

(뒷면)

(측면)

(앞면)

BSPE19380-116-13

과
제
번
호
PE
19380

실험동물
을
이
용
한
극
지
미
생
물
유
래
기
능
성
유
용
물
질
탐
색
및
안
전
성
검
증

실험동물을 이용한
극지 미생물 유래 기능성
유용물질 탐색 및
안전성 검증

Evaluation of the Potency and
Stability for Functional Materials
from Polar Microorganisms using
Laboratory Animal

주 의
(편집순서9)

(16 포인트 고딕체)

↑
15cm
↓

한
국
해
양
연
구
원
부
설
극
지
연
구
소

2020. 2. 29

한 국 해 양 과 학 기 술 원
부 설 극 지 연 구 소

해양수산부

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “실험동물을 이용한 극지 미생물 유래 기능성 유용물질 탐색 및 안전성 검증” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



2020. 2. 29

연구책임자 : 김 일 찬

참여연구원 : 김 정 은

“ : 김 태 경

“ : 민 슬 기

“ : 박 하 주

“ : 윤 의 중

“ : 임 정 한

“ : 한 세 중

“ : 홍 주 미

위탁연구기관명 : 신라대학교

위탁연구책임자 : 손 재 학

보고서 초록

과제관리번호	BSPE 19380-116-13	해당단계 연구기간	2019. 01. 01 - 2019. 12. 31	단계 구분	(해당단계)/(총단계)
연구사업명	중 사업명				
	세부사업명				
연구과제명	중 과제명	실험동물을 이용한 극지 미생물 유래 기능성 유용물질 탐색 및 안전성 검증			
	세부(단위)과제명				
연구책임자	김 일 칸	해당단계 참여연구원수	총 : 15 명 내부 : 9 명 외부 : 6 명	총 연구비	정부: 225,000 천원 기업: 천원 계: 225,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원 부설 극지연구소 극지생명과학연구부		참여기업명		
국제공동연구					
위탁연구	연구기관명: 신라대학교 연구책임자: 손재학		연구기관명:		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)				보고서 면수	147
<p>○ 연구목표 극지생물 유래 기능성 유용물질 탐색을 위한 실험동물 연구기반을 구축하고 신규 바이오소재의 유용성과 안전성 검증하여 초기단계에서 후보물질의 개발 가능성에 대한 기초자료 제공</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <p>1. 신약 및 바이오신소재의 안전성 및 독성평가</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Zebrafish 기반 스크리닝 시스템 구축 ■ 미세주입 장치 및 영상분석 시스템 확보 ■ 극지생물 유래 후보물질의 발생 및 신경독성 평가와 유전자 발현 분석(11건) <p>2. 질환모델동물을 이용한 후보물질 효능 검증</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 치매, 간 지방증 등 질환 모델 개발 및 항염증/지방간 개선 후보물질 효능 검증(7건) ■ 극지 미생물 유래 추출물 중 항염증 후보물질 탐색(8건) <p>3. 극지 미생물로부터 생리활성물질 확보 및 탐색</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ 극지 환경으로부터 세균, 진균 등 분리 및 동정, DB 구축(218점) ■ 극지미생물 유래 미생물 추출물 확보(128개) ■ 항당뇨/항염 활성 물질 탐색(52개) 					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	극지생물 대사체, 제브라피쉬, 바이오신소재, 극지미생물, 안전성 검증			
	영 어	Polar biotic metabolome, Zebrafish, Novel bio-material, Polar microorganisms, Stability evaluation			

요 약 문

I. 제 목

실험동물을 이용한 극지 미생물 유래 기능성 유용물질 탐색 및 안전성 검증

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 최종목표

- 실험동물을 활용한 극지 생물 유래 신규 바이오소재 유용성과 안전성 검증
- 기능성 유용물질 탐색을 위한 실험동물 연구기반 구축

2. 연구개발의 필요성

신규 의약품이나 신기능 생물소재의 기능 규명과 대사기전을 분석하고 안전성을 확보하기 위해서는 인간을 대신할 수 있는 실험동물을 활용한 검증 기술 확보가 필요하다. 실험동물모델은 질환의 원인 및 생리작용 규명과 예방·진단 및 치료방법을 모색하는 수단으로 의생명과학 분야에서 활용되어 왔다. 실험동물을 이용한 질환모델구축은 1980년대 후반부터 개발되기 시작하여 1990년대 후반부터는 기능유전체 연구와 사람의 질병 모델을 생산하기 위한 목적으로 대규모 프로젝트들이 시도되었다. 그 중에서도 설치류가 기초 및 임상연구를 위한 대표적인 실험동물모델로서 사용되어 왔지만 마우스를 이용한 질환동물모델은 발생초기 질병의 표현형 관찰, 유전자의 고속기능분석 및 대규모 스크리닝의 어려움, 시간적·경제적 측면에서의 부담 등으로 질환모델개발과 유전자 기능연구에서 제한점을 가지고 있다(Nishimura *et al.*, 2015).

근래에는 마우스, 쥐 및 토끼 등을 실험동물로 사용하는데서 오는 윤리적인 문제가 대두되면서 국내의 경우는 2007년 1월 동물보호 법이 공고되었고, 유럽의 경우에는 2012년부터는 연구에 발생 배 및 태아를 제외한 동물 사용 자체를 완전히 규제하는 법안이 설립되었다. 이에 따라, 실험실에서 쉽게 다룰 수 있는 실험 대체 동물의 개발이

절실한 상황이었다. 2000년 중반에 들어 새로운 실험동물 모델로서 제브라피쉬(zebrafish; *Danio rerio*)의 유용성이 확인되면서, 생명과학 전 분야에 폭넓게 도입되어 생물학, 유전학 및 독성학 연구에 훌륭한 모델로 사용되고 있다. 특히, 인간게놈 프로젝트 이후 공개된 새로운 유전자의 기능연구를 위해 새로운 동물모델의 필요성이 대두되면서 zebrafish를 활용한 질환모델 개발이 주목받기 시작하였으며, 척추동물의 발생기전연구와 유전자·유전체 기능연구에 탁월한 장점을 가지고 있는 zebrafish는 유전자 가위기술의 급속한 발전에 힘입어 생명과학 및 의학연구 분야에서 인간 질환모델로 이용되고 있는 다수의 모델동물 중에서 두각을 나타내고 있다. 또한 기존의 영장류 이용한 전임상 시험은 비용과 시간이 많이 들며, 도덕적 논란도 끊이지 않고 있다. 실험 자체가 복잡한 경우도 많고 세계적으로 동물윤리 지침이 강화되면서 세포 실험과 포유동물 실험의 중간 단계에 적용할 수 있는 동물대체시험법에 대한 필요성이 늘어나고 있다. 제브라피쉬 실험은 세포 실험과 포유동물 실험의 중간 단계에 적용될 수 있어 동물 실험을 최소화할 수 있다.

실험동물 모델로서 zebrafish는 사람과의 연계성이 좋으면서도, 고효율 독성평가가 가능하고 독성 메커니즘을 규명하는데 유용한 동물모델로서 제브라피쉬가 각광받고 있다. 동물 모델로서 논문출판 비율면에서 2010년을 기준으로 마우스, 초파리 등 기존 동물모델을 넘어섰으며 2013년 약 15% 정도의 점유율을 보여주고 있다. 제브라피쉬 배아는 간단한 사육환경에서 대량으로 얻기가 용이하고, 5일안에 모든 기관이 발달하는 등 발달이 빠르고 투명하여 고효율 독성평가가 가능하다. 제브라피쉬는 사람 유전자와 70% 비슷하며, 질병유전자로 한정할 경우는 그 상동성이 82%까지 올라간다(Howe *et al.*, 2013). 자궁을 제외한 대부분의 장기가 있어, 인간 유전체학 연구에 이미 많이 사용되고 있다. 특히 눈 같은 경우 사람과 매우 비슷하며, 색맹이 아닌 것으로 알려져 그 응용이 넓어지고 있다(Koehler *et al.*, 2018; Lieschke *et al.*, 2007).

현재까지 극지연구소에서는 극지생물 유래 실용화 후보물질 개발의 초기 스크리닝을 위해 세포수준의 연구가 수행 되었지만, 개발 가능성을 판단하기 위해서는, 동물실험을 통한 유효성과 안전성 확보가 필수적이다. 하지만, 동물과 사람의 대사·생리·병리학적 차이로 인하여, 동물실험결과를 인체에서 재현하는데 한계가 있으므로, 이를 해결하고자 보다 적절한 연구모델을 개발·활용해야할 필요성이 있다. 실험동물을 활용한 극지 유래 바이오신소재의 발굴과 효능평가, 신규 의약품 후보물질의 인체 내 작용기전 연구와 안전성 검증을 위해 실험동물 연구기반을 구축하여 극지생물 유래 유용물질 개발 가능성을 초기단계에서 평가하기 위한 목적으로 본 연구과제의 필요성이 있다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

구분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2019년	<ul style="list-style-type: none"> ○ 신약 및 바이오신소재의 안전성 및 독성평가 ○ 질환모델동물을 이용한 후보물질 효능 검증 ○ 극지 미생물로부터 생리활성물질 확보 및 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> - Zebrafish 기반 스크리닝 연구기반 구축 - Zebrafish 기반 도출물질의 유효성 및 안전성 평가(3건 이상) - 질환모델동물을 활용한 신규 후보물질 효능 검증(3건 이상) - 실험동물을 활용한 극지 미생물 유래 생리활성 물질 탐색(5건 이상) - 극지 환경으로부터 세균, 방선균 및 진균의 분리, 확보 및 DB 구축(200점 이상) - 극지미생물 유래 생리활성 물질 탐색을 위한 대량배양 및 추출물 확보(진균 120건 이상)

Ⅳ. 연구개발결과

1. 신약 및 바이오신소재의 안전성 및 독성평가

가. Zebrafish 기반 스크리닝 연구기반 구축

- (1) 실험동물 사육시스템은 21CZF model로 FT type으로 구축하였다. Stainless steel pipe 선반, 생물여과기, 가열기, 자외선 살균장치, 순환배관, 전기제어장치 등이 구성되어 있고, 스마트 관리 기능이 있어, 수조장치의 상태와 관리기록을 사용자가 상시 확인할 수 있다. 수조(case)는 3 L, 10 L 용량으로 목적에 맞게 다양하게 설치하였으며, case 바닥에 배설물, 사료 찌꺼기들이 잔류하지 않아 수질 오염을 줄여 주고, 자외선 차단과 이끼 발생을 최소화할 수 있도록 제작되었으며, FDA 무독성 인증 제품의 재질을 사용하였다.
- (2) 대상물질의 효능 및 독성평가를 위해, 물질을 실험동물의 발생 배나 성체에 주입할 수 있는 미세주입 장치(현미경, 미세바늘 제작기, 조절장치 등)를 개선하였다. 또한 대량의 신약후보물질들의 high-throughput screening, 제브라피쉬의 행동분

석 및 독성분석을 위해 약물 혹은 유전자 조절에 따른 행동양상을 관찰할 수 있는 체계를 갖추었다.

- (3) 제브라피쉬 개체의 안정적 유지를 위하여 외형상의 변화나 행동의 이상 유무를 지속적으로 관찰함으로써 이상이 있는 제브라피쉬는 즉시 격리 후 치료 또는 희생시켜 유지·관리하였다. 현재 야생형(wild type) 약 1,000개체, 돌연변이체(mutant) 32개체, 형질전환체(transgenic organism) 26개체를 유지하며, 실험에 활용하고 있다.

나. Zebrafish 기반 도출물질의 유효성 및 안전성 평가

- (1) 2017년 남극 생물 추출물 5개(17-Ant-42, 17-Ant-55-1, 17-Ant-55-3, 17-Ant-55-6, 17-Ant-69-1)와 호냉성 균주인 *Pseudalteromonas antarctica* PAMC 21717 유래 저온 활성 단백질 분해 효소인 P66의 발생독성을 평가하였다. *D. rerio* 배아에 대한 17-Ant-42의 반수치사농도(LC₅₀), NOEC 및 LOEC는 각각 212, 2.94, 14.7 ug/ml; 17-Ant-55-1은 150, 1, 5 ug/ml; 17-Ant-55-3은 333.3, 1, 5 ug/ml; 17-Ant-55-6은 110, 5, 10 ug/ml; 17-Ant-69-1은 75, 1, 5 ug/ml로 나타났다. P66은 모든 조건에서 수정란이 부화, 생존하지 못했다.
- (2) 형태학적 이상 증상으로 응고현상(C: Congelation), 난황부종(YSE: Yolk Sac Edema), 심장막부종(PE: Pericardial Edema), 수정란 와해되는 기형(CPFE: Collapse Phenomenon of Fertilized Egg), 꼬리 굽음(BT: Bent Tail), 출혈(H: Hemorrhage)을 관찰하였다. 17-Ant-42 평가 최고 농도인 147 ug/ml에서부터 수정란의 응고가 관찰되었다. 수정 후 24시간 경과 후, 응고현상을 보인 개체들은 96시간까지 지속적으로 응고현상이 유지되었다. 난황부종은 29.4 ug/ml부터 147 ug/ml에 노출된 개체에서 관찰되었다. 심장막부종과 꼬리 굽음이 처음으로 관찰된 농도는 14.7 ug/ml이다 17-Ant-55-1의 독성평가 결과, 5 ug/ml 농도에서 난황부종과 심장막부종이 3.3%가 관찰되었다. 그러나 평가 최고 농도인 100 ug/ml까지 이 외에 다른 형태학적 이상은 관찰되지 않았다.
- (3) 17-Ant-55-3의 독성평가 결과, 수정 후 24시간 경과 후, 수정란의 응고가 가장 낮은 농도인 1 ug/ml에서 3.3%, 5 ug/ml에서 6.6%, 100 ug/ml에서 3.3% 관찰되었다. 96시간에서 난황부종 80%, 심장막부종 90%, 꼬리 굽음 43.3%가 관찰되었다. 꼬리 굽음이 처음 관찰된 것은 72시간 200 ug/ml 농도에서, 96시간에는 43.3%로 비율이 증가하였다.

- (4) 17-Ant-55-6의 독성평가 결과, 평가 농도 범위에서는 난황부종과 심장막부종만 관찰되었고, 이 또한 시간이 경과함에 따라 비율이 감소되는 것을 확인하였다. 17-Ant-69-1의 경우, 수정 후 24시간 경과 후, 평가 최저 농도 1 ug/ml와 최고 농도인 50 ug/ml에서의 3.3%의 응고 현상이 관찰되었다. 평가 최고 농도인 50 ug/ml, 72시간에 관찰된 36.6%의 난황부종은 96시간에 3.3% 비율로 감소하였다.
- (5) 17-Ant-55-1, 17-Ant-55-3, 17-Ant-55-6, 17-Ant-69-1 시료는 정성적, 정량적 스크린을 통해 항균 활성이 확인된 것으로 항균 활성 물질 개발에 있어 물질의 독성이 배아의 어느 시기에 어떤 영향을 미치는지를 제시할 수 있을 것이라 생각된다.
- (6) 극지 공생 미생물 추출물 4 가지(2017-Ant-55-1, 55-3, 55-6, 69-1)에 대해서 신경 독성을 확인하였다 2017-Ant-55-6은 물질의 농도에 의존적으로 발현수준의 변화를 확인할 수 있었다. 이 물질은 25~50 ug/ml까지 처리된 larvae에서 mbpa를 제외한 5 가지 유전자의 발현률이 정상(아무것도 처리하지 않은 larvae)과 같은 수준을 유지하였으며 점차 증가되거나 감소되었다. 다른 물질의 처리군들은 비록 농도에 비례하여 일정하게 변화하지는 않았지만 물질처리군 전체적으로 정상군과 같은 수준을 유지하거나 에탄올 처리군과 같은 양상을 나타내기도 하였다.

2. 질환모델동물을 이용한 후보물질 효능 검증

가. 질환모델동물을 활용한 신규 후보물질 효능 검증

- (1) 2017년도 남극 세종과학기지에서 채집한 지의류 66종의 추출물 중 항염증 활성을 지닌 추출물을 9종을 선별하였다. 각 추출물에 포함되어 있는 항염증효능 물질의 작용기전을 확인하기 위해 다양한 염증반응 관련인자의 전사체 및 단백질 수준에서의 발현량을 분석 후 결과 도출하여 최종적으로 6종을 선별하였다. 선별된 6종에 대한 약효 평가를 *in vivo* 상태에서 실험하여 항염제로서의 가치가 있는지 확인하기 위해 제브라피쉬의 염증 질환모델을 제작하여 분석하였다.
- (2) 남극 지의류 추출물 *Umbilicaria Antarctica*, *Himantorimia lugubris*, *Psoroma sp.*, *Psoroma hypnorum*, *Amandinea sp.*의 농도에 따라 노출시킨 zebrafish larvae는 대조군 DMSO와 비교하였을 때 생존율이 100%를 나타내어 유의적인 차이를 보이지 않아 독성이 없다고 판단하였다. 그러나 지의류 *Pertusaria sp.* 추출물을 24시간 처리하였을 때의 생존율 변화를 측정한 결과 10 ug/ml 이하의 농도에서는

80% 이상의 생존율을 보였으나 25 ug/ml 이상의 농도에서 대조군과 비교하였을 때 20% 이하의 생존율을 보임으로써 독성이 있다고 판단되었다.

- (3) 남극 지의류 5종인 *Umbilicaria Antarctica*, *Himantorinia lugubris*, *Psoroma sp.*, *Psoroma hypnorum*, *Amandinea sp.*의 항염증 기전을 확인하기 위해 zebrafish larvae의 꼬리 절단 후 대조군과 비교 분석하였으며, 염증 유전인자인 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β 가 증가하는 것을 확인하였고 이로써 염증이 유발되었음을 확인할 수 있었다. 이를 활용하여 남극 지의류 추출물 6 종에 대해서 항염증 활성을 측정하였다.
- (4) 간 질환 동물모델을 이용하여 남극 지의류인 *Ramalina terebrata*에서 추출한 Ramalin (γ -glutamyl-N'-[2-hydroxyphenyl]hydrazide)의 간독성을 평가하였다. Embryo/larvae의 생존율, 심박수 및 형태학적 변화를 분석한 결과, 최고 농도인 100 ug만 제외하고 모든 처리군에서는 100% 부화율을 보였다. 100 ug 농도에서는 부화하지 못하고 모두 치사하였다. 형태학적 변화를 관찰한 결과, 50 ug에서 심장 부종과 꼬리 휨을 확인하였다. 그러나 꼬리 휨 현상은 시간이 지나면서 수영 운동을 통해 모두 정상으로 돌아왔다. 부화하지 못한 100 ug 농도에서는 대부분 난황부종, 심장부종이 확인되었다
- (5) Ramalin의 ethanol에 의한 zebrafish larvae hepatic steatosis 형성 억제 : 앞서 확인한 ethanol에 의한 유생 간 지방증 형성이 ramalin 처리 시 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인하였다. Whole-mount oil red O staining으로 염색 정도에 따라 none, some, steatosis 3단계로 구분하여 확인한 결과 전체적으로 지방증 형성이 감소한 것을 확인할 수 있었다.
- (6) Ramalin의 GPScreen 결과 자료를 활용하여 이미 확인된 상위 28개의 유전자 후보군(GPScreen)과 real-time PCR 결과에서 경향성을 보인 유전자 사이의 pathway를 확인하였다. 46개 유전자 중 확인되지 않는 4개의 유전자 외에 42개의 GPScreen 후보군과 real-time PCR 확인 유전자가의 pathway를 확인하였다. 이 중 GPScreen 후보군과 real-time PCR 확인 유전자가 공통으로 포함된 것은 biosynthesis of antibiotics (hmgcra, hmgcrb, hmgcs1, gck, hk1, hk2), biosynthesis of unsaturated fatty acids (fads2, scd)으로 확인되었다.
- (7) 형광단백질 삼입 형질전환 모델을 이용한 항염 효능 검증 : 형질전환 모델이 맞는지 확인하여 구별된 개체로만 실험을 진행하여야하기 때문에 이를 명확히 확

인하기 위하여 현미경 관찰 및 유전자형 검사를 수행하였다. 두 모델은 모두 다음 세대에 형광 단백질 유전자를 전달할 수 있었으며 이는 현미경 관찰로 가능하였고, 이 두 단백질이 삽입된 것으로 알려진 유전자 *dendra2*와 *mCherry*와 일치함을 유전자형 검사로도 확인하였다.

- (8) 동물세포(Raw 264.7 murine macrophages) 실험을 통해 항염 효능을 나타내는 것으로 평가되는 지의류 추출물 2017-Ant-29의 평가범위를 확장시키기 위해 3 dpf 제브라피쉬 larvae를 이용하여 *in vivo* 수준에서의 평가를 진행하였다. CuSO_4 를 처리하여 급성 염증환경을 조성하였을 때 macrophage와 neutrophil이 활성화 되어 체내 이동이 발생하는 것을 myoseptum 부분의 형광 세포를 개수하여 확인하였다. 또한 항염 후보물질인 2017-Ant-29를 농도별로 처리하였을 때 형광 세포의 수가 농도에 의존적으로 감소하였으므로 이전 연구에서 밝힌 *in vitro* 세포에서 항염 효능이 있는 것뿐만 아니라 *in vivo* 생체 검사에서도 항염 효능을 분명히 나타내는 것임을 확인하였다.
- (9) CRISPR/Cas9 기술을 활용한 유전자 질병모델 개발 : 돌연변이 여부를 간편히 눈으로 확인할 수 있는 색소단백질 생성 억제모델(Albino)을 우선적으로 제작하여 CRISPR/Cas9 기술의 일련의 과정을 수행하였다. PCR product는 적합한 크기(~150 bp)로 획득하였고 이를 정제해 내어 sgRNA 제작을 위한 주형 DNA로 사용하였다. sgRNA 합성을 끝내고 gel electrophoresis 로 확인해 보았을 때 주형 DNA와 같은 크기로 제작된 것을 확인하였다.

나. 실험동물을 활용한 극지 미생물 유래 생리활성 물질 탐색

- (1) 극지 미생물 유래 생리활성 물질의 항염 효능 확인 : Zebrafish를 활용하여 질병유사 반응 유도 후, 극지 미생물 유래 추출물의 약물효능평가를 수행하였다. 적절한 수준의 lipopolysaccharide (LPS)를 처리 후, 후보물질 처리에 의해 그 정도에 차이가 있는지 확인하기 위하여 LPS를 다양한 농도로 처리하여 발달 정도를 비교해 보았다. 10 ug/ml을 처리한 배아는 모두 사망, 5 ug/ml을 처리한 배아들은 발달에 심각한 이상이 발생한 것을 확인하였다. 대조군을 보면, 꼬리의 끝(전체 길이의 10 % 부분)을 제외하고 일자로 퍼져 있는 모습을 확인할 수 있다. 하지만 LPS 농도의존적으로 난황이 비교적 크며 꼬리가 말려있는 모습을 보인다. 결론적으로 LPS가 발달을 지연 시키는 것인지 혹은 기형적인 발달 진행을 유도하는 것인지는 구분할 수는 없지만 LPS 농도에 따른 변화가 있는 것은 확실히 구별할 수 있다.

- (2) 총 8 건의 미생물 추출물을 처리하였으며 이들 물질의 항염 효능을 1 차적으로 확인하기 위하여, 일정 시간에서의 배아 생김새를 보고 발달 지연 및 이상 정도를 판단하였다. 극지 미생물 추출물 시료를 처리한 제브라피쉬 유생의 외표검사 결과는 LPS 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 배아와 비교하여 판단하였으며, 난황 부종과 꼬리말림(발생 부진)을 위주로 LPS에 의한 손상이 시료에 의해 회복 혹은 악화되는지 그 정도를 판단하였다. 10개의 시료 중 2 가지는 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 낮은 농도에서도 다 수의 배아들이 사멸하였기 때문에 제외하고 나머지 8 개의 시료에 대한 외표검사만 실시하였다
- (3) 8가지의 극지 미생물 추출물 시료를 처리하였을 때 4, 8, 9, 10번의 시료를 처리한 배아들의 발달정도가 LPS를 처리하지 않거나 dexamethasone (Dex)와 LPS를 동시에 처리한 배아와 유사한 발달정도를 보이고 있음을 확인하였다.

3. 극지 미생물로부터 생리 활성물질 확보 및 탐색

가. 극지 환경으로부터 세균, 방선균 및 진균의 분리, 확보 및 DB 구축

- (1) 극한 미생물의 확보 : 2018년 북극 다산과학기지 주변으로부터 확보된 식물, 지의류, 환경시료 등 24의 시료로부터 세균(130 균주), 진균(88 균주)을 분리·보존하였다. 5종의 분리배지에 도말하여 배양하였으며, 이중 균체의 특성에 따라 1차로 세균과 진균을 분리하였고 필요에 따라 2~3차에 걸쳐 순수배양체를 확보하였다.
- (2) 극지 해양미생물의 특성 및 분류 : 세균 130종중 99종에 대하여 온도별 성장시험을 진행하였으며, 이중 저온성균(25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보다 10 $^{\circ}\text{C}$ 에서 높은 성장을 보인 종)은 1종, 내냉성균이 91종 그리고 중온성균이 7종으로 나타났다. 전체적으로 내냉성균이 92%를 차지하는 현상을 보였으며 이는 기존 2018년 남극지역으로부터 분리된 세균에서 저온성이 22%, 내냉성이 60% 그리고 중온성이 18%인 결과와 비교하여 저온성균의 비중이 현저히 낮고 내냉성균의 비중이 높은 것으로 보아 남극보다는 온도 폭의 변화에 의한 영향을 받은 것으로 판단된다.
- (3) 진균 89종을 대상으로 온도별 성장시험을 진행하였으며, 이중 68종에 대한 결과로부터 저온성균(25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보다 10 $^{\circ}\text{C}$ 에서 높은 성장을 보인 종)은 6종으로 9%를 차지하였다. 내냉성균은 37종으로 전체 가장 높은 비중인 54%를 그리고 중온성균은 25종으로 37%를 차지하고 있으며 결국 저온에서 성장이 가능한 종의 비중

은 63%를 차지하는 것으로 나타났다.

- (4) 세균과 진균의 온도별 성장특성을 조사한 결과, 세균은 99균주 중 저온성이 1균주 그리고 내냉성이 91균주로 나타났으며 진균은 68균주 중 저온성이 6균주 그리고 내냉성이 37균주로 나타났다. 분리된 미생물의 16S rRNA 및 ITS 영역의 염기서열분석을 통하여 진균 16균주를 동정하였다.

나. 극지미생물 유래 생리활성 물질 탐색을 위한 대량배양 및 추출물 확보

- (1) 극지 해양미생물로부터 추출물 구축 : 본 연구에서 분리된 88점과 기 확보된 우수활성을 갖는 40종을 포함한 128점의 진균은 PDA배지에서 배양하였으며 이후 ethyl acetate를 이용하여 추출물을 확보하였다.
- (2) 추출물확보현황 : 분리된 진균은 이차대사산물의 빈도가 높은 진균을 대상으로 대량배양을 진행하였다. 본 연구에서 분리된 진균 88점과 이전 확보된 진균중 항염 및 항당뇨 활성을 나타내었던 40점을 포함하여 총 128점의 진균은 PDA배지를 이용하여 제작된 plate (90 mm x 15 mm) 및 편박 플라스크에 접종하여 10°C에서 7~30일 배양하였다(균의 종에 따라 차이가 있음). 배양된 진균은 ethyl acetate 용매추출을 통하여 추출물제조를 완료하였다.
- (3) 극지 해양미생물유래 추출물의 생리활성 검색 : 항당뇨 및 비만 등을 위한 검색법인 PTP1B 저해활성을 검색한 결과 총 128점의 추출물 시료 중 73점의 시료에서 농도 의존적으로 강력한 PTP1B 및 항염 효과를 보였다. 생리활성은 각종 질병치료의 분자표적으로 인식되는 탈인산화 효소(PTP1B)를 이용한 항당뇨 관련 활성 검색법을 1차 스크리닝의 방법으로 적용하여 각 추출물에 대한 활성을 검토하고 그 결과를 토대로 향후 적용할 생리활성 평가법을 결정 하였다. 또한 얻어진 자료는 추출물과 함께 DB를 구축하였다.
- (4) PTP1B 저해활성에 의한 항당뇨 검색 : 진균 추출물을 대상으로 항당뇨 질병의 분자표적으로 인식되는 탈인산화효소인 PTP1B (Protein tyrosine phosphatase 1B)를 저해하는 *in vitro* assay를 수행하였으며 이를 통하여 진균 추출물의 항당뇨 저해능력을 평가하였다. 추출물의 농도를 0.3 ug/ml 수준에서 50% 이상 PTP1B 저해활성을 보인 시료는 총 33균주로 나타났으며 이중 SF-7648균주가 97.58%로 가장 높은 활성을 보였다. 1 ug/ml의 농도로 추출물을 처리하였을 때 PTP1B 저해활성이 70%이상을 나타낸 시료는 총 52균주로 나타났다.

V. 연구개발결과의 활용계획

1. 제브라피쉬를 이용한 기능성 물질 탐색을 위한 동물모델 연구기반을 확립하여, 제브라피쉬를 이용한 기능성 물질 탐색의 기초자료 제공, 제브라피쉬의 기능성 물질 탐색을 위한 동물모델로의 기술 확립, 기능성 물질의 효능 및 독성의 신속한 평가 등을 위한 정확성 향상에 활용할 수 있다.
2. Biomedical research에 있어서도 제브라피쉬는 강력한 imaging 기술과 발전된 genetic tool(유전체 디자인 기술)에 힘입어 가치 있는 동물모델(valuable model)로서 인정받고 있으며 여기에 약물 스크리닝을 위한 자동화된 시스템의 최적화와 결합되어 'Top Model'로서 떠오르고 있다. 제브라피쉬 질환모델은 기능유전체 뿐 만 아니라 생명의 과학 연구분야에서도 효율적인 활용되고 있다. 본 연구를 통해 개발된 질환모델은 신규 소재의 유효성과 안전성 평가는 물론, 신규 의약품 개발 분야에 유용한 실험동물로 활용될 수 있다.
3. 극지 생물로부터 분리된 극지 미생물, 추출물 및 생리활성검색자료를 바탕으로 신규 소재발굴을 위한 원천생명자원으로 활용 가능하며, 확보된 극지 미생물 자원으로부터 생리활성소재의 발굴을 통한 논문투고 및 특허를 확보함으로써 신규자원의 우선권을 확보할 수 있다. 또한 극지 미생물로부터 얻어진 자료의 DB를 구축하여 국내연구진과 공동연구를 통한 원천기술 및 응용을 통한 산업화 촉진한다.
4. Zebrafish 기반 동물모델 개발과 기능연구체계 확립으로 다양한 인간 질환치료 연구에 적용될 수 있는 기반 기술로 활용 가능하며, 신약개발 단계에서 효능 및 독성 검사를 위한 비포유류 전임상 모델로 활용, zebrafish 질환모델 인프라 구축을 기반으로 다양한 기초·임상 실험을 위한 실험동물모델 수립에 대한 시간적·경제적 투자비용 절감을 유도할 수 있을 것으로 기대된다.
5. Zebrafish 연구기반 구축 및 질환모델 개발과 활용을 위한 본 연구과제는 실험동물을 활용한 극지 유래 바이오신소재의 발굴과 효능평가, 신규 의약품 후보물질의 인체 내 작용기전 연구와 안전성 검증을 위해 실험동물 연구기반을 구축하여 극지생물 유래 유용물질 개발 가능성을 초기단계에서 평가하는데 유용한 정보를 제공할 것이다.

목 차

제출문	1
보고서초록	2
요약문	3
목차	13
List of Figures	15
List of Tables	17
제 1 장 서 론	19
제1절 연구개발의 목적	19
제2절 연구개발의 필요성	19
제3절 연구개발의 범위	24
제4절 정부정책과의 관련성	26
제 2 장 국내외 기술개발 현황	31
제1절 국내 연구동향	31
제2절 국외 연구동향	35
제3절 향후 전망	38
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	42
제 1 절 신약 및 바이오소재의 안전성 및 독성평가	42
1. 연구개요	42
2. 재료 및 방법	44
가. Zebrafish 기반 스크리닝 연구기반 구축	44
나. Zebrafish 기반 도출물질의 유효성 및 안전성 평가	45
3. 결과 및 고찰	52
가. Zebrafish 연구기반 구축	52
나. 발생독성 시험(Teratotoxicity Assay)	55
다. 간독성 시험(Hepatotoxicity Assay)	61
라. 신경독성 시험(Neurotoxicity Assay)	70
제 2 절 질환모델동물을 이용한 후보물질 효능 검증	73
1. 연구개요	73
2. 재료 및 방법	75
가. 질환모델동물을 활용한 신규 후보물질 효능 검증	75

나. 실험동물을 활용한 극지 미생물 유래 생리활성 물질 탐색	84
3. 결과 및 고찰	86
가. 항염증 후보물질의 독성 및 효능 검증	86
나. 형광단백질 삽입 형질전환 모델을 이용한 항염 효능 검증	92
다. CRISPR/Cas9 원리를 이용한 유전자 변이 모델 개발	94
라. 산화스트레스 모델	99
마. 성체 제브라피쉬 치매 모델	100
바. 질병유사반응 유도 후 약물효능 평가	100
제 3 절 극지 미생물로부터 생리 활성물질 확보 및 탐색	103
1. 연구개요	103
2. 재료 및 방법	103
가. 극지 환경으로부터 세균, 방선균 및 진균의 분리, 확보 및 DB 구축	103
나. 극지미생물 유래 생리활성 물질 탐색을 위한 대량배양 및 추출물 확보	106
3. 결과 및 고찰	108
가. 극지미생물 유래 미생물의 분리 및 보존	108
나. 미생물 동정을 위한 분자생물학적 분류	112
다. 극지생물 유래 미생물의 추출물 확보	116
라. 생리활성 검증	118
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도	123
제 1 절 연구평가의 착안점 및 검증방법	123
제 2 절 연구개발 목표 달성도	124
제 3 절 연구개발 결과의 대외 기여도	125
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획	131
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보	135
제 7 장 참고문헌	139
최종 결과보고서 평가의견 반영사항	147

List of Figures

Fig. 1-1. Research and development scheduling	25
Fig. 1-2. Role sharing of this project	25
Fig. 1-3. Research method of this project	26
Fig. 2-1. Utilization of zebrafish as experimental animal	40
Fig. 3-1. Equipments for zebrafish mating and egg harvest	45
Fig. 3-2. Ramalin isolated from <i>Ramalina terebrata</i>	47
Fig. 3-3. Images of Tg (Lfabp:dsRed;elastase:GFP)	50
Fig. 3-4. H&E staining of liver section from zebrafish larvae	50
Fig. 3-5. Zebrafish breeding facility	53
Fig. 3-6. Egg securement and generation stages of zebrafish	54
Fig. 3-7. Acute toxicity test of samples to <i>D. rerio</i> embryo	56
Fig. 3-8. Images summary of morphological abnormalities of <i>D. rerio</i> embryo	60
Fig. 3-9. Survival rates of zebrafish embryo in exposed to various ramalin	62
Fig. 3-10. Heartbeat rates of zebrafish embryo in exposed to various ramalin	62
Fig. 3-11. Images summary of morphological abnormalities of <i>D. rerio</i> embryo	63
Fig. 3-12. Survival rates of zebrafish larvae in exposed to various ramalin	63
Fig. 3-13. Hepatic Steatosis in zebrafish larvae treated in ethanol	64
Fig. 3-14. Quantification of hepatic Steatosis induced by EtOH was scored for zebrafish larvae treated with 5 μ g, 10 μ g, and 15 μ g Ramalin	65
Fig. 3-15. The expression of genes was analyzed by qPCR.	67
Fig. 3-16. Identification of key gene pathways	70
Fig. 3-17. RT-qPCR analysis of microorganisms extracts in neurotoxicity induction of zebrafish larvae	72
Fig. 3-18. Inflammatory regulation pathway in <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	75
Fig. 3-19. Antarctic lichen 6 species with anti-inflammatory activative	76
Fig. 3-20. Inflammatory responses induced by tail cut of zebrafish fry	77
Fig. 3-21. Information and method of sgRNA production targeting for Albino gene	80
Fig. 3-22. Primer sequences and PCR products for T7E1 assay after sgRNA injection	82
Fig. 3-23. Okadaic acid treatment for developing Alzheimer's disease	84
Fig. 3-24. Experiment method for anti-inflammatory effect analysis of polar microorganisms extracts after inflammation response induction in zebrafish egg	85
Fig. 3-25. The results of toxicity assessment of the Antarctic lichen 6 species	88
Fig. 3-26. Quantitative gene expression analysis for tail cut using zebrafish	88

Fig. 3-27. RNA extractions from the Antarctic lichens	89
Fig. 3-28. The results of real-time RT-PCR for inflammation-related genes of the Antarctic lichen extracts in zebrafish	92
Fig. 3-29. Fluorescent protein observation and genotype assay of Mpeg:dendra2 zebrafish	92
Fig. 3-30. Fluorescent protein observation and genotype assay of Mpeg:mCherry zebrafish	93
Fig. 3-31. Fluorescence change observation of macrophage number caused by anti-inflammation candidate (2017-Ant-29) in acute inflammation condition induced by CuSO ₄	94
Fig. 3-32. Fluorescent change observation of neutrophil number caused by anti-inflammation candidate (2017-Ant-29) in acute inflammation condition induced by CuSO ₄	94
Fig. 3-33. Principle of CRISPR/Cas9 gene edition technology	95
Fig. 3-34. Left: PCR product (self annealing), Right: sgRNA (after <i>in vitro</i> transcription)	96
Fig. 3-35. Process and equipments for microinjection	96
Fig. 3-36. Eggs and larvae images according to time course (4, 24, 48 hpf) after sgRNA injection for Albino model	96
Fig. 3-37. Principle of T7E1 assay	96
Fig. 3-38. T7E1 assay results of Albino model genes after sgRNA and Cas9 injection	98
Fig. 3-39. Qualitative analysis of accumulated oxidation stress by LPS-inflammation	99
Fig. 3-40. Developmental delay and disability of zebrafish eggs induced by LPS	100
Fig. 3-41. Effects of polar microorganism extracts on developmental delay and disability of zebrafish eggs induced by LPS	102
Fig. 3-42. Experimental protocol for isolation and identification of polar microorganisms	105
Fig. 3-43. Flow char for extract production from polar microorganisms	107

List of Tables

Table 1-1. Contents and scope of this project	24
Table 3-1. Sample list for teratotoxicity assay	45
Table 3-2. Primers used to quantify mRNA levels	49
Table 3-3. Primer sequences information for teratotoxicity assay	52
Table 3-4. Present condition of experimental animals	53
Table 3-5. Hatching rates and survival rates of <i>D. rerio</i> embryos	55
Table 3-6. Degree of the effect on the abnormal morphological symptoms of <i>D. rerio</i> embryo	61
Table 3-7. ZFIN ID of Genes	68
Table 3-8. Functions of maker proteins related to neurite development and expression profile change under neurotoxicity	71
Table 3-9. Primer list for real-time RT-PCR analysis	77
Table 3-10. Primers for genotype analysis of transgenic zebrafish with fluorescent protein	78
Table 3-11. Primer sequences for self-annealing PCR	80
Table 3-12. T7 <i>in vitro</i> transcription mixture	80
Table 3-13. Primer sequences for T7E1 assay	82
Table 3-14. Target genes for hepatocyte damage model production and symptoms caused by gene defects	98
Table 3-15. Medium composition for polar microorganisms isolation	104
Table 3-16. Medium composition for fungus isolation	105
Table 3-17. Number of microorganisms isolated from the Arctic biological samples	109
Table 3-18. List of fungi isolated from the Arctic biological samples	110
Table 3-19. List of bacteria isolated from the Arctic biological samples	111
Table 3-20. The effect of temperature on the growth of bacterial strains	113
Table 3-21. The effect of temperature on the growth of fungal strains	115
Table 3-22. List of fungal strain identified by ITS region sequence analysis	116
Table 3-23. List of extracts using ethyl acetate from the Arctic biological samples	117
Table 3-24. The summary of PTP1B inhibitory activity(%) against fungal extracts	119
Table 3-25. Effects of polar microorganism extracts on NO inhibition in RAW264.7 cells	121

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적

제 2 절 연구개발의 필요성

제 3 절 연구개발의 범위

제 4 절 정부정책과의 관련성

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적

극지생물 유래 기능성 유용물질 탐색을 위한 실험동물 연구기반을 구축하고 신규 바이오소재의 유용성과 안전성 검증하여 초기단계에서 후보물질의 개발 가능성에 대한 기초자료를 제공한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

신규 의약품이나 신기능 생물소재의 기능 규명과 대사기전을 분석하고 안전성을 확보하기 위해서는 인간을 대신할 수 있는 실험동물을 활용한 검증 기술 확보가 필요하다. 실험동물모델 질환의 원인 및 생리작용 규명과 예방·진단 및 치료방법을 모색하는 수단으로 의생명과학 분야에서 활용되어 왔다. 실험동물을 이용한 질환모델구축은 1980년대 후반부터 개발되기 시작하여 1990년대 후반부터는 기능유전체 연구와 사람의 질병모델을 생산하기 위한 목적으로 대규모 프로젝트들이 시도되었다. 그 중에서도 설치류가 기초 및 임상연구를 위한 대표적인 실험동물모델로서 사용되어 왔지만 마우스를 이용한 질환동물모델은 발생초기 질병의 표현형 관찰, 유전자의 고속기능분석 및 대규모 스크리닝의 어려움, 시간적·경제적 측면에서의 부담 등으로 질환모델개발과 유전자 기능연구에서 제한점을 가지고 있다.

근래에는 마우스, 쥐 및 토끼 등을 실험동물로 사용하는데서 오는 윤리적인 문제가 대두되면서 국내의 경우는 2007년 1월 동물보호 법이 공고되었고, 유럽의 경우에는 2012년부터는 연구에 발생 배 및 태아를 제외한 동물 사용 자체를 완전히 규제하는 법안이 설립되었다. 이에 따라, 무엇보다도 실험실에서 쉽게 다룰 수 있는 실험 대체 동물의 개발이 절실한 상황이었다. 2000년 중반에 들어 새로운 실험동물 모델로서 제브라피쉬(zebrafish; *Danio rerio*)의 유용성이 확인되면서, 생명과학 전 분야에 폭넓게 도입되어 생물학, 유전학 및 독성학 연구에 훌륭한 모델로 사용되고 있다. 특히, 인간게놈 프로젝트 이후 공개된 새로운 유전자의 기능연구를 위해 새로운 동물모델의 필요성이 대두되면서

zebrafish를 활용한 질환모델 개발이 주목받기 시작하였으며, 척추동물의 발생기전연구와 유전자·유전체 기능연구에 탁월한 장점을 가지고 있는 zebrafish는 유전자 가위기술의 급속한 발전에 힘입어 생명과학 및 의학연구 분야에서 인간 질환모델로 이용되고 있는 다수의 모델동물 중에서 두각을 나타내고 있다.

실험동물을 활용한 극지 유래 바이오신소재의 발굴과 효능평가, 신규 의약품 후보물질의 인체 내 작용기전 연구와 안전성 검증을 위해 실험동물 연구기반을 구축하여 극지 생물 유래 유용물질 개발 가능성을 초기단계에서 평가하기 위한 목적으로 본 연구과제의 필요성이 있다.

[과학·기술적 측면]

- 실험동물이란 검정, 진단, 연구 등의 목적에 사용하기 위해 개발·개량되어 사용되는 동물을 말하며, 이러한 실험동물은 인간을 대신하여 모든 정보를 제공하고 어떤 자극에 대하여 일정한 반응을 나타내는 생물 도량형(biomeasures) 역할을 하는 ‘살아 있는 시약’으로 불리고 생명과학 연구에 있어 필수적으로 사용된다(한국화학연구원 안전성평가연구소, 2016).
- 새로운 의약품의 인체 내 대사기전 및 안전성에 대한 정보를 획득하여 인간에 적용할 수 있으며, 질환의 원인, 치료 및 예방을 위하여 인간과 유사한 동물을 사용하여 정보를 획득하고, 사람에게 제어가 어려운 환경조건을 동물을 이용하여 연구할 수 있다.
- 제브라피쉬는 독성실험 모델로서 공간의 제약을 받지 않는 작은 크기, 간단한 사육환경에서 대량으로 쉽게 확보할 수 있는 수정란 및 대부분의 조직 및 장기가 하루 만에 형성되는 빠른 발생과정과 투명하여 고효율 독성평가의 장점을 가지고 있다(Kim *et al.*, 2014)
- 제브라피쉬 게놈 시퀀싱 프로젝트(Zebrafish genome-sequencing project) 결과, 질환관련 유전자를 포함하여 적어도 70%의 유전자가 인간과 동일하게 존재한다는 것이 보고되었고, 이러한 결과는 대부분 인간의 생리·병태현상이 제브라피쉬에서 모델화가 가능하다는 것을 의미한다(Julien A and Leonard IZ, 2013).
- 더욱이 최근 분자세포·생물학적 분석기술, 게놈 에디팅 기술, *in vivo* 실시간 이미징 기술 등 제브라피쉬 질환모델의 구축과 평가에 활용 가능한 기법 및 기술의 개선과 개발에 따라 대부분의 마우스실험기법이 제브라피쉬에서 가능하게 됨으로써 제브라피쉬

를 활용한 질환모델은 꾸준히 새로운 연구영역들을 구축해 나가고 있다(임현정 & 문현이, 2014).

- 현재까지 보고된 많은 zebrafish 돌연변이체는 인간의 질환과 매우 유사함이 밝혀졌고 심혈관계, 근육계, 골형성, 신경계, 감각계, 생식계 등 인간에게 유발되는 거의 대부분의 질병분야 연구에 적용될 수 있다. Zebrafish는 혈액질환, 근육질환에서 퇴행성신경질환과 암에 이르기까지 다양한 인간질환에 대한 질환모델이 개발·연구되어왔고 신약개발연구 분야에 있어서도 small molecule 스크리닝을 통해 다양한 질환치료 물질 발굴, 대단위 약물 검증, 독성연구, 전 임상시험 등 신약개발 후보물질에 대한 독성평가 및 약효 평가에 대한 탁월한 이점을 가진 실험동물모델임이 이미 많은 연구자들에서 입증되고 있다(임현정 & 문현이, 2014).
- 제브라피쉬(Zebrafish, *Danio rerio*)는 최근 세계적으로 척추동물의 발생 연구 및 사람의 질환연구에 탁월한 장점을 가지고 있는 중요한 모델 동물로 특히 조직 특이적으로 형광을 발현하는 transgenic fish를 이용하면 특정 세포의 이동이나 증식 사멸 분화 과정을 생체 내에서 살아있는 상태에서 관찰할 수 있다. 또한 제브라피쉬는 25개의 염색체를 가지고 있으므로, 인체의 유전자와 크기와 수가 비슷하며 유전자 및 단백질간의 상동성이 매우 높고, 또한 신경계뿐 아니라 각종 기관형성 과정이 사람과 매우 유사하기에 제브라피쉬의 연구를 통하여 얻어진 결과들은 바로 인간의 건강과 질병 연구에 중요한 자료로 활용될 수 있다(박해철, 2010).
- 신규 의약품이나 신기능 생물소재의 기능 규명과 대사기전을 분석하고 안전성을 확보하기 위해서는 인간을 대신할 수 있는 실험동물을 활용한 검증 기술 확보가 필요하다. 실험동물모델의 활용은 사람에게서 발생하는 질환의 원인 및 병태생리 규명과 질환의 예방·진단 및 치료방법을 모색하는 수단으로 의생명과학 분야의 발전과 더불어 병행하여 왔다. 실험동물을 이용한 질환모델구축은 1980년대 후반부터 개발되기 시작하여 1990년대 후반부터는 기능유전체 연구와 사람의 질병모델을 생산하기 위한 목적으로 대규모 프로젝트들이 시도되었다.
- 설치류(마우스)가 기초중개 및 임상연구를 위한 대표적인 실험동물모델로서 사용되어 왔지만 마우스를 이용한 질환동물모델은 발생초기 질병의 표현형 관찰, 유전자의 고속기능분석 및 대규모 스크리닝의 어려움, 시간적·경제적 측면에서의 부담 등으로 질환모델개발과 유전자 기능연구에서 제한점을 가지고 있다.
- 인간게놈 프로젝트 이후 공개된 새로운 유전자의 기능연구에 대한 새로운 동물모델의

필요성이 대두되면서 zebrafish를 활용한 질환모델 개발이 주목받기 시작하였으며, 척추동물의 발생기전연구와 유전자·유전체 기능연구에 탁월한 장점을 가지고 있는 zebrafish는 유전자 가위기술의 급속한 발전에 힘입어 생명과학 및 의학연구 분야에서 인간질환 모델로 이용되고 있는 다수의 모델동물 중에서 두각을 나타내고 있다.

- 특히 zebrafish는 인체의 질병모델 뿐 아니라 암이 유발되는 경로 및 암의 조직학적 구조가 사람과 유사하며, 각종 암 유발 관련 유전자들의 발암 기전이 사람과 거의 동일한 것으로 확인되어 최근 많은 연구자들에 의하여 암 동물모델로서 암 연구에 활용되고 있다. 또한 zebrafish는 각종 carcinogen에 대한 반응성이 일반적인 암 세포주와 비슷하며, 특히 발생 후 약 5 ~ 7일째까지는 96 well plate에서 배양이 가능하므로 질환모델로 확립한 zebrafish를 사용하여 대단위 신약 탐색이 가능하다.

[경제·사회적 측면]

- 고도산업 사회로의 발전과 소득수준의 향상에 따른 식생활 양식의 서구화와, 보건의료의 증진에 의한 수명연장에 따른 필연적 수반 질병인 암과 성인형 질환의 발병 및 이에 따른 치료제 수요의 급속한 증가는 불가피하다. 따라서 국내의 의약시장은 더욱 신장할 것이며 이에 따른 새로운 의약품의 개발이 필연적으로 요구되고 있다.
- 생명과학의 기초기반 분야인 실험동물의 운영이 국가적 관리 하에 합리적이고 체계적으로 운영관리 됨으로서 동물실험에 대한 윤리성을 보증하고 동물실험 결과의 정확성, 재현성을 확보함으로써 우리나라에서 수행되는 생명과학연구에 대한 국제 신뢰성 구축한다.
- 기존의 포유류 동물을 이용한 전임상시험은 비용과 시간이 많이 들며, 실험 자체가 복잡한 경우도 많다. 또한 세계적으로 동물윤리 지침이 강화 되어, 세포 실험과 포유동물 실험의 중간 단계에 적용할 수 있는 동물대체시험법에 대한 필요성이 늘어나고 있다.
- 실험동물 자원 자체뿐 아니라, 개발·공급, 관리·활용 과정과 관계되는 시설, 인력, 법·제도 등 광범위한 요소들이 실험동물의 활용과 밀접하게 관련되어 있으며, 실험동물의 적절한 활용을 위해서 다음의 요소가 중요하게 고려되고 있다. 동물실험 결과의 신뢰성과 재현성 확보를 위해서는 ‘실험동물의 품질 보증’이 매우 중요하며, 이를 위해서는 실험동물의 관리 및 시설 운영의 표준화가 담보되어야 한다. 실험동물은 ‘고통을 느낄 수 있는 살아있는 생명체’로, 실험동물의 개발·관리·활용시 ‘윤리

적연구'가 중요하게 고려되어야 하며, 이에 따른 제도와 지침이 강화되고 있다(김종란 & 김한해, 2019).

