

극지요각류의 영양대사체 및 관련 유전체의 분석을
통한 극지환경적응기작 연구

Study of polar environmental adaptation mechanism through
analysis of nutrient metabolism and it related genome in the
Antarctic copepod



성균관대학교 산학협력단

극지요각류의 영양대사체 및 관련 유전체의 분석을 통한 극지환경적응기작 연구
성균관대학교



제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지 바이오 대사체 상용화 구축 사업” 과제의 위탁연구 “극지요각류의 영양대사체 및 관련 유전체의 분석을 통한 극지환경적응기작 연구” 과제의 단계보고서로 제출합니다.



(본과제) 총괄연구책임자	:	임정한
위탁연구기관명	:	성균관대학교 산학협력단
위탁연구책임자	:	이재성
위탁참여연구원	:	변은진
“	:	김민섭
“	:	윤덕서
“	:	이요섭
“	:	정학수
“	:	왕초흠

보고서 초록

위탁연구과제명	극지요각류의 영양대사체 및 관련 유전체의 분석을 통한 극지환경적응기작 연구				
위탁연구책임자	이재성	해당단계 참여연구원수	6명	해당단계 연구비	140,000,000 원
연구기관명 및 소속부서명	성균관대학교 산학협력단		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
요약				보고서 면수	32
<p>○ 연구목적</p> <p>극지요각류 <i>Tigriopus kingsejongensis</i>를 활용하여 극지환경 적응에 있어 유용한 유전체 및 영양대사의 정보를 확보하고 환경변화에 따른 대사 경로의 변화를 규명하여 궁극적으로 에너지 대사체와 유전체의 상관관계에 대한 핵심기반지식을 구축</p> <p>○ 연구 수행 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 극지요각류의 전사체, 및 유전체를 확보하여 JBrowse DB 구축 - 구축된 유전체로부터 단백질, 탄수화물, 지질 대사와 관련 유전자 동정 및 분류 - 극지환경 변화 (온도, 염도) 등의 변화에 따라 유발되는 에너지대사체 (지질 등)와 유전자들의 변화를 통한 상관관계 및 분자수준에서의 적응기작 규명 <p>○ 연구 개발결과의 활용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 연구개발결과의 활용계획 본 연구를 통해 향후 극지의 환경변화가 극지 해양생물에 미칠 수 있는 영향을 유전체의 global expression pattern 분석뿐 아니라 영양대사체의 변화를 통한 분자생체지표로 쓰일수 있고, 극지 해양생물을 연구하는데에 기초자료로써 제시할 수 있다. - 극지 해양 환경변화에 반응하는 극지 요각류 유전자의 발굴을 통하여 환경감시체계의 수립에 기초 자료를 제공할 수 있으며, 나아가 향후 예상되는 환경오염을 예측할 수 있는 기반자료를 마련할 수 있다. - 극지 요각류 <i>Tigriopus kingsejongensis</i>의 분자생체지표용 유전체의 개발뿐 아니라 이를 이용한 단백질의 생산 및 항체 제작 등으로 이어가 이를 이용한 상업적인 연구도 가능하다. 					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	극지요각류, 유전체, 지질대사체, 탄수화물대사체, 단백질대사체			
	영 어	Antartic copepod, genome, transcriptome, proteome, lipids, carbohydrates			

요 약 문

I. 제 목

극지요각류의 영양대사체 및 관련 유전체의 분석을 통한 극지환경적응기작 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

극지요각류 *Tigriopus kingsejongensis*를 활용하여 극지환경 적응에 있어 유용한 유전체 및 영양대사의 정보를 확보하고 환경변화에 따른 대사 경로의 변화를 규명하여 궁극적으로 에너지 대사체와 유전체의 상관관계에 대한 핵심기반지식을 구축

III. 연구개발의 내용 및 범위

극지요각류에서의 발달단계 정보 확보 및 JBrowse DB 구축

- *Tigriopus kingsejongensis*의 JBrowse DB 구축
- 극지환경 변화 시 일어나는 극지요각류의 발달단계 변화관찰

극지환경적응기작 관련 영양대사 유전체 동정

- 극지환경적응기작 관련 지질대사 유전체 및 지질대사체 동정
- 극지환경적응기작 관련 단백질, 탄수화물대사 유전체 및 해당 대사체 동정

극지환경변화 및 오염원에 대한 유전체 활용 및 영양대사경로 파악

- 극지환경 변화에 대한 에너지 대사체의 변화량 분석
- 극지환경 변화 및 오염원에 의해 변화하는 유전체와 영양대사체의 상관관계 분석

IV. 연구개발결과

- 극지요각류의 전사체, 및 유전체를 확보하여 JBrowse DB 구축
- 구축된 유전체로부터 단백질, 탄수화물, 지질 대사와 관련 유전자 동정 및 분류
- 극지환경 변화 (온도, 염도) 등의 변화에 따라 유발되는 에너지대사체 (지질 등)와 유전자들의 변화를 통한 상관관계 및 분자수준에서의 적응기작 규명

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통해 향후 극지의 환경변화가 극지 해양생물에 미칠 수 있는 영향을 유전체의 global expression pattern 분석뿐만 아니라 영양대사체의 변화를 통한 분자생체지표로 쓰일 수 있고, 극지 해양생물을 연구하는데에 기초자료로써 제시할 수 있다.

S U M M A R Y

I. Title

Study of polar environmental adaptation mechanism through analysis of nutrient metabolism and it related genome in the Antarctic copepod

II. Purpose and Necessity of R&D

The purpose of this study is to construct the genome and transcriptome of Antarctic copepod, *Tigriopus kingsejongensis*, and to use it to identify useful genetic information related to carbohydrate, protein, and fat metabolism that adapts to changes in the polar environment.

III. Contents and Extent of R&D

Identification of changes in the developmental stage of Antarctic copepod, *Tigriopus kingsejongensis*, and the establishment of JBrowse DB

Identification of carbohydrate, protein, and lipid genes related to polar environmental changes

Correlation Analysis of Genetic and Nutritional Metabolism Changes by Polar Environmental Changes and Pollution Sources

IV. R&D Results

- Establish the JBrowse DB of Antarctic copepod, *Tigriopus kingsejongensis*
- Identification and classification of proteins, carbohydrates, lipid metabolism related genes from the Antarctic copepod, *Tigriopus kingsejongensis*
- Correlation between energy metabolites caused by changes in polar environment (temperature, salinity), and the correlation of genes and the identification of adaptation mechanisms at the molecular level.

V. Application Plans of R&D Results

The genome and transcriptome of *Tigriopus kingsejongensis* built through this study can help research other polar marine species, and the identified carbohydrate, proteins, and lipid metabolism-related genes can help analyze the global expression patterns of genes that change according to changes in the polar environment.

목 차

제 1 장 서론	
1-1. 연구개발의 목적	6
1-2. 연구개발 필요성	6
제 2 장 국내외 기술개발 현황	
2-1. 국내 동향	7
2-2. 국외 동향	7
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	
3-1. 연구개발 목표	8
3-2. 연구개발 내용 및 결과	8
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	
4-1. 연구개발목표 달성도	27
4-2. 연구개발목표 대외기여도	29
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	30
제 6 장 참고문헌	31

제 1장 서론

제 1절. 연구개발 목표

극지요각류 *Tigriopus kingsejongensis*를 활용하여 극지환경 적응에 있어 유용한 유전체 및 영양대사의 정보를 확보하고 환경변화에 따른 대사 경로의 변화를 규명하여 궁극적으로 에너지 대사체와 유전체의 상관관계에 대한 핵심기반지식을 구축한다.

제 2절. 연구개발의 필요성

1. 생물다양성 협약, 남극조약 등 생물자원에 대한 중요성이 지속적으로 증가하고 있으며, 특히 극지생물은 극지환경에서 생존하기 위한 특이적 작용 메커니즘 등을 보유하고 있어, 다른 지역에서 서식하는 생물들과는 차별되는 생물자원으로 가치가 높다.
2. 이러한 극지생물로부터 유전체 정보, 및 대사체 등을 확보하여, 극지생화학, 분자생물학 분야에서의 신규 유전자원, 대사체 발굴을 통해 궁극적으로는 생체기능, 생물공정, 신소재 활용 등 기술개발까지의 가능성을 열어둘 수 있으며, 기초정보의 축적이라는 측면에서도 세계 선도적인 연구집단으로 부상할 수 있다.
3. 최근 지구온난화, 해양산성화, 저산소증, 미세플라스틱 등 환경 변화요소가 급부상하며 극지역의 생태계도 변화를 맞고 있다. 이러한 변화에 대비하기 위해, 다양한 극지환경변화 요소가 생물체에 미치는 영향을 생태, 생리, 분자적 측면에서의 연구를 수행하여 궁극적으로는 극지생명체의 먹이사슬 변화, 종 분화 등에 대한 정보를 예측하는 것이 매우 중요하다.

제 2장 국내외 기술개발 현황

제 1절. 국내 동향

1. 극지 연구 중 기후학, 대기학, 지질학 등에 대비하여 생태 및 생물학 분야는 상대적으로 많은 관심과 집중이 이루어지지 않고 있다. 생태 및 생물학 분야들의 연구는 현재 극지 생태계에 서식하는 생물들의 종 동정 및 분류에 집중되고 있으며, 유전체 정보는 계통분류학에 필요한 수준의 marker DNA나 mitochondrial DNA 등 소수 정보가 활용되고 있다.
2. 극지 생물체 연구에 필요한 안정적인 배양 시설을 갖춘 곳 역시 극지연구소 외에는 거의 없는 실정이며, 기반 인프라와 정부 투자의 부족으로 대학이나 연구소 등 다양한 연구기관의 시설 투자는 현재까지 미비한 수준이다.
3. 극지 생물들을 이용하여 생태계와 환경을 연구하기 위해서는 이미 생태·생리학 및 유전학적으로 잘 밝혀진 모델 생물종이 아닌 비 모델 생물들에 대한 지식과 연구 경험이 풍부해야 하지만, 모델 생물들이 아닌 비생물종을 이용하여 다양한 측면에서 접근하는 연구 방법을 보유한 연구기관은 극히 드물다.

제 2절. 국외 동향

1. 극지 연구는 현재 선진국들을 중심으로 (영국, 미국, 독일 등) 대규모의 투자가 이루어져 연구들이 수행되고 있으며, 정부 지원 및 기업체 차원에서 연구 자금 투자가 이루어져 연구결과를 생산하고 있다.
2. 극지연구자들은 주기적으로 “국제극지의 해 (IPY)” 프로그램을 이용하여 극지 뿐 아니라 전 지구적 환경변화 관련 연구를 수행한다. 이들 프로젝트들 중 상당수는 환경생태 및 생물 관련 연구에 집중되어 있으며, 극지환경 적응에 필요한 생리·생태적 뿐만 아니라 생화학 및 분자생물학적 적응기작을 밝히고, 극지의 환경변화에 대한 생물들의 반응과 스트레스 등을 연구하는 것이 중요한 주제이다.
3. 하지만, 온난화, 저산소화, 미세플라스틱 등 극지환경 변화로 인해 발생할 수 있는 생물체의 변화 및 생화학적, 대사학적 변화에 대한 연구는 국제적으로도 미진한 수준에 있다.

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절. 연구개발 목표

가. 연구개발 최종 목표

극지요각류 *Tigriopus kingsejongensis*를 활용하여 극지환경 적응에 있어 유용한 유전체 및 영양대사의 정보를 확보하고 환경변화에 따른 대사 경로의 변화를 규명하여 궁극적으로 에너지 대사체와 유전체의 상관관계에 대한 핵심기반지식을 구축한다

제 2절. 연구개발 내용 및 결과

○ *Tigriopus kingsejongensis*의 JBrowse 데이터베이스 제작

- Genome 및 RNA sequencing을 수행하여 *Tigriopus kingsejongensis*의 JBrowse를 제작하였음.
- JBrowse제작을 위하여 Long read sequencing인 PacBio와 Illumina HiSeq 2500 (PE500)을 통하여 유전체를 분석함 (표 1).
- de novo genome contig assembly를 위해, SMARTdenovo, Medaka, Trimmomatic, Pilon 등의 프로그램을 사용하여 분석함.

