

대사체 분석 및 분자네트워킹 분석기법 기반
극지미생물 유래 바이오소재 발굴

Metabolomics and molecular networking
based discovery of biomaterials derived
from polar microorganism



고려대학교 산학협력단

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지 바이오 대사체 상용화 구축 사업” 과제의 위탁연구 “대사체 분석 및 분자네트워킹 분석기법 기반 극지미생물 유래 바이오소재 발굴” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



(본과제) 총괄연구책임자 : 김 일 찬
위탁연구기관명 : 고려대학교 산학협력단
위탁연구책임자 : 이 동 호
위탁참여연구원 : 권 하 은
“ : 장 유 주
“ : 박 현 서
“ : 이 재 훈

보고서 초록

위탁연구과제명	대사체 분석 및 분자네트워킹 분석기법 기반 극지미생물 유래 바이오소재 발굴				
위탁연구책임자	이동호	해당단계 참여연구원수	5	해당단계 연구비	50,000,000 원
연구기관명 및 소속부서명	고려대학교 산학협력단		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	23
<p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 다양한 극지 미생물의 추출물을 확보하여 LC-MS(Ion trap)를 이용하여 분석함. - LC-MS 분석결과를 기반으로 PCA, PLS-da와 같은 다변량 통계기법을 실시하여 유용 극지 균주를 선정함. - 추출물 분석을 통해 산출된 UV와 MS spectrum 결과를 바탕으로 chemical DB 검색과 분자 네트워킹(Molecular networking)을 이용한 MS/MS fragment 분석을 수행하여 기존에 보고된 다양한 활성물질에 대한 de-replication, 추출물 내 대사체를 파악하여 DB를 구축함. - 선정된 5종의 유용 극지 미생물을 선정하여, 대량배양을 통한 추출물을 확보하여 다양한 분리기법을 통해 대사체를 분리함. - 다양한 분광학 분석장비를 이용하여 분리된 대사체의 구조를 규명함. <p>○ 연구결과의 활용</p> <p>이와 같은 연구결과는 극지 미생물 자원 활용연구 및 관련 산업 활성화에 기여할 것임.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	대사체, 극지 미생물, 추출물, MS 라이브러리, 분자네트워킹			
	영 어	Metabolites, Polar microorganisms, Extract, MS-library, Molecular networking			

요 약 문

I. 제 목

대사체 분석 및 분자네트워킹 분석기법 기반 극지미생물 유래 바이오소재 발굴

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 극지 유래 미생물의 추출물을 제작하고 대사체 라이브러리를 확보하고, 추출물 내 특이적 대사체 구조의 특성을 분석하여 극지 바이오 연구를 활성화하는 데 있다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구개발의 목적을 달성하기 위하여 아래와 같은 연구가 진행되었다.

- 극지 미생물 유래 대사체 확보
 - 극지 미생물 추출물 확보
 - 극지 미생물 추출물 LC-MS 분석 및 분자네트워킹 분석
 - 극지 미생물 추출물 대량배양, 대사체 분리 정제 및 구조 규명

IV. 연구개발결과

- 극지 미생물 유래 대사체 확보

가. 극지 미생물 추출물 확보

극지연구소로부터 수령한 균주를 배양하여 추출물을 확보하였다.

나. 극지 미생물 추출물 LC-MS 분석 및 분자네트워킹 분석

극지 미생물 추출물 시료를 대상으로 LC-MS(Ion trap) 분석을 수행하였고, UV 및 MS spectrum 결과를 바탕으로 chemical DB 검색과 분자네트워킹 분석기법을 수행하여 de-replication 및 추출물 내 유용 대사체 분석을 하였다.

다. 극지 미생물 추출물 대량배양, 대사체 분리 정제 및 구조 규명

확보한 추출물 중 선정된 유용 극지 미생물을 대량배양하여 추출물을 확보하고 다양한 분리기법을 통해 대사체를 분리 정제하였으며, 분리된 대사체에 대한 분광학 분석을 통해 구조를 규명하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

극지 유래 미생물의 대사체 분석 결과를 통해 대사체를 미리 예측하여 신규 활성물질 또는 유용 활성 물질을 탐색하여 효용성이 높은 균주를 선택하는 데 도움을 준다. 또한 신규 활성 대사체 분리 정제 연구를 위한 토대를 마련할 수 있으며, 극지 미생물 자원들의 연구를 위한 기초 자료로써 기여한다.

S U M M A R Y

(영 문 요 약 문)

I. Title

Metabolomics and molecular networking based discovery of biomaterials derived from polar microorganism

II. Purpose and Necessity of R&D

The purpose of this study is to activate the antarctic research by constructing the extracts and library of metabolites from polar microorganism and analyzing the characteristics of specific metabolite structures.

III. Contents and Extent of R&D

The following studies were conducted to achieve the objectives of this study and development.

- Securement of metabolite derived from polar microorganisms
 - Acquisition of polar microorganisms extracts
 - Analysis of LC-MS and Molecular networking of polar microorganisms
 - Isolation of metabolites from polar microorganisms and structure elucidation of isolated metabolites by spectroscopic method

IV. R&D Results

The results of these studies are as follows.

- Securement of metabolite derived from polar microorganisms
 - A. Acquisition of polar microorganisms extracts
 - Extracts were obtained by culturing microbial strains from KOPRI were secured.
 - B. Analysis of LC-MS and Molecular networking of polar microorganisms
 - LC-MS(Ion trap) analysis was performed on the samples of the polar microorganisms extracts. Based on the UV and MS spectrum data, chemical DB searching and molecular networking analysis were performed to analyze de-replication and useful metabolites.
 - C. Isolation of metabolites from polar microorganisms and structure elucidation of isolated metabolites by spectroscopic method
 - Selected useful polar microorganisms were large-cultivated to obtain extracts, and metabolites were isolated through various separation techniques, and the structures of the metabolites were elucidated through spectroscopic analysis.

V. Application Plans of R&D Results

The results of the analysis of the metabolite derived from polar microorganisms can be used to predict the metabolites and to search for novel active substances or useful active materials. It also contributed as a basis for the study of polar microbial resources.

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 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌





제 1 장 서론

제 1절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

- LC-MS를 이용한 추출물의 대사체 분석(metabolomics)을 통한 유용 극지 미생물 추출물 선정(prioritizing) 및 DB화
- MS fragmentation 기반 분자네트워킹(Molecular networking) 분석기법을 통하여 선정된 추출물 내 특이적 대사체 구조 특성 분석 및 표적화(targeting)
- 선정된 유용 극지 미생물의 대량배양 및 표적화된 신규 활성 대사체 분리 및 구조 연구(targeted isolation)

2. 연구개발의 필요성 및 범위

- 극지 미생물은 극한 환경에서 생존하기 위해 특이한 적응 관련 유전자, 단백질 및 다양한 대사체를 보유하고 있으며, 특이적 대사체 자원과 신규 활성 대사체 개발의 가능성이 매우 큼.
- 해양 미생물 중 해양 유래 진균에서 얻은 2차 대사물질들이 주목받고 있고, 1990년대 이후 발표된 구조들의 수가 급격히 증가하였으며 많은 물질이 생물학적, 약리학적 특징을 가지고 있음. (Rateb and Ebel, 2011).
- 극지 미생물의 가치와 활용성을 극대화하기 위하여 LC-MS를 이용한 유용 극지 미생물 추출물 DB 구축, 대사체의 다양성 확보가 필요함.
- 신규 활성물질의 대량 표적 분리를 통해 신약 개발의 가능성을 가지는 생물자원의 대량확보를 위한 시스템 구축이 필요함.

