

Micractinium variable KSF0031 유래 생체생성아민 (BAs)
생합성 효소 조사 및 BAs 검출법 개발

Survey of biogenic amines (BAs) biosynthetic enzymes and development of BAs
analytic method in *Micractinium variable* KSF0031



한국해양과학기술원
부설 극지연구소

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “*Micractinium variabile* KSF0031 유래 생체생성아민 (BAs) 생합성 효소 조사 및 BAs 검출법 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2023. 01. 31.

연구 책임자 : 조성미

참여 연구원 : 김은재
유지현
김현중
서민지

보고서 초록

과제관리번호		해당단계 연구기간	2022.03.01. ~2022.12.31	단계 구분	(1단계)/(1단계)
연구사업명	중 사업명	연구·정책지원사업			
	세부사업명	신진연구자 지원과제			
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	<i>Micractinium variable</i> KSF0031 유래 생체생성아민 (BAs) 생합성 효소 조사와 BAs 검출법 개발			
연구책임자	조성미	해당단계 참여연구원수	총 : 5명 내부 : 1명 외부 : 4명	해당단계 연구비	정부: 천원 기업: 천원 계: 천원
연구기관명 및 소속부서명	극지연구소 생명과학연구본부		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
<p>34</p> <ul style="list-style-type: none"> 극지 미세조류의 낮은 성장률을 극복하기 위해 성장률이 높은 KSF0031 배양체의 고품질 유전체 정보를 활용하여 극지 미세조류의 성장 촉진 인자에 관한 연구를 수행하고자 함. 본 과제는 성장 촉진 후보물질인 생체생성아민 (BAs)의 생합성 효소가 KSF0031 유전체 내 존재하는지 확인하고 KSF0031 배양체로부터 BAs 물질을 검출하는 것을 목적으로 함. KSF0031 유전체는 BA 생합성 효소 유전자로 3개의 DDC (decarboxylase)와 1개의 TYR (monooxygenase)를 갖음. 이 두 유전자는 도파민 (dopamine)과 트립타민 (tryptamine, 세로토닌의 전구체)를 생합성 하는 기능을 함. 현재까지 보고된 미세조류 24종의 유전체와 대장균, 효모, 사람의 유전체 내 존재하는 DDC와 TYR 유전자를 확인한 결과, 두 유전자를 모두 갖는 미세조류는 녹조류 <i>Chlorella variabilis</i>와 해양성 착편모조류 <i>Emiliania huxleyi</i>로 나타남. 도파민이나 트립타민을 생합성 하는 조류는 매우 드물게 발견됨. 온도별 전사체 분석을 통해 DDC 유전자는 온도 변화에 큰 영향을 받지 않았고, TYR 유전자는 저온 처리 시 발현량이 증가하는 패턴을 보임. 선행 연구를 종합하여 미세조류의 BA 물질 검출법을 최적화하였음. 검출법에 따라 KSF0031 추출물과 도파민을 포함하는 7종의 기준물질을 LC-MS/MS로 분석한 결과 다량의 도파민과 푸트리신이 검출되었고, 소량의 카다버린이 확인되었음. 극소량의 트립타민과 타이라민이 검출되었으며 히스티딘과 페닐에틸아민은 검출되지 않았음. 이로써 KSF0031 배양체가 BA 물질을 생합성 함을 제시함. 본 연구개발 내용을 바탕으로 극지 미세조류 내 도파민의 생물학적, 생화학적 기능 연구를 수행할 계획이며 더 나아가 극지 생태계 내 도파민 검출, 도파민이 다른 생물에 미치는 영향, 극지 미세조류의 대량 발생과의 상관관계 연구로 확장하고자 함. 					
색인어 (각 5개 이상)	한글	<i>Micractinium</i> , KSF0031, 생체생성아민, 도파민, 트립타민, BAs 검출법			
	영어	<i>Micractinium</i> , KSF0031, Biogenic amines, Dopamine, Tryptamine, BAs Analytic method			

요 약 문

I. 제 목 : *Micractinium variable* KSF0031 유래 생체생성아민 (BAs) 생합성 효소 조사와 BAs 검출법 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 극지 미세조류 고부가가치의 신규 물질이 꾸준히 발견되고 있음에도 불구하고 낮은 성장률으로 인해 경제성 확보에 어려움이 있음. 이를 극복하기 위하여 높은 성장률을 보이는 KSF0031 배양체의 고품질 유전체 정보를 활용하여 극지 미세조류의 성장 촉진 기작을 연구하고자 함. 본 과제는 성장 촉진 후보물질인 생체생성아민(BAs)의 생합성 효소가 유전체 내에 존재하는지 확인하고, 미세조류에 최적화된 BAs 검출법을 개발하여 KSF0031 배양체에서 BAs의 정성, 정량 분석을 수행하는 것을 목적으로 함.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 고품질 유전체와 생물정보학 데이터베이스를 활용하여 *M. variable* KSF0031 유전체 내 존재하는 BA 생합성 효소 유전자를 제시하고 PCR을 통해 유전자 서열을 확보함. 조류를 포함한 총 27종 유전체에 존재하는 BA 생합성 유전자 정보를 비교 분석하여 극지 미세조류가 BA 생합성 효소를 갖는 것에 대한 진화적 의미를 제시함.
- BA 생합성 효소의 발현 기작을 확인하고자 온도 조건별 전사체 분석을 수행하며, 분석 결과 해당 유전자의 발현패턴을 제시함. 선행 연구를 종합하여 미세조류에 최적화된 BA 검출법을 제안하고, 개발한 검출법을 이용하여 KSF0031 배양체 추출물 내 BA 물질의 정성, 정량 분석을 수행함.

IV. 연구개발결과

- KSF0031 배양체는 BA 생합성 관련한 유전자 DDC (decarboxylase)와 TYR (monooxygenase) 총 7종이 확인되었고, 이 유전자는 타이로신 (L-tyrosine)을 도파민 (dopamine)으로 전환하고 트립토판 (L-tryptophan)을 세로토닌의 전구체인 트립타민 (tryptamine)으로 전환하는데 기능함.
- cDNA를 주형으로 PCR을 수행하여 DDC와 TYR 유전자의 코딩 염기서열을 확보하였으며, 도메인 구조 분석과 유전체 내 염기서열 정보와 비교하여 실제 3개의 DDC와 1개의 TYR 유전자가 존재함을 확인함.
- 현재까지 보고된 미세조류 24종의 유전체와 대장균, 효모, 사람의 유전체 내 존재하는 DDC와 TYR 유전자를 비교 분석한 결과, 두 유전자를 모두 갖는 미세조류는 녹조류

*Chlorella variabilis*와 해양성 작편모조류 *Emiliania huxleyi*로 매우 드물게 발견됨.

- 고품질 유전체 서열정보를 분석하여 DDC와 TYR 유전자가 온도 변화에 의해 발현이 조절될 것이라 가정하였으며 12도와 2도 조건에서 배양한 뒤 전사체 분석을 수행하였음. DDC 유전자의 경우 온도 변화에 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났으나, TYR 유전자의 경우 저온 처리 시 발현량이 증가하는 패턴을 보임.
- 선행 연구를 종합하여 미세조류의 BA 물질을 검출법을 제안하였음. 약 0.2g의 동결 건조 분말을 20% MeOH에 하룻동안 추출한 뒤 필터링함. 기준물질은 도파민, 타이라민 (도파민 전구체), 트립타민 (세로토닌 전구체), 히스티딘, 카다버린, 푸트리신, 페닐에틸아민으로 총 7종 BA 물질을 사용하였음. 추출물과 기준물질의 dansylation을 통한 유도체를 제작한 뒤 LC-MS/MS를 이용하여 정성, 정량 분석을 수행함.
- KSF0031 배양체는 주요 BA 물질로서 도파민과 푸트리신을 생성하였으며, 소량의 카다버린이 검출되었음. 극소량의 트립타민과 타이라민이 검출되었으며 히스티딘과 페닐에틸아민은 검출되지 않았음. 이로써 KSF0031 배양체는 도파민을 비롯한 BA 물질을 생합성 함을 확인함.

V. 연구개발결과의 활용계획

- 연구 개발한 BA 검출법을 다른 미세조류 및 환경시료 (물 또는 토양 등)에 존재하는 BA 물질 스크리닝에 활용하여 극지 생태계 내 BA 물질이 존재 여부, BA 물질이 생물량 변동에 미치는 영향 등을 조사하여 **생태계 내 생물간 상호작용 물질로의 기능**을 연구하고자 함.
- KSF0031 배양체를 모델생물로 하여 극지 미세조류가 분비하는 **도파민의 생물학적 기능**에 관한 연구를 수행하고자 함. 도파민의 분비 경로, 도파민 수용체의 존재 여부, 외부에서 주어진 도파민이 생장에 미치는 영향 등을 조사하고자 함. 또한 도파민 등의 BA 물질을 스스로 합성하지 않는 미세조류 배양체의 생장에 어떤 영향을 미치는지 연구하고자 함.
- 미세조류 내 BA 생합성 효소는 독특한 진화과정을 통해 획득한 형질로 예측되므로, *C. variabilis*와 *E. huxleyi*에 존재하는 유전자와의 비교를 통해 이 효소의 생화학적 기능, 단백질 구조적 특징과 진화적 의미를 밝히고자 함. 또한 KSF0031을 포함한 *C. variabilis*와 *E. huxleyi*는 모두 성장률이 높으며, 특히 *E. huxleyi*는 북극해에 대량 발생을 하는 종으로 알려져 있음. 이들 3종의 도파민 생합성 유전자의 비교연구를 통해 **극지 미세조류의 대량 발생과 도파민과의 상관관계**에 관한 추가적인 연구를 수행하고자 함.

