

# 메타게놈/프로테오믹스/메타볼로믹스

Metagenome/Proteome/Metabolome Bank

한국생명공학연구원

과학기술부

## 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “ 메타게놈/프로테옴/메타볼로믹스 ” 과제의 보고서로 제출합니다.

2005. 5.

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 이 총 환

연 구 원 : 윤 정훈

” : 김 명희

” : 지 상천

” : 이 종석

연 구 원 : 손 광희

” : 전 선희

” : 송 선아

” : 민 정원

” : 김 수진

연 구 원 : 홍 형표

” : 이 미화

” : 정 서연

” : 박 수연

연 구 원 : 강 소정

보고서 초록

과제관리번호	MG02-0401-001-1-0-0	해당단계 연구기간	2002 10 1-2005 3 31	단계 구분	1 / 3
연구사업명	중 사업명	21세기 프런티어사업			
	세부사업명	미생물유전체활용기술개발			
연구과제명	중 과제명	중과제가 있을 경우에는 기재 (단위과제일 경우에는 아래 기재)			
	세부(단위)과제명	메타게놈/프로테오姆/메타볼롬뱅크			
연구책임자	이 충 환	해당단계 참여연구원수	총 : 20 명 내부 :     명 외부 : 20 명	해당단계 연구비	정부: 3,998,750 천원 기업:            천원 계: 3,998,750 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국생명공학연구원 면역제어연구실		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 미생물자원 및 메타게놈자원 확보 및 분양체계구축</li> <li>- 프로테오姆자원 확보, 발현, 분리 및 분양</li> <li>- 토양 및 해양 방선균, 곰팡이, 세균, 호염성균, 점액세균을 포함 국내 미생물 자원 3,000여종을 확보하여 실험에 적용하였음.</li> <li>- 메타볼롬 생산성을 기준으로 미생물 1,348종에 대해서 각각 400ml씩 배양하여, 프로파일링 과정을 거쳐 활성저분자 도출 가능성이 높은 8,645개의 분획 메타볼롬을 정제/확보함.</li> <li>- 미생물 균주, 배양특성사진 자료, TLC와 Flash 컬럼 분획 프로파일링 자료, NMR 자료, 생물활성 자료를 취합 DB화 하여 분획메타볼롬 인프라 구축하였고, 메타볼롬 분양.</li> </ul>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	메타게놈, 프로테오姆, 메타볼롬 뱅크, 라이브러리, 신약개발			
	영 어	metagenome, proteome, metabolome, microbial natural products, drug discovery			

## 요 약 문

### I. 제 목

메타게놈/프로테오믹스/메타볼로믹스

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

#### II-1. 목적

미생물 천연물 근간의 화합물은행 기반 구축 : 미생물의 다량/대량 발효 시스템과 다중 분획 시스템을 이용하여 분획 정제된 미생물 대사물의 라이브러리를 확보하여, 의약 개발에 활용할 기반을 조성하는 것이 본과제의 목적임.

#### II-2. 필요성

인간게놈 사업이후 유전체 및 단백질체 연구의 활성화로 생체 기능 규명이 속속 밝혀지고 있어서 Bio 분야의 정보는 넘쳐나고 있다. 그러나 이러한 새로운 지식은 생체 기능을 조절하는 물질을 얻기 위한 도구이며, 우리가 우리의 물질 군인 라이브러리를 갖고 있을 때에만 연구개발 투자가 수익으로 돌아 올 수 있을 것이다.

##### II-2-1. 물질 스크리닝 비용의 천문학적 규모

세계적 다국적 제약사는 평균  $10^6$  규모의 물질 라이브러리를 의약 스크리닝에 활용중임. 그러나 단지 25개 target을 스크리닝 대상으로 하여 백만개의 물질을 적용하는데 소요되는 HTS 과정의 소요 비용은 US\$10million으로 100억 원 이상의 고가이다. 향후, 인간 게놈 연구와 proteome 연구로 새로이 규명될 예상 druggable target을 2,500개로 제한한다고 해도, 그 스크리닝 비용은 적어도 US\$1billion 즉, 1조원 이상의 막대한 비용이 필요하다 (Nature 432, 855-861, 2004).

US\$1billion, 이것은 단순한 속도 싸움인 HTS만으로는 도저히 감당할 수 없는 고비용이다. 최근 시료 사용량을 극소화한 microarray 기반기술, 초정밀 검출 시스템을 활용한 HCS 기술 등이 제시되고 있지만, 근본적으로 라이브러리 개념 자체가 변화하고 있음.

## II-2-2. HTS 및 제반 기술의 방향 재설정 요구

“백만개 라이브러리”로 대표되는 양적 접근법인 number game이 실용적 측면에서는 그 한계를 드러내기 시작한 것이며, 지식 기반, 다양성 기반의 “질적 라이브러리”가 추구해야 할 방향임이 확인되고 있음. 미국립보건원(NIH)의 roadmap이 제시하는 내용도, 향후 겨우 50만개의 물질로 라이브러리를 구성하여 전국적 공공 sector에 오픈하고 세계에서 가장 active한 자국내 연구자에 공급하려는 목표를 공표하였음. 국내 화학(연)의 화합물은행도 농약 의약 가리지 않고 숫자를 올리던 라이브러리 구축 방식에서 벗어나서, 선별화 된 양질의 라이브러리 10,000개 화합물을 2004년 말 오픈 예정임.

이렇게 국내외적으로 라이브러리 구축이 주목을 받고 역동적으로 방향 재설정이 이뤄지는 배경에는; 현재의 Bio를 이끌고 있는 Genomics, proteomics는 금광 굴착기에 비견될 수 있으며, 실제로 금맥 역할을 하는 것은 신약의 잠재성을 가진 물질 라이브러리임을 인정하는 컨센서스가 있기 때문이다.

