

포스트 극지유전체프로젝트: 극지 유용유전자  
발굴을 위한 기능유전체 연구

Post-Polar Genomics Project: Functional genomic study for  
securing of polar useful genes



2023. 2. 28

한국해양과학기술원  
부설극지연구소

# 제 출 문

## 극지연구소장 귀하

본 보고서를 “포스트 극지유전체프로젝트: 극지 유용유전자 발굴을 위한 기능유전체 연구” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2023. 02. 28

총괄연구책임자 : 김 진 형

참 여 연 구 원 : 이 성 구

김 한 우

이 형 석

이 준 혁

이 정 은

윤 의 중

강 승 현

김 보 미

도 학 원

위탁연구기관명 : 고려대학교

연세대학교

서강대학교

서울대학교

노스캐롤라이나대학교

위탁연구책임자 : 박 현

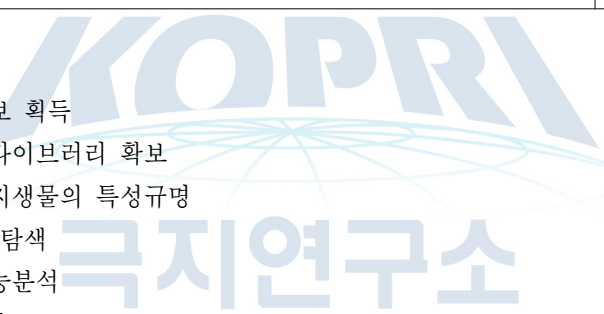
김 우 택

이 병 하

현 유 봉

Joseph Covi

## 보고서 초록

과제관리번호	PE22160	해당단계 연구기간	2020.01.01.~2022.12.31	단계 구분	
<b>연구사업명</b>	중 사업명	주요사업(기관목적사업)			
	세부사업명				
연구과제명	중 과제명	기관목적사업			
	세부(단위)과제명	포스트 극지유전체프로젝트: 극지 유용유전자 발굴을 위한 기능유전체 연구			
연구책임자	김진형	해당단계 참여연구원수	총 : 43 명 내부 : 32 명 외부 : 11 명	해당단계 연구비	정부: 6,290,060천원 기업: 천원 계: 6,290,060천원
연구기관명 및 소속부서명	극지연구소 생명과학연구본부		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 : 상대국연구기관명 :				
위탁연구	연구기관명	연구책임자			
	고려대학교	박현			
	연세대학교	김우택			
	노스캐롤라이나대학교	Joseph Covi			
	서강대	이병하			
	서울대	현유봉			
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)				보고서 면수	
					
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 극지생물 유전체 해독 극지 대표생물의 유전체 정보 획득 극지 환경시료의 메타지놈 라이브러리 확보</li> <li>○ 기능유전체 분석을 통한 극지생물의 특성규명 단백질 기능 기반의 유전자 탐색 극지생물 특이적 유전자 기능분석</li> <li>○ 극지 유전체 상용화 기반구축 유용 활성 단백질의 활성기작 해석 극지 생물유래 생리활성성분 분리 및 구조 분석</li> <li>○ 극지생물 유전체 연구관련 SCI 논문 5편 이상, 특허 5건 이상을 출원하여 관련 분야의 세계선도</li> <li>○ 극지생물의 기능 유전체 분석을 통한 극지생물의 환경적응 특성 규명 및 상용화 후보 발굴</li> </ul>					
색인어 (각 5개 이상)	한글	기능유전체, 단백질체, 전사체, 환경적응, 형질전환, 활성 이차 대사산물			
	영어	Functional genome, Proteome, Transcriptome, Environmental adoption, Reactive second metabolites			

# 요 약 문

## I. 제 목

포스트 극지유전체프로젝트: 극지 유용유전자 발굴을 위한 기능유전체 연구

## II. 연구개발의 배경, 목적 및 필요성

유전체 분야는 첨단생명공학기술을 활용한 생명자원의 확보와 활용에 관한 연구로서 미래 성장가능성이 높은 분야중 하나이며 세계적으로 연구투자가 강화되는 추세임. 또한 생물의 기능과 정보를 활용하여 인류를 위한 유용물질과 서비스 등 다양한 부가가치를 생산하는 바이오산업의 규모는 2020년경에는 1,540억 달러 규모로 성장할 것으로 전망되며, 자원 외교를 벌일 만큼 부존자원이 빈약한 우리나라는 생명공학과 바이오산업을 21세기 국가발전의 중요한 요체로 보고 제 1, 2차 생명공학육성기본계획을 수립 함. 남극에는 약 7,200종의 동물과 300여종의 식물, 그리고 확인되지 않은 수만 종 이상의 미생물이 서식하는 등 극한환경에도 불구하고 높은 생물 다양성을 지니고 있으며, 오랜 기간 고립된 극한환경에서 적응해온 극지생물은 다양한 산업분야로의 활용성이 높은 생명자원의 보고임. 극지생물의 전사체·단백체·대사체 정보를 확보하고 해석함으로써 극지생물 특이적 유전자 확장·상실 및 환경에 의한 유전자 조절 등 극지생물의 적응 및 진화 이해 증진 가능함 극지 해양생물 및 미생물들은 척박한 환경 및 질병 등으로부터 자신을 보호하기 위하여 피부 및 내부의 장기에 다양한 유전적 특성을 진화시켜 왔으며, 이들의 생합성 경로를 파악하고, 다양한 산업 기술에 이용가능 함. 극지생물 특이적 유전자, 단백질, 대사산물 등은 수산업, 축산업, 농업, 원예기술혁신 미용, 의료 등 다양한 산업 분야로의 활용이 가능한 미래 자원으로써 그 활용 가치가 매우 큼. 또한 극지 미생물을 비롯한 미생물은 생태계에서 아주 중요한 역할을 하고 있는 생명체이며, 고부가가치 자원으로서 효소 단백질을 이용한 생명공학 산업(생리활성 물질, 백신, 농약, 동식물 성장 조절물질, 식품 첨가물, 환경정화제, 생활용품 등의 산업)에서는 핵심소재로 활용되고 있음. 이렇듯 무한한 산업적 활용가능성에도 불구하고, 배양이 되지 않는 극지 난배양성 미생물의 신규 유용 효소 개발 등 가치창출을 위해서 미생물군집의 유전체를 대상으로 하는 메타지노믹 라이브러리가 이 한계를 극복할 수 있음

## III. 국내외 기술개발 현황

국외의 경우, JGI 오픈 유전체 데이터 리소스인 GOLD (Genome Online Database, <https://gold.jgi.doe.gov>)에 의하면, 2019년 11월 기준 37만 개 이상의 개체, 8만개이상의 Biosamples에 대해 32만 개 이상의 유전체 프로젝트 등록됨. 시퀀싱 기술의 발전과 함께 대규모 유전체 프로젝트들의 규모는 계속 확장되고 있으며, 기존의 척추동물 유전체프로젝트, 국제 무척추동물 유전체연합, 10000 식물 유전체 프로젝트, 5000 곤충 유전체프로젝트 등이 모두 협업하여 150만종에 달하는 진핵 생물 유전체 분석을 목표로 하는 'Earth BioGenome Project' 가 시작됨. 그중 극지 유전체 분야는 남극 곤충의 유전체 서열이 해



독된 이래로 총 8종의 극지생물 전장 유전체가 해독되었음. 효율적인 극지생물 연구를 수행하기 위하여 DNA bank 등과 같은 극지생물자원의 현지 외 보존(유전자 정보저장소)의 필요성 대두(Antarctic and Southern Ocean Science Horizon Scan Q.67) 됨. 국내의 경우, 포스트지놈 다부처 유전체사업(2014년 ~ 2021년, 총사업비 5788억원)의 일환으로 동·식물, 미생물, 해양생물 대상 유전체사업이 고부가가치생명자원 개발을 목적으로 수행 됨. 신규 유용 유전자의 발굴 및 활용화 기술에 대한 연구사업으로서 미생물유전체활용기술개발사업 등의 연구과제에서 메타지놈 추출, 라이브러리 구축 기술 및 스크리닝 관련 기술 등 확보 됨. 극지유전체 분야의 경우, 극지생물의 생명정보 분석은 극지연구소의 주도하에 진행 중에 있음. 남극생물 최초로 남극암치 전장유전체를 해독(2014) 이후 남극서식어류 3종의 유전체 해독을 성공적으로 수행, 특히 남극빙어(Antarctic Icefish)의 극한환경적응 기작을 규명(2019, Nature Ecology & Evolution)하였음, 그 밖에 극지 식물 유래 환경스트레스내성 유전자를 발굴하여 3종의 저온 및 건조 내성 작물 개발등 진행 중임

## V. 연구개발의 활용방안

학문적 파급 효과가 크고 산업적 활용 가능성이 높은 대상종을 우선 연구대상으로 선정하고 데이터를 선공개함으로써 다학제 연구 활성화와 연구소 전체의 연구 수월성 제고하여 극지 생물의 생명 현상의 이해를 통한 새로운 생명 자원 개발 기반 자원 제공 예정임. 극지 생명현상의 이해와 해석 정보를 바탕으로 새로운 생명자원을 개발하기 위한 4차 산업혁명의 핵심 생물자원 정보 제공 가능. 한 환경 적응관련 핵심 유전자 형질전환 활용 시 국가적 이익 창출과 더불어 반복되는 저수온, 고수온, 적조 등의 급격한 환경변화로 인한 수산생물의 피해 저감을 통한 국내 수산양식산업 전반의 사회 문제 해결 가능하며, 우수 유전형 및 표현형을 기반으로 한 핵심군집은 향후 수산 원예 등 육종 소재로 활용가능함.

# S U M M A R Y

## (영 문 요 약 문)

I. Title: Post-Polar Genomics Project: Functional genomic study for securing of polar useful genes

II. Purpose and Necessity of R&D

Development of useful genetic resources from polar organisms

III. Contents and Extent of R&D

- High-quality genome data analysis from polar organisms
  - High-quality genome data collection from polar higher organisms
  - Securing Metagenomic Library of Polar Environmental Specimens
- Characterization of polar organisms through functional genetic analysis
  - Functional protein identification by proteome analysis
  - Analysis of protein signal transduction and biological function from proteome data
  - Functional verification of target gene using heterologous gene expression
- Development of useful genetic resource candidate
  - Development of genome-based useful active protein and peptide
  - Production of target gene over-expressed transformants and phenotype analysis
  - Development of model transformants with useful target gene oriented from polar organisms

IV. R&D Results

- High-quality genome data analysis from polar organisms

- High-quality genome data collection from polar higher organisms
- Development of polar genome database
- Investigation of polar-specific environment adaptation mechanism from genome data analysis
  - Analysis of polar organism-specific gene functions and verification of practical applicability
  - Functional protein identification by proteome analysis
- Development of useful genetic resource candidate
  - Verification of active mechanisms of useful active proteins
  - Exploring the technology of utilizing genetic resources from polar organisms

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

- To lead the area of polar genome research as one of the world's top research institute
- Understanding of polar-specific environment adaptation mechanism and evolutionary evidence for polar organisms
- Application study such as transformants development using the genetic information obtained from polar-specific living mechanisms
- International polar research collaborations with genome and proteome data through the polar bioinformatic hub-network system

# C O N T E N T S

(영 문 목 차)

Chapter 1 Introduction

Chapter 2 Current R&D Status in Korea and Other Nations

Chapter 3 R&D Implementation Contents and Results

Chapter 4 Degree of R&D Goal Achievement and Degree of Contribution to Outside Research Institute

Chapter 5 Application Plans of R&D Results

Chapter 6 References



# 목 차

제 1 장 서론

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 참고문헌



## 제 1 장. 서론

### 제 1 절. 연구개발의 필요성

- 유전체 분야는 첨단생명공학기술을 활용한 생명자원의 확보와 활용에 관한 연구로서 미래 성장가능성이 높은 분야중 하나이며 세계적으로 연구투자가 강화되는 추세임
- 또한 생물의 기능과 정보를 활용하여 인류를 위한 유용물질과 서비스 등 다양한 부가가치를 생산하는 바이오산업의 규모는 2020년경에는 1,540억 달러 규모로 성장할 것으로 전망되며, 자원외교를 벌일 만큼 부존자원이 빈약한 우리나라는 생명공학과 바이오산업을 21세기 국가발전의 중요한 요체로 보고 제 1, 2차 생명공학육성기본계획을 수립
- 남극에는 약 7,200종의 동물과 300여종의 식물, 그리고 확인되지 않은 수만 종 이상의 미생물이 서식하는 등 극한환경에도 불구하고 높은 생물 다양성을 지니고 있으며, 오랜 기간 고립된 극한환경에서 적응해온 극지생물은 다양한 산업분야로의 활용성이 높은 생명자원의 보고임
- 극지생물의 전사체·단백체·대사체 정보를 확보하고 해석함으로써 극지생물 특이적 유전자 확장·상실 및 환경에 의한 유전자 조절 등 극지생물의 적응 및 진화 이해 증진
- 극지 해양생물 및 미생물들은 척박한 환경 및 질병 등으로부터 자신을 보호하기 위하여 피부 및 내부의 장기에 다양한 유전적 특성을 진화시켜 왔으며, 이들의 생합성 경로를 파악하고, 다양한 산업 기술에 이용
- 극지생물 특이적 유전자, 단백질, 대사산물 등은 수산업, 축산업, 농업, 원예기술혁신 미용, 의료 등 다양한 산업 분야로의 활용이 가능한 미래 자원으로써 그 활용 가치가 매우 큼
- 극지생물 유전체의 극지적응 관련 기작은 세계 공통의 관심사이지만 아직 많은 부분이 해결해야 할 과제로 남아있음(Antarctic and Southern Ocean Science Horizon Scan Q.43)
- 극지 미생물을 비롯한 미생물은 생태계에서 아주 중요한 역할을 하고 있는 생명체이며, 고부가가치 자원으로서 효소 단백질을 이용한 생명공학 산업(생리활성 물질, 백신, 농약, 동식물 성장 조절물질, 식품 첨가물, 환경정화제, 생활용품 등의 산업)에서는 핵심소재로 활용되고 있음
- 무한한 산업적 활용가능성에도 불구하고, 배양이 되지 않는 극지 난배양성 미생물의 신규 유용 효소 개발 등 가치창출을 위해서 미생물군집의 유전체를 대상으로 하는 메타지노믹 라이브러리가 이 한계를 극복할 수 있음

### 제 2 절. 연구개발의 개요

- 극지생물 유전체 해독을 통한 생명정보 수집 및 기능유전체 기반 활용가능 유전자원 발굴

○ 극지생물 유전자 유래 상용화 가능 후보 물질/기술 개발



## 제 2 장. 국내외 기술 개발 현황

### 제 1 절. 국내 동향

#### ○ 유전체 연구 동향

- 포스트지놈 다부처 유전체사업(2014년 ~ 2021년, 총사업비 5788억원)의 일환으로 동·식물, 미생물, 해양생물 대상 유전체사업이 고부가가치생명자원 개발을 목적으로 수행 중
- 신규 유용 유전자의 발굴 및 활용화 기술에 대한 연구사업으로서 미생물유전체활용기술개발사업 등의 연구과제에서 메타지놈 추출, 라이브러리 구축 기술 및 스크리닝 관련 기술 등 확보

#### ○ 극지유전체 연구 동향

- 극지생물의 생명정보 분석은 극지연구소의 주도하에 진행
- 남극생물 최초로 남극암치 전장유전체를 해독(2014) 이후 남극서식어류 3종의 유전체 해독을 성공적으로 수행, 특히 남극빙어(Antarctic Icefish)의 극한환경적응기작을 규명(2019, Nature Ecology & Evolution)
- 극지 식물 유래 환경스트레스내성 유전자를 발굴하여 3종의 저온 및 건조 내성 작물 개발
- 극지역의 시료를 대상으로 하는 메타지놈 라이브러리 구축 연구 전무
- 극지연구소는 전지구 진핵생물 유전체해독을 목표로 하는 'Earth BioGenome Project' 컨소시움에 극지생물 대표기관으로 참여

#### ○ 미생물 라이브러리 연구 동향

- 신규 유용 유전자의 발굴 및 활용화 기술에 대한 연구사업으로서 미생물유전체활용기술개발사업 등의 연구과제에서 메타지놈 추출, 라이브러리 구축 기술 및 스크리닝 관련 기술 등이 확보되어 왔음
- 메타지놈을 이용한 효소 탐색연구는 주로 다양한 환경(분변, 토양, 오염지역 등)에서 메타지놈 라이브러리가 만들어지고 스크리닝에 사용됨
- 산업체에 중요한 효소로서 amylase, esterase, xylannase, polyketide synthases 또는 항생제 내성 및 합성 유전자 등이 탐색되고 있음
- 메타지놈 기법에 의해 발굴된 신규 효소는 lipase 효소 탐색에 의해 기존의 효소 그룹과는 다른 새로운 family의 lipase가 3종, 인디루빈 및 인디고 생합성 유전자, lactam계 항생제를 가수분해하는 carboxylesterase도 발견된 바도 있다.
- 극지 지역의 시료를 대상으로 하는 메타지놈 구축에 대한 연구는 거의 전무함

#### ○ 극지 천연물 유래 상용화 연구 동향

- 극지연구소에서 극지 지의류 Ramalina terebrata로부터 ramalin을 분리하여 LG 생활



건강에 프로스틴이라는 상품명으로 항산화 화장품 상용화

- 극지연구소에서 극지 미생물로부터 항동결 폴리머를 정제하여 기술이전
- 극지연구소에서 극지 지의류 *Stereocaulon alpinum*으로부터 lobaric acid를 분리하여 항당뇨 기능을 발견하여 기술이전

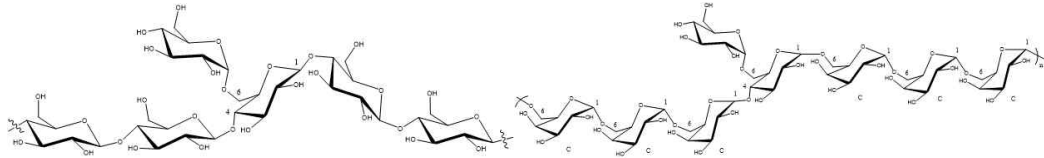


그림 1. 극지 천연물 유래 상용화 연구

- 극지연구소에서 극지 지의류 *Stereocaulon alpinum*로부터 lobaric acid를 분리하여 항당뇨 기능을 발견하여 기술이전

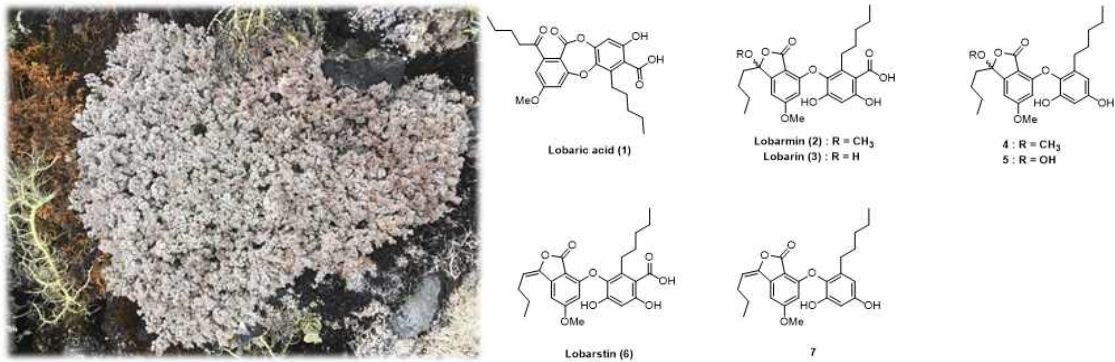


그림 2. *Stereocaulon alpinum* 으로 분리된 항당뇨 활성의 로바릭산 및 유도체들

## 제 2 절. 국외 동향

- 유전체 연구 동향
  - JGI 오픈 유전체 데이터 리소스인 GOLD (Genome Online Database, <https://gold.jgi.doe.gov>)에 의하면, 2019년 11월 기준 37만 개 이상의 개체, 8만개 이상의 Biosamples에 대해 32만 개 이상의 유전체 프로젝트 등록
  - 시퀀싱 기술의 발전과 함께 대규모 유전체 프로젝트들의 규모는 계속 확장되고 있으며, 기존의 척추동물 유전체프로젝트, 국제 무척추동물 유전체연합, 10000 식물 유전체 프로젝트, 5000 곤충 유전체프로젝트 등이 모두 협업하여 150만종에 달하는 진핵 생물 유전체 분석을 목표로 하는 'Earth BioGenome Project' 가 시작됨
  - 선진국을 중심으로 난배양성 미생물을 활용하기 위한 방법으로, 특정 환경내의 모든 DNA를 추출하여 라이브러리를 만드는 대규모 메타지놈 프로젝트 진행 중 (GEOTRACES cruises와 Station ALOHA and BATS의 sampling, Sargasso Sea sampling, Global Ocean Survey, human gut microbiome studies)

○ 극지 유전체 연구 동향

- 남극 곤충의 유전체 서열이 해독된 이래로 총 8종의 극지생물 전장 유전체가 해독되었으며, 이중 극지연구소는 4종의 척추동물, 1종의 무척추동물의 고품질 전장유전체를 발표함으로써 극지유전체 연구 분야 선도
- 미국 NSF는 '남극생명체의 유전체 분석'을 전략적 우선순위로 선정하여 집중 투자 중
- 효율적인 극지생물 연구를 수행하기 위하여 DNA bank 등과 같은 극지생물자원의 현지 외 보존(유전자 정보저장소)의 필요성 대두(Antarctic and Southern Ocean Science Horizon Scan Q.67)

○ 미생물 유래 효소 연구 동향

- 미국의 BASF사는 메타지놈 기반의 효소 탐색 기술을 보유한 기업으로서 normalized library 구축과 메타지놈으로부터 FACS를 이용한 효소자원 초고속 탐색기술을 확보하여 신규 효소 소재 개발에 주력함.
- 예일대/코넬대 등은 HTS (high throughput system) 탐색기술을 바이오매스를 이용한 에너지 생산에 필요한 효소 탐색에 응용하였으며, 현재 신규 항생물질 분리 등의 시스템으로 활용하고 있음
- 캐나다의 TerraGen Discovery사는 신약발굴 연구에 메타지놈 기술을 활용함
- 해외에서는 특정 환경을 대상으로 수많은 대규모 메타지놈 프로젝트가 진행되어 오고 있음 (GEOTRACES cruises와 Station ALOHA and BATS의 sampling, Sargasso Sea sampling, Global Ocean Survey, human gut microbiome studies)
- 메타지놈 라이브러리는 SCAR의 Horizon Scan 80중 67번 "What ex situ conservation measures, such as genetic repositories, are required for the Antarctic and Southern Ocean?"를 위한 필수적인 방법으로 생명정보저장소로 기능. 즉, 환경변화에 민감하며 난배양성인 미생물들의 경우 메타지놈 라이브러리 구축이 대안이 될 수 있음
- 극지를 대상으로 하는 메타지놈 시퀀싱 프로젝트는 있으나 DNA 보존을 위한 메타지놈 라이브러리 구축관련 연구는 부족함

○ 해양 천연물 유래 상용화 연구 동향

- 초기 해양 천연물의 연구는 약리활성에 무관하게 물질의 화학적 구조 규명에만 주력하였으나 1980년대 이후에는 활성기전 규명 등 신약개발 측면이 강조되게 되었다. 그 결과 현재까지 10,000을 상회하는 해양천연물이 발견되었으며 이들의 독특한 화학적 구조와 강력한 생리활성은 많은 의약학, 유기화학, 생화학적 파생연구를 낳아 연구의 질적인 면에서는 오랜 전통을 가진 육상천연물에 필적할 위치에 도달 함
- 1990년대 이후에는 해양천연물 연구의 방향이 완전히 신약개발의 원천물질의 개발로 모아졌다. 그 결과 약리활성물질의 규명 및 확보의 중요성이 강조되었고 같은 시기에 이루어진 리우 및 마닐라 협약의 영향으로 생물자원국의 권리가 강조되었다. 이에 따라 해양생물자원의 대규모 확보 및 이를 토대로 한 신약연구개발이 국가 연구기관을

중심으로 이루어졌는데 대표적인 예로서는 미국의 NCI 및 NCI 지원하의 NCDDP, 러시아의 PIBOC, 일본의 JAMSTEC 및 민간조직인 MBI, 호주의 AIMS 등을 들 수 있음

- 임상시험 단계중인 화합물을 살펴보면 아열대에 서식하는 청자고둥(*Conus magnus*)으로부터 분리된  $\omega$ -conotoxin (zincotide)은 필수아미노산이 중합된 소형 펩타이드계 화합물로서 모르핀의 수 천배 이상의 진통작용을 나타내어 최근 prialt라는 이름으로 상업화에 성공
- 또한 카리브해의 근체멍게 *Ecteinascidia turbinata*에서 분리된 bis-isoquinolone계 화합물 ecteinascidin 743은 tubulin binding 기작에 의한 난치성 자궁암에 대한 항암제로 개발, yondelis라는 이름으로 상품화에 접근하고 있음

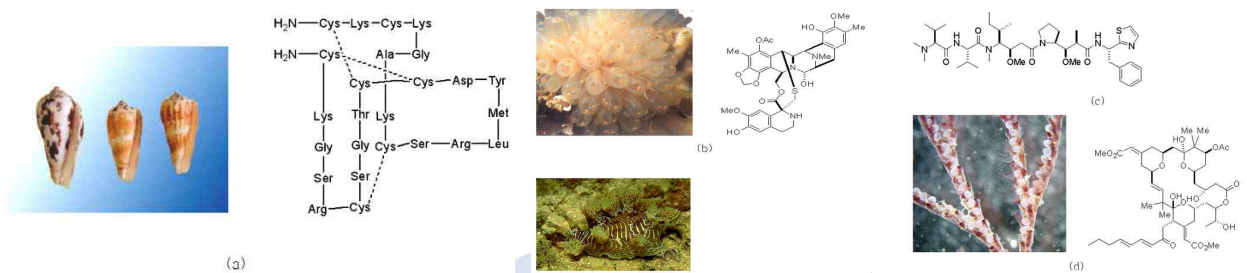


그림 3. 해양천연물 신약 후보물질들). a) 연체동물 *Conus magnus*와  $\omega$ -conotoxin b) 근체멍게 *Ecteinascidia turbinata*와 ecteinascidin 743, c) 연체동물 *Dolabella auricularia*와 dolastatin 10, d) 이끼벌레 *Bugula neritina*와 bryostatin 1.

## 극지연구소

### 제 3 절. 특허 분석

#### ○ 극지 동물 유전체 관련 특허동향 분석

- 1999년 이후부터 현재까지 지속적인 특허 출원이 이루어지고 있으며, 미국의 경우 2010년, 유럽과 일본의 경우 2001년에 가장 많은 수의 특허를 출원한 것으로 나타남.
- 국가별 점유율은 미국특허가 34건으로 과반수가 넘는 점유율(59%)을 차지하고 있고, 다음으로 유럽(17%), 일본(14%), 한국(10%) 순으로 나타남.
- 극지 동물 유전체 관련 기술 분야에 대한 기술주기 분석 결과, 해당 기술은 포트폴리오 기본 모델에서 발전기에 해당

#### ○ 극지 식물 유전체 관련 특허동향 분석

- 극지 식물 유전체 관련 기술 분야의 전체적인 특허동향을 살펴보면, 1991년도 유럽 특허를 시작으로, 2000년대에 들어서서 미국이 타 국가 대비 많은 수의 출원을 하고 있음.
- 국가별 점유율은 미국특허가 가장 많은 특허출원 건수(21건)를 보였고, 75%의 점유율을 차지하고 있어 해당 기술 분야에서 미국이 기술 흐름을 리드하고 있는 것으로 나

타났으며, 이 외에 한국(14%), 유럽(7%), 일본(4%) 순으로 나타남.

- 극지 식물 유전체 관련 기술에 대한 주요출원인으로는 VITROGEN SA(칠레), DANISCO AS(덴마크), 한국해양과학기술원(한국), AGRICULTURE VICTORIA SERVICES PTY LTD(호주) 등이 있음.
- 특이점은 한국은 자국기업에 의해 특허출원이 이루어진 반면, 미국, 유럽, 일본은 다국적 기업 중심의 출원활동을 보이고 있고, 주요 출원인 가운데 DANISCO AS의 경우 자국뿐만 아니라 미국에서도 특허를 출원하였음.

○ 극지 어류 상용화 관련 특허동향 분석

- 극지 어류는 항동결단백질(AFP)유전자를 지니고 있어 추위에 견딜 수 있도록 적응되었음. GM연어는 일반 연어의 동절기 성장 호르몬의 발현량 저하를 통한 성장억제 요소를 제거하고, 저온내성 유전자가 발현될 수 있도록 프로모터(op-AFP)를 왕연어 성장호르몬과 결합하여 일반 대서양 연어의 수정란에 주입하여 GM연어를 생산하였음
- 항동결단백질을 이용하여 어류의 저온내성을 증가시켜 겨울철 저수온기에 양식 어류들의 대량 폐사를 방지하기 위한 연구도 진행되고 있으며, 빙결점 하락은 항동결단백질이라고 불리는 펩티드, 클리고 펩티드 및 항동결 클리코단백질에 기인하는데, 이 단백질은 간에서 1차적으로 합성되어 혈액 및 세포 외 공간으로 분비되어 미세 얼음 결정구조와 결합하여 얼음 결정이 커지는 것을 억제하는 시키는 효과가 있음
- 극지 어류 상용화 기술은 아직 개발 초기 단계로 기술 개발 중인 것으로 나타났으며, 극지 어류가 아닌 어류에서는 식품, 화장품, 치료제 등에 사용, 연구개발을 하고 있는 것으로 확인됨. 이로 인하여 앞으로 어류 상용화 기술의 활성화와 동시에 아직 개발 초기 단계인 극지 어류의 연구 개발이 이루어진다면 치료제 및 수산자원(화장품, 식품, 첨가제등)에서도 사용이 될 것으로 전망됨

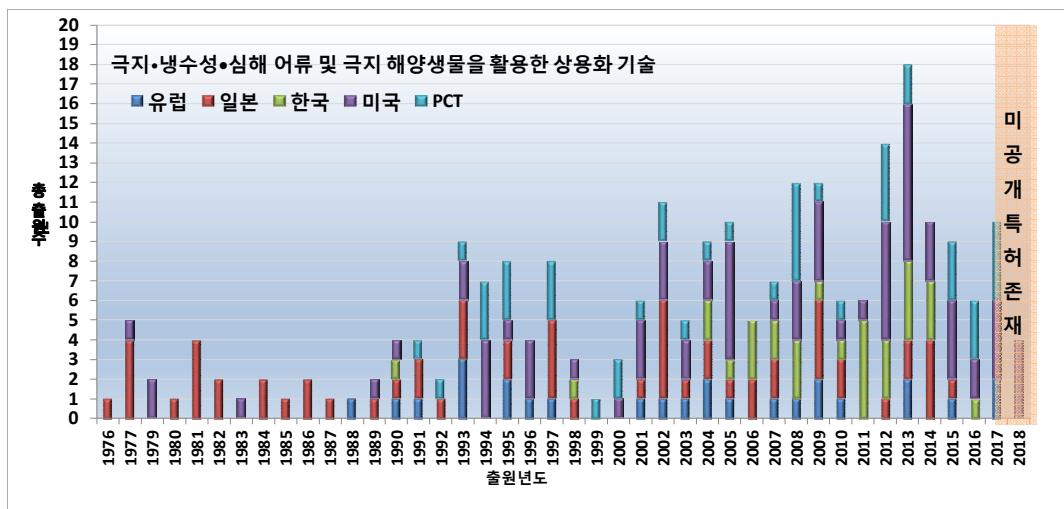


그림 4. 전체 연도별 특허출원 현황 추이

- 1988년 유럽의 NORSK HYDRO A/S이 출원한 Feed additive and feed containing

such additive기술은 북극 char 어류를 이용한 어류 사료 첨가제 기술로 확인되었음. 한국은 1998년 미국의 University of California 열 이력 단백질을 사용하여 저온 수술 중의 조직 파괴를 개선시키는 방법, 2008년 일본의 National University of corporation Tokyo University of Marine Science and Technology 출원 된 것으로 확인되었음. 한국 기업으로는 2014년 한국해양과학기술원이 결빙단백질 관련 기술을 출원한 것으로 나타남

- 1991년 유럽, 일본, PCT에서 각 1건씩 출원을 하였으며, 1995년 유럽 2건, 일본 2건, PCT 2건 총 6건으로 가장 많은 출원을 보이고 있는 것으로 확인되며, 아직 연구 개발 초기 단계로 판단되고 있음

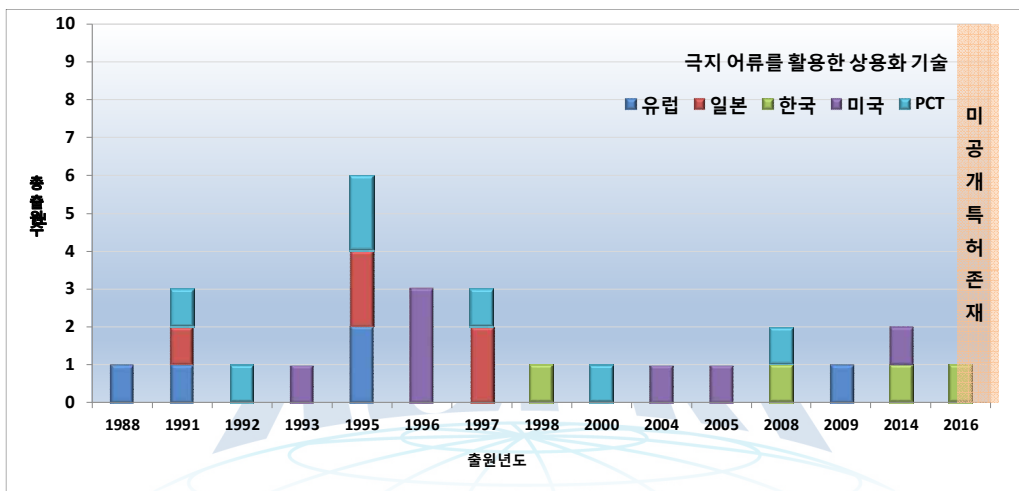


그림 5. 극지 어류를 활용한 상용화 기술 연도별 특허출원 현황 추이

- 988년 처음으로 유럽에서 출원되었으며, 현재 모든 국가에서 원천특허 개발을 하고 있는 개발 초기 단계로 판단되며 꾸준한 연구개발이 이루어지고 있음
- 1996년 미국의 University of California가 3건으로 가장 많이 출원을 하였으며, 극지 어류 단백질을 이용한 세포 보존 기술인 것으로 확인되었음
- 국가별 점유율은 미국 및 PCT가 7건으로 전체 21건 대비 약 25%로 나타나 가장 많은 특허출원 건수를 보이기에 본 기술 분야에서 기술의 흐름을 리드하는 것으로 확인되나, 미국, 한국, 일본, 유럽과 큰 차이가 없는 것으로 확인됨
- 아직 기술개발 초기 단계로 원천특허 출원을 하고 있는 것으로 판단되며, 각 국가에서 원천특허 선점을 위하여 극지 어류 관련 기술 개발을 하고 있는 것으로 판단됨



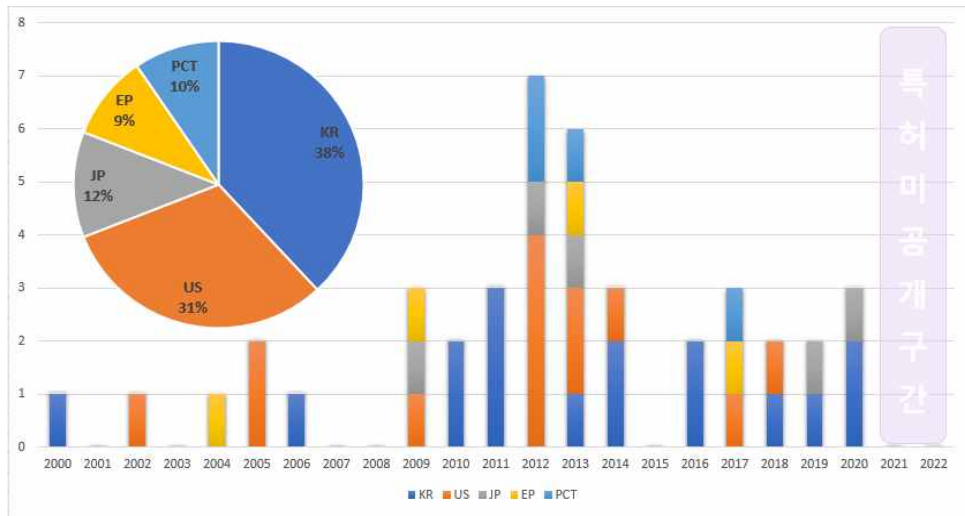


그림 6. 극지 어류를 활용한 상용화 기술 국가별 특허출원 현황 추이

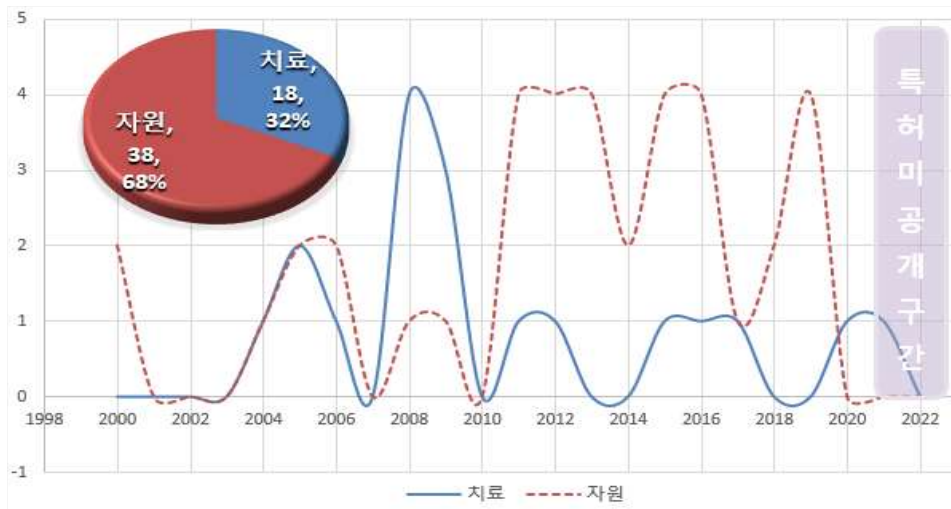


그림 7. 극지 어류를 활용한 상용화 기술 현황 추이

- 현재 전 세계 극지·냉수성·심해 어류 및 극지 해양생물 기술 성장 단계는 '성장기'로 점차 계속 증가하는 추세를 보이고 있으며, 극지 어류 기술 성장단계는 '태동기'로 기술개발 활동 및 시장 신규진입자수가 크지 않지만, 극지 어류 및 해양생물을 이용한 치료제 및 수산자원, GM 연어 등 시장 규모가 커지는 경향을 보이고, 특히 주요국 특허도 태동기에 해당하기에 향후 해당 기술의 R&D 연구와 국내외 출원이 충분히 권고됨

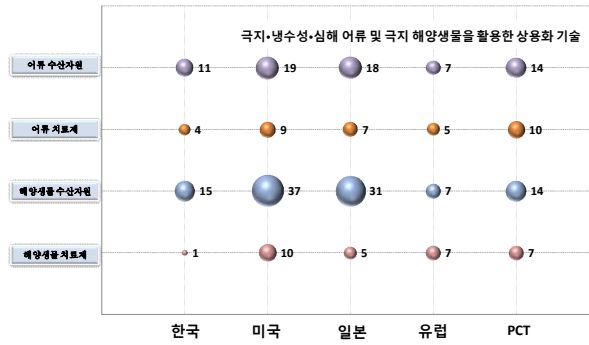
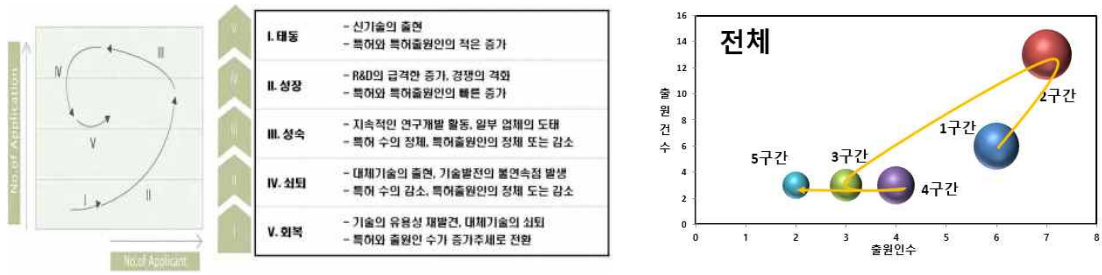


그림 8. 극지 어류를 활용한 상용화 기술 수준 및 미래 예측



# 제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1 절. 연구개발의 목표 및 내용

### 1. 최종 및 단계별 성과목표

가. 최종목표

- 극지생물의 유전체 기반 활용가능 유전자원 발굴
  - 극지생물 특이적 극한 환경적응 및 진화 기작 규명
  - 극지생물 유래 유용유전자원 10종 이상 발굴
  - 극지 대표종의 표준유전체지도 작성
  - 극지 메타지놈 유래의 기능성 효소 단백질 20종 이상 발굴

나. 성과목표

(1) 1단계 성과목표(2020.01.01 ~ 2022.12.31)

- 극지생물 유전체 해독을 통한 극지 생명정보 확보
- 극지생물 기능유전체 분석을 통한 극지생물의 특성 규명
- 극지생물 유전체 상용화 후보물질/기술 확보를 통한 기반 구축

(2) 2단계 성과목표(2023.01.01 ~ 2025.12.31)

- 극지생물 통합 유전체 해독을 통한 극지 특이적 생명현상 규명
- 극지생물 기능유전체 분석 및 검증을 통한 유용 유전자원 확보
- 극지생물 유전체 유래 상용화 후보물질/기술 개발



### 2. 상세 성과목표 및 내용

가. 1단계 정량적 성과목표 및 평가 기준

구분	년도	성과목표	지표	세계최고 수준주 (보유국/보유기관)	목표치	가중치 (%)	평가기준	설정근거	달성치
1단계 성과목표	2020 ~ 2022	극지 유전체 해독	극지 생명정보 수집 건수	독일/AWI	4	20	○Genome coverage 90% 이상의 draft 완료된 생물 종수		100
			극지 생명정보 수집 건수	독일/AWI	2	10	○극지 미생물 메타 지놈 라이브러리 제작		100
		기능유전체 분석을 통한 극지생물의 특성규명	극지 생명자원 특성분석 건수	이탈리아/CNR	13	10	○유전학적/생화학적 특성 분석 완료된 유전자/단백질 건수		100
		극지 유전체	국내외 특허 출원		3	15	○신규 유전자원 유		100



		상용화 기반구축	건수					래 원천특허 확보		
			국내외 특허 등록 건수		2	15	○신규 유전자원 유 래 원천특허 확보		100	
		논문	mrnIF 80이상 논문 편수	독일/AWI	5	20	○표준화된 영향력 지수(mrnIF) 80이 상		100	
mrnIF 40이상~ 80 미만 논문 편수	영국/BAS		3	10	○표준화된 영향력 지수(mrnIF) 40이 상 80미만		100			
1차 년도	2020	극지 유전체 해독	극지 생명정보 수집 건수	독일/AWI	1	20	○Genome coverage 90% 이상의 draft 완료된 생물 종수 ○KPDC 등재		100	
		기능유전체 분석을 통한 극지생물의 특성규명	극지 생명자원 특성분석 건수	이탈리아/ CNR	4	20	○유전학적/생화학적 특성 분석 완료된 유전자/단백질 건 수		100	
		극지 유전체 상용화 기반구축	국내외 특허 출원 건수		1	30	○신규 유전자원 유 래 원천특허 확보		100	
		논문	mrnIF 80이상 논문 편수	독일/AWI	1	15	○표준화된 영향력 지수(mrnIF) 80이 상		100	
			mrnIF 40이상~ 80 미만 논문 편수	영국/BAS	1	15	○표준화된 영향력 지수(mrnIF) 40이 상 80미만		100	
2차 년도	2021	극지 유전체 해독	극지 생명정보 수집 건수	독일/AWI	1	10	○Genome coverage 90% 이상의 draft 완료된 생물 종수 ○KPDC 등재		100	
			극지 생명정보 수집 건수	독일/AWI	1	10	○극지 미생물 메타 지놈 라이브러리 제작		100	
		기능유전체 분석을 통한 극지생물의 특성규명	극지 생명자원 특성분석 건수	이탈리아/ CNR	4	20	○유전학적/생화학적 특성 분석 완료된 유전자/단백질 건 수		100	
		극지 유전체 상용화 기반구축	국내외 특허 출원 건수		2	30	○신규 유전자원 유 래 원천특허 확보		100	
		논문	mrnIF	독일/AWI	2	20	○표준화된 영향력		100	

3차 년도			80이상 논문 편수				지수(mrnIF) 80이 상		
			mrnIF 40이상~ 80 미만 논문 편수	영국/BAS	1	10	○표준화된 영향력 지수(mrnIF) 40이 상 80미만	100	
	2022	극지 유전체 해독	극지 생명정보 수집 건수	독일/AWI	2	20	○Genome coverage 90% 이상의 draft 완료된 생물 종수 ○KPDC 등재	100	
			극지 생명정보 수집 건수	독일/AWI	1	5	○극지 미생물 메타 지노믹 라이브러리 제작	100	
		기능유전체 분석을 통한 극지생물의 특성규명	극지 생명자원 특성분석 건수	이탈리아/ CNR	5	10	○유전학적/생화학적 특성 분석 완료된 유전자/단백질 건 수	100	
		극지 유전체 상용화 기반구축	국내외 특허 등록 건수		2	30	○신규 유전자원 유 래 원천특허 확보	100	
		논문	mrnIF 80 이상 논문 편수	독일/AWI	2	25	○표준화된 영향력 지수(mrnIF) 80이 상	100	
			mrnIF 40이상~ 80 미만 논문 편수	영국/BAS	1	10	○표준화된 영향력 지수(mrnIF) 40이상 80미만	100	

나. 단계 연차별 연구목표 및 내용

(단위 : 천원)

구분	년도	성과목표	연구내용	연구범위	연구비 (직접비)
1차 년도	2020	극지생물 유전체 해독	- 극지 대표생물의 유전체 정보 분석을 통한 극지특이적 유전체 특성 규명	- 유전체 정보 획득(1건)	300,000
			- 극지 환경시료의 메타지노믹 라이브러리 확보 - 특정 단백질 활성을 고려한 극지 미생물종 선정 - 항생물질 변형효소 유전자 탐색	- 극지 메타지노믹 라이브러리 제작용 시료 확보 1건 - 극지 식물의 근권토양과 지의류 등의 환경시료 활용	100,000
		기능유전체 분석을 통한	- 단백질 기능 기반의 유전자 탐색 - 유용 유전자에 의한 발현단백체 분석을 통한 활성증진 연관요인	- 효소활성 스크리닝을 통한 유전자 탐색 5건 이상	412,000

		극지생물의 특성규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>분석</li> <li>- 단일체 성분들의 분리 및 화학구조 동정</li> <li>- 극지생물자원들의 추출물 제조 및 성분 분석</li> <li>- 재조합 항생물질 변형효소 단백질 생산</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성 연관요인 연구 1건 이상</li> <li>- 활성 시료 3건 이상</li> <li>- 활성 단일체 5건 이상</li> </ul>	
		극지 유전체 상용화 기반구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유용 활성 단백질의 활성기작 해석</li> <li>- 프로티움 분석법에 의한 기능 단백질군 탐색</li> <li>- 극지생물유래 생리활성성분 분리 및 구조 분석</li> <li>- 극지 해양어류 유전자원 활용기술 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 단백질 구조 및 기능해석 1건 이상</li> <li>- 기능 단백질 선정 2건 이상</li> </ul>	300,000
2차 년도	2021	극지생물 유전체 해독	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 극지생물의 표준 유전체지도 작성</li> <li>- 극지 환경시료의 메타지놈 라이브러리 확보</li> <li>- 특정 단백질 활성을 고려한 극지 미생물종 선정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 비교 유전체학적 분석을 위한 레퍼런스 확립</li> <li>- 극지 메타지놈 라이브러리 제작 1건 이상</li> <li>- 극지 미생물 선정 1건 이상</li> </ul>	260,000
		기능유전체 분석을 통한 극지생물의 특성규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 극지 메타지놈 기능 기반의 단백질 탐색기술 응용</li> <li>- 기능 단백질 군의 세포내 시너지 효능 검증</li> <li>- 다양한 극지환경 변화에 의한 발현전사체 및 단백질체 변화 분석</li> <li>- 서열 유사도 및 발현정보 기반 목표유전자군 발굴</li> <li>- 극지 유용유전자의 구조 및 기능 규명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 효소활성 스크리닝을 통한 유전자 탐색 5건 이상</li> <li>- 세포 활성 증진 연구 1건 이상</li> <li>- 극지적용 유전자 발굴 5건</li> <li>- 다양한 극지환경 변화에 의한 발현전사체 및 단백질체 변화 분석</li> </ul>	360,000
		극지 유전체 상용화 기반구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유용 활성 단백질의 활성기작 해석</li> <li>- 프로티움 분석법에 의한 기능 단백질군 탐색</li> <li>- 극지 메타지놈을 활용한 기능기반의 신규 효소 탐색기술 확립</li> <li>- 활성 단일체의 극지효소 처리를 통한 기질 개선, 화학 구조 분석 및 가치 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 단백질 구조 및 기능해석 1건 이상 기능 단백질 선정 2건 이상</li> <li>- 극지 특이 단백질 구조 분석 대상 후보 10종 이상 선정</li> <li>- 극지 효소 활성 단일체 합성 5건 이상</li> </ul>	265,000
		극지생물 유전체 해독 및 활용가치 증대	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 극지생물 유전체 데이터베이스 고도화</li> <li>- 극지생명정보를 활용한 산업적 응용성 도출을 위한 기반 마련</li> <li>- 극지 환경시료의 메타지놈 라이브러리 확보</li> <li>- 유용 미생물종의 표준 단백질체 지도 구축</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 극지생물 고유 유전자 발굴 3건</li> <li>- 극지 메타지놈 라이브러리 제작 1건 이상</li> <li>- 표준 단백질체 지도 구축 2건 이상</li> </ul>	260,000
3차 년도	2022	기능유전체 분석을	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 단백질 기능 기반의 유전자 탐색</li> <li>- 단백질체 발현패턴 분석에 의한 유</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 효소 활성 기반 스크리닝 기술 개발 1건</li> </ul>	360,000

	<p>통한 극지생물의 특성규명</p>	<p>용 유전자의 세포내 안정성 평가 - 유용 유전자군의 세포 내 기능분석 및 실용화 가능성 검증 - 극지생물 집단 적용가능 분자마커 발굴</p>	<p>- 단백질 발현패턴 분석 연구 1건 이상 - 집단유전학 적용 마커 개발</p>	
	<p>극지 유전체 상용화 기반구축</p>	<p>- 유용 활성 단백질의 활성기작 해석 - 프로티옴 분석법에 의한 기능 단백질 탐색 - 활성 단일체의 극지효소 처리를 통한 유도체 제작, 화학 구조 분석 및 가치 검증 - 환경 적응, 진화 연구를 위한 극지연구 모델생물 개발</p>	<p>- 단백질 구조 및 기능해석 1건 이상 - 기능 단백질 선정 2건 이상 - 활성 단일체 합성 5건 이상 - 지속가능한 극지생물 활용시스템 구축</p>	<p>265,000</p>