- 실험동물은 세대기간이 짧으므로 차세대에 미치는 영향을 쉽게 연구할 수 있으며 실험에 영향을 주는 환경 조절이 용이하여 사람에게는 일정한 환경의 시간적, 공간적 및 경제적으로 관리하기 어려운 한계를 극복 가능하다.
- Zebrafish는 인간이 가진 대부분의 장기(뇌, 심장, 간, 췌장, 신장, 흉선)가 있는데다 70% 이상의 유전자가 인간과 동일하며 알이 투명해 배아가 자라는 과정의 변화까지 관찰 가능한 특징이 있어 신약 개발 연구에 활용되고 있다.
- Zebrafish의 다양한 장점을 활용함으로써 신약개발 초기 단계에 신속한 대량 검증이 가능해 많은 비용과 시간이 소요되는 신약개발의 계속 진행여부를 초기에 판정할 수 있으며, 다양한 신물질에 대한 독성 및 효능평가를 개발 초기에 평가할 수 있어 최적의 후보물질 도출로 개발과정에서 실패에 대한 리스크를 줄일 수 있다.
- 비임상 시험 독성평가와 효능평가 부분에서 기존 동물 실험을 대체 할 수 있어 연구 현장에서 실험동물의 윤리문제 부담을 덜 수 있고 척추동물로서 여러 기관을 갖고 있는 zebrafish의 특징을 살려 배어나 치어 상태에서 시험을 수행 할 경우 외부에서 배양된 세포보다 더 다양한 기능적 평가를 검증 할 수 있다. 이를 통해 세포에서는 검증이 불가능한 압 전이 과정이 형광으로 관찰가능하고 장의 운동성도 관찰 가능해 연구자의 높은 관심을 받고 있다.
- 동물모델 사용은 복잡성·장시간·고비용의 한계와 더불어 동물윤리 강화에 따른 제한이 있어 이를 보완하기 위해 인간 유전자 및 조직 상동성이 높은 zebrafish 시스템을 평가에 활용함으로써 실패율을 줄이고, 개발비용도 절감 할 수 있다.
- 일반 실험동물은 대부분 국내 민간기업을 통해 획득하지만(마우스 64%, 마우스 외 82%), 유전자변형 실험동물의 경우 '국외수입'이 과반수를 차지(마우스 55%, 마우스 외 52%)한다. 국내 보유 종의 부재 및 실험동물의 품질에 대한 신뢰성 미흡이 해외도입의 주요사유로 제시되고 있다. 일반 실험동물의 경우, '보유종 부재' 및 '실험동물 품질의 신뢰성 미흡'이 주요한 이유로 제시되었고, 유전자변형 실험동물의 경우, '보유종 부재'가 70%이상으로 제시되었다. 국내 개발 또는 해외로부터 수입된 다양한 실험동물 자원의 기탁·등록 및 공유·활용 활성화가 필요하나 국내 자원의 공유·활용은 미흡한 실정이다(김종란 & 김한해, 2019)

제 3 절 연구개발의 범위

본 연구의 범위는 극지생물 유래 대사체 실용화의 개발 가능성을 초기에 판단할 수 있는 근거자료를 생산하기 위해 실험동물을 이용하여 후보물질의 독성평가 및 정밀 효능 검증을 수행하는 것으로 1) Zebrafish 기반 스크리닝 시스템 구축, 2) 질환모델 개발과 이를 활용한 후보물질의 정밀 효능 검증, 3) 극지 미생물 유래 생리활성 추출물 탐색과 검증으로 구성되어 있다. 실험동물 모델을 활용한 극지 미생물 유래 신규 바이오소재 탐색, 효능 검증 및 안전성 평가를 위해 미생물 기원 생리활성 물질 확보와 탐색은 이미 수년간 본 연구팀과 협력연구를 진행해 온 신라대학교 손재학 교수팀과 수행하며, 추출물이 확보되면 신라대학교와 극지연구소에서 유용성 평가가 진행되고, 1차 선별 또는 기 확보된 후보물질들은 zebrafish 배아, 성체 및 질환모델에 순차적 또는 병렬적 처리를 통해 궁극적으로 대상물질의 독성과 안전성 평가 및 분자수준의 작용기전을 분석한다.

Table 1-1. Contents and scope of this project

연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
<ul style="list-style-type: none"> ○ 신약 및 바이오신소재의 안전성 및 독성평가 	<ul style="list-style-type: none"> - Zebrafish 기반 스크리닝 연구기반 구축 - 남극 생물 추출물 6종의 발생독성 평가 - 극지 공생 미생물 추출물 4종의 신경독성 평가
<ul style="list-style-type: none"> ○ 질환모델동물을 이용한 후보물질 효능 검증 	<ul style="list-style-type: none"> - 항염증 후보물 6종의 독성평가 및 항염증 효능 평가 - 간 질환모델을 활용한 Ramalin의 간 지방증 완화효능 평가 - 극지 지의류 유래 항염 효능물질의 안전성 평가 - CRISPR/Cas9 기술을 활용한 유전자 질병모델 개발 - 극지 미생물 유래 생리활성 물질 8종의 항염 효능 확인
<ul style="list-style-type: none"> ○ 극지 미생물로부터 생리활성물질 확보 및 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> - 북극 생물 및 환경시료 24종에서 세균(130 균주), 진균(88 균주)를 분리보존 - 세균과 진균의 성장특성 분석 (세균 99균주 중 저온성 1균주, 내냉성 91균주/진균 68균주 중 저온성 6균주, 내냉성이 37균주) - 128점의 진균 유래 추출물 확보 - 총 128점의 추출물 시료 중 73점의 시료에서 농도 의존적으로 강력한 PTP1B 및 항염 효과 확인

구분	1월	2월	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월	10월	11월	12월
신약 및 바이오 신소재의 안정성 및 독성 평가	Zebrafish 기반 스크리닝 연구기반 구축			도출물질의 유효성 및 안정성 평가								
질환모델동물을 이용한 후보물질 효능 검증	실험동물을 활용한 극지 미생물 유래 생리활성 물질 탐색						질환모델동물을 활용한 신규 후보물질 효능 검증					
극지 미생물로부터 생리활성물질 확보 및 탐색	극지 환경으로부터 세균, 방선균 및 진균의 분리, 확보 및 DB 구축											
	대량배양 및 추출물 확보											

Fig. 1-1. Research and development scheduling

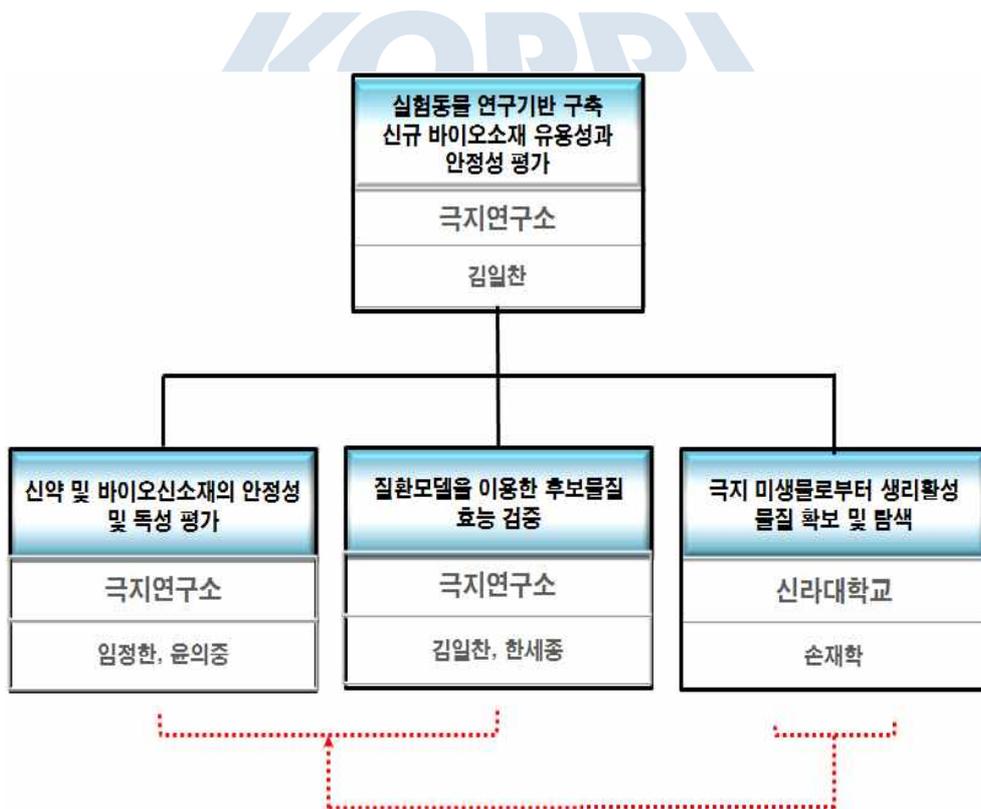


Fig. 1-2. Role sharing of this project



Fig. 1-3. Research method of this project

제 4 절 정부정책과의 관련성

- 바이오헬스 분야의 발전과 더불어, 핵심 연구기반인 실험동물 연구자원과 인프라의 중요성이 부각되고, 다양한 질환에 '보다 적절한 모델'을 활용하는 동물실험이 강조되고 있다. 최근, 보다 적절한 연구자원의 일환으로, 실험동물 모델의 고도화를 위한 기술개발이 활발하게 이루어지고 있으며 신물질 및 신약개발에 직접적으로 활용되고 있다. 실험동물 모델의 고도화란 인간과 인간의 질병에 더욱 근접한 양상을 나타낼 수 있는 '보다 적절한 실험동물 질환모델'을 개발·활용하는 것으로, 설치류나 미니돼지, 영장류 등을 이용한 유전자변형동물이나 인간화마우스, PDX마우스 등이 대표적인 예시가 될 수 있다. 다양한 실험동물 자원을 확보·보존하고, 효율적으로 공유·활용하는 것은 바이오헬스 분야의 기술력 증대를 위한 중요한 요소로, 많은 국가들에서 국가 차원에서의 관리 전략을 수립하여 운영하고 있다(김종란 & 김한해, 2019).
- 우리나라는 '제2차 생명연구자원관리 기본계획('16~'20)' 및 '2019년도 생명연구자원관리 시행계획'을 통해 국가 차원의 전략적 관리가 필요한 핵심자원을 관리하는 체계를 마련하였다(2019년도 생명연구자원관리시행계획, 2019). 생명연구자원법에 따라 연구

자원별 책임기관 및 기탁·등록 기관을 중심으로 확보·관리하고 있으며, 국가생명연구 자원정보센터(KOBIC)를 통해 범부처 정보를 연계하는 통합정보시스템(KOBIS)을 운영하고 있다. 생명연구자원 중 실험동물자원은 한국생명공학연구원(바이오의약인프라 사업부), 식품의약품안전평가원, 국가마우스표현형사업단을 중심으로 자원 확보·공유 기능을 수행하고 있다(김종란 & 김한해, 2019).

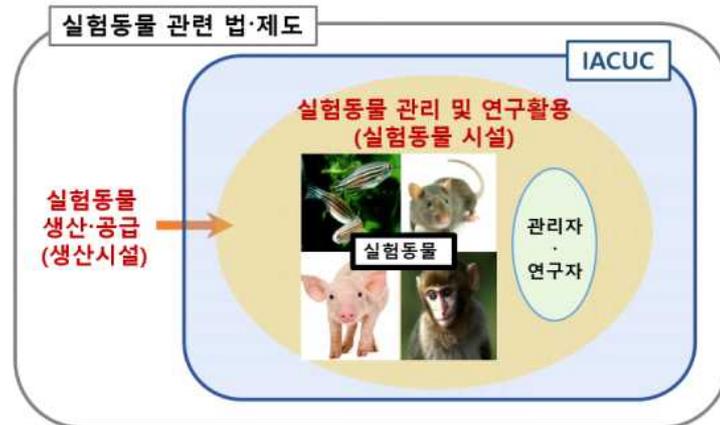
- 실험동물 자원 중 마우스, 돼지, 영장류가 10대 국가전략생명연구자원으로 선정되어, 안정적 확보·활용을 위한 전략을 수립하였다. 국공립(연)·출연(연) 소속의 실험동물 시설과 대형 국가연구개발사업 지원을 통한 주요 공공 인프라에서 기탁·등록·보급 및 연구지원 등의 기능을 수행하고 있다.

<주요 실험동물 공공 인프라>

구분	기관	주요기능	보유동물	관련 사업
기탁·등록·보존·보급 기능	실험동물 자원센터	- 마우스 자원 중심 - 무균동물 제작/관리 - 유전자변형마우스 개발 및 표현형분석 - 마우스자원동결, 오염동물 청정화 등	마우스	한국생명공학연구원 연구운영비 지원 (바이오인프라 사업)
	국가 영장류 센터	- 국가영장류연구 기반 확립위한 인프라 구축 및 지원 - SPF 영장류 자원 확보·공급 지원 - 영장류 질환모델 개발 - 이종장기이식 연구 - 유전체 연구, 미생물모니터링 등	영장류	
	영장류 자원 지원센터 (정읍)	- 고품질 SPF영장류 자원 대량생산 기반 마련 - 영장류 콜로니 형성 - 유전체 연구, 유전·미생물 모니터링 등	영장류	
	미래형 동물자원 센터	- SPF미니돼지 자원 개발·확보·평가 - 고효율 형질전환/복제 기반기술 확보 - 유전체 분석 및 미생물모니터링	미니돼지	
	식품의약품 안전평가원	- 질환모델마우스 확보 - 국산실험동물개발 및 보존 - 식의약 유효/안전성 평가모델 개발	마우스, 랫드, 기니픽, 토끼, 개, 돼지 등	안전성평가 기술개발연구 (실험동물활용 기술 및 관리선진화)
	국가마우스 표현형사업단	- 유전자변형마우스자원 확보 및 청정화 - 마우스표현형분석 - IMPC와의 국제공조를 통한 표현형분석 인프라 구축 - Mouse One Portal(마우스자원정보총괄 시스템) 구축·운영	마우스	바이오의료 기술개발사업 (국가마우스 표현형 분석 기반구축)
연구 지원 기능	안전성평가연구소	- 안전성평가 서비스 - 장비공동활용서비스 - 안전성평가 동물모델개발	마우스, 랫드, 토끼, 개, 영장류, 돼지 등	안전성평가 연구소 연구운영비지원
	오송첨단의료산업 진흥재단	- 유효성/안전성 평가 지원 - 유효성/안전성평가 동물모델 제작	마우스, 랫드, 토끼, 개, 영장류, 돼지 등	첨단의료 복합단지 기반기술구축
	대구경북첨단의료산업 진흥재단	- GEM·질환모델동물개발·보존·공급		
기관내 연구 수행	국립농업과학원, 국립수산과학원, 국립축산과학원, 국립정신건강센터, (지방)식약청, (지역)농업기술원, 국방과학연구소, 한국과학기술연구원, 한국기초과학지원연구원, 한국뇌연구원, 한국생명공학연구원, 한국식품연구원, 세계김치연구원, 한국원자력연구원, 한국한의학연구원, 한국화학연구원, 국제백신연구소, 한국파스퇴르연구소 등			

[출처 : KISTEP 기술동향브리프 15호]

- 우리나라의 경우 생명연구자원의 하나로써 실험동물 자원을 확보·관리하기 위한 정책을 수립·추진하고 있으나(2019년도 생명연구자원관리시행계획, 2019), 실험동물 자원의 효율적 관리·활용에 중점을 둔 상세한 추진계획은 아직 마련되지 않았다.

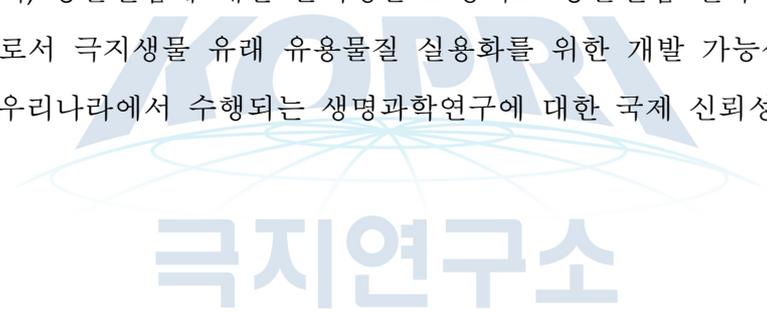


[출처 : 김종란, 김한해, 실험동물 공유·활용 동향, KISTEP 기술동향브리프, 2019]

- 최근 마우스, 돼지, 영장류 등의 실험동물로 사용과 관련된 윤리적인 문제가 대두되면서 법적인 제도적인 장치가 생겨났다. 국내의 경우는 2007년 1월 동물보호 법이 공고되었고, 유럽의 경우에는 2012년부터는 연구에 발생배 및 태아를 제외한 동물 사용 자체를 완전히 규제하는 법안이 설립되었다. 이러한 사회적인 동향은 향후 연구논문의 학술저널에 투고에 대한 제한을 시사해 주고 있으며, 무엇보다도 실험실에서 쉽게 다룰 수 있는 실험 대체 동물이 필요가 절실한 실정이다. 이에 따라 2000년 중반에 들어 새로운 실험동물 모델로서 생명과학 전 분야에 폭넓게 도입되고 있는 제브라피쉬(zebrafish; *Danio rerio*)는 생물학, 유전학 및 독성학 연구에 훌륭한 모델로 사용되고 있다(배영기, 2013). 물고기를 이용한 독성평가도 동물실험윤리위원회(IACUC, Institutional Animal Care and Use Committee)에서 그 적정성, 필요성, 타당성에 따라 허가를 받아야 하는데 배아 발달 단계에서의 독성평가는 법적인 제제를 받지 않는다(Embry *et al.*, 2010).
- 극지연구소에서는 극지생물 유래 유용물질의 실용화를 위한 연구과제들이 제안되어 수행되고 있으며, 대사체나 유전자원을 기반으로 신규 또는 우수 효능을 가진 후보물질들이 개발되고 있다. 유용물질 개발을 위해서는 초기 단계에서 후보물질의 독성 및 안전성 평가가 우선되어야 하는데, 현재까지는, 연구기반 부재로 인해, 세포수준에서

초기 검증이 이루어졌고 대부분 외부 연구기관에 의뢰해야 했기 때문에, 연구수행에 다소 제한요인 되고 있었다. 본 연구과제의 목표는 실용화 과제에서 도출되는 극지 유래 바이오신소재의 발굴과 효능평가, 신규 의약품 후보물질의 인체 내 작용기전 연구와 안전성 검증을 위해 제브라피쉬 연구기반을 구축·활용하여 극지생물 유래 유용물질 개발 가능성을 초기단계에서 평가하는 것으로 비임상 시험 독성평가와 효능평가 부분에서 윤리적 문제가 되는 기존 동물 실험을 대체 할 수 있어 연구 현장에서 실험동물의 윤리문제 부담을 덜 수 있고 척추동물로서 여러 기관을 갖고 있는 zebrafish의 특징을 살려 배아나 치어 상태에서 시험을 수행 할 경우 세포를 이용한 연구에 더하여 보다 더 다양한 기능적 평가를 검증 할 수 있다. 또한 복잡성·장시간·고비용의 한계와 더불어 동물윤리 강화에 따른 제한을 보완하기 위해 zebrafish 시스템을 평가에 활용함으로써 실패율을 줄이고, 개발비용도 절감 할 수 있다.

- 실험동물에 관한 정부정책에 준하여 실험동물의 운영이 합리적이고 체계적으로 운영 관리 됨으로서, 동물실험에 대한 윤리성을 보증하고 동물실험 결과의 정확성, 재현성을 확보함으로써 극지생물 유래 유용물질 실용화를 위한 개발 가능성을 제안하고 궁극적으로는 우리나라에서 수행되는 생명과학연구에 대한 국제 신뢰성을 향상한다.



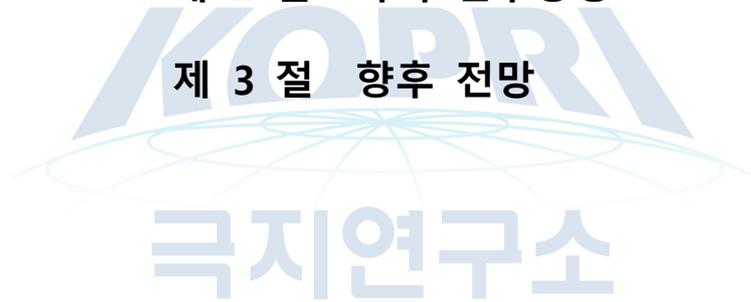
KOPRI
극지연구소

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 연구동향

제 2 절 국외 연구동향

제 3 절 향후 전망



제 1 장 서 론

제 1 절 국내 연구동향

- 질병관리본부는 2020년도 국가연구개발사업(R&D) 학술연구개발용역으로 zebrafish를 이용한 결핵치료 평가모델 개발 연구, zebrafish를 이용한 결핵 치료 평가모델 개발 연구개발을 공모하여 결핵 치료후보물질의 유용성 평가를 위한 zebrafish 모델 구축하고자 한다.
- 계명대학교 연구팀은 zebrafish에서 인간 KCNE1 유전자 발현에 관한 연구를 통해 transgenic zebrafish를 이용한 유전자 치료용 동물모델의 발판을 마련하였고, 동시에 유산균 등 미생물의 유용 유전자를 분리하여 해양생물에서 발현시키기 위한 가능성을 확인하였다(Park & Yoo, 2017).
- 영남대 단백질연구소 연구팀은 zebrafish를 활용하여, 시중에서 유통되는 가슴기 살균제 원료인 PHMG와 PGH가 심혈관 급성 독성(권혁범 외, 2006; 박현영 외, 2013), 피부세포 노화 촉진, 배아 염증 유발 등과 같은 심각한 독성을 지닌 것을 확인했다. 연구결과는 독성 분야에서 세계적 권위를 인정받는 SCI국제학술지인 '심혈관 독성학(Cardiovascular Toxicology)에 온라인으로 출판됐다(Kim *et al.*, 2013).
- 서울대학교 박재학 교수 연구팀은 생명산업기술개발 과제의 일환으로 제브라피쉬에서의 재조합 락토페린 대량생산체계 구축 및 사료화 방안 마련하여 사료 첨가제 중항생제 대체제로 유전자적으로 조작한 사람 락토페린을 열대 담수어인 제브라피쉬(zebrafish)에서 발현시키고, 이를 대량으로 사료화 하여 경제적인 가격으로 공급함을 목적으로 축산업의 발전에 이바지하고자 하였다.
- 한국생명공학연구원은 환경질환연구센터 정진영 박사팀과 질환표적구조연구센터 이정수 박사팀이 실험동물인 제브라피쉬를 이용해 초미세플라스틱의 체내 흡수와 복합독성 영향을 검증했다. 향후 초미세플라스틱의 안전성과 관리방안에 중요한 기초자료로 활용될 것으로 기대되는 연구는 나노분야의 과학전문 저널인 나노스케일(Nanoscale)에 지난해 12월 10일자 온라인 판에 게재됐다(Wang *et al.*, 2019).

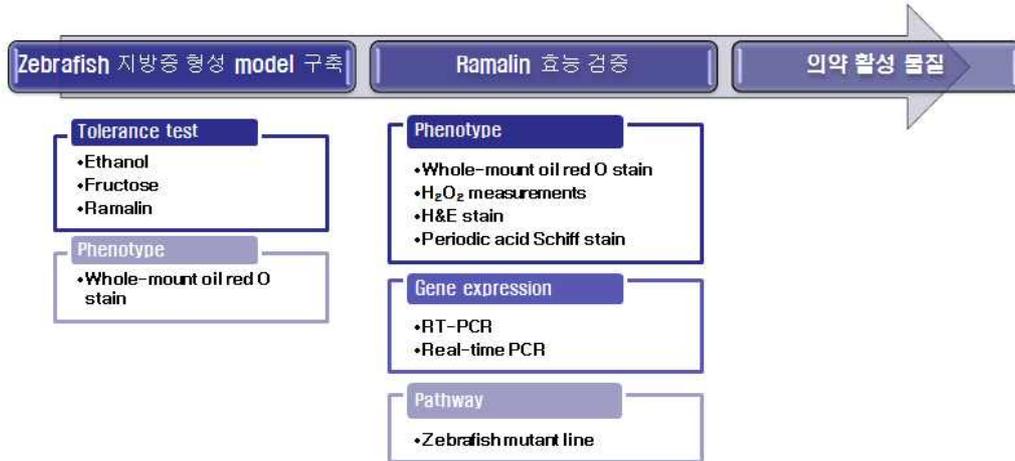
- 배명애 박사(화학연) 연구팀이 2009년부터 제브라피쉬를 이용한 실험 모델을 적용해 골다공증 치료제, 대사성치료제 등 신약 후보물질을 개발해 오고 있다. 사업단은 앞으로 의약품뿐 아니라 기능성 식품, 화장품, 친환경 농약 등 바이오 제품 개발 전반에 활용될 수 있도록 넓혀 나갈 예정이다. 국내 바이오 중소·중견 기업이 필요로 하는 제브라피쉬 기반 기술을 개발하고 전수하는 공공 기반 사업을 운영할 계획이다.
- 충남대학교 김철희 교수팀은 감마 아미노뷰티르산(GABA, γ -Aminobutyric acid) 연합 신경의 조절 기능에 이상이 생기면서 중추신경계가 지나친 신경흥분상태(뇌성마비)가 되고, 이에 따라 뇌전증 같은 운동장애 증상이 나타난다는 사실을 밝혀냈다. 또한 제브라피쉬를 이용한 새로운 유전자의 발굴 및 기능분석을 위해 신경계의 형성과 분화에 이상이 있는 headless와 mind bomb이라는 두 가지 돌연변이주에서 positional cloning에 의한 원인 유전자의 발굴과 기능 분석을 위해 제브라피쉬의 연구를 수행하고 있다(김현택 & 김철희, 2003; 김철희, 2010).
- 국립보건연구원(Korea National Institute of Health, NIH)에서는 심혈관질환 중개연구를 위해 제브라피쉬 모델을 개발하여 학제 간 연구를 주도하고 있다.



[출처: 국립보건연구원]

- 한국생명공학연구원 질환표적구조연구센터 이정수 박사, 충남대 김철희 교수, 미국 오거스타 대학 김형구 교수로 이뤄진 공동연구팀은 다운증후군 원인 유전자인 'DYRK1A'가 자폐증의 원인 유전자로도 작용한다는 것을 '제브라피쉬'(zebrafish) 동물모델 실험을 통해 검증했다. “이번 연구 성과는 ASD (Autism Spectrum Disorder, 자폐스펙트럼 장애) 환자에서 가장 빈번히 발견되는 고위험유전자 중 하나인 DYRK1A의 자폐증 관련성을 동물모델을 통해 세계 최초로 입증한 것”이라며 “개발된 자폐증 동물모델을 활용해 ASD 치료제 개발에 기여할 것”이라고 말했다. 이 외에도 제브라피쉬를 통한 뇌질환, 청각, 미세먼지, 독성, 미백화장품 개발 등 다양한 연구개발인프라가 국내에 구축돼 있으나 안타깝게도 우리나라 기업에서는 제브라피쉬를 활용해 신약개발이나 바이오제품 등을 개발하는 경우가 아직 초기단계이다.
- 세계적으로 실험동물을 보호하기 위한 동물윤리 지침이 강화되는 가운데 세포실험과 포유동물 실험 중간단계인 제브라피쉬의 필요성이 강조 될 것으로 예상된다. 국내 제브라피쉬연구자들은 한국분자세포생물학회 제브라피쉬 분과를 중심으로 학술대회를 매년 개최해 오고 있으며, 질환모델개발, 질환원인 규명, 신약개발 등의 분야에서 여러 대학병원, 약학대학, 공공기관연구소 등 50개 이상의 연구실에서 제브라피쉬를 활용한 연구를 수행하고 있다(조정식, 2000; 천병년, 2018; 환경부 2017).
- 국내 연구진들은 최근 각광받고 있는 첨단신기술인 TALEN (Transcription Activator-like Effector Nucleases)과 3세대 유전자 가위기술인 CRISPR/Cas9 기술을 이미 선점하여 기술적 우위에 있으며 제브라피쉬에 기술을 도입하여 이것을 바탕으로 유전체기반의 맞춤형 의료 및 신약개발 분야에 활용이 급격히 증가할 것으로 예상된다.
- 국립보건연구원에서는 NGS (Next Generation Sequencing) 중심의 대단위 유전체염기서열 분석기술과 정보처리기술, 유전자가위기술을 이용한 질환동물모델제작 및 제브라피쉬를 이용한 질병원인유전자의 생체 내 기능분석 등을 축적된 유전체자원과 임상중개연구 분야로 활용기회를 확대하고 질환연구의 패러다임 변화에 대처하고 있다.
- 국제환경 변화와 더불어 국내 연구자들도 다양한 분야에서 제브라피쉬를 활용한 질환모델개발을 통해 제브라피쉬 생명연구자원이 쏟아져 나오고 있고 나올 예정이지만 이들 생명연구자원을 체계적으로 관리유지하고 확보해야하는 기반구축은 미흡한 실정이다.
- 극지연구소 본 연구팀은 zebrafish를 활용하여 간 지방증 형성에 대한 Ramalin의 효능 평가하였다 : 알코올 섭취시 발생하는 알코올 대사산물(acetaldehyde) 및 산화스트레스(oxidative stress)가 주로 숙취와 간세포 손상의 주된 원인으로 여겨졌으나, 최근

연구결과에 의하면 간에 존재하는 약 30%의 비실질세포들(non-parenchymal cells)의 활성이 알코올성 간질환(alcoholic liver disease; ALD)의 중요한 요인으로 작용하며, 이들의 조절을 통해서 알코올성 간손상의 병증을 조절할 수 있을 것으로 예상된다.



- 알코올성 간 질환의 발생과 진행에 있어서 지방증(steatosis)과 염증(inflammation)이 핵심적인 역할을 하는데 본 연구진은 남극 지의류 중 *Ramalina terebrata*에서 추출한 Ramalin (y-glutamyl-N'-(2-hydroxyphenyl)hydrazide)을 이용하여 간의 지방증 형성 억제 효과를 평가 중이다.
- 국내자원을 대상으로 한 신약개발의 소재로서 생리활성 해양천연물에 대한 국내의 연구는 1990년대에 비로소 시작되었다. 출연연구기관인 한국해양연구원을 비롯하여 일부의 대학연구진을 중심으로 이루어진 연구는 우리나라 주변해역의 저서동물과 대형해조류를 주된 연구대상으로 하였으며 1990년대 말부터는 방선균, 진균 등 미생물과 단세포조류도 포함되게 되었다.
- 2004년에 시작된 정부 주도의 장기연구사업인 마린바이오 21사업에서는 국내연안 및 해양을 중심으로 해양생물과 미생물로부터 비만, 당뇨, 골다공증 등 대사성 질환을 주요대상으로 하여 천연물탐색, 유도체 합성 및 전합성, 동물실험이 망라된 종합적인 천연물신약연구가 진행 중이며 in vivo 수준에서의 우수한 활성물질도 보고되고 있다.
- 극지 생물자원을 이용한 천연물기반 연구는 극지연구소와 대학의 학연을 통하여 일부 진행되어 왔으며 특히, 남극의 지의류 등으로부터 생리활성을 갖는 신규천연물을 확보하였으며 일부는 산업화를 위한 연구가 진행되고 있다. 극지 미생물 및 그 추출물 그리고 기타 연구정보에 대한 국내 연구자들의 체계적인 접근은 전무한 실정이며

공동 연구자들이 근접할 수 있는 미생물 및 추출물을 구축하고 그 활용성을 극대화하기 위한 system을 구축 할 필요가 있다.

- 기능성 소재나 신약 개발에 있어서 성패는 질적, 양적으로 우수한 화합물 또는 추출물 라이브러리를 확보했는지의 여부에 달려 있으며, 극미 미생물 유래의 추출물이나 화합물구축은 미래 핵심 산업인 신약후보 물질을 제공 할 수 있는 매우 중요한 자원으로 인식되고 있다.
- 신약개발의 여러 단계 중 특정 질병에 대한 치료를 위한 분자표적이 정해진 후 분자표적에 작용하는 선도 화합물을 도출하기 위하여 다양한 종류의 화합물 library를 검색 하게 되는 단계(target selection 및 screening 단계)는 전체적인 신약개발 과정에서 매우 중요한 출발점이라 할 수 있다.

제 2 절 국외 연구동향

- 호주 퀸즈랜드 대학 연구팀은 'Nature Neuroscience'지에 뇌 주위 불순물을 제거하는 새로운 형의 임파구 세포를 발견했다고 밝혔다. 여러 세포와 기관들이 인체와 유사 인체대상 연구에 널리 사용되는 제브라피쉬라는 담수어를 대상으로 진행한 이번 연구결과 뇌가 림프관을 가지지 않는다는 이전 생각은 옳지 않은 것으로 나타났다. 연구결과 뇌가 림프관을 가지고 있어 혈관에서 누수된 불순물 제거를 돕는 것으로 나타났다. 연구팀은 "새로이 규명된 임파구 세포가 혈관과 독립적으로 존재해 과도한 지방과 기타 다른 불순물들이 혈관에서 주변 조직으로 누수 시 제거 조직 손상을 막는다"라고 밝혔다(Bower *et al.*, 2017).
- 캐나다 Cyrus 박사 연구팀은 제브라피쉬와 잠복 모델을 활용하여, 잠복중인 유방암 세포 DTC (Disseminated Tumour Cells)를 조절 연구와 관련하여 새로운 혈관이 유방암세포 증식 허용뿐만 아니라 촉진시키기도 한다는 점을 확인했다. TGF- β 1과 periostin은 내피 끝 세포에서 나온 종양-촉진 인자로 선별되었고 안정적인 미세 혈관은 잠복중인 niche를 구성하는 반면 형성되는 새로운 혈관은 미세전이 증식을 촉진시킨다는 것을 밝혔다(Chen, *et al.*, 2011; Cyrus *et al.*, 2013).
- 몬트리올대 병원 연구팀은 당초 3천850여 약물의 성분을 분석하는 과정에서 신경근 접합부(neuromuscular junction) 기능을 유지하는데 피모자이드가 일정 부분 역할을

수행한다는 사실을 발견했다. 이 후 인간 노화 연구에 이용되는 꼬마선충(*C. elegans*), 유전자 연구에 동물모델로 사용되는 제브라피시 등을 이용한 실험에서 피모자이드가 신경 근육 기능 유지에 효과가 있음을 확인하였다.

- 호주 Masselink 박사팀은 zebrafish 모델에서 transgene을 통한 muscle stem cell, progenitor cell marking으로 muscle regeneration 동안의 세포의 움직임과 반응을 in vivo상황에서 확인하였다. Zebrafish의 골격근 재생에서 cmet-positive한 muscle stem cell의 asymmetric division을 통한 근 재생을 in vivo상에서 확인하였고, zebrafish와 mammalian에서 stem cell niche의 유사성을 보임으로써 기존의 in vitro 상의 결과를 입증하였다(Masselink *et al.*, 2016).
- 글로벌 제약회사인 노바티스(Novartis)와 에보텍(Evotec), 임상시험 수탁 기관인 파이로닉스(Phylonix) 등에서는 신약후보물질에 대한 유효성, 독성과 안전성 평가 등에 제브라피쉬를 대규모로 활용하고 있다. 초기 단계 개발 실패율을 줄이고 개발 비용도 100억 원 이상 줄였다.
- 영국 런던대학 안과학 연구소의 아스트리드 림브박사의 연구팀이 제브라피쉬와 포유류의 눈의 망막에서 뉴런을 발생시키는 성체 줄기세포를 실험실에서 성공적으로 성장시켰다. 이들 세포들을 황반 변성, 녹내장, 당뇨병 실명과 같은 질병이 발생한 눈에 주사하면 시력이 회복될 수 있다고 기대된다.
- 제브라피쉬를 질환연구에 이용하는 연구체계는 미국의 경우, 미국 국립보건연구원의 지원(Trans-NIH Zebrafish Initiative) 아래 제브라피쉬 조정위원회를 통한 연구비 지원 및 조직적인 네트워크운동을 통하여 이미 13개 연구소, 19,000 탱크, 100,000종 이상의 제브라피쉬를 보유·운영하고 있다.
- Trans-NIH Zebrafish Initiatives : 1997년 미국 NIH에서 설립, 척추동물 발생 및 질병연구에서의 제브라피쉬 모델 동물이용을 활성화 하기 위해 추진되었으며, 제브라피쉬 유전체, 유전 자원연구에 대한 연구비 지원 및 정보자원의 제공을 위한 중추적인 역할 수행하였다. 미국 NIH 내부 제브라피쉬 코어랩을 운영하며 제브라피쉬 연구를 위한 연구자 교육 및 생명연구자원 유지, 관리업무를 수행하고 있다.
- 유럽의 경우, 유럽 7개국 통합 제브라피쉬연구 프로젝트 "ZF-Models Project" 을 통해 인체 발생 및 질환 관련 제브라피쉬모델 개발 및 정보기술을 공유하고 있다 : European Zebrafish Resource Center (EZRC) : 유럽제브라피쉬 자원센터

- Zebrafish International Resource Center (ZIRC) : 미국 오레곤 대학에서 운영하고 있는 미국 제브라피쉬자원센터. 제브라피쉬 라인, EST/cDNA, 항체 등을 확보 유지하고 연구자들에게 제공하고 있으며, 제브라피쉬 관련 유전자정보 및 생명자원을 유지, 관리, 제공하기 위한 The Zebrafish Model Organism Database (ZFIN)을 운영하고 있다.

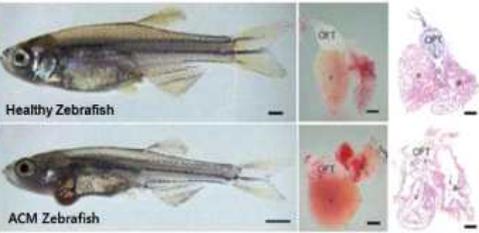
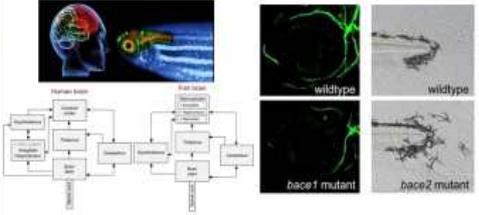
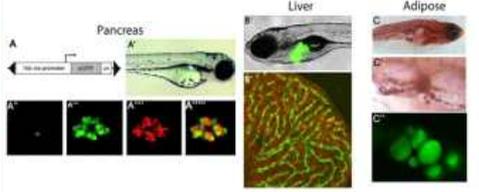


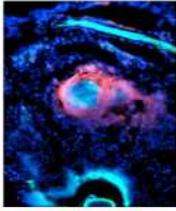
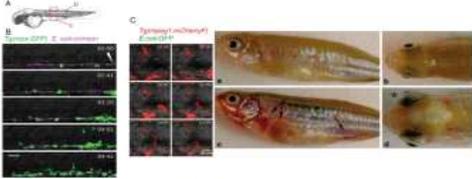
- ZF-MODELS consortium : 독일 막스프랑크연구소 주관으로 유럽 7개국 17개 기관으로 구성되어 있다. 다국적으로 구성으로 14,586 유전자 변이 제브라피쉬모델 제작에 돌입, 200여개 이상의 비정상적인 표현형 관찰을 통해 질환모델개발을 진행 중에 있다.
- Zebrafish Mutation Project (ZMP) : ZIRC와 EZRC를 통한 다양한 제브라피쉬 돌연변이체 제공 및 유전체 정보자원의 확보에 주력하고 ENU mutagenesis, NGS 및 CRISPR/Cas9을 이용하여 모든 coding gene의 mutant 제작을 목표로 하고 있다.
- National BioResource Project Zebrafish : 일본 제브라피쉬자원센터로 RIKEN에서 운영하는 메인 코어랩으로, 국가 차원에서 제브라피쉬 strains 등의 생명연구자원 확보를 live stock 및 sperm banking 시스템을 구축 운영하고 있다. 제브라피쉬 연구에서 구축된 라인을 유지, 관리하고 연구자를 위해 생명연구자원 제공 및 연구지원(교육) 등의 업무를 수행하고 있다. 또한 일본, 싱가포르, 한국, 호주를 포함하는 "Asia-Oceania Zebrafish Committee" 구성을 통해 세계 각국에서 투자 및 연구가 진행 중에 있다.
- 이외에도 다국적 제약회사, 하버드 메디칼 스쿨, 메이요 클리닉 등 의료기관과 대학에서 질환관련 인간 유전자 변이 기능연구, 신약개발연구, 질병모델 및 임상실습 분석을 위한 목적으로 대규모의 제브라피쉬 실험실을 운영하고 있다(Kaur *et al.* 2010; Motley *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2007).

제 3 절 향후 전망

- 기존의 실험쥐 등 포유류 동물을 이용한 전임상 시험은 비용과 시간이 많이 들며, 도덕적 논란도 끊이지 않고 있다. 실험 자체가 복잡한 경우도 많고 세계적으로 동물윤리 지침이 강화되면서 세포 실험과 포유동물 실험의 중간 단계에 적용할 수 있는 동물대체시험법에 대한 필요성이 늘어나고 있다. 제브라피쉬를 실험동물로 활용한 연구는 세포실험과 포유동물 실험의 중간 단계에 적용될 수 있어 동물 실험을 최소화할 수 있을 것으로 기대된다.
- 제브라피쉬 돌연변이체는 인체 질환과 매우 유사함이 밝혀졌고 심혈관계, 암, 근육계, 골형성, 신경계, 감각계 및 생식계 등 인간에게 유발하는 거의 대부분의 질병 분야 연구가 가능한 모델이다. 제브라피쉬는 small molecule screening을 통하여 다양한 질환 치료 물질 발굴, 대단위 약물 검증, 전임상 실험 등 질환치료 및 신약개발에 탁월한 이점을 가진 실험동물임이 이미 많은 연구들에서 입증되고 있다(임현정 & 문현이, 2014).

<Zebrafish를 이용한 질환연구모델>

<p>부정맥 심근병증모델 심장비대, wall thinning, chamber dilatation 양상, 질환기전연구 및 질환 증상 억제 약물 발굴에 활용. Identification of a new modulator of the intercalated disc in zebrafish model of Arrhythmogenic cardiomyopathy (Science Translational Medicine 2014; Vol. 6(240), pp. 240ra74)</p>	 <p>Healthy Zebrafish</p> <p>ACM Zebrafish</p>
<p>퇴행성 뇌질환모델로서 제브라피쉬 (Alzheimer's disease (AD), Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), and Frontotemporal Lobar Dementia (FTLD) 등)</p>	 <p>wildtype</p> <p>hace1 mutant</p> <p>hace2 mutant</p>
<p>대사질환연구에 적합: 제브라피쉬는 시상하부의 appetite circuits 에서 체장과 인슐린에 민감한 조직(간, 근육, 지방)에 이르기까지 인간의 신진대사제어에 필요한 주요기관 존재.</p>	 <p>Pancreas</p> <p>Liver</p> <p>Adipose</p>

<p>흡연관련물질의 스크리닝에 적합: 전임상 시험 (preclinical trial) 단계에서 시간·경제적 측면으로 탁월한 장점을 가진 제브라피쉬를 이용하여, CSCs(Cigarette smoke condensates)의 대규모 스크리닝을 수행함. Cardiac toxicity 및 기형발생과의 연관성과 신경활성 및 행동학적 차이의 분석을 통해 흡연연구에 적합한 모델을 제작.</p>	 <p>(CSCs 노출정도에 따른 zebrafish larva의 발생학적 변화) - Ref. Ellis LD, Soo EC, Achenbach JC, Morash MG, Soanes KH (2014) Use of the Zebrafish Larvae as a Model to Study Cigarette Smoke Condensate Toxicity. PLoS ONE 9(12): e115305.</p>
<p>결핵(Tuberculosis, TB)연구 : 제브라피쉬 폐렴모델에서 혈관형성 차단이 결핵의 새로운 치료법임을 규명. 제브라피쉬에 감염되는 결핵균 미코박테리움 마리눔(Mycobacterium marinum)은 인간의 결핵 원인균인 Mycobacterium tuberculosis와 유사. 사람 결핵 환자에서 발견된 것과 구조적으로 유사한 육아종 생성(청색=세균감염, 적색=면역세포)</p>	
<p>Immune system 연구 : 제브라피쉬의 면역계는 사람과 매우 유사하고, 결핵 이외에도 bacteria, virus 및 기생충에 의해 발병하는 인간의 감염질환을 연구하는데 있어 많은 장점을 보유하고 있기 때문에 매우 유용한 모델로 활용될 수 있음. (Host-pathogen interaction에 따른 유전자 분석 및 발생배가 투명하기 때문에 형광으로 표지된 pathogen을 쉽게 관찰할 수 있어 감염경로의 추적 가능)</p>	 <p>E.coli 감염에 따른 만성염증모델 및 virus infection에 따른 vaccination 연구</p>

[출처 : 제브라피쉬질환모델 개발 및 운영을 위한 기반 구축]

- 인간의 질병을 극복하기 위한 기초·응용연구와 임상연구 분야에서 다양한 모델동물이 시도되고 있으며, 인간의 질병과 유사한 최적의 모델동물을 선정·활용하는 것은 연구를 진행함에 있어 매우 중요한 부분이다. 단일 모델동물에 의한 인간질환모델의 완벽한 재현은 어렵고 제브라피쉬 질환모델의 경우도 모델동물로서의 제한점을 가지는 것은 사실이지만 제브라피쉬가 인간질환을 모델링하는데 있어 편리하고 강력한 플랫폼을 제공함으로써 유전자·유전체 기능연구, 질병의 새로운 표적 발굴, 초고속 스크리닝, 심뇌혈관 이미징 연구 등에 매우 이상적인 모델동물임은 분명하다. 또한 인간과의 높은 상동성, 유전학적, 병리학적 측면에서의 유사성, 질환모델 분석기술의 발달, 유전자조작기술의 발전으로 인해 제브라피쉬의 질환모델개발과 활용도는 점점 증가될 것으로 예상된다. 이들 제브라피쉬를 활용한 질환모델의 개발은 심뇌혈관질환 뿐만 아니라 다양한 질환의 병태를 이해하고 질환치료기술 개발연구에 기여할 것으로 기대된다(임현정 & 문현이, 2014).

- Post-genome 시대의 바이오산업의 핵심은 “Genome to Drug” 전략을 통한 신약개발 및 “Personal Genome”을 바탕으로 한 맞춤형의료이며, 여기에는 특히 기능유전체학을 이용한 신약개발 및 질병치료의 새로운 타겟유전자를 발굴하는 것이 매우 중요하다. 제브라피쉬라는 작은 척추동물을 이용한 2,700 인간유전자에 대한 기능정보의 확보는 직접적으로는 위암/간암 연구를 위한 새로운 타겟유전자 발굴과 함께, 새로운 신약후보물질의 대량 스크리닝 기술개발, 그리고 다양한 질환모델동물로서의 활용 등, 향후 의약바이오산업화에서 중요한 생명연구자원으로 자리매김할 것이다(한국화학연구원 안전성평가연구소, 2016).

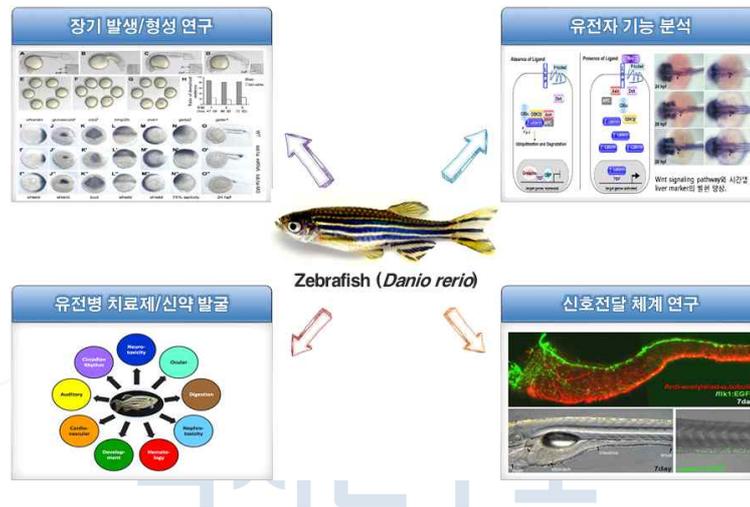


Fig. 2-1. Utilization of zebrafish as experimental animal

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 신약 및 바이오소재의 안정성 및 독성평가

제 2 절 질환모델동물을 이용한 후보물질 효능 검증

제 3 절 극지 미생물로부터 생리 활성물질 확보 및 탐색



제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 신약 및 바이오소재의 안전성 및 독성평가

1. 연구개요

전 세계적으로 유통되고 있는 화학물질의 수는 12만종에 이르며 매년 2천여 종의 새로운 화학물질이 개발되어 상품화되고 있다. 현대 기술 문명의 혜택을 누리는 공간에 있다면 누구나 화학물질에 노출되어 있는 것이다. 그러나 사람이나 환경에 대한 화학물질의 영향에 대한 면밀한 조사가 이루어지지 않고 있다. 화학물질이 어떤 독성이 있는지에 대한 정보 생산과 그에 따른 규제 조치가 화학물질 산업을 따라가지 못하고 있다. 생산, 사용, 유통되고 있는 화학물질의 수나 양에 비해 우리가 알고 있는 독성 정보는 매우 제한적이다.

현재 신약개발과정에서는 신약개발의 각 단계를 효율적으로 지원할 수 있는 다양한 *in vitro* 및 *in vivo* 시험계가 개발되어 활용되고 있다. 특히 선도물질의 최적화 단계에서 약물대사연구는 더욱 큰 의미를 지닌다. 특히, 약물 대사체의 동정 및 대사경로의 규명은 신약개발과정에서 필수적으로 요구되며 신약개발 규제/허가기관에서도 물질의 안전성 및 유효성 검증을 위하여 필수적으로 요구하고 있다(U.S. FDA, 2008). 신약개발 초기단계에서의 대사체 연구가 약물동태(pharmacokinetics, PK) 특성을 개선하기 위한 부분에 목적을 두어 정성적 분석에 초점을 맞추었다면 후기단계에서는 독성적 측면에서의 대사 연구를 수행하기 위해 정성뿐 아니라 정량적 분석이 강조되고 있다(Maria *et al.*, 2018).

1990년 이후 독성문제로 시판 중에 시장에서 철수한 33종의 의약품을 원인 별로 분석해본 결과 13종(약40%)은 간독성, 10건(약30%)은 QT interval 증가에 따른 심장독성(부정맥) 그리고 약물대사를 통한 약물상호작용 8건(약24%)으로 조사되었다(Shah, 2004). 심장독성을 제외하고 간독성과 약물 상호작용은 약물대사와 매우 밀접한 관련을 지닌다. 약물유래 간독성(DILI; drug-induced liver injury)은 모약물 보다는 친전자성의 독성 대사체에 기인한다. 1990년대 이후 benoxaprofen, iproniazid, nefazodone, tienilic acid, troglitazone, bromfenac (unclear) 등의 약물은 대사체에 의한 독성으로 시장에서 철수하였으며, black box 경고가 부가된 15개의 약물 중 8개(dacarbazine, dantrolene, felbamate,

flutamide, isoniazid, ketoconazole, tolcapone, valproic acid) 역시 독성 대사체에 기인하는 것으로 알려졌다. 심장독성의 경우 심장의 action potential을 조절하는 ion channel, 특히 hERG와 같은 중요한 표적 단백질이 규명되어 신약개발의 초기단계에서 심장독성에 대한 평가가 진행되고 있으나 약물유래 간독성은 표적 단백질이 발굴되지 않고 있어 신약개발의 초기단계에서 간독성을 평가할 수 있는 연구방법은 매우 제한적이다. 결과적으로 약물유래 간독성은 현재까지도 신약개발의 가장 큰 허들 중 하나이다.

물질의 독성평가를 위해 다양한 동물 모델이 개발, 제안되고 있다. 세포와 같은 하위단계의 모델을 사용한 생체 외(*in vitro*) 독성평가는 고효율 독성평가가 가능하고, 독성 메커니즘 규명이 가능하지만 사람과의 연관성이 낮다는 단점이 있고, 마우스와 같은 고등동물을 이용한 생체 내(*in vivo*) 독성평가는 사람과의 연관성에서는 장점이 있지만 고효율 독성평가 수행이 어렵고 독성 메커니즘을 파악하는데 어려움이 있다. 특히, 3R (replacement, reduction, refinement)으로 대변되는 실험동물 사용을 제한하는 동물 복지 문제에서 자유롭지 못하다.