## II-2-3. 질적 라이브러리의 최대 자원인 미생물 메타볼롬의 필요성

방선균을 비롯한 다양한 미생물 자원은 페니실린으로 시작되는 항생제, 심장순환기 약제인 스타틴류 의약, 가깝게는 epothilone으로 대표되는 항암제가 개발 시판된 경력을 가진, 검증되고 여전히 유용한 최고의 자원임.

라이브러리 구축 방향이 양적 경쟁에서 질적 경쟁으로 전환되는 이 시점에서, 미생물 유전체의 발현물인 메타볼롬 라이브러리의 확보 구축은, 최고의 생물자원을 활용하는 필수적인 국가 infra 사업이다. 미생물 채취, 선별, 분리, 배양, 추출, 정제의 고단한 과정을 거치는 미생물 메타볼롬 라이브러리는 단시간에 이뤄질 수 없는 소중한 연구기반으로 지속적 연구개발이 필요하며, 본 미생물 사업단의 인프라 부문에서는, 미생물 메타볼롬 라이브러리의 구축에 3년 이상의 경험을 확보한 다학제간 전문 연구인력을 투입하여 연구를 진행하였다..

## III. 연구개발의 내용 및 범위

(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

### III-1. 연구내용

#### III-1-1. 분획 메타볼롬 बैं크의 구축

미생물 유전체 유래의 메타볼롬을 생산, 분리, 분획하여 체계적으로 관리, 분양하여 관련연구자들이 효율적으로 사용할 수 있는 기반을 확보하였다.

- (1) 토양 및 해양 유래의 방선균 1,348종을 배양하여, 540 liter의 배양액 확보
- (2) Silica flash column을 통해 #1~#8,645의 정제분획 라이브러리 확보
- (3) 4차에 걸친 분양을 통해 3,840 well (4,486분획) 라이브러리 공개

- (4) <sup>1</sup>H-NMR에 의한 구조 기반 라이브러리 확보
- (5) 질적우수성: 천연물의 단일용매 추출물에서 false (+) 반응을 주는 불순물을 제거한 양질의 라이브러리를 구축하여, 국내 유일의 미생물 분획정제 라이브러리를 구축하여 곧바로 HTS등 스크리닝계에 적용할 수 있는 98-well plate format으로 공급하고 있다.

### III-1-2. 분획 메타볼롬 बैं크의 확인

- (1) 암세포주를 이용한 cell based-HTS, 효소저해 스크리닝계, 항암활성 스크리닝계, 항균활성 스크리닝계에 적용하여 적응성 테스트 및 hit 도출과정을 수행하였다.
- (2) UV 흡광도, 분석 TLC, NMR 분석을 통해서 미생물이 생산하는 저분자 메타볼롬의 프로파일링을 수행하여 정제도 및 활용 잠재성을 확인하였다.

### III-2. 연구범위 및 방법

- (1) 미생물 배양: 토양 방선균, 해양방선균 및 점액세균 자원에서 1,348개 균주 확보. 하여, 대두박/ 전분을 이용한 400ml 배지에 의한 액체 배양으로 총 540리터 생산하여 분획 과정에 도입함.
- (2) 배양물 초기정제: Hexane에 의해 지방산 제거, ethyl acetate part 수집
- (3) 분획정제: 동시에 4개 silica column으로 분획하여 50ml x 48tubes (QUAD)에 수집한 후, TLC와 UV-detector를 이용한 정제물 프로파일링, NMR을 활용한 구조기반 라이브러리 구축으로 정보를 확충함.
- (4) 총 8,645개의 분획 라이브러리를 확보하여, 4 차례에 걸쳐 3,840 well (4,486분획)을 Assay-ready plate 형태로 제작 함(80ea/96 well format; 50 µg/10µl-DMSO/well)
- (5) 분획정보, 생산균 특성은 스프레드시트 및 디지털 영상자료로 dB화 하였고, 생산미생물과 mother plate는 각각 초저온 및 냉동고에 확보 보관하였다.

### IV. 연구개발결과

(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

#### IV-1. 미생물 메타볼롬 बैं크 발생의 전주기적 과정 구축

국내 신약개발의 물질 라이브러리로 활용할 미생물 분획 메타볼롬 बैं크를 구축하였다. 미생물 뿐 아니라 식물, 곤충 등 천연물 유래의 활성물질 라이브러리 구축에 필요한 대량 고속 추출법, 정제법의 전주기 과정을 확보하였다. 미생물 분획 메타볼롬 라이브러리 발생의 전체적인 과정은 (표-s1)과 같으며, 전주기 관리의 결과 미생물 배양이 속도 결정단계임을 알 수 있었고, 분획 과정에서는 실제 다중컬럼의 운용 시간보다 프로파일링을 위한 단계가 가장 많은 노력이 요하는 과정이었다.

Step	Treatment	Time
Collection, culture	Flask culture (200 ml), Fermentor	7 days
Single solvent extraction	Acetone, Rotary evaporator	40 min
	Collected Ethyl acetate part	20 min
	Collected MeOH part, SpeedVac. (grouping, concentration, weighing)	4 hrs
Fractionation (4-channel system)	Samplet preparation (adsorption, dry)	4 hr
	Application on QUAD system	
	①Installed 4 columns (silica or C18)	
	②Wash/warm up	
	③Samplet loading	
	④Elution, continuous gradient solvent condition (5 min for 1 step fractions)	2 hrs
	⑤Washed out with MeOH	
Pre-profiling	Application TLC/UV detector for pre-profiling to fractions	
	Grouping the fractions and concentration (rotary evaporator)	6 hrs
	Collected into 10 ml tube and concentration (Speed Vac)	1 hr
Weighing	Sample dry in E-tube	3 hr
	Weighing	5 min
dB input, scanner	Numbering, Documentation	1 hr

표-s1 Fraction 메타볼롬 생성의 전주기

#### IV-2. 미생물 자원의 배양 및 분획 정제 프로트콜 확립

전주기 과정을 화합물 분리의 관점에서 살펴보면, 여타의 천연물 라이브러리가 단일 용매 추출인데 비해 본 과제의 라이브러리는 정제과정이 포함된 질적 개선을 이룬 방법론이다. 단일 용매 추출물의 경우 예상되는 불순물인 지방산, 배지유래 플라보노이드, 극성물질을 Flashes 컬럼의 운용을 통해서 제거하였다.