### 3. 세부연구목표

#### 가. 극지 생물 유전체 해독

##### (1) 연구내용 1-1. 극지 고등생물 유전체 해독

###### (가) 남극암치의 유전체 분석

- 남극암치 (*Notothenia coriiceps*)는 남극암치아목(Notothenioidei)에 속하며, 연중 평균 영하 1.9 °C의 차가운 남극 바다에 적응하여 살아가는 남극 고유종으로 남극해의 우점종으로 생물량이 풍부하며, 남극해에서 아남극해까지 넓은 지역에 분포하여 집단간의 위도 및 환경 차이에 따른 적응 관련 유용 유전자원 연구에 적합한 종임. 현재 극지연구소 내의 아쿠아리움에서 배양 가능하여 향후 환경 적응 기작 확인을 위한 다양한 생리 실험 가능

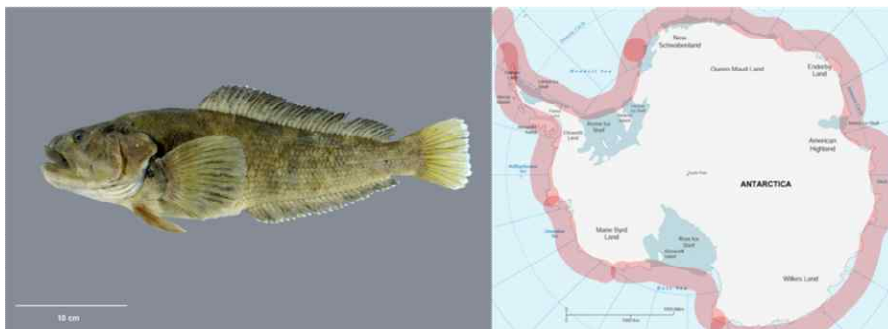


그림 9. 남극암치 사진과 남그 대륙에서의 분포도

###### ○ 남극암치의 유전체 분석

- 남극암치는 본 연구진에 의해 2세대 시퀀싱 방법인 Illumina short read 시퀀싱을 활용하여 유전체 정보가 해독된 바 있으나, 비교 집단 유전체 연구를 위해서는 정확한 고품질의 참조(reference) 유전체 지도가 필수. 이에 본 과제에서는 3세대 시퀀싱 방법인 long read 시퀀싱 방법을 적용하여 남극암치의 유전체 지도 제작

- 남극암치의 집단유전체 분석을 통해 생물학적 계층에 따른 환경적응과 진화 특성 규명
- 집단유전학적 연구는 개체군(집단) 수준에서 나타나는 유전자 형질, 분포의 변화 양상을 연구하는 분야로 중간 비교 연구에서는 밝히기 어려운 개체과 집단 등 생물학적 계층 구조에 따른 보다 미시적인 유전자 변이와 환경 적응 기작을 확인 가능.
- 남극암치의 집단 유전학적 연구를 위해 본 연구에는 기 확보된 남극 킹조지섬 연안의 남극암치 개체군(약 20개체)을 대상으로 집단 구분 마커로 활용되는 미토콘드리아 유전자(Cytochrome c oxidase I, mitochondrial control region, cytochrome b, 16S ribosomal RNA 등)의 반수체 유전형(haplotype) 염기서열 정보를 확보
- 향후 유전체 전반에 널리 분포하는 마이크로새틀라이트 부위 마커 개발과 RAD-seq을 진행할 예정이며, 확보된 RAD-seq 데이터와 고품질 참조 유전체 지도를 비교하여 SNP 부위와 유전자 부위를 정확히 매칭. 유전형-환경 상관성 분석을 통해 지역 적응 기작을 확인하고, 환경변수로는 해수 온도와 해수내 클로로필 농도 등을 측정할 예정. 본 연구 방법을 Ross Sea를 비롯한 남극해에서 아남극해 전체 개체군에 적용하여 남극암치의 유전자 변이와 환경 적응 기작을 확인

#### (나) 남방코끼리해표 *Mirounga leonina*의 고품질 유전체 분석

- 물범과 내에서 가장 크기가 큰 남방코끼리해표는 남극 생태계의 최상위포식자로서 남극 전역에 서식하며 남극 및 해양 환경에 성공적으로 적응·진화한 포유류 알려져 있음
- 남극 환경 내 생태학적 중요성 뿐 아니라 포유류의 해양 환경으로의 적응진화 과정을 이해할 수 있는 중요성에도 불구하고 3Gb에 달하는 유전체 크기와 유전체 분석 기술의 한계 및 연구를 위한 시료 채집의 어려움으로 남방코끼리해표의 유전체를 활용 연구는 전무한 수준임
- 선례 연구에서 웨델물범, 북방코끼리해표, 하와이몽크물범, 잔점박이물범 4 종의 기각류 지놈이 발표된 바 있으나 위 결과는 Illumina short read 시퀀싱을 통한 유전체 정보로 활용도가 낮음
- 이에 기각류 내 처음으로 3세대 염기서열 분석장비(PacBio Sequel)를 활용하여 고품질의 남방코끼리해표 유전체 정보를 확보하고자 함

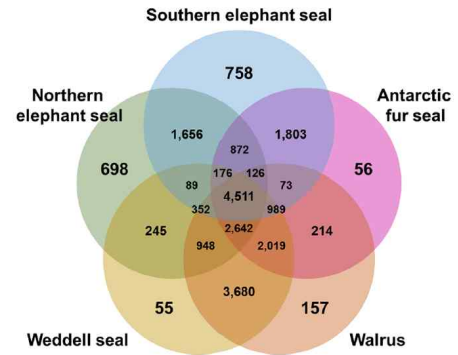


그림 10. (a) 기각류 내 가장 크기가 큰 남방코끼리해표 (b) 기각류 전사체 분석 결과 (Kim et al., 2019)

- 본 연구 수행에 앞서 선행 연구를 통하여 남방코끼리해표의 전사체정보를 확보하였고 4 종의 기각류 북방코끼리해표, 남극물개, 웨델해표, 바다코끼리의 전사체정보를 비교한 결과 4,511개의 기각류 내 공유유전자와 758개의 남방코끼리해표 특이적 유전자를 확보하였음
- 본 연구 결과를 통하여 북아메리카 태평양 해안에 서식하는 두 종의 코끼리물범속 내 다른 한 종인 북방코끼리해표와의 비교유전체학적 분석을 통하여 남방코끼리해표의 저온 적응 매커니즘 규명 가능
- 바다소, 물범, 바다코끼리 등과 같은 수생포유류의 육지에서 수생 환경으로의 적응 과정 중 확장 및 손실된 유전자 및 유전자군의 발굴을 통하여 수생 포유동물의 진화 과정을 이해할 수 있음
- 저온 환경 적응을 위하여 체내 유익 지방 함량을 높이는 방향으로 진화하는 과정 중 획득한 극지 물범 특이적 지질대사를 이해함으로써 이상지질혈증 등과 같은 지질 대사 관련 질병에 대한 이해할 수 있음

**(다) 남극 은어 전장 유전체 해독**

- 남극 은어의 전장 유전체 해독의 중요성
  - 남극 은어(*Pleuragramma antarcticum*)는 해빙 아래 얼음 조각인 아이스 플레틀릿(ice platelet) 사이에 산란을 하고, 알에서 깨어난 유생은 해빙 사이에 동물성 플랑크톤의 알을 먹다가 크기가 커짐에 따라 동물성 플랑크톤 성체 그리고 크릴로 옮겨가는 다양한 생물군을 먹이로 이용하고 있음



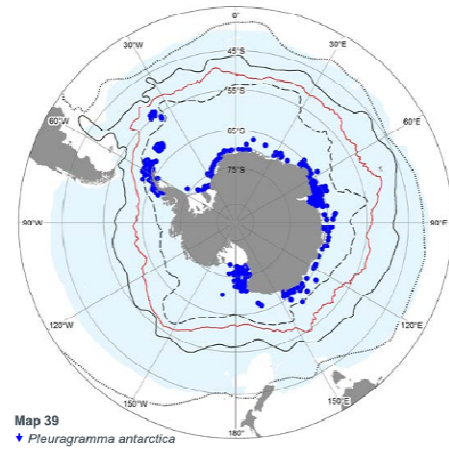
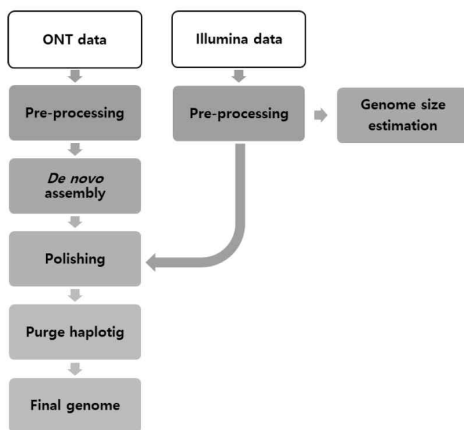


그림 11. 남극 은어(*Pleuragramma antarcticum*) 생체샘플과 남극권 분포 지도

- 펭귄, 웨델물범과 같은 high-trophic 생물들의 중요한 먹이원인데. 먹이망에서의 중요한 위치를 차지하기 때문에 남극해 생태계의 핵심종(keystone species)으로 매우 중요한 종이지만 유전체 정보는 아직 밝혀져 있지 않아 포스트유전체 과제에서 유전체 정보 밝히고자 하였음

○ 남극 은어의 전장 유전체 해독 방법

- De novo genome sequencing platform으로 long read는 oxford nanopore를 사용하고, short read는 Illumina Hiseq 플랫폼을 사용
- 데이터 트리밍, 유전체 크기 예측, de novo assembly는 long read assembler인 nextdenovo smartdenovo, canu 세 가지를 사용하고 좋은 결과를 선택할 예정
- Assembly가 완료되면 Maker, Evidence Modeler등을 이용하여 유전자 annotation을 진행



Procedure	Program	Version	Options
Preprocessing	Porechop	0.2.3	Default
	fastp	0.21.0	Default
Genome size estimation	BBDuk	38.87	kmer = 31
	jellyfish	2.2.10	Ploidy = 1, kmer = 17~21
De novo assembly	GenomeScope2	-	Default
	SMARTdenovo	-	Default
Polishing	NextDenovo	2.3.1	Seed length = 4k
Polishing	NextPolish	1.3.1	Default
Purge haplotigs	Purge_Haplotigs	-	Default
BUSCO	BUSCO	5.0.0	eukaryota_odb10 library

그림 12. De novo assembly 파이프라인

○ 남극 은어의 전장 유전체 해독 결과

- 실버피쉬는 약 100X coverage 수준의 short read data를 확보. 유전체 크기는 short read 기준 약 900 Mb 정도로 예측되어 long read 시퀀싱을 진행
- Long read는 유전체 크기 900 Mb 기준 약 50X coverage의 데이터 확보

- 총 세개의 assembler 프로그램 중 nextdenovo와 smartdenovo assembly가 진행되었고 canu는 적용 예정. Next denovo와 SMART denovo 분석 결과 유전체 크기가 약간 차이가 나는 상황으로 유전체 완성도 지표가 80 후반대로 보완을 통해 더 높일 예정

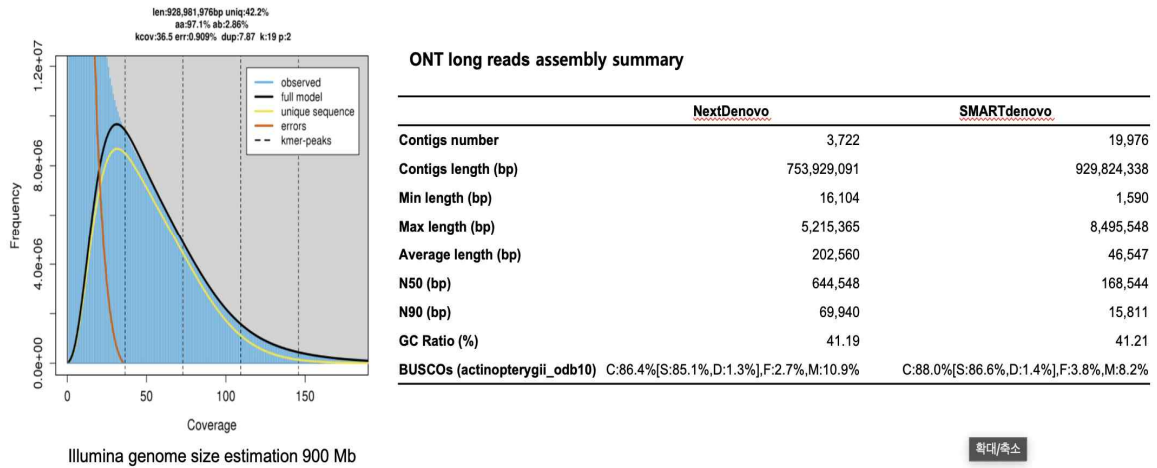


그림 13. 실버피쉬 유전체 크기 예측과 long read assembly 결과 요약

(라) 유전체 분석 레퍼런스 중, 심해어류 전장 유전체 해독

- 심해어류의 전장 유전체 해독의 중요성
- 심해(deep sea)는 수심 200m 이상의 깊은 바다로 저산소, 저온, 고압 등의 극한 환경임. 이런 심해의 극한 환경에 적응해온 생물은 극한의 환경에 적응한 극지 생물의 유전체를 활용한 환경 적응 및 진화 양상을 파악하는 대조군으로 활용 가능

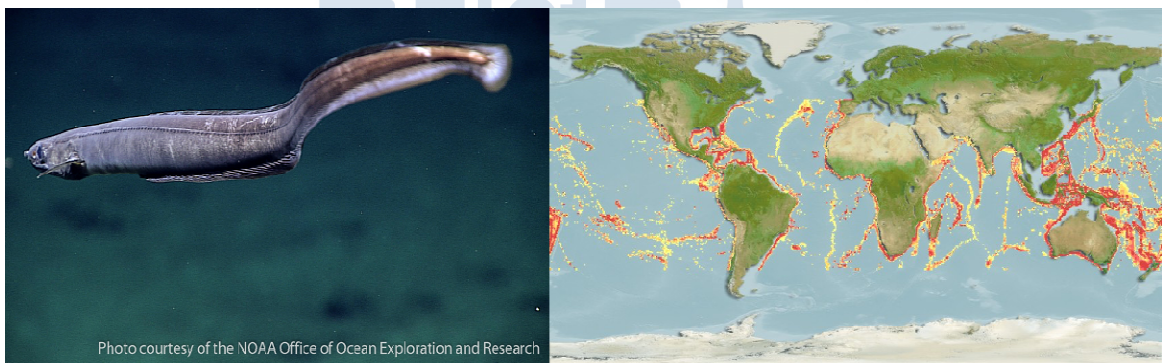


그림 14. 심해장어의 생물사진과 분포지도

- 심해어류의 전장 유전체 해독 방법
- De novo genome sequencing platform으로 long read는 oxford nanopore를 사용하고, short read는 Illumina Hiseq 플랫폼을 사용
- 데이터 트리밍, 유전체 크기 예측, denovo assembly는 long read assembler인 nextdenovo smartdenovo, canu 세 가지를 사용하고 좋은 결과를 선택할 예정
- Assembly가 완료되면 Maker, Evidence Modeler등을 이용하여 유전자 annotation을 진행
- 심해어류의 전장 유전체 해독 결과



- KIOST로부터 제공받은 샘플이 whole body가 아니고, 정확한 종동정을 위해 COI과 16S 유전자로 분자동정을 하여 percent identity 99.05%로 회색긴꼬리장어입 (*Synaphobranchus affinis*)을 확인하고 유전체 분석 진행
- Illumina short read 데이터까지 확보된 상태로 유전체 크기는 약 1.5Gb로 예측. 이를 기준으로 약 100X coverage 의 데이터를 확보한 상태
- 향후 생체 샘플 확보에 따라 long read, RNA-seq, Hi-C를 진행

**(마) 남극메컬빙어의 유전체 분석 해독**

- 극지어류 1종의 유전자 지도 작성
  - *Champscephalus gunnari*의 유전체 지도 작성
- 분석흐름도와 분석 프로그램
  - genome assembly 파이프라인 - 3세대 long read 중 Nanopore read 위주로 contig를 형성하고 Quality가 높은 illumina data로 polishing하는 전략으로 분석을 진행하였다. 사용한 프로그램 및 버전 정보는 표1. 과 같다.

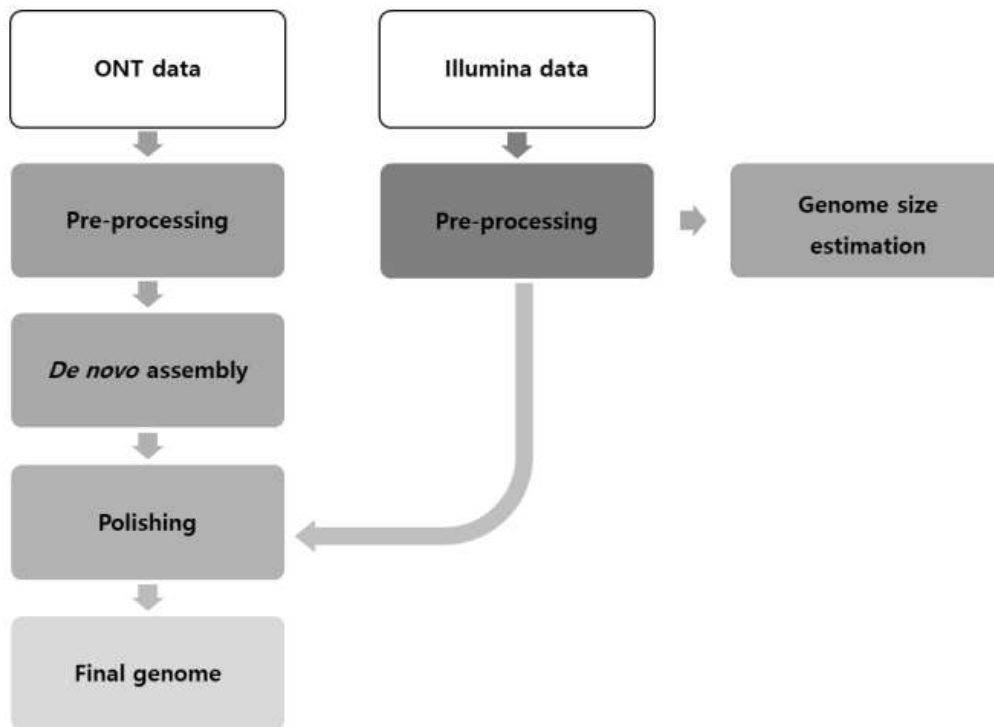


그림 15. genome assembly pipeline

표 1. 유전체 지도 작성 및 분석에 사용된 프로그램 정보

Procedure	Program	Version	Options
Preprocessing (Illumina)	fastp	0.21.0	Default
	BBDuK	38.87	kmer = 31, mcf=0.5
Genome size estimation	jellyfish	2.2.10	kmer = 19~23
	GenomeScope2	-	Ploidy = 2
De novo assembly	SMARTdenovo	-	Default
	NextDenovo	2.3.1	Default
Polishing	BWA	0.7.17	mem
	Pilon	1.24	--fix snps,indels --minqual 20 --minmq 20
	NextPolish	1.3.1	Default
Purge haplotigs	Purge Haplotigs	-	-l 11 -m 51 -h 180
BUSCO	BUSCO	5.0.0	actinopterygii_odb10

○ 시퀀싱 결과와 어셈블리 전처리

- Nanopore read의 경우 총 56,821,194개를 확보하였으며 (표 2), 길이 합으로는 99기가 베이스(Gb) 정도로 보통의 극지어류 전장유전체길이(0.9~1.3Gb)의 100배 정도 되는 양으로 Assembly에 충분한 양 (40배수 이상~)을 확보하였다. 또한 Nanopore read에 의해서 생성된 상대적으로 낮은 contig의 base quality를 보정하기 위해서 illumina sequencing도 같이 수행하였으며, 총 71Gb의 데이터를 확보하였다 (표 3).

표 2. Sequencing statistics of Nanopore reads

Sample	Total reads	Total base (bp)	N50	N90
M_icefish	56,821,194	99,110,669,031	3,085	717

표 3. Sequencing statistics of illumina reads

Sample	Raw data (bp)	Adaptor & Quality Trimming (bp)	%	After Decontamination (bp)	%
M_icefish	108,602,292,782	71,764,459,881	66.08%	70,737,357,669	65.13%

○ 유전체 크기 예측

- Illumina reads의 K-mer분석 (21mer) 을 통해서 유전체 크기를 예측하였으며, GenomeScope2.0을 사용하였다. 대략 990Mb의 크기가 예측되었으며, 이를 이용하여 Assembly를 진행하였다 (표 4와 그림 16).

표 4. GenomeScope2.0을 이용한 *Champocephalus gunnari*의 유전체 크기 예측

property	min	max
Homozygous (aa)	99.43%	99.45%
Heterozygous (ab)	0.55%	0.57%
Genome Haploid Length	989,001,296 bp	990,535,891 bp
Genome Repeat Length	490,518,894 bp	491,280,012 bp
Genome Unique Length	498,482,403 bp	499,255,878 bp
Model Fit	51.33%	96.36%
Read Error Rate	0.10%	0.10%

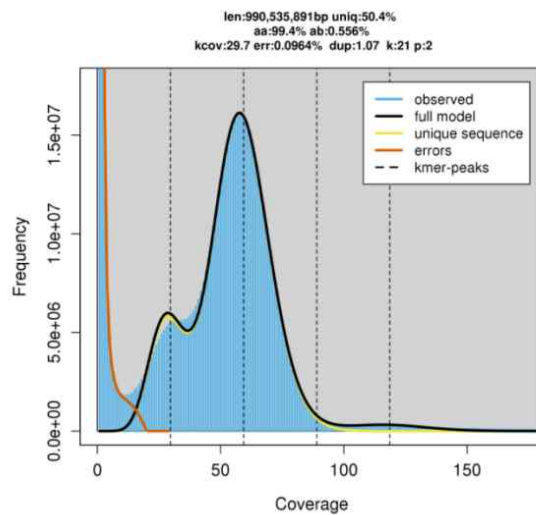


그림 16. 유전체 예측에 사용된 k-mer 그래프

○ 유전체 어셈블리 (initial genome assembly)

- De novo assembly는 두가지 assembler(SMARTdenovo 및 NextDenovo)를 이용하여 진행되었으며, 각각 아래와 같이 polishing 및 haplotig를 제거하였다 (표 5와 표 6). NextDenovo기반 assembly가 contig 수, N50 등의 항목에서 더 좋은 수치를 가지고 있어, 이를 최종 assembly set으로 확정하였으며, BUSCO validation을 통해서 두 Assembly 모두 추가 분석을 진행하는데 문제가 없는 Assembly임을 확인하였다 (Genome completeness > 90%).

표 5. SMARTdenovo를 이용한 De novo assembly

Step	<i>SMARTdenovo</i>	<i>SMART – pilon*2</i>	<i>SMART-pilon2-purgeHaplotigs</i>
Contigs number	3,022	3,022	2,388
Contigs length (bp)	987,197,702	987,368,074	971,248,557
Min length (bp)	5,627	5,623	6,498
Max length (bp)	6,075,363	6,077,851	6,077,851
Average length (bp)	326,670	326,727	406,721
N50 (bp)	1,133,087	1,133,678	1,166,086
N90 (bp)	170,696	170,776	196,422
GC Ratio (%)	42.14	42.16	42.14
BUSCO actinopterygii	-	-	C:97.7%[S:96.6%,D:1.1%], F:0.6%,M:1.7%

표 6. NextDenovo를 이용한 De novo assembly

Step	<i>NextDenovo</i>	<i>NextD – NextPolish</i>	<i>NextD – NextPolish-purgeHaplotigs</i>
Contigs number	789	789	712
Contigs length (bp)	970,482,743	970,275,184	965,181,431
Min length (bp)	6,906	6,909	10,589
Max length (bp)	15,938,855	15,935,986	15,935,986
Average length (bp)	1,230,016	1,229,753	1,355,592
N50 (bp)	3,857,535	3,857,672	3,894,822
N90 (bp)	660,190	659,215	699,260
GC Ratio (%)	42.12	42.15	42.15
BUSCO actinopterygii	-	-	C:97.9%[S:96.9%,D:1.0%], F:0.5%,M:1.6%

- Hi-C 분석을 추가하여 전장유전체의 고도화 작업
- Hi-C 분석을 통해서 유전체 지도의 고도화 작업을 진행하였다. 그 결과 전체 유전체의 98.89%를 차지하는 대략 24개의 Scaffold를 확인하였다 (표 7과 그림 17).

표 7. Hi-C scaffold 결과

	Input assembly (after polishing*)	Final scaffolding
Number of sequences	756	80
- Scaffolds(pseudomolecule) No.	-	24
- Unscfolded contigs No.	-	56
- Contigs over 100kb No.	640	60
- Contigs over 1Mb No.	241	25
Total length (bp)	965,181,431	965,249,031
- Total scaffolds length	-	954,491,458 (98.89 %)
- Total length of unscfolded contigs	-	10,757,573
- Maximum length of unscfolded contigs	-	1,308,799
Minimum length	10,589	10,589
Maximum length	15,935,986	56,887,322
N50 / L50	3,603,660 / 72	42,577,980 / 11
N90 / L90	627,209 / 310	29,413,002 / 21
N no	0	67,600

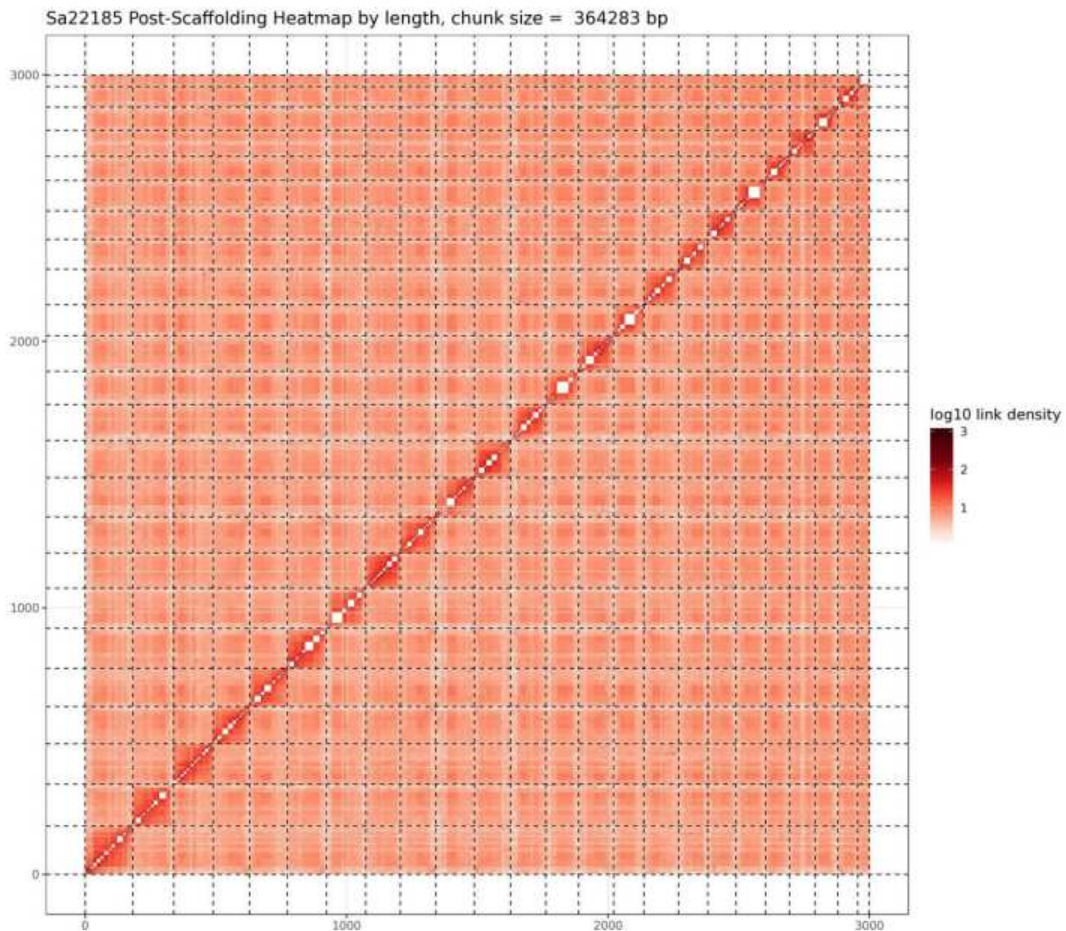


그림 17. Post scaffolding heatmap



○ 어셈블리 결과

- Long read assembly와 Genome polishing 및 Hi-C 분석을 통해서 높은 정밀도의 유전체 지도를 작성하였다. 그 결과 약 965Mb를 이루는 80개의 Scaffold를 확보하였으며, 전체 유전체의 98.89%를 차지하는 대략 24개의 Scaffold를 확인할 수 있었다 (그림 3). 이를 사용하여, Gene annotation 작업을 진행할 예정이며, 기존 극지어류와 유전자 수준에서 비교연구를 통해서 남극 어류의 특이한 진화 방식에 관련된 유전자들을 하나씩 찾아 나아갈 예정이다.

(바) 남극좀새풀 유전체 어셈블리 고도화

- 현화식물 중 남극에서 가장 우점하는 남극좀새풀은 벼과 식물이며 환경변화에 민감한 생태지표종으로 알려져 있음
- 2차년에 확보한 유전체 신규 어셈블리 데이터가 24,000여 개 scaffold로 구성되어 있으므로, 최종 scaffold 개수를 줄이기 위한 Hi-C 분석 수행
- 분석 결과 13개 chromosome 수준의 scaffolding이 가능하였으나, Hi-C heatmap 분석 결과 mapping intensity가 상대적으로 낮아서 추가 sequencing을 통한 2차 Hi-C scaffolding이 필요함

표 8. 1차 Hi-C scaffolding 결과

	Input assembly	Hi-C scaffolding
Number of sequences	<b>24,174</b>	<b>5,381</b>
Total length (bp)	4,565,884,284	4,567,763,584
- Total length of > 1Mbp contigs	114	<b>13</b>
Minimum length	3,390	3,390
Maximum length	2,102,073	522,212,831
N50	291,136	<b>321,525,813</b>
N90	89,358	196,668,770
N no	-	1,879,300

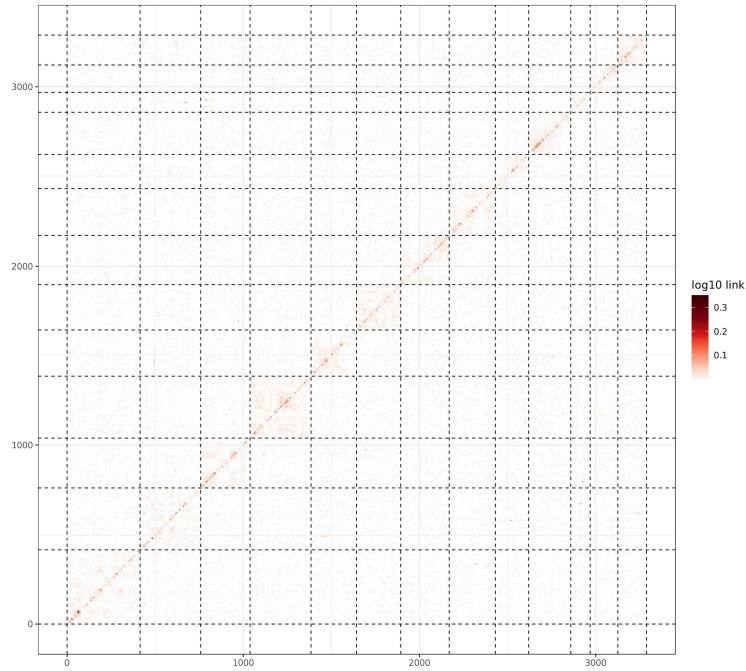


그림 18. 남극곰새풀 유전체 Hi-C 분석 결과 post scaffolding heatmap

(2) 연구내용 1-2. 남극이끼 *Sanionia uncinata*의 고품질 유전체 분석

- 남극 바톤반도의 대표 선태류인 *Sanionia uncinata*는 선태류 Hypnales에 속하며, 남극전체에서 가장 우점하는 종이면서, 모든대륙의 산간 지역에 분포하며, 환경변화에 민감한 생태지표종으로 알려져 있음
- *Sanionia uncinata*는 모델이끼종인 *Physcomitrella patens*에 비해 저온, 자외선 등 환경스트레스에 대한 내성이 강하기 때문에 비교연구를 통해 남극 선태류의 저온적응과 관련된 분자기작과 기능유전자군 선별이 가능함

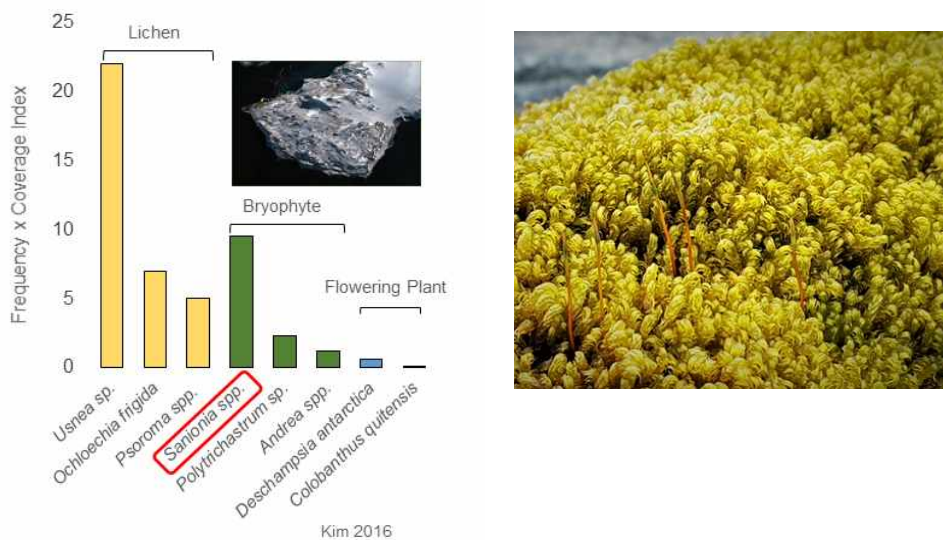


그림 19. 남극낫깃털이끼의 세종기지 주변의 빈도·피도(a) 및 표현형(b)

○ 남극 이끼 *Sanionia uncinata* Y3 라인의 유전체 분석

- 남극에 서식하는 이끼 *Sanionia uncinata*의 개체군 중 4배체인 A2 라인과 2배체인 Y3 라인의 배양체 확보 완료
- 2배체인 Y3 라인은 A2 라인의 4배체 형성 과정에 관여한 지놈 세트인 것으로 추정되며, Y3 라인이 최초로 남극에 유입된 개체군의 원형에 더욱 가까울 것으로 추정됨
- Y3 라인의 유전체 분석을 통해 남극 식생의 다배체 형성과 관련 지놈 수준 진화 과정과 유전자의 기능적 차이 규명 가능

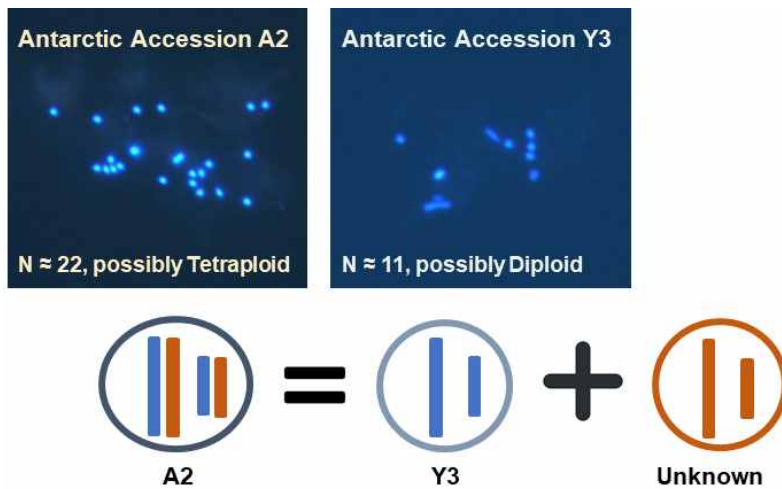


그림 20. 남극 이끼 A2 라인의 지놈 형성과정 가설

○ 남극낫깃털이끼 *S. uncinata*의 집단비교유전학적 분석을 통한 적응 진화 과정 추적

- 진화는 집단에 유익한 돌연변이의 빈도가 자연선택에 증가한 것으로, 극지생물의 적응진화를 관찰하기 위해서는 관련 기능유전자의 변이 추적이 필요하며 이는 개체군 간의 비교유전체 연구를 통해 가능
- 따라서 본연구에서는 *S. uncinata*의 집단 표현형질 및 개체군 형질 비교를 위해 극지역 및 타지역의 대표개체군집의 배양체 확보
- 지리분포 및 haplotype을 고려한 대표군집을 선정하고 샘플 확보)
- 개체군별 배양체의 배양조건 수립
- 향후 배양체간 낫깃털이끼의 표현형 분석을 위한 기초데이터 확보: 표면적, 큐티클층, 저온 성장속도 등

○ 남극좁새풀 표준유전체 지도 작성

- 남극 대표 현화식물인 남극좁새풀의 유전체 크기를 예측한 결과, 반수체 기준 4.2 Gb로 벼과의 대표식물인 벼에 비해 약 10배의 유전체를 가지는 것으로 확인되었음



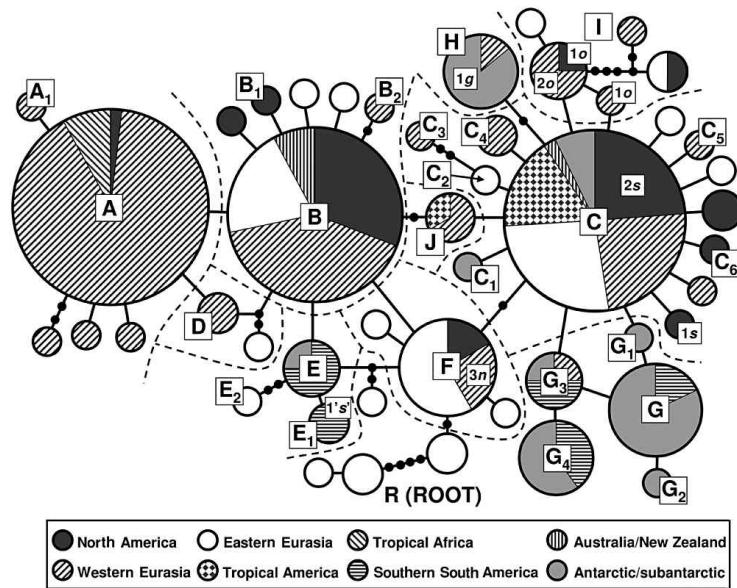


그림 21. Haplotype네트워크 분석을 통한 *S. uncinata* 개체군의 계통 지리학적 관계, Hadena 2012

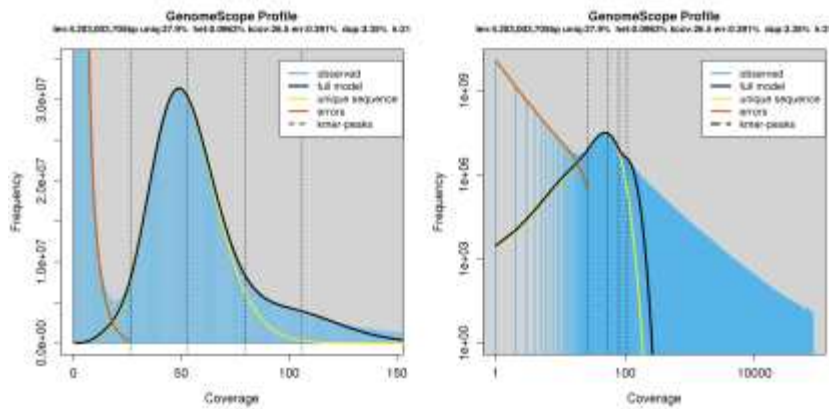


그림 22. 남극곰새풀 유전체 크기 예측을 위해 사용한 GenomeScope 프로그램 결과

- 남극곰새풀 유전체 de novo assembly를 위해 long read sequence를 얻을 수 있는 Nanopore sequencing 기법으로 염기서열을 확보한 후, pilon을 활용한 sequence polishing, ARCS 프로그램을 활용한 scaffolding을 수행한 결과 9,182개 scaffold, 4.5 GB 염기서열을 확보했으며, BUSCO로 genome completeness를 조사한 결과 99.1%의 완결성 확보

표 9. 남극곰새풀 유전체의 de novo assembly 과정 요약표

	Step 1. de novo assembly	Step 2. polishing	Step 3. scaffolding
Contigs number	25,119	24,174	<b>9,182</b>
Contigs length (bp)	4,554,945,758	4,565,884,284	<b>4,567,383,484</b>
Min length (bp)	3,390	3,390	3,390
Max length (bp)	2,076,101	2,102,073	6,715,414
Average length (bp)	181,335	188,876	497,428
N50 (bp)	285,567	291,136	1,260,583
N90 (bp)	85,542	89,358	302,199
N's No.	-	-	1,499,200
GC Ratio (%)	45.53	45.53	45.53
BUSCOs V4 Eukaryota	97.2	99.1	<b>99.1</b>

(3) 연구내용 1-3. 극지 환경시료의 메타지놈 라이브러리 확보

- 극지 미생물자원은행(Polar and Alpine Microbial Collection, PAMC)에서 분양받은 3063 균주 중에서 약 800 균주에 대한 유전체를 확보함

Category	number	Ocean/Continent number	State/Province	number
etc	1107	etc	etc	1568
YF	8	Antarctic	Adels Island	8
Algae	3	Antarctica	Alaska	4
Algae (marine)	12	Arctic	Barents Sea	5
Animal	15	Arctic	Barent Peninsula	41
Amphib	3	Asia	Imbruck	251
Bacteria	214	Balearic Sea	Kara Sea	337
Cryptofits	247	Europe	King George Island	265
Debris (animal excrement)	10	Norway	Navya Zemlya	29
Debris (plant)	5	Roost Sea	North of NZ and West of Russian Harbor	1
Fresh water	7	<b>유일계</b>	Russian Harbor	36
Ice	2		Sahard	418
Ice (glacier)	5		Victoria Land	8
Jctan	124		Wester Peninsula	6
marine sediment	17		<b>총합계</b>	<b>3063</b>
Moss	4			
ND	3			
rock	8			
Rock (sea shore)	1			
sea water	27			
Sediment (fresh water)	1			
Sediment (marine)	223			
sediment (sea)	3			
Snow	5			
Soil	6			
Soil (plant debris)	11			
Soil (sea shore)	161			
Soil (terrestrial)	10			
soil (terrestrial)	120			
soil (terrestrial) (?)	42			
Terrestrial soil	4			
Terrestrial soil	26			
unknown	16			
Water (fresh)	19			
Water (sea)	84			
Water (sewage)	15			
<b>총합계</b>	<b>3063</b>			

그림 23. 극지 미생물자원은행에서 분양된 균주의 분리장소 및 환경특성에 따른 분류

- 극지 미생물자원은행에서 보관 중인 미생물 중에서 얼음, 토양, 침전물 유래의 토양에서 분리된 미생물들을 각 0.1 mL씩 각 category별로 pooling해서 미생물 혼합 균체를 확보함
- DNA 추출은 Bacteria gram positive 매뉴얼 방식으로 추출하였으며, 확보된 DNA는 “PAMC 메타지놈 라이브러리” 제작을 위하여 사용됨

• DNA 추출은 Bacteria gram positive 매뉴얼 방식 사용

\* Fluorometer 기준

Lane	Sample	Conc. (ng/ul)	Vol. (ul)	Total (ug)
1	Ice	350		700
2	Soil	70	2000	140
3	Sediment	66.35		132

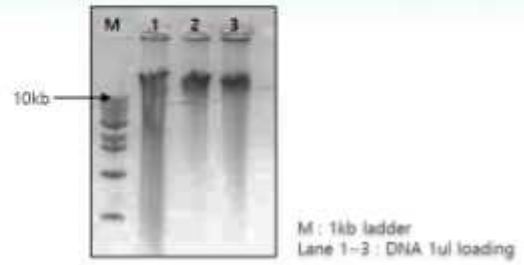


그림 24. 극지 미생물자원은행의 미생물 환경 유전체 pool 확보

○ PAMC 메타지놈 fosmid library 확보

- 확보된 미생물 유전체를 이용하여 BamHI을 이용한 size fraction 조건 설정 이후 End repair 반응 및 pCC1FOS vector를 이용하여 Ligation/Package & infection를 반복 실시하여 라이브러리를 확보함
- 전체 library titer는 87,000 clones를 확보(using 384 format plate)
- library 중에서 12개 clone을 random 하게 선별하여 NotI cutting 후 insert size를 측정 한 결과 평균 29 kb로 확인됨



## Fosmid library construction results

Sample	Ave. Insert size (kb)	Total clone (ea)
Ice	32	23,000
Soil	26	54,000
Sediment	30	10,000

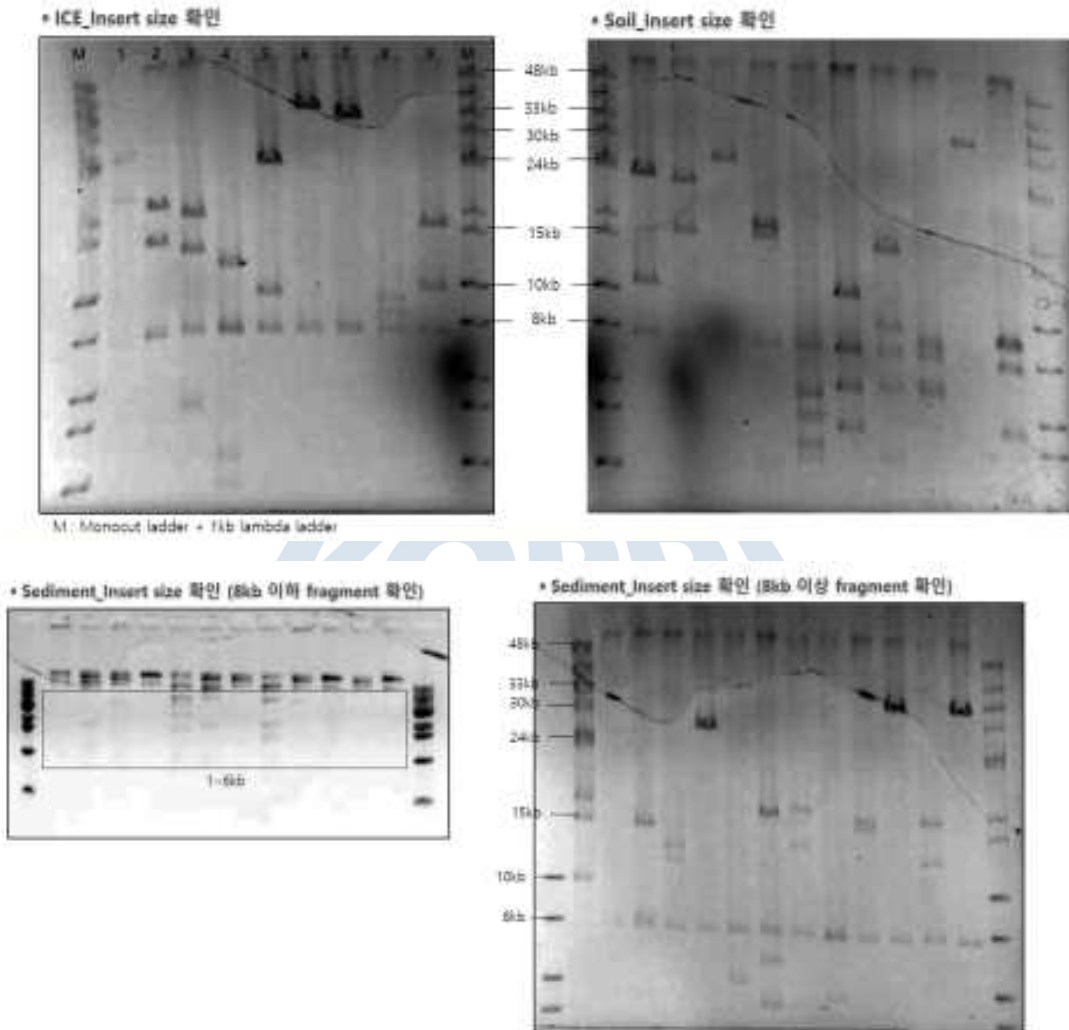


그림 25. PAMC 유래의 얼음, 토양, 침전물 유래의 미생물 fosmid library 구축

- 극지 환경에서 살고 있는 지의류와 극지식물의 근권 토양, 극지동물의 장내환경 등의 환경시료의 메타지놈 라이브러리 제작
- 극지의 특이 환경별 시료 채취 및 순수 메타지놈 DNA 추출을 위한 프로토콜을 확립
- 메타지놈 라이브러리에 적절한 fosmid 벡터를 선정하고 메타지놈 라이브러리를 제작함.

