

남극 해수 요각류를 이용한 극지 모델생물의 구축

Establishing a model organism for polar research



2015. 8. 14.

극 지 연 구 소

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “남극 해수 요각류를 이용한 극지 모델생물의 구축” 최종 보고서로 제출합니다.



2015. 8. 14.

연구 책임자 : 김 상 희

참여 연구원 : 박 경 민

“ : 심 현 지

“ : 윤 성 영

“ : 정 진 우

“ : 황 인 선

보고서 초록

과제관리번호	PE14260	해당단계 연구기간	2014.7.1 -2015.6.30	단계 구분	(해당단계) / (총단계)
연구사업명	중 사업명	창의연구사업			
	세부사업명				
연구과제명	중 과제명	신진연구원 지원과제			
	세부(단위)과제명	남극 해수 요각류를 이용한 극지 모델생물의 구축			
연구책임자	김 상 희	해당단계 참여연구원수	총 : 6명 내부 : 1명 외부 : 5명	해당단계 연구비	정부: 30,000 천원 기업: 천원 계: 30,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원 부설 극지연구소		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :				
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)					보고서 면수
					40
<p>-본 과제는 최근의 급격한 지구 변화에 따른 해양 환경 변화가 남극 생물과 전체 생태계에 미치는 영향을 연구하기 위한 모델 생물종을 발굴하는데 목적이 있다.</p> <p>- 요각류는 다양한 종수와 거대한 biomass를 가지고 있어서 세계 담수, 해수 생태계에 중요하 stodtkz자로 특히 어류 양식 등 상위 포식자들의 주요 먹이원이다.</p> <p>- 요각류는 긴노요각류(Calanoida), 검물벼룩목(Cyclopoida), 갈고리노벨레목(Harpacticoida) 등으로 구성되며 대부분 저서성으로 머리가 크고 입으로 먹이입자를 걸러먹는 filter feeding 방식이다. 축각으로 물의 움직임이나 화학물질을 감지하며 크기가 작고 널리 분포해 환경오염을 측정하기 위한 시험종으로도 유용하다.</p> <p>- 요각류 중 Harpacticoida에 속하는 <i>Tigriopus</i> 속은 비교적 짧은 생식주기를 가지고 실험실내 사육이 가능하여 population genetics, physiological experiment, 환경독성학 등의 연구를 위한 실험재료로 이용되고 있기 때문에 먹이원, 배양조건, 배양시설 등에 대한 정보가 상대적으로 다양하다.</p> <p>- 2014년 1월 남극 하계활동기간에 펄핀마을 (남극특별보호구역 ASPA171) 인근 조건대에서 포획한 남극 신종 요각류 <i>Tigriopus kingsejongensis</i> Park and Lee in Park et al (2014)을 극지연구소 실험실에서 배양하였고 배양의 가장 관건인 먹이원들과 빛, 온도에 따른 안정적인 배양 조건을 구축하여 현재 여러 generation에서 개체수를 안정적으로 유지하고 있다.</p> <p>- 남극 생물들이 가지고 있는 유전자 정보, 기능, 산업적으로 유용한 물질의 자원화를 위해 Genome분석을 진행하여 약 128Mb 게놈에서 12,000여개의 유전자 정보를 얻었다.</p> <p>- 극지 요각류의 뛰어난 저온 적응 능력과 독특한 체내 지질 성분, 생리 대사 물질 등은 -omics, metabolite 연구에 중요한 생화학적 연구 재료가 될 것이다.</p> <p>- 본 연구 대상종인 남극 요각류는 고립된 남극 대륙에서 종분화와 진화 과정을 반영하고 있을 뿐 아니라 고립된 남극 대륙의 급격한 환경 변화에 대한 생물들의 반응을 추적하는데 중요한 정보를 제공해 줄 수 있을 것으로 기대된다.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한글	남극, 킹조지섬, 기후변화, 생물 다양성, 남극 신종, 요각류, <i>Tigriopus kingsejongensis</i> Park and Lee in Park et al (2014)			
	영어	Antarctica, King George Island, climate change, biodiversity, Antarctic new species, copepod, <i>Tigriopus kingsejongensis</i> Park and Lee in Park et al (2014)			

요 약 문

I. 제목

남극 해수 요각류를 이용한 극지 모델생물의 구축

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 현재까지 극지 생물을 이용한 연구는 남극 쯤새풀, 남극 nematod 등 제한된 몇 종에 한정되어 왔으며 아직까지 배양보다는 채집, 포획에 의존한 제한된 연구만이 수행되어 왔다.
- 남극 서식종을 모델생물로 구축할 수 있다면 극한 환경요인과 생물반응을 이해하기 위한 후생학적 생물연구가 가능해지며 배양 가능한 모델생물을 이용해 UV, 저온, 해양 오염, 해수 상승 등 극지 환경을 실험실에서 재현하면서 이들 생물의 생리적, 생화학적 변화, 유전적 변이 등 다방면에 걸친 연구를 수행할 수 있다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 2014년 1월 하계활동 기간에 세종기지 주변 펭귄마을 (남극특별보호구역 ASPA171) 인근 조간대에서 포획한 추정 종 *Tigriopus kerguelenensis* s.l.을 실험실로 가져와 형태, 유전자 분석을 통해 남극 신종 *Tigriopus kingsejongensis* Park and Lee in Park et al (2014)임을 확인하였다 (이하 *Tigriopus kingsejongensis*로 표기).
- 완전한 생활사를 파악하고 개체수의 감소 없이 충분한 집단크기를 유지하기 위해서 빛, 온도 등의 배양 조건 구축과 특히 적합한 먹이 선별에 중점을 두었다.
- 성공적인 배양시스템 구축을 통해 실험에 충분한 개체수를 확보하게 되면 전체 transcriptome, genome 분석이 가능하다.
- 단백질 변이율 분석을 통해 진화적 선택 (evolutionary positive selection)을 많이 받은 유전자들을 파악하고 이들 유전자들을 중심으로 환경과 생물반응 사이의 유전자 변이 및 발현 차이를 밝히고자 한다.

IV. 연구개발결과

- 안정적인 배양 시스템을 구축하여 2014년 채집한 남극 중 군집들의 5 세대 자손들의 개체수를 유지하고 있다.
- 발생단계별, 온도별 전사체 라이브러리를 제작하였고 Illumina Miseq 염기서열 분석을 통해 300 메가베이스 계놈 (약 120X 계놈 coverage), 43,368 contigs, 27,823 scaffolds에 대한 유전정보를 확보하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

- 유전정보를 이용하여 남극 인근 대륙과 남극 대륙에 서식하는 *Tigriopus*의 군집 구조와 서식지에 따른 발생행동학적 차이점 등을 이해
- 남극 고유종의 환경에 따른 종분화와 진화 과정을 연구
- 고립된 남극 대륙의 급격한 환경변화에 대한 생물들의 반응을 추적하는데 중요 모델 생물이 될 것이며 이들의 생리적 이용하여 환경모니터링 기술 개발 및 환경 변화 예측기술 개발에 활용



S U M M A R Y

I. Subject

Establishing a model organism for polar research

II. Objectives and Necessities of the Study

The aim of this proposal is to establish candidate species as a representative polar model organism. Because most biological research has long relied on a small number of well-established model organisms, we are aware of limitations to expand our interest, basic biological knowledge and evolutionary mechanisms of the polar-adapted species which is urgently needed to be studied for the polar research.

III. Contents and Scope of the Study

- We collected the Antarctic intertidal copepod near the King Sejong Island during summer activity of 2013/2014, moved in to the lab and identified as a potential new species closely related to *Tigriopus kerguelenensis* s.l based on the morphological and molecular characters. Later it was found to be Antarctic new species *Tigriopus kingsejongensis* Park and Lee in Park et al (2014) (hereafter referred as to *Tigriopus kingsejongensis*).
- *Tigriopus kingsejongensis* is extremely cold-tolerant and is capable of surviving in frozen sea-water for several hours, providing a potential for a specialized model on cold adaptation. The copepod genus *Tigriopus* is found worldwide in almost every habitat and well known to be tolerant to various range of environmental fluctuations such as temperature, salinity, and desiccation as well as UV radiation
- We focused on establishment of solid and reliable culture system in the lab so as to maintain the healthy living individuals without decreasing of population size. We carefully selected the prey kind, the optimal culture temperature and light condition etc.
- With enough samples cultivated through generation to generation, the analysis of the whole genome and de novo transcriptome will be performed.
- We expect to discover the genes from the genome information that have evolved rapidly to render the survival ability to copepods in the harsh habitats in Antarctic tide pool.

IV. Results

- In the culture condition we set up, *T. kingsejongensis* is reproductively active, bears multiple broods of eggs and produces much enough of progenies for experiemntal work.
- we sequenced the genome of a *Tigriopus kingsejongensis* using a whole-genome shotgun strategy and the Illumina Miseq platform. *De novo* assembly of 203 million reads from paired-endlibraries and mate-paired libraries (**Supplementary TableS1**) yielded a draft assembly (65-foldcoverage) with a total length of 295Mb, and contig and scaffold N50 sizes of 17.5 kb and 159.2 kb, respectively. Non-gap sequences occupy 284.8 Mb (96.4%), and simple sequence repeats (SSR) total 1.2 Mb (0.4%). Transposable elements (TEs) add up to 6.5 Mb, roughly 2.3% of the assembled genome
- Comparison among the four arthropod species (copepod, mosquito, fruit fly and water flea) identified that 2,063 gene families were shared by the four species.
- The gene ontology (GO) categories showing accelerated evolution in *T. kingsejongensis* were 'regulation of cellular response to stress', carbohydrate metabolism, including 'glutamate metabolic process, 'glutamine family amino acid metabolic pathway' and 'cellular amino acid biosynthetic process' and energy metabolism such as 'ATPbinding' and 'mitochondrial transport'.
- Among over-representative GO terms, transmembrane transport (GO:0055085) term are included 4 facilitated trehalose transporter genes.

V. Future Application of the Study

- Taking all the known advantages as an experimental species and ecological and physiological knowledge accumulated so far in *Tigriopus* group, *T. kingsejongensis* is valuable subject for comparative genome analysis. There are two sequenced *Tigriopus* (*T. japonicas* and *T. californicus*) and the availability of sequencing data for more *Tigriopus* species will lead comparison between inter specific, habitual or phylogeological differences and will greatly increase our understanding on evolutionary adaptation of intertidal organisms.