PacBio Sequel	
Number of SMRT cells	2
Polymerase read	
Total number of reads	1,399,771
Total number of bases	23,747,900,141
N50 (bp)	28,750
Mean read length (bp)	16,966
Subread	
Total number of reads	1,696,326
Total number of bases	23,735,932,513
N50 (bp)	23,742
Mean read length (bp)	13,993
Genome Coverage (338.6 Mb)	70x
GenBank Accession No.	SRX8159652
Illumina HiSeq 2500	
Raw reads	
Total number of reads	93,897,422
Total number of bases	23,521,304,211
Cleaned reads	
Total number of reads	65,943,964
Total number of bases	14,232,918,582
GenBank Accession No.	SRX8159653

표 1. *Tigriopus kingsejongensis*의 전체 유전체 분석을 위한 sequencing library와 read

- 전체 유전체 분석결과, 총 938개의 scaffold가 발굴되었고 전체 scaffold의 길이는 338 Mb로 나타났음 (표 2). BUSCO value도 95.8%로 나타나 이전 연구보다 향상된 결과를 보여줌 (Kang et al., 2017).

Scaffold information	<i>T. kingsejongensis</i> (GCA_012959195.1)
Number of scaffolds	938
Total length of scaffolds (bp)	338,647,408
N50 (bp)	1,473,880
Largest scaffold (bp)	9,103,457
BUSCO complete copy (%)	95.8
Gap (%)	0.16
GC content (%)	47.3

표 2. *Tigriopus kingsejongensis*의 유전체 분석 결과

- *Tigriopus kingsejongensis*의 전체 유전자의 annotation을 진행하여 총 25,470개의 유전자를 발굴하였음.
- MAKER v.2.3.1 pipeline 사용 및 Genbank 내, *Tigriopus japonicus*, *Tigriopus californicus*, *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Daphnia pulex*, *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus* 등의 유전체 정보를 상기 만들어진 *T. kingsejongensis* genome에 mapping 하는 방식으로 진행함.
- Exonerate, tRNAscan-SE, Rfam database search, Blast2GO 등 프로그램을 사용하여 manual annotation 수행함.
- 전체 coding sequence의 길이는 35,739,996 bp이고, 평균 유전자의 길이는 3,814 bp로 나타났으며, 평균 coding sequence의 길이는 1,403 bp로 분석되었음 (표 3).

Categories	Value
Number of genes	25,470
Total coding sequence length (bp)	35,739,996
Average gene length (bp)	3,814
Largest gene length (bp)	114,816
Average CDS length (bp)	1,403
Average intron length (bp)	847
GC content (%)	53.04

표 3. *Tigriopus kingsejongensis*의 유전자 분석 결과

- 분석한 유전체 정보를 활용하여 상동성을 가진 유전자의 정보를 확인하기 위하여 다른 *Tigriopus* 종과의 비교를 하였음. 그 결과, *T. kingsejongensis*에서 14,029개, *T. japonicus*에서 13,844개, *T. californicus*에서 12,838개의 유전자를 발굴하였고, 그 중 10,765개의 유전자가 공통인 것으로 확인되었음 (그림 1A). *T. kingsejongensis*의 유전체가 (338 Mb) *T. japonicus* (197 Mb)나 *T. californicus* (191 Mb)가 매우 큰데도 불구하고 상동성을 가진 유전자의 정보가 비슷하다는 것으로 보아 *T. kingsejongensis*의 유전체 내에 intergenic 혹은 반복되는 서열이 많은 것으로 추정됨.
- 위의 정보를 토대로 *Tigriopus kingsejongensis*의 JBrowse의 제작을 완료하였고 (그림 1B), 이를 토대로 2차 및 3차년도 연구 진행하고자 함. (<http://rotifer.skku.edu:8080/Tk>)
- 지질대사 유전체 중 일부를 발굴하여 온대성 요각류인 *Tigriopus japonicus*와 비교하였음 (표 4). *T. kingsejongensis*에서 elongation of very long-chain fatty acid protein (*Elov1*) 유

전자 8개 (*Elov11/7a1, a2, b, c, d, 3/6, 4, 11*)와 fatty acid desaturase (*Fad*) 유전자 8개 (*Fad4, 5/6a, b, c, d1, d2, e1, 9*)를 찾았으며 온대성 요각류 *T. japonicus*에서는 *Elov1* 유전자 8개 (*Elov11/7a1, a2, b, c, d, 3/6, 4, 11*)와 *Fad* 유전자 8개 (*Fad4, 5/6a, b, c, d, e1, e2, 9*)를 찾았음. 두 종에서 *Elov1* 유전자의 종류와 개수는 일치하였으나 *Fad* 유전자의 경우 *T. kingsejongensis*에서는 *Fad5/6d*가 *d1, d2*로 분화된 반면 *T. japonicus*에는 *Fad5/6e*가 *e1, e2*로 분화된 것을 확인할 수 있었음. 따라서, 이 유전자들은 향후 *Tigriopus* 종을 동정하는데 사용이 가능한 마커가 될 수 있을 것으로 보임.

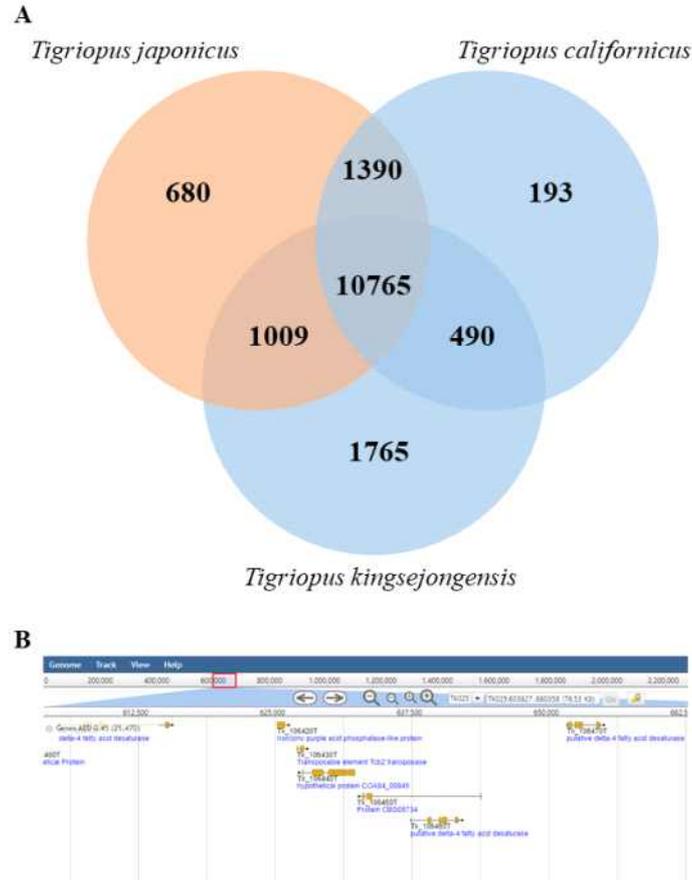


그림 1. (A) *Tigriopus* 종의 유전자 상동성 정보 (B) JBrowse의 예시.

<i>Tigriopus kingsejongensis</i>							<i>Tigriopus japonicus</i>						
Gene name	Scaffold	Start	End	Strand	Exon	Length	Gene name	Scaffold	Start	End	Strand	Exon	Length
<i>Elov11/7a1</i>	115	409,610	408,582	-	2	960	<i>Elov11/7a1</i>	119	290,895	291,759	+	2	804
<i>Elov11/7a2</i>	115	407,161	405,349	-	2	927	<i>Elov11/7a2</i>	119	292,320	293,664	+	2	816
<i>Elov11/7b</i>	159	353,244	352,386	-	2	792	<i>Elov11/7b</i>	111	76,713	74,127	+	2	789
<i>Elov11/7c</i>	10	690,192	691,076	+	1	885	<i>Elov11/7c</i>	14	1,659,459	1,658,638	-	1	822
<i>Elov11/7d</i>	91	404,329	402,463	-	5	855	<i>Elov11/7d</i>	10	1,428,556	1,426,415	-	5	858
<i>Elov13/6</i>	31	74,784	76,311	+	4	843	<i>Elov13/6</i>	2	2,330,062	2,327,201	-	4	861
<i>Elov14</i>	16	1,385,838	1,386,683	+	1	846	<i>Elov14</i>	163	120,157	118,235	-	2	942
<i>Elov111</i>	86	31,164	34,387	+	4	540	<i>Elov111</i>	2	2,519,428	2,521,170	+	4	714
<i>D4</i>	12	3,348,988	3,346,787	-	6	996	<i>D4</i>	53	391,360	394,601	+	6	1002
<i>D5/6a</i>	146	87,133	81,390	-	6	1287	<i>D5/6a</i>	48	545,924	553,143	+	6	1296
<i>D5/6b</i>	1	2,079,237	2,082,646	+	3	1323	<i>D5/6b</i>	79	87,227	83,952	-	3	1326
<i>D5/6c</i>	1	4,089,969	4,091,477	+	3	1293	<i>D5/6c</i>	12	1,997,864	2,000,444	+	3	1308
<i>D5/6d1</i>	25	638,948	641,715	+	4	1296	<i>D5/6d</i>	31	2,258,707	2,262,128	+	4	1320
<i>D5/6d2</i>	25	651,803	654,633	+	4	1293							
<i>D5/6e1</i>	25	607,645	615,280	+	4	1365	<i>D5/6e1</i>	31	2,249,394	2,252,637	+	4	1371
							<i>D5/6e2</i>	31	2,249,394	2,252,637	+	4	1434
<i>D9</i>	4	705,889	711,680	+	3	1035	<i>D9</i>	28	248,790	252,927	+	3	1068

표 4. Elongation of very long-chain fatty acid protein (*Elov1*)와 fatty acid desaturase(*Fad*) 유전자의 특징.

- 또한, 해당 유전자들이 scaffold 내에 어떠한 규칙성을 가지고 존재하는지에 대해 분석한 결과, *Elov1* 유전자 군에서는 *Elov11/7a1*, *a2*가 두 종 모두 10 kb basepair 내에서 밀접하게 분화된 것으로 나타났음 (그림 2). 하지만, scaffold 내에서 방향을 다른 것으로 나타나는 특징을 가짐.

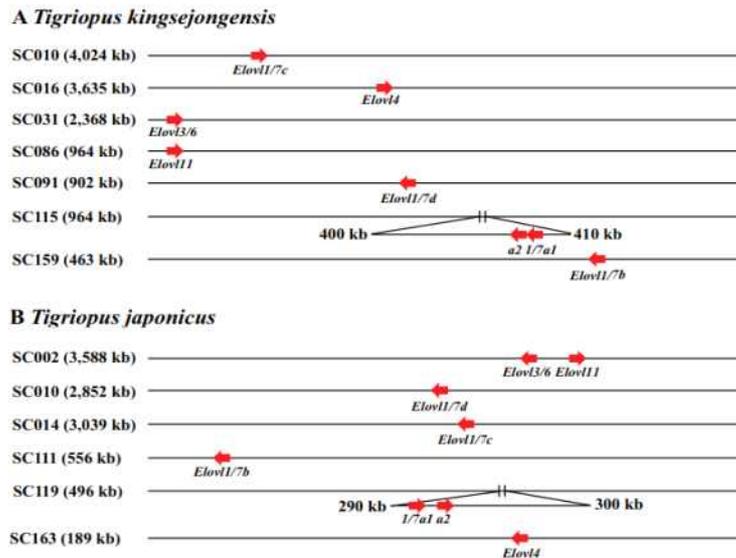


그림 2. Elongation of very long-chain fatty acid protein (*Elov1*)의 synteny 분석. (A) 극지요각류 *Tigriopus kingsejongensis*, (B) 온대요각류 *Tigriopus japonicus*

- *Fad* 유전자의 경우, *Fad5/6e*와 *d*가 동일한 규칙성 및 방향성을 나타내는 것으로 나타남 (그림 3). 특이할 만한 점은, 극지요각류에서는 *Fad5/6d*가 추가적으로 분화되었고, 온대요각류에서는 *Fad5/6e*가 추가적으로 분화되었음. 해당 유전자들이 가지는 특이성이 존재할 것으로 생각되지만 1차년도에서는 추가적인 분석을 진행하지 않았으며, 추후 지질대사와 연관되어 연구를 진행하게 된다면 보다 심도있는 분석이 필요할 것으로 보임.

