BSPM24030-011-3

극지 유래 생물자원을 활용한 항생제 후보물질 개발

Development of potential antibiotic compounds using polar organism resources

KOPRI
극지연구소

2025. 05. 12

한 국 해 양 과 학 기 술 원
부 설 극 지 연 구 소

해양수산부

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지 유래 생물자원을 활용한 항생제 후보물질 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2025. 05. 12.

극지연구소 연구책임자 : 이준혁
참여연구원 : 이성구
“ : 도학원
“ : 김기태
“ : 김한우
“ : 김보미
“ : 이두형
해양과학기술원 : 신희재
선문대학교 : 오태진
이화여자대학교 : 차선신
충남대학교 : 나민균
중앙대학교 : 박현호
부경대학교 : 김학준
가피바이오 : 이정준

KOPRI 극지연구소

[별지 17] 최종보고서 표준 서식

최종보고서

보안등급
일반[√], 보안[ ]

중앙행정기관명	해양수산부	사업명	사업명	극지 유전자원 활용기술 개발사업	
전문기관명(해당 시 작성)	해양수산과학기술진흥원		내역사업명 (해당 시 작성)		
공고번호		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		-	
		연구개발과제번호		20200610	

기술분류	국가과학기술 표준분류	LA0904	60%	LA0903	30%	NC0602	10%
	해양수산과학기술분류	POS0201	50%	POS0102	30%	MBT0302	20%

총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문	-			
	영문	-			
연구개발과제명	국문	극지 유래 생물자원을 활용한 항생제 후보물질 개발			
	영문	Development of potential antibiotic compounds using polar organism resources			
주관연구개발기관	기관명	극지연구소	사업자등록번호	134-82-06870	
	주소	(우)21990 인천시 연수구 송도미래로 26	법인등록번호		
연구책임자	성명	이준혁	직위	책임연구원	
	연락처 직장전화	032-760-5555	휴대전화	010-4739-7686	
	연락처 전자우편	junhyucklee@kopri.re.kr	국가연구자번호	1126 6089	

연구개발기간	전체		2020. 04. 22 - 2024. 12. 31 (4년 8개월)
	단계 (해당 시 작성)	1단계	2020. 04. 22 - 2024. 12. 31 (4년 8개월)
		n단계	YYYY. MM. DD - YYYY. MM. DD(년 개월)
	해당 연도	1단계 / 5년차	2024. 01. 01 - 2024. 12. 31 (12개월)

연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계			연구개발비 외 지원금
					지방자치단체		기타( )					
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계	
총계		9,831,000									9,831,000	
1단계	1년차	2,481,000									2,481,000	
	2년차	2,404,000									2,404,000	
	3년차	2,500,000									2,500,000	
	4년차	2,265,000									2,265,000	
	5년차	181,000									181,000	
해당 연도		181,000									181,000	

공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고	
						역할	기관유형
공동연구개발기관	해양과학기술원	신희재	책임	010-8950-5274	shinhj@kiost.ac.kr	공동	정부출연연
	선문대	오태진	교수	010-7499-6981	tjoh3782@sunmoon.ac.kr	공동	대학
	이화여대	차선신	교수	010-2302-3975	chajung@ewha.ac.kr	공동	대학
위탁연구개발기관	충남대	나민균	교수	010-8255-0810	mkna@cnu.ac.kr	위탁	대학
	중앙대	박현호	부교수	010-6565-6347	xrayleox@cau.ac.kr	위탁	대학
	부경대	김학준	부교수	010-7178-9024	kimhj@pknu.ac.kr	위탁	대학
	가피바이오	이정준	소장	010-3570-6905	orglab@gapibio.co.kr	위탁	중소기업
연구개발기관 외 기관							

연구개발과제 실무담당자	성명	도학원	직위	책임연구원
	연락처 직장전화	032-760-5560	휴대전화	010-8287-8975
	연락처 전자우편	hackwondo@kopri.re.kr	국가연구자번호	1126 6086

이 연차보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 연구개발과제 중단, 협약 해약, 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2025 년 1 월 15 일

연구책임자: 이준혁 (인)

주관연구개발기관의 장: 신형철 (직인)

해양수산과학기술진흥원장 귀하

< 요 약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	극지 유전자원 활용기술 개발사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	–		
내역사업명 (해당 시 작성)				연구개발과제번호	20200610		
기술분류	국가과학기술 표준분류	LA0904	60 %	LA0903	30 %	NC0602	10%
	해양수산과학기술분류	POS0201	50 %	POS0102	30 %	MBT0302	20%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	–						
연구개발과제명	극지 유래 생물자원을 활용한 항생제 후보물질 개발						
전체 연구개발기간	2020. 04. 22 – 2024. 12. 31 (4년 8개월)						
해당단계	4 단계						
해당연도	5년차 2024. 01. 01 – 2024. 12. 31 (12개월)						
총 연구개발비	총 9,831,000 천원 (정부지원연구개발비: 9,831,000 천원, 기관부담연구개발비 : 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
해당단계	총 9,831,000 천원 (정부지원연구개발비: 9,831,000 천원, 기관부담연구개발비 : 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
해당연도	총 181,000 천원 (정부지원연구개발비: 181,000 천원, 기관부담연구개발비 : 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계	기초[√] 응용[√] 개발[ ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]			기술성숙도 (해당 시 작성)	착수시점 기준( ) 종료시점 목표( )		
연구개발과제 유형	실용화(O), 비실용화( )						
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							

연구개발 목표 및 내용	최종 목표		극지/해양 항생제 발굴 플랫폼 기술 확립과 선도물질 개발
	전체 내용		□ 극지/해양 유래 신규 생물자원 확보 ㅇ 극지 미생물자원 및 유전체 정보 라이브러리 구축 ㅇ 극지/해양 유래 신규 항생물질 발굴 □ 극지유전자원 활용 항생제 선도물질 변형 효소 개발 ㅇ 극지/해양 유래 항생제 변형 효소 발굴 및 개량 ㅇ 항생물질 변형 효소의 촉매반응 카탈로그 완성 □ 극지/해양 유전자원 활용 신규 항생제 선도물질 개발 ㅇ 극지/해양 유래 변형효소를 활용한 신규활성 항생물질 발굴 ㅇ 항생제 선도물질의 구조분석 및 활성 검증 □ 항생제 선도물질 생산 기술 개발(Scale-Up) ㅇ 항생제 선도물질 대량생산 기술 개발
	1단계 (해당 시 작성)	목표	
		내용	
	n단계 (해당 시 작성)	목표	
		내용	

KOPRI 극지연구소

	해당 연도	목표	신규 항생물질 스크리닝, 항생물질 변형효소 카탈로그 구축, 항생물질 타겟 단백질 결정화
		내용	- 신규항생물질 탐색 - 극지유전자원 기반 항생물질 변형효소 선별 - 항생물질 변형체 제작 및 활성 검증 - 항생물질 타겟 단백질 발현 및 정제 - 타겟 단백질 결정화 실험

연구개발성과	□ (최종성과물) ○ 극지/해양 유래 희귀 생물자원 5종, 유전체 정보 10종, 항생물질 변형효소의 생화학적 특성 분석 10건 이상 확보, 변형 효소의 카탈로그 완성 ○ SCIE급 상위 30% 이상 논문 23건 (3건/1차년도, 5건/2~5차년도) 이상 ○ 항생제 선도물질과 이의 생산기술 개발 5건 이상 ○ 기술이전(제약회사 및 바이오 연구소 등) 또는 기술실시 1건 이상				
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	○ 확보된 차세대 항생제 선도물질의 임상시험을 통한 글로벌 항생제 개발은 경제적 가치 창출 및 국민의 건강한 삶에 기여할 것으로 기대 ○ 국내기업 및 외국 제약 회사와의 공동개발 또는 기술이전을 통한 실용화 추진으로 관련 제약산업 발전에 기여 ○ 극지유래 항생제 개발사업은 신약 개발을 위한 기반이 되는 사업으로 극지 생명과학분야 기초연구와 의료 R&D 분야 및 실용화 연구 단계를 연계시켜 주는 매개적인 역할 수행				
국문핵심어 (5개 이내)	극지미생물	방선균	변형효소	생물자원	항생물질
영문핵심어 (5개 이내)	Polar microbes	Actinomycetes	Modification enzyme	Bioresources	Antibiotics

KOPRI
극지연구소

목 차

1. 연구개발과제의 개요 ····· 5

1-1. 연구개발 목적 ····· 5
1-2. 연구개발의 필요성 ····· 6
1-3. 연구개발 범위 ····· 7
1-4. 국내외 기술 개발 현황 ····· 16

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 ····· 33

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 ····· 406

3-1. 연구개발과제의 대표적 연구 실적 ····· 406
3-2. 연구수행 결과 ····· 408

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성) ····· 435

4-1. 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용 ····· 435
4-2. 자체 보완활동 ····· 435
4-3. 연구개발 과정의 성실성 ····· 435

5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여정도 ····· 436

5-1. 목표 달성도 ····· 436
5-2. 관련 분야 기여도 ····· 437

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 ····· 438

6-1. 연구개발성과의 관리계획 ····· 438
6-2. 연구개발성과의 활용 계획 ····· 438

7. 기타 사항 ····· 439

7-1. 연구시설·장비종합정보시스템 등록한 연구시설 장비 현황 ····· 439
7-2. 연구시설·장비종합정보시스템 등록한 연구시설 장비 현황 ····· 440

기타1. 별첨자료 ····· 441
기타2. 참고문헌 ····· 441

KOPRI 국제연구소

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

가. 연구개발의 개요

;극지/해양 유래 신규 항생물질 탐색 및 극지 저온 변형효소 기반 차세대 항생제 합성 기술 개발

나. 연구의 배경 및 목적

1) 극지/해양 생물자원으로부터 신규 항생물질 탐색

2) 극지생물이 가지는 저온효소의 특성인 기질유연성을 다른 유용 화합물의 합성에 활용

3) 극지생물의 신규 유전정보를 기반으로 항생제 내성을 극복할 수 있는 차세대 항생제 후보물질 발굴

KOPRI 극지연구소

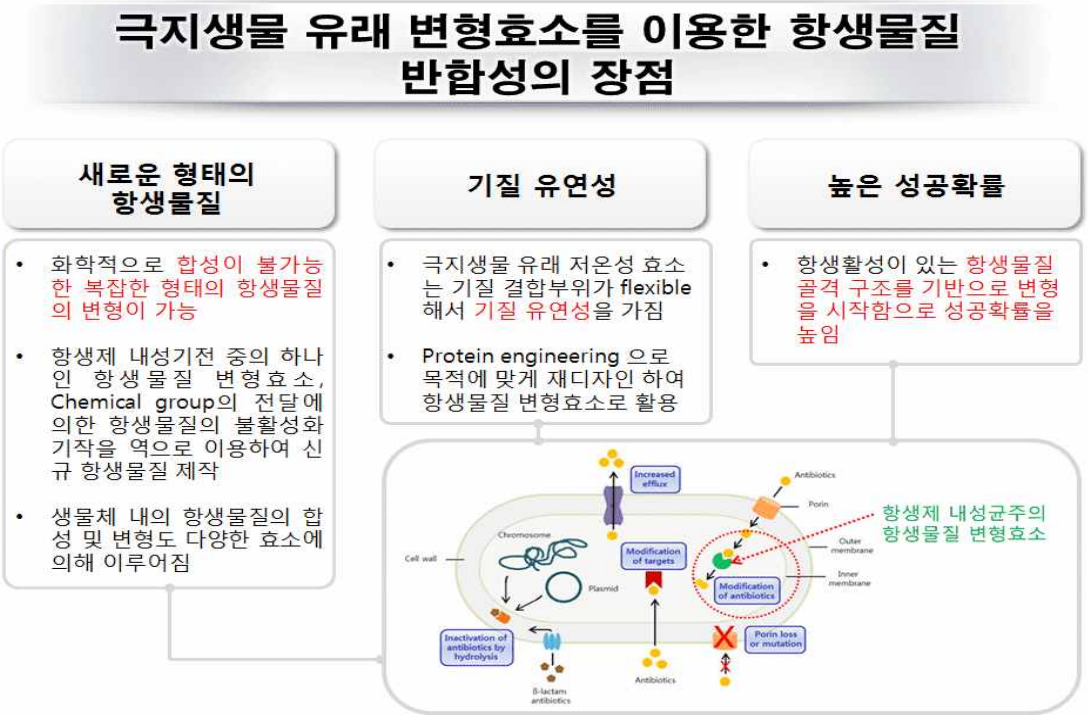
다. 연구의 목표

구분	내용
최종목표	○ 극지/해양 항생제 발굴 플랫폼 기술 확립과 선도물질 개발 - 극지/해양 유래 희귀 생물자원 5종, 유전체 정보 10종, 항생물질 변형효소의 생화학적 특성 분석 10건 이상 확보, 변형 효소의 카탈로그 완성 - SCIE급 상위 30% 이상 논문 23건 이상 - 항생제 선도물질과 이의 생산기술 5건 이상 개발 - 기술이전(제약회사 및 바이오 연구소 등) 또는 기술실시 1건 이상
최종목표 설정근거	○ 극지/해양 유래 희귀 생물자원 1년에 1종씩 총 5종, 유전체 정보 1년에 2종씩 총 10종, 항생물질 변형효소의 생화학적 특성 분석 1년에 2건씩 총 10건 이상 확보 ○ SCIE급 상위 30% 이상 논문 23건 이상 (1차년도에 3편, 2~5차년도에는 매년 5편씩 발표) ○ 항생제 선도물질 및 이의 생산기술 5건 이상 개발 (특허등록이 가능한 신규 항생물질을 세부 1팀에서 1건, 세부 2팀에서 1건, 세부 3팀에서 2건, 세부 4팀에서 1건 발굴) ○ 기술이전 또는 기술실시 1건 이상: 기술료 5천만원 이상, 2019년도 출연연구소 기술료 건당 평균치를 적용
세부목표	○ 주요 기능 - 항생제 선도물질: 신규 골격의 항생(균) 선도물질로 기존 항생제 내성 회피 기능 - 항생물질 변형효소: 다중 기질 인식 기능 및 저온 활성을 띠는 신규 변형효소, 신규 항생제 변형 기능 ○ 주요 성능치 - 항생제 선도물질: 항균 또는 항진균 활성, 물질의 안정성, 동물실험 시 안전성 확보 - 항생물질 변형효소: 변형효소의 생화학적 특성 규명 ○ 핵심 기술 - 극지 유래 신규 골격의 항생제 선도물질 발굴 (세계 top 10위) - 극지 변형 효소 및 분자진화를 활용한 다중 기질 인식 기술 개발 (세계 최초) ○ 적용범위 - 생물촉매 기반 신규 항생제, 항암제, 항바이러스제 등 개발에 활용 가능 - 생물촉매 기반 바이오 소재개발 및 정밀화학 분야에 활용 가능

1-2. 연구개발의 필요성

가. 새로운 항생제 개발 요구

1) 국민 건강을 위협하는 기존 항생제 내성균의 등장에 따른 차세대 항생제 개발 요구
2) 기존의 항생제 개발 방법의 한계 극복 (배양되는 방선균에서만 연구, 반복적인 동일 물질 발견) 신종 방선균 또는 새로운 실험적 방법 필요
3) 국내외 다른 연구자와의 극지생명자원 활용을 위한 중개연구 필요
4) 극지 방선균을 이용한 항생제 개발 분야에서의 학·연·산 공동연구 수행
5) 항생제 내성균 문제 즉, 슈퍼박테리아 출현이라는 국가적 재난 발생이라는 시급한 국가 현안에 대한 선제적 대응 필요



1-3. 연구개발 범위

가. 연구개발 추진전략 · 방법

1) 신규 항생물질 발굴 (세부 1팀)

❑ 제1세부팀에서는 국내외의 다양한 해양환경 및 심해에서 채집된 해양시료로부터 2만여종의 해양미생물들을 분리/보존하고 있으며, 이들 해양미생물들을 스크리닝하여 뛰어난 항균활성을 보이는 유용 균주선정

❑ 기 발굴한 유용 균주 및 스크리닝을 통하여 선정된 활성 균주의 대량 배양 및 신규

항생물질의 분리, 정제

❑ NMR, MS 등의 분광학적 방법을 이용하여 항생물질의 특성 분석 및 구조규명

❑ 항생물질 생산균주의 최적배양조건 검토를 통한 생산효율 증대 및 신규 유도체 발굴

2) 극지/해양 천연물 유래 신규 항생물질 탐색 (위탁과제: 충남대학교 나민균)

극지/해양생물 유래 항생물질 발굴방법

❑ 항생물질을 생산하는 극지/해양생물 스크리닝

- 기원이 확인된 극지/해양생물 확보
- Bioassay-guided 분리방법 이용: 효율적인 활성성분 분리
- ^{1}H NMR-guided 분리방법 이용: 화학구조 기반 활성성분 확인 및 분리방법 도출

❑ 극지/해양생물 추출물 및 분획물 제조

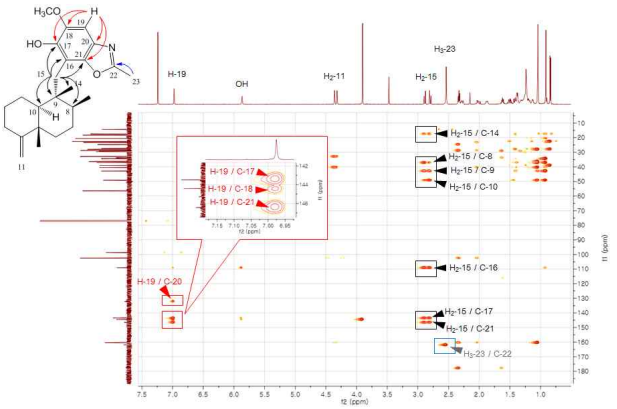
- 대사산물의 화학적 특성에 따른 추출 용매 선정
- 예비실험을 통한 최적 추출방법(온도, 시간 등) 결정
- 대형 Silica, C18, NH2 컬럼을 이용한 초기 분획물 제조
- 각각의 컬럼분획물에 대한 TLC 및 ^{1}H-NMR 분석을 통해 특이 성분 함유 분획물 확인

❑ 극지/해양생물 유래 항생물질 분리·정제

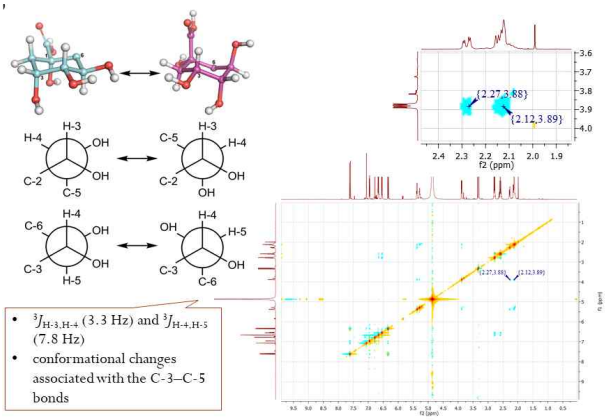
- 컬럼분획물에 대한 항균활성 평가
- MPLC 및 prep. HPLC를 이용하여 활성분획물로부터 유효물질 분리
- HPLC 정제를 반복하여 최종적으로 순도 95% 이상의 화합물 분리

❑ 분광학적 방법을 이용한 신규 항생물질의 화학구조 규명

- HR-MS data를 이용하여 분리·정제된 화합물의 분자량 및 화학식 결정
- NMR(^{1}H, ^{13}C, COSY, TOCSY, HMQC, HMBC)등의 분광학적 분석방법을 통해 분리·정제된 화합물의 구조규명
- NOE, specific rotation, ECD, Marfey, Mosher, GIAO-DP4 등의 분석을 통해 - 각종 database를 이용해 화합물의 신규성 검색



2D-NMR 분석을 통한 화학구조 결정



NOE, J-based 분석을 통한 입체구조 결정

❑ 신규 항생물질 확보

- 극지생물 유래 활성물질 데이터베이스 구축: 성상, 분광학적 분석자료, 분리/분석법 등
- 대량 추출물 분획을 통해 활성물질을 고농도로 함유하는 분획물 제조
- 분취용 MPLC, HPLC, HPCPC 등을 이용하여 유효물질 분리공정 개선: 데이터베이스 자료를 활용하여 분리조건 탐색
- 활성물질에 대한 분석법 확립 및 순도 평가

3) 극지 신규 미생물 탐색 및 항생물질 변형효소 개발 (세부 2팀)

❑ 극지/해양 생명 및 유전체 자원 확보 및 변형효소 발굴의 핵심 및 원천기술 개발

- 지난 10 여년 동안 극지연구소는 기관고유 사업과 연구소의 인프라 (쇄빙연구선, 세종기지, 장보고과학기지)를 활용하여 남극과 북극에서 채집한 극지미생물 3000종 (그 중 방선균 약 400종)의 생물자원을 이미 확보하여 데이터베이스 및 웹사이트 운영 중 PAMC (Polar and Alpine Microbial Collection) (https://pamc.kopri.re.kr/)
- PAMC에 보관 중인 극지/해양 미생물의 배양을 통해 신규 항생물질 및 항생물질 변형효소 유전자 탐색
- 신규 극지/해양 미생물 확보 및 항생물질 스크리닝

❑ 극지/해양 생물 유전자 정보로부터 유용 변형 효소 스크리닝, 유전자확보 및 단백질 생산

- 항생물질을 또는 항생물질 변형효소를 가지는 극지/해양 미생물의 유전체 분석
- 유전자 정보를 분석하여 항생물질 합성관련 유전자 및 항생물질 변형효소 유전자 선별
- 재조합 변형효소 발현 및 정제
- 변형효소 기질 특이성 및 활성 측정
- 변형효소의 생화학적 특성분석, 변형효소 구조 분석 및 항생물질을 기질로 이용한 대사 특성 규명

❑ 재조합 변형 효소의 대량 생산

- 확보된 변형효소 중 난발현성 효소에 대한 심화 발현 조건 탐색 및 변형효소의 돌연변이체 라이브러리 구축 및 탐색 개발 담당 (위탁과제: 부경대학교 김학준)

4) 신규 항생물질 변형체 제작 (세부 3팀)

❑ 극지/해양 유래 유전자와 단백질 정보 기반 항생물질 변형효소 스크리닝 및 활성 분

석

- 유전체 정보 기반 항생물질 변형효소 스크리닝 : 확인된 단백질의 변형효소 디자인
- 단백질 정보 기반 항생물질 변형효소 스크리닝 : 단백질 정보를 이용한 in silico 분석 디자인

❑ 극지/해양 유래 구조변형 효소 확보 및 이를 이용한 신규 항생물질 생산, 분리 및 구조 분석

- 기존 알려진 이차대사 관련 구조변형 효소 기반 in vitro 반응 시도 및 신규물질 생산
- 기존 알려진 이차대사 관련 구조변형 효소 기반 in vivo 반응 시도 및 신규물질 생산
- TLC, LC-MS, NMR 등 다양한 기기를 이용한 신규 항생물질의 분리 및 구조 분석

❑ 확보된 항생제 후보물질의 활성 스크리닝 및 분석

- 구조 기반 항생물질 활성 분석 및 정보 데이터베이스 구축
- 기본 항생물질 구조 합성을 통한 활성의 다양성 분석 및 신규 항생물질 제작
- 항생물질 스크리닝 결과에 따른 추가 항생물질 코어 개발 및 제조

❑ 극지생물 유래 유전자와 단백질 정보 기반 항생물질 변형효소 스크리닝 및 활성 분석

- 항생물질 변형효소 및 관련 효소의 구조를 기반으로 하여 선도 항생물질 및 기타 물질 선별 (화합물 데이터베이스 및 virtual screening 기법을 이용한 선도물질 선별)
- 선도물질-변형효소간 상호작용 예측 및 확인
- 선도물질 및 변형효소 구조를 기반으로 하는 site-driected mutagenesis을 이용한 돌연변이 개발 (변형효소의 기능 증진 및 선도물질 변형 위치 변화)

❑ 변형효소 합성 및 활성과 항생물질 구조를 고려한 데이터베이스 구축

- 기본 항생물질 구조 합성을 통한 활성 분석 및 새로운 항생물질 제작
- 극지/해양 미생물의 항생물질 관련 생합성 과정 증명 (유전체 및 유전자 확인, 전사체 분석 등을 통한 생합성 과정 확인)
- 생합성 과정 및 관련효소의 기능 · 특성 데이터베이스 구축 (미생물 · 효소 · 기능 · 변형위치 등 다양한 조건을 기준으로 데이터 축적)

❑ 타겟 효소-항생물질 알고리즘 개발

- 극지/해양 미생물의 유전체, 미생물의 항생물질 저항성 관련 유전자 및 단백질, 변형효소의 구조 및 기능성 등 관련 정보 종합
- 변형효소의 구조, 유전자 및 기능을 기반으로 하는 딥러닝 프로그램 개발 (변형효소에 적절한 기질 탐색, 구조 기반 기질 변형위치 예측 등)
- 극지 유래 유전체를 종합하여 데이터베이스 구축
- 극지 유래 항생물질 변형효소의 기능 · 구조적 특성 등 다양한 정보를 종합하여 데이터베이스 구축
- 항생물질 변형효소 유전자를 기반으로 하는 딥러닝 변형효소 유전자 마이닝 프로그램 개발 (유전자 및 기능, 특성, 선도물질 선별 및 변형위치 예측)
- 항생물질 변형효소 구조를 기반으로 하는 딥러닝 기질 예측 프로그램 개발
- 저온성 단백질 구조-딥러닝 기반 저온성 예측 프로그램 개발
- 변형효소 구조-딥러닝 기반 기질 및 생성물 예측 프로그램 개발
- 유전체 분석 및 데이터베이스 기반 유전자 매칭 및 마이닝 프로그램 개발

5) 항생물질 타겟 단백질 연구 (세부 4팀)

❑ 검증된 항생 타겟 단백질 선택

- 검증된 항생 타겟 단백질을 대상으로 하여 신규 항생물질 발굴을 위한 연구 기간, 비용을 절약
- 타겟 단백질에 최적화된 항생물질을 설계함으로써 부작용에 대한 위험 부담 감소

❑ 해양 극지 미생물 유래 타겟 단백질 설정

- 현존하는 항생제로 치료가 불가능한 슈퍼 박테리아가 발견되고 있는 현실
- 항생제 내성 문제를 피하면서 지속적인 치료 효과를 나타낼 수 있는 기존의 항생제와 차별화된 완전히 새로운 방식의 항생제 발견이 필요
- 이를 위해 항생제 발굴이 비교적 덜 이뤄진 해양 극지 생태계를 기반으로 신규 항생물질 발굴이 필요
- 해양 극지 유래 천연물의 타겟인 해양 극지 미생물 유래 타겟 단백질을 확보하여 해양 극지 유래 신규 항생 후보 물질의 활성을 확인하고 다재내성 병원균 유래 표적 단백질에 최적화

❑ X-ray crystallography, *in silico* modeling, enzyme kinetics

- 구조 생물학, 컴퓨터 모델링, 효소 생화학을 망라하여 신규 항생물질의 정량적·정성적 작용기전 분석
- 분석한 작용 기작을 기반으로 저해 효과가 증진된 신규 항생물질 디자인

❑ 대장균 발현 시스템을 이용한 표적 단백질의 발현과 정제

- 표적 단백질을 각각 His-tag을 포함한 vector에 subcloning하여 대장균에서 발현
- Affinity chromatography, ion exchange chromatography, size exclusion chromatography를 이용하여 순수정제

❑ Biophysical 저해 활성 분석

- 분광학적 방법을 통해 효소 기질 혹은 생산물 흡광 변화 측정
- 측정 방법을 기반으로 신규 항생물질에 의한 효소 활성 변화 측정
- 측정 된 효소 활성 변화를 기반으로 효소동력학적 작용 기작 및 상수 규명
- Mass 기법을 활용하여 효소-신규 항생물질 간의 공유결합 형성 여부 분석
- ITC를 이용하여 효소-신규 항생물질의 열역학적 결합 에너지 측정

KOPRI 극지연구소

❑ Microbatch 법을 이용한 단백질의 결정화 및 X-ray crystallography

- Microbatch 방법을 이용하여 상업적으로 판매되고 있는 다양한 결정화 스크리닝 키트를 이용하여 단백질의 최초 결정 획득
- 획득한 최초 결정 조건을 최적화 하여 X-선 최절 실험에 적합한 결정 획득
- 선도 물질과의 결합 단백질 결정화를 위해서는 crystal soaking 혹은 co-crystallization 방법을 이용
- 국내외 방사광을 이용하여 회절 자료 수집
- 분자 치환법이나 SAD 방법을 이용하여 구조 분석

❑ Template based modeling 및 *in silico* docking

- 결정화 및 X-선 회절 데이터 획득에 어려움이 있는 경우 computational modeling을 통해 3차 구조 예측
- Swiss model과 같은 플랫폼을 활용하여 3차 구조가 보고된 homologe를 template로 타겟 단백질 구조 모델 확보
- Chemdraw, PyMOL 등의 software를 이용하여 신규 항생물질 3차 구조 확보
- 타겟 단백질 구조 분석을 통해 신규 항생물질 결합 부위 예측
- Autodock vina, Schrödinger maestro 등의 프로그램을 사용하여 타겟 단백질 예상 결합 부위에 신규 항생물질 docking

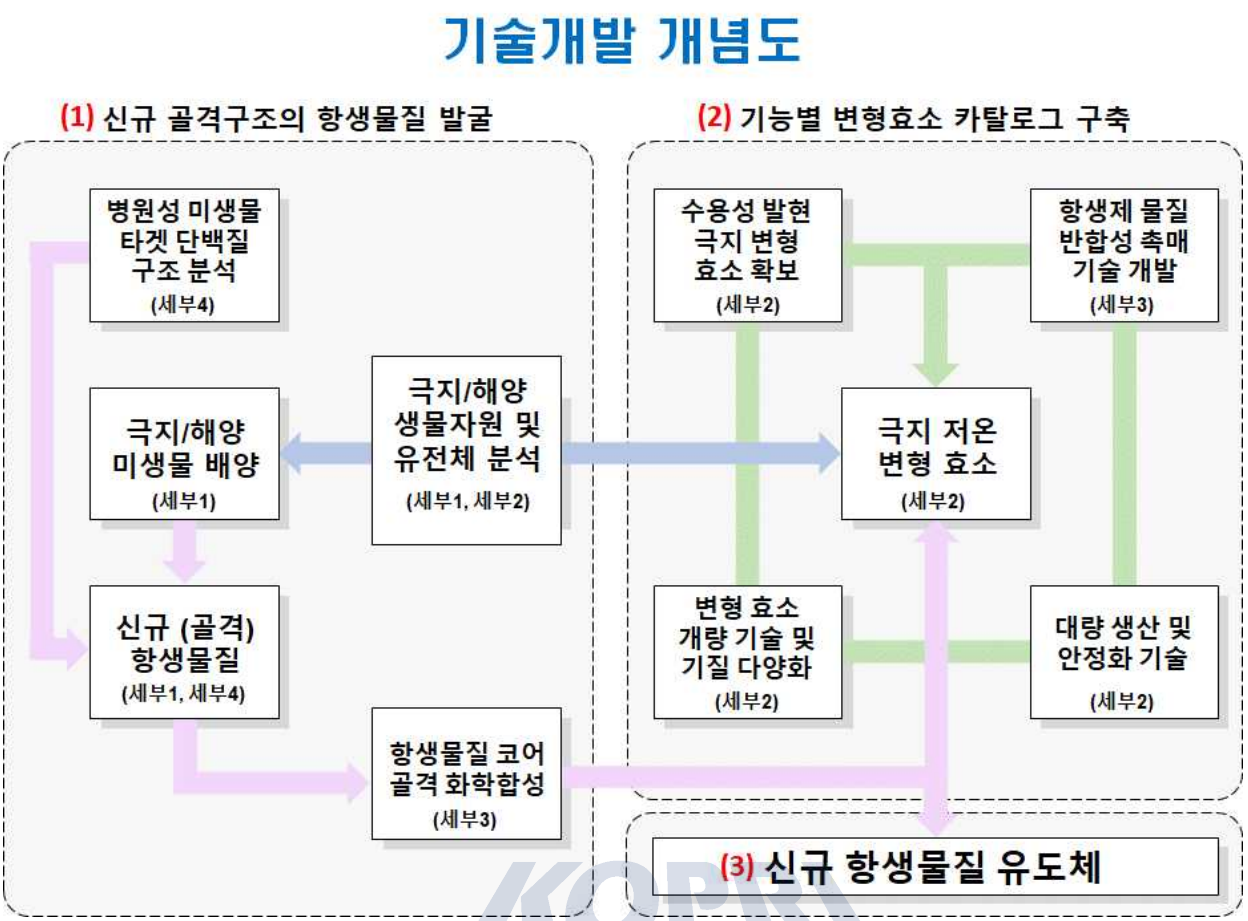
1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도
• 타겟 단백질 선정 및 타겟 단백질 유전자 확보 • 고순도의 재조합 타겟 단백질 확보 및 결정화	• X-선 회절 실험을 통한 고해상도 타겟 단백질 3차 구조 확보 • 실험적 구조 규명이 어려울 경우 template-based modelling 을 통해 3차 구조 좌표 확보 - Template-based modelling 의 경우 SWISS-MODEL을 활용 • 확보된 구조를 기반으로 Fragment-based hit discovery (FBHD)	• FBHD를 통해 발굴된 compound 및 1,3세부에서 발굴한 compound 의 저해 활성을 효소동력학적 측면에서 분석 • 발굴된 저해 물질과 타겟 단백질간의 복합체 결정화 및 결합 구조 규명 • 복합체 결합 구조 규명이 어려울 경우 *in silico* docking 기법을 이용하여 저해 물질과 타겟 단백질의 결합 방식 예측 • 타겟 단백질과 저해물질 간의 결합 양상을 분석하여 저해제의 결합력을 높일 수 있는 변형체 설계 - 신규 수소 결합 혹은 이온 결합을 형성하는 작용기 도입 - 소수성 상호작용 강화	• 3세부에서 합성한 저해 물질 변형체의 효소동력학적 저해 활성 검증 • 변형체와 타겟 단백질 간의 복합체 결정화 및 결합 구조 확보 • 복합체 결합 구조 규명이 어려울 경우 *in silico* docking 기법을 이용하여 변형체와 타겟 단백질의 결합 방식 예측	• 확보된 변형체의 결합에너지와 실험을 통한 활성 검증을 통해 SAR (structure activity relationship) 을 파악하여 신규 항생물질 화학 구조상의 특정 부위가 활성에 얼마큼 기여하는지를 특정 • 3차 구조와 효소동력학적 분석 결과를 기반으로 저해 활성이 최적화된 신규 항생물질의 저해 작용 기작 규명

KOPRI
극지연구소

나. 연차별 연구개발 로드맵

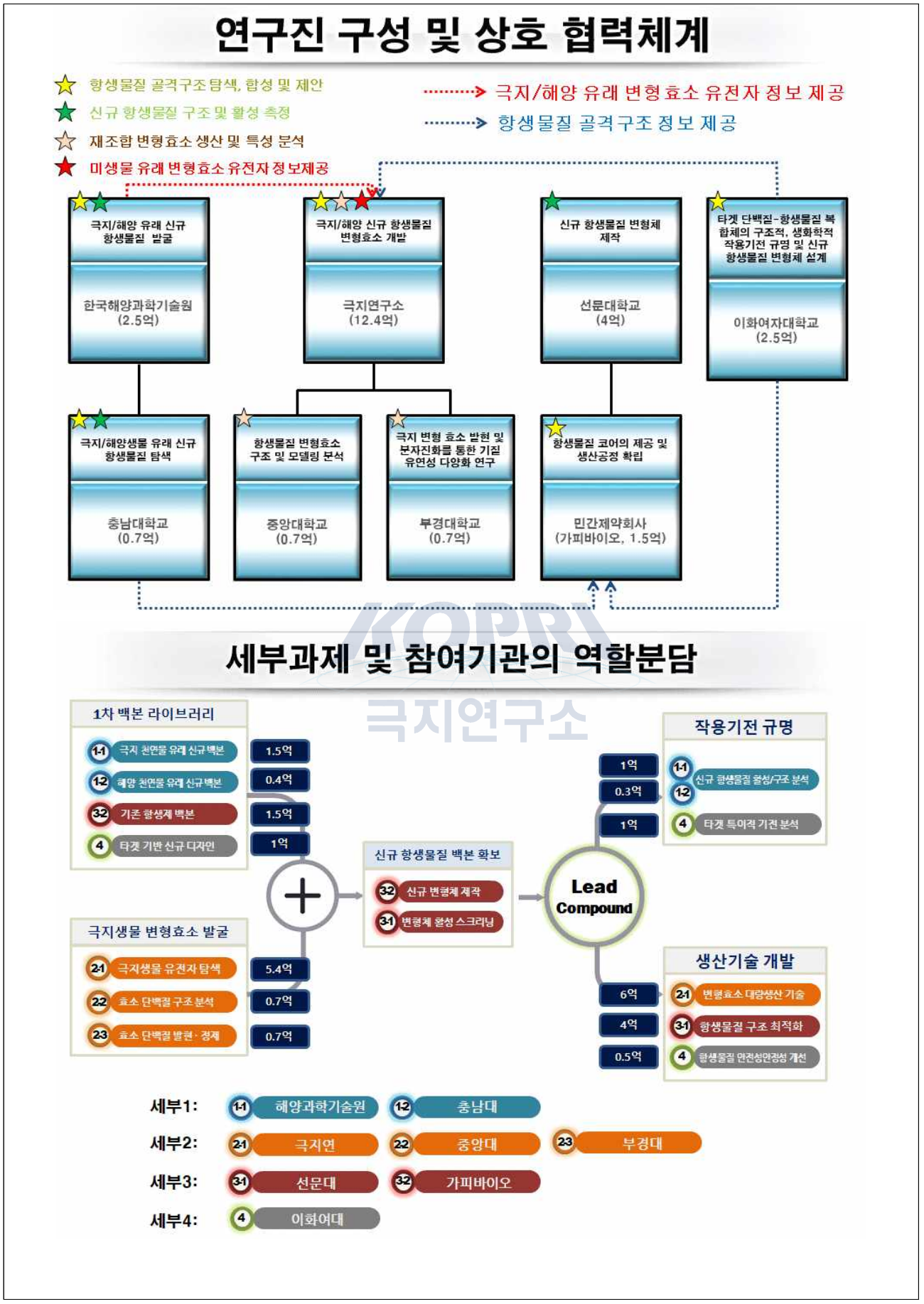
<연차별 연구개발 로드맵>

다. 연구개발 추진전략



KOPRI 극지연구소

라. 연구개발 추진체계



KOPRI 극지연구소

1-4. 국내외 기술 개발 현황

가. 항생제의 종류 및 작용기작

1) 항생제의 종류

항생제는 분자의 골격에 따라 β-lactams계, aminoglycosides계, macrolides계, tetracyclines계, glycopeptides계, quinolones계 등으로 구분함

❑ β-lactams계

- 화학구조상 β-lactam ring을 기본 구조로 하는 항생제로 peniciliin과 Cephalosporin이 β-lactam계의 가장 대표적인 항생제이며 그 외에 monobactam, carbapenem계 등이 여기에 포함

❑ Aminoglycosides계

- streptomycin, neomycin, gentamicin, amikacin 등이 대표적인 aminoglycosides계 항생제임. 그람음성균 외막의 porin을 통하여 세포 내로 이동한 다음 30S ribosome에 비가역적으로 결합하여 단백질 합성을 억제

❑ Macrolides계

- Macrolides는 "커다란 고리(large ring)"라는 뜻으로, 50S ribosome과 결합하여 단백질 합성을 억제하며 14각형, 15각형, 16각형의 고리 구조로 되어 있고 대표적인 macrolides계 항생제로는 erythromycin, azithromycin, clarithromycin 등이 있음

❑ Tetracyclines계

- 광범위 항생제로 그람양성균, 그람음성균, 혐기성균, rickettsiae, mycoplasma, ameoba등 여러 종류의 병원균에 우수한 항균효과를 보임. doxycycline, minocycline 등이 개발됨

❑ Glycopeptides계

- Glycopeptides계 항생제는 세포벽 생합성을 억제하여 작용하는 강력한 항생제로, 주로 그람양성균에만 작용하는 비교적 좁은 항균영역을 갖고 있으며 여기에는 vancomycin과 teicoplanin이 포함됨

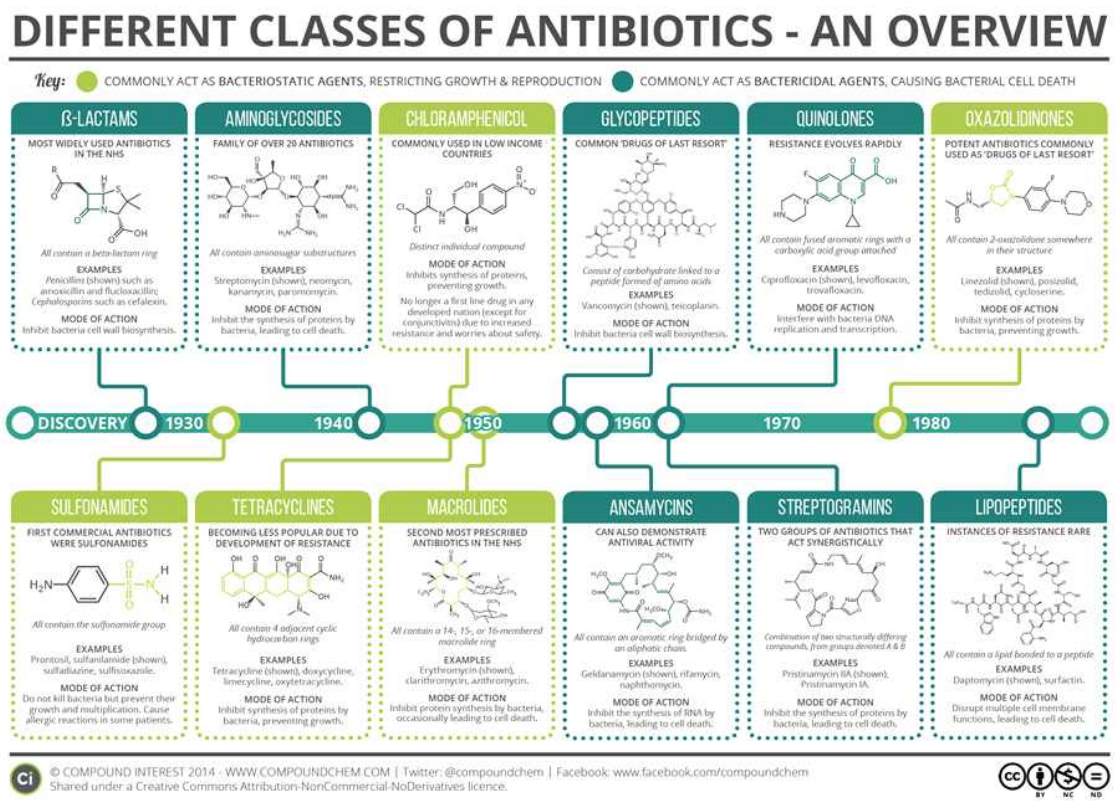
❑ Quinolones계

- Quinolones계 항생제는 합성 화합물이며 DNA gyrase를 억제하여 DNA의 복제를 방해하는 광범위 항생제로 그람양성균과 특히 그람음성균에 대해 현저한 항균력을 보임. nalidixic acid, oxolinic acid, cinoxacin 등이 개발되었음

❑ 기타

- 이외에도 chloramphenicol, sulfa제 및 trimethoprim, polymyxin, bacitracin, mupirocin, fusidic acid, streptogramin 등 다양한 항생제가 개발되어 사용되고 있음

KOPRI 극지연구소



<그림> 항생제 세대 분류

1) 항생제의 작용기작

항생제의 작용기작은 세포벽 합성 억제, 세포막 구조와 기능의 파괴, 단백질 합성 억제, 주요 대사경로 차단, DNA와 RNA 구조와 기능의 억제 등으로 구분하여 볼 수 있음.

❑ 세포벽 합성 억제

- beta-lactam antibiotics (penicillin, cephalosporin, carbapenem, monobactam)

; 세포벽 기본 구성물질인 peptidoglycan 형성의 마지막 단계에 관여하는 transpeptidase 효소와 비가역적 공유결합을 이루어 cross linking reaction을 억제

- Glycopeptides (vancomycin, teicoplanin)

; stem peptide의 terminal D-alanine-D-alanine component에 결합하여 subunits이 peptidoglycan backbone에 추가되는 것을 억제

❑ 세포막 구조와 기능의 파괴

- polymyxin

; 세포막에 있는 인지질에 작용하여 세포막의 투과성을 변화시켜 세포막 기능을 억제 그람음성균의 단백질과 질소염기를 유출시킴

- amphotericin B, fluconazole, itraconazole

; 진균막에 있는 스테롤과 복합체를 이루어 비정상적인 통로를 만들고 이온을 유출시킴

❑ 단백질 합성 억제

- Aminoglycosides (gentamicin, kanamycin, tobramycin, streptomycin, neomycin, netilmicin, amikacin)

; 박테리아 ribosome 30S subunits에 비가역적으로 결합하여 단백질 합성 시작을 차

단

- Macrolides (erythromycin, clarithromycin, azithromycin)

; 박테리아 ribosome의 50S 부분에 특이적으로 결합하여 단백질 chain elongation 억제

- Lincosamide (clindamycin, lincomycin)

; macrolides와 구조는 다르지만 50S ribosome에 결합하여 단백질 합성 억제

- Chloramphenicol

; 박테리아 ribosome의 50S에 가역적으로 결합하여 peptide bond 형성을 억제

- Tetracyclines (tetracycline, doxycycline, minocycline)

; 박테리아 30S ribosomal subunits와 가역적으로 결합하여 aminoacyl tRNA가 mRNA-ribosome complex와 결합하는 것을 억제

- Mupirocin (pseudomonic acid)

; isoleucine tRNA synthetase를 경쟁적으로 억제하여 isoleucine-charged tRNA의 세포내 저장을 고갈시켜 단백질 합성을 중지

❑ 주요 대사경로 차단

- Sulfonamide

; 기질인 p-aminobenzoic acid (PABA)와 유사한 구조로 정상적인 효소-기질 반응을 저지하여 folic acid 생성을 억제

- trimethoprim

; folic acid의 pteridine moiety와 유사한 구조로 dihydrofolate reductase의 competitive inhibitor로 작용하여 folic acid 생성을 억제

❑ DNA와 RNA 구조와 기능의 억제

- quinolones(norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, lomefloxacin)

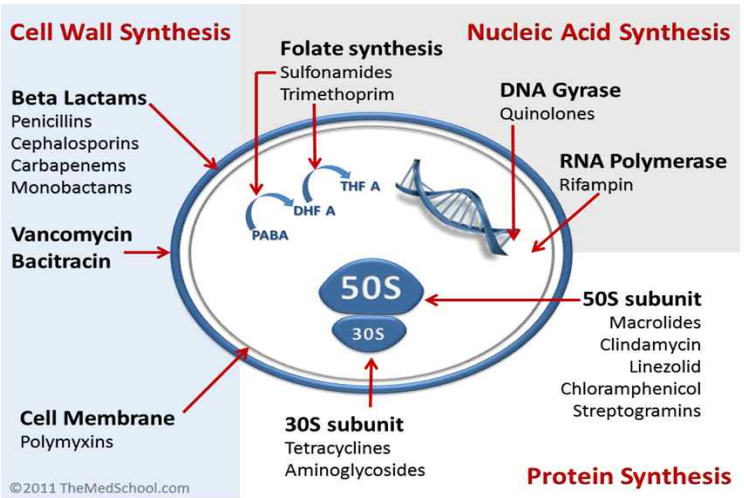
; DNA의 negative supercoiling에 관여하는 DNA gyrase의 subunits 중의 하나(A subunit)를 억제, DNA의 복제와 수선을 중단 시킴

- rifampin

; DNA-dependent RNA polymerase에 단단히 결합하여 DNA의 transcription을 억제

- nitrofurantoin

; DNA strand를 직, 간접적으로 파괴



<그림> 항생제의 작용기전과 종류

나. 항생제관련 주요 출원기업 리스트

주요출원인 리스트

항생제 주요기업	검색식	Clinical Trial 등록 건수
MERCK SHARP & DOHME	Antibiotics and Merck	195
PFIZER INC.	Antibiotics and Pfizer	421(raw data)
GlaxoSmithKline	antibiotics and beecham antibiotics and GlaxoSmithKline	270(raw data)
BAYER AG	Antibiotics and bayer	107(raw data)
SANOFI	Antibiotics and sanofi	123(raw data)

순위	다출원인(최근 10년)
1	MERCK SHARP & DOHME
2	MELINTA THERAPEUTICS INC
3	ACHAOGEN INC
4	WOCKHARDT LIMITED
5	REMPEX PHARMACEUTICALS, INC.
6	NEW JERSEY UNIV
7	ACTELION PHARMACEUTICALS LTD
8	PFIZER INC.
9	CUBIST PHARMACEUTICALS, INC
10	JANSSEN PHARMACEUTICA N.V.

분석기업 선정

- MERCK SHARP & DOHME
- PFIZER INC.

KOPRI 극지연구소

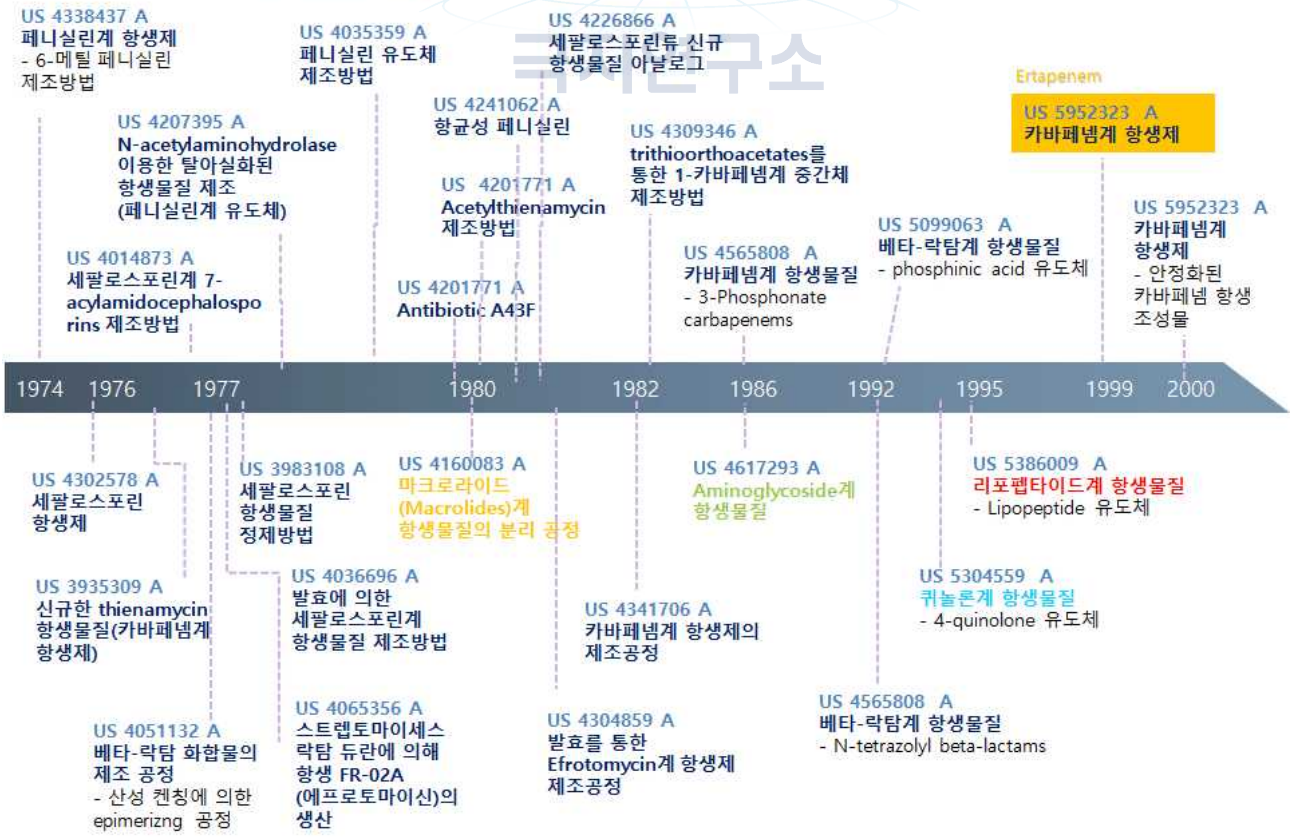
다. Merck 사의 항생제 개발 전략분석

- Merck 사는 처방의약품, 일반 의약품 등을 판매하는 대표적 글로벌 제약사임
- 대표적 제품으로는 표적항암제 키트루다(Keytruda)/ 카바탁(CAVATAK), 자궁경부 예방접종 가다실(Gardasil), 당뇨치료제 시타글립틴(Sitagliptin) 등이 있음
- **2014년 내성이 강한 감염병을 치료하기 위한 항생제 전문 기업인 Cubist를 인수하는 등 항생제 분야의 파이프라인 강화**
  - 2019년도 Zerbaxa(2019. 6 FDA 승인), Recarbrio(베타락탐계 병용 항생제, 2019. 07.17 FDA 승인) 등 2020년까지 20개의 신규 항생제 FDA 승인 목표

Cancer	Advanced solid tumors Prostate KEYTRUDA® MK-3475	1st line advanced ovarian cancer LYNPARZA® MK-73391 (EU)	2nd line metastatic breast cancer LYNPARZA® MK-73392 (US, EU)	.....	
Antibiotics	HABP/VABP3 SIVEXTRO® MK-1986	Ertapenem INVANZ®	HABP/VABP ZERBAXA® MK-7625A2 (US, EU)	Imipenem/ cilastatin/relebactam Recarbrio®	Prevention of CMV infection/disease PREVYMIS™ MK-8228 (US, EU)
	C. Difficile Bezlotoxumab ® EU/US	Imipenem/Cilastatin Relebactam ®	Daptomycin Cubicin ®	Bacterial infection relebactam+ imipenem/cilastatin MK-7655A (US, EU)	
Vaccine	Ebola vaccine V9203 (US, EU)	Pediatric hexavalent combination vaccine VAXELISTM V419 (US)	GARDASIL®9 V503 (US)	.....	
Diabetes	STEGLUJAN™ ertugliflozin + sitagliptin MK-8835A (US, EU)2	STEGLUJAN™ ertugliflozin + sitagliptin MK-8835A (US, EU)2	STEGLUJAN™ ertugliflozin + sitagliptin MK-8835A (US, EU)2		

.....

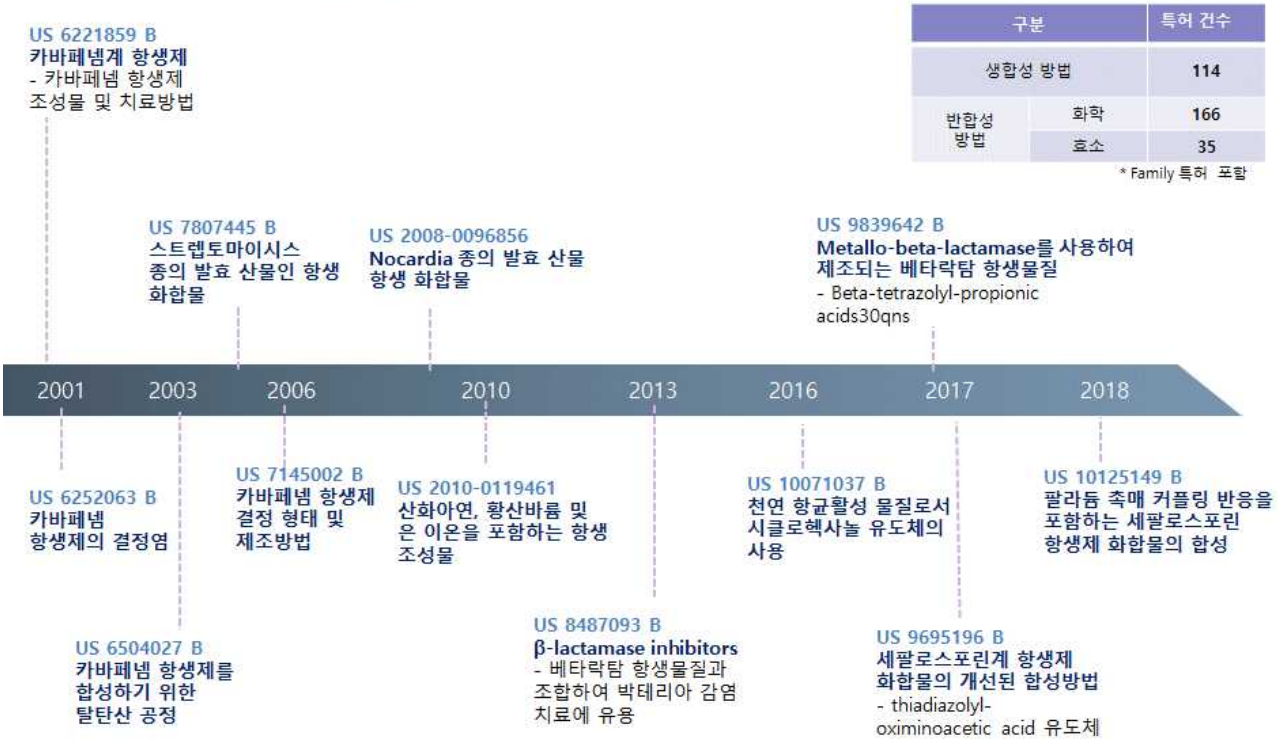
MERCK 특허망 (1)



MERCK 특허망 (2)

구분		특허 건수
생합성 방법		114
반합성 방법	화학	166
	효소	35

* Family 특허 포함



Merck: Clinical Trial 등록 화합물

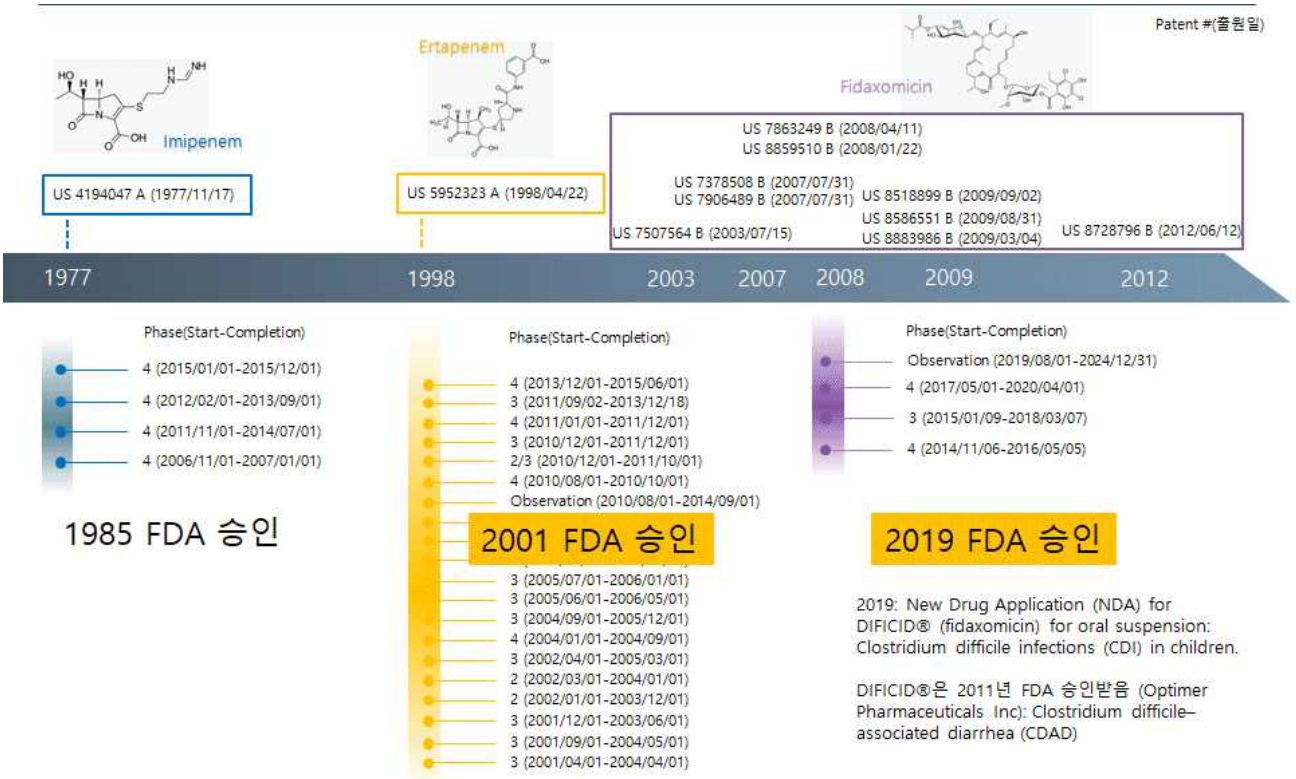
KOPRI 극지연구소

분석기업	검색식	Clinicaltials.gov 등록 건수
MERCK SHARP & DOHME	Antibiotics and Merck	195

임상단계	등록건수
1상	43
2상	49
3상	47
4상	33
합계	172

- 항생제별 최근 임상진행 단계 정리
- Merck 특허망과 연계

Merck의 항생제 다양성 확보 방안 파악


Patent #(출원일)
Imipenem
Ertapenem
Fidaxomicin
US 4194047 A (1977/11/17)
US 5952323 A (1998/04/22)
US 7863249 B (2008/04/11)
US 8859510 B (2008/01/22)
US 7378508 B (2007/07/31)
US 7906489 B (2007/07/31)
US 8518899 B (2009/09/02)
US 8586551 B (2009/08/31)
US 7507564 B (2003/07/15)
US 8883986 B (2009/03/04)
US 8728796 B (2012/06/12)
1977
1998
2003
2007
2008
2009
2012
Phase(Start-Completion)
4 (2015/01/01-2015/12/01)
4 (2012/02/01-2013/09/01)
4 (2011/11/01-2014/07/01)
4 (2006/11/01-2007/01/01)
1985 FDA 승인
Phase(Start-Completion)
4 (2013/12/01-2015/06/01)
3 (2011/09/02-2013/12/18)
4 (2011/01/01-2011/12/01)
3 (2010/12/01-2011/12/01)
2/3 (2010/12/01-2011/10/01)
4 (2010/08/01-2010/10/01)
Observation (2010/08/01-2014/09/01)
2001 FDA 승인
3 (2005/07/01-2006/01/01)
3 (2005/06/01-2006/05/01)
3 (2004/09/01-2005/12/01)
4 (2004/01/01-2004/09/01)
3 (2002/04/01-2005/03/01)
2 (2002/03/01-2004/01/01)
2 (2002/01/01-2003/12/01)
3 (2001/12/01-2003/06/01)
3 (2001/09/01-2004/05/01)
3 (2001/04/01-2004/04/01)
Phase(Start-Completion)
Observation (2019/08/01-2024/12/31)
4 (2017/05/01-2020/04/01)
3 (2015/01/09-2018/03/07)
4 (2014/11/06-2016/05/05)
2019 FDA 승인
2019: New Drug Application (NDA) for DIFICID® (fidaxomicin) for oral suspension: Clostridium difficile infections (CDI) in children.
DIFICID®은 2011년 FDA 승인받음 (Optimer Pharmaceuticals Inc): Clostridium difficile–associated diarrhea (CDAD)

KOPRI
극지연구소

라. 신규 항생제 발굴사례

1) 국내

❑ 2015년 국내 23호 신약 자보란테정(동화약품) 탄생. 자보란테정은 '자보플록사신 D-아스파르트산염'을 주성분으로 하는 퀴놀론계 항생제로써 만성기관지염, 폐기종을 포함하는 만성폐쇄성폐질환 급성악화에 사용하는 제품임.

❑ 국산 24호 신약 탄생. 동아에스티의 신약 슈퍼항생제 시벡스트로는 2014년 7월 미국 FDA(식품의약청)의 승인을 받았고, 2015년 국내 신약 허가 승인. 국산 신약으로 미국에 진출한 것은 지난 2003년 LG생명과학의 팩티브 이후 두 번째임.

❑ 전체적으로 국내 항생제 개발은 주로 대학이나 연구기관에서 소규모로 수행 중이며, 국내 제약회사의 경우, 주로 단백질 의약품 등에 투자를 집중하고 있는 실정이어서 해외 선진국에 비해 뒤쳐져 있는 것이 현실임.

2) 국외

❑ 전 세계 슈퍼박테리아 항생제 시장은 반코마이신(vancomycin), 뎁토마이신(Daptomycin) 및 자이복스(Zyvox)가 주도. IMS Health 보고서에 따르면 화이자 '자이복스(Zyvox)'의 2009년 매출은 약 1조3000억 원에 달함

❑ (미국) 박테리아 배양액 추출물로 부터 개발한 항생제 2종 (Daptomycin, Dalbavancin) FDA 승인.

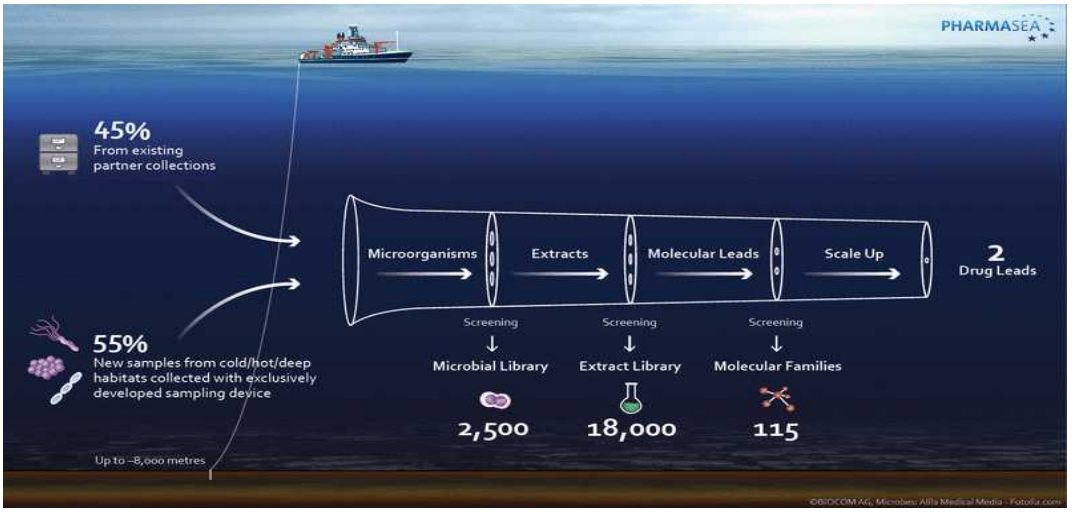
❑ (미국, 캐나다, 프랑스, 일본) 다양한 신규 항생제 후보 물질인 Telavancin, Oritavancin, Ramoplanin, Efiprestin, Lyostaphin, WAP 829A2을 탐색·개발하여 현재 임상 실험 진행중임.

❑ EU가 주관하는 “PharmaSea (2012.10.01~2016.09.30)”프로젝트는 남극과 북극을 포함한 해양에서 새로운 항생제 및 신약 후보 물질을 발굴하는 대형 프로젝트로 13개국에서 24개의 기업 및 연구기관이 참여하고 있으며, 4년간 950만유로 이상의 투자를 하고 있음.

❑ 현재까지 1000여개의 극지 및 해양 미생물을 스크리닝 하여 12,000 여종의 항생제 후보물질을 포함한 유용물질을 분리하였으며 40,000 여개의 활성 측정 실험을 수행하였음

❑ 항생제 및 신약 발굴을 위한 유전체 분석과 대사경로 분석을 실시한 수편의 논문 발표하였음 (Laura E. Lallier et al. 2014, Nat. Prod. Rep; Botana et al. 2014, Marine Drugs; Kennedy J, Flemer B, Jackson SA, Morrissey JP, O'Gara F, et al. 2015, PLoS ONE)

KOPRI 극지연구소



<그림>"PharmaSea"프로젝트의 전체 연구 모식도

마. 시장성 분석

전 세계적 항생제 시장은 2014년 기준 403억 달러 규모로 전체 의약품 시장의 4.3%를 차지한 반면, 국내 항생제 시장은 2015년 기준 1조 3,000억 원으로 국내 의약품 시장의 15%를 차지하고 있음. 이런 사실은 타 OECD 국가에 비해 우리나라의 항생제 남용이 우려됨을 방증하는 것으로, 이로 인한 슈퍼 박테리아의 등장 등 국가적 재난 상황에 대비해야 함을 암시함.

❑ 2014년 기준, 치료 영역별 5대 시장규모는 항암제 745억 달러, 당뇨치료제 639억 달러, 진통제 598억 달러, 고혈압 치료제 475억달러, 항생제 403억 달러로 집계되어 조사된 바 있으며, 전체 치료제 시장규모에서 4.3%를 차지하고 있음(출처: Khidi brief, 보건산업브리프 vol.176, 2015.05).

❑ 특히 국내 의약품 시장에서는 의약 분업의 정착으로 인해 의료기관의 처방 관행이 의약품 소비의 최대 변수로 부상하고 있는 바, 항생제는 보험 청구 약제비(곧 의료기관 처방에 의한 전문 의약품의 사용 동향을 의미) 중 최대액을 차지하고 있으며 특히 소비자의 접근 용이성이 큰 의원급 의료기관의 사용빈도가 높기 때문에 항생제 시장의 동향은 곧 전체 의약품 시장을 가늠할 수 있는 척도가 됨.

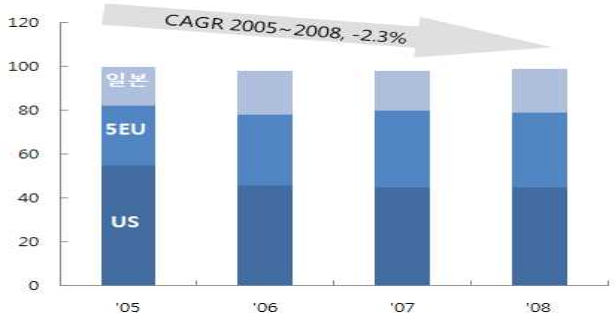
❑ 항생제를 통한 감염증의 예방 또는 완치는 20세기 의학이 이룬 가장 큰 업적이라고 할 수 있으나, 치료제인 항생제의 내성이 증가하면서 치료 실패에 따른 사망이 증가하고 있는 추세임.

❑ 최근까지도 각종 세균이 여러 항생제에 내성을 보이는 다제내성균이 돼 치료할 약제가 아예 없어지는 현상이 세계 병원에서 발생하고 있으며, 이러한 항생제 내성을 극복하기 위한 항생제 내성이 없는 항생제 개발이 요구됨.

1) 세계 항생제 치료제 시장

❑ 항생제는 세계 전체 의약품시장의 4.3%를 차지하며, 지난 2003년부터 2007년까지의 세계 항생제 시장규모는 연평균 -3%의 역성장을 기록한 바 있고, 2005~2008년 주요국의 항생제 시장의 연평균 성장률은 -2.3%로 규모가 감소했는데, 이는 항생제 산

업이 매우 성숙되었고 다양한 클래스와 제품들이 제네릭에 의해 개발됐기 때문으로 분석됨.



<그림> 최근 항생제 시장규모 및 연평균증가율

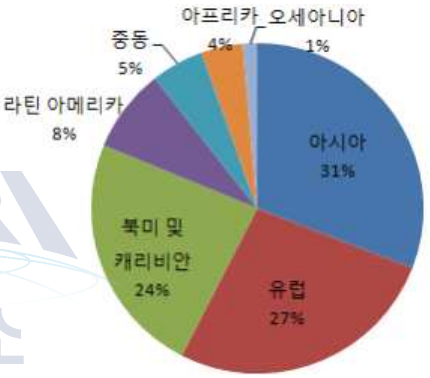
출처: Datamonitor, MIDAS sales data, IMS Health, 2009.4.

❑ 세계 항생제 시장을 지역별로 구분하였을 때, 아시아 지역 항생제 시장이 130억 달러(30.9%)로 가장 큰비중을 차지하고 있으며, 유럽(112억 달러, 26.6%)과 북미(100억 달러, 23.7%) 지역 시장 비중이 높은 것으로 나타남.

(단위: 백만 달러, %)

구분	시장규모	비중
아시아	13002	30.9
유럽	11215	26.6
북미 및 캐리비안	9982	23.7
라틴 아메리카	3450	8.2
중동	2159	5.1
아프리카	1708	4.1
오세아니아	587	1.4
전체 합계	42104	100.0

출처: Icon Group interntional Inc. (2010b)

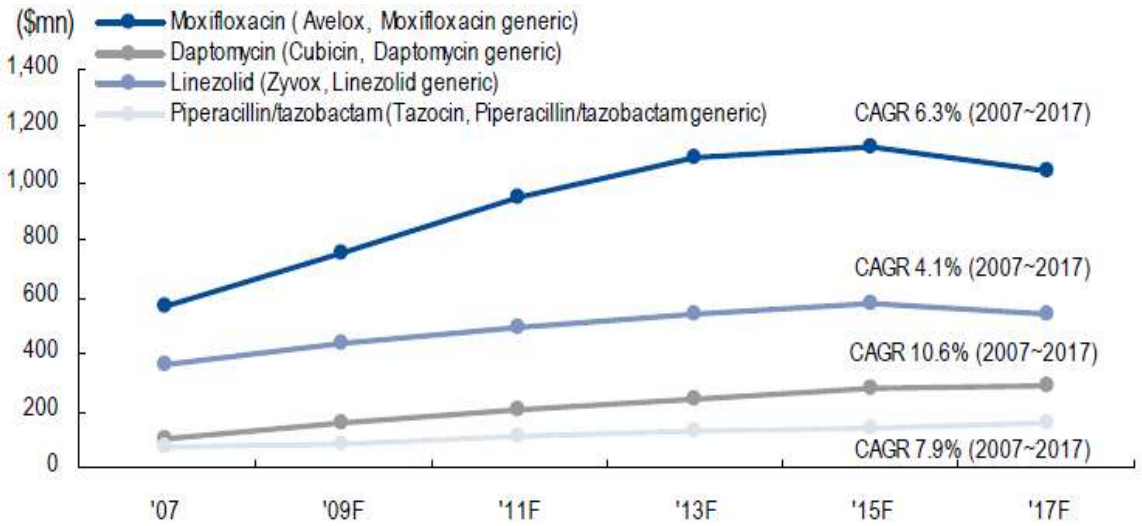


<그림> 지역별 항생제 시장 현황, 2011년

❑ 최근 글로벌 항생제 R&D 파이프라인이 증가하는 추세이며, 이는 1, 2세대 항생제에 대해 내성을 보이는 새로운 박테리아가 나타나면서 강력한 슈퍼항생제의 필요성이 대두되었기 때문임.

❑ 1세대 항생제인 페니실린계 항생제에 대해 내성을 보이는 박테리아가 나타나면서 글로벌 제약회사들은 항생제 연구를 줄였는데, 10년 연구 R&D 투자대비 판매 지속시간이 줄어들기 때문이었음. 그러나 R&D 투자가 지연되면서 나타난 부작용으로 기존 항생제에 대해 내성을 보이는 다양한 종류의 슈퍼박테리아들이 반복적으로 나타나기 시작했으며 이로 인한 사망자가 빠르게 증가하는 추세임.

❑ 항생제는 치료에 있어서 선택이 아닌 생존을 위한 필수적인 의약품으로 자리하고 있고, 항생제는 질병 감염 시에 가장 기본적으로 처방되는 의약품 중의 하나이므로 항생제 시장규모는 감소하기 보다는 꾸준한 성장을 지속할 전망으로 보임.



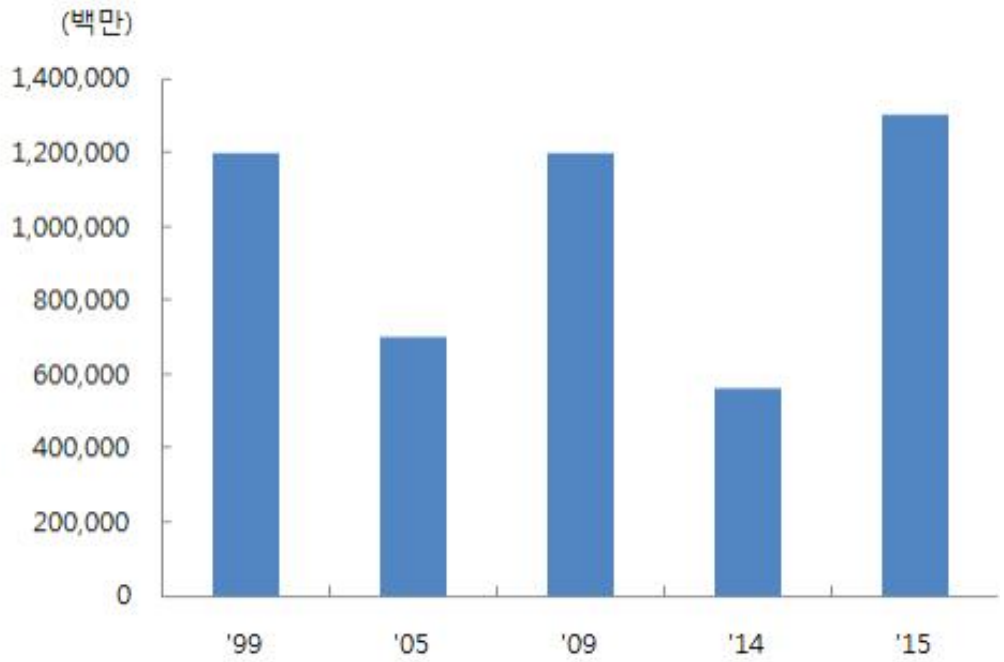
<그림> 전세계 항생제 종류별 시장규모 기준 (출처: Datamonitor)

- ❑ 세계 항생제 시장은 연간 성장률 2%로 추산되고 있으나, 항생제 시장규모보다 더 중요한 것은 현재 항생제 시장의 가장 큰 이슈인 저항성이고, 이로 인해 항생제 시장의 unmet needs가 발생하고 있는 실정임.
- ❑ 매년 6명 중 5명의 미국인이 항생제 처방을 받는다는 통계가 있는데, 이는 미국 내에서만 무려 연간 2억 6,200만 건의 항생제 처방 건수임.
- ❑ 따라서 현재 항생제 시장은 새로운 치료약이 필요한 실정이고, 항생제 연구개발 연구소 또는 기업에게는 새로운 기회가 될 것으로 예상됨.

2) 국내 항생제 치료제 시장

- ❑ 국내 제약산업은 내수용 완제품 중심이어서 초기 개발비를 투자하여 신약의 원료를 만들어 내는 것이 아니라 원료의 합성을 통한 최종 완제품 생산이 대부분을 차지하며, 이로 인해 제품의 life cycle이 짧고, 신약 개발투자비 보다는 상대적으로 판매비용의 비중이 높으며, 또한 특허권으로 보호되는 오리지널 의약품에 비해 부가가치 및 영업기반이 취약하며 질병의 다종다양성으로 인해 의약품 역시 다품종 소량생산 체제로 그 시장이 세분화 되어 있는 특징이 있음.
- ❑ 국내 항생제 시장은 2015년 기준 1조 3000억원으로 추정되고 있으며, 앞서 살펴본 전 세계 항생제 시장과 부합하는 시장의 규모가 형성되고 있음을 확인하였음.

KOPRA 극지연구소

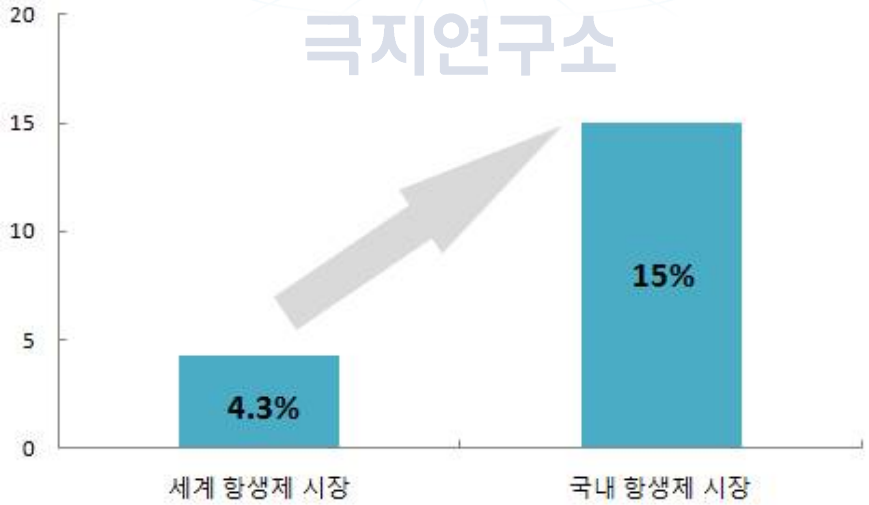


<그림> 국내 항생제 시장규모

출처: 세계일보 2015년 03월 기사 발췌, 농진청 자료, 대웅화학 분석보고서, 세계일보 2015년 03월 기사 발췌 및 재구성

❑ 국내 제약산업에서 항생제가 차지하는 비중은 전체 의약품 시장의 15% 수준으로, 이는 전세계 항생제 시장 비중(4.3%)을 크게 상회하는 것으로서 국내 의약 소비의 특성을 반영한다고 볼 수 있음.

KOPRI 극지연구소



<그림> 세계 및 국내 항생제 시장규모 비교

출처: 산업기술정보원,1999; 우경숙, 2006 재인용 및 재구성

❑ 보건복지가족부의 발표에 따르면 2010~2012년 사이 국내에서 소비된 항생제의 총량(DDDs)은 미미하게 증가하였으나, 3년간 매년 항생제 사용량은 OECD에 속한 30개국의 항생제 사용량 자료와 비교하면 아직도 높은 수준에 있음.

❑ 연도별 상반기 항생제 처방률을 보면, 2009년 28.6%, 2010년 27.3%, 2011년 26.2%, 2012년 26.1%으로 나타났고, 2000년 의약분업 이후 항생제 처방률이 지속적으로

감소하고 있으나 여전히 WHO 권장치(23%)보다는 높은 수준임.

<표1> 국내 연도별 항생제 사용량

(단위:DDD/1,000명/day)

구분	2010	2011	2012
사용량	27.1	26.6	27.3
전년대비	-	0.3%	2.9

출처: 2012년도 의약품 소비량 및 판매액 통계 심층분석, 한국보건사회연구원

* 인구 1,000명의 성인이 소비한 항생제 양을 DDD(Defined Daily Dose) 단위로 환산후 측정, 항생제 사용량 수치가 24.7이라면, 인구 1,000명 성인이 하루에 항생제 표준량으로 24.7명분을 복용하였다는 의미임, 자료출처: 보건복지가족부, 2009

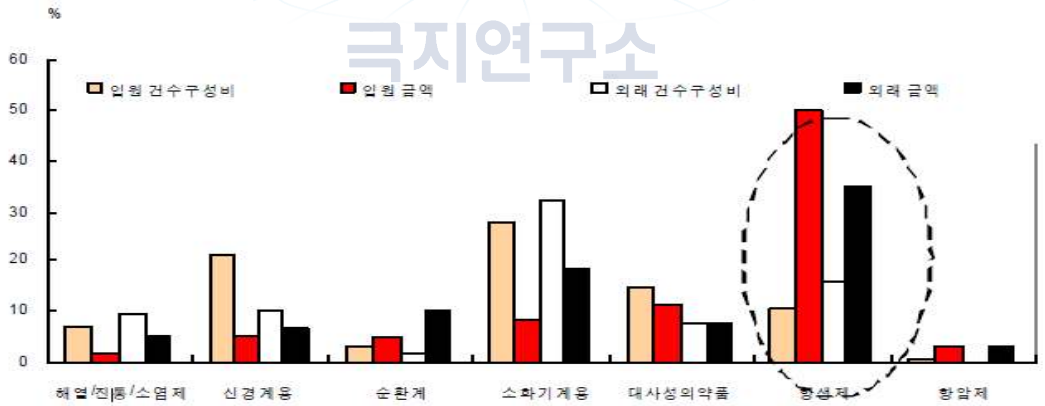
<표2> OECD 가입국 연도별 항생제 사용량

(단위:DDD/1,000명/day)

국가	벨기에	포르투칼	한국	호주	노르웨이	독일	네덜란드
사용량	24.7	23.8	23.8	22.3	20.1	14.2	12.3

* 2006년 기준, OECE 국가 중 일부 국가들만이 자국의 항생제 사용량을 공개하고 있으며 공개된 16개 국가의 평균비율은 21.3(최고 27.2, 최저 12.3), 자료출처: 보건복지가족부, 2009

❑ 국내 항생제의 사용량은 전년도 대비 매년 증가하는 추세이고 국내 치료영역 별 약재비 비중 또한 가장 많이 차지하고 있는바, 국내 항생제 시장성장률은 지속적으로 높아질 것으로 판단됨



<그림> 주요 치료영역 별 (보험) 약제비 비중
출처: 대한 의사 협회지, 신영증권리서치 센터

3) 항생제 시장의 변화

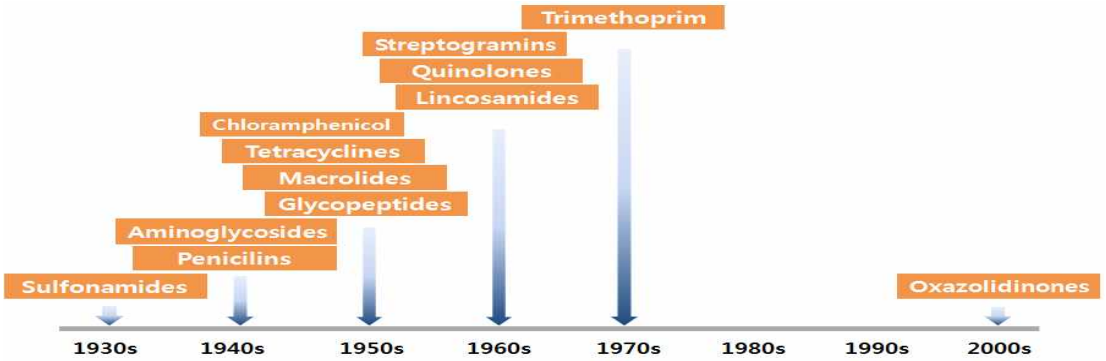
❑ 글로벌 제약사들은 항생제 시장을 이미 성숙하고 포화되어 지속적인 이익 창출이 힘들다고 전망하여 신규 항생제 개발에 대한 투자를 소홀히 해 왔으므로 현재 전 세계 항생제 파이프라인은 부족한 실정임.

❑ 주로 상업화의 주체가 되기 어려운 대학, 국공립연구소에서 항생제 연구가 이루어져

왔고, 이 때문에 신규 항생제가 실질적으로 시장에 나올 수 있는 기회가 많지 않았음.

❑ 실제로 1935~1968년 사이에는 142종의 항생제가 개발되었으나 이후 45년간 5종의 항생제만이 개발되었음. 1987년 이후에는 새로운 계열의 항생제가 나오지 않다가 2008~2012년에 2 종의 항생제만이 국제적 승인을 받았음.

❑ '15년 1월 글로벌 제약사 머크(Merck)가 항생제 개발회사인 큐비스트(Cubist Pharmaceuticcals)를 95억 달러에 인수하여 MRSA 등과 같은 슈퍼박테리아에 대한 항생제 파이프라인을 확보함에 따라 향후 항생제 개발에 대한 글로벌 제약사들의 움직임이 증가할 것으로 전망됨.

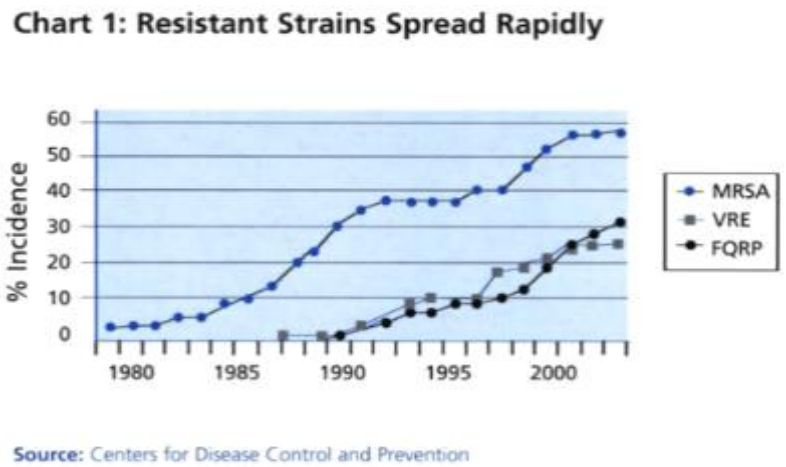


<그림> 항생제 개발 현황

4) 항생제 내성의 현황

❑ 미국 질병통제예방센터(CDC)와 항생제 내성에 대한 영국의 한 보고서에 따르면 미국에서 한해 슈퍼박테리아에 감염되는 환자수는 2백만 명에 이르고 미국과 유럽에서 이로 인해 사망하는 환자수는 약 5만 명에 달함.

❑ 미 오바마 정부도 항생제 저항에 대한 우려를 표명하며 지난 2014년부터 새로운 항생제 개발을 위한 이니셔티브 시행, 예산 증대 등 다각적 방안을 마련하여 추진하고 있음.



<그림> 저항성 균 발생 현황

5) 항생제 시장의 미래와 미국 정부의 지원 현황

❑ 세계 항생제 시장은 2010년 현재 약 420억 달러(한화 약 45조 원)에 이르고 있고, 연간 성장률은 4%로 추산됨.

❑ 이에 각국 정부에서도 새로운 항생제를 개발하는 데 각종 지원정책을 시행하고 있는데 미국의 Generating Antibiotic Incentives Now (GAIN) Act of 2012는 항생제 후보물질을 qualified intellectual disabilities professionals (QIDPs)로 지정해 더 빠른 FDA 심사가 이루어지며 5년간의 추가 시장독점권을 가지게 하였고, 카바페넴 내성 장내세균 (Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae, CRE)과 extended-spectrum β-lactamase producing enterobacteriaceae (ESBLs)가 QIDP 대상으로 지정된 사례임.

❑ Antibiotic Development To Advance Patient Treatment (ADAPT) Act of 2013은 미 FDA가 생존을 위협하는 수준의 감염(life-threatening infections)을 치료하는 항생제에 대해 적은 수의 임상시험으로도 허가를 내주도록 하는 법안임.

❑ 미 보건복지부 산하 생물의약품첨단연구개발국(Biomedical Advanced Research and Development Authority, BARDA)의 경우 항생제 전문 연구개발기업인 Achaogen의 그람음성균 항생제에 0.6억 달러, Cempra에는 5,800백만 달러를 지원한 바 있고, 최근에는 한 회사의 여러 항생제 파이프라인을 동시에 지원하는 프로그램도 시행하였는데 그 예로 지난 2013년 GSK의 항생제 개발에 5년간 2억 달러를 지원하는 협약을 체결한 바 있음.

6) 주요 항생제 제품의 특허만료에 따른 시장 침체 전망

❑ '19년부터 주요 항생제 제품의 특허가 만료되어 전체적으로 시장침체가 예상됨.

❑ 존슨앤존슨의 레바퀸(Levaquin), 화이자의 자이복스(Zyvox), 아스트라제네카의머렘(Merrem), 바이엘 헬스케어 아벨록스(Avelox)

<표3> 항생제 특허만료 및 출시예정

	미국	유럽	일본
2004	Ciproxin(2004년 특허만료)		Spectracef(2004년 특허만료)
2005	Zithromax(2005년 특허만료)		
	Biaxin(2005년 특허만료)		
2007	Zosyn(2007년 특허만료)	Tazocin(2007년 특허만료)	
2009	Vibativ(2009년 출시)	Merrem(2009년 특허만료)	
2010	Merrem(2010년 특허만료)	Zeftera(2010년 출시)	Tygacil(2010년 출시
	Zef tera(2010년 출시)		
2011	Levaquin(2011년 특허만료)	Tavanic(2011년 특허만료)	Cravit(2011년 특허만료)
	Ceftaroline(2011년 출시)	Vibativ(2011년 출시)	Merrem(2011년 특허만료)
		Ceftaroline (2005년 출시예정)	
2012	Doribax(2012년 특허만료)		Tygacil(2012년 특허만료)
2013			Zeftera(2013년 출시)
2014	Avelox(2014년 특허만료)	Avelox(2014년 특허만료)	Avelox(2014년 특허만료)
2015	Zybox(2015년 특허만료)		Vibativ(2015년 출시)
2016	Tygacil(2016년 특허만료)	Zyvox(2016년 특허만료)	
2018		Tygacil(2018년 특허만료)	

출처: Datamonitor, 생명공학정책연구센터

7) 주요 Key player 분석

❑ 항생제 시장에서 대부분의 시장을 차지하고 있는 제품은 존슨앤존슨의 레바퀸(Levaquin), 화이자의 자이복스(Zyvox), 아스트라제네카의 머렘(Merrem), 바이엘 헬스케어 아벨록스(Avelox)이고, 2006~2008의 매출액은 하기와 같음.

❑ 특허 만료가 다가오고 있으나 현재 까지 항생제 시장에서 가장 큰 점유율을 차지하고 있음.

<표4> 주요 항생제 매출액

(단위: 백만달러)

Brand	Generic	Compaies	Sales		
			2006	2007	2008
Cravit	Levofloxacin	Daiichi Sankyo, Santen	1002	1260	1903
Levaquin, Floxin	Levofloxacin	Johnson&Johnson	1530	1640	1600
Zosym/Tazocin	Piperacillin+Tazobaclam	Wyeth		880	1200
Avelox, Avalox	Moxifloxacin	Bayer, Schering-Plough, Shionogi	822	962	1100
Zyvox	Linezolid	PFizer	782	944	1100
Augmentin	Co-amoxiclav	GlaxoSmithKline	1055	1060	1080
Merrem	Meropenem	Astra Zeneca			900

출처: 각사 annal report, 우리투자증권(2010),

❑ 화이자, 자이복스(linezolid)

Datamonitor 자료에 따르면 지난해 4억 3,700만달러 정도의 매출을 기록한 화이자의 자이복스(linesolid)는 2017년까지 연평균 4.1%씩 성장할 것으로 전망되고 있음.

❑ 바이엘, 아벨록스(Avelox)

바이엘사의 아벨록스의 매출은 2009년 7억 5,900만 달러에서 2017년 10억 5,000만 달러로 연평균 성장률 6.3%를 기록할 것으로 전망되고 있음

❑ 동아ST, 시벡스트로(Sivextro)

미국 FDA로부터 신약허가 승인 획득하였고 폐렴 적응증 추가 등으로 글로벌 제품으로 성장 기대주임. 수퍼박테리아 항생제로써 2015년 유럽의 허가를 득한 받은 상태임.

❑ 한미약품, 세트리악손

세파항생제 '세트리악손'에 대한 독일 시판허가를 획득하였고, 유럽통합승인절차(DCP)에 따라 3개국 (영국·프랑스·이태리)에 자동 시판 허가 획득함. 연 100만 바이알 규모 수출-허가국가 확대 추진 중에 있음.

8) 종합분석 및 자체평가

❑ 국내 항생제 사용량 및 시장은 계속적인 증가 추세이지만 선진국 대비 상대적으로 항생제 개발 노력은 부족한 실정임.

❑ 국외 연구개발 현황으로 천연물질 유래 항생제 개발이 계속적으로 이루어지고 있지

만, 추가적인 신규 항생물질 골격구조 발굴이 시급한 상황임.

- ❑ 신규 항생물질 골격구조 발굴과 함께 기존 항생물질 골격구조를 이용한 항생물질 변형기술이 요구됨.
- ❑ 항생물질 개발의 현재 문제점들에 대한 해결방안으로 본 과제에서는 극지/해양 생물자원을 이용한 신규 항생물질 탐색 과 함께 저온성 효소의 기질 유연성을 이용한 기존 항생물질 재생기술을 개발하고자 함

KOPRI
극지연구소

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

2-1. 연차별 성과지표 및 목표치

구분	성과목표	성과지표	목표치	가중치 (퍼센트)	설정근거	평가기준 (측정산식 등)	달성도 (%)
최종목표	극지 및 해양 유래 희귀 생물자원 확보	신규 항생물질 또는 항생물질 변형효소 유전자를 가지는 균주개발	극지/해양 생물자원 4종 ~~5종~~	10	항생물질 생산균주의 탐색, 배양조건 확립 및 물질 분석까지 완료된 균주를 1년차부터 1년에 1종씩 확보, 유전체 분석은 1년에 2건씩 완료	자체평가 및 자료제시, 과제 종료 전까지 해양생물자원관에 기탁 및 등록 (기탁증, 등록증)	100
			극지/해양 미생물 유전체 분석 8종 ~~10종~~	10			
	항생물질 변형효소의 기능별 카탈로그 구축	생물자원, 유전체 분석, 항생물질 변형효소의 생화학적 특성 분석, 기존 상용화 효소와의 비교, 항생물질 변형체 개발 관련 논문발표	18건 ~~31건~~	20	1차년도에 3건, 2차년도부터 1년에 5건씩 발표	SCIE 상위 30% 논문발표 여부	100
	항생제 선도물질과 이의 생산기술 개발관련 특허등록 3건이상	항균 또는 항진균 활성을 가지는 신규 항생물질 발굴 또는 이의 생산 방법 특허 등록	3건 ~~5건~~	20	특허등록이 가능한 신규 항생물질을 세부 1팀에서 1건 세부 2팀에서 1건, 세부 3팀에서 2건, 세부4팀에서 1건 발굴	특허등록 여부 (단, 5년차 특허는 출원 여부)	100
	기술이전 또는 기술실시 1건 이상	기술료 3천만 원 ~~5천만 원~~ 이상	1건	40	2019년도 출연연구소 기술료 평균치를 적용	수요기업 평가	100
1차년도 (2020년)	극지 및 해양 유래 희귀 생물자원 확보	신규 항생물질 또는 항생물질 변형효소 유전자를 가지는 균주개발, 선도물질의 최소 성능 목표 및 차별적 기술요소 설정	생물자원 1종, 극지/해양 미생물 유전체 분석 2종	20	항생물질 생산균주의 탐색, 배양조건 확립 및 물질 분석까지 완료된 균주를 1년차부터 1년에 1종씩 확보	자체평가 및 자료제시 물질의 유효성 기준: 0.1 mg/ml 농도에서 clear zone 형성	생물자원:2종, 극지 미생물 (S. carbonis PAMC29251), 해양 미생물 (199DD-085) 유전체분석 :4종 Hymenobacter sp. PAMC26554, Hymenobacter sp. PAMC26628, S. carbonis PAMC29251, Sphingobium sp. PAMC28499)
	항생물질 변형효소의 기능별 카탈로그 구축	생물자원, 유전체 분석, 항생물질 변형효소의 생화학적 특성 분석, 기존 상용화	3건	30	1차년도에 3건, 2차년도부터 1년에 5건씩 발표	SCIE 상위 30% 논문발표 여부	SCIE 상위 30% 논문3건발표

KOPRI 극지연구소

		효소와의 비교, 항생물질 변형체 개발 관련 논문발표					
	항생물질 타겟 단백질 발현 및 정제	타겟 단백질 발현 벡터 제작	5건	10	단백질 결정화를 위한 단백질 확보 과정	벡터 제작 여부	100% 달성
		수용성 단백질 발현	2건	10	단백질 결정화를 위한 단백질 확보 과정	SDS-PAGE	100% 달성
		타겟 단백질 고순도 정제	순도 95% 이상	10	단백질 결정화를 위한 단백질 확보 과정	SDS-PAGE	100% 달성
	타겟 단백질 결정화 실험	타겟 단백질 결정화	2건	20	단백질 구조 규명을 위한 과정	초기 결정 획득 여부	100% 달성
2차년도 (2021년)	극지 및 해양 유래 희귀 생물자원 확보	백본 항생물질 또는 항생물질 변형효소 유전자를 가지는 균주개발	극지/해양 생물자원 1종	10	항생물질 생산균주의 탐색, 배양조건 확립 및 물질 분석까지 완료된 균주를 1년차부터 1년에 1종씩 확보	자체평가 및 자료제시 물질의 유효성 기준: 0.1 mg/ml 농도에서 clear zone 형성	100% (극지/해양 생물자원 9종 확보) (특히, 극지 미생물 2종 (*Streptomyces* sp. PAMC 29637 와 *Streptomyces* sp. PAMC 29639)은 0.1 mg/ml 이하의 농도에서 clear zone 형성. (극지미생물 4종의 유전체 분석 완료 (Burkholderia sp. PAMC28687, *Burkholderia* sp. PAMC26561, *Rhodococcus* sp. PAMC28705, *Rhodococcus* sp. PAMC28707) (Genomics. 2021 May;113(3):881-888) (Arch Microbiol. 2021 May;203(4):1731-1742)
			극지/해양 미생물 유전체 분석 2종	10			
	항생물질 변형효소의 기능별 카탈로그 구축	생물자원, 유전체 분석, 항생물질 변형효소의 생화학적 특성 분석, 기존 상용화 효소와의 비교, 항생물질 변형체 개발 관련 논문발표	5건	30	1차년도에 3건, 2차년도부터 1년에 5건씩 발표	SCIE 상위 30% 논문발표 여부	100% (SCIE 상위 30% 이내 논문 19건 발표로 초과달성)
	타겟 단백질 3차 구조 규명	타겟 단백질 X-선 회절 데이터 획득	1건	10	2차년도부터 1년에 1건 이상씩 구조적 분석	회절 데이터 획득 여부 (회절 데이터 이미지 또는 테이블 제시)	100% (ACI-1, CDA-1, HMGR, PA5542, WS5 포함 5건의 회절 데이터 획득) (MurG, MurE

KOPRI 극지연구소

							포함 2건의 구조분석)
		타겟 단백질 구조 논문 발표	1건	10	2차년도부터 1년에 1건 이상씩 구조적 분석	SCIE 상위 30% 논문발표 여부	100% [항생제 내성 병원균 (*Acinetobacter baumannii*) 이 가지는 항생제 타겟 단백질인 MurG의 hexamer 형태의 결정 구조 분석 (IUCrJ. 2021 May 8:8(Pt 4):574-583)]
	Fragment based hit discovery	활성 부위에 결합하는 분자량 300 Da 이하의 compounds 확보	1건 이상	30	구조 기반 신규 저해 물질 설계를 위한 과정	Compound 구조 제시 여부	100% [Class C β-lactamase 중 하나인 ACC-1 단백질에 대해 Fragment-based drug discovery (FBDD) screening 수행. Beta-Lactamase의 활성 저해제로서 다양한 Meropenem 유도체를 합성하여 병원균에 대한 살균 활성을 측정함. 총 13 종의 Meropenem 유도체를 이용하여 E.Coli 에 대한 MIC를 측정하여 총 5종의 (Meropenem trihydrate (merrem), Doripenem, Imipenem, Tebipenem, Biapenem) 유사체가 높은 살균 활성을 갖는다는 것을 확인함.]
3차년도 (2022년)	극지 및 해양 유래 희귀 생물자원 확보	백본 항생물질 또는 항생물질 변형효소 유전자를 가지는 균주개발	극지/해양 생물자원 1종	10	항생물질 생산균주의 탐색, 배양조건 확립 및 물질 분석까지 완료된 균주를 1년차부터 1년에 1종씩 확보	자체평가 및 자료제시 물질의 유효성 기준: 0.1 mg/ml 농도에서 clear zone 형성	100% - 항생물질 생산 균주 4건 확보: Streptomyces avidinii PAMC29637, Streptomyces avidinii PAMC29639, 유용 해양미생물 균주 Streptomyces ardesiacus, 유용
			극지/해양 미생물 유전체 분석 2종	10			

KOPRI 극지연구소

							해양미생물균주 Streptomyces zhaozhouensis - 남극 토양 미생물인 Antibiotic-Resistant Pseudomonas fluorescens Strain Ant01 의 유전체 분석 완료 - 남극 미생물 3종 (Variovorax sp. Strains PAMC28711, PAMC26660, and PAMC28562)의 유전체 분석 완료
	항생물질 변형효소의 기능별 카탈로그 구축	생물자원, 유전체 분석, 항생물질 변형효소의 생화학적 특성 분석, 기존 상용화 효소와의 비교, 항생물질 변형체 개발 관련 논문발표	5건	30	1차년도에 3건, 2차년도부터 1년에 5건씩 발표	SCIE 상위 30% 논문발표 여부	100% - SCIE 상위 30% 논문 10편 발표
	항생제 선도물질 및 생산기술 개발	항균 또는 항진균 활성을 가지는 신규 항생물질 개발 또는 이의 생산 방법 특허 등록	1건	10	특허등록이 가능한 신규 항생물질을 세부 1팀에서 1건 세부 2팀에서 1건, 세부 3팀에서 2건, 세부 4팀에서 1건 발굴	특허등록 여부 물질의 유효성 기준: MIC 값, 20ug/ml 이하	100% - 특허출원 (출원번호: 10-2022-0101541) 후 등록 기다리는 중 - 특허결정 후 등록 진행 중 (출원번호: 10-2020-0068238)
	신규 항생물질의 저해기작 규명	타겟 단백질-신규 항생물질 연구 논문발표	1건	10	2차년도부터 1년에 1건 이상씩 구조적 분석	SCIE 상위 30% 논문발표 여부	100% - SCIE 상위 30% 논문 1편 발표 - 논문제목: Antibacterial and Cytotoxic Phenolic Polyketides from Two Marine-Derived Fungal Strains of Aspergillus unguis - 학술지: Pharmaceuticals (IF: 5.215, JCR rate: 18.996)
	항생물질 변형체 설계	저해 활성이 증대된 신규 항생 물질 설계	3건	30	연구 결과를 기반으로 신규 항생물질 설계	신규 항생 물질 구조 제시 여부	100% (총 4건 설계 및 제시. CMY-10 peptide inhibitor 설계 1건,

KOPRI 극지연구소

							Halisulfate 유도체 설계 1건, Acyl-AMP 유도체 설계 2건)
4차년도 (2023년)	극지 및 해양 유래 희귀 생물자원 확보	신규 항생물질 또는 항생물질 변형효소 유전자를 가지는 균주개발	극지/해양 생물자원 1종	10	항생물질 생산균주의 탐색, 배양조건 확립 및 물질 분석까지 완료된 균주를 1년차부터 1년에 1종씩 확보	자체평가 및 자료제시 물질의 유효성 기준: 0.1 mg/ml 농도에서 clear zone 형성	100% - 극지해양 생물자원 4 종 (*S. antarcticus* Kirkpatrick, *Salinispora arenicola*, *Streptomyces qinglanensis*, *Sphaerophorus globosus*) 확보, - 유전체 분석 5종: *Glaciimonas* sp. PAMC28666, *Subtercola* sp. PAMC28395, *Nakamurella* sp. PAMC28650, *Microbacterium* sp. PAMC22086, *Microbacterium* sp. PAMC21962
			극지/해양 미생물 유전체 분석 2종	10			
	항생물질 변형효소의 기능별 카탈로그 구축	생물자원, 유전체 분석, 항생물질 변형효소의 생화학적 특성 분석, 기존 상용화 효소와의 비교, 항생물질 변형체 개발 관련 논문발표	5건	30	1차년도에 3건, 2차년도부터 1년에 5건씩 발표	SCIE 상위 30% 논문발표 여부	100% - SCIE 상위 30% 논문 13편 발표
	항생제 선도물질 및 생산기술 개발	항균 또는 항진균 활성을 가지는 신규 항생물질 개발 또는 이의 생산 방법 특허 등록	2건	20	특허출원이 가능한 신규 항생물질을 세부 1팀에서 1건 세부 2팀에서 1건, 세부 3팀에서 2건, 세부 4팀에서 1건 발굴	특허등록 여부 물질의 유효성 기준: MIC 값, 20ug/ml 이하	100% - 해면 유래 천연물 halisulfate 3은 MRSA 균주에 대해 8 μg/mL의 MIC 값을 가짐 - FBDD compound 2 (4 μg/mL의 MIC 값을 가짐) - Acetyl-AMP (4~16 μg/mL의 MIC 값을 가짐)
	항생물질 변형체/타겟 단백질 복합체 3차 구조 규명	항생물질 변형체/타겟 단백질 복합체 구조 획득	1건	15	2차년도부터 1년에 1건 이상씩 구조적 분석	자체평가 및 구조 좌표를 나타내는 PDB 파일 자료제시	100% 기질/단백질 복합체 구조 좌표를 나타내는 PDB 파일 확보 5건. 1) 항생물질 변형체인 BoA와 ACC-1 단백질의 복합체 구조 좌표 2) FBDD를 통해

KOPRI 극지연구소

							발굴한 항생후보물질과 ACC-1 단백질의 복합체 구조 좌표 3) Ampicillin과 *St*Lac 단백질의 복합체 구조 좌표 4) Cefaclor와 *St*Lac 단백질의 복합체 구조 좌표 5) Cephalexin과 *St*Lac 단백질의 복합체 구조 좌표
	항생물질/타겟 단백질 복합체 특성 분석	항생물질/타겟 단백질 연구 논문 발표	1건	15	2차년도부터 1년에 1건 이상씩 구조적 분석	SCIE 논문발표 여부	100% -3종의 β-lactam 계열 항생제와 *St*Lac 단백질의 복합체 규명을 바탕으로 기질특이성을 분석함. 해당 내용의 논문은 under review 상태임. - 항생물질 개발 타깃인 IRGB10의 구조규명 (Frontiers in Immunology 2023 Aug 29:14:1254415 논문 발표)
5차년도 (2024년)	극지 및 해양 유래 희귀 생물자원 확보	~~극지 및 해양 유래 희귀 생물자원 확보~~	~~신규 항생물질 또는 항생물질 변형효소 유전자를 가지는 균주개발~~	~~극지/해양 생물자원 1종~~	~~10~~	~~항생물질 생산균주의 탐색, 배양조건 확립 및 물질 분석까지 완료된 균주를 1년차부터 1년에 1종씩 확보~~	~~자체평가 및 자료제시 물질의 유효성 기준: 0.1 mg/ml 농도에서 clear zone 형성~~
			~~극지/해양 미생물 유전체 분석 2종~~	~~10~~			
	항생물질 변형효소의 기능별 카탈로그 구축 (10종 / 총 12 종의 변형 효소)	~~생물자원, 유전체 분석, 항생물질 변형효소의 생화학적 특성 분석, 기존 상용화 효소와의 비교, 항생물질 변형체 개발 관련 논문발표~~	5건	~~20~~	~~1차년도에 3건, 2차년도부터 1년에 5건씩 발표~~	~~SCIE 상위 30% 논문발표 여부~~	-
	항생제 선도물질 및 생산기술 개발	~~항균 또는 항진균 활성을 가지는 신규 항생물질 개발 또는 이의 생산 방법~~	~~2건~~	~~5~~	~~특허등록이 가능한 신규 항생물질을 세부 1팀에서 1건~~	~~특허출원 여부 물질의 유효성 기준: MIC 값, 20ug/ml 이하~~	-

KOPRI 극지연구소

		~~특허 등록~~ (삭제)			~~세부 2팀에서 1건, 세부 3팀에서 2건, 세부 4팀에서 1건 발굴~~		
		항생물질의 분리, 정제 및 구조규명	1건	5	후보물질의 구조 최적화 및 생산성 향상, 세포독성 확인 및 안전성 데이터 확보	자체평가 및 자료제시	쿠마린 합성 화합물 3종의 (GB-20-AB-35, GB-20-AB-37, GB20-AB-38) 항바이러스 효과 확인
	항생물질/타겟 단백질 복합체 특성 분석	항생물질/타겟 단백질 연구 논문 발표	1건	10	2차년도부터 1년에 1건 이상씩 구조적 분석	SCIE 논문발표 여부	cefaclor, cephalexin, or ampicillin 이 각각 결합된 β-lactamase CESS-1 의 복합체 구조 규명 [International Journal of Antimicrobial Agents 63.6 (2024): 107171]
	기술이전 또는 기술실시 1건 이상	기술료 3천만 원~~5천만 원~~ 이상	1건	40	2019년도 출연연구소 기술료 평균치를 적용	수요기업 평가 물질의 유효성 기준: MIC 값, 20ug/ml 이하, 안전성 실험 통과	-

KOPRI 극지연구소

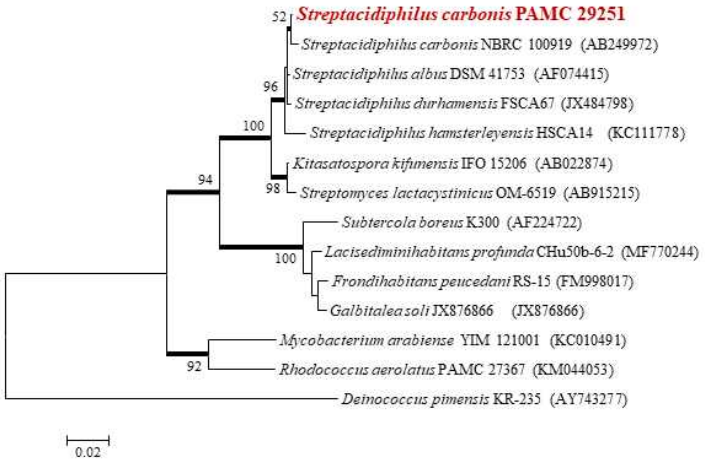
2-2. 연구개발과제의 연차 별 수행 내용

※ 1차년도: 2020년 결과

<1세부> 신규 항생물질 탐색

가. 극지 및 해양 유래 희귀 생물자원 확보

1) Sphaerophorus속 남극 지의류로부터 방선균 *Streptacidiphilus carbonis* PAMC 29251 확보



Streptacidiphilus carbonis PAMC 29251의 16S rRNA 유전자 기반 계통도

- 극지 지의류 추출물 및 극지 미생물(*S. carbonis* PAMC 29251) 배양액 추출물의 항균활성 확인
- 극지 지의류 추출물로부터 분리한 8개의 단일물질의 그람 음성균 (Escherichia coli), 그람 양성균 (Staphylococcus aureus), 진균류 (Candida albicans) 에 대한 항균 활성 실험 결과, S3, S4, S7, S8 물질이 그람 음성균 (Escherichia coli)에 대해 항균활성을 가짐. S1, S2, S3, S7, S8 물질이 그람 양성균 (Staphylococcus aureus)에 대해 항균활성을 가짐. S1, S7 물질이 진균류 (Candida albicans) 에 대한 항균활성을 가짐.
- 항균 활성이 확인 된 S1, S2, S3, S4, S7, S8 물질들에 대한 구조규명 진행 중
- *S. carbonis* PAMC 29251 배양 추출물 중 항균활성을 가지는 물질 규명 및 구조분석 진행 중
- PacBIO를 이용하여 *S. carbonis* PAMC 29251 유전체 확보 및 SMRT Analysis v2.3.0 HGAP.2를 이용하여 pre-assembly, assembly, consensus polishing을 수행함. Glimmer3와 RNAmmer-1.2 그리고 tRNAscan-SE를 이용하여, Gene prediction을 진행하고 Blastall 2.2.26d을 이용하여 annotation을 진행함. 총 2개의 linear contig로 구성되어 있으며, 길이는 각각 약 10 Mbp (Contig-01)와 17 Kbp (Contig-02)로 구성되며, 각각 9,179개의 ORF와 20개의 ORF를 가지고 있음을 확인함 (그림 1). Gene annotation의 결과 중, 항생물질의 생성에 관여할 것으로 보이는 polyketide 유전자 정보 확인함.

표. *Streptacidiphilus carbonis* PAMC 29251 유전체 정보

Data	Contig-01	Contig-02
Format	Linear	Linear
Contig length (bp)	10,088,994	16,908
GC contents (%)	70.96	68.26
Predicted CDS	9,179	20

Predicted	rRNA	24	0
Predicted	tRNA	98	0

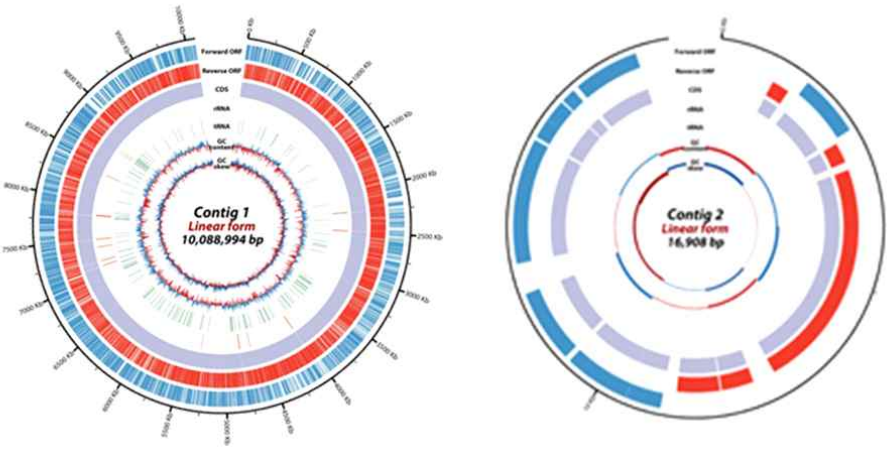


그림. Streptacidiphilus carbonis PAMC 29251 유전체 정보 (좌) Contig-01 유전체 (우) Contig-02 유전체 정보

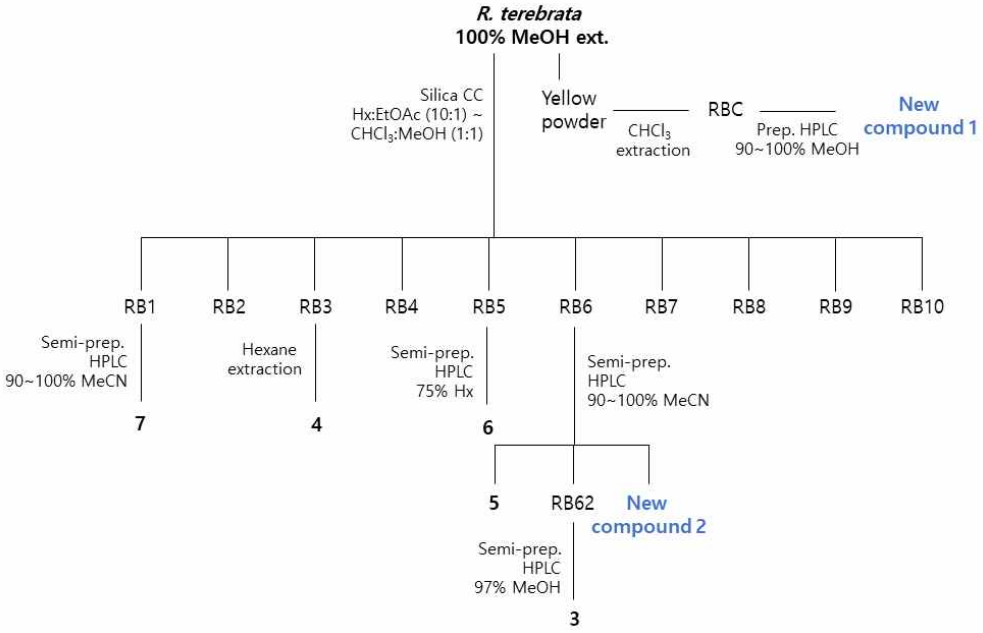
표. Polyketide 합성에 관여하는 유전자

Polyketide related genes	Number
Modular polyketide synthase	3
Polyketide beta-ketoacyl synthase WhiE-KS paralog	2
Polyketide chain length factor WhiE-CLF paralog	2
Polyketide cyclase WhiE II	1
Polyketide cyclase WhiE VII	2
polyketide cyclase/dehydrase	1
Polyketide hydroxylase WhiE VIII	2
Polyketide synthase modules and related proteins	15
Regulator of polyketide synthase expression	1
합계	29

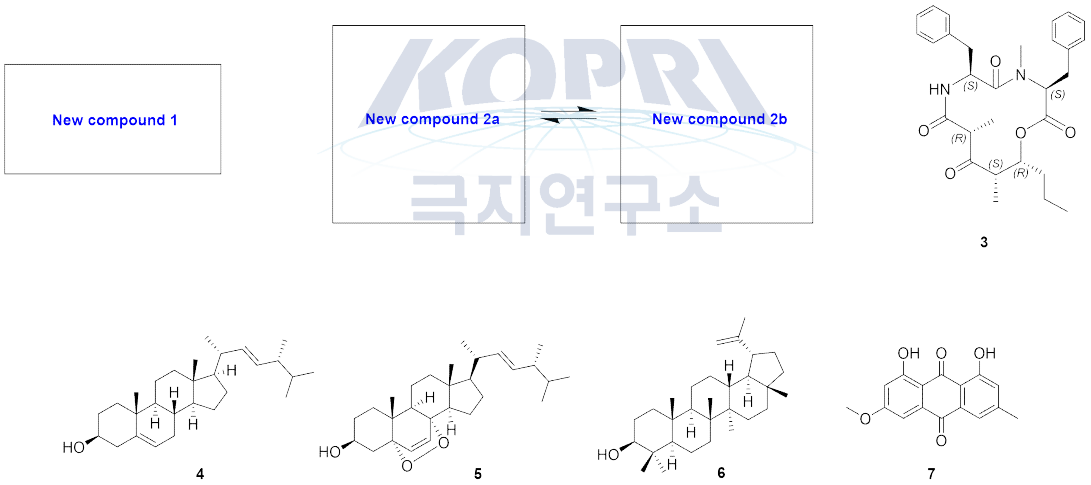
나. 남극 지의류 *Ramalina terebrata*의 성분분석 진행

1) *R. terebrata*로부터 신규 화합물 2 종과 알려진 steroids, triterpenoid 및 phenolic 화합물 분리

- 남극 세종기지에서 기 채집된 지의류 R. terebrata에 대하여 100% MeOH 추출물을 얻은 후, column chromatography 및 HPLC 등 다양한 chromatographic 기법을 이용하여 다음과 같이 총 7 종의 화합물을 분리함.



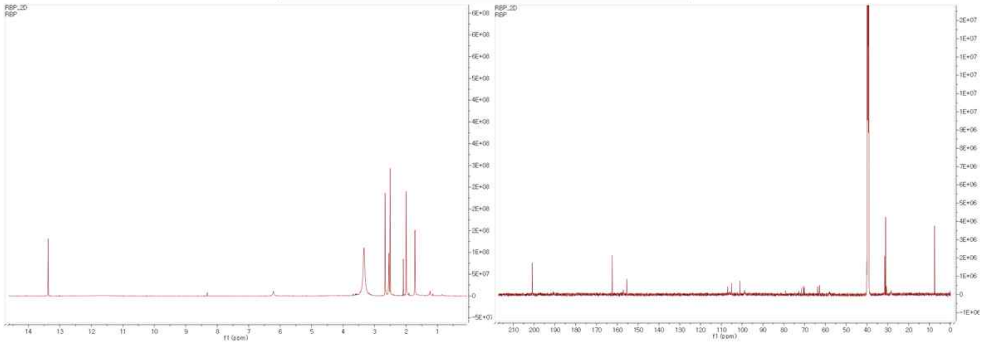
- 분리된 화합물 중 총 2 종의 화합물이 신규 물질로 확인 되었으며, 알려진 물질은 극지 지의류에서 유래한 cyclic depsipeptide로 잘 알려진 stereocalpin A (3), steroid인 brassicasterol (4)과 ergosterol peroxide (5), triterpene인 lupeol (6), 그리고 phenolic 화합물 parietin (7)으로 확인되었음.



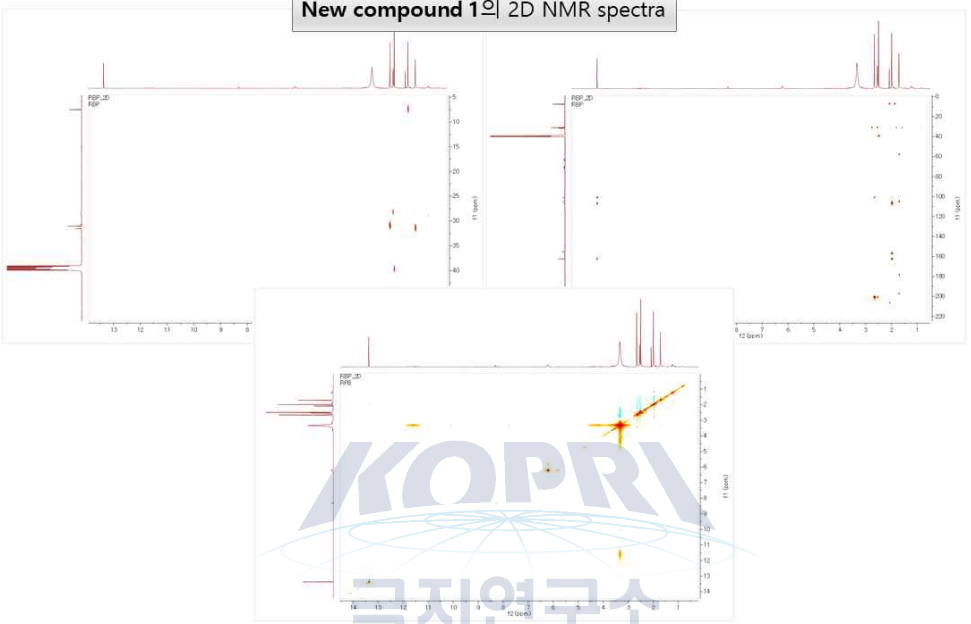
2) 신규 화합물의 구조규명

- 분리된 new compound 1은 dibenzofuran 골격을 가진 화합물로, ^{1}H 및 ^{13}C NMR을 통해 1차적으로 구조를 예측할 수 있었음. 이후에 2D NMR (HSQC, HMBC, NOESY) spectra 분석을 통해 예측한 구조를 확인할 수 있었으며, HR-ESIMS 분석을 통해 분자식을 확인하여 최종적으로 구조를 확정하였음.

New compound 1의 ^{1}H 및 ^{13}C NMR spectra



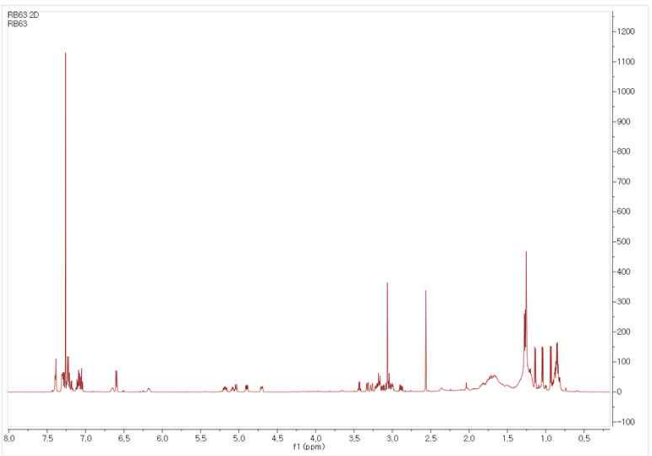
New compound 1의 2D NMR spectra



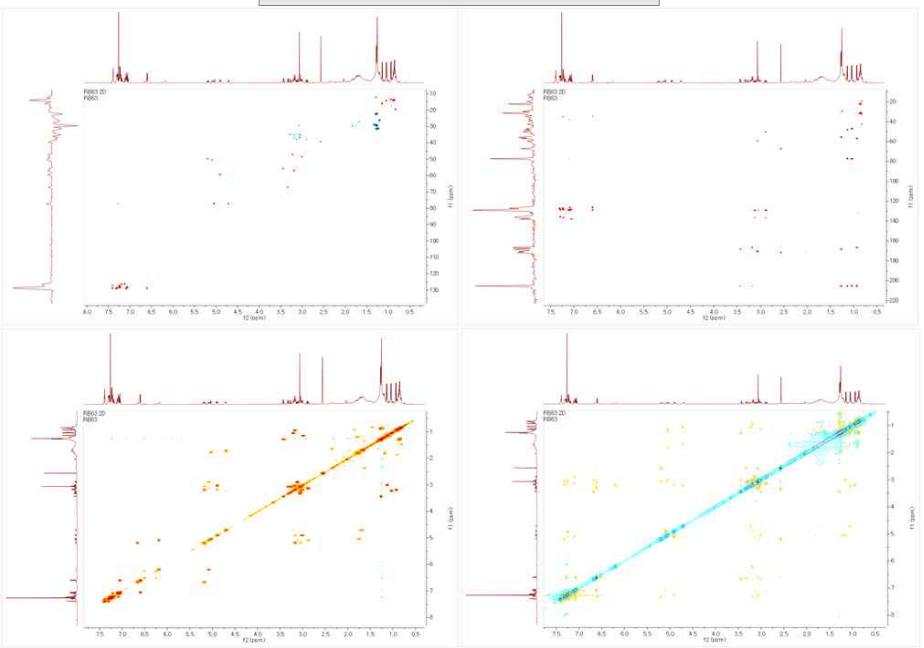
KOPRI 극지연구소

- 분리된 new compound 2는 depsipeptide 골격을 가진 화합물로, ^{1}H NMR을 통해 1차적으로 구조를 예측한 후, 2D NMR (HSQC, HMBC, ^{1}H-^{1}H COSY, NOESY) spectra 분석을 통해 이를 확인할 수 있었고 추가적으로 HR-ESIMS 분석을 통해 분자식을 확인하여 최종적으로 구조를 확정하였음. New compound 2는 rotational isomers 2a와 2b의 혼합물로 존재하며, 이러한 rotameric equilibrium은 NOESY/EXSY spectrum을 통하여 확인하였음.

New compound 2의 ^{1}H NMR spectra



New compound 2의 2D NMR spectra



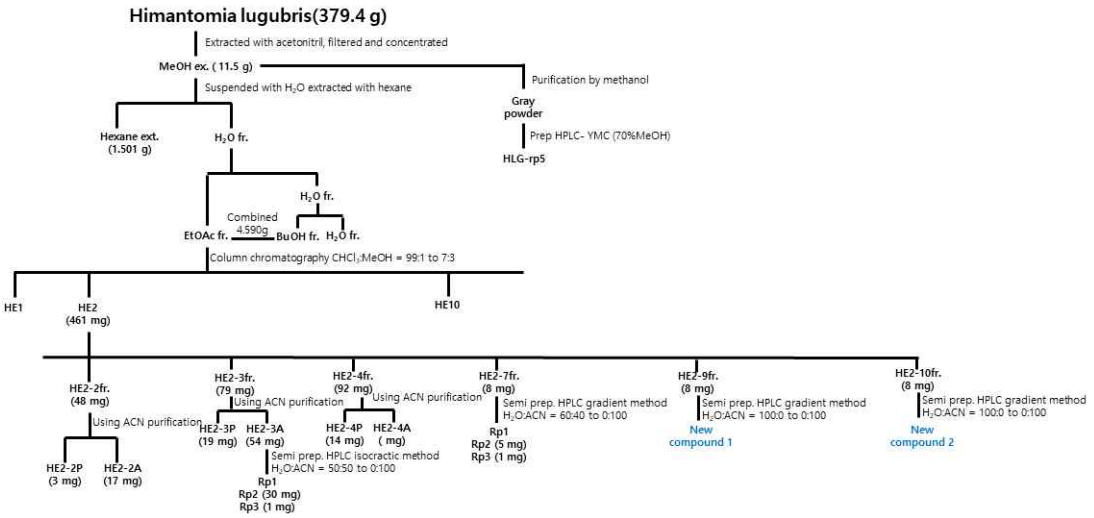
3) 분리된 화합물의 생리활성

- 기존에 보고된 문헌들을 통해 Ramalina 속에 속하는 지의류들이 항생 및 항균 활성을 나타내는 것으로 확인할 수 있었음. 따라서 극지 지의류 R. terebrata로부터 분리한 화합물 1-7에 대하여 추후 항생 및 항균 활성을 평가할 예정임.

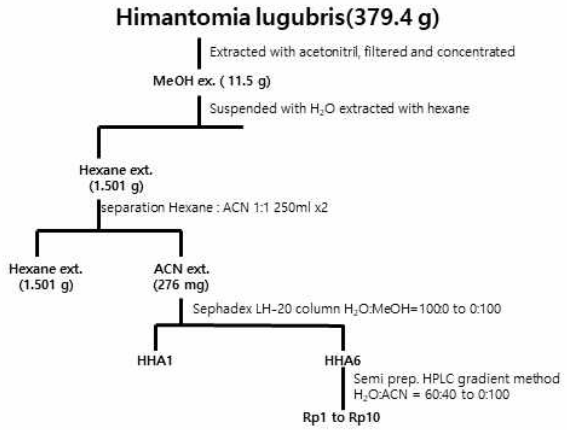
다. 남극 바톤반도 킹조지섬에서 채집된 지의류 *Himantormia lugubris*로부터 항생 및 항균활성 화합물 분리

1) *H. lugubris*로부터 신규 화합물 2 종과 알려진 steroid 및 phenolic 화합물 분리

- *H. lugubris* 100% MeOH 추출물을 얻은 후, column chromatography 및 HPLC 등 다양한 chromatographic 기법을 이용하여 다음과 같이 총 9 종의 화합물을 분리함.

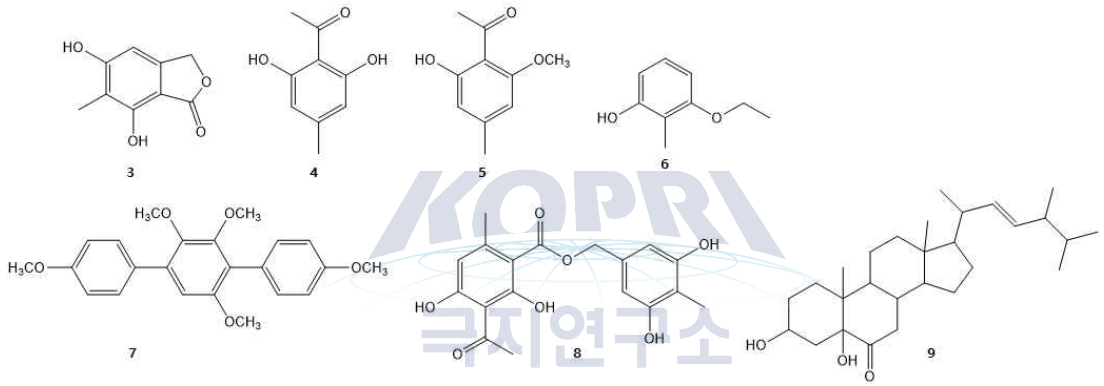


KOPRI 극지연구소



- 분리된 화합물 중 총 2 종의 화합물이 신규 물질로 확인 되었으며, 알려진 물질은 극지 지의류에서 유래한 phenolic 계열의 물질 및 steroid 계열의 물질로 확인되었음.

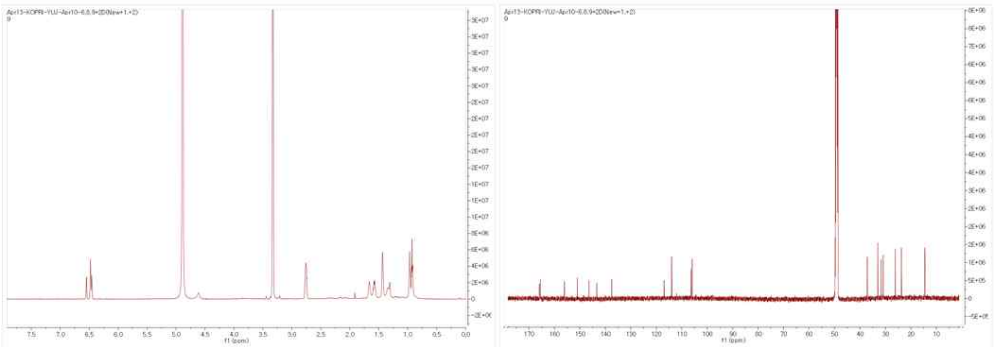
New compound 1 **New compound 2**



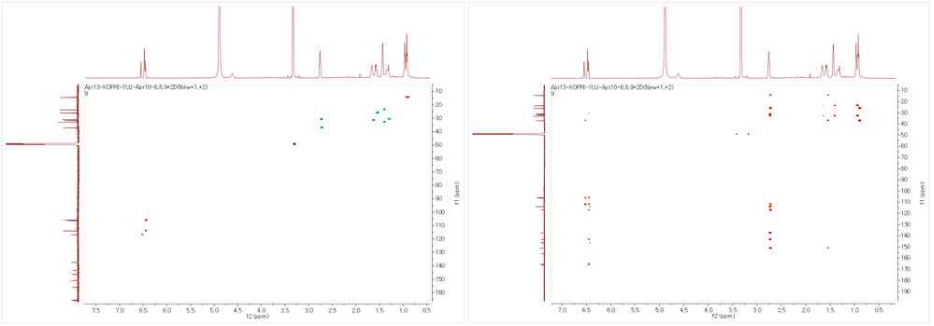
2) 신규 화합물의 구조규명

- 분리된 new compound 1은 depsidone 골격을 가진 화합물로, 1H 및 13C NMR을 통해 1차적으로 구조를 예측하였음. 이후에 2D NMR (HSQC 및 HMBC) spectra 분석을 통해 예측한 구조를 확인할 수 있었으며, HR-ESIMS 분석을 통해 최종적으로 구조를 확정하였음.

New compound 1의 ^{1}H 및 ^{13}C NMR spectra

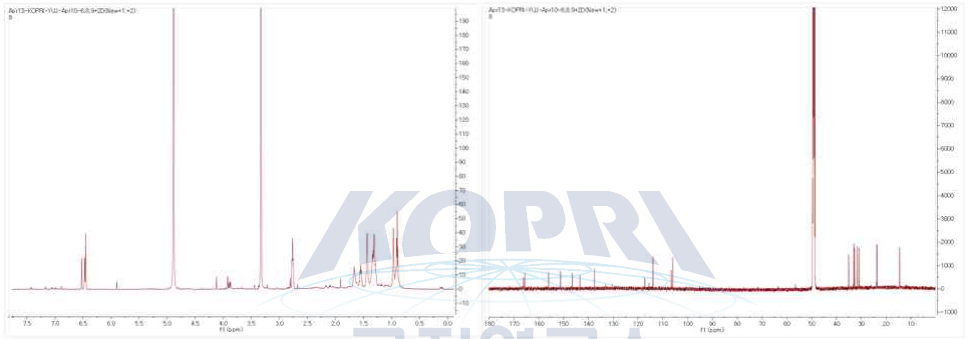


New compound 1의 2D NMR spectra

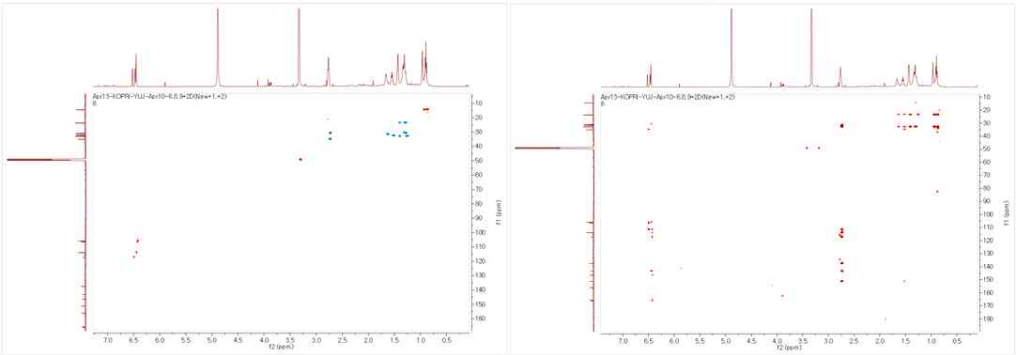


- 분리된 new compound 2 또한 depsidone 골격을 가진 화합물로, 1H 및 13C NMR을 통해 1차적으로 구조를 예측한 후, 2D NMR (HSQC 및 HMBC) spectra 분석을 통해 이를 확인할 수 있었고 추가적으로 HR-ESIMS 분석을 통해 분자식을 확인하여 최종적으로 구조를 확정하였음.

New compound 2의 ^{1}H 및 ^{13}C NMR spectra

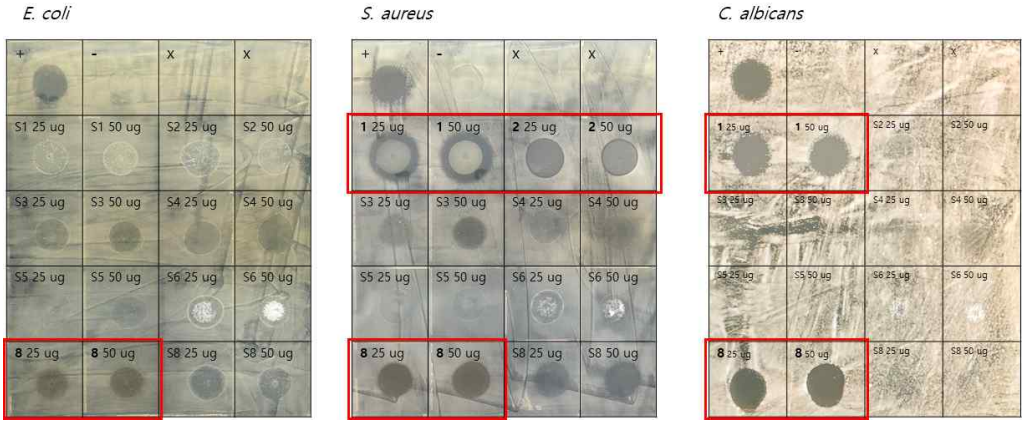


New compound 2의 2D NMR spectra



2) 분리된 화합물의 생리활성

- 항생 및 항균활성 평가를 진행 한 결과 H. lugubris에서 분리된 일부 이차대사물질에서 항생 및 항균 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었음.
- 특히 new compound 1은 S. aureaus와 C. albicans에 대해 강한 활성을 나타냈으며, new compound 2는 S. aureaus에 대해 선택적으로 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었음. 또한 화합물 8은 E. coli, S. aureaus, C. albicans 모두에 대해 억제 활성을 나타내는 것을 볼 수 있었음.



라. 유용 균주 발굴을 위한 해양시료 채집 및 해양미생물 분리, 보관(해양과학기술원)

1) 해양미생물 분리를 위한 시료(해양생물 11종, 퇴적토 31) 채집

2) 채집된 시료로부터 해양미생물 24주 분리 및 보관(표 1)타겟 단백질 결정화 실험

표 1. 2020년 해양미생물 분리를 위한 채집지역, 종류 및 분리된 균주 수

연차	채집지역	채집기간	시료종류		분리된 균수
1차년도 (2020)	독도주변 해역	2020.08.28.~09.01	해양생물 퇴적토	11종 31 점	24주+α

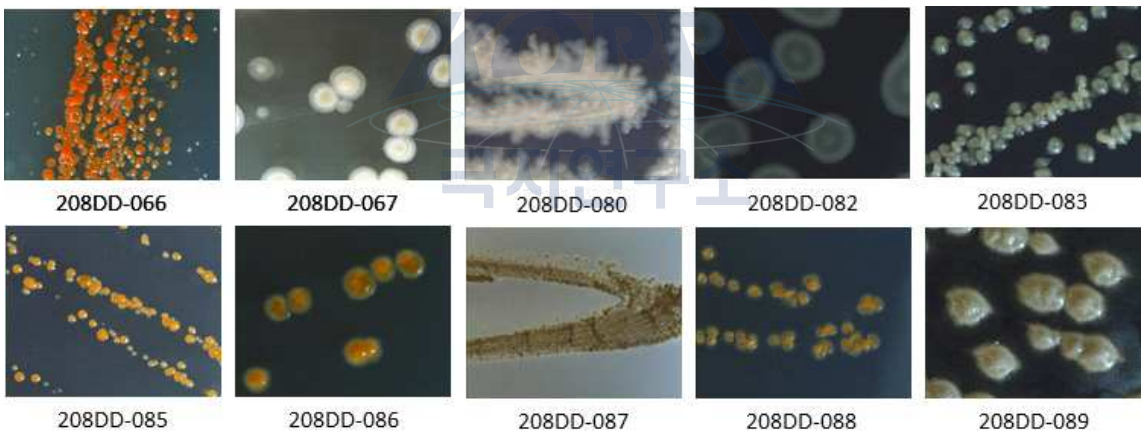


그림 1. 2020년 해양시료로부터 분리된 해양미생물 사진.

3) 추출물에 대한 1H-NMR 분석 및 항균활성 테스트

- 추출물에 대하여 1H-NMR 분석을 통한 유용균주 스크리닝 (그림 2)

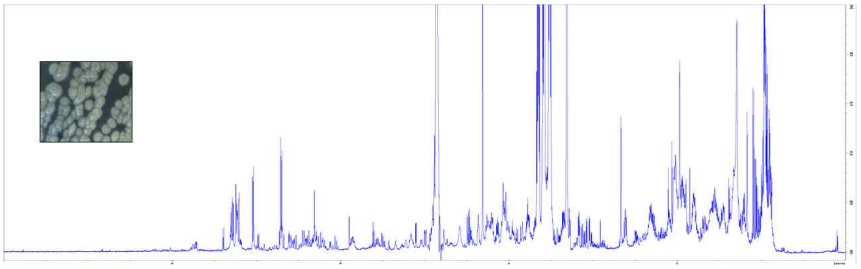


그림 2. 특이한 피크를 보이는 해양미생물 *Streptomyces zhaozhouensis*의 배양추출물의 ^{1}H-NMR 스펙트럼.

- 해양미생물 (199DD-085) 균주의 배양 추출물의 그람 양성균(*Bacillus subtilis*, *Micrococcus*

luteus)에 대한 항균활성 확인

4) 해양미생물 199DD-085 균주의 대량배양 및 신물질 분리, 구조결정

- 해양미생물 199DD-085균주를 70L를 대량배양하여 에틸아세테이트(EA)로 추출하여 조추출물을 얻고 ODS open flash chromatography를 이용하여 분획물을 얻은 후에 20%, 40%, 80%MeOH 분획물로부터 활성물질 분리, 정제.
- 순수하게 분리한 단일물질들의 구조를 1D, 2D NMR, Mass 등의 분광학적 방법을 통하여 7종의 신물질 및 6종의 기지물질의 구조를 규명함 (그림 3).

5) 분리된 단일물질들에 대한 항균활성 측정

- 해양미생물 199DD-085균주를 대량배양 추출물로부터 분리된 단일물질들에 대하여 그람 양성균, 그람음성균에 대하여 항균활성 실험 진행중 (그림 4).

○ 기지물질 13번 화합물이 그람 양성균(Micrococcus luteus)에 대하여 항균활성을 보임 (MIC value = 64 μg/ml) (그림 5)

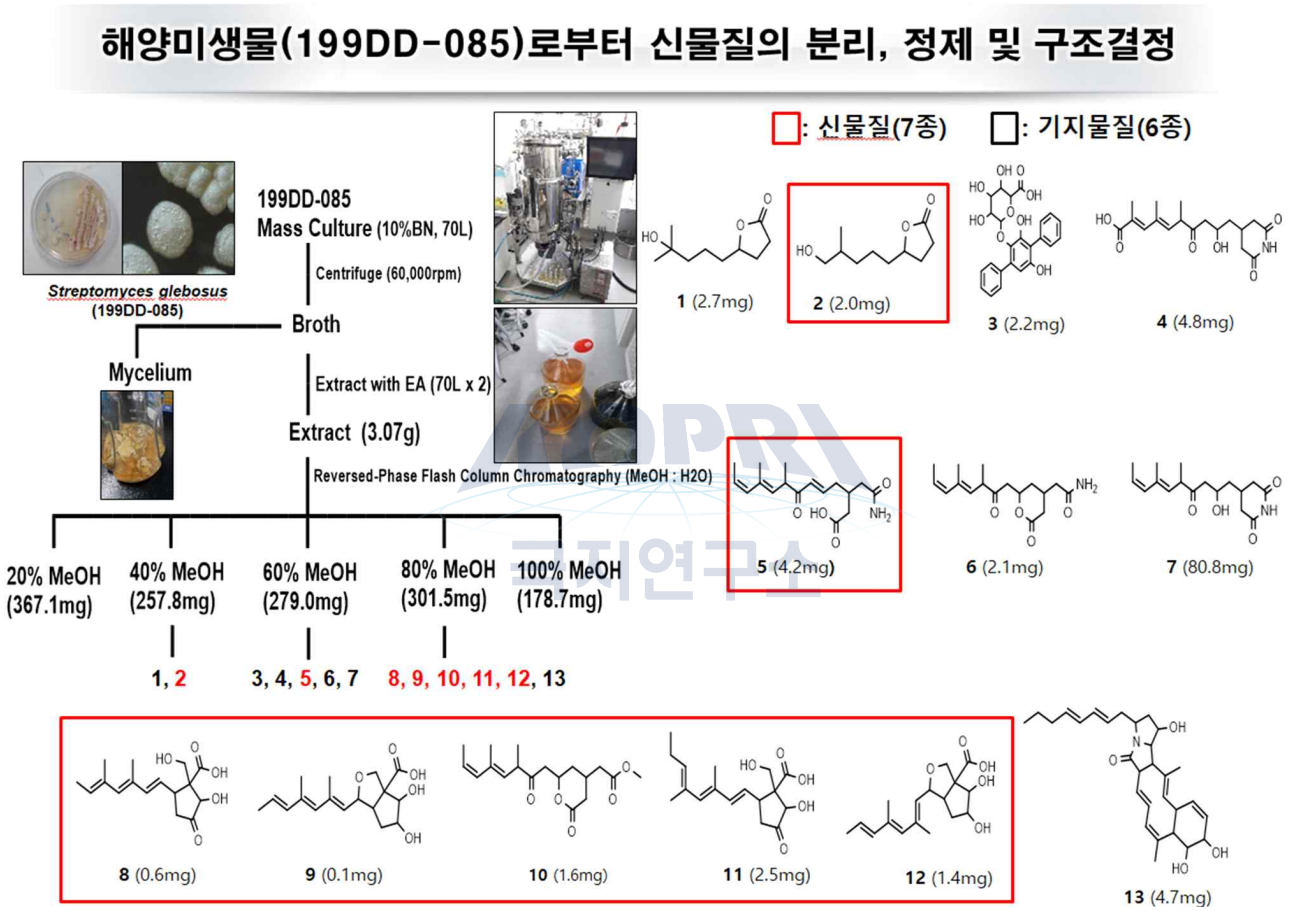


그림 3. 해양미생물 199DD-085균주로부터 활성물질들의 분리, 정제과정 및 이들 물질들의 구조

마. 극지(해양)생물 *Sinularia species* 유래 화합물 (충남대)

1) 극지(해양)생물(*Sinularia brassica*)로부터 신규화합물 4종 및 이차대사산물 16종을 분리함

해양미생물부터 분리된 단일물질의 최소저해농도(MIC) 테스트

MIC (μg/ml)

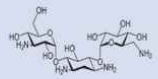
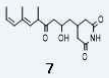
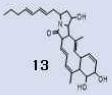
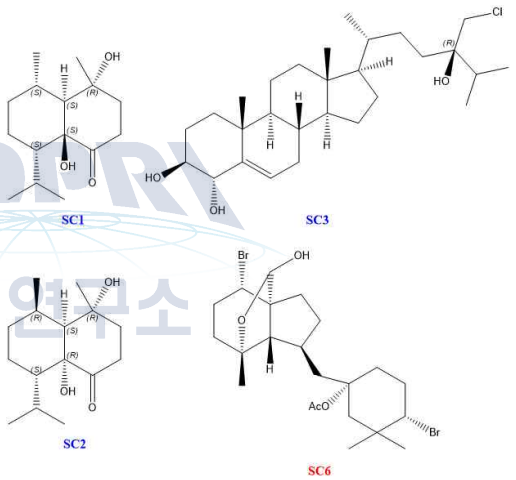
	Bacillus subtilis (Gram-positive)	*Micrococcus luteus* (Gram-positive)	*Escherichia coli* (Gram-negative)	*Klebsiella pneumonia* (Gram-negative)
 Kanamycin	<0.5	4	<0.5	2
 7	>256	>256	>256	>256
 13	256	64	>256	>256

그림 5. 해양미생물 199DD-085균주의 배양추출물에서 분리된 단일물질들의 항균활성 (MIC).

Sinularia brassica May 1898



- 신규화합물 4종: sinulaketol A (1), sinulaketol B (2), (24R)-28-chloroergost-5-ene-3β,4α,24-triol (3), 5α,6α-epoxygorgosterol (4)
- 이차대사산물 16종: nanolobatols A (5), pinnaterpene(6), 24-methylen cholestane-3β,5α,6β-triol-6-monoacetate (7), cholestane-3β,5α,6β-triol-6-monoacetate (8), 7β-hydroxy gorgosterol (9), crassumsterol (10), 24-methylenecholest-4-en- 3β,6β-diol (11), ergosta-5,22-diene-3β,7β-diol (12), 3β,7α-dihydroxyergosta-5,24(28)-diene (13), (3S,23R,24S)-ergost-5-ene-3β,23α,25-triol (14),ent-sinulolide D (15), ergost-24(28)-ene-3β,5α,6β-triol (16), 3β,7β-dihydroxyergosta-5,24(28)-diene (17), ent-sinulolide C (18), butenolide (19), (Z)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-3-methyldodec-2-enamid (20)
- 절대구조 규명: ECD 및 DP4 분석을 통하여 신규화합물 4종(1-4)의 절대구조 결정
- 항균활성 평가(주관기관 극지연구소): SC6의 그람 양성균(Staphylococcus aureus)에 대한 항균활성 확인

2) 신규화합물 4종의 화학구조 결정

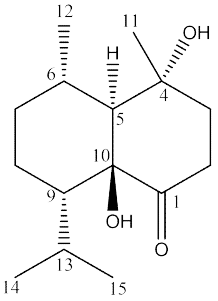
- 신규화합물 1

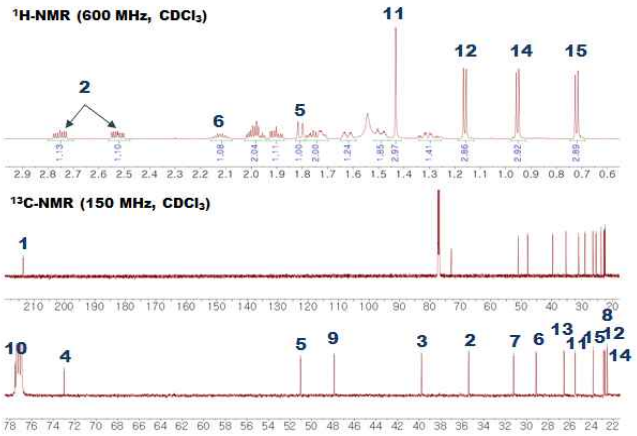
○ HRESIMS [M+Na]+ m/z 277.1782 (calculated for C15H26O3Na 277.1780)

○ 1H-NMR spectrum에서 isopropyl group(δH 1.76, m, H-13; δH 0.95 and 0.72, each d, J

= 6.5 Hz, H-14 and H-15)과 두 개의 methyl groups(δH 1.43, s, H-11; δH 1.16, d, J = 6.5 Hz, H-12)이 관찰됨

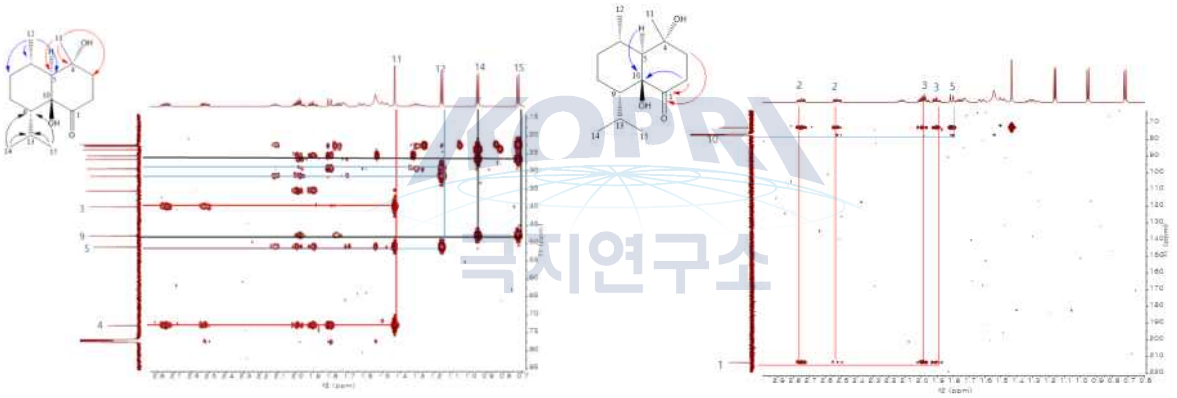
○ 13C-NMR spectrum에서 한 개의 ketone group(δC 213.5, C-1)과 두 개의 quaternary oxygenated carbons(δC 72.9, 77.5, C-4 and C-10)을 포함한 15개의 시그널이 관찰됨





○ 2D-NMR(HSQC, HMBC, COSY)의 특징적인 신호를 통해 신규화합물 1의 평면구조 규명하고 sesquiterpene임을 예측함

○ coupling constants, NOE correlations 및 ECD 분석을 통하여 신규화합물 1의 입체구조를 4R*, 5S*, 6S*, 9S*, 10S*으로 규명하고 sinulaketol A로 명명함

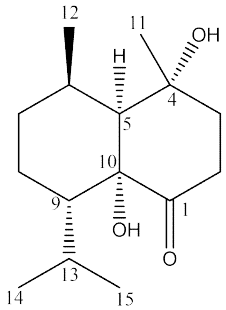


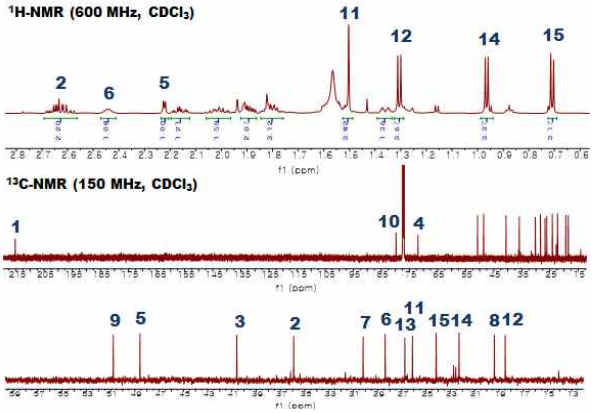
- 신규화합물 2

○ HRESIMS [M+Na]+ m/z 277.1782 (calculated for C15H26O3Na 277.1780)

○ 1H-NMR 및 13C-NMR 분광분석을 통해 신규화합물 2가 sinulaketol A(신규화합물 1)와 동일한 sesquiterpene임을 예측함

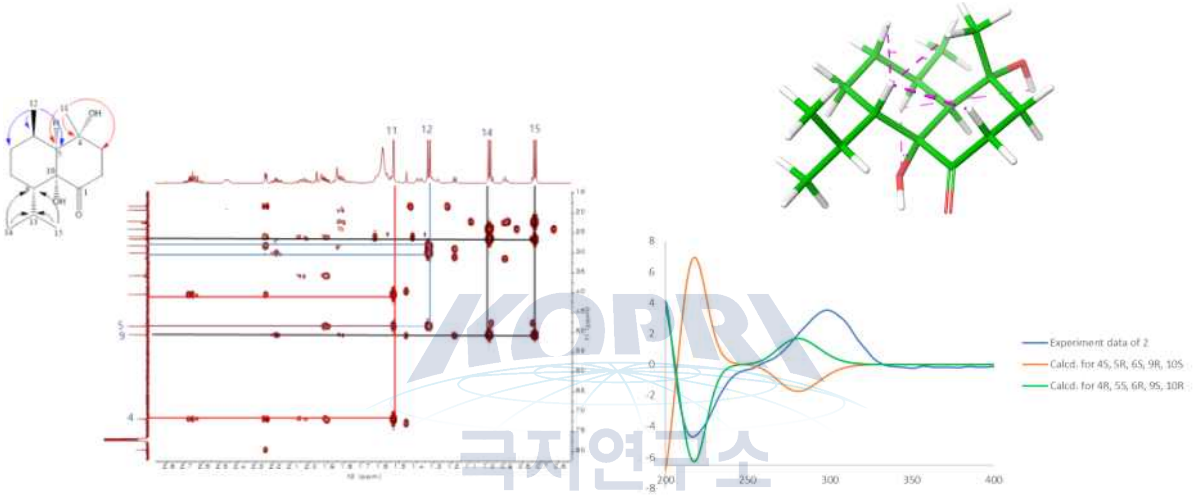
KOPRI 극지연구소





○ 2D-NMR(HMBC 및 COSY) spectroscopic data 분석을 통해 평면구조를 규명하고 NOE correlations을 통해 상대구조를 결정함

○ ECD 분석을 통해 신규화합물 2의 절대구조를 4R*, 5S*, 6R*, 9S*, 10R*으로 규명하고 sinulaketol B로 명명함

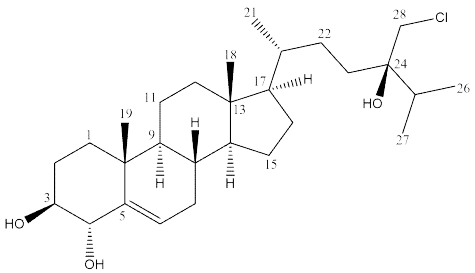


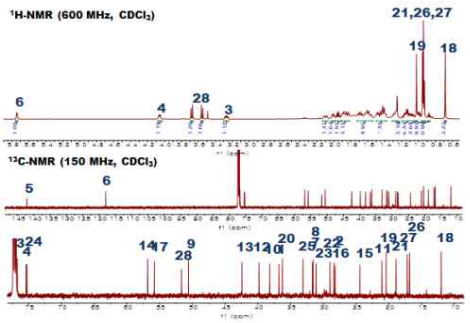
KORRI 극지연구소

- 신규화합물 3

○ HRESIMS [M+Na]+ m/z 489.3110 (calculated for C28H47ClNaO3 489.3106)

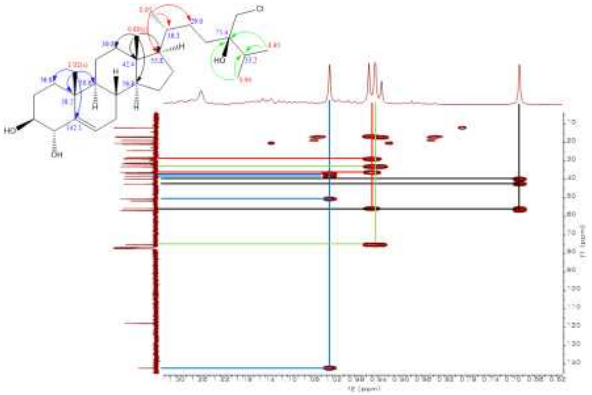
○ 1H-NMR spectrum에서 한 개의 olefinic proton(δH 5.74, dt, J = 2.1, 4.9 Hz, H-6)과 chlorinated methylene(δH 3.68, d, J = 11.2 Hz, H-28a; δH 3.56, d, J = 11.2 Hz, H-28b)이 관찰됨

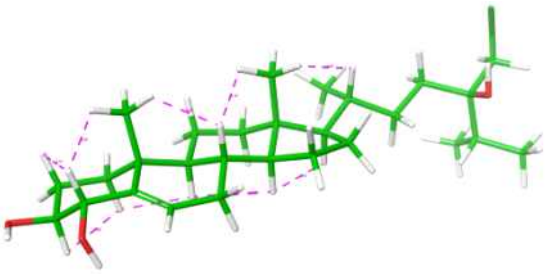


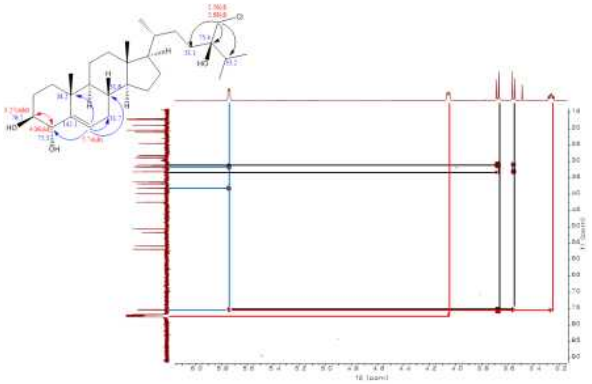


○ 13C-NMR 및 HSQC 분광분석을 통해 5개 methyls, 10개 methylenes, 9개 methines 그리고 4개의 quaternary carbons 포함한 28개의 시그널을 기반으로 신규화합물 3 ergostane-type steroid 화합물임을 예측함

○ coupling constants, NOE correlations, ECD 및 DP4+ 분석을 통하여 신규화합물 3의 입체구조를 24R로 규명하고 (24R)-28-chloroergost-5-ene-3β,4α,24-triol로 명명함





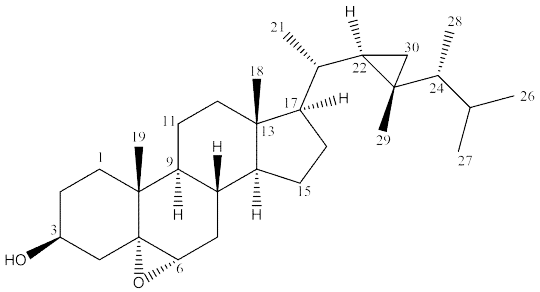


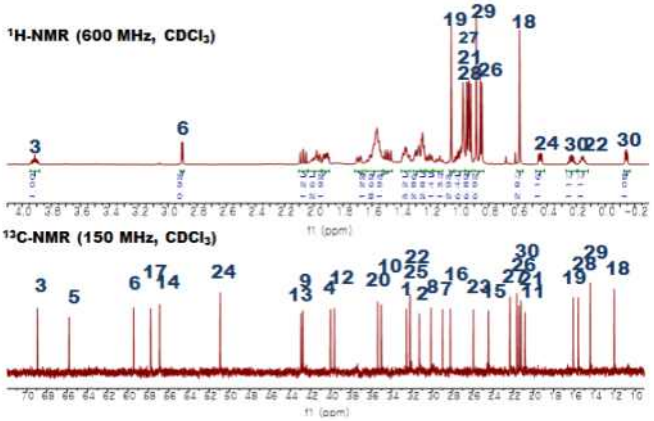
	Isomer 24S	Isomer 24R
sDP4+ (H data)	0.25%	99.75%
sDP4+ (C data)	12.83%	87.17%
sDP4+ (all data)	0.04%	99.96%
uDP4+ (H data)	0.39%	99.61%
uDP4+ (C data)	2.53%	97.47%
uDP4+ (all data)	0.01%	99.99%
DP4+ (H data)	0.00%	100.00%
DP4+ (C data)	0.38%	99.62%
DP4+ (all data)	0.00%	100.00%

- 신규화합물 4

○ HRESIMS [M+Na]+ m/z 465.3705 (calculated for C30H50NaO2 465.3709)

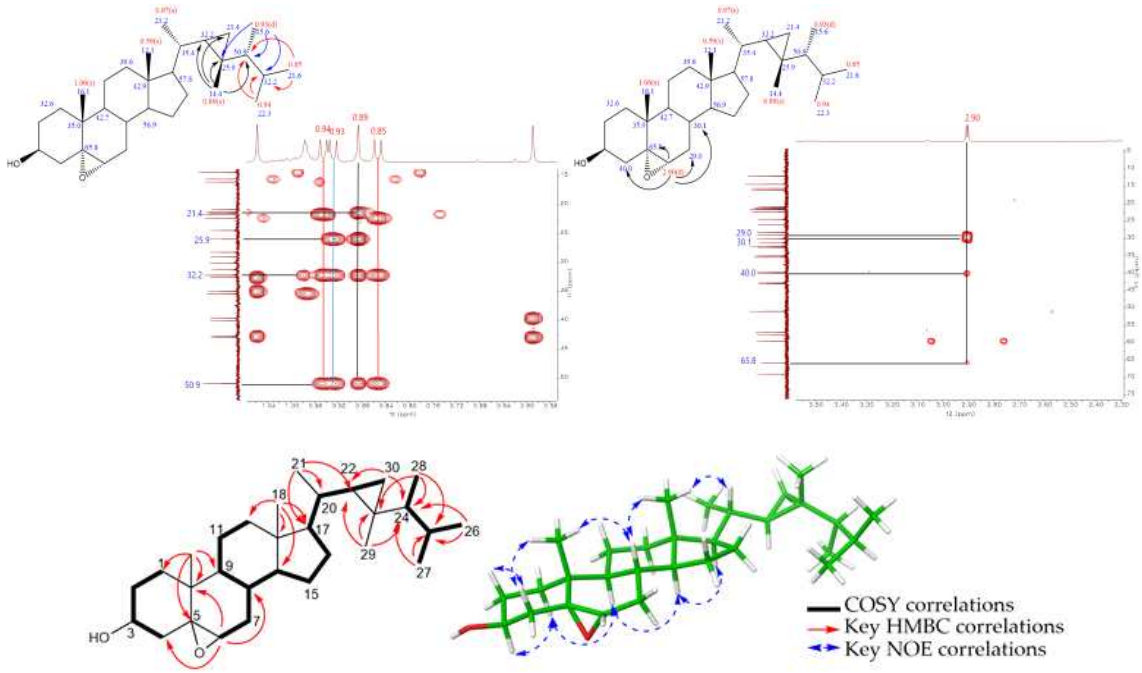
○ 1H-NMR spectrum에서 특징적인 chemical shifts(δH –0.14, dd, J = 5.9, 4.3 Hz, Ha-30; 0.16, td, J = 8.6, 5.7 Hz, H-22; 0.23, dq, J = 9.0, 6.9 Hz, H-24; 0.45, dd, J = 9.1, 4.3 Hz, Hb-30)가 관찰되어 신규화합물 4가 cyclopropyl 고리를 갖는 gorgosterol 화합물임을 예측함





○ 2D-NMR(HMBC) spectroscopic data 분석을 통해 H-6과 C-4/C-7/C-8의 correlations을 확인하여 epoxy bridge(C-5 와 C-6 사이)의 존재를 규명함

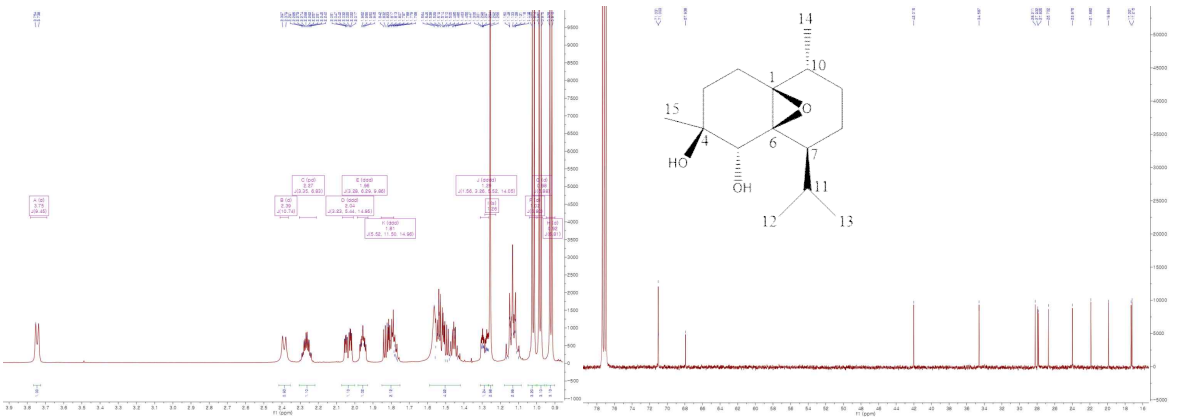
○ coupling constants, NOE correlations 및 ECD 분석을 통해 신규화합물 4의 입체구조를 결정하고 5α,6α-epoxygorgosterol로 명명함



3) 기지물질 16종의 화학구조 결정

- Nanolobatols A (5)

○ $[a]_D^{25}$ +27.1 (c 0.1, $CHCl_3$); ^1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H 3.75 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-5), 2.39 (1H, d, J = 10.7 Hz, 4-OH), 2.27 (1H, pd, J = 6.8, 3.3 Hz, H-11), 2.04 (1H, ddd, J = 15.0, 5.4, 3.2 Hz, H-2a), 1.96 (1H, ddd, J = 9.9, 6.3, 3.3 Hz, H-7), 1.81 (1H, ddd, J = 15.0, 11.5, 5.5 Hz, H-2b), 1.79 (1H, m, H-10), 1.55 (1H, m, H-8b), 1.51 (1H, m, H-3b), 1.45 (1H, m, H-9b), 1.29 (1H, dddd, J = 14.0, 5.5, 3.3, 1.6 Hz, H-3a), 1.26 (3H, s, H-15), 1.14 (1H, m, H-8a), 1.12 (1H, m, H-9a), 1.02 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-14), 0.98 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-13), 0.92 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-12). ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C 71.0 (C-1, C-5), 71.0 (C-4), 67.9 (C-6), 42.0 (C-7), 34.6 (C-10), 28.2 (C-11), 27.9 (C-3), 27.8 (C-9), 26.7 (C-15), 24.0 (C-2), 21.9 (C-13), 19.9 (C-8), 17.3 (C-14), 17.2 (C-12).

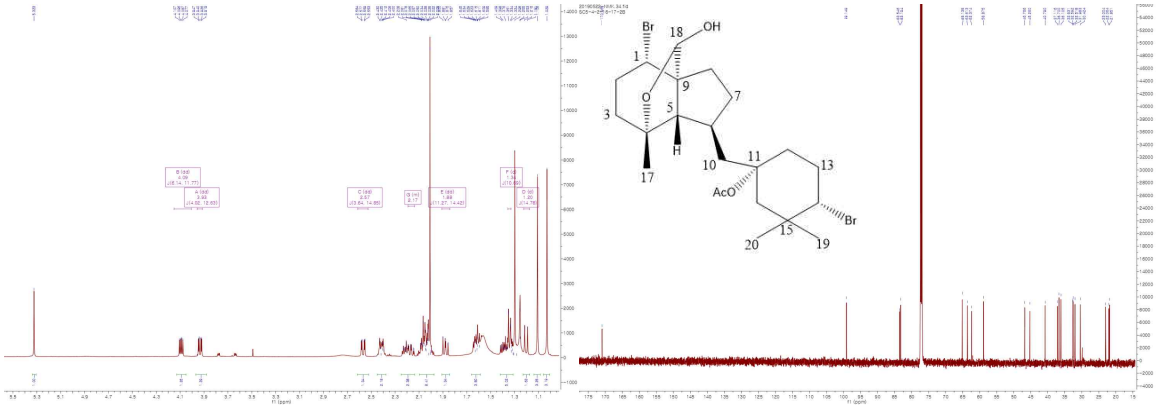


NMR spectroscopic data of compound 5

- Pinnaterpene C (6)

○ $[a]_D^{25}$ +8.0 (c 0.1, $CHCl_3$); ^1H NMR (600MHz, $CDCl_3$) δ_H 5.32 (1H, s, H-18), 4.09 (1H, dd, J = 11.8, 6.1 Hz, H-1), 3.93 (1H, dd, J = 12.6, 4.0 Hz, H-14), 2.57 (1H, dd, J = 14.8, 3.6 Hz, H-16a), 2.41 (1H, m, H-6), 2.40 (1H, m, H-12b), 2.23 (2H, overlap, H-2b,

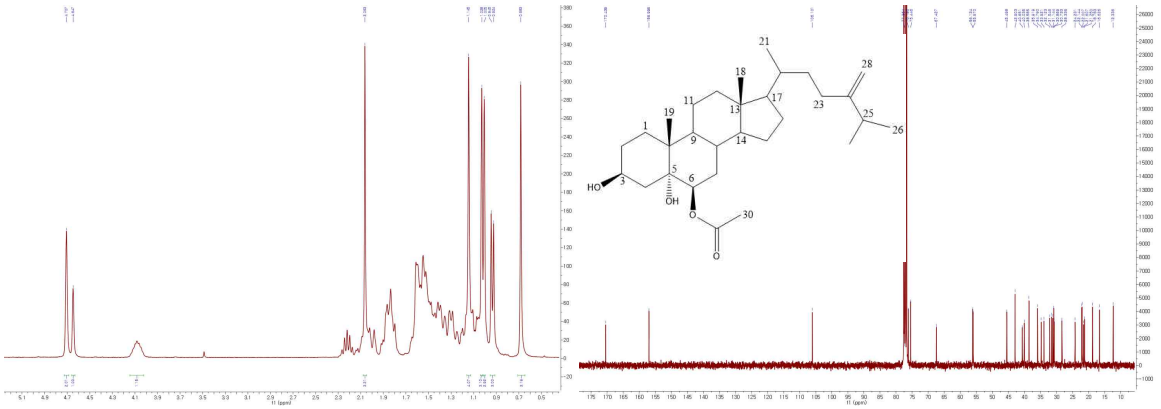
H-10b), 2.20 (1H, m, H-13b), 2.08-2.02 (3H, overlap, H-2a, H-7b, H-13a), 2.02 (3H, s, acetyl), 1.88 (1H, dd, J = 14.4, 11.3 Hz, H-10a), 1.62 (1H, m, H-3b), 1.60 (1H, m, H-8b), 1.40 (1H, m, H-3a), 1.35 (1H, m, H-12a), 1.34 (1H, d, J = 10.7 Hz, H-5), 1.33 (2H, overlap, H-7a, H-8a), 1.29 (3H, s, H-17), 1.20 (1H, d, J = 14.8 Hz, H-16b), 1.11 (3H, s, H-19), 1.03 (3H, s, H-20). ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C 170.9 (-COO-), 99.1 (C-18), 83.5 (C-11), 83.2 (C-4), 65.1 (C-14), 63.6 (C-5), 62.4 (C-9), 58.9 (C-1), 46.8 (C-16), 45.3 (C-10), 40.8 (C-3), 37.1 (C-12), 36.7 (C-15), 36.1 (C-6), 32.6 C-2), 32.6 (C-7), 32.6 (C-20), 32.0 (C-8), 30.4 (C-13), 23.0 (C-22), 22.1 (C-17), 21.8 (C-19).



NMR spectroscopic data of compound 6

- 24-methylen cholestane-3β,5α,6β-triol-6-monoacetate (7)

○ $[a]_D^{25}$ -32.4 (c 0.1, $CHCl_3$); ^{1}H NMR (300MHz, $CDCl_3$) δ_H 4.71 (2H, br s, H-6, H-28a), 4.65 (1H, brs, H-28b), 4.08 (1H, m, H-3), 2.22 (1H, m, H-25), 2.08 (1H, m, H-23b), 2.06 (3H, s, actetyl), 1.15 (3H, s, H-19), 1.01 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-26), 1.01 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-27), 0.93 (3H, d, J = 6.3 Hz, H-21), 0.68 (3H, s, H-18). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 170.4 (-COO-), 157.0 (C-24), 106.1 (C-28), 76.2 (C-6), 75.5 (C-5), 67.4 (C-3), 56.1 (C-17), 56.0 (C-14), 45.5 (C-9), 42.9 (C-13), 40.6 (C-4), 40.0 (C-12), 38.6 (C-10), 35.9 (C-20), 34.8 (C-22), 33.9 (C-25), 32.1 (C-1), 31.1 (C-23), 30.9 (C-2), 30.7 (C-8), 28.3 (C-16), 24.2 (C-15), 22.1 (C-27), 22.0 (C-26), 21.6 (C-11), 21.2 (C-30), 18.8 (C-21), 16.6 (C-19), 12.3 (C-18).

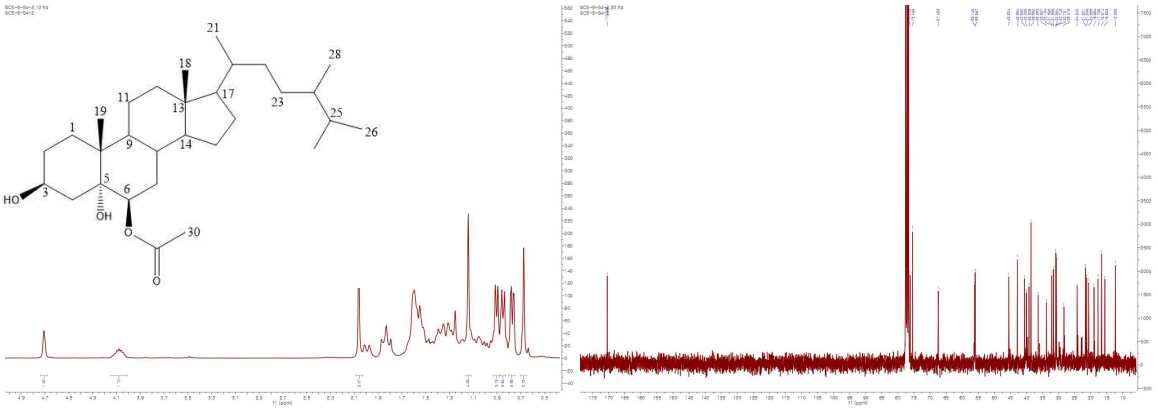


NMR spectroscopic data of compound 7

- Cholestane-3β,5α,6β-triol-6-monoacetate (8)

○ $[a]_D^{25}$ -56.0 (c 0.1, $CHCl_3$); ^{1}H NMR (300MHz, $CDCl_3$) δ_H 4.71 (1H, br s, H-6), 4.08 (1H, m, H-3), 2.01 (3H, s, actetyl), 1.14 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, s, H-21), 0.85 (3H, d, J =

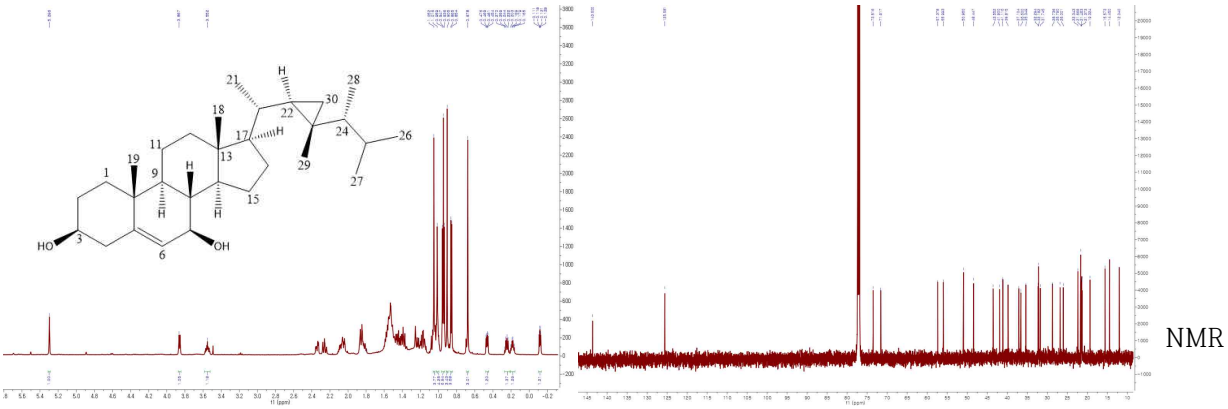
6.9 Hz, H-26), 0.77 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-26), 0.76 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-28), 0.68 (3H, s, H-18). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 170.4 (-COO-), 76.2 (C-6), 75.4 (C-5), 67.4 (C-3), 56.1 (C-17), 56.0 (C-14), 45.5 (C-9), 42.9 (C-13), 40.6 (C-4), 40.0 (C-12), 39.2 (C-24), 38.6 (C-10), 36.4 (C-20), 33.8 (C-22), 32.1 (C-1), 31.6 (C-25), 30.9 (C-2), 30.7 (C-8), 30.7 (C-23), 28.3 (C-16), 24.2 (C-15), 21.6 (C-11), 21.2 (C-30), 20.6 (C-26), 19.0 (C-21), 17.7 (C-27), 16.6 (C-19), 15.6 (C-28), 12.3 (C-18).



NMR spectroscopic data of compound 8

- 7β-hydroxy gorgosterol (9)

○ $[a]_D^{25}$ -105.2 (c 0.1, $CHCl_3$); ^{1}H NMR (600MHz, $CDCl_3$) δ_H 5.30 (1H, t, J = 1.9 Hz H-6), 3.86 (1H, br d, J = 7.9 Hz, H-7), 3.55 (1H, m, H-3), 2.34 (1H, ddd, J = 13.4, 5.0, 2.1 Hz, H-4a), 2.26 (1H, ddd, J = 13.4, 11.4, 2.2 Hz, H-4b), 1.05 (3H, s, H-19), 1.02 (3H, s, H-21), 0.95 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-27), 0.94 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-28), 0.91 (3H, s, H-29), 0.86 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-26), 0.68 (3H, s, H-18), 0.46 (1H, dd, J = 9.0, 4.3 Hz, H-30b), 0.25 (1H, m, H-24), 0.18 (1H, m, H-22), -0.12 (1H, dd, J = 5.8, 4.4 Hz, H-30a). ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C 143.6 (C-5), 125.6 (C-6), 73.5 (C-7), 71.6 (C-3), 57.4 (C-17), 56.0 (C-14), 51.0 (C-24), 48.4 (C-9), 43.5 (C-13), 41.9 (C-4), 41.1 (C-8), 39.8 (C-12), 37.1 (C-1), 36.6 (C-10), 35.3 (C-20), 32.3 (C-22), 32.2 (C-25), 31.7 (C-2), 28.7 (C-16), 26.8 (C-15), 26.0 (C-23), 22.3 (C-27), 21.7 (C-30), 21.5 (C-21), 21.4 (C-11), 19.3 (C-19), 15.6 (C-28), 14.4 (C-29), 12.0 (C-18).

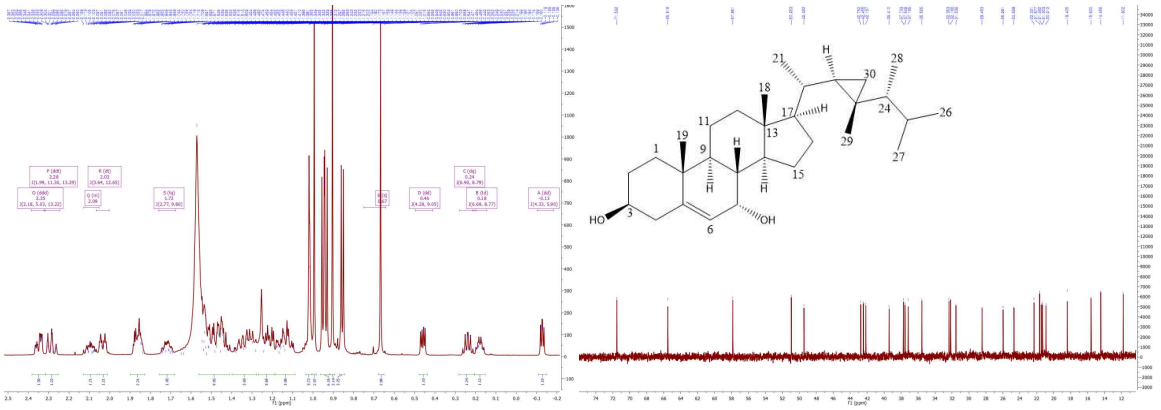


NMR spectroscopic data of compound 9

- Crassumsterol (10)

○ $[a]_D^{25}$ -85.6 (c 0.1, $CHCl_3$); ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H 5.61 (1H, dd, J = 5.3, 1.9 Hz, H-6), 3.86 (1H, br s, H-7), 3.59 (1H, tt, J = 11.2, 4.6 Hz, H-3), 2.35 (1H, ddd, J = 13.2, 5.0, 2.2 Hz, H-4a), 2.28 (1H, ddd, J = 13.2, 11.3, 2.0 Hz, H-4b), 1.05 (3H, s,

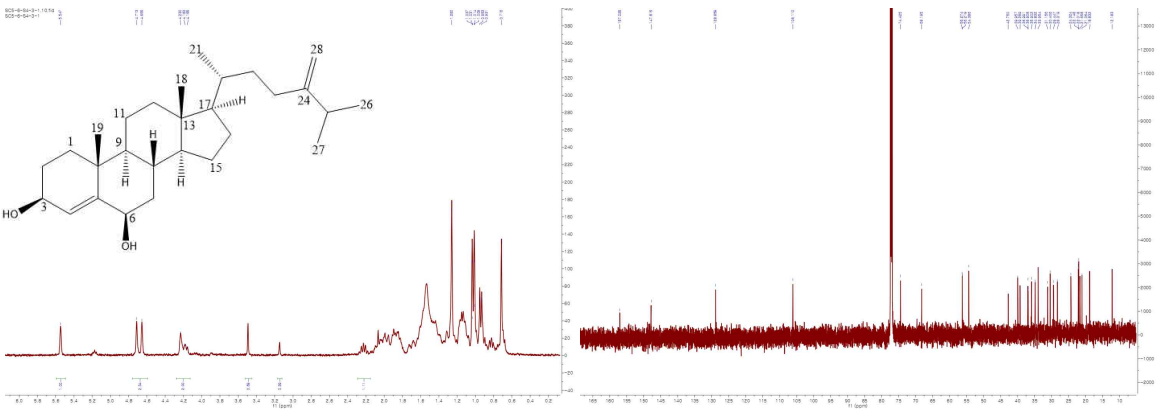
H-19), 1.02 (3H, s, H-21), 0.95 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-27), 0.94 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-28), 0.91 (3H, s, H-29), 0.86 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-26), 0.68 (3H, s, H-18), 0.46 (1H, dd, J = 9.0, 4.3 Hz, H-30b), 0.25 (1H, dq, J = 8.8, 6.9 Hz, H-24), 0.18 (1H, td, J = 8.8, 6.7 Hz, H-22), -0.12 (1H, dd, J = 5.8, 4.4 Hz, H-30a). ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C 146.4 (C-5), 124.0 (C-6), 71.5 (C-3), 65.5 (C-7), 57.8 (C-17), 49.5 (C-14), 50.9 (C-24), 42.7 (C-9), 42.2 (C-13), 42.4 (C-4), 37.5 (C-8), 39.4 (C-12), 37.2 (C-1), 37.8 (C-10), 35.5 (C-20), 32.3 (C-22), 32.2 (C-25), 31.5 (C-2), 28.4 (C-16), 24.7 (C-15), 26.0 (C-23), 22.3 (C-27), 21.7 (C-26), 21.5 (C-30), 21.3 (C-21), 20.9 (C-11), 18.4 (C-19), 15.6 (C-28), 14.5 (C-29), 11.8 (C-18).



NMR spectroscopic data of compound 10

- 24-methylenecholest-4-en-3β,6β-diol (11)

○ $[a]_D^{25}$ +25.3 (c 0.1, $CHCl_3$); ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H 5.54 (1H, br s, H-4), 4.71 (1H, br s, H-28a), 4.65 (1H, br s, H-28a), 4.23 (1H, br t, J = 2.8 Hz, H-6), 4.18 (1H, m, H-3), 2.23 (1H, m, H-23), 1.26 (3H, s, H-19), 1.03 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-26), 1.02 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-27), 0.94 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-21), 0.72 (3H, s, H-18). ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C 157.0 (C-24), 147.8 (C-5), 128.9 (C-4), 106.1 (C-28), 56.3 (C-17), 56.2 (C-14), 54.4 (C-19), 42.7 (C-13), 40.0 (C-7), 39.3 (C-10), 37.0 (C-1), 36.9 (C-12), 35.9 (C-20), 34.8 (C-22), 33.9 (C-25), 31.1 (C-8), 30.4 (C-23), 29.4 (C-2), 28.3 (C-16), 24.3 (C-15), 22.1 (C-26), 22.0 (C-27), 21.7 (C-11), 21.1 (C-19), 18.8 (C-21), 12.2 (C-18).

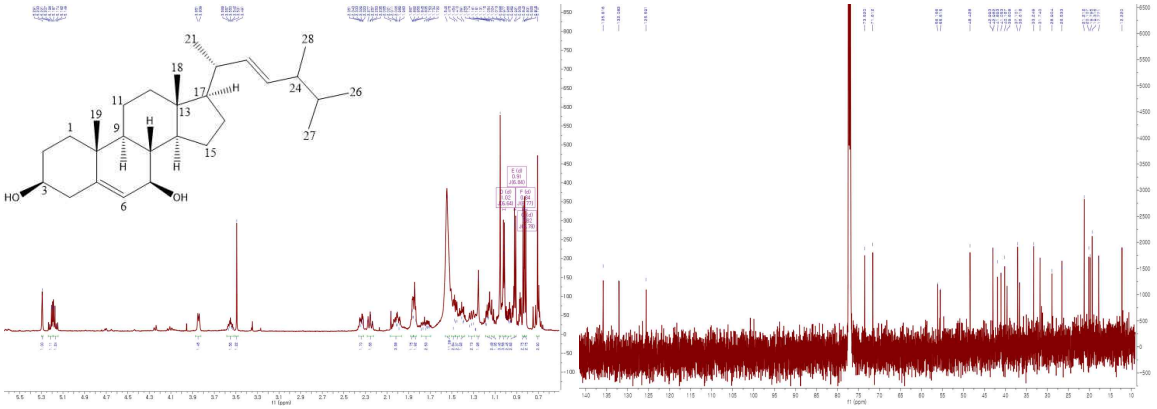


NMR spectroscopic data of compound 11

- Ergosta-5,22-diene-3β,7β-diol (12)

○ $[a]_D^{25}$ -140.7 (c 0.1, $CHCl_3$); ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H 5.29 (1H, br s, H-6), 5.21 (1H, dd, J = 15.2, 7.1 Hz, H-22), 5.17 (1H, dd, J = 15.3, 7.8 Hz, H-23), 3.84 (1H, br d,

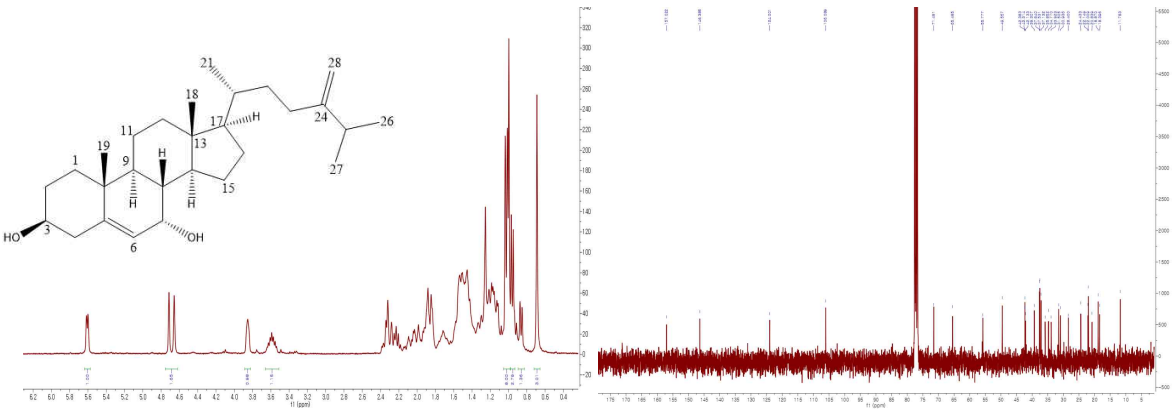
J = 7.7 Hz, H-7), 3.55 (1H, m, H-3), 1.05 (3H, s, H-19), 1.02 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-21), 0.91 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-28), 0.84 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-26), 0.82 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-27), 0.71 (3H, s, H-18). ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C 135.8 (C-22), 132.1 (C-23), 125.6 (C-6), 73.5 (C-7), 71.6 (C-3), 56.2 (C-17), 55.5 (C-14), 48.4 (C-9), 43.0 (C-24), 43.0 (C-13), 41.9 (C-4), 41.0 (C-8), 40.2 (C-20), 39.6 (C-12), 37.1 (C-1), 36.6 (C-10), 33.2 (C-25), 31.7 (C-2), 28.9 (C-16), 26.5 (C-15), 21.2 (C-21), 20.1 (C-26), 19.8 (C-27), 19.3 (C-19), 17.8 (C-28), 12.2 (C-18).



NMR spectroscopic data of compound 12

- 3β,7α-dihydroxyergosta-5,24(28)-diene (13)

○ $[a]_D^{25}$ -87.0 (c 0.1, $CHCl_3$); ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 5.61 (1H, br d, J = 5.1 Hz, H-6), 4.71 (1H, br s, H-28a), 4.66 (1H, br s, H-28b), 3.85 (1H, br s, H-7), 3.59 (1H, m, H-3), 1.03 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-26), 1.02 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-27), 0.99 (3H, s, H-19), 0.96 (3H, d, J = 6.3 Hz, H-21), 0.69 (3H, s, H-18). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 157.0 (C-24), 146.4 (C-5), 124.0 (C-6), 106.1 (C-28), 55.7 (C-17), 49.5 (C-14), 42.4 (C-9), 42.3 (C-13), 42.1 (C-4), 37.5 (C-8), 39.3 (C-12), 37.1 (C-1), 37.6 (C-10), 35.9 (C-20), 34.7 (C-22), 33.9 (C-25), 31.5 (C-2), 30.9 (C-23), 28.4 (C-16), 24.4 (C-15), 22.1 (C-27), 22.0 (C-26), 18.9 (C-21), 20.8 (C-11), 18.4 (C-19), 11.7 (C-18).

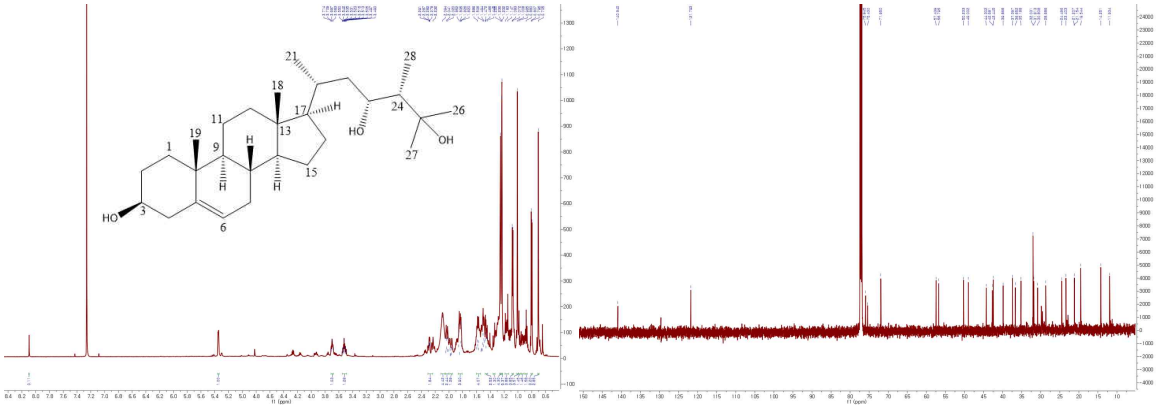


NMR spectroscopic data of compound 13

- (3S,23R,24S)-ergost-5-ene-3β,23α,25-triol (14)

○ $[a]_D^{25}$ -65.5 (c 0.04, $CHCl_3$); ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H 5.35 (1H, br s, H-6), 3.70 (1H, m, H-23), 3.52 (1H, m, H-3), 1.24 (3H, s, H-27), 1.23 (3H, s, H-26), 1.08 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-21), 1.01 (3H, s, H-19), 0.70 (3H, s, H-18). ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C 140.9 (C-5), 121.8 (C-6), 75.9 (C-23), 75.4 (C-25), 71.9 (C-3), 57.4 (C-17), 56.8

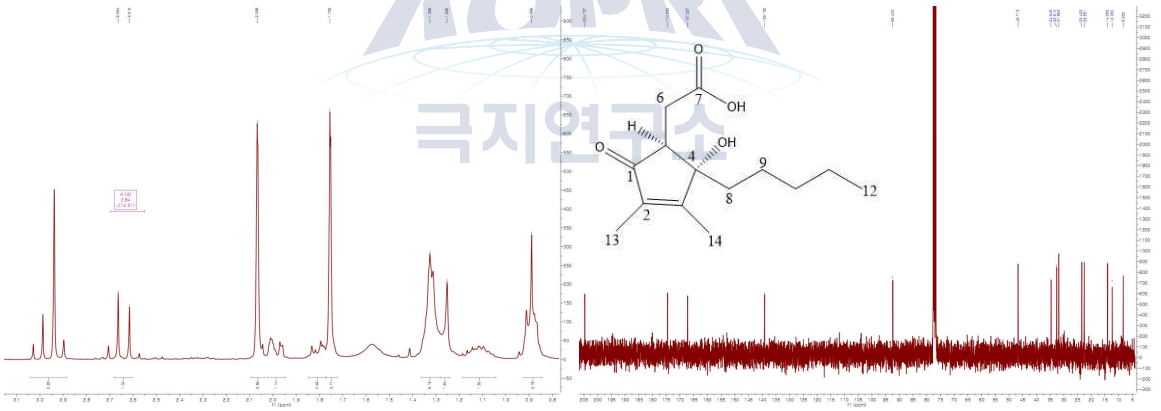
(C-14), 50.2 (C-9), 49.0 (C-24), 44.3 (C-22), 42.7 (C-13), 42.4 (C-4), 39.9 (C-12), 37.4 (C-1), 36.6 (C-10), 35.2 (C-20), 32.0 (C-26, C-27), 31.8 (C-8), 30.8 (C-7), 28.7 (C-16), 24.5 (C-2), 23.4 (C-21), 21.2 (C-11), 21.1 (C-15), 19.5 (C-19), 14.2 (C-28), 11.9 (C-18).



NMR spectroscopic data of compound 14

- ent-sinulolide D (15)

○ $[a]_D^{25}$ +39.0 (c 0.1, $CHCl_3$); ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 2.96 (1H, m, H-6a), 2.94 (1H, m, H-5), 2.64 (1H, d, J = 14.5 Hz, H-6b), 2.07 (3H, s, H-14), 1.98 (1H, m, H-8a), 1.81 (1H, m, H-8b), 1.76 (3H, s, H-13), 1.35 – 1.25 (4H, m, H-10, H-11), 1.11 (1H, m, H-9a), 0.90 (3H, t, J = 6.8 Hz, H-12), 0.89 (1H, m, H-9b). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 204.7 (C-1), 174.5 (C-7), 167.2 (C-3), 139.1 (C-2), 92.4 (C-4), 46.7 (C-5), 34.6 (C-8), 32.6 (C-6), 31.8 (C-10), 23.4 (C-9), 22.5 (C-11), 14.0 (C-12), 12.4 (C-14), 8.3 (C-13).

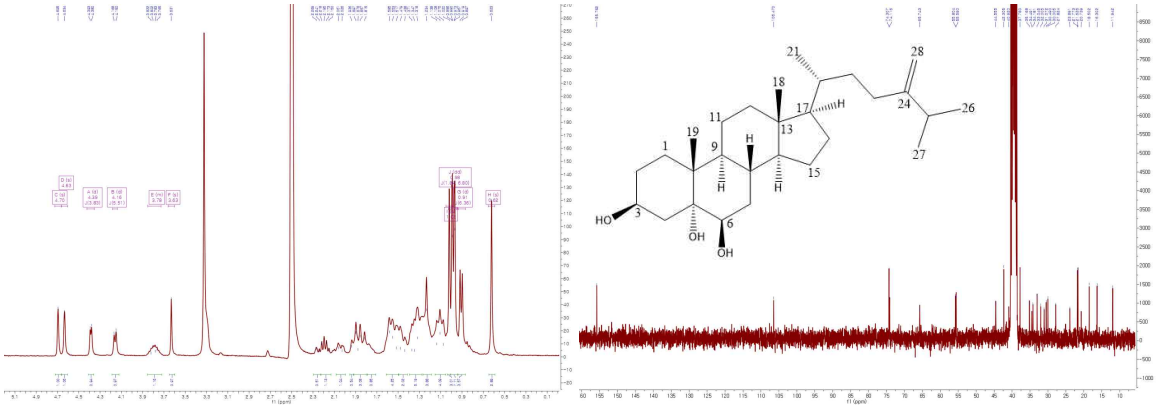


NMR spectroscopic data of compound 15

- Ergost-24(28)-ene-3β,5α,6β-triol (16)

○ $[a]_D^{25}$ -10.0 (c 0.04, $CHCl_3$); ^1H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H 4.69 (1H, br s, H-28a), 4.61 (1H, br s, H-28b), 4.39 (1H, d, J = 3.8 Hz, -OH), 4.16 (1H, d, J = 5.5 Hz, -OH), 3.78 (1H, m, H-3), 3.63 (1H, br s, H-6), 1.02 (3H, s, H-19), 0.99 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-26), 0.97 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-27), 0.91 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-21), 0.62 (3H, s, H-18). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) δ_C 155.8 (C-24), 106.5 (C-28), 74.3 (C-5), 74.1 (C-6), 65.7 (C-3), 55.8 (C-17), 55.6 (C-14), 44.5 (C-9), 42.3 (C-13), 40.9 (C-4), 37.8 (C-10), 35.2 (C-20), 34.5 (C-7), 34.2 (C-22), 33.0 (C-25), 32.0 (C-2), 31.1 (C-1), 30.5 (C-23), 30.0 (C-8), 27.8 (C-16), 23.9 (C-15), 21.7 (C-26), 21.6 (C-27), 20.7 (C-11), 18.5 (C-21), 16.3 (C-19, 11.9 (C-18).

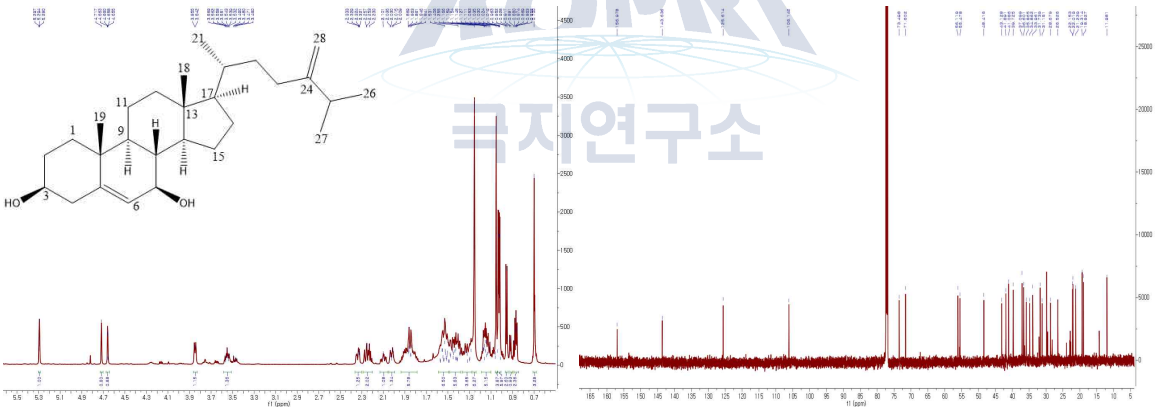
KOPRI 극지연구소



NMR spectroscopic data of compound 16

- 3β,7β-dihydroxyergosta-5,24(28)-diene (17)

○ $[a]_D^{25}$ -62.0 (c 0.1, $CHCl_3$); ^1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H 5.29 (1H, t, J = 1.8 Hz, H-6), 4.72 (1H, br s, H-28a), 4.66 (1H, br s, H-28b), 3.84 (1H, br s, J = 7.8 Hz, H-7), 3.55 (1H, m, H-3), 1.04 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-26), 1.02 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-27), 1.06 (3H, s, H-19), 0.96 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-21), 0.70 (3H, s, H-18). ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C 157.0 (C-24), 143.6 (C-5), 125.6 (C-6), 106.1 (C-28), 73.5 (C-7), 71.6 (C-3), 56.1 (C-17), 55.5 (C-14), 48.4 (C-9), 43.1 (C-13), 41.9 (C-4), 41.1 (C-8), 39.7 (C-12), 37.1 (C-1), 36.6 (C-10), 35.9 (C-20), 34.9 (C-22), 34.0 (C-25), 31.7 (C-2), 31.15 (C-23), 28.7 (C-16), 26.5 (C-15), 22.02 (C-27), 21.2 (C-11), 18.9 (C-21), 19.3 (C-19), 12.0 (C-18).

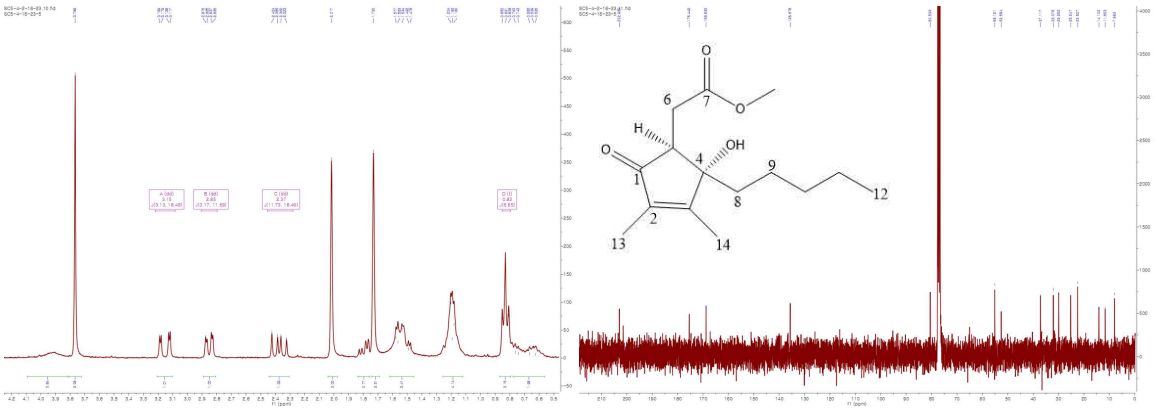


NMR spectroscopic data of compound 17

- ent-sinulolide C (18)

○ $[a]_D^{25}$ +15.5 (c 0.1, $CHCl_3$); ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 3.76 (3H, s, H-15), 3.15 (1H, dd, J = 18.5, 3.1 Hz, H-6a), 2.85 (1H, dd, J = 11.7, 3.2 Hz, H-5), 2.37 (1H, dd, J = 18.5, 11.7 Hz, H-6b), 2.01 (3H, s, H-14), 1.73 (3H, s, H-13), 1.79 (1H, m, H-8a), 1.55 (1H, m, H-8b), 1.30 – 1.15 (4H, m, H-10, H-11), 0.8 – 0.6 (2H, m, H-9), 0.83 (3H, t, J = 6.6 Hz, H-12). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 202.9 (C-1), 175.4 (C-7), 168.8 (C-3), 135.7 (C-2), 80.5 (C-4), 55.1 (C-15), 52.5 (C-5), 37.2 (C-8), 32.0 (C-10), 29.9 (C-6), 25.2 (C-9), 22.5 (C-11), 14.1 (C-12), 11.6 (C-14), 7.9 (C-13).

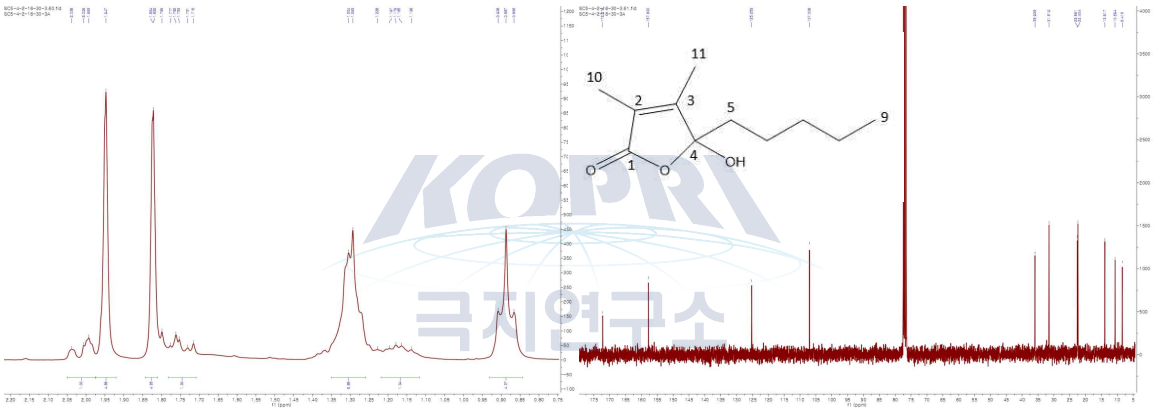
KORRI 극지연구소



NMR spectroscopic data of compound 18

- Butenolide (19)

○ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H 1.99 (1H, m, H-5a), 1.93 (3H, s, H-10), 1.80 (3H, s, H-11), 1.74 (1H, m, H-5b), 1.35 – 1.10 (6H, m, H-6, H-7, H-8), 0.87 (3H, t, J = 6.6 Hz, H-9). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C 172.4 (C-1), 158.0 (C-2), 125.4 (C-3), 107.2 (C-4), 36.1 (C-5), 31.7 (C-7), 22.7 (C-6), 22.5 (C-8), 14.1 (C-9), 10.8 (C-10), 8.5 (C-11).

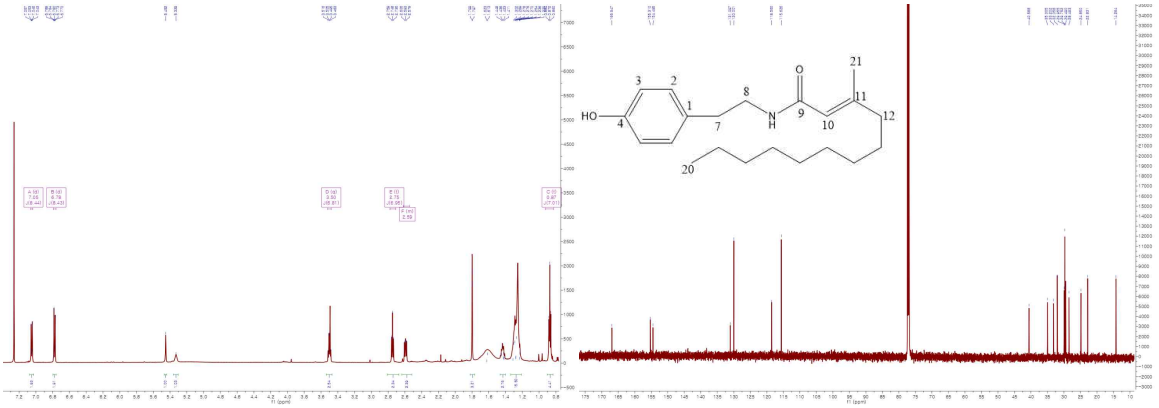


NMR spectroscopic data of compound 19

- (Z)-N-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-3-methyldodec-2-enamid (20)

○ ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.05 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2, H-6), 6.78 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3, H-5), 5.45 (1H, s, H-10), 3.50 (2H, q, J = 6.8 Hz, H-8), 2.75 (2H, t, J = 6.9 Hz, H-7), 2.59 (2H, m, H-12), 1.80 (3H, s, H-21), 1.45 – 1.20 (H-13, 14, 15, 16, 17, 18, 19), 0.87 (3H, t, J = 7.0 Hz, H-20). ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ_C 166.9 (C-9), 155.3 (C-11), 154.5 (C-4), 131.1 (C-1), 130.0 (C-3, C-5), 118.6 (C-10), 115.6 (C-2, C-6), 40.6 (C-8), 35.0 (C-7), 33.2 (C-12), 32.1 ($-CH_2-$), 29.9 ($-CH_2-$), 29.7 ($-CH_2-$), 29.5 ($-CH_2-$), 28.5 ($-CH_2-$), 24.8 ($-CH_2-$), 22.8 ($-CH_2-$), 14.3 (C-20).

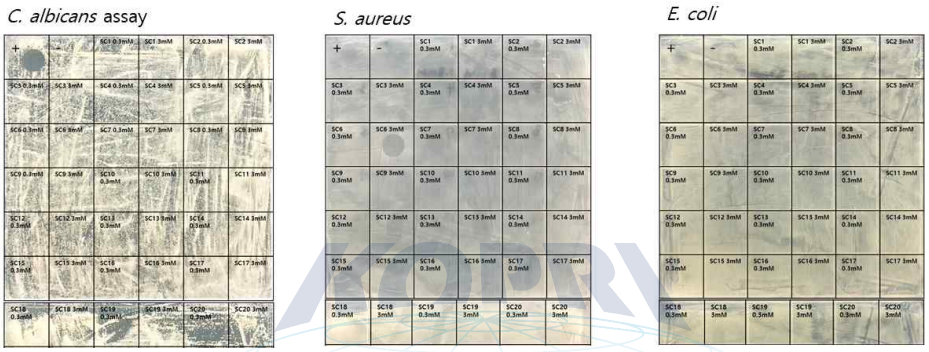
KOPRI 극지연구소



NMR spectroscopic data of compound 20

4) 극지(해양)생물(*Sinularia brassica*)유래 화합물 20종에 대한 항균활성 평가 (Soft coral)

- 주관기관인 극지연구소에서 항균활성 평가: 그람 음성균(*Escherichia coli*), 그람 양성균 (Staphylococcus aureus), 진균류(Candida albicans)에 대한 항균 활성 평가
- 화합물(SC1~SC20) 농도: 3, 03 mM 농도에서 평가



SC1~SC20 화합물에 대한 항균활성 평가 결과

- SC6 3 mM 농도에서 *S. aureus*에 대한 항균활성 확인
- SC1~SC20은 *C. albicans* 와 *E. coli* 에 대하여 항균활성을 보이지 않음

<2세부> 극지 유전자원 기반 항생물질 변형효소 선별

가. 저온성 항생물질 변형효소 유전자 타겟 53종 선정

1) 재조합 항생물질 변형효소의 수용성 발현 조건 탐색, 세 가지 다른 발현 호스트와 세 가지 온도 조건 (30도, 15도, 10도)에서 테스트

2) 재조합 변형효소 대량 정제

- 14종의 항생물질 변형효소 재조합 단백질 발현 확인
- 구조분석 및 생화학적 특성 분석을 위해 항생물질 변형효소 6종의 대량 정제된 재조합 단백질 확보

No.	Protein name	M.wt (kDa)	*E. coli* BL21 (DE3)		BL21(DE3)pGro7		BL21(DE3) pTs1Gro1LS
			30℃	15℃	30℃	15℃	10℃
1	qnr	24.644	I	I	I	I	I
2	aac (6')-Ii	20.548	I	I	I	I	I
3	aac (6')-Ic	26.022	S	S	S	S	S
4	Rv1347c	23.668	N/A	N/A	N/A	N/A	S
5	Hph	46.879	N/A	N/A	I	I	N/A
6	Rv3225c	51.14	I	I	I	I	N/A
7	aph (9)	38.394	N/A	N/A	I	I	S
8	pentapeptide repeat-containing protein	25.484	I	I	I	I	I
9		21.078	I	I	I	I	I
10		22.293	I	I	I	I	S
11	acetyltransferase	20.516	I	I	I	I	I
12	GNAT family N-acetyltransferase	19.699	I	I	I	I	S
13	hypothetical protein	17.068	S	S	S	S	S
14	acetyltransferase	36.533	I	I	I	I	I
15	GNAT family N-acetyltransferase	19.714	I	I	I	I	S
16	GNAT family N-acetyltransferase	16.942	I	I	I	I	I
17	aminoglycoside 3'-phosphotransferase	26.228	I	I	I	I	I
18	aminoglycoside 3'-phosphotransferase	26.287	I	I	I	I	I
19	phosphotransferase family protein	37.942	I	I	S	S	X
20	phosphotransferase	35.163	I	I	I	I	I
21	hypothetical protein	45.53	I	I	I	I	I
22	phosphotransferase	38.935	S	S	S	S	S
23	aminoglycoside phosphotransferase family protein	32.644	S	S	I	I	S
24	aminoglycoside phosphotransferase	31.634	I	I	S	S	X
25	aminoglycoside phosphotransferase family protein	32.764	I	I	I	I	I
26	choloylglycine hydrolase family protein	39.724	N/A	N/A	S	S	S
27	choloylglycine hydrolase family protein	35.752	I	I	I	S	I
28	antibiotic biosynthesis monooxygenase	11.566	S	S	S	S	S
29	antibiotic biosynthesis monooxygenase	11.692	S	S	S	S	S
30	PorT family protein	24.197	I	I	S	S	I
31	glycosyltransferase family 1 protein	46.185	N/A	N/A	I	I	I
32	glycosyltransferase family 1 protein	43.213	N/A	N/A	I	I	S
33	glycosyltransferase family 1 protein	47.298	X	X	I	I	I
34	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	49.493	I	I	I	I	I
35	serine hydrolase	52.924	I	I	I	I	I
36	serine hydrolase	43.083	I	I	I	I	S
37	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	43.235	S	S	S	S	S
38	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	44.305	I	I	I	I	S
39	SPOR domain-containing protein	59.454	I	I	S	I	I
40	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	43.546	I	I	I	I	I
41	glycosyltransferase family 1 protein	43.343	I	I	I	I	I
42	glycosyltransferase family 1 protein	42.191	I	I	I	I	I
43	hypothetical protein	43.235	I	I	I	I	I
44	glycosyltransferase family 1 protein	47.427	I	I	I	I	I
45	asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing)	73.167	I	I	I	I	I
46	asparagine synthase B	62.598	I	I	I	I	I
47	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase	57.452	I	S	I	I	I
48	16S rRNA (guanine (527)-N (7))-methyltransferase RsmG	22.854	I	I	I	I	I
Total soluble expression(before purification)			7	8	11	11	16

3) 극지 생물 유전자 정보로부터 유용 변형 효소 스크리닝 및 유전자 확보

- 극지 어류의 유용 변형 효소 후보 유전자 서열 확보(2종)
- 대표적 남극 어류인 Antarctic blackcod(*Notothenia coriiceps*)와 blackfin icefish(*Chaenocephalus aceratus*)를 대상
- 유전체 데이터베이스에서 타겟 유용 변형 효소 후보인 Antimicrobial peptide NK-lysin과 Liver expressed antimicrobial peptide 유전자 서열 탐색
- 비극지 어류 변형 효소와의 유전자 서열 비교

표. 유용 변형 효소 활용 가능 남극 어류 유전자 염기서열

Antimicrobial peptide NK-lysin

>icefish

ATGGACACCTCTTCGATCCTCATTGTGTGCATTCTGGTGACATGTTCAGTATGGACAATCCACGGCAGAAGCATCGAGGT
CAACATTGATGATCAGGAGCCGGGGGAAATGGAAATCTCTGTGGAGGCTGGAAAGCTTCCAGGTGTGTGCTGGGCGTGCA
AGTGGGCTTTAAATAAGGTGAAGAAAGTGGTTGGACGTAACGCCACAGCAGAGAAACTGAAGTCAAAGCTGACGGCCGTC
TGCAACGAGATTGGCCTCTTAAAATCGTTGTGCCGCAAATTTGTCAAGTCACACCTATCAGATTTAATCGAGGAGCTCAC
GACCACGGATGATGTGCGGACCATCTGTGTCAACACCAAAGCCTGCAAAGAAACCAAGTTTATCAAAGTGACGATGGGGG

TGTTCAAATACAAATTAATGAATATCCCGAGGGTCGCATGCATGGATGA

>icefish

MDTSSILIVCILVTCSVWTIHGRSIEVNIDDQEPGEMEISVEAGKLPGVCWACKWALNKVKKVVGRNATAEKLKSKLTAV
CNEIGLLKSLCRKFVKSHLSDLIEELTTTDDVRTICVNTKACKETKFIKVTMGVFKYKLMNIPRVACMD

>Antarctic blackcod

ATGGACACCTCTTCGATCCTCATTGTGTGCATTCTGGTGACATGTTCAGTATGGACAATCCACGGCAGAAGCATCGAGGT
CAACATCGATGATCAGGAGCCGGGGGGAAATGGAAATCTCTGTGGAGGCTGGAAAGCTTCCAGGTGTGTGCTGGGCGTGCA
AGTGGGCTTTAAATAAGGTGAAGAAAGCGGTCGGACGTAACGACACAGCAGAGAAACTGAAGTCAAAGCTGACGGCCGTC
TGCAACGAGATTGGCCGCTTAAAATCGTTGTGCCGCAAATTTGTCAAGTCACACCTCCCAGAGTTAATCGAGGAGCTCAC
GACCACGGATGATGTGCGGACCATCTGTGTCAACGTCAAAGCCTGCAAGCCAAAGGAGTTGTTGCACCAAGTTTATCAAA
GTGACGATGGGGGGTGTTAAAATACAAATTAATGAATATCCCGAGGGTCGCATGCATGGATGA

>Antarctic blackcod

MDTSSILIVCILVTCSVWTIHGRSIEVNIDDQEPGEMEISVEAGKLPGVCWACKWALNKVKKAVGRNDTAEKLKSKLTAV
CNEIGRLKSLCRKFVKSHLPELIEELTTTDDVRTICVNVKACKPKELLHQVYQSDDGGVKIQINEYPEGRMHG-

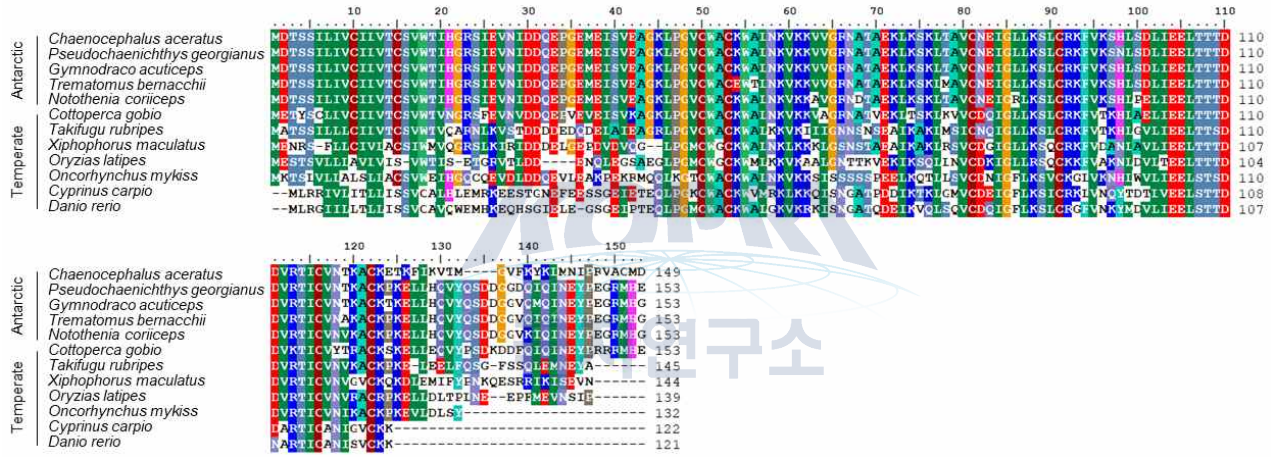


그림. 비극지 어류와의 효소 유전자 서열 비교

Liver expressed antimicrobial peptide

>icefish

ATGAAGACTGTTCAAGAAAAGATCATCGTTCTTTCAATGTTTCTGTCTCTGATATGTGCCATCCAGGTGGATTCAGCGCC
TGTGCCTCAAGACTGGAATGGTTTGATACAGCGGACCAAGCGGTCGCTCCTGTGGCGCTGGAACAGCATGAAGCCTGTGG
GGGCCAGCTGCAGGGACCACTCAGAGTGTGGCACAAACTACTGCAGGAAACATATATGTTCCTTCTGA

>icefish

MKTVQEKIIVLSMFLSLICAIQVDSAPVPQDWNGLIQRTKRSLLWRWNSMKPVGASCRDHSECGTNYCRKHICSF

>Antarctic blackcod

ATGAGGACTGTTCAAGAAAAGATCGTCGTTCTTTCAATGTTTCTGTCTCTGATATGTGCCATCCAGGTGGAATCAGCGCC
TGTGCCTAAAGACTGGAATGGTTTGATACAGCGGACCAAGCGGTCGCTCCTGTGGCGCTGGAACAGCATGAAGCCTGTGG
GGGCCAGCTGCAGGGACCACTTAGAGTGTGGCACAAACTACTGCAGGAAACATATATGTTCCTTCTGA

>Antarctic blackcod

MRTVQEKIVVLSMFLSLICAIQVESAPVPKDWNGLIQRTKRSLLWRWNSMKPVGASCRDHLECGTNYCRKHICSF

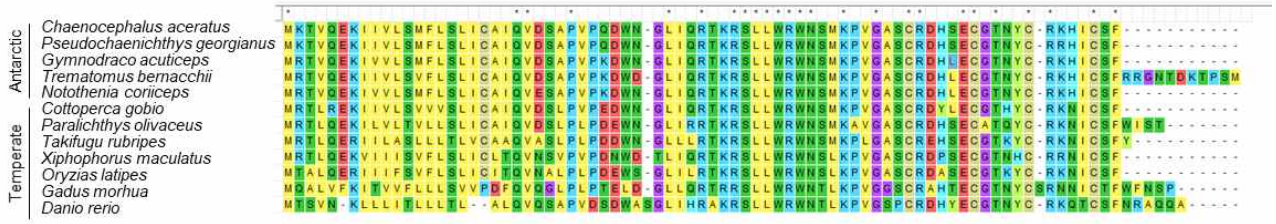


그림. 비극지 어류와의 효소 유전자 서열 비교

나. 극지 변형 효소 발현 및 분자진화를 통한 기질 유연성 연구 (부경대학교)

1) 난발현성 저온 변형효소 발현 탐색

- 난발현성 저온 변형효소를 대장균 발현 숙주에 형질전환하고 온도에 따른 발현 여부를 조사함.
- 대상 난발현성 저온 변형효소: 선행연구로 난발현성으로 분류된 53종의 단백질 (pET28a 발현 벡터에 삽입)을 형질전환하였으나 이 중 48종의 형질전환 균주를 확보하였음.
- 대장균 발현 숙주 3종(BL21(DE3), BL21(DE3)pGro7, BL21(DE3)pPsyGroELS)
- 단백질 발현 온도: BL21(DE3)와 BL21(DE3)pGro7 균주의 경우 30℃와 15℃에서 단백질 발현을 유도하였고 BL21(DE3)pPsyGroELS의 경우 10℃에서 수행하였음.
- 난발현성 단백질 11종의 경우 샤페론 균주 사용시 수용성 발현이 증가하는 것을 확인하였음 (아래 표와 그림 참조)
- 수용성 발현이 증가한 3종(7, 9, 12번)효소의 SDS-PAGE. 현재 이들에 대한 정제를 수행 중임.