목 차

제 출 문	i
보고서 초록	ii
요 약 문	iii
제 1 장 서론	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	4
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	9
3.1. KSF0031 유전체 내 BA 생합성 효소 조사 및 진화적 의미	10
3.2. KSF0031 배양체 유래 BA 물질 검출법 개발	14
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	17
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	19
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	23
제 7 장 참고문헌	25

제 1 장
서 론



1.1. 연구개발의 필요성

가. 극지 미세조류 산업화를 위한 성장 조절 인자 연구 필요

- 극지 미세조류는 극지역 육상 생태계의 대표적인 1차 생산자로서 눈 표면, 담수호 (수층과 저서환경 모두), 토양, 돌의 표면, 지의류 내 공생체로 발견되고 있음. 극지 미세조류는 자연 상태에서 특정 시기에 대량 발생하여 극지역 1차 생산자로 역할을 함. 이와같은 극지 미세조류의 대량 발생 현상에 대한 생리생태적 연구를 통해 미세조류의 성장 조절 인자에 관한 연구가 필요함.
- *Micractinium* 속은 극지역에 널리 분포하는 우점종으로 성장률이 높고 최근 3종의 신종을 발견하고 보고하였음 (Chae et al. 2021). *M. variable* KSF0031은 성장률이 높고 주름 개선 효능 물질 (Kim et al. 2023), 불포화 지방산 (PUFA) 및 phytol과 같은 고부가가치 물질 생산 (Kim et al. 2022)이 검증된 유용 배양체임. 또한 KSF0031 배양체의 고품질 유전체 정보를 기 확보하여 기능 유전체 연구, 유용자원 발굴 등의 다양한 연구에 활용 가능함.
- 극지 미세조류는 중온성 미세조류에 비해 환경 스트레스 저항성이 높아 고부가가치의 신규 물질이 꾸준히 발견되고 있으나, 저온 조건의 낮은 성장률로 경제성 확보에 어려움이 있음. 이를 극복 하기 위해서, KSF0031과 같이 성장률이 높고 고품질 유전체 정보가 마련된 배양체를 이용하여 극지 미세조류의 성장 촉진에 관한 연구가 수행되어야 함.
- 최근 미세조류 성장조절인자의 후보물질로 생체생성아민 (BA, biogenic amine)이 제안됨 (Oleskin et al., 2021a; 2021b). BA는 하나 이상의 아민기를 갖는 저분자 유기 염기로 아미노산의 유도체임. BA 물질은 mono-amine과 poly-amine류로 나뉘며, mono-amine류는 도파민, 트립타민, 세로토닌, 히스타민 등이 있음. 동물, 식물, 미생물의 대사 과정에서 생성되며 세포 내 축적되지 않고 분비됨. 선행 연구에서 산업용 미세조류 배양체 *Chlorella vulgaris*와 *Scenedesmus quadricauda*에 도파민, 트립타민, 히스타민을 처리하여 세포수가 1.5~2배 증가하는 결과가 도출됨. 이와 같은 BA 물질이 극지 미세조류의 성장 촉진을 유도할 가능성을 시사함.

나. 극지 미세조류 유래 BA 물질의 생태적 역할 규명 필요

- 조류 유래의 BA 물질은 성장 조절 인자뿐 아니라 생태계 내 다른 생물에 영향을 미치는 생태계내 상호작용 물질로도 작용함. 서태평양 연안에 대량서식하여 유해조류로 인식되고 있는 해양성 녹조류인 *Ulvaria obscura*는 BA 물질 중 하나인 도파민을 분비하여 식물성 무척추동물에 의한 섭식을 억제하는 것으로 밝혀짐 (Van Alstyne et al. 2006). 이 연구는 해양 녹조류가 도파민을 분비하는 것을 보고한 최초의 사례이며, 다른 조류군에서 이와 같은 연구는 진행되지 않았음.
- 일부 선행 연구에서 미세조류 유래의 poly-amine류의 생성 및 역할에 관한 보고가 있었으나, mono-amine류인 도파민, 트립타민, 세로토닌, 히스타민과 같은 물질의 생합성 여부, 검출법 및 관여하는 유전자에 관한 기능 연구는 이루어진 바 없음. 일부 연구 결과와 본 연구

과제에서 수행한 바에 의하면, 미세조류가 생성 및 분비하는 BA 물질은 생태계 내에서 다양한 역할을 할 것으로 예상됨.

1.2. 연구개발의 범위

가. 극지 미세조류 대상 연구주제의 다각화

- 극지 미세조류는 극한 환경 조건에서 성장하면서 다양한 저항성 물질을 생산하는 것으로 알려져 있으나 현재까지의 연구는 대부분 저온 및 결빙 저항성에 초점이 맞춰져 있었음. BA 물질은 동물계에서 신경전달물질로 작용하고 식물계에서 스트레스 저항성을 증가시키거나 스트레스 작용을 억제하는 조절자 역할을 하고 있음. 반면 미세조류를 대상으로 BA의 생합성 과정, 생물학적 역할, 생태적 기능 등에 관하여 연구되지 않음.
- 본 연구과제서 극지 미세조류의 성장 촉진 인자라는 새로운 주제어를 제시함으로써 극지 미세조류 연구 분야를 다각화하고자 함. 극지연구소에서 획득한 유전체 및 전사체 정보를 강점으로 하여 극지 미세조류 연구 분야의 새로운 주제를 개척하고자 함.

나. 유전체 정보 기반의 BA 생합성 효소 제시

- 선행 연구에서 미세조류 내 BA 생합성 경로 유전자가 확인된 사례는 없음. 해양 녹조류 *Ulvaria obscura* 연구의 경우, 세포 내 BA 물질 (도파민)이 생합성되어 세포 밖으로 분비되는 것은 확인되었으나 유전체나 전사체 정보가 없어 도파민 생합성의 원인, 생합성 과정, 세포 내 이동 및 분비 과정에 대한 이해가 부족함.
- 본 연구과제는 고품질 유전체 정보와 생물정보학 데이터베이스를 기반으로 BA 생합성 효소에 관한 유전자를 제시하고, 그 기능을 예측하는 충분한 정보를 제공하고자 함. 또한 이러한 유전자의 존재가 갖는 진화적 의미를 제시함으로써 극지 미세조류의 독특한 획득 형질에 대한 시사점을 제공하고자 함.

다. 미세조류 추출물 내 BA 물질 검출법 제시

- 현재까지 조류 유래의 BA (도파민) 검출법은 건조 해양 녹조류 ~ 300g의 추출물 중 무척추동물의 섭식 선호도 조사를 이용해 여러 분획으로 나눈 뒤 HPLC와 GC-MS를 이용하는 것이었음. 이와 같은 방식은 초기 생물량이 많이 필요하고 실험과정이 복잡하여 미세조류 연구에 적합하지 않음. 또한 이 검출법은 생물간 비교가 어렵고, 조건별 실험이 불가하며, 정량이 되지 않는 단점이 있음.
- 따라서 미세조류에 적합한 표준화된 검출법의 개발이 필요함. 본 연구과제에서 모든 미세조류에 사용 가능하고 소량의 초기 물질로 여러 종류의 BA 물질을 검출할 수 있는 표준화된 검출법을 제시하고자 함.

제 2 장
국내외 기술개발 현황



2.1. 국내 연구 및 기술개발 현황

2.1.1. 극지 미세조류의 유용자원 발굴 연구

가. 결빙방지 단백질 연구

- 극지역의 어류, 박테리아, 효모, 미세조류, 해빙 미세조류 및 겨울을 나는 곤충, 식물 등에서 결빙방지 단백질 (Ice-binding protein, IBP) 연구는 활발히 이루어져 있음. 일반적인 형태의 IBP는 박테리아의 것이 수평적 유전자 이동 (horizontal gene transfer, HGT)을 통해 여러 생물에 확장된 것으로 밝혀져있음.
- 최근 극지연구소에서 발표한 극지 미세조류 *Chloromonas* sp.의 IBP의 경우, 다른 미세조류에서 발견되는 박테리아 기원의 것과 다르며 단백질 구조적으로 곤충의 AFP, 식물의 IRIP 및 고세균의 adhesin 단백질과 그 구조가 유사하였음. 서열의 상동성이 없이 구조적으로 유사한 극지 미세조류의 IBP는 수렴진화를 통해 극지역 결빙환경에 적응하며 획득한 형질로 판단되며, 이 단백질이 과발현된 애기장대는 결빙 저항성이 약 30%가량 증가하는 것으로 나타남 (Cho et al., 2019). 이 결과는 미세조류 유래 유용자원의 활용 사례이자 극지역 미세조류의 독특한 진화적 특성을 이해하는데 도움이 됨.