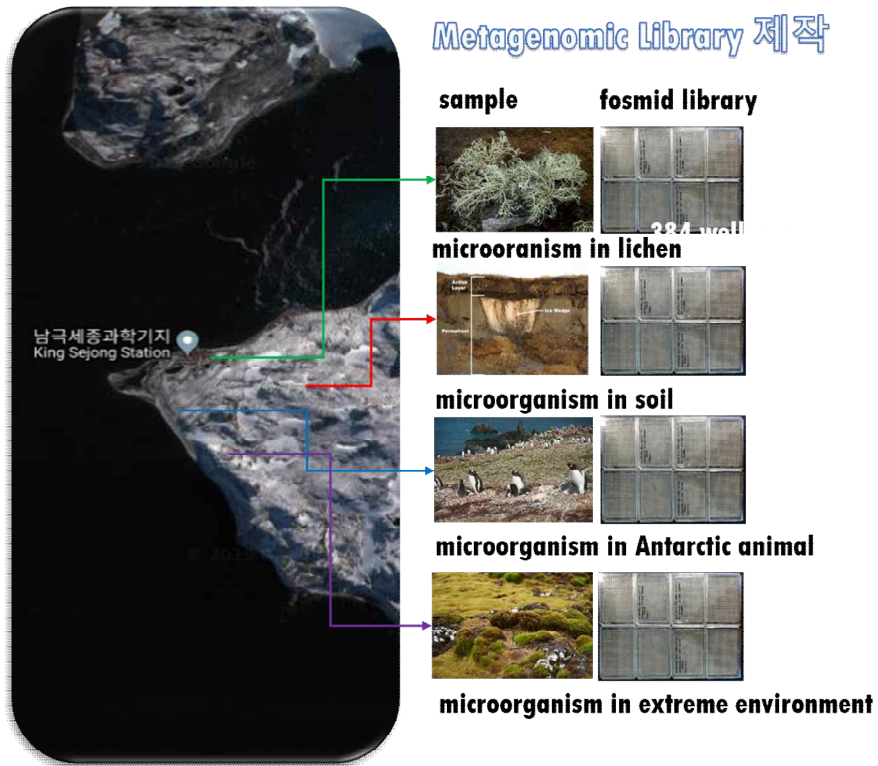


그림 26. 극지 환경시료 채취 및 메타지놈 라이브러리 제작

- 스크리닝 작업의 효율성을 증가시키기 위해서 메타지놈 라이브러리 제작시 자동화장비를 이용하여 다양한 방식의 3D pooling 라이브러리를 제작함

(a) 96 well liquid handler (b) 3D pooling

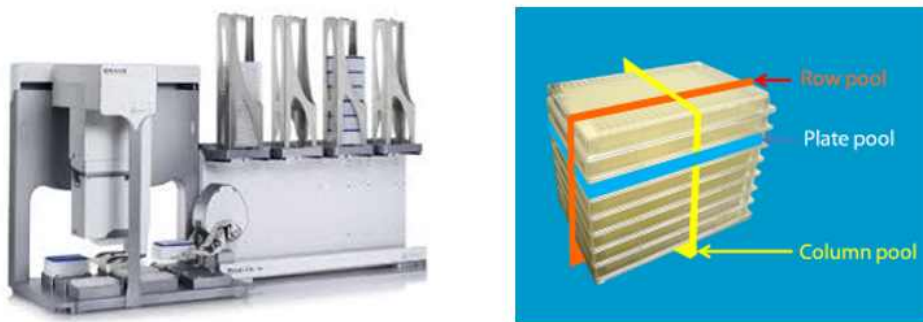


그림 27. 자동화 장비 및 384 well plate 형태의 라이브러리의 3D pooling

- 극지 메타지놈의 유전체 분석 및 대사지도 구축
  - 극지 환경시료의 메타지노믹스(환경미생물 유전체 분석)을 통하여 미생물군의 생리학적 경로에 해당하는 대사지도 작성
  - 메타지노믹스 정보를 활용하여 환경 특이적 유전자군 선별 및 유용 유전자 선정



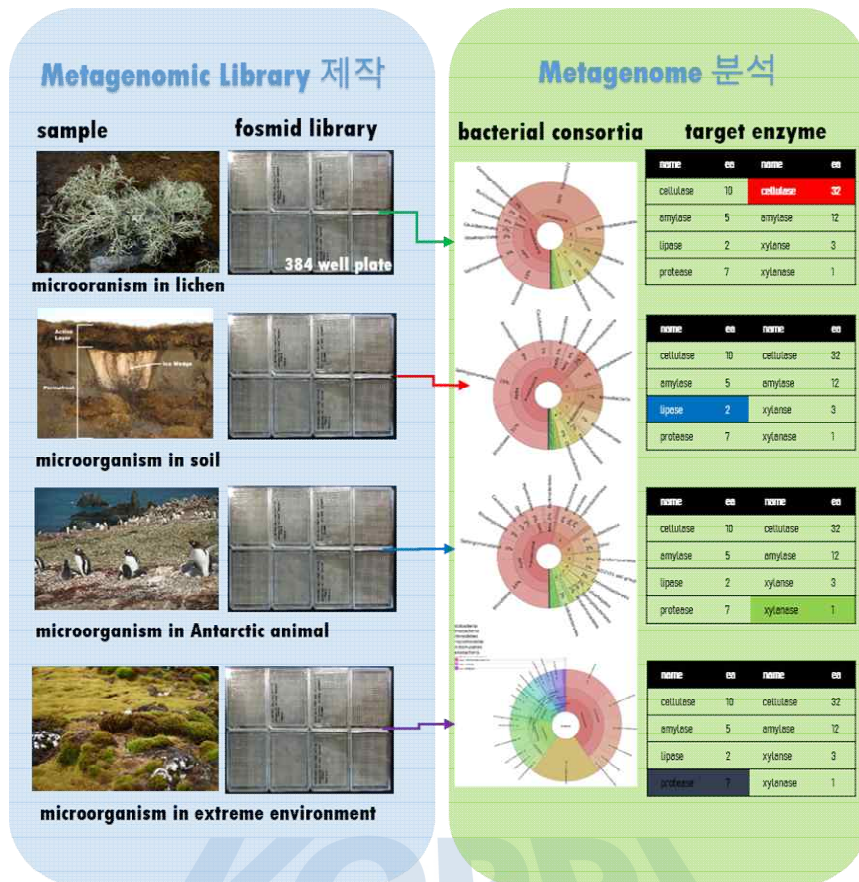
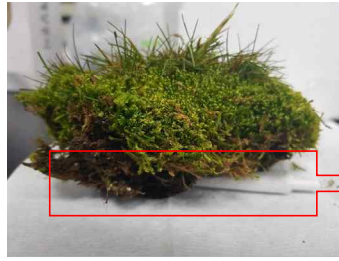


그림 28. 극지 메타지놈의 유전체 분석 및 타겟 유전자 선정

- 극지 미생물 PAMC 균주 중에서 lichen과 해수에서 분리된 275종의 미생물 유전체를 이용하여 극지 메타지놈 라이브러리 제작
  - PAMC 미생물 균주 275종 (Lichen 128종 + 해수 유래 147종)에 대한 cell stock 0.1 mL을 pooling하여 유전체 DNA를 추출함. (그람 양성 균주 매뉴얼 방식으로 추출)
  - 확보된 미생물 유전체를 이용하여 BamHI을 이용한 size fraction 조건설정 이후 End repair 반응 및 pCC1FOS vector를 이용하여 Ligation/Package & infection를 반복 실시하여 라이브러리를 확보함
  - 전체 library titer는 10,000 clones를 확보(using 384 format plate)
  - library 중에서 12개 clone 을 random 하게 선별하여 NotI cutting 후 insert size를 측정한 결과 평균 31 kb로 확인됨
- 극지 환경시료(남극 세종과학기지 주변의 이끼 근권토양) 유래 메타지놈 라이브러리 1건 제작(384 plate에서 10,752 클론 이상 확보)
  - 남극 세종과학기지의 남극 이끼 시료에서 근권토양을 채취한 후 토양시료를 이용하여 환경 유전체 (메타지놈)을 확보함



남극세종과학기지



남극 이끼



근권 토양시료

그림 29. 극지 고유의 메타지놈 fosmid 라이브러리 구축을 위한 남극이끼 근권 토양시료 확보

- DNA 추출은 MPBIO사의 FastDNA Spin kit for soil 제품을 사용하였으며, 1개 column 당 약 200 mg 의 토양시료를 사용하여 8.6 g의 시료로부터 토양 DNA를 추출
- 확보된 환경 유전체를 이용하여 pCC1FOS vector를 이용하여 라이브러리를 확보함
- 전체 library titer는 10,752 clones를 확보(using 384 format plate)
- library 중에서 12개 clone 을 random 하게 선별하여 NotI cutting 후 insert size를 측정한 결과 평균 26 kb로 확인됨



그림 30. 남극 이끼 근권 토양시료로부터 환경 유전체 추출 및 정제

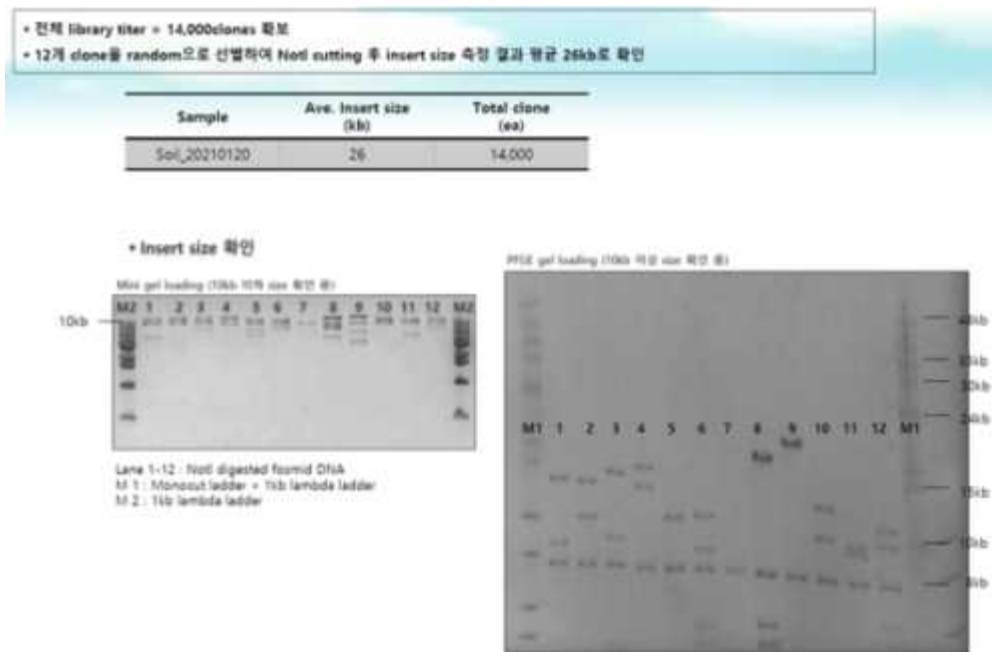


그림 31. 남극이끼 근권토양 유래 환경 유전체로부터 메타지놈 fosmid 라이브러리 구축

#### (4) 연구내용 1-4 특정 단백질 활성을 고려한 극지 미생물종 선정

○ 극지 미생물의 확보 방안

- 극지 환경시료를 확보하여 미생물군의 순수 분리를 위해 실험실로 이동
- 호기적 조건과 혐기적 조건에서 각 특성에 맞는 배양법으로 전체 배양하여 상대적으로 개체수가 적은 종의 증식유도
- 세포의 효소활성 또는 특정 환경에서의 세포활성을 촉진하는 요인에 의해 특이적인 생명반응성을 나타내는 개체를 순수 분리

#### 나. 기능유전체 분석을 통한 극지 생물 특성 규명

##### (1) 연구내용 2-1. 남극어류의 극지 환경 적응 유전자의 기능 분석

○ 남극어류 특이적 환경 적응 유전자 선별

- 본 연구진의 선행 연구 수행 결과 남극어류와 비극지어류의 유전체 비교를 통하여 저온, 극단적인 광주기, 높은 활성산소 농도 등의 극한 환경에 적응하기 위하여 확장 및 손실된 유전자를 확인하였음
- 남극 어류 특이적 결빙방지단백질 뿐 아니라 난 발생 중 저온 저항을 갖게 하는 난보호단백질의 지놈 내 연속적 확장이 발견됨
- 저온 환경 적응 과정 중 발생하는 세포내 활성산소에 의한 세포 손상을 줄이기 위한 항산화방어기작 내 유전자의 확장 확인



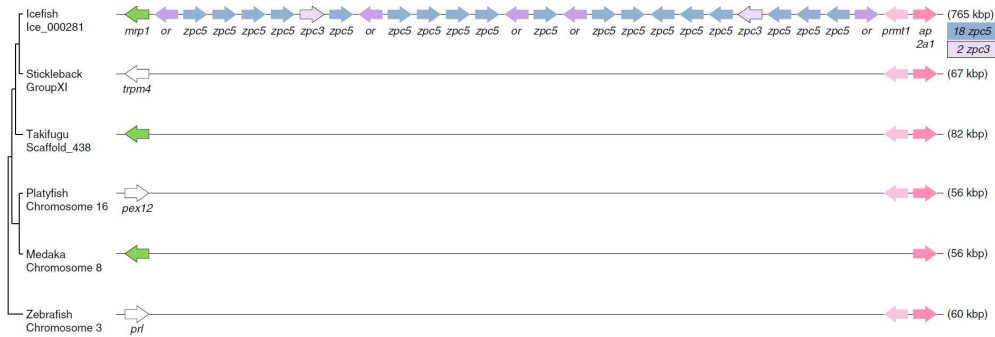


그림 32. 남극 어류에서만 발견된 난보호단백질 유전자군의 지놈 내 연속적 확장 패턴

○ 선별된 환경 적응 유전자의 형질전환체 제작을 통한 기능 규명

- 남극 빙어 지놈에서 세포 내외에서 발생된 활성산소의 직접적인 포획을 통한 제거, 구조 변화, 다양한 항산화효소의 발현 촉진 등의 기능을 갖는 것으로 알려진 Superoxide dismutase (SOD) 유전자 중 SOD3 의 확장이 발견
- 어류 연구의 모델로 활용되고 있는 제브라피쉬 지놈에서 두 타입의 sod3 유전자가 확인되었으나 지놈 내에서 연속적으로 확장된 형태인 sod3 유전자는 남극 빙어가 유일함
- 이에 CRISPR 기술을 활용한 sod3 gene knock out zebrafish를 제작하여 sod3 유전자의 기능을 예측하고 sod3 유전자 과발현 zebrafish를 제작하여 sod3 유전자의 확장이 남극 환경 내 적응에 미친 영향을 규명할 예정

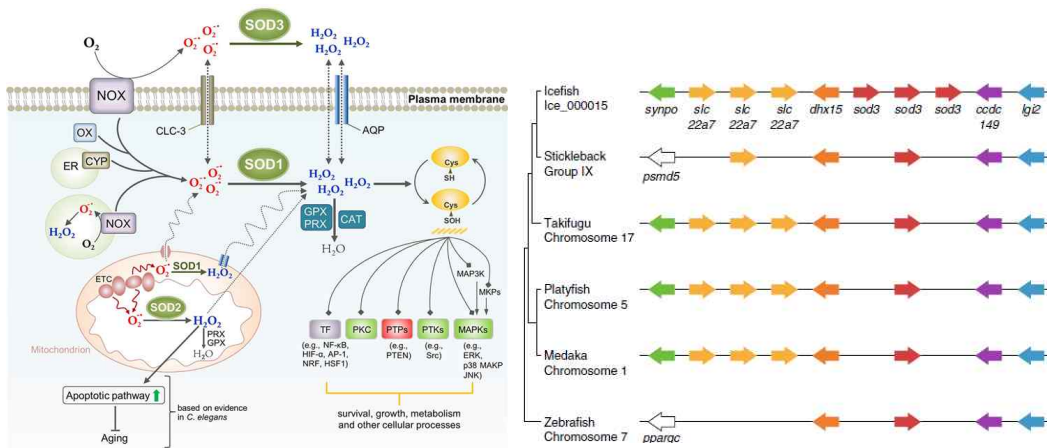


그림 33. SOD 유전자 기능의 모식도 (Wang et al., 2018)와 남극빙어 지놈 내에서 확인된 확장된 sod3

(2) 연구내용 2-2. 남극요각류의 저염 환경 적응 기작 연구

○ 연구의 필요성

- 요각류는 크기가 작고 실험실 내 배양이 용이하며 생식주기가 짧고 성적이형성을 갖는 등의 분자생물학 및 유전학 등의 분야에서 연구모델로써 장점을 가질 뿐 아니라 온도, 염분, 오염물질 노출 등 다양한 환경변화에 강한 내성을 가져 환경독성학 분야 연구에 활용되고 있음
- 남극 전역에 서식하는 *Tigriopus kingsejongensis*는 요각류가 갖는 연구모델로써의 장점을 모두 가지며 표준유전체 정보를 활용할 수 있어 남극 환경 변화 및 생태계 변화 연구의 지표종으로 활용 가능성이 높음



그림 34. 연구에 사용된 남극요각류(*Tigriopus kingsejongensis*)

- 남극 요각류의 경우 빙설수에 유입에 따른 저염분 환경 적응 기작이 발달했을 것으로 예상하여 다양한 염도 변화에 노출시킨 후 남극 요각류의 환경 적응 기작 연구를 수행하였음

○ 염분 변화에 따른 생리적 반응 분석 결과

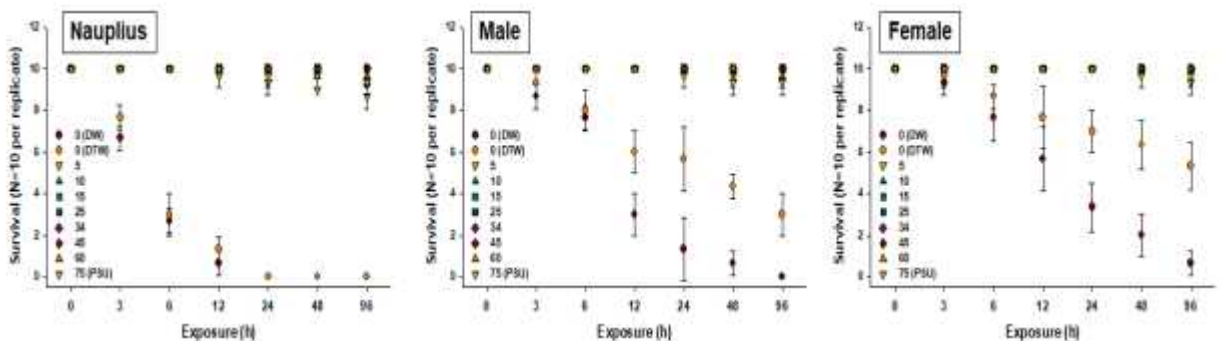


그림 35. 염도 변화에 따른 생존율 측정 결과

- 담수에 노출된 개체를 제외하고 5~75PSU에 노출된 모든 실험개체에서 생존율 변화

를 보이지 않았음

- 담수에서의 생존능력은 유생<수컷<암컷의 순서로 나타났으며 온대 서식 요각류를 이용한 선행 연구에서보다 더 오랜 시간 생존하는 것이 확인되어 남극 요각류가 담수 노출에 더 강한 저항성을 가지는 것을 알 수 있음

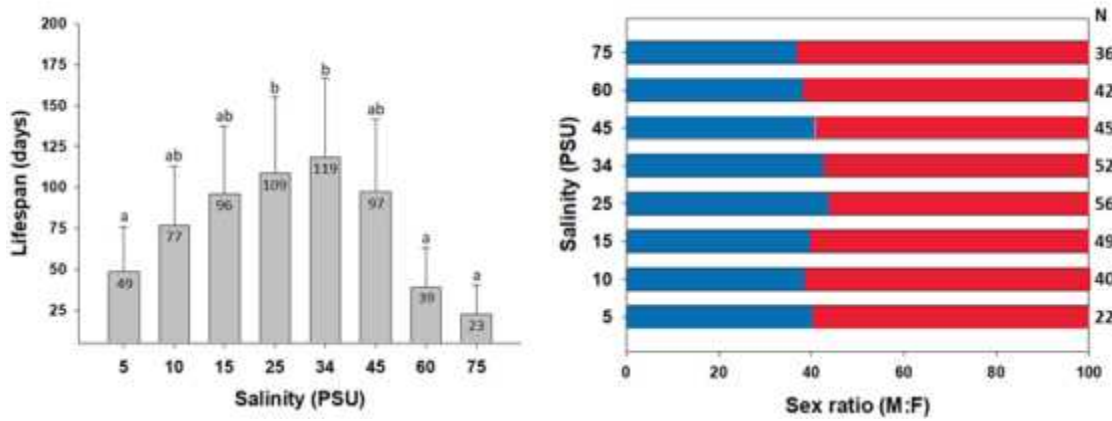


그림 36. 다양한 염분 노출에 의해 변화하는 수명(왼쪽)과 성비율의 변화(오른쪽)

- 남극 요각류는 저염분 노출에서보다 고염도 노출에서 수명에 더 큰 영향을 받는 것으로 측정되었고 통계적으로 유의미하지 않지만 염도 변화에 의해 암컷의 비율이 증가하는 것을 확인하였음(그림 36)

○ 염분 변화에 따른 분자생물학적 반응 분석 결과

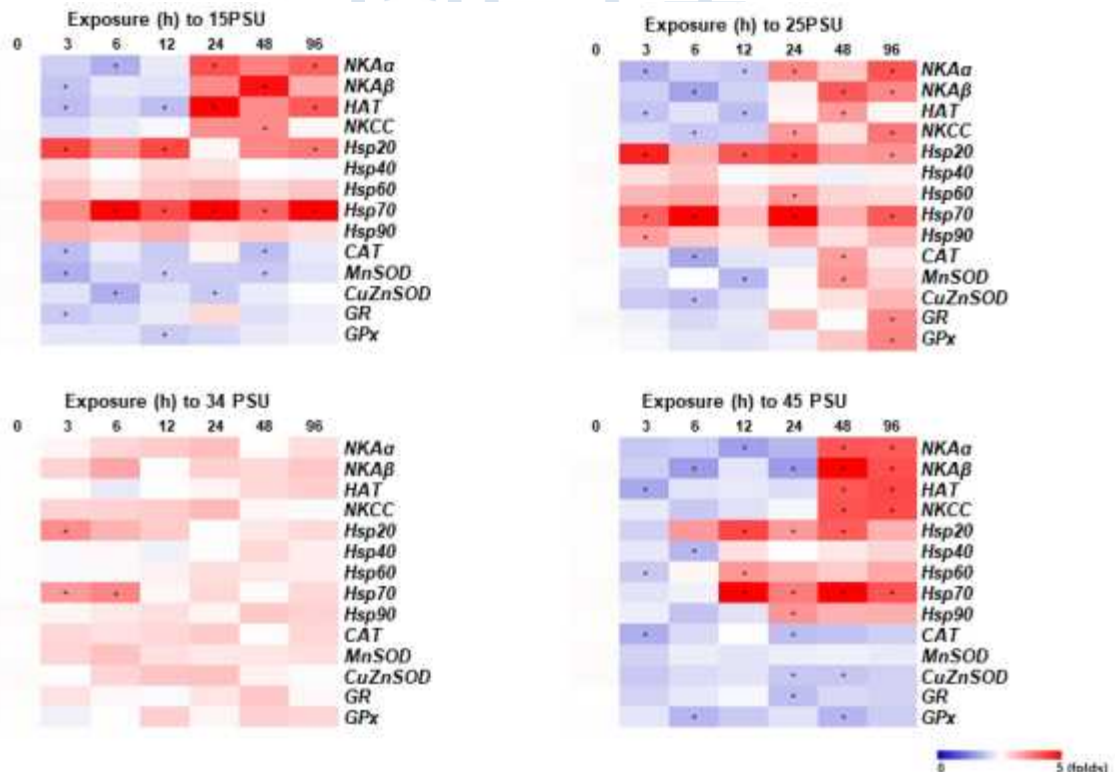


그림 37. 염도 변화에 따른 유전자 발현 양상

- 생존에 영향을 미치지 않는 15, 25, 45 psu에 노출된 요각류의 시간별 유전자 발현 양상을 측정된 결과, 삼투조절에 관여하고 있는 유전자(NKA, HAT, NKCC)의 경우 비교군에서 모두 발현이 감소하였다가 24시간 이후부터 발현이 증가하는 패턴을 보임
- 염도 변화에 의해 발현이 증가하는 것으로 알려져 있는 항산화기작 관련 유전자(CAT, SOD, GR, GPx)의 발현이 대부분 감소하였는데 이를 통해 선례 연구들에서 알려져 있던 기작 이외에 남극 요각류 특이적인 산화적 스트레스 해소 기작이 있을 것으로 예상할 수 있음

### (3) 연구내용 2-3. 남극선태류의 스트레스저항성 유전자의 기능 분석

- 남극 이끼 AP2 유전자군 과다발현체의 건조저항성 정량화를 통한 기능성 유전자 타겟 선별
- 선행연구에서 남극 이끼 유래 AP2 유전자군 18개 유전자를 과발현하는 모델이끼 형질전환체를 제작하여 이들의 저온 저항성을 분석하였음
- 식물의 AP2 유전자들은 저온 뿐 아니라 건조환경 적응 과정에서도 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려져 있음
- 남극 이끼 유래 AP2 유전자들의 건조환경 관련 기능성 검정을 위해, 해당 분야 전문가인 연세대 김우택 교수 연구팀과의 위탁연구 수행

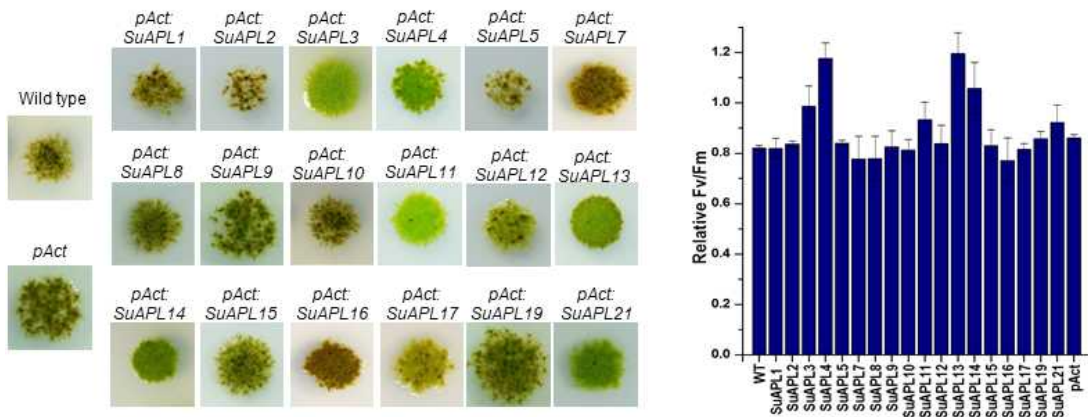


그림 38. 남극 이끼 AP2 유전자군 과발현체의 저온성장 표현형 분석

- 남극이끼의 환경반응유전자의 발현 분석
- 남극낫깃털이끼의 계절변동 전사체 결과를 바탕으로 남극낫깃털이끼는 DEG (differentially expressed gene)중 12%의 유전자군이 겨울시기에 해당하는 4월~9월에 발현됨을 확인



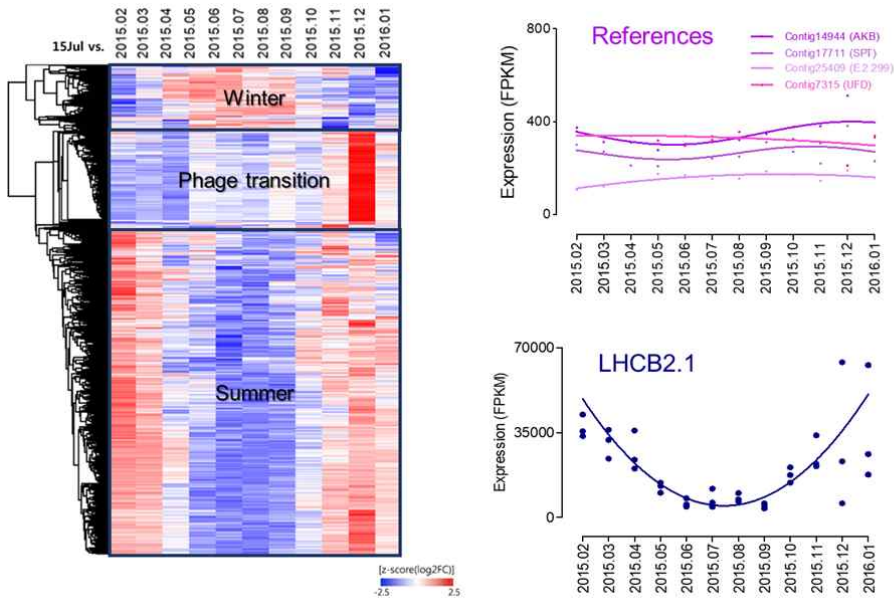


그림 39. 남극낮깃털이끼 전사체 발현의 계절적 변동성

- 이들 중 ABA 생합성과 관련된 유전자(ABI3, CYP707A1, FIE 등)는 식물의 종자휴면에 관여하는 식물의 발달과정에서 매우 중요한 유전자군으로서 남극낮깃털이끼의 연중전사체 변화에서 낮깃털이끼가 휴면과 상관관계가 매우 높음을 확인하였음
- 따라서 본연구에서는 ABA 생합성조절유전자의 발달유전학 및 생화학적 기능 연구를 통해 극지이끼의 환경적응기작을 규명할 예정

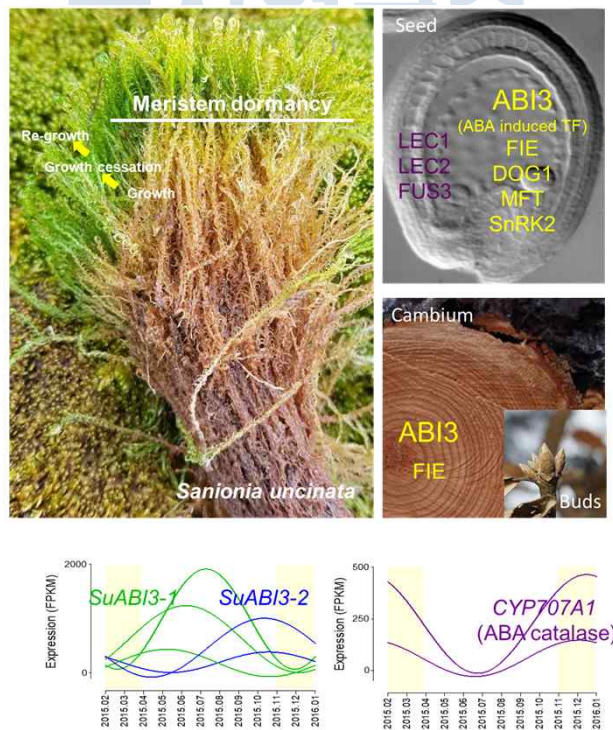


그림 40. 극지선대류의 극지에서 겨울휴면에 대한 SuABI3의 예상 조절기작

(4) 연구내용 2-4. 다양한 극지환경 변화에 의한 발현전사체 및 단백질체 변화 분석

○ 남극좀새풀의 남극환경 적응과정에 작용하는 ADF 유전자군 발현 분석

- 스트레스 환경에서 ADF(Actin Depolymerizing Factor)는 세포 내 액틴 필라멘트 구조를 역동적으로 변화시켜 식물의 환경스트레스 적응도를 높이는 것으로 알려져 있음. 기존 전사체 정보에 기반하여, 남극좀새풀의 ADF 유전자 8개를 분리하였음.

표 10. 남극좀새풀에서 분리한 8개 ADF 유전자의 세부 정보

Gene Name	Group	NCBI Accession	CDS Length (bp)	Amino Acids (aa)	Isoelectric Point	Molecular Weight (kDa)	GRAVY
DaADF1	C	MW818093	420	139	5.28	15.94	-0.371
DaADF2	B	MW818094	438	145	5.43	16.78	-0.467
DaADF3	E	MW818095	429	142	4.41	14.74	-0.263
DaADF4	E	MW818096	429	142	5.42	16.14	-0.574
DaADF5	A	MW818097	432	143	8.73	16.40	-0.300
DaADF7	D	MW818098	420	139	5.91	15.96	-0.381
DaADF9	C	MW818099	420	139	5.62	16.08	-0.540
DaADF10	B	MW818100	465	154	5.22	17.45	-0.478

Abbreviations: CDS, coding sequence; kDa, kilo Dalton; GRAVY, grand average of hydropathy

- 여러 환경스트레스 조건에 8개 ADF 유전자들의 발현이 어떻게 변화하는지를 알아보고자, 먼저 남극 필드 조건에서 유전자 발현을 조사한 결과, DaADF3은 스트레스 마커 유전자인 DaIRIP와 매우 유사한 반응을 보였음.
- 더불어 저온과 건조 조건에서도 8개 ADF 유전자들 중 DaADF3이 가장 두드러지는 발현 변화를 보였기 때문에, DaADF3이 남극좀새풀의 환경스트레스 반응에 관여하는 핵심 유전자인 것으로 판단하였음.

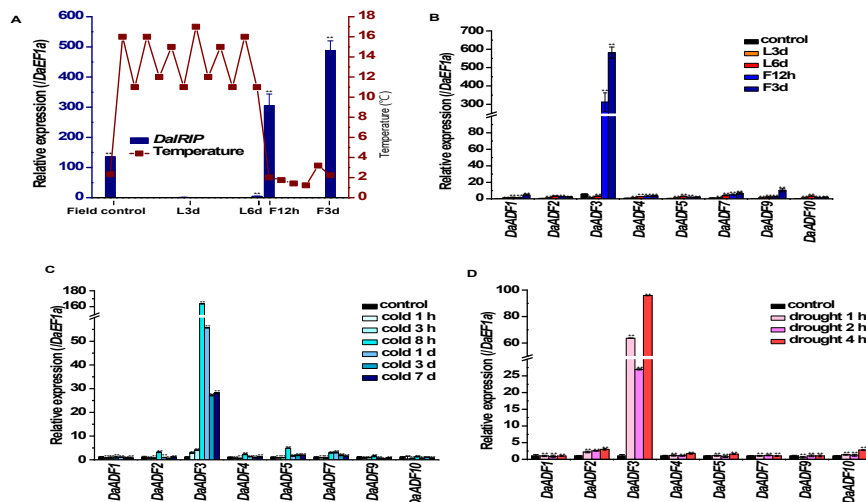


그림 41. 남극좀새풀 8개 ADF 유전자의 발현 분석. A, 남극 필드 마커 유전자로 사용한 IRIP 유전자 발현 양상. B, 남극 필드 조건, C, 저온 조건, D, 건조 조건]



○ 남극 이끼 *Sanionia uncinata*의 극지환경모사 발현전사체 분석을 통한 남극 이끼의 휴면기작 분석

- 남극 이끼의 극지환경 생존에 필수적인 휴면 과정의 메커니즘을 이해하기 위해 극지 환경 모사실험 수행, 남극 이끼의 서식지인 남극세종기지 주변의 기후 데이터를 바탕으로 여름 및 겨울 시즌의 평균 기온 및 광주기를 고려하여, 성장 시즌(Growth season : 장일 조건 20L:4D 10°C/4°C), 휴면 시즌(Dormant season: 단일조건 4L:20D, 0°C/-4°C) 환경을 유도함

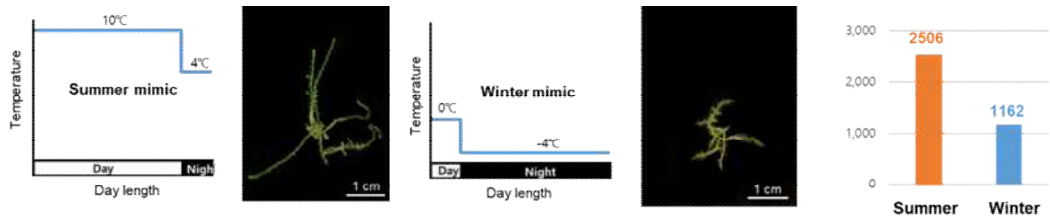


그림 42. 극지환경모사실험에 따른 식물의 길이성장변화 및 각 환경별 발현 유전자

- 해당 환경에서 남극 이끼의 성장을 비교한 결과, 휴면모사조건에서 남극 이끼의 primary shoot의 생장이 70% 이상 감소하고 branch 개수가 감소함을 관찰
- 환경모사샘플에 대한 RNA-seq 분석을 수행하여 2506 개의 성장 환경 특이 증가유전자 및 1162 개의 휴면 환경 특이 증가 유전자를 확인하였음
- 또한, 선행연구 결과, 식물호르몬 ABA가 겨울에 축적됨을 확인, 남극 이끼에 식물호르몬 ABA를 처리하여 식물의 생장이 지연됨을 확인

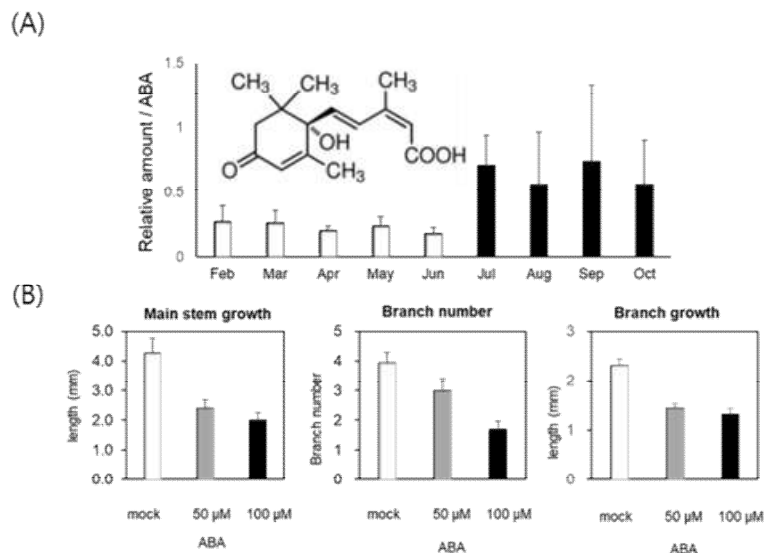


그림 43. 식물휴면조절호르몬 ABA에 대한 남극 이끼의 생물반응 (A)선행연구에서 확인된 계절 샘플에서 ABA 축적량 (B) ABA 처리시 남극 이끼의 성장 반응

- 극지 미생물 유래 LEA(Late Embryogenesis-Abundant) 단백질
  - 극지 미생물에서 발견되는 LEA 단백질 선정
  - 단백질 발현, 정제 및 결정화

>WP\_068336373 [*Hymenobacter* sp. PAMC 26554]

MKKLIILLTIIVCFNCKVKEKPEFLRVENIEVTDSNSKFIVLTADAFFNPNNSVGG  
KLETEGITITVNDIEVATVSSEAFDVPAPKKEFSIPLSANIPTNKVLNLNLSGLLNS  
VLNKSMMKVHYKGIKYKVFVGFVSYEYTVDETENVKIKI

>WP\_034057846 [*Lacinutrix jangbogonensis*]

MSIFRLFIRRVALLLPVSGLLLASGCTLRRETRQEGIPAVEPRLNVRAVEQASLGT  
LVDNKLKELGAGRMPLVLELPPRDSVRVPFSFELNTYKLLGTDALPALRNFBALGFG  
DLRRQRVTLRLHPIVRNARGRLSTLIRRGPLPLASRAKAGPASVEADSGGKVAKP  
APQAL

>WP\_052172585 [*Psychroserpens jangbogonensis*]

MKKLIILSTLVITFISCSVKEKPEFLRVENIKVLESTSKTITPTADALFMNPNDIGGE  
LRTDGIKVIVNGNEMASVSTESFKVPAKKEFSIPLRADVPTDSLFSKSLSGLLGSI  
FSKCLKVQYKGDIKYKVLGFSHTYAVDETEDVKIKF

- 단백질 발현조건 탐색

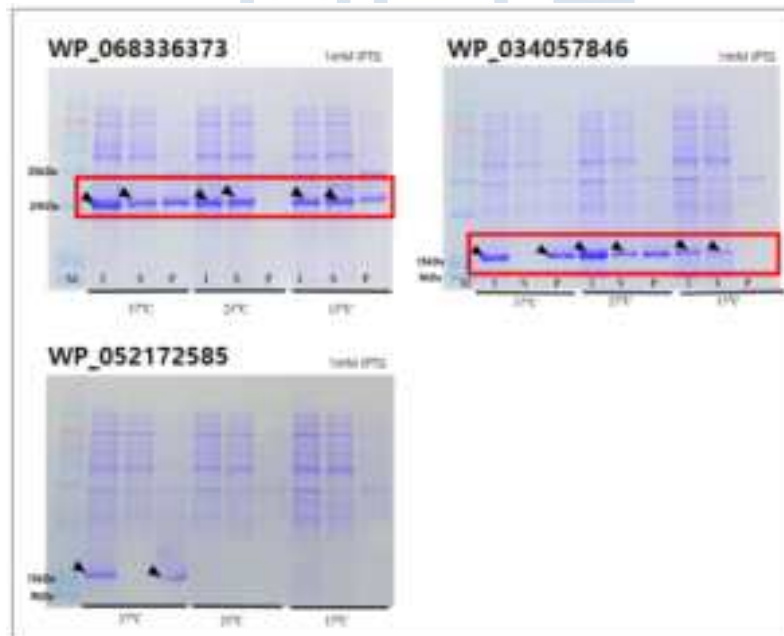


그림 44. 극지 미생물 유래 LEA 단백질 3종의 온도별 발현 테스트 결과

○ 단백질 정제

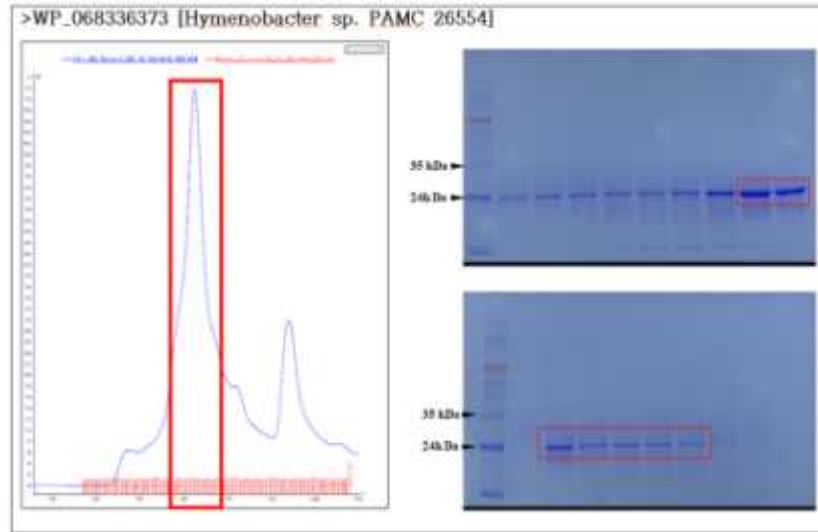


그림 45. WP\_068336373 [*Hymenobacter sp.* PAMC 26554] 단백질의 정제결과

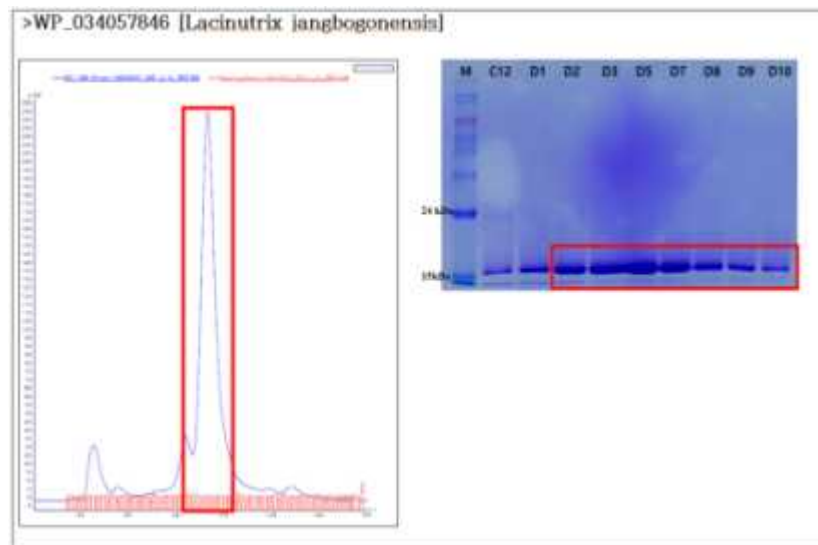


그림 46. WP\_034057846 [*Lacinutrix jangbogonensis*] 단백질의 정제 결과

○ 극지 미생물 유래 LEA(Late Embryogenesis-Abundant) 단백질

- LEA 단백질은 낮은 온도, 삼투압 스트레스로 인한 단백질 응집을 보호하는 환경 스트레스 단백질임. 극한의 상황에서 발현되는 극지 미생물 유래 LEA 단백질의 구조적 분석을 위한 기초 연구 실시
- LEA 단백질 후보군 선정
- LEA 단백질 발현, 정제 및 결정화
- LEA 단백질 구조 모델링을 통한 구조적 특징 분석

>WP\_068336373 [*Hymenobacter sp.* PAMC 26554]

MKKLIILLTIIVCFNCKVKEKPEFLRVENIEVTDSNSKFIVLTADAFFNPNNSVGG  
 KLETEGITITVNDIEVATVSSEAFDVPAPKKEFSIPLSANIPTNKVLNLNNSGLLNS  
 VLNKSMLVHYKGIKYKVFVGFVSYEYTVDETENVKIKI

>WP\_034057846 [*Lacinutrix jangbogonensis*]

MSIFRLFIRRVALLLPVSGLLLASGCTLRRETRQEGIPAVEPRLNVRAVEQASLGT  
 DVLPLRTPADVDLPRRNQLIDGYVKNLPLKMLRRLNVYNPNLEPIVITGLDYTV  
 LVDNKELGAGRMPLVLELPPRDSVRVPFSFELNTYKLLGTDALPALRNFBALGFG  
 DLRRQRVTLRLHPIVRNARGRLSTLIRRGPLPLASRAKAGPASVEADSGGKVAKP  
 APQAL

>WP\_052172585 [*Psychroserpens jangbogonensis*]

MKKLIILSTLVITFISCSVKEKPEFLRVENIKVLESTSKTITPTADALFMNPNDIGGE  
 LRTDGIKVIVNGNEMASVSTESFKVPAKKEFSIPLRADVPTDSLFSKSLSGLLGSI  
 FSKKLKVQYKGDIKYKVLGFSHTYAVDETEDVKIKF

○ LEA 단백질 정제

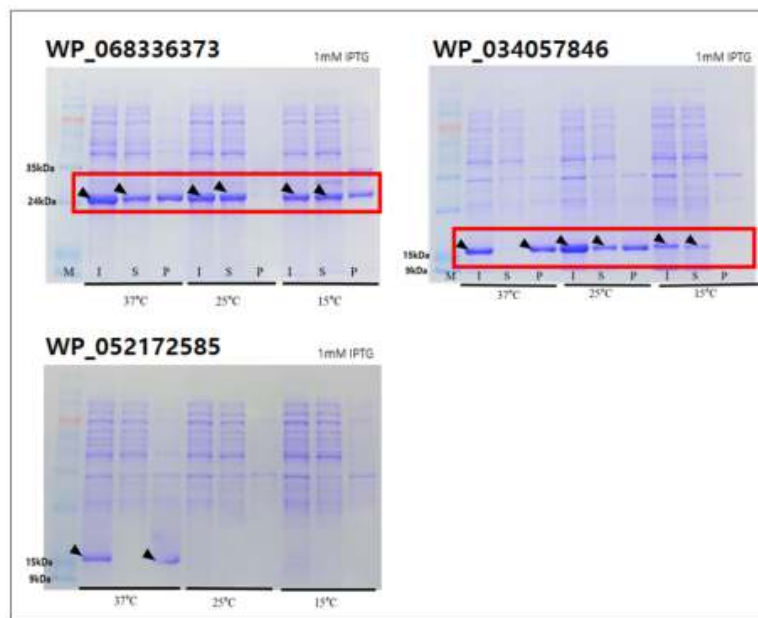


그림 47. 극지 미생물 유래 LEA 단백질 3종의 온도별 발현 테스트 결과

○ 단백질 서열 및 모델링을 통한 구조적 특성 분석

- LEA 단백질은 소수성 아미노산 비율이 낮고 무질서를 촉진하는 전하를 띤 친수성 잔기의 함량이 높다고 알려져 있음. 극지 유래 LEA 단백질의 친수성 특성을 확인하기 위해 소수성 테스트를 실시함 (그림 48). N-terminus 부분을 제외하고 모든 단백질에서 Hydrophobicity score가 낮게 나타남. 표면전하 분포 분석에서도 hydrophobic patch 부분이 낮게 전체적 표면에서 낮게 나타나는 것으로 확인됨. 결과적으로 극지 유래 LEA 단백질은 용해도가 높을 것으로 예상됨.

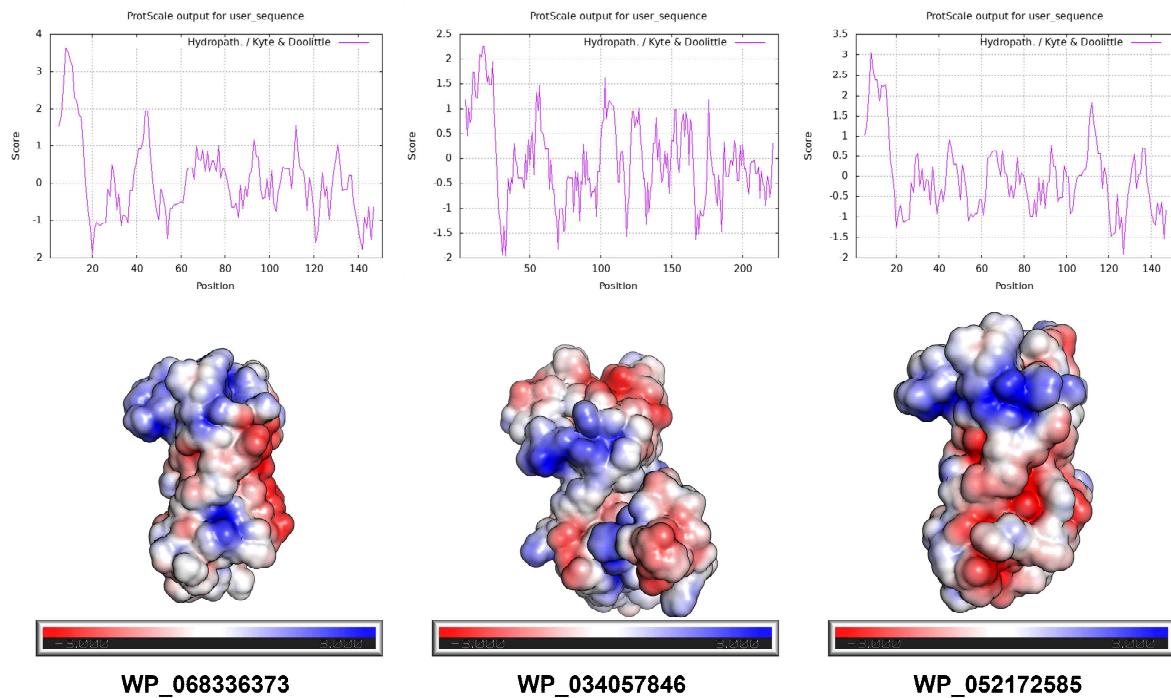


그림 48. WP\_068336373, WP\_034057846, WP\_052172585 전체 서열에 대한 ProtScale 소수성 그래프 및 표면 전하 분포 (surface charge distribution)

- LEA 단백질의 모델링 및 구조분석. LEA 단백질은 모두 비슷한 구조 형태를 가지고 있으며 중간에 Beta barrel 형태를 이루고 있음. barrel 안쪽은 소수성 잔기로 구성되어 있어 전체적 구조 안정화에 기여하는 것으로 판단됨 (그림 49). 특히, WP\_034057846 단백질의 경우 서열 중간에 구조화되지 않은 형태(unstructured form)를 가지고 있는데 이는 모델링 과정 중 구조 정보의 부족에 의해 나타는 것으로 예상됨. 하지만 이 부분은 LEA 단백질이 샤페론으로 작용할 때 다른 단백질을 인식하는 부분일 것으로 추측됨.

