, CSE4	
		H4	1 H4	7 H4	2 H4, H4G	1 H1S-1	1 H4	1 H4	
Histone acetyltransferase	GNAT	ELP3 F08F8.4 HAT1 NAA40 NAA50 NAA60 NAT10 PCAF1	1 ELP3 2 HAT1 1 NAA40 1 NAA50 1 NAA60 2 NAT10 1 KAT2A 3 KAT2B	1 ELP3 2 HAT1 1 NAA40 1 NAA50 1 NAA60 1 NAT10 1 KAT2A/B	1 ELP3 2 ESCO1/2 1 HAT1 1 NAA40 1 NAA50 1 NAA60 1 NAT10	1 ELP3 1 F08F8.4 1 HAT-1 1 Y38A10A.7 1 F40F4.7 1 F30F8.10 1 NATH-10	1 ELP3 0 - 1 CG2051 1 CG7593 1 SAN 1 NAA60 1 NAT10	1 ELP3 0 - 1 HAT1 2 HPA2/3, NAT4 0 - 1 SAN 0 - 1 NAT10	
		MYS1 MYS2 MYS4/LSY12 (LSY12) MYS4/LSY12 (MYS4)	2 TIRF0 1 ESA1 2 KAT8 3 KAT6B 2 KAT7	1 KAT5 1 KAT8 2 KAT6A/B 0 -	1 KAT5 1 KAT8 2 KAT6A/B 0 -	1 MYS-1 1 MYS-2 1 LSY-12 1 MYS-4	1 MYS-1 1 MYS-2 1 LSY-12 1 MYS-4	1 TIP60 2 MCF, CG1894 1 ENOK 0 -	1 ESA1 1 SAS2 0 - 0 -
	TF/NF	TF/NF (TAF1)	2 BTAF1	3 BTAF1	2 TAF1/1L	1 TAF-1	1 TAF1	1 TAF1	
	Histone deacetylase	ClassI	Class I (HDA1/3) Class I (HDA2)	2 HDAC1 1 HDAC2 3 HDAC3	2 HDAC1/2 1 HDAC3	2 HDA-1/3 1 HDA-2	1 RPD3 1 HDAC3	1 RPD3 1 HDAC3	
Class II (HDA4) Class II (HDA5/6/10) Class II (HDA5/6/10)			1 HDAC4 2 HDAC6 3 HDAC6	4 HDAC4/5/7/9 0 - 2 HDAC6/10	1 HDA-4 1 HDA-6 3 HDA-5/10, F43G6.17	1 HDAC4 0 - 1 HDAC6	1 HDA1 0 - 0 -		
ClassIII		Class III (SIR2.1) Class III (SIR2.2/2.3) Class III (SIR2.4)	2 SIRT1 2 SIRT4 1 SIRT6	1 SIRT1 1 SIRT4 1 SIRT6	1 SIR-2.1 2 SIR-2.2/2.3 1 SIR-2.4	1 SIR-2 1 SIR-2.2 1 SIR-2.4	1 SIR2 1 SIRT4 1 SIRT6	1 SIR2 0 - 0 -	
		ClassIV	Class IV	1 HDAC11	1 HDAC11	1 HDA-11	1 HDAC11	0 -	
DOT1		DOT1		1 DOT1M	6 DOT-1.1-1.5, D1053.2	1 GPP	1 DOT1		
Histone methyltransferase	PRMT	CARM1 PRMT1 PRMT3/7 PRMT3/7 PRMT5	1 CARM1 1 PRMT1 1 ART1	1 CARM1 2 PRMT1/8 1 PRMT7 1 PRMT9 1 PRMT5	1 PRMT-1 1 PRMT-3 1 PRMT-7 1 PRMT-5	0 - 2 ART1/2 0 - 1 ART7 1 CSUL	1 ART4 0 - 0 - 0 - 1 HSL7		
		SETu1	SET3 SET27 SET29	1 SETD7 19 SMYD4 20 SETD7	2 SMYD2/3 1 SETD7 0 - 0 -	1 SET-30 1 SET-3 1 SET-27 1 SET-29	0 - 0 - 0 - 0 -		
	SETeu2	SET1 MES4 SET16 SET2 Y7383A.1 - MET-1/LIN-59 MET-1/LIN-59	2 KMT2C 1 SETD18 1 KMT2B 1 SETD2	4 KMT2C 3 SETD18 1 KMT2E 1 SETD2 2 ASH1 1 ASH2	2 NSD1, WHSC1L1 2 KMT2C/D 2 SETD1A/B 1 KMT2E 0 KMT2B 1 SETD2 1 ASH1L	1 MES-4 1 SET-16 1 SET-2 1 Y7383A.1 1 SET-8 1 MET-1 1 LIN-59	1 MES4 1 TRR 1 SET1 0 - 0 - 0 - 1 SET2 1 ASH1	0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 -	
		SEThetero	DNMT1/CMT (DNMT1) MET2 SET3 MES2/SET12 MES2/SET12 SET4 SET-11 SET-6 family no no	1 SUV39H2 5 DNMT1 2 SETD81 1 EZH2 3 WHSC1 1 SET4 1 EHMT 1 CMT2 1 DNMT2	2 SUV39H1/2 2 SETDB1/2 0 - 2 EZH1/2 1 WHSC1 2 KMT5B/C, Dm Hmt4-2 2 EHMT1/2 0 - 0 - 0 -	0 - 1 MET-2 1 SET-23 1 MES-2 1 SET-12 1 SET-4 1 SET-11 8 SET-6/13/15/19/20/ 21/32/33 1 SET-25 1 SET-9	1 Su(var)3-9 1 EGG 0 - 1 E(z) 0 - 1 Hmt4-2 1 G9a 0 - 0 - 0 - 0 -	0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 -	
	SET - PPN	Cons07 Cons12 Cons18		0 - 0 - 0 -	0 - 0 - 0 -	0 - 0 - 0 -	0 - 0 - 0 -		
	Histone demethylase	LSD	AMX1 LSD1/SPR5	1 KDM1A	1 KDM1B 1 KDM1A	1 AMX-1 2 LSD-1, SPR-5	0 - 1 SU(VAR)3-3	0 - 0 -	
			JMJC1 JM.D1/JHD.M1 (JHDM1) JM.D1/JHD.M1 (JM.D1)	1 NO66 1 KDM7	1 NO66 2 PHF2 2 KDNAA 2 KDM4B 1 KDM4C 1 KDM5	1 KDM7 2 KDM2A/B 3 KDM7A, PHF2, PHF8	1 JMJC-1 1 JHD.M-1 2 JM.D-1.1/1.2	1 CG2882 1 KDM2 0 -	0 - 1 JHD1 0 -
		JMJD	JM.D2 RBR2	1 KDM4B 1 KDM5B	2 KDM4A 1 KDM5A	5 KDM4A/B/C/D/E 4 KDM5A/B/C/D	1 JMJD-2	2 KDM4A/B	1 G1S1 0 -
			JM.D3/UTX1 (JMJD3) JM.D3/UTX1 (UTX1) JM.D4/PSR1 (JMJD4) JM.D5 JM.D4/PSR1 (PSR1)	1 KDM6B 1 KDM8 1 JMJD6	2 KDM6A 5 KDM8 1 JMJD6	0 - 3 KDM6A/B, UTY 0 - 1 KDM8 1 JMJD6	3 JMJD-3.1/3.2/3.3 1 UTX-1 1 JMJD-4 1 JMJD-5 1 PSR-1	0 - 1 UTX 1 CG7200 1 GM21055p 1 PSR	0 - 0 - 0 - 0 - 0 -