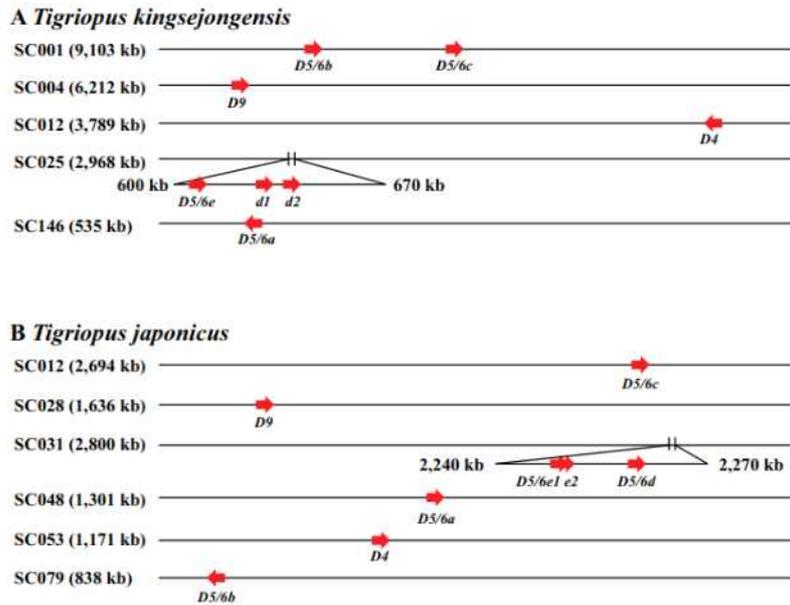


그림 3. Fatty acid desaturase (*Fad*) 유전자의 synteny 분석. (A) 극지요각류 *Tigriopus kingsejongensis*, (B) 온대요각류 *Tigriopus japonicus*.

- 이 외에 추가적으로, 정상상태에서의 극지요각류 및 온대요각류의 지방산 조성을 분석하여 비교하였음 (그림 4, 5). 모든 지방산 군에서 극지요각류가 온대요각류보다 많은 것으로 나타났고 전체 지방산의 함량은 극지요각류가 온대요각류보다 약 3배가량 높은 것으로 나타났음. 특히, 다가불포화지방산 (polyunsaturated fatty acid; PUFA)의 경우, 두 종에서 모두 가장 많은 양을 가지고 있었지만 그 차이는 더욱 두드러짐. 건중량 당 지방산의 양인 점을 고려해보면, 극지요각류가 지방을 많이 함유한 대신 다른 에너지를 적게 가지고 있을 것으로 보이므로 후속연구 참고자료로 활용할 수 있을 것으로 보임.

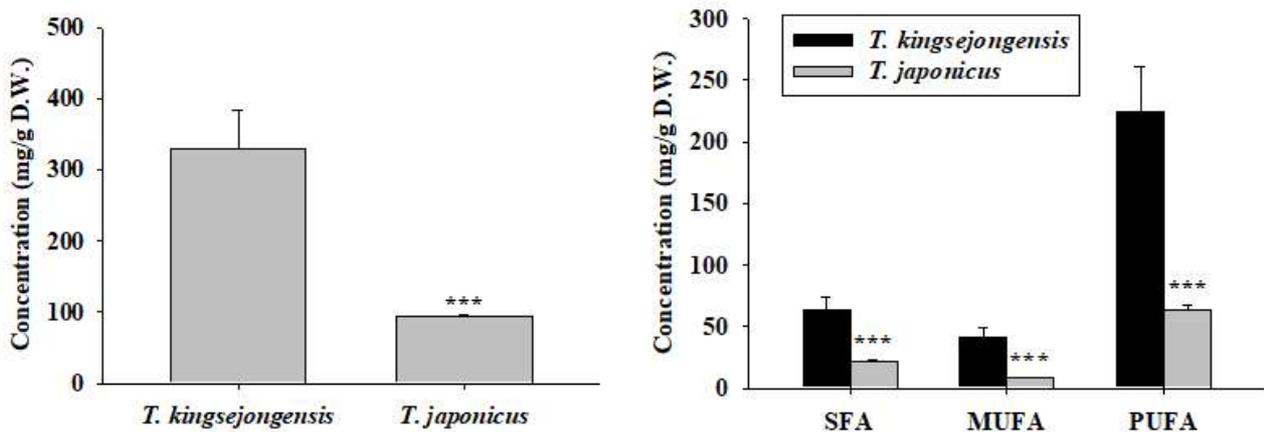


그림 4. 극지요각류 *Tigriopus kingsejongensis* (검정)와 온대요각류 *Tigriopus japonicus* (회색)의 지방산 조성.

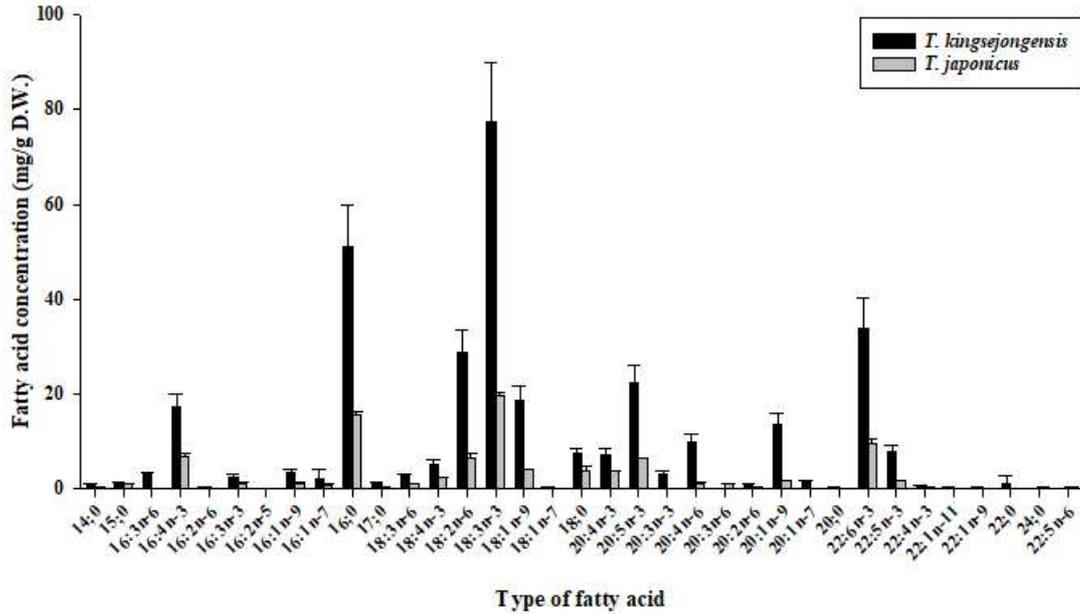


그림 5. 극지요각류 *Tigriopus kingsejongensis* (검정)와 온대요각류 *Tigriopus japonicus* (회색)의 지방산 조성

- 지방산 각각의 농도 또한 극지요각류가 온대요각류보다 높은 것으로 나타났고, 전체 지방산의 종류도 극지요각류가 더 다양한 것으로 나타났음. 뿐만 아니라, 긴 사슬 지방산의 경우 대부분 극지요각류에서만 검출이 된 것으로 보아, 극지생태계에 적응하는데 있어서 긴 사슬 지방산의 역할이 중요할 것으로 추정됨.
- 그 중, 22:1n-11은 copepod에서 wax ester로부터 합성되고 (Lee et al., 1971; Pascal and Ackman, 1976; Falk-Petersen et al., 1990), 먹이단계를 구별하는 좋은 지표라고 알려져 있어 (Ackman, 1980; Iverson, 1993; Dahl et al., 2000; Budge et al., 2002; Iverson et al., 2002; Cooper et al., 2005), 추후 연구에 사용할 수 있을 것으로 생각됨.
- 동일한 먹이 (녹조류, *Tetraselmis suecica*, 1×10^6 cells/ml)를 투여했음에도 불구하고 종 간에 이러한 차이가 나타나는 것은 같은 *Tigriopus* 종이라도 주 서식지에 따라 지질합성 및 분화 관련 유전자의 차이가 발생한다는 것을 의미하므로 후속연구에서 검토해 볼 만한 부분이라고 생각됨.

○ *Tigriopus kingsejongensis*의 발달단계 관찰

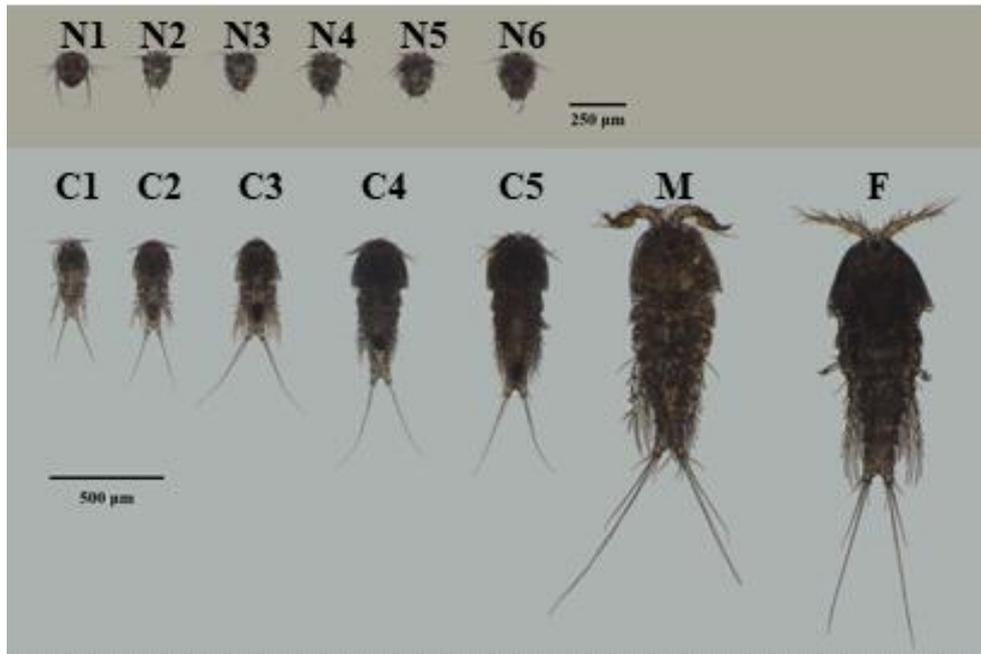


그림 6. *Tigriopus kingsejongensis*의 발달단계

- *Tigriopus kingsejongensis*의 nauplius부터 성체까지의 발달단계를 관찰하였음 (그림 6). 발달단계는 nauplius 6단계, copepodid 5단계를 거쳐 성체가 되며 nauplius 1기부터 성체까지는 약 4주간의 시간이 소요되었음 (14도, 30 ppt, 12:12 light:dark). 성체의 길이는 약 1.2 mm로 온대요각류보다 약 1.5배 가량 긴 것으로 나타남.
- 온도 (4℃, 14℃, 25℃) 및 염도 (10, 20, 30, 40, 50 psu) 조건에 따른 *Tigriopus kingsejongensis*의 nauplius부터 성체까지의 발달단계를 관찰하였음(12:12 light:dark; 먹이 녹조류 *Tetraselmis suecica* 1×10^6 cells/ml) (그림 7).
- 염도변화에 따른 *Tigriopus kingsejongensis* 발달단계 관찰에서는 10, 20, 30 psu에서는 nauplius (유생)으로부터 copepodid 단계까지 약 15-16일 정도로 큰 차이를 보이지 않았고, 40 psu, 50 psu에서는 염분도가 높아질수록 약 19-29일까지 농도 차등적인 발달단계의 지연이 관찰되었음.
- 해수면 상승, 해빙붕괴에 따른 급격한 극지환경 변화 및 지역적 격리로부터 고농도의 염도로 생태환경 변화가 야기될 수 있고, 갑각류에서 발달지연은 개체군 유지와도 밀접한 연관이 있음. 추후 2차, 3차년도 발현유전체 및 대사체 분석과도 관련하여 보충적인 연구를 진행하고자 함.
- 온도에 따른 *Tigriopus kingsejongensis* 발달단계 관찰에서는 예비실험에서 대조군으로 설정한 14℃에서는 15일경에 모든 nauplius(유생)이 copepodid 단계로 발달이 완료되나, 4℃에서는 2배 이상 길어진 40일 정도에 copepodid 단계로 탈피하는 것을 확인할 수 있었음. 한편, 25℃농도 조건에서는 생물이 발달하지 못하고 죽는 것을 확인하였음.