극지연구소

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 해외 연구현황

- 생물다양성협약에서 생물자원에 대한 국가 주권을 인정하면서 선진국들은 극지 및 해양생물정보은행을 구축하고 있으며, 유전체·단백체·천연물 대사체 탐색에 정부 차원의 대규모 투자를 하고 있다.
- 극지생물다양성, 생물계통·진화, 스트레스반응 등에 관한 연구를 위해 2007/2008 IPY를 통하여 국제 공동연구 체계가 이루어지고 있으며, 이외 저온효소 등의 신규 생물소재 연구를 보고하였다.
- 과학연구를 통해 극지 연구에 대한 영향력 확대를 위해 국제공동연구(북극해 환경변화 관측 공동연구; MOSAiC 프로젝트, 스위트 빙하 붕괴 연구 등)가 활발히 진행되고 있으며, 대규모 인프라 구축 등 국가 차원에서 투자가 강화되고 있다.
- 미국과학재단(National Science Foundation; NSF)에서 남극 연구 프로그램(U.S Antarctic Program; USAP)을 추진하며 매년 약 5,000억 원을 투자하여 남극 해양, 대기, 우주 관측과 생태연구, 인프라 운영을 진행하고 있다.
- 중국 극지연구소(Polar Research Institute of China; PRIC)에서 극지표본 자원 공유 플랫폼 사업을 통해 다양한 극지생물을 확보하고 관련 대사체에 관한 연구를 진행하고 있다.
- 중국 Shandong University 연구진은 남극 유래 해양 균주로부터 tremulane sesquiterpenoid 계열의 신규물질을 분리하였다. (Shi et al., 2021)
- 러시아 극지연구소(Arctic and Antarctic Research Institute of Roshydromet; AARI)에서 남북극 환경 내 기작 및 기작 간 상호작용에 대한 규명, 원거리 탐사 및 빙하시추 기술개발, 북극 생태연구, 남북극 해양활동 자원을 위한 연구 및 실시간 모니터링 활동을 하고 있다.
- 영국 극지연구소(British Antarctic Survey; BAS)에서 남극 환경의 미생물의 DNA를 연구하는 최첨단 유전적 방법을 통해 새로운 항생제 및 기타 화합물의 생산에 관해 연구를 하고 있다.

제 2절 국내 연구현황

- 국내에서는 극지연구소(Korea Polar Research Institute; KOPRI)를 2004년 설립하고, 남·북극 과학기지 설치, 2009년 아라온호 건조를 통해 극지역의 대기, 지구물리, 빙하, 해양환경, 생물자원 연구 등 다각도의 연구 활동을 펼치고 있다.
- KOPRI에서 극지 유용유전자원 활용과 극지생물 유전체 특성 규명을 통해 국제적 연구를 선도하고 산업적 고부가가치 창출이 가능한 극지생물 유전자원을 15종을 발굴하는 “극지유전체 101 프로젝트: 극지생물 유전체 정보 분석 및 활용기반 구축” 과제를 진행하였다.
- 현재 극지생물의 새로운 유전자를 이용하여 항생제 내성을 극복할 수 있는 차세대 항생제 후보물질 발굴을 위한 “극지유전자원 기반 신규활성 항생제 후보 물질 발굴” 과제를 진행하고 있다.
- 또한, 미개발된 극지 고유생물 유래 대사체의 생물공학적 활용기반을 구축하기 위해 극지 고유생물 탐사 및 확보, 극지 고유생물 유래 대사체 활용가치 규명을 위한 “극지적응 고유생물 유래 대사체의 상용화 구축사업”을 진행하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 유용 극지 미생물 선발 및 추출물 확보

1. 연구 목표

- ✓ 극지 미생물을 대상으로 추출물을 제작하여 각 추출물의 LC-MS 프로파일링(profiling) 분석을 통해 MS 라이브러리를 확보하고자 함. MS fragmentation 기반 분자네트워킹(Molecular networking) 분석기법을 통하여 선정된 추출물 내 특이적 대사체 구조 특성 분석 및 표적화(targeting)를 할 수 있음.

2. 연구 수행방법

가. 시료확보

- 2021년 극지연구소로부터 11종(strain Code. SH1-67-1 등)의 극지 균주를 추가 수령함(표 1).

표 1. 2021년 극지연구소로부터 수령한 11종의 극지 균주

Code	Description	Identification
SH1-67-1	2018Arc#P01-04	<i>Aspergillus</i> sp.
SH1-67-2	2018Arc#P27-03	Fungal sp.
SH1-67-3	2018Arc#P03-06	<i>Paecilomyces hepiali</i>
SH1-67-4	2018Arc#P03-04	<i>Penicillium</i> sp.
SH1-67-5	2018Arc#04-SW-2/2-04	<i>Simplicillium lamellicola</i>
SH1-67-6	2018Arc#05-SW-1/2-05	<i>Simplicillium lamellicola</i>
SH1-67-7	2018Arc#P02-05	<i>Trichoderma</i> sp.
SH1-67-8	2018Arc#01-SW-1/2-03	Uncultured Dikarya
SH1-67-9	2018Arc#04-SW-1/2-06	Uncultured Dikarya
SH1-67-10	2021-#KSJ05-01	<i>Cladosporium bruhnei</i>
SH1-67-11	2021-#KSJ02-01	<i>Thelebolus stercoreus</i>

나. 연구 결과

(1) 극지 미생물의 추출물에 대한 대사체 분석 결과

- 극지연구소로부터 수령한 총 11종의 균주 중 8종 균주 추출물에 대한 분석을 진행함(나머지 3종의 균주는 잘 자라지 않음.).
- 분석한 9종의 추출물 중 2종(SH1-67-5, SH1-67-8)의 추출물에서 신규 활성 물질을 함유하고 있을 가능성이 높아, 대량배양하여 물질을 분리할 만한 가치가 있다고 판단함.
- *Simplicillium lamellicola* (SH1-67-5) : have a broad spectrum of hosts and substrates, such as insects, plants, rusts, nematodes.
- 분류 : *Simplicillium*-Cordycipitaceae-Hypocreales-Sordariomycetes-Ascomycota-Fungi
- DB searching 결과 : *Simplicillium lamellicola*에 대해 29 (Scifinder), 34 (Reaxys), *Simplicillium* sp.에 대해 211 (Scifinder), 208 (Reaxys)개의 문헌이 존재함.
- 특히 해당 균주는 Microbial biopesticide로써, 다수의 활성 연구가 보고되었음.
- 하지만, 상대적으로 물질 분리 연구는 덜 진행되었으므로, 분리할 만한 가치가 높은 균주라 판단됨.

(2) MS fragmentation 기반 분자네트워킹(Molecular networking) 분석기법을 통하여 선정된 유용 극지 미생물의 대량배양 및 표적화된 신규 활성 대사체 분리 및 구조 연구(targeted

isolation)

(가) SH1-67-5 균주 추출물에 대한 대사체 분리 및 구조 연구

- SH1-67-5 균주 추출물에 대한 molecular networking 결과 다음과 같음(그림 1).

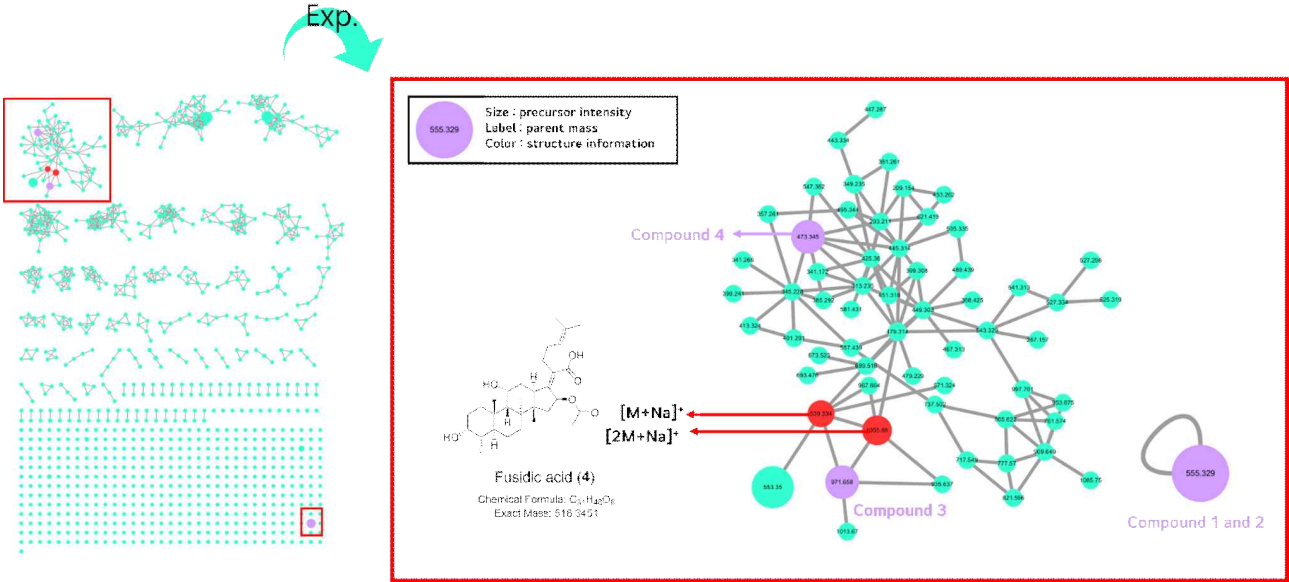


그림 1. 극지 균주 SH1-67-5 추출물의 molecular networking 결과

- 아래와 같은 scheme에 따라 추출물에서 활성물질 및 물질의 분리 정제를 진행함(그림 2).