나. 세포 보호 물질 스크리닝 연구

- 극지역 미세조류 30여 배양체의 추출물을 이용하여 UV-B에 의한 피부 손상을 세포모형을 이용하여 스크리닝 진행한 결과, 주름 개선 관련 인자 MMP-1과 보습 관련 인자의 평가 결과 유효한 효능을 보이는 추출물을 선별함. 추출물 중 유효 성분을 갖는 단일 화합물 1-Monoeicosapentaenoin (1-MEST)를 분리하였으며, 해당 물질의 주름 개선 효능 및 안전성에 대한 검증이 수행되었음 (Kim et al. 2023)

2.1.2. 극지 미세조류의 연구 방향 제시

가. 낮은 생장률을 극복하기 위한 생장 촉진 연구

- 극지 미세조류는 최적 생장 온도가 15도 미만으로 실내 배양시설을 이용한 배양체의 유지를 위해서는 냉각시설이 필요함. 또한 산업용 중온성 배양체에 비해 낮은 생장률을 보여 산업화를 위해 필요로 하는 최소 건중량 확보에 많은 시간과 비용이 요구됨. 이러한 특성으로 인해 극지 미세조류 유래 고부가가치 유용 물질이 발굴됨에도 불구하고 산업화 과정의 투자 대비 수익성이 보장되지 못하는 한계점을 갖음.
- 따라서 극지 미세조류의 산업화를 위해서는 생장 촉진을 위한 연구가 필요함. 최근 극지연구소에서는 *Micractinium variable* KSF0031의 배양 배지 BG-11의 구성성분 최적화를 통하

여 생중량을 37.5% 늘리고, 불포화지방산 (PUFA)의 수득률을 12%가량 증가시킨 연구 결과가 있음 (Kim et al. 2022, 그림 1).

- 극지연구소 내에는 KSF0031 배양체 외에도 다 수의 배양체를 유지 확보하고 있음. 이들의 유용자원의 생산 여부를 검토하는 한편, 이 배양체의 성장을 촉진하기 위한 연구가 필요함. 성장 촉진의 방법은 앞서 설명한 배지 최적화 등의 방법이 있으나, 이와 같은 방법은 하나의 배양체에 최적화된 방법으로 종 특이성을 떠나 일반적인 배양체의 성장률을 촉진할 수 있는 물질의 개발 또한 시급함.

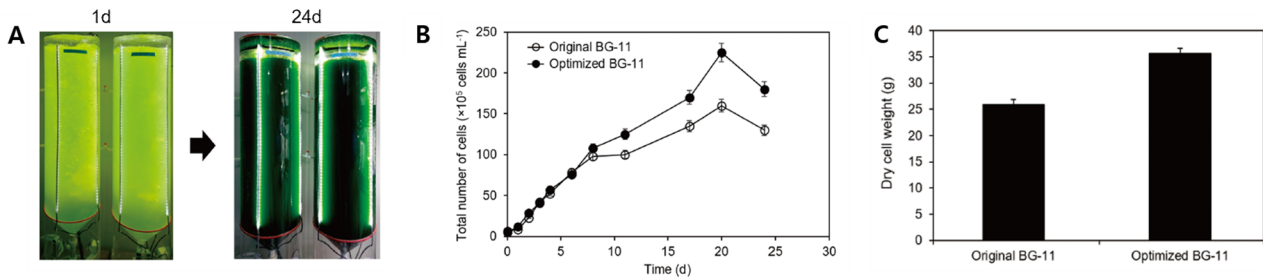


그림 1. 배지 최적화 실험을 통한 KSF0031의 성장률과 생중량 비교. A. 100L 광배양기, B. 배지 조건별 성장률, C. 배지 조건별 건중량

나. 극지 미세조류 유전체 정보 획득 및 활용 연구

- 현재까지 연구 발표된 극지 미세조류의 유전체 정보는 *Chlamydomonas* sp. UWO241 (Zhang et al. 2021)이 유일함. 이들의 유전체 정보 중 다수는 중온성 미세조류와 일치하지 않으므로 이들의 유전체 정보를 온전한 이해하기에 부족한 현실임. 본 연구과제에서 활용하고 있는 *M. variable* KSF0031의 유전체 정보는 극지 유래 *Micractinium* 속에서 처음 발표되는 것으로 그 가치가 매우 높음.
- 본인을 포함한 극지연구소 내 미세조류 연구팀은 극지연구소에서 유지하고 있는 배양체들을 대상으로 효율적인 고품질 유전체 확보를 위한 연구를 수행하고 있음. 극지 미세조류의 유전체 자원은 산업화로 활용도가 높은 자원으로 국제 사회에서 우선권을 확보하는 것이 매우 중요한 사안으로 판단됨. 따라서 본 연구과제는 극지 미세조류의 유전체 자원활용 사례로서 그 가치가 있다고 판단되며, 이와 같이 유전체 정보를 기반으로 한 연구들이 많이 이루어져야 함.

2.2. 국외의 연구 및 기술개발 현황

2.2.1. 생체생성아민 (Biogenic amines, BAs) 연구

가. *Chlorella vulgaris*와 *Scenedesmus quadricauda*의 BA 처리 효과: 성장 촉진

- 대표적인 산업용 배양체 *C. vulgaris*와 *S. quadricauda*에 도파민, 세로토닌, 히스타민을 1, 10, 100uM 처리한 후 세포수 변화를 측정. *C. vulgaris*에서 히스타민 1uM, 10uM 농도에서 성장 촉진이 두드러졌으며, 100uM에서 저해되는 현상을 보임. *S. quadricauda*는 도파민과 히스타민 처리조건에서 증가하는 양상을 보였으며, 특히 히스타민 100uM에서 생장이 저해되지 않았음 (Oleskin et al., 2021a; 2021b, 그림 2).
- 두 연구에서 세포 추출물에서 생체 생성 아민류는 검출되지 않았으며, 생체내 생합성 관련 유전자에 관한 연구는 수행되지 않았음. 미세조류가 생체 생성 아민류를 인지하는 수용체가 있을 가능성을 제시하며 수생태계 내 무척추동물 또는 물고기류에서 분비된 물질을 인지하여 성장 촉진에 활용할 가능성이 있음을 논의함.

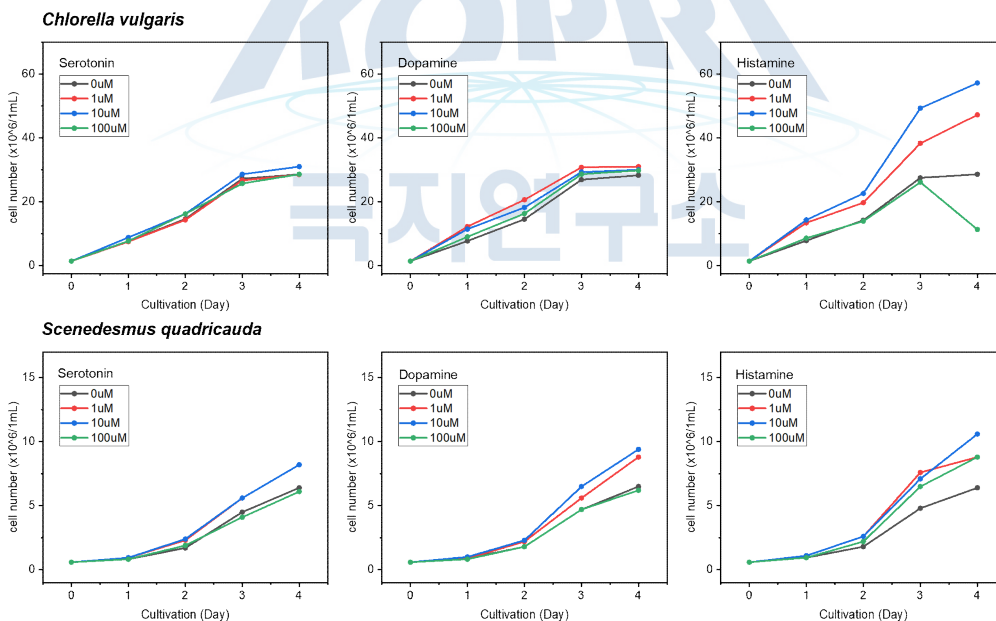


그림 2. 생체 생성 아민류 (serotonin, dopamine, histamine) 처리에 의한 산업용 미세조류 배양체 *C. vulgaris*와 *S. quadricauda*의 성장곡선

나. 녹조류 *Ulvaria obscura*의 도파민 분비: 초식성 무척추동물의 섭식 회피 기작

- 서태평양 연안의 대량 발생하여 유해조류로 인식되어 온 *U. obscura*의 생태적 연구를 통해 해당 녹조류가 도파민을 생성하여 분비함으로 초식성 무척추동물의 섭식기작을 회피하는 것으로 나타남 (Van Alstyne et al. 2006). 본 연구는 해당 녹조류의 추출물을 3종의 대표적인 초식성 무척추동물에 먹이로 주었을 때 회피하는 물질들을 분리, 동정하는 과정에서 발

견되었음 (그림 3)

- 이 결과는 조류에서 도파민을 검출한 첫 연구 결과로 생체 생성 아민류가 생태계 내 상호 작용 (ecosystem communication) 물질로 사용됨을 시사하며 조류 분류군 내 도파민을 포함한 BA의 생합성 경로가 존재할 가능성을 보여줌.

