

극지미생물 유전체 기반 신규 항생물질  
후보 발굴

Development of potential novel candidates as  
antibiotics based on Polar microorganism genome

선문대학교 산학협력단

# 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지유전자원 기반 신규활성 항생제 후보 물질 발굴 에 관한 연구(본과제명)” 과제의 위탁연구 “극지미생물 유전체 기반 신규 항생물질 후보 발굴 에 관한 연구(위탁과제명)” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



위탁연구기관명 : 선문대학교

위탁연구책임자 : 오 태 진

위탁참여연구원 : 이 주 호

“ : 김 기 화

“ : 김 별 이

“ : 이 우 행

“ : 유 은 지

“ : 김 민 수

“ : 조 자 영

“ : 니샤 기미레

“ : 구타 슈스마

“ : 수베디 프라딕

“ : 스투스타 프라산사

“ : 파데 바슈데브



## 요 약 문

### I. 제 목

극지미생물 유전체 기반 신규 항생물질 후보 발굴

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

극지미생물 유래 구조변형 단백질을 이용한 신규생리활성물질 생산 및 기능 증명

### III. 연구개발의 내용 및 범위

III-1. 극지미생물 게놈 분석 및 구조변형 단백질 기능 증명

III-2. 신규생리활성물질 생산 및 분리·분석

### IV. 연구개발결과

IV-1. 극지미생물의 게놈 및 비교게놈 분석

IV-2. TypeIII PKS 유전자 발현·정제 및 신물질 생산

IV-3. Cytochrome P450와 glycosyltransferase를 이용한 항생물질의 구조변형

### V. 연구개발결과의 활용계획

극지미생물 유래 구조변형 단백질의 기능을 발굴하여 산업적으로 유용한 타겟 생리활성물질 관련 신물질을 생산하고자 함

# S U M M A R Y

## (영 문 요 약 문)

### I. Title

Development of potential novel candidates as antibiotics based on Polar microorganism genome

### II. Purpose and Necessity of R&D

Production and characterization of novel bioactive substances using structural deformation proteins from Polar microorganism

### III. Contents and Extent of R&D

III-1. Genome analysis of Polar microorganism and characterization of structural deformation protein

III-2. Production and structural analysis of novel bioactive substances

### IV. R&D Results

IV-1. Genome of Polar microorganism and comparative genomics

IV-2. Overexpression of TypeIII PKS gene and their application

IV-3. Structural modification of well-known antibiotic compounds using cytochrome P450 and glycosyltransferase

### V. Application Plans of R&D Results

The industrial useful target hybrid bioactive substances will be produced by using structural modification-possible proteins from the Polar microorganism

## 목 차

### 제 1 장 서론

- 1-1. 연구개발의 최종 목표
- 1-2. 연구개발의 연차별 연구목표 및 연구 범위

### 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 2-1. 본 연구 필요성
- 2-2. 기존 연구의 문제점
- 2-2. 극지미생물 관련 국내외 연구 동향

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

- 3-1. 극지미생물의 계통 및 비교계통 분석
- 3-2. TypeIII PKS 유전자 발현·정제 및 신물질 생산
- 3-3. Cytochrome P450와 glycosyltransferase를 이용한 항생물질의 구조변형

### 제 4장 연구개발 최종 목표 및 달성도

- 4-1. 연구개발 최종 목표
- 4-2. 연구개발 목표에 따른 주요내용 및 달성도

### 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 5-1. 학술적 파급효과 및 추가연구의 필요성
- 5-2. 경제적 파급효과 및 기업화 추진 방안

## 제1장 서론

### 1-1. 연구개발의 최종 목표

극지미생물 유전체 기반 항생제 후보물질 관련 생합성유전자 기능 증명 및 구조변형 단백질을 이용한 신규 차세대 항생후보물질 개발

### 1-2. 연구개발의 연차별 연구목표 및 연구 범위

연차	연구 목표	연구 범위	비고
1차년도(2018)	극지 유래 항균활성 미생물의 계통분석 및 생합성 관련 단백질의 기능 예상	극지미생물 스크리닝 및 항균활성 테스트	
		항균활성 있는 극지미생물의 계통분석	
		항생후보물질 관련 생합성유전자 그룹핑 및 구조변형 단백질의 구조와 기질 선별 관련 in-silico 분석	
2차년도(2019)	극지미생물 유래 단백질의 기능 증명 및 신규활성물질 분리·분석	항생후보물질 관련 생합성유전자 및 구조변형 단백질의 in-vitro 기능 증명	
		기능이 증명된 다양한 단백질을 이용한 기존 활성물질의 구조 변형 시도	
		신규 항생후보물질의 분리 및 분석	

## 제2장 국내외 기술개발 현황

### 2-1. 본 연구 필요성

- 항생제 관련 의약품 시장은 꾸준히 최대 시장을 형성하고 있음. 특히 감염성 세균들이 거의 대부분의 항생제에 내성을 획득하면서 항생제 판매가 급증될 뿐만 아니라, 항생제에 내성 관련 다양한 질병의 발생도 증가함. 따라서 기존 항생제에 대해 내성을 갖는 세균, 곰팡이, 바이러스, 및 암세포 등의 치료를 위한 신규항생후보물질의 요구는 계속 증대될 것임.
- 미생물 유래 항생물질 생합성 관련 유전자들이 유전적으로 가까운 다른 균에서도 발견됨이 밝혀지면서 기능이 밝혀진 항생물질 생합성 유전자들을 조합 및 조작하여 새로운 하이브리드 신약후보물질은 설계될 수 있으며, 새로운 구조의 유도체를 생산하거나, 또는 신규 항생후보물질들의 생산능력을 증대시키는 다양한 시도가 가능하게 되었음.
- 또한 최근에는 한 걸음 더 나아가 이차대사물질 생합성 효소들의 기능을 이용하여 궁극적으로 복합 반응용 고생산성 미생물 개발 및 새로운 항생후보물질 등이 개발 가능함. 이는 기존 항생제들의 구조 개선으로 신약을 창출하기 때문에 약효 가능성이 매우 높은 획기적인 신약 개발 approach이며, 여러 미생물 유래 항생제들로부터 내성을 극복할 수 있는 신약을 창출하는 방법임. 시간적으로나 연구비용으로 볼 때 매우 경제적인 신약 개발 과정으로서 이는 타 신약 개발의 발전에도 이용될 수 있음.
- 최근 중국 및 인도 등의 항생제 포함 생리활성물질의 생산능력이 급성장하였고 특히 저임금 등으로 인한 낮은 생산원가는 이미 국내 제약 산업의 가격 경쟁력을 앞지르고 있음. 따라서 의약품 생산의 경쟁력 확보를 위해서는 고도의 기술력을 필요로 하는 대사공학 등을 활용한 체계적인 고생산성 미생물의 개발이 필요함.
- 또한 선진국과의 기술 격차를 비교적 단시간에 극복하고 신약 강국으로 부상할 수 있는 단·중기적으로 추진되어야 할 신약개발기술의 추진방향은 개량신약개발 분야의 육성임. 대부분의 경우, 미생물 유래 천연 생리활성물질의 구조가 매우 복잡하기 때문에 유기합성에 의한 유도체 개발은 한계가 있음. 따라서 조합생합성 등 생합성 유전자의 조작기술을 활용한 유용 생리활성물질의 유도체 개발을 통한 개량신약개발 기술의 연구가 절실히 필요함.

### 2-2. 기존 연구의 문제점

- 고전적 균주개량법의 한계: 현재까지 산업용 생산균주의 개발은 주로 돌연변이에 의한 고전적 균주개량법에 의존해 옴. 특히, *Micromonospora*와 *Streptomyces* 등



- 으로 대표되는 방선균 중 극히 일부만 유전자 조작이 가능하므로 고부가가치의 생리활성물질의 대량생산, 특정 유용물질의 선택적 생산 및 유도체 생산을 통한 개량신약의 개발은 장시간을 요하는 전통적인 돌연변이법에 의존할 수밖에 없음.
- 유전자 조작이 어려운 야생생물 미생물 개발의 문제점: 최근의 DNA 염기서열 분석기술은 급속도로 성장하여 유전자원의 확보는 상대적으로 용이해졌지만, 야생 생산균주의 유전자 조작과 배양이 어려울 경우, 유전자원의 실질적 활용을 위해서는 확보된 유전체 정보를 활용하여 대량생산을 가능하게 하는 보편적 기술의 개발이 필요함. 따라서 대사공학적 기법을 활용한 보다 효율적인 균주 개량과 조합생합성 등을 활용한 특정 유용물질의 선택적 생산 및 신규물질의 효율적 생산을 위해서는 유용물질 생합성 유전자의 이종숙주 발현기술과 고생산 이종숙주의 개발이 필수적임.
  - 공급부족으로 인한 신약개발의 문제점: 일부 의약품은 공급부족과 유전자 조작의 어려움으로 인해 매우 고가이며 화학합성과 조합생합성 등을 활용한 유도체 개발은 지연되고 있음. 따라서 대사공학의 적용에 의한 생산성 향상과 조합생합성에 의한 개량 신약의 개발을 위한 기반 기술로서 유전자 조작이 용이한 다목적 고효율 이종숙주의 개발은 학문적·산업적 의미가 매우 큼.
  - 기존 대사공학의 적용의 한계: “The improvement of cellular activities by manipulation of enzymatic, transport, and regulatory functions of the cell with the use of recombinant DNA technology” 으로 정의할 수 있는 대사공학은 주로 재조합 단백질 및 일차대사산물의 생산성 향상에 기여해 왔으나 이차대사산물인 천연물 유래 저분자 의약품의 생산의 적용에는 어려움이 있음. 기존 대사공학 (constructive metabolic engineering) 기법은 정확한 대사경로와 각 단계 관련 효소, 동역학적 정보, 대사 중간체의 세포 내 농도 등 방대한 지식을 요하며 알려진 대사 네트워크 내에서만 적용이 가능함. 무엇보다도 대상 세포의 기본적인 유전자 조작이 가능해야 적용 가능함.