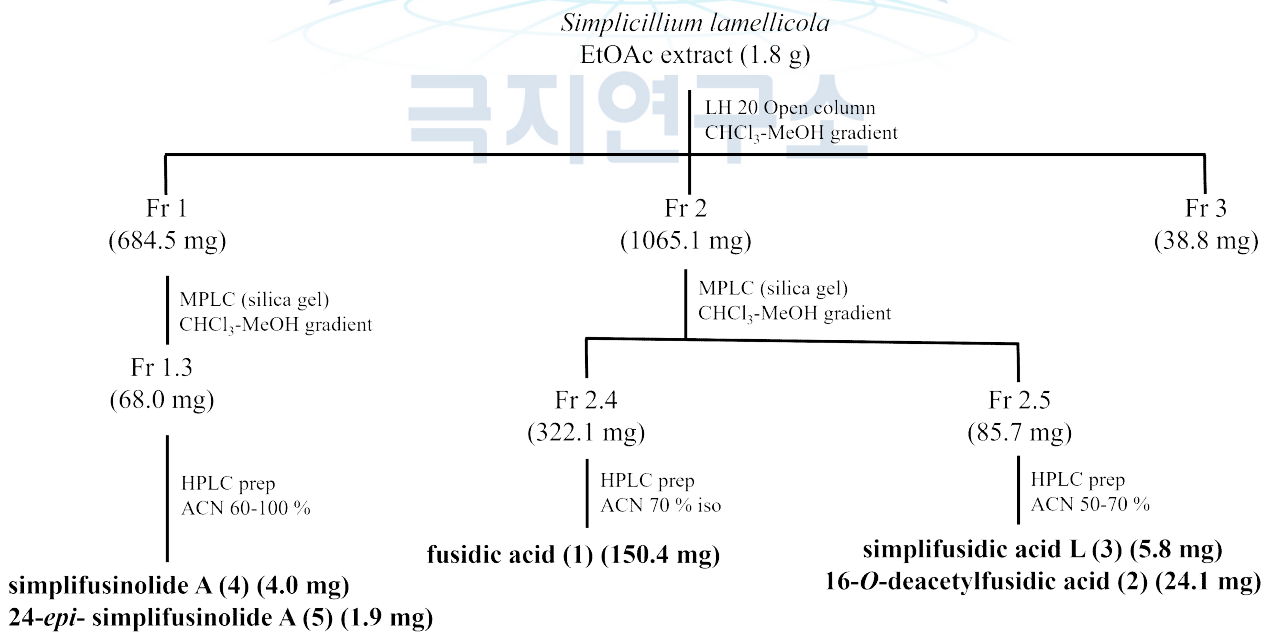


그림 2. 극지 균주 SH1-67-5 추출물의 분리 scheme

- 해당 균주의 추출물의 UPLC-PDA-ELSD, MS 및 Thin layer chromatography(TLC) 분석을 진행함(그림 3).

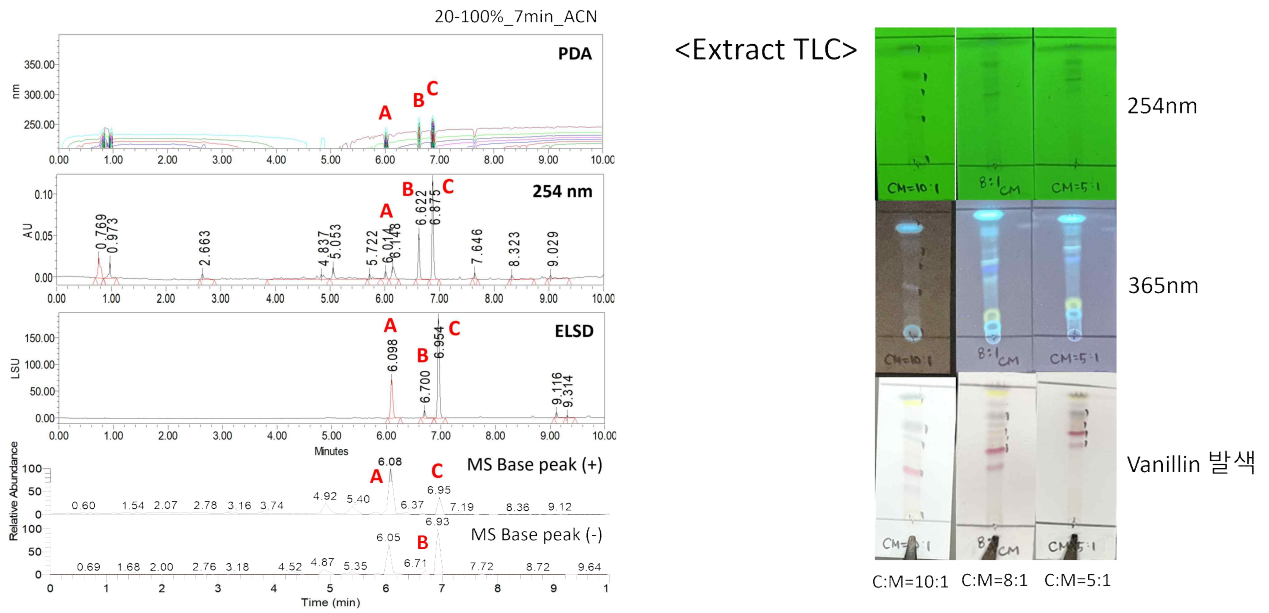


그림 3. 극지 균주 SH1-67-5 추출물 분석결과 (PDA, 254 nm, ELSD, MS, TLC)



- 물질의 분리 정제 결과, 추출물의 주성분인 fusidic acid(1) 및 16-*O*-deacetylfusidic acid(2)를 분리함(그림 4, 5).