목 차

보고서 초록	0
요약문	1
SUMMARY	3
목 차	5
제 1 장 연구개발의 필요성	6
가. 연구개발의 경제, 사회, 기술적 필요성	6
1. 기술적 측면	6
2. 경제, 산업적 측면	6
3. 과학적 측면	7
4. 사회 문화적 측면	7
제 2 장 국내외 기술개발 현황	8
가. 현재 개발 내용(기술)의 수준	8
1. 극지모텔생물을 이용한 국외 연구 현황	8
2. 극지모텔생물을 이용한 국내 연구 현황	9
나. 현 기술상태의 취약성	9
다. 앞으로의 전망	9
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	10
가. 연구개발의 최종 목표	10
나. 연구개발 추진 계획 및 방법	10
1. 월별 추진 계획	10
2. 세부 추진 계획 수립	10
다. 연구개발 추진 체계	12
라. 연구 결과	14
1. 배양 시스템 안정화	14
2. 형태 발생학적 분석	16
3. 유전체 분석	17
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	33
가. 연구개발 목표의 달성도	33
나. 대내외 기여도	33
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	34
제 6 장 참고 문헌	36

제 1 장 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 경제, 사회, 기술적 필요성

1. 기술적 측면

- 요각류는 다양한 종수와 거대한 biomass를 가지고 있어서 세계 담수, 해수 생태계에 중요한 생산자로 특히 어류 양식 등에 중요 먹이원으로 배양되고 있다.
- 요각류 중 Harpacticoida에 속하는 *Tigriopus* 속은 비교적 짧은 생식주기를 가지고 실험실내 사육이 가능하여 population genetics, physiological experiment, environmental toxicology 등의 연구에 실험 생물로 이용되고 있기 때문에 먹이원, 배양조건, 배양시설 등에 대한 정보가 상대적으로 다양하다.
- 2014년 1월 남극 하계시즌에 포획한 남극 추정종 *Tigriopus kerguelensis* s.l.을 극지연구소 실험실에서 배양 중이며, 배양의 가장 관건인 후보 먹이원들을 선별 하고 빛, 온도에 따른 안정적인 배양 조건을 구축하고자 조건별 실험을 진행 중
- 배양기술 축적을 통해 다른 극지 동물군에도 적용할 수 있을 것이며 안정된 배양시스템이 구축되면 극지 모델 동물들 후보군을 다양화 할 수 있다.

2. 경제·산업적 측면

- 2014년 초 식약청에서 미래 맞춤형 질환 모델동물개발 연구사업단을 만들어 18년까지 42억을 투입한다고 발표하였으며 이미 보건의료기술 연구 사업이나 신약개발 공모서에 동물 모델 평가시스템을 개발한다는 내용들이 필수 요건으로 포함되는 추세이다.
- genome project의 완성과 맞물려 생물과학 분야가 21세기 주력 산업(학문이 아니라)이라고 하며 유전자 기능 연구, 신물질, 유용물질의 자원화에 이런 모델동물들이 중요한 연구대상인 동시에 개발대상이다.
- 남극 서식 종을 모델생물로 구축할 수 있다면 극한 환경 하에 생물 반응을 이해하고 기후 변화가 생태계에 미치는 영향에 관한 신뢰성 있는 과학적 지식과 non-model 생물 배양 기술 개발에 기여할 것이다.
- 특히 본 연구에서 구축하고자 하는 모델동물 극지 요각류는 뛰어난 저온 적응 능력과 독특한 체내 지질 성분(총 지질 함량 중 90% 이상의 wax esters 포함), 독특한 생리 대사물질을 가지고 있는 것으로 알려져 있어 -omics, metabolite 등의 생화학적 연구 재료로도 중요하다.

- 후보군 극지 요각류는 형태, 유전자 분석을 통해 남극 신종으로 추정되므로 종분화와 진화 과정을 반영하고 있음과 동시에 고립된 남극 대륙의 급격한 환경변화에 대한 생물들의 반응을 추적하는데 중요한 정보를 제공해 줄 수 있고 이 같은 특성을 이용하여 국지적 또는 전 세계적인 기후변화에 sensitive indicators 로 활용할 수 있다.

3. 과학적 측면

- 현재까지 극지 생물을 이용한 연구는 남극 좀새풀, 남극 nematoda 등 제한된 분야에 한정된 극지 생물들이었으며 아직까지 배양 보다는 채집, 포획에 의존한 제한된 연구만 수행되어 왔다.
- 남극 동물, 특히 남극 신종을 안정적인 모델 동물군으로 이용할 수 있다면 UV, 저온, 해양 오염, 해수 상승 등 극지 환경을 실험실에서 재현하면서 이들 생물의 생리적, 생화학적 변화, 유전적 변이 등 다방면에 걸친 연구를 진행할 수 있을 것으로 기대된다.
- 2014년 1월 남극 하계기간동안 채집된 *Tigriopus kerguelensis* s.l.은 분류학 측면에서 형태, 분자적 특성상 남극 신종으로 판단하였다.
- 요각류는 마리안 소만부터 포터코브를 잇는 조건대 물 웅덩이에 주로 서식하며 해양 어류의 먹이생물로 단순한 남극 생태계에 중요 이차 생산자이다.
- 고립된 남극 대륙 역사동안 독자적으로 진화해온 genome 정보를 제공하는 동시에 남극의 환경 적응에 따른 분자, 생화학적 정보를 포함하고 있을 것으로 기대된다.
- 특히 Tigriopus 속내 근연종들과의 분류학적 관계와 게놈 비교 분석을 통해 환경적 요인과 유전적 변이간의 상관관계를 추적할 수 있을 것으로 보인다.

4. 사회 · 문화적 측면

- 현대 과학은 과학자들, 교육제도, 목적 하에 이루어진 기업의 투자, 연구비의 배분 및 관리, 성과발표 및 특허 제도, 실험 기자재 관련 산업 등이 유기적으로 맞물려 작동하며 어떤 종류의 지식을 생산하고 그 지식을 어떻게 활용할 것인가를 결정하는 하나의 사회제도가 되고 있다.
- 남극에서 또는 남극 자원을 이용한 과학 활동 및 연구 결과는 지식, 정보의 확보를 통해 환경보존에 대한 인식과 기후변화 예방을 위한 제도 마련에 근거와 개연성을 제공할 수 있으며 나아가 인류의 복리를 증진시키는데 기여할 수 있을 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

가. 현재 개발 내용(기술)의 수준

1. 극지 모델생물을 이용한 국외 연구 현황

- The Antarctic *Chlamydomonas raudensis*: an emerging model for cold adaptation of photosynthesis (Dolhi et al., 2013)
- 454 GS FLX를 이용한 북극 요각류 *Calanus sinicus*의 전사체 분석 (Ning et al., 2013)
- 북극 우점 요각류 *Calanus finmarchicus* EST 분석 (Lenz et al., 2012)
- Antarctic krill, *Euphausia superba*, a model organism to understand the impact of global warming on the marine Antarctic ecosystem (Meyer, 2010)
- The Antarctic Nematode *Plectus murrayi*: An Emerging Model to Study Multiple Stress Survival (Adhikari et al., 2010)
- Biology's next top model (From Antarctic icefish to Galapagos finches) (Maher, 2009)
- Cell biology in the Antarctic: studying life in the freezer (Romisch and Matheson, 2003)
- Tale of a sleeping beauty: a new and easily cultured model organism for experimental studies on bdelloid rotifers (Segers and Shiel., 2005)
- Frog is a new prince of model organism (Vogel, 1999)
- CAREX Conference on life in extreme environments: CAREX Model organisms workshop 2009. 07
<http://www.carex-eu.org/activities/carex-conference-on-life-in-extreme-environments.html>
- 10th International congress on Extremophiles 2014.09
<http://www.extremophiles2014.ru/>

2. 극지 모델생물을 이용한 국내 연구 현황

- 극지연구소 연구진이 저온환경에 적응한 남극 대구의 전체 게놈 정보를 분석 (Shin et al., 2014)가 유일하다.

나. 현재 기술상태의 취약성

- 국내에서는 극지 무척추동물을 안정적으로 배양하고 실험 재료로 사용하고 있는 연구자들이 없으며 단기간을 제외하고 generation to generation 배양에 성공한 사례가 보고된 적 없다.
- 따라서 극지 무척추동물의 환경에 반응하는 생리적 변화, 성장속도, life cycle등에 대한 기본적인 지식도 부족한 상황이다.
- Toxicology, -omics 등 깊이 있는 과학적 지식과 환경변화에 따른 생물반응의 상관관계 연구를 위해서는 생물의 안정적인 공급과 활용이 용이하도록 laboratory culture system 구축이 시급하다.

다. 앞으로의 전망

- 극지연구를 위한 중요 모델 동물군의 개발 및 활용을 가능케 한다.
- 이들 모델 동물군은 2010-2013 극지연구소 경영목표 ‘극지환경 변화에 따른 생물적응과 생태계 반응평가’에 부합할 수 있다.
- 본 연구 동물은 남극 해양 생태계의 중요 먹이원으로써 기후변화에 따른 남극 생태계의 역할과 상위 포식자들의 생태적 지위 및 전체 생태계에 미치는 영향을 파악하는데 중요한 정보 제공 할 것이다.
- 장기간 연구를 통하여 남극의 환경변화와 동물의 분포 및 서식지에 미치는 영향을 모니터링 하고 예측하는데 기여할 것이다.
- 극지 생물연구는 대부분 극지 생물종 목록 확보와 환경 자료 축적, 제한된 극지 생물종에 대한 생리적 연구가 수행되어 왔으나 충분한 개체수 확보와 발생 생리학적 연구가 가능한 배양 가능한 모델생물은 다학제 연구로 확대될 가능성 크다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

가. 연구개발의 최종 목표

○ 남극 신종 해수 요각류를 이용한 극지 모델 동물 시스템 구축

나. 연구개발의 추진 계획 및 방법

구분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	추정연구비 (단위: 천원)
1차년도 (2014)	남극 신종 후보 <i>Tigriopus kerguelensis s.l.</i> 을 이용한 극지 모델 동물 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> 안정적인 배양 시스템 확립 형태, 유전자 분석을 통한 분류학적 위치 growth, development, life cycle 자료 축적 de novo Genome/Transcriptome analysis 	30,000

1. 월별 추진 계획

월	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6
과업내용												
○ 세부 추진계획 수립	■											
○ 배양 시설 구축		■	■	■								
○ 형태, 발생학적 분석		■	■	■	■	■						
○ Genome/Transcriptome 분석					■	■	■	■				
○ 배양 시스템의 안정화						■	■	■	■	■	■	■

2. 세부 추진계획 수립

- 2014년 1월 하계활동 기간에 세종기지 주변 펭귄마을 입구 조간대 웅덩이에서 채집한 추정종 *Tigriopus kerguelensis s.l.* 을 국내 실험실로 가져왔으며 다른 생물들

이 섞이지 않은 순배양 상태로 분리 배양

- 연구 대상종이 2014년 7월에 한양대 연구팀에서 신종 *Tigriopus kingsejongensis* Park and Lee in Park et al (2014)로 워싱턴 생물사회학회지에 보고한 것을 확인 (이하

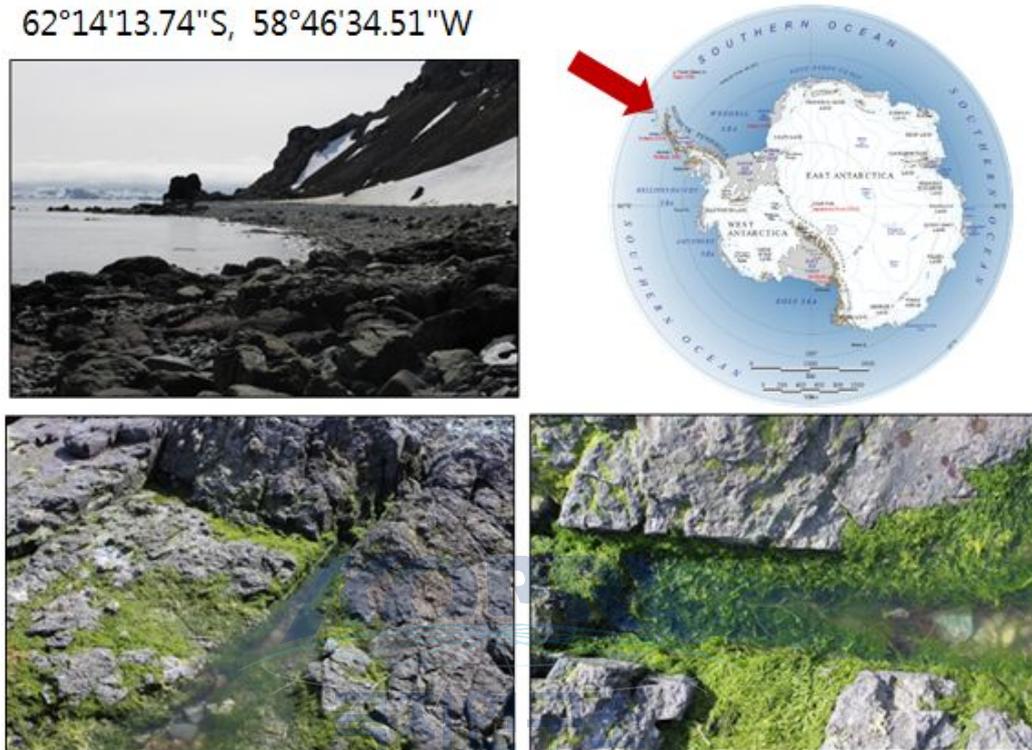


그림 1. 2013/2014 하계채집활동 동안 실험 대상 생물이 채집된 세종기지 펭귄마을 입구 조간대 전경

*Tigriopus kingsejongensis*로 표기) (Park et al., 2014).