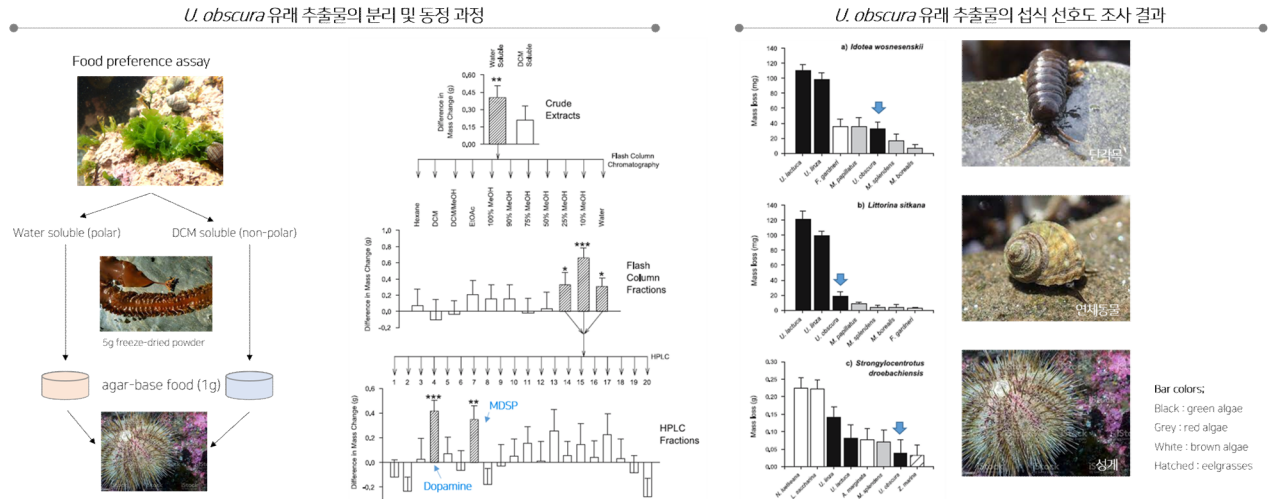


그림 3. 섭식 선호도 조사를 통한 해양 녹조류 유래 도파민 분리 및 동정



제 3 장
연구개발 수행내용 및 결과



3.1. KSF0031 유전체 내 BA 생합성 효소 조사 및 진화적 의미

3.1.1. KSF0031 유전체 정보 기반 BA 생합성 효소 조사

가. KEGG pathway 정보를 이용한 BA 생합성 유전자 목록화

- KEGG pathway (<https://www.genome.jp/kegg/>)는 다양한 생물체 내 대사 과정에 관여하는 유전자 정보 (DNA 및 단백질 서열)와 대사 물질의 반응과정에 대한 정보를 담고 있는 대표적인 데이터베이스로 생물정보학 연구 분야에서 널리 사용되고 있음. 본 연구에서는 대표적인 mono-amine 물질인 도파민 (KO00350), 세로토닌 (KO00380), 히스타민(KO00340)의 생합성 정보를 활용함.
- 대사 과정 중 물질 반응 단계에 관여하는 효소는 고유한 번호 (EC number, K number)를 통해 식별되며, 미세조류 (*Chlorella sorokiniana*, *Micractinium conductrix*)와 식물(*Arabidopsis thaliana*)의 유전체 정보를 바탕으로 KSF0031 유전체 정보 내의 BLAST 분석을 수행.
- 서열 유사성에 기반하여, KSF0031에 1종의 monooxygenase, K00505 (TYR, tyrosinase)와 1종의 decarboxylase K01593 (DDC/TDC, aromatic-L-amino-acid/ L-tryptophan decarboxylase)에 해당하는 유전자 정보가 존재함을 확인함 (표 1). 이 중 DDC 유전자의 경우 도파민과 세로토닌 생합성에 모두 관여하는 효소임. 따라서 KSF0031 배양체는 TYR와 DDC 유전자에 의한 BA물질 중 도파민과 세로토닌의 중간산물인 트립타민을 합성할 가능성이 있음을 확인함.

표 1. KEGG pathway 기반의 BA 생합성 경로 유전자 목록

Reactions	EC/ K number	Gene name	KSF0031
1. 도파민 생합성 (KEGG: KO00350)			
L-Tyrosine → Tyramine	4.1.1.25/ K01592	TYDC	X
	4.1.1.28/ K01593*	DDC	O
Tyramine → Dopamine	1.14.18.1/ K00505	TYR	O
2. 세로토닌 생합성 (KEGG: KO00380)			
Tryptophan → Tryptamine	4.1.1.28/ K01593*	DDC	O
	4.1.1.105/ K22433	PSID	X
Tryptophan → 5-Hydroxy-L-tryptophan	1.14.16.4/ K00502	TPH	X
5-Hydroxy-L-tryptophan → Serotonin	4.1.1.28/ K01593*	DDC	O
3. 히스타민 생합성 (KEGG: KO00340)			
L-Histidine → Histamine	4.1.1.22/ K01590	HDC	X

나. 도메인 구조 분석

- 염기서열 유사성 근거하여 선별한 유전자는 TYR 2종 (MvTYR1-MvTYR2)과 DDC 5종 (MvDDC1-MvDDC5)으로 KSF0031 유전체 내에 중복하여 존재하는 것으로 확인되었음. 이 유전자 서열의 단백질 기능을 예측하기 위하여 선별된 7종 유전자의 단백질 서열 내 도메인 구조 분석을 수행함. 도메인은 단백질이 생화학적 기능을 수행하는 최소단위의 아미노산 서

열을 의미하여, 생물간 유사한 기능을 하는 단백질은 유사한 도메인 서열 (또는 도메인 구조)를 갖고 있음. 따라서 도메인 구조 분석은 신규 단백질 서열의 기능을 예측하기 위해 활용됨.

- 도메인 구조 분석 결과, 2종 TYR 단백질 서열 내에 tyrosinase 도메인이 보존되어 있었으며, DDC 5종 중 4종의 단백질 서열 내에 PLP-dependent decarboxylase 도메인이 존재함을 확인함. MvDDC2 유전자의 경우 도메인 범위 내 기능을 알 수 없는 아미노산 서열이 존재하기 때문에 다른 DDC 유전자와 다른 기능을 하거나, 기능하지 않을 가능성이 있는 것으로 판단됨 (그림 4).

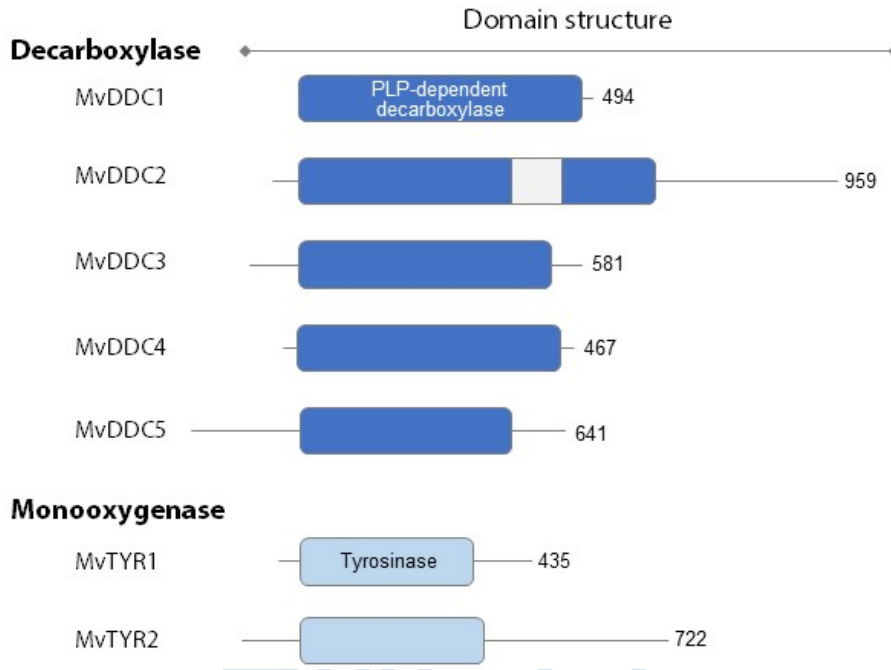


그림 4. *Micractinium variabile* KSF0031 유전체 내 존재하는 DDC와 TYR 유전자의 도메인 구조

다. 유전자 서열 확보 및 염기서열 분석

- 염기서열 유사성과 도메인 구조 분석을 통해 확보한 BA 생합성 효소 후보군 유전자 7종의 단백질 서열 존재를 확인하기 위하여 PCR을 수행함. 단백질로 코딩되는 염기서열을 확보하기 위해서 KSF0031 배양체를 12도와 4도 (1시간, 3시간 처리군)에서 각각 키워 total RNA를 추출한 뒤 cDNA를 합성하여 이를 주형으로 PCR을 수행하였음.
- 그 결과 MvDDC1, MvDDC3, MvDDC4, MvTYR2의 유전자가 실제로 존재함을 확인할 수 있었으며, 해당 PCR 산물의 염기서열 분석을 수행한 결과 유전체 내 존재하는 서열과 모두 일치함을 확인하였음. 이로써 KSF0031 배양체 내에 3종의 DDC 유전자와 1종의 TYR 유전자가 존재함을 확인함 (그림 5).

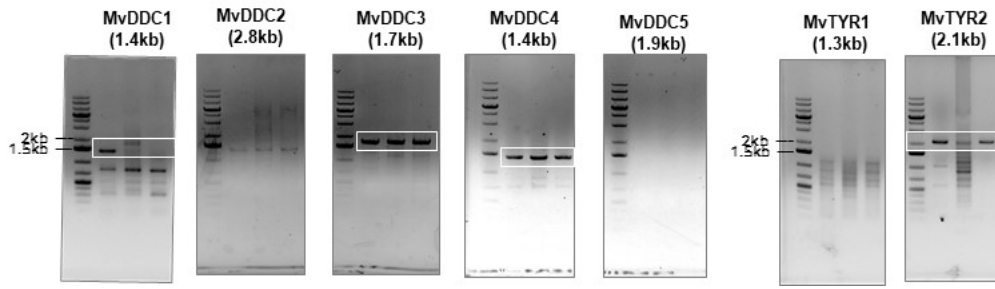


그림 5. KSF0031 배양체 cDNA (1-3 lane: 12도, 4도 1시간, 4도 3시간 배양)를 주형으로 수행한 각 유전자의 코딩 부위 PCR 후 전기영동 결과.