분획과정의 핵심은 다중 컬럼을 이용한 고속 분리 정제이다. 50ml tube 48개를 기본으로 물질을 용출시켰으며, 흡광도, TLC 양양에 따라 물질군을 재 분류하는 프로파일링을 수행하였다.

이러한 분획과정이 중요한 것은, 합성물질과 달리 미생물 배양배지는 그 자체로도 false (+)반응을 보일 수 있는 각종 배지 성분을 포함하기 때문에, HTS등 스크리닝에 적용하기 위해서는 단일 용매 추출물을 벗어나 보다 정제된 형태가 요구되기 때문이었다.

#### IV-3. 미생물 자원의 재평가 작업

생물 다양성에 근거한 물질 다양성을 충분히 확보하기 위하여 다양하거나 안정적인 미생물 자원을 조사하였다. 특수 미생물은 분획의 양적인 확보가 쉽지는 않지만 (표-s2), 다른 물질군에서는 좀처럼 hit이 나타나지 않는 PRL-3 스크리닝계에서도 hit을 보여줌으로써, 라이브러리의 질이 상당히 높음을 알 수 있어서 양질의 라이브러리 자원임을 알 수 있었다.

자원별	자원크기	장점	단점
토양방선균	크다	양적 확보	중균불안
호염호알칼리	적다	극한미생물	대사물 양적 부족
해양방선균	크다	다양성	양적문제
점액세균	중간	안정적 활성	배양, 양적문제
Symbiotics	더작다	희귀성(곤충관련)	활성미지수

표-s2 미생물 자원별 특성

#### IV-4. 미생물 분획 메타볼롬의 평가 및 적용성

적용되는 스크리닝계의 종류별로 1% 내외의 hit 비율을 보여서 (표-s3) 라이브러리의 질이 높음을 알 수 있었다. 또한 proton NMR을 활용하여 분획 메타볼롬을 분석하여 구조적으로 독특한 IZ2610 유래 메타볼롬의 세포주 활성 및 균주 동정을 통해 라이브러리의 적용성을 확인하였다.



#### Screening with the 1<sup>st</sup> Lot of Metabolome Library

80ea / 96 well format, 5mg/ml-DMSO well /10ul

Plate No.	Bioactive Hits					
	PTP 1B (Diabetes)	VHR (Cell cycle)	Hypoxic Ischemia	HT29 (Tumor)	HDAC/HAT (Cancer)	PRL-3 (Metastasis)
1	8	2	-	-	2	-
2	9	3	5	-	1	-
3	6	5	1	2	-	-
4	8	8	-	1	1	-
5	1	4	-	-	-	-
6	8	6	2	-	1	-
7	6	4	-	4	1	-
8	10	5	3	3	1	-
9	8	2	-	7	1	-
10	15	7	-	3	-	-
11	8	7	-	-	3	-
12	19	2	2	-	3	-
Hit ratio	11.04 %	2.29 %	1.35 %	2.08 %	1.16 %	0 %

표-s3 미생물 Fraction metabolom 라이브러리의 스크리닝 적용예와 Hit ratio 예시.

#### IV-5. 미생물 분획 메타볼롬이 구축

최종적으로 fraction 메타볼롬은 총 8,645종이 확보되었다 (표-s4)

Step	No. of species	No. of fractionations
1st lot (Mar. 2003)	1 - 455	1- 3,016
2nd lot (Nov. 2003)	456 - 681	3,017 - 4,566
3rd lot (May 2004)	682 - 892	4,567 - 5,692
4th lot (Dec. 2004)	893 - 1,101	5,693 - 6,824
5th lot (April. 2005)	1,102 - 1,298	6,825 - 8,645

표-s4. 분획 메타볼롬 라이브러리 현황



## V. 연구개발결과의 활용계획

(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

- 전세계적으로 지금까지 연구된 천연물 유래의 단일 화합물은 약 3만개 이내에 불과 하다. 그러나 신규 미생물 분리 기술의 대폭적인 개선으로 미생물 자원의 활용성은 획기적으로 늘어날 것이며, 이를 바탕으로 한 미생물 메타볼롬 라이브러리의 잠재성도 매우 클 것이다.

- 궁극적으로는 국내 가용 미생물 자원과 미생물 유전체 사업단 확보의 미생물 자원 모두를 배양 정제하여 라이브러리화 하는 작업의 시발점이 본 과제가 될 것이며, 궁극적으로는 순수화합물 라이브러리 생성의 기반으로 활용할 것이다.

- 최근 국내외적으로 의학, 제약, 환경, 식품, 신소재 산업 분야에서 생촉매제들의 이용률이 급속히 증가되고 있는 추세로 본 연구에서 구축한 생촉매제 소재들은 기존에 보고된 생촉매제들과는 다른 특성을 나타낼 것으로 기대되어 산학연으로의 분양 및 생산 기술 연구 지원은 신속한 연구 수행 및 산업화를 한층 가속 시킬 수 있는 원동력이 될 것으로 사료된다.