최근에는 독성발현경로(AOP, Adverse Outcome pathway) 개념이 주목 받고 있다. 분자와 같은 낮은 단계에서의 독성 결과가 세포, 조직기관을 넘어 개체와 집단 수준에서 어떤 경로로 연결되는지를 찾는 것이다. 제브라피쉬는 분자 수준에서 나타나는 독성 메커니즘 규명이 용이하므로 처음부터 생체 외 결과가 아닌 생체 내 결과를 가지고 독성 발현경로를 연구할 수 있다. 물고기를 이용한 독성평가도 동물실험윤리위원회(IACUC, Institutional Animal Care and Use Committee)에서 그 적정성, 필요성, 타당성에 따라 허가를 받아야 하는데 배아 발달 단계에서의 독성평가는 법적인 제제를 받지 않는다 (Embry *et al.*, 2010).

비포유류이자 척추동물인 제브라피쉬는 인간과 유전적, 해부학 및 질병학적으로 상당히 비슷하여 최근 생명공학연구의 핵심시험모델로 유전공학 및 발생학 등의 연구 분야에 공헌하고 있다. 실험동물로 널리 사용되어 왔던 마우스, 랫드에 비해 유전자 조작이 나 유지가 용이하며 더욱 경제적이고 실험동물 윤리 문제에 비교적 자유롭기 때문에 모델동물로서 그 가치가 증가하고 있다. 본 연구에서는 기형학적(teratogenic) 기준을 바탕으로 제브라피쉬 배아의 초기 발생 과정 동안의 형태적 변화를 관찰(Kimmel *et al.*, 1995)하므로 물질의 독성을 평가하였다. 제브라피쉬는 포유류와 간기능의 유사성이 높아 약물에 의한 간독성 평가에 적합하며, 간에서 특이적으로 형광단백질을 발현하는 형질전환개체를 이용하여 지방간(steatosis), 간세포사멸(cell death), 간의 크기 및 형태적 변화

를 평가하여 약물에 의한 간독성을 평가할 수 있다. *in vitro* 세포를 이용한 독성 및 약효능 평가 수행은 생체 내 기능을 완벽하게 모사하지 못하는 한계가 있으므로 *in vivo* 동물 모델 중 위의 장점을 가지는 제브라피쉬를 활용하여 다 수의 남·북극 유래 시료에 대하여 빠르고 다양하게 안전성 및 독성평가를 진행하였다.

2. 재료 및 방법

가. Zebrafish 기반 스크리닝 연구기반 구축

(1) 대량 사육시설 운영 및 분석시스템 구축

실험동물 사육시스템은 Stainless steel pipe 선반, 생물여과기, 가열기, 자외선 살균장치, 순환배관, 전기제어장치 등으로 구성하고, 스마트 관리 기능이 있어, 수조장치의 상태와 관리기록을 사용자가 상시 확인할 수 있도록 하였다. 수조(case)는 3 L, 10 L 용량으로 목적에 맞게 다양하게 설치하였으며, case 바닥에 배설물, 사료 찌꺼기들이 잔류하지 않아 수질 오염을 줄여 주고, 자외선 차단과 이끼 발생을 최소화할 수 있도록 FDA 무독성 인증 제품의 재질로 제작하였다.

(2) 제브라피쉬 및 발생배의 유지관리

(가) 성체 제브라피쉬는 암컷과 수컷을 나누어 물의 순환과 정수 처리가 갖추어진 시스템 또는 케이지에서 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 적정 온도를 유지하여 사육하였다. 사육 시스템은 주기적으로 수온과 pH를 확인하며 일주일에 한 번씩 카본필터와 카트리지 필터를 교체하여 수질을 관리하였다. 시스템이 아닌 별도의 케이지에서 실험을 위해 유지하는 경우 물의 염소 등을 제거하기 위해 24 시간 이상 통에 담아 보관한 후 pH 7.5 정도로 유지한 후 사용하였다.

(나) 제브라피쉬의 식이계획은 성체의 경우 부화새우(*artemia*)를 10분 동안 충분히 먹을 수 있는 양으로 하루 2회 실시하고, 교배 전 성체의 경우는 하루 3회, 치어는 부화새우와 tetramin baby를 하루 2회 이상 주었다. 성체의 교배 전 산란을 위해서는 적절한 낮과 밤의 분리가 필요하므로 14시간의 빛과 10시간의 암환경을 제공하도록 제작한 mating 전용 선반에서 주광주기를 맞춰주었다. 산란을 위해 사육실이 소등되기 전 2시간 이내에 mating cage에 1마리의 암컷과 1마리의 수컷의 비율로 옮겨주고 다음날 아침에 빛을 쬐줌으로써 자연 산란을 유발시켰다(Fig. 3-1). 성체와 배아를 구분한 후 수집된 배아는 $0.5 \times \text{E2}$ embryo

media로 채운 petri dish에 보관하였다. 배아는 28℃ 배양기에서 키우며 성체는 교배일과 상태를 표시 후 사육시설로 옮겨주었다.



Fig. 3-1. Equipments for zebrafish mating and egg harvest

나. Zebrafish 기반 도출물질의 유효성 및 안전성 평가

(1) 발생독성 시험(Teratotoxicity Assay)

(가) 평가 물질

- ① 실험에 사용된 물질은 2017년 남극에서 채집된 시료 추출물 5개와 호냉성 균주인 *Pseudoalteromonas antarctica* PAMC 21717 유래 저온 활성 단백질 분해 효소인 P66이다(Table 3-1).

Table 3-1. Sample list for teratotoxicity assay

No.	Sample name	Sample type (Extract solvent)	Solvent
1	17-Ant-42	Extract (MeOH)	DMSO
2	17-Ant-55-1	Extract (EA)	DMSO
3	17-Ant-55-3	Extract (EA)	DMSO
4	17-Ant-55-6	Extract (EA)	DMSO
5	17-Ant-69-1	Extract (EA)	DMSO
6	P66	Enzyme	

- ② 시료 17-Ant-42는 남극 지의류 추출물로 건조된 지의류를 파우더 형태로 분쇄하여 methanol을 사용하여 추출한 것이다. 시료 17-Ant-55-1, 17-Ant-55-3, 17-Ant-55-6, 17-Ant-69-1은 남극 지의류 유래 곰팡이 추출물로 지의류를 멸균수로 세척 후 갈아서 PDB (Potato Dextrose Broth) 고체 배지에 도말, 15℃에

서 7일 동안 저온 배양한 후 단일 곰팡이를 분리하여, 멸균한 PDB 액체배지에 곰팡이를 접종하여 배양한 후 얻은 추출물이다.

(나) 사육 조건 및 급성독성평가

- ① 제브라피쉬 성체는 28°C, 광주기 14시간/10시간(명/암)으로 일정하게 유지하여 사육하였다. 산란 유도를 위해 실험 전날 수컷과 암컷의 비율을 1:1로 하여 mating cage에 옮겨 유지시킨 후, 다음날 아침 mating cage의 칸막이를 열어 배아를 얻었다. 수집된 배아는 0.5 x E2 embryo media로 세척한 후 현미경을 사용하여 수정란과 미수정란을 관찰 분리하였다.
- ② 수정 후 약 3 ~ 4 hpf (hours post-fertilization)일 때 물질에 노출시켰다. 각 농도에서 실험은 10마리씩 3반복으로 총 30개체를 사용하였다. 실험 시작 후 96시간까지 치사 및 형태학적 이상을 보이는 개체를 24시간마다 1회 현미경으로 관찰하였다. 대조군과 비교하여 배아 및 치어의 성장과 형태에 이상이 있는 것을 기형으로 판단하였으며, 수정란이 와해되거나 심장이 튀지 않는 것을 치사로 간주하였다. 계수한 후에 이상을 보이는 개체들을 기록하여 백분율 단위로 표시하였다. 한 배아에 대하여 복수의 이상 현상이 발생하는 경우도 있으므로 백분율 총 합이 100% 이상이 될 수도 있다. 제브라피쉬 배아 독성 평가는 Organization for Economic Co-Operation development (OECD) 가이드 라인 210에 따라 수행하였다(Thomas & Eva, 2006; OECD, 2013).

[Maintenance, breeding and typical conditions for embryo toxicity tests with the common OECD test fish species]

	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	Fathead minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	Japanese medaka (<i>Oryzias latipes</i>)
Origin of species	India, Burma, Malakka, Sumatra	Temperate zones of central North America	Japan, China, South Korea
Sexual dimorphism	Females: protruding belly, when carrying eggs Males: more slender, orange tint between blue longitudinal stripes (particularly evident at the anal fin)	Females: more plump, when carrying eggs, ovipositor Non-spawning males: black spot on dorsal fin Spawning males: black coloration of head, dorsal nuptial pad and nuptial tubercles in spawning season, vertical black bands along body sides	Females: generally more plump, carrying sticky eggs at anal fin Males: anal fin larger, papillary processes on posterior dorsal fin rays
Feeding regime	Dry flake food (max. 3 % fish weight per day) 3 - 5 times daily; from three days before spawning, plus frozen adult brine shrimp (<i>Artemia</i> spec.) or <i>Daphnia</i> twice daily (<i>ad libitum</i>). To guarantee for optimal water quality, excess feces should be removed approx. one hour after feeding.		
Approximate weight of adult fish	Females: 0.65 ± 0.13 g Males: 0.5 ± 0.1 g	Females: 1.5 ± 0.3 g Males: 2.5 ± 0.5 g	Females: 0.35 ± 0.07 g Males: 0.35 ± 0.07 g
Maintenance of parental fish	Illumination	Fluorescent bulbs (wide spectrum); 10-20 µE/M ² /s, 540-1080 lux, or 50-100 ft-c (ambient laboratory levels); 12 - 16 hours photoperiod	
	Water temperature	16.5 ± 1.5 °C	
	Water quality	O ₂ ≥ 80 % saturation, hardness: e.g., 3 - 20°dH (= 30 - 215 mg/L CaCO ₃), NO ₂ ≤ 48ng/L, NH ₃ and NO ₃ < 0.001mg/L, total organic carbon < 2 mg/L, residual chlorine < 10 µg/L, total organochlorine pesticides plus polychlorinated biphenyls < 50 ng/L, total organophosphorus pesticides < 50 ng/L, total organic chlorine < 25 ng/L, pH = 7.8 ± 0.2	
	Further water quality criteria	Particulate matter < 20 mg/L, total organic carbon < 2 mg/L, unionized ammonia < 1 µg/L, residual chlorine < 10 µg/L, total organophosphorus pesticides < 50 ng/L, total organochlorine pesticides plus polychlorinated biphenyls < 50 ng/L, total organic chlorine < 25 ng/L.	
	Tank size for maintenance	180 L (max. 180 individuals)	180 L (max. 80 individuals)
Water purification	Permanent (charcoal filtered); possible are combinations with semi-static maintenance or flow-through system with continuous water renewal		

* Data given explicitly are those relevant for the maintenance facilities of the authors of this document.

[Fish testing requirements of various OECD jurisdictions]

	OECD TG 203 (1992)	OECD TG 204 (1984)	OECD TG 210 (1992)	OECD TG 212 (1998)	OECD TG 215 (2000)	OECD TG 229 (2009)	OECD TG 230 (2009)****	OECD TG 234 (2011)	OECD TG 305 (1996)
Title	Fish acute toxicity test	Fish prolonged toxicity test: 14-day study	Fish early life-stage toxicity test	Fish short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages	Fish juvenile growth test	Fish short-term reproduction assay	21-Day fish screening assay	Fish sexual development test	Bioconcentration: Flow-through fish test
Legislation									
EU Regulation (EC) No 1107/2009 on plant protection products *	Always for rainbow trout and warm water species. Revisions may allow for rainbow trout only. Formulation rainbow trout only	If not acutely toxic (> 0.1 mg/L acute LC ₅₀); if Early Life Stage (ELS) Full Life Cycle tests (FLC) are not appropriate – however, OECD TG 204 data have restricted relevance regards chronic toxicity (ELS/FLC tests preferable), only with combined with sublethal endpoints of	If BCF > 100 and/or LC ₅₀ < 0.1 mg/L and/or DT90(w/s) > 100. Generally not on formulation. [continued exposure]		If not acutely toxic (>0.1 mg/L acute LC ₅₀); generally not on formulation; [continued exposure]; if ELS/FLC are not appropriate – however, OECD 215 data have restricted relevance regards chronic toxicity (ELS/FLC	<i>Ad hoc</i> basis, if concern for endocrine disruption	<i>Ad hoc</i> basis, if concern for endocrine disruption	Probably on an <i>ad hoc</i> basis, if concern for endocrine disruption	If log Kow > 3, and DT ₅₀ from water-sediment study >10d etc.

(2) 간독성 시험(Hepatotoxicity Assay)

(가) 평가 물질

실험에 사용된 물질은 남극 지의류인 라말리나 테레브라타(Antarctic lichen *Ramalina terebrata*)에서 추출한 라말린(γ -glutamyl-N'-(2-hydroxyphenyl)hydrazide)으로 강력한 항산화, 항균효과를 가지고 있는 활성 물질로 알려져 있다(Fig. 3-2).

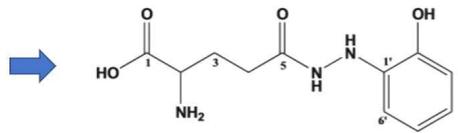


Fig. 3-2. Ramalin isolated from *Ramalina terebrata*

(나) Ramalin 독성평가 / 평가 농도 결정

Ramalin의 배아와 유생에 대한 독성 평가를 실시하였다. 배아에 대한 독성 평가는 수정 후 약 3 ~ 4 hpf 일 때 라말린을 처리하여 168시간까지 치사 및 형태학적 이상을 보이는 개체를 24시간마다 1회 현미경으로 관찰하였다. 실험은 10마리씩 3반복으로 총 30개체를 사용하였다. 실험 시작 후 대조군과 비교하여

배아 및 치어의 성장과 형태에 이상이 있는 것을 기형으로 판단하였으며, 수정란이 와해되거나 심장이 뛰지 않는 것을 치사로 간주하였다.

(다) Zebrafish larvae의 Ethanol에 의한 Hepatic Steatosis phenotype 구축

유생의 알코올성 Hepatic Steatosis을 라말린이 억제하는지 확인하기 위해 Ethanol에 의한 Hepatic Steatosis phenotype을 구축하였다. Ethanol에 대한 유생의 노출 수준을 정하기 위해 Ethanol 농도 1 ~ 3% 범위에서 생존율 변화를 측정하였다. 초기 제브라피쉬 배아는 Ethanol에 노출되면 형태적 이상이 유발된다고 알려져 있다(Bilotta *et al.*, Li *et al.*, 2007; 2004; Reimers *et al.*, 2004; Tanguay *et al.*, 2008). 초기 발달에 대한 이러한 영향을 피하기 위해, 수정 후 4 dpf 일 때 Ethanol을 처리하여 32시간까지 치사 개체를 확인하였다. Ethanol 노출에 의한 유생 간 지방증 형성 유도 확인은 Whole-mount oil red O staining으로 하였다.

(라) Ramalin : Zebrafish larvae의 Hepatic Steatosis 영향 평가

- ① Ethanol에 의한 Zebrafish larvae 간의 지방증 형성을 라말린이 억제하는지 확인하였다. 유생에서 라말린 처리시 치사 개체가 확인되지 않았던 농도는 30 μ g/ml이었으므로, 라말린 처리 농도는 5 ~ 15 μ g으로 진행하였다. 수정 후 4 dpf 일 때 Ethanol과 라말린을 동시 처리하여 32시간 후 Whole-mount oil red O staining으로 지방증 형성을 확인하였다.
- ② 유생 10마리씩 3반복으로 Trizol reagent를 사용하여 total RNA를 추출하였다. cDNA합성은 M-MLV Reverse Transcriptase (RT001S, Sigma-Aldrich)를 사용하여 진행하였으며, real-time PCR은 TOP real TM qPCR 2X Pre MIX (RT500, Enzynomics)를 사용하였다. 실험에 사용한 유전자의 primer sequence 정보는 아래 표(Table 3-2)와 같다.
- ③ 간세포(Hepatocytes)는 간의 주요 세포이며, 이종대사(xenobiotic metabolism), 암모니아 해독(ammonia detoxification), 지질대사(lipid metabolism), 글리코겐 저장(glycogen storage), 인슐린 반응성(insulin responsiveness), 혈청 단백질 분비, 세포외 기질 합성(extracellular matrix synthesis), 담즙의 합성 및 분비에 관여한다. 지방간 환자의 경우 이러한 기능들이 중단된 것이 확인되었다 (Baraona *et al.*, 1982; Krahenbuhl *et al.*, 2003; Marsano *et al.*, 2003; Van *et al.*,

2001). 비슷한 결과가 제브라피쉬 모델에서도 확인되어 졌으며, 본 연구에서도 이와 관련된 유전자들의 발현 양상을 확인하였다.

Table 3-2. Primers used to quantify mRNA levels

Category	Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
Alcohol metabolism	cyp2y3	TATCCCATGCTGCACTCTG	AGGAGCGTTTACCTGCAGAA
	cyp3a65	AAACCCTGATGAGCATGGAC	CAAGTCTTTGGGGATGAGGA
Lipid metabolism	hmgcra	CTGAGGCTCTGGTGGACGTG	GATAGCAGCTACGATGTTGGCG
	hmgcrb	CCTGTTAGCCGTCAGTGGA	TCITTTGACCACTCGTGCCG
	hmgcs	CTCACTCGTGTGGACGAGAA	GATACGGGGCATCTTCTTGA
	fasn	GAGAAAGCTTGCCAAACAGG	GAGGGTCTTGACAGGAGACAG
	fads2	TCATCGTCGCTGTTATTCTGG	TGAAGATGTTGGGTTTAGCGTG
Endoplasmic reticulum stress and DNA damage	chop	AGGAAAGTGCAGGAGCTGAC	CTCCACAAGAAGAATTTCTCC
	edem1	GACAGCAGAAACCTCAAGC	CATGGCCCTCATCTTGACTT
Acute phase	saa	CGTGCCTACCAGCATATGAA	CAGCATCTGAATTGCCTCTG
	Saal1	GAGAGGATACGGCAGCAGTC	TCCAGCAGAGAGGACAGGAT
	a1at	CATGTTGGGTCACAGTCAGG	CGATTTCAAGCTTGGAGAA
	fth1a	CCGTCCATCTTTGTGTTCTT	CAAACCTGTGAACGAGCTGGA
Hepatic function	hpx	TAGATGCTGCCTTTGTGTGC	TGGTTCCTTCCTCACAAGC
	ces2	AGCGCTCCTTTCACAGAAGA	TTTTCCAGGTTTCTGTGTC
	c8g	AAAGGCAAGAGACCGTCTGAW	TCTTCGCTCGATCTCAAAT
	tfa	TGCAGAAAAAGCTGGTGATG	ACAGCATGAACTGGCACTTG
Thioredoxins	txn1	TCACAATGGCCTTCAATCAA	CCAGACTCTGTGTGGCTTCA
	txn14a	CACAATGGCTGGCAAGTAGA	CTGGCACTTCTGTGATGTCC
Housekeeping gene	rpp0	CTGAACATCTCGCCCTTCTC	TAGCCGATCTGCAGACACAC

(마) Zebrafish Tg (Fabp10:RFP), Tg (Lfabp:dsRed;elastase:GFP) 구축

제브라피쉬 질환모델링 은행에서 Tg (Fabp10:RFP) 모델 수컷 2마리, 암컷 3마리를 분양 받았다. 교배를 통해 개체수를 늘려 실험에 사용할 만큼 충분한 양을 확보할 예정이었으나, 분양 받은 모델이 Tg (Lfabp:dsRed;elastase:GFP)로 확인되어 간(fabp:Red)과 췌장(elastase:Green)에서 형광 발현되는 double line을 현재 보유하고 있는 상태이다(Fig. 3-3). 현재 제브라피쉬 질환모델링 은행에도 Tg (Fabp10:RFP)를 보유하고 있지 않는 것으로 확인되어 추후 확보되면 다시 분양 받을 계획에 있다.

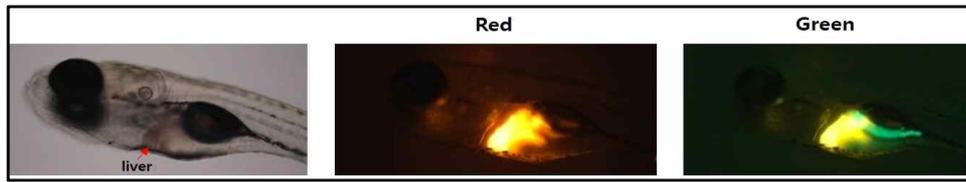


Fig. 3-3. Images of Tg (Lfabp:dsRed;elastase:GFP)

(바) Zebrafish larvae : Paraffin block 제작

시료는 10% NBF (Neutral buffered formalin), 4°C, 12시간 고정 후 70% 에탄올로 교체 보관 하였다. 고정된 시료는 4°C에서 1주일간 안정하게 보관이 가능하다. 에탄올과 자일렌을 사용하여 탈수 과정을 진행한 후에 파라핀에 유생을 심어 주었다. 파라핀 블록을 5 µm 두께로 잘라 H&E (Hematoxylin and eosin) 염색을 진행하여 현미경 관찰하였다(Fig. 3-4). 유생을 이용한 파라핀 블록 제작 방법을 확인하였으며 추후 연구에 활용할 예정이다.

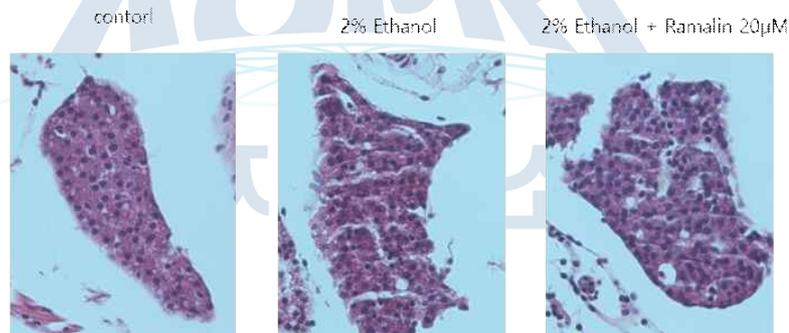


Fig. 3-4. H&E staining of liver section from zebrafish larvae

(3) 신경독성 시험(Neurotoxicity Assay)

(가) 실험용 동물 유지 및 수정란 획득

Wild type 제브라피쉬의 사육은 암컷과 수컷을 분리시킨 후 28°C의 물이 순환되는 장치에서 사육하였으며 14 시간 빛을 주고, 10 시간 빛을 차단하는 일정한 주기를 유지하였다. 일주일 이상 분리 사육이 된 제브라피쉬는 mating cage에 암컷 1~2 마리, 수컷 1~2 마리를 구분하여 넣어주고 다음 날 오전에 빛을 쬐고 동시에 가림막을 제거하여 암컷과 수컷이 만나 교배를 하도록 하였다. 약 30 분 후 수정된 알을 획득하여 embryo medium으로 씻어내었다.

(나) 약물처리

획득된 알을 24 well plate에 well 당 10 개의 알을 넣고 미생물 추출물 시료를 처리하였다. 처리 농도는 0 (only DMSO), 1, 5, 25, 50, 100 µg/ml 로 하였으며 모든 샘플은 총 DMSO의 양을 5 µl로 일치시켰다. 신경독성이 유발된 모델로는 1% EtOH 처리 군을 추가하였으며, DMSO는 동일하게 처리되었다. 96 시간동안 28 °C에서 배양기에서 배아를 유지 하였으며, 1일 1회 알 껍질 및 발달되지 않은 알들을 골라내었다.

(다) RNA 추출 및 cDNA 합성

96 시간 동안의 시료 처리가 종료된 larvae 들을 tube에 모아 넣고(tube당 9~10 마리) 배양수를 걷어낸 후 Trizol을 이용하여 RNA 추출을 진행하였다. Trizol을 tube당 1 ml 씩 넣고 직경 3 mm의 metal bead를 넣어 준 후 tissue homogenizer (초당 25 회 진동, 1 분간)로 조직을 잘게 파쇄하였다. 종료 후 파쇄액을 모두 다른 튜브로 옮긴 후 chloroform 200 µl 넣고 15초간 vortexing 하여 잘 섞어준 후 3 분간 놓아두었다. 15분간 원심분리 (14,000 g, 4°C) 하고 난 후 supernatant 300 µl 를 새로운 튜브로 옮기고 IPA 500 µl를 섞어서 10 분간 놓아두었다. 그것을 10 분간 원심분리 (14,000 g, 4°C) 한 뒤 pellet은 남기고 모두 제거하였으며 75 % EtOH를 1 ml 씩 넣고 pellet을 씻어내었다. 그것을 5 분간 원심분리 (14,000 g, 4°C)한 뒤 EtOH를 모두 제거하였으며 tube를 뒤집어서 20 분간 상온에서 남은 EtOH를 모두 증발되게 하였다. DEPC treated water를 tube 당 30 µl 씩 넣고 잘 섞은 후 농도를 측정하여 cDNA 합성을 위한 주형으로 사용하였다. cDNA 합성은 Enzynomics의 M-MLV Reverse Transcriptase (Cat. #RT001S)로 하였다.

(라) qRT-PCR 법을 이용한 유전자 발현 분석

합성된 cDNA는 5 배로 희석하여 qRT-PCR에 사용되었다. Enzynomics사의 TOPreal qPCR 2X PreMIX (SYBR Green with low ROX. #RT500M)를 사용하였으며 Primer와 주형 DNA 가닥 및 시약들을 혼합한 시료를 다음의 조건으로 PCR을 수행하며 실시간으로 Product 형성을 관찰하였다. 조건 ; Holding 95°C, 15 min/Cycling (×40) 95°C, 10 sec, 60°C, 15 sec, 72°C, 20 sec. 본 실험을 위한 primer 정보는 아래의 Table 3-3과 같다. 발현률은 beta-actin을 house keeping gene으로 선정하여 아래의 계산법을 이용하여 정량적으로 표현하였고 결과 값은 normal condition을 $2^0 = 1$ 로 하여 상대적인 값으로 표현하였다.

Table 3-3. Primer sequences information for teratotoxicity assay

Gene	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Product size (bp)
beta-actin 2	AATTGCCGCACTGGTTGTTG	GACCCACGATGGATGGGAAG	98
tuba1b	TTTGTGCACTGGTACGTGGG	TTCCACACTCTCAGCTCCAAC	114
GFAP	TGTGCGAACTGTTGAGACCC	CTTCTTCTGCAGCCAAGCCA	107
ef1a	TTTGCTGTGCGTGACATGAG	GGAACGGTGTGATTGAGGGAA	143
neurog	CTCCCAGCCCACCAATAAGG	CATCCGTGTGCGAAAAGGAG	93
nes	AGGCCCAAGTAAACACCCTG	TATGTTGCCACCTCCAGTCC	124
mbpa	AGAGAAAGGGAAAGAGACCCC	GGCTTTCTCCCCTCGACTTA	120

3. 결과 및 고찰

가. Zebrafish 연구기반 구축

(1) Zebrafish 사육시설 확보 및 분석기술 확충

(가) 실험동물 사육시스템은 21CZF model로 FT type으로 구축하였다. Stainless steel pipe 선반, 생물여과기, 가열기, 자외선 살균장치, 순환배관, 전기제어장치 등이 구성되어 있고, 스마트 관리 기능이 있어, 수조장치의 상태와 관리기록을 사용자가 상시 확인할 수 있다. 수조(case)는 3 L, 10 L 용량으로 목적에 맞게 다양하게 설치하였으며, case 바닥에 배설물, 사료 찌꺼기들이 잔류하지 않아 수질 오염을 줄여 주고, 자외선 차단과 이끼 발생을 최소화할 수 있도록 제작되었으며, FDA 무독성 인증 제품의 재질을 사용하였다(Fig. 3-5).

(나) 대상물질의 효능 및 독성평가를 위해, 물질을 실험동물의 발생 배나 성체에 주입할 수 있는 미세주입 장치(현미경, 미세바늘 제작기, 조절장치 등)를 개선하였다. 또한 대량의 신약후보물질들의 high-throughput screening, 제브라피쉬의 행동분석 및 독성분석을 위해 약물 혹은 유전자 조절에 따른 행동양상을 관찰할 수 있는 체계를 갖추었다(Fig. 3-5).

(다) 제브라피쉬 개체의 안정적 유지를 위하여 외형상의 변화나 행동의 이상 유무를 지속적으로 관찰함으로써 이상이 있는 제브라피쉬는 즉시 격리 후 치료 또는 희생시켜 유지·관리하였다. 현재 야생형(wild type) 약 1,000 개체, 돌연변이체(mutant) 32 개체, 형질전환체(transgenic organism) 26 개체를 유지하며, 실험에 활용하고 있다(Table 3-4).

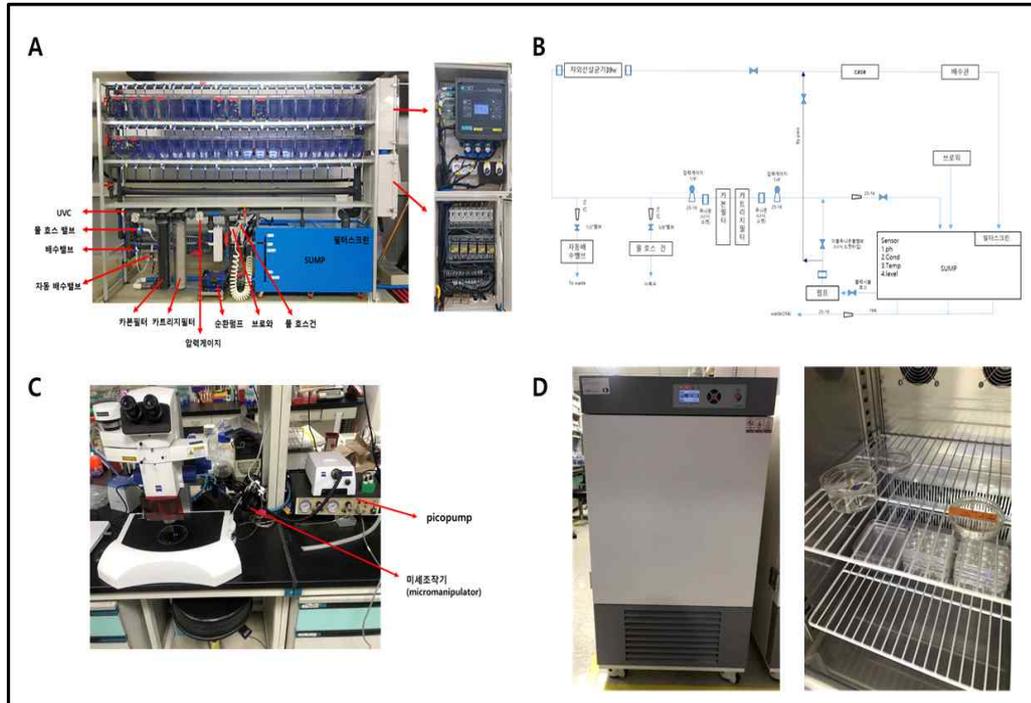


Fig. 3-5. Zebrafish breeding facility (A,B), microinjection (C) and culture system (D)

Table 3-4. Present condition of experimental animals

야생형 (Wild type)	약 1000 마리	
돌연변이체 (Mutants)	Albino model : 22 마리	
	abcb11b : 10 마리	
형질전환체 (Transgenic zebrafish)	Lfabp:dsRed; elastase:GFP : 7마리	
	Mpeg:dendra2 : 19 마리	

(2) Zebrafish 유지 및 발생배 확보

(가) 제브라피쉬는 순환식 항온 수족관 시스템을 이용하여 사육하는데 하루 두 번 식이를 공급하며 수질을 청결하게 유지하기 위한 필터, 온도를 25~28℃로 조절하기 위한 히터가 시스템에 포함되었다. 제브라피쉬의 건강한 발생 배아를 확보하기 위해 2주 간격으로 교배를 진행하여 100~200개의 수정란을 생산하였다. 수정된 배아는 수정 30분 후부터 발생이 시작하여 48 시간 이내에 주요한 신체 장기의 발생과정이 완료되었으며 72시간 이내에 부화하여 5일째부터 음식섭취가 가능하였다(Fig. 3-6). 수정 후 10주가 지나면 성적으로 성숙한 성어가 되어 산란을 시작하였다.

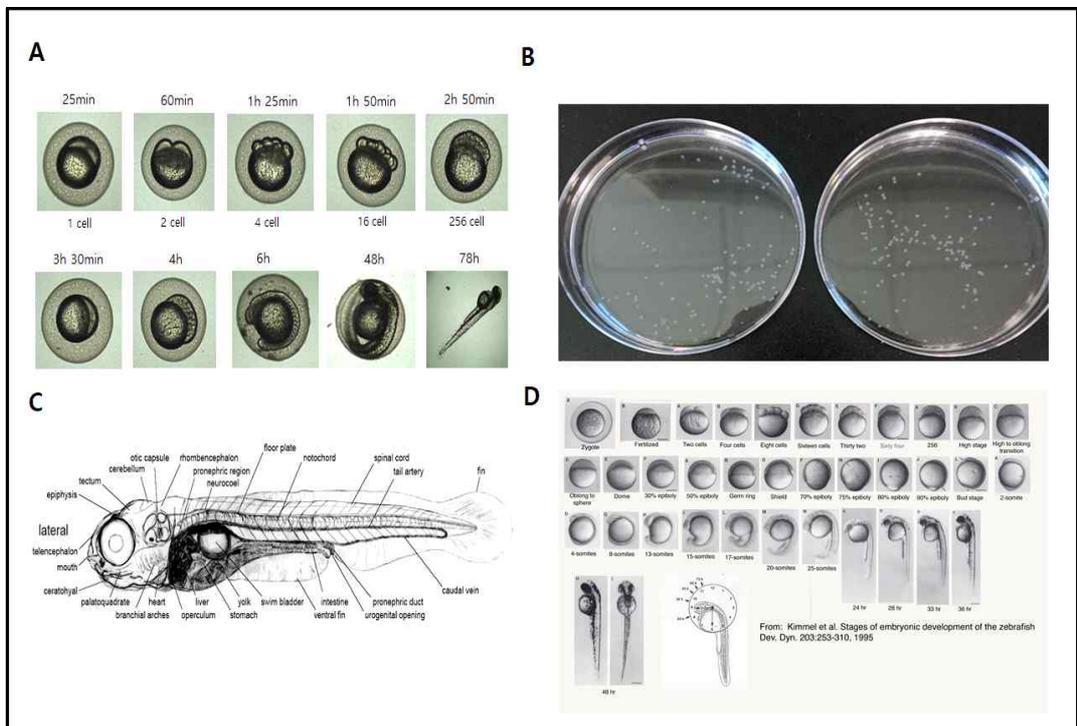


Fig. 3-6. Egg securing and generation stages of zebrafish

(나) 건강한 제브라피쉬의 유지를 위하여 외형상의 변화나 행동의 이상 유무를 지속적으로 관찰함으로써 이상이 있는 제브라피쉬는 즉시 격리 후 치료 또는 희생시켜 유지·관리하였다. 제브라피쉬의 외형상의 변화와 행동이상 증상으로는 여위거나 등이 굽는 현상, 비늘이 부풀거나 하얀 가루 같은 반점이 생기는 현상, 흐느적거리거나 지느러미가 굽거나 접혀있는 증상, 눈의 팽창, 염증이 발생, 내출혈 관찰, 지느러미가 찢어지거나 뜯겨 나갔을 때, 아가미에 상처를 입었거나 빨

장게 변색되는 경우, 이상한 양상으로 수영을 하는 현상, 수조의 바닥에 가라앉거나 수면에서 잠수 하지 않을 때, 몸의 표면에 공기방울이 발생하는 경우 등의 현상이 발견되었을 때 즉시 격리 조치하였다.

나. 발생독성 시험(Teratotoxicity Assay)

(1) 처리 농도 결정

(가) OECD 가이드라인은 각각의 개체 특이성을 고려하여 대조군의 부화한 수정란의 생존율이 최소 90%를 초과하도록 규정 한다(OECD Test No. 236, 2013). 해당 기준에 만족하는 농도를 확인하였다(Table 3-5).

(나) *D. rerio* 배아에 대한 17-Ant-42의 농도는 총 5개의 노출 농도 2.94, 14.7, 29.4, 100, 147 µg/ml; 17-Ant-55-1은 총 5개의 노출 농도 1, 5, 25, 50, 100 µg/ml; 17-Ant-55-3은 총 6개의 노출 농도 1, 5, 25, 50, 100, 200 µg/ml; 17-Ant-55-6은 총 5개의 노출 농도 0.5, 1, 5, 10, 50 µg/ml; 17-Ant-69-1은 총 4개의 노출 농도 1, 5, 25, 50 µg/ml를 설정하여 96 hpf 동안 급성독성실험을 수행하였다. P66은 모든 조건에서 수정란이 부화, 생존하지 못했다.

Table 3-5. Hatching rates and survival rates of *D. rerio* embryos

17-Ant-42			17-Ant-55-1			17-Ant-55-3		
Concentrations (µg/ml)	Hatching rates (%)	Survival rates of hatching individuals (%)	Concentrations (µg/ml)	Hatching rates (%)	Survival rates of hatching individuals (%)	Concentrations (µg/ml)	Hatching rates (%)	Survival rates of hatching individuals (%)
DMSO	96.6	100	DMSO	100	100	DMSO	100	100
2.94	100	100	1	100	100	1	96.6	100
14.7	93.3	100	5	100	100	5	93.3	100
29.4	100	100	25	100	100	25	100	100
100	100	100	50	100	100	50	100	100
147	90	100	100	100	100	100	96.6	100
294.1	0	0	200	56.6	0	200	90	100
500	0	0	500	0	0	500	0	0
580	0	0						

17-Ant-55-6			17-Ant-69-1			P66		
Concentrations (µg/ml)	Hatching rates (%)	Survival rates of hatching individuals (%)	Concentrations (µg/ml)	Hatching rates (%)	Survival rates of hatching individuals (%)	Concentrations (%)	Hatching rates (%)	Survival rates of hatching individuals (%)
DMSO	100	100	DMSO	100	100	Control	100	100
0.5	100	100	1	96.7	100	Buffer	0	0
1	100	100	5	100	100	0.1% P66	0	0
5	100	100	25	100	100	0.5% P66	0	0
10	100	100	50	96.7	100	1% P66	0	0
50	100	100	100	93.7	0	2% P66	0	0
100	63	100	200			Savinase 1%	0	0
150	0	0	500					
200	0	0						
300	0	0						

(2) LC₅₀, NOEC, LOEC 값 산출

(가) Sigma-plot10을 사용하여 반수치사농도(LC₅₀), NOEC (no observed effect concentration) 및 LOEC (lowest observed effect concentration) 값을 산출하였다. NOEC값은 일정 기간 동안 시험 생물에 노출된 후에도 어떠한 독성이 관

찰되지 않는 최고농도를 의미하며, LOEC 값은 일정 기간 동안 시험 생물에 노출한 후에 특정 영향이 관찰되는 가장 낮은 농도를 의미한다(Reza *et al.*, 2012). 본 실험에서는 어떠한 변화도 관찰되지 않은 농도를 NOEC_{acute} 값으로, 처음으로 독성 영향이 발생하는 농도를 LOEC_{acute} 값으로 선정하였다.

(나) *D. rerio* 배아에 대한 17-Ant-42의 반수치사농도(LC₅₀), NOEC 및 LOEC는 각각 212, 2.94, 14.7 µg/ml; 17-Ant-55-1은 150, 1, 5 µg/ml; 17-Ant-55-3은 333.3, 1, 5 µg/ml; 17-Ant-55-6은 110, 5, 10 µg/ml; 17-Ant-69-1은 75, 1, 5 µg/ml로 나타났다(Fig. 3-7).

(다) 문헌에 따르면 배아 및 성어는 흡수와 신진대사의 차이로 인해 어류의 나이가 증가함에 따라 안전 농도가 감소한다고 보고되어져 있다(Macova *et al.*, 2008). 본 연구 자료는 추후 성어 급성독성 평가 시 물질의 시작농도를 결정하는데 활용할 수 있을 것이라 생각된다.

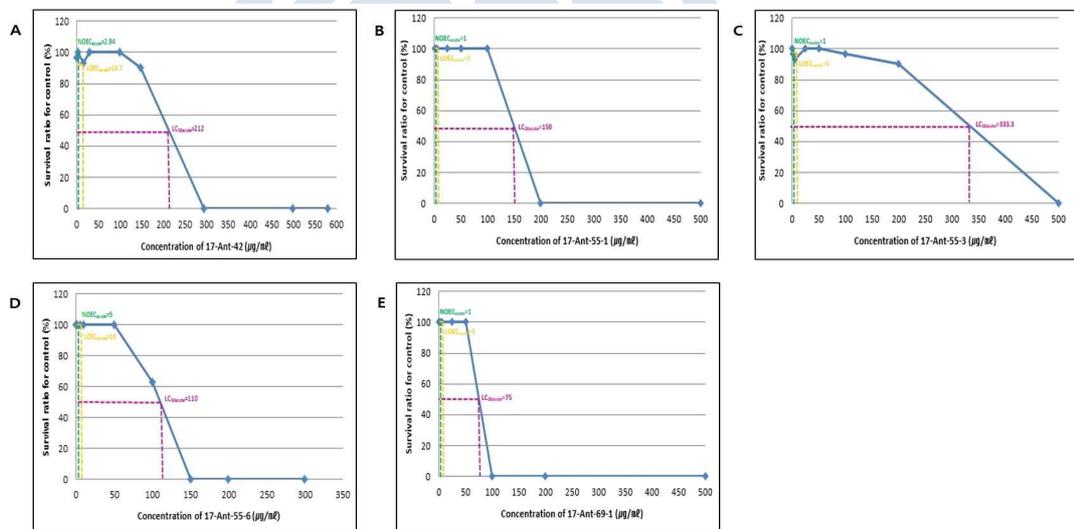


Fig. 3-7. Acute toxicity test of samples to *D. rerio* embryo. (A) 17-Ant-42, (B) 17-Ant-55-1, (C) 17-Ant-55-3, (D) 17-Ant-55-6, (E) 17-Ant-69-1

(3) 형태학적 관찰

(가) 형태학적 이상 증상으로 응고현상(C: Congelation), 난황부종(YSE: Yolk Sac Edema), 심장막부종(PE: Pericardial Edema), 수정란 와해되는 기형(CPFE: Collapse Phenomenon of Fertilized Egg), 꼬리 굽음(BT: Bent Tail), 출혈(H: Hemorrhage)을 관찰하였다 (Fig. 3-8, Table 3-6).

- (나) 17-Ant-42 평가 최고 농도인 147 µg/ml에서부터 수정란의 응고가 관찰되었다. 수정 후 24시간 경과 후, 응고현상을 보인 개체들은 96시간까지 지속적으로 응고현상이 유지되었다. 난황부종은 29.4 µg/ml부터 147 µg/ml에 노출된 개체에서 관찰되었다. 29.4 µg/ml, 100 µg/ml의 농도에서는 72시간에서부터 난황부종이 관찰되었으나, 147 µg/ml에서는 난황부종이 24시간 이내에 96.6%로 96시간까지 86.6%로 유지되었다. 심장막부종과 꼬리 굽음이 처음으로 관찰된 농도는 14.7 µg/ml이다(Fig. 3-8A, Table 3-6). 17-Ant-55-1의 독성평가 결과, 5 µg/ml 농도에서 난황부종과 심장막부종이 3.3%가 관찰되었다. 그러나 평가 최고 농도인 100 µg/ml까지 이 외에 다른 형태학적 이상은 관찰되지 않았다(Fig. 3-8B, Table 3-6).
- (다) 17-Ant-55-3의 독성평가 결과, 수정 후 24시간 경과 후, 수정란의 응고가 가장 낮은 농도인 1 µg/ml에서 3.3%, 5 µg/ml에서 6.6%, 100 µg/ml에서 3.3% 관찰되었다. 48시간 경과 후 5 µg/ml에서 난황부종이 3.3% 관찰되었지만 이 외에 25 µg/ml까지 다른 이상 현상이 관찰되지 않았으므로 앞에 수정란의 응고는 물질에 의한 독성 보다는 자연 발생상에 생긴 이상이라고 생각 된다. 100 µg/ml, 72시간에서 머리 쪽에 출현이 관찰되었으며, 96시간 경과 후 난황부종 10%, 심장막부종 73.3%, 출혈 3.3%, 꼬리 굽음 20%가 관찰되었다. 평가 최고 농도인 200 µg/ml에서는 48시간에 처음으로 난황부종이 관찰되었으며, 96시간에서 난황부종 80%, 심장막부종 90%, 꼬리 굽음 43.3%가 관찰되었다. 꼬리 굽음이 처음 관찰된 것은 72시간 200 µg/ml에서이며 96시간에는 43.3%로 비율이 증가하였다(Fig. 3-8C, Table 3-6).
- (라) 17-Ant-55-6의 독성평가 결과, 평가 농도 범위에서는 난황부종과 심장막부종만 관찰되었고, 이 또한 시간이 경과함에 따라 비율이 감소되는 것을 확인하였다. 수정 후 48시간 경과 후, 난황부종이 10 µg/ml에서 3.3%, 50 µg/ml에서 93.3% 관찰되었다. 10 µg/ml에서 확인된 난황부종은 72시간 이후에는 관찰되지 않았다. 또한, 50 µg/ml에서 관찰된 난황부종은 시간이 경과함에 따라 비율이 감소하여 96시간에는 3.3%로 확인되었다(Fig. 3-8D, Table 3-6).
- (마) 17-Ant-69-1의 독성평가 결과, 수정 후 24시간 경과 후, 평가 최저 농도 1 µg/ml와 최고 농도인 50 µg/ml에서의 3.3%의 응고 현상이 관찰되었다. 이것은 24시간에서만 관찰되고 96시간까지 더 이상 관찰되지 않았다. 평가 최고 농도인 50 µg/ml,

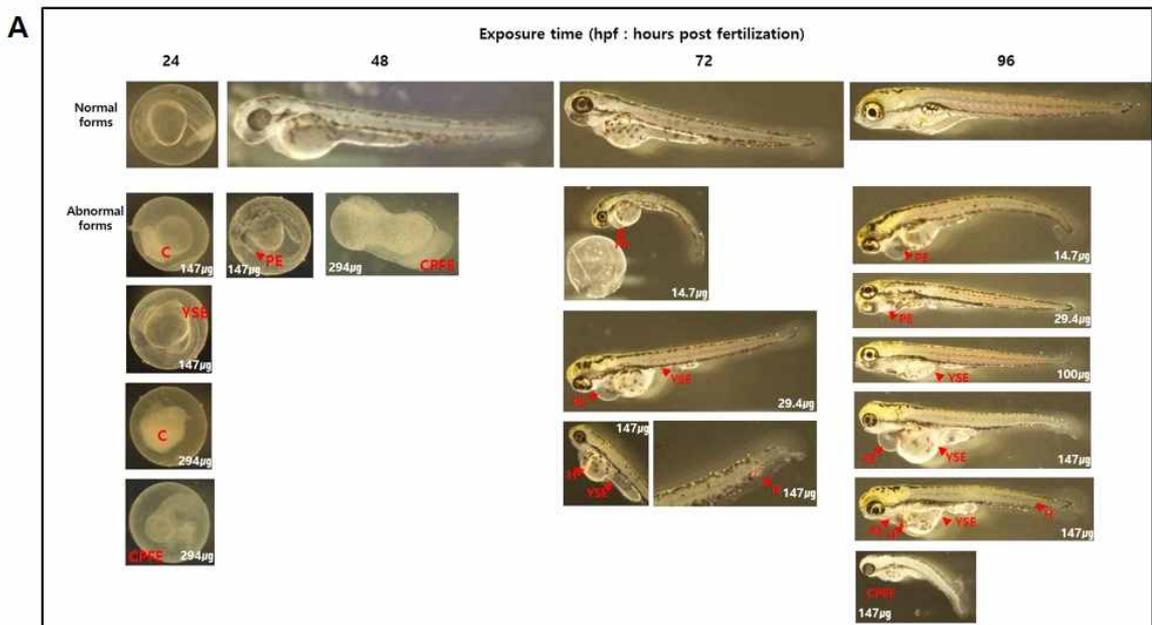
72시간에 관찰된 36.6%의 난황부종은 96시간에 3.3% 비율로 감소하였다(Fig. 3-8E, Table 3-6).

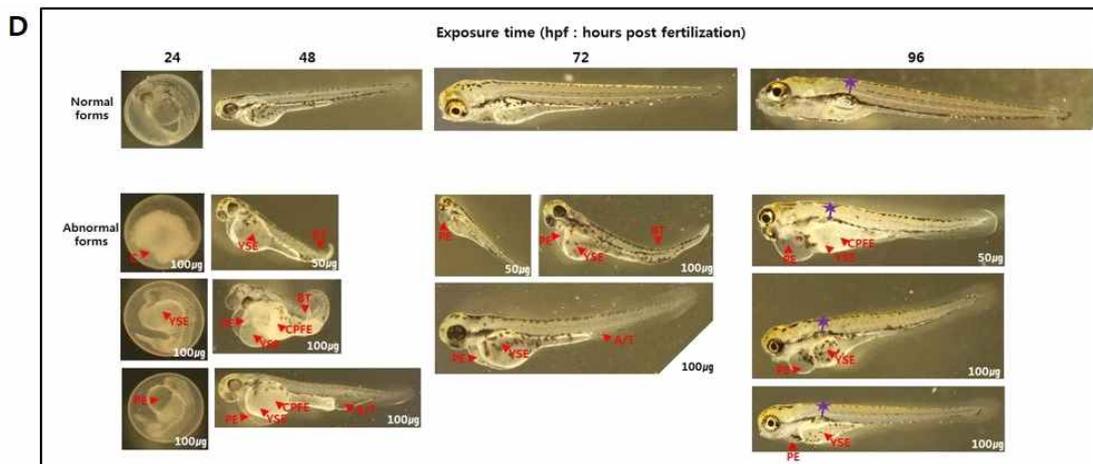
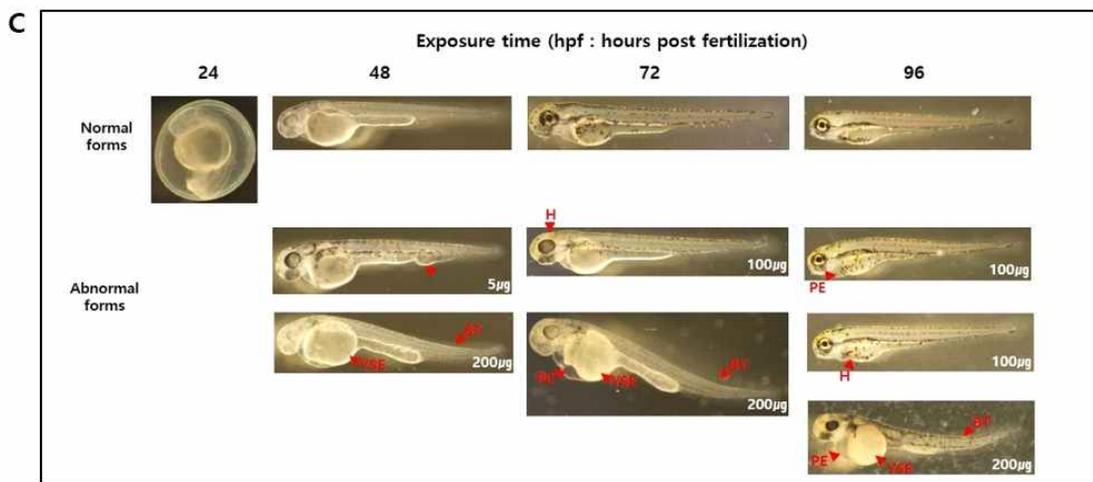
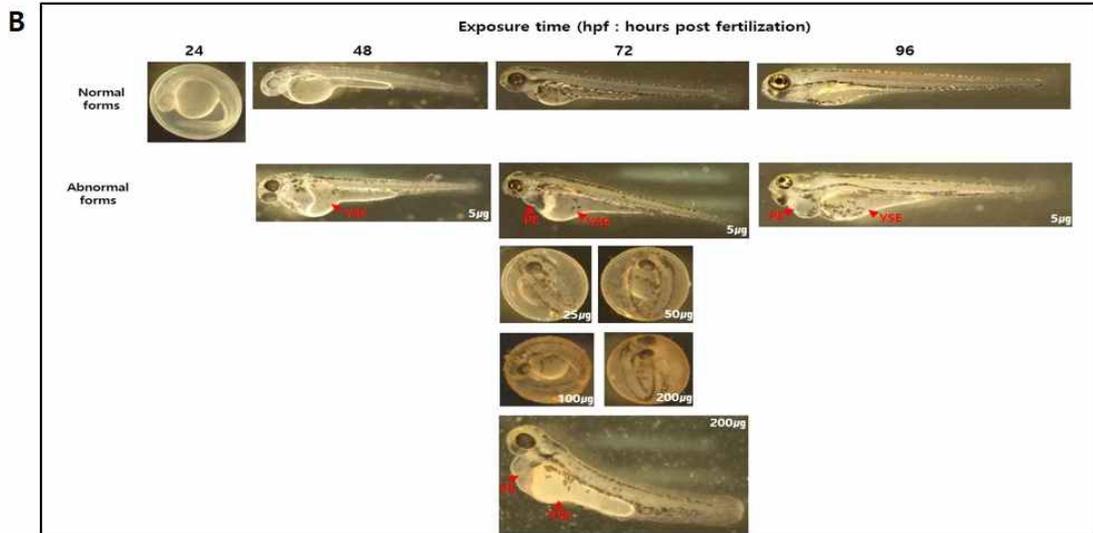
(바) P66의 독성평가는 OECD 가이드라인에 만족하는 농도 조건이 확인되지 않아 실험을 진행하지 못하였다. 대조군을 제외한 모든 조건에서 수정란이 모두 생존하지 못했고, 발생이 진행되지 않거나 기형발생, 배아 껍질이 벗겨지는 등의 현상이 관찰되었다(Fig. 3-8F, Table 3-6).