(A) Salinity

(B) Temperature

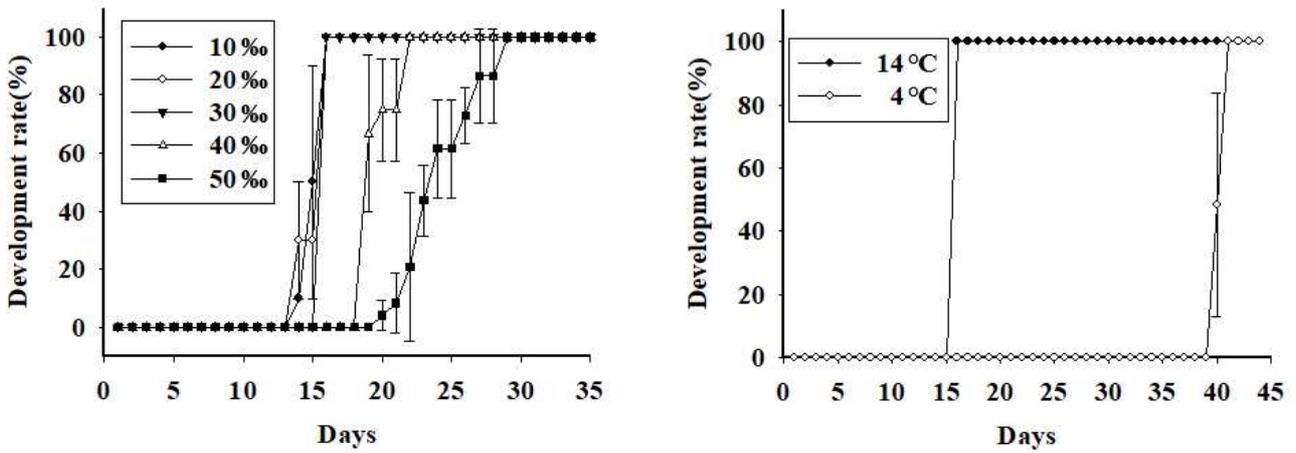


그림 7. (A) 염도 및 (B) 온도에 따른 극지요각류 *Tigriopus kingsejongensis*의 발달영향 평가

- *Tigriopus kingsejongensis*는 극지요각류로 저온 환경에서도 오랜 기간 버티는 능력이 있음을 확인할 수 있었으며, 고온의 조건에서는 민감하게 반응하는 것을 확인할 수 있었음. 다만, 개체 수의 부족으로 인하여 온도 및 염도 변화에 따른 생식률의 변화를 측정하는 것은 불가능하였음. 추후 대사체 분석과 연결지어 연구수행을 진행할 예정임.

극지연구소

○ 극지 환경 적응기작 관련 지질대사 유전체 및 지질대사체 동정

- 1차년도에서 구축한 극지요각류 *T. kingsejongensis*의 Genome database 및 JBrowse 를 활용하여 지질대사 관련 유전자들을 동정 및 분석함.
- 지질은 가장 기본적인 nutrient 자원이자, 생물이 살아가는데 가장 기본적인 세포의 막 구성 및 이의 유동성에도 큰 관여를 함.
- 지질대사 조절에 관여하는 여러 유전자 (단백질) 중, Elongase와 Fatty acid desaturase는 불포화지방산 (unsaturated fatty acid) 합성에 중요한 역할을 한다고 알려져 있음.
- 특히, 저온에 지속적으로 노출되어있는 극지환경에서의 지질 환경은 불포화지방산과 많은 연결점이 있어 해당 유전자의 분석과 발굴이 더욱 중요함.
- 다른 요각류 및 해양 무척추생물 중 중, GenBank 등지에 선례 보고가 된 Elongase 및 Fatty acid desaturase를 수집하여, *T. kingsejongensis* 의 유전체 및 전사체 database와 local BLAST 분석하여 유전자 candidate 수집. *In silico* 방법을 통해 유전자 발굴.
- Candidate는 Geneious program을 이용하여, Genome에 local mapping 및 유전자 분석 수행되었고, Full length gene들은 근연종의 Elongase 및 Fatty acid desaturase와 alignment 및 phylogenetic tree 분석을 통해 유전자 동정함.
- 극지요각류 *T. kingsejongensis*에서 총 8개의 Elongase (*Elov1*; elongation of very long-chain fatty acid protein) 유전자와, 8개의 Fatty acid desaturase (*Fad*) 동정.
- 극지요각류의 해당 지질대사 유전자들의 특수성을 비교 분석하기 위하여, 해당 유전자들을 온대요각류인 *T. japonicus*, *T. californicus* 2종, Cyclopoid 요각류 종인 *Paracyclopina nana*, 윤충류 *Brachionus* spp. 및 양서류, 포유류, 사람을 포함한 고등생물종과 phylogenetic 분석방법을 통해 비교함.

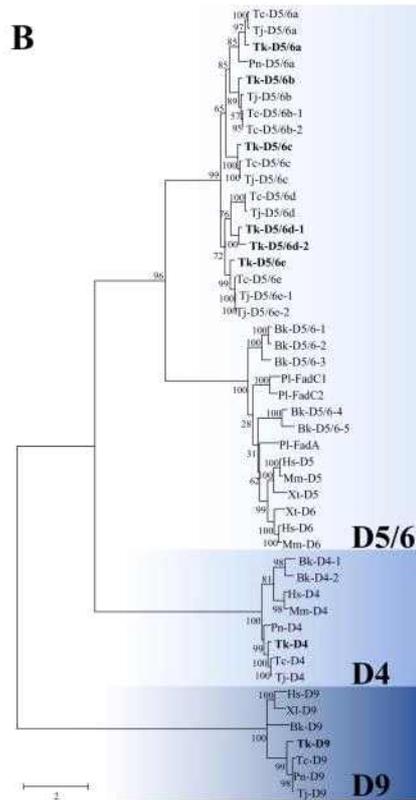
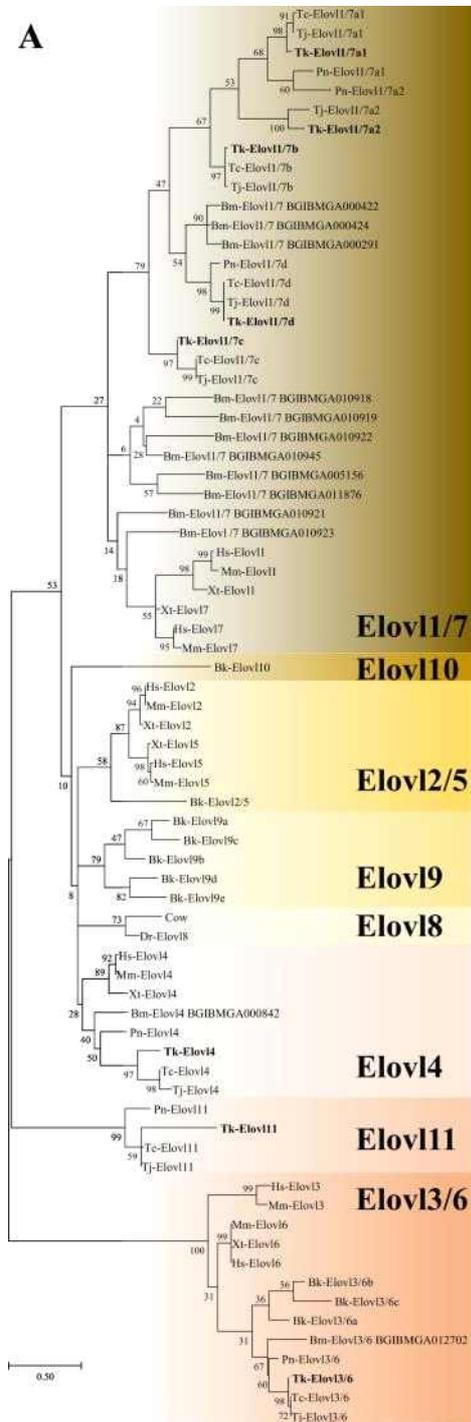


그림 8. A) Elov1 (Elongation of very long-chain fatty acid protein) 유전자의 계통수 분석. B) Fad (Fatty acid desaturase) 유전자의 계통수 분석. *T. kingsejongensis* 유전자는 굵은색으로 표기.

- Fatty acid desaturase는 D4, D9의 경우 다른 생물종과 같이 1개의 유전자로 확인되었고, 이에 따라 중간 기능이 보존되어있는 것을 확인할 수 있었음. 반면, D5/6의 경우 요각류 D5/6은 윤충류 및 고등생물의 D5, D6와는 달리 오래전에 공동조상으로부터 분화되어 요각류 중에서 duplication을 통해 여러 copy 유전자로 분화된 것으로 파악됨. *T. kingsejongensis*의 D5/6은 다른 온대 요각류들과 그 종류가 서로 비슷하고 보존적임. (그림 8A).
- *Elov1*의 경우, 다른 종들과 비교했을 때, 요각류에서는 Elov11/7, Elov13/6, Elov14, Elov111

의 4가지 type만이 확인되었음. Elov14, Elov11는 분석한 해당 종들간 매우 보존적인 것으로 확인되었고, Elov13/6의 경우, 고등생물에서 Elov13, Elov16의 두 가지 type으로 분화된 것과 달리, 무척추생물 중에서는 Elov13/6의 원시적인 type 형태로 진화 적응된 것으로 확인되었음. Elov11/7의 경우도, 위와 비슷하나, 무척추생물중에서는 해당 유전자가 duplication을 통해 여러 copy로 분화되어, 다양한 기능을 할 것으로 추측가능함 (그림 8B).

- 전반적으로 극지요각류 *T. kingsejongensis*의 지질대사 관련 유전자는, 이들이 적응하고 있는 환경이 매우 다름에도 불구하고 온대요각류와 매우 비슷함 (Orthologous relationship). 이는, 두 극한의 요각류들 사이에 유전자 조성 (repertory)에 따른 적응기작 보다는, 유전자 전사 및 발현 조절 메커니즘의 차이가 있다고 해석 가능함.

○ 극지환경적응기작 관련 단백질, 탄수화물대사 유전체 및 해당 대사체 동정

- G protein-coupled receptor (GPCR)은 인간 기준으로 800여개가 넘는 거대한 유전자 family로 광자 (photons), 이온 (ion), 탄수화물 대사체, 단백질, 펩타이드, 호르몬, 지질, purine 계 유도체 등 다양한 리간드와 반응하여 생체 내 신호전달 네트워크를 활성화하고, 세포 반응을 유도함. 생물 내 가장 큰 단백질 family로, 앞선 지질대사와도 관련이 깊으며 탄수화물, 단백질대사에도 연관성이 있음.
- 극지요각류 *T. kingsejongensis*의 극지환경 특이적인 대사 유전체 존재 여부를 알기 위하여, 거대 유전자 family인 GPCR을 동정함. 온대 근연종과의 해당 유전자 family 확보 및 비교연구는 각각의 환경에 맞게 적응하여 발달한 유전체 군이 무엇인지를 분석할 수 있고, 이 유전자에 초점을 맞추어 심화 연구를 수행할 수 있다는 장점이 있음.
- 사람 (*Homo sapiens*), 초파리 (*Drosophila melanogaster*), 물벼룩 (*Daphnia magna*) 등 지금까지 잘 연구되어있는 모델생물종으로부터 GPCR 유전자 pool 확보 후, 기존에 확보한 극지요각류 *T. kingsejongensis*의 유전체, 및 전사체 데이터베이스에 local BLAST 수행하여, GPCR 유전자 후보군을 확보함.
- 총 513개의 유전자 후보군에서, 7TM 구조분석, domain 및 motif 분석, 근연종과의 계통분석등을 통하여, 극지요각류 *T. kingsejongensis*에서 총 239개의 GPCR 유전자 확보.
- GPCR 유전자 family는 가장 많은 연구가 된 사람을 기준으로 Class A Rhodopsin, Class B Secretin/Adhesion, Class C Glutamate, Class F Frizzled receptors로 총 4개의 큰 하위 분류군으로 나뉨. 이 중, *T. kingsejongensis*의 GPCR은 Class A rhodopsin에 해당하는 유전자가 총 239개 중 187개로 약 78.24%를 차지함.
- 사람 (*Homo sapiens*), 초파리 (*Drosophila melanogaster*), 물벼룩 (*Daphnia magna*) 등의 근연종과 계통분석 수행 시, *T. kingsejongensis*의 Class A 군 GPCR 유전자는 Lipid, Aminergic, Peptide, Melatonin, Opsin 등의 Ligand과 많은 연관이 있는 receptor들이 공통적으로 발견됨. 이 중, Peptide receptor로 분류되는 유전자 계통에서 *T. kingsejongensis*의 유전자들이 대량 발견되는 것을 확인함 (그림 9). 이는 현재 분석에서 극지 요각류에서만 특이적으로 나타나는 현상으로, 극지 적응에 관련된 기능과 연관되어 있을 가능성이 있다고 추측 가능함. 하지만, 온대 요각류 등에서 GPCR을 추가발굴하여 비교하거나, 해당 특이 유전자들의 기능규명을 위한 추가 연구 등이 필요함.