KOPRI
극지연구소

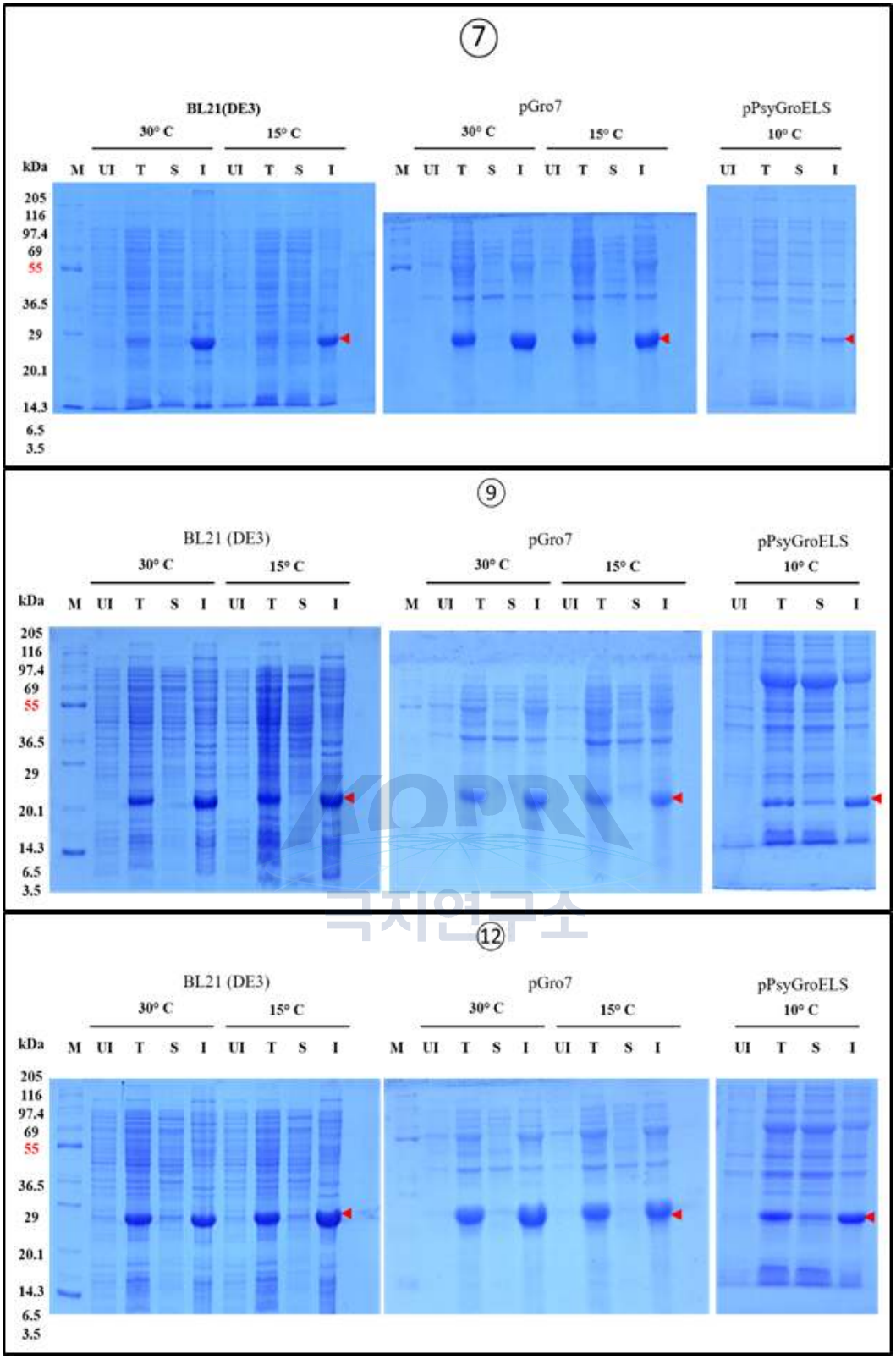
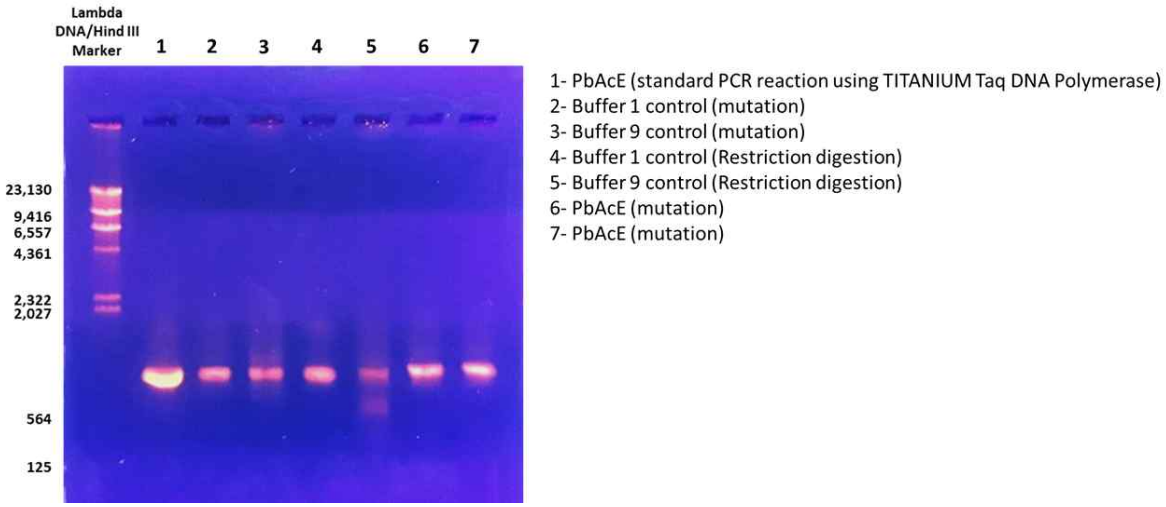


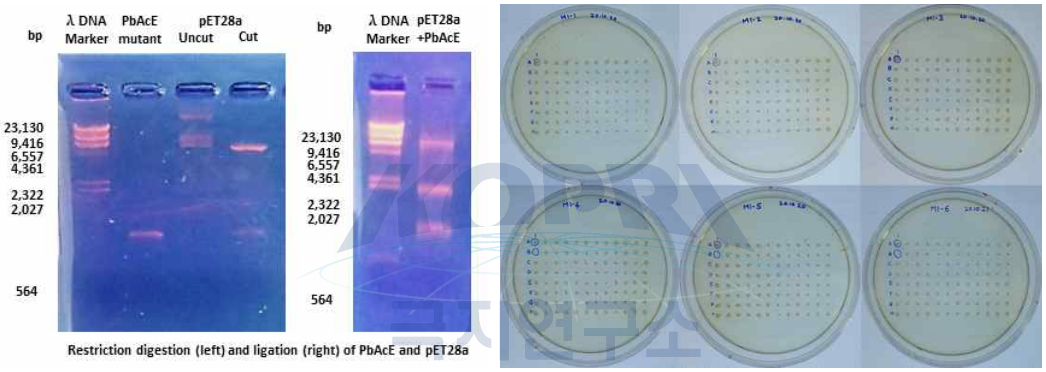
표. 난발현성 저온 변형효소의 발현조건별 결과

2) 변형효소 1종의 분자진화기반 기질 유연성

- 변형효소인 PbAcE에 대한 무작위 돌연변이 라이브러리를 구축하고 PbAcE 활성이 낮은 기질인 Linalyl acetate, α-terpinyl acetate, glyceryl trioleate 등을 대상으로 활성이 증가한 돌연변이 스크리닝을 수행하고자 함.
- 저온 변형효소 PbAcE의 무작위 돌연변이 증폭. Error-prone PCR를 이용하여 무작위 돌연변이 PbAcE를 실시하였고 대조구 실험과 병행하였으며 돌연변이 생성을 확인하였음.



- 무작위 돌연변이 PbAcE를 박테리아 표면 발현 벡터에 삽입하려고 하였으나 PbAcE의 특성상 이를 기존 벡터인 pET28a에 삽입하였고 BL21(DE3) 균주에 형질전환하였음. 현재 약 4000 콜로니의 돌연변이 라이브러리를 구축하였음. 현재 이 라이브러리를 이용하여 기질 특이성 확장에 대한 실험 수행 중임.

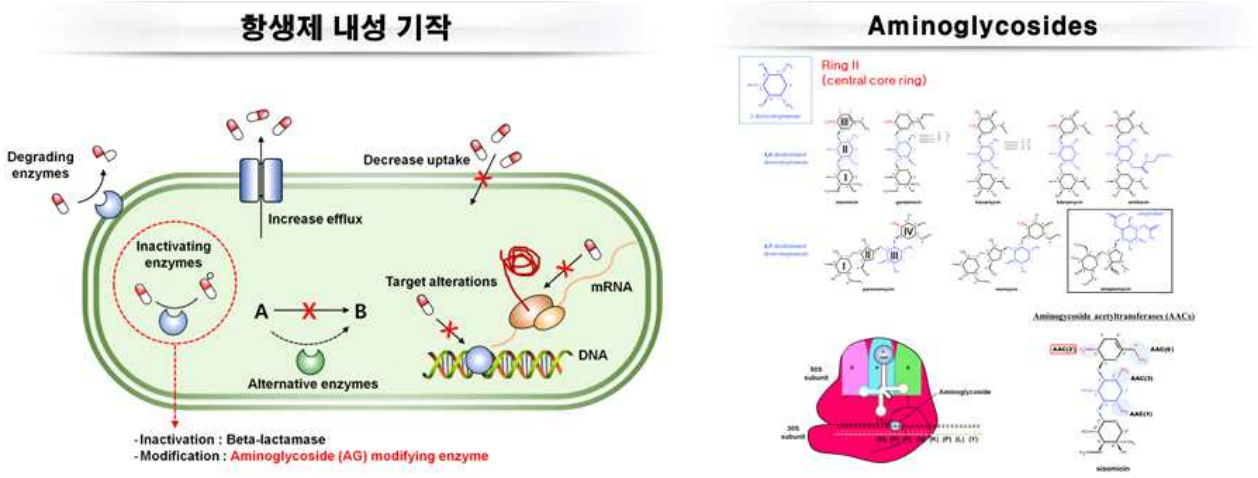


<PbAcE 돌연변이체 클로닝 및 돌연변이 라이브러리(일부) 구축>

다. 항생물질 타겟 단백질 발현 및 정제

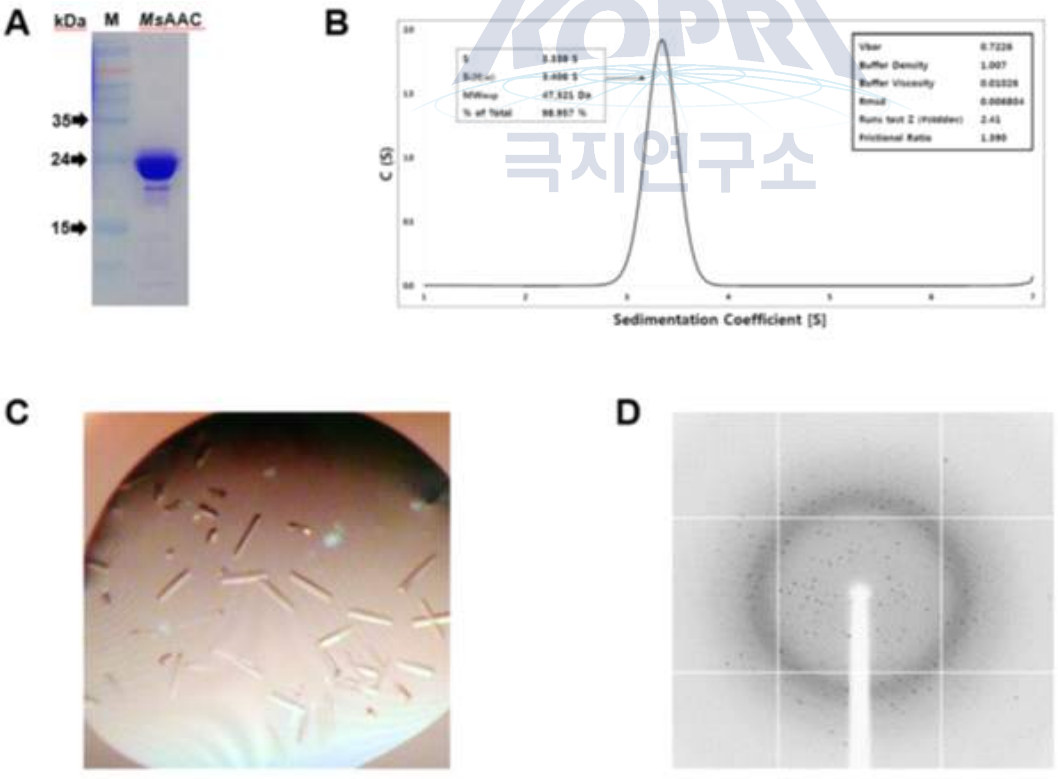
1) 새로운 형태의 항생제를 찾기 위한 병원균 항생제 (aminoglycoside) 내성 극복 메커니즘 분석

- 기존에 병원균의 항생제 내성극복 메커니즘을 분석하여 항생제 변형 효소의 효용성을 평가하고 전략적 계획을 수립
- 병원균의 Aminoglycoside 항생제 변형효소(Acetyltransferase)는 1′, 2′, 3′, 6′에 아세틸기를 부착하여 항생제에 의한 단백질 합성 억제를 회피함



2) Mycolicibacterium smegmatis 유래 아미노글리코사이드 변형효소 (AAC(2')-Id) 의 발현, 정제 및 결정화

- 아래 그림의 (A)는 정제된 AAC(2')-Id 단백질을 SDS-PAGE로 순도 확인 (B) 그림은 Analytical ultracentrifugation 실험을 통해 용액상태에서 dimer로 존재한다는 사실 규명, (C) 그림은 0.2 M ammonium acetate, 0.1 M Bis-Tris (pH 6.5), and 20% (w/v) PEG 3350 조건에서 만들어진 AAC(2')-Id 단백질 결정 (D) 기질이 결합되지 않은 상태의 AAC(2')-Id 단백질 결정을 이용해서 얻은 X-선 회절 이미지 데이터



3) Aminoglycoside 항생제 변형효소의 아포 및 4개의 서로 다른 리간드 결합구조 및 생화학적 특성 분석 (Scientific Report 저널 리비전 중)

- Aminoglycoside 항생제인 Gentamicin, Sisomicin, Neomycin, 그리고 Paromomycin과 변형효소와의 결합 구조를 약 2Å의 고해상도 구조를 해석함

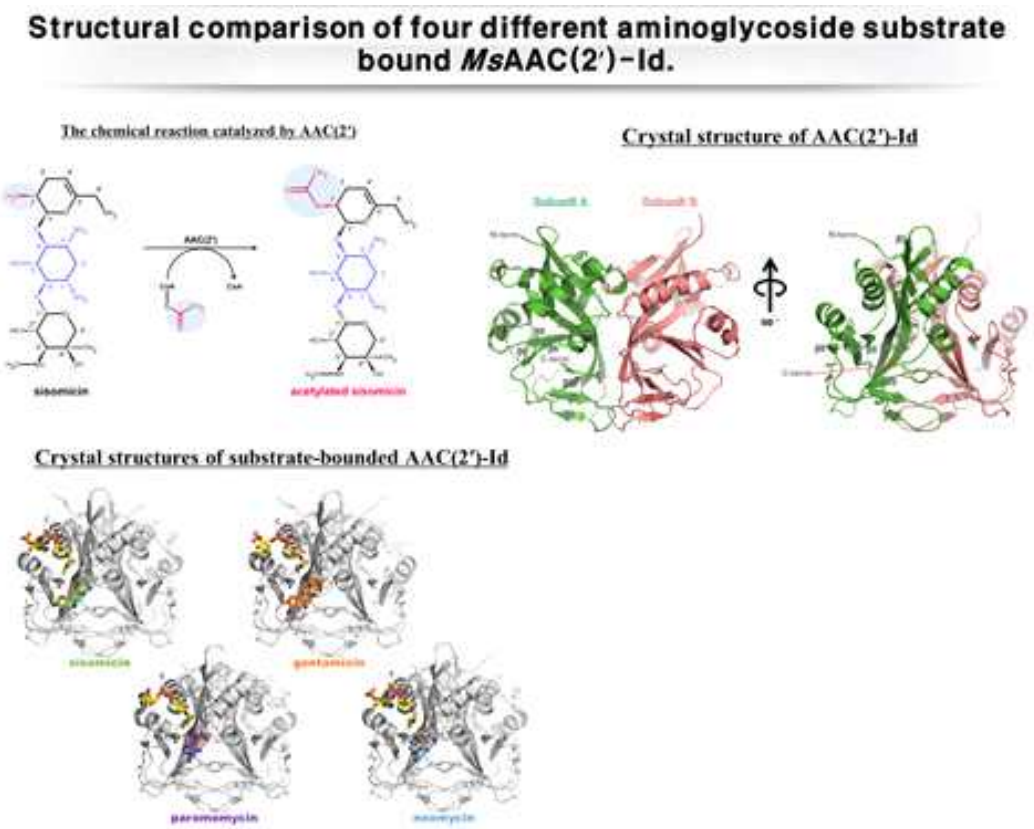


Table 3. Steady-state kinetic parameters of AAC(2′)-Id for various substrates and acetyl-CoA

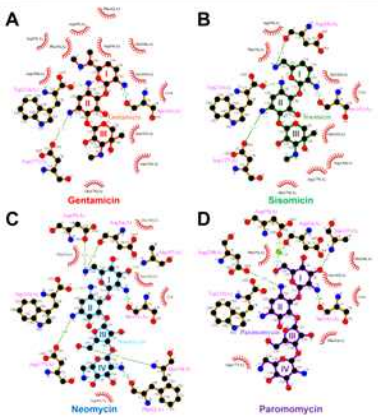
Family	Coenzyme/ Substrate	*Km* (μM)	*kcat* (s^{-1})	*kcat/Km* ($M^{-1}s^{-1}$)
	Acetyl-CoA	(6.10 ± 1.20) × 10	0.34 ± 0.03	(5.67 ± 1.62) × 10^3
Kanamycin	Amikacin	NA		
	Kanamycin	(1.67 ± 0.84) × 10^2	0.13 ± 0.03	(8.17 ± 6.20) × 10^2
	Tobramycin	(1.86 ± 0.10) × 10^2	3.34 ± 0.10	(1.80 ± 0.16) × 10^4
Gentamicin	Gentamicin	(2.06 ± 0.36) × 10	0.28 ± 0.00	(1.41 ± 0.29) × 10^4
	Sisomicin	(7.30 ± 0.58) × 10	1.87 ± 0.08	(2.57 ± 0.41) × 10^4
Neomycin	Neomycin	(7.76 ± 1.35) × 10	0.10 ± 0.00	(0.13 ± 0.03) × 10^4
	Paromomycin	(1.04 ± 0.14) × 10^2	1.08 ± 0.06	(1.04 ± 0.21) × 10^4
Streptomycin	Streptomycin	NA		
		Tyr150Ala		
	Acetyl-CoA	NA		
Kanamycin	Amikacin	NA		
	Kanamycin	NA		
	Tobramycin	NA		
Gentamicin	Gentamicin	NA		
	Sisomicin	(5.91 ± 1.06) × 10	0.01 ± 0.00	(2.18 ± 0.52) × 10^2
Neomycin	Neomycin	NA		
	Paromomycin	NA		
Streptomycin	Streptomycin	NA		

NA, no acetyl transfer activity was detected.

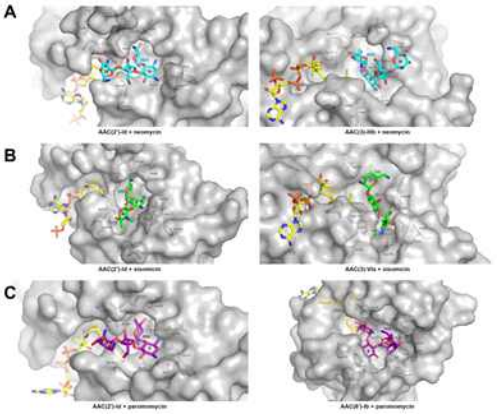
표. 리간드와 항생물질 변형효소와의 결합 능력 측정 결과

- 리간드와 항생물질 변형효소의 결합 특성을 분자 수준에서 분석

Substrate interaction residues of *Ms*AAC(2′)-Id.

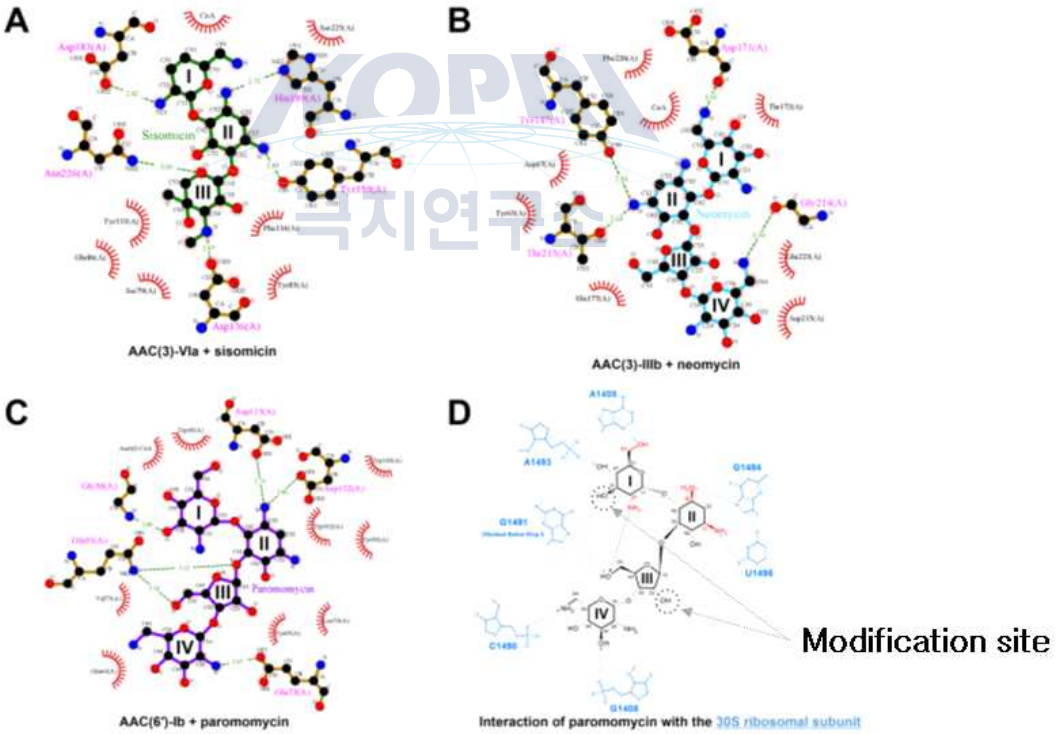


Regioselectivity mechanism of AAC enzymes.



- Aminoglycoside 항생제와 Aminoglycoside 항생제 변형효소의 결합 구조분석을 통해 Paromomycin에서 O23, O31 부위의 화학적 변형은 항생제의 단백질 합성 억제 능력은 유지하지만 Aminoglycoside 항생제와 항생제 변형효소의 (AAC2 와 AAC6) 결합을 억제할 수 있는 유도체를 만들 수 있다는 결과를 도출함

Substrate interaction modes of other AAC enzymes and the interaction between paromomycin and 30S ribosome.



- 구조 분석을 통해 얻은 결과를 가지고 Paromomycin을 backbone으로 새로운 유도체를 합성하기 위한 플랫폼 구축

KOPRI 극지연구소

Paromomycin derivative 제작

라. 극지 생물 유전자 정보 유래 유용 구조변형 효소 스크리닝 및 유전자 확보

1) 극지 생물 유전체 정보로부터 유용 구조변형효소 유전자 확보: 총 731개의 잠재적 유용 구조변형 효소 후보 유전자 서열 확보함. 또한 146종의 항생물질 변형효소 클로닝 및 발현 확인 (glycosyl transferase, hydroxylase, methyltransferase, sulfurtransferase, isomerase, acyltransferase, monoozygenase 등)

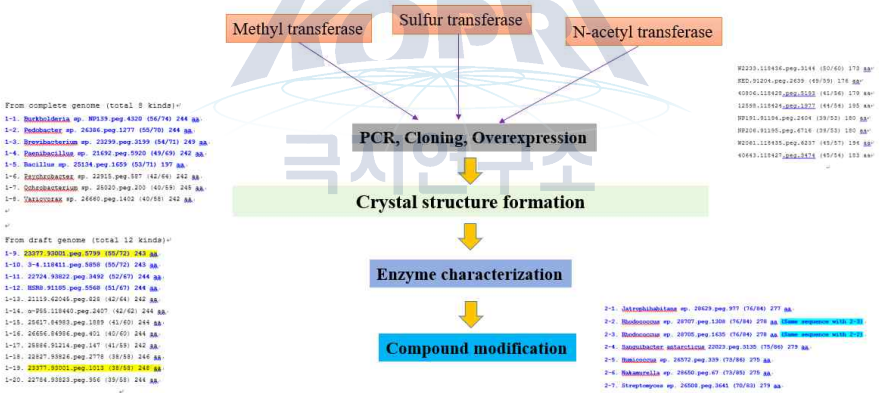


그림. 극지생물 유전체 정보로부터 유용변형효소 유전자 확보된 list (methyltransferase, sulfurtransferase, N-acetyl transferase 관련)

- 하나의 예로 transferase는 aminoglycosides, vitamins, flavonids 등의 기질을 사용하는 것으로 보고되어 있으며, 본 연구는 methyltransferase 2종, sulfurtransferase 3종을 균주로부터 유전자 선별하였음. PCR을 시작으로 클로닝하여 단백질 발현과 정제를 수행 중임.

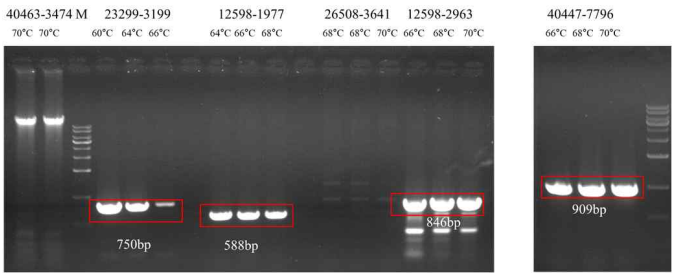


그림. Transferase 관련 PCR결과

- CYP는 모든 생물체에서 얻을 수 있는 단백질로써 다양한 활성을 가지고 있어, 상업적인 생합성 및 제약업종에 관련하여 각광받고 있는 효소임. 이들은 주로 수산화기로 치환하는 작용을 하고 넓은 기질 스펙트럼을 가지고 있음. 스테로이드 기질과 반응 할 수 있는 효소는 CYP106A 시리즈와 CYP154C 시리즈가 있음.
- CYP106A 시리즈는 총 7종에서 4종 유전자의 발현을 성공하였으며, 그 후 추가적으로 4종을 더 확보하였음. 기존에 실험하던 분류는 CYP106A2, CYP106A4, CYP106A5 그리고 CYP106A6로 명명되었음. CYP106A6는 in vitro assay 및 in vivo assay를 진행하였으며, 대표적인 전환율은 다음 그림과 같음.

substrate	type I shift	conversion	
		in vitro	in vivo
4-Androstenedione	+	<10%	>50%
Nandrolone	+	<10%	>50%
Progesterone	+	>50%	>80%
Testosterone	+	<10%	>80%

그림. CYP106A6 in vitro 및 in vivo assay 중 일부

- 이 외에도 H2O2를 이용한 in vitro assay를 시도하였으며, HPLC로 분석되었음 (그림). 이때 progesterone에서 높은 전환율을 얻었기 때문에 앞으로의 실험에서 구조분석과 기전연구에 좋은 결과를 기대할 수 있음.

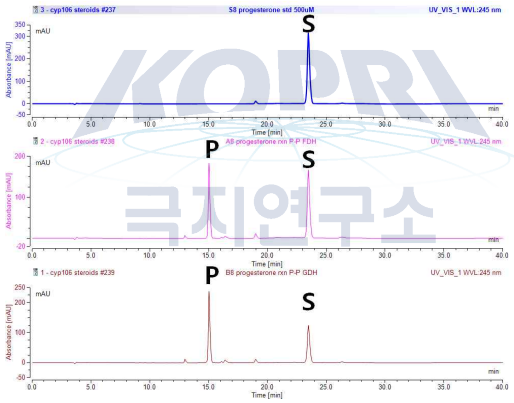


그림. H_2O_2를 이용한 assay의 HPLC 결과 중 일부 (P, Product; S, Standard)

- 추가된 유전자는 각각 3종의 CYP106A2와 CYP106A14로 새롭게 명명되었으며, 그 중 CYP106A2는 기존에 알려진 Rita 그룹의 단백질 서열과 동일한 시퀀스를 얻게 되어 비교 대조군을 얻었다는 의의가 있음. 특히 CYP106A14는 CYP106A6와 78%의 유사도를 갖는 유전자로써 이번에 새롭게 명명되었기에 기존 결과와 다른 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대됨.
- CYP154C3는 2종이 성공적으로 발현되었으며, 이들은 같은 CYP group으로 명명되었지만, 균주의 유래가 다름. CO-환원 반응을 통해 CYP 활성을 확인하였고, 그 결과는 아래와 같음 (그림).

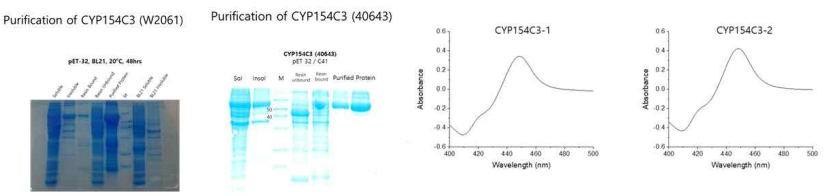


그림. CYP154C3의 SDS-PAGE 결과 및 CO-환원 반응

- 이 효소의 최적화 반응을 유도하기 위한 PH, 온도 그리고 염에 대한 실험이 진행되었음 (그림).

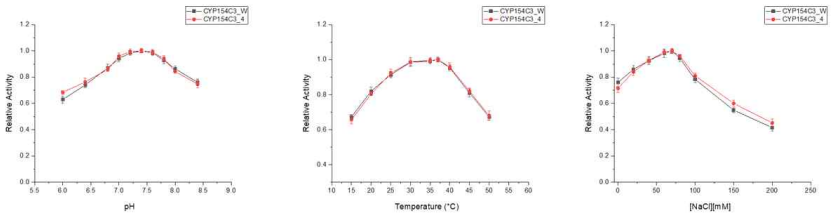
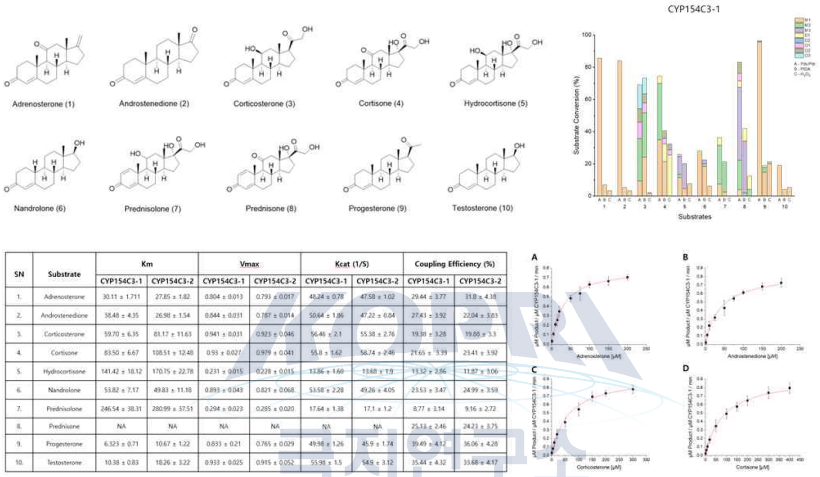


그림. CYP154C3의 최적화된 환경 조건 분석

- 위의 조건을 참고하여 기질 10가지를 사용한 in vitro assay를 시도하였으며, 다양한 전자전달계에 따른 색다른 전환율을 얻을 수 있었음. 각 기질에 대한 카이네틱 결과도 진행되었으며, 이를 통해 두 효소의 차이 및 활성을 증명할 수 있었음 (그림).



SN	Substrate	Km		Vmax		Kcat (1/S)		Coupling Efficiency (%)	
		CYP154C3-1	CYP154C3-2	CYP154C3-1	CYP154C3-2	CYP154C3-1	CYP154C3-2	CYP154C3-1	CYP154C3-2
1.	Adrenosterone	30.11 ± 1.711	27.85 ± 1.82	0.804 ± 0.013	0.793 ± 0.017	46.24 ± 0.78	47.58 ± 1.02	29.44 ± 3.77	31.8 ± 4.18
2.	Androstenedione	38.40 ± 4.35	26.98 ± 1.54	0.844 ± 0.031	0.787 ± 0.014	50.64 ± 1.86	47.22 ± 0.84	27.41 ± 3.92	22.04 ± 3.03
3.	Corticosterone	59.70 ± 6.35	83.17 ± 11.63	0.941 ± 0.031	0.923 ± 0.046	56.46 ± 2.1	55.38 ± 2.76	19.38 ± 3.26	19.65 ± 5.3
4.	Cortisone	83.50 ± 6.67	108.51 ± 12.48	0.93 ± 0.027	0.979 ± 0.041	55.8 ± 1.62	58.74 ± 2.46	21.65 ± 3.39	23.41 ± 3.92
5.	Hydrocortisone	141.42 ± 18.12	170.75 ± 22.78	0.231 ± 0.015	0.228 ± 0.015	13.86 ± 1.69	13.68 ± 1.9	11.32 ± 2.86	11.87 ± 3.06
6.	Nandrolone	53.82 ± 7.17	49.83 ± 11.18	0.893 ± 0.049	0.821 ± 0.068	53.58 ± 2.28	49.26 ± 4.05	23.53 ± 3.47	24.99 ± 3.59
7.	Prednisolone	246.54 ± 38.31	280.99 ± 37.51	0.294 ± 0.023	0.285 ± 0.020	17.64 ± 1.38	17.1 ± 1.2	8.77 ± 3.14	9.16 ± 2.72
8.	Prednisone	NA	NA	NA	NA	NA	NA	25.13 ± 2.46	24.21 ± 3.75
9.	Progesterone	6.323 ± 0.71	10.67 ± 1.22	0.833 ± 0.21	0.765 ± 0.029	49.96 ± 1.26	45.9 ± 1.74	39.49 ± 4.32	36.06 ± 4.28
10.	Testosterone	10.38 ± 0.83	18.26 ± 3.22	0.933 ± 0.025	0.915 ± 0.052	55.98 ± 1.5	54.9 ± 3.12	35.44 ± 4.32	33.68 ± 4.17

그림. 사용된 기질 및 in vitro assay 후 전환율과 CYP154C3의 카이네틱 결과

- 이 외에도 스테로이드 및 테르페노이드 관련 CYP를 스크리닝하여 새롭게 클로닝을 진행 중에 있음. CYP108, CYP109, CYP159 또한 CYP219의 명명을 가진 효소들로써, 차후 이들을 발현하여 활성을 확인한다면, 더욱 폭넓은 활성을 확인할 수 있을 것이라 생각됨.
- 기질이 명확하게 알려지지 않은 효소로써는 CYP236A 효소를 발현 및 정제하였음 (그림). 발현은 20도에서 72시간 진행되었으며, 정제한 단백질은 차후 FdX, FdR 전자전달계를 사용하여 관련 기능을 확인할 예정임.

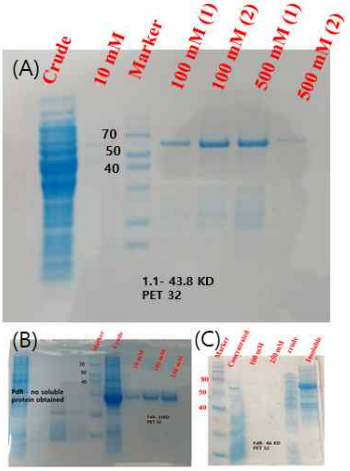


그림. CYP234A 효소에 대한 발현 및 정제 결과

2) 극지 미생물 유전체 안에서 이차대사물질 Pathway 관련 예측

- Burkholderia sp. PAMC 26561의 유전체 안에서 antiSMASH를 이용하여 예측한 이차대사물질 Pathway 결과임. 총 6개의 클러스터가 나온 것을 확인하였으며, Terpene 계열 3개, type 1 PKS, NRPS로 크게 분류될 수 있음. 각 코어 유전자는 한 개에서 3개가 나왔으며, 각 유전자는 기능별로 색을 달리하여 표현하였음. PAMC 26561은 총 3개의 염색체를 가지고 있다고 분석되었으며, 다음과 같이 염색체 별로 분석을 달리하여 각 염색체별 이차대사물질 생합성 클러스터를 분석하였음.

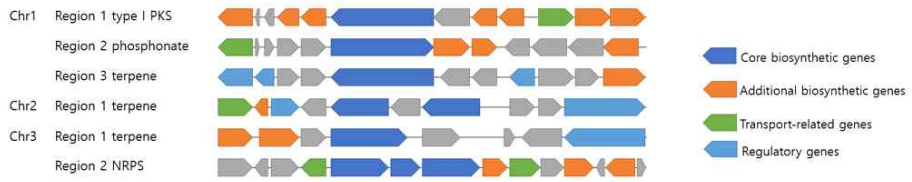


그림. AntiSMASH tool을 이용해 균주 PAMC26561이 가지고 있는 2차대사물질 예측 경로

- 또한 antiSMASH로 분석이 힘든 예상 생합성 클러스터 분석의 경우, deepBGC 프로그램을 이용하여 분석하였으며, 기존 데이터베이스외의 클러스터를 분석하는 것이 가능하나, 자세하게 알지 못해 각 클러스터별 길이, 단백질 개수, 예측된 활성 등을 아래의 표로 표기하였음. 그 외 각 유전자 포함 유무는 조사 중에 있음.

nucl_start	nucl_end	nucl_length	num_proteins	num_domains	num_bio_domains	deepbgc_score	product_activity	product_class
210975	216804	5829	7	21	9	0.61805	antibacterial	Polyketide
314074	317964	3890	2	8	2	0.58189	antibacterial	
366625	372178	5553	5	16	2	0.64147	antibacterial	Saccharide
375180	456553	81373	62	172	24	0.96972		Saccharide
514349	556421	42072	37	120	18	0.86984	cytotoxic	Saccharide
562517	564775	2258	3	3	0	0.57677	antibacterial	Polyketide
566868	568962	2094	1	1	0	0.52244	antibacterial	
570316	605592	35276	24	64	15	0.72313		Polyketide
645795	650875	5080	6	26	2	0.65683		Other
1359069	1371880	12811	13	26	3	0.77065		
1463341	1470080	6739	7	15	3	0.63332	antibacterial	Polyketide
1470834	1474799	3965	4	18	4	0.66523	cytotoxic	
1698714	1703598	4884	5	18	2	0.85395		
2138201	2142006	3805	2	19	3	0.61089		
2308048	2309747	1699	3	16	3	0.81899		
3181560	3206934	25374	21	49	12	0.83236	antibacterial	Saccharide
3214388	3217574	3186	4	8	1	0.62423	antibacterial	Saccharide
3243169	3244186	1017	1	1	0	0.51357	antibacterial	

표 deepBGC tool을 이용해 균주 PAMC26561이 가지고 있는 2차대사물질 예측 경로

- 또한 Shigella sp. PAMC28760의 Terpenoid backbone biosynthesis pathway 분석으로 glycolysis 에서 ubiquinone과 그 외 terpenoid-quinon 생합성과정에 필요한 모든 유전자를 보유하고 있는 것으로 확인됨. 또한 이를 이용하여 steroid를 생성할 수 있을 것으로 예상되며, 그 외 zeatin/monoterpenoid 도 생성 할 것으로 예상됨. 그러나 carotenoid, diterpenoid, indole 관련 생합성 과정까지는 유전자가 부족한 것으로 사료되어 annotation 과정을 일부 다시 확인 중에 있음.

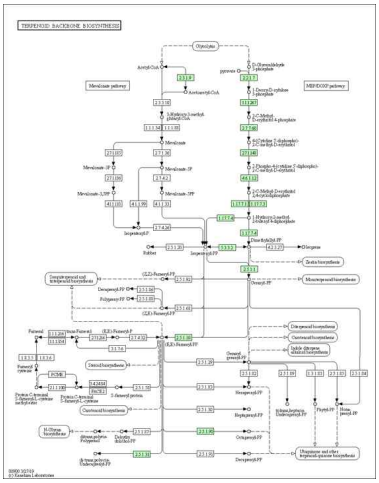


그림. KEGG를 통한 *Shigella* sp. PAMC28760의 Terpenoid backbone 생합성 경로 예측

<3세부> 항생물질 변형체 제작 및 활성 검증

가. 변형효소를 이용한 다양한 신규항생물질 발굴

1) 당전이효소를 이용한 스테로이드의 당화반응

- 당전이 효소 (glycosyltransferase) 중 기질 유연성이 높은 것으로 알려진 Bacillus licheniformis DSM13 (ATCC14580)에서 확인된 UDP-glucosyltransferase YjiC 유전정보를 이용하여 (아래 표) 극지방에서 분리한 균주 중 일부 유전체분석이 된 Bacillus atrophaeus PAMC 23288의 당전이 효소 유전정보를 확보하여 PCR primer를 제작함.

표. UDP-glucosyltransferase 아미노산서열 (Bacillus licheniformis DSM13, ATCC14580)

UDP-glucosyltransferase YjiC	MSHKKIAIFHIPAHGHINPTLALATAELVKRGYRVTYPVTDEFVKAVEETGAEPLHYPSTLNIDPQQIEKLMKNKK
UDP-glucosyltransferase YdhE	MTHMHILVVPFPAQGHVNPSLQLSKRLIEKGVEVTFATSVFGSKMEAAGLNQVHSFDDGYDDGFKAGERESYMSF
UDP-glucosyltransferase YojK	MMGHCVLMINFPGEGHINPSIGVTKELQRRGESIVYYAVKEYAEKIKKTGAEVRLYPDFPREVLSFGKKKEKMDIFA

표. PCR primer 정보

YjiC 유전자와 유사	23288-2171 (F)	5' - GGA TCC ATG AAA CAG CAT CAT ATC ACA A -3'
	23288-2171 (R)	5' - G TTA TTG CGG AAC GAC AGA -3'

- PCR product를 발현벡터인 pET-28a/pET-32a vector에 삽입 후, C41 발현 균주에서 37℃에서 OD 0.6 – 0.8 동안 키운 후, 0.5 mM IPTG를 넣고 20℃에서 2일간 발현하여 정제함. 정제된 당전이효소는 스테로이드 (cortisone과 prednisone)를 대상으로 당화반응하여 확보한 유도체들의 구조변형을 NMR로 확인함 (그림 1 - 4).

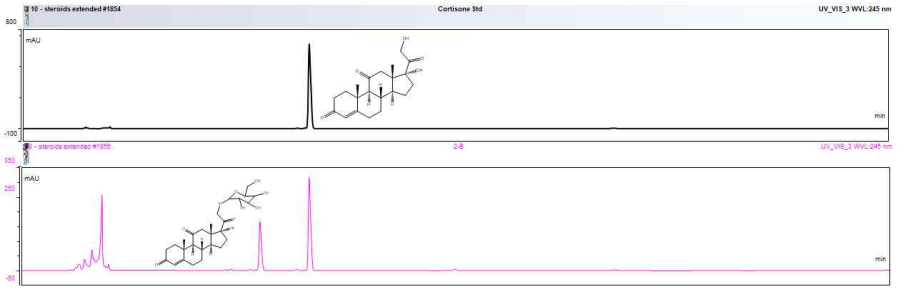


그림. 당전이효소와 cortisone의 당화반응 HPLC 결과

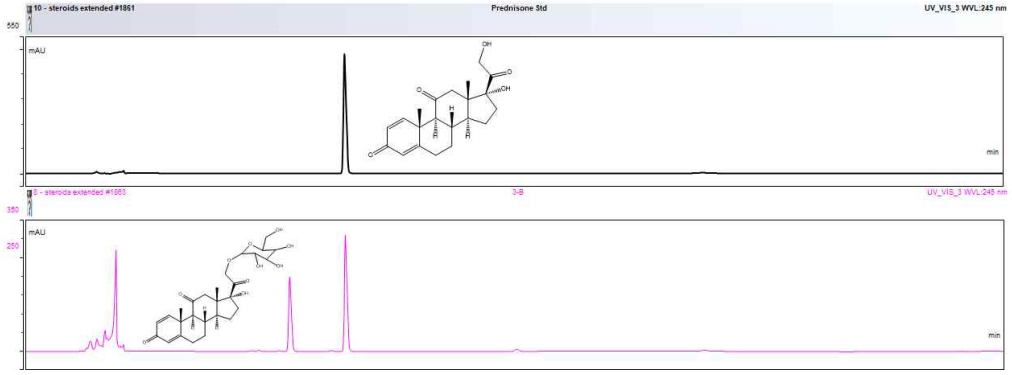


그림. 당전이효소와 prednisone의 당화반응 HPLC 결과

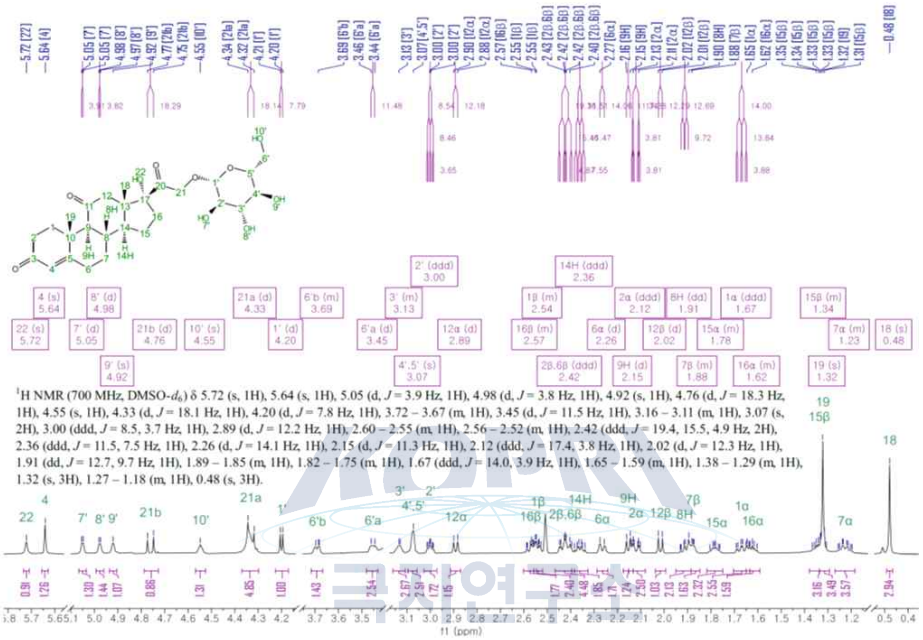


그림. Cortisone-glucoside의 NMR분석

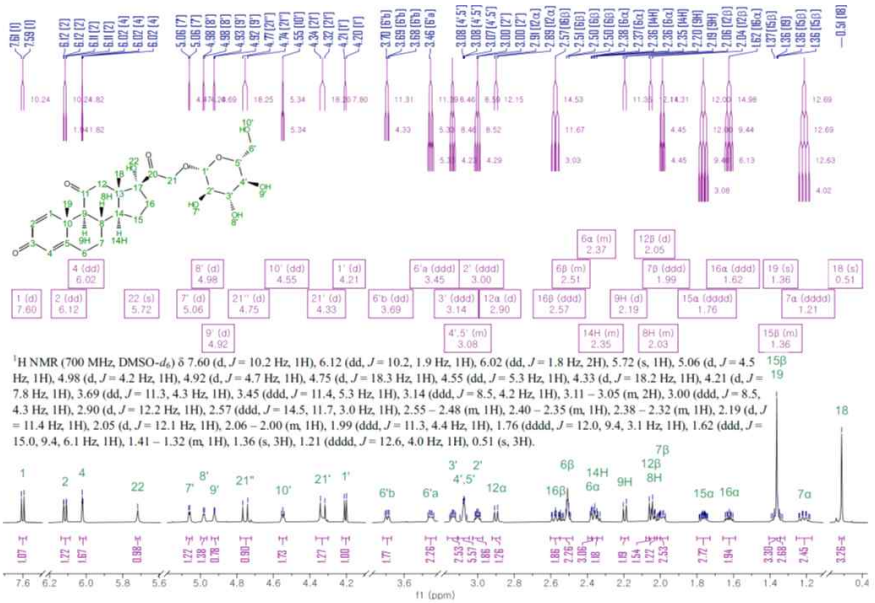


그림 4. Prednisone-glucoside의 NMR분석

2) 수산화효소를 이용한 스테로이드의 수산화반응

- 터페노이드 CYP105 시리즈에 대한 연구를 진행함. 본 실험실에서 CYP105D14, CYP105D18 및 CYP105D19를 확보하여 클로닝/발현하였으며, 현재 활성 확인 중에 있음. 이 중 CYP105D19는 daidzein을 기질로 기능을 확인 중에 중임.

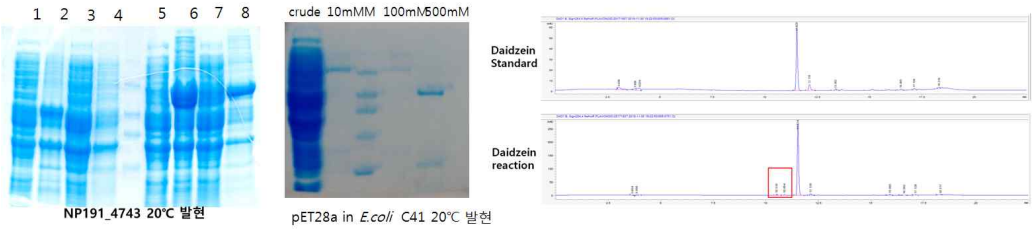


그림. CYP105D19의 발현, 정제 및 HPLC 분석 결과

- 이들의 활성은 일반적인 전자전달계 (예를 들어 FdX-FdR)로 전환이 이루어지지 않아, H2O2를 사용한 활성 분석법이 사용됨. CYP105D18과 기질 papaverine은 2시간 동안 반응으로 수산화 활성을 확인하였으며, 이는 탄소 2번 위치로 확인됨. 또한 homology modeling을 통해 이미 알려진 CYP105D7과의 구조적 차이점을 해석하여 현재 기능적 활성 연구를 증명하는데 활용하고 있음.

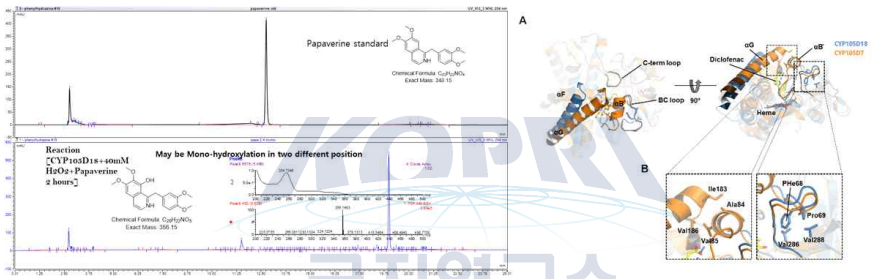


그림. CYP105D18의 HPLC 결과 및 homology modeling 결과

- 위의 효소를 대상으로 새로운 기질의 기능을 확인하기 위하여 monoterpenes 계열인 eugenol, methyl eugenol 그리고 isoeugenol 등을 반응하여 다양한 유도체를 확인함. 특히, methyl eugenol에서 활성이 좋았으며, 더 많은 기질로 실험을 확대 적용 중임.

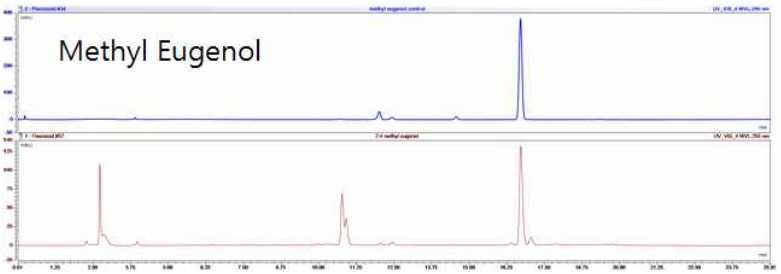


그림. CYP105D18의 HPLC 결과 중 일부

3) 수산화효소를 이용한 플라보노이드의 수산화반응

- 터페노이드를 기질로 사용한다고 알려진 CYP105 시리즈를 플라보노이드에도 반응하여 새로운 신규항생 물질을 발굴하고자 하였음.

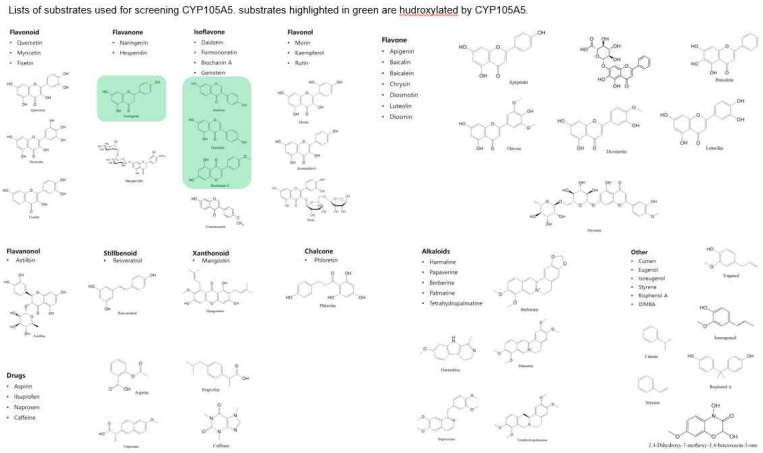


그림. CYP 105A5 수산화반응이 가능한 기질 리스트. green은 이미 반응이 진행된 물질.

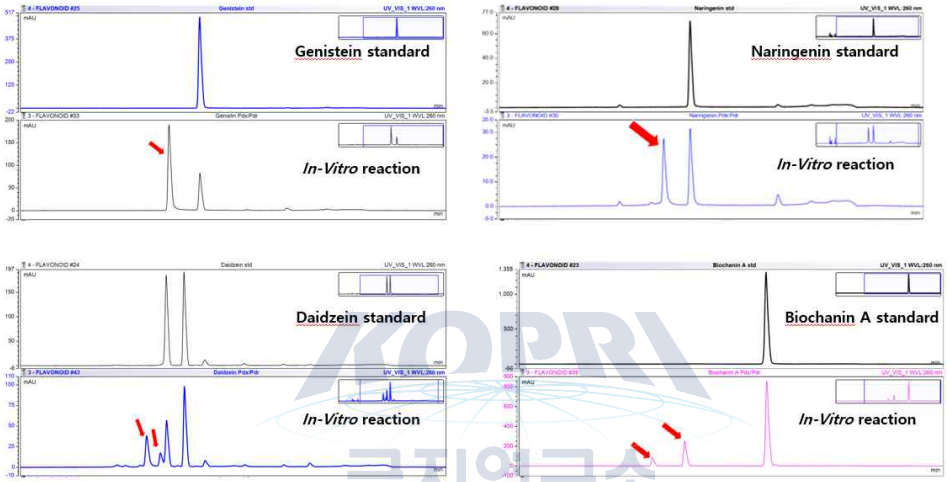


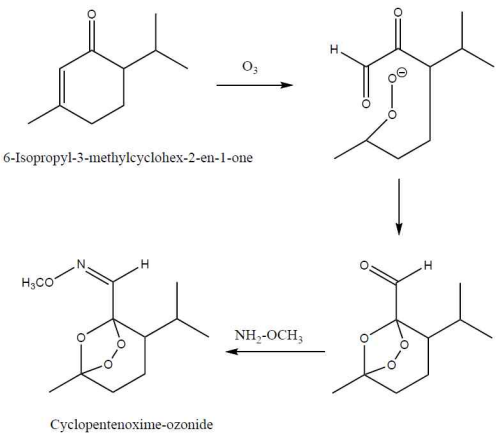
그림. CYP105A5를 이용한 플라보노이드 in-vitro 반응 결과.

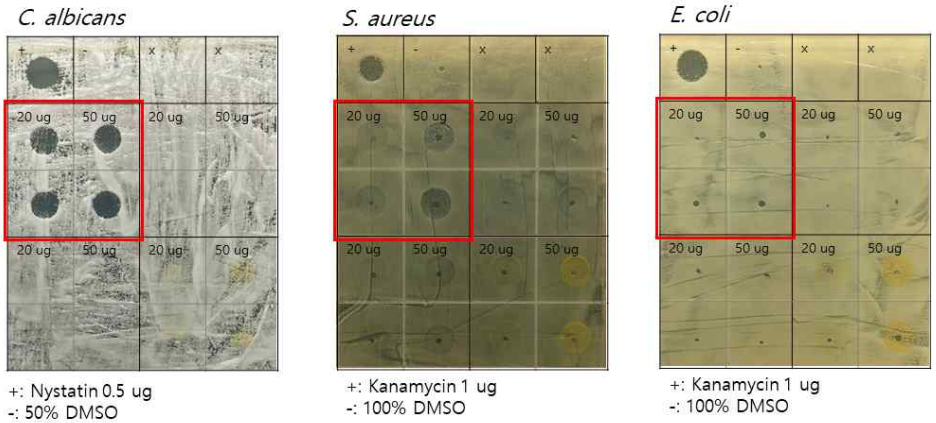
- 그림과 같이 플라보이드 계열인 Genistein, Naringenin, Daidzein, Biochanin A 등 4가지 물질에 in-vitro 반응한 결과, CYP105A5가 플라보노이드에 수산화된 것을 확인하였음.

나. 항생 및 항균 물질 발굴을 위한 화합물 반응

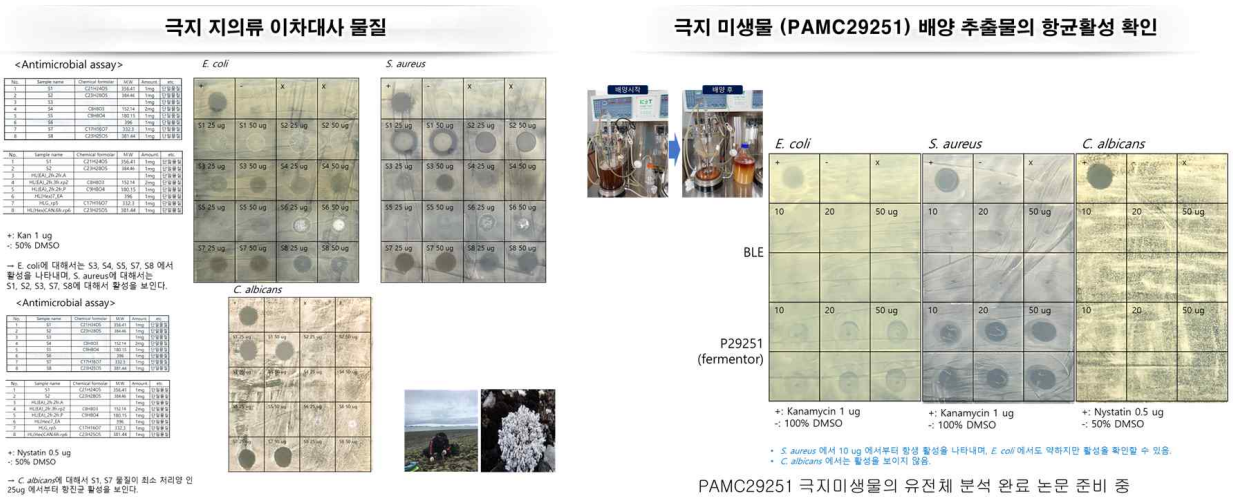
1) Ozonolysis를 통한 신규 항생/항균물질 합성

- Piperitone (6-isopropyl-3-methylcyclohex-2-en-1-one)을 시작물질로 다음과 같이 ozonolysis 반응을 진행함. 결과로 cyclopentenoxime-ozonide가 합성 되었으며, 1H 및 13C NMR 측정 결과 입체구조로 인해 3개의 isomers (A, B, C)가 혼합된 상태로 존재하는 것을 확인할 수 있었음.





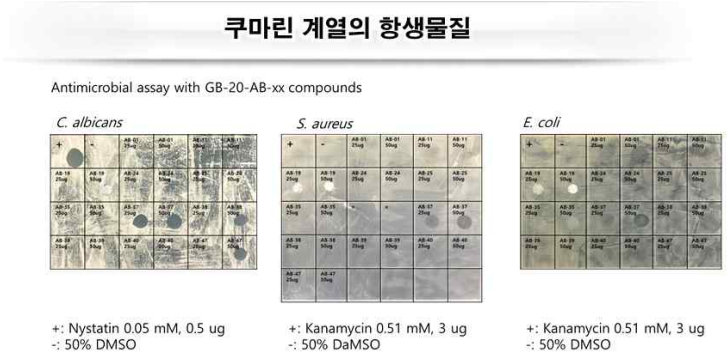
- 따라서 column chromatography를 이용하여 A 및 B를 혼합물로부터 분리하였으며, 현재까지 A에 대한 항균 활성을 확인하였음.
- Isomer A는 C. albicans에 대해 강한 항균 활성을 나타냈으며, *S. aureus*에 대해서도 활성을 나타냈음.
- 추후에 분리된 isomer B에 대해서도 같은 활성을 확인할 예정이며, HPLC를 이용하여 isomer C를 분리할 예정임.

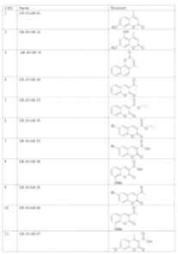


2) 가피바이오에서 제안한 항생물질 백본 물질인 쿠마린 계열의 항생물질 화학합성 및 항균활성 측정

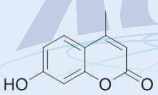
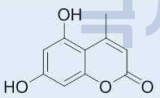
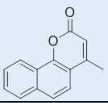
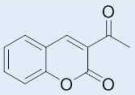
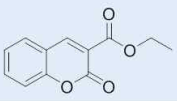
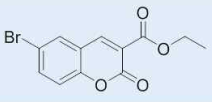
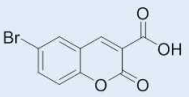
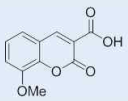
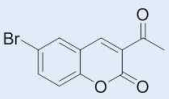
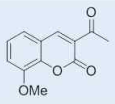
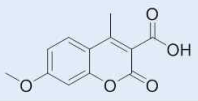
KOPRI 극지연구소

- 쿠마린 계열 화합물 11종 화학합성 및 항균활성 측정
- AB37, AB38, AB47 화합물의 항균활성 확인
- 저온성 효소 (CYP, GT, MT 등) 를 이용한 변형체 제작 실험 진행 중





- Coumarin 화합물 코어 11종 개발

No.	Comps. Code	Mass	Structure
1	GB-20-AB-01	192.17	
2	GB-20-AB-11	176.17	
3	GB-20-AB-19	210.23	
4	GB-20-AB-24	188.18	
5	GB-20-AB-25	218.21	
6	GB-20-AB-35	297.10	
7	GB-20-AB-37	269.05	
8	GB-20-AB-38	220.18	
9	GB-20-AB-39	267.08	
10	GB-20-AB-40	218.21	
11	GB-20-AB-47	234.21	

- 합성 구조확인은 NMR 및 Mass를 이용하여 확인
- 합성화합물의 순도는 다음 조건으로 HPLC 순도 분석하였음.

<HPLC 분석 조건>

Pump A: 0.1% Formic acid in Water

Pump B: Solvent: ACN 100%

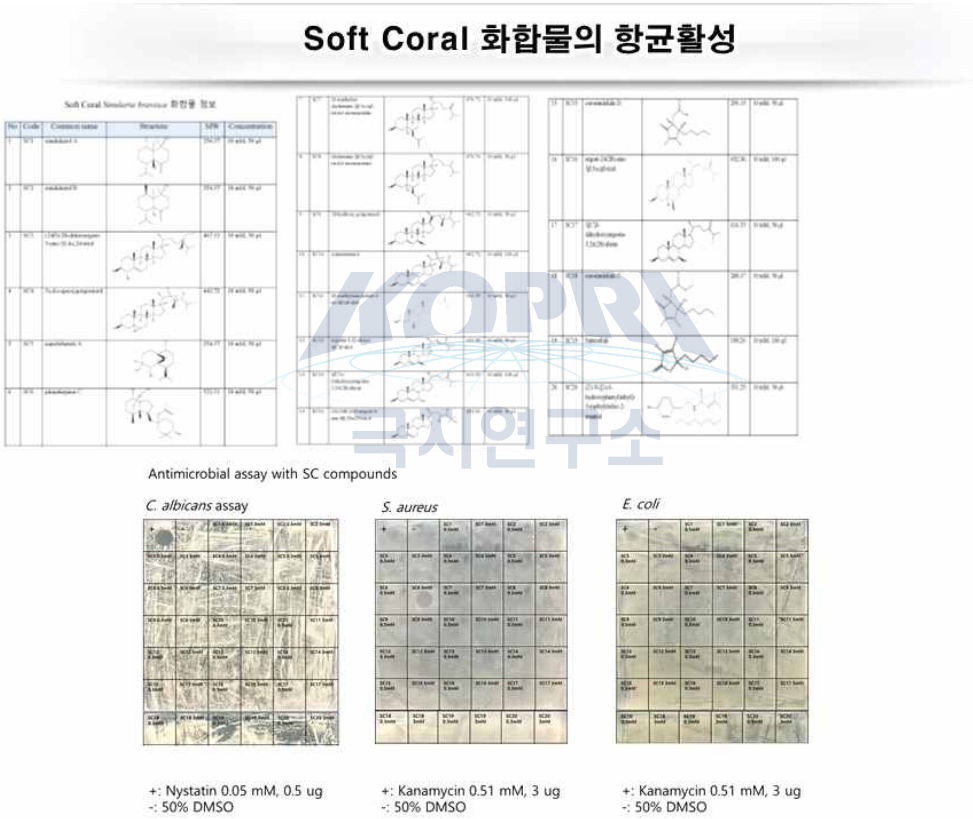
Diluent: 100% MeOH/ Select depends on synthesized compound

Sample con.: 1mg/ml

KOPRI 극지연구소

Column: CAPCELL PAK C18 UG120(4.6mm I.D. X 250mm, 5μm) or equivalent.
Column Temperature: 35℃
Flow: 1.0 ml/min.
Gradient Time / ACN % : 0/12, 12/15, 40/25, 50/40, 51/10,60/10
Runtime: 60min.
Injection volume: 10μL.
UV: 280nm, 290nm (Select depends on synthesized compound)
Note: Based on literature UV was monitored at 280nm, but need to check UV max for synthesized
compound, respectively.)
Able to modify gradient based on need.

3) Soft coral에서 분리된 물질 20종에 대한 항균활성 측정
- SC6 물질의 그람 양성균 (Staphylococcus aureus)에 대한 항균활성 확인
- SC6 물질과 저온성 효소 (CYP, GT, MT) 를 이용한 변형체 제작 실험 진행 중



<4세부> 항생물질 타겟 단백질 발현 및 정제

가. 항생물질 타겟 단백질 발현 및 정제

1) ACI-1, Class A β-lactamase 발현 및 정제 조건 확립

- *Acidaminococcus fermentans* 유래한 class A β-lactamase , ACI-1 서열을 확보한 뒤 signal peptide 서열을 제거함. 이를 제한효소 Nde Ⅰ, HindⅢ를 이용해 pET24a vector에 삽입하여 유전자 확보함.
- *E.coli* BL21(DE3)를 숙주로 15℃에서 40시간 배양하며 0.5 mM의 IPTG로 가용성 발현을 유도함.
- pH 6.5~8.0 버퍼 조건에서 ion exchange chromatography 및 size-exclusion chromatography을

이용하여 분리 시도 하였으나 낮은 purity로 정제됨.

- *m-Aminophenylboronic acid-Agarose* resin을 이용하는 새로운 affinity chromatography 방식 (Cartwright, S. J., & Waley, S. G., Biochemical Journal, 1984)을 도입하여 pH 7.0 조건에서 정제 진행함. 이후 size exclusion chromatography을 통해 95% 이상의 고순도 단백질을 리터당 7 mg 정도 확보함.

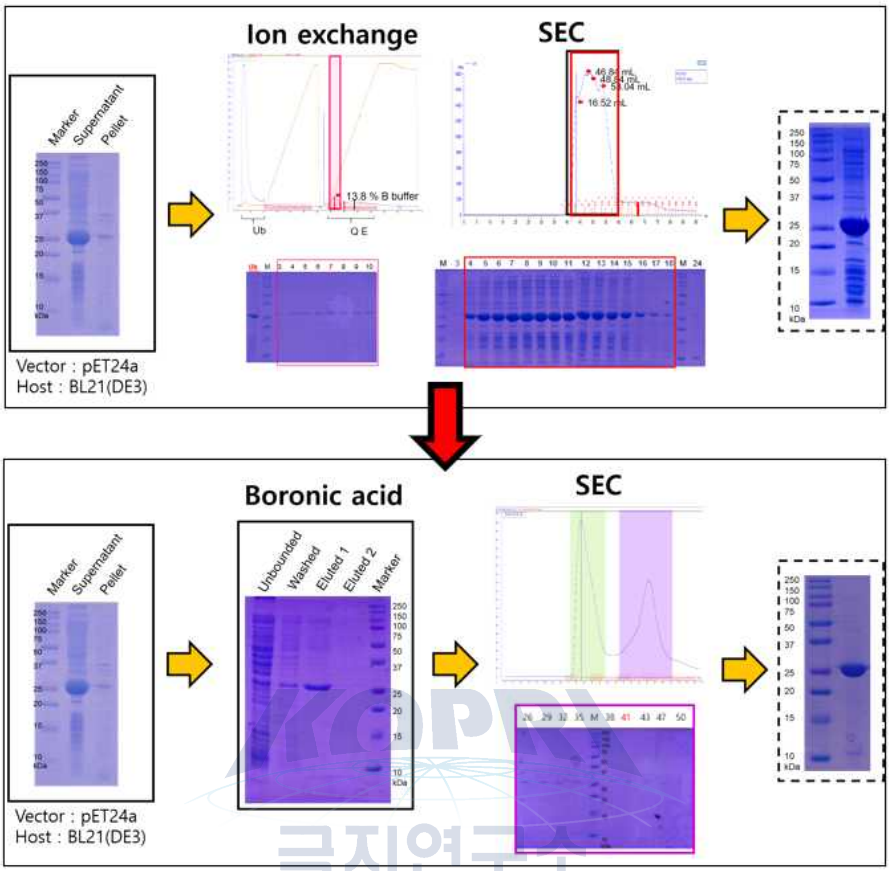


그림. ACI-1의 발현 및 정제

2) CDA-1, Class C β-lactamase 발현 및 정제 조건 확립

- *Cedecea davisae* 유래된 class C β-lactamase, CDA-1의 서열 (GenBank: KJ650399)에서 signal peptide 서열을 제거함. 이를 제한효소 Nde Ⅰ, Hind Ⅲ를 이용해 pET24a vector에 삽입하여 유전자 확보함.
- *E.coli* BL21(DE3)를 숙주로 15도에서 25시간 배양하며 1.0 mM의 IPTG로 가용성 발현을 유도함.
- pH 7.0과 pH 8.0 조건의 버퍼에서 수용성 단백질 발현을 확보하였고, Q와 SP resin에 binding하여 최종 염의 농도가 1 M NaCl이 되도록 Isocratic Elution을 진행함.

KOPRI 극지연구소

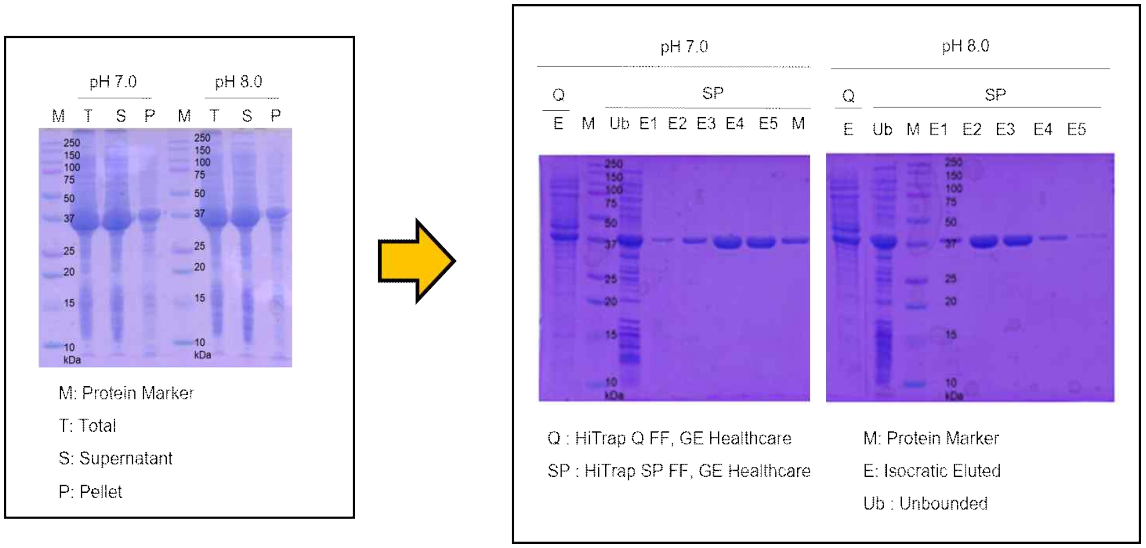


그림. CDA-1의 발현 및 pH 7.0과 8.0 조건 정제

- 위 그림과 같이, pH 7.0과 pH 8.0 두 조건에서 모두 ion exchange chromatography를 통해 정제가 가능하나 pH 8.0조건 보다 pH 7.0 조건에서 더 많은 타겟 단백질이 정제되는 결과 보임.
- 10 mM potassium phosphate, 10 mM β-mercapto ethanol (pH 7.0) 조성의 버퍼를 이동상으로 이용하였고, ion exchange chromatography를 통한 정제 과정에서는 1 M NaCl 까지 gradient를 주어 elution을 진행함. 그 후 동일 이동상으로 size exclusion chromatography 진행. 결과적으로 95% 이상의 고순도 단백질을 리터당 6 mg 정도 확보함.

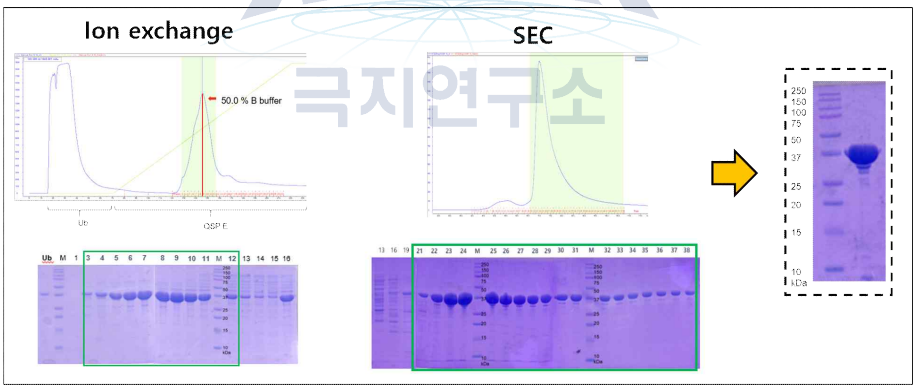


그림. Ion exchange chromatography와 size exclusion chromatography를 통한 CDA-1의 고순도 정제

3) Novel Zn^{2+}-dependent class C β-lactamase로 추정되는 PA5542 단백질 발현 및 정제조건 확립

- β-lacamase는 작용 메커니즘에 따라 serine β-lactamase (class A, C, D)와 metallo-β-lactamase (class B)로 구분됨. PA5542는 *Pseudomonas aeruginosa* 균 유래 class C β-lactamase로 분류되며 Zn^{2+} 존재 하에 활성이 증진된다는 보고가 있음 (Fajardo, Alicia, et al., JAC, 2014). 이는 기존에 보고되지 않은 새로운 양상의 β-lactamase인 것으로, PA5542의 구조 및 메커니즘 규명은 항생제 개발 및 내성균의 진화 양상 연구에 중요한 의의를 갖음.
- *Psedomonas aeruginosa* PAO1 유래 PA5542 유전자 서열 (NCBI: NC002516.2)을 확보하여 signal peptide 제거 및 direct 6x histidine tag을 부착한 뒤 대장균 발현 벡터인 pET24a에 삽입함.
- 형질전환 방법을 이용하여 확보한 벡터를 *E. coli* BL21(DE3)에 삽입한 뒤, 16℃, 0.1 mM IPTG

조건에서 단백질 과발현 여부 확인 함.

- 20 mM Tris pH7.5, 200 mM NaCl 버퍼 조성에서 단백질이 수용화 된 상태로 존재함을 확인함. Ni-NTA affinity 크로마토그래피 및 Size-Exclusion chromatography를 통해 순도 95% 이상의 단백질을 확보하였음.

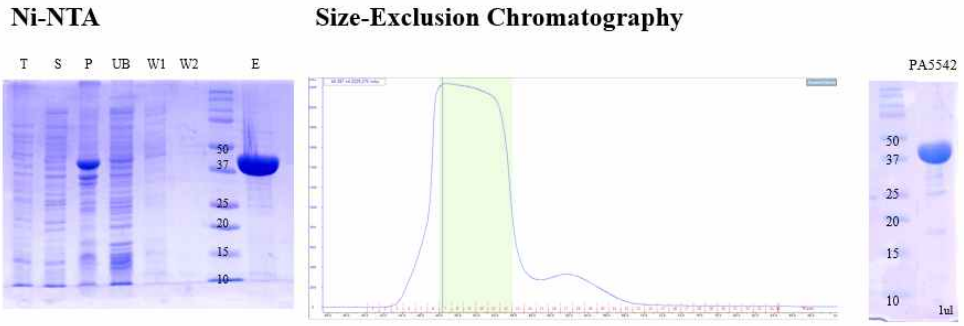


그림. PA5542 단백질 정제 과정

4) *Vibrio vulnificus* Dihydropteroate Synthase (*Vv*DS)

- 항생제 내성 관련 해양생물 유래 표적 단백질, *Vv*DS 선정 및 발현 벡터 제작

○ 심각한 항생제 내성 문제 때문에 치료제 사용이 제한되고 있는 해양 미생물 *Vibrio vulnificus*를 모델 균주로 선정

○ 미생물 생존에 필수적인 엽산의 생합성 경로 핵심 효소인 Dihydropteroate Synthase (DHPS)를 표적 단백질로 선정

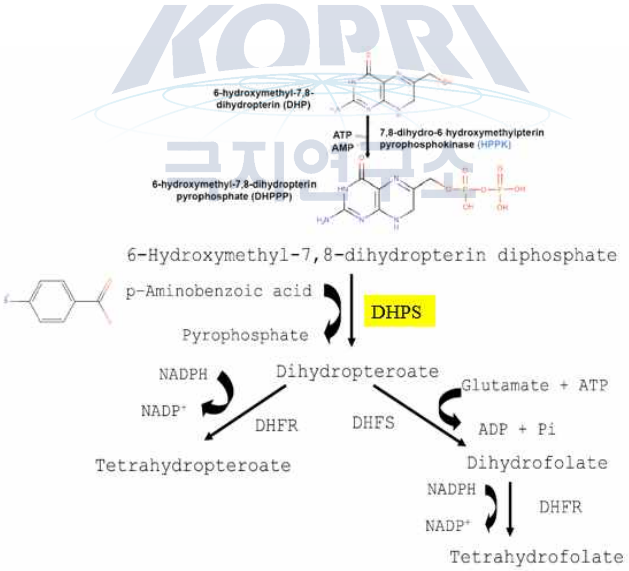


그림. 미생물의 엽산 생합성 경로

○ NCBI 데이터베이스를 통해 얻은 *Vibrio vulnificus* Dihydropteroate Synthase (*Vv*DS) 서열 (WP_013571176.1)을 기반으로 한 유전자 확보

○ 확보한 *Vv*DS 유전자를 대장균 발현 벡터인 pRSET A에 삽입. pRSET A에 암호화되어있는 His-tag(Ni-NTA 친화 크로마토그래피를 이용한 정제)이 결합된 재조합 단백질이 발현되도록 설계

- 대장균 시스템을 이용한 *Vv*DS 수용성 단백질 과발현 조건 확립

○ 제작한 발현 벡터를 단백질 발현 대장균 숙주인 BL21(DE3)에 형질전환 시킴

○ LB 배지에서 OD_{600nm}=0.5~0.6 까지 배양하여 IPTG 농도, 발현 온도, 시간 등을 변경하면서 수용

성 단백질로 얻어지는 최적의 조건 확립

○ 단백질 과발현 최적화 조건 : BL21(DE3), 1 mM IPTG, 15℃, 23시간

○ 충분한 양의 수용성 단백질을 확보하기 위해 버퍼의 pH 조건, chemical 종류, salt의 종류와 농도, reducing agent 유무 등의 조건을 다양하게 테스트 후 단백질 정제 실험 조건 확립

○ 수용성 단백질 획득 조건 : 20 mM Tris pH 7.5, 10 mM β-mercapto ethanol

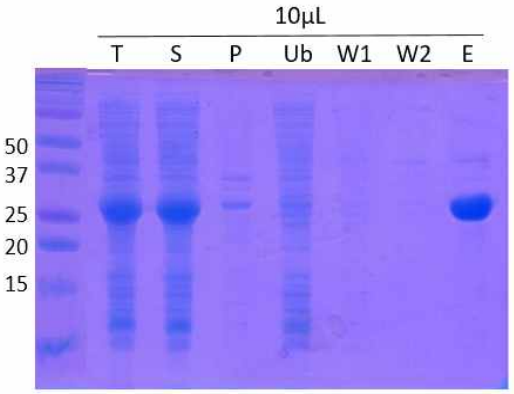


그림 X. 수용성 VvDS의 발현 결과

○ 3가지 크로마토그래피 기법(친화 크로마토그래피, 음이온-교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피)을 통해 95% 이상 고순도의 *Vv*DS 단백질을 정제함

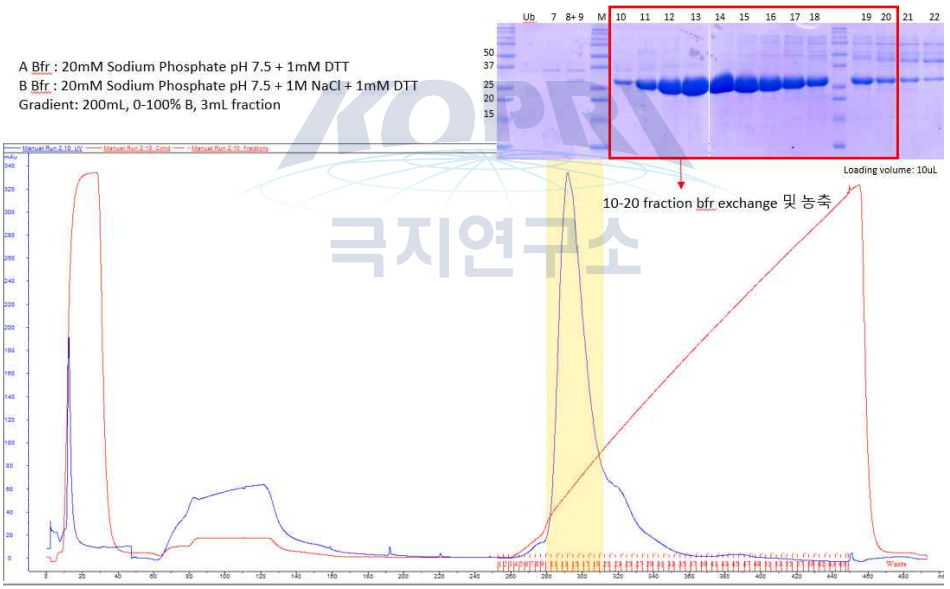


그림 X. *Vv*DS 단백질의 음이온-교환 크로마토그래피 정제 결과

5) Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) 유래 HMG-CoA reductase (HMGR) 유전자 확보

- 미생물 생존에 필수적인 mevalonate pathway 조절에 관여하는 HMGR를 신규 항생제 개발의 표적 단백질로 선정하였음.

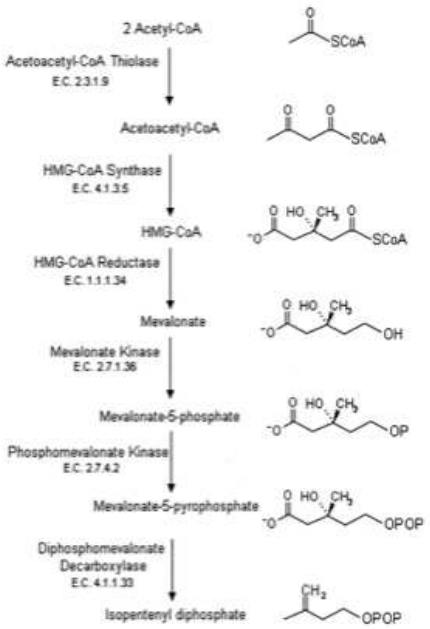


그림 X. Mevalonate pathway

- 슈퍼박테리아인 MRSA 유래 class Ⅱ HMGR의 유전자를 확보하여 대장균 발현 벡터인 pET24a에 삽입하여 유전자 확보함.

6) Nonribosomal peptide synthetase (NRPS) type II Thioesterase(TE) 발현 및 정제조건 확립
- Rosetta(DE3)pLysS 대장균 시스템을 활용하여 pET28a 벡터에 인코딩된 *Streptomyces sp. SNM55*균 유래 type Ⅱ TE의 재조합 단백질을 발현함
- 수용성 단백질을 얻기 위해 버퍼의 pH, Salt농도, 환원제 등의 조건 수립
- 단백질의 정제를 위해 친화도, 이온-교환, 크기-배제 크로마토그래피 등의 3단계 기법을 통해 95% 이상의 고순도 단백질 획득. 세포 배양 리터당 약 8 mg이상의 고순도 단백질 수득

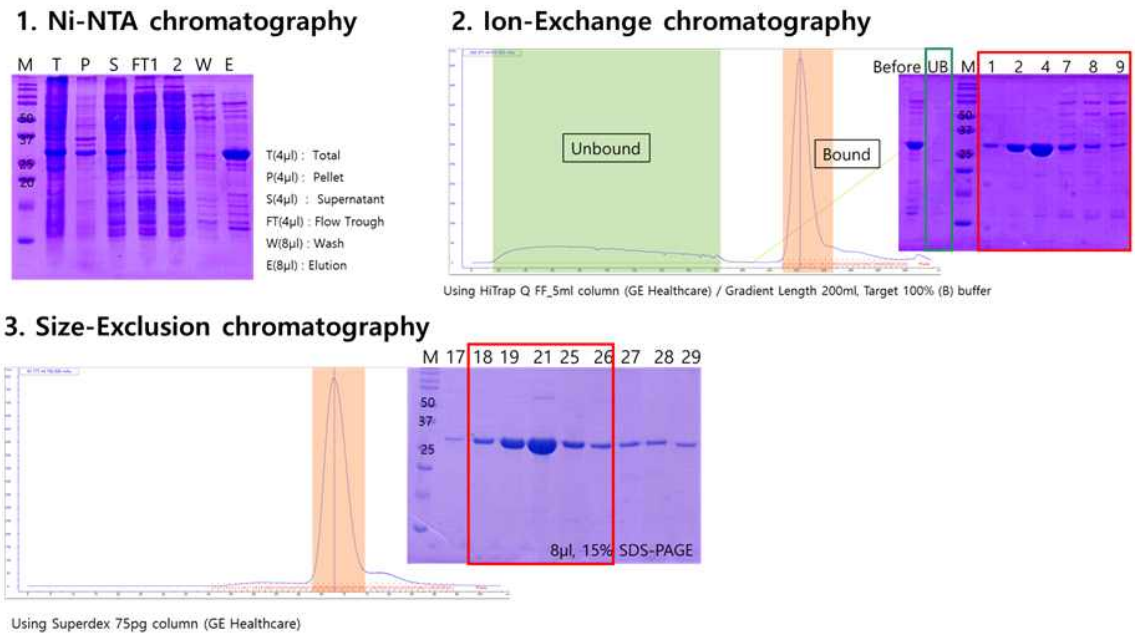


그림. *Streptomyces sp. SNM55*균 유래 type Ⅱ TE의 3단계 정제실험 데이터

7) Class C β-lactamase 정제기법 개발

- Class C β-lactamase는 그람음성균에서 널리 분포되어있으며, cephalosporin, carbapenem 계열을 포함하는 많은 β-lactamam 약물을 가수분해하여 항생제에 대한 저항성을 보이는 것으로 알려져 있음. 따라서 class c β-lactamase에 대하여 현존하는 β-lactamam 항생제들의 작용기전 규명, 활성을 분석하는 작업은 매우 중요하다고 할 수 있음.
- 많은 Class C β-lactamase의 N-term에는 signal peptide가 존재하여 cytoplasm에서 발현이 된 후 periplasm으로 나갈 수 있지만, 실험을 위해 제작된 재조합 DNA의 경우에는 발현이 된 후 세포질 내에서만 존재함. 이 경우 균주의 대사산물이 lactamase 활성부위의 친핵성 세린기에 결합하여 효소활성이 없는 형태의 단백질이 얻어질 수 있음. 따라서 효소활성측정 및 기질결합 복합체 구조규명을 위해서는 활성이 없는 형태의 단백질과 아무것도 붙어있지 않은 apo 상태의 단백질은 분리되어야 함.
- 생명체의 유전 물질인 핵산을 구성하는 단위 분자인 AMP가 class C β-lactamase에 대하여 저해활성을 보인다는 보고가 있음 (Kim et al. 2017. JAC). 해당 보고에 근거하여 뉴클레오타이드를 분리하는 데에 용이한 것으로 알려진 affinity column을 이용하여 class C β-lactamase를 정제 시도하였음.
- Column에 붙은 형태의 단백질과 붙지 않은 형태의 단백질로 나뉘어 졌으며, 각각을 결정화하여 구조를 규명한 결과, 붙지 않은 형태의 단백질은 AMP가 친핵성 세린기에 붙어 변형된 형태임을 알 수 있었음. 즉, affinity 크로마토그래피 과정을 추가하여 class C β-lactamase의 활성이 있는 형태와 없는 형태의 단백질을 분리할 수 있다는 결론을 도출하였음.

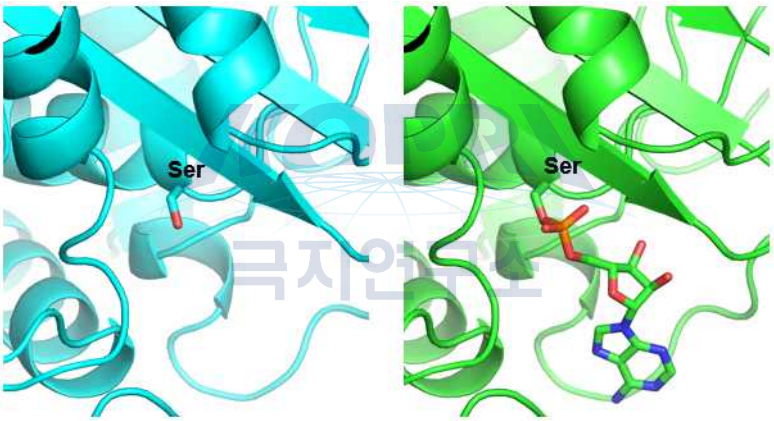


그림. Column에 붙은 형태(좌), 붙지 않은 형태(우)

나. 타겟 단백질 결정화 실험

1) PA5542 단백질의 초기 결정 및 X-ray 회절 데이터 확보

- PA5542와 의 상호작용을 단백질 결정 구조로 확인하기 위해, 고순도로 정제된 PA5542에 Zinc Acetate를 첨가하여 결정화 실험 진행함. Microbatch crystallization 방식을 이용하여 침전제, 염, 완충용액 조건이 다양하게 조합된 결정화 solution 약 2000여종에 대해 screening 진행함.
- 약 30여 조건에서 단백질 결정을 확보하였고, X-ray 회절 실험을 통해 단백질 결정임을 확인하였음. Zn-SAD 방법 (Cha, S-S., et al., 2012, ActaD)을 통해, space group C2에 해당하는 1.9 Å의 고해상도 회절 데이터를 확보함.

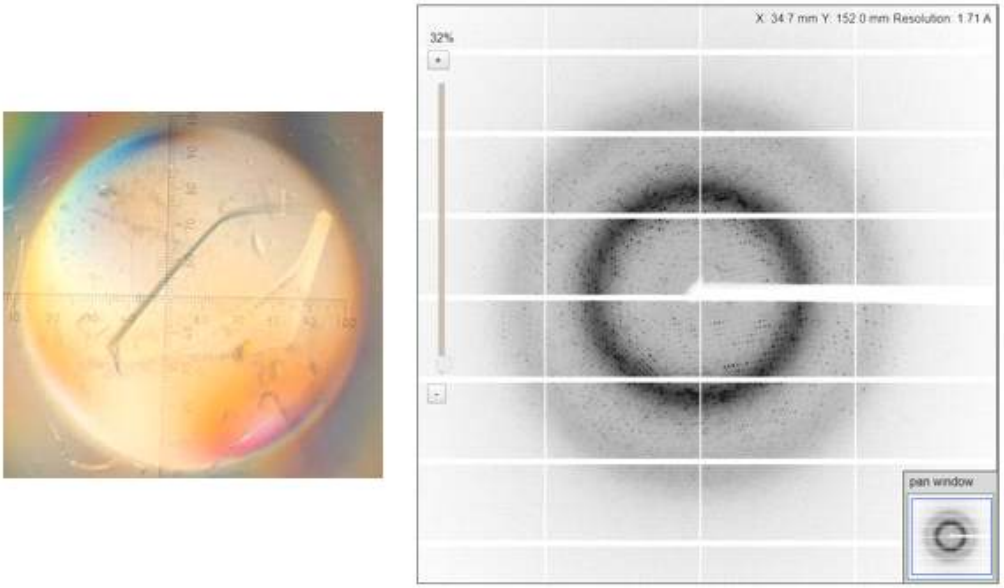


그림. PA5542 결정 사진 (좌) 및 X-ray 회절 데이터 (우)

2) 저온성 미생물 유래 class A β-lactamase

- 연구 목적

○ 현존하는 항생제에 내성을 나타내는 슈퍼박테리아의 등장으로 인류 보건이 위협받고 있음.

○ 항생제 내성 문제를 피하면서 지속적 치료 효과를 나타내기 위해 기존의 항생제와 차별화된 완전히 새로운 방식의 항생제 발굴이 필요하며, 이를 위해 항생제 발굴이 비교적 덜 이뤄진 해양극지 생태계를 기반으로 연구를 진행함.

○ 이러한 전략의 일환으로 해양 극지 유래 천연물의 타겟인 해양 극지 미생물 유래 타겟 단백질을 확보하여 해양 극지 유래 신규 항생 후보 물질의 활성을 확인하고 다재내성 병원균 유래 표적 단백질에 최적화를 꾀하고자 함.

- 기존 연구 성과

○ 현재는 종료된 다른 연구과제를 통해 해양극지 미생물 유래 class A β-lactamase의 유전자인 ColdA를 확보하였으며, 단백질 발현, 정제, 및 결정화를 통해 구조를 밝힘.

○ 저온성 해양 미생물인 *Moritella marina* ATCC15381 유래 class A β-lactamase인 Cold A 유전자를 확보하고 대장균 발현 시스템을 이용할 수 있는 벡터에 해당 유전자를 삽입함.

○ 발현 벡터를 대장균 숙주 BL21(DE3)에 형질전환하여 iopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 이용하여 과발현 시킴.

○ 수용성 단백질 과발현 조건: 0.5 mM IPTG, 10℃, 120rpm, 41hr

○ 과발현한 단백질을 Ni-NTA affinity chromatography 및 size-exclusion chromatography를 통해 고순도로 정제, 분리함.

○ 고순도로 정제하여 확보한 20 mg/mL Cold A를 아래와 같은 조건에서 결정화 함.

○ 결정 조건: 0.2 M Sodium chloride, 0.1 M Cacodylic acid sodium salt trihydrate pH 6.6, 27% PEG3350

그림. 최적화를 통해 얻은
Cold A 결정

- 해당 결정을 이용하여 X-선 회절 실험을 통해 1.75 Å resolution의 sapce group *P*3(1)2(1) 결정 구조를 얻음.

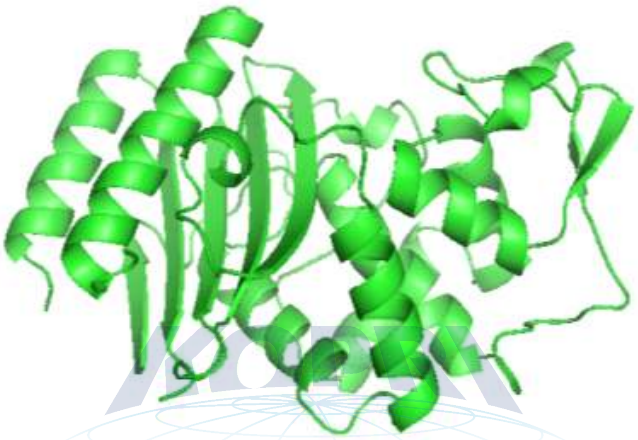


그림. *Moritella marina* ATCC15381유래 Cold A의
3차구조

- Cold A의 구조를 기질 스펙트럼이 넓은 class A β-lactamase인 PSE-4의 구조와 비교 분석함.
- Cold A는 PSE-4의 기질확장성에 중요한 역할을 하는 돌연변이인 K234R을 가지고 있는 것으로 확인됨.
- 반면, 기질 인식에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 PSE-4의 Y105가 Cold A에서는 W105로 이는 Cold A의 기질 특이성에 기여할 것으로 예상됨.

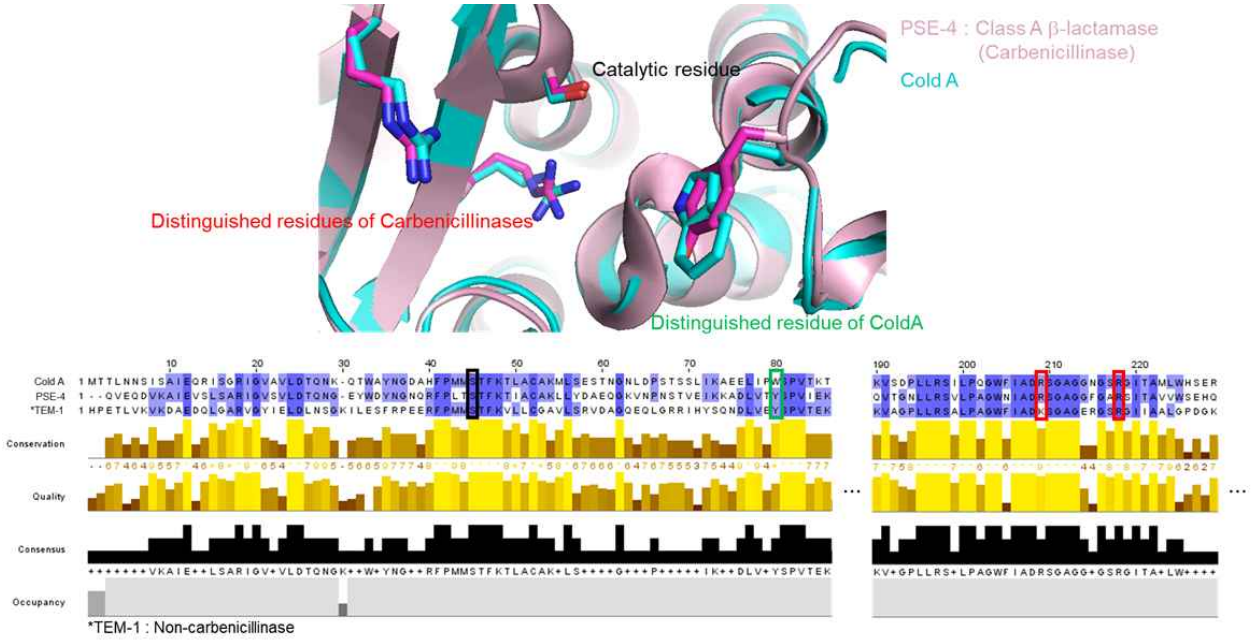


그림. Cold A와 PSE-4의 서열 및 구조 비교 분석

- Cold A의 β-lactamase 활성을 확인하기 위해 β-lactam 분광학적 방법을 통해 항생제 유사체인 nitrocefin의 가수분해 활성을 확인하고, 효소동력학적 실험을 실시하여 그 활성을 정량적으로 분석함 (K_M=32.58 μM, K_{cat}=232.5 sec^{-1}).

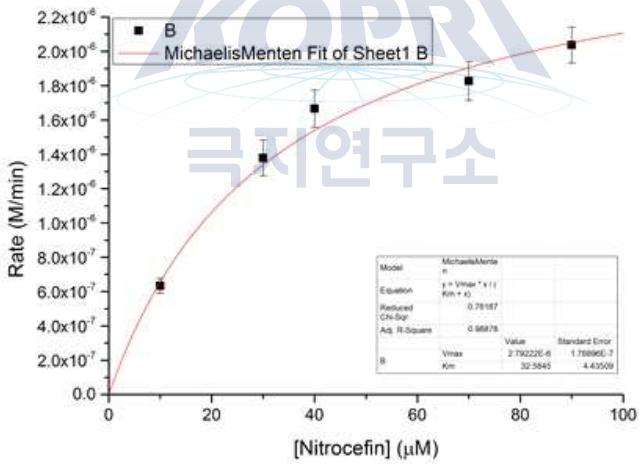


그림. Nitrocefin에 대한 Cold A의 Michaelis-Menten 그래프

- 당해 연도 연구 성과 및 연구 계획

○Cold A의 다양한 β-lactam 기질에 대한 활성 확인 및 효소동력학적 실험을 진행하기 위해 추가 정제를 통해 Cold A 단백질을 확보함.

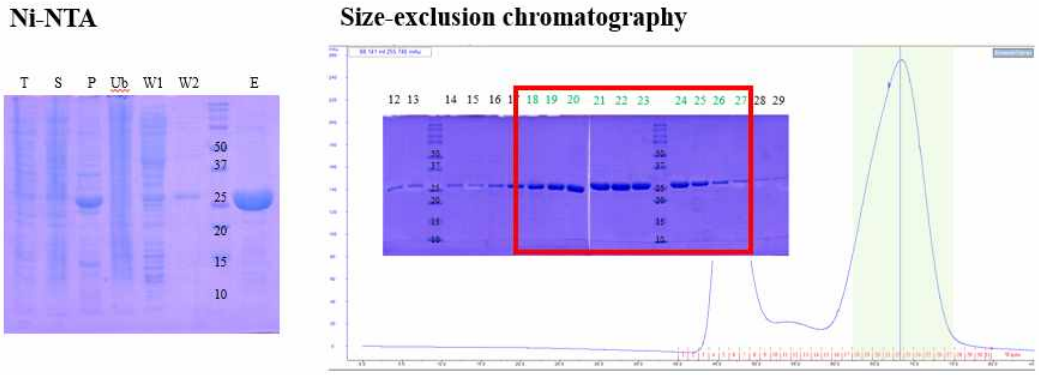


그림. coldA 단백질 정제

3) *Vibrio vulnificus* Dihydropteroate Synthase (*Vv*DS)

- *Vv*DS 단백질 결정화 조건 탐색

○ 1000종 이상의 다양한 침전제, 염, 완충용액 조건을 가진 결정화 스크리닝 용액을 이용하여 *Vv*DS 결정화 시도

○ Microbatch 방법을 통해 고순도로 정제된 단백질의 초기결정 획득

○ *Vv*DS 초기 결정 조건 4건 확립

: 0.2 M Magnesium Formate pH 5.9, 20%(w/v) Polyethylene glycol 3350

: 0.2 M Sodium Thiocyanate pH 6.9, 20%(w/v) Polyethylene glycol 3350

: 2.0 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Bis-Tris pH 6.5

: 0.2 M Sodium Bromide 20%(w/v) Polyethylene glycol 3350

그림. *Vv*DS 초기결정

○ *Vv*DS 초기결정 조건 최적화를 위한 단백질 추가 정제

- 확립한 단백질 정제조건을 활용하여 추가적인 고순도 단백질 정제 진행

- 90% 이상 정제된 *Vv*DS 수율 : 형질전환 대장균 1L당 95mg 획득

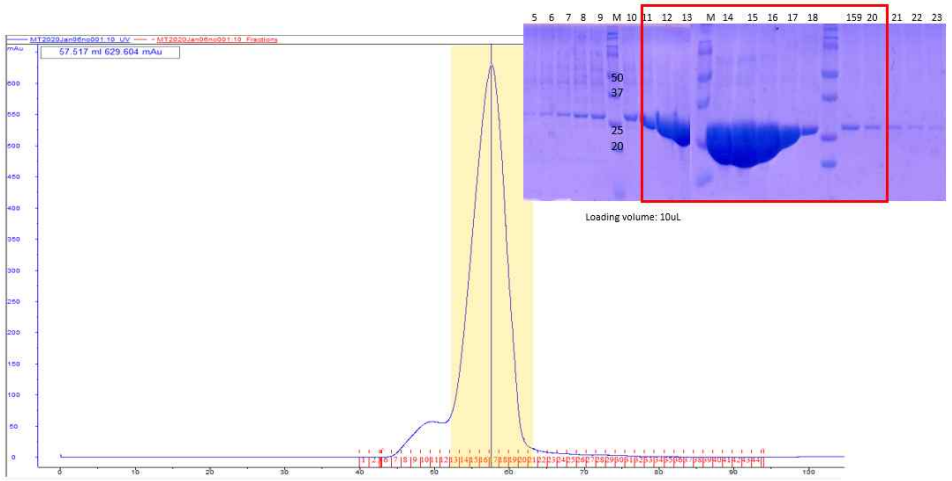


그림. *Vv*DS 단백질의 크기 배제 크로마토그래피 정제 결과

- *Vv*DS 결정조건 최적화

○초기결정 획득한 결정화 용액의 salt 농도 및 완충용액의 pH 변경을 통한 결정화 조건 최적화

○3.0 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Bis-Tris pH 5.6 조건에서 단결정 획득

그림. *Vv*DS 결정화 조건 최적화 진행 후 결정

4) NRPS type II TE

- 수득된 단백질을 20mg/ml로 농축하여 apo상태에서 총 384조건 결정화 screening 진행하였으며, 해당 단백질의 특이적 기질로 예상되는 Asparagine(Asn)을 co-crystallization하여 총 432조건 screening 진행함.
- Apo상태의 경우 약 30가지의 조건에서 단백질 결정으로 예상되는 초기결정을 확보하였으며, Asn과 co-crystallization의 경우 15가지 조건에서 단백질 초기결정 확보함. 이는 추후 X-ray 회절 실험을 통해 단백질 결정구조 회절 데이터 확보 예정.

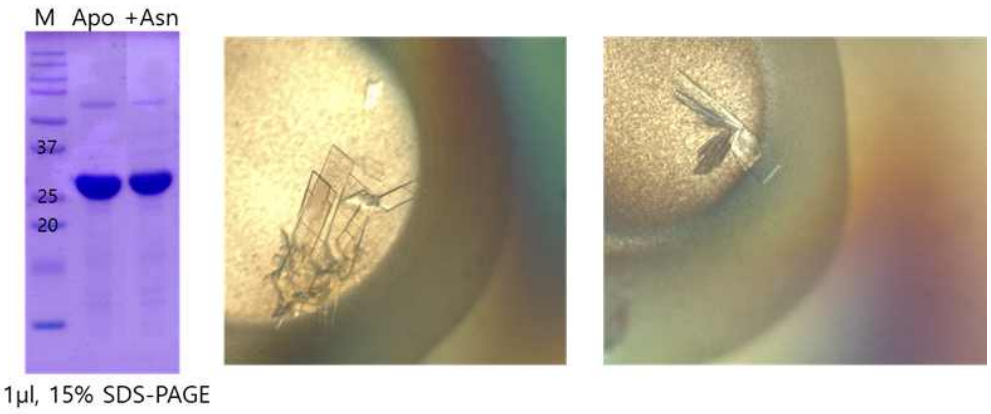


그림. type II TE의 결정화 실험 샘플에 대한 SDS-PAGE 분석 및 apo상태(좌)와 Asn co-crystallization 상태(우)의 초기결정 사진

5) Class C β-lactamase인 AmpC HD 단백질의 결정구조 규명 및 분석

- *Serratia marcescens*균 유래 Class C β-lactamase인 AmpC HD의 결정구조 회절 데이터를 규명하기 위해 *Phenix* 소프트웨어의 *phaser-MR*과 *phenix.refine* tool을 이용하여 molecular replacement(MR)와 refinement 수행
- 95% 이상의 completeness를 갖는 결정구조를 규명하였으며 이에 대한 단백질 구조 분석 진행
- 결정구조 분석결과, 단백질의 active site에 peptide가 상호작용하여 packing을 이루고 있음을 확인하였으며 이를 바탕으로 단백질과 peptide간의 상호작용 분석 실험 단계에 있음. 또한 추후 peptide 기반 class C β-lactamase inhibitor 설계 적용 예정

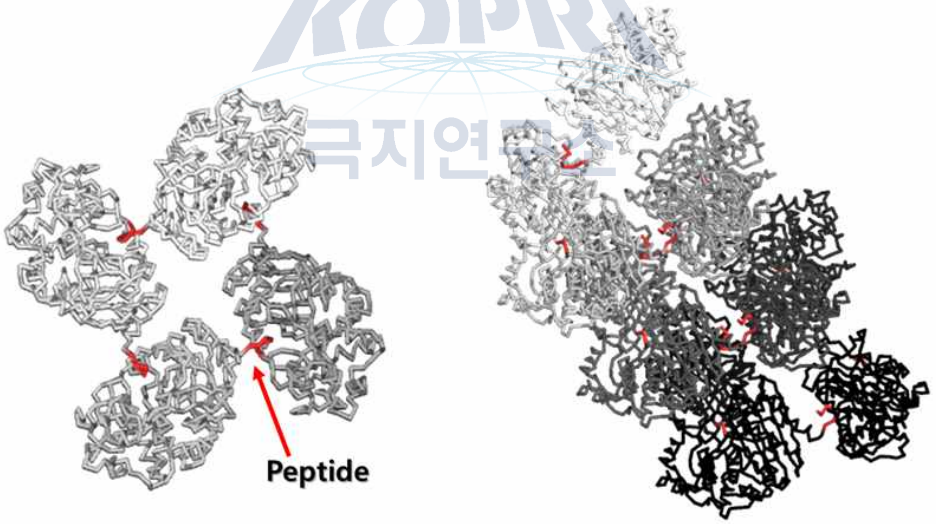
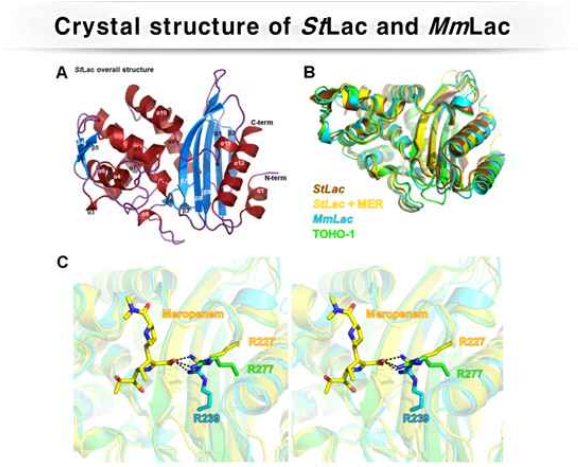


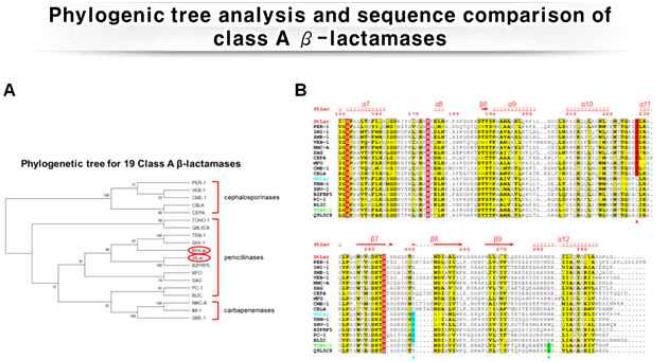
그림. AmpC HD의 결정구조의 top view(좌) 및 side view(우)

다. β-Lactam 항생제 변형효소인 β-Lactamase 구조 및 생화학적 특성 분석

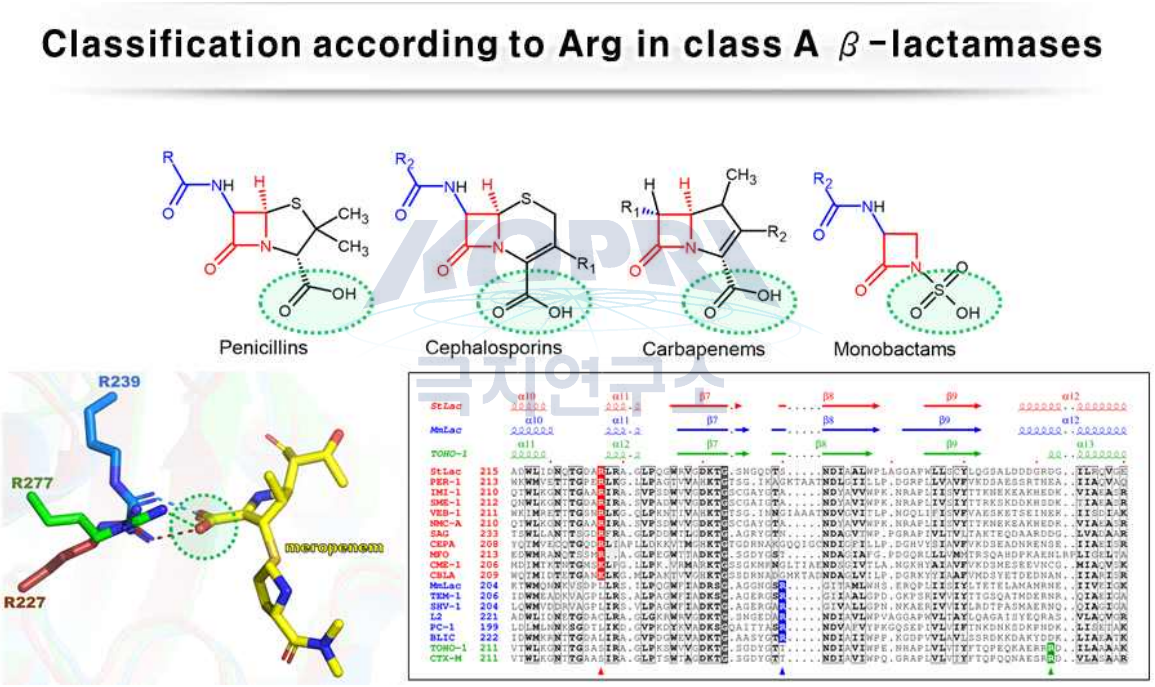
1) *Senotrophomonas* sp. KCTC 12332에서 유래한 Lactamase (*St*Lac) 와 *Moritella marina* ATCC15381에서 유래한 Lactamase (*Mm*Lac)의 고해상도 구조 해석

- Lactamase의 전체적 구조 특성을 밝히고 다른 Lactamase와의 구조 비교 분석을 통해 Lactamase 그룹을 나누는 새로운 기준 제시





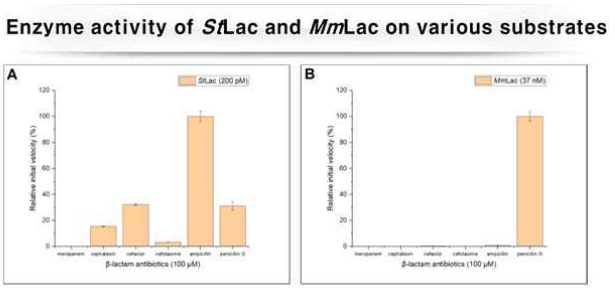
- Lactamase의 구조 분석 결과 비슷한 단백질 서열을 가진 효소임에도 불구하고 Arginine의 위치에 따라 Class A Lactamase 그룹을 나누는 기준이 되는 것을 확인

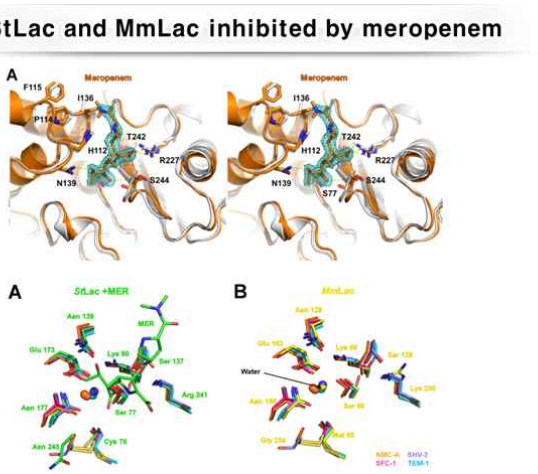


2) Lactamase의 효소 활성 분석을 통한 기질 특이성 확인

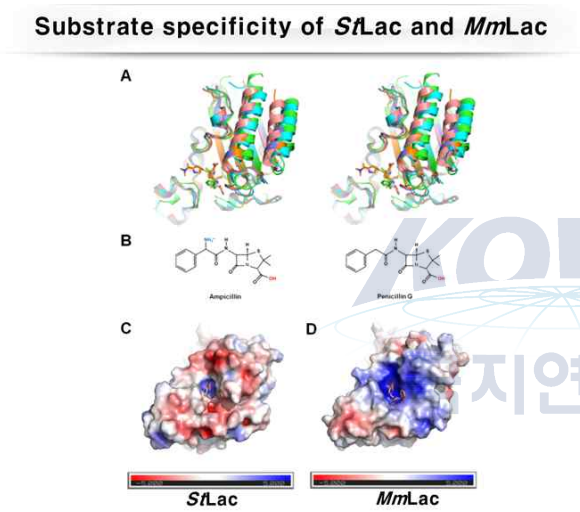
- *St*Lac의 경우 meropenem을 제외한 cephalexin, cefaclor, cefotaxime, ampicillin, 그리고 penicillin G에 효소 활성을 가지는 반면 *Mm*Lac의 경우 오직 penicillin G에 효소 활성을 확인

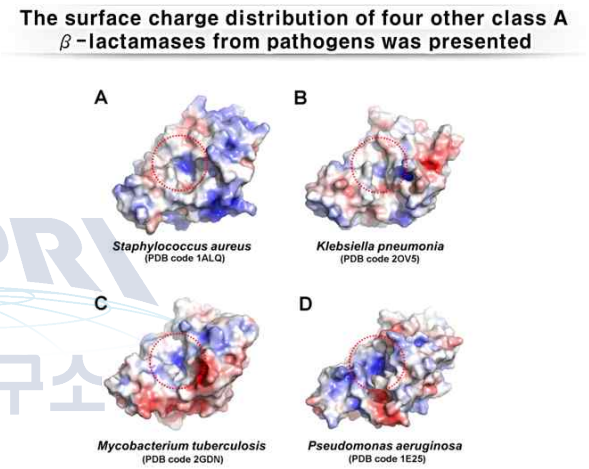
- Lactamase 기질 특이성을 구조를 바탕으로 해석





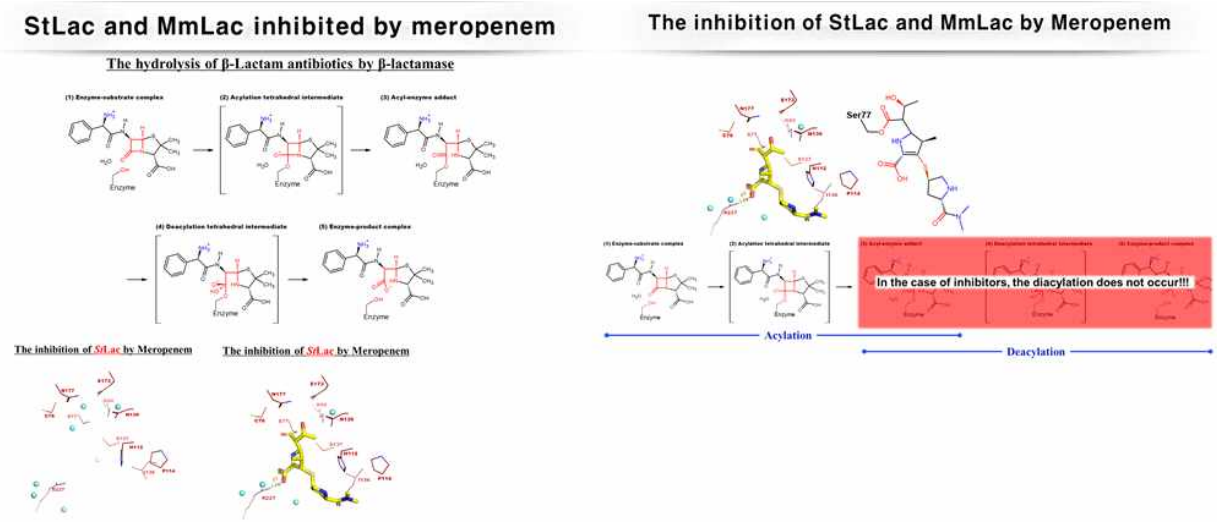
- 구조 분석 결과 StLac 와 MmLac의 항생제 기질 특이성이 단백질 표면 잔기의 영향을 받음을 알아냄
- StLac는 활성부위에 Meropenem의 저해 메커니즘을 바탕으로 새로운 meropenem 유도체 합성



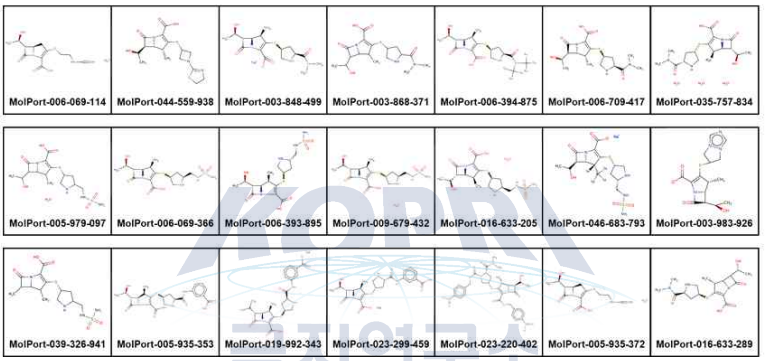


3) *St*Lac 와 *Mm*Lac 모두 meropenem에 의해 활성이 저해됨을 확인
- StLac는 Lactam 계열의 항생제를 hydrolysis하기위해 acylation 과 deacylation 과정을 거침
- Meropenem은 StLac의 활성 부위에 결합하여 효소의 deacylation 과정을 저해함
- Meropenem에 의한 *St*Lac의 deacylation 저해 과정 메커니즘을 밝힘

KOPRI 극지연구소



- Meropenem의 저해 메커니즘을 바탕으로 새로운 meropenem 유도체 합성 및 라이브러리 구축



※2차년도: 2021년 결과

<1세부> 극지 및 해양유래 희귀 생물자원 확보

가. 극지/해양 미생물들의 지속적인 스크리닝을 통하여 뛰어난 항균활성을 보이는 유용 균주 발굴 (극지연)

1) 극지유래 항생물질 생산 후보 미생물 배양

- 북극환경 유래 *Streptomyces* 속 균주 11점 확보, 항균활성 실험 수행 및 활성 보이는 균주 *Streptomyces* avidinii PAMC 29639에 대한 유전체 분석 수행을 통해 약 8.4Mb 유전체 확보 완료
- 신규 항생물질 생산 후보 미생물을 스크리닝하기 위하여 남극 킹조지섬 바톤반도의 호수, 북빅토리아 랜드의 암석, 눈, 빙하를 대상으로 미생물 순수분리 배양을 수행하였음. 그 결과 총 39종의 108 균주를 확보하였음. 호수에서는 총 14종의 25균주, 암석(7균주)과 눈(8균주)은 각각 4종이 확인되었고, 스틱스 빙하의 경우 18종 68균주를 확보하였음. 확보된 균주의 동정결과는 아래의 표와 같음.
- 남극 스틱스 빙하 시료에서 추가로 350개 균주(10도 배양체 300균주, 25도 배양체 25균주) 확보하여 동정 진행 중. 빙하 미생물 배양은 극지연구소 주요사업 “국제심부빙하시추 네트워크를 활용한 대기-빙상 상호작용의 자연적·인위적 특성 규명” 과 공동으로 진행하고 있음.

Identification					No of strains according to the isolation source				Total
					King George Island	Northern Victoria Land			
Phylum	Class	Order	Family	Species	Freshwater	Rock	Snow	Glacier	
Actinobaceria	Actinomycetia	Dermatophilales	Dermacoccaceaea	Dermacoccus nishinomiyaensis		1			1
		Microbacteriales	Microbacteriaceae	Cryobacterium breve		1			1
				Cryobacterium soli		1			1
				Lacisediminihabitans profunda		4			4
				Subtercola boreus			4		4
				Subtercola vilae			1		1
			Micrococcaceae	Micrococcus luteus	2		2		4
				Paenarthrobacter nicotinovorans	1				1
Alphaproteobacteria		Rhizobiales	Methylobacteriaceae	Methylobacterium radiotolerans	4				4
			Nitrobacteraceae	Bradyrhizobium elkanii				37	37
		Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Roseomonas mucosa				4	4
		Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas echinoides				4	4
				Sphingomonas aerolata				4	4
				Sphingomonas aquatilis				1	1
				Sphingomonas glacialis				4	4
Betaproteobacteria		Burkholderiales	Burkholderiaceae	Caballeronia sordidicola				1	1
			Comamonadaceae	Polaromonas vacuolata				1	1
				Rhodoferax ferrireducens				1	1
				Rhodoferax aquaticus				1	1
				Variovorax boronicumulans				2	2
			Oxalobacteraceae	Rugamonas rubra				1	1
Gammaproteobacteria		Lysobacterales	Rhodanobacteraceae	Rhodanobacter ginsengisoli				1	1
		Pseudomonadales	Moraxellaceae	Psychrobacter alimentarius				1	1
			Pseudomonadaceae	Pseudomonas antarctica				2	2
				Pseudomonas kitaguniensis				1	1
				Pseudomonas syringae				1	1
				Pseudomonas poae				1	1
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Halpernia frigidisoli	4				4
	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Mucilaginibacter rigui	1				1
				Mucilaginibacer phyllosphaerae			1		1
				Pedobacter paludis	1				1
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus infantis	2				2
				Metabacillus indicus	1				1
				Brevibacterium frigoritolerans	1				1
				Peribacillus butanolivorans	1				1
			Paenibacillaceae	Paenibacillus lautus	1				1
				Paenibacillus humicus	1				1
				Paenibacillus glucanolyticus	4				4
			Planococcaceae	Paenisporosarcina indica	1				1
Total					25	7	8	68	108

2) 항생물질을 찾는 빈도를 증가시키기 위해 기존에 항생물질을 내놓은 종 *Streptomyces* sp. 혹은 *Bacillus* sp.를 (총 8종) 우선 선별하여 항생물질 스크리닝을 실시함.

- 미생물의 배양 조건에 따라 항생물질이 발현이 달라지므로 Agar based 추출 혹은 액체 배양 두 방법을 통해 얻은 2차 대사산물을 이용하여 항균 활성 테스트를 실시함.
- 극지 미생물을 배양한 배양액을 원심분리를 통해서 미생물을 일차적으로 분획한 뒤 Ethyl Acetate로 항생제 부분을 획득하여 항생 효과를 측정함.
- 그람 음성 (*Escherichia coli*), 그람 양성 (*Staphylococcus aureus*), 곰팡이 (*Candida albicans*) 종에 대한 살균효과를 측정하였음.

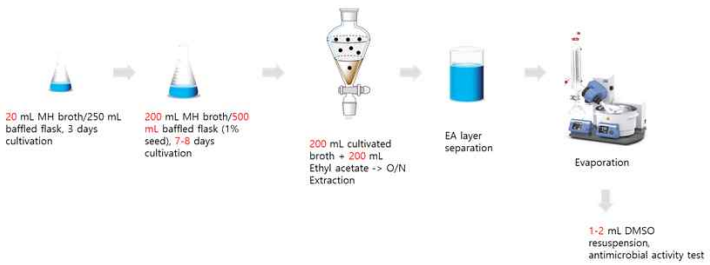
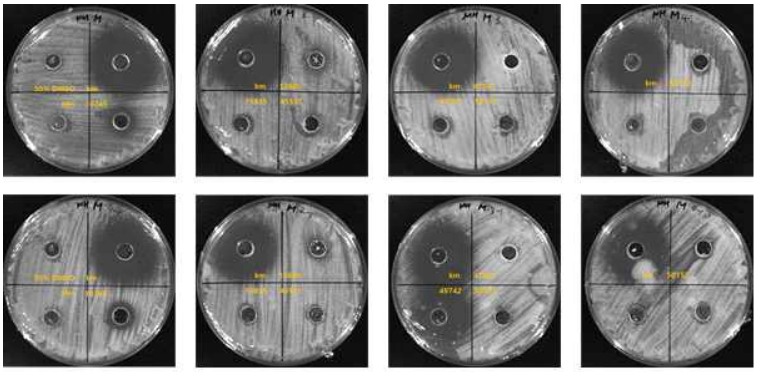
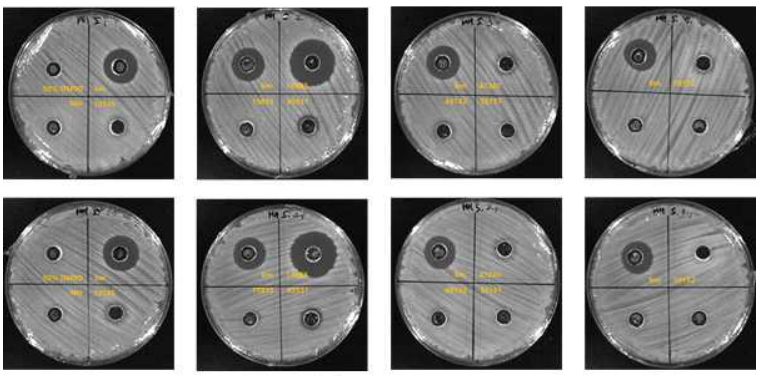


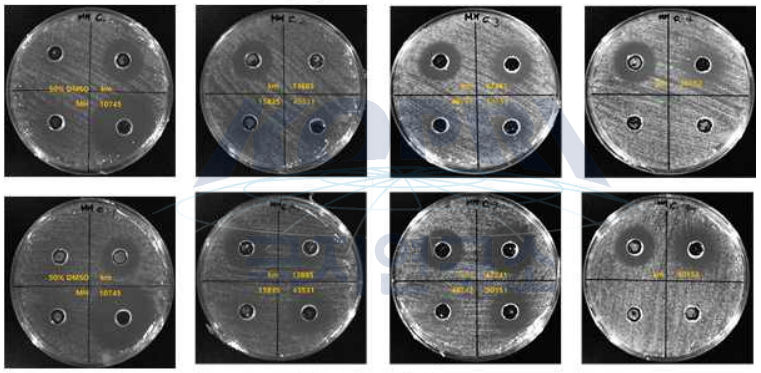
그림. 극지 미생물에서 항생물질 분획을 획득하는 과정



Escherichia coli



Staphylococcus aureus



Candida albicans

Tests/ Identification No. / Pathogen	*Streptomyces fradiae*	*Amycolatopsis mediterranei*	*Micromonospora echinospora*	*Bacillus aryabhattai*	*Bacillus aryabhattai*	*Bacillus idriensis*	*Bacillus idriensis*	*Bacillus oceanisediminis*
	10745	13685	15835	45531	47241	49742	50151	50152
Escherichia coli	+	+	-	-	-	-	-	+
Staphylococcus aureus	+	+	-	+	+	+	-	+
Candida albicans	+	+	-	+	+	-	+	+

표. 극지유래 미생물이 분비하는 항생물질 스크리닝 결과. + 살균효과 있음, - 살균효과 없음.

3) 극지 북극 퇴적물, 토양과 남극 지의류에서 유래한 방선균 (약 50 여종) 에서의 항균물질 스크리닝

Catalogue No.	PAMC No.	Name/ Description		PAMC 29564	Pseudarthrobacter siccitolerans	1 set
	PAMC 29354	Cryobacterium psychrotolerans		PAMC 29567	Pseudarthrobacter siccitolerans	1 set
	PAMC 29355	Cryobacterium psychrotolerans		PAMC 29570	Arthrobacter ginsengisoli	1 set
	PAMC 29405	Cryobacterium soli		PAMC 29589	Pseudarthrobacter oxydans	1 set
	PAMC 29406	Pseudarthrobacter oxydans		PAMC 29590	Arthrobacter ginsengisoli	1 set
	PAMC 29421	Pseudarthrobacter siccitolerans		PAMC 29592	Pseudarthrobacter sulfonivorans	1 set
	PAMC 29422	Arthrobacter ginsengisoli		PAMC 29593	Pseudarthrobacter siccitolerans	1 set
	PAMC 29429	Rhodococcus fascians		PAMC 29594	Pseudarthrobacter sulfonivorans	1 set
	PAMC 29432	Cryobacterium soli		PAMC 29595	Pseudarthrobacter sulfonivorans	1 set
	PAMC 29441	Rhodococcus fascians		PAMC 29596	Pseudarthrobacter sulfonivorans	1 set
	PAMC 29445	Arthrobacter citreus		PAMC 29598	Pseudarthrobacter oxydans	1 set
	PAMC 29451	Arthrobacter ginsengisoli		PAMC 29603	Paeniglutamicibacter sulfureus	1 set
	PAMC 29452	Arthrobacter ginsengisoli		PAMC 29608	Pseudarthrobacter sulfonivorans	1 set
	PAMC 29470	Rhodococcus globerulus		PAMC 29624	Conyzicola lurida	1 set
	PAMC 29481	Arthrobacter ginsengisoli		PAMC 29655	Lacisediminihabitans profunda	1 set
	PAMC 29482	Pseudarthrobacter scleromae		PAMC 29659	Arthrobacter citreus	1 set
	PAMC 29508	Arthrobacter ginsengisoli		PAMC 29198	Subtercola boreus	1 set
	PAMC 29529	Arthrobacter citreus		PAMC 29225	Frondihabitans peucedani	1 set
	PAMC 29530	Arthrobacter ginsengisoli		PAMC 29226	Subtercola boreus	1 set
	PAMC 29540	Arthrobacter oryzae		PAMC 29253	Lacisediminihabitans sp.	1 set
	PAMC 29542	Arthrobacter humicola		PAMC 29299	Subtercola sp.	1 set
	PAMC 29543	Pseudarthrobacter sulfonivorans		PAMC 29328	Mycobacterium sp.	1 set
	PAMC 29544	Arthrobacter ginsengisoli		PAMC 29329	Rhodococcus sp.	1 set
	PAMC 29548	Arthrobacter oryzae		PAMC 29337	Galbitalea sp.	1 set
				PAMC 29360	Mycobacterium sp.	1 set

표. 항균활성을 위해 분양받은 극지유래 방선균 리스트

- 방선균이 분비하는 항균물질 스크리닝은 Agar추출물 그리고 배양액을 분리 정제하여 여러 병원균에 대해 처리 후 항균 활성을 측정하였음.
- 측정 방법은 병원균이 도말되어 있는 Agar plate에 추출액을 넣는 방법과 병원균 배양액의 성장 능력을 측정하는 방법으로 시행되었음.

그림. 여러 병원성 박테리아를 상대로 방선균이 분비하는 향균 물질 스크리닝 결과 (Agar extracts)

방선균이 분비하는 항균물질 스크리닝 Agar-base (Liquid culture extracts)

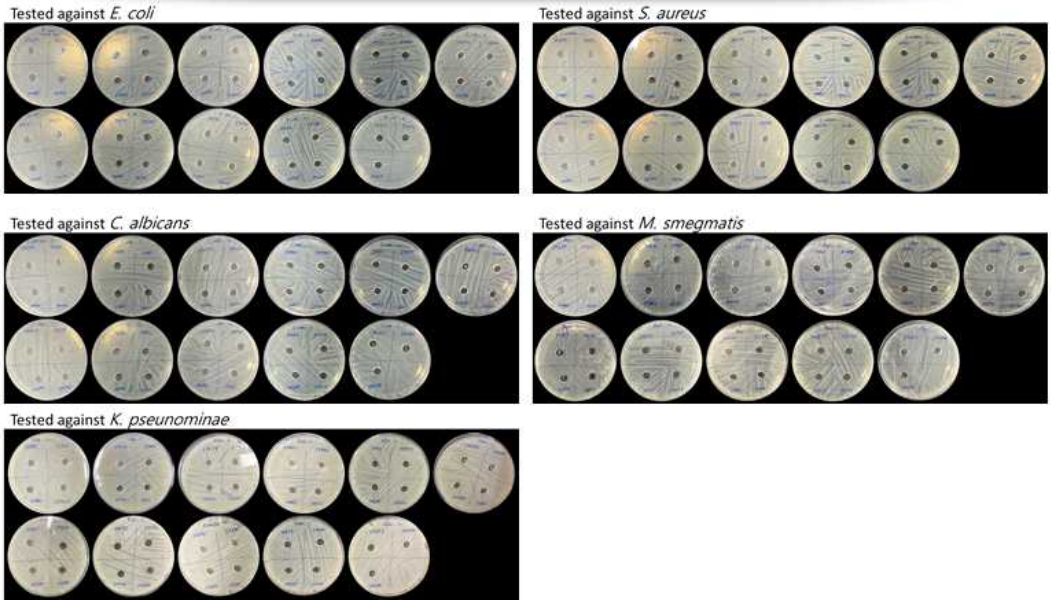


그림. 여러 병원성 박테리아를 상대로 방선균이 분비하는 항균 물질 스크리닝 결과 (Liquid extracts)

방선균이 분비하는 항균물질 스크리닝 Liquid-base (Agar extracts)

16h incubation

	(-) (MHB)	29405	29406	29421	29422	29429	29432	29441	29451
E. coli	0.296	0.189	0.173	0.169	0.119	0.124	0.146	0.174	0.126
S. aureus	0.259	0.211	0.297	0.238	0.159	0.2	0.196	0.236	0.229
C. albicans	0.104	0.073	0.062	0.109	0.066	0.069	0.07	0.065	0.063
Mycobecterium	0.076	0.072	0.07	0.114	0.065	0.067	0.073	0.074	0.059
Klebsiella	0.452	0.294	0.17	0.234	0.182	0.173	0.218	0.225	0.191

	29452	29470	29481	29482	29508	29530(-)	
E. coli	0.124	0.133	0.108	0.107	0.141	0.147	0.292
S. aureus	0.185	0.234	0.176	0.178	0.205	0.191	0.336
C. albicans	0.063	0.065	0.065	0.063	0.078	0.066	0.102
Myco	0.056	0.064	0.064	0.064	0.07	0.064	0.088
Klebsiella	0.202	0.194	0.162	0.169	0.165	0.251	0.469

	MHB	29540	29542	29543	29544	29548	2954	29567	29570	29589
E. coli	0.432	0.34	0.268	0.22	0.239	0.226	0.21	0.211	0.241	0.231
S. aureus	0.395	0.417	0.328	0.324	0.342	0.366	0.309	0.298	0.303	0.331
C. albicans	0.403	0.429	0.399	0.379	0.42	0.431	0.321	0.3	0.349	0.36
Myco	0.181	0.196	0.176	0.175	0.164	0.173	0.171	0.167	0.174	0.165
Klebsiella	0.596	0.456	0.424	0.402	0.323	0.387	0.382	0.314	0.341	0.373

	MHB	29590	29592	29593	29594	29595	29596	29598	29603	29608	29608 (2)
E. coli	0.341	0.219	0.227	0.22	0.208	0.213	0.265	0.214	0.183	0.172	0.172
S. aureus	0.376	0.283	0.289	0.332	0.303	0.311	0.363	0.345	0.301	0.283	0.262
C. albicans	0.325	0.319	0.178	0.298	0.301	0.339	0.352	0.327	0.179	0.257	0.285
Myco	0.159	0.159	0.165	0.17	0.165	0.168	0.174	0.165	0.157	0.134	0.13
Klebsiella	0.494	0.356	0.358	0.403	0.37	0.389	0.462	0.357	0.348	0.295	0.354

	MHB	29198	29225	29226	29253	29299	29328	29354	29355	29445	29529
E. coli	0.419	0.432	0.426	0.42	0.472	0.444	0.426	0.495	0.519	0.401	0.405
S. aureus	0.421	0.408	0.421	0.398	0.423	0.358	0.435	0.508	0.466	0.425	0.399
C. albicans	0.456	0.352	0.454	0.394	0.371	0.231	0.414	0.475	0.555	0.389	0.394
Myco	0.196	0.239	0.233	0.229	0.271	0.222	0.279	0.229	0.255	0.258	0.245
Klebsiella	0.622	0.613	0.628	0.615	0.637	0.607	0.638	0.623	0.678	0.619	0.611

그림. 여러 병원성 박테리아를 상대로 방선균이 분비하는 항균 물질 스크리닝 결과 (Agar extracts)

방선균이 분비하는 항균물질 스크리닝 Liquid (Liquid culture extracts)

16h incubation

	29354	29355	29405	29406	29421	29422	29429	29432	29441	29445	29451
E. coli	0.398	0.376	0.378	0.338	0.316	0.319	0.372	0.312	0.323	0.337	0.317
S. aureus	0.359	0.321	0.298	0.324	0.282	0.285	0.34	0.27	0.274	0.294	0.352
C. albicans	0.399	0.392	0.356	0.323	0.295	0.297	0.373	0.296	0.357	0.382	0.305
Mycobecterium	0.144	0.208	0.153	0.147	0.164	0.145	0.162	0.288	0.163	0.162	0.141
Klebsiella	0.503	0.558	0.56	0.504	0.423	0.383	0.613	0.51	0.564	0.594	0.499

	29452	29470	29481	29482	29508	29529	29420	29540	29542	29543	29544
E. coli	0.378	0.392	0.331	0.363	0.36	0.379	0.371	0.396	0.409	0.349	0.379
S. aureus	0.382	0.344	0.309	0.326	0.307	0.306	0.352	0.339	0.365	0.323	0.363
C. albicans	0.39	0.403	0.32	0.356	0.354	0.406	0.37	0.395	0.42	0.397	0.364
Mycobecterium	0.263	0.178	0.176	0.215	0.178	0.186	0.191	0.174	0.188	0.191	0.179
Klebsiella	0.481	0.619	0.472	0.499	0.508	0.56	0.563	0.567	0.629	0.504	0.477

	29548	29564	29567	29570	29589	29590	29592	29593	29594	29595	29596
E. coli	0.351	0.326	0.32	0.285	0.316	0.317	0.348	0.309	0.343	0.323	0.322
S. aureus	0.342	0.29	0.277	0.29	0.291	0.289	0.276	0.288	0.314	0.294	0.32
C. albicans	0.306	0.313	0.313	0.282	0.318	0.304	0.348	0.309	0.328	0.336	0.358
Mycobecterium	0.135	0.138	0.142	0.148	0.267	0.181	0.14	0.154	0.153	0.152	0.179
Klebsiella	0.459	0.467	0.458	0.457	0.465	0.462	0.495	0.464	0.648	0.447	0.575

	29598	29603	29608	29624	29198	29225	29226	29253	29299	29328
E. coli	0.369	0.389	0.376	0.35	0.381	0.352	0.358	0.373	0.39	0.393
S. aureus	0.303	0.369	0.297	0.286	0.289	0.278	0.279	0.283	0.29	0.349
C. albicans	0.341	0.378	0.364	0.378	0.407	0.405	0.392	0.424	0.403	0.378
Mycobecterium	0.166	0.189	0.19	0.183	0.176	0.166	0.2	0.159	0.173	0.157
Klebsiella	0.466	0.575	0.539	0.706	0.657	0.67	0.664	0.663	0.723	0.547

그림. 여러 병원성 박테리아를 상대로 방선균이 분비하는 향균 물질 스크리닝 결과 (Liquid culture extracts)

4) 극지 *Streptomyces* sp. 11종에서 항균물질 스크리닝을 실시하여 PAMC 29637 and PAMC 29639 두 종이 항균 물질을 분비하는 것으로 확인

KOPRI 극지연구소

항균 물질을 분비하는 *Streptomyces* sp. List

No.	PAMC No.	Name	Note
1	PAMC 29635	*Streptomyces avidinii*	
2	PAMC 29637	*Streptomyces avidinii*	
3	PAMC 29638	*Streptomyces subrutilus*	
4	PAMC 29639	*Streptomyces avidinii*	
5	PAMC 29494	*Streptomyces fulvissimus*	
6	PAMC 29626	*Streptomyces fulvissimus*	
7	PAMC 29699	*Streptomyces sp.*	
8	PAMC 29701	*Streptomyces sp.*	
9	PAMC 29702	*Streptomyces sp.*	
10	PAMC 29704	*Streptomyces sp.*	
11	PAMC 29636	*Streptomyces subrutilus*	

그림. 항균물질 스크리닝을 실시 *Streptomyces* sp. 11종

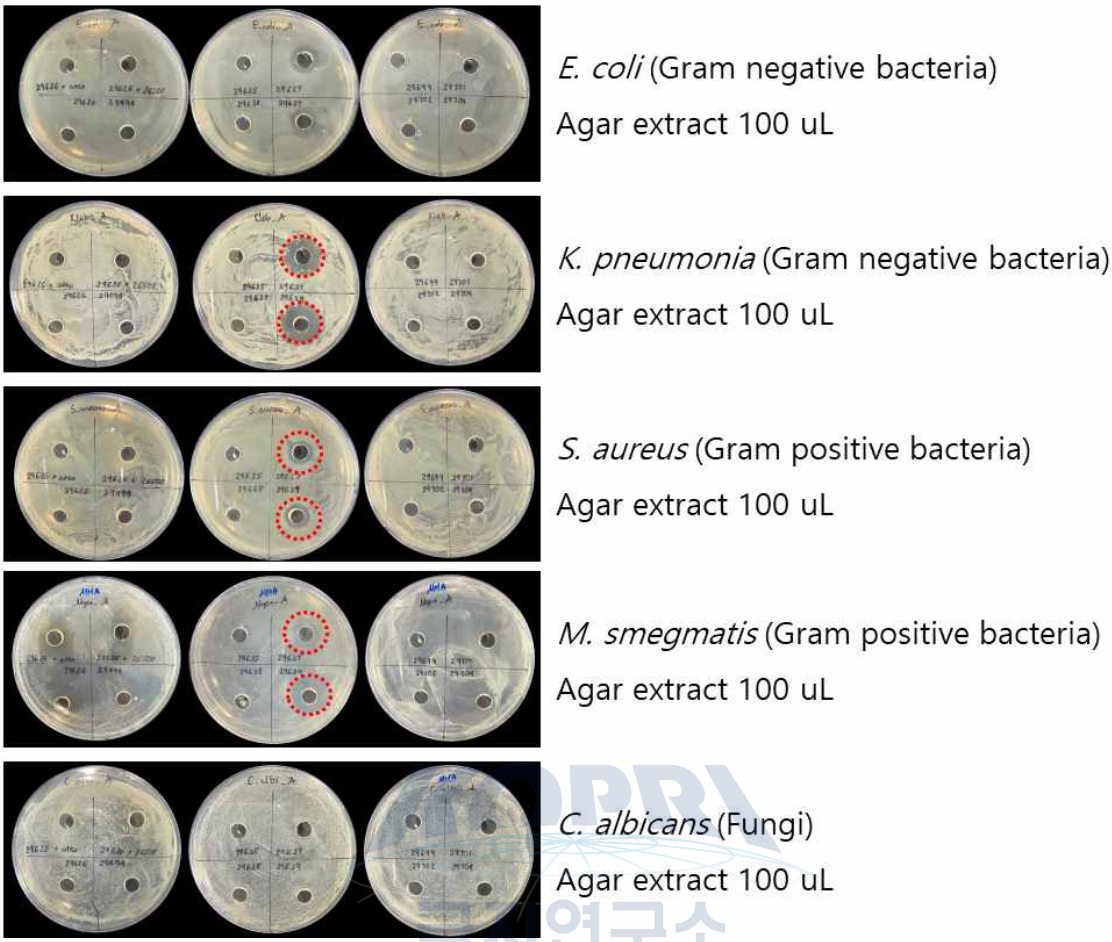


그림. Streptomyces sp.의 추출물을 여러 병원균을 이용하여 항균활성 측정한 결과

그림. PAMC 29637 and PAMC 29639 두 종이 분비하는 물질을 EA 또는 water phase로 구분하여 항균물질이 존재하는 Faction을 확인.

Streptomyces sp. 유래 항균물질 분석 결과

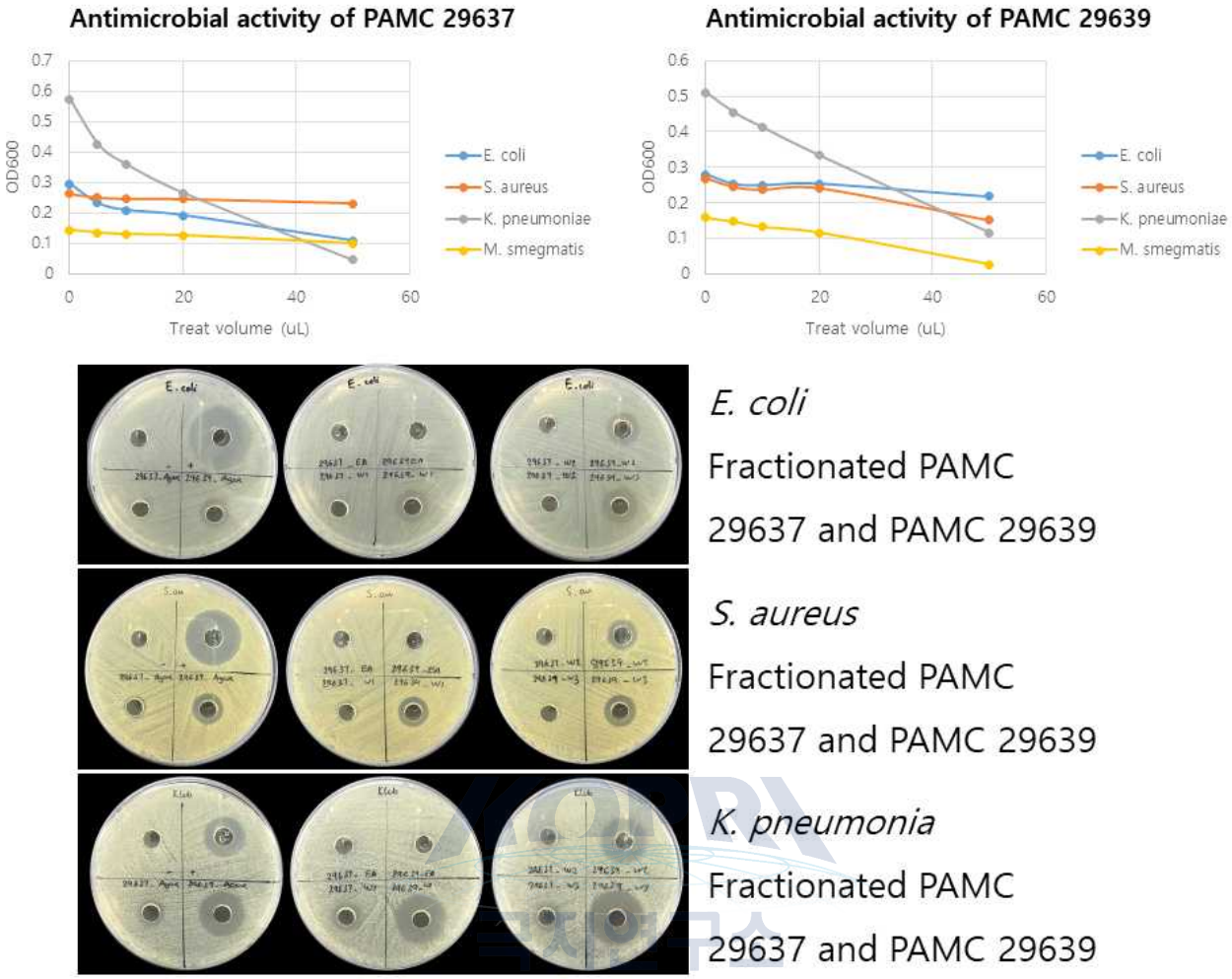
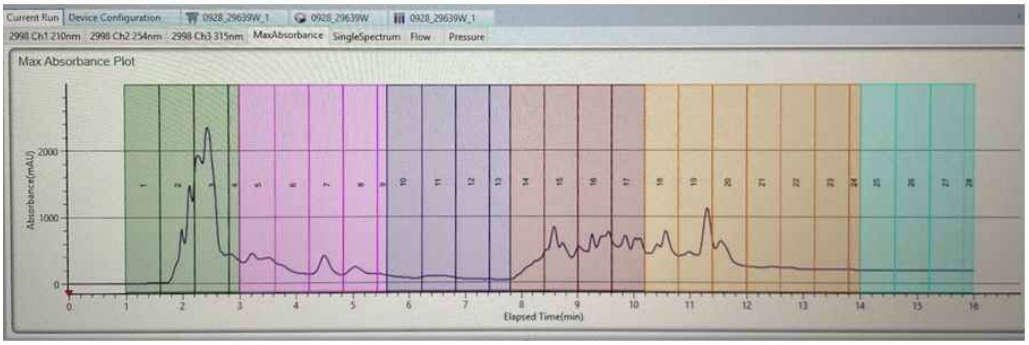


그림. 항균 추출물 HPLC 결과 및 구간별 분획 대한 항균 활성 결과.

Streptomyces sp.01 분비하는 항균물질의 분리 정제



Pathogen: *S. aureus*

-> Further separation: W1; W3; W4; W5 -> collect every peak in each fraction

5) 극지 곰팡이류 (약 22 여종) 에서의 항균물질 스크리닝

극지미생물의 항균활성 물질 스크리닝 (총 22종)

Strain name	Sample info				Cultivation info		
	Sample category	Sample name	Lat	Long	Incubation Temp. (°C)	Medium	Duration
GISt001	Styx glacier	GISt001_100	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	0.1XNA	
GISt002	Styx glacier	GISt002_50	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	0.1XNA	
GISt003	Styx glacier	GISt003_50	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	0.1XNA	
GISt007	Styx glacier	GISt007_10	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	0.1XNA	
GISt008	Styx glacier	GISt008_10	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	0.1XNA	
GISt010	Styx glacier	GISt010_10	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	0.1XNA	
GISt014	Styx glacier	GISt014_150	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	0.1XNA	
GISt016	Styx glacier	GISt016_50	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	0.1XNA	
GISt059	Styx glacier	GISt059_50	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	1XLA	
GISt152	Styx glacier	GISt152_50	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	0.01XNA	
GISt155	Styx glacier	GISt155_10	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	0.01XNA	
GISt156	Styx glacier	GISt156_10	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	0.01XNA	
GISt188	Styx glacier	GISt188_10	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	0.1XR2A	
GISt190	Styx glacier	GISt190_150	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	0.1XR2A	
GISt236	Styx glacier	GISt236_10	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	1XTSA	
GISt237	Styx glacier	GISt237_150	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	1XTSA	
GISt238	Styx glacier	GISt238_150	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	1XTSA	
GISt239	Styx glacier	GISt239_150	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	1XTSA	
GISt318	Styx glacier	GISt318_10	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	0.1XR2A	
GISt319	Styx glacier	GISt319_10	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	0.1XR2A	
GISt332	Styx glacier	GISt332_100	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	1XNA	
GISt338	Styx glacier	GISt338_10	73° 51.10'S	163° 41.22'E	25	0.1XTSA	

그림. 항균활성 물질 스크리닝을 위한 극지미생물 정보

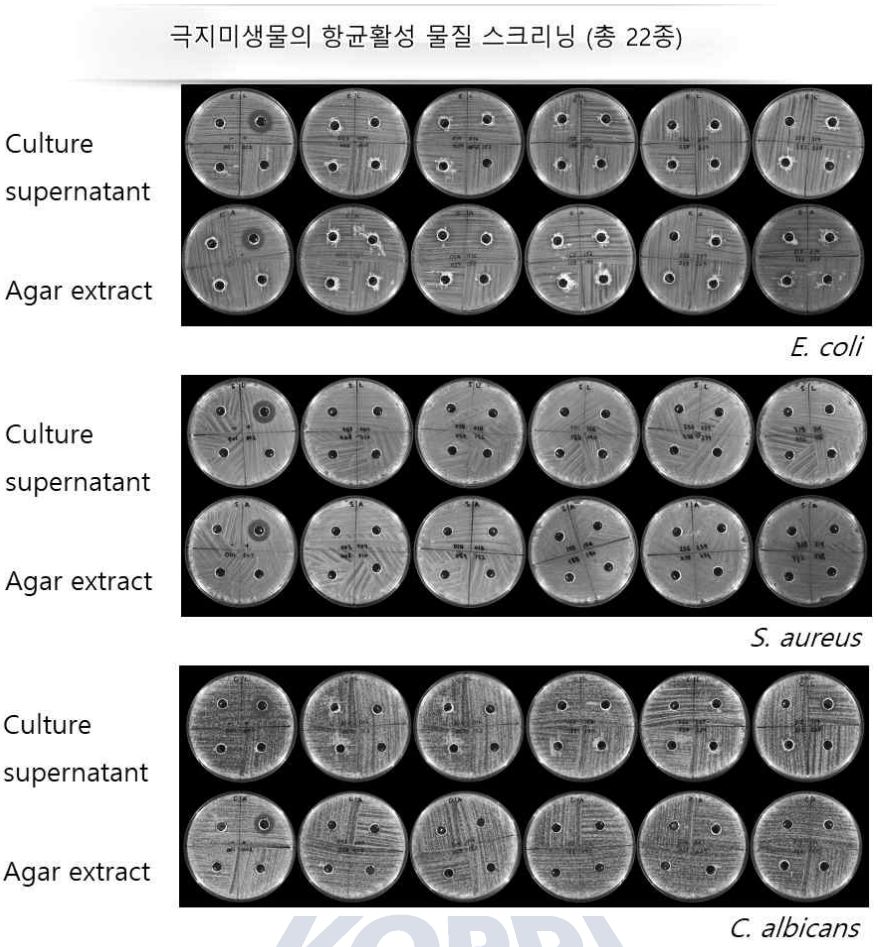


그림. 항균활성 측정 결과 Ⅰ

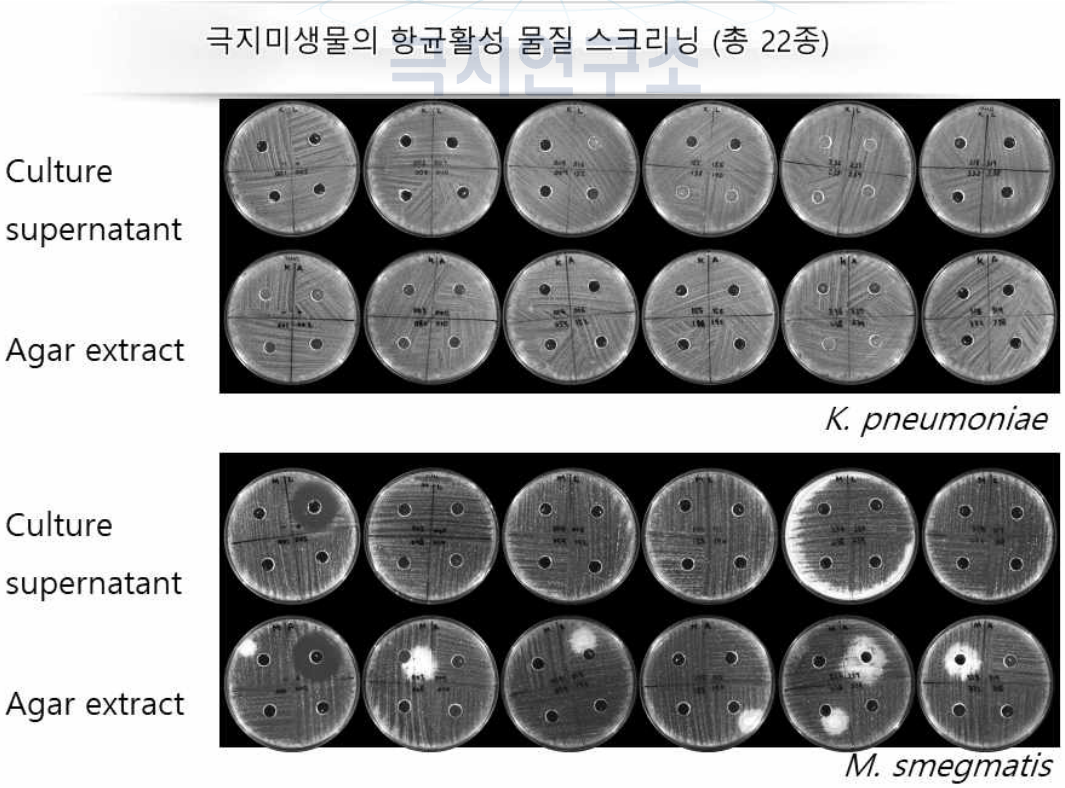


그림. 그림. 항균활성 측정 결과 Ⅱ

- 1차년도 (2020년)에 분리한 해양미생물 및 기분리 보존 중인 극지/해양미생물 중 유용 균주를 발굴하여 4종에 대한 유전체 분석 완료
(*Burkholderia* sp. PAMC28687, *Burkholderia* sp. PAMC26561, *Rhodococcus* sp. PAMC28705, *Rhodococcus* sp. PAMC28707) (Genomics. 2021 May;113(3):881-888) (Arch Microbiol. 2021 May;203(4):1731-1742)

나. 유용 균주의 대량배양 및 신규 항생물질의 분리, 정제. (해양과학기술연구원)

1) 해양미생물 분리를 위한 시료(해양생물 30종, 퇴적토 23) 채집

2) 채집된 시료로부터 해양미생물 130주 분리 및 동정 후 보관

연차	채집지역	채집기간	시료종류		분리된 균수
2차년도 (2021)	독도주변 해역	2021.03.30.~04.01	해양생물 퇴적토	30종 23점	130주+ α

표 1. 2021년 해양미생물 분리를 위한 채집지역, 시료종류 및 분리된 균주 수

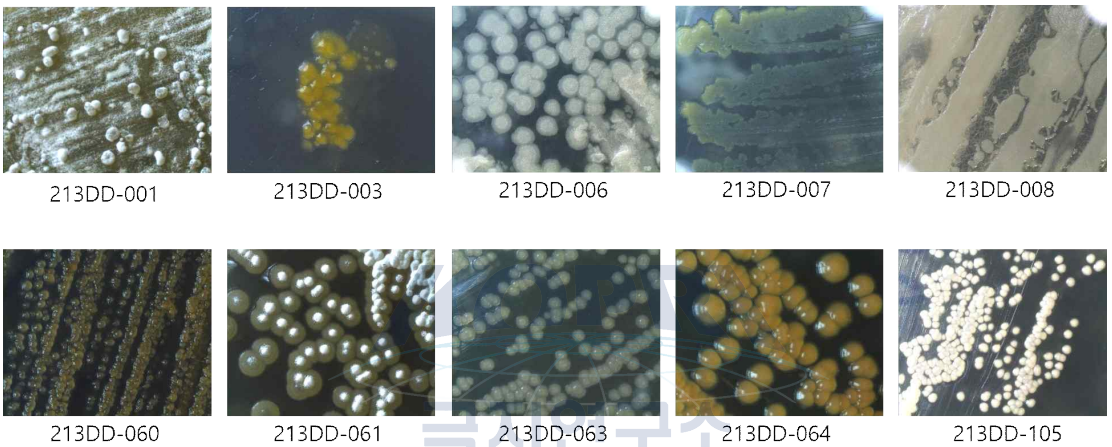


그림. 2021년 해양시료로부터 분리된 해양미생물들의 사진

3) 유용균주 *Streptomyces hoynatensis* 213DD-061의 배양액으로부터 이차대사산물의 분리 및 정제

- 213DD-061 균주는 16S rRNA 서열분석을 이용한 동정결과, *Streptomyces hoynatensis*로 확인
- 대량배양 후, 배양액을 연속원심분리기를 이용하여 균체와 배양액으로 분리하고 배양액을 Ethyl Acetate로 추출한 후에 본 균주가 생성하는 이차대산산물을 Reversed-Phase Flash Column Chromatograph 및 HPLC를 이용하여 순수하게 분리 및 정제
- rfc100% MeOH 분획에서 5종의 물질을 순수하게 분리, 정제

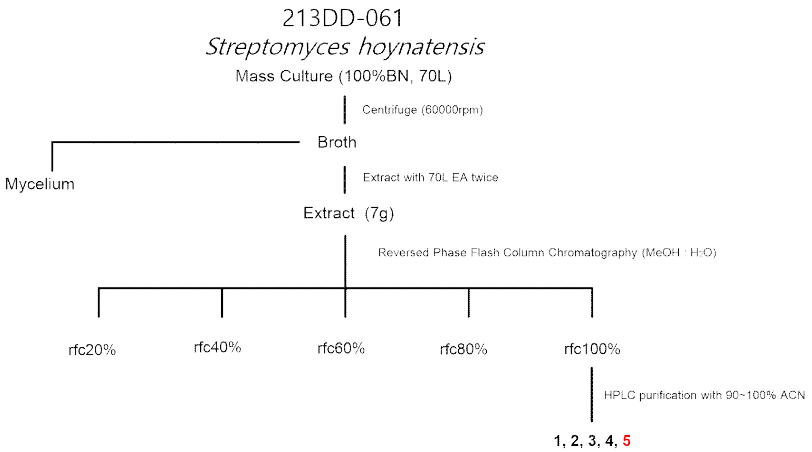
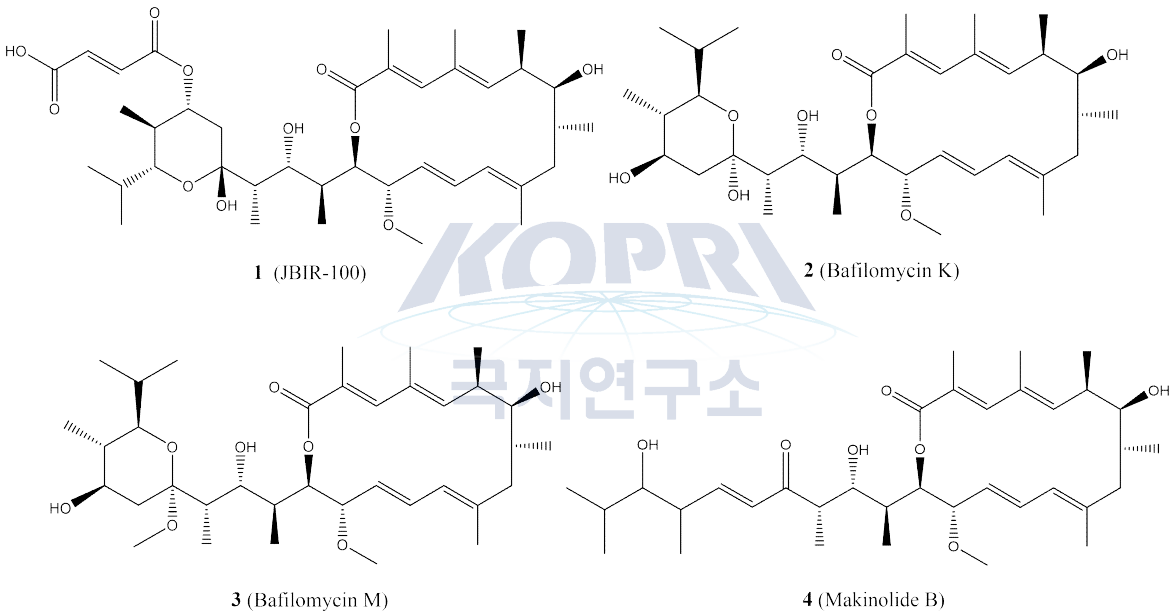


그림. *Streptomyces hoynatensis* 배양액으로부터 화합물의 분리 및 정제 과정

4) 화합물 5종의 구조분석

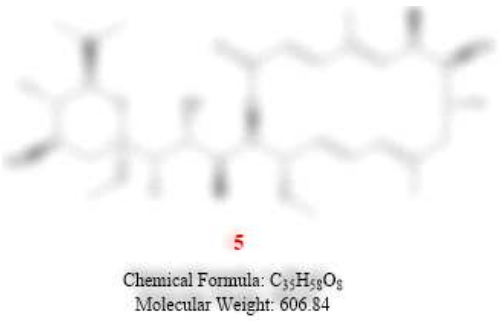
- 분리된 화합물 5종을 HR-ESI-MS 및 NMR 등 분광학적 해석을 통하여 구조를 규명하였음
- 5종 모두 Bafilomycin 계열 물질로 확인되었으며 1종이 신규 화합물 (5)로 확인되었음



KOPRI 극지연구소

그림. 분리된 Bafilomycin 계열 화합물들의 구조

- 신규 화합물 5의 구조 분석



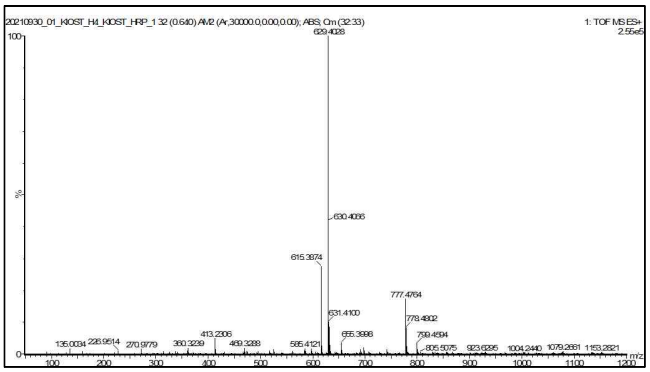


그림. Bafilomycin 계열의 신규 화합물 (5)의 구조와 HR-ESI-MS 분석 자료

- 고분해능 질량분석 (HR-ESI-MS) 결과와 ^{13}C NMR 해석을 통해 신규 화합물 (5)의 분자식 ($C_{35}H_{58}O_8$)과 질량(m/z 629.4028 $[M+Na]^+$, calcd 629.4029)을 확인하였음.

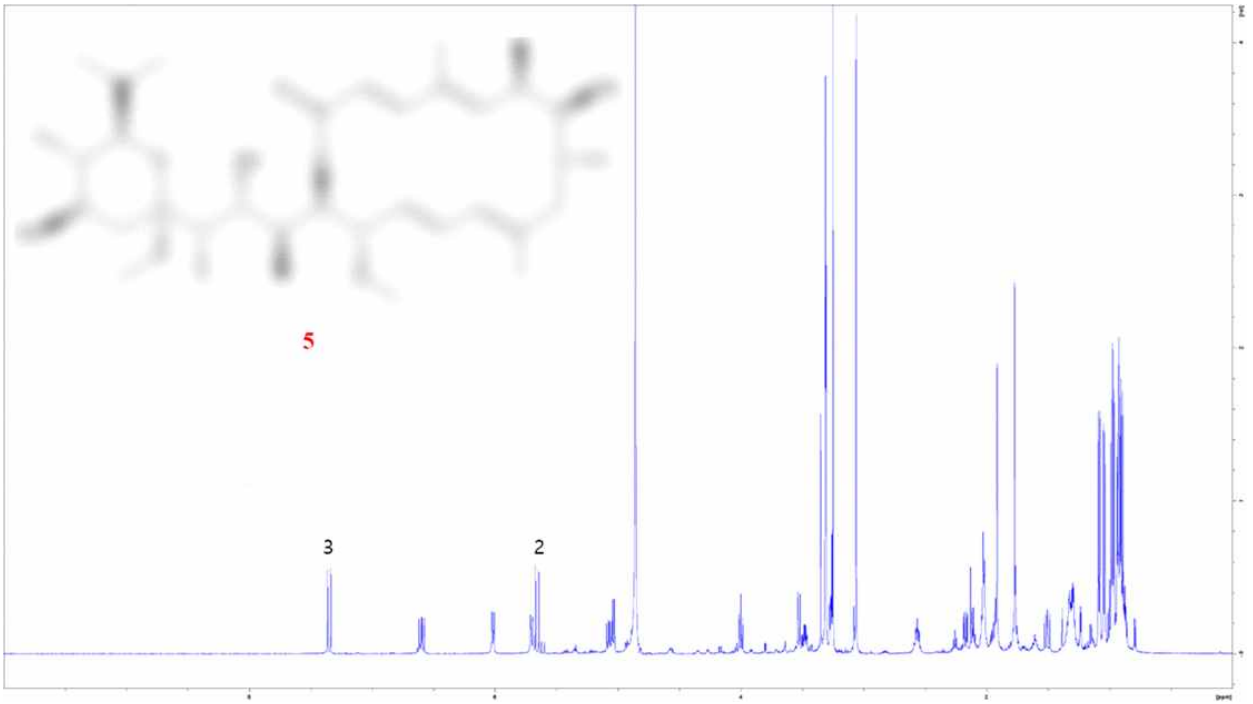


그림. Bafilomycin 계열의 신규 화합물 (5)의 ^1H NMR 스펙트럼 (600 MHZ, CD_3OD)

- ^1H NMR 스펙트럼에서 신규 화합물 (5)의 H-3 (δ_H 7.35, J=15.70 Hz)의 분열패턴이 다른 bafilomycin 계열의 화합물과는 다르게 doublet 형태로 나오는 것이 관찰이 되었음. H-2 (δ_H 5.65, J=15.69 Hz) 또한 H-3와 coupling을 하면서 doublet 형태로 나오는 것을 확인하였음.

KORRI 극지연구소

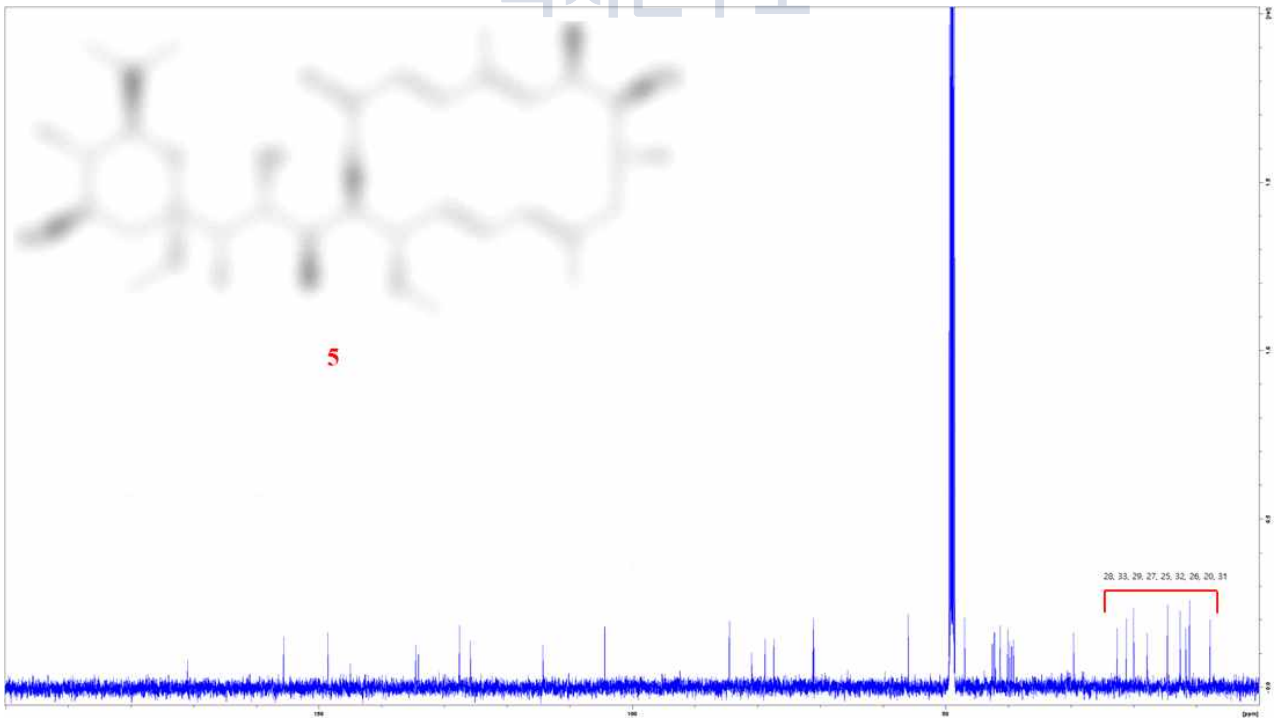


그림 6. Bafilomycin 계열의 신규 화합물 (5)의 ^{13}C NMR 스펙트럼 (600 MHZ, CD_3OD).

- ^{13}C NMR 스펙트럼에서 신규 화합물 (5)은 35개의 탄소를 가지는 것을 확인할 수 있었음. 또한 신규 물질의 경우, ^{13}C NMR 스펙트럼에서 유사한 형태의 bafilomycin계열 화합물들 (2, 3)은

10개의 methyl 그룹이 관찰되었으나, 신규 화합물 (5)은 9개의 methyl 그룹을 가지고 있는 것을 알 수 있었음 (붉은색 표시).

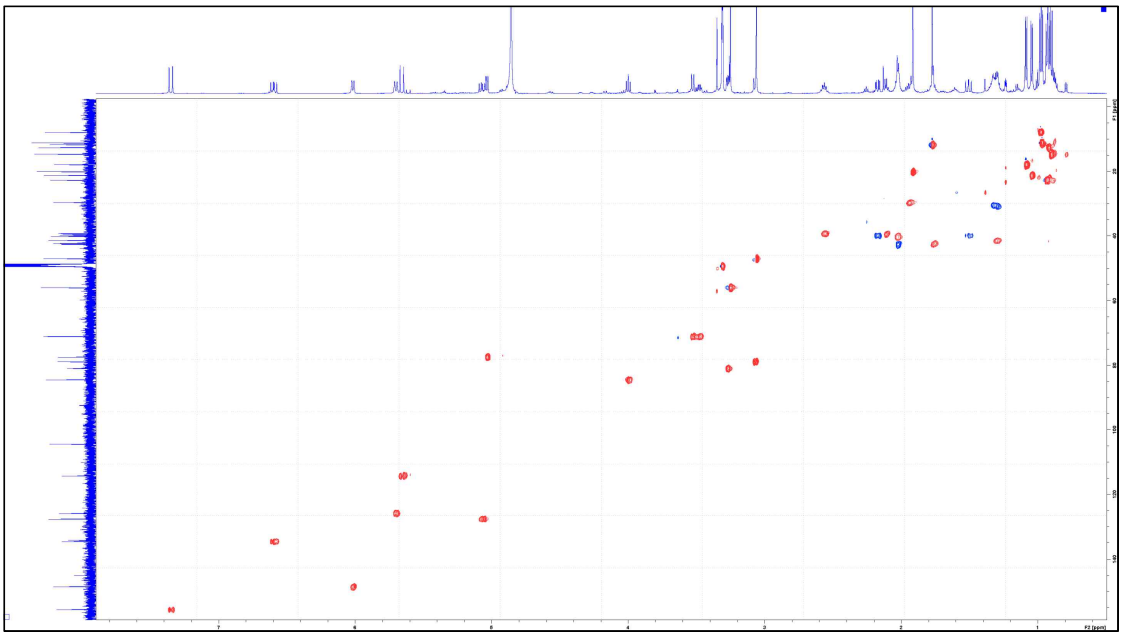


그림. Bafilomycin 계열의 신규 화합물 (5)의 HSQC 스펙트럼 (600 MHZ, CD_3OD)

- HSQC 스펙트럼의 면밀한 해석을 통해, 화합물 5의 분자 내의 탄소와 수소의 결합관계를 확인하고 각각의 탄소와 수소의 종류를 확인할 수 있었음. ^{13}C NMR 스펙트럼을 통해, 9개의 methyl기 탄소 C-25(δ_C 14.6), C-26(δ_C 11.6), C-27(δ_C 17.8), C-28(δ_C 22.6), C-29(δ_C 20.0), C-30(δ_C 11.1), C-31(δ_C 7.8), C-32(δ_C 12.6), C-33(δ_C 21.1)와 각각 연결되어 있는 수소 H_3-25(δ_H 0.89), H_3-26(δ_H 1.77), H_3-27(δ_H 1.08), H_3-28(δ_H 0.92), H_3-29(δ_H 1.91), H_3-30(δ_H 0.96), H_3-31(δ_H 0.97), H_3-32(δ_H 0.91), H_3-33(δ_H 1.04)의 존재를 확인 할 수 있었음. 또 2개의 methylene기 탄소 C-9(δ_C 42.5), C-20(δ_C 39.8)와 각각 연결되어 있는 수소 H_2-9 (δ_H 2.02), H_2-20a(δ_H 2.17), H_2-20b(δ_H 1.49)를 확인 할 수 있었으며 6개의 oxygenated methine기 탄소 C-7(δ_C 80.9), C-14(δ_C 84.5), C-15(δ_C 77.4), C-17(δ_C 71.0), C-19(δ_C 104.3), C-23(δ_C 78.8)와 각각 연결되어 있는 수소 H-7(δ_H 3.25), H-14(δ_H 3.99), H-15(δ_H 5.03), H-17(δ_H 3.48), H-21(δ_H 3.50), H-23(δ_H 3.06)의 존재를 확인 할 수 있었음. 6개의 methine기 탄소 C-6(δ_C 39.1), C-8(δ_C 42.2), C-16(δ_C 40.0), C-18(δ_C 39.4), C-22(δ_C 41.3), C-24(δ_C 78.8)와 각각 연결되어 있는 수소 H-6(δ_H 2.55), H-8(δ_H 1.75), H-16(δ_H 2.02), H-18(δ_H 2.10), H-22(δ_H 1.29), H-24(δ_H 1.93)를 확인 할 수 있었으며 6개의 olefinic methine기 탄소 C-2(δ_C 114.2), C-3(δ_C 155.6), C-5(δ_C 148.9), C-11(δ_C 128.5), C-12(δ_C 134.5), C-13(δ_C 127.5)와 각각 연결되어 있는 수소 H-2(δ_H 5.65), H-3(δ_H 7.35), H-5(δ_H 6.02), H-11(δ_H 5.70), H-12(δ_H 6.59), H-13(δ_H 5.07) 또한 확인 할 수 있었음. noprotonated 탄소 3개 C-4(δ_C 134.0), C-10(δ_C 144.9), C-19 (δ_C 104.3)를 확인 할 수 있었으며, carbonyl기 탄소 C-1(δ_C 170.9) 1개 또한 확인 할 수 있었음. 2개의 methoxy기 탄소 14-OCH_3(δ_C 55.9), 19-OCH_3(δ_C 46.9)와 각각 연결되어 있는 수소 14-OCH_3(δ_H 3.24), 19-OCH_3(δ_H 3.05)를 확인하였음.

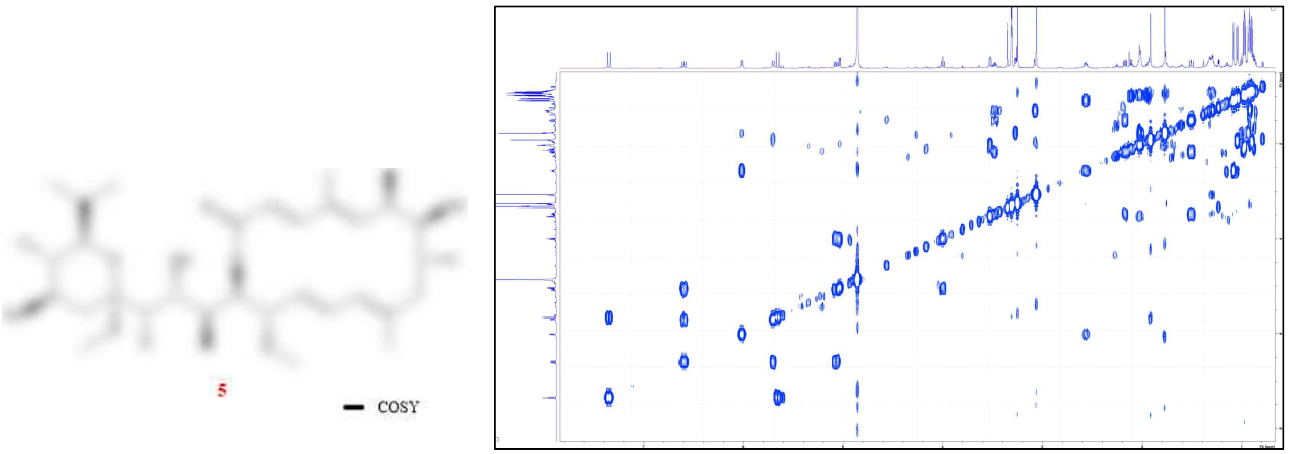


그림. Bafilomycin계열의 신규 화합물 (5)의 COSY 스펙트럼 (600 MHZ, CD_3OD).

- ^1H-^1H COSY 스펙트럼의 해석을 통해 6개의 부분구조를 예측할 수 있었음. H-2(δ_H 5.65)와 H-3(δ_H 7.35), H-5(δ_H 6.02)에서 H-6(δ_H 2.55)와 H_3-27(δ_H 1.08), H-7(δ_H 3.25)에서 H-8(δ_H 1.75)과 H_3-28(δ_H 0.92), H-11(δ_H 5.70)에서 H-12(δ_H 6.59)와 H-13(δ_H 5.07), H-16(δ_H 2.02)에서 H-17(δ_H 3.48)과 H-18(δ_H 2.10), H_2-20a(δ_H 2.17)와 H_2-20b(δ_H 1.49)에서 H-21(δ_H 3.50), H-22(δ_H 1.29), H-23(δ_H 3.06), H-24(δ_H 1.93)와 H_3-32(δ_H 0.91)까지의 correlation을 통해 서로가 인접해 있음을 알 수 있었음.

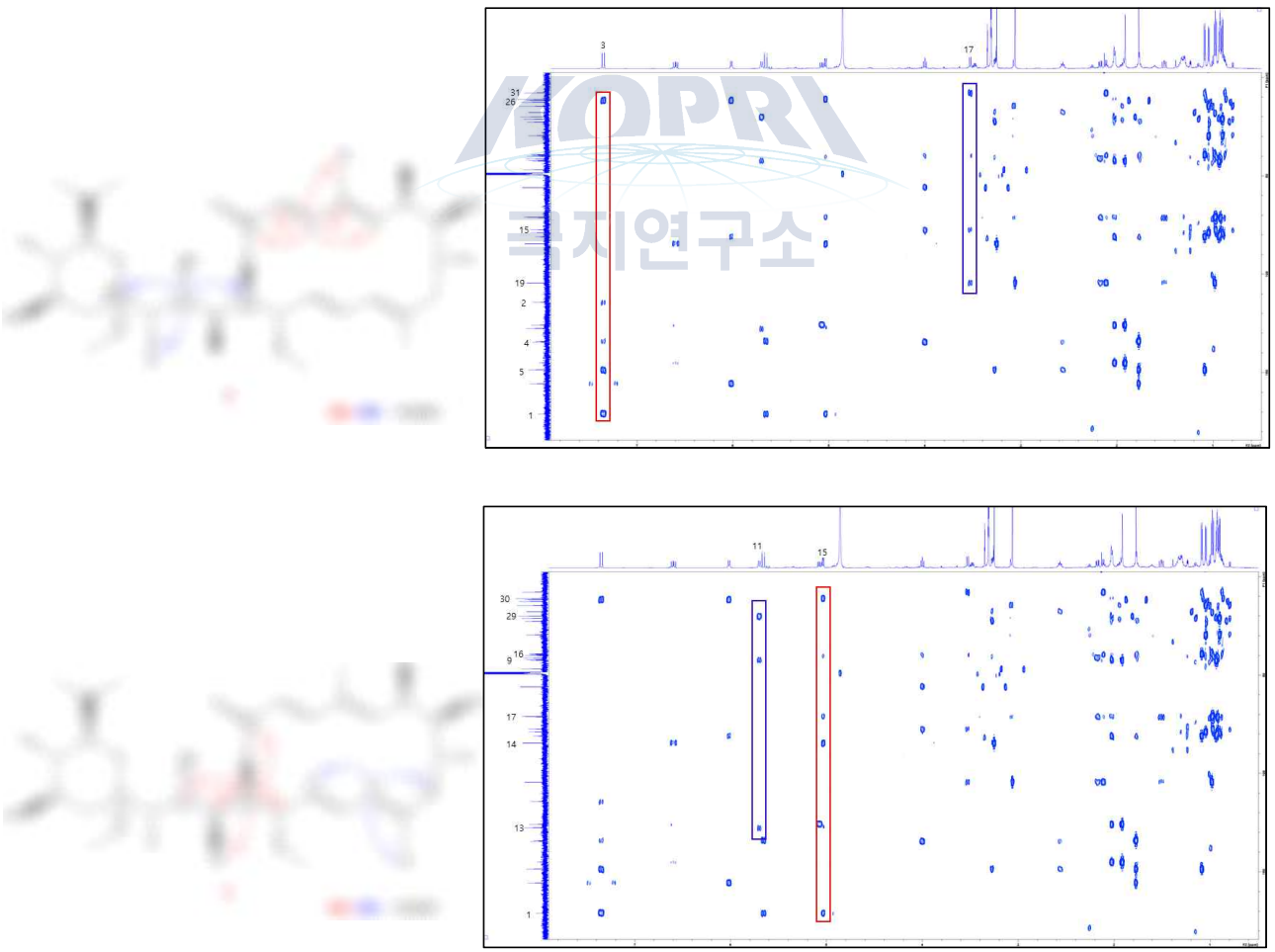


그림. Bafilomycin 계열의 신규 화합물 (5)의 HMBC 스펙트럼 (600 MHZ, CD_3OD).

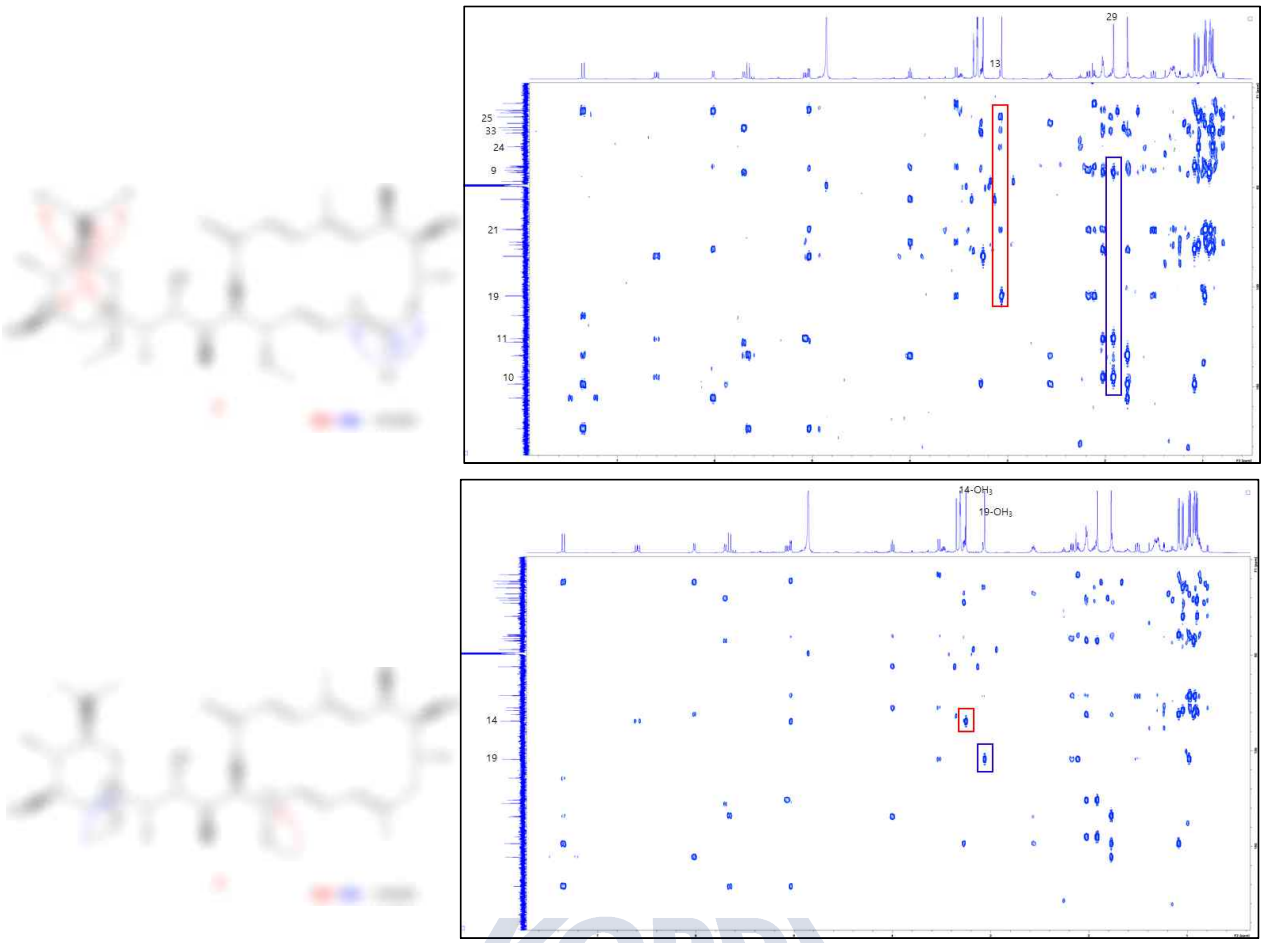


그림. Bafilomycin 계열의 신규 화합물 (5)의 HMBC 스펙트럼 (600 MHZ, CD_3OD).

- HMBC 스펙트럼의 해석을 통해, ^1H-^1H COSY 스펙트럼으로 해석한 부분구조를 연결할 수 있었으며 화합물 5의 전체구조를 결정할 수 있었음. H-3(δ_H 7.35)와 C-1(δ_C 170.9), C-2(δ_C 114.2), C-3(δ_C 155.6), C-4(δ_C 134.0), C-5(δ_C 148.9), C-26(δ_C 11.6) 사이의 신호를 통해 C-1에서 C-5까지 부분구조를 해석하였음. H_3-29과 C-9(δ_C 42.5), C-10(δ_C 144.9), C-11(δ_C 128.5) 사이의 신호 및 H-11(δ_H 5.70)과 C-9(δ_C 42.5), C-13(δ_C 127.5), C-29(δ_C 20.0) 통해 C-9에서 C-13까지 부분구조를 해석하였으며 H-15(δ_H 5.03)과 C-14(δ_C 84.5), C-16(δ_C 40.0), C-17(δ_C 71.0), C-30(δ_C 11.1) 사이의 신호를 통해 C-14에서 C-17까지 부분구조를 해석하였음. 그리고 H-15(δ_H 5.03)과 C-1(δ_C 170.9) 사이의 신호를 통해 이 물질은 16각 고리 구조를 가지는 macrolide형태의 Bafilomycin계열 화합물임을 확인할 수 있었음. H-23(δ_H 3.06)와 C-19(δ_C 104.3), C-19(δ_C 104.3), C-24(δ_C 78.8), C-25(δ_C 14.6), C-33(δ_C 21.1) 사이의 신호를 통해 C-19/23 ether 연결을 가진 고리 형태의 부분구조가 존재하는 것을 예상할 수 있었으며 H-15(δ_H 5.03)과 C-16(δ_C 40.0), C-17(δ_C 71.0), C-19(δ_C 104.3) 사이의 신호를 통해 16각 고리 구조의 C-15부터 hemiketal 구조의 C-19까지 가지의 탄소로 연결되는 것을 확인할 수 있었음. methoxy기 14-OCH_3(δ_H 3.24)와 C-14(δ_C 84.5), 19-OCH_3(δ_H 3.05)와 C-19(δ_C 104.3) 사이에 연결되는 신호를 확인하였으며 최종적으로 5의 구조를 규명하였음. 문헌 조사 결과 미생물에서 분리된 적이 없는 Bafilomycin계열의 신규 물질로 확인되었음.

5) 유용균주 *Streptomyces zhaozhouensis* 208DD-064의 이차대사산물 분리 및 정제

- 208DD-064 균주는 16S rRNA 서열분석을 이용한 동정결과, *Streptomyces zhaozhouensis*로 확인
- 플라스크를 이용하여 5L 배양 후, 배양액을 Ethyl Acetate로 추출하여 추출물을 조제하고 Reversed Phase Flash Column Chromatograph 및 HPLC를 이용하여 208DD-064 균주가 생성

하는 이차대사산물을 분리 및 정제

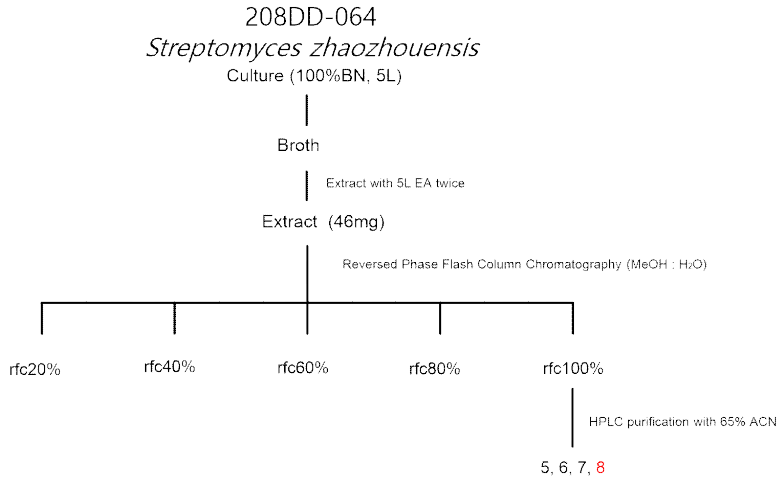
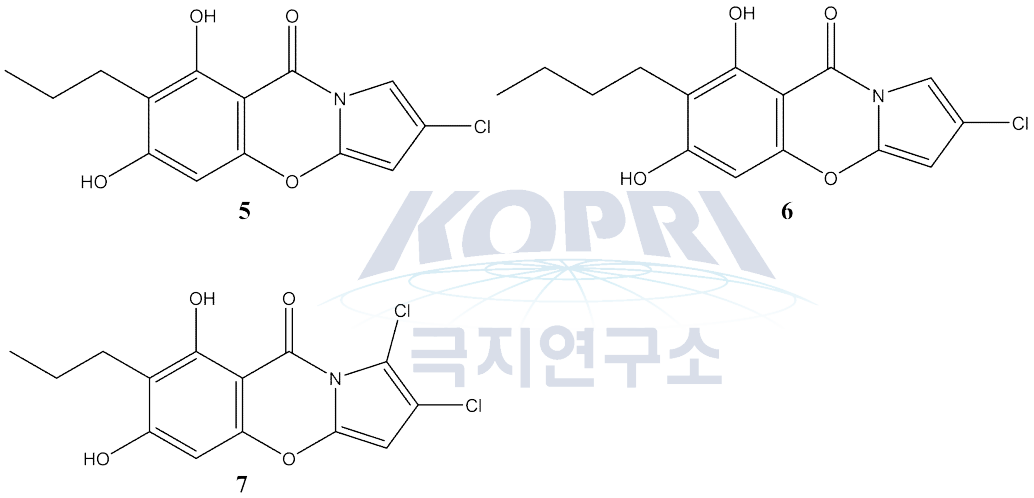


그림. *Streptomyces zhaozhouensis* 208DD-064의 배양액에서 화합물의 분리 및 정제 과정.

- rfc100% MeOH 분획에서 4 종류의 물질을 분리, 정제.



KOPRI 극지연구소

그림. 분리된 Streptopyrrole 계열의 화합물들.

6) 화합물 4종의 구조분석

- 분리된 화합물 4종을 LR-ESI-MS 및 NMR 장비로 구조를 규명하였음.
- 4종 모두 Streptopyrrole 계열 물질로 확인되었으며 1종이 신규 화합물인 것으로 판명되었음.
- 신규 화합물 구조 분석

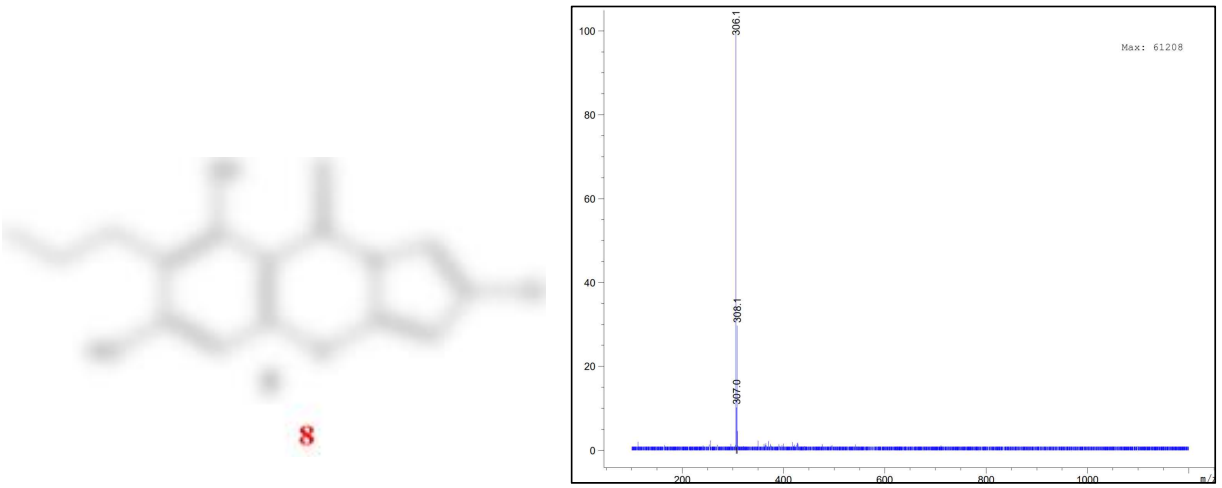


그림. Streptopyrrole 계열의 신규 화합물 (8)의 구조와 LR-ESI-MS 분석 자료.

- 화합물 8의 LR-ESI-MS와 ^{13}C NMR 및 HSQC와 같은 NMR 데이터 분석결과, 화합물 8의 분자량 (m/z 306.1 $[M-H]^-$)과 분자식 ($C_{15}H_{14}ClNO_4$)을 확인하였음.

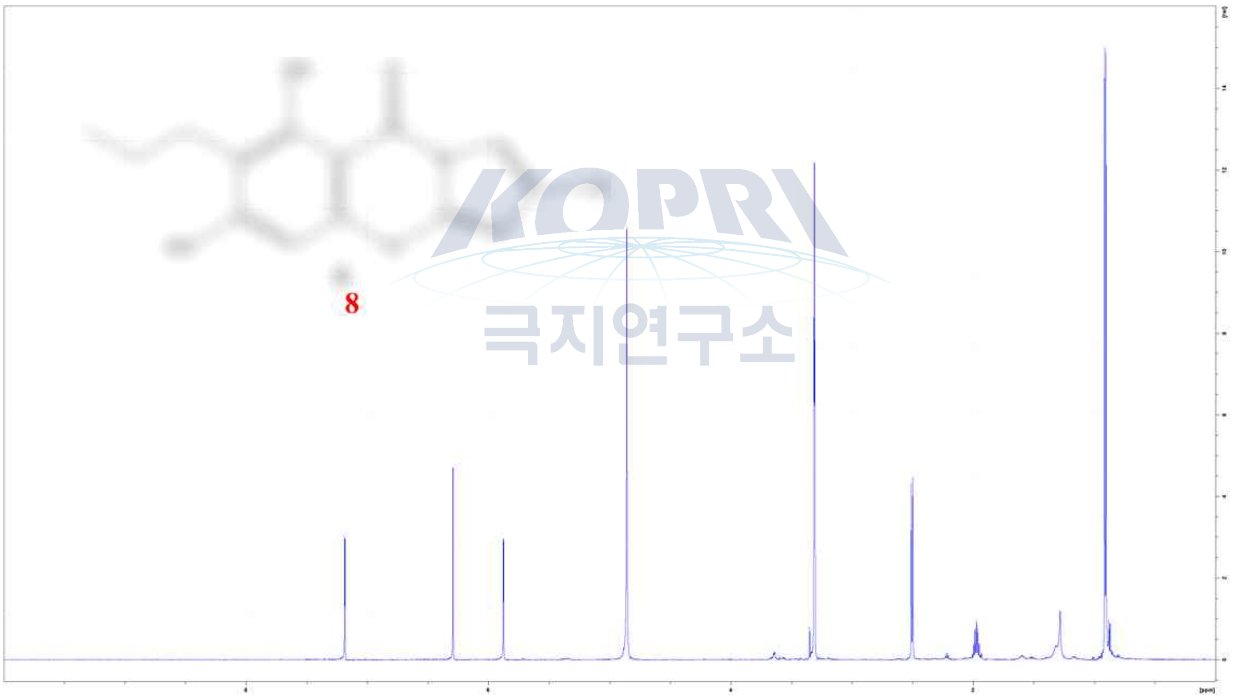


그림. Streptopyrrole 계열의 신규 화합물 (8)의 ^1H NMR 스펙트럼 (600 MHZ, CD_3OD).

- 화합물 8의 ^1H NMR 스펙트럼의 해석을 통해, 2개의 methyl기 수소 H_3-3′ /4′ (δ_H 0.91), 1개의 methylene기 수소 H_2-1′ (δ_H 2.05), 1개의 methine기 수소 H_1-2′ (δ_H 1.97), 3개의 olefinic methine기 수소 H_1-2(δ_H 7.18), H_1-3(δ_H 5.87), H_1-5(δ_H 6.29)가 존재함을 확인할 수 있었음.

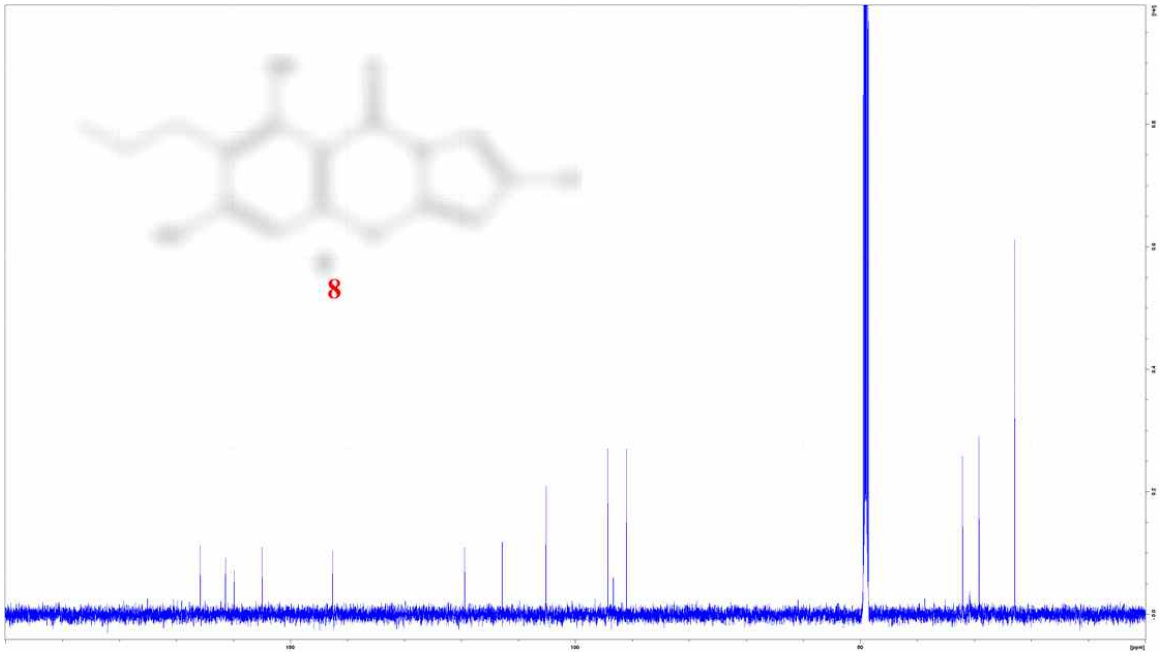


그림. Streptopyrrole 계열의 신규 화합물 (8)의 ^{13}C NMR 스펙트럼 (600 MHZ, CD_3OD).

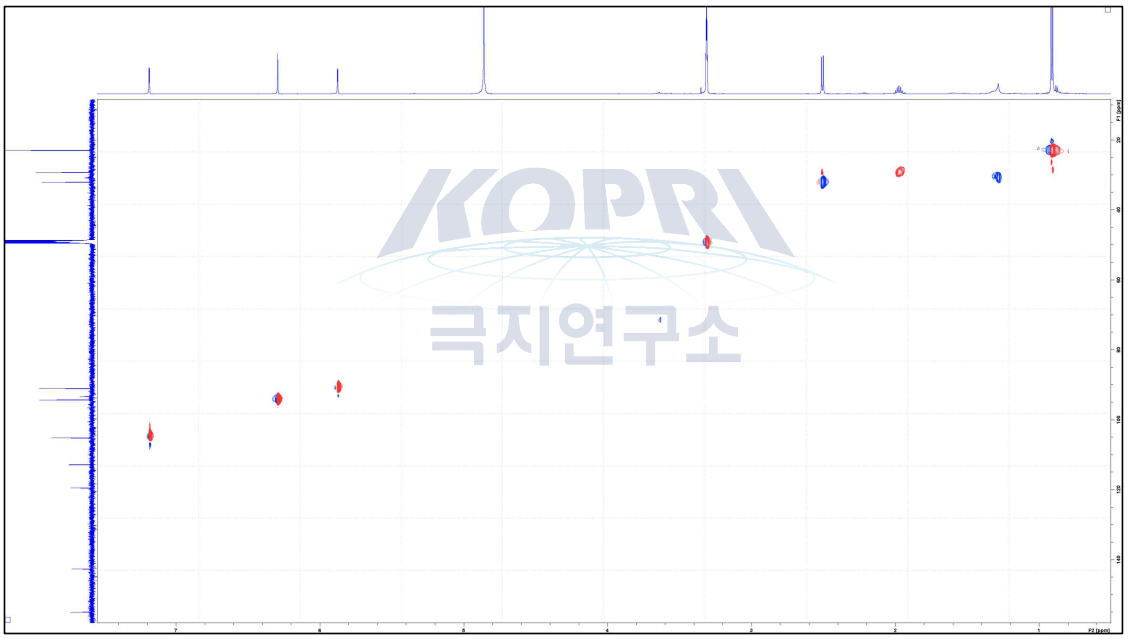


그림. Streptopyrrole 계열의 신규 화합물 (8)의 HSQC 스펙트럼 (600 MHZ, CD_3OD).

- ^{13}C NMR 스펙트럼 및 HSQC 스펙트럼의 해석을 통해 신규 화합물 (8)의 분자 내 탄소와 수소의 결합관계를 확인하였고 각각의 탄소의 종류를 확인할 수 있었음. 총 15개의 탄소가 존재하였으며, 그 중에 2개의 methyl기 탄소 C-3′ /C-4′ (δ_C 22.8), 1개의 methylene기 탄소 C-1′ (δ_C 32.0), 1개의 methine기 탄소 C-2′ (δ_C 29.1), 2개의 protonated olefinic methine기 탄소 C-2(δ_C 105.0), C-3(δ_C 90.9)와, 9개의 noprotonated 탄소 C-1(δ_C 119.3), C-3a(δ_C 142.5), C-4a(δ_C 154.9), C-5(δ_C 94.2), C-6(δ_C 165.7), C-7(δ_C 112.7), C-8(δ_C 161.3), C-8a(δ_C 93.2), C-9(δ_C 159.8)의 존재를 각각 확인하였음.

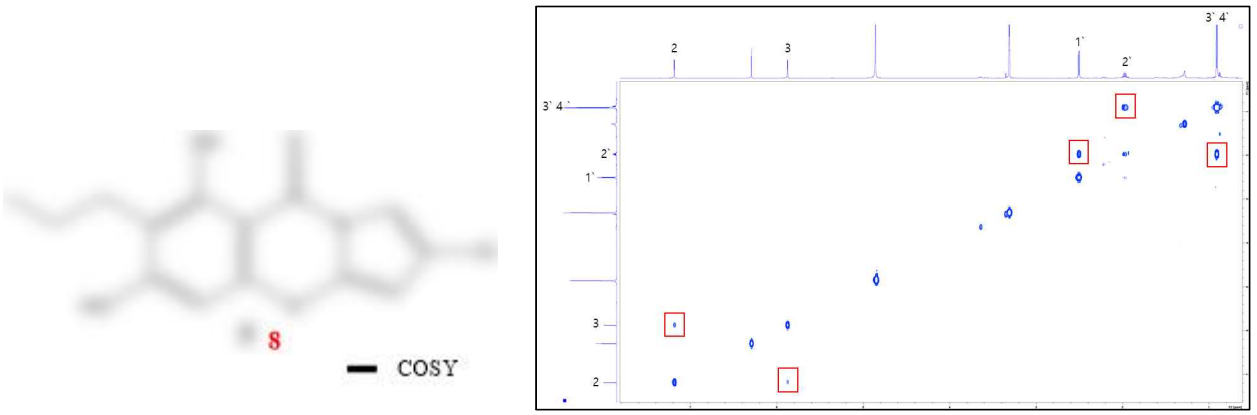


그림. Streptopyrrole 계열의 신규 화합물 (8)의 COSY 스펙트럼 (600 MHZ, CD_3OD).

- ^1H-^1H COSY 스펙트럼의 해석을 통하여, H_1-2(δ_H 7.18)와 H_1-3(δ_H 5.87)의 연결, 그리고 H_2-1′(δ_H 2.05)에서 H_1-2′(δ_H 1.97)과 H_3-3′/4′(δ_H 0.91)까지 연결되는 부분구조가 존재하는 것을 확인할 수 있었음.

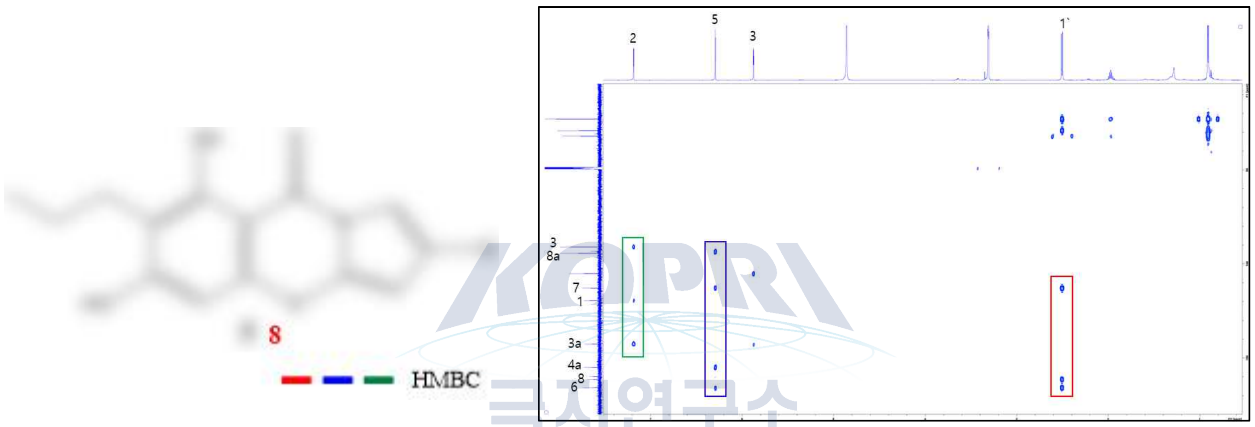


그림. Streptopyrrole 계열의 신규 화합물 (8)의 HMBC 스펙트럼 (600 MHZ, CD_3OD).

- HMBC 스펙트럼의 상세한 해석을 통해, 화합물 8의 각 탄소들의 결합관계를 확인하고 전체구조를 해석하였음. H_2-1′(δ_H 2.05)과 C-6(δ_C 165.7), C-7(δ_C 112.7), C-8(δ_C 161.3) 사이의 상관관계 신호 및 H_1-5(δ_H 6.29)와 C-4a(δ_C 154.9), C-6(δ_C 165.7), C-7(δ_C 112.7), C-8a(δ_C 93.2) 간의 신호를 통해 C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8, C-8a가 연결되어 있는 불포화 고리구조의 존재를 알 수 있었음. 또한 H_2-1′과 C-6(δ_C 165.7), C-7(δ_C 112.7), C-8(δ_C 161.3)과의 HMBC 상관관계 및 이들 탄소의 δ_C값을 통해 C-7이 side chain의 C-1′과 연결된 구조임을 확인할 수 있었음. H_2-2 (δ_H 7.18)와 C-1(δ_C 119.3), C-3(δ_C 90.9), C-3a(δ_C 142.5) 간의 신호와 δ_C값을 고려하여 C-1, C-2, C-3, C-3a가 연결된 pyrrole 부분구조로 해석하였으며 최종적으로 8의 구조를 규명 할 수 있었음. 문헌조사 결과, 8은 미생물에서 분리된 적이 없는 streptopyrrole 계열의 신규 물질로 확인되었음.

7) 신규 화합물들의 항균활성 평가

- Clinical and Laboratory Standards Institute의 가이드라인 (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Tenth Edition)에 의거하여 microdilution 방법으로 그람 양성균(*Bacillus subtilis, Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus*)과 그람 음성균(*Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Klebsiella pneumonia*)에 대한 신규 화합물 2종의 항균활성 시험을 실시하였음.

- MIC(minimum inhibitory concentration)시험:
96 well plate의 각 라인을 다음과 같은 방법으로 처리한 후 시험하였음.

A,B : Kanamycin (Positive control)

B,C : 신규화합물 **5**

E,F : 신규화합물 **8**

1~10 : 농도 128~0.25 μg/ml

11 : Growth control (MH broth + Bacteria)

12 : Sterility control (only MH broth)

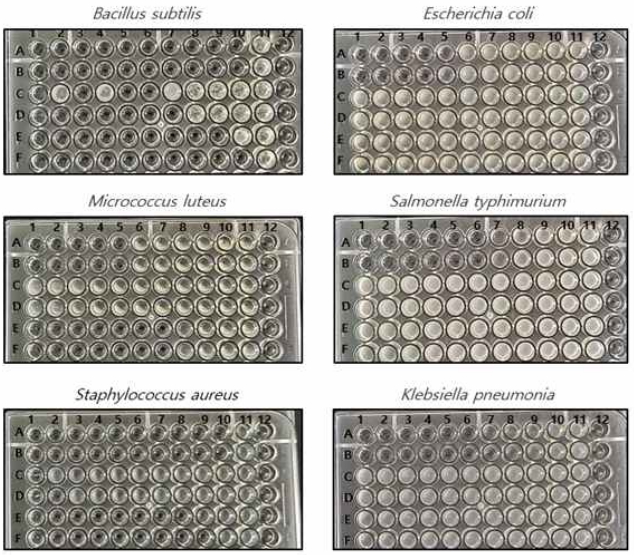


그림. 신규 화합물의 항균활성 평가

- 신규 화합물 5와 8의 항균활성 평가 결과

표. 신규 화합물들의 MIC 시험결과

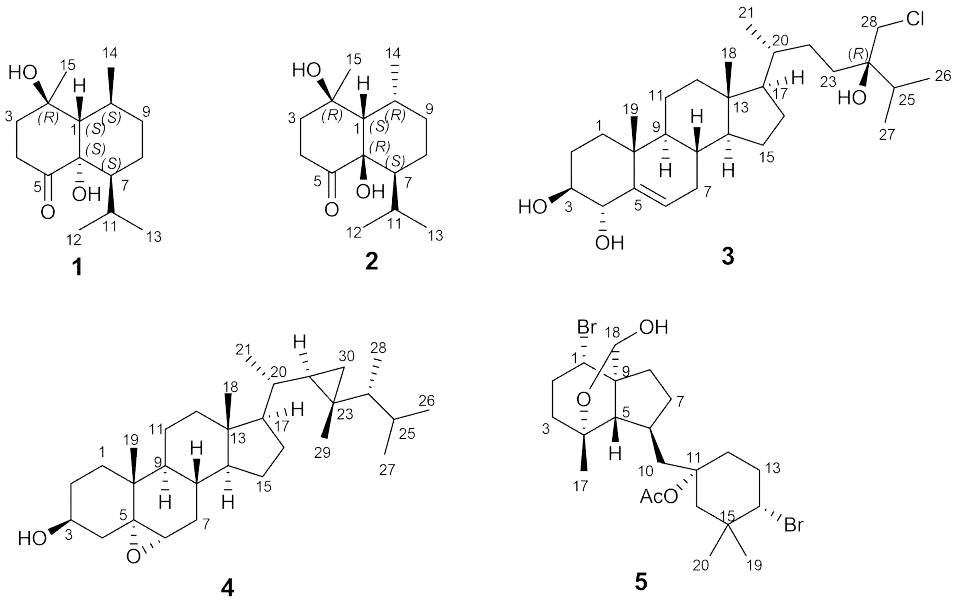
Strains	MIC (μg/ml)		
	신규 화합물 5	신규 화합물 8	Kanamycin
Bacillus subtilis	4	0.5	<0.25
Micrococcus luteus	>128	2	4
Staphylococcus aureus	128	0.5	<0.25
Escherichia coli	none	none	8
Salmonella typhimurium	none	none	4
Staphylococcus aureus	none	none	4

- 신규 화합물 5는 *Bacillus subtilis*에 대하여 4 μg/ml의 MIC 값을 보였으며, 또한 *Staphylococcus aureus*에 대하여 128 μg/ml의 MIC 값을 보였음. 그러나 *Micrococcus luteus* 및 그람 음성균에 대하여 항균활성을 보이지 않았음. 문헌 조사에 따르면 Bafilomycin계열의 물질들은 강한 항균, 항암 활성을 가지는 것으로 검색되었으나, 신규 화합물 5의 경우 *Bacillus subtilis*에 대한 강한 항균활성을 보였지만 다른 균주들에 대해서는 유의미한 결과를 나타내지 않았음. 신규 화합물 8은 *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus*에 대하여 0.5 ~ 2 μg/ml의 MIC 값을 가지는 강력한 항균 활성을 보여주었으며, *Micrococcus luteus*에 대해서는 Kanamycin 보다 더 강한 항균활성을 보였으나, 그람 음성균에 대해서는 항균활성을 보이지 않았음. 추가 신규 bafilomycin 유도체를 찾기 위해 계속해서 실험중에 있음. Bafilomycin 계열의 물질들은 항균, 항암, 항기생충, 면역억제 및 항진균 활성을 포함한 광범위한 생물학적 활성을 나타내기 때문에 본 연구에서 분리한 신규 bafilomycin 유도체들 (5, 8)에 대해서 다양한 생리활성 검색이 필요할 것으로 보임.

다. 극지(해양)생물(*Sinularia brassica*) 유래 화합물 (충남대)

1) 극지(해양)생물(*Sinularia brassica*)로부터 신규화합물 4종에 대한 절대구조 및 이차대사산물 1종에 대한 구조 결정

- 신규화합물 4종: sinulaketol A (1), sinulaketol B (2), (24R)-28-chloroergost-5-ene-3β,4α,24-triol (3), 5α,6α-epoxygorgosterol (4)
- 이차대사산물 1종: pinnaterpene (5)



- 절대구조 규명: NOESY, ECD 및 DP4 분석을 통하여 신규화합물 4종(1-4)의 절대구조 결정

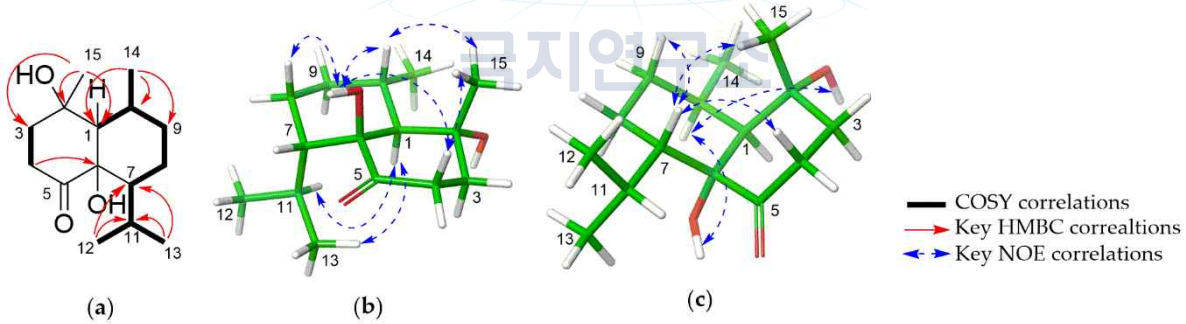


그림. (**a**) Key COSY and HMBC correlations of 1 and 2 (**b**),(**c**) MMFF-energy minimized structures and key NOE correlations of 1 and 2

- 신규화합물 1

○ Coupling constants, NOESY 및 ECD 분석을 통하여 신규화합물 1의 입체구조를 1*S*, 2*R*, 6*S*, 7*S*, 10*S* 로 규명하고 sinulaketol A로 명명함

- 신규화합물 2

○Coupling constants, NOESY 및 ECD 분석을 통하여 신규화합물 2의 입체구조를 1*S*, 2*R*, 6*R*, 7*S*, 10*R* 로 규명하고 sinulaketol B로 명명함

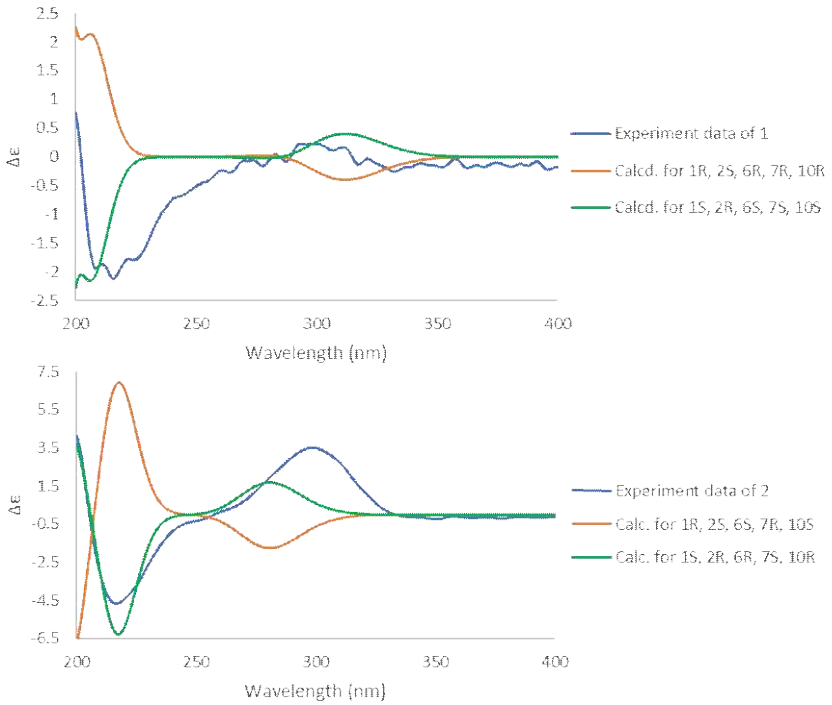


그림. Experimental and calculated ECD spectra of 1 and 2

- 신규화합물 3

○ Coupling constants, NOESY 및 DP4+ 분석을 통하여 신규화합물 3의 절대구조를 결정하고 (24*R*)-28-chloroergost-5-ene-3*β*,4*α*,24-triol로 명명함

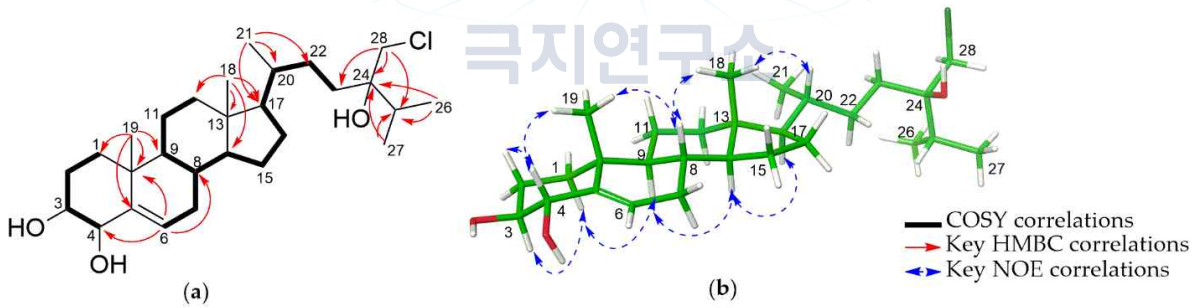


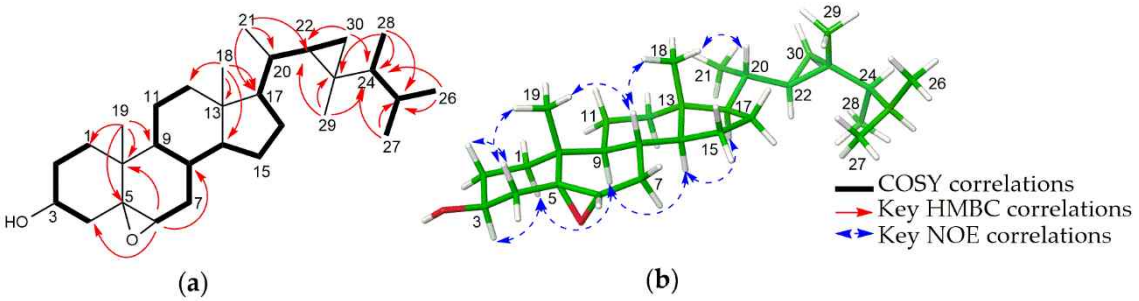
그림. (**a**) Key COSY and HMBC correlations of 3 (**b**) MMFF-energy minimized structure and key NOE correlations of 3

표. DP4+ probabilities of 3

	Isomer 24*S*	Isomer 24*R*
sDP4+ (H data)	0.25%	99.75%
sDP4+ (C data)	12.83%	87.17%
sDP4+ (all data)	0.04%	99.96%
uDP4+ (H data)	0.39%	99.61%
uDP4+ (C data)	2.53%	97.47%
uDP4+ (all data)	0.01%	99.99%
DP4+ (H data)	0.00%	100.00%
DP4+ (C data)	0.38%	99.62%
DP4+ (all data)	0.00%	100.00%

- 신규화합물 4

○ Coupling constants, NOESY 및 reference 분석을 통하여 신규화합물 4의 절대구조를 결정하고 5*α*,6*α*-epoxygorgosterol로 명명함



(a) (b)

그림. (a) Key COSY and HMBC correlations of 4
(b) MMFF-energy minimized structure and key NOE correlations of 4

2) 극지(해양)생물(*Sinularia brassica*) 유래 화합물에 대한 항균 및 항리슈만편모충 활성 평가
- 신규화합물 3에서 항리슈만편모충 활성 확인
- 화합물 5에서 항균 및 항리슈만편모충 활성 확인

Table. 신규화합물 4종과 기지물질 1종에 대한 항리슈만편모충 및 항균 활성

Compound	Antileishmanial		Antimicrobial		
	Inhibition of parasites (%)[a]	Cell viability (%)[b]	*C. albicans*	*S. aureus*	*E. coli*
			IC_{50} (μg/mL)		
1	-5.3	96.2	NA[c]	NA	NA
2	1.4	96.5	NA	NA	NA
3	58.7	88.8	NA	NA	NA
4	-11.9	97.1	NA	NA	NA
5	74.3	106.2	NA	>104	NA
kanamycin			NA	13.5	1.50 ± 0.24
nystatin			0.93 ± 0.18	NA	NA

[a]Inhibition of a growth of *L. donovani* at 50 μM,
[b]Cell viability of compounds in THP-1 cell at 50 μM, NA: Not active at 500 μg/mL

라. 극지(해양)생물(*Sphaerophorus globosus*) 유래 화합물 (충남대)
1) 극지(해양)생물(*Sphaerophorus globosus*)로부터 이차대사산물 9종을 분리함
- 이차대사산물 9종: 7-hydroxy-5-methoxy phthalide (1), everninic acid (2), lecanoric acid (3), ethyl orsellate (4), sphaerophorin (5), squamarone (6), 6-heptyl-*β*-resorcylic acid (7), sphaeropherol (8), 4-*O*-demethyl sphaerophorin (9)

2) 화합물 9종의 화학구조 결정
- 7-hydroxy-5-methoxy phthalide (1)
○ ^{1}H NMR (600 MHz, methanol-d_4) δ_H 6.59 (1H, s, H-4), 6.40 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 5.22 (2H, s, H_2-3), 3.85 (-OCH_3, s); ^{13}C-NMR (150 MHz, methanol-d_4) δ_C 172.5 (C-1), 168.6 (C-5), 159.5 (C-7), 152.7 (C-4a), 105.7 (C-7a), 102.5(C-4), 99.8 (C-6), 70.7 (C-3), 56.4 (-OCH_3).

KOPRI 극지연구소

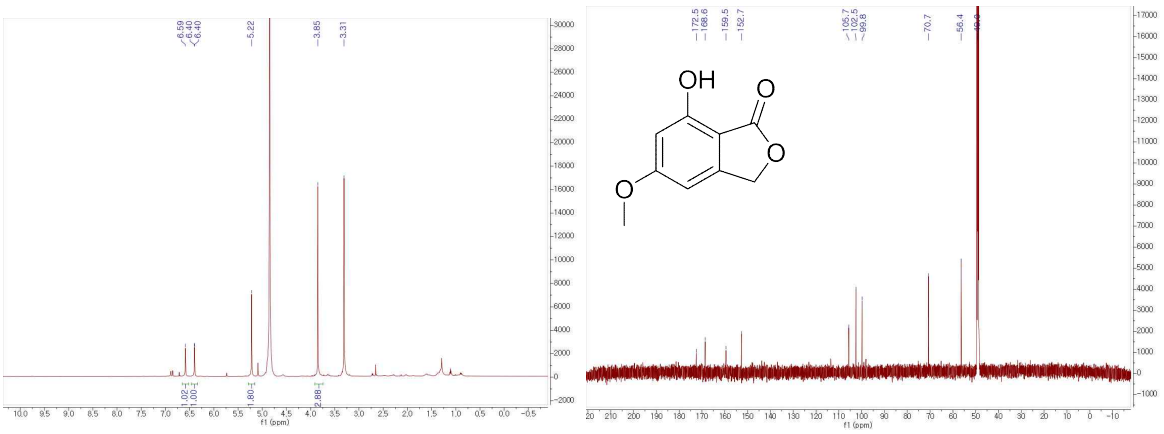
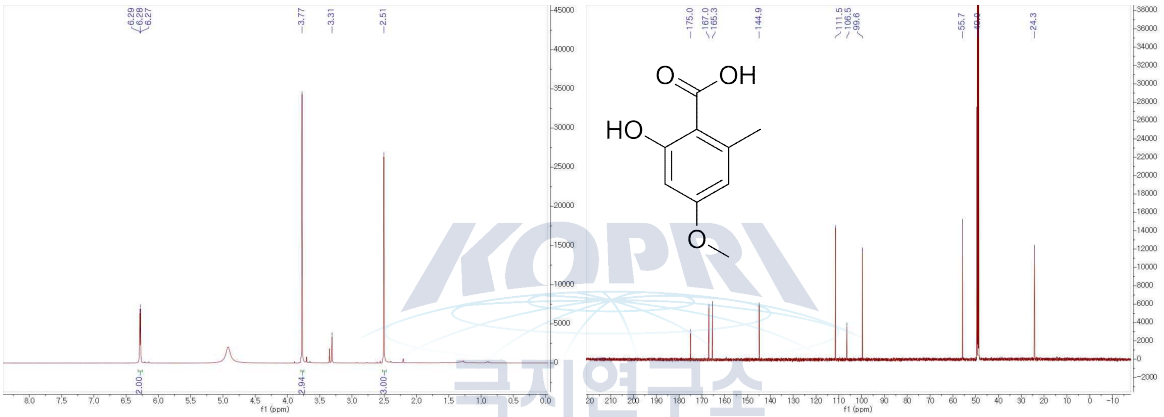


그림. NMR spectroscopic data of compound 1

- Everninic acid (2)

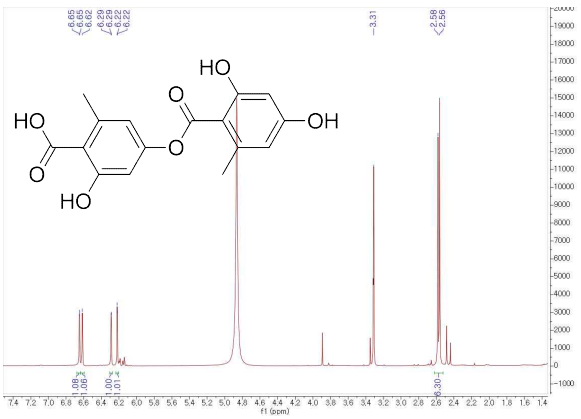
○ ^{1}H NMR (600 MHz, methanol-d_4) δ_H 6.29 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-6), 6.28 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-4), 3.77 (3H, s, H-1′), 2.51 (3H, s, H-8); ^{13}C NMR (150 MHz, methanol-d_4) δ_C 175.0 (C-1), 167.0 (C-5), 165.3 (C-3), 144.9 (C-7), 111.5 (C-2), 106.5 (C-6), 99.6 (C-4), 55.7 (C-1'), 24.3 (C-8).