- 배양온도는 2도, 8도, 15도, 20도 4가지 경우로 나누었고 광주기는 light: dark=16:8, 먹이는 국내 해수 미세조류 *Tetraselmis suecica*, 극지 *Chlamydomonas* sp. 2종 (ArF24, ArF8), 냉동 *Chlorella* sp. (인터넷 구입)을 선별하여 공급
- 배양액은 남극 해수 (33 psu)를 45 μ m 필터로 걸러 멸균 후 사용

○ 배양 시설 구축:

- 기존에 수행되었던 *Tigriopus* 종 연구 문헌 조사 및 연구범위, 수준 파악
- 배양에 필요한 물품구입, 제작 및 관리
- 실험실 내에서 full life cycle을 관찰하고 최적의 배양 조건을 갖추는데 주력

- 형태 발생학적 분석:
 - 비교종으로 사용하기 위해 같은 Genus 에 속하는 한국 서식종 *Tigriopus japonicus* 를 채집하여 성장, 발생 등의 비교를 통해 생리적 차이 파악
 - egg/Nauplius/Copepodit/adult 발생단계 주기와 형태차이 비교 분석
 - 한국종과 남극종 간의 온도별 성장조건과 최적 성장온도 파악

- Genome/Transcriptome 분석
 - de novo genomic analysis/transcriptome analysis 진행
 - metabolite, lipidomics 분석을 위한 유전정보 토대 마련

다. 연구개발 추진 체계



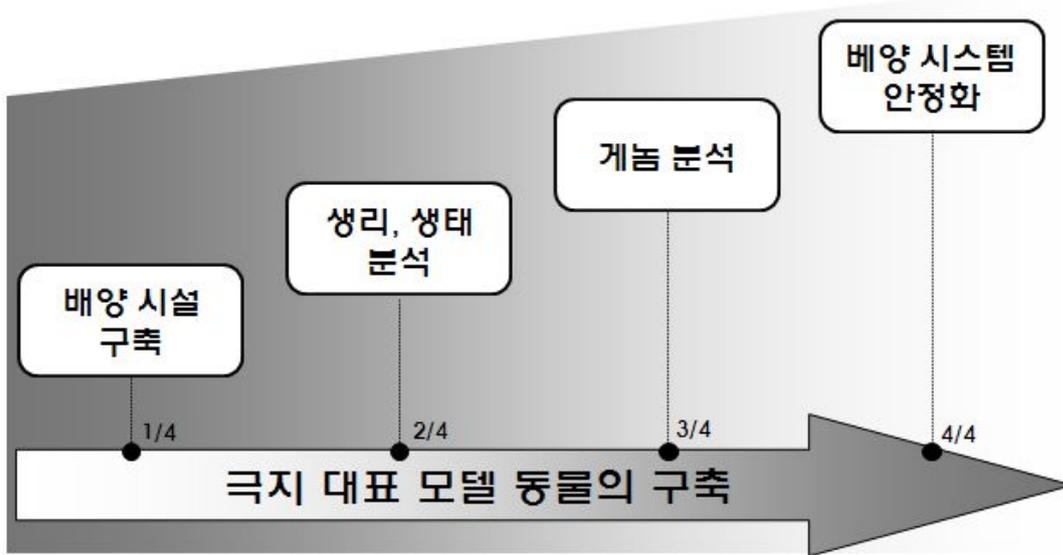


그림 2. 연구개발 추진도

라. 연구 결과

- *Tigriopus kingsejongensis* 완전한 생활사를 파악하고 개체수의 감소 없이 충분한 집단크기를 유지하기 위해서 빛, 온도 등의 배양 조건과 특히 적합한 먹이 선별에 중점을 두었다.
- 남극 인근 대륙과 남극 대륙에 서식하는 *Tigriopus*의 군집 구조와 서식지에 따른 발생 행동학적 차이점 등을 유전자 수준에서 이해하기 위해 전체 transcriptome, genome 분석을 수행하였다.

1. 배양 시스템 안정화

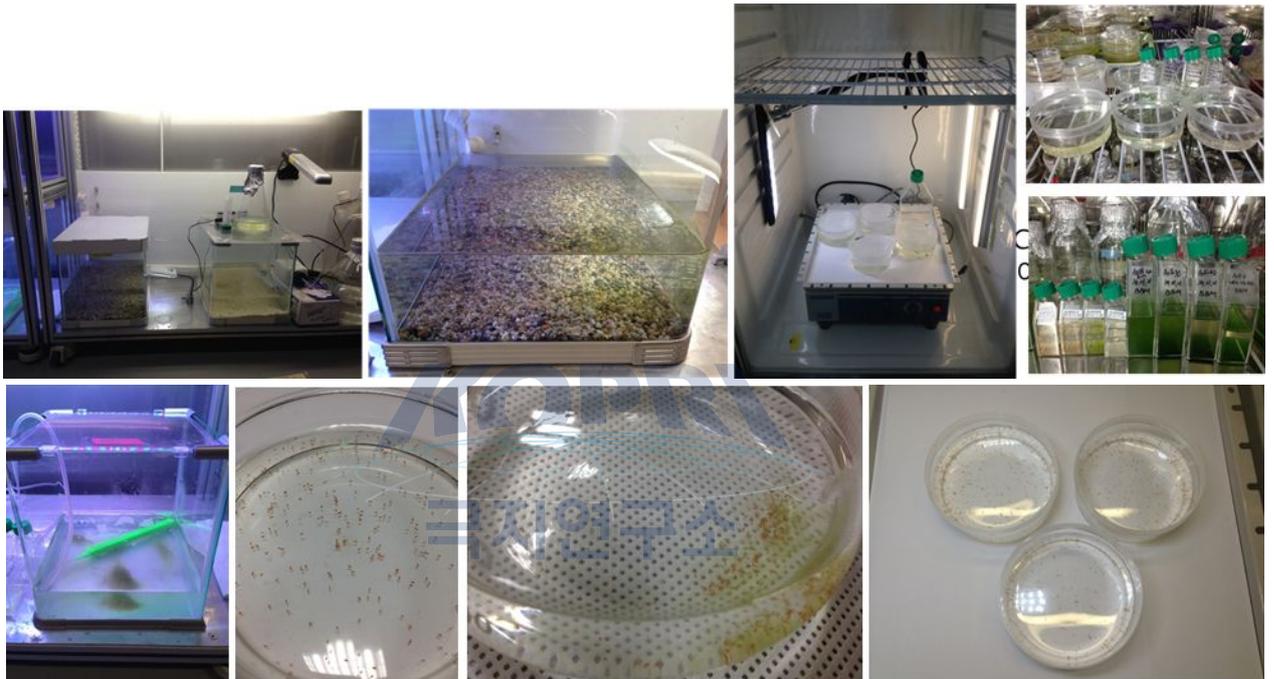


그림 3. 저온 배양 시설 및 먹이원 관리

- 2014. 2. 24일부터 2014. 06. 28일까지 배양 관찰일지 작성 시작
- 배양온도는 10도 전후에서 키웠으며 전사체 분석을 위해 2도, 8도, 15도, 20도 4가지 배양조건을 사용하였으며 온도처리 기간은 6시간 또는 24시간으로 나누었다.
- 광주기는 light: dark=12:12, 먹이는 국내 해수 미세조류 *Tetraselmis suecica*, 극지 *Chlamydomonas sp.* 2종 (ArF24, ArF8)을 배양 배지에 키워서 centrifuge한 뒤 해수로 치환한 뒤 사용하였고 냉동 *Chlorella sp.* (인터넷 구입)는 수시로 공급해 주었다.
- 남극종의 적정 배양온도는 0 - 15도 사이이고 최적 온도는 6 - 12도 사이로 보이며 배양 온도 15도 이상에서는 알들의 부화율이 현저히 떨어졌고 암컷들이 포란하고 있던 알주머니(egg pouch)가 떨어지는 현상 관찰

- 8도에서 키운 유생들이 copetilde 단계에 이르기까지 대략 21일이 걸리며 성체가 되는 기간은, 4도 이하에서는 약 2달, 15도에서는 4 -6 주가 걸리는 것으로 관찰됨
- 3rd generation (1st egg through 3rd egg 출현으로 계산) 까지는 3달 소요