- histone acetylation과 methylation에 관련된 유전자들은 표 10에서 보는바와 같이 두 종간에 유전자의 숫자는 다르지만, 모두 발현되고 있는 것을 볼 수 있음. histone acetylase 중 GNAT family의 경우 *Philodina gregaria*과 *Boeckella poppei*에서 모두 발현되었으며, 다른 종들의 결과를 보아도 진화적으로 잘 보존되었음을 알수있음. *Philodina gregaria*에서 특이하게 lysine acetyltransferase family와 Class I deacetylase family가 발현되지 않았음. 또한 Histone methyltransferase family 역시 *Boeckella poppei*에 비해 제한된 숫자의 유전자들이 발현되었음. 이중 H3K4-methyltransferase인 SETu2 관련 유전자들은 *C. elegans*에서 장수의 세대간 유전에 관련되어 있으며, 이들 유전자들은 *Philodina gregaria*에서도 보존되고 있음. H3K4-demethylase인 SPR5의 경우 *Boeckella poppei*에서는 발현되나 *Philodina gregaria*는 loss되어있음. 이는 fertility 관련 세대간 유전 결함이 이 유전자의 loss와 관련된다고 보고되었고, 또한 SET30과 MET2 유전자의 loss는 이러한 결함을 촉진한다고 보고되어 있어, 이들 유전자가 발현되지 않은 *Philodina gregaria*의 경우 환경 스트레스에 기인한 fertility 결함이 세대를 통해 유전될 수 있음을 나타냄.

3. 전사체 및 후성유전체 통합분석을 통한 개체 방어 및 적응 기작 규명

가. 연구내용

- 1, 2차년도에 확보한 남극 채집 *Philodina gregaria*과 *Boeckella poppei*에 대한 전사체 분석 결과로 부터 후성유전체 주요 기작인 Histone 단백질, Histone acetylation 및 deacetylation, Histone methylation 및 demethylation에 관여하는 것으로 보고된 유전자 목록을 작성하여, 두 종에서 발현되는 유전자들을 확인하였고, 실제 극지 요각류를 대상으로 환경 스트레스 조건에서 Methylation 양상에 영향을 주는지 확인하는 연구를 수행하였음.

나. 연구 방법 및 연구 결과

- (1) 남극 채집 *Philodina gregaria*과 *Boeckella poppei*의 고온 스트레스에 따른 전사체 및 후성유전체 통합 분석
 - 다양한 환경 스트레스 조건에 따라 발현양이 변화하는 남극 무척추동물의 전사체 및 후성유전체 결과를 분석함으로써, 스트레스에 대한 방어 및 적응 기작을 규명하고자 함. 이를 위해 2차년도에는 1차년도에 확보한 남극 채집 *Philodina gregaria*과 *Boeckella poppei*에 2°C vs 20°C 노출 시킨 고온 스트레스 조건에서 분석한 전사체 발현양 결과로 부터 후성유전체 주요 유전자들의 발현양 추

이를 분석하였음

(가) *Philodina gregaria* 종에 대한 고온 스트레스 조건에서 후성유전체 관련 유전자 발현양 변화

- 앞서 확보된 후성유전체 유전자 목록을 바탕으로 전사체 발현양을 비교하여 나타낸 결과를 **그림 20**에 제시하였음. 고온 스트레스에 의해 core Histone 단백질의 발현이 감소하였고, GNAT 관련 histone acetylase 중 ELP3, NAT10은 1.5 배이상 감소하였으나, KAT2A는 증가하였음. *Philodina gregaria* 종에 발현된 유일한 histone deacetylase 6는 고온 스트레스에 의해 감소하였음. 또한 histone methylation 관련해서는 methyltransferase 3종이 감소하고 demethylase 는 증가하여 고온 스트레스에 의해 histone의 hypomethylation이 야기되었을 것으로 추정됨 (**그림 20**).