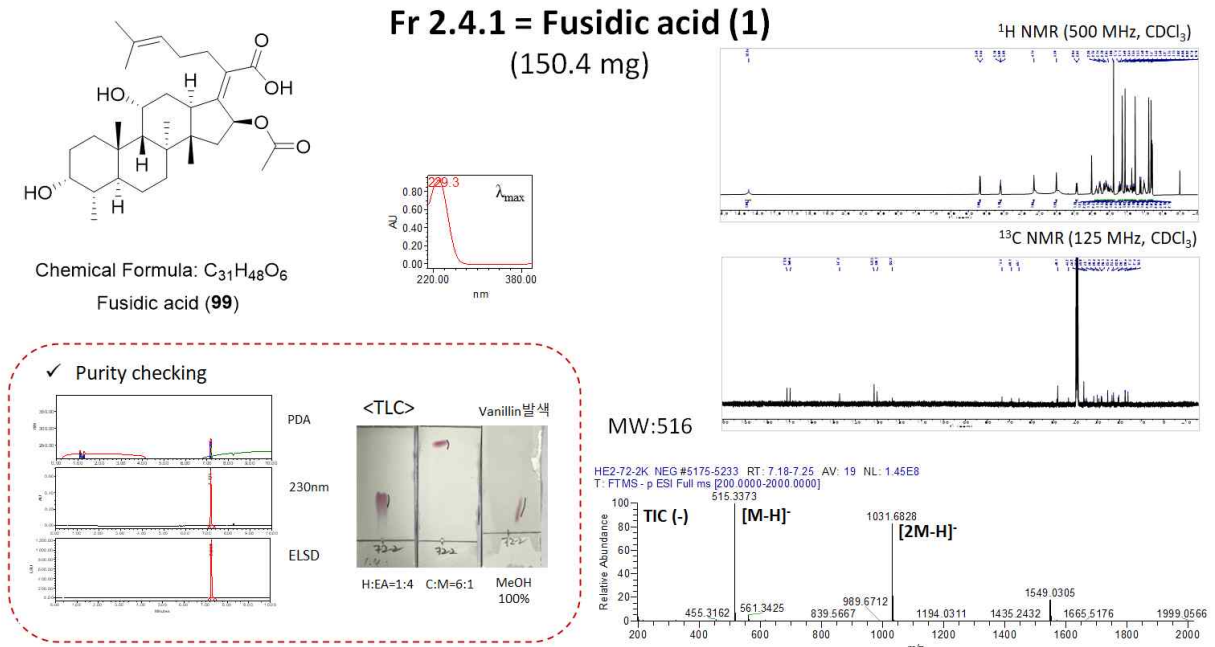


그림 4. 극지 균주 SH1-67-5 추출물로부터 분리한 fusidic acid(1)

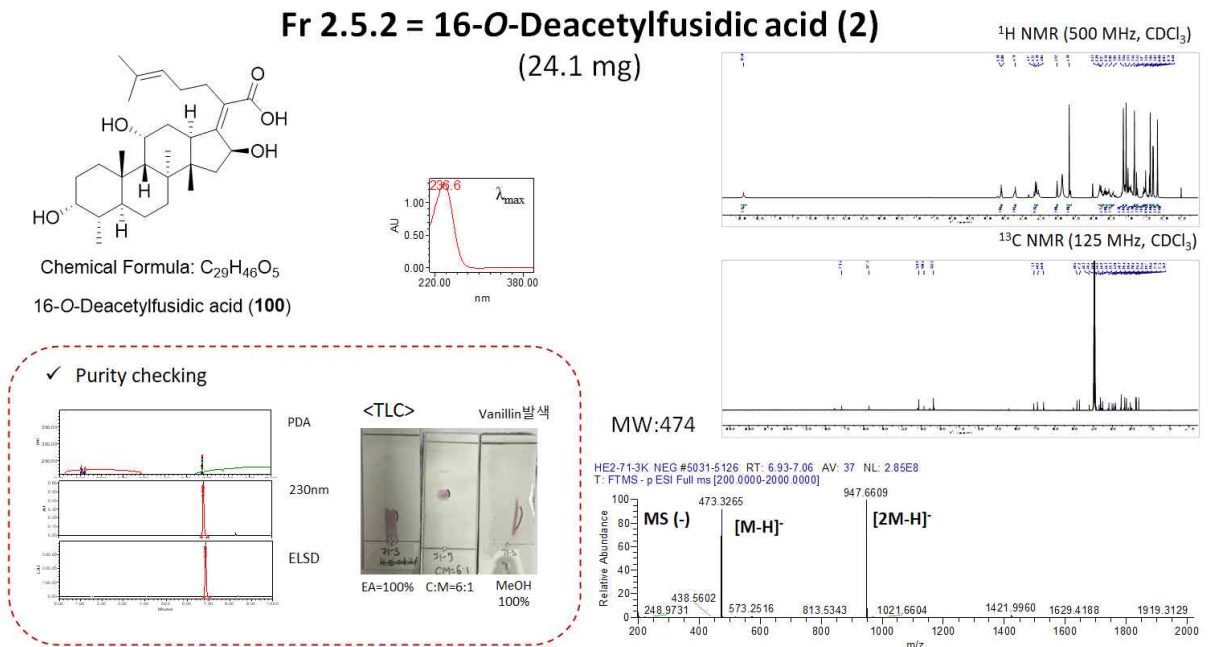


그림 5. 극지 균주 SH1-67-5 추출물로부터 분리한 16-*O*-deacetylfusidic acid(2)

- 물질의 분리 정제 결과, 신규 물질 3종 simplifusidic acid L(3), simplifusinolide A(4), 24-*epi*-simplifusinolide A(5)을 분리함(그림 6-8).

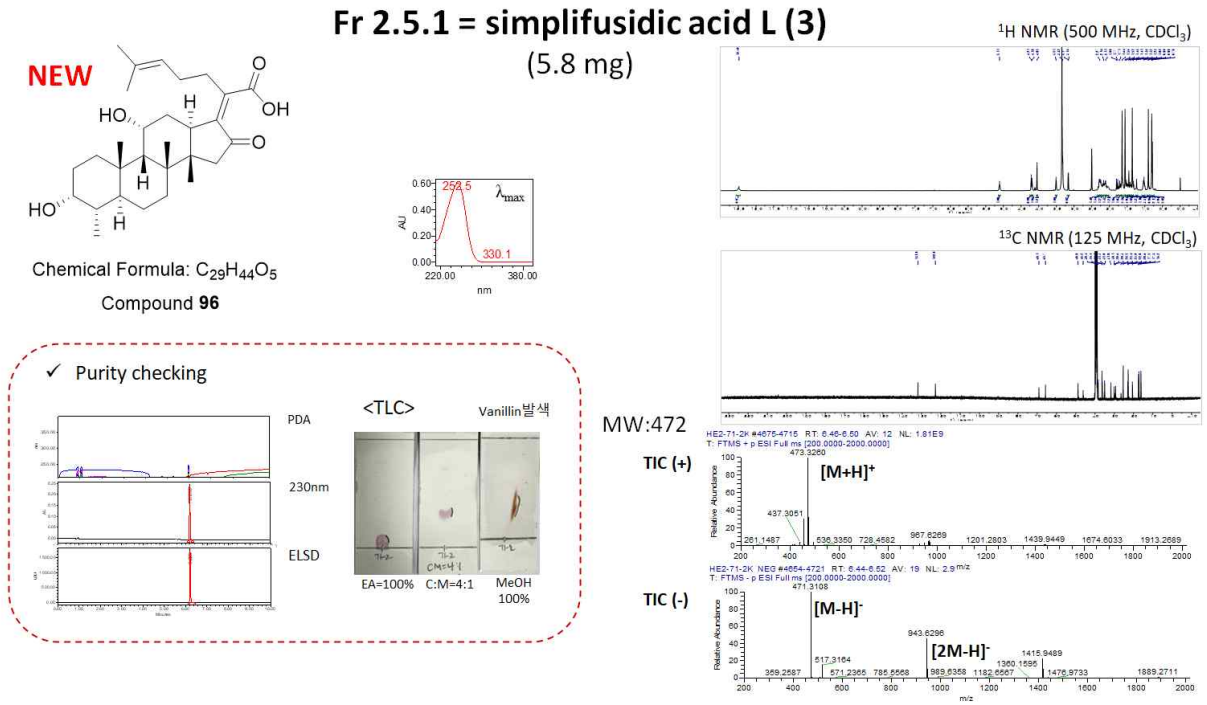


그림 6. 극지 균주 SH1-67-5 추출물로부터 분리한 신규 물질 simplifusidic acid L(3)