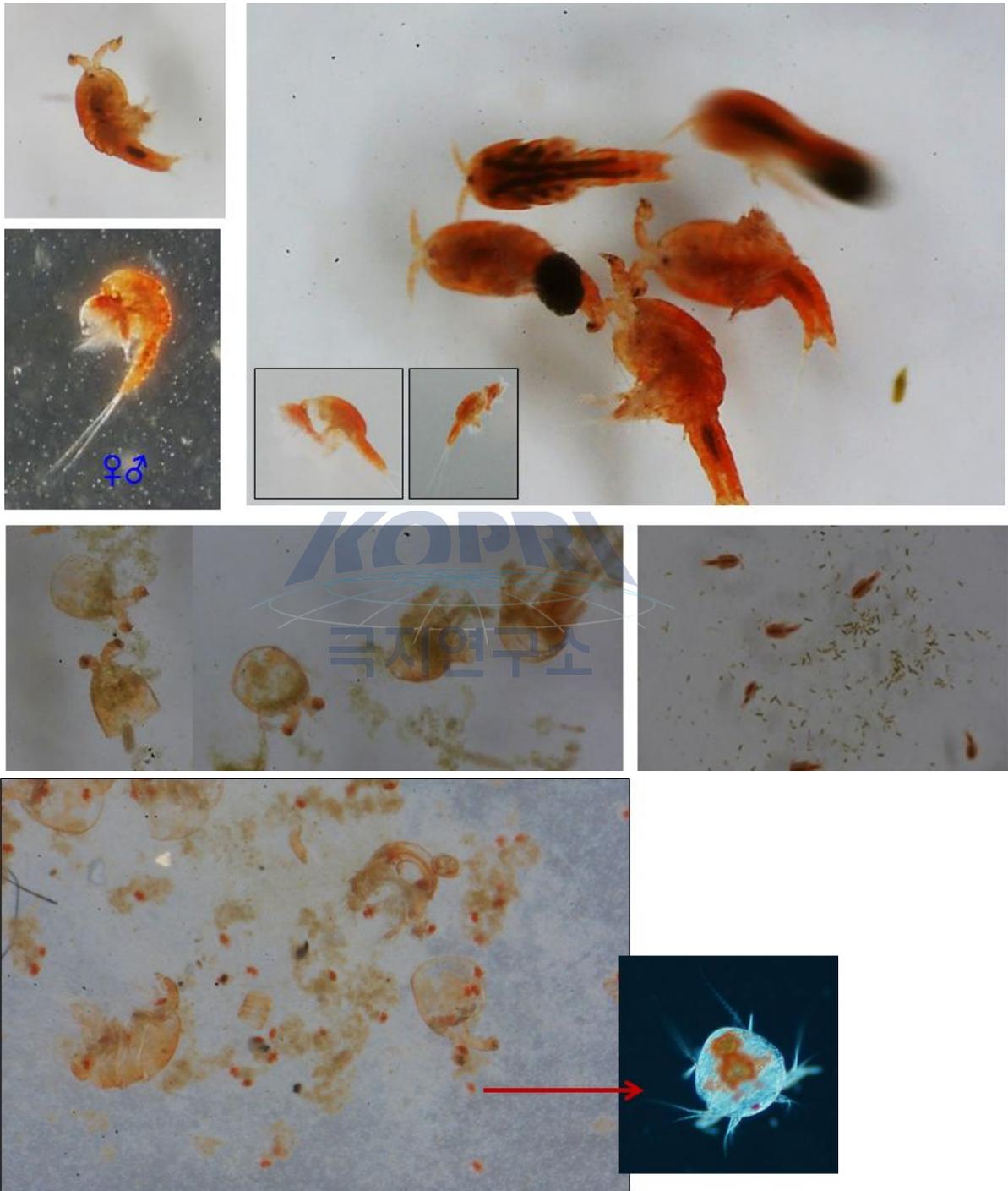


그림 4. 남극 요각류 유생, 성체, 교배, 탈피각 사진들

2. 형태 발생학적 분석

- 비교군으로써 성장, 발생 등의 비교를 위해 2014년 5~6월, 동해안, 서해안 조간대 조사를 실시한 결과, 같은 Genus에 속하는 동아시아 서식종 *Tigriopus japonicus*를 서해안 을왕리 선녀바위 주변에서 채집하여 남극종과의 생리적 차이를 파악하는데 이용하였다.
- Egg/Nauplius/Copepodit/adult 발생단계 주기와 형태차이 비교 분석하였다.
- 서해안 서식종은 20도, 남극종은 10도 전후의 최적 성장온도를 보였으며 서해안 종은 10도 이하에서 발생이 느려지며 4도 이하에서는 부화율이 떨어졌고 반대로 남극종은 20도 이상에서는 발생을 멈췄고 몇 주안에 죽는 것이 관찰되었다.

표 1. 서해안 서식종 *Tigriopus japonicus*와 남극 고유종 *Tigriopus kingsejongensis* 유생들의 발생단계별 형태 (강모수 변화) 비교

Nauplii of *Tigriopus japonicus* (from Dahms et al, 2007) *A: aesthetasc

Nauplii	Caudal setae	Antennule setae	Antenna		MD		Maxillule setae	
			Basis setae	Exopod setae	Exopod setae	Endopod setae		
I	1	1-3-4	2	1-1-1-3	1-3	3+ claw	0	
II	1	1-3-4A	3	2-1-1-3	1-3	4+ claw	1	
III	3	1-3-6A	4	2-1-1-3	1-3	5+ claw	?	
IV	4	1-3-7A	4	2-1-1-4	1-3	5+ claw	2	
V	4	1-3-9A	5	3-1-1-3	1-3	5+ claw	2	
VI	4	1-3-13A	0	3-1-1-5	2-3	6+ claw	3	

Nauplii of Antarctic *Tigriopus kingsejongensis* Park and Lee in Park et al (2014) (observed by Il-Hoi Lee)

Nauplii	Caudal setae	Antennule setae	Antenna		Mandible		Maxillule setae	
			Basis setae	Exopod setae	Exopod setae	Endopod setae		
I	1	0-3-2A	3	1-2-3	1-3	4+ claw	0	
II								
III	3	0-3-6A	4	3-1-1-3	2-3	6+ claw	1	
IV	4	0-3-7A	4	3-1-1-3	2-3	6+ calw	2	
V	4	0-3-9A	4	3-1-1-3	2-3	6+ claw	2	
VI	4+1	0-3-12A	4	3-1-1-3	2-3	6+ claw	3	

Observed samples

부화 일자	Nauplii						Copepodids						해부 개체	비고
	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI		
5.7	> 1 0												1	
5.3	10												X	
4.30			3	1	3								각각 1개체	
4.26			3		5								X	
4.18				4										
4.10				2	4									
4.5			1		3								각각 1개체	
3.31					2									
3.27						5							1	다른 요각류 NVI 6 개체 섞임
3.21							> 1 0						1	
C 단 계							1	1	5	1				

- Angennule의 강모수는 유생단계별, 종별로 달라 종동정에 중요한 형질인데 서해안 선녀바위에서 잡은 *T. japonicus*와 남극 종 *T. kingsejongensis*는 이 강모수에서 차이가 났다.
- Nauplius I에서 첫째-세번째 마디의 강모수는 남극종의 경우 0, 3, 2+aesthetasc인데, 서해안 *T. japonicus*에서는 1, 3, 4개로 기록되어 있다.
- 남극 종 성체의 antennule 7번째 마디가 특이한 형태이며, 주변 남극 종 *Tigriopus kerguelenensis* 에 비해서도 P1의 basis inner seta, P2의 endopod 길이가 더 긴 것으로 관찰되었으며 P2의 endopod 2번째 마디에 돌기가 관찰되었다 (본 연구자 관찰 자료와 한양대 조미진 석사논문 참조).

3. 유전체 분석

- 남극, 서해안 2종에 대해 Gentra Puregene Blood kit(Qiagen)을 이용해 total gDNA를 추출한 뒤 paired-end library용으로 300, 350, 400, 450, 500 bp, mate-pair library용으로 3, 8kb 등 총 7종류의 라이브러리를 제작하였다.
- 발생단계별 각 8개, 온도별 각 4개 샘플에서 RNA를 추출하여 각 전사체 라이브러리를 제작하였다.

- total gDNA를 약 500 - 600bp 길이로 자른 다음 단편들의 양쪽 끝에 Adaptor를 붙여 라이브러리를 만든 후 300 x 300 으로 MiSeq을 통해 염기서열을 분석하였고 어셈블리를 위해서 fastq_quality_trimmer를 사용하여 신뢰도 높은 서열들만을 선택하였다.
- Celera assebler (v.8) (Myers et a., 2000), fastqToCA라는 Script를 사용하였고 annotation 은 MAKER, SNAP software, RepeatMasker, BLASTn, tBLASTx, TopHat52, Cufflinks53 등을 이용하였다.

표 2. Statistics of genome assembly of *T. kingsejongensis*

Celera assembler (Version :8.0)		
Scaffold	Total scaffold length (bases)	295,233,602
	Gap size (bases)	10,474,460
	Scaffolds (n)	11,558
	N50 scaffold length (bases)	159,218
	Max scaffold length (bases)	3,401,446
Contig	Total contig length (bases)	305,712,242
	Contigs (n)	48,368
	N50 contig length (bases)	17,566
	Max contig length (bases)	349,507