NMR spectroscopic data of compound 2

- Lecanoric acid (3)

○ ^{1}H NMR (600 MHz, methanol-d_4) δ_H 6.65 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.62 (1H, s, H-4), 6.29 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-4'), 6.22 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6'), 2.58 (3H, s, C-8), 2.56 (3H, s, C-8').

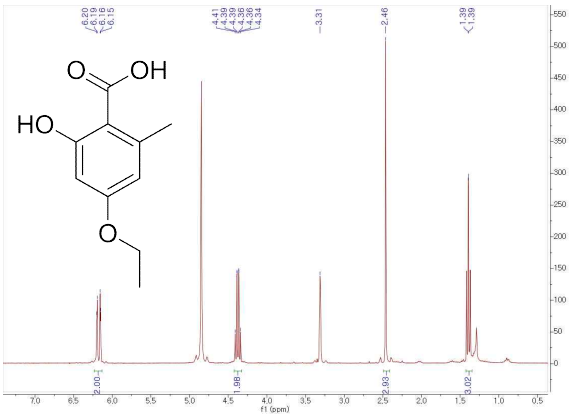


NMR spectroscopic data of compound 3

- Ethyl orsellate (4)

○ ^{1}H NMR (300 MHz, methanol-d_4) δ_H 6.20 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-6), 6.15 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-4), 4.37 (2H, qd, J = 7.1, 0.5 Hz, H-1'), 2.46 (3H, s, H-8), 1.39 (3H, td, J = 7.1, 0.5

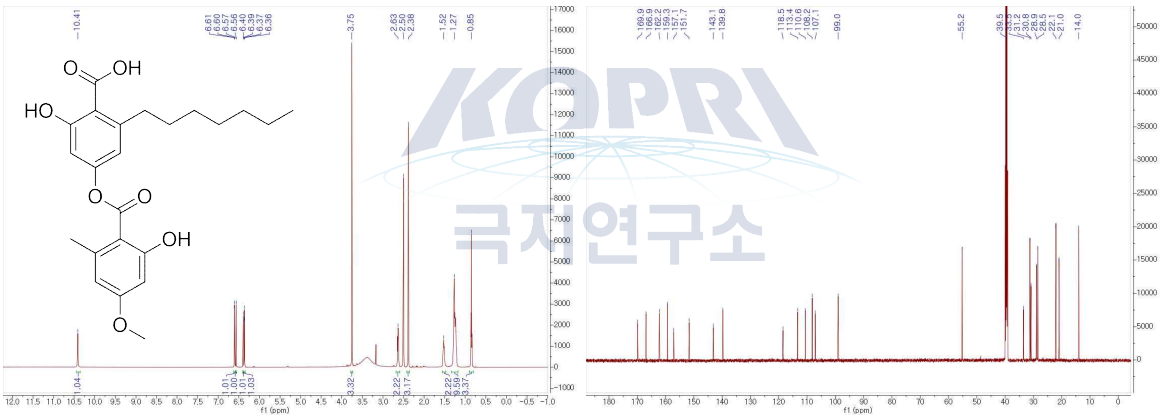
Hz, H-2').



NMR spectroscopic data of compound 4

- Sphaerophorin (5)

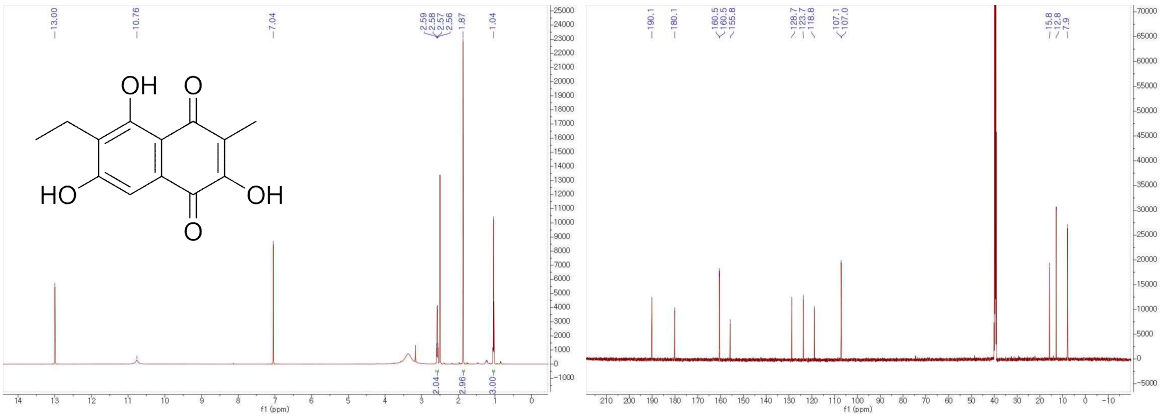
○ ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO) δ_H 6.61 (1H, d, J = 2.1, H-6), 6.56 (1H, d, J = 2.1, H-4), 6.39 (1H, d, J = 2.1, H-4'), 6.36 (1H, d, J = 2.1, H-6'), 3.75 (3H, s, -OCH3), 2.63 (2H, m, H-8), 2.38 (3H, s, H-8'), 1.52 (2H, m, H-9), 1.29-1.22 (8H, m, H-10,11,12,13,14), 0.85 (3H, t, J = 7.2, H-14); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO) δ_C 169.9 (C-1), 166.9 (C-1'), 162.2 (C-5'), 159.3 (C-7'), 157.1 (C-3), 151.7 (C-5), 143.1 (C-7), 139.8 (C-3'), 118.5 (C-6'), 113.4 (C-2'), 110.6 (C-4'), 108.2 (C-4), 107.1 (C-2'), 99.0 (C-6'), 55.2 (-OCH_3), 33.5 (C-8), 31.2 (C-12), 30.8 (C-9), 28.9 (C-11), 28.5 (C-10), 22.1 (C-13), 21.0 (C-8'), 14.0 (C-14).



NMR spectroscopic data of compound 5

- Squamarone (6)

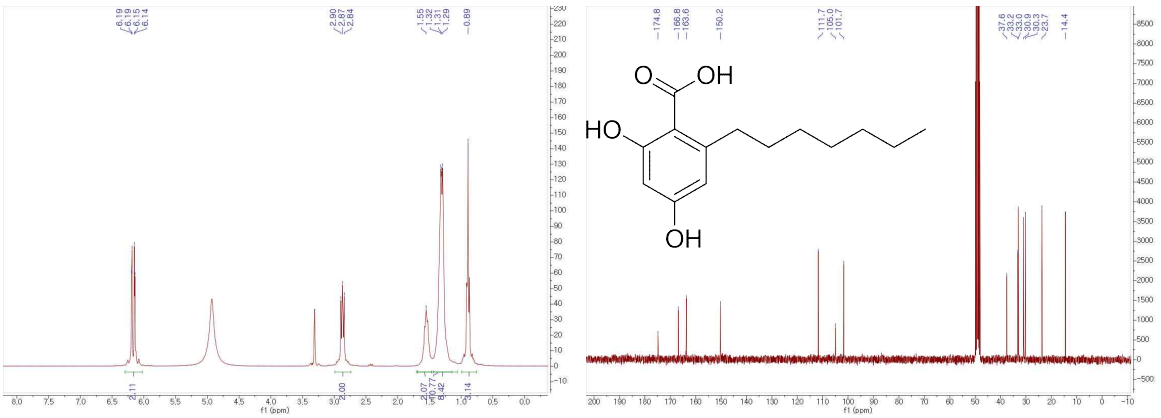
○ ^{1}H NMR (600 MHz, chloroform-d) δ_H 7.04 (1H, s, H-9), 2.57 (2H, q, J = 7.4 Hz, H-12), 1.87 (3H, s, H-11), 1.04 (3H, t, J = 7.4 Hz, H-13); ^{13}C NMR (150 MHz, chloroform-d) δ_C 190.1 (C-4), 180.1 (C-1), 160.5 (C-7), 160.5 (C-3), 155.8 (C-2), 128.7 (C-8), 123.7 (C-6), 118.8 (C-10), 107.1 (C-5), 107.0 (C-9), 15.8 (C-12), 12.8 (C-13), 7.9 (C-11).



NMR spectroscopic data of compound 6

- 6-heptyl-β-resorcylic acid (7)

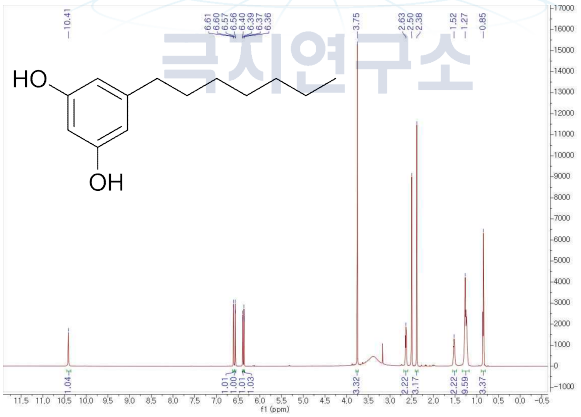
○ ^{1}H NMR (300 MHz, methanol-d_4) δ_H 6.19 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-6), 6.14 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-4), 2.87 (1H, m, H-8), 1.55 (2H, m, H-13), 1.42-1.24 (8H, m, H-9,10,11,12), 0.89 (3H, t, J = 6.6 H-14); ^{13}C NMR (75 MHz, methanol-d_4) δ_C 174.8 (C-1), 166.8 (C-3), 163.6 (C-5), 150.2 (C-2), 111.7 (C-7), 105.0 (C-6), 101.7 (C-4), 37.6 (C-8), 33.2 (C-9), 33.0 (C-10), 30.9 (C-11), 30.3 (C-12), 23.7 (C-13), 14.4 (C-14).



NMR spectroscopic data of compound 7

- Sphaeropherol (8)

○ ^{1}H NMR (300 MHz, methanol-d_4) δ_H 6.13 (1H, s, H-2), 6.12 (1H, s, H-6), 6.08 (1H, t, J = 2.0, H-4), 2.43 (2H, m, H-7), 1.56 (2H, m, H-12), 1.40-1.20 (8H, m, H-8,9,10,11), 0.89 (3H, t, J = 6.7 H-13); ^{13}C NMR (75 MHz, methanol-d_4) δ_C 159.3 (C-3), 159.3 (C-5), 146.3 (C-1), 107.9 (C-2), 107.9 (C-6), 37.0 (C-7), 33.0 (C-8), 32.4 (C-9), 30.3 (C-10), 30.3 (C-11), 23.7 (C-12), 14.4 (C-13).

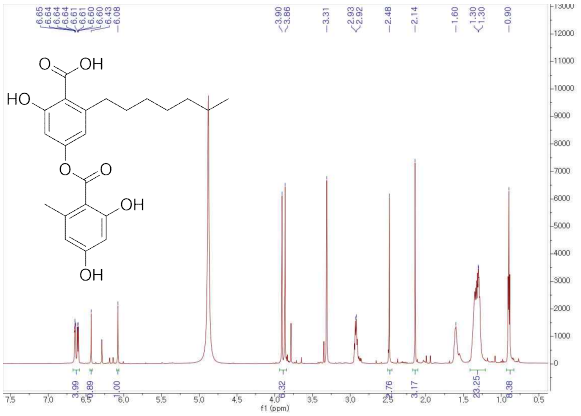


NMR spectroscopic data of compound 8

- 4-*O*-demethyl sphaerophorin (9)

○ ^{1}H NMR (300 MHz, methanol-d_4) δ_H 6.63 (1H, d, J = 2.2, H-6), 6.60 (1H, d, J = 2.2, H-4), 6.29 (1H, d, J = 2.1, H-4'), 6.22 (1H, d, J = 2.2, H-6'), 2.94 (2H, m, H-8), 2.57 (3H, s, H-8'), 1.61 (2H, m, H-13), 6.12 (1H, s, H-6), 6.08 (1H, t, J = 2.0, H-4), 2.43 (2H, m, H-7), 1.56 (2H, m, H-12), 1.40-1.20 (8H, m, H-8,9,10,11), 0.89 (3H, t, J = 6.7 H-13).

KOPRI 극지연구소



NMR spectroscopic data of compound 9

마. 천연물(*Paramignya trimera*) 유래 new dimeric coumarin 분리 (충남대)

1) 천연물(*Paramignya trimera*) 추출물 및 분획물 제조

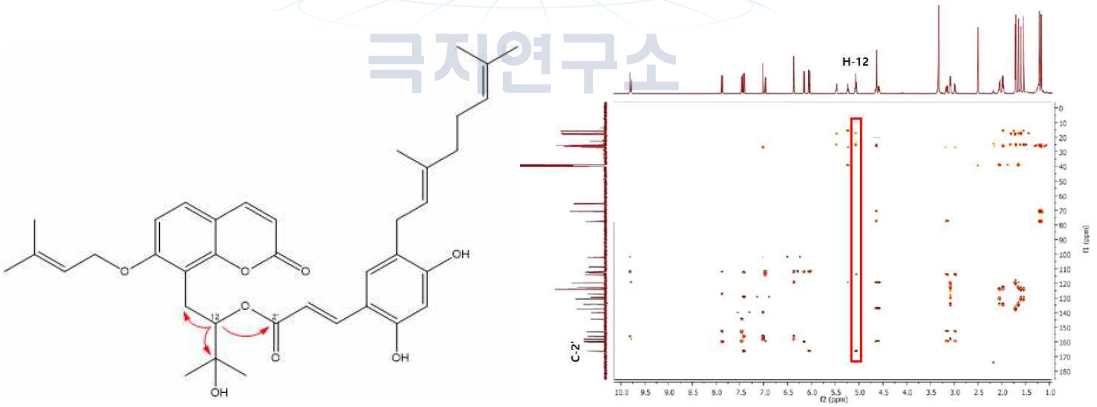
- Silica, C18 컬럼을 통한 초기 분획물 제조
- 각각의 컬럼분획물에 대한 LC/MS data를 기반으로 하여 특이 성분 함유 분획물 확인
- 분획물으로부터 활성물질 분리 및 정제
- 1D/2D NMR, HR-ESIMS, ECD data를 기반으로 하여 절대구조를 규명

2) 신규화합물의 절대구조 규명

- 신규화합물 paratrimerin W

○ HRESIMS [M + Na]$^+$ m/z 355.1520 (calculated for $C_{19}H_{24}O_5Na^+$ 355.1516), 631.3260 (calculated for C38H46O8Na+ 653.3085), 1283.6266 (calculated for C38H46O8Na+ 1283.6278)

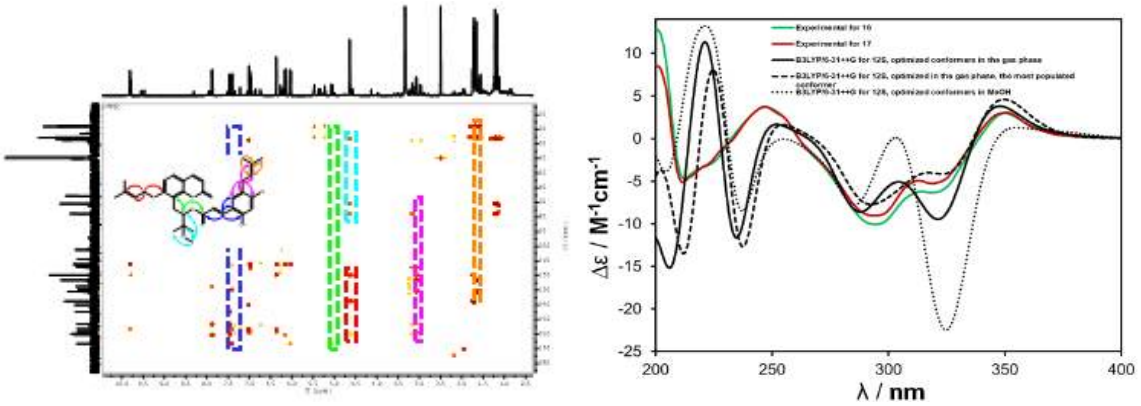
○ HMBC에서 두 개의 monomer가 연결된 H-12(δH 5.06)과 C-2'(δC 166.5)의 cross peak 관찰됨



○ DEPT, COSY, HSQC, HMBC의 특징적인 신호를 통해 신규 화합물의 평면구조를 규명하고 dimeric coumarin임을 예측함

○ ECD 분석을 통해 신규 화합물의 입체구조를 12(*S*)으로 규명하고 paratrimerin W로 명명함

KBRI 극지연구소



바. 극지(해양)생물(*Andreaea*) 유래 신규 항생물질 탐색 (충남대)

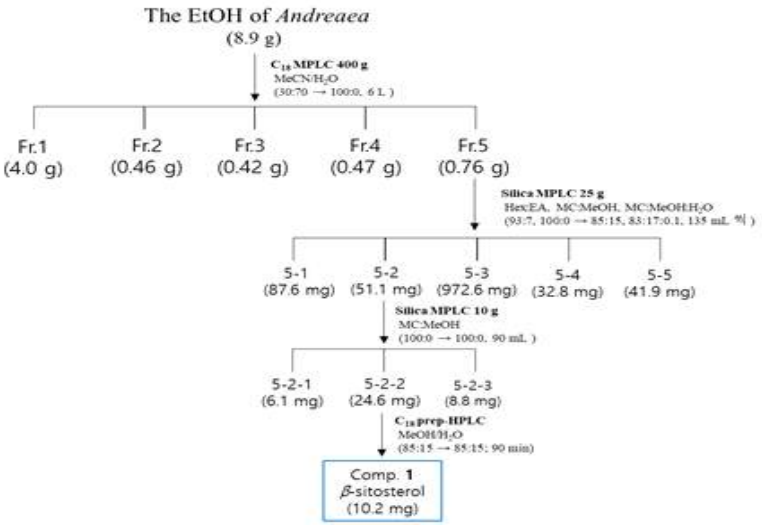
1) 극지(해양)생물(*Andreaea*) 확보 : 주관기관 극지연구소에서 분양 받음

- 기원이 확인된 극지생물확보

극지(해양)생물(*Andreaea*)

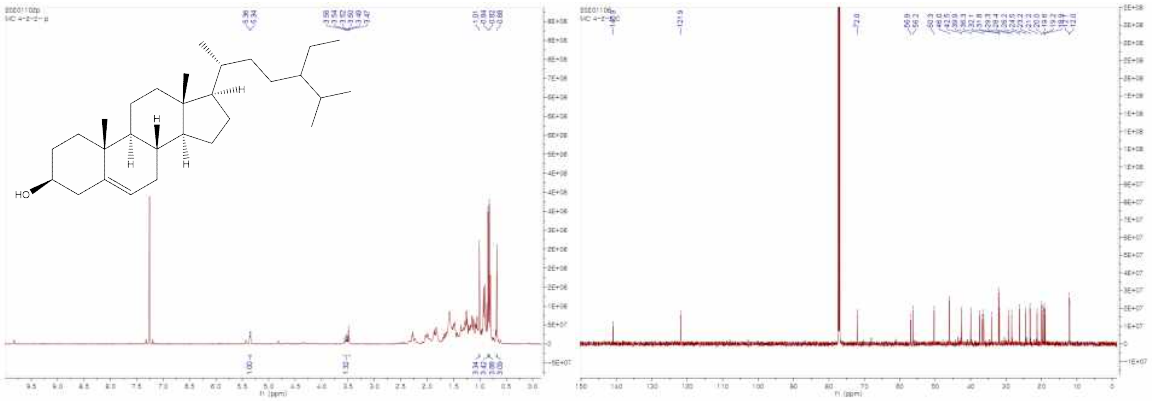
2) 극지(해양)생물(*Andreaea*) 추출물 및 분획물 제조

- *Andreaea* 약 458.5 g을 세절하고 95% EtOH로 5회 상온 추출(24 h) 후 1회 환류 추출(6 h)하여 추출물 8.9 g을 얻음
- EtOH추출물(8.9 g)에 대하여 ACN-H_2O 기울기 용매조건(30%-100% 8 L; 100% 3 L)을 이용하여 MPLC(Biotage SNAP Cartridge, KP-c18-HS, 400g)를 실시하여 총 5개의 분획물(Fr.1~Fr.5)을 얻음



극지(해양)생물(*Andreaea*) 분리 과정

3) 극지(해양)생물(*Andreaea*)로부터 분리된 화합물 화학구조 결정



극지(해양)생물(*Andreaea*)의 $^{1}H/^{13}C$ NMR spectroscopic data

- 추출물과 분획물(Fr.1~Fr.5)을 $CDCl_3$으로 용해하여 proton NMR 분석 진행함
- ^{1}H-NMR spectroscopic data의 chemical shift 분석 결과, 일반적인 sterol과 fatty acid의 peak들- 해당 극지(해양)샘플에는 목표하는 신규 항생물질이 없다고 판단하여 연구를 중단함

사. 극지 미생물 유래 항생제 발굴 및 대량 생산 (극지연)

-항생제 생산능력이 있는 극지 미생물 스크리닝 및 후보물질 검증

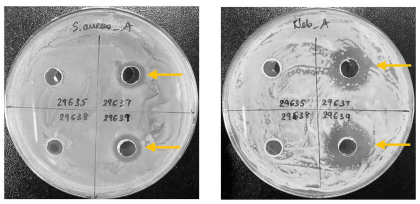
그림. 항생후보물질 생산을 위한 극지미생물 스크리닝 및 활성 검증 연구

- 항생물질 생산 균주 선별 및 물질 분석을 위한 생산 최적화 및 후보물질 구조 분석

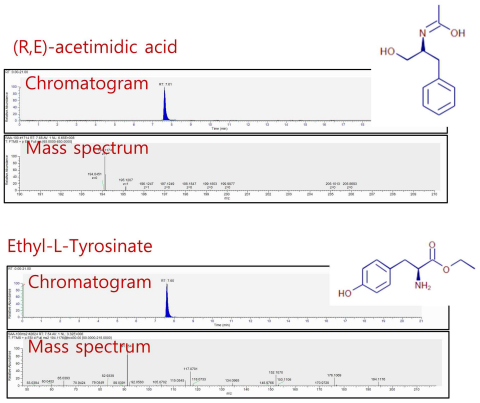
극지 미생물 유래 항생제 발굴 및 대량 생산 I

후보 항생 물질 구조 분석

3 단계 대량 생산 및 항생제 구조 분석



<PAMC 29637> *Streptomyces avidinii*
<*PAMC 29639*> *Streptomyces avidinii*



- 포도상구균 *S. Aureus* 및 폐렴균 *K. pneumoniae* 에 항균 활성을 보이는 균주 2종 확보
- MASS분석 및 물질의 화학구조 예측
- 물질 분석을 위한 생산 방식 최적화 (freezing-thaw 방식)
- MASS분석 및 물질의 화학구조 예측

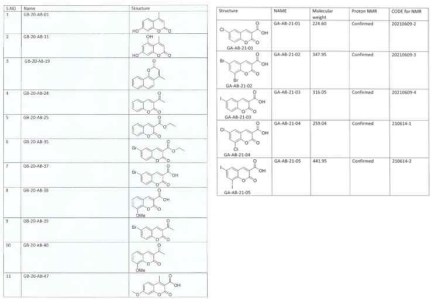
그림. 항생물질 생산 균주 선별 및 항생 후보물질 구조분석

- 구조분석이 완료 된 항생후보물질에 한하여 유기합성을 통한 대량생산으로 물질 확보
- 후속 연구에서 사용할 수 있는 수준의 양을 확보하고 유기합성 과정에서 유도체 생산을 통한 신규 항생후보물질 생산

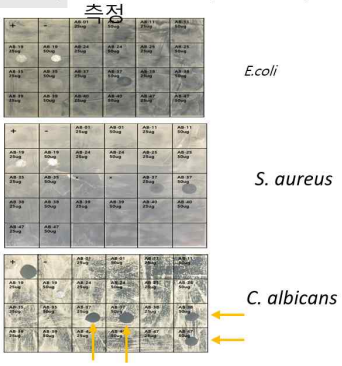
유기합성을 통한 항생물질 대량 확보 II

유기합성을 통한 쿠마린 생산

1 단계 다양한 쿠마린 유도체 확보



2 단계 쿠마린 항생 후보물질의 항균 활성 측정



- 합성 화학적 방법을 통해 구조가 다양한 쿠마린 유도체를 수집 및 생성함
- 구조적 다양성을 기반으로, 항균 활성 가능성이 높은 물질군을 폭넓게 탐색
- 확보된 유도체들을 대상으로 항균 활성 스크리닝 수행
- MIC, MBC 측정. 항균 활성 실험 등을 통해 다양한 병원균에 대한 항생 효능 평가

그림. 유기합성을 통한 유도체 합성 및 항생후보물질 스크리닝

유기 합성을 통한 항생물질 대량 확보 II

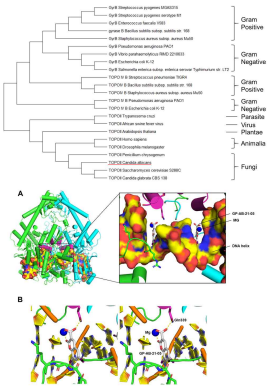
유기합성을 통한 쿠마린 생산

3 단계 후보물질의 대량 생산 및 확보

그람(g) 단위 쿠마린 유도체 확보

- 유망 후보물질의 대량 생산을 위한 화학 합성 공정 개발
- 생산된 물질은 전임상 시험 등 후속 연구에 활용 가능한 수준으로 확보

4 단계 항균 메커니즘 규명



GP-AB-21-05 타겟 단백질 예측 (Topoisomerase II)

쿠마린 GP-AB-21-05 결합 메커니즘 (컴퓨터 기반 도킹 분석(in silico docking)

- 후보물질의 작용 표적 탐색 (예: 세포벽 합성, 단백질 생성 억제 등)전사체 분석, 단백질 상호작용 분석 등을 통해 항생 메커니즘 과학적 입증

그림. 유기합성을 통한 항생후보물질 다량 확보 및 항생메커니즘 연구

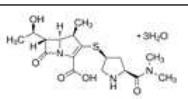
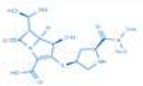
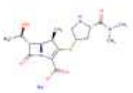
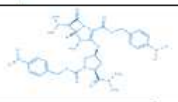
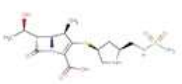
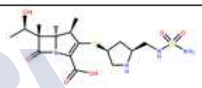
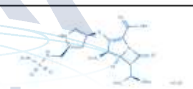
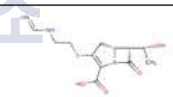
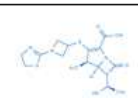
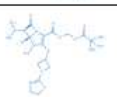
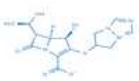
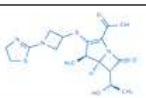
KOPRI 극지연구소

<2세부> 극지 유전자원 기반 항생물질 변형효소 선별

가. Meropenem 유도체 라이브러리 구축 및 Lactamase의 활성 저해제로서의 가능성 연구 (극지연)

1) Lactamase 저해 활성을 보이는 Meropenem 유도체를 합성하여 병원균에 대한 살균 활성을 측정함.

2) 총 13 종의 Meropenem 유도체를 이용하여 *E.Coli* 에 대한 MIC를 측정하여 총 5종의 (Meropenem trihydrate (merrem), Doripenem, Imipenem, Tebipenem, Biapenem) 유사체가 높은 살균 활성을 갖는다는 것을 확인함.

#		Compound name	Synonyms	Product #	CAS number	Structure	Molecular weight	MIC (ug/ml)
1	km	Kanamycin						1.95
2	1	Meropenem trihydrate	(1R,5S,6S)-2-[(3S,5S)-5-(dimethylaminocarbonyl)pyrrolidin-3-ylthio]-6-[(R)-1-hydroxyethyl]-1-methylcarbapen-2-em-3-carboxylic acid trihydrate, Meropenem trihydrate	Sigma, PHR1772	211238-34-5		405.44	15.63
3	8	Meropenem trihydrate (merrem)	(4R,5S,6S)-3-(((3S,5S)-5-(Dimethylcarbamoyl)pyrrolidin-3-yl)thio)-6-((R)-1-hydroxyethyl)-4-methyl-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxylic acid trihydrate, 97%	BLDpharm, BD137491	119478-56-7		437.51	1.95
4	3	Meropenem sodium salt	1-Azabicyclo[3.2.0]hept-2-enr-2-carboxylic acid, 3-[[(3S,5S)-5-[(dimethylamino)carbonyl]-3pyrrolidinyl]thio]-6-[(1R)-1-	Aablocks, AA002L5E	148016-81-3		405.44	>1000
5	6	Merophenem p-nitrobenzyl diester (Protected meropenem)	(4-nitrophenyl)methyl (4R,5S,6S)-3-[[(3S,5S)-5-(dimethylcarbamoyl)-1-[[(4-nitrophenyl)methoxy]carbonyl]pyrrolidin-3-yl]sulfanyl]-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-4-methyl-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-	BLDpharm, BD23262	96036-02-1		697.71	>1000
6	2	Doripenem	(4R,5S,6S)-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-4-methyl-7-oxo-3-[[(3S,5S)-5-[(sulfamoylamino)methyl]pyrrolidin-3-yl]sulfanyl]-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxylic acid	AK scientific, P521	148016-81-3		420.5	3.91
7	7	Doripenem		AKscientific J95957	74431-23-5		420.5	1.95
8	4	Doripenem hydrate	(4R,5S,6S)-6-((R)-1-Hydroxyethyl)-4-methyl-7-oxo-3-(((3S,5S)-5-((sulfamoylamino)methyl)pyrrolidin-3-yl)thio)-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxylic acid hydrate	BLDpharm, BD126854	364622-82-2		438.52	1.95
9	9	Imipenem	(5R,6S)-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-3-[(2-methanimidamidoethyl)sulfanyl]-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxylic acid	angene	64221-86-9		299.35	7.81
10	12	Tebipenem	(4R,5S,6S)-3-[[1-(4,5-dihydro-1,3-thiazol-2-yl)azetidin-3-yl]sulfanyl]-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-4-methyl-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxylic acid	BLDpharm, BD630388	161715-21-5		383.49	≤0.98
11	10	tebipenem (Tebipenem pivoxil)	(4R,5S,6S)-(Pivaloyloxy)methyl 3-((1-(4,5-dihydrothiazol-2-yl)azetidin-3-yl)thio)-6-((R)-1-hydroxyethyl)-4-methyl-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxylate, 98%	BLDpharm, BD209498	161715-24-8		497.63	7.81
12	11	Biapenem	(4R,5S,6S)-3-((6,7-Dihydro-5H-pyrazolo[1,2-a][1,2,4]triazol-4-ium-6-yl)thio)-6-((R)-1-hydroxyethyl)-4-methyl-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxylate, 98%	BLDpharm, BD116647	120410-24-4		350.39	≤0.98
13	13	(Ertapenem disodium salt)	sodium (4R,5S,6S)-3-[[(3S,5S)-5-[(3-carboxyphenyl)carbamoyl]pyrrolidin-3-yl]sulfanyl]-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-4-methyl-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxylate	BLDpharm, BD630388	153773-82-1		497.5	15.63
14	14	(Ertapenem disodium salt)	sodium (4R,5S,6S)-3-[[(3S,5S)-5-[(3-carboxyphenyl)carbamoyl]pyrrolidin-3-yl]sulfanyl]-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-4-methyl-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxylate	Angene	153773-82-1		497.5	125

KOPRI 극지연구소

나. 항생물질 타겟 단백질 발현 및 정제

1) 극지 세균 *Paenibacillus* sp. 유래 항생물질 변형효소 단백질 대량생산 및 활성 규명

- 항생제 변형효소 PbAcE 단백질 생산을 위한 7L 발효기 배양

○ 세포농도는 IPTG처리후 24시간까지 계속해서 증가함. 세포건조중량으로 발현유도 24시간 후에 17g/L를 나타냄

○ 효소의 생산은 세포 파쇄후 수용성 분획에서 발현 유도 후 0, 5, 10, 19, 와 24시간에서 SDS-PAGE로 확인함

○ PbAcE의 발현은 IPTG 발현유도 10시간에 최대 수준을 나타냄

○ 세포 당 PbAcE의 농도와 활성은 발현 유도 후 19시간에 최대를 보임

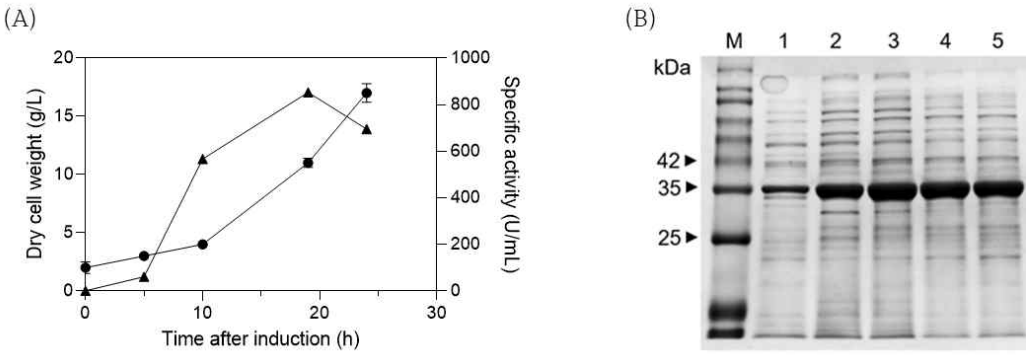


그림. 7L 발효기를 이용한 재조합 PbAcE의 생산. (A) 시간별 세포건조중량 변화(▲)와 PbAcE 생산(■). (B) 생산된 세포내 수용성 PbAcE의 SDS-PAGE. . Lane M: size marker; lane 1: 발현유도전; lanes 2 - 5: 발현유도 후 시간 5, 10, 19, 24h에서 단백질 밴드.

- 항생제 변형효소 PbAcE 단백질 생산을 위한 30L 발효기 배양

○ 세포농도는 IPTG처리후 24시간까지 계속해서 증가함. 세포건조중량으로 발현유도 24시간 후에 6 g/L를 나타냄. 이는 7L 발효기에서 나타난 세포생산보다 낮은 값이었음

○ PbAcE의 발현은 IPTG 발현유도 10 시간에 최대 수준을 나타냄

○ 세포 당 PbAcE의 농도와 활성은 발현 유도 후 19시간에 최대를 보임

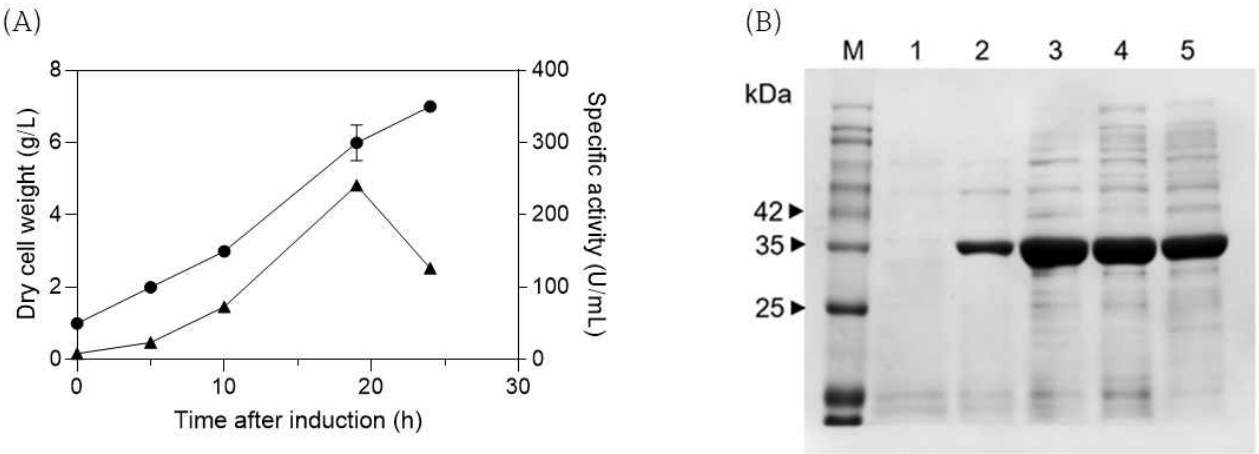


그림. 30L 발효기를 이용한 재조합 PbAcE의 생산. (A) 시간별 세포건조중량 변화(▲)와 PbAcE 생산(■). (B) 생산된 세포내 수용성 PbAcE의 SDS-PAGE. . Lane M: size marker; lane 1: 발현유도전; lanes 2 - 5: 발현유도 후 시간 5, 10, 19, 24h에서 단백질 밴드.

- PbAcE 단백질의 정제 및 생산량 분석

○ 배양된 세포를 파쇄하여 수용성 분획을 affinity chromatography를 이용해 정제한 후 SDS-PAGE로 분석함. 단백질의 순도는 densitometry 프로그램을 이용한 결과 80% 이상을 나타냄

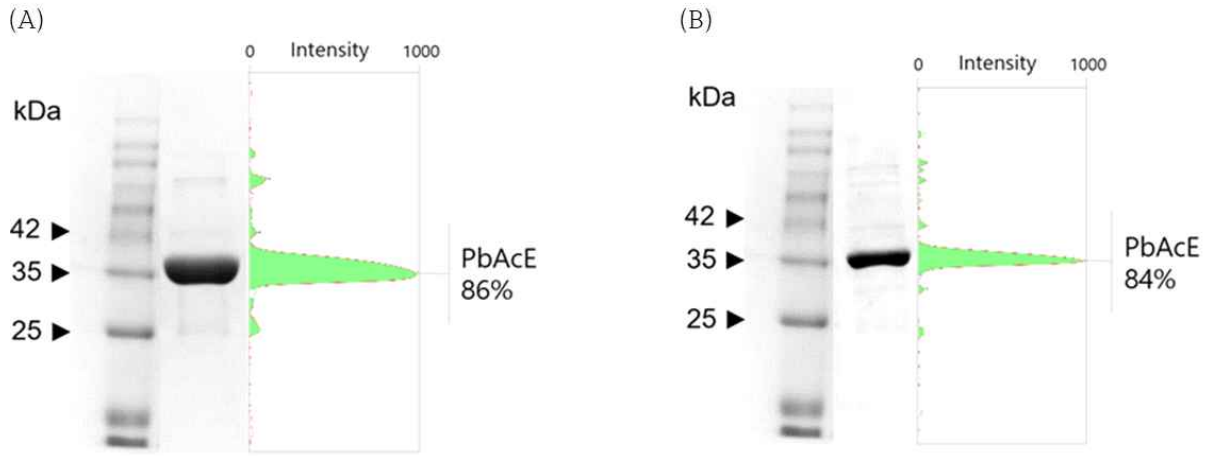


그림. SDS gel 상에서 정제된 PbAcE의 분석 (A) 7L 발효기에서 생산된 PbAcE의 밴드와 순도 (B) 30L 발효기에서 생산된 PbAcE의 밴드와 순도

- 7L와 30L의 발효기에서 생산된 PbAcE의 산출량은 각각 657 mg/L 와 500 mg/L 였음.
- 7L와 30L의 발효기에서 생산된 PbAcE의 가수분해 활성은 대략 27 U/mg으로 동일하였음.

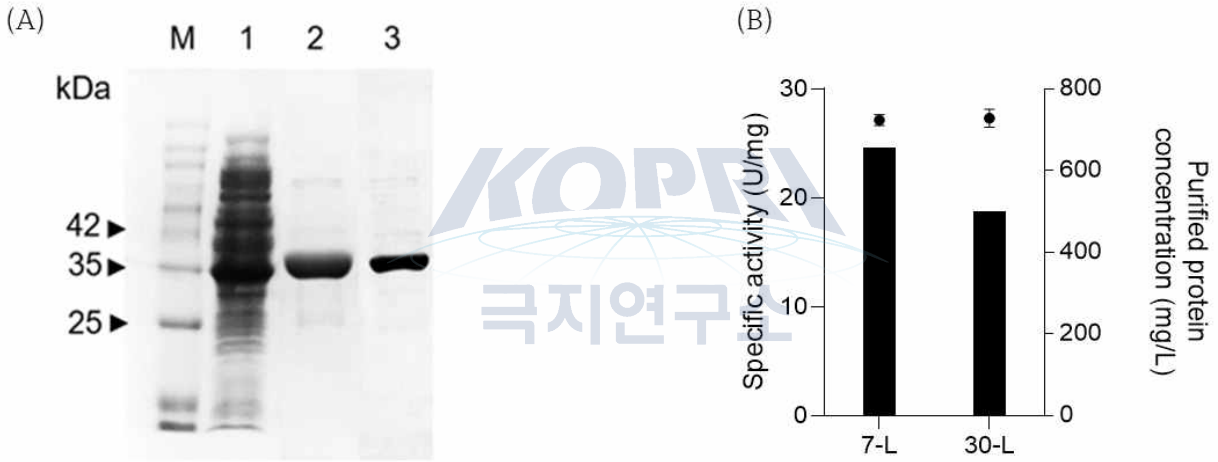


그림. 7L와 30L 발효기를 이용한 재조합 PbAcE의 생산량과 활성비교. (A) 정제된 PbAcE의 SDS-PAGE 분석. Lane M: size marker; lane 1: 정제전 PbAcE; lane 2: 7L 발효기에서 생산된 정제된 His-tagged PbAcE; lane 3: 30L 발효기에서 생산된 His-tagged purified PbAcE. (B) 7L와 30L 발효기에서 생산한 후 정제된 PbAcE 생산농도(막대그래프)와 가수분해 활성(●). 모든 실험은 25℃에서 수행되었고, 3번 반복하여 실험함.

○ 기존의 보고된 가수분해 효소 AXE의 경우 최대 활성은 플라스크 배양시 32.5 U/mg 였고, 파일럿 스케일인 20L 발효기의 경우 0.49 U/mg로 급격히 감소하였음

○ 이번 연구에서 활용된 7L와 30L의 발효기에서 PbAcE의 생산은 파일럿 스케일에서 낮았지만 활성의 경우는 동일한 값을 보였음

○ 파일럿 스케일 발효기의 경우, 증가된 배양 규모에 따른 공기순환, 교반, 용존산소량의 변화가 영향을 미치는 것으로 파악. 향후 이러한 배양조건의 개선은 단백질 생산량과 활성을 증대시킬 것으로 예상함

KOPRI 극지연구소

표. 배양 규모에 따른 가수분해 효소 AXE와 생산량 및 활성비교

Specific name	Organism	Mw (kDa)	Expression host	Culture scale	Production level (mg/L)	Specific activity (U/mg)	Reference
AfAXE	*Aspergillus ficuum*	29.5	*P. pastoris*	Flask	1400	32.5	Enzyme Microb Tech 31 (2002) 384
AXE	*Bacillus pumilus*	40	*B. pumilus*	Flask	n.d.	32	Appl Environ Microbiol 64 (1998) 789
PbAcE	*Paenibacillus* sp. R4	36	*E. coli*	7-L fermenter	657	27	This study
AoAXE	*Aspergillus oryzae*	31	*P. pastoris*	n.d.	190	24.8	J Biotechnol 121 (2006) 381
rAXE	*Ochrovigra pacifica*	31.75	*E. coli*	Flask	n.d.	4	Microbial Cell Factories 2019, 18
AxeA	*Orpinomyces* sp. PC-2	34.8	*E. coli*	20-L fermenter	n.d.	0.49	Appl Environ Microbiol 65 (1999) 3990

- 대량 생산된 PbAcE 단백질의 특성 및 활성분석

○ pH에 따른 PbAcE의 활성과 안정성 분석하였음. 25℃에서 기질로써 *p*-NA (C2)와 반응을 시켜 최적의 pH를 결정함

○ PbAcE는 acetyl xylan esterases로 다른 CE7 esterases 효소와 비슷한 pH 8.0에서 Tris-HCl buffer 와 가장 높은 활성을 나타냈음

○ pH 안정성 측면에서 PbAcE는 pH값 5에서 11까지 안정한 결과를 보였음

○ pH값 4와 11은 PbAcE의 활성을 20% 낮추었음. 특히 pH값 12에서는 대부분의 활성을 잃었음

○ PbAcE는 pH값 6과 11에서 이전에 보고된 *Lactobacillus antri*에서 유래한 CE7 esterase, AXE 보다 높은 pH 안정성을 나타냈음

○ PbAcE는 pH값 7과 10에서 이전에 보고된 *Bacillus halodurans*에서 유래한 AXE 보다 높은 pH 안정성을 나타냈음

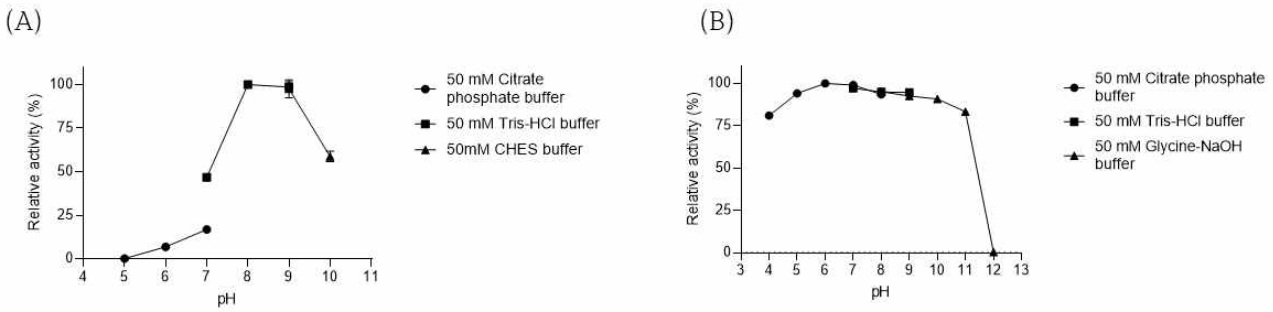


그림. pH 변화에 따른 PbAcE의 활성과 안정성. 25℃에서 기질로써 *p*-NA (C2)와 반응을 시킴. (A) PbAcE 효소 활성에 대한 pH의 영향. : 다른 buffer조건에서 PbAcE 활성을 결정함. 50 mM citrate

phosphate buffer (pH 5.0 - 7.0), 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0 - 9.0), 50 mM CHES buffer (pH 9.0 - 10.0). (B) pH에 따른 PbAcE 안정성. 50 mM citrate-phosphate (pH 4.0 - 8.0), 50 mM Tris-HCl (pH 7.0 - 9.0), 와 50 mM glycine-NaOH (pH 8.0 - 12.0). 가장 높은 활성값을 100%로 나타냄. 모든 실험은 25℃에서 수행되었고, 3번 반복하여 실험함

- PbAcE 단백질의 항생제변형 활성분석

○ 항생제변형 활성분석을 위해 cefotaxime와 7-ACA 항생제를 positive control로 사용하였고, 8개의 항생제(ketoconazole, fusidic acid sodium salt, sulfacetamide, cephalothin sodium salt, paclitaxel, daunorubicin hydrochloride, chromomycin A_3, cephalomannine)를 사용하여 분석

○ 페놀red 시약의 색변화를 통해 deacetylation 활성을 분석한 결과 8개의 항생제 중 2개의 항생제(Cephalothin, chromomycin A_3)에 대해 활성이 있었음

○ Cephalothin와 반응시, PbAcE는 실온에서 20 mM 농도로 5분 후에 상당한 deacetylation 활성을 보였음

○ Anthraquinone antibiotic glycoside 인 chromomycin A_3 반응시, PbAcE는 20 mM 농도로 7시간 후에 중간 정도의 deacetylation 활성을 보였음

○ 이번 연구에서 처음으로 PbAcE에 의해 deacetylation 된 두 항생제를 보고하였고 이는 내성균주에 대해 항생 활성을 높이는 고부가 가치의 물질로 활용될 것으로 기대됨

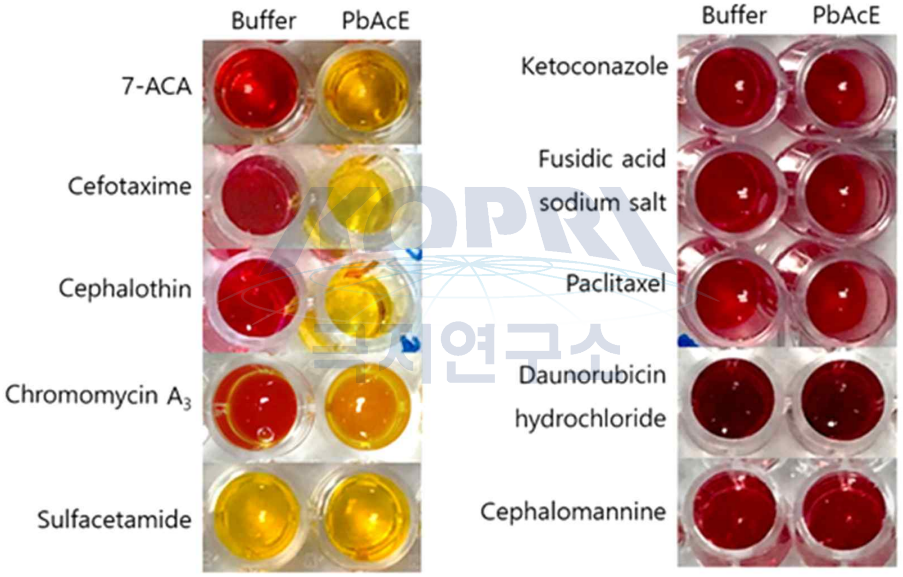


그림. 항생제에 대한 PbAcE 효소 활성의 비색분석. PbAcE의 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA), cefotaxime sodium salt, cephalothin sodium salt, 와 chromomycin A_3 에 대한 가수분해활성. 효소활성에 의한 생성된 acetic acid는 시약의 색을 붉은색에서 노란색으로 변하게 함.

다. 극지 변형 효소 발현 및 분자진화를 통한 기질 다중화 연구 (부경대학교 위탁)

1) 난발현성 변형효소 심화 발현 조건 탐색

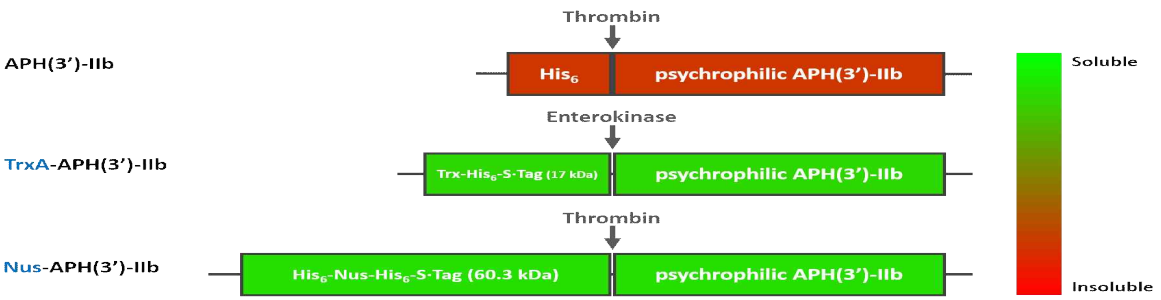
- 1차 발현 결과 및 가용성 발현 예측

- 3종의 소프트웨어(SoluProt, Protein-Sol, Camsol)를 이용한 가용성 발현 (초록색: 가용성, 빨간색: 불용성) 예측 결과, 11종이 가용성 발현 가능성이 높은 것으로 예측되었으며, 실제 실험결과 7종은 샤페론없이, 추가 9종은 샤페론 공발현시 가용성 발현이 가능한 것으로 나타났음.

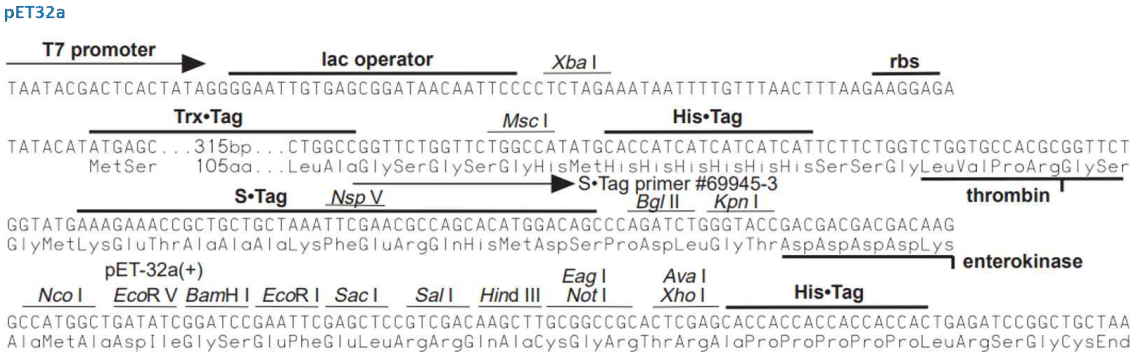
<1차 발현 결과 및 가용성 발현 예측>

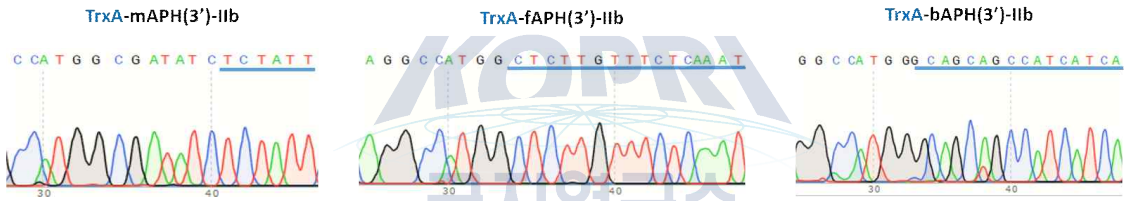
- 1차 발현에서 난발현으로 판정된 변형효소 중 활용도가 높은 3 종에 대해 발현 벡터(2종) 교체 및 발현 온도(2종) 및 발현 균주(2종) 등 발현 조건탐색

○ 1차 발현결과 불용성으로 발현된 3종의 Aminoglycoside Phosphotransferase를 pET32a, pET44a 벡터에 각각 클로닝하였음. 각 aminoglycoside phosphotransferase는 *Microbacterium*, *Frondihabitans* sp. (PAMC 28766) *Bosea* sp. (PAMC 26642)에서 유래하였음. pET32a와 pET44a는 TrxA와 Nus를 aminoglycoside phosphotransferase와 융합시켜 가용성을 증가시키고자 하였음 (아래 그림 참고). 각각의 단백질은 TrxA-mAPH(3')-IIIb, TrxA-fAPH(3')-IIIb, TrxA-bAPH(3')-IIIb, Nus-mAPH(3')-IIIb, Nus-fAPH(3')-IIIb, and Nus-bAPH(3')-IIIb로 대장균숙주인 BL21(DE3), BL21(DE3)pGro7, BL21(DE3)pPsyGroELS, BL21(DE3)pTF/FkpA, and BL21(DE3)pDnaK/GrpE/DnaJ에서 발현하였고 BL21(DE3) and BL21(DE3)pGro7는 30 °C와 15 °C,나머지 균주는 15 °C에서 발현하였음 (아래 그림 참고).



Construction of Trx fusion vectors





Protein	BL21(DE3)	BL21(DE3) *m*GroELS(chl)	BL21(DE3) *p*GroELS(chl)	BL21(DE3) *p*TF/FkpA(kan)	BL21(DE3) *p*DnaK/GrpE/DnaJ(kan)
mAPH(3')-IIb	pMAPH (28.5 kDa)[a]			pMAPH/Amp (28.5 kDa)[b]	
TrxA-mAPH(3')-IIb	pTrxA-MAPH (43.5 kDa)[c]				
Nus-mAPH(3')-IIb	pNus-MAPH (86.6 kDa)[d]				
fAPH(3')-IIb	pFAPH (28.5 kDa)[a]			pFAPH/Amp (28.5 kDa)[b]	
TrxA-fAPH(3')-IIb	pTrxA-FAPH (43.5 kDa)[c]				
Nus-fAPH(3')-IIb	pNus-FAPH (86.6 kDa)[d]				
bAPH(3')-IIb	pBAPH (40.2 kDa)[a]			pBAPH/Amp (40.2 kDa)[b]	
TrxA-bAPH(3')-IIb	pTrxA-BAPH (55.2 kDa)[c]				
Nus-bAPH(3')-IIb	pNus-BAPH (98.4 kDa)[d]				

[a]gene of interest in pET28a (calculated protein MW with tag).
[b]gene of interest in pET32a backbone with pET28a MCS fragment (calculated protein MW with tag).
[c]gene of interest in pET32a (calculated protein MW with tag).
[d]gene of interest in pET44a (calculated protein MW with tag).

그림. 가용성 발현 융합벡터 모식도(상), 벡터 제조 (중), 및 발현 조건(하)

- TrxA tagged *Bosea* sp. APH(3')-IIIb (bAPH(3')-IIIb)는 BL21(DE3)에서 30° C와 15° C에 발현시, BL21(DE3)pPsyGroELS 균주에서는 15 ° C 발현시 가용성이 증가하는 것으로 나타났음 (아래 그림 참고). 또한 Nus tag도 *Microbacterium* 속(mAPH(3')-IIIb)과 BL21(DE3)pPsyGroELS 15° C 조건에서, *Frondihabitans* APH(3')-IIIb (fAPH(3')-IIIb)를 BL21(DE3)pGro7,

BL21(DE3)pPsyGroELS, BL21(DE3)pTF/FkpA균주 15° C 조건에서 가용성을 증가시키는 것을 확인하였음 (아래 그림 참고).

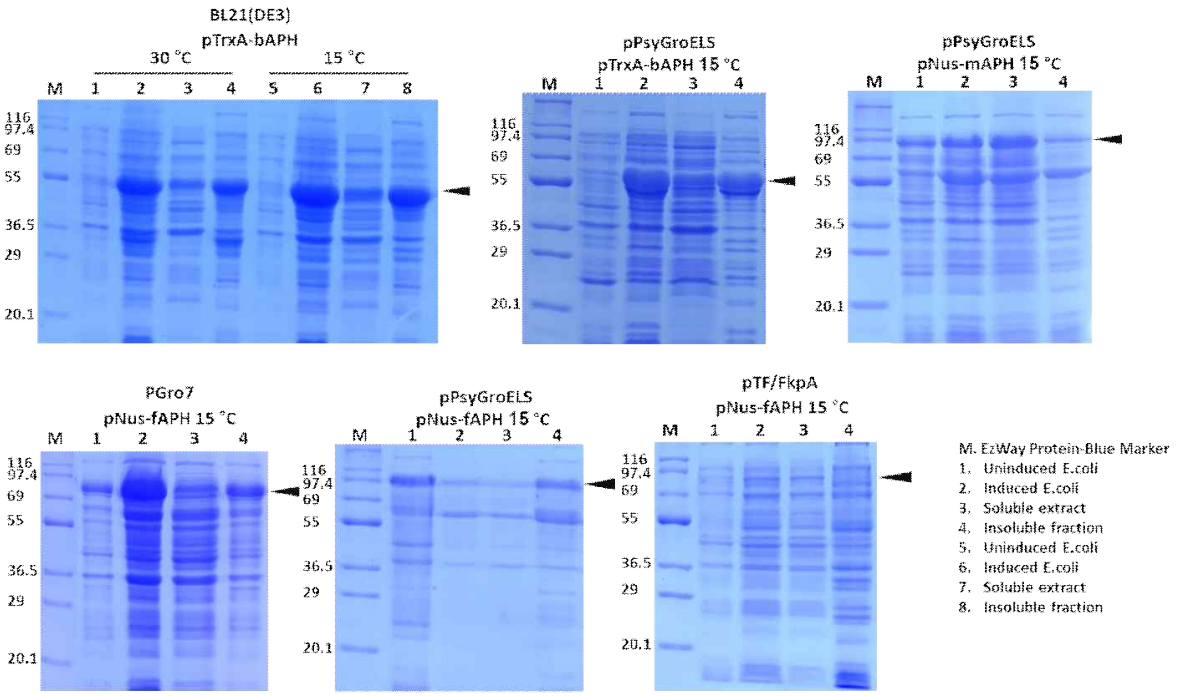


그림. TrxA, Nus 융합 APH-IIb 단백질의 발현 결과 SDS-PAGE

- 분자진화된 개량 변형효소의 제작 및 특성 연구

○ 저온 활성 Acetyl Xylan Esterase (PbAcE)의 Semi-rational engineering을 통한 기질 선택성 또는 다중성 증가 돌연변이 (아래 모식도 참고)

- Audock vina의 covalent docking을 이용하여 기질과 촉매 부위인 Ser 185를 공유결합한 후 docking을 수행하였음. 각 기질과 가장 낮은 결합에너지를 가진 모델을 추출하고 결합잔기들을 분석하였음. 또한 활성 부위와 기질 접근 터널 등에 위치한 돌연변이 도입 가능성이 높은 기능적 핫스팟을 제시해 주는 HotSpot Wizard 3.0을 이용하여 PbAcE의 기질 선택성 또는 다중성을 증가시킬 돌연변이 후보들을 도출하였음. 특히 K91, H93, Y95, Y182, H221, P225, M313 잔기를 돌연변히 후보로 선정하였는데 이들은 기질의 결합 접근 및 결합과 관련이 있으며 PbAcE의 기질 다중성에 영향을 줄 수 있을 것으로 판단됨 (아래 그림 참고).

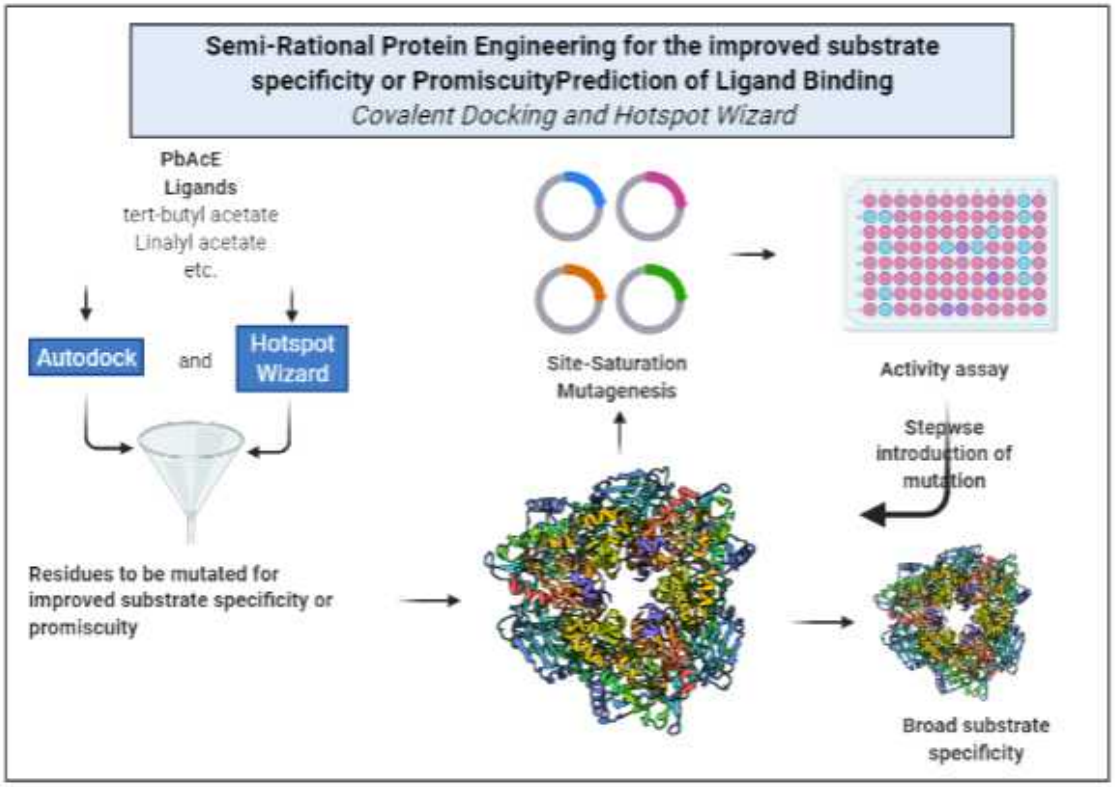


그림. 합리적 설계를 통한 PbAcE 기질 다양성 증가 연구 모식도

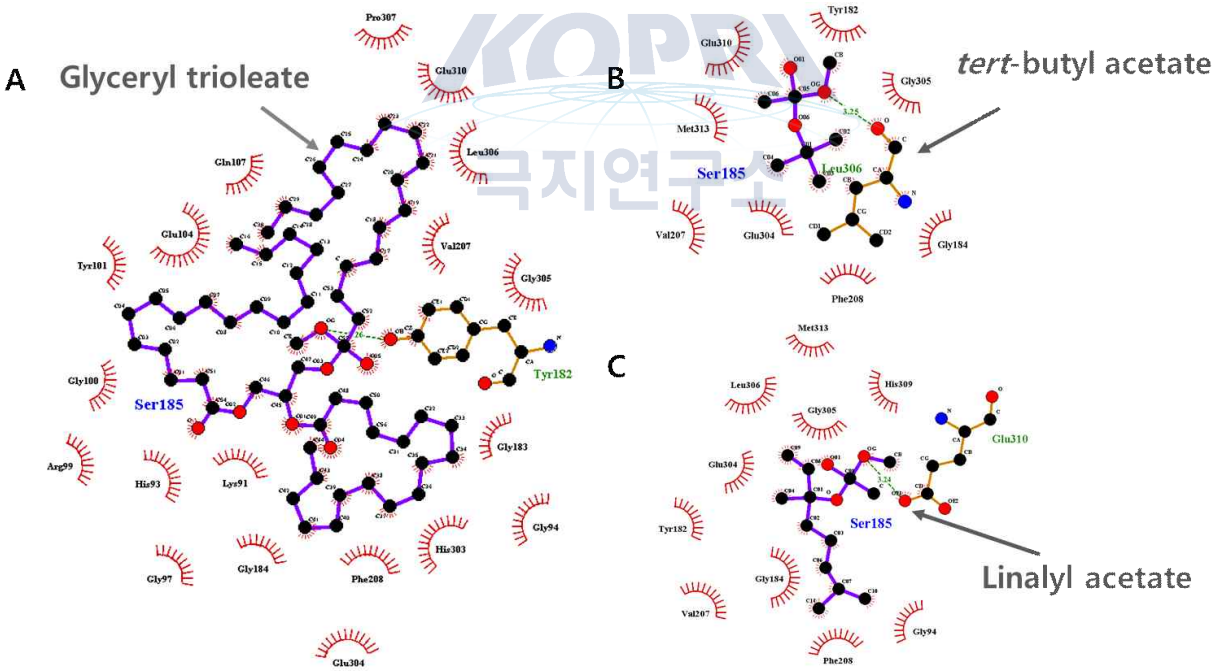


그림. 기질과 PbAcE 기질 결합 부위간의 공유 docking을 상호작용 분석 (A) Glyceryl trioleate, (B) tert-butyl acetate, (C) linalyl acetate

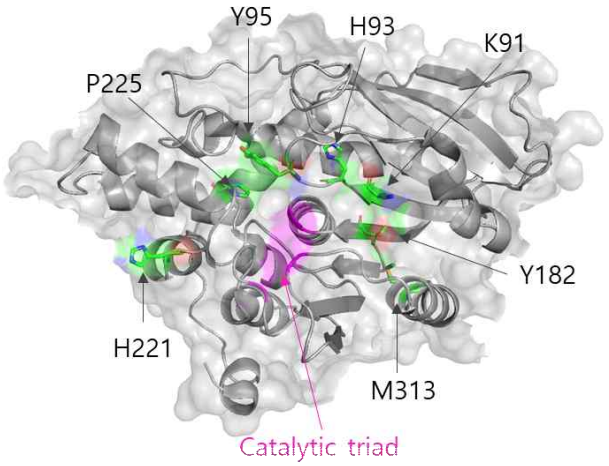


그림. PbAcE의 Catalytic triad (magenta)와 돌연변이가 도입된 잔기들의 위치

- 각 잔기에 “NNK” 코돈을 이용 단일 부위 포화 돌연변이 (site saturation mutagenesis)를 도입한 후 PbAcE의 활성을 증가시키는 돌연변이를 확보하고 이들 돌연변이를 중첩하여 기질 다중성이 증가한 돌연변이를 도출하는 방식으로 진행하였음. 포화 돌연변이 유전자는 PCR을 통해 증폭되었고 이를 야생형 PbAcE와 같은 pET28a 벡터에 삽입함.

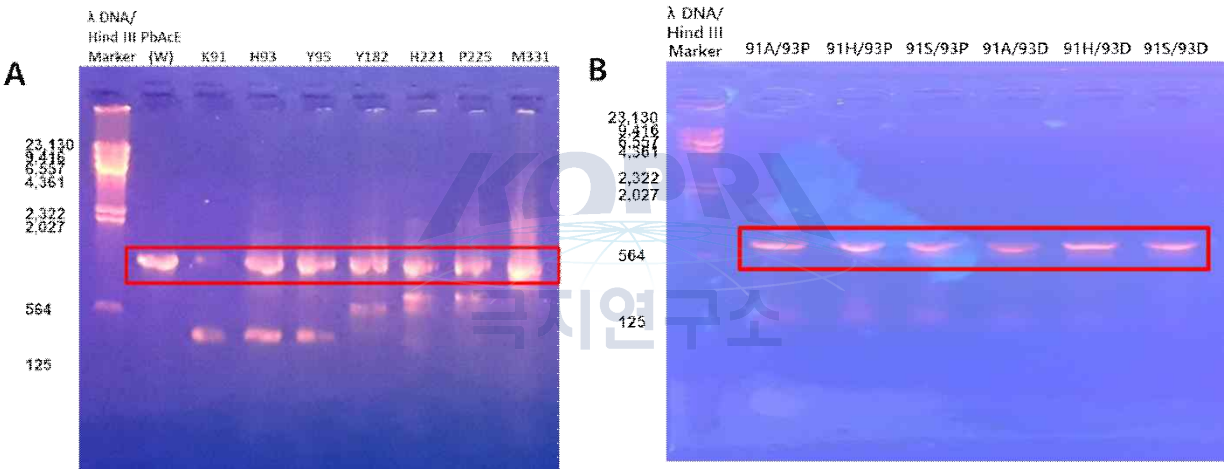


그림. PCR로 증폭된 단일 부위 포화 돌연변이(A)와 이중 돌연변이(B)의 아가로스 젤 전기영동

- 각 단일부위 포화 돌연변이 라이브러리로 형질전환된 대장균 98균주를 25 ° C에서 하룻밤 배양한 후 효소 반응을 기질 linalyl acetate (LA) 와 terpinyl acetate (TA)를 이용하여 측정하였음. 가수 분해반응이 진행되면 pH 지시자인 phenol red의 색이 노란색으로 변화하게 되며 이를 통해 활성 증가 돌연변이를 확보하였음.

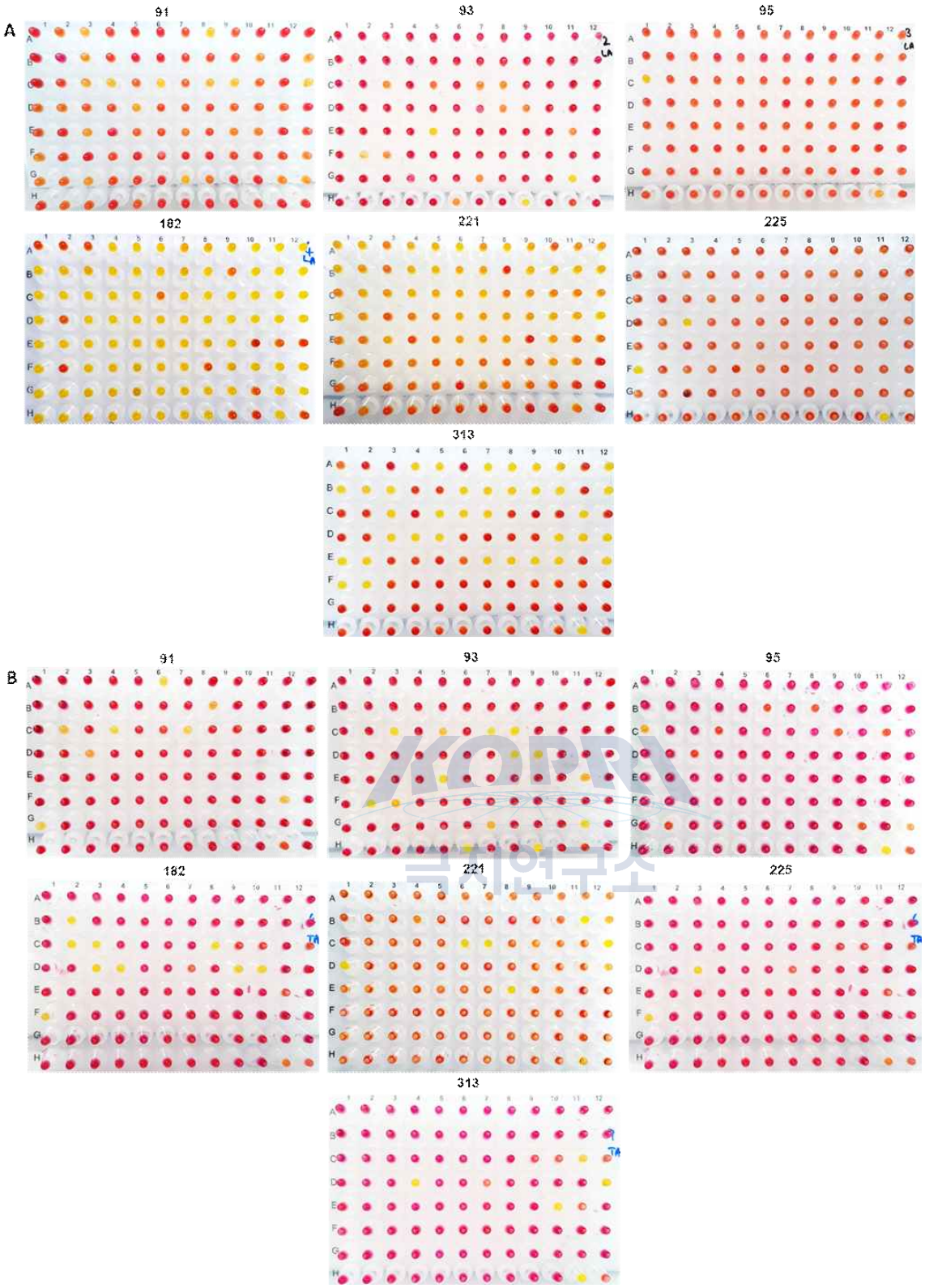


그림. 돌연변이 균주에 의한 (A) linalyl acetate와 (B) terpinyl acetate의 분해에 의한 pH 변화 및 색 변화

- 야생형 및 다른 변이보다 높은 활성을 보인 변이는 K91에 3개, H93에 2개, Y182에 5개, H221에 한 개를 확보하였고 이들에 대한 염기서열도 아래와 같이 확인하였음.

A

>Pbace(W)

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVKYHGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVYGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
FIEAYL

>1

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVAYHGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYY
KQVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVYGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
RFIEAYL

>2

MPNVNMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVHYHGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYY
KQVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVYGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
RFIEAYL

>3

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVSYHGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVYGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
FIEAYL

>4

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVKYPGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVYGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
FIEAYL
>5

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVKYDGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVYGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
FIEAYL

>6

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVKYHGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVVGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
FIEAYL

>7

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVKYHGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVTGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
FIEAYL

>8

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVKYHGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVEGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
FIEAYL

>9

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVKYHGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVMGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
RFIEAYL

>10

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVKYHGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVWGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
RFIEAYL

>11

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVKYHGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVYGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIDASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
FIEAYL

B

>12

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVAYPGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVYGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
FIEAYL

>13

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVHYPGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVYGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
FIEAYL

KOPRI 극지연구소

C

>14

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVAYPGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVFGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
FIEAYL

>15

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVAYPGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVMGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
FIEAYL

>16

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVAYPGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVTGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
FIEAYL

>17

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVAYPGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVVGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
FIEAYL

>18

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVAYPGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVWGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGLEGLPFHEEAMMR
FIKAYL

>19

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVHYPGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVEGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGLEGLPFHEEAMMRF
IKAYL

>20

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVHYPGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVMGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
RIKAYL

>21

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVHYPGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGITPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVWGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIHASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMM
RFIEAYL

D

>22

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVAYPGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVMGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIDASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
RFIEAYL

>23

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVAYPGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVTGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIDASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMR
FIEAYL

>24

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVAYPGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVWGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIDVSGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMM
RFIEAYL

>25

MPNVDMPLSQLQDYKPELTNETDFDLFWDNAKALSNQKPLHAQVNLVQDYPLKSISIYDVVYDGADGTPIHGWYVTPKGEHQPGSLPVLVHYPGYSGNRGYPNELLQWASMGMAALAIDVRGQGGVTPDRAEYPQGGIPGWMTLGILDPASYYYK
QVYLDCIRALDFVCSREEVDASRIAVMGGSQGGGLALAAAGLDSRPKLALPVFPFLCHFRRSVEIDASGPYVEIKNWFRRYDPEHRQEEQVYRTLSYFDGMNMASRIKARTLMAITLQDITCPPSTCFAAYNHLAGPKEVRLYHDYGHEGLPFHEEAMMM
RFIEAYL

그림. 돌연변이 도입된 PbAcE 일차서열. (A) 야생형, 1 (K91A), 2(K91H), 3(K91S), 4(H93P), 5(H93D), 6(Y182V), 7(Y182T), 8(Y182E), 9(Y182M), 10(Y182W), 11(H221D), (B) 이중 돌연변이 일차서열 12(K91A/H93P), 13(K91H/H93P), (C) 삼중 돌연변이 14(K91A/H93P/Y182E), 15(K91A/H93P/Y182M), 16(K91A/H93P/Y182T), 17(K91A/H93P/Y182V), 18(K91A/H93P/Y182W), 19(K91H/H93P/Y182E), 20(K91H/H93P/Y182M), 21(K91H/H93P/Y182W), (D) 사중 돌연변이 22(K91A/H93P/Y182M/H221D), 23(K91A/H93P/Y182T/H221D), 24(K91A/H93P/Y182W/H221D), 25(K91H/H93P/Y182M/H221D)

- 이중 돌연변이는 K91A, H, S에 H93P 또는 D를 도입하여 구축하였고 상기와 같이 효소 반응을 진행한 결과 K91A/H93P(12)과 K91H/H93P(13) 변이가 다른 이중 변이에 비해 높은 활성을 아래와 같이 보였음.

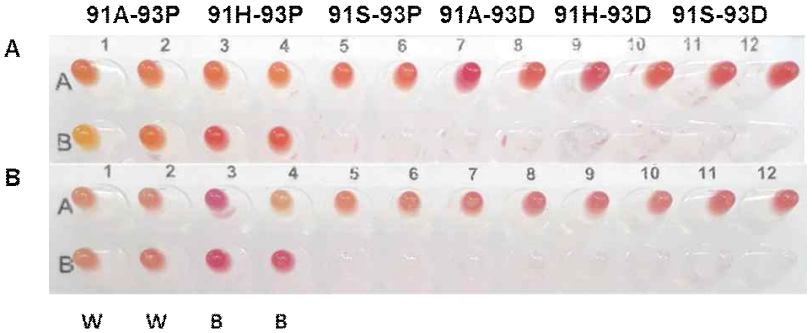


그림. 이중 돌연변이에 대한 효소 반응

- 삼중 돌연변이는 K91A/H93P(12)과 K91H/H93P(13) 변이에 추가적으로 Y182V, T, E, M, 또는 W 변이를 도입함으로써 구축하였고 K91A/H93P/Y182E(14), K91A/H93P/Y182M(15), K91A/H93P/Y182T(16), K91A/H93P/Y182V(17), K91A/H93P/Y182W(18), K91H/H93P/Y182E(19), K91H/H93P/Y182M(20), and K91H/H93P/Y182W(21)가 다른 삼중 변이에 비해 아래 그림과 같이 높은 활성을 보였음.

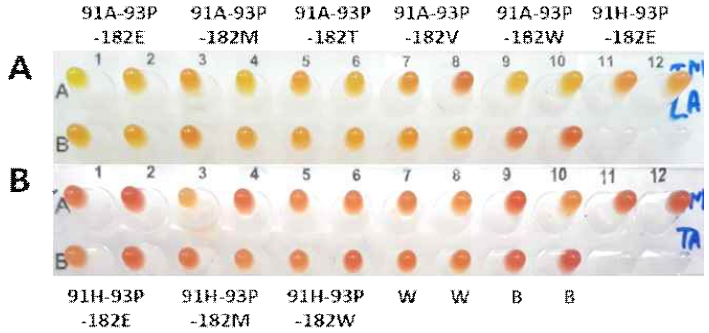


그림. 삼중 돌연변이에 대한 효소 반응

- 사중 돌연변이는 앞의 8개 삼중 변이의 H221에 D를 도입함으로써 구축하였는데 전체 사중 변이 K91A/H93P/Y182M/H221D(22), K91A/H93P/Y182T/H221D(23), K91A/H93P/Y182W/H221D(24), and K91H/H93P/Y182M/H221D(25)는 야생형에 비해 활성이 낮게 나타났음.

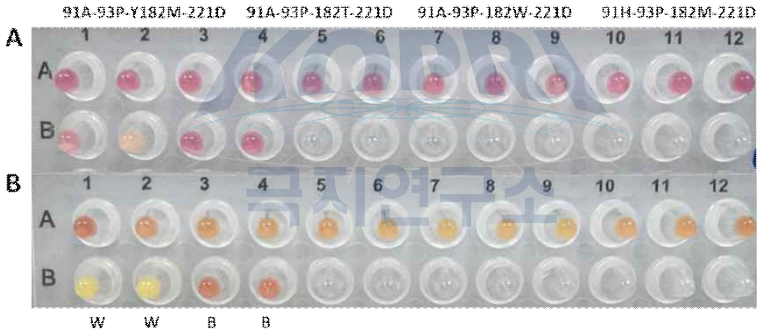


그림. 사중 돌연변이에 대한 효소 반응

- PbAcE 야생형과 semi-rational protein engineering을 통해 제작된 돌연변이 25종의 효소반응속도론적 특성을 분석하고자 단백질을 발현・정제하였음.

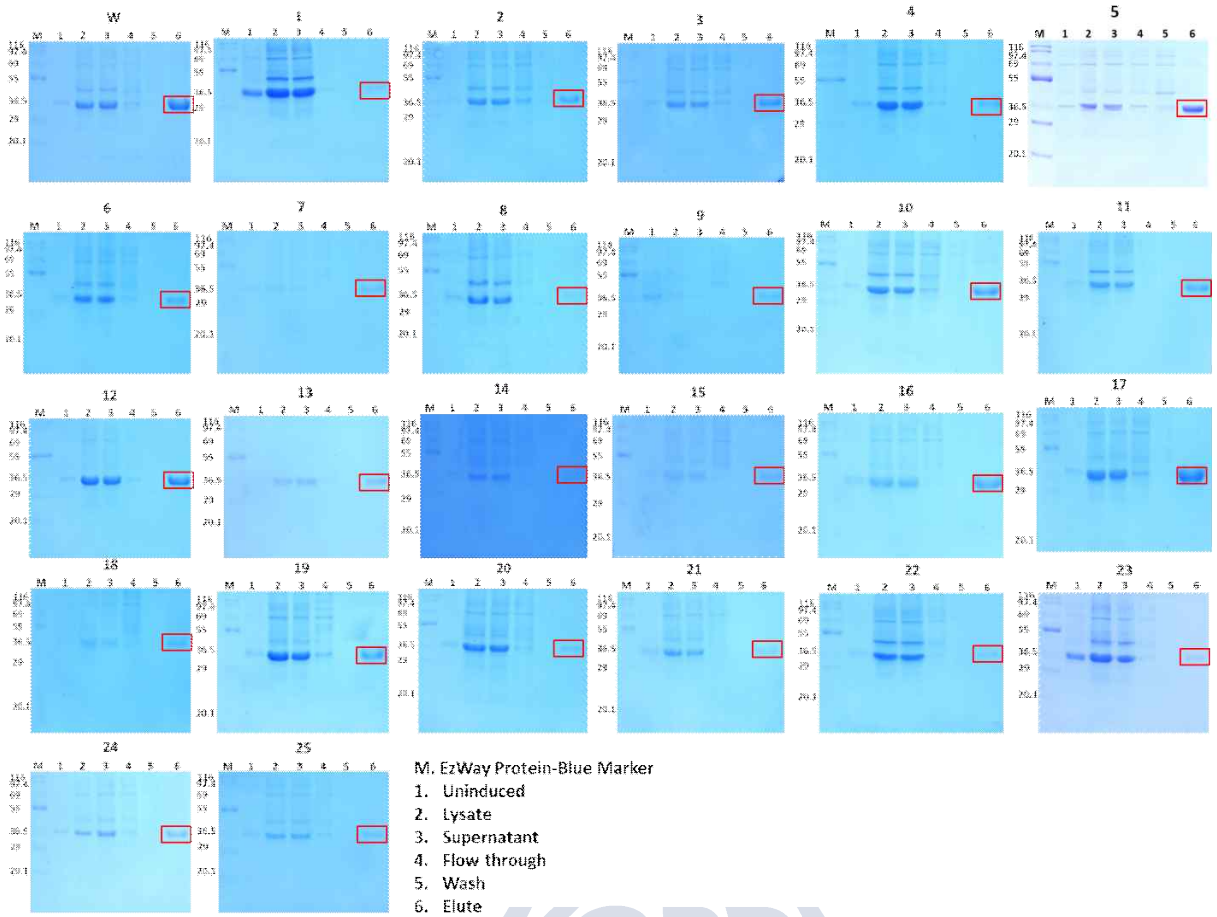
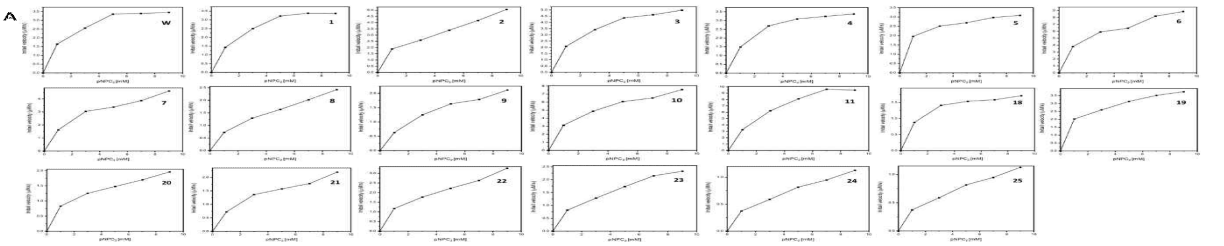


그림. 야생형과 돌연변이 25종의 발현 및 정제

- 효소반응속도론적 특성은 기질로 첫 번째로 para-nitrophenyl acetate (pNPC2)를 이용하여 수행하였음 (아래 그림A). 8, 9, 12, 13, 14, 23, 24, 25을 제외한 돌연변이에서 야생형에 비해 높은 활성이 측정되었으며 이중 삼중 변이인 K91A/H93P/Y182T(16)가 가장 높은 활성을 보여 PbAcE의 esterase 활성이 증가하였음을 시사함. 기질 para-nitrophenyl butyrate (pNPC4)에 대해 5, 13, 17번 변이를 제외한 모든 변이가 야생형보다 높은 활성을 보인 반면, para-nitrophenyl octanoate (pNPC8)에 대해서는 1번 변이만이 야생형과 유사한 활성을 보였음.



D

Enzymes	Relative activity (%)	K_M (mM)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/Km ($s^{-1}mM^{-1}$)
W	70.08	2.08	1.47	0.71
1	92.90	1.95	1.43	0.71
2	76.91	6.95	2.82	0.41
3	87.89	2.67	2.15	0.82
4	81.10	1.29	1.29	1.00
5	90.66	1.14	1.14	1.00
6	90.85	2.82	3.70	1.31
7	79.33	2.46	1.80	0.73
8	57.06	5.80	1.27	0.22
9	55.97	4.16	0.99	0.24
10	93.72	2.99	3.23	1.08
11	79.78	3.68	4.66	1.27
12	38.84	1.17	0.83	0.71
13	60.84	1.45	0.77	0.53
14	49.41	5.28	1.08	0.20
15	93.58	2.12	1.48	0.70
16	100.00	1.44	1.75	1.21
17	70.04	0.93	0.61	0.66
18	87.52	3.28	1.46	0.45
19	95.52	2.54	1.59	0.63
20	68.58	3.06	0.83	0.27
21	60.15	3.02	0.89	0.29
22	89.16	5.33	1.60	0.30
23	67.90	6.43	1.36	0.21
24	34.74	6.93	0.65	0.09
25	34.74	6.93	0.65	0.09

그림. PbAcE 야생형 및 돌연변이 25종의 효소반응속도론적 특성 및 기질에 대한 활성

- 기질인 linalyl acetate, terpinyl acetate, glyceryl trioleate에 대한 활성도 페놀 레드 지시약을 이용하여 수행하였음 (아래 그림A). 야생형에 비해 5, 10, 16, 17, 19번 변이가 linaly acetate에 대한 활성이, 5, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 19번 변이가 terpinyl acetate에 대한 활성이 증가하였음. 반면 glyceryl acetate에 대한 활성은 10번 변이만 증가한 것으로 관찰됨.

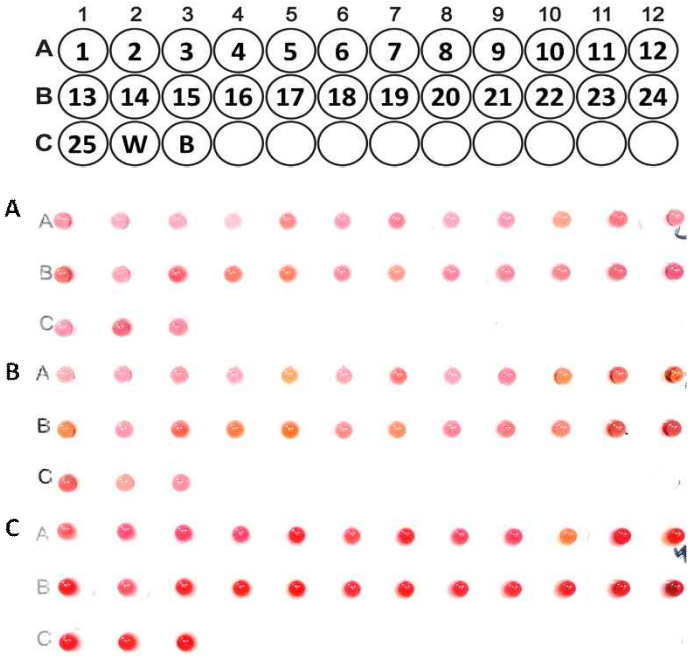


그림. PbAcE 야생형과 변이의 (A) linalyl acetate, (B) terpinyl acetate, (C) glyceryl trioleate에 대한 활성

- 종합적으로 semi-rational 접근방법으로 acetyl xylan esterase (PbAcE)에 변이를 도입함으로써 비천연 기질에 대한 특이성을 증가 시킬 수 있다고 판단됨.

나) 이차대사 관련 클러스터 분석

- 관련 균주 선별 및 유전체 분석

○ 마이크로네시아 Kosrae 섬의 맹그로브 지역에서 분리한 *Streptomyces* sp.의 유전체 염기서열 초안을 작성을 위해 NGS를 실시함.

Total Sequence	5194516
Sequence length	35-301
%GC	71
Average quality per read (Phred Score)	32

○ 이차대사 관련 유전자 클러스터 발굴

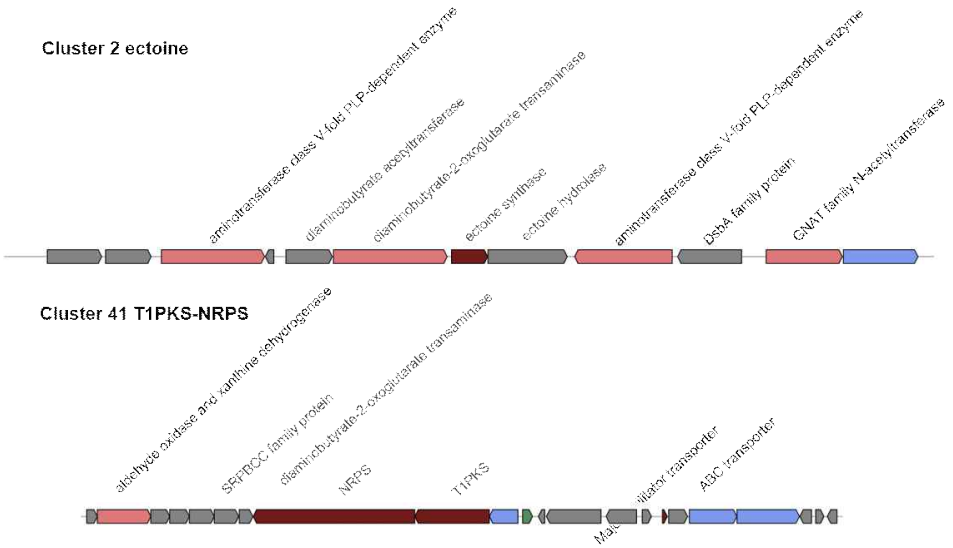
- *Streptomyces* sp.의 유전체 염기서열 초안에 이차 대사산물 유전자 클러스터가 존재하는 지를 antiSMASH 프로그램을 이용하여 분석하였음. 그 결과 아래 표에 제시한 바와 같이 *Streptomyces* sp. 염기서열내에 31개의 이차 대사산물 유전자 클러스터가 예측되었고 이 중 24개의 유전자 클러스터가 기존에 밝혀진 이차 대사산물 생합성 유전자 클러스터와 6~100%의 유사도를 보였음. 분석된 생합성 유전자 클러스터의 타입으로는 Non-ribosomal Peptide synthease, PKS, terpene, siderophore, thioamitides, butyrolactone, ladderane, betalactone, melanine, ectone, lanthipeptide class II가 확인되었으며 이 중 NRPS와 PKS가 각각 9개의 클러스터, terpene이 4개의 클러스터에서 예측되었음. 기존 클러스터와 50%의 유사도를 보인 10개의 클러스터 가운데 3개 (Region 2.1 ectoine; Region 10.2와 14.1 terpene)는 100%의 유사도를 나타냄. 높은 유사도를 보인 두 클러스터를 아래 그림에 제시하였음. 향후 본 균주에서 분리한 이차 대사산물과 이들의 생리 활성 데이터에 기반하여 유용 클러스터를 클로닝하여 생리활성 물질 생산 및 변형효소 개발에 활용하고자 함.

KOPRI 극지연구소

- Streptomyces sp. antiSMASH 클러스터 분석 결과

Region	Type	From	To	Most similar known cluster		Similarity
Region 1.1	NAPAA	292,637	326,509			
Region 2.1	ectoine	294,785	305,189	ectoine	Other	100%
Region 3.1	lanthipeptide-class-ii,NRPS	99,417	154,179	rimosamide	NRP	21%
Region 3.2	T1PKS	200,897	247,211			
Region 3.3	other	255,732	297,105	A-503083 A / A-503083 B / A-503083 E / A-503083 F	NRP	7%
Region 5.1	terpene,melanin	34,141	55,190	melanin	Other	57%
Region 5.2	T1PKS	66,260	120,410	foxicins A-D	NRP + Polyketide	12%
Region 6.1	siderophore	215,232	227,001	desferrioxamin B / desferrioxamine E	Other	83%
Region 8.1	hglE-KS,T1PKS	51,366	103,009	cinnamycin	RiPP:Lanthipeptide	14%
Region 8.2	T3PKS,NRPS	136,636	206,241	diisonitrile antibiotic SF2768	NRP	66%
Region 9.1	T2PKS	90,506	163,118	spore pigment	Polyketide	83%
Region 10.1	siderophore	7,043	20,247			
Region 10.2	terpene	113,318	135,477	geosmin	Terpene	100%
Region 10.3	RiPP-like	147,439	158,803			
Region 11.1	NRPS,NAPAA	70,897	114,160	stenothricin	NRP:Cyclic depsipeptide	13%
Region 14.1	terpene	132,069	153,184	albaflavenone	Terpene	100%
Region 15.1	NRPS	7,160	85,848	GE81112	NRP	7%
Region 16.1	siderophore	75,993	87,918			
Region 20.1	thioamitides	73,616	96,188			
Region 31.1	betalactone,NRPS,NRPS-like,T3PKS	28,270	88,575	teicoplanin	NRP	24%
Region 32.1	NRPS,T1PKS,RiPP-like	1	45,663	informatipeptin	RiPP:Lanthipeptide	42%
Region 33.1	NRPS	7,884	73,762	thiazostatin / watasemycin A / watasemycin B / 2-hydroxyphenylthiazoline enantiopyochelin / isopyochelin	NRP	33%
Region 36.1	NRPS,T1PKS	1	46,628	pyridomycin	NRP + Polyketide	7%
Region 39.1	NRPS,NRPS-like	1	42,178	deimino-antipain	NRP	66%
Region 41.1	T1PKS,NRPS,NRPS-like	1	59,218	echinomycin	NRP	88%
Region 46.1	NRPS-like,NRPS	1	25,124	WS9326	NRP	7%
Region 48.1	ladderane	1	36,443	metatricycloene	Polyketide	6%
Region 52.1	NRPS	1	30,680	zorbamycin	NRP:Glycopeptide + Polyketide:Modular type I + Saccharide:Hybrid/tailoring	8%
Region 54.1	terpene	6,448	28,561	hopene	Terpene	92%
Region 59.1	butyrolactone	9,179	19,889	lactonamycin	Polyketide	7%
Region 74.1	thioamitides	1	12,459			

그림. antiSMASH로 예측된 생합성 유전자 클러스터



라. 항생제 내성 병원균이 가지는 β-lactamase 발현을 억제할 수 있는 저해제 개발연구 (극지연)

1) 항생제 분해 효소인 β-lactamase의 발현을 억제하고 병원균의 항생제 저항성이 낮아지는 전략을 바탕으로 한 저해제 연구개발.

- β-lactamase 발현의 발현을 조절하는 전사 조절 단백질 5종을 타겟 선정하여 유전자 합성함.
- β-lactamase 발현 조절단백질의 서열 정보

```
>SGC57716.1 LysRfamilytranscriptionalregulator[Mycobacteriumtuberculosis]
MVRRYLPLNPLRAFEAAARHLSFTRAAIELNVTHAAVSQQVRALEEQLGCVLFTRVSRGLVLTHEGEGLL
PVLNEAFDRIADTLECFSHGQFRERVKVGAVGTFAAGWLLPRLAGFYDSHPHIDLHISTHNNHVDPAAEG
HDYTIRFGNGAWHESDAELIFSAPHAPLCSPAIAEQLQQPDDVHRFTLLRSFRRDEWSRWLDCAGGTPPS
PSQPVMVFDTSLAMAEAALLGAGVAIAPVCMFSRLLQSGALVQPFAAEITLGGYWLTRLQSRAETPAMQQ
FARWLLNTAAA
>WP_187109268.1 transcriptionalregulatorGcvA[Variovoraxsp. PAMC26660]
MTEHQLPPLNALRAFEASARHLSVKNAADELSVTPGAVSQLIKTLELHLGVDLFRRVNRGIFLTDAGQAY
LPPVRNAFRQISDATRRVAVPPETGILTVSATPFFASAWLVPRLKSFQDAHPDIDLQVLTSSALADFSRD
GVDVAIRHGLGRYPGLSSRRLLTVEIVPVAAPALVKSLGIPATPTDLTRWPRVNDAERKGWALWFQAQGI
EDAGPARGPSFDDSGLLLKSVLAGQGAALLPLAVVASEIAEGRLVQLSEVTWLEDFAYYLVYPESSEARP
KVVAFRDWLLEVSRNAPAAVRAKRASSGSRKRSSPTFKGKASAPSS
>WP_168166088.1 LysRfamilytranscriptionalregulator[Boseasp. PAMC 26642]
MSRTLPPLNSVKAFEAAVRHGTTLAAAAELGVTHGAVSRQIKQLEAWIGRPLFQRLGGRLVVTEAGAAYA
EIAGRALDLLHDGTHGLTEVSDHVVRVSTTASFASEWLMPRLPRFQSLHPQIDIWLDEGKGIVDPRSGGC
DLAIRMGAGPWPGVSAVPLMSDRLRPVCSPGLASALQCLGDLATVPLLHDGDPNAQWSRWLDEFAPQGIG
IAAGSRFASSALLLRAATDGQGVALARERLSEAWLASGRLVHPFSEAVELGLAYWLVLRQGAEARRPLRS
FMAWIAAQPALPAPEPG
>WP_187110181.1 LysRfamilytranscriptionalregulator[Variovoraxsp. PAMC26660]
MNEIGSSVRPPRRLPPLLSLRAFEAAAAHRSFQRAALELSVTPSAISHQVRALEDTLGQPLFRRLTRQLA
LTPAGQRLFDDLRMGFDVLEAGVDKLRRPAASQAVTLTTNTAFAARWVLPRMVAFREACPGVELRLHASD
TLVDLARGDADIAVRSGSGNWPGLASRELMPERYAPLCSPMLGLTRVGDLPKHQLIHCDWQPQALAPAVW
PRWFREAGITPPRGRALKASGLSFSDETHAMLAALGGHGVALLSLTLAAEEVRSGALVQPFGPALDTGSY
FLATASGREKEPAIRAVWEWIAMQAAGDAPHGR
>WP_136179236.1 LysRfamilytranscriptionalregulator[Hydrogenophagasp.
PAMC20947]
MTVRIPPIQCLLTFEALARLRSVTQTSEELCVTPSAVSHRIKQLEQILGTKLFGRADFSLTTEGCEYLAH
VREGLATLQKFPSHAATPGRRKLRLAVTPTFARSILLPRLKQFSEAYPEIDITLQVSIPLLDVVAEDADL
MIRFGTGRYADVEHVCLMKDDVTPLASPAFARENGPFETPEDLEGVPLLRSPLEPWRTWFAAHDLDWPEP
VEGSQFNDVGLMCDGAAAGMGVALVRLKLAAPWLEHGTLVPLYERHVPSPHAHYLCWRTGTMDRWECAAF
SEWLKKSIA
```

- 5개의 타겟 단백질에 대한 발현테스트 수행하였으며 그 중 한 개의 단백질이 (WP_136179236.1)의 용해도가 높은 것으로 확인되어 정제를 실시함.
- 정제된 β-lactamase 발현 전사 조절 단백질을 결정화를 진행한 결과 [0.2 M Calcium Chloride, 0.1 M Tris:HCl(pH 8.5), 25% (w/v) PEG 4000] 조건에서 단백질 결정이 생김을 확인함.

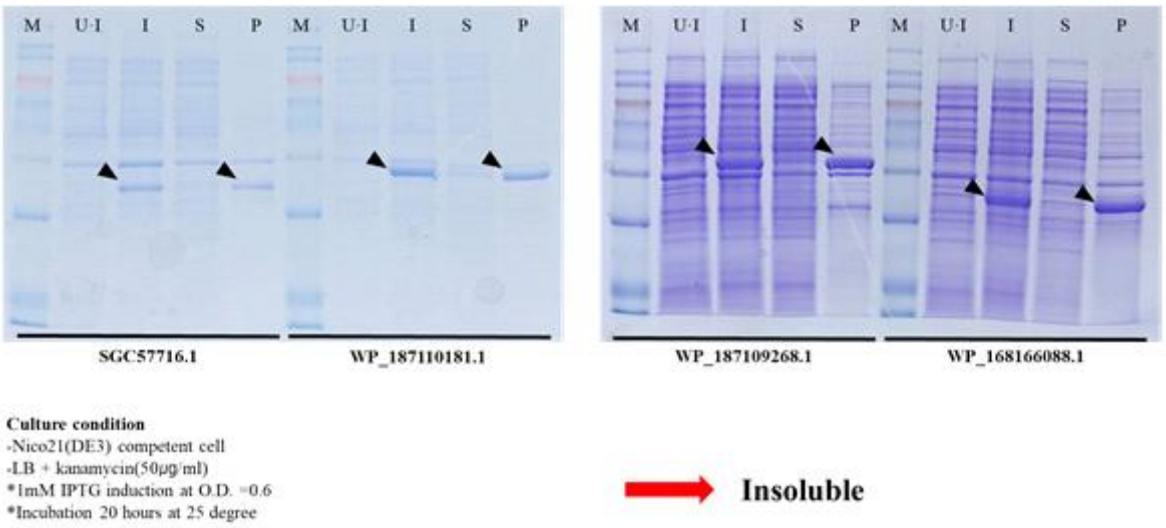


그림. β-lactamase 발현 전사 조절 단백질의 발현 및 용해도 측정 결과

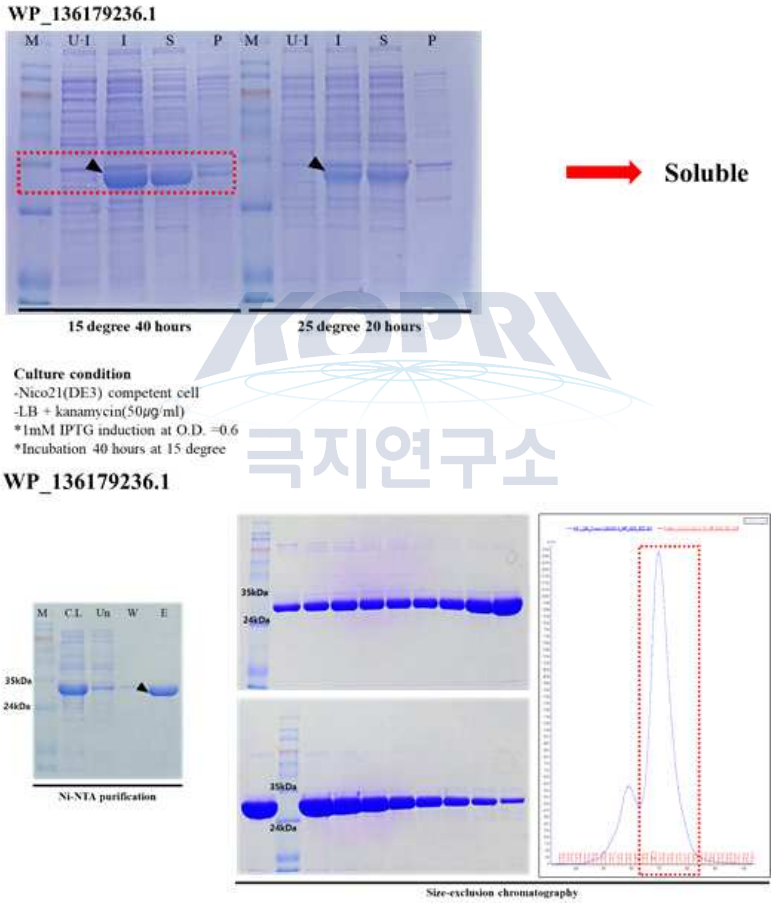
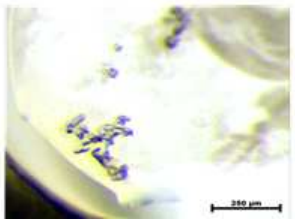


그림. 전사 조절 단백질(WP_136179236.1)에 대한 발현 테스트 및 정제 결과

KOPRI 극지연구소



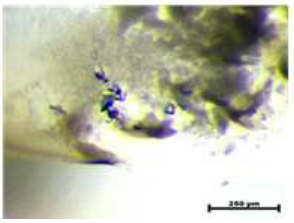


그림. 전사 조절 단백질(WP_136179236.1)에 대한 단백질 결정화 스크리닝 결과.

마. 신규 항생물질의 독성검사 실험 셋팅 (극지연)

1) 항생효과가 있는 쿠마린 유사체를 이용하여 동물세포 독성 검사를 실시함.

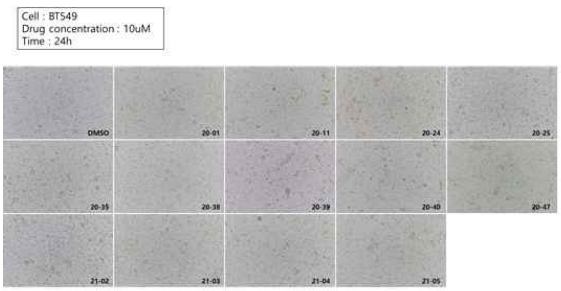
2) 새로 합성한 항생물질이 인체에 무해한지 확인하기 위한 기초조사로 인하대학교 의과대학에 의뢰를 하여 인간유래세포에 대한 독성 검사 실험 세팅 및 테스트를 수행함.

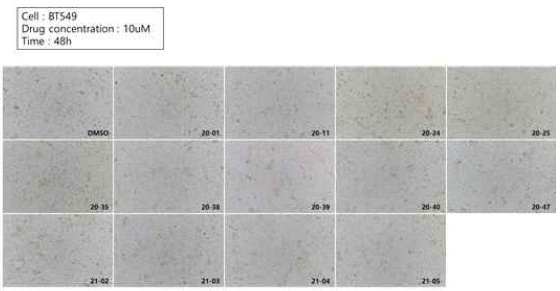
	GA-AB-21-01	GA-AB-21-02	GA-AB-21-03	GA-AB-21-04	GA-AB-21-05
Solubility	X	G	G	G	G
Stock Concentration	X	250mM	500mM	1M	250mM
Response (+/-)	-	-	-	-	-
	GB-20-AB-01	GB-20-AB-11	GB-20-AB-19	GB-20-AB-24	GB-20-AB-25
Solubility	NG	NG	X	G	G
Stock concentration	100mM	100mM	X	1M	1M
Response (+/-)	-	-	-	-	-
	GB-20-AB-35	GB-20-AB-37	GB-20-AB-38	GB-20-AB-39	GB-20-AB-40
Solubility	NG	X	G	NG	NG
Stock concentration	100mM	X	1M	10mM	100mM
Response (+/-)	-	-	-	-	-
	GB-20-AB-47				
Solubility	G				
Stock concentration	500mM				
Response (+/-)	-				

- solvent: DMSO
- G: stock concentration > 250mM
- NG: stock concentration <100mM

KOPRI 극지연구소

표. 동물세포 독성실험에 사용된 쿠마린 유사체의 물질 용해도 및 농도





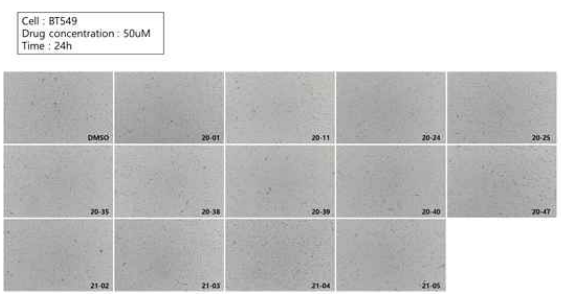


그림. 인간 유래 세포에 쿠마린 유사체를 농도별로 처리 후 세포 사멸에 대한 형태 관찰 결과

3) 인간유래 세포를 이용하여 쿠마린 유사체의 세포독성을 관찰한 결과 모든 유사체에 대해서 세포 독성이 없는 것으로 확인함.

<3세부> 항생물질 변형체 제작 및 활성 검증

가. 극지/해양 유래 유전자와 단백질 정보 기반 항생물질 변형효소 스크리닝 및 활성 분석 (선문대, 극지연)

1) 유전체 정보 기반 항생물질 변형효소 스크리닝 : 확인된 단백질의 변형효소 디자인

- 방향족 화합물 저해 관련 효소 및 균주를 선별하기 위해 게놈 분석을 진행함. 총 18종의 균주가 검색되었으며, 자료 조사를 통해 8가지 기질에 대한 분해 경로 존재 여부를 조사함. 이 중, 게놈은 등록되어 있지만, 논문화되지 않은 PAMC26660 *Variovorax* sp. 균주를 선별하였음. 이 균주를 wild type으로 8가지 기질 중 하나인 4-hydroxybenzoate와 반응하여 실제 분해 여부를 확인함. 또한, 이차대사물질 경로를 KEGG pathway 분석을 통해 확인하고, 오페론 분석으로 분해 관여 효소를 정리함. 현재 5종 효소를 선정하여 유전자 재조합 및 단백질 발현 중이며, 단백질 구조를 규명하기 위한 실험도 병행하고 있음 (그림).

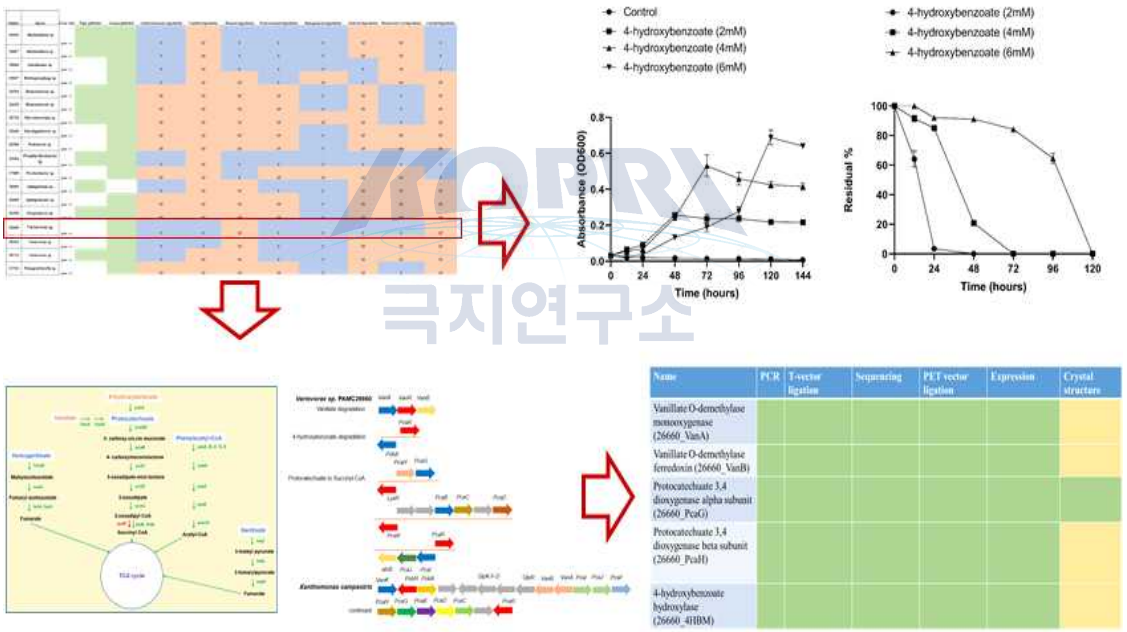
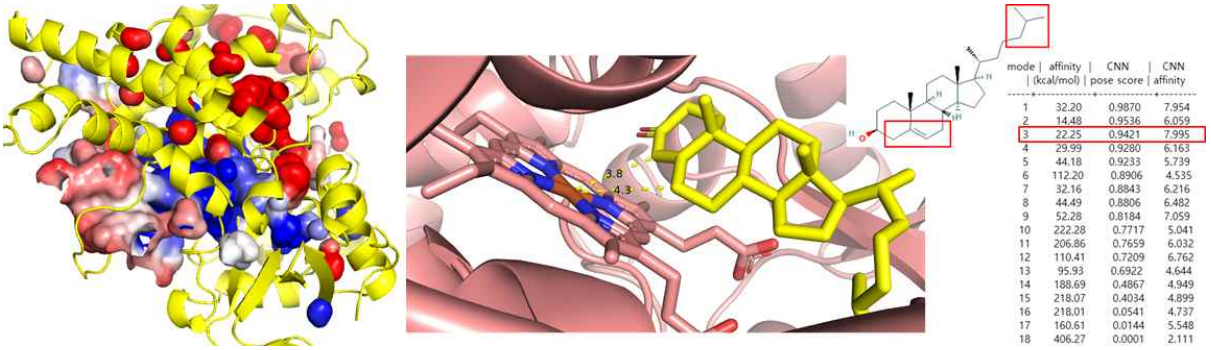


그림. 방향족 화합물 저해 관련 효소 및 실험 진행과정

2) 단백질 정보 기반 항생물질 변형효소 스크리닝 : 단백질 정보를 이용한 in silico 분석 디자인

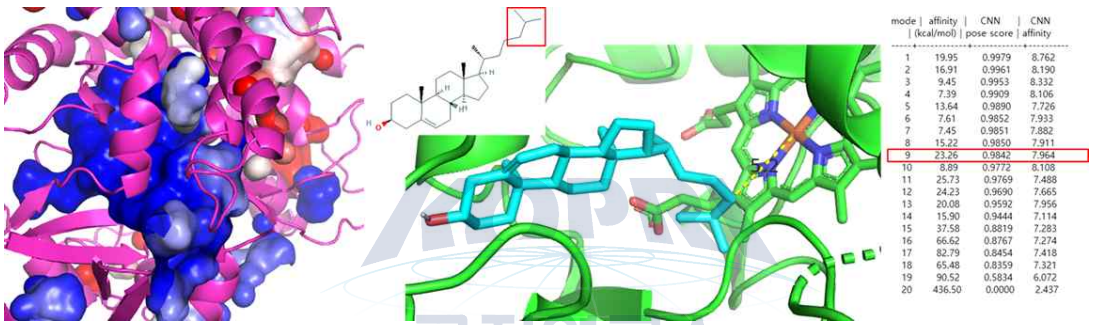
- 콜레스테롤은 스테롤의 일종으로서, 본 연구진이 연구하는 스테로이드와 구조적 유사성이 높은 물질임. 관련 연구로 Cholesterol 7α-hydroxylase와 Cholesterol 24-hydroxylase와 유사한 Cytochrome P450 유전자를 확인하였음. 그림 2처럼 *In-silico* 방법을 이용하여 *Rhodococcus* sp.의 유전자 아미노산 서열의 유사성을 바탕으로 CYP51에 유사한 유전자로 확인되었으며, Alphafold2를 바탕으로 non-template modeling을 시도하였음. 또한, AutoDock Vina의 기존의 scoring 문제를 해결하기 위해 CNN을 도입한 Gnina 1.0을 이용하여 docking simulation을 시도하였음.



mode	affinity (kcal/mol)	CNN pose score	CNN affinity
1	32.20	0.9870	7.954
2	14.48	0.9536	6.059
3	22.25	0.9421	7.995
4	29.99	0.9280	6.163
5	44.18	0.9233	5.739
6	112.20	0.8906	4.535
7	32.16	0.8843	6.216
8	44.49	0.8806	6.482
9	52.28	0.8184	7.059
10	222.28	0.7717	5.041
11	206.86	0.7659	6.032
12	110.41	0.7209	6.762
13	95.93	0.6922	4.644
14	188.69	0.4867	4.949
15	218.07	0.4034	4.899
16	218.01	0.0541	4.737
17	160.61	0.0144	5.548
18	406.27	0.0001	2.111

그림. *Rhodococcus* sp. 단백질 모델링 결과 (Cavity) 및 Cholesterol docking simulation 결과

- 모델링 결과, Cholesterol 7α-hydroxylase의 구조(ID:3SN5)와 부분 일치하는 것으로 보였지만, CYP의 입구부분에 유사점이 다소 낮은 것으로 확인되었음. 또한 내부 cavity 또한 cholesterol 7α-hydroxylase가 더 큰 것으로 확인되었지만, Docking simulation에서는 cholesterol 7α-hydroxylase의 기능과 유사한 결과를 확인할 수 있었음. 이후 현재 단백질 발현 및 *In-vitro* 실험이 진행 중에 있음. 또한, 동일 기질에 반응하는 Cholesterol 24-hydroxylase의 경우도 동일한 방법으로 모델링 및 기능 예측을 시도하였음 (그림).



mode	affinity (kcal/mol)	CNN pose score	CNN affinity
1	19.95	0.9979	8.762
2	16.91	0.9961	8.190
3	9.45	0.9953	8.332
4	7.39	0.9909	8.106
5	13.64	0.9890	7.726
6	7.61	0.9852	7.933
7	7.45	0.9851	7.882
8	15.22	0.9850	7.911
9	23.26	0.9842	7.964
10	8.89	0.9772	8.108
11	25.73	0.9769	7.488
12	24.23	0.9690	7.665
13	20.08	0.9592	7.956
14	15.90	0.9444	7.114
15	37.58	0.8819	7.283
16	66.62	0.8767	7.274
17	82.79	0.8454	7.418
18	65.48	0.8359	7.321
19	90.52	0.5834	6.072
20	436.50	0.0000	2.437

그림. *Streptomyces* sp. 단백질 모델링 결과 (Cavity) 및 Cholesterol docking simulation 결과

- 모델링 결과, Cholesterol 24-hydroxylase(ID : 2Q9F)와 helix 및 beta-sheet의 분포나 위치는 비슷한 형태를 취하였지만, 본 유전자가 좀 더 큰 cavity를 소화하고 있었음. 모델링 또한 open-form 형태로 확인되었음. Docking simulation 결과에서는 낮은 mode의 포즈로, 본래 단백질이 가지고 있는 기능과는 다른 기능을 할 것으로 예측되어 새로운 기질을 찾는 작업을 현재 진행 중에 있음. 또한 콜레스테롤의 구조는 리간드-수용체 신호전달 및 바이러스 침입과 같은 다양한 생물학적 과정을 제어하고 스테로이드 호르몬과 담즙산의 전구체 역할을 함. 특히, 콜레스테롤은 스테로이드 성분과 유사한 구조를 가지고 있어 콜레스테롤에 작용하는 CYP는 스테로이드 성분의 수산화 및 작용에 중요한 역할을 할 것으로 추측되어 극지 균주 게놈에서 몇몇 효소들을 찾아 클로닝하고 실험관 내 실험을 실시함.

표 1. Cholesterol 7α-hydroxylase/Cholesterol 24-hydroxylase 진척사항

Name	Strain_ID	Code	Vector/Host	Progress
Cholesterol 7α-hydroxylase	14820_3556	α3	pET28/pET32-BL21	In-progress
	23299_1492	α4	pET28/pET32-BL21	In-progress
	23299_2092	α10	pET28/pET32-BL21	In-progress
	21349_5369	α9	pET28/pET32-BL21	In-progress
Cholesterol 24-hydroxylase	HSR26_742	α11	pET28/pET32-BL21	Stop
	40447_2335	α13	pET28/pET32-BL21	In-progress
	12257_1762	α14	pET28/pET32-BL21	In-progress

- 알려져 있는 인간/진핵생물/곰팡이 유래 cholesterol 7α-hydroxylase와 cholesterol 24-hydroxylase를 본 연구진 게놈에서 서칭하였고, 위 표와 같은 시퀀스를 확인하였음. 이에 따라, 각 유전자마다 코드를 부여하였고 클로닝 및 단백질 발현을 진행하였음.

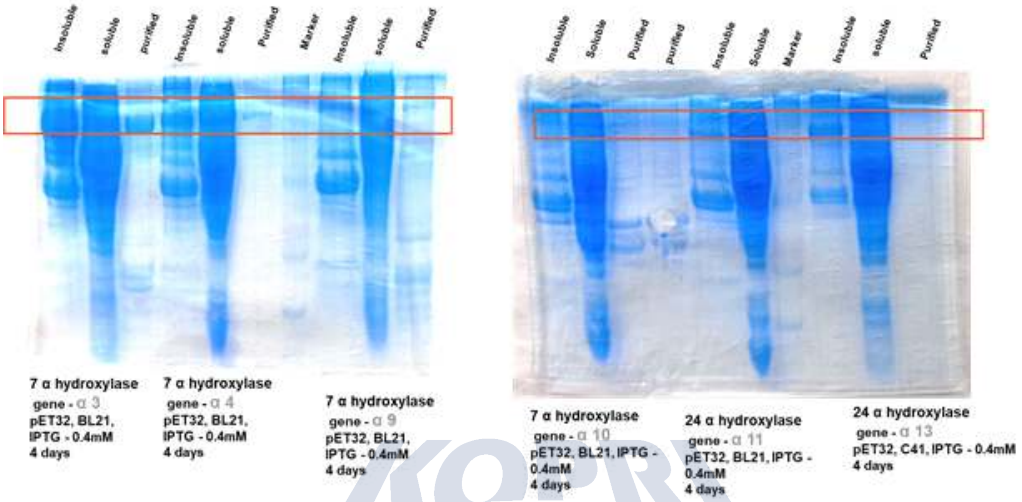


그림. Cholesterol 7α-hydroxylase/Cholesterol 24-hydroxylase 발현 및 정제 결과

- 단백질 발현 결과, cholesterol 7α-hydroxylase에서는 α3, α4, 및 α9 등이 정제 되었음. 특히, α3가 좀 더 높은 농도로 발현 및 정제됨. 또한, Cholesterol 24-hydroxylase는 전체적으로 낮은 발현을 보였지만, 이후 발현 조건을 조절하여 발현에 성공하였고 활성 확인 연구를 진행함.

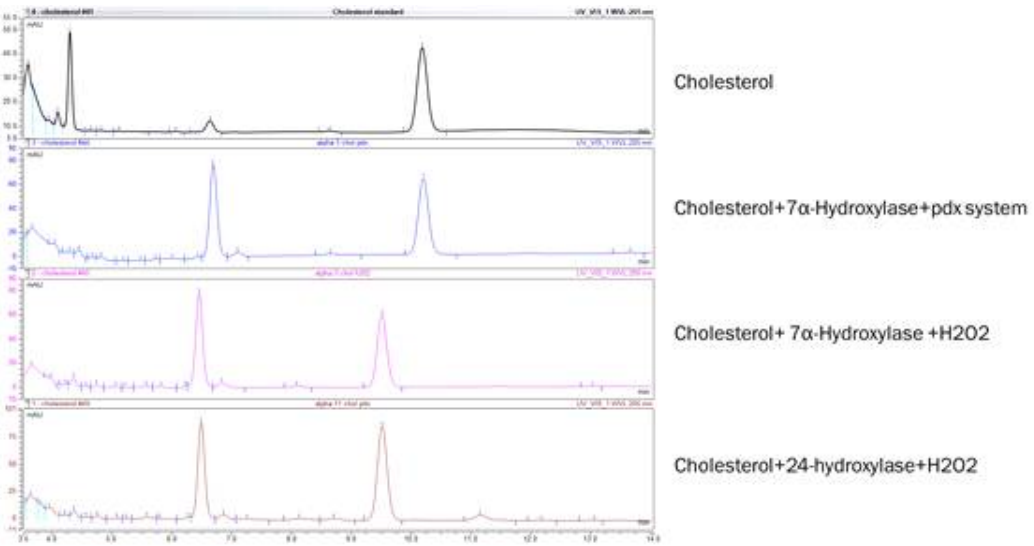


그림. Cholesterol 7α-hydroxylase/Cholesterol 24-hydroxylase 실험관 내 실험 HPLC 결과

- Cholesterol 7α-hydroxylase의 α3를 이용하여 실험관 내 실험을 진행함. 기질은 Cholesterol로서, methanol에 녹여 사용하였으며, Cytochrome P450의 전자전달체계인 Pdx/PdR과 과산화수소를 이용하여 진행함. 반응물은 Ethyl acetate를 이용하여 추출하였으며, 원심분리 후 상층액을 얻은 후에 질소농축을 하였고, 마지막으로 methanol을 이용하여 추출하여 HPLC 분석을 진행함. HPLC 분석 결과, Pdx/PdR을 이용한 실험관 내 실험과 과산화수소를 이용한 실험 모두 cholesterol과 수산화된 것으로 추측되는 피크를 확인하였음 (그림).

- Cholesterol 24-hydroxylase의 α13 관련 연구에서도 기질과 실험방법은 위와 동일함. HPLC 분석 결과, α3의 실험결과와 동일하게 2개의 피크를 확인함 (그림 5). HPLC 분석간 cholesterol의 약간의 shift가 발견되어 확실한 분석을 위해 GC-MS를 진행하고자 한국기초과학지원연구원 오창센터의 Two-dimensional Gas Chromatography/High Resolution Mass Spectrometer system (2D GC-MS) 분석을 의뢰함.

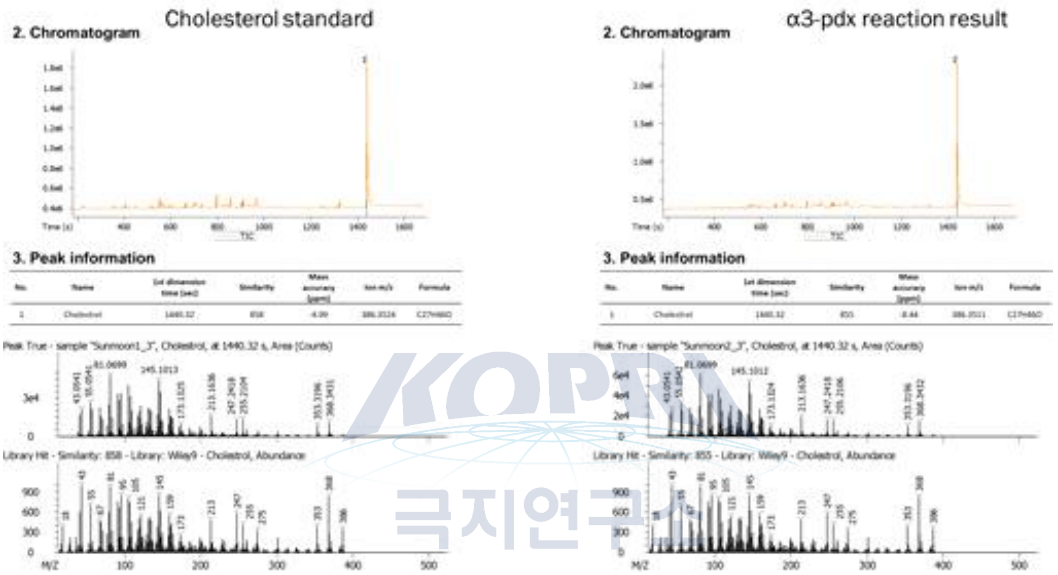


그림. Cholesterol 7α-hydroxylase의 2D GC-MS 분석 결과

- 2D GC-MS 분석 결과, 기질은 Cholesterol만 발견되었음. Cholesterol 스탠다드 성분과 GC spectrometry를 비교하였으나, α3 및 α13 동일하게 생성물이 확인되지 않음 (그림). 현재, 2차 실험 및 HPLC 분석 예정임.

나. 극지/해양 유래 구조변형 효소 확보 및 이를 이용한 신규 항생물질 생산, 분리 및 구조 분석 (선문대, 극지연)

1) 기존 알려진 이차대사 관련 구조변형 효소 기반 in vivo 반응 시도 및 신규물질 생산

- 총 11종의 스테로이드 기질 중 5종의 스테로이드 기질과 상호작용을 연구함. 반응한 기질은 testosterone, methyl testosterone, nandrolone, adrenosterone, androstenedione 임. Wild type의 CYP105D18을 사용하여 유전자 재조합 및 분광학적 분석을 진행하고, 스테로이드 기질을 사용한 HPLC 및 MS 분석을 통해 수산화 생성물을 확인함 (그림). 이 자료는 돌연변이화한 데이터와의 비교를 위해 사용됨.

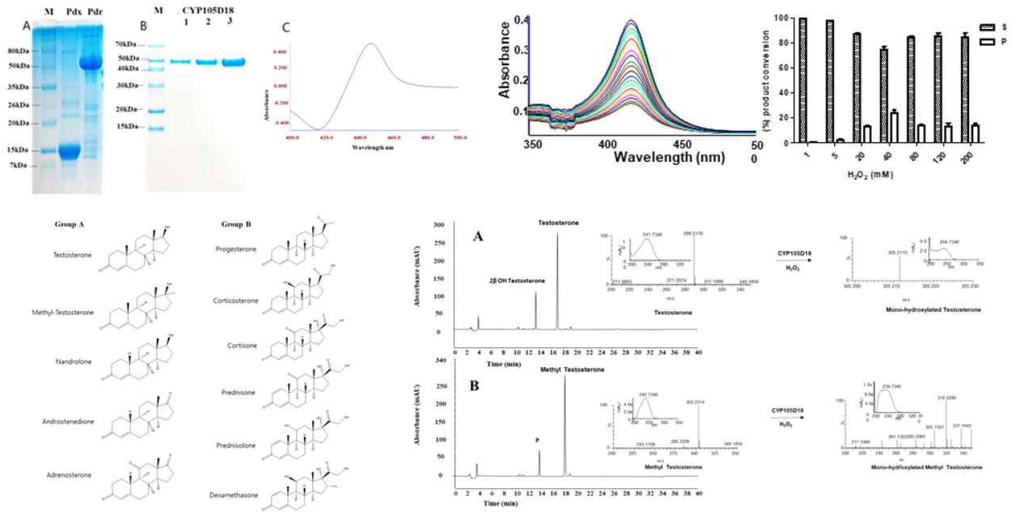


그림. CYP105D18 (wild type) 효소의 분광학적 분석 및 스테로이드 기반의 HPLC 및 MS 분석

- Site-mutagenesis를 위해 target이 된 아미노산은 기질의 활성 입구 부분으로 S63, R82, F184가 선택됨. 기질이 들어갈 입구를 넓히는 것을 목적으로 선택된 이러한 아미노산들은 Ala 아미노산으로 바꿔 크기를 축소화함으로써 실제 기질 활성에 영향을 주는 것으로 확인됨. 특히, F184A 돌연변이 효소에서 가장 두드러진 활성을 보여, 위 아미노산이 스테로이드 활성에 있어 핵심 아미노산임을 증명함 (그림).

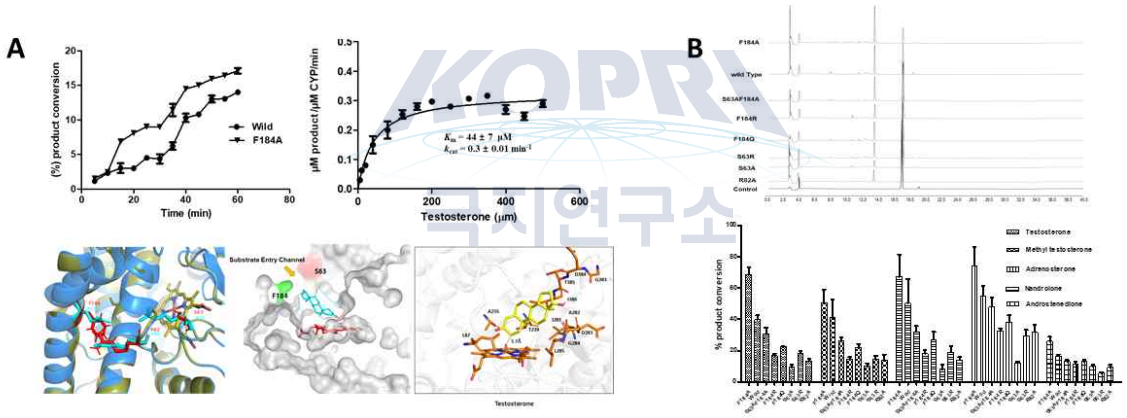
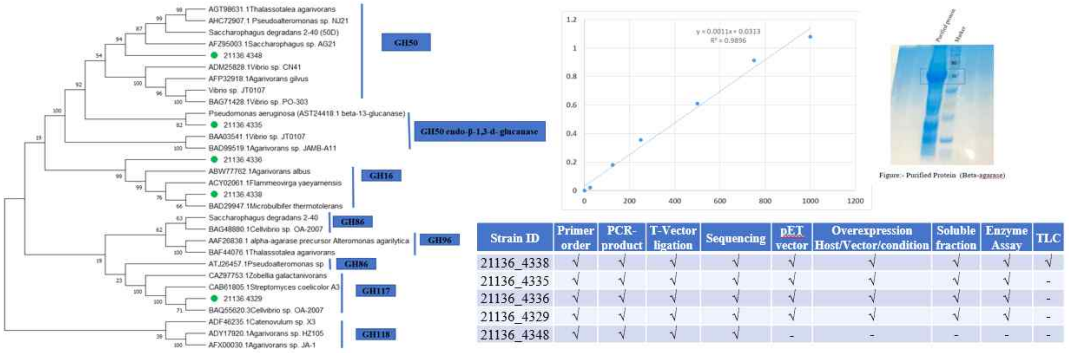


그림. CYP105D18 효소의 site-mutagenesis 아미노산 선별 및 활성 비교

2) 저온성 Polysaccharide 관련 분해 효소 발현, 정제 및 구조 분석

- PAMC21136은 유전체 분석 결과, Agar를 분해 할 수 있는 Beta-agarase 포함 5가지의 Agar 분해 효소를 가지고 있었음. CAZyme 관련 예측을 통해 각각의 유전자는 그림 9와 같은 CAZyme family로 구분 될 수 있었음. 각각의 유전자를 Phylogenetic tree로 표현 하였을 때 gene no. 4348은 GH50, gene no. 4335는 GH50 중에서 endo-â-1,3-d-glucanase로 구분되었음. 또한 gene no. 4336과 gene no. 4338은 비슷하지만 다른 GH16으로 구분되었음. 마지막으로 gene no. 4329는 GH117과 비슷한 기능으로 분석되었음. 한 균주 유전체 내에 다양한 타입의 Agar를 분해 할 수 있는 경우는 드문 케이스일 뿐만 아니라, *Gelidibacter salicanalis* 종에서 Agar 분해관련 연구는 새로운 주제로 확인됨. 또한 저온 가능성이 크기 때문에 기대되는 연구 주제임.



Strain ID	Primer order	PCR-product	T-Vector ligation	Sequencing	pET vector	Overexpression Host/Vector/condition	Soluble fraction	Enzyme Assay	TLC
21136_4338	√	√	√	√	√	√	√	√	√
21136_4335	√	√	√	√	√	√	√	√	-
21136_4336	√	√	√	√	√	√	√	√	-
21136_4329	√	√	√	√	√	√	√	√	-
21136_4348	√	√	√	√	-	-	-	-	-

그림. 균주 PAMC21136에서 분리된 Agar 분해 관련효소 5종에 대한 정보

- PAMC21136에서 확인한 Agar 분해 관련 효소 5종을 기존 CYP 발현 조건과 유사하게 대장균 발현을 시도하였으나, 전체적으로 단백질의 양이 적게 발현되었음. 따라서 발현의 온도를 16° C로 낮추고 IPTG의 양을 조절하면서 발현의 양이 증가 되는 것을 확인 할 수 있었음. 발현 효소들은 저온활성을 가질 수 있기 때문에 Agar 분해 실험을 진행하였음.

- Fucose는 생합성을 통해 값이 비싼 fuculose 또는 상업적으로 많이 사용하는 기타 화합물을 생성하는데 중요한 기질임. 최근 항노화, 알레르기 피부반응 억제, 항바이러스, 항암, 면역조절 활성뿐만 아니라 프리바이오틱스의 역할을 수행한다는 보고에 의해 산업적 가치가 높아짐. 그러므로 이 생합성 과정에 관여하는 효소들을 조사하고, 균주 유래 효소들을 스크리닝함. *Mucilaginibacter* sp. PAMC26640 균주와 *Paenibacillus* sp. PAMC21692 균주에서 관련 효소들이 있음을 확인하였으며, 이들을 재조합하여 발현 실험 중임 (그림).

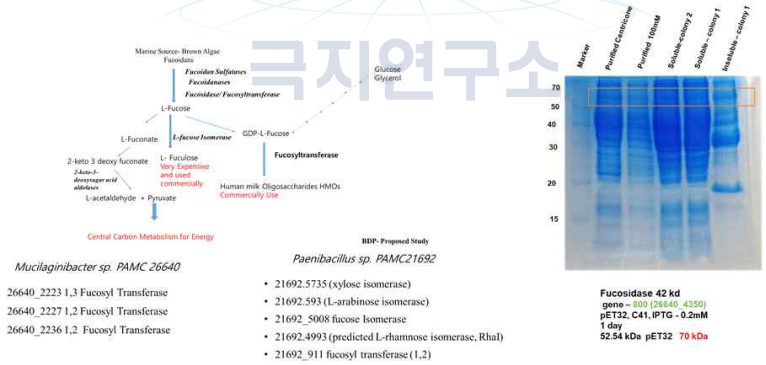


그림. Fucose 관련 생합성 과정 및 효소 발현

3) TLC, LC-MS, NMR 등 다양한 기기를 이용한 신규 항생물질과 다당 분해 관련 효소의 분리 및 구조 분석

- 위에서 설명한 것과 같이 PAMC21136에서 분리한 단백질 5 개 중 하나의 효소 gene no. 4348를 이용해 Agar 분해 관련 효소의 활성 실험을 진행함. 실험 결과, 발현된 단백질은 Agar를 분해하는 것을 확인 할 수 있었음 (그림). 결과적으로 Agar를 분해했을 때 생성되는 다당의 종류인 Neoagarobiose(N2), Neoagarotetrapse(N4), Neoagarohexose (N6) 등을 확인할 수 있었음. 이런 결과를 통해서 gene no. 4348 단백질은 Agar 분해능이 높다는 것을 증명함. 또한 재조합해서 단백질만 보유한 cell 자체로 Aymogram 실험을 통해 Agarase Activity를 확인하였음. 시각적으로도 확연히 Agar가 분해 된 것을 확인 할 수 있었을 뿐만 아니라, 온도를 다르게 하여 16° C와 20° C를 비교 하였으나 억제환의 크기가 큰 차이가 없는 것을 확인 할 수 있었으며 이는 좀 더 낮은 온도에서도 활성을 확인 할 수 있는 가능성을 보여주는 결과라고 생각됨. 현재 이 효소에 대한 단백질 구조 연구를 진행 중이며, 다른 4종의 효소들도 같은 활

성을 가지고 다른 특이당도 분해 할 수 있는지 추가 실험을 진행하고 있음. 또한 다른 다당 분해 관련 효소들도 발현하여 신규항생물질 개발연구를 진행 하고 있음.

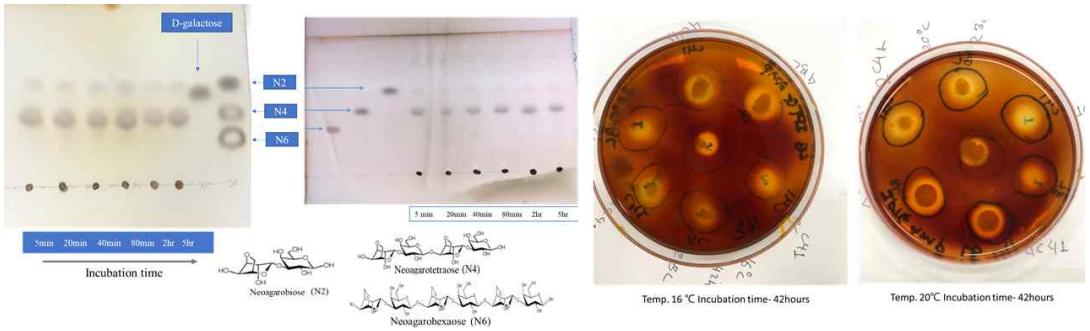


그림. PAMC21136에서 분리한 효소의 활성을 확인한 결과

다. 확보된 항생제 후보물질의 활성 스크리닝 및 분석 (선문대)

1) 유전체 기반 항생물질 활성 분석 및 정보 데이터베이스 구축

- 구조기반 항생물질 활성분석 및 정보 데이터베이스 구축하기 위해 유전체기반 항생물질 활성을 예측할 수 있도록 데이터베이스와 정보를 수집하기로 결정하였음. 그 중에서도 미생물에서 분리할 수 있도록 정보를 수집하기 위해 미생물 종을 선정하여 관련 2차대사물질 생합성유전자와 pathway 대사경로 중심으로 각각 정리하였으며, 관련 결과는 현재 논문 작성하여 투고하였음.
- 본 연구진은 먼저 *Burkholderia* species를 선정하여 결과를 수집하였음. 최대 3개의 chromosome을 가지고 다양한 나라에서 분리되었다고 알려진 *Burkholderia*는 cystic fibrosis 병원성을 보유하는 종부터 식물 생장촉진과 관련된 종까지 현재 90여 종에 대해서 알려져 있음 (그림). chromosome의 경우 1번째 염색체는 생장과 관련된 모든 역할을 담당하며, 2번째 염색체는 이차대사물질 생산 등과 관련된 역할을 한다고 알려져 있음. 이에 대해 *Burkholderia* 도 2/3번째 염색체에 각 특징을 보유하고 있는 특이 2차대사물질을 생산할 것으로 예상하여 연구를 진행하였음.

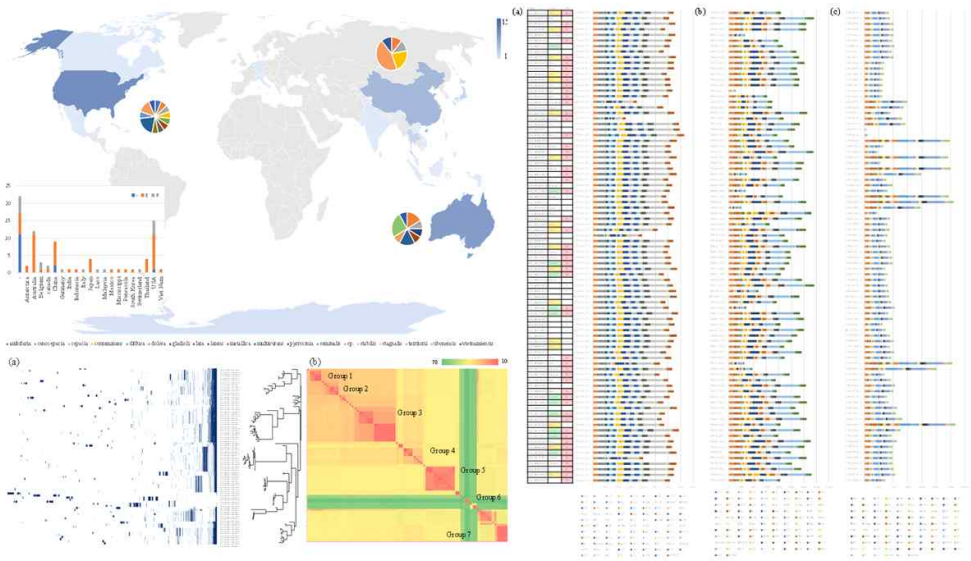


그림. *Burkholderia* 의 전 세계 분리된 지역 및 분포도, 여러 개수의 염색체를 보유한 균주에 대한 Pan-genome, ANI 분석 결과

- 전체 *Burkholderia*에서 3개 염색체를 보유하고 있는 87종을 NCBI에서 다운받아 분석을 진행하

였으며, 각 염색체별 특징을 확인하기 위해 command를 이용하여 염색체 시퀀스를 분리하여 분석을 진행하였음. 또한 염색체별 분석을 통한 COG 분포를 알 수 있었으며, 염색체별 패턴이 유사한 것을 확인할 수 있음. 분리 지역에 따라 COG 분포가 유사함을 보였으며, 이차대사물질 예측을 위하여 각 염색체별 antiSMASH 분석도 진행하였음 (표 2). 각 염색체 별로 진행하였으며, 시각적으로 보기 쉽게 종별로 묶어서 진행하였음. 각 숫자표기는 세부종이 보유하고 있는 gene cluster의 전체 합계를 나타냄.

표. *Burkholderia species*에 대한 Chr 1에 대한 이차대물질 관련 gene cluster 분석

chr1	ambifaria	cenocepacia	cepacia	contaminans	diffusa	gladioli	lata	metallica	multivorans	pyrrocinia	seminalis	sp.	stabilis	stagnalis	territorii	ubonensis	vietnamiensis
arylpolyene	1	8	7	2	1	0	1	0	0	1	1	8	1	2	1	5	6
bacteriocin	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0
betalactone	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
blactam	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
hglE-KS	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
hserlactone	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NRPS	2	9	8	4	1	3	1	1	3	1	1	10	1	3	1	5	6
NRPS-like	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
other	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
phosphote	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0
T1PKS	0	8	5	1	1	1	1	1	0	1	1	5	1	0	1	0	0
terpene	1	9	10	6	1	1	1	2	1	2	1	12	1	1	1	3	6

KOPRI 극지연구소

- 염색체 별로 대표하는 이차대사물질이 있었으며, 1번째 염색체의 경우 NRPS, terpene, arlpolyene 과 같은 물질을 보유하는 것으로 나타났으며, 2/3번째 염색체의 경우는 종별로 다양한 물질을 생성할 수 있는 가능성을 확인하였음. 특히 hserlactone 물질 관련 gene cluster가 발견되었으며, terpene의 경우 염색체 상관없이 균일하게 보유하였음. 3번째 염색체의 경우 bacteriocin과 같은 물질 관련 gene cluster을 많이 보유하고 있었으며, 이는 생존과 관련된 물질 생산 및 다른 미생물과의 communication 상호작용의 용이성과 관련이 있을 것으로 사료됨.

2) 기본 항생물질 구조 합성을 통한 활성의 다양성 분석 및 신규 항생물질 제작

- Type III polyketide synthases (PKSs)는 반복적인 탈카르복실화 aldol 또는 Claisen 축합 반응 또는 lactonization을 통해 시작 기질에 1개 내지 여러분자의 증량체 기질을 축합 촉매하는 ketosynthase의 단순 동족이량체임. 주로 식물에 특이적으로 알려져 있지만, 게놈 분석이 활발해지면서 미생물에서도 발견되고 있음. Type III PKS는 유형에 따라 동일 단백질이지만 시작기질 및 증량체 기질에 대한 특이성, 응축될 증량체 기질의 수 및 고리화 반응에 따라 다양한 천연물이 합성되며, 고리화반응에서 aldol 또는 claisen 축합반응, 락톤화 타입에 따라 다양한 고리화반응에 의해서도 달라짐. 본 연구진은 극지 균주 내 type III polyketide synthase로 추정되는 효소의 발현 및 *In-vitro* 실험을 진행하였음. 단백질 발현 크기는 약 40 kDa이며, *In-vitro* 결과, Acetyl-CoA에서는 반응하지 않았지만 특이하게 p-coumaroyl-CoA에서는 반응하여 유의미한 피크를 보였음 (그림). 이후, UPLC-MS 분석결과 273.1672 m/z 값의 특이화합물을 확인하였지만, 생성물의 양이 적어 NMR까지는 분석하지 못하였음.

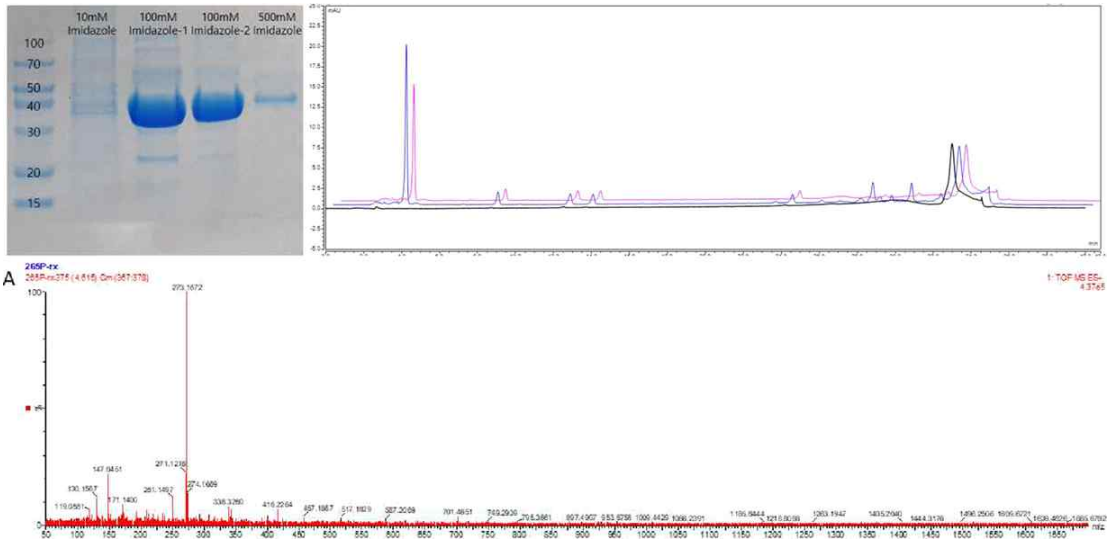


그림. 극지 유래 type III polyketide synthase의 발현 정제 및 *in-vitro* 결과

- 본 연구진은 극지 균주 내 p-coumaroyl-CoA 및 malonyl-CoA 생합성 관련 유전자의 과다발현을 통한 *in-vivo* 시스템을 구성하고자 하였음 (그림). 알려져 있는 malonyl-CoA 및 p-coumaroyl-CoA의 아미노산 서열을 이용하여 연구진이 보유하고 있는 유전체 내 관련 유전자를 확보하였으며, 후보군을 선정하였고, 이미 알려져 있는 *RppA* 유전자를 이용하여 *in-vivo* cell의 기능을 예측할 수 있도록 vector를 구성하고 현재 연구를 진행 중에 있음.

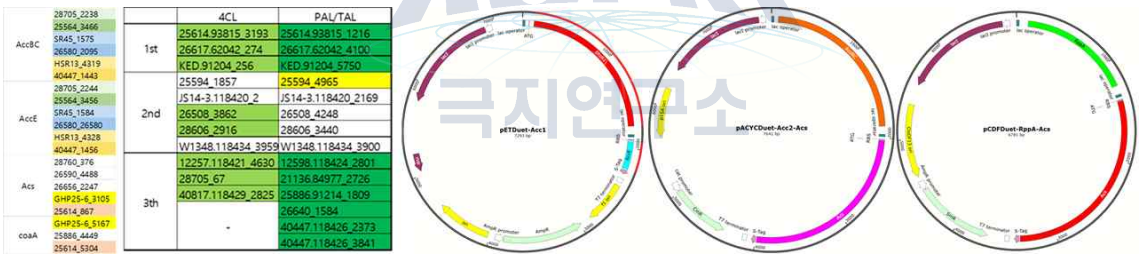


그림. 극지 유래 CoA 화합물 관련 유전자 및 Vector 구상안

- Cytochrome P450 (CYP)은 유용한 수산화 기능을 가진 생촉매 효소로 사용되어 왔음. 이들은 기질 특이성이 높아 산업적/제약적으로 활용도가 있어 지금까지 활발히 실험되어 옴. 본 실험실에서는 다양한 종류의 CYP를 실험중이며, 현재까지도 새로운 기질에 반응하는 효소들을 스크리닝하고 있음. CYP236A는 탄수화물 분해 관련 효소로 알려져 있어, 당 O-demethylation을 위한 후보 효소로 선별되었음. 현재 PAMC21136 균주로부터 고유의 전자전달계와 CYP236A를 발현 중임 (그림).

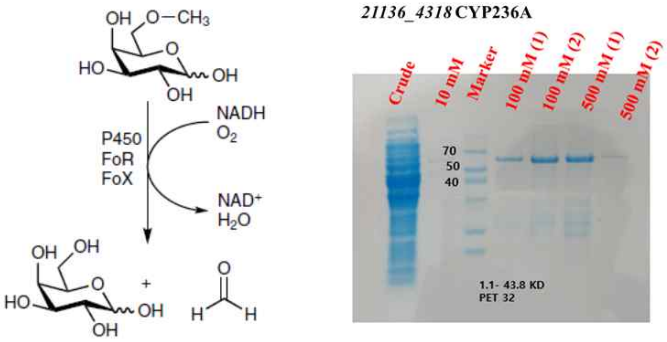


그림. CYP236A 효소 관련 생합성 및 단백질 정제

- CYP101D5는 ionone 기질을 사용하는 특이적 효소이며, alpha-ionone에서 뛰어난 활성을 보임. 현재 GC-MS 분석으로 마무리 연구를 수행 중에 있음 (그림).

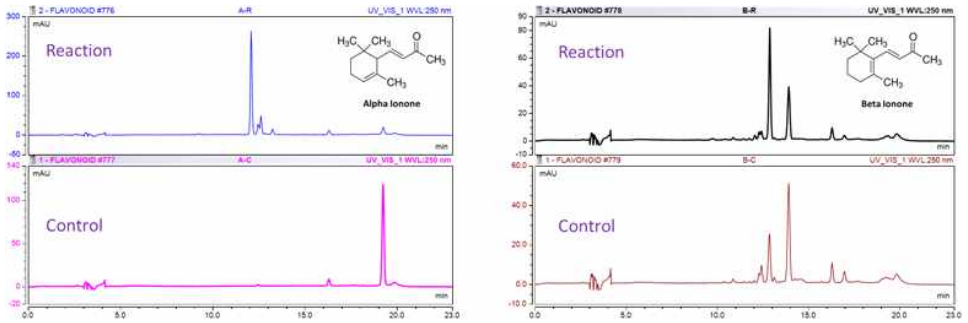


그림. CYP101D5 효소와 ionone 활성 실험 분석 결과

- 또한, CYP108, CYP109, CYP159, CYP219 시리즈 효소들이 새롭게 재조합되고 in vitro assay까지 진행되고 있음. 이들 중에는 기질이 명확하지 않은 효소들이 있기에 실험실에 보유하고 있는 기질들을 활용하여 기능을 증명하고자 계획 중에 있음. 그 중, *Pseudarthrobacter* PAMC25564 균주로부터 유래된 CYP109J6은 iodo-benzene을 사용하여 14종의 스테로이드 기질과 반응을 시도하였음. 이는 이 효소가 Pdx-Pdr 과 H_2O_2를 전자전달계로 사용하지 못함을 실험적으로 확인하였기 때문임. 14종의 기질 중, androstenedione, methyl testosterone, nandrolone, testosterone 기질에서 활성을 나타냄을 확인하고, 현재 NMR 분석을 위해 현재 마무리실험을 진행하고 있음 (그림).

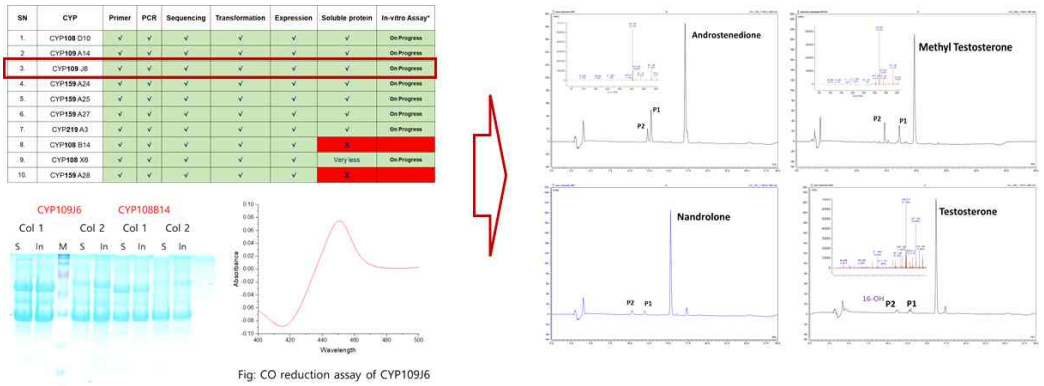


그림. 다양한 CYP 실험 진행 과정 및 CYP109J6 활성 분석

- 또한, CYP105A5는 결과적으로 플라보노이드 기질을 demethylation 하거나 hydroxylation 하는 것

으로 확인됨. 이를 증명하기 위해 in vitro, in vivo, NMR analysis, kinetic assay까지 현재 마무리 실험을 진행하고 있음 (그림).

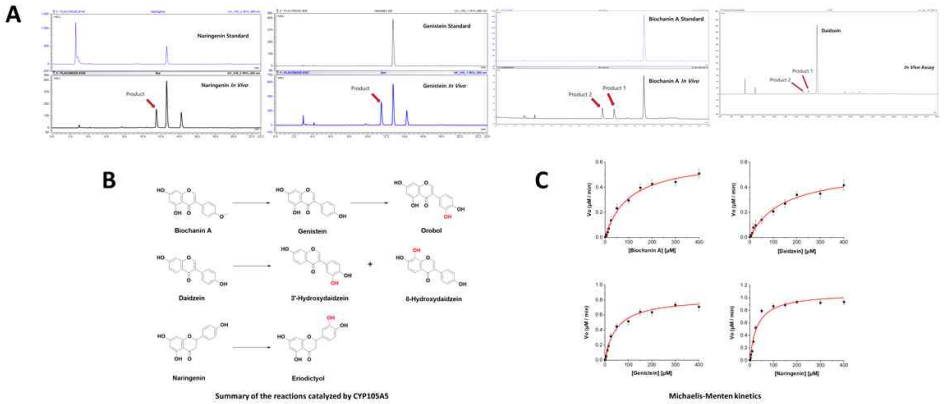


그림. CYP105A5 효소의 in vitro, in vivo, NMR analysis, kinetic assay 결과

- 관련 연구는 박테리아 유래 효소로써 플라보노이드와 연관된 사례가 드물기 때문에 매우 의미 있는 연구임. 현재 논문 작성을 완료하여 투고 진행 중임.

3) 항생물질 스크리닝 결과에 따른 추가 항생물질 코어 개발 및 제조

- UV 및 H_2O_2 저항성에 대한 mechanism을 밝히기 위한 glutathione 관련 효소들을 검색함. 21136, 40447, 41178, 22235 균주들로부터 스크리닝 되었으며, 이들 중 21136 균주가 먼저 선택됨. 이를 UV, H_2O_2, heavy metal, 저온, 고농도의 염 등의 스트레스 환경에 노출하여 배양하고, 전사체 분석 실험 및 단백질체학 연구를 진행하고 있음. 현재 21136 균주 유래 glutathione peroxidase 1개와 glutathione reductase (GRA) 2개를 발현하였으나, GRA 1개를 제외하고 insoluble 형태로 발현되어 다소 연구의 어려움이 있음. 최종적으로 발현된 GRA 1개는 glutathione disulfide (GSSG)를 기질로 사용하여 산화 형을 분광학적으로 확인하고, H_2O_2 저항성을 disc diffusion assay를 통해 확인하였음 (그림).

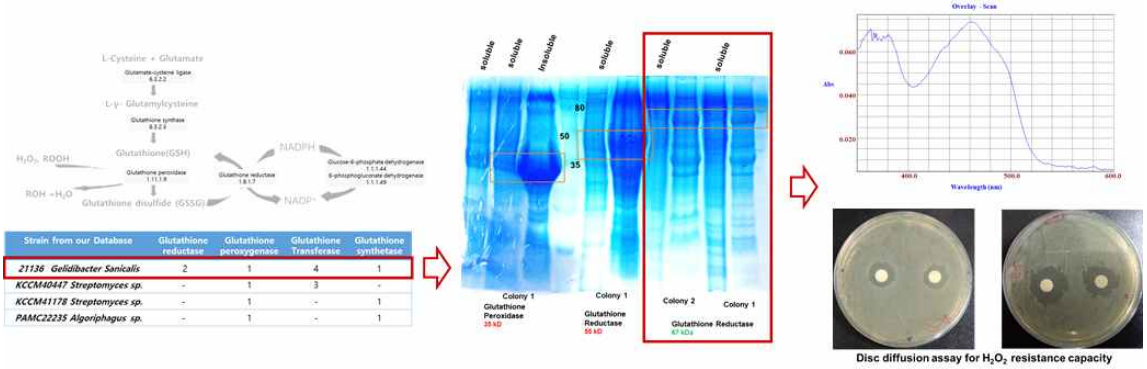


그림. UV, H_2O_2 저항성 관련 효소 실험과정 및 GRA 활성

- 나머지 효소들은 현재 soluble 발현 실험을 시도 중이며, 발현이 확인되면 정제 후 구조 규명 및 기능 증명 실험을 연속적으로 진행할 계획임.

라. 극지생물 유래 유전자와 단백질 정보 기반 항생물질 변형효소 스크리닝 및 활성 분석 (선문대, 극지연)

1) 항생물질 변형효소 및 관련 효소의 구조를 기반으로 하여 선도 항생물질 및 기타 물질 선별

- (화합물 데이터베이스 및 virtual screening 기법을 이용한 선도물질 선별)

○ 이전 결과보고서에서 언급한 methyltransferase에 대한 실험이 진행되었으며, 그 외 다수 새로운 형태의 transferase를 분리함. Methyltransferase는 23299, 21692, 그리고 22724 균주에서 분리되었으나, 지금까지 성공적으로 재조합된 균주는 23299와 22724 등임. 또한, catechol O-methyltransferase 2개, flavoid O-methyltransferase 2개, sulfur transferase 4개, 그리고 N-acetyltransferase 2개가 스크리닝되어 재조합 실험 진행 중임. 이 중, Catechol O-methyltransferase에 속하는 12598-4525 효소에 대한 플라보노이드 기질 활성을 아래 결과처럼 확인함 (그림). 4가지 기질에 대한 활성 검사를 진행하여 뛰어난 활성을 보여주는 것을 확인하였으며, MS 분석을 통해 메틸기가 형성됨을 증명함. 다른 기타 효소들 또한 활성 실험을 진행하여 이들의 반응 정도를 비교해보고자 함.

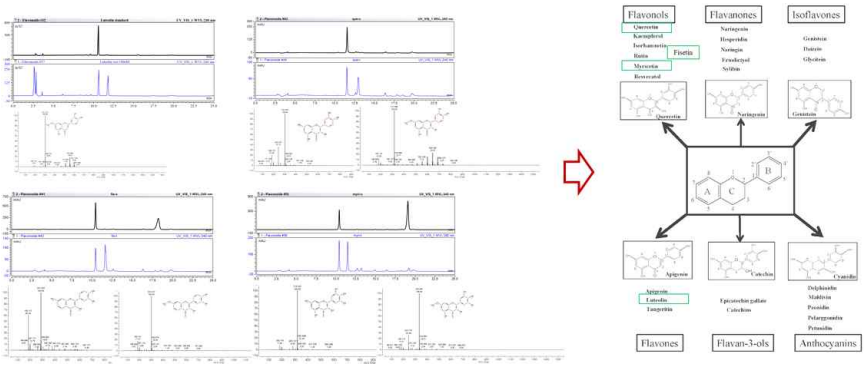


그림. Catechol O-methyltransferase (12598-4525) 효소의 기질 활성

2) 선도물질-변형효소간 상호작용 예측 및 확인

- 스테로이드 기질과 관련된 효소로써, 7 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (7 alpha-HSDH)와 7 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (7 beta-HSDH)를 분리 및 합성하였으며, 이에 대한 기능 및 구조 증명 실험도 진행됨. 7 alpha-HSDH는 성공적으로 구조가 밝혀졌으며, 특히 최초의 apo 형태로 형성되어 이를 논문화함. 기존 구조들과의 차이점을 언급함과 동시에 NAD 의존형 효소로써 chendeoxycholic acid (CDCA)를 7-ketolithocholic acid(7K-LCA)로 전환하는 활성을 보이며 2021년 최종적으로 출판됨 (그림 21).

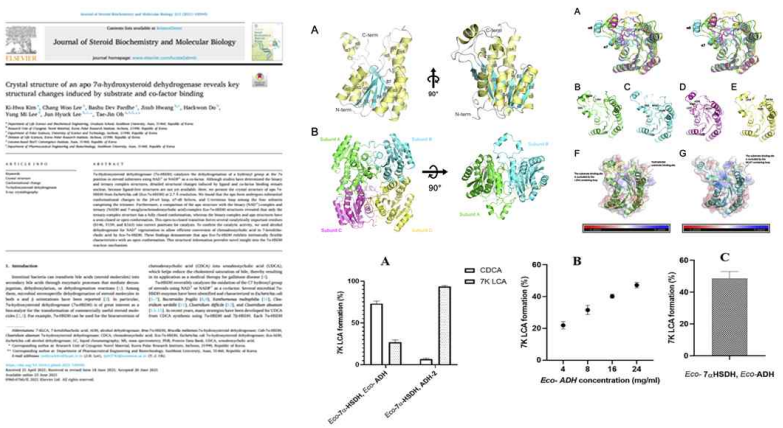


그림 21. 7 alpha-HSDH 논문관련 결과

3) 선도물질 및 변형효소 구조를 기반으로 하는 site-driected mutagenesis을 이용한 돌연변이 개발 (변형효소의 기능 증진 및 선도물질 변형 위치 변화)

- CYP105D18은 papaverine 기질로 수산화 기질 증명 및 구조 규명하여 논문화하고 출판이 완료된 상태이며, 추후 돌연변이화를 진행하여 스테로이드 기질과의 상호작용에 대해 연구 중에 있음. 현재, CYP105D18에 papaverine이 도킹된 이전과 이후의 중요잔기의 molecular dynamics 분석 결과, L87 잔기의 변화가 두드러지는 것을 확인할 수 있었음 (그림).

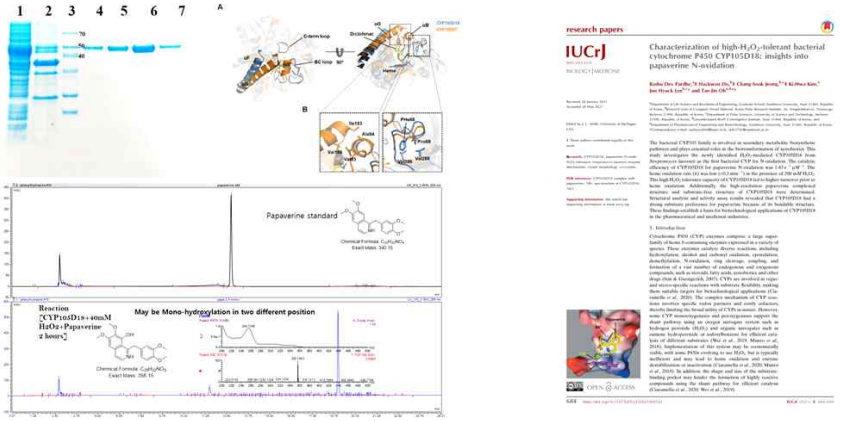


그림. CYP105D18 효소와 papaverine 기질 활성 및 논문 출판

- 그와 반대로 G383, D384, T385, I386은 큰 변화를 보이지 않았음. 이는 L87, A235, T239, I281, A282, D283, G284, L285가 papaverine이 도킹되는 순간에 기질을 받아드리고 바인딩하는데 더 많은 역할을 한 것으로 해석할 수 있음 (그림 23). 이에 따라, 위 잔기들이 이후 진행될 돌연변이화 연구의 후보 잔기들로 선정되었음.

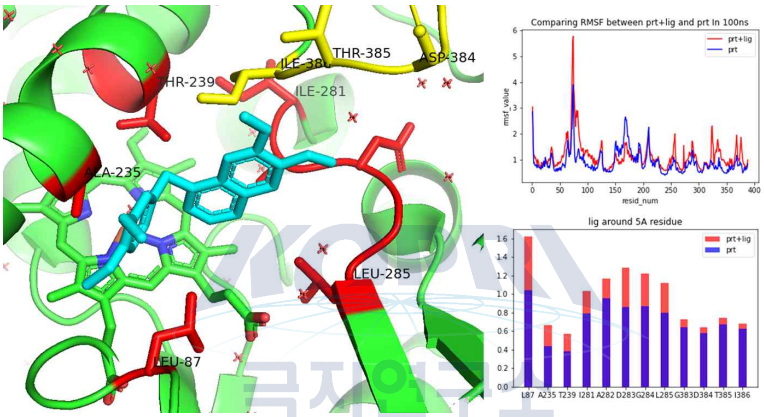


그림. CYP105D18 효소와 Molecular dynamics 분석 결과

- CYP106A 시리즈에 대한 효소 활성 연구는 꾸준히 계속되어오고 있음. 위 효소는 스테로이드 기질을 수산화하는 기능을 가지고 있으며, 그 외 테르페노이드 기질과도 활발히 실험이 진행되어 그 유용성이 입증된 효소임. CYP106A6는 본 실험실에서 보유하고 구조를 규명한 새로운 분류의 효소이며, 이미 기질 전환 활성이 뛰어나다고 알려진 CYP106A2 효소와 비교 하여도 충분히 훌륭한 촉매제로 작용하는 것으로 판단되었음. 이는 논문 작성 중임. 한편, 기존의 생성물과 동일하게 나타나는 것이 부족하다고 판단되어 이를 변화시키기 위한 site-mutagenesis 방법을 진행하였음. Mutagenesis를 하기에 앞서, target으로 할 아미노산을 선별하기 위해 Pymol을 사용하여 단백질 구조에 대해 분석하였음. CYP106A2와 비교하여 차이가 두드러지는 부분을 먼저 목표하고, 그 외 활성 부위 주변으로 차이가 보이는 곳을 선정함. 기존 CYP106A2에 대한 돌연변이 실험도 진행된 바가 있기 때문에 이를 참고하였음. Arg295, Ser293, Leu91 총 3개의 아미노산을 선택하고, 활성 부위를 넓히는 목적으로 모두 Ala로 돌연변이 화하기로 함 (그림 24). 추가로 Arg295 부분은 구조적으로 두드러지게 구별되는 아미노산이기 때문에 크기가 큰 Val을 넣음으로써, 단백질 활성에 영향을 주는 인자인지 판단하고자 시도함.

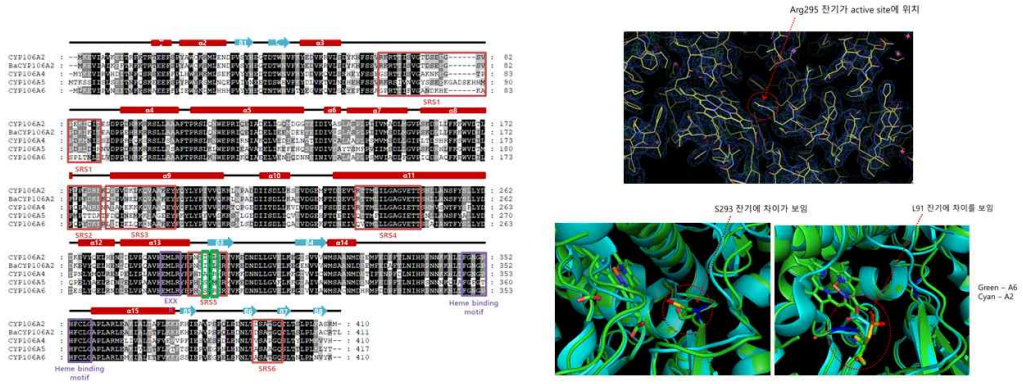


그림. CYP106A6 효소의 site-mutagenesis 아미노산 선별

- 돌연변이 연구 진행 후, 스테로이드 progesterone에 대해 in vivo assay 진행 결과, R295V가 유독 기질 특이성이 높아짐과 동시에 전환율이 떨어지는 것을 확인하였음. 이는 R295A, S293A, L91A 효소가 기존 wild type과 비슷한 수준 혹은 좀 더 높은 전환율을 보인 것과 대비되는 결과임 (그림). 이로써 R295 부분이 기질 반응에 있어 핵심 아미노산이며, 이 부분을 수정함으로써 특이적인 화합물의 생성 증가에 대한 결과를 도출 할 수 있을 것으로 사료됨.

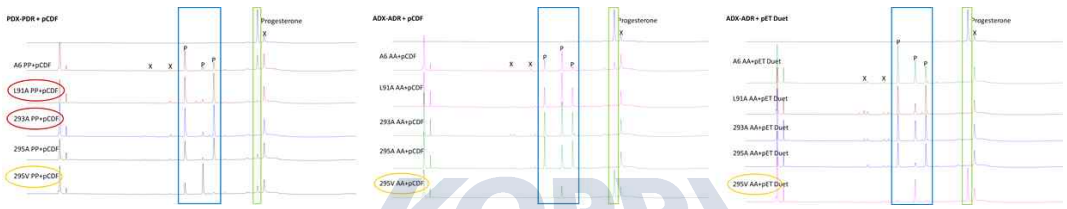


그림. R295A, S293A, L91A, R295V 효소의 in vivo assay

마. KOPRI 보유 미생물 및 저온성을 가지는 미생물 데이터베이스 구축 (선문대, 극지연)

1) 저온성을 바탕으로 의미 있는 미생물 기능 예측 가능한 모델 디자인

- 저온환경 유래 미생물의 유전체 관련 분석을 통하여 미생물이 분리되는 환경에 따라 CAZyme 패턴이 조금씩 다르다는 것을 확인하였음. 이에 대한 결과는 극지환경에 대한 적응과 관련된 특징에 대한 새로운 통찰력이라 할 수 있음. 극지환경에서 분리한 26개 균주의 CAZyme 패턴을 조사하였을 때, AA3, AA4, CE1, CE4, CE9, CE14, GH3, GH13, GH23, GT2, GT4, GT51, CBM48 families 관련 단백질 계열이 많이 조사되었음. 이러한 효소들은 대부분 자일란, 키틴, 팩틴 등 풀이나 이끼, 미역, 갑각류를 이루고 있는 다당류 계열에서 주로 활성을 보이는 효소 계열이며, 이러한 결과를 통하여 극지방에서 미생물이 살아남고 적응하기 위해서는 글루코오즈를 생성할 수 있는 CAZyme familiy를 보유하고 있어야 한다는 사실을 짐작 할 수 있었음. 이들은 이런 효소를 사용하여 주변의 환경에서 다당을 단당으로 분해하여 에너지로 바꾸어 적응하며 살 수 있다고 말할 수 있기 때문에 최근 이러한 결과를 정리하여 *Arthrobacter* sp. PAMC25564 균주의 유전체 분석과 저온적응에 관련된 과정에 대한 내용으로 최종적으로 BMC Genomics 저널에 출판하였음 (그림).

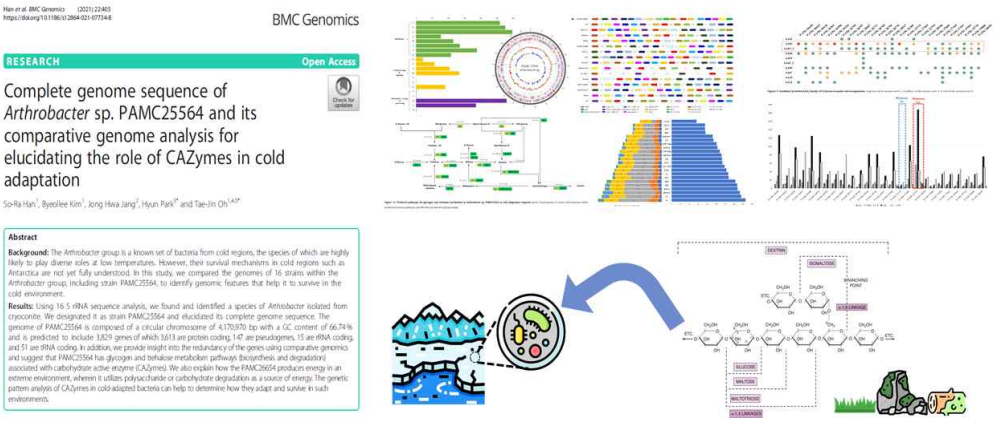


그림. *Arthrobacter* sp. PAMC25564 유전체 관련 논문

- 이런 특징으로 CAZyme 예측모델을 구축하여 좀 더 저온성을 가지는 균주의 유전체에 대한 색다른 특색을 더할 수 있을 것이라고 사료됨. 현재 dbCAN2, Hotpep 등 CAZyme 패밀리를 예측하는 모델들은 몇몇 존재하지만 결과 예상 관련해서 방법적으로 여전히 부족한 실정이며, CAZyme 특색에 따라 좀 더 디테일하게 예측할 수 있는 모델이 필요한 실정임. 따라서 각 CAZyme family가 가지는 K-mer를 사용하여 CAZyme sequence pattern을 예측하고 Conserved peptide pattern 단위로 CAZyme sequence pattern 예측 결과 등을 이용하여 모델을 구축 하였을 때 좀 더 CAZyme 특색을 포함하여 정확도가 높은 모델을 구축 할 수 있을 것이라 사료됨. 아직 모델에 대한 디테일이 좀 더 필요한 실정임. 이 모델을 시작으로 저온성을 가진 미생물 유전체를 활용하였을 때 다음과 같이 예측된 결과에 대해 새로움을 예측할 수 있을 것이라 사료됨 (그림).

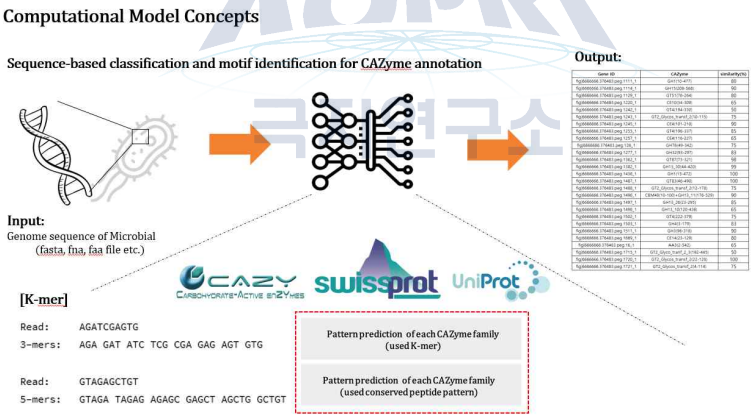


그림. CAZyme 예측을 위한 모델 모식도

2) 극지/해양 미생물의 저온 관련 다양한 대사 과정을 예측 할 수 있는 머신러닝을 활용한 모델 구축 (유전체 및 유전자, 전사체 분석 등 관련 데이터베이스를 활용할 예정)

- EC number는 단백질 서열과 관련해 효소의 화학반응과 연관시키는 역할을 나타냄. 번호는 4개의 자리로 구성되어 있으며 마침표를 이용해 구분하고 첫번째 자리에서 네번째 자리의 숫자는 각각의 클래스, 하위클래스, 최하위 클래스 및 기질의 일련번호 등을 나타냄. 결과적으로 4자리의 EC 번호가 있는 것은 효소의 역할이 확실하게 정해져 있는 ID라고 생각하기 때문에 EC number를 통해 효소의 기능을 예측하는 모델이 2002년 시작으로 현재까지 꾸준히 이용되며 업그레이드 되고 있음. 최근 본 연구팀은 컴퓨터 분야와의 융합 연구를 통해 EC number를 예측하는 딥러닝 모델을 UNLV 강민곤 교수팀과의 협업으로 구축하였음 (그림 28).

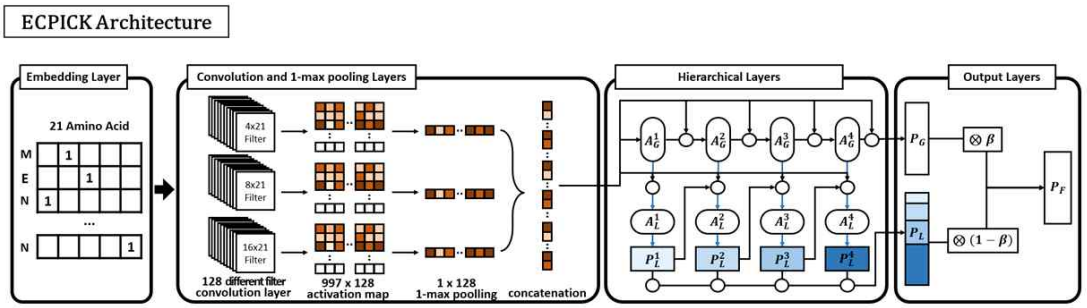


그림. 본 연구팀과 UNLV 강민곤 교수팀이 구축한 딥러닝 EC넘버링 모델 모식도

- ECPICK은 EC number Prediction using Interpretable CNN for Knowledge discovery의 줄임말로 Concolution Neural Network 기술과 Hierarchical classification layer 로 이루어진 모델임. Hierarchical classification layer은 EC number가 계층적 구조로 이루어져 있다는 점에 착안해 Hierarchical한 구조를 가지는 layer을 구성하게 되었으며, Global flow와 Local Flow로 이루어져 있음. 다양한 선행 연구들을 대상으로 비교 실험을 수행하였고, 실험 결과, 본 연구팀의 모델이 전 세계적으로 가장 많은 개수의 EC number를 예측 할 수 있었고, 무엇보다 가장 속도가 빠른 것을 증명하였음. 또한 현재 등록되어 있는 EC number를 가장 많이 예측할 수 있으며, 다양한 EC number를 예측할 수 있었음. 또한 사용자가 해석할 수 있는 범위를 보여줌으로써 사용자가 용이하게 원하는 연구 목적에 맞게 사용할 수 있을 뿐 아니라, 결과에 대해서도 신뢰할 수 있도록 구성하였음.

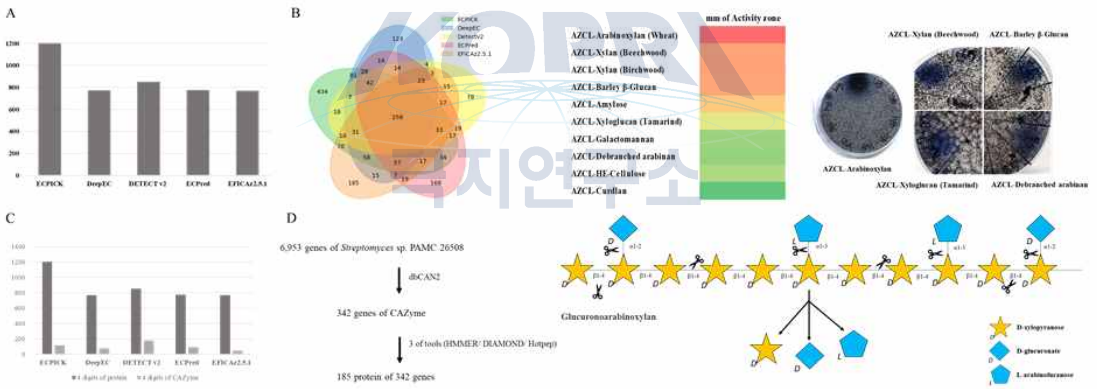


그림. ECPICK을 사용하여 *Streptomyces* sp. PAMC26508 유전체 특징 재분석

- ECPICK을 통해 그림 29와 같이 *Streptomyces* sp. PAMC26508 유전체 sequence를 test 데이터로 사용하여 각 단백질에 대해 기능을 EC number를 통해 예측하였으며, RAST 결과와 비교하고, 다른 EC number 예측 tool과도 비교하였음. 그 결과, EC number 전체 4자리 예측을 기준으로 하였을 때 1,201개로 가장 많이 EC number를 예측하였으며, 가장 다양하게 EC number를 예측하는 결과를 확인할 수 있었음. 또한 본 연구팀의 방법을 통해 CAZyme을 예측하였을 때 가장 최신의 EC number를 예측하는 결과와 Glucuronoarbinoxylan을 분해할 수 있는 pathway도 예측할 수 있는 결과를 얻을 수 있었음. 이러한 결과를 통해 저온을 특성으로 하는 미생물 유전체뿐만 아니라 다양한 효소에 대해 여러 특징을 예측할 수 있었음. 이러한 모든 결과는 현재 마무리 작업 중이며, 논문 작성 이후, 저널에 투고할 예정임.

3) 저온성을 특징으로 생합성 과정 및 관련효소의 기능·특성 데이터베이스 구축
(미생물·효소·기능·변형위치 등 다양한 조건을 기준으로 데이터 축적)

- 현재 극지연구소의 PAMC site(http://pamc.kopri.re.kr)에 등록된 미생물 종류에 대해 조사 하였을

때 남극에서 분리된 미생물과 북극에서 분리된 미생물의 개수와 종이 조금 다른 패턴을 보여주는 것을 알 수 있었음. 북극의 경우 실제로 분리된 미생물의 family를 조사해본 결과, Firmicutes에 속하는 미생물이 많이 분리된 사실을 알 수 있었으며, 남극에서는 Actinobacteria에 속하는 미생물이 많은 것을 사이트에서 수집한 결과에 의해 알 수 있었음. 따라서 본 연구팀은 그림의 모식도처럼 논문 중심과 극지연구소의 정보를 합쳐 새로운 저온관련 데이터베이스를 구축하고자 함. 이와 같은 DB를 구축하면 저온 관련 미생물을 비롯하여 메커니즘 유전자 까지도 예측하는데 용이할 수 있다고 사료됨.

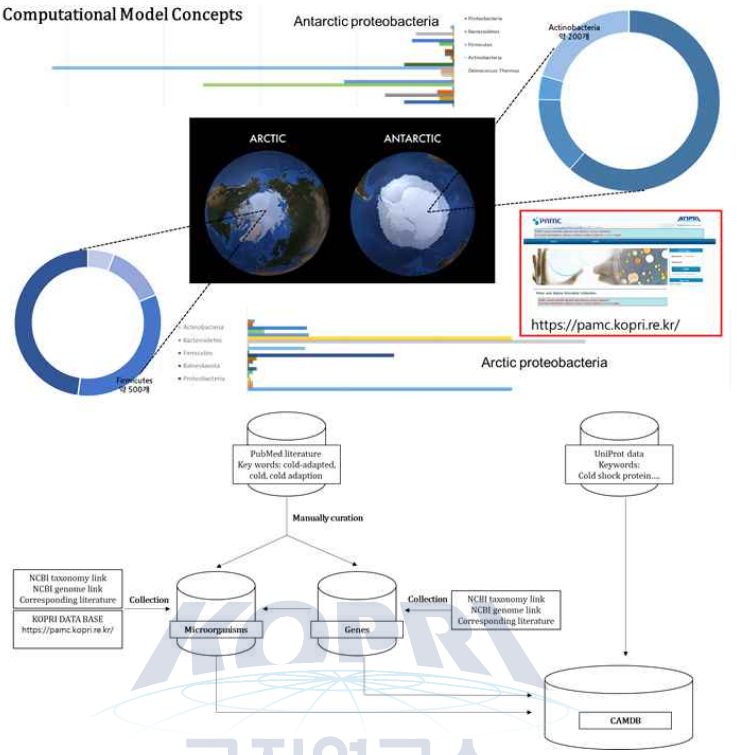


그림. 저온 특징과 관련된 데이터베이스 구축에 대한 모식도

- 또한 후속연구로 효소와 기질간의 상호작용을 예측하고 상호작용에 대해 중요한 아미노산 서열인 활성부위를 식별할 수 있는 해석 가능한 딥러닝 모델을 개발하려고 계획 중에 있음 (그림). 미생물의 제한된 데이터베이스의 한계를 해결하기 위해 학습데이터로 모든 생물에서 발견되는 효소의 DB를 활용할 계획이며, 효소의 잠재적 활성부위 식별을 통해 생합성에 사용되는 효소나 효소 특이적으로 기질에 사용할 수 있는 활성 부위를 식별할 수 있도록 효소-기질 모델을 구축할 예정임.

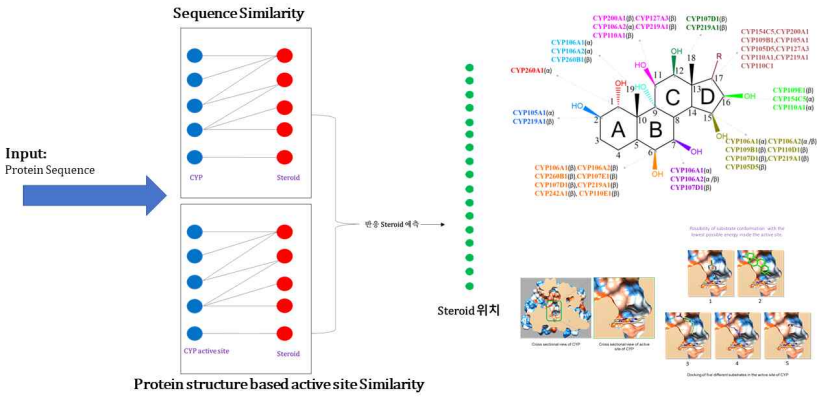
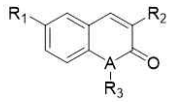


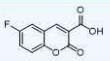
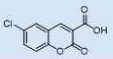
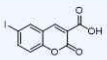
그림. 효소-기질 상호작용 예측 관련 후속연구에 대한 모식도

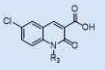
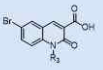
바. 1차년도 우수 항균활성물질(GB-20-AB-37) 코어의 유사 15종 이상의 유도체 코어의 제조 (가피바이오)

Derivatives Synthesis of Antibacterial Activity Core



A : N or O
R_1 : halogen (F, Cl, Br, I)
R_2 : Dihydroxy, (CH)n, other functional group
R_3 : H, (CH)n, other functional group

A : O comp.	
R_1	Derivatives
F	
Cl	
I	

A : N comp.				
R_2, R_3 \ R_1		F	Cl	Br
R_2	Carboxylic acid			
R_2	Dihydroxy			
R_3	(CH)n			
R_3	Other	R_3 : Piperidine, Piperazine, pyrimidine	 R_3 : Piperidine, Piperazine, pyrimidine	 R_3 : Piperidine, Piperazine, pyrimidine

MIC (ug/ml)				IC50 (ug/ml)			
	S. aureus	*E. coli*	*C. albicans*		*S. aureus*	*E. coli*	*C. albicans*
Kanamycin	50	10	-	Kanamycin	13.5	1.5±0.24	-
Nystatin	-	-	2	Nystatin	-	-	0.93±0.18
SC6	>104	>52	>52	SC6	>104	>52	>52
GB-20-AB-37	>500	>500	500	GB-20-AB-37	>500	>500	228±23
GB-20-AB-38	>500	>500	>500	GB-20-AB-38	207.4	>500	>500
GB-20-AB-47	>500	>500	>500	GB-20-AB-47	>500	>500	>500

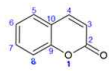
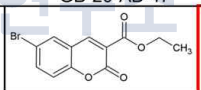
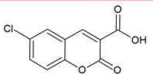
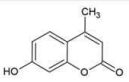
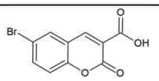
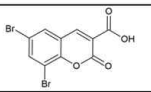
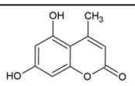
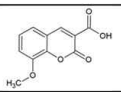
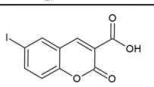
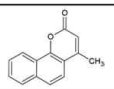
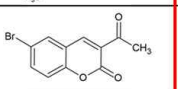
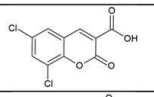
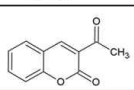
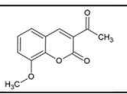
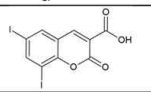
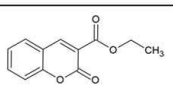
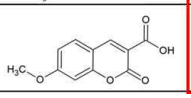
Coumarin		GB-20-AB-35		GB-21-AB-01	
GB-20-AB-01		GB-20-AB-37		GB-21-AB-02	
GB-20-AB-11		GB-20-AB-38		GB-21-AB-03	
GB-20-AB-19		GB-20-AB-39		GB-21-AB-04	
GB-20-AB-24		GB-20-AB-40		GB-21-AB-05	
GB-20-AB-25		GB-20-AB-47			

표. 우수활성 물질을 (GB-20-AB-37) 코어 구조로 하는 추가적인 유사체를 합성

1) 1차년도 우수 항균활성 물질에 (GB-20-AB-37) 대한 추가적인 MIC 측정을 실시하여 항균활성을 확인함.
2) 우수 항균활성 물질을(GB-20-AB-37) 바탕으로 추가적인 유사체를 합성하여 더 우수한 항균 활성 물질을 스크리닝함.
3) 고항균 활성 물질인 GB-21-AB-05와 가능성이 있는 Candida albicans 유래 Isomerase와의 결합

모델을 바탕으로 항균활성물질의 병원균 성장저해 메커니즘을 분석함.

4) GB-20-AB-37을 코어 구조로 하는 유사체 외, 추가적으로 N Compounds 10종(적색 박스)을 합성 완료하였으며 항균활성물질을 확인할 예정임. (GB-21-AB-06~15)

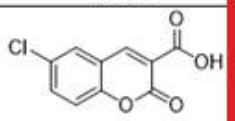
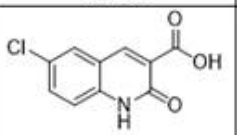
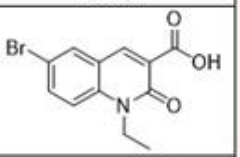
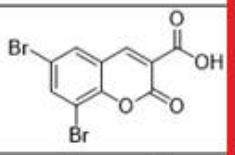
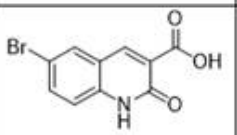
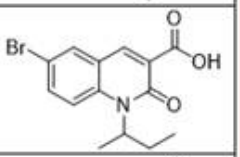
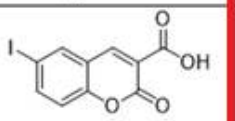
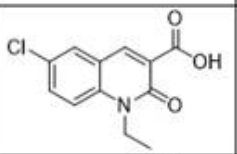
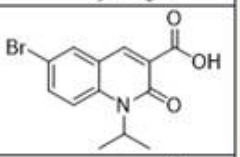
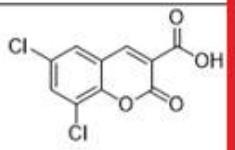
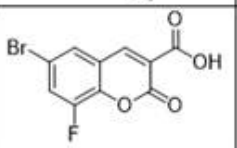
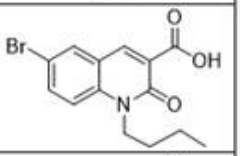
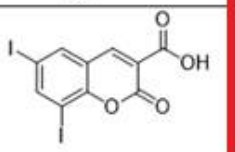
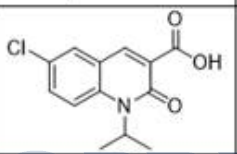
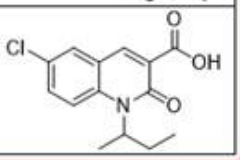
Name	Structure	Name	Structure	Name	Structure
GA-AB-21-01		GA-AB-21-06		GA-AB-21-11	
GA-AB-21-02		GA-AB-21-07		GA-AB-21-12	
GA-AB-21-03		GA-AB-21-08		GA-AB-21-13	
GA-AB-21-04		GA-AB-21-09		GA-AB-21-14	
GA-AB-21-05		GA-AB-21-10		GA-AB-21-15	

표. 추가 합성된 O Comps와 N Comps.

KOPRI 극지연구소

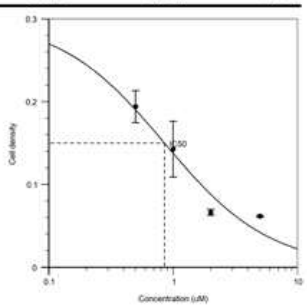
우수항균 활성 쿠마린 유도체 GB-21-AB-05

IC50 value of 21-05 compound against *C. albicans*

Nystatin (Positive control)

Concentration (uM)	Cell density 1	Cell density 2	Cell density 3
0	0.257	0.275	0.364
0.5	0.24	0.162	0.18
1	0.108	0.095	0.225
2	0.059	0.066	0.074
5	0.06	0.064	0.061

IC50 0.85±0.02 uM



21-05 compound

Concentration (uM)	Cell density 1	Cell density 2	Cell density 3
0	0.342	0.18	0.325
10	0.187	0.125	0.365
20	0.175	0.226	0.266
50	0.178	0.266	0.146
100	0.139	0.173	0.08

IC50 107.1±0.06 uM

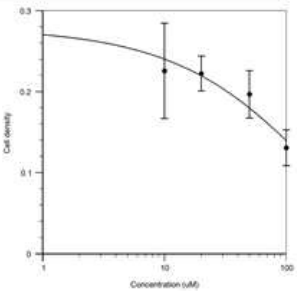


그림. 고항균 활성 물질인 (GB-21-AB-05)에 대한 IC50 측정 및 Nystatin과의 비교 결과.

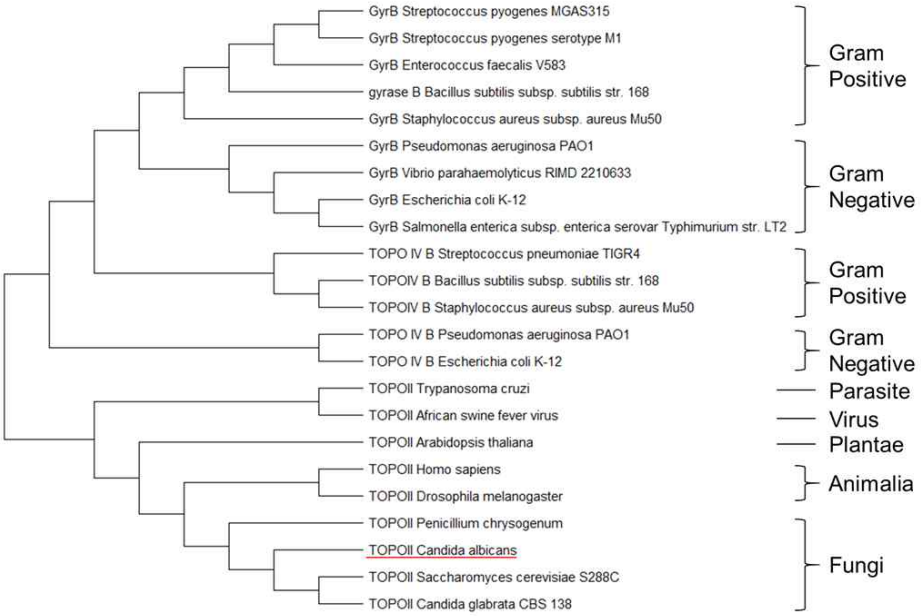


그림. *Candica albicans* 유래 isomeras와 다른 생물 종에서 유래하는 siomerase와의 서열 유사도를 나타내는 Phylogenetic tree

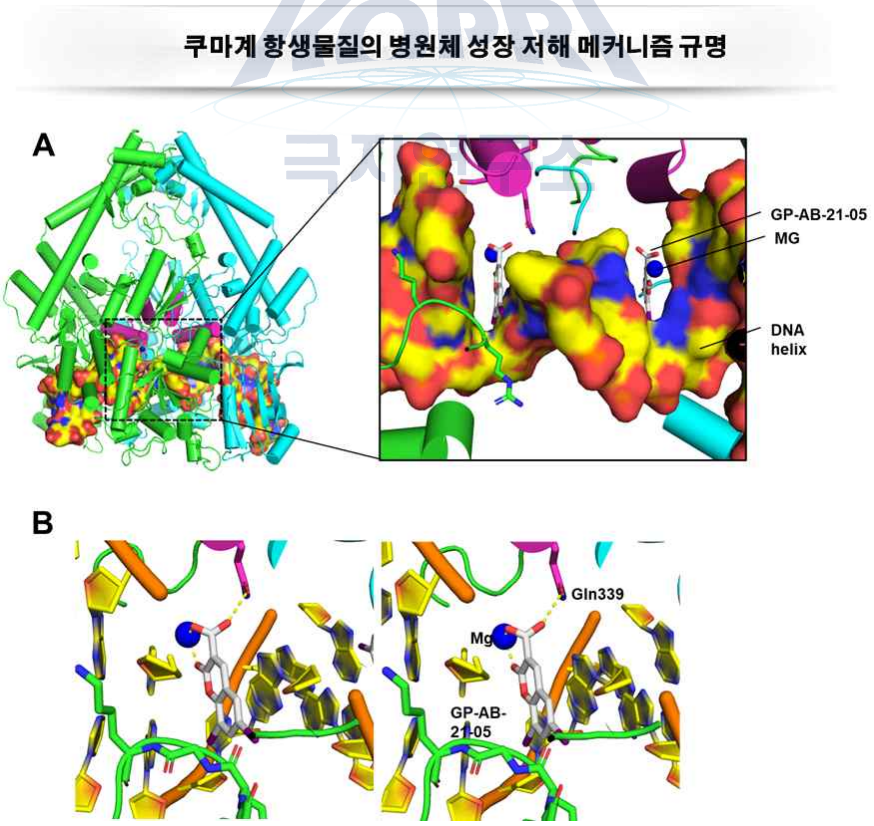


그림. 고항균 활성 물질인 (GB-21-AB-05) 와 siomerase 결합 모델.

- 고항균 활성 물질인 (GB-21-AB-05)와 가능성이 있는 *Candida albicans* 유래 Isomerase와의 결합 모델을 바탕으로 항균활성물질의 병원균 성장저해 메커니즘을 분석함.
- 결합 모델을 바탕으로 항균물질(GB-21-AB-05)이 *Candida albicans* 유래 Isomerase와 결하하는지

증명하기 위해 *Candida albicans*유래 TOPOII-isomerase를 클로닝하여 발현 정제함.

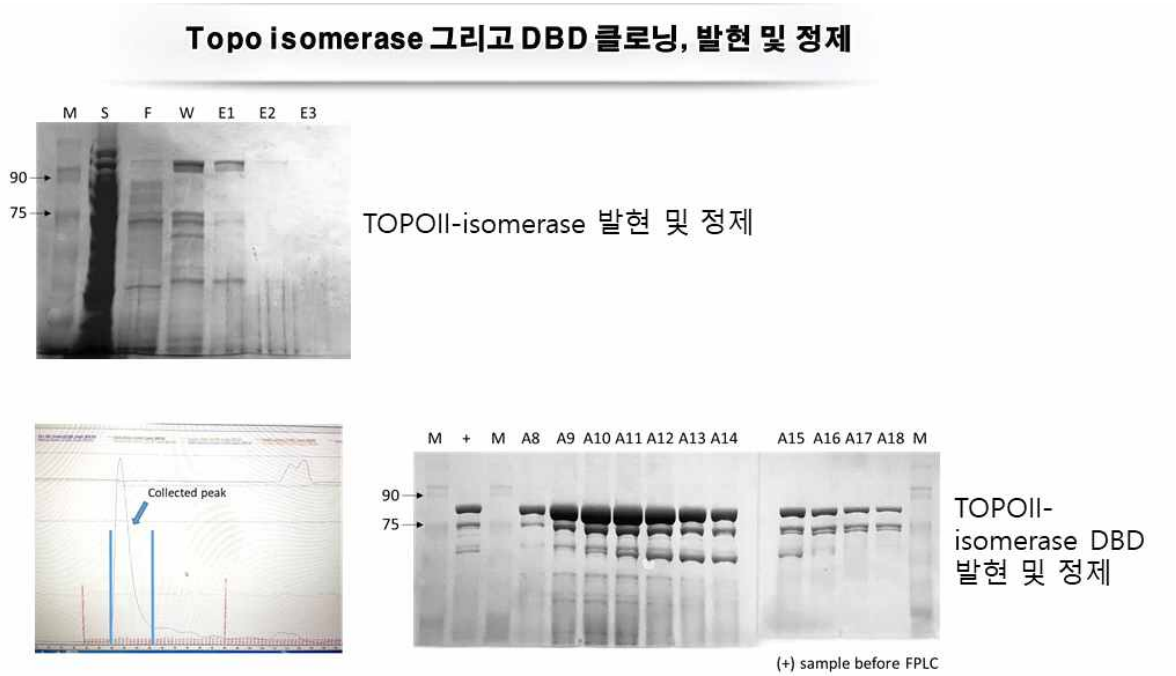


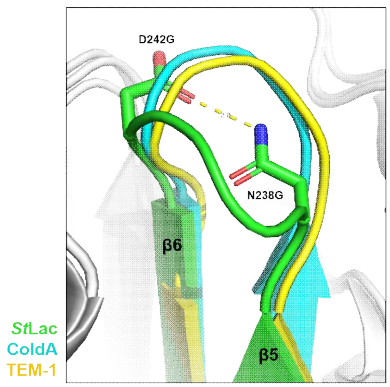
그림. 고항균 활성 물질인 (GB-21-AB-05)와 결합가능한 TOPOII-isomerase 그리고 DBD 발현, 정제 결과

<4세부> 항생물질 타겟 단백질 발현 및 정제조건

가. 항생물질 타겟 단백질 발현 및 정제조건 확립 (이화여대)

1) *Senotrophomonas* sp. KCTC 12332에서 유래 class A β-lactamase, *St*Lac 돌연변이 설계 및 확보

- *St*Lac와 다른 class A β-lactamase의 구조를 비교했을 때, *St*Lac의 β5-β6 loop은 가장 큰 구조적 차이를 가지고 있음. 아미노산 서열 비교를 통해, *St*Lac 단백질의 경우 *Mm*Lac, PSE-4, TEM-1, SHV-1, CTX-M-14, PenL와 같은 G-x-x-G motif가 아닌 N-x-x-D motif를 가짐을 확인함. *St*Lac 단백질의 β5-β6 loop에 있는 N238과 D242는 수소결합을 형성하고 있음. 따라서 N-x-x-D를 G-x-x-G로 돌연변이 시킨 *St*Lac^{N238G,D242G} mutant는 *St*Lac의 β5-β6 loop이 활성에 미치는 영향을 원자 수준에서 분석할 수 있을 것으로 기대됨.
- 1차년도에 확보한 *St*Lac의 wild type 유전자로부터 site directed mutagenesis를 통해 해당 돌연변이 유전자가 삽입된 벡터를 확보함.



β-lactamase	β5-β6 loop	
***St*Lac**	NGQD	NXXD
L2	NGED	
ColdA	GGNG	GXXG
PSE-4	GGFG	
TEM-1	GERG	
KPC-2	GVYG	
SHV-1	GERG	
CTX-M-14	GDYG	
PenL	GDYG	

그림. Class A β-actamase의 β5-β6 loop 구조(*St*Lac;초록, ColdA;하늘, TEM-1;노랑)(좌) 및 아미노산 서열비교표(우)

2) *St*Lac^{N238G,D242G} 돌연변이 단백질 발현 및 정제조건 확립

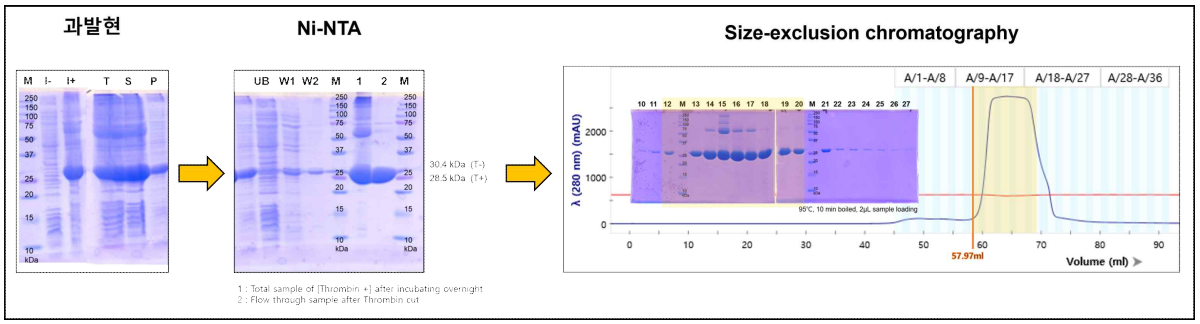
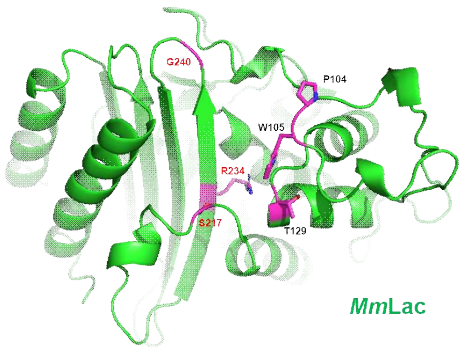


그림. *St*Lac^{N238G,D242G} 돌연변이 단백질 정제 과정

- *E.coli* BL21(DE3)를 숙주로 25℃에서 16시간 배양하며 0.5mM 농도의 Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside (IPTG)로 가용성 과발현을 유도함.
- 가용화된 상태의 *St*Lac^{N238G,D242G} 돌연변이 단백질을 고순도로 정제하기 위하여 Ni-NTA chromatography 및 size-exclusion chromatography와 같은 정제과정을 거침. Ni-NTA chromatography 정제과정에서 Thrombin protease를 이용하여 타겟 단백질에 존재하는 6*His-tag을 제거한 후, 20mM Tris, 200mM NaCl (pH 8.5) 조성의 버퍼를 이동상으로 size exclusion chromatography를 진행하여 90% 이상의 고순도 단백질을 리터당 약 6 mg 확보함.

3) 저온성 해양 미생물인 *Moritella marina* ATCC15381 유래 class A β-lactamase, *Mm*Lac 돌연변이 설계 및 확보.

- *Mm*Lac 단백질은 저온성 β-lactamase로 기질 스펙트럼이 넓지 못함.
- TEM-1 β-lactamase와의 활성부위에 대한 구조 비교를 통해 구조적 차이가 발생하는 여섯 부위의 residue를 확보하였고 여섯 부위 중 다른 class A β-lactamase와의 구조·서열 비교를 통해 돌연변이 부위 3개를 선정함. 최종적으로 선정한 3개의 부위 (Ser217, Arg234, Gly240)를 TEM-1 단백질의 서열과 일치하도록 각각 Ala, Lys, Glu로 돌연변이 시킨 *Mm*Lac^{S217A,R234K,G240E} mutant를 설계함(그림).
- 따라서 S217, R234, G240 residue가 *Mm*Lac 단백질 활성에 미치는 영향을 원자 수준에서 분석할 수 있을 것으로 기대됨.
- 1차년도에 확보한 *Mm*Lac의 wild type 유전자로부터 site directed mutagenesis를 통해 *Mm*Lac^{S217A,R234K,G240E} 돌연변이 유전자가 삽입된 벡터를 확보함.



No	β-lactamase	PDB code	104	105	129	217	234	240
1	***Mm*Lac**		P	W	T	**S**	**R**	**G**
2	PSE-4	1G68	T	Y	T	T	R	G
3	6693		S	H	I	G	K	G
4	L2	1N4O	S	H	T	G	K	G
5	TEM-1	1M40	E	Y	M	A	K	E
6	KPC-2	2OV5	P	W	Y	G	K	V
7	SHV-1	4ZAM	D	Y	M	A	K	E
8	CTX-M-14	1YLT	N	Y	Y	G	K	D
9	PenL	5GL9	R	Y	Y	G	K	D
						G or A	K	E or D

그림. *Mm*Lac의 3차 구조(초록)와 6개의 residue(분홍)(좌) 및 돌연변이 설계를 위한 서열 비교 목록(우)

4) *Mm*Lac 돌연변이 단백질 발현 및 정제조건 확립

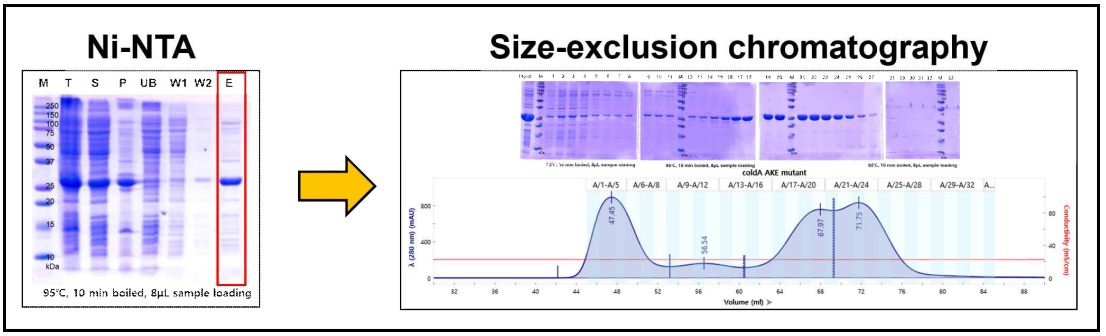


그림. *Mm*Lac^{S217A,R234K,G240E} 돌연변이 단백질 정제 과정

- *E.coli* BL21(DE3)를 숙주로 15℃에서 23시간 배양하며 0.5mM 농도의 Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside (IPTG)로 가용성 과발현을 유도함.
- 가용화된 상태의 *Mm*Lac^{S217A,R234K,G240E} 돌연변이 단백질을 고순도로 정제하기 위하여 Ni-NTA chromatography 및 size-exclusion chromatography 정제과정을 거침. Ni-NTA chromatography 정제과정에서 니켈에 결합한 타겟 단백질은 최종 200mM 농도의 imidazole을 이용하여 Isocratic Elution을 통해 정제됨.
- 20mM Tris, 200mM NaCl (pH 8.5) 조성의 버퍼를 이동상으로 size exclusion chromatography를 진행하여 95% 이상의 고순도 단백질을 리터당 약 4 mg 확보함.

5) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MR*SA*) 유래 HMG-CoA reductase (HMGR) 발현 및 정제 조건 확립

- 1차년도에 미생물의 mevalonate pathway 조절에 필수적인 HMGR을 신규 항생제 개발의 표적 단백질로 선정하고, HMGR 유전자가 삽입된 벡터를 확보함.
- 대장균 발현 시스템을 이용하여 발현 온도 및 isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 농도 조절을 통해 단백질이 가용화된 상태로 발현되는 조건을 확립함.
- 가용화된 상태의 HMGR 단백질을 고순도로 정제하기 위하여 Ni-NTA chromatography, blue affinity chromatography 및 size-exclusion chromatography의 세 단계 정제과정을 거침(그림).

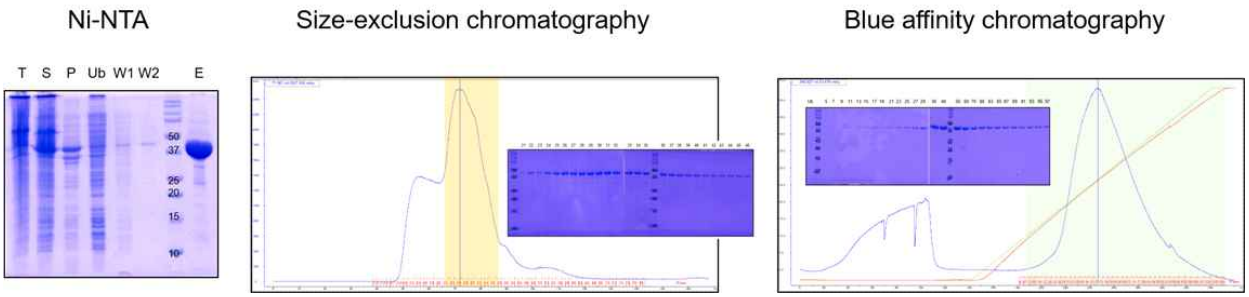
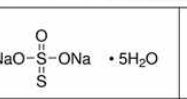
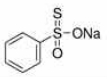
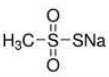
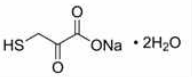
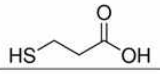
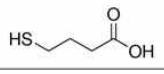
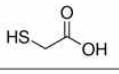
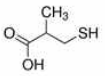


그림. *Mm*Lac^{S217A,R234K,G240E} 돌연변이 단백질 정제 과정

나. 항생제 변형 타겟 단백질 3차 구조 규명 (이화여대) (극지연, 중앙대 참여)

1) Sulfurtransferase (극지연, 구조규명 및 분석, 유사체 생합성 기초연구 진행)

- 극지유래 변형효소를 확보하고 기존에 알려진 항생제를 백본으로 하여 다양한 유사체를 만들기 위한 전략으로 새로운 항생물질 변형 효소를 발굴하는 목적으로 진행함. 변형 효소에 대한 구조 분석을 통해 항생제 유사체의 생합성에 대한 기초 지식 제공.
- 극지유래 *Frondihabitans* sp.에서 유래한 항생 물질 변형효소 중 하나인 Sulfurtransferase의 구조를 1.9 Å 해상도로 규명함.
- 구조 및 생화학적 분석을 통해서 항생제 유사체를 생합성하기 위한 기초 연구를 진행함.

			
Sodium thiosulfate pentahydrate	Benzenethionosulfonic acid sodium salt	Sodium methanethiosulfonate	Sodium mercaptopyruvate dihydrate
			
3-Mercaptopropionic acid	4-mercaptobutyric acid	Thioglycolic acid	2-Methyl-3-sulfanylpropanoic acid

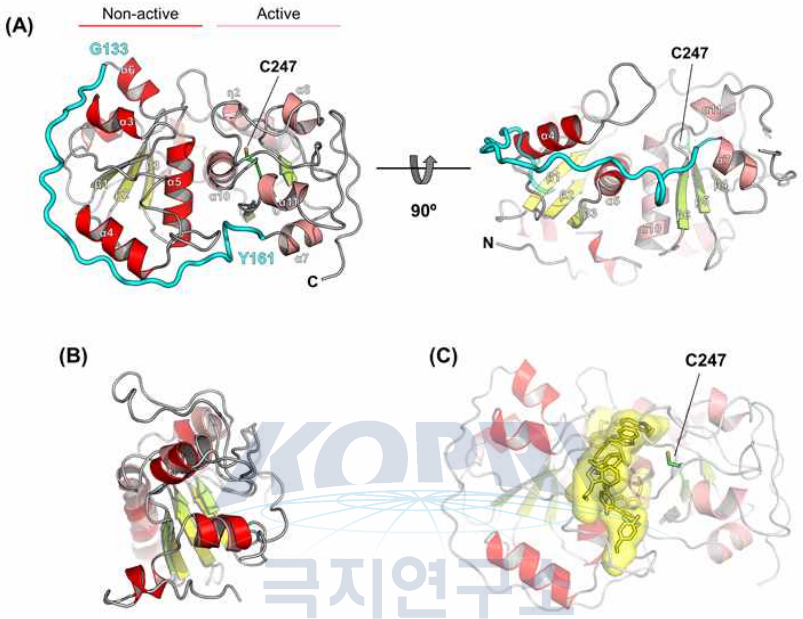


그림. Sulfurtransferase의 기질 종류 및 구조

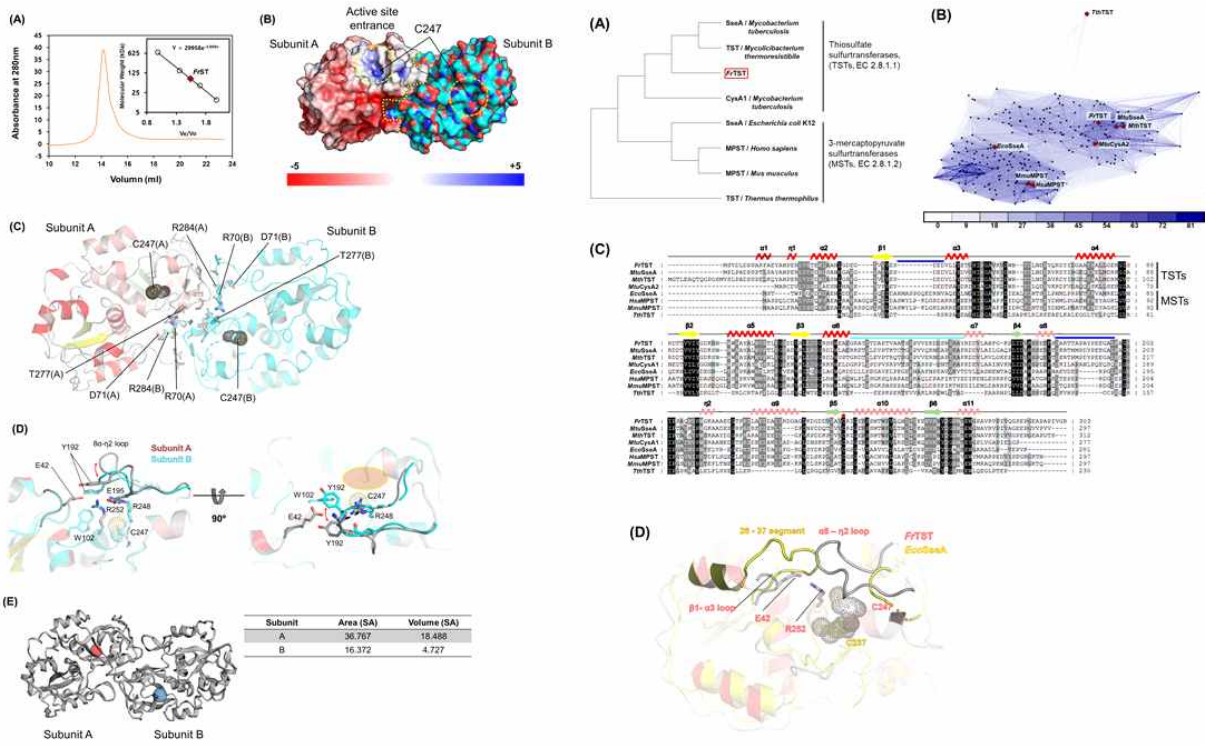


그림. Sulfurtransferase와 상동 단백질간의 아미노산 서열 분석

2) *Sphingomonas echinoides* 유래 물질 변형 효소 중 하나인 CytochromeP450의 구조를 1.9 Å 해상도로 규명함.

- 새로운 기질에 대한 구조 및 반응 메커니즘을 연구하여 항생제 변형에 적용 가능성을 알아보는 Bioinformatics 분석을 실시함.

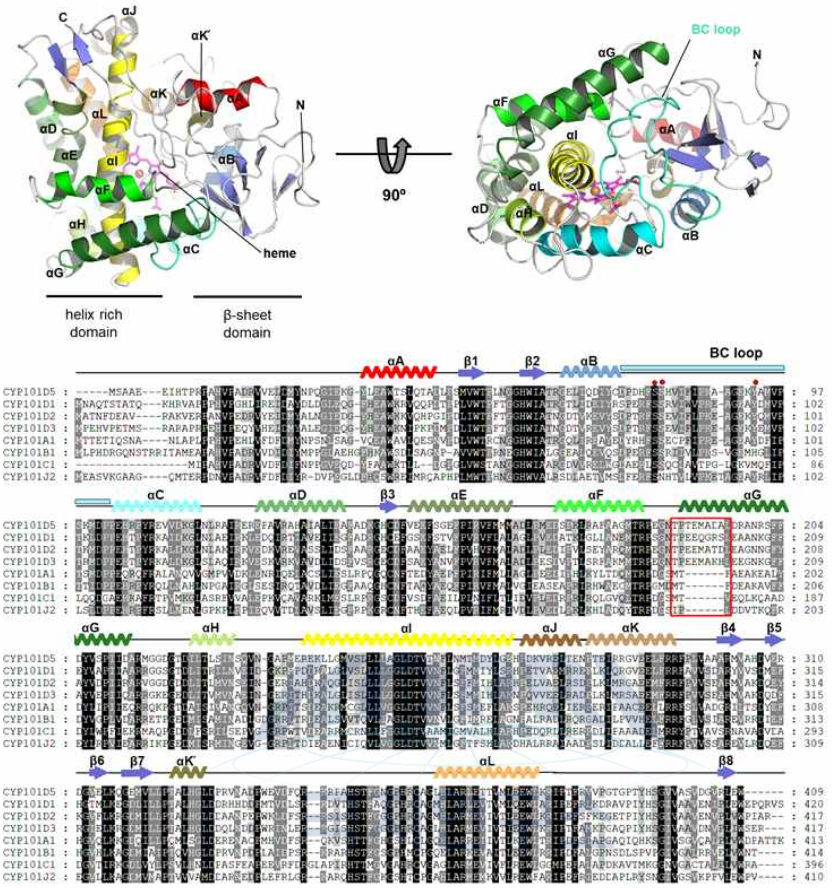


그림. 물질 변형 효소인 cytochromeP450 구조 및 유사 단백질과의 서열 분석 결과.