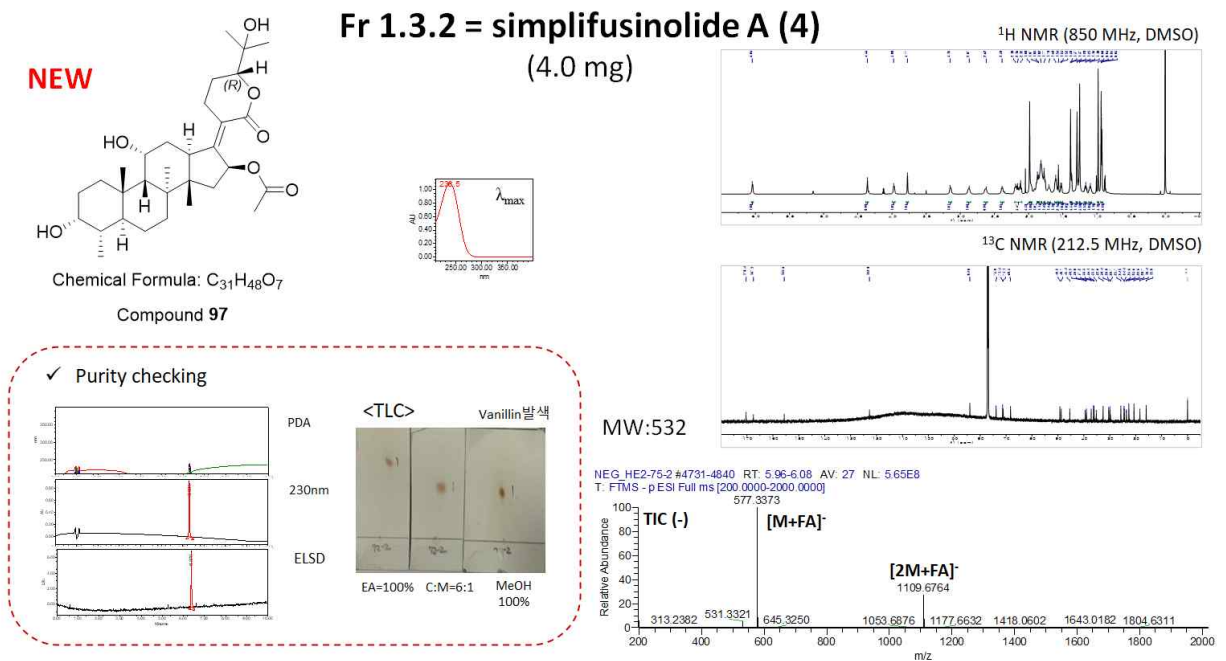


그림 7. 극지 균주 SH1-67-5 추출물로부터 분리한 신규 물질 simplifusinolide A(4)

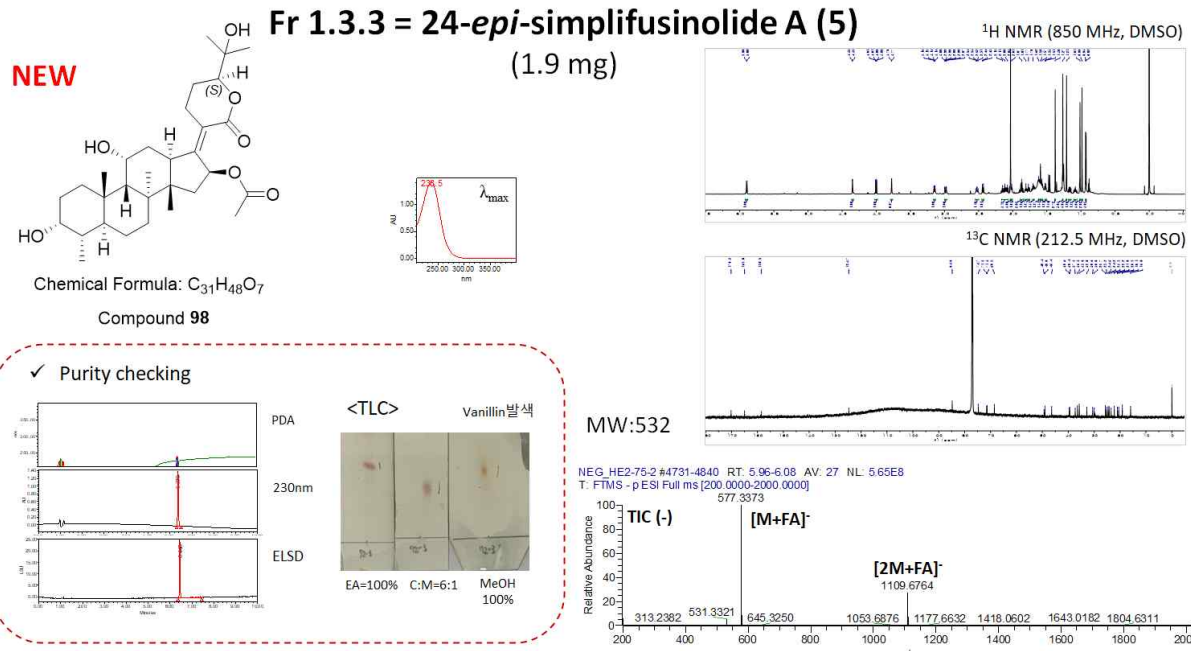


그림 8. 극지 균주 SH1-67-5 추출물로부터 분리한 신규 물질 24-*epi*-simplifusinolide A(5)

- 분리된 5종의 BPH-1 세포에 대한 anti-proliferative 효과 실험 결과, 다음과 같이 24-*epi*-simplifusinolide A(5), simplifusidic acid L(3), fusidic acid(1)에 효과를 나타냈음(그림 9).

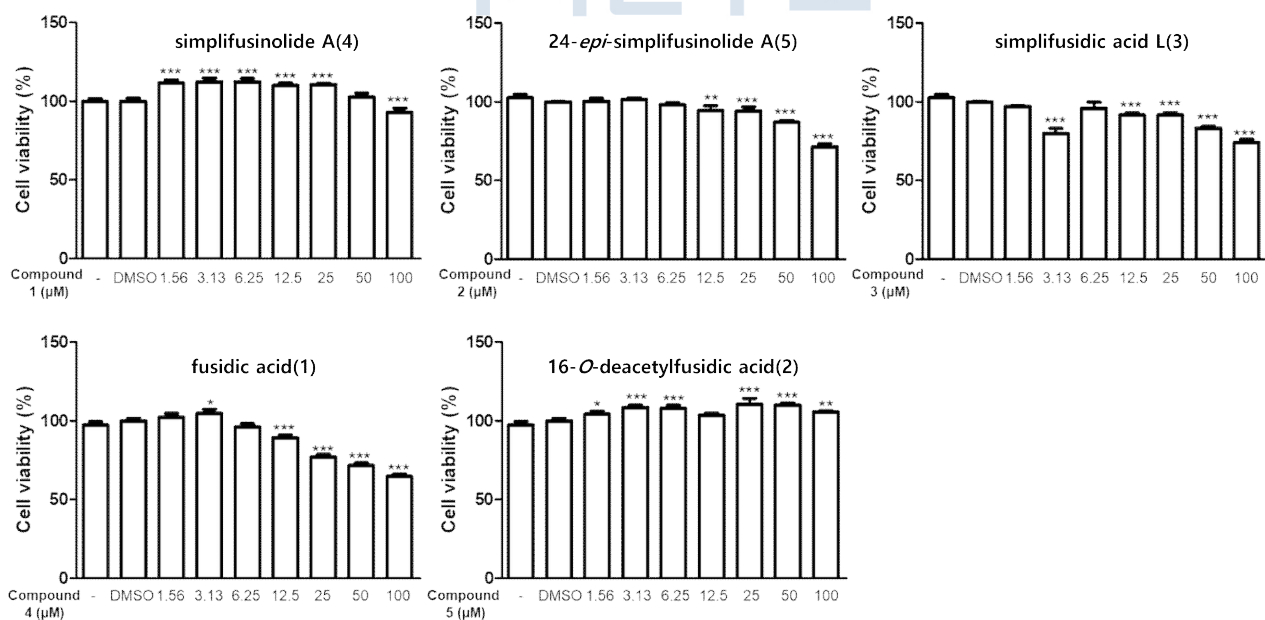


그림 9. 분리된 5종 물질의 BPH-1 세포에 대한 anti-proliferative effects 결과

- BPH-1 세포에 대한 anti-proliferative 효과를 나타낸 24-*epi*-simplifusinolide A(5), simplifusidic acid L(3), fusidic acid(1)에 대한 추가적으로 WPMY-1 세포에 대한 활성을 확인함. 그 결과, 24-*epi*-simplifusinolide A(5)에서 뚜렷한 효과를 보임(그림 10).