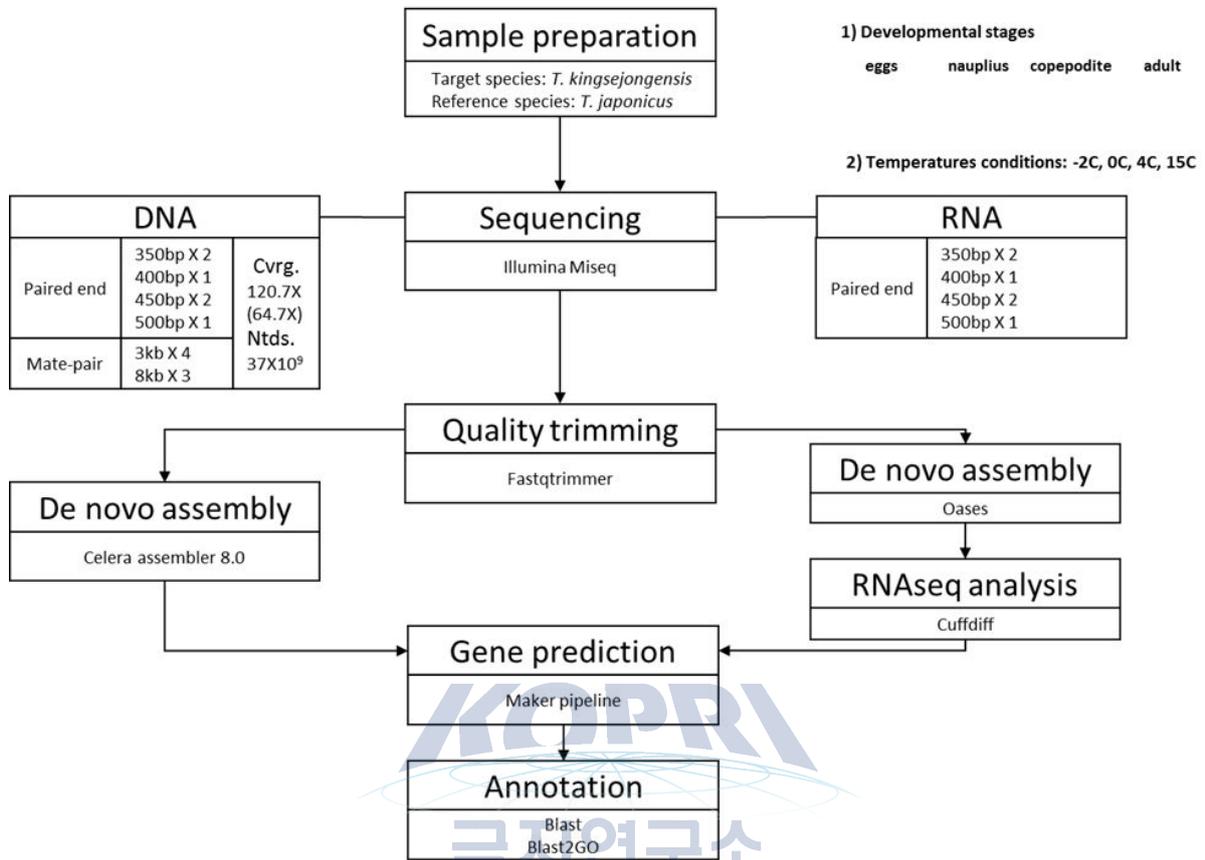


그림 5. Genome sequencing, assembly and annotation pipeline

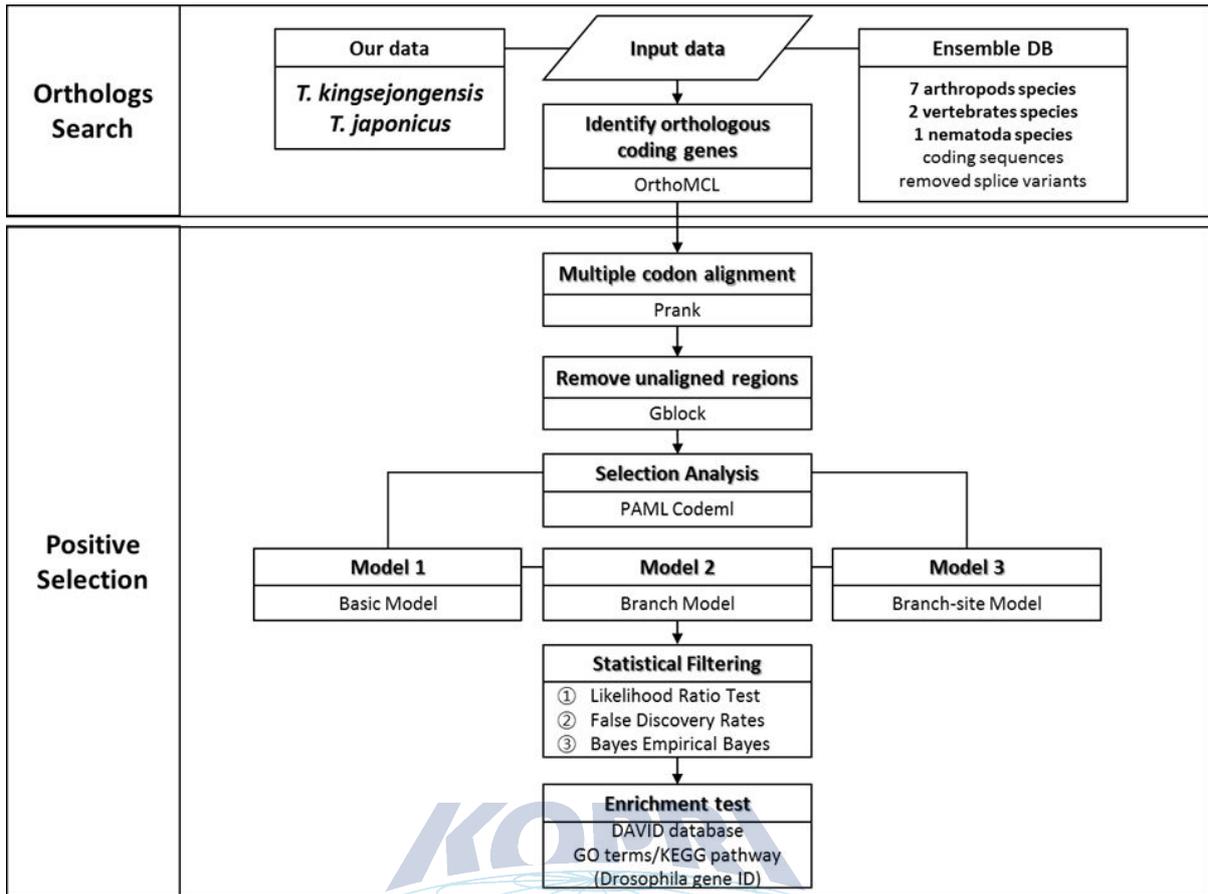


그림 6. Gene families and Positive selection analysis workflow

표 3. Statistics for each DNA library of *T. kingsejongensis*

Library		Reads (n)		Sequences (bp) (n)		Reads (trimmed) (n)		Sequences (trimmed) (n)	
			Ave. length				Ave. length		
Paired-end	Sum	99,710,266		29,271,916,613		65,644,374		14,668,956,871	
	350	6,661,392		300	2,005,078,992	4,446,394	233	1,034,231,244	
	350S2	4,933,058		265	1,311,700,122	4,618,711	211	975,471,763	
	400	65,668,598		300	19,766,247,998	36,863,154	228	8,397,426,481	
	450	3,418,988		300	1,029,115,388	2,812,455	230	646,302,159	
	450S2	8,009,162		245	1,968,652,020	7,660,814	199	1,527,566,312	
	500	11,019,068		289	3,191,122,093	9,242,846	226	2,087,958,911	
Mate-Paired	Sum	103,373,998		7,753,049,850		73,515,391		5,169,006,268	
	3KS1	8,374,238		75	628,067,850	6,745,546	73	493,099,413	
	3KS2	9,250,994		75	693,824,550	5,281,513	65	344,618,723	
	3KS3	51,349,594		75	3,851,219,550	39,147,167	72	2,816,638,666	
	3KS4	3,063,232		75	229,742,400	1,740,986	65	112,554,745	
	8KS1	9,847,636		75	738,572,700	7,887,612	73	572,246,251	
	8KS2	16,322,038		75	1,224,152,850	9,653,293	65	630,842,698	
	8KS3	5,166,266		75	387,469,950	3,059,274	65	199,005,774	
Total	203,084,264		37,024,966,463		139,159,765		19,837,963,139		
Coverage (folds) [†]				120.7				64.7	

표 4. Sequencing statistics of transcriptome analysis of each organ of *T. kingsejongensis*

Illumina MiSeq		KOPRI 극지연구소			
		Adult	Egg	Nauplius	Copepodite
Illumina MiSeq	Total reads (n)	13,927,140	11,474,334	11,117,114	9,324,280
	Total bases (n)	1,044,535,500	860,575,050	833,783,550	699,321,000
	Trimmed reads (n)	13,917,242	11,389,352	11,077,234	9,124,763
	Trimmed bases (n)	1,029,875,908	820,033,344	808,638,082	675,232,462
Illumina MiSeq (RNAseq)		Mom-4	Mom-15	Tot-4	Tot-15
	Total reads (n)	8,100,012	7,577,612	7,686,106	8,839,460
	Total bases (n)	1,830,602,712	1,712,540,312	1,737,059,956	2,050,754,720
	Trimmed reads (n)	7,597,004	7,114,494	7,248,099	8,274,019
	Trimmed bases (n)	1,413,042,744	1,294,837,908	1,348,146,414	1,538,967,534