### 2-3. 극지미생물 관련 국내외 연구 동향

- 최근에는 유전체 분석기술의 발전에 힘입어 야생 생산균주의 유전자 조작과 배양이 어려워 신약으로 개발되기 어려운 화합물의 유전자원이 축적됨에 따라 고전적 방법으로 개량된 고생산 균주에 유용물질의 생합성 유전자를 이종 발현하여 대량생산하려는 시도가 연구 중임.
- 단백질체학과 대사체학 기법의 접목: 기능유전체학적 기법은 고생산 균주의 진단에 각각 장단점이 있음. 전사체와 단백질체 연구는 일차대사경로 효소의 발

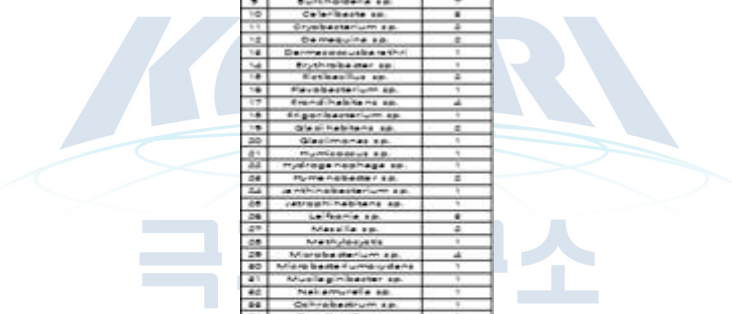
현정도와 조절기작을 진단하는데 유용하며 대사체학 연구는 이차대사경로의 효소의 발현이 일반적으로 매우 낮으므로 대사중간체들의 농도를 측정하여 이차대사산물의 생합성단계 중 속도결정단계를 규명하는데 보다 효율적임. 따라서 본 연구는 극지미생물과 기존미생물의 비교 단백질체학적 연구를 통하여 이차대사산물의 생산에 필요한 전구체의 생합성 등에 관련된 일차대사경로와의 연관성과 조절기작을 규명하고, 대사체학적 연구를 통하여 이차대사산물 생합성단계 중 속도결정단계를 결정하여 활용하고자 함. 즉 단백질체학과 대사체학의 기술을 접목하여 이차대사산물의 생산에 영향을 미치는 일차대사경로 및 조절기작과 이차대사경로 자체의 속도결정단계를 보다 자세히 진단하여 역설계에 적용하고자 함.

- 역설계 대사공학의 잠재력 및 이중숙주 개발에의 적용연구 부재의 문제점: 최근 기능유전체학 기술의 발전은 고생산 미생물의 체계적인 연구를 필요로 하는 역설계 대사공학에 돌파구를 제공할 잠재력이 있으나 아직 이를 이용한 고생산미생물의 체계적 분석은 시작단계에 불과하며 실제 이중숙주의 역설계에의 적용에 관한 연구는 전무한 실정임.
- 최근 생체 재설계 및 대사공학에 관련된 많은 연구를 보면, 유전자 재조합에 의한 유전공학 기술을 이용한 방법은 물질대사에 참여하는 유전자를 형질 전환하여 예측 가능한 새로운 구조를 가진 대사물질 생산할 수 있으며, 기능이 밝혀진 대사물질로부터 유전자의 조합을 통한 combinatorial biosynthesis에 의하여 새로운 대사물질을 설계할 수 있고, 잠재적인 대사물질 유전자를 발현되게 하여 새로운 물질생산을 유도하거나, 또는 대사물질의 생산능력을 증대하고 있음.
- 일반 미생물 유래 생리활성물질의 생합성에 대한 학문적 수준에서의 연구는 1990년대 중반이후 대학과 정부출연연구소에서 활성화되기 시작하였으나, 극지미생물 유전자원을 활용한 유용 생리활성물질의 산업적 생산에 관한 연구는 전 세계적으로 전무한 실정임. 특히 조합생합성을 이용한 극지미생물 유래 생리활성물질의 유도체 생산과 생합성 유전자의 이중숙주발현을 통한 유용 생리활성물질의 이중숙주 생산에 관한 국제논문발표 등 가시적 연구결과는 본 연구책임자의 실험실에서만 보고되고 있음.

## 제3장 연구개발수행 내용 및 결과

### 3-1. 극지미생물의 계놈 및 비교계놈 분석

극지연구소 보유 6천 여개의 박테리아와 본 연구실에서 분리한 모든 미생물을 대상으로 16s rRNA 조사를 통해 정보를 재확인하고 그들의 항균력 일부를 확인함과 동시에 균주 관련 특성을 조사하여 결과적으로 206종의 complete genome analysis를 진행해야 할 균주 리스트를 확보하였고 현재 일부 미생물의 gDNA를 바탕으로 계놈 분석을 수행 중임. 현재까지 55종의 98개의 미생물에 대한 완벽한 계놈을 확보한 상태이며 (그림 1), 지금도 일부 미생물의 gDNA를 바탕으로 계놈 분석을 수행하고 있음.



Accession	Genus
1	Agrobacterium sp.
2	Acetivibrio sp.
3	Acetivibrio sp.
4	Acetivibrio sp.
5	Acetivibrio sp.
6	Acetivibrio sp.
7	Acetivibrio sp.
8	Acetivibrio sp.
9	Acetivibrio sp.
10	Acetivibrio sp.
11	Acetivibrio sp.
12	Acetivibrio sp.
13	Acetivibrio sp.
14	Acetivibrio sp.
15	Acetivibrio sp.
16	Acetivibrio sp.
17	Acetivibrio sp.
18	Acetivibrio sp.
19	Acetivibrio sp.
20	Acetivibrio sp.
21	Acetivibrio sp.
22	Acetivibrio sp.
23	Acetivibrio sp.
24	Acetivibrio sp.
25	Acetivibrio sp.
26	Acetivibrio sp.
27	Acetivibrio sp.
28	Acetivibrio sp.
29	Acetivibrio sp.
30	Acetivibrio sp.
31	Acetivibrio sp.
32	Acetivibrio sp.
33	Acetivibrio sp.
34	Acetivibrio sp.
35	Acetivibrio sp.
36	Acetivibrio sp.
37	Acetivibrio sp.
38	Acetivibrio sp.
39	Acetivibrio sp.
40	Acetivibrio sp.
41	Acetivibrio sp.
42	Acetivibrio sp.
43	Acetivibrio sp.
44	Acetivibrio sp.
45	Acetivibrio sp.
46	Acetivibrio sp.
47	Acetivibrio sp.
48	Acetivibrio sp.
49	Acetivibrio sp.
50	Acetivibrio sp.
51	Acetivibrio sp.
52	Acetivibrio sp.
53	Acetivibrio sp.
54	Acetivibrio sp.
55	Acetivibrio sp.
56	Acetivibrio sp.
57	Acetivibrio sp.
58	Acetivibrio sp.
59	Acetivibrio sp.
60	Acetivibrio sp.
61	Acetivibrio sp.
62	Acetivibrio sp.
63	Acetivibrio sp.
64	Acetivibrio sp.
65	Acetivibrio sp.
66	Acetivibrio sp.
67	Acetivibrio sp.
68	Acetivibrio sp.
69	Acetivibrio sp.
70	Acetivibrio sp.
71	Acetivibrio sp.
72	Acetivibrio sp.
73	Acetivibrio sp.
74	Acetivibrio sp.
75	Acetivibrio sp.
76	Acetivibrio sp.
77	Acetivibrio sp.
78	Acetivibrio sp.
79	Acetivibrio sp.
80	Acetivibrio sp.
81	Acetivibrio sp.
82	Acetivibrio sp.
83	Acetivibrio sp.
84	Acetivibrio sp.
85	Acetivibrio sp.
86	Acetivibrio sp.
87	Acetivibrio sp.
88	Acetivibrio sp.
89	Acetivibrio sp.
90	Acetivibrio sp.
91	Acetivibrio sp.
92	Acetivibrio sp.
93	Acetivibrio sp.
94	Acetivibrio sp.
95	Acetivibrio sp.
96	Acetivibrio sp.
97	Acetivibrio sp.
98	Acetivibrio sp.

그림 1. 완벽한 계놈을 가지고 있는 미생물 중 일부 list.

현재 기 확보한 계놈으로부터 균주의 특징을 파악하며 그들에 대한 complete 논문 작성을 수행하고 있음. 예를 들어 본 실험실에서 분리한 PAMC 28760 균주의 경우, 극지연구소에서 남극 lichen인 *Himantormia* sp. 로부터 분리한 미생물로 16s rRNA 를 확인해 본 결과, *Shigella* sp. 균주로 확인이 되었음. *Shigella* sp. 는 gram-negative 균주이며, non-sporulating bacterium 임. Complete genome 을 수행한 결과, 전체 4,278개의 DNA 시퀀스를 보유하고 있음을 알 수 있었으며, 85개의

tRNA, 22개의 rRNA 오페론과 58.85% GC를 함유하고 있음을 확인함. 또한 COG 카테고리별 조사한 결과, 그림 2와 같이 G (375), E (350), K (295), C (294), M (278)의 카테고리에서 관련된 유전자를 많이 가지고 있는 것을 확인 할 수 있었음. PAMC 28760 균주의 경우에는 G 카테고리 관련된 유전자가 가장 많았으며, G 카테고리는 Carbohydrate transport and metabolism 관련 유전자들이 주로 해당됨. 이 카테고리에 해당되는 유전자는 대부분 살아있는 유기체에서 탄수화물의 대사형성, 분해, 상호변환을 담당하는 다양한 생화학 과정을 말하며, 탄수화물의 경우에는 많은 필수적인 신진대사 경로의 중심에 해당이 됨.