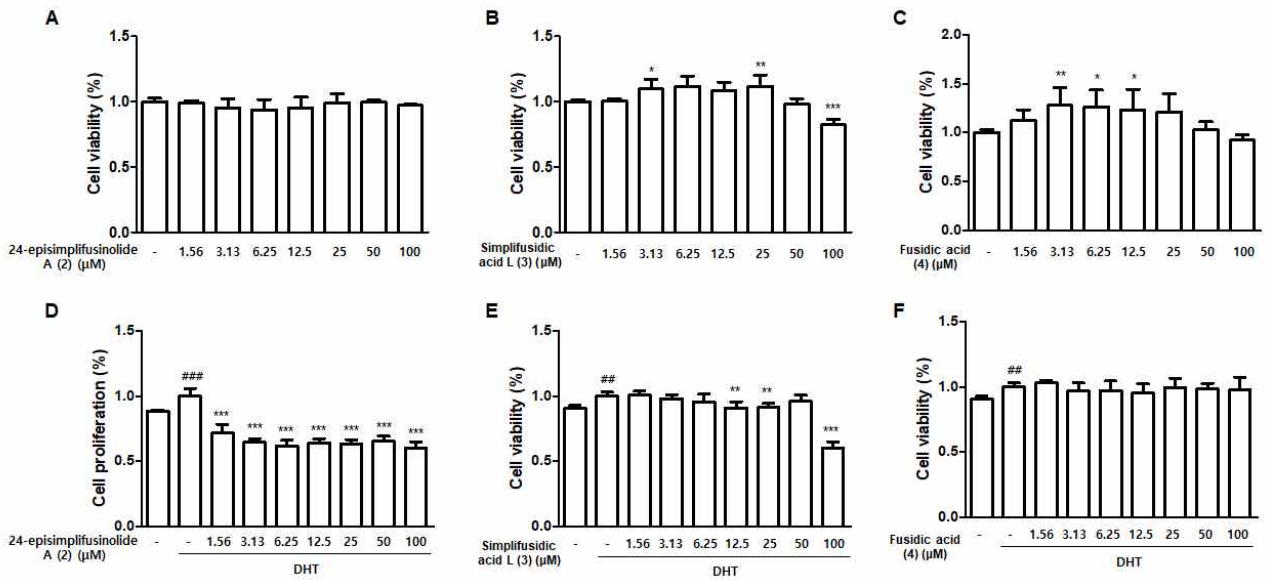


그림 10. 분리된 3종의 물질의 WPMY-1 세포에 대한 anti-proliferative effects 결과



- BPH의 발달에 중요한 역할을 하는 androgen receptor(AR) signaling에 대한 억제 활성을 확인함.
- 24-*epi*-simplifusinolide A(5)에 대한 BPH-1 세포 AR signaling pathway 억제 활성을 검증함(그림 11).

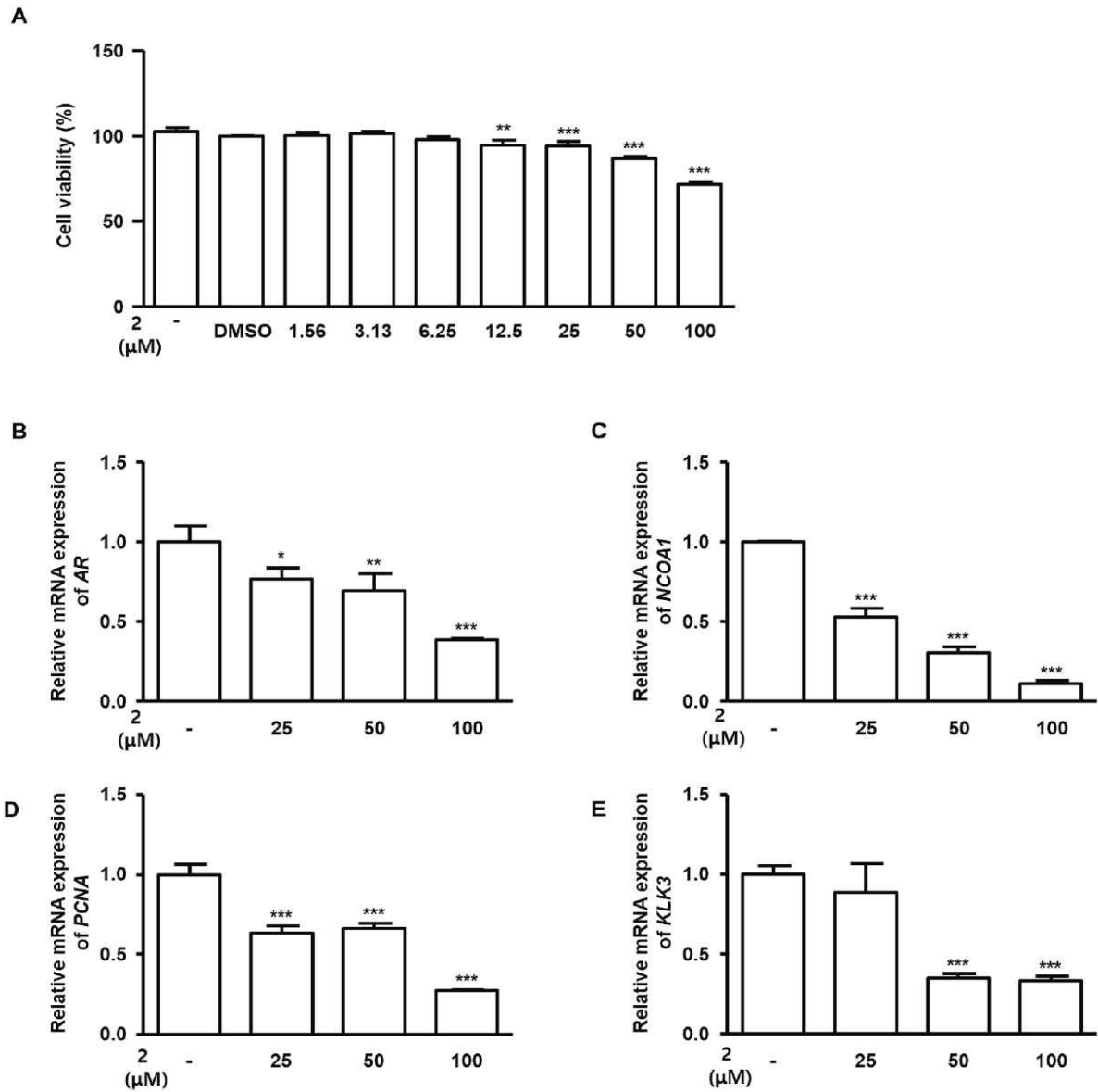


그림 11. 24-*epi*-simplifusinolide A(5)의 BPH-1 세포 AR signaling 억제를 통한 anti-proliferative effects 결과

- simplifusidic acid L(3)에 대한 BPH-1 세포 AR signaling pathway 억제 활성을 검증함(그림 12).