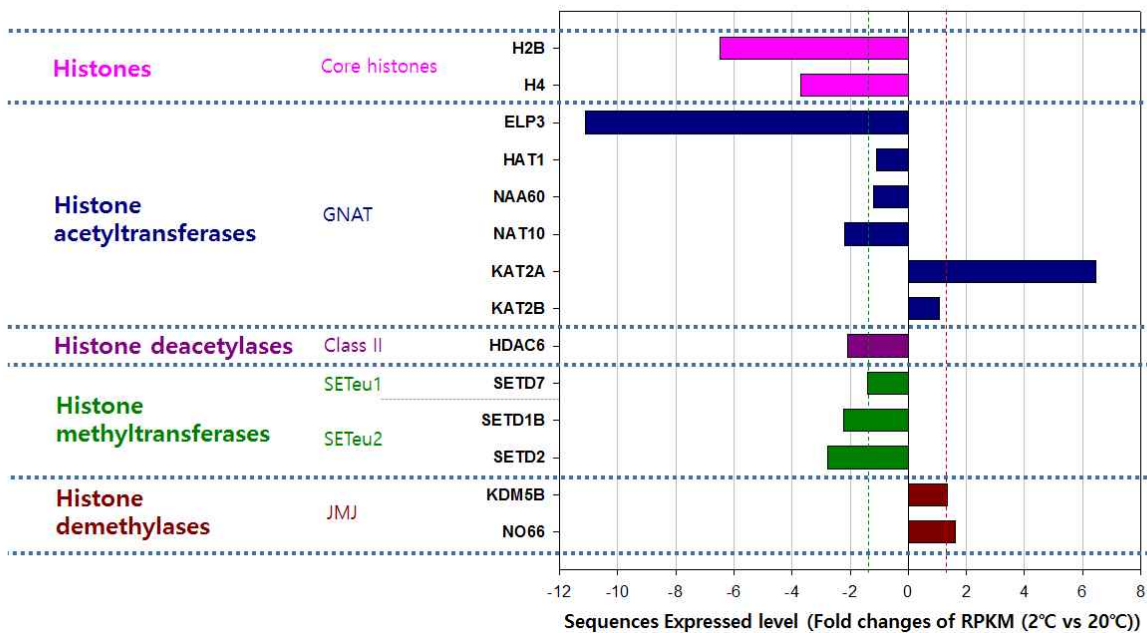


그림 20. 극저 *Philodina gregaria*의 온도 스트레스에 따른 후성유전체 관련 유전자 발현양 분석

(나) *Boeckella poppei* 종에 대한 고온 스트레스 조건에서 후성유전체 관련 유전자 발현양 변화

- 앞서 확보된 후성유전체 유전자 목록을 바탕으로 전사체 발현양을 비교하여 나타낸 결과를 **그림 21**에 제시하였음. 고온 스트레스에 의해 H1-delta linker Histone 단백질의 발현이 감소하였고, H2A1, H2A4, H4는 발현이 1.5배 이상 감소하였으며, H2A와 H3.1과 H3 단백질은 발현이 크게 증가하였음. GNAT 관련 histone acetylase 중 NAA40, NAA50은 증가하였고, KAT2A는 감소하였음.

lysine acetyltransferase 중 TIP60과 KT6B의 발현이 감소하였음. Class I과 II Histone deacetylase들의 발현은 주로 증가하였음, 또한 histone methylation 관련해서는 methyltransferase 13종이 감소하고 SETDB1과 WHSC1 두종만이 고온스트레스에 의해 증가하였음. demethylase 역시 JMJD6를 제외하고 7종이 감소하였음. 고온 스트레스에 의해 histone의 hypomethylation이 야기되었을 것으로 추정됨 (그림 21).

(다) *Philodina gregaria*과 *Boeckella poppei*에 대한 고온 스트레스 조건에서 후성유전체 관련 유전자 발현양 비교

- rotifer문인 *Philodina gregaria*가 발현하는 후성유전체 관련 유전자수가 적어 비교가 어렵지만, Arthropoda문의 *Boeckella poppei*과 공통적으로 발현이 변화하는 유전자들을 발굴하여 고온 스트레스에 의한 후성유전체 작용 기작을 예측할 수 있음. H2B, H4, ELP3, NAT10, SETD7, SETD1B, SETD2, NO66등의 발현양상이 유사하였고, KAT2A, HDAC6는 발현 양상이 상반되었음. 향후 추가적인 분석을 통해 환경 스트레스에 의한 후성유전체 machinery의 역할과 작용 기작을 파악하고자 함.