현재 *Shigella* sp. PAMC 28760에 대한 유전체 게놈 정보는 Complete genome 논문들을 통해 NCBI에 등록하여 그들의 유전체 정보를 공개한 상태임. *Shigella* sp. PAMC 28760 또한 이번 Microbial Pathogenesis 저널에 투고완료 되었음.

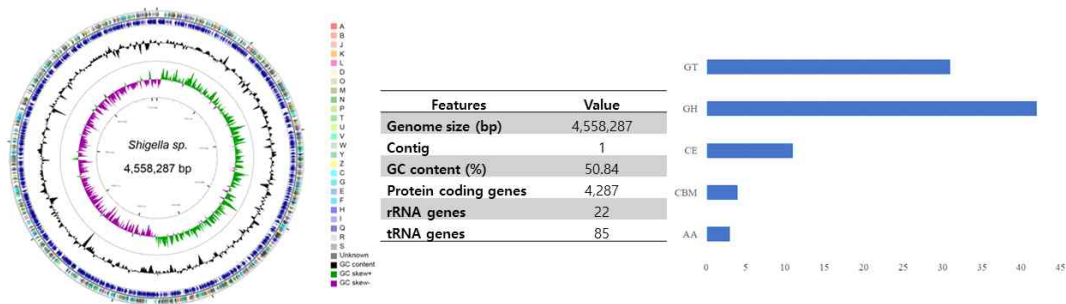


그림 2. *Shigella* sp. PAMC 28760에 대한 Circular map과 유전체 정보 및 CAZYme 분석 결과.

*Shigella* sp. PAMC 28760의 dbCAN2 분석을 통해 전체 91개의 유전자가 carbohydrate-metabolizing enzymes이 에너지를 보충을 위한 포도당을 얻기 위해 전분을 분해함 (그림 3). *Shigella* sp. PAMC 28760 균주에 대한 비교 유전체 분석으로 남극 조건에서 *Shigella* 생존 매커니즘을 이해하기 위한 연구임.

	PAMC28760	1487	KE7674	5497	ATCC 12009	CFAN30956	FORC-011	CFAN30807	LC1477_18	24-09-201	G1683	CDC 3083-94	ATCC 9210	88227	ATCC 11775
Genome size (Mb)	4.55	4.48	3.9176	4.4602	3.9831	4.7207	3.9271	3.9202	4.6106	4.2302	4.6170	4.4602	4.5762	4.5166	4.5166
GC content (%)	50.84	50.92	50.1241	50.9361	50.8268	50.7898	50.7103	50.7623	50.8889	50.8039	50.8889	50.8869	51.2	50.9873	50.8039
Genes	3768	4024	3444	4020	3739	3622	3708	3602	3709	4788	3922	4088	4222	3966	3928
Proteins	4033	4234	4022	4409	4228	4051	3700	4488	4139	4133	4178	4234	3968	4017	4223
plasmid	0	1	2	1	1	1	1	3	3	1	1	5	0	3	1
AA	3	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	4
CBM	4	2	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	3
CE	11	7	9	7	9	11	10	10	10	10	9	9	7	7	13
CAZyme	42	37	38	36	45	34	43	43	43	41	41	35	35	35	43
CR	71	29	31	29	34	24	26	26	26	30	30	29	28	28	34
Total	91	70	83	75	92	83	87	87	87	84	84	76	72	72	97

	PAMC28760	1487	KE7674	5497	ATCC 12009	CFAN30956	FORC-011	CFAN30807	LC1477_18	24-09-201	G1683	CDC 3083-94	ATCC 9210	88227	ATCC 11775
PAMC28760	100.00	97.81	97.84	97.84	97.22	98.11	98.39	97.84	98.11	98.14	94.97	93.25	98.18	98.30	98.49
1487	97.81	100.00	97.87	99.46	97.12	97.67	97.69	97.71	97.67	97.62	97.63	97.66	97.60	97.69	98.86
KE7674	97.84	97.87	100.00	97.76	97.24	98.25	98.29	98.22	98.29	98.16	98.21	98.14	98.13	98.13	98.92
5497	97.84	99.46	97.76	100.00	97.22	97.80	97.54	97.82	97.81	97.71	97.77	97.73	97.78	97.77	98.96
ATCC 12009	97.22	97.12	97.24	97.12	100.00	97.22	97.33	97.29	97.26	97.16	97.21	97.10	97.13	97.17	97.01
CFAN30956	98.42	97.67	98.24	97.80	97.22	100.00	98.61	98.63	98.70	98.18	98.34	98.69	98.71	98.71	98.96
FORC-011	98.39	97.69	98.29	97.74	97.33	98.61	100.00	99.97	98.40	98.44	98.60	98.72	98.74	98.84	98.84
CFAN30807	98.14	97.71	98.12	97.82	97.29	98.61	99.96	100.00	99.86	98.60	98.67	98.72	98.68	98.76	98.76
LC1477_18	98.41	97.67	98.29	97.81	97.26	98.70	99.97	99.96	100.00	98.40	98.42	98.65	98.72	98.71	98.76
24-09-201	98.14	97.62	98.16	97.71	97.16	98.38	98.40	98.40	98.40	100.00	99.91	98.24	98.31	98.36	98.95
G1683	98.15	97.63	98.23	97.71	97.21	98.38	98.41	98.40	98.42	99.91	100.00	98.24	98.12	98.41	98.96
CDC 3083-94	98.25	97.66	98.14	97.71	97.10	98.69	98.60	98.67	98.65	98.24	98.24	100.00	98.61	98.54	97.00
ATCC 9210	98.18	97.60	98.13	97.78	97.13	98.71	98.72	98.72	98.31	98.12	98.11	100.00	99.89	99.89	98.86
88227	98.30	97.69	98.13	97.78	97.17	98.71	98.74	98.69	98.71	98.36	98.41	99.84	99.89	100.00	99.86
ATCC 11775	98.87	98.38	98.82	98.96	97.01	98.98	98.84	98.76	98.70	98.87	98.81	97.00	98.88	98.87	100.00

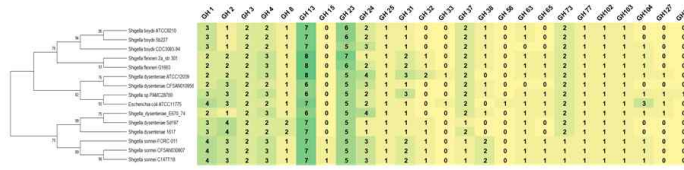


그림 3. *Shigella* sp. PAMC 28760 균주에 대한 comparative genomics 분석 data.

또한 *Streptomyces* sp. NP160은 항생물질이 많이 생성된다고 알려진 *Streptomyces* 균주로 유전체 분석을 통해 다양한 물질의 생합성과정인 PKS와 관련성 있는 Cluster를 그림으로 표시함 (그림 4).

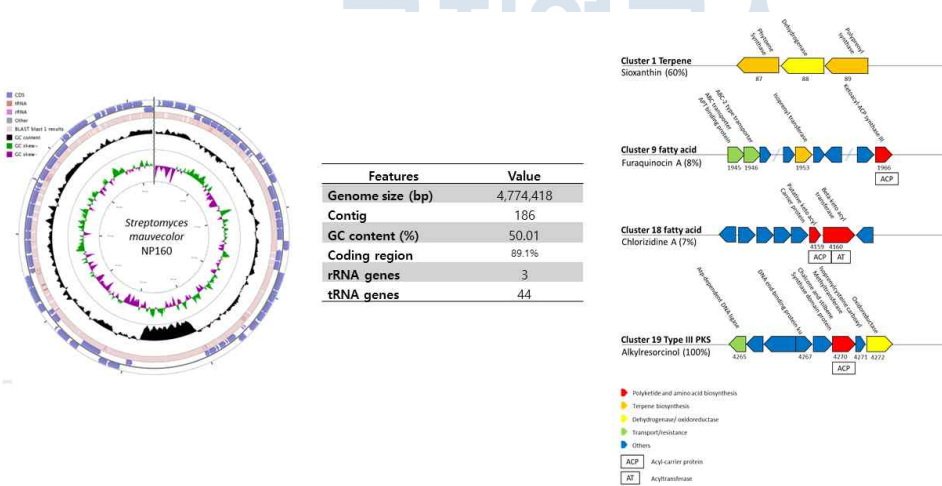


그림 4. *Streptomyces* sp. NP160에 대한 유전체 분석 결과 및 cluster 분석.

### 3-2. TypeIII PKS 유전자 발현·정제 및 신물질 생산

본 연구팀은 기존에 PKS typeIII 유전자를 확보한 계놈으로부터 그룹핑을 완료하였음. 확보한 PKS type III 유전자들은 PCR 과정을 이용하여 클로닝하고 pET28a(+) 발현벡터에서 대장균 발현 연구를 수행하여 soluble한 단백질을 분리해 확인하였음.

표 1. 현재까지 진행 중인 TypeIII PKS 유전자 관련 list.