(사) 제브라피쉬 배아에서의 특정 부분의 부종은 독성물질이 축적되어 혈류의 흐름이 정상적으로 작동하지 않게 되어 혈관 부근이 과다하게 부어오르는 현상이라고 알려져 있다(Hong *et al.*, 1986). 본 연구에서 관찰된 난황부종, 심장막부종도 물질의 축적으로 인해 부종이 발생한 것으로 사료된다.

(아) 17-Ant-42 추출물은 항염 활성이 확인된 것으로 *in vitro* cell 수준의 항염 실험은 모두 완료된 상태이다. 이번 발생독성 결과는 차후 제브라피쉬를 이용한 *in vivo* 실험에 기초 자료가 될 것이라 생각된다. 17-Ant-55-1, 55-3, 55-6, 69-1 시료는 정성적, 정량적 스크린을 통해 항균 활성이 확인된 것으로 항균 활성 물질 개발에 있어 물질의 독성이 배아의 어느 시기에 어떤 영향을 미치는지를 제시할 수 있을 것이라 생각된다.

크지연구소





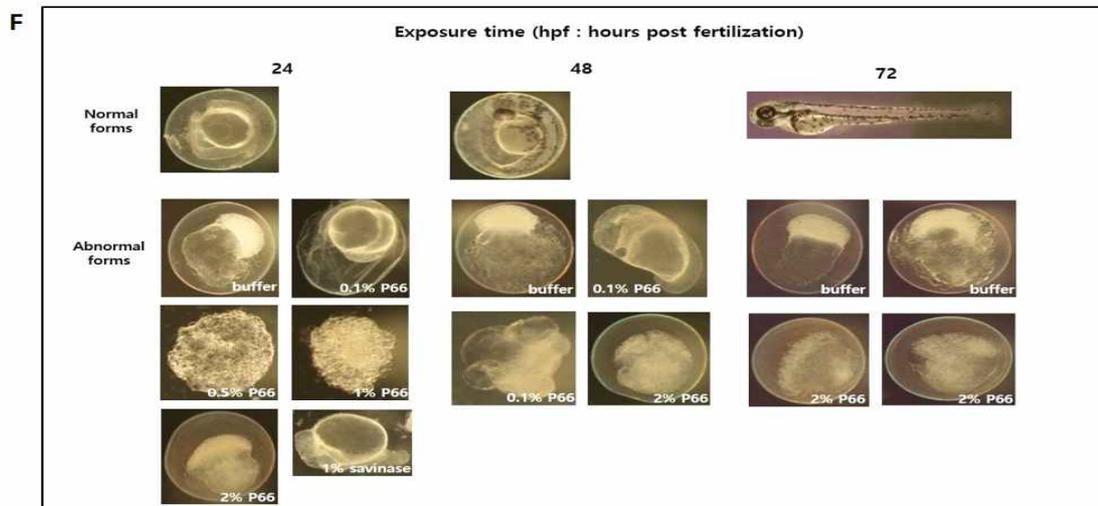
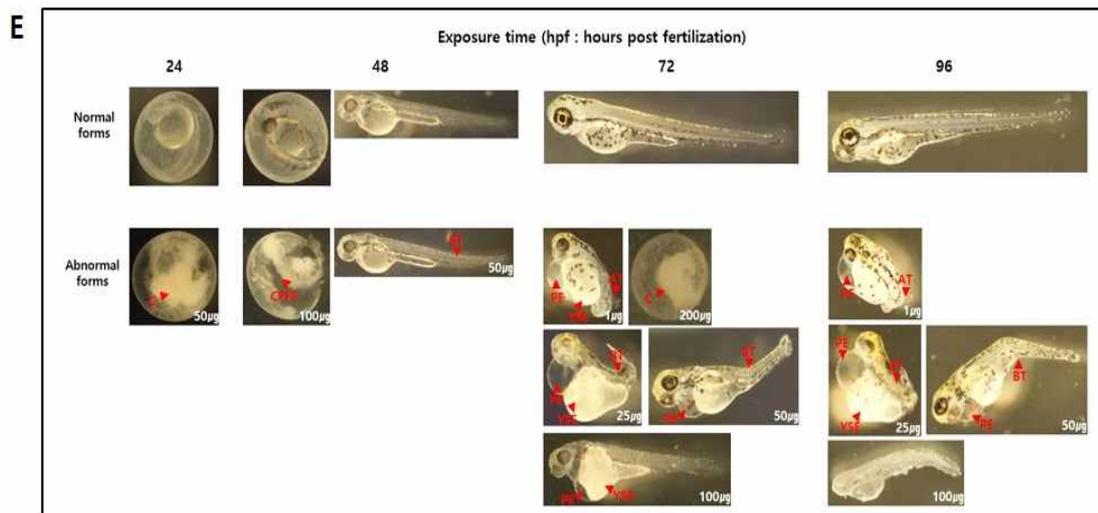


Fig. 3-8. Images summary of morphological abnormalities of *D. rerio* embryo. (A) 17-Ant-42, (B) 17-Ant-55-1, (C) 17-Ant-55-3, (D) 17-Ant-55-6, (E) 17-Ant-69-1, (F) P66

Table 3-6. Degree of the effect on the abnormal morphological symptoms of *D. rerio* embryo

17-Ant-42		Morphological abnormality symptoms (%) ± Standard deviation																						
Symptoms	C				YES				PE				H				CPFE				BT			
	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
Over time	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
DMSO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.94 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14.7 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.3	3.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.3
29.4 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	6.6	0	0	0	3.3	3.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100 µg/ml	0	0	0	0	0	0	10	6.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
147 µg/ml	3.3	0	0	0	96.6	96.6	80	86.6	0	96.6	36.6	56.6	0	0	60	20	0	0	0	10	0	0	0	0
294.1 µg/ml	90	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-
500 µg/ml	100	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-
580 µg/ml	100	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-

17-Ant-55-1		Morphological abnormality symptoms (%) ± Standard deviation																			
Symptoms	C				YES				PE				CPFE				BT				
	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	
Over time	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	
DMSO	3.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5 µg/ml	0	0	0	0	0	3.3	3.3	0	0	0	0	3.3	3.3	0	0	0	0	0	0	0	
25 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
50 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
100 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
200 µg/ml	0	0	0	100	0	46.6	0	-	0	0	0	-	0	0	0	10	-	-	-	-	
500 µg/ml	56.6	56.6	100	-	0	43.3	0	-	0	0	0	-	0	0	0	0	-	-	-	-	

17-Ant-55-3		Morphological abnormality symptoms (%) ± Standard deviation																						
Symptoms	C				YES				PE				H				CPFE				BT			
	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
Over time	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
DMSO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 µg/ml	3.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 µg/ml	6.6	0	0	0	0	3.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.6
100 µg/ml	3.3	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	73.3	0	0	6.6	3.3	0	0	0	0	0	0	0	20
200 µg/ml	0	0	0	0	0	3.3	0	80	0	0	0	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16.6	43.3
500 µg/ml	0	30	6.6	10	0	23.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0

17-Ant-55-6		Morphological abnormality symptoms (%) ± Standard deviation																						
Symptoms	C				YES				PE				A/T				CPFE				BT			
	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
Over time	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
DMSO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 µg/ml	0	0	0	0	0	3.3	3.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50 µg/ml	0	0	0	0	0	93.3	26.7	3.3	0	0	66.7	3.3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0	0
100 µg/ml	13.3	30	36.7	36.7	16.7	40	78.9	68.4	13.3	20	73.7	73.7	0	42.9	26.3	5.3	0	7	7	7	0	19	21	5.3
150 µg/ml	100	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200 µg/ml	100	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
300 µg/ml	100	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

17-Ant-69-1		Morphological abnormality symptoms (%) ± Standard deviation																						
Symptoms	C				YES				PE				A/T				CPFE				BT			
	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
Over time	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
DMSO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 µg/ml	3.3	0	0	0	0	3.3	0	3.3	0	3.3	0	3.3	0	0	0	3.3	0	0	0	0	0	0	0	3.3
5 µg/ml	0	0	0	0	0	0	3.3	6.6	0	0	3.3	6.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.3	13.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.3
50 µg/ml	3.3	0	0	0	0	0	36.6	3.3	0	0	16.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.3	3.3	6.6
100 µg/ml	3.3	3.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16.6	76.6	0	0	10	0
200 µg/ml	30	0	0	0	26.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500 µg/ml	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

다. 간독성 시험(Hepatotoxicity Assay)

(1) Embryo/larvae의 생존율, 심박수 및 형태학적 변화

(가) 72시간 경과 후 최고 농도인 100 µg만 제외하고 모든 처리군에서는 100% 부화율을 보였다. 100 µg 농도에서는 부화하지 못하고 모두 치사하였다(Fig. 3-9).

(나) 심장독성평가는 심장 박동수를 측정하여 평가하였다. 배아가 부화되는 48 hpf 시점에 현미경을 통해 1분 동안 측정하였다. 측정 결과 대부분 유의적인 차이를 보이지 않았지만 100 µg의 농도로 노출시킨 군과 대조군을 비교하였을 때 유의적으로 심장 박동수가 감소한 것을 확인하였다(Fig. 3-10).

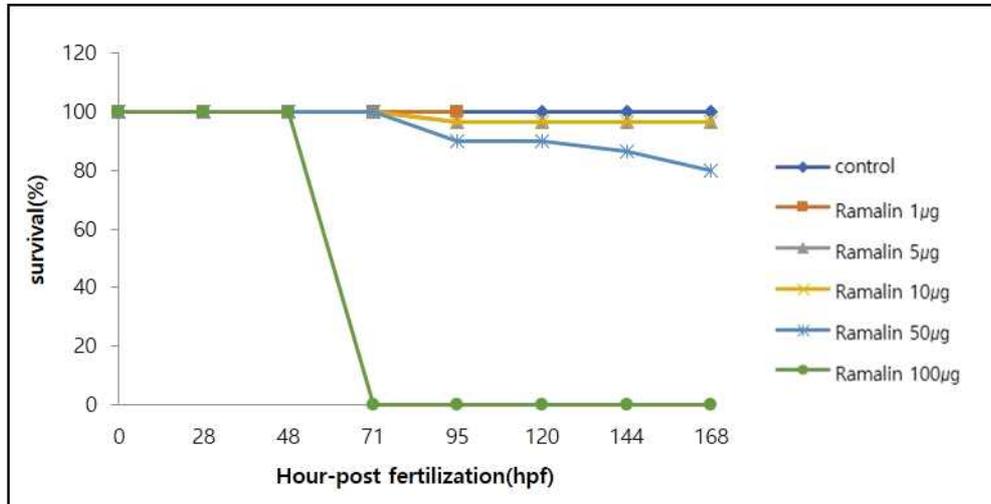


Fig. 3-9. Survival rates of zebrafish embryo in exposed to various ramalin

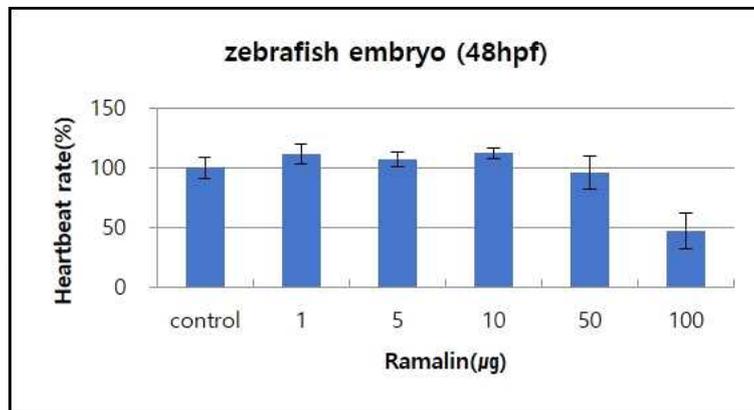


Fig. 3-10. Heartbeat rates of zebrafish embryo in exposed to various ramalin

(다) 형태학적 변화를 관찰한 결과, 50 µg에서 심장 부종과 꼬리 휨을 확인하였다. 그러나 꼬리 휨 현상은 시간이 지나면서 유영 운동을 통해 모두 정상으로 돌아왔다. 부화하지 못한 100 µg 농도에서는 대부분 난황부종, 심장부종이 확인되었다(Fig. 3-11).

(라) 유생(larvae) 독성 평가는 수정후 4 dpf (days post-fertilization)일 때 처리하여 48시간까지 치사 개체를 확인하였다. 라말린을 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500 µg/ml로 처리하여 육안으로 죽지 않는 농도를 확인한 결과, 40 ~ 500 µg/ml 처리군에서는 치사 개체가 확인되었고 30 µg/ml 처리군에서는 움직임이 줄어들었지만 치사 개체는 확인되지 않았다(Fig. 3-12).

	Observation time					참고
	4 hpf	28 hpf	48 hpf	71 hpf		
Control						24hpf
Ramalin 1 μ g						48hpf
Ramalin 5 μ g						72hpf
Ramalin 10 μ g						72hpf
Ramalin 50 μ g						72hpf
Ramalin 100 μ g						

Fig. 3-11. Images summary of morphological abnormalities of *D. rerio* embryo

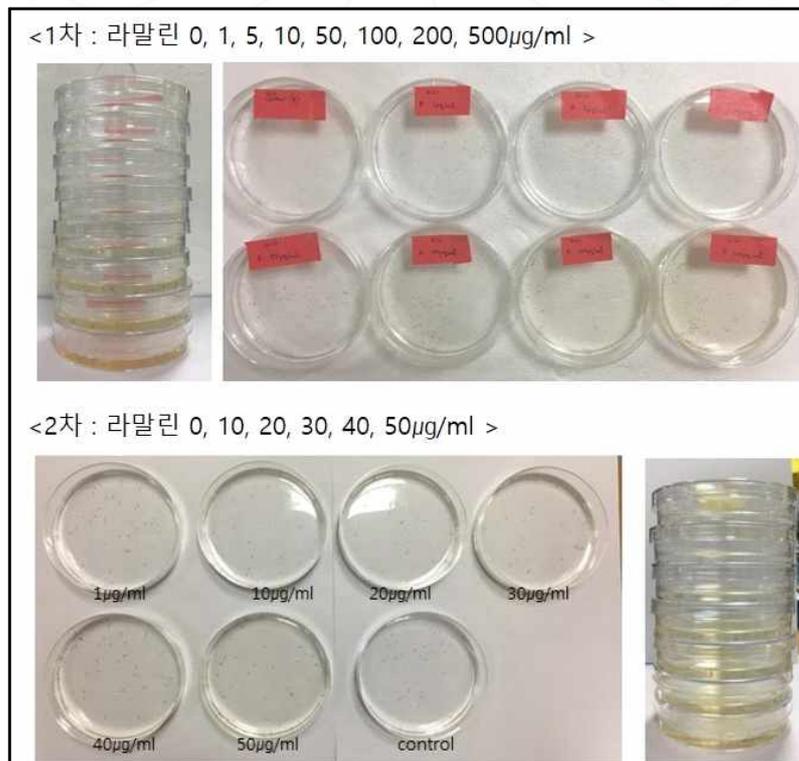


Fig. 3-12. Survival rates of zebrafish larvae in exposed to various ramalin

(마) Zebrafish larvae의 Ethanol에 의한 생존율, Hepatic Steatosis 형성 : Ethanol 노출에 따른 농도별 생존율 측정 결과, 배양 시간 동안 2% Ethanol에서 100%의 생존율을 보였으며 그 이상의 농도에서는 생존율이 저하되는 것을 확인하였다. 2% Ethanol를 32시간 처리한 후 Whole-mount oil red O staining으로 확인한 결과 대조군에서는 지방증이 거의 형성되지 않은 반면, 노출된 유생의 간에서는 지방증이 형성되는 것을 확인하였다(Fig. 3-13).

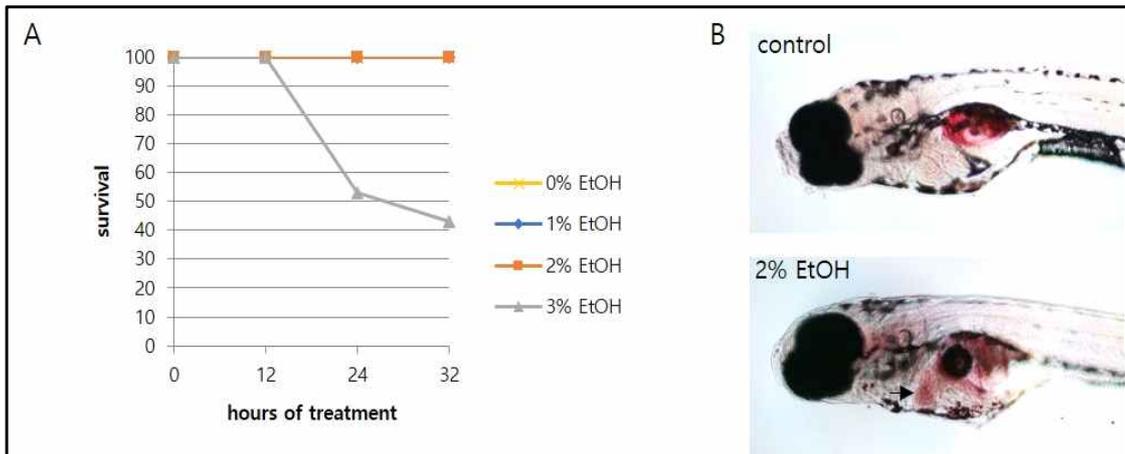


Fig. 3-13. Hepatic Steatosis in zebrafish larvae treated in ethanol. (A) Zebrafish larvae were treated with 0 ~ 3% ethanol (v/v) and were observed for 32 hours. (B) oil red O staining of 2% ethanol-treated larva, showing steatosis in the liver (arrow)

(바) Ramalin : Ethanol에 의한 Zebrafish larvae Hepatic Steatosis 형성 억제

- ① 앞서 확인한 Ethanol에 의한 유생 간 지방증 형성이 Ramlin 처리 시 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인하였다. Whole-mount oil red O staining으로 염색 정도에 따라 none, some, steatosis 3단계로 구분하여 확인한 결과 전체적으로 지방증 형성이 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3-14).
- ② Cytochrome P450 family2 subfamily E member 1 (cyp2e1)은 포유동물에서 알코올성 간 손상 원인으로 알려져 있다. Cytochrome P450 family 2 subfamily Y polypeptide 3 (cyp2y3)는 cyp2e1 유전자의 상동체로 제브라피쉬 간에서 알코올성 대사에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 간 손상시 cyp2y3 증가하며 알코올 대사 속도가 빨라지고 acetaldehyde가 축적된다고 알려져 있다 (Tsedensodnom *et al.*, 2013). 본 연구에서도 2% Ethanol 처리로 지방증 형성

이 확인된 군에서 *cyp2y3*의 발현이 증가한 것을 확인하였으며, Ethanol과 라말린을 같이 처리할 경우에는 농도 의존적으로 발현이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3-15A). 알코올 대사 중 내인성, 외인성 물질 대사에 중요한 역할을 하는 cytochrome P450 family 3 subfamily A (*cyp3a*)의 제브라피쉬 상동유전자 cytochrome P450 family 3 subfamily A polypeptide 65 (*cyp3a65*)도 대사 과정에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Tseng *et al.*, 2005). 라말린 처리시 control군 보다 감소한 것을 확인하였다(Fig. 3-15A). 이러한 결과는 라말린에 에탄올에 노출된 제브라피쉬 유생의 알코올 대사를 개선하고 독성 물질의 축적을 감소시키는 역할을 할 수 있을 것이라 예상할 수 있다.

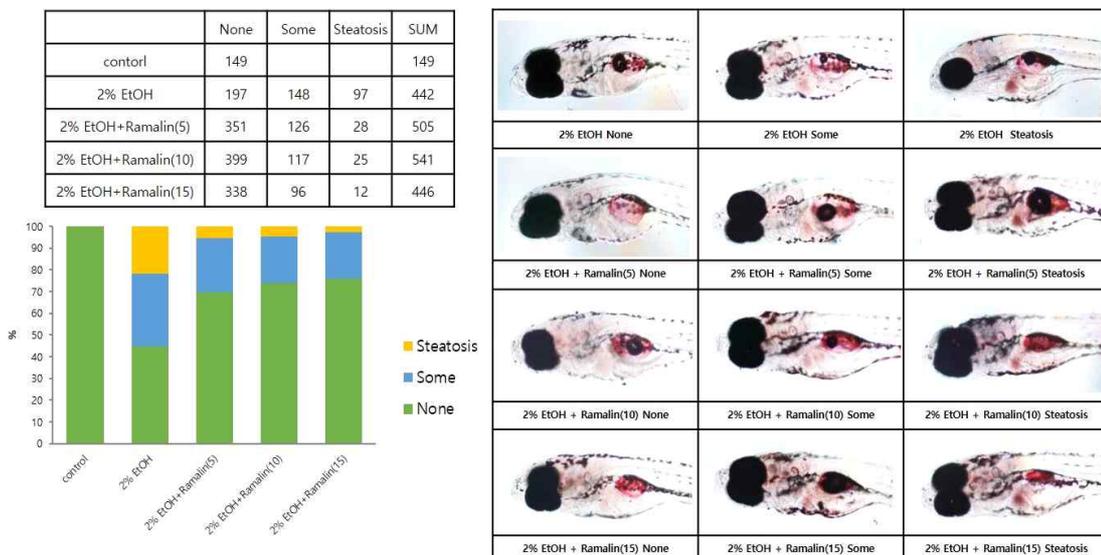


Fig. 3-14. Quantification of hepatic Steatosis induced by EtOH was scored for zebrafish larvae treated with 5 μ g, 10 μ g, and 15 μ g Ramalin. Larvae were examined in a blinded fashion and were categorized as having "steatosis," "some" steatosis, or "none"

- ③ 콜레스테롤 합성(cholesterol synthesis), 지방산 합성(fatty acid synthase), 불포화화효소(desaturase), 미토콘드리아 효소(mitochondrial enzyme)와 관련이 있는 지질대사 유전자들의 발현 변화를 측정하였다. 라말린에 의한 지질 대사 감소 및 지질 항상성 개선으로 간 지방증 생성이 억제되는지를 확인하고자 했다. 실험 결과, 유생에 2% Ethanol을 처리하면 *hmgcra*, *hmgcrb*, *hmgcs*, *fasn*, *fads2*의 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, 그 중 *hmgcra*, *hmgcs*, *fads2*는 ramalin 처리 시 농도 의존적으로 발현이 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 3-15B).

- ④ 알코올에 의한 간 손상으로 소포체 스트레스나 DNA 손상이 발생된다(Malhi *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2016). 소포체 스트레스와 DNA 손상과 관련된 유전자의 발현을 확인하였다. 그 결과 chop (DNA damage inducible transcript 3)의 경우 2% Ethanol 처리군 보다 라말린 동시 처리 시 mRNA의 발현이 더 증가되는 것을 확인하였으며, 라말린 단독 처리 시에도 control 보다 발현양이 많은 것을 확인하였다(Fig. 3-15C). 라말린에 의한 DNA 손상이 발생하는지 확인해 볼 필요가 있다.
- ⑤ Acute phase response의 marker인 saa (serum amyloid A)는 Ethanol 처리된 제브라피쉬 유생에서 발현이 증가된다고 알려져 있다(Passeri *et al.*, 2009). 본 실험에서도 2% Ethanol 처리 시 saa의 발현이 증가된 것을 확인하였으나 라말린 동시 처리 시 발현이 더 증가된 것을 확인하였다. DNA 손상 관련 유전자의 발현 양상과 같이 확인해 볼 필요가 있을 것이라 생각된다. A1at (alpha-1 antitrypsin)의 경우 Ethanol과 라말린을 같이 처리할 경우에는 농도 의존적으로 발현이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3-15D).
- ⑥ 간세포의 기능과 관련된 유전자들은 2% Ethanol 처리 시에도 발현 변화가 거의 없다고 알려져 있다(Howarth *et al.*, 2013). 그러나 본 실험 결과에서는 ces2 (carboxylesterase 2), c8g (complement component 8 gamma Polypeptide), tfa (transferring alpha)의 발현이 라말린 동시 처리 시 control 보다 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 3-15E). 라말린이 분비 단백질의 발현을 억제시키는 것이라 예상할 수 있다.
- ⑦ 산화환원반응(Xedox signaling)에 포함되어 있는 txn1 (thioredoxin like 1), txn1a (thioredoxin like 4a) 중 txn1의 발현은 Ethanol, 라말린 동시 처리 시 발현이 감소된 것을 확인하였다(Fig. 3-15F).
- ⑧ 라말린의 GPScreen 결과 자료를 활용하여 이미 확인된 상위 28개의 유전자 후보군(GPScreen)과 real-time PCR 결과에서 경향성을 보인 유전자 사이의 pathway를 확인하였다. 각 유전자의 ZFIN ID를 확인한 후, DAVID tool을 이용하여 유전자의 pathway를 확인하였으며 실험에 사용한 유전자의 ZFIN ID는 다음과 같다(Table 3-7).
- ⑨ 46개 유전자 중 확인되지 않는 4개의 유전자 외에 42개의 GPScreen 후보군과 real-time PCR 확인 유전자의 pathway를 확인하였다(Fig. 3-16). 이 중 GPScreen

후보군과 real-time PCR 확인 유전자가 공통으로 포함된 것은 Biosynthesis of antibiotics(hmgcra, hmgcrb, hmgcs1, gck, hk1, hk2), Biosynthesis of unsaturated fatty acids (fads2, scd)으로 확인되었다. PPAR signaling pathway (fads2, scd), Insulin signaling pathway (scd, gck, hk1, hk2) 관련 유전자들을 추가로 확인할 예정이다.

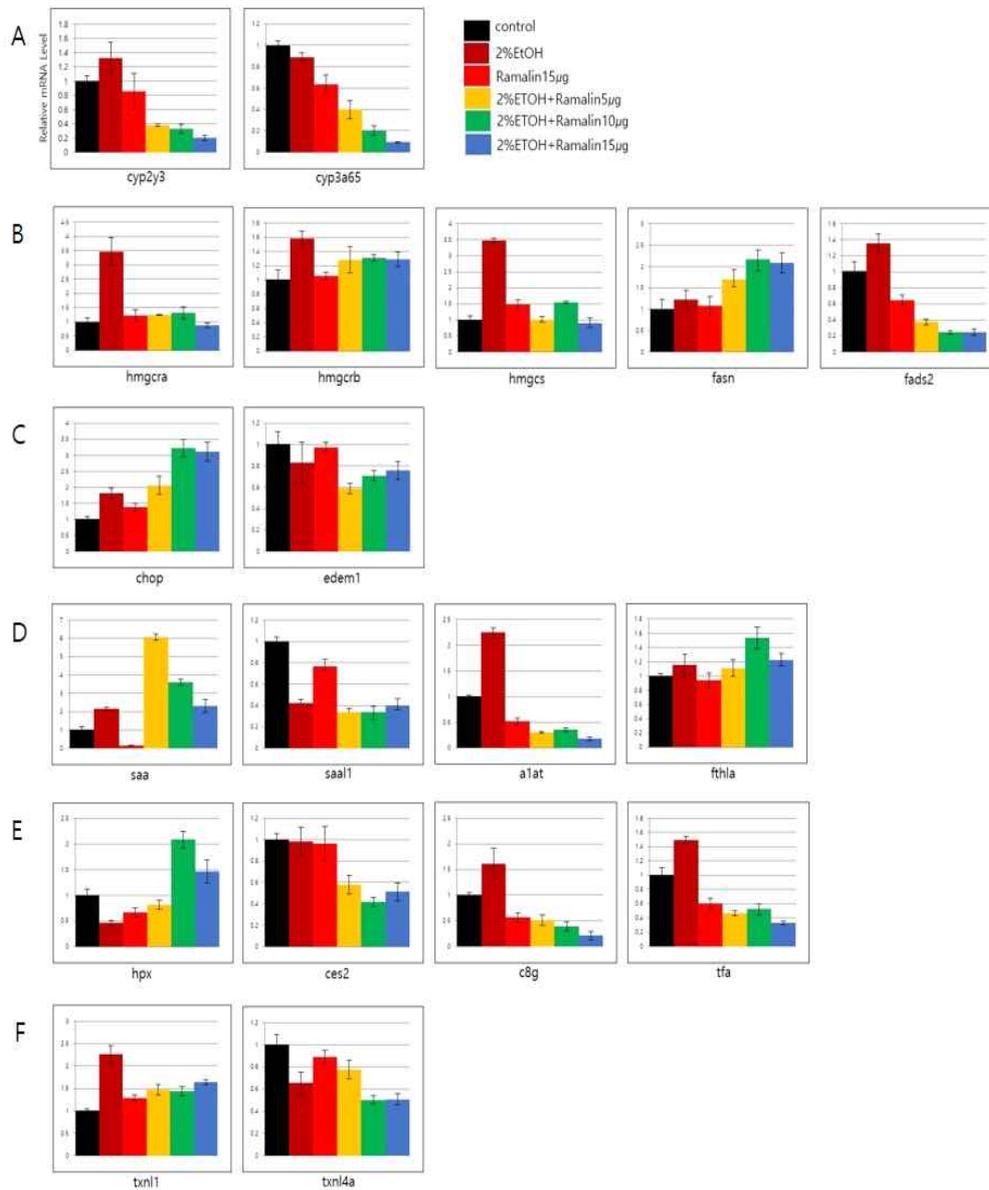


Fig. 3-15. The expression of genes was analyzed by qPCR. (A) alcohol metabolism, (B) lipid metabolism, (C) endoplasmic reticulum stress and DNA damage, (D) acute phase, (E) hepatic function, (F) thioredoxins

Table 3-7. ZFIN ID of Genes

No.	Gene	ZFIN ID	Remarks
1	SCD	ZDB-GENE-031106-3	GPScreen candidate group
2	PSMB2	ZDB-GENE-040718-353	GPScreen candidate group
3	EIF2S3	ZDB-TSCRIPT-090929-9760	GPScreen candidate group
4	SEC24A	ZDB-GENE-120926-1	GPScreen candidate group
5	SEC24B	ZDB-GENE-030131-656	GPScreen candidate group
6	CWC15	ZDB-GENE-040625-10	GPScreen candidate group
7	MSI1	ZDB-GENE-030131-4491	GPScreen candidate group
8	DAZAP1	ZDB-GENE-070212-1	GPScreen candidate group
9	MSI2	ZDB-GENE-070912-449	GPScreen candidate group
10	SUPT5H	ZDB-GENE-001207-1	GPScreen candidate group
11	PSMD1	ZDB-GENE-040426-810	GPScreen candidate group
12	LSM3	ZDB-GENE-161207-2	GPScreen candidate group
13	RBM39	ZDB-GENE-040426-2852	GPScreen candidate group
14	RPP21	ZDB-GENE-040801-37	GPScreen candidate group
15	EIF4E	ZDB-GENE-040413-1	GPScreen candidate group
16	EIF4E1B	ZDB-GENE-980526-127	GPScreen candidate group
17	YIF1A	ZDB-GENE-030131-6922	GPScreen candidate group
18	YIF1B	ZDB-GENE-041114-16	GPScreen candidate group
19	GCK	ZDB-GENE-060825-204	GPScreen candidate group
20	HK2	ZDB-GENE-040426-2017	GPScreen candidate group
21	HK1	ZDB-GENE-040426-2848	GPScreen candidate group
22	HSPE1	ZDB-GENE-000906-2	GPScreen candidate group
23	VPS16	ZDB-GENE-050809-9	GPScreen candidate group
24	PSMC2	ZDB-GENE-040426-1327	GPScreen candidate group
25	KDM5B	ZDB-GENE-030131-5379	GPScreen candidate group
26	KDM5C	ZDB-GENE-060810-94	GPScreen candidate group
27	KDM5A	ZDB-GENE-150114-1	GPScreen candidate group
28	SEC61G	ZDB-GENE-040718-203	GPScreen candidate group
29	PDCD11	ZDB-GENE-030131-4076	GPScreen candidate group
30	PGS1	ZDB-GENE-170216-1	GPScreen candidate group
31	ATP6V0D1	ZDB-GENE-030131-1531	GPScreen candidate group
32	PDPK1	ZDB-GENE-061013-109	GPScreen candidate group
33	PSMB1	ZDB-GENE-040618-2	GPScreen candidate group
34	VARS	ZDB-GENE-010601-1	GPScreen candidate group
35	YIPF5	ZDB-GENE-040426-1057	GPScreen candidate group
36	CDK7	ZDB-GENE-010320-2	GPScreen candidate group
37	TWISTNB	ZDB-GENE-041007-3	GPScreen candidate group
38	cyp2y3	ZDB-GENE-050522-490	Real-time PCR confirmation
39	hmgcra	ZDB-GENE-040401-2	Real-time PCR confirmation
40	hmgcrb	ZDB-GENE-051108-1	Real-time PCR confirmation
41	hmgcs	ZDB-GENE-040426-1042	Real-time PCR confirmation
42	fads2	ZDB-GENE-011212-1	Real-time PCR confirmation
43	a1at	ZDB-GENE-030131-1421	Real-time PCR confirmation
44	c8g	ZDB-GENE-040426-1898	Real-time PCR confirmation
45	tfa	ZDB-GENE-980526-35	Real-time PCR confirmation
46	txn1	ZDB-GENE-040426-701	Real-time PCR confirmation

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
	KEGG_PATHWAY	Butirosin and neomycin biosynthesis	RT		3	7.1	8.6E-5	3.0E-3
	KEGG_PATHWAY	Proteasome	RT		4	9.5	1.2E-3	2.0E-2
	KEGG_PATHWAY	Biosynthesis of antibiotics	RT		6	14.3	1.6E-3	1.9E-2
	KEGG_PATHWAY	Terpenoid backbone biosynthesis	RT		3	7.1	3.2E-3	2.7E-2
	KEGG_PATHWAY	Starch and sucrose metabolism	RT		3	7.1	6.6E-3	4.6E-2
	KEGG_PATHWAY	Galactose metabolism	RT		3	7.1	7.1E-3	4.0E-2
	KEGG_PATHWAY	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	RT		3	7.1	2.0E-2	9.4E-2
	KEGG_PATHWAY	Insulin signaling pathway	RT		4	9.5	2.8E-2	1.2E-1
	KEGG_PATHWAY	Glycolysis / Gluconeogenesis	RT		3	7.1	3.2E-2	1.2E-1
	KEGG_PATHWAY	Carbon metabolism	RT		3	7.1	8.4E-2	2.6E-1
	KEGG_PATHWAY	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	RT		2	4.8	8.9E-2	2.6E-1

Fig. 3-16. Identification of key gene pathways

라. 신경독성 시험(Neurotoxicity Assay)

(1) 발달과정에서 중추신경계와 뇌혈관장벽은 화학물질에 특히 취약하고 민감하다(Hill *et al.*, 2005). 이러한 화학물질에 의한 자극들은 알츠하이머병이나 파킨슨병과 같은 신경계 질병과 자폐 범주성 장애(autism spectrum disorders)와 같은 질환에 연관되어 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 개발하고자 하는 약물 후보 물질의 신경독성여부를 판단하고 독성을 나타내지 않는 사용 농도 범위를 제시해야만 추후 유효성 평가에 적용하여 약물 개발 가능여부를 판단할 수 있게 된다.

(2) 유전자(Transcripts, mRNA) 분석

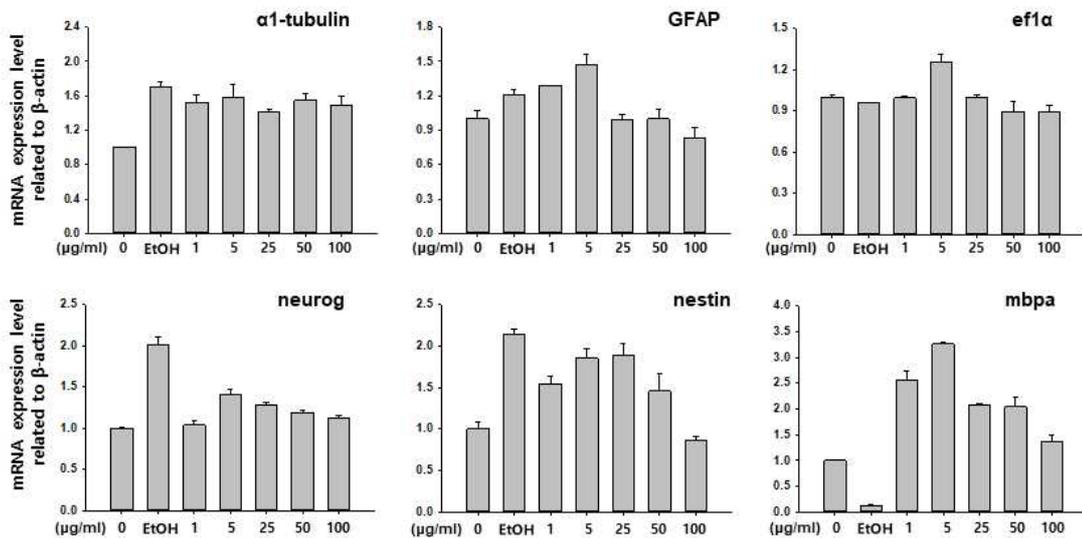
(가) 화학물질을 처리한 후 제브라피쉬의 유전자 패턴의 변화를 빠르고 민감하게 분석할 수 있는 방법으로 발달과 관련된 유전자를 정량적으로 분석할 수 있다. 이전 연구에 의해 다양한 신경계 발달 마커 유전자가 밝혀져 있으며(Fan *et al.*, 2010), 대상 유전자는 아래 표(Table 3-8)와 같다. 본 연구에서는 배아에 시료를 처리한 후 참고논문에서의 방법을 참고하여 타겟 유전자에 대한 발현 프로파일을 qRT-PCR 로 분석하였다.

(나) 이러한 유전자의 발현 분석은 각각의 화학물질이 신경계 발달에 어떤 영향을 주는가에 대한 정보를 제공한다. 신경독성 환경을 인위적으로 유발한 positive model 확립을 위해 신경독성 물질로 알려져 있는 Ethanol을 1%로 처리하였다. 본 연구에서는 극지 공생 미생물 추출물 4 가지(2017-Ant-55-1, 55-3, 55-6, 69-1)에 대해서 신경독성을 확인하였다(Fig. 3-17). 2017-Ant-55-3의 경우, 분석이 불가능한 결과를 얻어서 추가 확인 중에 있다.

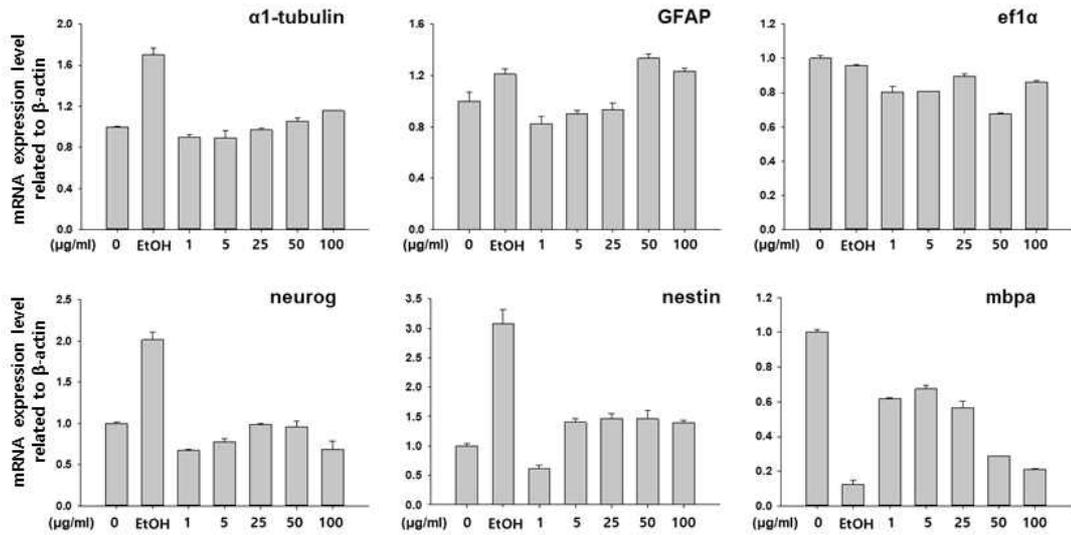
Table 3-8. Functions of maker proteins related to neurite development and expression profile change under neurotoxicity

마커 단백질 이름	신경계에서의 기능	신경독성 상태에서의 변화
α1-tubulin	신경세포의 axon과 dendrite를 발달 및 재생시킬 때 microtubule cytoskeleton 구조를 형성시키는 intermediate filament protein	증가
GFAP	중추신경계의 astrocytes와 radial glial cells에서 많이 발현되는 intermediate filament protein, astroglia의 마커 유전자	증가
nestin	동물 신경계가 발달할 때 neuronal progenitor cell이나 neuronal stem cell에서 광범위하게 발현되는 type IV intermediate filament protein의 한 종류, neural fate를 결정짓는 stem cells의 마커 유전자	증가
myelin basic protein (mbp)	제브라피쉬 중추신경계 발달 시 axon의 myelination에 필요한 단백질	감소
neurogenin 1 (ngn1)	제브라피쉬와 동물에서 발견되는 초기 신경계 마커 단백질, dorsal root ganglion와 같은 감각신경 발달에 필요한 단백질	증가
ef1a	Internal control gene, 단백질 합성 시 번역.신장 과정에서 사용되는 인자 (정상 상태에서는 일자에 관계없이 일정함)	유지

A. 2017-Ant-55-1 : *Cladosporium sp.*



B. 2017-Ant-55-6



C. 2017-Ant-69-1 : Fungal *sp.*

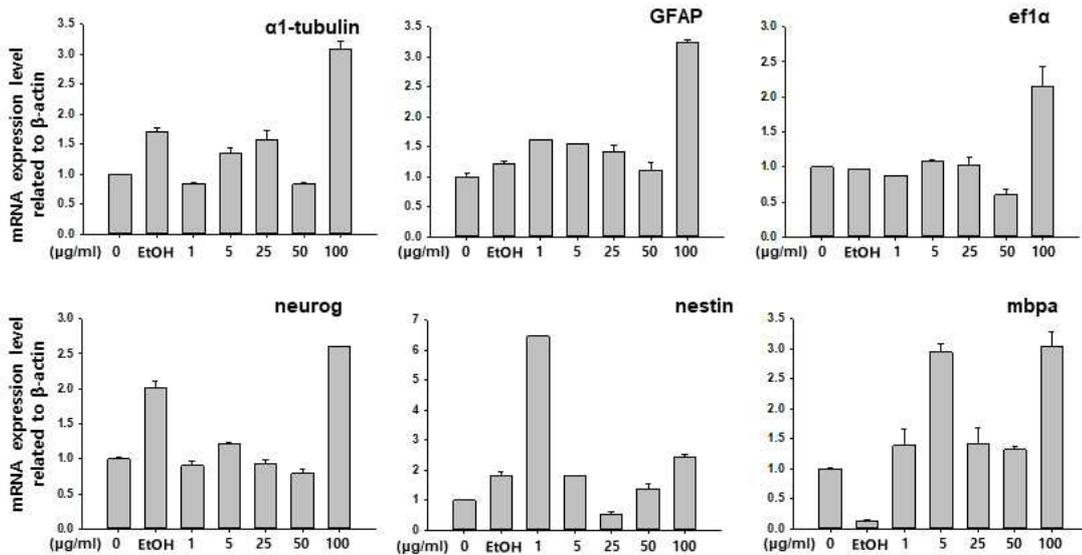


Fig. 3-17. RT-qPCR analysis of microorganisms extracts in neurotoxicity induction of zebrafish larvae

(다) 지난 연구로부터 후보 물질의 신경 독성을 평가하기 위한 목적으로 제브라피쉬 신경계 발달에 연관된 여러 가지 유전자에 대한 일시적인 전사 프로파일이 조사된 바 있다(Fan *et al.*, 2010). 많은 연구들을 통해 에탄올이 동물과 제브라피쉬 발달에 악영향을 미치는 화학물질이라는 것이 밝혀져 있으므로 본 연구에서

도 신경독성을 일으키는 positive control로 사용하였다. 에탄올을 처리하였을 때 모든 유전자가 균일하게 감소하거나 활성화되지 않았으며, 구체적으로는 α -1-tubulin, GFAP, neurogenin, nestin의 발현 수준은 증가하였으며, mbpa의 발현 수준은 감소하였다. 평가 물질 중 특히 2017-Ant-55-6은 물질의 농도에 의존적으로 발현수준의 변화를 확인할 수 있었다. 이 물질은 25 ~ 50 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리된 larvae에서 mbpa를 제외한 5 가지 유전자의 발현률이 정상(아무것도 처리하지 않은 larvae)과 같은 수준을 유지하였으며 점차 증가되거나 감소되었다. 다른 물질의 처리군들은 비록 농도에 비례하여 일정하게 변화하지는 않았지만 물질처리군 전체적으로 정상군과 같은 수준을 유지하거나 에탄올 처리군과 같은 양상을 나타내기도 하였다. 본 연구결과는 하여 해당 물질들의 추후 효능평가에 있어서 효능 평가 농도범위를 결정하는 참고자료로 유용하게 사용될 수 있다.

제 2 절 질환모델동물을 이용한 후보물질 효능 검증

1. 연구개요

염증성 질환을 예방하거나 치료할 수 있는 약물을 개발하는 데에 매우 유용한 염증성 질환용 제브라피쉬 모델 및 이를 이용한 항염증제의 스크리닝을 통해 후보물질을 선별이 필요하다. 제브라피쉬는 척추동물에 속하며 사람과 유전자가 70% 이상 동일하여 포유동물의 면역시스템과 매우 흡사한 선천성 및 후천성 면역 시스템이 잘 개발된 동물로써, 발생 시 제브라피쉬 배아는 외부로 발생되며 광학적으로 투명하다. 이러한 특징으로 인해 제브라피쉬는 다양한 연구를 위하여 유용한 동물 모델로서 사용되고 있다. 한편, 다양한 염증성 질환의 치료제로는 프레드니솔론과 같은 스테로이드에 의한 염증 억제제, 나프록센과 같은 비스테로이드성 항염 치료제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs; NSAID) 및 사이클로스포린이나 FK506과 같이 칼슘 및 칼모듈린 의존성 단백질인산화 효소인 칼시뉴린(calcineurin)에 결합하여 그 작용을 억제하는 면역억제제가 가장 많이 사용되어 왔다. 그러나 이러한 스테로이드를 비롯한 면역억제제들은 신독성, 감염, 임파종, 당뇨병, 진전(tremor), 두통, 설사, 고혈압, 오심, 신기능 장애 등의 부작용이 따르게 된다. 따라서 효능이 좋으면서도 부작용이 적은 항염증제 개발을 위해 질환모델동물을 활용한

스크리닝 방법의 개발을 통해 심화된 후보물질 선별이 절실히 필요하다. 제브라피쉬의 동물모델을 사용함으로써의 장점으로는 마우스에 비해 많은 수의 개체수를 유지하기 쉬우며, 통계적인 자료를 만들기 쉬어 재현성이 뛰어나 높은 실험 효율을 나타낸다. 또한 배아가 투명하여 *in vivo* 상에서의 기관발생을 관찰하기 쉬우며, 쉽게 광학상의 스크리닝이 가능하다. 이외에도 제브라피쉬 배아는 약 5 mm로 작아서 96 well plate와 같은 작은 사이즈의 공간으로도 가능하기 때문에 물질을 최소한으로 사용하여 저렴한 경비로 많은 수의 화합물들을 확인할 수 있는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서 6 종의 남극 지의류로부터 얻은 추출물의 발생독성 및 안정성을 평가하고자 *in vivo* 모델로서 제브라피쉬를 사용하였다.

염증과정은 다량의 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등 염증 인자가 Nitric Oxide Synthase (NOS) 및 cyclooxygenase (COX)에 의해 형성된다. NO는 혈압조절 및 응고, 면역기능 등의 역할을 하며 NOS에 의해 형성되는데 NOS는 constitutive form (cNOS)과 inducible form (iNOS)로 나뉜다(Crane *et al.*, 1998; Garthwaite, 2010; Isenberg *et al.*, 2003, 2006). cNOS는 정상적인 체내 생리기능을 담당하는 반면 iNOS는 다양한 조직에서 염증 유발 물질인 lipopolysaccharide (LPS), 염증성 cytokine인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), interferon- γ (IFN- γ) 등에 유도돼 많은 양의 NO를 생성하고 세포독성이나 조직 손상과 같은 인체에 유해한 작용을 나타낸다고 보고되었다(Forstermann & Sessa, 2012). 뿐만 아니라 NO가 염증반응의 원인이 되거나 COX의 활성을 촉진시켜서 prostaglandin의 합성을 촉진하고 염증반응을 심화시킨다고 알려져 있다(Lee, 2014). PGE₂는 염증 반응의 매개체로서 역할을 하며 대식세포에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 등의 염증성 cytokine 생성을 억제하는 면역 반응의 조절자 역할을 한다는 것이 많은 연구를 통해 입증되었다(Harris *et al.*, 2002). PGE₂의 합성은 phospholipid A₂의 효소작용을 통해 arachidonic acid가 생성되고 이 arachidonic acid는 효소에 의해서 prostaglandin G₂, 그리고 다시 prostaglandin H₂가 되는데 COX에 의해 촉진되는 과정이다. COX의 isoenzyme 중에서 COX-1은 혈소판 응집, 위점막 보호 등 생리적 기능을 담당하며 COX-2는 염증 등 자극에 의해서 발현되고 COX-2로 인해 만들어진 prostaglandin이 염증 반응에 관여한다고 보고되어 왔다(Turini *et al.*, 2002).