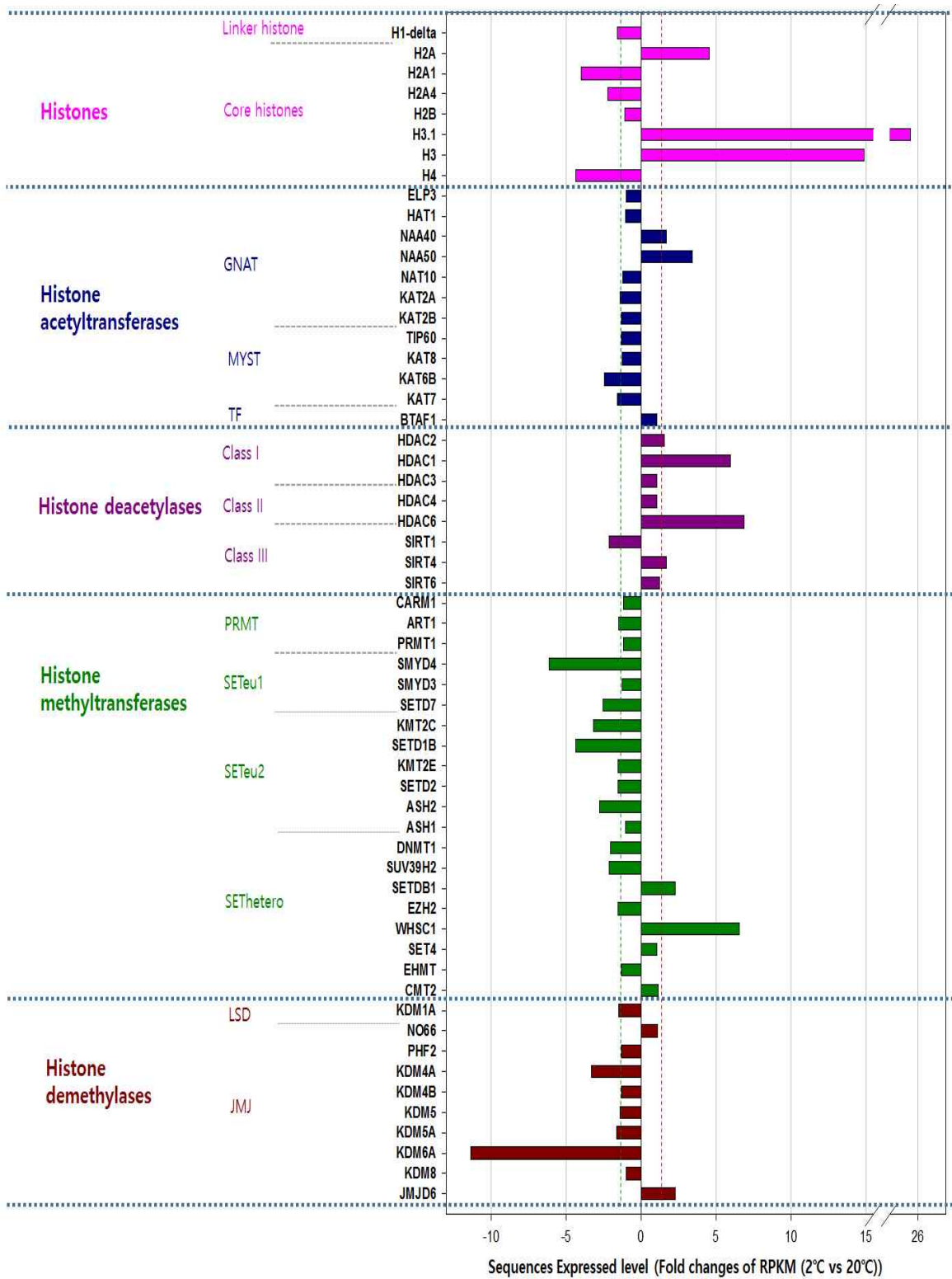


그림 21. 극지 *Boeckella poppei* 의 온도 스트레스에 따른 후성유전체 관련 유전자 발현양 분석

(2) 스트레스 조건별 후성유전체(DNA methylation) 변화 확인

- 앞서 진행된 선행실험을 통해 확립된 조건별 환경스트레스에 의해 노출되었을 경우의 스트레스 조건별 DNA methylation 변화를 확인하였다. DNA methylation 여부 확인을 하기 위해 가장 먼저 요각류 개체로부터의 고순도의 Genomic DNA 분리를 하였다. 이 후 DNA methylation pattern 분석을 위한 조건을 선별하고자 5-mC DNA ELISA Kit를 이용하였고 문헌조사를 통하여 DNA methylation과 관련이 있는 유전자 선별 및 특정 유전자의 DNA methylation pattern 분석을 진행하고 있다.

(가) 연구 방법

① 극지 요각류 개체로부터의 Genomic DNA 분리

- UV-B 스트레스 조건 : $61 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ vs $88 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ vs $100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ vs $136 \mu\text{W}/\text{cm}^2$
- UV-B에 대한 노출은 대조군의 경우 기존 배양조건 10°C 에서 진행하였다. 총 노출기간은 5일로 조건별로 요각류 1마리씩 총 50개의 반복수를 두었다. 노출이 끝난 후 요각류로부터 Genomic DNA를 분리하였다.
- DNA 분리 방법 : 기존 연구 중 갑각류인 *Daphnia pulex*를 이용하여 hydroxymethylation을 분석한 논문(Dovile Strepetkaite et al., 2015)을 참고하여 Genomic DNA를 분리하였다. Thermo Scientific™ 사의 GeneJET™ Plant Genomic DNA Purification Mini Kit를 이용하였고 Kit 내부의 있는 기본 protocol A 방법을 이용하였다.

② 개별 환경 스트레스에 대한 DNA의 methylation 확인

- 기존 연구 중 요각류인 *Gladiolus pectinatus*를 이용하여 DNA methylation을 분석한 논문(Anais Guyon et al., 2018)을 참고하여 실험을 진행했다. ZYMO RESEARCH 사의 5-mC DNA ELISA Kit를 이용하였고 내부에 있는 protocol 방법을 이용하였다.

(나) 연구 결과

① UV-B 스트레스에 따른 DNA methylation 분석

- UV-B 스트레스 ($1 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ vs $88 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ vs $100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ vs $136 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) 실험 결과 : UV-B를 처리한 요각류의 개체에서 고순도의 Genomic DNA를 분리 후 5-mC DNA ELISA Kit를 이용하여 % of DNA methylation을 확인하였

다. 대조군의 DNA methylation 값은 1.69%, UV-B 처리군의 DNA methylation 값은 61 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 에서 2.52%, 88 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 에서 2.96%, 100 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 에서 2.3%, 136 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 에서 2.733%로 UV-B를 처리한 요각류 개체의 DNA가 대조군에 비해 DAN methylation의 수치가 더 높은 것을 관찰하였다 (그림 22).