Group	Number	Source	Species	Isolated	Similarity/Identity/Gap(%)			Size
1	W2061_1389	-	<i>Streptomyces</i> sp.	-	97.7	94.6	0	37.65
2	40643_5831	KCCM	<i>Streptomyces</i> sp.	-	95.4	92	0	37.14
3	NP206_5213	Lichen	<i>Streptomyces</i> sp.	Nepal	82.5	74.5	3	38.29
4	12297_829	KCCM	<i>Streptomyces macromyceticus</i>	-	70.3	55.1	1.4	36.5
5	21847_134	-	<i>Salinibacterium</i> sp.	Antarctica	65.9	52	0.6	36.98
6	21357_1903	Soil	<i>Salinibacterium</i> sp.	Antarctica	66.5	52.3	0.6	37.05
7	23324_2311	Sediment	<i>Bacillus pumilus</i>	Kara sea	80.3	62.8	0.3	40.78
8	25034_2404	water	<i>Bacillus</i> sp.	Kara sea	80.1	62.8	0.3	40.78
9	23447_1813	sediment	<i>Bacillus</i> sp.	Kara sea	80.1	62.8	0.3	40.78
10	NP167_3664	Lichen	<i>Curtobacterium</i> sp.	Nepal	82.8	68.3	0.3	40.37
11	HSR18_574	Lichen	<i>Terrabacter</i> sp.	Antarctica	82.8	68.3	0.3	40.37
12	26561_1218	Lichen	<i>Sphingomonas</i> sp.	Antarctica	80.1	62.8	0.3	40.78
13	21151_1006	Soil	<i>Algoriphagus</i> sp.	Antarctica	-	-	-	39.76
14	26565_1585	Lichen	<i>Frondihabians</i> sp.	Antarctica	-	-	-	41.58
15	26617_1105	Lichen	<i>Sphingomonas</i> sp.	Arctic	-	-	-	36.74
16	14820_2420	ATCC	<i>Sphingomonas echinoides</i>	-	-	-	-	36.95

총 52개의 유전자 중 16개 관련 cloning 관련 실험이 완료되었으며, 현재 발현확인 중에 있음. 그중, 표 1에서 녹색으로 표시한 26565\_1585와 14820\_2420 단백질은 현재 발현되어 구조 분석 및 in-vivo 실험을 진행 하고 있음.

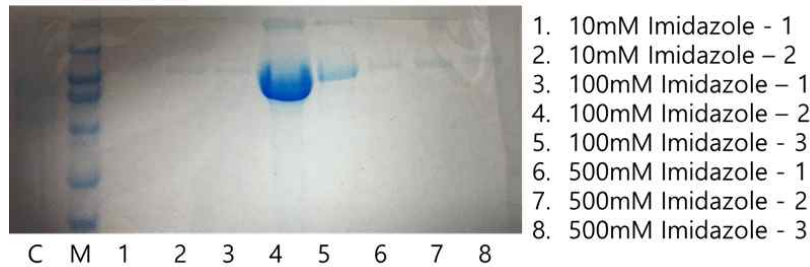


그림 5. 14820\_2420 단백질발현 결과.

그림 5의 경우, 14820\_2420 단백질발현 결과로 20℃에서 36시간 동안 배양하여 약 50 kDa 위에서 발현되는 것을 확인할 수 있었음. 발현이 확인된 이 단백질은 NCBI balst 결과, Stilbene synthase 시퀀스와 유사한 것으로 확인할 수 있었음. 따라서 제일 유사한 Stilbene synthase 시퀀스를 이용하여 단백질 유사도 확인 및 in silico 분석도 함께 진행하여 구조를 예측하였음 (그림 6).

Chain A, An Aldol Switch Discovered In Stilbene Synthases Mediates Cyclization Specificity Of Type III Polyketide Synthases: Pine Stilbene Synthase Structure  
 Sequence ID: 1U0U\_A Length: 397 Number of Matches: 1  
[See 5 more title\(s\)](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps				
148 bits(374)	7e-41	Compositional matrix adjust.	123/376(33%)	171/376(45%)	28/376(7%)				
Query 5	AHIAAI	GTAVPA	----QDIHAAF	IEWARARLPDGRAVRI	FORMAGRAAI	AHRWVSLPLGA	60		
Sbjct 23	ASILAIGTANPNVAIDG	STYPOFVFRIT	QNEHNT	ELADKFRICERSAIKGRYVLT	EEI	82			
Query 61	QGSSPYDPDGFYAKSVLP	GTAEERMLYAQAPELS	IAAIEAL	PAQ--VALEGI	ITHLVVAS	118			
Sbjct 83	LK9NP-DYCAFVE	---HPSLDARQA	MLMEYFRLAKEA	KEKAIQEYGGK	SGSITHLIFCS	138			
Query 119	CTGF	IAPGIDQIIAARI	IGLAPSERLLY	GFNGCYAAVAL	RSARHIVFSDADARV	LVCV	178		
Sbjct 139	TTTTPLP	GADEVAEKLLGLHPSY	KRVGVFQHG	CFAGSTVLRMAKOLA	ENRGRARV	IVICS	198		
Query 179	ELSTLHLQ	---DNP	ALEPLLMLQFGDGA	AAALVTAEP	----AGFALD	HPFATLTPD	230		
Sbjct 199	EITATVFR	FPSETHLDSLYGQAL	FGDGA	SALIVGADP	IPQVETAC	FEIHWTAQT	VYPNSE	258	
Query 231	ALIRRDITDQGF	AMHLSGEV	PARIAAGLSDP	YAAATGGPR	LEIDGAVHAG	GRSILD	290		
Sbjct 259	GAIGGV	REVLTFQLK	GAVPDLISANI	ENOMYEA	FSQFKISDNNK	FPVYVHPG	RAILD	318	
Query 291	AVENSLGL	PADALDASR	VLSEYGN	MSATLNFV	----ARMLD	GPVYIN	340		
Sbjct 319	FVEAK	NLDPTKLPTR	HHNSEYGN	MSACVHF	ILDQUT	RKASLQ	NGCSTIGE	LENGVLF	378
Query 341	AFGQL	AAEG	GFQSV	356					
Sbjct 379	GFQQL	TIETV	LKSV	394					



그림 6. 14820\_2420 단백질 관련 단백질 유사도 확인 및 in silico 분석.

발현된 단백질을 이용하여 p-coumaroyl-CoA와 malonyl-CoA를 기질로 사용하여 새로운 물질 혹은 기존에 알려진 물질이 생성이 되는지 확인하였음. 실험 결과 그림 7에서 보여주는 것과 같이 control과 비교하여 330 nm의 파장, 8.472분에서 새로운 피크를 확인할 수 있었음.

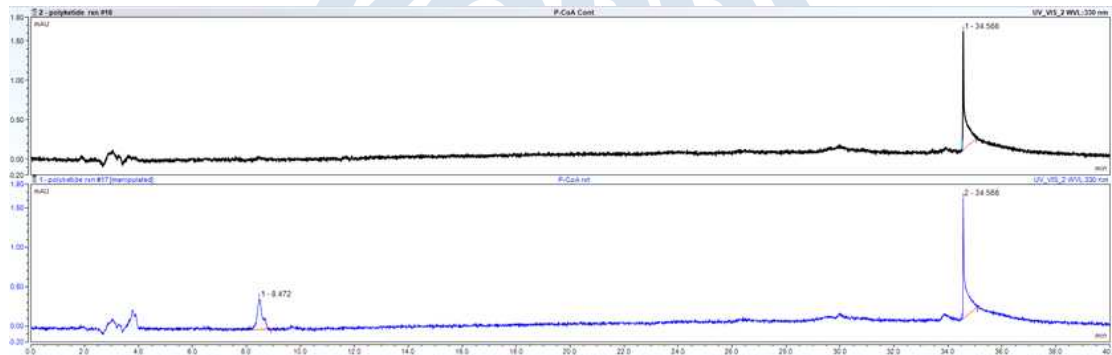


그림 7. p-Coumaroyl-CoA와 malonyl-CoA를 사용하여 반응한 후 확인한 HPLC 결과.

새로운 피크에 대한 MS도 같이 분석한 결과, 그림 7과 동일한 결과를 확인할 수 있었으며, 가장 유사하다고 확인한 기준에 알려진 단백질인 1U0V와 1CGZ의 경우에는 Resveratrol이나 Stilbene을 생산한다는 보고가 있으나 이와는 다른 MS값인 것으로 확인되었음 (그림 8).

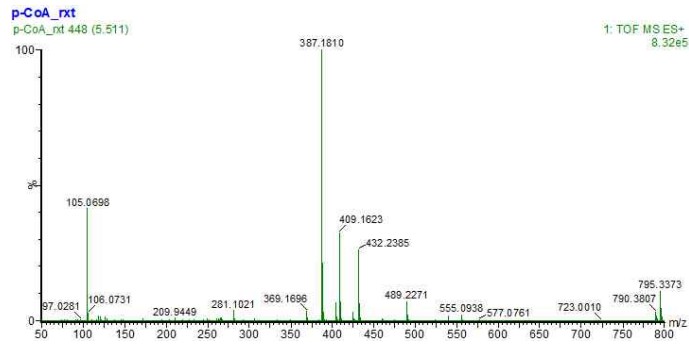


그림 8. MS 분석 결과.

위와 같은 결과를 종합하고 MASS값을 확인하여 생산 가능한 물질에 대하여 구조를 예측한 결과, 그림 9와 같다고 예상함.