## S U M M A R Y

Bacteria are almost unlimited sources of useful proteins. With the recent rapid expansion of the list of sequenced microbial genomes, obtaining a target gene, which eventually encodes a target protein, from microorganisms has become routine in microbiology laboratories. Moreover, the diverse nature of the sequenced microbial genomes and the recent development of directed evolution techniques essentially diminish the need to screen novel proteins from uncharacterized microorganisms. The notion that finding a new protein or a protein with modified function could be achieved from an already sequenced microbial genome in combination with directed evolution techniques is especially applicable in screening a novel biocatalyst with a target function. In this regard, the work presented in this report could be a first step in using the sequenced microbial genome data for mining novel biocatalysts.

Accordingly, we have chosen esterases, monooxygenases, nitrilases, and cofactor-regeneration enzymes as our target enzymes to demonstrate the usefulness of the mining of genes of interest from the sequenced microbial genomes. One hundred eighty seven esterase genes, 51 monooxygenase genes, 14 nitrilase genes, and approximately 120 cofactor-regeneration enzyme coding genes were PCR cloned by using expression vectors possessing hexahistidine-tag or glutathione S-transferase-tag. The cloned enzymes were systematically classified by sequence and structure analysis based on sequence similarities and functional regions for catalytic activity, and their activities were assayed. Some were further purified and biochemically characterized.

## C O N T E N T S

Chapter 1. Overview

Chapter 2. Trends of researches and developments in microbial genome applications

Chapter 3. Methods and results

Chapter 4. Achievements and evaluation

Chapter 5. Application and further development

Chapter 6. Informations from foreign resources

Chapter 7. References

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

\* 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술

## 제 1 절 목적

미생물의 다량/대량 발효 시스템과 다중 분획 시스템을 이용하여 분획 정제된 미생물 대사물의 라이브러리를 확보하여, 의약 개발에 활용할 기반을 조성하는 것이 본과제의 목적임.

## 제 2 절 필요성

### 1. 저분자 물질의 실재적 확보의 중요성

PubChem(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)은, 생물학 정보의 최고권위 PubMed를 운영하는 세계 최고 생물학 연구단체인 NIH에 구축된, 본격적인 “공공 sector 물질 라이브러리”로서 약 80만종의 화합물에 대한 구조, 활성, 명칭, 키워드 및 공급자 정보를 담고 있다. PubChem은 공공 기능으로서 웹상에서 연구자의 자유로운 접근이 가능해서, 기존 미국화학회가 주관하며 약 200여만 개의 물질 정보를 확보한 CAS (chemical abstract service, <http://www.cas.org>)에 대한 강력한 라이벌로 등장하였다. PubChem은 NIH의 roadmap에 근거한 MLI(molecular libraries initiative)<sup>1)</sup> 프로그램의 일환으로, 의약개발 연구자가 필요로 하는 저분자 물질군에 대한 접근성과 유연성을 높여줄 것이며, 의약개발에 있어서 저분자 물질의 실재적 확보가 얼마나 중요한지를 보여주는 예이다.

CAS보다 접근성이 우수한 PubChem의 약진은, 그동안 제약사가 주도하던 배타적이고 개별적인 유용물질의 정보 및 라이브러리의 근간이 열리는 신호탄으로, 사회 인프라로서 물질 은행의 나아갈 방향을 보여주는 적절한 예가 될 것이다. 즉 물질 각각에 대한 정보뿐 아니라 실재하는 물질-그것이 known 이건 아니건, 지금 당장 어떤 활성이 있건 없건-을 갖고 있는 것이야말로 연구 및 향후 개발에 있어서 최대의 무기가 될 수 있음을 보여주고 있는 것이다.

의약개발에 있어 저분자 물질의 중요성은 선택적 목표점의 확보와 아울러 2대 과제가 될것이다. 아래의 (그림-1)은 전세계 유명 제약사의 주종 품목을 단순 구성화한 것으로, 임상약 개발에 있어서 주요 제약사의 관심 대상이 저분자 물질에 집중되어 있음을 보여주고 있어, 의약개발이 곧바로 저분자 물질의 개발임을 보여주고 있다.

1) NIH molecular libraries initiatives. C. Austin, L.S. Brady, T.R. Insel & F.S. Collins. Science, 306, 1138-1139

# BIG AND LITTLE

## Small molecules dominate clinical development candidates at major firms

SOURCE: Wood Mackenzie

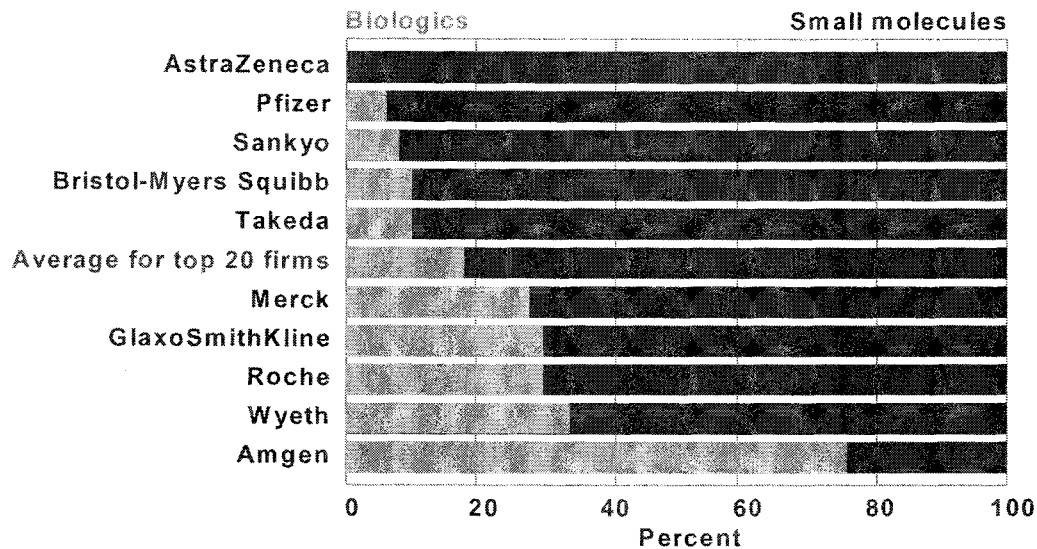


그림 1. 거대제약사의 저분자물질 연구개발.