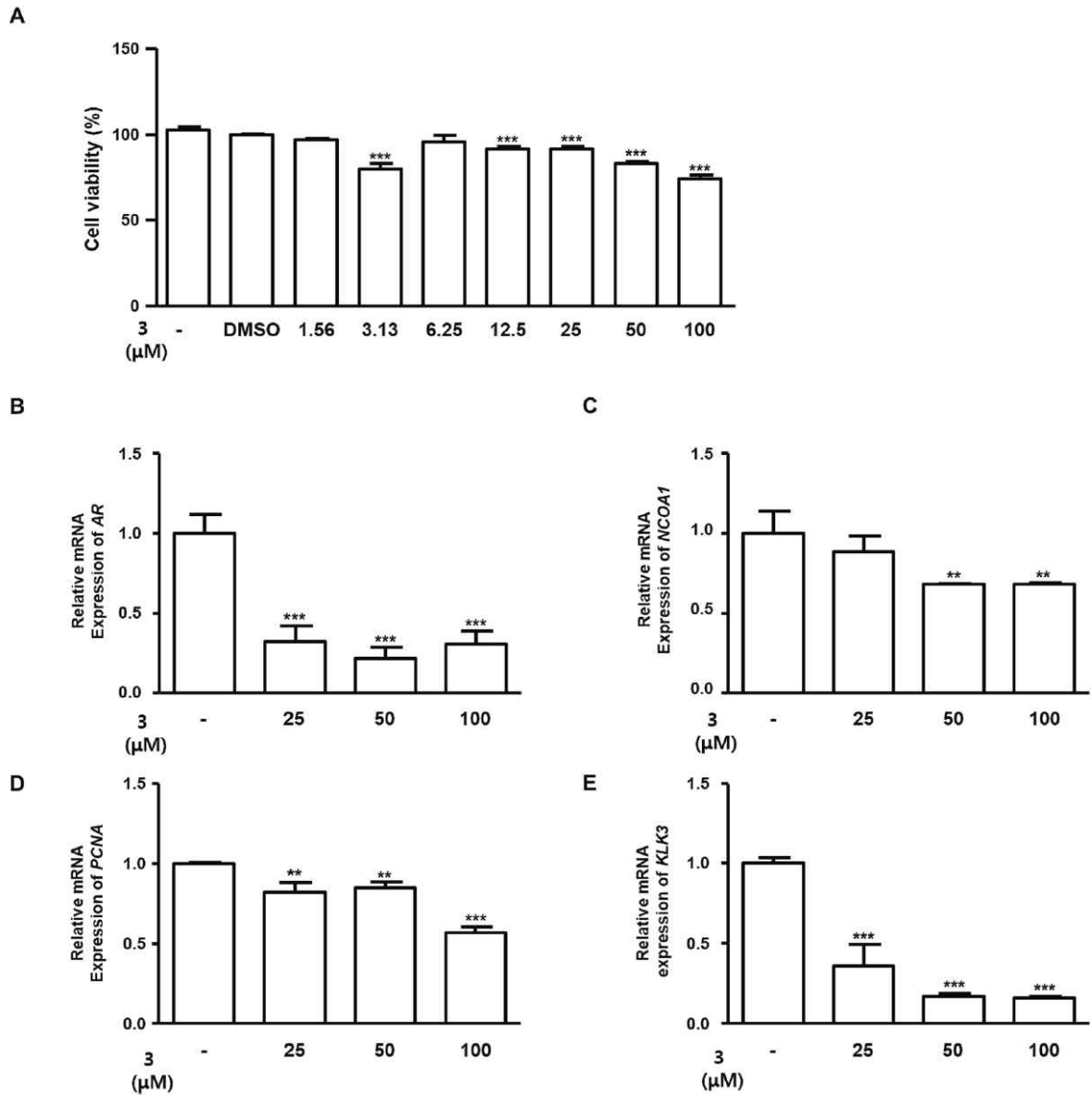


그림 12. simplifusidic acid L(3)의 BPH-1 세포 AR signaling 억제를 통한 anti-proliferative effects 결과

- fusidic acid(1)에 대한 BPH-1 세포의 AR signaling pathway 억제 활성을 검증함(그림 13).

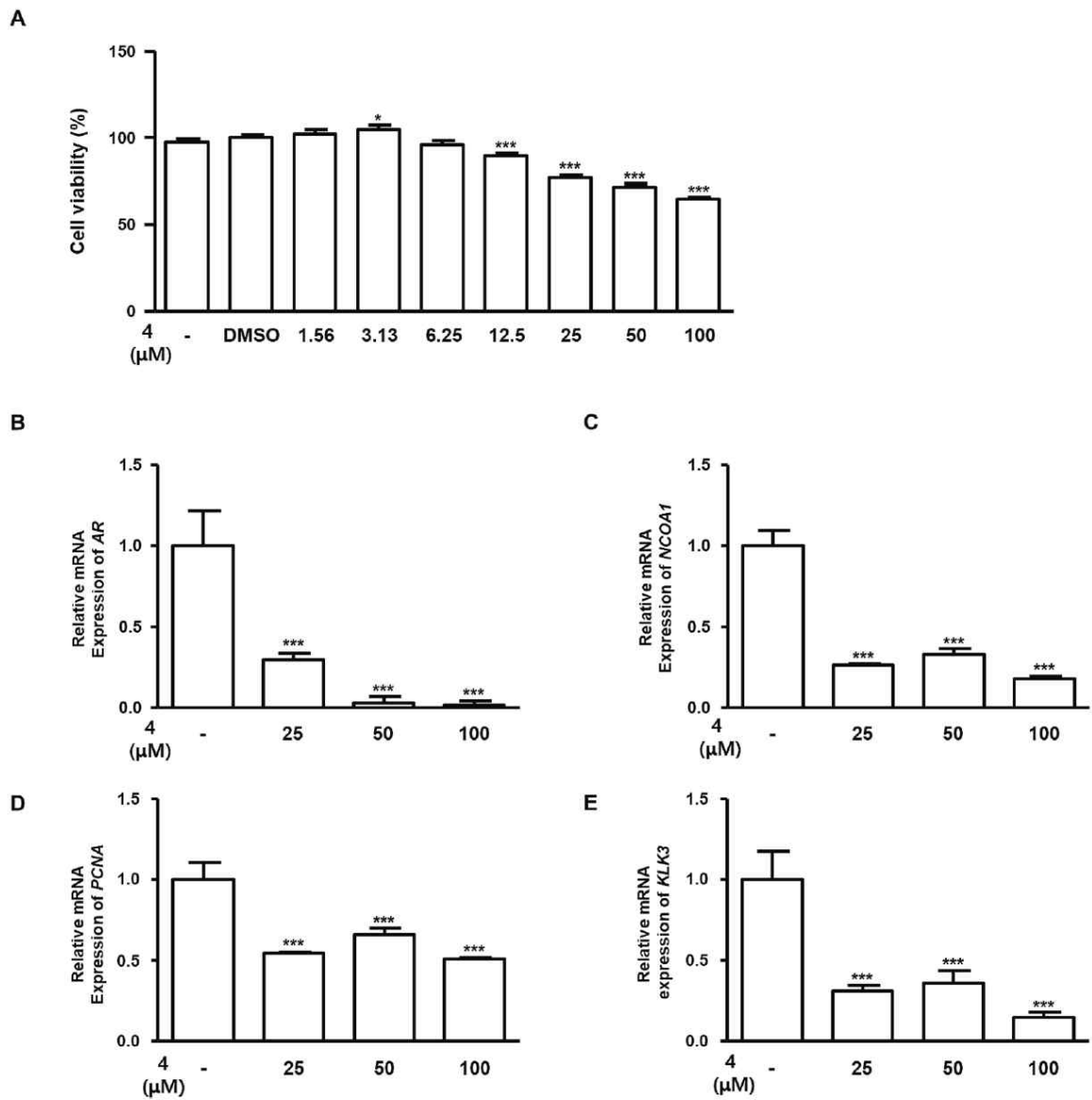


그림 13. fusidic acid(1)의 BPH-1 세포 AR signaling 억제를 통한 anti-proliferative effects 결과

- 24-*epi*-simplifusinolide A(5)에 대한 DHT-stimulated WPMY-1 세포의 AR signaling pathway 억제 활성을 검증함(그림 14).