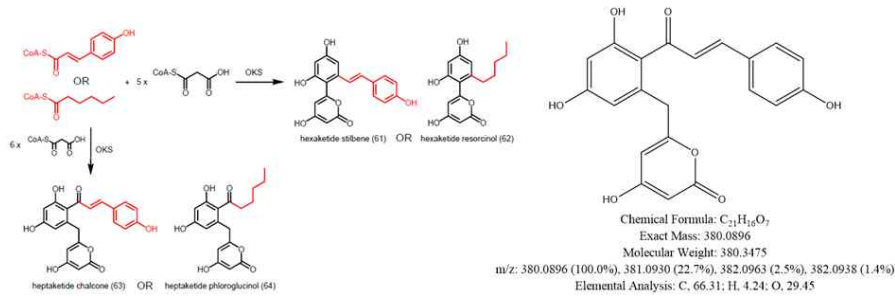


그림 9. 결과를 종합하여 예측한 물질구조 결과.

이들 PKS 단백질들 중 26565\_1585은 Unitprot blast 결과상 *Glycine max* Naringenin-chalcone synthase와 가장 유사하다는 결과를 확인할 수 있었음 (33% identities). pET28 vector과 *E. coli* C41 host를 이용해 20°C에서 48시간 동안 과다 발현을 통해 soluble한 단백질이 발현되는 것을 확인함 (그림 10).

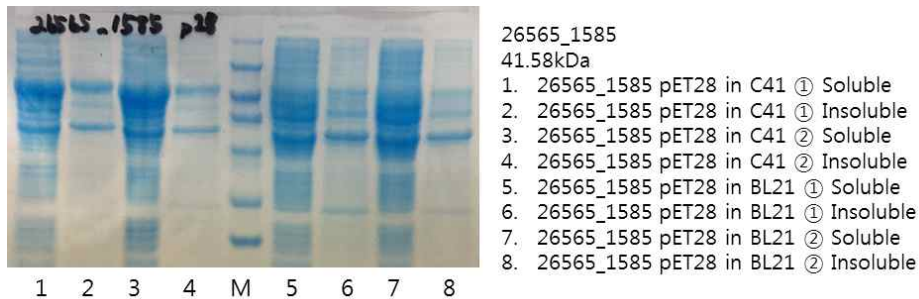


그림 10. 14820\_2420 TypeIII PKS 단백질 발현.

발현된 단백질은 Co\_resin을 통해 정제를 실시하였으며 100 mM imidazole에서 중



은 결과를 확인함 (그림 11).

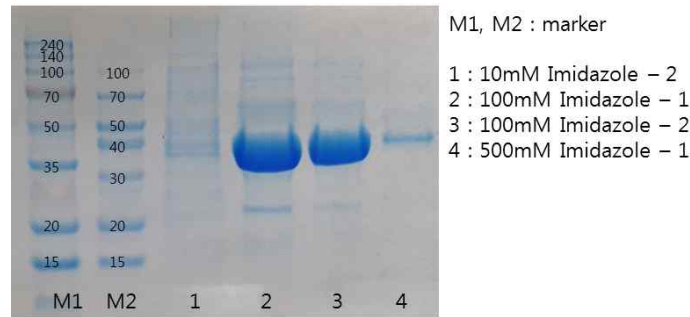


그림 11. 26565\_1585 TypeIII PKS 단백질 정제.

농축한 단백질은 농도 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 기준으로, starter-CoA로는 p-coumaroyl-CoA 등을 사용하였으며, extender-CoA로는 malonyl-CoA를 사용하였음. Assay는 potassium buffer (pH 7.4) 및 Tris-HCl buffer (pH 8.0) 그리고 starter-CoA를 단백질과 30°C에서 30분간 반응시키며, extender-CoA를 농도에 맞게 넣은 후 동일한 온도에서 1시간 반응한 뒤 4% trifluoroacetic acid 10  $\mu\text{l}$ 를 넣어 반응을 종료함. 종료한 샘플은 ethyl acetate로 추출 후, 원심분리하고 상층액을 분리하여 이를 농축 및 증발시킨 뒤, methanol로 녹여 HPLC 분석 및 MS 분석을 수행하였음.

14820\_2420과 26565\_1585 단백질을 potassium buffer 베이스로 p-coumaroyl-CoA와 반응시킨 결과, 280 nm에서 14820\_2420은 control과 비교하였을 때 유력한 peak가 나오지 않았지만, 330 nm 파장에서의 분석에서는 new peak를 보였으며, 26565\_1585의 결과상에서 280 nm 및 330 nm 둘 모두에서 control과 비교하였을 때 유의한 peak를 확인할 수 있었음 (그림 12 & 13).

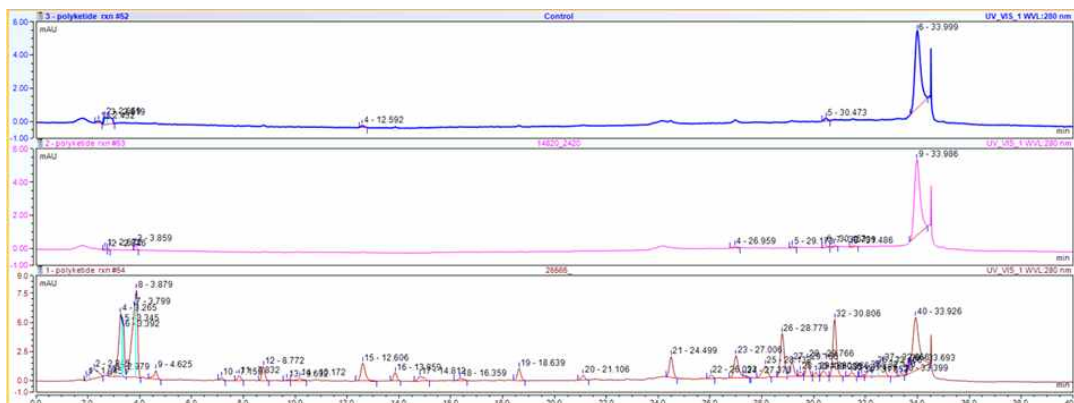


그림 12. 14820\_2420/pET32/C41 및 26565\_1585/pET28/C41 TypeIII PKS 단백질을 p-coumaroyl-CoA와 반응 후 확인한 HPLC 결과 (280 nm).

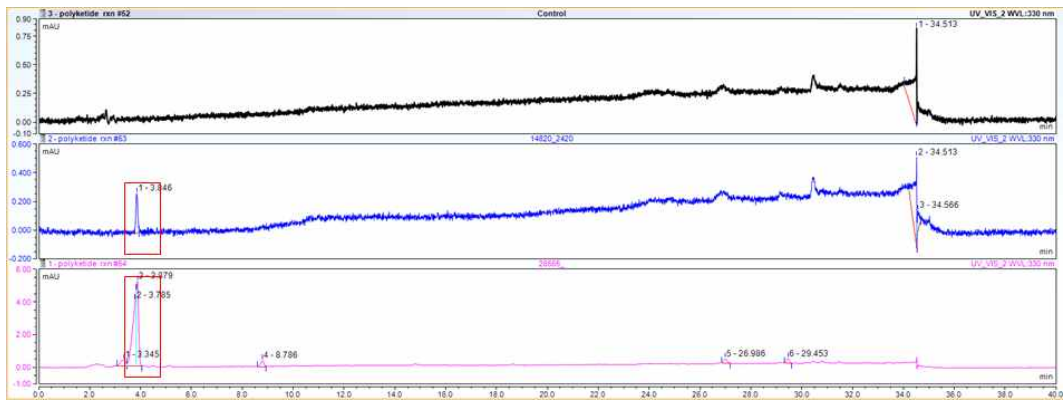


그림 13. 14820\_2420/pET32/C41 및 26565\_1585/pET28/C41 TypeIII PKS 단백질을 p-coumaroyl-CoA와 반응 후 확인한 HPLC 결과 (330 nm).

14820\_2420과 26565\_1585 단백질 모두 TypeIII PKS 그룹화 과정에서 분류되지 않은 새로운 스타일의 유전자이기 때문에 어떤 product를 생성할지 예측하기 어려운 부분이 있음. 따라서, 14820\_2420과 26565\_1585 단백질을 potassium buffer (pH 7.4) 및 Tris-HCl buffer (pH 8.0) 등을 베이스로 p-coumaroyl-CoA와 반응시킨 후 MS 분석을 실시하였음 (그림 14).

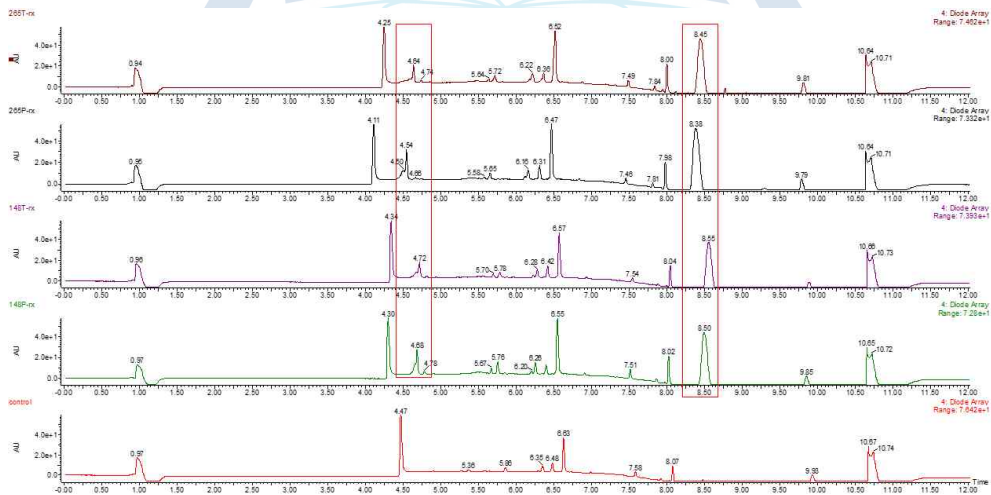


그림 14. 14820\_2420/pET32/C41 및 26565\_1585/pET28/C41 TypeIII PKS 단백질을 p-coumaroyl-CoA와 반응 후 확인한 MS 분석 결과.