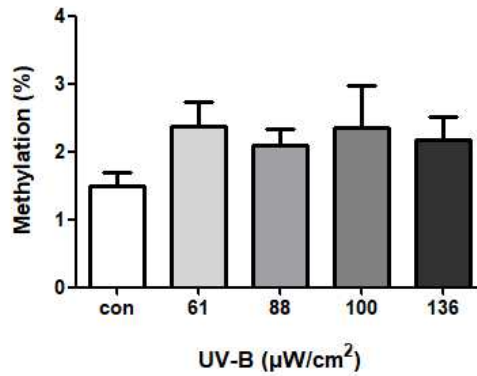


그림 22. 요각류에서의 UV-B 스트레스에 대한 DNA methylation 분석 그래프

(3) 다중 환경스트레스 조건별 유해성 등급화 분석을 통해 생물정보를 이용한 환경 관리방안 제시

- 문헌조사 및 도출된 결과로부터 유해성 등급화를 위한 세부 평가 항목 선정 및 통계분석을 위한 방법 타진중임. 세부평가항목은 본 연구에서 사용되는 생물종들의 치사율, 생리적 반응, 유전자 발현 변화율, 후성 유전체 변화율 등 각각 분석 지표들을 선정하고, 각 지표들의 지수화를 위하여 Threshold 값을 설정한 후, 유의성을 평가한다. 예상되는 지표들을 그림 23에 제시하였음. 세부적인 분석 방법은 향후 선정될 세부 평가 항목들에 따라 변경될 수 있으므로 3차년도에 통계 분석 모델을 통해 HQ (유해성 지수)를 산출하고 이를 바탕으로 유해성 등급화를 수행하고자 함.

유해성 등급	매우 안전	안전	관심	우려	매우 우려
HQ	1	2	3	4	5

지표	지수화	5	4	3	2	1
유전자 발현 변화율	Heat shock response	> 90	90-80	80-70	70-50	50 >
	Proteasome degradation	> 80	80-60	60-40	40-20	20 >
	DNA protection	> 80	80-60	60-40	40-20	20 >
	Redox protection	> 90	90-80	80-70	70-50	50 >
	Metabolism	> 90	90-80	80-70	70-50	50 >
후성 유전체 변화율	DNA methylation	> 90	90-80	80-70	70-50	50 >
	Histone modification	> 90	90-80	80-70	70-50	50 >
치사율	치사율	> 80	80-60	60-40	40-20	20 >
생리적 반응	유영저해율	> 80	80-50	50-10	10-1	1 >
	생식률	> 80	80-60	60-40	40-20	20 >

그림 23. 유해성 등급화 분석을 위한 지표 및 지수화 예시

제 5 절 비극지권 생물과의 비교연구를 통한 차별화된 스트레스 방어 기작 도출 및 key signature 발굴

1. 비극지권 서식 동일 종(속) 선별 및 환경 스트레스 노출후 전사체 분석 및 비교

가. 연구내용

- 지난 1~2차년도 실험결과를 통해 남극에서 채집한 무척추동물종 중 실험실내 사육가능하며 개체 확보가 용이한 종을 선별하고 이들에 대한 종분석 및 개체 확보 조건을 설정하고, 다양한 환경 스트레스 조건별 생리적 변화를 관찰하고 유해성 등급이 높게 관찰된 조건을 선정하고, 비극지권 서식 동일 종(속)에 해당하는 생물종을 선별하여 동일한 환경 스트레스 조건으로 노출한후 생리적 변화 관찰 및 전사체 분석을 수행하여 이들 중에서 스트레스 방어 및 적응 기작 관련 유전자들을 확보하고자 연구를 진행중이다.

나. 연구 방법 및 연구 결과

(1) 비극지권 서식 동일 종(속) 선별 및 환경 스트레스 노출

- 남극 King George Island의 King Sejong Station 근처에서 발견된 종으로 해수 copepoda(요각류)를 대상으로 종분석을 진행한 결과, *Tigriopus Kingsejongensis*로 확인되어, 이와 유사한 비극지권 서식종으로 *Tigriopus japonicus*을 선별하여 두 종에 대한 대량 배양 시스템을 구축중임(그림 24).

(A)



(B) *T. kingsejongensis* *T. japonicus* *T. kingsejongensis* *T. japonicus*



그림 24. 배양중인 남극서식 요각류의 사진(A)과 *Tigriopus Kingsejongensis* 와 비극지권 서식종인 *Tigriopus japonicus* 사진(B)

출처: Han et al. Mar Ecol Prog Ser 561:99-107 (2016)

(2) 유해성 등급이 높은 다중스트레스에 대한 남극 서식 종과 *Tigriopus japonicus* 종의 비교 분석 연구 수행

- 고온 스트레스 조건과 PFOS 노출시 가장 유해성이 높게 관찰되어, 이 스트레스 조건에서의 남극서식종과 *Tigriopus japonicus* 종의 생리적 특성을 비교하고 RNA를 확보하고자 함. 현재 *Tigriopus japonicus* 종을 배양하여 노출 실험을 수행중이며, 전사체 분석 결과를 확보할 계획임.

2. Functional study를 통해 남극 서식종과 차별화된 스트레스 방어 기작 발굴 및 Key signature 유전자 발굴 및 산업적 활용성 타진

가. 연구내용

- 1,2차년도에 확보된 *Philodina gregaria* 및 *Boeckella poppei* 종의 전사체 결과로부터 Stress Defense (SD) 관련 유전자들의 발현양을 확인하고 이들로부터 Key signature 유전자를 발굴하고자 하였음. 또한 극지요각류와 비극지권 요각류를 대상으로 동일한 스트레스 조건하에서 전사체를 확보하여 비교 분석함으로써 남극 서식종에 특이적인 스트레스 방어기작을 발굴하고자 하였음

나. 연구 방법 및 연구 결과

- (1) 1,2차년도에 확보된 *Philodina gregaria* 및 *Boeckella poppei* 종의 전사체 결과로부터 SD 유전자 발현양 확인을 통해 key signature 유전자 발굴

- 1,2차년도에 확보된 온도스트레스에 따른 *Philodina gregaria* 및 *Boeckella poppei* 종의 전사체 결과로부터 SD 유전자 발현양 확인
- 극지 요각류인 *Boeckella poppei* 종의 전사체 결과와 문헌에 보고된 다른 요각류 종들의 동일한 온도스트레스 조건하에서 발현이 조절되는 유전자 바이오마커들을 탐색하고 발현에 대한 영향을 비교함으로써 Key signature 유전자 발굴하고자 하였음
- 고온 스트레스 조건에서 기존에 보고된 요각류 결과와 유사한 결과를 나타내는 유전자들의 경우 스트레스 방어 기작에 기인하는 것으로 사료되며, 극지요각류에서 특이적으로 반응이 관찰되는 유전자들을 이용하여 남극 생물 특유의 방어 기작을 탐색하고자 함.