### 2. 미생물 메타볼롬 라이브러리의 필요성

의약 개발<sup>2)</sup>을 위해서는 작용점의 규명<sup>3)</sup>과 이 작용점을 조절하는 물질의 확보가 선행되어야 한다. 인간 유전체<sup>4)</sup> 및 단백질체<sup>5)</sup>의 연구를 통해서 작용점의 연구는 급격히 진행되는 것에 비해서<sup>7)</sup>, 실제 개발해야 할 물질의 공급은 그렇지 못하여 인간게놈정보 및 비용의 투입에 비해서 신약창출은 저조하였다<sup>8)</sup>. 신약개발에 있어서 유용물질군 공급의 중요성을 말해 주는 것이 미국보건원의 Molecular Library 이다 (NIH roadmap, 2003)<sup>9)</sup>.

지금까지 신약개발을 위한 물질의 공급은 조합화학이 핵심 기술이었지만, 합성속도 위주로 창출된 조합화학 library는 숫자를 늘리는 데는 성공했지만 실제 활성으로 확인한 그동안의 성적은 저조하였다. 결국, 많은 수의 유사체에 연연하던 기존의 Number game은 Quality game으로, HTS는

2) A brief history of novel drug discovery technologies. L.J. Gershell & J.H. Atkins. Nature Reviews Drug Discovery, 2003, 2, 321-327

3) Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. K.H. Blericher, H.-J. Bolm, K. Muller & A.I. Alanine. Nature Reviews Drug Discovery, 2003, 2, 369-378

4) Harnessing the power of the genome in the search for new antibiotics. J. Rosamond & A. Allsop. Science, 2000, 287, 1973-1976

5) The impact of the completed human genome sequence on the development of novel therapeutics for human disease. C.P. Austin. Ann. Rev. Med. 2004, 55, 1-13

6) Genomics and proteomics tools for compound mode-of-action studies in drug discovery. N. Kley, I. Ivanov & S. Meier-Ewert. Pharmacogenomics. 2004, 5, 395-404

7) The druggable genome. A.L. Hopkins & C.R. Groom. Nature Review Drug Discovery, 2002, 1, 727-730

8) Delivering the power of discovery in large pharmaceutical organizations. T. Peakman, S. Franks, C. White & M. Beggs. DDT, 2003, 8, 203-211

9) The NIH Roadmap. E. Zerhouni. Science, 2003, 302, 63-72

HCS로 점차 연구 방향이 업그레이드되고 있으며, 특히 실효성 위주의 natural product-like synthesis등으로 방향을 재조정하는 것이 최근의 추세이다 (천연물의 재발견, C&E News, October 13,2003).

미생물자원은 의약개발 역사에 있어서 폴리키타이드류 화합물을 비롯한 그 효용성이 확인된 의약품 생물활성물질의 생산자로 기여해 왔으며, 이러한 미생물 자원의 통합 및 체계화는 국가 경쟁력의 출발점이 될 것이다. 그러나 미생물 자원을 비롯한 천연물질군의 기존의 시료형태는 정제되지 않은 단일용매의 추출물로서, 여러 화합물의 혼합체이며 또한 스크리닝계의 운용에 방해를 하는 각종 불순물이 포함되어 직접 HTS에 적용할 수 없는 것이 일반적이다. 따라서 단순 추출물로서 천연물은 현대의 신약연구에 부적절하며, 정제되고 집약적 정보 dB를 구축한 라이브러리 형태가 천연물 및 미생물 산물에도 요구되고 있다. 균주 관리와 배양이라는 걸림돌으로 인하여 라이브러리 발생속도에 제한이 있는 미생물산물의 특성상, 정제 분획물을 내용으로 하는 분획-라이브러리가 정제물질 라이브러리의 좋은 대안이며, 구조기반 천연물질연구의 기반이 될 수 있다.

세계수준과 엄청난 차이가 있는 국내 신약연구 분야에 있어서, 모방적 연구보다는 흔적이 남는 연구, 시간이 지날수록 힘을 발휘하는 인프라분야의 사업이 본 과제가 추구하는 Molecular Library 연구인 것이다.

미생물 유래의 의약은 페니실린계 항생제, 폴리키타이드류, 아미노글리코사이드류, 폴리엔류 그리고 최근에 개발된 에포틸런과 같은 훌륭한 예가 있다(그림-2). 그럼에도 불구하고 이들 결과는 추정 미생물 자원의 1%도 안되는 부분에서 개발이 되었다고 보고되어 미생물 자원 즉, 미생물 유전체 자원의 막강한 다양성을 알 수 있다. 이들 미생물을 포함한 천연물 의약은 simvastatin, lovastatin, enalapril, pravastatin, atorvastatin, aufmentin, ciprofloxacin, clarithromycin, cyclosporin 등의 형태로 연간 U\$16 billion이상의 판매를 보였다.