분석 결과, control의 결과와 달리 4분 및 8분대에 새로운 peak가 나타난 것을 확인 하였지만 반응물의 구조 예측을 하기엔 정보가 상당히 현재 부족한 실정임. 따라서 반응 후 떨어지는 CoA의 양을 정량화하고 *in vivo* 실험을 준비하여 MS-MS 및 NMR을 준비를 준비 중에 있음. 또한 MS값을 피싱한 결과, 6분 및 기타 시간에 naringenin chalcone, p-hydroxybenzalacetone 및 resveratrol 등을 확인할 수 있었음.

### 3-3. Cytochrome P450와 glycosyltransferase를 이용한 항생 물질의 구조변형

다양한 기질 (magnolol, rapamycin, baicalein, hesperidin, honokiol, naringenin, 및  $\alpha$ -ionone)을 대상으로 CYP105A5 및 CYP101D5와 본 연구팀이 보유하고 있는 glycosyltransferase를 이용하여 구조변형을 시도함 (그림 15).

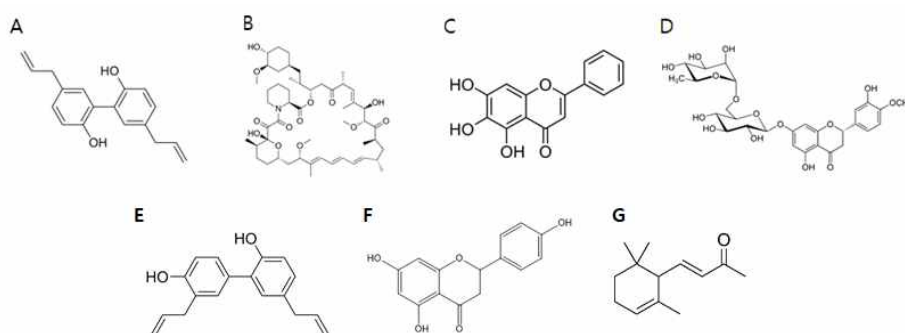


그림 15. 사용한 기질들. A, magnolol; B, rapamycin; C, baicalein; D, hesperidin; E, honokiol F, naringenin; and G,  $\alpha$ -ionone.

CYP105A5의 경우, magnolol, rapamycin과 honokiol에서는 수산화 반응이 일어나지 않았지만, flavonoid인 baicalein, hesperidin과 naringenin에서는 수산화 반응을 확인할 수 있었음. 특이하게도 hesperidin에서는 기존 구조에 포함되어 있는 당을 떼어 낸 결과를 확인할 수 있었음 (그림 16).

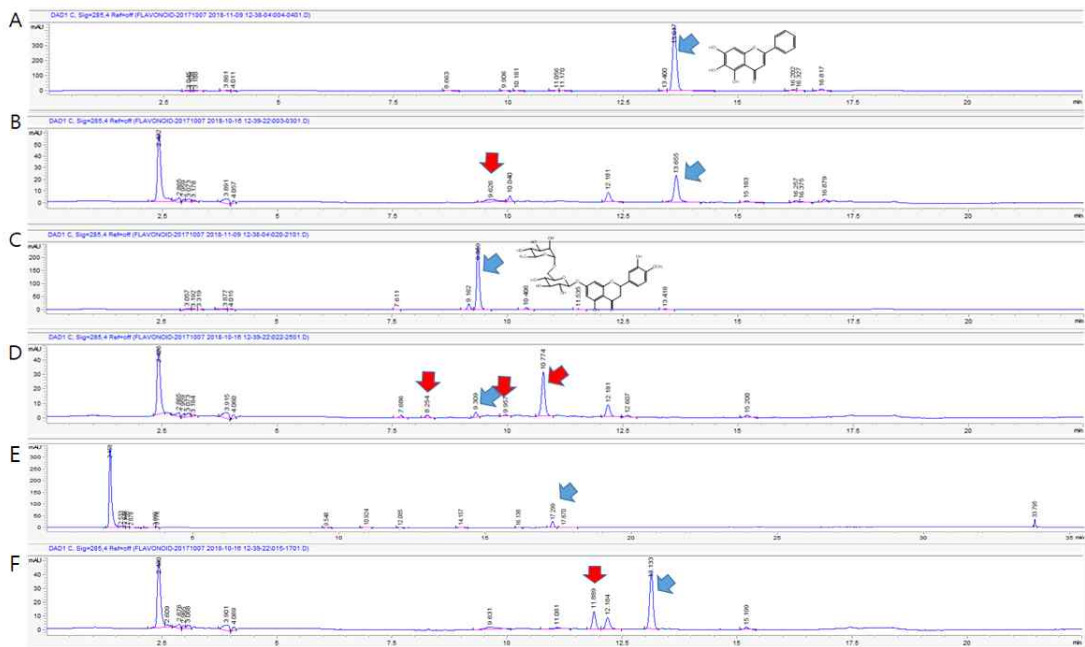


그림 16. CYP105A5의 baicalein과 hesperidin의 수산화 반응 결과. A, baicalein 표준물질; B, baicalein 수산화반응; C, hesperidin 표준물질; D, hesperidin 수산화 반응; E, honokiol 수산화 반응; F, naringenin 수산화 반응.

CYP101D5의 경우에는 naringenin과  $\alpha$ -ionone에서 반응함을 확인하였음. 특히, 이 효소는  $\alpha$ -ionone에서 반응하는 것으로 알려져 있었으나, naringenin과는 연구가 되어 있지 않음 (그림 17).

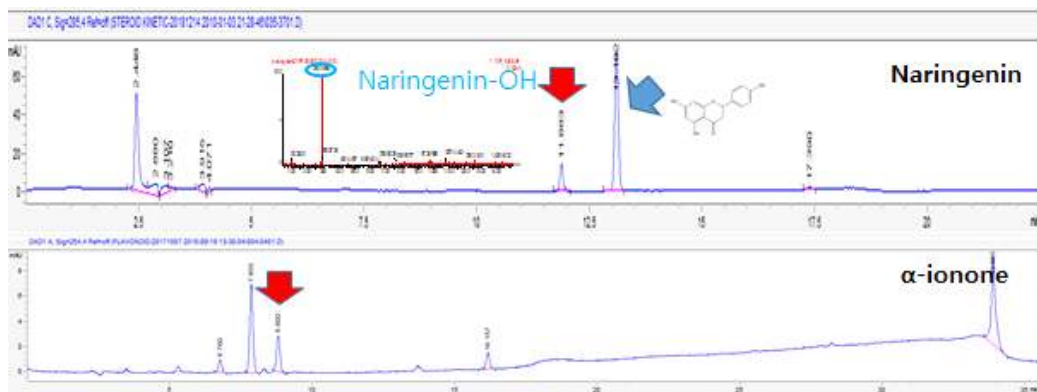


그림 17. CYP101D5의 naringenin과  $\alpha$ -ionone 수산화 반응 결과.

Glycosyltransferase를 이용한 반응에서는 모든 기질에서 당화반응이 일어나는 것을 확인할 수 있었음. Magnolol은 거의 100%로 conversion이 일어나며, mono-glucoside가 생성되는 것으로 보이고, rapamycin의 경우는 conversion yield



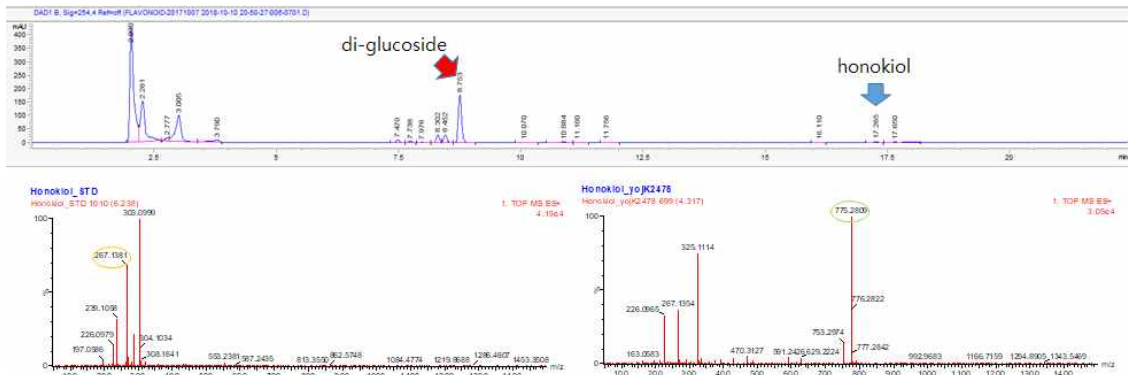


그림 20. Honokiol 기질의 당화반응 결과.

이 외에도 O-demethylation 하는 것으로 알려진 CYP105D17과 CYP105D18의 실험을 진행하고 있음. 약 1,200bp의 길이인 이들 유전자는 현재 클로닝 및 HPLC 반응을 진행 중이며, tetrahydroplamatin 및 다른 기질들로 O-demethylation 반응을 시도 중임 (그림 21). 앞으로 여러 기질들과 반응하여 새로운 유도체 개발용 CYP로써 활용하고자 함.