척추동물인 제브라피쉬는 최근 표현형 기반 신약개발 연구에 크게 공헌하고 있다. 제브라피쉬를 활용한 질병 기반의 표현형 연구는 다중 표적을 가진 약물후보물질의 경우에 효능을 쉽게 규명할 수 있는 장점이 있으므로 약물 표적에 대한 구체적 정보가 없

을 시 초기 스크리닝 하기에 적합하여 신약개발에 소요되는 시간과 비용을 효과적으로 절감할 수 있다. 본 연구에서는 염증, 간질환, 산화스트레스, 치매 모델을 만들고 이를 검증하여 추후 남북극 유래 소재들의 효능검증을 수행할 수 있도록 준비 하였으며, 그 중 염증모델에 세포 실험을 통해 기 검증된 항염 효능 물질을 적용하여 후보물질의 항염 효능에 대한 추가 검증을 진행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 질환모델동물을 활용한 신규 후보물질 효능 검증

(1) 항염증 활성물질의 효능 검증

(가) 항염증 활성물질 선별

- ① 2017년도 남극 세종과학기지에서 채집한 지의류 66종 중 항염증 분야 등에서 다양한 선도물질 및 후보물질을 개발하기 위하여 *in vitro* 활성 평가를 통해 예비 후보물질을 선별하였다(Fig. 3-18). 선별 기준으로는 추출물 내 독성물질 포함 여부확인을 위한 시료 농도별 세포 독성 분석과 nitric oxide 생성량을 억제시키는 항염증 활성을 지닌 추출물을 선별하였다.

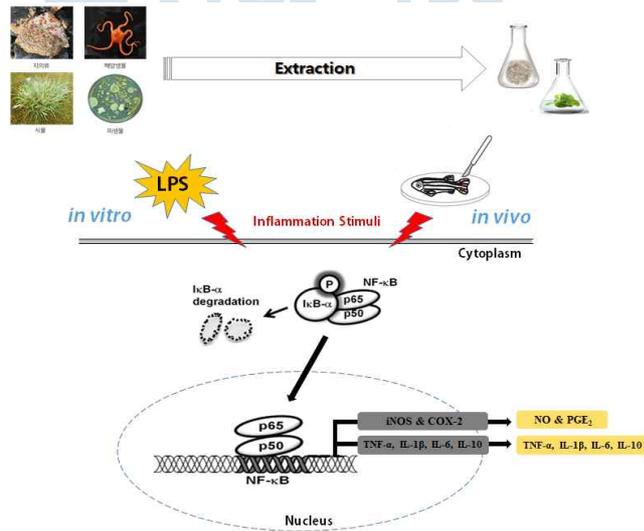


Fig. 3-18. Inflammatory regulation pathway in *in vitro* and *in vivo*

- ② 그 중 9종의 항염증 후보물질을 선별하였으며, 각 추출물에 포함되어 있는 항염증효능 물질의 작용기전을 확인하기 위해 다양한 염증반응 관련인자의 전사

체 및 단백질 수준에서의 발현량을 분석 후 결과 도출하여 최종적으로 6종을 선별하였다(Fig. 3-19). 선별된 6종에 대한 약효 평가를 *in vivo* 상태에서 실험하여 항염제로서의 가치가 있는지 확인하기 위해 제브라피쉬의 염증 질환모델을 제작하여 분석하였다.

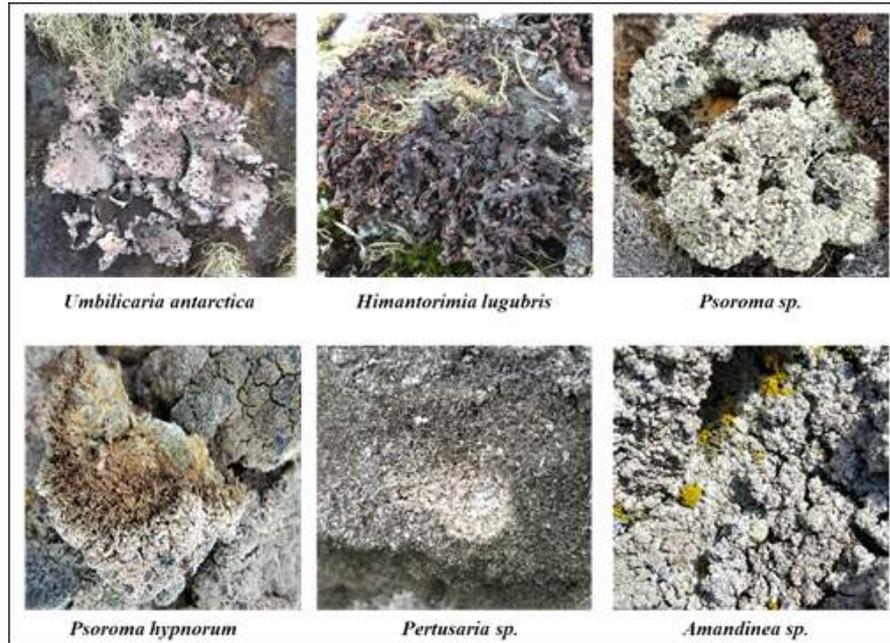


Fig. 3-19. Antarctic lichen 6 species with anti-inflammatory activative

(나) 항염증 후보물질 독성평가

제브라피쉬 larvae 독성 평가는 수정 후 약 4 dpf 일 때 24 well plate의 각 well에 1 mL의 embryo media를 포함하여 한 군당 10 마리씩 3반복으로 총 30 개체를 사용하였다. 남극 지의류 6 종의 추출물로부터 5, 10, 25, 50 그리고 100 ug/mL의 농도를 선택하여 각각의 well에 남극 지의류 추출물을 첨가하였으며 24시간 노출시켜 현미경으로 관찰하였다.

(다) 염증 유발 실험동물 확보

조직이 손상되면 염증이 일어나므로 제브라피쉬의 꼬리를 절단하여 염증을 유도하였다(Fig. 3-20). 수정 후 96 hpf의 larvae를 48 well plate에 0.5 × E2 embryo media 0.5 mL을 포함하여 한 군당 5 마리씩 4반복하였다. Larvae의 꼬리절단이 염증을 유발하였는지 확인하기 위하여 실시간 역전사

중합효소 연쇄반응(Real-time Reverse Transcription-PCR, Real-time RT-PCR)을 수행하여 mRNA 수준에서의 유전자 발현을 분석하였다. 염증과 관련된 유전인자로는 nitric oxide (NO) 생성 촉매효소인 inducible nitric oxide synthase (iNOS), 염증자극에 의해 발현 및 염증 조절인자 PGE₂를 생성하는 cyclooxygenase-2 (COX-2), 전염증성 사이토카인인 interleukin-6 (IL-6), IL-10, IL-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 primer를 제작하여 대조군과 비교 분석하였다(Table 3-9).

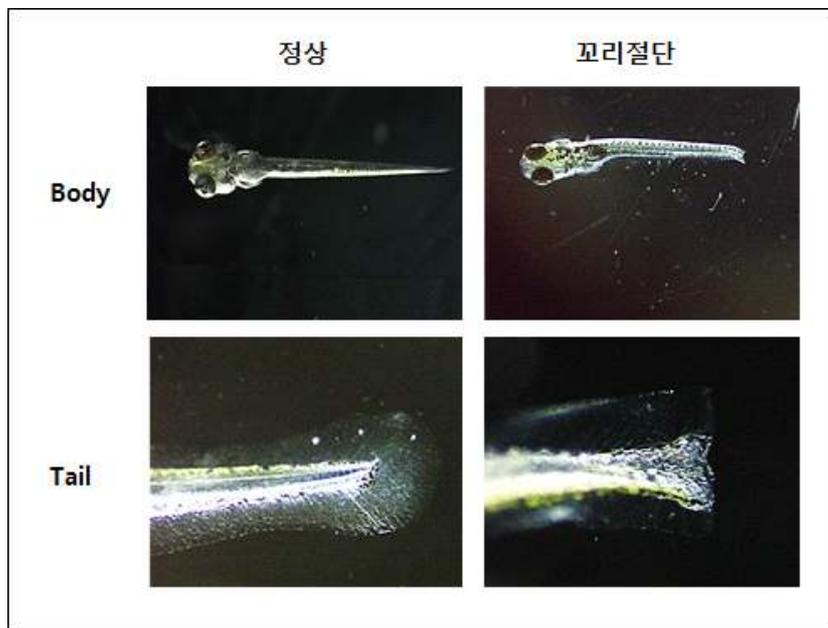


Fig. 3-20. Inflammatory responses induced by tail cut of zebrafish fry

Table 3-9. Primer list for real-time RT-PCR analysis

Genename	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	size
iNOS	CTGCGGTGGAATGAACATGG	TCTCCAGCTTCTACCTCGCTC	93
COX-2	GCTGCTTTGGTGGACTTACAG	TCAGAGGAGGGCTATTGTCAG	100
TNF- α	TCTCAGGGCAAGAAATCGA C	TCTCACTGCAATCGGCTTTGT	90
IL-6	TGAAGGGGTCAGGATCAGCA	CACGTCAGGACGCTGTAGAIT	108
IL-1 β	GCACGGCTAATCAGAGATGGT	CCAAGAATAAGCAGCACTTGG G	133
IL-10	TAGGATGTTGCTGGGTTGGAC	TAGTGTGATGGATGGACGGG	148
β -actin	GCCACCTTAAATGGCTAGCA	GCCATACAGAGCAGAAGCCA	99
rpl13	GAAGTACCAGGCCATCACC	TCAGCCTGCTTAGTCAGCTTC	105

(2) 형광단백질 삽입 형질전환 모델을 이용한 항염 효능 검증

(가) PCR 기술을 활용한 형질전환체 유전자형 확인

- ① 성체 제브라피쉬를 0.4 % tricaine에 넣고 단 시간 마취를 한 후 꼬리 지느러미를 잘라서 전체 유전체를 획득하기 위해 활용하였다. Tube에 각 꼬리 지느러미 샘플을 넣은 후 500 μ l의 CTAB buffer를 넣고 Disposable homogenizer (#890863)을 이용하여 조직을 최대한 곱게 갈아주었다. 그 후 60°C에서 30 분간 incubation 한 뒤 5 분 동안 원심분리(14,000 rpm, 4°C)를 해 주었고 상등액을 새로운 튜브로 옮겨준 후 RNase solution (100 mg/ml)을 5 μ l 넣어주었다.
- ② 혼합액이 들어있는 튜브는 32°C에서 20 분간 incubation을 해 주고 500 μ l의 chloroform : isoamly alcohol (24:1)을 넣은 후 vortexing 5 초, 원심분리 1 분 (14,000 rpm, 4°C)를 해 주었다. 결과물에서 투명한 상층액만을 조심스럽게 건어서 새로운 튜브에 옮기고 70% volume의 차가운 isopropanol을 넣은 뒤 20°C에서 15 분간 incubation 해 주었다. 이것을 10 분간 원심분리 (14,000 rpm, 4°C) 하고 상등액을 버린 후 차가운 70% EtOH을 500 μ l 넣어서 washing한다. 마지막으로 원심분리 (14,000 rpm, 4°C)를 5 분 한 후 상등액 모두 건어내고 pellet 만 남겨 상온에서 말린다. pellet이 완전히 마른 후 DEPC treated water 를 30 μ l 씩 넣고 잘 녹여주어 Nanodrop으로 농도를 측정한다. 이렇게 획득된 gDNA는 Primers (Table 3-10), 각종 효소들과 혼합되었으며 재료의 설명서를 참고하여 PCR을 수행하였다. PCR이 완료된 후의 PCR Product의 확인은 1.5% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

Table 3-10. Primers list for genotype analysis of transgenic zebrafish with fluorescent protein

Gene	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Product size (bp)
Dendra 2	CAACCTGACCGTGAAGGAGG	TCCTCGGGTACTTGGTGAA	249
mCherry	CCGACATCCCCGACTACTTG	GCGCAGCTTCACCTTGTAGA	146

(나) 제브라피쉬 수정란 획득 및 유생 준비

본 실험에는 야생형이 아닌 형질전환형 제브라피쉬 (Mpeg:dendra2, Mpx:mCherry)를 사용하였으며, 위와 동일한 방법으로 성체 제브라피쉬를 사

육하여 실험에 필요한 알을 마련하였다. 알을 획득한 후 3 일간 배양기에서 유지하고 알을 깨고 나온 유생을 현미경으로 관찰하여 형광현미경을 발현하는 개체를 구분해 내었다. 실험은 형광 단백질이 발현되는 형질전환체만을 사용하여 진행하였다.

(다) 약물 처리

3 dpf의 유생을 12 well plate에 well당 10 마리씩 넣고 아래의 표에 맞게 시료를 처리하였다. 시료처리를 먼저 1 시간 동안 한 후, Macrophage 관찰을 위해서는 40 μ M CuSO₄를 24 시간 동안 처리하였고, Neutrophil 관찰을 위해서는 25 μ M CuSO₄를 1 시간 동안 처리하였다.

(라) 현미경 관찰

현미경 관찰 시 움직임이 없도록 하기 위해 0.4%의 Tricaine으로 단 시간 마취시켰으며, green과 red에 적합한 필터를 사용하여 neuromast 형광 세포와 myoseptum의 형광 세포를 관찰하여 그 수를 직접 세었다.

(3) CRISPR/Cas9 원리를 이용한 유전자 변이모델 개발

(가) sgRNA 제작 : Self-annealing PCR 수행

T7 *in vitro* transcription을 위한 이중가닥 주형 template를 만들기 위하여 self-annealing PCR을 수행하였다. Target sequence를 포함하고 있는 forward primer와 universal reverse primer를 혼합하여 PCR을 하였으며 조건은 initial denaturation을 위해 98°C 30 초, 1 cycle을 98°C 10초, 60 °C 30 초, 72 °C 15 초로 하여 40 cycles을 돌렸고 final elongation을 72 °C 10 분으로 하였다. PCR이 종료되고 난 후의 PCR 산물은 PCR purification kit (Cosmogenetech, Korea)를 사용하여 정제하였고 결과물의 농도는 Nanodrop machine을 이용하여 측정 하였다.

(나) sgRNA 제작 : T7 *in vitro* transcription 및 RNA purification

Self-annealing 기법으로 제작된 PCR 산물을 주형가닥으로 하여 T7 *in vitro* transcription를 수행하였다. T7 polymerase가 T7 promoter 부분에 붙은 후 전사를 진행하여 target gene (Albino)의 서열을 포함하는 RNA 가닥이 생성되었고, 반응이 종료된 후 정제 과정을 통해 결과물 중 sgRNA만을 순수하게 획득하였다. 반응 수행을 위한 mixture 조성, 반응 시간 및 조건은 Table 3-12과 같다.



Fig. 3-21. Information and method of sgRNA production targeting for Albino gene. (A) Forward primer sequence, (B) Universal Reverse primer sequence and PCR product, (C) PCR product confirmation

Table 3-11. Primer sequences for self-annealing PCR

Gene	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
Universal Reverse	-	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTT TCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATT TTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC
Albino (Exon 6 targeted)	GAAATTAATACGACTCACTATAGGTTTG GGAACCGGTCTGATGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	-
slc30a10 (Exon 1 targeted)	GAAATTAATACGACTCACTATAACATCC TGTCGCTGTGCGTCGGGGTTTTAGAGC TAGAAATAGC	-
abcb11b (Exon 2 targeted)	GAAATTAATACGACTCACTATAAGTCA GGTTTCTCCACTGTATGGGTTTTAGAGC TAGAAATAGC	-

Table 3-12. T7 *in vitro* transcription mixture

Step	반응물 조성 및 재료	반응 조건
I	10× T7 Reaction buffer ATP, CTP, GTP, UTP solution Template DNA (PCR product) T7 polymerase / water (up to 20 µl)	37 °C, 8 시간
II	Step I + DNase I	37 °C, 15 분

(다) Needle 제작

1 ~ 2 pl/egg로 주입하기 위하여 needle puller를 사용해서 내경 1 mm의 미세유리관(Cat. No. TW100-4)으로 바늘을 제작하였다. needle puller의 작동 조건은 열 90, 시간 10 초, 압력 50으로 고정하였으며 injection 직전에 끝부분을 미세핀셋으로 절단하여 구멍을 낸 뒤 사용하였다.

(라) Zebrafish egg 확보

암컷과 수컷을 분리시킨 후 28 °C의 물이 순환되는 장치에서 14 시간 빛을 주고, 10 시간 빛을 차단하는 일정한 주기로 사육하였으며, 일주일 이상 분리 사육이 된 제브라피쉬는 mating cage에 암컷 1 ~ 2 마리, 수컷 1 ~ 2 마리를 구분하여 넣어주고 다음 날 오전에 빛을 쬐고 동시에 가림막을 제거하여 암컷과 수컷이 만나 교배를 하도록 하였다. 약 30분 후 수정된 알을 획득하여 embryo medium으로 씻어내었다.

(마) Injection mold 제작 및 미세주입

- ① 주입을 위한 고정 틀에 1.5 % agarose를 부은 뒤 굳혀서 알을 정렬하고 고정할 수 있는 틀을 만들었다. 받아놓은 알 들을 스포이드로 옮겨 틀 위에 올려놓고 틈새에 끼어 고정될 수 있도록 약간의 압력을 가하였다.
- ② 알들이 고정된 injection mold를 실체현미경의 채물대에 올려놓고 미세주입기를 알에 맞춰서 위치를 고정시켰다. 미세주입기의 위치조절 레버를 돌려서 바늘이 알에 접근하고 뚫고 들어가 세포에 닿을 수 있게 하였으며 Pneumatic PicoPump (PV820)을 Injection pressure 25~30 psi, balance pressure ~0.5 psi, injection time 400 msec, injection volume 1~2 nl의 조건으로 압을 조절하여 내용물이 주입될 수 있도록 하였다. 내용물은 0.5× Phenol red, sgRNA 200 ~ 400 ng/μl, Cas9 2,000 ng/μl로 구성되어 있으며 추후 검증을 통하여 유전자 결여 반응이 없을 경우 Cas9의 농도는 고정하고 sgRNA의 농도를 조절하여 efficiency를 조절하고자 하였다.

(바) 유전체 획득 및 절단부위를 Product 내에 포함하는 PCR 수행

PCR product 내에 유전자 편집 부위가 포함되도록 하며 T7E1 assay를 수행하였을 때 잘린 두 개의 결과물의 크기에 차이가 있도록 Primer를 디자인 하였다(Fig. 3-22). sgRNA와 Cas9 이 주입된 배아를 튜브당 2 마리씩 넣고 CTAB buffer 추출법

으로 DNA를 획득한 후 위의 디자인된 Primer를 사용하여 해당 부분의 PCR을 수행하였다.

Table 3-13. Primer sequences for T7E1 assay

Gene	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Product size (bp)
Albino	CCCATTGACACCGTAAACTGAC	TTAGCACTGGAAGACGTGTGT	409
slc30a10	CATCCATGCGCGGAAAAGT	GCTGATGGAGAAGCAGAGCG	429
abcb11b	TTTGGGAGTTTGTGTGCGATTG	AAGCGCTGGATGAAGATTCCC	488

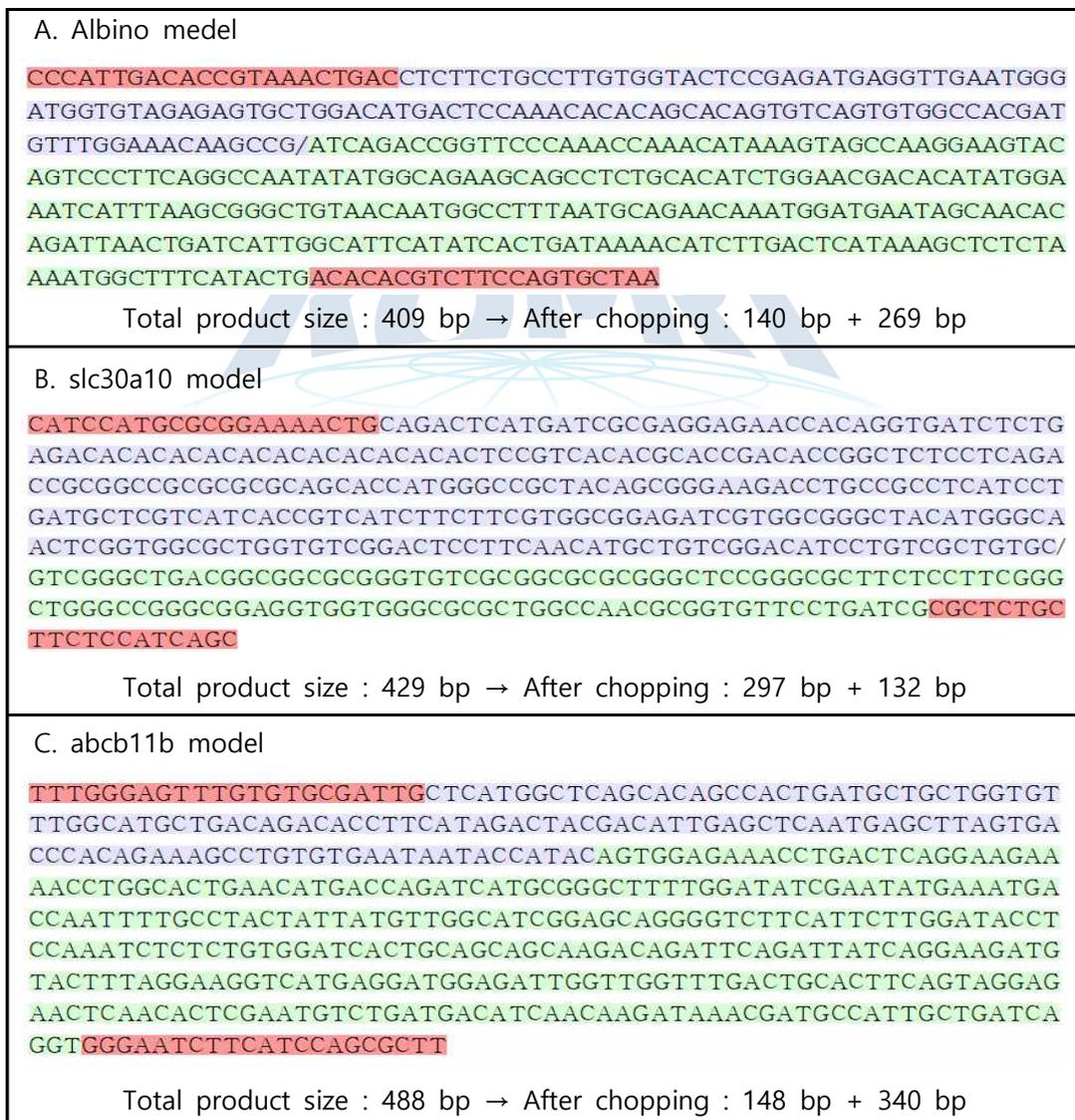


Fig. 3-22. Primer sequences and PCR products for T7E1 assay after sgRNA injection. (A) Albino medel, (B) slc30a10 model and (C) abcb11b model. Red letters: Primer sequences

(사) T7E1 assay 수행

위의 PCR 과정으로부터 획득된 PCR product 내에 유전자 결여가 발생하였는지 확인하기 위하여 Product 들을 denaturation과 renaturation을 하면서 T7 Endonuclease I에 의한 절단이 발생하는지 확인하였다. denaturation을 위해서는 PCR product 10 μ l, 10 \times NEB buffer 2 μ l, water 8 μ l를 한 튜브에 넣고 다음의 단계로 열을 가하였다. 95°C : 5 min, 95 \rightarrow 85°C : 2°C/s, 85 \rightarrow 25°C : 0.1°C/s. 이 중 10 μ l에 1 μ l 의 T7 Endonuclease를 넣고 37 °C에서 15 분간 incubation 하였다. 결과물은 1.5% agarose gel 에 전기영동하여 확인하였다.

(4) 유생 제브라피쉬 산화스트레스 모델 준비

(가) 약물처리

Mating cage에 암수를 구별하여 하루 간 둔 후 가림막을 제거하고 알을 획득하였다. 이 중 온전히 수정된 알들을 골라내었고 8 hpf가 되었을 때 LPS를 처리하고 16 시간 후에 실험을 종료하였다.

(나) DCF-DA 처리 후 관찰

LPS로 인하여 배아 내에 형성된 ROS의 양을 정성적으로 확인하기 위하여 5 μ M의 DCF-DA FM을 처리하였으며 28°C로 유지되는 incubator 내에서 어둡게 하여 1 시간 가량 두었다. 처리가 종료된 후 Fresh embryo medium으로 3 번 씻어내 주었으며 알 껍질을 제거한 후 배아를 슬라이드 글라스에 올려 현미경으로 형광물질을 관찰하였다.

(5) 성체 제브라피쉬 치매 모델 준비

(가) Okadaic acid (OKA) 처리

야생형의 성체 수컷 제브라피쉬를 사용하였으며, 그룹 당 2 마리로 진행하였다. LC laboratoies로부터 구매한 OKA는 95% alcohol 에 녹였으며 이것을 최종농도 0, 50, 100, 200 nM이 되도록 200 ml의 배양수에 희석하여 준비하였다. 이 때 각 그룹 당 처리된 95% alcohol의 총량은 동일하게 하였다. 물은 2 일에 한 번씩 교체 해주었으며 9 일이 되는 날에 처리를 종료하였다.

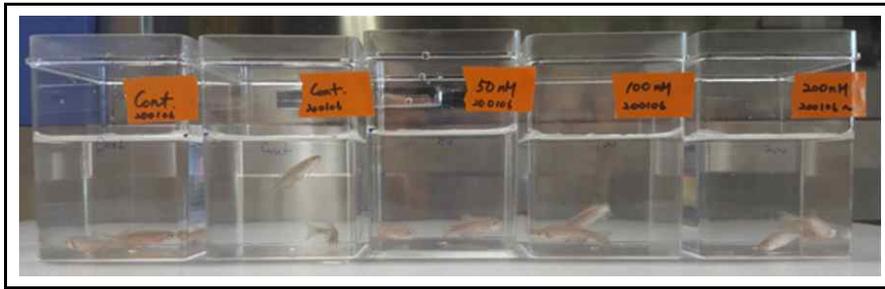


Fig. 3-23. Okadaic acid treatment for developing Alzheimer's disease

(나) 뇌수 적출 및 단백질 추출

OKA 처리가 종료된 제브라피쉬를 0.4% tricaine에 마취한 뒤 뇌수를 적출해 내었다. 적출한 뇌는 조직용해버퍼(T-Per)를 100 μ l씩 가하였고, Disposable homogenizer (#890863)로 조직을 곱게 갈아주었다. 용해액을 30분간 냉장 상태(4 $^{\circ}$ C)로 보관 한 후 30 분간 원심분리(10,000 g, 4 $^{\circ}$ C)해 주었다. 상등액을 새로운 튜브로 옮겨준 뒤 BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific, USA)를 수행하여 단백질 농도를 측정하였다. 농도에 맞게 5 \times protein sample buffer와 혼합한 뒤 100 $^{\circ}$ C로 5 분간 끓여 최종적으로 샘플준비를 완료하였다.

(다) SDS-PAGE 및 western blot

12% acrylamide gel을 만들고 위에서 준비한 단백질 샘플을 전기영동 하여 SDS-PAGE를 완료하였으며, gel에 있는 단백질들을 PVDF membrane으로 옮겼다. Membrane을 상온에서 5% skim milk를 희석한 TBST (Tris Buffered Saline with Tween; 25 mM Tris, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.05% Tween-20, pH 8.0)에 1시간 동안 처리하여 blocking하였다. 그 후 1차 항체를 앞의 blocking buffer에 희석하여 (1:1000) 4 $^{\circ}$ C에서 overnight으로 처리하였고, TBST로 10 분간 3 회 세척한 후 blocking buffer에 HRP-conjugated 2차 항체를 희석한 것을 1 시간 동안 상온에서 처리하였다. Membrane을 마지막으로 TBST로 10 분간 3 회 세척한 후 ECL solution을 가하여 항체가 붙은 부분을 활성화 시켰으며 Chemidoc (BIORAD, USA)으로 membrane의 해당 부분을 촬영하였다. 밴드 이미지는 image J로 정량화 하였다.

나. 실험동물을 활용한 극지 미생물 유래 생리활성 물질 탐색

(1) 배양수에 희석하여 질병유사반응 유도 후 약물효능평가

(가) 교배 및 egg 확보

28 °C의 물이 순환되는 장치에서 빛을 14 시간 주고 10 시간 차단하는 일정한 주기로 암컷과 수컷을 분리하여 1 주일 이상 사육한 후, mating cage에 암컷 1 ~ 2마리, 수컷 1 ~ 2 마리를 구분하여 넣어 주었다. 다음 날 오전에 빛을 줌과 동시에 가림막을 제거하여 암컷과 수컷이 만나 교배를 하도록 하였으며 약 30분 후 수정된 알을 획득하여 embryo medium으로 씻어내었다.

(나) LPS 농도 결정

적절한 수준의 LPS의 농도를 결정하기 위하여 LPS를 다양한 농도로 처리하여 발달 정도를 비교해 보았다. 12 well plate에 well 당 2 ml로 하여 0, 1, 2, 5, 10 µg/ml의 LPS를 처리하여 8 hpf를 10마리 넣고 16 시간 후 처리를 종료하였다. 0.4 %의 tricaine으로 알을 옮긴 뒤 알 껍질을 제거하여 배아를 꺼내어 whole body shape의 변화를 실체현미경으로 확인하였다.

(다) 약물처리

제브라피쉬 배아를 12 well plate에 8 embryo/well씩 넣고 fresh fish water를 2 ml로 맞춰 주었다. 8 hpf가 되었을 때 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10번 시료를 3 가지 농도 (5, 10, 20 µg/ml)로 구분하여 1 시간 동안 처리하였다. 그 후 4 µg/ml의 LPS를 16 시간 동안 처리하고 실험을 종료하였다(Fig. 3-24). 비교 관찰을 위하여 항염 약물인 dexamethasone을 2 µM, 5 µM로 처리한 Positive control 그룹을 추가하였다.

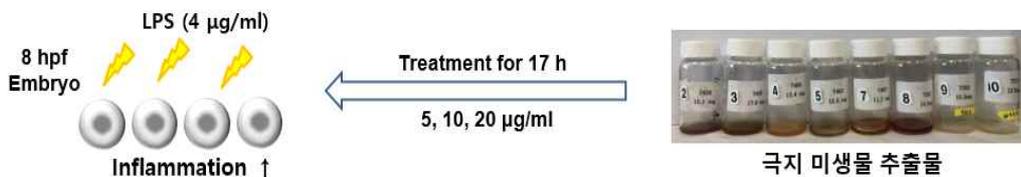


Fig. 3-24. Experiment method for anti-inflammatory effect analysis of polar microorganisms extracts after inflammation response induction in zebrafish egg

(라) 현미경 관찰

제브라피쉬 배아의 발달정도를 확인하기 위하여 알 껍질을 제거하고 배아

의 whole body shape을 실체현미경으로 관찰하고 촬영하였다. 움직임을 억제하기 위하여 0.4 % tricaine에서 작업하였고, 8 마리 중 대표적으로 보이는 4 마리씩을 선별하여 한 장의 사진에 담기도록 하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 항염증 후보물질의 독성 및 효능 검증

(1) 항염증 후보물질 독성평가

남극 지의류 *Pertusaria sp.* 추출물을 제외한 나머지 남극 지의류 추출물 *Umbilicaria Antarctica*, *Himantorimia lugubris*, *Psoroma sp.*, *Psoroma hypnorum*, *Amandinea sp.*의 농도에 따라 노출시킨 zebrafish larvae는 대조군 DMSO와 비교하였을 때 생존율이 100 %를 나타내어 유의적인 차이를 보이지 않아 독성이 없다고 판단하였다. 그러나 지의류 *Pertusaria sp.* 추출물을 24시간 처리하였을 때의 생존율 변화를 측정한 결과 10 µg/mL 이하의 농도에서는 80% 이상의 생존율을 보였으나 25 µg/mL 이상의 농도에서 대조군과 비교하였을 때 20% 이하의 생존율을 보임으로써 독성이 있다고 판단되어 남극 지의류 *Pertusaria sp.* 추출물은 제외하여 실험을 진행하였다(Fig. 3-25).

(2) 항염증 유발 zebrafish 이용한 항염증 측정

(가) Zebrafish larvae의 꼬리절단 후 대조군과 비교 분석하였을 때 염증 유전인자인 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β 가 증가하는 것을 확인하였고 이로써 염증이 유발되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 3-26). 이를 활용하여 남극 지의류 추출물 6 종에 대해서 항염증 활성을 측정하였다.

(나) 꼬리 절단으로 염증이 유발된 제브라피쉬를 이용하여 이미 항염증제로 사용되고 있는 텍사메타손을 사용하여 항염증 활성을 측정할 수 있는지 확인하였다. 수정 후 96 hpf의 larvae를 48 well plate에 0.5 × E2 embryo media 0.5 mL을 포함하여 한 군당 5마리씩 4반복하였다. 물질 독성평가에서 독성을 보이지 않았던 남극 지의류 5종의 추출물에 대해 25 그리고 50 µg/mL의 두 농도와 텍사메타손 100 µM을 24시간 처리하였다. 이 후 zebrafish larvae를 DEPC-DW로 2번 씻고 DEPC-DW를 완전히 제거하자마자 TRIzol을 이용한 추출방법으로 RNA를 확보하였다(Fig. 3-27). 추출된 RNA는 cDNA 합성 kit (M-MLV reverse

transcriptase)를 사용하여 1 µg의 RNA로 상보적 DNA (Complementary DNA, cDNA)를 합성하였다. SYBR Green (TOP realTM qPCR 2×PreMix)을 사용하여 3 번의 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(Real-time RT-PCR)을 수행하였고 45 cycles의 cDNA를 증폭시켰다. PCR 반응의 특이성은 melting curve 분석으로 확인하였다.

- (다) 남극 지의류 5종인 *Umbilicaria Antarctica*, *Himantorimia lugubris*, *Psoroma sp.*, *Psoroma hypnorum*, *Amandinea sp.*의 항염증 기전을 확인하기 위해 염증 반응에 대한 민감 지표가 되는 iNOS, COX-2, TNF-α, IL-1β, IL-6 및 IL-10에 대해 분석하였다. Real-time RT-PCR을 진행한 결과 꼬리절단으로 염증을 유발한 균에서는 꼬리를 절단하지 않은 대조군에 비해 유의적으로 염증 관련인자들이 증가하였다. 그러나 *Umbilicaria Antarctica*와 텍사메타손은 염증 유발된 상태에서 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인하여 염증 반응을 억제시키는 것을 확인하였다. 또한 *Umbilicaria Antarctica*은 최고 농도 100 µg/mL에서 텍사메타손 실험군 보다 염증 반응을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 낮은 농도인 25 와 50 µg/mL에서도 텍사메타손 보다 염증 반응 억제능이 비슷하거나 약하게 보이는 것으로 확인하였다. *Himantorimia lugubris*는 TNF-α, IL-1β, IL-6 및 IL-10의 염증 인자에서 항염증제인 텍사메타손과 비슷하거나 더 높은 항염증 효과를 보였으나 iNOS와 COX-2에서는 유의적인 결과를 확인할 수 없었다.
- (라) *Psoroma sp.*은 iNOS, COX-2 및 IL-6의 염증 발현이 50 µg/mL에서 텍사메타손 보다 염증이 억제되었고 TNF-α, IL-10는 농도 의존적으로 염증 반응이 억제되는 것을 확인하였다. *Psoroma hypnorum*의 추출물에서 iNOS, TNF-α와 IL-10 염증 유전인자에서 염증이 유발되지 않은 대조군과 흡사한 정도의 발현량을 보임으로써 iNOS, TNF-α와 IL-10의 유전인자의 발현을 완전히 억제시킴으로써 강력한 항염 효능을 확인할 수 있었다. 그러나 COX-2와 IL-1β의 발현은 대조군에 비해 감소하는 경향이 적게 나타남을 확인하였다. *Amandinea sp.*는 50 µg/mL의 농도에서 iNOS, COX-2, TNF-α, IL-1β, IL-6 및 IL-10 모두 텍사메타손 보다 염증 발현이 억제되었음을 확인하였다(Fig. 3-28).

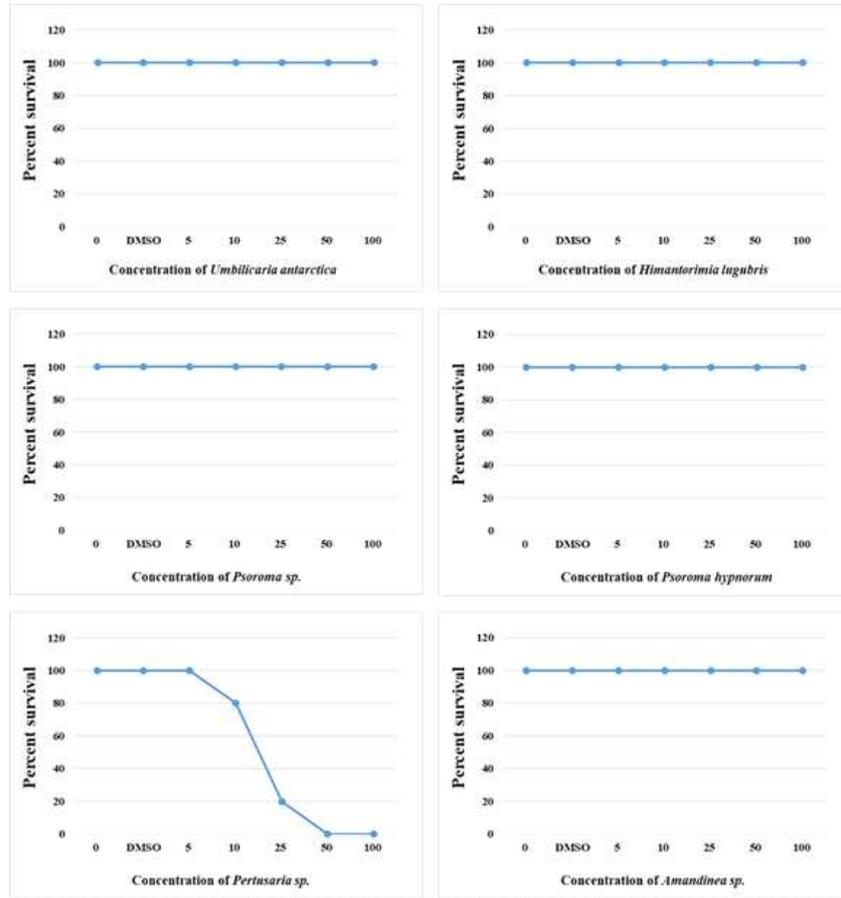


Fig. 3-25. The results of toxicity assessment of the Antarctic lichen 6 species

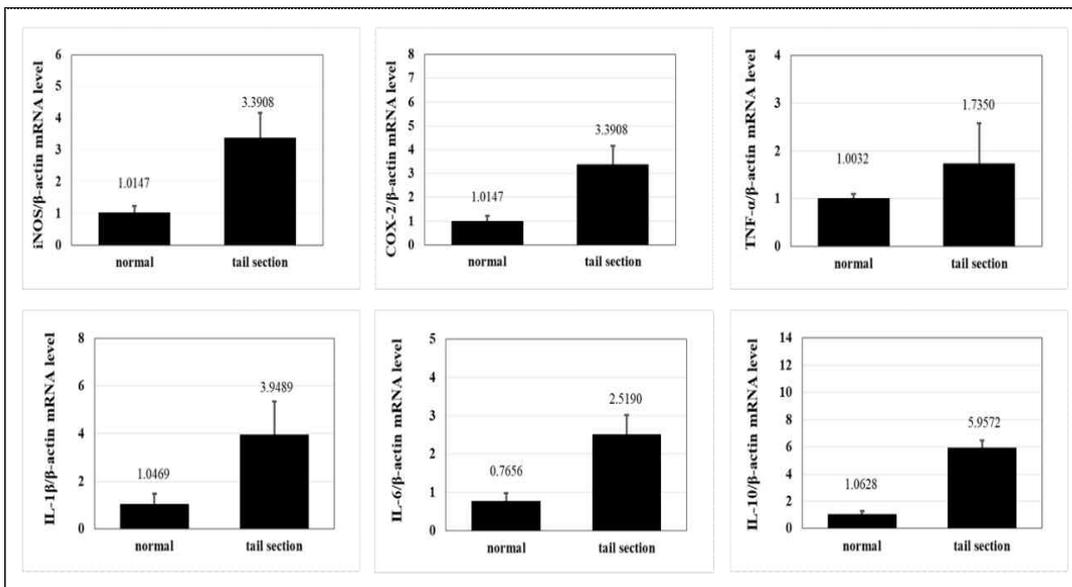


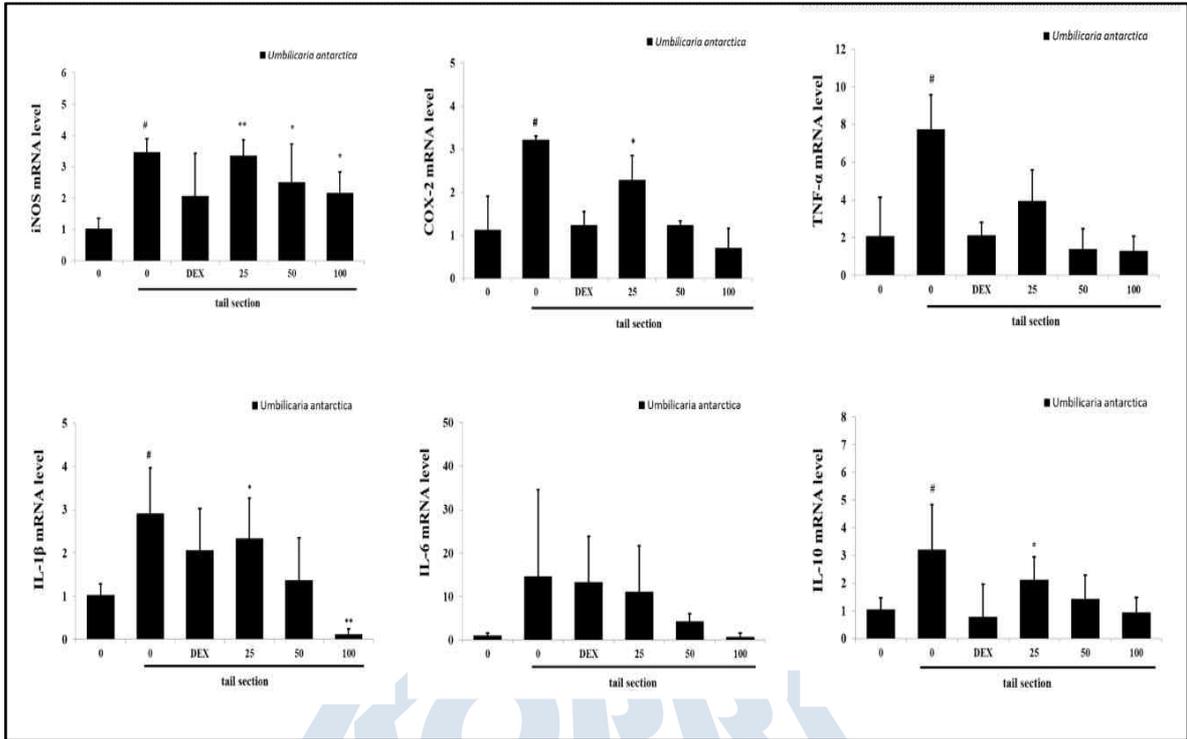
Fig. 3-26. Quantitative gene expression analysis for tail cut using zebrafish

Sample Name	A260/280	Result(ng/ul)
Control	1.96	135.25
	1.9	204.69
	1.9	120.09
	1.89	147.02
Tail section (Positive control)	2.08	376.86
	1.9	141.32
	1.9	47.65
	1.88	92.24
Dexamethasone	1.87	108.2
	1.95	227.56
	1.91	63.15
	1.87	80.28
Umbilicaria antarctica (25ug/ml)	1.87	232.48
	1.95	221.47
	1.92	192.33
Umbilicaria antarctica (50ug/ml)	1.93	306.87
	1.97	188.03
	1.93	198.01
Himantorimia lugubris (25ug/ml)	2.04	73.06
	1.95	94.1
	1.99	169.69
Himantorimia lugubris (50ug/ml)	1.99	290.66
	1.93	167.8
	1.94	255.47
	1.95	79.07
Psoroma sp. (25ug/ml)	1.91	183.2
	1.98	170.02
	1.98	64.85
	1.93	163.83
Psoroma sp. (50ug/ml)	1.95	70.02
	1.93	148.65
	1.93	154.59
	1.96	134.04
Pertusaria sp. (25ug/ml)	1.96	157.02
	1.95	161.03
	1.98	131.62
	1.94	192.16
Pertusaria sp. (50ug/ml)	1.91	265.41
	1.94	230
	1.98	102.22
	1.92	255.03
Amandinea sp. (25ug/ml)	1.97	117.12
	1.93	71.33
	1.92	147.08
	1.93	95.57
Amandinea sp. (50ug/ml)	1.96	229.33
	1.99	162.19
	1.97	236.66
	1.88	84.43
	1.92	149.39

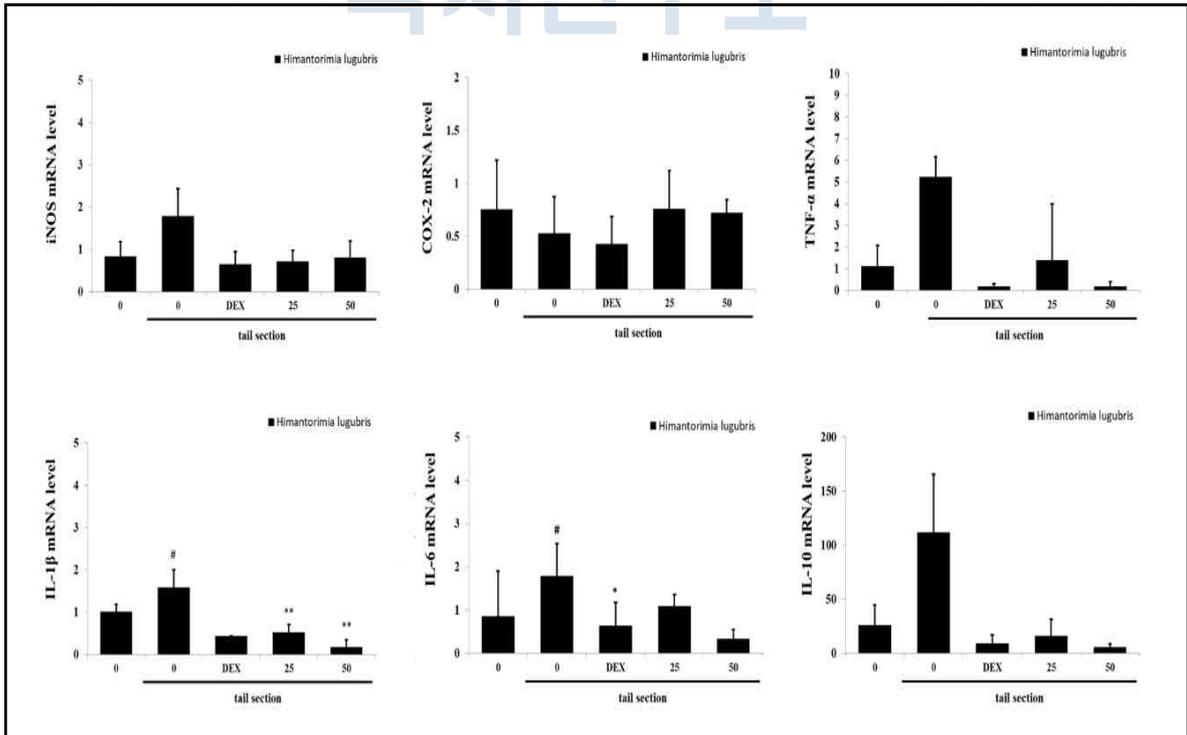
Fig. 3-27. RNA extractions from the Antarctic lichens

(마) 세포에서 항염증에 활성이 있는 물질을 제브라피쉬에서 항염증 프로토콜을 만들어 실험을 수행하였고 생체 외(*in vitro*)와 생체 내(*in vivo*) 실험에서의 항염 활성 정도의 차이는 있으나 서로 유사한 활성을 보이는 것을 확인 할 수 있었다. 이로써 남극 지의류 추출물의 항염증 활성을 평가하는데 제브라피쉬가 동물대체 모델로서의 하나의 방법이 될 수 있을 것으로 사료되며 추가적인 연구를 진행하는데 있어 기초자료로 활용할 수 있을 것이다.