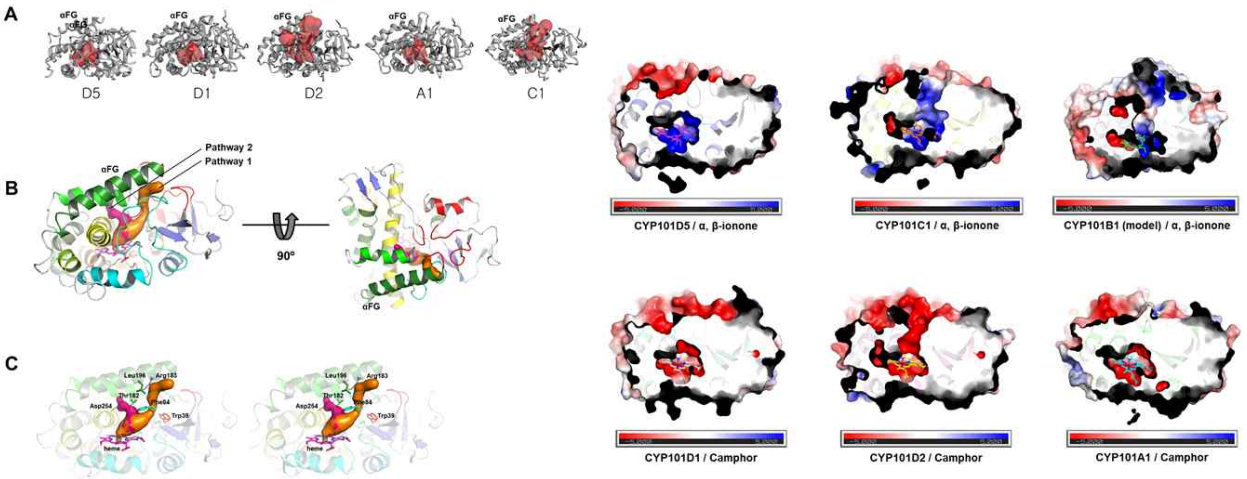


그림. 물질 변형 효소인 cytochromeP450의 기질 결합 특성을 유사 단백질과 비교 분석한 결과

3) 스테로이드 화합물의 변형에 사용가능 한 7α-hydroxysteroid dehydrogenase 효소의 구조변화 연구 (J Steroid Biochem Mol Biol. 2021 Sep;212:105945.) (극지연, 선문대)

- Eco-7α-HSDH 효소는 스테로이드 계열 항생물질 구조 변형에 사용되어질 수 있음

- 기질과 조효소가 결합되어 있지 않은 Eco-7α-HSDH 효소에서의 β4-α4 loop, α7-α8 helices, 와 C-terminus loop 부분의 구조변화 확인
- 기질과 조효소가 결합되지 않은 Eco-7α-HSDH 효소의 구조와 기질이 결합된 또는 기질과 조효소가 같이 결합된 Eco-7α-HSDH 효소 구조들간의 비교를 통해 기질과 조효소 도무가 결합되었을 때 완전히 닫혀진 구조 형태를 가진다는 사실 규명. 조효소만 결합 했을 때는 open form 또는 semi-closed form을 가짐

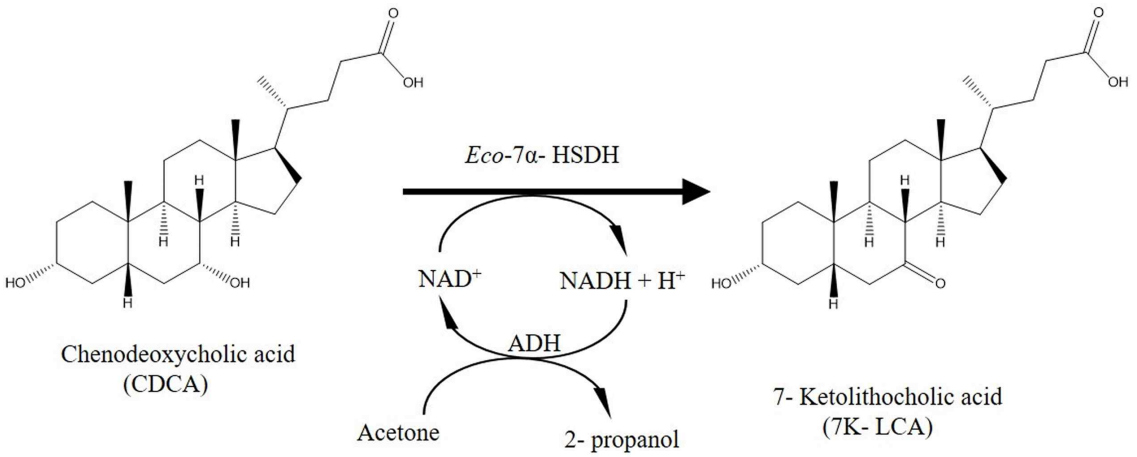


그림. Eco-7α-HSDH 효소의 CDCA 기질에 대한 반응 메카니즘

KOPRI
극지연구소

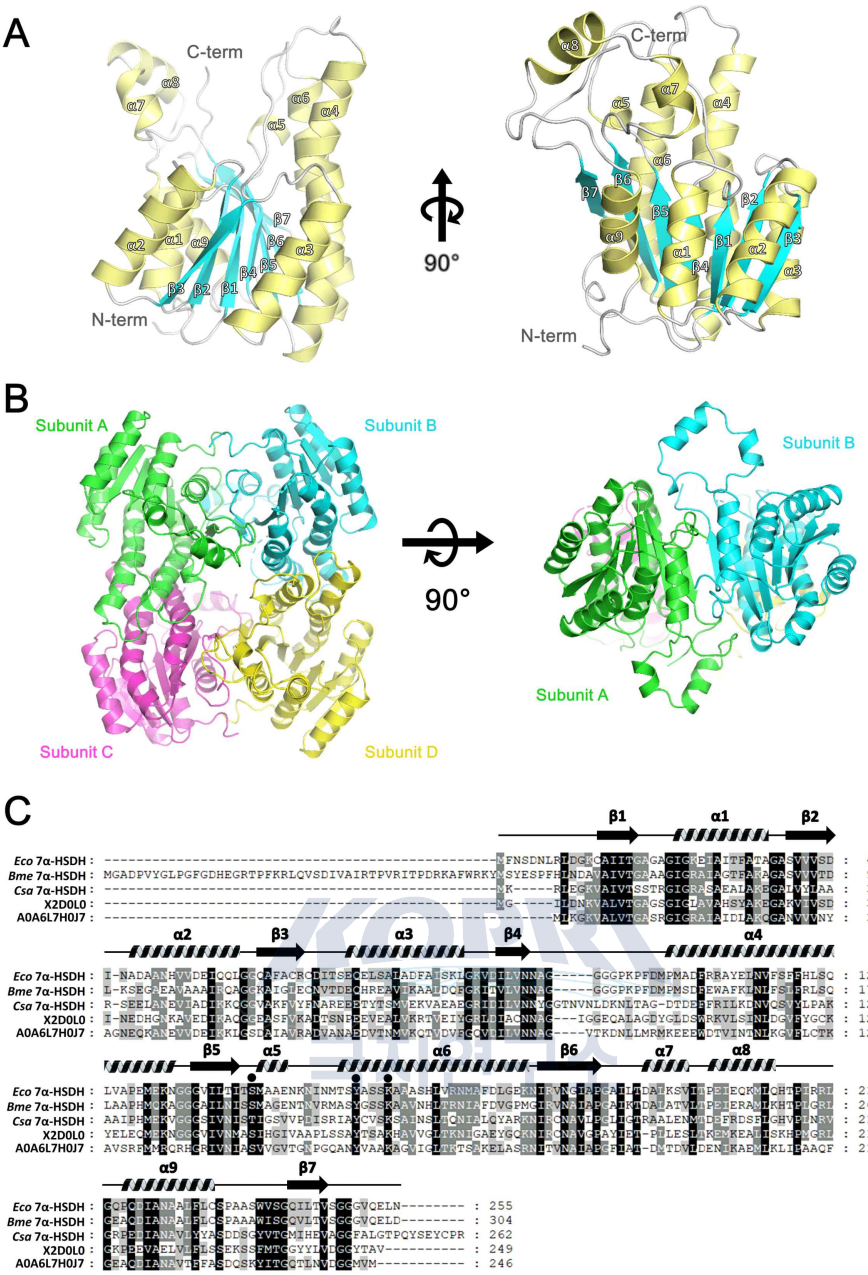


그림. Eco-7α-HSDH 효소의 구조 모습. Eco-7α-HSDH 효소는 용액 상에서 tetramer를 이룸

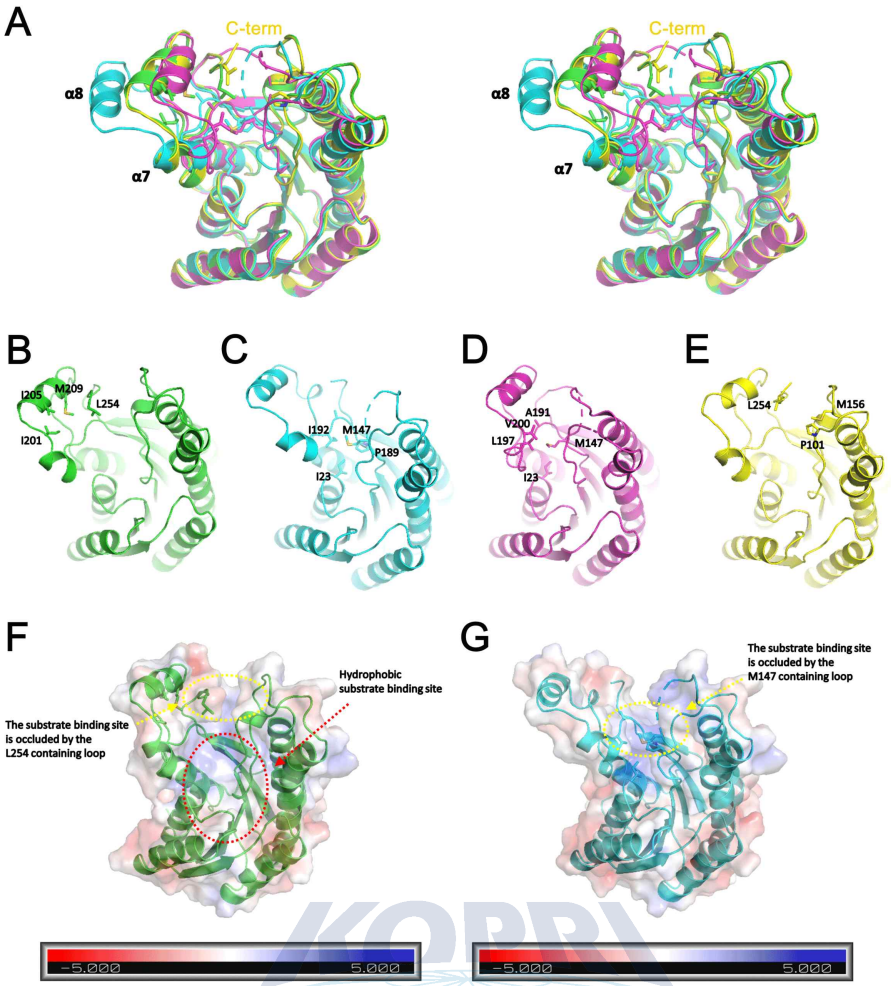


그림. Eco-7α-HSDH 효소의 구조에서 tetramer를 이루는 각각의 subunit 구조비교

KOBRI
극지연구소

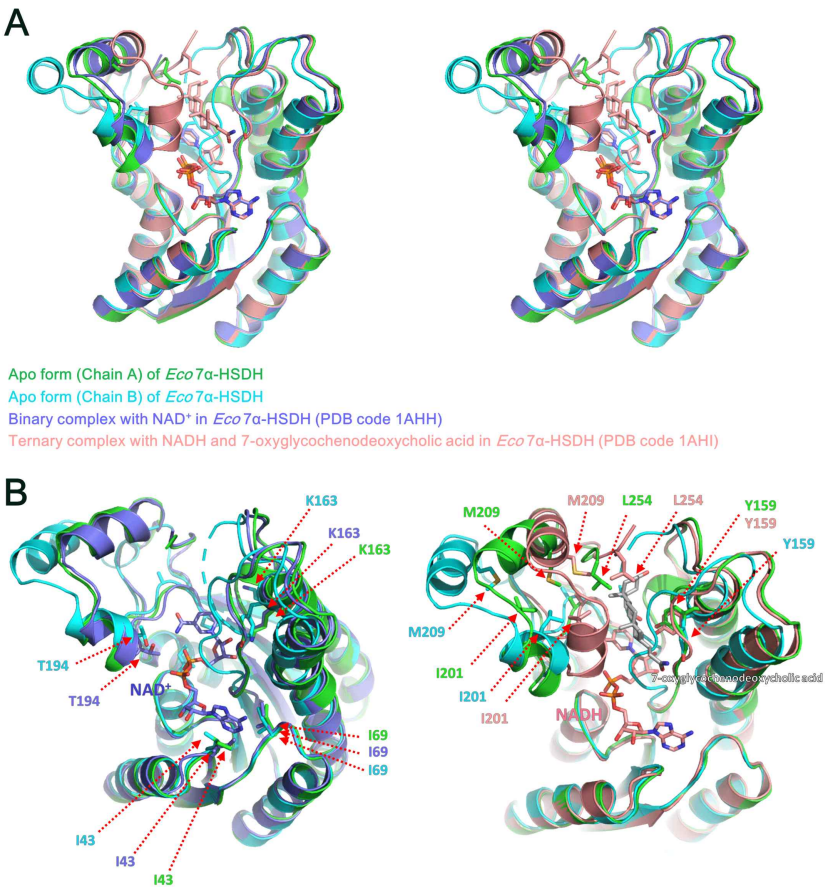


그림. 기질과 조효소가 결합되지 않은 Eco-7α-HSDH 효소의 구조와 기질이 결합된 또는 기질과 조효소가 같이 결합된 Eco-7α-HSDH 효소 구조들간의 비교

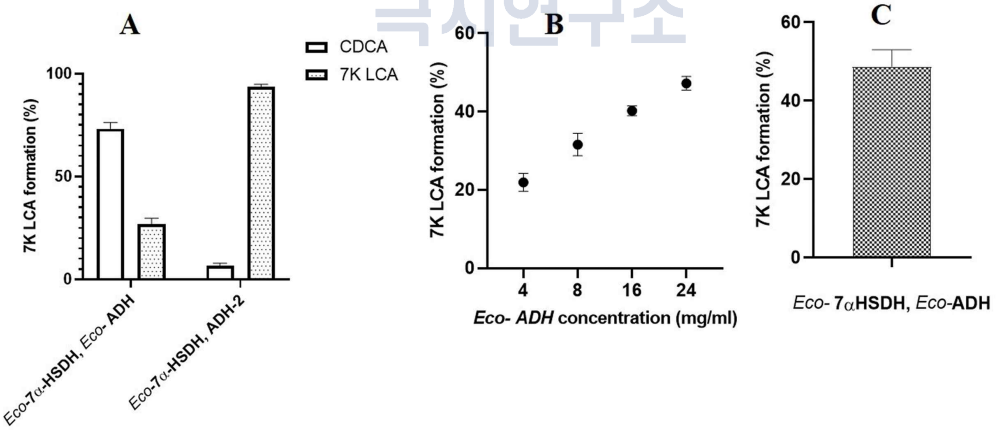


그림. CDCA 기질에 대한 Eco-7α-HSDH 효소의 활성확인

4) 과산화수소 저항성을 가지는 CYP105D18 효소의 구조 및 기능 연구: 파파베린 약물의 N-oxidation 변형에 사용 (IUCrJ. 2021 Jun 29;8(Pt 4):684-694.) (극지연, 선문대)

- CYP105D18 효소는 항생물질 질소원자 부위의 수산화 잔기 추가에 사용되어질 수 있음
- CYP105D18 효소와 파파베린이 결합된 복합체 구조해석
- CYP105D18 효소와 파파베린의 강한 결합은 중간에 flexible 하게 휘어질 수 있는 구조형태를 가지기 때문인 것을 발견

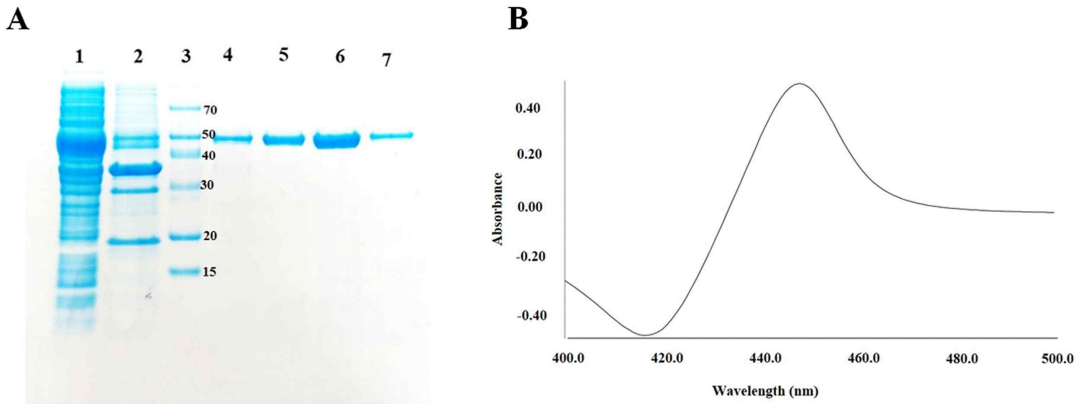


그림. CYP105D18 효소의 정제과정 중 순도를 확인 한 SDS-PAGE 실험결과, 정제 후 449 nm파장에서 흡광을 나타내는 CYP105D18 효소 단백질

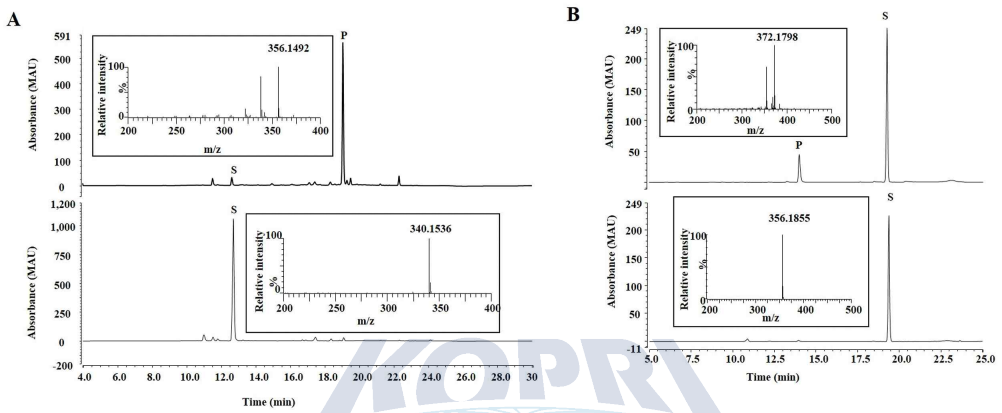


그림. HPLC 분석 결과 (A) papaverine, (B) tetrahydropalmatine 기질을 이용

KOPRI 극지연구소

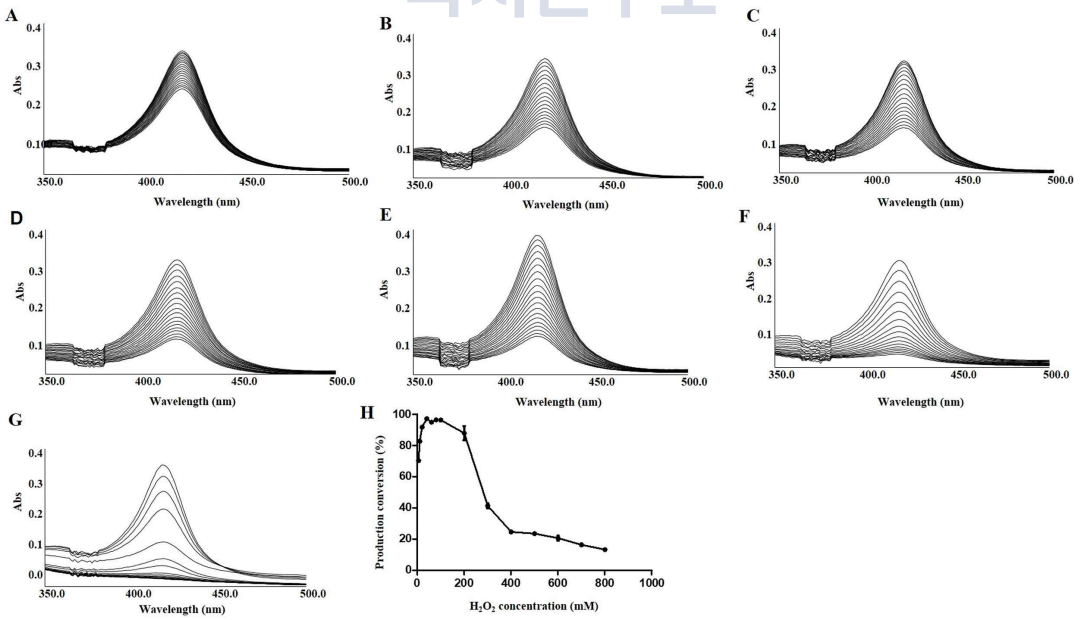


그림. 다른 H2O2 농도에 대한 CYP105D18 효소의 Heme 산화 모습. (a) 1mM, (b) 5mM, (c) 10 mM, (d) 20 mM, (e) 40mM, (f) 100 mM and (g) 200 mM H2O2.

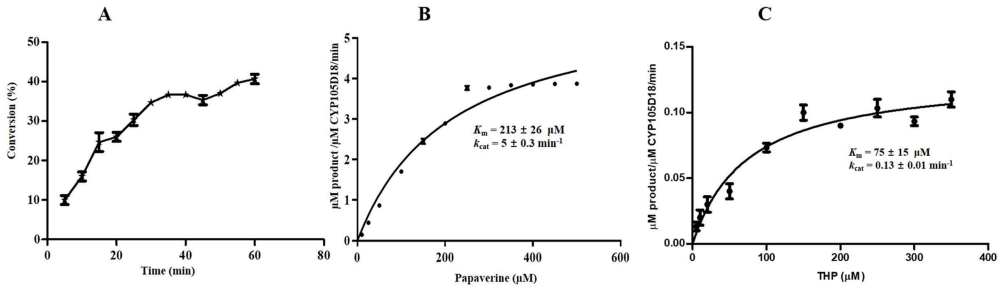


그림. 40 mM H2O2 농도에서 CYP105D18 효소가 papaverine 기질을 papaverine N-oxide 생성물을 만드는 활성 측정

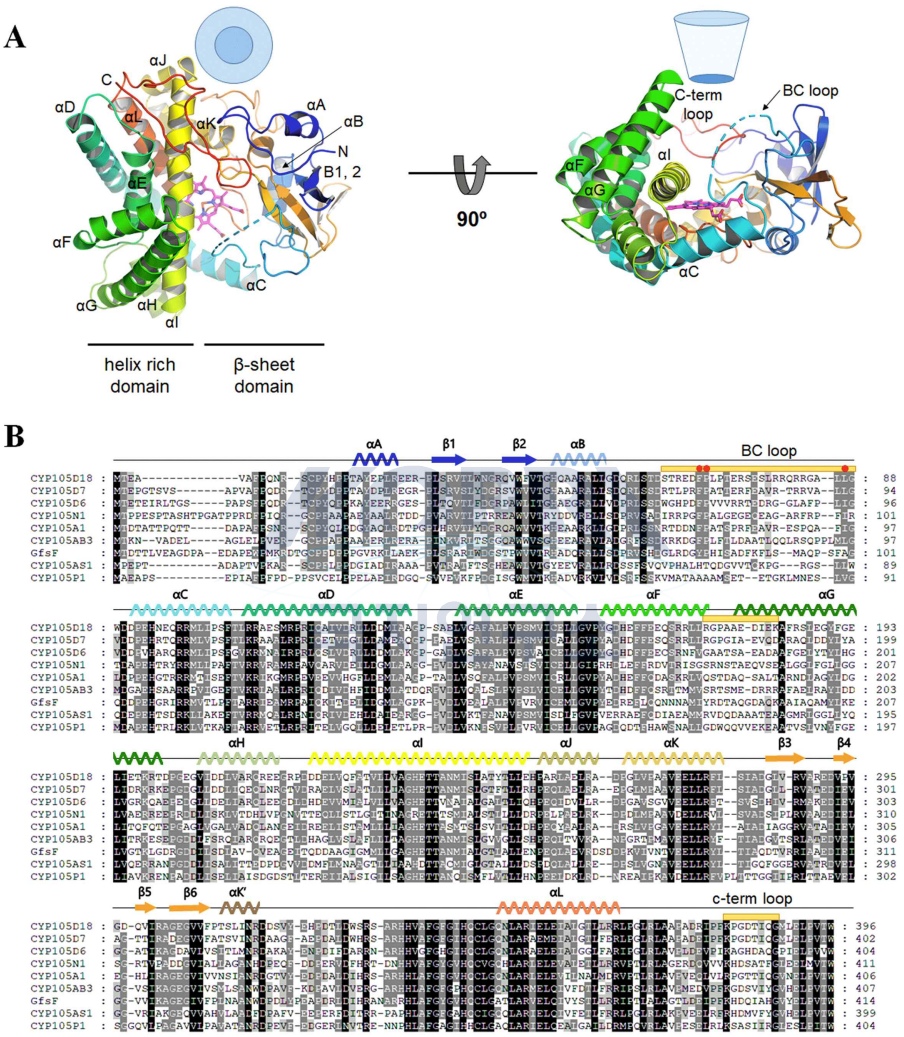


그림. CYP105D18 효소의 삼차구조 모습과 유사 다른 단백질 서열과의 비교

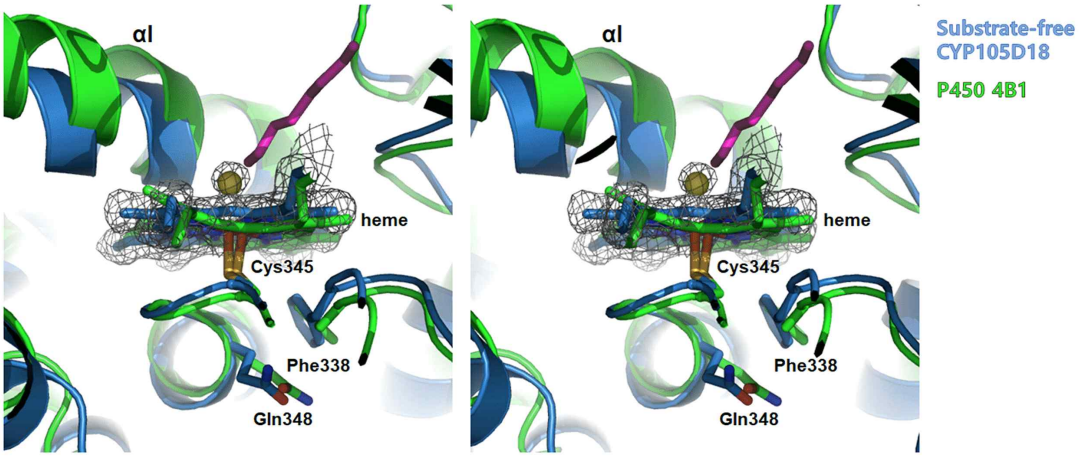


그림. 과산화수소 저항성을 가지는 CYP105D18 효소의 삼차구조와 비슷한 과산화 수소 저항성을 가지는 rabbit P450 4B1 구조 비교 모습. 두 단백질이 공통적으로 가지는 Gln잔기와 Phe 잔기가 과산화 수소 저항성에 관여할 것으로 생각됨

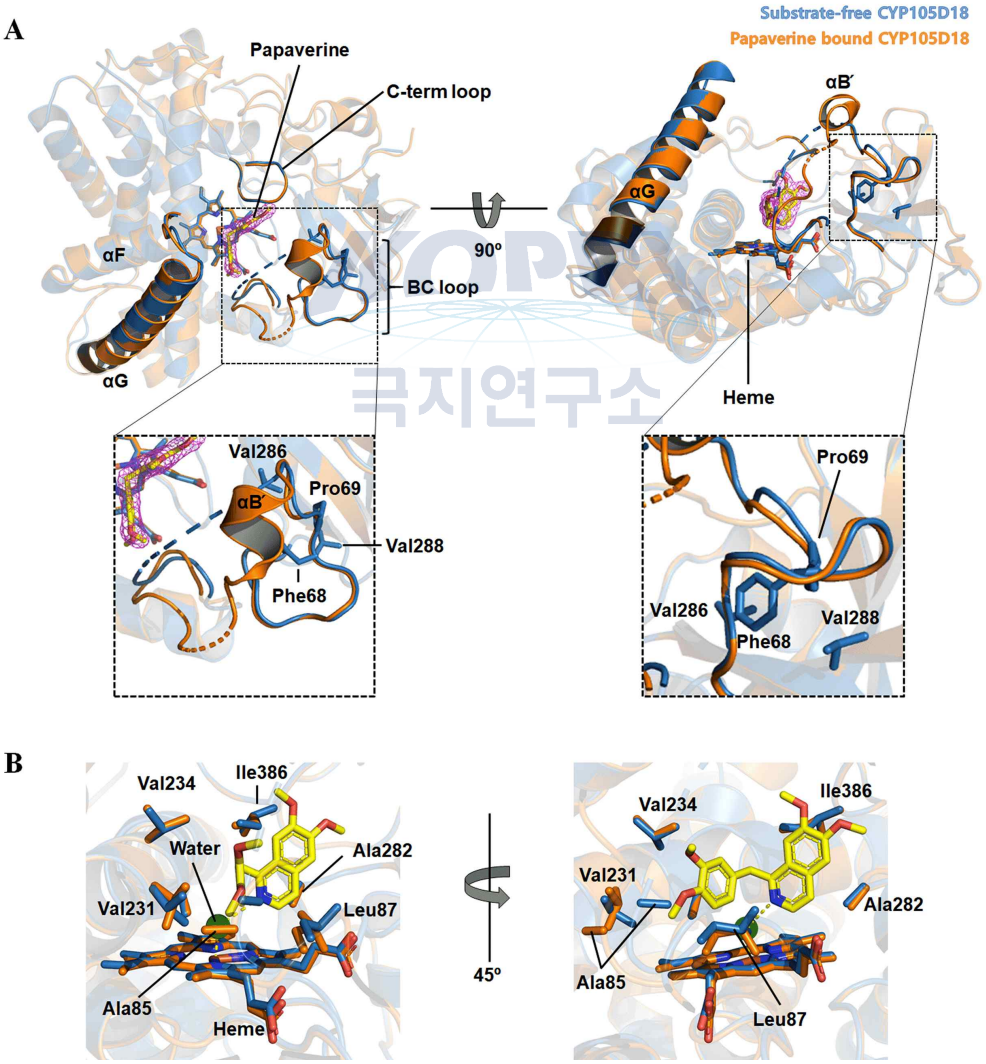


그림. 기질이 결합되어 있지 않은 CYP105D18 효소의 구조와 파파베린이 결합된 복합체 CYP105D18 구조의 비교

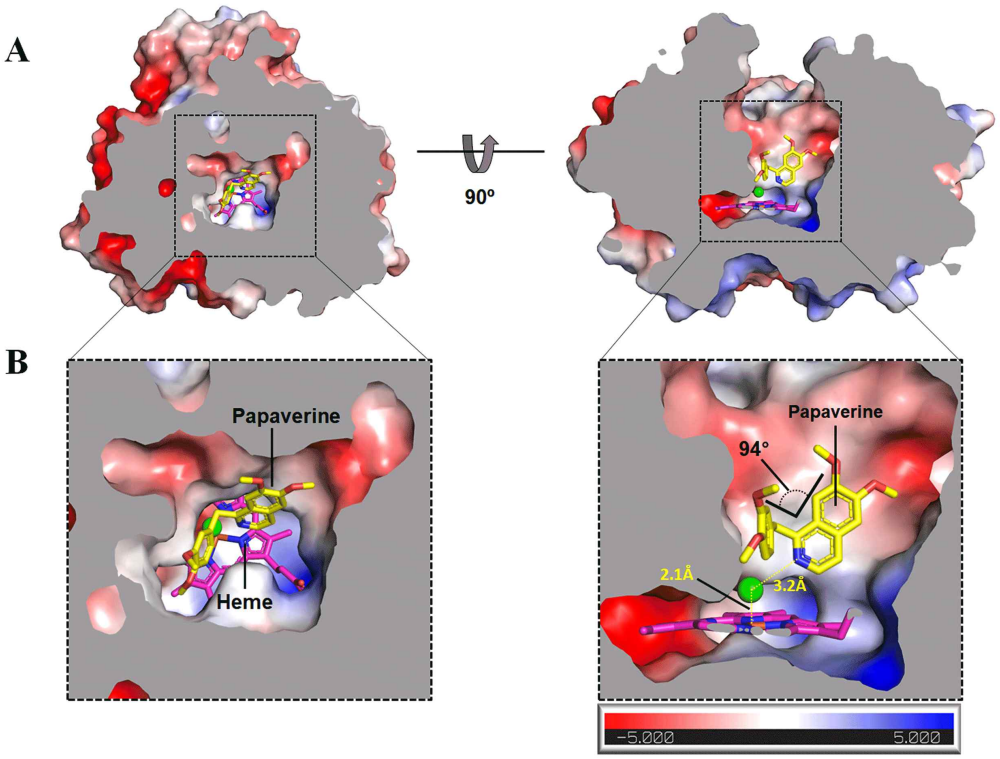


그림. CYP105D18 효소와 기질인 파파베린이 결합할 때 파파베린이 약 94도의 각도를 가지며 벤딩 하게 됨

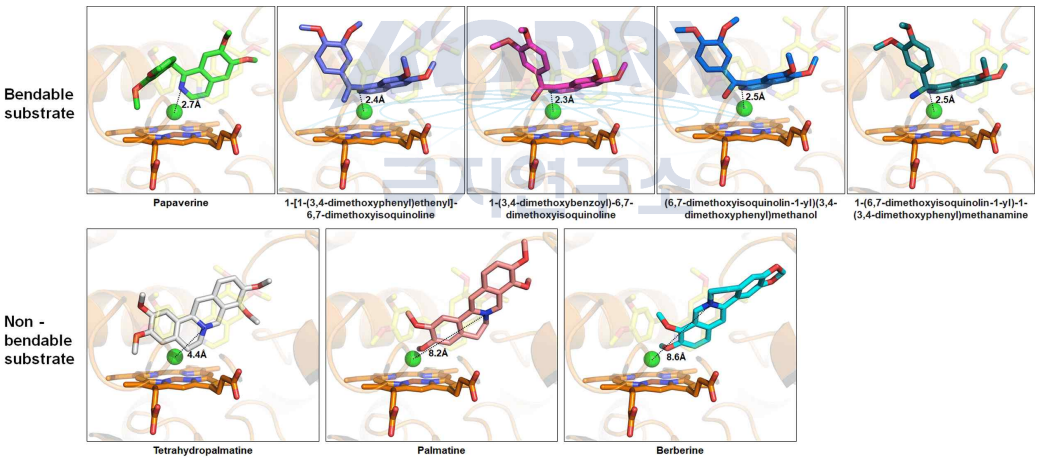


그림. 중간에 휘어질 수 있는 기질과 휘어질 수 없는 구조를 가지는 기질을 이용하여 결합 모드를 모델링으로 분석한 결과 중간에 휘어질 수 있는 기질들이 CYP105D18 효소에 더 잘 결합 할 수 있음을 규명

5) 항생제 내성 병원균 (*Acinetobacter baumannii*) 이 가지는 항생제 타겟 단백질인 MurG의 hexamer 형태의 결정 구조 분석 (IUCrJ. 2021 May 8;8(Pt 4):574-583) (극지연, 중앙대)

- 항생물질 개발의 타겟 단백질인 AbMurG 단백질의 삼차구조 해석
- AbMurG 단백질은 기존에 알려지지 않은 새로운 형태의 hexamer 구조를 가짐
- AbMurG 단백질의 hexamer 구조 정보는 새로운 항생물질 개발에 중요한 정보 제공

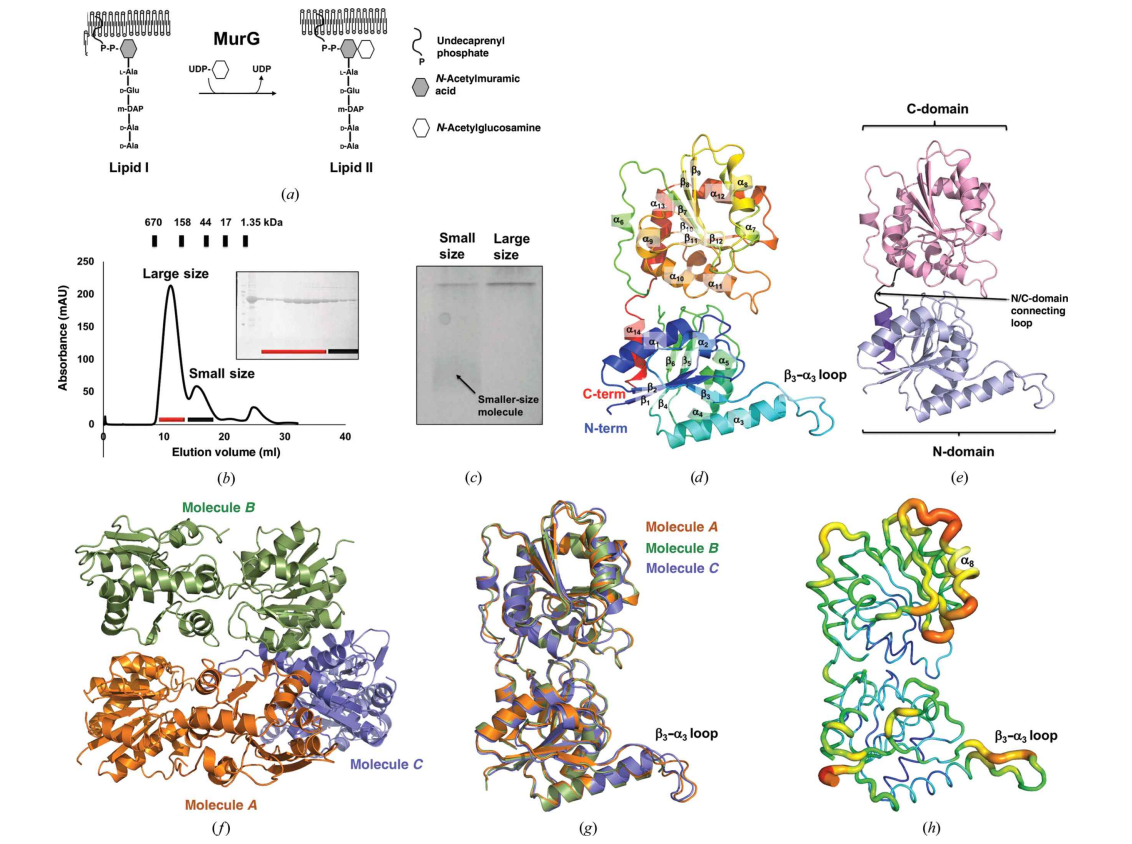


그림. 용액 상에서의 AbMurG 단백질의 hexamer 형성 확인과 AbMurG 단백질의 삼차구조 모습

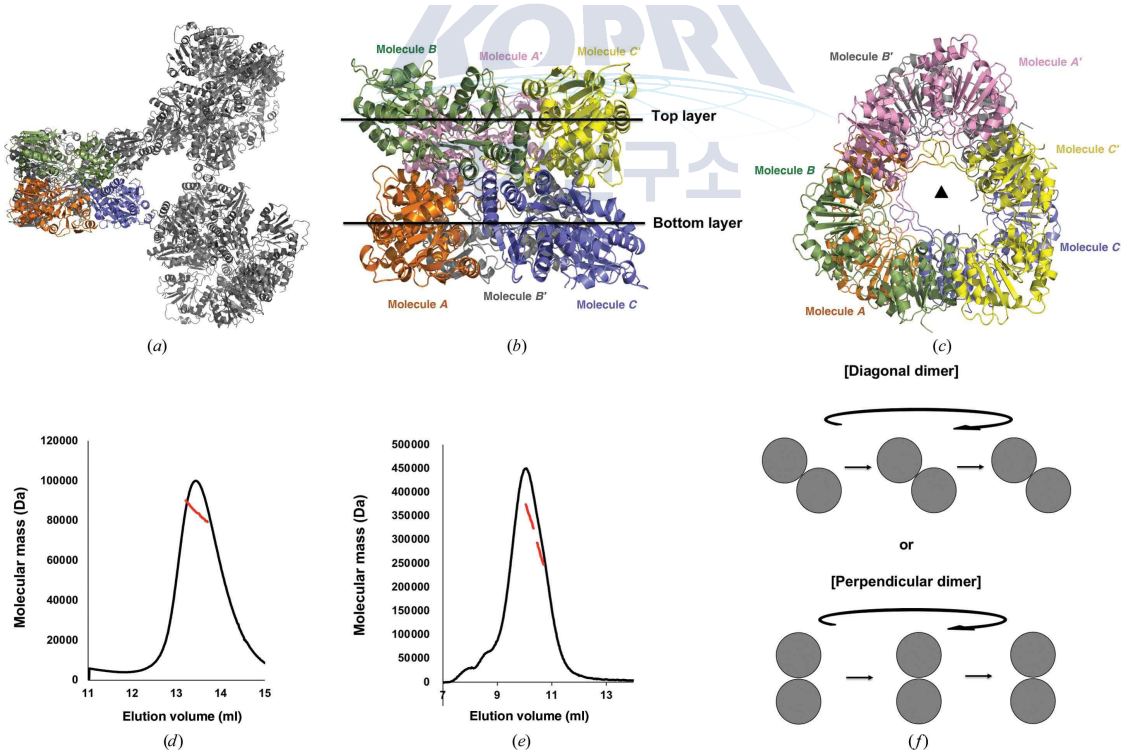
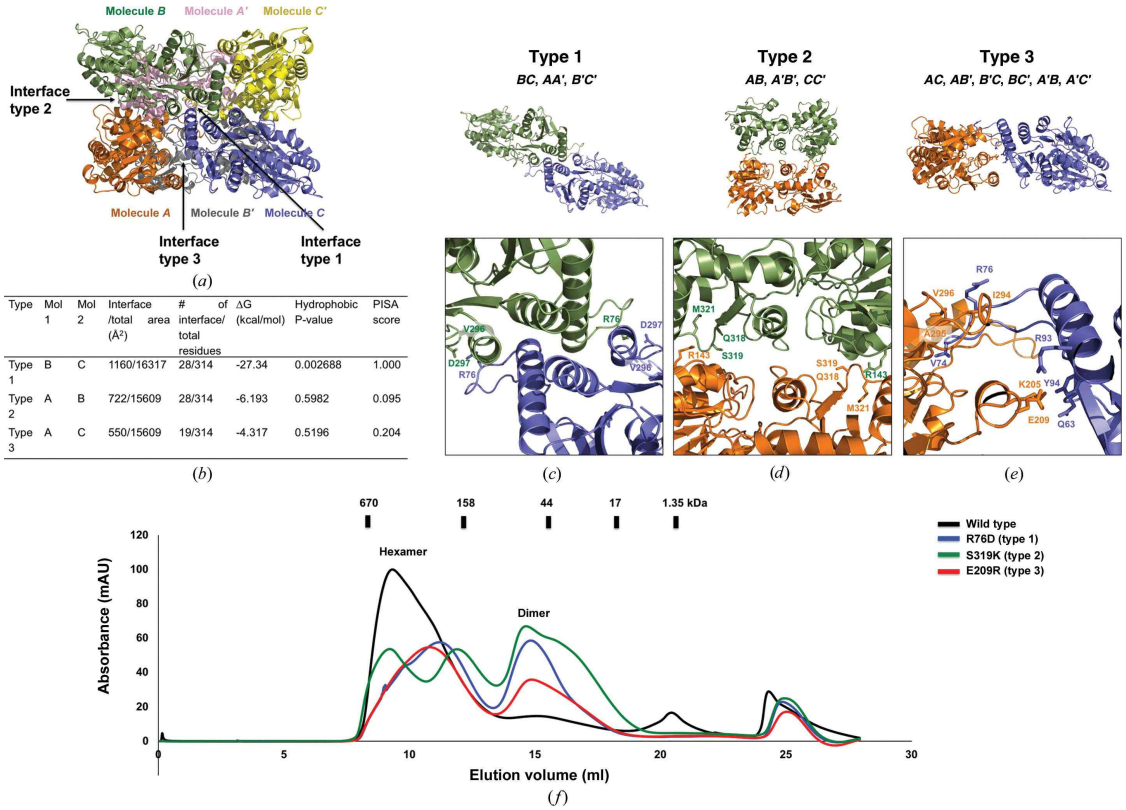


그림. AbMurG 단백질의 hexamer 형성 기작



Type	Mol 1	Mol 2	Interface /total area (Å²)	# of interface/ total residues	ΔG (kcal/mol)	Hydrophobic P-value	PISA score
Type 1	B	C	1160/16317	28/314	-27.34	0.002688	1.000
Type 2	A	B	722/15609	28/314	-6.193	0.5982	0.095
Type 3	A	C	550/15609	19/314	-4.317	0.5196	0.204

그림. AbMurG 단백질의 hexamer 형성에서 중요한 상호작용 부위 확인

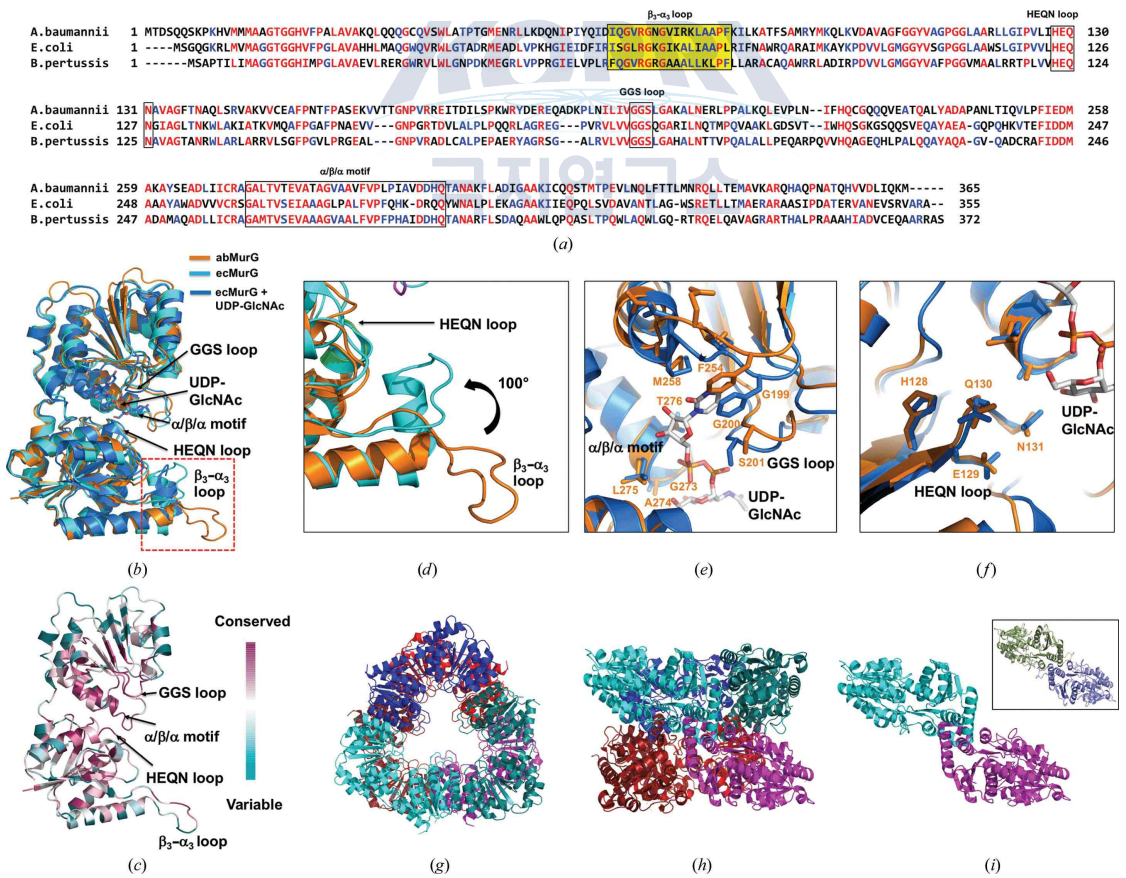


그림. AbMurG 단백질의 hexamer 형성에서 중요한 상호작용 잔기 확인

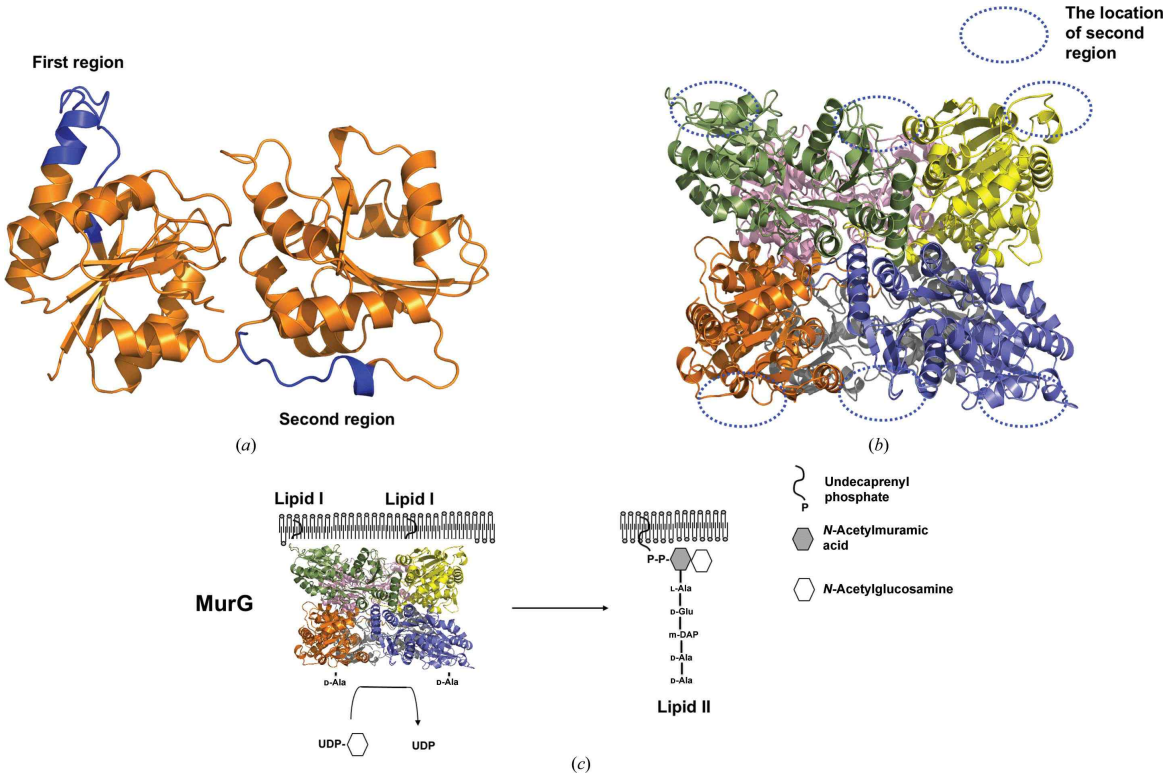


그림. Hexamer 형태의 AbMurG 단백질과 생체막 사이에서의 상호작용 모델

6) 병원균 (*Acinotobacter baumannii*) 유래 MltA 단백질의 구조 분석을 통한 이량체 형성과 활성기작 연구 (IUCrJ. 2021 November vol 8:921-930) (극지연, 중앙대)

- 항생물질 개발의 타겟 단백질인 membrane-bound lytic murein transglycosylase A (MltA) 단백질의 삼차구조 해석
- AbMltA 단백질은 기존에 알려지지 않은 새로운 형태의 dimer interface 구조를 가짐
- AbMltA 단백질의 구조 정보로 부터 기질인 peptideglycan 결합 모델 제시

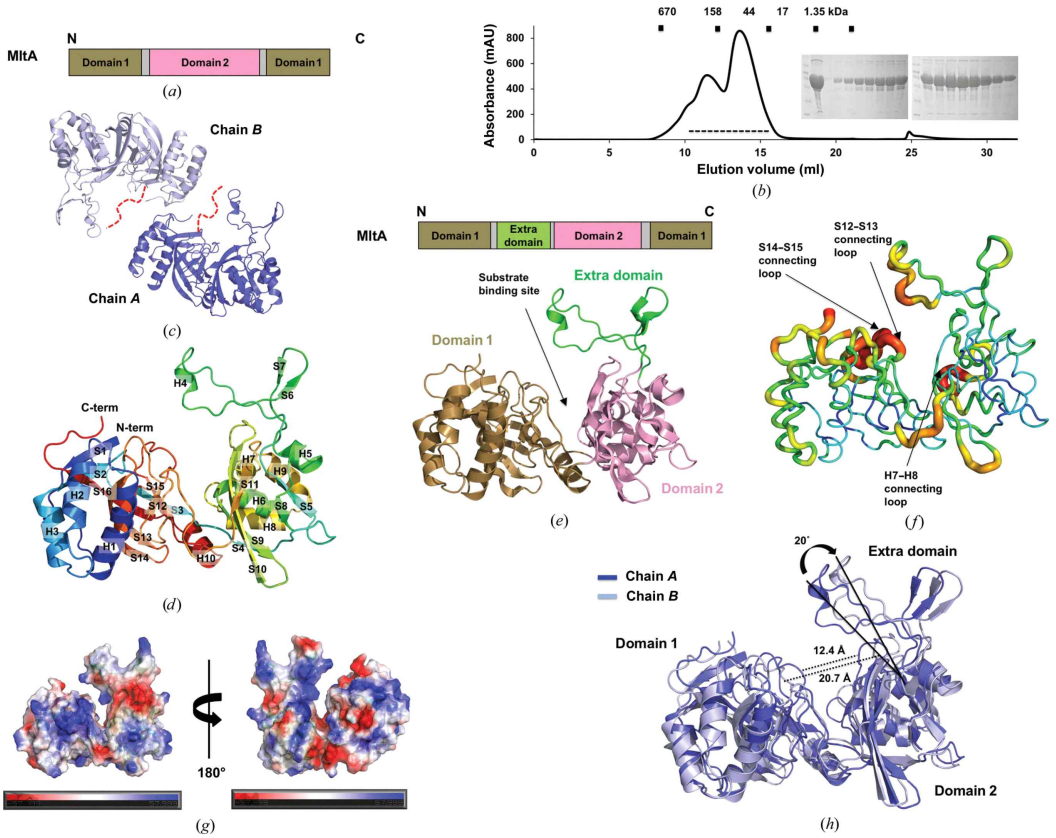
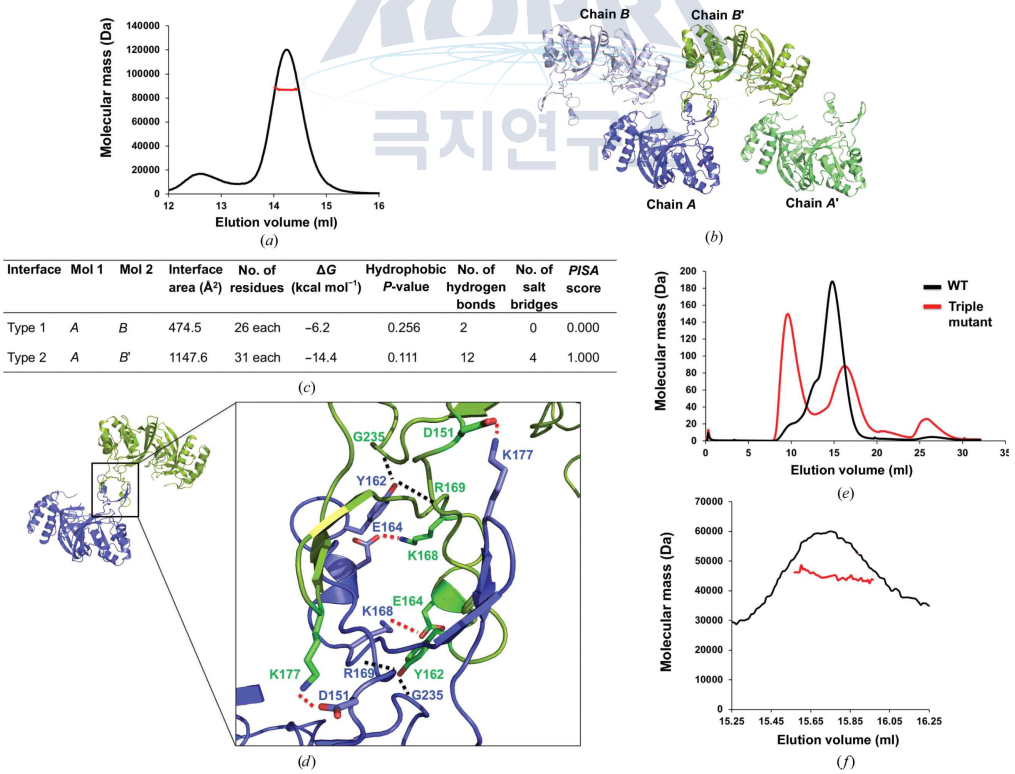


그림. AbMltA 단백질의 삼차구조 모습과 용액 상에서의 dimer 형성 확인



Interface	Mol 1	Mol 2	Interface area (Å²)	No. of residues	ΔG (kcal mol⁻¹)	Hydrophobic *P*-value	No. of hydrogen bonds	No. of salt bridges	*PISA* score
Type 1	*A*	*B*	474.5	26 each	−6.2	0.256	2	0	0.000
Type 2	*A*	*B'*	1147.6	31 each	−14.4	0.111	12	4	1.000

그림. AbMltA 단백질의 dimer 구조 형성에 중요한 부위 확인

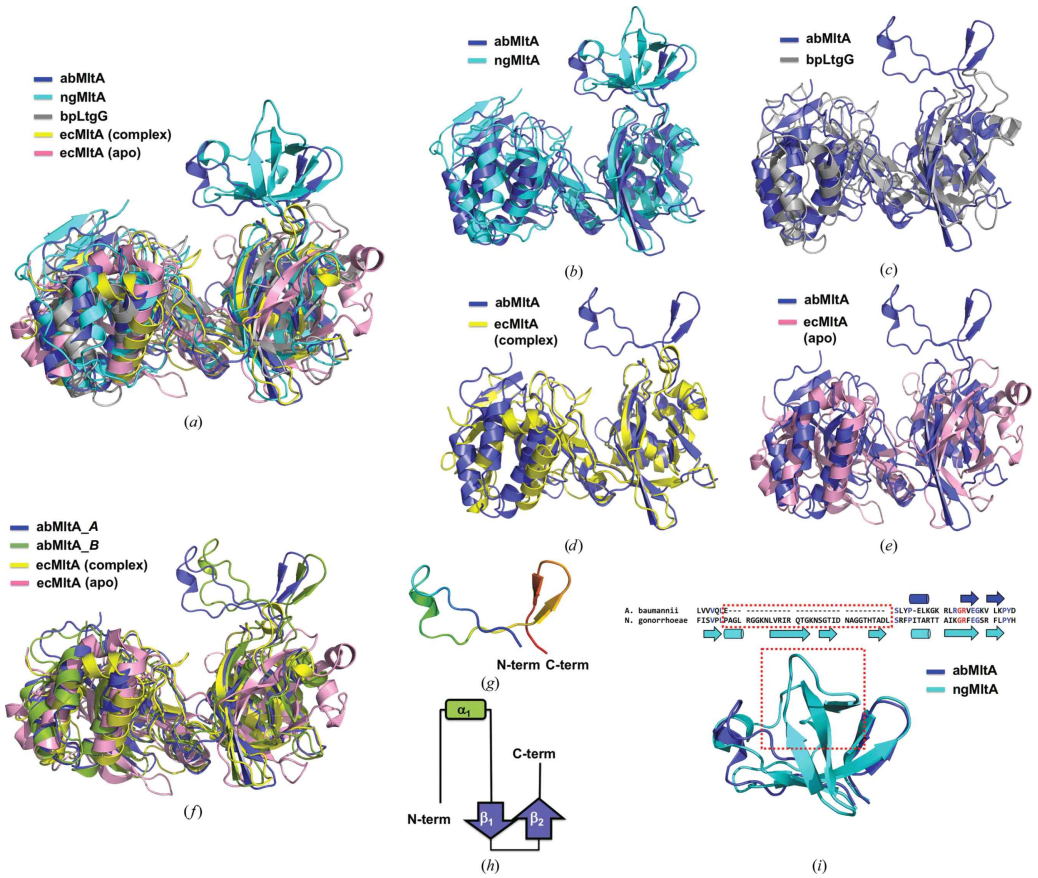


그림. AbMltA 단백질 구조와 기존에 알려진 다른 유사 MltA 단백질 구조들과의 비교를 통해 AbMltA 단백질이 특이적으로 extra-domain 부분을 가지고 있고, 이 부분이 AbMltA 단백질의 dimer 형성과 활성에 중요하다는 사실 규명

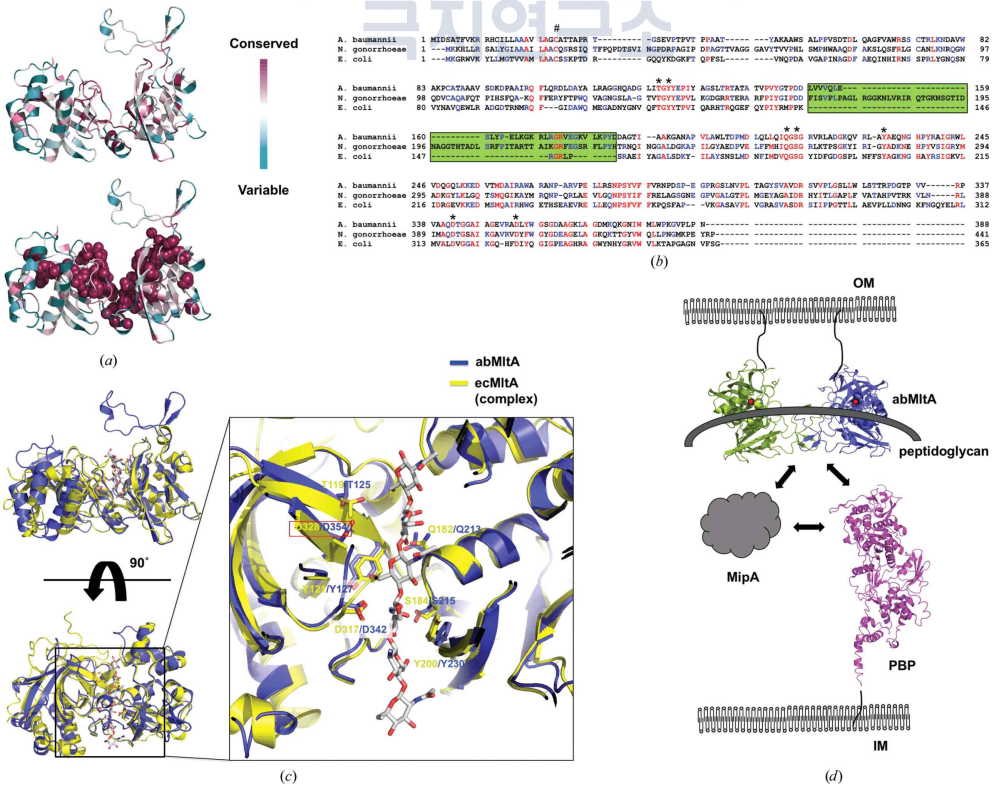


그림. dimer 형태의 AbMltA 단백질과 기질인 peptideglycan 결합 모델 제시

7) ACI-1, Class A β-lactamase 초기 결정 획득 및 3차 구조 규명

- 1차년도에 확보한 고순도의 ACI-1 단백질을 버퍼의 종류/pH, 염·침전제의 종류/농도가 다른 480가지의 결정화 용액을 이용하여 microbatch 방식으로 단백질 결정화 실험 진행함. 결정화 실험을 통해 7가지 조건에서 단백질 초기 결정을 획득함.
- 포항 가속기연구소의 5C 빔라인을 이용하여 0.2M Ammonium acetate, 0.1M Hepes pH7.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350 구성의 결정화 조건에서 성장한 초기 결정으로부터 1.21Å에 해당하는 고해상도 X-선 회절 데이터를 획득함(그림).

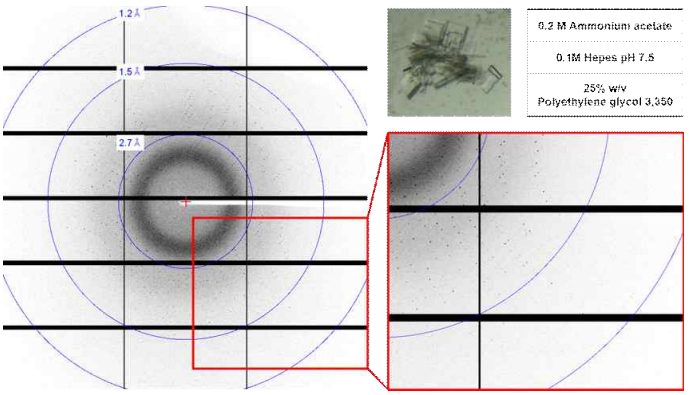
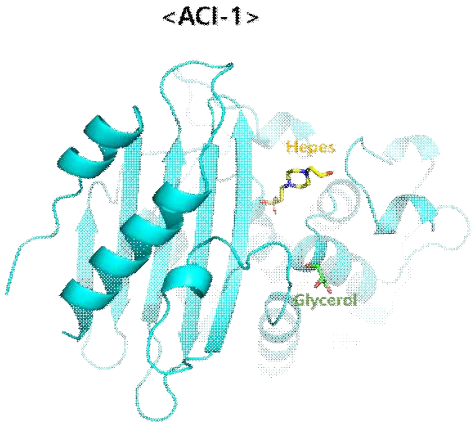


그림. ACI-1 단백질 결정의 X-선 회절 이미지

- *XDS* 프로그램을 통해 회절 데이터로부터 Space group을 $P2_1$로 특정함.
- *Acidaminococcus fermentans* 유래 class A β-lactamase인 ACI-1의 3차구조를 규명하기 위해 ACI-1과 53.15%의 identity를 갖는 *Clostridium kluyveri* DSM 555 유래 class A β-lactamase (PDB code : 6NJ1) 구조를 template으로 선정함. *Phenix* 프로그램의 *Phase-MR* 및 *phenix.refine*에서 선정한 template을 활용하여 분자치환법을 통해 ACI-1의 3차 구조를 규명함.
- 99% 이상의 completeness를 갖는 결정 구조를 규명하였으며 이에 대한 단백질 구조 분석을 진행함.
- 구조를 규명한 결과, asymmetric unit 내에 분자 2개가 존재함을 확인함. 또한 단백질 표면과 3개의 글리세롤 분자, 그리고 단백질의 active site와 Hepes 분자가 상호작용하고 있음을 확인함.



	ACI-1
Data collection	
Diffraction source	PAL/PLS beamline 5C
Wavelength(Å)	0.97959
Rotation range per image (')	1
Total rotation range (')	360
Exposure time per image (s)	0.1
Space Group	$P2_1$
a, b, c(Å) / α, β, γ(')	44.46, 66.31, 47.40/ 90.0, 111.2, 90.0
Resolution range (Å)	50.0 -1.21
Total No. of Reflections	511652
No. of unique Reflections	77977
Completeness (%)	99.80
I/Sigma	21.5
R-means	5
CC½ (%)	99.90
Isa	24.5

그림. ACI-1(하늘)과 Hepes(노랑), 글리세롤(초록)의 복합체 3차 구조(좌) 및 X-선 회절 데이터 정보(우)

8) CDA-1, Class C β-lactamase 초기 결정 획득 및 결정 최적화를 통한 3차 구조 규명

- 1차년도에 확보한 고순도의 CDA-1 정제 단백질을 버퍼의 종류/pH, 염·침전제의 종류/농도가

다양하게 조합된 480가지의 결정화 용액을 이용하여 microbatch 방식으로 단백질 결정화 실험 진행함. 결정화 실험을 통해 18가지 조건에서 단백질 초기 결정을 획득함.

- X-선 회절 실험에 적합한 단결정을 성장시키기 위해, 초기결정 성장조건에 대해 pH 및 PEG 조성에 변화를 주어 결정화 조건 최적화 진행(그림). 결정 최적화 과정에서 결정화 용액을 구성하는 버퍼의 pH가 9.5이상으로 높고, 침전제의 농도가 20%~32%일 때, 결정이 X-선 회절 실험에 적합한 단결정으로 성장하는 경향성을 확인함.

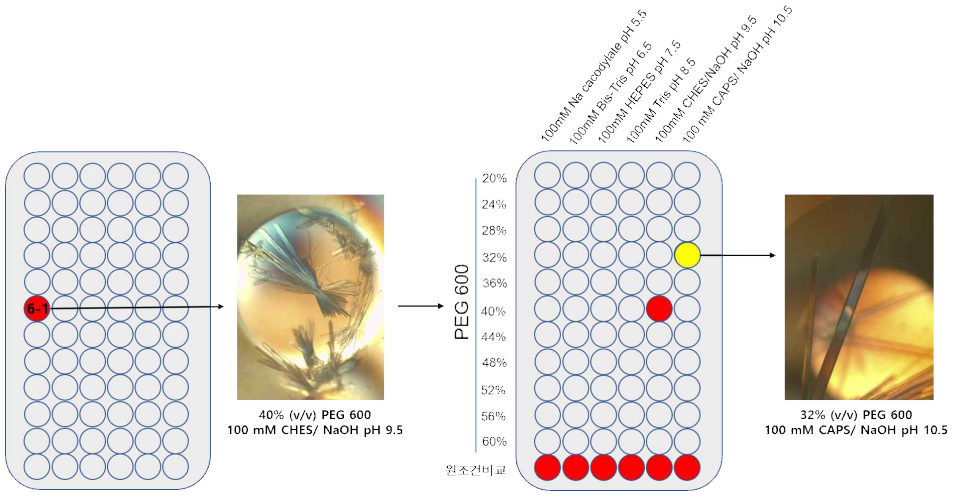


그림. CDA-1의 초기 결정(좌)과 결정조건 최적화(우)

- 포항 가속기연구소의 5C 빔라인을 이용하여 초기 결정과 최적화한 결정 모두 단백질 결정 X-선 회절 실험을 진행하였으며, 초기 결정으로부터 1.45 Å에 해당하는 고해상도 X-선 회절 데이터를 획득함(그림).
- *XDS* 프로그램을 통해 회절 데이터로부터 Space group을 $P2_12_12_1$로 특정함.

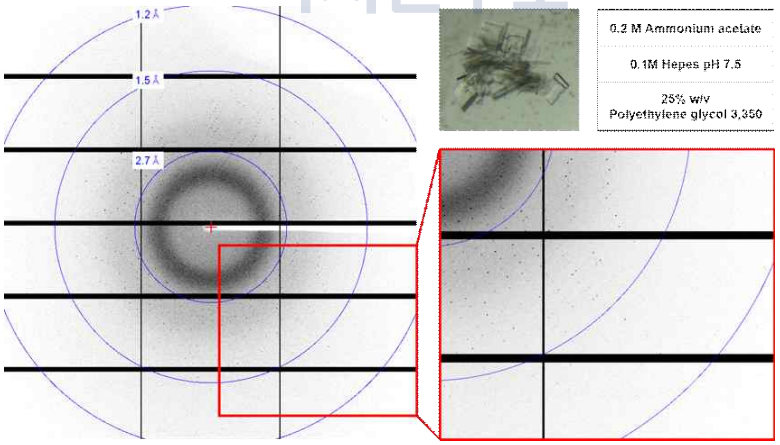
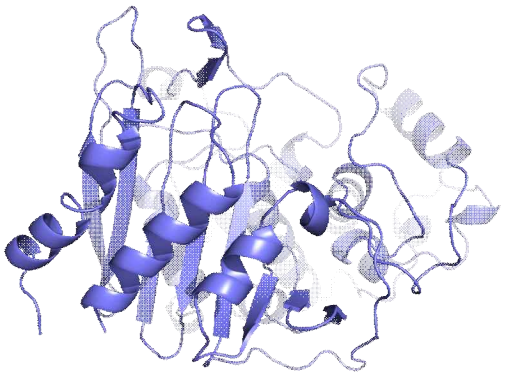


그림. CDA-1 단백질 결정의 X-선 회절 이미지

- *Cedecea davisae* 유래 class C β-lactamase인 CDA-1의 3차구조를 규명하기 위해 CDA-1과 76.19%의 identity를 갖는 *Enterobacter cloacae* 유래 class C β-lactamase (PDB code : 6LC7) 구조를 template으로 선정함. *Phenix* 프로그램의 *Phase-MR* 및 *phenix.refine*에서 선정한 template을 활용하여 분자치환법을 통해 99.9% 이상의 completeness를 갖는 CDA-1의 결정 구조를 규명함.

<CDA-1 apo>



	CDA-1
Data collection	
Diffraction source	PAL/PLS beamline 5C
Wavelength(Å)	0.97959
Rotation range per image (°)	1
Total rotation range (°)	360
Exposure time per image (s)	0.2
Space Group	$P2_12_12_1$
a, b, c(Å) / α, β, γ(°)	58.95, 88.87, 155.66/ 90.0, 90, 90.0
Resolution range (Å)	50.0 -1.45
Total No. of Reflections	1957842
No. of unique Reflections	145248
Completeness (%)	100.0
I/Sigma	14.8
R-means	5
CC½ (%)	99.90
ISa	18.5

그림. CDA-1의 3차 구조(좌) 및 X-선 회절 데이터 정보(우)

9) HMGR 단백질의 초기 결정 확보

- X선 회절 실험을 위한 HMGR 단백질 결정을 확보하기 위해 pH, salt 및 precipitant가 다양한 조성으로 구성된 용액 약 500조건에 대해 결정화 실험을 진행함. 확보된 초기 결정 중 4% (v/v) Tacsimate pH 6.0, 12% (w/v) Polyethylene glycol (PEG) 3,350 조건에서 성장한 결정이 4.7Å 해상도로 회절하는 것 확인함.
- 해당 조건에 대해 pH 및 PEG 조성에 변화를 주어 결정화 조건 최적화 진행. 추가 확보된 결정에 대해 회절 실험 진행한 결과 3.4Å 해상도로 회절하는 것 확인함. 하지만 사용한 cryo 조건에서 결정이 녹는 현상이 관찰되어, 회절 실험에 적합한 조건을 탐색하기 위해 결정 추가 확보가 필요함. 또한 기질을 첨가하여 co-crystallization을 진행하는 등 양질의 결정을 얻기 위한 결정화 실험을 진행할 예정.

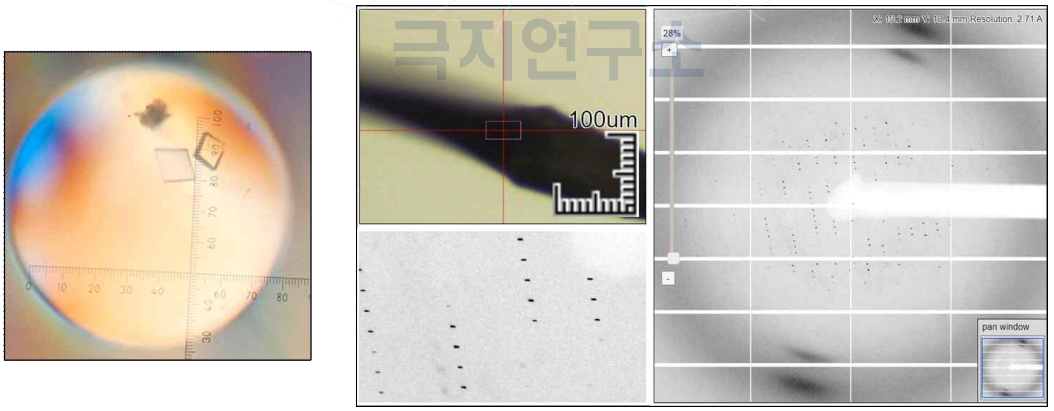


그림. HMGR 단백질 결정(좌) 및 X-선 회절 이미지(우)

10) PA5542 결정 구조 규명 및 분석

- 1차년도에 확보한 PA5542 x-선 회절 데이터를 이용하여 구조를 규명한 결과, asymmetric unit 내에 분자 3개가 존재함을 확인함. 결정화 실험 시 첨가해준 Zn^{2+}가 단백질의 N-말단에 존재하는 direct histidine tag과 배위결합으로 연결되어 dimer of trimer를 형성하는 것 확인함.

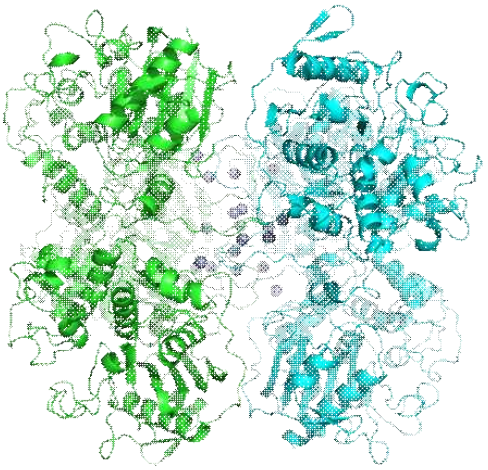


그림. Zn^{2+} 첨가된 PA5542 결정 구조

- PA5542가 Zn^{2+}-dependent imipenemase로 보고되었으므로 (Fajardo, Alicia, et al., JAC, 2014), 이들의 상호작용을 구조적으로 관찰하기 위해 앞서 확보된 PA5542 결정에 imipenem을 3시간 soaking하여 회절 데이터를 수집함. XDS 프로그램을 이용하여 processing한 결과, space group $C2$ (a:102.9 Å, b:160.4 Å, c:101.0 Å, β: 116.9°)에 해당하는 1.9 Å 해상도 데이터 확보함. 구조 규명 결과, PA5542의 active site에 위치한 nucleophilic serine에 imipenem이 acylation 된 상태로 결합되어 있는 것 확인함. Histidine tag을 제외한 부위에 결합된 Zn^{2+}는 구조에서 확인할 수 없었음.

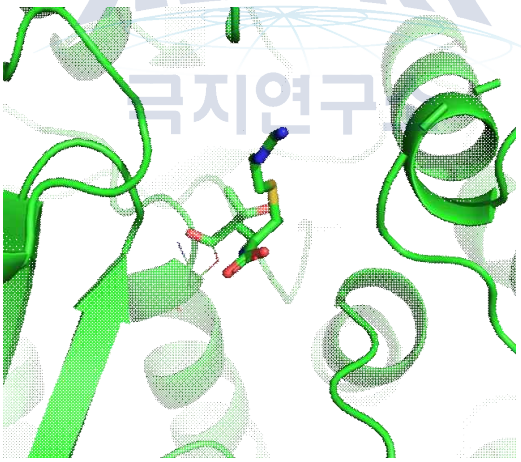


그림. PA5542 imipenem 복합체 결정 구조

- 또한 Zn^{2+}가 첨가되지 않은 조건에서 결정 확보 후 x선 회절 데이터를 수집함. XDS 프로그램을 이용하여 processing 한 결과, space group $P2$ (a=55.1 Å, b=147.7 Å, c=82.7 Å, β:105.2°) 에 해당하는 2.4 Å 해상도 데이터를 확보함. Phenix 프로그램을 이용하여 분자치환법으로 구조를 규명한 결과, asymmetric unit 내에 분자 3개가 Zn^{2+} 결합 구조에서 관찰된 것과 유사한 trimer 형태로 존재하는 것을 확인함.

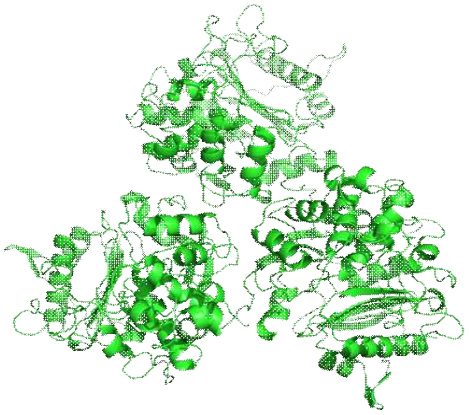


그림. Zn^{2+} 첨가되지 않은 PA5542 결정 구조

- 규명된 두 구조를 바탕으로 PA5542의 trimer 작용 여부 및 Zn^{2+} 존재 하에서의 효소 활성 분석을 위하여 histidine tag을 제거할 수 있는 construct를 설계 후 확보하였음. 추후 발현 및 정제조건을 확립하고, 확보된 단백질에 대해 size-exclusion chromatography 및 dynamic light scattering (DLS)을 진행하여 solution 상태에서의 크기를 정량적으로 분석할 예정. 또한 Zn^{2+} 존재 하에서 효소 활성을 분광학적 방법을 이용하여 측정할 예정.

11) Type II Thioesterase (TEII)인 WS5의 apo와 아연이 결합된 형태의 X-선 회절 자료 수집 및 3차 구조 규명

- 해양 방선균(*Streptomyces* sp. SNM55) 유래 cyclodepsipeptide인 WS9326A의 생합성과정에 참여하는 효소(nonribosomal peptide synthetase) 중 특정 아미노산을 전달하는 TEII인 WS5의 3차 구조를 최초로 규명하였으며 이를 활용하여 파트너 단백질들에 대한 선택성 차이를 해석함. (Kim, M.-S., et al., 2021, *Angew. Chem., Int. Ed.*)
- WS5 결정을 획득하기 위해 Microbatch crystallization 기법을 이용하여 약 1000가지 조건의 결정화 용액에 대한 screening 진행한 결과, 45가지 조건에서 단백질 결정이 생성됨.
- *De novo* phasing을 위해 포항 가속기연구소의 11C 빔라인을 이용하여 아연(Zn)이 결합된 WS5 (Zn-WS5)의 2.07 Å에 해당하는 X-선 회절 데이터를 확보함(그림).

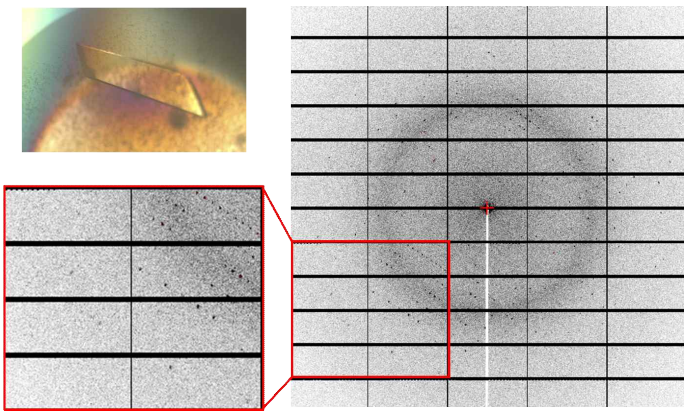
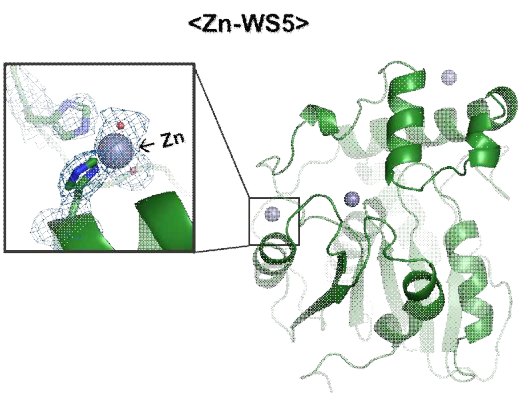


그림. Zn-WS5의 결정 및 X-선 회절 이미지

- *HKL2000* 프로그램을 통해 회절 데이터로부터 Space group을 *P*1으로 특정함.
- *Phenix* 프로그램의 *Autosol* 및 *Refinement* tool을 이용하여 선행연구를 통해 개발된 Zn-SAD 기법(Cha, S-S., *et al.*, 2012, ActaD)으로 단백질 결정구조의 phase 정보 획득함(그림).

- *Coot* 와 *Phenix* 프로그램으로 model building을 진행하여 특정 아미노산을 전달하는 TEII의 3차 구조를 최초로 규명함(그림).



	Zinc-WS5
Data collection	
Diffraction source	PAL/PLS beamline 11C
Wavelength (Å)	1.28229
Rotation range per image (°)	1
Total rotation range (°)	360
Exposure time per image (s)	1
Space group	*P*1
a, b, c (Å)/α, β, γ (°)	41.05, 45.64, 66.75/ 90.07, 89.98, 97.70
Resolution range (Å) [a]	50-2.07(2.11-2.07)
Total No. of reflections	89886
No. of unique reflections	25973
Completeness (%) [a]	89.2(88.4)
CC (1/2) (%) [a]	98.7(96.5)
Redundancy [a]	3.5(3.4)
Mean I/σ (I) [a]	25.2(5.5)
R_{merge} (%) [a, b]	6.1(18.2)

그림. Zn-WS5의 3차 구조(좌) 및 X-선 회절 데이터 정보(우)

- Native 상태의 WS5 apo 구조를 규명하기 위해 포항 가속기연구소의 5C 빔라인을 이용하여 1.45 Å에 해당하는 고해상도 X-선 회절 데이터를 획득함(그림).

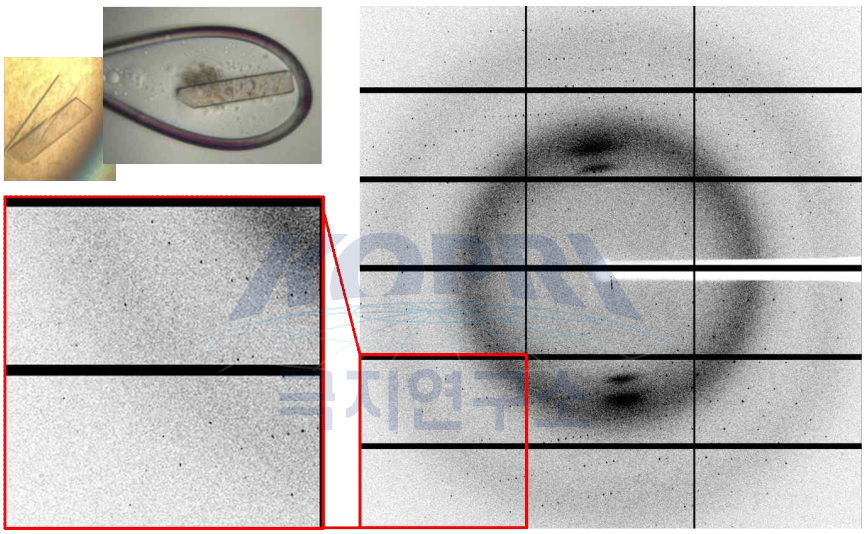
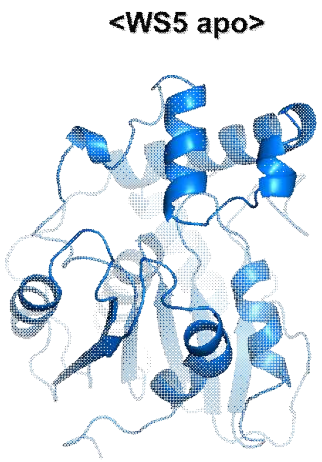


그림. WS5 apo의 결정 및 X-선 회절 이미지

- *XDS* 프로그램을 통해 회절 데이터로부터 Space group을 *P2*로 특정함.
- *Phenix* 프로그램의 *Phase-MR* 및 *Refinement* tool에서 Zn-WS5 구조를 template로 활용하여 분자치환법을 통해 WS5 apo의 3차 구조를 규명함(그림).
- 해당 구조는 논문 게재를 위해 단백질의 구조 정보를 공유하는 사이트인 Protein Data Bank (PDB)에 코드명 7E3Z로 업로드함(그림).



	WS5 apo
PDB code	7E5Z
Data collection	'20.11.15.
Diffraction source	PAL/PLS beamline 5C
Wavelength (Å)	0.97957
Rotation range per image (°)	1
Total rotation range (°)	360
Exposure time per image (s)	1
Space group	$P2_1$
a, b, c (Å)/α, β, γ (°)	40.73, 66.45, 45.29/ β = 98.06
Resolution range (Å) [a]	30-1.45(1.50-1.45)
Total No. of reflections	291032
No. of unique reflections	41790
Completeness (%) [a]	98.7(96.3)
CC (1/2) (%) [a]	99.7(96.2)
Redundancy [a]	7(6.98)
Mean I/σ (I) [a]	15.1(4.6)
R_{merge} (%) [a, b]	6.8(32.9)
Refinement statistics	
Resolution range (Å) [a]	29.07-1.45(1.48-1.45)
No. of reflections of working set [a]	39693(2524)
No. of reflections of test set [a]	2090(133)
No. of atoms	
Protein	1874
Chloride ion	1
Water	215
Average B value (Å^2)	
Protein	20.45
Water	29.92
R_{work}/R_{free} (%) [a, c]	17.99(22.92)/20.26(26.71)
R.m.s deviations [d]	
Bond length (Å)	0.013
Bond angles (°)	1.396

그림. WS5 apo의 3차 구조(좌) 및 X-선 회절 데이터 정보(우)

- 생합성 경로에서 WS5와 상호작용하는 것으로 알려져 있으나 결정 획득이 어려운 파트너 단백질들(WS22, WS23의 T 도메인)의 경우, homolog 단백질들의 구조(PDB code: 5T3D, 5U89)를 기준으로 3차 모델 구조를 획득함(그림).
- WS5 apo 구조와 WS22/23의 T 도메인 모델 구조를 활용하여 유사한 작용기전을 갖는 대장균 유래 Enterobactin synthase에 속하는 PCP-TE 단백질 복합체 구조(PDB code: 3TEJ)를 template로 *in silico* 복합체 모델 구조를 획득함(그림).

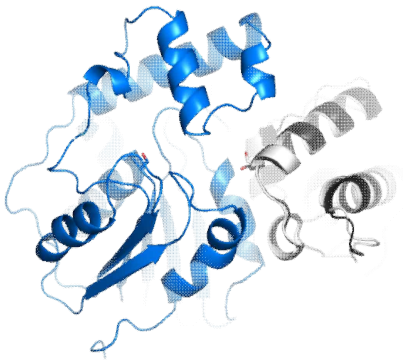


그림. WS5(파란색)-WS22/23(검정/흰색)의 *in silico* 복합체 모델 구조

- 이를 바탕으로 구조적 측면에서 해석했을 때, WS5가 파트너 단백질로써 WS22보다 WS23을 선호하는 원인은 각 단백질 표면의 정전기적 특성으로 인해 기인한 것임을 밝힘(그림).

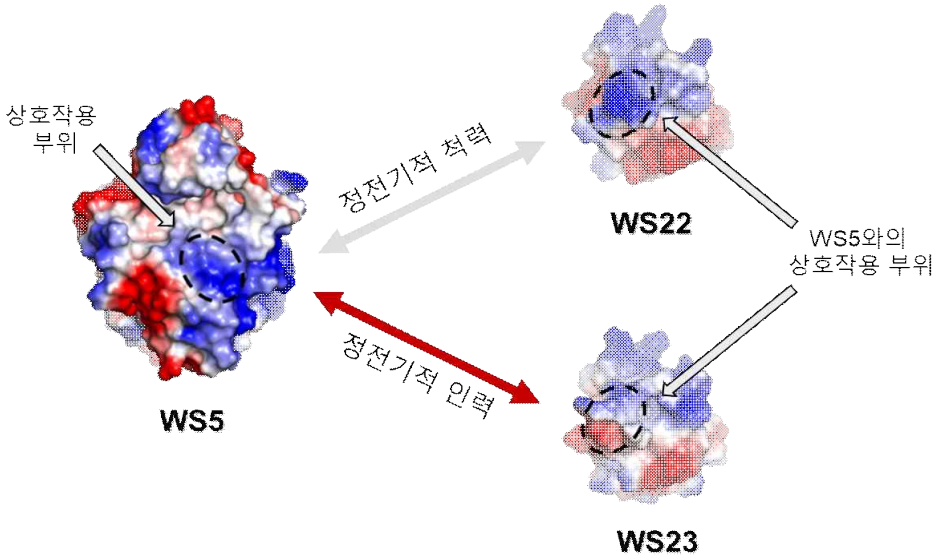


그림. 정전기적 특성으로 표현된 WS5의 파트너 선택성 분석 모식도

다. 타겟 단백질 효소 활성 분석

1) *Senotrophomonas* sp. KCTC 12332에서 유래 class A β-lactamase, *St*Lac

- *St*Lac의 기질 스펙트럼을 확인하기 위해, β-lactam 항생제 7종에 대한 가수분해 활성을 분광학적인 방법을 이용하여 측정함. 1차년도에 진행한 활성 측정 방법을 보완하여 재실험함.
- 측정에 사용한 β-lactam 항생제는 cephalosporin 계열 3종 (cephalexin, cefaclor, cefotaxime), carbapenem 계열 2종 (meropenem, imipenem), penicillin 계열 2종 (penicillin G, ampicillin)으로, 각 기질에 대한 *St*Lac의 product 생성 정도를 분광광도계를 이용하여 측정함.
- 측정 결과 cefaclor에 대한 가수분해 활성이 다른 기질에 비해 월등하게 뛰어남을 확인. Penicillin G, cefotaxime, cephalexin, ampicillin은 중간정도의 활성을 보이며, carbapenem 계열에 대한 활성은 관찰할 수 없었음.

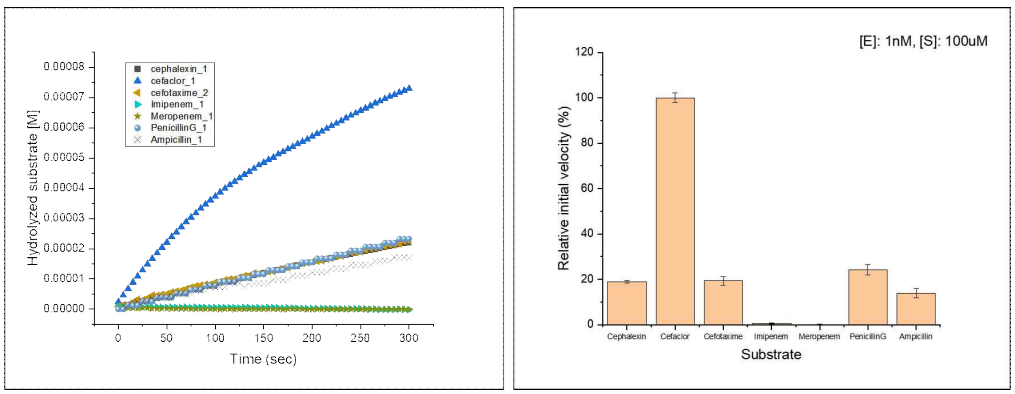


그림. *St*Lac의 기질 7종에 대한 시간-생성물 농도 그래프 (좌) 및 가수분해 초기속도 상대 비교 (우)

- Cefaclor에 대해 steady-state kinetics를 진행하여 효소반응속도상수인 K_m (287.6 μM) 및 k_{cat} (1250 s^{-1}) 값을 도출함.

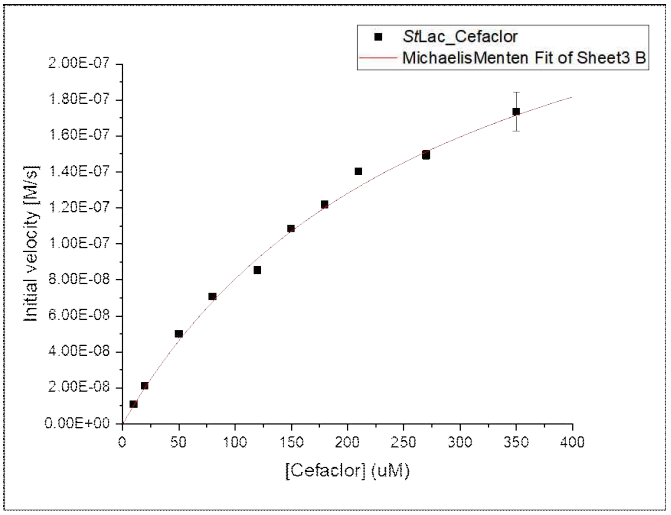


그림. Cefaclor에 대한 *St*Lac의 Michaelis-Menten 그래프

2) 저온성 해양 미생물인 *Moritella marina* ATCC15381 유래 class A β-lactamase, *Mm*Lac

- *Mm*Lac에 대해 동일 실험을 진행한 결과, penicillin 계열에 대한 기질 특이성 확인함. Cephalosporin 및 carbapenem 계열에 대한 가수분해 활성은 관찰할 수 없었음.

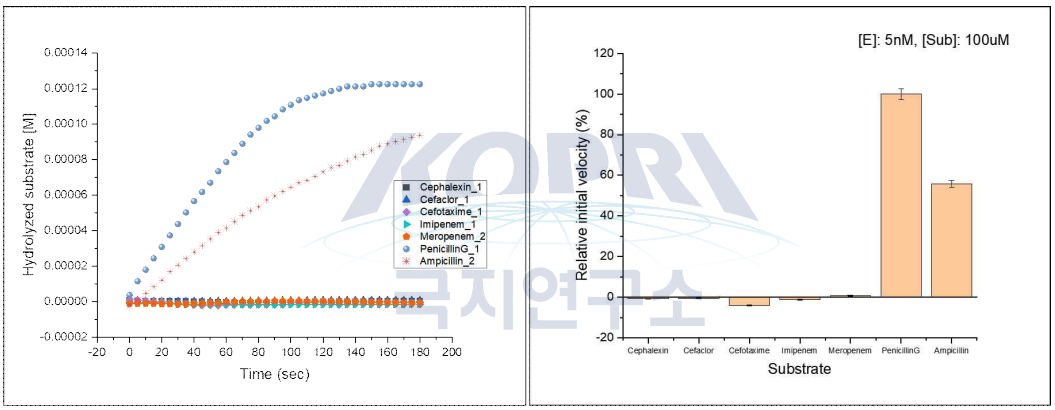


그림. *Mm*Lac의 기질 7종에 대한 시간-생성물 농도 그래프(좌) 및 가수분해 초기속도 상대 비교(우)

- Penicillin G, ampicillin에 대한 steady-state kinetics를 수행하여, *Mm*Lac의 효소 활성을 정량적으로 측정함 (penicillin G - K_m: 25.5 μM, k_{cat}: 190 s^{-1} / ampicillin - K_m: 40.9 μM, k_{cat}: 123 s^{-1}).

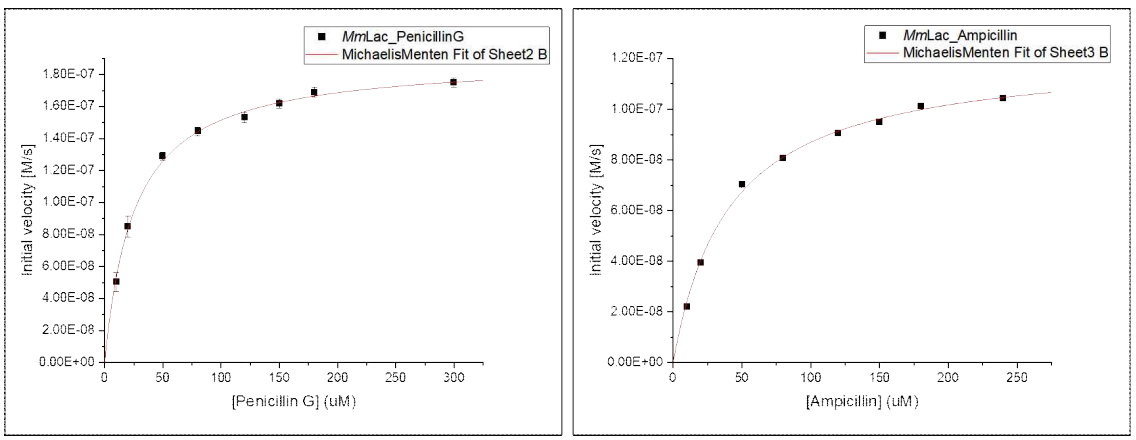


그림 396. Penicillin G (좌) 및 ampicillin (우)에 대한 *Mm*Lac의 Michaelis-Menten 그래프

라. Fragment based hit discovery

1) Fragment-based drug discovery (FBDD) screening

- Class C β-lactamase 중 하나인 ACC-1 단백질에 대해 sitting-drop 방식으로 crystallization 진행함. Microbatch crystallization method를 이용하여 확립한 두 개의 결정화 조건 중 triple-drop plate에서 FBDD 실험에 적합한 조건을 활용하여 약 500개 well에서 결정을 획득함.
- 포항가속기연구소에서 보유한 fragment library를 이용하여 획득한 결정에 대해 soaking 진행 후, x-ray diffraction 실험 진행. 약 430개 조건에 대해 회절데이터를 획득하였으나 구조 규명 결과 결정화 용액 내 precipitant인 PEG400이 활성부위에 결합한 상태였으며, nucleophilic serine에 공유결합으로 fragment가 연결된 양상은 관찰되지 않았으나 매우 가까운 거리로 결합한 미지의 물질에 의한 FoFc map을 관찰할 수 있었음 (그림).
- 추후, 결정화 조건 내 precipitant로 PEG400이 없는 용액을 이용하여 결정화 후 획득한 결정에 대해 FBDD 재실시 예정임.

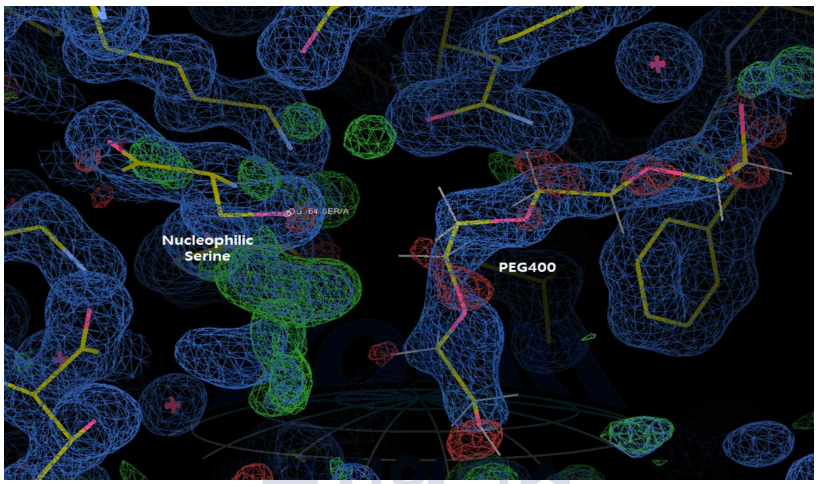


그림. ACC-1 활성부위의 nucleophilic serine과 PEG400

※3차년도: 2022년 결과

<1세부> 극지 및 해양유래 희귀 생물자원 확보

가. 극지유래 항생물질 생산 후보 미생물 배양 (극지연)

1) 신규 항생물질 생산 후보 미생물을 스크리닝하기 위하여 남극 킹조지섬 바톤반도의 호수, 북빅토리아 랜드의 암석, 눈, 빙하를 대상으로 미생물 순수분리 배양을 수행하였음. 그 결과 총 39종의 108 균주를 확보하였음. 호수에서는 총 14종의 25균주, 암석(7균주)과 눈(8균주)은 각각 4종이 확인되었고, 스틱스 빙하의 경우 18종 68균주를 확보하였음. 확보된 균주의 동정결과는 아래의 표와 같음.
2) 남극 스틱스 빙하 시료에서 추가로 350개 균주(10도 배양체 300균주, 25도 배양체 25균주) 확보하여 동정 진행 중. 빙하 미생물 배양은 극지연구소 주요사업 “국제심부빙하시추 네트워크를 활용한 대기-빙상 상호작용의 자연적·인위적 특성 규명”과 공동으로 진행하고 있음.

Identification					No of strains according to the isolation source				Total
					King George Island	Northern Victoria Land			
Phylum	Class	Order	Family	Species	Freshwater	Rock	Snow	Glacier	
Actinobaceria	Actinomycetia	Dermatophilales	Dermacoccaceaea	Dermacoccus nishinomiyaensis		1			1
		Microbacteriales	Microbacteriaceae	Cryobacterium breve		1			1
				Cryobacterium soli		1			1
				Lacisediminihabitans profunda		4			4
				Subtercola boreus			4		4
				Subtercola vilae			1		1
			Micrococcaceae	Micrococcus luteus	2		2		4
				Paenarthrobacter nicotinovorans	1				1
Alphaproteobacteria		Rhizobiales	Methylobacteriaceae	Methylobacterium radiotolerans	4				4
			Nitrobacteraceae	Bradyrhizobium elkanii				37	37
		Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Roseomonas mucosa				4	4
		Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas echinoides				4	4
				Sphingomonas aerolata				4	4
				Sphingomonas aquatilis				1	1
				Sphingomonas glacialis				4	4
Betaproteobacteria		Burkholderiales	Burkholderiaceae	Caballeronia sordidicola				1	1
			Comamonadaceae	Polaromonas vacuolata				1	1
				Rhodoferax ferrireducens				1	1
				Rhodoferax aquaticus				1	1
				Variovorax boronicumulans				2	2
			Oxalobacteraceae	Rugamonas rubra				1	1
Gammaproteobacteria		Lysobacterales	Rhodanobacteraceae	Rhodanobacter ginsengisoli				1	1
		Pseudomonadales	Moraxellaceae	Psychrobacter alimentarius				1	1
			Pseudomonadaceae	Pseudomonas antarctica				2	2
				Pseudomonas kitaguniensis				1	1
				Pseudomonas syringae				1	1
				Pseudomonas poae				1	1
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Halpernia frigidisoli	4				4
	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Mucilaginibacter rigui	1				1
				Mucilaginibacer phyllosphaerae			1		1
				Pedobacter paludis	1				1
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus infantis	2				2
				Metabacillus indicus	1				1
				Brevibacterium frigoritolerans	1				1
				Peribacillus butanolivorans	1				1
			Paenibacillaceae	Paenibacillus lautus	1				1
				Paenibacillus humicus	1				1
				Paenibacillus glucanolyticus	4				4
			Planococcaceae	Paenisporosarcina indica	1				1
Total					25	7	8	68	108

나. 항생물질 타겟 단백질 발현 및 정제 (극지연)

1) 세균 *Falsihalocynthiibacter arcticus* 유래 항생물질 변형효소 단백질 대량생산 및 활성 규명

- 항생제 변형효소 monooxygenase ActVA-Orf6 단백질 생산 최적화를 위한 배양조건 탐색

○ 단백질의 서열은 105개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 11,692 Da의 크기, pI 4.81, Extinction Coefficient Abs 0.1% : 0.863 의 특성을 가짐

○ Monooxygenase ActVA-Orf6 의 아미노산 서열

>Monooxygenase ActVA-Orf6

mpiisvaapv qtvittfemt pgtcqdllda ltdayevfis kqpgfigagl hvndaqtria nysqwtrred fqamlrteem rarnraisdl cksfepvmye vsavf

○ 단백질의 생산을 위해 pET28a 벡터에 목표 단백질의 유전자를 삽입하였고, 최종 발현균주로 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환함

○ 7L 발효기를 이용해 형질전환된 균주를 37℃ 에서 배양한 후 세포농도 OD600=3 부근에서 단백질 생산 유도함

○ 단백질 생산 유도 후 온도 조건은 20℃와 30℃에서 세포농도와 단백질 생산량을 비교

○ 단백질 생산 유도 조건은 IPTG 1mM과 0.1mM을 사용하여 발현량을 비교

○ Monooxygenase 효소의 생산분석을 위해 발현 유도 후 0, 6, 12, 16, 와 24시간에서 시료 채집하였고, 세포 파쇄후 수용성, 난용성 분획에서의 단백질 발현정도를 SDS-PAGE로 확인함

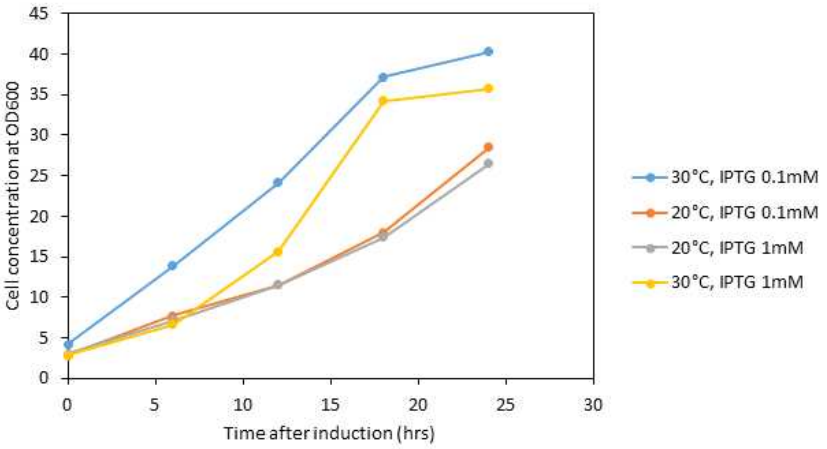


그림. 7L 발효기를 이용한 재조합 monooxygenase ActVA-Orf6의 균주의 시간별 생장. IPTG 처리농도와 배양 온도에 따른 세포 농도 분석

○ 형질전환된 대장균은 30℃, 0.1mM IPTG 에서 가장 높은 세포농도를 보임

○ Monooxygenase ActVA-Orf6의 발현은 대장균 IPTG 발현유도 6시간부터 단백질의 발현이 관찰되었고, 발현조건에 따라 수용성 단백질이 다르게 생산됨을 확인함

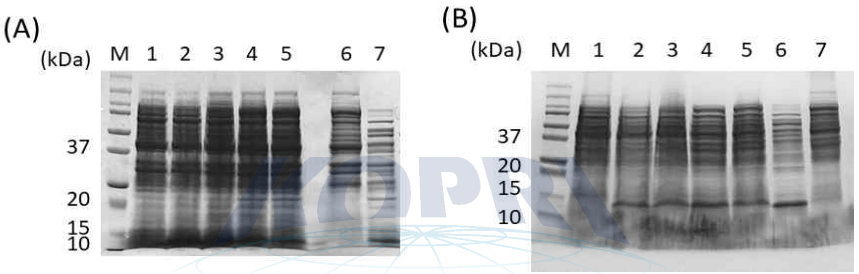


그림. SDS-PAGE를 통한 Monooxygenase ActVA-Orf6의 발현분석. (A) 30℃, IPTG 1mM 에서 단백질 발현. (B) 30℃, IPTG 0.1mM 에서 단백질 발현 Lane M: size marker; lane 1: 발현유도전; lanes 2 - 5: 발현유도 후 시간 6, 12, 18, 24h에서 단백질 밴드; lanes 6: 세포파쇄 후 상등액, soluble protein; lanes 7: 세포파쇄 후 pellet, insoluble protein

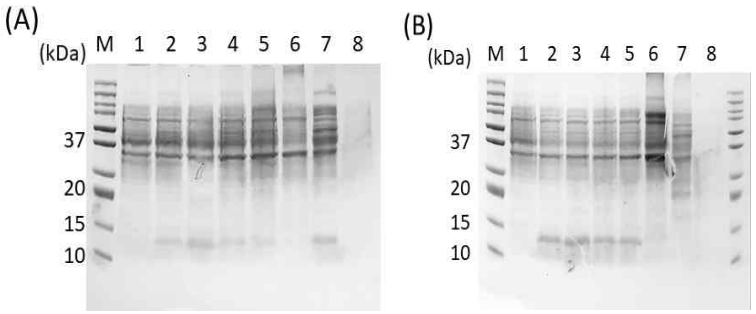


그림. SDS-PAGE를 통한 Monooxygenase ActVA-Orf6의 발현분석 (A) 20℃, IPTG 0.1mM 에서 단백질 발현. (B) 20℃, IPTG 1mM 에서 단백질 발현 Lane M: size marker; lane 1: 발현유도전; lanes 2 - 5: 발현유도 후 시간 6, 12, 18, 24h에서 단백질 밴드; lanes 6: 세포파쇄 후 상등액, soluble protein; lanes 7: 세포파쇄 후 pellet, insoluble protein

- 항생제 변형효소 monooxygenase ActVA-Orf6 단백질의 발현조건별 생산분석을 위한 정제

○ 배양액을 원심분리하여 상등액을 제거하고 2g의 biomass를 채취한 후 50mL의 lysis buffer를 처리함. 초음파 파쇄기의 조건은 on:off=2s:4s, amp 32%로 맞추고 15분간 처리함. His-tag

binding resin 10mL을 사용하였고, 용출은 NPI-300 10mL을 이용하여 목표 단백질을 획득함. SDS-PAGE를 이용하여 단백질의 정제 상태를 분석하였고, 280nm 흡광도를 이용하여 정량함.

○ 30℃, IPTG 1mM 에서 발현된 단백질을 정제하였을 때, SDS-PAGE 상에서 elution buffer의 목표 단백질 밴드가 확인되지 않음. 목표 단백질의 resin 부착률이 낮았고, 비특이적 결합을 보이는 단백질이 많이 존재하였음. 목표 단백질의 생산을 확인하기 위해 Elution buffer를 10배 농축하였으나, SDS-PAGE 상으로는 매우 약한 밴드만 보였음. 총 단백질량을 정량한 결과, 목표 단백질을 포함한 정제된 단백질의 생산량은 0.18g/L 이었음.

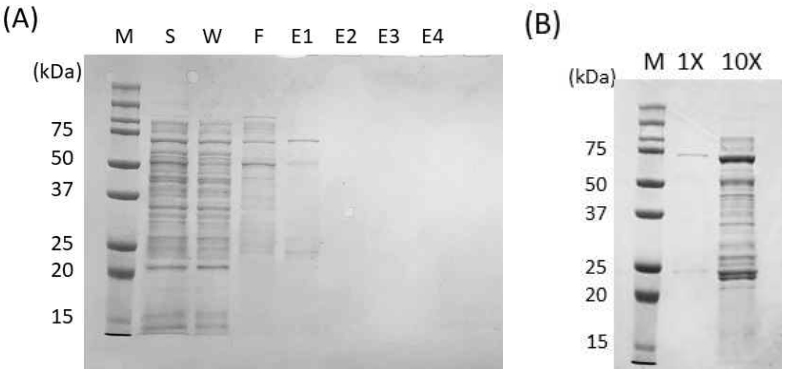


그림. 30℃, IPTG 1mM 에서 발현된 단백질의 정제. (A) His-tag bindng resin으로 얻어진 분획에서 목표 단백질 및 비특이적 결합 단백질의 분석. (B) Elution 분획의 농축(1배, 10배). Lane M: size marker; lane S: 세포파쇄후 상등액; lanes W: wash buffer; lanes F: resin 통과 상등액; lanes E1~E4: elution buffer

○ 30℃, IPTG 0.1mM 에서 발현된 단백질을 정제하였을 때, 목표 단백질의 resin 부착률의 강도가 높았고, 비특이적 결합이 적었음. Elution buffer의 3번째 분획(E3)부터 목표 단백질의 순도가 높게 나타남. Imidazole의 농도를 높인 wash buffer 사용할 경우 목표 단백질의 순도를 높일 것으로 예상됨. Elution buffer를 총 6번 처리한 결과, E3~E5 까지 목표 단백질이 용출이 되었고, E6에는 밴드가 나타나지 않음으로 E6처리 이전에 모두 용출된 것으로 보임.

○ 30℃, IPTG 0.1mM 발현유도 조건에서 목표 단백질의 총 생산량은 1.09 g/L 로 나타남.

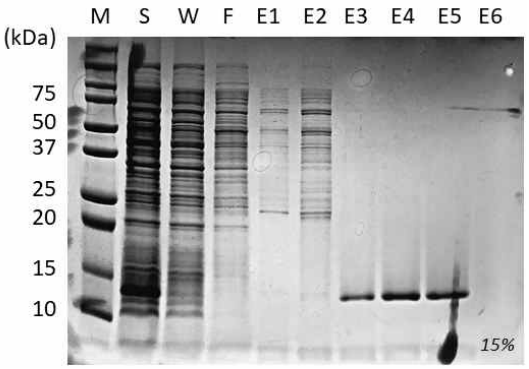
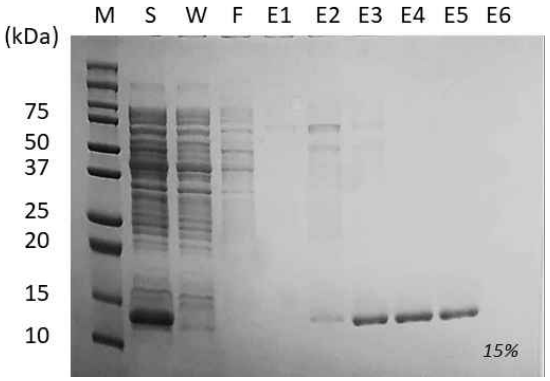


그림. 30℃, IPTG 0.1mM 에서 발현된 단백질의 정제. Lane M: size marker; lane S: 세포파쇄후 상등액; lanes W: wash buffer; lanes F: resin 통과 상등액; lanes E1~E6: elution buffer

○ 20℃, IPTG 1mM 에서 발현된 단백질을 정제하였을 때, 30℃, IPTG 0.1mM 조건에서 발현,

정제 양상과 비슷한 SDS-PAGE 사진을 보였음. E1과 E2에서 비특이적 결합 단백질이 보였지만, 30℃, IPTG 0.1mM 조건의 E1, E2 보다는 약한 비특이적 결합 단백질로 보임. 동일하게 E3~E5에서 순도 높은 목표 단백질이 검출됨.



• 20℃, IPTG 1mM 에서 발현된 단백질의 총 생산량은 1.41g/L로 나타남

그림. 20℃, IPTG 1mM 에서 발현된 단백질의 정제. Lane M: size marker; lane S: 세포파쇄후 상등액; lanes W: wash buffer; lanes F: resin 통과 상등액; lanes E1~E6: elution buffer

○ 20℃, IPTG 0.1mM 에서 발현된 단백질을 정제하였을 때, 30℃, IPTG 0.1mM 조건에서 발현 후 정제 양상과 비슷한 SDS-PAGE 사진을 보였음. E1과 E2에서 비특이적 결합 단백질이 보였음. E3~E5에서 순도 높은 목표 단백질이 검출됨.

○ 정제된 Monooxygenase ActVA-Orf6 단백질의 생산량은 20℃, IPTG 0.1mM 조건에서 2.38 g/L 을 보여 가장 높은 값을 나타냄

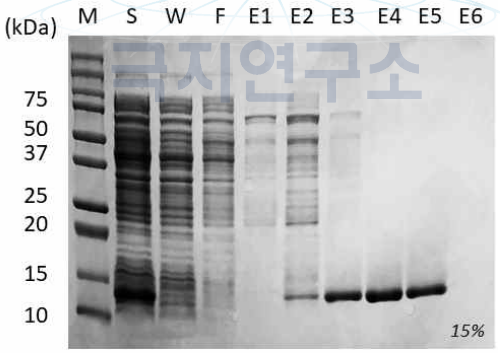


그림. 20℃, IPTG 0.1mM 에서 발현된 단백질의 정제. Lane M: size marker; lane S: 세포파쇄후 상등액; lanes W: wash buffer; lanes F: resin 통과 상등액; lanes E1~E6: elution buffer

KOPRI 극지연구소

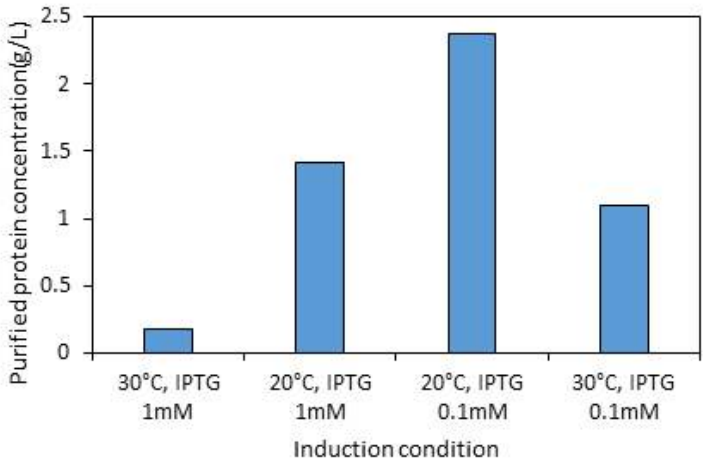


그림. 발현 유도 조건에 따른 정제된 단백질의 생산량 비교

○ 정제된 monooxygenase ActVA-Orf6 단백질의 생산은 상대적으로 저온인 20℃에서 수용성이며 11 kDa 사이즈의 니켈 resin 친화적인 단백질이 30℃에서 발현보다 더 높은 생산량을 보였고, IPTG의 농도가 1mM 보다 0.1mM로 처리했을 때 단백질 생산 효율이 더 높다는 것을 알 수 있었음

다. 유용균주 발굴을 위한 해양미생물 스크리닝 및 항생물질 분리정제 (KIOST)

1) 해양미생물 분리를 위한 시료(해양생물 34종, 퇴적토 11) 채집

2) 채집된 시료로부터 해양미생물 134주 분리 및 동정 후 보관

연차	채집지역	채집기간	시료종류		분리된 균수
3차년도 (2022)	독도주변 해역	2022.05.12.~05.16	해양생물 퇴적토	27종 3점	62주
		2022.07.27.~07.31	해양생물 퇴적토	7종 8점	72주

표. 2022년 해양미생물 분리를 위한 채집지역, 시료종류 및 분리된 균주 수

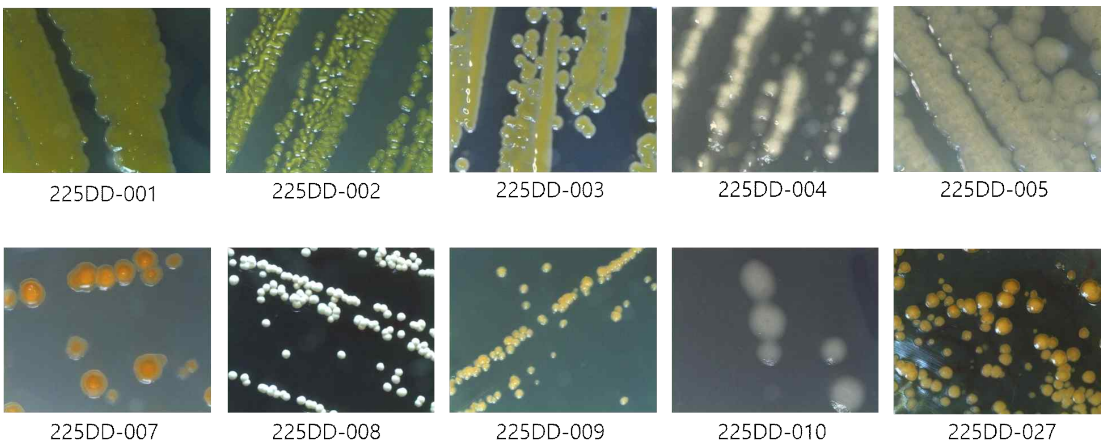


그림. 2022년 해양시료로부터 분리된 해양미생물들의 사진.

3) 유용균주로 선정된 *Streptomyces ardesiacus*의 배양액으로부터 이차대사산물의 분리 및 정제 - 156VN-095 균주는 16S rRNA 서열분석을 이용한 동정결과, *Streptomyces ardesiacus*로 확인됨.

- 대량배양 후, 배양액을 연속원심분리기를 이용하여 균체와 배양액으로 분리하고 배양액을 Ethyl Acetate로 추출한 후에 본 균주가 생성하는 이차대산산물을 Reversed-Phase Flash Column Chromatograph 및 HPLC를 이용하여 순수하게 분리 및 정제하였음.

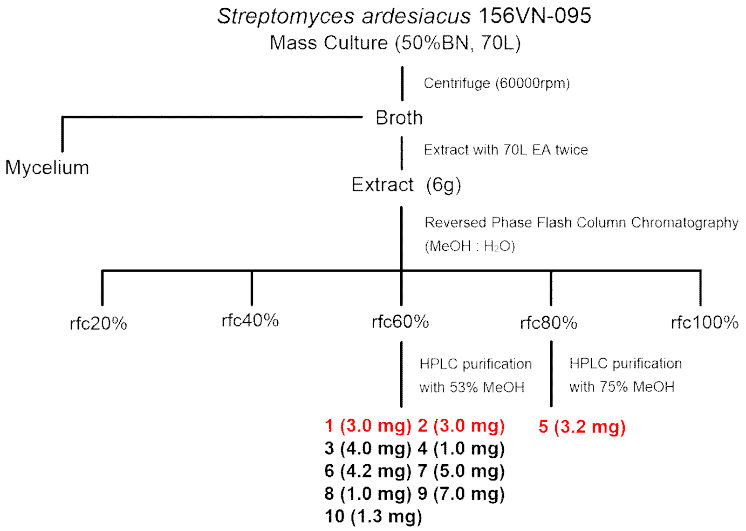


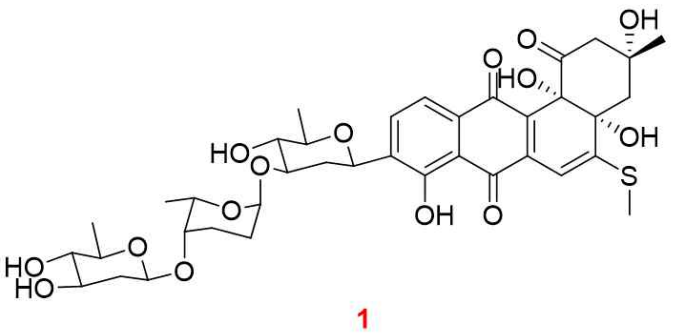
그림. *Streptomyces ardesiacus* 배양액으로부터 화합물의 분리 및 정제 과정.

- rfc 60% MeOH 분획물에서 C18 컬럼을 장착한 역상 HPLC를 이용하여 9종의 활성물질을 분리하였으며, rfc 80% MeOH 분획으로부터 역상 HPLC를 이용하여 1종류의 물질을 순수하게 분리하였음.

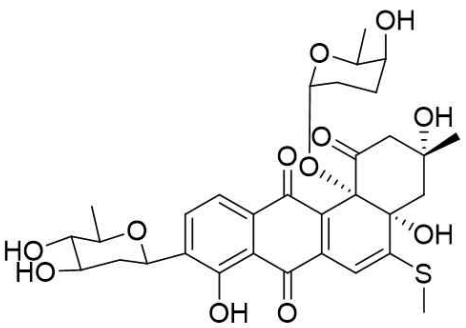
4) 화합물 10종의 구조 분석

- 분리된 화합물 10종을 HR-ESIMS 및 NMR 분석으로 구조를 규명하였음.
- 10종의 화합물들은 urdamycin 및 grincamycin 계열 물질로 확인되었으며 데이터베이스 검색 결과, 3종이 신규 화합물인 것으로 판명되었음.

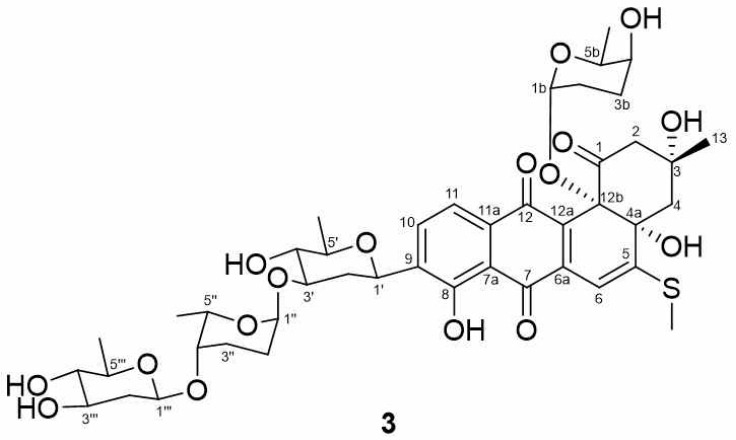
KOPRI 극지연구소



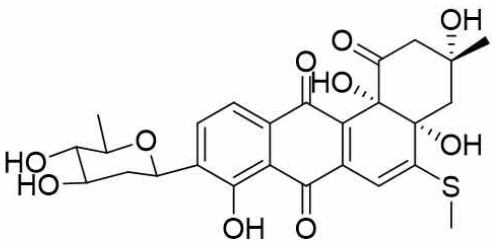
1



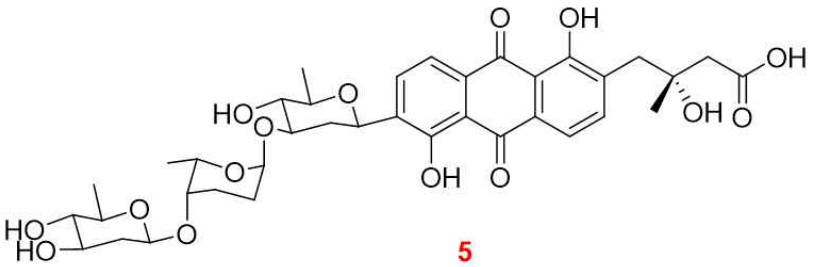
2



3

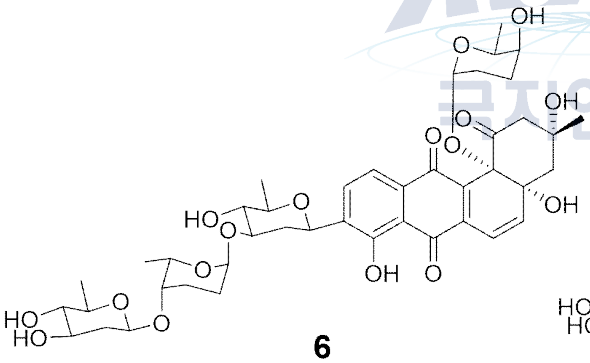


4

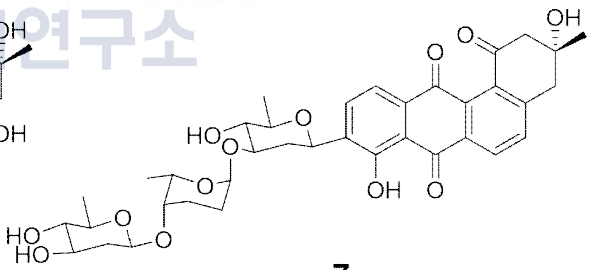


5

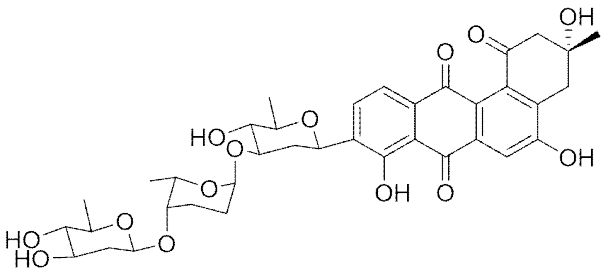
그림. 분리된 화합물 1-5의 구조.



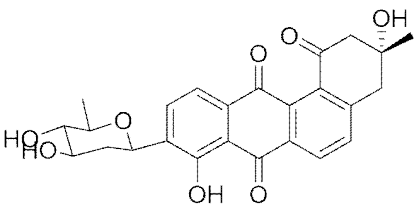
6



7



8



9

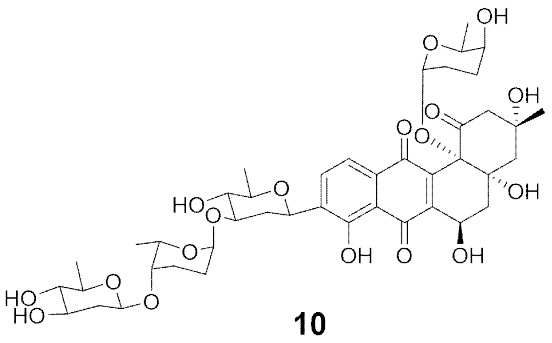


그림. 분리된 화합물 6-10의 구조.

- 신규 화합물 1의 구조 분석

○ 신규 화합물 1은 암적색의 가루 형태로 분리되었으며, 고분해능 질량분석기(HR-ESIMS)와 ^{13}C NMR 스펙트럼의 해석을 통해, 화합물 1의 분자식 $C_{38}H_{48}O_{15}S$과 분자량 776(m/z 799.2612 $[M+Na]^+$, calcd 799.2612)을 결정하였음.

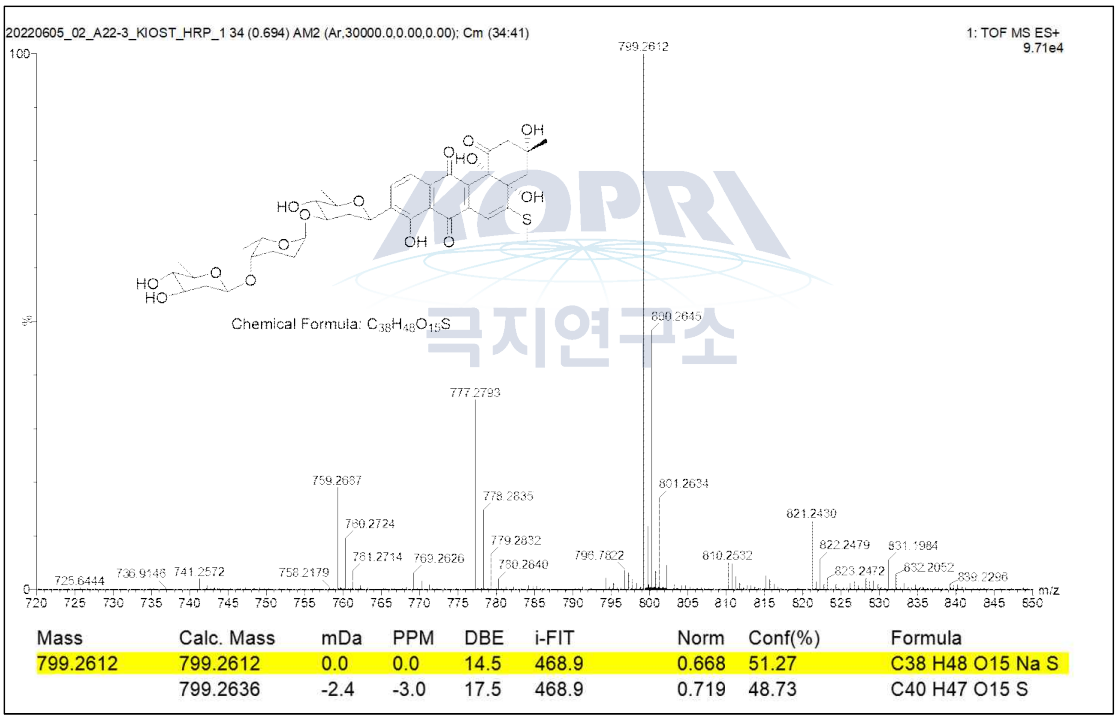


그림. 신규 화합물 1의 구조와 HR-ESI-MS 분석 자료.

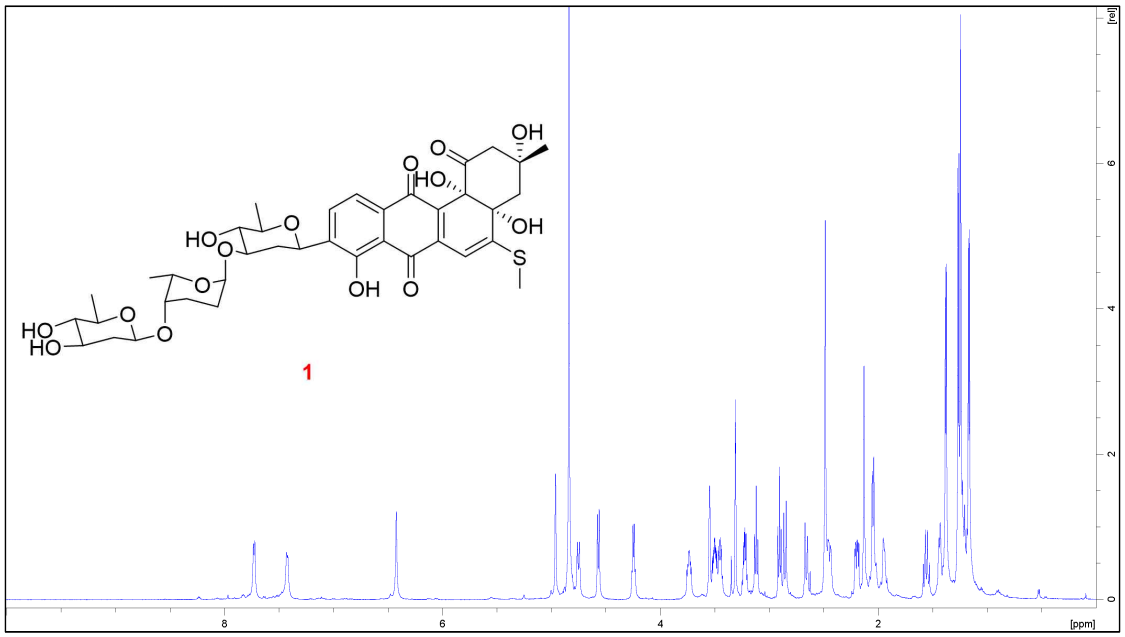


그림. 신규 화합물 **1**의 ^{1}H NMR 스펙트럼 (600 MHz, CD_3OD).

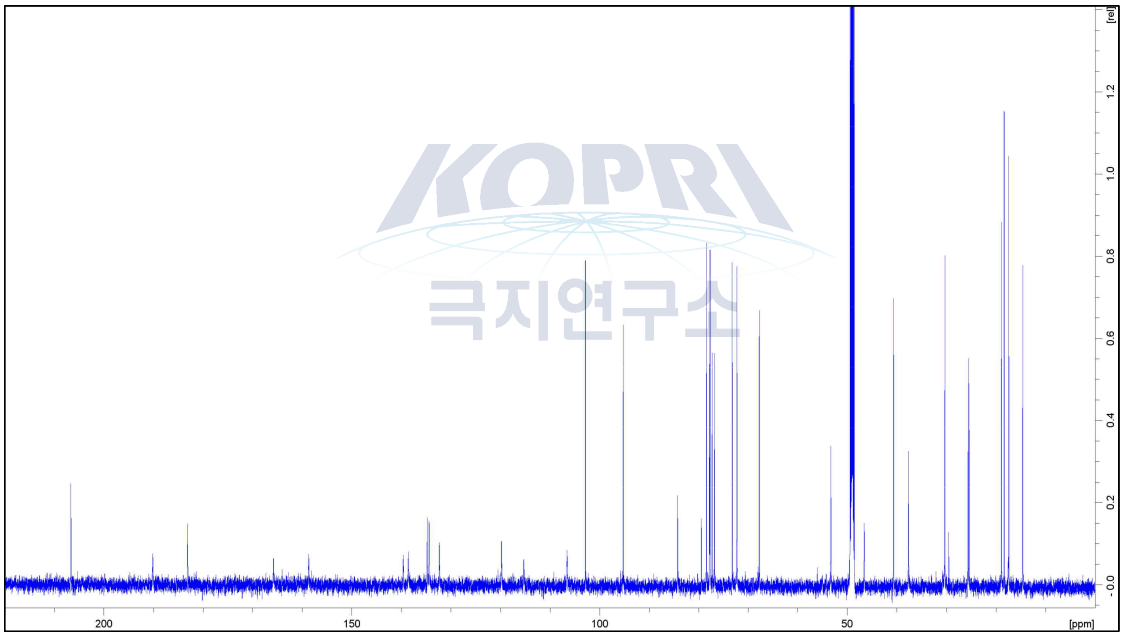


그림. 신규 화합물 **1**의 ^{13}C NMR 스펙트럼 (150 MHz, CD_3OD).

○ ^{1}H NMR spectrum의 해석에 의해, 신규 화합물 1은 3개의 aromatic 수소 H-10(δ_H 7.73, d, J = 7.6 Hz), H-11(δ_H 7.42, d, J = 6.8 Hz), H-6(δ_H 6.42)와 2개의 anomeric 수소 H-1″(δ_H 4.96), H-1‴(δ_H 4.57, d, J = 9.6 Hz), 9개의 oxygenated methine기 수소(δ_H 2.91-4.75), 12개의 methylene기 수소(δ_H 1.22-2.85), 5개의 methyl기 수소(δ_H 1.17-2.49)들을 가지는 것을 확인하였음. ^{13}C NMR과 HSQC spectrum의 면밀한 해석을 통해, 분자 내 탄소와 수소의 결합 관계를 확인하고 각각 탄소와 수소의 종류를 확인할 수 있었음. 3개의 ketone C-1(δ_C 206.6), C-7(δ_C 190.1), C-12(δ_C 183.1)과, 3개의 방향족 탄소 C-10(δ_C 134.4), C-11(δ_C 119.7), C-6(δ_C 106.5), 7개의 non-protonated sp^2 탄소(δ_C 115.3-165.8), 2개의 anomeric 탄소 C-1‴(δ_C 102.8), C-1″(δ_C 95.2), 9개의 oxygenated methine기 탄소(δ_C 67.8-78.4), 3개의 tertiary

alcohols C-4a(δ_C 84.2), C-12b(δ_C 79.5), C-3(δ_C 77.3), 6개의 methylene기 탄소(δ_C 25.4-53.3), 5개의 methyl기 탄소(δ_C 14.6-30.3)를 확인할 수 있었음. HMBC와 COSY NMR 스펙트럼의 해석을 통해, 각 탄소들의 결합 관계를 확인하고 이들의 면밀한 해석을 통해 전체구조를 결정하였음. COSY NMR 스펙트럼을 통해 H_3-6′(δ_H 1.38)에서 H-1′(δ_H 4.75)까지, H_3-6″(δ_H 1.17)에서 H-1″(δ_H 4.96)까지, H_3-6‴(δ_H 1.26)에서 H-1‴ (δ_H 4.57)까지 연결되는 각각의 당 구조가 존재하는 것을 확인할 수 있었음. HMBC 스펙트럼의 통해 각 당들의 연결관계를 확인하였으며, H-10(δ_H 7.73)과 C-8(δ_C 158.7), C-11a(δ_C 132.3) 그리고 H-11(δ_H 7.42)과 C-9(δ_C 138.5), C-7a(δ_C 115.3), C-12(δ_C 183.1)사이의 HMBC 상관관계 신호 및 H-6(δ_H 6.42)와 C-7 (δ_C 190.1), C-12a(δ_C 134.7), C-4a(δ_C 84.2)간의 신호를 통해 C-4a에서 C-12b에 이르는 불포화 고리구조의 존재를 알 수 있었음. 또한 H_2-2(δ_H 2.66, 2.85)와 C-1(δ_C 206.6), C-12b(δ_C 79.5) 그리고 H-4(δ_H 2.13)와 C-5(δ_C 165.8), C-12b(δ_C 79.5)사이의 HMBC 상관관계 신호를 통하여 이 화합물 구조가 angucycline 유사구조임을 확인하였으며 최종적으로 1의 평면구조를 규명 할 수 있었음. 신규 화합물 **1**의 ^{1}H NMR spectrum은 **3**(urdamycin E)의 ^{1}H NMR spectrum과 유사하였으며 **1**의 구조는 **3**의 C-12b에 연결되는 sugar moiety 부분만 없는 구조임을 해석할 수 있었음.

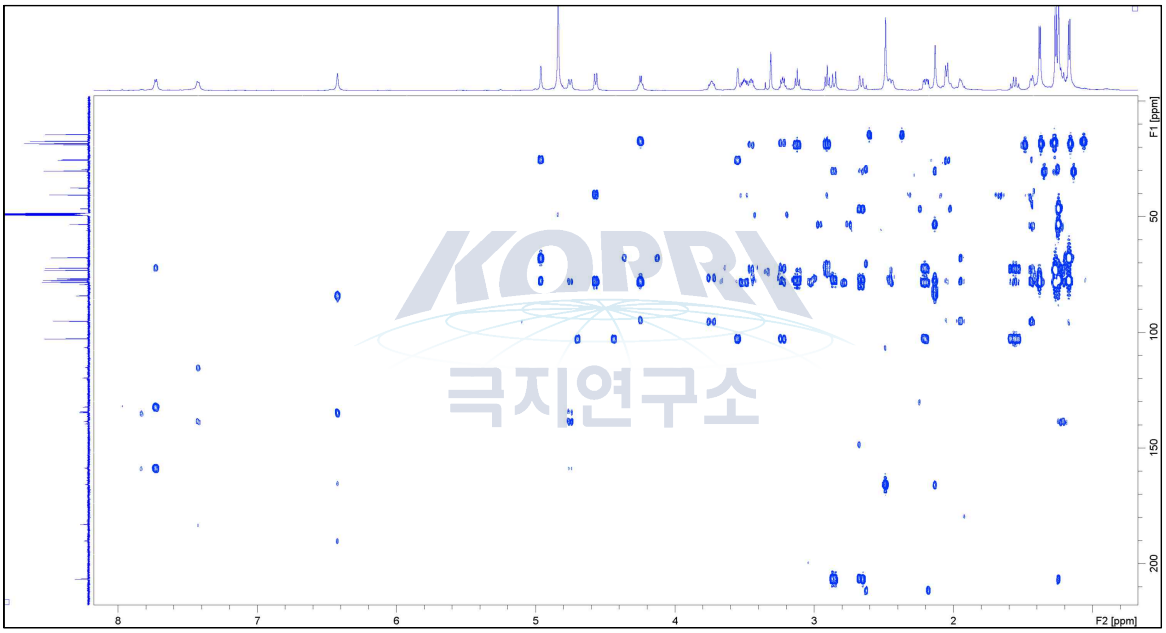


그림. 신규 화합물 **1**의 HMBC NMR 스펙트럼 (CD_3OD).

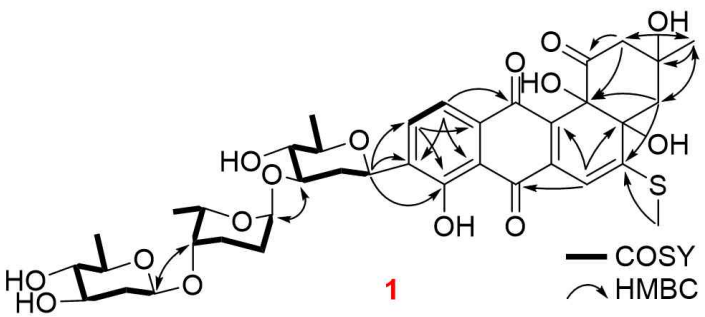


그림. 신규 화합물 (**1**)의 Key COSY와 HMBC 상관관계.

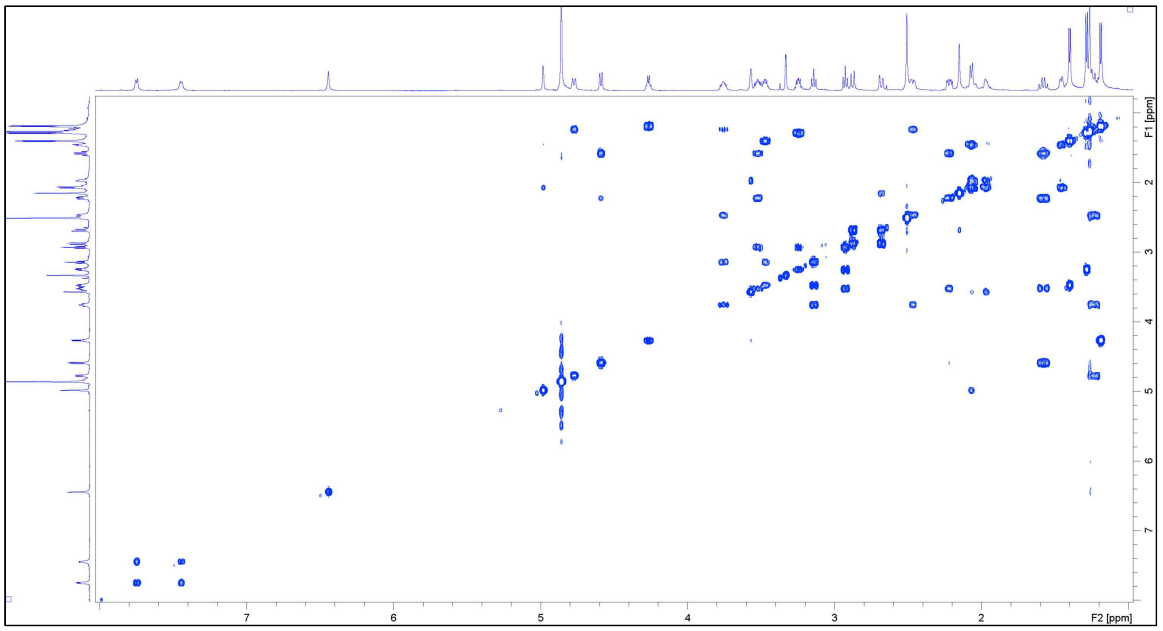


그림. 신규 화합물 **1**의 COSY NMR 스펙트럼 (CD_3OD).

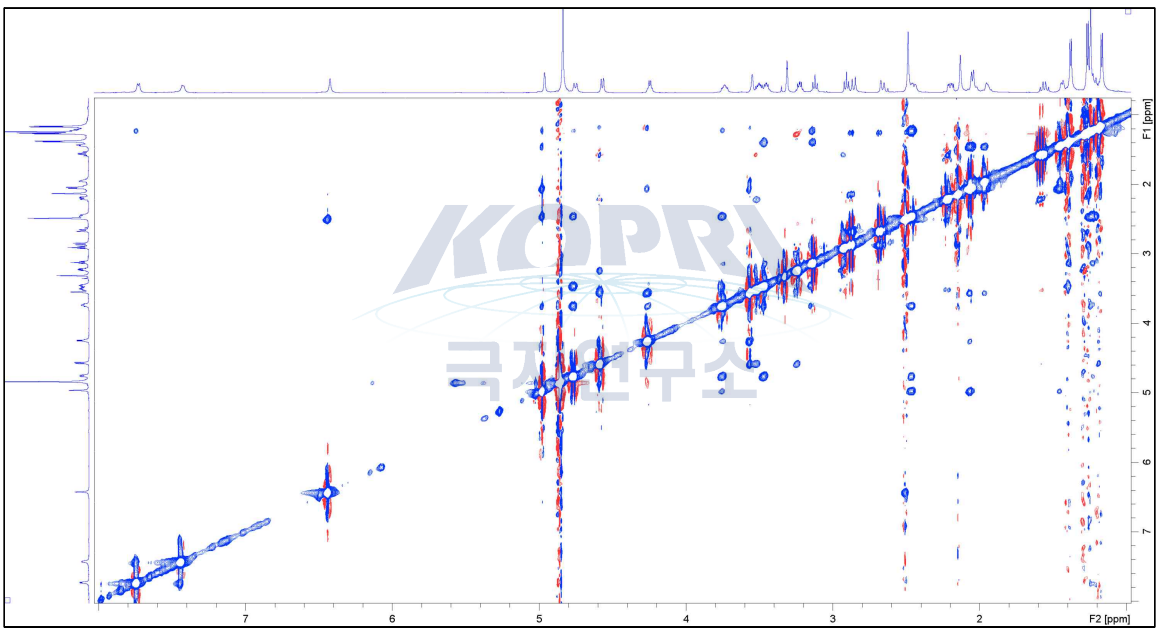


그림. 신규 화합물 **1**의 NOESY NMR 스펙트럼 (CD_3OD).

○ trisaccharide 부분의 상대구조는 $^{3}J_{H,H}$ coupling 상수와 NOESY 자료 분석에 의하여 결정되었음. H-1′에서 H-3′와 H-5′로의 NOESY 신호를 통해 H-1′, H-3′, H-5′수소가 모두 같은 평면에 존재한다는 사실을 알 수 있었음. 또한 H-4′수소(δ_H 3.12, t)에서 관찰되는 coupling 상수(J = 8.9 Hz)는 H-4′수소가 H-3′, H-5′수소와 diaxial 관계로 존재한다는 사실을 뒷받침하였음. 따라서 첫 번째 위치의 당은 *D*-olivose 형태임을 알 수 있었으며 세 번째 위치의 당 또한 NOESY 신호를 통해 *D*-olivose 형태인 것을 확인할 수 있었음. 두 번째 위치의 당의 경우 H-4″와 H-5″사이의 강한 NOESY 신호와 H-1″과 H-5″간의 약한 신호를 고려할 때 두 번째 당은 *L*-rhodinose 형태인 것으로 결정하였음.

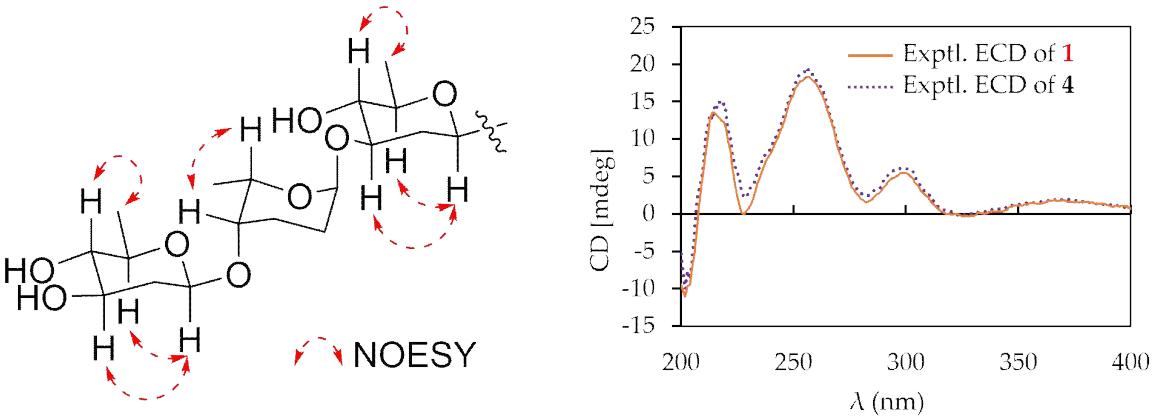
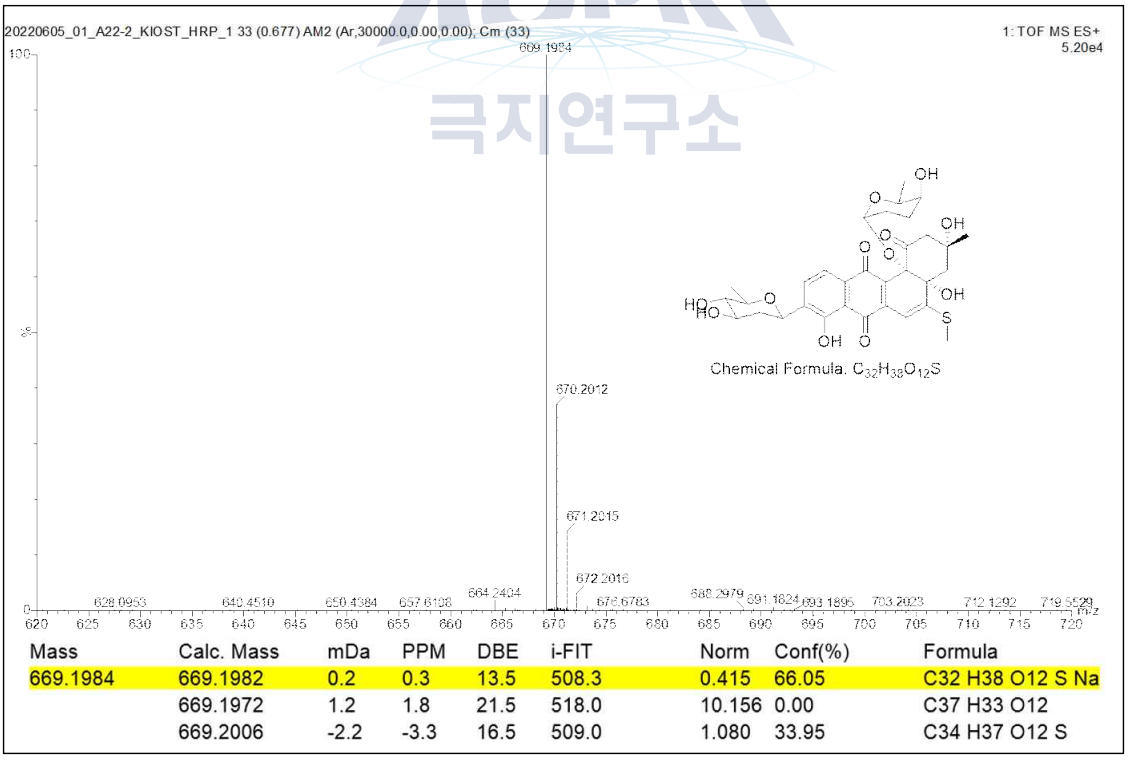


그림. 신규 화합물 (1)의 trisaccharide 구조 Key NOESY 상관관계와 화합물 1, 4 ECD 스펙트럼 비교 그림.

○ 알려진 화합물인 4의 ^{1}H, ^{13}C NMR 자료 비교를 통해 화합물 1과 4는 유사한 구조임을 확인하였음. 같은 균주에서 생성된 화합물의 생합성 경로를 고려하였을 때 1과 4는 같은 stereocenter를 가질 것으로 예상할 수 있음. 이런 사실은 화합물 1과 4의 ECD 스펙트럼을 비교하였을 때, 거의 같은 스펙트럼을 가진다는 사실로도 뒷받침되었음. 따라서 신규 화합물 1의절대구조는 4의 C-3′ 위치에 연결된 sugar moiety 부분이 결실된 것을 제외하고는 화합물 4와 같은 구조임을 알 수 있으며 신규 화합물 1의 이름을 urdamycin W로 명명하였음.

- 신규 화합물 2의 구조 분석



Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
669.1984	669.1982	0.2	0.3	13.5	508.3	0.415	66.05	C32 H38 O12 S Na
	669.1972	1.2	1.8	21.5	518.0	10.156	0.00	C37 H33 O12
	669.2006	-2.2	-3.3	16.5	509.0	1.080	33.95	C34 H37 O12 S

그림. 신규 화합물 2의 구조와 HR-ESI-MS 분석 자료.

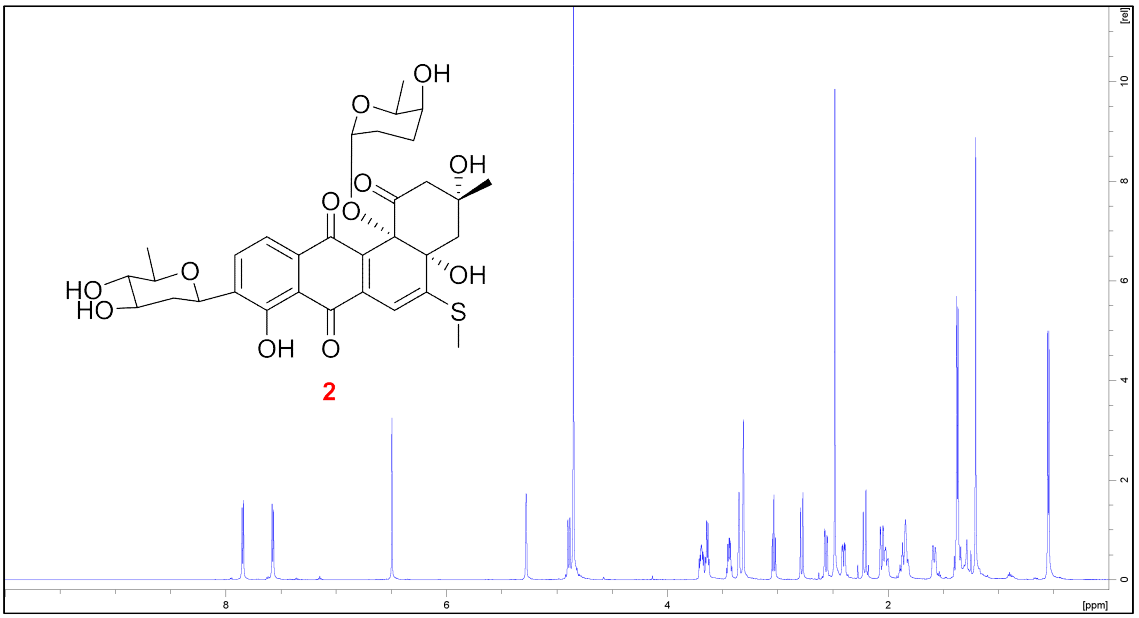


그림. 신규 화합물 **2**의 ^{1}H NMR 스펙트럼 (600 MHz, CD_3OD).

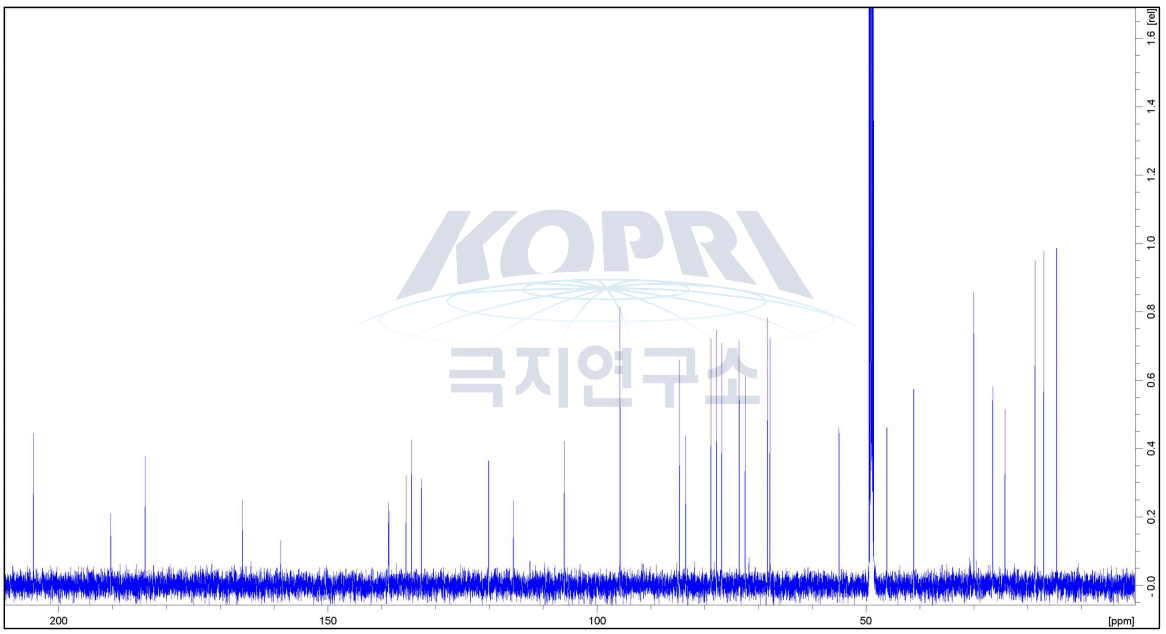


그림. 신규 화합물 **2**의 ^{13}C NMR 스펙트럼 (150 MHz, CD_3OD).

○ 신규 화합물 **2** 또한 암적색의 가루 형태로 분리되었으며 HR-ESI-MS와 ^{13}C NMR의 해석을 통해, 신규 화합물 2의 분자식 $C_{32}H_{38}O_{12}S$과 분자량 646(m/z 669.1984 $[M+Na]^+$, calcd 699.1982)을 확인하였음. ^{1}H NMR spectrum의 해석에 의하여, 신규 화합물 2는 3개의 aromatic 수소 H-10(δ_H 7.84, d, J = 7.8 Hz), H-11(δ_H 7.57, d, J = 7.8 Hz), H-6(δ_H 6.49, s)와 1개의 anomeric 수소 H-1b(δ_H 5.28, s), 6개의 oxygenated methine기 수소 (δ_H 3.03-4.89), 10개의 methylene기 수소 (δ_H 1.38-2.78), 4개의 methyl기 수소 (δ_H 0.55-2.48)을 가지는 것을 확인하였음. ^{13}C NMR과 HSQC spectrum의 면밀한 해석을 통해, 분자 내 탄소와 수소의 결합 관계를 확인하고 각각 탄소와 수소의 종류를 확인할 수 있었음. 3개의 ketones C-1(δ_C 204.7), C-7(δ_C 190.3), C-12(δ_C 183.9), 3개의 방향족 탄소 C-10(δ_C 134.4), C-11(δ_C 120.1), C-6(δ_C 106.0), 7개의 non-protonated sp^2 탄소(δ_C 115.5-165.8), 1개의 anomeric 탄소 C-1b(δ_C 95.7), 6개의 oxygenated methine기 탄소(δ_C 67.8-78.8), 3개의 tertiary alcohols C-4a(δ_C 84.7), C-12b(δ_C 83.5), C-3(δ_C 76.8), 5개의 methylene기 탄소(δ_C

24.2-55.0), 4개의 methyl기 탄소(δ_C 14.6-30.0)를 확인할 수 있었음. 또한 HMBC와 COSY 등의 2D NMR 스펙트럼의 해석을 통해, 각 탄소들의 결합 관계를 확인하고 전체구조를 해석하였음. 화합물 2의 구조는 urdamycin V의 구조와 유사하였으며 urdamycin V의 H-1″위치의 anomeric 수소와 H-6″위치의 methyl기 수소에서 나오는 신호가 존재하지 않는 것을 통하여 urdamycin V의 구조에서 C-3′에 연결되는 sugar moiety 부분만 없는 구조가 신규 화합물 **2**의 구조임을 확인할 수 있었음.

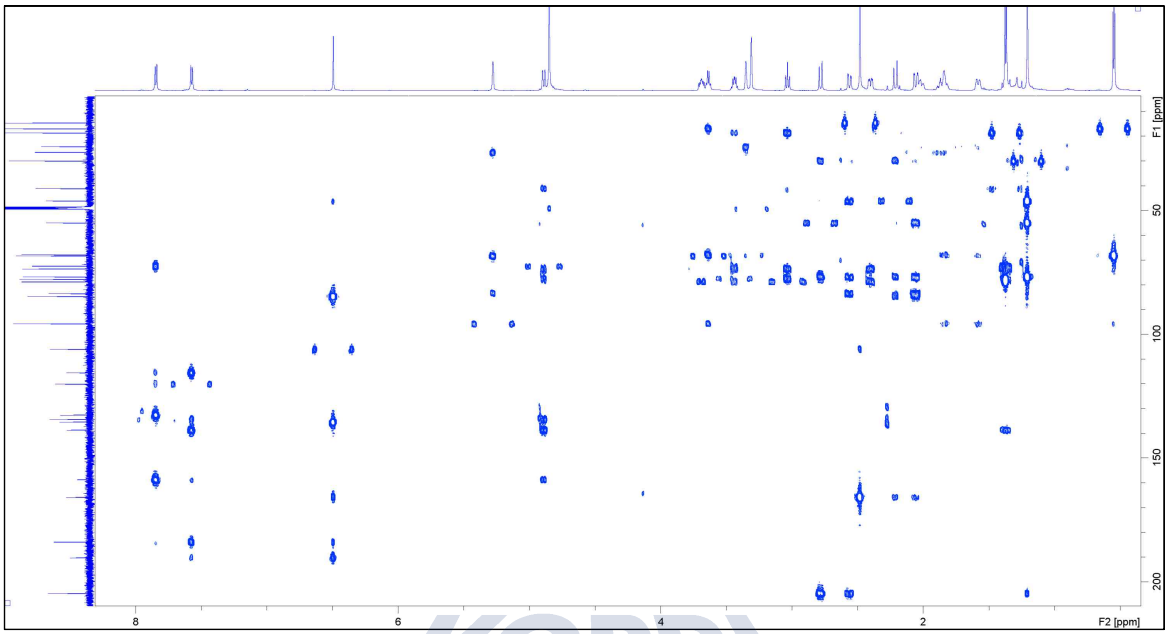


그림. 신규 화합물 **2**의 HMBC NMR 스펙트럼 (CD_3OD).

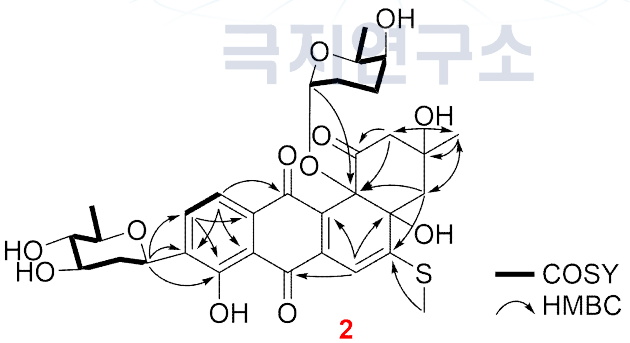


그림. 신규 화합물 **2**의 Key COSY와 HMBC 상관관계.

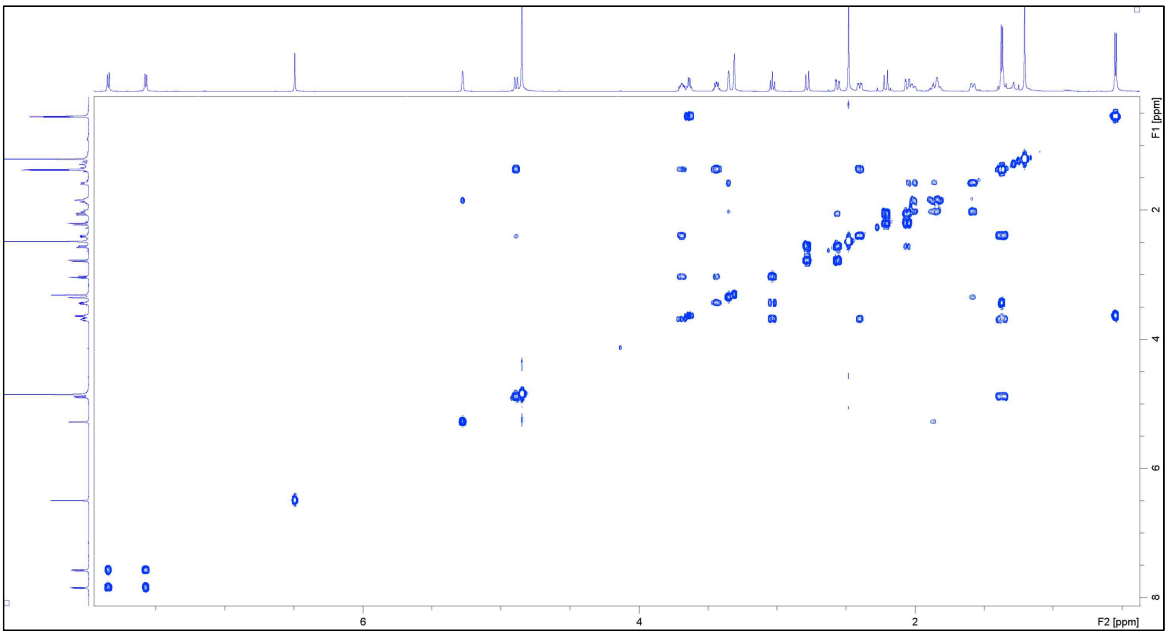


그림. 신규 화합물 **2**의 COSY NMR 스펙트럼 (CD_3OD).

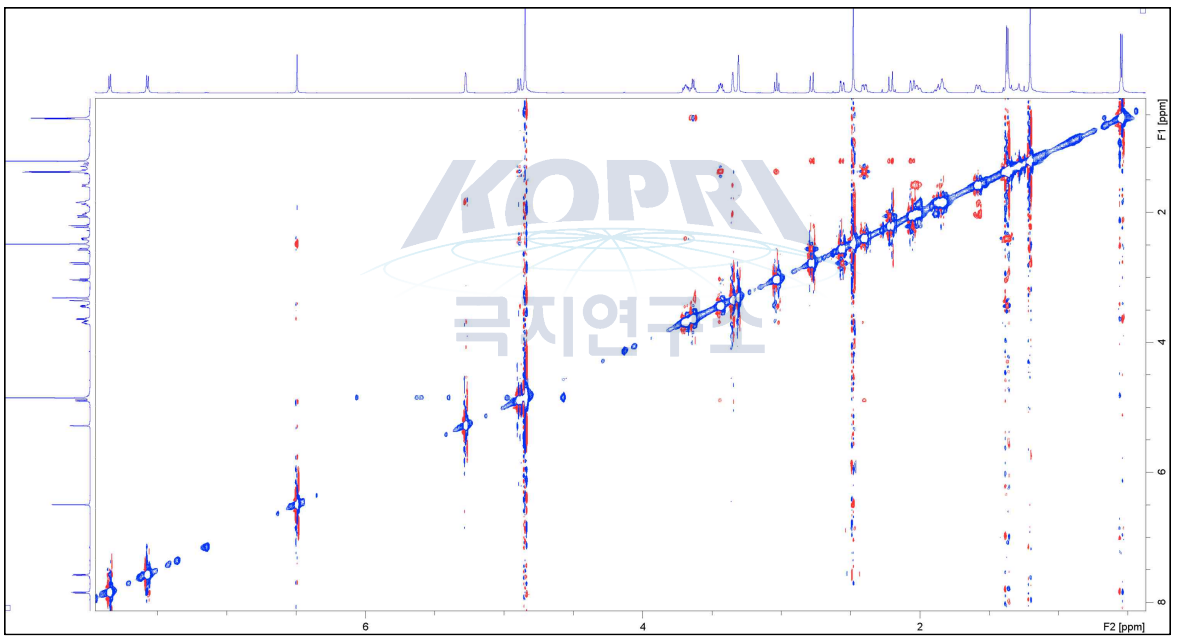


그림. 신규 화합물 **2**의 NOESY NMR 스펙트럼 (CD_3OD).

○ 2개의 sugar moiety의 상대구조는 NOESY 자료 분석에 의하여 결정되었음. H-1′에서 H-3′와 H-5′로의 NOESY 상관관계를 통해 H-1′, H-3′, H-5′수소가 diaxial 관계로 존재한다는 사실 사실을 알 수 있었음. 또한 H-4b 에서 H-5b로의 NOESY 상관관계를 통해 H-4b 수소와 H-5b 수소가 같은 평면에 존재한다는 사실을 알 수 있었음. 따라서 C-9 위치에 연결된 당이 *D*-olivose 형태임을 알 수 있었으며 C-12b 위치에 연결된 당은 *L*-rhodinose 형태인 것으로 결정되었음.

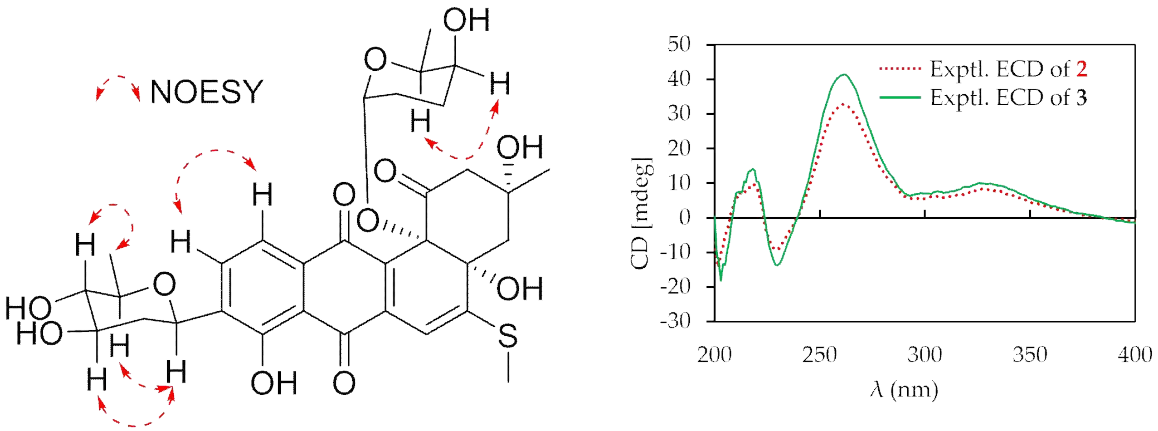


그림. 신규 화합물 (2)의 Key NOESY 상관관계와 2, 3 ECD 스펙트럼 비교 그림.

○ 알려진 화합물인 3의 ^{1}H, ^{13}C NMR 자료 비교를 통해 2와 3은 유사한 구조임을 확인할 수 있었음. 2와 3의 ECD 스펙트럼을 비교한 결과, 이 두 가지의 화합물들은 거의 같은 스펙트럼을 가지고 있었음. 따라서 ECD 분석 결과 및 같은 균주에서 생성된 화합물의 생합성 경로를 고려하였을 때 3의 절대구조는 C-3′ 위치에 sugar부분이 결실된 것을 제외하고는 같은 구조임을 알 수 있었으며 화합물 2의 이름을 urdamycin X로 명명하였음.

- 신규 화합물 5의 구조 분석

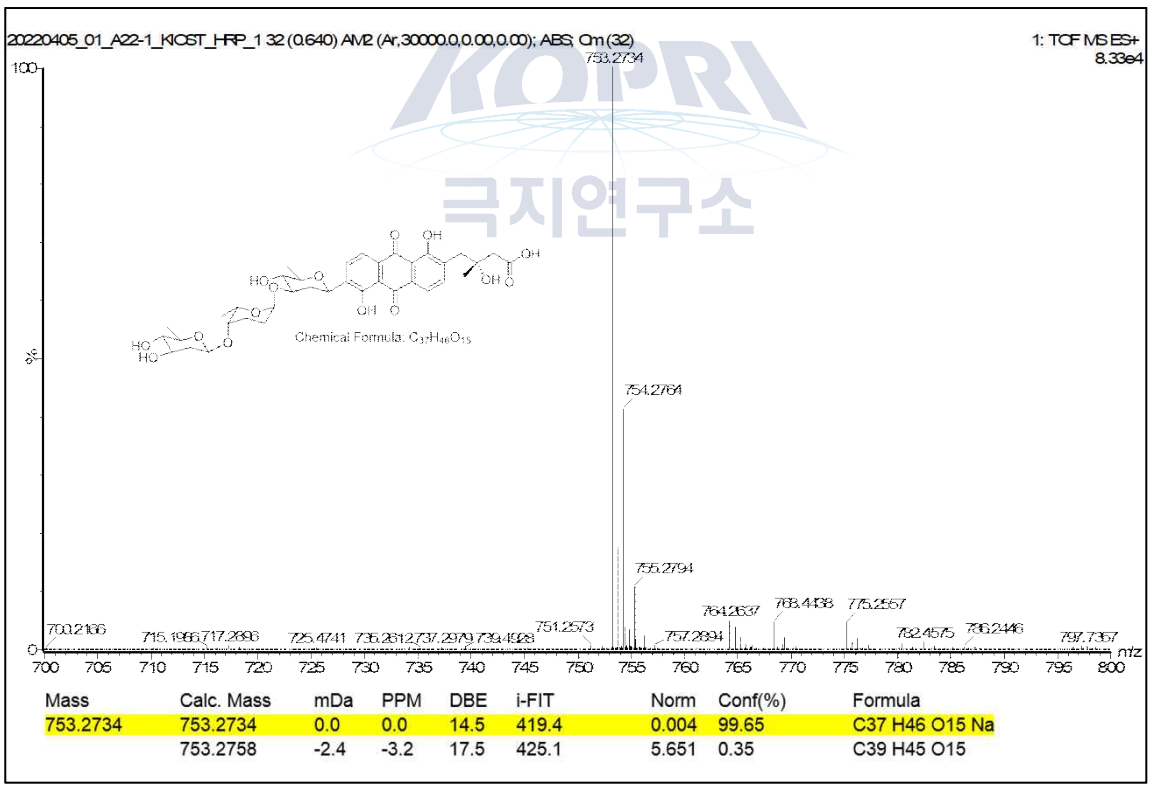


그림. 신규 화합물 5의 구조와 HR-ESI-MS 분석 자료.

KOPRI 극지연구소

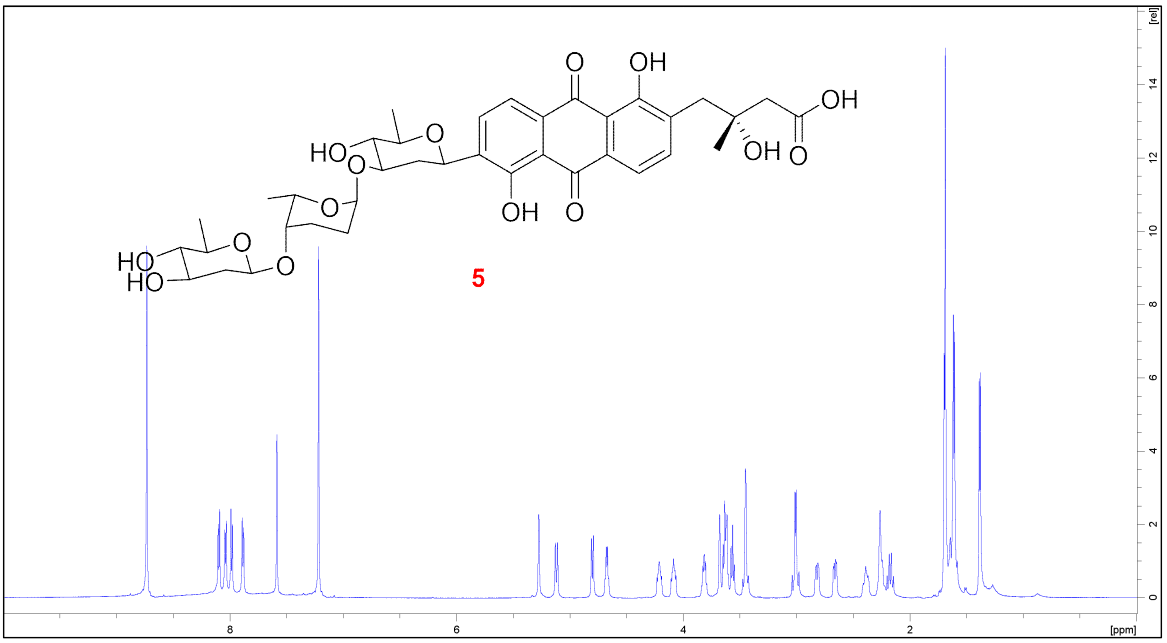


그림. 신규 화합물 **5**의 ^{1}H NMR 스펙트럼 (600 MHz, pyridine-d_5).

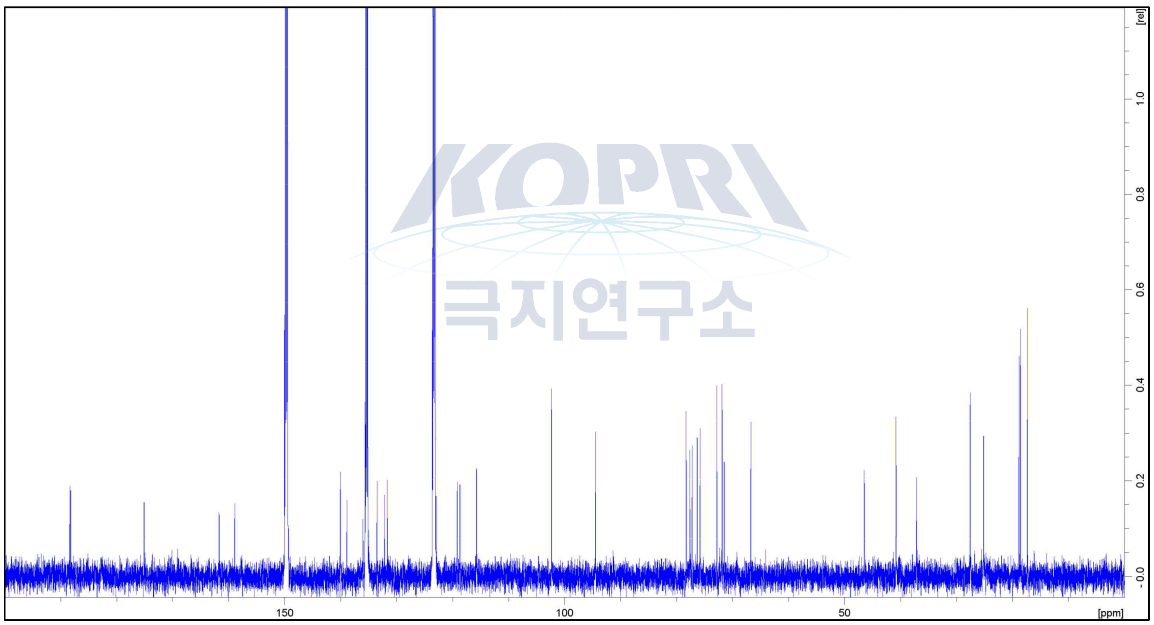


그림. 신규 화합물 **5**의 ^{13}C NMR 스펙트럼 (150 MHz, pyridine-d_5).

○ 신규 화합물 **5**는 오랜지색의 가루 형태로 분리되었으며, HR-ESIMS와 ^{13}C NMR을 통해, 신규 화합물 **5**는 분자식 $C_{37}H_{46}O_{15}$과 분자량 730(m/z 753.2734 $[M+Na]^+$, calcd 753.2734)을 가지는 것을 확인하였음. 신규 화합물 **5**는 화합물 **1**, **2**와는 다르게 CD_3OD에 잘 녹지 않는 물성을 나타내어 pyridine-d_5에 녹여 NMR을 측정하였음. 신규 화합물 **5**의 ^{1}H NMR spectrum은 알려진 화합물 **7**(urdamycin B)의 ^{1}H-NMR spectrum과 유사하였으며 Mass 데이터로부터 얻은 분자식을 통해 화합물 **7**과 유사한 구조를 가지며 **7**과 비교하여 hydroxy 그룹이 2개가 추가된 구조일 것으로 예측하였음. ^{13}C NMR spectrum의 분석 결과, 신규 화합물 **5**는 일반적인 urdamycin 화합물에서 보이는 δ_C 204.7 영역의 ketone 작용기가 없는 것을 확인할 수 있었으며, 대신 δ_C 175.7에서 carbonyl기 신호가 존재하는 것을 알 수 있었음. 이를 통하여 **7**번 화합물 구조에서 D링이 열리고 hydrolyzed 되면서 ketone 작용기가 carboxyl 작용기로 변화된 구

조일 것으로 예측 하였음. HMBC와 COSY-NMR 스펙트럼의 해석을 통해 각 탄소들의 결합 관계를 확인하고 전체구조를 해석하였음. 화합물 2의 구조는 urdamycin V와 유사하였으며 urdamycin V의 H-1″위치의 anomeric 수소와 H-6″위치의 methyl기 수소에서 나오는 신호가 존재하지 않았음. 2의 구조는 urdamycin V의 C-3′에 연결되는 sugar moiety 부분만 결실된 구조임을 확인할 수 있었음.

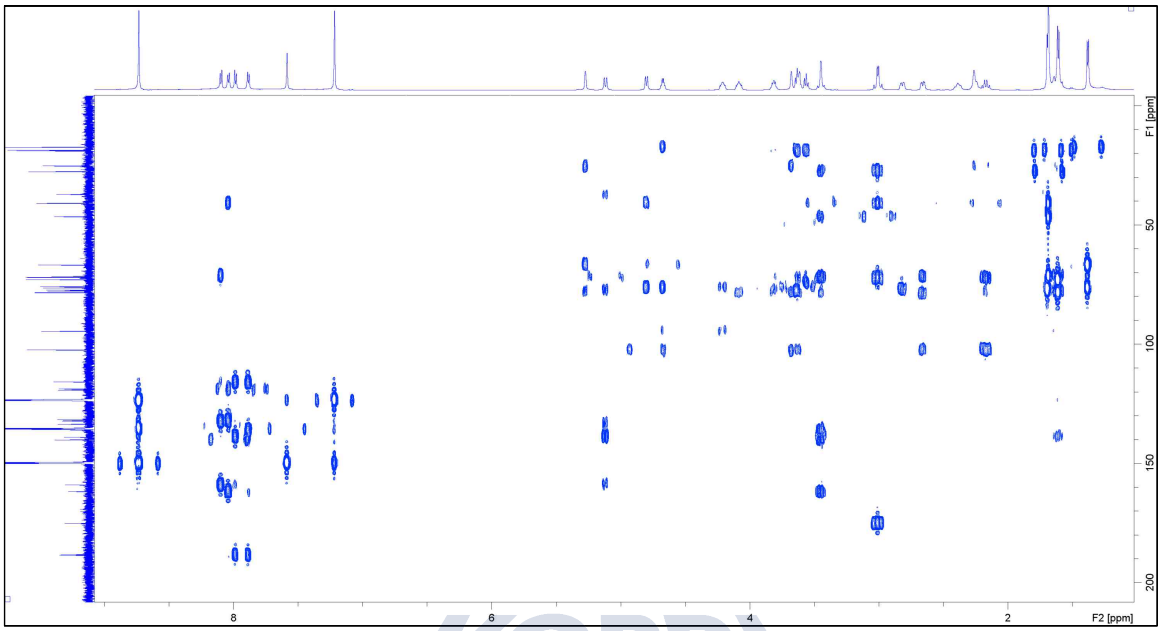


그림. 신규 화합물 5의 HMBC NMR 스펙트럼 (pyridine-d_5).

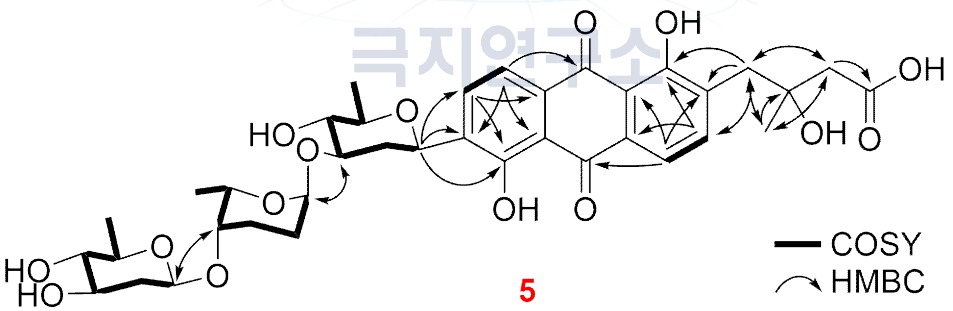


그림. 신규 화합물 5의 Key COSY와 HMBC 상관관계.

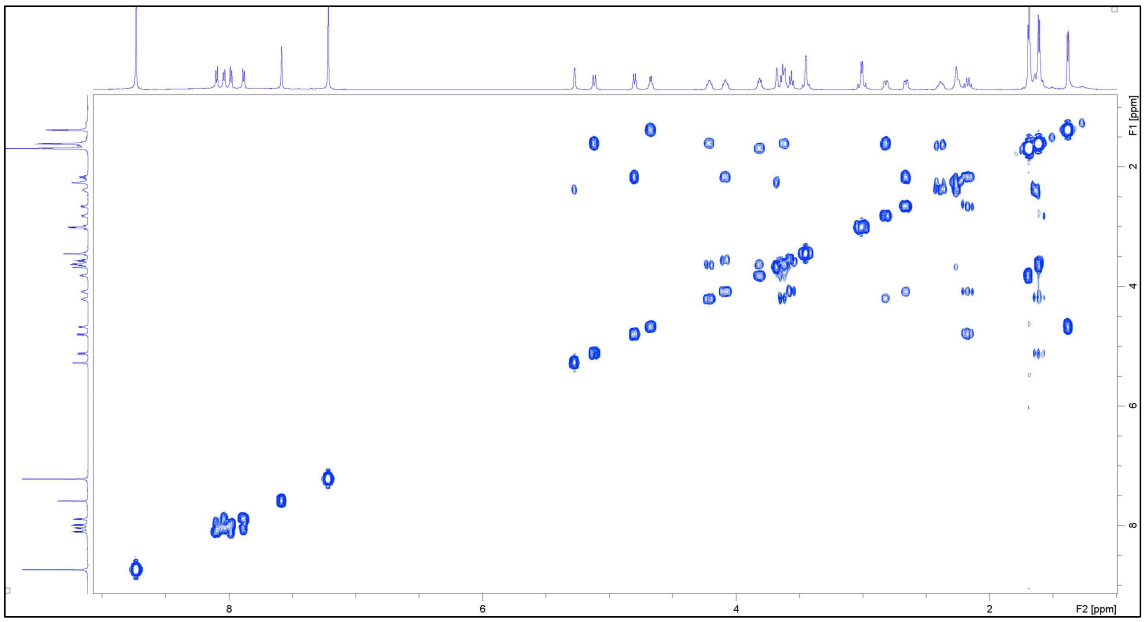


그림. 신규 화합물 **5**의 COSY NMR 스펙트럼 (pyridine-d_5).

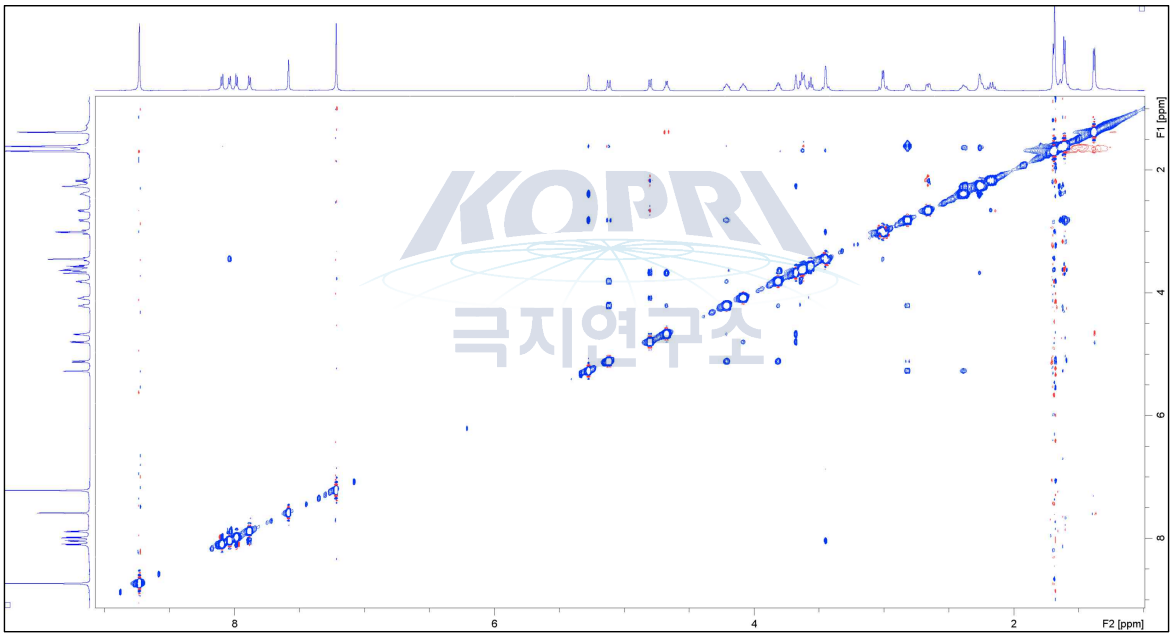


그림. 신규 화합물 **5**의 NOESY NMR 스펙트럼 (CD_3OD).

○ 신규 화합물 **5**에 존재하는 2개의 sugar moiety의 상대구조는 NOESY 자료 분석에 의해 결정되었음. H-1′에서 H-3′와 H-5′로의 NOESY 상관관계를 통해 H-1′, H-3′, H-5′ 수소가 diaxial 관계로 존재한다는 사실 사실을 알 수 있었음. 또한 H-4b 에서 H-5b 로의 NOESY 상관관계를 통해 H-4b 수소와 H-5b 수소가 같은 평면에 존재한다는 사실을 알 수 있었음. 따라서 C-9 위치에 연결된 당이 *D*-olivose 형태임을 결정하였으며 C-12b 위치에 연결된 당은 *L*-rhodinose 형태인 것으로 결정되었음.

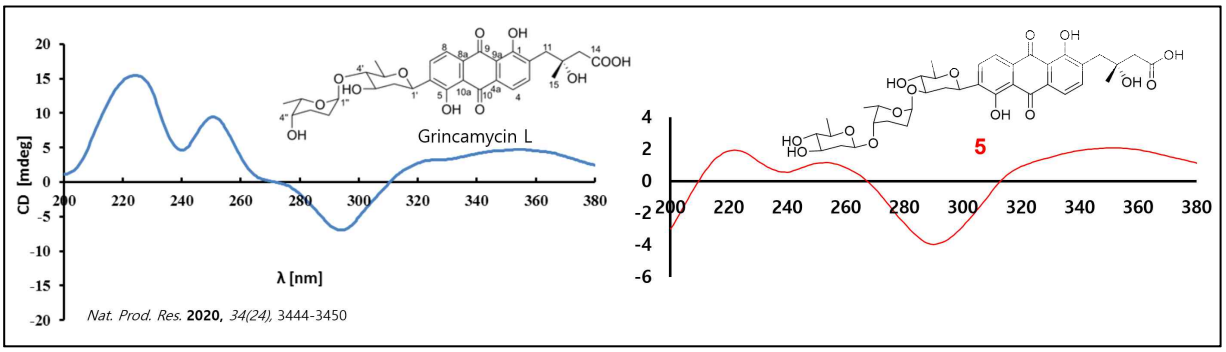


그림. Grincamycin L과 신규 화합물 5의 ECD 스펙트럼의 비교 그림.

○ 신규 화합물 **5**의 생합성 경로를 고려하였을 때, 화합물 **5**는 **7**에서 유래되어 D링이 열려 생성된 것으로 생각되며, 따라서 같은 stereocenter를 가지는 것으로 판단됨. 또한 문헌 검색으로 유사한 구조를 가지며 이미 알려진 화합물인 grincamycin L과 화합물 5의 ECD 스펙트럼 비교 결과, 거의 유사한 스펙트럼을 가지는 것을 확인할 수 있었음. 이를 통하여 신규 화합물 5의 절대구조는 grincamycin L의 C-4″ 위치에 sugar 부분이 1개가 없는 것을 제외하고는 같은 구조임을 알 수 있었으며 신규 화합물 **5**의 이름을 grincamycin U로 명명하였음.

5) 신규 화합물의 항균활성 평가

- CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute)의 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Tenth Edition. CLSI document M07-A10에 의거하여 microdilution 방법으로 그람 양성균(*Bacillus subtilis*(KCTC1021), *Micrococcus luteus*(KCTC1915), *Staphylococcus aureus*(KCTC1927))에 대한 신규 화합물 3종의 항균 활성을 시험하였음.

- 신규 화합물 **1**, **2**, **5**의 항균활성 평가 결과

표. 신규 화합물의 MIC 시험 결과

Strains	MIC (μg/ml)			
	신규 화합물 **1**	신규 화합물 **2**	신규 화합물 **5**	Kanamycin
Bacillus subtilis	8.0	>128	32.0	0.25
Micrococcus luteus	64.0	64.0	>128	1.0
Staphylococcus aureus	32.0	64.0	>128	0.5

○ 신규 화합물 **1**은 *Bacillus subtilis*에 대하여 8 μg/ml의 MIC 값을 보였으며, *Micrococcus luteus* 및 *Staphylococcus aureus*에 대하여 각각 64, 32 μg/ml의 MIC 값을 나타내어 분리된 신규 화합물들 중에서 가장 강한 항균활성을 나타내었음. 신규 화합물 2는 *Micrococcus luteus* 및 *Staphylococcus aureus*에 대하여 64 μg/ml의 MIC 값을 보였으며, 신규 화합물 5의 경우에는 *Bacillus subtilis*에 대하여 32 μg/ml의 MIC 값을 보였음. 항균 활성을 나타내는 데 있어서, 구조적으로 D링이 다른 부분에 의하여 가려서 막히거나 D링이 열리는 경우에 항균활성이 감소하는 것으로 판단됨. 문헌 조사에 따르면 angucycline glycoside 계열의 물질의 경우 그람양성 균에 대한 활성과 암세포에 대한 세포독성을 가지며 4-64 μg/ml 정도의 MIC 값을 가지는 것으로 검색됨. 신규 물질의 경우 보통 또는 약한 MIC 값을 보였으며 연구 결과를 논문 투고 완료하였음(*Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23(22)*, 13779).

6) 유용균주 *Streptomyces zhaozhouensis*의 배양액으로부터 이차대사산물의 분리, 정제

- 208DD-064 균주는 16S rRNA 서열분석 결과, *Streptomyces zhaozhouensis*로 동정됨.
- 10%BN Broth로 70L 대량배양 후, 배양액을 연속원심분리기를 이용하여 균체와 배양액으로 분리하고 배양액을 Ethyl Acetate로 추출한 후에 본 균주가 생성하는 이차대산산물을 Reversed-Phase Flash Column Chromatograph 및 HPLC를 이용하여 순수하게 분리 및 정제하였음.
- rfc 100% MeOH 분획물에서 C18 컬럼을 장착한 역상 HPLC를 이용하여 6종의 활성물질을 분리하였음.

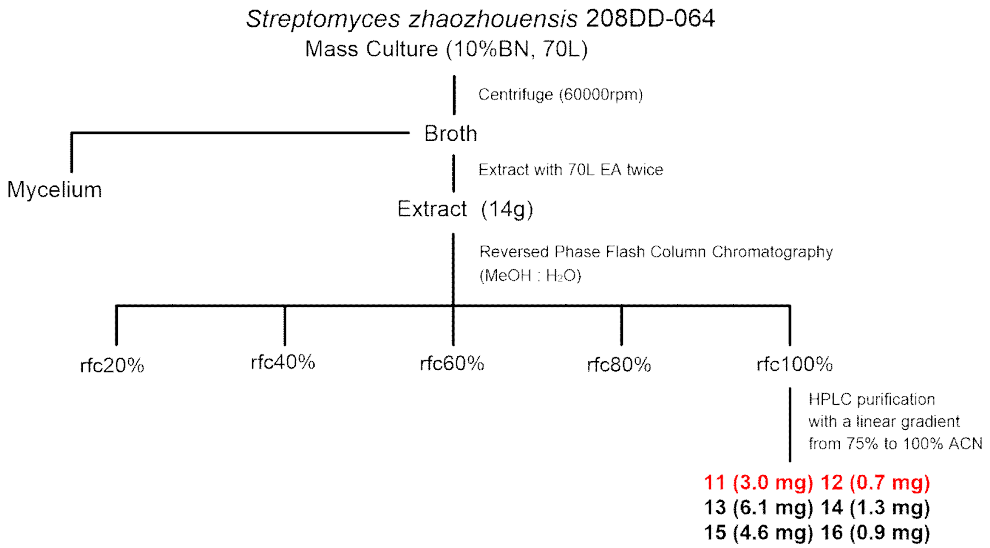


그림. *Streptomyces zhaozhouensis* 배양액으로부터 화합물의 분리 및 정제 과정.

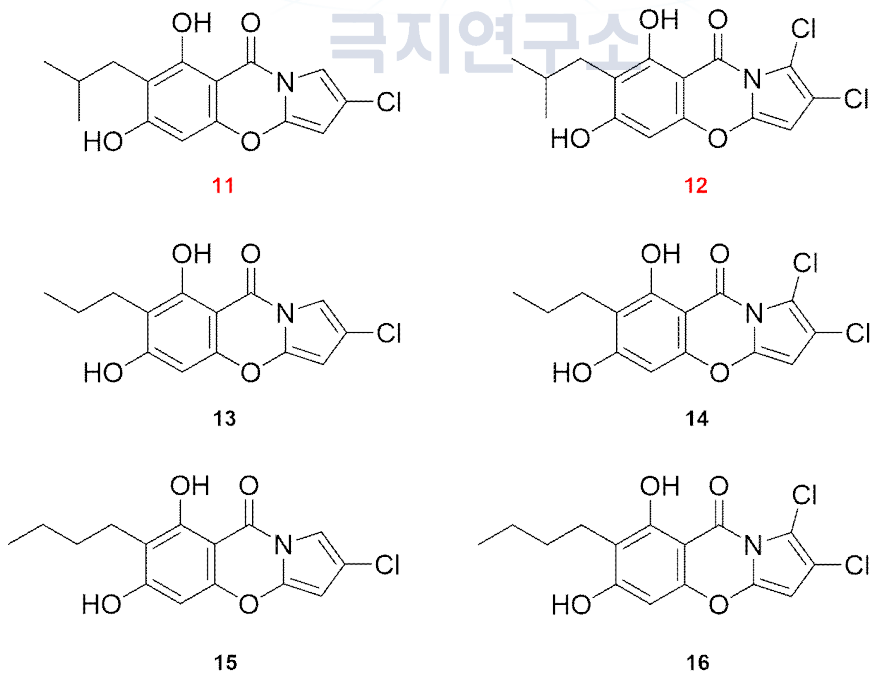


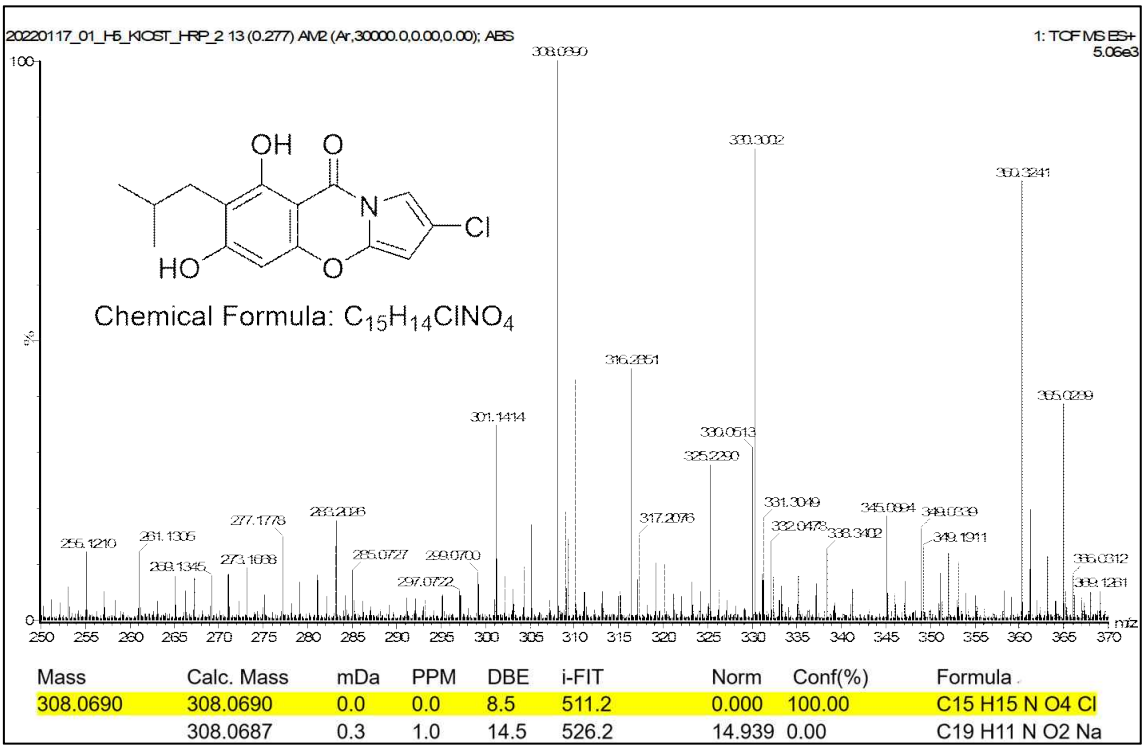
그림. 분리된 화합물 11-16의 구조.

7) 화합물 6종의 구조 분석

- 분리된 화합물 6종을 HR-ESIMS 및 NMR 등의 상세한 분석으로 구조를 규명하였음.
- 6종의 화합물들은 streptopyrrole 계열 물질로 확인되었으며 데이터베이스 검색 결과, 2종이 신규

화합물인 것으로 판명되었음.

- 신규 화합물 11의 구조 분석



Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
308.0690	308.0690	0.0	0.0	8.5	511.2	0.000	100.00	C15 H15 N O4 Cl
	308.0687	0.3	1.0	14.5	526.2	14.939	0.00	C19 H11 N O2 Na

그림. 신규 화합물 **11**의 구조와 HR-ESI-MS 분석 자료.

KOPRI 극지연구소

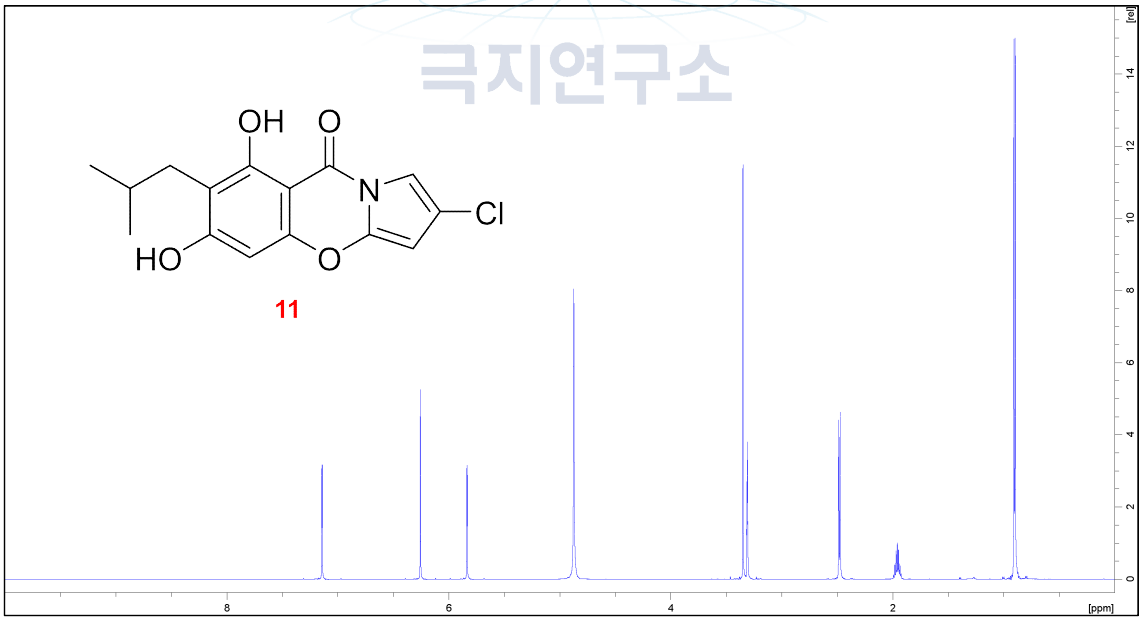


그림. 신규 화합물 **11**의 ^{1}H NMR 스펙트럼 (600 MHZ, CD_3OD).

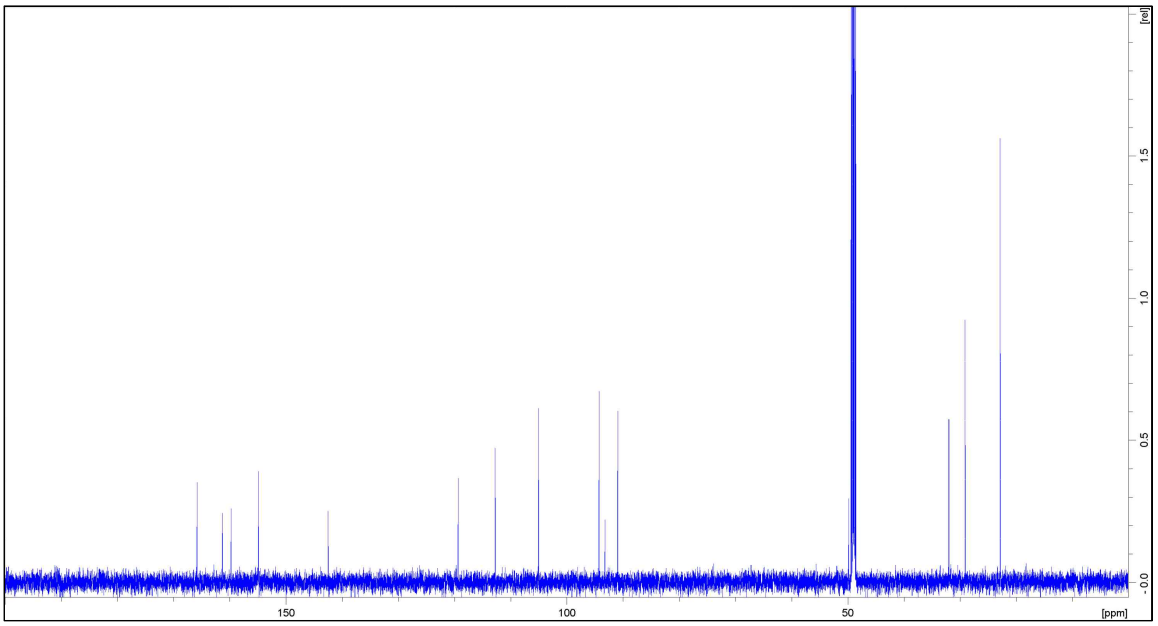


그림. 신규 화합물 **11**의 ^{13}C NMR 스펙트럼 (150 MHZ, CD_3OD).

○ 신규 화합물 **11**은 흰색의 가루 형태로 분리되었으며, 고분해능 질량분석기(HR-ESIMS)와 ^{13}C NMR 스펙트럼의 해석을 통해, 화합물 11의 분자식 $C_{15}H_{14}ClNO_4$와 분자량 307(m/z 308.0690 $[M+H]^+$, calcd 308.0690)을 결정하였음. ^1H NMR spectrum의 해석에 의하여, 신규 화합물 11은 1개의 aromatic 수소 H-5(δ_H 6.29, s), meta-coupling pyrrole 수소 H-3(δ_H 5.87, d, J=2.1), H-1(δ_H 7.18, d, J=2.1), 1개의 methine기 수소 H-2′(δ_H 1.97, m), 1개의 methylene기 수소 H_2-1′(δ_H 2.50, d, J=7.3), 2개의 methyl기 수소 H-3′(δ_H 0.91, d, J=6.7), H-4′(δ_H 0.91, d, J=6.7)을 가지는 것을 확인하였음. ^{13}C NMR과 HSQC spectrum의 면밀한 해석을 통해, 분자 내 탄소와 수소의 결합 관계를 확인하고 각각 탄소와 수소의 종류를 확인할 수 있었음. 1개의 carbonyl기 탄소 C-9(δ_C 159.8), 7개의 non-protonated sp^2 탄소 C-8a(δ_C 93.2), C-7(δ_C 112.7), C-2(δ_C 119.3), C-3a(δ_C 142.5), C-4a(δ_C 154.9), C-8(δ_C 161.3), C-6(δ_C 165.8), 3개의 aromatic protonated 탄소 C-3(δ_C 90.9), C-5(δ_C 94.2), C-1(δ_C 105.0), 1개의 methine기 탄소 C-2′(δ_C 29.1), 1개의 methylene기 탄소 C-1′(δ_C 32.0), 2개의 methyl기 탄소 C-3′(δ_C 22.9), C-4′(δ_C 22.9)를 확인할 수 있었음. 또한 HMBC와 COSY 등의 2D NMR 스펙트럼의 해석을 통해, 각 탄소들의 결합 관계를 확인하고 전체구조를 해석하였음. COSY NMR 스펙트럼을 통해 H_2-1′(δ_H 2.05)에서 H-2′(δ_H 1.97)과 H_3-3′/4′(δ_H 0.91)까지 연결되는 부분구조가 존재하는 것을 확인할 수 있었음. HMBC 스펙트럼의 상세한 해석을 통해, 각 탄소들의 결합관계를 확인하였음. H_2-1′(δ_H 2.05)과 C-6(δ_C 165.7), C-7(δ_C 112.7), C-8(δ_C 161.3) 사이의 상관관계 신호 및 H-5(δ_H 6.29)와 C-4a(δ_C 154.9), C-6(δ_C 165.7), C-7(δ_C 112.7), C-8a(δ_C 93.2) 간의 신호를 통해 C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8, C-8a가 연결되어 있는 불포화 고리구조의 존재를 알 수 있었음. 또한 H_2-1′과 C-6(δ_C 165.7), C-7(δ_C 112.7), C-8(δ_C 161.3)과의 HMBC 상관관계 및 이들 탄소의 δ_C 값을 통해 C-7이 side chain의 C-1′과 연결된 구조임을 확인할 수 있었음. H-1 (δ_H 7.18)와 C-2(δ_C 119.3), C-3(δ_C 90.9), C-3a(δ_C 142.5), C-9(δ_C 159.8), 간의 신호와 δC값을 고려하여 C-9과 C-1, C-2, C-3, C-3a가 연결된 pyrrole 부분구조로 해석하였으며 최종적으로 **11**의 구조를 규명할 수 있었음. 문헌검색 결과, 화합물 **11**은 streptopyrrole 계열의 신규 화합물로 확인되었음.

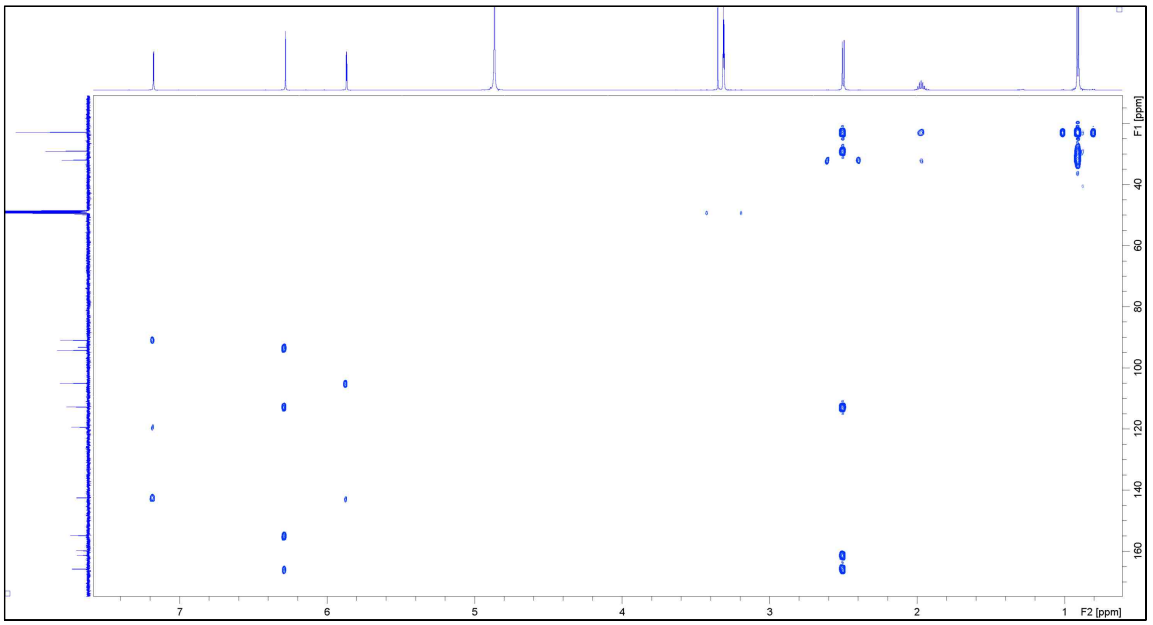


그림. 신규 화합물 **11**의 HMBC NMR 스펙트럼 (CD_3OD).

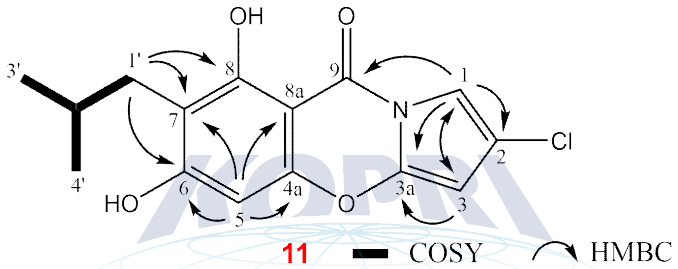


그림. 신규 화합물 **11**의 Key COSY와 HMBC 상관관계.

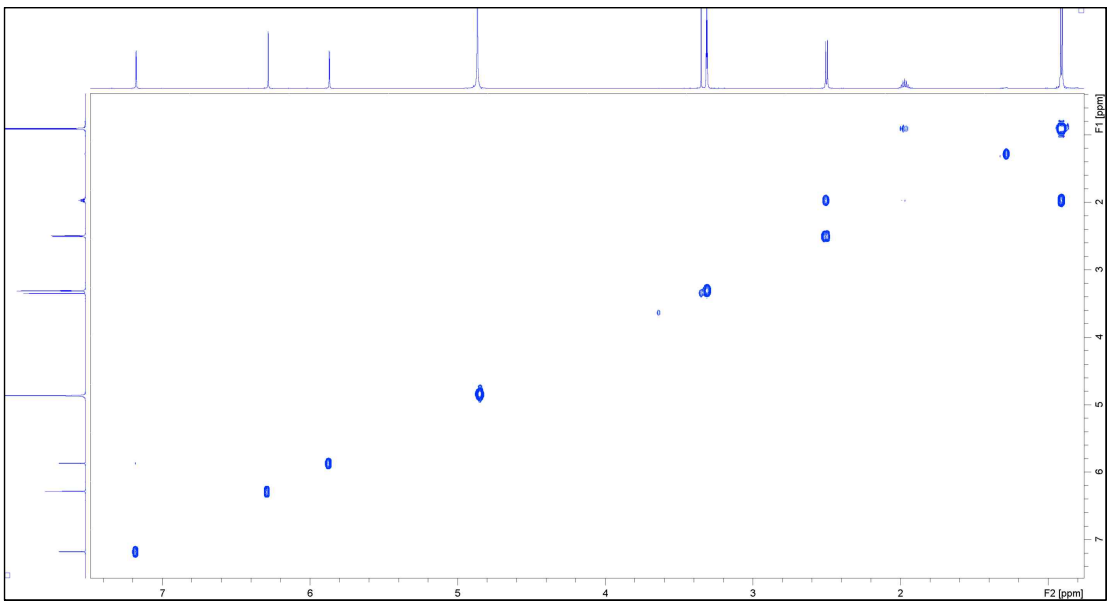


그림. 신규 화합물 **11**의 COSY NMR 스펙트럼 (CD_3OD).

- 신규 화합물 **12**의 구조 분석

○ 신규 화합물 **12**는 흰색의 가루 형태로 분리되었으며, 고분해능 질량분석기(HR-ESIMS)와

^{13}C NMR 스펙트럼의 해석을 통해, 화합물 12의 분자식 $C_{15}H_{13}Cl_2NO_4$와 분자량 341(m/z 342.0300 $[M+H]^+$, calcd 342.0300)을 결정하였음.

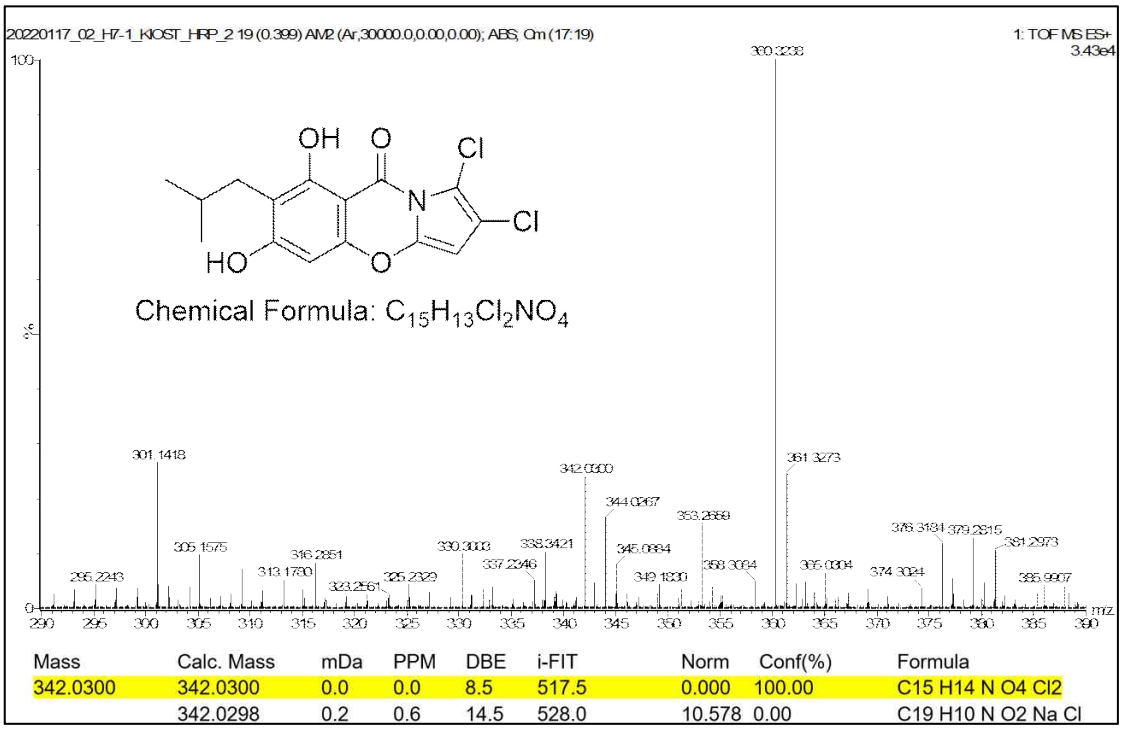


그림. 신규 화합물 **12**의 구조와 HR-ESI-MS 분석 자료.

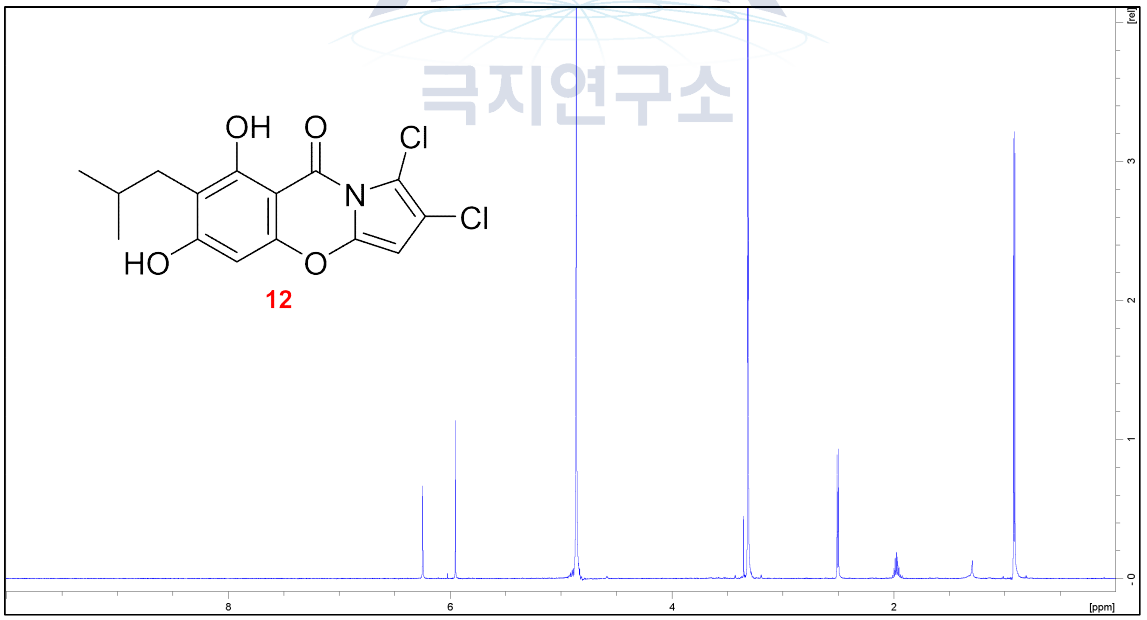


그림. 신규 화합물 **12**의 ^1H NMR 스펙트럼 (600 MHZ, CD_3OD).

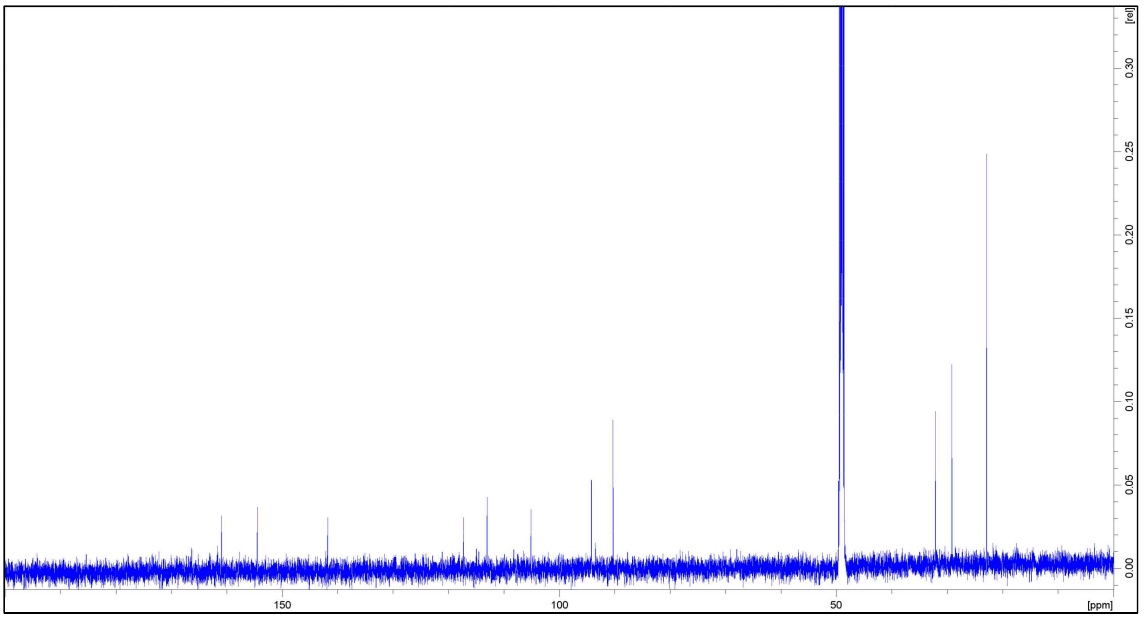


그림. 신규 화합물 **12**의 ^{13}C NMR 스펙트럼 (150 MHZ, CD_3OD).

○ ^{1}H NMR spectrum의 해석에 의하여, 신규 화합물 **12**는 1개의 aromatic 수소 H-5(δ_H 6.25, s), 1개의 pyrrole 수소 H-3(δ_H 5.95, s=2.1), 1개의 methine기 수소 H-2′(δ_H 1.97, m), 1개의 methylene기 수소 H_2-1′(δ_H 2.50, d, J=7.3), 2개의 methyl기 수소 H-3′(δ_H 0.91, d, J=6.7), H-4′(δ_H 0.91, d, J=6.7)을 가지는 것을 확인하였음. ^{13}C NMR과 HSQC spectrum의 면밀한 해석을 통해, 분자 내 탄소와 수소의 결합 관계를 확인하고 각각 탄소와 수소의 종류를 확인할 수 있었음. 1개의 carbonyl기 탄소 C-9(δ_C 160.9), 8개의 non-protonated sp^2 탄소 C-8a(δ_C 93.5), C-1(δ_C 105.1), C-7(δ_C 113.0), C-2(δ_C 117.3), C-3a(δ_C 141.7), C-4a(δ_C 154.5), C-8(δ_C 161.6), C-6(δ_C 166.3), 2개의 aromatic protonated 탄소 C-3(δ_C 90.3), C-5(δ_C 94.1), 1개의 methine기 탄소 C-2′(δ_C 29.1), 1개의 methylene기 탄소 C-1′(δ_C 32.0), 2개의 methyl기 탄소 C-3′(δ_C 22.9), C-4′(δ_C 22.9)를 확인할 수 있었음. 또한 HMBC와 COSY 등의 2D NMR 스펙트럼의 해석을 통해, 각 탄소들의 결합 관계를 확인하고 전체구조를 해석하였음. 해석결과 화합물 12는 화합물 11과 거의 유사한 구조였으며 차이점은 **11**에서 보이는 H-1 (δ_H 7.18)와 C-2(δ_C 119.3), C-3(δ_C 90.9), C-3a(δ_C 142.5), C-9(δ_C 159.8), HMBC 상관관계 신호를 **12**에서는 발견할 수가 없었음. 분자식과 δ_C를 고려하여 C-1 위치에 수소원자 대신 염소원자가 치환된 구조로 최종적으로 결정하였으며 문헌검색 결과, 화합물 **12** 또한 streptopyrrole 계열의 신규 화합물로 확인되었음.

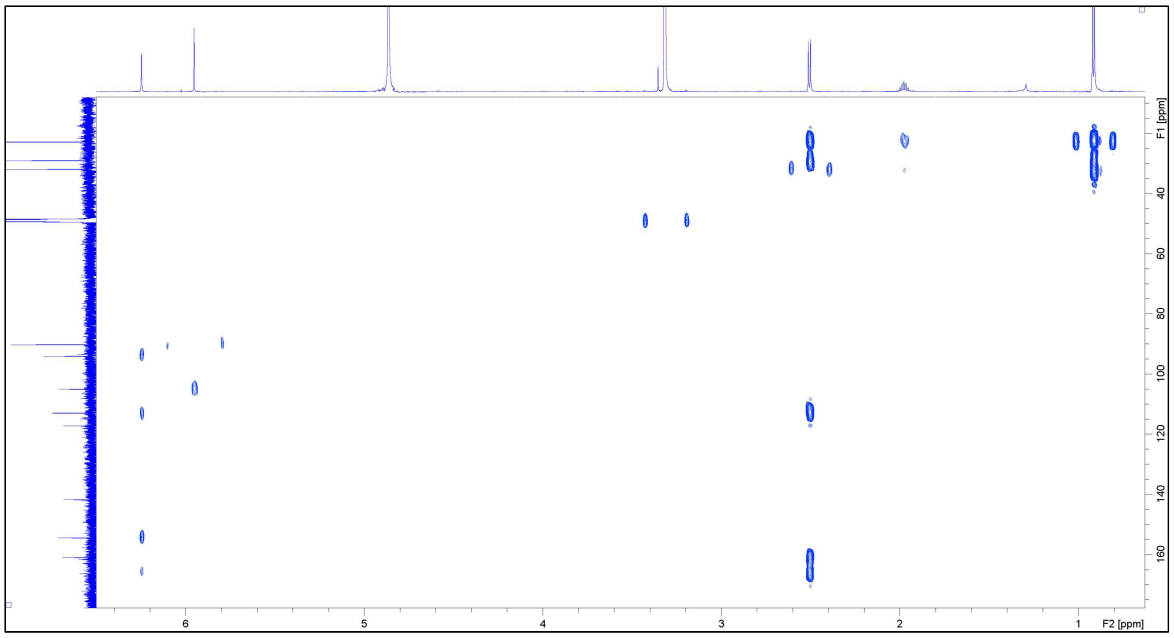


그림. 신규 화합물 12의 HMBC NMR 스펙트럼 (CD_3OD).

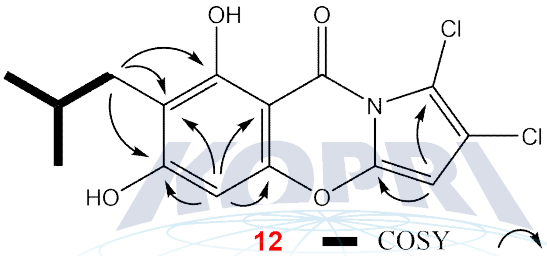


그림. 신규 화합물 12의 Key COSY와 HMBC 상관관계.

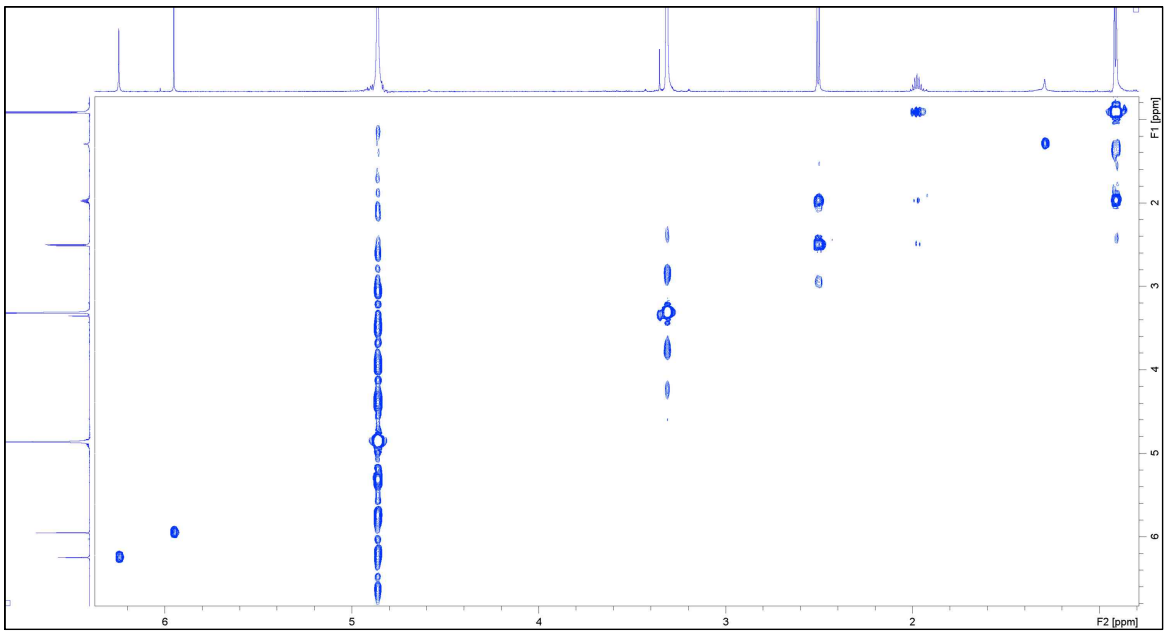


그림. 신규 화합물 12의 COSY NMR 스펙트럼 (CD_3OD).

8) 신규 화합물의 항균활성 평가

- ① CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute)의 Methods for Dilution Antimicrobial

Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Tenth Edition. CLSI document M07-A10에 의거하여 microdilution 방법으로 그람 양성균(*Bacillus subtilis*(KCTC1021), *Micrococcus luteus*(KCTC1915), *Staphylococcus aureus*(KCTC1927))과 그람 음성균(*Escherichia coli*(KCTC2441), *Salmonella typhimurium*(KCTC 2515), *Klebsiella pneumonia*(KCTC2690))에 대한 신규 화합물 2종의 항균 활성을 시험하였음.

- 신규 화합물 **11**, **12**의 항균활성 평가 결과

표. 신규 화합물의 MIC 시험 결과

Strains	MIC (㎍/ml)		
	신규 화합물 11	신규 화합물 12	Kanamycin
Bacillus subtilis	<0.25	1	0.5
Micrococcus luteus	<0.25	<0.25	2.0
Staphylococcus aureus	<0.25	<0.25	<0.25
Escherichia coli	none	none	<0.25
Salmonella typhimurium	none	none	2.0
Klebsiella pneumonia	none	none	0.5

신규 화합물 11과 12는 그람 양성균 *Bacillus subtilis*와 *Micrococcus luteus* 및 *Staphylococcus aureus*에 대하여 MIC 값이 <0.25-1 μg/ml의 강력한 항균 활성을 나타내었으며 그람 음성균에 대해서는 효과가 없었음. 문헌 조사에 따르면 streptopyrrole 계열의 물질은 그람양성 균에 대한 활성과 항진균 활성 그리고 암세포에 대한 세포독성을 가지며, 항균활성의 경우 0.2-12.5 μg/ml 정도의 MIC 값을 가지는 것으로 검색됨. 신규 물질의 경우 기존에 알려진 streptopyrrole 계열의 물질들 보다 더 강한 항균 활성을 보였으며 연구 결과를 논문 투고 준비중에 있음.