3.2.1. BA 생합성 유전자의 진화적 의미

가. 미세조류 유전체 정보 내 BA 생합성 유전자 조사

- KEGG 데이터베이스 내 27종 유전체 (회조류 1종, 홍조류 3종, 녹조류 8종, 육상식물 3종, Stramenopiles 5종, Rhizaria 1종, 착편모조류 2종, 은편모조류 1종으로 총 24종 미세조류와 대장균, 인간, 효모)를 대상으로 DDC와 TYR 유전자의 존재를 확인하였음.
- DDC는 녹조류 내 녹조강 (Chlorophyceae) 2종, 트리복시오강 (Trebouxiophyceae) 2종에서 확인되고, 착편모조류 *Emiliana huxleyi*, 육상식물 애기장대와 벼, 동물 중 인간의 유전체에서 발견되었음. 반면 TYR의 경우, 홍조류 *Chondrus crispus*, 녹조류 *Chlorella variabilis*, 일부의 Stramenopiles, 착편모조류 *E. huxleyi*, 은편모조류 *Guillardia theta*, 동물 중 인간의 유전체에서 나타남. TYR과 유사한 기능을 하는 TH (tyrosine 3-monooxygenase), PO (polyphenol oxidase) 유전자를 갖는 생물도 있었으나, 녹조류에서는 나타나지 않았음. 따라서 녹조류 *Micractinium variabile* KSF0031와 24종의 미세조류 비교 유전체를 수행한 결과 DDC와 TYR을 동시에 갖는 조류는 녹조류 *C. variabilis*와 착편모조류 *E. huxleyi*로 나타남. (그림 6).

Organism	DDC	TYR	TH	PO
Bacteria				
<i>Escherichia coli</i>				
Animals				
<i>Homo sapiens</i>				
Fungi				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
Glaucophytes				
<i>Cyanophora paradoxa</i>				
Red algae				
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>				
<i>Galdiera sulphuraria</i>				
<i>Chondrus crispus</i>				
Green algae				
<i>Micractinium variabile</i> KSF0031				
<i>Chlorella variabilis</i>				
<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>				
<i>Volvox carterii</i>				
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>				
<i>Ostreococcus tauri</i> (ata)				
<i>Ostreococcus lucimarinus</i> (olu)				
<i>Micromonas commoda</i>				
<i>Micromonas pusilla</i>				
Streptophytes				
<i>Arabidopsis thaliana</i>				
<i>Oryza sativa</i>				
<i>Physcomitrella patens</i>				
Stramenopiles				
<i>Aureococcus anophagefferens</i>				
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>				
<i>Thalassiosira pseudonana</i>				
<i>Fragilariopsis cylindrus</i>				
<i>Ectocarpus siliculosus</i>				
Rhizaria				
<i>Bigelowiella natans</i>				
Haptophytes				
<i>Emiliana huxleyi</i>				
<i>Pavlova lutheri</i>				
Cryptophytes				
<i>Guillardia theta</i>				

그림 6. 미세조류 24종, 대장균, 효모, 인간의 유전체 내 존재하는 DDC, TYR, TH, PO 유전자. 유전자가 있는 경우 파란색, 없는 경우 회색으로 표현

나. KSF0031의 BA 생합성 효소 유전자 존재의 진화적 의미

- 미세조류 유전체 중 DDC와 TYR을 동시에 갖는 조류는 매우 드물게 확인됨. 각 유전자의 기능을 검증하는 과정이 필요하겠지만, 녹조류 *C. variabilis*는 *M. variable*와 계통적으로 가까운 그룹이나 착편모조류 *E. huxleyi*는 진화적으로 매우 먼 관계의 조류임. 따라서 이 두 그룹 내 도파민 생합성 유전자가 보존된 것은 독립적인 과정을 통해 획득한 형질일 것으로 예상됨. 진화적으로 매우 먼 그룹이나 한가지 주목할 공통점은 두 조류의 생장률이 매우 높다는 점으로 *E. huxleyi*는 여름철 북극해에서 대량 발생하는 미세조류이며, *C. variabilis*는 빠른 생장 속도와 높은 광합성 효율로 다양한 산업 분야에 활용되고 있음.
- DDC 유전자는 반응물로 tyrosine, tryptophan, phenylalanin에 반응하는 decarboxylase로 1차 세포내공생 조류 (회조류, 홍조류, 녹조류) 중 일부 녹조류에서 발견되고, 육상식물 애기장대와 벼에도 존재함. 따라서 미세조류와 육상식물의 비교연구를 통해 DDC 유전자의 진화적 의미를 연구할 수 있으며, 또한 기능적 특성을 비교 분석하여 육상식물의 기능향상 등의 응용 연구에 활용 가능함.
- TYR과 TH와 같은 monooxygenase는 도파민 생합성의 중간산물인 트립타민 (tryptamine)을 합성함. 일부 조류에서 TYR을 단독으로 갖거나 혹은 TYR과 TH를 동시에 갖는 경우들이 존재하는 것으로 보아, 미세조류 내 도파민보다 트립타민을 생산하여 BA로서 활용할 가능성이 있다고 생각됨. 트립타민과 도파민의 기능적 차이에 관한 연구 또한 필요할 것으로 생각됨.

3.2. KSF0031 배양체 유래 BA 물질 검출법 개발

3.2.1. KSF0031 배양체의 온도 조건별 전사체 분석

가. BA 생합성 효소 유전자의 상위 조절인자 분석

- 유전자는 특정한 조건에서 정해진 신호전달 과정을 통해 발현되어 기능을 함. 신호전달 과정의 상위 조절인자 (전사 조절인자, transcription factor)는 DDC와 TYR 유전자 서열의 upstream 부위에 결합하여 각 유전자의 발현 여부를 조절함. 식물의 전사 조절인자 데이터 베이스를 활용하여, DDC와 TYR 유전자의 3kb-upstream에 존재하는 전사 조절인자 결합 부위를 조사하였음. 그 결과 AP2 (APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR)와 WRKY 전사 조절 인자의 결합 부위의 빈도가 높았음. 이 두 전사 조절인자는 비생물적 스트레스 반응 (저온, 고온, 건조 등)에 광범위하게 관여하는 것으로 알려져 있음 (표 2).

표 2. 유전자의 3kb-upstream 내에 존재하는 전사 조절인자 결합 부위

	AP2	WRKY	GATA	AT-Hook	TBP	MYB/SANT
MvDDC1	11	1	2	0	0	0
MvDDC3	7	2	2	2	0	1
MvDDC4	14	3	0	2	0	0
MvTYR2	16	2	2	2	2	0
Sum	48	8	6	6	2	1

나. 온도 조건별 전사체 분석 수행

- 다양한 비생물적 환경 조건 중 남극의 저온 환경을 고려하여 KSF0031 배양체를 12도 조건, 2도 조건 (1일, 3일, 7일)에서 배양한 뒤 샘플링하여 total RNA를 추출함. RNA의 추출은 RNeasy Plant mini kit (Qiagen)의 프로토콜을 따라 추출하고, DNase I을 처리하여 DNA를 제거함. 1-2ug의 total RNA를 이용하여 비교 전사체 분석을 의뢰함.
- 전사체 분석 결과 각 조건별 1.8-2.8Gb의 최종 데이터를 획득하였으며, KSF0031 유전체 정보를 바탕으로 assembly를 수행한 결과 총 12,734 유전자의 발현량 변화 데이터를 획득하였음. 각 유전자의 annotation 수행률은 88.5%로 총 11,271 유전자의 정보를 얻었으며, 이 유전자를 활용하여 protein domain (InterProScan), Gene Ontology (BLAST2GO), KEGG pathway (KAAS webtools)를 수행하여 공개된 데이터베이스에서 각 유전자에 해당하는 정보를 수집함.
- 전사체 분석 결과 4개의 DDC transcripts와 1개의 TYR transcripts가 확인되었음. DDC transcripts의 경우 온도 변화에 따른 발현량의 차이가 거의 없었으나 TYR transcripts는 저온에서 증가하는 패턴을 보임. 생화학적인 추가 실험을 통해 두 효소의 반응성 및 온도와의 상관관계에 관한 연구가 필요할 것으로 보임 (그림 7).