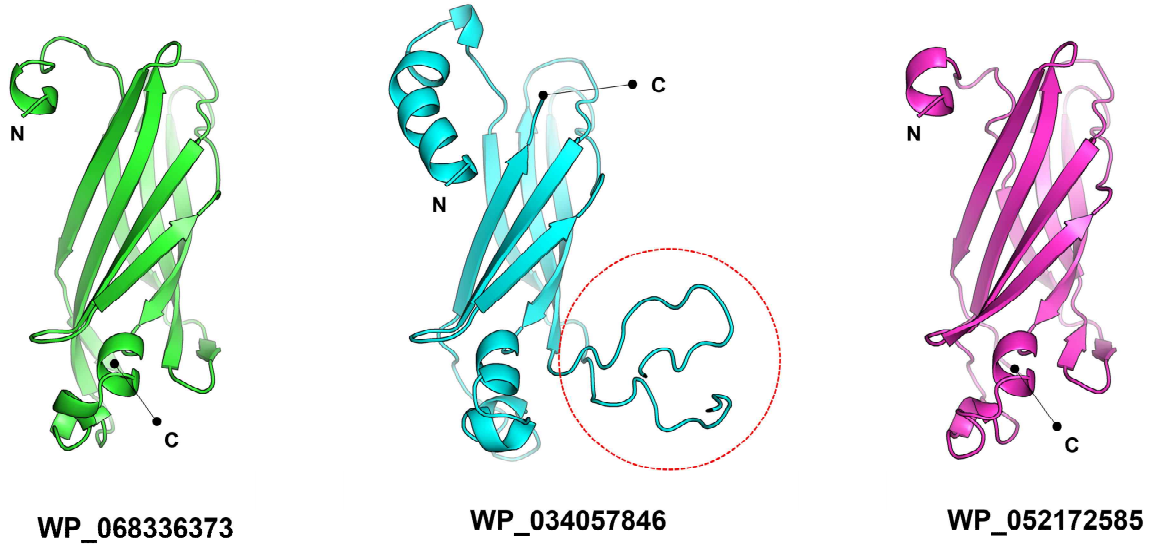


그림 49. 극지 유래 LEA 단백질의 모델링 구조. N-terminus와 C-terminus 부분을 표시하였고 단백질마다 다른 색으로 나타내었음. WP\_034057846 단백질의 구조화되지 않은 구조(unstructured form)는 빨간색 원으로 표시함.

**(5) 연구내용 2-5. 서열유사도 및 발현정보 기반 목표 유전자군 발굴**

- 남극 이끼의 테르페노이드 생합성 과정의 주요 유전자인 Terpene synthase 유전자군 발굴 및 환경조건 별 스트레스 반응
- 남극 낮깃털이끼의 유전체 DB (Su ver 3.2 Genome DB)에 Terpene synthase 유전자의 conserved domain Terpene synth\_C (PF03936) 및 Terpene synth(PF01397)을 query로 하여 blast 탐색을 한 결과, 남극 낮깃털이끼는 총 8종의 SuTPS (*Sanionia uncinata* Terpene synthase) 유전자가 존재하며, 이들의 coding sequence 및 genomic sequence 사이의 비교를 통해 유전자 구조를 확인함

표 11. 남극 낮깃털이끼에서 발견된 8종의 SuTPS의 유전자 정보

Gene Name	Genome scaffold	Group	CDS Length (bp)	Amino Acids (aa)	Isoelectric Point	Molecular Weight (kDa)	Conserved domain (accession number)
SuTPS1	SamA_0060	Plant type	2547	849	5.013	96.497	Terpene synth_C(PF03936) Terpene synth(PF01397)
SuTPS2	SamA_0060	Plant type	1527	509	4.663	57.955	Terpene synth_C(PF03936) Terpene synth(PF01397)
SuTPS3	SamA_0060	Plant type	4347	1449	5.057	165.434	Terpene synth_C(PF03936) Terpene synth(PF01397)
SuTPS4	SamA_0129	Plant type	942	314	9.778	34.554	SQS_PSY(PF00494)
SuTPS5	SamA_0060	Non-plant type	2271	757	6.212	86.392	SQHop cyclase_C(PF13243) SQHop cyclase_N(PF13240)
SuTPS6	SamA_0089	Non-plant type	675	225	5.359	24.808	None
SuTPS7	SamA_0089	Non-plant type	1308	436	4.696	48.55	None
SuTPS8	SamA_0005	Non-plant type	1035	345	6.009	38.781	None

Abbreviations: CDS, coding sequence; bp, base pair; kDa, kilo Dalton



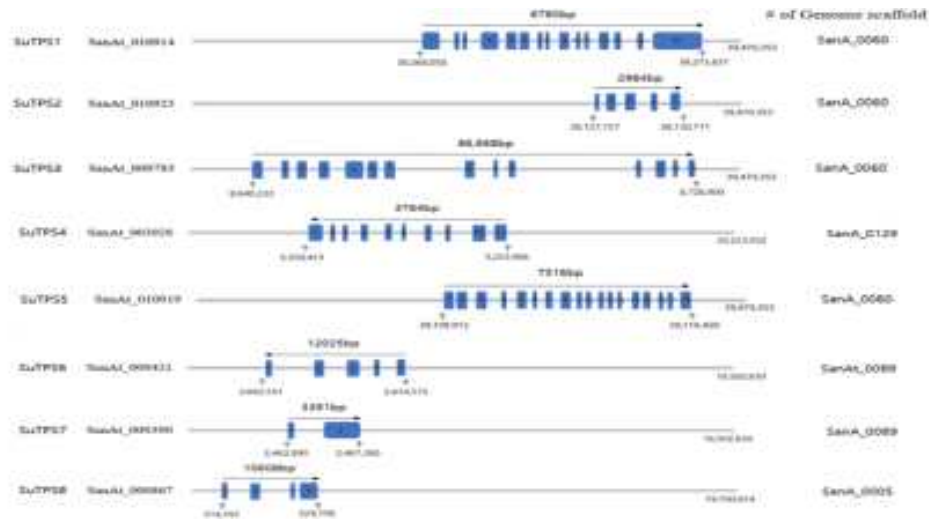


그림 50. 남극 낫깃털이끼에서 발견된 8종의 SuTPS 유전자의 exon-intron 구조

- 선대식물의 terpene synthase의 경우, plant-type terpene synthase 외에도 bacterial - type terpene synthase를 가지고 있음이 확인된 바 있음, 이러한 특징이 남극 낫깃털 이끼의 Terpene synthase 유전자군에서도 나타남.
- 계통 분석 결과 8개의 SuTPS 유전자는 4개의 plant-type SuTPS 및 4개의 non-plant type TPS 로 구분되었으며 다양한 종으로부터 확인된 TPS homolog 유전자들과 진화적 유연관계를 확인

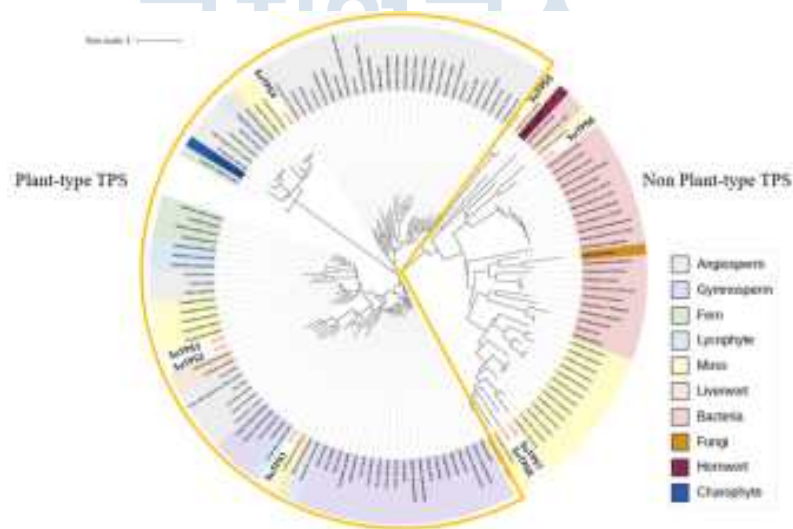


그림 51. 남극 낫깃털이끼의 terpene synthase 인 SuTPS 유전자군의 계통유연분석

- 남극 낫깃털이끼의 계절 발현전사체 결과를 활용하여 SuTPS의 계절별 발현 양상을 확인한 결과, TPS 발현은 계절별 변화양상이 뚜렷하며, 이는 외부 환경요소가 TPS 발현에 큰 영향을 끼친다는 것을 의미함

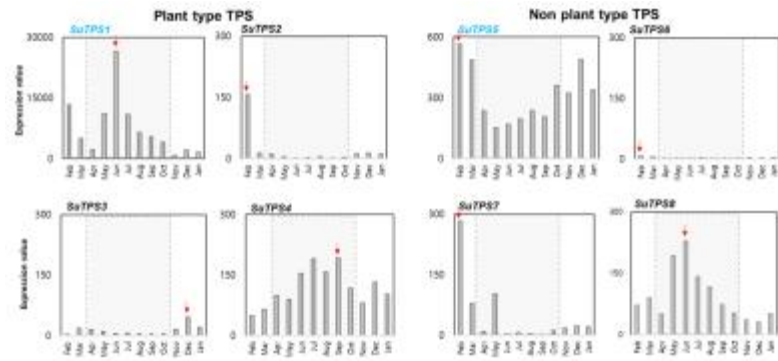


그림 52. SuTPS의 계절에 따른 발현변화

- 위탁연구팀의 GC-MS 분석을 통해 남극 낮깃털이끼의 테르페노이드 프로파일 분석을 통해 남극 이끼는 다양한 종류의 테르페노이드를 공기중으로 발산하며, 이들은 C15 구조의 세스퀴테르펜(sesquiterpene) 형태의 물질임을 확인
- 다양한 VOC들 중 생물학적 기능을 가지리라 여겨지는 VOC 후보군을 확인함 (cis-Thujopsene, alpha-Cedrene, alpha-Copaene)

#### (6) 연구내용 2-6. 극지 유용유전자의 구조 및 기능 규명

○ 남극곰새풀의 저온 적응과 관련된 DaADF3 기능 분석

- 저온 조건에서 발현이 현저히 증가하는 DaADF3의 생물학적 기능을 분석하기 위해 DaADF3을 과발현하는 벼 형질전환체를 제작하여 스트레스 조건에서 표현형을 분석하였음.
- 일반 벼의 90%가 죽어버리는 냉해 조건에서 DaADF3 과발현체는 60% 이상 생존하여 일반 벼 대비 6배 이상 냉해 저항성이 증가했고, 엽록소 함유량이나 이온 용출량도 일반 벼 대비 높은 수준의 저항성을 보여 DaADF3이 식물의 저온저항성을 증대시키는 핵심 유전자인 것을 규명하였음.

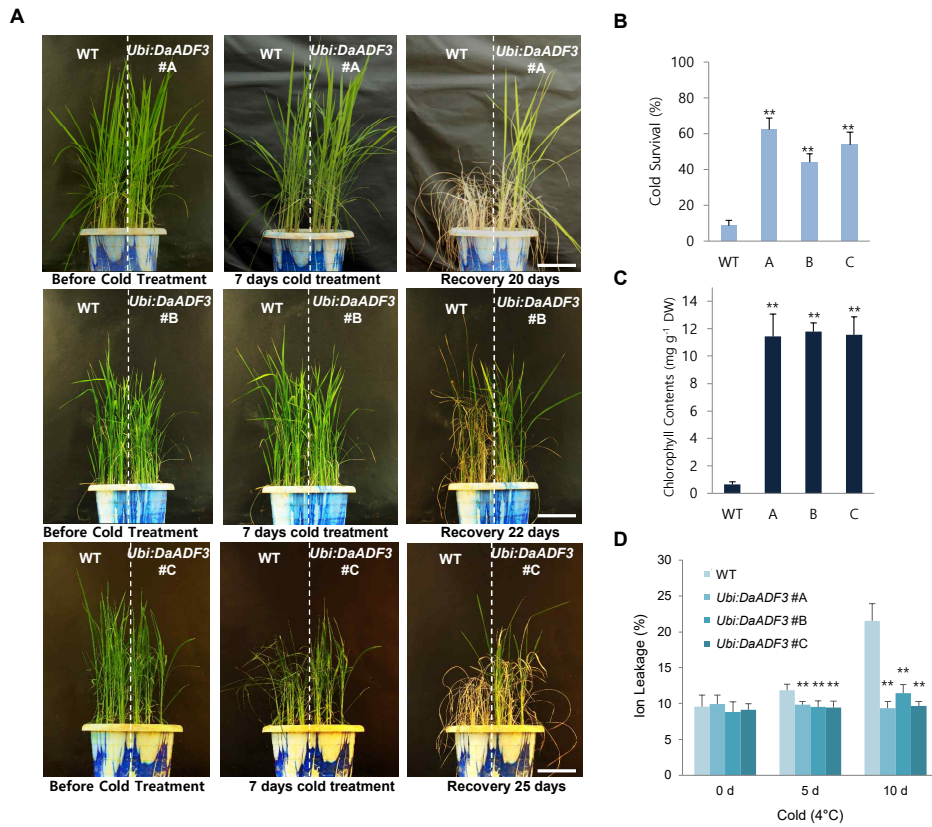


그림 53. DaADF3 과다발현 벼 형질전환체 표현형 분석. A, 저온 처리 과정에서 식물체의 형태적 변화. B, 저온처리 후 생존률, C, 엽록소 함량, D, 이온 용출량

- DaADF3 과발현체의 증대된 냉해 저항성의 원인을 규명하기 위해 일반 벼와 과발현체의 세포 내 액틴 구성 변화를 특이적 형광 항체를 이용하여 현미경으로 관찰한 결과, DaADF3 과발현체에서 액틴 필라멘트(F-actin)가 유리 액틴(G-actin)으로 전환된 비율이 더욱 높은 것을 확인하여, 스트레스 조건에서 세포 내 액틴의 신속한 구조적 변화가 식물의 냉해 저항성 증대의 원인임을 확인하였음.

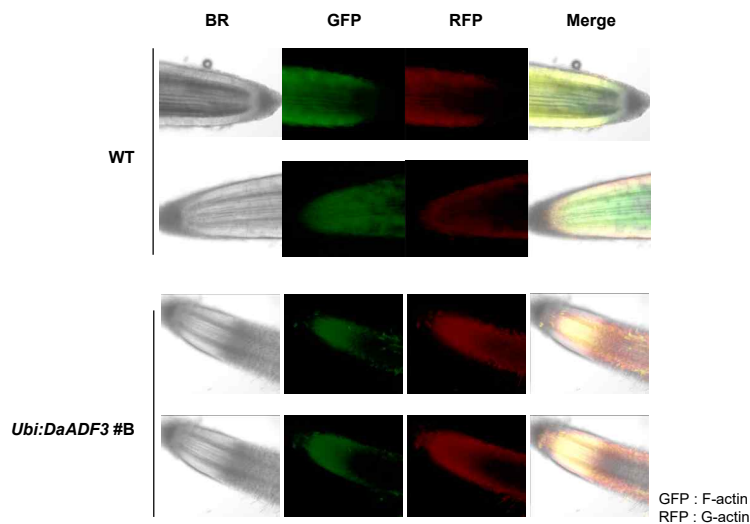


그림 54. DaADF3 과다발현 벼 형질전환체와 일반 벼의 뿌리 조직 내 액틴 단백질 구조적 변화 확인

○ 저온성 Esterase 효소 타겟 3종 선정(WP\_068632277.1 [*Variovorax* sp. PAMC 28711], WP\_062000720.1 [*Burkholderiaceae*], WP\_066282381.1 [*Fronidhabitans* sp. PAMC 28766])

- Esterase 2종 구조해석 완료(WP\_068632277.1, WP\_062000720.1), 논문 작성 중

○ 플라스틱 분해 활성이 확인된 2종의 단백질(IsPETase, 9ACTN esterase)과 아미노산 서열 유사성을 보이는 단백질 후보군을 극지 미생물 유전체에서 탐색

- 타겟 플라스틱 분해효소 : IsPETase, 9ACTN esterase

- 타겟 효소와 30~35%의 아미노산 서열 유사성을 보이는 극지 미생물 유래 후보 단백질 선정

- 후보 단백질의 발현 테스트 및 정제를 통해 고농도, 고순도의 단백질 샘플을 획득

- X-ray crystallography 를 활용하여 효소의 3차원 구조를 규명

○ 단백질 발현을 위해 합성된 아미노산 서열

>WP\_068632277.1 [*Variovorax* sp. PAMC 28711]

MTDSIKTL SAHRSFGGVQHFHEHASREIGLPMRFAAYLPPQAEHGKVPALLYLA  
GLTCNEETFMVKAGAQRLLAAELGIALIAPDTSPRG AHIDGESTSWDFGVGAGFYL  
DATAAPWAPNWRMESYLVDLLPLAKTLPIDGDRIGVFGHSMGGHGALTLAL  
RHPGLFKSLSAFAPICAPTQCPWGHKAFTGYLGADTTRWIEHDATVLMQHQPV  
PYPAGILIDQGLADKFLAEQLPHLLEDACRAIGQPLTLRRHEGYDHGYYFVQSF  
ADHLAHHAQILNGAIGRPAARQP

>WP\_062000720.1 [*Burkholderiaceae*]

MLELVEEHRCFSGVQRTYKHDSQTIGLPMRFSVFLPPQAAHGKVPALFYLAGLT  
CTEETF AIKAGAQRFASEHGIALIGPDTSPRGAGVPNEGAAWDFGVGAGFYVDA  
TQEPWARNYRMYSYVTQELRTTVLAELPVREDRLGIFGHSMGGHGALVLALRN  
PDIYKSVSAFAPIAAPSHCPWGEKAFSGYLGDDRETWKQYDASELVKSAKTKFD  
AGILIDQGLADNFLATQLHPEIFEAAAKAAGQAVTLRRHEGYDHGYYFISTFIGEH  
VAFHARTLCA

>WP\_066282381.1 [*Fronidhabitans* sp. PAMC 28766]

MTDDILSPVLQDLLDSVPESGPVSTGTARYAEGDSELEGYFAHPVGADGPRPGVL  
VLHDWFGMSDHVRVRAQMLARLG YVALAGDVY GADVEVTDGG EAQAQAGR  
YGD PALFRARVKANLEALRADPAVDSSRIAVMGYCFGGSGALELARTGEEAAGF  
VSFHG NLTSGAPAEADSIASPILVLTGADDPVVPPEAVVAFEDEMRAGGADDWQ  
IVSYSGALHAFVPGTNSPEHGAAFDATANRRSWRAMRDFDFDEVFA

○ 단백질 발현조건 탐색

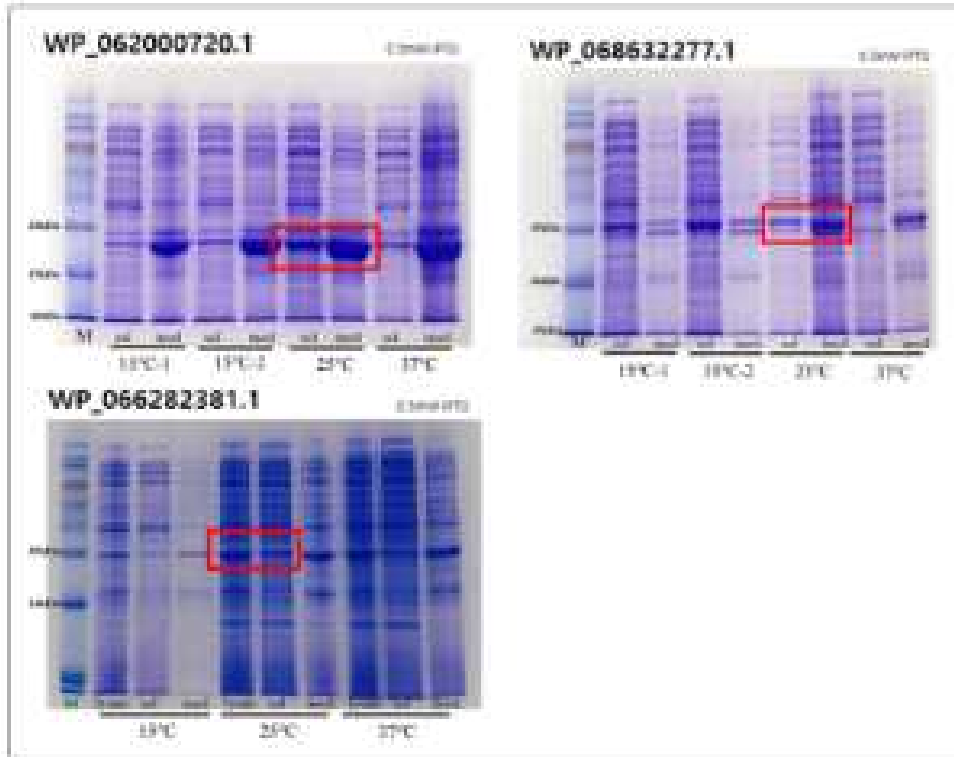


그림 55. WP\_068632277.1 [*Variovorax* sp. PAMC 28711], WP\_062000720.1 [Burkholderiaceae], WP\_066282381.1 [*Fronthabitan* sp. PAMC 28766] 단백질의 온도별 발현 테스트 결과

○ 단백질 정제 및 결정화

>WP\_068632277.1 [*Variovorax* sp. PAMC 28711]

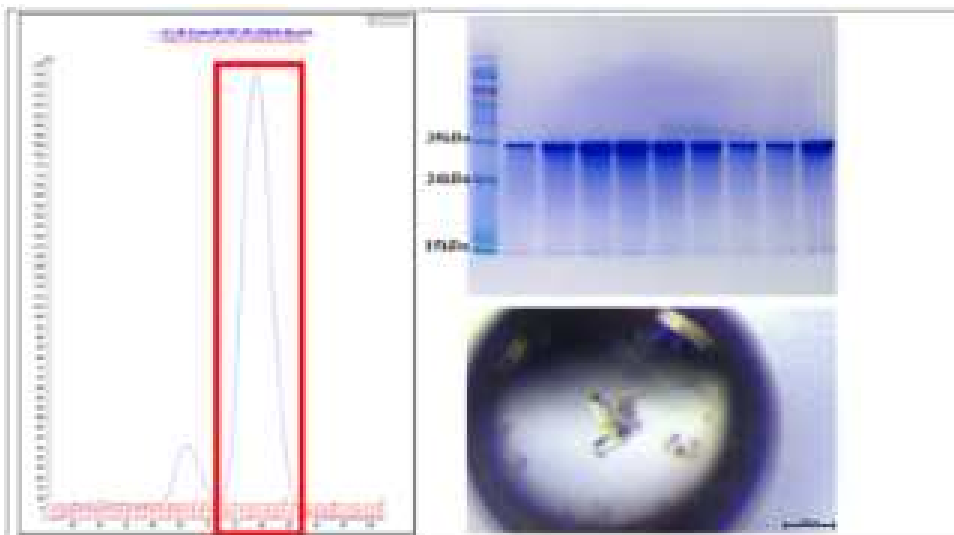


그림 56. WP\_068632277.1 [*Variovorax* sp. PAMC 28711] 단백질의 정제결과 및 결정화 조건확보

>WP\_062000720.1 [Burkholderiaceae]

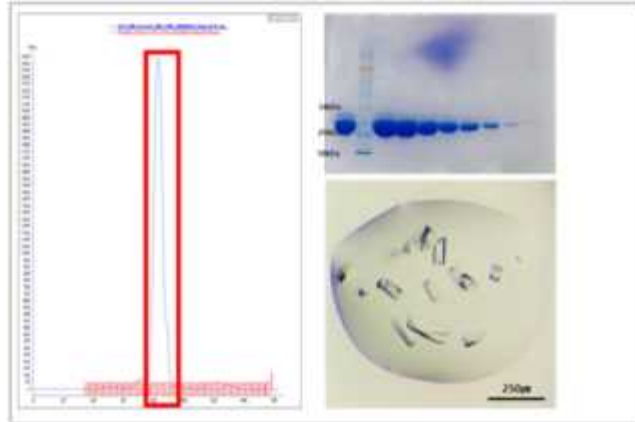


그림 57. WP\_062000720.1 [Burkholderiaceae] 단백질의 정제결과 및 결정화 조건확보

>WP\_066282381.1 [Fron dih abitans sp. PAMC 28766]

- 대량배양 시 단백질 과발현 유도 X --> 발현 조건 다시 잡아야함

○ 효소의 3차원 구조분석

>WP\_068632277.1

>WP\_062000720.1

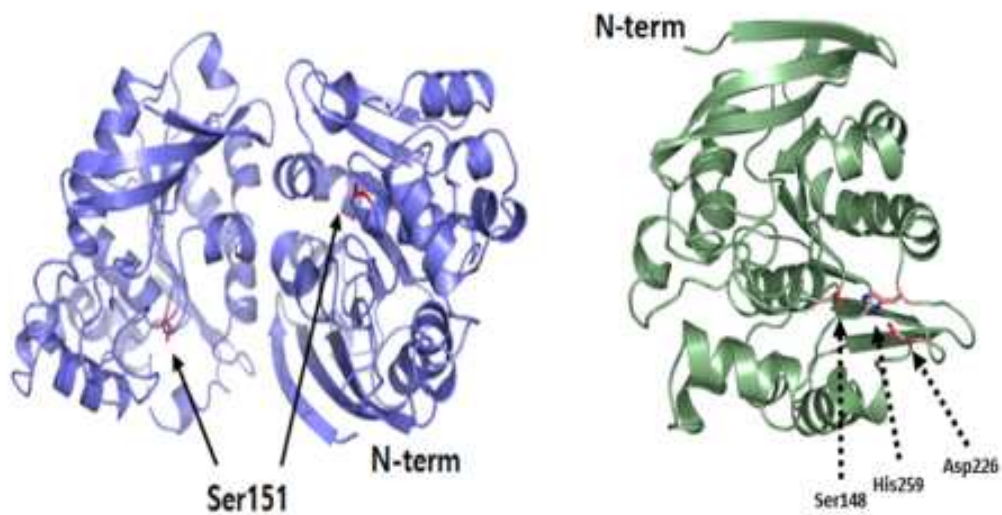


그림 58. WP\_068632277.1 [*Variovorax* sp. PAMC 28711], WP\_062000720.1 [Burkholderiaceae] 단백질의 삼차구조 모습

○ WP\_062000720.1 [Burkholderiaceae] 효소(S-formylglutathione hydrolase) 와 다른 유사 단백질과의 아미노산 서열 비교



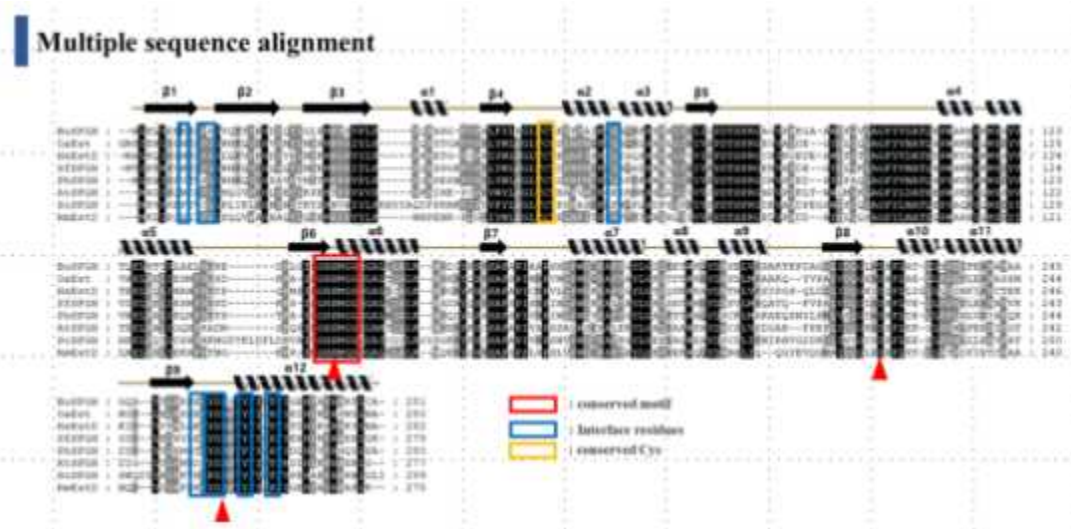


그림 59. WP\_062000720.1 [Burkholderiaceae] 단백질 서열과 기존에 알려진 유사 단백질 서열과의 비교를 통해 잘 보존된 활성잔기, conserved Cys 잔기 및 motif 확인

○ WP\_062000720.1 [Burkholderiaceae] 효소의 활성 실험결과

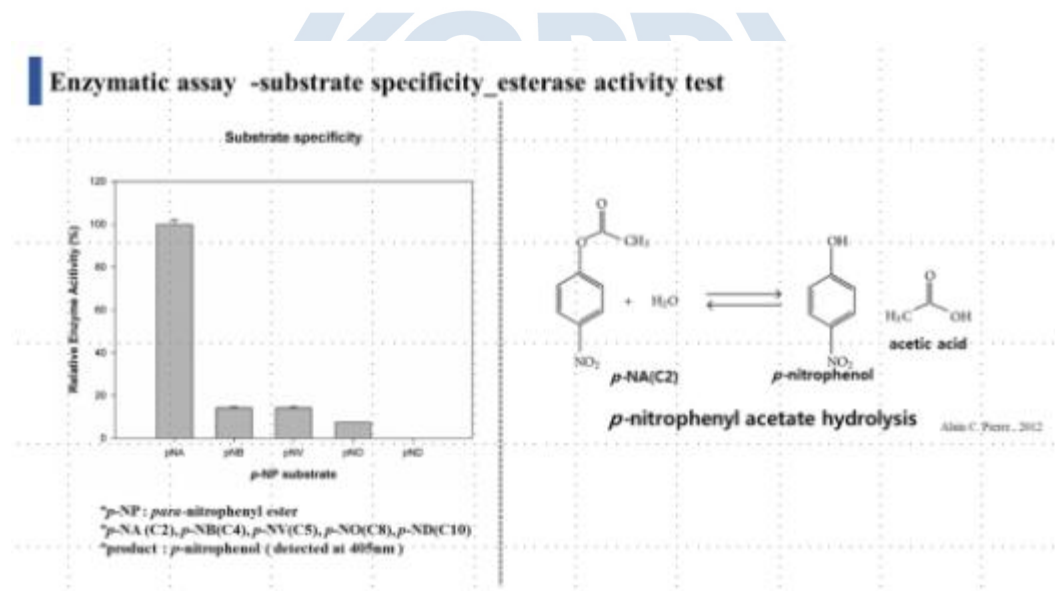


그림 60. WP\_062000720.1 [Burkholderiaceae] 효소는 짧은 길이의 para-nitrophenyl acetate에 강한 활성을 보임

○ WP\_062000720.1 [Burkholderiaceae] 효소의 온도별, pH별 활성 비교

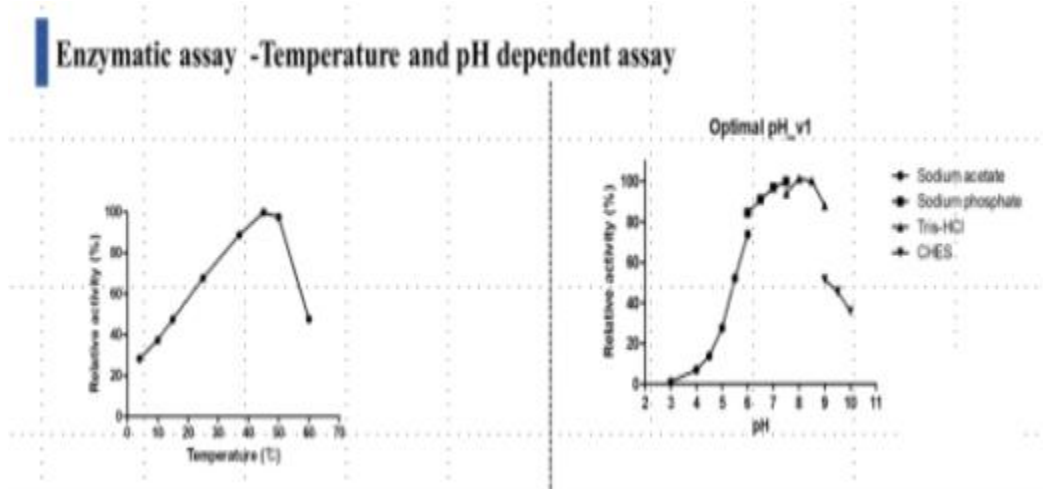


그림 61. WP\_062000720.1 [Burkholderiaceae] 효소는 45도와 pH 8 에서 가장 높은 효소활성을 가짐

- 분자동역학(Molecular dynamics) 연구를 통해 결빙방지단백질의 고활성 조건 밝힘
- 고활성 결빙방지단백질을 제작하기 위한 기초 연구자료를 확보, 논문 작성 중

(7) 연구내용 2-7. 효소 단백질 기능 기반의 유용 유전자 탐색

- 효소 기질 배지 및 합성 기질을 이용한 HTS(high-throughput screening, 고효율 스크리닝) 시스템 구축
- CAZyme 효소군: 다당류(cellulose, chitin, xylan 등) 가수분해 및 당전이 반응에 관여하는 효소의 탐색 및 특성 분석
- Lipase/Esterase 효소군: olive oil 혹은 tributyrin 등이 포함된 배지를 이용하여 효소 탐색. p-nitrophenyl palmitate(pNPP) 등의 합성기질을 활용하여 활성 탐색.

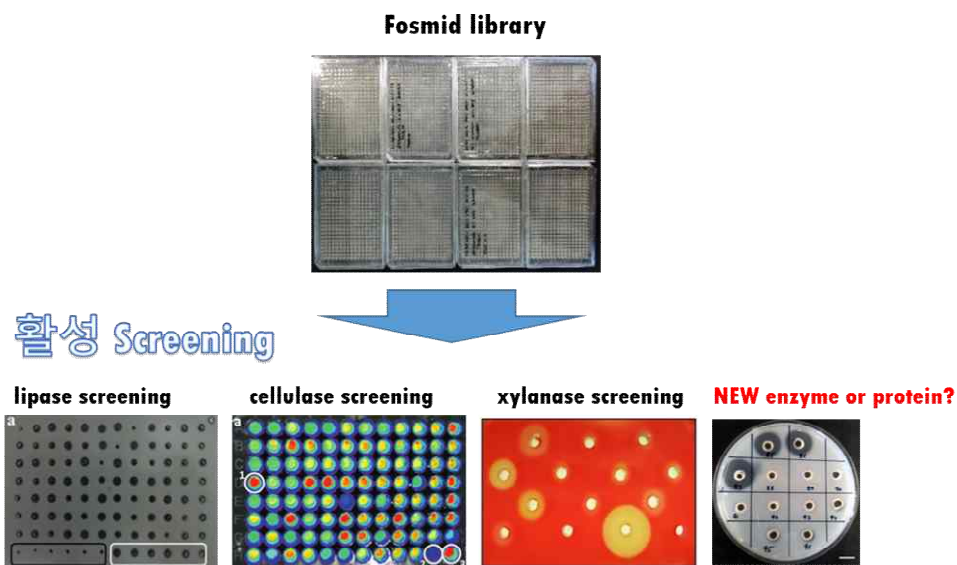


그림 62. 극지 메타지놈 라이브러리를 활용한 HTS(high-throughput screening, 고효율스크리닝) 시스템구축

○ 효소 활성 클론의 유전자 분석 및 타겟 단백질 확보

- 단백질 기능 기반 스크리닝을 통하여 활성 클론을 확보하고 해당 fosmid clone의 유전자 정보를 분석
- 트랜스포존(transposon)을 이용한 유전자 강제발현 및 선별 기술에 의한 활성 단백질의 탐색 및 발굴
- 대장균을 이용한 타겟 단백질의 고발현 생산 시스템 확립을 위한 배양 및 발현 조건 검토

○ 구축된 메타지놈 라이브러리를 활용하여 단백질 기능 기반의 탐색기술을 응용 유용 유전자 탐색

- 극지 메타지놈 라이브러리로부터 lipase 활성 유전자 확보
- 효소의 기능성 활성을 기반으로 분해활성 효소 유전자를 탐색
- glyceryl trioctanoate (tricaprylin, TCN)이 함유된 LB 배지를 스크리닝 배지로 사용하여 활성 halo를 가지는 클론을 확보함

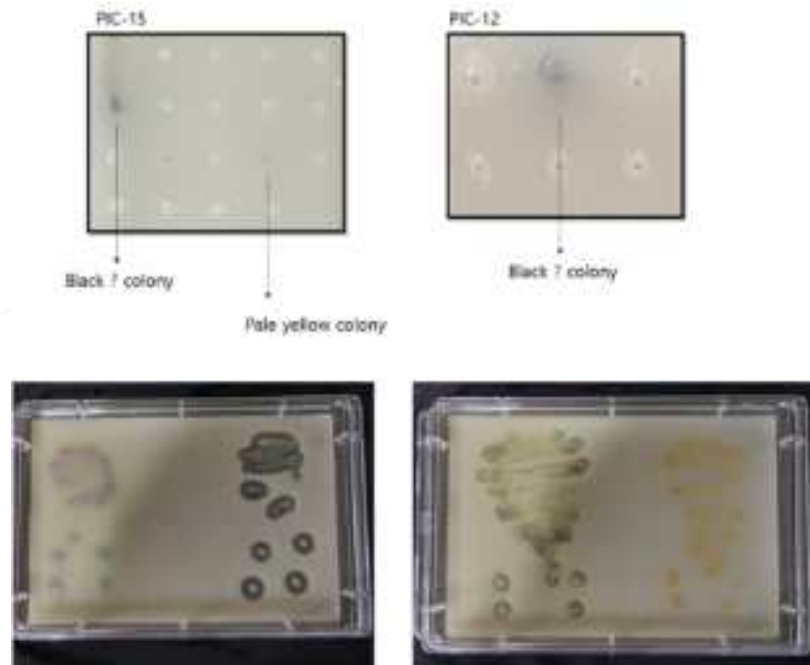


그림 63. 극지 미생물 유래 유전체를 이용한 fosmid 라이브러리에 의해 탐색된 lipase 활성 클론

○ 극지 메타지놈 fosmid 라이브러리 유래의 기능성 효소 단백질 유전자 발굴

- 효소의 기질을 포함한 배지를 이용하여 활성 스크리닝 기법을 통하여 지질분해 효소 (Lipase) 및 색소 (yellow, blue, red pigment) 를 생산하는 클론 16종을 발굴하였음.
- 특히 미생물 유전체에서 발견되어진 색소는 다양한 생리활성 후보 물질(면역, 항균 등의 의약 분야에 활용)로 알려져 있어서 향후 지속적인 연구개발이 필요할 것으로 사료됨.

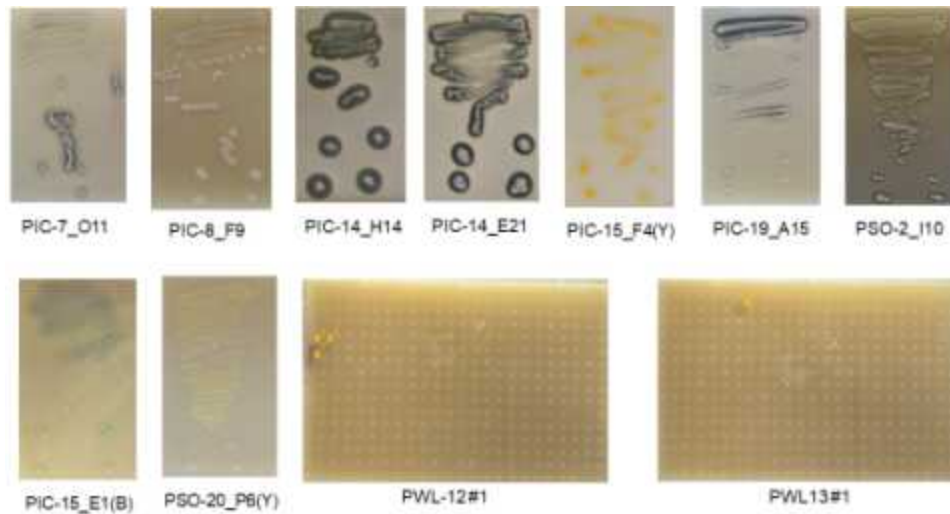


그림 64. 극지 메타지놈 fosmid 라이브러리 기반의 활성 스크리닝으로 확보된 클론의 기능성

- 1단계(1, 2, 3차년도)에서 구축된 극지 메타지놈 fosmid 라이브러리에서 기능성 효소 단백질 유전자 총 22종을 발굴하였음. 3차년도에서 발굴된 기능성 효소 및 물질 생산 클론 16종의 유전자 정보를 KPDC에 등록 완료하였음.

○ 극지 메타지놈 라이브러리에서 기능성 기반 탐색기술을 활용한 CALA homologue 유전자 확보

- 미생물이 생산하는 지질분해 효소(Lipase)는 다양한 기질특이성과 입체이성질체에 대한 선택성을 이용한 가수분해, 에스테르화 및 트랜스에스테르화 반응으로 의약적으로 중요한 키랄물질을 생산하는 연구 뿐만 아니라, 식품첨가물, 산업용 시약, 의약품 진단 시약 등의 다양한 분야에서 이용되고 있음.
- 극지미생물 유래의 유전체를 활용하여 제작된 fosmid 라이브러리를 이용하여 Tricaprylin (TCN)-LB agar plate에서 지질분해활성을 탐색함.
- 효소 활성에 의한 지질분해 halo를 가지는 fosmid 클론을 다수 확보하여 insert DNA의 end sequencing결과를 토대로 PAMC 유전체 정보에서 유전자 matching결과를 확보함
- PAMC 유전체 DB 분석을 통해서 확보된 유전자 중에서 putative lipase gene을 분석한 결과 Candida antarctica lipase A (CALA) homologue임을 확인함.
- 대장균 발현 시스템을 이용하여 효소 활성을 가지는 재조합 단백질 생산이 가능하였으나, 대부분의 재조합 단백질이 불활성 형태의 inclusion body로 발현되는 것을 확인함.
- 불활성 형태의 insoluble protein을 통상적으로 많이 사용하는 denaturation buffer와 refolding buffer를 이용한 정제 시스템을 활용하여 실험실 수준의 연구가 가능한 정도의 단백질 양이 확보됨.



Contig/Clone	Class (LED)	Family	Secretion	Name	Putative Origin in GenBank
37	PIC14-H14	Class Y abH38 - Candida antarctica lipase A like	Fungal- Bact_LIP X.2	Signal peptide	PLI-CALA1 Arthrobacter dokdonellae, complete genome
8072	PSO2-110			PLI-CALA2	Pseudarthrobacter sulfonivorans strain Ar51 chromosome

Annotation of the insert sequence

PIC14-H14 (contig\_37)  
CALA1

- MyoD-like 3-conspicua antiser
- hypothetical protein
- Transcription elongation factor-IVa
- hypothetical protein
- L-lysine aminotransferase
- Putative transport protein
- putative protein Y165
- putative NTH type transcriptional regulator Y167
- Galectin-1 (chondroitin-6-sulfate) transferase
- Galectinase
- putative inactive kinase**
- putative membrane protein
- hypothetical protein
- SDS-Lactase
- hypothetical protein
- Dimethylglyoxal synthase related protein
- Sulfatase 21
- Exopolysphatase 2
- hypothetical protein
- hypothetical protein
- Endase
- hypothetical protein
- hypothetical protein
- Transcriptional regulator Y161
- Nucleoside triphosphate pyrophosphatase related protein
- Phenase 14.21
- Adenosine diaminase
- putative membrane protein
- Thymidine phosphorylase
- Cytidine deaminase
- hypothetical protein
- Fructose import permease protein FrcI

PSO2-110 (contig\_8072)  
CALA2

- lys-methyl-2-dehydrogenase
- NTH-type transcriptional repressor CytR
- isolate isomerase
- kinetic 2-dehydrogenase
- D-galactonate dehydrogenase family member PgaA
- Beta-51-acetylglucosaminidase-beta-glucosidase
- S-methyltransferase 4 chromocyanase
- Ornithine phosphorylase/ornithinase
- hypothetical protein
- Dihydroxyacetone phosphate kinase
- RNA (guanosine) (5'-2'-O)-methyltransferase
- putative inactive kinase**
- Fructose bisphosphate aldolase
- hypothetical protein
- hypothetical protein
- Zinc carboxypeptidase
- Adenosine succinate synthetase
- hypothetical protein
- hypothetical protein
- hypothetical protein
- Fructose bisphosphate aldolase
- hypothetical protein
- hypothetical protein
- Zinc carboxypeptidase

그림 65. 지질분해효소 활성을 가지는 fosmid clone의 유전자 분석 결과

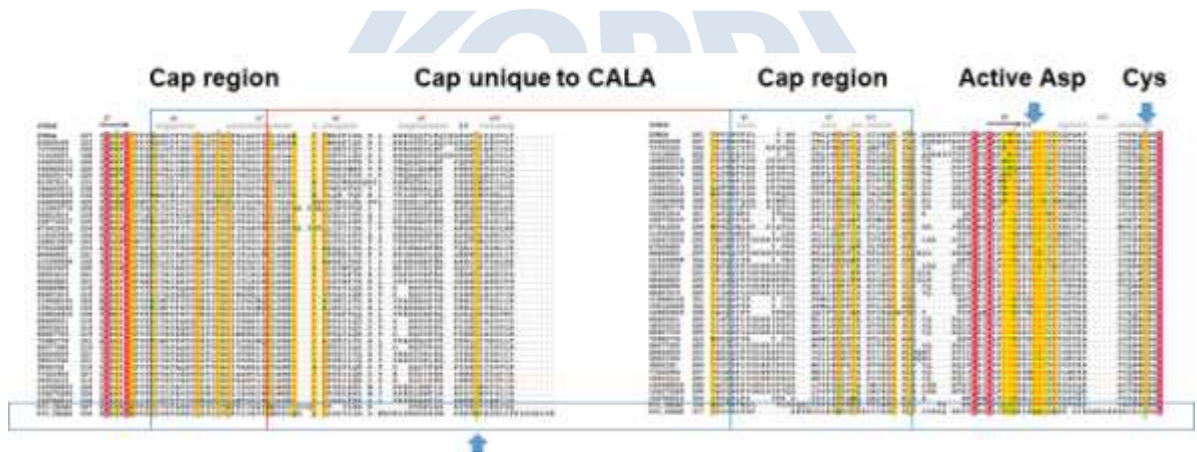


그림 66. Lipase CALA homologue 유전자의 multiple sequence alignment (MSA)

- 극지 미생물 유래 SSB (single strand DNA binding protein)의 단백질 구조 분석
- SSB 단백질은 모든 생명체에서 복제, 수복 및 재조합 등을 포함한 DNA 대사과정에 필수적인 단백질이며, 단백질의 물리화학적 특성을 이용하여 분자생물학 연구에서 다양하게 활용되고 있음.
- 남극에서 분리된 세균 *Lacinutrix jangbogonensis* PAMC 27137의 유전체에서 저온성 SSB 단백질을 대장균에서의 대량 발현에 성공하였으며, 재조합 단백질의 활성 검정을 통하여 산업적 활용 가능성을 확인함에 따라 단백질의 구조분석을 통하여 분자 수준에서의 활성 기작 연구를 수행하였음.

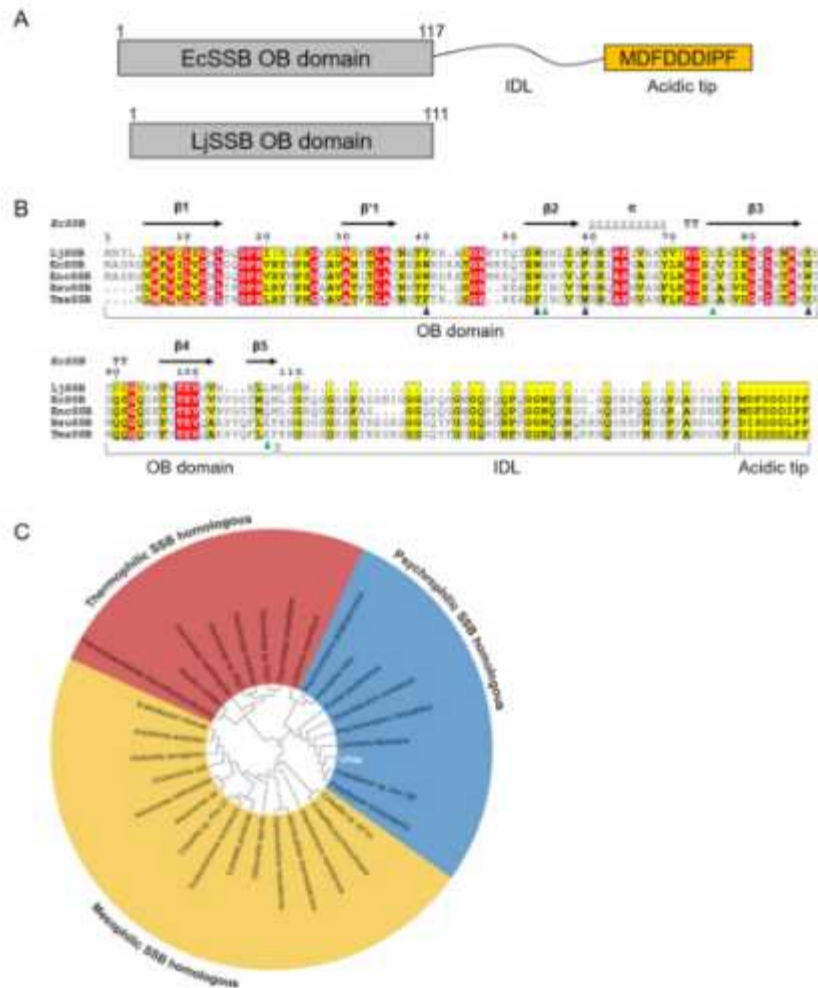


그림 67. 저온성, 중온성, 고온성 미생물 유래의 SSB 단백질과 LacSSB 단백질의 sequence 분석 결과

- 중온성 (E. coli SSB)와 고온성 (P.faci-parum SSB) 유사 단백질의 구조를 기반으로 저온성 SSB의 단백질 구조 특성과 DNA 결합 패턴 등의 물리화학적 특성을 분석하였으며, 향후 돌연변이 단백질을 이용한 기능성 개선 연구가 필요함.