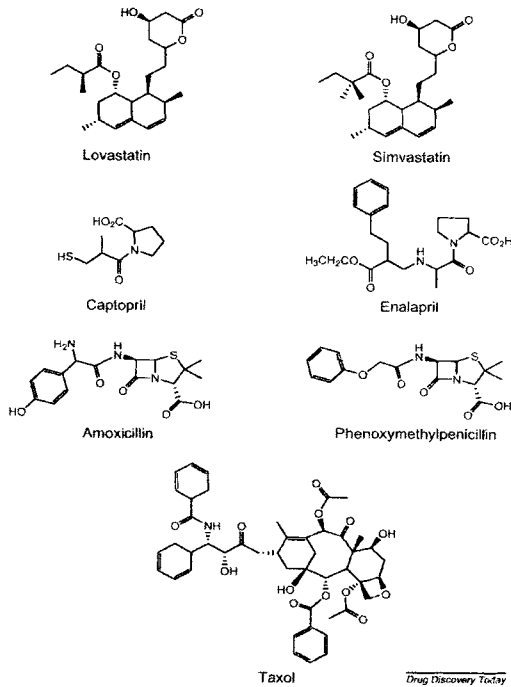


Figure 1. Structures of some of the current best-selling drugs derived from natural products.

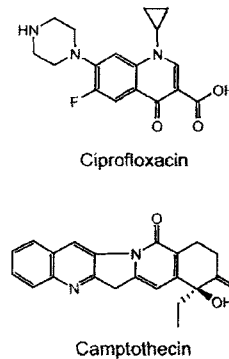


Figure 2. Structures of two newer drugs developed from natural products.

그림 2. 천연물 유래 의약품

### 3. 천연물의 라이브러리의 가치와 활용범위

항세균제의 개발이후 지난 30여년간 임상에 적용된 새로운 화합물질로서 항생제는 오로지 linezolid 한가지이며, 최근 10년간의 신규 화합물(NCE) 도출 성적이 전 세계적으로 연평균 30여 개에서 기껏 17개로 줄어들었는데, 이것은 조합화학 도입 후 위축된 천연물 의약개발 의지의 감소와 관련이 있다. 최근 기술의 진보로 다시금 천연물 연구가 활기를 띠는데, AnalytiCon Discovery사의 연구자는 매일매일 신규 천연물을 발견, 분리(순도 > 85%), 구조 결정을 하여, 곧바로 HTS로 진행할 수 있다는 면에서는 마치 어느 합성 화합물과 같은 경쟁력을 확보하였다.

따라서 기존의 천연물의 가치-천연물은 생체막의 투과성이 좋고, 특정 세포나 기관으로의 접근성이 높으며, 선천적으로 특정 단백질에 접근/결합할 수 있는 생물학적 공인을 받은 자연산 화합물, 의약특성이 뛰어난 물질 타입<sup>10)</sup>-뿐만 아니라, 제약사가 원하는 틀에 근거하여, 천연물 의약 개발 전략을 변화시켜서, 천연물 스크리닝이 합성 화합물 스크리닝과 전혀 차이가 없게 하였다. 천연물이 모든 문제를 다 풀 수 있다는 것이 아니지만, 한편 천연물 연구를 등한시 했던 결과, 아주 많은 문제들이 해결되지 못했다는 것이다.

이제 천연물 유래의 골격은, 장구한 시간동안 진화의 선택을 거친 것으로 간주할 수 있고 생물활성이나 이용성에 유리한 특성을 가지면서 기술적 문제점-다량생산과 정제도-도 해결하여 기존 물질 라이브러리에 보다 좋은 특성을 부여할 것으로 기대된다.

아래의 (표-1)에서 보듯이, 일단 하나의 신약을 FDA 공인을 거쳐 시장에 진입시키는 데는 약 1조원의 막대한 투자가 필요하다. 이러한 막대한 사업에서 초기의 의사결정에 중요한 hit

10) Property distributions: Differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry, M. Feher and J.M. Schmidt, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 2003, 43, 218-227.

generation 단계의 해결은 실패율의 감소 및 위험성을 최소화하는 최선의 방안이며, 우리나라가 추구해야할 방향일 것이다. 따라서 hit generation에 사용된 우리의 자체적 물질 라이브러리, 특히 그간 효용성이 입증된 미생물 유래의 라이브러리를 확보하는 것은 매우 중요한 사업이다.

### Probability of Success and Cost during Drug Discovery and Development

	Probability of completing Stage	Projects Needed for One Launch	Stage Cost per Project (\$ millions)	Total Cost per Launch (\$ millions)
Target Validation	30%	50	3.2	158
Hit generation	90%	15	5.3	79
Lead optimization	90%	13	4.5	61
Biological validation	75%	12	6.7	81
Preclinical	50%	9	8.8	80
Phase I	70%	5	35.2	160
Phase II	50%	3	42.9	136
Phase III	70%	2	123.6	196
FDA filing	90%	1		
<b>Cumulative</b>	<b>2%</b>			
<b>Risk adjusted cost</b>				<b>\$950 million</b>

Source : Drug & Market Development, March 2004

표 1. 신약개발 비용

미생물은 종의 숫자나 그 유전적 다양성이 매우 크며, 동일한 종이라 할지라도 생태계내의 경쟁이나 유전적 변이와 같은 요인에 의해 형질 변화의 폭이 커서 미생물자원의 다양성은 무궁하다고 할 수 있다. 이러한 미생물이 생산하는 저분자 물질의 다양성 또한 무궁한데, 대개는 양적 확보가 보장되는 물질만이 주요 연구대상이 되며 미량의 물질은 무시되고 있다. 궁극적으로는 활성과는 별개로 개개의 미생물이 생산하는 모든 저분자 유용물질을 화학적 entity로 간주하고 구조 기반에서 확보해 나가는 것도 필요하다 (표-2). 본 과제는 이러한 목적에 따라서 미생물 유래 활성물질 연구팀에 공급할 수 있는 assay-ready 형태의 저분자물질 라이브러리를 구축하였다.