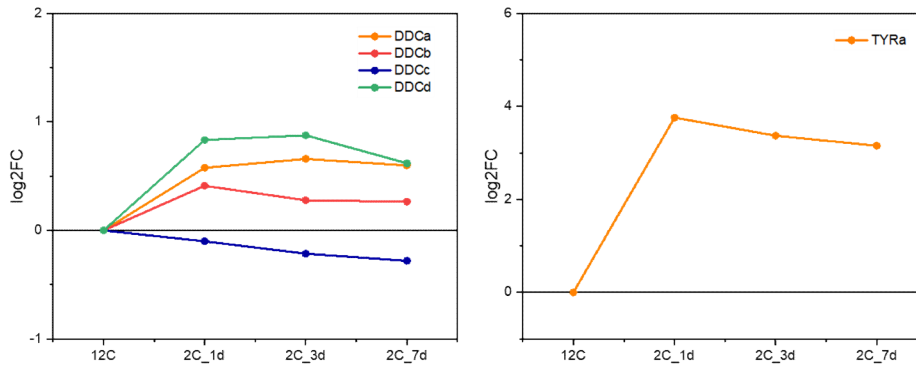


그림 7. 온도별 DDC와 TYR 전사체의 발현량 (log₂FC) 패턴

3.2.2. KSF0031 배양체 유래 BA 물질 검출법 개발

가. 미세조류 유래 BA 검출 조건 최적화

- 최초의 조류 유래 도파민 검출 실험은 해양 무척추동물이 녹조류 *Ulvaria obscura*의 섭식을 회피하는 현상을 이용한 bioassay법이었음 (Van Alstyne et al. 2006). 약 300g의 해조류를 건조하여 flash column chromatography와 HPLC를 통해 분리한 후 GC/MS를 이용하여 해당 물질을 동정하는 실험법으로 다량의 초기 물질이 필요로 하는 단점이 있었음. 해양 해조류에 비해 미세조류는 배양을 통한 회수율이 낮아, 적은 양의 배양체를 이용하여 정확한 분리 동정을 할 수 있는 검출법 개발이 필요하였음.
- 도파민 등의 BA 물질이 친수성인 점을 고려하여, 용매는 DW와 20-100% MeOH을 사용하여 추출을 수행하였음. 8-12도의 조건에서 배양한 KSF0031 배양체를 수확하여 동결건조한 뒤 0.2g의 파우더를 용매 5ml에 녹여 상온에서 하룻동안 추출하였음. 추출물은 filter paper로 거른 뒤 상층액을 0.22um syringe filter를 이용하여 걸러 회수함. 추출물은 기준물질인 dopamine hydrochloride (Sigma Cat. H8502)과 함께 dansylation을 통해 유도체를 만든 뒤 LC-MS/MS 장비를 이용하여 기준물질과 동일한 시간에 검출되는 물질을 선별하고 그 양을 정량적으로 산출함.
- 미세조류 0.2g DCW을 5ml 용매 (20% MeOH)에 녹여 최종 획득한 추출물은 약 1.5-2ml 정도였으며, 한 번의 LC-MS/MS 실험에는 약 0.5ml이 사용되었음. 따라서 미세조류 최소 준비량은 약 0.1-0.2g 건중량으로 가능할 것으로 판단됨. 용매 내 수분 함량이 감소할수록 추출되는 도파민의 양이 감소하는 양상을 보였으므로 도파민 추출을 위한 최적 용매 조건 20% MeOH로 정하였음. 추출 시간을 1일 - 7일까지 실험한 결과, 추출되는 양이 시간이 비례하여 증가하지 않으므로 최적 추출 시간은 1일로 정하였음 (그림 8).

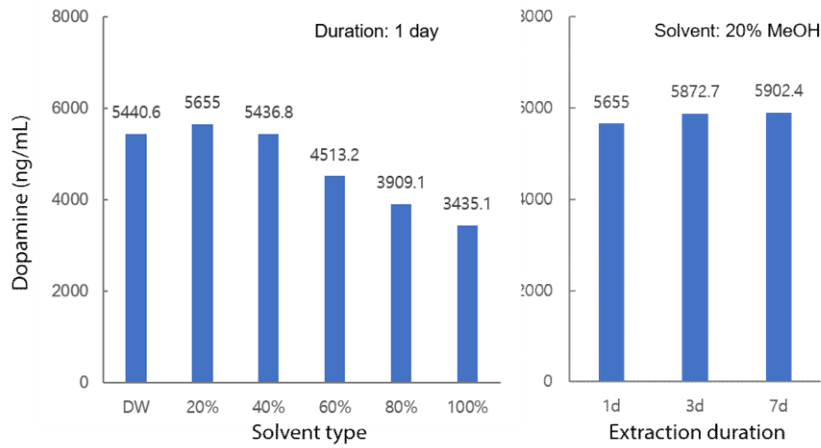


그림 8. BA 물질 검출을 위한 용매 및 추출 시간 최적화 실험

나. KSF0031 세포 추출물 유래 BA 물질 분석 결과

- 앞서 확보한 검출법을 이용하여 KSF0031 유래 다양한 BA 물질을 검출하기 위하여 기준물질을 도파민 외 6종을 추가하여 분석을 수행함. 추가된 기준물질은 mono-amine류에 해당하는 타이라민 (tyramine, 도파민 중간산물), 트립타민 (tryptamine, 세로토닌 중간산물), 히스타민 (histamine)과 poly-amine류에 해당하는 카다버린(cadaverine), 푸트리신 (putrescine), 페닐에틸아민 (phenylethylamine)임.
- 7종 BA 물질 중 도파민이 5.6mg/ml로 가장 높게 나타났으며, 푸트리신이 2.5mg/ml로 두 번째로 높게 나타남. 소량의 BA 물질로 카다버린이 검출되었으며, 극소량의 트립타민과 페닐에틸아민이 검출되었고 타이라민과 히스타민은 검출되지 않았음 (그림 9).
- 이로써 KSF0031 배양체는 주요 BA 물질로 도파민과 푸트리신을 생산함을 확인할 수 있었으며, 소량의 트립타민 (세로토닌 중간산물)이 검출된 결과로 미루어 보아 세로토닌의 생산 가능성도 확인이 필요함. 도파민과 트립타민 생성에 관여하는 DDC와 TYR 효소는 배양체 내에서 그 기능을 할 것으로 예측되며, 추가로 검출된 폴리아민류 푸트리신과 카다버린의 생합성 효소에 관한 조사가 필요함.

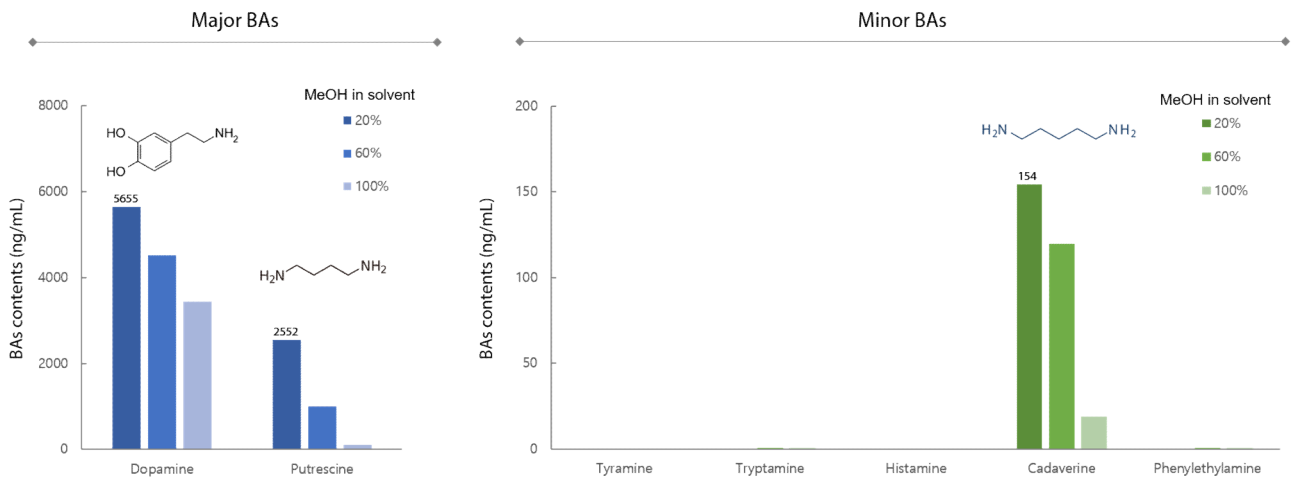


그림 9. KSF0031 배양체 유래 용매 조건에 따른 7종 BA 물질의 검출 결과.

제 4 장

연구개발목표 달성도 및 대외 기여도



4.1. 연구개발 목표 달성도

년도	성과목표	지표	목표치	가중치	평가기준	달성치
2022	KSF0031 유전체 정보 기반 BA 생합성 효소 조사	BA 생합성 효소 후보군 발굴	3건 이상	5	제시여부	100
		유전자 서열 확보	3건 이상	15	확보여부	100
		도메인 구조 분석	3건 이상	5		100
		비교 유전체 분석 수행	20종 이상	15		100
	KSF0031 배양체 유래 BA 물질 검출법 개발	조건별 전사체 분석 수행	완료	10		100
		조건별 유전자 발현패턴 제시	2건	5		100
		BA 검출법 최적화	완료	15	완료 여부	100
		KSF0031 추출물을 이용한 BA 물질 검출 결과	5종 이상	20	검출법 검증	100
	국제학회 발표	구두 발표 여부	1건	10		100

4.2. 대외기여도

- 온도별 전사체 시퀀싱 결과의 KPDC 등록 완료

KPDC ID	File name	Description	Size (Mb)
KOPRI-KPDC-00002176	KSF0031-12C-1.fastq.gz	RNA-seq data of KSF0031 by 12°C treatment	862.5
	KSF0031-12C-2.fastq.gz		885.8
	KSF0031-2C-1d-1.fastq.gz	RNA-seq data of KSF0031 by 2°C for 1 day treatment	715.5
	KSF0031-2C-1d-2.fastq.gz		731.0
	KSF0031-2C-3d-1.fastq.gz	RNA-seq data of KSF0031 by 2°C for 3 days treatment	666.5
	KSF0031-2C-3d-2.fastq.gz		681.0
	KSF0031-2C-7d-1.fastq.gz	RNA-seq data of KSF0031 by 2°C for 7 days treatment	655.7
	KSF0031-2C-7d-2.fastq.gz		680.5

제 5 장
연구개발 결과의 활용계획



5.1. 연구개발 결과의 활용계획

가. BA 검출법 활용방안

- 연구 개발한 BA 검출법을 다른 미세조류 및 환경시료 (물 또는 토양 등)에 존재하는 BA 물질 스크리닝에 활용하여 극지 생태계 내 BA 물질이 존재 여부, BA 물질이 생물량 변동에 미치는 영향 등을 조사하여 **생태계 내 생물간 상호작용 물질로의 기능**을 연구하고자 함. 이러한 연구는 남극 담수생태계의 형성 과정, 먹이사슬 유지 및 군집 다양성 형성에 중요한 결과로 활용될 것으로 생각됨.
- 미세조류는 극지 생태계 먹이사슬에서 에너지를 공급하는 주요 생물군임. 담수, 해수, 육상 및 눈에 서식하고 광합성을 통해 대기 중 이산화탄소를 고정하여 에너지를 생산하고, 이를 포식자에게 전달하는 중요한 기능을 함. 따라서 1차 생산자인 미세조류의 개체군 증감은 극지 생태계 먹이사슬의 구조와 크기를 결정하는 요인됨. 본 과제에서 연구개발한 BA 검출법을 이용하여 극지역 생태계 모니터링 연구로써 **미세조류 개체군 변동의 예측지표로 활용** 가능한지를 연구하고자 함.