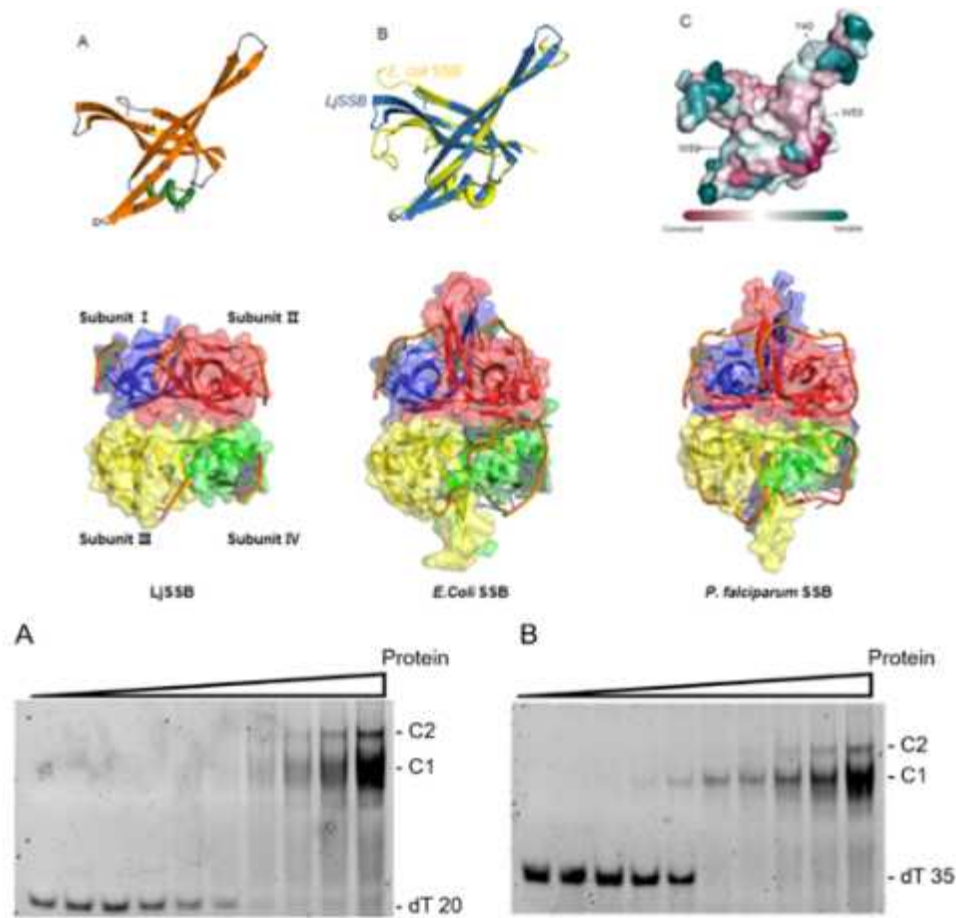


그림 68. LacSSB 단백질의 3차 구조분석 및 활성 검증

(8) 연구내용 2-8. 유용 유전자에 의한 발현단백체 분석을 통한 활성증진 연관요인 분석

○ 극지 생물특성의 단백질적 분석 전략

- 단백질 연구는 발현 유전체라 불릴 만큼 유전체의 기능연구의 일환임
- 유전체 정보에 의해 발현되는 단백질 군의 복합적 작용에 따라 생명현상이 조절되며 단백질의 발현과 발현후 수식에 의한 기능조절을 다면적으로 분석할 수 있음
- 극지생물체의 특이적 환경적응기작 규명을 위한 단백질 연구를 진행하기 위해서는 선행적으로 유전정보가 대부분 알려지지 않은 극지종에 대한 유전체 정보해석이 필요하며 이를 아미노산 형식의 단백질 서열로 변환하는 과정이 필요함. 이는 본 연구팀의 생물정보학 기법의 변환 알고리즘을 응용한 활용이 가능
- 단백질의 개별 단백질 전개를 위해 일차적으로 이차원 전기영동 기법을 활용하고 특정 단백질의 확인 또는 발현후 수식의 확인에는 특정항체를 사용한 western blot 기법과 면역침전법을 사용
- 이차원 전기영동법으로 단백체를 분석하는 경우 이차원 전기영동 이미지 분석은 Bio-Rad사의 PDQuest v8.1을 사용함
- Trypsin을 이용하여 peptide 수준으로 분해시킨 개별 단백질을 질량분석기 기반 단백질 분석기법을 사용하여 peptide mass fingerprinting map 및 이중 질량분석 장치를 사용하여 개별 아미노산 서열 확인에 의한 서열정보 구축 후 다양한 Proteome

database(Mascot, ProFound, MassSearch, MOWDE, Prospector, Peptide)와의 matching을 통해 단백질 동정과 기능 구조 예측

- 단백질 연구에 필수적으로 사용되는 고해상도 질량분석 장비는 매우 고가이며 유지보수에 상당한 비용과 인력이 필요함. 본 연구팀은 해당장비를 기보유중인 타기관의 시설(MALDI-TOF/TOF, Q-TOF, LC-MS/MS, Ion-trap MS 등)을 활용하여 비용과 인력의 효율성을 도모하고자 함

#### (9) 연구내용 2-9. 기능 단백질 군의 세포내 시너지 효능 검증

- 염도 변화에 따른 남극 요각류(*T. kingsejongensis*)의 발현 유전체 변화 분석
- 삼투조절 유전자( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase alpha and beta subunit), 스트레스 반응 유전자(heat shock protein), 항산화 유전자(catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase) 등의 발현 증가 확인

#### (10) 연구내용 2-10. 서열 유사도 및 발현정보 기반 목표 유전자군 발굴

- 저온성 지질 가수분해 효소 10종 타겟 선정
- 3종 단백질 정제 완료, 1종 단백질 결정 확보
- *Stenotrophomonas sp.* 유래 지질가수분해효소의 단백질 결정화, 구조해석 예정

#### (11) 연구내용 2-11. 남극 생물의 극한 환경 적응 유전자의 기능 분석

- Superoxide dismutase(SOD)는 박테리아부터 인간까지 대부분의 생체 내 존재하는 강력한 항산화효소로 생체내에서 발생된 활성산소의 제거 및 분해 기능을 하는 것으로 알려져있고, 항산화 작용에 필요한 조효소 및 작용 위치에 따라 SOD1(Cu-Zn SOD, 세포질), SOD2(Mn-SOD, 미토콘드리아), SOD3(Cu-Zn SOD, 세포외부) 3가지 type으로 분류됨
- 세포외에서 발견되는 것 이외에 sod1, sod2와 비교하여 기능 및 세포내 역할이 많이 알려져 있지 않았으나 암세포에서의 발현 저하, 저산소환경에서의 조혈호르몬(Erythropoietin)과의 관계 등이 알려지며 다양한 혈액관련 질병 및 암 치료 연구분야에서 주목받는 유전자로 부상하고 있음
- 선례 연구 결과에서는 남극 빙어 특이적 확장 유전자로 여겨졌으나 5종의 남극어류의 유전체 정보와 14종의 비남극 어류, 그리고 인간의 유전체 정보를 이용하여 수행된 비교유전체학적 분석 결과, sod3유전자가 남극 어류 유전체 내에서만 연속적으로 복제되어 확장되어 있는 것(tandem replication)을 확인하였고, 확장된 개수는 2개에서 최대 4개로 남극 어류 내에서도 종 별로 상이하였음 (그림 69)

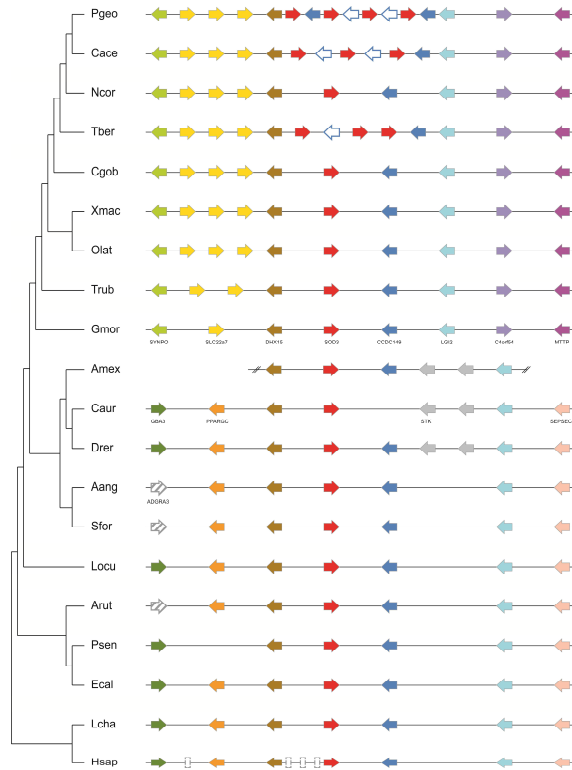


그림 69. sod3 유전자의 gene synteny 비교 결과

- 남극 어류 특이적으로 확장된 sod3 유전자 서열을 기반으로 한 분자계통분석 결과, 확장된 sod3 유전자는 남극 어류 특이적으로 진화하였음을 알 수 있었고 SOD3 단백질 서열 유사도를 비남극 어류와 비교한 결과, 표 12에서와 같이 남극 어류 내(파란색 음영부분) 높은 유사도를 보이는 것을 확인하였음

표 12. 남극 어류와 비남극 어류의 SOD3 단백질 서열 유사도

	Pgeo	Cace	Tber	Gacu	Ncor	Cgob	Olat	Pfor	Xmac	Trub
Pgeo										
Cace	98.40									
Tber	96.65	96.69								
Gacu	96.15	97.81	96.77							
Ncor	93.39	93.43	93.60	92.52						
Cgob	66.87	65.65	64.31	66.21	64.54					
Olat	58.72	58.24	57.01	57.62	55.76	55.28				
Pfor	62.83	62.49	64.08	63.52	61.10	56.34	67.68			
Xmac	61.62	61.10	62.72	62.14	59.69	58.51	64.33	93.76		
Trub	52.12	51.15	49.02	50.35	49.56	56.03	50.84	51.27	48.12	

- 남극 어류 특이적으로 확장된 SOD3 단백질 서열을 분석 한 결과(그림 70), 남극 어류 특이적인 deletion과 mutation이 발견되었고 이 결과를 통해 유전자 개수의 확장 뿐 아니라 구조적·기능적인 변화를 가질 것으로 예상되며 단백질 구조 분석 및 남극 어류 SOD3 단백질의 항산화효율 측정 등을 통하여 남극 어류의 남극 환경 적응 진화 뿐

아니라 아직 기능이 밝혀지지 않은 SOD3 단백질의 기능 규명 연구에도 활용 될 수 있을 것으로 예상됨

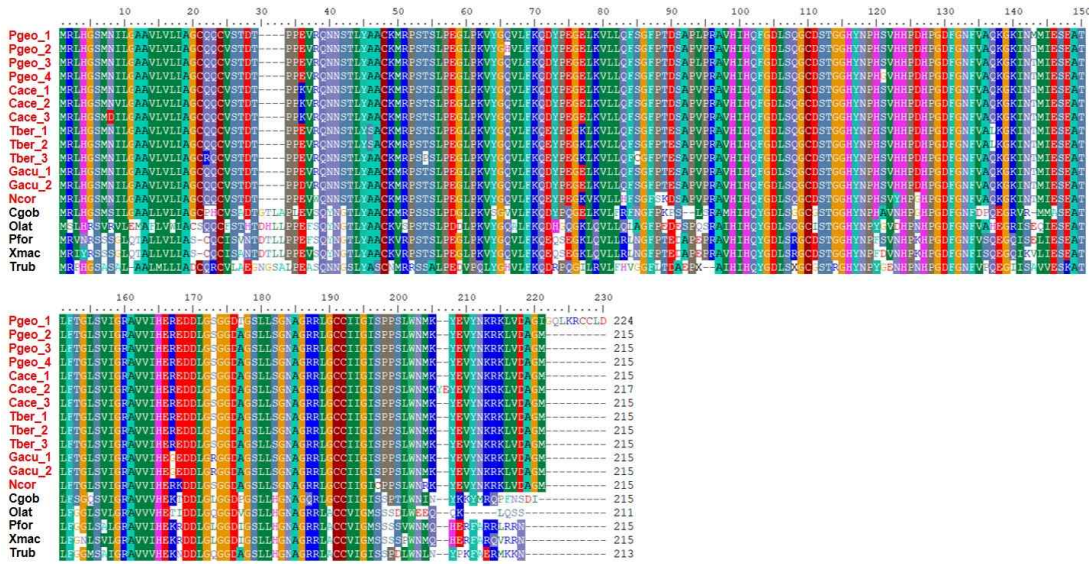


그림 70. 남극 어류와 비남극 어류의 SOD3 단백질 서열 비교 결과

(12) 연구내용 2-12. 유용 유전자군의 세포 내 기능분석

- 남극 산술이끼 유전자 PaPC의 우수기능 활성화 부위 도입 후 기능 검정
- 1차년에 구축한 담배잎을 활용한 검정시스템으로 애기장대 AtPC 유전자의 일부 아미노산을 교정한 단백질 제작
- 교정된 AtPC 유전자를 과발현하는 애기장대 형질전환체 제작과 표현형 분석

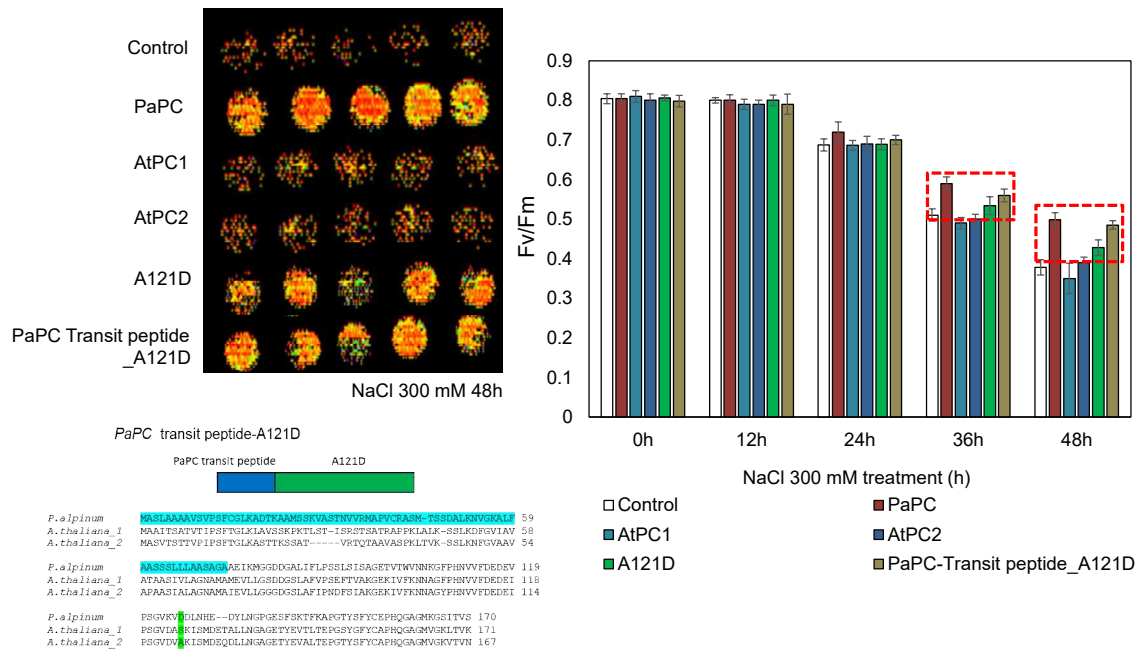


그림 71. 아미노산 서열을 교정한 애기장대 PC 유전자의 광합성능 향상 분석



- 교정된 AtPC 유전자를 도입 후 염스트레스 조건에서 광합성을 분석한 결과, 야생형 유전자에 비해 121번 아미노산 1개를 산술이끼 유전자 sequence로 치환한 경우 13%, 121번 아미노산과 transit peptide를 함께 치환한 경우 28%의 광합성능 향상을 보였음

○ 남극낫깃털이끼 *Sanionia uncinata* 에서 남극의 계절에 따른 환경적응 유전자들의 발현 분석 및 세포소기관 구조 변화 비교

- 남극의 기후조건을 모방하여 이끼의 성장 및 휴면 상태를 재구성하는 실험을 진행
- 기후조건을 모사하여 하절기 (12월말-1월초 기준, 주간: 10°C, 20시간, 야간: 4°C, 4시간) vs. 동절기 (7월 기준 주간: 0°C, 4시간, 야간: -4°C, 20시간)의 조건으로 생육하였을 때 줄기의 길이생장을 비교한 결과, 동절기 조건은 하절기에 비해 줄기의 신장 및 가지수가 현저히 줄어드는 것을 관찰
- 정단분열조직의 세포 모양을 비교한 결과, 겨울 샘플에서는 다량의 지질체와 작고 수많은 액포, 비후된 세포벽의 특성을 보여주었으며, 여름샘플에서는 틸라코이드와 그라나구조가 잘 구성되어있는 반면, 겨울샘플의 엽록체에는 전분과립이 축적되는 형태가 관찰됨

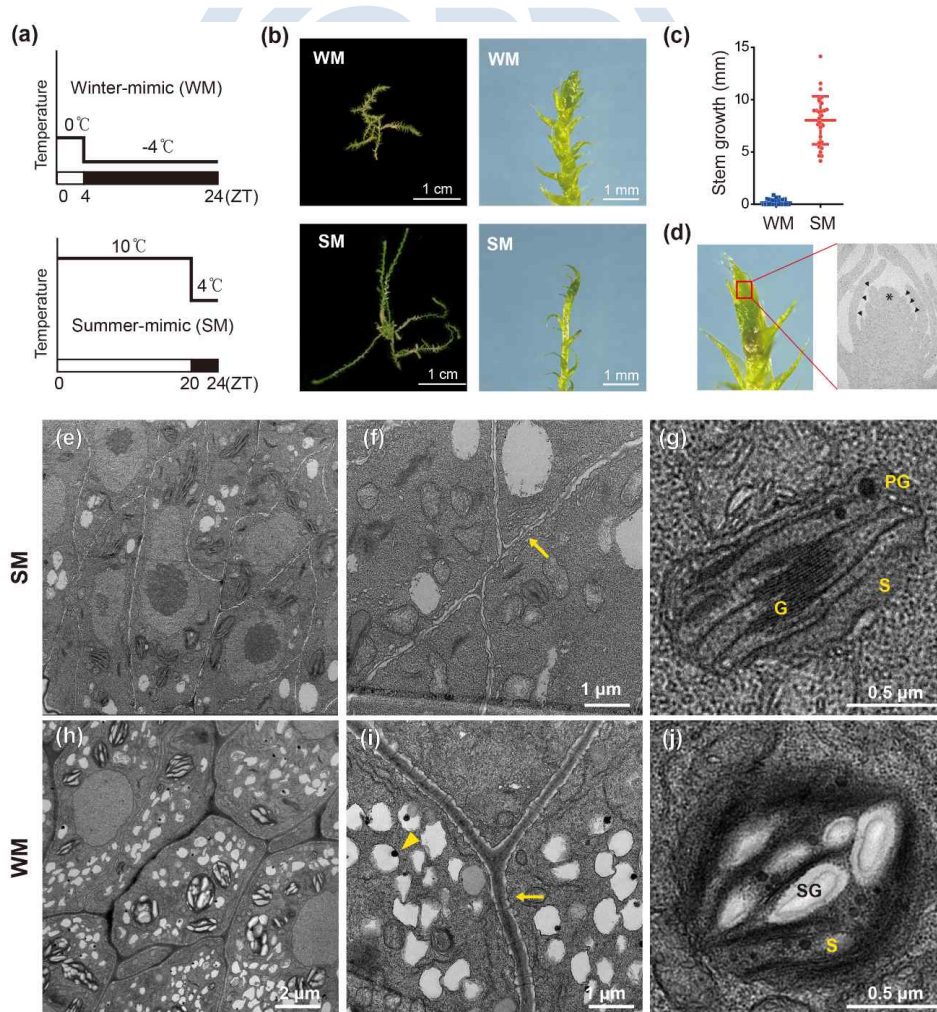


그림 72. 기후-모방 조건에서 여름 및 겨울 환경모사 조건에서 남극 낫깃털이끼의 *S.uncinata*의 성장 및 세포소기관 변화 양상

- 한편 남극 현지에서 매월 채집된 이끼의 RNA 라이브러리 기반 계절별로 발현되는 유전자군들의 기능을 분석한 결과, 여름에는 세포성장 및 발달, UV 반응 유전자들이 발현되는 반면, 겨울에는 에너지대사 및 호흡과 관련된 유전자들의 발현이 두드러졌다. 또한 겨울에서 여름으로 넘어가는 전환기에는 단백질 합성 및 분자샤페론, 세포주기와 관련된 유전자들의 발현이 뚜렷하게 나타남
- 세포구조의 변화와 계절에 따른 유전자의 동적변화를 통해 남극낮깃털이끼의 환경적응유전자군을 유추할 수 있으며, 특히 겨울에 발현되는 주요유전자 군들은 추후 스트레스내성 기술 개발에 활용 가능

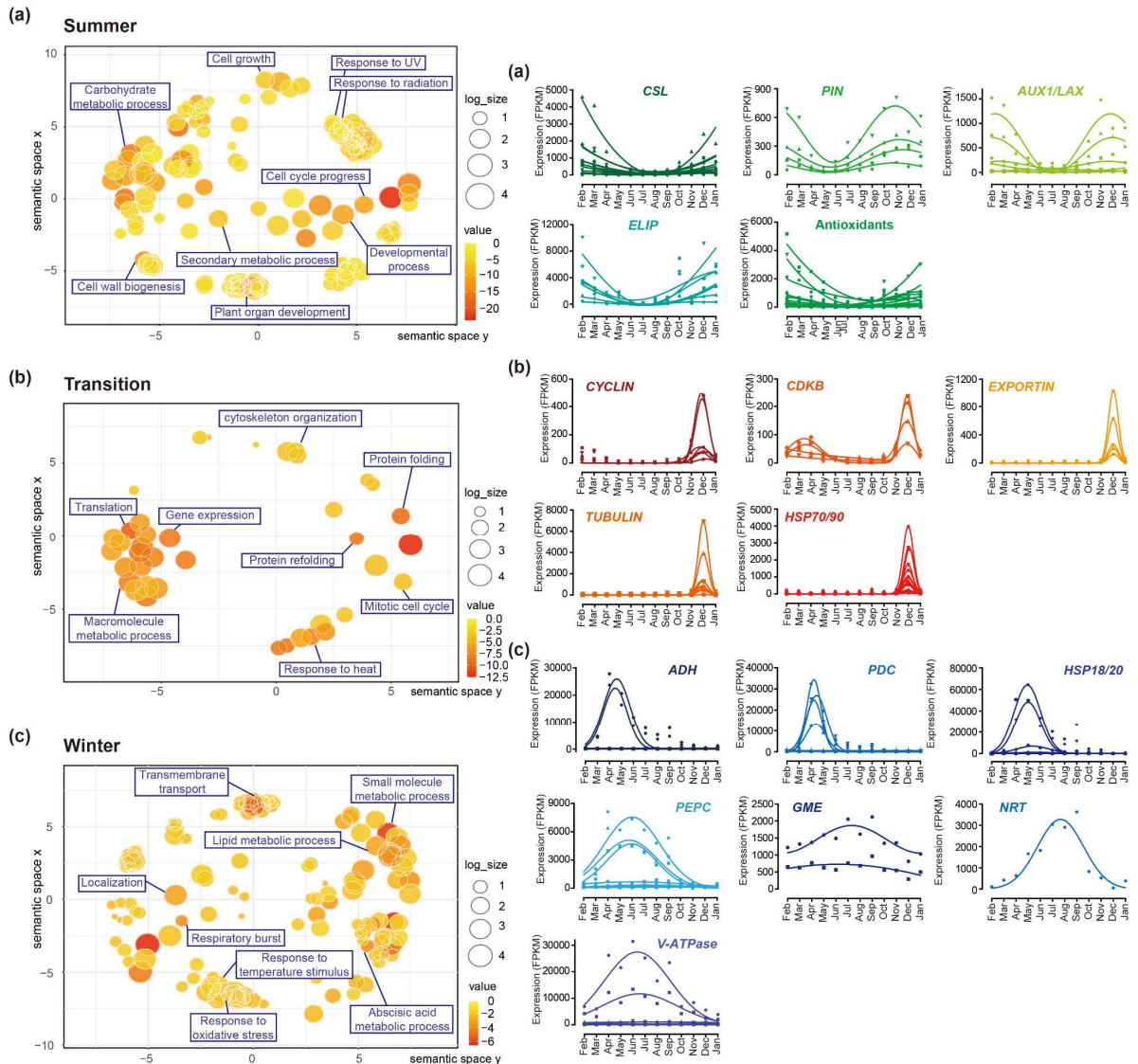


그림 73. 남극낮깃털이끼의 계절에 따른 동적반응을 보이는 기능유전자군과 개별유전자의 발현양상



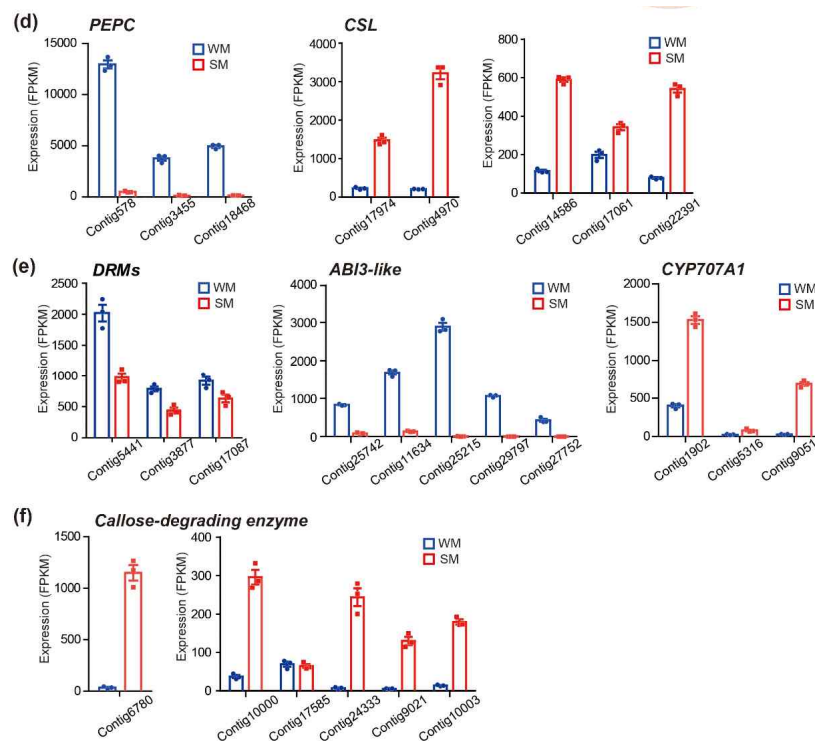


그림 74. 남극낙기털이끼의 주요기능유전자들의 환경모사조건에서의 발현 양상에 대한 q-PCR 분석

#### 다. 극지유전체 상용화 기반 구축

##### (1) 연구내용 3-1. 극지식물의 미세먼지 저감기능 관련 유전자원 탐색

- 이끼는 해부학, 생리학적 특징으로 인해 대기오염물질 축적률이 높아 대기질의 생체 모니터링을 위한 가장 효과적인 생물소재로 알려짐
- 특히 관속식물과 비교하여 (1) 성장 계절에 따른 낮은 형태 변동성, (2) 물질의 흡수를 막는 큐티클층이 낮음, (3) 높은 표면적 비율, (4) 세포벽의 높은 양이온 교환을 등은 미량원소검출의 생체모니터로서 매우 큰 장점을 가지고 있음
- 최근 유럽에서 친환경소재를 활용한 대기오염모니터링 방법이 고안되었으며 (그림 75), 특히 물질흡수성이 높은 이끼는 좋은 대체제로 각광을 받고 있음
- 본연구에서는 극지식물의 미세먼지 저감기능 관련 유전자원 탐색을 위한 기초자료 확보를 위해, 당해연도에는 국내 자생이끼 및 극지이끼 배양체를 활용한 Moss-bag을 제작하여 대기오염물질을 분석하고 미세먼지저감과 관련한 극지식물의 엽상 구조를 특성화하고자 하며 추후 연구를 통해 관련 유전자원을 발굴하고자 함



그림 75. moss-bag을 사용한 유럽도시 대기질 바이오 모니터링 연구 사례(Ares et al. 2012)

- 당해연도에는 이끼 4종(국내 자생종 2종: 깃털이끼, 양지이끼, 극지유래이끼 2종)을 바이오리액터를 사용하여 대량배양하여 충분한 양의 배양체를 만들고, 동일질량의 이끼배양체를 구형의 PVC-mesh 백에 넣어, 높이를 달리하여(예: 2m, 6m, 15m) 실외 설치한 후 8주간 샘플링, IC, LC 등을 사용하여 시계열에 따른 오염물질 축적량 추적 예정

## (2) 연구내용 3-2. 극지 해양어류 유전자원 활용 기술개발

- 남극 어류의 부위별 추출물의 GC-MS 분석을 통한 지방산 함량 측정
  - 남극 어류 2 종(*Notothenia rossii*, *Champscephalus gunnari*)의 추출물이 높은 오메가-3 함유량을 나타내는 것을 이전 년도에 확인하여, 두 어류의 부위별(피부, 위, 간, 뇌) 추출물을 얻어 지방산 함량을 확인
  - GC-MS 분석을 통해 각 추출물의 구성 성분을 확인할 수 있고 각 성분의 fragmentation pattern을 통해 어떤 화학적 구조를 갖는지 또한 확인할 수 있음. 따라서 본 분석을 진행하기 위해 어류 2 종의 hexane 추출물을 얻어 이에 대해 methylation 반응을 진행
  - 2 종의 어류 모두 높은 오메가-3 함유량을 나타냈으나, *C. gunnari*의 경우 대표 오메가-3인 EPA (retention time 43.1에 나타나는 peak)와 DHA (retention time 51.2에 나타나는 peak)가 피부와 위 추출물에 특이적으로 높은 함량으로 분포되어 있음을 확인하였고, *N. rossii*의 경우 모든 부위에 높은 함량으로 존재하는 것을 확인

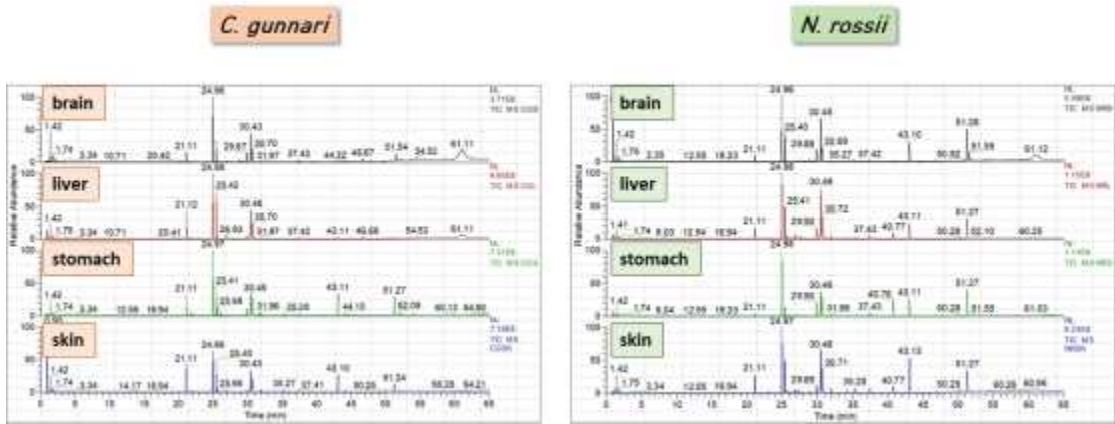


그림 76. 남극 어류 2 종의 부위별 추출물의 GC-MS 분석

○ 남극 어류 2 종의 부위별 추출물의 주름개선 효과

- 남극 어류 2 종이 콜라겐 분해 효소인 MMP-1에 대해 상당한 억제 효과를 나타내는 것을 이전 년도에 확인하여 두 어류의 부위별(피부, 위, 간, 뇌) 추출물을 얻어 주름개선 효능을 확인
- *C. gunnari*의 피부 추출물과 *N. rossii*의 뇌 추출물을 제외한 모든 부위별 추출물이 UVB에 의한 세포손상으로부터 세포를 보호하는 것을 확인할 수 있었으며, 그 중 *N. rossii*의 피부 추출물과 간 추출물이 가장 높은 억제 활성을 나타냄
- 추가적으로 콜라겐 생성량을 확인할 수 있는 PIP (procollagen type I) 정량을 통해, 위의 결과와 같이 *N. rossii*의 피부 추출물과 간 추출물, 그리고 추가적으로 *N. rossii*의 위 추출물이 가장 높은 콜라겐 생성량을 나타냄
- 어류 2종의 부위별 추출물(피부, 뇌, 간, 위, 근육)에 대하여 *E. coli*, *Staphylococcus aureus* 및 *Candida albicans*에 대한 항생 활성을 평가
- *E. coli* 및 *C. albicans*에 대해서는 모든 추출물이 유의한 활성을 나타내지 않았으나, gram-positive 세균인 *S. aureus*에 대해 *C. gunnari*의 피부, 간, 위 추출물, 그리고 *N. rossii*의 위 추출물이 가장 좋은 항생 활성을 나타냄
- 네 가지 추출물에 대해 IC50 값을 확인한 결과, *N. rossii*의 위 추출물이 가장 유의한 항생 활성을 갖는 것을 확인(IC50 = 188.16±26.63 ug/mL)

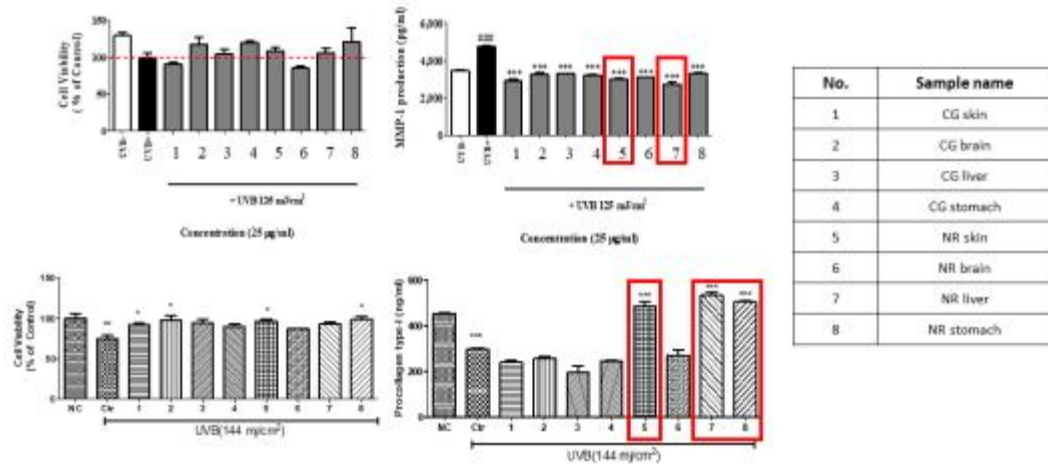


그림 77. 남극 어류 2 종의 부위별 추출물의 MMP-1 억제 활성 및 콜라겐 생성량 증가

○ 남극 어류 2 종의 부위별 추출물의 항생 활성

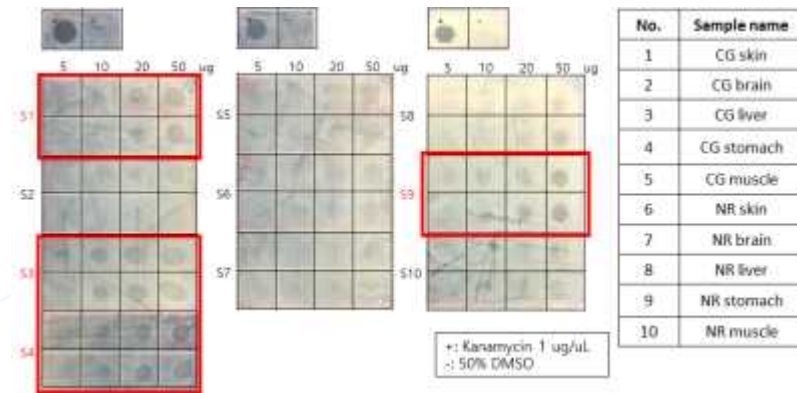


그림 78. 남극 어류 2 종의 부위별 추출물의 *Staphylococcus aureus*에 대한 항생 활성

- 남극메커털빙어 *C. gunnari*의 세부 부위별 추출물(눈, 정소, 장, 난소, 심장, 쓸개, 지방 질, 아가미)에 대하여 같은 활성 평가를 진행하였으며, 마찬가지로 *E. coli* 및 *C. albicans*에 대해서는 유의한 활성을 나타내지 않았으나 *S. aureus*에 대해 선택적으로 항생 활성을 나타냄
- 세부 부위별 추출물 중 정소, 장, 난소, 심장, 쓸개 및 아가미 추출물이 가장 높은 활성을 나타냈으며, 여섯 가지 추출물에 대해 IC50 값을 확인한 결과 장(IC50 = 104±27.61 µg/mL), 정소(IC50 = 77.01±22.70 µg/mL), 심장(IC50 = 131.96±28.20 µg/mL) 및 쓸개(IC50 = 98.03±1.45 µg/mL) 추출물이 유의한 항생 활성 확인

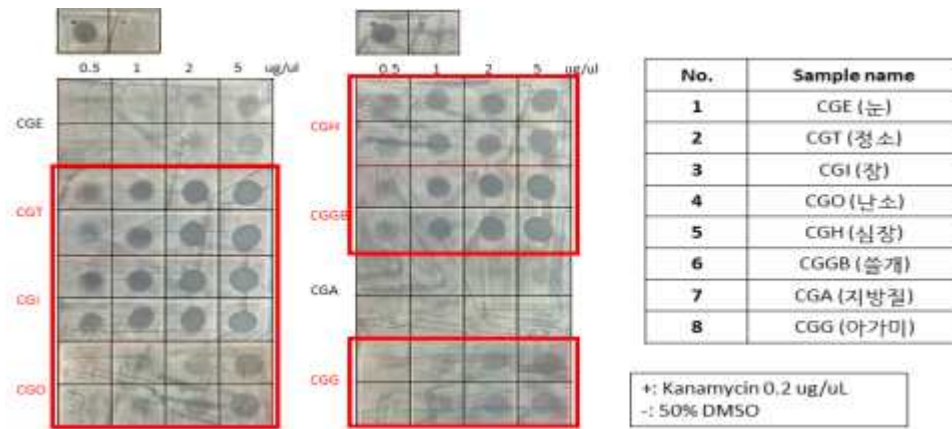


그림 79. 남극 어류 2 종의 부위별 추출물의 *Staphylococcus aureus*에 대한 항생 활성

### (3) 연구내용 3-3. 유용 활성 단백질의 활성기작 해석

- 유용 활성 단백질의 생화학적 특성 규명
  - 효소 활성에 대한 기질 다양성 조사 및 활성 비교 조사
  - 재조합 단백질의 최적 활성 반응 조건에 대한 조사 및 분석
  - 효소 단백질의 기질에 대한 특이성과 역학 분석

표 13. 극저온성 단백질의 활용 가능성 및 상용화 분야

Psychrophiles and Cold-active Enzymes in Biotechnology		
Applications	Advantages	Involved Enzymes or Proteins
<b>Detergents</b>	Washing at low temperature	Protease, lipase, amylase, cellulase, oxygenase
<b>Food Industry</b>	Improved taste and aroma of fermentation products (cheese, etc)	Fermentation and ripening enzymes
	Lactose hydrolysis	$\beta$ -galactosidase
	Juice clarification and yield of extraction	Pectinase, cellulase
	Meat tenderization	Protease
<b>Organic synthesis</b>	Volatile and heat-sensitive compounds, organic phase synthesis	Protease, lipase, glycosyl-hydrolase, etc
<b>Molecular biology</b>	Mild inactivation, ligation, PCR	Various enzymes
	Low temperature	Ligation, carry-over in PCR
<b>Textiles</b>	Improved quality due to mild heat treatment for desizing, biopolishing and stone-washing of fabrics	Amylase, laccase, cellulase
<b>Environment</b>	In situ bioremediation of organic pollutants and hydrocarbons	Various hydrolases, mono- and dioxygenases, dehydrogenases
	Biogas production	Psychrophilic anaerobic digestion
<b>Cryoprotectants</b>	Non-toxic to cryopreserved cell	Antifreeze proteins
<b>Synthetic snow</b>	Non-toxic, Eco-friendly method	Ice nucleation proteins

- 유전자 분석을 통해 극저온 환경 특이적 단백질 타겟 선정
  - 재조합 단백질 발현 및 정제 프로토콜 확립
  - 도메인 예측을 통해 전체 단백질 또는 도메인으로 구분하여 대장균에서 타겟 단백질의 과발현을 시도
  - 발현된 단백질의 solubility 와 folding을 향상 시키고 정제를 용이하게 하기 위해 다양한 fusion 단백질의 형태로 발현(His tag fusion: pET vectors, GST fusion: pGEX vectors, MBP fusion: pMAL vectors)



- 대장균에서 발현되지 않은 단백질과 당 단백질 같은 경우에는 효모 또는 baculovirus 를 이용한 진핵 생물 발현 시스템을 이용하여 발현
- 발현된 단백질에 대하여 affinity chromatography, ion exchange chromatography, gel filtration chromatography 등의 방법을 통하여 단백질 정제
- 수용성으로 발현되지 않는 단백질에 대해서는 계면 활성제를 이용한 추출 방법 및 refolding 방법을 통하여 정제
- 단백질의 정성분석: dynamic light scattering, native gel, mass spectrometry 등을 이용하여 단백질의 순수도 및 결정화 여부를 확인. 성공적인 단백질 결정화를 위해서는 homogeneous 상태의 단백질이 요구 되어 지기 때문에 위의 3가지 방법을 통해 단백질의 상태를 확인하고 최적의 buffer 조건을 결정
- 타겟 단백질의 구조 분석을 위한 결정화 조건 탐색
  - 정제된 단백질은 결정화 로봇(모스키토 장비) 을 이용하여 2천 가지 이상의 조건을 Screening 하여 단백질 결정을 확보
  - 확인된 단백질 결정은 한국기초과학지원연구원(KBSI) 의 X-ray 장비를 이용하여 회절 여부를 테스트
- 단일 결정으로부터 X-선 회절 데이터 수집
  - 포항가속기 연구소(PAL), 일본의 Photon factory 또는 미국의 Argonne National Laboratory's Advance Photon Source (APS) 방사광을 이용하여 고 에너지의 X-선으로부터 단백질 결정의 회절 데이터 수집
  - Se-Met 치환된 단백질에서 multi-wavelength anomalous diffraction (MAD) data를 얻어 phase 문제를 해결
- 타겟 단백질의 고해상도 삼차구조 해석 및 분석
  - 단백질 구조 결정: Solve, Resolve, MOLREP, Auto Sharp, arp/wARP, CNS, REFMAC, BUSTER-TNT 등의 program을 이용하여 phase계산과 refinement를 수행
  - 단백질의 3차 구조를 결정한 후 활성 부위, 기질결합 상호작용에 중요한 부위를 확인 및 활성을 향상 시킬 수 있는 돌연변이 위치 디자인
  - 구조정보를 통해 찾아낸 활성 또는 상호작용 부위를 돌연변이 단백질들을 이용한 생화학적 실험을 통해 검증
- 중온성 또는 고온성 유사 단백질들과의 구조 비교분석을 통해 극지환경 적응 기작 유추



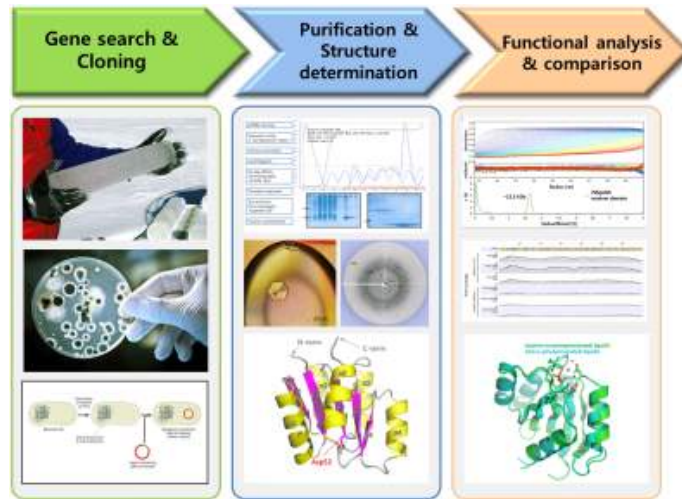
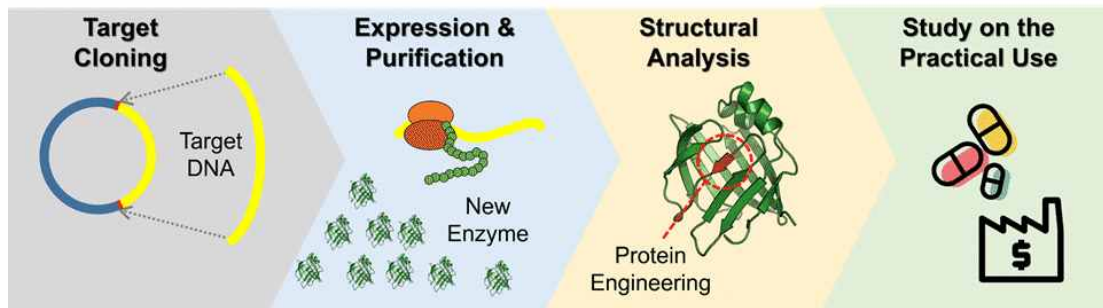


그림 80. 극지환경 특이적 단백질의 삼차구조 및 기능분석 과정

- 단백질 공학방법을 이용한 기능 개선형 저온성 효소 개발
- 저온성 효소의 구조-기능 상관관계 분석 후 목적에 맞게 단백질의 재설계
- 효소의 안정성과 활성을 변화: 효소의 기질 결합부위 잔기의 돌연변이체 제작



Development of cold-active enzyme using protein engineering

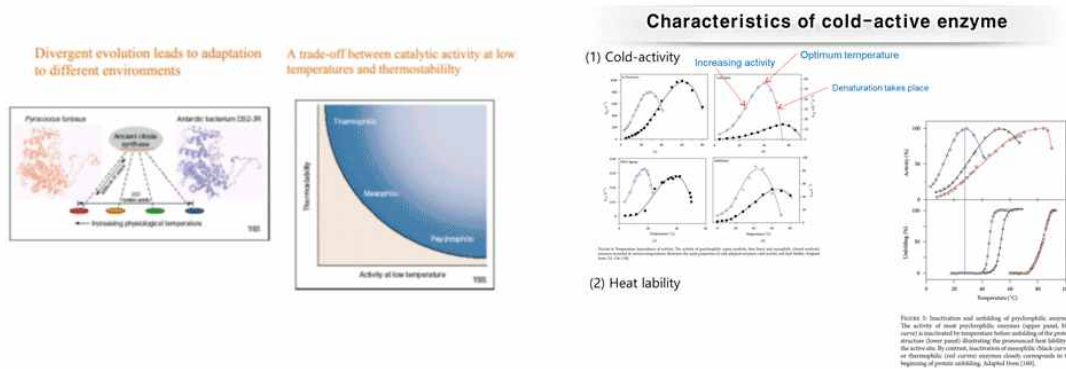


그림 81. 저온성 효소의 특성과 구조정보 기반 효소 개량

- 극지 박테리아 유래 결빙방지단백질의 고효율성 특성 규명
- 결빙방지단백질은 얼음의 빙점을 낮춤으로서 극지생물이 저온에서 살아갈 수 있도록 도와줌
- 이런 결빙방지단백질을 이용한 동결보존제 혹은 결빙방지단백질 유전자를 생물체에

- 주입하여 냉해에 강한 유전자변형 생물체를 만들려는 시도가 이루어지고 있음
- 결빙방지단백질의 효과를 증대시키기 위한 고효성 결빙방지단백질을 합성하려는 연구가 이루어지고 있음
- 이번 연구에서는 남극 박테리아 유래 고효성 결빙방지단백질(FfIBP)을 이용하여 비교 및 Molecular dynamics simulation을 이용하여 고효성 결빙방지단백질의 특성 규명하였음
- 이 결과를 바탕으로 향후 고효성 결빙방지단백질을 검색하고 새로운 형태의 결빙방지단백질을 설계하는데 기초자료로 사용할 수 있음
- 결빙방지단백질의 Capping head region이 다른 키메릭 단백질 발현 및 활성 측정
  - 3종의 재조합 단백질을(FfIBP, mFfIBP, C107S) 발현 정제하여Capping head region의 구조에 따른 결빙방지단백질의 활성 차이를 확인
  - 결빙방지단백질 존재하에 얼음결정의 형태적 변화를 관찰

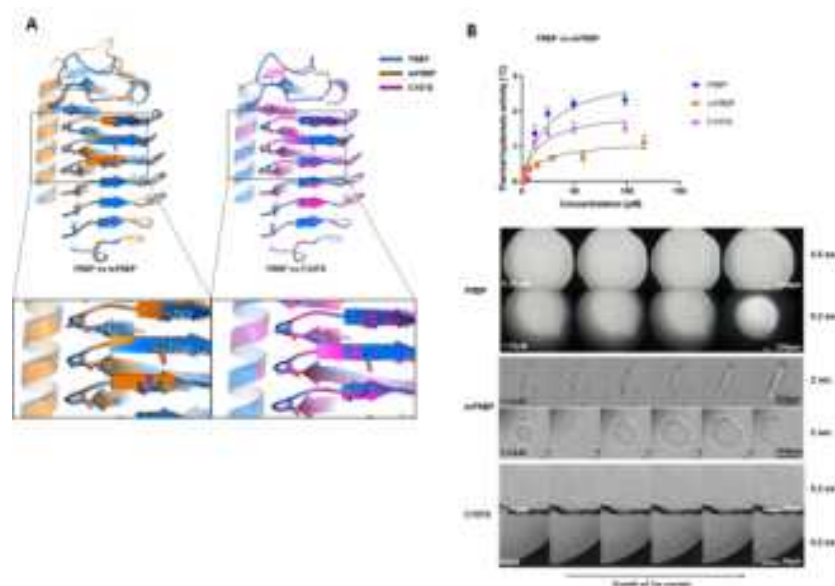


그림 82. FfIBP 유래 3종의 재조합 단백질의 구조 비교 및 활성 및 얼음 형태 관찰

- Capping head region에 따른 결빙방지단백질의 유동성 측정
  - 3종의 재조합 단백질 구조를 이용하여 분자동역학(Molecular dynamics) 실시
  - Capping head region의 구조에 따라 단백질 전체 아미노산 유동성이 달라짐을 관찰
  - 이런 유동성은 Capping head region의 구조에 따라 달라짐을 확인. 고효성을 가지는 결빙방지단백질은 낮은 유동성을 가짐

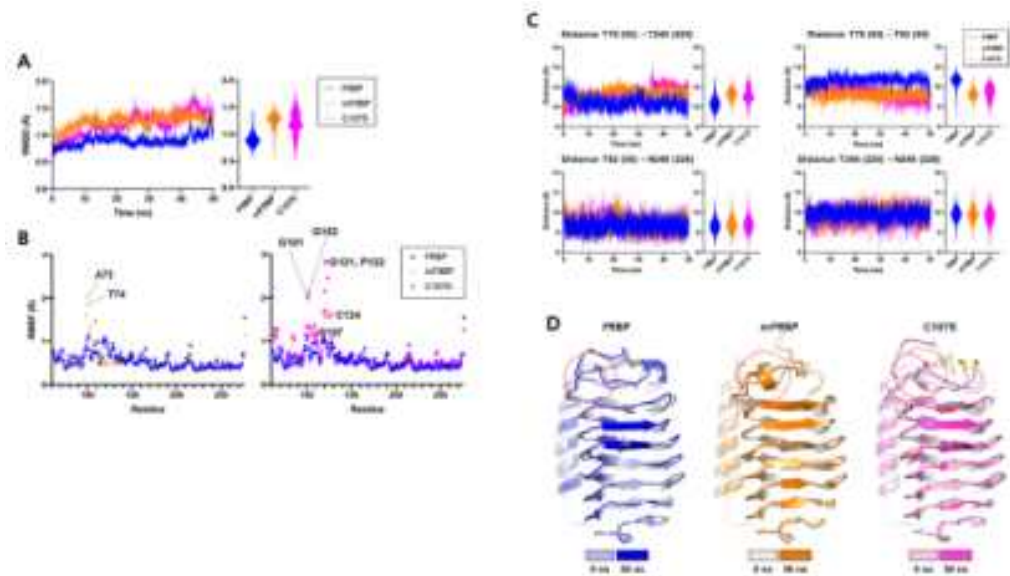


그림 83. FfIBP 유래 3종의 재조합 단백질의 분자동역학(Molecular dynamics) 실시 결과. 고효성 결빙방지단백질은 Capping head region의 유동성이 낮게 유지됨을 관찰. Capping head region의 유동성과 얼음과 결합하는 아미노산의 유동성의 상관관계에 따라 결빙방지단백질의 활성이 달라짐을 확인