- 극지요각류 *T. kingsejongensis*의 Class B, Class C, Class F 군에 해당하는 유전자들은 같이 비교 분석한 종들과 일부 분화의 차이는 있으나, 작은 범주별로는 상동성을 지니며 보존된 것을 확인함 (그림 10). 따라서 해당 분류군에 속하는 유전자들은 극지 환경 등 특수한 환경 적응에 대한 메커니즘과 연관된 것 보다, 오랜 기간 전부터 보존되며 진화해 온 유전자군으로 생물의 기본적인 대사 활동, 생명에 필수적인 메커니즘과 연관성이 깊은 것으로 해석 가능함.

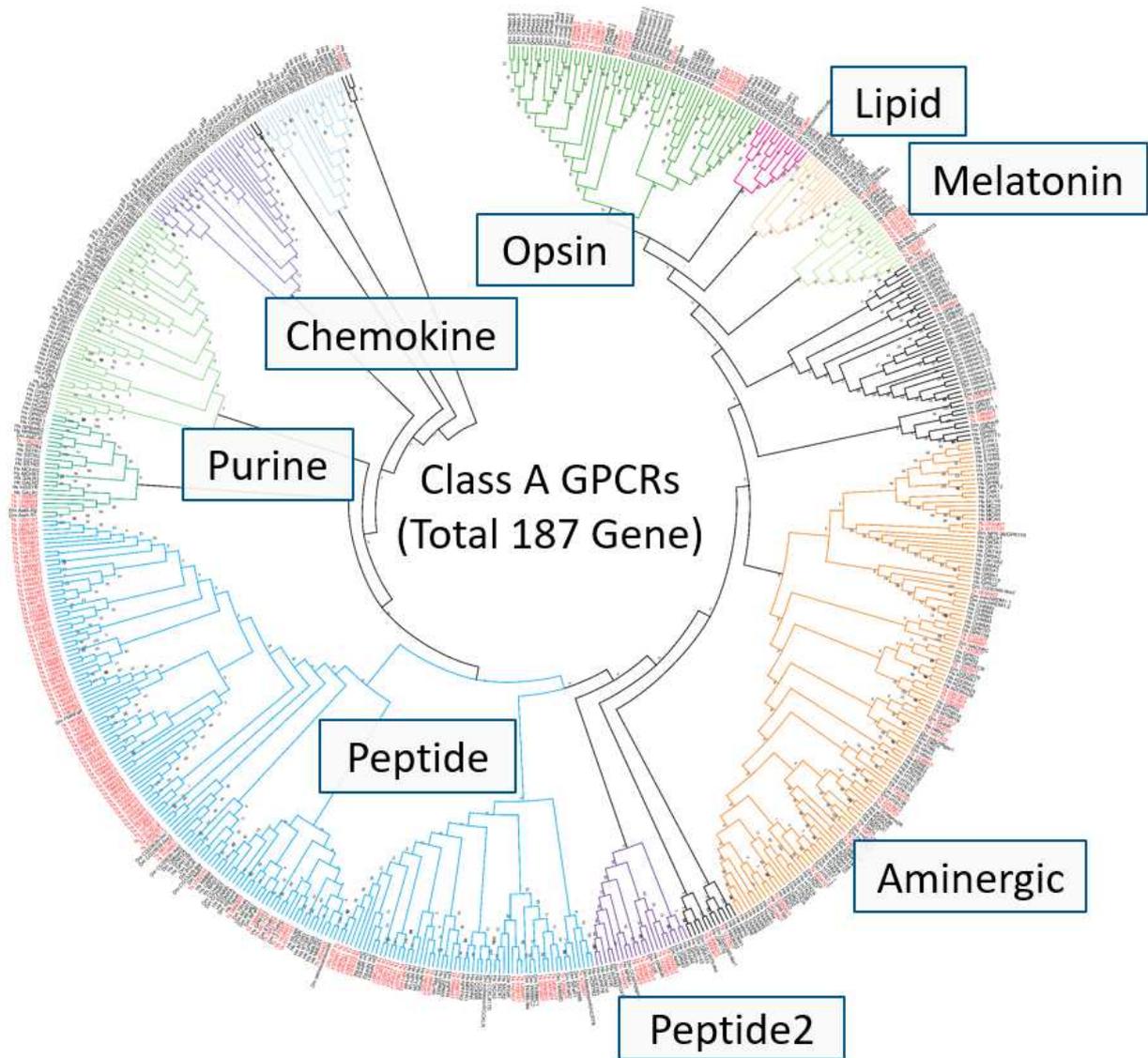
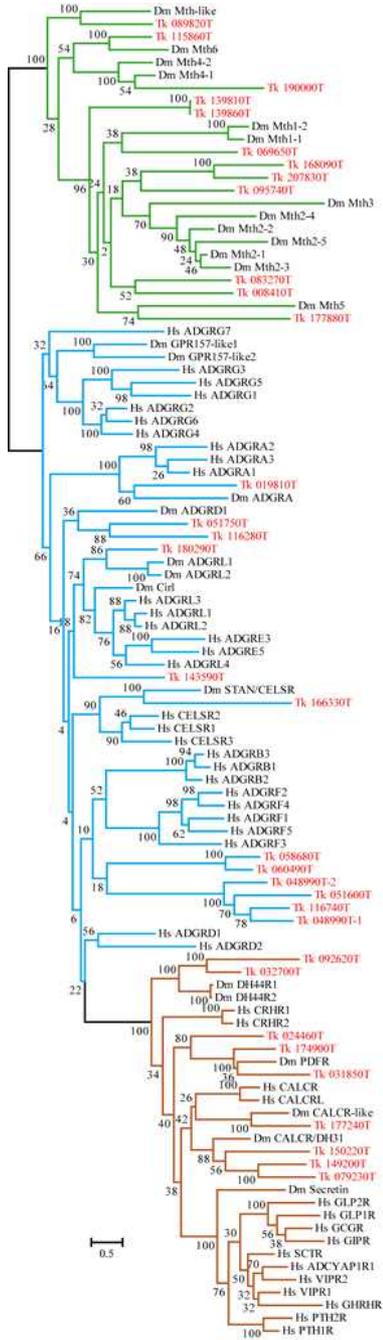
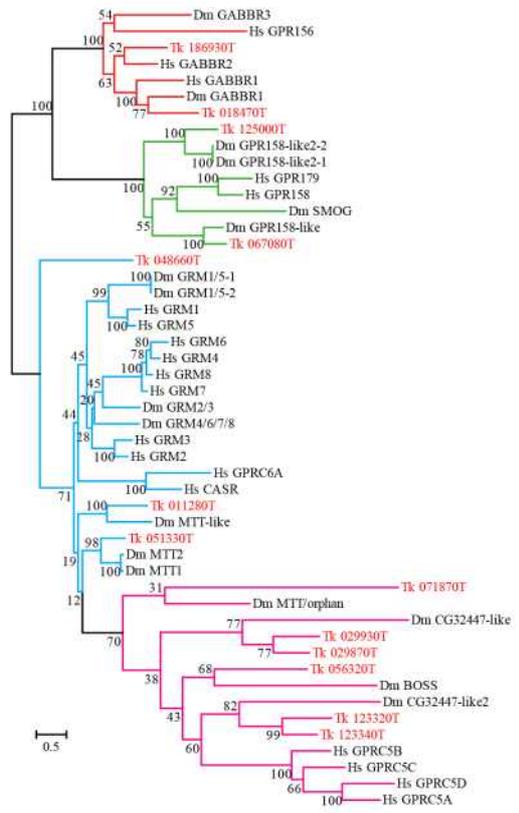


그림 9. *T. kingsejongensis* 의 G protein-coupled receptor (GPCR) Class A 유전자 계통도. *T. kingsejongensis*의 GPCR 유전자는 빨간색으로 표기.

A)



B)



C)

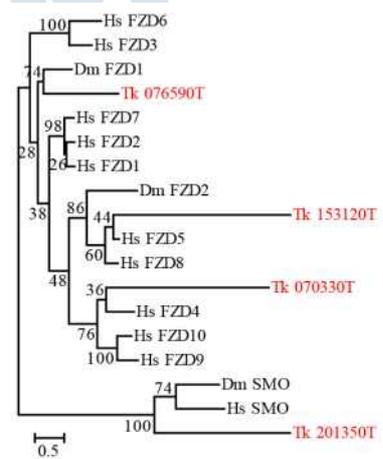


그림 10. *T. kingsejongensis* 의 G protein-coupled receptor (GPCR) 유전자 계통도 A) Class B 유전자, B) Class C 유전자, C) Class F 유전자. *T. kingsejongensis*의 GPCR 유전자는 빨간색으로 표기.

○ 온도 변이에 따른 극지요각류의 *In vivo* 생체 지표 확인

- 극지환경 온도변이 및 금식기에 따른 극지요각류 *T. kingsejongensis*의 지방산 대사 변이 확인을 위해, 4개의 온도 범위 (4°C, 8°C, 14°C, 18°C)에 따른 *In vivo* 생체 지표 (발달시간, 생식능 등)을 확인함.
- 연구실 내 배양환경 조건인 14°C와 비교하여, 저온조건 (4°C, 8°C)에서는 현저한 발달시간의 지연이 확인되었고, 고온조건인 18°C에서는 약간의 발달시간 단축이 확인되었음 (그림 11A).
- 생식능의 경우, 총 새끼 수가 대조군 대비 고온환경에서 유의하게 증가했음 (그림 11B). 저온조건에서는 90일 이상 관찰하였을 때, 알을 달고 있는 생식능이 존재하는 암컷 개체를 발견하지 못하였음.
- 일반적으로 염분이나 온도는 해양 유기체의 발달에 영향을 미치는 생물학적 인자로 알려져 있음. 특히, 극지 바닷물의 염분은 지구온난화로 인해 빙하가 녹는 것에 영향을 받음. 예를 들어 염분 노출이 생식과 수명에 미치는 다세대적 영향 분석이 *T. kingsejongensis*에서 확인되었고 (Kim et al., 2022), calanoid 요각류에 속하는 *Pseudodiaptomus dubia*와 *Eurytemora affinis*에서도 온도에 따른 발달지연이 확인되었음 (Li et al., 2009; Karlsson et al., 2018). 따라서 남극의 요각류 *T. kingsejongensis*의 발달과 번식능이 온도와 염도에 영향을 받는다는 것을 분명하게 확인할 수 있음.