라. 극지(해양)생물(*Sphaerotylus antarcticus* Kirkpatrick) 유래 항생물질 (충남대)

1) 극지(해양)생물(*Sphaerotylus antarcticus* Kirkpatrick) 확보

- 2019년 2월 21일 남극 테라노바만 장보고기지에서 채집한 샘플을 주관연구기관인 극지연구소를 통해 제공받음

그림. *Sphaerotylus antarcticus* Kirkpatrick, 1907

2) 극지(해양)생물(*Sphaerotylus antarcticus* Kirkpatrick) 추출물 및 분획물 제조

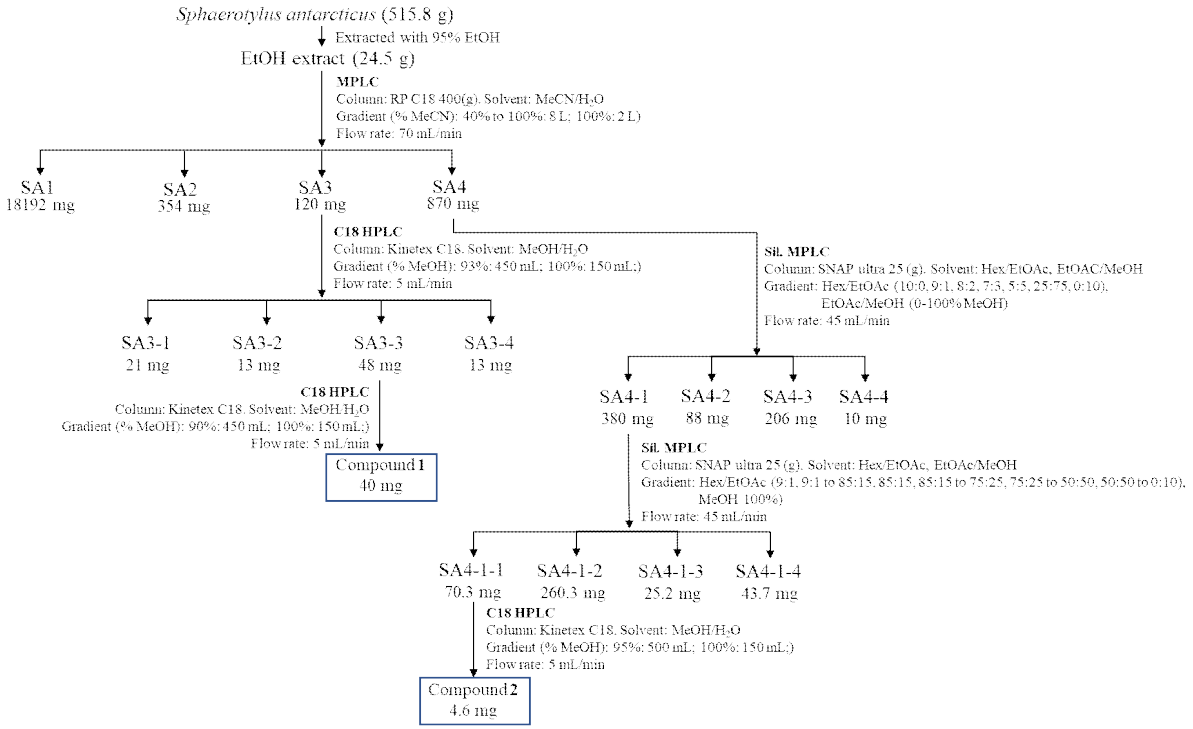


그림. 극지(해양)생물(*Sphaerotylus antarcticus* Kirkpatrick) 추출물 분리과정

- 극지(해양)생물 *S. antarcticus* (wet weight: 515.8 g)를 상온추출[95% EtOH (2 L, 2일)] 2회, 환류추출[95% EtOH (2 L, 6 hr)] 1회 실시하여 *S. antarcticus* 추출물 24.5 g을 얻음
- MPLC [(column: Biotage SNAP cartridge, KP-C18-HS, 400 g), mobile phase: MeCN/H_2O (40% to 100% MeCN, 8 L; 100% MeCN, 2 L)]를 실시하여 SA1-SA4 컬럼분획물을 얻음
- ^{1}H-NMR spectroscopic data 확인결과 SA3 및 SA4 분획물에서 특이적인 cyclopropane ring이 확인되어, SA3 (120 mg)에 대해 preparative HPLC (Gilson PLC2020) [column: Phenomenex Kinetex C18 (250 x 21.2 mm, 5 μm), mobile phase: MeOH/H_2O (93%, 450 mL; 100% 150 mL)] 을 실시하여 SA3-3 (48 mg)을 포함한 4개(SA3-1-SA3-4)의 소분획물을 얻음
- SA3-3 (48 mg)에 대해 [column: Phenomenex Kinetex C18 (250 x 21.2 mm, 5 μm), solvent: MeOH/H_2O (93%, 450 mL; 100% 150 mL)]를 실시하여 compound 1 (40 mg) 분리
- SA4 (870 mg)에 대해 MPLC [column: Biotage SNAP ultra cartridge, KP-Sil, 25 g, solvent: *n*-hexane/EtOAc (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 5:5, 25:75, 0:10), EtOAc/MeOH (0-100% MeOH)]를 실시하여 4개의 소분획물(SA4-1-SA4-4)을 얻음
- SA4-1 (380 mg)에 대한 MPLC [column: Biotage SNAP ultra cartridge, KP-Sil, 25 g, solvent: *n*-hexane/EtOAc (9:1, 9:1→85:15, 85:15, 85:15→75:25, 75:25→5:5, 5:5→0:10, MeOH 100%)]를 실시하여 4개의 소분획물(SA4-1-1-SA4-1-4)을 얻음
- SA4-1-1 (70.3 mg)에 대한 preparative HPLC [column: Phenomenex Kinetex C18 column (250 x 21.2 mm, 5 μm), solvent: MeOH/H_2O (95%, 500 mL; 100% 150 mL)]를 실시하여 mixture compound 2 (4.6 mg) 분리

3) 극지(해양)생물(*S. antarcticus* Kirkpatrick) 유래 화합물의 화학구조 결정

- 2종의 화합물은 cyclopropane rings이 포함된 지방산 유도체로 확인됨

• 화합물 1: (9*R*,10*S*)-*cis*-methylenehexadecanoic acid (1)

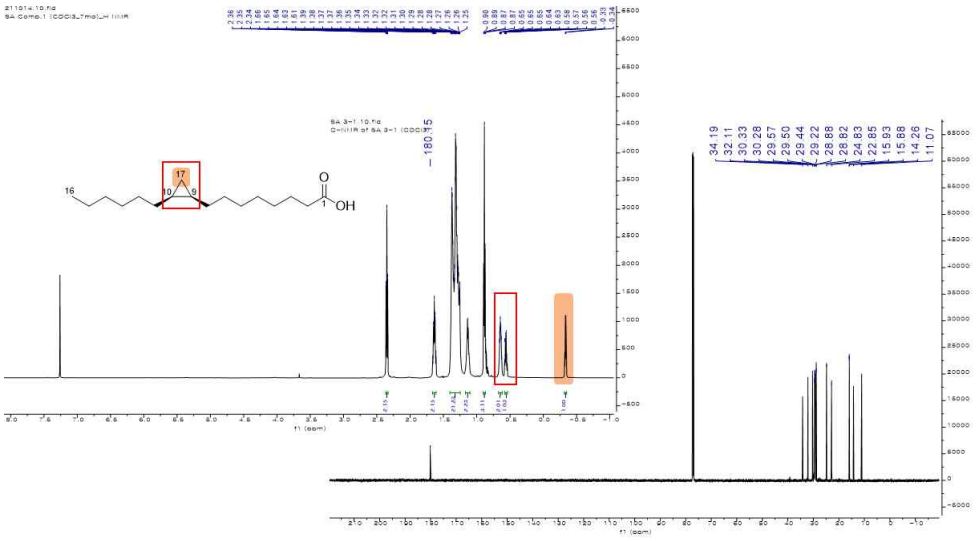


그림. ^{1}H- and ^{13}C-NMR spectroscopic data of compound 1 ($CDCl_3$, 600 MHz)

- Colorless oil; [α]$_D$ +1.24 (*c* 0.1, $CHCl_3$); ^{1}H NMR (chloroform-*d*, 600 MHz) δ_H 2.35 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 1.63 (2H, m), 1.40-1.23 (18H, m), 1.13 (2H, m), 0.89 (3H, t, *J* = 7.0 Hz), 0.64 (2H, m), 0.56 (1H, -*trans*, td, *J* = 8.2, 4.5 Hz), -0.34 (1H, -*cis*, q, *J* = 4.5 Hz); ^{13}C NMR (chloroform-*d*, 150 MHz) δ_C 180.2 (-COOH), 34.2 (C-2), 32.1 (C-14), 30.3 (C-12), 30.3 (C-7), 29.6-29.4 (CH_2), 29.2 (C-4), 28.9 (C-11), 28.8 (C-8), 24.8 (C-3), 22.8 (C-15), 15.9 (C-9), 15.9 (C-10), 14.3 (C-16), 11.1 (C-17); HRESIMS *m/z* 267.2312 $[M - H]^-$ (calculated for $C_{17}H_{31}O_2$, 267.2329); HRFABMS *m/z* 269.2479 $[M + H]^+$ (calculated for $C_{17}H_{33}O_2$, 269.2475).

- ^{1}H-NMR spectroscopic data에서 나타난 methylene protons [δ_H 2.35 (t, *J* = 7.5 Hz), δ_H 1.63 (m) 및 δ_H 1.40-1.23 (18H, m)]과 methyl signal [δ_H 0.89 (t, *J* = 7.0 Hz)]을 통해 지방산 골격 확인
- δ_H 0.64 (2H, m), δ_H 0.56 (-trans, td, *J* = 8.2, 4.5 Hz) 및 δ_H -0.34 (-cis, q, *J* = 4.5 Hz)의 특이적 신호로부터 cyclopropane ring 확인
- ^{13}C-NMR spectroscopic data에 나타난 δ_C 180.2에서 carboxyl signal과 δ_C 15.9 (C-9, C-10) 및 11.1 (C-17)에서 하나의 cyclopropane 고리 확인

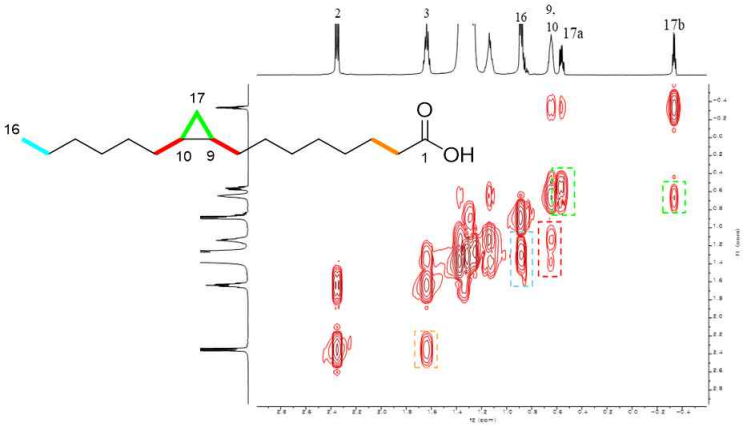


그림.^{1}H-^{1}H-COSY data of compound 1 (CDCl3, 600 MHz)

- ^{1}H-^{1}H-COSY data를 분석하여 H_2-2와 H_2-3, H_3-16과 H_2-15, H-9와 H_2-7, H_2-17과 H-9의 연결 확인

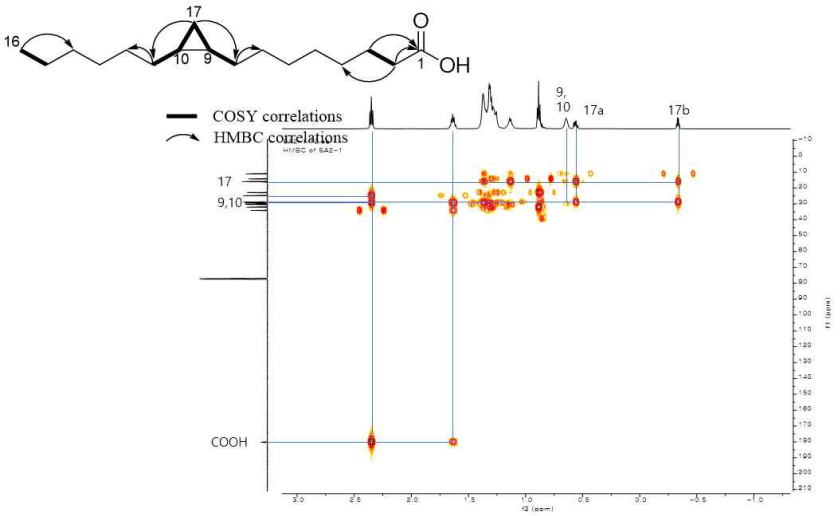


그림. HMBC data of compound 1 ($CDCl_3$, 600 MHz)

- HMBC 분석을 통해 H_2-2 (δ_H 2.35, t, J = 7.5 Hz)와 carboxylic acid (δ_C 180.2), C-4 (δ_C 29.2), H_2-8 [δ_H 1.40 (m), 1.13 (m)]와 C-7 (δ_C 30.3), H_3-16 [δ_H 0.89 (t, J = 7.0 Hz)], C-14 (δ_C 32.1) 및 H_2-17 [δ_H 0.56 (-trans, td, J = 8.2, 4.5 Hz), δ_H -0.34 (-cis, q, J = 4.5 Hz)] 와 C-9 (δ_C 15.9)의 상관관계 확인

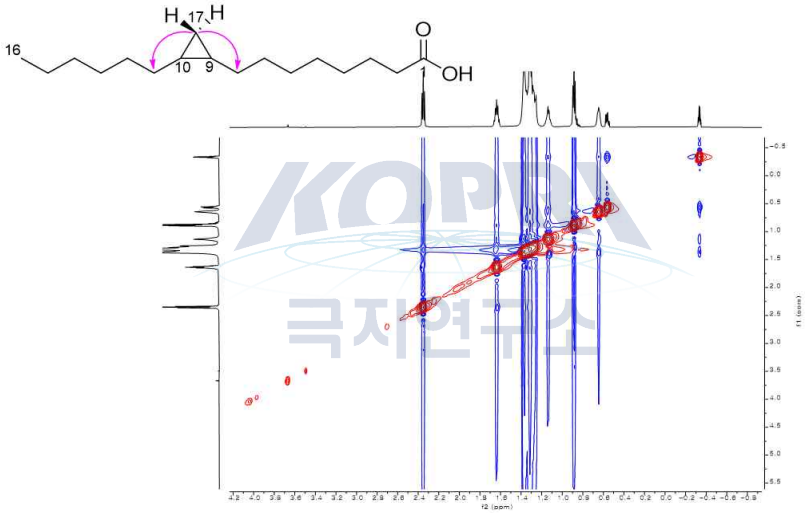


그림. NOESY data of compound 1 ($CDCl_3$, 600 MHz)

- NOE correlations를 통해 H-17 (δ_H -0.34) and H_2-8 (cyclopropane ring)는 *cis*-형태로 결정

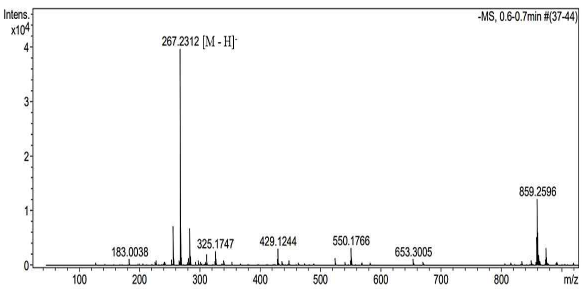


그림. HRESIMS data of compound 1

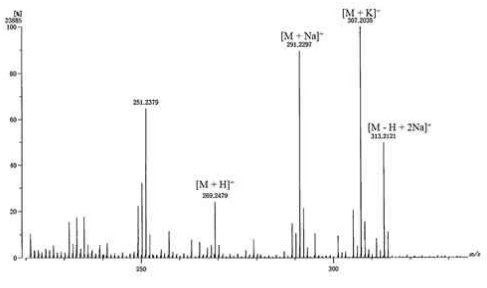
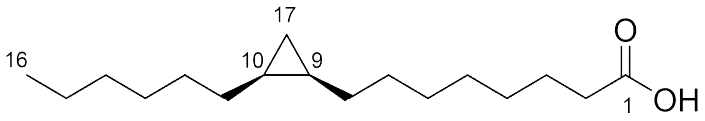


그림. HRFABMS data of compound 1

- HRESIMS *m/z* 267.2312 $[M - H]^-$ (calculated for $C_{17}H_{31}O_2$, 267.2329); HRFABMS *m/z* 269.2479 $[M + H]^+$ (calculated for $C_{17}H_{33}O_2$, 269.2475)로부터 hydrocarbon 길이를 확인하고, $[\alpha]_D$ +1.24

(c 0.1, $CHCl_3$) 값에 근거하여 화학구조를 (9*R*,10*S*)-*cis*-methylenehexadecanoic acid로 결정



1

그림. 화합물 1의 화학구조

- 화합물 2: octadecanoic acid / methyl *cis*-9,10-methylenehexadecanoate (2)

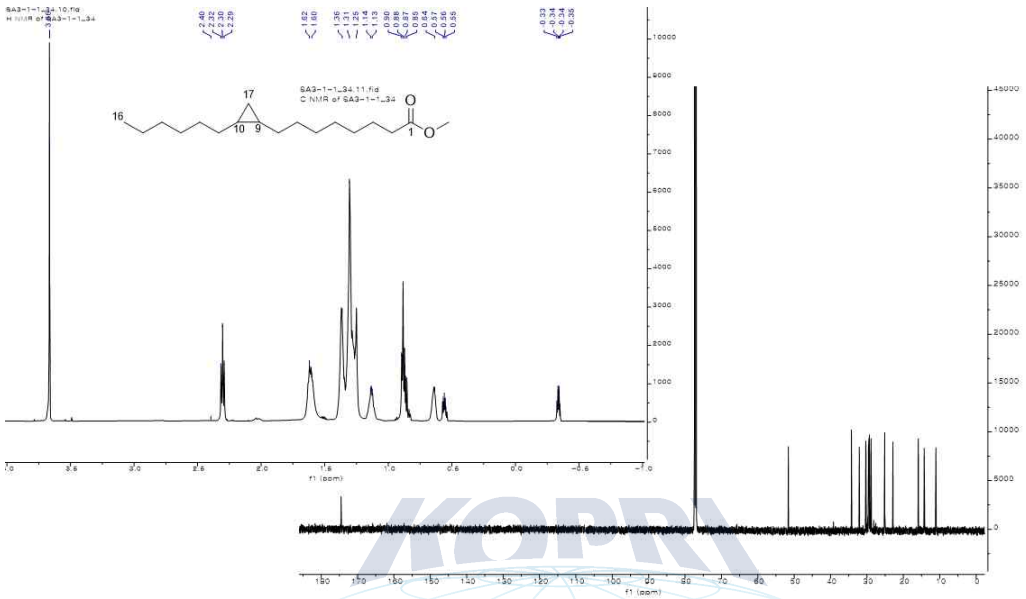


그림. ^{1}H- and ^{13}C-NMR spectroscopic data of compound 2 ($CDCl_3$, 600 MHz)

- Colorless oil; ^{1}H NMR (chloroform-*d*, 600 MHz) δ_H 3.67 (3H, s, $-OCH_3$), 2.30 (2H, t, J = 7.6 Hz), 1.64-1.55 (overlapped), 1.40-1.23 (m), 1.13 (2H, m), 0.88 (3H, t, J = 7.0 Hz), 0.64 (2H, m), 0.56 (1H, -*trans*, td, J = 8.3, 4.7 Hz), -0.34 (1H, -*cis*, q, J = 4.7 Hz); ^{13}C NMR (chloroform-*d*, 150 MHz) δ_C 174.5 (C-1), 51.6 ($-OCH_3$), 34.3 (C-2), 32.1 (C-14), 30.3 (C-12), 30.3 (C-7), 29.6-29.5 (CH_2), 29. 3 (C-4), 28.9 (C-11), 28.8 (C-8), 25.1 (C-3), 22.9 (C-15), 15.9 (C-9), 15.9 (C-10), 14.3 (C-16), 11.1 (C-17); HRESIMS *m/z* 283.2637 $[M - H]^-$ (calculated for $C_{18}H_{35}O_2$, 283.2636) and *m/z* 281.2477 [M - H]- (calculated for $C_{18}H_{33}O_2$, 281.2480).

- 화합물 2의 ^{1}H- 및 ^{13}C-NMR spectroscopic data는 화합물 1과 매우 유사하였으며, 특히 δ_H 0.64 (2H, m), 0.56 (1H, -*trans*, td, J = 8.3, 4.7 Hz), -0.34 (1H, -*cis*, q, J = 4.7 Hz) 신호를 근거로 cyclopropyl ring이 있는 지방산으로 추정
- δ_H 3.67 (3H, s)과 δ_C 51.6 신호로부터 methoxyl group 존재를 확인하여 화합물 1의 methyloxy 유도체로 예상

KOPRI 극지연구소

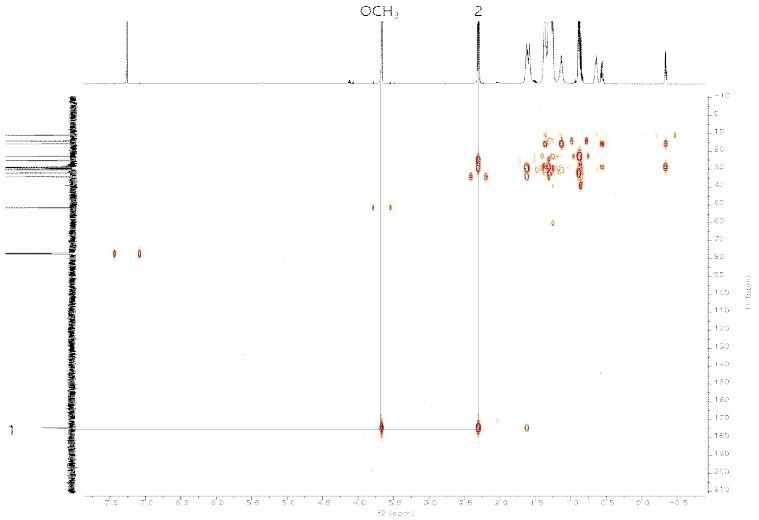


그림. HMBC data of compound 2 ($CDCl_3$, 600 MHz)

- HMBC data에서 관찰된 δ_H 3.67 (3H, s)/2.30 (2H, t, J = 7.6 Hz, H-2)와 δ_C 174.5 (C-1)의 상관관계를 통해 methoxy group의 위치 확인

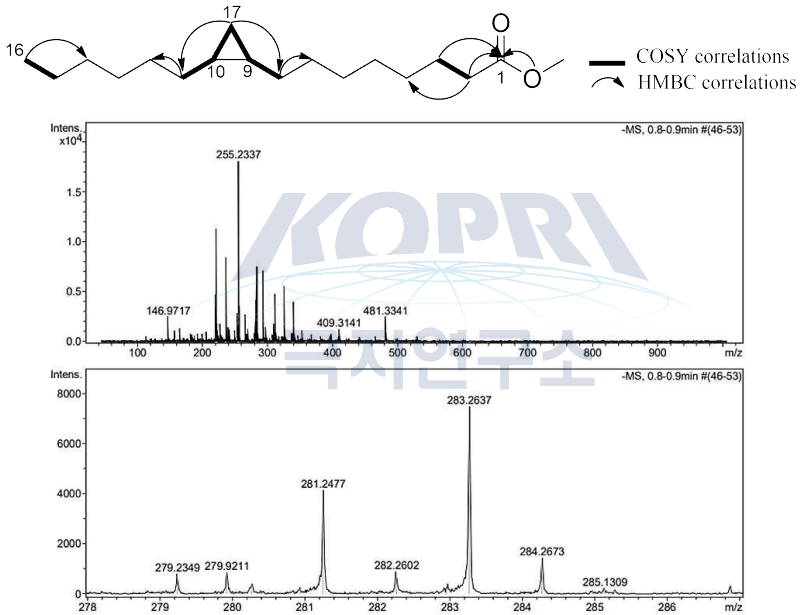
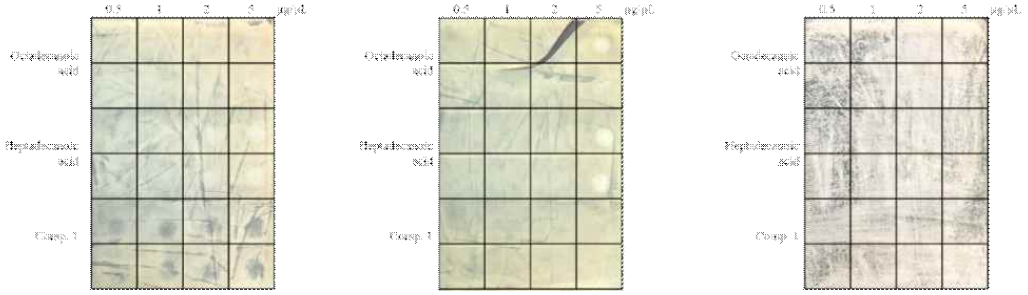


그림. HRESIMS data of compound 2

- HRESIMS *m/z* 283.2637 $[M - H]^-$ (calculated for $C_{18}H_{35}O_2$, 283.2636) 및 *m/z* 281.2477 [M - H]- (calculated for $C_{18}H_{33}O_2$, 281.2480) 2개의 분자이온 피크로부터 화합물 2가 octadecanoic acid / methyl *cis*-9,10-methylenehexadecanoate 혼합물임을 확인

4) 극지(해양)생물(*S. antarcticus* Kirkpatrick) 유래 화합물의 항균활성 평가
- *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*에 대한 화합물 2종의 항균활성 평가
- 화합물 1은 *S. aureus*에 대해 항균활성(IC_{50} 17.4 μg/mL)을 나타냄
- 반면, cyclopropyl ring이 없는 지방산인 margaric acid (C17:0, heptadecanoic acid)와 stearic acid (C18:0, octadecanoic acid)는 항균활성을 보이지 않음
- 따라서 지방산의 cyclopropyl ring이 항균활성에 중요한 역할을 한다는 것을 입증



S. aureus *E. coli* *C. albicans*

+: Kanamycin, 0.2 μg/μL +: Kanamycin, 0.2 μg/μL +: Nystatin 0.05 μg/μL

마. 극지(해양)생물(*Sphaerotylus antarcticus* Kirkpatrick)의 골다공증 억제작용 (충남대)

1) 파골세포 분화 및 기능 억제작용

- Receptor activator of nuclear factor κB ligand (RANKL) 유도 파골세포 분화 모델에서 *S. antarcticus* 추출물(SAE)는 파골세포의 분화의 중요한 화학적 표지자인 TRAP의 생성과 활성을 억제
- SAE는 파골세포의 구조적 특징인 F-actin ring의 형성과 함께 거대 다핵세포인 파골세포 핵의 밀집을 농도-의존적으로 억제
- SAE는 RANKL에 의해 분화된 파골세포의 골 흡수 면적 및 세포이동을 억제

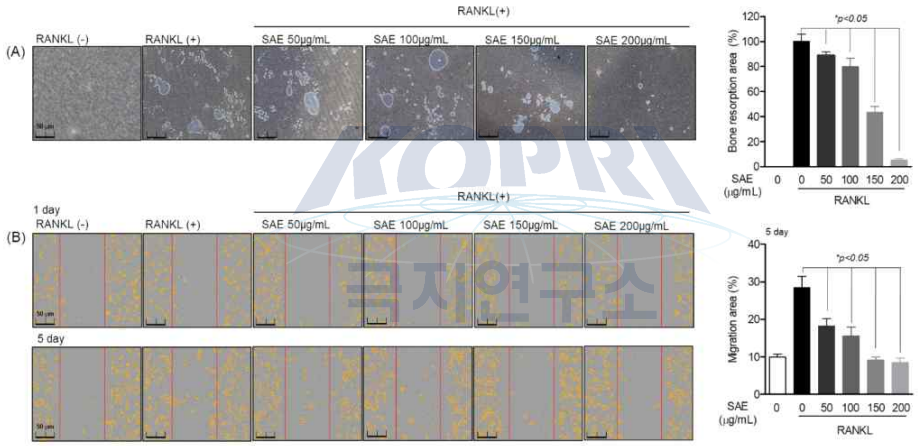


그림. RANKL 유도 파골세포 분화 모델에서 SAE의 파골세포 분화 및 이동 저해작용

→ SAE가 RANKL로 유도된 파골세포 분화 억제 효과뿐만 아니라 파골세포의 기능도 억제함을 입증

2) RANKL에 의해 생성된 파골세포의 활성산소종(ROS) 생성저해작용

- 파골세포 형성 과정에서 RANKL에 의해 활성화된 TRAF6는 NADPH oxidase 1 (NOX1) 발현을 통해 세포내 ROS를 생성
- SAE (100, 200 μg/mL) 처리시 농도-의존적으로 ROS 생성을 저해
- SAE는 RANKL에 의해 손실된 항산화효소[superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT)] 회복을 유도

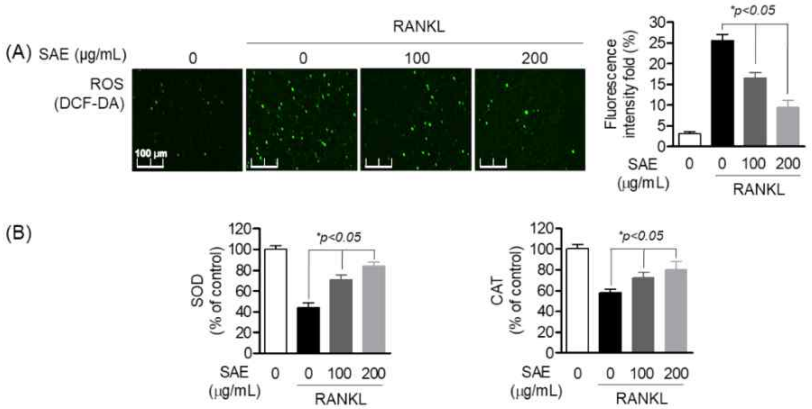


그림. SAE의 ROS 생성 저해 및 항산화효소 증가작용

→ 극지(해양)생물(*S. antarcticus* Kirkpatrick)이 과도한 파골세포 분화를 억제하고 ROS 생성으로 인한 골다공증을 억제할 수 있는 소재임을 입증

- 논문게재: *Kor. J. Pharmacogn.* 53(1), 42-48 (2022)

바. 극지/해양 미생물들의 지속적인 스크리닝을 통하여 뛰어난 항균활성을 보이는 유용 균주 발굴 (극지연)

1) 2차연도에 항생물질을 생산하는 미생물 배양조건 확립

- 2차연도에 발견한 항생물질 분비 미생물 *Streptomyces* sp. PAMC 29637과 PAMC 29637의 배양조건 검색을 통해서 항생물질을 분비하는 조건을 확인함.

.

- **Samples:** <PAMC 29637> *Streptomyces avidinii*
  <PAMC 29639> *Streptomyces avidinii*

- **Bacterial agar extract**

Agar culture -> freeze at -80°C, overnight -> thaw at RT to collect agar extract -> Filter with 0.22 um filter

- **Antibiotic assay**

Pathogens: *S. aureus* on MHA plates

(-) 100 uL pure MHA extract

- (+) 10 uL Kanamycin 1 mg/mL

Test with 100 uL agar extract of PAMC 29637 and 29639

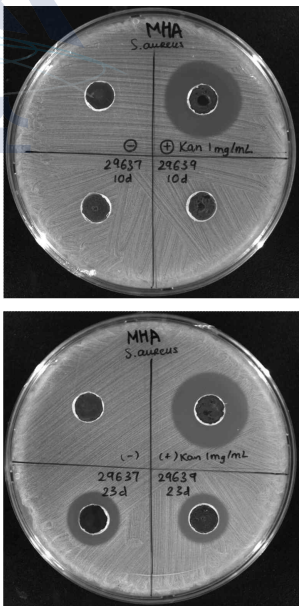
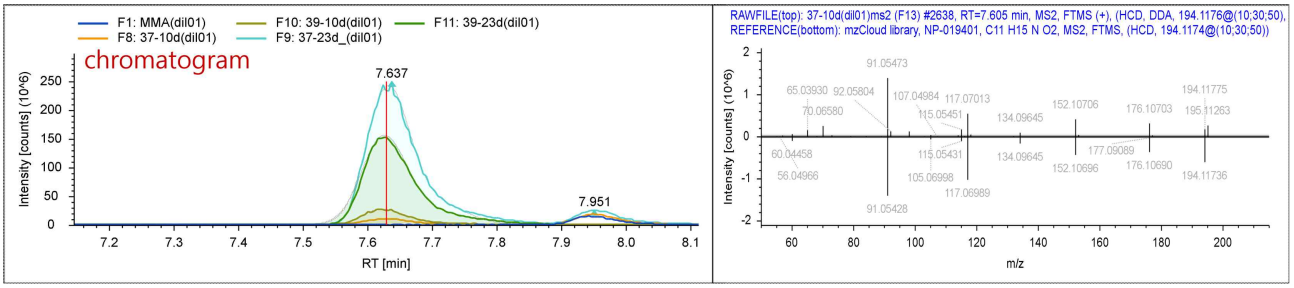


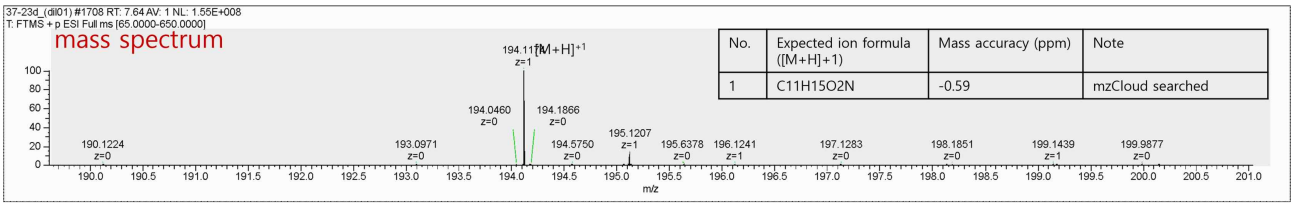
그림. 항생제 물질 발현 및 추출 조건

- 항생물질을 포함하는 추출물과 포함하지 않는 추출물의 비교 실험을 통해서 3개의 Peak가 항생물질을 포함하는 추출물에 존재하는 것을 확인함.
- 각각의 Peak.를 HPLC-MS/MS 분석을 통해서 2개의 peak에서 항생물질 구조를 밝힘.
- 밝혀진 구조를 합성한 후 항생물질로의 가능성을 테스트 할 예정.



Top: Measured ms^2 spectrum, Bottom: searched from Library

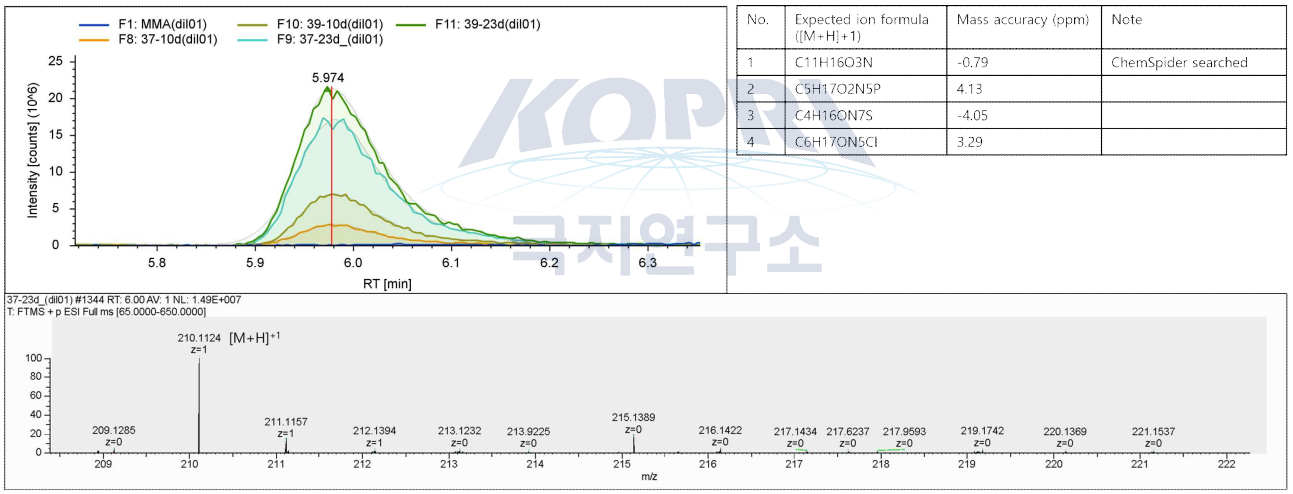
Name: NP-019401



No.	Expected ion formula ([M+H]+1)	Mass accuracy (ppm)	Note
1	C11H15O2N	-0.59	mzCloud searched

Structure proposal
(Found from the public ms^2 library)

그림. Peak 1의 분석을 통해서 밝혀낸 항생 후보 물질의 구조



No.	Expected ion formula ([M+H]+1)	Mass accuracy (ppm)	Note
1	C11H16O3N	-0.79	ChemSpider searched
2	C5H17O2N5P	4.13	
3	C4H16ON7S	-4.05	
4	C6H17ON5Cl	3.29	

Structure proposal
(Found from the public chemical library)

Name: Ethyl L-tyrosinate

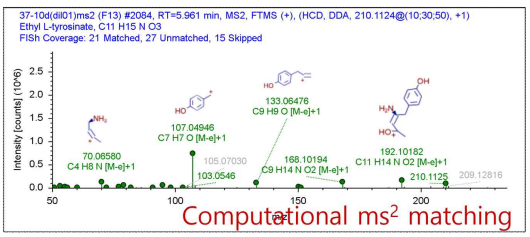
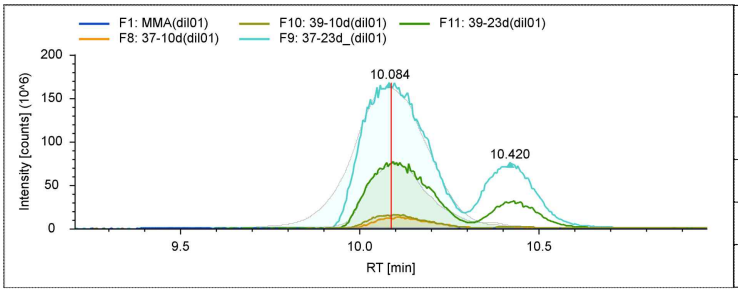


그림. Peak 2의 분석을 통해서 밝혀낸 항생 후보 물질 구조



No.	Expected ion formula ([M+2H]+2)	Mass accuracy (ppm)	Note
1	C29H43O4N13	3.03	
2	C32H48O3N9P	-5.87	
3	C33H47O6N7	-1.18	
4	C34H43O2N11	-3.28	
5	C28H47O8N9	5.13	

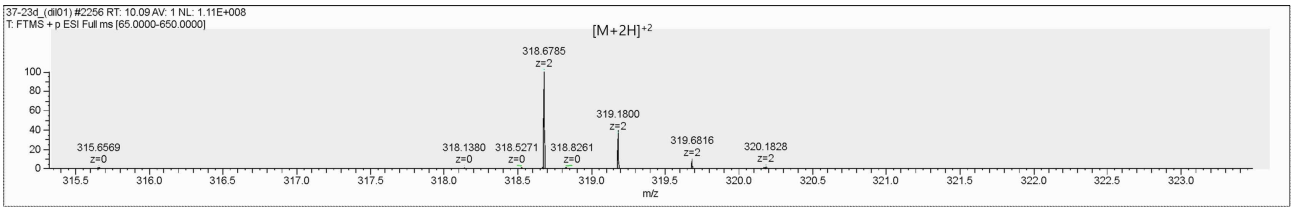


그림. Peak 3의 분석을 통해서 밝혀낸 항생 후보 물질

사. 남극 세종기지 주변에서 채집한 생물들로부터의 유용자원 발굴 (극지연)

1) 남극 새종기지 주변 유래 생물들로부터 항생후보물질 추출

- 2021년 채집된 극지유래 식물 2종, 지의류 12종, 해조류 6종 그리고 이끼17종 외 미확인 5종 시료 확보, 각 시료별로 용매 MeOH 또는 Acetone로 추출하여 추출물 확보
- 종 동정된 시료의 추출물들을 소분하여 항생 및 항암 등의 활성 실험 진행 중

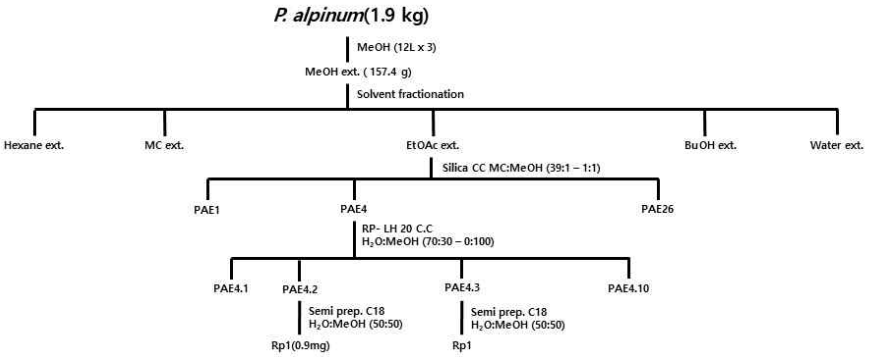
Antarctic lichen	**Antarctic moss**
Stereocaulon paschale	Warnstorfia fontinaliopsis
Stereocaulon alpinum	Sanionia uncinata
Sphaerophorus globosus	Syntrichia filaris
Pseudephebe pubescencs	Chorisodontium aciphyllum
Cladonia furcata	Ceratodon purpureus
Cladonia borealis	Andreaea depressinervis
Cetraria aculeata	Polytrichum strictum
Umbilicaria antarctica	Polytrichastrum alpinum
Collema sp.	Ditrichum hyalinocuspidatum
Lecania brialmontii	Syntrichia saxicola
Haematomma erythroma	Andreaea regularis
Caloplaca regalis	Bartramia patens
Antarctic algae	Syntrichia magellanica
Desmarestia menziesii	Bryum argenteum
Gigartina skottsbergii	Bryum pseudotriquetrum
Gysto sphaera jaquinotii	Pohlia cruda
Desmarestia antarctica	Cladonia fimbriata
Palmaria decipiens	**Antarctic Plant**
Phaeurus antarcticus	Deschampsia antarctica
	Colobanthus quitensis

2) 남극 이끼*Polytrichastrum alpinum*의 성분 분석 진행

- *P. alpinum*로부터 용매 분획 및 화합물 분리 진행 중
- *P. alpinum*에 대하여 100% MeOH 추출물을 얻은 후, 분액깔때기를 통해 Hexane, Dimethylchloride (MC), Ethyl acetate (EtOAc), n-Butanol(n-BuOH) 용매로 용매분획을 실시하

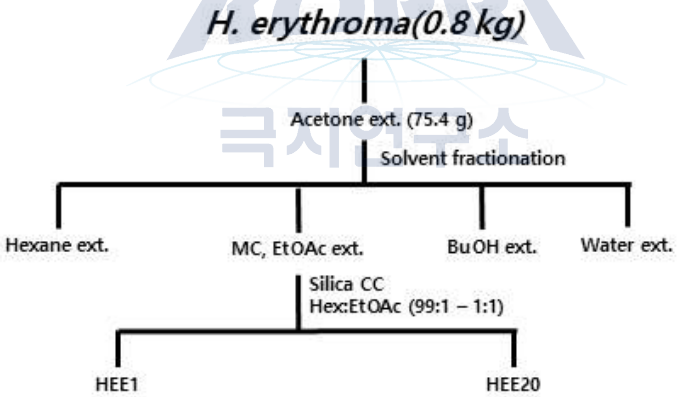
여 각 Hexane, MC, EtOAc, n-BuOH 그리고 water 분획물을 얻음

- 분획물들 중 먼저 EtOAc 분획물을 Column chromatography 및 HPLC 등 다양한 chromatographic 기법을 이용하여 다음과 같이 물질 분리 진행 중



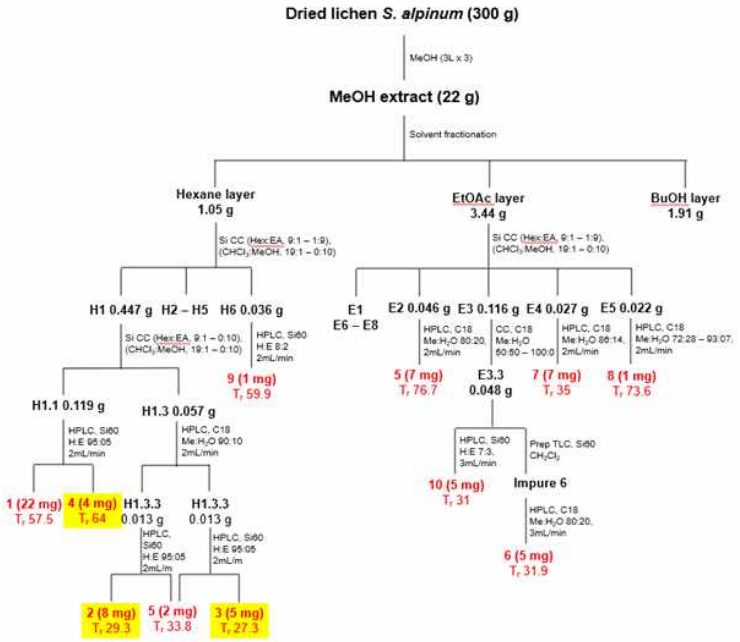
3) 남극 지의류 *Haematomma erythroma*의 성분 분석 진행

- *H. erythroma*로부터 용매 분획 및 화합물 분리 진행 중
- *H. erythroma*에 대하여 100% MeOH 추출물을 얻은 후, 분액깔때기를 통해 Hexane, Dimethylchloride (MC), Ethyl acetate (EtOAc), n-Butanol(n-BuOH) 용매로 용매분획을 실시하여 각 Hexane, MC, EtOAc, n-BuOH 그리고 water 분획물을 얻음
- 각 분획물들 중 MC와 EtOAc 분획물을 TLC 분석을 통해 비슷한 물질 패턴을 확인하여, 한번에 Column chromatography 및 HPLC 등 다양한 chromatographic 기법을 이용하여 다음과 같이 물질 분리 진행 중



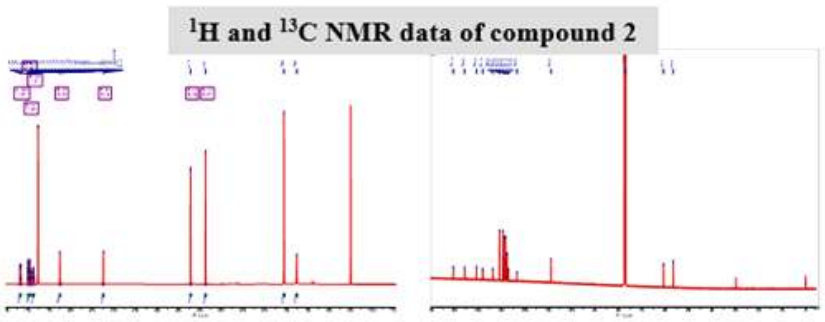
4) 남극지의류 *Stereocaulon alpinum*의 성분분석 진행

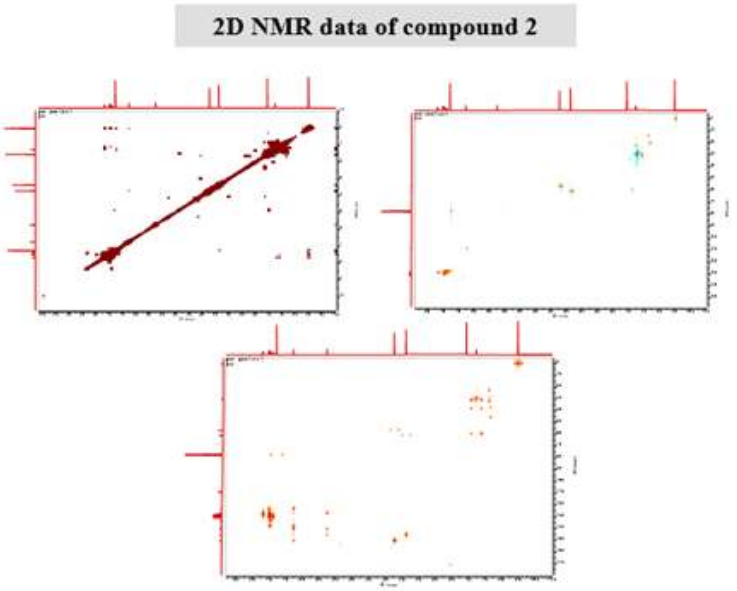
- *Stereocaulon alpinum*으로부터 신규 화합물 3종과 알려진 p-terphenyl, phenolic benzofuran 그리고 steroid 화합물 분리
- 남극 세종기지에서 기 채집된 지의류 *R. terebrata*에 대하여 100% MeOH 추출물을 얻은 후, column chromatography 및 HPLC 등 다양한 chromatographic 기법을 이용하여 다음과 같이 총 10개의 화합물을 분리함.



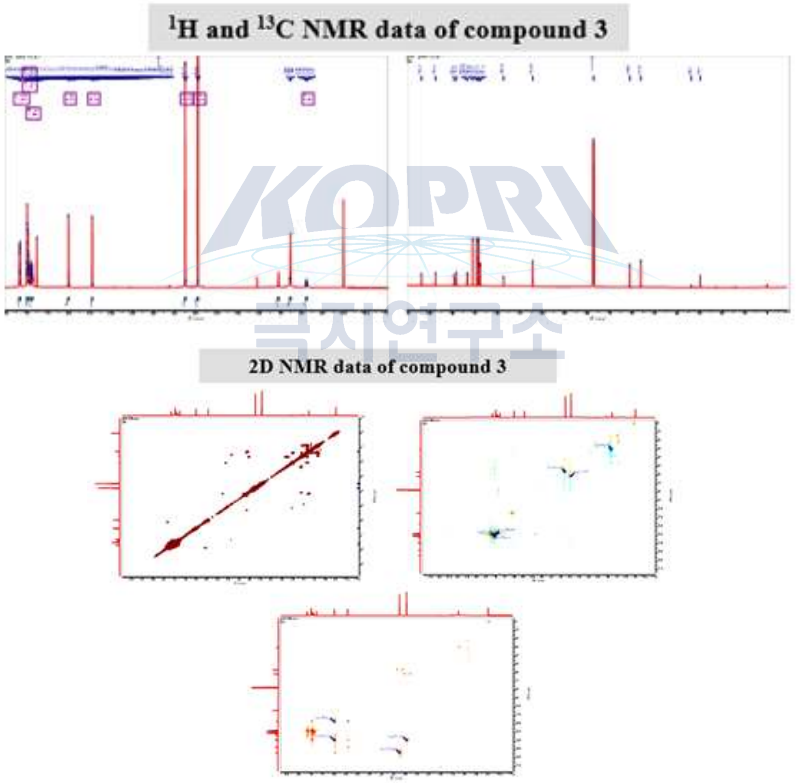
- 분리된 화합물 중, 화합물 2, 3 그리고 4번 화합물은 신규 화합물들이며, 알려진 물질들은 2,5,6-trimethoxy-p-terphenyl (1), methyl 3-formyl-2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate (5), methyl 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoate (6), 2,6-dihydroxy-4-methylbenzaldehyde (7), 3,7-dihydroxy-1,9-dimethyldibenzofuran (8), methyl orsellinate (9), and brassicasterol (10)으로 확인 되었음.
- 분리된 신규 화합물 2, 3, 그리고 4는 균류와 지의류로부터 생산되는 *p*-terphenyl계 화합물들이며, 1H 및 13C NMR을 통해 1차적으로 구조를 예측할 수 있었음. 이후에, 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC) spectra 분석을 통해 예측한 구조를 확인할 수 있었으며, HR-MS 분석을 통해 분자식을 확인하여 최종적으로 구조를 확정하였음.

KOPRI 극지연구소

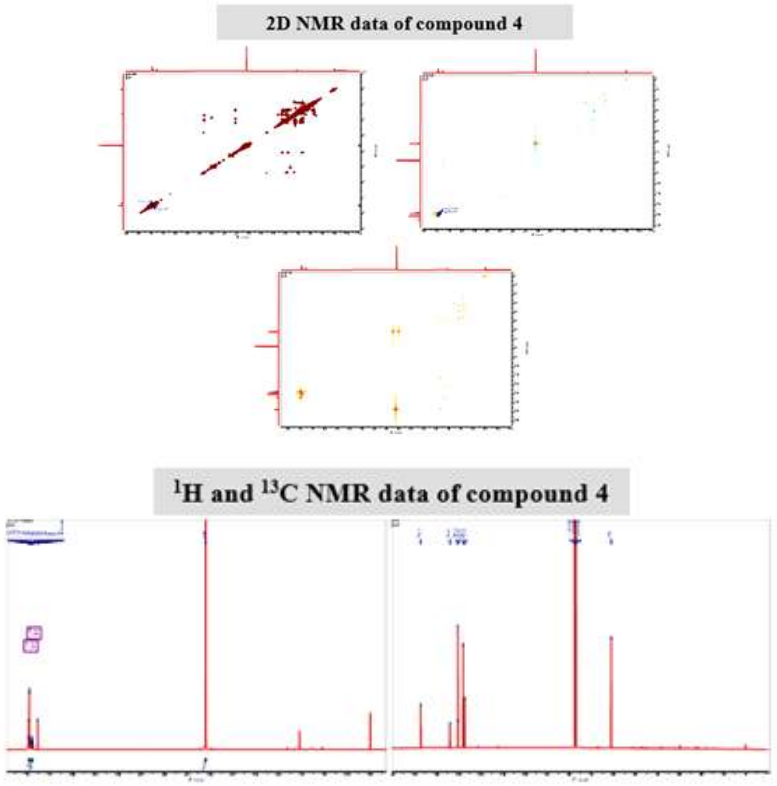




NMR spectroscopic data of compound 2



NMR spectroscopic data of compound 3



NMR spectroscopic data of compound 4

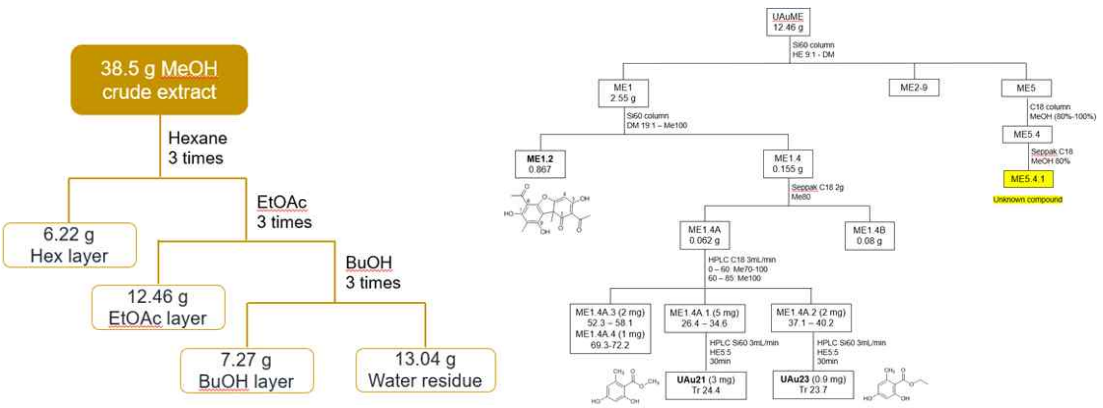
- 분리된 화합물들에 대한 항균활성 및 세포독성 평가
- 분리된 화합물 1-10은 항생 및 항균 활성은 없었으며, 신규 화합물 3은 세포독성 및 항염증 활성을 다음과 같이 나타냄.

Table. 신규 화합물 3에 대한 세포독성 및 항염증 활성

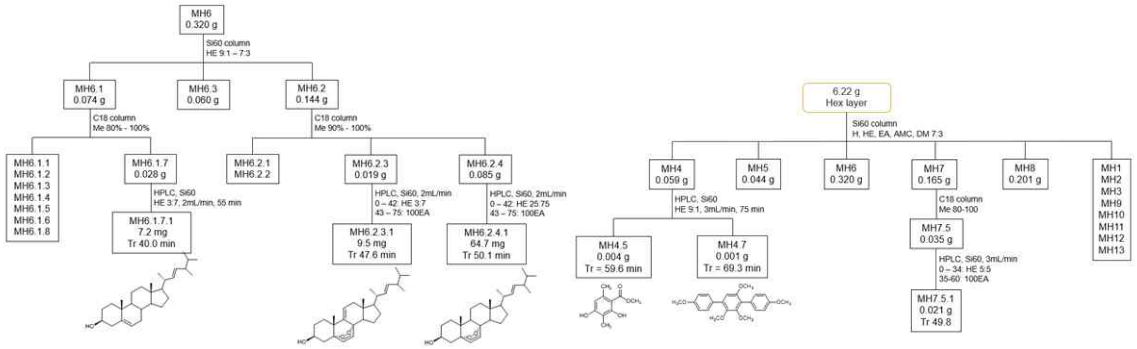
Compound	Cytotoxicity	Anti-inflammatory
	HCT116 cells	LPS-induced RAW264.7 cells
	IC_{50} (μM)	
3	3.76 ± 0.03	22.82 ± 0.015

5) 남극 지의류 *Usnea aurantiaco-atra*의 성분분석

- *U. aurantiaco-atra*으로부터 알려진 화합물 9종 분리하여 구조결정 중
- 남극 세종기지에서 기 채집된 지의류 *U. aurantiaco-atra*에 대하여 100% MeOH 추출물을 얻은 후, column chromatography 및 HPLC 등 다양한 chromatographic 기법을 이용하여 다음과 같이 총 9개 물질 분리함



(a) (b)



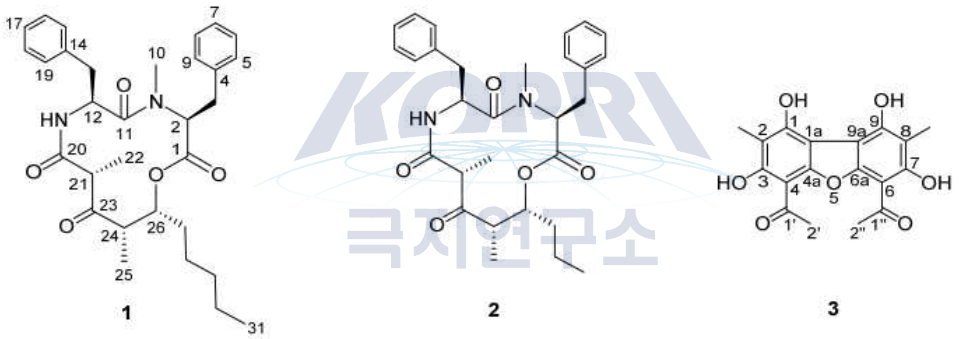
(c)

그림. 남극 지의류 *Usnea aurantiaco-atra*의 성분분리 과정. (a) MeOH 추출물의 용매분획, (b) EtOac 분획물의 성분분리 과정, (c) hexane 분획물의 성분분리 과정

6) 남극 지의류들로부터 분리된 화합물의 항생 및 항균 활성

- 남극 지의류 *Ramalina terebrata*로부터 분리된 화합물의 항생 및 항균 활성

○ 분리된 화합물 1-7에 대하여 항생 및 항균 활성을 평가한 결과, 화합물1-3이 *Escherichia coli*(*E. coli*)에 대하여 다음과 같은 항균 활성을 보였음.



KOPRI
극지연구소

Table S1. IC_{50} values of compounds **1-3** against *E. coli*

Compounds	IC_{50} (ug/mL)
Apramycin	2.19
1	30.06
2	28.44
3	18.34

Apramycin was used as positive control.

- 남극 지의류 *Himantormia lugubris*로부터 분리된 화합물의 항생 및 세포독성 활성 평가

○ 분리된 화합물 중 1-4와 6-7에 대하여 항생 및 항균 활성 평가 결과, 신규 화합물 1-2에서 *staphylococcus aureus*(*S. aureus*)에 대하여 다음과 같이 유의미한 항균 활성을 나타냄.

○ 신규 화합물 2번이 HCT116 cell에 대하여 세포독성을 보임

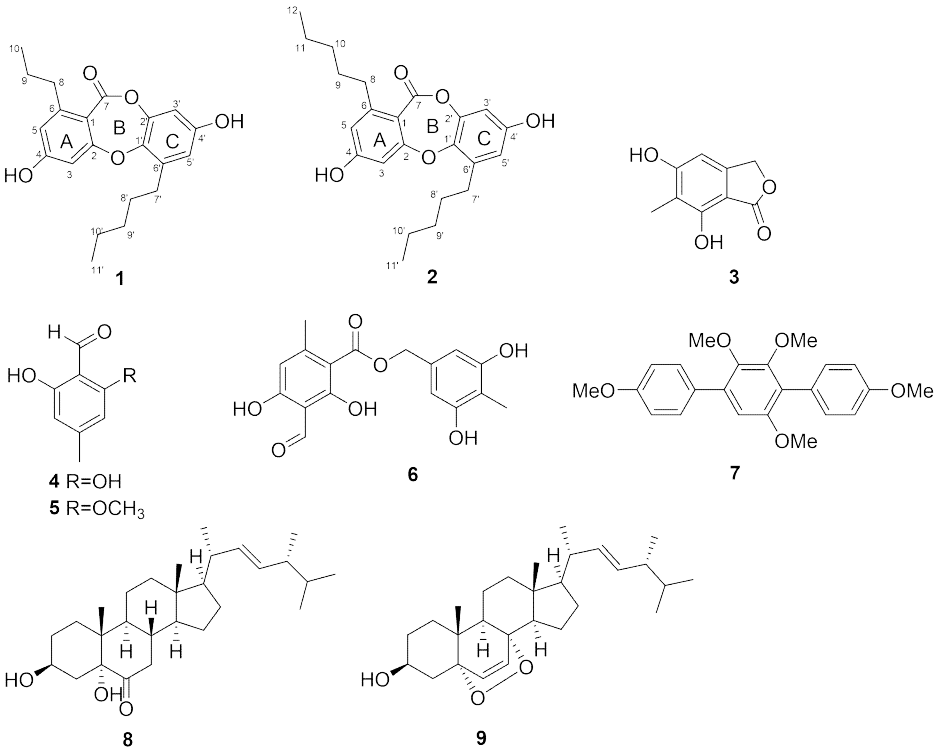


Table. 화합물 1-4와 6-7에 대한 항생 및 항균 활성

Compounds	IC_{50}		
	S. aureus	*E. coli*	*C. albicans*
Kanamycin[a]	0.042 ± 0.0032 mM	0.009 ± 0.0012 mM	-
Nystatin[a]	-	-	0.001 ± 0.0006 mM
1	35.09 ± 3.38 mM	-	>200 mM
2	7.01 ± 0.85 mM	-	-
3	-	>200 mM	-
4	>200 mM	>200 mM	-
6	>200 mM	>200 mM	139.1 ± 26.03 mM
7	>200 mM	>200 mM	-

[a] :Positive control

Table. 신규 화합물 2에 대한 세포독성 활성

Compound	EC_{50}
5-fluouracil[a]	9.4 ± 1.90 μM
2	1.11 ± 0.85 μM

[a] :Positive control

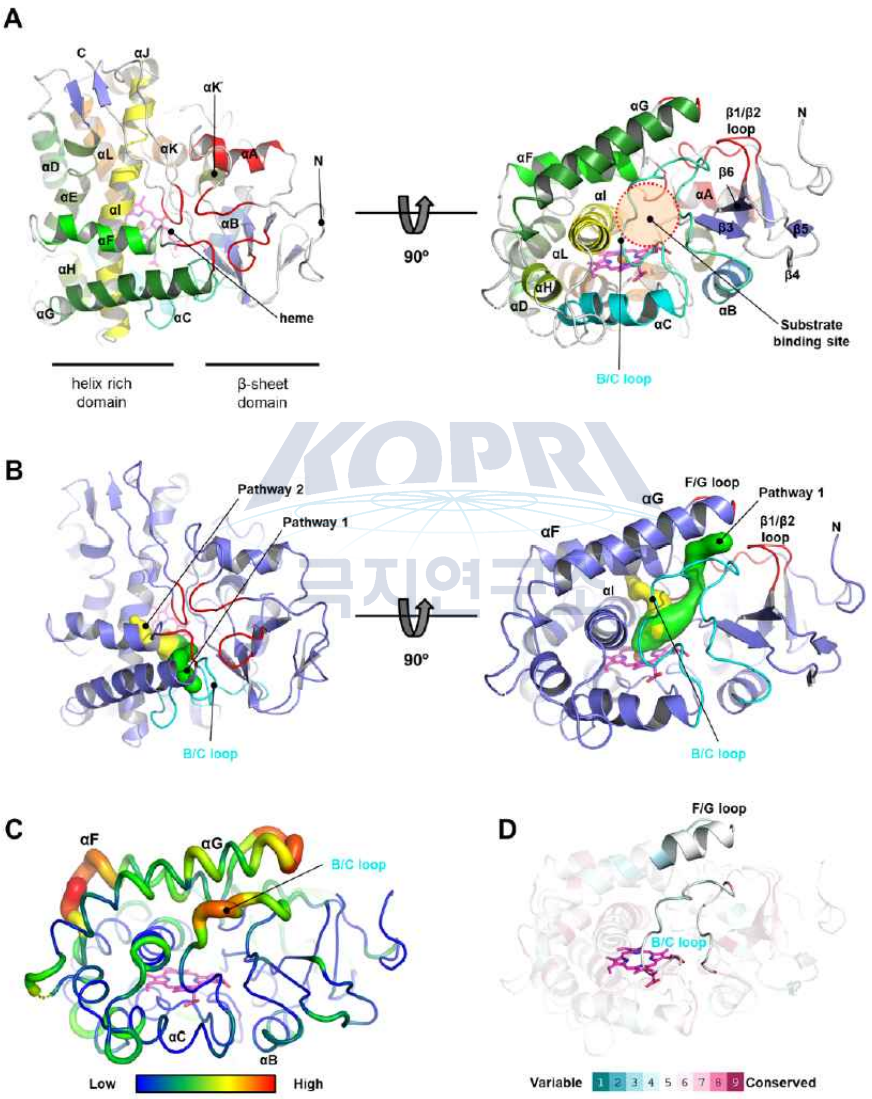
KOPRI 극지연구소

<2세부> 극지 유전자원 기반 항생물질 변형효소 선별

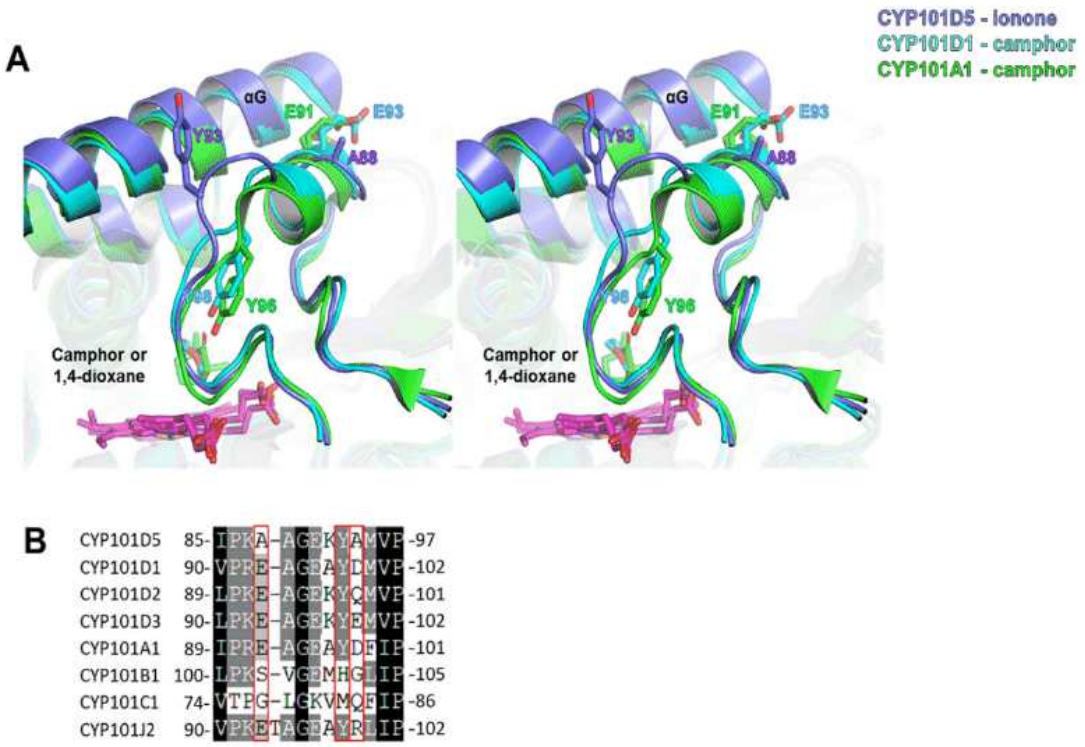
가. 항생물질 타겟 단백질 발현 및 정제 (극지연, 선문대)

1) 토양 미생물 (*Sphingomonas echinoides*) 유래 cytochrome P450 CYP101D5 효소의 삼차구조 분석과 생화학적 특성 연구 (Int J Mol Sci. 2022 Nov 1;23(21):13317.)

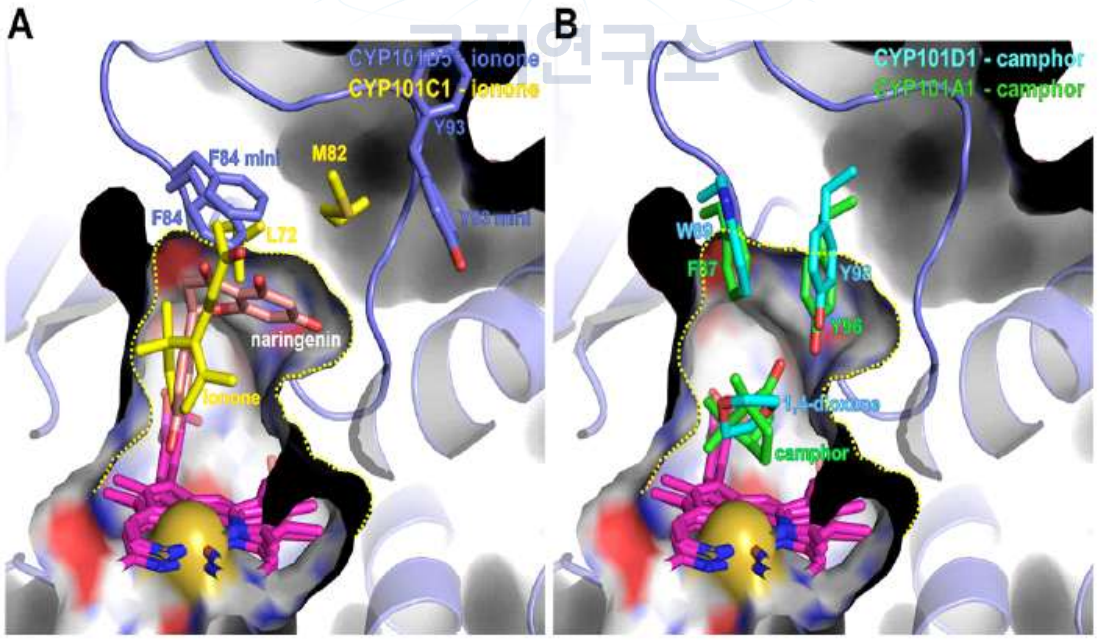
- 항생물질 변형효소로 사용 할 수 있는 CYP101D5 단백질의 삼차구조 해석
- CYP101D5 효소는 기질의 hydroxylation (β-ionone and flavonoids) 또는 dehydrogenation (α-ionone) 반응을 유도
- CYP101D5 효소의 삼차구조 분석과 다른 CYP101 계열 단백질 구조들과의 비교 분석을 통해 CYP101D5 효소 기질 인식 부위의 공간적 제약이 B/C 루프 영역에서 비롯된다는 것을 규명
- 기질 결합 부위에서의 전하 분포는 CYP101D5에 대한 기질 선택성 및 기질 선호도에 중요



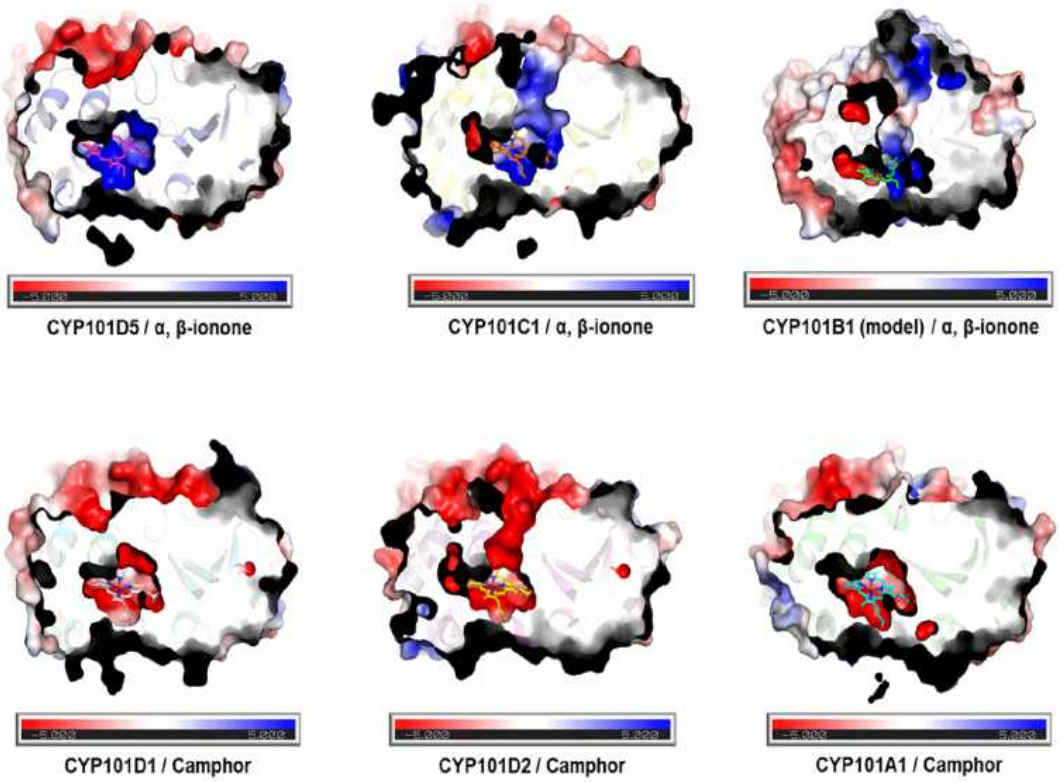
<그림> CYP101D5의 전반적인 구조 및 구조적 특징



<그림> B/C 영역의 구조 및 시퀀스 비교. (A) 구조적으로 유사한 CYP101D1 (PDB: 3LXH) 및 CYP101A1 (PDB: 4KYK)과 구조적으로 겹쳐진 CYP101D5 구조의 스테레오 이미지. (B) B/C 루프 영역의 아미노산 서열 비교. CYP101D5의 Tyr93 잔기 및 B/C 루프의 작은 아미노산 잔기들 (Ala88 and Ala94)이 Ionone 에 대한 기질 선호도를 결정할 것으로 예상됨.



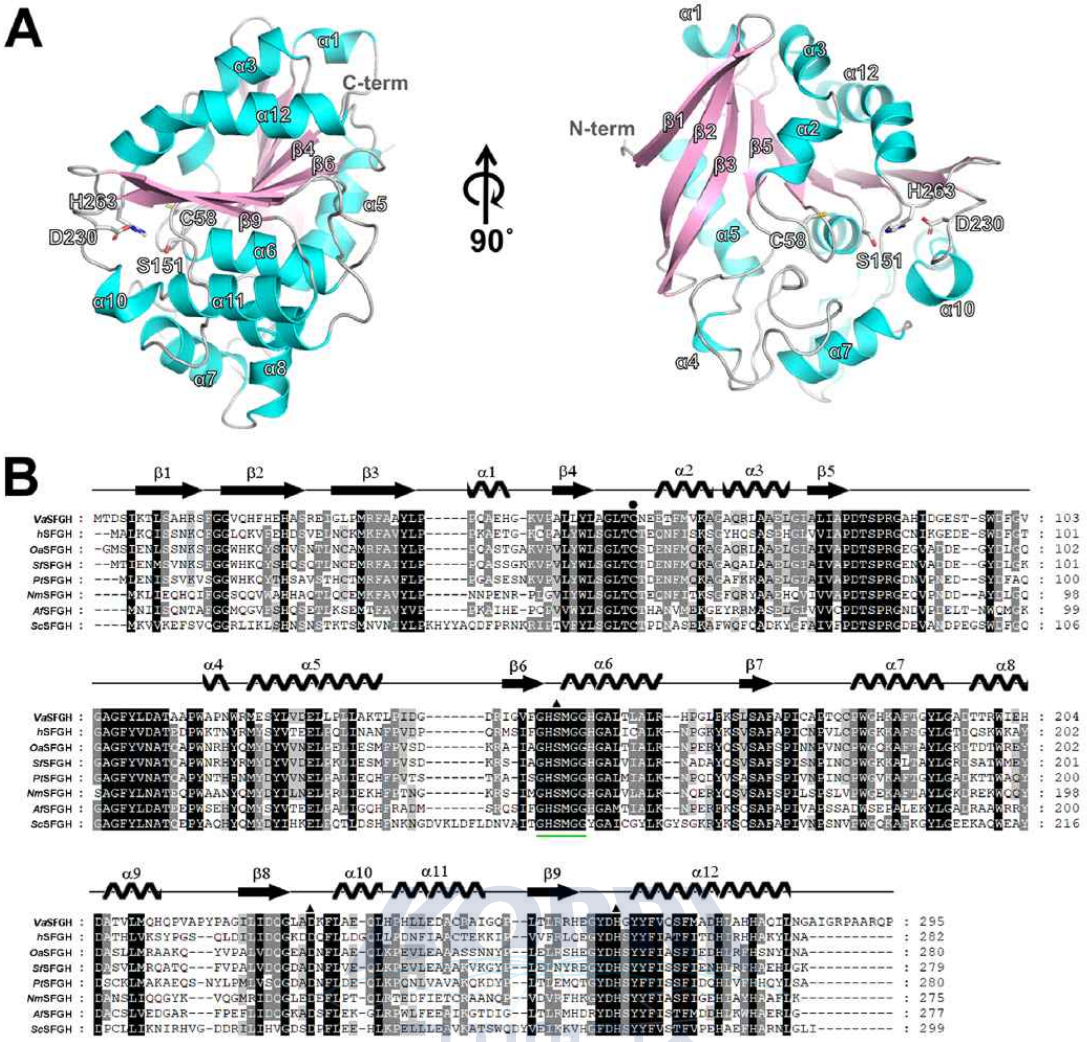
<그림> CYP101D5의 기질결합부위 및 CYP101 계열의 3개 CYP 구조의 기질 결합부위로 구성된 아미노산 잔기의 비교 (A) Ionone 선호 CYPs; CYP101D5 및 CYP101C1의 구조가 겹쳐져 있음 (B) Campor 결합 CYPs 의 구조 모습.



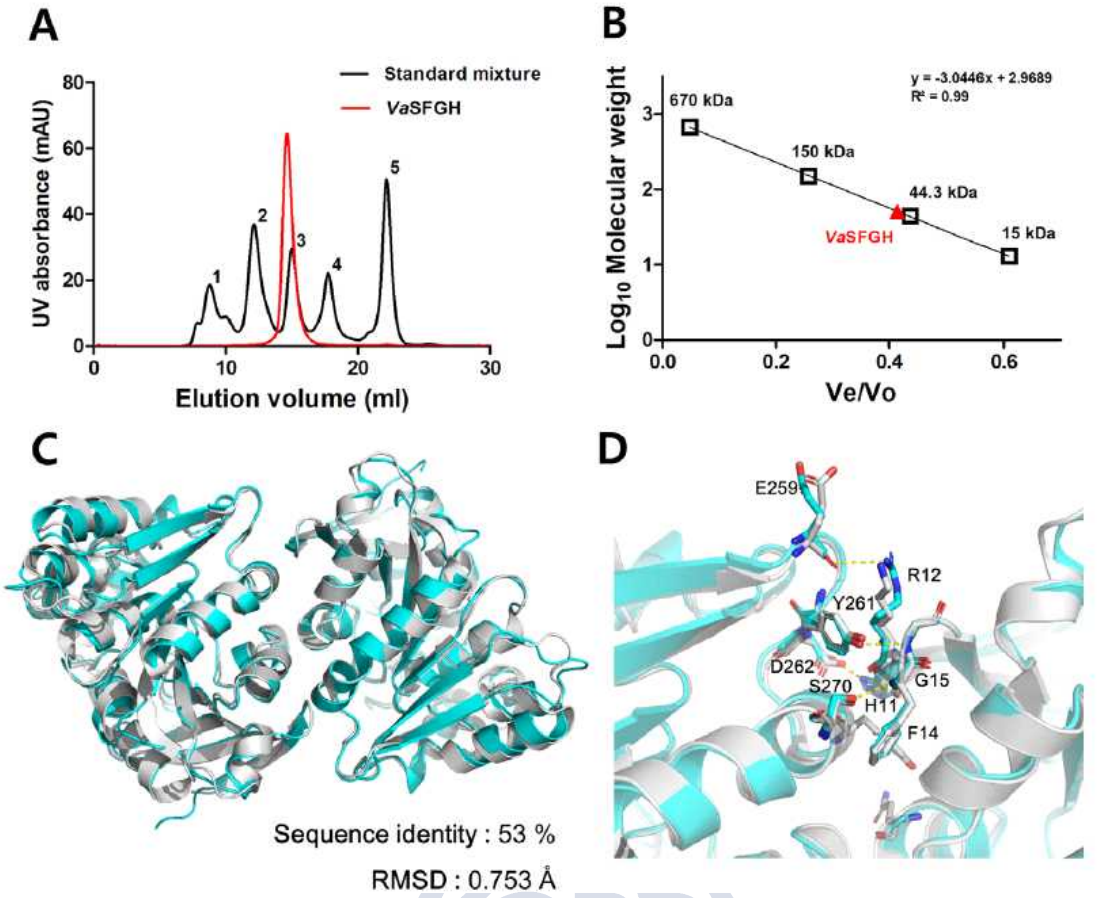
<그림> CYP101 패밀리 단백질들의 구조에서 표면 전하 분포. 빨간색은 음전하를 띤 영역, 파란색은 양전하를 띤 영역, 회색은 중성전하를 띤 영역을 나타냄. Ionone 결합 CYP는 특히 헴 분자와 기질 결합 부위를 둘러싸는 양전하의 분포를 보여주는 반면, camphor 결합 CYP는 기질 경로를 포함한 기질 결합 부위에서 대부분 음성 전하를 나타냄.

2) 남극 지의류에서 분리한 미생물 (*Variovorax* sp. PAMC 28711) 유래 S-formylglutathione hydrolase 효소의 구조 및 기질 특이성 규명 (Biochem Biophys Res Commun. 2022 Nov 12;629:159-164) (극지연)

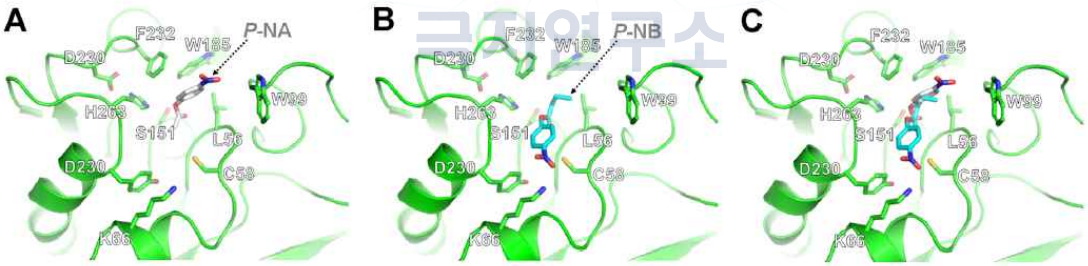
- S-formylglutathione hydrolase 효소는 S-formylglutathione 기질의 가수분해를 촉매하여 글루타티온을 형성하는 것으로 알려져 있음.
- 최근 연구에 의하면 S-formylglutathione hydrolase 효소는 thioester 및 ester bonds 결합을 포함하는 기질에 대해서도 활성을 가진다는 사실이 규명됨
- 본 연구에서는 남극 박테리아 *Variovorax* sp. PAMC 28711 균주에서 새로운 S-formylglutathione hydrolase 효소 (VaSFGH) 유전자를 확인하고 재조합 VaSFGH 단백질을 정제. 효소 활성 분석 연구를 통해 VaSFGH가 특히 짧은 사슬의 p-니트로페닐 에스터(C2~C4)에 대해 높은 활성을 갖는다는 사실 규명.
- 2.38Å의 해상도로 VaSFGH의 결정 구조를 규명하고 모델링 연구를 통해 다양한 길이의 p-nitrophenyl ester 기질이 결합된 VaSFGH 구조 모델을 제작
- 기질이 결합되어 있지 않은 구조와 p-nitrophenyl ester 기질이 결합된 VaSFGH 모델 구조의 비교 분석을 통해 VaSFGH 효소가 짧은 길이의 기질을 선호하는 이유가 본질적으로 작은 기질 결합 포켓 크기와 기질결합 부위 구조의 유동성이 작기 때문이라는 사실 규명



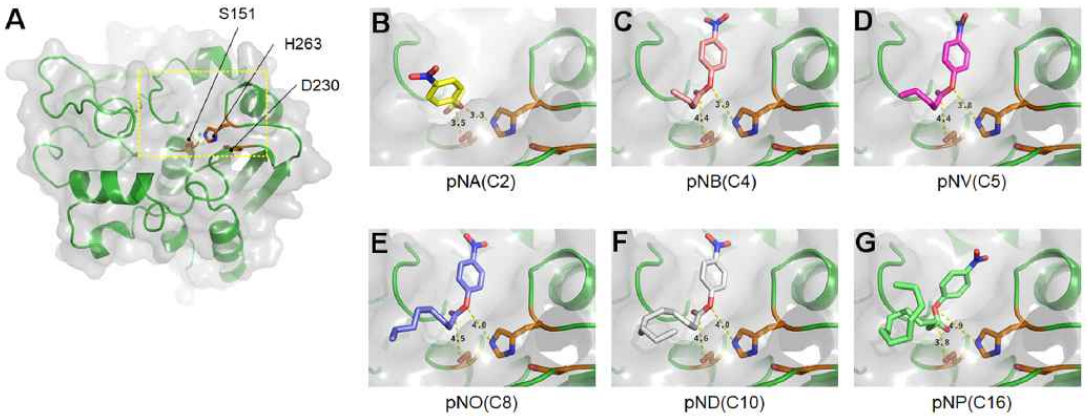
<그림> VaSFGH의 결정 구조 및 다른 SFGH 단백질들과의 아미노산 서열 비교



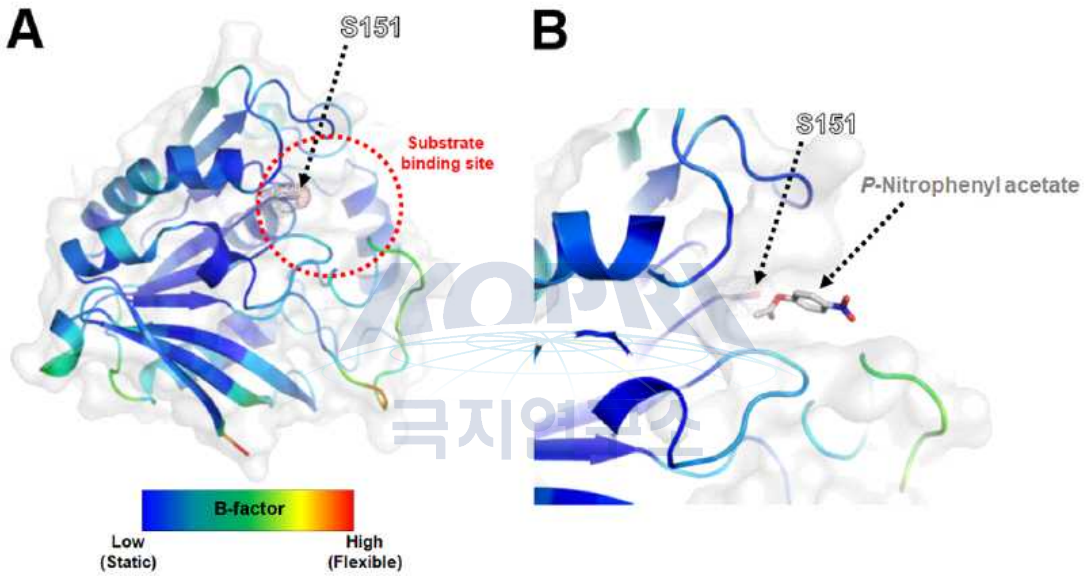
<그림> 용액상태에서 dimer 형태를 가지는 VaSFGH 과 dimer를 이루는 부위의 상호작용 모습



<그림> 컴퓨터 시뮬레이션 도킹 방법으로 만들어진 p-nitrophenyl acetate (p-NA,C2) 결합된 VaSFGH 구조와 p-nitrophenyl butylate (p-NB, C4) 결합된 VaSFGH 구조에서 기질결합에 중요한 상호작용 비교



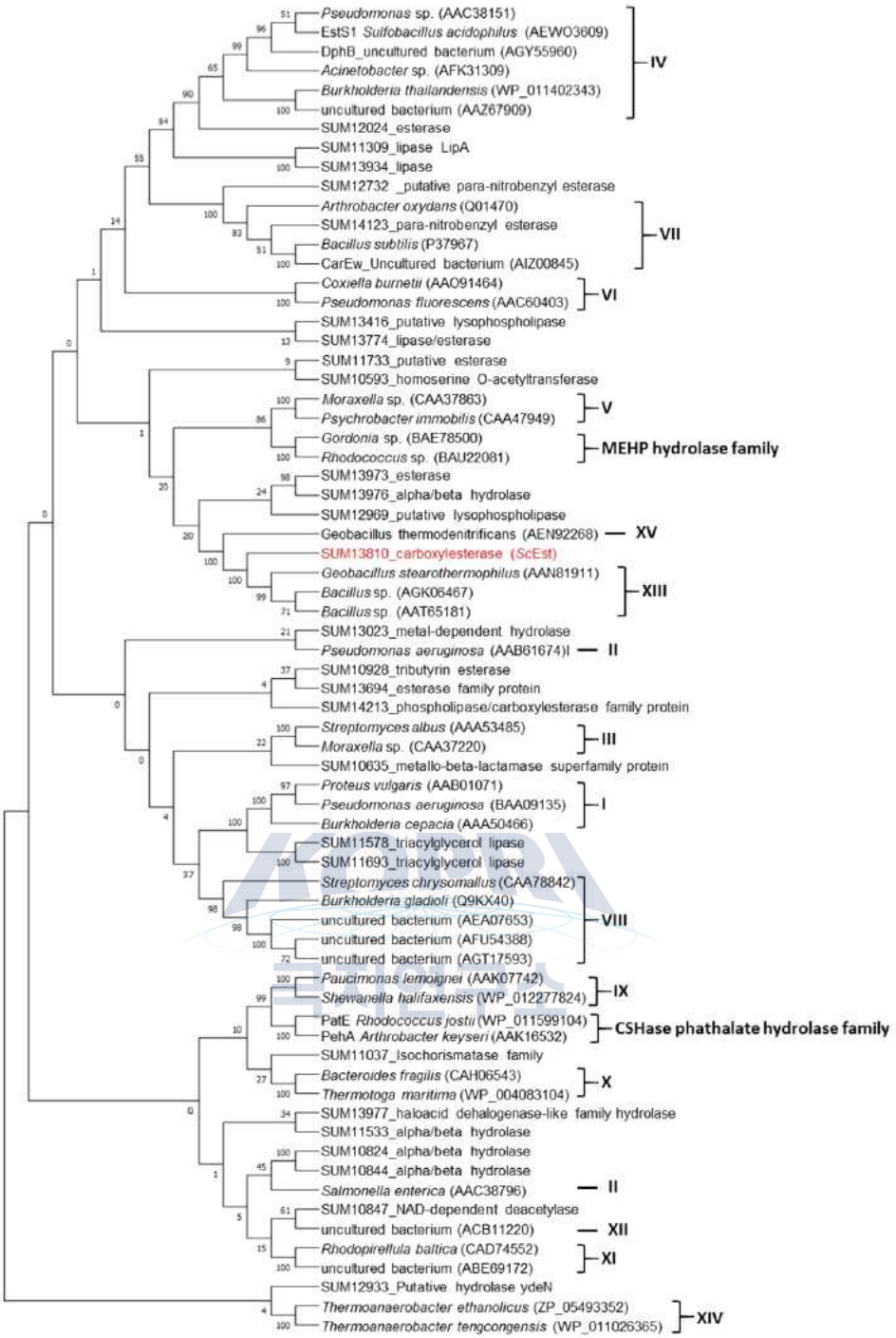
<그림> 컴퓨터 시뮬레이션 도킹 방법으로 만들어진 다양한 길이의 기질과의 결합 VaSFGH 구조에서 p-nitrophenyl esters 와 catalytic serine 잔기 사이의 거리 차이. 활성이 좋은 짧은 길이의 p-nitrophenyl ester 결합일수록 거리 차이가 좁아짐.



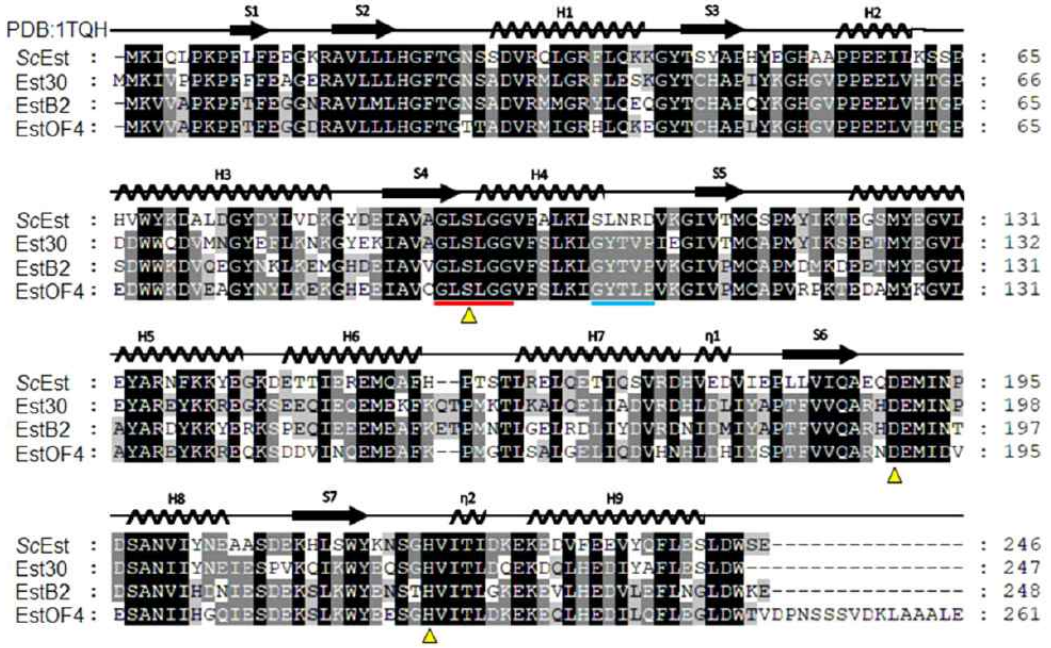
<그림> VaSFGH 구조에서의 기질 결합부위의 특성. (A) 기질결합부위를 포함하는 루프 지역은 상대적으로 낮은 B-factor 값을 보임 (B) VaSFGH의 기질결합부위는 표면에 노출되어 있어서 기질 결합 포켓의 깊이가 얕고 소수성의 길이가 긴 기질이 결합하기에 부적합함

3) 병원성 미생물 (*Staphylococcus chromogenes*)유래 신규 에스터레이즈 효소의 서열 및 결정화 연구 (Crystals 2022, 12, 546.) (극지연)

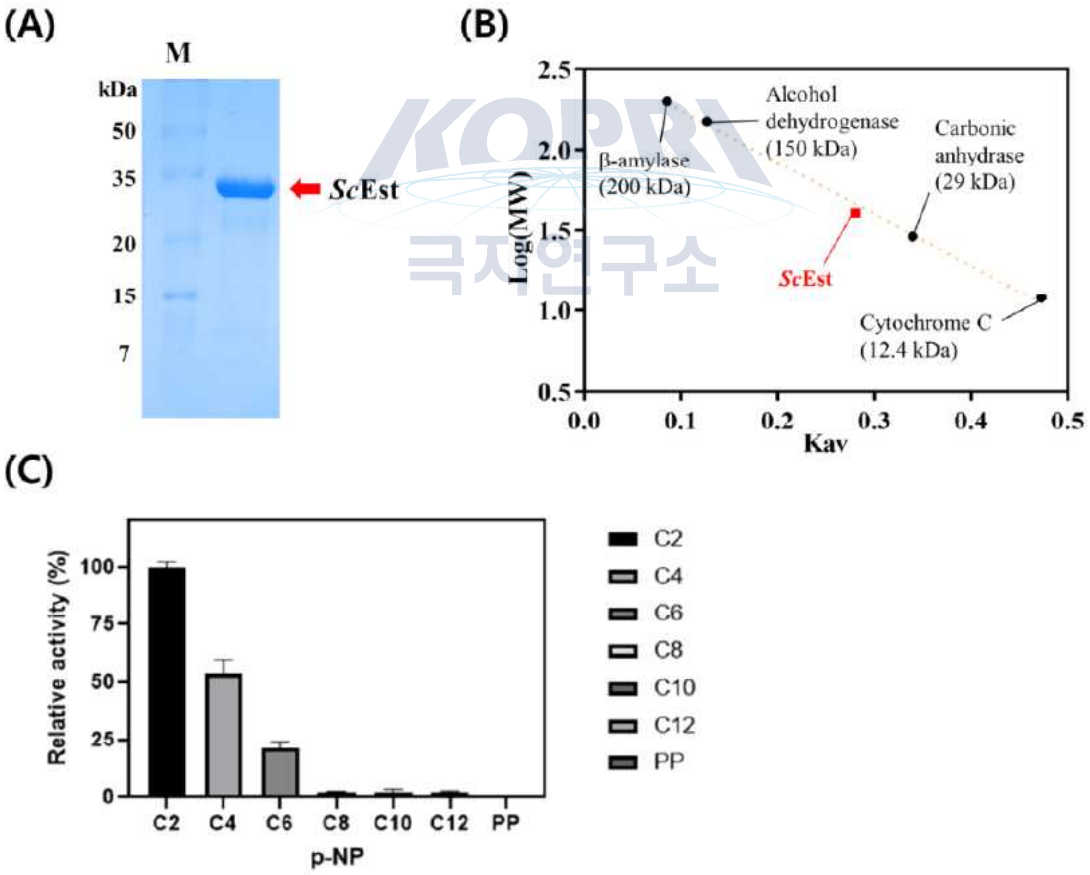
- Ester prodrugs 는 새로운 항생제로 개발될 수 있고 다수의 내성 박테리아에 대한 잠재적인 치료제로 이용 가능
- Ester prodrug의 항균 활성은 병원체에 의해 생성된 에스테라아제에 의해 분해된 후 활성화됨
- 본 연구에서는 *Staphylococcus chromogenes* NCTC10530 균주에서 새로운 esterase 효소 (ScEst) 유전자를 클로닝 하여 대장균에서 재조합 ScEst 단백질을 대량 발현 후 정제
- 정제된 ScEst 단백질을 이용하여 0.25 M ammonium citrate tribasic (pH 7.0), 20% PEG 3350 조건에서 결정화 하여 삼차구조 분석을 위한 X-선 회절 데이터를 확보함



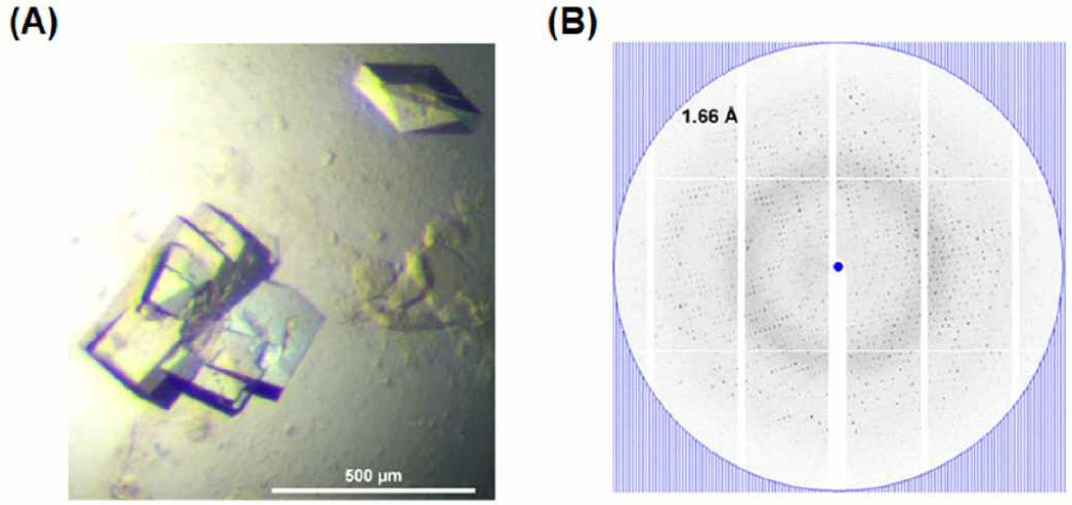
<그림> 세균성 지방 분해 효소 아미노산 서열을 이용한 ScEst의 계통발생학적 분석



<그림> ScEst와 bacterial lipolytic enzyme VIII 그룹의 다른 에스테라아제 아미노산 서열의 비교



<그림> ScEst 단백질의 정제와 기질 특이성 규명 (A) 정제된 ScEst 단백질의 SDS-PAGE 실험결과 (B) 용액 상태에서의 ScEst 단백질의 oligomerization 분석 결과 (C) 다양한 길이의 p-Nitrophenyl esters 기질을 이용한 ScEst의 효소 활성 평가

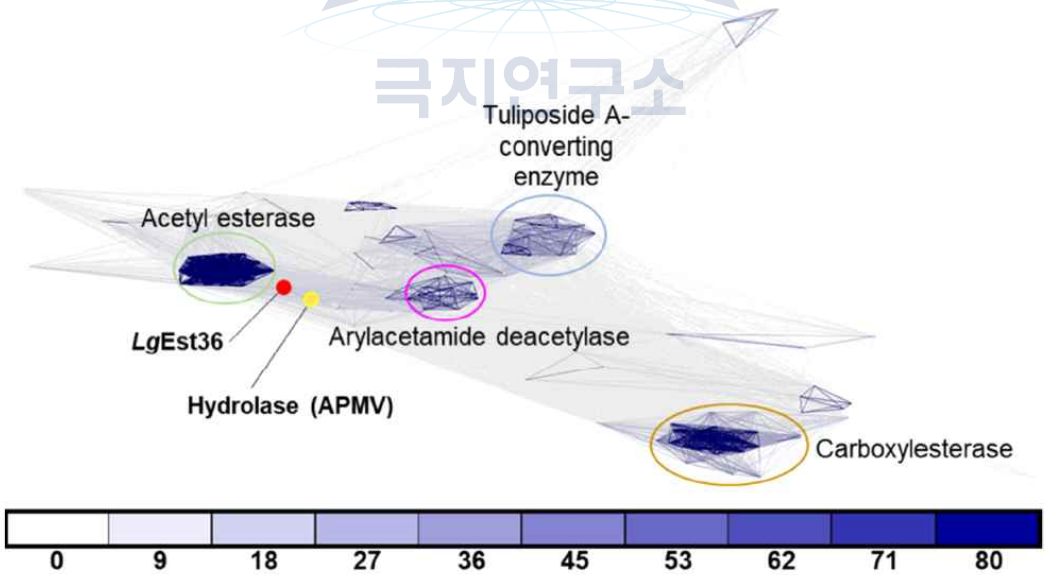


<그림> ScEst 단백질의 결정과 이를 이용한 X-선 회절 데이터 이미지

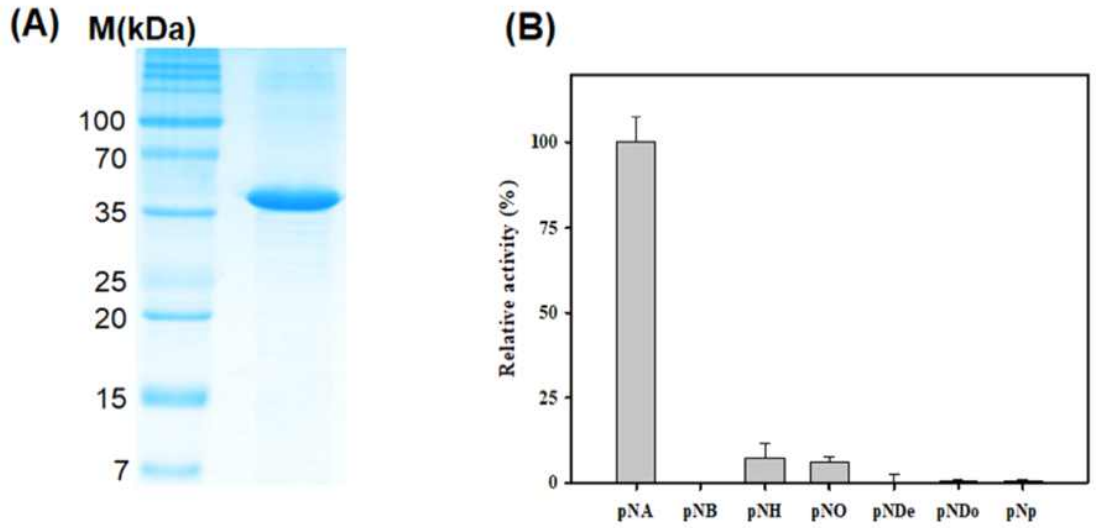
4) 해양어류 병원성 미생물 (*Lactococcus garvieae*)유래 아세틸에스터레이즈 효소의 서열 및 결정화 연구 (Crystals 2022, 12, 46) (극지연)

- 박테리아성 어류 병원체인 *Lactococcus garvieae* 유래 acetyl esterase 효소 (LgEstI) 의 삼차구조 분석을 위한 단백질 정제 및 결정화 연구
- 정제된 LgEstI 단백질과 결정화조건 [0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.1), 0.2 M calcium acetate hydrate, 19 %(w/v) PEG 3000] 을 이용해서 결정화하고 2.0 Å 해상도까지 X선 회절 데이터 세트를 수집

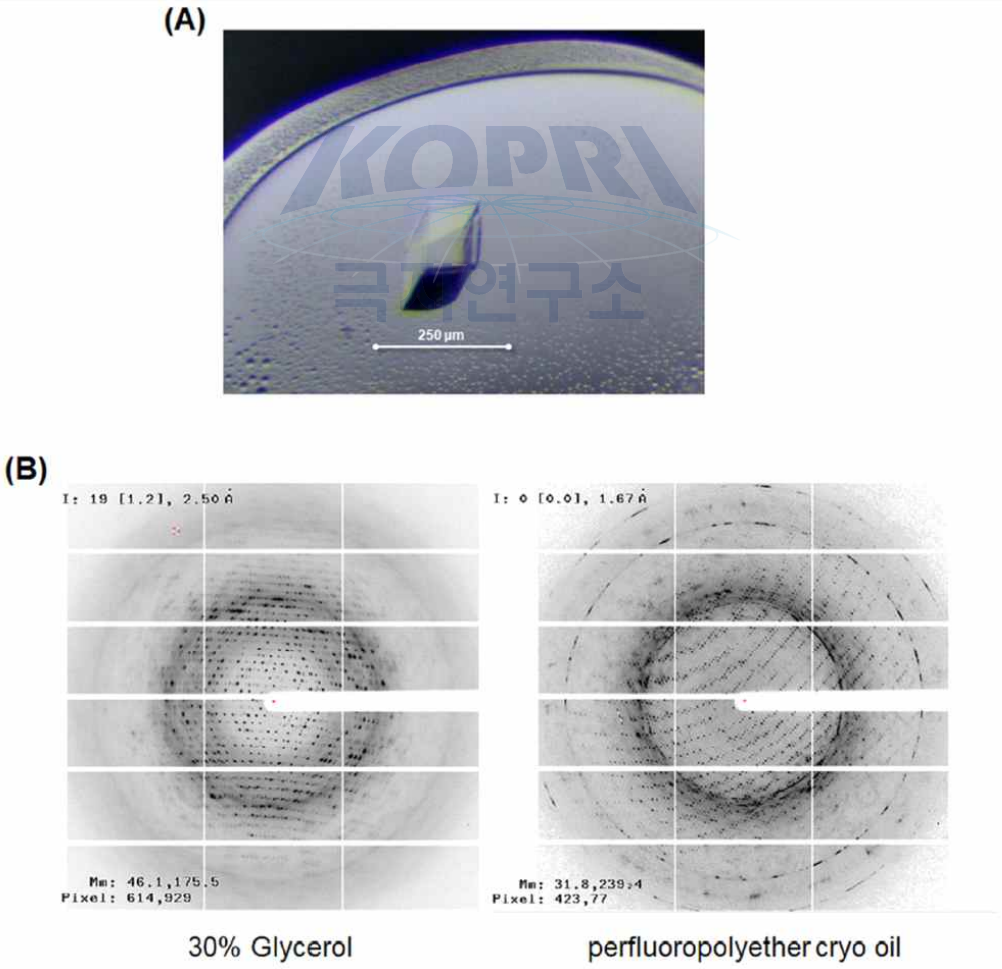
KOPRI
극지연구소



<그림> CLANS 클러스터링을 이용한 LgEstI 아미노산 서열 분석결과 LgEstI은 acetyl esterase 특성을 가지는 것으로 확인됨



<그림> LgEstI의 정제 및 다양한 p-nitrophenyl esters 기질을 이용한 활성분석 (A) LgEstI의 SDS-PAGE 분석 (B) 다양한 길이를 가지는 p-nitrophenyl esters 기질을 이용한 LgEstI의 상대적인 활성차이

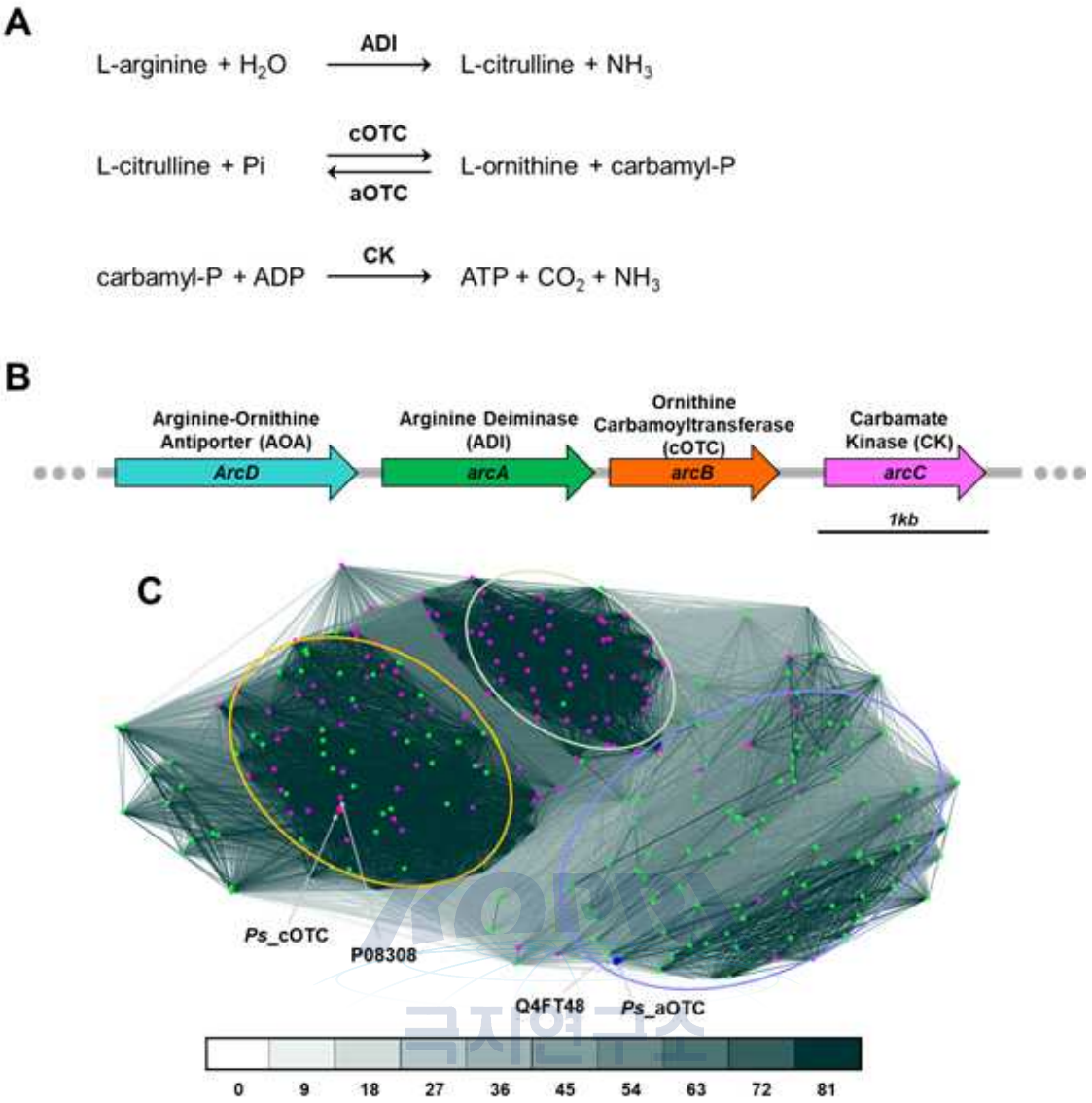


<그림> LgEstI 단백질의 결정 [결정화 조건: 0.1 M Tris-HCl (pH 7.1), 0.2 M calcium acetate hydrate, and 19% (w/v) PEG 3000] 과 두 가지 다른 Cryoprotectant를 이용한 X-선 회절 데이터 이미지 차이

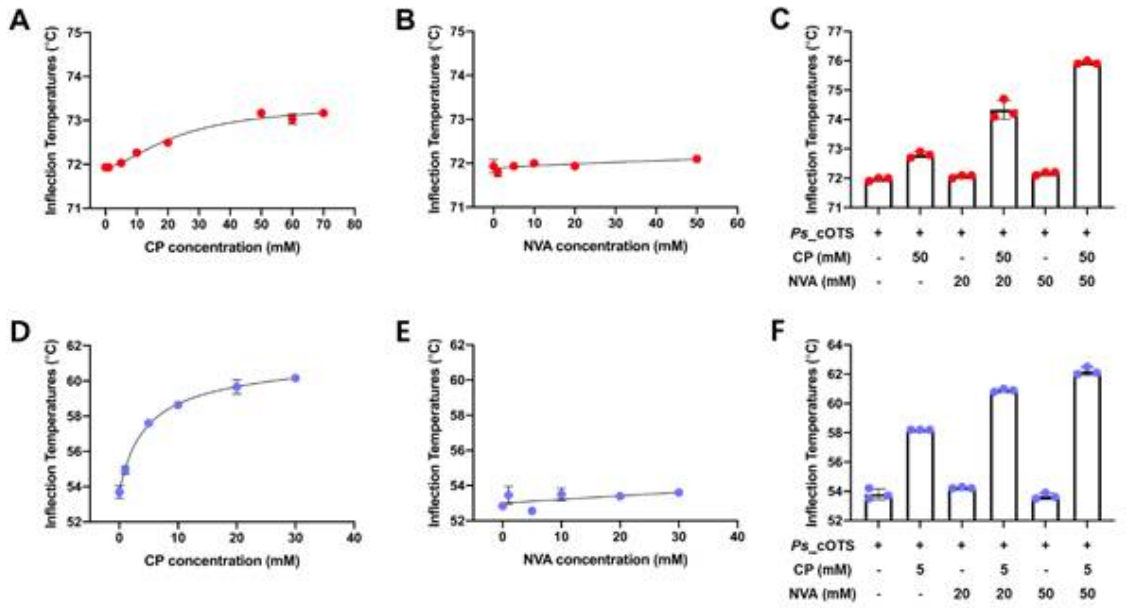
5) 남극 저온성 미생물 (*Psychrobacter* sp. PAMC 21119) 미생물 유래 ornithine carbamoyltransferase 효소의 구조-기능 연구 (PLoS One. 2022 Sep 23;17(9):e0274019) (극지연)

- *Psychrobacter* sp. PAMC 21119 유래 카타볼릭 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제(catabolic Ornithine carbamoyltransferases, Ps_cOTC) 및 아나볼릭 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제(anabolic Ornithine carbamoyltransferases, Ps_aOTC) 효소의 구조적 및 화학적 특징을 규명
- ornithine transcarbamylase의 구조를 분석하여 CP 및 Orn의 적절한 결합을 위해 기질 결합부위 루프, 즉 80s 및 SMG/240s 루프의 기질 유도 형태 변화가 필요
- anabolic ornithine carbamoyltransferase의 구조를 분석하여 CP의 낮은 친화성으로 인해 단방향 반응이 가능하고, CP 결합에 관여하는 B2-H3 루프 및 ORN 결합 모티프를 포함하는 루프의 형태변화를 관찰
- 동일한 종인 *Psychrobacter* sp. PAMC 21119 유래 카탈리틱 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제(catalytic Ornithine carbamoyltransferases, Ps_cOTC) 및 아나볼릭 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제(anabolic Ornithine carbamoyltransferases, Ps_aOTC) 효소의 구조적 및 화학적 특징 분석을 통해, 두 효소의 상기 특징으로 인하여 이화작용(catabolism) 및 동화작용(anabolism)을 촉매하는 것을 확인함
- 구조적 및 화학적 특성 차이로 인해, L-시트룰린(L-citrulline)으로부터 L-오르니틴(L-ornithine)을 제조하기 위해서는 Ps_cOTC를 이용해야 하고, L-오르니틴으로부터 L-시트룰린를 제조하기 위해서는 Ps_aOTC를 이용

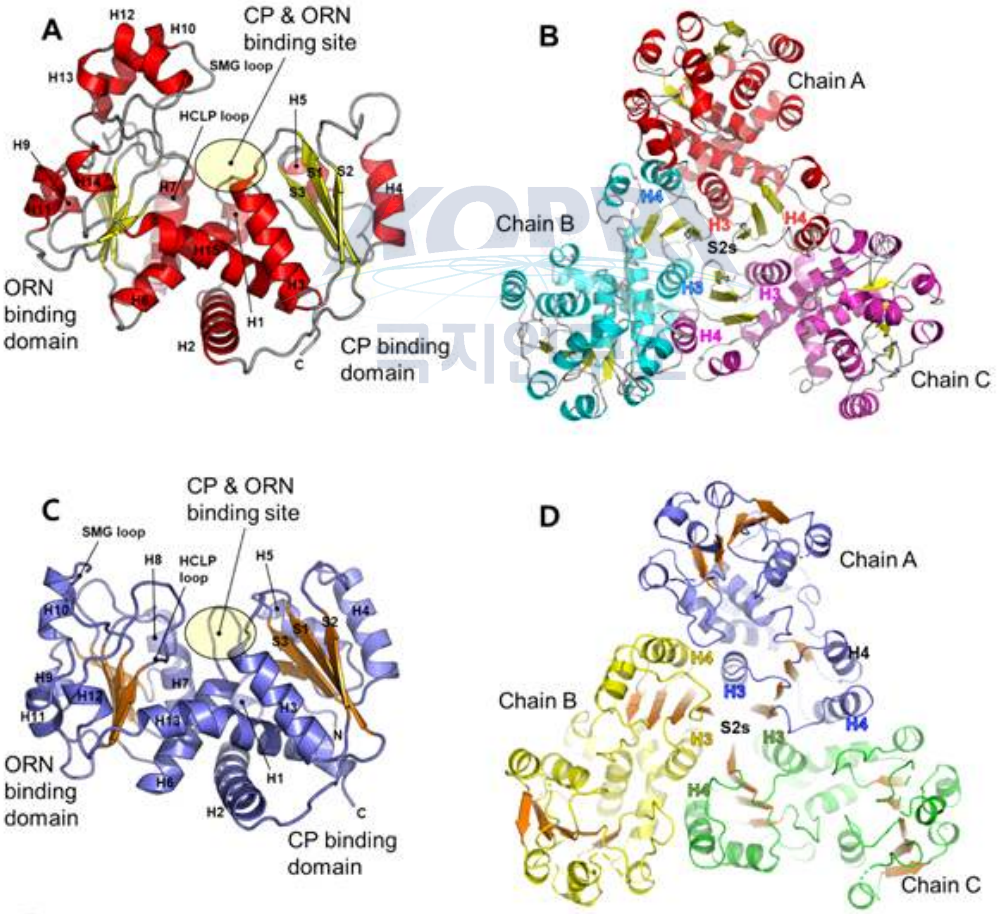
KOPRI
극지연구소



<그림> Ps_cOTC 와 Ps_aOTC 효소의 기능 (A) ADI 경로 및 OTCs에 의해 촉매되는 반응의 도식적 표현 (B) PAMC 2119 균주의 ADI 시스템 내 유전자 구조의 도식적 표현 (C) Uniprot_sport 데이터베이스에서 ProtBLast/PSI-BLAST를 사용하여 검색한 OTC의 클러스터링 분석



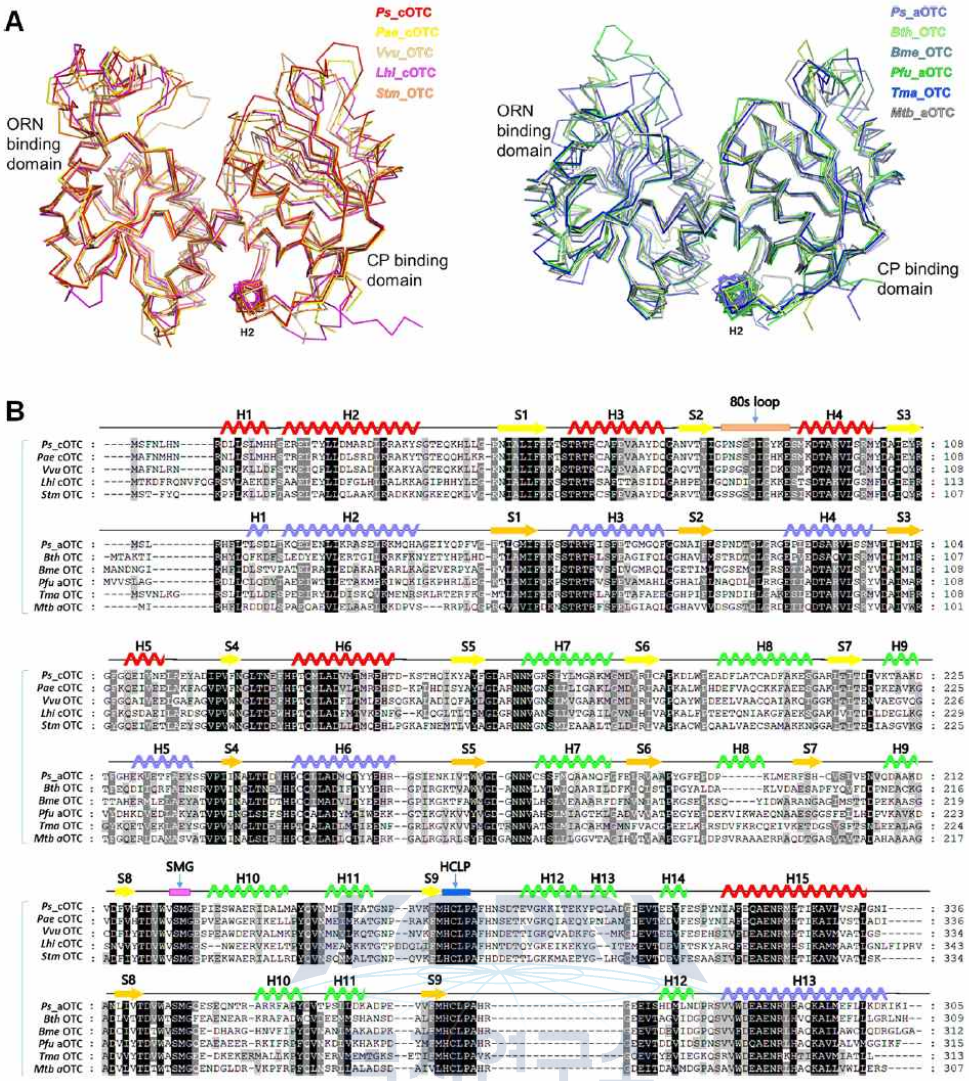
<그림> 서로 다른 기질인 CP와 NVA의 다양한 농도조건에서 Ps_cOTC (A, B, C)와 Ps_aOTC (D, E, F)의 열적 안정성 변화



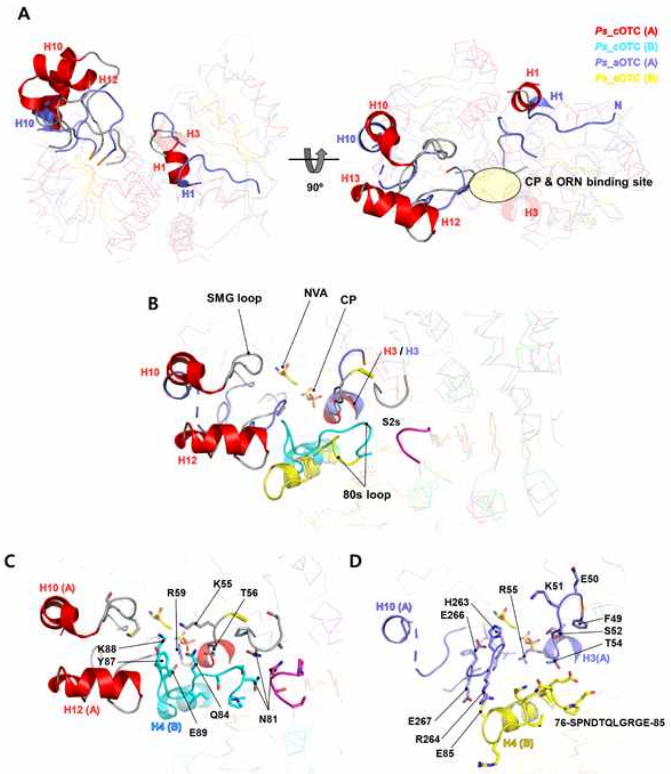
E

Protein	*Ps*_cOTC	*Ps*_aOTC
M.W. (kDa) (theoretical)	114.9	104.7
M.W. (kDa) (AUC)	120.8	103.2

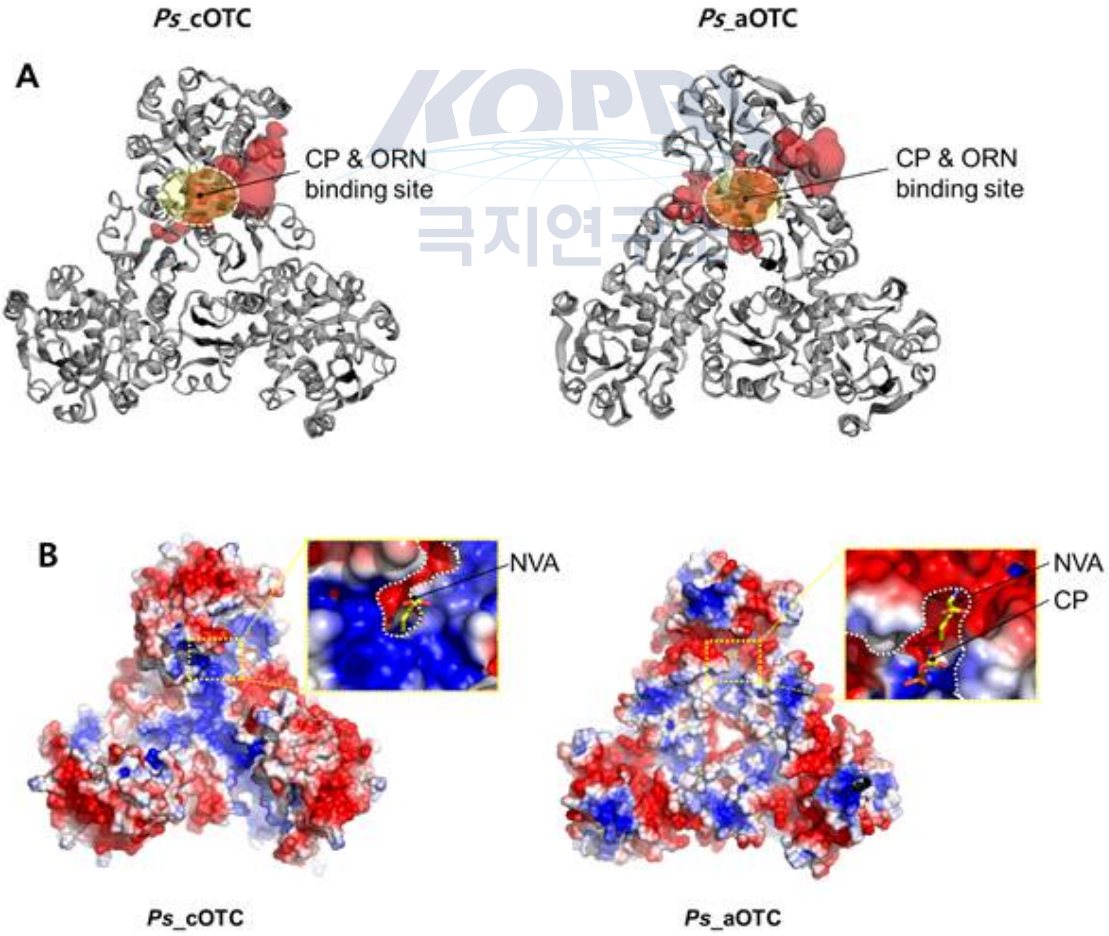
<그림> Ps_cOTC 와 Ps_aOTC 의 monomer 및 trimer 구조 비교



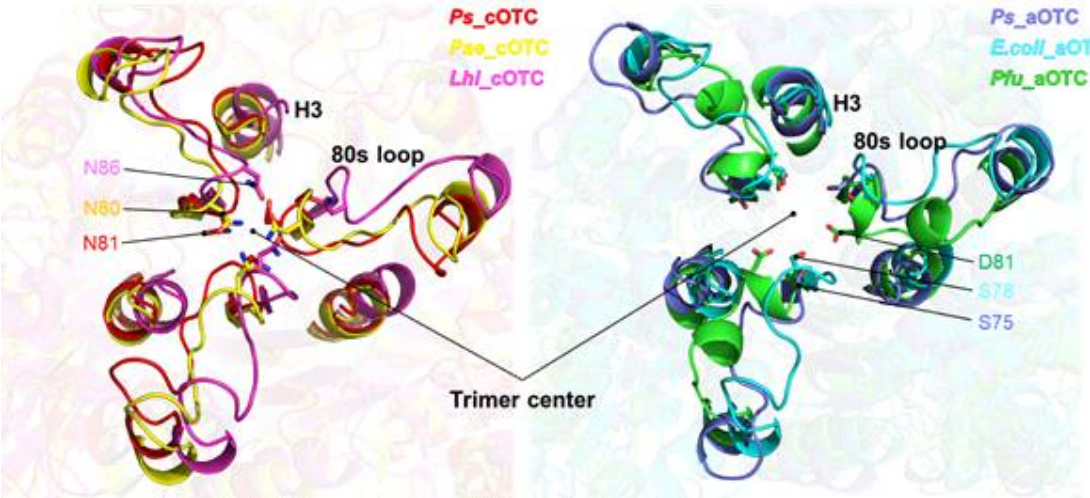
<그림> Ps_cOTC와 Ps_aOTC의 구조적 및 시퀀스 비교



<그림> Ps_cOTC와 Ps_aOTC의 활성 부위 구조적 비교



<그림> Ps_cOTC와 Ps_aOTC의 기질 결합 부위의 구조적 비교



<그림> OTC의 trimer 구조 비교

나. 극지 변형 효소 발현 및 분자진화를 통한 기질 다중화 연구 (부경대)

1) 분자진화 기반 변형효소 발현개선

- *Microbacterium* sp. 17 APH(3’)-IIb, *Frondihabitans* sp. (PAMC 28766) 18 APH(3’)-IIb 단백질 발현 개선

- 재조합 단백질의 생산을 증가시키기 위하여 코돈 최적화 (codon optimization)와 동의코돈 (synonymous codon) 치환방법을 사용할 수 있다. 하지만 두 방법 모두 단백질 번역 속도의 증가에 주안점을 두고 있으며, 번역율 (translation rate)의 증가는 단백질 오접힘 (misfolding)과 불용성 (insolubility)을 높인다고 보고되어 있음.
- 최근에는 동의희귀코돈 (synonymous rare codon) 치환을 통해 번역율을 낮춰 단백질의 용해성을 높이는 연구가 진행되고 있다. 희귀코돈은 5‘-말단에 군집을 이루고 있으며, A/T의 비율에 의해 2차 구조 형성이 감소되어 RBS 노출이 용이해 진다. 이는 분비단백질을 코딩하는 유전자에서도 유사하게 나타난다고 보고되어 있음.

- Hess, Anne-Katrin, et al. "Optimization of translation profiles enhances protein expression and solubility." PLoS One 10.5 (2015): e0127039.
- Cheong, Dae-Eun, et al. "Enhancing functional expression of heterologous proteins through random substitution of genetic codes in the 5'coding region." Biotechnology and bioengineering 112.4 (2015): 822-826.
- Zhong, Chao, Ping Wei, and Yi-Heng Percival Zhang. "Enhancing functional expression of codon-optimized heterologous enzymes in *Escherichia coli* BL21 (DE3) by selective introduction of synonymous rare codons." Biotechnology and bioengineering 114.5 (2017): 1054-1064.
- Konczal, Jennifer, Justin Bower, and Christopher H. Gray. "Re-introducing non-optimal synonymous codons into codon-optimized constructs enhances soluble recovery of recombinant proteins from *Escherichia coli*." PLoS One 14.4 (2019): e0215892.
- Zheng, Bo, et al. "Utilization of rare codon-rich markers for screening amino acid overproducers." Nature communications 9.1 (2018): 1-11.

- 유전자 재설계를 위한 코돈최적화

- 문헌조사결과에 따라서 *Microbacterium* sp. 17 APH(3’)-IIb와 *Frondihabitans* sp. (PAMC 28766) 18 APH(3’)-IIb의 발현을 최적화하기 위한 유전자재설계 방법으로 각 유전자의

코돈최적화를 진행하였음

>*Microbacterium* sp. 17 APH(3')-IIb_Original gene sequence

ATG AGC ATC **CCC** GCC GCC TCC GTC GAG GTC **CCC** GCC **CGG** GTC CGC GAA CTC GCC GCC **GGG**
GCC GCG CTG ACC **CCC** GCG TGG CGC AAC GCG ATC GGC GGC CTG ACC TTC CGC ACC GAC GAC
GGC CGC TAC ATC AAA TGG GGT **CCC** CAC GAT **CCC** GAG GCG AAC ATG CGC GAC GAG GCC GAG
CGG ATG CGC TGG GCC CGC ACC TGG ACC **ACG** GTG **CCC** GAG GTG CTC TCC CAG GGC GAG GAC
GAG GCA CAC GAG TGG CTC GTG **ACG** GCG GCC CTG TCC GGC AGC AGT GCC GTG GAT CCG **CGG**
TGG GCC GCC TCT **CCC** GAG GCC GCC GTG CGC GCG GTC **GGG** CTC GGC CTG CGT CGC CTG CAC
GAT GCG CTC **CCC** GTC GCG GAG TGC CCG TGG ACC TGG AGC **CCC** GAG GAG CGC ATC GCG AAC
GCC GCC GCC CGT GGC **ACG** CTG GTG CCG **ACG** GAC CTG CAG GAG **CCC** CCG TCG ATC GAC **CGG**
CTC GTG GTC TGC CAC GGC GAC GCG TGC CTC **CCC** AAC ACC CTG CTC GAC GAC GAC GGC CGT
CCG GTG GCC CAC GTC GAC CTC GCC GCG CTC GGC GTC GCC GAC **CGG** TGG GCC GAC ATC GCC
GTG GCC GCC ATG AGC **ACG** CTG TGG AAC TTC GGT **CCC** **GGG** TGG GAG GAC **ACG** CTC ATC GCG
GCC TAC GGC GTC GAC **CCC** GAT **CCC** CCG **CGG** CTG GAG TAC TAC **CGA** **CGG** CTC TGG AAC GAG
ACC

>*Microbacterium* sp. 17 APH(3')-IIb_codon optimized

ATG TCT ATT CCT GCA GCT TCG GTT GAA GTT CCT GCT CGT GTT CGT GAA TTG GCA GCA GGT
GCA GCC CTG **ACG** CCT GCT TGG CGT AAT GCA ATT GGT GGT TTG ACC TTC CGT ACA GAT GAT
GGT **AGG** TAT **AUA** AAA TGG GGT **CCC** CAT GAT CCG GAG GCT AAC ATG **AGA** GAT GAA GCA GAA
CGG ATG CGC TGG GCA CGT ACC TGG ACC ACA GTT CCA GAA GTT TTG TCA CAA GGC GAA GAT
GAA GCA CAT GAA TGG CTT GTT **ACG** GCA GCA CTG AGT GGT AGC TCA GCA GTA GAT CCT CGT
TGG GCT GCA TCT CCG GAG GCA GCT GTT **AGA** GCT GTT GGC TTA GGT CTG **CGA** **CGA** TTA CAC
GAT GCA CTG CCG GTT GCA GAG TGT CCA TGG ACT TGG TCC CCA GAA GAG CGT ATT GCA AAC
GCT GCA GCA CGT GGC ACA CTT GTT **CCC** ACA GAT CTG CAG GAA CCG **CCC** AGC ATC GAT CGC
CUA GTT GTG TGC CAC **GGA** GAT GCA TGT CTG CCG AAT ACT TTA CTC GAT GAT GAT **GGA** **AGA**
CCG GTA GCA CAT GTT GAT CTG GCA GCA TTA **GGG** GTT GCA GAT CGT TGG GCA GAT ATT GCC
GTA GCA GCA ATG AGT **ACG** CTT TGG AAT TTT GGT CCA **GGG** TGG GAG GAT ACC CTC ATC GCT
GCG TAC **GGA** GTT GAT CCA GAT CCG CCT CGT CTG GAA TAT TAT CGT CGC CTG TGG AAT GAA
ACT

>*Frondihabitans* sp. (PAMC 28766) 18 APH(3')-IIb_Original gene sequence

ATG CTG GTC AGC CAG ATC CCG **ACG** GGC **CCC** GTG **CCC** GTT **CCC** GTG CCG ATC GCC GAG ATC
GCA **GGA** TCC GAC **ACG** GTT ACC **CCC** GTC TGG CTC AAC GAG GTC GGC GGT ATC ACC TTC CAG
CTC GGC GAA GGC CCG TCG CGT **CGG** TTC GCC AAG TGG GCG CCT CAC GGC GTC **GGG** CTC GAC
CTC GCC GCC GAA GAG GCC **CGG** CTC **CGG** TGG GCC GTC GCA TAC ACC TCG GTG CCG **CGA** GTC
CTC GCC TCC GGC ACC **GGG** **CCC** GAC GCC GAC TGG CTC GTG ACC GCC GGC GTC **CCC** **GGG** CGC
AGC GCA GTC GAC CCG **CGG** TGG **CGG** GCT GAG CCG GTA CGC GCC GTC GCA GCG CTC GGT CAG
GGG CTG **CGG** GCC TTC CAC GAT GCG CTG **CCC** GTC GAG GCG TGC **CCC** TTC GAC TGG TCG GTC
GAG ATG **CGA** CTT GCC **CGA** TCC GAG AAG GCG **AGG** CGT CAG GAT CCT GGT CTG CCG CCT GTT
CCA TCC CTC GAC **CGA** CTC GTC GTC TGC CAG **GGA** GAC **CCC** TGC TCG CCG AAC **ACG** CTC ATC
GCC GAC GAC GGC GCC TGG TCG GGT CAC GTC GAC CTC GAC GCC CTC GGT GTA GCC GAC CGC
GCG GCC TTC CTC GAG GCC TAC **GGA** ATC GAG **CCC** GAT TCC GAG **CGG** ACC TCG TTC TAC **CGG**
GCG CTG TGG AAC GGC ACC

>*Frondihabitans* sp. (PAMC 28766) 18 APH(3')-IIb_codon optimized

ATG CTT GTT TCT CAA **ATA** CCG **ACG** GGC CCG GTT **CCC** GTT CCA GTC CCG ATT GCA GAA ATC
GCA GGT TCT GAT ACT GTA ACC CCT GTT TGG TTA AAT GAA GTT GGT **GGG** ATC ACT TTT CAG
TTA GGT GAA GGT CCT AGT CGT CGT TTC GCA AAA TGG GCA CCA CAT GGT GTA GGT CTG GAT
TTA GCA GCA GAG GAA GCA CGT TTA CGT TGG GCA GTT GCA TAT ACC AGT GTT CCT CGT GTT
CTA GCA TCA GGT ACA GGC **CCC** GAT GCA GAT TGG CTG GTT **ACG** GCA GGT GTT CCT **GGA** CGT
TCC GCT GTA GAT CCG CGT TGG **CGA** GCT GAG CCA GTA CGT GCA GTA GCA GCA TTA GGT CAG
GGT TTG CGT GCA TTT CAT GAT GCT TTG **CCC** GTT GAA GCA TGT CCA TTC GAT TGG TCG GTT
GAG ATG **AGA** CTG GCA CGT TCT GAA AAA GCA **AGA** CGT CAA GAT CCA GGT CTG CCG CCT GTT
CCA TCA TTA GAT CGC TTA GTT GTT TGT CAG GGT GAT CCG TGC AGC CCT AAT ACA TTA ATT
GCA GAT GAC **GGA** GCA TGG TCC **GGA** CAC GTT GAT CTG GAT GCA TTA GGT GTT GCA GAT **AGG**
TGG GCT GAT ATT GCA GTT GCT ACA ATG AGC TTA GAG TGG AAC TAT GGT TTA GGT TGG GAT
GCA GCA TTT TTA GAA GCT TAT GGT ATT GAA CCG GAT AGC GAA CGT ACA AGT TTT TAC CGT
GCT TTG TGG AAT **GGA** ACC

- 희귀코돈사용빈도 분석
  - https://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html
  - 코돈최적화결과를 바탕으로 하여 희귀코돈사용빈도를 분석하였음.

***Microbacterium* sp. 17 APH(3′)-IIb**

Amino Acid	Rare Codon	Frequency of Occurrence	
		Orig.	Opt.
Arginine	CGA	1	2
	CGG	7	1
	AGG	0	1
	AGA	0	3
Glycine	GGA	0	3
	GGG	3	2
Isoleucine	AUA	0	1
Leucine	CUA	0	1
Proline	CCC	14	3
Threonine	ACG	6	3

***Frondihabitans* sp. 18 APH(3′)-IIb**

Amino Acid	Rare Codon	Frequency of Occurrence	
		Orig.	Opt.
Arginine	CGA	4	1
	CGG	8	0
	AGG	1	1
	AGA	0	2
Glycine	GGA	3	4
	GGG	4	1
Isoleucine	AUA	0	1
Leucine	CUA	0	1
Proline	CCC	10	3
Threonine	ACG	3	2

그림. Rare codon usage analysis

- 빈도분석 결과, 코돈최적화를 진행하기 이전이 희귀코돈사용빈도가 높은 것을 확인하였음.
- 또한 RBS calculator를 이용한 번역율분석결과, 최적화 전후 모두에서 번역개시율이 높은 것을 확인하였음.

Gene	Translation rate		ΔG_{mRNA} (kcal/mol)	
	Orig.	Opt.	Orig.	Opt.
Microbacterium sp. 17	63148.36	11215.69	-19.21	-21.39
Frondihabitans sp. 18	14109.33	16892.24	-19.33	-20.62

KOPRI 극지연구소

CODON USAGE IN *E. COLI* GENES[1]

	Codon	Amino acid[2]	%[3]	Ratio[4]	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	
U	UUU	Phe (F)	1.9	0.51	UCU	Ser (S)	1.1	0.19	UAU	Tyr (Y)	1.6	0.53	UGU	Cys (C)	0.4	0.43	U
	UUC	Phe (F)	1.8	0.49	UCC	Ser (S)	1.0	0.17	UAC	Tyr (Y)	1.4	0.47	UGC	Cys (C)	0.6	0.57	C
	UUA	Leu (L)	1.0	0.11	UCA	Ser (S)	0.7	0.12	UAA	STOP	0.2	0.62	UGA	STOP	0.1	0.30	A
	UUG	Leu (L)	1.1	0.11	UCG	Ser (S)	0.8	0.13	UAG	STOP	0.03	0.09	UGG	Trp (W)	1.4	1.00	G
C	CUU	Leu (L)	1.0	0.10	CCU	Pro (P)	0.7	0.16	CAU	His (H)	1.2	0.52	CGU	Arg (R)	2.4	0.42	U
	CUC	Leu (L)	0.9	0.10	CCC	Pro (P)	0.4	0.10	CAC	His (H)	1.1	0.48	CGC	Arg (R)	2.2	0.37	C
	CUA	Leu (L)	0.3	0.03	CCA	Pro (P)	0.8	0.20	CAA	Gln (Q)	1.3	0.31	CGA	Arg (R)	0.3	0.05	A
	CUG	Leu (L)	5.2	0.55	CCG	Pro (P)	2.4	0.55	CAG	Gln (Q)	2.9	0.69	CGG	Arg (R)	0.5	0.08	G
A	AUU	Ile (I)	2.7	0.47	ACU	Thr (T)	1.2	0.21	AAU	Asn (N)	1.6	0.39	AGU	Ser (S)	0.7	0.13	U
	AUC	Ile (I)	2.7	0.46	ACC	Thr (T)	2.4	0.43	AAC	Asn (N)	2.6	0.61	AGC	Ser (S)	1.5	0.27	C
	AUA	Ile (I)	0.4	0.07	ACA	Thr (T)	0.1	0.30	AAA	Lys (K)	3.8	0.76	AGA	Arg (R)	0.2	0.04	A
	AUG	Met (M)	2.6	1.00	ACG	Thr (T)	1.3	0.23	AAG	Lys (K)	1.2	0.24	AGG	Arg (R)	0.2	0.03	G
G	GUU	Val (V)	2.0	0.29	GCU	Ala (A)	1.8	0.19	GAU	Asp (D)	3.3	0.59	GGU	Gly (G)	2.8	0.38	U
	GUC	Val (V)	1.4	0.20	GCC	Ala (A)	2.3	0.25	GAC	Asp (D)	2.3	0.41	GGC	Gly (G)	3.0	0.40	C
	GUA	Val (V)	1.2	0.17	GCA	Ala (A)	2.1	0.22	GAA	Glu (E)	4.4	0.70	GGA	Gly (G)	0.7	0.09	A
	GUG	Val (V)	2.4	0.34	GCG	Ala (A)	3.2	0.34	GAG	Glu (E)	1.9	0.30	GGG	Gly (G)	0.9	0.13	G
	U				C				A				G				

[1] The data shown in this table is from the Arabidopsis Research Companion on the World Wide Web (//weeds/mgh.harvard.edu). Codon frequencies for many other bacteria can be found at http://morgan.angis.su.oz.au/Angis/Tables.html.
[2] The letter in parenthesis represents the one-letter code for the amino acid.
[3] % represents the average frequency this codon is used per 100 codons.
[4] Ratio represents the abundance of that codon relative to all of the codons for that particular amino acid.

그림. RBS calculator를 이용한 번역율 분석 및 대장균에서의 코돈사용빈도

- 단백질 번역속도 완화를 위한 돌연변이 도입 site 선정 관련 문헌조사

- *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*이 생산하는 sucrose phosphorylase를 이용한 연구에서 linker (L16, L133), α-helix (I93, L180), ß-sheet (L83, I193, L235) 부분을

동의희귀코돈으로 치환한 결과, α-helix의 I93과 ß-sheet의 I193, L235 부위를 각각 치환했을 때 가용성이 증가하는 것을 확인하였음, 또한 다중치환한 경우 최대 6배의 가용성 증가가 확인되었음.

- human small GTPase를 이용한 연구에서는 코돈최적화만으로도 가용성이 증가하였음. KRase, RalA, Rac1 유전자에 각각 존재하는 α-helix R164, R108, R174 부분을 동의코돈으로 치환하였을 때 가용성이 증가하는 것을 확인. T7 promoter와 translation start codon을 치환한 경우는 가용성이 증가하지 않음을 확인. 다중치환한 경우 최대 10배의 가용성 증가를 확인하였음.
- α-helix와 ß-sheet 부분의 코돈을 치환했을 때 가용성이 증가됨

- Zhong, Chao, Ping Wei, and Yi-Heng Percival Zhang. "Enhancing functional expression of codon-optimized heterologous enzymes in *Escherichia coli* BL21 (DE3) by selective introduction of synonymous rare codons." Biotechnology and bioengineering 114.5 (2017): 1054-1064.
- Konczal, Jennifer, Justin Bower, and Christopher H. Gray. "Re-introducing non-optimal synonymous codons into codon-optimized constructs enhances soluble recovery of recombinant proteins from *Escherichia coli*." PLoS One 14.4 (2019): e0215892.

- 동의희귀코돈 도입을 위한 잔기 분석
  - SIB Expasy의 SWISS-MODEL을 이용하여 3차원 구조를 예측하였음
  - 동의희귀코돈은 문헌정보분석을 바탕으로 α-helix와 ß-sheet를 위주로 선정하였음

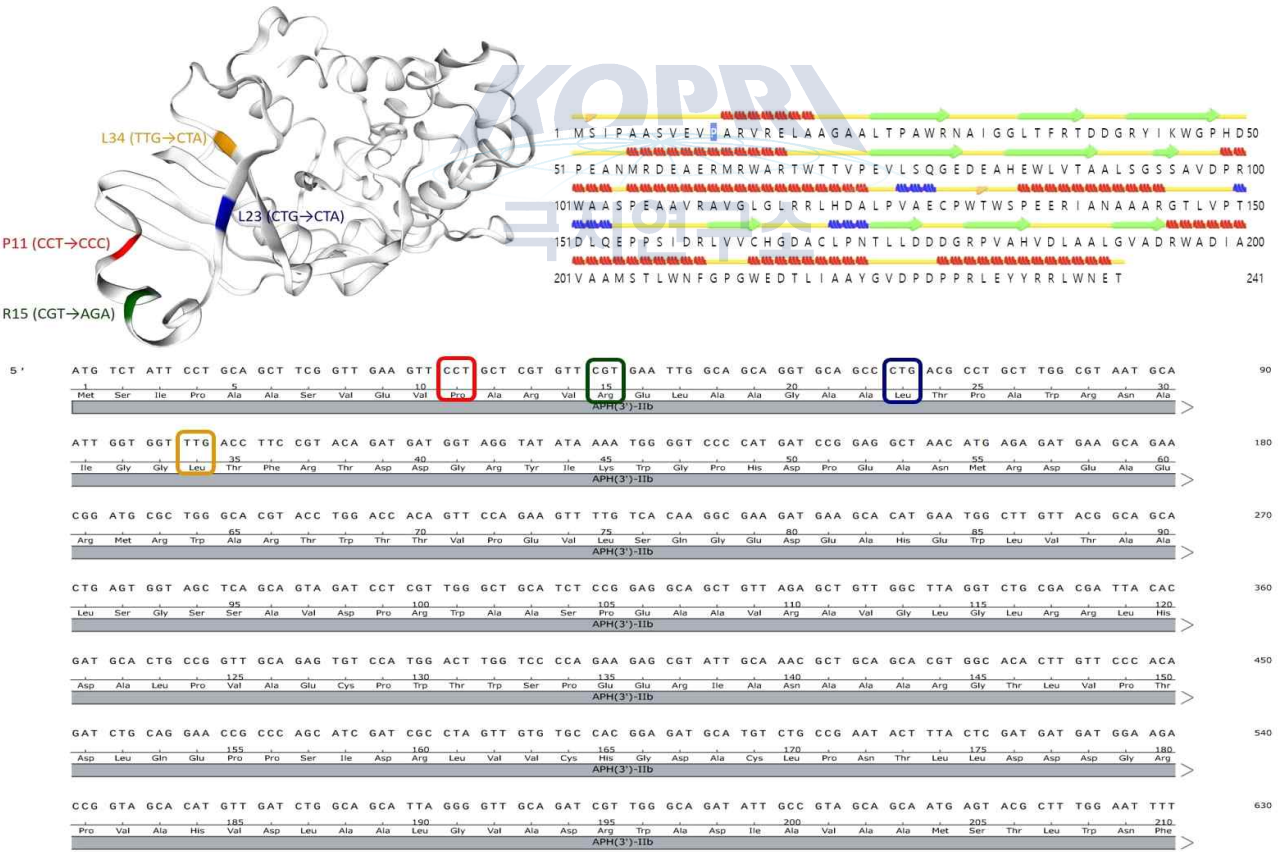


그림. SRC 도입을 위한 *Microbacterium* sp. 17 APH(3')-IIb 잔기 분석

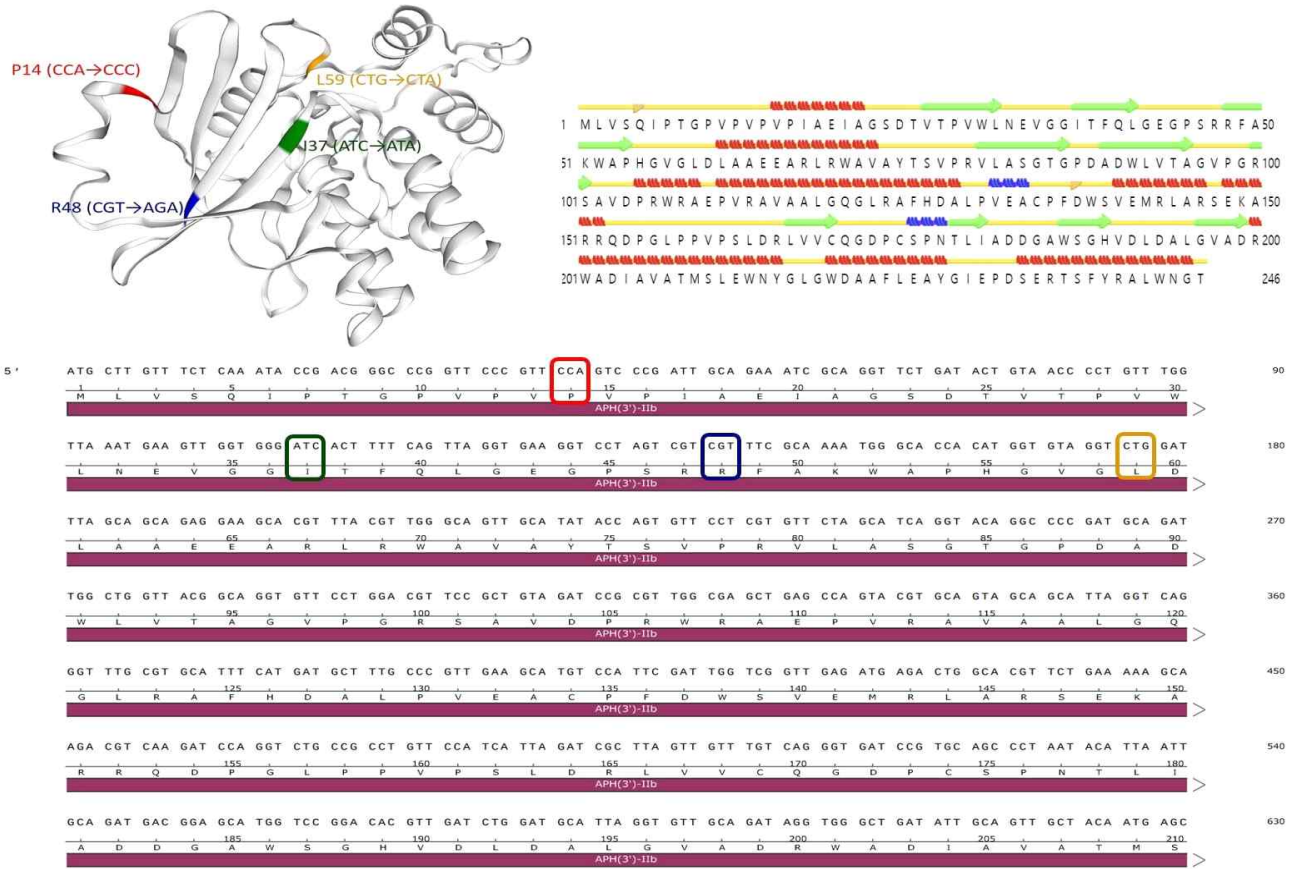


그림. SRC 도입을 위한 *Frondihabitans* sp. (PAMC 28766) 18 APH(3')-IIb 잔기 분석

- 동의희귀코돈 도입을 위한 부위 특이적 돌연변이 (site-directed mutagenesis) 유도

• NEB사의 Q5 site-directed mutagenesis kit를 사용하여 수행하였으며, 아래의 primer를 이용하여 제작하고 pET28a 벡터에 삽입하였음.

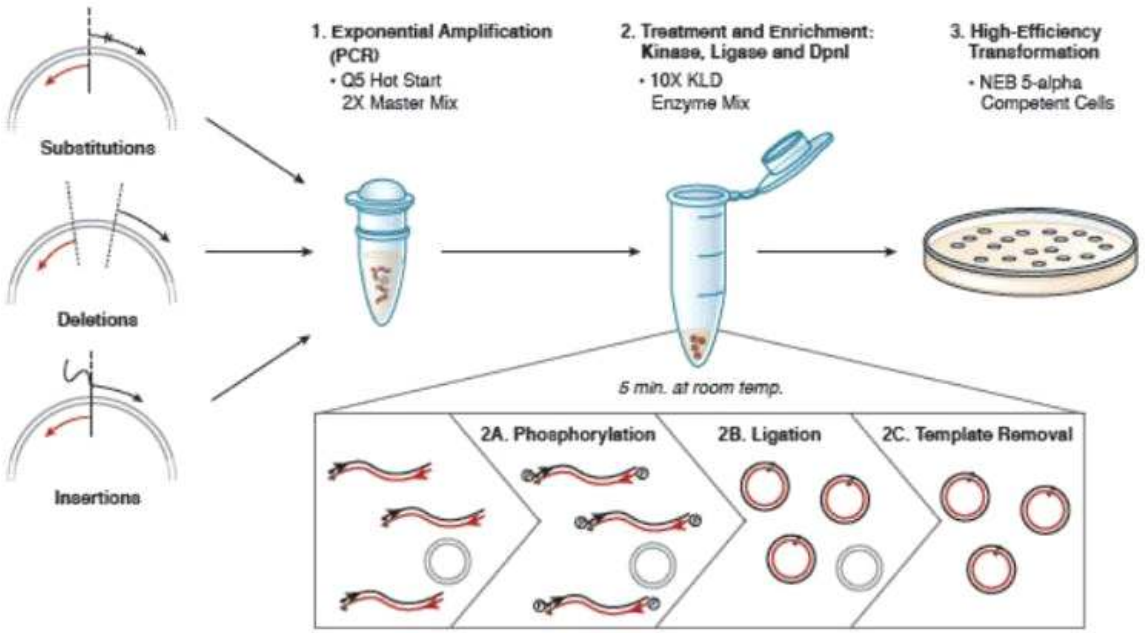


그림. Site-directed mutagenesis 모식도

Microbacterium sp.17 APH(3')-IIb	
	P11_F TTGAAGTTcccGCTCGTGTTC P11_R CCGAAGCTGCAGGAATAG
	R15_F TGCTCGTGTTagaGAATTGGCAG R15_R GGAACTTCAACCGAAGCTG
	L23_F GTGCAGCCctaACGCCTGCTT L23_R CTGCTGCCAATTCACGAACAC
	L34_F AATTGGTGGTctaACCTTCCGTACAG L34_R GCATTACGCCAAGCAGGC
Frondihabitans sp.18 APH(3')-IIb	
	P14_F TTCCCGTTcccGTCCCGATTGCAG P14_R CCGGGCCCGTCGGTTTTG
	I37_F TTGGTGGGataACTTTTCAGTTAG I37_R CTTCATTTAACCAAACAGG
	R48_F TCCTAGTCGTagaTTCGCAAAATG R48_R CCTTCACCTAACTGAAAAG
	L59_F GTGTAGGTctaGATTTAGCAGC L59_R CATGTGGTGCCCATTTTG

그림. Site-directed mutagenesis에 사용된 primer set

- 1차적으로 단일 동의희귀코돈 전환체를 제작한 후, 제작된 단일 동의희귀코톤 전환체를 이용하여 이중 동의희귀코돈 전환체를 제작하였음. 같은 방법으로 삼중과 사중 동의희귀코돈 전환체를 제작하였음.
- 제작된 동의희귀코돈 전환체는 아가로즈 겔 전기영동 및 유전자 서열분석을 통하여 확인과정을 거친 후 단백질 발현 연구에 사용하였음.

KOPRI
극지연구소

***Microbacterium* sp. 17 APH(3')-IIb**

>No. 1 (P11)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCCGCTCGTGTTCGTGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTGACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTTTGACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATATAUAAAATGGGGG
TCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCACTGAGTGG
TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCGTATTGCA
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCACATGTTG
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTCGTCTGGA
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 2 (R15)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCTGCTCGTGTTAGAGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTGACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTTTGACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAAAATGGGGG
TCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCACTGAGTGG
TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCGTATTGCA
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCACATGTTG
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTCGTCTGGA
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 3 (L23)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCTGCTCGTGTTCGTGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTAACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTTTGACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAAAATGGGGG
TCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCACTGAGTGG
TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCGTATTGCA
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCACATGTTG
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTCGTCTGGA
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 4 (L34)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCTGCTCGTGTTCGTGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTGACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTCTAACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAAAATGGGGG
TCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCACTGAGTGG
TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCGTATTGCA
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCACATGTTG
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTCGTCTGGA
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 5 (P11-R15)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCCGCTCGTGTTAGAGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTGACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTTTGACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAAAATGGG
GTCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCACTGAGTG
GTAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCGTATTGCA
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCACATGTTG
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTCGTCTGGA
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 6 (P11-L23)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCCGCTCGTGTTCGTGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTAACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTTTGACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAAAATGGGG
TCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCACTGAGTGG
TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCGTATTGCA
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCACATGTTG
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTCGTCTGGA
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 7 (P11-L34)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCCGCTCGTGTTCGTGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTGACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTCTAACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAAAATGGGGG
TCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCACTGAGTGG
TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCGTATTGCA
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCACATGTTG
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTCGTCTGGA
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 8 (R15-L23)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCTGCTCGTGTTAGAGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTAACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTTTGACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAAAATGGGGG
TCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCACTGAGTGG
TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCGTATTGCA
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCACATGTTG
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTCGTCTGGA
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 9 (R15-L34)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCTGCTCGTGTTAGAGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTGACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTCTAACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAAAATGGGGG
TCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCACTGAGTGG
TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCGTATTGCA
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCACATGTTG
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTCGTCTGGA
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 10 (L23-L34)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCTGCTCGTGTTCGTGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTAACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTCTAACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAAAATGGGGG
TCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCACTGAGTGG
TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCGTATTGCA
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCACATGTTG
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTCGTCTGGA
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 11 (P11-R15-L23)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCCGCTCGTGTTAGAGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTAACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTTTGACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAAAATGGGGG
TCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCACTGAGTGG
TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCGTATTGCA
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCACATGTTG
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTCGTCTGGA
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 12 (P11-R15-L34)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCCGCTCGTGTTAGAGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTGACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTCTAACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAAAATGGG
GTCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCACTGAGTG
GTAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCGTATTGC
AAACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCACATGTTG
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTCGTCTGG
AATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 13 (P11-L23-L34)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCCGCTCGTGTTCGTGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTAACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTCTAACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAAAATGGGGG
TCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCACTGAGTGG
TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCGTATTGCA
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCACATGTTG
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTCGTCTGGA
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 14 (R15-L23-L34)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCTGCTCGTGTTAGAGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTAACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTCTAACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAAAATGGGGG
TCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCACTGAGTGG
TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCGTATTGCA
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCACATGTTG
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTCGTCTGGA
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 15 (P11-R15-L23-L34)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCCGCTCGTGTTAGAGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTAACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTCTAACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAAAATGGGGG
TCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCACTGAGTGG
TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCGTATTGCA
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCACATGTTG
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTCGTCTGGA
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCG
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCA
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTC
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 9 (R15-L34)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCTGCTCGTGTTAGAGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTGACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTCTAACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAA
TCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCAC
TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCG
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCA
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTC
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 10 (L23-L34)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCTGCTCGTGTTCGTGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTAACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTCTAACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAA
TCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCAC
TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCG
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCA
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTC
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 11 (P11-R15-L23)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCCGCTCGTGTTAGAGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTAACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTTTGACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAA
TCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCAC
TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCG
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCA
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTC
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 12 (P11-R15-L34)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCCGCTCGTGTTAGAGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTGACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTCTAACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAA
GTCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCA
GTAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGC
AAACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGC
GATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCT
AATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 13 (P11-L23-L34)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCCGCTCGTGTTCGTGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTAACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTCTAACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAA
TCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCAC
TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCG
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCA
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTC
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 14 (R15-L23-L34)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCTGCTCGTGTTAGAGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTAACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTCTAACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAA
TCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCAC
TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCG
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCA
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTC
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

>No. 15 (P11-R15-L23-L34)

ATGTCTATTCCTGCAGCTTCGGTTGAAGTTCCCGCTCGTGTTAGAGAATTGGCAGCAGGTGCAGCCCTAACGCCTGCTTGGCGTAATGCAATTGGTGGTCTAACCTTCCGTACAGATGATGGTAGGTATAUAA
TCCCCATGATCCGGAGGCTAACATGAGAGATGAAGCAGAACGGATGCGCTGGGCACGTACCTGGACCACAGTTCCAGAAGTTTTGTCACAAGGCGAAGATGAAGCACATGAATGGCTTGTTACGGCAGCAC
TAGCTCAGCAGTAGATCCTCGTTGGGCTGCATCTCCGGAGGCAGCTGTTAGAGCTGTTGGCTTAGGTCTGCGACGATTACACGATGCACTGCCGGTTGCAGAGTGTCCATGGACTTGGTCCCCAGAAGAGCG
AACGCTGCAGCACGTGGCACACTTGTTCCCACAGATCTGCAGGAACCGCCCAGCATCGATCGCCUAGTTGTGTGCCACGGAGATGCATGTCTGCCGAATACTTTACTCGATGATGATGGAAGACCGGTAGCA
ATCTGGCAGCATTAGGGGTTGCAGATCGTTGGGCAGATATTGCCGTAGCAGCAATGAGTACGCTTTGGAATTTTGGTCCAGGGTGGGAGGATACCCTCATCGCTGCGTACGGAGTTGATCCAGATCCGCCTC
ATATTATCGTCGCCTGTGGAATGAAACT

그림. 동의희귀코돈을 도입한 *Microbacterium* sp. 17 APH(3')-IIb의 유전자 서열 분석

- 단일 동의희귀코돈 전환체 (No. 1, 2, 3, 4), 이중 동의희귀코돈 전환체 (No. 5, 6, 7, 8, 9, 10), 삼중 동의희귀코돈 전환체 (No. 11, 12, 13, 14), 사중 동의희귀코돈 전환체 (No. 15)
- 유전자 서열분석을 통해 목적하는 부위의 동의희귀코돈 전환을 확인하였음.

***Frondihabitans* sp. (PAMC 28766) 18 APH(3')-IIb**

>No.16 (P14)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCCGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATCACTTTTCAGTTAGGTGAAGGTCCTAGTCGT
CGTTTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTGGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATTGGCTGGTT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTGAAGCATGTCCATTCGATTGGTCG
GTTGAGATGAGACTGGCACGTTCTGAAAAAGCAAGACGTCAAGATCCAGGTCTGCCGCCTGTTCCATCATTAGATCGCTTAGTTGTTTGTCAGGGTGATCCGTGCAGCCCTAATACATTAATTGCAGATGACGGAGCAT
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTATTGAACCGG
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.17 (I37)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCAGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATAACTTTTCAGTTAGGTGAAGGTCCTAGTCGT
CGTTTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTGGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATTGGCTGGTT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTGAAGCATGTCCATTCGATTGGTCG
GTTGAGATGAGACTGGCACGTTCTGAAAAAGCAAGACGTCAAGATCCAGGTCTGCCGCCTGTTCCATCATTAGATCGCTTAGTTGTTTGTCAGGGTGATCCGTGCAGCCCTAATACATTAATTGCAGATGACGGAGCAT
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTATTGAACCGG
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.18 (R48)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCAGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATCACTTTTCAGTTAGGTGAAGGTCCTAGTCGT
AGATTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTGGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATTGGCTGGTT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTGAAGCATGTCCATTCGATTGGTCG
GTTGAGATGAGACTGGCACGTTCTGAAAAAGCAAGACGTCAAGATCCAGGTCTGCCGCCTGTTCCATCATTAGATCGCTTAGTTGTTTGTCAGGGTGATCCGTGCAGCCCTAATACATTAATTGCAGATGACGGAGCAT
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTATTGAACCGG
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.19 (L59)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCAGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATCACTTTTCAGTTAGGTGAAGGTCCTAGTCGT
CGTTTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTAGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATTGGCTGGTT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTGAAGCATGTCCATTCGATTGGTCG
GTTGAGATGAGACTGGCACGTTCTGAAAAAGCAAGACGTCAAGATCCAGGTCTGCCGCCTGTTCCATCATTAGATCGCTTAGTTGTTTGTCAGGGTGATCCGTGCAGCCCTAATACATTAATTGCAGATGACGGAGCAT
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTATTGAACCGG
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.20 (P14-I37)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCCGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATAACTTTTCAGTTAGGTGAAGGTCCTAGTCGT
CGTTTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTGGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATTGGCTGGTT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTGAAGCATGTCCATTCGATTGGTCG
GTTGAGATGAGACTGGCACGTTCTGAAAAAGCAAGACGTCAAGATCCAGGTCTGCCGCCTGTTCCATCATTAGATCGCTTAGTTGTTTGTCAGGGTGATCCGTGCAGCCCTAATACATTAATTGCAGATGACGGAGCAT
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTATTGAACCGG
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.21 (P14-R48)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCCGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATCACTTTTCAGTTAGGTGAAGGTCCTAGTCGT
AGATTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTGGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATTGGCTGGTT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTGAAGCATGTCCATTCGATTGGTCG
GTTGAGATGAGACTGGCACGTTCTGAAAAAGCAAGACGTCAAGATCCAGGTCTGCCGCCTGTTCCATCATTAGATCGCTTAGTTGTTTGTCAGGGTGATCCGTGCAGCCCTAATACATTAATTGCAGATGACGGAGCAT
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTATTGAACCGG
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.22 (P14-L59)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCCGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATCACTTTTCAGTTAGGTGAAGGTCCTAGTCGT
CGTTTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTAGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATTGGCTGGTT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTGAAGCATGTCCATTCGATTGGTCG
GTTGAGATGAGACTGGCACGTTCTGAAAAAGCAAGACGTCAAGATCCAGGTCTGCCGCCTGTTCCATCATTAGATCGCTTAGTTGTTTGTCAGGGTGATCCGTGCAGCCCTAATACATTAATTGCAGATGACGGAGCAT
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTATTGAACCGG
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.23 (I37-R48)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCAGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATAACTTTTCAGTTAGGTGAAGGTCCTAGTCGT
AGATTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTGGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATTGGCTGGTT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTAATACATTAATTGCAGATGACGGAGCAT
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTATTGAACCGG
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.24 (I37-L59)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCAGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATAACTTTTCAGTTAGGTGAAGGTCCTAGTCGT
CGTTTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTAGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATTGGCTGGTT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTAATACATTAATTGCAGATGACGGAGCAT
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTATTGAACCGG
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.25 (R48-L59)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCAGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATCACTTTTCAGTTAGGTGAAGGTCCTAGTCGT
AGATTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTAGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATTGGCTGGTT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTAATACATTAATTGCAGATGACGGAGCAT
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTATTGAACCGG
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.26 (P14-I37-R48)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCCGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATAACTTTTCAGTTAGGTGAAGGTCCTAGTCGT
AGATTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTAGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATTGGCTGGTT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTAATACATTAATTGCAGATGACGGAGCAT
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTATTGAACCGG
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.27 (P14-I37-L59)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCCGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATAACTTTTCAGTTAGGTGAAGGTCCTAGTCGT
CGTTTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTAGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATTGGCTGGTT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTGAAGCATGTCCATTCGATTGGTCG
GTTGAGATGAGACTGGCACGTTCTGAAAAAGCAAGACGTCAAGATCCAGGTCTGCCGCCTGTTCCATCATTAGATCGCTTAGTTGTTTGTCAGGGTGATCCGTGCAGCCCTAATACATTAATTGCAGATGACGGAGCAT
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTATTGAACCGG
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.28 (P14-R48-L59)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCCGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATCACTTTTCAGTTAGGTGAAGGTCCTAGTCGT
AGATTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTAGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATTGGCTGGTT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTGAAGCATGTCCATTCGATTGGTCG
GTTGAGATGAGACTGGCACGTTCTGAAAAAGCAAGACGTCAAGATCCAGGTCTGCCGCCTGTTCCATCATTAGATCGCTTAGTTGTTTGTCAGGGTGATCCGTGCAGCCCTAATACATTAATTGCAGATGACGGAGCAT
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTATTGAACCGG
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.29 (I37-R48-L59)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCAGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATAACTTTTCAGTTAGGTGAAGGTCCTAGTCGT
AGATTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTAGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATTGGCTGGTT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTGAAGCATGTCCATTCGATTGGTCG
GTTGAGATGAGACTGGCACGTTCTGAAAAAGCAAGACGTCAAGATCCAGGTCTGCCGCCTGTTCCATCATTAGATCGCTTAGTTGTTTGTCAGGGTGATCCGTGCAGCCCTAATACATTAATTGCAGATGACGGAGCAT
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTATTGAACCGG
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.30 (P14-I37-R48-L59)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCCGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATAACTTTTCAGTTAGGTGAAGGTCCTAGTCGT
AGATTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTAGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATTGGCTGGTT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTGAAGCATGTCCATTCGATTGGTCG
GTTGAGATGAGACTGGCACGTTCTGAAAAAGCAAGACGTCAAGATCCAGGTCTGCCGCCTGTTCCATCATTAGATCGCTTAGTTGTTTGTCAGGGTGATCCGTGCAGCCCTAATACATTAATTGCAGATGACGGAGCAT
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTATTGAACCGG
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

GTTGAGATGAGACTGGCACGTTCTGAAAAAGCAAGACGTCAAGATCCAGGTCTGCCGCCTGTTCCATCATTAGATCGCTTAGTTGTTTGTCAGGGTGATCCGTGCAGCCCTAATACATTAATTGCAGATG/
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTA1
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.24 (I37-L59)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCAGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATAACTTTTCAGTTAGGTGAAGGT
CGTTTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTAGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTGAAGCATGTCCATTCG
GTTGAGATGAGACTGGCACGTTCTGAAAAAGCAAGACGTCAAGATCCAGGTCTGCCGCCTGTTCCATCATTAGATCGCTTAGTTGTTTGTCAGGGTGATCCGTGCAGCCCTAATACATTAATTGCAGATG/
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTA1
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.25 (R48-L59)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCAGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATCACTTTTCAGTTAGGTGAAGGT
AGATTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTAGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTGAAGCATGTCCATTCG
GTTGAGATGAGACTGGCACGTTCTGAAAAAGCAAGACGTCAAGATCCAGGTCTGCCGCCTGTTCCATCATTAGATCGCTTAGTTGTTTGTCAGGGTGATCCGTGCAGCCCTAATACATTAATTGCAGATG/
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTA1
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.26 (P14-I37-R48)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCCGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATAACTTTTCAGTTAGGTGAAGGT
AGATTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTGGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTGAAGCATGTCCATTCG
GTTGAGATGAGACTGGCACGTTCTGAAAAAGCAAGACGTCAAGATCCAGGTCTGCCGCCTGTTCCATCATTAGATCGCTTAGTTGTTTGTCAGGGTGATCCGTGCAGCCCTAATACATTAATTGCAGATG/
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTA1
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.27 (P14-I37-L59)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCCGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATAACTTTTCAGTTAGGTGAAGGT
CGTTTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTAGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTGAAGCATGTCCATTCG
GTTGAGATGAGACTGGCACGTTCTGAAAAAGCAAGACGTCAAGATCCAGGTCTGCCGCCTGTTCCATCATTAGATCGCTTAGTTGTTTGTCAGGGTGATCCGTGCAGCCCTAATACATTAATTGCAGATG/
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTA1
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.28 (P14-R48-L59)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCCGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATCACTTTTCAGTTAGGTGAAGGT
AGATTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTAGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTGAAGCATGTCCATTCG
GTTGAGATGAGACTGGCACGTTCTGAAAAAGCAAGACGTCAAGATCCAGGTCTGCCGCCTGTTCCATCATTAGATCGCTTAGTTGTTTGTCAGGGTGATCCGTGCAGCCCTAATACATTAATTGCAGATG/
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTA1
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.29 (I37-R48-L59)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCAGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATAACTTTTCAGTTAGGTGAAGGT
AGATTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTAGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTGAAGCATGTCCATTCG
GTTGAGATGAGACTGGCACGTTCTGAAAAAGCAAGACGTCAAGATCCAGGTCTGCCGCCTGTTCCATCATTAGATCGCTTAGTTGTTTGTCAGGGTGATCCGTGCAGCCCTAATACATTAATTGCAGATG/
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTA1
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

>No.30 (P14-I37-R48-L59)

ATGCTTGTTTCTCAAATACCGACGGGCCCGGTTCCCGTTCCCGTCCCGATTGCAGAAATCGCAGGTTCTGATACTGTAACCCCTGTTTGGTTAAATGAATTGGTGGGATAACTTTTCAGTTAGGTGAAGGT
AGATTCGCAAAATGGGCACCACATGGTGTAGGTCTAGATTTAGCAGCAGAGGAAGCACGTTTACGTTGGGCAGTTGCATATACCAGTGTTCCTCGTGTTCTAGCATCAGGTACAGGCCCCGATGCAGATT
ACGGCAGGTGTTCCTGGACGTTCCGCTGTAGATCCGCGTTGGCGAGCTGAGCCAGTACGTGCAGTAGCAGCATTAGGTCAGGGTTTGCGTGCATTTCATGATGCTTTGCCCGTTGAAGCATGTCCATTCG
GTTGAGATGAGACTGGCACGTTCTGAAAAAGCAAGACGTCAAGATCCAGGTCTGCCGCCTGTTCCATCATTAGATCGCTTAGTTGTTTGTCAGGGTGATCCGTGCAGCCCTAATACATTAATTGCAGATG/
GGTCCGGACACGTTGATCTGGATGCATTAGGTGTTGCAGATAGGTGGGCTGATATTGCAGTTGCTACAATGAGCTTAGAGTGGAACTATGGTTTAGGTTGGGATGCAGCATTTTTAGAAGCTTATGGTA1
ATAGCGAACGTACAAGTTTTTACCGTGCTTTGTGGAATGGAACC

그림. 동의희귀코돈을 도입한 *Frondihabitans* sp. 18 APH(3')-IIb의 유전자 서열 분석

- 단일 동의희귀코돈 전환체 (No. 16, 17, 18, 19), 이중 동의희귀코돈 전환체 (No. 20, 21, 22, 23, 24, 25), 삼중 동의희귀코돈 전환체 (No. 26, 27, 28, 29), 사중 동의희귀코돈 전환체 (No. 30)
- 유전자 서열분석을 통해 목적하는 부위의 동의희귀코돈 전환을 확인하였음.

- 동의희귀코돈전환체의 단백질 발현 및 가용성 분석

- BL21(DE3)를 이용하였으며, 1mM IPTG로 발현을 유도하고 20℃-12시간 배양의 조건으로 수행하였음.

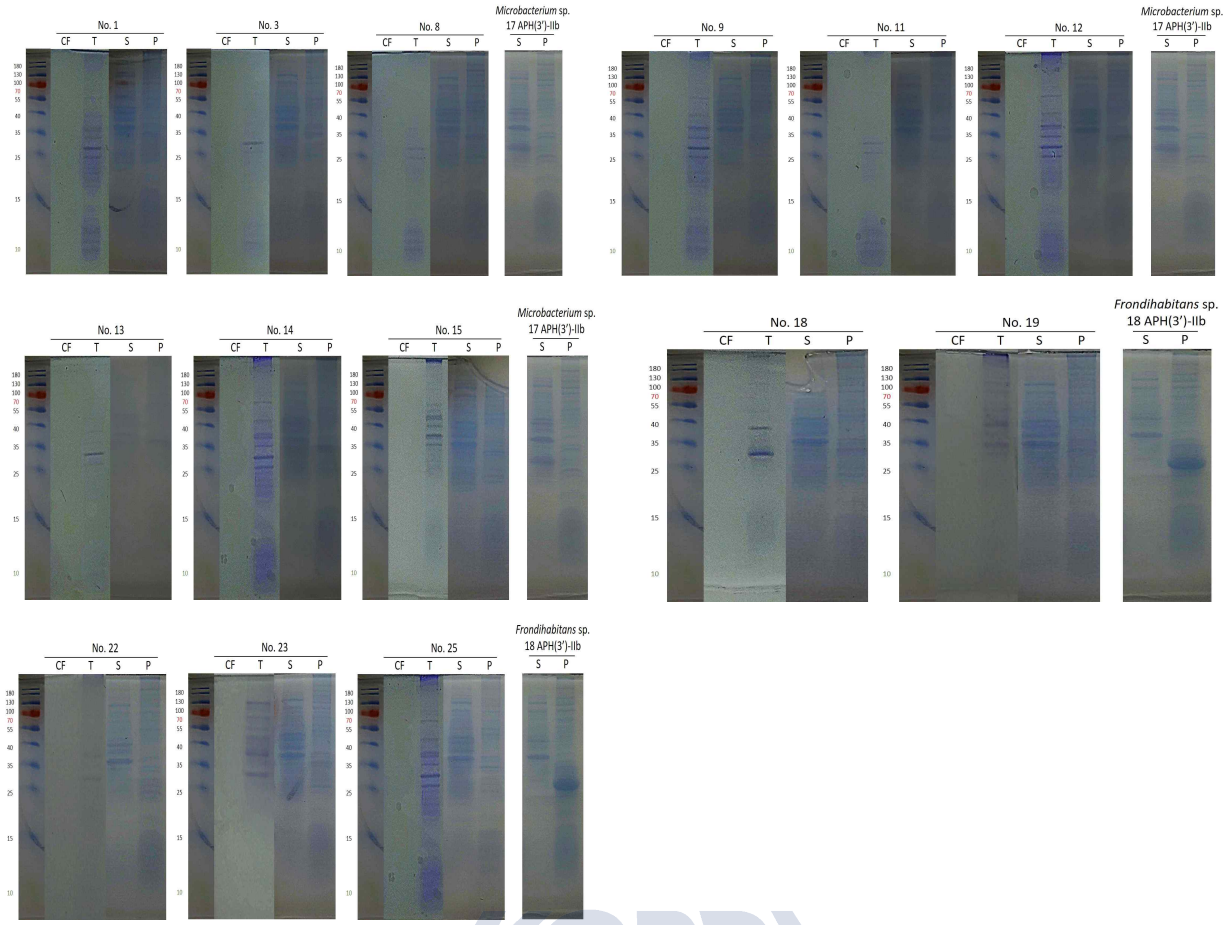


그림. 동의희귀코돈 전환체의 세포외 분비 단백질 분비 및 가용성 측정 결과

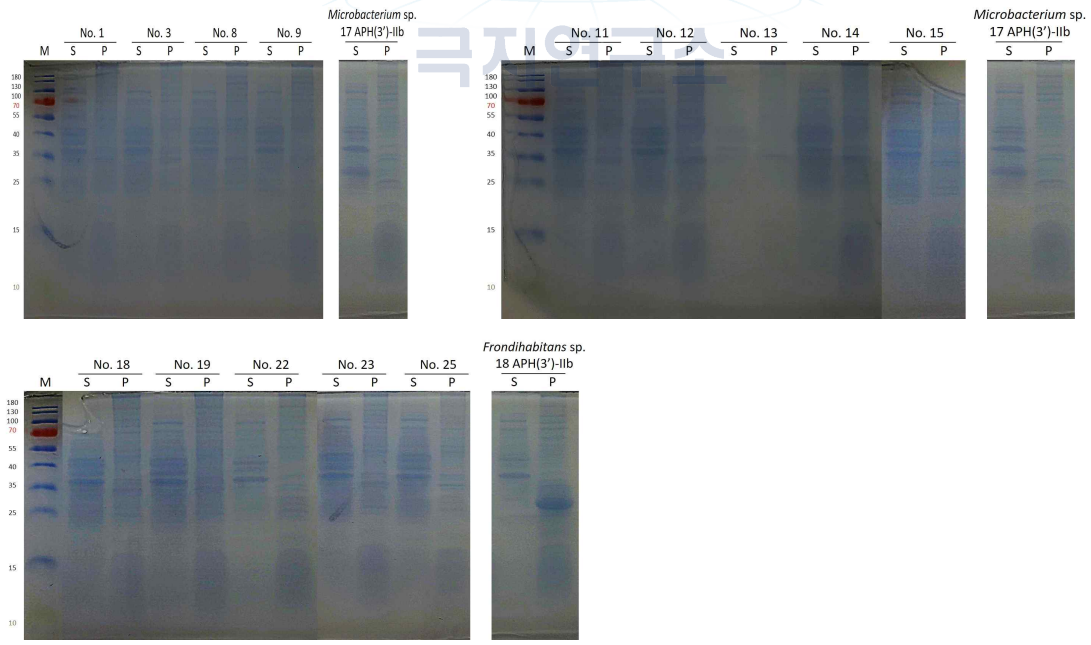


그림. 전환체의 가용성 측정 결과

- 발현 결과 일부 전환체에서 가용성이 나타나는 것으로 예상됨.
- *Microbacterium* sp. 17 APH(3')-IIb의 P11 부위와 *Frondihabitans* sp. 18 APH(3')-IIb의의 R48 부위를 동의희귀코돈으로 전환하였을 때 가용성에 대한 가능성을 나타냄.
- 가용성 여부 판단을 위하여 정제 및 western blot 수행 및 예정중.

Microbacterium sp. 17 APH(3')-lib					*Frondihabitans* sp. 18 APH(3')-lib				
NO	SRC substitute	Mutagenesis	Expression	Solubility	NO	SRC substitute	Mutagenesis	Expression	Solubility
1	P11	○	○	△	16	P14	○	△	
2	R15	○	△		17	I37	○	△	
3	L23	○	○	X	18	R48	○	○	△
4	L34	○	△		19	L59	○	○	X
5	P11-R15	○	△		20	P14-I37	○	△	
6	P11-L23	○	△		21	P14-R48	○	△	
7	P11-L34	○	△		22	P14-L59	○	○	X
8	R12-L23	○	○	X	23	I37-R48	○	○	X
9	R15-L34	○	○	X	24	I37-L59	○	△	
10	L23-L34	○	△		25	R48-L59	○	○	△
11	P11-R15-L23	○	○	△	26	P14-I37-R48	○	△	
12	P11-R15-L34	○	○	△	27	P14-I47-L59	○	△	
13	P11-L23-L34	○	○	X	28	P14-R48-L59	○	△	
14	R15-L23-L34	○	○	X	29	I37-R48-L59	○	△	
15	P11-R15-L23-L34	○	○	△	30	P14-I37-R48-L59	○	△	

그림. 동의희귀코돈 전환체 개발 유무, 발현진행상황 및 가용성확인. 돌연변이 제조 및 발현 (○; 진행완료, △; 진행중), 가용성 확인 (×; 불용성, △; 가용성 예상 및 추가확인 진행)

<3세부> 항생물질 변형체 제작 및 활성 검증

가. 구조변형 효소를 이용한 다양한 *In vitro*/ *In vivo* 반응으로 신규 항생물질 발굴 (선문대)

1) 미생물 유전체 정보 기반 항생물질 변형효소 스크리닝 후 *In vitro*/ *In vivo* 반응 결과 및 in silico 분석

- 극지에서 분리된 미생물 유전체 정보에서 각각 스테로이드 수산화 관련 하여 기존에 보고된 스테로이드 수산화관련 새로운 CYP 계열의 효소를 스크리닝 하였음. 기존 스테로이드계 화합물과 관련된 Cytochrome P450 패밀리는 CYP106과 CYP109 계열만 존재하며, 다양한 종류의 스테로이드와 테르페노이드를 수산화한다는 보고가 있음. 하지만 최근에는 이 두 계열의 CYP 말고 새로운 CYP들이 가능성을 보였고, 미생물 유전체 정보를 사용하여 유사한 계열의 시퀀스들을 스크리닝 하였음. 선별한 유전자의 시퀀스 구성원들은 유사하면서 약 30% 이상의 서열 동일성을 가지며, 각 CYP의 기질 선호도와 서로 다른 수화 부위 영역을 가지고 있다고 예측함.

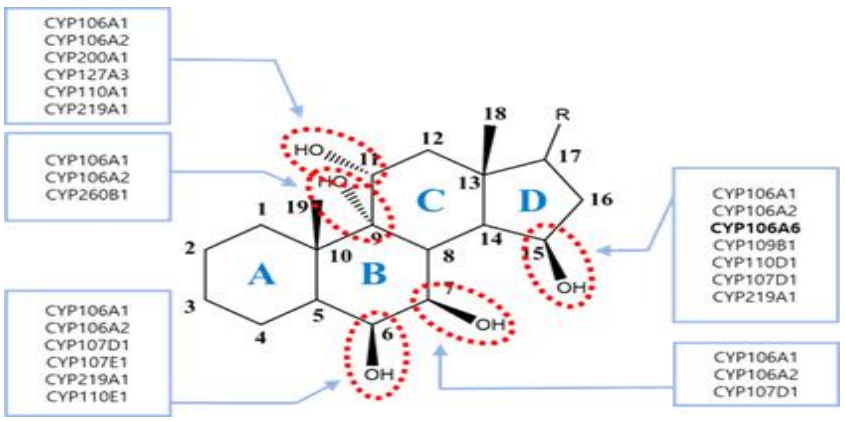


그림. 스테로이드에 수산화 반응한다고 보고된 CYP 계열의 정보

- 총 10종의 새로운 스테로이드 수산화 관련 효소들을 클로닝 했으며, 수용성 단백질을 추출하여 in vitro 반응을 수행하였음. 분리한 효소는 CYP 데이터베이스를 확인하여 어떠한 효소 패밀리에 분류가 되는지 확인하였음. 그 결과 CYP105 계열 2개, CYP107 계열 3개, CYP130 계열 1개, CYP135 계열 1개, CYP154 계열 1개, CYP242 계열 1개, CYP1047 계열 1개로 확인되

었음. 또한 각 CYP 계열에 대해 새로운 번호를 부여 받으면서 스크리닝한 효소 모두 새로운 효소계열이라고 예측하였음

SN	Genes	Strain	PCR	Sequencing	Transformation (pET28 / pET32))	Soluble protein	Purification	In-vitro Assay
1.	CYP105X4	40447_7248	√	√	√	√	√	√
2.	CYP105AK22	28650_930	√	√	√	√	√	√
3.	CYP107E41	KED_3856	√	√	√	√	√	√
4.	CYP107DE6	22724_5177	√	√	√	√	√	√
5.	CYP107G9	KED_4218	√	√	√	√	√	√
6.	CYP130C5	39638_1851	√	√	√	√	√	√
7.	CYP135E10	40447_6403	√	√	√	√	√	√
8.	CYP154D23	40643_882	√	√	√	√	√	√
9.	CYP242A5	KED_5620	√	√	√	√	√ (Less)	√
10.	CYP1047A9	40643_5831	√	√	√	√	√ (Less)	√

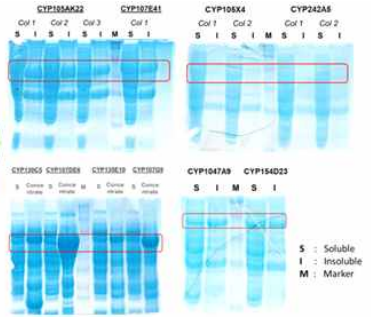


그림. 미생물 유전체 정보 기반 발굴한 수산화 스테로이드 효소 및 단백질 발현 결과

- 새롭게 발굴한 효소에 대해 *In vitro* 활성을 확인하여 기능을 확인하였음. 활성은 총 4가지 스테로이드 기질로 수행되었으며, iodobenzene이 redox partner로 사용되었음. 반응 조건은 CYP 3μM, 기질 200μM, iodobenzene 2.5mM을 첨가하고 온도는 30도에서 1시간동안 진행하였음. 반응 완료 된 후, 에틸아세테이트 용매로 동일 용량의 2배로 추출하고 건조하였으며, 최종 샘플은 메탄올에 녹여 HPLC 분석에 사용하였음. HPLC 분석 결과, 5종의 CYP가 testosterone과 반응하였고, 7종의 CYP가 nandrolone과 반응하였으며, androstenedione과 corticosterone은 각각 1종의 CYP 만이 반응하였음

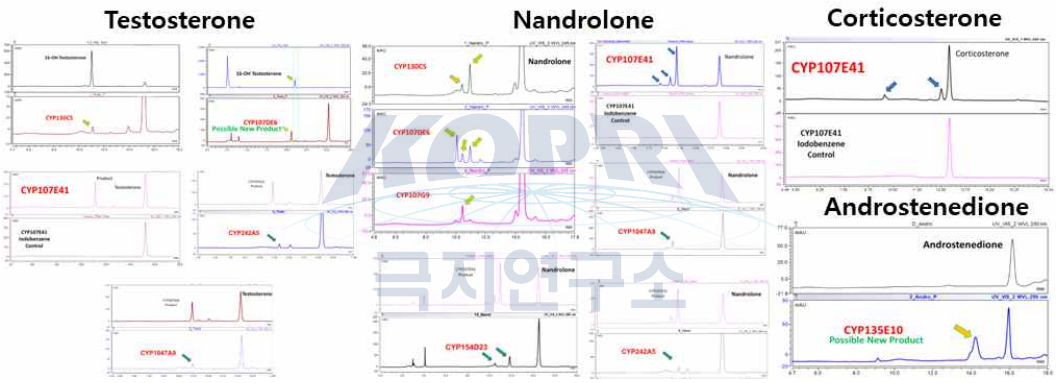


그림. 스크리닝하여 선별된 새로운 CYP 계열 효소의 *In vitro* 활성 모습

- 또한 스테로이드에 수산화반응을 보이는 CYP106 계열의 효소를 찾아 새롭게 분류를 해보니 CYP106A6라는 효소를 얻을 수 있었고, BaCYP106A6라고 명명하였음. BaCYP106A6는 대장균 숙주 세포에서 수용성 형태로 성공적으로 발현 및 정제되었으며, 정제된 고순도 BaCYP106A6는 SDS-PAGE 분석 결과 균질한 정제 단백질 밴드가 47.1 kDa의 예상 분자량으로 확인되었음. 정제된 BaCYP106A6는 휴지 상태에서 Type I spin shift를 유도하였으며, UV-visible 흡수분광법으로 기질이 없는 산화 형태에서 417 nm에 헴 소렛 피크를 보였으며 환원된 CO-결합 형태에서 448nm로 이동하여 Fe(II)-CO 복합체에서의 CYP의 시스테인-티올레이트-라이지드 헴 특징을 보였음. 이를 통해 CYP의 기능을 수행 할 수 있을 것이라고 예상하였음.

- CYP와 스테로이드의 결합은 헴-철 배위구에서 축방향 물 분자의 치환으로 인해 I형 스펙트럼 변화를 일으켜 각각 ~390 nm 및 ~420 nm의 최대 및 최소 스펙트럼 값을 나타내었음. CYP의 해리상수 (K_d)는 포화까지 상이한 농도의 기질을 적정하여 결정하였으며, 실제로 6개의 스테로이드 기질 중 2개 (프로게스테론 및 안드로스텐디온)에서만 각각 38.38 uM 및 36.64 uM의 평형 해리상수를 보였음. 이는 BaCYP106A6와 상호작용하는 활성 스테로이드 그룹이 11β 위치에 수산기가 없는 그룹에 더 활성을 보이며, 특히, 17β 위치의 하이드록시기와 측쇄 길이가 BaCYP106A6에 대한 기질 친화성을 결정하는 중요한 요인으로 확인됨.

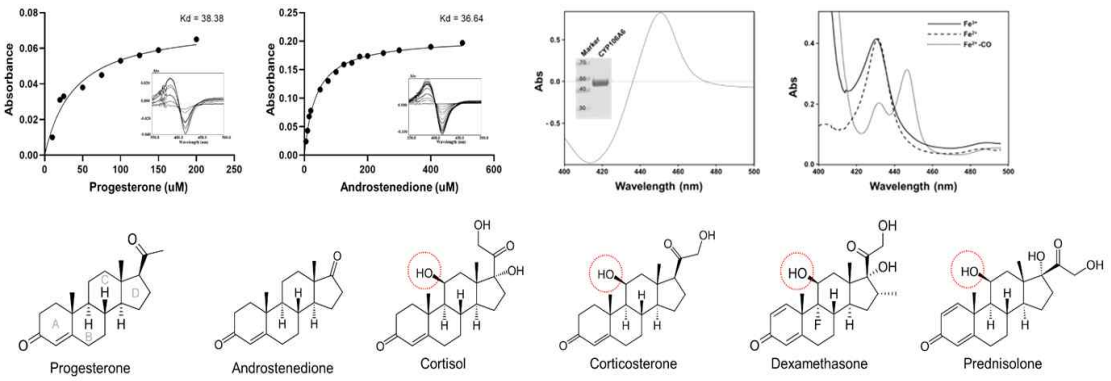


그림. BaCYP106A6의 스테로이드 활성 실험 결과 모습

- BaCYP106A6의 적합한 redox 파트너 선정을 위해 시험관 내 실험을 진행하였으며, 실험 결과는 FDX/FDR 시스템이 적합한 것으로 확인함. FDX/FDR의 redox partner 시스템을 이용한 생체 전환 반응을 수행한 결과, 프로게스테론의 경우, 분자식 C21H30O4에 대한 질량[M + H]+ m/z+~331.2273에 해당하는 화합물을 13.41분의 머무름 시간에 확인할 수 있었으며, 안드로스테니온의 경우, 질량[M + H]+ m/z+ ~303.1960에서 관찰된 모노하이드록실화 생성물이 나타남. 면적 계산 결과, 프로게스테론이 70%의 가장 높은 전환율을 보였으며, 안드로스테니온은 30% 이상의 전환율을 보였음. 생체전환된 수산화 생성물의 화학적 구조에 대한 NMR 분석은 높은 영역 및 입체 선택성을 갖는 BaCYP106A6에 의해 C15 영역이 수산화 부위임을 나타나였으며, 이는 NMR 분광 데이터를 비교하여 생성물의 구조가 15β-히드록시프로게스테론과 15β-히드록시안드로스테니온으로 결정되었음.

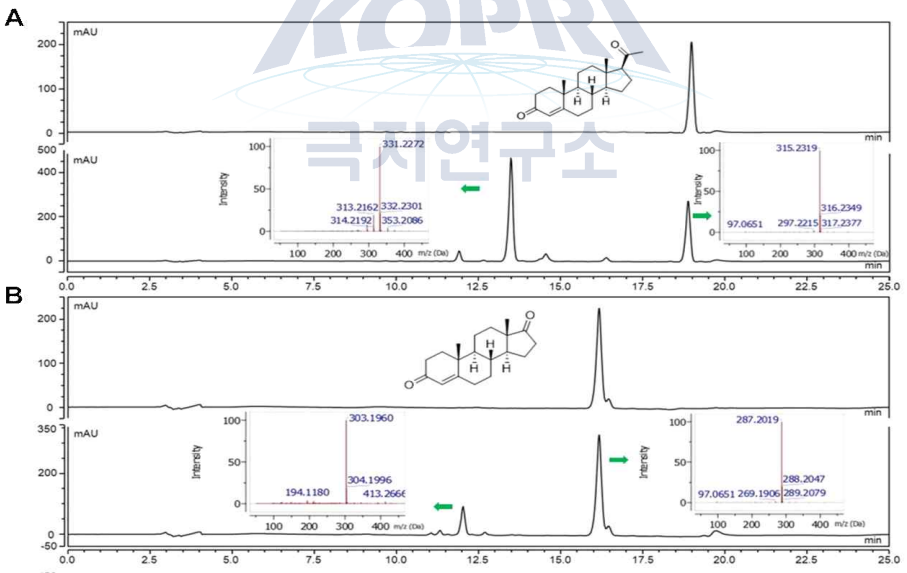


그림. BaCYP106A6를 사용하여 5β-히드록시프로게스테론과
15β-히드록시안드로스테니온 물질 생성 확인 모습

- 방향족 화합물의 O-demethylation을 수행하기 위해 미생물 유전체 정보를 활용하여 CYP199 패밀리의 효소를 스크리닝 하였음. CYP199 패밀리는 방향족 화합물에 O-demethylation 할 수 있다고 보고 되어있음. 이미 보유하고 있었던 미생물 유전체 정보에서 CYP199 패밀리의 3개의 새로운 효소를 발굴해 내었음. CYP199A35, CYP199C4, CYP199C3 이며, 그 중에서 CYP199A35 의 경우에는 단백질 결정 구조가 해석되었으며, 이에 대해 생화학적 특성 실험을 준비하고 있으며 사용되는 기질 및 일부 결과는 그림과 같음. 또한 이러한 결과 역시 논문 투고를 앞두고 있음

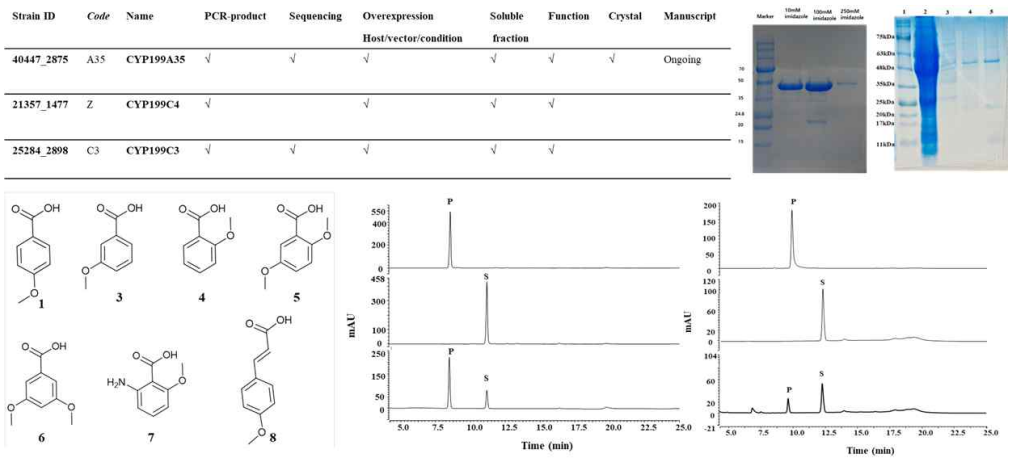


그림. CYP199 패밀리 관련 스크리닝 결과와 실험 결과 모습

- 글루코실전달효소(glucosyltransferase)는 활성화된 당 공여체로부터 수용체 기질로 포도당 분자를 전달함으로써 글루코사이드 결합의 형성을 촉매함. 글루코코르티코이드(GC)는 항염증 치료에 가장 널리 사용되는 부신 유래 스테로이드 호르몬임. 본 연구에서, 우리는 선택된 두 개의 GC, 즉 코르티손과 프레드니존을 다재다능한 UDP-글리코실트랜스퍼레이스 UGT-1을 사용하여 O-글루코사이드 유도체로 변형시켰음. 당화생성물의 완전한 구조적 할당은 코르티손과 프레니손의 위치선택적 당화반응에 의한 생체 변환이 각각 코르티손 21-글루코사이드와 프레니손 21-글루코사이드를 생성한다는 것을 밝혔음. 우리는 또한 당화반응의 결합 특징과 메커니즘을 연구하기 위해 분자 역학(MD) 시뮬레이션을 결합하였고, MD 시뮬레이션 연구는 단백질, 포도당 공여체, 기질 사이에 수소 결합에 의해 안정화된 안정적인 복합체의 형성을 보여주었음. 전반적으로, 우리는 실험과 컴퓨터 기술을 통합하여 당화반응에 대한 실험적으로 관찰된 선택성에 대한 설명을 제공할 수 있었음.

- 생성물 피크는 기질 피크에 비해 짧은 유지 시간에서 관찰되어 당화반응 생성물을 나타냈으며, 각각 코르티손과 프레드니손의 전환 수율은 각각 34%와 39% 나타났으며, LC-QTOF-ESI/MS에 의해 추가 분석되었으며, 질량 스펙트럼은 코르티손이 [M+H]+상에서 361.2031으로 나타난 반면, 당화된 코르티손은 [M+Na]+상에서 545.2363으로 나타났음. 비슷하게, 프레드니손이 [M+H]+상에서 359.1861이 나온 반면, 당화된 프레드니손은 [M+H]+상에서 521.2394로 나오면서 각 생성물들의 질량이 162.05만큼 증가하면서 생성물이 포도당 분자의 내부 이득을 보여주었음.

- 질량 분석만으로는 하드록실기 중 하나에 대한 포도당의 부착 위치를 결정하기 매우 어렵기 때문에 형성된 생성물의 포도당 부착위치 및 입체화학적 성질을 확인하기 위해 NMR 분석(1H, 13C ,COSY, ROESY, HSQC-DEPT 및 HMBC) 을 수행하였음. 그 결과, 2개 기질의 21C는 탄소와 양성자의 장거리 결합에 의해 포도당의 아노머 양성자와 상관관계를 보였으며, 21H 또한 포도당의 아노머 탄소와 상관관계를 보였음. 포도당의 아노머 양성자와 21H 사이에 NOE 상관관계가 발견되면서, 결과적으로 포도당이 하이드록실기의 산소에 결합하는 것으로 나타나 21C에 포도당이 결합되어있는 것을 확인함.

- MD 시뮬레이션의 안정적인 코르티손 구성 중 수용체의 하이드록실 (C21) 그룹이 His16 및 UDP-G로 지향한다는 점이 주목하였으며, UDP-G의 글루코실 잔기 근처에 위치한 촉매 His16은 수용체의 수산기의 탈양성자화를 담당하는 염기 역할을 하고 근처의 아스파르트산 잔기(Asp106)이 His16의 양성자 수용 능력을 촉진하여 당화를 촉매할 수 있었음. 또한 MD 시뮬레

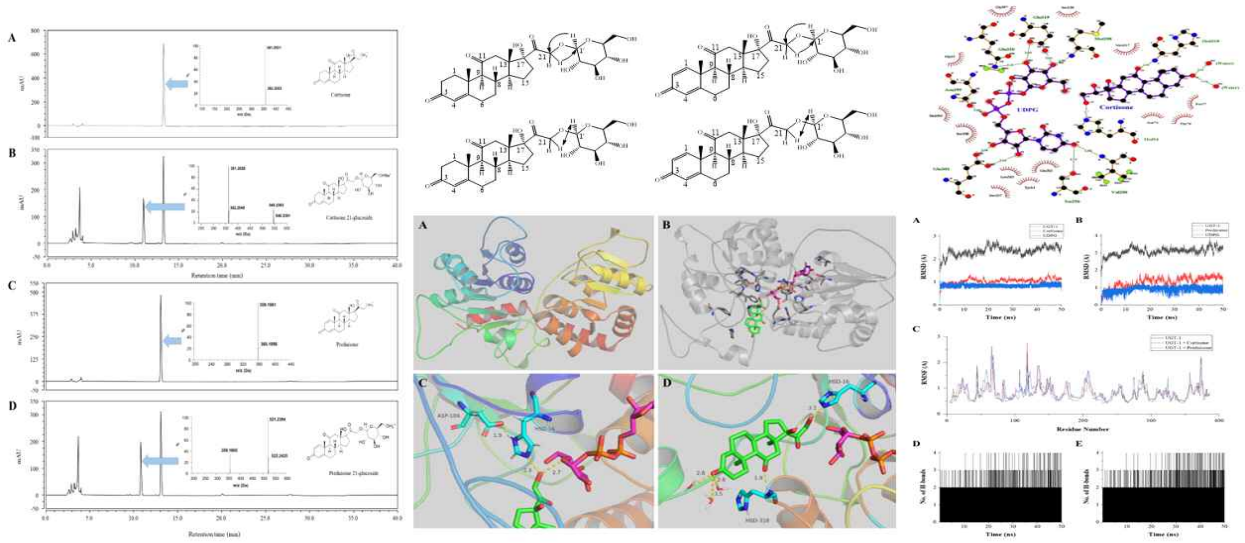


그림. 글루코실전달효소(glucosyltransferase)를 사용하여 코르티손 21-글루코사이드와 프레니손 21-글루코사이드를 생성한 결과

이션 중 코르티손이 촉매적으로 유능한 위치로 이동하면 잔기 His16과 Asp106사이의 합리적인 거리가 관찰되었으며,. His16-Cortisone-UDP-G 사이의 거리는 당 잔기의 C1을 공격하여 해당 글루코사이드를 형성하고 UDP 잔기를 대체하는 것으로 확인됨. 작용을 위한 수용체의 형상 안정성은 수소 결합에 의해 제공되며, 코르티손의 수산기(C21) 및 카르보닐(C11)은 각각 His16 및 His318과 수소결합을 형성할 수 있었음. 카보닐기(C3)는 물 분자와 수소결합을 형성하며, 이러한 수소결합은 시뮬레이션 동안 일관성있게 보여 수용체에 안정성을 제공함.

2) 단백질 정보 기반 항생물질 변형효소 스크리닝 후 in votro/ in vivo 반응 결과 및 in silico 분석

- CYP101D5 단백질의 구조 및 정제 결과는 이미 이전 결과에서 확인되었으며, *in vitro* 활성 결과와 kinetic 분석 및 각 생성물의 구조를 증명하였음. *In vitro* 활성은 PdX와 PdR을 redox partner로 사용하였으며, 반응 결과, 위 효소는 α / β-ionones, 그리고 플라보노이드 계열의 Apigenin, Naringenin 과 반응하였음. α-ionone에서는 탈수소화 생성물이 관찰되었고, β-ionone, Apigenin, 그리고 Naringenin에서는 수산화된 생성물이 생성되었음. 각 생성물은 가스 크로마토그래피(GC)로 분석되었음. CYP101D5의 kinetic 결과는 그림과 같이 나타났으며, 이 반응은 CYP101D5 (1 μm), PDX (8 μM), PDR (2 μM), 그리고 500 μM NADH를 첨가하여 실험되었음. 하여 변형효소 기반으로 새로운 물질을 획득하였음을 확인하였음.

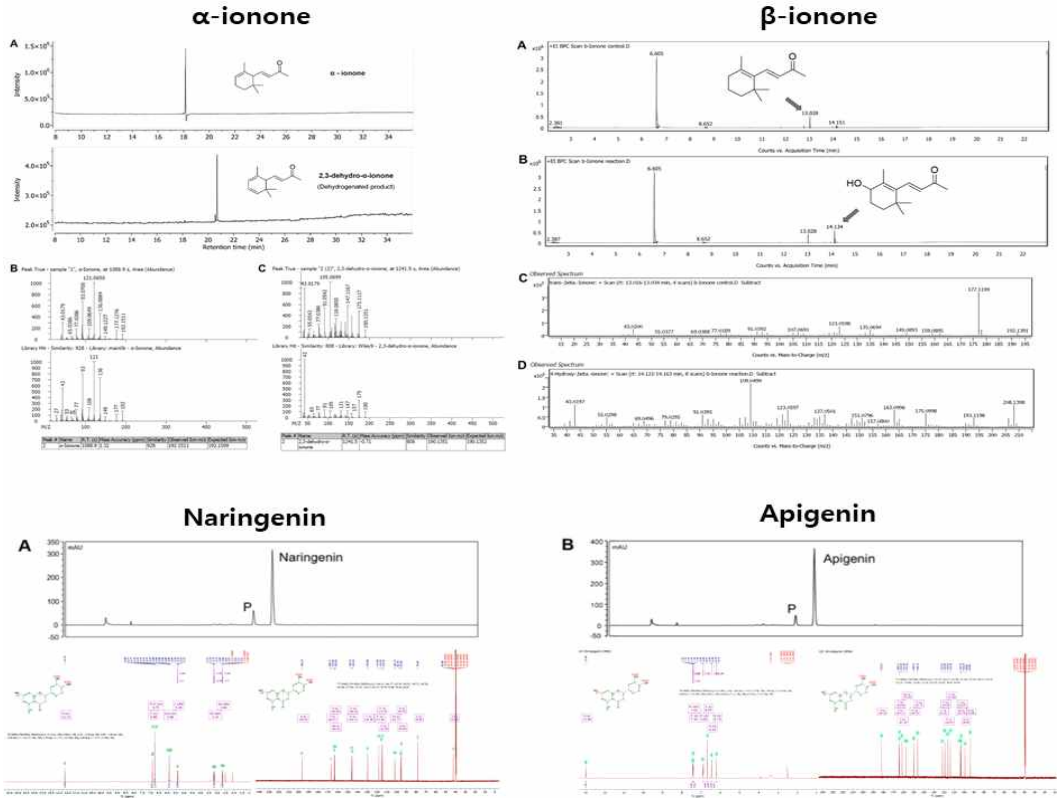
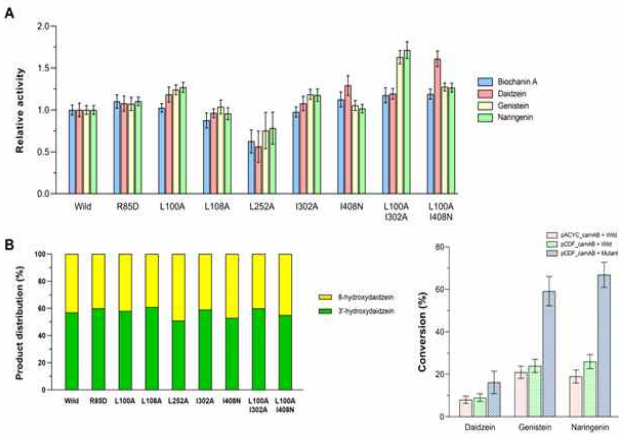


그림. CYP101D5를 통해 β-ionone, Apigenin, 그리고 Naringenin에 수산화한 결과

- CYP105A5는 이미 정제, *in vitro* 활성, 그리고 생성물에 대한 연구는 이전에 연구된 바 있음. 하여 이것을 바탕으로 CYP105A5의 돌연변이에 대한 실험을 진행 후, kinetic 실험과 *in vivo* 연구를 통한 다량의 생성물이 생성하였음. 또한 In silico 분석 중 docking 연구를 통해 활성 부위에 위치하는 소수성 아미노산을 채택하여 BC 루프의 R85, L100, L108, L252와 헴 그룹의 I302, I408가 선택하여 돌연변이화 하였음. 변화된 미생물은 site-directed mutagenesis 기법을 사용하여 R85D, L100A, L108A, L252A, I302A, 그리고 I408N로 만들어졌으며, 이 중 가장 유망한 활성을 나타낸 변이체를 두번 변이시켜 L100A/I302A와 L100A/I408N를 생성하였음. 이 이중 변이체는 야생형에 비해 daidzein, genistein, naringenin의 활성이 각각 59%, 63%, 71% 증가하였고, L100A/I408N은 daidzein 수산화 활성을 증가시켰음. 반면, 탈메틸화 활성 및 다른 플라보노이드의 전환에는 유의미한 결과를 내지 않았음



Strain/mutant	k_m (μM)	k_{cat}(min^{-1})	k_{cat}/k_m (M^{-1} min^{-1})	Ratio k_{cat}/k_m	Coupling efficiency [%]
Daidzin					
WT	143.44 ± 11.52	0.09 ± 0.04	627.44	1.00	19.26 ± 3.07
L100A	124.73 ± 17.89	0.10 ± 0.05	801.73	1.28	24.94 ± 5.17
I408N	159.83 ± 15.37	0.12 ± 0.06	750.79	1.19	18.73 ± 6.30
L100A/I408N	131.57 ± 12.09	0.13 ± 0.04	988.06	1.57	26.38 ± 6.95
Genistein					
WT	49.19 ± 4.27	0.26 ± 0.07	5.296 x 10^3	1.00	53.83 ± 4.38
L100A	58.43 ± 6.74	0.34 ± 0.09	5.818 x 10^3	1.09	50.83 ± 6.72
I302A	67.01 ± 9.83	0.42 ± 0.10	6.267 x 10^3	1.18	44.30 ± 9.29
L100A/I302A	64.38 ± 8.56	0.49 ± 0.12	7.611 x 10^3	1.43	43.62 ± 8.16
Naringenin					
WT	31.09 ± 4.64	0.31 ± 0.09	9.971 x 10^3	1.00	61.27 ± 5.26
L100A	37.84 ± 8.02	0.43 ± 0.11	1.136 x 10^4	1.14	62.91 ± 9.51
I302A	32.96 ± 6.38	0.39 ± 0.07	1.183 x 10^4	1.18	50.36 ± 11.83
L100A/I302A	41.16 ± 7.16	0.69 ± 0.09	1.676 x 10^4	1.68	57.28 ± 10.06

그림. CYP105A5 효소를 돌연변이화 하여 반응력을 비교한 결과

- 먼저 연구에서, 단백질 결정 구조 및 기질 특성화를 포함하여 2개의 원고가 나왔던

CYP105D18에 대한 후속 연구를 수행함. 기질에 대한 H2O2 저항성 및 대사 부위(SOM)의 변화 연구를 목표로 CYP105D18의 엔지니어링을 수행하였음. Q348L 및 Q348E는 H2O2 저항성 연구를 위해 준비되었으며, 활성부위 잔기의 변이체 L87A, L87E, A235E, T239A, T239E는 SOM 변화 및 촉매 효율 변화를 보였음. 이 중, T239A와 T239E 변이체는 생성물 형성 패턴 및 redox partner의 변화를 보였음. 돌연변이화 된 효소 활성 반응으로 papaverine과 testosterone에서 새로운 생성물이 확인되었음. 이에 대한 내용을 논문으로 투고를 하려고 작성 중에 있음.

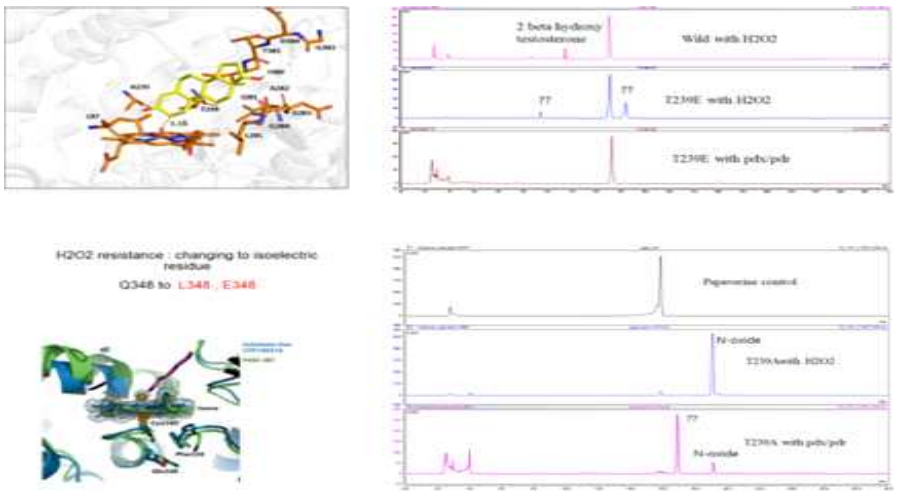


그림. CYP105D18 효소를 돌연변이화 하여 반응력을 비교한 결과

나. 확보된 신규 항생물질의 분리 및 구조 분석 (선문대)

1) 유전체 분석을 통해 신규 항생 물질 가능성 있는 미생물 선정 후 신규 항생물질 확보시도

- 유전체 비교 분석 및 In Silico 분석 중에 Variovorax sp. PAMC28711, PAMC28562 및 PAMC26660은 트레할로스를 합성하고 분해할 가능성이 있는 것으로 확인됨. 일반적으로 박테리아는 트레할로스를 생산하는 5가지 다른 경로를 가지고 있음. 이들은 TreY/TreZ 경로(maltooligosyl-trehalose synthase and maltooligosyl-trehalose trehaldohydrolase), TreP 경로(trehalosephosphorylase), TreT 경로(trehalose glycosyl-transferring synthase), TPS/TPP 경로(trehalose phosphate synthase and trehalose 6-phosphate). 남극 대륙에서 분리된 3종 중 2종인 PAMC28711과 PAMC28562는 3개의 트레할로스 생합성 경로(TPP/TPS, TreY/TreZ 및 TS)를 가지고 있는 반면, PAMC26660은 하나의 경로(TPS/TPP)만 가지고 있었음. Variovorax sp. PAMC28711의 대사 경로를 서로 다른 생물정보학 도구를 사용하여 분석한 결과, KEGG 및 MetaCyc 데이터베이스와 같이 일반적으로 사용되는 생물정보학 도구에는 몇 가지 한계가 있음을 알 수 있었음. 데이터베이스는 RAST를 사용하여 Variovorax sp. PAMC28711의 전체 게놈에 주석을 달 때 트레할로스 대사 경로에 관여했음.

- 현재까지 Variovorax 균주가 다양한 목적으로 연구되고 있지만, Variovorax 균주의 트레할로스 대사 경로는 이전에 보고된 바가 없었음. 3개의 완전한 트레할로스 생합성 경로(TPS/TPP, TS 및 TreY/TreZ)를 모두 갖는 균주 PAMC28711 및 PAMC28561과 비교하여, 비교 분석에 따르면 균주 PAMC26660은 하나의 완전한 트레할로스 생합성 경로(TPS/TPP)만 포함되어있었음. 획득한 게놈의 또한, 여기에서 연구된 3개의 남극 분리주 중 PAMC28711 균주만이 2개의 트레할로스(GH37 및 GH15)를 보유하고 있는 것으로 밝혀졌으며, PAMC28711 균주는 추위에 적응한 지의류로부터 분리되었음에도 불구하고 AZCL 스크리닝 결과에 따르면 25° C에서 확인되었으며, 트레할로스 생산 및 분해 유전자의 기능에 대한 결과를 확인 할 수 있었음

Table 1 Prediction of enzymes involved in trehalose metabolic pathway in *Variovorax* sp. PAMC28711

Program	Trehalose biosynthesis pathway					Enzyme missing
	OtsA-OtsB		TreY-TreZ		TreS	
	EC 2.4.1.15	EC 3.1.3.12	EC 5.4.99.15	EC 3.2.1.141	EC 5.4.99.16	
KEGG	O	O	X	O	O	EC 5.4.99.15
MetaCyc	O	O	X	O	O	EC 5.4.99.15
RAST	O	O	O	O	O	No

'O' represents the presence of the respective pathway and 'X' represents the absence of the respective pathway

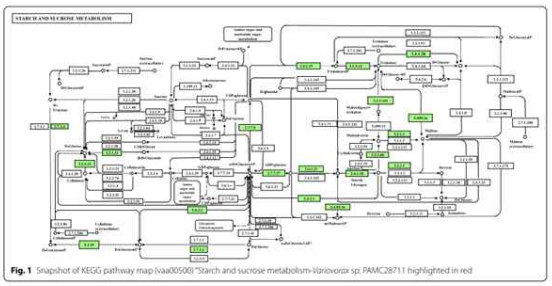


Fig. 1 Snapshot of KEGG pathway map (vaa00500) "Starch and sucrose metabolism-*Variovorax* sp. PAMC28711 highlighted in red

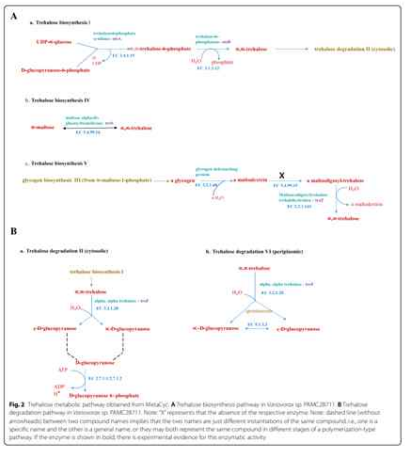


그림. 미생물 유전체 내에서 확인된 트레할로스 생성 가능성

Media/ Temp(°C)	AZCL substrates																							
	AZCL-amylose				AZCL-barley β-glucan				AZCL-arabinoxylan				AZCL-HE-cellulose				AZCL-xylan (Beech wood)				AZCL-xylan (Birch wood)			
	4	15	25	37	4	15	25	37	4	15	25	37	4	15	25	37	4	15	25	37	4	15	25	37
B's	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
MA	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MY	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
R2A	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-

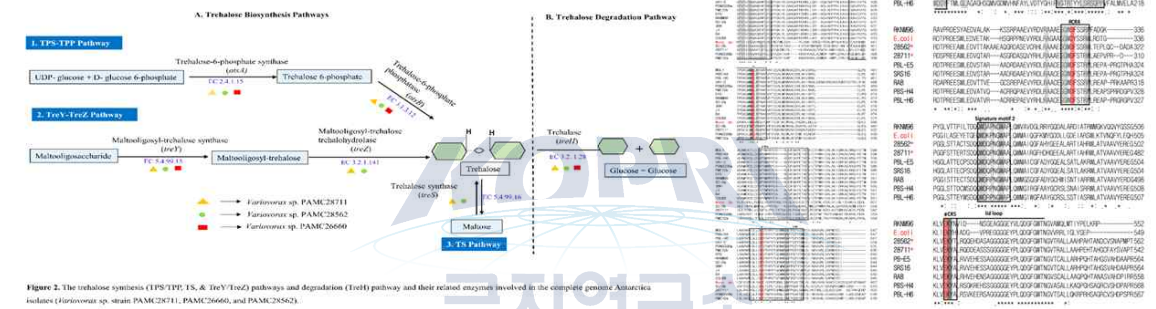


Figure 2. The trehalose synthesis (TPS/TPP, TS, & TreY/TreZ) pathways and degradation (TreH) pathway and their related enzymes involved in the complete genome Antarctica isolates (*Variovorax* sp. strain PAMC28711, PAMC26660, and PAMC28562).

그림. 극지환경에서 분리된 미생물 Variovorax sp. 균주 3개에서 확인된 결과 모습

- 구리는 박테리아 및 기타 유기체에 유해한 것으로 밝혀진 금속 이온으로, 과도한 구리는 원자가 상태에 관계없이 단백질, 지질 및 핵산을 포함한 광범위한 생체 분자에 결합하는 것으로 보고됨. 구리 저항은 다른 구리 수송 ATPase에 의해 인코딩되며, 다중 구리 산화 효소에 의한 구리 방어는 다양한 박테리아에서 보고되었음. 자연에서 다중 구리 산화효소 기능은 근원 유기체와 주변 환경에 따라 다름. PAMC25284는 유전적 및 표현형 통찰력과 구리 저항성에 대한 잠재력을 제공하였으며, 이 연구를 위해 우리는 NCBI 데이터베이스, Sigle IP, TMHMN 및 RAST 데이터베이스를 사용하여 다양한 게놈 마이닝 방법을 사용하여 결과를 확인하였음. Arthrobacter sp. 균주 PAMC25284는 그람-양성 및 그람-음성 박테리아의 균주와 비교하여 Cu 임포터/익스포터 및 멀티-구리 옥시다제를 포함하며, 다양한 유전자좌를 가진 5개의 다중 구리 산화효소 도메인 함유 단백질. 이 TatA와 함께 Tat 수출 시스템을 만드는 TatB 및 TatC가 연구 균주에서 발견되어 Mycobacterium tuberculosis의 Tat 수출 시스템과 비교되었음.

극지연구소

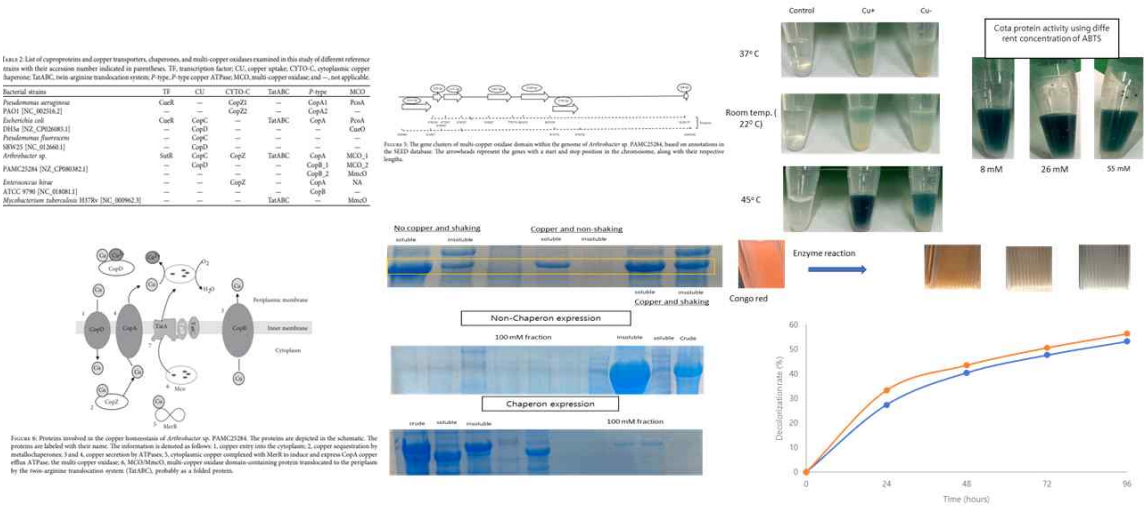


그림. PAMC25284에서 분리한 CotA laccase 효소 활성 확인 모습

- 남극 지의류에서 최초 분리된 극지 방선균 Streptomyces sp. PAMC26508는 complete genome sequence를 이미 확보 하였으며, 2차대사물질 관련 생성 유전자가 많이 보유되어 있다는 것을 유전체 분석을 통해 확인 할 수 있었음. 분석 결과, Polyketide 유전자와 NRPS 유전자를 많이 보유하고 있었으며, 관련 2차대사물질을 예측할 수 있었음

Region	Type	From	To	Most similar known cluster		Similarity
Region 1	butyrolactone	208,998	217,403			
Region 2	NRPS	290,455	342,980	rimosamide	NRP	21%
Region 3	T2PKS , terpene	483,987	555,432	spore pigment	Polyketide	83%
Region 4	melanin	581,362	591,826	melanin	Other	100%
Region 5	T3PKS	688,185	729,243	tetronasin	Polyketide	11%
Region 6	RiPP-like	883,854	890,717			
Region 7	terpene , ectoine	921,087	941,465	ectoine	Other	100%
Region 8	terpene	1,222,289	1,242,878	stelfimycin D	Polyketide:Type II + Saccharide:Hybrid/tailoring	16%
Region 9	T2PKS , PKS-like	1,287,765	1,360,321	cinerubin B	Polyketide:Type II	25%
Region 10	ectoine	1,756,238	1,768,636	ectoine	Other	100%
Region 11	terpene	2,220,814	2,240,572			
Region 12	lanthipeptide-class-iii , lanthipeptide-class-iii	2,650,711	2,681,695	azalomycin F3a	Polyketide	8%
Region 13	siderophore	2,726,276	2,737,916	desferrioxamin B / desferrioxamine E	Other	83%
Region 14	NRPS , T1PKS , NRPS-like	3,362,798	3,417,389	istamycin	Saccharide	11%
Region 15	butyrolactone	3,618,198	3,629,124	lactonamycin	Polyketide	3%
Region 16	RiPP-like	5,270,432	5,279,963			
Region 17	terpene	5,440,959	5,460,656			
Region 18	siderophore	5,525,938	5,540,522	f-coelomycin	NRP	3%
Region 19	NRPS	5,614,244	5,869,074	cadaside A / cadaside B	NRP	19%
Region 20	RiPP-like	5,955,006	5,965,517			
Region 21	T1PKS	6,178,159	6,272,196	scleriphrolactam	Polyketide	88%
Region 22	terpene	6,622,379	6,647,380	hopene	Terpene	69%
Region 23	blactam	6,729,865	6,749,249	clavulanic acid	Other:Non-NRP beta-lactam	20%
Region 24	NRPS	6,810,802	6,859,029	BE-14106	Polyketide:Modular type I	10%
Region 25	PKS-like , RiPP-like	6,902,188	6,948,314	A54145	NRP	3%
Region 26	terpene	7,090,034	7,115,526	isorenieratene	Terpene	100%
Region 27	NRPS	7,129,935	7,179,683	coelichelin	NRP	90%
Region 28	blactam , T1PKS , NRPS	7,297,163	7,437,851	carbapenem MM4550	Other:Non-NRP beta-lactam	58%

그림. 지의류에서 발견된 방선균 PAMC26508 2차대사물질 관련 유전체 분석 결과

- PAMC26508 미생물을 production 3개의 배지를 사용하여 미생물을 배양하여 Ethyl acetate를 사용하여 추출하고 HPLC를 통해 물질 추출의 패턴을 비교하였음. 추출 후 추출물에 대해 항균 테스트를 진행하여 항균력을 확인하였음. 실험 결과 그람 양성균 3종과 그람 음성균 2종에 대해 항균활성을 확인 하였을 때, YPM 배지를 사용했을 때 추출한 추출물이 가장 활성이 좋았음. 하여 YPM 배지에서 물질 분리를 하기 위해 prep HPLC를 실시하여 5개의 Fraction과 순수 화합물을 얻었음

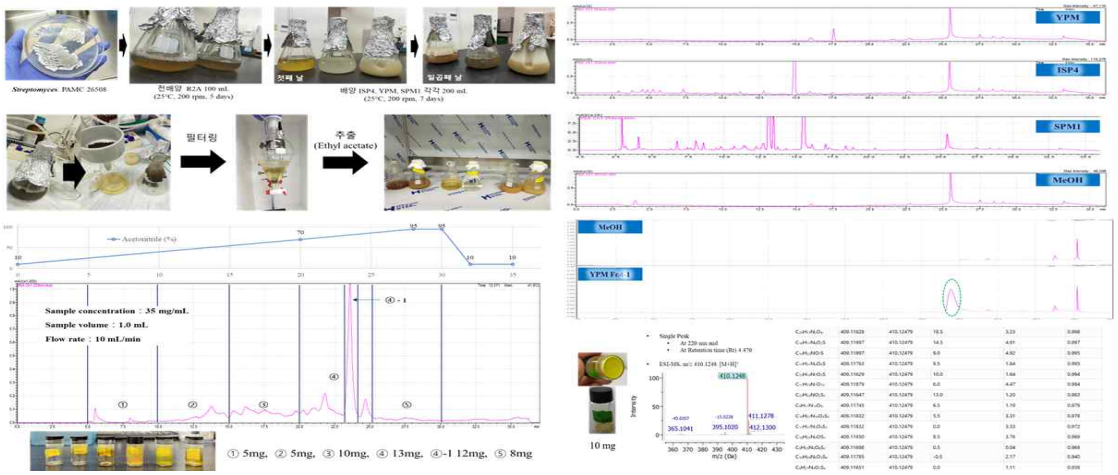


그림. PAMC26508 배양액으로부터 물질 추출 후 분석 결과

2) 미생물로부터 신규 항생물질 분리 및 LC-MS, NMR 분석을 통한 결과 확인

- 2대사물질을 생성하는 것으로 예상된 PAMC26508 미생물 추출물에서 prep HPLC를 실시하여 5개의 Fraction과 순수 화합물을 얻었음. 순수 화합물의 구조를 알아보기 위해 NMR 분석을 실시하여 구조를 분석하였음. 그 결과 “Copridisin A”로 확인 되었음. Copridisin A는 2016년 서울대에 의해 이미 보고된 물질로, 제주도 쇠똥구리에서 분리된 Streptomyces sp. SNU607에서 생산한다고 보고 되어 있었음. 서울대에서 중국 연구팀에 생합성 유전자 분석을 의뢰하여 생합성 유전자도 확인되었음. 실제로 PAMC26508 유전체 내에서 Copridisin A 생합성 gene cluster를 보유 하고 있는 것을 확인 하였으며, 추후 Copridisin A 관련 활성을 확인 할 예정임. 현재 Copridisin A 관련 특별한 활성에 대해 연구가 진행이 안된 것으로 확인되었음. 하여, 극지에서 분리된 항생물질로서의 가치가 있는지 확인할 예정에 있음

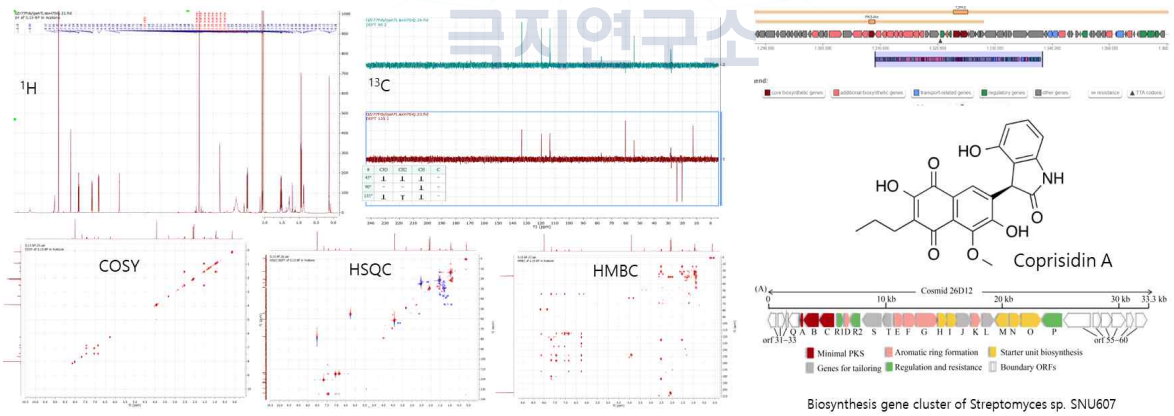


그림 PAMC26508에서 확인된 Copridisin A NMR 구조 분석결과와 생합성과정

3) 기존 알려진 이차대사 관련 구조변형 효소 기반 in vitro 반응 시도 및 신규물질 생산

- *Geledibacter salicanalis* PAMC21136 균주의 UV/H2O2 및 중금속 이온 저항 메커니즘 연구가 수행되었음. 여기서 스트레스 처리하여 glutathione reductase와 peroxygenase의 역할을 연구했으며 또한 환원된 글루타티온의 상당항 양이 생성됨을 확인하였음. 게다가, *Geledibacter salicanalis* PAMC 21136 균주에서 산화환원효소(수은환원효소)를 확인했고, 이 효소의 결정구조가 풀렸음. 또한 glutathine Synthase (21136_3260) 및 glutamate cysteine ligase (21136_1350)을 포함한 글루타티온 합성에 관여하는 효소들의 클로닝, 과발현 및 특성화를 연구하여 신규물질을 생산하려고 시도 중에 있음.