- Capping head region에 따른 결빙방지단백질의 분류 및 유동성과 활성과의 상관관계 확인
- 결빙방지단백질의 활성과 유동성과의 상관관계를 확인하기 위해 기존에 알려진 결빙방지단백질의 구조 분석
- Capping head region의 구조에 따라 결빙방지단백질을 구분할 수 있고 이는 결빙방지단백질의 활성과도 높은 상관관계가 있음을 밝힘
- 고효성의 결빙방지단백질은 FfIBP와 유사한 Capping head region을 가지고 있거나  $\beta$ -strains 사이에 이황화 결합을 가지고 있어서 얼음과 결합하는 아미노산의 유동성이 낮아짐
- 저활성 결빙방지단백질은 LeIB(저활성 결빙방지단백질)과 유사한 Capping head region을 가지거나 Capping head region이 소실되어 있음

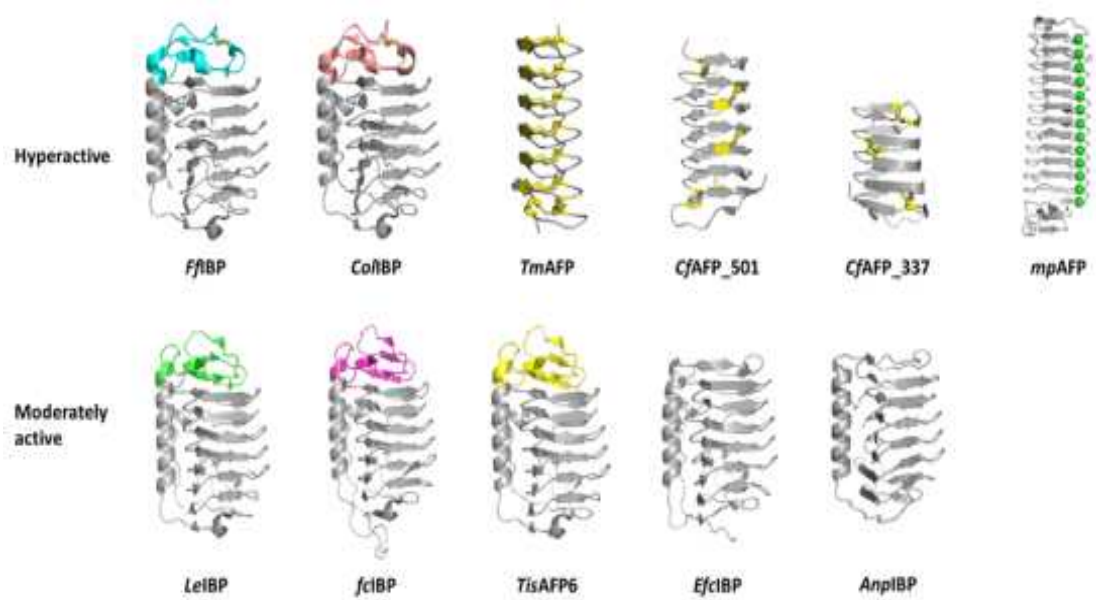


그림 84. 기존의 알려진 결빙방진단백질과 고활성을 가지는 특징 비교 분석

(4) 연구내용 3-4. 프로티움 분석법에 의한 기능 단백질군 탐색

○ 발현 단백질 분석에 의한 기능성 단백질 발굴

- 전체 단백질 분리를 위해서 분산 이온화 기법을 통한 대량분석법을 활용하거나 또는 통계적으로 의미 있는 발현변화를 보이는 소수단백질 동정을 위한 개별 질량분석법을 사용하여 발현 단백질의 확인 및 정보획득

MS Analysis

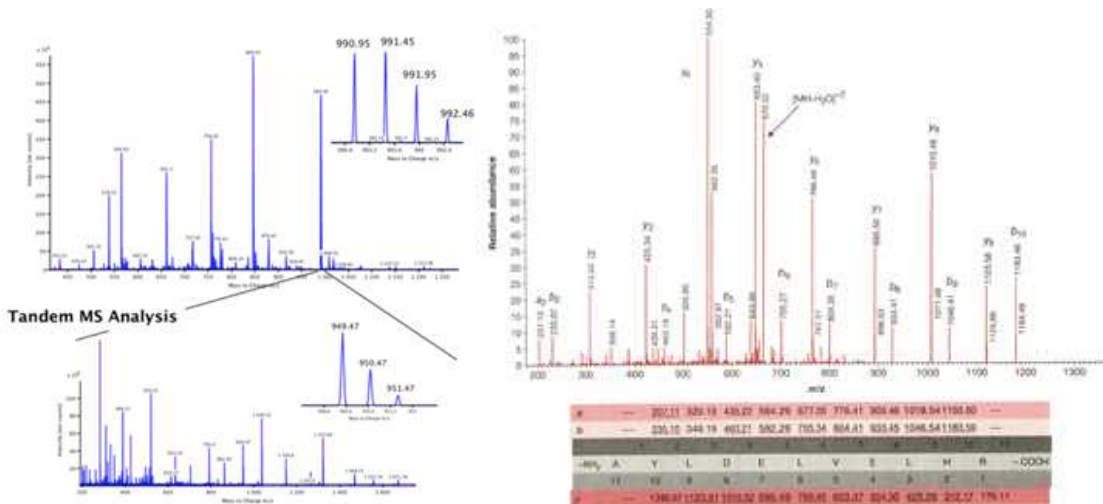


그림 85. 질량분석법에 의한 단백질 정보 동정

- 극지 생명체의 생명특성을 유도하는 극지 특이적 환경요인을 적용하여 단백질 발현상의 특이점을 나타내는 단백질 또는 단백질 군을 요약정리한 후 특정 환경요인에 부합

하여 발현되는 특정 단백질을 선정하여 유용 유전자원 후보로 발굴

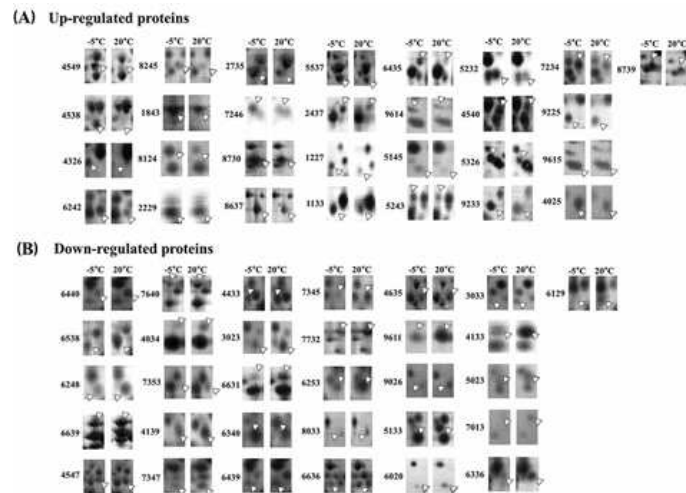


그림 86. 단백질 분석에 의한 발현 단백질군 분석

- 극지 미생물 유래 환경 스트레스 저항성 단백질인 LEA (Late Embryogenesis - Abundant)에 의한 환경적응 기작 규명연구 진행

(5) 연구내용 3-5. 극지 메타지놈을 활용한 기능기반의 신규 효소 탐색기술 확립

- 극지 메타지놈 라이브러리로부터 Indigo 생산 효소 유전자 확보
  - lipase, protease, amylase 효소 탐색을 위한 선택배지에서 색소(빨강, 파랑, 검정 등)를 나타내는 클론을 확보하여 분석함
  - 액체배지에서 배양 후 색소를 분리 후 질량분석을 통하여 물질 동정
  - 색소의 동정 결과 indigo와 indirubin으로 확인됨.



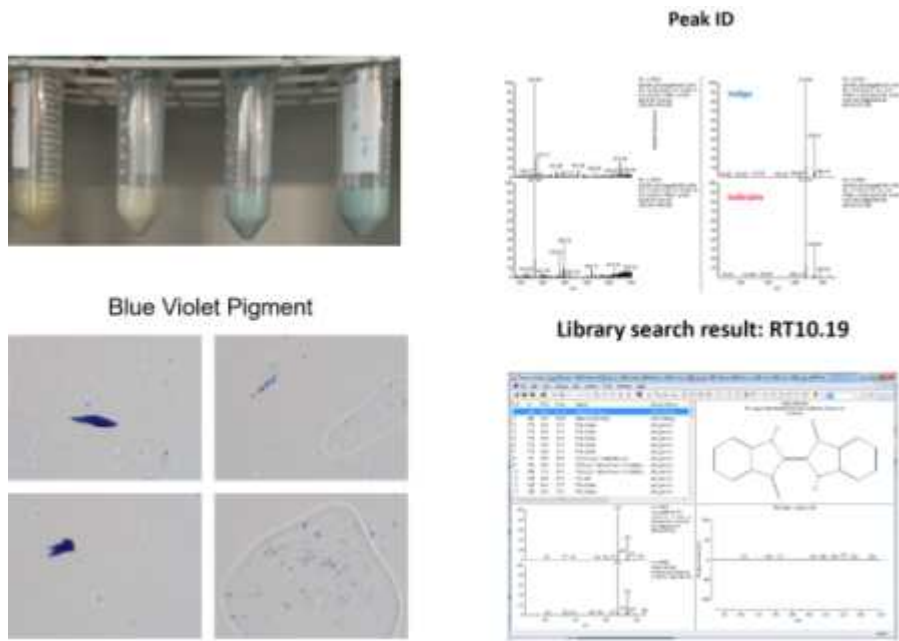


그림 87. 청색 색소를 생산하는 대장균 클론의 배양액 및 색소 (indigo)의 질량분석 결과



그림 88. 그림. 대장균 클론에서 생산된 빨간 색소(Indirubin)와 질량 분석 결과

(6) 연구내용 3-6. 극지 식물 유래 환경스트레스 내성 효소 단백질의 유전자 개발

○ 남극곰새풀의 DaMDHAR에 의한 환경스트레스 내성 형질 특성 규명

- 극지 식물 남극곰새풀의 비타민C 재생 관련 효소인 monodehydroascorbate reductase (DaMDHAR)에 의한 동결-융해 스트레스 내성에 관한 특성을 효모 실험으로 규명함



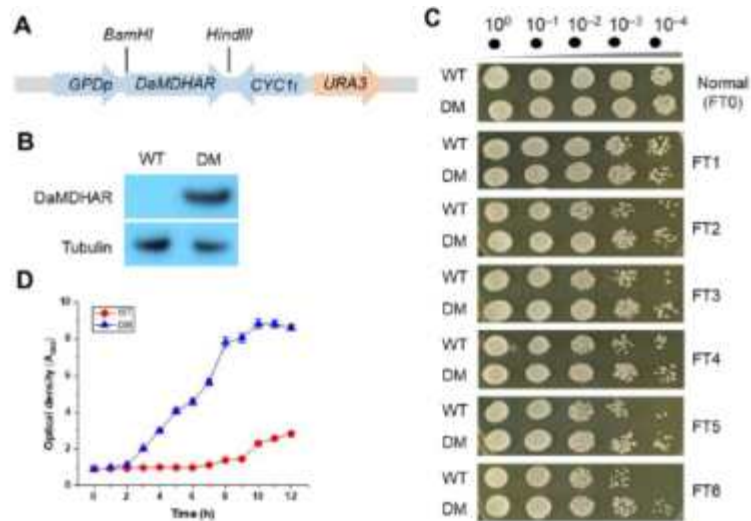


그림 89. 그림. DaMDHAR-expressing transgenic yeast 세포의 동결-융해 스트레스 내성에 관한 실험

- 유전자 분석기술을 이용하여 DaMDHAR에 의해 환경 스트레스 내성에 반응하는 효모 세포내의 유전자 네트워크를 분석하였음

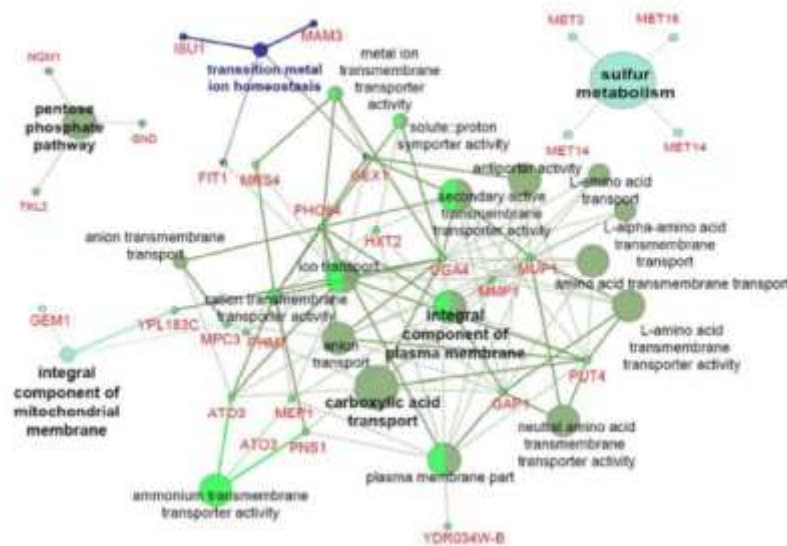


그림 90. DaMDHAR 발현에 의한 조절되는 유전자의 ClueGO-based genetic network 분석

- 동결-융해 스트레스에 대한 내성은 DaMDHAR 효소의 작용에 의해 세포 내의 항산화 관련 효소 유전자와 세포벽의 안정화와 기능에 관련된 유전자가 중요하다는 메커니즘을 규명함

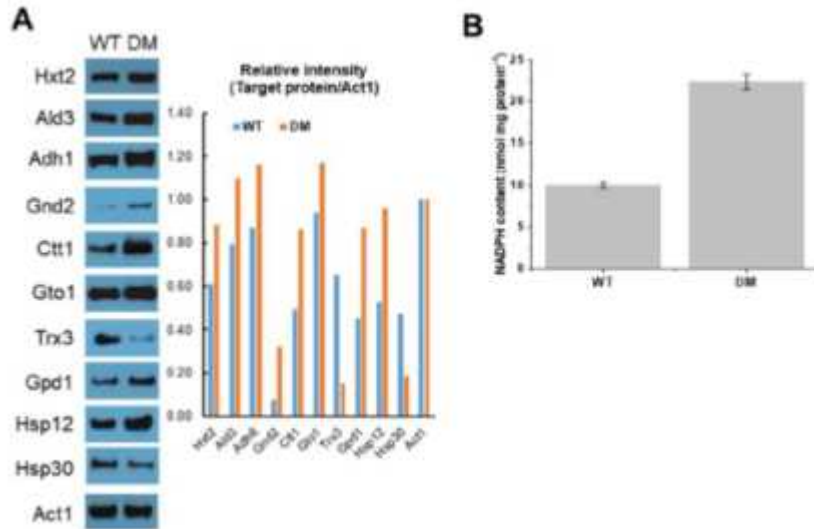


그림 91. DaMDHAR 발현에 의한 2배 이상 조절되는 유전자의 단백질 발현 분석

(7) 연구내용 3-7. 유용 활성 단백질의 활성기작 해석

- 남극 이끼 유래 테르페노이드 생합성 효소인 SuTPS의 활성 검증
- 남극낫깃털이끼 테르페노이드 생합성 효소 SuTPS 효소의 활성 검증을 위해 모델식물 과발현 형질전환체 제작을 통한 ex vivo 기능성 연구를 수행
- 남극낫깃털이끼의 유전체로부터 동정한 총 8개의 SuTPS 중 5에 대해 과발현 애기장대 형질전환체 제작을 완료하고 이에 대해 유전자 삽입 및 과발현 확인

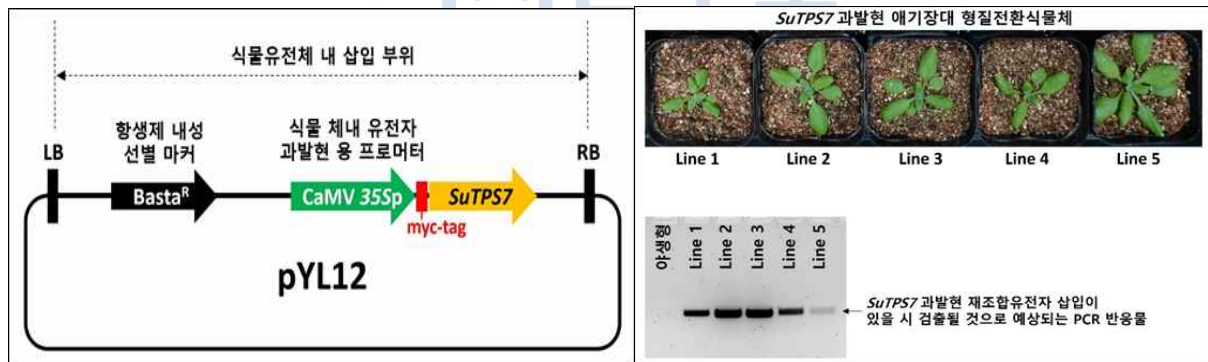


그림 92. 남극 이끼 유래 테르페노이드 생합성 효소인 SuTPS의 활성 검증

- SuTPS7이 도입된 식물에서 VOC 대사체 변화를 검증한 결과, 과발현 형질전환체에서 깃털이끼 순수배양체에서 확인되었던 VOC 들이 검출됨을 확인. 특히 말라리아 치료제 아르테미신 전구체인 아모르파-1,4-디엔이 특정 TPS 유전자의 과발현에 의해 생성되는 것을 확인함 (특허출원 완료 및 논문 작성중)

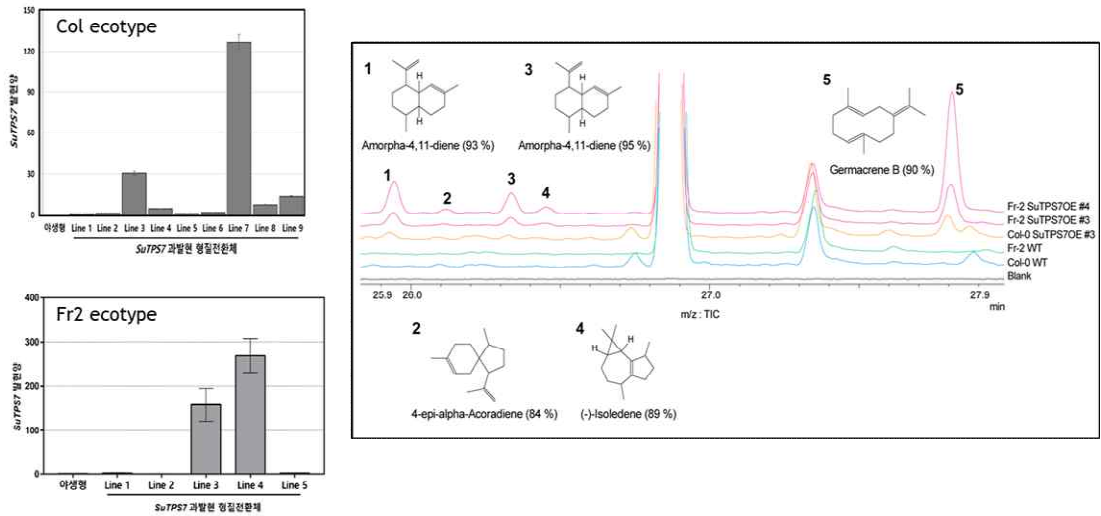


그림 93. 남극낫깃털이끼의 테르펜 합성효소가 도입된 형질전환체의 테르페노이드 프로파일 비교

- 극지미생물 유래의 신규 esterase의 구조해석 및 돌연변이 제작을 통한 기능성 분석
- 에스테라제 (esterase)는 다수의 유기용매에 대한 높은 내성과 카르복실산 의약품의 광학적으로 순수한 광학활성 의약품 개발 및 생물촉매 공정기술의 핵심소재로 사용될 수 있음.
- 극지미생물 *Paenibacillus* sp. R4 균주 유래의 esterase (PsEst3)를 대장균에서 발현 생산 조건을 확립하고, 재조합 단백질을 확보하고 생화학적 특성을 조사함.
- PsEst3 esterase의 단백질 3차 구조를 분석하였으며, 활성부위에서 존재하는 주요 아미노산 잔기에 대한 활성기작에 대한 역할에 대하여 고찰하였으며, 활성기작 연구를 기반으로 돌연변이 단백질을 디자인하고 제작하여 활성이 증가된 고기능성 효소 단백질을 구축하는데 성공하였음.

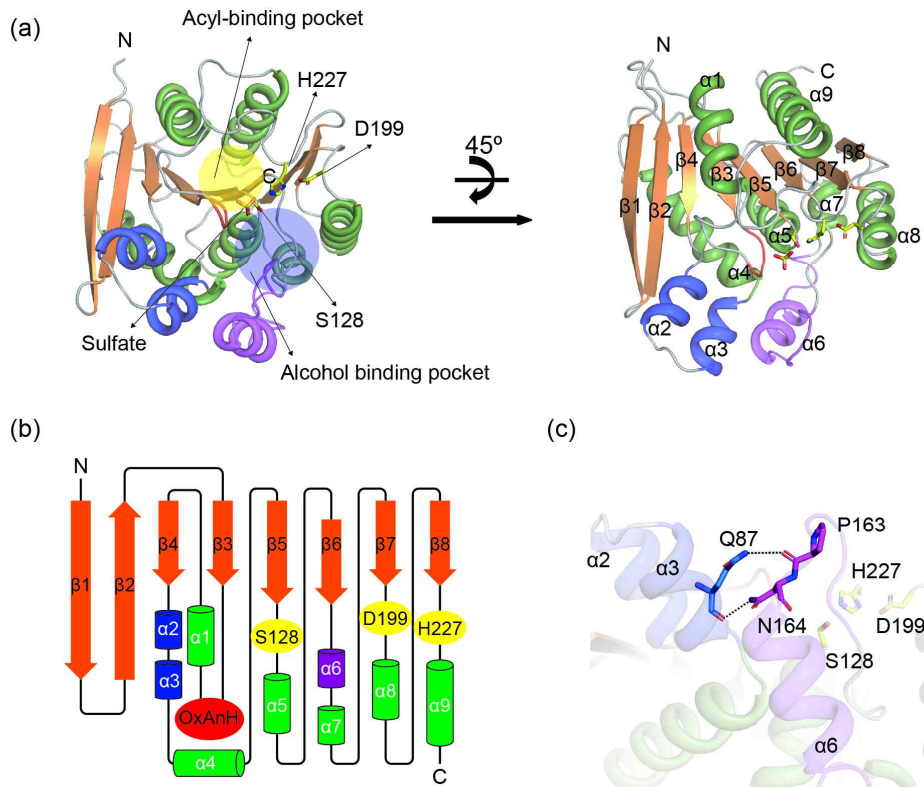
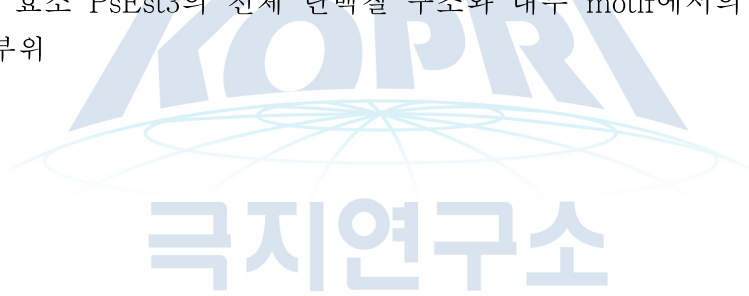


그림 94. 효소 PsEst3의 전체 단백질 구조와 내부 motif에서의 주요 잔기 연결부위



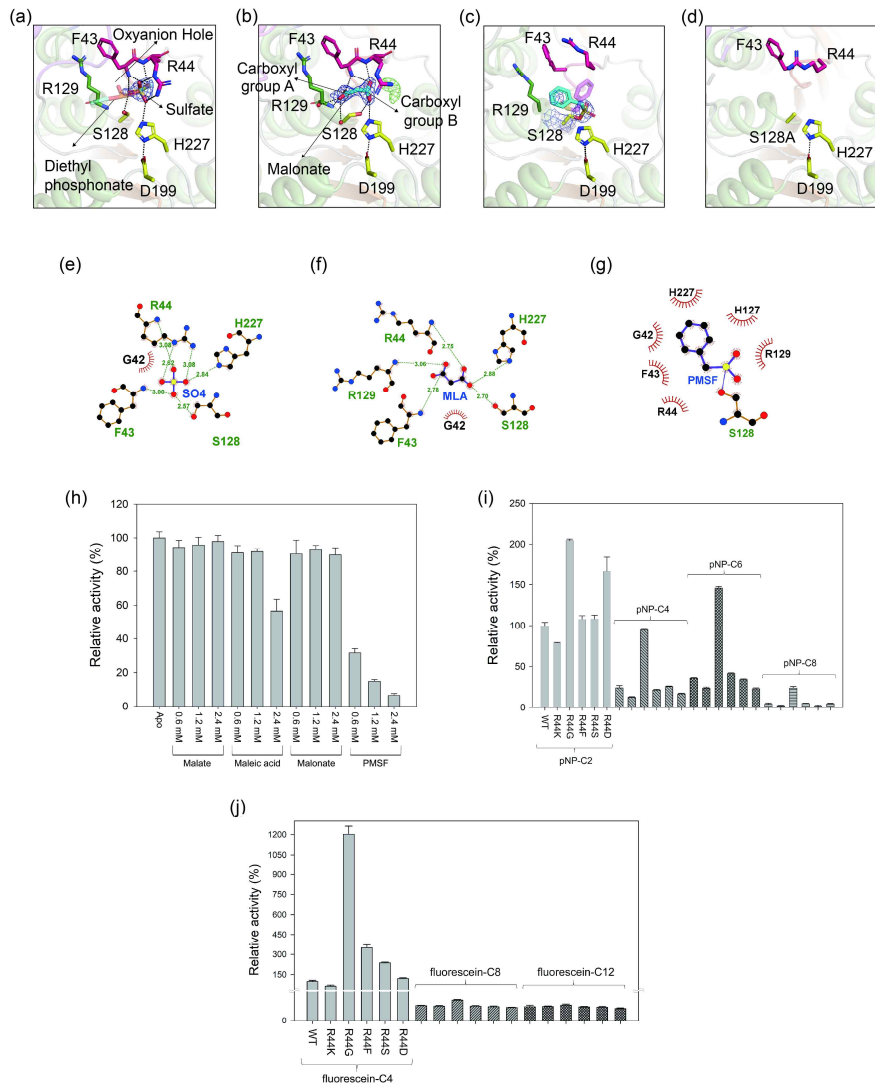


그림 95. 효소-리간드 결합 구조 분석을 통한 다양한 리간드 결합 모드 방식과 돌연변이 단백질의 기질 특이성 조사

○ 고효율성 결빙방지 단백질의 구조해석 및 활성 기작 규명

- 결빙방지 단백질은 얼음의 빙점을 낮춤으로써 극지생물이 저온에서 살아갈 수 있도록 도와줌.
- 이런 결빙방지 단백질을 이용한 동결보존제 혹은 결빙방지 단백질을 유전자를 생물체에 주입하여 냉해에 강한 유전자 변형 생물체를 만들려는 시도가 이루어지고 있음.
- 결빙방지 단백질의 효과를 증대시키기 위한 고효율성 결빙방지 단백질을 합성하려는 연구가 이루어지고 있음.
- 이번 연구에서는 남극 박테리아 유래 고효율성 결빙방지 단백질(FfIBP)을 이용하여 비교 및 Molecular dynamics simulation을 이용하여 고효율성 결빙방지 단백질의 특성 규명하였음.
- 이 결과를 바탕으로 향후 고효율성 결빙방지 단백질을 검색하고 새로운 형태의 결빙방지 단백질을 설계하는데 기초자료로 사용할 수 있음.

○ 결빙방지 단백질의 Hydration shell을 이루는 물 분자의 위치적 분포 분석

- 고효성 결빙방지 단백질(FfIBP)의 얼음 결합 특성을 확인하기 위해, 구조 분석 시 획득한 물 분자의 위치를 바탕으로 얼음 결합에 중요한 물 분자의 분포를 확인 (그림 96A, 96B)
- FfIBP의 얼음 결합 부위에는 6각형 형태로 물 분자들이 분포하는 것으로 확인됨. 이러한 물 분자의 분포는 얼음에 존재하는 물 분자의 분포와 유사하며 단백질과 얼음의 결합 시 직접적으로 이용되는 것으로 추측됨.

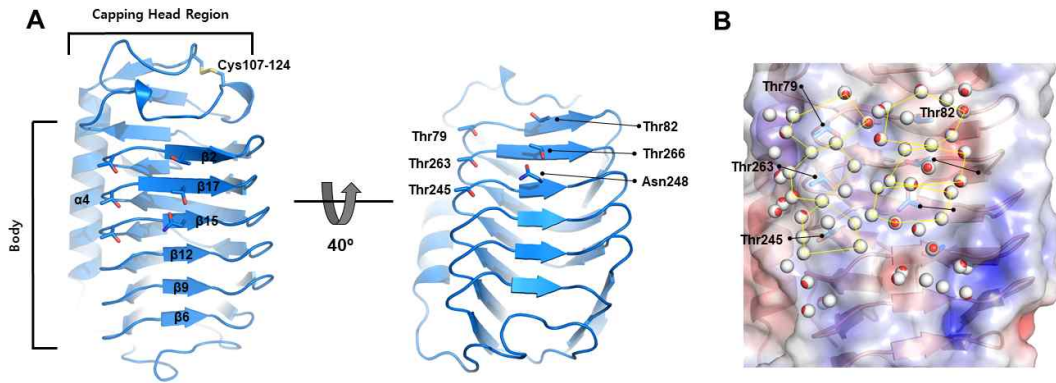


그림 96. FfIBP의 전체 구조 및 얼음결합 부위에 존재하는 물 분자의 분포.

- Capping head region의 유동성이 결빙방지 단백질의 얼음 결합 부위에 미치는 영향 분석
  - 3종의 재조합 단백질 구조를 이용하여 분자동역학 (Molecular dynamics) 실시하여 단백질의 움직임 관찰
  - Capping head region의 구조에 따라 단백질의 유동성이 달라짐을 관찰. Capping head region의 돌연변이 변화는 단백질 얼음 결합 부위의 움직임을 증가시켜 돌연변이 단백질들의 활성이 낮아짐을 관찰. 이에 반해, 고효성을 가지는 결빙방지 단백질은 낮은 유동성을 가짐 (그림 97)



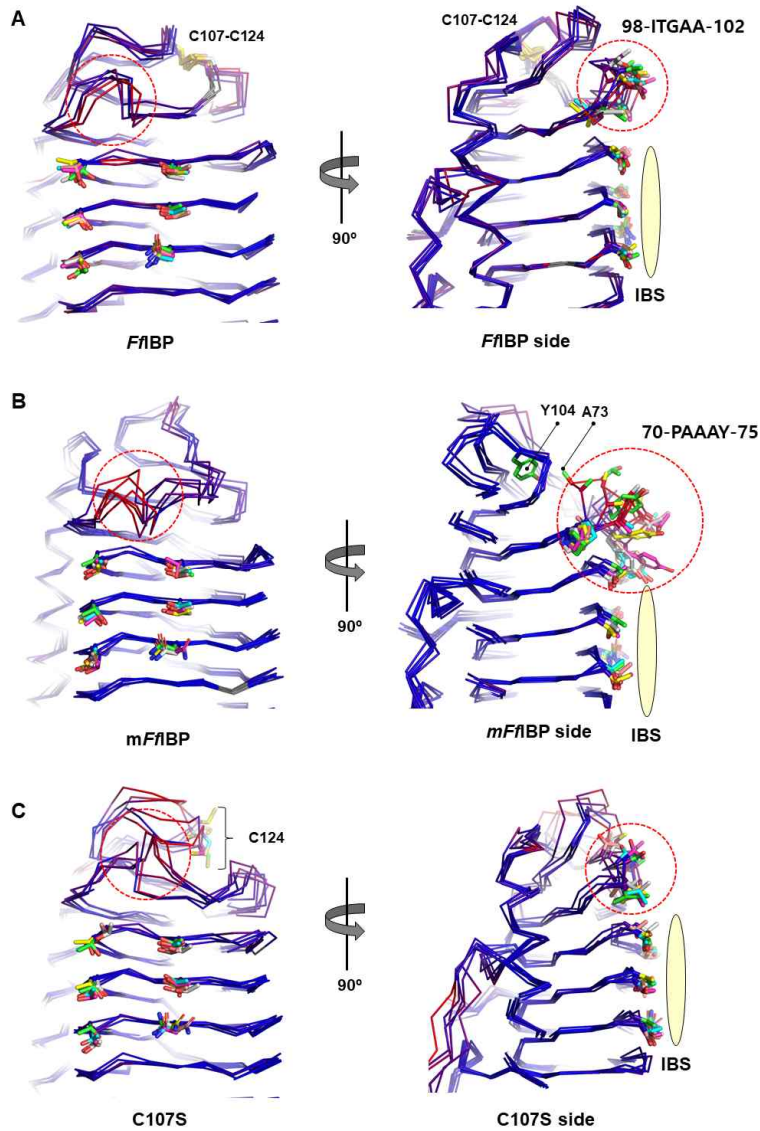


그림 97. FfIBP와 돌연변이 단백질의 분자동역학 결과 및 비교 분석 결과.

- Capping head region의 유동성이 결빙방지 단백질의 얼음 결합 부위 아미노산의 회전에 미치는 영향 분석
- Capping head region의 구조에 따라 얼음 결합 부위의 아미노산 잔기의 회전 특성이 다름을 확인
- 유동성이 증가하는 돌연변이일수록 아미노산 잔기의 회전성이 증가하고 야생형 단백질과 다른 위치의 각도 선호도를 가짐.
- 이를 통해서, Capping head region의 돌연변이는 단백질의 유동성을 증가시키고 이러한 증가는 얼음 결합 아미노산 잔기의 회전을 증가시킴.
- 아미노산 잔기의 회전은 Hydration shell을 이루는 물 분자의 위치적 분포를 변화시켜 결빙방지 단백질의 활성을 낮추는 것으로 추측됨.

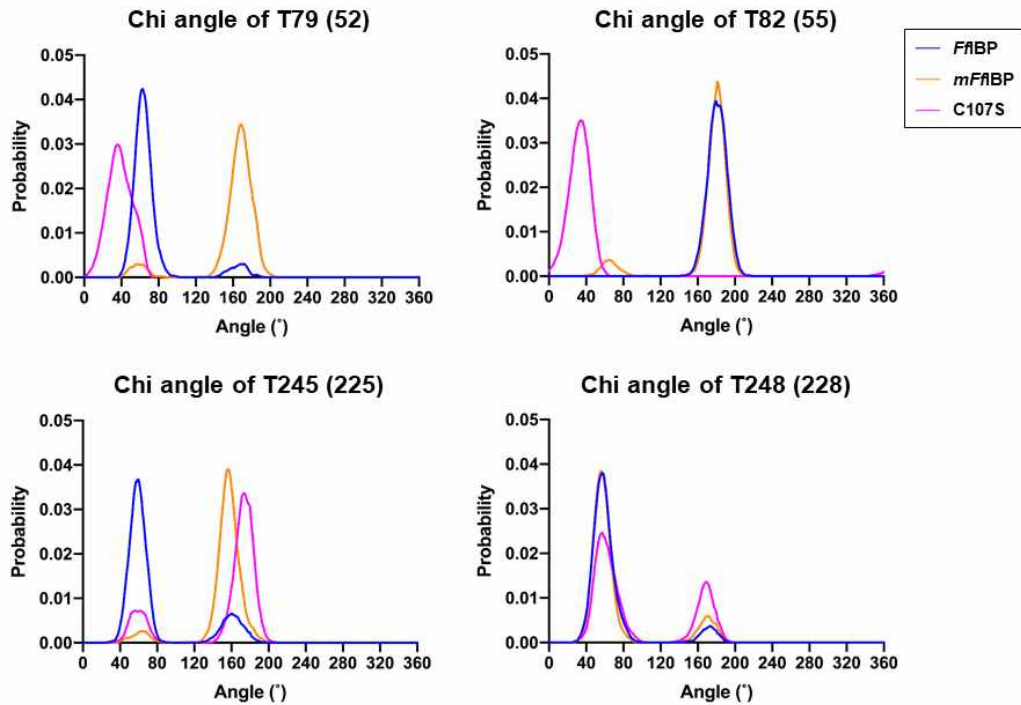


그림 98. FfIBP와 돌연변이 단백질의 얼음결합 아미노산의 Chi 각도 분석 결과.

#### (8) 연구내용 3-8. 저온성 esterase 효소 구조 분석 및 활성과의 상호 관계 규명

- S-formylglutathione hydrolase (BuSFGH) (Burkholderiaceae sp.)의 생화학적 특성 기질 특이성 분석
- BuSFGH의 용액 내 크기 및 올리고머 상태를 확인하기 위해 크기 배제 크로마토그래피(SEC: Size Exclusion Chromatography)를 이용하여 분석하였음. 정제된 BuSFGH는 크로마토그래피 방법을 이용한 결과 51 kDa의 분자량을 나타내었으며 이는 BuSFGH가 용액상에서 이합체(Dimer)로 존재한다는 것을 의미함. 결정 구조에서도 VaSFGH의  $\beta 1$  strand,  $\beta 2$ - $\beta 3$  loop,  $\beta 9$ - $\alpha 12$  loop, and  $\alpha 12$  helix 지역이 이합체를 이루는데 중요한 위치인 것으로 확인되었으며 BuSFGH는 936 Å<sup>2</sup> 면적을 중심으로 이합체를 이루고 있는 것을 확인하였음 (그림 99 그리고 100).

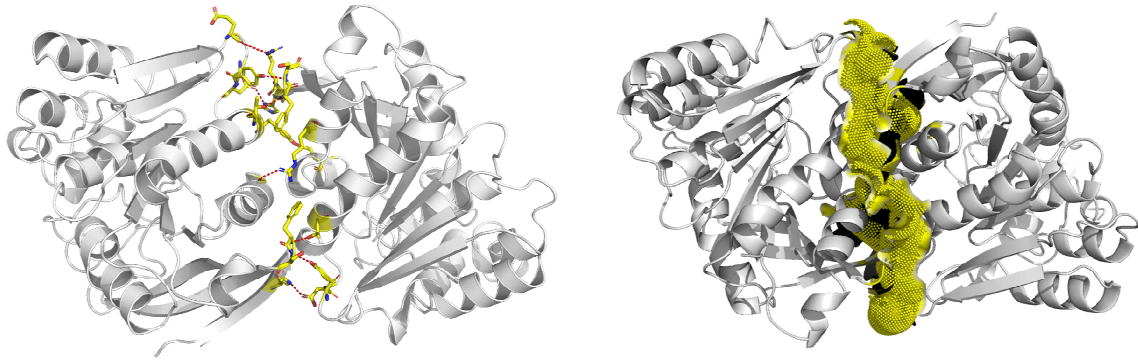


그림 99. 이합체를 이루는 결합면에 존재하는 아미노산 잔기들 및 결합면

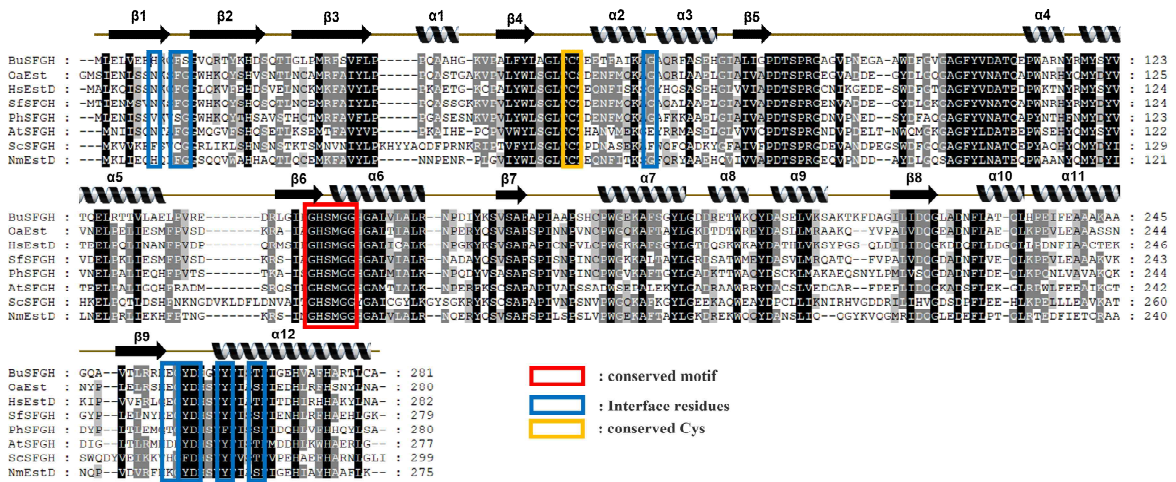


그림 100. 유사 단백질과 BuSFGH와의 다중 시퀀스 정렬 (Multiple sequence alignment). 이합체 결합면에 존재하는 아미노산 잔기는 파란색으로 표시

- BuSFGH의 기질 특이성을 확인하기 위해 다양한 길이의 아실기를 가지는 para-nitrophenyl ester를 이용하여 활성을 측정함. BuSFGH의 기질 특이성 분석 결과 BuSFGH는 p-NA에 대해 가장 높은 활성을 가지는 것을 확인함 (그림 101).

### Substrate specificity

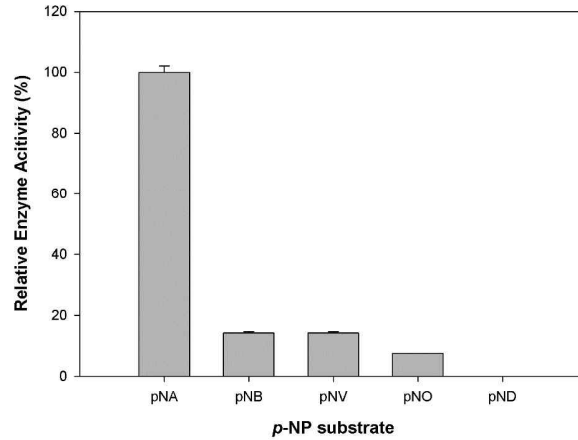


그림 101. VaSFGH의 기질 특이성 분석. carboxylesterase 활성을 평가하기 위해 다른 아실 길이의 p-nitrophenyl esters를 사용. 생성물인 p-nitrophenol은 노란색을 띠므로 405nm 파장에서 흡광도를 측정하여 생성물을 정량화할 수 있음.

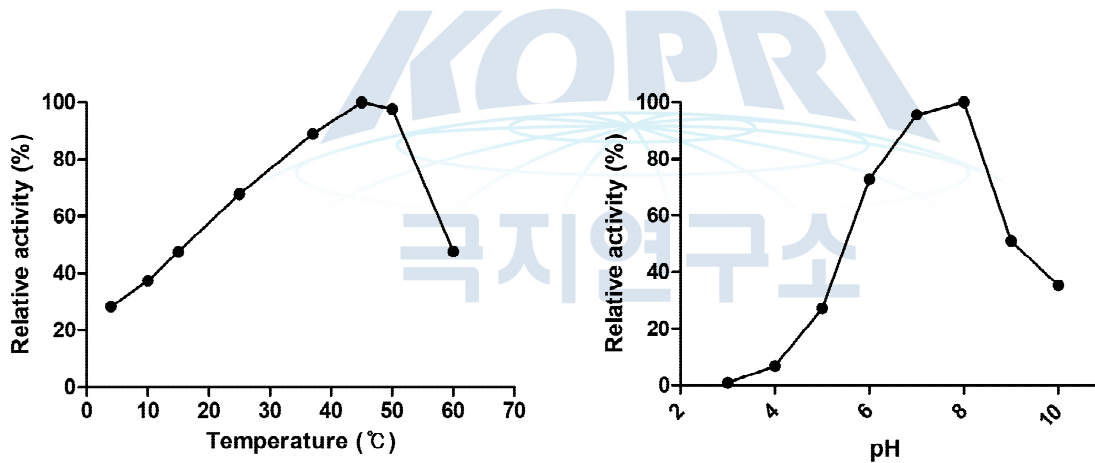


그림 102. 온도 및 pH 변화에 따른 BuSFGH의 활성 측정

- BuSFGH의 최적 기질인 p-NA를 이용하여 여러 parameter의 변화 속에서 활성을 측정 한 결과, BuSFGH는 약 45 °C에서 가장 높은 활성을 보였으며 pH 따른 활성 측정에서는 pH 8에서 최적의 활성을 확인함 (그림 102).

#### ○ 저온성 Esterase(SteEST, Stenotrophomonas sp.)의 생화학적 특성 분석

- Esterase는 산업, 식품, 및 세제 산업에서 많은 용도로 사용될 가능성이 높음. 특히, 저온 활성 esterase는 오염 배제 그리고 최적 온도에 맞는 온도 컨트롤 시스템이 필요 없기 때문에 산업적 측면에서 많은 이점을 보여왔음. 극지 유래 효소의 경우 극지 미생물의 저온 적응으로 인해 저온 활성 특성을 가지는 특성을 바탕으로 극지 박테리아 유래 Esterase를 스크리닝한 결과 3종의 esterase를 찾음.

>WP\_062170718.1 MULTISPECIES: alpha/beta hydrolase [Stenotrophomonas]  
MKATPFELQLDGVRIAGLRAGNPAGLKVLALHGWLDNAASFLPLAAQLPTLDDL  
VMVDLPGHGYSDHLPLT  
TPYTTPQAIVQTLAIADALGWDRFVLLGHSMGAAIASLVAAVAADRVQALVSIE  
ALGGLTAPAGETVQRL  
RTYVDAMLKLDKQLRVFPDLSAPVRRARMMVNQLSEGSARLLVERGVKPVDDGG  
WSWRSDPRLMLPTAIRM  
TEEQVCDVVSAILCPAQVIYATPAQAYFPEPERSQRAALLRDGRLHTLPGHHHVH  
MDQAEAVAAMIRDFI  
AELPDAT

>WP\_083359342.1 alpha/beta hydrolase [Pseudomonas antarctica]  
MSTPVEEVRLSLPHIELAAHLFGPEDGLPVIALHGWLDNANSFARLAPKLHGLRI  
VALDMAGHGHS AHRP  
AGAGYSLWDYVFDVLQVAEQLGWKRFBALLGHSLGAIVSLVLAGALPERVTHLG  
LIDGVVPPTAAGENAAE  
RLGMALQAQLNLQDKRKPVYSTLDRAVEARMKGVVAVSREAAELLAQRGLMP  
VPGGYTWRTDSRLTLASP  
MRLTDEQAMAFVRRVGCPTQLVVADDGMLVKHSELLSQLPFTVNTLPGGHHLH  
LNDEPGAILVADCFNRF  
FHAP

>WP\_064451628.1 alpha/beta fold hydrolase [Pseudomonas antarctica]  
MSAPVEEVRLSLPHIELAAHLFGPEDGLPVIALHGWLDNANSFARLAPKLQGLRI  
VALDMAGHGHS AHRP  
AGAGYALWDYVFDVLQVAEQLGWKRFBALLGHSLGAIVSLVLAGALPERVTHLG  
LIDGVIPPTAAGENAAE  
RLGMALQAQLSLQNKRKPVYSTLDRAVEARMKGVVAVSREAAELLAQRGLMP  
VPGGYTWRTDSRLTLASP  
MRLTDEQAMAFVRRVACPTQLVVAADGMLAKHPELLSQLPFTVNTLPGGHHLH  
LNDEPGAILVADCFNRF  
FSTP



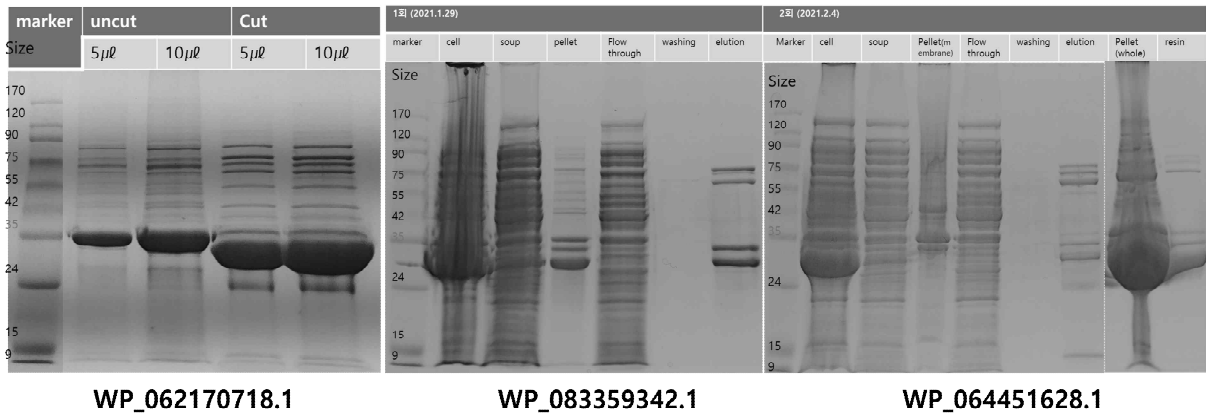


그림 103. 재조합 단백질 Esterase의 His-tag를 이용한 정제 결과.

- 3가지 esterase의 발현 및 용해도를 확인한 결과 *Stenotrophomonas* sp. 유래 esterase는 발현량과 용해도가 높음을 확인함. Esterase (SteEST)의 생화학적 특성을 위해 대량 배양 방법으로 재조합 단백질을 생산하고 크기 배제 크로마토그래피를 이용한 정제를 실시하여 순도 95% 이상의 재조합 단백질을 획득함 (그림 103).
- 정제된 SteEST의 여러 가지 생화학적 특성을 분석한 결과, SteEST는 아실기가 짧은 기질(pNA)에 대해 높은 활성을 보이며 아실 길이가 길어질수록 낮은 활성을 보였음 (그림 104A). pH에 따른 활성 측정에서는 pH에서 가장 높은 활성을 보였음 (그림 104B). SteEST의 저온활성을 확인하기 위해 다양한 온도에서 활성을 측정함. 결과적으로 SteEST는 37. C에서 가장 높은 활성을 보였으며 온도가 낮아짐에도 불구하고 가수분해 활성은 현저히 줄어들지 않음. 특히, 다른 esterase와 달리 SteEST는 4. C에서도 최대 활성 대비 50%의 활성을 유지하고 있었음 (그림 104C). 고온 안정성 테스트 결과 SteEST는 50. C 45분 후에 완전히 활성을 잃었으며 60. C에서는 15분 만에 활성을 잃었음 (그림 104D).