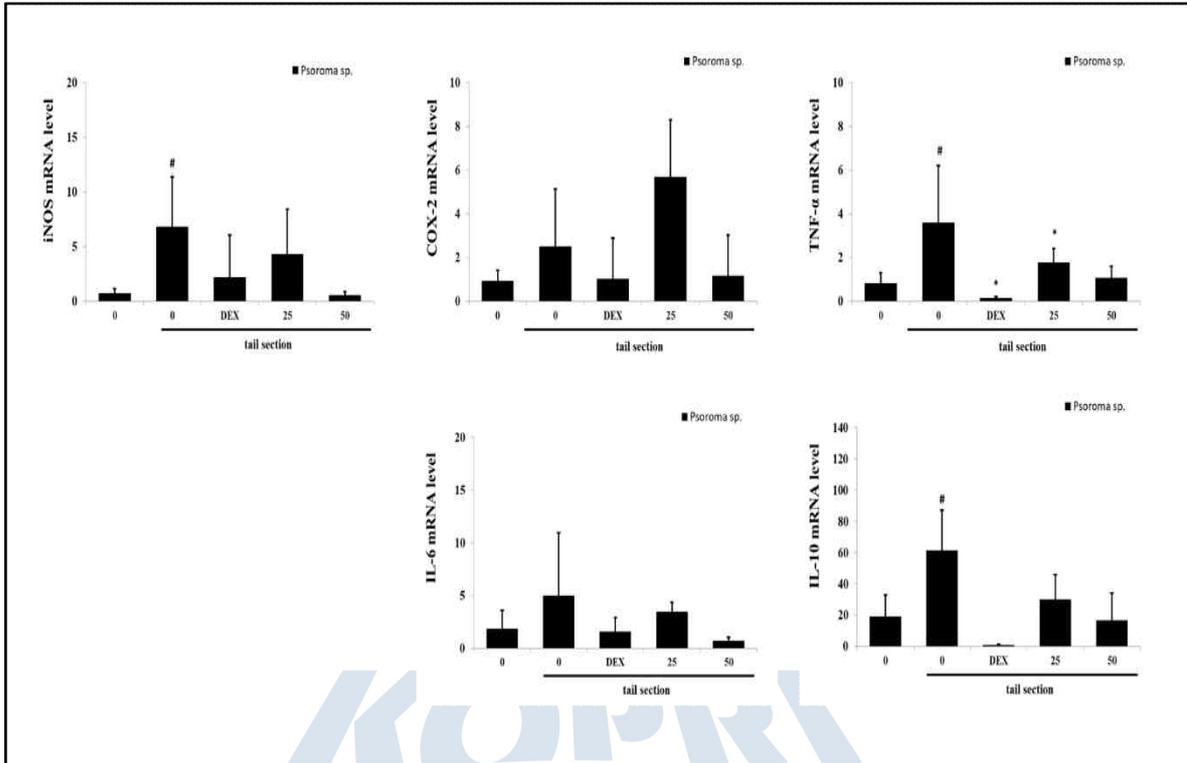
A. 2017-ant-042: *Umbilicaria Antarctica*



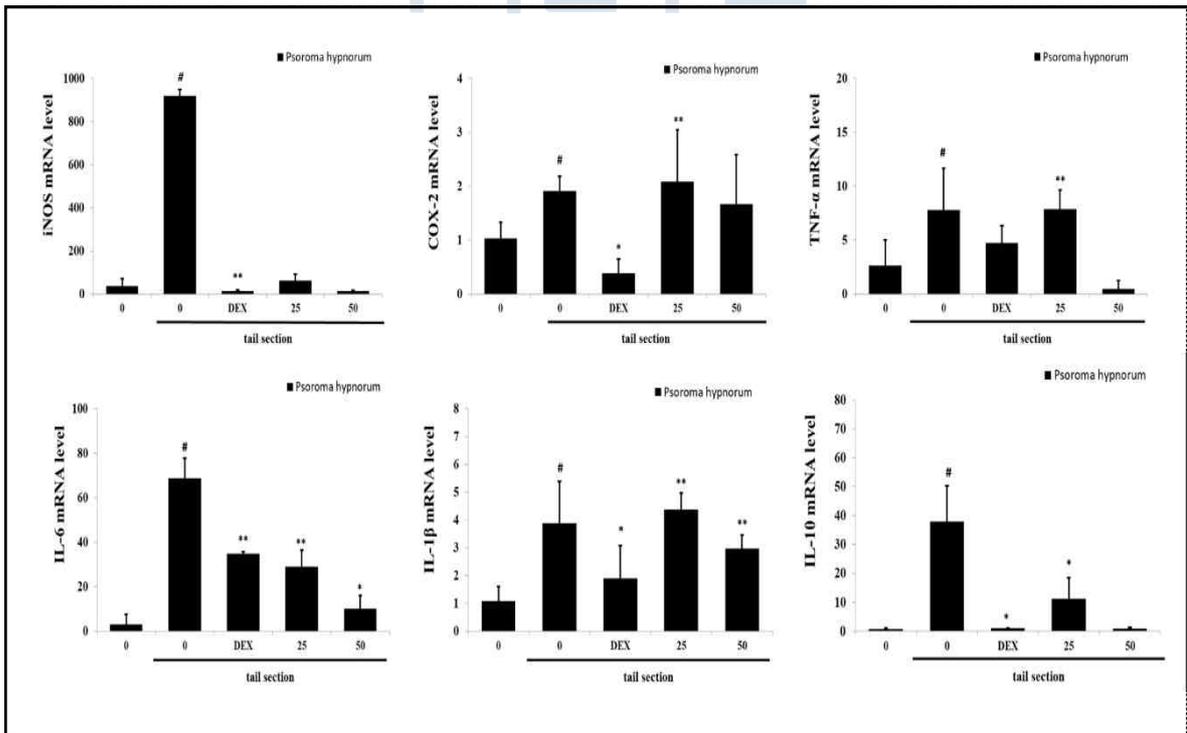
B. 2017-ant-044: *Himantorimia lugubris*



C. 2017-ant-048: *Psoroma sp.*



D. 2017-ant-052: *Psoroma hypnorum*



E. 2017-ant-064: *Amandinea* sp.

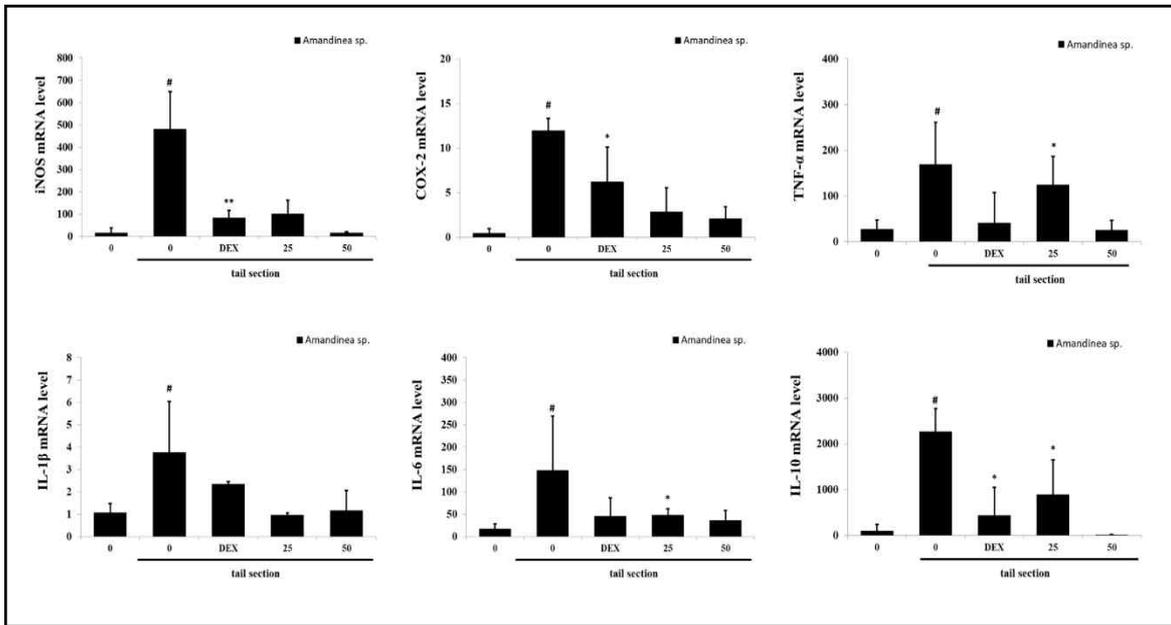


Fig. 3-28. The results of real-time RT-PCR for inflammation-related genes of the Antarctic lichen extracts in zebrafish

나. 형광단백질 삽입 형질전환 모델을 이용한 항염 효능 검증

(1) 형질전환 모델 검증

두 가지 형질전환체 제브라피쉬 성체는 heterotype이므로 야생형과 교배하여 획득한 알은 형광단백질을 발현할 수도 그렇지 않을 수도 있다. 형질전환 모델이 맞는지 확인하여 구별된 개체로만 실험을 진행하여야하기 때문에 현미경 관찰 및 유전자형 검사를 수행하였다. 두 모델은 모두 다음 세대에 형광 단백질 유전자를 전달할 수 있었으며 이는 현미경 관찰로 가능하였고(Fig. 3-29, Fig. 3-30) 이 두 단백질이 삽입된 것으로 알려진 유전자 *dendra2*와 *mCherry*와 일치함을 유전자형 검사로도 확인하였다.



Fig. 3-29. Fluorescent protein observation and genotype assay of Mpeg:dendra2 zebrafish

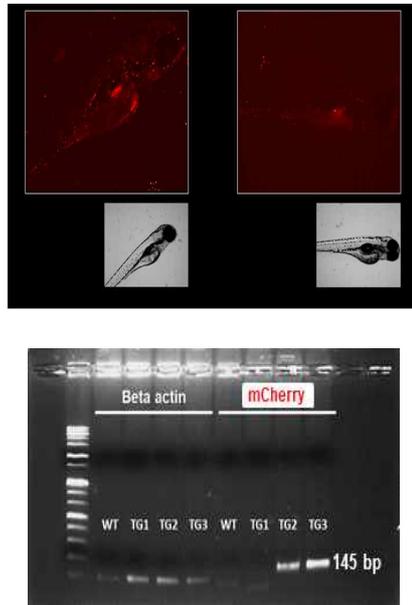


Fig. 3-30. Fluorescent protein observation and genotype assay of Mpeg:mCherry zebrafish

(2) 형질전환 모델을 이용한 급성염증 발생에 대한 항염 효능 확인

(가) Lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성균의 지질 다당체 성분으로 동물 세포에 처리하였을 때 미생물 감염으로 인식하여 염증반응을 유도하는 물질로 흔하게 사용된다. 기존 연구들에 의해 제브라피쉬 배아에 처리하였을 때에도 염증반응을 유발하는 것이 확인되었으며(Yang *et al.*, 2014), 이를 이용하여 약물 후보물질이 염증 반응을 완화시킬 수 있는지 macrophage와 neutrophil의 이동과 활성화 정도를 관찰하여 항염 효능에 대해 검증하였다.

(나) 본 연구팀은 동물세포(Raw 264.7 murine macrophages) 실험을 통해 항염 효능을 나타내는 것으로 평가되는 지의류 추출물 2017-Ant-29의 평가범위를 확장시키기 위해 3 dpf 제브라피쉬 larvae를 이용하여 *in vivo* 수준에서의 평가를 진행하였다. Fig. 3-31과 Fig. 3-32에서 보는 것과 같이 CuSO_4 를 처리하여 급성 염증환경을 조성하였을 때 macrophage와 Neutrophil이 활성화 되어 체내 이동이 발생하는 것을 myoseptum 부분의 형광 세포를 개수하여 확인하였다. 또한 항염 후보물질인 2017-Ant-29를 농도별로 처리하였을 때 형광 세포의 수가 농도에 의존적으로 감소하였으므로 이전 연구에서 밝힌 *in vitro* 세포에서 항염 효능이 있는 것뿐만 아니라 *in vivo* 생체 검사에서도 항염 효능을 분명히 나타내는 것임을 확인한 결과이다.

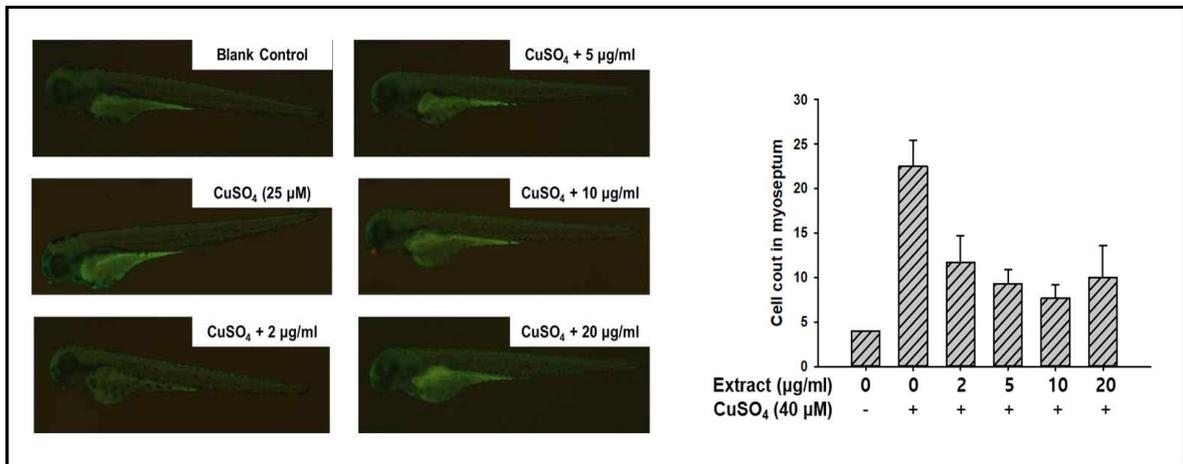


Fig. 3-31. Fluorescence change observation of macrophage number caused by anti-inflammation candidate (2017-Ant-29) in acute inflammation condition induced by CuSO₄

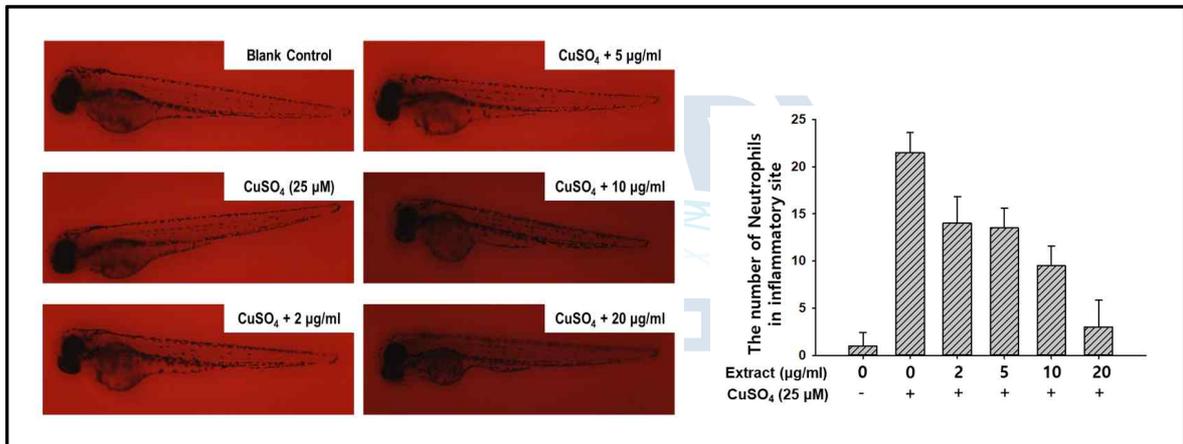


Fig. 3-32. Fluorescent change observation of neutrophil number caused by anti-inflammation candidate (2017-Ant-29) in acute inflammation condition induced by CuSO₄

다. CRISPR/Cas9 원리를 이용한 유전자 변이모델 개발

(1) CRISPR/Cas9 기술을 활용한 유전자 질병모델 개발

유전자 편집 기술 중 3 세대에 해당하는 CRISPR-Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats (CRISPR/Cas9) 기술은 박테리아 적응면역 체계에서 유래하였으며, DNA 절단효소(Cas9)로 표적 유전자를 없애거나 더할 수 있고, 다른 염기서열로 교체할 수도 있다(Fig. 3-33). 이 기술을 활용하면 질병모델을 개발하거나 특정 유전자로부터 발현된 단백질 작용기전 분석할 수 있으므로(Dow, 2015) 전 세계 다수의 연구팀에서 이를 활용한 관련 연구결과가 활발히 보고되고 있다.

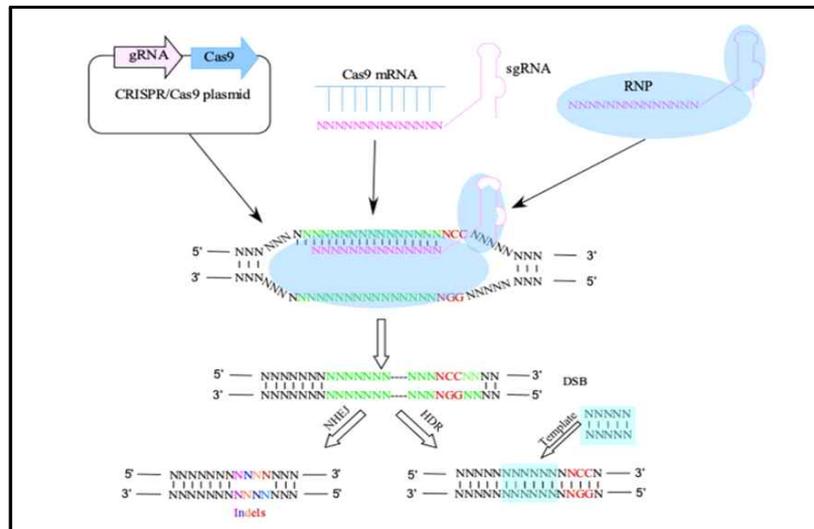


Fig. 3-33. Principle of CRISPR/Cas9 gene edition technology (Tian *et al.*, 2019)

(2) 기술 작동여부 확인을 위한 멜라닌 색소 생성억제 모델(Albino)

(가) 본 연구팀은 해당 기술의 검증을 위해 돌연변이 여부를 간편히 눈으로 확인할 수 있는 색소단백질 생성 억제모델(Albino)을 우선적으로 제작하여 CRISPR/Cas9 기술의 일련의 과정을 수행하였다. 디자인된 sgRNA의 Target 유전자 서열은 albino gene의 6 번째 Exon에서 PAM sequence (NGG) 앞에 위치하며, 이를 인식하고 추후 T7 RNA polymerase에 의해 RNA로 전사될 수 있도록 T7 promoter 서열을 포함하고 있다. 멜라닌 합성에 필요한 단백질인 slc45a2을 포함하는 genomic DNA에서 Exon 6를 타겟으로 한다.

(나) 최종적으로 200 ~ 300 pg/embryo의 농도로 sgRNA를 주입하기 위하여 500 ng/μl 이상의 sgRNA를 정제해야 하였으며, 이를 위해 다양한 PCR 조건으로 product를 제작하였다. PCR product는 적합한 크기(~150 bp)로 획득하였고 이를 정제해 내어 sgRNA 제작을 위한 주형 DNA로 사용하였다. sgRNA 합성을 끝내고 gel electrophoresis로 확인해 보았을 때 주형 DNA와 같은 크기로 제작된 것을 확인하였다(Fig. 3-34).

(다) 제작된 sgRNA의 농도는 668.0 ng/μl이며, 이를 제브라피쉬 수정란에 적용하기 위하여 미세주입 장비를 설치하고 사용법을 수련하였다. 제브라피쉬 교배를 통해 획득된 알들을 agarose mold에 일렬로 정렬하였고(Fig. 3-34A) 실제 현미경으로 알을 보면서 1-cell 혹은 2-cell stage에 sgRNA + Cas9 혼합물을 주입하였다(Fig. 3-34B, C).

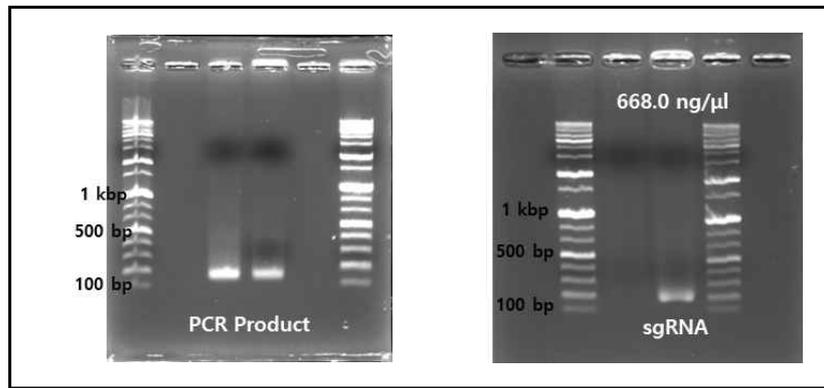


Fig. 3-34. Left: PCR product (self annealing), Right: sgRNA (after *in vitro* transcription)

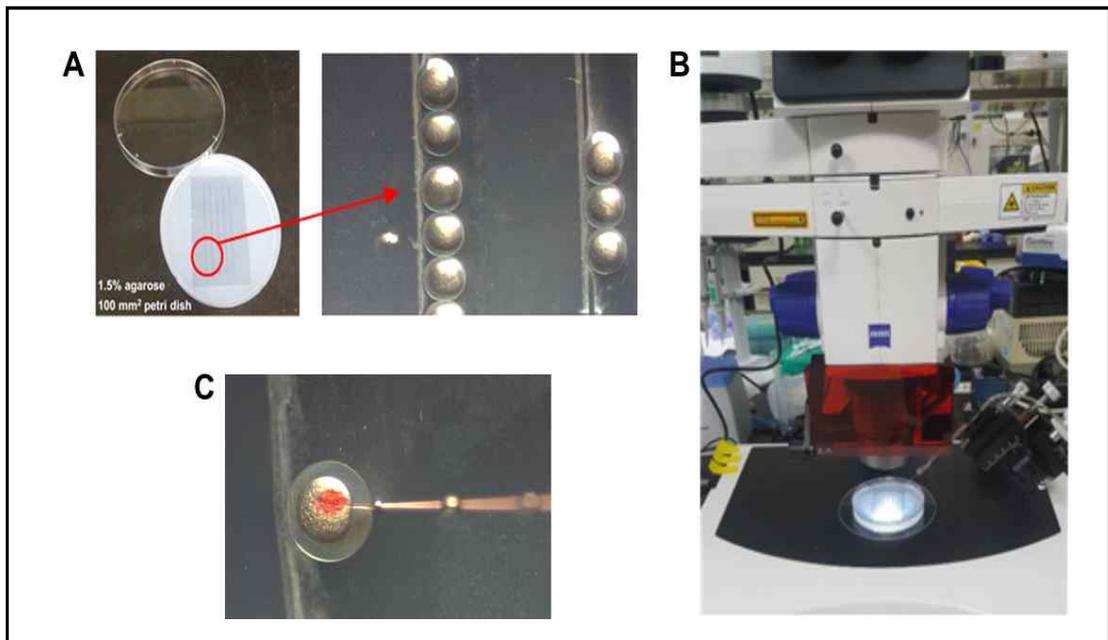


Fig. 3-35. Process and equipments for microinjection (A) Fixed eggs on special mold, (B) Microinjection system and (C) Injection of C. sgRNA and Cas9 mixture

(라) 4 시간 후 혼합물이 주입된 알들의 세포 분열이 정상적으로 진행되고 있는지 현미경으로 관찰하였으며 비정상적인 배아는 제거하였다. 주입을 한 배아들은 혼합물의 phenol red로 인하여 붉은 색을 띄고 있었으며 시간이 지남에 따라 야생형 제브라피쉬와 색소 생성여부에서 차이를 나타내었다(Fig. 3-36). 이로써 Albino model을 위한 sgRNA가 목적으로 한 위치의 DNA를 절단하며 그로 인하여 색소 생성이 억제된 것이 확인되었고, 유전자형 검사(T7E1 assay)도 추가적으로 진행하였다.

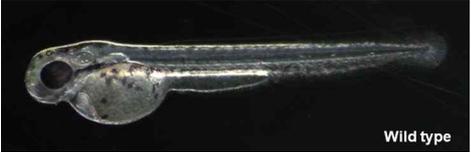
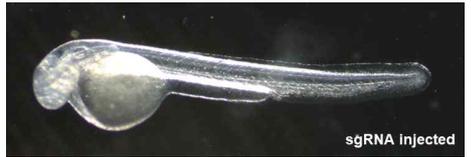
Remarks	4 hpf	24 hpf	48 hpf
Wild type (negative control)			
Injection			

Fig. 3-36. Eggs and larvae images according to time course (4, 24, 48 hpf) after sgRNA injection for Albino model

(마) T7E1 assay는 Mutation이 일어난 부분을 포함하는 부분을 PCR 한 후 그 산물을 열변성 시키고 재결합하여 염기가 서로 상보적이지 않은 부분을 T7 Endonuclease 로 절단하여 Mutation의 발생여부를 확인하는 검증방법이다. Fig. 3-37과 같이 최종 산물을 전기영동 하였을 때 Mutation이 발생하지 않으면 온전한 하나의 밴드(PCR 산물 그대로의 크기)가 보이며 Mutation이 발생하였으면 절단된 fragments가 두 개가 생겨나므로 총 세 개의 밴드가 보이게 된다(Fig. 3-37). T7E1 assay를 진행한 후 wild type의 PCR Product는 409 bp에 적합한 위치에서 확인 되었으며, Albino sgRNA가 주입된 배아의 PCR product는 절단되어 140 bp와 269 bp 크기에 맞는 부분에 밴드가 확인 되었다(Fig. 3-38).

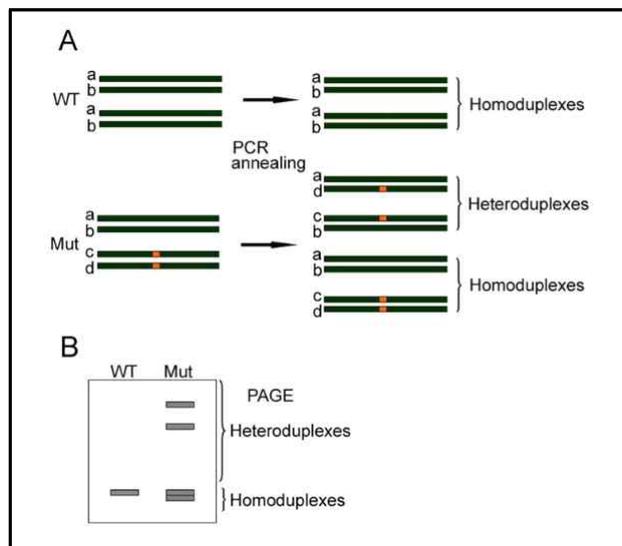


Fig. 3-37. Principle of T7E1 assay (Xiaoxiao *et al.*, 2014)

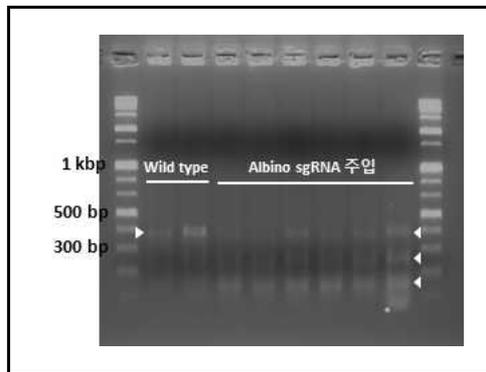


Fig. 3-38. T7E1 assay results of Albino model genes after sgRNA and Cas9 injection

(바) 이를 통하여 sgRNA가 제대로 작동하였으며, Albino model이 알맞게 제작된 것을 확인하였다. 해당 개체들은 F0 세대이므로 성체가 되어 F1 세대를 획득하였을 때 germ line 유전자 전이가 되었는지 확인과정을 거쳐 heterogenous 유전자 변이 모델로 확정지을 수 있을 것이다. 따라서 이러한 결과들을 기반으로 본 연구팀에서 마련한 일련의 실험 과정과 미세주입 장치는 유전자 조작 모델을 제작하기에 적합하다고 할 수 있다.

(3) 추가 질병모델의 제작 : 간세포 손상

Ramalin이 알콜성 지방간 억제능 및 항산화능이 있으므로 이를 간세포 손상 회복에 적용하였을 때 약물로서의 가능성을 확인하기 위하여 *abcb11b*와 *slc30a10*을 타겟으로 하는 sgRNA를 제작하여 주입하였다. 각 유전자의 결여 시 증상은 다음과 같다(Table 3-14). 해당 모델들은 외표검사로 유전자 결여 여부를 구분할 수 없으므로 sgRNA+Cas9 혼합물이 주입된 배아 중 일부의 gDNA를 획득하고 T7E1 assay를 수행하였다.

Table 3-14. Target genes for hepatocyte damage model production and symptoms caused by gene defects

타겟 유전자	유전자 결여 시 증상
abcb11b	비정상 담즙분비 (impaired bile excretion), 간세포 손상 (hepatocellular injury), 간세포 자가포식 (induction of autophagy in hepatocytes)
slc30a10	혈액 및 간 망간수치 증가 (high level of circulating and hepatic Mn), 지방간 (hepatosteatosis), 간경변 (liver fibrosis) (Xia <i>et al.</i> , 2017)

라. 산화스트레스 모델

- (1) 활성산소는 생물체 내에서 에너지를 생산하거나 신진대사를 진행하면서 발생하게 되는 불안정하며 매우 반응성이 높은 전자 물질이다. 뿐만 아니라 유해한 화학물질이나 방사성 물질과 같은 독성 물질에 대해 신체 반응으로 염증과 함께 발생하기도 한다. 이 반응성 높은 활성산소는 세포막의 지방산을 공격하여 세포막을 손상시켜 죽게 하며 유전자의 손상까지 초래하게 된다. 현재까지 다양한 연구들을 통하여 바르는 암, 파킨슨병, 알츠하이머, 백내장, 동맥경화증, 당뇨(Karakikes *et al.*, 2009), 류마치스 관절염 등의 다양한 질병의 원인이 되는 것으로 밝혀져 있다 (Liu *et al.*, 2018). 따라서 항산화 능을 판단하고 약물 후보물질로 선택하는 것은 다양한 질병의 치료제로서 잠재력을 확인하는 중요한 일이라고 할 수 있다.

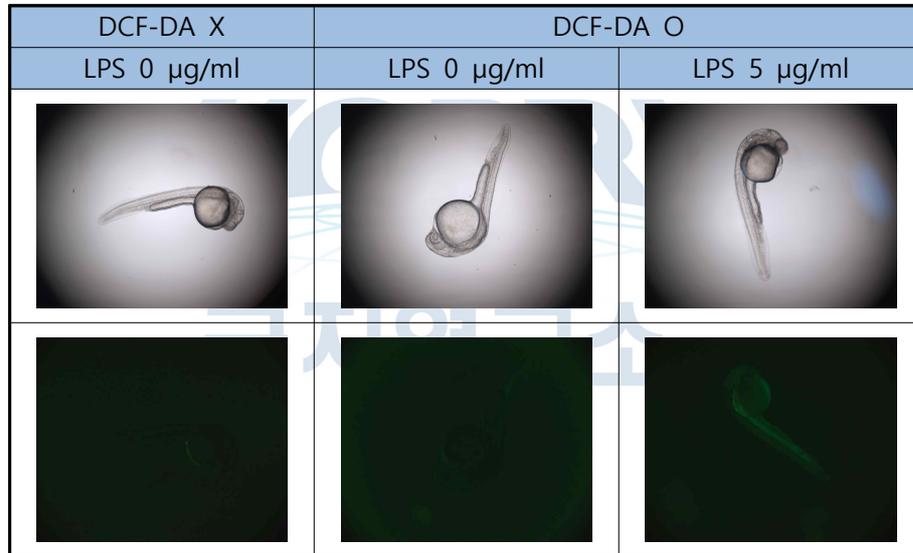


Fig. 3-39. Qualitative analysis of accumulated oxidation stress by LPS-inflammation

- (2) 본 연구에서는 다양한 물질들의 *in vivo*에서의 항산화 능을 간편하게 평가하기 위한 도구로 제브라피쉬 배아를 사용하였으며 염증이 발생하였을 때 생겨나는 산화물질을 화학물질(DCF-DA FM)로 반응시켜 정성적으로 확인 하였다. Fig. 3-39에서 보이는 바와 같이 DCF-DA를 처리하지 않은 배아는 형광반응이 나타나지 않았으며, DCF-DA를 처리한 제브라피쉬 배아는 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 처리한 것과 처리하지 않은 것에 명확한 차이가 있음을 알 수 있었다. 다양한 지난 연구와 마찬가지로 해당 모델을 사용하여 후보물질을 처리하였을 때 형광량이 감소되는 정도를 파악하여 항산화능에 대해 판단할 수 있을 것으로 평가된다.

마. 성체 제브라피쉬 치매 모델

- (1) 최근 몇몇의 연구에서 Okadaic acid (OKA)를 제브라피쉬에 처리한 Alzheimer's disease 모델이 개발되었다. 세대 전이가 될 때 까지 장시간이 소요되는 유전자 편집모델이나 정교한 조작으로 기술력을 요하는 모델과는 다르게 성체의 제브라피쉬를 배양하고 있는 물에 OKA를 희석하는 방법으로 간편하게 만들 수 있다.
- (2) OKA는 polyether fatty acid의 일종으로 protein phosphatases (PPA) 1과 2A의 inhibitor이며 문헌에 의하면 생물체에 처리가 되었을 때 AD에서와 유사한 신경손상을 일으킨다(Nada *et al.*, 2016). 이 물질은 ROS를 생성시키고, amyloid beta의 생성과 축적을 유도하며, protein phosphatase 1과 2A를 inhibition시켜서 MAPK와 ERK를 활성화 시키는 경로로 신경독성을 나타낸다. OKA가 처리된 생물체로부터 AD의 병적 증상인 synaptic loss가 발생하거나 기억력 손상, tau protein의 생성 및 phosphorylation의 증가를 관찰할 수 있다(Daniel & Frederick, 2018).

바. 질병유사반응 유도 후 약물효능 평가

(1) LPS 농도 결정

적절한 수준의 LPS를 처리하여 발달에 이상을 주고 물질 처리에 의해 그 정도에 차이가 있는지 확인하기 위하여 LPS를 다양한 농도로 처리하여 발달 정도를 비교해 보았다. 10 µg/ml을 처리한 배아는 모두 사망하였고, 5 µg/ml을 처리한 배아들은 발달에 심각한 이상이 발생한 것을 확인하였다. 아무것도 처리하지 않은 정상 배아의 발달 정도를 보면, 꼬리의 끝(전체 길이의 10 % 부분)을 제외하고 일자로 펴져 있는 모습을 확인할 수 있다. 하지만 LPS 처리 농도가 높아질수록 난황이 비교적 크며 꼬리가 말려있는 모습을 보인다. 이러한 관찰의 결과로 LPS가 발달을 지연 시키는 것인지 혹은 기형적인 발달 진행을 유도하는 것인지는 구분할 수는 없지만 LPS 농도에 따른 변화가 있는 것은 확실히 구별할 수 있다.

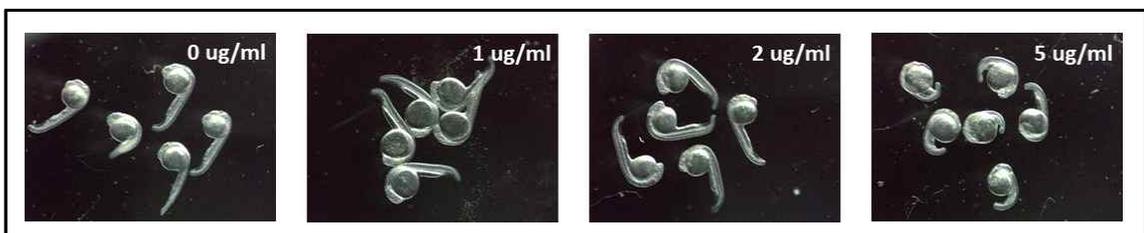
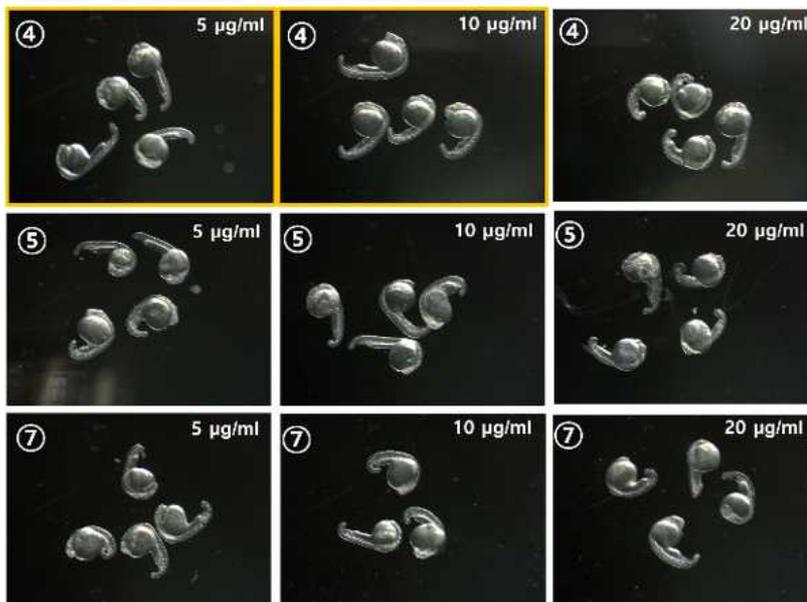
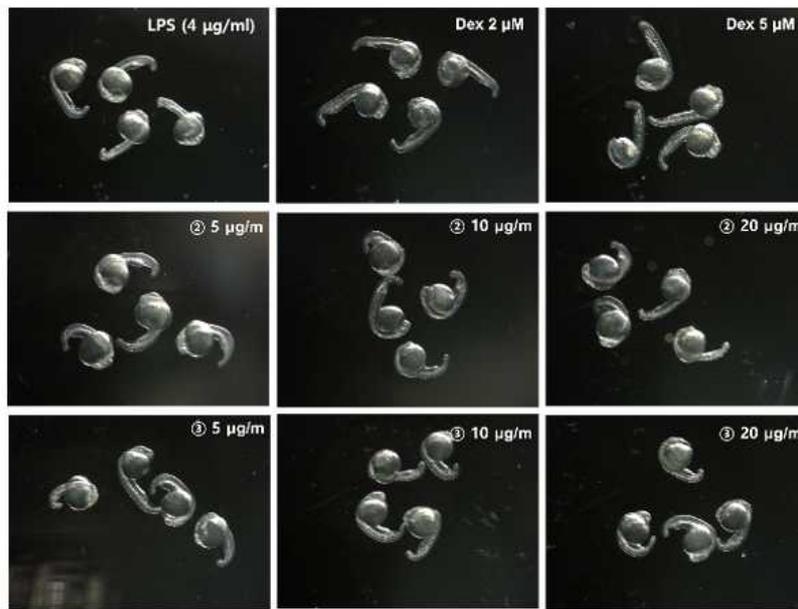


Fig. 3-40. Developmental delay and disability of zebrafish eggs induced by LPS

(2) 극지 미생물 유래 생리활성 물질의 항염 효능 확인

(가) 총 8 건의 미생물 추출물을 처리하였으며 이들 물질의 항염 효능을 1 차적으로 확인하기 위하여, 일정 시간에서의 배아 생김새를 보고 발달 지연 및 이상 정도를 판단하였다. 극지 미생물 추출물 시료를 처리한 제브라피쉬 유생의 외표 검사 결과는 Fig. 3-41의 LPS 0 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 배아와 비교하여 판단하였으며, 난황 부종과 꼬리말림(발생 부진)을 위주로 LPS에 의한 손상이 시료에 의해 회복 혹은 악화되는지 그 정도를 판단하였다.



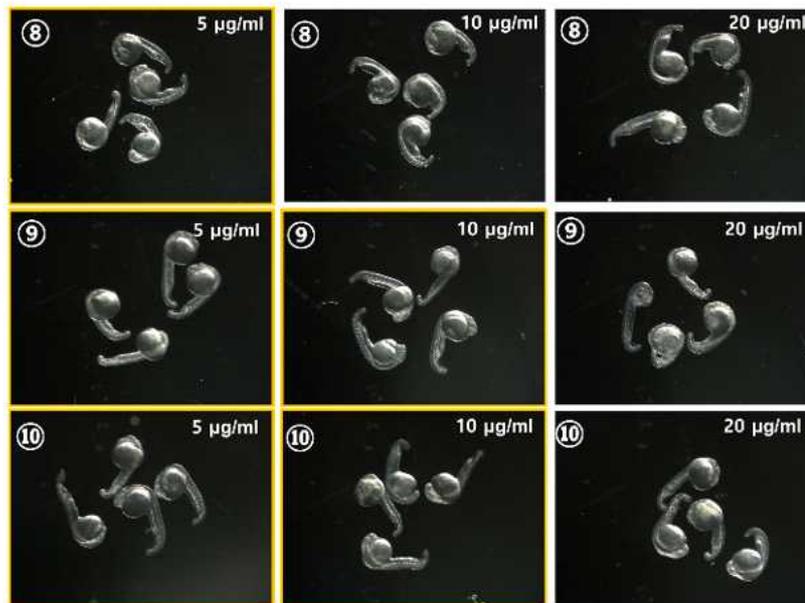


Fig. 3-41. Effects of polar microorganism extracts on developmental delay and disability of zebrafish eggs induced by LPS

(나) 10 개의 시료 중 2 가지(1, 6 번)는 5 µg/ml의 낮은 농도에서도 다 수의 배아들이 사멸하였기 때문에 제외하고 나머지 8 개의 시료에 대한 외표검사만 실시하였다(Fig. 3-41). 일반적으로 사용되는 항염제인 Dexamethasone (Dex)을 2 또는 5 µM 처리하고 LPS를 처리하였을 때, 꼬리 말림의 정도가 LPS에 비해 적은 것을 확인할 수 있다. 이와 비교하여 8 가지의 극지 미생물 추출물 시료를 처리하였을 때 4, 8, 9, 10번의 시료를 처리한 배아들의 발달정도가 LPS를 처리하지 않거나 Dex와 LPS를 동시에 처리한 배아와 유사한 발달정도를 보이고 있음을 확인하였다(노란색 표시 부분). 이것은 해당 시료들이 항염증 효능을 나타낼 수 있음을 1 차적으로 확인한 결과로 선별된 시료에 대하여 추후 CuSO₄ 염증 모델이나 tail cutting 모델을 통해 더욱 명확한 항염증 효능을 확인할 수 있을 것이며, 유전자 및 단백질 발현 정도를 비교 분석하여 항염증 효능의 작용기전을 밝힐 수 있을 것이다.

제 3 절 극지 미생물로부터 생리 활성물질 확보 및 탐색

1. 연구개요

신약개발에서 screening을 위한 library 구축에 있어서 보유하고 있는 화합물의 수가 중요한 것이 아니고, 보유하고 있는 화합물의 구조적 특징 및 화학구조를 형성하는 골격의 다양성이 중요하다는 사실을 시사하고 있다. 다양한 골격의 화학적 다양성을 천연자원유래 이차대사물질로부터 제공 받기 위해서는 이미 상대적으로 활발하게 생리활성물질 탐색연구가 진행된 육상생물에 대한 연구보다는 아직까지 많은 연구가 진행되지 않은 자원에 대한 연구가 최근 관심의 대상이 되고 있다.

극지 미생물유래의 천연물은 그 구조가 육상에서 분리되는 물질과 상이한 경우가 많으므로 신약 스크리닝 시 중요한 요소로 인식되는 분자구조의 다양성구축면에서 장점을 지니고 있다고 판단된다. 극한 지역에 서식하는 육상 및 해양생물은 위에서 언급한 생물자원으로서 가지는 고유의 특징에 추가하여 양극 지역의 독특한 극한환경 및 생태환경이 이 지역에 서식하는 극한생물의 이차대사물질 생합성 과정에 영향을 유발했을 것으로 예상되므로 매우 독특한 생물자원으로 인식될 수 있다.

최근 극지생물로부터 얻어진 활성물질을 극지 미생물에 의해 생산되는 경우가 많고 숙주생물과 공생을 하는 미생물로부터 생리활성물질이 발견되는 기회가 많으며 이는 산업화를 위한 대량생산에 이점을 가지고 있다. 따라서 본 과제에서는 극지생물자원으로부터 미생물을 분리·보존하고, 미생물배양체로부터 제작된 추출물로부터 질병치료 및 기능성 소재의 유효한 타겟으로 인식되고 있는 효소 등을 이용하여 생리활성 탐색하여 DB화하는 데 목적을 두고 있다.

2. 재료 및 방법

가. 극지 환경으로부터 세균, 방선균 및 진균의 분리, 확보 및 DB 구축

(1) 시료확보 및 미생물의 분리

- (가) 북극 다산과학기지 주변으로 부터 채취된 moss, plant, lichen 등 시료 총 20 점은 냉동상태로 보존된 시료를 확보하였고, 적정 배지를 선정하여 미생물 배양 및 분리를 수행하였다(Table 3-15).

(나) 사용된 배지는 세균분리를 위해서는 고영양배지인 NA와 빈영양배지인 0.1% NA 그리고 세균과 진균에 효과적인 R2A배지를 이용하였으며 진균분리를 위해 PDA와 YMA배지를 선정하였다.

Table 3-15. Medium composition for polar microorganisms isolation

NA(Nutrient agar)		0.1% NA		R2A	
Beef extract	3 g	Beef extract	0.3 g	Yeast extract	0.5 g
Peptone	5 g	Peptone	0.5 g	Proteose peptone	0.5 g
Agar	2%	Agar	2%	Casamino acids	0.5 g
DW or Seawater	1 L	DW or Seawater	1 L	Dextrose	0.5 g
				Soluble starch	0.5 g
				Sodium pyruvate	0.3 g
				Dipotassium phosphate	0.3 g
				Magnesium sulfate	0.05 g
				Agar	15 g
				DW	1 L

Table 3-16. Medium composition for fungus isolation

PDA(potato dextrose agar)		YMA	
Potato infusion	4 g	Yeast extract	3 g
Dextrose	20 g	Malt extract	3 g
Agar	2%	Peptone A	5 g
DW 또는 Seawater	1 L	Glucose	10 g
		Agar	2%
		DW 또는 Seawater	1 L

(다) 채취된 시료는 일정량을 무균적으로 채취하여 멸균된 막자사발을 이용하여 균질화하였으며 멸균된 증류수와 해수를 이용하여 연속희석(10 fold dilution method)하여 5종의 고형배지에 도말하여 10℃에서 10 ~ 30일간 배양한다. 배양된 plate는 colony의 형태, 색을 기준으로 순수분리하였으며 이 과정에서 세

균 및 진균의 형태별 특성을 구분하기 위하여 세균은 NA배지에 그리고 진균은 PDA 배지에 순수분리하여 형태적 중복을 최소화하였다. 이후 순수배양체는 10% glycerol 용액에 부유하여 -80℃ 초저온냉동고에 보존하였다.

(2) 미생물동정을 위한 분자생물학적 분류

(가) 분리균주를 대상으로 2개의 온도에서 성장특성

분리된 세균과 진균은 각각 2장의 Marine agar와 PDA agar 배지에 도말한 후 5, 10, 25℃ 배양기에서 배양한 후 일정 기간간격으로 성장여부를 확인하여 기록하였다. 이를 통하여 저온성균주와 내냉성 및 저온균주 여부를 판정하였다.

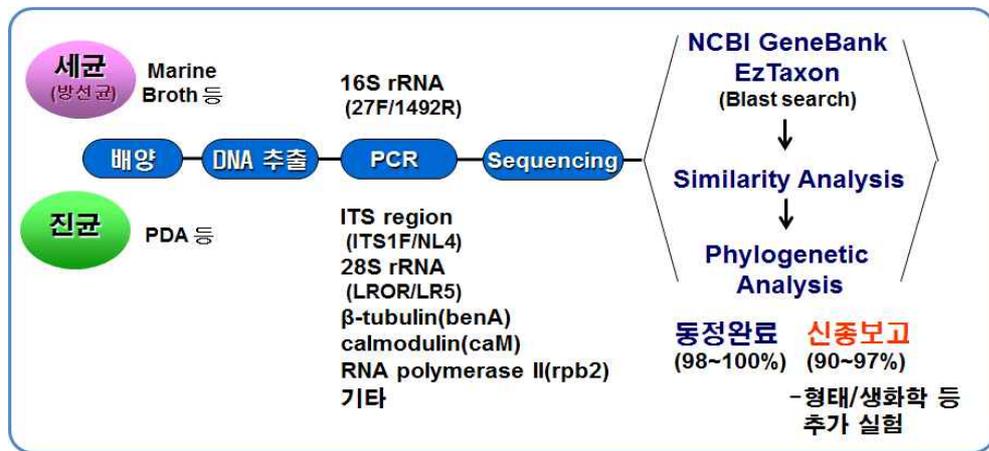


Fig. 3-42. Experimental protocol for isolation and identification of polar microorganisms

(나) 세균 (16S rDNA 염기서열분석)

- ① 16S rDNA는 16S rDNA primer, 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'; *Escherichia coli* nucleotide 8~27)와 1518R (5'-AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA-3'; *Escherichia coli* nucleotide 1541 ~ 1522)을 사용하여 PCR에 의해 genomic DNA로부터 증폭하였다. PCR 산물은 전기영동(0.8% agarose)에 의해 DNA가 증폭되었음을 확인하였다. 16S rDNA는 자동염기서열장치를 이용하여 염기서열을 결정하였다.
- ② 16S rDNA염기서열의 분석은 National Center Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)(Altschul & Lipman, 1990)로부

터 얻어진 분류군의 염기서열을 이용하여 서열화하였으며 Phylogenetic Interference Package (PHYLIP)로 서열 데이터를 분석하기 위해 사용되었다. Phylogenetic tree는 neighbour-joining 방법을 이용하였으며, Evolutionary distances matrices는 Jukes & Cantor (1969) 모델에 따라 작성되었다. Neighbour-joining tree topology는 1000 resampling에 기초한 bootstrap analysis (Felsenstein, 1985)에 의해 평가되었다.

(다) 진균(28S rDNA 염기서열분석)

- ① 균류는 액체질소를 이용한 gliding 방법을 이용하여 세포를 파쇄한 후 DNA분리키트를 이용하여 genomic DNA를 분리하였으며 partial 28S rDNA 염기서열은 LR0R (ACCCGCTGAACCTAAGC; 26~42)과 LR5 (TCCTGAGGGAAACTTCG; 964~948)을 그리고 ITS (ITS1-5.8S-ITS2)는 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA)과 NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG)을 사용하여 PCR에 의해 genomic DNA로부터 증폭하였다. PCR 산물은 전기영동(0.8% agarose)에 의해 DNA가 증폭되었음을 확인하였다. 28S rDNA는 자동염기서열장치를 이용하여 염기서열을 결정하였다.
- ② ITS 및 28S rDNA염기서열의 분석은 National Center Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)로부터 얻어진 분류군의 염기서열을 이용하여 서열화하였으며 Phylogenetic Interference Package (PHYLIP) (Felsenstein, 1993)로 서열 데이터를 분석하기 위해 사용되었다. Phylogenetic tree는 neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987)방법을 이용하였으며, Evolutionary distances matrices는 Jukes & Cantor 모델에 따라 작성되었다. Neighbour-joining tree topology는 1000 resampling에 기초한 bootstrap analysis (Felsenstein, 1985)에 의해 평가되었다.

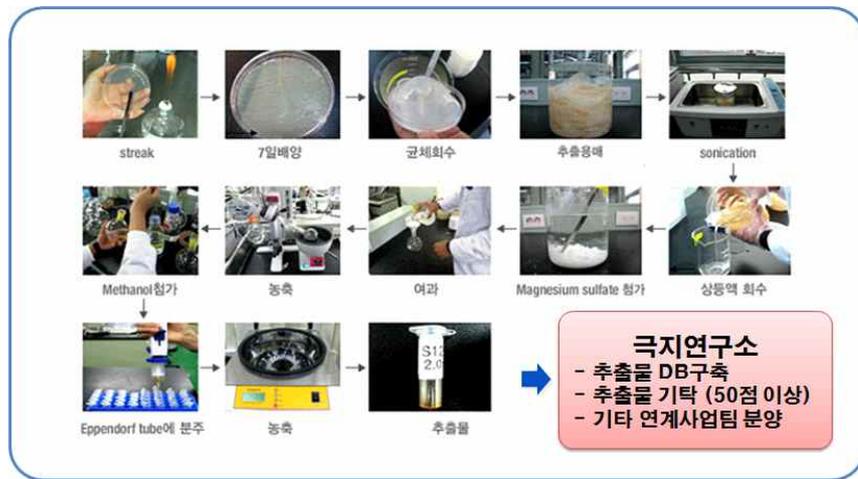
나. 극지미생물 유래 생리활성 물질 탐색을 위한 대량배양 및 추출물 확보

(1) 해양생물유래 공생미생물의 추출물 제조

- (가) 분리된 미생물중 이차대사산물의 빈도가 높은 진균을 대상으로 대량배양을 진행하였다. 배지는 해수가 첨가된 PDA배지를 이용하여 plate (90 mm x 15 mm) 및 편박플라스크를 이용하여 10°C에서 7~30일 배양하였다(균의 종에 따라 차이가 있음).

(나) 배양 후 ethyl acetate를 이용하여 추출하였으며 이후 여과한 후 진공농축기를 이용하여 용매를 제거하여 조추출물을 확보하였다. 추출과정의 대략적인 흐름은 아래의 Fig. 3-43과 같다.

(다) 농축된 시료는 계량하여 무게를 기록하였으며 이후 실험에 이용되기 까지 냉장보관하였다. 대사체/신규물질연구를 위해 공동연구팀에게 시료를 제공하였으며 대사체 및 신규물질의 가능성이 높은 시료는 대량배양을 통하여 추가적인 추출물을 제작하였다.



1. PDA배지 제작	1L 삼각플라스크에 50ml의 PDA배지를 멸균하여 준비
2. 미생물 접종/배양 (10~15℃, 7~30일 배양)	멸균해수 3ml에 stock 균주 150~200 ml를 첨가하고 Vortex 후, 배지에 첨가, 배양
3. 추출용매인 Ethylacetate 첨가	포자가 형성된 정지기, Ethylacetate 300 ml 첨가
4. Sonication (30분, 2회 반복)	30분간 sonication 2회 반복한 후 냉암소에서 overnight 방치
5. 상등액 회수	Beaker에 상등액을 회수한다. 이후 100ml의 동일용매로 세척하고 Beaker에 모음(총 500 ml)
6. Magnesium Sulfate 첨가 (수분제거)	Beaker에 Magnesium sulfate(MS) 2스푼 (1g)을 첨가한 후 혼합 (수분이 MS에 흡착)
7. 여과	여과장치에 여과지를 놓고 상기 용액 일부를 첨가하고 진공펌프 작동(여과지가 밀착). 이후 나머지 용액을 첨가하여 회수
8. 농축	Evaporator를 이용하여 여과액을 제거하여 추출물을 농축
9. Methanol 첨가/재용해	용매 제거 후, 5~10 ml의 Methanol을 이용하여 추출물을 재용해하고 Capillary tube를 이용하여 20 ml tube로 옮김
10. 농축/ weighting	Evaporator를 이용하여 용매를 제거. 이후 질소가스로 용매를 완전히 제거하고 무게를 측정 후 병 무게를 빼어 회수율을 기록

Fig. 3-43. Flow char for extract production from polar microorganisms

(2) 조추출물의 생리활성측정

(가) 생리활성은 각종 질병치료의 분자표적으로 인식되는 탈인산화 효소(PTP1B)를 이용한 항당뇨 관련 활성 검색법을 1차 스크리닝의 방법으로 적용하여 각 추출물에 대한 활성을 검토하고 그 결과를 토대로 향후 적용할 생리활성 평가법을 결정 하였다. 또한 얻어진 자료는 추출물과 함께 DB를 구축하였다.