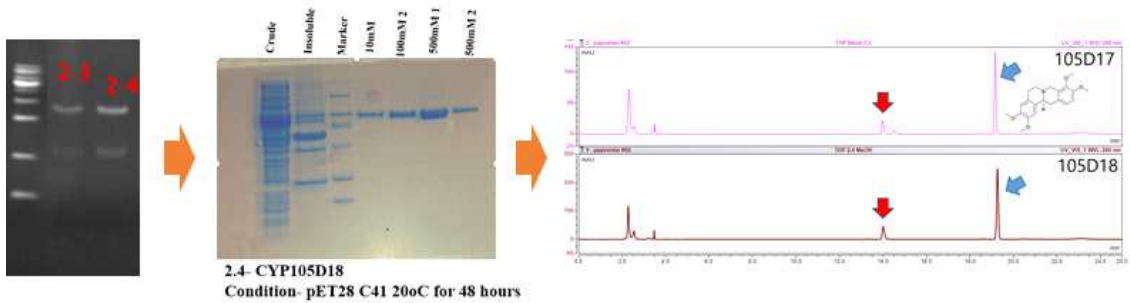


그림 21. CYP105D17과 CYP105D18의 클로닝, 단백질 정제 그리고 HPLC 반응 결과 일부.

마지막으로, CYP 반응할 때 들어가는 전자전달계의 다양성을 탐구하고자, ADX과 ADR에 대한 클로닝을 진행함 (그림 22). 다양한 vector와 클로닝을 시도하여 soluble한 단백질을 얻기 위한 시도를 하였으며, 그 결과 pET32 vector와 pET44 vector에서 각각의 효소들을 발현하였음. 발현온도는 37도보다 25도에서 발현율이 좋아서 25도 3일로 세팅되었음. 단백질 발현 및 정제를 통해 반응하기 충분한 양을 확보하였으며, 한편으로는 in vivo 반응을 실시하고자 duet vector에 클로닝 하였음. 3가지의 duet vector를 사용하였으며, conversion은 모두 가능하지만 그 중, pCDF duet vector와 클로닝 된 균주를 이용해 실험하였음. 이는 활성이 가장 좋으며, 동시에 PDX와 PDR이 위의 vector에 들어가 있는 것을 참고함. CYP106A 시리즈의 효소와 스테로이드 기질을 이용하여 in vivo 반응 결과, 50%이상의 conversion을 보였음.



그림 22. ADX와 ADR의 클로닝, 발현·정제, 그리고 in vivo 반응 결과.

PDX-PDR 전자전달계를 이용한 활성과 ADX-ADR 전자전달계를 이용한 활성을 비교해보면, 생성물은 동일하나, conversion에 차이가 나타남을 확인하여 CYP106A6와는 PDX-PDR이 더 적합함을 확인하였음 (그림 23). 또한, 이들의 주생성물은 CYP106A2의 반응 결과에 따라 15 beta hydroxyprogesterone일 것으로 예상되어짐. CYP106A 시리즈 효소들끼리 비교해보면, 이미 많은 연구가 진행된 CYP106A2와 달리 CYP106A6에서 더 강한 활성 및 다양한 반응을 진행함이 입증되었음.

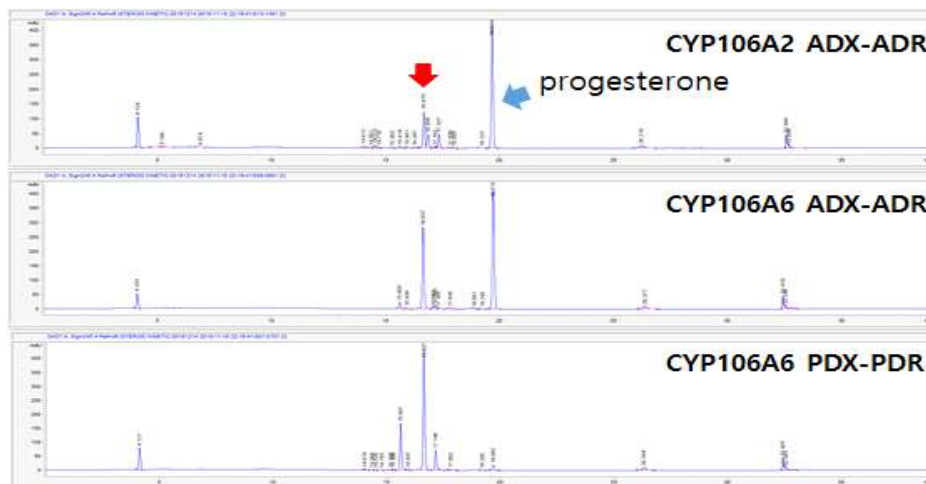


그림 23. 전자전달계에 따른 in vivo 반응 결과 일부.

ADX와 ADR은 CYP106A 시리즈 외 다양한 CYP와 반응한다고 알려져 있으므로, 앞으로 많은 CYP 반응에 있어 중요한 요소가 될 것으로 생각됨. 또한 전자전달계에 따라 생성물이 달라지는 경우도 존재하기 때문에 더 다양한 유도체 개발에 활용할 수 있을 것이라 사료됨.

이들 효소 외에 새로이 반응 중인 효소는 CYP154C3이며, 이 효소는 앞서 연구되었던 CYP154C 시리즈의 스테로이드 수산화 효소들 중 하나임. 클로닝 및 단백질 발현을 통해 과발현 됨을 확인하였고, 정제를 통해 in vitro와 in vivo 반응을 진행하였음 (그림 24).

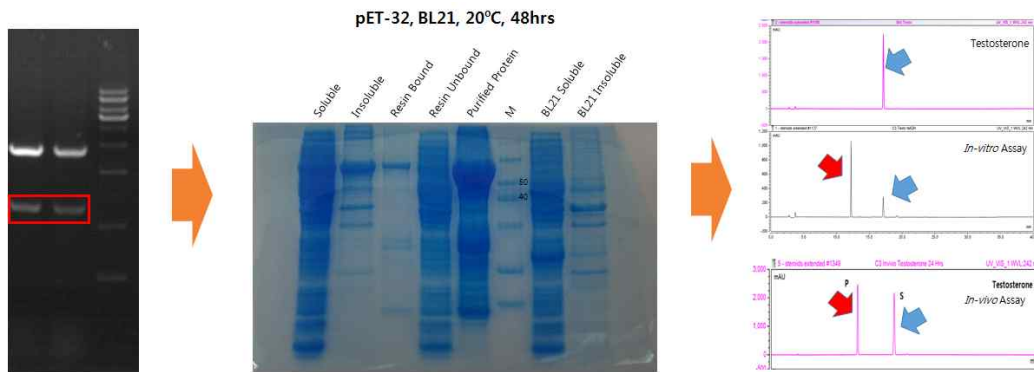


그림 24. CYP154C3의 클로닝, 단백질 발현 및 conversion 반응 이후, HPLC 결과 일부.

실험실 보유 다양한 스테로이드 기질을 사용하여 반응하였으며, 80% 이상 conversion을 보이거나, 여러 minor 생성물을 보이는 기질을 확인할 수 있었음 (표 2). 또한 전자전달시스템을 변경하면서 다양한 conversion 정도를 유도할 수 있음을 확인하였음. 그 중 PDX-PDR로 반응했을 때 가장 yield가 좋은 결과를 얻을 수 있었으며, 이들의 농도를 바꾸어 최적의 조건을 설립하는 실험을 현재 진행 중에 있음.

표 2. 다양한 전자전달계를 활용한 conversion 반응 요약 일부.

	Substrate	Pdx / Pdr	Iodo Benzene	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
1.	Progesterone	86.7% (16 $\alpha$ ) 4.12% (6 $\beta$ ,16 $\alpha$ ) 7.13% (2 $\alpha$ ,16 $\alpha$ )	20.28% (16 $\alpha$ ) 4.25% (6 $\beta$ ,16 $\alpha$ ) 2.07% (2 $\alpha$ ,16 $\alpha$ )	7.95% (16 $\alpha$ )
2.	Androstenedione	97.43% (16 $\alpha$ ) 2.33%	22.83% (16 $\alpha$ )	4.21% (16 $\alpha$ )
3.	Testosterone	70.69% (16 $\alpha$ )	28.87% (16 $\alpha$ )	10.5% (16 $\alpha$ )

다양한 기질과의 반응성을 확인하기 위해 플라보노이드 계열의 기질을 사용하였으나, 반응이 진행되지 않아 이 효소는 특정 기질 전환 가능한 효소임을 확인함. 효소의 활성을 높이는 방법 중에는 효소 자체 돌연변이 시키는 방법도 있으며 전자전달계를 바꾸는 방법도 존재함. 특정 효소에 적합한 전자전달계를 찾는 방법인데, 이를 위해 상업적으로 쓰일 정도로 flexible하다고 알려진 전자전달계를 사용하는 것과 각 균주 안에 존재하는 그들의 real 전자전달계를 사용하는 것이 있음. 앞서 실험한 내용들은 각기 유래가 다르지만, 여러 효소에 작용한다고 알려진 전자전달계를 사용한 것임. 이번 실험에서는 사용하고자하는 효소의 origin에서 전자전달계를 사용하고자 함. 실험하기에 앞서 CYP와 origin FDX 간의 상호작용을 보기 위한 docking을 확인하였음. 이 때, 헴과 철이온 사이 거리가 20Å 이하일 경우, 가능성이 있다고 가정할 수 있는데, 아래와 같은 반응 가능성을 확인함 (그림 25).