(2) Key signature 유전자/단백질에 대한 특성 분석 및 산업적 활용 가능성 타진

- 기존 문헌 조사를 통해 표 11에 제시한 바와 같이 스트레스별 키 유전자 발현 데이터 확보 및 특허 출원 가능 유전자 선별 중임



표 11. 온도 스트레스 노출에 따른 다양한 요각류에서 독성 관련 유전자 바이오마커의 수준 변화

stressors	Biomarker	Effect	Species	References
Increasing temperature	Aldehyde dehydrogenases (ALDHs)	Decreased expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Catalases (CATs)	Decreased expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Cellular apoptosis susceptibility protein	Elevated expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Cytochrome c oxidase subunit I (COI)	No significant change	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Cytochromes P450 (CYPs)	Decreased expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	DnaJ homolog	No significant change	<i>C. finmarchicus</i>	(Smolina et al., 2015)
Increasing temperature		Elevated expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Ferritin	No significant change	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Temperature; salinity shock	Glucose-regulated protein, 78 kDa	Elevated expression	<i>E. affinis</i>	(Xuereb et al., 2012)
Increasing temperature		Elevated expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Glutamate dehydrogenase	Elevated expression, time dependent	<i>C. finmarchicus</i>	(Smolina et al., 2015)
Increasing temperature		Elevated expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Glutathione peroxidases (GPxs)	Decreased expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Glutathione reductase (GR)	Elevated expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
increasing temperature	Glutathione S-transferases (GSTs)	Elevated expression for low and, decreased expression for high temperatures	<i>T. japonicus</i>	(Han et al., 2018)
increasing temperature		Elevated expression	<i>T. kingsejongensis</i>	(Han et al., 2018)
Increasing temperature		Isoform dependent	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Glutathione synthetase	Elevated expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Temperature	Heat-shock protein 10, 20, 21, 22, 40, 60, 94 or 105 kDa	No significant change	<i>T. japonicus</i>	(Rhee et al., 2009)
Temperature		Elevated expression for high and, decreased expression for low temperatures	<i>T. japonicus</i>	(Seo et al., 2006c)
Increasing temperature		Isoform dependent	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Heat-shock/increasing temperature	Heat-shock protein 70 kDa (HSP70)	Elevated expression (acclimatization result in lower expression)	<i>A. tonsa</i>	(Petkeviciute et al., 2015; Rahlff et al., 2017)
Heat-shock/increasing temperature		Elevated expression (acclimatization result in lower expression)	<i>C. finmarchicus</i>	(Voznesensky et al., 2004)
Heat-shock/increasing temperature		No significance	<i>C. finmarchicus</i>	(Smolina et al., 2015)
Heat-shock/increasing temperature		Elevated expression (acclimatization result in lower expression)	<i>E. affinis</i>	(Rahlff et al., 2017)
Heat-shock/increasing temperature		Elevated expression (acclimatization result in lower expression)	<i>T. californicus</i>	(Chan et al., 2014)
Heat-shock/increasing temperature		Elevated expression (acclimatization result in lower expression)	<i>T. japonicus</i>	(Rhee et al., 2009)
Increasing temperature		Elevated expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Heat shock/increasing temperature	Heat-shock protein 90 kDa (HSP90)	Elevated expression	<i>A. tonsa</i>	(Petkeviciute et al., 2015)
Heat shock/increasing temperature		Elevated expression	<i>E. affinis</i>	(Xuereb et al., 2012)
Heat shock/increasing temperature		No significant change	<i>T. japonicus</i>	(Rhee et al., 2009)
Increasing temperature		Elevated expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Inhibitor of apoptosis protein	Decreased expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	No significant change	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Nucleosome assembly protein 1	Elevated expression, time dependent	<i>C. finmarchicus</i>	(Smolina et al., 2015)
Increasing temperature		No significant change	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Peroxiredoxin-6	No significant change	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	Elevated expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Retinoid X receptor	Decreased expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Ribosomal protein L13	Elevated expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Ribosomal protein S11	No significant change	<i>C. finmarchicus</i>	(Smolina et al., 2015)
Increasing temperature		No significant change	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Superoxide dismutases (SODs)	Elevated expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Toll-like receptor	Elevated expression	<i>T. californicus</i>	(Chan et al., 2014)
Increasing temperature		No significant change	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Tubulins-alpha	Elevated expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Tubulins-beta	Elevated expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study
Increasing temperature	Vitellogenin	Decreased expression	<i>Boeckella poppei</i>	In this study

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연구개발 목표 달성도

1. 연구개발 최종 목표

본 위탁 과제에 최종 목표는 다중 환경 스트레스(온도차, 자외선, 독성원 노출 등)에 따른 남극 서식 무척추동물의 생리적 반응 및 유전체 그리고 후성유전체 변이를 추적하여, 남극 무척추동물의 체내 방어 및 적응 반응을 이해함으로써, 최종적으로 이들 반응 Key signature 및 작용 기전들을 기후변화 및 해양환경오염에 노출되어 있는 개체군의 건강성 유지를 제어할 수 있는 바이오마커를 활용함으로써 환경 대응 전략을 제시하고, 스트레스 방어기작에 관여하는 신규 분자 발굴을 통해 산업적 활용가치를 제고하고자 함.