나. 도파민 생합성 효소의 생화학적·생물학적 기능 연구

- 미세조류 내 BA 생합성 효소는 독특한 진화과정을 통해 획득한 형질로 예측되므로, *C. variabilis*와 *E. huxleyi*에 존재하는 유전자와의 비교를 통해 이 효소의 생화학적 기능, 단백질 구조적 특징과 진화적 의미를 밝히고자 함. 또한 KSF0031을 포함한 *C. variabilis*와 *E. huxleyi*는 모두 생장률이 높으며, 특히 *E. huxleyi*는 북극해에 대량 발생을 하는 종으로 알려져 있음. 이들 3종의 도파민 생합성 유전자의 비교연구를 통해 **극지 미세조류의 대량 발생과 도파민과의 상관관계**에 관한 추가적인 연구를 수행하고자 함.
- KSF0031 배양체를 모델생물로 하여 극지 미세조류가 분비하는 **도파민의 생물학적 기능**에 관한 연구를 수행하고자 함. 도파민의 분비 경로, 도파민 수용체의 존재 여부, 외부에서 주어진 도파민이 생장에 미치는 영향 등을 조사하고자 함. 또한 도파민 등의 BA 물질을 스스로 합성하지 않는 미세조류 배양체의 생장에 어떤 영향을 미치는지 연구하고자 함.

다. 극지 미세조류의 대량 발생과 기후변화의 상관관계 연구

- 최근 극지역의 이례적인 기온상승이 기록되면서 미세조류의 대량 발생이 빈번히 관찰되고 있어 **기온상승과 미세조류 대량 발생 사이의 연관성에 관한 연구**가 주목받고 있음. 극지역 눈에서 대량 발생하는 미세조류를 snow algae라 부르며 눈이라는 독특한 서식 환경에서 발견되고 있어 최근 생태생리학적 연구가 다수 이루어지고 있음.
- 현재까지 극지역 미세조류 대량 발생의 생리적 특성에 관한 연구는 알려진 바 없음. snow algae는 눈 표면에서 이산화탄소 고정 능력이 남극 식물만큼 높다는 것이 알려지면서 생태적 역할의 중요성이 높아지고 있음. 아직까지 도파민과 같은 물질이 snow algae의 대량 발

생과 어떤 연관성이 있는지 알 수 없으나, 본 연구과제에서 연구 개발한 내용을 snow algae 연구로 확장하여 적용한다면 대량 발생 현상에 대한 이해를 높일 수 있을 것으로 예상함.

라. 전사체 정보를 활용한 추가 유용자원 발굴 연구

- 온도 조건별 유전자의 발현량을 서로 비교하여 발현량의 변동이 유의미한 유전자군을 선별하기 위한 DEG (differentially expressed gene) 분석을 수행함. 저온 처리 1-7일 조건에서 항상 up-regulation 되는 유전자는 총 225개이며, 항상 down-regulation 되는 유전자는 총 309개로 각 유전자의 상위 10% 유전자의 정보는 표 3-4에 나타남. 미세조류의 유전체 연구는 다른 생물에 비해 유전자의 기능연구가 많이 이루어져 있지 않아, 일부 hypothetical protein으로 분류되거나 annotation이 되지 않은 유전자도 목록에 있음. 하지만 이 목록에 명명되지 않은 신규 유전자들이 저온에서 매우 중요한 기능을 수행하고 있으므로, 이 유전자에 관한 연구가 극히 미세조류의 특성을 이해하는데 중요한 정보를 제공할 것으로 예상된다.

표 3. 저온 조건에서 항상 up-regulation 되는 상위 10% 유전자의 목록

No.	NR Description
up-01	PSC68059.1_fucoxanthin chlorophyll a c [Micractinium conductrix]
up-02	n/a
up-03	PSC76641.1_fasciclin [Micractinium conductrix]
up-04	PRW60807.1_putative metal-nicotianamine transporter YSL6 [Chlorella sorokiniana]
up-05	n/a
up-06	PSC70183.1_Carotene biosynthesis-related CBR [Micractinium conductrix]
up-07	PSC70526.1_autophagy-related 18a [Micractinium conductrix]
up-08	PRW50936.1_Carotene biosynthesis-related CBR [Chlorella sorokiniana]
up-09	n/a
up-10	PRW20344.1_oxidoreductase isoform A [Chlorella sorokiniana]
up-11	PSC72013.1_hypothetical protein C2E20_4764 [Micractinium conductrix]
up-12	KXZ52931.1_hypothetical protein GPECTOR_8g307 [Gonium pectorale]
up-13	XP_005850847.1_hypothetical protein CHLNCDRAFT_140444 [Chlorella variabilis]
up-14	PSC72746.1_serine threonine-kinase EDR1 isoform X1 isoform A [Micractinium conductrix]
up-15	PSC72722.1_UPF0454 C12orf49lags:Precursor [Micractinium conductrix]
up-16	n/a
up-17	XP_005845072.1_hypothetical protein CHLNCDRAFT_137368 [Chlorella variabilis]
up-18	PSC70732.1_methyltransferase sll0829 [Micractinium conductrix]
up-19	n/a
up-20	n/a
up-21	PSC72013.1_hypothetical protein C2E20_4764 [Micractinium conductrix]
up-22	PRW57178.1_putative plastid-lipid-associated chloroplastic [Chlorella sorokiniana]
up-23	PSC72964.1_N-acetyltransferase 10 isoform A [Micractinium conductrix]

표 4. 저온 조건에서 항상 down-regulation 되는 상위 10% 유전자의 목록

No.	NR Description
down-01	n/a
down-02	PSC76510.1_hypothetical protein C2E20_0311 [Micractinium conductrix]
down-03	XP_005845186.1_hypothetical protein CHLNCDRAFT_137395 [Chlorella variabilis]
down-04	n/a
down-05	n/a
down-06	PSC71762.1_fucoxanthin chlorophyll a c [Micractinium conductrix]
down-07	PSC74521.1_Myb-related B isoform B [Micractinium conductrix]
down-08	PSC76510.1_hypothetical protein C2E20_0311 [Micractinium conductrix]
down-09	WP_054160519.1_hypothetical protein [Rhizobium sp. AAP43]
down-10	PSC74952.1_PHR1-LIKE 1 [Micractinium conductrix]
down-11	ADZ36804.1_hypothetical protein [Chlorella vulgaris]
down-12	PSC76507.1_7-hydroxymethyl chlorophyll a chloroplastic [Micractinium conductrix]
down-13	PSC76442.1_putative Chi [Micractinium conductrix]
down-14	PSC69835.1_ABC transporter G family member 31 [Micractinium conductrix]
down-15	XP_005845521.1_hypothetical protein CHLNCDRAFT_136623 [Chlorella variabilis]
down-16	n/a
down-17	n/a
down-18	PSC70191.1_zinc finger CCCH domain-containing 11 [Micractinium conductrix]
down-19	XP_005845634.1_hypothetical protein CHLNCDRAFT_136637 [Chlorella variabilis]
down-20	KAH7282539.1_hypothetical protein KP509_35G035300 [Ceratopteris richardii]
down-21	n/a
down-22	PSC67992.1_POC1 centriolar-like protein A-like isoform X1 [Micractinium conductrix]
down-23	KAH7620489.1_hypothetical protein NADE_003107 [Chlorella desiccata (nom. nud.)]
down-24	n/a
down-25	WP_161806449.1_lecithin retinol acyltransferase family protein [Desulfocarro indianensis]
down-26	WP_163445062.1_hypothetical protein [Flavobacterium columnare]
down-27	PSC72620.1_hypothetical protein C2E20_4085 [Micractinium conductrix]
down-28	XP_005852002.1_hypothetical protein CHLNCDRAFT_132922 [Chlorella variabilis]
down-29	PSC76939.1_regulator of chromosome condensation RCC1 [Micractinium conductrix]
down-30	n/a
down-31	MBC5800019.1_tyrosine-type recombinase/integrase [Candidatus Eremiobacteraeota bacterium]

제 6 장

연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술 정보



6.1.1. 연구개발과정에 수집한 해외 연구정보

- 수집한 연구 정보: Conte, M., Lupette, J., Seddiki, K., Mei, C., Dolch, L. J., Gros, V., ... & Maréchal, E. (2018). Screening for biologically annotated drugs that trigger triacylglycerol accumulation in the diatom *Phaeodactylum*. *Plant physiology*, 177(2), 532-552.
- 해당 논문은 해양 규조류 *Phaeodactylum tricornutum*에서 TAG 축적을 유발하는 약리 화합물을 스크리닝하기 위해 약 1,200개의 약물 라이브러리를 처리한 뒤 TAG의 축적률을 조사하였음. 그 과정에서 다 수의 세로토닌 반응 물질이 검출되어 해당 미세조류가 세로토닌 수용체 및 세로토닌 관련한 대사 과정이 존재함을 시사하고 있음. 이와 같은 연구 결과는 생태계 내 미세조류가 mono-amine류인 세로토닌과 같은 물질을 합성하거나 이를 이용하는 기작이 존재할 수 있음을 의미함. 따라서 본 연구개발 내용이 미세조류 내에 일반적으로 존재하는 현상일 가능성이 있음.