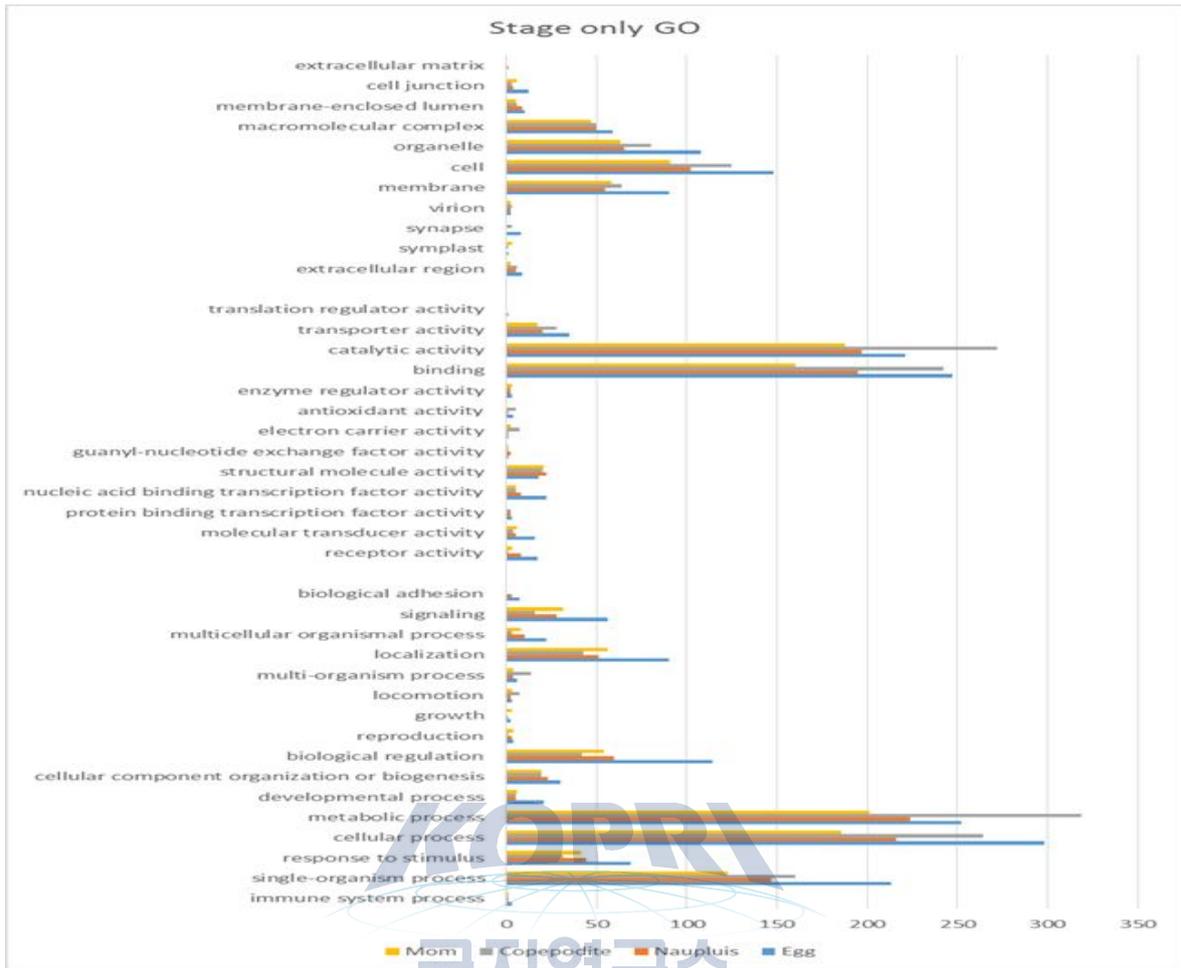


그림 7. *Tigriopus kingsejongensis* 발생 단계별 GO 분석

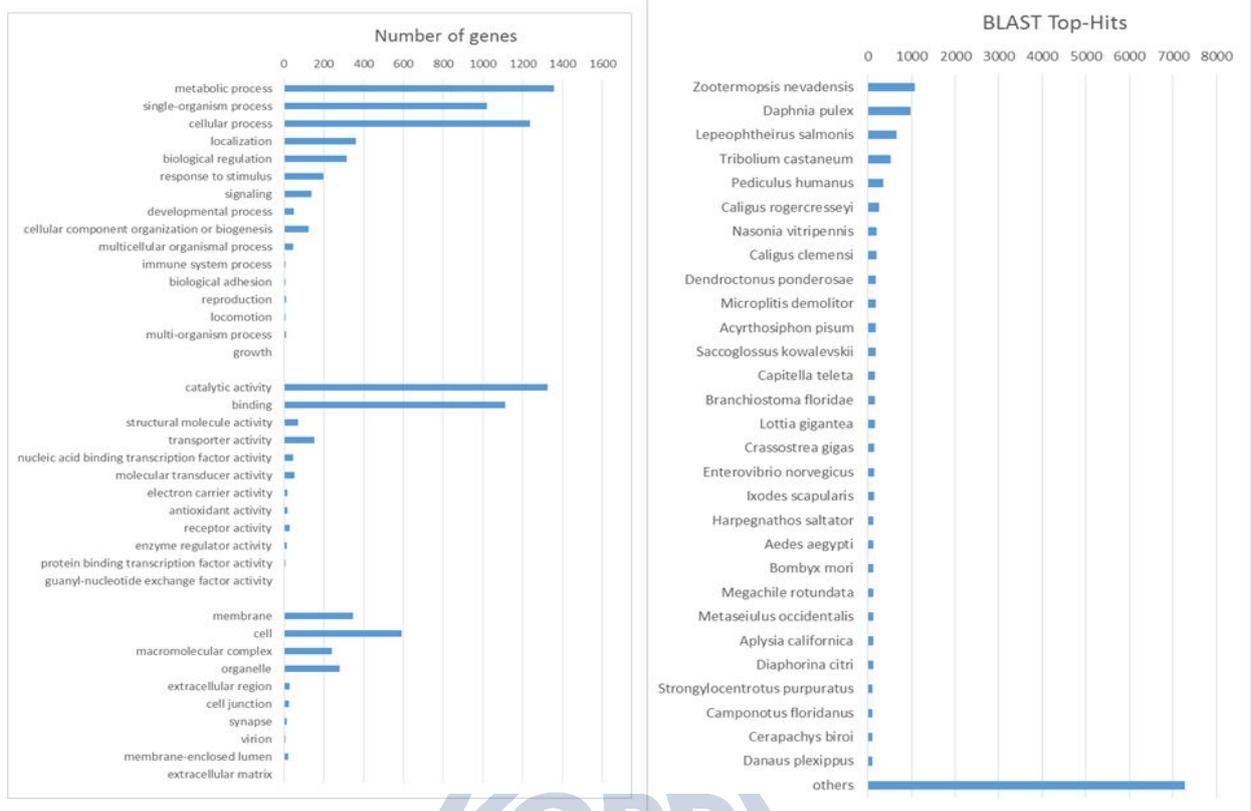


그림 8. *Tigriopus kingsejongensis* GO분석(왼쪽)과 Blast top-hits 유전자 수



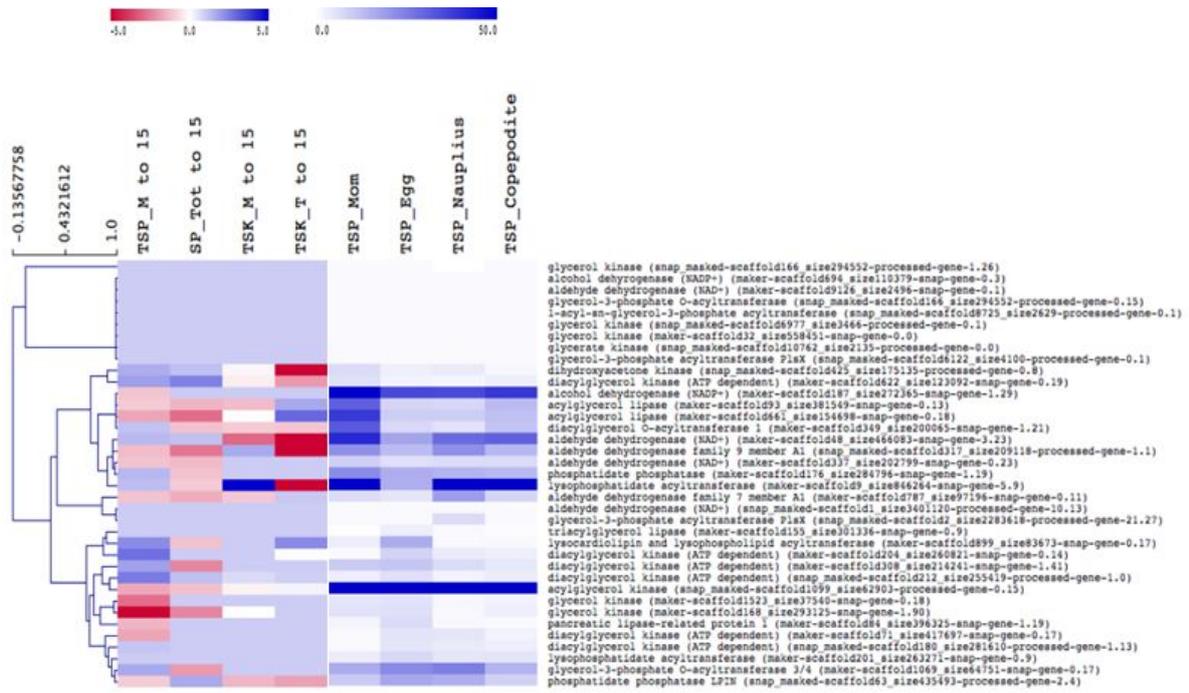


그림 9. Glycerolipid pathway in *T. kingsejongensis*



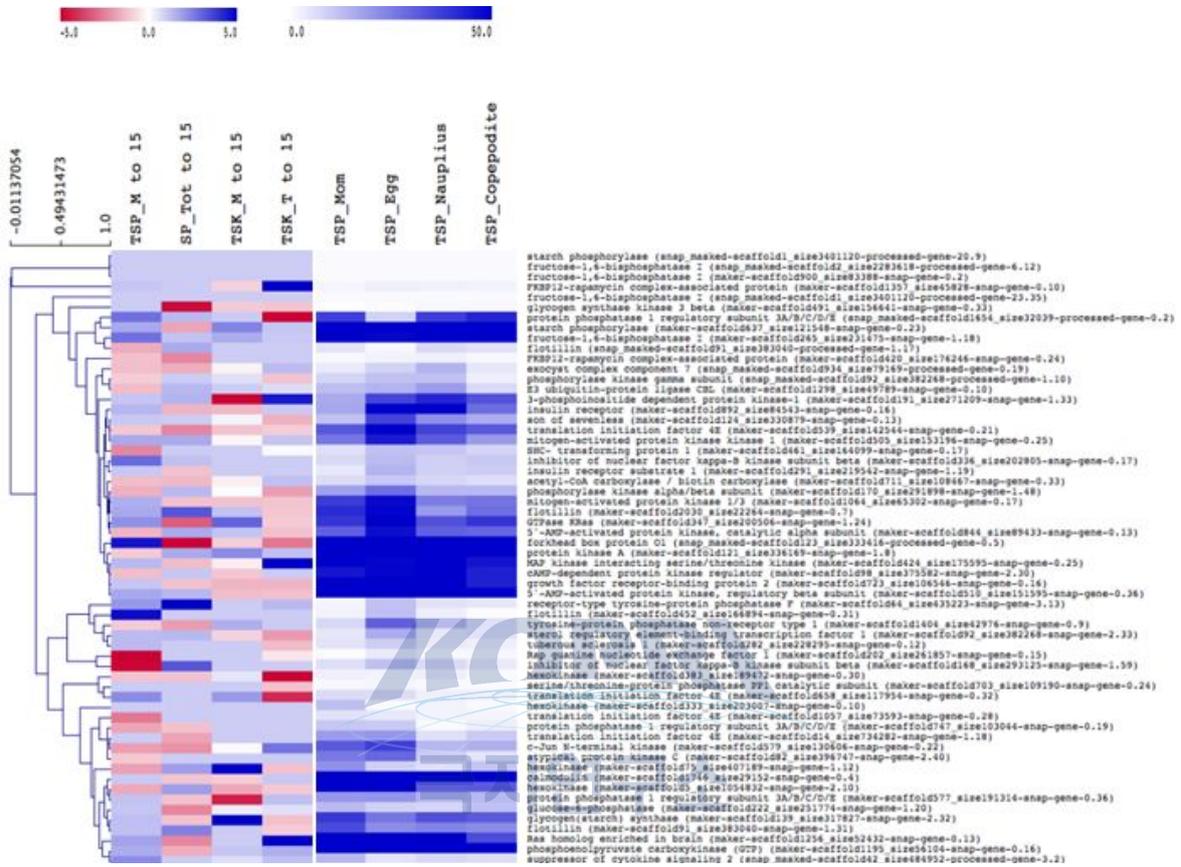


그림 10. Insulin Pathway in *T. kingsejongensis*

㉔ 5. Sequencing statistics of transcriptome analysis of each organ of *Tigriopus japonicus*

		Mom-4	Mom-15	Tot-4	Tot-15
Illumina MiSeq (RNAseq)	Total reads (n)	5,968,132	12,934,070	9,447,282	9,606,676
	Total bases (n)	1,372,670,360	2,522,143,650	1,936,692,810	1,882,908,496
	Trimmed reads (n)	5,565,031	12,166,279	8,862,566	8,983,760
	Trimmed bases (n)	1,035,095,766	1,983,103,477	1,506,636,220	1,464,352,880

㉔ 6. Assembly results of transcriptome analysis of each organ of *Tigriopus japonicus*

contigs (n)	40,172
Total contig length (bases)	28,850,726
N50 contig length (bases)	1,093
Max scaffold length (bases)	23,942
With Blast Results	20392
Without Blast Hits	7090
With Mapping Results	8172
Annotated Sequences	4518