2. 연구개발목표 및 달성도

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도(%)
1. 다중 환경스트레스에 의한 남극 서식 무척추동물의 전사체 프로파일 확보	1-1 다중 환경스트레스에 대한 스트레스 및 defense 생리적 반응 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 남극 채집 무척추동물종 중 실험실내 사육가능하며 개체 확보가 용이한 종 선별 <ul style="list-style-type: none"> · Rotifer(윤충류)인 <i>Philodina gregaria</i> 외 추가종 선별 · Copepod(요각류)인 <i>Boeckella poppei</i> 외 1종 - 로티퍼와 요각류를 대상으로 하는 개별 환경 스트레스 노출 조건 확립 완료 <ul style="list-style-type: none"> · 온도 스트레스 조건: 2°C vs 20°C or 5°C vs 25°C · UV 스트레스 조건: UV-B (312 nm; 10 vs 100 J/m²) · 독성원 스트레스 조건: Pb and HCB - 다중 환경스트레스 노출 조건 확립 완료 - 환경 스트레스에 대한 생리적 반응 분석 <ul style="list-style-type: none"> · 신규 로티퍼 및 요각류에 대한 온도 스트레스 조건에서 유영저해율 및 치사율 평가 	- 100%
	1-2 다중 환경스트레스 노출 생활사별 전사체 프로파일 확보 (6건)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Philodina gregaria</i> & <i>Boeckella poppei</i> 두 종에서 온도 스트레스에 따른 전사체 프로파일 확보 <ul style="list-style-type: none"> · 2°C vs 20°C 조건에 노출된 RNA 확보 및 RNA-Seq 수행 및 4건의 전사체 프로파일 확보 완료 - Functional study 및 후보 유전자 군 선별 <ul style="list-style-type: none"> · <i>Philodina gregaria</i> 종에서 고온 스트레스 방어 혹은 적응 유전자 정보 확보 완료 	- 100%

성과목표	세부목표		달성 주요내용	달성도(%)
2. 다중 환경스트레스와 스트레스 방어 및 적응 기작 관련 유전자들의 상호작용 연구	2-1	환경스트레스 방어 및 적응 관련 유전자 서열 확보(20건)	<ul style="list-style-type: none"> - 남극 채집 무척추동물종 중 실험실내 사육가능하며 개체 확보가 용이한 종 선별 <ul style="list-style-type: none"> · Rotifer문의 <i>Philodina gregaria</i>의 추가 종 · Arthropoda문의 <i>Boeckella poppei</i>의 추가 종 - 다중 스트레스 조건별 생리적 변화 및 전사체 분석 <ul style="list-style-type: none"> · Rotifer문 1종 및 Copepoda문 1종의 개체수 확보의 어려움으로 일정상 지연되었으나, 다중스트레스 조건별 생리적변화 관찰 완료 => 전사체 분석을 할 수 있을 정도의 개체수 확보가 어려움 => 연구종료후에도 전사체 프로파일 확보할 계획임 - 문헌조사를 통한 남극 채집 2종의 무척추동물종의 후성유전체 관련 유전자 (24종 +64종) 목록화 완료 	- 100%
	2-2	다중 환경스트레스 방어 및 적응 기작 및 조절 인자 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 스트레스 조건별 후성유전체(DNA methylation) 변화 확인 <ul style="list-style-type: none"> · Copepoda문 1종에 적합한 DNA 메틸화 분석을 위한 DNA 분리 및 방법구축 완료 · 개체수가 확보되는 UV 스트레스 조건에 따른 DNA methylation pattern 변화 확인 완료 - 전사체 및 후성유전체 통합분석을 통한 개체 방어 및 적응 기작 규명 <ul style="list-style-type: none"> · 2종의 온도스트레스에 따른 후성유전체 관련 유전자의 발현 변화 분석 완료 - 다중 환경스트레스 조건별 유해성 등급화 분석을 통해 생물정보를 이용한 환경관리 방안 제시 <ul style="list-style-type: none"> · 문헌조사 및 도출된 결과로부터 유해성 등급화를 위한 세부 평가 항목 선정 완료 	- 100%

성과목표	세부목표		달성 주요내용	달성도(%)
3. 비극지권 생물과의 비교연구를 통한 차별화된 스트레스 방어 기작 도출 및 key signature 발굴	3-1	비극지권 서식 동일 종(속) 선별 및 환경 스트레스 노출후 전사체 분석 및 비교	<ul style="list-style-type: none"> - 비극지권 서식 동일 종(속) 선별 및 배양 <ul style="list-style-type: none"> · 요각류인 <i>Tigriopus kingsejongensis</i>와 비교종으로 <i>Tigriopus japonicus</i> 선별 - 유해성 등급이 높게 나온 환경 스트레스 노출 분석완료 <ul style="list-style-type: none"> · 온도와 다양한 독성원들을 다중으로 노출하여 분석한 결과 온도+PFOS 조건이 가장 유해성 등급이 높게 관찰되었음 - 온도+PFOS 노출조건에서 RNA 확보 및 sequencing 후 전사체 분석 예정 	- 80%
	3-2	Functional study를 통해 남극 서식종과 차별화된 스트레스 방어 기작 발굴 및 Key signature 유전자 발굴	<ul style="list-style-type: none"> - 1,2차년도에 확보된 <i>Philodina gregaria</i> 및 <i>Boeckella poppei</i> 종의 전사체 결과로부터 SD 유전자 발현양 확인을 통해 key signature 유전자 발굴 - 극지요각류 및 비극지권 서식종의 전사체 분석 파일 확보중임 - Key signature 유전자/단백질에 대한 특성 분석 및 산업적 활용 가능성 타진 완료 	- 80%