KOPRI 극지연구소

- *Streptomyces laurentii* 유래 lanthipetide 생합성 유전자 클러스터와 관련된 CYP105D17 효소의 기질 특이성 및 상동성 모델링 구조 분석임. Lanthipetide 생합유전자 클러스터의 실제 기능은 아직 알려지지 않았으며, CYP105D17은 이미 특성화된 *Streptomyces laurentii* 유래 CYP105D18과 81.8%의 동일성을 나타냈음. 단백질의 분자량은 SDS-PAGE에 의해 43.9kDa로 분석되었으며, CYP105D18처럼 H2O2의 존재 하에서 papaverine의 N-oxidation을 촉매하였음. 최적의 반응 조건은 20mM H2O2 였으며, kinetic 분석 결과 K_m값 302 ± 33 μM, K_{cat}값 1.6 ± 0.08 min $^{-1}$,그리고 catalytic efficiency 0.31 sec^{-1} μM^{-1}로 확인되었음. CYP105D17의 상동성 모델링 구조는 7DLS (PDB code) 구조를 템플릿으로 만들어졌으며, 이때 papaverine은 소수성 코어에 완전히 묻혀 있는 형태였음. T239는 CYP105D17의 활성 부위에 관여했고 Val231은 CYP105D18에서 leu231로 대체되었음. 이렇듯, CYP105D18와의 높은 구조적 유사성에도 불구하고, CYP105D17는 CYP105D18와 달리 testosterone을 촉매 할 수 없었으며 H2O2 내성이 낮고 papaverine에 대한 N-oxidation 촉매 효율이 낮았음.

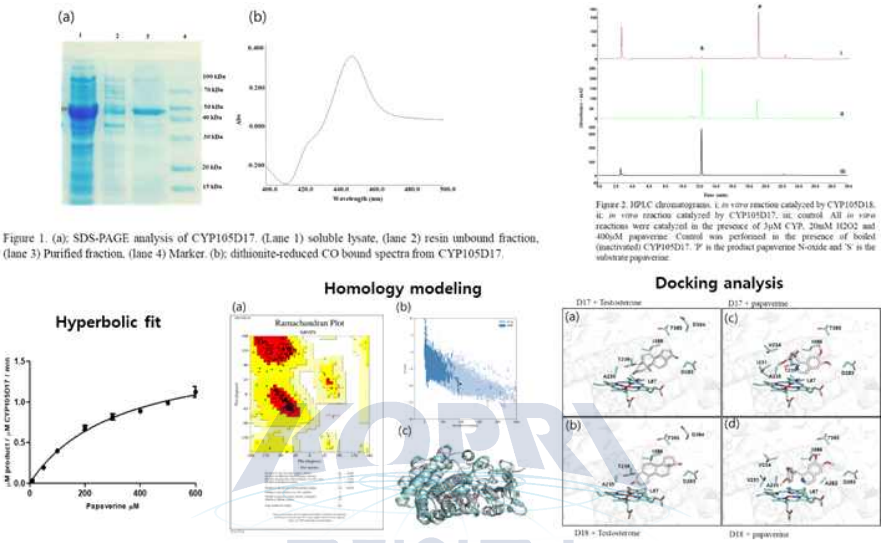


그림. CYP105D17 기질 특이성 및 모델링 구조 분석 결과

다. 변형된 항생제 후보물질의 활성 스크리닝(선문대)

1) 항생물질 합성 유전자 카셋트를 미생물 배양 숙주에 삽입하여 유용물질 생산 방법 셋팅 후 유용성 있는 물질의 활성 스크리닝 시도

- Chitosanase는 chitosan의 β-1,4-linked glycosidic bond 을 절단하고 키토산을 생물학적으로 유용한 다른 올리고당으로 해중합시키는 가수분해 효소임. CAZy 데이터베이스에 따르면 Chitosanase는 아미노산 유사성에 따라 GH5, GH7, GH8, GH46, GH75 및 GH80 계열로 분류되지만, Chitosanase의 촉매 패턴은 매우 무작위적이며 COS 생성 범위는 2-6개로 보고됨. Endo type Chitosanase (EC 3.2.1.132)는 키토산의 환원 말단에 작용하는 반면, exo-type chitosanase (EC 3.2.1.165) 는 비환원 말단에서 β-1,4-linked glycosidic bond을 분해한다. 또한 절단 특이성에 따라 endo-chitosanases는 유형 I-IV의 4개 그룹으로 분류됨. 미생물 유전체 내에서 Chitosanase를 분리하여 단백질 발현 후 chitosan과 반응하여 chitosan 유래 산물을 얻을 수 있는지에 대해 효소 활성을 확인하였음. 그 결과, 키틴 및 키토산을 포함한 다양한 다당류 및 다양한 올리고당 생산을 위해 유용한 단백질을 발굴하였음

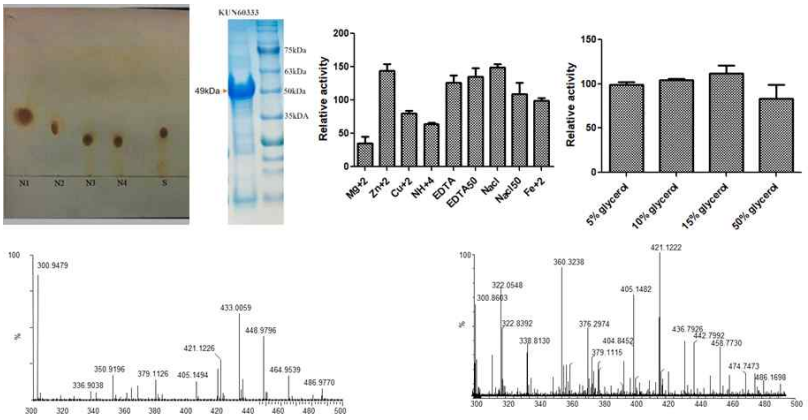


그림. 새롭게 얻은 Chitosanase와 키토산 분해 실험 확인한 결과

- Variovorax sp. PAMC28711은 cytoplasmic trehalase로 일단 세포가 삼투압이 낮아지면 cytosolic trehalose를 소비하는 것으로 조사되었음 Variovorax sp. PAMC28711 trehalase는 안정적이고 열에 안정적이며, 최적 온도 50℃이며, 40℃에서 안정성을 보여주었음. 최적의 활성은 pH 6에서 나타났으며, 분해가능성을 확인하기 위해 TLC를 수행하였음. TLC 분석은 트레할로스의 전환이 글루코스의 동시 형성을 야기함을 보여주었음. glucose HPLC-ELSD 분석을 통해 재조합하여 발현한 trehalose를 포도당으로 전환하는 것을 확인하였음

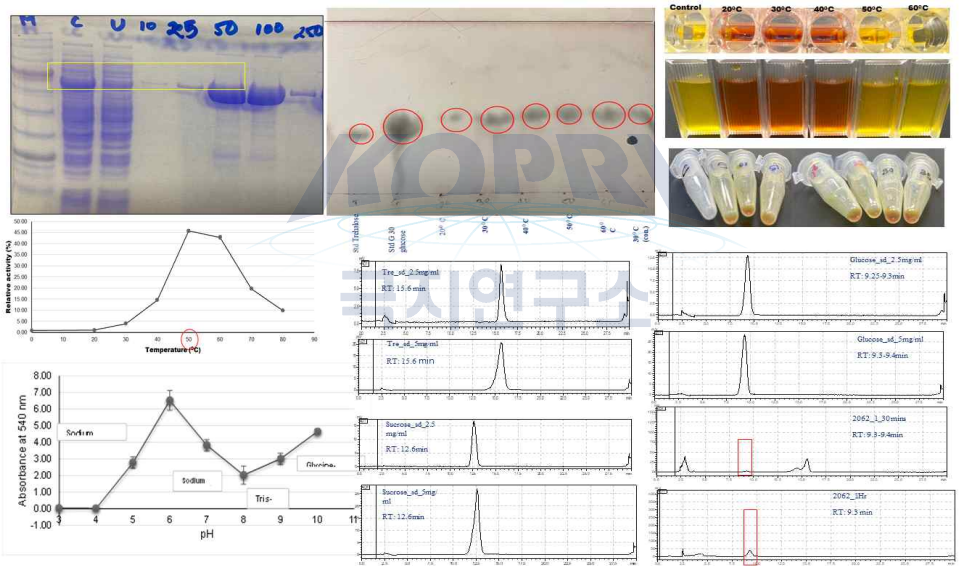


그림. Variovorax sp. PAMC28711 의 cytoplasmic trehalase 효소 활성 결과

- 추가로 먼저 연구를 진행했던 당화효소 YdhE의 상위 화합물의 당화반응에 대한 가능성을 확인하기 위해 in-silico 분석 실시함. YdhE의 free-form과 UDP를 가진 구조를 이용해 모델링 및 optimization을 실시하였으며, 상위 화합물을 docking한 결과, 그림과 같은 위치에 당화반응할 것으로 예측되었음. 이번 in-silico 분석간에 구조를 과도하게 optimization한 것을 감안한다면 꽤 다양한 위치에 가능성을 보여 상위 화합물에 활성을 보일 것으로 예상됨. 또한, 구조 유사성으로 확인한 유사 유전자들 또한 macrolide계 화합물의 당화를 하는 것으로 확인된 바, 큰 ligand binding pocket이 그 결과와 상응하는 것으로 판단하였음. 또한, 구조 유사성으로 확인한 유사 구조들의 mutagenesis 결과나 구조 분석을 통해 새로운 물질을 생성할 수 있는 예측 결과를 얻을 수 있었으며, 실험 중에 있음

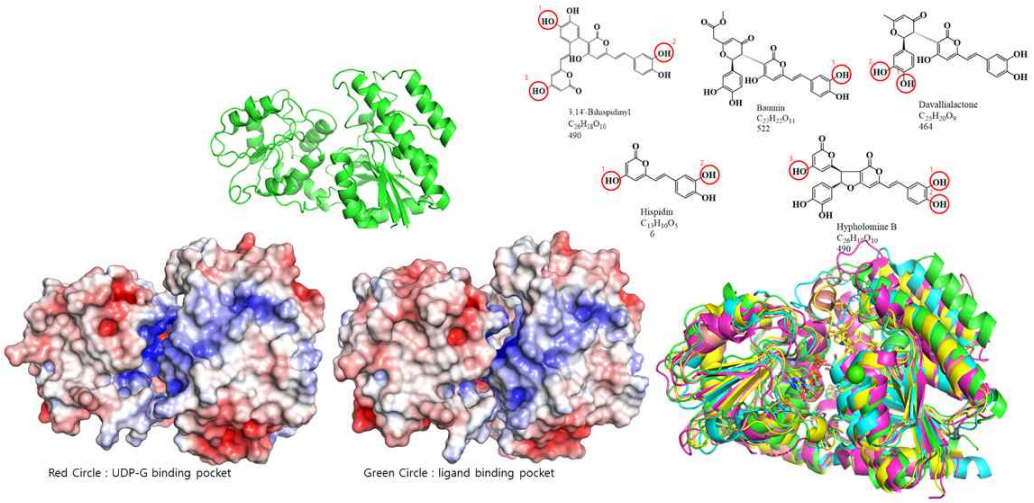


그림. 발현한 당화효소 YdhE의 기질별 당화반응 예측 결과

2) 항생물질 변형효소를 발현 하는 유전자를 미생물 배양 숙주에 삽입하여 변형하고자 하는 전구물질은 배양액에 넣어 주는 방식의 생산 방법 셋팅 후 나온 물질 활성 스크리닝 시도

- 효소의 기질 특이성을 조사하기 위해 시험관 내 반응을 통해 15종의 서로 다른 플라보노이드(플라보놀, 플라본, 플라바논 및 이소플라본)을 이용해 수행하였음. 생체 내 변환은 *Pseudomonas putida* 의 이종 산화환원 파트너 Pdx/Pdr 과 시금치의 Fdx/FdR과 함께 화학 산화한원 파트너인 과산화수소 및 다이아세톡시아이도벤젠과 함께 수행하여 결과를 확인 하였음. 실험 결과, 보조인자 NADH의 존재 하에 Pdx/PdR 을 사용하여 플라보노이드 하이드록실화를 촉매할 수 있었으며, 다른 산화환원제 파트너는 활성이 미비하거나 전혀 변환이 되지 않았음. 선택된 15개의 기질 중 플라바논 (나린제닌)과 이소플라본 (바이오카닌 A, 다이드제인, 제니스테인)만이 전환을 보였고, 변환된 물질은 활성을 조사하기 위해 지금 조사 중에 있음

KOBRI 극지연구소

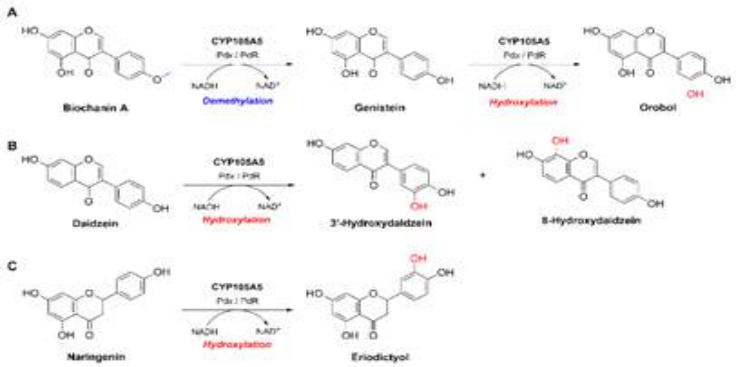


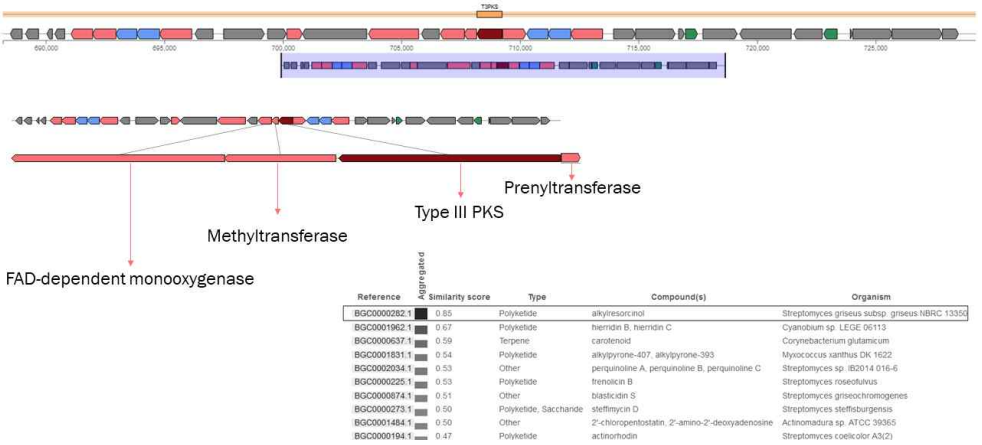
그림. 산화환원 파트너에 따라 물질 구조변환에 대한 결과

라. 공정 최적화 및 화학합성을 통한 항생물질의 구조 최적화 (선문대)

1) 기본 항생물질 구조 합성을 통한 활성의 다양성 분석 및 신규 항생물질 제작

- PAMC26508 Streptomyces에서 type Ⅲ PKS에 대한 연구를 진행함. PAMC26508의 antismash 분석 결과에서는 그림과 같은 클러스터가 alkylresorcinol와 비슷한 화합물을 생성할 것으로 보였으나, 추후 분석 결과 알려진 생합성 클러스터와는 유사성이 떨어져 다른 물질의 생성도 예측할 수 있을 것으로 예측하였음. 하여 예측된 2차대사물질의 생합성 클러스터의 characterization을 진행해보고자 하여 진행 중에 있음. 현재, 유전자 클러스터의 중요 유전자인 type Ⅲ pks는 soluble protein을 얻었으며, 관련된 methyltransferase 유전자와 또는

FAD-depdent monooxygenase는 클로닝을 추가적으로 진행하고 있음. 각각의 유전자를 발현하고 최적화하여 물질생산을 확인해보고자 함.



Reference	Similarity score	Type	Compound(s)	Organism
BGC0000282.1	0.85	Polyketide	alkylresorcinol	Streptomyces griseus subsp. griseus NBRC 13350
BGC0001962.1	0.67	Polyketide	hierridin B, hierridin C	Cyanobium sp. LEGE 06113
BGC0000637.1	0.59	Terpene	carotenoid	Corynebacterium glutamicum
BGC0001831.1	0.54	Polyketide	alkylpyrone-407, alkylpyrone-393	Myxococcus xanthus DK 1622
BGC0002034.1	0.53	Other	perquinoline A, perquinoline B, perquinoline C	Streptomyces sp. IB2014 016-6
BGC0000225.1	0.53	Polyketide	frenolicin B	Streptomyces roseofulvus
BGC0000874.1	0.51	Other	blasticidin S	Streptomyces griseochromogenes
BGC0000273.1	0.50	Polyketide, Saccharide	steffimycin D	Streptomyces steffisburgensis
BGC0001484.1	0.50	Other	2'-chloropentostatin, 2'-amino-2'-deoxyadenosine	Actinomadura sp. ATCC 39365
BGC0001194.1	0.47	Polyketide	actinorhodin	Streptomyces coelicolor A3(2)

그림. PAMC26508 내에 새로운 2차대사 물질 생성 가능성 확보

2) 항생물질 스크리닝 결과에 따른 추가 항생물질 코어 개발 및 제조

마. KOPRI 보유 미생물 및 저온성을 가지는 미생물 데이터베이스 구축 (선문대)

1) 저온성을 바탕으로 의미 있는 결과를 예측할 수 있도록 모델 구축관련 디자인

- 먼저 보고했던 것과 같이 저온환경 유래 미생물의 유전체 관련 분석을 통하여 미생물이 분리되는 환경에 따라 CAZyme 패턴이 조금씩 다르다는 것을 통해 이를 활용한 모델을 구축하기 위에 지속적으로 회의를 하고 모델 구축관련 디자인을 하였음. 극지환경에서 분리한 26개 균주의 CAZyme 패턴을 조사하였을 때, AA3, AA4, CE1, CE4, CE9, CE14, GH3, GH13, GH23, GT2, GT4, GT51, CBM48 families 관련 단백질 계열이 많이 조사되었었고, 추가로 저온에서 분리된 미생물 유전체의 정보와 저온 관련 미생물과 효소 등 관련된 정보를 논문에서부터 수집하여 데이터 셋을 구축하고자 하엿으며, 관련 효소들이 당 분해 관련 효소이기 때문에 관련된 당 중심으로 검색어를 조절하여 자일란, 키틴, 팩틴 등 풀이나 이끼, 미역, 갑각류를 이루고 있는 다당류 계열 위주로 자료조사를 하였음.

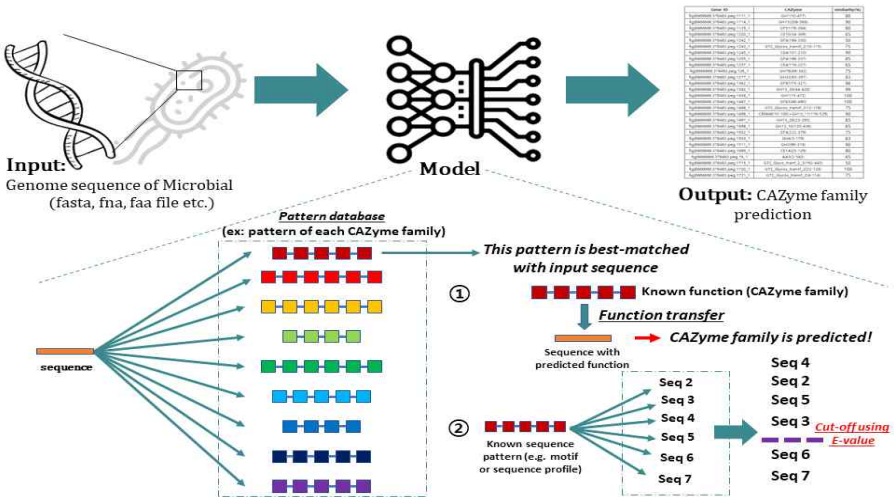


그림. 저온 관련하여 유전자 예측을 위한 모델 구축관련 디자인 모식도

- In put 형태를 전체적인 미생물의 게놈 시퀀스로 생각하였고, 모델을 거쳐 저온에 특화된 CAZyme을 예측할 수 있는 모델로 구상 하였으며, 미리 각 CAZyme family에 대해 Pattern database를 구축하였을때 시퀀스가 모델에 삽입 되었을 때 Pattern database에서 유사한 시퀀스를 찾고 그 안에서 시퀀스를 리스트업 하여 가장 유사한 시퀀스를 찾아주어 기능을 예측할

수 있는 디지인으로 디자인 하였음. 현재 지속적으로 미팅하면서 데이터베이스를 구축하는 단계예 있으며 여러 컴퓨터 기술을 도입하여 모델을 구축하였을 때 최적의 기술이 삽입 될 수 있도록 연구 중에 있음.

2) 머신러닝을 활용한 극지/해양 미생물 관련 다양한 대사과정 분석시도

- 머신러닝을 비롯한 다양한 컴퓨터 툴을 기반으로 극지/해양 미생물 유전체 정보를 토대로 다양한 대사과정에 대해 분석을 시도 하였고, 결과를 얻었음. Burkholderia는 다중 염색체로 알려진 다능성 변종이며, 다양한 환경에서 격리되어 최근 90종으로 확대되었음. 여기에서 Burkholderia가 고립된 환경에 따라 게놈의 차이를 보이는 것을 확인하고 각 다염색체의 특성을 알아보고자 하였음. 3개의 염색체를 갖는 Burkholderia의 다염색체를 연구하기 위해 85종을 선정하였으며, 염색체와 고립된 환경에 의존하는 2차 대사산물과 COG(orthologous group)의 클러스터를 antiSMASH와 deepBGC를 사용하여 비교 분석하였음. 또한 각 그룹별로 더 많은 패턴을 설명하여, 그 결과 각 염색체에 존재하는 유전자 군집 패턴이 염색체, 고립 부위, 종에 따라 다르다는 것이 확인하였음. 하여 본 연구에 대해 논문으로 투고를 할 준비를 하고 있음

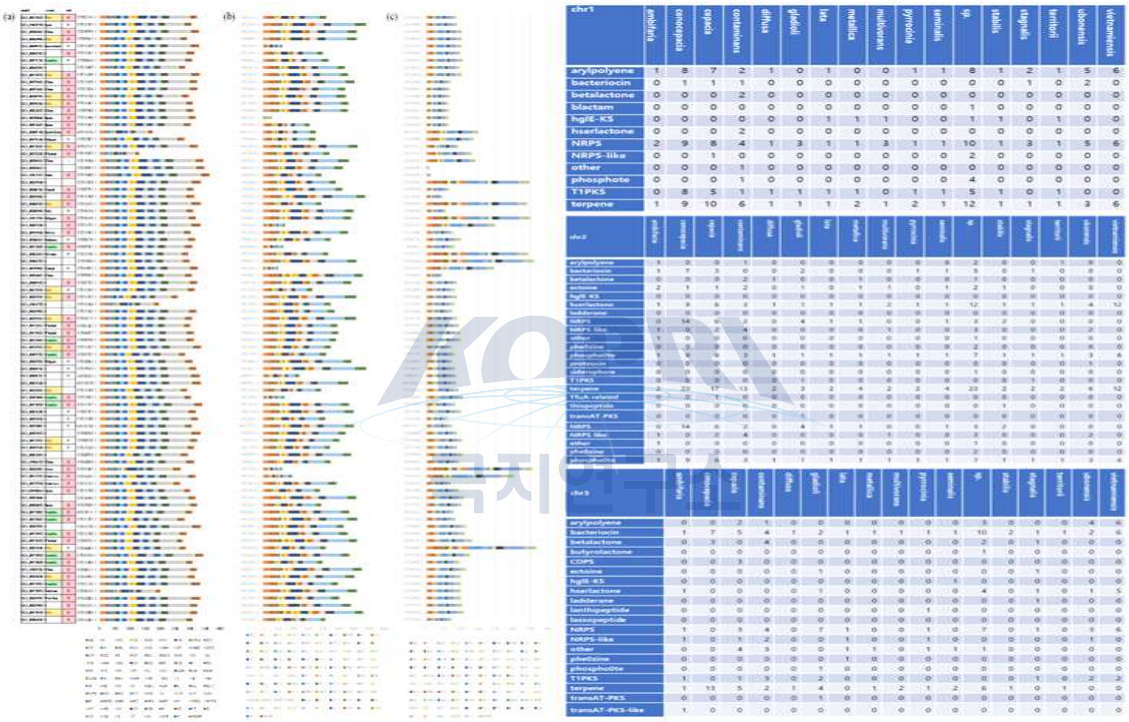


그림. 머신러닝 및 다양한 컴퓨터 툴을 사용하여 예측한 Burkholderia 85종 분석 결과

3) 저온성을 특징으로 생합성 과정 및 관련효소의 기능·특성 데이터베이스 구축

- 현재 저온성을 특징으로 하는 생합성 과정 및 관련 효소를 바탕으로 기능·특성에 대해 데이터베이스는 따로 존재하지 않음. 하지만 현재 데이터가 어느 정도 쌓이면서 저온성을 특징으로 하는 데이터베이스도 필요로 하기 시작했음. 이에 관련 정보를 모두 수집하고 이 정보 모두를 데이터베이스화 하여 웹사이트로 구축을 하려고 시도 중에 있음. 현재 플라스틱오염의 심각성으로 인해 플라스틱분해 효소를 예측할 수 있고, 플라스틱 분해 효소와 관련하여 분해 과정이나 특성에 대해 데이터베이스한 사이트가 존재함. 이를 착안하여, 저온성 관련 하여 미생물 데이터베이스를 만들고자 하였음. 이 사이트 내에서 저온관련 유전자를 예측할 수 있고, 미생물을 탐색할 수 있으며, 관련 메커니즘을 예측 할 수 있도록 디자인하였음. 뿐만아니라 논문탐색, 효소정보 등을 공유 하여 웹사이트화 할 예정에 있음. 현재 저온 관련 키워드로 데이터를 수집하고 있으며, 웹사이트 디자인을 구체화하는 단계에 있음

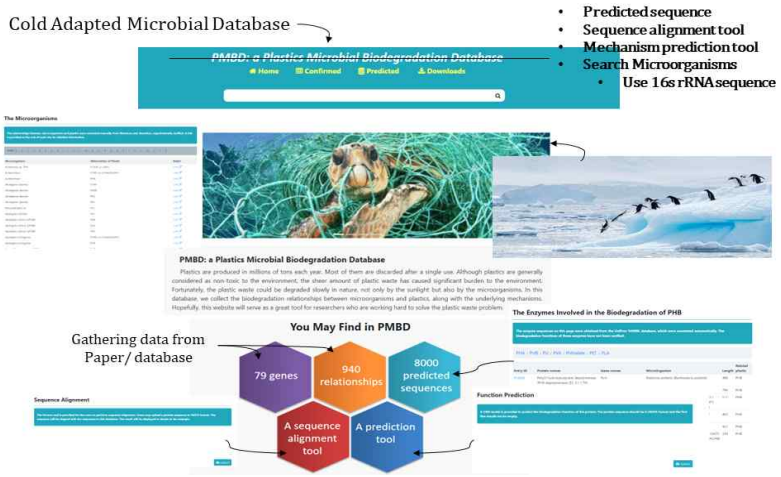
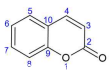
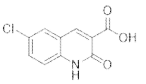
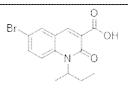
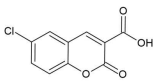
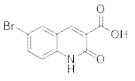
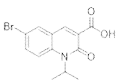
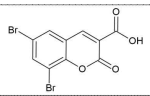
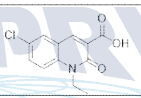
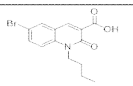
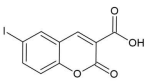
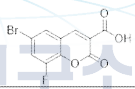
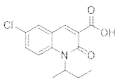
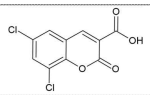
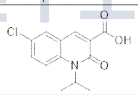
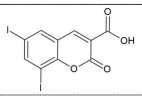
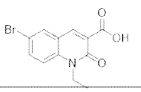


그림. 저온유전자 관련 데이터베이스 웹사이트화 디자인 모습

바. 쿠마린 계열 합성 물질 항균활성 측정 (가피바이오, 극지연)

1) 2차년도에 밝혀낸 항균 활성 물질(GB_AB_21_37 및 GB_AB_22_05) 코어의 유도체 합성 (30종)

Coumarin		GB-21-AB-06		GB-21-AB-12	
GB-21-AB-01		GB-21-AB-07		GB-21-AB-13	
GB-21-AB-02		GB-21-AB-08		GB-21-AB-14	
GB-21-AB-03		GB-21-AB-09		GB-21-AB-15	
GB-21-AB-04		GB-21-AB-10			
GB-21-AB-05		GB-21-AB-11			

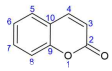
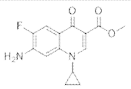
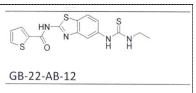
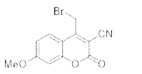
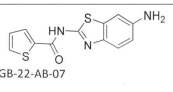
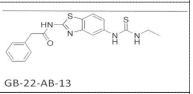
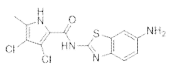
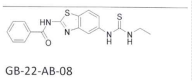
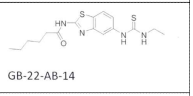
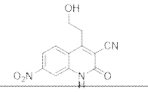
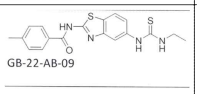
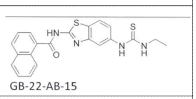
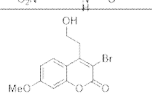
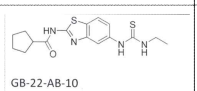
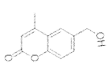
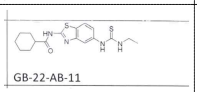
Coumarin		GB-22-AB-06		GB-22-AB-12	
GB-22-AB-01		GB-22-AB-07		GB-22-AB-13	
GB-22-AB-02		GB-22-AB-08		GB-22-AB-14	
GB-22-AB-03		GB-22-AB-09		GB-22-AB-15	
GB-22-AB-04		GB-22-AB-10			
GB-22-AB-05		GB-22-AB-11			

그림. 항균활성 물질을 백본으로 하는 다양한 쿠마린 유도체

KOPRI 극지연구소

2) 합성된 유도체를 이용하여 다양한 병원균을 가지고 항균 테스트 실시

- 항균활성 테스트 결과 GB-22-AB-01이 *Staphylococcus aureus*에 대해서 농도에 따른 항균 활성이 있는 것으로 확인됨.
- 추가적으로 정확한 MIC 값을 결정할 예정임.

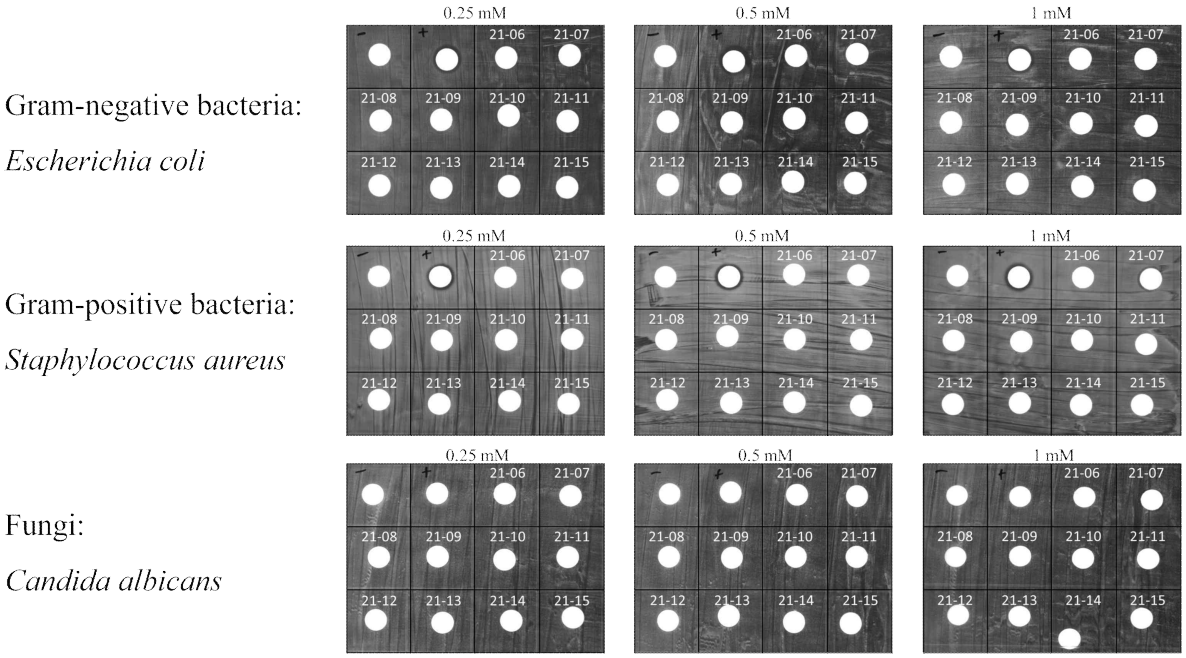


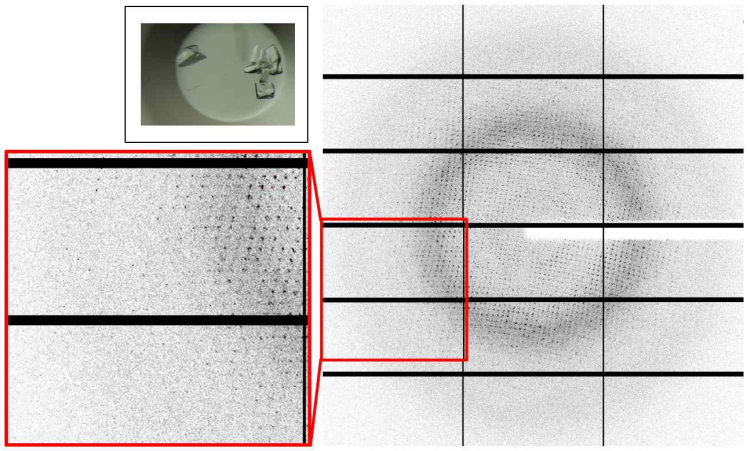
그림. *Escherichia coli,* Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus, Candida albicans*를 이요한 항생물질 활성 테스트 결과.

<4세부> 항생물질 타겟 단백질 발현 및 정제조건

가. 타겟 단백질 3차 구조 규명 (이화여대)

1) *Senotrophomonas* sp. KCTC 12332 유래 class A β-lactamase, *St*Lac^{N238G,D242G} 돌연변이 단백질 3차구조 규명

- 2차년도에 확보한 고순도의 *St*Lac^{N238G,D242G} 단백질을 pH, salt 및 precipitant등 다양한 조성으로 구성된 384가지 종류의 결정화 용액을 이용하여 microbatch 방식으로 단백질 결정화 실험을 진행함. 해당 결정화 실험을 통해 17가지 조건에서 단백질 초기결정을 획득함.
- 포항 가속기연구소의 5C 빔라인을 이용하여 17종의 초기결정 중 1종에 대해 space group $P2_12_12_1$에 해당하는 1.82 Å 고해상도 회절 데이터를 획득함.



*St*Lac^{N238G,D242G} apo	
Data collection	
Diffraction source	PAL/PLS beamline 5C
Wavelength(Å)	1
Rotation range per image (')	1
Total rotation range (')	360
Exposure time per image (s)	0.1
Space Group	$P2_12_12_1$
a, b, c(Å)	75.75 85.37 154.16
Resolution range (Å)	50.0 -**1.82**
Total No. of Reflections	1209546
No. of unique Reflections	89720
Completeness (%)	98.90
I/Sigma	10.6
R-meas	19.3
CC½ (%)	99.60
Isa	10.2

그림. *St*Lac^{N238G,D242G} 의 결정의 X-선 회절 이미지(좌) 및 회절 데이터 정보(우)

KOPRI 극지연구소

- *St*Lac^{N238G,D242G} 단백질 결정구조 규명 결과, asymmetric unit 내 4개의 분자가 존재함을 확인함. 분자 구조를 각각 겹쳤을 때 root-mean-square deviation (RMSD) 값이 0.19 ~ 0.31 Å으로 구조가 매우 유사함을 확인하였고, 한 분자를 임의로 선정하여 구조 분석을 진행함

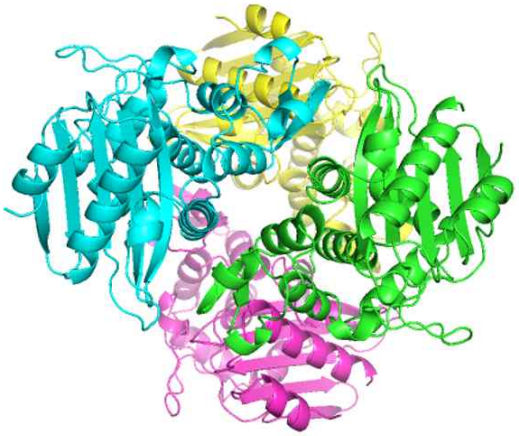


그림. Asymmetric unit 내 *St*Lac^{N238G,D242G} 단백질 결정 구조

- 돌연변이 도입 부위인 β5-β6 loop을 중심으로 구조를 비교함. 야생형 단백질과 비교한 결과, 야생형의 β5-β6 loop에서 관찰되는 N238과 D242 사이의 수소결합이 돌연변이 단백질 결정 구조에서는 관찰되지 않음. 다른 class A β-lactamase의 구조와 *St*Lac^{N238G,D242G} 돌연변이 단백질의 3차 구조를 비교한 결과, *St*Lac^{N238G,D242G}의 β5-β6 loop은 기존 N-x-x-D motif의 구조가 아닌, 다른 class A β-lactamase에서 관찰되는 G-x-x-G motif의 구조와 유사함을 확인함.

KOPRI 극지연구소

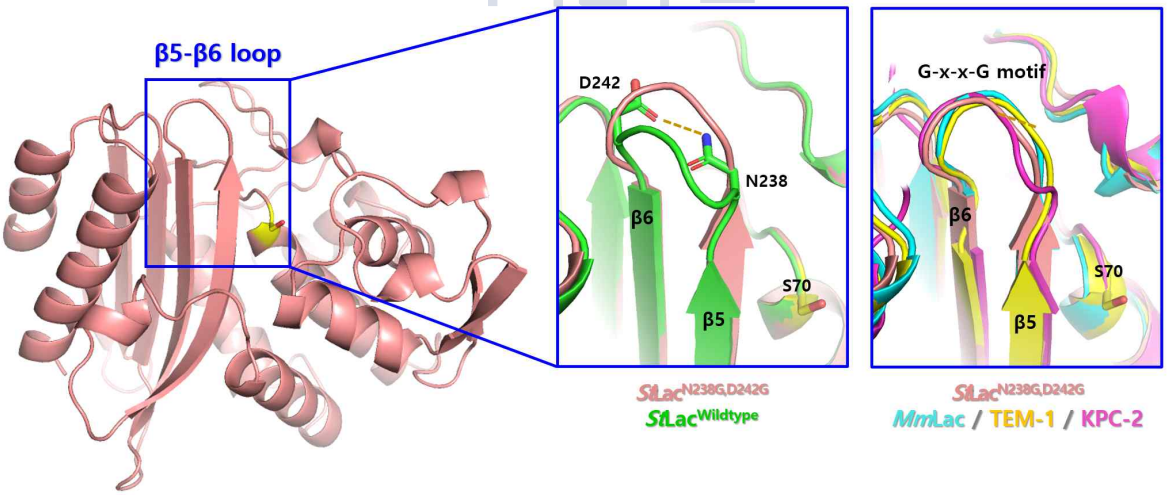


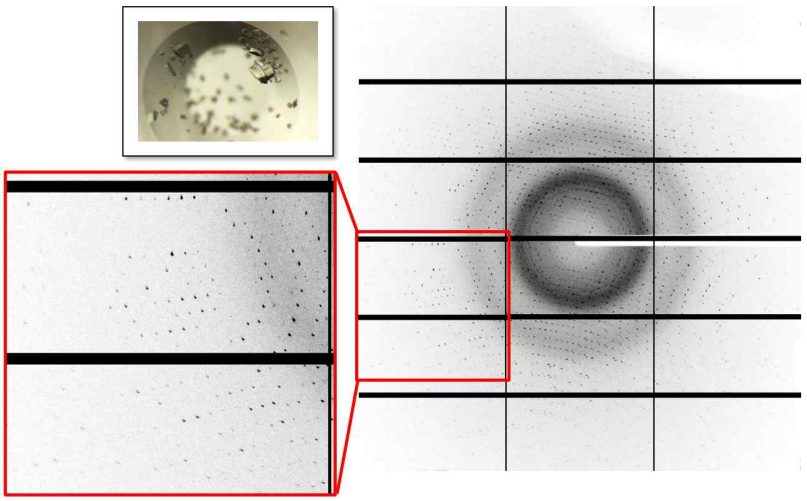
그림. *St*Lac^{N238G,D242G}의 β5-β6 loop 구조; *St*Lac 야생형과의 구조 비교(좌) 및 class A β-lactamases와의 구조 비교(우)

2) *Enterobacter aerogenes* 유래 class C β-lactamase, CMY-10 단백질 3차 구조 규명 및 분석

- 신규 항생물질의 저해 효과 확인 및 저해 기작 분석을 목적으로 *Enterobacter aerogenes* 유래 class C β-lactamase인 CMY-10을 타겟 단백질로 추가 선정함.
- CMY-10 단백질에 대한 4세부 연구팀의 선행연구 결과를 바탕으로, 고순도의 CMY-10 단백질

을 정제함. (*The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2017, 72 (3): 735-743/ *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61:5, e00098-17)

- 복합체 구조규명에 적합한 단백질 결정을 확보하기 위해 pH, salt 및 precipitant가 다양한 조성으로 구성된 432가지의 결정화 용액을 이용하여 결정화 실험을 진행함. 확보한 7종의 단백질 초기결정 중 1종의 결정으로부터 1.32Å에 해당하는 고해상도 X-선 회절 데이터를 획득함.



CMY-10 WT apo	
Data collection	
Diffraction source	PAL/PLS beamline 5C
Wavelength(Å)	0.97957
Rotation range per image (')	1
Total rotation range (')	360
Exposure time per image (s)	0.1
Space Group	$P2_1$
Unit Cell (Å)	43.17 73.54 54.14 90.0 111.2 90.0
Resolution range (Å)	50.0 -**1.32**
Total No. of Reflections	489435
No. of unique Reflections	73566
Completeness (%)	99.3
Mosaicity	0.25
I/Sigma	7.9
R-meas	20.1
CC½ (%)	98.90
Isa	7.7

그림. CMY-10 결정의 X-선 회절 이미지(좌) 및 회절 데이터 정보(우)

- *XDS* 프로그램을 이용하여 회절 데이터를 processing한 결과, space group $P2_1$에 해당하는 1.32 Å 해상도의 데이터를 확보함. 4세부 연구팀이 2006년에 규명한 CMY-10 단백질 결정구조 (PDB code: 1ZKJ)를 template으로 사용하여 분자치환법을 통해 CMY-10의 구조를 규명함 (*Molecular Microbiology J.*, 2006, 60(4):907-916).
- 구조 규명 결과, symmetry 분자의 N-terminus가 helical structure를 유지하며 CMY-10의 active site에 결합하는 것을 확인함. 해당 결합 구조는 펩타이드 기반의 inhibitor 개발 가능성을 시사함.
- Helical N-terminus에서 관찰되는 ion은 결정화 조건, 정제조건에 포함된 이온으로 예상됨. 차년도에는 첨가하는 이온의 종류에 따른 분광학적 효소 활성 분석을 통해, 결정구조에서 관찰되는 이온을 규명하고자 함.

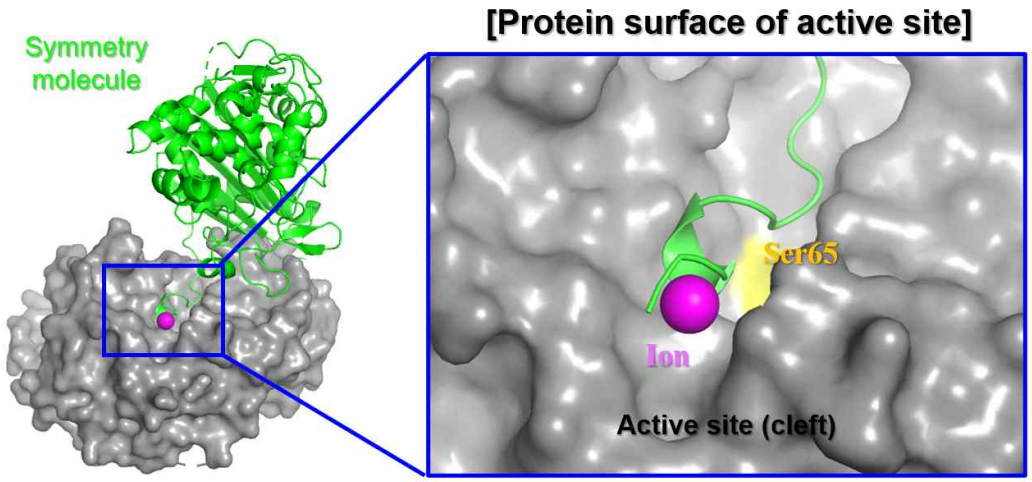


그림. CMY-10 active site에 packing 된 symmetry 분자의 N-terminus(초록) 와 이온 분자(분홍)

나. 타겟 단백질 효소 활성 분석 (이화여대)

1) *St*Lac 야생형 단백질의 반응속도상수 규명

- 2차년도에 측정한 *St*Lac의 기질 스펙트럼 결과를 바탕으로, 구조적 유사성을 가지는 3종의 β-lactam 항생제 (cephalexin, cefaclor, ampicillin)를 선정함.

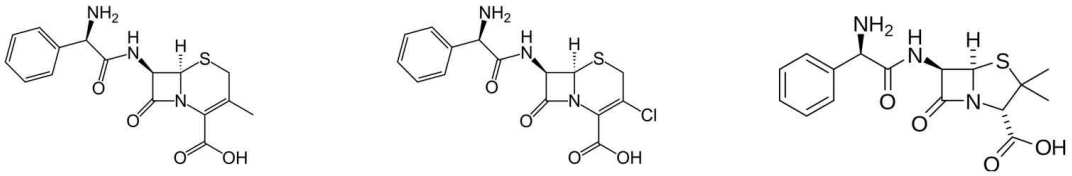


그림. β-lactam 항생제의 구조

- 3종의 β-lactam 항생제에 대한 steady-state kinetics를 수행하여, 효소의 반응속도상수인 K_m 및 k_{cat} 값을 각각 도출함. (cephalexin - K_m: 236.7 μM, k_{cat}: 204.3 s^{-1} / cefaclor - K_m: 287.6 μM, k_{cat}: 1249.6 s^{-1} / ampicillin - K_m: 28.8 μM, k_{cat}: 69.8 s^{-1})

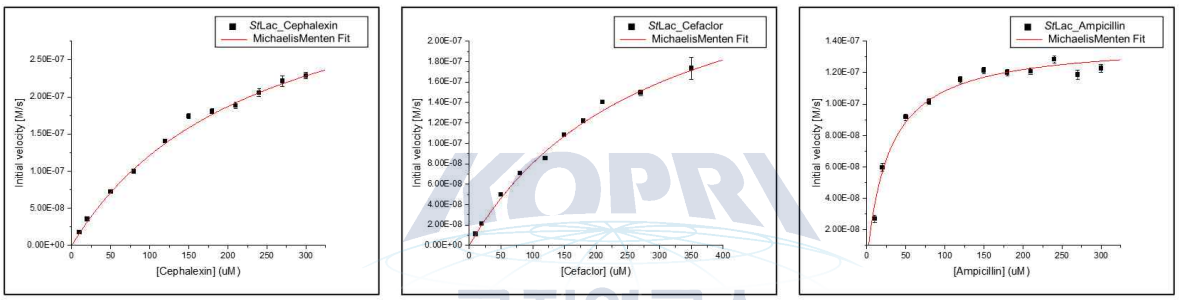
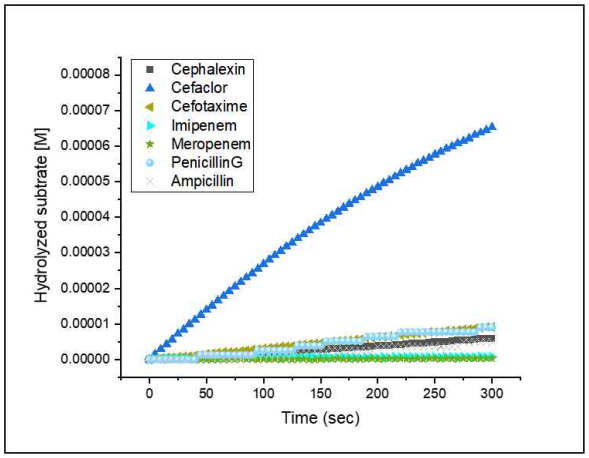


그림. Cephalexin(좌), Cefaclor(가운데) 및 Ampicillin(우)에 대한 *St*Lac의 Michaelis-Menten 그래프

2) *St*Lac^{N238G,D242G} 돌연변이 단백질의 기질 스펙트럼 분석

- *St*Lac^{N238G,D242G} 의 기질 스펙트럼을 확인하기 위해, β-lactam 항생제 7종에 대한 가수분해 활성을 2차년도와 동일한 방식으로 측정함.
- 측정에 사용한 7종의 β-lactam 항생제는 cephalosporin 계열 3종 (cephalexin, cefaclor, cefotaxime), carbapenem 계열 2종 (meropenem, imipenem), penicillin 계열 2종 (penicillin G, ampicillin)이며, 기질 소모정도를 분광광도계로 측정하여 각 기질에 대한 *St*Lac^{N238G,D242G}의 효소 활성을 측정함.
- 효소 활성 측정 결과, *St*Lac 야생형 단백질의 가수분해 활성과 유사하게 carbapenem 계열에 대한 가수분해 활성은 관찰할 수 없었고, cefaclor에 대한 가수분해 활성은 다른 기질 대비 월등하게 뛰어남을 확인함. Cephalexin, cefotaxime, penicillin G, ampicillin에 대한 가수분해 활성은 측정 가능한 수준의 약한 활성이었으며, 이 중 cephalexin, penicillin G, ampicillin에 대한 가수분해 활성은 *St*Lac 야생형보다 낮음.

KOPRI 극지연구소



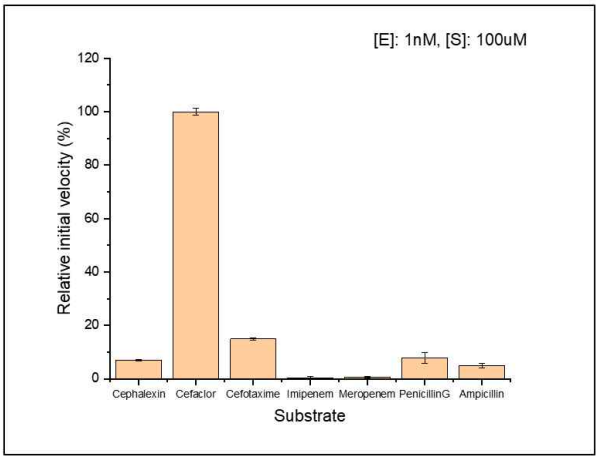
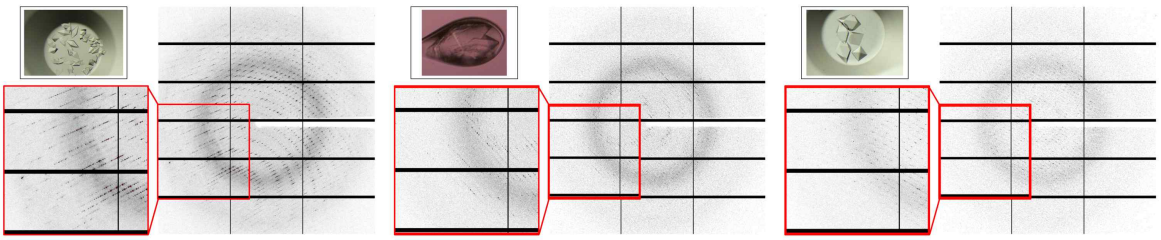


그림. *St*Lac^{N238G,D242G}의 기질 7종에 대한 시간-생성물 농도 그래프(좌) 및 가수분해 초기속도 상대 비교(우)

다. 신규 항생물질 / 타겟 단백질 복합체 구조 획득 - 이화여대

1) *St*Lac 단백질과 항생물질의 복합체 구조 규명

- 반응속도상수가 규명된 3종의 β-lactam 항생제 (cefaclor, cephalexin, ampicillin)와 *St*Lac 단백질의 상호작용을 구조적으로 관찰하고자 복합체 구조를 규명함.
- Class A β-lactamase의 mechanism은 nucleophilic serine과 기질이 acyl-enzyme 중간체를 형성하는 acylation 과정과 general base에 의해 가수분해된 생성물이 방출되는 deacylation 과정으로 나눌 수 있음. Deacylation 이전 과정을 관찰하기 위해, general base인 166번 Glutamate (E) 잔기를 Glutamine (Q)으로 치환한 deacylation-defective 돌연변이 (*St*Lac^{E166Q})를 제작함.
- 확보된 *St*Lac^{E166Q} 결정에 cefaclor, cephalexin 그리고 ampicillin을 각각 2시간, 2시간, 4시간 soaking 하여 회절데이터를 수집함. *XDS* 및 *HKL2000* 프로그램을 이용하여 회절 데이터를 processing한 결과. 각각 $P4_12_12$, $P2_12_12_1$, $P4_12_12$에 해당하는 고해상도 결정 구조를 규명할 수 있었음.



***St*Lac^{E166Q} + Cephalexin complex**	
Data collection	
Diffraction source	PAL/PLS beamline 5C
Wavelength(Å)	1.0
Rotation range per image (°)	1
Total rotation range (°)	180
Exposure time per image (s)	0.2
Space Group	$P4_12_12$
a, b, c(Å)	62.118 62.118 150.448
Resolution range (Å)	50.0 -**2.10**
Total No. of Reflections	125407
No. of unique Reflections	17064 (873)
Completeness (%)	98.6
Mosaicity	0.30
I/Sigma	3.4
CC½ (%)	98.0
ISa	15.75

***St*Lac^{E166Q} + Cefaclor complex**	
Data collection	
Diffraction source	PAL/PLS beamline 5C
Wavelength(Å)	1.0
Rotation range per image (°)	1
Total rotation range (°)	360
Exposure time per image (s)	0.2
Space Group	$P2_12_12_1$
a, b, c(Å)	61.68, 70.41, 130.94
Resolution range (Å)	50.0 -**2.09**
Total No. of Reflections	459194
No. of unique Reflections	34518
Completeness (%)	99.9
Mosaicity	0.20
I/Sigma	7.4
CC½ (%)	99.1
ISa	15.2

***St*Lac^{E166Q} + Ampicillin complex**	
Data collection	
Diffraction source	PAL/PLS beamline 5C
Wavelength(Å)	1.0
Rotation range per image (°)	1
Total rotation range (°)	360
Exposure time per image (s)	0.4
Space Group	$P4_12_12$
a, b, c(Å)	61.35, 61.35, 140.27
Resolution range (Å)	50.0 -**2.24**
Total No. of Reflections	341128
No. of unique Reflections	13572
Completeness (%)	99.9
Mosaicity	0.24
I/Sigma	8.8
CC½ (%)	99.50
ISa	8.6

그림. *St*Lac^{E166Q} 결정의 X-선 회절 이미지(상) 및 회절 데이터 정보(하)

KOPRI 극지연구소

- *St*Lac의 nucleophilic serine에 3종의 β-lactam 항생제가 각각 공유결합되어 있는 acyl-enzyme 복합체 구조를 규명함.

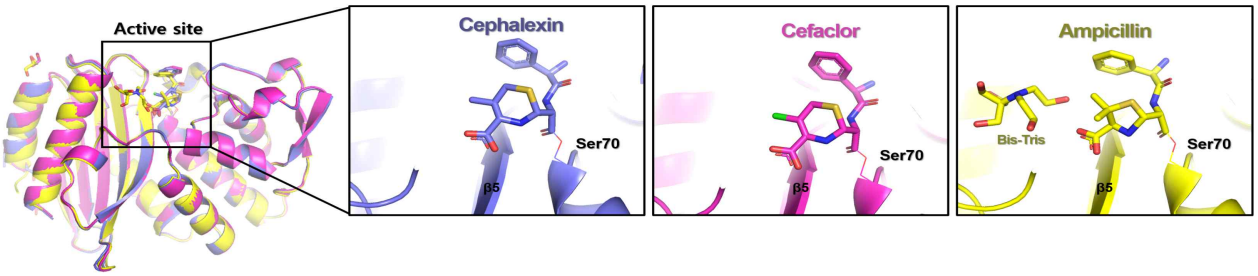


그림. 3종의 β-lactam 항생제와 *St*Lac^{E166Q} 의 acyl-enzyme 복합체 구조

- 차년도에는 규명된 구조를 바탕으로 3종의 β-lactam 항생제에 대한 *St*Lac의 효소 활성 차이를 원자 수준으로 분석 예정.

2) Fragment-based Drug Discovery (FBDD)

- β-lactamase 저해물질 개발을 위해 병원균 유래 class C β-lactamase인 ACC-1에 대한 FBDD 실험 진행 중. 2차년도 실험 결과를 통해 기존에 확보한 결정화 조건이 FBDD 실험에 부적합함이 확인되어, 신규 조건 확보를 위해 FBDD 용 triple-drop plate에 sitting-drop 방식으로 결정화 실험 및 결정화 조건 최적화 진행함.

- Micro-batch 방식으로 결정 성장이 확인된 다른 조건에 대해 sitting-drop 방식으로 결정화 실험을 진행했으나 크기가 작고 덧 자란 형태의 결정이 성장함. Dehydration 속도 조절을 위해 결정화 용액과 distilled water의 비율을 조정하여 결정화 조건을 최적화한 결과, FBDD 실험에 적합한 크기의 단결정 약 600 well 정도를 획득할 수 있었음.

그림. ACC-1 결정화 조건 최적화

- 포항가속기연구소에서 보유한 fragment library를 이용하여 획득한 결정에 480종의 chemical을 soaking한 뒤 x-ray 회절 실험 진행함. PanDDA 프로그램을 이용하여 회절 데이터를 분석한 결과, active site를 포함한 6개 site에서 21개 chemical에 대한 24개의 결합 event가 확인됨. 추후 chemical을 확보하고 soaking 조건을 최적화하여 분명한 Fo-Fc map이 관찰되는 고해상도 회절 데이터를 획득할 예정.

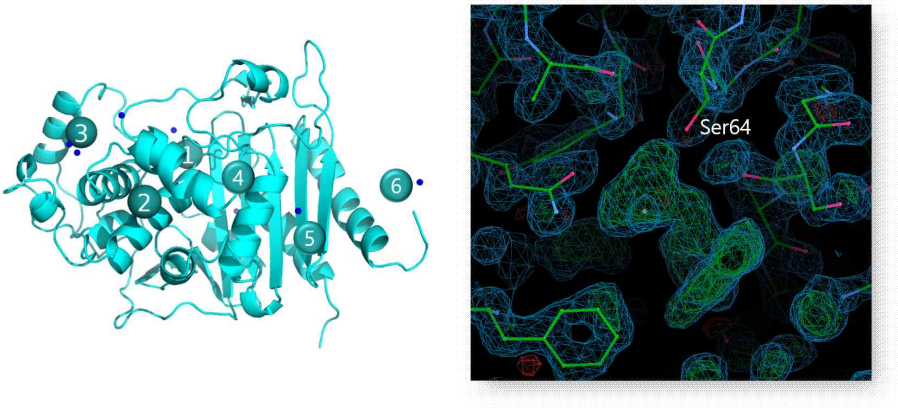


그림. ACC-1 구조의 chemical 결합 부위(좌) 및 결합된 chemical의 Fo-Fc 맵(우)

라. 신규 항생물질의 저해기작 규명 (이화여대)

1) Acyl-AMP 유도체 2종에 대한 저해 기작 분석

- Acyl-AMP 유도체 2종 (propionyl-AMP, butyryl-AMP)의 저해 효과를 class C β-lactamase인 CMY-10에 대해 확인함. Pre-incubation 시간이 증가함에 따라 저해 효과가 증가함.

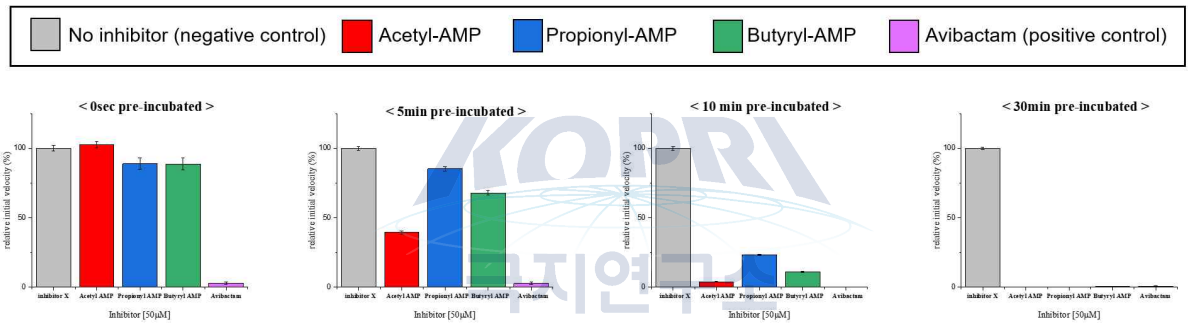


그림. Pre-incubation 시간에 따른 신규항생물질의 저해효과 비교

- 차년도에는 Jumping-dilution analysis를 활용하여, acyl-AMP 유도체가 비가역적 저해제인지 평가 예정. (*Analytical biochemistry*, 2011, 416(2), 206-210.)

마. 항생물질 변형체 설계 및 제시 (이화여대)

1) Acyl-AMP 유도체 2종 설계 및 확보

- 4세부 연구팀은 선행연구를 통해 acetyl-AMP (acAMP)가 class C β-lactamase인 CMY-10에 irreversible covalent inhibitor로 작용함을 보고한 바 있음 (*The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2017, 72 (3): 735-743).
- 저해 활성이 증진된 acAMP 유도체 확보를 위하여 AMP monohydrate를 출발물질로 사용한 합성 조건을 연구함.

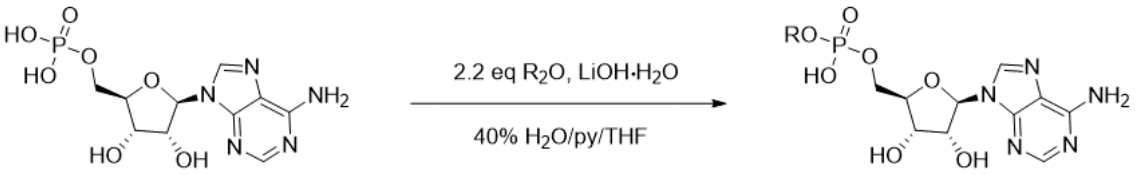


그림. Acyl-AMP 유도체 합성조건

- 최적화된 반응조건을 이용하여 Acetyl-AMP와 신규물질인 Propionyl-AMP, Butyryl-AMP 2종을 합성하였음.

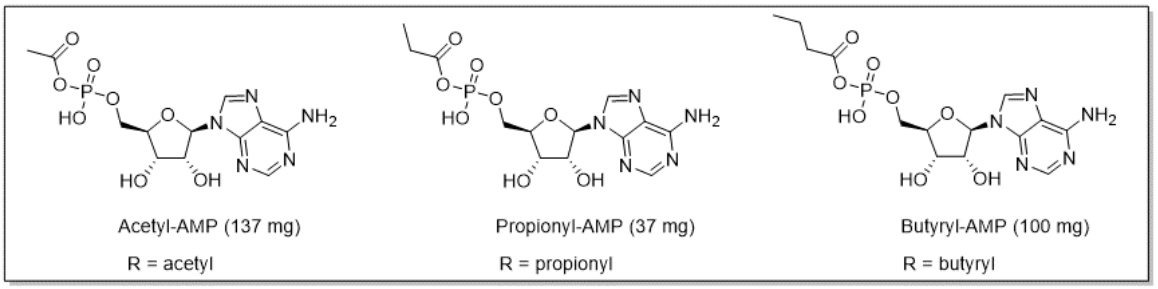


그림. 합성한 acyl-AMP 유도체 3종

- CMY-10에 대한 신규물질 Propionyl-AMP 그리고 Butyryl-AMP의 저해 활성 결과를 바탕으로 차년도에 AMP 유도체를 추가 설계 및 합성 예정.

2) 구조 기반 halisulfate 유도체 설계

- Halisulfate는 해면으로부터 추출한 해양 천연물로 다중 ring 구조와 sulfate group을 포함하는 물질임. 4세부 연구팀에서는 halisulfate 3 및 halisulfate 5가 기질 확장성 class C β-lactamase의 nitrocefin 가수분해 활성을 우수하게 저해함을 보고한 바 있음 (*Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 2021, 19: 145-152). 화학합성 연구팀과의 공동연구를 통해 halisulfate 3 및 halisulfate 5의 *in silico* docking 구조를 바탕으로 저해 활성 및 물성이 개선될 것으로 예상되는 유도체를 설계함.

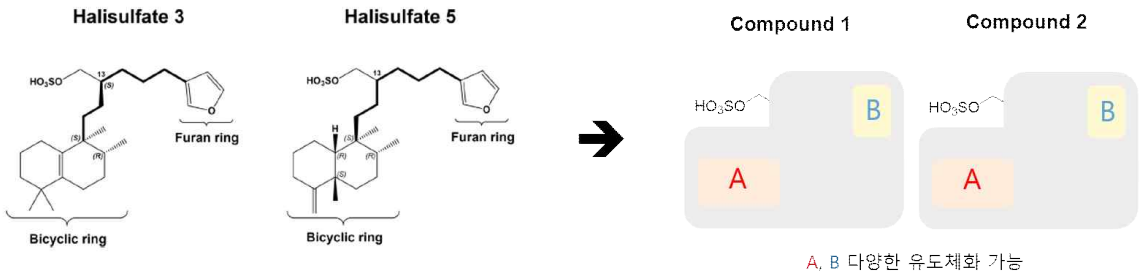


그림. Halisulfate 유도체 설계

- 추후 halisulfate 유도체를 확보하고 class C β-lactamase에 대한 저해 활성 증진 및 물성 개선 여부를 확인할 예정.

3) CMY-10 peptide inhibitor 설계

- 단백질 결정구조 분석결과, 타겟 단백질의 active site와 상호작용하여 packing을 형성하는

N-terminal peptide가 정제 목적으로 삽입한 histidine tag sequence (MHHHHHH) 인 것을 확인함.

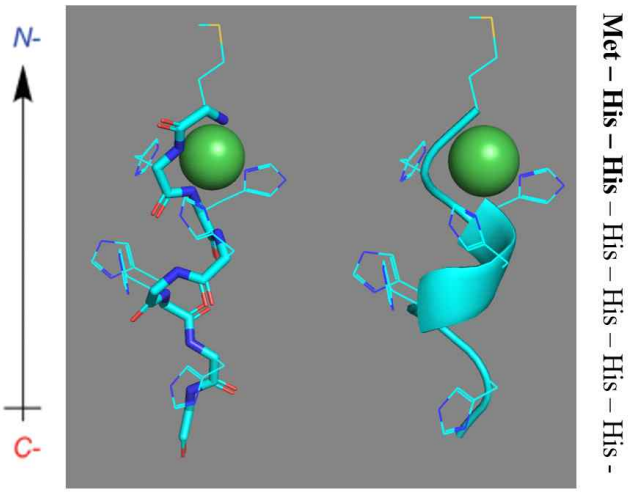


그림. CMY-10의 N-terminus 구조와 서열

- 안정적인 펩타이드 확보를 위해 서열 앞뒤로 ‘Glycine’을 추가하여 ‘GMHHHHHHG’ 서열의 peptide를 설계함 (그림 36).

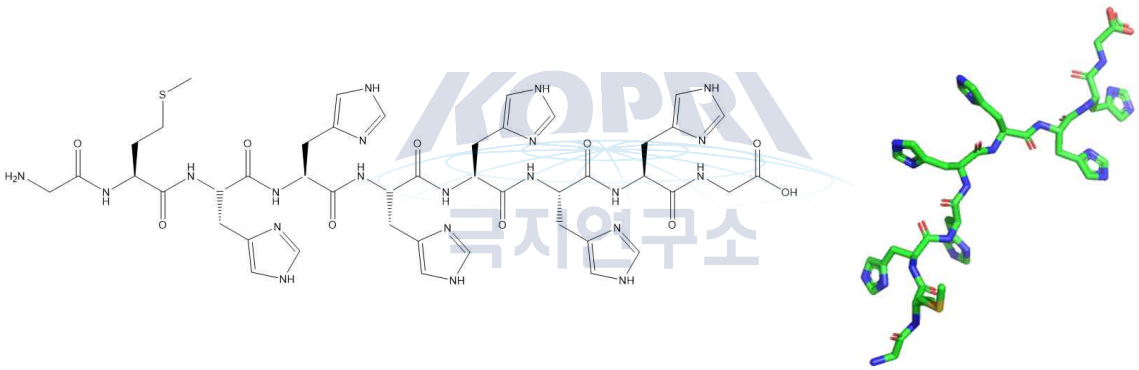


그림. 설계한 peptide의 2차 구조(좌) 및 3차 구조(우)

- 차년도에는 His-tag sequence를 제거한 CMY-10 단백질과 설계한 peptide를 확보하여, Isothermal Titration Calorimetry (ITC) 분석, *in vitro* assay, co-crystallization 혹은 *in sillico* docking 등의 방법을 이용해 해당 peptide와 단백질과의 상호작용을 알아보고자 함.

4) 항생제 내성 병원균 (*Acinetobacter baumannii*) 이 가지는 항생제 타겟 단백질인 Trx2의 결정구조 분석 (IUCrJ. in review) (극지연, 중앙대)
- 항생물질 개발의 타겟 단백질인 AbTrx2 단백질의 삼차구조 해석
- AbTrx2 단백질은 전형적인 Trx fold외에 새로운 Zinc finger domain을 가지는 Trx family임.
- AbTrx2 단백질의구조 정보는 새로운 항생물질 개발에 중요한 정보 제공

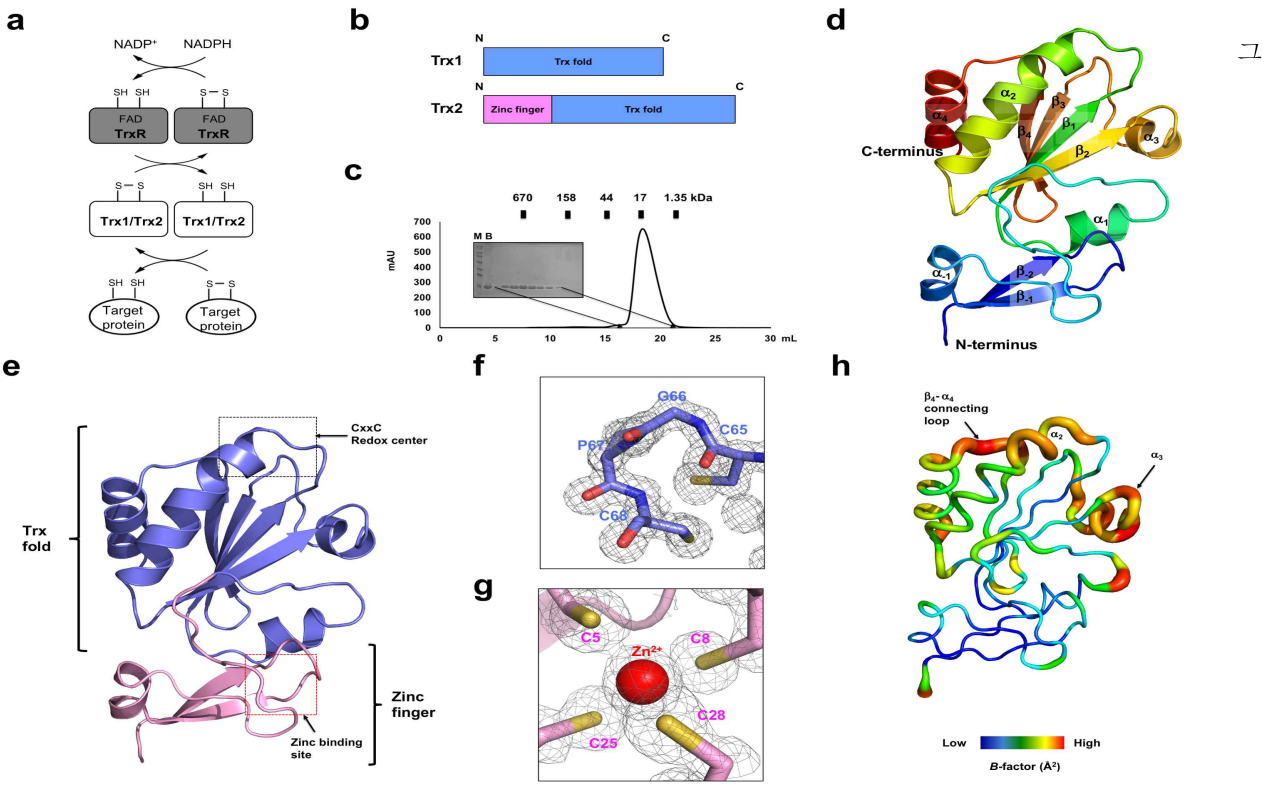


그림. AbTrx2의 3차구조. Zinc finger domain의 Zn의 분석

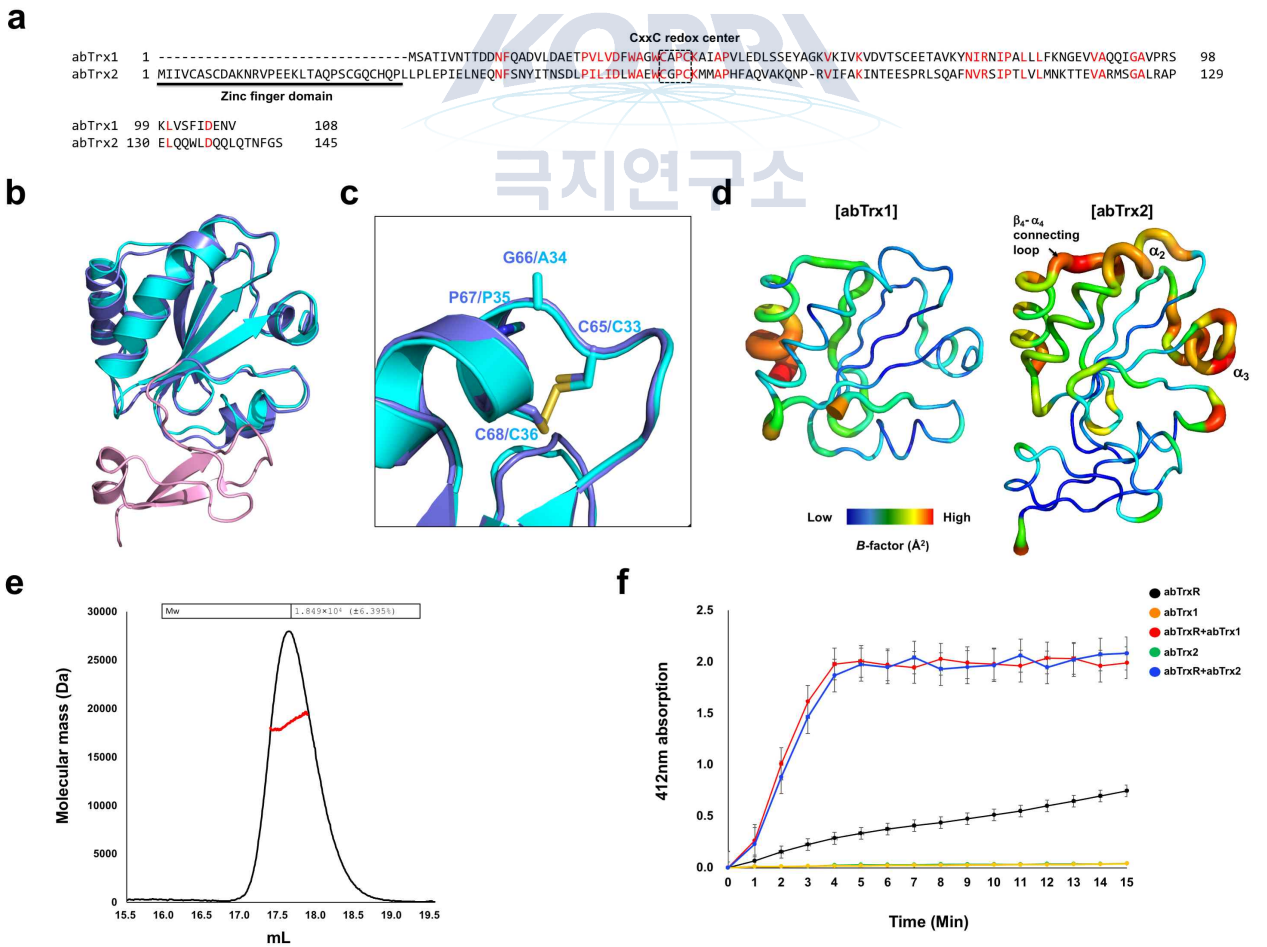


그림. AbTrx2와 AbTrx1의 구조와 활성 비교 분석

KOPRI 극지연구소

a

Species	PDB Code	RMSD (Å)/	# of aligned residues	Active site status	Identity (%)
Rhodobacter capsulatus	2PPT	1.3	141/143	Reduced	32
Yersinia pestis	3P2A	1.6	140/144	Oxidized	38
Deinococcus radiodurans	7D6L	2.3	118/142	Oxidized	27

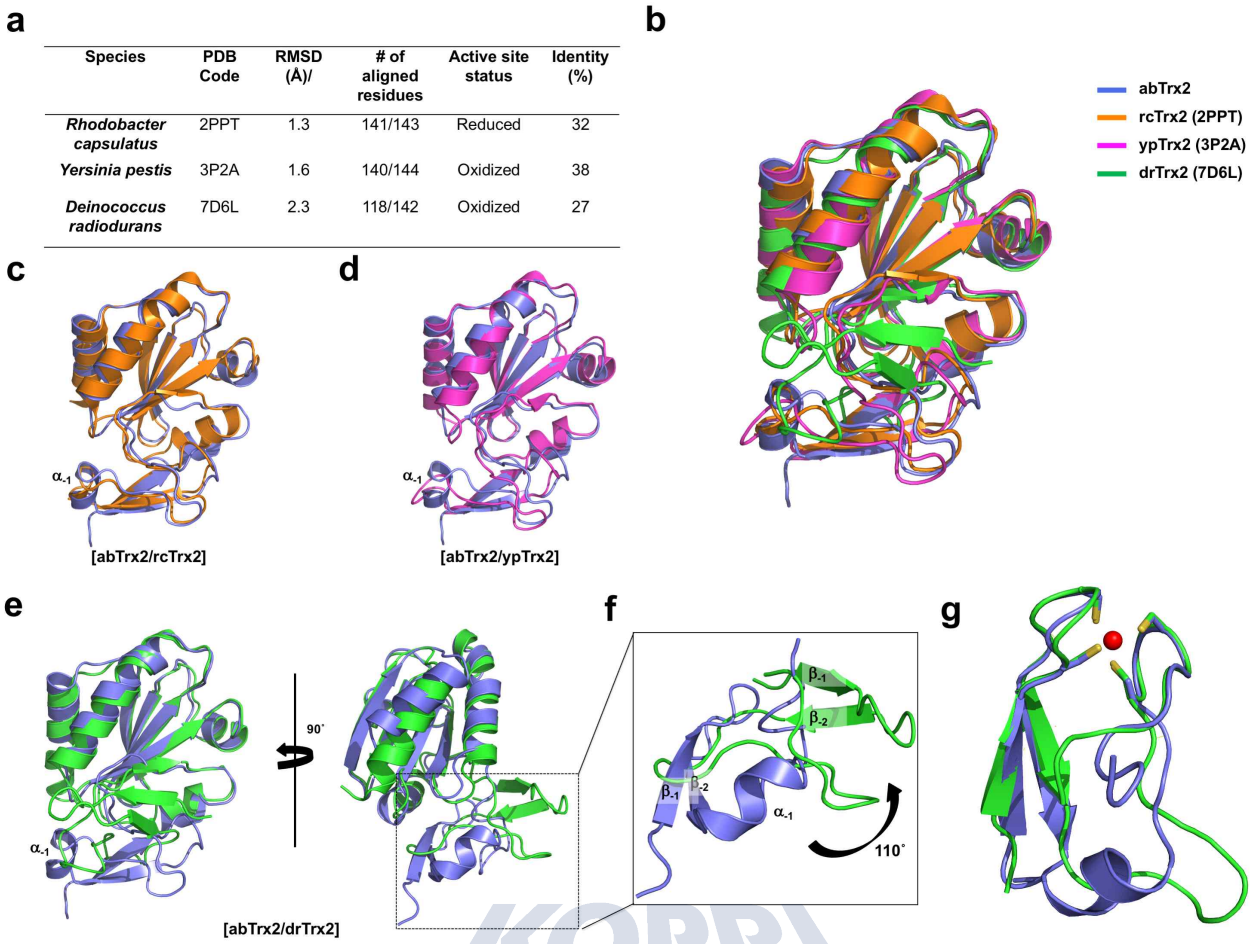


그림. AbTrx2와 다른 유사구조의 비교분석. Zn finger domain의 로테이션을 통한 이부분의 open close form의 존재를 동정함.

KOPRI 극지연구소

a

```
abTrx2   1  ---------MIIVCASCDAKNRVPEEKLTAQPSCGQCHQPLLPLEPIELNEQNFSNVITNSDLPILIDLWAEWCGPCKMMAPHFAQVAKQNP-RVIFAKINTEESPRLSQAFNVRSIPTLVLMNKTTEVA  120
RcTrx2   1  MMGAKMAESLRLTCLACGQANKVPSDRLAAGPKCGICGAGLITGKVAGIDPAILAR-AERDDLPLLVDFWAPWCGPCRQMAPQFQAAAATLAGQVRLAKIDTQAHPAVAGRHRIQGIPAFILFHKGRELA  129
YpTrx2   1  ---------MNTVCTACMATNRLPEERIDDGAKCGRCGHSLFDGEVINATAETLDK-LLQDDLPMVIDFWAPWCGPCRSFAPIFAETAAERAGKVRFVKVNTEAEPALSTRFRIRSIPTIMLYRNGKMID  120
EcTrx2   1  ---------MNTVCTHCQAINRIPDDRIEDAAKCGRCGHDLFDGEVINATGETLDK-LLKDDLPVVIDFWAPWCGPCRNFAPIFEDVAQERSGKVRFVKVNTEAERELSSRFGIRSIPTIMIFKNGQVVD  120
DrTrx2   1  -MHHHHHHSDILTCTHCQAKNRVGAVPAGQVPSCARCGAALPWLH--DGTDATFEQ-DLQTSVPVLVDFWAPWCGPCRVMGPVLEDLARDLPGKVRVVKVNVDENPRTAARFEVRSIPTLLMFKDGEEVD  126
                          * *                 * *

abTrx2 121 RMSGALRAPELQQWLDQQLQTNFGS  145
RcTrx2 130 RAAGARPASELVGFVRGKLGARA    152
YpTrx2 121 MLNGAVPKAPFDNWLDEQLSRDPNS  145
EcTrx2 121 MLNGAVPKAPFDSWLNESL        139
DrTrx2 127 QMVGVTQKAALRARVEHLNQLS     148
```

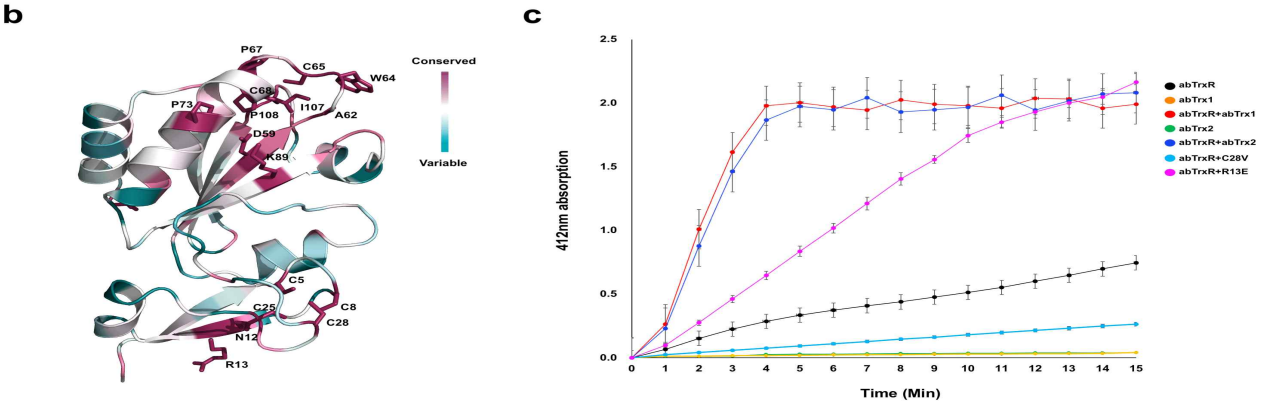


그림. Zn finger domain이 Trx2의 Trx 기능에 중요함을 뮤테이션 실험으로 증명함

5) 극지 어류에서 중요한 면역신호 메게단백질인 TRAF4를 동정하고 구조분석 연구를 함 (Fish and Shell Fish Immunoloty (분야 상위 5 % 논문) 2022 In press) (극지연, 중앙대)

- 극지어류에서 동정한 면역신호 단백질의 삼차구조 해석
- TRAF4 단백질과 결합하는 혈소판 수용체를 극지어류에서 발견 실제 결합을 밝힘으로써 TRAF4 메게 혈소판, 면역 신호전달을 이해함.

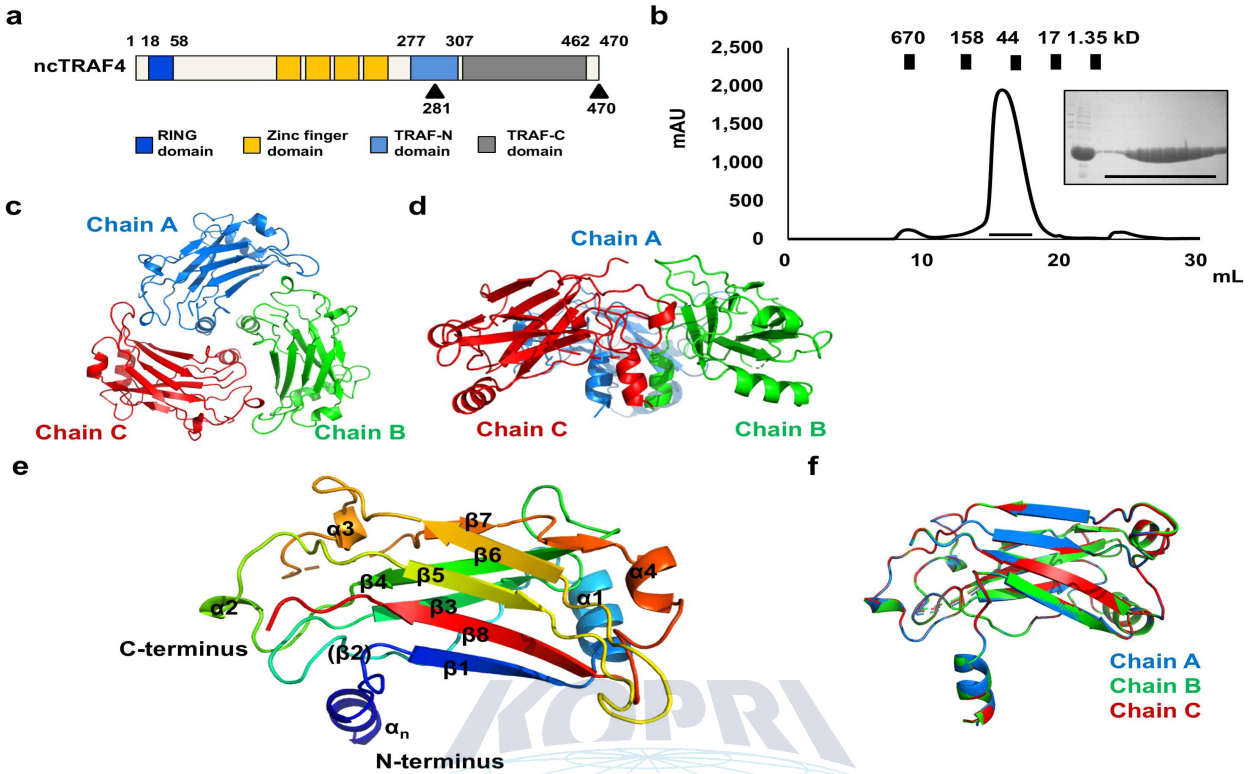


그림. NcTRAF4 단백질의 삼차구조 모습과 용액 상에서의 trimer 형성 확인

KOPRI 극지연구소

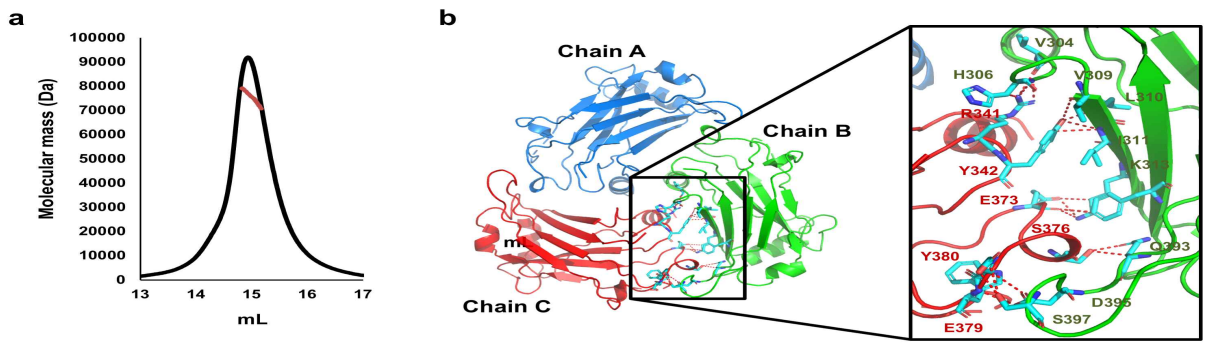


그림. NcTARF4 단백질의 trimer 구조 형성에 중요한 부위 확인

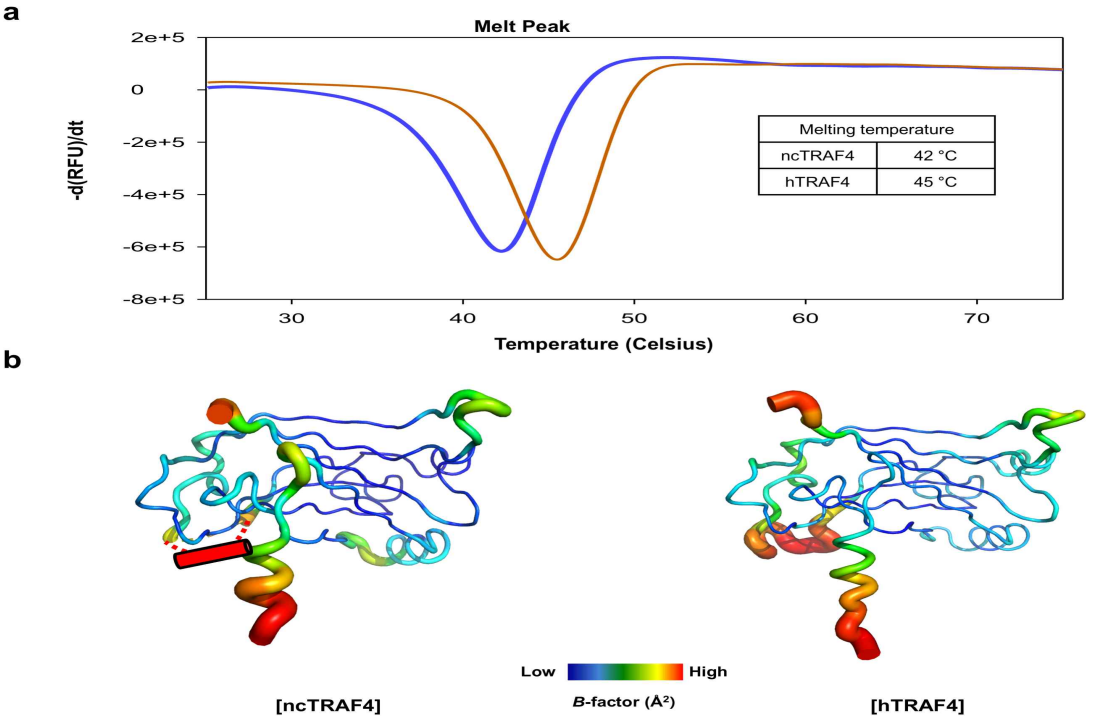


그림. 극지 생물의 TRAF4가 인간 TRAF4보다 불안정한 것을 확인. 이를 통한 추운환경에 단백질의 적응성 설명

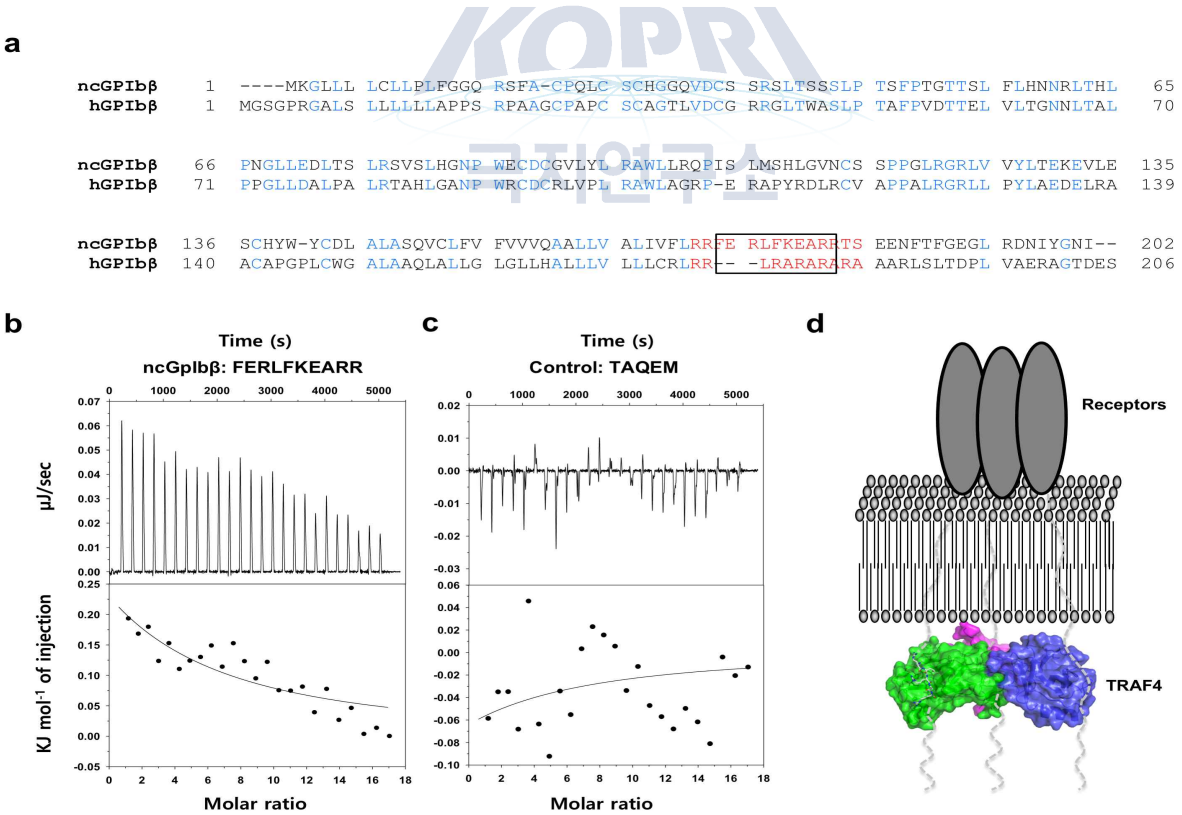


그림. 혈소판수용체에서 NcTRAF4와 결합하는 부위 동정후 실제 결합을 ITC로 확인. 이를 통한 TRAF4매개 신호전달 모델 제시

※4차년도: 2023년 결과

<1세부> 극지 및 해양유래 희귀 생물자원 확보

가. 극지유래 항생물질 생산 후보 미생물 배양 (극지연)

1) 항생물질 생산 후보 미생물 스크리닝

- 항생물질 생산 후보 미생물 스크리닝을 위하여 남극 킹조지섬 바톤반도 및 포터반도의 호수를 대상으로 미생물 순수분리 배양을 수행하였음. 그 결과 총 14종의 64 균주를 확보하였음. 바톤반도 호수에서는 총 12종의 56균주가 확인되었고, 포터반도 호수의 경우 2종 8균주를 확보하였음. 확보된 균주의 동정결과는 아래의 표와 같음.

표 27. 남극 킹조지섬 바톤반도와 포터반도 호수 유래 세균 배양체 동정결과

Identification					No of strians		Total
Phylum	Class	Order	Family	Species	Potter Peninsula	Barton Peninsula	
Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	Micrococcaceae	*Pseudarthrobacter psychrotolerans*		11	11
				Pseudarthrobacter scleromae		2	2
				Pseudarthrobacter humi		3	3
				Arthrobacter oryzae		18	18
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	*Brevundimonas mongoliensis*		4	4
	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	*Polaromonas eurypsychrophila*		4	4
	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas laurylsulfatiphila*		2	2
				Pseudomonas antarctica		3	3
				Pseudomonas alvandae		2	2
				Pseudomonas piscicola		1	1
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Flavobacterium frigidarium*		5	5
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	*Paenisporosarcina indica*		1	1
			Bacillaceae	*Bacillus mycoides*	7		7
				Bacillus infantis	1		1
Total					8	56	64

- 남극 스틱스 빙하 시료에서 확보한 총 145균주의 진균 배양체에 대하여 신규 항생물질 생산 후보 미생물을 스크리닝을 진행하고자 함. 남극 스틱스 빙하시료에서 확보된 진균 균주의 동정 결과는 아래의 표와 같음. 빙하 진균 배양체 대상 실험은 해양수산부의 “극지활동 기반시설(남극세종과학기지) 공동활용사업” 내 연구 개발 과제인 “빙권 내 진균의 특성 및 기후변화로 인한 노출이 주변 환경에 미치는 영향 규명(PE23931-360-050101001, 연구책임자 서울대학교 임영운)”과 공동으로 진행할 예정임.

표 28. 남극 스틱스 빙하 유래 진균 배양체 동정결과

Identification				No of strians according to the isolation source				Total
				Styx glacier				
Division	Class	Order	Family	Species	10m	50m	100m	150m	
Ascomycota	Dothideomycetes	Cladosporiales	Cladosporiaceae	*Cladosporium* cf. *cladosporioides*	1				1
				Cladosporium halotolerans	1		1		2
				Cladosporium omanense	1				1
				Cladosporium sp.			1	1	2
		Mycosphaerellales	Teratosphaeriaceae	*Aeroaotinum crateriforme*				1	1
				Aeroaotinum sp.				1	1
				Recurvomyces mirabilis	1				1
				Teratosphaeriaceae sp.				1	1
		Pleosporales	Didymellaceae	*Phoma* sp.				1	1
			Lophiotremataceae	*Lophiotrema macrostomum*	1				1
				Neovagmatispora sp.			1		1
				Periconia sp.		1			1
		Venturiales	Sympoventuriaceae	*Scolecobasidium tshawytschae*	1				1
		In cortice cedit		*Sclerostagonospora* sp.		1			1
				Trisetosphaeria sp.			1		1
	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	*Aspergillus sydowii*			1		1
				Penicillium cf. *antarcticum*				1	1
				Penicillium cf. *brevicompactum*			1		1
				Penicillium cf. *citreonigrum*				1	1
				Penicillium cf. *citrinum*		1	1	1	3
				Penicillium cf. *johnbiggsii*	1	1			2
				Penicillium cf. *ruberes*				1	1
				Penicillium thermotolerans				1	1
				Penicillium citrinum	1	1	1	1	4
			Trichocomaceae	*Talaromyces* cf. *dendriticus*			1		1
				Talaromyces variabilis	1				1
		In cortice cedit		*Metarhizium* sp.	1				1
	Leotiomycetes	Helotiales	Pezizellaceae	*Chalara holubovae*				1	1
		In cortice cedit		*Leotiomycetes* sp1			1		1
				Leotiomycetes sp2	1				1
	Sordariomycetes	Amphisphaeriales	Apiosporaceae	*Arthrinium phaeospermum*	1				1
		Annulatascales	Annulatascaceae	*Rhamphoria breei*	1	1			2
				Rhamphoria sp.	1				1
		Diaporthales	Diaporthaceae	*Diaporthe* sp.			1		1
		Glomerellales	Glomerellaceae	*Colletotrichum boninense*		1			1
		Hypocreales	Bionectriaceae	*Clonostachys rosea*			1	1	2
			Nectriaceae	*Fusarilli violacea*	1				1
			Clavicipitaceae	*Metarhizium* sp.			1		1
			Cordycipitaceae	*Paramycotentium album*			1		1
				Parengyodontium cf. *album*				1	1
			Stachybotryaceae	*Stachybotrys chartarum*			1		1
		In cortice cedit		*Trichothecium roseum*		1			1
		Xylariales	Diatrypaceae	*Peroneutypa heterodoxa*			1		1
				Peroneutypa scoparia		1	1	1	3
				Peroneutypa sp1		1	1		2
				Peroneutypa sp2		1	1		2
				Peroneutypa sp3			1		1
			Zygosporiaceae	*Zygosporium pseudoglobum*		1			1
Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Entolomataceae	*Clitopilus hobsonii*				1	1
			Schizaphyllaceae	*Schizaphyllum commune*			1	1	2
			Tricholomataceae	*Clitocybe nebularis*			1		1
				Leucocalocybe gigantea		1	1		2
		Auriculariales	Exidiaceae	*Basidiodendron* sp.		1			1
		Corticiales	Corticiaceae	*Laetisaria* sp.	1				1
				Sistotrema sp.		1			1
			Punctulariaceae	*Punctularia strigosozonata*				1	1
		Hymenochaetales	Chaetoporellaceae	*Knoffiella* sp.			1	1	2
			Hymenochaetaceae	*Fuscoporia gilva*	1	1			2
				Fuscoporia gilvoides	1				1
				Hydnoporia tenuiculae			1	1	2
			Rickenellaceae	*Peniophorella pubera*	1		1		2
			Schizoporaceae	*Xylodon ovisporus*	1			1	2
				Xylodon subflavipurus			1	1	2
		Polyporales	Fomitopsidaceae	*Rhodofomitella rosigna*		1			1
			Hyphodermataceae	*Hyphoderma subtestaceum*		1			1
			Incrustoporiaceae	*Tyromyces chionea*		1			1
				Tyromyces sp1	1				1
			Ipsiaceae	*Ipsia cf. lacerans*				1	1
				Ipsia cf. lucina			1		1
				Ipsia lacerans	1	1			2
				Ipsia lucina				1	1
				Ipsia sp1				1	1
			Meruliaceae	*Flavodon flavus*			1		1
				Hydnophlebia subchrysorhiza	1				1
				Mycoacia livida	1	1			2
				Mycoacicella cf. *efibulata*			1		1
				Phlebia acerina	1	1	1	1	4
				Phlebia tremellosa	1				1
			Phanerochaetaceae	*Bjerkandera adusta*	1	1		1	3
				Phanerochaete cf. *sordida*	1				1
				Phanerochaete concrescens	1	1			2
				Phanerodontia nuginatae				1	1
				Phlebiopsis cf. *himalayensis*				1	1
				Phlebiopsis cf. *pilatii*				1	1
				Phlebiopsis himalayensis				1	1
				Phlebiopsis pilatii				1	1
				Porostereum cf. *spadiceum*		1	1	1	3
			Polyporaceae	*Cerrigrapsis fimbriata*			1		1
				Cerrena unicolor				1	1
				Trametes coccinea	1		1		2
				Trametes cubensis	1				1
				Trametes versicolor	1		1	1	3
				Tyromyrum albellinum				1	1
		Russulales	Peniophoraceae	*Peniophora* cf. *incarnata*				1	1
				Peniophora incarnata				1	1
				Peniophora sp1				1	1
				Peniophora sp2			1	1	2
				Peniophora sp3				1	1
				Peniophora sp4			1	1	2
				Peniophora sp5				1	1
			Stereaceae	*Stereum hirsutum*	1				1
				Stereum ostrea				1	1
				Stereum subtomentosum	1				1
		Sistotrematales	Sistotremastraceae	*Sistotremastrum guttuliferum*	1				1
	Exobasidiomycetes	Robbauerales	Robbaueraceae	*Robbauera albescens*		1	1	1	3
	Ustilaginomycetes	Ustilaginales	Ustilaginaceae	*Moesziomyces antarcticus*		1			1
			Total		33	26	38	46	145

KOPRI
극지연구소

Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Entolomataceae	*Clitopilus hobsonii*
			Schizophyllaceae	*Schizophyllum commune*
			Tricholomataceae	*Clitocybe nebularis*
				Leucopaxillus giganteus
		Auriculariales	Exidiaceae	*Basidiodendron* sp.
		Corticiales	Corticiaceae	*Laetisaria* sp.
				Sistotrema sp.
			Punctulariaceae	*Punctularia strigosozonata*
		Hymenochaetales	Chaetoporellaceae	*Kneiffiella* sp.
			Hymenochaetaceae	*Fuscoporia gilva*
				Fuscoporia gilvoides
				Hydnoporia yasudae
			Rickenellaceae	*Peniophorella pubera*
			Schizoporaceae	*Xylodon ovisporus*
				Xylodon subflaviporus
		Polyporales	Fomitopsidaceae	*Rhodoantrodia tropica*
			Hyphodermataceae	*Hyphoderma subtestaceum*
			Incrustoporiaceae	*Tyromyces chioneus*
				Tyromyces sp.
			Irpicaceae	*Irpex* cf. *laceratus*
				Irpex cf. *lacteus*
				Irpex laceratus
				Irpex lacteus
				Irpex sp1
			Meruliaceae	*Flavodon flavus*
				Hydnophlebia subchrysorhiza
				Mycoacia livida
				Mycoaciella cf. *efibulata*
				Phlebia acerina
				Phlebia tremellosa
			Phanerochaetaceae	*Bjerkandera adusta*
				Phanerochaete cf. *sordida*
				Phanerochaete concrescens
				Phanerodontia magnoliae
				Phlebiopsis cf. *himalayensis*
				Phlebiopsis cf. *pilatii*
				Phlebiopsis himalayensis
				Phlebiopsis pilatii
				Porostereum cf. *spadiceum*
			Polyporaceae	*Ceriporiopsis fimbriata*
				Cerrena zonata
				Trametes coccinea
				Trametes ochracea
				Trametes versicolor
				Trichaptum abietinum
		Russulales	Peniophoraceae	*Peniophora* cf. *incarnata*
				Peniophora incarnata
				Peniophora sp1
				Peniophora sp2
				Peniophora sp3
				Peniophora sp4
				Peniophora sp5
			Stereaceae	*Stereum hirsutum*
				Stereum ostrea
				Stereum subtomentosum
		Sistotrematales	Sistotremastraceae	*Sistotremastrum guttuliferum*
	Exobasidiomycetes	Robbauerales	Robbaueraceae	*Robbauera albescens*
	Ustilaginomycetes	Ustilaginales	Ustilaginaceae	*Moesziomyces antarcticus*
Total				

KOPRI 극지연구소

나. 유용균주 발굴을 위한 해양미생물 스크리닝 및 항생물질 분리정제 (KIOST)

1) 해양미생물 분리를 위한 시료(해양퇴적토 18점) 채집

2) 채집된 시료로부터 해양미생물 172주 분리 및 동정 후 보관

표. 2022~2023년 해양미생물 분리를 위한 채집지역, 시료종류 및 분리된 균주 수

연차	채집지역	채집기간	시료종류		분리된 균수
4차년도 (2023)	제주도 해변	2022.10.20.~10.21	해양퇴적토	5점	98주
		2023.04.19.~04.22	해양퇴적토	13점	74주

그림. 2022년 해양시료로부터 분리된 해양미생물들의 사진.

3) 유용균주로 선정된 *Streptomyces griseorubens*의 배양액으로부터 이차대사산물의 분리 및 정제

- 2210JJ-087 균주는 16S rRNA 서열분석을 이용한 동정 결과, *Streptomyces griseorubens*로 확인됨.
- 대량 배양 후, 배양액을 연속원심분리기를 이용하여 균체와 배양액으로 분리하고 배양액을 Ethyl Acetate로 추출한 후에 Reversed-Phase Flash Column Chromatography 및 HPLC를 이용하여 균주가 생성하는 이차대사 산물을 순수하게 분리 및 정제.

KIOST 극지연구소

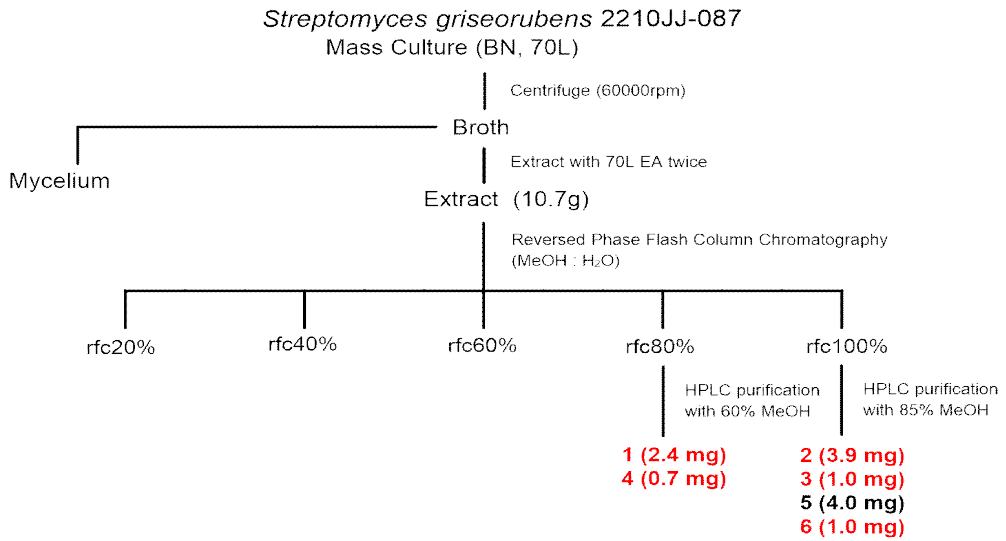


그림. *Streptomyces griseorubens* 배양액으로부터 화합물의 분리 및 정제 과정.

- rfc 80%과 분획물에서 C18 컬럼을 장착한 역상 HPLC를 이용하여 2종의 활성물질을 분리하였으며, rfc 100% MeOH 분획으로부터 역상 HPLC를 이용하여 4종류의 물질을 순수하게 분리하였음.

4) 화합물 6종의 구조 규명

- 분리된 화합물 6종을 HR-ESIMS 및 NMR 분석을 통하여 이들의 구조를 규명하였음.
- 6종의 화합물들은 diterpenoid 계열 물질로 확인되었으며 데이터베이스 검색 결과, 5종이 신규 화합물(붉은색으로 표시)로 판명되었음.

KOPRI 극지연구소

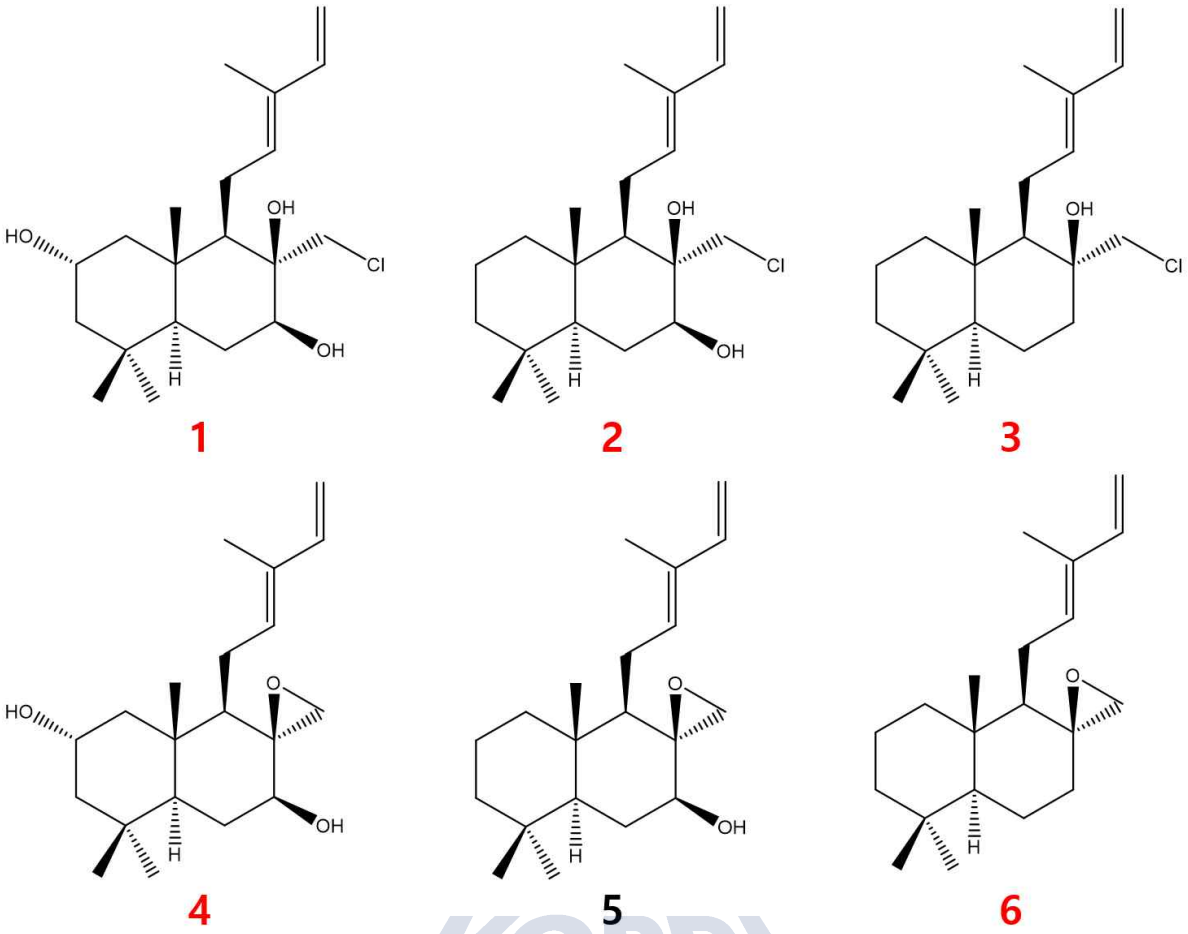


그림. 분리된 화합물 1-6의 구조.

KOPRI 극지연구소

5) 신규 화합물 1의 구조 분석

- 신규 화합물 1은 연녹색의 가루 형태로 분리되었으며, 고분해능 질량분석기(HR-ESIMS)와 ^{13}C NMR 스펙트럼의 해석을 통해, 화합물 1의 분자식 $C_{20}H_{33}ClO_3$와 분자량 356(m/z 379.2012 $[M+Na]^+$, calcd 379.2010, m/z 343.2236 $[M-HCl+Na]^+$, m/z 325.2278 $[M-HCl-H_2O+Na]^+$)을 결정하였음. 또한 m/z 379.2012와 381.1996의 3 : 1 피크 비율을 통해 한 개의 Cl원자의 존재를 예상하였음.

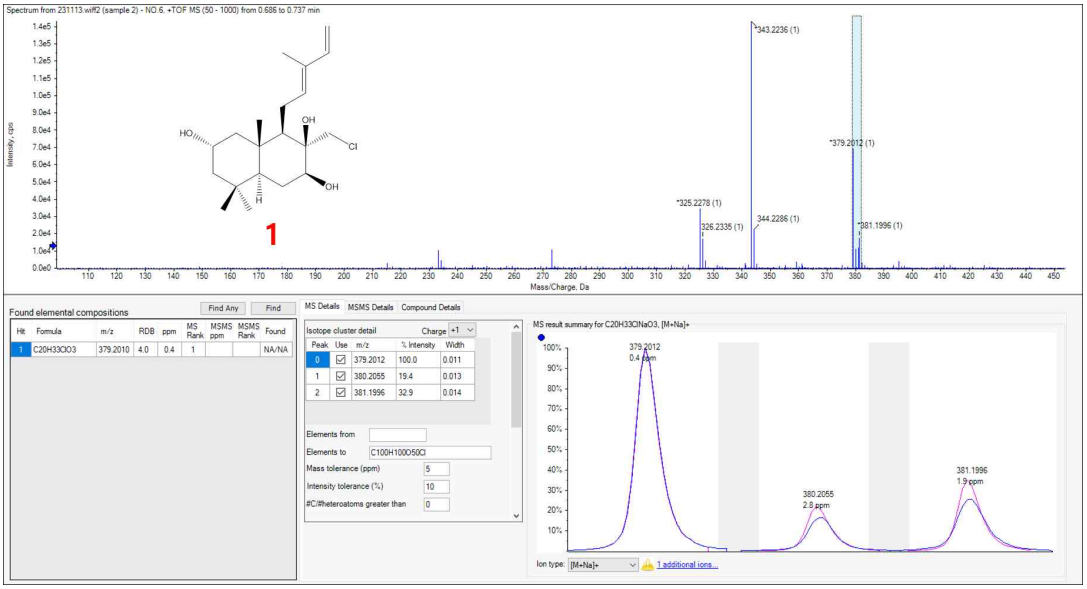


그림. 신규 화합물 (1)의 구조와 HR-ESI-MS 분석 자료.

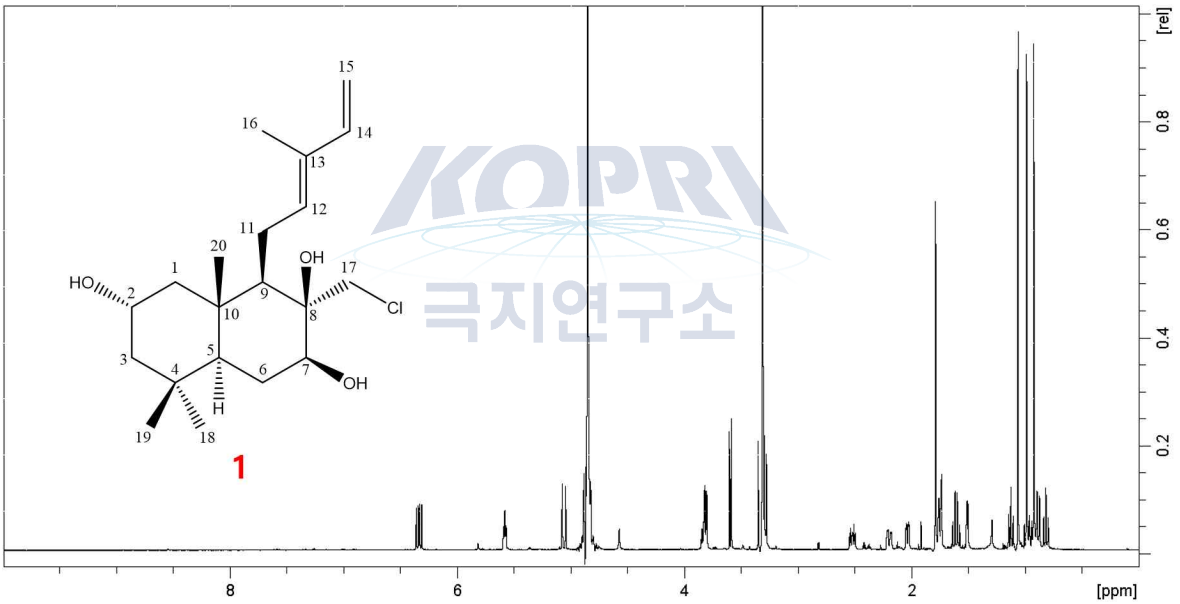


그림. 신규 화합물 (1)의 ^{1}H NMR 스펙트럼 (600 MHz, CD_3OD).

KOPRI 극지연구소

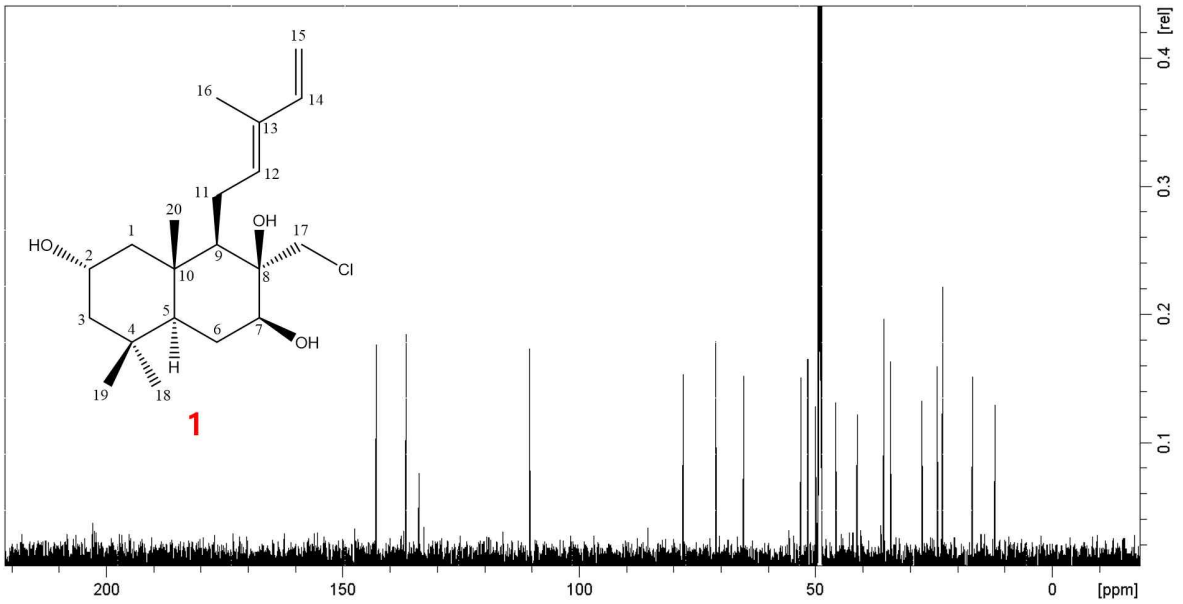


그림. 신규 화합물 (1)의 ^{13}C NMR 스펙트럼 (150 MHz, CD_3OD).

- ^{1}H NMR spectrum의 해석을 통해, 신규 화합물 1은 4개의 olefinic 수소 H-14(δ_H 6.33, dd), H-12(δ_H 5.58, dd), H-15a(δ_H 5.06, dd) 및 H-15b(δ_H 4.87, overlaped)와 2개의 oxygenated methine기 수소 H-2(δ_H 3.82, overlaped) 및 H-7(δ_H 3.81, overlaped), 10개의 oxygenated methylene기 수소(δ_H 0.81-3.60), 2개의 methine기 수소 H-9(δ_H 1.50, dd)와 H-5(δ_H 0.88, dd), 4개의 methyl기 수소(δ_H 0.93-1.79)들을 가지는 것을 확인하였음. ^{13}C NMR과 HSQC spectrum의 면밀한 해석을 통해, 분자 내 탄소와 수소의 결합 관계를 확인하고 각각 탄소와 수소의 종류를 확인할 수 있었음. 4개의 olefinic 탄소 C-14(δ_C 142.9), C-12(δ_C 136.5), C-13 (δ_C 133.8), C-15(δ_C 110.4)와, 1개의 oxygenated quaternary 탄소 C-8(δ_C 77.9), 2개의 oxygenated methine기 탄소 C-7(δ_C 71.0) 및 C-2(δ_C 65.1), 2개의 methine기 탄소 C-5(δ_C 53.1)와 C-9(δ_C 53.0), 2개의 quaternary 탄소 C-10(δ_C 41.2) 및 C-4(δ_C 35.5), 5개의 methylene기 탄소(δ_C 24.2-51.6), 4개의 methyl기 탄소(δ_C 12.0-34.1)의 존재를 확인할 수 있었음.

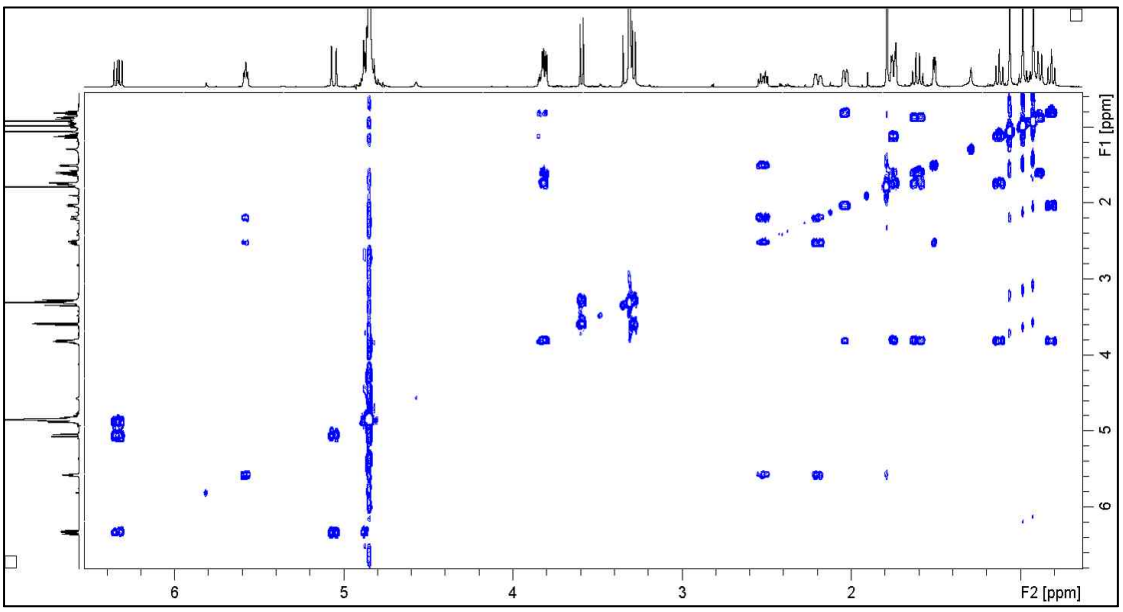


그림. 신규 화합물 (1)의 COSY NMR 스펙트럼 (CD_3OD).

- ^{1}H-^{1}H COSY 상관관계 자료 분석을 통하여, spin-spin 짝지음 하는 수소들의 결합 관계(H-1에서 H-3, H-5에서 H-7, H-9에서 H-12, H-14에서 H-15)를 확인하고 4개의 부분구조들을 해석할 수 있었음. HMBC 상관관계 신호들, 즉 H-3에서 C-4, C-5 그리고 H-20에서 C-1, C-5, C-10을 통해 ring A 부분의 구조를 해석하였으며, HMBC 상관관계 신호들, 즉 H-6에서 C-8 그리고 H-11에서 C-8 그리고 H-20에서 C-9을 통해 ring B의 부분구조가 C-5와 C-10에서 ring A와 연결되는 것을 알 수 있었음. H-14에서 C-12, C-16 그리고 H-16에서 C-12, C-14 사이의 HMBC 상관관계 신호들을 통해 olefinic 탄소를 포함하는 사슬형태의 부분구조를 해석하였으며 side chain이 B링의 C-9에 연결되는 것을 확인할 수 있었음. H-17과 C-8 사이의 HMBC 상관관계 신호와 H-17(δ_H 3.28, 3.60) 및 C-17(δ_C 45.6)의 화학적 이동을 고려하여 Cl 원자와 결합된 C-17 탄소가 C-8 탄소와 연결되는 것을 알 수 있었음. COSY와 HMBC NMR 스펙트럼의 종합적인 분석을 통해, 각 탄소들의 결합 관계를 확인하고 2D NMR의 면밀한 해석을 통해 신규 화합물 1의 전체 평면구조를 결정하였음.

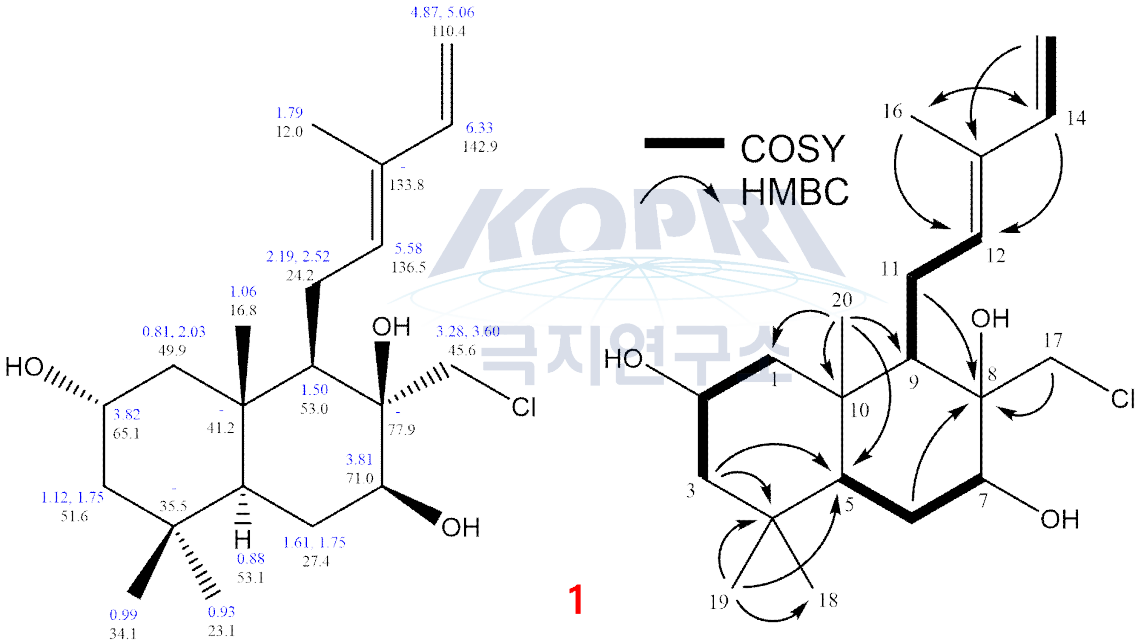


그림. 신규 화합물 (1)의 수소 및 탄소의 화학적 이동값 assignment 및 Key COSY와 HMBC 상관관계.

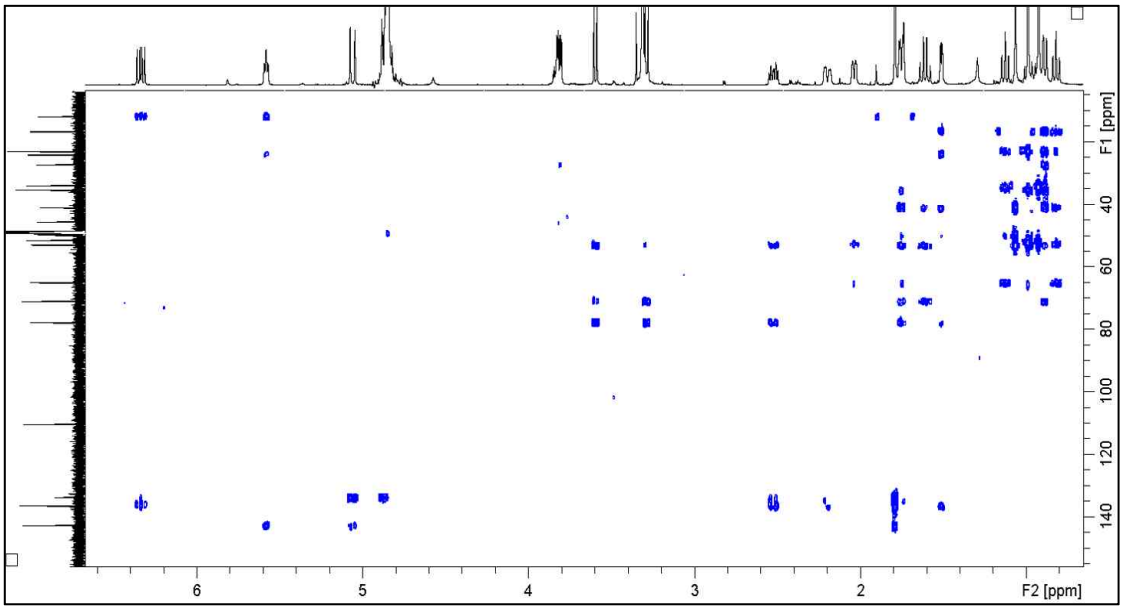


그림. 신규 화합물 (1)의 HMBC NMR 스펙트럼 (CD_3OD).

- 신규 화합물 1의 상대구조는 NOESY 스펙트럼 분석을 통하여 결정하였음. H-9과 H-5, H-7, H-17과의 NOESY 상관관계 및 H-5와 H-7과의 NOE 신호를 통해 해당 수소들이 α-orientated된 평면에 존재한다는 사실을 알 수 있었음. 또한 H-20와 H-2, H-11, H-19과의 NOESY 상관관계를 통해 해당 수소들이 β-orientated된 평면에 존재한다는 사실을 알 수 있었음. 또한 H-12와 H-14과의 NOESY 상관관계를 통하여, Δ^{12}의 *E*-configuration 형태를 확인하였음. 이와 같은 면밀한 NOESY 상관관계 해석을 통하여 최종적으로 입체중심들의 상대구조를 2*S**,5*S**,7*S**,8*R**,9*R**,10*S**으로 결정하였음.

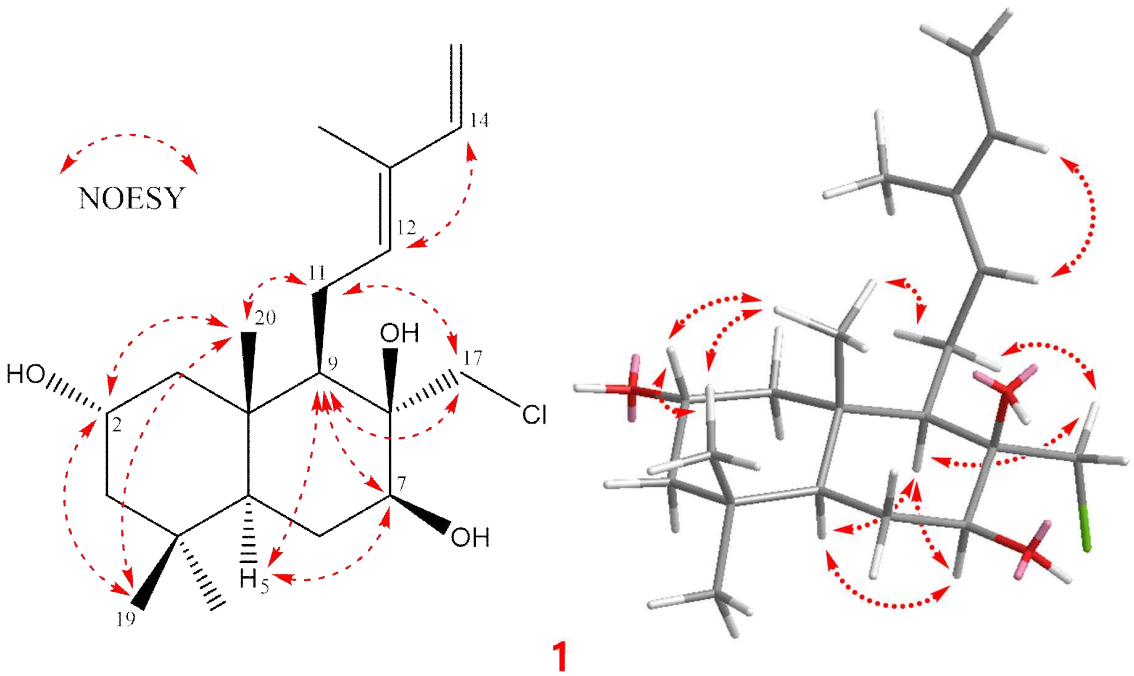


그림. 신규 화합물 (1)의 Key NOESY 상관관계.

- 신규 화합물 1의 절대구조는 변형된 Mosher's method를 이용하여 결정하였음. 화합물 1을 (*S*)-di-MTPA ester형태로 변환시키기 위한 화학반응을 진행하였음. 0.2 mg의 화합물 1을 pyridine 0.5 mL에 녹인 다음, DMAP을 소량 첨가해 주었음. (*R*)-MTPA chloride를 5 μL 첨가하고 혼합물을 실온에서 교반시키면서 14시간 동안 반응시켜 주었음. 반응이 끝난 후에, 질소 가스를 이용하여 건조시키고 20 mL의 ethyl acetate로 추출한 다음, 0.1 M HCl 수용액, 0.1 M $NaHCO_3$ 수용액, 0.1 M NaCl 수용액들과 순서대로 각각 혼합 및 분리하여 work-up 작업을 마쳤음. 다음으로 ^{1}H-NMR, HQSC, ^{1}H-^{1}H COSY NMR들을 측정하여 (*S*)-di-MTPA ester화된 화합물 1a의 화학적 이동값을 분석하였음. 동일한 방법으로 (*S*)-MTPA chloride를 사용하여 (*R*)-di-MTPA ester화된 화합물 1b을 얻고, NMR 측정을 하였음.

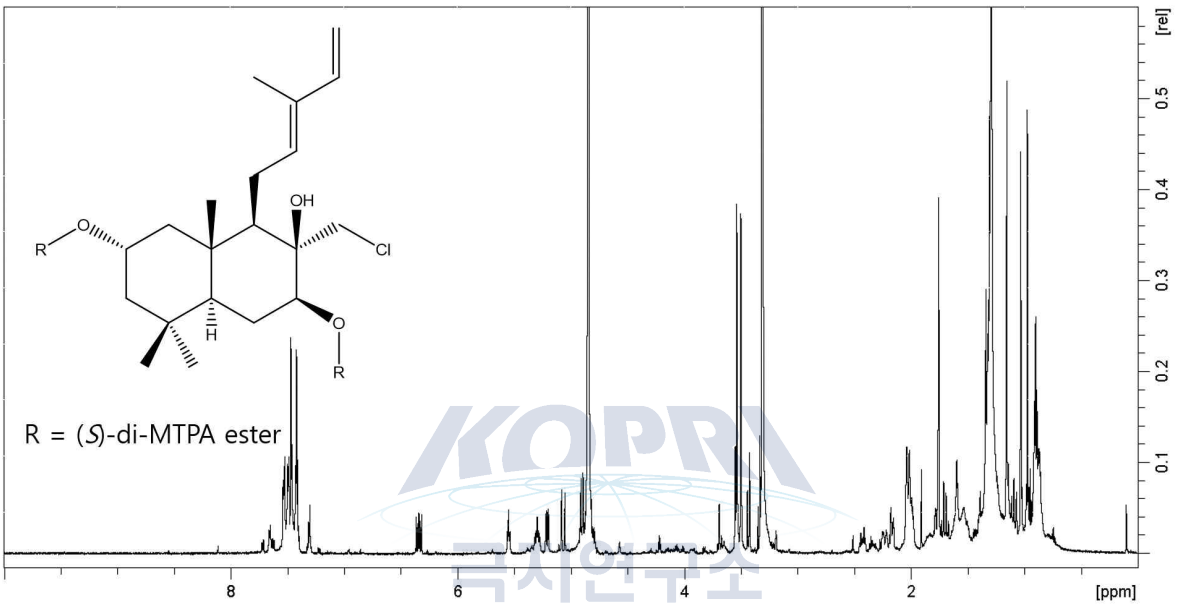


그림. (*S*)-di-MTPA ester화된 화합물 (1a)의 ^{1}H NMR 스펙트럼 (600 MHz, CD_3OD).

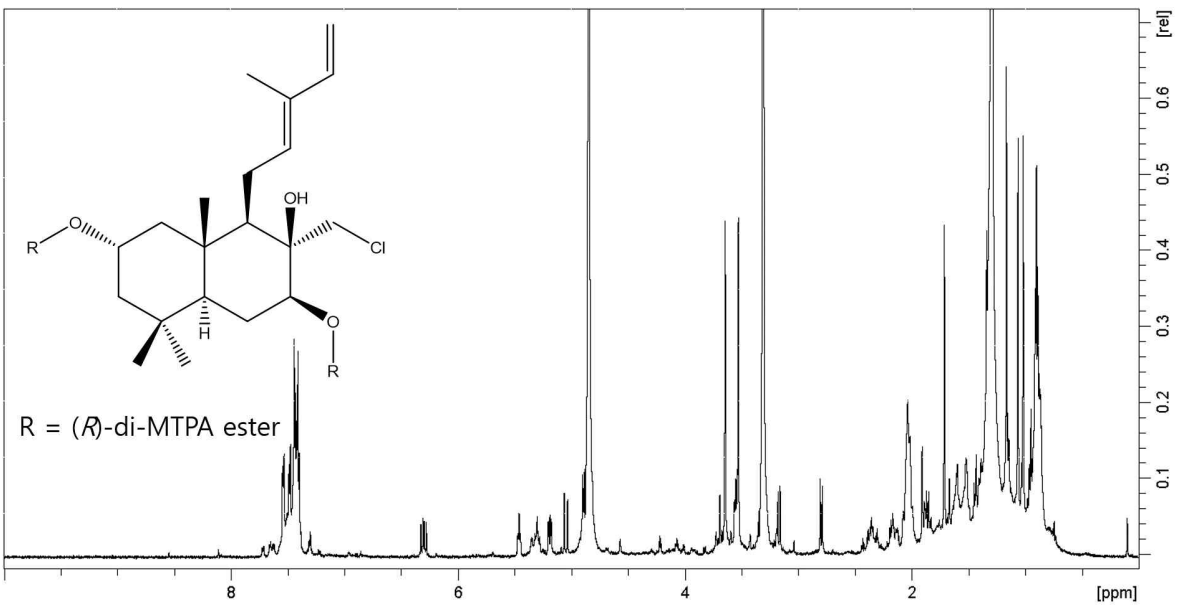
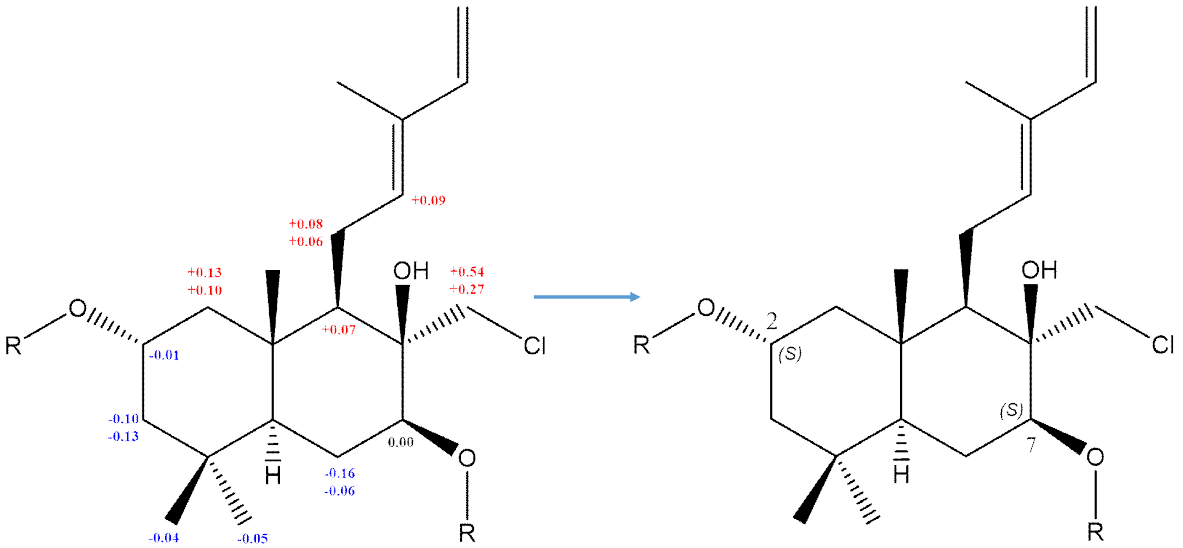


그림. (*R*)-di-MTPA ester화된 화합물 (1b)의 ^{1}H NMR 스펙트럼 (600 MHz, CD_3OD).

- 측정한 ^{1}H-NMR, HQSC, ^{1}H-^{1}H COSY NMR 데이터들을 이용하여 (*S*)-di-MTPA ester화된 화합물 1a과 (*R*)-di-MTPA ester화된 화합물 1b의 화학적 이동값을 각각 구하고 두 값의 차이(1a-1b)를 계산하여 입체중심 C-2와 C-7의 절대구조를 2*S*,7*S*인 것으로 확인하였음. 따라서 신규 화합물 1의 각각의 입체중심들의 절대구조는 2*S*,5*S*,7*S*,8*R*,9*R*,10*S*인 것으로 결정하였음.



$\Delta\delta_H$ = (*S*)-di-MTPA ester δ_H - (*R*)-di-MTPA ester δ_H

R = (*S*)-di-MTPA ester, (*R*)-di-MTPA ester

그림. (*S*)-di-MTPA ester화된 화합물(1a), (*R*)-di-MTPA ester화된 화합물 (1b)의 δ_H 값 차이와 결정된 C-2, C-7위치의 입체중심.

6) 신규 화합물 2의 구조 분석

- 신규 화합물 2는 연녹색의 가루 형태로 분리되었으며, 고분해능 질량분석기(HR-ESIMS)와 ^{13}C NMR 스펙트럼의 해석을 통해, 화합물 2의 분자식 $C_{20}H_{33}ClO_2$와 분자량 340(m/z 363.2054 $[M+Na]^+$, calcd 379.2010, m/z 327.2286 $[M-HCl+Na]^+$)을 결정하였음. 또한 m/z 363.2054와 365.2043의 3 : 1 피크 비율을 통해 신규 화합물 2는 한 개의 Cl원자를 갖은 것으로 예상하였음.

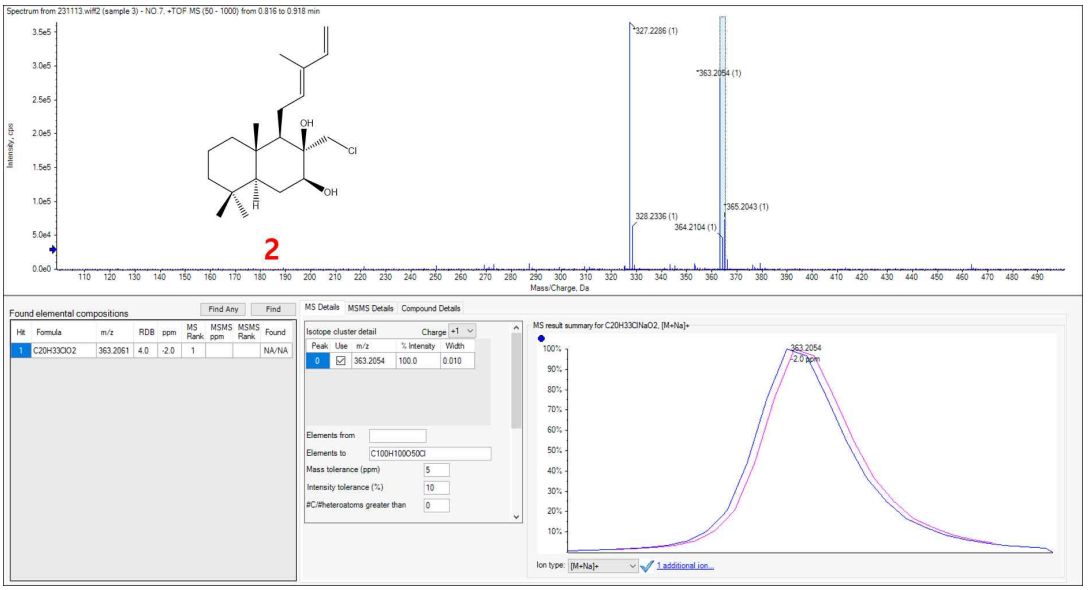


그림. 신규 화합물 (2)의 구조와 HR-ESI-MS 분석 자료.

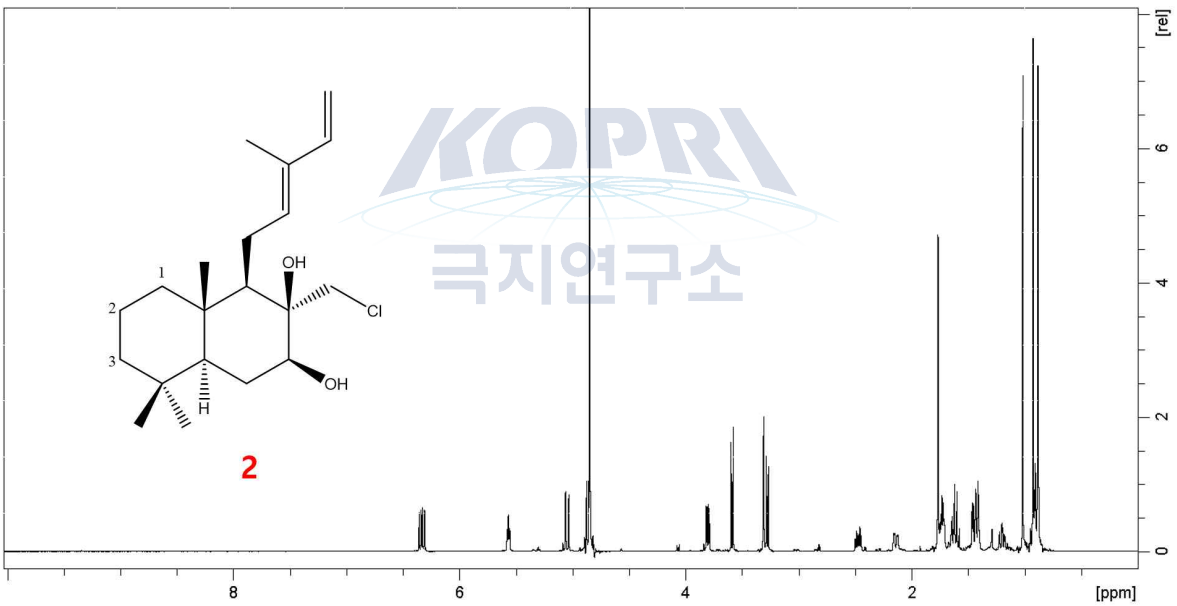


그림. 신규 화합물 (2)의 ^{1}H NMR 스펙트럼 (600 MHz, CD_3OD).

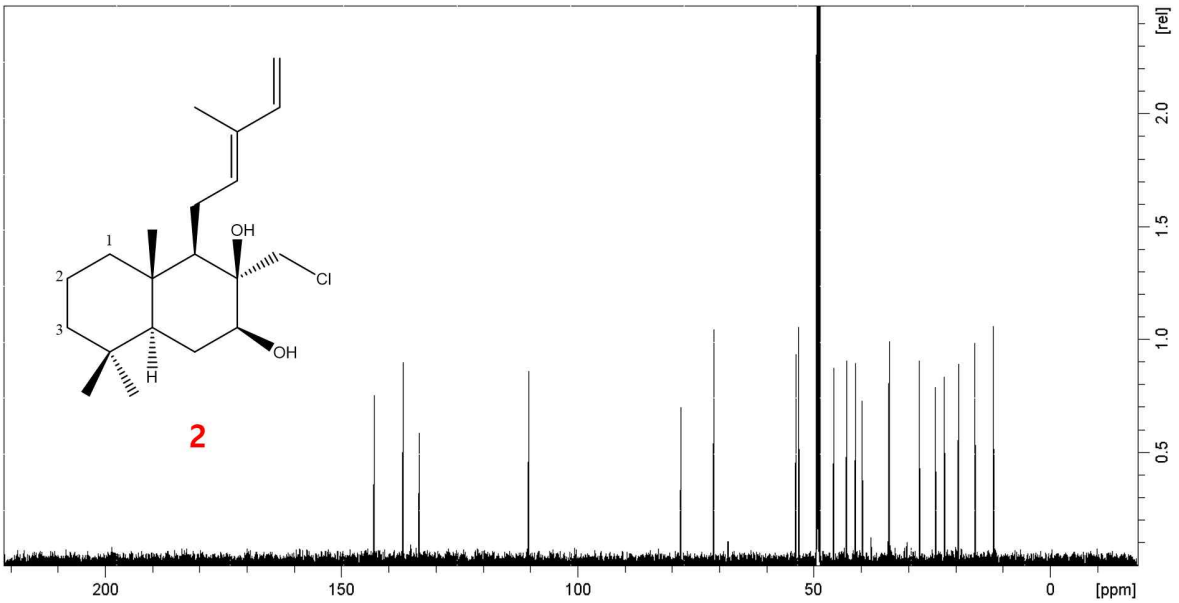


그림. 신규 화합물 (2)의 ^{13}C NMR 스펙트럼 (150 MHz, CD_3OD).

- 신규 화합물 2는 화합물 1과 유사한 ^{1}H와 ^{13}C NMR 스펙트럼 패턴을 가지는 것을 알 수 있었음. HSQC NMR 스펙트럼의 분석을 통해, 화합물 1의 C-2에 위치한 hydroxy기가 화합물 2에서없어지고 methylene기(δ_C 19.4, δ_H 1.42, 1.62)로 치환된 구조를 가지는 것을 알 수 있었음. 질량분석으로 얻은 분자식 $C_{20}H_{33}ClO_2$와 분자량 340 데이터 또한 이러한 사실을 뒷받침하였음. 뿐만아니라 COSY와 HMBC NMR 스펙트럼의 상세한 분석을 통하여 신규 화합물 2의 평면 구조를 규명하였음.

KOPRI 극지연구소

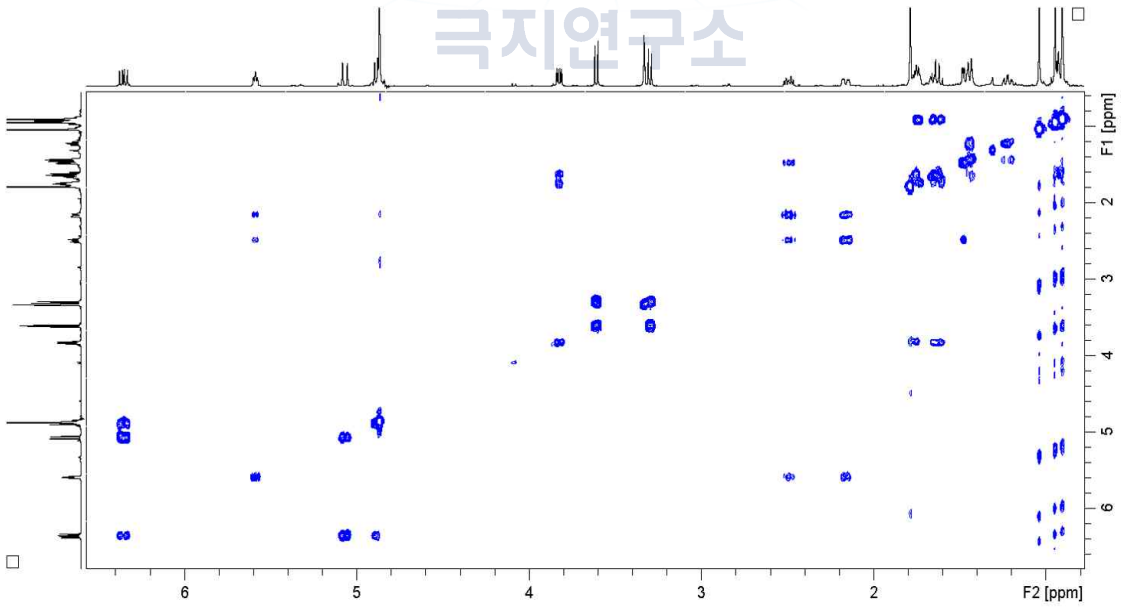


그림. 신규 화합물 (2)의 COSY NMR 스펙트럼 (CD_3OD).

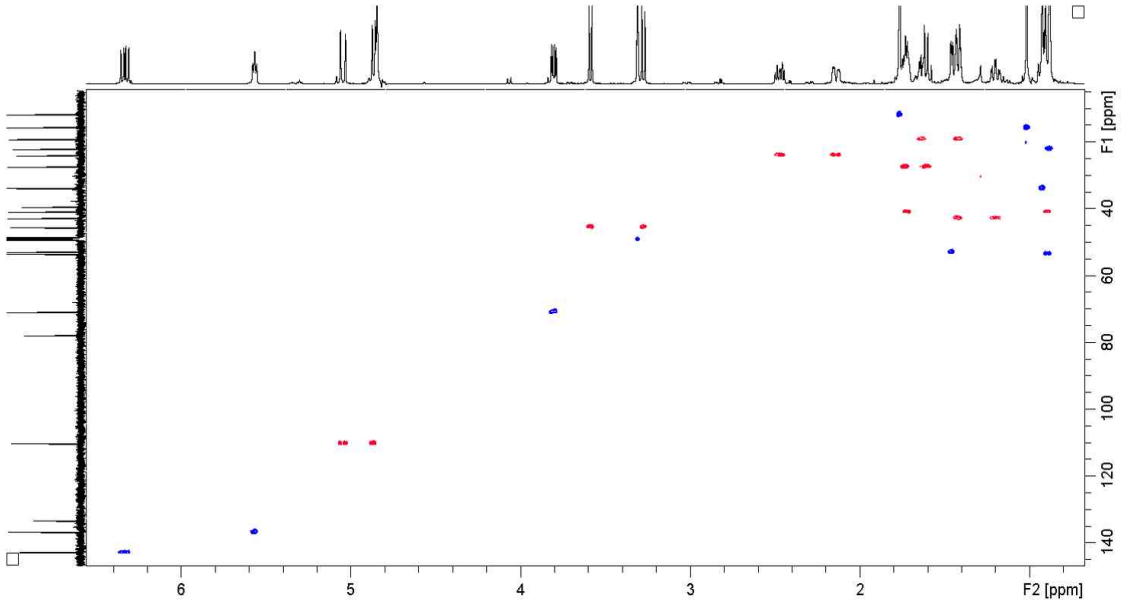


그림. 신규 화합물 (2)의 HSQC NMR 스펙트럼 (CD_3OD).

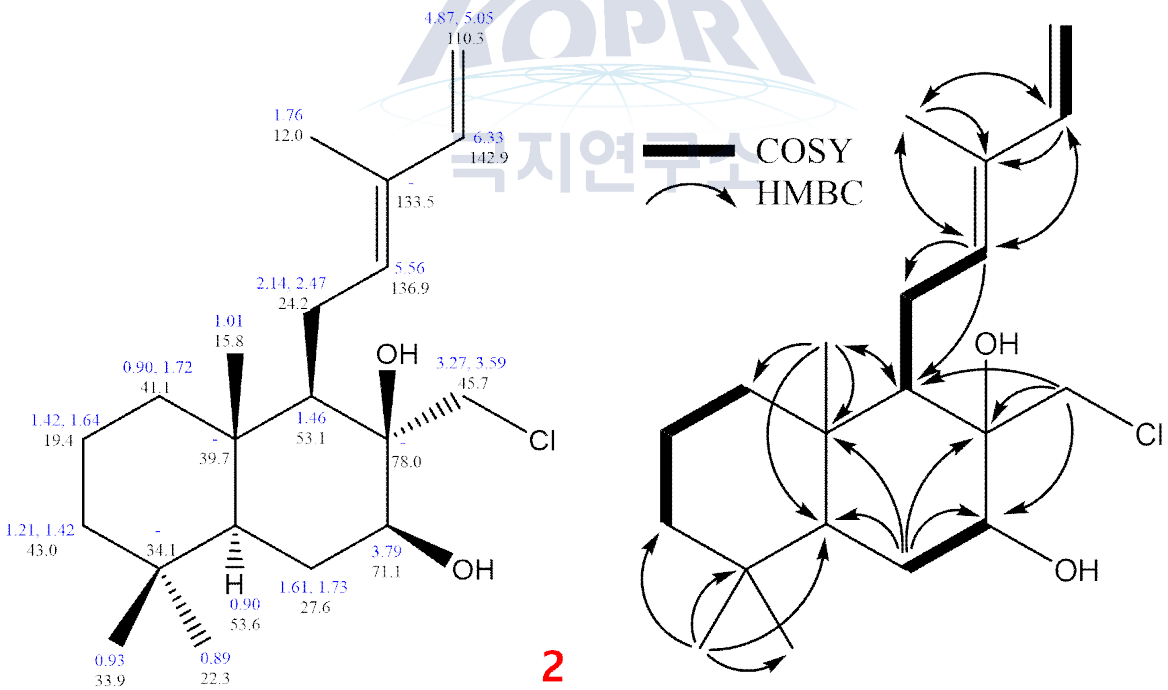


그림. 신규 화합물 (2)의 수소 및 탄소의 화학적 이동값 assignment, Key COSY와 HMBC 상관관계.

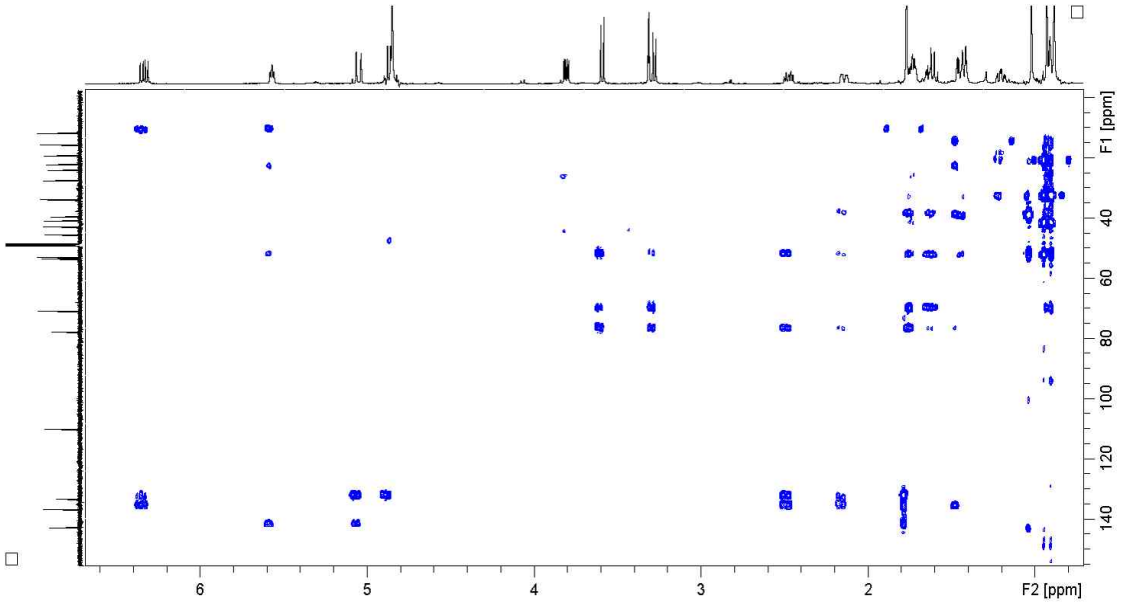


그림. 신규 화합물 (2)의 HMBC NMR 스펙트럼 (CD_3OD).

- 신규 화합물 2의 상대구조는 NOESY 자료 분석을 통하여 결정하였음. H-9과 H-5 및 H-7 사이의 NOESY 상관관계를 통해 해당 수소들이 α-orientated된 평면에 존재한다는 사실을 알 수 있었음. H-17과 H-20 사이에 NOESY 상관관계가 보이지 않는 것을 통해, 두 수소가 서로 다른 평면에 위치하는 것을 알 수 있었으며 H-17은 α-orientated된 평면에 존재하는 것으로 결정하였음. 또한 H-20와 H-11과의 NOESY 상관관계 신호를 통해 해당 수소들이 β-orientated된 평면에 존재하는 것을 알 수 있었음. H-12와 H-14과의 NOESY 상관관계를 통하여 $\triangle^{12}$의 *E*-configuration을 확인하였음. 이러한 결과를 종합하여, 신규 화합물 2의 입체중심들의 상대구조는 5*S**,7*S**,8*R**,9*R**,10*S**으로 결정하였음.

KOPRI 극지연구소

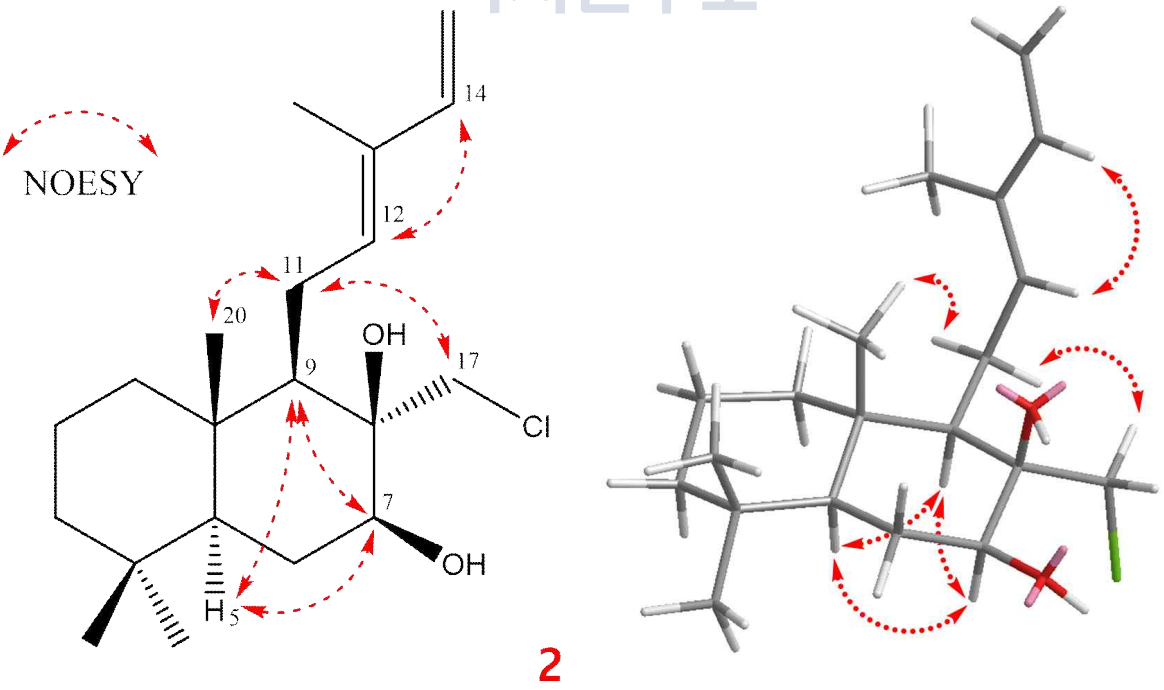


그림. 신규 화합물 (2)의 Key NOESY 상관관계.

- 신규 화합물 2의 절대구조 또한 변형된 Mosher’s method를 이용하여 결정하였음. 화합물 2를

앞의 실험과 동일한 방법으로 (*S*)-MTPA ester형태와 (*R*)-MTPA ester형태로 변환하였음. 다음으로 ^{1}H-NMR, HQSC, ^{1}H-^{1}H COSY NMR들을 측정하였음.

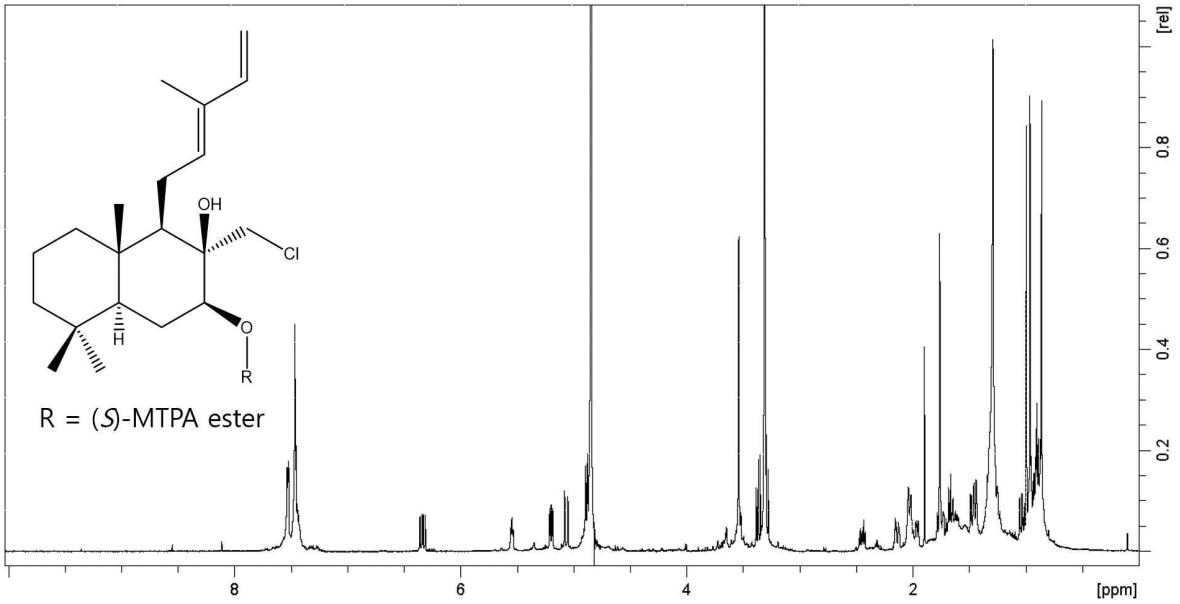


그림. (*S*)-di-MTPA ester화된 화합물 (2a)의 ^{1}H NMR 스펙트럼 (600 MHz, CD_3OD).

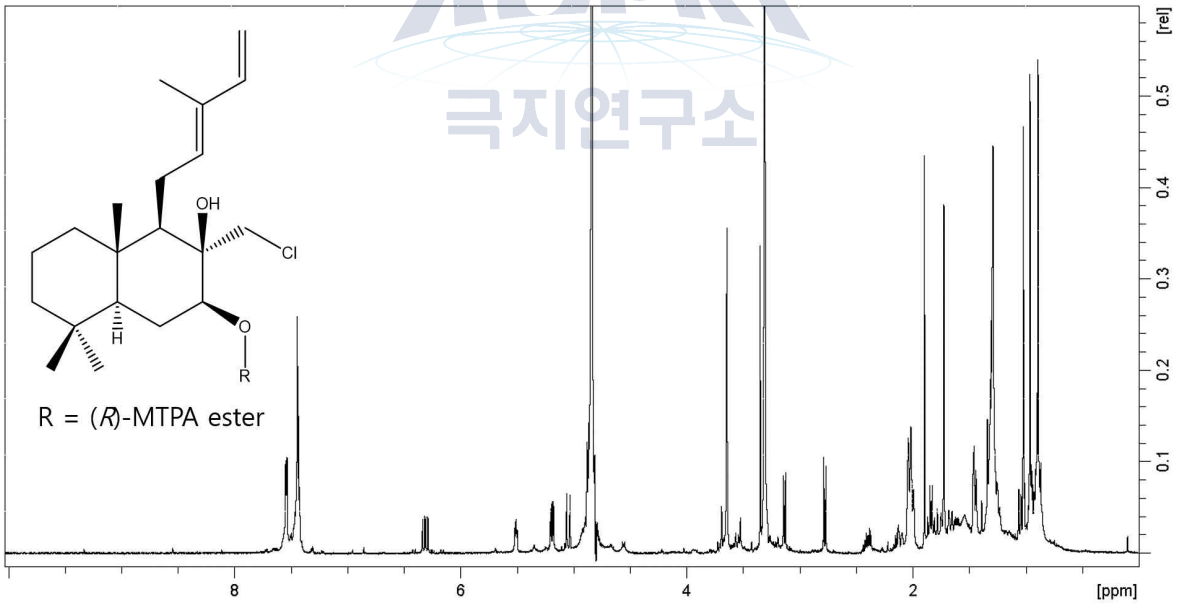


그림. (*R*)-di-MTPA ester화된 화합물 (2b)의 ^{1}H NMR 스펙트럼 (600 MHz, CD_3OD).

- 측정한 ^{1}H-NMR, HQSC, ^{1}H-^{1}H COSY NMR 데이터들을 이용하여 (*S*)-di-MTPA ester화된 화합물

2a과 (*R*)-di-MTPA ester화된 화합물 2b의 화학적 이동값을 각각 구하고 두 값의 차이(1a-1b)를 계산하여 입체중심 C-7의 절대구조를 7*S*인 것으로 확인하였음., 최종적으로 신규 화합물 2의 각각의 입체중심들의 절대구조는 5*S*,7*S*,8*R*,9*R*,10*S*인 것으로 결정하였음. 신규 화합물 2의 절대구조는 신규 화합물 1의 절대구조와 동일한 입체중심을 공유하였으며, 거의 유사한 구조를 가지는 것으로 규명되었음.

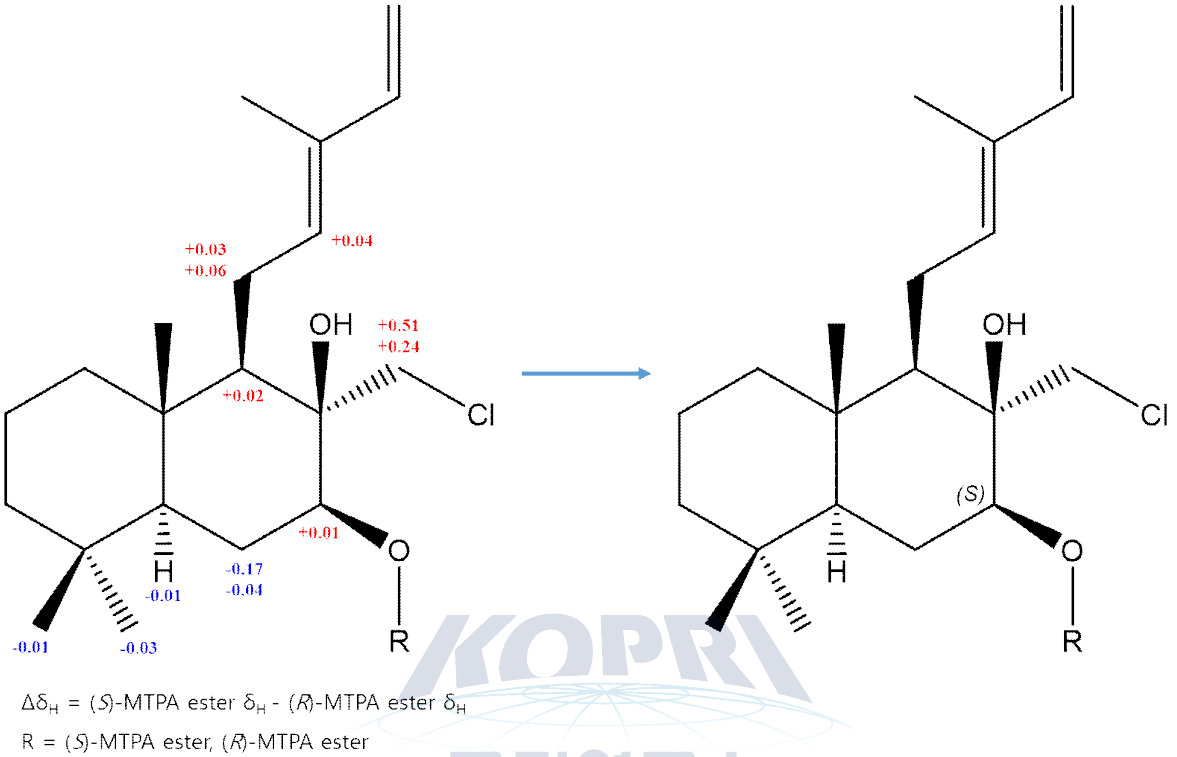


그림. (*S*)-di-MTPA ester화된 화합물(2a), (*R*)-di-MTPA ester화된 화합물 (2b)의 δ_H 값 차이와 결정된 C-7위치의 입체중심.

7) 신규 화합물 3, 4, 6의 구조 분석

- 신규 화합물 3, 4, 6은 무색의 필름 형태로 분리되었으며, 고분해능 질량분석기(HR-ESIMS)와 ^{13}C NMR 스펙트럼의 해석을 통해, 화합물 3의 분자식 $C_{20}H_{33}ClO$와 분자량 324(m/z 325.2278 $[M+H]^+$, calcd 325.2293)를 결정하였음. 또한 m/z 325.2278과 327.2449의 3 : 1 피크 비율을 통해 Cl원자의 존재를 예상하였음. 화합물 4의 분자식 $C_{20}H_{32}O_3$와 분자량 320(m/z 343.2238 $[M+Na]^+$, calcd 343.2244)을 결정하였으며, 화합물 6의 분자식 $C_{20}H_{32}O$와 분자량 288(m/z 289.2533 $[M+H]^+$, calcd 289.2526)을 결정하였음.

KOPRI 극지연구소

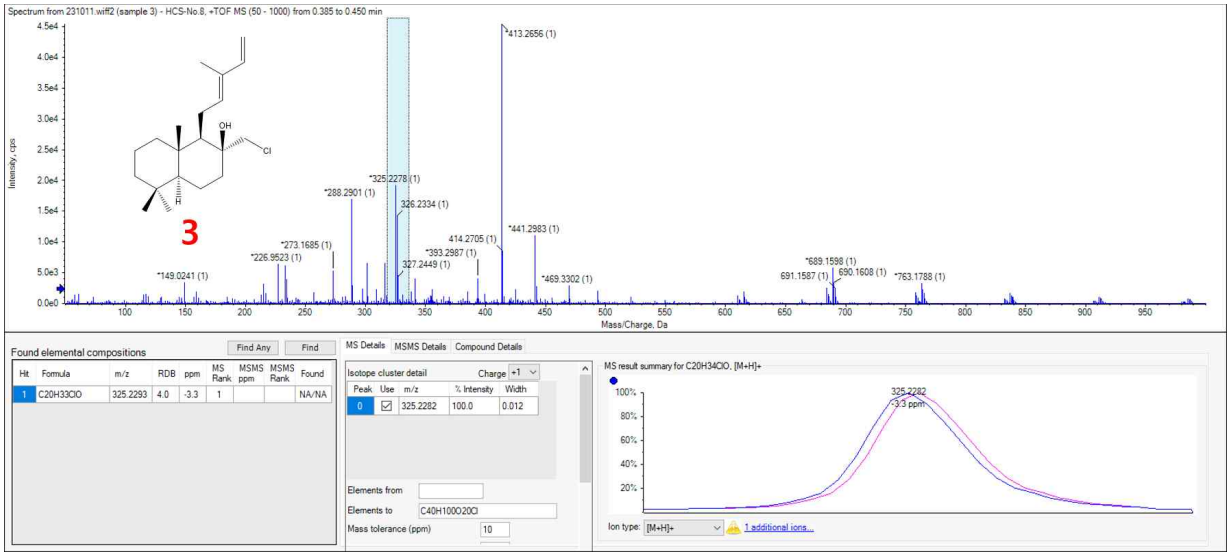


그림. 신규 화합물 (3)의 구조와 HR-ESI-MS 분석 자료.

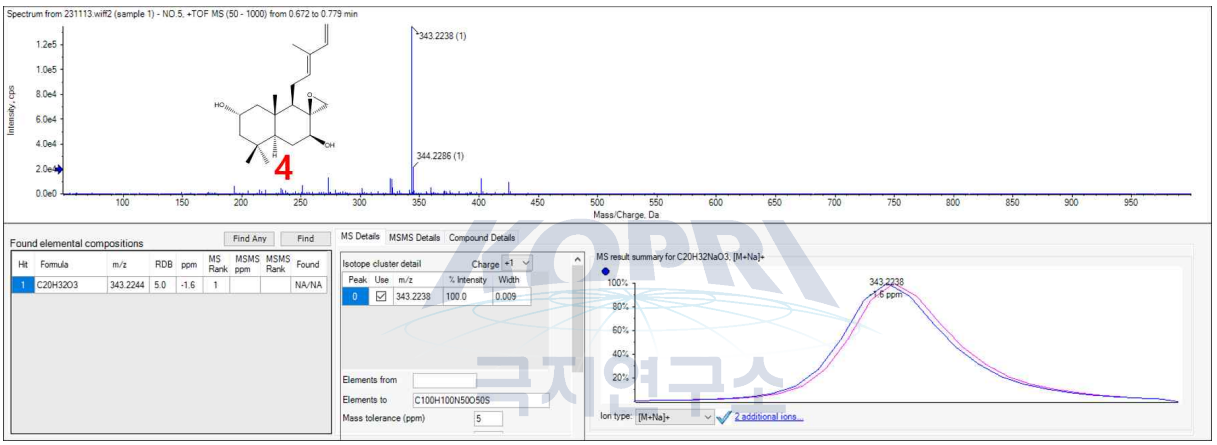


그림. 신규 화합물 (4)의 구조와 HR-ESI-MS 분석 자료.

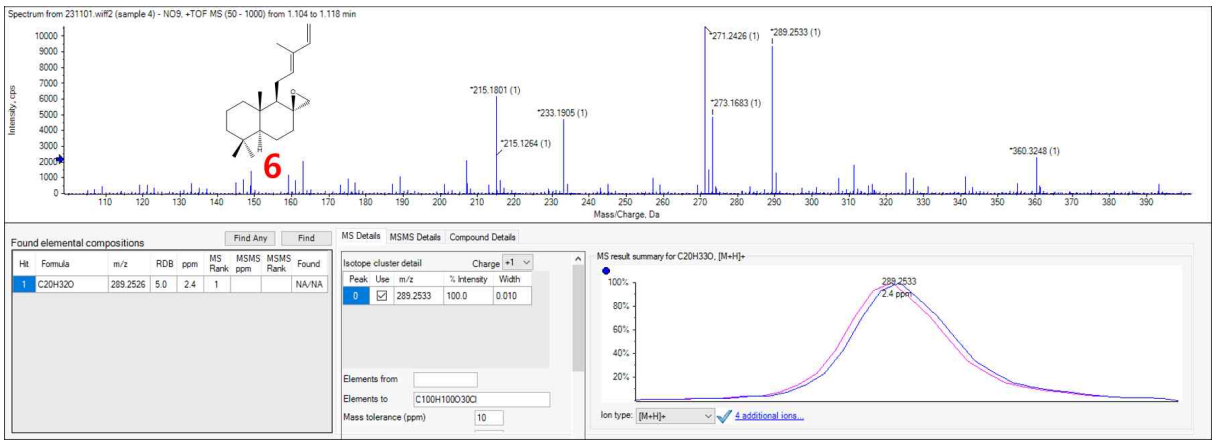


그림. 신규 화합물 (6)의 구조와 HR-ESI-MS 분석 자료.

- 신규 화합물 3의 ^{1}H와 ^{13}C NMR spectrum은 화합물 1, 2의 NMR spectrum과 유사한 패턴을 나타내었으며 동일한 탄소 수를 갖고 있었음. 질량분석으로 얻은 분자량 324와 분자식 $C_{20}H_{33}ClO$을 통해 화합물 2의 구조에서 산소 원자 1개가 결실된 구조임을 예상할 수 있었음. HSQC NMR 스펙트럼의 분석을 통해 화합물 3는 C-7 위치의 hydroxy기 대신 methylene기 탄소(δ_C 37.9)와 수소 H-7(δ_H 1.71, 1.80)로 치환된 구조임을 알 수 있었으며, COSY와 HMBC NMR 스펙트럼 상세한 분석을 통하여 신규 화합물 3의 구조를 규명하였음.

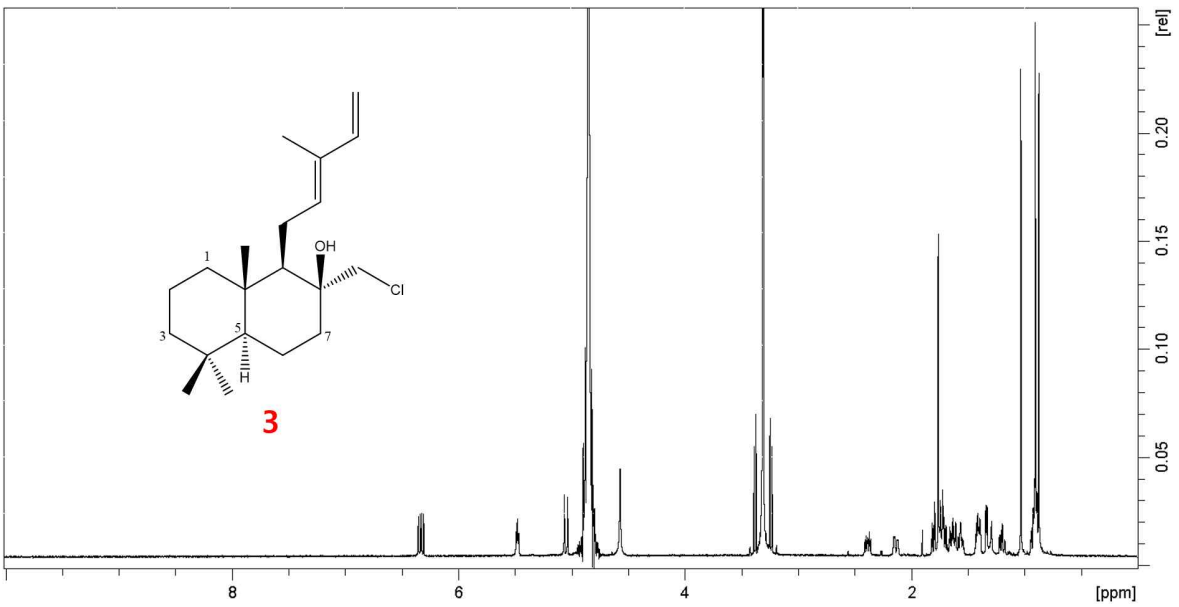


그림. 신규 화합물 (3)의 ^{1}H NMR 스펙트럼 (600 MHz, CD_3OD).

KOPRI 극지연구소

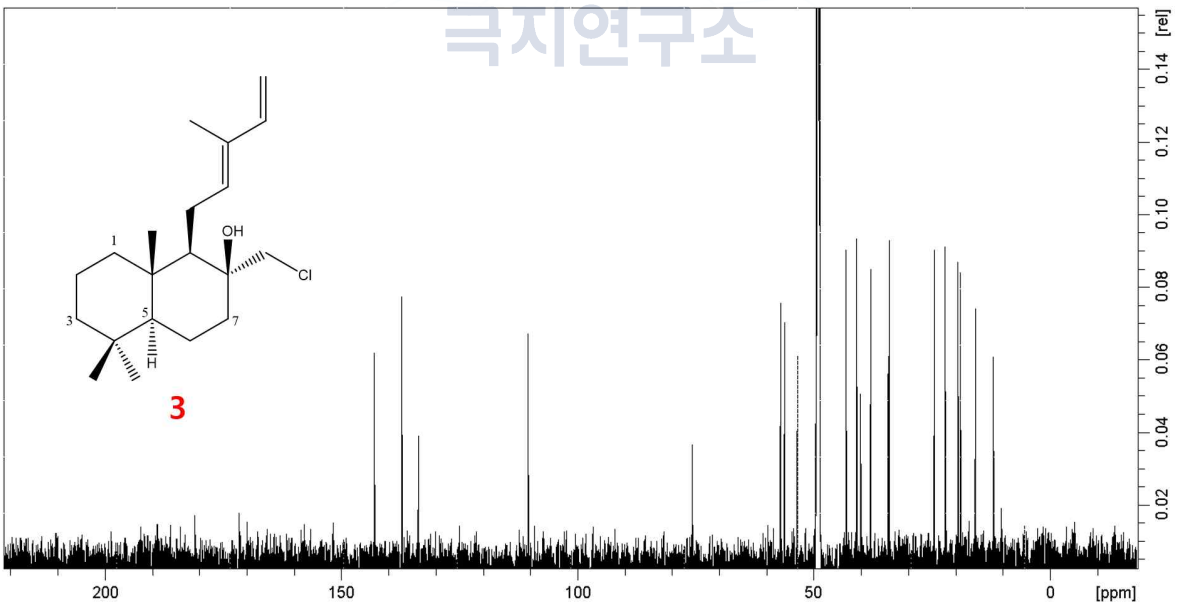


그림. 신규 화합물 (3)의 ^{13}C NMR 스펙트럼 (150 MHz, CD_3OD).

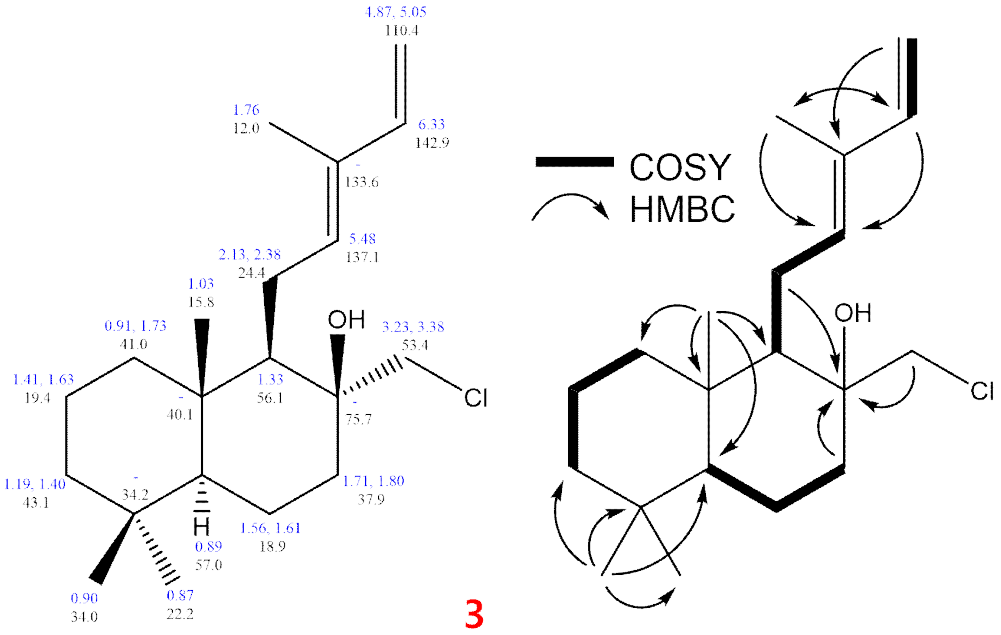


그림. 신규 화합물 (3)의 수소 및 탄소의 화학적 이동값 assignment, Key COSY와 HMBC 상관관계.

- 신규 화합물 4의 ^{1}H NMR spectrum은 화합물 1의 ^{1}H NMR spectrum과 유사한 패턴을 나타내었으며, ^{13}C NMR spectrum의 해석을 통해 신규 화합물 4는 신규 화합물 1과 동일한 탄소 수를 가지는 것을 알 수 있었음. 신규 화합물 4의 질량분석을 통하여 확인된 분자량 320와 분자식 $C_{20}H_{32}O_3$을 통해 신규 화합물 4는 화합물 1의 구조에서 Cl원자가 없는 구조를 가지는 것을 알 수 있었음. 또한 화합물 1의 ^{1}H NMR spectrum에서는 볼 수 없었던 δ_H 2.41, 2.81의 특별한 화학적 이동값을 가지는 수소 신호들을 관찰할 수 있었음. HSQC NMR 스펙트럼의 분석을 통해 epoxy기의 산소 원자와 연결된 methylene 탄소(δ_C 45.0)와 수소 H-17(δ_H 2.41, 2.81)의 존재를 확인할 수 있었으며, COSY와 HMBC NMR 스펙트럼 분석을 통해 화합물 4는 화합물 1의 구조에서 C-8 위치에 epoxide가 존재하는 구조를 가지는 것으로 구조 결정하였음.

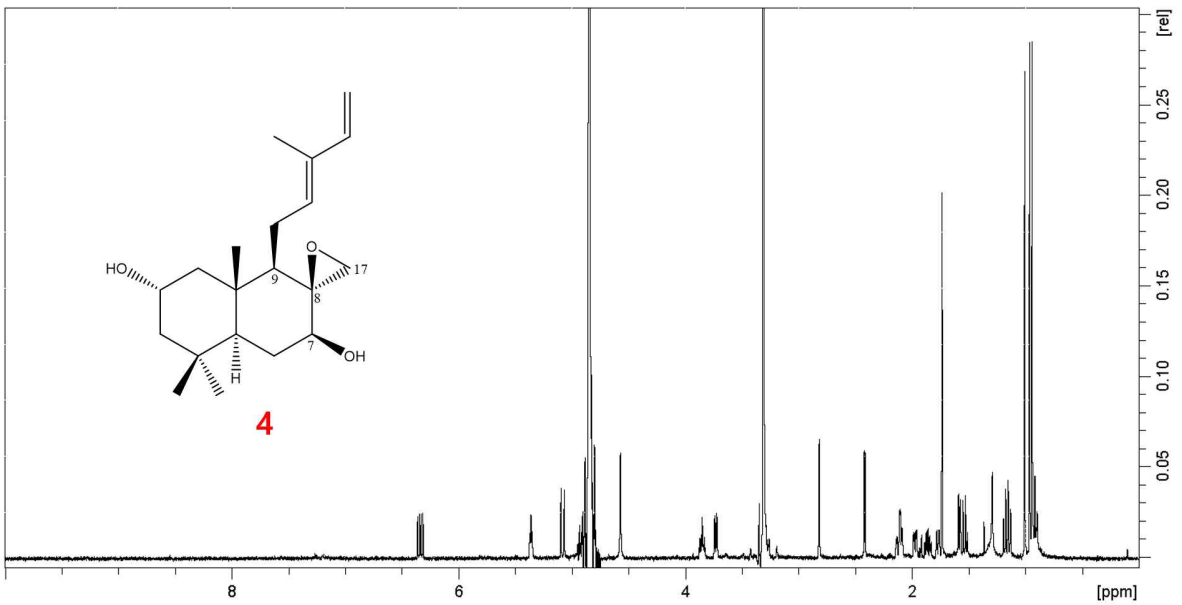


그림. 신규 화합물 (4)의 ^{1}H NMR 스펙트럼 (600 MHz, CD_3OD).

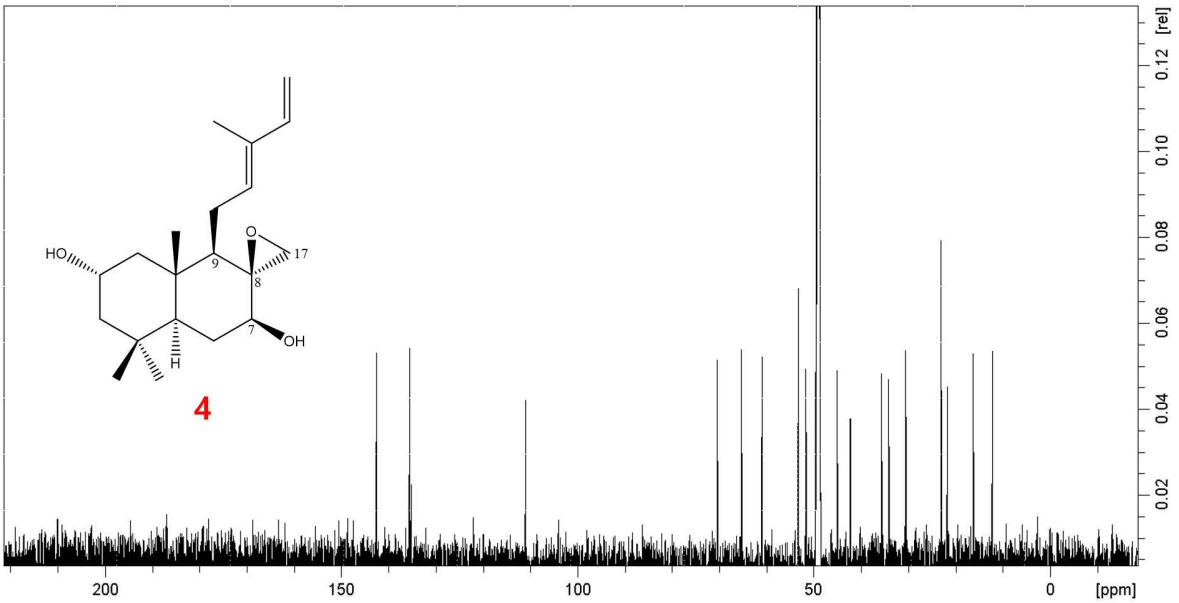


그림. 신규 화합물 (4)의 ^{13}C NMR 스펙트럼 (150 MHz, CD_3OD).

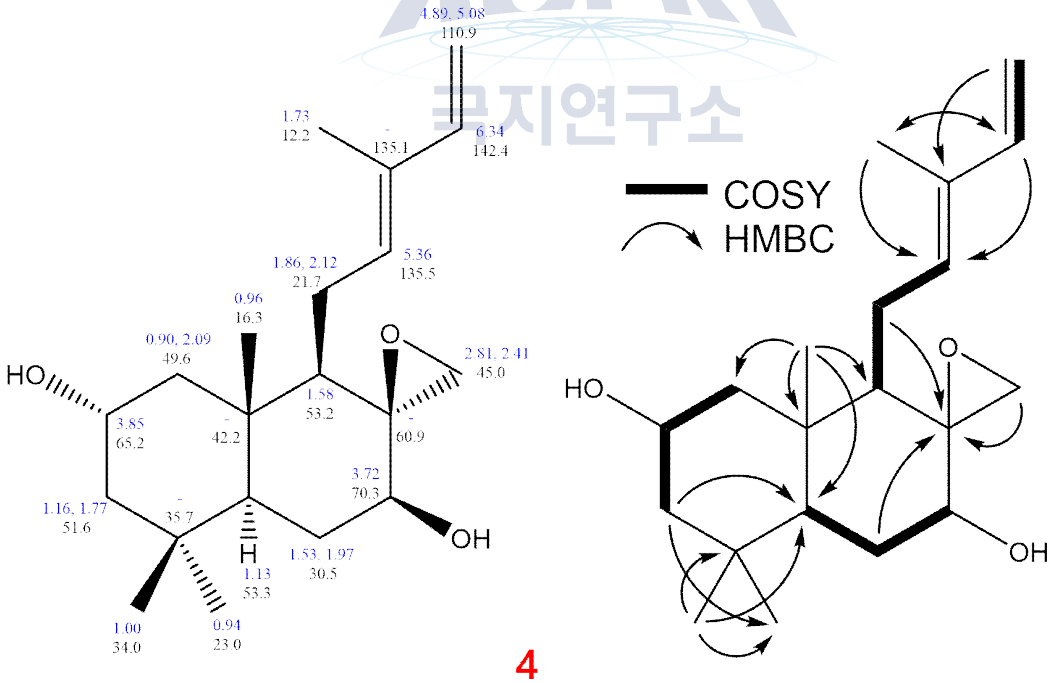


그림. 신규 화합물 (4)의 수소 및 탄소의 화학적 이동값 assignment, Key COSY와 HMBC 상관관계.

- 신규 화합물 6은 화합물 4와 유사한 ^1H NMR 스펙트럼 패턴을 나타내었으며, 두 화합물의 ^1H NMR spectrum에서 eopxy기의 특별한 ^1H NMR 신호를 관찰할 수 있었음. 그러나 화합물 4의

^{1}H NMR spectrum에서 4 ppm 근처에서 관찰되었던 oxygenated methine기의 수소가 화합물 6의 ^{1}H NMR spectrum에서는 관찰이 되지 않는 사실과, 화합물 6의 질량분석을 통해 확인된 분자식 $C_{20}H_{32}O$와 분자량 288을 통해, 신규 화합물 6은 화합물 4의 구조에서 C-2와 C-7에 위치한 hydroxy기가 없어진 구조를 가지는 것을 예상할 수 있었음. 뿐만아니라 COSY와 HMBC NMR 스펙트럼의 상세한 분석 통하여 신규 화합물 6의 평면구조를 규명하였음.

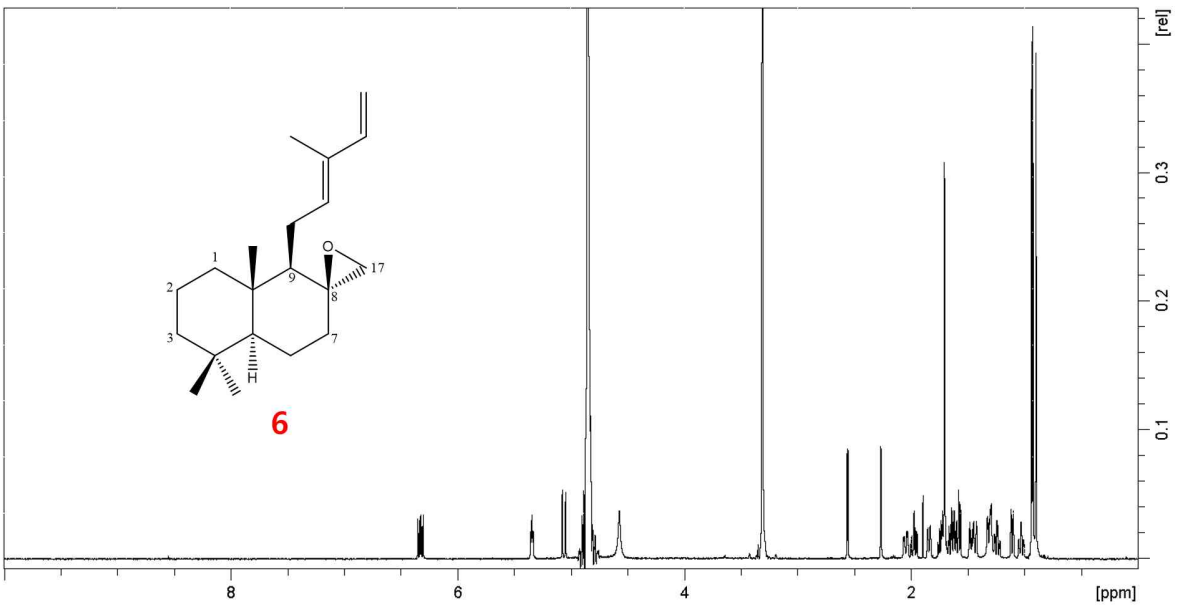


그림. 신규 화합물 (6)의 ^{1}H NMR 스펙트럼 (600 MHz, CD_3OD).

KOPRI
극지연구소

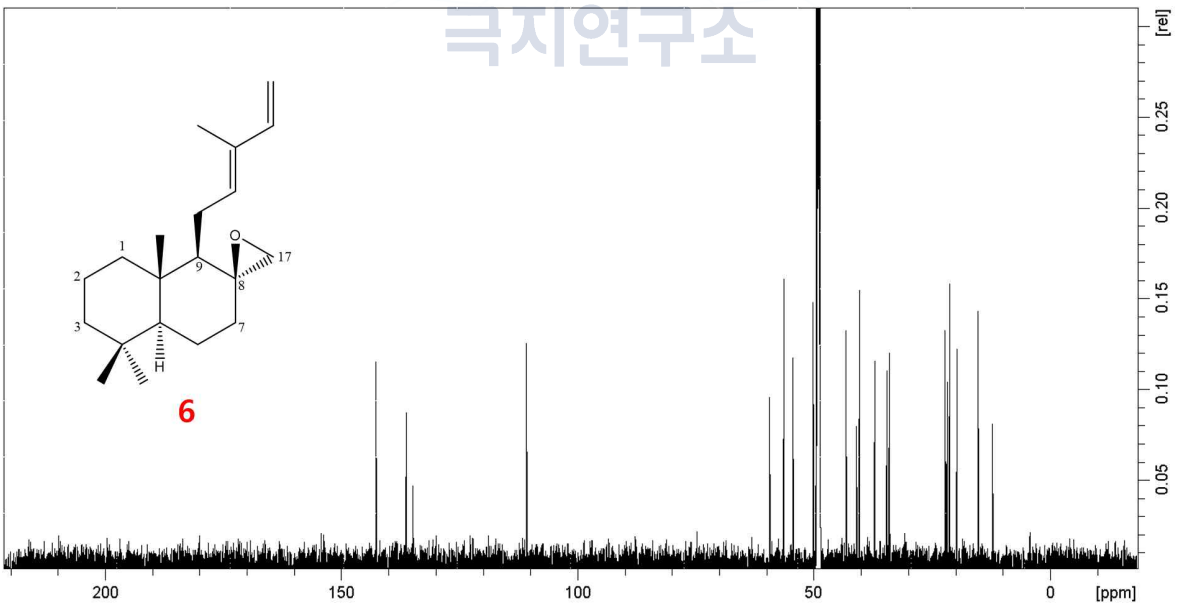


그림. 신규 화합물 (6)의 ^{13}C NMR 스펙트럼 (150 MHz, CD_3OD).

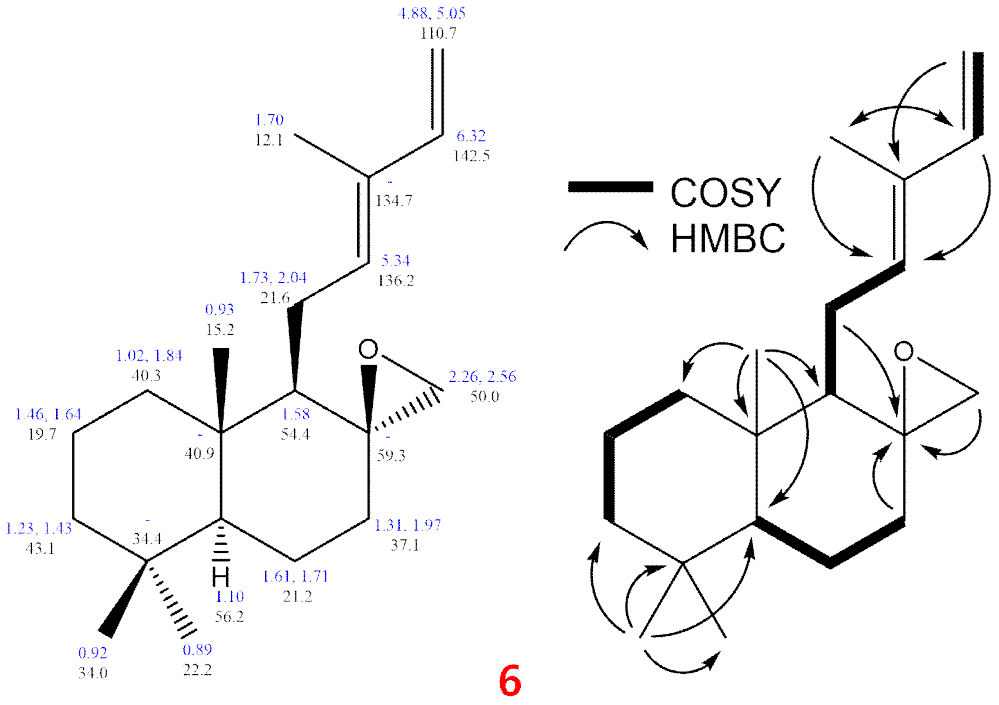


그림. 신규 화합물 (6)의 수소 및 탄소의 화학적 이동값 assignment, Key COSY와 HMBC 상관관계.

- NOESY 자료 분석을 통해, 신규 화합물 3과 4, 그리고 6의 상대구조를 확인하였음. H-12와 H-14 사이의 NOESY 상관관계를 통하여 화합물 3, 4와 6의 Δ^{12}의 이중결합은 *E*-configuration을 가지는 것을 확인하였음. 또한 화합물 3과 4 및 6의 공통적인 신호, H-5와 H-9 사이의 NOESY 상관관계를 통하여 두 수소가 화합물 1, 2와 동일하게 α-orientated된 평면에 존재하는 것을 확인하였음. 그리고 H-20와 H-17 사이에 NOESY 상관관계가 나오지 않는 사실을 통하여 두 수소는 서로 다른 평면에 위치하는 것으로 해석하였음. 이와 같은 결과를 종합하여, 신규 화합물 3, 4와 6은 화합물 1, 2와 동일한 상대구조를 갖는 것으로 해석되었음.

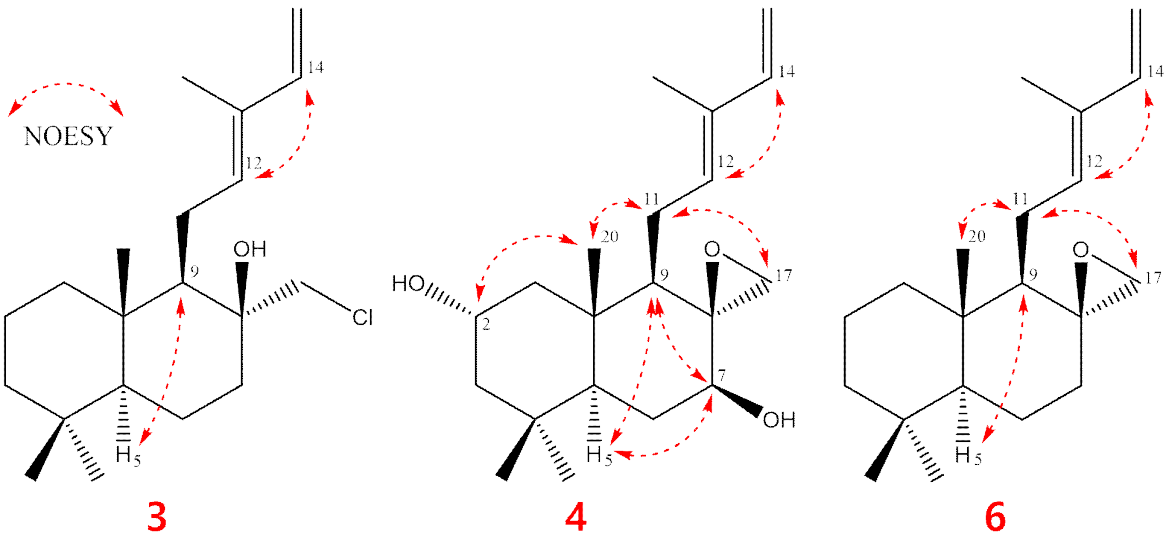


그림. 신규 화합물 (3), (4)와 (6)의 Key NOESY 상관관계.

- 신규 화합물 3, 4, 6의 절대구조는 각각의 화합물들의 고유 광회전도 측정과 이전 보고된 연구 결과들을 고려하여 결정하였음. 절대구조를 규명한 화합물 1, 2, 4의 고유 광회전도 값과 화합물 3, 4, 6의 고유 광회전도 값을 비교하였을 때, 유사한 양(+)의 값을 가지는 것을 확인할 수 있었음. 또한 문헌 검색 결과, 방선균들이 생성하는 유사한 diterpenoid 화합물들의 구조에서 C-11 탄소는 equiatorial 방향, C-20 탄소는 axial 방향을 갖는 화합물들로 생합성이 이루어지는 연구 결과들을 확인할 수 있었으며, labdane-type diterpene 화합물들의 일반적인 입체구조와 일치함을 알 수 있었음. 이러한 사실들을 고려하여 화합물 3, 4, 6은 화합물 1, 2, 4의 절대구조와 유사한 절대구조를 갖는 것을 알 수 있었음. 따라서 화합물 3의 입체중심들의 절대구조를 5*S*,8*R*,9*R*,10*S*, 화합물 4의 입체중심들의 절대구조를 2*S*,5*S*,7*S*,8*S*,9*R*,10*S*, 화합물 6의 입체중심의 절대구조를 5*S*,8*S*,9*R*,10*S*로 각각 결정하였음.

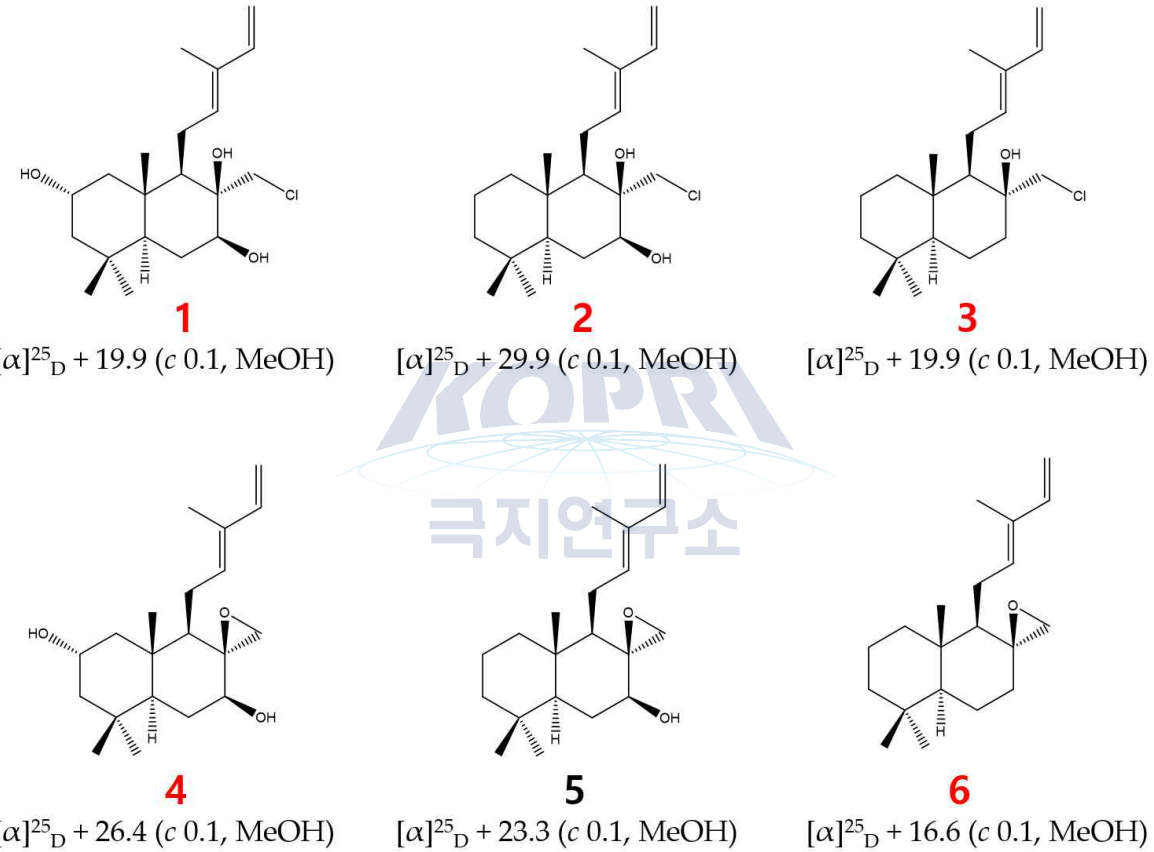


그림. 분리된 화합물 1-6의 고유 광회전도.

다. 신규 화합물의 항균활성 평가

1) 항균 활성 실험

- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – 11th Edition. CLSI document M07-A10에 의거하여 microdilution 방법으로 그람 양성균(*Bacillus subtilis*(KCTC1021), *Micrococcus luteus*(KCTC1915), *Staphylococcus aureus*(KCTC1927))과 그람 음성균(*Escherichia coli*(KCTC2441), *Salmonella typhimurium*(KCTC2515), *Klebsiella pneumonia*(KCTC2690))에 대한 신규 화합물 5종과 알려진 화합물 1종의 항균 활성을 시험하였음.

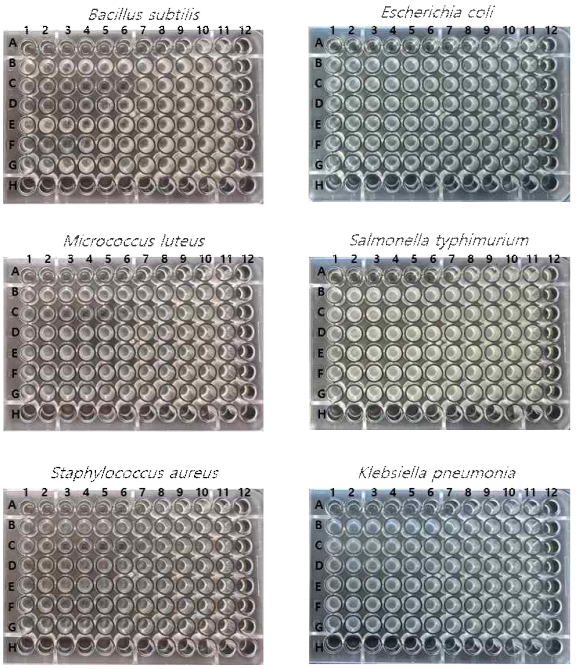


그림. 신규 화합물 5종과 알려진 화합물 1종의 항균 활성

2) MIC(minimum inhibitory concentration)시험

- 96 well plate의 각 라인을 다음과 같은 방법으로 처리한 후 시험하였음.

A : Kanamycin (Positive control)
B~E : 신규 화합물 1~4
F : 알려진 화합물 5
G : 신규 화합물 6
1~10 : 농도 128~0.25 MIC (ug/ml)
11 : Growth control (MH broth + Bacteria)
12 : Sterility control (only MH broth)

KOPRI 극지연구소

3) 신규 화합물 5종과 알려진 화합물 1종의 항균활성 평가 결과

표. 신규 화합물의 MIC 시험 결과

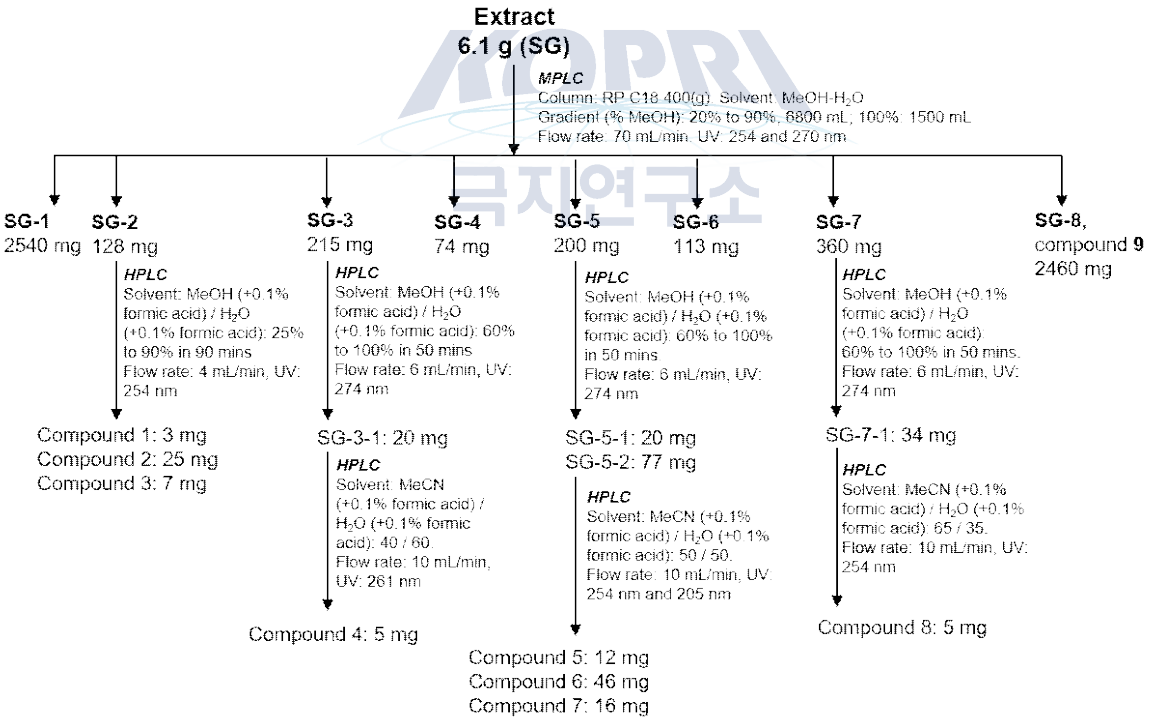
Strains	MIC (μg/ml)						
	1	2	3	4	5	6	Kanamycin
Bacillus subtilis	>128	4.0	32	>128	32	>128	0.5
Micrococcus luteus	>128	8.0	>128	>128	>128	>128	0.5
Staphylococcus aureus	128	8.0	128	128	128	128	1.0
Escherichia coli	none	none	none	none	none	none	1.0
Salmonella typhimurium	none	none	none	none	none	none	2.0
Klebsiella pneumonia	none	none	none	none	none	none	0.5

- 6종의 화합물들 중 신규 화합물 2가 그람 양성균에 대하여 뛰어난 항균 활성을 나타내었음. 신규 화합물 2는 *Bacillus subtilis*에 대하여 4 μg/ml의 MIC 값을 보였으며, *Micrococcus luteus* 및 *Staphylococcus aureus*에 대하여 각각 8 μg/ml의 MIC 값을 나타내어 분리된 신규 화합물들

중에서 가장 뛰어난 항균 활성을 나타내었음. 신규 화합물 2와 화합물 5의 구조를 비교하여 보면 epoxide링이 열리면서 항균 활성이 증가하는 것으로 추측해 볼 수 있으며, 화합물 2와 화합물 1을 비교하면 탄소 C-2 위치에 hydroxy기가 존재할 때에 항균 활성이 감소하는 것을 알 수 있음. 연구 결과를 논문 투고 준비 중에 있음.

라. 극지(해양)생물(*Sphaerophorus globosus*) 유래 화합물 (충남대)

Sphaerophorus globosus



극지(해양)생물(*Sphaerophorus globosus*) 추출물 분리과정

1) 극지(해양)생물(*Sphaerophorus globosus*) 추출물 및 분획물 제조

- 극지(해양)생물 *S. globosus* (weight: 300 g)를 초음파추출[95% EtOH (0.7 L, 3시간, 4회)] 진행하여 *S. globosus* 추출물 6.1 g 얻음
- MPLC [(column: Biotage SNAP cartridge, KP-C18-HS, 400 g), mobile phase: MeOH/H_2O (20% to 90% MeOH, 6.8 L; 100% MeOH, 1.5 L)]실시하여 (SG1-SG8) 소분획물 얻음
- SG2 (128 mg)에 대해 preparative HPLC (Gilson PLC2020) [column: using Phenomenex Kinetex

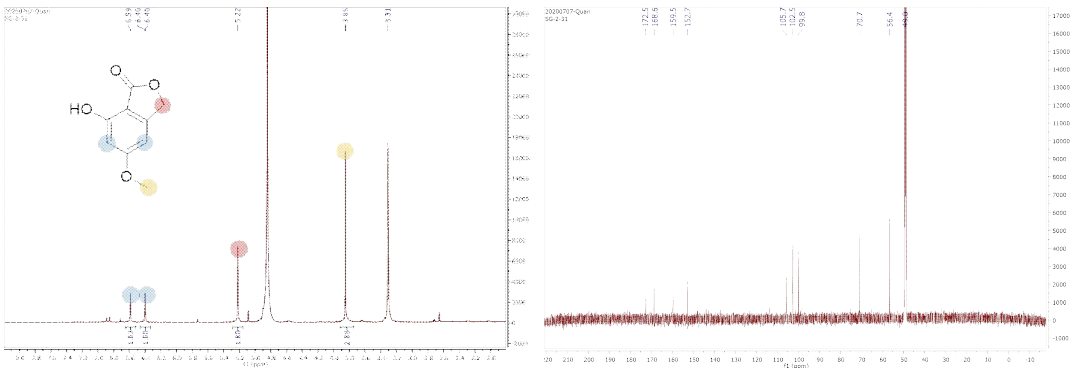
C_{18} (250 x 21.2 mm, 5 μm), solvent: MeOH (+0.1% formic aicd) / H_2O (+0.1% formic aicd) (90% in 90mins, Flow rate: 4 mL/min)를 실시하여 compound 1 (3 mg), compound 2 (25 mg), compound 3 (7 mg)을 얻음

- SG3 (215 mg)에 대해 preparative HPLC (Gilson PLC2020) [column: using Phenomenex Kinetex C_{18} (250 x 21.2 mm, 5 μm), solvent: MeOH (+0.1% formic aicd) / H_2O (+0.1% formic aicd) (60% in 50mins, Flow rate: 6 mL/min)를 실시하여 SG3-1 (20 mg)을 얻음
- SG3-1 (20 mg)을 preparative HPLC (Gilson PLC2020) [column: using Phenomenex Kinetex C_{18} (250 x 21.2 mm, 5 μm), solvent: MeCN (+0.1% formic aicd) / H_2O (+0.1% formic aicd) (40%, Flow rate: 10 mL/min)를 실시하여 compound 4 (5 mg)을 얻음
- SG5 (200 mg)에 대해 HPLC (Gilson PLC2020) [column: using Phenomenex Kinetex C_{18} (250 x 21.2 mm, 5 μm), solvent: MeOH (+0.1% formic acid)/H_2O (+0.1% formic acid) (60% to 100% 50 min, Flow rate 6 mL/min)]을 실시하여 SG5-1 (20 mg), SG5-2 (77 mg)을 얻음
- SG5-1 (20 mg), SG-2 (77 mg)에 대해 HPLC (Gilson PLC2020) [column: using Phenomenex Kinetex C_{18} (250 x 21.2 mm, 5 μm), solvent: MeCN (+0.1% formic acid) 50% / H_2O (+0.1% formic acid) 50%, Flow rate 10 mL/min)]을 실시하여 compound 5 (12 mg), compound 6 (46 mg), compound 7 (16 mg)을 얻음
- SG7 (360 mg)에 대해 HPLC (Gilson PLC2020) [column: using Phenomenex Kinetex C_{18} (250 x 21.2 mm, 5 μm), solvent: MeOH (+0.1% formic acid)/H_2O (+0.1% formic acid) (60% to 100% 50 min, Flow rate 6 mL/min)]을 실시하여 SG7-1 (34 mg)을 얻음
- SG7-1 (34 mg)에 대해 HPLC (Gilson PLC2020) [column: using Phenomenex Kinetex C_{18} (250 x 21.2 mm, 5 μm), solvent: MeCN (+0.1% formic acid) 65% /H_2O (+0.1% formic acid) 35%, Flow rate 10 mL/min)]을 실시하여 compound 8 (5 mg)을 얻음
- SG8 (2460 mg)로부터 compound 9 (4.6 mg)을 얻음

2) 극지(해양)생물(*Sphaerophorus globosus*)로부터 분리된 화합물 화학구조 결정

- 7-hydroxy-5-methoxyphthalide (1)

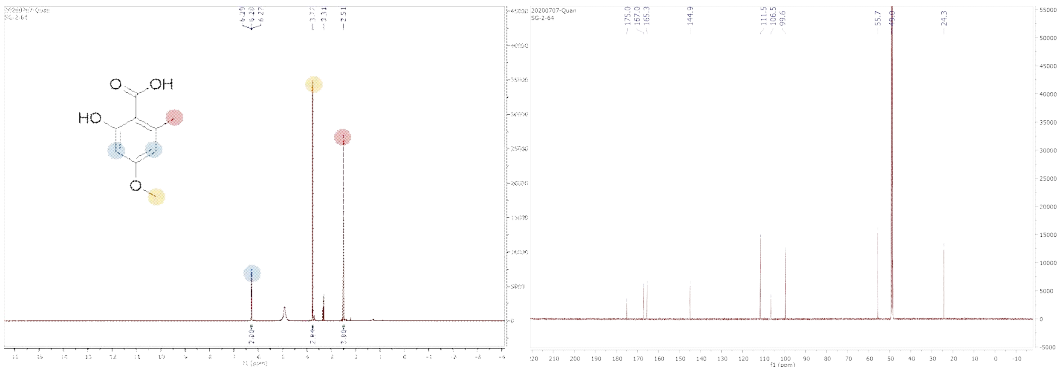
○ ^{1}H NMR (600 MHz, methanol-d_4) δ_H 6.59 (1H, s, H-4), 6.40 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 5.22 (2H, s, H_2-3), 3.85 (-OCH_3, s); ^{13}C-NMR (150 MHz, methanol-d_4) δ_C 172.5 (C-1), 168.6 (C-5), 159.5 (C-7), 152.7 (C-4a), 105.7 (C-7a), 102.5(C-4), 99.8 (C-6), 70.7 (C-3), 56.4 (-OCH_3).



NMR spectroscopic data of compound 1

- Everninic acid (2)

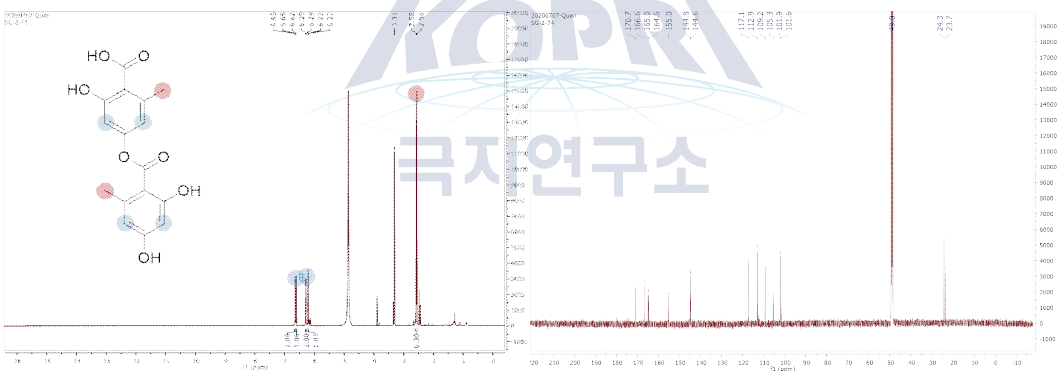
○ ^{1}H NMR (600 MHz, methanol-d_4) δ_H 6.29 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-6), 6.28 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-4), 3.77 (3H, s, H-1′), 2.51 (3H, s, H-8); ^{13}C NMR (150 MHz, methanol-d_4) δ_C 175.0 (C-1), 167.0 (C-5), 165.3 (C-3), 144.9 (C-7), 111.5 (C-2), 106.5 (C-6), 99.6 (C-4), 55.7 (C-1'), 24.3 (C-8).