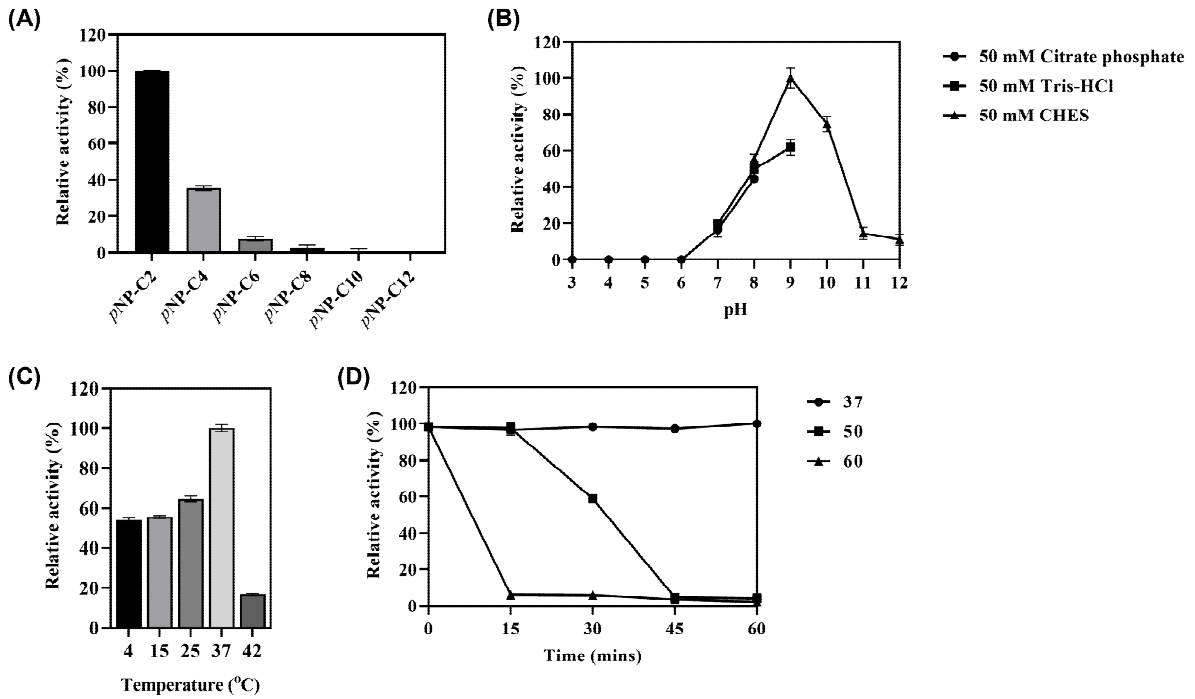


그림 104. 저온성 효소 SteEST의 특성 연구. (A) 기질 특이성 연구, (B) 최적의 pH 측정 연구, (C) 온도에 따른 활성 측정, (D) 온도 안정성 측정

- SteEST의 기질 결합 모드 및 기질 선호도에 대한 구조적 특징을 확인하기 위해 정제된 SteEST를 이용하여 단백질 결정화를 실시함. 초기 결정화 조건 스크리닝 결과 세 조건에서 단백질 결정이 형성됨을 확인함 (그림 105). 추가적인 결정화 조건 스크리닝을 통해서 구조 데이터를 획득할 예정이다.



그림 105. SteEST의 결정 사진 및 조건

### (9) 연구내용 3-9. 극지 어류 유래 추출물의 활성분석

- 극지 어류 *Trematomus bernacchii* (T. B.)와 *Trematomus newnesi* (T. N.)로부터 alcohol 추출 및 생리 활성 의뢰
- 극지 어류 T. B.과 T. N.을 각 1마리씩 증류수로 충분히 세척한 뒤 냉동고에 얼린 뒤 동결건조하여 EtOH로 추출하여 EtOH 추출물 확보
- 극지 어류 T. B.와 T. N. 각 한 마리씩 해부 후 시료 전체를 유기용매 EtOH를 이용

하여 3회 반복 추출한 후 농축하여 TBE (637.0 mg)과 TNE (829.0 mg)의 ethanol 추출물 확보

- TBE와 TNE 추출물 각 200 mg씩 분주하여 근육노화방지 활성의뢰

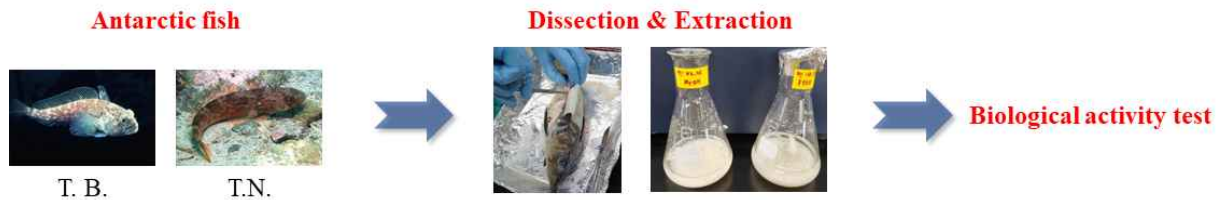


그림 106. Alcohol extraction and biological test of Antarctic fish, *Trematomus bernacchii* (T. B.) and *Trematomus newnesi* (T. N.)

- 극지 어류 *Chaenocephalus aceratus* (C. A.)와 *Trematomus bernacchii* (T. B.)로부터 천연물 추출 및 항균 활성측정
  - 극지어류 C. A.과 T. B.를 각각 5마리씩 부위(뇌, 간, 위, 심장, 눈, 장, 쓸개, 표피, 근육조직)별로 해부하여 각각 증류수로 불순물 제거후 동결건조하여 각부위별로 ethanol로 추출하여 ethanol 추출물 확보
  - C. A.와 T. B.를 각 개체별로 해부해 조직 시료를 얻어 각 부위를 증류수를 이용해 세척한 뒤 동결건조
  - 각 부위별 시료들을 막자사발을 이용하여 잘게 부순 후 200 mL 삼각 플라스크에 옮겨 ethanol을 200 mL씩 넣고 상온에서 하루씩 추출 (2회 반복)
  - 얻어진 각각의 추출물들은 둥근 플라스크에 옮겨 감압농축기를 이용하여 용매 제거
  - 농축된 추출물들 중 C.A.의 간, 위, 근육조직과 T.B.의 생식소, 근육조직, 간, 위 추출물을 30 mg씩 분주하여 항생, 항암, 및 항염증 활성 test 의뢰
  - 각 개체별 농축된 ethanol 추출물들로 Hexan을 이용하여 용매분획으로 hexane 추출물 확보
  - 각 부위별 농축된 ethanol 추출물들과 hexane을 분액깔대기에 넣고 혼합 후 층분리를 하여 hexane 추출물들을 확보
  - 얻어진 각각의 hexane 추출물들은 둥근 플라스크에 옮겨 감압농축기를 이용하여 용매 제거
  - 농축된 추출물들 중 C.A.의 뇌, 간, 위, 피부, 근육조직, 쓸개, 장과 T.B.의 간, 위, 피부, 생식소 그리고 눈 추출물들에 대한 항생, 항암, 및 항염증 활성 test 의뢰



그림 107. Alcohol extraction and biological test of Antarctic fish, Chaenocephalus aceratus (C. A.) and Trematomus bernacchii (T. B.)

표 14. Chaenocephalus aceratus (C. A.) 와 Trematomus bernacchii (T. B.)의 건조된 시료 와 추출물의 무게

어류 종명	부위	건조된 시료무게(g)	Ethanol 추출물 무게(g)	hexane 추출물 무게(g)
Chaenocephalus aceratus (C. A.)	뇌	0.230	0.020	0.054
	간	2.710	1.294	0.716
	위	17.580	1.882	0.679
	눈	3.210	0.141	0.028
	피부	6.840	0.343	0.057
	근조직	15.950	1.170	0.169
	생식소	6.880	0.221	0.010
	쓸개	0.070	0.179	0.045
	심장	0.130	0.109	0.004
	장	1.580	0.354	0.092
Trematomus bernacchii (T. B.)	뇌	0.040	0.072	0.001
	간	2.540	0.913	0.177
	위	2.600	0.534	0.059
	눈	1.820	0.356	0.079
	피부	3.490	0.163	0.013
	근조직	11.060	0.656	0.067
	생식소	2.230	0.450	0.032
	쓸개	0.040	0.013	0.001
	심장	0.690	0.115	0.005
	장	1.010	0.177	0.004

- 추출 및 정제물의 항균 활성 측정
  - 냉동상태의 남극어류 CA (Chaenocephalus aceratus) 및 TB (Trematomus bernacchii)를 각각 5마리씩 해동시킴
  - 각 개체별로 해부해 조직 시료(CA: 간, 위, 근육; TB: 위, 근육, 생식소, 간)를 얻어 각 부위를 증류수를 이용해 세척한 뒤 동결건조 시킴
  - 건조된 조직 시료로부터 각각 CA: 간 2.71 g, 위 17.58 g, 근육 15.95 g, TB: 생식소 2.23 g, 근육 11.06 g, 간 2.54 g을 얻음
  - 각 시료를 막자사발을 이용하여 잘게 부순 후 200 mL 유리병에 각각 옮겨 담은 뒤 ethanol을 200 mL씩 넣고 하루 2회 반복하여 상온에서 추출함 (24 hr X 2)
  - 얻어진 각각의 추출물들은 등근 플라스크에 옮겨 담아 감압농축기를 이용하여 용매를 완전히 제거함

- 농축된 추출물은 CA: 간 1.29 g, 위 1.88 g, 근육 1.17 g, TB: 생식소 0.45 g, 근육 0.65 g, 간 0.91 g을 얻음
- 어류 추출물의 항균 활성 assay 방법
  - 고체 배양배지에 추출물을 떨어뜨려 미생물 성장의 저해 여부를 판단 (정성적 방법)
  - 세균 중 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus* 와 그람 음성균인 대장균, *Escherichia coli* 에 대해 항생 활성을 그리고 곰팡이 *Candida albicans*에 대해 항진균 활성을 확인
  - 세균 두 종에 대해서는 LB 고체 배지에 10<sup>8</sup>cell을 도포한 후 추출물을 10 ul씩 농도별로 주입
  - 같은 농도에 대해 두 번 실험을 반복하였다. 떨어뜨린 추출물의 농도가 0.5, 1, 2, 5 ug/ul이 되게 하여 최종적으로 사용된 추출물의 양은 5, 10, 20, 50 ug이 되게 함
  - 추출물은 50% DMSO에 녹였으며, positive control로는 Kanamycin 0.1과 0.2 ug/ul이 사용
  - 곰팡이 *C. albicans*에 대해서는 GPY 고체배지에 10<sup>8</sup>cell을 도포한 후 추출물을 10 ul씩 농도별로 주입
  - 세균 실험에서와 같이 50% DMSO에 녹인 추출물을 0.5, 1, 2, 5 ug/ul이 되게 하여 10 ul씩 떨어뜨리고, Positive control로는 Nystatin 0.05 ug/ul을 사용
  - 각 고체배지를 37도에서 16~24시간 배양하여 도포된 미생물의 성장 정도를 눈으로 확인
- 미생물에 대한 어류 추출물의 IC<sub>50</sub> 값 (정량적 방법)
  - 정성적 방법으로 실험한 결과 세균 *S. aureus*에 대해 성장 저해 활성을 보인 4개의 추출물 (S1, S3, S4, S9)을 확인하였으며, 항생 활성을 정량적으로 알기 위해 세균의 액체 배양으로 IC<sub>50</sub> 값을 계산
  - *S. aureus* 배양액을 0.5McFarland Standard로 희석 후 96well plate에 95ul씩 분주 후 각 추출물을 농도별로 (10, 20, 50, 100, 200, 500 ug/ml) 처리
  - 37°C에서 24 시간 배양 후 Plate reader로 OD<sub>600</sub> 흡광도를 측정하여 cell이 50% 감소했을 때의 농도를 측정
- 어류 추출물의 항균활성 결과

표 15. Staphylococcus aureus에 대한 어류 추출물들의 항균 활성.

Extract	IC <sub>50</sub> (ug/mL)
Kanamycin	3.89±0.49
C.M.	>200
C.L.	>200
C.S	191.88±14.83
T.M.	70.64±1.13
T.L.	>200
T.S.	>200
T.G.	>200

- 시료들 중 TM에서 S. aureus 에 대하여 70µg/ml 으로 강한 활성을 보였고, CS 추출물은 191µg/ml로 중간 정도의 억제 활성을 나타냄

○ 어류 추출물의 항생활성 측정

○ 방법 : MTT assay를 통한 Cell viability 측정 및 NO(Nitric oxide) assay 통한 Nitric oxide 생성량 측정

- 면역활성 물질의 최초 적정 농도 설정이나 초기 활성 물질 분리에 주로 사용

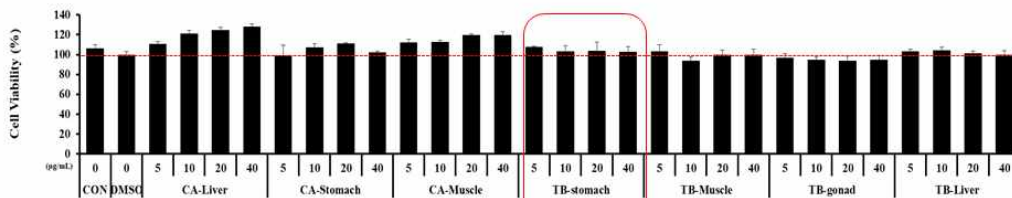
- 시료 처리 농도: 0, 5, 10, 20, 40 ug/mL

- 세포주 : RAW 264.7 cell line (macrophage cell, 대식세포)

- 염증 유발: LPS (Lipopolysaccharide) 사용

○ 어류 추출물의 항생활성 결과

1)세포독성 (cell viability)



2) NO(nitric oxide) 생성량

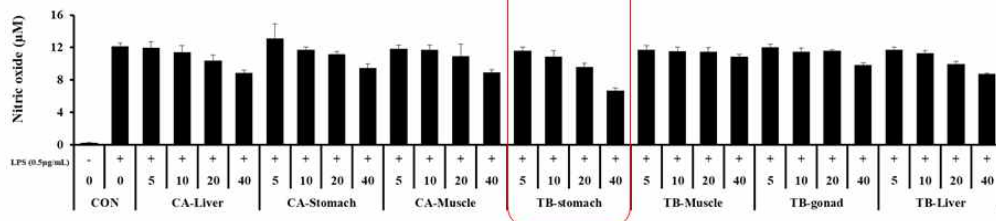


그림 108. 어류 추출물들의 세포독성 및 NO 생성 측정



- CA-Liver, CA-Stomach, CA-muscle, TB-Stomach, TB-Liver 시료가 40 ug/ml 이하 농도에서 세포생존율이 100% 이상이면서 NO 생성의 감소가 농도 의존적으로 활성을 나타냄
- NO 생성의 가장 높은 저해를 일으킨 시료는 TB-Stomach 시료이며, 40ug/ml 농도에 서 약 45%의 NO 생성을 억제시킴
- TB-stomach 추출물의 이차 대사산물이 항염증을 나타낼 것으로 판단됨



## 제 4 장. 연구개발목표 달성도

### 1. 연구목표의 정상 추진 및 성과 우수성

가. 목표 대비 달성도

구분	연구목표 달성내용				계획 대비 연구실적 달성율(B) (%)
	세부연구 목표	연구내용	가중치 (A)	달성실적	
1년차 (2020)	극지생물 유전체 해독	- 극지생물의 표준유전체지도 작성	0.2	- 비교 유전체학적 분석을 위한 레퍼런스 확립	20
		- 극지 환경시료의 메타지놈 라이브러리 확보 - 특정 단백질 활성을 고려한 극지 미생물종 선정			
	기능유전체 분석을 통한 극지생물의 특성규명	- 극지 메타지놈 기능 기반의 단백질 탐색기술 응용 - 기능 단백질 군의 세포내 시너지 효능 검증 - 다양한 극지환경 변화에 의한 발현전사체 및 단백질체 변화 분석	0.2	- 효소활성 스크리닝을 통한 유전자 탐색 5건 이상 - 세포 활성 증진 연구 1건 이상 - 극지적용 유전자 발굴 5건 - 다양한 극지환경 변화에 의한 발현전사체 및 단백질체 변화 분석	20
		- 서열 유사도 및 발현정보 기반 목표유전자군 발굴 - 극지 유용유전자의 구조 및 기능 규명			
	극지 유전체 상용화 기반구축	- 유용 활성 단백질의 활성기작 해석 - 프로티옴 분석법에 의한 기능 단백질군 탐색 - 극지 메타지놈을 활용한 기능 기반의 신규 효소 탐색기술 확립 - 활성 단일체의 극지효소 처리를 통한 기질 개선, 화학 구조 분석 및 가치 검증	0.3	- 단백질 구조 및 기능해석 1건 이상 기능 단백질 선정 2건 이상 - 극지 특이 단백질 구조분석 대상 후보 10종 이상 선정 - 극지 효소 활성 단일체 합성 5건 이상	30
논문		mrnIF 80이상 논문 편수 mrnIF 40이상 ~ 80미만 논문 편수			
계			1		100
2년차 (2021)	극지생물 유전체 해독	- 극지생물의 표준유전체지도 작성	0.2	- 비교 유전체학적 분석을 위한 레퍼런스 확립	100
		- 극지 환경시료의 메타지놈 라이브러리 확보 - 특정 단백질 활성을 고려한 극지 미생물종 선정		- 극지 메타지놈 라이브러리 제작 1건 이상 - 극지 미생물 선정 1건 이상	

	기능유전체 분석을 통한 극지생물의 특성규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 극지 메타지놈 기능 기반의 단백질 탐색기술 응용</li> <li>- 기능 단백질 군의 세포내 시너지 효능 검증</li> <li>- 다양한 극지환경 변화에 의한 발현전사체 및 단백질체 변화 분석</li> <li>- 서열 유사도 및 발현정보 기반 목표유전자군 발굴</li> <li>- 극지 유용유전자의 구조 및 기능 규명</li> </ul>	0.2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 효소활성 스크리닝을 통한 유전자 탐색 5건 이상</li> <li>- 세포 활성 증진 연구 1건 이상</li> <li>- 극지적응 유전자 발굴 5건</li> <li>- 다양한 극지환경 변화에 의한 발현전사체 및 단백질체 변화 분석</li> </ul>	100
	극지 유전체 상용화 기반구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유용 활성 단백질의 활성기작 해석</li> <li>- 프로티움 분석법에 의한 기능 단백질군 탐색</li> <li>- 극지 메타지놈을 활용한 기능 기반의 신규 효소 탐색기술 확립</li> <li>- 활성 단일체의 극지효소 처리를 통한 기질 개선, 화학 구조 분석 및 가치 검증</li> </ul>	0.3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 단백질 구조 및 기능해석 1건 이상 기능 단백질 선정 2건 이상</li> <li>- 극지 특이 단백질 구조분석 대상 후보 10종 이상 선정</li> <li>- 극지 효소 활성 단일체 합성 5건 이상</li> </ul>	100
	논문	mrnIF 80이상 논문 편수	0.3	1편 출판	100
		mrnIF 40이상 ~ 80미만 논문 편수		2편 출판	
	계		1		100
3년차 (2022)	극지생물 유전체 해독 및 활용가치 증대	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 극지생물 유전체 고도화</li> <li>- 극지 환경시료의 메타지놈 라이브러리 확보</li> </ul>	0.25	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 남극조새풀 유전체 어셈블리 고도화</li> <li>- 남극 어류 유전체 에셈블리 고도화</li> <li>- 극지 환경시료(남극 세종 과학기지 주변의 이끼 근권토양) 유래 메타지놈 라이브러리 1건 제작</li> <li>- 극지 미생물 PAMC 균주 중에서 lichen과 해수에서 분리된 275종의 미생물 유전체를 이용하여 극지 환경시료 유래 활성 확인</li> </ul>	100
	기능유전체 분석을 통한 극지생물의 특성규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유용 유전자군의 세포 내 기능 분석 및 실용화 가능성 검증</li> <li>- 단백질 기능 기반의 유전자 탐색</li> </ul>	0.1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 극지 메타지놈 라이브러리에서 기능성 기반 탐색기술을 활용한 기능성 효소 단백질 유전자 16건 확보</li> <li>- 극지 미생물 유래 SSB (single strand DNA binding protein)의 기능성 분석 1건</li> <li>- 전사체 및 세포 구조 분석</li> </ul>	100

				을 통한 극지식물 유전자원의 기능 검증 5건 이상	
극지 유전체 상용화 기반구축	- 유용 활성 단백질의 활성기작 해석	0.3	- 분자동역학을 이용한 고효성 결빙방지 단백질의 고효성 특성 연구 - 극지미생물 유래의 신규 esterase의 구조분석을 통한 활성기작 해석 1건 - 남극 이끼 유래 테르페노이드 생합성 효소인 SuTPS의 활성 검증 1건 (특허출원)	100	
논문	mrnIF 80이상 논문 편수	0.35	2편 출판	100	
	mrnIF 40이상 ~ 80미만 논문 편수		2편 출판		
계		1		100	



나. 연구내용 및 달성실적

(1) 1차연도

성과목표1. 극지 생물 유전체 해독

□ 연구내용 1-1. 극지 고등생물 유전체 해독

가) 남극암치의 유전체 분석

○ 남극암치의 유전체 분석

- 남극암치는 본 연구진에 의해 2세대 시퀀싱 방법인 Illumina short read 시퀀싱을 활용하여 유전체 정보가 해독된 바 있으나, 비교 집단 유전체 연구를 위해서는 정확한 고품질의 참조(reference) 유전체 지도가 필수. 이에 본 과제에서는 3세대 시퀀싱 방법인 long read 시퀀싱 방법을 적용하여 남극암치의 유전체 지도 제작

○ 남극암치의 집단유전체 분석을 통해 생물학적 계층에 따른 환경적응과 진화 특성 규명

- 집단유전학적 연구는 개체군(집단) 수준에서 나타나는 유전자 형질, 분포의 변화 양상을 연구하는 분야로 종간 비교 연구에서는 밝히기 어려운 개체과 집단 등 생물학적 계층 구조에 따른 보다 미시적인 유전자 변이와 환경 적응 기작을 확인

나) 남방코끼리해표 *Mirounga leonina*의 고품질 유전체 분석

○ 선행 연구를 통하여 남방코끼리해표의 전사체정보를 확보하였고 4 종의 기각류 북방코끼리해표, 남극물개, 웨델해표, 바다코끼리의 전사체정보를 비교한 결과 4,511개의 기각류 내 공유유전자와 758개의 남방코끼리해표 특이적 유전자를 확보

○ 본 연구 결과를 통하여 북아메리카 태평양 해안에 서식하는 두 종의 코끼리물범속 내 다른 한 종인 북방코끼리해표와의 비교유전체학적 분석을 통하여 남방코끼리해표의 저온 적응 매커니즘 규명 가능

○ 바다소, 물범, 바다코끼리 등과 같은 수생포유류의 육지에서 수생 환경으로의 적응 과정 중 확장 및 손실된 유전자 및 유전자군의 발굴을 통하여 수생 포유동물의 진화 과정을 이해할 수 있음

○ 저온 환경 적응을 위하여 체내 유익 지방 함량을 높이는 방향으로 진화하는 과정 중 획득한 극지 물범 특이적 지질대사를 이해함으로써 이상지질혈증 등과 같은 지질 대사 관련 질병에 대한 이해할 수 있음

□ 연구내용 1-2. 남극이끼 *Sanionia uncinata*의 고품질 유전체 분석

○ 남극 이끼 *Sanionia uncinata* Y3 라인의 유전체 분석

- 남극에 서식하는 이끼 *Sanionia uncinata*의 개체군 중 4배체인 A2 라인과 2배체인 Y3 라인의 배양체 확보 완료
- 2배체인 Y3 라인은 A2 라인의 4배체 형성 과정에 참여한 지놈 세트인 것으로 추정되며, Y3 라인이 최초로 남극에 유입된 개체군의 원형에 더욱 가까울 것으로 추정됨
- Y3 라인의 유전체 분석을 통해 남극 식생의 다배체 형성과 관련 지놈 수준 진화 과정과 유전자의 기능적 차이 규명 가능

○ 남극나뭇잎이끼 *S. uncinata*의 집단비교유전학적 분석을 통한 적응 진화 과정 추적

- *S. uncinata*의 집단 표현형질 및 개체군 형질 비교를 위해 극지역 및 타지역의 대표개체군집의 배양체 확보
- 지리분포 및 haplotype을 고려한 대표군집을 선정하고 샘플 확보



<p>- 개체군별 배양체의 배양조건 수립</p>
<p><input type="checkbox"/> 연구내용 1-3. 극지 환경시료의 메타지놈 라이브러리 확보</p> <p>○ 극지 환경에서 살고 있는 지의류와 극지식물의 근권 토양, 극지동물의 장내환경 등의 환경시료의 메타지놈 라이브러리 제작</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 극지의 특이 환경별 시료 채취 및 순수 메타지놈 DNA 추출을 위한 프로토콜을 확립</li> <li>- 메타지놈 라이브러리에 적절한 fosmid 벡터를 선정하고 메타지놈 라이브러리를 제작</li> <li>- 스크리닝 작업의 효율성을 증가시키기 위해서 메타지놈 라이브러리 제작시 자동화장비를 이용하여 다양한 방식의 3D pooling 라이브러리를 제작</li> </ul> <p>○ 극지 메타지놈의 유전체 분석 및 대사지도 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 극지 환경시료의 메타지노믹스(환경미생물 유전체 분석)을 통하여 미생물군의 생리학적 경로에 해당하는 대사지도 작성</li> <li>- 메타지노믹스 정보를 활용하여 환경 특이적 유전자군 선별 및 유용 유전자 선정</li> </ul>
<p><input type="checkbox"/> 연구내용 1-3. 특정 단백질 활성을 고려한 극지 미생물종 선정</p> <p>○ 극지 미생물의 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 극지 환경시료를 확보하여 미생물군의 순수 분리를 위해 실험실로 이동</li> <li>- 호기적 조건과 혐기적 조건에서 각 특성에 맞는 배양법으로 전체 배양하여 상대적으로 개체수가 적은 종의 증식유도</li> <li>- 세포의 효소활성 또는 특정 환경에서의 세포활성을 촉진하는 요인에 의해 특이적인 생명반응성을 나타내는 개체를 순수 분리</li> </ul>
<p><b>성과목표2. 기능유전체 분석을 통한 극지 생물 특성 규명</b></p>
<p><input type="checkbox"/> 연구내용 2-1. 남극어류의 극지 환경 적응 유전자의 기능 분석</p> <p>○ 남극어류 특이적 환경 적응 유전자 선별</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 남극어류와 비극지어류의 유전체 비교를 통하여 저온, 극단적인 광주기, 높은 활성산소 농도 등의 극한 환경에 적응하기 위하여 확장 및 손실된 유전자를 확인</li> <li>- 남극 어류 특이적 결빙방지단백질 뿐 아니라 난 발생 중 저온 저항을 갖게 하는 난보호 단백질의 지놈 내 연속적 확장 발견</li> <li>- 저온 환경 적응 과정 중 발생하는 세포내 활성산소에 의한 세포 손상을 줄이기 위한 항산화방어기작 내 유전자의 확장 확인</li> </ul> <p>○ 선별된 환경 적응 유전자의 형질전환체 제작을 통한 기능 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 남극 빙어 지놈에서 세포 내외에서 발생된 활성산소의 직접적인 포획을 통한 제거, 구조 변화, 다양한 항산화효소의 발현 촉진 등의 기능을 갖는 것으로 알려진 Superoxide dismutase (SOD) 유전자 중 SOD3 의 확장 발견</li> </ul>
<p><input type="checkbox"/> 연구내용 2-2. 남극선태류의 스트레스저항성 유전자의 기능 분석</p> <p>○ 남극 이끼 AP2 유전자군 과다발현체의 건조저항성 정량화를 통한 기능성 유전자 타겟 선별</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 선행연구에서 남극 이끼 유래 AP2 유전자군 18개 유전자를 과발현하는 모델이끼 형질 전환체를 제작하여 이들의 저온 저항성을 분석</li> <li>- 남극 이끼 유래 AP2 유전자들의 건조환경 관련 기능성 검정을 위해, 해당 분야 전문가인 연세대 김우택 교수 연구팀과의 위탁연구 수행</li> </ul> <p>○ 남극이끼의 환경반응유전자의 발현 분석</p>

- 남극낫깃털이끼의 계절변동 전사체 결과를 바탕으로 남극낫깃털이끼는 DEG(differentially expressed gene)중 12%의 유전자군이 겨울시기에 해당하는 4월~9월에 발현 확인
- 이들 중 ABA 생합성과 관련된 유전자(ABI3, CYP707A1, FIE 등)는 식물의 종자휴면에 관여하는 식물의 발달과정에서 매우 중요한 유전자군으로서 남극낫깃털이끼의 연중전사체 변화에서 낫깃털이끼가 휴면과 상관관계가 매우 높음 확인

연구내용 2-3. 효소 단백질 기능 기반의 유용 유전자 탐색

- 효소 기질 배지 및 합성 기질을 이용한 HTS(high-throughput screening, 고효율 스크리닝) 시스템 구축
  - CAZyme 효소군: 다당류(cellulose, chitin, xylan 등) 가수분해 및 당전이 반응에 관여하는 효소의 탐색 및 특성 분석
  - Lipase/Esterase 효소군: olive oil 혹은 tributyrin 등이 포함된 배지를 이용하여 효소 탐색, p-nitrophenyl palmitate(pNPP) 등의 합성기질을 활용하여 활성 탐색.
- 효소 활성 클론의 유전자 분석 및 타겟 단백질 확보
  - 단백질 기능 기반 스크리닝을 통하여 활성 클론을 확보하고 해당 fosmid clone의 유전자 정보를 분석
  - 트랜스포존(transposon)을 이용한 유전자 강제발현 및 선별 기술에 의한 활성 단백질의 탐색 및 발굴
  - 대장균을 이용한 타겟 단백질의 고발현 생산 시스템 확립을 위한 배양 및 발현 조건 검토

연구내용 2-4. 유용 유전자에 의한 발현단백체 분석을 통한 활성증진 연관요인 분석

- 극지 생물특성의 단백질체 분석 전략
  - 단백질체의 개별 단백질 전개를 위해 일차적으로 이차원 전기영동 기법을 활용하고 특정 단백질의 확인 또는 발현후 수식의 확인에는 특정항체를 사용한 western blot 기법과 면역침전법을 사용
  - 이차원 전기영동법으로 단백질체를 분석하는 경우 이차원 전기영동 이미지 분석은 Bio-Rad사의 PDQuest v8.1을 사용함

**성과목표3. 극지 유전체 상용화 기반구축**

연구내용 3-1. 극지식물의 미세먼지 저감기능 관련 유전자원 탐색

- 이끼 4종(국내 자생종 2종: 깃털이끼, 양지이끼, 극지유래이끼 2종)을 바이오리액터를 사용하여 대량배양하여 충분한 양의 배양체를 만들고, 동일질량의 이끼배양체를 구형의 PVC-mesh 백에 넣어, 높이를 달리하여(예: 2m, 6m, 15m) 실외 설치한 후 8주간 샘플링, IC, LC 등을 사용하여 시계열에 따른 오염물질 축적량 추적

연구내용 3-2. 유용 활성 단백질의 활성기작 해석

- 유용 활성 단백질의 생화학적 특성 규명
  - 효소 활성에 대한 기질 다양성 조사 및 활성 비교 조사
  - 재조합 단백질의 최적 활성 반응 조건에 대한 조사 및 분석
  - 효소 단백질의 기질에 대한 특이성과 역학 분석

- 유전자 분석을 통해 극지환경 특이적 단백질 타겟 선정
  - 재조합 단백질 발현 및 정제 프로토콜 확립
  - 단백질의 정성분석
- 타겟 단백질의 구조 분석을 위한 결정화 조건 탐색
  - 정제된 단백질은 결정화 로봇(모스키토 장비) 을 이용하여 2천 가지 이상의 조건을 Screening 하여 단백질 결정을 확보
  - 확인된 단백질 결정은 한국기초과학지원연구원(KBSI) 의 X-ray 장비를 이용하여 회절 여부를 테스트
- 단일 결정으로부터 X-선 회절 데이터 수집
  - 포항가속기 연구소(PAL), 일본의 Photon factory 또는 미국의 Argonne National Laboratory's Advance Photon Source (APS) 방사광을 이용하여 고 에너지의 X-선으로부터 단백질 결정의 회절 데이터 수집
  - Se-Met 치환된 단백질에서 multi-wavelength anomalous diffraction (MAD) data를 얻어 phase 문제를 해결
- 타겟 단백질의 고해상도 삼차구조 해석 및 분석
  - 단백질 구조 결정: Solve, Resolve, MOLREP, Auto Sharp, arp/wARP, CNS, REFMAC, BUSTER-TNT 등의 program을 이용하여 phase계산과 refinement를 수행
  - 단백질의 3차 구조를 결정한 후 활성 부위, 기질결합 상호작용에 중요한 부위를 확인 및 활성을 향상 시킬 수 있는 돌연변이 위치 디자인
  - 구조정보를 통해 찾아낸 활성 또는 상호작용 부위를 돌연변이 단백질들을 이용한 생화학적 실험을 통해 검증
- 중온성 또는 고온성 유사 단백질들과의 구조 비교분석을 통해 극지환경 적응 기작 유추
- 단백질 공학방법을 이용한 기능 개선형 저온성 효소 개발
  - 저온성 효소의 구조-기능 상관관계 분석 후 목적에 맞게 단백질의 재설계
  - 효소의 안정성과 활성을 변화: 효소의 기질 결합부위 잔기의 돌연변이체 제작

연구내용 3-3. 프로티옴 분석법에 의한 기능 단백질군 탐색

- 발현 단백질 분석에 의한 기능성 단백질 발굴
  - 극지 생명체의 생명특성을 유도하는 극지 특이적 환경요인을 적용하여 단백질 발현상의 특이점을 나타내는 단백질 또는 단백질 군을 요약정리한 후 특정 환경요인에 부합하여 발현되는 특정 단백질을 선정하여 유용 유전자원 후보로 발굴

(2) 2차연도

**성과목표1. 극지 생물 유전체 해독**

- 연구내용 1-1. 극지 고등생물 유전체 해독
  - 남극실버피쉬(*Pleuragramma antarcticum*)의 전장 유전체 해독
    - 유전체 완성도 지표를 높이고, 유전자 Annotation을 진행
  - 심해어류의 전장 유전체 해독
    - long read, RNA-seq 등 고품질 유전체 정보 확보
  - 남극암치의 집단유전학 적용 마커 개발
    - 남극 킹조지섬 연안 개체군에 적용 가능한 집단유전학 마커 개발

<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 남극종새풀 유전체 어셈블리 고도화 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2차년에 확보한 유전체 신규 어셈블리 데이터가 9000여 개 scaffold로 구성되어 있으므로, 최종 scaffold 개수를 줄이기 위한 Hi-C 분석 수행을 통해 어셈블리 품질 고도화 진행</li> </ul> </li> <li>○ 북극 식물 유전체 신규 어셈블리 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 북극 식물의 저온, 건조 환경 적응 기작 이해를 위한 북극 식물 1종의 유전체 분석</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 연구내용 1-2. 극지 환경시료 메타지놈 라이브러리 확보</li> <li>○ 극지 환경시료의 메타지놈 라이브러리 확보 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 극지 환경에서 서식하는 다양한 미생물의 유전자를 확보하고, 유전자 발현 및 기능에 대해서 단백질 수준으로 탐색할 수 있도록 대장균 fosmid library를 확보.</li> <li>- 남극식물의 근권토양시료를 이용하여 근권 미생물의 메타지놈 라이브러리를 제작</li> </ul> </li> </ul>
<b>성과목표2. 기능유전체 분석을 통한 극지 생물 특성 규명</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 연구내용 2-1. 남극 생물의 극한 환경 적응 유전자의 기능 분석</li> <li>○ 남극검은지느러미빙어(<i>Chaemochephalus aceratus</i>) 유전체 정보를 활용한 극한 환경적응 유전자발굴 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 비교유전체학적 연구를 통한 남극 어류 유전체내 SOD3 유전자 확장 진화 과정 이해</li> <li>- SOD3 단백질 정제 후 골밀도, 고혈압, 항산화기작등의 남극 어류 특이적 생리기작과 관련된 기능 여부 확인</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 연구내용 2-2. 유용유전자군의 세포 내 기능 분석 및 실용화 가능성 검증</li> <li>○ 남극 이끼 유래 테르페노이드 생합성 효소인 SuTPS 유전자의 조절네트워크 검증 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 환경요인에 따른 SuTPS의 전사조절 확인</li> <li>- 형질전환체를 사용한 VOC변화 프로파일을 통해 실용화 가능한 VOC 후보군 선정</li> </ul> </li> <li>○ 남극 산술이끼 활성화 부위 도입 유전자 기능 검증 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 산술이끼 plastocyanin과 PaMBF1c 유전자 2종을 활용한 환경스트레스 관련 표현형과 기능 비교 분석</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 연구내용 2-3. 단백질 기능기반의 유전자 탐색</li> <li>○ 효소 활성 기반의 스크리닝 기술개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 극지토양 및 PAMC 미생물의 메타지놈 라이브러리를 이용하여 분해활성 효소(esterase, protease, laccase 등) 유전자를 가지는 클론 스크리닝을 위한 최적 조건 검증</li> <li>- 메타지놈 라이브러리 클론의 pooling culture를 통한 기능성 탐색 방법을 시도함으로써 새로운 HTS (High Throughput Screening) 기법을 개발하고자 함</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 연구내용 2-4. 단백질 발현패턴 분석에 의한 유용 유전자의 세포내 안정성 평가</li> <li>○ 단일 지표 유전자 도입에 의한 세포내 단백질 변화 추적 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 단백질 발현패턴의 종합적 분석</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 연구내용 2-5. 극지 유용유전자의 구조 및 기능 규명</li> <li>○ Esterase 2종 구조 리파인 완료 및 구조 비교 분석(WP__068632277.1, WP__062000720.1) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유사 다른 구조와 비교 분석</li> <li>- 기질 또는 기질 유사물질 저해제와의 복합체 구조 분석 또는 모델링</li> </ul> </li> <li>○ 극지 어류 유래 결빙방지단백질의(AFGP) 구조 분석 수행</li> </ul>

- Lectine + AFGP 복합체 구조분석 및 생화학적 활성 분석

### 성과목표3. 극지 유전체 상용화 기반구축

연구내용 3-1. 유용 활성 단백질의 활성기작 해석

○ 남극 이끼 유래 테르페노이드 생합성 효소인 SuTPS의 활성 검증

- 2종 이상의 SuTPS의 재조합단백질의 in vitro 활성 분석

- 남극 이끼 유래 SuTPS를 모델 식물에 도입하여 식물의 VOC 대사체 변화 검증

연구내용 3-2. 유용 활성 단백질의 활성기작 해석

○ Esterase 2종의 활성 특성 분석(WP\_068632277.1, WP\_062000720.1)

- 기질 특이성 분석

- 돌연변이체 제작을 통한 기질 특이성 변화 유도

연구내용 3-3. 프로티옴 분석법에 의한 기능 단백질군 탐색

○ 기능 단백질 도입에 의한 세포 반응성 분석

- 생리학적 변화 및 세포활성 분석

연구내용 3-4. 극지 어류 유전자원 활용 기술개발

○ 남극대리석무늬암치(*N. rossii* 및 남극메컬빙어(*C. gunnari*)의 활성 부위로부터 유용물질 분리

- 주름개선 활성 및 항생 활성이 확인된 어류의 부위별 추출물에 대하여 silica gel, sephadex LH-20, ODS-A, HPLC 등 다양한 크로마토그래피 기법을 이용하여 활성을 나타내는 단일 화합물을 분리

- 또한 활성 물질 외에도 oxylipins, vitamin D 유도체, alkaloids 등 부위별 추출물이 갖는 독특한 단일 화합물들을 정제 및 분리하여 극지 어류 내에 특이적으로 존재하는 화합물을 탐색

- 분리된 화합물들에 대해 NMR, UV, IR 및 MS 등의 정보를 얻어 구조 결정

- 극지 효소 처리로 주요 작용기에 변형을 유도하여, 분리된 유용물질의 대량 확보 가능성에 대한 연구 진행

- 최종적으로 2종의 극지 어류로부터 특정 활성을 갖는 유용물질 및 신규 화합물을 분리하고 대량 확보를 가능하게 하여 극지 어류의 의·약학 및 산업적 이용 가치를 검증

### (3) 3차연도

### 성과목표1. 극지 생물 유전체 해독

연구내용 1-1. 남극메컬빙어의 유전체 분석 해독

○ 극지어류 1종의 유전자 지도 작성

- *Champscephalalus gunnari*의 유전체 지도 작성

○ 어셈블리 결과

- Long read assembly와 Genome polishing 및 Hi-C 분석을 통해서 높은 정밀도의 유전체 지도를 작성하였다. 그 결과 약 965Mb를 이루는 80개의 Scaffold를 확보하였으며, 전체 유전체의 98.89%를 차지하는 대략 24개의 Scaffold를 확인할 수 있었다 (그림 3). 이를 사용하여, Gene annotation 작업을 진행할 예정이며, 기존 극지어류와 유전자 수준에서

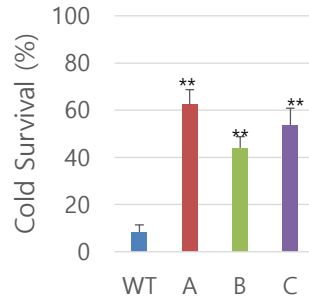


<p>비교연구를 통해서 남극 어류의 특이한 진화 방식에 관여된 유전자들을 하나씩 찾아 나아갈 예정이다.</p>
<p><input type="checkbox"/> 연구내용 1-2. 극지 고등생물 유전체 해독</p> <p><input type="checkbox"/> 남극좁새풀 유전체 어셈블리 고도화</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 현화식물 중 남극에서 가장 우점하는 남극좁새풀은 벼과 식물이며 환경변화에 민감한 생태지표종으로 알려져 있음</li> </ul>
<p><input type="checkbox"/> 연구내용 1-3. 극지 환경시료의 메타지놈 라이브러리 확보</p> <p><input type="checkbox"/> 극지 미생물 PAMC 균주 중에서 lichen과 해수에서 분리된 275종의 미생물 유전체를 이용하여 극지 메타지놈 라이브러리 제작</p> <p><input type="checkbox"/> 극지 환경시료(남극 세종과학기지 주변의 이끼 근권토양) 유래 메타지놈 라이브러리 1건 제작(384 plate에서 10,752 클론 이상 확보)</p>
<p><b>성과목표2. 기능유전체 분석을 통한 극지 생물 특성 규명</b></p>
<p><input type="checkbox"/> 연구내용 2-1. 남극 생물의 극한 환경 적응 유전자의 기능 분석</p> <p><input type="checkbox"/> Superoxide dismutase(SOD)는 박테리아부터 인간까지 대부분의 생체 내 존재하는 강력한 항산화효소로 생체내에서 발생된 활성산소의 제거 및 분해 기능을 하는 것으로 알려져 있고, 항산화 작용에 필요한 조효소 및 작용 위치에 따라 SOD1(Cu-Zn SOD, 세포질), SOD2(Mn-SOD, 미토콘드리아), SOD3(Cu-Zn SOD, 세포외부) 3가지 type으로 분류됨</p>
<p><input type="checkbox"/> 연구내용 2-2. 유용 유전자군의 세포 내 기능분석</p> <p><input type="checkbox"/> 남극 산술이끼 유전자 PaPC의 우수기능 활성화 부위 도입 후 기능 검정</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1차원에 구축한 담배잎을 활용한 검정시스템으로 애기장대 AtPC 유전자의 일부 아미노산을 교정한 단백질 제작</li> </ul>
<p><input type="checkbox"/> 연구내용 2-3. 유용 유전자군의 세포 내 기능분석</p> <p><input type="checkbox"/> 남극낮깃털이끼 <i>Sanionia uncinata</i> 에서 남극의 계절에 따른 환경적응 유전자들의 발현 분석 및 세포소기관 구조 변화 비교</p>
<p><input type="checkbox"/> 연구내용 2-4. 효소 단백질 기능 기반의 유용 유전자 탐색</p> <p><input type="checkbox"/> 극지 메타지놈 fosmid 라이브러리 유래의 기능성 효소 단백질 유전자 발굴</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 효소의 기질을 포함한 배지를 이용하여 활성 스크리닝 기법을 통하여 지질분해 효소(Lipase) 및 색소 (yellow, blue, red pigment) 를 생산하는 클론 16종을 발굴</li> </ul>
<p><input type="checkbox"/> 연구내용 2-5. 다양한 극지환경 변화에 의한 발현전사체 및 단백질체 변화 분석</p> <p><input type="checkbox"/> 극지 미생물 유래 LEA(Late Embryogenesis-Abundant) 단백질</p>
<p><b>성과목표3. 극지 유전체 상용화 기반구축</b></p>
<p><input type="checkbox"/> 연구내용 3-1. 유용 활성 단백질의 활성기작 해석</p> <p><input type="checkbox"/> 남극 이끼 유래 테르페노이드 생합성 효소인 SuTPS의 활성 검증</p>
<p><input type="checkbox"/> 연구내용 3-2. 유용 활성 단백질의 활성기작 해석</p>

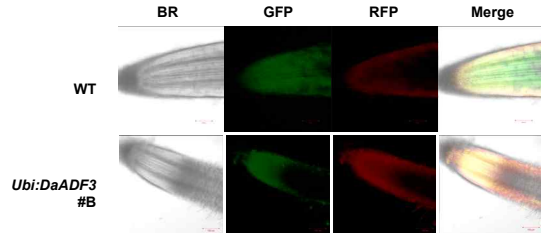
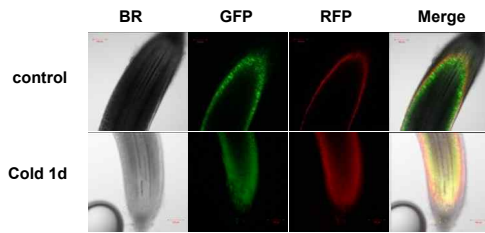
○ 극지미생물 유래의 신규 esterase의 구조해석 및 돌연변이 제작을 통한 기능성 분석
□ 연구내용 3-3. 유용 활성 단백질의 활성기작 해석
○ 고효성 결빙방지 단백질의 구조해석 및 활성 기작 규명
□ 연구내용 3-4. 저온성 esterase 효소 구조 분석 및 활성과의 상호 관계 규명
○ S-formylglutathione hydrolase (BuSFGH) (Burkholderiaceae sp.)의 생화학적 특성 기질 특이성 분석
□ 연구내용 3-4. 극지 어류 유래 추출물의 활성분석
○ 극지 어류 Trematomus bernacchii (T. B.)와 Trematomus newnesi (T. N.)로부터 alcohol 추출 및 생리 활성 분석

다. 1단계 대표적 우수성과 : 대표적 사례 3건 이내, 건당 1장 이내 작성

우수성과 - 1.	남극좀새풀 유래 냉해 저항성 핵심유전자 기능 규명 (Frontiers in Plant Science, IF 5.7, JCR rate 상위 6.84% 게재)
성과 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 남극좀새풀에서 남극 필드 조건과 저온, 건조 등 여러 환경스트레스에 의해 발현이 증가하는 ADF(Actin Depolymerizing Factor) 유전자 DaADF3을 분리하여 이를 과다발현하는 벼 형질전환 식물체를 활용하여 기능분석 수행</li> <li>○ 벼에 심각한 냉해를 미치는 온도 4°C에서 7일간 배양 후, 일반 벼는 8%만이 살아남았지만 형질전환체는 평균 53%, 최고 62%의 생존율을 보여 DaADF 유전자가 벼의 내냉성을 6배 이상 증가시킬 수 있음을 증명</li> <li>○ 저온조건에서 키운 남극좀새풀 뿌리 세포에서 액틴 구조가 단편화되는 것을 확인하였고, 이러한 현상이 정상조건의 형질전환 벼에서도 발견되었음</li> <li>○ 세포 내 액틴 구조의 변화는 세포 형태의 능동적인 변화를 용이하게 하고 세포 내 물질 수송의 통로로도 기능하여 저온 조건에서 세포 내 필요한 대사물질 수송을 원활하게 하여 환경 변화에 빠른 대처를 가능하게 하는 것으로 예상됨</li> </ul>
성과의 우수성	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 남극식물에서 유래한 환경스트레스 관련 유전자의 생화학적/유전학적 기능분석 연구를 바탕으로 남극식물의 극지 적응과 관련된 핵심 유전자원 발굴</li> <li>○ 기후변화로 인해 다양한 이상기후 현상이 더욱 빈번해질 것으로 예상되며, 냉해가 국내 벼농사의 주요한 환경재해임을 고려할 때 DaADF3은 국내 농작물 생산성 향상에 기여할 수 있는 가치가 높은 유전자원임</li> </ul>



[남극곰새풀 DaADF3을 과발현하는 벼 형질전환체의 향상된 냉해 저항성]



GFP : F-actin  
RFP : G-actin

[저온 조건에서 남극곰새풀 뿌리(좌)와 DaADF3 과발현 벼 형질전환체 뿌리(우)의 액틴 구조 변화]

증빙자료

○ 논문명

변미영, 최려화, 이안도성, 오형근, 유요한, 이정은, 김우택, 이형석. Abiotic stress-induced *Actin-Depolymerizing Factor 3* from *Deschampsia antarctica* enhanced cold tolerance when constitutively expressed in rice. *Frontiers in Plant Science*. 12:734500. doi: 10.3389/fpls.2021.734500. 2021년 9월 28일 출판. (2020 JCR 기준 IF 5.753, mrnIF 93.162)

우수성과 - 2

남극 해빙박테리아 유래 결빙방지단백질 (FfIBP) 의 활성화에 중요한 구조적 특성 규명 (*International Journal of Biological Macromolecules*, IF 6.9, JCR rate 상위 6.67% 게재)