Table 1. Compounds selected after the secondary screen

Chemical Abstracts Service (CAS) numbers are indicated. Results of the three independent dose-response analyses are compiled, with high Nile Red (NR) dose-dependent detection and toxicity. Previously characterized targets of the selected compounds are classified based on general biological function and/or molecular features.

Chemical Name	CAS No.	Tertiary Screen Results (Triplicate) and Toxicity (*) in the Tested Concentration Range	Previously Characterized Targets	Known Side Activities on Cytochrome P450 (CYP) Involved in Sterol Metabolism	References
Nucleic acid biosynthesis and cell division					
Pentamidine	140-64-7	High NR in two of three tests	Nucleic acid-binding activity		Overington et al. (2006)
Oxytetracycline	6153-64-6	High NR in two of three tests	Nucleic acid-binding activity		Overington et al. (2006)
Ifosfamide	3778-73-2	High NR in two of three tests	Alkylation of DNA	CYP2B6 (steroid hydroxylase) modulator	Furlanut and Franceschi (2003); Chen et al. (2005)
Rifaximin	80621-81-4	High NR in two of three tests	RNA polymerase-blocking agent		Overington et al. (2006)
Nocodazole	31430-18-9	High NR in three of three tests (>120%)	Microtubule-depolymerizing agent		Baas et al. (2016)
Membrane receptors					
Xylometazoline	1218-35-5	High NR in three of three tests (>120%; *)	Adrenergic receptor agonist		Haenisch et al. (2010)
Labetalol	32780-64-6	High NR in two of three tests	Adrenergic receptor agonist	CYP2D6 (steroid hydroxylase) inhibitor	Riva et al. (1991); Preissner et al. (2010)
Acebutolol	34381-68-5	High NR in two of three tests	Adrenergic receptor agonist	CYP2D6 (steroid hydroxylase) inhibitor	van den Meiracker et al. (1988); Preissner et al. (2010)
Meclozine	1104-22-9	High NR in two of three tests	Dopamine (precursor of adrenaline) antagonist		Haraguchi et al. (1997)
Serotonin	153-98-0	High NR in two of three tests	Serotonin receptor ligand		Pytliak et al. (2011)
Alverine	5560-59-8	High NR in three of three tests (>120%; *)	Serotonin receptor antagonist		Coelho et al. (2001)
Pirenperone	75444-65-4	High NR in two of three tests	Serotonin receptor antagonist		Pawłowski et al. (1985)
Hyoscyamine	101-31-5	High NR in two of three tests	Acetylcholine receptor antagonist		Huang et al. (1998)
Pipenzolate	125-51-9	High NR in two of three tests	Acetylcholine receptor antagonist		Attwood (1976)
Mecamylamine	826-39-1	High NR in two of three tests	Acetylcholine receptor antagonist		Overington et al. (2006)
Bephenium	3818-50-6	High NR in two of three tests	Acetylcholine receptor antagonist		Qian et al. (2006)
Dimaprit	23256-33-9	High NR in two of three tests	Histamine [2-(1H-imidazol-4-yl) ethanamine] H2 receptor antagonist		Shteinikov et al. (2017)
Membrane transporters					
Bendroflumethiazide	73-48-3	High NR in two of three tests	Solute carrier family 12 member 3 inhibitor/carbonic anhydrase inhibitor		Chen et al. (2002); Tricarico et al. (2006)
Rimantadine	13392-28-4	High NR in three of three tests (>120%; *)	Proton pump inhibitor		Imming et al. (2006)
Gaboxadol	64603-91-4		Proton-coupled amino acid transporter		Larsen et al. (2010)
Antimycin A	1397-94-0	High NR in three of three tests (>120%)	Mitochondria or chloroplast electron transport chains		Shikanai (2014); Georgakopoulos et al. (2017)
Sterol metabolism					

(Table continues on following page.)

제 7 장
참고문헌



- Chae, H., Lim, S., Kim, H. S., Choi, H. G., & Kim, J. H. (2019). Morphology and phylogenetic relationships of *Micractinium* (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae) taxa, including three new species from Antarctica. *ALGAE*, 34(4): 267-275
- Cho, S. M., Kim, S., Cho, H., Lee, H., Lee, J. H., Lee, H., ... & Lee, J. (2019). Type II ice-binding proteins isolated from an arctic microalga are similar to adhesin-like proteins and increase freezing tolerance in transgenic plants. *Plant and Cell Physiology*, 60(12), 2744-2757.
- Conte, M., Lupette, J., Seddiki, K., Meï, C., Dolch, L. J., Gros, V., ... & Maréchal, E. (2018). Screening for biologically annotated drugs that trigger triacylglycerol accumulation in the diatom *Phaeodactylum*. *Plant physiology*, 177(2), 532-552.
- Kim, E. J., Chae, H., Koo, M. H., Yu, J., Kim, H., Cho, S. M., ... & Han, S. J. (2022). Statistical optimization of phytol and polyunsaturated fatty acid production in the Antarctic microalga *Micractinium variabile* KSF0031. *Algae*, 37(2), 175-183.
- Kim, K. M., Ji, K. Y., Choi, Y. J., Heo, J. B., Youn, U. J., Kim, S., ... & Chae, S. (2023). The Safety and Efficacy of 1-Monoeicosapentaenoin Isolated from the Trebouxiophyceae *Micractinium* on Anti-Wrinkle: A Split-Face Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Study. *Journal of Clinical Medicine*, 12(2), 587.
- Oleskin, A. V., Postnov, A. L., & Boyang, C. (2021a). Impact of biogenic amines on the growth of a *Chlorella vulgaris* culture. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, 11(1), 49-53.
- Oleskin, A. V., Postnov, A. L., & Boyang, C. (2021b). Impact of biogenic amines on the growth of green microalgae. *J. Pharm. Nutr. Sci*, 11, 144-150.
- Van Alstyne, K. L., Nelson, A. V., Vyvyan, J. R., & Cancilla, D. A. (2006). Dopamine functions as an antiherbivore defense in the temperate green alga *Ulvaria obscura*. *Oecologia*, 148, 304-311.
- Zhang, X., Cvetkovska, M., Morgan-Kiss, R., Hüner, N. P., & Smith, D. R. (2021). Draft genome sequence of the Antarctic green alga *Chlamydomonas* sp. UWO241. *Iscience*, 24(2), 102084.

연구·정책지원사업 최종 결과보고서 평가의견 반영사항

과제 구분	신진연구원 지원과제								
과제명	<i>Micractinium variable</i> KSF0031 유래 생체생성아민 (BAs) 생합성 효소 조사와 BAs 검출법 개발 (계정번호: PE22300)	연구기간	2022. 3. ~ 2022. 12. (10개월)						
연구책임자	조성미	연구비(직접비)	30,000천원						
과제개요, 연구성과 및 최종 결과보고서 평가의견 반영 사항									
<p>(1) 과제목적</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 극지 미세조류 고부가가치의 신규 물질이 꾸준히 발견되고 있음에도 불구하고 낮은 생산률로 인해 경제성 확보에 어려움이 있음. 이를 극복하기 위하여 높은 생산률을 보이는 KSF0031 배양체의 고품질 유전체 정보를 활용하여 극지 미세조류의 생산 촉진 기작을 연구하고자 함. ○ 본 과제는 생산 촉진 후보물질인 생체생성아민(BAs)의 생합성 효소가 유전체 내에 존재하는지 확인하고, 미세조류에 최적화된 BAs 검출법을 개발하여 KSF0031 배양체에서 BAs의 정성, 정량 분석을 수행하는 것을 목적으로 함. <p>(2) 최종성과</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Micractinium variable</i> KSF0031 유전체 내 BAs 생합성 효소 2종의 염기서열 확보 및 온도변화에 따른 BAs 생합성 효소 유전자의 발현패턴 확인 ○ 미세조류 대상으로 BAs의 정량 정성분석이 가능한 LC-MS/MS 프로토콜 개발 ○ <i>M. variable</i> KSF0031의 추출물 대상으로 BAs 7종의 정량 분석 수행 결과 도파민, 푸트리신, 카다버린을 검출함. <p>(3) 성과의 향후 연구소 활용방안 또는 기대효과</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 극지 환경시료 및 미세조류 생물시료에 BAs 검출법을 적용하여 극지 생태계 내 BAs 물질의 존재 여부, BAs 물질이 생물량 변동에 미치는 영향 등을 조사하여 생태계 내 생물간 상호작용 물질로의 기능 연구 ○ 극지 미세조류 내 도파민의 분비 경로, 도파민 수용체의 존재 여부 및 생장에 미치는 영향 등을 조사하여 도파민의 생물학적 기능 연구 수행 ○ 일부 미세조류에서 발견된 도파민 생합성 유전자의 생화학적 특성 연구 및 진화적 의미 부여 ○ 극지 미세조류의 대량 발생과 기후변화와의 상관관계 연구로 확장 <p>(4) 최종 결과보고서에 평가의견 반영 사항</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 10px;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%;">평가의견</th> <th style="width: 30%;">반영사항</th> <th style="width: 30%;">비고</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>○ 보고서 초안의 완성도가 높음</td> <td>○ 해당사항 없음</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>				평가의견	반영사항	비고	○ 보고서 초안의 완성도가 높음	○ 해당사항 없음	
평가의견	반영사항	비고							
○ 보고서 초안의 완성도가 높음	○ 해당사항 없음								

※ 본 양식은 필요시 작성하여 최종결과보고서에 포함하여 제출

(국내 과제용)

주 의

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