(나) PTP1B분석 : PTP1B는 BIOMOL International LP에서 구입하였다. 효소활성은 p-nitrophenyl phosphate (pNPP)를 사용하여 측정하였다. 각각의 96 well plate 에 2 mM pNPP와 50 mM citrate (pH 6.0), 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol (DTT)를 포함하는 완충용액을 100 μ l 첨가한 후 시료(0.3 ~ 30 μ g/ml)를 첨가하였으며 대조구는 시료대신 시료용해액을 첨가하였다. 이 후 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 30분 동안 반응시킨다. 10 M NaOH를 넣어 반응을 종결시켰다. 생산된 p-nitrophenol의 양을 405nm의 흡광도에서 측정하였다.

$$\text{Inhibition \%} = \left\{ \frac{[(\text{DMSO OD value} - \text{DMSO blank OD value}) - (\text{samples OD value} - \text{samples blank OD value})]}{(\text{DMSO OD value} - \text{DMSO blank OD value})} \times 100 \right\}$$

3. 결과 및 고찰

가. 극지미생물 유래 미생물의 분리 및 보존

(1) 북극 다산과학기지 주변 지의류 및 이끼류 등(Table 3-17)의 생물시료를 5종의 분리배지에 도말하여 배양하였으며, 배양된 plate는 colony의 형태, 색을 기준으로 순수분리 하였으며 이 과정에서 세균 및 진균의 형태별 특성을 구분하기 위하여 세균은 NA배지에 그리고 진균은 PDA 배지에 순수분리하여 형태적 중복을 최소화 하였다.이 중 균체의 특성에 따라 1차로 세균과 진균을 분리하였고 필요에 따라 2~3 차에 걸쳐 순수배양체를 확보하였다.

(2) 시료별로 순수분리된 세균, 진균은 Table 3-17에 정리하였다. 결과적으로 진균은 88점(Table 3-18), 세균은 130점(Table 3-19)을 포함하여 총 218점을 확보하였다. 세균의 경우, 16S rDNA는 27F와 1518R을 사용하였고, 진균은 partial 28S rDNA LR0R과 LR5 그리고 ITS (ITS1-5.8S-ITS2)는 ITS1F와 NL4을 사용하여 genomic DNA로부터 증폭하였다.

Table 3-17. Number of microorganisms isolated from the Arctic biological samples

No.	Sample No.	Scientific name	Categorization	Fungi	Bacteria
1	2018 Arc #P01	<i>Arcticmoss</i> sp.	Moss	7	15
2	2018 Arc #P02	<i>Arcticmoss</i> sp.	Moss	5	17
3	2018 Arc #P03	<i>Arcticlichen</i> sp.	Lichen	3	2
4	2018 Arc #P04	<i>Stereocaulon</i> sp.	Lichen	5	7
5	2018 Arc #P05	<i>Arcticlichen</i> sp.	Lichen	2	8
6	2018 Arc #P06	<i>Stereocaulon</i> sp.	Lichen	2	5
7	2018 Arc #P07	Arctic lichen	Lichen	6	8
8	2018 Arc #P08	<i>Saxifraga oppositifolia</i>	Plant	10	6
9	2018 Arc #P11	<i>Salix</i> sp.	Plant	4	6
10	2018 Arc #P12	<i>Salix polaris</i>	Plant	0	14
11	2018 Arc #P13	<i>Cerastium</i> sp.	Plant	5	4
12	2018 Arc #P15	<i>Oxyria digyna</i>	Plant	7	11
13	2018 Arc #P16	<i>Dryas octopetala</i>	Plant	4	3
14	2018 Arc #P17	Arctic lichen	Lichen	1	10
15	2018 Arc #P19	<i>Stereocaulon</i> sp.	Lichen	11	0
16	2018 Arc #P20	<i>Cladonia</i> sp.	Lichen	2	4
17	2018 Arc #P21	Arctic lichen	Lichen	1	1
18	2018 Arc #P22	Arctic lichen	Lichen	10	1
19	2018 Arc #P24	Arctic lichen	Lichen	1	5
20	2018 Arc #P28	Arctic lichen	Lichen	2	3
Total				88	130

Table 3-18. List of fungi isolated from the Arctic biological samples

No	Station No.	분리 배지	부여 번호 (SF-)	Stock 수	제조일	No	Station No.	분리 배지	부여 번호 (SF-)	Stock 수	제조일
1	P1	0.1%NA	7569	4	19.09.11	45	P19	NA	7623	4	19.10.26
2	P1	YMA	7570	4	19.09.11	46	P19	NA	7624	4	19.10.26
3	P1	R2A	7572	4	19.09.11	47	P19	NA	7625	4	19.10.26
4	P1	NA	7573	4	19.09.11	48	P19	NA	7626	4	19.10.26
5	P1	PDA	7575	4	19.09.11	49	P19	NA	7627	4	19.10.26
6	P2	PDA	7577	4	19.12.18	50	P19	NA	7628	4	19.10.26
7	P2	PDA	7578	4	19.09.11	51	P19	YMA	7629	4	19.10.26
8	P2	NA	7579	4	19.09.11	52	P19	R2A	7630	4	19.11.09
9	P2	YMA	7580	4	19.09.11	53	P20	NA	7631	4	19.11.09
10	P2	PDA	7581	4	19.09.11	54	P21	NA	7634	4	19.11.09
11	P3	NA	7582	4	19.09.11	55	P22	NA	7635	4	19.11.09
12	P3	R2A	7585	4	19.09.11	56	P22	NA	7636	4	19.11.09
13	P4	NA	7586	4	19.09.25	57	P22	YMA	7638	4	19.11.09
14	P4	PDA	7588	4	19.09.25	58	P22	YMA	7639	4	19.11.09
15	P4	R2A	7589	4	19.12.18	59	P22	PDA	7640	4	19.11.09
16	P4	PDA	7590	4	19.09.25	60	P22	YMA	7641	4	19.11.09
17	P5	NA	7591	4	19.09.25	61	P22	0.1%NA	7642	4	19.11.09
18	P5	YMA	7593	4	19.09.25	62	P22	YMA	7643	4	19.11.09
19	P6	R2A	7594	4	19.09.25	63	P28	PDA	7645	4	19.11.09
20	P6	PDA	7595	4	19.09.25	64	P28	0.1%NA	7646	4	19.11.09
21	P7	YMA	7597	4	19.09.25	65	P1	PDA	7648	4	19.11.09
22	P8	R2A	7598	4	19.09.25	66	P3	PDA	7652	4	19.11.09
23	P8	YMA	7599	4	19.09.25	67	P4	0.1%NA	7653	4	19.11.09
24	P8	PDA	7600	4	19.09.25	68	P7	NA	7656	4	19.11.09
25	P8	NA	7601	4	19.10.12	69	P7	NA	7657	4	19.11.16
26	P8	0.1%NA	7602	4	19.10.12	70	P7	NA	7659	4	19.11.16
27	P8	0.1%NA	7603	4	19.10.12	71	P7	PDA	7661	4	19.11.16
28	P8	R2A	7604	4	19.10.12	72	P7	PDA	7662	4	19.12.18
29	P11	0.1%NA	7605	4	19.10.12	73	P8	R2A	7663	4	19.11.16
30	P11	NA	7606	4	19.10.12	74	P8	NA	7665	4	19.11.16
31	P11	NA	7607	4	19.10.12	75	P8	PDA	7666	4	19.11.16
32	P11	NA	7608	4	19.10.12	76	P13	PDA	7672	4	19.11.16
33	P13	NA	7610	4	19.10.12	77	P13	YMA	7673	4	19.11.16
34	P13	PDA	7611	4	19.10.12	78	P13	PDA	7674	4	19.11.16
35	P15	YMA	7612	4	19.10.12	79	P16	YMA	7675	4	19.11.16
36	P15	YMA	7613	4	19.12.18	80	P20	PDA	7677	4	19.11.16
37	P15	YMA	7614	4	19.10.12	81	P22	R2A	7678	4	19.12.07
38	P15	YMA	7615	4	19.10.26	82	P22	PDA	7679	4	19.12.07
39	P15	YMA	7616	4	19.10.26	83	P24	R2A	7681	4	19.12.07
40	P15	PDA	7617	4	19.10.26	84	P19	NA	7684	4	19.12.07
41	P16	PDA	7618	4	19.10.26	85	P19	NA	7685	4	19.12.07
42	P16	R2A	7619	4	19.10.26	86	P1	NA	7686	4	19.12.07
43	P16	YMA	7620	4	19.10.26	87	P15	YMA	7687	4	19.12.07
44	P17	0.1%NA	7621	4	19.12.18	88	P19	NA	7688	4	19.12.07

Table 3-19. List of bacteria isolated from the Arctic biological samples

No	Station No.	분리 배지	부여 번호 (SF-)	Stock 수	제조일	No	Station No.	분리 배지	부여 번호 (SF-)	Stock 수	제조일
1	P1	NA	3898	3	19.09.26	41	P21	R2A	3941	3	19.11.07
2	P1	NA	3899	3	19.09.26	42	P24	0.1%NA	3942	3	20.01.23
3	P1	NA	3900	3	19.09.26	43	P6	0.1%NA	3944	3	19.10.11
4	P1	NA	3901	3	19.09.26	44	P11	NA	3948	3	20.01.09
5	P1	NA	3902	3	19.09.26	45	P12	PDA	3949	3	19.11.07
6	P4	YMA	3903	3	19.10.11	46	P17	NA	3951	3	20.01.08
7	P4	YMA	3904	3	19.10.11	47	P17	R2A	3952	3	20.01.23
8	P4	YMA	3905	3	19.10.11	48	P1	R2A	3953	3	19.09.26
9	P4	R2A	3906	3	19.10.11	49	P1	R2A	3954	3	19.09.26
10	P8	R2A	3908	3	19.10.11	50	P1	R2A	3955	3	19.09.26
11	P8	0.1%NA	3909	3	19.10.11	51	P1	R2A	3956	3	19.10.04
12	P12	PDA	3910	3	19.11.04	52	P1	R2A	3957	3	19.10.04
13	P12	PDA	3911	3	19.11.04	53	P1	R2A	3958	3	19.10.04
14	P12	PDA	3912	3	19.11.04	54	P1	R2A	3959	3	19.10.04
15	P12	R2A	3913	3	19.11.12	55	P1	R2A	3960	3	19.10.04
16	P12	R2A	3914	3	19.11.12	56	P7	R2A	3964	3	19.10.11
17	P12	R2A	3915	3	20.01.09	57	P8	NA	3965	3	19.10.11
18	P12	R2A	3916	3	19.11.04	58	P11	NA	3967	3	20.01.03
19	P12	R2A	3917	3	19.11.04	59	P11	NA	3968	3	19.11.26
20	P15	R2A	3918	3	20.01.23	60	P11	NA	3969	3	20.01.09
21	P15	R2A	3919	3	20.01.23	61	P12	PDA	3970	3	20.01.09
22	P15	R2A	3920	3	19.11.12	62	P12	PDA	3971	3	20.01.13
23	P15	R2A	3921	3	19.11.07	63	P12	R2A	3972	3	19.11.12
24	P15	0.1%NA	3922	3	19.11.07	64	P17	NA	3973	3	20.01.13
25	P16	PDA	3923	2	19.11.26	65	P17	NA	3974	3	19.11.09
26	P16	PDA	3924	3	20.01.13	66	P17	NA	3975	3	20.01.13
27	P28	PDA	3925	3	19.11.07	67	P17	YMA	3976	3	19.11.07
28	P28	PDA	3926	3	19.11.07	68	P17	R2A	3977	3	20.01.09
29	P2	NA	3927	3	19.10.05	69	P17	R2A	3978	3	20.01.13
30	P2	PDA	3928	3	19.10.11	70	P20	NA	3979	2	20.01.13
31	P8	PDA	3929	3	19.10.11	71	P20	NA	3980	3	19.11.26
32	P13	R2A	3931	3	19.11.04	72	P24	0.1%NA	3981	3	20.01.13
33	P13	R2A	3932	3	19.11.04	73	P2	NA	3982	3	20.01.23
34	P13	R2A	3933	3	19.11.04	74	P2	NA	3983	3	19.10.04
35	P16	PDA	3935	3	20.01.13	75	P2	NA	3984	3	19.10.04
36	P17	NA	3936	3	20.01.09	76	P2	NA	3985	3	19.10.05
37	P1	R2A	3937	3	19.09.26	77	P2	YMA	3986	3	19.10.05
38	P5	0.1%NA	3938	3	19.10.11	78	P2	YMA	3987	3	19.10.05
39	P8	R2A	3939	3	19.10.11	79	P2	YMA	3988	3	19.10.05
40	P20	NA	3940	3	20.01.09	80	P2	YMA	3989	3	19.10.05

Table 3-19. List of bacteria isolated from the Arctic biological samples (Continued)

No	Station No.	분리 배지	부여 번호 (SF-)	Stock 수	제조일	No	Station No.	분리 배지	부여 번호 (SF-)	Stock 수	제조일
81	P2	YMA	3990	2	19.10.05	106	P24	0.1%NA	4015	3	20.01.09
82	P2	PDA	3991	3	19.10.05	107	P28	PDA	4016	3	20.01.09
83	P2	PDA	3992	3	19.10.05	108	P15	NA	4017	3	20.01.13
84	P2	PDA	3993	3	19.10.11	109	P15	R2A	4018	3	20.01.23
85	P2	PDA	3994	3	19.10.11	110	P15	R2A	4019	3	20.01.13
86	P2	R2A	3995	3	19.10.11	111	P12	R2A	4020	3	20.01.08
87	P5	NA	3996	3	19.10.11	112	P4	YMA	4021	3	20.01.13
88	P5	NA	3997	3	19.10.11	113	P4	YMA	4022	3	20.01.13
89	P5	NA	3998	3	19.10.11	114	P5	R2A	4023	3	20.01.13
90	P5	R2A	3999	3	19.10.11	115	P6	NA	4024	3	20.01.13
91	P5	R2A	4000	3	19.10.11	116	P7	R2A	4025	3	20.01.13
92	P5	R2A	4001	3	19.10.11	117	P7	R2A	4026	3	20.01.13
93	P6	NA	4002	3	19.10.11	118	P12	R2A	4027	3	20.01.08
94	P6	NA	4003	3	19.10.11	119	P6	0.1%NA	4028	3	20.01.13
95	P7	R2A	4004	3	19.10.11	120	P20	NA	4029	3	20.01.13
96	P7	R2A	4005	3	19.10.11	121	P24	YMA	4030	3	20.01.23
97	P7	R2A	4006	3	19.10.11	122	P1	NA	4031	3	20.01.23
98	P7	0.1%NA	4007	3	20.01.04	123	P11	NA	4032	3	20.01.23
99	P11	NA	4008	3	19.11.12	124	P2	PDA	4033	3	20.01.23
100	P13	R2A	4009	3	19.11.07	125	P3	PDA	4034	3	20.01.23
101	P15	NA	4010	3	19.11.12	126	P7	NA	4035	3	20.01.23
102	P15	NA	4011	3	20.01.09	127	P3	R2A	4036	3	20.01.23
103	P15	R2A	4012	3	19.11.12	128	P22	YMA	4037	3	20.01.23
104	P17	YMA	4013	3	19.11.07	129	P4	R2A	4038	3	20.01.23
105	P24	0.1%NA	4014	3	20.01.13	130	P8	YMA	4039	3	20.01.23

나. 미생물 동정을 위한 분자생물학적 분류

(1) 분리균주를 대상으로 2개의 온도에서 성장특성

(가) 분리된 세균과 진균은 각각 2장의 NA 배지와 PDA agar 배지에 도달한 후 10℃와 25℃ 배양기에서 배양한 후 일정 기간간격으로 성장여부를 확인하여 저온성 또는 내냉성 균주 여부를 판정하여 균주의 DB화에 활용한다.

(나) 세균 130종 중 99종에 대하여 온도별 성장시험을 진행하였으며(Table 3-20), 이 중 저온성균(25℃에서 보다 10℃에서 높은 성장을 보인 종)은 1종, 내냉성균이 91종 그리고 중온성균이 7종으로 나타났다. 전체적으로 내냉성균이 92%를 차지하는 현상을 보였으며 이는 기존 2018년 남극지역으로부터 분리된 세균에서 저

온성이 22%, 내냉성이 60% 그리고 중온성이 18%인 결과와 비교하여 저온성균의 비중이 현저히 낮고 내냉성균의 비중이 높은 것으로 보아 남극보다는 온도 폭의 변화에 의한 영향을 받은 것으로 판단된다.

(다) 진균 89종을 대상으로 온도별 성장시험을 진행하였으며(Table 3-21), 이중 68종에 대한 결과로부터 저온성균(25°C에서 보다 10°C에서 높은 성장을 보인 종)은 6종으로 9%를 차지하였다. 내냉성균은 37종으로 전체 가장 높은 비중인 54%를 그리고 중온성균은 25종으로 37%를 차지하고 있으며 결국 저온에서 성장이 가능한 종의 비중은 63%를 차지하는 것으로 나타났다

Table 3-20. The effect of temperature on the growth of bacterial strains

No.	Strain No.	Incubation temp.		No.	Strain No.	Incubation temp.	
		10°C	25°C			10°C	25°C
1	3898	+++	+++	29	3927	+	++
2	3899	+++	+++	30	3928	+++	+++
3	3900	+++	+++	31	3929	+++	+++
4	3901	+++	+++	32	3931	++	+++
5	3902	+++	+++	33	3932	+	+++
6	3903	+++	+++	34	3933	++	+++
7	3904	Ongoing	Ongoing	35	3935	++	+++
8	3905	+++	+++	36	3936	+++	+++
9	3906	+++	+++	37	3937	+++	+++
10	3908	+++	+++	38	3938	Ongoing	Ongoing
11	3909	+++	+++	39	3939	++	+++
12	3910	+++	+++	40	3940	+	+++
13	3911	+++	+++	41	3941	+	+++
14	3912	+++	+++	42	3942	Ongoing	Ongoing
15	3913	+++	+++	43	3944	+++	+++
16	3914	++	++	44	3948	+	+
17	3915	+++	+++	45	3949	+	+++
18	3916	+++	+++	46	3951	Ongoing	Ongoing
19	3917	+++	+++	47	3952	Ongoing	Ongoing
20	3918	Ongoing	Ongoing	48	3953	+	++
21	3919	Ongoing	Ongoing	49	3954	Ongoing	Ongoing
22	3920	++	+++	50	3955	+++	+++
23	3921	+++	+++	51	3956	++	+++
24	3922	++	+++	52	3957	++	+++
25	3923	+++	+++	53	3958	+	++
26	3924	+++	+++	54	3959	+	++
27	3925	++	+++	55	3960	++	+++
28	3926	+++	+++	56	3964	Ongoing	+++

Table 3-20. The effect of temperature on the growth of bacterial strains (Continued)

No.	Strain No.	Incubation temp.		No.	Strain No.	Incubation temp.	
		10°C	25°C			10°C	25°C
57	3965	+++	+++	94	4003	+++	+++
58	3967	Ongoing	Ongoing	95	4004	+++	+++
59	3968	+	+++	96	4005	+++	+++
60	3969	+	+++	97	4006	+++	+++
61	3970	+++	+++	98	4007	+++	+++
62	3971	Ongoing	Ongoing	99	4008	+++	+++
63	3972	+	++	100	4009	+++	+++
64	3973	++	+++	101	4010	+	+++
65	3974	±	+	102	4011	Ongoing	Ongoing
66	3975	++	+++	103	4012	+++	+++
67	3976	Ongoing	Ongoing	104	4013	+++	+++
68	3977	++	+++	105	4014	+++	+++
69	3978	+++	+++	106	4015	+++	+++
70	3979	+++	+	107	4016	+++	+++
71	3980	++	+++	108	4017	+++	+++
72	3981	Ongoing	Ongoing	109	4018	Ongoing	Ongoing
73	3982	+++	+++	110	4019	+++	+++
74	3983	+++	+++	111	4020	+++	+++
75	3984	+++	Ongoing	112	4021	Ongoing	Ongoing
76	3985	+++	+++	113	4022	+++	+++
77	3986	+++	+++	114	4023	+++	+++
78	3987	+++	+++	115	4024	Ongoing	Ongoing
79	3988	+++	+++	116	4025	Ongoing	Ongoing
80	3989	+++	Ongoing	117	4026	++	+++
81	3990	+++	+++	118	4027	Ongoing	Ongoing
82	3991	+++	+++	119	4028	+++	+++
83	3992	+++	+++	120	4029	Ongoing	Ongoing
84	3993	+++	+++	121	4030	Ongoing	Ongoing
85	3994	+++	+++	122	4031	Ongoing	Ongoing
86	3995	+++	+++	123	4032	Ongoing	Ongoing
87	3996	+++	+++	124	4033	Ongoing	Ongoing
88	3997	+++	+++	125	4034	Ongoing	Ongoing
89	3998	+++	+++	126	4035	Ongoing	Ongoing
90	3999	+++	+++	127	4036	Ongoing	Ongoing
91	4000	+++	+++	128	4037	Ongoing	Ongoing
92	4001	+++	+++	129	4038	Ongoing	Ongoing
93	4002	+++	+++	130	4039	Ongoing	Ongoing

Table 3-21. The effect of temperature on the growth of fungal strains

No.	Strain No.	Incubation temp.		No.	Strain No.	Incubation temp.	
		10°C	25°C			10°C	25°C
1	7569	+	++++	45	7623	+	++
2	7570	++	++++	46	7624	+++	+
3	7572	++	±	47	7625	++	+++
4	7573	±	++	48	7626	++	++
5	7575	+	+++	49	7627	+++	++
6	7577	Under incubation	Under incubation	50	7628	Under incubation	Under incubation
7	7578	+++	++++	51	7629	±	++++
8	7579	+	+	52	7630	+	+++
9	7580	++	+++	53	7631	±	-
10	7581	Under incubation	Under incubation	54	7634	Under incubation	Under incubation
11	7582	++	+++	55	7635	+	+++
12	7585	++	++	56	7636	++	++
13	7586	++	++	57	7638	++	-
14	7588	++	+++	58	7639	Under incubation	Under incubation
15	7589	Under incubation	Under incubation	59	7640	+	+++
16	7590	++	++++	60	7641	±	+
17	7591	+++	+++	61	7642	+	+++
18	7593	++	++++	62	7643	Under incubation	Under incubation
19	7594	+++	++++	63	7645	++	++
20	7595	++	+++	64	7646	Under incubation	Under incubation
21	7597	Under incubation	Under incubation	65	7648	Under incubation	Under incubation
22	7598	+	+++	66	7652	+++	++++
23	7599	Under incubation	Under incubation	67	7653	±	-
24	7600	++++	++++	68	7656	++	++
25	7601	++	+++	69	7657	+++	++++
26	7602	+	++++	70	7659	Under incubation	Under incubation
27	7603	++++	++++	71	7661	++	++++
28	7604	+++	++++	72	7663	+++	++
29	7605	++	+++	73	7665	±	+++
30	7606	+++	++++	74	7666	±	++
31	7607	+	+++	75	7672	++	+++
32	7608	++	++++	76	7673	±	-
33	7610	+	+++	77	7674	±	++
34	7611	+++	+	78	7675	++++	++++
35	7612	+++	+	79	7676	Under incubation	Under incubation
36	7613	±	+++	80	7677	±	+
37	7614	+++	+++	81	7678	+	+++
38	7615	±	++	82	7679	++	++
39	7616	++	++	83	7681	+	++
40	7617	Under incubation	Under incubation	84	7684	++	++
41	7618	+++	++++	85	7685	++	+++
42	7619	++	++	86	7686	Under incubation	Under incubation
43	7620	++++	++++	87	7687	Under incubation	Under incubation
44	7621	Under incubation	Under incubation	88	7688	Under incubation	Under incubation

(2) 극지 미생물의 동정

(가) 이전 연구에서 우수한 활성을 보인 진균 16종에 대한 염기서열을 결정하였으며 NCBI BLAST search를 통하여 유사도가 높은 균주들을 대상으로 clustalW alignment를 통하여 유사도를 분석하여 Table 3-22에 정리하였다.

(나) 우수균주 16점은 8속(genus) 13종(species)으로 나타났으며 *Cladosporium* 속이 6점, *Penicillium* 속이 4점으로 비중이 다소 높았다.

Table 3-22. List of fungal strain identified by ITS region sequence analysis

No.	Strain No. (SF-)	Closest relative	Similarity (%)	Reference*
1	7294	<i>Penicillium aeneum</i>	99.62	
2	7296	<i>Penicillium spathulatum</i>	100	KC427190
3	7303	<i>Cladosporium halotolerans</i>	99.64	KP701958
4	7309	<i>Penicillium dipodomyicola</i>	100	KT151579
5	7342	<i>Cladosporium asperulatum</i>	100	LN834357
6	7354	<i>Penicillium spathulatum</i>	99.47	KC427190
7	7358	<i>Cladosporium perangustum</i>	100	KP701968
8	7383	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100	KX463059
9	7395	<i>Camarosporula persooniae</i>	90.3	JF770449
10	7396	<i>Tolypocladium ophioglossoides</i>	98.98	EU834213
11	7416	<i>Leptosphaeria microscopica</i>	100	FN386274
12	7422	<i>Cladosporium cf. cladosporoides</i>	99.82	KY781769
13	7460	<i>Pseudogymnoascus destructans</i>	99.78	MF467856,
14	7473	<i>Lachnellula fusc sanguinea</i>	95.32	MH858769
15	7477	<i>Chrysosporium merdarium</i>	99.8	MH859164
16	7497	<i>Cladosporium perangustum</i>	100	MH863940

다. 극지생물 유래 미생물의 추출물 확보

추출물확보현황 : 분리된 진균은 이차대사산물의 빈도가 높은 진균을 대상으로 대량배양을 진행하였다. 본 연구에서 분리된 진균 88점과 이전 확보된 진균중 항염 및 항당뇨활성을 나타내었던 40점을 포함하여 총 128점의 진균은 PDA배지를 이용하여 제작된 plate (90 mm x 15 mm) 및 편박 플라스크에 접종하여 10℃에서 7~30일 배양하였다(균의 종에 따라 차이가 있음). 배양된 진균은 ethyl acetate 용매추출을 통하여 추출물제조를 완료하였다(Table 3-23).

Table 3-23. List of extracts using ethyl acetate from the Arctic biological samples

No.	Stock No.	Culture period		Extract (mg)	No.	Stock No.	Culture period		Extract (mg)
		Start date	End date				Start date	End date	
1	7569	19.09.18	19.10.01	43.2	41	7618	19.10.30	19.11.18	32.2
2	7570	19.09.18	19.10.01	24	42	7619	19.10.30	19.11.18	38.4
3	7572	19.09.18	19.10.01	100	43	7620	19.10.30	19.11.18	9
4	7573	19.09.18	19.10.01	78	44	7621	19.12.30	20.01.15	Ongoing
5	7575	19.09.18	19.10.01	18.4	45	7623	19.10.30	19.11.18	42.5
6	7577	19.12.30	20.01.15	Ongoing	46	7624	19.10.30	19.11.18	83.4
7	7578	19.09.18	19.10.01	18.2	47	7625	19.10.30	19.11.18	83
8	7579	19.09.18	19.10.01	73.6	48	7626	19.10.30	19.11.18	121.6
9	7580	19.09.18	19.10.01	25	49	7627	19.10.30	19.11.18	4.3
10	7581	19.09.18	19.10.01	22.7	50	7628	19.10.30	19.11.18	108.3
11	7582	19.09.18	19.10.01	42.3	51	7629	19.10.30	19.11.18	4
12	7585	19.09.18	19.10.01	19.1	52	7630	19.11.12	19.12.02	69.4
13	7586	19.10.05	19.10.21	57.6	53	7631	19.11.12	19.12.02	3
14	7588	19.10.05	19.10.21	32.1	54	7634	19.11.12	19.12.02	118.1
15	7589	19.12.30	20.01.15	Ongoing	55	7635	19.11.12	19.12.02	20
16	7590	19.10.05	19.10.21	19.3	56	7636	19.11.12	19.12.02	14.7
17	7591	19.10.05	19.10.21	30.2	57	7638	19.11.12	19.12.02	6.3
18	7593	19.10.05	19.10.21	124.3	58	7639	19.11.12	19.12.02	14.7
19	7594	19.10.05	19.10.21	65.2	59	7640	19.11.12	19.12.02	121.1
20	7595	19.10.05	19.10.21	12	60	7641	19.11.12	19.12.02	3.5
21	7597	19.10.05	19.10.21	59.5	61	7642	19.11.12	19.12.02	72.3
22	7598	19.10.05	19.10.21	50.7	62	7643	19.11.12	19.12.02	27.2
23	7599	19.10.05	19.10.21	140.3	63	7645	19.11.12	19.12.02	125.1
24	7600	19.10.05	19.10.21	38.4	64	7646	19.11.12	19.12.02	27.3
25	7601	19.10.16	19.11.05	104.2	65	7648	19.11.12	19.12.02	3.6
26	7602	19.10.16	19.11.05	81.9	66	7652	19.11.12	19.12.02	3
27	7603	19.10.16	19.11.05	53.9	67	7653	19.11.12	19.12.02	7.1
28	7604	19.10.16	19.11.05	17.7	68	7656	19.11.12	19.12.02	5.3
29	7605	19.10.16	19.11.05	51.3	69	7657	19.11.20	19.12.9	28.8
30	7606	19.10.16	19.11.05	19.9	70	7659	19.11.20	19.12.9	108.3
31	7607	19.10.16	19.11.05	21.5	71	7661	19.11.20	19.12.9	37.7
32	7608	19.10.16	19.11.05	12	72	7662	19.12.30	20.01.15	Ongoing
33	7610	19.10.16	19.11.05	20.5	73	7663	19.11.20	19.12.9	62.1
34	7611	19.10.16	19.11.05	23.4	74	7665	19.11.20	19.12.9	11
35	7612	19.10.16	19.11.05	43.5	75	7666	19.11.20	19.12.9	53.5
36	7613	19.12.30	20.01.15	Ongoing	76	7672	19.11.20	19.12.9	21
37	7614	19.10.16	19.11.05	26	77	7673	19.11.20	19.12.9	15.9
38	7615	19.10.30	19.11.18	21.1	78	7674	19.11.20	19.12.9	19.8
39	7616	19.10.30	19.11.18	40.8	79	7675	19.11.20	19.12.9	17.7
40	7617	19.10.30	19.11.18	39.8	80	7677	19.11.20	19.12.9	15

Table 3-23. List of extracts using ethyl acetate from the Arctic biological samples (Continued)

No.	Stock No.	Culture period		Extract (mg)	No.	Stock No.	Culture period		Extract (mg)
		Start date	End date				Start date	End date	
81	7678	19.12.21	20.01.06	34	105	7495	19.11.20	19.12.10	4.6
82	7679	19.12.21	20.01.06	12.9	106	7497	19.11.20	19.12.10	6.7
83	7681	19.12.21	20.01.06	73.8	107	7446	19.11.20	19.12.10	3.4
84	7684	19.12.21	20.01.06	89.4	108	7467	19.11.20	19.12.10	6.5
85	7685	19.12.21	20.01.06	16.1	109	7506	19.11.20	19.12.10	4.3
86	7686	19.12.21	20.01.06	43.6	110	7523	19.11.20	19.12.10	8.6
87	7687	19.12.21	20.01.06	3.1	111	7527	19.11.20	19.12.10	4.0
88	7688	19.12.30	20.01.15	Ongoing	112	7541	19.11.20	19.12.10	1.0
89	7412	19.11.08	19.11.25	1.0	113	7553	19.11.20	19.12.10	3.2
90	7425	19.11.08	19.11.25	6.6	114	7556	19.11.20	19.12.10	1.5
91	7427	19.11.08	19.11.25	5.2	115	7294	19.12.12	19.12.26	7.3
92	7428	19.11.08	19.11.25	1.0	116	7296	19.12.12	19.12.26	9.9
93	7432	19.11.08	19.11.25	1.0	117	7303	19.12.12	19.12.26	4
94	7451	19.11.08	19.11.25	9.2	118	7309	19.12.12	19.12.26	9.9
95	7452	19.11.08	19.11.25	10.7	119	7310	19.12.12	19.12.26	1.4
96	7457	19.11.08	19.11.25	8.2	120	7341	19.12.12	19.12.26	1.0
97	7466	19.11.08	19.11.25	5.4	121	7342	19.12.12	19.12.26	4.0
98	7473	19.11.08	19.11.25	8.9	122	7354	19.12.12	19.12.26	5.9
99	7477	19.11.08	19.11.25	9.9	123	7358	19.12.12	19.12.26	5.1
100	7488	19.11.08	19.11.25	4.5	124	7383	19.12.12	19.12.26	7.8
101	7492	19.11.08	19.11.25	6.3	125	7395	19.12.12	19.12.26	3.5
102	7453	19.11.20	19.12.10	12	126	7396	19.12.12	19.12.26	1.9
103	7460	19.11.20	19.12.10	3.2	127	7416	19.12.12	19.12.26	7.0
104	7478	19.11.20	19.12.10	4.9	128	7422	19.12.12	19.12.26	1.2

라. 생리활성 검증

(1) PTP1B 저해활성에 의한 항당뇨 검색

(가) 진균 추출물을 대상으로 항당뇨 질병의 분자표적으로 인식되는 탈인산화효소인 PTP1B (Protein tyrosine phosphatase 1B)를 저해하는 *in vitro* assay를 수행하였으며 이를 통하여 진균 추출물의 항당뇨 저해능력을 평가하였다.

(나) 본 연구에서 분리된 진균 추출물을 대상으로 PTP1B 저해활성을 조사하였으며 균주 중 추출물의 농도를 0.3 µg/ml 수준에서 50%이상 PTP1B 저해활성을 보인 시료는 총 33균주로 나타났으며 이중 SF-7648균주가 97.58%로 가장 높은 활성을 보였다. 1 µg/ml의 농도로 추출물을 처리하였을 때 PTP1B 저해활성이

70%이상을 나타낸 시료는 총 52균주로 나타났다. 이전균주로부터 얻어진 우수 추출물의 활성은 Table 3-24에 No. 89-115까지 결과를 수록하였다.

(2) 항염활성 : RAW264.7 세포주 NO억제실험에서 우수활성을 보인 균주인 13종의 측정결과는 Table 3-25에 수록하였다.

Table 3-24. The summary of PTP1B inhibitory activity(%) against fungal extracts

No.	Strain No.	Conc.(ug/ml)			No.	Strain No.	Conc.(ug/ml)		
		0.3	1	3			0.3	1	3
1	7569	54.48	68.09	92.36	31	7607	50.24	99.71	99.75
2	7570	71.69	80.99	97.73	32	7608	Ongoing		
3	7572	56.82	74.25	96.15	33	7610	16.85	22.59	27.75
4	7573	69.45	93.12	97.98	34	7611	61.10	22.59	99.97
5	7575	52.20	97.11	100.07	35	7612	57.71	99.82	100.00
6	7577	Ongoing			36	7613	Ongoing		
7	7578	62.19	97.66	99.75	37	7614	85.99	99.82	99.78
8	7579	42.83	76.43	99.51	38	7615	27.17	32.67	99.85
9	7580	59.72	90.22	98.46	39	7616	43.49	99.33	99.85
10	7581	40.72	82.14	98.40	40	7617	42.66	70.05	99.92
11	7582	34.77	99.04	98.51	41	7618	27.52	39.11	58.75
12	7585	36.72	63.75	97.01	42	7619	48.13	77.55	99.91
13	7586	73.72	92.86	104.63	43	7620	42.59	92.91	99.52
14	7588	57.32	91.80	99.81	44	7621	Ongoing		
15	7589	Ongoing			45	7623	44.84	87.04	99.81
16	7590	Ongoing			46	7624	35.65	89.73	99.78
17	7591	57.91	84.11	102.89	47	7625	9.65	17.95	43.87
18	7593	71.02	97.04	98.74	48	7626	27.99	40.58	91.26
19	7594	85.50	96.63	98.16	49	7627	48.66	99.37	99.14
20	7595	28.82	69.00	96.54	50	7628	45.44	73.67	99.47
21	7597	40.42	92.03	96.88	51	7629	20.38	36.73	42.30
22	7598	60.89	99.80	97.01	52	7630	39.57	99.17	99.79
23	7599	47.49	68.74	89.53	53	7631	44.95	99.91	99.96
24	7600	55.68	87.39	98.83	54	7634	27.31	76.81	99.96
25	7601	78.63	96.07	97.79	55	7635	32.16	69.76	99.89
26	7602	23.72	76.22	99.81	56	7636	33.39	100.06	99.67
27	7603	53.54	98.04	99.76	57	7638	Ongoing		
28	7604	58.24	81.55	98.48	58	7639	Ongoing		
29	7605	53.99	90.17	99.42	59	7640	35.05	98.45	99.43
30	7606	47.42	68.66	76.51	60	7641	53.74	97.70	99.40

Table 3-24. The summary of PTP1B inhibitory activity(%) against fungal extracts (Continued)

No.	Strain No.	Conc.(ug/ml)			No.	Strain No.	Conc.(ug/ml)		
		0.3	1	3			0.3	1	3
61	7642	10.29	43.34	99.87	89	7453	41.36	95.21	98.01
62	7643	92.42	100.64	99.40	90	7460	65.27	99.88	108.05
63	7645	4.39	28.96	92.34	91	7478	39.59	99.8	101.46
64	7646	81.52	99.74	99.99	92	7495	68.73	99.37	101.12
65	7648	97.58	99.06	98.89	93	7497	79.14	100.62	102.17
66	7652	51.54	96.97	99.24	94	7446	41.01	69.43	100.03
67	7653	24.58	28.74	98.51	95	7467	40.34	91.92	100.3
68	7656	29.33	76.23	99.94	96	7506	42.92	88.77	103.07
69	7657	34.02	37.65	98.69	97	7523	48.62	94.41	99.2
70	7659	86.89	98.76	100.23	98	7527	38.82	95.66	98.69
71	7661	79.71	100.00	100.10	99	7541	43.03	84.82	100.29
72	7662	Ongoing			100	7553	40.28	98.57	99.91
73	7663	94.31	99.93	99.68	101	7556	39.56	98.5	99.66
74	7665	78.75			102	7294	54.10	99.85	99.91
75	7666	8.67	21.76	84.48	103	7296	93.10	98.01	106.35
76	7672	21.03	30.18	69.51	104	7303	49.66	98.01	106.35
77	7673	16.55	27.03	46.65	105	7309	83.22	99.87	99.95
78	7674	62.85	79.89	99.74	106	7310	53.05	98.94	100.27
79	7675	4.50	17.28	20.86	107	7341	96.14	99.34	99.90
80	7677	67.73	83.81	99.97	108	7342	67.10	98.09	99.80
81	7678	6.52	50.45	100.00	109	7354	89.81	100.16	100.12
82	7679	80.25	99.47	99.75	110	7358	99.73	99.59	99.26
83	7681	27.11	59.50	99.14	111	7383	97.49	99.33	99.50
84	7684	12.48	18.68	28.98	112	7395	99.05	99.23	99.27
85	7685	17.74	75.35	99.96	113	7396	64.12	68.05	100.10
86	7686	14.24	69.40	99.45	114	7416	73.03	99.71	99.86
87	7687	20.92	65.74	99.93	115	7422	52.81	87.06	100.03
88	7688	Ongoing							

Table 3-25. Effects of polar microorganism extracts on NO inhibition in RAW264.7 cells

No.	Name	Conc.	NO (μ M)	Inhibition (%)
		Butein	10 μ M	0.775
1	SF 7412	25ug/ml	3.058	46.3
		50ug/ml	2.411	59.6
		100ug/ml	2.147	65.0
2	SF 7425	25ug/ml	4.400	18.7
		50ug/ml	3.250	42.4
		100ug/ml	1.453	79.3
3	SF 7427	25ug/ml	4.496	16.7
		50ug/ml	1.620	75.9
		100ug/ml	1.620	75.9
4	SF 7428	25ug/ml	4.064	25.6
		50ug/ml	2.507	57.6
		100ug/ml	1.788	72.4
5	SF 7432	25ug/ml	4.047	26.0
		50ug/ml	4.064	25.6
		100ug/ml	2.363	60.6
6	SF 7451	25ug/ml	2.339	61.1
		50ug/ml	1.381	80.8
		100ug/ml	1.093	86.7
7	SF 7452	25ug/ml	3.921	28.6
		50ug/ml	3.417	38.9
		100ug/ml	1.956	69.0
8	SF 7457	25ug/ml	4.208	22.7
		50ug/ml	2.842	50.7
		100ug/ml	2.459	58.6
9	SF 7466	25ug/ml	2.387	60.1
		50ug/ml	1.261	83.2
		100ug/ml	0.590	97.0
10	SF 7473	25ug/ml	3.513	36.9
		50ug/ml	2.962	48.3
		100ug/ml	1.285	82.8
11	SF 7477	25ug/ml	3.657	34.0
		50ug/ml	3.202	43.3
		100ug/ml	0.758	93.6
12	SF 7488	25ug/ml	3.417	38.9
		50ug/ml	2.746	52.7
		100ug/ml	2.986	47.8
13	SF 7492	25ug/ml	3.801	31.0
		50ug/ml	2.675	54.2
		100ug/ml	2.794	51.7

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

제 1 절 연구평가의 착안점 및 검증방법

제 2 절 연구개발 목표 달성도

제 3 절 연구개발 결과의 대외 기여도



제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연구평가의 착안점 및 검증방법

연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	평가의 착안점 및 척도	검증방법	가중치 (%)
신약 및 바이오신소재의 안전성 및 독성평가	Zebrafish 기반 스크리닝 연구기반 구축	<ul style="list-style-type: none"> ■ Zebrafish 유지/배양시스템 구축 ■ 미세주입 장치 및 영상 분석 시스템 확보 	시스템 구축 및 확보 여부	30
	Zebrafish 기반 도출물질의 유효성 및 안전성 평가(3건 이상)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 발생독성 및 신경독성 평가 ■ 유전자 발현 및 표현형 분석 	독성평가 방법 구축 및 평가 건수	
질환모델 동물을 이용한 후보물질 효능 검증	질환모델동물을 활용한 신규 후보물질 효능 검증 (3건 이상)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 질환모델 확보 ■ 항염증/지방간 개선 후보물질 효능 검증 	질환모델 개발 기술 확보 및 효능 검증 건수	40
	실험동물을 활용한 극지 미생물 유래 생리활성 물질 탐색(5건 이상)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 항염증 후보물질 탐색 ■ 후보 미생물 추출물 확보 	후보물질 탐색 건수	
극지 미생물로부터 생리 활성물질 확보 및 탐색	극지 환경으로부터 세균, 방선균 및 진균의 분리, 확보 및 DB 구축(200점 이상)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 극지생물 유래 미생물 확보 ■ 세균, 진균 등 DB 구축 	미생물 확보 건수 및 DB 구축 여부	30
	극지미생물 유래 생리활성 물질 탐색을 위한 대량배양 및 추출물 확보(진균 120건 이상)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 극지미생물 추출물 확보 ■ 항당뇨/항염 활성 검증 	추출물 확보 건수 및 활성 검증 여부	

제 2 절 연구개발 목표 달성도

총연구기간 내 목표 대비 달성율(%)			
연구 목표 달성내용			연구실적 달성율 (%)
세부연구목표	연구내용	달성실적	
신약 및 바이오신소재의 안전성 및 독성평가 (30%)	Zebrafish 기반 스크리닝 연구기반 구축	자동화 배양/미세주입 시스템 구축과 분석 기법 기반 확립	100
	Zebrafish 기반 도출물질의 유효성 및 안전성 평가(3건 이상)	극지 지의류/미생물 유래 추출 물의 발생/신경독성 평가와 유 전자 발현 분석(11건)	
질환모델동물을 이용한 후보물질 효능 검증 (40%)	질환모델동물을 활용한 신규 후보물질 효능 검증(3건 이상)	치매, 간 지방증 등 질환 모델 확보 및 개발과 항염증/지방간 개선 후보 물질 효능 검증(7건)	100
	실험동물을 활용한 극지 미생물 유래 생리활성 물질 탐색(5건 이상)	미생물 추출물 확보 및 항염증 후보물질 탐색(8건)	
극지 미생물로부터 생리 활성물질 확보 및 탐색 (30%)	극지 환경으로부터 세균, 방선균 및 진균의 분리, 확보 및 DB 구축(200점 이상)	세균, 방선균 및 진균 218점 이상 분리 및 DB 구축	100
	극지미생물 유래 생리활성 물질 탐색을 위한 대량배양 및 추출물 확보(진균 120건 이상)	극지 미생물 추출물 128개 확보 및 항당뇨/항염 활성 탐색	

제 3 절 연구개발 결과의 대외 기여도

천연물 유래의 신규 의약품 개발이나 신기능 생물소재의 기능 규명 및 대사기전을 분석하기 위해서는 후보물질의 안전성을 확보하는 것이 최우선 되어야하며, 이를 위해서는 인간을 대신할 수 있는 실험동물을 활용한 검증 기술 확보가 필요하다. 과학자들은 실험동물모델을 개발하여 질환의 원인 및 생리작용 규명과 예방·진단 및 치료방법을 모색하는 수단으로 특히, 의생명과학 분야에서 활용하여 왔다. 그 중에서도 설치류가 기초 및 임상연구를 위한 대표적인 실험동물모델로서 사용되어 왔지만 마우스를 이용한 질환동물모델은 발생초기 질병의 표현형 관찰, 유전자의 고속기능분석 및 대규모 스크리닝의 어려움, 시간적·경제적 측면에서의 부담 등으로 질환모델개발과 유전자 기능연구에서 제한점을 가지고 있다. 근래에는 마우스, 쥐 및 토끼 등을 실험동물로 사용하는데서 오는 윤리적인 문제가 대두되면서 무엇보다도 실험실에서 쉽게 다룰 수 있는 실험 대체 동물의 개발이 절실한 상황이었다. 2000년 중반에 들어 새로운 실험동물 모델로서 제브라피쉬(zebrafish; *Danio rerio*)의 유용성이 확인되면서, 생명과학 전 분야에 폭넓게 도입되어 생물학, 유전학 및 독성학 연구에 훌륭한 모델로 사용되고 있다. 또한 제브라피쉬 활용연구는 인간과의 높은 상동성, 유전학적, 병리학적 측면에서의 유사성, 질환모델 분석기술의 발달, 유전자조작기술의 발전으로 인해 제브라피쉬의 질환모델개발과 활용도는 점점 증가될 것으로 예상된다. 이들 제브라피쉬를 활용한 질환모델의 개발은 심뇌혈관질환 뿐만 아니라 다양한 질환의 병태를 이해하고 질환치료기술 개발연구에 기여할 것으로 기대 된다.

본 연구에서는 실험동물을 활용한 극지 유래 유용활성물질의 개발을 위해 바이오신소재의 발굴과 효능평가, 신규 의약품 후보물질의 인체 내 작용기전 연구와 안전성 검증을 위한 실험동물 연구기반을 구축하여 극지생물 유래 유용물질 개발 가능성을 초기 단계에서 평가하기 연구기반을 확보하였고, 연구소 내외 진행 중인 극지생물 기반 실용화 연구에서 개발코자 하는 후보물질의 안전성 평가에 널리 기여할 것으로 기대한다.

[과학·기술적측면]

- 제브라피쉬는 인체 질환과 매우 유사함이 밝혀졌고 심혈관계, 암, 근육계, 골 형성, 신경계, 감각계 및 생식계 등 인간에게 유발하는 거의 대부분의 질병 분야 연구가 가능

한 모델이므로, 본 연구의 제브라피쉬 기반 질환모델체 확보 및 개발은 다양한 질환치료 물질 발굴, 대단위 약물 검증, 전임상 실험 등 질환치료 및 신약개발에 활용될 기준 자료를 제시한다.

- 제브라피쉬는 포유류와 간 기능의 유사성이 높아 약물에 의한 간독성 평가에 적합하며, 간에서 특이적으로 형광단백질을 발현하는 형질전환개체를 이용하여 지방간(steatosis), 간세포사멸(cell death), 간의 크기 및 형태적 변화를 평가하여 약물에 의한 간독성을 평가할 수 있다. *in vitro* 세포를 이용한 독성 및 약물효능 평가 수행은 생체 내 기능을 완벽하게 모사하지 못하는 한계가 있으므로 *in vivo* 동물 모델 중 위의 장점을 가지는 제브라피쉬를 활용하여 다 수의 남·북극 유래 시료에 대하여 빠르고 다양하게 안전성 및 독성평가를 제시한다.
- 포스트게놈 시대에 기능유전체학을 이용한 신약개발 및 질병치료의 새로운 타겟유전자를 발굴하는 것이 매우 중요하다. 제브라피쉬라는 작은 척추동물을 이용한 2,700 인간 유전자에 대한 기능정보의 확보는 바이오신소재 발굴을 위한 타겟유전자 발굴과 함께, 새로운 신약후보물질의 대량 스크리닝 기술개발, 그리고 다양한 질환모델동물로서의 활용 등, 향후 의약바이오산업화에서 중요한 생명연구자원이 될 것이다.
- 설치류(마우스)가 실험동물기초중개 및 임상연구를 위한 대표적인 실험동물모델로서 사용되어 왔지만 마우스를 이용한 질환동물모델은 발생초기 질병의 표현형 관찰, 유전자의 고속기능분석 및 대규모 스크리닝의 어려움, 시간적·경제적 측면에서의 부담 등으로 질환모델개발과 유전자 기능연구에서 제한점을 가지고 있는 것에 반하여, zebrafish는 세대기간이 짧으므로 차세대에 미치는 영향을 쉽게 연구할 수 있으며 실험에 영향을 주는 환경 조절이 용이하여 연구소 내 최소한의 공간에서 운영이 가능한 배양시스템을 구축하였으며, 일정한 환경의 시간적, 공간적 및 경제적으로 관리하기 어려운 한계를 극복 가능할 것이다.
- Zebrafish는 암이 유발되는 경로 및 암의 조직학적 구조가 사람과 유사하며, 각종 암 유발 관련 유전자들의 발암 기전이 사람과 거의 동일한 것으로 확인되어 최근 많은 연구자들에 의하여 암 동물모델로서 활용되고 있다. 본 연구에서는 항염, 항당뇨, 치매, 항암 및 간질환 치료를 위한 질환모델을 구축 및 활용 중에 있으므로, 질환모델을 활용한 극지유래 활성물질 탐색 및 안정성 평가를 위한 기반을 제시한다.
- 제브라피쉬 게놈 시퀀싱 프로젝트(Zebrafish genome-sequencing project) 결과, 질환관련 유전자를 포함하여 적어도 70%의 유전자가 인간과 동일하게 존재한다는 것이 보고

되어 대부분 인간의 생리·병태현상이 제브라피쉬에서 모델화가 가능하다. 연구과제 확보된 유전자 정보를 활용하여 새로운 질환모델 제브라피쉬를 개발하여 zebrafish 활용 연구에 기여한다.