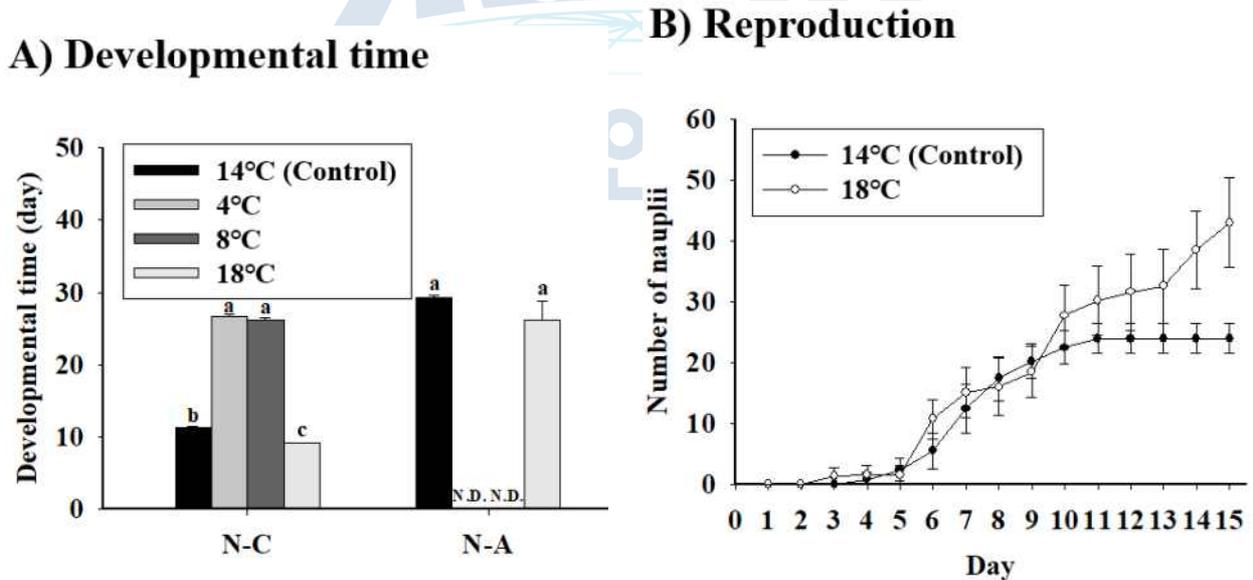


그림 11. A) 온도 조건에 따른 극지요각류 *T. kingsejongensis*의 발달시간 B) 온도 조건에 따른 극지요각류 *T. kingsejongensis*의 생식능

○ 온도 변이 및 금식기간에 따른 극지요각류의 활성산소종 확인

- 활성산소종 (ROS, reactive oxidative species)의 경우 스트레스상황에도 발생하지만, 저장된 에너지 활용 등을 위해 지방산 분해를 통한 대사작용에도 발생함. 일반적으로 임계 온도에 도달할 때까지 온도 상승은 단백질 활성화와 산소소비량을 증가시켜 신진대사를 증가시킨다는 보고가 있음 (Schulte, 2015).

- 금식을 하지 않은 대조군에 비해, 5일차, 10일차에서 전반적으로 ROS가 증가하는 양상이 확인되었고, 온도가 증가할수록 이러한 경향성이 더 크게 벌어졌음 (그림 12A). 금식지속 10일째의, 18도 온도 조건의 개체는 오히려 ROS가 감소하는 양상이 확인되었는데, 과도한 스트레스로 지방산 대사가 지연된 것으로 보임 (그림 12B).
- 실험 결과 고온에서의 ROS 증가양상과 에너지 대사율 증가를 확인했으며, 지속적인 기아 상태는 저장된 에너지원의 분해를 일으키고 ROS 발생을 더욱 증가시킬 수 있음. 종합하면 고온조건과 기아상태는 ROS를 충분히 증가시킬 수 있는 용인이 될 수 있으며, 이는 극지환경에서의 요각류에게도 해로운 영향을 미칠 수 있음.

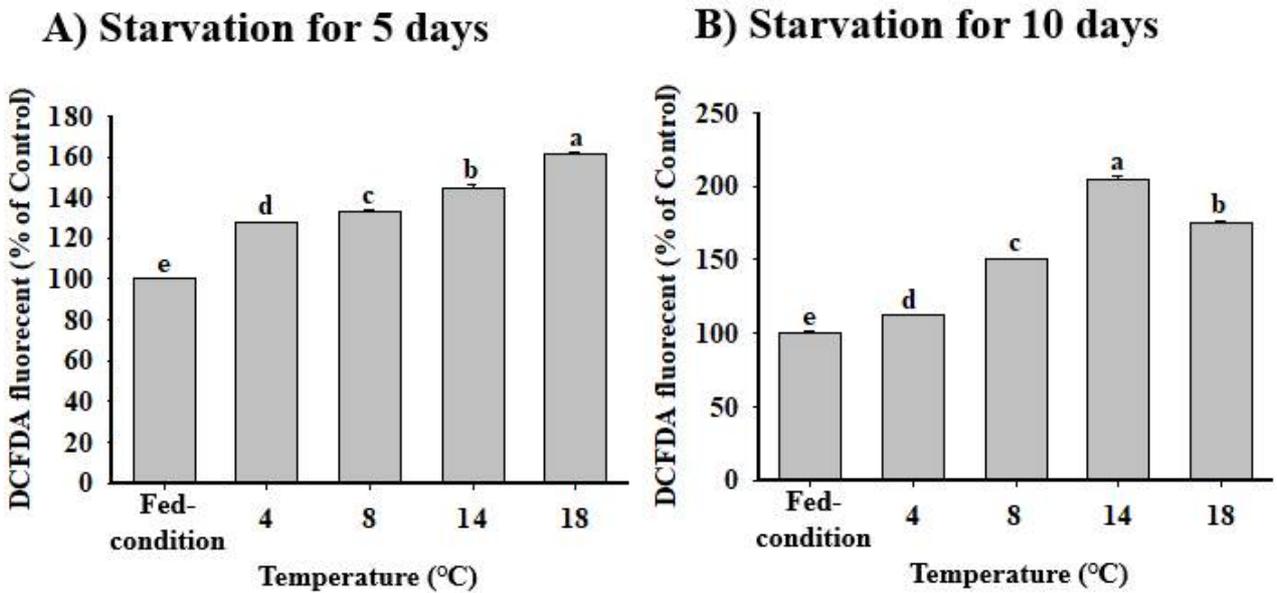


그림 12. A) 온도 및 금식 기간에 따른 *T. kingsejongensis* 의 활성산소종 분석 (5일차) B) 온도 및 금식 기간에 따른 *T. kingsejongensis* 의 활성산소종 분석 (10일차)

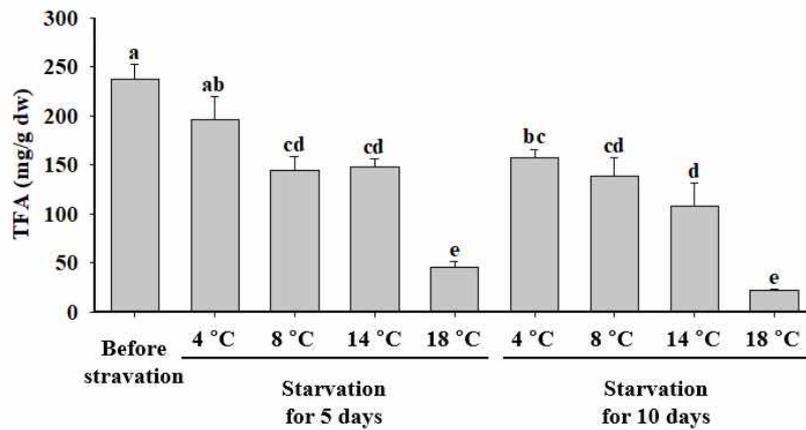
○ 온도 변이 및 금식기간에 따른 지방산 대사 변화

- 비금식 대조군에 비해, 전체 그룹에서 총 지방산량이 감소하였으며, 금식기간이 길어질수록, 온도가 증가할수록 경향성이 두드러짐 (그림 13A). 특히, 고온조건인 18°C에서 지방산이 큰 차이로 감소하는 것이 확인되었음.
- 비율분석에서는 금식지속과 온도증가에 따라 포화지방산 (SFA, saturated fatty acid)이 증가하고, 다가불포화지방산 (PUFA, polyunsaturated fatty acid)이 감소하였으며, 특히 18도 온도에서 10일 동안 금식된 실험군이 상대적으로 큰 폭의 변화를 보였음. 단일 불포화지방산(MUFA, monounsaturated fatty acid)은 금식, 온도변이에 특별한 차이를 보이지 않았음. (그림 13B).
- 특히 온도 및 금식에 따라 총 지방산량이 감소하면서 PUFA가 함께 감소하였기 때문에, PUFA의 소모가 가장 중요한 것으로 보임. 온도에 의한 이러한 비율 변화는 극지환경에서도 요각류가 점성적응을 잘 따르는 것으로 확인됨.
- 환경온도가 체액의 녹는점 이하로 떨어지면 체내에 얼음이 얼 위험이 있어 심한 경우 개체의 사망에 이를 수 있음. 따라서 유기체는 동결 내성을 증가시키거나 극저온 보호제를

합성하여 체액의 녹는 점을 낮춰 방어 시스템을 활성화한다 (Sinclair and Marshall, 2018). 무척추동물 중에서 곤충은 글리세롤이나 TAG를 축적하여 저온에서 체액 항상성을 유지시키고 (Cossins, 1994). 수생 무척추동물은 막 인지질의 불포화도를 높여 막 유동성을 높이는 연구보고가 있음 (Yoon et al., 2022).

- 저온과 기아조건에서 수행된 극지요각류 *T. kingsejongensis*의 지방산 비율 결과는 PUFA의 소비가 14도 기아 조건에서 에너지원으로 필수적이었지만, PUFA의 비율은 저온에서 더 높게 나왔음. 따라서, PUFA가 남극의 극저온 환경에 적응하는데 필수적인 역할을 할 수 있다고 추측할 수 있으나, 추가적인 연구는 필요함.

A) Total fatty acid



B) Fatty acids proportion

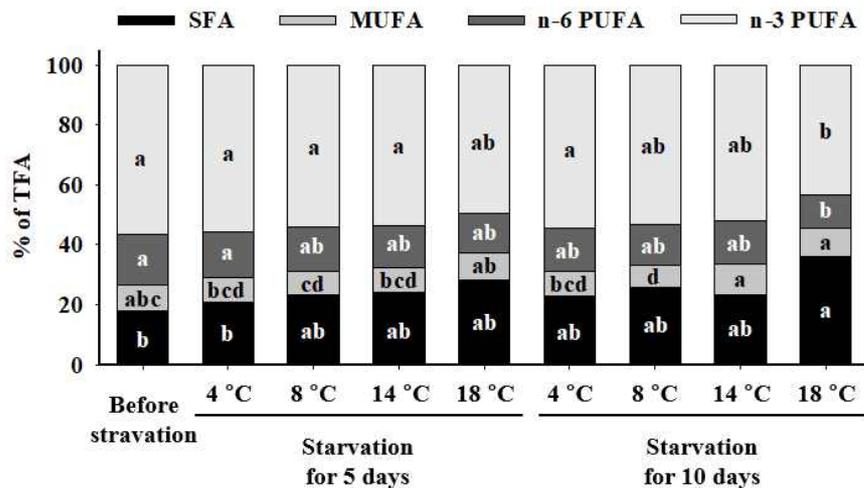


그림 13. A) 온도 및 금식 기간에 따른 *T. kingsejongensis*의 전체 지방산 함량 B) 온도 및 금식 기간에 따른 *T. kingsejongensis*의 지방산 조성비

- 개별 분석에서는 온도가 높아질수록 포화지방산과 가장 긴 단일불포화지방산이 증가하였음. 특이한 점은 온도와 금식에 의해 전체 PUFA의 양이 감소하였지만, 가장 긴 두 지방산 (22:5n-3, DPA; 22:6n-3, DHA)은 증가하는 것이 확인됨 (그림 14; 표 4).
- 따라서, 극지 요각류의 경우 온도 및 금식 조건에서 PUFA가 대체 에너지원으로 높게 소모되는 것으로 판단되며, ROS 활성도도 이러한 양상을 뒷받침함. 한편, 2개의 긴 PUFA (22:5n-3, DPA; 22:6n-3, DHA)가 높게 유지되는 것은 에너지를 소모하는 상황에서도

축적하여 더 안 좋은 환경에서의 생존전략으로 추정됨.

- DHA는 막의 유동성, 유연성 및 두께를 조절할 수 있으며 막 포스파티딜세린 의존 신호 메커니즘의 조절에 영향을 주며, (Hishikawa et al., 2017; Bie et al., 2020). DPA는 수생 무척추동물 내에서 연구되지 않았지만 DPA는 포유류의 염증 반응과 신경 발달에 기여하는 것으로 알려져 있음 (Drouin et al., 2019).