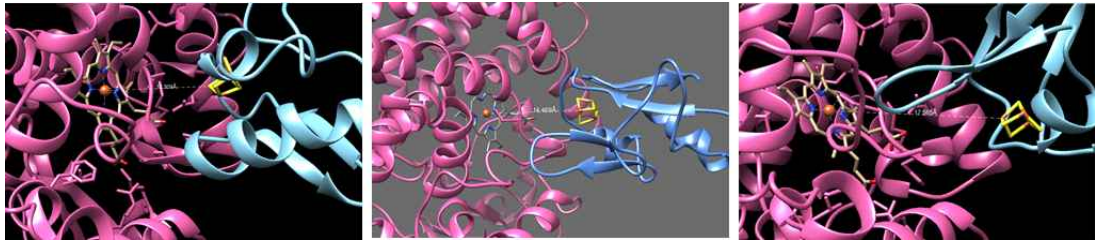


그림 25. Docking을 통한 CYP와 origin FDX 사이의 거리 분석.

Origin 균주로부터 유전자 서열을 비교하여 각각 7가지 FDX와 10가지 FDR 후보군을 비교분석하였으며, 그 중 가능성이 가장 높은 2-3 종을 선택하여 현재 클로닝 진행 중임 (그림 26).

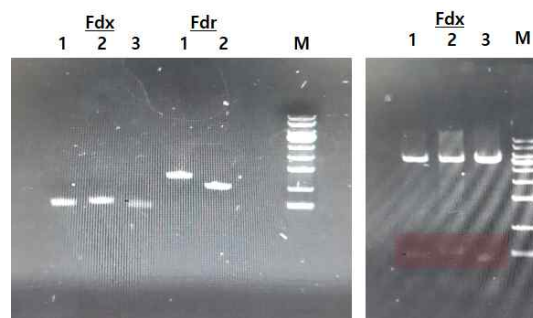


그림 26. Origin FDX와 FDR의 클로닝 일부 결과.

이후, 반응을 통한 효소의 활성을 비교하여 좀 더 높은 활성에 따른 수산화 반응 결과를 얻을 수 있을 것이라 기대되기 때문에, 새로운 전자전달계에 대한 가능성을 확인하고 앞으로의 연구방향을 설정 할 수 있을 것임.

## 제4장 연구개발 최종 목표 및 달성도

### 4-1. 연구개발 최종 목표

극지미생물 유전체 기반 항생제 후보물질 관련 생합성유전자 기능 증명 및 구조변형 단백질을 이용한 신규 차세대 항생후보물질 개발

### 4-2. 연구개발 목표에 따른 주요내용 및 달성도

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도(%)
극지미생물 유래 단백질의 기능 증명 및 신규활성물질 분리·분석	1-1 항생후보물질 관련 생합성유전자 및 구조변형 단백질의 in-vitro 기능 증명	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항생물질 및 구조변형 관련 유전자의 발현·정제</li> <li>- 항생물질 및 구조변형 관련 단백질의 기능 증명 완료</li> </ul>	100% <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2종 TypeIII PKS 단백질의 정제 완료</li> <li>- 구조변형 가능 CYP 단백질의 정제 완료 및 구조와 기능 증명 완료</li> <li>- 구조변형 가능 GT 단백질의 정제 완료 및 기능 증명 완료</li> </ul>
	1-2 기능이 증명된 다양한 단백질을 이용한 기존 활성물질의 구조 변형 시도	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항생물질 생합성단백질을 이용한 반응 완료</li> <li>- 선별된 기질 대상 구조변형 관련 단백질 반응 완료</li> </ul>	100% <ul style="list-style-type: none"> <li>- TypeIII PKS 단백질의 신물질 in vitro반응 완료</li> <li>- 기확보된 CYP 단백질을 이용한 선택적 기질의 수산화 구조변형 유도체 in vivo &amp; in vitro반응 완료</li> <li>- 기확보된 GT 단백질을 이용한 선택적 기질의 당화 구조변형 유도체 in vivo &amp; in vitro반응 완료</li> </ul>
	1-3 신규 항생후보물질의 분리 및 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 신규 항생후보물질의 분리·분석</li> </ul>	100% <ul style="list-style-type: none"> <li>- TypeIII PKS 단백질의 in vitro 반응 유래 신규물질 분리 분석 수행</li> <li>- 기확보된 CYP를 이용한 수산화 구조변형 유도체 신규물질 분리·분석 수행</li> <li>- 기확보된 GT를 이용한 당화 구조변형 유도체 신규물질 분리·분석 수행</li> </ul>

## 제5장 연구개발결과의 활용계획

### 5-1. 학술적 파급효과 및 추가연구의 필요성

- 극지미생물 유래 유전자원의 확보에 기인한 유전체 연구는 기존 비극지 생물의 유전체 등과 비교 분석을 통하여 다양한 생리활성물질들의 생합성 기작과 조절 기작 등을 규명할 수 있을 뿐만 아니라, 극지미생물의 다양성 조사를 통하여 생리·화학적 관점에서 생명현상 및 환경(온도)적응기작 등을 예측·추적할 수 있는 기반기술을 제공 가능할 것임. 기능유전체학을 활용한 체계적인 연구는 현재 초보적인 단계이며, 특히 극지미생물 유래 천연생리활성물질의 생산을 위한 기능유전체학과 대사공학의 접목 시도는 전무한 상태임. 따라서 본 연구에서 확보 가능한 극지생물의 유전자원 관련 연구는 학문적 활용 차원에서 상당한 잠재력을 내포하리라 생각됨.
- 현재까지 많은 부분 구조 변형 가능 효소들의 낮은 활성 문제점을 해결하지 못하고 있는 실정이며, 이는 효소 특성 연구의 부재를 비롯하여 그들의 구조적 기질유연성/특이성 연구가 체계적으로 이루어지지 못하였기 때문으로 생각됨. 따라서 본 연구로부터 확보 가능한 극지미생물 유전체의 다양한 구조변형 가능 효소들을 기존에 알려진 유전체 등과 비교·분석하여 기술적으로 낮은 활성을 극대화시킬 수 있는 방법을 모색하고자 하며 또한 학술적으로나 산업적으로 유용한 타겟 물질의 구조를 변형시킴으로써 결과적으로 신규활성을 지닌 새로운 구조의 항생후보물질을 확보할 수 있으리라 자신함.

### 5-2. 경제적 파급효과 및 기업화 추진방안

- 극한 환경에서 생존하는 극지미생물로부터 의약품으로 사용 가능한 신규항생물질 발굴 차원에서 본 연구는 상당한 이용 가치가 있음. 또한 이러한 연구는 유기합성이 어려운 다양한 유기화합물을 합성할 수 있는 근거를 제공할 뿐만 아니라, 향후의 산업적 적용 가능성에 따라 다방면으로 선택되어질 수 있는 기초기반기술을 보여줄 것임. 현재 한미 FTA 협상 이후, 국내 제약사는 혁신신약의 개발에 박차를 가하고 있음에도 불구하고 막강한 연구개발 인력과 기술력, 막대한 자본력 및 광대한 화합물 라이브러리를 보유한 거대 다국적 제약사들과 효율적으로 경쟁하기 위해서는 창의적인 우리만의 아이디어가 필요하고 우리만의 강점을 개발하여 활용해야 함. 따라서 향후 본

연구의 기초연구가 국내제약사나 벤처기업들과 연계·연구될 경우, 유전자 특허, 물질특허 및 치료법 특허로 이어지도록 추가연구를 수행하여 높은 제약산업적 가치를 창출할 수 있을 것으로 생각함.

- 일반적으로, 구조변형 가능 효소는 위치·입체 특이적으로 반응할 수 있는 산업적으로 매우 유용한 생촉매이기 때문에 정밀합성이 어려운 기존 생리활성물질들에서 선택적인 다양한 반응을 통해 부가가치가 높은 새로운 신규물질을 유도할 수 있는 가능성을 제공할 것임. 또한 본 연구를 통하여 일반적인 기질에 따른 생전환 가능성 등을 예상할 수 있을 것이며, 실제 경제·산업적으로 유용한 신규생리활성물질을 생산할 수 있는 방법으로 활용될 수 있으리라 확신함.



## 본 문

### (작성요령)

1. 본문의 순서는 장, 절, 1, 가, (1), (가), ①, ②, 등으로 하고,
  - 장은 17 포인트 중고딕체
  - 절은 15 포인트 명조체
  - 본문은 11 포인트 신명조체로 한다.  
단, 본문의 내용 중 중요부분은 중고딕체로 사용할 수 있다.
2. 장은 원칙적으로 페이지를 바꾸어 시작한다.
3. 본문은 신명조체 11 포인트 횡으로 작성한다.
4. 페이지 번호는 하단 중앙 끝에 11 포인트로 한다.
5. 각주는 해당 페이지 하단에 8포인트 활자로 표기하며, 본문과 구분토록 한다.
6. 페이지 수는 편집순서 2의 제출문부터 시작한다.  
단, 삽입물이 있을 때는 그 삽입물의 크기에 불문하고 1면을 한 페이지로 하여 일련번호를 붙인다.
7. 한글, 한문, 영문을 혼용할 수 있다.
8. 뒷면지에 주의문을 넣는다.
- 9.참고문헌(reference) 인용의 경우 본문 중에 사용처를 반드시 표시한다.

## 뒷 면

### 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.