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

1. 학술적 측면

- 남극 무척추동물중 로티퍼와 요각류 총 4종에 대한 개체 확보 및 이들의 배양방법 확립을 통한 기초연구 수행 환경이 조성되었음
- 남극 무척추동물의 다중 스트레스에 대한 스트레스 반응 특성 분석 결과를 통해 다양한 조건에 노출될 수 있는 생물종들에 대한 관리 방안 마련을 위한 기초자료로 활용될 수 있음
- 남극 서식 로티퍼와 요각류 2종에 대해 고온 스트레스에 의한 방어 기작을 전사체와 후성유전체 통합 분석 결과를 최초로 도출하여 학술적 의미가 큼
- 특히 생식 및 환경스트레스 표지유전자의 발굴은 극지환경모니터링 및 생태영향평가 기술 등과 연계하여 관리 측면에서 활용할 수 있음
- 극지 생물 유전체 연구에 의한 연구 인프라 확보 및 전문가 양성을 위한 기초토대를 확립하였음

2. 경제적 산업적 측면

- 다중환경스트레스 적응에 대한 특이적 유전자를 발굴하였으며 이들에 대한 특성파악을 통해 향후 환경 모니터링을 위한 바이오마커로 활용할 수 있으며 스트레스 대응 기능성 신소재 발굴하기 위한 대사 기작 규명에 활용될 수 있음
- 남극 무척추동물의 사육을 위한 생식생리학적 기초 자료 제공
- 기후변화에 따른 생물의 변화를 예측하고 대비할 수 있는 기초자료 확보하였음
- 개발된 유용 유전자 정보는 바이오소재 산업으로 확대 적용함으로써 해양바이오분야의 전반적인 수준을 향상시킬 것임

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구결과를 통해 첫째, 남극 서식 무척추동물로서 로티퍼와 요각류 4종을 확보하여 이들의 배양 조건을 확립하였으며, 둘째, 이들이 다중환경스트레스 조건에서 어떠한 생리적 반응을 보이는지 특성을 규명하였고 특히 전사체 및 후성유전체 수준에서의 변화를 확인하는 첫 번째 연구가 되었으며, 셋째, 이들 결과로부터 환경스트레스에 특이적으로 반응을 보이는 유전자들을 발굴하여 향후 다중환경스트레스에 노출시 독성 예측이 가능한 바이오마커를 발굴할 수 있었다. 따라서 본 연구의 결과물을 다음과 같이 이용 및 활용 가능하다.

- 현재 진행 중인 범국가적 극지 환경 보호 관련 프로젝트들이 성공적으로 수행될 수 있도록 환경스트레스에 따른 극지 생물들의 독성 모니터링 방법 개발에 상기 유전자들이 활용되어 국내기술의 위상제고가 가능해 짐
- 상대적으로 기후변화와 같은 환경스트레스에 취약한 극지 생물들의 방어 및 적응 가능성을 사전에 타진해봄으로써 극지 환경 보호를 위한 관리 방안 제시 가능
- 독성원에 의한 남극환경 오염은 상대적으로 간과되어 있으나, 본 연구의 결과를 통해 온도나 자외선 스트레스와 독성원이 함께 노출되는 환경에서 극지 생물들에 미치는 위해성이 더 높아질수 있음이 확인되어 향후 범국가적인 유해물질 사용 제한 등의 관리 및 규제 안 마련에 기초 자료로 활용될 수 있음
- 극지 생물 안전성 판정용 DNA 기반 tool kit 개발 및 실용화를 통해 국가경쟁력 제고
- 신규로 확보한 종들에 대한 개체수 확보의 어려움으로 다중 스트레스 조건에서의 전사체 자료를 확보하지 못하여 본 연구의 종료 이후에도 지속적으로 결과를 도출하여 중요한 극지 생물 활용 자료로 제공할 계획임

제 6 장 참고문헌

- Benedetti M, Lanzoni I, Nardi A, d'Errico G, Di Carlo M, Fattorini D, Nigro M, Regoli F. Oxidative responsiveness to multiple stressors in the key Antarctic species, *Adamussium colbecki*: Interactions between temperature, acidification and cadmium exposure. *Mar Environ Res*. 2016 Oct;121:20-30.
- Peck LS, Souster T, Clark MS. Juveniles Are More Resistant to Warming than Adults in 4 Species of Antarctic Marine Invertebrates. *PLoS One*. 2013 Jun 26;8(6):e66033.
- Riesgo A, Taboada S, Avila C. Evolutionary patterns in Antarctic marine invertebrates: an update on molecular studies. *Mar Genomics*. 2015 Oct;23:1-13.
- Kang S, Kim S, Park H. Transcriptome of the Antarctic amphipod *Gondogeneia antarctica* and its response to pollutant exposure. *Mar Genomics*. 2015 Dec;24 Pt 3:253-4.
- Marsh AG, Pasqualone AA. DNA methylation and temperature stress in an Antarctic polychaete, *Spiophanes tcherniai*. *Front Physiol*. 2014 May 5;5:173.
- Teets NM, Denlinger DL. Surviving in a frozen desert: environmental stress physiology of terrestrial Antarctic arthropods. *J Exp Biol*. 2014 Jan 1;217(Pt 1):84-93.
- Förster F, Liang C, Shkumatov A, Beisser D, Engelmann JC, Schnölzer M, Frohme M, Müller T, Schill RO, Dandekar T. Tardigrade workbench: comparing stress-related proteins, sequence-similar and functional protein clusters as well as RNA elements in tardigrades. *BMC Genomics*. 2009 Oct 12;10:469.
- Byrne M, and Przeslawski R. Multi stressor Impacts of Warming and Acidification of the Ocean on Marine Invertebrates' Life Histories. *Integrative and Comparative Biology*, 2013 53(4), 582 - 596.
- Alejandro Velasco-Castrillón, Timothy J. Page, John A. E. Gibson & Mark I. Stevens. Surprisingly high levels of biodiversity and endemism amongst Antarctic rotifers uncovered with mitochondrial DNA. *Biodiversity*, 2014 15 130-142.

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.