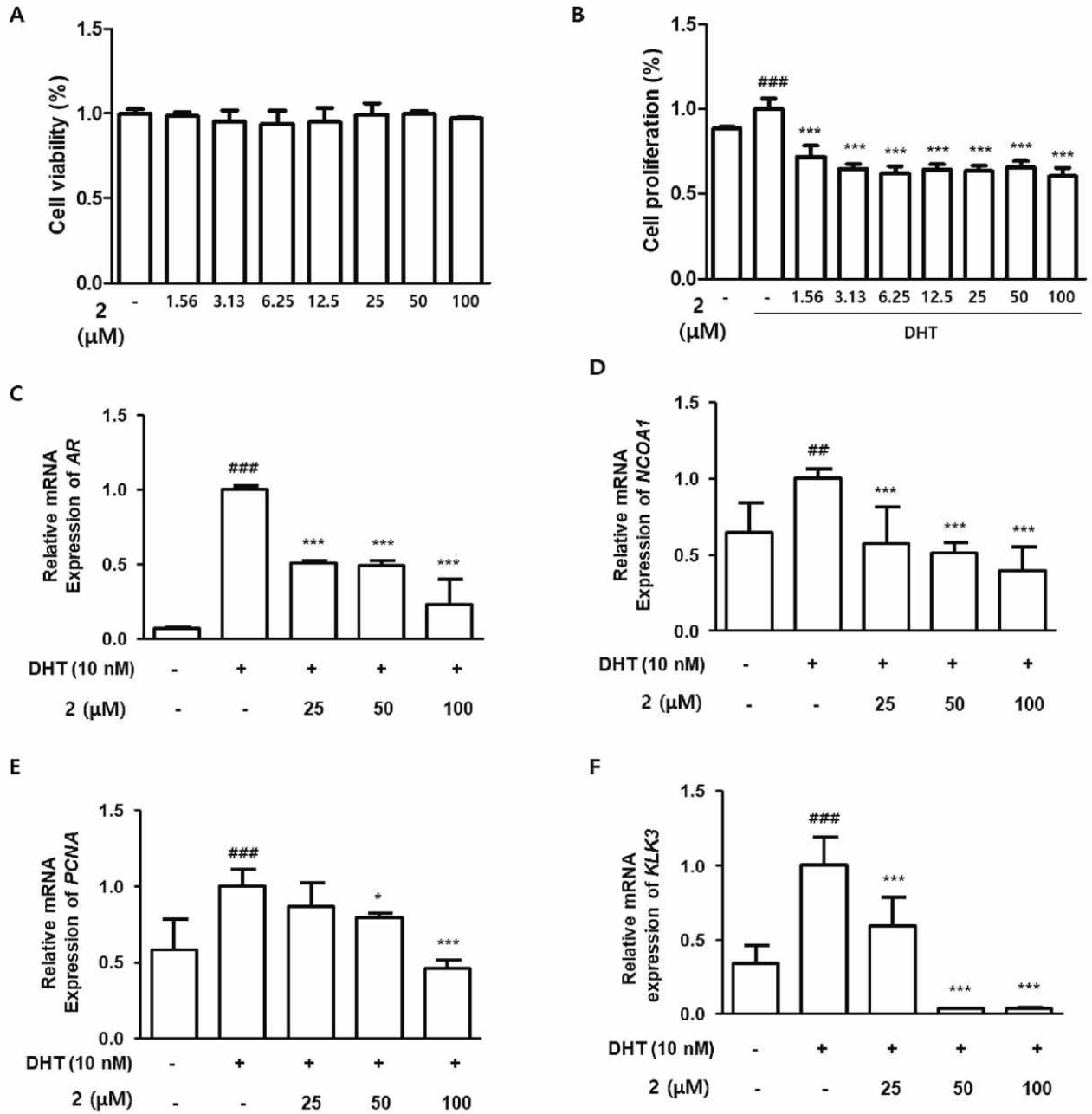


그림 14. 24-*epi*-simplifusinolide A(5)의 DHT-stimulated WPMY-1 세포 AR signaling 억제를 통한 anti-proliferative effects 결과

다. 결론 및 제언

- 극지 유래 미생물 대상으로 추출물을 제작하여 각 추출물의 LC-MS 프로파일링(profiling) 분석 및 MS fragmentation 기반 분자네트워킹(Molecular networking) 분석기법을 통하여 추출물을 선정하였음.
- 극지 유래 추출물의 UV spectrum 및 MS spectrum를 확보하고 기존 문헌과의 비교 및 분자네트워킹(Molecular networking) 분석을 통해 예측된 대사체의 DB를 구축함.
- 선정된 균주 *Simplicillium lamellicola* (SH1-67-5)에 대한 특이적 대사체 구조 특성을 분석하고 표적화(targeting)를 통해 대사체를 분리하였음.
- 다양한 chromatography 기법을 사용하여 분리한 결과, SH1-67-5 균주 추출물의 주성분으로 기지 물질인 fusidic acid(1)와 16-*O*-acetylfusidic acid(2)를 분리하였음.
- 또한, 신규 물질인 simplifusidic acid L(3), simplifusinolide A(4), 24-*epi*-simplifusinolide A(5)를 분리하여 구조를 규명하였음.
- 분리한 5종의 전립선 비대증과 관련한 BPH-1 세포에 대한 anti-proliferative effect 실험 결과에서 24-*epi*-simplifusinolide A(5), simplifusidic acid L(3), fusidic acid(1)가 활성을 나타냄. 또한, 전립선 세포 주변의 기질 세포인 WPMY-1 세포에 대한 활성을 확인한 결과, 24-*epi*-simplifusinolide A(5)에서 뚜렷한 효과를 나타내었음. 이러한 효과는 AR signaling pathway 억제를 통해 나타남.
- 따라서 극지 균주 추출물로부터 분리된 fusidic acid 유도체가 BPH-1 세포에 대해 흥미로운 *in-vitro* 결과를 나타내었으며, 이러한 결과는 향후 *in-vivo* 실험을 통해 전립선 비대증 치료제로서의 가능성을 기대할 수 있음.
- 위와 같은 연구 결과로 Bioorganic Chemistry(IF 5.1, Quartile Rank Q1) 저널에 출판하였음(<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.107070>).

극지연구소

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1절 연차별 연구개발목표 달성도

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도(%)
1. 대사체 분석 및 분자네트워킹 기법 기반 극지 미생물 유래 바이오소재 발굴	1-1 LC-MS를 이용한 추출물의 대사체 분석 (metabolomics)을 통한 유용 극지 미생물 추출물 선정 (prioritizing)	- 최적의 배양 및 추출 조건을 확립하여, 다양한 극지 미생물 추출물 확보 - LC/MS의 다양한 분석조건변화를 통하여 최적의 분석 조건 확립 및 대사체 분석 - LC/MS를 이용한 다변량 통계기법을 이용하여, 극지 미생물 추출물 내 대사체 패턴 확인 및 유용 극지 미생물 선정	100
	1-2 MS fragmentation 기반 분자네트워킹 (Molecular networking) 분석기법을 통하여 선정된 추출물 내 특이적 대사체 구조 특성 분석 및 표적화 (targeting)	- 선정된 유용 추출물의 MS/MS data를 이용한 molecular networking 분석 실시 - 분석결과를 기반으로 추출물 내 특이적 대사체 구조 특성 분석 및 표적화 - Scifinder, Reaxys 등 chemical DB 검색을 통한 구조 연구	100
	1-3 선정된 유용 극지 미생물의 대량 배양 및 표적화된 신규 활성 대사체 분리 및 구조 연구 (targeted isolation)	- 선정된 유용 극지 미생물의 대량 배양 - 표적화된 물질 분리 및 구조 연구	100

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- ✓ 극지 유래 미생물의 LC-MS를 이용한 추출물의 대사체 분석(metabolomics)을 통한 유용 극지 미생물 추출물 선정(prioritizing) 및 DB화와 MS fragmentation 기반 분자네트워킹(Molecular networking) 분석기법을 통하여 선정된 추출물 내 특이적 대사체 구조 특성 분석 및 표적화(targeting)를 통한 분리 결과를 바탕으로 대사체를 미리 예측하여 신규 활성 물질 또는 유용 활성물질을 탐색하여 효용성이 높은 균주를 선택하는 데 도움을 준다.
- ✓ 선정된 유용 극지 미생물의 대량배양 및 표적화된 신규 활성 대사체 분리정제 연구를 위한 토대를 마련할 수 있으며, 극지 미생물 기반 천연물 신약개발에 있어 선도 물질을 신속히 확보하는 데 기여하며, 이를 통해 우선권을 선점할 수 있다.



제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

✓ 없음.



제 7 장 참고문헌

- Rateb and Ebel, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, 28, 290-344.
- Shi et al., *Microbiol.* **2021**, 12, 688202.



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.