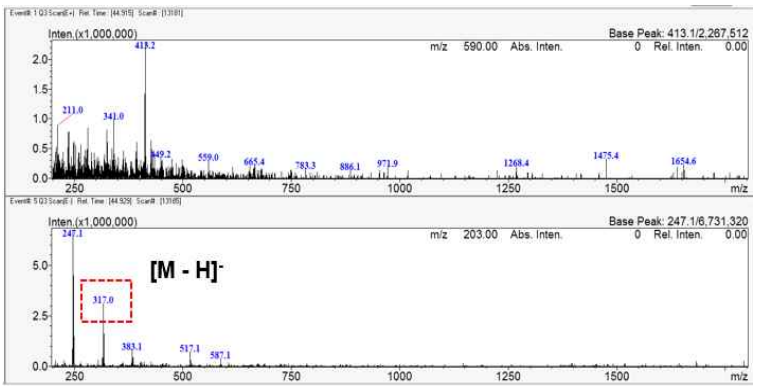
NMR spectroscopic data of compound 2

- Lecanoric acid (3)

○ ^{1}H NMR (600 MHz, methanol-d_4) δ_H 6.65 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.62 (1H, s, H-4), 6.29 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-4'), 6.22 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6'), 2.58 (3H, s, C-8), 2.56 (3H, s, C-8').



NMR spectroscopic data of compound 3

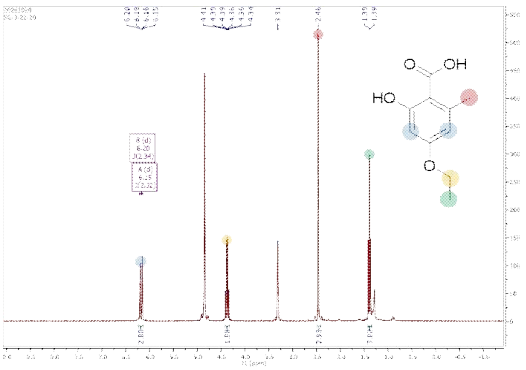


LC-MS spectrum of compound 3

- 4-ethoxy-2-hydroxy-6-methylbenzoic acid (4)

○ ^{1}H NMR (300 MHz, methanol-d_4) δ_H 6.20 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-6), 6.15 (1H, d, J = 2.3

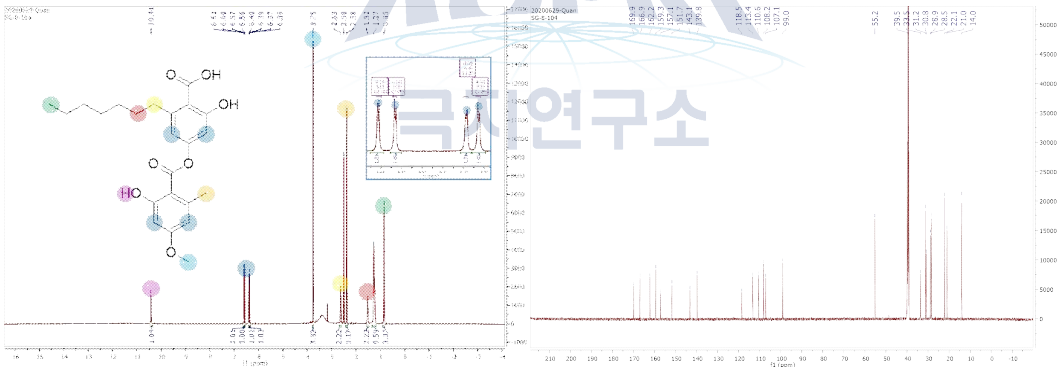
Hz, H-4), 4.37 (2H, qd, J = 7.1, 0.5 Hz, H-1'), 2.46 (3H, s, H-8), 1.39 (3H, td, J = 7.1, 0.5 Hz, H-2').



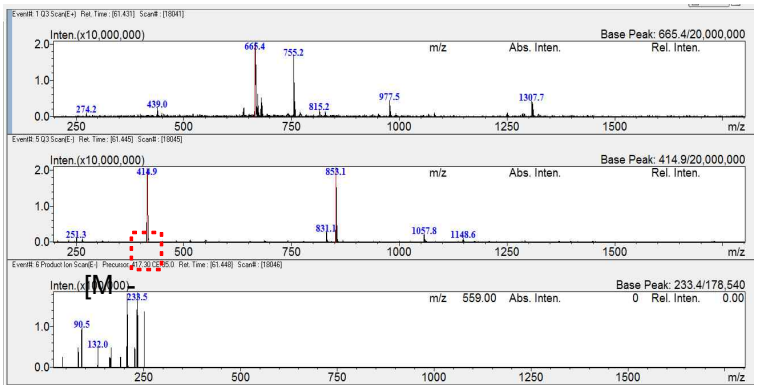
NMR spectroscopic data of compound 4

- Sphaerophorin (5)

○ ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO) δ_H 6.61 (1H, d, J = 2.1, H-6), 6.56 (1H, d, J = 2.1, H-4), 6.39 (1H, d, J = 2.1, H-4'), 6.36 (1H, d, J = 2.1, H-6'), 3.75 (3H, s, -OCH3), 2.63 (2H, m, H-8), 2.38 (3H, s, H-8'), 1.52 (2H, m, H-9), 1.29-1.22 (8H, m, H-10,11,12,13,14), 0.85 (3H, t, J = 7.2, H-14); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO) δ_C 169.9 (C-1), 166.9 (C-1'), 162.2 (C-5'), 159.3 (C-7'), 157.1 (C-3), 151.7 (C-5), 143.1 (C-7), 139.8 (C-3'), 118.5 (C-6'), 113.4 (C-2'), 110.6 (C-4'), 108.2 (C-4), 107.1 (C-2'), 99.0 (C-6'), 55.2 (-OCH_3), 33.5 (C-8), 31.2 (C-12), 30.8 (C-9), 28.9 (C-11), 28.5 (C-10), 22.1 (C-13), 21.0 (C-8'), 14.0 (C-14).



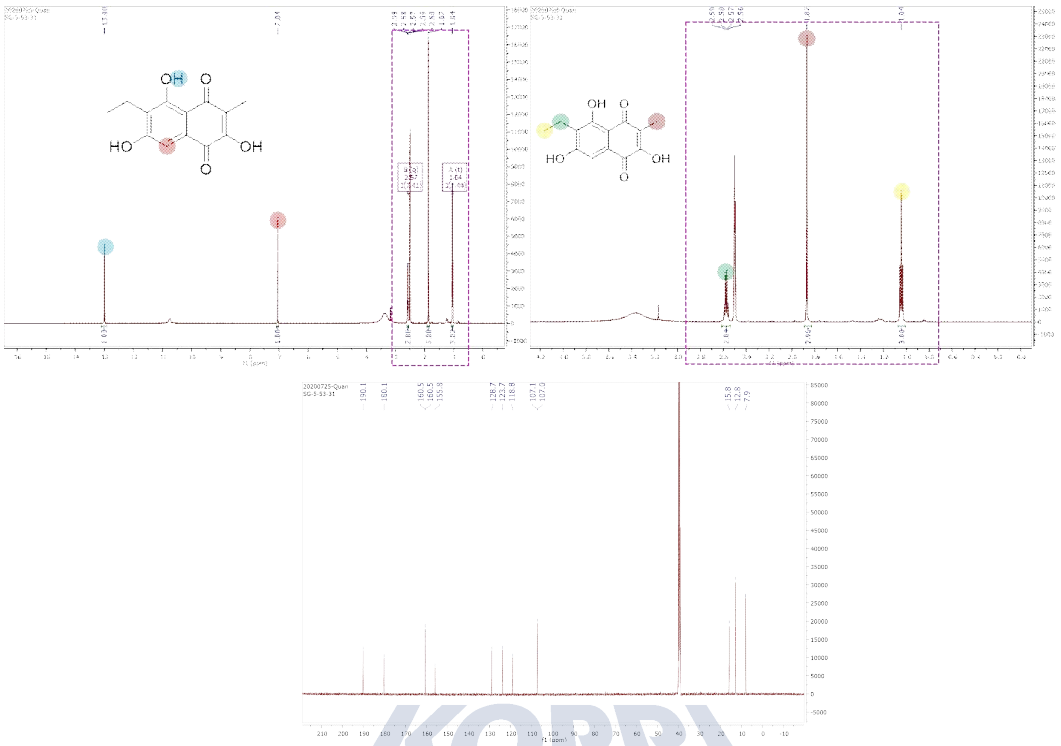
NMR spectroscopic data of compound 5



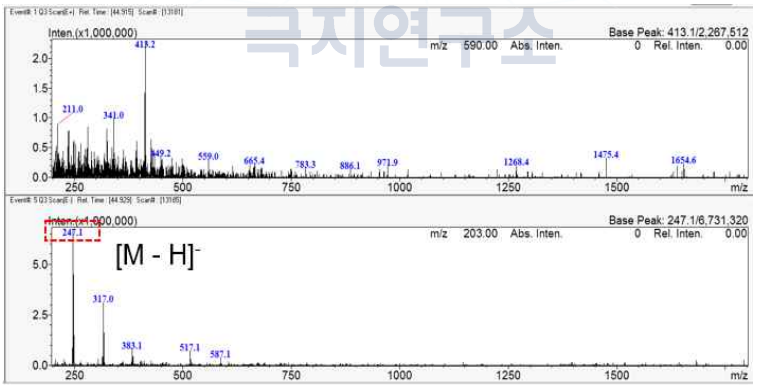
LC-MS spectrum of compound 5

- Squamarone (6)

○ ^{1}H NMR (600 MHz, chloroform-*d*) δ_H 7.04 (1H, s, H-9), 2.57 (2H, q, *J* = 7.4 Hz, H-12), 1.87 (3H, s, H-11), 1.04 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, H-13); ^{13}C NMR (150 MHz, chloroform-*d*) δ_C 190.1 (C-4), 180.1 (C-1), 160.5 (C-7), 160.5 (C-3), 155.8 (C-2), 128.7 (C-8), 123.7 (C-6), 118.8 (C-10), 107.1 (C-5), 107.0 (C-9), 15.8 (C-12), 12.8 (C-13), 7.9 (C-11).



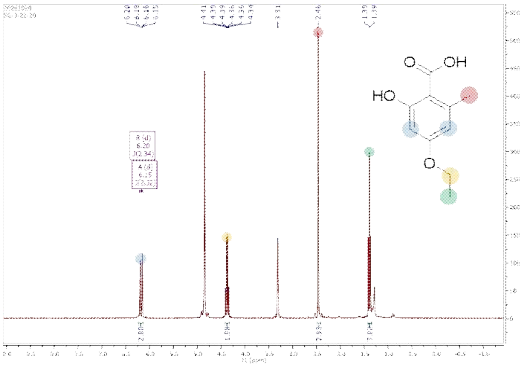
NMR spectroscopic data of compound 6



LC-MS spectrum of compound 6

- 2-heptyl-4,6-dihydroxybenzoic acid (7)

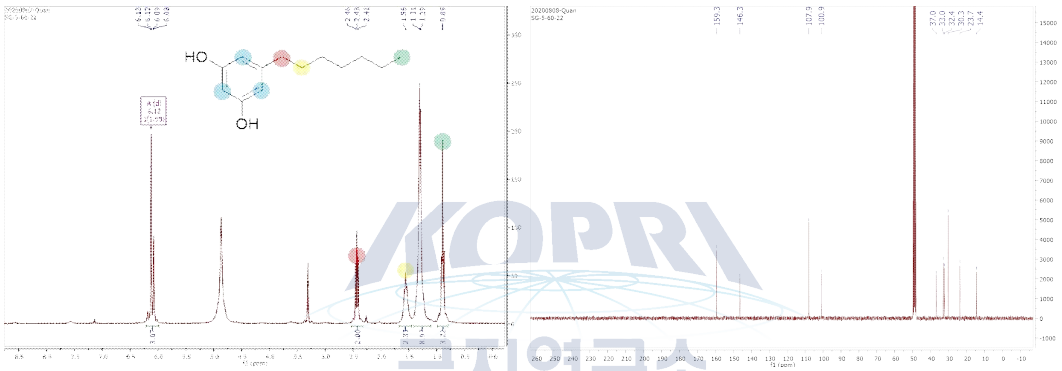
○ ^{1}H NMR (300 MHz, methanol-d_4) δ_H 6.20 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-6), 6.15 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2), 4.37 (2H, qd, *J* = 0.5, 7.1 Hz, H-8), 2.46 (3H, s, H-7), 1..39 (3H, td, *J* = 0.5, 7.1 Hz, H-9).



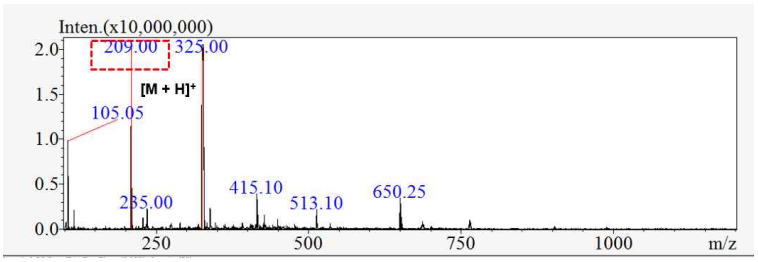
NMR spectroscopic data of compound 7

- Sphaeropherol (8)

○ ^{1}H NMR (300 MHz, methanol-d_4) δ_H 6.13 (1H, s, H-2), 6.12 (1H, s, H-6), 6.08 (1H, t, J = 2.0, H-4), 2.43 (2H, m, H-7), 1.56 (2H, m, H-12), 1.40-1.20 (8H, m, H-8,9,10,11), 0.89 (3H, t, J = 6.7 H-13); ^{13}C NMR (75 MHz, methanol-d_4) δ_C 159.3 (C-3), 159.3 (C-5), 146.3 (C-1), 107.9 (C-2), 107.9 (C-6), 37.0 (C-7), 33.0 (C-8), 32.4 (C-9), 30.3 (C-10), 30.3 (C-11), 23.7 (C-12), 14.4 (C-13).



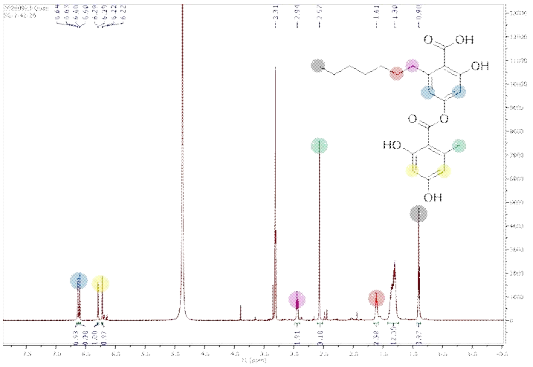
NMR spectroscopic data of compound 8



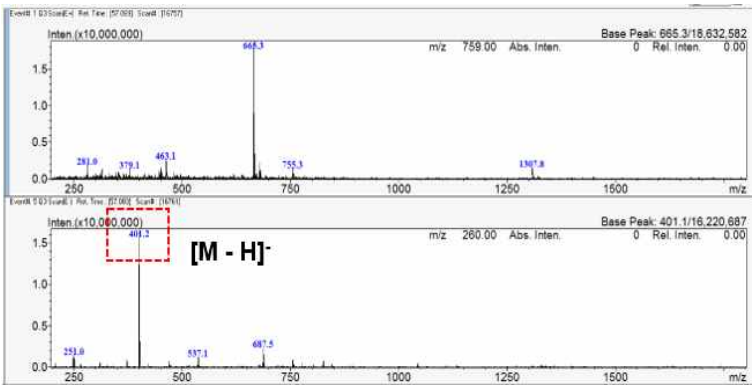
LC-MS spectrum of compound 8

- 4-*O*-demethyl sphaerophorin (9)

○ ^{1}H NMR (300 MHz, methanol-d_4) δ_H 6.63 (1H, d, J = 2.2, H-6), 6.60 (1H, d, J = 2.2, H-4), 6.29 (1H, d, J = 2.1, H-4'), 6.22 (1H, d, J = 2.2, H-6'), 2.94 (2H, m, H-8), 2.57 (3H, s, H-8'), 1.61 (2H, m, H-13), 6.12 (1H, s, H-6), 6.08 (1H, t, J = 2.0, H-4), 2.43 (2H, m, H-7), 1.56 (2H, m, H-12), 1.40-1.20 (8H, m, H-8,9,10,11), 0.89 (3H, t, J = 6.7 H-13).



NMR spectroscopic data of compound 9



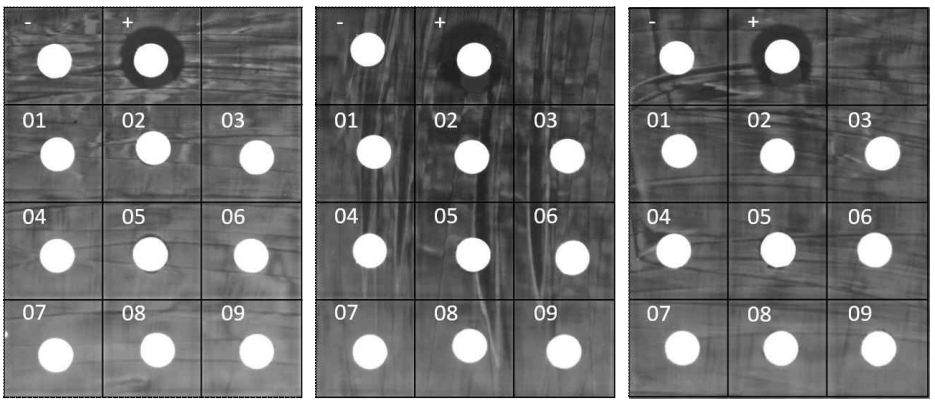
LC-MS spectrum of compound 9

3) 극지(해양)생물(*Sphaerophorus globosus*)의 항균활성 평가

- 병원성 균주에 대해 항균활성을 평가하기 위해 paper disc diffusion assay를 수행한 결과, Sphaerophorin (5)은 *S. aureus*에 대해 0.25 mM 농도부터 활성을 나타내었고 Sphaeropherol (8)은 *C. albicans*에 대해 0.5 mM 농도부터 활성을 보였으며, 4-*O*-demethyl sphaerophorin (9) *S. aureus*에 대해 1 mM 농도에서 활성을 보임을 확인

(A) *E. coli*

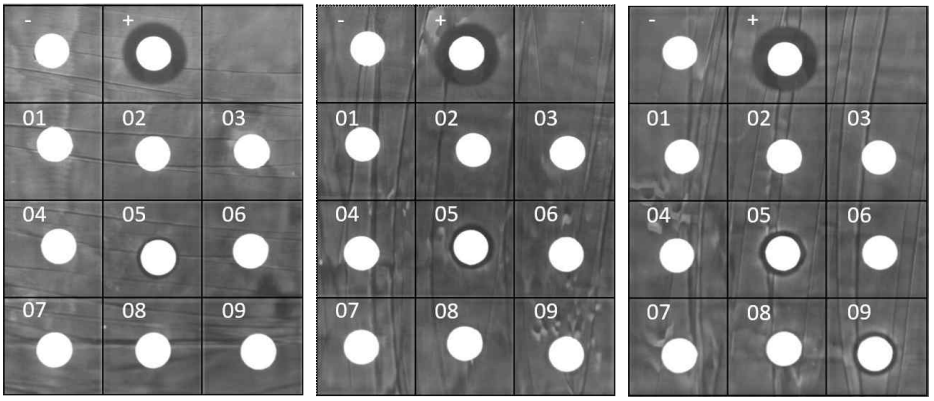
\+ Kanamycin 0.2 mM



0.25 mM 0.5 mM 1 mM

(B) *S. aureus*

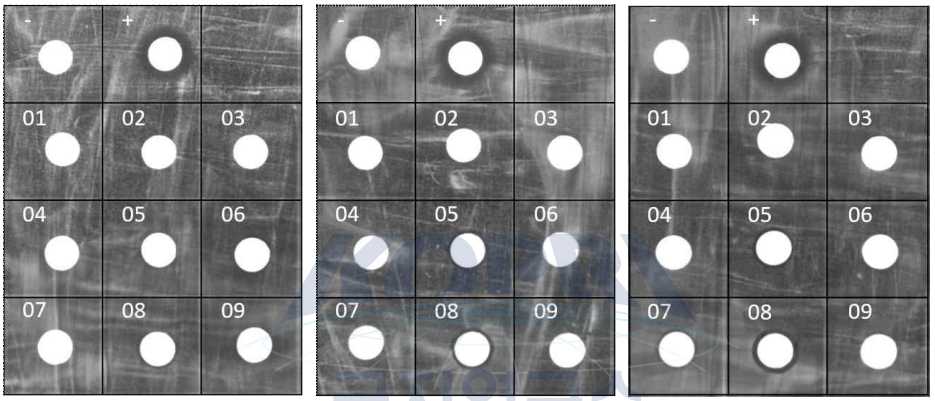
\+ Kanamycin 0.2 mM



0.25 mM 0.5 mM 1 mM

(C) *C. albicans*

\+ Nystatin 0.2 mM



0.25 mM 0.5 mM 1 mM

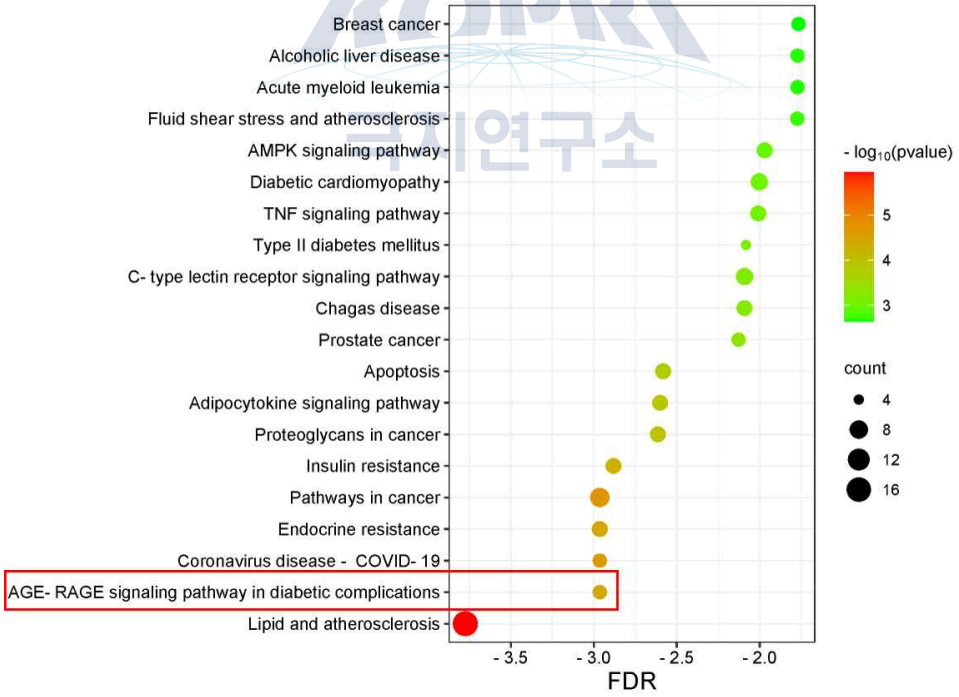
- Compound 1 - 9의 IC_{50} 값을 확인하기 위해 96-well plate에서 실험한 결과, *E. coli*에 대해 compound 5, 2-heptyl-4,6-dihydroxybenzoic acid (7), 8, 9는 각각 49.04, 58.20, 57.43, 68.14 μM, *S. aureus*에 대해 compound 5, squamarone (6), 7, 8, 9는 54.42, 61.55, 92.50, 50.84, 19.62 μM, *C. albicans*에 대해 compound 7, 8은 116.9, 20.45 μM의 IC_{50} 값을 나타내어 항균 활성을 확인

Compound	IC_{50} (μM)		
	E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
1	>200	>200	>200
2	>200	>200	>200
3	>200	>200	>200
4	>200	>200	>200
5	49.04	54.42	>200
6	>200	61.55	>200
7	58.20	92.50	116.9
8	57.43	50.84	20.45
9	68.14	19.62	>200
Kanamycin	2.132	5.236	-
Nystatin	-	-	0.444

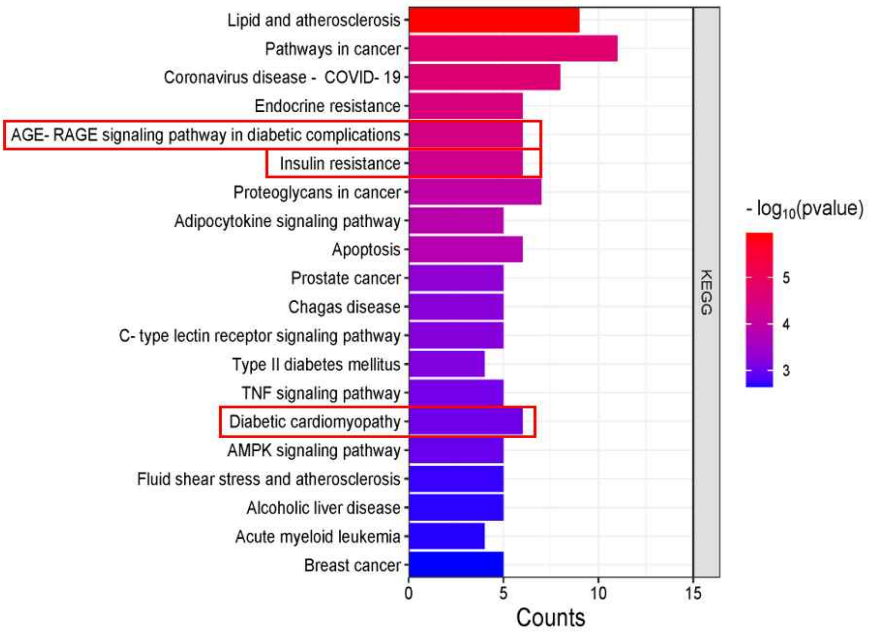
- 극지생물(*Sphaerophorus globosus*) 유래 화합물의 항균활성은 강하지 않았으므로, network pharmacology를 활용하여 적합한 단백질 타겟 및 관련 질환을 탐색

4) Network pharmacology를 이용한 극지(해양)생물(*Sphaerophorus globosus*) 유래 화합물의 타겟 protein 및 관련 질환 예측

- KEGG pathway를 이용하여 lecanoric acid (3), sphaerophorin (5), squamarone (6)와 연관성이 있는 타겟 genes 탐색

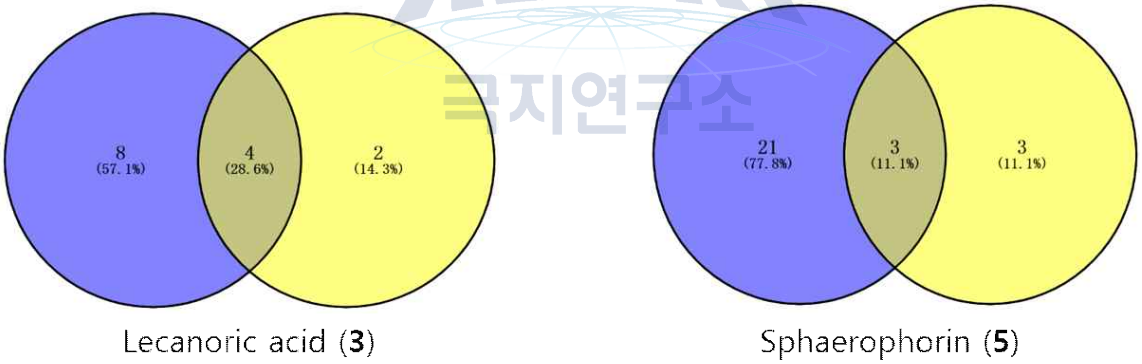


KOPRI 극지연구소



- Lecanoric acid (3), sphaerophorin (5), squamarone (6)는 지질대사 및 당뇨병 관련 pathway와 연관성이 있는 것을 확인

- Lecanoric acid (3), sphaerophorin (5), squamarone (6)와 당뇨병과 관련된 타겟 genes의 연관성 분석



○ Lecanoric acid (3), sphaerophorin (5)은 당뇨병과의 연관성이 각각 28.6, 11.1% 있는 것으로 확인

○ Network pharmacoloy 분석결과를 근거로 *in vitro* 항당뇨활성 평가를 수행

5) 극지(해양)생물(*Sphaerophorus globosus*) 유래 화합물의 인슐린 분비 증가활성 평가

- *In vitro* 인슐린 분비 증가활성 평가

○ INS-1 cells에서 glucose로 유도된 인슐린 분비에 대한 화합물의 활성 평가

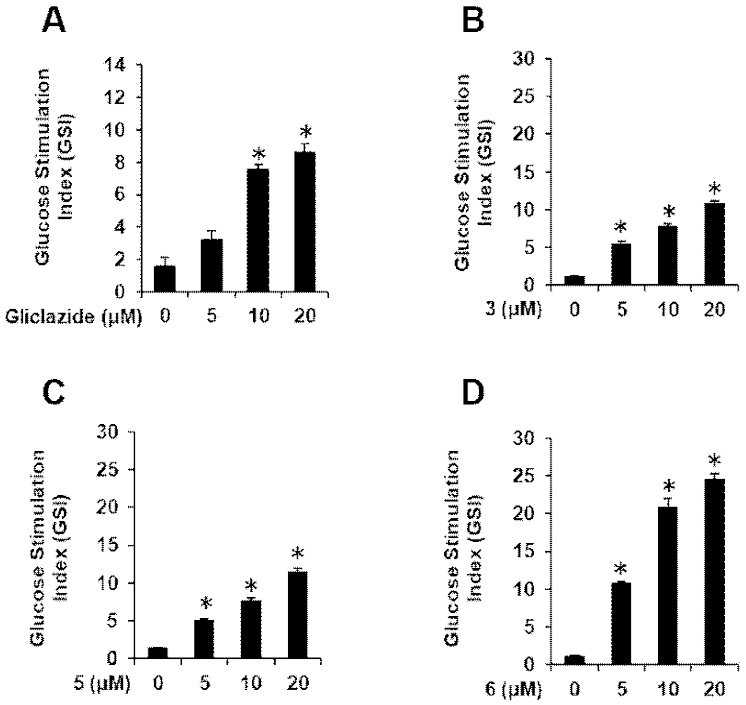


그림. 순서대로 (A) positive control (Gliclazide), (B) lecanoric acid (3), (C) sphaerophorin (5), (D) squamarone (6)

○ Lecanoric acid (3), sphaerophorin (5), squamarone (6)은 glucose로 자극된 INS-1 cells에서 인슐린 분비를 농도-의존적으로 증가시킴

○ Squamarone (6)은 양성대조군 약물 gliclazide (A)와 비교했을 때 더 강한 인슐린 분비 활성을 나타냄

○ Squamarone (6)의 IRS-2 (Ser731), P-IRS-2, PI3K, P-PI3K, Akt, P-Akt (Ser473), and PDX-1 단백질 발현 평가

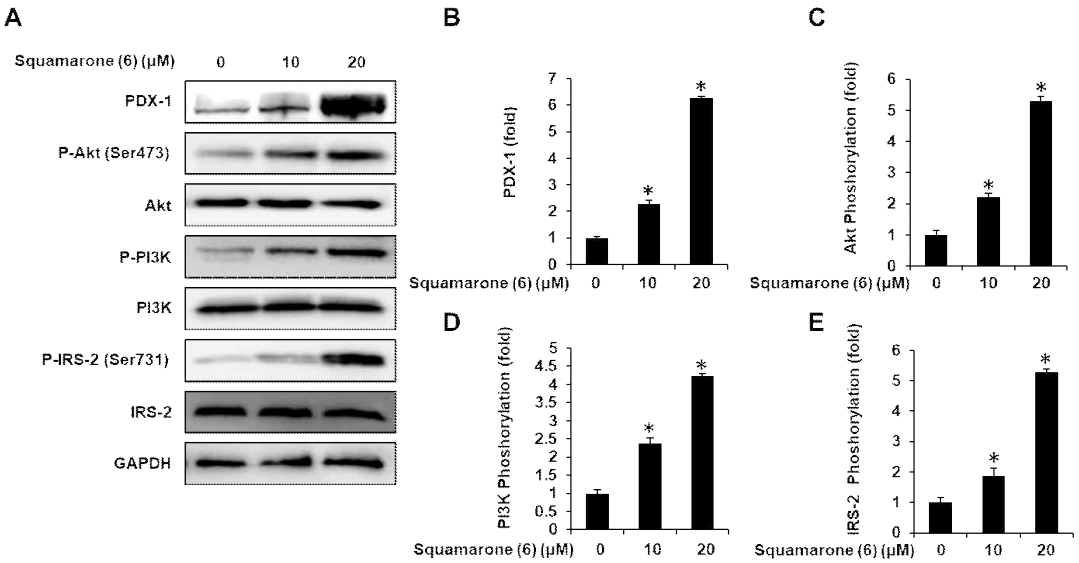


그림. Squamarone 처리 시 단백질 발현을 나타낸 western blotting assay 결과 (A), PDX-1 (B), Akt 인산화 (C), PI3K 인산화 (D), IRS-2 인산화 (E) 발현 효과

○ Squamarone (6)은 포도당 대사 및 인슐린 분비에 관여하는 PDX-1, Akt, PI3K, IRS-2 단백

질의 발현을 증가

6) 감염(항균, 항염증) 관련 타겟 protein에 대한 network pharmacology 분석

- Sphaerophorin (5), sphaeropherol (8), 4-*O*-demethyl sphaerophorin (9)의 약물성(drug-likeness, DL) 및 경구 생체이용률(oral bioavailability, OB) 평가

Drug	Pre-calculated molecular properties								Weighted QED_w^{mo}	Veber	RESULT
	MW	ALOGP	HBA	HBD	PSA	ROTB	AROM	ALERTS			
SPO (Sphaerophorin)	416.46	4.63	7	3	113.29	11	2	1	0.458	FALSE	PASS
SPE (Sphaeropherol)	208.3	3.43	2	2	40.46	6	1	0	0.752	TRUE	PASS
4ODS (4-*O*-dimethyl sphaerophorin)	402.44	4.23	7	4	124.29	10	2	1	0.438	TRUE	PASS

그림. Pass criteria: QED > 0.300 OR Veber's'TRUE'

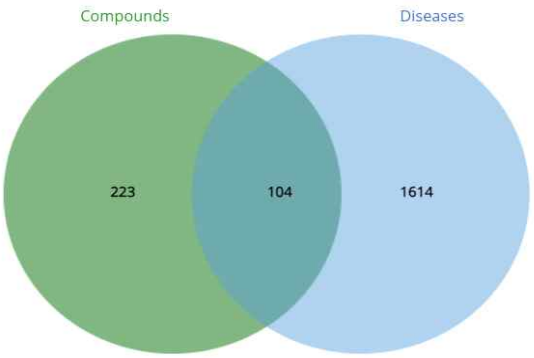
○ Sphaerophorin (5), sphaeropherol (8), 4-*O*-demethyl sphaerophorin (9)은 감염 및 염증 타겟 genes와 관련이 있음을 확인

- 화합물의 타겟 genes 예측

Compound	Targets STP	Targets PPB2	Targets SP	Total (Unique)
SPO (Sphaerophorin)	105	19	95	327
SPE (Sphaeropherol)	108	16	106	
4ODS (4-*O*-dimethyl sphaerophorin)	2	19	100	

* SwissTargetPrediction, STP (http://www.swisstargetprediction.ch/, accessed 28.11.2023)
* PolypharmacologyBrowser PPB2 (https://ppb2.gdb.tools/, accessed 28.11.2023)
* SuperPred, SP (https://prediction.charite.de/, accessed 28.11.2023)

- 감염성 질환에 대한 화합물의 타겟 설정
- 질환과 관련된 genes 예측 및 잠재적인 타겟 분석

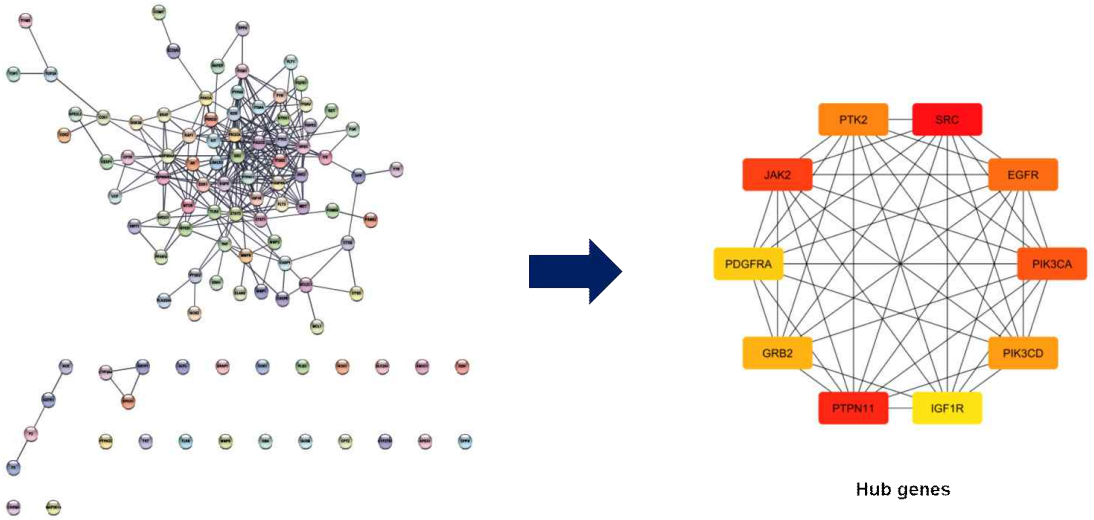


* GeneCards(https://www.genecards.org/, accessed 28.11.2023)

* Venn Diagrams (https://www.biotools.fr/misc/venny, accessed 28.11.2023)

○ 키워드를 '감염(infection)'으로 했을 때, score가 5 이상인 타겟이 1614개, 공통적인 타겟이 104개임을 확인

- 잠재적인 타겟과 핵심 타겟의 단백질 간 연결(Protein-Protein Interaction, PPI) 관계망 도출

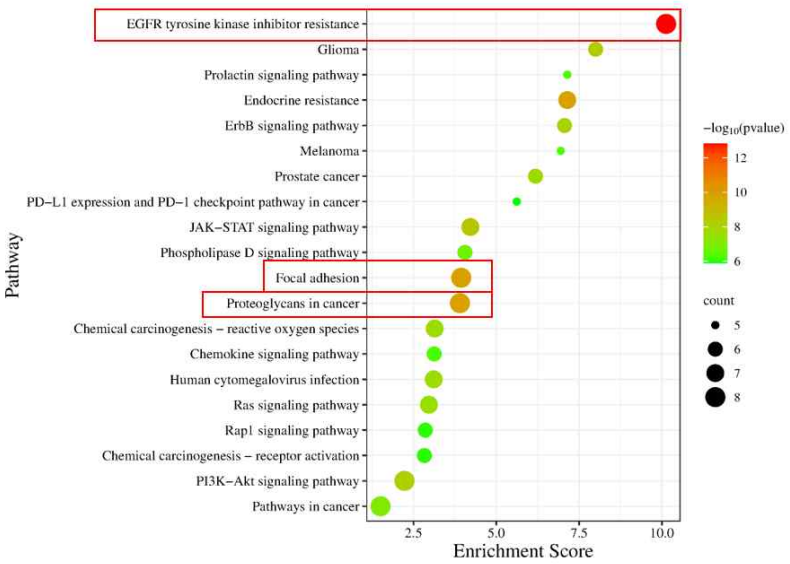


Hub genes

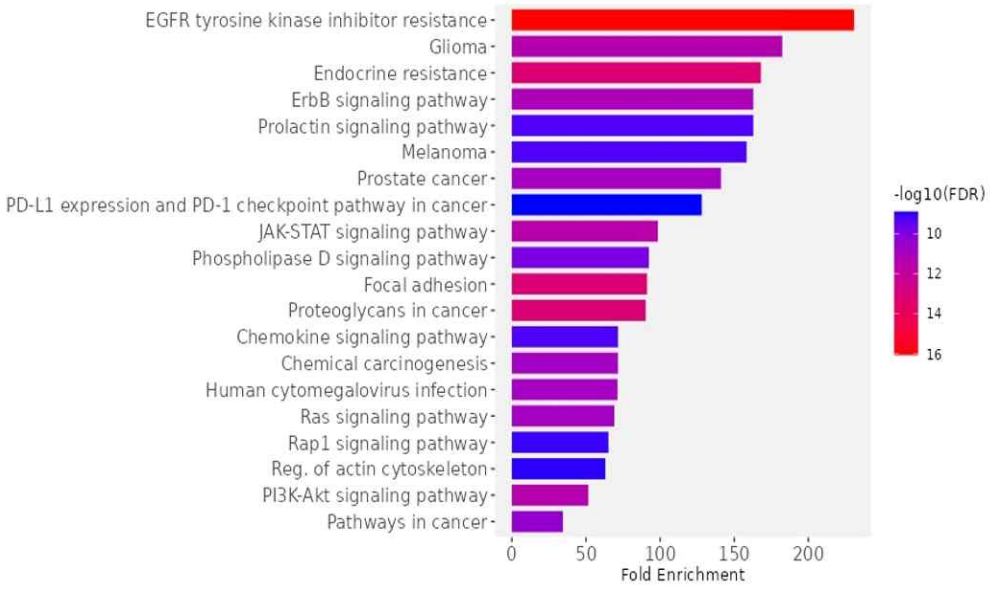
* STRING, (https://string-db.org/, accessed 28.11.2023) - highest confidence score of 0.900;*H. sapiens* as the default organism

○ 최종적으로 PPI를 통해 PTK2, SRC, EGFR, PIK3CA, PIK3CD, IGF1R, PTPN11, GRB2, PDGFRA, JAK2 등 10개의 hub genes와 관계있음을 확인

- Sphaerophorin (5), sphaeropherol (8), 4-*O*-demethyl sphaerophorin (9)와 연관성이 있는 질환 대사경로 Mapping 제작



DAVID, SRplot



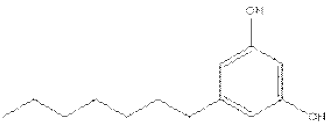
ShinyGO 0.77

Pathway	*p*-value
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	1.51E-13
Focal adhesion	3.58E-13
Proteoglycans in cancer	8.13E-13

* DAVID (https://david.ncifcrf.gov/, accessed 28.11.2023)
* SRplot(https://www.bioinformatics.com.cn/plot_basic_gopathway_enrichment_bubbleplot_081_en, accessed 28.11.2023)
* ShinyGO0.77 (http://bioinformatics.sdstate.edu/go/, accessed 28.11.2023)

○ Sphaerophorin (5), sphaeropherol (8), 4-*O*-demethyl sphaerophorin (9)에 대해 관련성이 높은 질환 경로를 예측했을 때, EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance에서 가장 높은 연관성을 보였으며, focal adhension 및 proteoglycans in cancer에 대해서도 순차적으로 연관성을 보임

- Sphaeropherol (8)과 EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance의 연관성



SPE
(Sphaeropherol)

Chem	Hub gene
SPE	IGF1R
SPE	JAK2
SPE	PDGFRA
SPE	SRC
SPO	GRB2
SPO	PDGFRA
SPO	PIK3CA
4ODS	EGFR
4ODS	PDGFRA
4ODS	PIK3CD

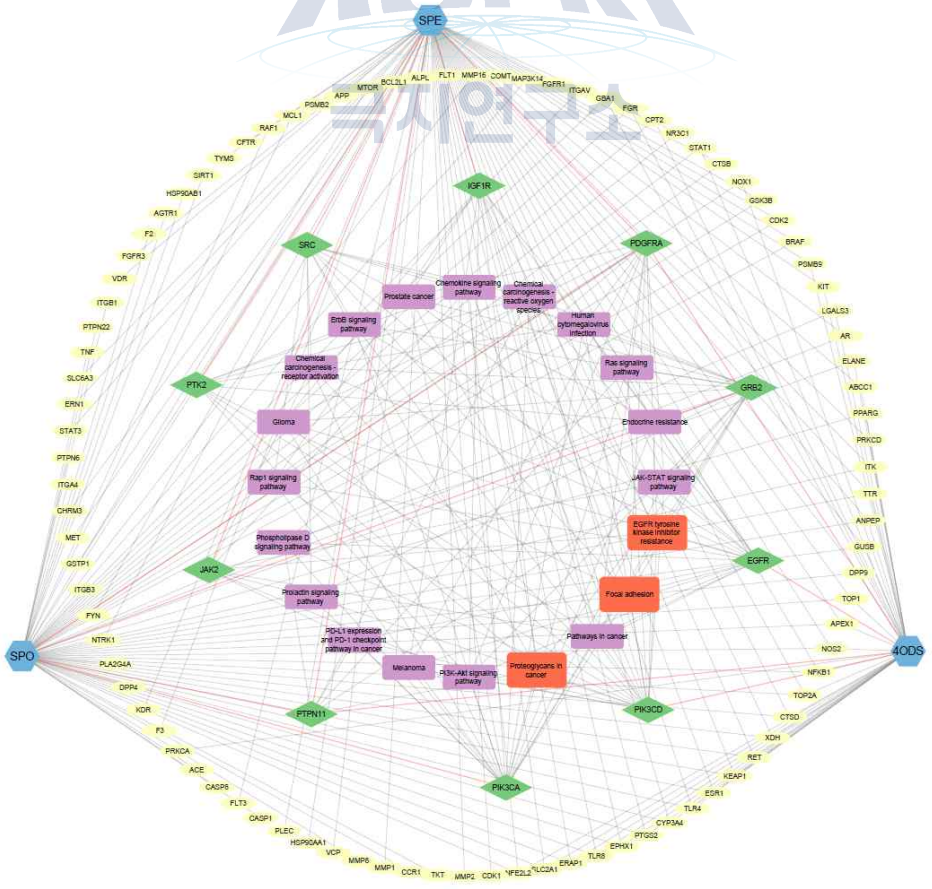
○ 3개의 화합물 중 sphaeropherol (8)이 hub genes와 network가 가장 많이 연결되어있는 것을 확인

○ 암과 관련된 경로인 EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance에서 IGF1R, JAK2, PDGFRA, SRC와 연결성이 높음

○ 세포와 기질 결합의 형태인 focal adhension에서 IGF1R, PDGFRA, PTK2, SRC와 연결성이 높음

○ 암세포의 proteoglycans에 영향을 주는 hub genes인 IGF1R, PTK2, PTPN11, SRC와 연결성이 높음

- 통합된 Compounds-Key Targets-Pathways (C-T-P) Network의 분석



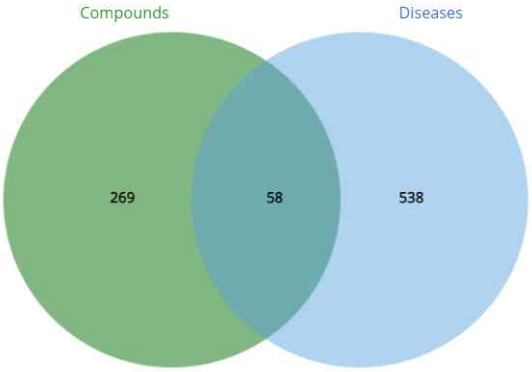
Compound	Degree	Connections with Hubs
SPO	66	4
SPE	66	6
4ODS	39	4

* Cytoscape (Version: 3.10.1)

○ Sphaeropherol (8)이 감염과 관련된 hub genes와의 가장 높은 연관성을 보임

- 염증성 질환에 대한 화합물의 타겟 분석

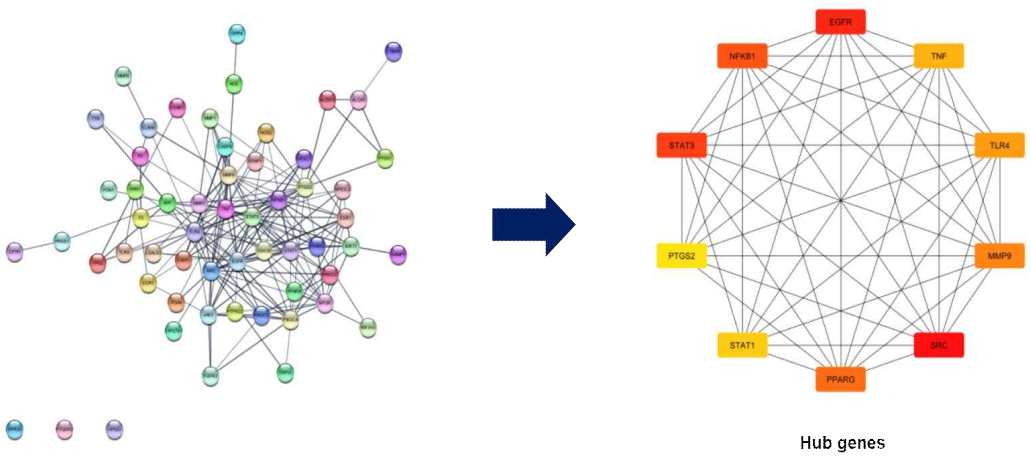
- 질환과 관련된 genes 예측 및 잠재적인 타겟 분석



* GeneCards(https://www.genecards.org/, accessed 28.11.2023)
* Venn Diagrams (https://www.biotools.fr/misc/venny, accessed 28.11.2023)

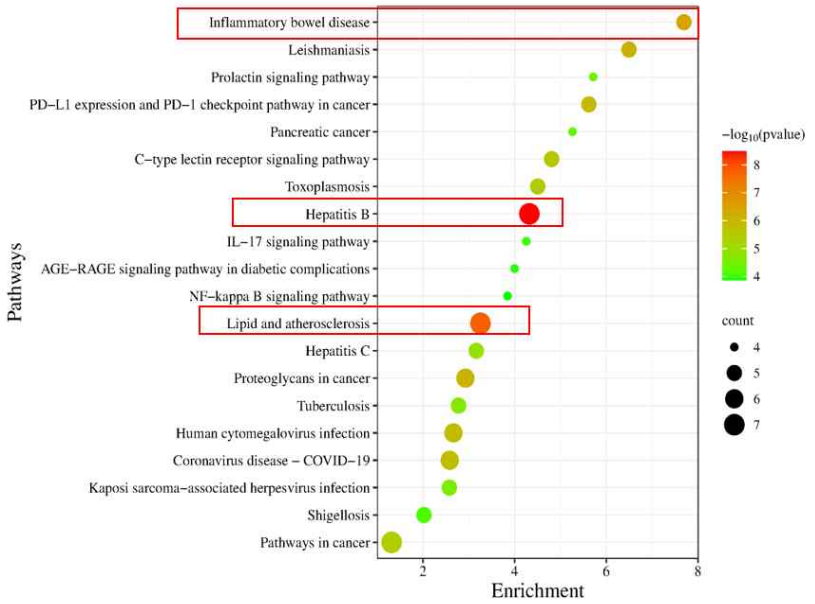
○ 키워드를 '염증(inflammation)'으로 했을 때, score가 5 이상인 타겟이 538개, 공통적인 타겟이 58개임을 확인

- 잠재적인 타겟과 핵심 타겟의 단백질 간 연결(Protein-Protein Interaction, PPI) 관계망

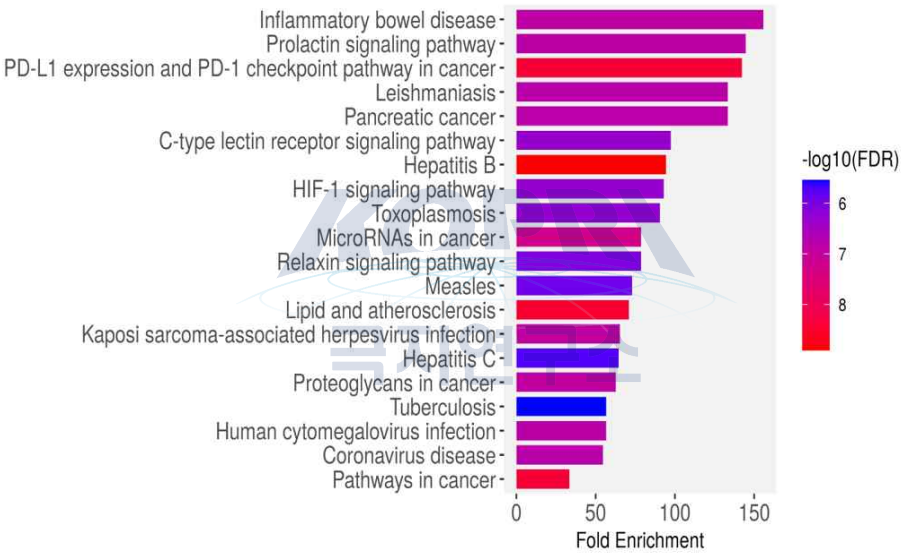


* STRING, (https://string-db.org/, accessed 28.11.2023) - highest confidence score of 0.900;*H. sapiens* as the default organism

- Sphaerophorin (5), sphaeropherol (8), 4-*O*-demethyl sphaerophorin (9)와 연관성이 있는 질환 대사경로 Mapping 제작



DAVID, SRplot



ShinyGO 0.77

Pathway	*p*-value
Hepatitis B	3.30E-09
Lipid and atherosclerosis	1.82E-08
Inflammatory bowel disease	3.66E-07

* DAVID (https://david.ncifcrf.gov/, accessed 28.11.2023)

* SRplot(https://www.bioinformatics.com.cn/plot_basic_gopathway_enrichment_bubbleplot_081_en, accessed 28.11.2023)

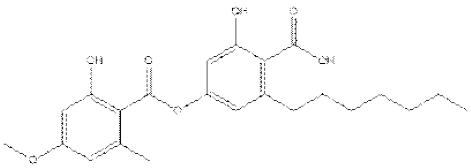
* ShinyGO0.77 (http://bioinformatics.sdstate.edu/go/, accessed 28.11.2023)

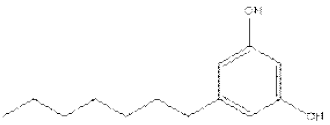
○ Sphaerophorin (**5**), sphaeropherol (**8**), 4-*O*-demethyl sphaerophorin (**9**)에 대해 관련성이 높은 질환 경로를 예측했을 때, inflammatory bowel disease에서 가장 높은 연관성을 보였으며 hepatitis B, lipid and atherosclerosis에 대해서도 순차적으로 연관성을 보임

- Sphaerophorin (5), sphaeropherol (8), 4-*O*-demethyl sphaerophorin (9)와 hub genes의 연관성

○ 3개의 화합물 중 sphaerophorin (5), sphaeropherol (8)이 hub genes와의 network가 가장 많이 연결되어있는 것을 확인

- Sphaerophorin (5) 및 sphaeropherol (8)과 hepatitis B 관련 hub genes의 연관성





SPO
(Sphaerophorin)

SPE
(Sphaeropherol)

Chem	Hub gene
SPO	MMP9
SPO	NFKB1
SPO	STAT1
SPO	TLR4
SPO	TNF
SPE	MMP9
SPE	NFKB1
SPE	SRC
SPE	STAT3
SPE	TLR4
4ODS	NFKB1
4ODS	STAT1
4ODS	TLR4

KOPRI 극지연구소

○ B형 간염 바이러스(HBV) 감염 경로와 연관된 hub genes와 sphaerophorin (5), sphaeropherol (8)의 연결성이 높음

- Sphaerophorin (5), sphaeropherol (8)과 lipid and atherosclerosis 관련 hub genes의 연관성

Chem	Hub gene
SPO	TNF
SPO	TLR4
SPO	PPARG
SPO	NFKB1
SPO	MMP9
SPE	TLR4
SPE	STAT3
SPE	SRC
SPE	NFKB1
SPE	MMP9
4ODS	TLR4
4ODS	PPARG
4ODS	NFKB1

○ 지질 및 죽상동맥경화증 관련 hub genes와 sphaerophorin (5), sphaeropherol (8)의 연결성이 높음

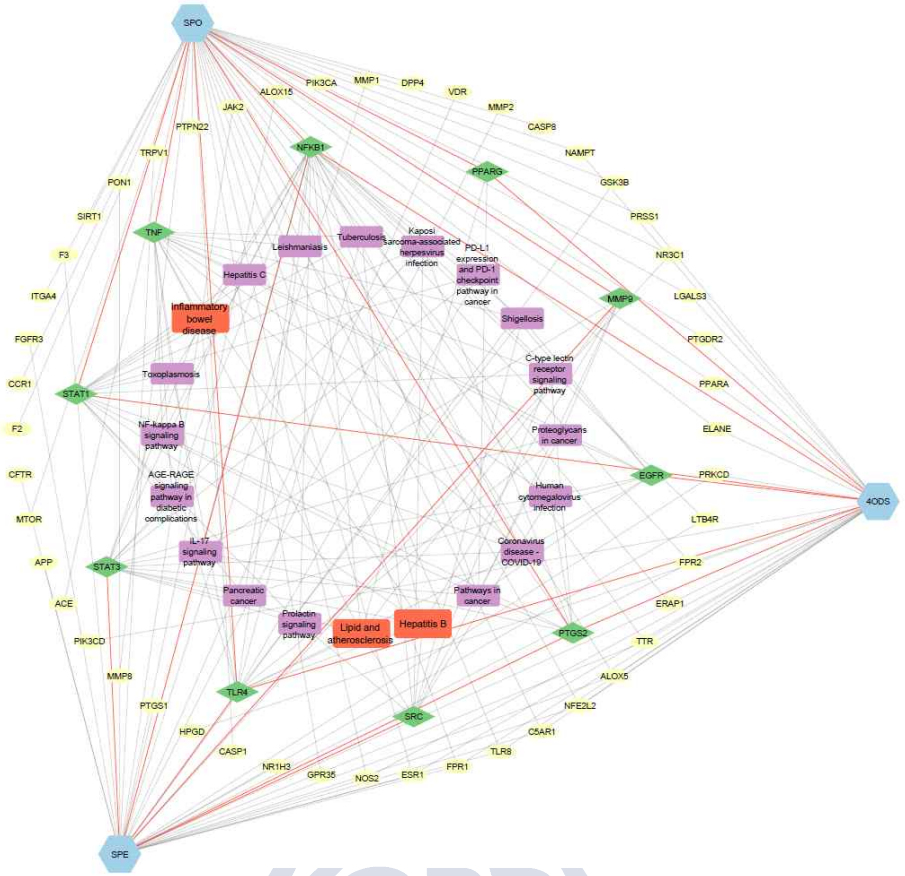
- Sphaerophorin (5)과 inflammatory bowel disease 관련 hub genes의 연관성

Chem	Hub gene
SPO	TNF
SPO	TLR4
SPO	STAT1
SPO	NFKB1
SPE	TLR4
SPE	STAT3
SPE	NFKB1
4ODS	TLR4
4ODS	STAT1
4ODS	NFKB1

KOPRI 극지연구소

○ 염증성 장질환과 관련된 hub genes인 TNF, TLR4, STAT1, NFKB1과 연결성이 높음

- 통합된 Compounds-Key Targets-Pathways (C-T-P) Network의 분석



Compound	Degree	Connections with Hubs
SPO	39	7
SPE	33	6
4ODS	25	6

* Cytoscape (Version: 3.10.1)

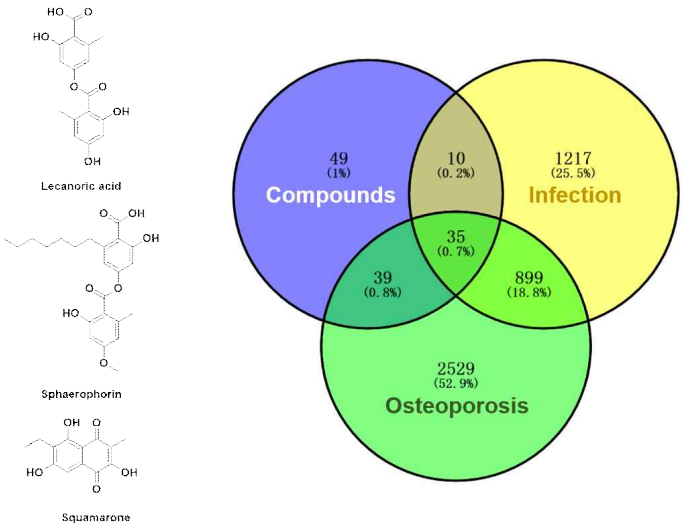
○ Sphaerophorin (5)이 항감염·항염증과 관련된 hub genes와 가장 높은 연관성을 보임

○ Sphaeropherol (8)은 EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance, focal adhension, proteoglycans in cancer와의 관련성이 높은 것으로 확인되어 감염성 질환의 잠재적인 타겟 화합물임을 제시

○ Sphaerophorin (5)는 hepatitis B, lipid and atherosclerosis 및 inflammatory bowel disease와의 network가 확인되어 간염, 죽상동맥경화증 및 염증성장질환의 잠재적인 타겟 화합물임을 확인

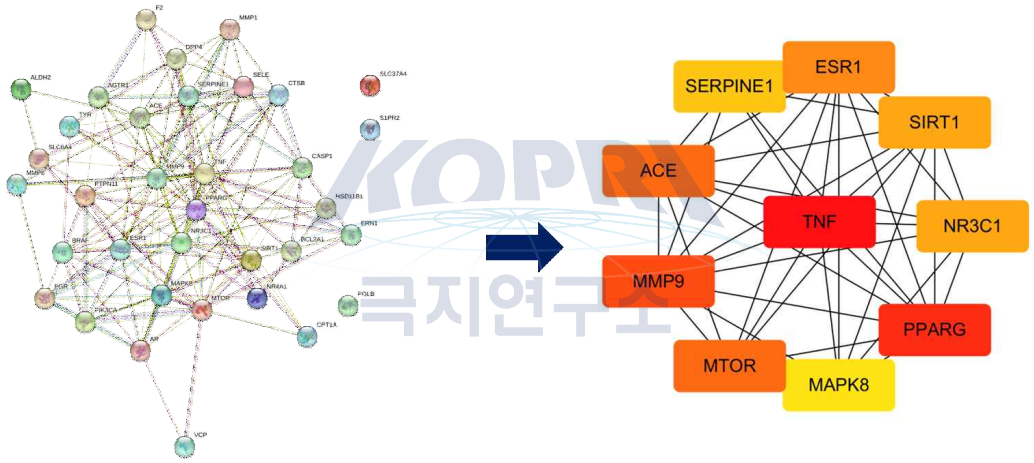
○ 추후 연구에서, 극지(해양)생물(*Sphaerophorus globosus*) 유래 화합물의 항감염·항염증작용에 대한 연구 방향 제시

- Lecanoric acid (3), sphaerophorin (5), squamarone (6)과 감염 또는 골다공증 관련 genes 예측 및 잠재적인 타겟 분석



○ 키워드를 '감염(infection)' 또는 '골다공증(osteoporosis)'으로 했을 때, 공통적인 타겟이 35개임을 확인

- 잠재적인 타겟과 핵심 타겟의 단백질 간 연결(Protein-Protein Interaction, PPI) 관계망 도출

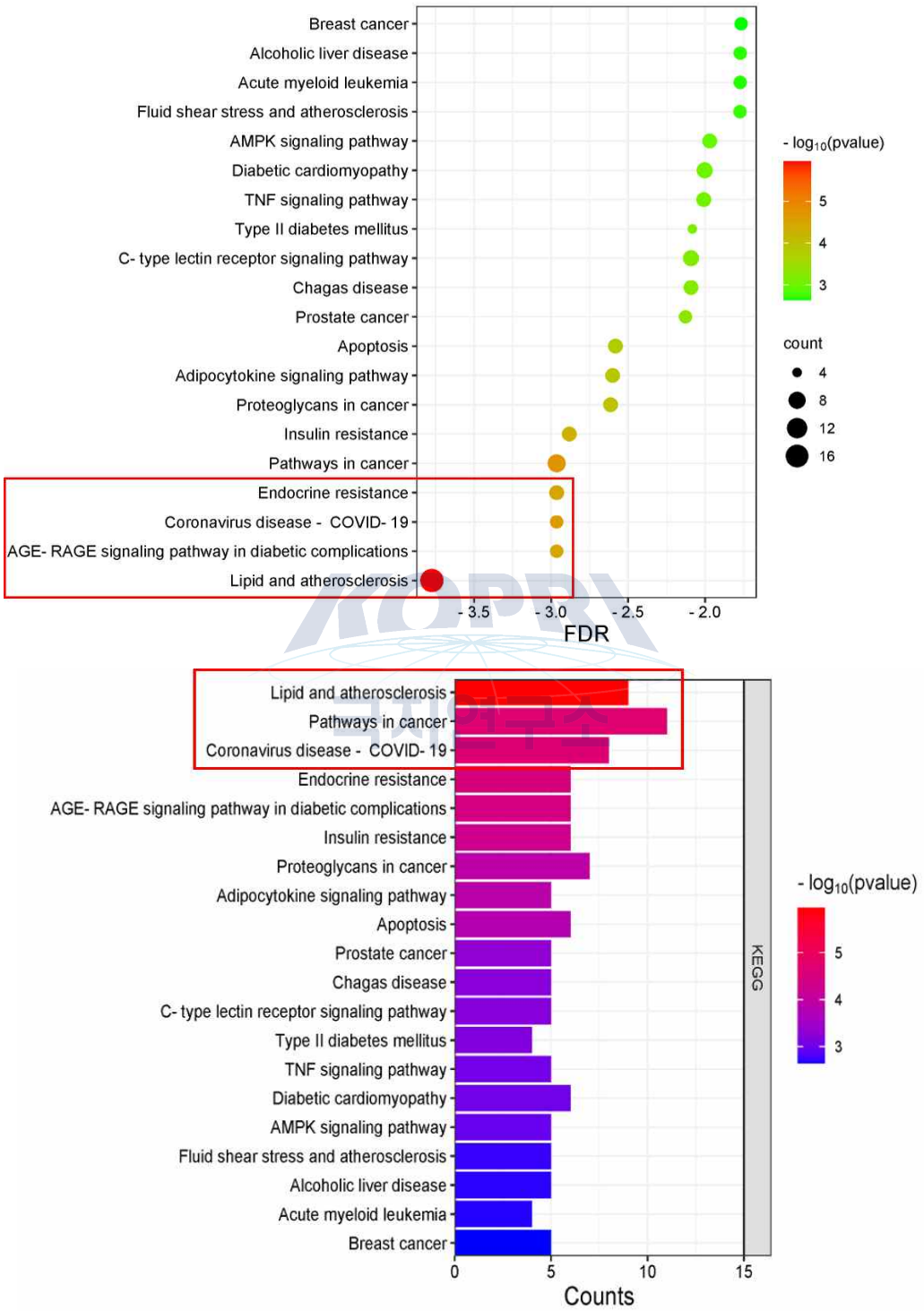


Top 10 in network ranked by Degree method		
Rank	Name	Score
1	TNF	28
2	PPARG	23
3	MMP9	20
4	MTOR	17
4	ACE	17
6	ESR1	16
7	NR3C1	15
7	SIRT1	15
9	SERPINE1	14
10	MAPK8	12

○ 최종적으로 PPI를 통해 암 및 염증 관련 인자인 TNF와 가장 높은 연관성이 있음을 확인

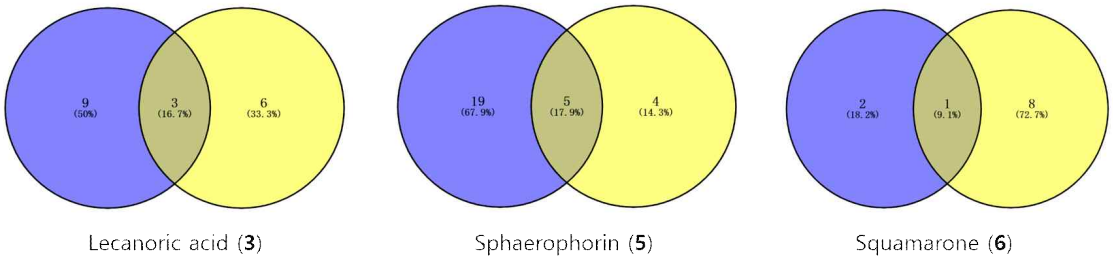
○ 그 밖에, PPARG, MMP9, MTOR, ACE, ESR1, NR3C1, SIRT1, SERPINE1, MAPK8 순으로 연관성이 있음을 확인

- Lecanoric acid (3), sphaerophorin (5), squamarone (6)와 연관성이 있는 질환 대사경로 Mapping 제작



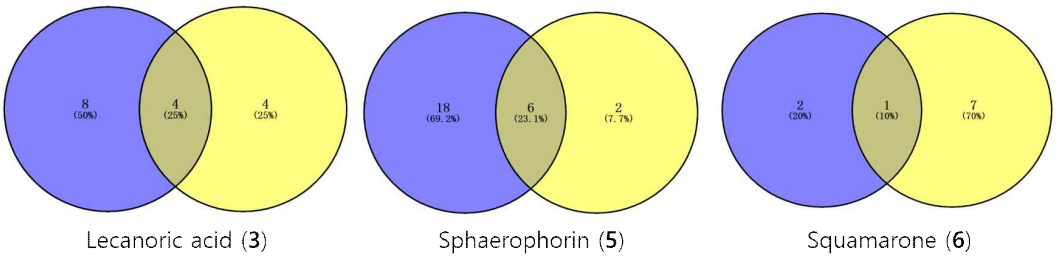
○ Lecanoric acid (3), sphaerophorin (5), squamarone (6)에 대해 관련성이 높은 질환 경로를 예측했을 때, lipid and atherosclerosis에서 가장 높은 연관성을 보였으며 암 및 COVID-19에 대해서도 순차적으로 연관성을 보임

- Lecanoric acid (3), sphaerophorin (5), squamarone (6)과 lipid and atherosclerosis 관련 hub genes의 연관성



○ Lecanoric acid (**3**), sphaerophorin (**5**), squamarone (**6**)에서 지질 및 죽상동맥경화증과의 연관성이 각각 16.7%, 17.9%, 9.1% 있는 것을 확인

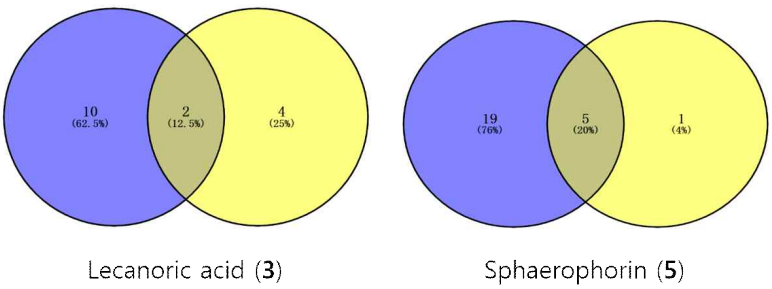
- Lecanoric acid (3), sphaerophorin (5), squamarone (6)과 COVID-19 관련 hub genes의 연관성



○ Lecanoric acid (**3**), sphaerophorin (**5**), squamarone (**6**)에서 COVID-19와의 연관성이 각각 25%, 23.1%, 10.0% 있는 것을 확인

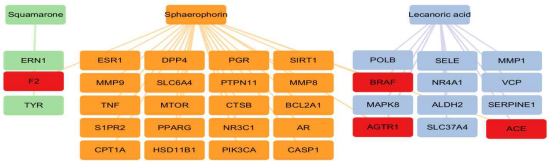
KOPRI 극지연구소

- Lecanoric acid (3), sphaerophorin (5), squamarone (6)과 endocrine resistance 관련 hub genes의 연관성



○ Lecanoric acid (**3**), sphaerophorin (**5**), squamarone (**6**)에서 endocrine resistance와의 연관성이 각각 12.5%, 20.0% 있는 것을 확인

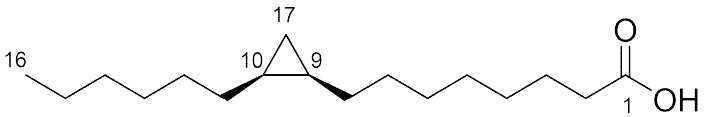
- 통합된 Compounds-Key Targets-Pathways (C-T-P) Network의 분석



○ Lecanoric acid (3), sphaerophorin (5), squamarone (6)과 감염 및 골다공증 관련 인자의 복합적인 상호 관계망을 도출했을 때, F2, BRAF, AGTR1, ACE와의 연관성이 높게 나타남을 확인

7) Network Pharmacology를 이용한 극지(해양)생물(*Sphaerotylus antarcticus* Kirkpatrick) 유래 화합물 methyl *cis*-9,10-methylenehexadecanoate의 타겟 protein 및 관련 질환 예측

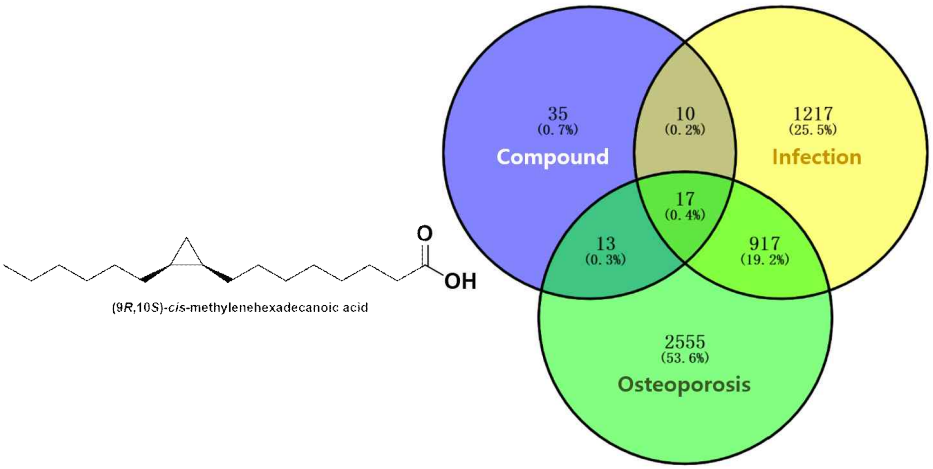
Sphaerotylus antarcticus Kirkpatrick, 1907



1

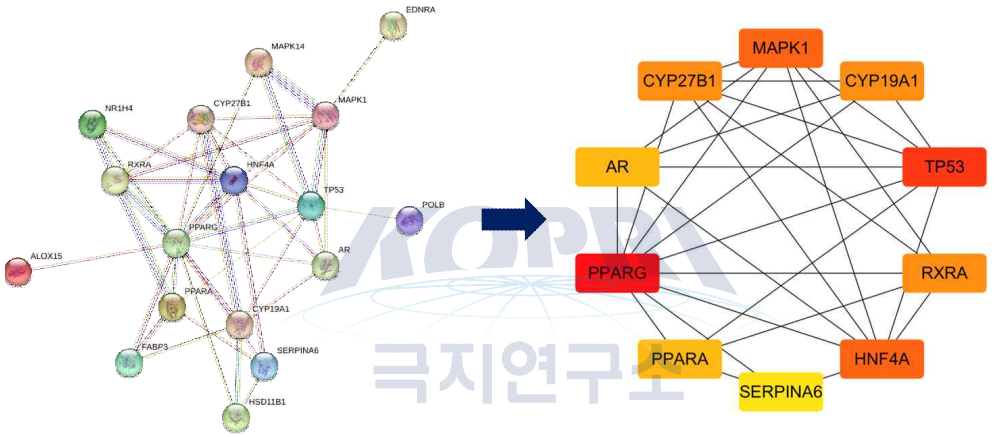
Methyl *cis*-9,10-methylenehexadecanoate의 화학구조

- Methyl *cis*-9,10-methylenehexadecanoate와 감염 또는 골다공증 관련 genes 예측 및 잠재적인 타겟 분석



○ 키워드를 '감염(infection)' 또는 '골다공증(osteoporosis)'으로 했을 때, 공통적인 타겟이 17개임을 확인

- 잠재적인 타겟과 핵심 타겟의 단백질 간 연결(Protein-Protein Interaction, PPI) 관계망 도출



Top 10 in network ranked by Degree method		
Rank	Name	Score
1	PPARG	14
2	TP53	9
3	HNF4A	8
3	MAPK1	8
5	CYP19A1	6
5	CYP27B1	6
5	RXRA	6
8	AR	5
8	PPARA	5
10	SERPINA6	4

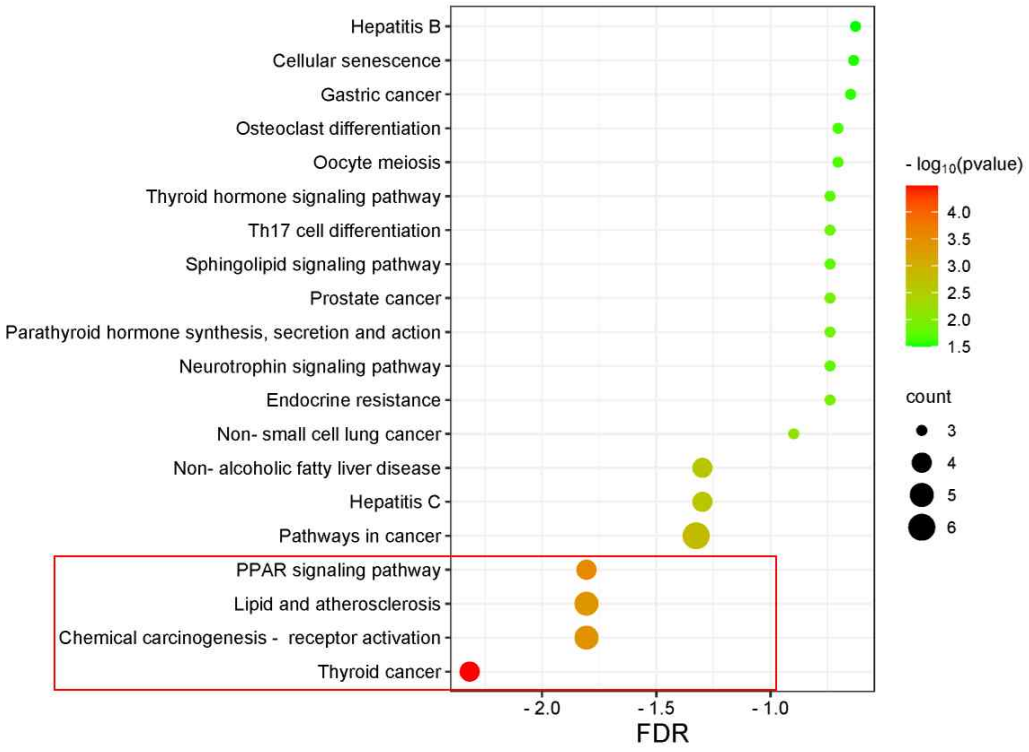
○ 최종적으로 PPI를 통해 인슐린 저항성 관련 인자인 PPARG와 가장 높은 연관성이 있음을 확인

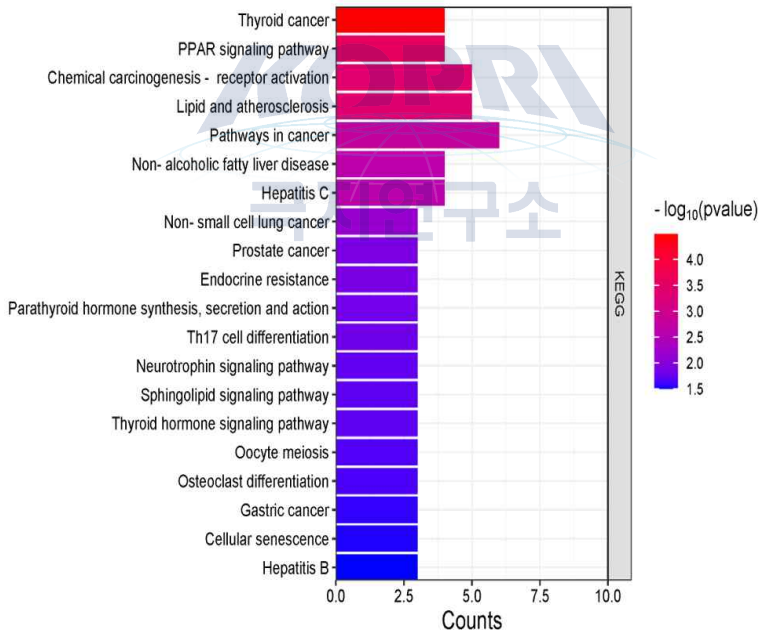
○ 그 밖에, TP53, HNF4A, MAPK1, CYP19A1, CYP27B1, RXRA, AR, PPARA, SERPINA6

순으로 연관성이 있음을 확인

KOPRI
극지연구소

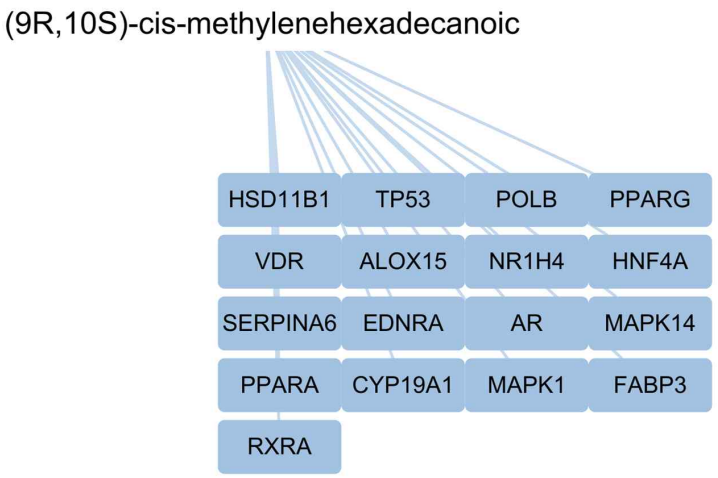
- Methyl *cis*-9,10-methylenehexadecanoate와 연관성이 있는 질환 대사경로 Mapping 제작





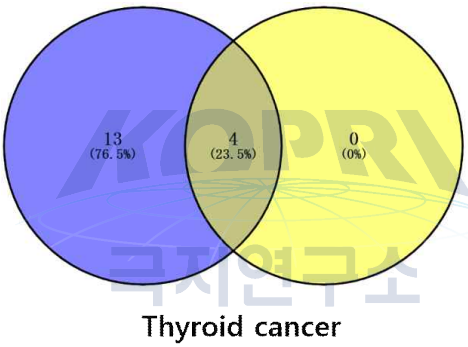
○ Methyl *cis*-9,10-methylenehexadecanoate에 대해 관련성이 높은 질환 경로를 예측했을 때, thyroid cancer와 가장 높은 연관성을 보였으며 chemical carcinogenesis-receptor activation, lipid and atherosclerosis, PPAR에 대해서도 순차적으로 연관성을 보임

- 통합된 Compounds-Key Targets-Pathways (C-T-P) Network의 분석



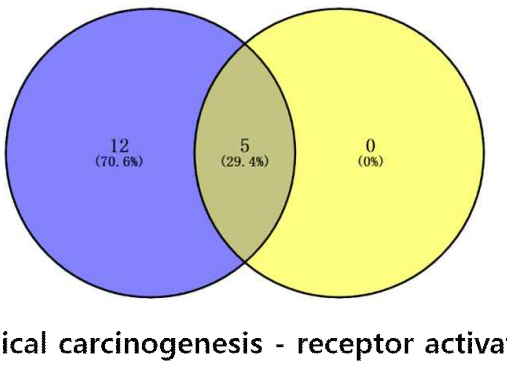
○ Methyl *cis*-9,10-methylenehexadecanoate과 감염 및 골다공증 관련 인자의 복합적인 상호 관계망을 도출했을 때, 17개 pathway와 연관성을 확인

- Methyl *cis*-9,10-methylenehexadecanoate와 thyroid cancer 관련 hub genes의 연관성



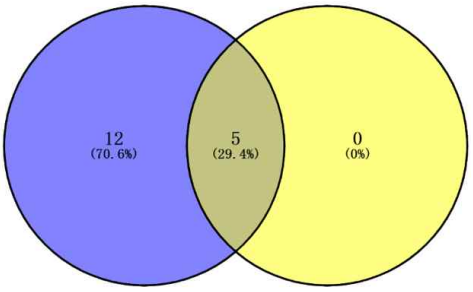
○ Methyl *cis*-9,10-methylenehexadecanoate는 갑상선암과의 연관성이 23.5% 있음을 확인

- Methyl *cis*-9,10-methylenehexadecanoate와 chemical carcinogenesis-receptor activation 관련 hub genes의 연관성



○ Methyl *cis*-9,10-methylenehexadecanoate는 화학적 발암과의 연관성이 29.4% 있음을 확인

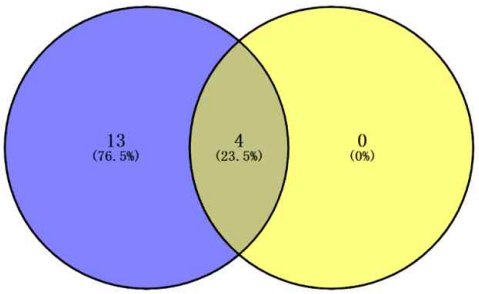
- Methyl *cis*-9,10-methylenehexadecanoate와 lipid and atherosclerosis 관련 hub genes의 연관성



Lipid and atherosclerosis

○ Methyl *cis*-9,10-methylenehexadecanoate는 지질 및 죽상동맥경화증과의 연관성이 29.4% 있음을 확인

○ Methyl *cis*-9,10-methylenehexadecanoate와 PPAR 관련 hub genes의 연관성



PPAR signaling pathway

○ Methyl *cis*-9,10-methylenehexadecanoate는 PPAR signaling pathway과의 연관성이 23.5% 있음을 확인

○ Methyl *cis*-9,10-methylenehexadecanoate는 thyroid cancer, chemical carcinogenesis-receptor activation, lipid and atherosclerosis 및 PPAR signaling pathway와의 network가 확인되어 향후 관련 연구 방향 제시

KOPRI 극지연구소

<2세부> 극지 유전자원 기반 항생물질 변형효소 선별 (항생물질 변형체/타겟단백질 복합체 3차 구조 규명)

가. 항생물질 타겟 단백질 발현 및 정제 (극지연)

1) *Porphyromonas gingivalis* 유래 Aspartate semialdehyde dehydrogenase, PgASADH 구조 및 생화학적 특성 연구

- 박테리아(*Porphyromonas gingivalis*)는 병원성을 띄는 혐기성 박테리아로 특히 치주염과 관련된 주요 병원체로 간주됨. 특히, 이 박테리아는 탄수화물 활용 능력이 매우 낮은 것으로 알려져 있으며 유리 아미노산을 흡수할 수 없기 때문에 짧은 올리고펩타이드만을 탄소 및 에너지원으로 활용하는 것으로 알려져 있음. 이번 연구에서는 병원균의 아미노산 합성에 매우 중요한 전구체인 aspartate β-semialdehyde(ASA)에 연구를 진행하여 병원균의 생존에 주요한 아미노산 합성에 관한 연구를 진행함. 이 연구를 통해서 병원성 박테리아의 생존 전략을 이해하고 새로운 형태의 항생제 개발 방법에 대한 기술을 모색함.

- Aspartate Semialdehyde Dehydrogenase의 특성 연구 및 구조 분석

○ Porphyromonas gingivalis에서 유래한 Aspartate semialdehyde dehydrogenase (PgASADH, UniProtKB 코드 A0A1R4DY25)는 aspartyl-β-phosphate의 탈인산화 과정을 통해 ASA를 생성하는 주요 효소

○ ASA는 후에 methionine, threonine, isoleucine, diaminopimelate (DAP) 또는 lysine으로 프

로세스되는 중요한 전구체로 알려져 있음.

○ 이 연구에서는 PgASADH의 X-ray 결정학을 통해 삼차원 구조를 분석을 진행함. PgASADH의 apo 형태 구조를 1.73 □의 해상도로 결정하기 위해 결정화 및 X-선 회절 방법을 사용하였고 Unit Cell에서 두 개의 단량체가 확인되었고, Matthews 계수는 2.22이며 용매 비율은 44.5% 였음.

○ apo-PgASADH 구조는 Alphafold 데이터베이스의 서열 기반 모델링된 template (모델 번호: AF-A0A1R4DY25-F1)을 사용하여 Molecular Replace 방법으로 해석되었으며, 최종 구조는 Rfactor가 21.7%, Rfree가 23.8%로 고해상도의 구조를 얻음(그림 C,D).

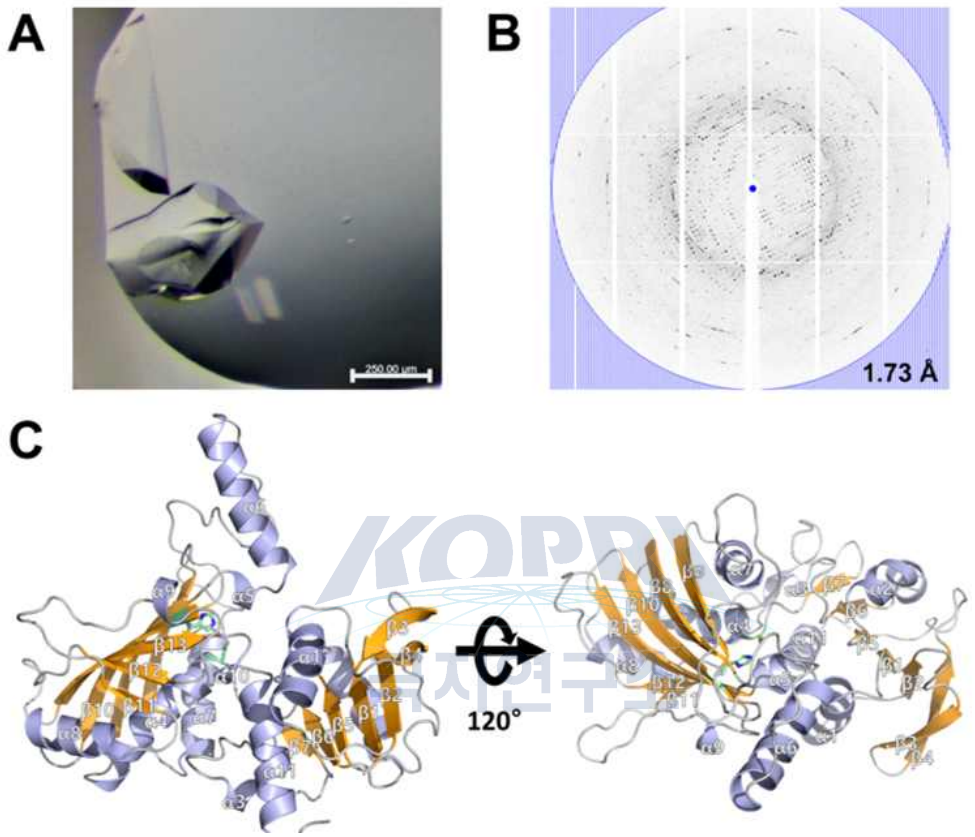


그림. PgASADH 단백질의 결정(A)과 이를 이용한 X-선 회절 데이터 이미지(B).
(C,D) X-ray 회절 데이터를 이용한 구분 분석 결과.

- PgASADH의 구조 특성

○ 단량체 단위에서는 11개의 α-helix와 13개의 β-strand로 이루어져 있으며, β-strand는 수소 결합을 통해 형성된 확장된 β-sheet를 형성(그림 C). N-terminal 도메인에서는 보존된 β-α-β motif가 관찰되었고, α-helix 묶음은 β-sheet를 둘러싸며 전형적인 Rossmann 폴드를 형성. 이러한 폴드는 효소의 NAD/NADP 또는 FAD와 같은 뉴클레오타이드 cofactor를 결합시키는 데 사용되는 것으로 알려져 있음.

○ 결과적으로 PgASADH는 37.3 kDa의 분자량을 가진 338개의 아미노산 잔기로 이루어져 있었으며, 분석적 크기배제 크로마토그래피(SEC) 결과에서는 PgASADH가 용액 내에서 이량체 상태로 존재하는 것을 확인하였음(그림 B 그리고 C).

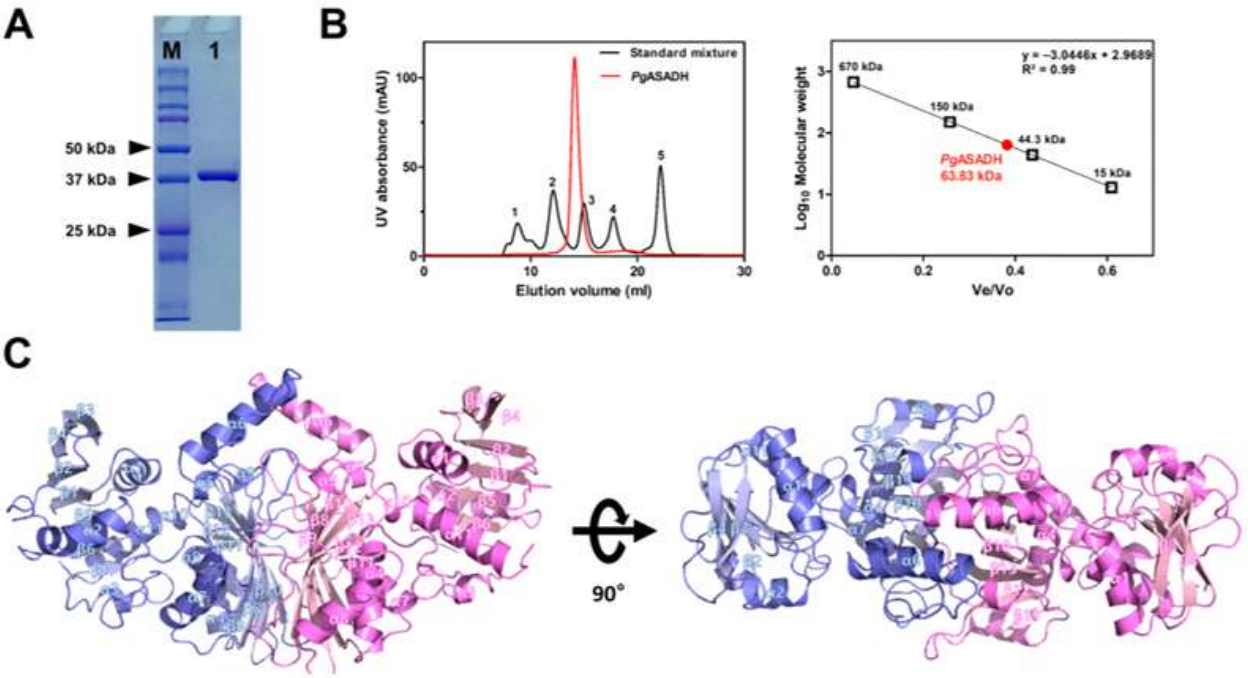


그림. PgASADH의 Dimerization. (A) PgASADH의 SDS-PAGE 전기영동 결과. (B) 크기배제 크로마토그래피 결과는 용액 내 PgASADH의 올리고머 상태를 보여줌.. 1: Bovine thyroglobulin (670 kDa), 2: g-globulins from bovine blood (150 kDa), 3: albumin chicken egg grade VI (44.3 kDa), 4: Ribonuclease A type I-A from bovine pancreas (15 kDa), 5: p-aminobenzoic acid. (C) PgASADH의 이량체 구조. PgASADH 결정의 Unit Cell은 두 개의 PgASADH 분자로 이루어져 있음(슬레이트 및 연한 핑크).

KOPRI 극지연구소

- PgASADH와 cofactor 결합 구조

○ PgASADH의 cofactor 결합 구조는 동일한 1.73 Å 해상도로 해석되었고, 이 구조는 PgASADH의 apo 형태와 비슷하게 비대칭 단량체에서 복합체 구조를 이루는 두 개의 단량체를 포함하고 있음. 이 구조에서는 aspartate-semialdehyde와 NADP라는 cofactor가 함께 결합된 형태를 관찰할 수 있었음.

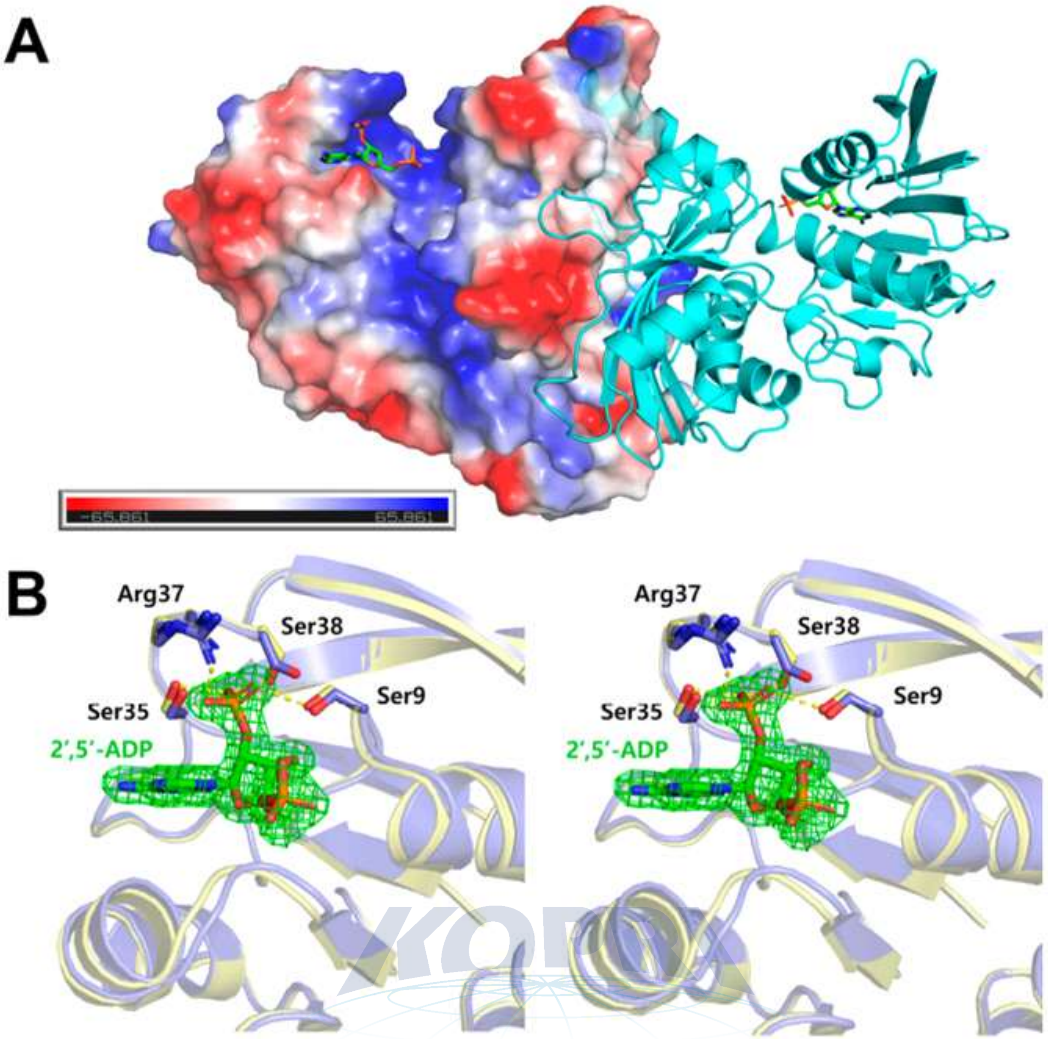


그림. 20,50-ADP 결합한 PgASADH 구조. (A) 전체적인 20,50-ADP 결합 구조는 전기적 표면 전위 (chain A)와 cartoon (chain B, 청록색) 모델을 사용하여 나타냄. (B) Apo 및 20,50-ADP (녹색) 결합 복합체 구조의 조효소 결합 부위 (노란색)를 나타냄. 20,50-ADP에 대한 전자밀도 map은 녹색으로 표시함.

- PgASADH의 활성 위치 및 비교

○ InterProScan을 통한 서열 기반 도메인 예측에 의하면 PgASADH 구조는 두 가지 다른 도메인으로 구성되어 있음을 나타냄: cofactor 결합 도메인(잔기 2-118)과 기질 결합 도메인(잔기 137-316). 20,50-ADP 결합 구조에서, 효소 결합 도메인과 리간드는 Ser9, Ser35, Ser38의 OG 원자 및 Arg37의 NH1 원자와의 수소결합으로 밀접하게 상호작용함을 알 수 있음. apo-PgASADH와 20,50-ADP-결합된 PgASADH의 구조적 중첩결과 구조는 전반적으로 유사하지만, 20,50-ADP와 상호작용하는 몇 개의 아미노산(Ser9, Ser35, Arg37, Ser38)에서 변화가 나타나 있음. 이 두 구조는 SpASADH의 삼중 복합체 구조(PDB 코드 2GZ3)와 비교하여 개방된 구조를 나타냄 (그림 A,B). 따라서 20,50-ADP 결합은 아마도 PgASADH의 도메인 담힘 구조를 유도하지 못했을 것으로 예상 됨.

○ PgASADH의 cofactor 결합구조는 apo 형태와 마찬가지로 비대칭 단위에서 복합체 구조로서 두 개의 단량체를 포함하고 있음. 이 구조에서 PgASADH는 기질인 aspartate-semialdehyde와 cofactor인 NADP가 결합한 형태로 나타남.

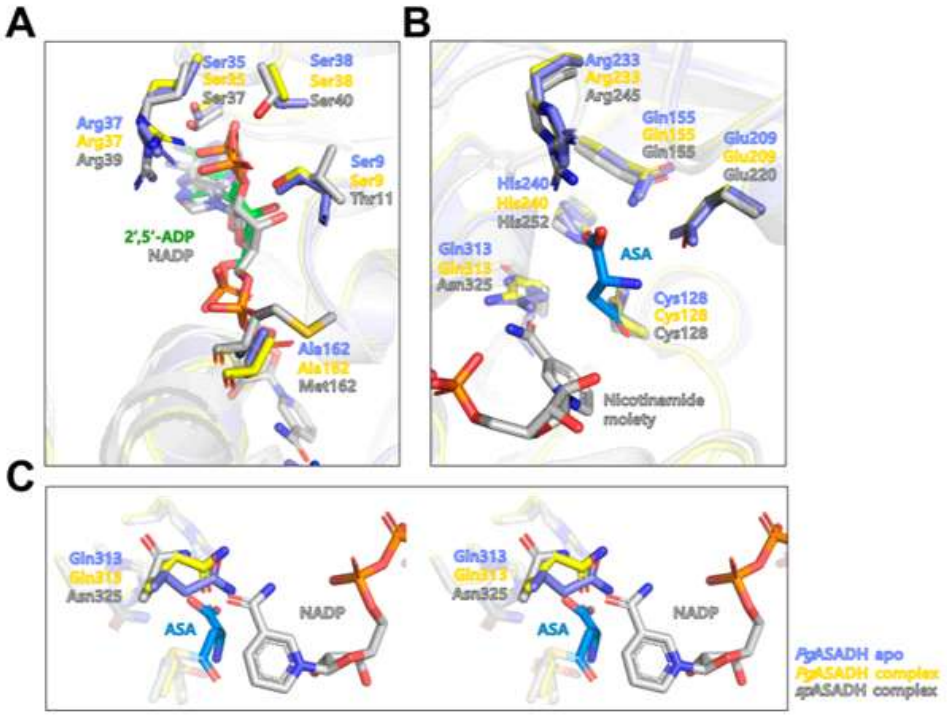


그림. PgASADH와 SpASADH의 구조 비교. PgASADH와 NADP-결합된 SpASADH의 apo- (슬레이트)와 20,50-ADP-결합된 (노랑) 구조 간의 효소 결합부위 (A) 기질 결합부위 (B)의 구조적 비교. (C) PgASADH와 SpASADH의 apo와 복합체 구조의 nicotinamide 결합 부위의 자세한 구조 모습.

KOPRI 극지연구소

- 다른 ASADH들과 서열 및 구조적 비교

○ Dali 검색 결과에서 PgASADH와 유사한 구조를 가진 단백질들의 multi sequences alignment 결과 이 효소들을 α6 헬릭스-α6-α7 loop 영역의 서열의 차이에 따라 두 그룹으로 분류할 수 있음을 보여줌 (그림 C). 이 서열 영역은 PgASADH의 삼차 구조에서 α6-α7 loop에 해당 또한, ASADH 유사 단백질들은 구조적 비교를 통해 I형과 II형으로 분류되는 것으로 나타남. 두 유형의 ASADH 간의 주요한 차이점은 α6-α7 loop 영역의 길이와 추가 α-helix 이차 구조의 존재에 있었음

○ I형과 II형 ASADH를 비교한 결과, 이전 연구에서 V. cholerae의 두 개의 ASADH 이소폼은 이와 유사한 영역의 서열 차이를 기반으로 분류되었습니다. II형 ASADH와 비교하여, I형 ASADH에는 구조적 영역에서 추가적인 서열과 부가적인 α-helix가 관찰됨.

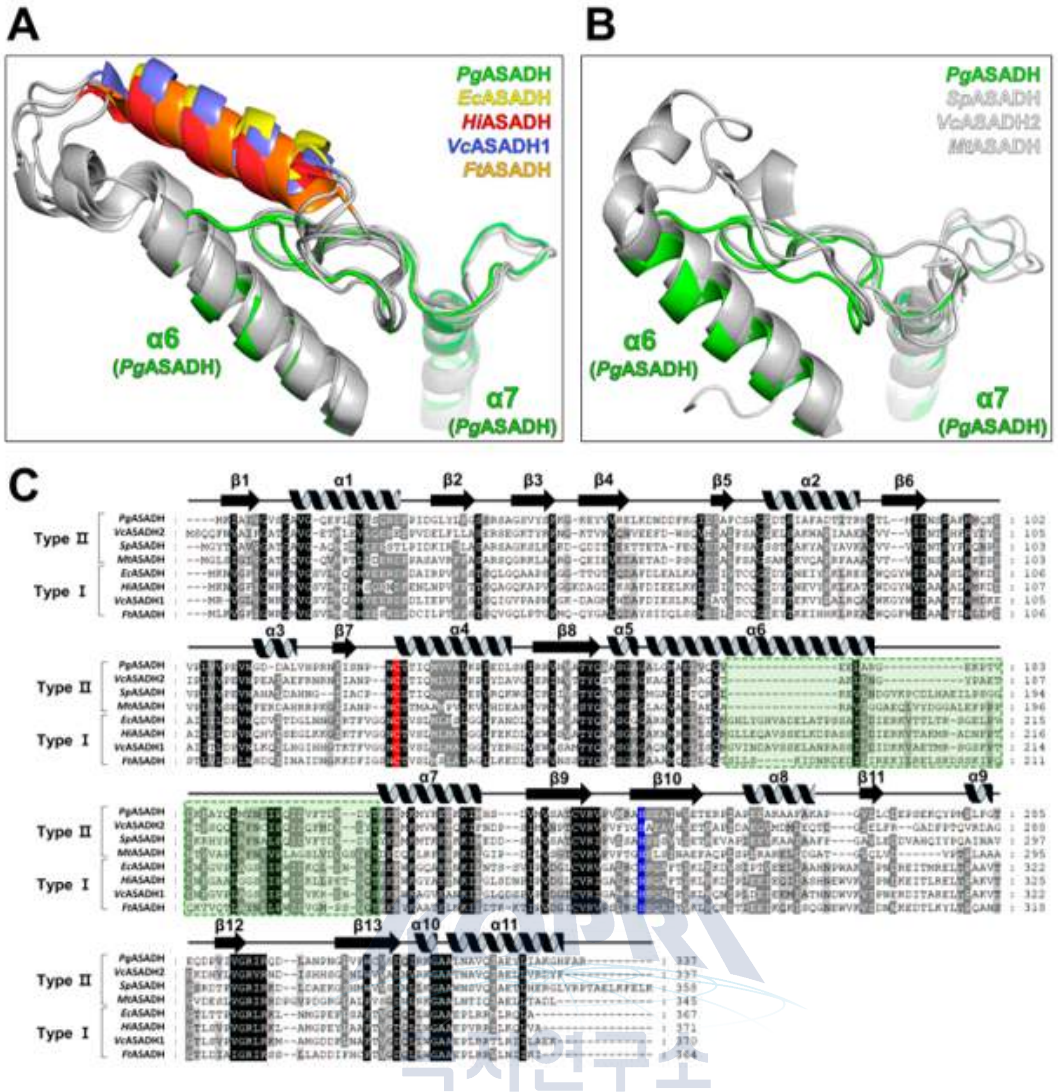


그림. PgASADH와 유사한 ASADH 계열 효소들 간의 구조적 중첩 및 multi sequences alignment. PgASADH의 α6 영역에서 α7 영역까지의 구조를 유형 I ASADH (A)와 유형 II ASADH (B)로 중첩시킴. (C) multi sequences alignment는 PgASADH(UniProtKB 코드 A0A1R4DY25)와 EcASADH(Escherichia coli의 PDB 코드 1BRM, 1T4B, 1T4D 및 1GL3; UniProtKB 코드 P0A9Q9), HiASADH(Haemophilus influenzae의 PDB 코드 1NWC, 1NWH, 1TA4, 1TB4, 1NX6, 1OZA, 1PS8, 1PU2, 1Q2X, 1PQP, 1PR3 및 1PQU; UniProtKB 코드 P44801), Vibrio cholerae의 유형 I VcASADH(PDB 코드 4R5M, 1MC4, 1MB4, 3Q0E 및 3PZR; UniProtKB 코드 Q9KQG2), Francisella tularensis의 FtASADH(PDB 코드 4WOJ; UniProtKB 코드 Q8G8T7), Vibrio cholerae의 유형 II VcASADH(PDB 코드 2R00 및 2QZ9; UniProtKB 코드 P23247), Streptococcus pneumoniae의 SpASADH(PDB 코드 3Q1L 및 4R3N; UniProtKB 코드 Q8DQ00), Mycobacterium tuberculosis의 MtASADH(PDB 코드 3VOS 및 3TZ6; UniProtKB 코드 P9WNX5)와의 비교를. 서열 상 보존된 촉매 cysteine 잔기(C128)와 산/염기 촉매 histidine 잔기(H240)는 각각 빨간색과 파란색으로 표시함.

- 다른 ASADH들과 서열 및 구조적 비교

○ β-strand로 형성된 interface 영역은 매우 보존되어 있었지만, 상호 분자간 상호 작용에 관여하

는 α-helix 하위 도메인인 α6-α7 loop 영역은 상대적으로 보존도가 낮음(그림 B). PgASADH의 α6 helix-α6-α7 loop 영역은 ASADH들을 세 가지 유형으로 나누게 된 중요한 차이점을 보여줌. 이러한 분류 체계는 특정 종을 대상으로 하는 약물을 개발하는 데 적용될 수 있을 것으로 예상되며 더 나아가, 이러한 분류는 미래에 의사들이 병원균의 종류에 따라 특정 약물을 효과적으로 처방하는 데 도움이 될 수 있을 것으로 기대됨.

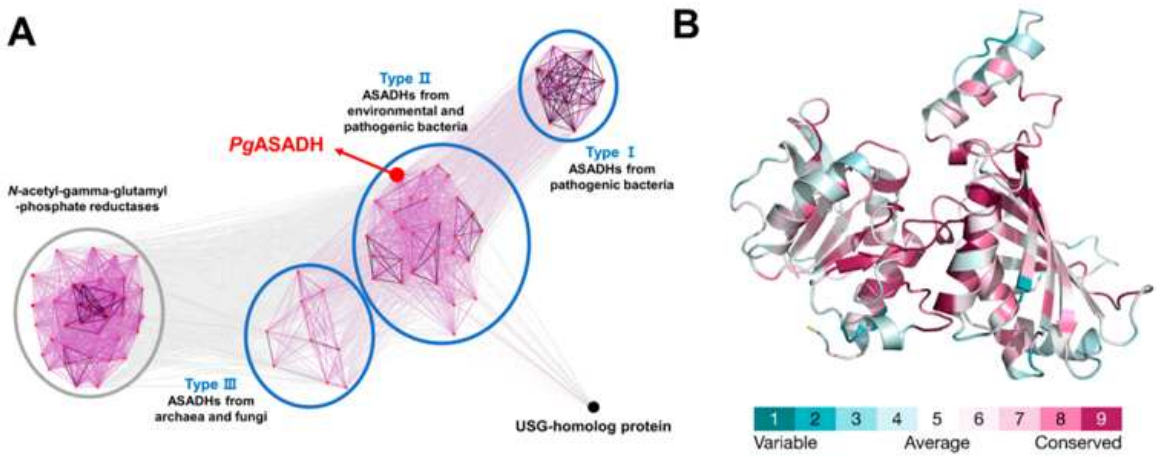


그림. CLANS를 사용한 PgASADH와 서열 기반 유사 효소 간의 관계를 나타냈습니다. (A) 타입 I, II 및 III ASADH는 파란 동그라미로 표시되었으며, PgASADH는 빨간 점과 화살표로 나타냄. (B) 보존도 점수를 PgASADH 구조에 매핑하기 위해 Residues의 구조적 보존도 점수를 Consurf를 사용하여 분석했함. 보존도 점수의 척도 막대는 구조 아래에 나타냄.

2) *Porphyromonas gingivalis* 유래 PgFolD 구조 및 생화학적 특성 연구

- PgFolD의 단백질 해석 및 전체 구조

○ *Porphyromonas gingivalis* 균주 게놈 정보를 바탕으로 PgFolD 유전자를 인코딩하는 서열 UniProtKB ID Q7MVE9를 클로닝, 발현 및 정제.

○ 정제된 PgFolD는 20℃에서 hanging drop 증발 확산 방법을 사용하여 결정을 얻음.

○ PgFolD의 apo 형태의 결정 구조는 Moleular Replace 방법을 사용하여 2.05 Å 해상도로 결정되었으며, 최종 모델은 285개의 아미노산과 163개의 물 분자로 구성됨 (표).

표. X-ray diffraction data collection and refinement statistics.

Table 1. X-ray diffraction data collection and refinement statistics.

Data Set	*Pg*FolD
X-ray source	BL-5C (PAL, Pohang)
Space group	$P4_322$
Unit cell parameters (Å, °)	a = 110.68, b = 110.68, c = 69.78, α = β = γ = 90
Wavelength (Å)	0.9796
Resolution (Å)	50–2.05 (2.09–2.05)
Total reflections	723,199 (1739)
Unique reflections	27,821 (1347)
Average I/σ (I)	59.67 (10.38)
R_{merge} [a]	0.100 (0.304)
Redundancy	26 (26.3)
Completeness (%)	99.9 (99.9)
Refinement	
Resolution range (Å)	35.01–2.05 (2.12–2.05)
No. of reflections of working set	27,773 (2576)
No. of reflections of test set	1413 (142)
No. of amino acid residues	285
No. of water molecules	163
R_{cryst} [b]	0.215 (0.254)
R_{free} [c]	0.238 (0.288)
R.m.s. bond length (Å)	0.011
R.m.s. bond angle (°)	1.13
Average B value (Å^2) (protein)	40.82
Average B value (Å^2) (solvent)	43.49
Ramachandran plot	
Favored (%)	94.66
Allowed (%)	5.34
Outliers (%)	0.00

[a] $R_{merge} = \sum|<I> - I|/\sum<I>$. [b] $R_{cryst} = \sum||Fo| - |Fc||/\sum|Fo|$. [c] R_{free} calculated with 5% of all reflections excluded from the refinement stages using high-resolution data. Values in parentheses refer to the highest-resolution shells.

○ PgFolD의 전체적인 구조는 N-terminus와 C-terminus 두 도메인으로 나뉨. N-terminus 도메인은 세 개의 평행 β-strands(β1-β3)와 여섯 개의 α-helix(α1, α2, α3, α4, α5, α6)로 둘러싸여 있음. C-terminus 도메인은 두 개의 분리된 β-sheet(β4-β7 및 β8-β9)와 여섯 개의 α-helix(α6, α7, α8, α9, α10, α11)으로 둘러싸여 있음 (그림).

○ Co-factor 및 기질 결합 부위는 N-terminus와 C-terminus 도메인 사이에 위치함.

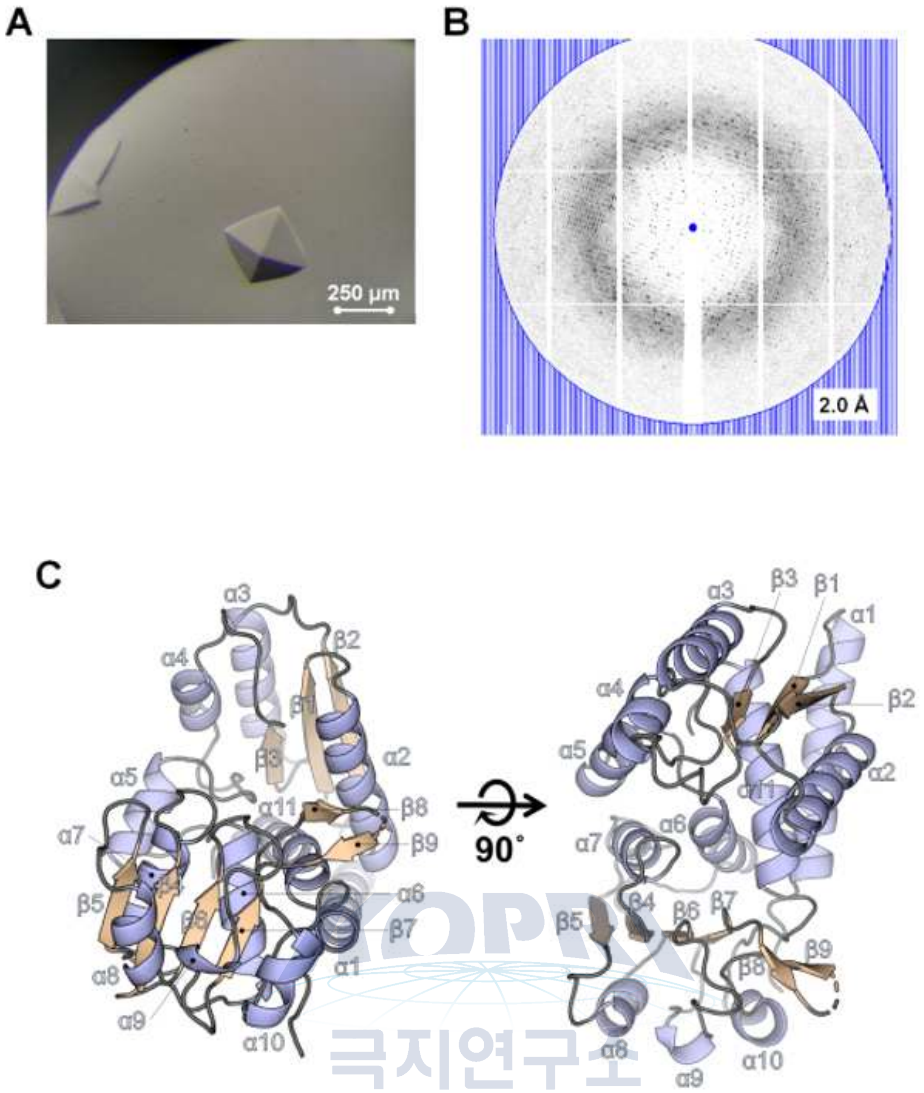


그림. PgFolD의 결정화 및 X-선 회절 및 구조 결정. (A) Sitting drop plates에 있는 PgFolD의 결정 사진. 척도 막대, 250 μm. (B) 최종 2.05 Å 회절 데이터 수집 시 PgFolD의 X-선 회절 사진. (C) PgFolD의 전체 구조는 11 개의 α-helix가 (연한 파란색) 9 개의 β-stran (황금색)으로 구성되어 있음.

○ Analytical gel filtration 결과, PgFolD가 용액 중에서 안정된 이성질체(dimer)를 형성했음을 보여줌.

○ PgFolD의 이성질체(dimer) 구조는 대칭으로 이루어져 있으며, 다른 세균성 FolD 유사체로부터 알려진 이전의 이성질체(dimer) 구조와 매우 유사함 (그림).

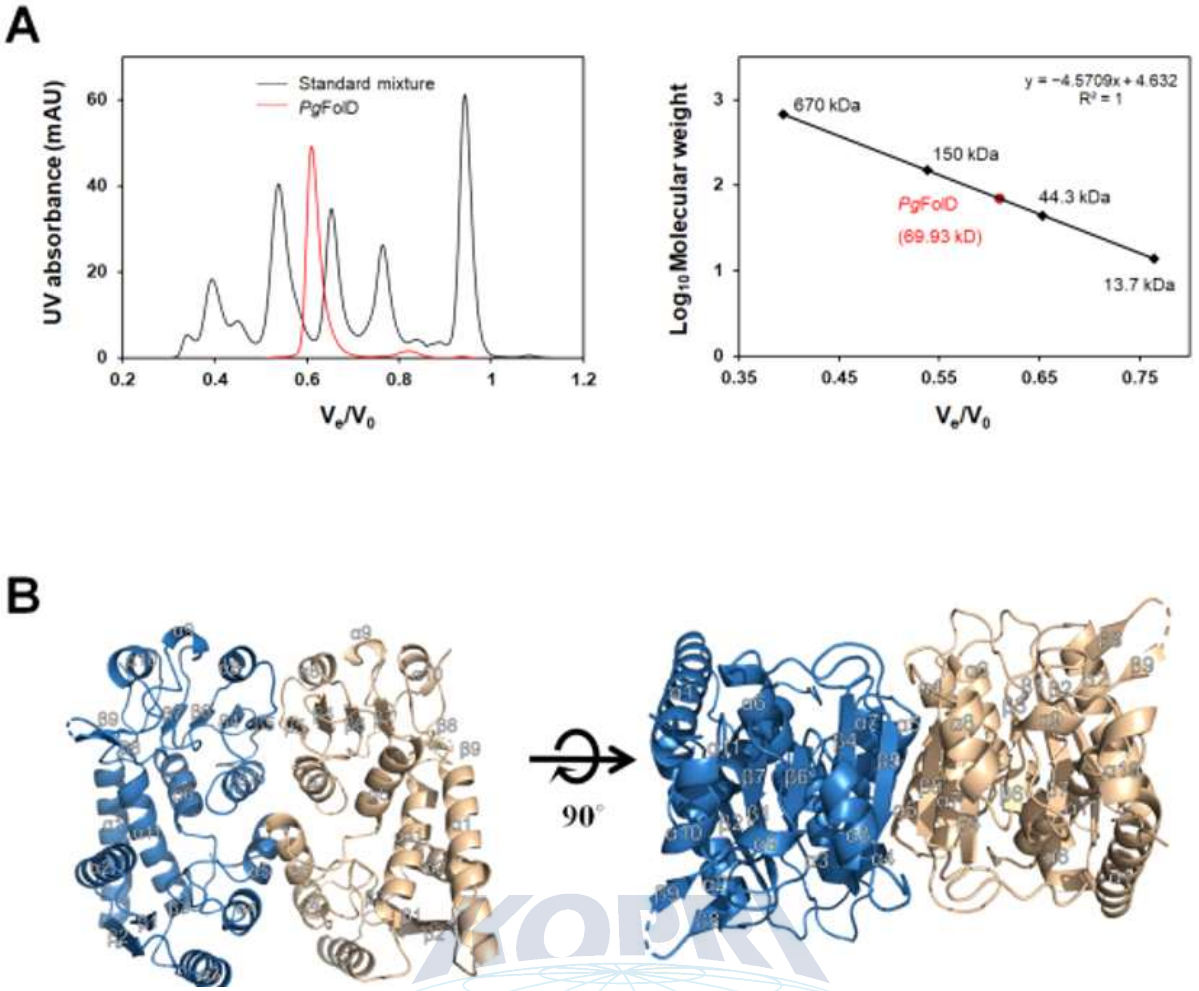


그림. 크기 배제 크로마토그래피 결과 및 PgFolD의 이성질체 구조. (A) 5개의 Peak로 나타난 검은 곡선은 단백질 표준 혼합물의 크기 배제 크로마토그래피 결과를 나타내며, 단일 peak로 나타난 빨간 곡선은 PgFolD의 결과를 보여줌. 이 결과는 PgFolD의 수용액에서 이성질체로 존재함을 나타냄. (B) PgFolD의 이성질체 구조 및 이차 구조. 이성질체 구조의 각 PgFolD 분자는 두 가지 다른 색상으로 나타냄.

- PgFolD의 활성 부위

○ PgFolD의 활성 부위 잔기를 조사하고 비교하기 위해, 이전에 보고된 NADP-결합 AbFolD (PDB 코드 4B4U) 및 억제제 (LY354899)-NADP-결합 AbFolD (PDB 코드 4B4V) 구조에 apo-PgFolD 구조를 중첩시킴. 세균성 FolD 구조 중, PgFolD와 AbFolD 간의 효소 활성 부위 잔기를 비교하기 위해 AbFolD 구조를 선택.

○ PgFolD와 AbFolD 간의 아미노산 서열 유사도는 42.7%임 (그림). 또한, apo-PgFolD 구조를 NADP에 결합된 AbFolD 구조 (PDB 코드 4B4U)와 비교함으로써 PgFolD의 NADP 결합 잔기를 함.

표 45. 알려진 박테리아 FolD 구조

Protein Name	*Pg*FolD	*Ab*FolD			*Ec*FolD		*Pa*FolD
Source	*Porphyromonas gingivalis*	*Acinetobacter baumannii*			*Escherichia coli*		*Pseudomonas aeruginosa*
UniProtKB code	Q7MVE9	D0CBC8			P24186		Q9I2U6
Sequence identity/similarity (%) with *Pg*FolD		39%/57%			44%/59%		45%/60%
PDB code		4B4U	4B4V	4B4W	5O28, 1B0A	5O22	4A5O
Complexed ligand	none	NADP	NADP and inhibitor LY354899	NADP and an inhibitor	none	carolacton	none
Domain conformation	open	closed	closed	closed	open	open	open

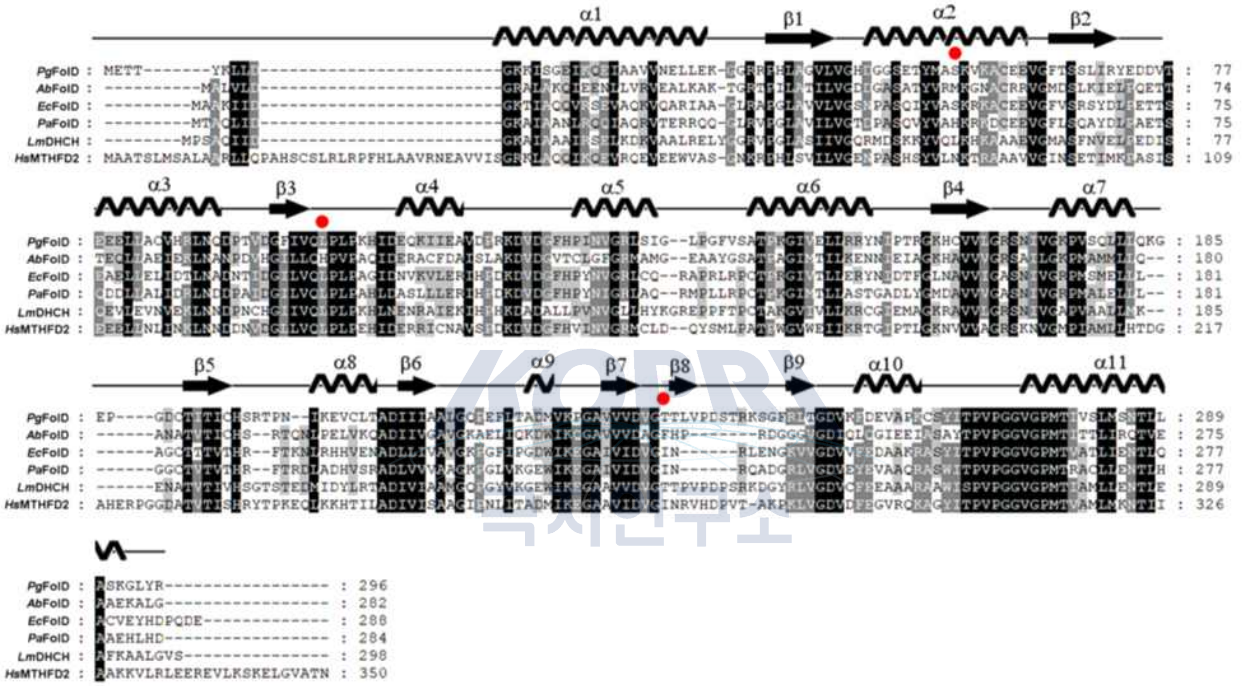


그림. 다른 구조 유사체들과의 아미노산 서열 정렬. PgFolD (UniProtKB 코드 Q7MVE9)와 다른 FolD인 Acinetobacter baumannii (AbFolD; UniProtKB 코드 D0CBC8; PDB 코드 4B4U, 4B4V 및 4B4W), Escherichia coli (EcFolD; UniProtKB 코드 P24186; PDB 코드 5O28, 1B0A 및 5O22), Pseudomonas aeruginosa (PaFolD; UniProtKB 코드 Q9I2U6; PDB 코드 4A5O), Leishmania major 에서 ethylene-tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase (LmDHCH; UniProtKB 코드 Q4Q9F9; PDB 코드 4A26) 및 Human sapiens에서 bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase (HsMTHFD2; UniProtKB 코드 P13995; PDB 코드 7EHJ, 6KG2, 5TC4). PgFolD의 세 개의 서열 (S55, L101 및 T238)은 PgFolD와 붉은색 원으로 표시됨.

○ PgFolD와 AbFolD의 NADP와 상호작용하는 아미노산 잔기는 Q218이 PgFolD에서 AbFolD의 K211에 해당하는 것을 제외하고 매우 유사했습니다. apo-PgFolD 구조를 억제제 (LY354899)-NADP에 결합된 AbFolD (PDB 코드 4B4V) 구조와 비교하였을 때, PgFolD의 추정 리간드 결합 잔기를 확인 할 수 있었고. 이 구조적 비교를 통해 PgFolD의 추정 기질 결합 부위에서 AbFolD와 비교하여 다른 잔기를 확인 함. PgFolD는 기질 결합 부위에 S55, L101 및 T238 세 개의 고유한 잔기 가지고 있으며, AbFolD는 해당 위치에서 M52, H98 및 F231 잔기를 가지

고 있음 (그림).

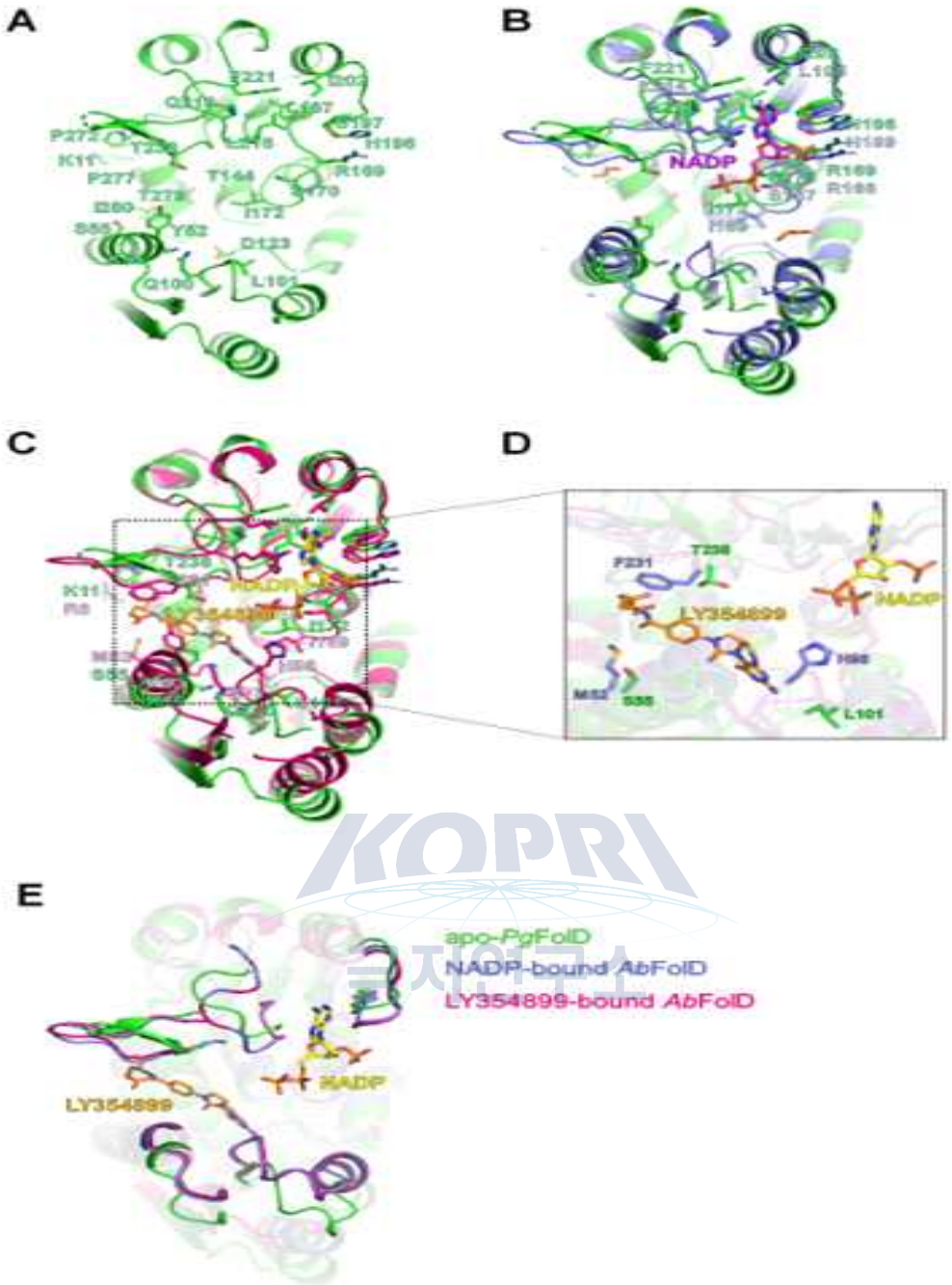


그림. PgFolD와 AbFolD의 구조 비교. (A) PgFolD에서 NADP 결합에 관여하는 주요 잔기가 stick 모델로 표시되어 있음. (B) PgFolD (녹색)와 NADP (주황색)로 결합된 AbFolD (슬레이트 블루)의 중첩된 구조 (PDB 코드 4B4U). (C, D) 억제제 (LY354899) 결합된 PgFolD와 NADP와 결합된 AbFolD (빨간색)의 중첩된 구조 (PDB 코드 4B4V). PgFolD의 하부 결합 부위에는 AbFolD의 하부 결합 잔기와는 다른 세 개의 잔기 (S55, L101, T238)가 있는 것이 특징. (E) PgFolD apo 구조 (녹색)와 두 가지 다른 AbFolD의 구조 (PDB 코드 4B4U 및 4B4V)를 비교하면 PgFolD의 apo 구조 (녹색)가 열린 구조를 갖고 있으며, 이와는 달리 다른 AbFolD구조는 닫힌 구조를 보여줌.

○ 억제제(LY354899) 결합 부위 주변 잔기의 독특한 배열은 해당 억제제가 PgFolD의 활성을 억제하는 데 효과적이지 않음을 의미하며 구조 정보를 기반으로 PgFolD에 특화된 억제제를 개발해

야 할 필요성을 시사함. 게다가, PgFolD와 AbFolD의 도메인이 결합하는 과정에서 나타나는 구조적 비교 연구를 통해 도메인이 두 형태를 관찰할 수 있었음.

○ PgFolD의 기질과 결합 하지 않은 형태는 열린 형태를 취하고 있으며, NADP 결합에 의해 도메인 의 닫힌 구조가 유도됨.

○ AbFolD에 NADP와 억제제가 동시에 결합되었을 때, AbFolD는 가장 완전히 닫힌 형태를 띄었음(그림). 다음으로, 세균성 FolD의 표면 전하를 조사하고 비교한 결과, NADP 결합 부위는 음전하가 지배하는 모습을 보이는 반면 기질 결합 부위의 전하 분포와 형태는 상당히 다름 (그림). 이는 기질 결합 부위의 구조 정보를 활용하여 P. gingivalis에 특화된 억제제를 생산할 수 있다는 가능성을 시사함.

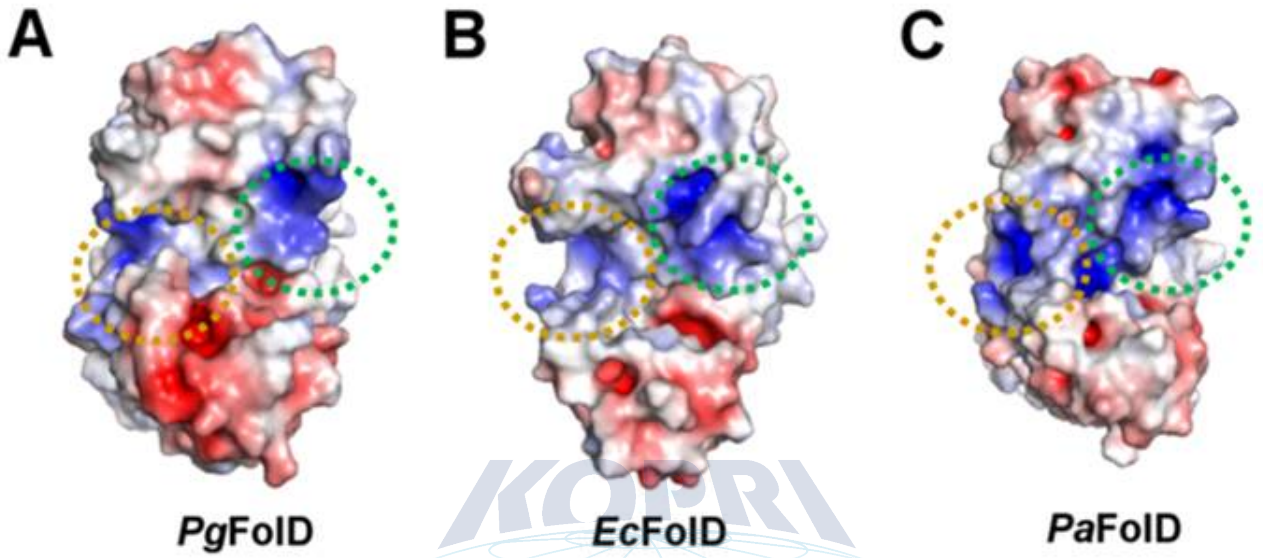


그림. 세균성 apo-FolD의 표면 전기적 특성 비교. (A) apo-PgFolD의 전기적 표면 표현, (B) apo-EcFolD (PDB 코드 5O28)의 전기적 표면 표현, 그리고 (C) apo-PaFolD (PDB 코드 4A5O)의 전기적 표면. NADP와 기질 결합 부위는 각각 녹색과 황금색으로 표시함.

3) *Methylocapsa palsarum* 유래 adenosylcobinamide kinase / adenosylcobinamide phosphate guanylyltransferase (MpaCobU)의 촉매 기작

- 코발라민(Cobalamin)은 비타민 B12로 잘 알려진 수용성 필수 비타민으로, 세균의 대사 과정에서 중추적인 역할 함.. 다양한 효소의 보조인자로서 코발라민은 산소 부족 호흡, 리보뉴클레오티드 감소 및 세균 성장과 생존에 중요한 공진화 B12-의존적 반응과 같은 다양한 생화학 반응을 촉진하는 데 중요한 역할을 함.
- 코발라민은 세 가지 부분으로 나뉘며, 코발트가 함유된 고리형 tetrapyrrolidine (코린형 고리)은 분자의 중심에 위치함. 메틸, 시아노, 수산화 또는 5´-desoxyadenosyl 라디칼이 고리형 tetrapyrrolidine의 β-위치에 상부 리간드로 배치될 수 있습니다. 상부 리간드에 따라 코발라민은 메틸-코발라민(MeCbl), 시아노코발라민(CNCbl), 수산화코발라민(OHCbl) 및 5´-desoxyadenosyl 코발라민(AdoCbl)으로 구분 됨. 하부 리간드인 5,6-dimethylbenzimidazole (DMB)은 tetrapyrrolidine의 알파 위치에 결합.
- 이번 연구의 목적은 미생물의 코발라민 생합적 기작을 연구하여 미생물의 생존 전략에 대한 이해.

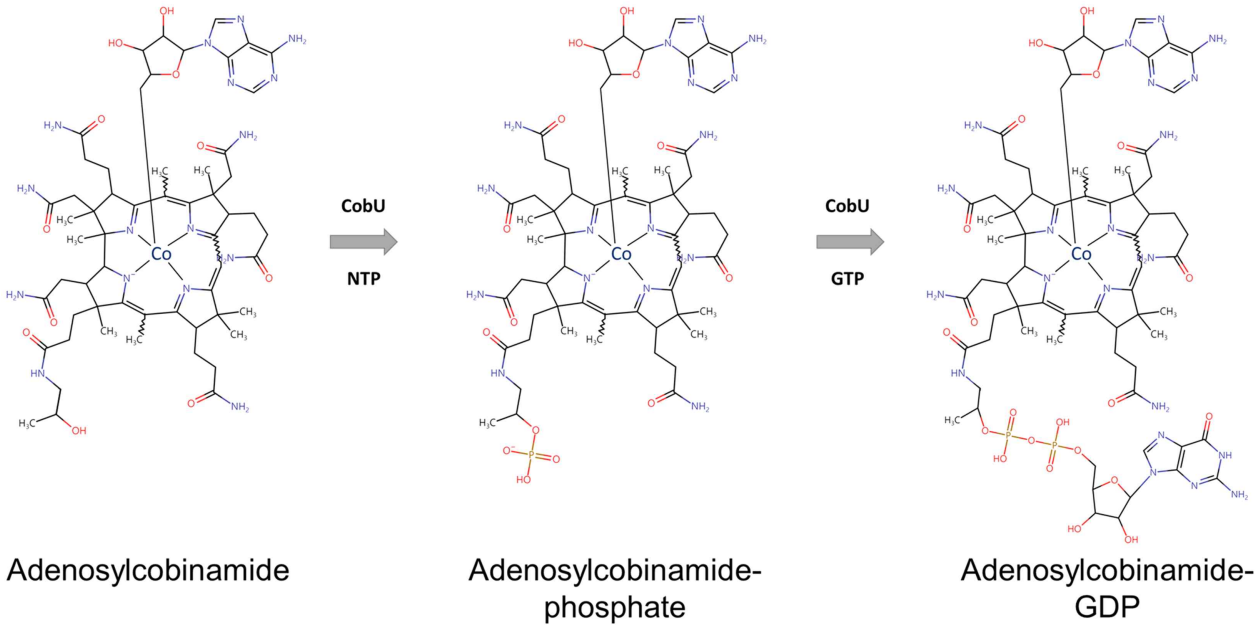


그림. 코발라민 생합 경로에서의 CobU를 통한 뉴클레오티드 loop 조립 과정. CobU의 연속적인 kinase 및 nucleotidyl transferase 활성. CobU는 adenosylcobinamide 링의 1-amino-O-2-propanol 측면 연쇄를 인산화하며 시작하여, 이어서 guanylyltransferase로 작용하여 adenosylcobinamide GDP를 형성.

- MpaCobU의 결정화와 전체 구조

○ X-선 결정학을 통해 MpaCobU의 단일 결정 데이터가 1.8 Å의 해상도로 수집되었으며, Alphafold에서 얻은 모델을 사용하여 분자 치환(molecular replacement)을 사용하여 위상 문제(phase problem)를 해결했음.

○ 반복적인 정제 과정 이후, 최종 모델은 Rwork 값이 22%, Rfree 값이 25%인 결과를 얻음

○ MpaCobU의 단량체 구조는 다섯 개의 α-helix (H1-H5)와 일곱 개의 β-strands(S1-S7)로 이루어져 있으며 평행한 β-sheet는 단량체 중앙에 비틀린 형태로 존재하며, 용매 부분에 노출된 strand (S7)는 베타 시트에 대해 반대로 형성됨. 이 일곱 개의 strand는 오목한 포켓 모양을 형성하고, 이 포켓의 중앙 영역에 위치한 H1을 둘러싸고 있음. 정제과정에서 활성 부위 속한 H1 근처에 사면체 전자 밀도가 관찰되었고, 이는 잘 알려진 인산염 loop(ATP 및 GTP 결합 단백질로부터 유래된)와 유사한 15-GGARSGKS-22 아미노산으로 구성되어 있음. 이러한 아미노산들은 다른 종의 CobU에서 보존적이기 때문에 모델에 인산염을 추가하였음. 인산염 분자는 활성 부위 내에 위치한 아미노산의 백본 amide 질소(Ala17 ~ Ser22)와 K21 및 S22의 측면 잔기와 수소 결합 네트워크를 형성함. 인산염과 amide 질소 사이의 거리는 2.7~3.3 Å의 범위에 있음.. 따라서 이 P-loop는 촉매 과정 중 생성되는 음이온이나 중간체를 안정화할 수 는 지역적 환경을 형성.

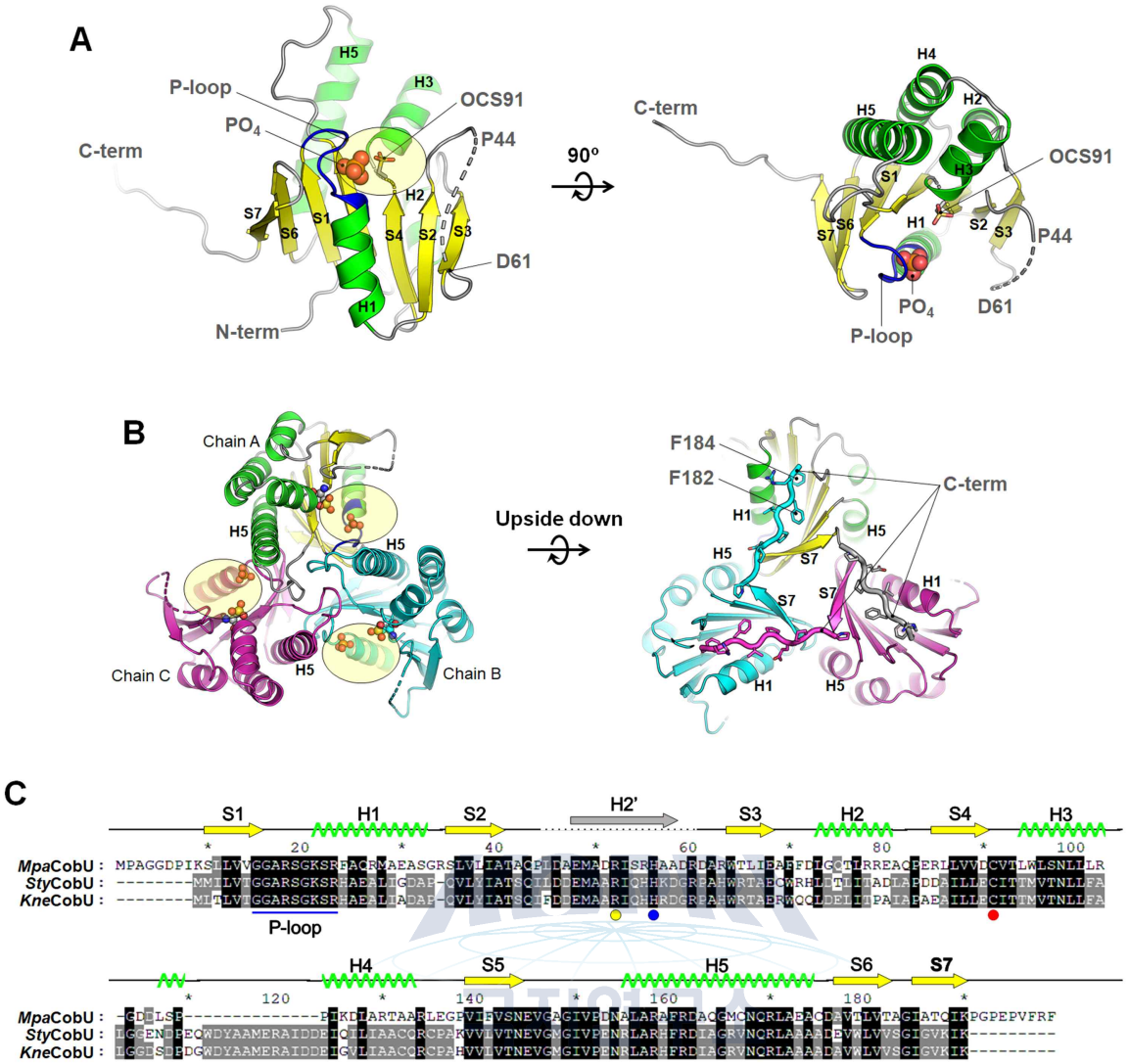


그림. MpaCobU의 결정 구조와 동족체와의 multiple sequence alignment. (A) 단량체 apo-MpaCobU 구조의 리본 표현. 이차 구조 요소인 α-helix (녹색), β-strand (노랑), N- 및 C-termunus가 라벨로 표시. 활성 부위는 노란색 원으로 표시되었으며, loop는 회색으로 표시되었음. (B) MpaCobU가 trimer를 형성하는 삼차 구조. 각 체인은 서로 다른 색상으로 표시. 각 단량체의 C-terminus은 Phe182와 Phe184로부터 인접 체인과의 소수성 상호작용을 통해 상호작용. (C) MpaCobU의 다중 서열 정렬은 Salmonella typhimurium의 StyCobU (UniProtKB 코드: Q05599; PDB 코드 1C9K) 및 Klebsiella pneumoniae의 KneCobU (UniProtKB 코드: A0A0H3GSH0; PDB 코드: 7TM8)와 서열 정렬. 정렬 상단에는 MpaCobU에 특정한 이차 구조가 표시되어 있으며, (A)에 제시된 구도와 색상 코드가 일치. P-loop, 결합부위 B에 위치한 Arg52, guanylylation 부위의 His56 및 인산화의 Cys92가 정렬 아래에 표시됨.

○ Symmetry mate 생성은 세 개의 단량체가 강하게 상호 작용하여 3배 회전 대칭을 형성한다는 것을 보여주고, S5-H5 사이의 loop는 유사한 삼각형 모양의 트리머(trimer)를 형성하는 측면체로 밀집되어 있음. 이와 일관되게, MpaCobU의 단량체는 단백질 발현에 사용된 벡터의 GSH를 포함한 경우 약 20.0 kDa의 분자량을 가지며, 정제된 샘플을 사용한 분석용 analytical ultracentrifugation 분석 의하면, MpaCobU는 용액 속에서 0.7 mg/ml의 단백질 농도에서 59.5 kDa의 트리머로 존재함.

- MpaCobU의 GDP 복합 구조

○ CobU는 adenosylcobinamide 고리에서 1-amino-O-2-propanol 잔기의 인산화를 수행하는 이중 기능성 효소로 작용하는 것으로 알려져 있음. 그 후, CobU는 guanylyltransferase 역할을 하여 adenosylcobinamide-인산염에서 adenosylcobinamide-GDP의 형성을 촉매.

○ MpaCobU의 구조 기반 촉매 메커니즘을 이해하기 위해 GDP + MpaCobU 돌연변이(C92S) 복합체 구조는 공결정화 방법을 사용하여 1.92 Å에서 결정함. apo MpaCobU와 달리 S2와 S3 사이의 영역은 전기 밀도로 명확하게 나타나며, MpaCobU-GDP 복합체에 H2′라는 추가 나선을 형성함. GDP는 P-loop, 이웃 하위 단위 C의 H5 및 새로운 나선 H2′에 의해 형성된 큰 틈새 내에 위치하며, GDP의 말단 인산염은 apo 구조에서 관찰되는 인산염과 유사한 형태로 P-loop에 위치함

○ Glu48, Met49 및 Asp147(체인 C)은 GDP의 guanosine과 상호작용하는 반면 Arg52, Arg55 및 His56은 GDP의 pyrophosphate 그룹과 수소 결합을 형성. 그림 C에 표시된 것처럼 전자 밀도를 갖는 GDP 분자를 갖는 사슬 A와 B만이 GDP-복합체 구조에서 H2′ 나선을 형성했기 때문에 구조화되지 않은 형태로부터의 2차 구조 형성(H2′)은 GDP의 결합에 의해 촉발되는 것으로 보임

KOPRI
극지연구소

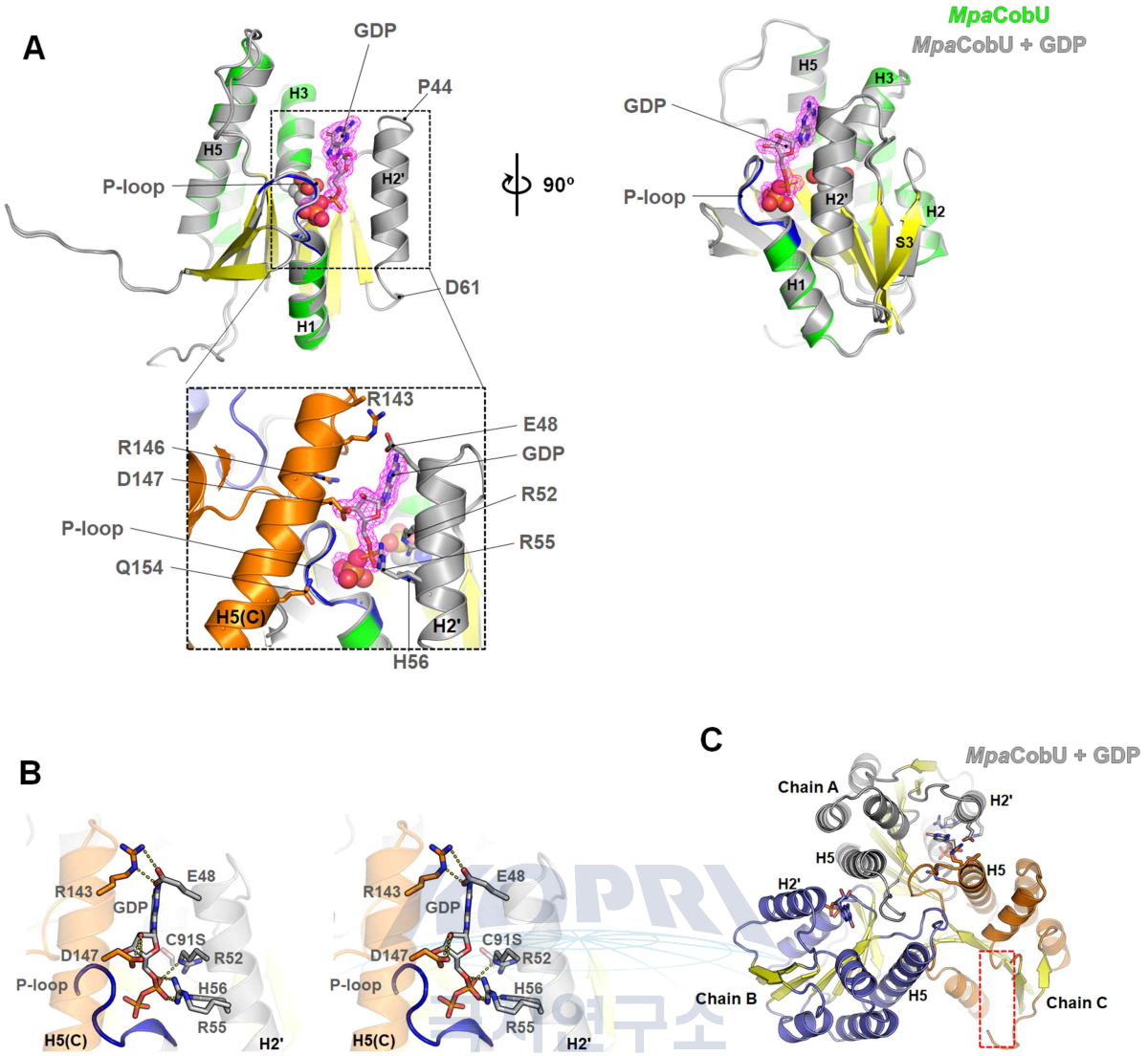


그림. apo 및 GDP 바인딩 MpaCobU(C91S) 구조의 비교. (A) MpaCobU(녹색/노란색)의 구조는 GDP 바인딩된 MpaCobU(회색)와 겹쳐지고 다른 각도로 표시됨. 전자 밀도와 GDP는 활성 사이트(결합 사이트 A)에 위치했음. GDP는 원자색 막대(회색 탄소)로 표시되며 해당 2Fo-Fc 전자 밀도는 1σ에서 분홍색 전자 구름으로 나타냄. GDP 주변의 잔차는 막대 모양으로 표시. (B) MpaCobU의 활성 사이트에 결합된 GDP. GDP의 탄소 원자는 회색으로 표시되고 다른 원자는 표준 색상(질소는 파란색, 산소는 빨간색) (C) GDP에 결합 된 MpaCobU의 삼량체 배열. GDP 분자가 없는 사슬에는 나선 H2′도 나타나지 않음.

- MpaCobU와 Adenosylcobinamide의 복합체 구조

○ MpaCobU의 촉매 메커니즘을 이해하기 adenosylcobinamide와 MpaCobU의 결합 복합체 구조 해석함. adenosylcobinamide나 adenosylcobinamide-인산염은 시중에서 쉽게 구할 수 없기 때문에 코발라민을 이용하여 실험을 진행함. 결정화를 시도한 후 우리는 2.6Å의 분해능으로 세 가지 단량체 모두에 대한 코발라민 복합체 구조를 성공적으로 얻음. 그러나 모델 구축 동안에 우리는 GDP가 GDP-MpaCobU 복합체에 있는 틈새에서 코발라민 대신 adenosylcobinamide-인산염 중간체를 발견함. 코발라민의 5,6-dimethylbenzimidazole(DMB)-ribose (α-ribazole)는 전자 구름에서 명확하게 보이지 않았음. 따라서 결정화를 위해 초기에 코발라민을 첨가했지만 adenosylcobinamide-인산염이 모델

링되었음.

○ MpaCobU에 의한 코발라민의 가수분해가 확실하지 않지만 인산염 후 전자 밀도는 구조의 모든 코발라민에 대해 연결이 끊어짐. 온전한 H2′도 adenosylcobinamide-인산염 복합체 구조에서 형성되었음. GDP 복합체 구조와 유사하게 H2′의 Asp46, Glu48, Met49 및 Arg52 잔기는 수소 결합을 통해 adenosylcobinamide-인산염와 상호작용함..

○ 아데노실코빈아미드-인산염 MpaCobU 복합체를 GDP 결합 구조와 비교할 때, 리간드 상호작용에 관여하는 대부분의 잔기는 몇 가지 예외를 제외하고 변경되지 않은 상태로 유지됨을 알 수 있음.

○ 아데노실코빈아미드-인산염 복합체 형태에서는 H3와 H2′ 모두 표면적을 향해 약 1.2Å만큼 이동하여 결과적으로 리간드 결합 포켓의 부피가 증가함. 또 다른 주목할만한 차이점은 H5의 Arg18, Asp147(C), H2′의 Arg52 및 H56의 측쇄 방향에 있음. GDP 복합 구조에서 Arg18, Arg52, H56 및 D147은 GDP 분자를 위한 공간을 만들기 위해 용매 영역을 향한 상태를 유지하나 adenosylcobinamide-인산염 MpaCobU 복합체 구조에서 이러한 잔기는 활성 부위 구성으로 다시 돌아가고 adenosylcobinamide-인산염의 인산기와 상호작용함 (그림).

KOPRI
극지연구소

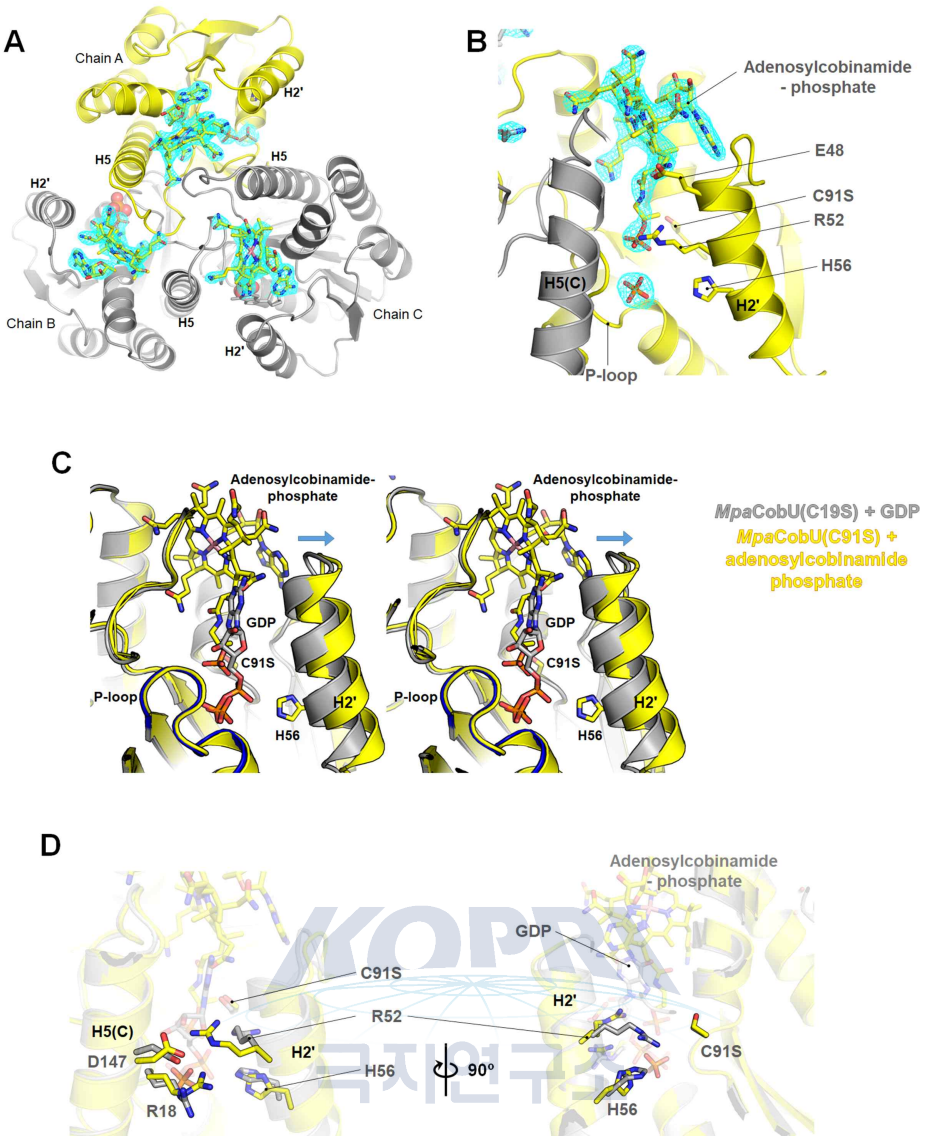


그림. adenosylcobinamide-인산염 결합 MpaCobU(C91S) 구조의 결정 구조 및 GDP 결합 형태와의 비교. (A) adenosylcobinamide-인산염 결합 MpaCobU의 삼량체 배열. 사슬 중 하나와 adenosylcobinamide-인산 분자는 노란색으로 표시. adenosylcobinamide-인산염은 막대 모양(황색 탄소)으로 표시되며 해당 2Fo-Fc 전자 밀도는 1σ에서 청록색 전자 구름으로로 표시. (B) adenosylcobinamide-인산염 결합의 상세 보기(C) 활성 부위에서 GDP와 adenosylcobinamide-인산염 사이의 결합 모드 비교, 스테레오 view로 묘사. 두 분자 모두 동일한 결합 부위를 공유함. (D) adenosylcobinamide-인산염 결합 시 변경된 측쇄 구조를 가진 잔기를 강조하며 막대로 표현.

나. 이차대사 관련 gene cluster 효소 활성 및 반응기작 (부경대)

1) 항균, 항암활성을 가진 이차대사산물인 prodigiosin 생성 극지 균주 확보

– *Granulosicoccus antarcticus*와 *Kordia antarctica* 확보

○ 논문검색과 NCBI 검색을 통해 극지 유래 균주 활용을 위한 미생물 분양을 실시함. (검색어: prodigiosin and bacteria and antarctica)

○ 분양 균주는 Marine agar 배지를 이용하여 배양하였으며 15℃에서 6일간 배양하여 집락을 확인하였음.

○ 단일집락이 확인된 균주를 Marine broth에 접종하여 15℃에서 6일간 배양한 후 보관균주 제작함.

– prodigiosin 생합성 선행연구

○ prodigiosin을 생합성하는 *Serratia* sp. 균주를 이용 극지 유래 균주를 이용한 연구 진행에 앞서 생합성량 증가를 위한 선행연구 수행함

○ 염농도에 따른 생합성량의 차이를 색소 발현량에 따라 육안으로 확인. prodigiosin은 붉은색소로 염농도가 높아질수록 색의 진하기가 옅어짐을 확인. prodigiosin 함량과 균 증식을 측정한 결과, 색소는 0%에서 가장 많이 생성되나 균은 1%에서 가장 잘 자라는 것을 확인.

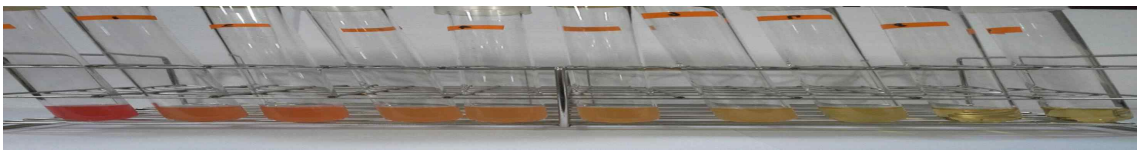


그림. NaCl 농도에 따른 발현 차이 (0-9%)

○ Prodigiosin 생합성은 온도 민감성이 높은 것으로 알려져 있으며, 균주에 따라 최적 발현 온도에 차이는 있으나 공통적으로 37℃가 넘어가면 발현이 정지되는 것으로 알려져 있음. 보유균주는 25℃에서 가장 잘 발현되었으며 균 증식은 37℃에서 가장 잘 자라는 것을 확인.

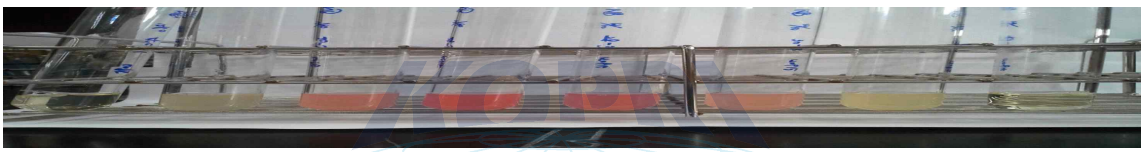


그림. 배양온도에 따른 발현 차이 (4℃, 15℃, 20℃, 25℃, 28℃, 30℃, 37℃, 42℃)

극지연구소

○ 배지 조성 성분 조절을 통한 prodigiosin 생산량 증대와 관련 다수의 연구논문들을 보면 증식을 더디게 하거나 분해에 필요한 물질을 첨가할 때 생합성량이 증가하는 경향이 나타남. casein이 첨가된 배지에서 배양했을 때 생산량이 증가되는 것을 확인하였으며, 24시간에서 36시간까지 최대 생산량을 보였으며 그 이후부터 생산량이 감소됨을 확인. 다만, 이는 회분배양방식으로 배양했을 때 나타나는 결과이므로 연속배양을 실시한다면 더 좋은 생산량을 나타낼 수 있을 것으로 기대됨.

그림. 배지 별 prodigiosin 생산량

2) Prodigiosin 생합성 gene cluster cloning

- Prodigiosin 생합성 유전자 클러스터 서열 확보 및 클로닝

○ Prodigiosin 생합성 관련 유전자는 pigA부터 picN까지 총 14개의 유전자로 구성되어 있으며 현재까지 극지 종의 경우 prodigiosin 전체를 생산하는 균주의 유전자 정보는 규명되지 않았으나 prodigiosin의 유도체 개발에 중요한 pigC의 상동 단백질 서열이 존재함이 밝혀져 있음. 따라서 기존 prodigiosin 생성 균주의 유전자와 극지 pigC를 클로닝함으로써 향후 광범위한 기질 특이성을 가진 변형효소 설계를 통해 다양한 생리활성을 가진 prodigiosin 유도체를 생산할 수 있음. 관련 유전자 증폭을 위한 프라이머의 표와 이를 통해 증폭된 일부 유전자의 agarose gel 전기영동 그림은 아래와 같음.

표. prodigiosin 생합성 유전자 클로닝을 위한 primer set

KOPRI 극지연구소

target gene		sequence	size
pigA	F	5'-ATGGATTTTAACTTATCAAG-3'	1,158bp
	R	5'-TCATGCGCCTCCCCGCAGAC-3'	
pigB	F	5'-ATGATGATCGTTCAACGCGT-3'	2,016bp
	R	5'-TCATGACATCACCTCCGCAG-3'	
pigC	F	5'-ATGAATCCTACCCTGGTGGT-3'	2,667bp
	R	5'-CTAGCCATCGGCACGTTCTC-3'	
pigD	F	5'-ATFCGCGCGGCAACCGCCGC-3'	2,715bp
	R	5'-TCATGAGGTGGCTTCCTGTG-3'	
pigE	F	5'-ATGAAATTCGGATTCATCGC-3'	2,562bp
	R	5'-CTAGTCTAAAAAGGTGGAGA-3'	
pigF	F	5'-ATGCCTTTAACCAAGCAAGA-3'	1,017bp
	R	5'-TTATTTTTCGCCGACGATCA-3'	
pigG	F	5'-ATGTTAGAAAGCAAATTGAT-3'	264bp
	R	5'-TCATGCGACACCCCCTGCGG-3'	
pigH	F	5'-ATGAGCGTTCACGCCGTCGA-3'	1,947bp
	R	5'-TCAGACCTCGGTGGCGCGTG-3'	
pigI	F	5'-ATGGCAACCTTCATTTCACC-3'	1,473bp
	R	5'-TCATCGCGCATTCACCTCGG-3'	
pigJ	F	5'-ATGAACCAGGAAATTCATGC-3'	2,289bp
	R	5'-TTAAACGGGTTGATGGATAA-3'	
pigK	F	5'-ATGCACATTATCGTCCATAA-3'	315bp
	R	5'-CTAAGCTCGATAACCATCGG-3'	
pigL	F	5'-ATGGTTATCGAGCTTAGCGT-3'	648bp
	R	5'-TCATGATAAGGCTCCGAAAG-3'	
pigM	F	5'-ATGACCCAAGACCTTTTCGC-3'	1,059bp
	R	5'-TTAGGGGGAATCGTTCCCCG-3'	
pigN	F	5'-ATGAATGTATTGATTGCTTT-3'	729bp
	R	5'-TTACAGCACGAAAGGAATGA-3'	

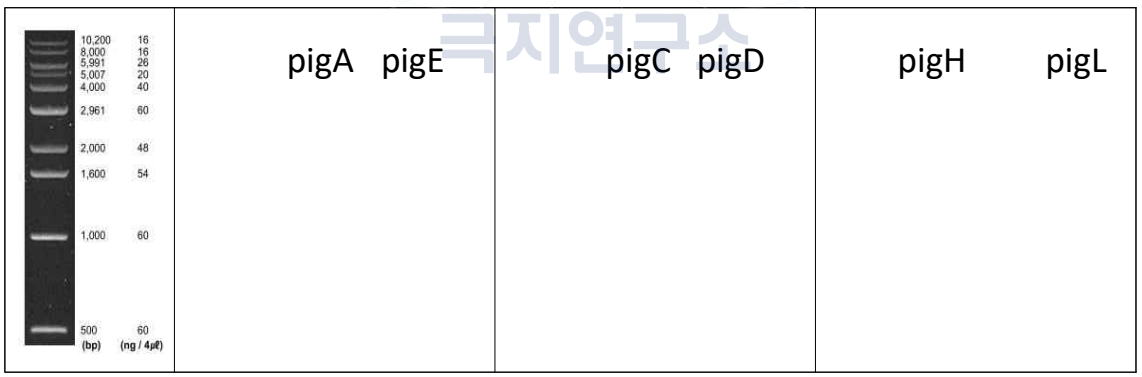


그림. 증폭된 prodigiosin 유전자의 아가로즈 겔 전기영동

○ Prodigiosin의 MAP moeity에 다양한 기능기가 도입할 경우 prodigion 유도체의 생산이 용이할 것이며 이를 담당하는 유전자인 pigB, D, E에 대한 연구를 수행하기 위하여 MAP 생합성 유전자를 Novagen 사의 pETDuet-1 vector에 클로닝하여 발현 벡터를 구축하였음. 확보된 서열과 벡터는 아래 그림과 같음.

>*Serratia* sp. PDGS[120915] pigB 합성 유전자

CTCGAGTCATGACATCACCTCCGCAGGCGTAACGGGCATTGCGAGGCGTCCTCTCACCGCTTTGGCGGCGTTCAGTCCGGCTAACACCGCGCTTTCGATATTACCGATG
CCCACGCTGTCCTGATTGGCGAAGTGAATATTCTCAAATGGCCTGCTGGCCTGGTGAAACACGCCCTGGGCCTGTTGCCCGGCGACCGAGGTCACCAGACCCGCGGGCC
AGAACCAGATTTGAATGTCTTCAATGATGTCGGCGTCAATACCCATGTTGCCCAGCACTTTGGCGATTTCGACATAGGTCTGTTGCTGCAGCGCCGGGAACTCGTTTTGC
GCGGTGCGACCTTGCCGCTCTGGGCGAGTGGTCGGTTTGAGCAGGGTTAATACCCCGGCTTCCGCGCTGAGGTGATTGTCCATCCAATTGGCGACCAGGCAGGTGCCGGC
TTTGCTCCAATAGTAAGGTGTGCGGGTGTTTTCCGGCTCGATCAGATAGCCGCCGAACGAGCGTTCGAGGATCGGTTTTTTCAACAGCACGTTCGCCAGGTAGTAATCTT
CATGGCGGATCTGGCGGATCGCCGCCAATTGCTCTTTGGGCAGGGTGGGCAACCAGGTGGGCACATGCGTTTTGGGGGCGGCCCAGATCACTTGTTTGGCTCTGATTTCG
CTGGTCGCACCATTGACGCTGAACCGGATCACCGTTTCGTCGCCGCCGGGCGTGATGCTTTGAAGCTGTACGCGGCTTTGCAGCCTGACGTTGTTTTGTTCCTCAAGATA
GTCGAGCAGCCCGGCGCTGATGCTGCCGTTACCGCCCGGCAGCGTGACCAGATTGCCGCGTAAATACCCCACCAGGAAGTGCAATCCGACATAGGCGGAGACTTCGCGA
ATATCGAGACATTCCACGCGCAGCGTGGTGCTGACGGCATTCTCTACCAGCTTGCCGAATTTTCTCGGTGGCCGCAGATCCGCCGGGATCTGATCCAGTTTGTGCGGTTC
GAACAGATAAGTGTACAGCGGGATAGTGTCGAGCAGCGCCATATTCGTTTTGCTCCAGGCGCTCTGCGGCGTCCAGGGCAGGCTGGGGTACCGCTCGCCGCGCGGCGAG
AAGGTATCCAGGAAGGCGTACAGATCGGCAAAGATCGGATCGCCCAGCTGTTTTGCCGCGATAACATAAGGTTTACCGATCAAGGCATGCAGGAATAGTTGTCCCGTCA
GGCGCCAGACGGCGGGTTTAAGCAGGTAGACCGGTCGTTTGATAAAACCGACGACGACTTCACCCAGGCAGCGGAGCAGCAAGAAGGTGTCGAAAAATACCAGCGTGTC
CTTTTCATTGGATTTATATACGCCGCTCAGACCGTTTTTCTTCAGCAGTTGCGCCATGAAAGAATTCGGCAGCGGTTCCTGGAAGCAGACGCCGGCGATAGGAAATTTC
AGGCGGTTCACCGTACTGTAGCGGGCGTTGCCGCCGAAGGAGGCGCTTTTTTCCAGCACCAAAACCCGGCGATCGGTCAGTTCGCTGGCCGCGGCCAAACCGGAGACGC
CGCCGCCGATGATCACCACGTCATACTCGCCGTCCAGCGCGGGGGTTACCGGGCCGCCTGCCGCCGGCGTGGGCGTGGAAAAGTCGCGCGTGGGGAACGTGCGCGGCTT
GGGTTTGCGGTGGTGCTGCTGACGCAGCATGTACAGCGCCGCCAGCGCGAAAATCGCATCGAGCAACATGACCTGCGGCTGGGCGCGGTGCAGGATCGTGACAAATCCC
GCTATCATCAGCAGCTGGCAGTAGATGATCAATGGCGTCCAACGCGGGTTGAACATCAAGACCGCACCGGAGGCAAACAGCGCCACGCCGATCAGCGCGTTAACCACTG
TACCCTGCGCCGCCAACCAAGCCGTCGCCCCGGCGTACCAGGTGCCCTGGTTCGCCACGGCCGCCTGCTGCAGAATATCGGCGACGTTTTCCAACTGAGGGAAGGCTTT
CGCCAGGCCGGCCAACATATAGAGCACGGCAAAAACGCGTTGAACGATCATCATGGTACC

>*Serratia* sp. PDGS[120915] PigB 단백질 1차 서열

MMIVQRVFAVLYMLAGLAKAFPQLENVADILQQAAVANQGTWYAGATAWLAAQGTVVNALIGVALFASGAVLMFNPRWTPLIIYCQLLMIAGFVTILHRAQPQVML
LDAIFALAALYMLRQQHHRKPKPRTFPTRDFSTPTPAAGGPVTPALDGEYDVVIIGGGVSGLAAASELTDRRVLVLEKSASFGGNARYSTVNRLKFPIAGVCFQEPLP
NSFMAQLLKKNGLSGVYKSNEKDTLVFFDTFLLLRCLGEVVVGFIKRPVYLLKPAVWRLTGQLFLHALIGKPYVIAAKQLGDPIFADLYAFLDTFSPRGERYPSLPWT
PQSAWSKTNMALLDTIPLYTYLFEPHKLDQIPADLRPPRKFGKLVENAVSTTLRVECLDIREVSAYVGLHFLVGYLRGNLVTLPGGNGSISAGLLDYLEEQNNVRLQS
RVQLQSITPGGDETVIRFSVNGATSEIRAKQVIWAAPKTHVPTWLPTLPKEQLAAIRQIRHEDYYLANVLLKKPILERSFGGYLIEPENTRTPYYWSKAGTCLVANWMD
NHLSAEAGVLTLLKPTTRPERQGRTAQNEFPALQQQTYVEIAKVLGNMGIDADIIEDIQIWFWPAGLVTSVAGQQAQGVFHQASRPFENIHFANQDSVGIGNIESAVLA
GLNAAKAVRGRLAMPVTPAEVMS

KOPRI
극지연구소

>*Serratia* sp. PDGS^{120915} pigD 합성 유전자

ATGACCACCCTGACCGGCCAGGCGCGCCTGACCAACAGCGCGGCGTATGAACAGGTGTGGCAGGCGGAACGCCAGGCGTGCCGCACCGATGCGGATCCGGATACCC
TGACCGTGGGCGTGGTGGTGGTGACCCGCAACCCGGCGTTTTTTCAGACCGGCCTGAGCGTGCTGAACGATATTCGCGATTATGTGTTTAACCGCGTGCATATTCAG
AGCGAAATGCCGCTGAAACTGCTGGATCTGGCGGCGGATAGCCTGTATCTGGCGGCGCGCGAAAAAGCGCTGCATTTTCTGAAAGGCCAGAACAAAGCGATTAACG
TGCGCATTATTCAGTGCGCGAGCCTGGCGGAAGCGACCGGCAAAATTATTTATACCCATGCGCTGGAACAGCGCCCGGAATTTCATCTGGGCATGCTGTTTTATGAT
CAGACCACCCCGGCGGGCGTGGATGATAGCATTGAACAGATTGATCGCGATCTGGATGCGTTTTATAGCGCGCTGCAGCGCAGCGGCATTCCGGCGTTTTATACCAC
CTTTAGCACCGTGGCGTTTATTCGCCAGCTGCGCAGCCCGTTTCGCTATCTGCCGCAGCAGTATCGCGAAATTGTGCGCAGCGAAGATCCGGCGATTTTTCAGACCG
AACTGCTGTGCCTGTGGATGGATTTTTTTGAAATGAACTATACCAACCGCCGCGTGAAACCGATTGGCGCGCTGGCGCTGCATAACACCCTGGGCGAACAGCTGATT
CAGTTTTTTGAACGCACCGCGGCGGAACGCTGGCTGGTGAGCTATTATACCGGCAGCATTATTAGCAACCTGATTGGCTATCTGGATCGCCATGCGGAAGCGCGCGG
CGCGCTGATTCTGCGCGGCCCGAACGAACATGCGATTGCGTGCGGCGCGATGGCGAACTGGCAGCTGTATCGCATGCCGTTTCTGGGCGTGGTGACCAGCGGCATGA
TGGATGAATTTAAAGGCACCCTGGCGAACCTGAAAGAAACCGCGGCGCAGGGCATTATTGTGGCGGCGGAAAACCGCGGCAACCAGTGGTATAGCTTTCAGGGCAC
CCTGACCCCGACCGAAGATATGCGCGAAGTGCTGATTGCGCGCCGCATTCCGTTTGTGTATATTGATGATGTGGAAATGATTGGCGCGGGCCTGACCGAAGCGTTTC
GCCTGTATCATCAGGGCCAGGGCCCGGTGGTGATTCTGGCGACCCAGAACGTGCTGGAAAGCACCCTGAGCCTGGAAGGCGCGGTGTGCGATCCGAGCCCGATTCC
GGTGCTGAGCGCGGATGATCCGCTGCCGATGAGCGAAAGCCTGGCGCAGGCGATTGCGCTGATTAACCGCGGCCCGGAACGCCTGGTGTGGCAGCTGGGCCCGGTG
AGCGATGATGAATATGCGCTGATTCATGATATTGCGGATGCGGCGGGCATTGCGCTGGTGGATAGCCTGGCGCATCCGGGCAGCGCGCCGAAATATTATCAGGGCCG
CCGCAACCCGCATTATCTGGGCACCCTGGCGATTTATGGCTATAGCCCGCGCGTGTATAACTTTCTGCATACCAACGATAAACTGAACGCGATGAGCGAACAGAGC
CTGTTTATGATTAAAAGCCGCGTGGCGCAGATTACCACCCCGTTTAGCGATGGCCGCCTGGAACGCAAAGTGCATCTGGTGCAGCTGACCCATGATGATCGCCATCT
GAGCCCGTATGCGGATCTGCATCTGCATATGAACTGCCTGGCGTTTCTGCGCACCGTGAAAGCGCATCTGGATGTGGATCCGGCGCTGCGCGAACGCCGCCGCGCGC
TGATTGCGGCGTATCTGGATAGCCCGAGCGATGTGGTGAGCCAGCTGCCGAGCCTGCCGATGAGCGCGAACTATTTTTTTTGCCAGCTGAACCGCGTGATTGAAGAA
CTGATTGAAACCGAAGGCTTTGATTTTACCGGCGTGTATGATGTGGGCCGCTGCGGCATTAGCGCGGCGCGCAACGTGGCGAAAACCCGCCGCGGCTTTAGCGGCTG
GTATGGCCGCGCGCTGATGGGCGATGCGCTGCTGGCGACCGGCTATCTGGCGTATACCAGCCCGAGCCATGTGATGGCGTTTATTGGCGATGGCGCGAAAGGCATTG
TGCCGGATATTCTGCCGGCGTTTATTGATAACATTCTGACCCATCCGCAGCTGCTGAACAAAAGCATTACCGTGTTTTATCTGTGCAACGGCGGCCTGAGCGTGATT
AACACCTATCAGGAACGCATTCTGTTTAACCGCACCAGCCGCCAGATGCGCCTGGTGAACGTGGAACAGCCGGATGTGGAACAGACCGTGAACAACTTTCATATTC
AGAGCAAAACCCTGACCCATTTTGATGAAGATGTGATTCGCCAGGCGCTGACCACCCCGCATCGCCTGAACCTGTTTAGCGTGGTGCTGGGCCATAACAACGAAGG
CGATGGCATTAGCCTGGCGACCGCGAAAGGCTGGCAGCGCGATCCGAGCGATCATGATGCGCTGCAGGAACGCAAAGCGTGGGCGGCGCAGCAGCCGGAAAGCACC
AGCACCGCGTTTGATCAGGATCCGACCCAGGAAGCGACCAGC

>*Serratia* sp. PDGS^{120915} PigD 단백질 1차 서열

MTTLTGQARLTNSAAYEQVWQAERQACRTDADPDTLTVGVVVVTRNPAFFQTGLSVLNDIRDYVFNRVHIQSEMPLKLLDLAADSLYLAAREKALHFLKGQNKAIN
VRIIQCASLAEATGKIIYTHALEQRPEFHLGMLFYDQTTPAGVDDSIEQIDRDLDAFYSALQRSGIPAFYTTFSTVAFIRQLRSPFRYLPQQYREIVRSEDPAIFQTELLC
LWMDFFEMNYTNRRVKPIGALALHNTLGEQLIQFFERTAAERWLVSYYTGSIISNLIGYLDRHAEARGALILRGPNEHAIACGAMANWQLYRMPFLGVVTSGMMDEF
KGTLANLKETAAQGIIVAAENRGNQWYSFQGTLTPTEDMREVLIARRIPFVYIDDVEMIGAGLTEAFRLYHQGQGPVVILATQNVLESTLSLEGAVCDPSPIPVLSADD
PLPMSESLAQAIALINRGPERLVWQLGPVSDDEYALIHDIADAAGIALVDSLAHPGSAPKYYQGRRNPHYLGTLAIYGYSPRVYNFLHTNDKLNAMSEQSLFMIKSRV
AQITTPFSDGRLERKVHLVQLTHDDRHLSPYADLHLHMNCLAFLRTVKAHLDVDPALRERRRALIAAYLDSPSDVVSQLPSLPMSANYFFCQLNRVIEELIETEGFDF
TGVYDVGRCGISAARNVAKTRRGFSGWYGRALMGDALLATGYLAYTSPSHVMAFIGDGAKGIVPDILPAFIDNILTHPQLLNKSITVFYLCNGGLSVINTYQERILFNR
TSRQMRLVNVEQPDVEQTVNNFHIQSKTLTHFDEDVIRQALTTPHRLNLFSVVLGHNNEGDGISLATAKGWQRDPSDHDALQERKAWAAQQPESTSTAFDQDPTQ
EATS

>*Serratia* sp. PDGS^{120915} pigE 합성 유전자

ATGAAATTTGGCTTTATTGCGCATCCGACCAGCCTGGGCCTGAAACGCTATGTGAAAATGCTGGATCTGCTGCAGCGCAACAGCACCGAACAGCATAGCGGCTATACC
CGCGAACTGTGGGAACGCCAGAACCTGGTGCCGTTTATGAACTTTGCGCGCATTACCAGCGCGACCGGCGCGACCTGCGAAGGCGTGATTAAATATATGCCGCTGGTG
GCGGATGAAATGCTGGCGGATGCGCGCGGCATTGCGGCGCGCGTGGTGCAGGGCATTGAAGAACTGGCGGGCGATGGCGCGGAACTGGTGGGCCTGGGCGGCTTTACC
AGCATTGTGGGCCGCCGCGGCGAAGCGACCGCGGAAAAAAGCCCGGTGCCGGTGACCAGCGGCAACAGCCTGACCACCTATGCGGGCTATAAAGCGCTGATGCAGATT
CAGAGCTGGCTGGAAATTAGCCCGGAAGAAGAACCGGTGGCGATTGTGGGCTATCCGGGCAGCATTTGCCTGGCGCTGAGCCGCCTGCTGCTGGCGCATGGCTTTAGC
CTGCATCTGCTGCATCGCGCGGGCAACCATGATCGCAGCGAACTGCTGAGCCATCTGCCGGAAGAATATCATAGCCGCGTGACCCTGACCAGCGATCCGGAAGATCTG
TATCCGCGCTGCAAACTGTTTGCGGCGGCGACCAGCGCGGGCGGCGTGATTGATCCGGCGCGCCTGCAGCCGGGCAGCATTTTTATTGATGTGGCGCTGCCGCGCGATA
TTGCGAGCGAAACCCGCCCGGCGCGCGATGATATTCTGATTATTGATGGCGGCTGCGTGACCGCGACCGATGCGGTGAAACTGGGCGGCGAAAGCCTGAACGTGACCA
TTAAACAGCAGCTGAACGGCTGCATGGCGGAAACCATTGTGCTGGCGCTGGAAAACCGCCGCGAAAACTTTAGCCTGGGCCGCTATCTGGCGCCGGAAAAAGTGCTGG
AAATTGGCGAAATTGCGGAACGCCATGGCTTTTTTGCGTATCCGCTGGCGAGCTATGGCGAACGCATTGATCGCCAGAGCGTGACCAACCTGAAACGCTATTATCATC
ATGATATTTATGCGGGCGAACCGGCGGATGCGGCGCTGCCGGCGAGCCGCCTGGCGTTTATTGATGCGGTGATTGCGCAGACCCCGGCGCGCGAAGATACCCTGGATC
GCTATCATCAGTATATTAACCCGATGATGGTGGATTTTCTGAAACTGCAGCGCTGCGATAACGTGTTTCGCAGCGCGGCGGGCACCCAGCTGTATGATGATGCGGGCG
AAGCGTTTCTGGATATGGTGGCGGGCTATGGCTGCCTGAACCTGGGCCATAACCCGCAGCCGGTGGTGAACGCGCTGAAAAACTATCTGGATGCGCAGGGCCCGAACT
TTATTCAGTATATTAGCATTCCGGAACAGACCGCGAAACTGGCGGAAGTGCTGTGCCGCCTGGCGCCGGGCAACATGGGCCGCGTGTTTTTTAGCAACAGCGGCACCG
AAGCGGTGGAAGCGGCGATGAAAATTGCGAAAGCGAGCACCGGCAAACCGGGCATTGCGTATCTGCGCAACAGCTATCATGGCAAAACCCTGGGCGCGCTGAGCATTA
CCGGCCGCGATAAACATCGCCGCTATTTTACCCCGCTGCTGGATGCGATGGTGGAAGTGCCGTTTGGCGATCTGGCGGCGCTGCGCGAAGCGCTGAACCGCGAAGATG
TGGGCGCGCTGATGATTGAACCGATTCAGGGCGAAGGCGGCGTGCATATTCCGCCGGCGGGCTATCTGCAGGCGGTGCAGCAGCTGTGCCGCGAAACCGGCGTGCTGC
TGATGGTGGATGAAGTGCAGACCGGCCTGGGCCGCACCGGCAAACTGTTTGCGTGCGAATGGGATGGCATTGAACCGGATATGCTGATGCTGAGCAAAAGCCTGAGCG
GCGGCCTGATTCCGATTGGCGCGACCCTGTGCCGCACCGATCTGTGGCAGAAAGCGTATGGCACCGCGGATCGCTTTCTGGTGCATAGCAGCACCTATGGCGGCGGCA
ACCTGGCGAGCGTGGTGGCGCTGAGCGCGCTGCGCGAAATTCTGGCGCAGGATCTGGTGGGCCATGCGGAACGCATGGGCGCGTATTTTAAACAGGCGCTGAGCGAAA
TTGCGGCGCGCTATCCGTTTGTGAGCGAAGTGCGCGGCCGCGGCCTGATGCTGGGCATTCAGTTTGATCAGGCGTTTACCGGCGCGGTGAACGCGAGCGCGCGCGAATT
TGCGACCCGCCTGCCGGGCGATTGGCATACCACCTGGAAATTTCTGCCGGATCCGGTGCAGGCGCATCTGCGCGCGGCGATGGATCGCATGGAACAGGCGCTGGGCGA
AATGTTTTGCATGAAATTTGTGACCAAACTGTGCCAGGATCATAAAATTCTGACCTTTATTACCGCGAACAGCAGCACCGTGATTCGCATTCAGCCGCCGCTGATTAT
TAGCAAAGCGGAAATTGATCGCTTTGTGGGCGCGTTTGCGACCGTGTGCGAAGAACTGAGCACCTTTCTGGAT

>*Serratia* sp. PDGS[120915] PigE 단백질 1차 서열

MKFGFIAHPTSLGLKRYVKMLDLLQRNSTEQHSGYTRELWERQNLVPFMNFARITSATGATCEGVIKYMPLVADEMLADARGIAARVVQGIEELAGDGAELVGLGGFTSIVGR
RGEATAEKSPVPVTSGNSLTTYAGYKALMQIQSWLEISPEEEPVAIVGYPGSICLALSRLLLAHGFSLHLLHRAGNHDRSELLSHLPEEYHSRVTLTSDPEDLYPRCKLFAAAT
SAGGVIDPARLQPGSIFIDVALPRDIASETRPARDDILIIDGGCVTATDAVKLGGESLNVTIKQQLNGCMAETIVLALENRRENFSLGRYLAPEKVLEIGEIAERHGFFAYPLASYG
ERIDRQSVTNLKRYYHHDIYAGEPADAALPASRLAFIDAVIAQTPAREDTLDRYHQYINPMMVDFLKLQRCDNVFRSAAGTQLYDDAGEAFLDMVAGYGCLNLGHNPQPVVN
ALKNYLDAQGPNFIQYISIPEQTAKLAEVLCRLAPGNMGRVFFSNSGTEAVEAAMKIAKASTGKPGIAYLRNSYHGKTLGALSITGRDKHRRYFTPLLDAMVEVPFGDLAALRE
ALNREDVGALMIEPIQGEGGVHIPPAGYLQAVQQLCRETGVLLMVDEVQTGLGRTGKLFACEWDGIEPDMLMLSKSLSGGLIPIGATLCRTDLWQKAYGTADRFLVHSSTYGG
GNLASVVALSALREILAQDLVGHAERMGAYFKQALSEIAARYPFVSEVRGRGLMLGIQFDQAFTGAVNASAREFATRLPGDWHTTWKFLPDPVQAHLRAAMDRMEQALGEM
FCMKFVTKLCQDHKILTFITANSSTVIRIQPPLIISKAEIDRFVGAFATVCEELSTFLD

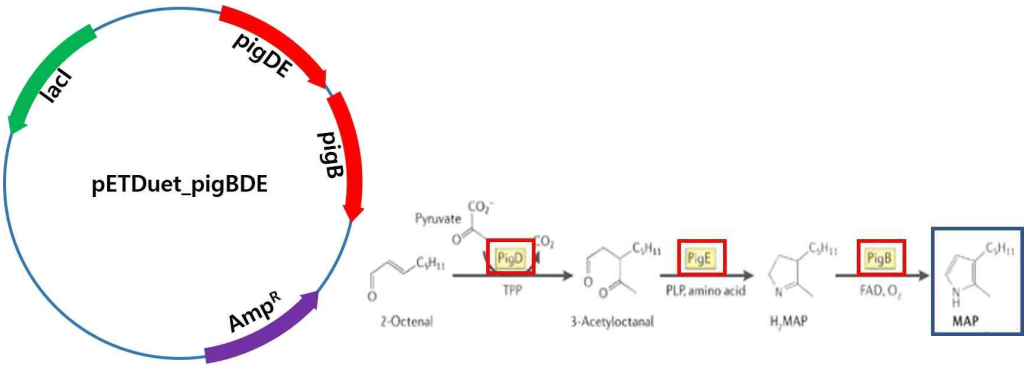
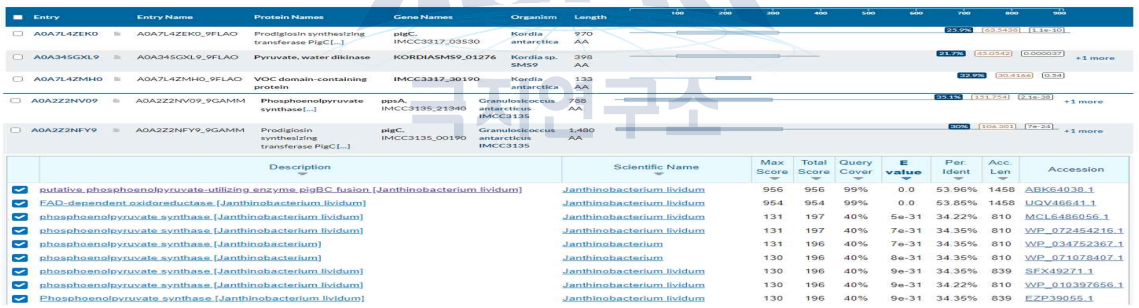


그림. pigB, pigD, pigE의 유전자 및 단백질 서열과 이를 이용해 구축한 벡터 모식도

3) Prodigiosin synthesizing transferase PigC 발현 및 활성 측정

- NCBI blast를 통해 극지 박테리아의 pigC 유전자를 탐색하였으며, 극지 호냉성 박테리아 중 유전체 서열이 규명되고 prodigiosin 생합성 경로가 밝혀진 종인 *Kordia antarctica*의 prodigiosin synthesizing transferase PigC를 표적 PigC로 선정하였음. 극지 *Kordia antarctica*는 극지 연구소의 지원으로 확보된 종으로 극지 자원 활용의 좋은 예라고 하겠음.



Entry	Entry Name	Protein Names	Gene Names	Organism	Length
A0A7L4ZEK0	A0A7L4ZEK0_9FLAO	Prodigiosin synthesizing transferase PigC [...]	pigC, IMCC3317_03530	Kordia antarctica	970 AA
A0A345GXL9	A0A345GXL9_9FLAO	Pyruvate, water dikinase	KORDIASMS9_01276	Kordia sp. SMS9	398 AA
A0A7L4ZMH0	A0A7L4ZMH0_9FLAO	VOC domain-containing protein	IMCC3317_30190	Kordia antarctica	133 AA
A0A2Z2NV09	A0A2Z2NV09_9GAMM	Phosphoenolpyruvate synthase [...]	ppsA, IMCC3135_21340	Granulosicoccus antarcticus IMCC3135	788 AA
A0A2Z2NFY9	A0A2Z2NFY9_9GAMM	Prodigiosin synthesizing transferase PigC [...]	pigC, IMCC3135_00190	Granulosicoccus antarcticus IMCC3135	1,480 AA

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
putative phosphoenolpyruvate-utilizing enzyme pigBC fusion [Janthinobacterium lividum]	Janthinobacterium lividum	956	956	99%	0.0	53.96%	1458	ABK64038.1
FAD-dependent oxidoreductase [Janthinobacterium lividum]	Janthinobacterium lividum	954	954	99%	0.0	53.86%	1458	UQV46641.1
phosphoenolpyruvate synthase [Janthinobacterium lividum]	Janthinobacterium lividum	131	197	40%	5e-31	34.22%	810	MCL6486056.1
phosphoenolpyruvate synthase [Janthinobacterium lividum]	Janthinobacterium lividum	131	197	40%	7e-31	34.35%	810	WP_072454216.1
phosphoenolpyruvate synthase [Janthinobacterium]	Janthinobacterium	131	196	40%	7e-31	34.35%	810	WP_034752367.1
phosphoenolpyruvate synthase [Janthinobacterium]	Janthinobacterium	130	196	40%	8e-31	34.35%	810	WP_071078407.1
phosphoenolpyruvate synthase [Janthinobacterium lividum]	Janthinobacterium lividum	130	196	40%	9e-31	34.35%	839	SFX49271.1
phosphoenolpyruvate synthase [Janthinobacterium lividum]	Janthinobacterium lividum	130	196	40%	9e-31	34.22%	810	WP_010397656.1
Phosphoenolpyruvate synthase [Janthinobacterium lividum]	Janthinobacterium lividum	130	196	40%	9e-31	34.36%	839	EZP39055.1

- *Kordia antarctica* PigC 단백질의 유전자 서열은 기확보되어 있어 이를 최적화하지 않고 자체 서열을 그대로 합성하여 이를 발현벡터인 pET28a에 삽입하였음. 단백질과 유전자 서열, 구축된 발현 벡터의 모식도는 아래와 같음.

>**Kordia antarctica PigC 합성 유전자**

ATGCTAAAAAAACTTCCCTTATTCTTCGTCCTATTCTTTTTTGTTGCTTCTCCTTTTATTGAAGCGCAAGAAAAATCAACAAATCAGATTA
AAAATCTTATAAAAGAATACAAACAAGATCGTCGTGGTCCGTATAGCGGTATCAAATGGTTTTGTAAAGATGGTAGCCAACGAGAAGCCAG
AGATCCGTGTCCTGACAATATTGGCGGCGGAATTCAGCATGCTAGTTTTAAAAGCAGCGTTGTCGATTTAAGAAAAACCAACCATTTGTTT
TTCGGTGAAATTTTAGCATCTTTAAGTTCGTATGATTTTATAGATAAAAAAAATAATTTTAGCCGTTTAAAGCAATATCAAATTGGTAAAT
ACCTTTCAAGCGTTGATGACGGTTGGGTTTTGAGACGCGCACAATATTACCGAGGCGCTTTTCAAAGTGAAGATGAAGAAGCTTGGGGAAA
AGACTTTTTTGAAACGTTATTAAGAAATGACGATCTTATACTTAGTAATTATTTCTTATTCCGTCAGGCTTTAAAAGATATTCCACACAAT
GGCGATAGTAATCTTGCGCAAGATATGCGGAGTGAATCTAAATTAATTGCTGAAGATATTTCATCTTTTATGGATGTGAGAATTAAAATTC
ACGGACAACCAGATGTTACTGATATTGCATTGGTAGAAAGCTATGTAAAGAAGAATGACGCAAAACTTTCCGTTGCACAGAAAAAAGAATT
TTCAAAATTATTAGTGACTATGCGTGAATATTACGCGCCTATAAATTTTGAAAAACTTTCAAGCGATGTAAATTTAATTTCAGAAAAAAAT
ACTACTACAGAATTAATAGCTGATTTTTTAAAAACGTATCGCACAGAAACTTCTCCTAAAGTATTAGTTACAGAAGTTTCTAGATTGTTGT
ATGAAATCCGTTTAGGTGTTAATACTTTTAAAAGCAGCAAAGATCGATTGAAATTACTTGATATTTCCAATCAATTGGAACACACACTTTT
AAAAGAAGTTCAAAATTGGCAAGTAGTAACGCTTGAAGATAATTTAGACAAAATAAGCGCATTAGCGTGTGCTTCCGCAGGTACAGGACTT
ATTGAAACTTGGGAATATAACGCTATTGATACGCAACTAAACGAAGCAATGTCAACACGTGATTTAAGTATTGAAACCTTAAATACCATCT
TAACTCACAGTCGAAGTATTGTAGAATGGAGTACATCTATGGTGAAAGCAAATTACCAAGCAGATGTTGATAAATATACTGCGTTTGAACC
GATGACCTATAGTTTTATAGACGATAGAGTTCGGAGTAGCGTTGCGTTAAACTTGGGTGAAACCGTAAGTAACTTAGGTGTTTTTGTTTCG
AAAGTATCAAAAATAAATAATCAAGTGATGAACATTGAAAGTCAGACAGCAATTAGAGGATTAAATCCTGGATATGCATTTGGCGAATTGG
TGGTTGTTGATGGAAATCCTGATGATGTTGAAGTAAATACAAATAAAATATACATTTTTGAGAAACCACCGCACGATTTAAAACCTGTGGC
AGGAATTATGACGGTTTCCGAAGGGAATTTAGTGTCGCACGTACAATTGTTGGCGCGTAACTTAGGAATTCCTAATGCAGTTTTATCGTAT
GACAATTTAAAAGCATTAAAAAAATACAACGGCAAAAAAGTGTTTTACGCAGTTTCTAACAAAGGAAATGTAGTTTTGAAAGCTGAAGATG
AAATGTCTGCCAATGAAACTGCGCTTTTTAGCAAGAAAGAACGTAGTAAGAACGTTATTGAAGTTCCTATTAAGGATATTCGCTTAGATGT
TTCTAAAGTGATAAATATGCGTGATGTGAATGCTTCTGATTCTGGAAAACTTTGTGGACCAAAAGCAGCCAATCTTGGAGAATTGAAACAT
TTATTTCCAGATCAAGTTGTGGAAGGATTAATTATTCCGTTTGGTGTATTCAAATCGCACATGAATTTAATGATGCCTGGCGAAAACATAA
GTTATTGGACATATTTGAATAACACATTCGCGAAAGCGGATTCAATGAGAGCGCAAAATGAATCAGAAGAAGTTATTGAAGCGTTTCAGTT
AGCCAATTTGAAAAAATTGCACGATGCTATTATAAAAATTCCTTTAGACGCAACCTTTAAAAATGACTTGTATACGAGTTTTAAATCCGCT
TTTGGAAATTCGATAGGAAATGTTCCTGTGTTTTTACGAAGTGACACCAATATGGAAGATTTGAAAGAGTTTACTGGAGCTGGTTTAAATT
TGACACTTTTCAATATTAAAAACGAAGACGAAATCGTAAAAGGAATCAAGCGCGTTTGGGCTTCTGCGTATACAGAACGTAGTTTTAAATG
GAGACAGAAATATTTATCAAATCCTGAGAATGTTTTTCCTTCTATTTTAATTATTCCAAGTGTAGATGTTGATTATTCTGGTGTAATGATT
ACCAAAGGAATCAACTCCGGAAATGATGATGATTTAACCGTTGCTTTTAGTCGTGGTGCTGGTGGAGCTGTTGATGGACAATCTGCGGAAA
CGCGTTTAATCACGGAAAAAGGCAATACATTACTAGCTCCTGCAAGACAAGCAGATTATATTAGATTGCCCGATTATGGTGGCACAAAAGG
GTATTTTACCACTTTTGAATCTCCTATTTTGAATGAAAAAAATATAGAAGATATTCGAAAAATCGCTAAAAAAGTAAGAGCAAAAATGACC
GAACATACAGCATCTAGCAATCAAGCATATGATGTAGAGTTTGGATTTAAAGATGATAAATTATGGTTGTTTCAAATACGTCCATTTGTAG
AGAATAAGAAAGCAAAAAGTTCTGAGTATTTATTATCTATCACACCAAAAATAGACGCTGACAAAATGGTATCTATTACAACACCTTTG

>PigC 단백질 1차서열[Kordia antarctica]

MLKKLPLFFVLFFFVASPFIEAQEKSTNQIKNLIKEYKQDRRGPYSGIKWFCKDGSQREARDPCPDNIGG
GIQHASFKSSVVDLRKTNHLFFGEILASLSSYDFIDKKNNFSRLKQYQIGKYLSSVDDGWVLRRAQYYRG
AFQSEDEEAWGKDFFETLLRNDDLILSNYFLFRQALKDIPHNGDSNLAQDMRSESKLIAEDISSFMDVRI
KIHGQPDVTDIALVESYVKKNDAKLSVAQKKEFSKLLVTMREYYAPINFEKLSSDVNLISEKNTTTELIA
DFLKTYRTETSPKVLVTEVSRLLYEIRLGVNTFKSSKDRLKLLDISNQLEHTLLKEVQNWQVVTLEDNLD
KISALACASAGTGLIETWEYNAIDTQLNEAMSTRDLSIETLNTILTHSRSIVEWSTSMVKANYQADVDKY
TAFEPMTYSFIDDRVRSSVALNLGETVSNLGVFVSKVSKINNQVMNIESQTAIRGLNPGYAFGELVVVDG
NPDDVEVNTNKIYIFEKPPHDLKPVAGIMTVSEGNLVSHVQLLARNLGIPNAVLSYDNLKALKKYNGKKV
FYAVSNKGNVVLKAEDEMSANETALFSKKERSKNVIEVPIKDIRLDVSKVINMRDVNASDSGKLCGPKAA
NLGELKHLFPDQVVEGLIIPFGVFKSHMNLMMPGENISYWTYLNNTFAKADSMRAQNESEEVIEAFQLAN
LKKLHDAIIKIPLDATFKNDLYTSFKSAFGNSIGNVPVFLRSDTNMEQLKEFTGAGLNLTLFNIKNEDEI
VKGIKRVWASAYTERSFKWRQKYLSNPENVFPSILIIPSVDVDYSGVMITKGINSGNDDDLTVAFSRGAG
GAVDGQSAETRLITEKGNTLLAPARQADYIRLPDYGGTKGYFTTFESPILNEKNIEDIRKIAKKVRAKMT
EHTASSNQAYDVEFGFKDDKLWLFQIRPFVENKKAKSSEYLLSITPKIDADKMVSITTPL

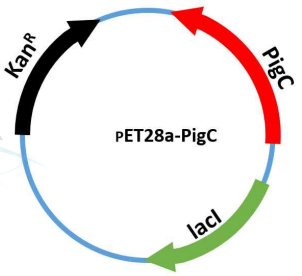


그림. K. antarctica의 pigC 유전자서열 및 단백질 서열과 발현을 위해 구축한 벡터의 모식도

– PigC 발현 및 활성 측정

○ pET28a-pigC를 대장균 BL21(DE3)에 형질전환하고 발현을 유도하였음. 0.1mM IPTG로 발현을 유도하고 25℃-16시간 배양의 조건으로 수행하였음. 단백질 정제는 Ulrich 등의 방법에 따라 진행하였음.

○ 발현된 배양액을 4℃, 4,000×g 조건에서 15분간 원심분리하여 균체를 회수하고, 습윤중량 4g에 100 mM Tris/HCl (pH7.5) buffer를 20mL가하여 재현탁하였음. 재현탁액을 30s/30s pulse/pause, 40% amplitude 조건에서 5분간 초음파파쇄를 진행한 후 4℃, 18,500×g 조건에서 15분간 원심분리하여 상층액을 회수한 후 100,000×g에서 60분간 초고속원심분리를 진행하여 membrane fraction (MF)를 획득하였음. PigC가 포함된 MF를 차가운 100 mM Tris/HCl (pH 7.5) buffer 3.5 mL로 재현탁하여 활성 분석 연구에 사용하였음.

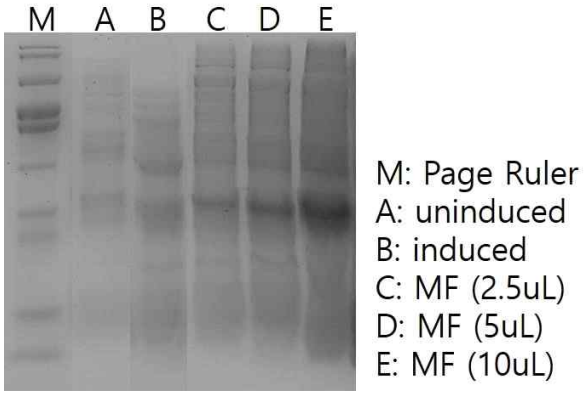


그림. pigC의 발현 전후와 추출한 MF의 발현량 확인

○ PigC 효소의 활성 측정은 Ulrich 등의 방법을 변형하여 수행하였음. 활성 측정은 96-well에서 진행하였으며, 활성 측정을 위한 용액은 100 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5), 200 μM ATP, 0-100μM MBC, 0-140μM MAP, 5% DMSO, 50uL의 MF로 조성되었음. 각 반응액을 혼합 후 25℃ 조건에서 30초 간격 30분간 536 nm에서 흡광도를 측정하였음

KOBRI 국지연구소

<그림> 색변화 관찰을 통한 pigC의 활성 확인

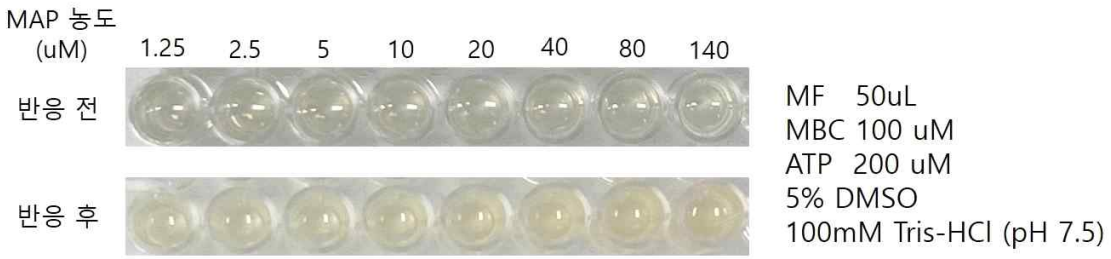


그림. MAP 농도별 색변화 관찰을 통한 pigC의 활성 확인

4) 분자진화 변형효소 변이체의 반응 메커니즘 및 삼차 구조 규명

- PbAcE 효소의 돌연변이 15종에 대해 정상상태 반응속도 매개변수를 pNP-C_2를 기질로 분석하였음. 아래 그림은 돌연변이중 대표적인 단일 돌연변이 2종과 이중 돌연 변이 2종에 대한 미켈리스-멘텐 그래프임. 돌연변이 전체에 대한 K_m, k_{cat}은 아래 표와 같음. 이를 통해 도입된 대부분의 돌연변이는 야생형에 비해 기질에 대한 친화도를 증가시키는 것으로 나타났음. 하지만 기질인 pNP-C_2는 두 개의 결합 pocket 중 S0에 결합함으로써 돌연변이가 도입된 영역은 S1이므로 전체적인 K_m, k_{cat}은 크지 않았음.

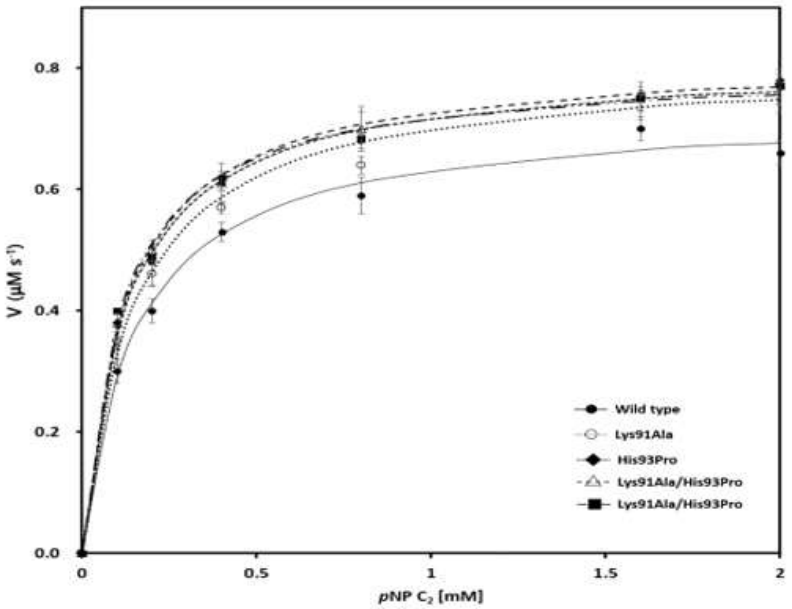


그림. PbAcE 돌연변이의 미켈리스-멘텐 그래프.

Enzyme	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($mM^{-1}S^{-1}$)
Wild type	52.5 ± 0.9	0.19 ± 0.01	282.3
Lys91Ala	53.5± 1.1	0.17 ± 0.01	308.8
Lys91His	55 ± 0.8	0.16 ± 0.02	343.8
Lys91Ser	57.5 ± 0.7	0.17 ± 0.01	338.2
His93Pro	48.3 ± 0.9	0.14 ± 0.01	332.2
His93Asp	55 ± 0.8	0.18 ± 0.02	305.6
Tyr182Thr	52.5 ± 1.0	0.16 ± 0.01	328.1
Tyr182Glu	55 ± 0.9	0.17 ± 0.01	323.1
Tyr182Met	52.5 ± 1.2	0.16 ± 0.01	328.1
Tyr182Trp	55 ± 1.5	0.16 ± 0.01	343.8
Lys91Ala/His93Pro	50.5 ± 0.9	0.14 ± 0.02	384.6
Lys91His/His93Pro	51.4 ± 1.0	0.15 ± 0.01	357.1
Lys91Ala/His93Pro/Tyr182Glu	50.3 ± 0.7	0.16 ± 0.01	312.1
Lys91Ala/His93Pro/Tyr182Met	55.5 ± 0.9	0.15 ± 0.01	366.7
Lys91Ala/His93Pro/Tyr182Thr	57.3 ± 1.2	0.15 ± 0.01	383.3
Lys91Ala/His93Pro/Tyr182Trp	55.2 ± 1.1	0.16 ± 0.01	366.7

그림. PbAcE 돌연변이의 반응속도 매개변수

- PbAcE에 도입된 돌연변이는 기질 결합 부위인 S1 영역에 집중되어 있으며, 이를 통해 기질 결합 부위의 cavity가 증가할 것으로 예상됨. 아래 그림은 각 돌연변이별 기질 결합 부위를 도식화한 것임. 결합부위는 각각 야생형 PbAcE는 818.38 $Å^3$인데 비해 단일돌연변이인 Lys91Ala는 858.38 $Å^3$, 이중돌연변이인 Lys91Ala/His93Pro는 855.38 $Å^3$, 삼중돌연변이인 Lys91Ala/His93Pro/Tyr182Val는 974.62 $Å^3$로 계산되었음. 이를 통해 광범위한 기질 특이성이 증가할 것으로 판단됨.

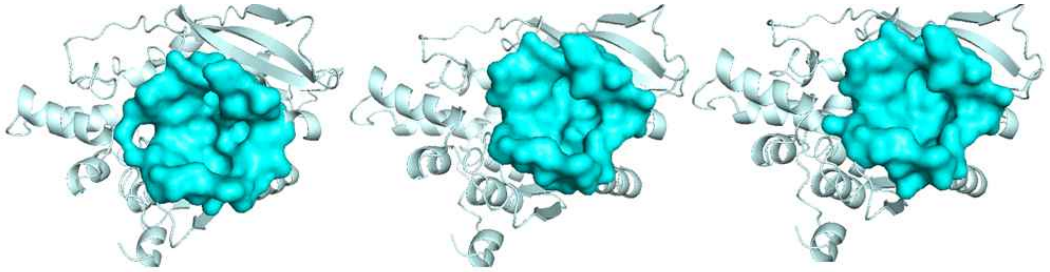


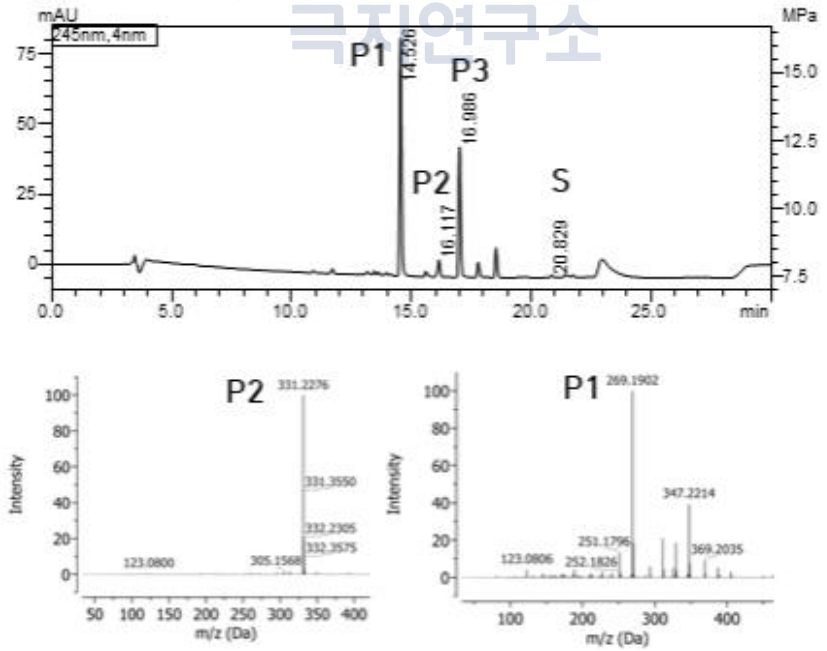
그림. 야생형 (a), 단일돌연변이 Lys91Ala (b), 삼중돌연변이 Lys91Ala/His93Pro/Tyr182Val (c) PbAcE의 cavity 분석 결과

<3세부> 항생물질 변형체 제작 및 활성 검증

가. 구조변형 효소를 이용한 다양한 in vitro / in vivo 반응으로 신규 항생물질 발굴 (선문대)

1) 스테로이드 구조 변형효소인 CYP106A6 mutagenesis 연구

- 스테로이드 수산화 효소로 연구 중인 CYP106A6는 이전에 본 연구실에서 연구한 BaCYP106A2에 이어 후속으로 연구하는 효소임. 이 효소는 BaCYP106A2와 같이 뛰어난 용해도를 보여 실험에 사용하기 유용하며, 주로 15 beta 탄소 위치에 수산기로 치환하는 역할을 수행하는 효소임. 흥미로운 점은 유전자 유사도가 CYP106A1과 더 유사하다는 것임. 이로써, 기존 효소와 다른 활성을 기대하고 실험에 임하였음.
- 프로게스테론 기질과 in vitro 반응하는 실험을 수행한 결과, 15 beta 탄소 위치 외에도 다른 부분에 작용하는 것으로 판단되는 새로운 마이너 생성물을 확인하였음. 이는 mass로 확인하였으며, P3의 분자량이 m/z+ 329.2105 인 것으로 보아 수산화반응이 진행된 후 탈수소화 작용이 일어난 것으로 판단되었음. (그림)



KOPRA 극지연구소

Substrate	Parent m/z$^+$[M+H]$^+$	Product m/z$^+$[M+H]$^+$
Progesterone	315.2331	347.2214 (P1) 331.2276 (P2) 329.2105 (P3)

그림. 프로게스테론 in vitro 반응 HPLC와 MS 결과

- 다만, 반응 시간에 따른 전환률의 변동으로 인해 이 생성물이 2차 생성물인지 3차 생성물인지에 대한 탐구가 필요하다 판단함. 2시간 동안 각 샘플을 비교한 결과, P3은 P2에서 비롯되었을 거란 추측이 가능하였음 (그림). P2는 NMR 분석 결과 15베타 수산화 물질이기 때문에 이로써 생성되는 물질은 15케토 화합물 또는 수산화된 형태에서 다른 탄소고리의 이중결합이 단일결합으로 변환된 것이라 추측할 수 있음. 이를 정확히 확인하기 위한 추가 분석을 수행중에 있음.

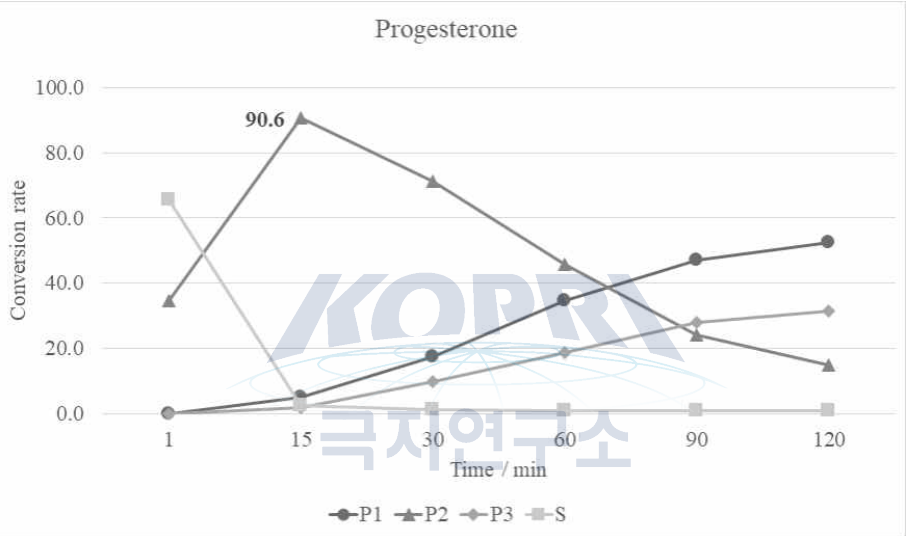


그림. 시간 변화에 따른 각 생성물의 전환률

- 기존의 CYP106A6의 효소 모델링 결과, 활성 부위를 가리고 있는 R295 잔기가 존재함을 확인하였으며, 이를 돌연변이하여 결과를 비교해 보고자 하였음. 이에 P3의 생성률 또한 증가되기를 기대하는 바였음. 활성 부위의 크기를 확장하기 위하여 가장 작은 아미노산인 A와 ㅣ기존에 활성이 좋다고 알려진 BaCYP106A2에서 같은 위치에 존재하는 L 아미노산으로 전환하여 그 결과를 비교하였음 (그림). 확연히 공간이 넓어진 것으로 확인할 수 있었으며, 이를 통해 새로운 활성 패턴을 기대해볼 수 있었음.

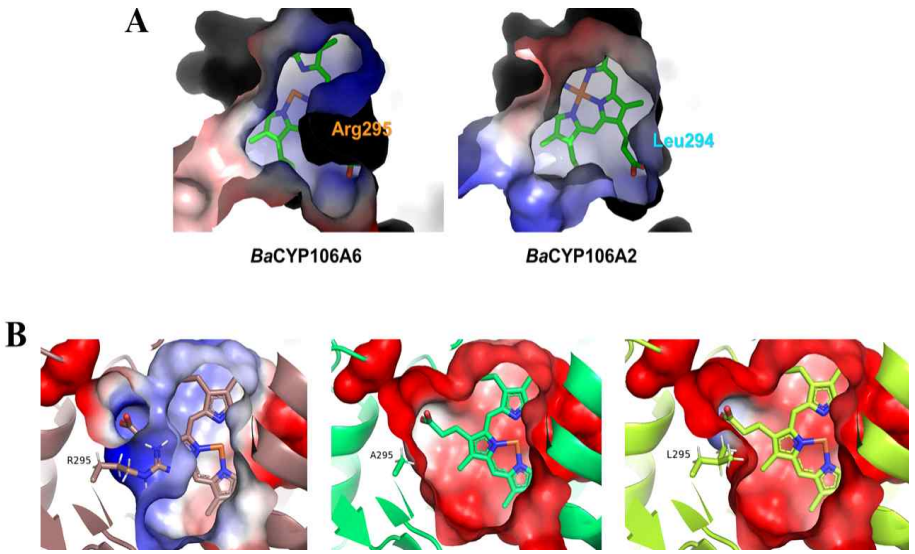


그림. 돌연변이를 위한 잔기 위치에 대한 구조 비교. (A) R295 아미노산과 L294 아미노산의 형태 비교. (B) CYP106A6의 각 부분을 돌연변이화 했을 때 예상되어지는 구조 형태 비교.

- 프라이머는 아래 표와 같이 만들었으며, 클로닝하고 단백질 발현하여 HPLC 분석으로 생성물의 전환률을 확인하였음 (표 와 그림). HPLC 분석 결과, 흥미롭게도 프로게스테론의 P3 생성물이 R295A 효소에서 두드러지게 많이 전환된 것을 확인할 수 있었음. 이는 기존 활성이 높아졌음을 의미하는 동시에 충분한 양을 추출하여 NMR 물질 분석이 더 용이해질 수 있음을 의미함. 기존의 효소로 in vivo를 진행하였을 때, P3의 전환률이 유독 낮아져 분석할 생성물을 충분히 얻기 어려웠으나, 이번 돌연변이의 활성으로 이를 극복할 수 있을 것으로 기대함. 그에 앞서, 정확히 동일한 화합물일지에 대한 확인 연구가 필요함으로 재연성 및 활성 최적화를 위한 실험을 준비 중에 있음.

KOREA 극지연구소

표 . 각 돌연변이를 위한 프라이머 제작

CYP mutant	Primer	Length
R295A	F- TTCATATGTCGAGAGCAGACCGAACTGTGAAA R- TTTCACAGTTCGGTCTGCTCTCGACATATGAA	32 dp
R295L	F- TTCATATGTCGAGATTAGACCGAACTGTGAAA R- TTTCACAGTTCGGTCTAATCTCGACATATGAA	32 dp

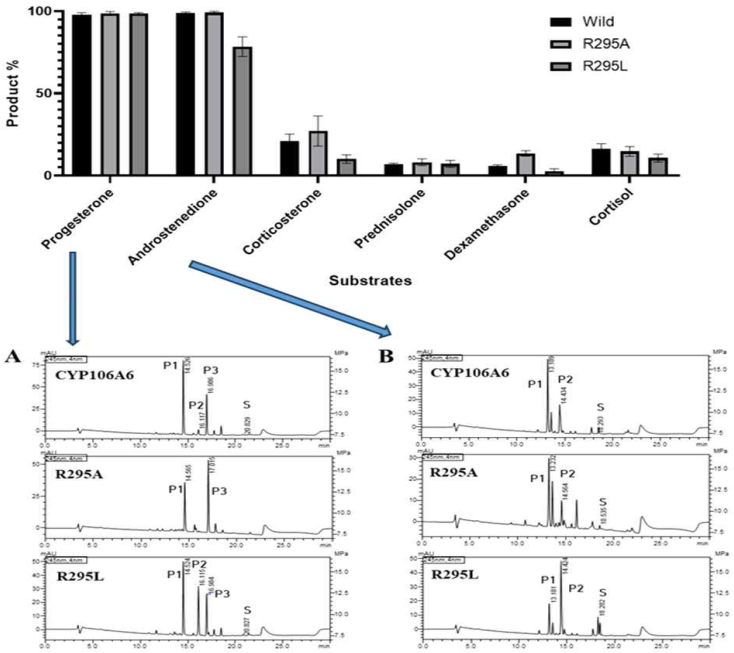


그림. 기존 효소와 돌연변이 효소의 in vitro 반응 결과

- 마지막으로, CYP106A6와 코르티코스테로이드의 전환률을 높이기위한 연구를 계획 중에 있음. 코르티코스테로이드는 탁월한 항염증 효과를 지니고 있어 다양한 제약적 요소로 사용되기 때문에 기질의 변환에 중요점을 둘 수 있음. 보고된 바에 따르면, CYP106A1은 높은 코르티코스테로이드 전환률을 보이는데, 이와 유전적으로 유사한 CYP106A6의 in vitro 실험 결과, 현저히 낮은 활성을 보였음. 두 효소의 차이를 알아보기 위해 인실리코 데이터를 만들어 비교한 결과, 기질이 닥킹되나 그 형태가 다름을 확인 할 수 있었음 (그림). 기질이 반대로 들어가거나 틀어진채 닥킹 되므로 활성이 떨어지는 것으로 보였음. 그러므로, 여기 작용하는 아미노산을 더 명확히 특정하여 특이적 코르티코스테로이드 활성 전환을 위한 돌연변이를 구상 중에 있음.