## Strategies to expand the range of natural products available for drug discovery screening

Strategy	Proponents	Advantages	Disadvantages
Untapped geographical sources	Drug Discovery (Diversa)	Plant-based diversity has been historically successful	Concerns over sustainability of natural collecting (Limited area such as Enzymes)
<b>Preparation of libraries of isolated compounds</b>	Analyticon Molecular Nature	More compatible than mixtures for HTS	Cost of production
Marine sources	PharmaMar Australian Institute for Marine Sciences	Unusual chemistry	Identification of source organisms Recollection difficult on large scale
Insects	INBio CSIRO (Entomology)	Little studied	Scale-up potentially difficult
Plant tissue culture	Phytera	Control over genetic pathways	Concerns over access to genetic material sourced from developing countries
Combinatorial genetics	Kosan Biosciences Galilaeus Oy Terragen	Convenient production using fermentor technology	Restricted range of structures

Source : Drug Discovery Ltd, UK. DDT Vol 5, No 7 July 2000

표 2. 천연물로부터 신약 개발 확률을 높이기 위한 가용 전략

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

\* 국내외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

### 1. 미생물 연구의 재조명

그간 재현성, 양적 확보, 정제도 등에서 기술적 약점을 가졌던 천연물질연구가 실험기술의 발전<sup>11)</sup>과 아울러 부상하고 있어서 미생물을 비롯한 천연물의 가치에 대한 재조명 시작되어<sup>12)</sup>, 2004년 미국산업미생물학회를 기점으로 미생물 연구의 새로운 부흥기가 예고되고 있다<sup>13)</sup>. 이러한 경향 변화는 이전의 치료약으로는 극복할 수 없는 새로운 질병 및 내성균의 등장과 점차 확산되어가는 생물무기의 위협 그리고 이전과는 현저히 다른 미생물 유전체 분석기술의 발달에 기인하고 있다. 또한, 지질학, 극한환경, 우주 연구 등 미생물학 분야에서도 미생물 지식을 요구하고 있다.

### 2. 신약개발을 위한 물질 library 현황

조합화학에 의한 각종의 "백만 라이브러리" 구축과 이를 이용한 신약개발의 청사진의 기술적 한계에 이르렀다. 고속합성이 가능한 제한적 유기반응 및 고체상 반응을 중심으로 한 단순한 숫자게임보다는, 신약이 될 수 있는 가치있는 골격<sup>14)</sup>의 확보가 중요한 것으로 재차 판명되고 있다. 2004년 이후의 라이브러리 구축연구 추세는 "천연물 유사한 조합화학 방법론<sup>15)16)17)</sup>" 등을 이용한 보다 다양하고 내실 있는 라이브러리 구축에 초점을 두고 있으며, 막연히 숫자만 늘리던 민간 제약사들의 노력을 대신하여 NIH에서는 장기적 계획에 따라서 공개적 라이브러리의 구축(PubChem)과 자국연구자들의 자유로운 이용을 위한 roadmap을 작성하기에 이르렀다. 이전이 숫자 라이브러리에서 기능라이브러리로의 추구는 계속되고 있다<sup>18)</sup>.

국내 최초의 물질 라이브러리인 한국화합물은행도 농약, 의약 가리지 않고 확보한 특정 골격의 물질 확보에 의한 단순한 숫자 싸움으로는 경쟁성에 제한이 있음을 간파하고, 전체 화합물을 7개의 종(race), 주요 구조별 168개로 대분류(tribe), 1080여종의 골격(scaffold)으로 구분하여 숫자위주의 라이브러리에서 기능성 위주로 라이브러리를 재구성하고 있다. 기타 천연물 추출물을 포함한 국내의 일반 라이브러리 현황은 아래 표-3과 같다.

11) The evolving role of natural productions in drug discovery. F.E. Kohen & G.T. Carter. Nature Reviews Drug Discovery 2005, 4, 206-220

12) Rediscovering natural products. A.M. Rouhi. Chem & Eng News, 2003, 81(41), 77-91

13) Microbiology gaining ground after lean years. J. Knight. Nature 2004, 429, 332

14) Libraries from natural product-like scaffolds. A.M. Boldi. Curr. Opin. Chem. Biol. 2004, 8, 281-286

15) What can a chemist learn from nature's macrocycles? - A brief, conceptual view. L.A. Wessjihann, E. Ruijter, D. Garcia-Rivera & W. Brandt. Molecular Diversity, 2005, 9, 171-186.

16) From protein domains to drug candidates-Natural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libraries. R. Breinbauer, I.R. Vetter & H. Waldmann. Ang. Chem. Int. Ed. 2002, 41, 2878-2890

17) Lessons from natural molecules. J. Clardy & C. Walsh. Nature, 2004, 432, 829-837

18) Biological mechanism profiling using an annotated compound library. D.E. Root, S.P. Flaherty, B.P. Kelley & B.R. Stockwell. Chem. Biol. 2003, 10, 881-892

Bank/Library	Library size		활용성과	Contents
	Size	Note		
한국화학물은행 ( <a href="http://www.chembank.or.kr/">http://www.chembank.or.kr/</a> )	- 120,000 (04' 8월 기준)	국내외 120개 기관으로부터 확보하여 위탁관리	35개 기관의 120건 약효시험, 1,700개 유효물질 도출	- 화합물 - 물성 dB
미생물 소재은행 ( <a href="http://www.microbank.re.kr/">http://www.microbank.re.kr/</a> )	- 750 (순수 메타볼롬) - 3,520 (분획 메타볼롬 04' 7월, 4차분 8 plates 포함)	자체 분획 및 수집	11개 팀의 약효시험	- 화합물 - 분획물 - 균주 - 물성 dB - 자원 dB
자생식물 ( <a href="http://extract.pdrc.re.kr/extract/f.htm">http://extract.pdrc.re.kr/extract/f.htm</a> )	- 2,525 (추출물, 04' 7월, 24차분 기준)	자체 추출	국내 수집 기관에 다년간 시료 공급	- 추출물 - 생약 - 자원 dB
미생물 추출물 은행 ( <a href="http://mrdb.or.kr/">http://mrdb.or.kr/</a> )	- 33,800 (배양액) - 28,300 (균주) - 2,893 (도양시료)	자체 확보 및 추출	국내 수집 기관에 다년간 시료 공급	- 추출물 - 균주 - 분리자원 - 자원 dB
특수소재은행 ( <a href="http://www.kosef.re.kr/srb/index.php">http://www.kosef.re.kr/srb/index.php</a> )		1999년 시작, 과학재단 산하의 22개 특화된 은행 활동	전문연구소재 관리	