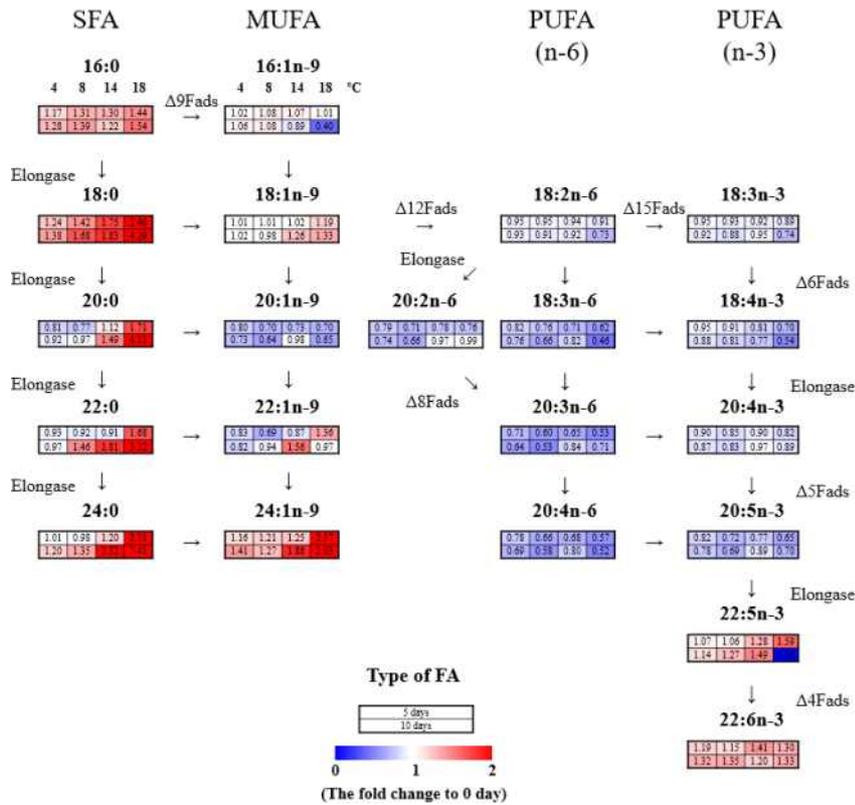


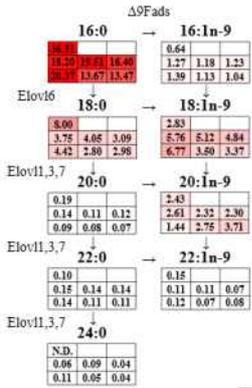
그림 14. 온도 및 금식 기간에 따른 *T. kingsejongensis* 의 각 지방산별 변화 프로파일

F a t t y acid	Sampling group								
	Before starvation	Starvation for 5 days				Starvation for 10 days			
		4 ° C	8 ° C	12 ° C	24 ° C	4 ° C	8 ° C	12 ° C	24 ° C
SFA									
16:0	14.1±0.32 ^b	16.52±1.82 ^{ab}	18.12±2.33 ^{ab}	18.49±0.89 ^{ab}	19.66±0.53 ^{ab}	18.4±1.94 ^{ab}	17.16±1.28 ^{ab}	20.32±1.72 ^{ab}	21.75±5.29 ^a
18:0	2.49±0.37 ^b	3.08±0.65 ^b	3.44±0.85 ^b	3.54±0.52 ^b	4.17±0.4 ^b	4.34±0.86 ^b	4.55±0.96 ^b	6.11±0.49 ^{ab}	10.66±5.42 ^a
20:0	0.09±0.01 ^b	0.08±0.01 ^b	0.09±0.01 ^b	0.07±0.01 ^b	0.09±0 ^b	0.11±0.02 ^b	0.14±0.03 ^b	0.16±0.06 ^b	0.39±0.13 ^a
22:0	0.11±0 ^b	0.1±0 ^b	0.11±0.01 ^b	0.1±0.02 ^b	0.16±0.11 ^{ab}	0.1±0.03 ^b	0.2±0.04 ^{ab}	0.19±0.06 ^{ab}	0.37±0.17 ^a
24:0	0.07±0.01 ^b	0.07±0.01 ^b	0.08±0.02 ^b	0.07±0.01 ^b	0.09±0.03 ^b	0.08±0.01 ^b	0.16±0.04 ^b	0.16±0.02 ^b	0.51±0.33 ^a
MUFA									
16:1n-9	0.79±0 ^a	0.81±0.01 ^a	0.84±0.01 ^a	0.85±0.03 ^a	0.85±0.03 ^a	0.85±0.04 ^a	0.7±0.08 ^a	0.8±0.1 ^a	0.64±0 ^b
18:1n-9	3.55±0.01 ^{bc}	3.57±0.07 ^{bc}	3.62±0.13 ^{bc}	3.57±0.1 ^{bc}	3.47±0.11 ^c	3.61±0.15 ^{bc}	4.47±0.34 ^{ab}	4.21±0.08 ^{abc}	4.73±0.86 ^a
20:1n-9	3.81±0.06	3.03±0.64	2.76±0.62	2.67±0.05	2.42±0.15	2.79±0.5	3.71±0.41	2.66±0.16	2.46±1.05
22:1n-9	0.3±0.02	0.25±0.04	0.25±0.03	0.21±0.05	0.28±0.06	0.26±0.05	0.47±0.1	0.41±0	0.44±0.05
24:1n-9	0.12±0.02	0.14±0.04	0.17±0.06	0.14±0.05	0.15±0.06	0.15±0.01	0.22±0.08	0.31±0.09	0.36±0.14
n-6 PUFA									
18:2n-6	7.92±0.11 ^a	7.51±0.39 ^{ab}	7.39±0.61 ^{ab}	7.51±0.07 ^{ab}	7.2±0.13 ^{ab}	7.46±0.35 ^{ab}	7.27±0.47 ^{ab}	7.19±0.45 ^{ab}	5.79±1.54 ^b
18:3n-6	0.77±0.01 ^a	0.63±0.11 ^{ab}	0.58±0.16 ^{ab}	0.59±0.03 ^{ab}	0.51±0.04 ^b	0.55±0.1 ^{ab}	0.63±0.05 ^{ab}	0.47±0.02 ^b	0.53±0.08 ^{ab}
20:2n-6	0.39±0.01	0.31±0.08	0.29±0.08	0.28±0.01	0.26±0.02	0.3±0.04	0.38±0.06	0.3±0.03	0.39±0.09
20:3n-6	0.8±0.03 ^a	0.57±0.19 ^{ab}	0.51±0.2 ^{ab}	0.48±0.02 ^b	0.43±0.03 ^b	0.52±0.13 ^{ab}	0.67±0.08 ^{ab}	0.42±0.03 ^b	0.57±0.09 ^{ab}
20:4n-6	4.19±0.15 ^a	3.26±0.69 ^{ab}	2.91±0.73 ^{ab}	2.78±0.16 ^{ab}	2.42±0.24 ^{ab}	2.85±0.61 ^{ab}	3.36±0.21 ^b	2.4±0.18 ^b	2.17±1.28 ^b
n-3 PUFA									
18:3n-3	24.62±0.46 ^a	23.43±1.01 ^{ab}	22.77±1.33 ^{ab}	22.92±0.33 ^{ab}	21.61±0.8 ^{ab}	22.63±1.46 ^{ab}	23.38±0.78 ^{ab}	22.03±1.12 ^{ab}	18.19±4.91 ^b
18:4n-3	2.76±0.13 ^a	2.62±0.13 ^{ab}	2.41±0.17 ^{abc}	2.5±0.17 ^{abc}	2.23±0.19 ^{abc}	2.24±0.25 ^{abc}	2.11±0.29 ^{bcd}	1.93±0.16 ^{cd}	1.48±0.39 ^d
20:4n-3	1.21±0.03 ^a	1.08±0.15 ^{ab}	1.05±0.14 ^{ab}	1.03±0.02 ^{ab}	1±0.01 ^{ab}	1.09±0.07 ^{ab}	1.18±0.04 ^{ab}	0.99±0.15 ^b	1.07±0.2 ^{ab}
20:5n-3	8.65±0.21	7.07±1.23	6.73±1.19	6.19±0.26	5.94±0.04	6.66±0.9	7.69±0.76	5.61±0.72	6.1±2.09
22:5n-3	0.26±0 ^b	0.28±0.03 ^{ab}	0.3±0.03 ^{ab}	0.28±0.03 ^{ab}	0.33±0.03 ^{ab}	0.34±0.06 ^{ab}	0.39±0.1 ^{ab}	0.42±0.09 ^a	0±0 ^c

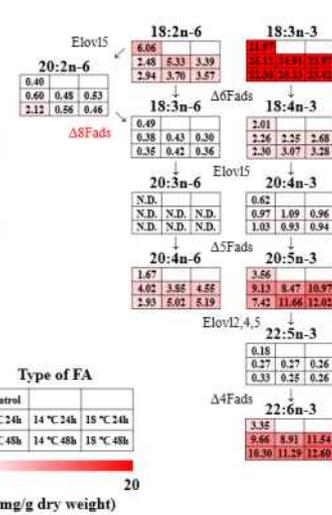
표 4. 온도 및 금식 기간에 따른 *T. kingsejongensis* 의 각 지방산별 변화 프로파일 세부 통계분석자료

극지연구소

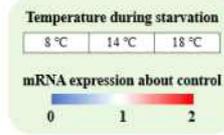
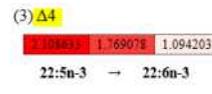
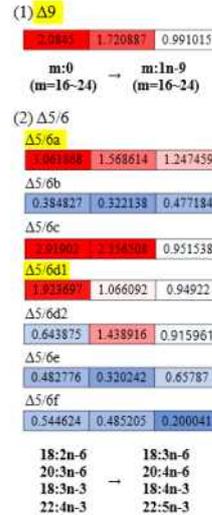
A) Monounsaturated fatty acids synthesis



B) Omega-3 and -6 fatty acids synthesis



A) Desaturase



B) Elov1

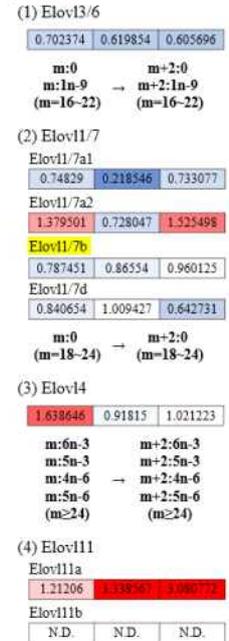


그림 15. A) 온도변화에 따른 *T. kingsejongensis*의 지방산 조성 B) 온도변화에 따른 *T. kingsejongensis*의 지방산 대사에 관여하는 유전자 Desaturase와 Elov1의 유전자 발현양상 (노란색음영은 유의적인 수치를 의미)

- 이전 실험 결과에서 온대 요각류 *T. japonicus*와 극지요각류 *T. kingsejongensis*의 지방산 함량 비교 시, 전체 지방산 군에서 극지요각류가 나타났음. 온도에 따른 *T. kingsejongensis*의 지방산 profile 변화에서는 특히, 다가불포화지방산 (polyunsaturated fatty acid; PUFA)의 경우, 그 양이 다른 지방산들에 비해서 많은 비율을 차지하고 있는 것을 확인할 수 있음 (그림 15A). 특히, 긴 지방산의 경우 대부분의 극지요각류에서만 검출이 된 것으로 극지 생태계에 적응하는데 있어서 그 역할이 중요할 것으로 추정됨.
- 한편, 온도 변화에 따른 지방산 변화 추이도 대조군 대비 24시간, 48시간 온도변화에 노출시켰을 때, 온도가 낮아질수록 전체적으로 불포화지방산의 비율이 높아지는 것을 확인할 수 있었음 (그림 9A). 지방산 대사에서 불포화도를 높이는 Fatty acid desaturase (D)와 사슬을 연장시켜서 긴 사슬의 지방산을 만들어내는 Elongase (Elov1)의 유전자 발현조사에서 *T. kingsejongensis*는 온도가 낮은 곳에 노출될수록 Desaturase는 증가하는 경향성을 보였고, 반면 Elov1 유전자는 발현의 경향성이 없거나 감소하는 경향성을 보임 (그림 15B).
- 종합하면, 극지생태계에 적응한 *T. kingsejongensis*는 다가불포화지방산 비율이 높아서 극지 생태계 적응에 역할이 중요할 것으로 추정되나, 온도가 낮은 환경에 노출될수록 지방산의 불포화도를 높이는 유전자들의 발현이 증가하고, 사슬을 연장시키는 유전자의 발현이 감소하는 적응기작을 보여줌. 지질의 불포화도는 생물이 살아가는데 가장 기본적인 세포의 막 구성 및 이의 유동성에도 큰 관여를 하기에, 해당 연구결과는 극지환경 변화에 따른 분자생리학적 적응기작에 대한 기본지식을 제공할 수 있음.