- 조직 특이적으로 형광을 발현하는 transgenic zebrafish의 활용은 특정 세포의 이동이나 증식 사멸 분화 과정을 생체 내에서 살아있는 상태에서 관찰할 수 있다. 또한 제브라피쉬는 25개의 염색체를 가지고 있으므로, 인체의 유전자와 크기와 수가 비슷하며 유전자 및 단백질간의 상동성이 매우 높고, 또한 신경계뿐 아니라 각종 기관형성 과정이 사람과 매우 유사하기에 제브라피쉬의 연구를 통하여 얻어진 결과들은 바로 인간의 건강과 질병 연구에 중요한 자료로 활용될 수 있다.

[경제·산업적 측면]

- Zebrafish의 다양한 장점을 활용함으로써 신약개발 초기 단계에 신속한 대량 검증이 가능해 많은 비용과 시간이 소요되는 신약개발의 계속 진행여부를 초기에 판정할 수 있으며, 다양한 신물질에 대한 독성 및 효능평가를 개발 초기에 평가할 수 있어 최적의 후보물질 도출로 개발과정에서 실패에 대한 리스크를 줄일 수 있다.
- 비임상 시험 독성평가와 효능평가 부분에서 기존 동물 실험을 대체할 수 있어 연구 현장에서 실험 동물의 윤리문제 부담을 덜 수 있고 척추동물로서 여러 기관을 갖고 있는 zebrafish의 특징을 살려 배아나 치어 상태에서 시험을 수행할 경우 외부에서 배양된 세포보다 더 다양한 기능적 평가를 검증할 수 있다.
- Zebrafish 동물모델 사용은 복잡성·장시간·고비용의 한계와 더불어 동물윤리 강화에 따른 제한이 있어 이를 보완하기 위해 인간 유전자 및 조직 상동성이 높은 zebrafish 시스템을 평가에 활용함으로써 실패율을 줄이고, 개발비용도 절감할 수 있다.
- 기존의 실험쥐 등 포유류 동물을 이용한 전임상 시험은 비용과 시간이 많이 들며, 도덕적 논란도 끊이지 않고 있다. 실험 자체가 복잡한 경우도 많고 세계적으로 동물윤리 지침이 강화되면서 세포 실험과 포유동물 실험의 중간 단계에 적용할 수 있는 동물대체시험법에 대한 필요성이 늘어나고 있다. 제브라피쉬를 실험동물로 활용한 연구는 세포실험과 포유동물 실험의 중간 단계에 적용될 수 있어 동물 실험을 최소화할 수 있을 것으로 기대된다.
- 실험동물의 운영이 합리적이고 체계적으로 운영관리 됨으로서 동물실험에 대한 윤리성을

보증하고 동물실험 결과의 정확성, 재현성을 확보함으로써 우리나라에서 수행되는 생명과학연구에 대한 국제 신뢰성 구축한다.

- 현재 신약개발과정에서는 신약개발의 각 단계를 효율적으로 지원할 수 있는 다양한 *in vitro* 및 *in vivo* 시험계가 개발되어 활용되고 있다. 특히 선도물질의 최적화 단계에서 약물대사연구는 더욱 큰 의미를 지닌다. 특히, 약물 대사체의 동정 및 대사경로의 규명은 신약개발과정에서 필수적으로 요구되며 신약개발 규제/허가기관에서도 물질의 안전성 및 유효성 검증을 위하여 필수적으로 요구하고 있다. 제브라피쉬를 이용한 신약 개발 초기단계에서의 대사체 연구가 약물동태(pharmacokinetics, PK) 특성을 개선하기 위한 부분에 목적을 두어 정성적 분석에 초점을 맞추고 있으므로 독성적 측면에서의 대사 연구를 수행하기 위해 정성뿐 아니라 정량적 분석이 가능하다.
- Zebrafish 기반 동물모델 개발과 기능연구체계 확립으로 다양한 인간 질환치료 연구에 적용될 수 있는 기반 기술로 활용 가능하며, 신약개발 단계에서 효능 및 독성 검사를 위한 비포유류 전임상모델로 활용, zebrafish 질환모델 인프라 구축을 기반으로 다양한 기초·임상 실험을 위한 실험동물모델 수립에 대한 시간적·경제적 투자 비용 절감을 유도할 수 있을 것으로 기대된다.

[국제공동연구에 대한 기여도]

- 본 연구는 극지생물 유래의 유용물질 발굴 및 개발을 위해 제브라피쉬 연구기반 구축과 이를 이용한 후보물질의 독성 및 안전성 평가와 효능 정밀 검증을 목표로, 다양한 초기 독성평가 시스템을 구축하였고, 질환모델 도입과 새로운 질환모델을 개발하여 후보물질의 실용화 가능성을 제시한다. 현재 제브라피쉬를 이용한 국제공동연구는 첫째, 질환모델 확립기술 개발과 공동 활용, 둘째, 대규모의 배양 및 스크리닝을 목적으로 진행되고 있다. 이번 연구에서 구축된 스크리닝 시스템은 극지에서 유래하는 물질의 안전성 및 효능 검증을 위해 소규모로 운영되는 것으로 국제공동연구를 대비한 규모의 시스템이라고는 할 수는 없으나, 질환모델 기술개발 측면에서는, 연구팀 자체적으로 질환모델을 제작·유지할 수 있는 기술을 확보하고 있으므로, 추가 질환모델들을 개발 중에 있고, 국제공동연구 추진을 통해 공동 활용이 가능할 것으로 사료된다. 본 연구팀은 제브라피쉬 활용연구 영역 확장과 극대화를 위해, 국제학회에 적극적으로 연구결과를 소개하고 국제공동 연구주제를 도출할 계획이다. 국제 공동연구를 목표로 하는 주요국과 연구동향을 아래에 기술하였다.

- 제브라피쉬 국제학회는 2년 주기로 개최되고 있으며, 각 지역별로 별도의 모임이 만들어지고 있으며 최근 아시아에서도 Asia-Oceania Zebrafish Meeting이 개최되고 있다. 이들 일반적 학회와는 별도로, 제브라피쉬의 국제적 역할과 중요성이 점점 더 긴박해지고 있기 때문에 신속한 정보교환과 세계적 연구방향의 설정을 위하여 얼마 전부터 미국 주도로 zebrafish PI meeting을 별도로 하고 있다. 큰 변화는 기존의 초기발생 연구중심에서 발생후기의 장기형성 및 질병모델을 중심으로 성체줄기세포 및 행동연구에까지 확대되고 있다는 것이다. 줄기세포 연구의 경우, 미국이나 유럽, 일본 등 소위 선진국에서는 현재 동물모델을 중심으로 기초연구가 한창 진행되고 있으며, 여기서 나온 새로운 연구결과들을 조심스럽게 인간에 적용하려 노력하고 있다.
- 제브라피쉬를 질환연구에 이용하는 연구체계는 미국의 경우, 미국 국립보건연구원의 지원(Trans-NIH Zebrafish Initiative) 아래 제브라피쉬 조정위원회를 통한 연구비 지원 및 조직적인 네트워크운동을 통하여 이미 13개 연구소, 19,000 탱크, 100,000종 이상의 제브라피쉬를 보유·운영하고 있다. 또한 미국 NIH에서는 Trans-NIH Zebrafish Initiatives를 설립하여, 척추동물 발생 및 질병연구에서의 제브라피쉬 모델 동물이용을 활성화하기 위해 추진되었으며, 제브라피쉬 유전체, 유전 자원연구에 대한 연구비 지원 및 정보자원의 제공을 위한 중추적인 역할 수행하고 있다.
- 유럽의 경우, 유럽 7개국 통합 제브라피쉬연구 프로젝트 "ZF-Models Project" 을 통해 인체 발생 및 질환 관련 제브라피쉬모델 개발 및 정보기술을 공유하고 있다. 독일 막스프랑크연구소 주관으로 ZF-MODELS consortium은 유럽 7개국 17개 기관으로 구성되어 있다. 다국적으로 구성으로 14,586 유전자 변이 제브라피쉬모델 제작에 돌입, 200여 개 이상의 비정상적인 표현형 관찰을 통해 질환모델개발을 진행 중에 있다.
- National BioResource Project Zebrafish : 일본 제브라피쉬자원센터로 RIKEN에서 운영하는 메인 코어랩으로, 국가 차원에서 제브라피쉬 strains 등의 생명연구자원 확보를 live stock 및 sperm banking 시스템을 구축 운영하고 있다. 제브라피쉬연구에서 구축된 라인을 유지, 관리하고 연구자를 위해 생명연구자원 제공 및 연구지원(교육) 등의 업무를 수행하고 있다. 또한 일본, 싱가포르, 한국, 호주를 포함하는 "Asia-Oceania Zebrafish Committee" 구성을 통해 세계 각국에서 투자 및 연구가 진행 중에 있다.
- 이외에도 다국적 제약회사, 하버드 메디칼 스쿨, 메이요 클리닉 등 의료기관과 대학에서 질환관련 인간 유전자 변이 기능연구, 신약개발연구, 질병모델 및 임상실습 분석을 위한 목적으로 대규모의 제브라피쉬 실험실을 운영하고 있다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

첨부 : 최종 결과보고서 평가의견 반영사항



제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

1. 과학·기술적 측면

- 간 지방증 제브라피쉬 모델을 활용, 콜레스테롤 합성(cholesterol synthesis), 지방산 합성(fatty acid synthase), 불포화화효소(desaturase), 미토콘드리아 효소(mitochondrial enzyme)와 관련이 있는 지질대사 유전자들의 발현 변화를 분석하여, 라말린의 안전성 평가와 지질 대사 감소 및 지질 항상성 개선으로 간 지방증 생성 억제효과를 확인하였다. 본 결과는 라말린의 상용화를 위한 추가 활성 및 정밀 효능검증을 위한 자료로 활용된다.
- 유전자 편집 기술 중 3 세대에 해당하는 CRISPR-Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats (CRISPR/Cas9) 기술은 DNA 절단효소(Cas9)로 표적 유전자를 없애거나 더할 수 있고, 다른 염기서열로 교체할 수도 있다. 본 과제에서 수행된 유전자 가위 기술 및 화합물 기반 질환모델 개발 연구는 특정 유전자로부터 발현된 단백질 작용기전 분석과 추가 질환모델 개발의 가능성을 높이고 제브라피쉬 연구범위를 확대하는데 기여한다.
- 최근에는 독성발현경로(AOP, Adverse Outcome pathway) 개념이 주목 받고 있다. 분자와 같은 낮은 단계에서의 독성 결과가 세포, 조직기관을 넘어 개체와 집단 수준에서 어떤 경로로 연결되는지를 찾는 것이다. 제브라피쉬는 분자 수준에서 나타나는 독성 메커니즘 규명이 용이하므로 처음부터 생체 외 결과가 아닌 생체 내 결과를 가지고 독성발현경로를 연구할 수 있다.
- 제브라피쉬를 이용한 기능성 물질 탐색을 위한 동물모델 연구기반을 확립하여, 제브라피쉬를 이용한 기능성 물질 탐색의 기초자료 제공, 제브라피쉬의 기능성 물질 탐색을 위한 동물모델로의 기술 확립, 기능성 물질의 효능 및 독성의 신속한 평가 등을 위한 정확성 향상에 활용할 수 있다.
- Biomedical research에 있어서도 제브라피쉬는 강력한 imaging 기술과 발전된 genetic tool(유전체 디자인 기술)에 힘입어 가치 있는 동물모델(valuable model)로서 인정받고 있으며 여기에 약물 스크리닝을 위한 자동화된 시스템의 최적화와 결합되어 'Top Model'로서 떠오르고 있다. 제브라피쉬 질환모델은 기능유전체 뿐 만 아니라 생명의 과학 연구분야에서도 효율적인 활용되고 있다(Ellis *et al.*, 2018). 본 연구를 통해 개발

된 질환모델은 신규 소재의 유효성과 안전성 평가는 물론, 신규 의약품 개발 분야에 유용한 실험동물로 활용될 수 있다.

- 제브라피쉬는 인체 질환과 매우 유사함이 밝혀졌고 심혈관계, 암, 근육계, 골형성, 신경계, 감각계 및 생식계 등 인간에게 유발하는 거의 대부분의 질병 분야 연구가 가능한 모델이므로, 제브라피쉬 기반 질환모델체 확보 및 개발 연구는 다양한 질환치료 물질 발굴, 대단위 약물 검증, 전임상 실험 등 질환치료 및 신약개발에 활용될 기준자료를 제시한다.
- 제브라피쉬는 포유류와 간 기능의 유사성이 높아 약물에 의한 간독성 평가에 적합하며, 간에서 특이적으로 형광단백질을 발현하는 형질전환개체를 이용하여 지방간 (steatosis), 간세포사멸(cell death), 간의 크기 및 형태적 변화를 평가하여 약물에 의한 간독성을 평가할 수 있다. *in vitro* 세포를 이용한 독성 및 약물효능 평가 수행은 생체 내 기능을 완벽하게 모사하지 못하는 한계가 있으므로 *in vivo* 동물 모델 중 위의 장점을 가지는 제브라피쉬를 활용하여 다 수의 남·북극 유래 시료에 대하여 빠르고 다양하게 안전성 및 독성평가를 진행할 수 있다.
- 조직특이적으로 형광을 발현하는 transgenic zebrafish의 활용은 특정 세포의 이동이나 증식 사멸 분화 과정을 생체 내에서 살아있는 상태에서 관찰할 수 있다. 또한 제브라피쉬는 25개의 염색체를 가지고 있으므로, 인체의 유전자와 크기와 수가 비슷하며 유전자 및 단백질간의 상동성이 매우 높고, 또한 신경계뿐 아니라 각종 기관형성 과정이 사람과 매우 유사하기에 제브라피쉬의 연구를 통하여 얻어진 결과들은 바로 인간의 건강과 질병 연구에 중요한 자료로 활용될 수 있다.

2. 경제·산업적 측면

- Zebrafish 기반 동물모델 개발과 기능연구체계 확립으로 다양한 인간 질환치료 연구에 적용될 수 있는 기반 기술로 활용 가능하며, 신약개발 단계에서 효능 및 독성 검사를 위한 비포유류 전임상모델로 활용, zebrafish 질환모델 인프라 구축을 기반으로 다양한 기초·임상 실험을 위한 실험동물모델 수립에 대한 시간적·경제적 투자 비용 절감을 유도할 수 있을 것으로 기대된다.
- 제브라피쉬의 지질대사, 지질흡수, 에너지 항상성이 포유류의 것과 굉장히 유사하기 때문에 심혈관계 질환을 비롯한 대사, 비만, 지질 등의 연구에도 각광을 받고 있다. 제

브라피쉬를 활용한 질환모델 개발은 기능유전체 뿐 만 아니라 생명과학 연구의 효율적인 질환모델 개발이 요구되고 있다. 본 연구를 통해 얻어진 신규 소재의 유효성과 안전성 평가를 위한 시스템 구축은 국가 연구 경쟁력을 높이는데 기여할 것으로 기대된다.

- Post-genome 시대의 바이오산업의 핵심은 "Genome to Drug" 전략을 통한 신약개발 및 "Personal Genome"을 바탕으로 한 맞춤형의료이며, 여기에는 특히 기능유전체학을 이용한 신약개발 및 질병치료의 새로운 타겟유전자를 발굴하는 것이 매우 중요하다. 제브라피쉬라는 작은 척추동물을 이용한 2,700 인간유전자에 대한 기능정보의 확보는 직접적으로는 위암/간암 연구를 위한 새로운 타겟유전자 발굴과 함께, 새로운 신약후보물질의 대량 스크리닝 기술개발, 그리고 다양한 질환모델동물로서의 활용 등, 향후 의약바이오산업화에서 중요한 생명연구자원으로 자리매김할 것이다.
- 세계적으로 동물윤리 지침이 강화되면서 세포 실험과 포유동물 실험의 중간 단계에 적용할 수 있는 동물대체시험법에 대한 필요성이 늘어나고 있다. Zebrafish 동물모델 사용은 복잡성·장시간·고비용의 한계와 더불어 동물윤리 강화에 따른 제한이 있어 이를 보완하기 위해 인간 유전자 및 조직 상동성이 높은 zebrafish 시스템을 평가에 활용함으로써 실패율을 줄이고, 개발비용도 절감 할 수 있다.
- Zebrafish 기반 동물모델 개발과 기능연구체계 확립으로 다양한 인간 질환치료 연구에 적용될 수 있는 기반 기술로 활용 가능하며, 신약개발 단계에서 효능 및 독성 검사를 위한 비포유류 전임상모델로 활용, zebrafish 질환모델 인프라 구축을 기반으로 다양한 기초·임상 실험을 위한 실험동물모델 수립에 대한 시간적·경제적 투자 비용 절감을 유도할 수 있을 것으로 기대된다(Sun *et al.*, 2014).
- 극지 생물로부터 분리된 극지 미생물, 추출물 및 생리활성검색자료를 바탕으로 신규 소재발굴을 위한 원천생명자원으로 활용 가능하며, 확보된 극지 미생물 자원으로부터 생리활성소재의 발굴을 통한 논문투고 및 특허를 확보함으로써 신규자원의 우선권을 확보할 수 있다. 또한 극지 미생물로부터 얻어진 자료의 DB를 구축하여 국내연구진과 공동연구를 통한 원천기술 및 응용을 통한 산업화 촉진한다.

3. 중장기 계획과 내부공동연구 계획

- Zebrafish는 1980년대 초에 발생학 연구를 위한 모델동물로 이용되기 시작한 이래, 폭발적으로 전파되어 현재에는 다양한 연구 분야에서 없어서는 안 될 주요 모델로 자리

를 잡고 있다. 제브라피쉬, 첫째, 초파리나 편형동물과 달리 인류와 척추동물 조상을 공유하기 때문에 유전적으로 인류에 더 가까우며, 둘째, 설치류 모델에 반하여 발생기간이 짧고 배아가 투명하여 실시간대로 발생과정을 관찰할 수 있으며, 셋째, 포유류와 달리 체외에서 수정되기 때문에 유전적 조작이 용이하며, 넷째, 비교적 적은 비용으로 대규모(large scale)의 고효율연구(high throughput study)가 가능하다는 장점이 있다 (Parng *et al.*, 2002; Stern *et al.*, 2003. Yee *et al.*, 2005). 또한 최근 분자세포·생물학적 분석기술, 게놈 에디팅 기술, *in vivo* 실시간 이미징 기술 등 제브라피쉬 질환모델의 구축과 평가에 활용 가능한 기법 및 기술의 개선과 개발에 따라 대부분의 마우스실험 기법이 제브라피쉬에서 가능하게 됨으로써 제브라피쉬를 활용한 질환모델을 꾸준히 개발하여 연구영역을 확대할 수 있다.

- Zebrafish genome-sequencing project 결과, 질환관련 유전자를 포함하여 적어도 70%의 유전자가 인간과 동일하게 존재한다는 것이 보고되어 대부분 인간의 생리·병태현상이 제브라피쉬에서 모델화가 가능하다. 프로젝트에서 확보된 유전자 정보를 활용하여 새로운 질환모델 제브라피쉬를 개발하여 zebrafish 활용연구에 기여한다.
- 본 연구에서는 실험동물 zebrafish 연구 기반을 확보하고 염증, 간질환, 산화스트레스, 치매 등의 모델을 개발하여 다양한 남북극 유래 소재들의 안전성 및 정밀효능을 검증할 수 있는 시스템을 마련하였다. 현재 소내에서는 극지생물 유래 대사체나 유전자원을 활용한 소·대형 실용화 연구가 수행되고 있으며, 본 과제 수행을 통해 개발된 질환모델이나 분석기술 등은 다양한 후보물질들의 안전성 및 정밀효능 검증에 활용이 가능하므로, 개발 초기에 기초자료를 제공하여 개발 가능성을 사전에 판단할 수 있는 근거를 제시할 것이다. 지속적으로 연구책임자들과의 정보교류를 통해 연구수요를 파악하고 협력연구를 수행하여 제브라피쉬 연구기반 활용 극대화를 유도할 계획이다.
- 본 연구과제의 중장기적 연구목표는 제브라피쉬를 이용한 기능성 물질 탐색을 위한 동물모델의 기본을 확립하는 것이고 궁극적인 연구목표는 제브라피쉬를 이용한 기능성 물질 탐색 기초자료 제공, 제브라피쉬의 기능성 물질 탐색을 위한 동물모델로의 기술 확립, 기능성 물질의 효능 및 독성에 대한 발생단계에서 신속한 평가, 다양한 기능성물질의 실험동물 평가에서 정확성 향상시키는 것이다. 향후 실험동물 유지/관리 시스템을 확장하고 보다 다양한 분석기법을 추가 확립하여 연구 역량을 강화하고, 독립적인 연구과제로 개발하기 보다는 현재 진행 중인 실용화 과제에서 사전 계획을 수립하여 예산을 확보하는 것이 합리적이라고 판단된다.

제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 주요국의 실험동물 인프라 현황 : 미국의 대표적인 마우스 자원 인프라는 Jackson Laboratory, MMRRC (Mutant Mouse Regional Resource Centers) 등이 있으며(실험동물 산업육성방안과 국내 복지상황 조사연구, 2007), 7개의 영장류 연구소를 국가차원에서 관리하고 있다. Jackson Laboratory는 실험동물 분야의 발전에 주도적인 역할을 수행하고 있는 대표적 기관으로서, 자체적으로 개발한 유전자변형마우스를 포함해 세계적으로 개발되고 있는 유용한 질환동물모델을 수집·보존·공유하고 있다.
- MGI (Mouse Genome Informatics)는 National Human Genome Research Institute와 National Cancer Institute 등의 재정 지원을 통해 Jackson이 운영하고 있는 국제적인 데이터베이스로 마우스의 유전적·생물학적 데이터를 제공하고, IMSR (International Mouse Strain Resource)과 연계하여 마우스 품종, ES cell line 등의 보유 국가, 기관 등 정보를 제공한다(https://en.wikipedia.org/wiki/Mouse_Genome_Informatics).
- MMRRC는 미국국립보건원(NIH, National Institutes of Health)의 NCCR (National Center for Research Resources)에서 지원하는 센터로, 유전자변형마우스의 유효성을 지속시키고, 연구자에게 마우스를 공급하는 것을 목적으로 한다. 미국의 7개 국립영장류센터는 센터 당 평균 2천 마리 이상의 영장류 자원을 보존하고 있으며, 그 외에도 10여개 이상의 영장류 번식군을 보유하고 있다(국내외 영장류 현황 및 연구동향, 2015). 또한, 미국은 1958년부터 연구소, 대학, 기업 등에서 Hanford, Yucatan, Sinclair와 같은 미니돼지 자원을 개발·확보(Tetsuo *et al.*, 2007)하였고, 많은 나라에서 활용하는 주요 자원이 되고 있다.
- [Jackson Laboratory] : 실험동물 분야에서 주도적인 역할을 수행하고 있는 대표적인 비영리기관으로, 1929년 설립되었다. 마우스 개발·공급을 지원하고 있으며, 이 외에도 다양한 분야에 대한 연구협력, 교육프로그램 운영, 데이터 등을 제공하는 등 매우 포괄적인 역할을 수행한다. JAX® Mice & Services 섹션에서는 연구자가 연구 분야, 질병명, 증상 등의 키워드로 검색하면 적절한 마우스 품종을 추천해주며, stock의 타입(inbred, targeted mutation, transgenic, spontaneous mutation 등)과 최종 산출물의 상태(살아있는 마우스 또는 동결된 배아상태 등)를 선택하여 공급 받을 수 있다. 연구자가 원하는 유전자변형 마우스를 직접 디자인하여 개발하거나, 빠른 시간 내에 많은

마우스를 생산하기 위한 expansion 서비스, 가치가 높은 마우스 품종을 보존하기 위한 배아·정자의 냉동보존서비스, 연구자가 보유한 품종을 기증받아 보존하고 공유하는 서비스 등을 제공한다. Jackson Laboratory에서 공급되는 마우스는 미생물학적 제어가 매우 철저하고 그 품질이 보증되어, 많은 실험동물시설에서의 수용도가 높다.

- 유럽은 EMMA(European Mouse Mutant Archive)를 토대로 Infrafrontier Research Infrastructure를 운영하고 있으며(<https://www.infrafrontier.eu/>), EU 8개 국가에서 영장류 연구시설을 관리한다. EMMA는 생명과학 기초연구에 사용되는 돌연변이 마우스 품종을 모아, 보존·공급 서비스를 제공하는 비영리목적의 프로그램이다. 영국, 프랑스, 독일, 네덜란드, 이탈리아 등 유럽 6개국 7개 연구소가 가입되어 국가적으로 관리되며, 영장류 연구시설은 수백~수천 마리 규모의 영장류 자원을 보유하고 있다.
- 일본은 2002년부터 국가생물자원프로젝트(NBRP, National BioResource Project)가 수행되고 있으며, 실험동물 자원별 NBRP센터를 지정·운영하고 있다(<https://nbrp.jp/about/about.jsp>). NBRP는 실험동물·식물·미생물 등 생명연구자원 중 국가에서 전략적으로 관리할 중요 자원들에 대해 수집·보존·제공 체계를 구축·운영하고 있으며, 2017년부터 4기 프로젝트를 추진하고 있다(출처: <https://nbrp.jp/about/about.jsp>).
- 일본의 NBRP 목표 및 체계 : 마우스 자원은 RIKEN Bioresource Center(BRC)가 NBRP center로 지정·운영되고 있으며, Experimental Animal Division은 마우스와 랫드를 보존·공급하고, 질병에 감염된 마우스와 랫드에 대한 SPF화 서비스 실시하고 있다(<https://mus.brc.riken.jp/en/>). 랫드 자원은 교토 대학(의과대학)의 실험동물연구소(Institute of Laboratory Animals)가 지정·운영되고 있다. 유전자변형 랫드를 포함한 763개의 품종을 보유·공급하고 기본적인 표현형 정보(체중, 혈압, 혈액화학분석 정보 등)와 계통 정보를 제공한다(<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/nbr/Default.aspx>). 일본원숭이(*Japanese Macaques*)는 교토대학의 영장류연구소(Primate Research Institute)가 지정·운영되고 있으며, 주로 인지과학 등 영장류 연구 전반에 대한 연구를 수행 중임. 쓰쿠바 영장류센터는 생명과학연구를 주로 수행하고 있으며, 두 센터 모두 천 마리 이상의 영장류를 보유하고 있다. 일본은 중국의 stock을 이용하거나, 독일의 Göttingen 미니돼지와 교배하는 방법 등으로 Ohmini, CLAWN, NIBS 미니돼지를 자체 개발하고 있다(Tetsuo *et al.*, 2007).
- 중국은 정부차원에서 전략적으로 실험동물 시설을 육성·운영 중으로 특히, 연구용 영장류 육성과 연구에 대한 집중 투자로 생명공학 분야에서 급성장하고 있다. 마우스

질환모델을 개발·공유 역할을 촉진하기 위해 2001년 NRCMM (National Resource Center of Mutant Mice)/MARC, NJU(Model Animal Research Center of Nanjing University)가 설립·운영되고 있으며 3,500개의 마우스 계통을 보유, IMPC에 참여하고 있다(<https://www.nju.edu.cn/EN/wationalwvesourcewenterwforwwutantwwicewofwwhina/list.htm>). 상하이 실험동물센터(SLACCAS, Shanghai Laboratory Animal Center, Chinese Academy of Science)는 National Laboratory Rabbit Center로서의 역할을 수행한다(<http://english.sibs.cas.cn/rs/fs/ShanghaiLaboratoryAnimalCenterCAS/34>). 윈난 영장류 생물의학중점연구소(Yunnan Key Laboratory of Primate Biomedical Research)는 중국 정부에서 전략적으로 육성하고 있는 최고의 영장류 연구시설로 2011년에 설립하였다. 2016년 국제학술지인 Nature에 'Monkey Kingdom'이란 제목으로 중국이 영장류 연구의 세계적 리더로 자리 잡고 있다는 내용이 게재되었으며, 중국 중앙 및 지방 정부의 지원으로 실험용 영장류의 육성과 연구에 집중 투자하고 있다(Cyranoski, 2016). 유전자변형 질환모델 영장류를 제작하는 데 유리하다는 점은 중국의 생명공학 분야에서의 급성장 요인 중 하나로 꼽힌다(<https://news.joins.com/article/22256028>). 전세계적으로 온라인으로 접근 가능한 모든 실험동물 자원의 품종, 돌연변이 ES cell line 관련 데이터베이스를 통합한 LasDB (Laboratory animal strain resource database)를 구축·운영하고 있다(Qi, 2018). 2018년 LasDB에는 마우스(21,596개), 랫드(2,062개), 영장류(13개), 햄스터(2개), 개(5개), 토끼(5개) 및 50개의 다른 실험동물 자원 정보가 구축되어 있다(김종란 & 김한해, 2019).

- 호주 퀸즈랜드 대학 연구팀은 'Nature Neuroscience'지에 뇌 주위 불순물을 제거하는 새로운 형의 임파구 세포를 발견했다라고 밝혔다. 연구결과 뇌가 림프관을 가지고 있어 혈관에서 누수된 불순물 제거를 돕는 것으로 나타났다. 연구팀은 "새로이 규명된 임파구 세포가 혈관과 독립적으로 존재해 과도한 지방과 기타 다른 불순물들이 혈관에서 주변 조직으로 누수 시 제거 조직 손상을 막는다"라고 밝혔다(Bower *et al.*, 2017). Masselink 박사팀은 zebrafish 모델에서 transgene을 통한 muscle stem cell, progenitor cell marking으로 muscle regeneration 동안의 세포의 움직임과 반응을 in vivo상황에서 확인하였다. Zebrafish의 골격근 재생에서 cmet-positive한 muscle stem cell의 asymmetric division을 통한 근 재생을 in vivo상에서 확인하였고, zebrafish와 mammalian에서 stem cell niche의 유사성을 보임으로써 기존의 in vitro상의 결과를 입증하였다(Masselink *et al.*, 2016).

- 제브라피쉬를 질환연구에 이용하는 연구체계는 미국의 경우, 미국 국립보건연구원의 지원(Trans-NIH Zebrafish Initiative) 아래 제브라피쉬 조정위원회를 통한 연구비 지원 및 조직적인 네트워크운동을 통하여 이미 13개 연구소, 19,000 탱크, 100,000종 이상의 제브라피쉬를 보유·운영하고 있다.
- Trans-NIH Zebrafish Initiatives : 1997년 미국 NIH에서 설립, 척추동물 발생 및 질병 연구에서의 제브라피쉬 모델 동물이용을 활성화 하기 위해 추진되었으며, 제브라피쉬 유전체, 유전 자원연구에 대한 연구비 지원 및 정보자원의 제공을 위한 중추적인 역할 수행하였다. 미국 NIH 내부 제브라피쉬 코어랩을 운영하며 제브라피쉬 연구를 위한 연구자 교육 및 생명연구자원 유지, 관리업무를 수행하고 있다.
- Zebrafish International Resource Center (ZIRC) : 미국 오레곤 대학에서 운영하고 있는 미국 제브라피쉬자원센터. 제브라피쉬 라인, EST/cDNA, 항체 등을 확보 유지하고 연구자들에게 제공하고 있으며, 제브라피쉬 관련 유전자정보 및 생명자원을 유지, 관리, 제공하기 위한 The Zebrafish Model Organism Database (ZFIN)을 운영하고 있다.
- 유럽의 경우, 유럽 7개국 통합 제브라피쉬연구 프로젝트 "ZF-Models Project" 을 통해 인체 발생 및 질환 관련 제브라피쉬모델 개발 및 정보기술을 공유하고 있다 : European Zebrafish Resource Center (EZRC) : 유럽제브라피쉬 자원센터
- ZF-MODELS consortium : 독일 막스프랑크연구소 주관으로 유럽 7개국 17개 기관으로 구성되어 있다. 다국적으로 구성으로 14,586 유전자 변이 제브라피쉬모델 제작에 돌입, 200여개 이상의 비정상적인 표현형 관찰을 통해 질환모델개발을 진행 중에 있다.
- Zebrafish Mutation Project (ZMP) : ZIRC 와 EZRC를 통한 다양한 제브라피쉬 돌연변이체 제공 및 유전체 정보자원의 확보에 주력하고 ENU mutagenesis, NGS 및 CRISPR/Cas9을 이용하여 모든 coding gene의 mutant 제작을 목표로 하고 있다.
- National BioResource Project Zebrafish : 일본 제브라피쉬자원센터로 RIKEN에서 운영하는 메인 코어랩으로, 국가 차원에서 제브라피쉬 strains 등의 생명연구자원 확보를 live stock 및 sperm banking 시스템을 구축 운영하고 있다. 제브라피쉬연구에서 구축된 라인을 유지, 관리하고 연구자를 위해 생명연구자원 제공 및 연구지원(교육) 등의 업무를 수행하고 있다. 또한 일본, 싱가포르, 한국, 호주를 포함하는 "Asia-Oceania Zebrafish Committee" 구성을 통해 세계 각국에서 투자 및 연구가 진행 중에 있다.

제 7 장 참고문헌

- Altschul SF, Lipman DJ. Protein database searches for multiple alignments. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87(14): 5509 - 5513 (1990).
- Baraona E, Lieber CS. Effects of alcohol on hepatic transport of proteins. *Annu Rev Med*. 33:281 - 292 (1982).
- Bilotta J, Barnett JA, Hancock L, Saszik S. Ethanol exposure alters zebrafish development : a novel model of fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicol Teratol*. 26:737-743 (2004).
- Bower NI, Koltowska K, Pichol-Thievend C, Virshup I, Paterson S, Legendijk AK, Wang W, Lindsey BW, Bent SJ, Baek S, Rondon-Galeano M, Hurley DG, Mochizuki N, Simons C, Francois M, Wells CA, Kaslin J, Hogan BM. Mural lymphatic endothelial cells regulate meningeal angiogenesis in the zebrafish. *Nat Neurosci*. 20(6):774-783 (2017).
- Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Safety testing for drug metabolites; Guidance for industry. *Pharmacology/Toxicology*. (2016).
- Chen Y, Leask A, Abraham DJ, Kennedy L, Shi-Wen X, Denton CP, Black CM, Verjee LS, Eastwood M. Thrombospondin 1 is a key mediator of transforming growth factor β -mediated cell contractility in systemic sclerosis via a mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent mechanism. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 31;4(1):9 (2011).
- Crane BR, Arvai AS, Ghosh DK, Wu C, Getzoff ED, Stuehr DJ, Tainer JA. Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science*. 279:2121-2126 (1998).
- Cyranoski D, Monkey Kingdom. *Nature* 532(7599):300-2 (2016).
- Cyrus M, Ghajar, Héctor Peinado, Hidetoshi Mori, Irina R. Matei, Kimberley J. Evason, Hélène Brazier, Dena Almeida, Antonius Koller, Katherine A. Hajjar, Didier Y. R. Stainier, Emily I. Chen, David Lyden & Mina J. Bissell. The perivascular niche

- regulates breast tumour dormancy. *Nature Cell Biology*. 15:807-817 (2013).
- Daniel Koehler, Frederick E. Williams. Utilizing zebrafish and okadaic acid to study Alzheimer's disease. *Neural Regen Res*. 13(9): 1538 - 1541 (2018).
- Dow LE. Modeling disease *in vivo* with CRISPR/Cas9. *Trends in Molecular Medicine*. 21: 609-621 (2015).
- Ellis JL, Bove KE, Schuetz EG, Leino D, Valencia CA, Schuetz JD, Alexander M, Yin C. Zebrafish *abcb11b* mutant reveals strategies to restore bile excretion impaired by bile salt export pump deficiency. *Hepatology*. 67: 1531-1545 (2018).
- Embry MR, Belanger SE, Braunbeck TA, Galay-Burgos M, Halder M, Hinton DE, Léonard MA, Lillicrap A, Norberg-King T and Whale G. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology*. 97:79-87 (2010).
- Fan CY, Cowden J, Simmons SO, Padilla S, Ramabhadran R. Gene expression changes in developing zebrafish as potential markers for rapid developmental neurotoxicity screening. *Neurotoxicology and Teratology*. 32: 91-98 (2010).
- Felsenstein J. Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist*. 125(1):1-15 (1985).
- Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.5. (1993).
- Forstermann. U. and W. C. Sessa. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur. Heart J*. 33:829-837 (2012).
- Garthwaite, J. New insight into the functioning of nitric oxide receptive guanylyl cyclase: Physiological and pharmacological implications. *Mol. Cell Biochem*. 334: 221-232 (2010).
- Harris, S. G., J. Padilla, L. Koumas, D. Ray, and R. P. Phipps. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol*. 23:144-150 (2002).
- Hill AJ, Teraoka H, Heideman W and Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci*. 86:6-19 (2005).
- Hong, S. H., Song, H. G., Jeong, K. J., Ko, K. I. and Yeo, M. K. Effects of silver

- nanoparticles exposed in somite stage on zebrafish development. *J. Environ. Toxicol.* 24:17-23 (1986).
- Howarth DL, Yin C, Yeh K and Sadler KC. Defining hepatic dysfunction parameters in two models of fatty liver disease in zebrafish larvae. *Zebrafish.* 10:199 - 210 (2013).
- Howe *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature.* 496:498-503 (2013).
- Hyeon Jeong Park and Min Yoo. Expression of Human KCNE1 Gene in Zebrafish. *Journal of Life Science.* 27(5):524-529 (2017).
- Isenberg JS, Martin-Manso G, Maxhimer JB, Roberts DD. Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: implications for anti-angiogenic therapies. *Nat Rev Cancer.* 9(3):182-94 (2003).
- Isenberg JS, Ridnour LA, Dimitry J, Frazier WA, Wink DA, Roberts DD. CD47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1. *J Biol Chem.* 281(36):26069-80 (2006).
- Jae-Yong Kim, Hak Hyeon Kim & Kyung-Hyun Cho. Acute Cardiovascular Toxicity of Sterilizers, PHMG, and PGH: Severe Inflammation in Human Cells and Heart Failure in Zebrafish. *Cardiovascular Toxicology.* 13:148 - 160 (2013).
- Jukes TH, Cantor CR. *Evolution of Protein Molecules.* New York: Academic Press. pp.21 - 132 (1969).
- Julien A and Leonard IZ. Of fish and men: using zebrafish to fight human diseases. *Trend in Cell.* 23(12):584-586 (2013).
- Karakikes I, Kim M, Hadri L, Sakata S, Sun Y, Zhang W, *et al.* Gene remodeling in type 2 diabetic cardiomyopathy and its phenotypic rescue with SERCA2a. *PLoS One* 4(7):e6474 (2009).
- Kaur S, Martin-Manso G, Pendrak ML, Garfield SH, Isenberg JS, Roberts DD. Thrombospondin-1 inhibits VEGF receptor-2 signaling by disrupting its association with CD47. *J Biol Chem.* 285(50):38923-32 (2010).
- Kim EA, Lee SH, Ko CI, Cha SH, Kang MC, Kang SM, Ko SC, Lee WW, Ko JY and Lee

- JH. Protective effect of fucoidan against AAPH-induced oxidative stress in zebrafish model. *Carbohydr Polym.* 102:185-191 (2014).
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B and Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* 203:253-310 (1995).
- Koehler D, Williams FE. Utilizing zebrafish and okadaic acid to study Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research.* 13: 1538 (2018).
- Krahenbuhl L, Lang C, Ludes S, Seiler C, Schafer M, Zimmermann A, *et al.* Reduced hepatic glycogen stores in patients with liver cirrhosis. *Liver Int.* 23:101 - 109 (2003).
- Lee HJ. Inhibitory effect of galangin from *Alpinia officinarum* on lipopolysaccharide induced nitric oxide synthesis in RAW 264.7 macrophages. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46:511-515 (2014).
- Li YX, Yang HT, Zdanowicz M, Sicklick JK, Qi Y, Camp TJ, *et al.* Fetal alcohol exposure impairs Hedgehog cholesterol modification and signaling. *Lab Invest.* 87:231-240 (2007).
- Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Review Genetics.* 8: 353 (2007).
- Liu Z, Ren Z, Zhang J, Chuang CC, Kandaswamy E, Zhou T, Zuo L. Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases. *Frontiers in Physiology.* 9: 477 (2018).
- Macova, S., Dolezelova, P., Pistekova, V., Svobodova, Z., Bedanova, I. and Voslarova, E. Comparison of acute toxicity of 2-phenoxyethanol and clove oil to juvenile and embryonic stages of *Danio rerio*. *Neuroendocrinol.* 29(5):680-684 (2008).
- Malhi H, Kaufman RJ. Kaufman, Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol.* 54:795 - 809 (2011). Malhi H, Kaufman RJ. Kaufman, Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol.* 54:795 - 809 (2011).
- Maria VC and Manila C. Zebrafish as screening model for detecting toxicity and drugs efficacy. *J Unexplored Med Data.* 2018;3:4 (2018).
- Marsano LS, Mendez C, Hill D, Barve S and McClain CJ. Diagnosis and treatment of alcoholic liver disease and its complications. *Alcohol Res Health.* 27:247 - 256

(2003).

- Masselink W, Cole NJ, Fenyés F, Berger S, Sonntag C, Wood A, Nguyen PD, Cohen N, Knopf F, Weidinger G, Hall TE, Currie PD. A somitic contribution to the apical ectodermal ridge is essential for fin formation. *Nature*. 28;535(7613):542-6 (2016).
- Motley ED, Eguchi K, Patterson MM, Palmer PD, Suzuki H, Eguchi S. Mechanism of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and activation by thrombin. *Hypertension*. 49(3):577-83 (2007).
- Nada SE, Williams F, Shah AZ. Development of a novel and robust pharmacological model of okadaic acid-induced Alzheimer's disease in zebrafish. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*. 15: 86-94 (2016).
- Nishimura Y, Murakami S, Ashikawa Y, Sasagawa S, Umemoto N, Shimada Y, Tanaka T. Zebrafish as a systems toxicology model for developmental neurotoxicity testing. *Congenital Anomalies*. 55: 1-16 (2015).
- OECD/OCDE. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2 (2013).
- Parrng C, Seng WL, Semino C and McGrath P. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay Drug Dev Techn*. 1:41-48 (2002).
- Passeri MJ, Cinaroglu A, Gao C, Sadler KC. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. *Hepatology*. 49:443 - 452 (2009).
- Qi K, Chuan Q, LasDB: A collective database for laboratory animal strain resources. *Animal Model Experimental Medicine*. 1(4):266-271(2018).
- Reimers MJ, Flockton AR, Tanguay RL. Ethanol- and acetaldehyde-mediated developmental toxicity in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol*. 26: 769-781 (2004).
- Ren Z, Wang X, Xu M, Yang F, Frank JA, Ke ZJ and Luo J. Binge ethanol exposure causes endoplasmic reticulum stress, oxidative stress and tissue injury in the pancreas. *Oncotarget*. 7:54303 - 54316 (2016).
- Reza, T., Aliakbar, H., Tahere, B., Ahmad, S., and Mohsen, K., "Investigation of LC50, NOEC and LOEC of Zebrafish (*Danio rerio*) in response to common agricultural

- pesticides in Golestan province, Iran," Journal of Comparative Clinical Pathology Research. 1(2):57-62 (2012).
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evo. 4:406-425 (1987).
- Schmidt TS, Alp NJ. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. Clin Sci (Lond). 113(2):47-63 (2007).
- Shah RR. Pharmacogenetic aspects of drug-induced torsade de pointes: potential tool for improving clinical drug development and prescribing. Drug Saf. 27:145-172 (2004).
- Stern HM, Zon LI: Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. Nat Rev Cancer. 3: 1-7 (2003).
- Sun L, Xin L, Peng Z, Jin R, Jin Y, Qian H and Fu Z. Toxicity and enantiospecific differences of two β -blockers, propranolol and metoprolol, in the embryos and larvae of zebrafish (*Danio rerio*). Environ Toxicol. 29:1367-1378 (2014).
- Tanguay RL, Reimers MJ. Analysis of ethanol developmental toxicity in zebrafish. Methods Mol Biol. 447:63-74 (2008).
- Thomas Braunbeck & Eva Lammer. FISH EMBRYO TOXICITY ASSAYS. Umwelt Vundes Amt. Contract No. 203 85 122 (2006).
- Tian X, Gu T, Patel S, Bode AM, Lee MH, Dong Z. CRISPR/Cas9 - An evolving biological tool kit for cancer biology and oncology. NPJ precision oncology. 3:1-8 (2019).
- Tsedensodnom O, Vacaru AM, Howarth DL, Yin C, and Sadler KC. Ethanol metabolism and oxidative stress are required for unfolded protein response activation and steatosis in zebrafish with alcoholic liver disease. Disease Models & Mechanisms. 6:1213 - 1226 (2013).
- Tetsuo N, *et al.*, Use of Miniature Pig for Biomedical Research, with Reference to Toxicological Studies. Journal of Toxicology and Pathology. 20:125-132 (2007).
- Tseng HP, Hseu TH, Buhler DR, Wang WD and Hu CH. Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva.

- Toxicology and Applied Pharmacology. 205:247 - 258 (2005).
- Turini, M. E. and R. N. DuBois. Cyclooxygenase-2: A therapeutic target. *Annu Rev Med.* 53:35-57 (2002).
- Van Horn CG, Ivester P, Cunningham CC. Chronic ethanol consumption and liver glycogen synthesis. *Arch Biochem Biophys.* 392:145 - 152 (2001).
- Wang Sik Lee, Hyun-Ju Cho, Eungwang Kim, Yang Hoon Huh, Hyo-Jeong Kim, Bongsoo Kim, Taejoon Kang, Jeong-Soo Lee and Jinyoung Jeong. Bioaccumulation of polystyrene nanoplastics and their effect on the toxicity of Au ions in zebrafish embryos. *Nanoscale.* 7(11):3173-3185 (2019).
- Xia Z, Wei J, Li Y, Wang J, Li W, Wang K, Hong X, Zhao L, Chen C, Min J, Wang F. Zebrafish *slc30a10* deficiency revealed a novel compensatory mechanism of *Atp2c1* in maintaining manganese homeostasis. *PLoS Genetics.* 13(7):e1006892 (2017).
- Yang LL, Wang GQ, Yang LM, Huang ZB, Zhang WQ, Yu LZ. Endotoxin molecule lipopolysaccharide-induced zebrafish inflammation model: a novel screening method for anti-inflammatory drugs. *Molecules.* 19: 2390-2409 (2014).
- Yee NS, Pack M. Zebrafish as a model for pancreatic cancer research. *Methods Mol Med.* 103: 273-298 (2005).
- Zhu X, Xu Y, Yu S, Lu L, Ding M, Cheng J, Song G, Gao X, Yao L, Fan D, Meng S, Zhang X, Hu S, Tian Y. An efficient genotyping method for genome-modified animals and human cells generated with CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep.* 4:6420 (2014).
- 관계부처 합동(과기정통부, 농식품부, 산업부, 복지부, 환경부, 해수부, 식약처, 농진청, 산림청). 2019년도 생명연구자원관리시행계획. 2019.
- 권혁범, 이효종, 김규원. 제브라피쉬를 이용한 혈관 연구. 서울대학교 약학대학, 2006.
- 김철희. Zebrafish를 이용한 인간유전체기능 정보자원 확보. 충남대학교, 2010.
- 김현택, 김철희. 제브라피쉬를 이용한 새로운 유전자의 발굴 및 기능분석. 충남대학교 생물학과, 2003.

- 김종란, 김한해, 실험동물 공유·활용 동향, KISTEP 기술동향브리프, 2019.
- 박현영. Cardiovascular Disease Research Programs. 국립보건연구원, 2013.
- 박해철. Zebrafish (*Danio rerio*). 고려대학교 의과대학, 2010.
- 배영기. 제브라피쉬를 이용한 발암유전자 기능연구와 암모델동물 개발을 위한 연구. 국립 암센터, 2013.
- 임현정, 문현이. 제브라피쉬를 활용한 심뇌혈관질환 모델 개발(Development of Vascular Disease Models in Zebrafish). 질병관리본부, 2014.
- 한국화학연구원 안전성평가연구소. 신약평가 예측용 기반기술 개발, 2016.
- 조정식. 21세기 실험동물의 중요성 및 방향. 식품의약품안전청, 국립독성연구소, 2000.
- 천병년. 신약개발의 새로운 기대주 '제브라피시'. 우정비에스씨 대표, 2018.
- 환경부. 화학물질 사용현황과 독성 평가, 2017.



연구·정책지원사업 최종 결과보고서 평가의견 반영사항

창의연구사업 구분	연구정책·지원과제		
과제명	실험동물을 이용한 극지 미생물 유래 기능성 유용물질 탐색 및 안전성 검증(계정번호: PE19380)	연구기간	2019.01.01. ~ 2019.12.31.
연구책임자	김일찬 책임연구원	연구비(직접비)	225백만원
과제개요, 연구성과 및 최종 결과보고서 평가의견 반영 사항			
<p>(1) 과제목적 극지생물 유래 기능성 유용물질 탐색을 위한 실험동물 연구기반을 구축하고 신규 바이오소재의 유용성과 안전성 검증하여 초기단계에서 후보물질의 개발 가능성에 대한 기초자료 제공</p> <p>(2) 최종성과</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ Zebrafish 기반 스크리닝 시스템 구축 ◦ 극지생물 유래 후보물질의 발생 및 신경독성 평가와 유전자 발현 분석(11건) ◦ 치매, 간 지방증 등 질환 모델 개발 및 항염증/지방간 개선 후보물질 효능 검증(7건) ◦ 극지 미생물 유래 추출물 중 항염증 후보물질 탐색(8건) ◦ 극지 환경으로부터 세균, 진균 등 분리 및 동정, DB 구축(218점) ◦ 극지미생물 유래 미생물 추출물 확보(128개)/항당뇨 및 항염 활성 물질 탐색(52개) <p>(3) 성과의 향후 연구소 활용방안 또는 기대효과</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ Zebrafish 기반 동물모델 개발과 기능연구체계 확립으로 다양한 인간 질환치료 연구에 적용될 수 있는 기반 기술로 활용 ◦ 신약개발 단계에서 효능 및 독성 검사를 위한 비포유류 전임상모델로 활용 ◦ 독자적인 질환모델 은행 구축과 운영으로 실험동물 자원 확보 및 공유를 통한 연구협력 <p>(4) 최종 결과보고서에 평가의견 반영 사항</p>			
	평가의견	반영사항	비고
	◦ 연구결과의 기대 성과와 활용방안을 성실하게 기술 필요	◦ 연구결과의 기대성과와 활용방안을 구체적으로 제시	p.131-133 참조
	◦ 연구정책·지원과제로서 연구결과를 활용한 정부정책 수립 가능성 기술 필요	◦ 실험동물 관련 정부정책 분석과 본 연구의 추진배경 및 연구결과 활용 관련성 기술	p.26-29 참조
	◦ 국제공동연구 프로그램에서의 기여도 기술필요	◦ 본 과제에서 도출된 기반과 기술들을 국제수준에서 진단하고 향후 국제공동연구 프로그램 개발 계획을 기술	p.128-129 참조
	◦ 대형 실용화 R&D 사업에 기여하고 발전하기 위한 예산확보 및 성과창출 전략 기술 필요	◦ 실용화 후보물질의 개발 가능성을 제시할 수 있는 성과창출 계획 기술	p.133-134 참조
	◦ 모델 생물을 이용한 결과 해석시 안정성 여부 판단 기준을 제시 요망	◦ OECD에서 제안하는 zebrafish 활용 독성평가 기준에 따라 진행 중 (OECD 기준 제시)	p.46-47 참조
	◦ 선도적인 독성/안정성 평가를 위한 기반·기준이 마련될 수 있도록 중장기계획을 보고서에 기술 필요	◦ 국제적 평가 기반·기준을 마련하였고, 평가의 정확성을 향상하는 중장기 계획 제안	p.46-47, p.133-134 참조
	◦ 타 과제에서도 구축된 실험동물 시스템을 이용할 수 있게 내부공동연구 방안 제시 필요	◦ 연구자 간 정보공유와 연구수요 파악을 통한 협력 연구 수행방안 제안	p.133-134 참조