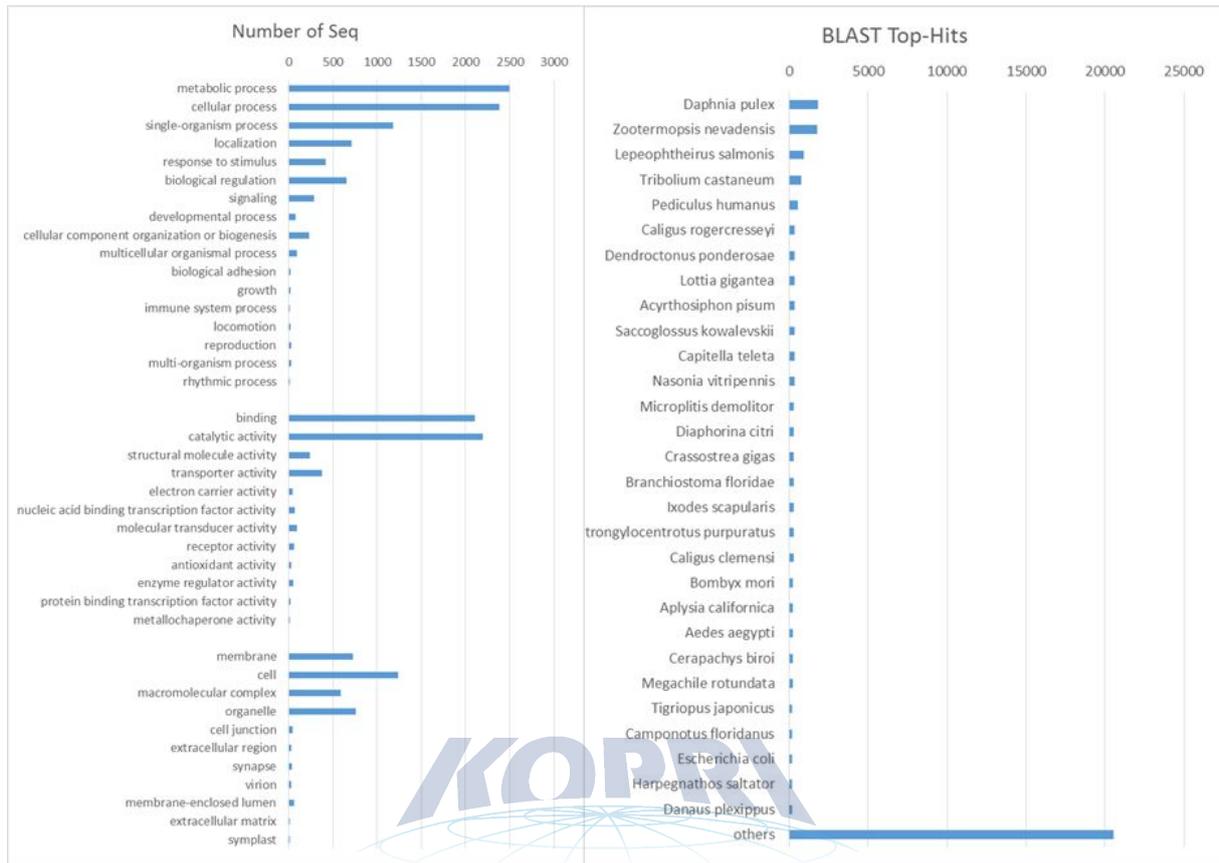


그림 11. *Tigriopus japonicus* GO분석(왼쪽)과 Blast top-hits 유전자 수

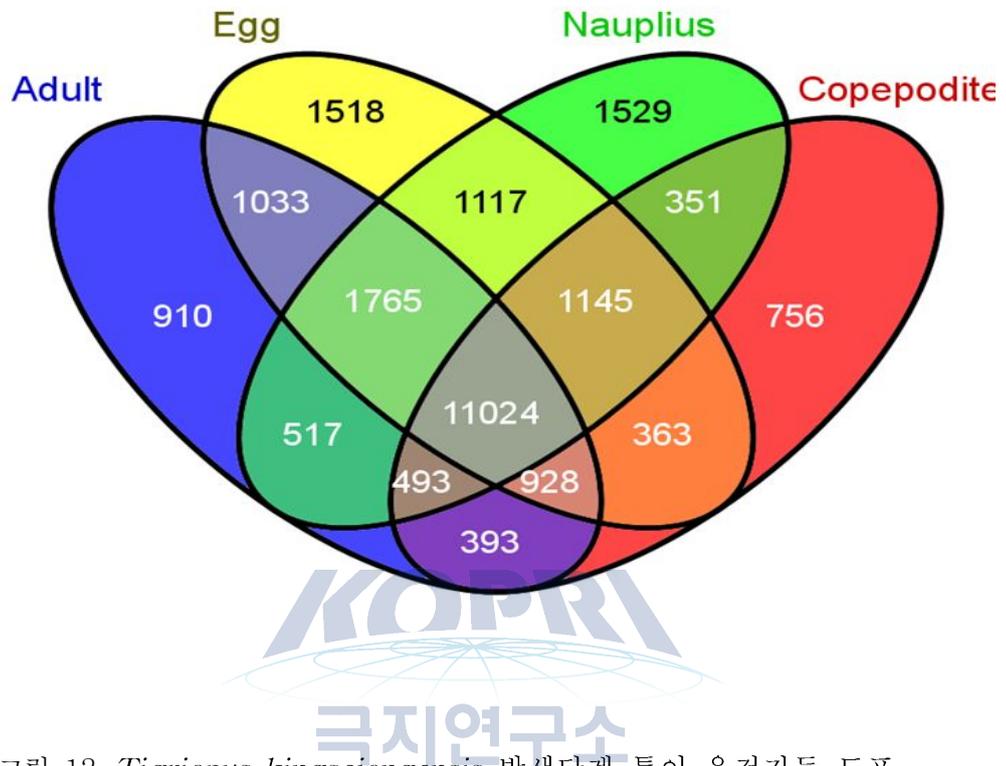


그림 12. *Tigriopus kingsejongensis* 발생단계 특이 유전자들 도표

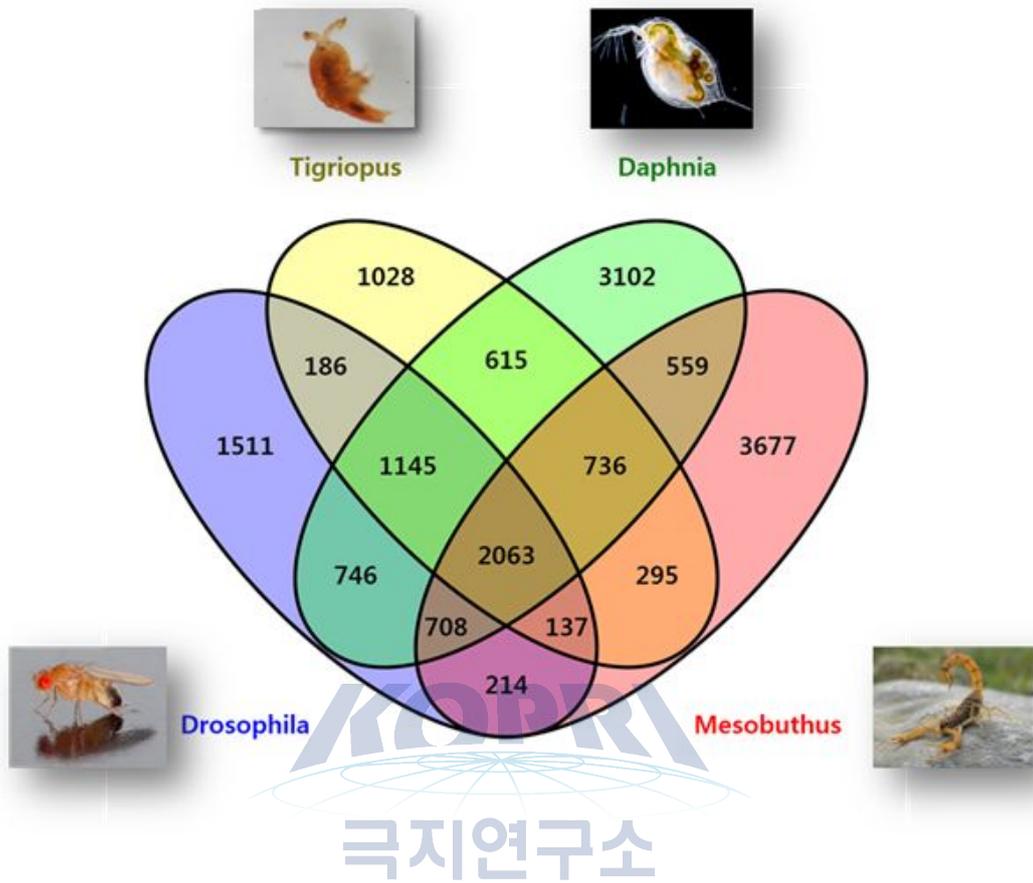


그림 13. Venn diagram of the shared gene families. Comparison among the four arthropod species (copepod, mosquito, fruit fly and water flea) identified that 2,063 gene families were shared by the four species. *T. kingsejongensis* shares 4,562 (73.5%) gene families with *Daphnia pulex* the most which belong to the same Crustacean lineage. The *T. kingsejongensis* specific gene families were 1,028 and significantly enriched in ATPase activity (8 genes; $P < 0.01$) and active transmembrane transporter activity (12 genes; $P < 0.01$).

- 현재 게놈 정보가 알려진 절지동물들 중 요각류와 유연관계가 가까운 3종 (mosquito, fruit fly, water flea)와 공통되는 유전자들을 분석한 결과 남극종만 가지고 있는 1,028 개의 종 특이 유전자 정보를 확보하였다.
- 외부 환경변화에 의해 많은 대사 관련 유전자들의 발현이 변화하게 되고 이는 생리적 조절로 이어지게 되는데 환경과 유전자변화 간의 상관관계를 알기 위해 진화선택 (evolutionary positively selected)을 받은 유전자들을 조사하였다.
- 탄수화물, 지질 metabolic pathway에 관련된 유전자들에서 많은 단백질 변이율을 보였으며 특히 oxidative phosphorylation pathway에 관련된 유전자들은 서해안종과 비교해 봐도 5.71배나 차이를 보였으며 이는 분류학적 유연관계와 상관없는 남극종만의 특이 현상으로 보인다.
- 추운 환경에 적응하기 위해 해당과정과 TCA회로에서 생성된 고에너지 전자가 전자전달계를 따라 이동하는 과정에서 단계적으로 방출된 에너지를 이용하여 생체에너지 ATP를 생산하는 산화인산화 (Oxidative phosphorylation) 과정을 고효율 또는 고효율화 한 것으로 추정된다.

표 7. Enriched GO categories identified by PSGs from the *T. kingsejongensis*.

Category	GO IDs	GO descriptions	Genes	%
Cellular process	GO:0005811	lipid particle	7	9.9
Biological Process	GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	6	8.5
Biological Process	GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	6	8.5
Molecular Function	GO:0022890	inorganic cation transmembrane transporter activity	5	7.0
Cellular process	GO:0044455	mitochondrial membrane part	5	7.0
Biological Process	GO:0032268	regulation of cellular protein metabolic process	5	7.0
Biological Process	GO:0006119	oxidative phosphorylation	5	7.0
Molecular Function	GO:0051540	metal cluster binding	4	5.6
Molecular Function	GO:0051536	iron-sulfur cluster binding	4	5.6
Molecular Function	GO:0015078	hydrogen ion transmembrane transporter activity	4	5.6
Molecular Function	GO:0015077	monovalent inorganic cation transmembrane transporter activity	4	5.6
Molecular Function	GO:0008135	translation factor activity, nucleic acid binding	4	5.6
Molecular Function	GO:0004386	helicase activity	4	5.6
Biological Process	GO:0010608	posttranscriptional regulation of gene expression	4	5.6
Cellular process	GO:0005753	mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex	3	4.2
Cellular process	GO:0045259	proton-transporting ATP synthase complex	3	4.2
Biological Process	GO:0015986	ATP synthesis coupled proton transport	3	4.2
Biological Process	GO:0015985	energy coupled proton transport, down electrochemical gradient	3	4.2
Biological Process	GO:0007277	pole cell development	3	4.2

- 또한 남극 종에서 일주기 리듬에 관련된 유전자들이 대부분 발견되었는데 DNA복제나 세포분열이 빛에 의한 손상으로부터 자유로운 밤에 이루어지는데 일주기 리듬을 관장하는 유전자와 세포주기를 관장하는 유전자 사이에 밀접한 연결고리가 있다고 알려져 있다.

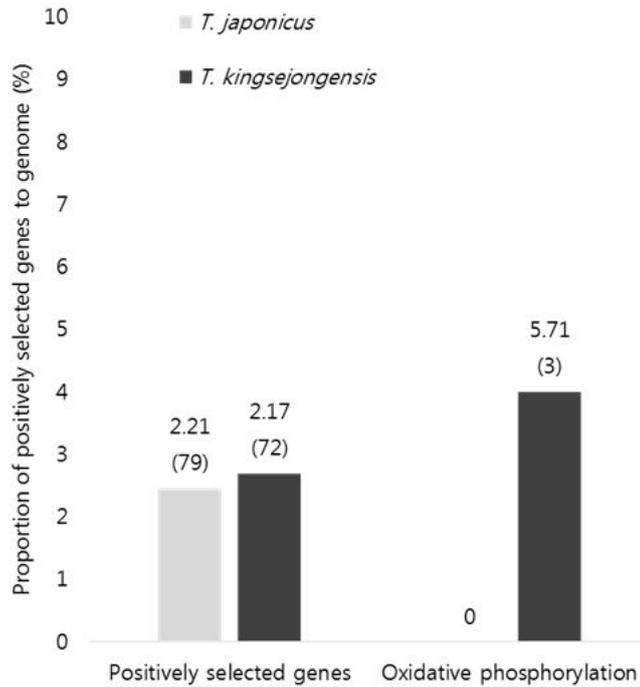


그림 14. Proportion of PSGs to genome and oxidative phosphorylation pathway

- 일주기 활동패턴, 섭식, 호르몬 분비, 체온의 변화, 물질대사를 비롯한 수많은 생리, 생화학적 생명현상이 하루를 주기로 일정한 리듬을 나타내는 circadian rhythm이 남극의 white night에서는 어떻게 조절되는 지도 향후 중요 연구 주제다.
- 극지 요각류는 뛰어난 저온 적응 능력과 독특한 체내 지질 성분을 가지고 있다고 알려져 있는데 이를 증명하듯이 유전체 분석을 통해 다수의 지방산 대사 관련 유전자들을 발견하였고 향수 이들의 분자, 생화학적 분석을 통해 저온 적응 기작의 특성을 밝히려고 한다.