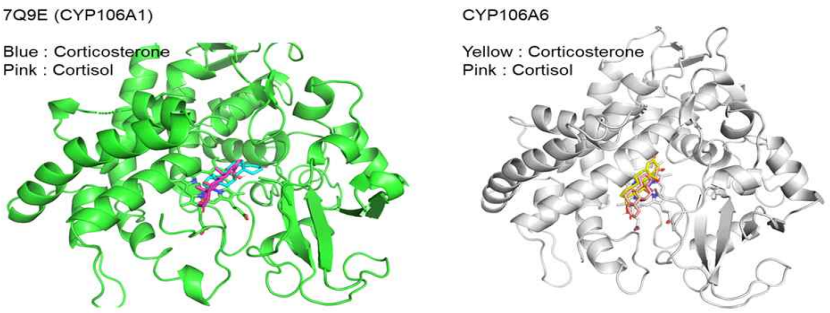


그림. CYP106A1과 CYP106A6의 기질 닥킹 인실리코 분석 결과

2) CYP105D18-H_2O_2 를 보조기질로 사용하여 스테로이드 변형 수행

- 스테로이드 구조적 변형은 어려운 화학반응에 속하며, 코어링과 측쇄부분을 변형하게 되면 스테로이드의 생물학적 활성이 향성됨. 현재 연구를 통해 값비싼 보조 인자의 사용을 극복하고 H_2O_2 를 보조기질로 사용하여 수산화된 스테로이드 변형 물질을 보고 할 수 있었음
- 실험데이터와 molecular docking을 기반으로 methyl testosterone와 nandrolone의 A-고리의 2번 위치에서 수산화가 일어날 것이라고 예측하였고, androstenedione 와 adrenosterone

의 B-고리에서 수산화가 일어날 것이라고 예측하였음. 뿐만 아니라, S63, R82, F184 위치에서 돌연변이 유발을 통해 생성물 형성을 향상 시킬 수 있는 결과를 얻었음

- 관련 결과를, Applied and Environmental Microbiology 저널에 게재하였음

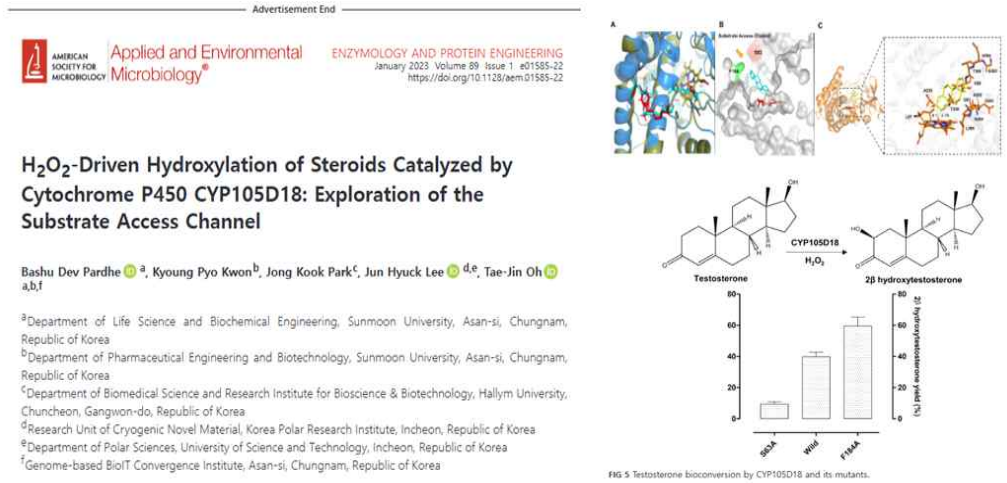


그림. 돌연변이된 CYP105D18효소에 대한 논문 결과

3) 스테로이드 구조 변형 새로운 효소 발굴에 대한 결과

- Acetyltransferases 효소를 이용해 스테로이드 구조를 변형 시킬 수 있는지에 대해 In vitro 실험을 통해 확인해 보았음. 극지미생물 2종에서 분리한 Acetyltransferases 효소를 통해 7개의 기질(Methyltestosterone, Cortisone, Dehydroepiandrosterone, Pregnenolone, Nandrolone, Chloramphenicol, 11-Deoxycorticosterone acetate) 에 반응하여 결과를 확인하였음
- 그 결과, 7개주 3개의 스테로이드 물질에 반응하여 물질이 변환 된 것을 확인 할 수 있었음. 반응된 스테로이드 물질은 Nandrolone, Cortisone, 11-Deoxycorticosterone acetate로, 아세트기가 구조상에 존재 하지 않은 Nandrolone, Cortisone에서는 아세틸기가 붙은걸로 확인이 되었고, 아세틸기가 원래 존재 하였던 11-Deoxycorticosterone acetate구조에서는 아세틸기가 제가 된 것을 확인하여 스테로이드 구조 변형 효소를 새롭게 발굴하였음

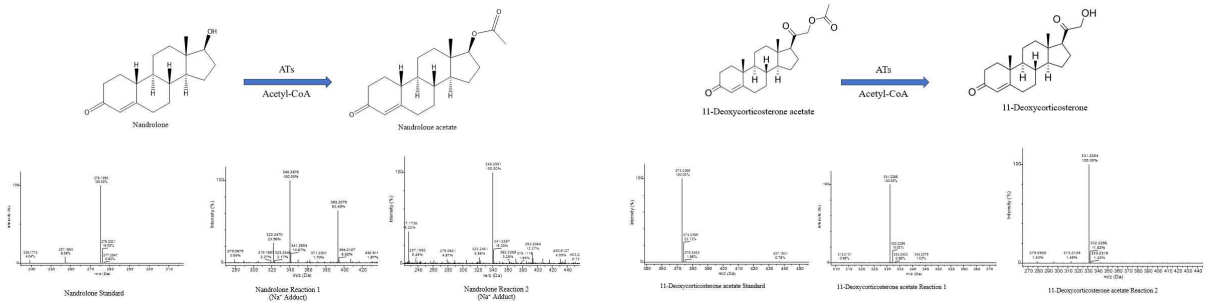


그림. Acetyltransferases 효소를 이용해 스테로이드 구조를 변형결과 일부
(첫번째: Nandrolone, 두 번째: 11-Deoxycorticosterone acetate)

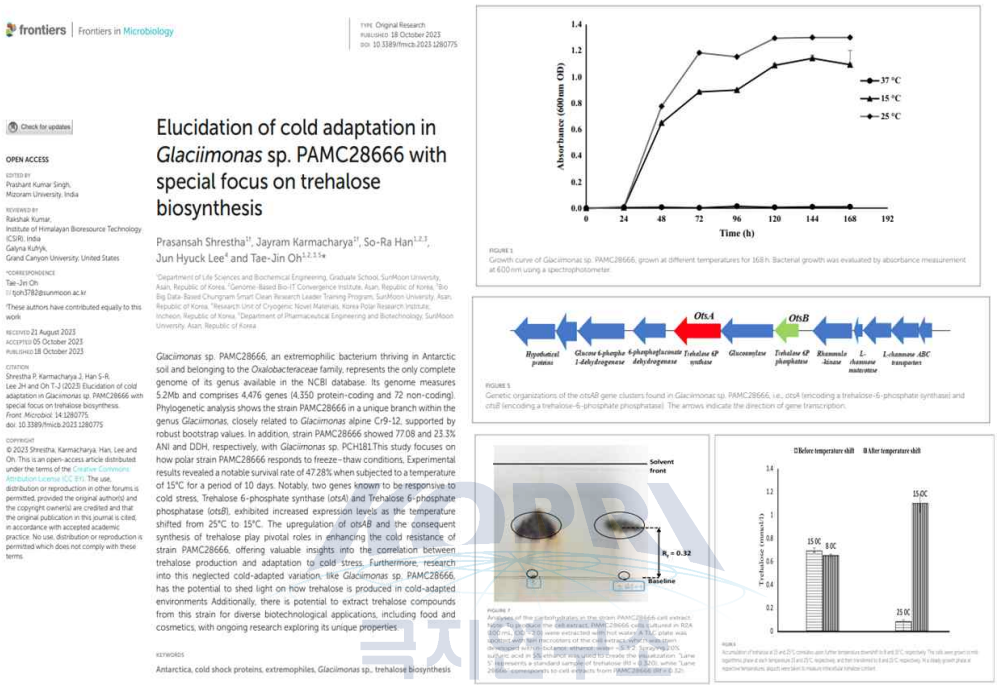
나. 확보된 신규 항생물질의 분리 및 구조 분석 (선문대)

1) 저온 관련 Trehalose 생합성과정 확인 및 물질 확인

- 극지에서 분리한 *Glaciimonas* sp. PAMC28666을 통해 Trehalose 생합성 과정을 확인 하였고, 저온 적응 환경에서 Trehalose가 어떻게 생성되는지에 대해 유전적으로 확인하고 물질을 확인하였음. Trehalose는 자체적으로 수분을 흡수하는 특성을 가지고 있어 여러 생물체가 극

한환경에서 생존하는데 도움을 주며 세포를 보호하는 작용을 수행 할 수 있어, 화장품이나 감미료, 천연 보존제로 사용할 수 있음

- *Glaciimonas* sp. PAMC28666 유전체로부터 Trehalose 6-phosphate synthase (otsA) 와 Trehalose 6-phosphate phosphatase (otsB)의 단백질을 얻고 온도별로 온도가 25° C에서 15° C로 이동함에 따라 발현 수준이 증가한 것으로 나타났음. otsAB의 상향 조절과 그에 따른 트레할로스 합성은 PAMC28666 균주의 내한성을 강화하는 데 중추적인 역할을 하며, 트레할로스 생산과 저온 스트레스에 대한 적응 사이의 상관관계에 대한 귀중한 통찰력을 제공하였음.
- 관련 내용을 Frontiers in Microbiology 저널에 게재하였음


frontiers | Frontiers in Microbiology

TYPE Original Research
PUBLISHED 18 October 2023
DOI 10.3389/fmicb.2023.1280775

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Prashant Kumar Singh,
Mizoram University, India

REVIEWED BY
Rakshak Kumar,
Institute of Himalayan Bioresource Technology (CSIR), India
Galyna Kuhyk,
Grand Canyon University, United States

*CORRESPONDENCE
Tae-Jin Oh
tjoh3782@sunmoon.ac.kr

†These authors have contributed equally to this work

RECEIVED 21 August 2023
ACCEPTED 05 October 2023
PUBLISHED 18 October 2023

CITATION
Shrestha P, Karmacharya J, Han S-R, Lee JH and Oh T-J (2023) Elucidation of cold adaptation in *Glaciimonas* sp. PAMC28666 with special focus on trehalose biosynthesis. *Front. Microbiol.* 14:1280775. doi: 10.3389/fmicb.2023.1280775

COPYRIGHT
© 2023 Shrestha, Karmacharya, Han, Lee and Oh. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Elucidation of cold adaptation in *Glaciimonas* sp. PAMC28666 with special focus on trehalose biosynthesis

Prasansah Shrestha[†], Jayram Karmacharya[†], So-Ra Han[1,2,3], Jun Hyuck Lee[4] and Tae-Jin Oh[1,2,3]*

[1]Department of Life Sciences and Biochemical Engineering, Graduate School, SunMoon University, Asan, Republic of Korea, [2]Genome-Based Bio-IT Convergence Institute, Asan, Republic of Korea, [3]Bio Big Data-Based Chungnam Smart Clean Research Leader Training Program, SunMoon University, Asan, Republic of Korea, [4]Research Unit of Cryogenic Novel Materials, Korea Polar Research Institute, Incheon, Republic of Korea, [5]Department of Pharmaceutical Engineering and Biotechnology, SunMoon University, Asan, Republic of Korea

Glaciimonas sp. PAMC28666, an extremophilic bacterium thriving in Antarctic soil and belonging to the *Oxalobacteraceae* family, represents the only complete genome of its genus available in the NCBI database. Its genome measures 5.2Mb and comprises 4,476 genes (4,350 protein-coding and 72 non-coding). Phylogenetic analysis shows the strain PAMC28666 in a unique branch within the genus *Glaciimonas*, closely related to *Glaciimonas alpine* Cr9-12, supported by robust bootstrap values. In addition, strain PAMC28666 showed 77.08 and 23.3% ANI and DDH, respectively, with *Glaciimonas* sp. PCH181.This study focuses on how polar strain PAMC28666 responds to freeze–thaw conditions. Experimental results revealed a notable survival rate of 47.28% when subjected to a temperature of 15°C for a period of 10 days. Notably, two genes known to be responsive to cold stress, Trehalose 6-phosphate synthase (*otsA*) and Trehalose 6-phosphate phosphatase (*otsB*), exhibited increased expression levels as the temperature shifted from 25°C to 15°C. The upregulation of *otsAB* and the consequent synthesis of trehalose play pivotal roles in enhancing the cold resistance of strain PAMC28666, offering valuable insights into the correlation between trehalose production and adaptation to cold stress. Furthermore, research into this neglected cold-adapted variation, like *Glaciimonas* sp. PAMC28666, has the potential to shed light on how trehalose is produced in cold-adapted environments Additionally, there is potential to extract trehalose compounds from this strain for diverse biotechnological applications, including food and cosmetics, with ongoing research exploring its unique properties.

KEYWORDS
Antarctica, cold shock proteins, extremophiles, *Glaciimonas* sp., trehalose biosynthesis

그림. *Glaciimonas* sp. PAMC28666로부터 분리된 Trehalose 관련 게제된 논문내용

2) 새로운 GH46계열의 Chitoshanase를 통한 키토산 분해 관련 결과

- 새로운 GH46계열의 Chitoshanase를 찾아 키토산 분해를 할 수 있는지에 대한 여부를 확인하였음. 인간은 키틴을 분해하는 능력이 매우 떨어지기 때문에 키틴을 섭취할 때 키틴을 분해할 수 있는 효소와 같이 섭취해야함.
- 분리한 효소는 새로운 GH46계열로 키토올리고당의 관련된 것을 분해하는 것으로 실험을 통해 확인 할 수 있었고, 다당의 구조를 단당으로 분해하여 효소에 대한 중요성을 증명하였음
- 산업적으로나 연구적으로 의미있는 결과를 거두었으며, 관련된 내용을 International Journal of Biological Macromolecules 저널에 투고하여 논문을 게재하였음.

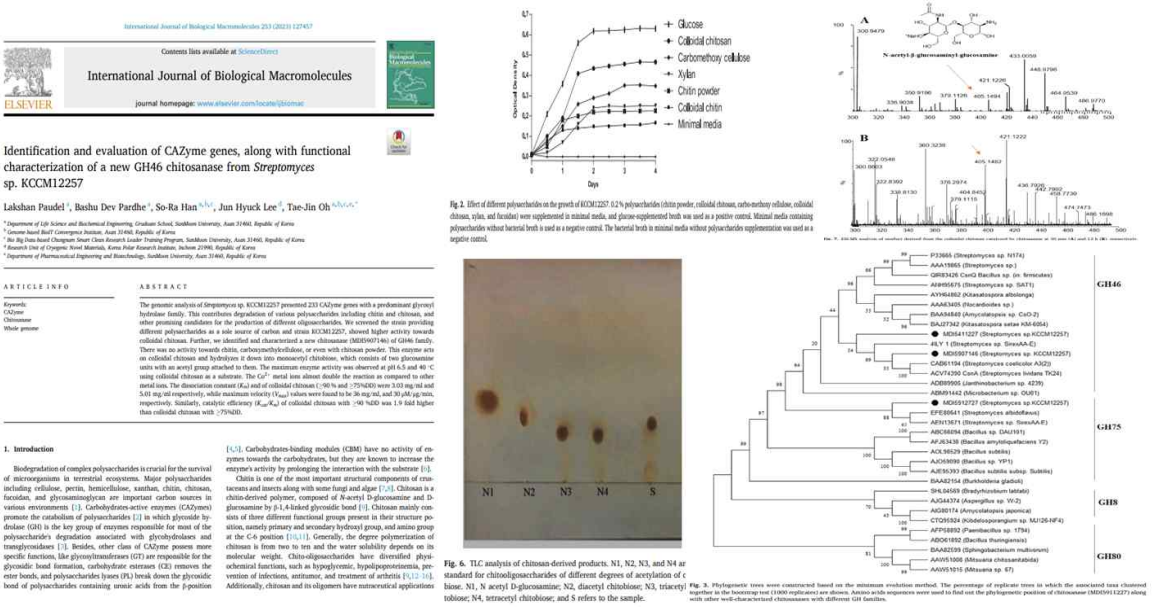
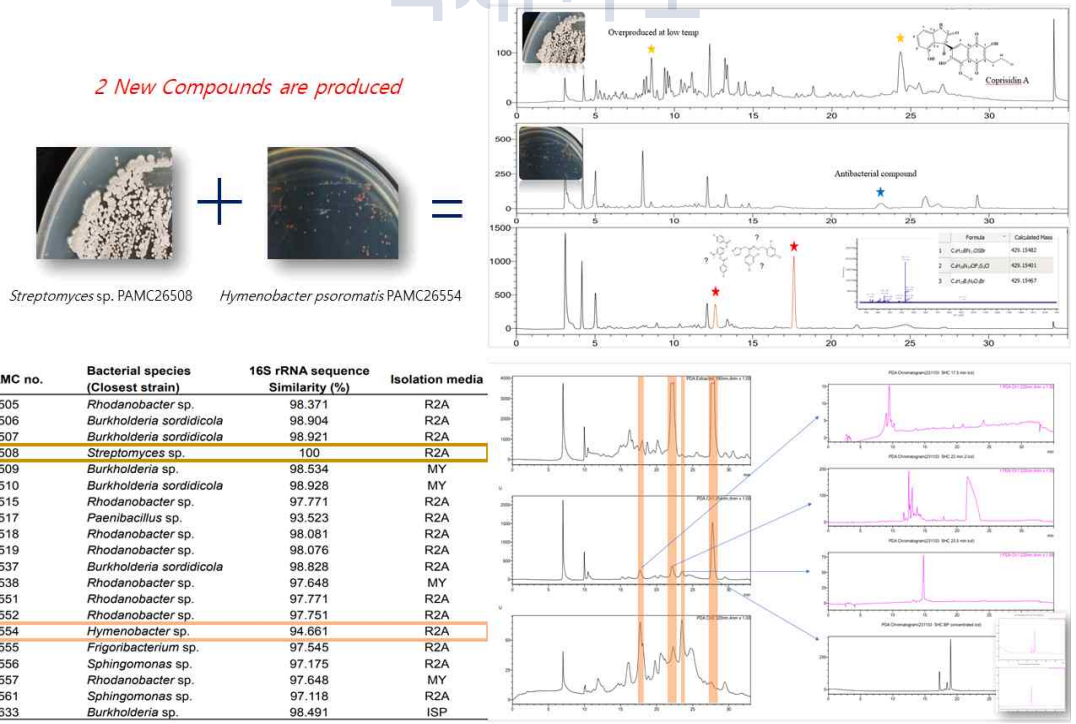


그림. 새로운 GH46계열의 Chitoshanase를 통한 키토산 분해 관련 게제된 논문내용

3) 미생물 2종 co-culture를 통한 신규 물질 분리 및 분석

- 기 연구를 통해 Streptomyces sp, PAMC26508 미생물 추출물에서 다양한 2차대사물질을 생산할 수 있을 것이라고 예측하였고, 추출 실험을 통해 “Coprisidin A” 물질이 생산되는 것을 확인하였음.
- *Streptomyces* sp, PAMC26508 미생물은 남극 Lichen *Pcoroma* sp.에서 분리되었으며, 같이 분리된 *Hymenobacter* sp. PAMC26554와 함께 배양하여 결과를 확인하였음. 그 결과, 양쪽에서 볼수 없었던 새로운 peak를 확인 할 수 있었으며, 그 peak를 분리하여 지금 물질 구조를 확인 하고 있음.

KOPRI 극지연구소



PAMC no.	Bacterial species (Closest strain)	16S rRNA sequence Similarity (%)	Isolation media
26505	*Rhodanobacter* sp.	98.371	R2A
26506	*Burkholderia sordidicola*	98.904	R2A
26507	*Burkholderia sordidicola*	98.921	R2A
26508	*Streptomyces* sp.	100	R2A
26509	*Burkholderia* sp.	98.534	MY
26510	*Burkholderia sordidicola*	98.928	MY
26515	*Rhodanobacter* sp.	97.771	R2A
26517	*Paenibacillus* sp.	93.523	R2A
26518	*Rhodanobacter* sp.	98.081	R2A
26519	*Rhodanobacter* sp.	98.076	R2A
26537	*Burkholderia sordidicola*	98.828	R2A
26538	*Rhodanobacter* sp.	97.648	MY
26551	*Rhodanobacter* sp.	97.771	R2A
26552	*Rhodanobacter* sp.	97.751	R2A
26554	*Hymenobacter* sp.	94.661	R2A
26555	*Frigoribacterium* sp.	97.545	R2A
26556	*Sphingomonas* sp.	97.175	R2A
26557	*Rhodanobacter* sp.	97.648	MY
26561	*Sphingomonas* sp.	97.118	R2A
26633	*Burkholderia* sp.	98.491	ISP

그림. 미생물 2종 co-culture한 결과

4) 미생물 *Serratia* sp. PAMC26656의 siderophore 계열 물질 생산에 대한 스크리닝

- siderophore는 미생물이 철을 흡수하기위해 체외로 분비하는 펩티드성 킬레이트 물질로 Serratia sp.미생물에서 생산하는 물질 중 하나임. 이 물질은 미생물이 다양한 환경에서 생존과 성장을 위해 사용되는 물질로 농업에서는 식물 성장 촉진제, 생물학적 제어, 의학에서는 치료제, 항생제, 항 말라리아제 등으로 사용되는 물질임.
- *Serratia* sp. PAMC26656를 배양할 때 유독 진한 핑크색의 색깔을 보여주어 그 물질을 분리하여 조사하여 보니 siderophore 계열의 물질로 조사 되었고, plate assay를 통해서 확인해 보았을 때 역시 siderophore 계열의 물질을 생산할 수 있는 것으로 확인 되었음. 저온일수록 강한 분홍색 pigment를 가지는 것으로 생각 하였을 때 저온성 siderophore 계열 물질 생산이 가능함.

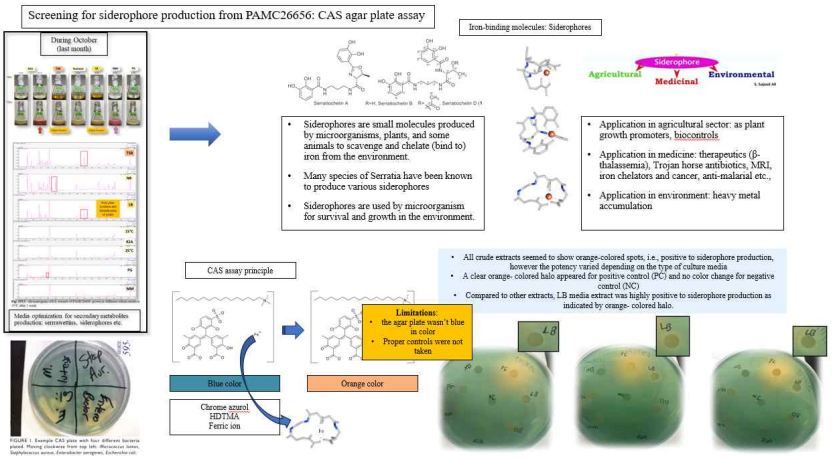


그림. *Serratia* sp. PAMC26656의 siderophore 계열 물질 생산결과

다. 변형된 항생제 후보물질의 활성 스크리닝 (선문대)

1) 안트라퀴논(anthraquinone) 관련 Glucosyl transferase 변형 물질 활성 스크리닝 실시

- 안트라퀴논은 방향족 유기화합물로 안트라퀴논 유도체의 경우에는 완화제, 항균제, 항염증제 등으로 오랫동안 사용되었음. 특히 안트라퀴논은 장점막에 직접 작용하기 때문에 배변을 쉽게 도와줘 변비치료제로도 알려져 있음. 뿐만 아니라 안트라퀴논의 경우 유방암과 신장암에서 세포 사멸을 유도하고 암세포의 성장을 억제하는 효과가 보고되어있음. 하지만 위암, 간세포암, 췌장암에 대한 활성이 보고되어 있지 않아 그들에 대한 활성을 먼저 스크리닝 작업을 통해 결과를 확인하였음
- 그 결과, 총 39개의 안트라퀴논 유도체 물질에서 28개의 물질이 위암, 간세포암, 췌장암에서 효과가 있는 것으로 조사되었음. 총 39개 물질 중에서 Rubiadin 1-methyl ether 와 Glucosyl transferase를 반응 하였을 때 물질이 변형 되는 것을 확인 하였고, 이 물질을 extract하여 위암, 간세포암, 췌장암에 대해 실험을 실시함.

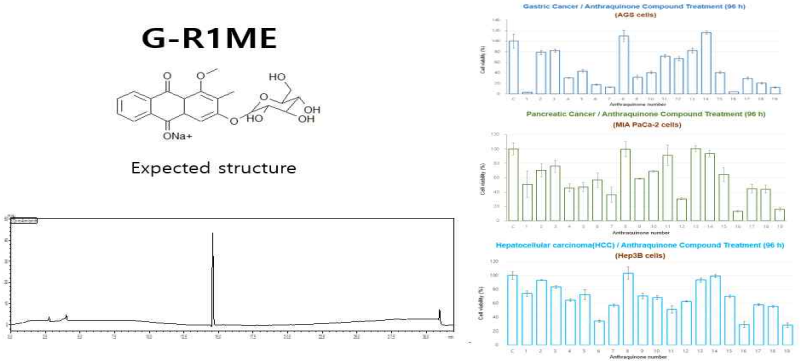


그림. Glucosyl transferase로 반응한 Rubiadin 1-methyl ether와 안트라퀴논계열 스크리닝 결과

2) Glucosyl transferase를 통해 변형된 스테로이드 유도체에 대한 뇌신경세포 관련 활성 스크리닝 결과

- 기 연구된 스테로이드구조를 Glucosyl transferase를 통해 변형하여 총 5개의 새로운 Glucosylation된 스테로이드 유도체를 개발하였음. 스테로이드는 호르몬의 일종으로 광범위하게 사용되지만 뇌와 관련된 질환에서 사용됨. 그렇기 때문에 변형된 유도체 역시 뇌신경세포에 대해 활성스크리닝을 실시함
- testosterone을 반응하여 얻은 유도체는 T-1, Nandrolone을 반응하여 얻은 유도체는 N-1, cortisone을 반응하여 얻은 유도체는 C-1, hydrocortisone을 반응하였을 때 유도체를 두 개를 얻어 H-1과 H-2로 명명하여 활성을 진행함
- 실험결과, T-1과, H-1,H-2의 샘플은 뇌신경 세포 PC12cell 과 연관이 있었고, N-1,C-1의 샘플은 뇌신경 세포 SH SY5Y cell와 연관이 있는 결과를 보여주었다. PC12cell의 경우에는 부신수질에서 발생한 크롬친화세포종에서 유래된 세포주로 신경분화 연구에 관련이 있고, SH SY5Y cel은 신경모세포종에서 유래된 세포주로 파킨슨병 및 신경발생 및 뇌세포 연구에 관련이 있음.
- 이러한 결과를 통해 Glucosyl transferase를 통해 변형된 스테로이드 유도체 역시 뇌신경세포에 활성이 있는 것으로 조사되었으며, 뇌신경세포 관련 새로운 후보물질이 될 수도 있는 결과를 얻을 수 있었음. 아직 활성 스크리닝 결과이기 때문에 다양한 뇌신경세포에도 조사할 예정임

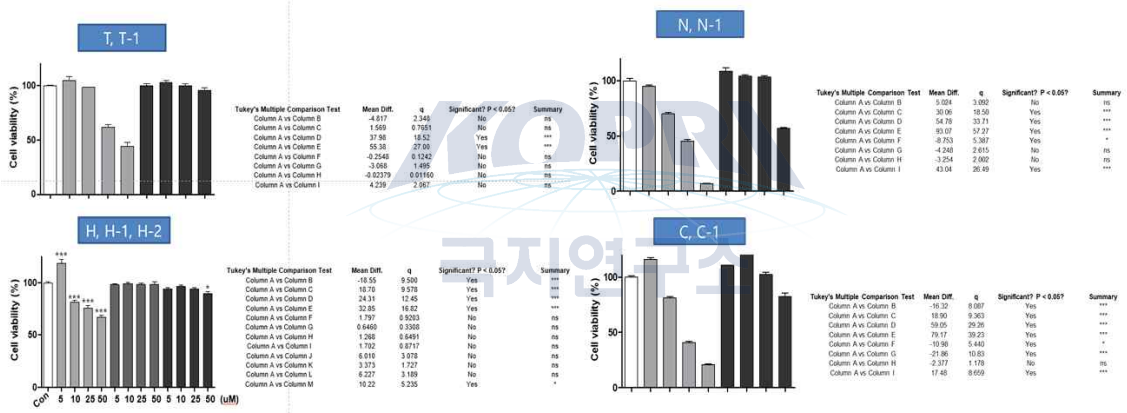


그림. Glucosyl transferase를 통해 변형된 스테로이드 유도체에 대한 뇌신경세포 활성 스크리닝 결과

라. 타겟 효소-항생물질 관련 데이터베이스 구축과 알고리즘 개발 (선문대)

1) EC번호를 통한 효소 기능 예측모델

- EC번호(Enzyme Commission Number)는 효소의 촉매 화학반응에 따라 분류하기 위한 체계로 해당되며, EC번호를 통해 효소의 기능을 예측할 수 있음. EC번호의 분류 기준은 효소의 반응특이성과 기질특이성의 차이로 구분되어 있으며, 마침표로 구분되는 4개의 숫자로 구성되어 있음. EC번호의 체계가 형성되기 전까지 효소는 임의적인 방법에 따라 분류되었으며, 특이성에 근거한 합리적인 분류가 매우 어려웠음. 시퀀싱 기술이 발달하면서 박테리아, 곰팡이, 식물, 동물, 인간 등의 많은 유전자 데이터들이 저비용 및 효과적으로 분석이 가능함에 따라 현재 많은 데이터들이 축적되고 있음
- 따라서 염기서열이 무엇을 암호화하고, 유전자가 유기체에서 어떻게 발현되는 지와 같은 새로운 생물학적 가설 유도 등 유전체 데이터로부터 새로운 의미를 부여하기 위해 심층적인 기계학습 모델을 필요로 하고 있음
- 본 연구팀은 UNLV 강민곤 교수팀과 함께 Evidential Deep Learning이라는 개념을 기반으로 Domain Specific-Evidence를 제공함으로써 신뢰할 수 있는 예측(Trustworthy Prediction)

기술을 개발하여 ECPICK 모델을 구축하여 생물정보학 분야 권위지인 브리핑스 인 바이오인포매틱스(Briefings in Bioinformatics)’에 논문을 등재하였음

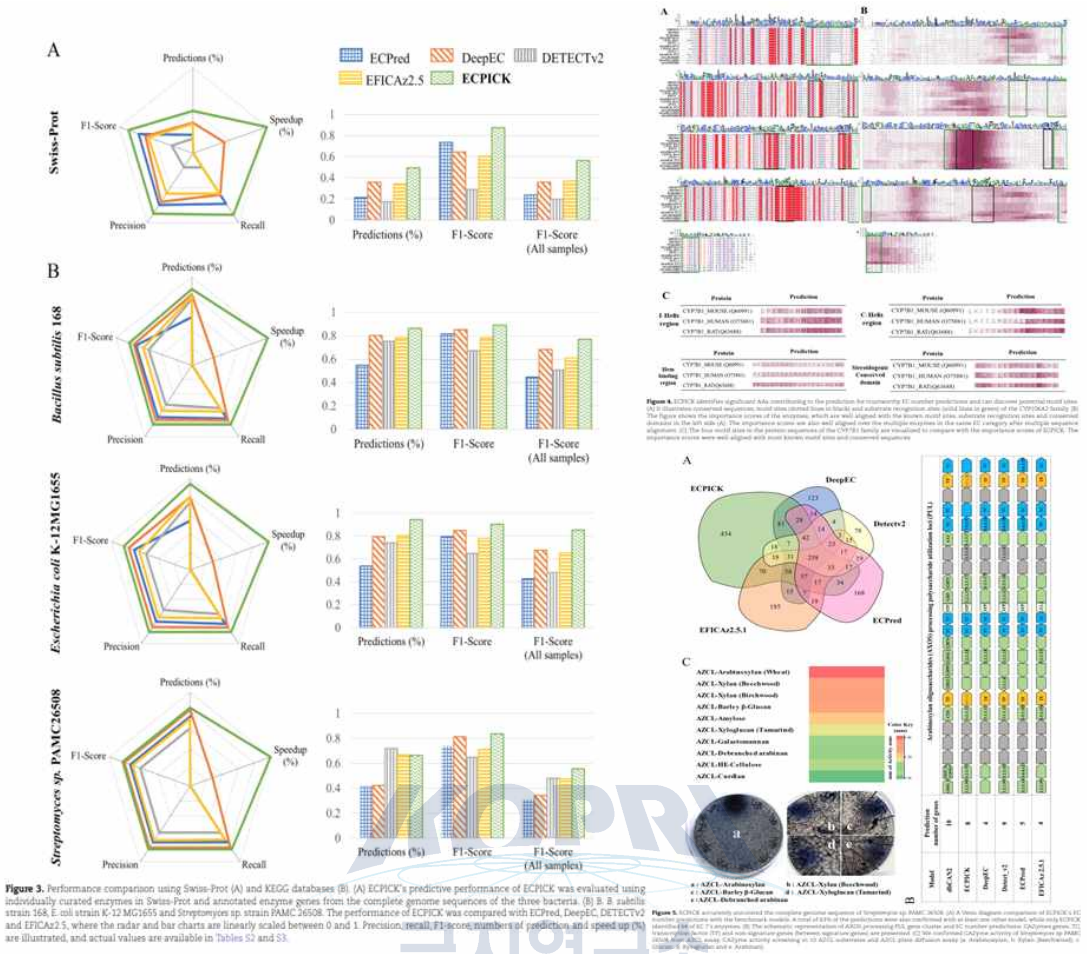


Figure 3. Performance comparison using Swiss-Prot (A) and KEGG databases (B). (A) ECPICK's predictive performance of ECPICK was evaluated using individually curated enzymes in Swiss-Prot and annotated enzyme genes from the complete genome sequences of the three bacteria. (B) B. subtilis strain 168, E. coli strain K-12 MG1655 and Streptomyces sp. strain PAMC 26508. The performance of ECPICK was compared with ECPred, DeepEC, DETECTv2 and EFICAz2.5, where the radar and bar charts are linearly scaled between 0 and 1. Precision, recall, F1-score, numbers of prediction, and speed up (%) are illustrated, and actual values are available in Tables S2 and S3.

그림. ECPICK 모델 관련 실험 결과 모습

2) CYP 효소 family 분류 모델

- 단백질-리간드 상호 작용 연구에는 박테리아의 경우에는 없는 기계 학습 모델의 훈련을 용이하게 하는 광범위하고 선별된 데이터 세트가 너무 많이 있지만, 박테리아 관련 데이터는 매우 부족함. 그래서 데이터에 대해 양성 샘플만을 사용하여 CYP P450 박테리아 단백질-리간드 상호작용에 초점을 맞춰 진행함. 우리는 박테리아 단백질-리간드 상호 작용 연구에서 양성 샘플만 갖는 문제를 해결하기 위한 실행 가능한 솔루션으로 PU(Positive-Unlabeled) 학습을 고려하였음

- 데이터베이스 구축 및 양성 샘플 선별 작업을 완료하여, 현재 CYP효소와 기질간의 상호작용을 예측하기 위해 딥러닝 기반 모델을 90%정도 완성한 상태이며, 데이터에 따라 디테일한 부분을 수정하고 있음. 효소와 기질간의 관계를 고려하여 이들의 상호작용에 대해 예측하기 위해 실험 진행 중임

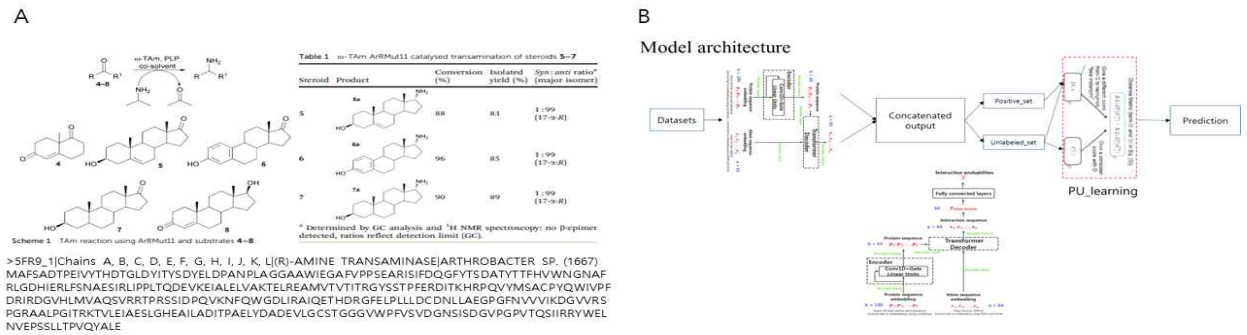


그림. CYP 효소 family 분류 모델 관련 (A) 모델 구축시 필요한 데이터 정보 (B) 모델 구조도

3) 플라스틱 분해 효소 예측 모델

- 시퀀스 및 실험결과를 토대로 전 세계적으로 알려진 플라스틱 분해 효소의 데이터를 수집하고 플라스틱을 분해할 수 있는 효소군에 대해 정확하게 예측하기 위한 딥러닝 기반 모델을 구축하였음. 이 프로젝트를 위해 총 13가지의 플라스틱 종류에 대해 조사 하였고, 많은 논문으로부터 결과를 수집하여 정확성 높은 모델을 구상하기 위해 노력함
- 플라스틱 분해 관련 모델은 구축이 이미 다 완료된 상태이며, 모델이 플라스틱을 분해하는 효소에 대해 예측하는 정확도 및 미생물 유전체 정보에 활용 응용이 가능한지에 대한 여부를 확인하는 중이며, 최적화된 모델 환경을 구성하기 위해 테스트를 진행하고 있음

Name	16				32				64			
	CNN		BRNN		CNN		BRNN		CNN		BRNN	
	F1	wt F1	F1	wt F1	F1	wt F1	F1	wt F1	F1	wt F1	F1	wt F1
zScales	0.5688	0.5688	0.4331	0.4331	0.5301	0.5301	0.3207	0.3207	**0.6213**	**0.6213**	0.3859	0.3859
VHSE	**0.6584**	**0.6584**	0.4376	0.4376	0.4662	0.4662	0.3917	0.3917	0.5725	0.5725	0.3861	0.3861
PCscores	0.0147	0.0147	0.0199	0.0199	0.0147	0.0147	0.0164	0.0164	0.0221	0.0221	0.0164	0.0164
sScales	0.0221	0.0221	0.0199	0.0199	0.0147	0.0147	0.0164	0.0164	0.0221	0.0221	0.0164	0.0164
One Hot Encoding	0.3208	0.3208	**0.4554**	**0.4554**	0.5453	0.5453	0.3629	0.3629	0.3100	0.3100	0.3397	0.3397
Five Bit Encoding	0.3896	0.3896	**0.4534**	**0.4534**	0.4614	0.4614	0.3636	0.3636	0.2658	0.2658	0.3591	0.3591
Six Bit Encoding	0.3546	0.3546	0.3765	0.3765	0.3537	0.3537	0.3943	0.3943	0.3340	0.3340	0.3530	0.3530
Hydrophobicity matrix	0.5828	0.5828	0.3254	0.3254	0.3693	0.3693	0.3960	0.3960	0.2223	0.2223	0.3811	0.3811
Meiler Parameters	0.2235	0.2235	0.3606	0.3606	0.2475	0.2475	0.4258	0.4258	0.2476	0.2476	**0.4082**	**0.4082**
Acthely Factors	0.3895	0.3895	0.3930	0.3930	**0.6612**	**0.6612**	0.3653	0.3653	0.4599	0.4599	0.3393	0.3393
PAM250	0.2922	0.2922	0.3728	0.3728	0.4747	0.4747	0.3646	0.3646	0.4341	0.4341	0.3335	0.3335
BLOSUM62	0.3394	0.3394	0.3945	0.3945	0.4015	0.4015	**0.4412**	**0.4412**	0.5685	0.5685	0.3951	0.3951
Cristian	0.3541	0.3541	0.3887	0.3887	0.4796	0.4796	0.3367	0.3367	0.2616	0.2616	0.3984	0.3984
Tanaka sheraga	0.2265	0.2265	0.3688	0.3688	0.1299	0.1299	0.3501	0.3501	0.1960	0.1960	0.3472	0.3472
Miyazawa energies	0.5368	0.5368	0.3808	0.3808	0.1985	0.1985	0.4357	0.4357	0.3092	0.3092	0.3564	0.3564
Micheletti Potentials	0.3603	0.3603	0.3270	0.3270	0.6146	0.6146	0.3302	0.3302	0.5914	0.5914	0.3883	0.3883
AESNN3	0.5690	0.5690	0.3889	0.3889	0.6028	0.6028	0.3972	0.3972	0.5786	0.5786	0.3265	0.3265
ANN4D	0.2999	0.2999	0.2977	0.2977	0.3058	0.3058	0.3330	0.3330	0.2381	0.2381	0.3621	0.3621

그림. 최적화된 모델 환경구성을 위해 테스트를 진행한 결과 일부

<4세부> 항생물질 타겟 단백질 발현 및 정제조건

가. 항생물질 변형체의 저해 활성 검증 (이화여대)

1) 최소저해농도 결정 실험 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC test) 조건 구축

- 확보한 후보물질 및 항생물질 변형체의 저해 활성 검증을 위해, 추가적으로 MIC test 실험 조건을 구축함.
- 항생제 내성 문제를 가지는 주요 박테리아인 "ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp*)" 중 4가지 균주와 class C β-lactamase인 AmpC BER을 발현하는 *Escherchia coli* 균주를 확보함 (표). *E. coli* BER producing AmpC BER 균주의 경우, 위스콘신대학교 Patrice Nordmann으로부터 제공받음 (*JAC*, 2007, 60(3): 490-494). *Staphylococcus aureus* MW2 strain 균주와 관련한 실험은 이화여자대학교 약학대학 김우성 교수님 연구실에 의뢰하여 연구를 진행함.

- 각 균주를 전배양 한 뒤 (LB broth / 37℃ / 180rpm / 22시간), PBS buffer를 이용해 배양액을 10^{-1}~10^{-8}으로 serial dilution 함. 이를 5 μL 씩 취하여 MHA plate에 spotting 한 뒤, 서로 겹치지 않으면서 셀 수 있는 정도로 colony가 자랄 때까지 배양함 (37℃, 약 6시간). 이후 10개 이상의 colony가 관찰되는 spot을 기준으로 Colony Formation Unit (CFU)을 계산함 (표 11).

		평균 CFU/mL
Staphylococcus aureus MW2 strain	-	
Staphylococcus aureus	KCTC. 1621	1.53×10^{10}
Klebsiella pneumoniae	CCARM 10255	3.52×10^{9}
Acinetobacter baumannii	CCARM 12001	2.70×10^{9}
Enterobacter aerogenes	CCARM 16006	4.02×10^{9}
E. coli BER producing AmpC BER	from Nordmann, P.	2.36×10^{9}

표. 연구에 활용한 병원성 균주 6종 및 5종에 대한 평균 CFU값

- 현재 임상에서는 amoxㄴicillin/clavulanate와 같이 β-lactamase inhibitor (BLI)가 β-lactam 계열 항생제와 혼합제제로 병용투여되고 있음. 이에 따라, 확보한 화합물이 BLI로서 효능을 가지는지 평가하기 위해 두 가지 방식의 MIC 실험을 진행함. 첫 번째는 병원성 균주에 단독으로 화합물을 처리하여 균주의 생장 억제를 확인하는 방식으로 1차원적인 MIC 값을 산출하는 것임. 두 번째는 균주가 특정 β-lactam 계열 항생제에 대해 내성을 보일 때, 해당 항생제와 화합물을 동시에 처리함으로써 화합물이 BLI로서 작용하여 β-lactam 항생제의 항생효과를 회복시키는지 검증하는 것임. 이 방식으로 수행한 실험에서, 항생제 단독 처리에 비해 동시 처리 시 MIC 값이 4배 이상 감소하는 경우, 화합물을 유효한 BLI 후보물질로 판단함.

2) 해면 유래 천연물 halisulfate (2종) 및 halisulfate 유도체 (3종)의 저해 활성 검증

- Halisulfate는 해면으로부터 추출한 해양 천연물로 다중 ring 구조와 sulfate group을 포함하는 물질임. 특히, halisulfate 3 및 5는 항생제 내성 원인 단백질인 β-lactamase의 저해제로 작용하여, 기질 확장성 class C β-lactamase 뿐만 아니라 class A, B, D enzymes의 가수분해 활성 저해 효능을 보고한 바 있음 (*Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 2021, 19: 145-152). 지난 3차년도에는 halisulfate 3 및 halisulfate 5의 *in silico* molecular-docking 구조를 기반으로 저해 활성 및 물성이 개선될 것으로 예상되는 유도체 4종을 설계함 (그림).

그림. Halisulfate 및 halisulfate 유도체의 화학구조

- 당해년도에는 화학합성 연구팀과의 공동연구를 통해 halisulfate 유도체 확보를 시도함. A 화합물 합성과정에서 1번 물질의 benzylic proton의 반응성으로 인해 합성 용이성이 떨어져, B 화

합물에 대한 합성조건을 집중적으로 탐색함 (그림). 총 4스텝에 걸쳐 4번 화합물로부터 9번 화합물을 26%의 수득률로 합성하였으며, 9번 화합물로부터 sulfate group과 furan ring을 도입하여 halisulfate 유도체인 B 화합물을 합성 확보함 (그림).

- 화합물 C와 D를 합성하기 위해, commercially available한 14번 화합물을 이용하여 coupling partener인 17번 화합물을 39%의 수득률로 합성함 (그림). 현재 17번 화합물을 기반으로 하여 화합물 C와 D를 합성하기 위한 조건을 추가 탐색 중임.

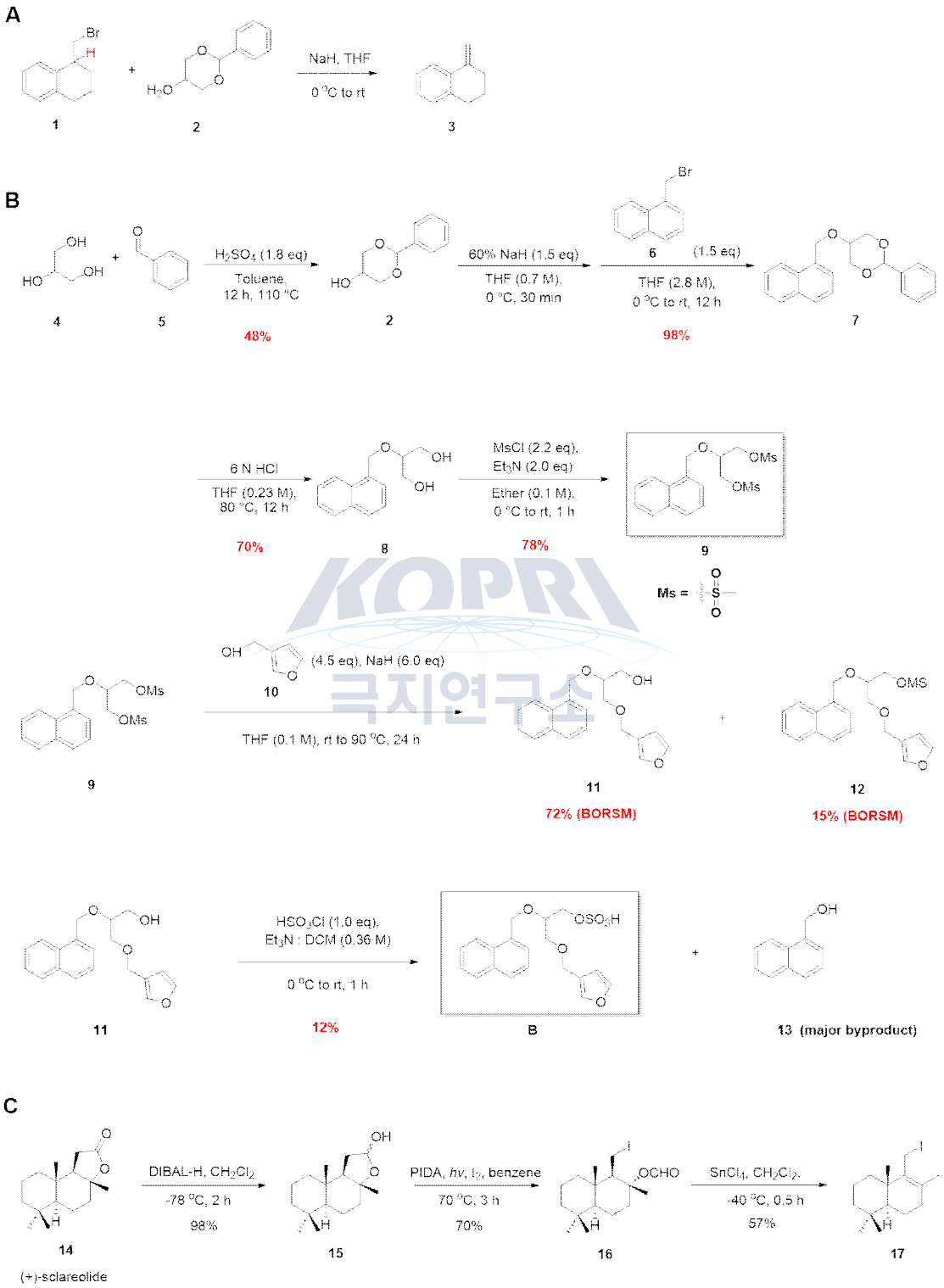


그림. Halisulfate 유도체 합성 scheme

- Halisulfate 3와 5의 병원성 균주 생장 억제 능력을 평가하기 위해, MIC test를 진행함. 임상

에서 다제내성 문제를 일으키는 주요 균주인 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)에 대한 MIC test 결과, halisulfate 3과 5의 MIC 값이 각각 8 μg/mL, 16 μg/mL로 결정됨 (표 12). Halisulfate 3과 5는 본 과제의 항생물질 유효성 평가 기준인 20 μg/mL 이하를 충족함으로써, 항생물질로서의 효용성을 보임.

	Property		MIC (unit: μg/mL)
	clogP	tPSA	Staphylococcus. aureus[a]
Halisulfate 3	7.867	72.83	8
Halisulfate 5	8.388	72.83	16
compound B	2.818	91.29	> 25.09
compound 11	2.856	47.92	> 19.97
compound 12	3.265	71.06	> 24.96
Vancomycin	-1.142	530.49	1
[a]Starin MW2 (MRSA)			

표. Halisulfate 및 halisulfate 유도체 화합물의 MIC 결과

- 화학합성 연구팀이 합성한 화합물 B와 11, 12의 BLI로서의 효능을 평가하기 위해, 세 가지 병원성 균주에 대한 MIC 실험을 진행함. MRSA 균주에 대한 MIC test는 halisulfate 3, 5와 동일 조건으로 진행하였으며, 약 20 μg/mL 이상 MIC 값으로 측정됨. *E.coli*와 *K.pneumoniae*에 대한 MIC test는 내성을 보이는 β-lactam 항생제 (ceftazidime)과 함께 처리하여 내성을 극복하는 효과가 있는지 확인함. 화합물 B와 11, 12가 균주의 생장을 억제하거나 내성을 극복시키지 못함.

		Property		MIC (unit: μg/mL)	
		clogP	tPSA	*E. coli* BER producing AmpC BER	*K.pneumoniae*[a]
Ceftazidime only		-6.671	189.82	32	128
Ceftazi-dime	+ compound B (128 μg/mL)	2.818	91.29	32	64-128
	+ compound 11 (640 μg/mL)	2.856	47.92	32	64-128
	+ compound 12 (256 μg/mL)	3.265	71.06	32	64-128
[a]CCARM 10255.					

표. Halisulfate 유도체 화합물 B와 11, 12의 MIC 결과

- Halisulfate 3과 5가 기질 확장성 class C β-lactamase의 nitrocefin 가수분해 활성을 저해한다는 것을 선행연구를 통해 규명한 바 있음 (*Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 2021, 19: 145-152). 선행연구를 바탕으로, 화학합성 연구팀이 확보한 halisulfate 유도체인 화합물 B와 11, 12의 저해 활성 증진 여부를 평가함. 분광학적인 방법으로 class C β-lactamase인 CMY-10과 ACC-1에 대한 저해 활성을 측정함 (그림). 화합물 11과 12의 경우 β-lactamase 저해 활성이 관찰되지 않았으나, 화합물 B는 CMY-10에 대해서 선택적인 저해 활성을 보임. 하지만, positive control인 avibactam 대비 낮은 수준이며, halisulfate 5보다 낮음.

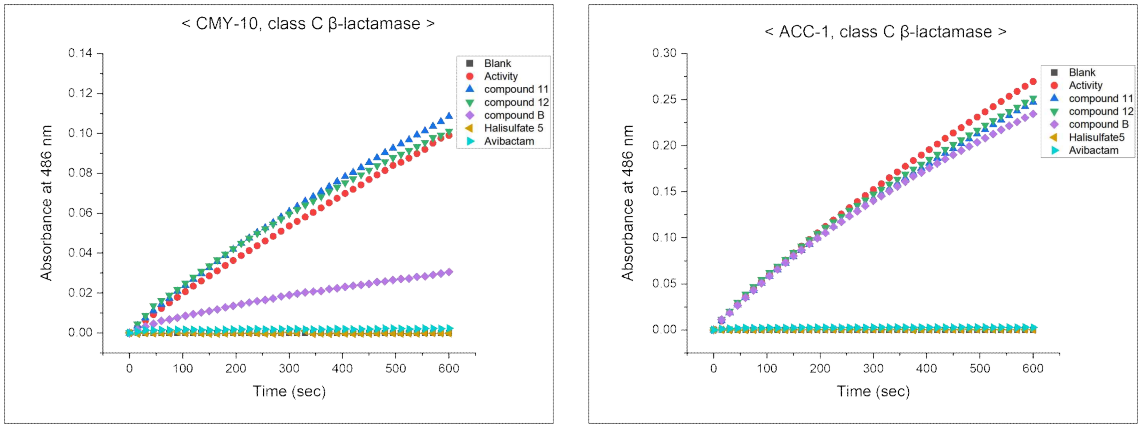


그림. Halisulfate 유도체 화합물 B와 11, 12의 β-lactamase 저해 활성 측정 그래프

- 효소 기반 및 세포 기반으로 진행된 저해 활성 검증 결과, halisulfate 3과 5는 BLI로서의 유효할 뿐만 아니라, 그람양성균에 대해 항생제로 작용할 수 있음. 그람양성균에 대한 항생 메커니즘 규명을 위해서는 향후 타겟 단백질 특정이 필요함.
- Halisulfate 5, 화합물 B, 11, 12 중 halisulfate 5와 화합물 B만 효소 저해 활성이 관찰됨을 통해 halisulfate의 sulfate moiety가 효소 저해 활성에 기여함을 확인함.

3) Boronic acid 기반 화합물 (1종)의 저해 활성 검증

- 최근 taniborbactam, vaborbactam등의 cyclic boronate 기반 BLI가 FDA 승인을 받음으로써, 항생물질로서의 boron compound의 유효성이 입증됨. Boronic acid는 class A, C, D β-lactamase의 핵심 촉매 잔기인 serine과 공유결합을 형성할 수 있음 (그림).

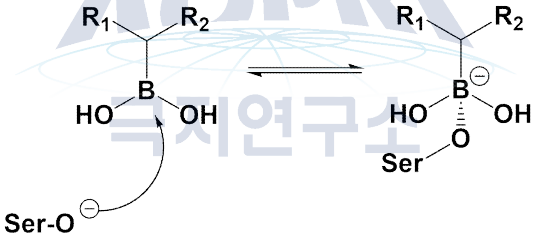


그림. Boronic acid에 대한 serine 잔기의
친핵성 공격 반응

- 하기 구조의 boron compound A (BoA)를 확보하여 (그림), 다제내성균 유래 β-lactamase인 KPC-2 (class A β-lactamase), NDM-1 (class B β-lactamase), AmpC BER (class C β-lactamase), OXA-48 (class D β-lactamase)에 대한 저해 활성을 분광학적 방법으로 측정함. BoA는 class A, B, D β-lactamase에 비해 class C β-lactamase에 대해 상대적으로 높은 저해 활성을 나타냄 (그림). Class C β-lactamase인 CMY-2와 CMY-10에 대한 추가 실험에서는 가수분해 활성 저해에 필요한 BoA의 농도가 AmpC BER보다 상대적으로 낮음을 확인함 (그림).

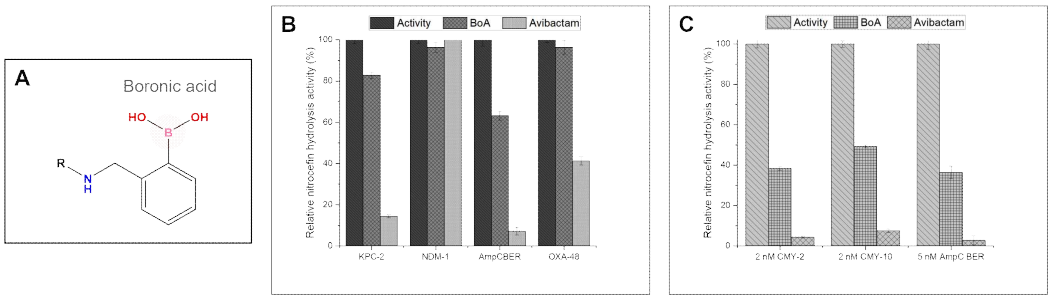


그림. BoA의 화학 구조(A) 및 β-lactamase에 대한 저해 활성(B,C)

4) Fragment-Based Drug Discovery (FBDD)를 통해 발굴한 화합물 (5종)의 저해 활성 검증

- 본 과제의 3차년도에 포항가속기연구소에서 보유한 fragment library를 이용하여 X-ray crystallography 기반의 fragment-based drug discovery를 진행하였음. 이를 통해 active site를 포함한 6개의 site에서 21개의 chemical에 대한 24개의 결합 event를 확인한 바 있음.
- 당해년도에는 결합 event가 관찰된 21개의 chemical 중 18개의 chemical을 확보하였으며, 이 중 active site에 결합가능한 5개의 chemical을 우선순위로 선정하여 저해 활성을 검증함 (그림).

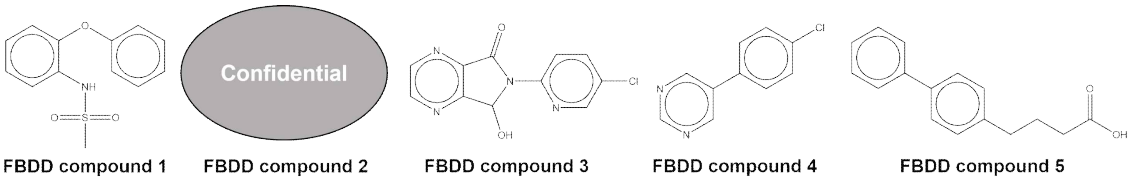


그림. FBDD를 통해 발굴한 화합물의 화학 구조

- 물질이 가지는 균주 생장 억제 효능 및 항생제 내성 억제 효능을 평가하기 위하여, 병원성 균주인 *K.pneumoniae*에 대해 MIC test를 진행함. 그 결과, FBDD compound 5종 모두 단독 투여 시 균주 생장 억제 능력을 보이지 않지만, FBDD compound 2번을 8192 μg/mL의 농도로 균주에 처리하면, ceftazidime의 MIC 값을 128 μg/mL에서 4 μg/mL으로 회복시킴 (표).

(단독 처리)	Property		MIC (unit: ug/mL)		(동시 처리)		MIC (unit: ug/mL)
	clogP	tPSA	*K.pneumoniae*[a]				*K.pneumoniae*[a]
FBDD compound 1	3.049	55.4	ND		Cefta-zidime	FBDD compound 1 (> 512 μg/mL)	> 512
FBDD compound 2	0.962	97.46	ND			FBDD compound 2 (8192 μg/mL)	4
FBDD compound 3	-0.516	79.21	ND			FBDD compound 3 (> 512 μg/mL)	> 512
FBDD compound 4	2.297	25.78	ND			FBDD compound 4 (> 256 μg/mL)	> 256
FBDD compound 5	4.17	37.3	ND			FBDD compound 5 (> 512 μg/mL)	> 512
Ceftazidime	-6.671	189.8	128				

ND, not deremined
[1]Compound 단독 처리시, MIC 값
[2]Ceftazidime에 대한 MIC 값을 감소시키는 compound의 최소 농도를 의미
[a]CCARM 10255.

표. FBDD를 통해 발굴한 화합물 5종의 MIC 결과

- MIC test에서 내성 극복 효과를 보인 보였던 FBDD compound 2의 β-lactamase 효소에 대한 저해 활성을 평가하기 위해, 2종의 class C β-lactamase (CMY-10, ACC-1)에 대한 저해 활성을 분광학적인 방법을 통해 측정함 (그림). FBDD compound 2는 효소 차원에서 저해 효과를 보이지 않음.

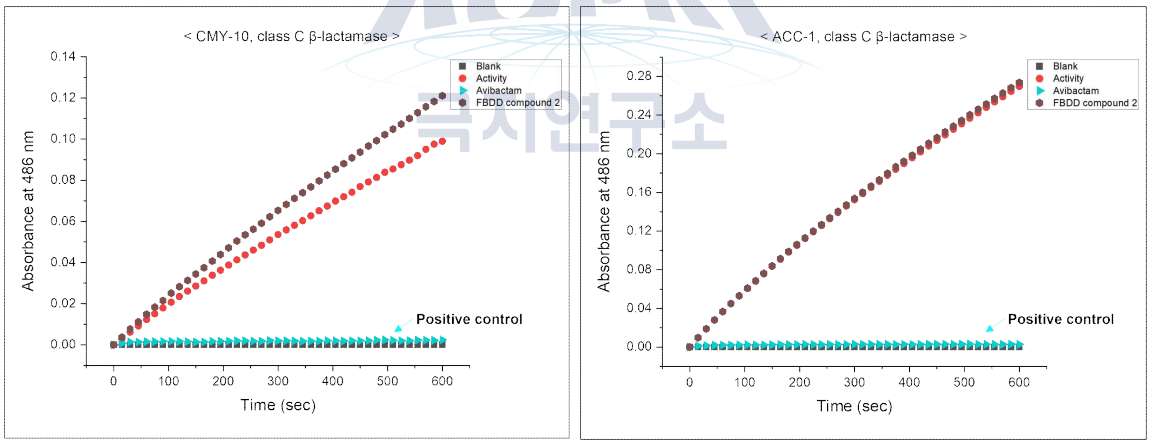


그림. FBDD compound 2의 β-lactamase 저해 활성 측정 그래프

5) 뉴클레오타이드 기반의 화합물 (3종)의 저해 활성 검증

- 과제 3차년도에 뉴클레오타이드 기반의 신규물질을 확보하고 해당 물질의 강력한 효소 활성 저해 능력을 확인함. 당해년도에는 MIC test를 통해 물질의 균주 생장 억제 능력 및 항생제 내성 억제 효능을 추가적으로 검증해봄 (그림)

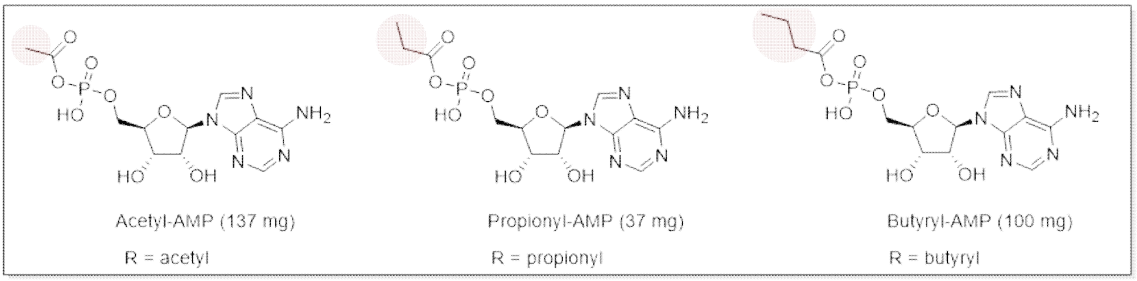


그림. 3차년도에 확보한 AMP 유도체 3종의 화학구조

- 확보한 4가지의 병원성 균주 (*E. coli* BER producing AmpC BER, *K.pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Enterococcus aerogenes*)가 내성을 갖는 β-lactam 항생제인 ceftazidime을 AMP 유도체와 함께 처리함 (표).
- *E. coli* BER producing AmpC BER에 대한 ceftazidime의 기존 MIC 값은 32 μg/mL인 반면, acetyl-AMP를 2048, 4096 μg/mL 처리 시 ceftazidime의 MIC 값은 4-8배 낮게 측정됨. 2048 μg/mL 이상의 acetyl AMP 농도에서 ceftazidime에 대한 내성을 회복시킴. *K.pneumoniae*에 대한 ceftazidime의 MIC 값은 128-256 μg/mL이나 acetyl-AMP, propionyl-AMP, butyryl-AMP를 4096 μg/mL의 농도로 각각 처리할 경우, 16배 낮은 농도의 ceftazidime으로 균주 생장을 완전히 억제함. *A.baumanni*는 ceftazidime에 대해 4096 μg/mL 이상의 MIC 값을 가지며 완전한 내성을 보임. 이 균주에 4096 μg/mL 농도의 acetyl-AMP를 처리할 경우, ceftazidime 없이도 균주 생장을 저해할 수 있음. 512, 1024, 2048 μg/mL 농도의 acetyl-AMP를 ceftazidime과 함께 처리할 경우, 512~2048 μg/mL의 ceftazidime으로 균주 생장을 억제할 수 있음. *Enterococcus aerogenes*에 대한 ceftazidime의 MIC 값은 16 μg/mL로 측정되며, 2048 μg/mL 이상의 acetyl-AMP를 처리할 경우, ceftazidime의 MIC 값은 4 μg/mL으로 4배 감소됨.

KRIBB 극지연구소

		Property		MIC (unit: μg/mL)			
		clogP	tPSA	*E. coli* BER producing AmpC BER	*K.pneumoniae*[a]	*Acinetobacter baumannii*[b]	*Enterococcus aerogenes*[c]
Ceftazidime		-6.671	189.8	32	128	ND	16
Ceftazi-dime	+ Acetyl-AMP (4096 μg/mL)	-2.469	188.86	4	8-16	0	4
	+ Acetyl-AMP (2048 μg/mL)			8	128-256	512	4
	+ Acetyl-AMP (1024 μg/mL)			32	128-256	2048	16
	+ Acetyl-AMP (512 μg/mL)			32	128-256	2048	16
	+ Pripionyl-AMP (4096 μg/mL)	-1.940	188.86	NT	16	NT	NT
	+ Butyrl-AMP (4096 μg/mL)	-1.411	188.86	NT	8	NT	NT

ND, not determined.
NT, not tested.
[a]CCARM 10255.
[b]CCARM 12001.
[c]CCARM 16006.

표. AMP 유도체 3종의 MIC 결과

6) Carborane 기반의 신규 항생 후보 물질의 확보 및 저해 활성 검증

- 본 연구팀의 선행 논문 결과를 통해 phosphate 그룹이 class A, C, D의 핵심 촉매 잔기인 serine과 공유결합할 수 있는 reactive center임을 밝힘. Carborane은 boron과 carbon으로 구성된 3차원 구조의 분자이며, 화학적 안정성이 높고 전자 구조의 유연성을 가져 다양한 작용기 도입에 유리한 구조적 성질을 가짐. 따라서, phosphate 그룹을 reactive center로 활용한 carborane 유도체를 디자인함 (그림). 이 때, phosphate 그룹에 대한 nucleophilic serine의 공격성을 증진시키는 목적으로, acetyl 그룹을 도입하고자 함.

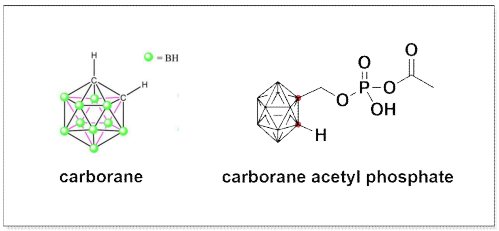


그림. Carborane과 carborane acetyl phosphate 화학구조

- 18번 화합물(*ortho*-carborane)을 바탕으로 21번 화합물까지 합성한 상태이며 (그림), 21번 화합물 (carborane phosphate)에 대한 MIC test 및 enzyme inhibition assay를 진행함.

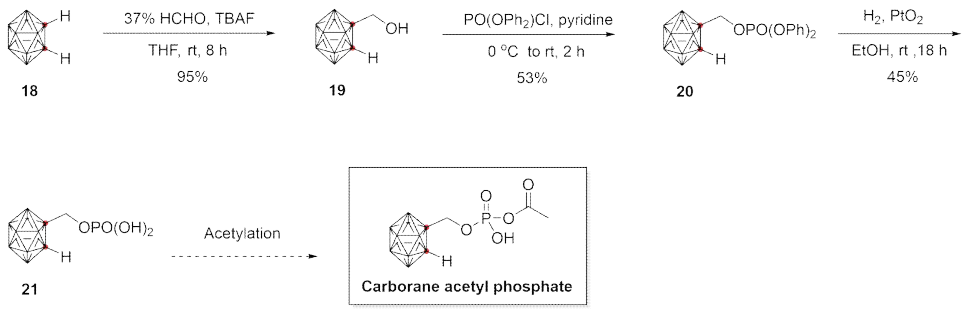


그림. Carborane acetyl phosphate 합성 scheme

- Halisulfate의 저해 활성을 분석하기 위해 사용된 분광학적 방법을 동일하게 적용하여, class C β-lactamase인 CMY-10에 대한 저해 활성을 측정함 (그림). Carborane phosphate은 positive control인 avibactam과 유사한 수준으로 효소활성을 저해함. 따라서, 최종 목표 물질인 carborane acetyl phosphate를 성공적으로 합성하여 확보할 경우, acetyl 그룹의 추가로 인해 serine의 친핵성 공격이 증가되어 avibactam보다 높은 수준의 저해 효과를 갖는 물질을 얻을 수 있을 것으로 기대됨.

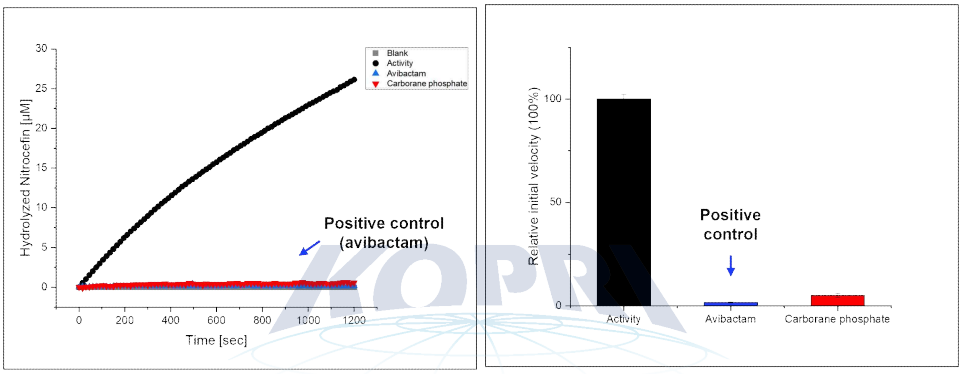


그림. Carborane phosphate의 β-lactamase 저해 활성 측정 그래프

- 2종의 병원성 균주에 β-lactam 항생제인 ceftazidime과 carborane phosphate를 혼합하여 처리한 결과 carborane phosphate가 ceftazidime에 대한 MIC 값을 감소시키지 못함 (표).

		MIC (unit: μg/mL)	
		K.pneumoniae[a]	*Enterococcus aerogenes*[b]
Ceftazidime		128	64-128
Ceftazi-dime	+ Carborane phosphate (64 μg/mL)	64-128	64-128
[a]CCARM 10255. [b]CCARM 16006.			

표. Carborane phosphate의 MIC 실험 결과

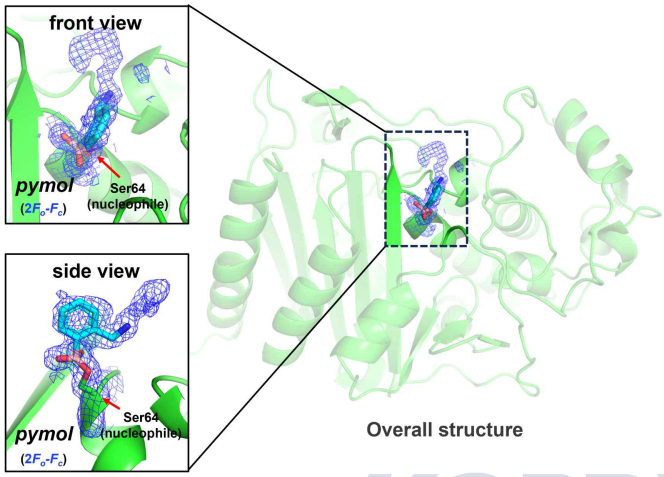
나. 항생물질 변형체/타겟 단백질 복합체 결정화 및 3차 구조 규명

1) 항생제 내성균인 *Klebsiella pneumoniae* 유래 class C β-lactamase, ACC-1 단백질과 신규 항생 후보물질 BoA의 복합체 구조 규명

- Class C β-lactamase에 대한 저해 활성이 보이는 BoA의 작용 기작을 원자 수준에서 분석하기 위해, BoA와 class C β-lactamase의 복합체 구조를 규명함. 해당 실험은 포항가속기

연구소의 빔라인을 이용하여 진행함.

- 본 과제 3차년도에 확보한 class C β-lactamase인 ACC-1의 결정 조건을 활용하여, microbatch 방식으로 단백질 결정을 획득함. Crystal-soaking 기법을 통해 BoA와 ACC-1 복합체 결정의 X-선 회절데이터를 수집함. *XDS* 프로그램을 이용하여 회절 데이터를 processing한 결과, space group *C2* (a: 130.79 Å, b: 60.23 Å, c: 55.68 Å, β: 111.2 °)에 해당하는 고해상도 결정 구조를 획득함. 4세부팀이 2019년도에 규명한 ACC-1 단백질 결정 구조 (PDB code: 6K9T)를 template으로 활용하여 ACC-1 단백질과 BoA의 복합체 구조를 규명함. *Coot*와 *Phenix* 프로그램을 활용한 model building 및 refinement 과정을 통해, ACC-1의 nucleophilic serine 잔기에 BoA의 boronic acid moiety가 공유결합되어 있음을 확인함 (그림).

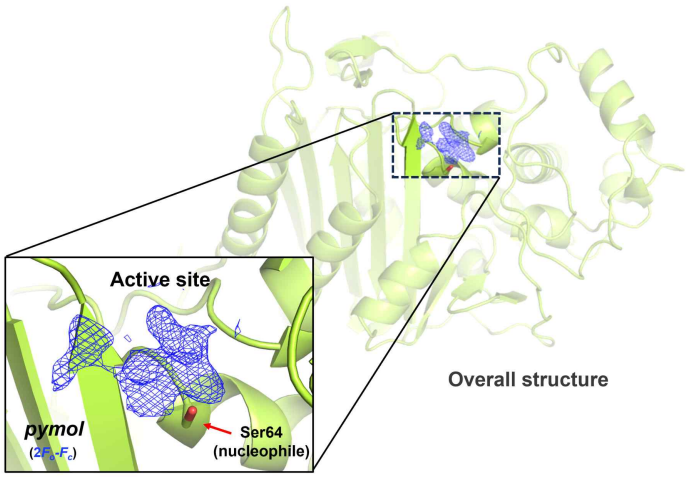


ACC-1 / BoA complex	
Data collection	
Diffraction source	PAL/PLS beamline 11C
Wavelength(Å)	0.97942
Rotation range per image (')	1
Total rotation range (')	360
Exposure time per image (s)	0.2
Space Group	*C2*
a, b, c(Å) α, β, γ (')	130.79 60.23 55.68 β = 112
Resolution range (Å)	50.0 -**1.58**
Total No. of Reflections	459194
No. of unique Reflections	34518
Completeness (%)	97.7
Mosaicity	0.33
I/Sigma	11.9
R-means	9.6
CC½ (%)	99.8
ISa	12.1

그림. 항생 후보물질 BoA와 ACC-1의 복합체 구조(좌) 및 X-선 회절 데이터 정보(우)

2) ACC-1 단백질과 FBDD를 통해 발굴한 화합물의 복합체 구조 규명.

- *K.pneumoniae*균주의 ceftazidime에 대한 MIC 값을 감소시키는 물질인 FBDD compound 2의 물성 및 저해 활성을 개선하기 위해, 복합체 구조를 기반으로 유도체를 디자인하고자 함. FBDD 실험을 통해 확보한 전자 밀도맵보다 더 높은 해상도의 회절 데이터를 획득함. 해당 실험은 포항 가속기연구소의 5C 빔라인을 활용하여 수행함.
- 확보된 ACC-1 결정에 FBDD compound 2를 soaking하여 1.25 Å에 해당하는 고해상도 X-선 회절 데이터를 수집함. *XDS* 프로그램을 통해 회절 데이터로부터 Bravais lattice를 *C2* (a: 131.47 Å, b: 60.19 Å, c: 55.87 Å, β: 111.2°)로 결정함. ACC-1/BoA 복합체 구조 규명에 사용된 방식과 동일한 방식의 분자 치환법을 통해 복합체 구조를 획득함. *Coot* 및 *Phenix* 프로그램을 활용한 molecular building 및 refinement를 통해 ACC-1의 active site와 FBDD compound 2의 복합체 구조를 규명함 (그림).



ACC-1 / FBDD compound 2 complex	
Data collection	
Diffraction source	PAL/PLS beamline 5C
Wavelength(Å)	1
Rotation range per image (°)	1
Total rotation range (°)	360
Exposure time per image (s)	0.2
Space Group	*C2*
a, b, c(Å) α, β, γ (°)	131.47 60.19 55.87 β = 112
Resolution range (Å)	50.0 -**1.26**
Total No. of Reflections	708772
No. of unique Reflections	109057
Completeness (%)	99.8
Mosaicity	0.26
I/Sigma	6.6
R-means	17.2
CC½ (%)	99.2
ISa	6.5

그림. FBDD compound 2와 ACC-1의 복합체 구조(좌) 및 X-선 회절 데이터 정보(우)

3) *Stenotrophomonas* spp. KCTC 12332 유래 class A β-lactamase, *St*Lac 단백질과 3종의 β-lactam 항생제 (cefaclor, cephalexin, ampicillin)의 복합체 특성 분석 및 논문 투고

- 본 4세부 연구팀은 *St*Lac 단백질의 기질 선택성을 원자 수준에서 분석하기 위해, 1-3차년도에 걸쳐 3종의 β-lactam 항생제 (cefaclor, cephalexin, ampicillin)에 대한 반응속도상수 규명 및 기질/단백질 복합체 구조 규명을 진행함.
- 해당 3종의 복합체 구조는 당해년도 3월에 원자 수준의 구조 분석이 가능한 상태로 refinement 작업을 완료함. 이후 논문게재를 위해, 해당 3종의 기질/단백질 복합체 구조는 단백질 구조정보를 공유하는 사이트인 PDB에 코드명 8ISR, 8ISP, 8ISQ로 업로드 완료함.
- *St*Lac 단백질을 포함한 class A β-lactamase 56종에 대해 서열유사도 기반의 클러스터링 분석을 진행함. 그 결과, *St*Lac은 기질 확장성 β-lactamases로 알려진 L2와 동일한 subgroup F로 분류되고, 연구된 class A β-lactamase 중 L2 단백질과 가장 높은 서열 유사도를 보이긴 하나, 54.31%에 불과함 (그림).

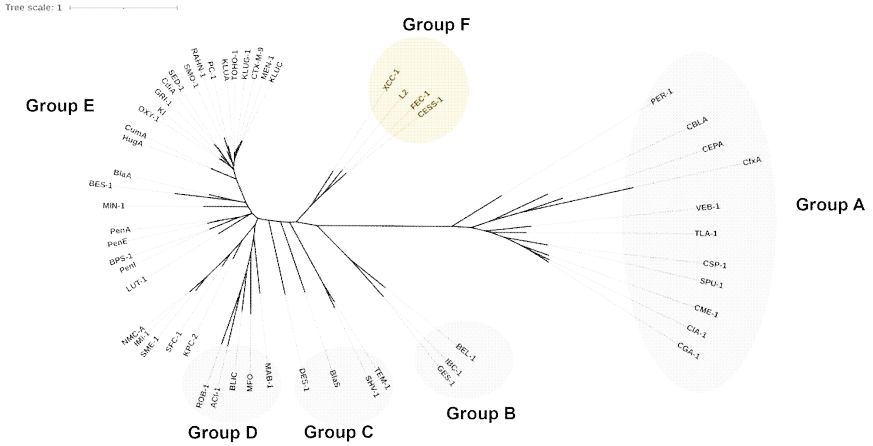


그림. Class A β-lactamase 56종의 서열 기반 클러스터링

- *St*Lac은 본 과제를 통해 처음으로 규명된 단백질이며, *St*Lac의 기질 선호도를 기반으로 "CESS-1 (cefaclor preferring extended-spectrum β-lactamase from *Stenotrophomonas* sp.)"으로 명명함. 이하 언급되는 CESS-1 단백질은 *St*Lac과 동일한 단백질을 의미함.

- 본 연구팀에서 규명한 3종의 β-lactam 항생제/CESS-1 단백질 복합체 구조를 분석한 결과, 항생제의 R1 side chain이 가지는 구조적 차이가 CESS-1의 β5-β6 loop 위치를 결정하고, 해당 loop과 상호작용하는 Asn170의 위치 또한 연쇄적으로 변화시킴 (그림). Asn170은 β-lactam 항생제 가수분해 과정에서 acyl-enzyme 중간체를 생성물로 방출시키는 핵심 물 분자와 수소 결합하는 잔기임.

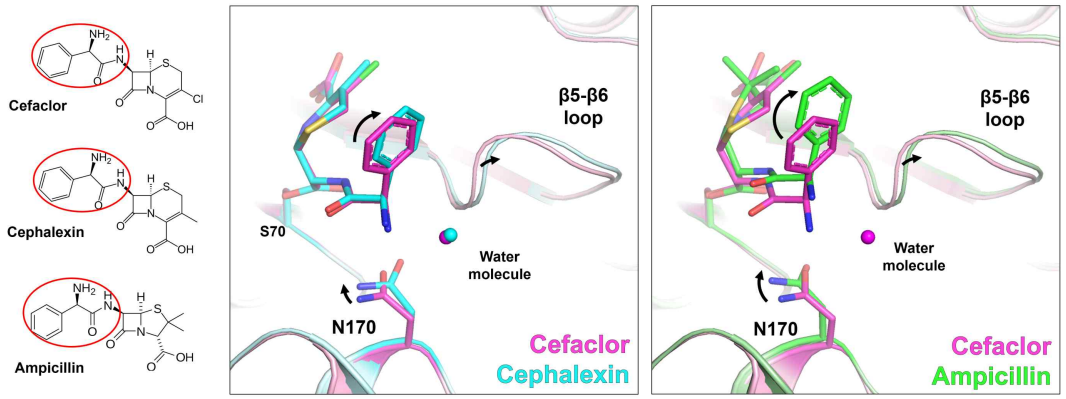


그림. β-Lactam 항생제 3종과 기질-복합체 구조에서 관찰되는 구조적 변화 및 핵심 물 분자

- Ampicillin/CESS-1 복합체 구조에서 Asn170의 side chain이 핵심 물 분자가 위치하는 공간으로 침입하여 해당 물 분자가 관찰되지 않으며, cephalexin과의 복합체 구조에서는 Asn170과 핵심 물 분자의 결합길이(2.3 Å)가 보편적인 수소결합 길이 (2.7-3.3 Å)보다 감소되어 두 분자 사이 강한 수소결합이 관찰됨. Asn170의 위치변화로 인한 물 분자의 부재 및 강한 수소결합 형성은 cefaclor 복합체 구조에서 관찰되지 않는 특이적 현상이며, 이로 인해 ampicillin과 cephalexin에 대한 가수분해 반응이 일부 저해됨을 분석함. 이러한 구조적 분석을 바탕으로, 핵심 물 분자의 위치적 특성에 기인하여 cefaclor에 대한 높은 기질 선호도를 밝힘.
- 3차 구조 기반의 CESS-1 단백질의 기질 특이성 분석 내용은 항생제 개발 및 임상 분야의 SCIE 저널인 *International Journal of Antimicrobial Agents*에 당해 연도 4월 3일 투고하여, 한 차례의 revision 이후 under review 단계임.
- 유사한 단백질 구조를 보이는 서로 다른 생물 유래의 β-lactamase와 구조를 비교 결과, 활성부위의 loop (CESS-1 기준, Ser237-Ser244)의 conformation에서 큰 차이를 보이는 것으로 보아, 해당 부위가 서로 다른 β-lactam 계열 항생물질을 인식하고 결합하는데 있어서 중요한 역할을 할 것으로 추정됨.

표. CESS-1과 구조가 유사한 β-lactamases

No.	Name	Source organism	PDB code
1	CESS-1	Stenotrophomonas sp. KCTC 12332	8ISO
2	Beta-lactamase (L2)	Stenotrophomonas maltophilia	1N4O
3	Beta-lactamase	Xanthomonas campestris pv. campestris	6WGP
4	Beta-lactamase	Rhodopseudomonas palustris CGA009	6NIQ
5	Beta-lactamase (PenP)	Bordetella bronchiseptica RB50	9BZN

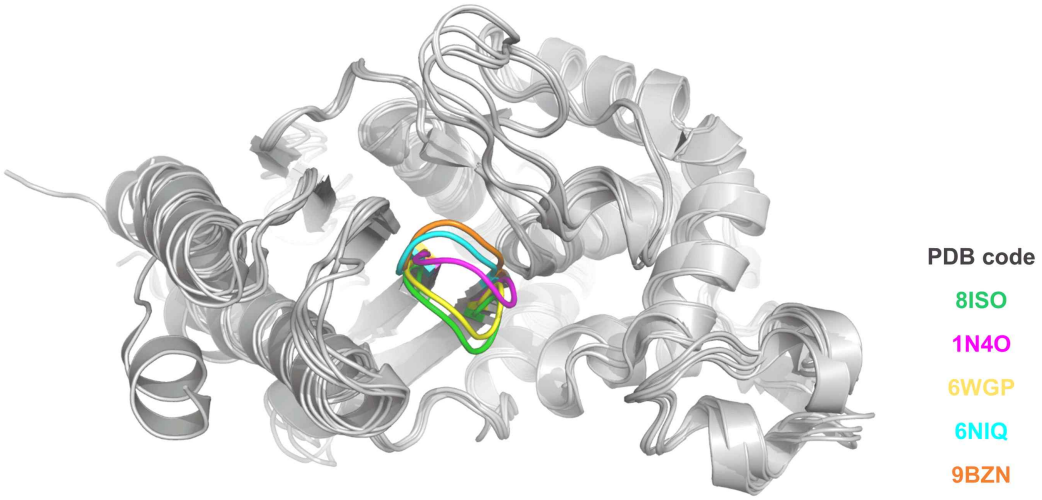


그림. CESS-1(PDB code)와 Homolog 구조를 갖는 β-lactamases 비교

- 보편적으로 널리 사용되며, 다수의 내성이 보고되고 있는 항생제 Ampicillin 에 대한 beta-lactamase 효소들의 활성 효율을 비교한 결과 본 연구에서 활용된 CESS-1 효소가 Ampicillin 항생제에 대한 전환효율이 비교적 높은 것으로 확인되었음.

표. CESS-1 과 β-lactamase 의 Ampicillin 항생제에 대한 활성 효율 비교

No.	Name	K_{cat}/K_m ($s^{-1}/\mu M$) toward Ampicillin	Reference
1	CESS-1	28.8 ± 3.3	Jeong et al., 2024, IJAA
2	BlaC	24	Bhattacharya et al., 2021, Front. Microbiol.
3	FPH-1	16 ± 3	Toth et al., 2012, AAC
4	OXA-10	6.9	De Luca et al., 2011, PNAS

KOPRI 극지연구소

4) 항생물질 개발 타깃인 IRGB10의 구조규명 및 이 구조를 활용한 작용 메커니즘 연구, 관련내용은 2023년 08월, 09월에 Frontiers in Immunology에 2편의 논문 발표 (극지연, 중앙대)

- 항생물질 개발의 타겟 단백질인 IRGB10 단백질의 삼차구조 해석
- IRGB10에 GDP가 결합하면 dimer로 존재하고 nucleotide를 제거하는 MONOMER로 존재하는 사실을 밝힘.
- 이런 변화에 따른 IRGB10-NTfree 의 monomer구조를 밝힘

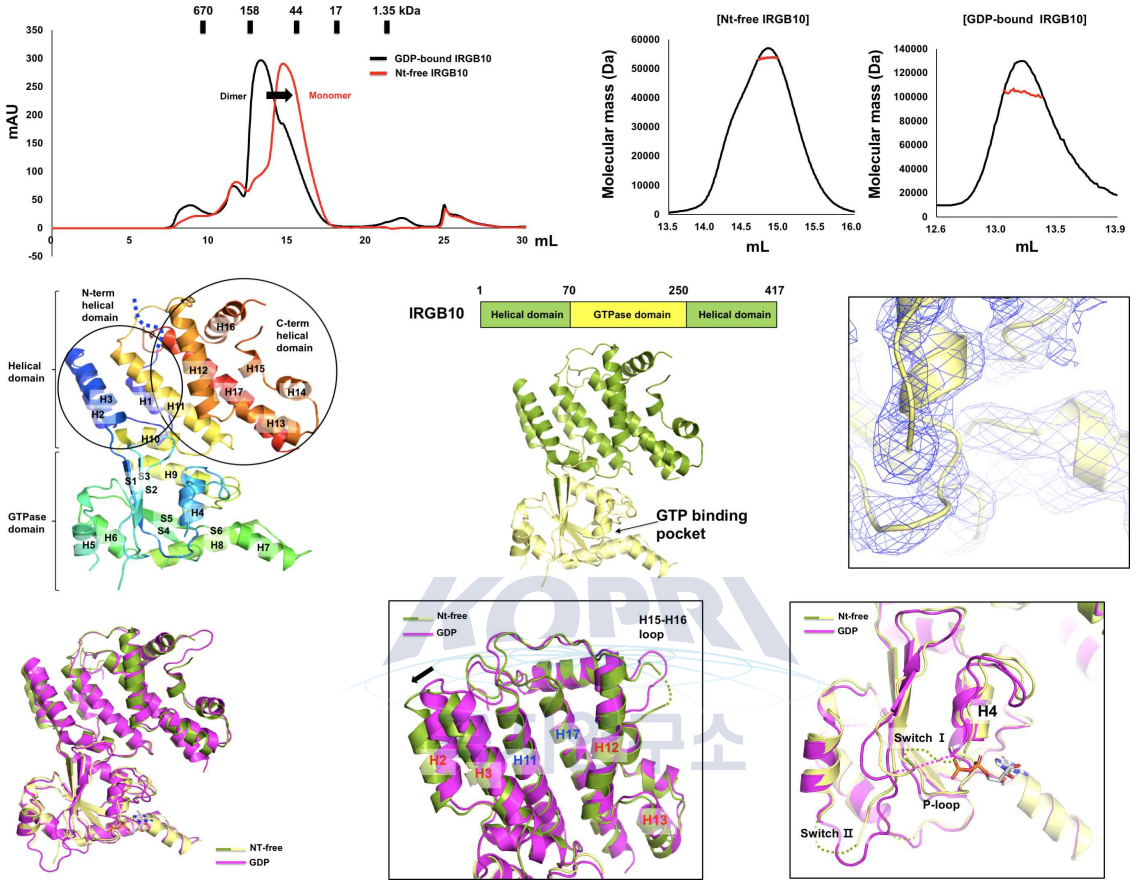


그림. IRGB10/Nttree monomer의 3차구조 분석

- IRGB10에 GTP를 넣어주면 oligomerization이 일어나는 것을 밝힘.

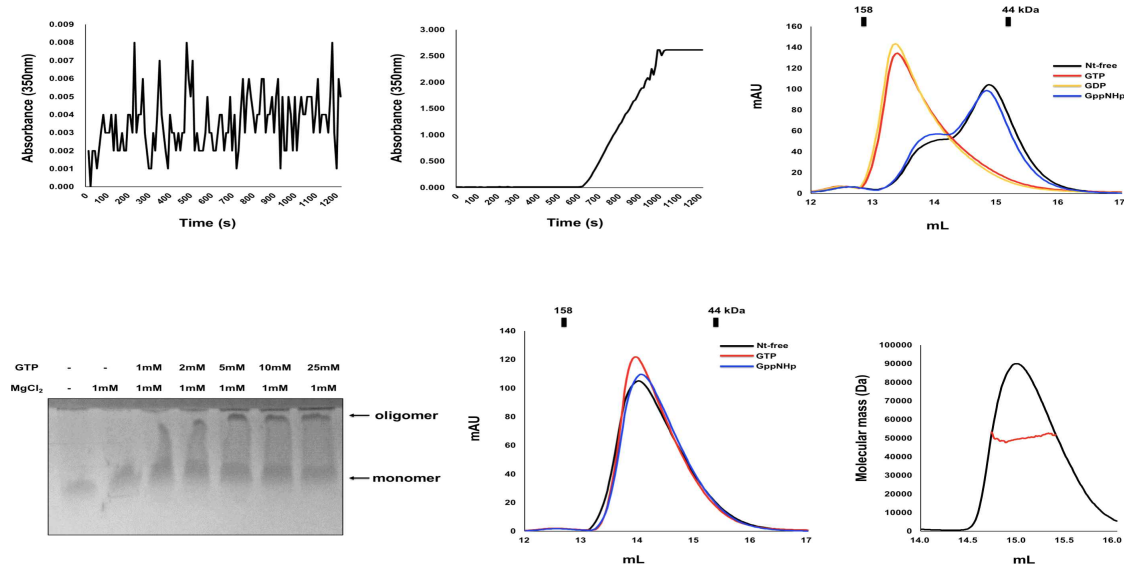


그림. GTP에 의한 IRGB10의 복합체 형성 규명

- IRGB10의 GTP첨가에 의한 복합체 형성에 구조적 변화가 일어남을 밝힘

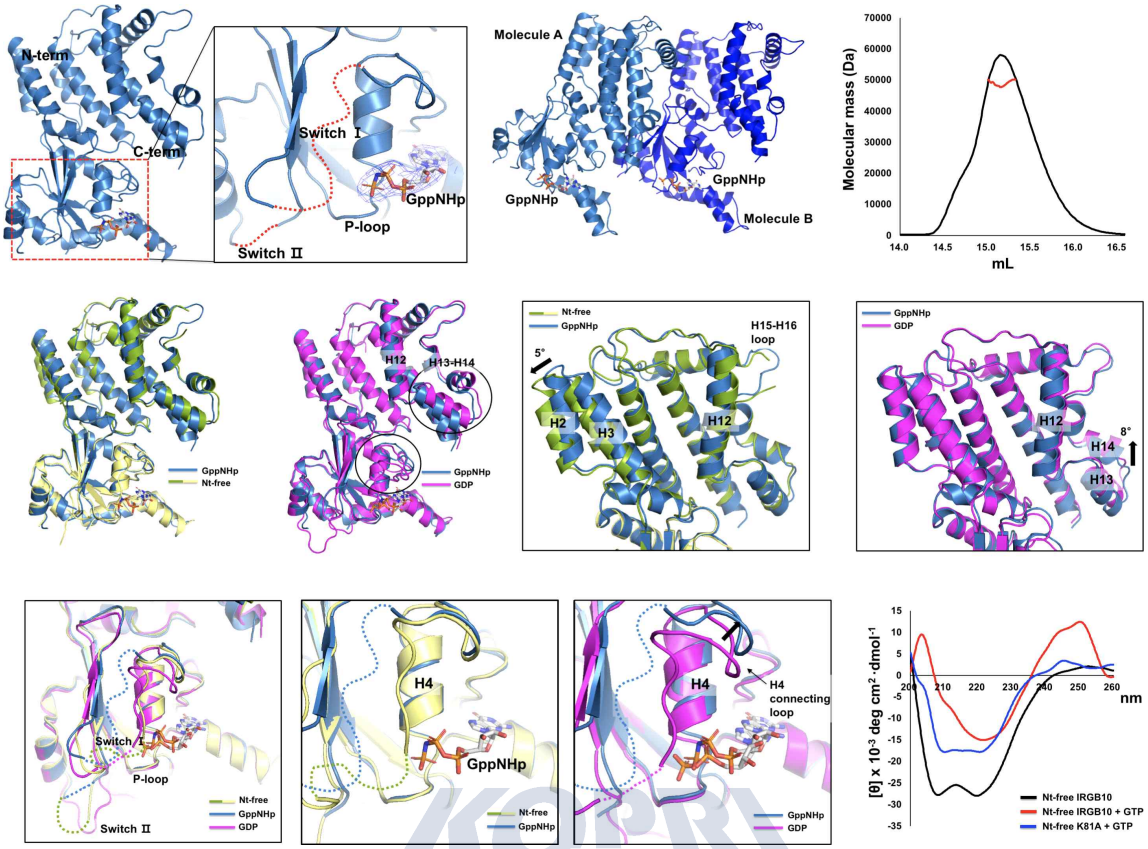


그림. IRGB10 단백질의 Monomer/dimer 구조 비교

분석.

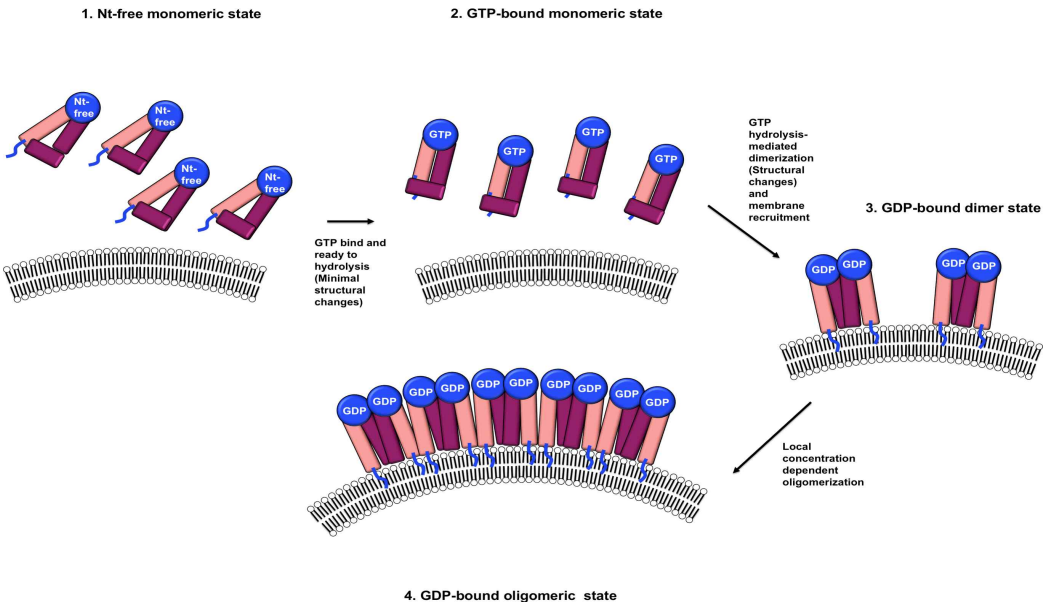


그림. IRGB10에 의한 병원균 막에 구멍을 뚫는 메커니즘 규명

※5차년도: 2024년 결과

항생물질의 변형체 구조 규명 및 세포 안정성 데이터 확보

가. 항생물질 변형체의 세포 독성 확인을 위한 안정성 테스트

1) 항생물질 변형체의 세포 독성 확인 전, 용해도(Solubility)를 평가하여 실험 조건 최적화. 항생제 변형체의 적합한 농도를 설정하기 위함

– 각 변형체의 초기 농도는 10 mM DMSO 용액에 용해한 결과 GA-AB-21-02, GA-AB-21-03, GA-AB-21-04, GA-AB-21-05, GA-20-AB-24, GA-20-AB-25, GA-20-AB-38 변형체가 높은 용도를 가지는 것을 확인함.

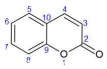
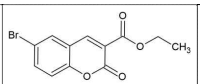
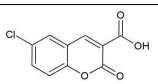
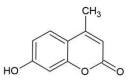
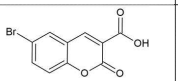
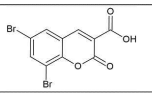
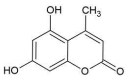
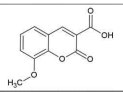
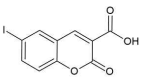
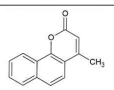
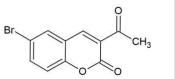
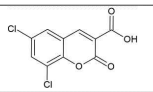
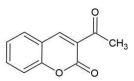
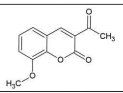
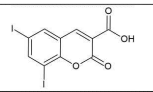
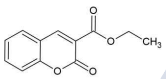
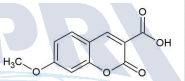
Coumarin		GB-20-AB-35		GB-21-AB-01	
GB-20-AB-01		GB-20-AB-37		GB-21-AB-02	
GB-20-AB-11		GB-20-AB-38		GB-21-AB-03	
GB-20-AB-19		GB-20-AB-39		GB-21-AB-04	
GB-20-AB-24		GB-20-AB-40		GB-21-AB-05	
GB-20-AB-25		GB-20-AB-47			

그림. 쿠마린 변형체들의 구조

KOPRI 극지연구소

	GA-AB-21-01	GA-AB-21-02	GA-AB-21-03	GA-AB-21-04	GA-AB-21-05
Solubility	X	G	G	G	G
Stock Concentration	X	250mM	500mM	1M	250mM
Response (+/-)	-	-	-	-	-
	GB-20-AB-01	**GB-20-AB-11**	**GB-20-AB-19**	**GB-20-AB-24**	**GB-20-AB-25**
Solubility	NG	NG	X	G	G
Stock concentration	100mM	100mM	X	1M	1M
Response (+/-)	-	-	-	-	-
	GB-20-AB-35	**GB-20-AB-37**	**GB-20-AB-38**	**GB-20-AB-39**	**GB-20-AB-40**
Solubility	NG	X	G	NG	NG
Stock concentration	100mM	X	1M	10mM	100mM
Response (+/-)	-	-	-	-	-
	GB-20-AB-47				
Solubility	G				
Stock concentration	500mM				
Response (+/-)	-				

- solvent: DMSO
- G: stock concentration > 250mM
- NG: stock concentration <100mM

그림. 쿠마린 변형체들의 용해도 측정 결과

2) 다양한 항생물질 변형체의 세포 독성을 확인하기 위하여 여러 세포를 대상으로 독성테스트를 실시

- 인간 세포주(human breast cancer cell line)인 BT-549 세포를 이용하여 세포 독성 테스트를 실시. 실시 결과, 모든 항생제 변형체는 세포 독성을 보이지 않는 것으로 확인됨.
- 또한, 24시간 뿐만 아니라 48시간 후에도 뚜렷한 독성을 보이는 항생제 변형체는 없음.

Cell : BT549
Drug concentration : 10uM
Time : 24h

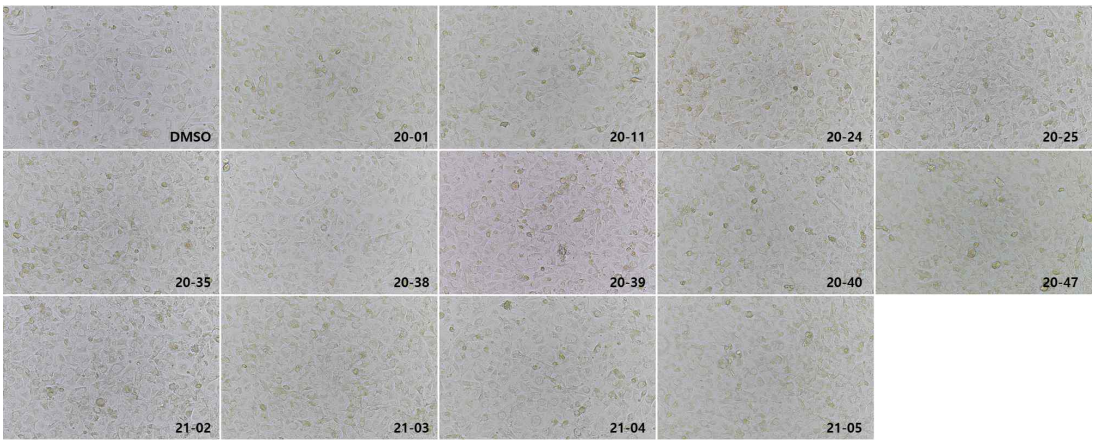


그림. BT549 세포를 이용한 사멸 측정. 쿠마린 변형체를 혼합 후 24시간 후에 관찰한 결과 (농도는 10uM)

Cell : BT549
Drug concentration : 10uM
Time : 48h

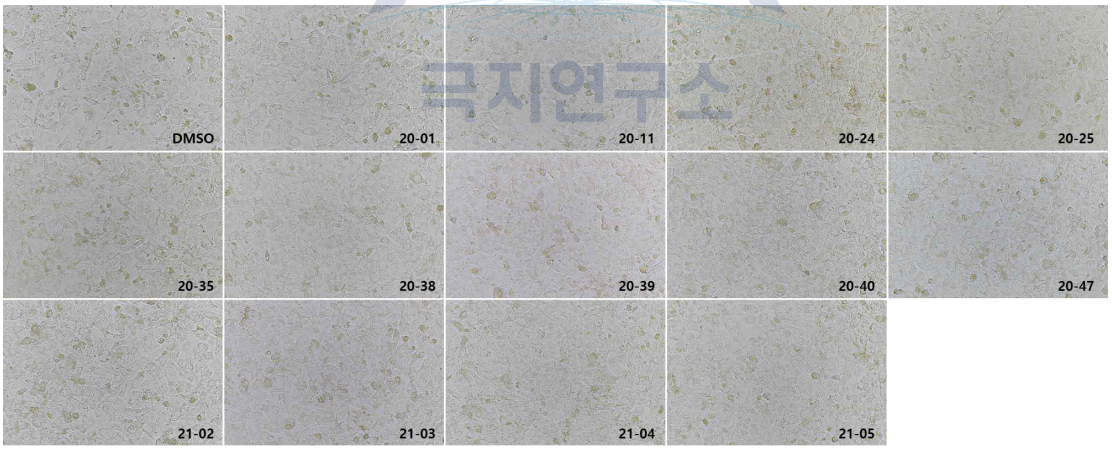


그림. BT549 세포를 이용한 사멸 측정. 쿠마린 변형체를 혼합 후 48시간 후에 관찰한 결과 (농도는 10uM)

- 10 uM 뿐만 아니라 50uM의 높은 농도에서도 뚜렷한 독성을 보이는 항생제 변형체는 없음.

Cell : BT549
Drug concentration : 50uM
Time : 24h

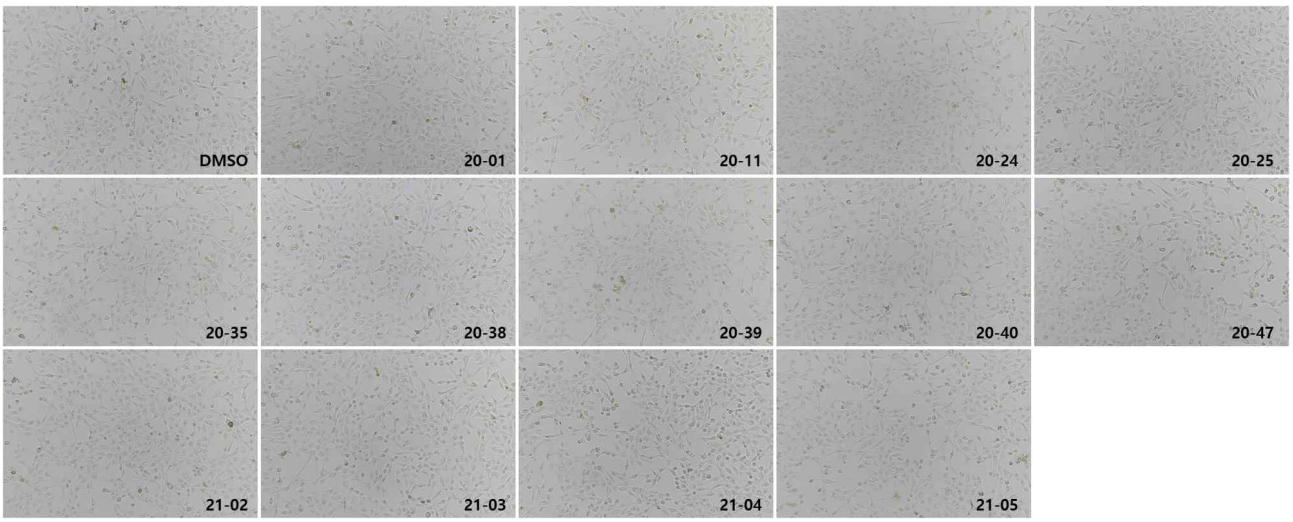
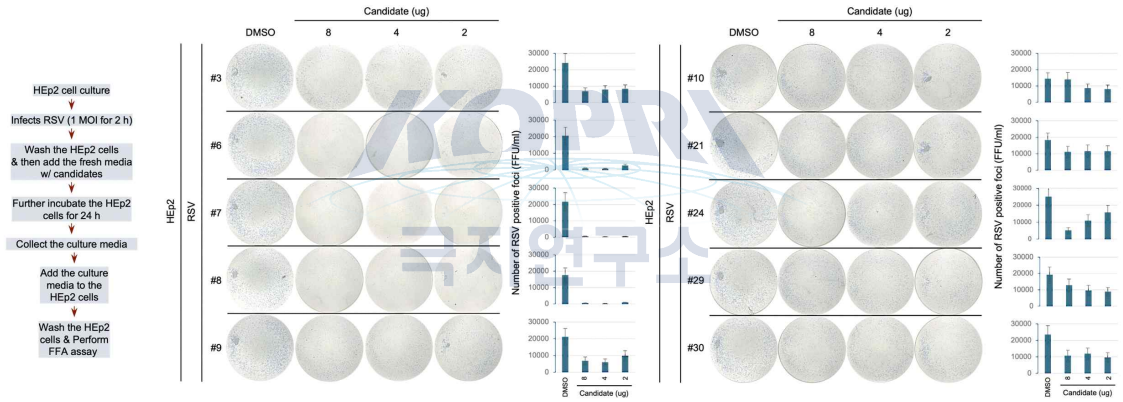


그림. BT549 세포를 이용한 사멸 측정. 쿠마린 변형체를 혼합 후 24시간 후에 관찰한 결과 (농도는 50uM)



[그림] 항바이러스 효능 검증 실험
HEp2 세포에 RSV (Respiratory Syncytial Virus)를 MOI 1으로 감염하고 2시간 후, 화합물 후보군을 처리함. 화합물 후보군 농도 (2, 4 및 8 μg)으로 처리 후, 24시간 동안 추가로 배양. RSV 감염 HEp2 세포의 배지를 새로 배양한 HEp2 세포로 옮긴 다음 FFU (focus-forming units) 분석을 위해 24시간 동안 배양. 감염 가능한 바이러스 존재를 확인하기 위해 FFU 분석을 수행. DMSO를 음성 대조군으로 사용함. 그래프는 화합물 후보군 처리 후, RSV 감염성의 감소를 보여주는 FFU 분석 데이터임.

➔ 6번 (GB-20-AB-35), 7번 (GB-20-AB-37), 8번 (GB20-AB-38)

항생물질/타겟단백질 복합체 특성 분석

가. 항생물질 변형체/타겟 단백질 복합체 결정화 및 3차 구조 규명 (CESS-1과 β-lactam 항생제의 복합체)

1) Class A β-lactamase, CESS-1과 β-lactam 항생제의 복합체 구조 규명

- Stenotrophomonas spp. 유래의 CESS-1 단백질과 다양한 β-lactam 항생제(페니실린 G, 암피실린, 세팔렉신, 세팔로, 세포탁심, 임피페넴, 메로페넴)와의 복합체 구조를 분석함으로써, CESS-1의 확장된 기질 스펙트럼과 기질 선호도에 대한 구조 기반의 조사를 진행
- X-ray 결정학을 이용하여 CESS-1과 β-lactam 항생제 복합체의 3차 구조를 규명하고, 이를 바탕으로 CESS-1의 기질 반응성을 분석. 또한, 세포내 활성 실험을 통해 각 항생제에 대한

CESS-1의 가수분해 활성을 측정.

2) CESS-1의 기질 선호도 조사

- CESS-1은 세파클로르에 대해 가장 높은 활성도를 보임.
- 페니실린보다 세팔로스포린에서 더 높은 가수분해 활동 관찰.
- 카바페넴에 대한 가수분해 활동은 미미함.

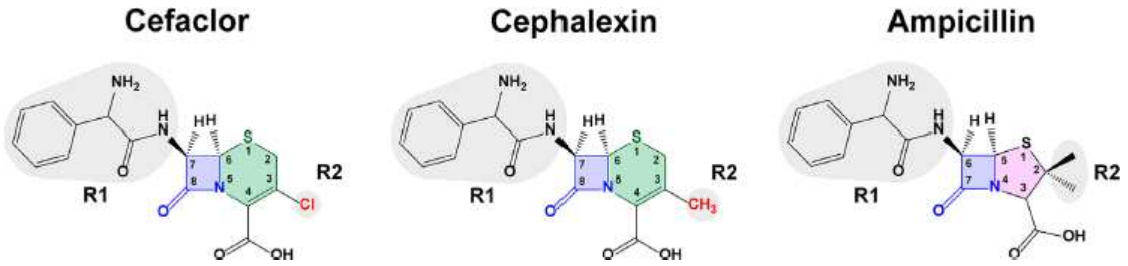


그림. 세파클로르, 세팔렉신, 그리고 암피실린의 개략도. 이환 고리 구조는 번호로 표시됨. β-락탐 고리는 파란색, 디히드로티아진 고리는 초록색, 티아졸리딘 고리는 분홍색으로 색상 지정. 회색 음영으로 표시된 영역 R1과 R2는 각각 R1 및 R2 곁사슬을 포함. 세파클로르의 염소 원자와 세팔렉신의 C3 위치 메틸 치환체는 빨간색으로 강조 표시됨

3) CESS-1 단백질과 β-lactam 항생제의 복합체 구조 규명

- CESS-1 단백질과 세팔로, 암피실린, 세팔렉신 등의 β-lactam 항생제와의 복합체 구조를 규명하고, 이를 통해 CESS-1의 항생제 저항성 메커니즘을 분석.
- 복합체 구조 분석을 통해 CESS-1이 β-lactam 항생제와 결합 시 발생하는 구조적 변화를 규명하고, 이를 바탕으로 CESS-1의 기질 선호도와 항생제 저항 메커니즘을 이해
- 구조 분석 결과, β-lactam 항생제의 화학적 구조와 효소 활성 부위의 상호작용 패턴을 통해 CESS-1의 특정 기질에 대한 선호도가 결정되는 것을 확인.

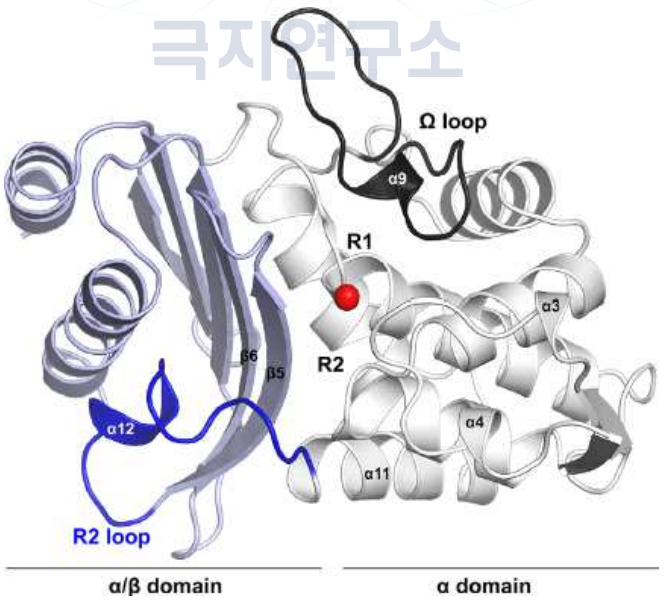


그림 4. 야생형 CESS-1의 전체 구조. α/β 도메인, α 도메인, -루프 및 R2 루프는 각각 하늘색, 회색, 검정색, 파란색으로 표시. 친핵성 Ser70은 빨간색 구체로 강조 표시

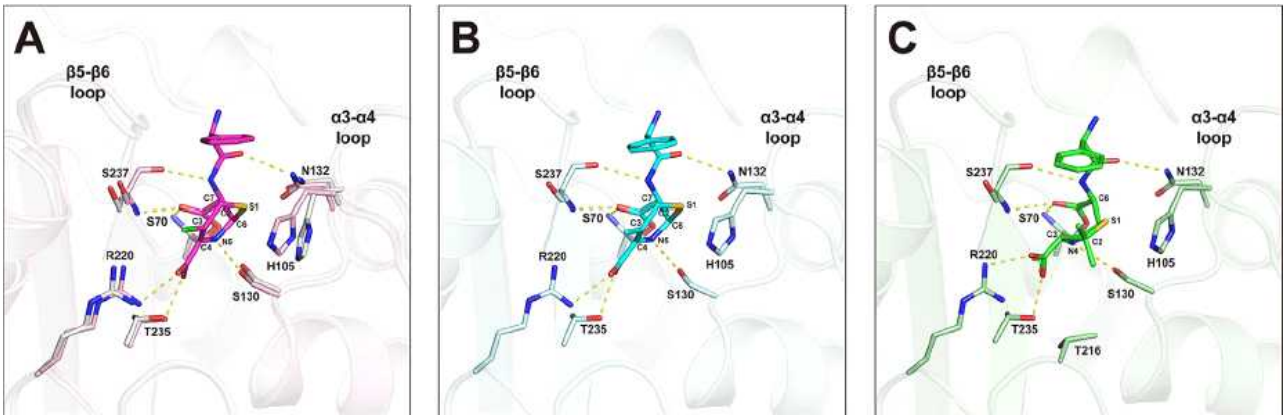


그림. CESS-1이 β-락탐 항생제에 대해 보이는 가수분해 활성의 비율 변화. 페니실린, 세팔로스포린, 그리고 카바페넴은 각각 진한 회색, 회색, 흰색 막대로 표시됨. 오차 막대는 중복 실험에서 도출된 표준편차(" ±")를 나타냄.

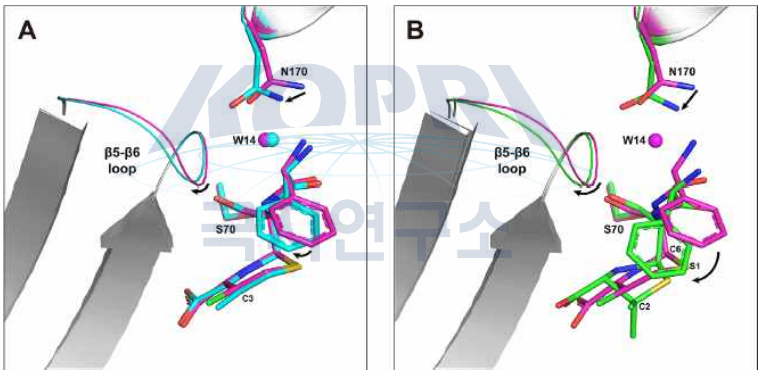


그림. 리간드에 따른 형태 변화의 비교. E166Q/cefaclor 복합체(자홍색)의 결정 구조는 (A)의 결정 구조와 중첩. E166Q/세팔렉신 복합체(청록색) 및 (B) E166Q/암피실린 복합체(녹색). 물 분자는 구체로 표시되며 복합체의 구조 변화 cefaclor와 비교한 cephalexin과 ampicillin은 검은색 화살표로 표시.

나. Porphyromonas gingivalis 유래 DUF2436 도메인의 구조적 분석

1) DUF2436은 Porphyromonas gingivalis의 병원성 단백질에서 발견되는 보존된 도메인으로, 치주질환의 주요 병원성 기전에 관여할 가능성이 높다. 이 도메인의 구조적 특성과 기작을 규명함으로써 P. gingivalis 병원성 메커니즘 이해와 치료 표적 발굴에 기여

- DUF2436(Ser361-Cys579) 도메인을 pET-28a 벡터에 클로닝하여 E. coli BL21 (DE3)에서 발현
- Ni-NTA resin 및 Superdex 200 크기 배제 크로마토그래피로 단백질 정제 후 120 mg/mL로 농축
- Sitting-drop 증발확산법을 사용하여 결정화 실시
- 결정화 조건은 0.2 M 염화나트륨, 0.1 M Tris-HCl(pH 7.0), 1 M 시트르산나트륨, 293 K(20° C).
- 포항가속기연구소에서 2.21 Å 해상도의 X-ray 회절 데이터를 수집.

- REFMAC5, Phenix, Coot을 사용하여 구조 정제 및 모델링 수행.
- DaliLite 분석을 통해 유사 단백질과 구조 비교.
- 전기적 표면 분석으로 음전하 패치와 상호작용 가능성 평가

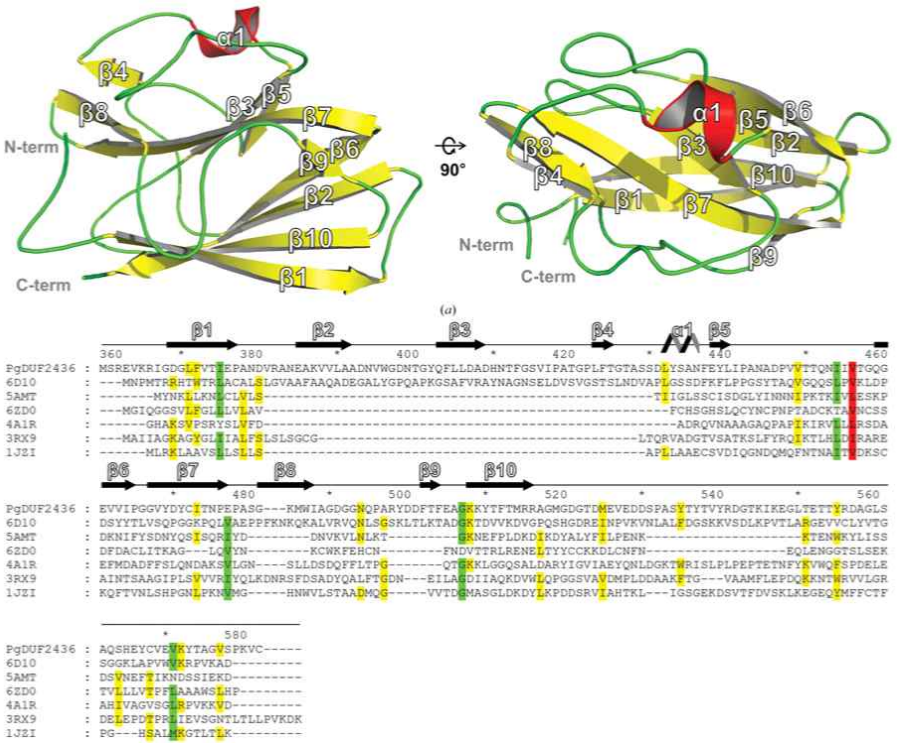


그림. PgDUF2436의 단량체 구조. β-롤 접힘 구조를 가지며, N-말단과 C-말단이 명확히 구분. 다중 서열 정렬 결과, *Pseudomonas aeruginosa*의 AlgF, *Francisella tularensis*의 IglE, *Streptococcus intermedius*의 콜레스테롤-의존성 세포용해소(D4 도메인) 등과 구조적 유사성을 보임. 이차 구조와 서열 정렬을 통해 PgDUF2436의 보존된 구조적 특징과 잠재적 기능적 역할을 시사

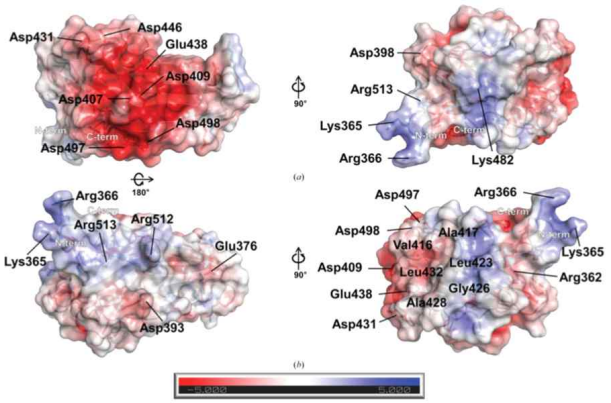


그림. PgDUF2436 도메인 구조의 전기적 표면 전하 표현. (b) (a)의 구조를 180도 회전한 모습. 전기적 표면 전위는 APBS를 사용하여 계산되었으며, 계산된 전하에 따라 빨간색(−5 kT/e)에서 파란색(+5 kT/e)까지 색상으로 표시됨.

2) 연구 결과 (구조적 특징 및 유사도)
- DUF2436은 비정형 β-jelly-roll 접힘 구조로, 10개의 β-strands와 1개의 α-helix로 구성.
- AlphaFold 예측과 비교해 고유한 구조적 변형이 확인됨.
- *Pseudomonas aeruginosa*의 AlgF(Z-score 5.9) 및 Francisella tularensis의 IglE(Z-score 5.4)와 구조적으로 유사하나, 독특한 β-jelly-roll 변형이 PgDUF2436에서 확인됨.

- 표면에서 음전하 패치가 발견되었으며, 이는 특정 상호작용의 특이성을 시사.
- DUF2436은 분자 간 상호작용에 중요한 결합 모듈로 작용할 가능성이 높으며, 병원성 단백질의 중요한 역할을 가질 것으로 예측됨.

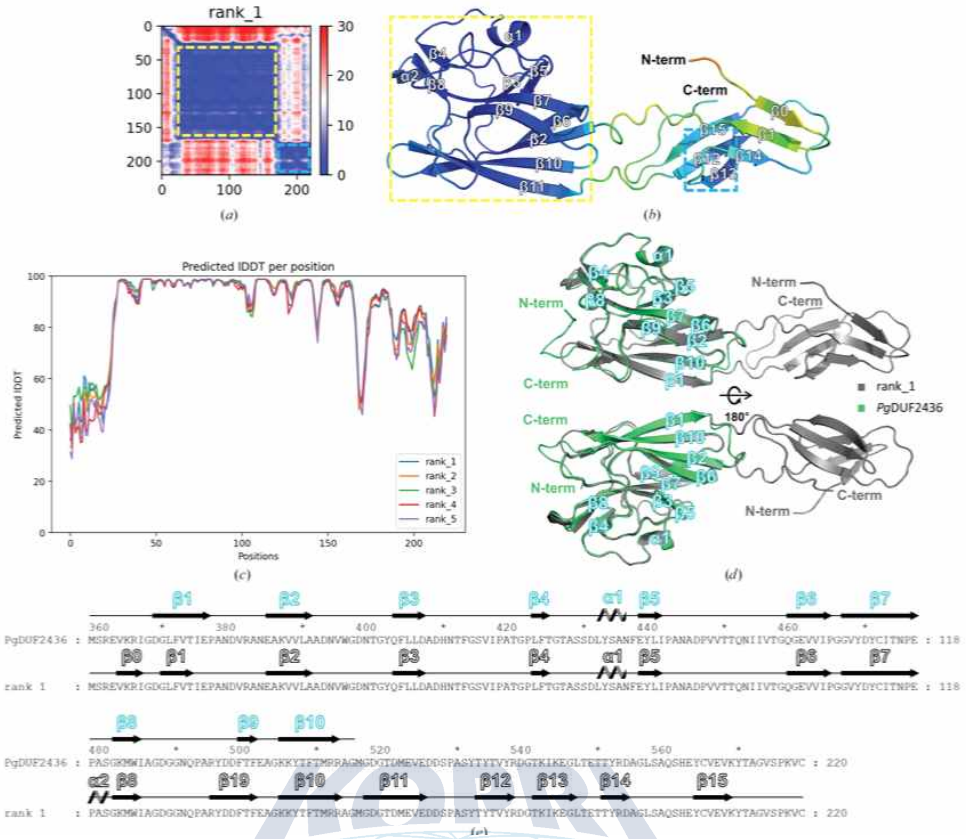
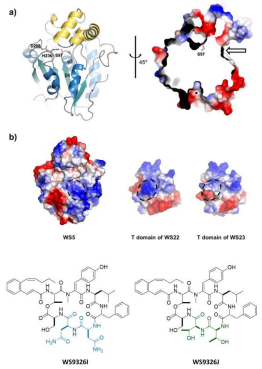
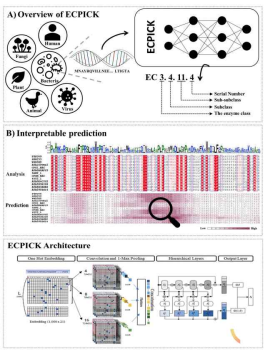


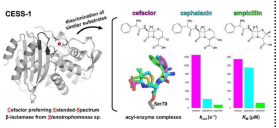
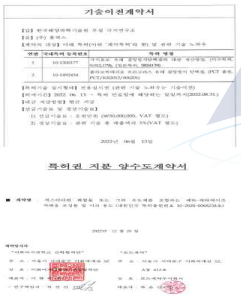
그림. AlphaFold 모델과 PgDUF2436의 결정 구조의 구조 비교. (a) 예측 정렬 오류(PAE) 플롯이 히트맵으로 표시. 높은 신뢰도(파란색)부터 낮은 신뢰도(빨간색)까지 색상으로 구분된 이미지. 여기서 x 및 y축은 잔여물에 해당. (b) 최상위 알파폴드 모델 순위_1은 파란색(90 이상)에서 빨간색(이하)까지 예측된 로컬 거리 차이 테스트(plDDT) 점수로 표시. 50). 노란색 점선과 청록색 선은 AlphaFold 모델의 하위 도메인 경계를 나타냄. 노란색 점선 상자는 해당 지역을 강조 표시. Asn384에서 Glu525까지, 청록색 점선 상자는 Tyr535에서 Cys579까지의 영역을 나타냄. (c) plDDT 점수는 아미노산 상단에 표시 (d) 실험적으로 결정된 PgDUF2436 도메인 구조의 중첩(녹색, 2차 구조 라벨링) 녹색 테두리가 있는 흰색 텍스트)와 AlphaFold 예측 모델(회색)을 사용. (e) PgDUF2436 및 Rank_1의 2차 구조 정렬.

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

3-1. 연구개발과제의 대표적 연구 실적

대표성과	연구성과	
(1) Non-리보좀 펩타이드 합성효소의 특이 생합성 메카니즘 최초 규명		○ 해양 유래 방선균(스트렙토마이세스 종 SNM55)으로부터 만들어지는 유용생리활성물질(WS9326A)의 생합성이 특이 메카니즘에 의해 이루어진다는 것을 세계 최초로 규명 ○ 스트렙토마이세스 종 SNM55 미생물이 만들어 내는 유용생리활성물질(WS9326A)의 생합성에 관여하는 효소들의 작용 기작을 규명하여 향후 WS9326A 물질의 대량 생산에 활용 가능 – 해양 미생물의 모듈화된 형태의 거대 non-리보좀 펩타이드 합성효소(nonribosomal peptide synthetase, NRPS)에 의한 WS9326A라는 유용생리활성물질의 생합성이 현재까지 알려지지 않았던 특이 메카니즘에 의해 이루어진다는 것을 세계 최초로 규명 – 유용활성을 지닌 천연물을 조합생합성적으로 효능, 부작용, 물성 측면에서 개량할 수 있는 길을 열어 신규의약품의 개발에 기여 – 해양 유래 방선균 스트렙토마이세스 종 SNM55로부터 WS9326A를 생합성하는 NRPS를 암호화하는 유전자 집단을 확인하였으며, 지금까지의 전형적인 NRPS와는 매우 다른 도메인과 모듈구조로 구성된 것을 발견 – 연구결과는 Angewandte Chemie International Edition(IF 16.82, mrn IF: 91.90)에 게재 (‘21.9)
(2) 단백질 서열로부터 신뢰도 높은 효소 기능 예측 인공지능 기술 개발		○ ECPICK 모델을 만들어 효소의 기능 예측 기술 성능을 향상 – 효소의 기능 예측에 있어서 Evidential Deep Learning이라는 새로운 개념을 이용하여 Domain Specific-Evidence를 제공해 모델 결과에 대해 신뢰할 수 있는 예측(Trustworthy Prediction)을 가능하게 하는 기술 개발 – 본 dsurn를 통해 개발된 기술을 이용해 기존에 알려지지 않은 Motif/Active Sites 제시 및 증명이 가능해짐 – 지속해서 증가하고 있는 게놈 및 메타게놈 유전자 정보 중 유용한 역할을 할 수 있는 단백질이나 효소에 대해 신뢰성 있게 기능 예측 가능 – 연구결과는 Briefings in Bioinformatics (impact factor of 13.994 in 2021) 에 게재 (‘23.12)

KRIBB 극지연구소

<table>
<tr>
<td>(3) Stenotrophomonas sp. 미생물에서 항생제 내성을 유도하는 새로운 유형의 class A β-lactamase 효소 (CESS-1)를 발견하고, 약물 개발을 위한 단백질 구조 기반 효소 활성 기작 세계최초 규명</td>
<td> 
</td>
<td>○ CESS-1 단백질 결정 구조를 통해 폭넓은 항생제 내성 유도 활성을 갖는 CESS-1의 기능과 활성 기작 규명
○ β-lactamase는 세균의 세포벽 합성을 막는 β-lactam 계열 항생제를 무력화 시켜 항생제 내성을 유도하는 효소
○ CESS-1의 3차원 결정 구조와 효소의 기질 특이성 규명
– CESS-1 효소가 다양한 β-lactam 항생제에 활성을 보이며, 그 중 Cefaclor 항생제에 특이적으로 기질 선택성이 높은 것을 확인
– 세 가지 항생제 cefaclor, cephalexin, ampicillin와의 복합체 구조 분석을 통해 효소 활성에 중요한 활성 부위 아민노산 잔기를 확인
– 연구 결과는 International Journal of Antimicrobial Agents 저널 (impact factor of 10.8 for the year 2022) 2024년 4월에 발표</td>
</tr>
<tr>
<td>(4) 기술이전 성과 2건</td>
<td> 
기술이전계약서
특허권 지분 양수도계약서</td>
<td>
<table>
<tr><th>구분</th><th>기술이전명</th><th>업체명</th><th>계약금액</th></tr>
<tr><td>전용실시권</td><td>• 국내특허 등록번호 10-1300177
– 극지효모 유래 결빙방지 단백질 활용기술 극지효모 유래 단백질의 대량생산 방법 (미국특허 9,012,179 / 일본특허 5824139)
• 국내특허 등록번호 10-1492434
– 플라보벡테리움 프리고리스 유래 결빙방지 단백질(PCT 출원, CT/KR2012/006201)</td><td>㈜휴젝스</td><td>50백만원</td></tr>
<tr><td>특허권 지분 양수도계약*</td><td>• 국내특허출원번호 10-2020-0068238)
– 세스터터핀 화합물 또는 그의 유도체를 포함하는 베타-락타메이즈 저해용 조성물 및 이의 용도</td><td>토드제약</td><td>30백만원</td></tr>
</table>
</td>
</tr>
</table>

KOPRI 극지연구소

3-2. 연구수행 결과

1) 정성적 연구개발성과

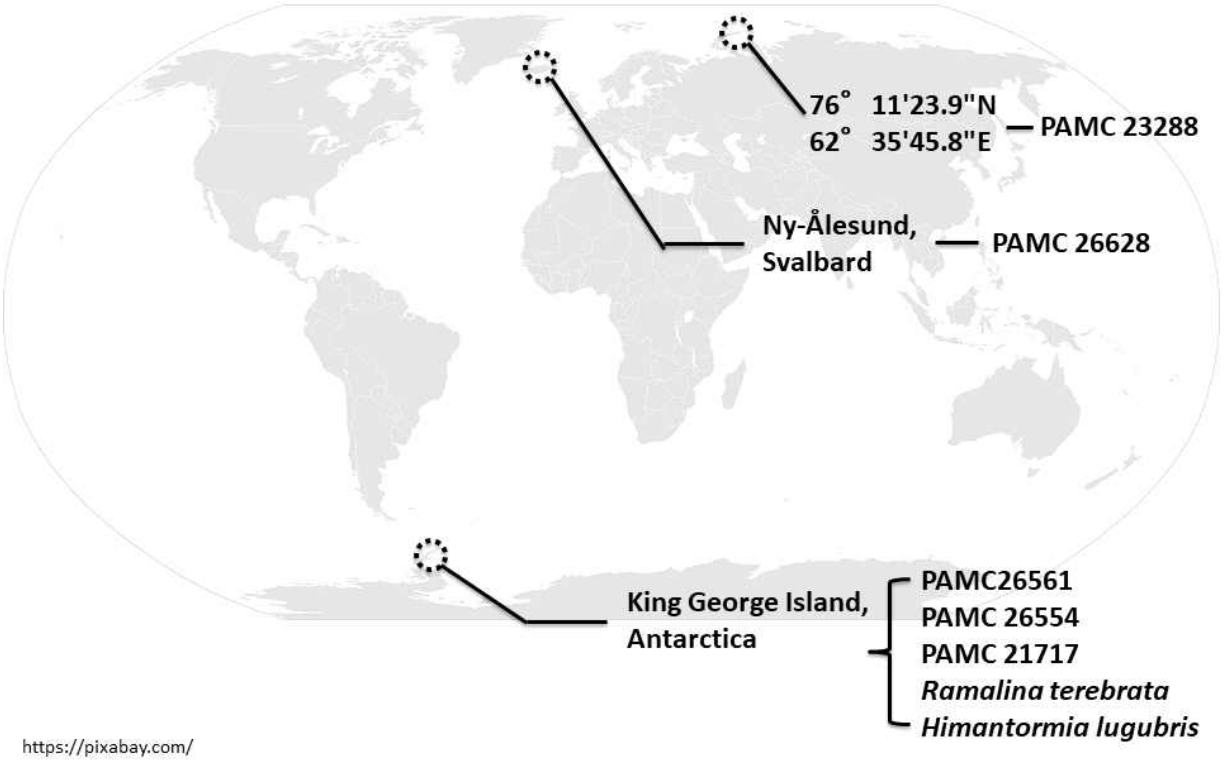
※1차년도: 2020년 정성적 연구성과

1차년도 정량적 목표 및 성과

구분	성과목표	성과지표	목표치	가중치 (퍼센트)	설정근거	평가기준	성과
1차년도 (2020년)	극지 및 해양 유래 희귀 생물자원 확보	신규 항생물질 또는 항생물질 변형효소 유전자를 가지는 균주 개발, 선도물질의 최소 성능목표 및 차별적 기술요소 설정	생물자원 1종, 극지/해양 미생물 유전체 분석 2종	20	항생물질 생산균주의 탐색, 배양조건 확립 및 물질 분석까지 완료된 균주를 1년차부터 1년에 1종씩 확보	자체평가 및 자료제시 물질의 유효성 기준: 0.1 mg/ml 농도에서 clear zone 형성	생물자원: 2종, 극지 미생물 (S. carbonis PAMC 29251), 해양 미생물 (199DD-085) 유전체 분석: 4종 (Hymenobacter sp. PAMC 26554, Hymenobacter sp. PAMC 26628, S. carbonis PAMC 29251, Sphingobium sp. PAMC 28499)
	항생물질 변형효소의 기능별 카달로그 구축	생물자원, 유전체 분석, 항생물질 변형효소의 생화학적 특성 분석, 기존 상용화 효소와의 비교, 항생물질 변형체 개발 관련 논문발표	3건	30	1차년도에 3건, 2차년도부터 1년에 5건씩 발표	SCIE 상위 30% 논문 발표 여부	SCIE 상위 30% 논문 2건 발표, 1편 In press
	항생물질 타겟 단백질 발현 및 정제	타겟 단백질 발현 벡터 제작	5건	10	단백질 결정화를 위한 단백질 확보 과정	벡터 제작 여부	100% 달성
		수용성 단백질 발현	2건	10	단백질 결정화를 위한 단백질 확보 과정	SDS-PAGE 결과제시	100% 달성
		타겟 단백질 고순도 정제	순도 95% 이상	10	단백질 결정화를 위한 단백질 확보 과정	SDS-PAGE 결과제시	100% 달성
	타겟 단백질 결정화 실험	타겟 단백질 결정화	2건	20	단백질 구조 규명을 위한 과정	초기 결정 획득 여부	100% 달성

KOPRI 극지연구소

극지/해양 생물자원 채취 지점 정보



https://pixabay.com/

KOPRI 극지연구소

※2차년도: 2021년 정성적 연구성과

1) 극지/해양 생물자원 대량 확보: 극지 곰팡이류 (약 120 여종), 극지 미생물 (그람 양성 및 음성 박테리아 약 40 여종), 국립해양생물자원관 보유 생물자원 (추출물 9종, 미생물 5종) 을 확보하여 항균물질 대량 스크리닝 작업 완료

2) 신규 오존화합물 유도체 합성, 구조규명 및 항균활성 실험 완료 (한서대학교 화학과 정인찬 교수 연구팀과 공동연구)

3) 항생물질 타겟 단백질 유전자 확보 : 돌연변이를 포함한 항생물질 타겟 단백질의 유전자(총 12개)를 확보하였으며, 해당 타겟 단백질의 특성을 바탕으로 정제조건을 확립함

4) 항생물질 타겟 단백질의 초기결정 획득을 통한 결정 최적화 : 항생물질 타겟 단백질의 초기결정(약 200개)을 확보하였으며, 이 중 2개의 조건 대해여 결정조건 최적화(200개 이상 조건)를 진행.

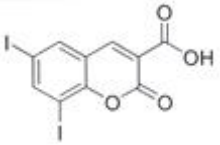
5) 확보한 타겟 단백질의 회절 데이터를 바탕으로 7개의 타겟 단백질에 대한 구조규명을 진행.

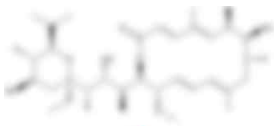
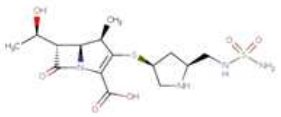
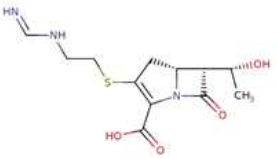
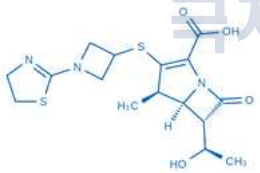
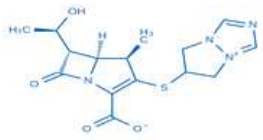
6) 포항가속기연구소에서 보유한 fragment library를 이용하여 Fragment-based drug discovery (FBDD)를 진행 및 결정조건 탐색

<확보된 항균활성을 가지는 극지/해양 유래 생물자원 정보>

생물자원 이름	확보된 지역 위치정보	활성 병원균	향후 계획
Bacillus aryabhattai	국립해양생물자원관 (MABIK MI00045531)	*S. aureus* *C. albicans* *E.coli*	항생물질 추출분리 정제
Bacillus aryabhattai	국립해양생물자원관 (MABIK MI00047241)	*S. aureus* *C. albicans*	항생물질 추출분리 정제
Bacillus idriensis	국립해양생물자원관 (MABIK MI00047242)	*S. aureus* *E.coli*	항생물질 추출분리 정제
Bacillus idriensis	국립해양생물자원관 (MABIK MI00050151)	*C. albicans*	항생물질 추출분리 정제
Bacillus oceanisediminis	국립해양생물자원관 (MABIK MI00050152)	*C. albicans* *E.coli*	항생물질 추출분리 정제
*Streptomyces avidinii*PAMC29637	(극지역) S1-8-1	*E. coli* *K. pneumonia* *S. aureus* *M. smegmatis*	항생제 구조 분석,합성, 활성 분석
*Streptomyces avidinii*PAMC29639	(극지역) S1-1-4	*E. coli* *K. pneumonia* *S. aureus* *M. smegmatis*	항생제 구조 분석,합성, 활성 분석
Metabacillusindicus	극지역	*S. aureus* *C. albicans* *M. smegmatis*	항생물질 추출분리 정제
*Cryobacterium*sp.	극지역	*S. aureus* *C. albicans* *M. smegmatis*	항생물질 추출분리 정제

<확보된 항균활성을 가지는 화합물 정보>

항생물질 화합물 이름	**구조**	**활성 측정**	**향후 계획**
GA-AB-21-05		IC50 : 107.1±0.06 uM	Activity optimization
Bafilomycin계열의 신규 화합물 (5)		MIC: 4 ug/ml (*Bacillus subtilis*)	생리활성 검색

	 5		
Streptopyrrole 계열의 신규 화합물 (8)	8	MIC: 0.5 μg/ml (*Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus*)	생리활성 검색
(4R,5S,6S)-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-4-methyl-7-oxo-3-{[(3S,5S)-5-[(sulfamoylamino)methyl]pyrrolidin-3-yl]sulfanyl}-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxylic acid		MIC: 3.91 ug/ml	Modification
(5R,6S)-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-3-[(2-methanimidamidoethyl)sulfanyl]-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxylic acid		7.81 ug/ml	Modification
(4R,5S,6S)-3-{[1-(4,5-dihydro-1,3-thiazol-2-yl)azetidin-3-yl]sulfanyl}-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-4-methyl-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxylic acid		≤0.98 ug/ml	Modification
(4R,5S,6S)-3-((6,7-Dihydro-5H-pyrazolo[1,2-a][1,2,4]triazol-4-ium-6-yl)thio)-6-((R)-1-hydroxyethyl)-4-methyl-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ene-2-carboxylate, 98%		≤0.98 ug/ml	Modification

KOPRI 극지연구소

※3차년도: 2022년 정성적 연구성과

1) 남극 세종기지 주변에서 채집한 생물들로부터의 항균물질 탐색: 극지유래 식물 2종, 지의류 12종, 해조류 6종 그리고 이끼17종 외 미확인 5종 시료 확보, 각 시료별로 용매 MeOH 또는 Acetone로 추출하여 추출물 확보하여 항균물질 대량 스크리닝 작업 완료

2) 해양미생물 분리를 위한 시료(해양생물 34종, 퇴적토 11) 채집, 채집된 시료로부터 해양미생물 134주 분리 및 동정 후 보관

3) 신규 항생물질 생산 후보 미생물을 스크리닝하기 위하여 남극 킹조지섬 바톤반도의 호수, 북빅토리아 랜드의 암석, 눈, 빙하를 대상으로 미생물 순수분리 배양을 수행하였음. 그 결과 총 39종의 108 균주를 확보하였음. 호수에서는 총 14종의 25균주, 암석(7균주)과 눈(8균주)은 각각 4종이 확인되었고, 스틱스 빙하의 경우 18종 68균주를 확보

4) 남극 스틱스 빙하 시료에서 추가로 350개 균주(10도 배양체 300균주, 25도 배양체 25균주) 확보하여 동정 진행 중. 빙하 미생물 배양은 극지연구소 주요사업 “국제심부빙하시추 네트워크를 활용한 대기-빙상 상호작용의 자연적·인위적 특성 규명”과 공동으로 진행하고 있음종의 108 균주를 확보하였음. 호수에서는 총 14종의 25균주, 암석(7균주)과 눈(8균주)은 각각 4종이 확인되었고, 스틱스 빙하의 경우 18종 68균주를 확보

5) 가피바이오 연구소에서 합성된 화합물의 다양한 생리활성 확인을 위해 공동연구 수행 (경상대학교 약학대학 이창섭 교수팀과 면역활성 확인, 한림대학교 바이오메디컬학과 박종국 교수팀과 항암활성 확인)

6) β-lactamase 저해물질 개발을 위해 병원균 유래 class C β-lactamase인 ACC-1에 대한 FBDD 실험 진행 중. 2차년도 실험 결과를 통해 기존에 확보한 결정화 조건이 FBDD (Fragment-based Drug Discovery) 실험에 부적합함이 확인되어, 신규 조건 확보를 위해 FBDD 용 triple-drop plate에 sitting-drop 방식으로 결정화 실험 및 결정화 조건 최적화 진행

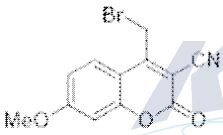
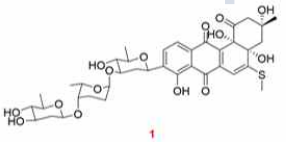
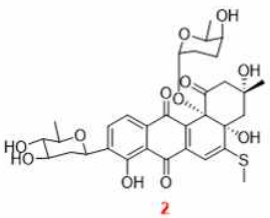
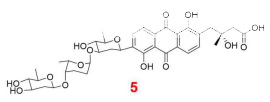
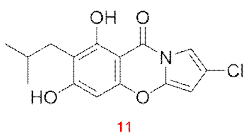
7) 한-러 연구협력 및 북극지역 시료 확보에 대한 논문 발표, 논문 제목: 러시아 북극영토 지정의 시대별 변화와 함의(EU연구 62호/KCI 등재지. 2022.5월 논문발간), 논문 내용: 러시아가 지정 관리하는 북극 영토의 시대적 변화와 지정 목적을 분석함으로 러-우크나 사태 종료 후 한-러 연구협력 대비 러시아 북극지역 시료 확보 등에 기여

<확보된 항균활성을 가지는 극지/해양 유래 생물자원 정보>

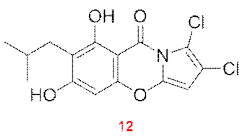
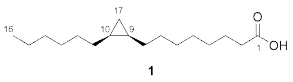
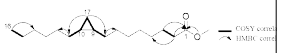
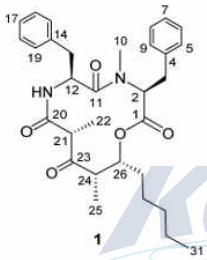
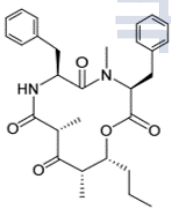
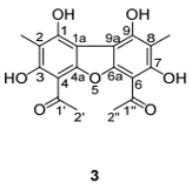
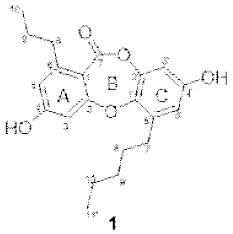
생물자원 이름	확보된 지역 위치정보	활성 병원균	향후 계획
Streptomyces avidinii PAMC29637	(극지역) S1-8-1	*E. coli* *K. pneumonia* *S. aureus* *M. smegmatis*	항생제 구조 분석, 합성, 활성 분석
Streptomyces avidinii PAMC29639	(극지역) S1-1-4	*E. coli* *K. pneumonia* *S. aureus* *M. smegmatis*	항생제 구조 분석, 합성, 활성 분석
남극 지의류 Ramalina terebrata	남극 세종기지 인근	*Escherichia coli*	유도체 합성, 활성 분석
남극 지의류 Himantormia lugubris	남극 세종기지 인근	*Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Candida albicans*	유도체 합성, 활성 분석
유용 해양미생물 균주 Streptomyces	독도주변 해역	*Bacillus subtilis(KCTC1021),*	유도체 합성, 활성 향상

ardesiacus		*Micrococcus luteus(KCTC1915), Staphylococcus aureus(KCTC1927)*	
유용 해양미생물균주 Streptomyces zhaozhouensis	독도주변 해역	-	배양액으로부터 6종의 이차대사산물의 분리, 정제 완료 향후 활성 분석 필요
극지(해양)생물(*Sphaerotylus antarcticus* Kirkpatrick)	남극 테라노바만 장보고기지 인근	*Staphylococcus aureus*	유도체 합성, 활성 분석
남극 지의류에서 최초 분리된 극지 방선균 *Streptomyces* sp. PAMC26508	남극 세종기지 인근	-	Coprisidin A 물질의 항균 활성 확인 및 유도체 합성

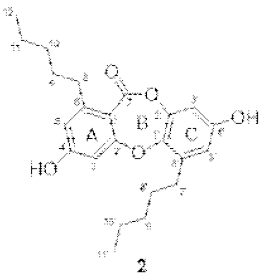
<확보된 항균활성을 가지는 화합물 정보>

항생물질 화합물 이름	구조	활성 측정	향후 계획
GA-22-AB-01		-	Activity optimization
grincamycin W 신규 화합물 (1)		MIC : 8μg/ml (*Bacillus subtilis*) MIC : 32μg/ml (*Staphylococcus aureus*) MIC : 64μg/ml (*Micrococcus luteus*)	생리활성 검색, Activity optimization
urdamycin X 신규 화합물 (2)		MIC : 64μg/ml (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*)	생리활성 검색, Activity optimization
grincamycin U 신규 화합물 (5)		MIC : 32μg/ml (*Bacillus subtilis*)	생리활성 검색, Activity optimization
streptopyrrole 계열의 신규 화합물 (11)		MIC: <0.25 ug/ml (*Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus*)	Activity optimization

KOPRI 극지연구소

streptopyrrole 계열의 신규 화합물 (12)	 12	MIC : 1μg/ml (*Bacillus subtilis*) MIC : <0.25 μg/ml (*Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus*)	Activity optimization
(9*R*,10*S*)-*cis*-methylenehexadecanoic acid (1)	 1	IC_{50}: <17.4 ug/ml (*Staphylococcus aureus*)	Modification
octadecanoic acid / methyl *cis*-9,10-methylene hexadecanoate (2)		≤0.98 ug/ml	Modification
남극 지의류 *Ramalina terebrata* 유래 화합물 (1)	 1	IC_{50}: 30 ug/ml (*Escherichia coli*)	Modification
남극 지의류 *Ramalina terebrata* 유래 화합물 (2)	 2	IC_{50}: 28 ug/ml (*Escherichia coli*)	Activity optimization
남극 지의류 *Ramalina terebrata* 유래 화합물 (3)	 3	IC_{50}: 18 ug/ml (*Escherichia coli*)	Activity optimization
남극 지의류 *Himantormia lugubris* 유래 화합물 (1)	 1	IC_{50}: 35 mM (*Staphylococcus aureus*)	Activity optimization

KOPRI 극지연구소

남극 지의류 *Himantormia lugubris* 유래 화합물 (2)	 2	IC_{50}: 7 mM (*Staphylococcus aureus*)	Activity optimization

※4차년도: 2023년 정성적 연구성과

1) 항생물질 생산 후보 미생물 스크리닝을 위하여 남극 킹조지섬 바톤반도 및 포터반도의 호수를 대상으로 미생물 순수분리 배양을 수행하였음. 그 결과 총 14종의 64 균주를 확보하였음. 바톤반도 호수에서는 총 12종의 56균주가 확인되었고, 포터반도 호수의 경우 2종 8 균주를 확보

2) 남극 스틱스 빙하 시료에서 확보한 총 145균주의 진균 배양체에 대하여 신규 항생물질 생산을 위한 균주 분리 후 보관

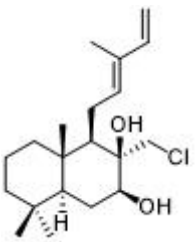
3) 해양 미생물이 생산하는 새로운 신규 화합물 6종 화합물 6종의 구조 규명 및 신규 항생물질 1종 활성 측정 완료

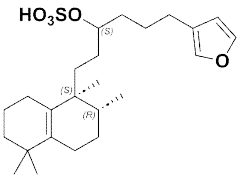
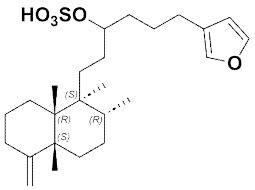
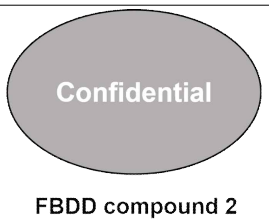
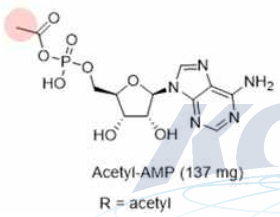
4) *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas gingivalis, Methylocapsa palsarum* 유래 항생물질 관련 단백질에 대한 생화학적 구조적 분석 완료하였으며, 이를 바탕으로 항생제 개발에 필요한 기초 자료 제공

5) 39개의 안트라퀴논(anthraquinone) 관련 Glucosyl transferase 변형 물질을 이용한 활성 스크리닝 결과 안트라퀴논 유도체 물질이 물질이 완화제, 항균제, 항염증제 효과 뿐만 아니라 위암, 간세포암, 췌장암에서 효과가 있는 것으로 조사되었음. (선문대)

6) 시퀀싱 기술이 발달하면서 박테리아, 곰팡이, 식물, 동물, 인간 등의 많은 유전자 데이터들이 저비용 및 효과적으로 분석이 가능함에 따라 현재 많은 데이터들이 축적되고 있음. 이러한 빅데이터를 이용한 타겟 효소-항생물질 관련 데이터베이스 구축과 알고리즘 개발완료 및 논문 발표. 바이오인포메틱스 기술을 이용한 항생물질 타겟 단백질을 1차적으로 분류하여 효과적인 후보물질을 찾는데 기여할 것으로 기대

<확보된 항균활성을 가지는 화합물 정보>

항생물질 화합물 이름	구조	활성 측정	향후 계획
Streptomyces griseorubens 신규 화합물 2	 2	MIC : 4μg/ml (*Bacillus subtilis*) MIC : 8 μg/ml (*Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus*)	Activity optimization

Halisulfate 유도체3		MIC (unit: μg/mL) : 6	Activity optimization
Halisulfate 유도체5		MIC (unit: μg/mL) : 16	Activity optimization
FBDD compound 2 (8192 μg/mL)		MIC (unit: ug/mL) : 4 *K.pneumoniae*[a]	Activity optimization
+ Acetyl-AMP (4096 μg/mL)		MIC (unit: ug/mL) : 8-16 for *K.pneumoniae*[a] 4 for *Enterococcus aerogenes*	Activity optimization

KOPRI 극지연구소

※5차년도: 2024년 정성적 연구성과

1) 용해도 평가 결과, 변형체 GA-AB-21-02, GA-AB-21-03, GA-AB-21-04, GA-AB-21-05, GA-20-AB-24, GA-20-AB-25, GA-20-AB-38은 높은 용해도를 확인. 실험 조건 최적화를 위한 적합한 항생제 변형체로 선정.

2) 세포 독성 테스트 결과, BT-549 인간 세포주를 대상으로 10μM 및 50μM 농도에서 테스트 실시. 24시간 및 48시간 동안 모든 변형체에서 세포 독성 관찰되지 않음. 항생물질 변형체는 안정성을 입증하며 추가 응용 가능성을 확인.

3) PgDUF2436은 치주질환 병원성 기전에 관여할 수 있는 중요한 구조적 특징을 가짐.

4) 독특한 β-jelly-roll 구조와 음전하 패치는 특정 상호작용 및 치료 표적 발굴에 기여할 수 있는 단서를 제공. 본 연구는 Porphyromonas gingivalis 병원성 메커니즘 이해 및 치료 전략 수립에 중요한 기초 데이터를 제공함.

2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

(1) 단계별 성과지표 및 달성치

성과지표명 \ 연차			20년	21년	22년	23년	24년	계
계량지표 (전담기관 등록 · 기탁지표) * 세부사항은 시행령 별표 4참조	논문(건) (SCI/SCIE/비SCI)		3/9/0	0/5/0	0/6/0	0/6/0	0/2/0	3/28/0
	특허 (건)	국내 (출원/등록)	2/0	0/0	0/1	0/2	0/0	2/3
		국외 (출원/등록)	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	보고서원문		연차보고서	연차보고서	연차보고서	연차보고서	연차보고서	연차보고서
	연구시설 · 장비		고속단백질 정제시스템					
	기술요약정보							
	생명자원 중 생명정보		2	2	2	2	0	8
	소프트웨어							
	표준 (국내/국외)		0/0	0/0				0/0
	생명자원 중 생물자원		1	1	1	1	0	4
	화합물							
	신품종							

(2) 연차별 성과지표 및 달성치

- **'연차별 성과지표 및 달성치'의 연구개발성과 달성도 확인은 '[별지 37] 정량적 성과목표 달성도'를 활용하여 필수 작성 및 별도 제출해야 함**

- **[별지 37] 정량적 성과목표 달성도 참조**

KOPRI 극지연구소

3) 성능지표 및 측정방법(해당시 작성)

(1) 결과물의 성능지표

평가 항목 (주요성능[1])	단위	전체 항목에서 차지하는 비중[2] (%)	세계 최고수준 보유국/보유기관	연구개발 전 국내 수준	연구개발 목표치		목표 설정 근거
			성능수준	성능수준	1단계(yy~yy)	n단계(yy~yy)	

* 1」 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.
* 2」 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

(2) 평가방법 및 평가환경

순번	평가항목 (성능지표)	평가방법	평가환경
1			
2			

※ 최종보고서 제출시 등록 및 기탁 증빙 제출

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율 (%)
1	Structural insights into the psychrophilic germinal protease PaGPR and its autoinhibitory loop	Journal of Microbiology (IF:3.3, JCR rate: 38.1)	이창우, 이세영, 박하중, 김혜연, 이준혁	58	대한민국	MICROBIOLOGICAL SOCIETY KOREA	SCIE	2020.09.01	1976-3794	25
2	Crystallization and Preliminary X-ray Diffraction Study of a Novel Bacterial Homologue of Mammalian Hormone-Sensitive Lipase (halip1) from Halocynthiibacter arcticus	Crystals (IF:2.4, JCR rate: 67.3)	전상은, 황지섭, 이준혁, 김두헌	10	스위스	MDPI	SCIE	2020.10.23	2073-4352	100
3	Complete genome sequence of Sphingobium sp. strain PAMC 28499 reveals a potential for degrading pectin with comparative genomics approach	Genes & Genomics (IF:0.6, JCR rate: 13.9)	한소라, 장성민, 박현, 오태진	42	미국	SPRINGER	SCIE	2020.09.01	1976-9571	100
4	Enhanced reduction of hexavalent chromium by hydrogen sulfide in frozen solution	SEPARATION AND PURIFICATION TECHNOLOGY (IF:8.2, JCR rate: 91.9)	Nguyen Quoc Anh, 김기태	1	네덜란드	ELSEVIER	SCIE	2020.07.13	1383-5866	50
5	Freezing-accelerated removal of chromate by biochar synthesized from waste rice husk	SEPARATION AND PURIFICATION TECHNOLOGY (IF:8.2, JCR rate: 91.9)	Han Tae Uk, 김기태	250	네덜란드	ELSEVIER	SCIE	2020.11.01	1383-5866	50
6	Freezing-Induced Simultaneous Reduction of Chromate and Production of Molecular Iodine: Mechanism, Kinetics, and Practical Implications	Environmental Science & Technology (IF:10.9, JCR rate: 92.0)	김기태, 김정원	54	미국	ACS	SCIE	2020.10.30	0013-936X	33.3
7	Characterization of CYP125A13, the first steroid C-27 monooxygenase from Streptomyces peucetius ATCC27952.	Journal of Microbiology and Biotechnology (IF:2.5, JCR rate: 41.7)	Rimal H, 이준혁, 오태진	30(11)	대한민국	KOREAN SOC MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY	SCIE	2020.11.28	1017-7825	50
8	Taking Advantage of Cold-Active Enzymes: Beyond the Low-Temperature Activity	Applied Sciences (IF:2.5,)	Sondavid Nandanwar 김학준	10,812 8	스위스	MDPI	SCI	2020.11.17	2076-3417	100
9	Structural and biochemical analyses of an aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase from Mycolicibacterium smegmatis	Scientific reports (IF:3.8, JCR rate: 81.7)	정창숙, 박현호, 이준혁	10, 21503	ENGLAND	NATURE PUBLISHING GROUP	SCIE	2020.12.09	2045-2322	100
10	Putative hexameric glycosyltransferase functional unit revealed by the crystal structure of Acinetobacter baumannii MurG	IUCrJ (IF: 5.401, JCR rate: 7.69)	Kyoung Ho Jung	8	United Kingdom	International Union of Crystallography	SCIE	21. 04. 07	2052-2525	50
11	Structural basis of the cooperative activation of type II citrate synthase (*Hy*CS) from *Hymenobacter*sp. PAMC 26554	Int J Biol Macromol. (IF: 5.162, JCR rate: 10.11)	Sun-Ha Park	183	Netherlands	Elsevier	SCIE	21. 04. 25	0141-8130	50
12	A computational approach to identify CRISPR-Cas loci in the complete genomes of the lichen-associated Burkholderia sp. PAMC28687 and PAMC26561	Genomics (IF: 6.205, JCR rate: 10.11)	Prasansah Shrestha	133(3)	Netherlands	Elsevier	SCIE	21. 01. 29	0888-7543	100
13	Whole genome survey and microsatellite motif identification of Artemia franciscana	Biosci Rep (IF: 2.942, JCR rate: 55.22)	Euna Jo	41(3)	United Kingdom	Portland Press, Ltd.	SCIE	21. 02. 25	0144-8463	50
14	Dimeric Coumarins Isolated from the Stems of Paramignya trimera.J7	J Nat Prod (IF: 3.782, JCR rate: 13.68)	Khong Trong Quan	84(2)	United States	American Chemical Society	SCIE	21. 01. 19	0163-3864	50
15	Tulipiferamide A, an Alkamide from *Liriodendron tulipifera*, Exhibits an Anti-Inflammatory Effect via Targeting IKKβ Phosphorylation	J Nat Prod (IF: 3.782, JCR rate: 13.68)	InWha Park	84(5)	United States	American Chemical Society	SCIE	21. 05. 03	0163-3864	50
16	Wide-open conformation of UDP-MurNc-tripeptide ligaserevealed by the substrate-free structure of MurE from *Acinetobacter baumannii*	Febs letters (IF: 3.057, JCR rate: 33.80)	Kyoung Ho Jung	595(2)	United States	Wiley-Blackwell	SCIE	20. 12. 03	0014-5793	50
17	Crystal structure of AmpC BER and molecular docking lead to the discovery of broad inhibition activities of halisulfates against β-lactamases	Computational and structural biotechnology journal (IF: 6.018, JCR rate: 14.48)	Bo-Gyeong Jeong	19	Sweden	Research Network of Computational and Structural Biotechnology	SCIE	20. 12. 17	2001-0370	33
18	Unprecedented Noncanonical Features of the Nonlinear Nonribosomal Peptide Synthetase Assembly Line for WS9326A Biosynthesis	Angew Chem Int Ed (IF: 12.959, JCR rate: 8.47)	Myoun-Su Kim, Munhyung Bae, Ye-Eun Jung	60(36)	United Kingdom	John Wiley and Sons Ltd	SCIE	21. 05. 07	1433-7851	20
19	Complete genome sequence of Pedobacter sp. PAMC26386 and their low temperature application in arabinose-containing polysaccharides degradation	Current Microbiology (IF: 1.746, JCR rate: 80.88)	Cya-Yong Cho	78(3)	United States	Springer New York	SCIE	21. 02. 26	0343-8651	100

20	Enzymatic characterization and comparison of two steroid hydroxylases CYP154C3-1 and CYP154C3-2 from *Streptomyces*species	Journal of Microbiology and Biotechnology (IF: 1.992, JCR rate: 67.95)	Pradeep Subedi	31(3)	South Korea	Korean Society for Microbiology and Biotechnology	SCIE	21. 01. 04	1738-8872	50
21	Complete genome sequence of Arthrobacter sp. PAMC25564 and its comparative genome analysis for elucidating the role of CAZymes in cold adaptation	BMC Genomics (IF: 3.594, JCR rate: 27.56)	So-Ra Han	22(1)	United Kingdom	BioMed Central Ltd.	SCIE	21. 06. 02	1471-2164	50
22	Gold Nanoparticle-Assisted SELEX as a Visual Monitoring Platform for the Development of Small Molecule-Binding DNA Aptasensors	Biosensors and Bioelectronics (IF: 10.257, JCR rate: 1.16)	Eun-Song Lee	191	United Kingdom	Elsevier Ltd.	SCIE	21. 06. 30	1873-4235	20
23	Crystal structure of an apo 7α-hydroxysteroid dehydrogenase reveals key structural changes induced by substrate and co-factor binding	The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology (IF: 3.813, JCR rate: 31.47)	Ki-Hwa Kim	212	United Kingdom	Elsevier Ltd.	SCIE	21. 06. 23	0960-0760	100
24	Characterization of high-H2O2-tolerant bacterial cytochrome P450 CYP105D18: insights into papaverine N-oxidation.	IUCrJ (IF: 5.401, JCR rate: 7.69)	Bashu Dev Pardhe	8(Pt 4)	United Kingdom	International Union of Crystallography	SCIE	21. 06. 29	2052-2525	100
25	Anti-Mycoplasma Activity of Bacilotetrins C-E, Cyclic Lipodepsipeptides from the Marine-Derived Bacillus subtilis and Structure Revision of Bacilotetrins A and B	Marine Drugs (IF: 4.073, JCR rate: 26.23)	Hwa-Sun Lee	19(10)	Switzerland	MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute	SCIE	21. 09. 22	1660-3397	50
26	Sex-Biased Gene Expression and Isoform Profile of Brine Shrimp Artemia franciscana by Transcriptome Analysis	Animals (IF: 2.323, JCR rate: 9.93)	Euna Jo	11(9)	Switzerland	MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute	SCIE	21. 09. 07	2076-2615	100
27	Crystal structure of a MarR family protein from the psychrophilic bacterium Paenisporosarcina sp. TG-14 in complex with a lipid-like molecule	IUCrJ (IF: 5.401, JCR rate: 7.69)	Jisub Hwang	8(Pt 5)	United Kingdom	International Union of Crystallography	SCIE	21. 09. 01	2052-2525	33
28	Isolation of Sesquiterpenoids and Steroids from the Soft Coral Sinularia brassica and Determination of their Absolute Configuration	Marine Drugs (IF: 4.073, JCR rate: 26.23)	Giang Nam Pham	19(9)	Switzerland	MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute	SCIE	21. 09. 17	1660-3397	100
29	Molecular basis of dimerization of lytic transglycosylase revealed by the crystal structure of MltA from Acinetobacter baumannii	IUCrJ (IF: 5.401, JCR rate: 7.69)	Hyunseok Jang	8(Pt 6)	United Kingdom	International Union of Crystallography	SCIE	21. 11. 01	2052-2525	25
30	Use of spent coffee ground as a reducing agent for enhanced reduction of chromate by freezing process	Journal of Industrial and Engineering Chemistry (IF: 5.278, JCR rate: 14.69)	Kitae Kim	100(1)	Netherlands	Elsevier	SCIE	21.08.25	1226-086X	50
31	Activation of peroxymonosulfate by bicarbonate and acceleration of the reaction by freezing	Science of Total Environment (IF: 6.551, JCR rate: 8.3)	Kitae Kim	785(1)	Netherlands	Elsevier	SCIE	21.09.01	0048-9697	50
32	Abiotic Stress-Induced Actin-Depolymerizing Factor 3 From Deschampsia antarctica Enhanced Cold Tolerance When Constitutively Expressed in Rice	Frontiers in Plant Science (IF: 4.402, JCR rate: 8.12)	Hyoungseok Lee	12(1)	Switzerland	FRONTIERS MEDIA SA	SCIE	21.09.28	1664-462X	50
33	Accelerated chromate reduction by tea waste: Comparison of chromate reduction properties between water and ice systems	Environmental Research (IF: 5.715, JCR rate: 7.77)	Kitae Kim	197(1)	Netherlands	Elsevier	SCIE	21.06.01	1096-0953	50
34	Freezing-induced activation of the binary chloride-Oxone system to free chlorine and its application in water treatment	Chemical Engineering Journal (IF: 10.652, JCR rate: 2.8)	Kitae Kim	428(1)	Netherlands	Elsevier	SCIE	22.01.15	1385-8947	50
35	Crystal structure of a novel putative sugar isomerase from the psychrophilic bacterium Paenibacillus sp. R4	Biochem Biophys Res Commun. (IF: 2.985, JCR rate 36.6)	Sunghark Kwon	585	USA	Elsevier	SCIE	21.11.11	0006-291X	50
36	Antibacterial Meroterpenoids, Merochlorins G-J from the Marine Bacterium Streptomyces sp	Marine Drugs (IF: 4.073, JCR rate: 26.23)	Min-Ji Ryu	19(11)	Switzerland	MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute	SCIE	21. 10. 30	1660-3397	33
37	7β-22 Dihydroxyhopane, Isolated from the Sub-Antarctic Lichen, Inhibits the Viability and Stemness in Glioma Stem Like Cells	ONCOTARGETS AND THERAPY (IF: 4.147, JCR rate: 33.3)	윤의중	15(1)	영국	DOVE MEDICAL PRESS LTD	SCIE	2022.11.15	1178-6930	100
38	Crystal Structure and Biochemical Analysis of a Cytochrome P450 CYP101D5 from Sphingomonas echinoides	INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES (IF: 5.924, JCR rate: 22.7)	오태진, 이준혁	23(21)	스위스	MDPI	SCIE	2022.11.01	1661-6596	100
39	Comparative structural insight into the unidirectional catalysis of ornithine carbamoyltransferases from Psychrobacter sp. PAMC 21119	PLOS ONE (IF: 3.24, JCR rate: 36.1)	이준혁	17(9)	미국	PUBLIC LIBRARY SCIENCE	SCIE	2022.09.23	1932-6203	50
40	Structural basis for the substrate specificity of an S-formylglutathione hydrolase derived from Variovorax sp. PAMC 28711	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS (IF: 3.575, JCR rate: 42.3)	이준혁	629(1)	미국	ACADEMIC PRESS INC ELSEVIER SCIENCE	SCIE	2022.11.12	0006-291X	50
41	Freezing-enhanced oxidation of iodide by hydrogen peroxide in the presence of antifreeze proteins from the Arctic yeast Leucosporidium sp.AY30	ENVIRONMENTAL RESEARCH (IF: 6.498, JCR rate: 7.88)	김기태	212(1)	네덜란드	ACADEMIC PRESS INC ELSEVIER SCIENCE	SCIE	2022.09.01	0013-9351	50
42	Bioactive Secondary Metabolites Isolated from the Antarctic Lichen Himantormia lugubris	CHEMISTRY & BIODIVERSITY (IF: 2.408, JCR rate: 61.8)	윤의중	19(10)	스위스	WILEY-V C H VERLAG GMBH	SCIE	2022.10.01	1612-1872	100

43	Investigating the Functional Role of the Cysteine Residue in Dehydrin from the Arctic Mouse-Ear Chickweed Cerastium arcticum	MOLECULES (IF: 4.412, JCR rate: 35.4)	김한우	27(9)	스위스	MDPI	SCIE	2022.05.04	1420-3049	50
44	Bioactive Terphenyls Isolated from the Antarctic Lichen Stereocaulon alpinum	MOLECULES (IF: 4.412, JCR rate: 35.4)	윤의중	27(7)	스위스	MDPI	SCIE	2022.04.06	1420-3049	50
45	Identification, Characterization, and Preliminary X-ray Diffraction Analysis of a Novel Esterase (ScEst) from Staphylococcus chromogenes	CRYSTALS (IF: 2.589, JCR rate: 36)	도학원	12(4)	스위스	MDPI	SCIE	2022.04.13	2073-4352	50
46	Inhibitory Effect of RANKL-Induced Osteoclast Differentiation and ROS Generation by Sphaerotylus antarcticus Extract	생약학회지	나민균	53(1)	대한민국	한국생약학회	비SCIE	2022.03.01	0253-3073	100
47	Production and Characterization of a Recombinant Cold-Active Acetyl Xylan Esterase from Psychrophilic Paenibacillus sp. R4 Strain	APPLIED BIOCHEMISTRY AND MICROBIOLOGY (IF: 0.886, JCR rate: 96.3)	한세종	58(4)	러시아	PLEIADES PUBLISHING INC	SCIE	2022.07.12	0003-6838	100
48	Importance of rigidity of ice-binding protein (FfIBP) for hyperthermal hysteresis activity and microbial survival	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES (IF: 6.953, JCR rate: 6.67)	이준혁	204(1)	네덜란드	ELSEVIER	SCIE	2022.04.15	0141-8130	33
49	Sequence Analysis and Preliminary X-ray Crystallographic Analysis of an Acetylesterase (LgEstI) from Lactococcus garvieae	CRYSTALS (IF: 2.589, JCR rate: 36)	이준혁	12(1)	스위스	MDPI	SCIE	2022.04.15	2073-4352	50
50	Engineering of a bacterial outer membrane vesicle to a nano-scale reactor for the biodegradation of β-lactam antibiotics	Journal of Biotechnology (IF: 3.49, JCR rate: 47.2)	우지민, 김명연, 송지원 (교신저자:차선신, 박진병)	356(1)	네덜란드	ELSEVIER	SCIE	2022.09.10	0168-1656	50
51	Structural and functional identification of uncharacterized metallo-β-lactamase superfamily protein TW9814 as a phosphodiesterase with unique metal coordination	Acta Crystallographica Section D-Structural Biology (IF: 5.15, JCR rate: 3.85)	허윤석 (교신저자: 차선신; 이원태)	78(4)	영국	INT UNION CRYSTALLOGRAPHY (IUCr)	SCIE	2022.02.22	2059-7983	33
52	Actinopolymorphols E and F, pyrazine alkaloids from a marine sediment-derived bacterium Streptomyces sp	The Journal of Antibiotics (IF: 3.33, JCR rate: 49.1)	김소희 (교신저자: 남상집, William Fenical)	75(11)	일본	Nature Publishing Group (NPG)	SCIE	2022.08.30	0021-8820	33
53	Saccharobisindole, Neoasterric Methyl Ester, and 7-Chloro-4(1H)-quinolone: Three New Compounds Isolated from the Marine Bacterium Saccharomonospora sp.	marine drugs (IF: 4.762, JCR rate: 15.9)	김소희, Tu Cam Le, 한상아 (교신저자: 남상집, 이지혜, William Fenical)	20(1)	스위스	MDPI	SCIE	2021.12.29	1660-3397	33
54	Antibacterial Meroterpenoids, Merochlorins G-J from the Marine Bacterium Streptomyces sp.	marine drugs (IF: 4.762, JCR rate: 15.9)	류민지 (교신저자: 남상집, William Fenical)	19(11)	스위스	MDPI	SCIE	2021.10.30	1660-3397	33
55	New Angucycline Glycosides from a Marine-Derived Bacterium Streptomyces ardesiacus	International Journal of Molecular Sciences (IF: 6.208, JCR rate: 21.549)	Anh, Cao Van 신희재	23(22)	스위스	MDPI	SCIE	2022.11.03	1422-0067	50
56	Aspersterols A-D, Ergostane-Type Sterols with an Unusual Unsaturated Side Chain from the Deep-Sea-Derived Fungus Aspergillus unguis	Journal of Natural Products (IF: 4.803, JCR rate: 18.410)	Anh, Cao Van 신희재	85(9)	미국	ACS	SCIE	2022.08.30	1520-6025	50
57	New Glycosylated Secondary Metabolites from Marine-Derived Bacteria	Marine Drugs (IF: 6.085, JCR rate: 14.286)	Anh, Cao Van 신희재	20(7)	스위스	MDPI	SCIE	2022.07.18	1660-3397	50
58	Nitrogen-Containing Secondary Metabolites from a Deep-Sea Fungus Aspergillus unguis and Their Anti-Inflammatory Activity	Marine Drugs (IF: 6.085, JCR rate: 14.286)	Anh, Cao Van 신희재	20(3)	스위스	MDPI	SCIE	2022.03.19	1660-3397	33
59	Antibacterial and Cytotoxic Phenolic Polyketides from Two Marine-Derived Fungal Strains of Aspergillus unguis	Pharmaceuticals (IF: 5.215, JCR rate: 18.996)	Anh, Cao Van 신희재	15(1)	스위스	MDPI	SCIE	2022.01.04	1424-8247	33
60	Prediction of trehalose-metabolic pathway and comparative analysis of KEGG, MetaCyc, and RAST databases based on complete genome of Variovorax sp. PAMC28711	BMC Genomic Data (IF: 2.759)	오태진	23(4)	영국	BodMed Central	SCIE	2022.01.06	2730-6844	100
61	Complete Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of Variovorax sp. Strains PAMC28711, PAMC26660, and PAMC28562 and Trehalose Metabolic Pathways in Antarctica Isolates	International Journal of Microbiology (IF: 3.75, SJR rate: 0.625)	오태진	2022	이집트	Hindawi	SCIE	2022.11.09	1687-9198	100
62	In silico analysis and a comparative genomics approach to predict pathogenic trehalase genes in the complete genome of Antarctica Shigella sp. PAMC28760	Virulence (IF:5.428, JCR rate: 5.428)	오태진	13(1)	영국	Taylor&Francis online	SCIE	2022.08.30	2150-5594	100

KOPRI 극지연구소

63	Complete Genome Sequencing of Polar Arthrobacter sp. PAMC25284, Copper Tolerance Potential Unraveled with Genomic Analysis	International Journal of Microbiology (IF: 3.75, SJR rate: 0.625)	오태진	2022	이집트	Hindawi	SCIE	2022.08.25	1687-9198	100
64	Comparative genome analysis among Variovorax species and genome guided aromatic compound degradation analysis emphasizing 4-hydroxybenzoate degradation in Variovorax sp. PAMC26660	BMC genomics (IF: 4.26 SJR rate: 1.258)	오태진	23(1)	영국	BodMed Central	SCIE	2022.05.18	1471-2164	100
65	Comparative analysis of genome-based CAZyme cassette in Antarctic Microbacterium sp. PAMC28756 with 31 other Microbacterium species	Genes and Genomics (IF: , JCR rate: 2.164)	오태진	44	한국	Springer	SCIE	2022.04.29	2092-9293	100
66	Changes and Implications of the Russian-Arctic Zone by Period	EU연구	서현교	1(62)	한국	EU연구소	비SCIE	2022.05.23	1738-2319	50
67	Characterization of the Gut Microbiota of Mackerel Icefish, Champsocephalus gunnari	Fishes	송호경, 김진형	8(13)	스위스	MDPI	SCIE	2022.12.26	2410-3888	50
68	Feruloyl Esterase (LaFae) from Lactobacillus acidophilus: Structural Insights and Functional Characterization for Application in Ferulic Acid Production	International Journal of Molecular Sciences (IF:5.6, mrnIF rate:77.0%)	전상근, 황지섭	13	스위스	MDPI	SCIE	2023.07.24	1422-0067	50
69	Structural and Biochemical Insights into Bis(2-hydroxyethyl) Terephthalate Degrading Carboxylesterase Isolated from Psychrotrophic Bacterium Exiguobacterium antarcticum	International Journal of Molecular Sciences (IF:5.6, mrnIF rate:77.0%)	황지섭, 유완기	24	스위스	MDPI	SCIE	2023.07.27	1422-0067	50
70	Heterologous protein production using Psychrobacter sp. PAMC 21119 analyzed with a green fluorescent protein-based reporter system	Protein Expression and Purification (IF:1.6, mrnIF rate:14.2%)	이민주	22	네델란드	ELSEVIER	SCIE	2023.08.16	1096-0279	33.3
71	Crystal Structure of Aspartate Semialdehyde Dehydrogenase from Porphyromonas gingivalis	Crystals (IF:2.7, mrnIF rate:67.3%)	황지섭, 도학원	13	스위스	MDPI	SCIE	2023.08.18	1422-0067	100
72	Crystal Structure and Sequence Analysis of N5, N10-Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase/Cyclohydrolase Enzyme from Porphyromonas gingivalis	Crystals (IF:2.7, mrnIF rate:67.3%)	임세혁, 도학원	13	스위스	MDPI	SCIE	2023.10.13	1422-0067	100
73	Biochemical and structural basis of mercuric reductase, GbsMerA, from Gelidibacter salicanalis PAMC21136	Scientific Reports (IF:4.6, mrnIF rate:70.5%)	Bashu Dev Pardhe,이민주	13:17854	영국	Nature Portfolio	SCIE	2023.10.19	2045-2322	100
74	Structural basis of IRGB10 oligomerization by GTPhydrolysis	Frontiers in Immunology (IF:7.3, mrnIF rate:78.6%)	Hyun Ji Ha	14	스위스	FRONTIERS	SCIE	2023.11.02	1664-3224	20
75	Structural immunology of molecular innate immunity	Frontiers in Immunology (IF:7.3, mrnIF rate:78.6%)	Jun Hyuck Lee	14	스위스	FRONTIERS	SCIE	2023.09.01	1664-3224	20
76	Complete mitochondrial genome of *Trematomus newnesi* (Perciformes, Nototheniidae)	Mitochondrial DNA Part B (IF:0.5, mrnIF rate:1.5%)	Nguyen, Phuong Thi & Lee, Seungyeon	8	영국	Taylor & Francis	SCIE	2023.11.02	2380-2359	50
77	Structural and functional characterization of a thermostable secretory phospholipase A2 from Sciscionella marina and its application for liposome biotransformation	Acta Crystallographica Section D (IF:2.2, mrnIF rate:59.6%)	강부경, 권승연	D79	England	INT UNION CRYSTALLOGRAPHY	SCIE	2023.02.01	2059-7983	20
78	Targeting BAP1 with small compound inhibitor for colon cancer treatment	Scientific Reports (IF:4.6, mrnIF rate:70.5%)	강민화	13	England	NATURE PORTFOLIO	SCIE	2023.02.08	2045-2322	20
79	An archaeal transcription factor EnfR with a novel 'eighth note' fold controls hydrogen production of a hyperthermophilic archaeon Thermococcus onnurineus NA1	Nucleic Acids Research (IF:14.9, mrnIF rate:96.7%)	배다운, 이성혁	51	England	OXFORD UNIV PRESS	SCIE	2023.08.31	0305-1048	12.5
80	Integrated continuous-flow/batch protocol for ortho-selective alkynylation of (hetero)aryl tosylates	Bulletin of the Korean Chemical Society (IF:1.7, mrnIF rate:27.8%)	주은혜	44	South korea	WILEY-V C H VERLAG GMBH	SCIE	2023.05.16	0253-2964	20
81	Crystal Structure and Biochemical Analysis of a Cytochrome P450 Steroid Hydroxylase (BaCYP106A6) from Bacillus Species	Journal of Microbiology and Biotechnology (IF:2.8, JCR rate:62.66%)	김기화, 도학원	33(3)	Korea, Republic of	JMB	SCIE	23.03.28	1738-8872	100
82	Complete genome of Nakamurella sp. PAMC28650: genomic insights into its environmental adaptation and biotechnological potential	Functional & Integrative Genomics (IF:2.9, JCR rate:53.22%)	Lakshan Paudel	18(2023)	Germany	Springer	SCIE	22.12.23	1438-7948	100
83	Complete Genome Analysis of Subtercola sp. PAMC28395: Genomic Insights into Its Potential Role for Cold Adaptation and Biotechnological Applications	Microorganisms (IF:4.5, JCR rate:34.81%)	Ryoichi Yamada, So-Ra Han	11(6)	Switzerland	MDPI	SCIE	23.06.01	2076-2607	100
84	Comparative Genomic Analysis of Biofilm-Forming Polar Microbacterium sp. Strains PAMC22086 and PAMC21962 Isolated from Extreme Habitats	Microorganisms (IF:4.5, JCR rate:34.81%)	김별이, Saru Gurung	11(7)	Switzerland	MDPI	SCIE	23.07.05	2076-2607	100
85	Identification and evaluation of CAZyme genes, along with functional characterization of a new GH46 chitosanase from Streptomyces sp. KCCM12257	International Journal of Biological Macromolecules (IF:8.2, JCR rate:12.28%)	Lakshan Paudel	127457	Netherlands	SienceDirect	SCIE	23.10.17	1879-0003	100

KOPRI 극지연구소

86	Elucidation of bacterial trehalose-degrading trehalase and trehalose phosphorylase: physiological significance and its potential applications	Glycobiology (IF:4.3, JCR rate:37.89%)	Prasansah Shrestha, Jayram Karmacharya	cwad084	United Kingdom	OXPORD ACADEMIC	SCIE	23.10.17	0959-6658	100
87	Elucidation of cold adaptation in Glaciimonas sp. PAMC28666 with special focus on trehalose biosynthesis	Frontiers in Microbiology (IF:5.2, JCR rate:28.15%)	Prasansah Shrestha, Jayram Karmacharya	14	United States	Frontiers	SCIE	23.10.18	1664-302X	100
88	Biochemical and structural basis of mercuric reductase, GbsMerA, from Gelidibacter salicanalis PAMC21136	Scientific Reports (IF:4.6, JCR rate:30.14%)	Bashu Dev Pardhe	13	United States	Springer Nature	SCIE	23.10.19	2045-2322	100
89	H2O2-Driven Hydroxylation of Steroids Catalyzed by Cytochrome P450 CYP105D18: Exploration of the Substrate Access Channel	Applied and Environmental Microbiology (IF:4.4, JCR rate:29.75%)	Bashu Dev Pardhe	Vol. 89, No. 11	United States	ASM Journals	SCIE	23.10.27	0099-2240	100
90	Evidential deep learning for trustworthy prediction of enzyme commission number	Briefings in Bioinformatics (IF:9.5, JCR rate:3.61%)	So-Ra Han	25	United Kingdom	OXPORD ACADEMIC	SCIE	23.11.22	1477-4054	100
91	Rifamycin-Related Polyketides from a Marine-Derived Bacterium *Salinispora arenicola* and Their Cytotoxic Activity	Marine Drugs (IF: 5.4, mrnIF: 82.2)	Anh, Cao Van	21(9)	스위스	MDPI	SCIE	2022.09.15	1660-3397	50
92	Sesquiterpenes from Streptomyces qinglanensis and Their Cytotoxic Activity	Marine Drugs (IF: 5.4, mrnIF: 82.2)	Anh, Cao Van	21(6)	스위스	MDPI	SCIE	2022.06.16	1660-3397	50
93	Pyrrole-Containing Alkaloids from a Marine-Derived Actinobacterium *Streptomyces zhaozhouensis* and Their Antimicrobial and Cytotoxic Activities	Marine Drugs (IF: 5.4, mrnIF: 82.2)	Chang Su, Heo	21(3)	스위스	MDPI	SCIE	2023.03.06	1660-3397	50
94	Structural and biochemical insights into PsEst3, a new GHSR-type esterase obtained from Paenibacillus sp. R4	IUCrJ (IF: 3.9, mrnIF: 86.5)	Jonghyeon Son, Woong Choi, Hyun Kim, Minseo Kim, Jun Hyuck Lee, Seung Chul Shin and Han-Woo Kim	10	England	International Union of Crystallography	SCIE	2023.02.20.	2052-2525	50
95	Analysis of critical residues for peroxygenation and improved peroxygenase activity via in situ H2O2 generation in CYP105D18	Frontiers in Microbiology (IF: 4.0, mrnIF: 72.2)	Bashu Dev Pardhe, Tae-Jin Oh	14	SWITZERLAND	FRONTIERS MEDIA SA	SCIE	2023.12.11	1664-302X	100
96	Assessmentofthecystwallandsurfacemicrobiotain dormantembryosoftheAntarcticcalanoidcopepod, Boeckellapoppei	Environmental Microbiology Reports (IF: 3.6, mrnIF: 61.0)	HunterB.Arrington, JosephA.Covi	16	ENGLAND	WILEY	SCIE	2024.10.16	1758-2229	33.3
97	Exploring the mechanisms underlying recovery from freeze-thaw injury in Colobanthus quitensis: mechanistic insights via transcriptome profiling	Physiologia Plantarum (IF: 5.4, mrnIF: 90.0)	Kyungwon Min, Hyoungseok Lee	176	DENMARK	WILEY	SCIE	2024.11.12	0031-9317	50
98	High-quality chromosome-level genome assembly of female Artemia franciscana reveals sex chromosome and Hox gene organization	Heliyon (IF: 4.0, mrnIF: 72.2)	Euna Jo, Jun Hyuck Lee, Hyun Park	10	ENGLAND	CELL PRESS	SCIE	2024.09.28	2405-8440	100
100	Functional characterization and unraveling the structural determinants of novel steroid hydroxylase CYP154C7 from Streptomyces sp. PAMC26508	Heliyon (IF: 4.0, mrnIF: 72.2)	Prakash Paudel, Tae-Jin Oh	10	ENGLAND	CELL PRESS	SCIE	2024.10.23	2053-230X	100
101	A structure-based mechanism of adenosylcobinamide kinase/adenosylcobinamide phosphate guanylyltransferase (MpaCobU) from Methylocapsa palsarum	International Journal of Biological Macromolecules (IF: 7.7, mrnIF: 89.3)	Yewon Nam, Jun Hyuck Lee, Hackwon Do	280,136021	NETHERLANDS	ELSEVIER	SCIE	2024.09.24	0141-8130	33.3
102	Structural insights into the distinct substrate preferences of two bacterial epoxide hydrolases	International Journal of Biological Macromolecules (IF: 7.7, mrnIF: 89.3)	Jisub Hwang, Min Ju Lee, Jun Hyuck Lee, Hackwon Do	264,130419	NETHERLANDS	ELSEVIER	SCIE	2024.02.27	0141-8130	50
103	Characterization of the extended substrate spectrum of the class A β-lactamase CESS-1 from Stenotrophomonas sp. and structure-based investigation into its substrate preference	International Journal of Antimicrobial Agents (IF: 4.0, mrnIF: 72.2)	Bo-Gyeong Jeong, Jun Hyuck Lee, Sun-Shin Cha	63(6)	NETHERLANDS	ELSEVIER	SCIE	2024.04.03	0924-8579	50
104	Structural and functional characterization of sulfurtransferase from Frondihabitans sp. PAMC28461	Plos One (IF: 2.9, mrnIF: 76.)	HackwonDo, DieuLinhNguyen, JunHyuckLee	0298999	USA	PUBLIC LIBRARY SCIENCE	SCIE	2024.03.25	1932-6203	100
105	Engineered ice-binding protein (FfIBP) shows increased stability and resistance to thermal and chemical denaturation compared to the wildtype	Scientific Reports (IF: 4.0, mrnIF: 72.2)	Yewon Nam, Jun Hyuck Lee, Hackwon Do	14:3234	ENGLISH	NATURE PORTFOLIO	SCIE	2024.02.08	2045-2322	50
106	Oral Pathogens and Their Antibiotics from Marine Organisms: A Systematic Review of New Drugs for Novel Drug Targets	Journal of Dental Hygiene Science	Sehyeok Im, Jun Hyuck Lee, Youn-Soo Shim	24	Korea	The Korean Society of Dental Hygiene Science	한국연구재단 등재지	2024.06.05	2233-7679	100
107	Structural insights into the role of NahX from Pseudomonas sp. MC1 in the naphthalene degradation pathway	Biochemical and Biophysical Research Communications(IF: 2.5, mrnIF: 31.2)	Jonghyeon Son, Ae Kyung Park, Han-Woo Kim	742	USA	ACADEMIC PRESS INC ELSEVIER SCIENCE	SCIE	2024.12.07	0006-291X	50

108	Detoxification of arsenite by iodide in frozen solution	Chemosphere (IF: 8.1, mrnIF: 91.2)	Quoc Anh Nguyen, Bomi Kim, Hyun Young Chung, Yong-Yoon Ahn, Kitae Kim	340	ENGLAND	PERGAMON-ELSEVIER SCIENCE LTD	SCIE	2023.08.22	1879-1298	50
109	Catalytic behavior of nitrous acid for acetaminophen transformation during the freezing process	Journal of Hazardous Materials (IF: 12.2, mrnIF: 96.3)	Yong-Yoon Ahn, Jungwon Kim, Kitae Kim	456	NETHERLANDS	ELSEVIER	SCIE	2023.05.22	0304-3894	50
110	Frozen Clay Minerals as a Potential Source of Bioavailable Iron and Magnetite	Environmental Science and Technology (IF: 10.9, mrnIF: 93.6)	Hyun Young Chung, Jaewoo Jung, Kiho Yang, Jungwon Kim, Kitae Kim	57	USA	AMER CHEMICAL SOC	SCIE	2023.11.07	0013-936X	33.3
111	Freezing-enhanced degradation of azo dyes in the chloride-peroxymonosulfate system	Chemosphere (IF: 8.1, mrnIF: 91.2)	Yong-Yoon Ahn, Jungwon Kim, Junho Jeon, Kitae Kim	359	ENGLAND	PERGAMON-ELSEVIER SCIENCE LTD	SCIE	2024.05.05	1879-1298	50
112	Integrating LC-MS/MS and In Silico Methods to Uncover Bioactive Compounds with Lipase Inhibitory Potential in the Antarctic Moss Warnstorfia fontinaliopsis	APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY IF: 3.1, mrnIF: 49.9)	Hirotake Yamaguchi, Ryoichi Yamada, Kristina Lama, Ui Joung Youn, Jun Hyuck Lee, Tae-Jin Oh	05139-3	USA	SPRINGER	SCIE	2025.01.10	0273-2289	50
113	Exploiting CotA laccase from Antarctic Bacillus sp. PAMC28748 for efficient mediator-assisted dye decolorization and ABTS regeneration	Chemosphere (IF: 8.1, mrnIF: 91.2)	Jayram Karmacharya, Prasansah Shrestha, So-Ra Han, Jun Hyuck Lee, Tae-Jin Oh	372	ENGLAND	PERGAMON-ELSEVIER SCIENCE LTD	SCIE	2025.01.22	1879-1298	100
114	Unraveling nitrogen metabolism, cold and stress adaptation in polar Bosea sp. PAMC26642 through comparative genome analysis	Frontiers in Microbiology (IF: 4.0, mrnIF: 67.4)	Anamika Khanal, So-Ra Han, Jun Hyuck Lee, Tae-Jin Oh	15	SWITZERLAND	FRONTIERS MEDIA SA	SCIE	2025.01.24	1664-302X	100

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2021 한국미생물학회 정기 학술대회	도학원	2021.08.24	창원 컨벤션 센터	한국
2	2021한국단백질학회&한국생물물리학회 공동 심포지엄	도학원	2021.10.22	한국생명공학원	한국
3	2021 한국해양생명과학회	황지섭	2021.11.10	성균관대학교	한국
4	2021 한국미생물학회 정기 학술대회	차선신	2021.08.24	창원 컨벤션 센터	한국
5	2021 한국결정학회 정기학술대회	차선신	2021.11.05	신라스테이 천안	한국
6	2022 한국단백질학회 워크샵	이준혁	2022.07.12	한국해양과학기술원(KIOST) 제주연구소	한국
7	2022 한국해양생명과학회 학술대회	도학원	2022.10.21	여수 유탑 마리나 호텔	한국
8	2022 한국미생물 생명공학회 학술대회	도학원	2022.06.21	HICO 경주	한국
9	2022 한국단백질학회 워크샵	차선신	2022.07.12	한국해양과학기술원(KIOST) 제주연구소	한국
10	2022 한국단백질학회 워크샵	정보경	2022.07.12	한국해양과학기술원(KIOST) 제주연구소	한국
11	2022 한국단백질학회 워크샵	정예은	2022.07.12	한국해양과학기술원(KIOST) 제주연구소	한국
12	ASCA 2022	손세영,정예은	2022.10.30	제주 라마다 프라자 호텔	한국
13	ASCA 2022	정예은	2022.10.31	제주 라마다 프라자 호텔	한국
14	FKSBS 2022	손세영	2022.11.04	제주 라마다 프라자 호텔	한국
15	제34차 방사광이용자 연구발표회(협회정기총회)	차선신	2022.11.17	포항 포스코국제관	한국
16	2022 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (PSK)	허창수	2022.10.20	제주	한국
17	2022 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (PSK)	Anh, Cao Van	2022.10.20	제주	한국

KOPRI 극지연구소

18	2022 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (PSK)	이화선	2022.10.20	제주	한국
19	2022 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (PSK)	이민아	2022.10.20	제주	한국
20	13th International Congress on Extremophiles 2022	신희재	2022.09.21	루트라키	그리스
21	Drug Discovery and Therapeutics Conference	차선신	2023. 02. 6-8	Abu Dhabi NYUAD campus	Abu Dhabi
22	난치성 질환-질환 커뮤니케이션 융합클러스터 심포지움 및 워크샵	차선신	2023.02.16	한국뇌연구원 연구동B 중강당	한국
23	2023 MSK 생리생화학 심포지움: Advances in Microbial Physiology and Biochemical Research	차선신	2023.08.17-18	부산대학교 첨단과학관 205호	한국
24	제35회 방사광이용자협회 발표회	차선신	2023.11.22.-23	포항공대 국제관	한국
25	2023년도 한국분자·세포생물학회 제34회 동계학술대회	강부경, 배다운, 정예은, 정예은	2023. 02.22-24	평창 알펜시아 리조트	한국
26	2023 한국단백질학회 - 한국생물물리학회 연합학회	강부경, 김명연	2023. 06.21-23	부산 광안리 호메르스 호텔오딧세이 홀	한국
27	26th Congress and general assembly of the international union of crystallography (IUCr) 2023	강부경, 배다운, 정보경, 정예은	2023. 08.22-29	Melbourne Convention and Exhibition Centre (MCEC)	호주
28	MSK2023 한국미생물학회 국제학술대회	강부경, 김명연	2023.10.25-27	여수 엑스포 컨벤션 센터	한국
29	제35회 방사광이용자협회 발표회	김명연, 윤소연, 정연주	2023.11.22-23	포항공대 국제관	한국
30	The 19TH KSMB ANNUAL MEETING & SYMPOSIUM 2023	허창수	2023.11.09	부산	한국
31	2024(사)한국유산균/프로바이오틱스학회 춘계 심포지엄	도학원	2024.05.24	서울 건국대학교 새천년관	한국
32	AMSM2024 국제 학술대회	도학원	2024.10.28	인천 컨벤션센터	한국

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

KOPRI 극지연구소

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	Streptomyces sp.	PAMC 29639	극지연구소 PAMC	2024
2	Streptomyces sp.	PAMC 29637	극지연구소 PAMC	2024
3	Sphingobium sp.	PAMC 28499	극지연구소 PAMC	2024
4	Hymenobacter sp.	PAMC 26628	극지연구소 PAMC	2024
5	Hymenobacter sp.	PAMC 26654	극지연구소 PAMC	2024
6	Streptacidiphilus sp.	PAMC 29251	극지연구소 PAMC	2024

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	CYP154C-1 효소의 단백질 결정화 방법 및 이를 이용한 스테로이드의 히드록시화 생물전환 방법	대한민국	선문대학교 산학협력단	2019.08.22	10-2019-0103148	10-2302692	선문대학교 산학협력단	2021.09.09	10-2302692	100	
2	CYP154C-2 효소의 단백질 결정화 방법 및 이를 이용한 스테로이드의 히드록시화 생물전환 방법	대한민국	선문대학교 산학협력단	2019.08.22	10-2019-0103149	10-2302693	선문대학교 산학협력단	2021.09.09	10-2302693	100	
3	남극 메켈 빙어 추출물 또는 남극 대리석무늬 암치 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름개선용 화장료 조성물	대한민국	한국해양과학기술원(1-2012-034461-6) 외 1명	2021.07.12	10-2021-0091068					20	
4	남극 메켈 빙어 추출물 또는 남극 대리석무늬 암치 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물	대한민국	한국해양과학기술원(1-2012-034461-6)	2021.08.04	10-2021-0102714					20	
5	미생물 유래 글루코실트랜스퍼라제 및 이를 이용한 스테로이드 글리코사이드의 합성방법	대한민국	선문대학교 산학협력단	2019.11.13	10-2019-0145147	10-2333190	선문대학교 산학협력단	2021.11.25	10-2333190	100	
6	CYP125A13 효소를 이용한 스테로이드의 히드록시화 생물전환 방법	대한민국	선문대학교 산학협력단	2021.09.07	10-2021-0119086					50	
7	CYP105D18 효소를 이용한 이소퀴놀린 알칼로이드 화합물의 N-산화 생물전환 방법	대한민국	선문대학교 산학협력단	2021.09.13	10-2021-0121745					100	
8	7α-히드록시스테로이드 탈수소 효소를 이용한 스테로이드의 탈수소화 생물전환 방법	대한민국	선문대학교 산학협력단	2021.09.07	10-2021-0119088					100	
9	남극 검은지느러미 빙어 추출물 또는 남극 에메랄드 암치 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염증용 조성물	대한민국	한국해양과학기술원	2022.09.21	10-2022-0119437					20%	
10	Psychrobacter sp. PAMC 21119 유래 Ps_cOTC 및 Ps_aOTC 효소 및 이의 용도	대한민국	한국해양과학기술원	2022.11.04	10-2022-0145788					50%	
11	신규 화합물 및 이를 포함하는 항균용 조성물	대한민국	신희재	2022.08.12	10-2022-0101541					50%	
12	세스터터핀 화합물 또는 그의 유도체를 포함하는 베타-락타메이즈 저해용 조성물 및 이의 용도	대한민국	이화여자대학교 산학협력단	2020.06.05	10-2020-0068238	10-2483249	이화여자대학교 산학협력단	2022.12.27	10-2483249	25%	

13	남극 메켈 빙어 추출물 또는 남극 대리석무늬 암치 추출물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물	대한민국	한국해양과학기술원	2021.08.04	10-2021-0102714	10-2545792	한국해양과학기술원	2023.06.15	10-2545792	20	
14	남극 메켈 빙어 추출물 또는 남극 대리석무늬 암치 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름개선용 화장료 조성물	대한민국	한국해양과학기술원	2021.07.12	10-2021-0091068	10-2577747	한국해양과학기술원	2023.09.07	10-2577747	20	
15	스핑고모나스 에키노이데스 유래 신규 사이트크롬 P450 효소	대한민국	선문대학교 산학협력단	2022.12.21	10-2022-0180769					50	
16	사이토크롬 P450 또는 이의 변이체 및 이의 용도	대한민국	선문대학교 산학협력단	2022.12.21	10-2022-0180770					50	
17	BaCYP106A6 효소의 단백질 결정화 방법 및 이를 이용한 스테로이드의 히드록시화 생물전환 방법	대한민국	선문대학교 산학협력단	2023.01.11	10-2023-0004244					50	
18	신규 화합물 및 이를 포함하는 항균용 조성물	미국	한국해양과학기술원	2023.08.11	18/448,611					50	

ㅇ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

□ 신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

□ 기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

□ 표준화

ㅇ 국내표준

번호	인증구분[1]	인증여부[2]	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류[3]	제안/인증일자

* 1」 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
* 2」 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
* 3」 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

ㅇ 국제표준

번호	표준화단계구분[1]」	표준명	표준기구명[2]」	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식[3]」	제안자	표준화 번호	제안일자

* 1」 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
* 2」 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
* 3」 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	전용실시권	(1) 극지효모 유래 결빙방지단백질의 대량 생산방법, (2) 플라보박테리움 프리고리스 유래 결빙방지 단백질 활용 기술	㈜휴젝스	2022. 06. 13.	선급기술료: 오천만원, 경상기술료: 관련 기술 총 매출액의 3%	
2	지분 양도	세스터터핀 화합물 또는 그의 유도체를 포함하는 베타-락타메이즈 저해용 조성물 및 이의 용도	㈜ 토드제약	2022. 12.	선급기술료: 삼천만원, 마일스톤기술료: 칠억 칠천만원	

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식[1]」	사업화 형태[2]」	지역[3]」	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

* 1」 기술이전 또는 자기실시
* 2」 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
* 3」 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

KOPRI 극지연구소

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)		현재까지	3년 후	5년 후
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
		국외			
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)		현재	3년 후	5년 후
	수출				

KOPRI 극지연구소

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			yyyy년	yyyy년	
합계					

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	
		생산인력	
	개발 후	연구인력	
		생산인력	

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

KOPRI 극지연구소

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구 분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	(이대, 김명연) (선문대, Bashu Dev Pardhe)	2023	1				1	1	1	1			
2	(이대, 정보경),(UST,Linh) (선문대, 김기화)	2024	3					3	1	2			
3	(UST, 황지섭)	2025	1				1			1			
4													
5													

KOPRI 극지연구소

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	신문	조선Biz	“슈퍼 박테리아 정복, 해답은 남·북극에”… 세계 최초·유일 ‘극지 항생제 연구’	2020.11.19
2	신문	연합뉴스	추위에 가장 강한 생물은…극지연, '얼음결합 단백질' 특성 규명	2022.03.03
3	신문	뉴시스	극지硏, 결빙방지 단백질 기술 민간 이전…기능성 화장품 개발	2022.06.15
4	신문	동아사이언스/뉴시스	남극 미생물에서 '항생제 무력화하는 효소' 발견	2024.06.14
5	신문	시사위크	항생제 안드는 이유, 남극 미생물서 찾아냈다	2024.06.14

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

KOPRI 극지연구소

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/연구장비명	규격(모델명)	개발여부(○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자(YY.MM.DD)	구축비용(천원)	비고(설치 장소)
이화여자대학교	형광 플레이트 리더기 (Fluorescence Microplate reader)	BMG Labtech / CLARIOstar	X	ZEUS 등록	NFEC-2022-10-281950	22.10.13	59,950	서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동) 11-1번지 이화여자대학교 종합과학관 D동 지상 2층 206호(신약표적 단백질 연구실)
해양과학기술원	진공펌프	V-600/I-300	X	X	X	2020-02.15 ~05.15	13,805	해양과학기술원 1316호
해양과학기술원	질량 분석용 이온 검출기	ISQEM-LC	X	X	X	2021-04 ~ 2021-05	29,000	한국해양과학기술원 (제1연구동 1317호)
해양과학기술원	질소 발생기	068126	X	X	X	2021-04 ~ 2021-05	28,500	한국해양과학기술원 (제1연구동 1317호)
극지연구소	멀티모드 마이크로플레이트 리더	Synergy H1	X	ZEUS 등록	NFEC-2022-08-280841	2022-07-20	64,242	인천광역시 연수구 송도미래로 26 (송도동) 송도미래로26 F5층 520호
극지연구소	생체분자물질 순도 및 반응분석기	Tycho NT.6	X	X	X	X	32.000	인천광역시 연수구 송도미래로 26 (송도동) 송도미래로26 F5층 520호
극지연구소	디지털 피씨알 시스템	(Digital PCR system)/QIAcuity One, 5plex	X	X	X	X	89,100	인천광역시 연수구 송도미래로 26 (송도동) 송도미래로26 F5층 520호

* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

KOPRI 극지연구소

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

극지연구소

5) 목표 달성 수준

추 진 목 표	달 성 내 용	달성도(%)
○ 신규 항생물질 또는 항생물질 변형 효소 유전자를 가지는 균주 개발 - 매년 신규 생물자원 1종 확보.	○ 확보된 생물자원: – 극지 미생물 S. carbonis PAMC29251 – 해양 미생물 199DD-085 – Streptomyces avidinii PAMC29637 – Streptomyces avidinii PAMC29639 – Streptomyces ardesiacus – Streptomyces zhaozhouensis ○ 유전체 분석 완료: – Hymenobacter sp. PAMC26554 – Hymenobacter sp. PAMC26628 – S. carbonis PAMC29251 – Sphingobium sp. PAMC28499 – Antibiotic-Resistant Pseudomonas fluorescens Strain Ant01 – Variovorax sp. PAMC28711 – Variovorax sp. PAMC26660 – Variovorax sp. PAMC28562	목표치: ○ 2021년 2종 확보 달성도: 200%. ○ 2022년 달성치: 4종 확보 달성도: 400%. ○ 2023년 달성치: 총 5종 확보. 달성도: 500%.

○ 신규항생물질 탐색 -항생제 선도물질과 이의 생산기술 5건 이상 개발	○ GB-20-AB-37 - 1차년도 우수 활성물질로 확인되었으며, 이를 기반으로 유사 15종 이상의 유도체 코어가 제조됨 ○ GA-AB-21-05 - 2차년도 항생물질 스크리닝에서 우수한 효과를 보였으며, SAR 분석을 통해 새로운 유도체 15종 합성 및 항균활성을 확인함 ○ Halisulfate 유도체 - Halisulfate 3 (MIC: 6 □g/mL), Halisulfate 5 (MIC: 16 □g/mL) ○Grincamycin 계열 신규 화합물 - Grincamycin W: MIC 8 □g/mL (Bacillus subtilis) - Grincamycin U: MIC 32 □g/mL (Bacillus subtilis) ○ Urdamycin X - 신규 화합물로 MIC 64 □g/mL (Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus) ○ Streptopyrrole 계열 화합물 - 신규로 분리된 화합물로 항균 활성 확인 ○ Bafilomycin 계열 신규 화합물 - 분자식: C35H58O8, m/z 629.4028 [M+Na]+ - 기존 Bafilomycin 계열과 구조적으로 차별화. - NMR 스펙트럼 분석을 통해 9개의 메틸 그룹 확인. - 화합물 내 탄소와 수소 결합관계 규명 ○ 신규 화합물 (1-7) - 화합물 2번: Staphylococcus aureus에 대해 강력한 항균 - 신규 화합물 11: Staphylococcus aureus에 대해 <0.25 μg/mL. - 신규 화합물 12: Micrococcus luteus 및 Staphylococcus aureus에서 유의미한 활성을 보임 ○ Coprisidin A - 남극 지의류 (Ramalina terebrata)에서 최초 분리. - 항균 활성 확인 및 유도체 합성 진행 ▶ 실증적 검증 강화를 위하여, 향후 다양한 다제내성균을 포함한 병원체를 대상으로 한 확대 검증을 추진할 계획임.	200%

KOPRI 극지연구소

○항생물질 변형체/타겟 단백질 복합체 구조 획득 - 항생물질 변형체와 타겟 단백질 복합체 구조 좌표 확보 - 항생제 변형에 대한 메커니즘 규명 - 항생물질 변형효소의 생화학적 특성 분석 10건 이상 확보 - SCIE급 상위 30% 이상 논문 23건 이상	- BoA와 ACC-1 단백질 - ACC-1: Class C β-lactamase와 항생물질 변형체 복합체 구조 결정 - Ampicillin과 StLac 단백질 구조 분석 - Cefaclor와 StLac 단백질 구조 분석 - Cephalexin과 StLac 단백질 구조 분석 - CMY-10 단백질 - Enterobacter aerogenes 유래 class C β-lactamase - StLacN238G,D242G 단백질 - Senotrophomonas sp. KCTC 12332 유래 class A β-lactamase 돌연변이체 - ACI-1 단백질 - Acidaminococcus fermentans 유래 class A β-lactamase, Hepes와 글리세롤 분자와의 상호작용 규명 - CDA-1 단백질 - Cedecea davisae 유래 class C β-lactamase - AbMltA 단백질 - membrane-bound lytic murein transglycosylase A - HMGR 단백질 - Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase - PA5542 단백질 - PA5542 구조 분석 결정, 고유한 삼량체 배열로 결정 구조 확인 - AbTrx2 단백질 - Acinetobacter baumannii 유래 Trx2 단백질 - PA5542: 독특한 삼량체 배열로 구조 규명 - 스테로이드 수산화 효소로 연구 중인 CYP106A6 구조 및 수산기 추가 메커니즘 연구 - CYP105D18-H202 를 보조기질로 사용하여 스테로이드 변형	160%
○기술이전 또는 기술실시 1건 이상	○ 전용실시권 이전 - 국내특허 등록번호 10-1300177, 국내특허 등록번호 10-1492434 ○ 특허권 지분 양수도계약 - 국내특허출원번호 10-2020-0068238	200%

4. 목표 미달 시 원인분석: 해당사항 없음

4-1. 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

4-2. 자체 보완활동

4-3. 연구개발 과정의 성실성

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

5-1. 목표 달성도

- **극지 및 해양 유래 희귀 생물자원 확보:**
  목표치 4종을 설정했으나, 실적치 14종을 확보하여 350%의 달성
- **극지/해양 미생물 유전체 분석:**
  목표치 8종에 대해 실적치 17종을 분석 완료하여 212.5%의 달성도
- **항생물질 변형효소의 기능별 카탈로그 구축:**
  목표치 18건을 설정하였고, 실적치 65건을 발표하여 361%의 달성
- **항생제 선도물질 및 생산기술 개발:**
  목표치 3건에 대해 실적치 18건을 등록하여 600%의 달성
- **기술이전 또는 기술실시:**
  목표치 1건을 설정한 반면, 실적치 2건을 실현하여 200%의 달성
- **극지 및 해양 생물자원 확보 (1차년도):**
  목표치 2종에 대해 실적치 4종을 확보하여 200%의 달성
- **SCIE 상위 30% 논문 발표:**
  목표치 3건에 대해 실적치 2건을 발표하여 66%의 달성
- **타겟 단백질 발현 및 정제:**
  목표치 5건에 대해 실적치 2건을 완료하여 40%의 달성
- **타겟 단백질 결정화 실험:**
  목표치 2건에 대해 실적치 2건을 달성하여 100%의 목표 달성도
- **백본 항생물질 개발 및 균주 확보 (2차년도):**
  목표치 1종에 대해 실적치 9종을 확보하여 550%의 달성
- **SCIE 논문 발표 (2차년도):**
  목표치 5건에 대해 실적치 19건을 발표하여 380%의 달성
- **타겟 단백질 구조 규명 (2차년도):**
  목표치 1건에 대해 실적치 5건을 규명하여 700%의 달성
- **활성 분자 확보 및 연구 (3차년도):**
  목표치 1건에 대해 실적치 13건을 확보하여 1300%의 달성
- **항생물질 변형효소 연구 (3차년도):**
  목표치 5건에 대해 실적치 13건을 연구하여 260%의 달성
- **항생제 선도물질 개발 (3차년도):**
  목표치 1건에 대해 실적치 3건을 개발하여 150%의 달성
- **기술이전 및 상용화 (3차년도):**

KOPRI 극지연구소

목표치 1건을 실현하여 100%의 목표 달성도

- **극지/해양 생물자원 확보 및 유전체 분석 (4차년도):**
  목표치 1종에 대해 실적치 4종을 확보하여 650%의 달성
- **SCIE 논문 발표 (4차년도):**
  목표치 5건에 대해 실적치 28건을 발표하여 560%의 달성
- **항생물질 변형체/타겟 단백질 복합체 3차 구조 규명 (4차년도):**
  목표치 1건에 대해 실적치 5건을 규명하여 500%의 달성
- **항생제/타겟 단백질 복합체 연구 (4차년도):**
  목표치 1건에 대해 실적치 12건을 연구하여 1200%의 달성
- **기술이전 또는 기술실시 (4차년도):**
  목표치 1건을 실현하여 100%의 목표 달성

5-2. 관련 분야 기여도 (정성적 성과지표 참고, p.419)

○ **극지해양 유래 생물자원 확보**
- 항생물질 개발을 위한 기초 자원으로서 극지 및 해양 생물자원의 확보가 중요
- 극지와 해양 환경에서 독특한 미생물을 발견하여 새로운 항생물질 후보 물질 제공
- 생물 다양성 및 생물 자원 발굴을 통해 항생제 저항성 문제 해결의 가능성 제시

○ **극지/해양 미생물 유전체 분석**
- 극지 및 해양 미생물의 유전체 분석을 통해 미생물의 유전적 특성 파악
- 항생물질 개발과 미생물학적 특성 연구를 위한 중요한 데이터 제공
- 극지/해양 유래 새로운 유전자와 효소의 상용화 가능성 높임

○ **항생물질 변형효소의 기능별 카탈로그 구축**
- 효소의 생화학적 특성과 작용 메커니즘을 이해하는 데 기여
- 항생물질 변형효소의 효율성 및 상용화 가능성 향상
- 기존 상용화 효소와의 비교를 통해 다양한 산업 분야에서 응용 가능성 제시

○ **항생제 선도물질 및 생산기술 개발**
- 항생제 선도물질 발굴을 통해 항생제 저항성 문제 해결 가능성 제공
- 생산기술 개발로 상용화 가능성을 높여 항생물질의 산업적 활용 촉진
- 특허 등록을 통해 기술 상용화 및 연구의 실용적 성과 도출

○ **기술이전 또는 기술실시**
- 연구 성과의 산업적 적용을 위한 기술이전 및 기술실시 중요
- 기업에 새로운 기술적 해결책을 제공하여 경쟁력 강화
- 연구 결과를 상용화하여 경제적 가치 창출 및 지속 가능한 성장 촉진

KOPRI 극지연구소

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

6-1. 연구개발성과의 관리계획

○ 신규 항생물질의 제약회사나 바이오 업체로의 기술이전
- 신규 항생물질 대량생산 공정 수립, 항생물질 변형효소의 반합성을 이용한 신규 항생물질 생산방법으로 지식재산권 확보
- 신규 항생물질의 작용기전 규명
- 신규 항생물질의 안전성 평가 수행
- 확보된 차세대 항생제 후보물질의 임상시험을 통한 글로벌 항생제 개발은 경제적 가치 창출 및 국민의 건강한 삶에 기여할 것으로 기대
- 국내 및 외국 제약사와의 공동개발 또는 기술이전을 통한 실용화 추진으로 관련 산업 개발에 기여
- 극지 유래 항생제 개발사업은 신약 개발을 위한 기반이 되는 사업으로 극지 생명과학분야 기초연구와 의료 R&D 분야 및 실용화 연구 단계를 연계시켜 주는 매개적인 역할 수행

○ 본 사업을 통해 구축된 저온성 효소를 이용한 유용물질개발 연구 플랫폼의 지속적인 활용가능
- 확보된 유용물질 변형효소 카달로그 구축으로 다른 적용점의 다양한 유용물질 변형체 제작에 확대적용
- 개발된 유용물질의 다양한 활성 및 적용점 탐색 연구 수행

○ 실용화 연구를 통한 극지연구의 저변확대와 극지생명 연구 분야 국제적 선도 기관으로 도약
- 미지의 극지생명 유전정보를 적극 활용하여 화학합성, 제약산업 등 다른 융합학문을 촉진시킴으로써 극지 생명공학 분야 국가 경쟁력 제고
- 극지 생명현상의 이해와 해석 정보를 바탕으로 새로운 신생명자원을 개발하기 위한 창조산업의 기반아이디어 및 자원 제공

6-2. 연구개발성과의 활용 계획

※ 연구개발성과의 활용계획 작성자 성명 기입 요망

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)			연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE		매년 목표치
	비SCIE		
	계		
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내		
	국외		
	계		
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시		
	기술이전		
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

KOPRI 극지연구소

6-3) 연구성과의 보안등급

※ 해양수산 연구개발사업 보안관리지침 제12조 참조

해양수산 연구개발사업 보안관리지침 제12조에 의거하여 일반 등급으로 분류하는 것이 타당함

7. 기타사항

7-1. 연구시설·장비종합정보시스템 등록한 연구시설 장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치장소)	ZEUS장비 등록 번호
이화여대	고속단백질 정제시스템	NGC Quest 10 plus	1	2020.09.23	42,680	Bio-rad	이화여자대학교 종합과학관 D동 206호	NFEC-2020-09-265007
이화여대	형광 플레이트 리더기 (Fluorescence Microplate reader)	CLARIOStar	1	2022.10.13	59,950	Bmg Labtech	서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동) 11-1번지 이화여자대학교 종합과학관 D동 지상 2층 206호(신약표적단백질 연구실)	NFEC-2022-10-281950
극지연구소	멀티모드 마이크로플레이트 리더 (Multimode microplate reader)	Synergy H1	1	2022.06.15	67,196	Biotek	인천광역시 연수구 송도미래로26, 극지연구소, 제1연구동 R1-520호 (단백체연구실II)	NFEC-2022-08-280841
극지연구소	디지털 유전자 증폭기 (Digital PCR)	QIAcuity One 5plex	1	2022-07-12	89,100	Qiagen	인천광역시 연수구 송도미래로26, 극지연구소, 제1연구동 R1-311호(생물다양성연구실)	NFEC-2022-07-280378

KOPRI 극지연구소

7-2. 연구시설·장비종합정보시스템 등록한 연구시설 장비 현황

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1)
	2)
2.	1)
	2)

< 참고 문헌 >

1. Zhang G, Li Y, Fang L, Pfeifer BA. Tailoring pathway modularity in the biosynthesis of erythromycin analogs heterologously engineered in E. coli. Sci Adv. 2015 May 29;1(4):e1500077. doi: 10.1126/sciadv.1500077. eCollection 2015 May. PubMed PMID: 26601183; PubMed Central PMCID: PMC4640655.

2. Vicente M, Hodgson J, Massidda O, Tonjum T, Henriques-Normark B, Ron EZ. The fallacies of hope: will we discover new antibiotics to combat pathogenic bacteria in time? FEMS Microbiol Rev. 2006 Nov;30(6):841-52. Review. PubMed PMID:17064283.

3. Kummerer K. Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. Chemosphere. 2009 Apr;75(4):417-34. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.11.086. Epub 2009 Jan 30. Review. PubMed PMID: 19185900.

4. Kummerer K. Antibiotics in the aquatic environment--a review--part II. Chemosphere. 2009 Apr;75(4):435-41. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.12.006. Review. PubMed PMID: 19178931.

5. Singh RK, Tiwari SP, Rai AK, Mohapatra TM. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. J Antibiot (Tokyo). 2011 Jun;64(6):401-12. doi:10.1038/ja.2011.21. Epub 2011 Apr 6. Review. PubMed PMID: 21468079

6. Clardy J, Fischbach MA, Walsh CT. New antibiotics from bacterial natural products. Nat Biotechnol. 2006 Dec;24(12):1541-50. Review. PubMed PMID: 17160060.

7. Hong W, Zeng J, Xie J. Antibiotic drugs targeting bacterial RNAs. Acta Pharm Sin B. 2014 Aug;4(4):258-65. doi: 10.1016/j.apsb.2014.06.012. Epub 2014 Jul 31. Review. PubMed PMID: 26579393; PubMed Central PMCID: PMC4629089.

8. Cartwright, S. J., & Waley, S. G. (1984). Purification of β-lactamases by affinity chromatography on phenylboronic acid-agarose. Biochemical Journal, 221(2), 505-512.

9. Fajardo, A., Hernando-Amado, S., Oliver, A., Ball, G., Filloux, A., & Martinez, J. L. (2014). Characterization of a novel Zn2+-dependent intrinsic imipenemase from Pseudomonas aeruginosa. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 69(11), 2972-2978.

10. Kim, M. K., An, Y. J., Na, J. H., Seol, J. H., Ryu, J. Y., Lee, J. W., ... & Cha, S. S. (2017). Structural and mechanistic insights into the inhibition of class C β-lactamases through the adenylylation of the nucleophilic serine. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 72(3), 735-743.

11. Na, J. H., An, Y. J., & Cha, S. S. (2017). GMP and IMP are competitive inhibitors of CMY-10, an extended-spectrum class C β-lactamase. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 61(5), e00098-17.

12. Kim, J. Y., Jung, H. I., An, Y. J., Lee, J. H., Kim, S. J., Jeong, S. H., ... & Cha, S. S. (2006). Structural basis for the extended substrate spectrum of CMY 10, a plasmid encoded class C β lactamase. Molecular microbiology, 60(4), 907-916.

13. Jeong, B. G., Na, J. H., Bae, D. W., Park, S. B., Lee, H. S., & Cha, S. S. (2021). Crystal structure of AmpC BER and molecular docking lead to the discovery of broad inhibition activities of halisulfates against β-lactamases. Computational and structural biotechnology journal, 19, 145-152.

14. Copeland, R. A., Basavapathruni, A., Moyer, M., & Scott, M. P. (2011). Impact of enzyme concentration and residence time on apparent activity recovery in jump dilution analysis. Analytical biochemistry, 416(2), 206-210.

15. Nam Y, Ahn YY, Kim BM, Kim K, Lee JH, Do H. A structure-based mechanism of adenosylcobinamide kinase/adenosylcobinamide phosphate guanylyltransferase (MpaCobU) from Methylocapsa palsarum. Int J Biol Macromol. 2024 Sep 24;280(Pt 3):136021. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.136021. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 39326622.

16. Do H, Li ZR, Tripathi PK, Mitra S, Guerra S, Dash A, Weerasekera D, Makthal N, Shams S, Aggarwal S, Singh BB, Gu D, Du Y, Olsen RJ, LaRock C, Zhang W, Kumaraswami M. Engineered probiotic overcomes pathogen defences using signal interference and antibiotic production to treat infection in mice. Nat Microbiol. 2024 Feb;9(2):502-513. doi: 10.1038/s41564-023-01583-9. Epub 2024 Jan 16. PubMed PMID: 38228859; PubMed Central PMCID: PMC10847043.

17. Lee MJ, Kim B, Kim K, Lee JH, Do H. Heterologous protein production using Psychrobacter sp. PAMC 21119 analyzed with a green fluorescent protein-based reporter system. Protein Expr Purif. 2023 Dec;212:106352. doi: 10.1016/j.pep.2023.106352. Epub 2023 Aug 16. PubMed PMID: 37595854.

18. Hwang J, Yoo W, Shin SC, Kim KK, Kim HW, Do H, Lee JH. Structural and Biochemical Insights into Bis(2-hydroxyethyl) Terephthalate Degrading Carboxylesterase Isolated from Psychrotrophic Bacterium Exiguobacterium antarcticum. Int J Mol Sci. 2023 Jul 27;24(15). doi: 10.3390/ijms241512022. PubMed PMID: 37569396; PubMed Central PMCID: PMC10418727.

19. Jeon S, Hwang J, Do H, Le LTHL, Lee CW, Yoo W, Lee MJ, Shin SC, Kim KK, Kim HW, Lee JH. Feruloyl Esterase (LaFae) from Lactobacillus acidophilus: Structural Insights and Functional Characterization for Application in Ferulic Acid Production. Int J Mol Sci. 2023 Jul 6;24(13). doi: 10.3390/ijms241311170. PubMed PMID: 37446348; PubMed Central PMCID: PMC10342849.

20. Hwang J. Crystal Structure and Functional Characterization of an S-Formylglutathione Hydrolase (BuSFGH) from Burkholderiaceae sp. Crystals. 2023 April.

21. Kim KH, Do H, Lee CW, Subedi P, Choi M, Nam Y, Lee JH, Oh TJ. Crystal Structure and Biochemical Analysis of a Cytochrome P450 Steroid Hydroxylase (BaCYP106A6) from Bacillus Species. J Microbiol Biotechnol. 2023 Mar 28;33(3):387-397. doi: 10.4014/jmb.2211.11031. Epub 2022 Dec 12. PubMed PMID: 36655276; PubMed Central PMCID: PMC10084758.

22. Do H, Yoo W, Wang Y, Nam Y, Shin SC, Kim HW, Kim KK, Lee JH. Crystal structure and biochemical analysis of acetylesterase (LgEstI) from Lactococcus garvieae. PLoS One. 2023;18(2):e0280988. doi: 10.1371/journal.pone.0280988. eCollection 2023. PubMed PMID: 36745644; PubMed Central PMCID: PMC9901739.

23. Hwang J, Lee H, Do H, Lee SG, Oh TJ, Lee JH. Complete Genome Sequence of the Antibiotic-Resistant Pseudomonas fluorescens Strain Ant01, from the Rhizosphere of Antarctic Moss. Microbiol Resour Announc. 2023 Jan 24;12(1):e0105722. doi: 10.1128/mra.01057-22. Epub 2022 Dec 12. PubMed PMID: 36507684; PubMed Central PMCID: PMC9872653.

24. Hwang J, Kim B, Lee MJ, Nam Y, Youn UJ, Lee CS, Oh TJ, Park HH, Do H, Lee JH. Structural basis for the substrate specificity of an S-formylglutathione hydrolase derived from Variovorax sp. PAMC 28711. Biochem Biophys Res Commun. 2022 Nov 12;629:159-164. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.09.008. Epub 2022 Sep 10. PubMed PMID: 36122453.

25. Subedi P, Do H, Lee JH, Oh TJ. Crystal Structure and Biochemical Analysis of a Cytochrome P450 CYP101D5 from Sphingomonas echinoides. Int J Mol Sci. 2022 Nov 1;23(21). doi: 10.3390/ijms232113317. PubMed PMID: 36362105; PubMed Central PMCID: PMC9655578.

26. Do H, Nguyen DL, Lee CW, Lee MJ, Oh H, Hwang J, Han SJ, Lee SG, Lee JH. Comparative structural insight into the unidirectional catalysis of ornithine carbamoyltransferases from Psychrobacter sp. PAMC 21119. PLoS One. 2022;17(9):e0274019. doi: 10.1371/journal.pone.0274019. eCollection 2022. PubMed PMID: 36149917; PubMed Central PMCID: PMC9506655.

27. Kim B, Do H, Kim BM, Lee JH, Kim S, Kim EJ, Lee J, Cho SM, Kim K. Freezing-enhanced oxidation of iodide by hydrogen peroxide in the presence of antifreeze proteins from the Arctic yeast Leucosporidium sp.AY30. Environ Res. 2022 Sep;212(Pt A):113233. doi: 10.1016/j.envres.2022.113233. Epub 2022 Apr 4. PubMed PMID: 35390302.

28. 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:

KOPRI 극지연구소

10.1016/j.ijbiomac.2022.02.032. Epub 2022 Feb 9. PubMed PMID: 35149098.

29. Jang H, Do H, Kim CM, Kim GE, Lee JH, Park HH. Molecular basis of dimerization of lytic transglycosylase revealed by the crystal structure of MltA from Acinetobacter baumannii. IUCrJ. 2021 Nov 1;8(Pt 6):921-930. doi: 10.1107/S2052252521008666. eCollection 2021 Nov 1. PubMed PMID: 34804545; PubMed Central PMCID: PMC8562663.

30. Kim KH, Lee CW, Pardhe BD, Hwang J, Do H, Lee YM, Lee JH, Oh TJ. Crystal structure of an apo 7α-hydroxysteroid dehydrogenase reveals key structural changes induced by substrate and co-factor binding. J Steroid Biochem Mol Biol. 2021 Sep;212:105945. doi: 10.1016/j.jsbmb.2021.105945. Epub 2021 Jun 23. PubMed PMID: 34171491.

31. Hwang J, Park SH, Lee CW, Do H, Shin SC, Kim HW, Lee SG, Park HH, Kwon S, Lee JH. Crystal structure of a MarR family protein from the psychrophilic bacterium Paenisporosarcina sp. TG-14 in complex with a lipid-like molecule. IUCrJ. 2021 Sep 1;8(Pt 5):842-852. doi: 10.1107/S2052252521005704. eCollection 2021 Sep 1. PubMed PMID: 34584745; PubMed Central PMCID: PMC8420766.

32. Park SH, Lee CW, Bae DW, Do H, Jeong CS, Hwang J, Cha SS, Lee JH. Structural basis of the cooperative activation of type II citrate synthase (HyCS) from Hymenobacter sp. PAMC 26554. Int J Biol Macromol. 2021 Jul 31;183:213-221. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.141. Epub 2021 Apr 25. PubMed PMID: 33910038.

33. Pardhe BD, Do H, Jeong CS, Kim KH, Lee JH, Oh TJ. Characterization of high-H(2)O(2)-tolerant bacterial cytochrome P450 CYP105D18: insights into papaverine N-oxidation. IUCrJ. 2021 Jul 1;8(Pt 4):684-694. doi: 10.1107/S2052252521005522. eCollection 2021 Jul 1. PubMed PMID: 34258016; PubMed Central PMCID: PMC8256718.

34. Park HJ, Lee YM, Do H, Lee JH, Kim E, Lee H, Kim D. Involvement of laccase-like enzymes in humic substance degradation by diverse polar soil bacteria. Folia Microbiol (Praha). 2021 Jun;66(3):331-340. doi: 10.1007/s12223-020-00847-9. Epub 2021 Jan 20. PubMed PMID: 33471293.

35. Jeong CS, Hwang J, Do H, Cha SS, Oh TJ, Kim HJ, Park HH, Lee JH. Structural and biochemical analyses of an aminoglycoside 2′-N-acetyltransferase from Mycolicibacterium smegmatis. Sci Rep. 2020 Dec 9;10(1):21503. doi: 10.1038/s41598-020-78699-z. PubMed PMID: 33299080; PubMed Central PMCID: PMC7725843.

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 해양수산부에서 시행한 극지 유전자원 활용기술 개발사업, 극지 유래 생물자원을 활용한 항생제 후보물질 개발과제 최종보고서이다.

2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 해양수산부에서 시행한 극지 유래 생물자원을 활용한 항생제 후보물질 개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.

3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.

KOPRI
극지연구소

210mm×297mm[(백상지(80g/m^2) 또는 중질지(80g/m^2)

주 의

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

KOPRI
극지연구소