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1절. 연구개발 목표 달성도

가. 연구개발 최종 목표

극지요각류 *Tigriopus kingsejongensis*를 활용하여 극지환경 적응에 있어 유용한 유전체 및 영양대사의 정보를 확보하고 환경변화에 따른 대사 경로의 변화를 규명하여 궁극적으로 에너지 대사체와 유전체의 상관관계에 대한 핵심기반지식을 구축한다

나. 연구개발목표 및 달성도

성과목표	세부목표		달성 주요내용	달성도(%)
1. 극지요각류에서의 발달단계 정보 확보 및 JBrowse DB 구축 (2020)	1-1	<i>Tigriopus kingsejongensis</i> 의 JBrowse DB 구축	<ul style="list-style-type: none"> - <i>T. kingsejongensis</i> RNAseq 수행 - <i>T. kingsejongensis</i> Genome sequencing 수행 - 전체 유전체 조립 및 퀄리티 분석 - <i>T. kingsejongensis</i>의 JBrowse DB 구축 	- JBrowse 웹사이트 공개 (100%)
	1-2	극지환경 변화 시 일어나는 <i>Tigriopus kingsejongensis</i> 의 발달단계 변화 관찰	<ul style="list-style-type: none"> - 염도 및 온도 변화에 따른 <i>T. kingsejongensis</i>의 발달단계 관찰 및 분석 - 염도 및 온도 변화에 따른 <i>T. kingsejongensis</i>의 생식능력 관찰 및 분석 	- 급성 및 만성 영향평가 (100%)
2. 극지환경적응 기작관련 영양대사 유전체 동정 (2021)	2-1	극지 환경 적응기작 관련 지질대사 유전체 및 지질대사체 동정	<ul style="list-style-type: none"> - 지질대사 관련 유전체 발굴 및 동정 - 지질대사 관련 대사체 분석 	- 지질 대사 유전체 동정 및 대사체 분석 완료 (100%)
	2-2	극지 환경 적응기작 관련 단백질, 탄수화물대사 유전체 및 해당 대사체 동정	<ul style="list-style-type: none"> - 단백질대사 관련 유전체 발굴 및 동정 - 탄수화물대사 관련 유전체 발굴 및 동정 	- GPCR 유전체 발굴완료, 유전자 명명 및 분류(100%)
3. 극지환경변화 및 오염원에 대한 유전체 활용 및 영양대사경로 파악 (2022)	3-1	극지환경 변화에 대한 에너지 대사체의 변화량 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 탄소 및 아미노산 동위원소비 변화량 측정 - 지방산 변화량 측정 	-지방산 변화량 측정 완료 (100%)
	3-2	극지환경 변화 및 오염원에 의해 변화하는 유전체와 영양대사체의 상관관계 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 유전체의 변화량 측정 	- 유전체 변화량 측정 완료 (100%)

다. 연구수행 세부 내용 및 결과

○ 세부목표 1-1: 극지요각류에서의 발달단계 정보 확보 및 JBrowse DB 구축

연구 내용	연구 결과
<i>T. kingsejongensis</i> 의 JBrowse DB 구축	<ul style="list-style-type: none"> - <i>T. kingsejongensis</i> RNAseq 수행 - <i>T. kingsejongensis</i> Genome sequencing 수행 - 전체 유전체 조립 및 퀄리티 분석 - <i>T. kingsejongensis</i>의 JBrowse DB 구축
극지환경 변화 시 일어나는 극지요각류의 발달단계 변화관찰	<ul style="list-style-type: none"> - 염도 및 온도 변화에 따른 <i>T. kingsejongensis</i>의 발달단계 관찰 및 분석 - 염도 및 온도 변화에 따른 <i>T. kingsejongensis</i>의 생식능력 관찰 및 분석

○ 세부목표 1-2: 극지환경적응기작 관련 영양대사 유전체 동정

연구 내용	연구 결과
극지환경적응기작 관련 지질대사 유전체 및 지질대사체 동정	<ul style="list-style-type: none"> - 지질대사 관련 유전체 발굴 및 동정 - 지질대사 관련 대사체 분석
극지환경적응기작 관련 단백질, 탄수화물대사 유전체 및 해당 대사체 동정	<ul style="list-style-type: none"> - 단백질대사 관련 유전체 발굴 및 동정 - 탄수화물대사 관련 유전체 발굴 및 동정

○ 세부목표 1-3: 극지환경변화 및 오염원에 대한 유전체 활용 및 영양대사경로 파악

연구 내용	연구 결과
극지환경 변화에 대한 에너지 대사체의 변화량 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 온도, 급이에 따른 지방산 분석
극지환경 변화 및 오염원에 의해 변화하는 유전체와 영양대사체의 상관관계 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 환경변화에 따른 유전체 변화량 측정

라. 연구성과(정량적 성과)

□ 계획 대비 실적

(계획(건수)/대비(건수))

구분		계획/실적					
		국외			국내		
논문		SCI	기타	소계	SCI	기타	소계
		3/5	/	/	/	/	/
		국외			국내		
Proceeding		/			/		
단행본(저서)		/					
특허		국외			국내		
	출원	/			/		
	등록	/			/		
기술실시계약		/					
세미나개최		/					
인터넷사이트 개설		/					
기타사항		/					

제 2절. 대외 기여도

- 본 연구를 통해 향후 극지의 환경변화가 극지 해양생물에 미칠 수 있는 영향을 유전체의 global expression pattern 분석뿐 아니라 영양대사체의 변화를 통한 분자생체지표로 쓰일 수 있고, 극지 해양생물을 연구하는데에 기초자료로써 제시할 수 있다.
- 극지 해양 환경변화 및 환경오염이 극지 해양생물에 미치는 영향을 초기단계에서부터 매우 미세한 수준에서 검출하고 이들 환경요인이 극지 해양생물의 개체수준 및 분자기작에 미치는 영향을 심도있게 연구하는데 중점을 둘 수 있다.
- 최근 빠르게 진행되고 있는 극지 해양 환경변화에 따른 극지 해양생물의 생태학적 영향 분석에 대한 기초 자료를 제공할 수 있다.

제 5장 연구개발결과의 활용계획

- 극지 해양 환경변화에 반응하는 극지 요각류 유전자의 발굴을 통하여 환경감시체계의 수립에 기초자료를 제공할 수 있으며, 나아가 향후 예상되는 환경오염을 예측할 수 있는 기반자료를 마련할 수 있다.
- 극지 요각류 *Tigriopus kingsejongensis*의 분자생체지표용 유전체의 개발뿐 아니라 이를 이용한 단백질의 생산 및 항체 제작 등으로 이어가 이를 이용한 상업적인 연구도 가능하다.
- 극지 요각류와 온대요각류의 비교연구를 통하여 극지요각류의 특이적인 영양대사체의 생성기작을 발굴하고, 유용 바이오 대사체의 생산 효율성을 증진시키는데 필요한 자료를 구축할 수 있다.



제 6장 참고문헌

- Ackman, R.G., 1980. Fish lipids. Pt. I. In: Connell, J.J. (Ed.), *Advances in Fish Science and Technology*. Fishing News, Surrey, pp. 86 - 103.
- Bie, N., Han, L., Meng, M., Yan, Z., Wang, C., 2020. The immunomodulatory effect of docosahexaenoic acid (DHA) on the RAW264.7 cells by modification of the membrane structure and function. *Food Funct.* 11, 2603 - 2616.
- Budge, S.M., Iverson, S.J., Bowen, W.D., Ackman, R.G., 2002. Among and within species variability in fatty acid signatures of marine fish and invertebrates on the Scotian Shelf, Georges Bank, and southern Gulf of St. Lawrence. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 886 - 898.
- Cooper, M.H., Iverson, S.J., Rouvinen-Watt, K., 2005. Metabolism of dietary cetoleic acid (22:1n-11) in mink (*Mustela vison*) and gray seals (*Halichoerus grypus*) studied using radiolabeled fatty acids. *Physiol. Biochem. Zool.* 79, 820 - 829.
- Cossins, A.R. 1994. *Temperature adaptation of biological membranes*. Portland Press, London.
- Dahl, T.M., Lydersen, C., Kovacs, K.M., Falk-Petersen, S., Sargent, J., Gjertz, I., Gulliksen, B., 2000. Fatty acid composition of the blubber in white whales (*Delphinapterus leucas*). *Polar Biol.* 23, 401 - 409.
- Drouin, G., Rioux, V., Legrand, P., 2019. The n-3 docosapentaenoic acid (DPA): A new player in the n-3 long chain polyunsaturated fatty acid family. *Biochimie* 159, 36 - 48.
- Falk-Petersen, S., Hopkins, C.C.E., Sargent, J.R., 1990. Trophic relationships in the pelagic, arctic food web. In: Barnes, M., Gibson, R.N. (Eds.), *Trophic Relationships in the Marine Environment*. Aberdeen University Press, Aberdeen, pp. 315 - 333.
- Hishikawa, D., Valentine, W.J., Iizuka-Hishikawa, Y., Shindou, H., Shimizu, T., 2017. Metabolism and functions of docosahexaenoic acid-containing membrane glycerophospholipids. *FEBS Lett.* 591, 2730 - 2744.
- Iverson, S.J., 1993. Milk secretion in marine mammals in relation to foraging: can milk fatty acids predict diet? *Symp. Zool. Soc. Lond.* 66, 263 - 291.
- Iverson, S.J., Frost, K.J., Lang, S.L.C., 2002. Fat content and fatty acid composition of forage fish and invertebrates in Prince William Sound, Alaska: factors contributing to among and within species variability. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 241, 161 - 181.
- Kang, S., Ahn, D.-H., Lee, J.H., Lee, S.G., Shin, S.C., Lee, J., Min, G.-S., Lee, H., Kim, H.-W., Kim, S., Park, H., 2017. The genome of the Antarctic-endemic copepod, *Tigriopus kingsejongensis*. *Gigascience* 6, 1 - 9.
- Karlsson, K., Puiac, S., Winder, M., 2018. Life-history responses to changing temperature and salinity of the baltic sea copepod *Eurytemora affinis*. *Mar. Biol.* 165, 30.
- Kim, B.M., Lee, Y., Hwang, J.Y., Kim, Y.K., Kim, T.W., Kim, I.N., Kang, S., Kim, J.H., Rhee, J.S., 2022. Physiological and molecular responses of the Antarctic harpacticoid copepod *Tigriopus kingsejongensis* to salinity fluctuations - A multigenerational study. *Environ. Res.* 204, 112075.

- Lee, R.F., Nevenzel, J.C., Paffenhfer, G.-A., 1971. Importance of wax esters and other lipids in the marine food chain: phytoplankton and copepods. *Mar. Biol.* 9, 99 - 108.
- Li, C., Luo, X., Huang, X., Gu, B., 2009. Influences of temperature on development and survival, reproduction and growth of a calanoid copepod (*Pseudodiaptomus dubia*). *Scientif.World J.* 9, 866 - 879.
- Pascal, J.C., Ackman, R.G., 1976. Long chain monoethylenic alcohol and acid isomers in lipids of copepods and capelin. *Chem. Phys. Lipids* 16, 219 - 223.
- Schulte, P.M., 2015. The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *J. Exp. Biol.* 218, 1856 - 1866.
- Sinclair, B.J., Marshall, K.E., 2018. The many roles of fats in overwintering insects. *J. Exp. Biol.* 221, jeb161836.
- Yoon, D.-S., Byeon, E., Kim, D.-H., Lee, M.-C., Shin, K.-H., Hagiwara, A., Park, H.G., Lee, J.-S., 2022. Effects of temperature and combinational exposure on lipid metabolism in aquatic invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol., Part C.* 30, 109449.



주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.