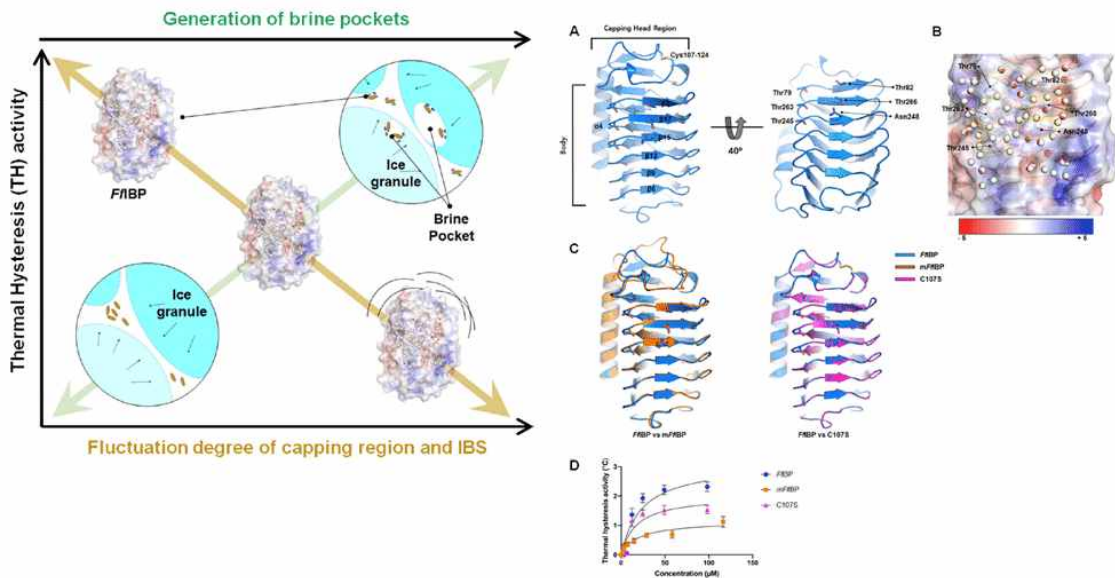
성과 내용

- FfIBP 결빙방지단백질의 Capping head region이 결빙방지활성 및 얼음 결합에 중요하다는 사실 규명
  - FfIBP 결빙방지단백질은 다른 결빙방지단백질과 달리 capping head region에 disulfide bond를 가짐
  - FfIBP 결빙방지단백질이 다른 결빙방지단백질과 달리 높은 결빙방지활성을 가지는 이유가 disulfide bond 형성에 의한 capping head region의 구조적 안정성 증가라는 사실을 C107S 돌연변이체를 이용한 활성 비교 실험으로 규명
- 컴퓨터 시뮬레이션을 이용하여 FfIBP 결빙방지단백질의 capping head region의 구조적 안정성과 결빙방지활성과의 상관관계 연구

- 세 가지 다른 FfIBP 단백질 (WT FfIBP, mFfIBP and C107S FfIBP)의 구조 모델을 이용하여 컴퓨터 시뮬레이션 수행 후 얼음결합산기의 움직임 및 변화 관찰
- FfIBP 결빙방지단백질의 capping head region 움직임이 커질수록 최적의 얼음결합을 위한 얼음결합산기의 올바른 배열을 방해한다는 사실 발견
- FfIBP 결빙방지단백질의 생물학적 기능 규명
  - 모델 박테리아에서 membrane-anchored FfIBP의 발현은 얼음생성 조건에서 다수의 brine pocket 형성 유도
  - FfIBP를 가지는 남극 해빙 박테리아는 brine pocket 형성 유도를 통해 극저온 상태에서 염 농도를 낮추어 극한 환경에서 생존율을 높일 것으로 예상됨

성과의 우수성

- 세계 최초로 고효성 결빙방지단백질과 활성이 낮은 결빙방지단백질들과의 구조적인 차이점 이해
- membrane-anchored 결빙방지단백질들의 생물학적 기능 설명
- 기능개선형 고효성 결빙방지단백질의 디자인과 개발에 활용가능



〈그림〉 FfIBP 결빙방지단백질의 capping head region의 구조적 안정성과 결빙방지활성과의 상관관계

증빙자료

- Hwang J, Kim B, Lee MJ, Kim EJ, Cho SM, Lee SG, Han SJ, Kim K, Lee JH, Do H. Importance of rigidity of ice-binding protein (FfIBP) for hyperthermal hysteresis activity and microbial survival. *Int J Biol Macromol.* 2022 Apr 15;204:485-499. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.02.032. Epub 2022 Feb 9. PMID: 35149098. (2020 JCR 기준 IF 6.953, mrnIF 94.382)

**극지어류 유래 유용 추출물의 활용**  
(국내 특허 출원 4건 완료)

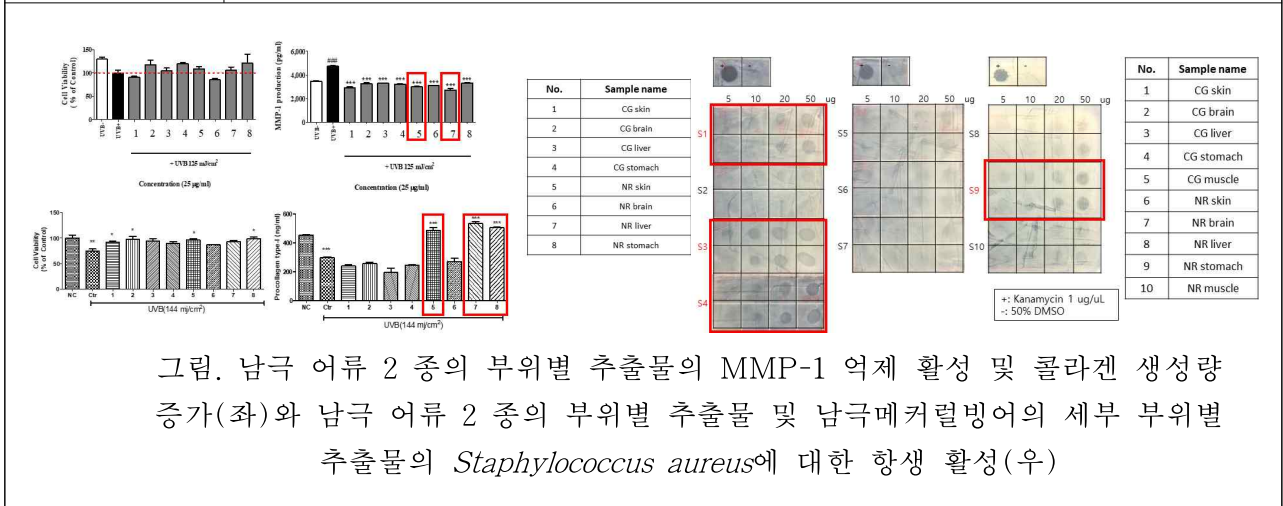
**우수성과 -3**

성과  
내용

- 남극 어류 2 종의 주름개선 효능 연구
  - 남극대리석무늬암치(*Notothenia rossii*)와 메커털빙어(*Champsocephalus gunnari*)의 추출물이 뛰어난 주름개선 활성을 나타내는 것을 확인하여, 부위별(뇌, 간, 위, 피부) 추출물에 대한 주름개선 활성을 확인
  - 남극암치의 피부 및 간 추출물이 가장 높은 MMP-1(콜라겐 합성 저해 효소) 억제 활성을 나타내었으며, 남극암치의 피부, 간 및 위 추출물이 가장 높은 콜라겐 생성량을 나타냄으로써 가장 뛰어난 주름개선 활성을 나타내는 것을 확인
- 남극 어류 4 종의 항생·항균 연구
  - 남극대리석무늬암치(*N. rossii*)와 남극메커털빙어(*C. gunnari*), 검은지느러미빙어(*C. aceratus*), 그리고 남극에메랄드암치(*T. bernacchii*)의 부위별 추출물에 대해 항생·항균 활성 평가를 진행하였으며, 그 중, 남극대리석무늬암치의 위 추출물과 남극메커털빙어 등의 장, 정소, 심장 및 쓸개 추출물이 *Staphylococcus aureus*에 대해 뛰어난 항생·항균 활성을 나타냄

성과의  
우수성

- 남극 어류 추출물의 화장품 조성물 유효성분 활용 가능성 확인
  - 남극 어류의 부위별 추출물이 낮은 농도에서도 뛰어난 주름개선 활성을 나타낼 뿐만 아니라 자외선으로부터 세포를 보호하는 것을 확인하여, 남극 어류의 피부 주름개선 기능성 화장품 소재로 충분한 가치가 있음을 확인
  - 또한 남극 어류의 부위별 추출물의 높은 항생·항균 효과는 장기간 사용에도 인체에 안전할 것으로 화장품 조성물로서의 활용 가치를 다시 한번 확인하였으며, 이는 화장품 뿐만 아니라 의약품, 의약외품, 식품 및 다목적 세정제 등에도 유용하게 활용될 수 있음
  - 2단계 연구의 핵심으로 유용 유전자원의 발굴 및 실용화 후보로 적합함



증빙자료

- 특허 출원 4건
  - 남극 메켈 빙어 추출물 또는 남극 대리석무늬 암치 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름개선용 화장료 조성물(출원 10-2021-0091068, 2021



	<p>년 7월)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 남극 메켈 빙어 추출물 또는 남극 대리석무늬 암치 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물(출원 10-2021-0102714, 2021년 8월)</li> <li>- 검은지느러미 빙어 추출물 또는 에메랄드 암치 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염증용 조성물(출원 10-2022-0119437, 2022년 9월)</li> <li>- 검은지느러미 빙어 추출물 또는 에메랄드 암치 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물(출원 10-2022_0119436, 2022년 9월)</li> </ul>
--	--



## 2. 정량적 연구성과

가. 1단계 목표 대비 달성도 예

년도 (과제 연차)	성과목표	지표	목표치 (A)	달성 (B)	가중치 % (C)	평가기준	달성도(%)	
							(D= B/A)	(D*A)
2020 (1차 년도)	극지 유전체 해독	극지 생명정보 수집 건수	1	2	20	◦ Genome coverage 90% 이상의 draft 완료된 생물 종수 ◦ KPDC 등재	100	100
	기능유전 체 분석을 통한 극지생물 의 특성규명	극지 생명자원 특성분석 건수	4	5	20	◦ 유전학적/생화학적 특성 분석 완료된 유전자/단백질 건수	100	100
	극지 유전체 상용화 기반구축	국내외 특허 출원 건수	1	3	30	◦ 신규 유전자원 유 래 원천특허 확보	100	100
	논문	mrnIF 80이상 논문 편수	1	1	15	◦ 표준화된 영향력 지수(mrnIF) 80이 상	100	100
		mrnIF 40이상~80 미만 논문 편수	1	1	15	◦ 표준화된 영향력 지수(mrnIF) 40이 상 80미만	100	100
	계					100		100
2021 (2차 년도)	극지 유전체 해독	극지 생명정보 수집 건수	1	1	10	◦ Genome coverage 90% 이상의 draft 완료된 생물 종수 ◦ KPDC 등재	100	100
		극지 생명정보 수집 건수	1	1	10	◦ 극지 미생물 메타 지놈 라이브러리 제 작	100	100
	기능유전 체 분석을 통한 극지생물 의 특성규명	극지 생명자원 특성분석 건수	4	4	20	◦ 유전학적/생화학적 특성 분석 완료된 유전자/단백질 건수	100	100
	극지 유전체 상용화 기반구축	국내외 특허 출원 건수	2	3	30	◦ 신규 유전자원 유 래 원천특허 확보	100	100
	논문	mrnIF 80이상 논문 편수	2	2	20	◦ 표준화된 영향력 지수(mrnIF) 80이 상	100	100
		mrnIF 40이상~80 미만 논문 편수	1	2	10	◦ 표준화된 영향력 지수(mrnIF) 40이 상 80미만	100	100

		계			100		100	100
2022 (3차 년도)	극지 유전체 해독	극지 생명정보 수집 건수	2	2	20	◦ Genome coverage 90% 이상의 draft 완료된 생물 종수 ○ KPDC 등재	100	100
		극지 생명정보 수집 건수	1	2	5	◦ 극지 미생물 메타 지놈 라이브러리 제 작	100	100
	기능유전 체 분석을 통한 극지생물 의 특성규명	극지 생명자원 특성분석 건수	5	5	10	◦ 유전학적/생화학적 특성 분석 완료된 유전자/단백질 건수	100	100
	극지 유전체 상용화 기반구축	국내외 특허 출원/등록수	2	3	30	◦ 신규 유전자원 유 래 원천특허 확보	100	100
	논문	mrnIF 80 이상 논문 편수	2	2.5	25	◦ 표준화된 영향력 지수(mrnIF) 80이 상	100	100
		mrnIF 40이상~80 미만 논문 편수	1	4	10	◦ 표준화된 영향력 지수(mrnIF) 40이 상 80미만	100	100
		계			100		100	100

나. 증빙자료

성과 목표	성과지표						
1. 극지 유전 체 해독	[성과지표] 극지 생명정보 수집 건수	◎ 달성도: 100%					
	[평가기준] ◦ Genome coverage 90% 이상의 draft 완료된 생물 종수 ◦ KPDC 등재 ◦ 극지 미생물 메타지놈 라이브러리 제 작	번호	성과구분	성과명	달성 건수	연도	KPDC
	[목표] 6건	1	극지 고등생물 유전체분석	남방코끼리해표 고품질 유전체 분석	1	202 0	- 논문출판 The Genome Assembly and Annotation of the Southern Elephant Seal <i>Mirounga leonina</i> (Genes, 2020) KOPRI-KPDC-00001544
		2	극지 고등생물 유전체분석	남극 이끼 <i>Sanionia uncinata</i> Y3 accession 의 draft genome 확보	1	202 0	KOPRI-KPDC-00001461
		3	극지 고등생물 유전체분석	남극실버피쉬 유전체 해 독	1	202 1	KOPRI-KPDC-00002109
		4	극지 미생물 메타지놈 라이브러리 제작	극지 메타지놈라이브러리	1	202 1	KOPRI-KPDC-00001808
		5	극지 고등생물 유전체분석	남극메컬빙어의 유전체 분석 해독	1	202 2	KOPRI-KPDC-00002108
		극지	남극검은암치 유전체 분	1	202	KOPRI-KPDC-00002110	

[달성] 8건	고등생물 유전체분석	석 및 고도화		2	
	극지 미생물 메타지놈 라이브러리 제작	Lichen과 해수 유래의 PAMC 미생물 활용	1	2022	KOPRI-KPDC-00002017
	극지 미생물 메타지놈 라이브러리 제작	극지 근권토양 유래 환경미생물 유전체 활용	1	2022	KOPRI-KPDC-00002018
2 기능 유전체 분석을 통한 극지생물의 특성 규명	◎ 달성도: 100%				
	번호	성과명	달성건수	연도	KPDC / 논문출판
	1	극지 어류의 저온적응 특성 유전자 변이 확인	1	2020	논문출판 The Genome Assembly and Annotation of the Southern Elephant Seal <i>Mirounga leonina</i> (Genes, 2020)
	2	남극 이끼 <i>Sanionia uncinata</i> 의 whole genome reference를 사용한 월별 RNA library 분석	1	2020	KOPRI-KPDC-00001543
	3	남극 이끼 <i>Sanionia uncinata</i> 의 AP2 도메인 단백질 52 종에 대한 gene phylogeny, 도메인 분석 및 계절별 발현 패턴 분석	1	2020	KOPRI-KPDC-00001613
	4	북극 지의류 유래의 지방산의 분해와 변형에 사용가능한 BoECI와 HyECH 효소의 구조-기능 연구를 통한 단백질 구조 및 기능 해석	2	2020	논문출판 2편 ○ Structural and sequence comparisons of bacterial enoyl-CoA isomerase and enoyl-CoA hydratase (J Microbiology, 2020) ○ Structural insights into the psychrophilic germinal protease PaGPR and its autoinhibitory loop (J Microbiology, 2020)
	5	극지 미생물 메타지놈 라이브러리 제작 및 발현분석	1	2021	KOPRI-KPDC-00001802-8
	6	남극 요각류의 저염 환경 적응 기작 연구	1	2021	논문출판 Physiological and molecular responses of the Antarctic harpacticoid copepod <i>Tigriopus kingsejongensis</i> to salinity fluctuations - a multi-generational study (Environmental Research, 2021)
	7	다양한 극지 환경 변화에 의한 발현전사체 및 단백질체 변화 분석	1	2021	논문출판 Abiotic stress-induced Actin - Depolymerizing Factor 3 from <i>Deschampsia antarctica</i> enhanced cold tolerance when constitutively expressed in rice (Frontiers in Plant Science, 2021)
	8	효소 단백질 기능 기반의 유용 유전자 탐색	1	2021	논문출판 Screening and Genetic Network Analysis of Genes Involved in
[성과지표]	극지 생명자원 특성분석 건수				
[평가기준]	유전학적/생화학적 특성 분석 완료된 유전자/단백질 건수				
[목표]	13건				
[달성]	13건				

					Freezing and Thawing Resistance in DaMDHAR. Expressing <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Using Gene Expression Profiling (Genes, 2021)		
	9	극지 미생물 메타지놈 라이브러리 발현분석	1	2022	KOPRI-KPDC-00002012-27		
	10	남극 낮깃털이끼의 현장 샘플의 RNA-seq 데이터	1	2022	KOPRI-KPDC-00002037		
	11	남극 낮깃털이끼의 테르페노이드 생합성하는 유전자들이 도입된 형질전환체의 VOC 프로파일	1	2022	KOPRI-KPDC-00002032		
	12	남극 미생물 생존 관련 아이스바인딩프로테인 구조 분석	1	2022	논문출판, Importance of rigidity of ice-binding protein (FfIBP) for hyperthermal hysteresis activity and microbial survival (International Journal of Biological Macromolecules, 2022)		
	13	남극 지의류 추출성분의 활성분석	1	2022	논문출판, Bioactive Terphenyls Isolated from the Antarctic Lichen <i>Stereocaulon alpinum</i> (Molecules, 2022)		
3 극지 유전체 상용화 기반 구축	<p><b>[성과지표]</b> 국내외 특허 출원/등록 건수</p> <p><b>[평가기준]</b> 신규 유전자 원 유래 원 천특허 확 보 건수</p> <p><b>[목표]</b> 5건</p> <p><b>[달성]</b> 9건</p>	<b>번호</b>	<b>발명자</b>	<b>출원번호</b>	<b>현재상태</b>	<b>기술명</b>	<b>출원 일자</b>
		1	김진형, 윤의중, 김일찬, 한세중, 구만형, 한동원	10-2022_0119436	출원	검은지느러미 방어 추출물 또는 에메랄드 암치 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물	2022-09
		2	김진형, 윤의중, 김일찬, 이준혁, 구만형, 한동원	10-2022-0119437	출원	검은지느러미 방어 추출물 또는 에메랄드 암치 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염증용 조성물	2022-09
		3	이정은, 이형석, 이예림	10-2022-012408	출원	남극 낮깃털이끼 유래 테르펜 합성효소 활용 방법	2022-09
		4	윤미섭, 김진형, 김일찬	10-2021-0119804	출원9	크릴새우 추출물을 포함하는 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물	2021-09-08
		5	김진형, 윤의중, 김일찬, 한세중, 이준혁, 구만형, 김민주, 이슬아, 강승현, 김보미	10-2021-0102714	출원	남극 메켈 방어 추출물 또는 남극 대리석무늬 암치 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물	2021-08-04
		6	김진형, 윤의중, 김일찬, 이준혁, 이슬아, 구만형	10-2021-0091068	출원	남극 메켈 방어 추출물 또는 남극 대리석무늬 암치 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름개선용 화장료 조성물	2021-07-12
		7	김진형, 김일찬, 한동원, 이준혁, 강승현, 김보미, 정지혜, 조은아	10-2020-0120017	출원	젤라틴을 포함하는 배합 사료, 그의 제조 방법과 제조 장치, 및 아쿠아리움 시스템	2020-09-17
		8	이정은, 이형석, 서수연, 김한우, 김진형	10-2021-0015673	출원	모스틀을 이용한 공기 정화 장치	2021-02-03
		9	김진형, 김일찬	10-2018-0071668	등록	극지 해양생물 아쿠아리움 시스템	2018-06-21
4	<b>[성과지표]</b>	<b>번호</b>	저자	논문명	학술지명	연도	mrnIF



<p>mrnIF 80 이상 논문 편수</p> <p>[평가기준] 표준화된 영향력 지수 (mrnIF) 80이상</p> <p>[목표] 5건</p> <p>[달성] 5.5건</p>	<p>논문</p>	1	변미영, 서수연, 이정은, 유요한, 이형석	Transfection of Arctic Bryum sp. KMR5045 as a Model for Genetic Engineering of Cold-Tolerant Mosses	FRONTIERS IN PLANT SCIENCE	2020	92.275
		2	변미영, 최려화, 이안도성, 오형근, 유요한, 이정은, 김우택, 이형석	Abiotic Stress-Induced Actin-Depolymerizing Factor 3 From <i>Deschampsia antarctica</i> Enhanced Cold Tolerance When Constitutively Expressed in Rice	FRONTIERS IN PLANT SCIENCE	2021	92.275
		3	이연희, 황지영, 김영기, 김태완, 김일남, 강승현, 김진형, 이재성	Physiological and molecular responses of the Antarctic harpacticoid copepod <i>Tigriopus kingsejongensis</i> to salinity fluctuations? A multigenerational study	ENVIRONMENTAL RESEARCH	2021	92.574
		4	Harris A. Lewin, 김진형	The Earth BioGenome Project 2020: Starting the clock	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA	2022	90.141
		5	황지섭, 김봄이, 이민주, 김은재, 조성미, 이성구, 한세중, 김기태, 이준혁, 도학원	Importance of rigidity of ice-binding protein (FfIBP) for hyperthermal hysteresis activity and microbial survival	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES	2022	94.382
		6	김홍실, 유지현, Jesse Kaleku, 이에림, 박은숙, 김한우, 이형석, 이정은	High-quality genome resource of a novel <i>Venturiaceae</i> sp. KMAF11, isolated from diseased <i>Colobanthus quitensis</i> , an Antarctic flowering plant	PLANT DISEASE	2022	88.034 (공동 사사, 50%)
<p>[성과지표] mrnIF 40이상~80 미만 논문 편수</p> <p>[평가기준] 표준화된 영향력 지수 (mrnIF) 40 이상 80미만</p> <p>[목표] 3건</p> <p>[달성] 6건</p>		번호	저자	논문명	학술지명	연도	mrnIF
	1	김일섭, 최웅, 손종현, 이준혁, 이형석, 이정은, 신승철, 김한우	Screening and Genetic Network Analysis of Genes Involved in Freezing and Thawing Resistance in <i>DaMDHAR</i> —Expressing <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Using Gene Expression Profiling	GENES	2021	70.056	
	2	Katherine A. Reed, 이성구, 이준혁, Hyun Park, Joseph A. Covi	The ultrastructure of resurrection: Post-diapause development in an Antarctic freshwater copepod	JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY	2021	68.571	
	3	이슬아, 정세윤, Dieu Linh NGUYEN, 소재은, 김기현, 김지희, 한세중, 서승석, 이준혁, 윤의중	Stereocalpin B, a New Cyclic Depsipeptide from the Antarctic Lichen <i>Ramalina terebrata</i>	METABOLITES	2022	68.367	
	4	Phi Kim Hoa, 신민지, 이슬아, 소재은, 김지희, 서승석, 구만형, 신승철, 김진형,	Bioactive Terphenyls Isolated from the Antarctic Lichen <i>Stereocaulon alpinum</i>	MOLECULES	2022	64.972	

		이준혁, 윤의중			
5	최웅, 손중현, 박애경, 김홍실, 신승철, 이준혁, 김두현, 김한우	Identification, Characterization, and Preliminary X-ray Diffraction Analysis of a Single Stranded DNA Binding Protein (LjSSB) from Psychrophilic <i>Lacinutrix jangbogonensis</i> PAMC 27137	CRYSTALS	2022	66.667
6	이슬아, 구만형, 한동원, 김일찬, 이준혁, 김정훈, 라지아, 김선여, 윤의중, 김진형	High-quality genome resource of a novel Venturiaceae sp. KMAF11, isolated from diseased <i>Colobanthus quitensis</i> , an Antarctic flowering plant	MOLECULES	2022	64.972

### 3. KPDC 등록 이행실적

데이터 이름	메타데이터 ID	메타데이터 제목	원시데이터 등록여부
Fosmid clone (PSO23-K9)	KOPRI-KPDC-00002012	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying amylase gene (PSO23-K9)	등록
Fosmid clone (PSO_Lac5C)	KOPRI-KPDC-00002013	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying laccase gene (PSO_Lac5C)	등록
Fosmid clone (PSO_Lac6E)	KOPRI-KPDC-00002014	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying laccase gene (PSO_Lac6E)	등록
Fosmid clone (PSO_Lac6H)	KOPRI-KPDC-00002015	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying laccase gene (PSO_Lac6H)	등록
Fosmid clone (PIC15-F4)	KOPRI-KPDC-00002016	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PIC15-F4)	등록
Fosmid clone (PWL12-F1)	KOPRI-KPDC-00002017	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PWL7-F10)	등록
Fosmid clone (PWL13-C7)	KOPRI-KPDC-00002018	Fosmid sequence carrying genes related with lipase gene (PWL13-C7)	등록
Fosmid clone (PIC14-H14)	KOPRI-KPDC-00002019	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC14-H14)	등록
Fosmid clone (PSO2-I10)	KOPRI-KPDC-00002020	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PSO2-I10)	등록
Fosmie clone (PIC19-A15)	KOPRI-KPDC-00002021	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC19-A15)	등록
Fosmie clone (PIC14-E21)	KOPRI-KPDC-00002022	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC14-E21)	등록
Fosmie clone (PIC7-O11)	KOPRI-KPDC-00002023	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC7-O11)	등록
Fosmie clone (PIC8-F9)	KOPRI-KPDC-00002024	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC8-F9)	등록

Fosmid clone (PSO20-P6)	KOPRI-KPDC-00002 025	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PSO20-P6)	등록
Fosmid clone (PSO2-K8)	KOPRI-KPDC-00002 026	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PSO2-K8)	등록
Fosmid clone (PSO1-A20)	KOPRI-KPDC-00002 027	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PSO1-A20)	등록
	KOPRI-KPDC-00002 032	Enhanced photosynthesis efficiency by PaPC gene substitution under salt stress	미등록
	KOPRI-KPDC-00002 037	Sanionia uncinata field samples mRNA sequencing data	등록
	KOPRI-KPDC-00002 0xx	남극 낮깃털이끼의 테르페노이드 생합성하는 유전자들이 도입된 형질전환식물의 테르페노이드 프로파일	등록
	KOPRI-KPDC-00002 032	Enhanced photosynthesis efficiency by PaPC gene substitution under salt stress	등록
	KOPRI-KPDC-00002 037	Sanionia uncinata field samples mRNA sequencing data	등록
	KOPRI-KPDC-00002 0xx	남극 낮깃털이끼의 테르페노이드 생합성하는 유전자들이 도입된 형질전환식물의 테르페노이드 프로파일	등록
	KOPRI-KPDC-00001 544	남방코끼리해포 고품질 유전체 분석	등록
	KOPRI-KPDC-00001 461	The draft genome of an Antarctic moss <i>Sanionia uncinata</i>	등록
	KOPRI-KPDC-00002 109	Antarctic silverfish genome	등록
	KOPRI-KPDC-00001 808	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC13-E19)	등록
	KOPRI-KPDC-00002 108	Meckerel icefish genome	등록
	KOPRI-KPDC-00002 110	Antarctic Blackcod genome	등록
	KOPRI-KPDC-00002 017	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PWL7-F10)	등록
	KOPRI-KPDC-00002 018	Fosmid sequence carrying genes related with lipase gene (PWL13-C7)	등록
	KOPRI-KPDC-00001 543	Transcriptome analysis on Antarctic moss, <i>Sanionia uncinata</i> in the field	등록
	KOPRI-KPDC-00001 613	The phylogenetic analysis of AP2 domains found in <i>S. uncinata</i> genome and the seasonal transcription levels of the genes containing AP2 domains	등록
	KOPRI-KPDC-00001 802	Fosmid sequence carrying lipase gene (PIC24-F4)	등록
원시데이터 등록률			98%

#### 4. 기타 성과 (점검시 참고자료)

가. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역

(2) 장·단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외

(3) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

나. 국제화/협력 성과

(1) 국내·외 공동 연구협력 실적(위탁연구 제외)

연구협력 파트너	수행 형태	연구협력 내용(목표)	수행 결과 및 우수성
Earth BioGenome Project	공동/협동	지구상 모든 진핵생물 유전체 확보	- 극지생물 유전체 분야 대표연구 기관으로 참여 - 공동논문 출판(2022, PNAS)

(2) 인력교류 성과

외국 연구자 유치				해외 파견			
유치기간(월)	국적	학위	전공	파견기간(월)	파견국	학위	전공
2	칠레	석사	생물정보학				

○ 달성실적 상세내용(의의, 기대효과 등)

- 칠레 극지연구소 INACH 소속 연구원 2인, KOPRI 펠로우쉽 수혜 및 공동연구 수행
- 극지 해양어류 자원 증강을 위한 마이크로바이옴 연구 수행

(3) 학술회의 개최 성과

명칭	기술분야	규 모			개최장소	지원금액 (백만원)
		참가국	인원	기간(일)		

(4) 국제협력 성과

MOU 체결			수요조사			공동연구	
대상국	대상기관	수집자료(건)	대상국	과제접수(건)	과제도출(건)	대상국	협약연구비 (백만원)
			칠레	3	2	칠레	

○ 달성실적 상세내용(의의, 기대효과 등)

- 칠레 극지연구소 INACH 소속 연구원 2인, KOPRI 펠로우쉽 수혜 및 공동연구 수행
- 극지 해양어류 자원 증강을 위한 마이크로바이옴 연구 수행
- 공동 논문 출판 및 상호 인력 및 연구 교류예정

(5) 기타 성과

- mrnIF 40 미만 논문 SCIE & KCI

번호	저자	논문명	학술지명	mrnIF
1	황지섭, 정창숙, 이창우, 신승철, 김한우, 이성구, 윤의중, Chang Sup Lee, Tae-Jin Oh, Hak Jun Kim, Hyun Park, Hyun Ho Park, 이준혁	Structural and sequence comparisons of bacterial enoyl-CoA isomerase and enoyl-CoA hydratase	JOURNAL OF MICROBIOLOGY	33.33
2	조은아, 조일환, 이성재, 최은경, 김정훈, 지영민, 김진형, 박현	The complete mitochondrial genome of the Antarctic marbled rockcod, <i>Notothenia rossii</i> (Perciformes, Nototheniidae)	MITOCHONDRIAL DNA PART B-RESOURCES	4.624
3	이승재, 임태울, 조은아, 최은경, 지영민, 김진형, 김정훈, 박현	The complete mitochondrial genome of <i>Macrourus whitsoni</i> (Gadiformes, Macrouridae)	MITOCHONDRIAL DNA PART B-RESOURCES	4.624
4	최은경, 박승희, 이승재, 조은아, 김진무, 김정훈, 김진형, 임종석, 박현	The complete mitochondrial genome of Patagonian moray cod, <i>Muraenolepis orangiensis</i> Vaillant, 1888 (Gadiformes, Muraenolepididae)	MITOCHONDRIAL DNA PART B-RESOURCES	4.624
5	이창우, Saeyoung	Structural insights into the	JOURNAL OF	33.33

	Lee, 정창숙, 황지섭, Jeong Ho Chang, In-Geol Choi, T. Doohun Kim, HaJeung Park, Hye-Yeon Kim, 이준혁	psychrophilic germinal protease PaGPR and its autoinhibitory loop	MICROBIOLOGY	
6	김진무, 장성민, 최은영, 조은아, 이성재, 김선희, 지영민, 김진형, 박현	The complete mitochondrial genome of Eaton's skate, <i>Bathyraja eatonii</i> (Rajiformes, Arhynchobatidae)	MITOCHONDRIAL DNA PART B-RESOURCES	4.624
7	강승현, 조은아	DNA Barcoding of Antarctic Freshwater Copepod <i>Boeckella poppei</i> (Crustacea: Copepoda: Calanoida: Centropagidae) Inhabiting King George Island, South Shetland Islands, Antarctica	한국동물분류학회지 (KCI)	





## 5. 1단계 연구결과 (실적)

성과목표	성과지표
<p>자체 종합 평가 의견</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 계획 대비 초과 목표 달성하였으며, 2단계 종료시 최종 성과목표인 기술이전 후보물질/기술 발굴이라는 목표 달성을 위해 매진하고자 함</li> <li>○ 목표 달성을 위해 2단계 연구수행의 핵심 전략을 수립완료 함</li> </ul>
<p>1차년 (2020년) 성과 및 의의</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 계획된 극지 생물의 유전체 해독 수행 완료</li> <li>○ 극지생물의 기능 유전체 분석을 통한 극지 생물의 특성 규명 연구 수행 완료</li> <li>○ (위탁과제 이병하) 산술이끼 MBF1c 유전자의 스트레스 저항성 기능 검증을 성공적으로 수행하여 극지 생명자원 특성 분석에 기여</li> <li>○ (위탁과제 Joseph A. Covi) (위탁과제 Joseph A. Covi) 남극 담수 요각류 배아가 휴면상태에서 깨어나는 기작분석과 환경오염 물질이 끼치는 영향을 성공적으로 수행하여 극지 생명자원 특성 분석에 기여</li> </ul>
<p>2차년 (2021년) 성과 및 의의</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 계획된 극지생물의 유전체 분석 연구수행 완료</li> <li>○ 극지생물의 기능 유전체 분석을 통한 극지 생물의 특성 규명 연구수행</li> <li>○ 극지생물 유래 유전자원 활용기반 구축 연구수행</li> <li>○ (위탁과제 이병하) 산술이끼 PC 유전자의 스트레스 저항성 기능 검증을 성공적으로 수행하여 극지 생명자원 특성 분석에 기여</li> <li>○ (위탁과제 현유봉) 남극낫깃털이끼의 휘발성 유기화합물 탐색 및 유전체 탐색을 통해 유용유전자군 분석을 효율적으로 수행하여 극지 생명자원 특성 분석에 기여</li> <li>○ (위탁과제 Joseph A. Covi) 남극 담수 요각류 배아의 보존에 영향을 끼치는 외부 환경적 요인을 성공적으로 분석하여 극지 생명자원 특성 분석에 기여</li> </ul>
<p>3차년 (2022년) 성과 및 의의</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 극지생물의 유전체 해독 수행 완료</li> <li>○ 극지생물의 기능 유전체 분석을 통한 극지 생물의 특성 규명</li> <li>○ 극지생물 유전체 유래 상용화 후보 물질/기술 발굴</li> <li>○ (위탁과제 이병하) 산술이끼 PC 유전자의 활성부위 탐색과 기능 검증을 성공적으로 수행하여 극지 생명자원 특성 분석에 기여</li> <li>○ (위탁과제 현유봉) 남극낫깃털이끼의 테르페노이드 생합성 유전자의 기능성 규명을 성공적으로 수행하여 극지생명자원의 유용성 증명</li> <li>○ (위탁과제 Joseph A. Covi) 남극 담수 요각류 배아의 휴면상태에 영향을 미치는 생리학적 인자 분석을 효율적으로 수행하여 극지 생명자원 특성 분석에 기여</li> </ul>

## 제 5 장. 연구개발결과의 활용계획

### 1. 연구결과의 활용방안

- 학문적 파급 효과가 크고 산업적 활용 가능성이 높은 대상종을 우선 연구대상으로 선정하고 데이터를 선공개함으로써 다학제 연구 활성화와 연구소 전체의 연구 수월성 제고
- 극지 생물의 생명 현상의 이해를 통한 새로운 생명 자원 개발 기반 제공
- 극지 생명현상의 이해와 해석 정보를 바탕으로 새로운 생명자원을 개발하기 위한 4차 산업혁명의 핵심 생물자원 정보 제공
- 극한 환경 적응관련 핵심 유전자 형질전환 활용 시 국가적 이익 창출과 더불어 반복되는 저수온, 고수온, 적조 등의 급격한 환경변화로 인한 수산생물의 피해 저감을 통한 국내 수산양식산업 전반의 사회 문제 해결 가능
- 우수 유전형 및 표현형을 기반으로 한 핵심군집은 향후 수산 원예 등 육종 소재로 활용 가능
- 지속가능한 극지유전자원 확보 차원에서 메타지노 라이브러리를 구축하고 클론폴을 제작함으로써 지속가능한 극지 미생물 유전자원을 보존하고 응용 개발에 활용
- 국내외 연구자들과의 협력연구를 통한 극지 생명공학 연구의 다학제적 활성화
- 메타지노믹스 정보를 활용한 메타지노 라이브러리는 극지환경 조건과 메타지노 분석을 통해 메타지노 라이브러리의 생리적 대사경로 특성을 정의함으로써 맞춤형 타겟 효소군의 예측이 가능함에 따라 유용 효소 탐색이 매우 효율적으로 수행 될 수 있는 정보도 동시 제공됨
- 메타지노 라이브러리를 구축하고 클론폴을 제작함으로써 지속가능한 극지 미생물 유전자원을 확보
- 극지 환경 특성을 기반으로 한 생물자원을 발굴하여 극지연 중심의 다학제 연구 활성화와 연구소 전체의 연구 수월성 제고
- 극지 생명현상의 생물정보화를 통해 새로운 생명자원을 개발하기 위한 기반자원으로 활용
- 극지 생물들이 가지는 특이 2차대사산물들의 개발과 분자, 생화학적 기초 연구를 통해 새로운 분자기작과 약리 기전을 규명함으로써 새로운 유용물질 개발에 방향 제시
- 극한 생물들이 가지고 있는 이차대사산물들은 의약 등 다양한 산업계에 사용될 가능성 확대
- 극지 유전 생물자원 유래 신소재를 활용한 제품 개발로 미래원천 기술을 확보하고 시장 진입 시 매출액 상승, 일자리 창출, 연구 개발 투자 증대, 신제품 추가 개발의 시장 선순환 고리를 창출할 수 있음
- 극지 환경 특성을 기반으로 한 생물자원을 발굴하여 극지연 중심의 다학제 연구 활성화와 연구소 전체의 연구 수월성 제고
- 극지 생명현상의 생물정보화를 통해 새로운 생명자원을 개발하기 위한 기반자원으로 활용
- 극지 환경 특성을 기반으로 한 생물자원을 발굴하여 극지연 중심의 다학제 연구 활성화와 연구소 전체의 연구 수월성 제고
- 극지 생명현상의 생물정보화를 통해 새로운 생명자원을 개발하기 위한 기반자원으로 활용

- 극지어류의 극한 환경에 적응한 진화의 방식을 확인할 수 있으며, 이들이 앞으로 지구온난화에 대응하는 방식을 예측할 수 있다.
- 극지어류의 저온 적응방식에 관련된 유전자를 온대 어종에 도입함으로써 저온 스트레스가 강한 품종을 개발하는 기본 자료가 될 수 있다.
- 극지생물들이 가지는 특이 2차대사산물들의 개발과 분자, 생화학적 기초 연구를 통해 새로운 분자기작과 약리 기전을 규명함으로써 새로운 유용물질 개발에 방향 제시
- 극한 생물들이 가지고 있는 이차대사산물들은 의약 등 다양한 산업계에 사용될 가능성 확대
- 극지 유전 생물자원 유래 신소재를 활용한 제품 개발로 미래원천 기술을 확보하고 시장 진입 시 매출액 상승, 일자리 창출, 연구 개발 투자 증대, 신제품 추가 개발의 시장 선순환 고리를 창출할 수 있음

## 2. 기대성과 및 파급효과

- 고유의 극지생물의 핵심 유용유전자들의 확보 및 기능 분석에 관한 학술적 지식 보유
- 극지 생물의 극지 환경 적응 핵심 유전자 기능 판별 플랫폼 구축
- 극지 생물과 비극지 생물과의 비교유전체학 분석 기법 마련
- 극지 환경 적응 메커니즘 분석과 유전체 기반 활용 가능한 국제적 수준의 연구 인력 양성
- 극지 환경 적응 핵심 유전자 분석 기술 전수를 통한 국내 연구 및 산업계 내 이익 창출
- 나고야의정서관련 생물주권에 있어 극지생물 분야의 글로벌 선도기관으로 세계적 우위 선점
- 극지 생물 특이적 유전체 분석 기법 마련을 통한 국제네트워크 구축 및 국외연구비 창출과 국내로의 유입 효과 유도
- 극지생물의 유전체분석을 통한 유용 유전자원 발굴 및 극지생물 연구분야의 세계적 선도
- 극지생명과학연구의 근간인 유전체 정보 확보 및 극지생물의 적응과 진화 연구 토대 마련
- 극지 특이적인 생명현상 규명을 통한 지구 생명의 생성과 적응, 진화의 과학적 근거 제시
- 극지를 중심으로 급속도로 진행되는 지구 온난화의 원인을 극지생물을 중심으로 기후학과 생물학의 연계점을 제시
- 극지적응 핵심 유전자의 수생물 및 작물 내 형질전환 도입 기술 확보시 국가이익 창출 가능
- 환경스트레스내성이 강한 극지생물은 미래소재로서의 활용가치가 뛰어나, 축적된 생명정보 및 생물공학적인 기법은 향후 소재개발의 원천기술로 사용가능
- 유전체 분석분야는 신약, 수산, 농업, 환경, 에너지, IT등 산업적 파급효과가 큰 분야로서 극지생물유전체에 대한 성공적 연구는 긍정적 사회경제적 효과 창출 가능
- 미개발 유용 미생물들의 메타지놈 자원 확보를 통하여 기존 연구방식에서 찾지 못한 생물의약품, 효소, 항생제 개발 등에 이용함으로써 새로운 범주에서 경제적 가치를 창출 가능함
- 극지생물의 유용 유전체기반 극지 해양생물의 유전체, 생리 및 생태를 종합적으로 고려한 극지 해양자원 보존 기술 개발 등 국제사회 공동 현안에 대응하고 관련분야 선도 가능
- 연구소 외부 연구자들과의 공동활용을 통한 극지 생명공학 연구의 활성화에 기여

- 연구자들의 연구 수월성을 제공하기 위해 특정 생리활성 및 효소 활성 클론 선발, 정보 공유
- 극지 메타지놈 라이브러리에 의해 발굴된 신규 유용 효소의 개발 및 활성기작 규명(논문 및 지식재산권 확보)
- 극지 생물 신소재 개발을 위한 기초연구로 21세기 세계생명공학 분야에서 선도적 역할 담당
- 유전체, 단백질 등 극지 고유 생명정보 확보를 통한 극지연구의 저변 확대와 극지생명 연구 분야 세계 1위의 국제적 선도 기관으로 도약
- 미지의 극지생명정보를 적극 확보하고 BT, IT 등 융합학문을 촉진하여 극지생명공학 분야의 국가 경쟁력 제고
- 극지 생명자원 유래 추출물을 확보하고 이들의 다양한 활성들을 확인함으로써 저온 및 결빙 환경에서 남극생물이 생존하는 관련 기작 연구
- 극지유래 신규 소재의 개발이 초기 단계인 만큼 시장에서 큰 파급효과 기대
- 유용물질 실용화에 따른 관련 시장 진입 시 일자리 창출, 연구개발 투자 증대, 신제품 추가 개발의 시장 선순환 고리를 형성할 것임
- 극지역에 대한 대국민 이미지를 극대화시키고 극지 생명체 응용연구에 대한 도전정신, 기업가 정신 확산으로 국가 자긍심 고취
- 극지 생명자원 유래 유전 특이적 생합성체들을 생명공학 이외에 농학, 의학 등 다양한 분야에 보급 적용하여 융복합적인 연구개발을 촉진시킬 것으로 기대
- 과학기지, 쇄빙선 등 극지인프라를 활용해 수집한 해양생물자원의 실용화로 '극지바이오' 패러다임을 교육, 연구에서 산업을 통한 국익 창출로 확대
- 극지 생명자원 실용화/산업화 연구에 대한 국가적 정책 지원 확대 유도
- 극지 유전자원을 확보하여 극지생물 활용성 개발의 토대 마련
- 세계 바이오산업 시장 규모는 약 330조 원(2013년 기준)로 연평균 10.8%의 고성장세를 보이고 있으며, 지속적으로 증가될 전망. 이에 미래 글로벌 시장의 선점을 위해서는 극지 생물을 이용한 다양한 생명공학기술의 연구개발이 필요하며, 미래경제력 창조의 촉매 역할을 담당
- (과학 분야)
  - 극지 생명자원 유래 추출물을 확보하고 이들의 다양한 활성들을 확인함으로써 저온 및 결빙 환경에서 남극생물이 생존하는 관련 기작 연구
- (사회/경제적 분야)
  - 극지유래 신규 소재의 개발이 초기 단계인 만큼 시장에서 큰 파급효과 기대
  - 유용물질 실용화에 따른 관련 시장 진입 시 일자리 창출, 연구개발 투자 증대, 신제품 추가 개발의 시장 선순환 고리를 형성할 것임
  - 극지역에 대한 대국민 이미지를 극대화시키고 극지 생명체 응용연구에 대한 도전정신, 기업가 정신 확산으로 국가 자긍심 고취
- (정책 분야)
  - 극지생명자원 유래 유전 특이적 생합성체들을 생명공학 이외에 농학, 의학 등 다양한 분야에 보급 적용하여 융복합적인 연구개발을 촉진시킬 것으로 기대
  - 과학기지, 쇄빙선 등 극지인프라를 활용해 수집한 해양생물자원의 실용화로 '극지바이오' 패러다임을 교육, 연구에서 산업을 통한 국익 창출로 확대



## 제 6 장. 참고문헌

1. 극지환경에서의 진화 메커니즘을 밝힌다. 과학과기술 2007. 1
2. Life in the Frozen State. Taylor and Francis, London. 2004
3. 극지 생물의 저온적응 기작과 저온 생물학적 응용 연구 Ocean and Polar Research 2007.9
4. Horwath, K.L., & Duman, J.G., 1983. Induction of antifreeze protein production by juvenile hormone in larvae of the beetle, *Dendroides canadensis*. Journal of comparative physiology. 151(2), 233-240.
5. Fletcher, G.L., Hew, C.L., Davies, P.L., 2001. Antifreeze proteins of teleost fishes. Annual review of physiology. 63(1), 359-390.
6. Kao, M.H., Fletcher, G.L., Wang, N.C., Hew, C.L., 1986. The relationship between molecular weight and antifreeze polypeptide activity in marine fish. Canadian journal of zoology. 64(3), 578-582.
7. Scott, G.K., Fletcher, G.L., Davies, P.L., 1986. Fish antifreeze proteins: recent gene evolution. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 43(5), 1028-1034.
8. Aparicio, S., Chapman, J., Stupka, E., Putnam, N., Chia, J. M., Dehal, P., Brenner, S., 2002. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. Science. 297(5585), 1301-1310.
9. Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S., Nakatani, Y., Qu, W., Ahsan, B., Kohara, Y., 2007. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. Nature. 447(7145), 714-719.
10. Postlethwait, J. H., Yan, Y. L., Gates, M. A., Horne, S., Amores, A., Brownlie, A., Talbot, W. S., 1998. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. Nature genetics. 18(4), 345-349.
11. David, C., Lange, B., Krumpfen, T., Schaafsma, F., Andries van Franeker, J., Flores, H., 2015. Under-ice distribution of polar cod *Boreogadus saida* in the central Arctic Ocean and their association with sea-ice habitat properties. Polar Biology.
12. Shin, S.C., Kim, S.J., Lee, J.K., Ahn do, H., Kim, M.G., Lee, H., Lee, J., Kim, B.K., Park, H., 2012. Transcriptomics and comparative analysis of three antarctic notothenioid fishes, PLoS One. 7, e43762.
13. Shin, S.C., Ahn do, H., Kim, S.J., Pyo, C.W., Lee, H., Kim, M.K., Lee, J., Lee, J.E., Detrich, H.W., Postlethwait, J.H., Edwards, D., Lee, S.G., Lee, J.H., Park, H., 2014. The genome sequence of the Antarctic bullhead notothen reveals evolutionary adaptations to a cold environment, Genome Biol. 15, 468.



14. Duman, J.G. and A.L. de Vries, 1976. Isolation, characterization, and physical properties of protein antifreezes from the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Comp Biochem Physiol B*. 54(3), 375-80.
15. John, U.P., et al., 2009. Ice recrystallization inhibition proteins (IRIPs) and freeze tolerance in the cryophilic Antarctic hair grass *Deschampsia antarctica* E. Desv. *Plant Cell Environ*. 32(4), 336-348.
16. Harding, M.M., Anderberg, P.I., Haymet, A.D., 2003. 'Antifreeze' glycoproteins from polar fish, *Eur J Biochem*. 270, 1381-92.
17. Graham, M.S., Fletcher, G.L., Haedrich, R.L., 1985. Blood viscosity in arctic fishes, *J Exp Zool*. 234, 157-60.
18. Nilsson, S., Forster, M.E., Davison, W., Axelsson, M., 1996. Nervous control of the spleen in the red-blooded Antarctic fish, *Pagothenia borchgrevinki*, *Am J Physiol*. 270, R599-604.
19. Sazykina, T.G., Kryshev, II., 1997. Current and potential doses from Arctic seafood consumption, *Sci Total Environ*. 202, 57-65.
20. Montgomery, J.C., Foster, B.A., Cargill, J.M., 1989. Stomach evacuation rate in the planktivorous Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*. *Polar Biology*. 9(6), 405-408.
21. van Oort B.E., Tyler N.J., Gerkema M.P., Folkow L., Blix A.S., Stokkan K.A., 2005 "Circadian organization in reindeer". *Nature*, 438: 1095-6.
22. Folk, G.E., Thrift, D.L., Zimmerman, M.B., Reimann, P.C., 2006. "Mammalian activity - rest rhythms in Arctic continuous daylight". *Biological Rhythm Research*. 37(6): 455-469.
23. Richards, J.G., 2009. Metabolic and molecular responses of fish to hypoxia. In *Hypoxia*, Vol. 27 (ed. Richards, J.G., Farrell, A.P., Brauner, C.J.), pp. 443-485. San Diego: Elsevier.
24. Lefevre, S., Damsgaard, C., Pascale, D.R., Nilsson, G.E., Stecyk, J.A., 2014. Air breathing in the Arctic: influence of temperature, hypoxia, activity and restricted air access on respiratory physiology of the Alaska blackfish *Dallia pectoralis*, *J Exp Biol*. 217, 4387-98.
25. Jeffrey, W. H., Aas, P., Maille Lyons, M., Coffin, R. B., Pledger, R.J., Mitchell, D.L., 1996. *Photochem. Photobiol*. 64, 419 - 427.
26. Worrest, R.C., Brooker, D.L., Van Dyke, H., 1980. *Limnol. Oceanogr*. 25, 360 - 364.
27. Damkaer, D.M., Dey, D.B., Heron, G.A., 1981. *Oecologia*. 48, 178 - 182.
28. Malloy, K.D., Holman, M.A., Mitchell, D., etrich, H.W., 3rd, 1997. Solar UVB-induced DNA damage and photoenzymatic DNA repair in antarctic zooplankton, *Proc Natl Acad Sci USA*. 94, 1258-63.

29. Madrid Protocol. (<http://www.ejil.org/pdfs/11/3/544.pdf>)

30. Antarctic Environment Protection Act of 1996.  
([https://en.wikipedia.org/wiki/Antarctic\\_Treaty\\_System](https://en.wikipedia.org/wiki/Antarctic_Treaty_System))

31. 극지 교육 자료, 극지연구소 [http://www.kopri.re.kr/home/contents/m\\_4110000/view.cms](http://www.kopri.re.kr/home/contents/m_4110000/view.cms))



# KOPRI

(국내 과제용)

## 극지연구소

주 의

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