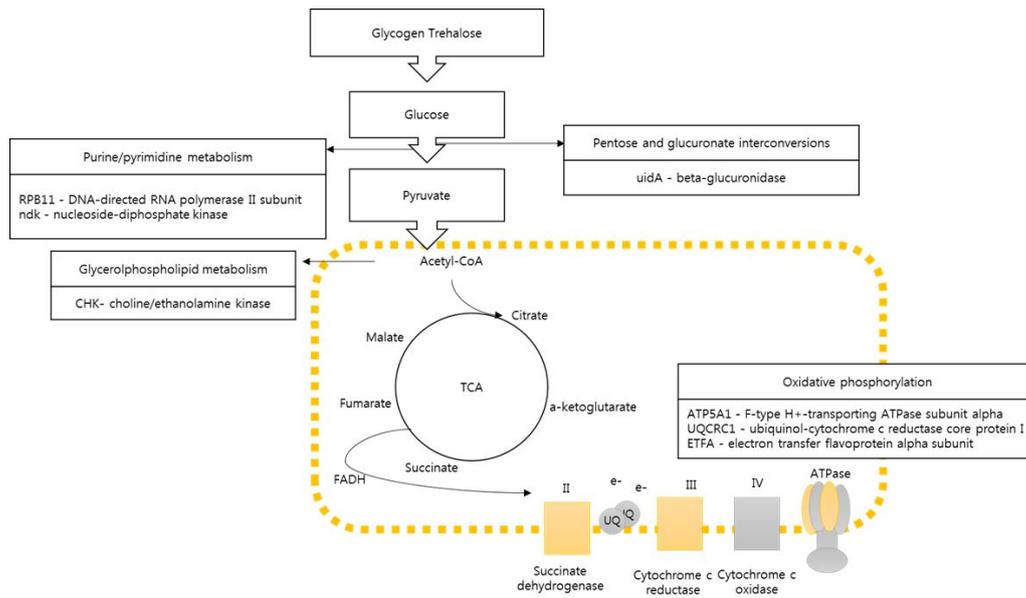


그림 15. A total of six enzyme coding genes were PSG involved in metabolic pathways.



제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도

가. 연구개발 목표의 달성도

성과 목표	세부 목표		달성 주요 내용	달성도(%)
남극 해수 요각류를 이 용한 극지 모델생물의 구축	1.	안정된 배양화 시스템 구축	- 성공적인 generation to generation 상태 유지 - 실험 재료로 충분한 양의 개체수 확보	100%
	2.	진화 계통 정보 및 유전자 정보 확보	- 환경에 따른 단백질 변이율의 상관 관계를 추적하기 위한 후보 유전자 군 발굴 - 인근 대륙에 서식하는 근연종과의 종분화 기작을 위한 계통 정보 확보	100%

나. 대내외 기여도

- 남극 무척추동물을 안정적으로 실험실에서 배양하는데 필요한 기술 및 정보를 축적하였으며 구축된 배양 기술을 이용해 대상 연구 생물의 범위를 넓힘으로써 극지 생물 활용도가 커질 것으로 예상된다.
- 현재 본 연구자는 축적된 배양기술을 활용해 여러 종류의 남극 생물들을 배양하고 있으며 특히, 남극 빙하가 녹아 이루어진 세종기지 주변 담수호에 서식하는 담수 요각류 또한 안정적으로 유지하고 있으며 2015/2016 하계시즌에는 보다 다양한 생물들을 채집해서 배양을 시도하려고 한다.
- 극지 동물 생리 발생 연구를 통해 환경 변화에 따른 동물의 행동, 생식, 군집 변화 양상을 예측하고 그 결과, 요각류의 먹이사슬을 통해 전체 남극 생태계에 미치는 영향을 예측할 수 있는 기반을 마련한 데 의의가 크다.
- 미세조류 등을 제외하면 지속적인 배양이 되는 극지 무척추동물은 Nematode가 유일하며 본 연구를 통해 남극 고유종 요각류를 이용한 극지 모델생물로 이용하는 토대를 마련하였다고 할 수 있다.
- 첫 극지 서식 무척추동물로써 귀중한 연구재료를 제공해 줄 것으로 기대되며 이미 성균관대 (이재성 교수팀, UV 관련 DNA repair 기작연구), 중앙대 (설우준 교수팀, 장내 미생물 분석을 통해 저온활성 유전자원 개발), 가천대 (이철순 교수팀, 유용지

방산 분석), 부경대 (이현우 교수팀, 생식관련 유전자 vitellogenin 연구를 통해 생식 주기 연구)와 활발한 research network을 구축하였고 일부 연구 결과는 현재 논문화 작업 중이다(아래).

- Transcriptome profiling of the Antarctic copepod *Tigriopus kingsejongensis* (Copepoda, Harpacticoida) by Illumina RNA-seq (투고 완료)
- Development of eight microsatellite loci for the Antarctic copepod *Tigriopus kingsejongensis* (8월 투고 예정)
- Draft genome of *Tigriopus kingsejongensis* (가제, 논문 작성 중)

Research Network 구축



그림 16. 극지종을 모델생물로 여러 분야 연구자들과 공동 연구 진행

제 5 장 연구개발결과의 활용 계획

- 극지 생물은 고립된 독특한 환경에 적응하는 과정에서 다른 기후대에 서식하는 생물들에서는 볼 수 없었던 분화된 특정 물질들을 함유하고 있는 것으로 알려져 있어 자원개발 및 유전자원의 확보 차원에서도 의미가 크다.
- 극지 조간대는 낮과 밤의 기온차, UV 강도, 건조 stress 등 극히 제한된 서식지에서

짧은 시간 내 다양한 환경변화가 일어나고 있으며 이런 서식처에서 생존하기 위해 요각류는 다양한 방어 기작과 물질을 발달시켰기 때문에 맞춤형 환경 적응 연구 모델을 제공한다.

- 기후 변화와 서식지변화 등에 영향을 받기 쉬우며 이들을 지역 지표종으로 활용한다면 대형생물 위주의 환경 모니터링과 차별화된 특성을 보여줄 것이며 환경평가에 지표로 활용될 수 있을 것으로 보인다.
- 계놈 정보를 통해 극지생물을 대상으로 하는 신물질 개발 연구, 독성연구, 생물 진화, 계통 연구에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.
- 극지 요각류가 가지고 있는 독특한 체내 지질 성분과 항산화물질을 가지고 있다고 알려져 있어서 유용 단백질, 지질 개발에 좋은 생물 재료이다.
- 특히 남극 중에서 유전자 duplicate으로 유전자 수가 많고 과발현 되어 다량의 축적이 있는 것으로 예상되는 단백질 **Trehalose**의 경우 생물계에 존재하는 대표적 방어 물질로 산업적 활용도가 상당히 높다. 예를 들면 쓴 맛을 줄이는 풍미제, 음식 동결 보존제, 감미료, 보습제, UV 차단제, 혈장 대체제, 항우울증 치료제, 백신 안정제 등으로 사용되고 있으며 trehalose 유전자를 넣어 저온 내성 벼를 만들었다는 보고도 있는 만큼 극지 유래의 새로운 trehalose를 이용한 산업화 가능성을 모색해 볼 수 있다.

극지연구소

제 6 장 참고 문헌

- Eun-Ok Park, S.L., Mijin Cho, Suk Hyun Yoon, Yoon Lee, and Wonchoel Lee. 1. A new species of the genus *Tigriopus* (Copepoda: Harpacticoida: Harpacticidae) from Antarctica. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 127, 138-154 (2014).
- Michael A. S. Thorne, H.K., Melody S. Clark, Craig J. Marshall, David A. Wharton. Molecular Analysis of the Cold Tolerant Antarctic Nematode, *Panagrolaimus davidi*. *PLoS ONE* 9, e104526 (2014).
- Ivana Lazzaretto, A.L. Karyological comparison among different Mediterranean populations of the genus *Tigriopus* (Copepoda Harpacticoida). *Bolletino di Zoologia* 3, 197-201 (2009)
- Lisa Handschumacher, María Björk Steinarsdóttir, Suzanne Edmands & Ingólfsson, A. Phylogeography of the rock-pool copepod *Tigriopus brevicornis* (Harpacticoida) in the northern North Atlantic, and its relationship to other species of the genus. *Marine Biology* 157, 1357-1366 (2010).
- Myers EW, Sutton GG, Delcher AL., Dew IM, Fasulo DP, Flanigan MJ., Kravitz SA, Mobarry CM, Reinert KH, Remington KA, Anson EL, et al. A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science*, 287, 2196-2204 (2001).
- Raisuddin, S., K.W.H. Kwok, K.M.Y. Leung, D. Schlenk, and J.-S. Lee. The copepod *Tigriopus*: a promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquat. Toxicol.* 83, 161-173 (2007).
- Jenna M. Dolhi, Denis P. Maxwell, Rachael M. Morgan-Kiss. Review: the Antarctic *Chlamydomonas raudensis*: an emerging model for cold adaptation of photosynthesis. *Extremophiles* 17, 711-722 (2013).
- Juan Ning, Minxiao Wang, Chaolun Li, Song Sun. Transcriptome Sequencing and De Novo Analysis of the Copepod *Calanus sinicus* Using 454 GS FLX *PLoS ONE* 8(5): e63741 (2013).
- Petra H. Lenza, d, Ebru Unalb, R. Patrick Hassetc, d, Christine M. Smithd, Ann Bucklinb, Andrew E. Christiea, d, David W. Towle. Functional genomics resources for the North Atlantic copepod, *Calanus finmarchicus*: EST database and physiological microarray. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 7, 110-123 (2012).
- Bettina Meyer. Antarctic krill, *Euphausia superba*, a model organism to understand the impact of global warming on the marine Antarctic ecosystem. *Polarforschung* 80, 17-22 (2010).
- Brendan Maher. Evolution: Biology's next top model? *Nature* 458, 695-698 (2009).
- Karin Römisch, Tom Matheson. Cell biology in the Antarctic: studying life in the freezer. *Nature Cell Biology* 5, 3-6 (2003).
- Hendrik Segers, Russell J. Shiel. Tale of a sleeping beauty: a new and easily cultured model organism for experimental studies on *bdelloid rotifers*. *Developments in Hydrobiology* 181, 141-145 (2005).
- Gretchen Vogel. Frog is a prince of a new model organism. *Science* 285, 25 (1999).



주 의

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