표 3. 국내 각종 생물 관련 라이브러리 현황

국외의 물질 라이브러리 현황은 아래의 표-4와 같으며, 상용화 되지 않은 라이브러리를 각 제약사마다 약 100개 이상씩을 확보하고 있으며, 대학 및 소규모 연구소와 연계한 관련 전문기업의 활동도 활발하다.

## Commercial Suppliers for Chemical Compounds Library

[Source: BioIndustry (생물산업) 15(3): p 29 (2002)]

Chemical Supplier	WEB Site	Compounds
AsInEx Ltd.	<a href="http://www.asiaex.com">www.asiaex.com</a>	300,000
BioNet Research Ltd.	<a href="http://www.biocetresearch.co.uk">www.biocetresearch.co.uk</a>	30,000
ChemBridge Corporation	<a href="http://www.chembridge.com">www.chembridge.com</a>	220,000
Chemical Diversity Inc.	<a href="http://www.chemdiv.com">www.chemdiv.com</a>	360,000
InterBioScreen Ltd.	<a href="http://www.ibscreen.com">www.ibscreen.com</a>	240,000
Maybridge Chemical Company Ltd.	<a href="http://www.maybridge.com">www.maybridge.com</a>	70,000
SPECS and BIOSPECS B.V.	<a href="http://www.specs.net">www.specs.net</a>	170,000
Tripos Inc.	<a href="http://www.tripos.com">www.tripos.com</a>	80,000
Vitas-M Laboratory Ltd.	<a href="http://www.vitasmilab.com">www.vitasmilab.com</a>	160,000

표 4. 상용화 라이브러리 공급사

### 3. 미생물유전체 사업단의 메타볼롬 라이브러리 현황

가. 토양방선균 유래 분획 메타볼롬: 본 사업단 분획 라이브러리 구축팀은 2003년 이후 3년여에 걸쳐 국내에서 사용 가능한 토양방선균의 대부분(1,900여종 이상)을 수집하여 이중 1,400종 이상을 액체 배양하였다. 이들 배양액은 pre-profiling 과정을 거쳐 770종의 미생물 배양액이 실리카 분획에 적용되었고 이중 다시 profiling 과정을 통해 533종의 미생물이 선별되어 분획 메타볼롬 2,731개를 구축 완료하였다. 분획물의 profiling은 모든 분획물에 대한 TLC 분석과 online-UV 흡광도 자료를 근거로 하였으며, 미생물의 활성과 생산성, 균주의 안정성을 고려하여 균주 bank를 병행 확보(810종 vial, -70도 보관)하였다.

나. 해양방선균 유래 분획 메타볼롬: 한편, 확보 가능한 가용 방선균 자원을 거의 모두 사용하였고, 희귀 방선균류는 배양 조건의 표준화가 어려워서 새로운 방선균 자원을 찾게 되어 해양유래의 방선균<sup>19)</sup> 자원을 메타볼롬 발생에 적용하였다. 총 1,200종의 해양 방선균을 확보하였고, 이중 400여 종은 이미 액체 배양을 거쳐 300여 종은 분획 메타볼롬 라이브러리 구성에 이미 투입되었다. 현재 약 700여개의 분획 메타볼롬이 확보되었고, 여분의 미생물과 배양액은 계속 분획 과정을 진행하고 있다. 또한 250종은 vial 상태로 저온 보관되어 후속되는 대량생산 요구에 대응하고 있다.

다. 희귀미생물 유래 분획 메타볼롬: 또한, 보다 확률 높은 HTS hit을 찾기 위해서 cyanobacteria, 내염성의 희귀방선균, 점액세균을 확보하여 보다 value가 높은 라이브러리 발성을 기대하고 있다.

라. 구조기반의 메타볼롬 라이브러리: 분획된 기존의 라이브러리가 최고 80%까지의 purity를 보여 주고 있지만, 구조에 대한 화합물 수준의 정보는 부족하다. 현재 <sup>1</sup>H-NMR을 이용해서 고리화합물과 세스퀴터펜류 등의 골격 위주의 라이브러리 구축을 위한 연구를 진행하고 있으며, 일부는 LC/MS/MS를 통해서 보다 효율적인 구조기반의 라이브러리에 접근하고 있다.

19) Marine natural products. JW. Blunt, B.R. Copp, M.H.G. Munro, T. Northcote & M.R. Prinsep. Nat. Prod. Rep. 2004, 21, 1-49

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 (메타게놈분야)

### 제 1 절. 연구개발의 최종목표

고부가가치 신산업 창출을 위해 기존 선발 선진국과의 차별화 및 경쟁력을 확보할 수 있는 상호작용 (interaction) 관련 미생물 (미생물-미생물 등) 과 특수환경 (해양, 열대성 고염 지역, 화산지역 등)에 존재하는 난배양성 및 특수환경 미생물 10,000주 이상, 신종 미생물 100 종 이상(20종 이상 등록), 메타게놈 자원 1,000메가 염기쌍 이상을 확보, 보존하고 관련 분야에 분양, 지원함.

### 제 2 절. 연구개발 세부 목표

- 특수환경 및 해양 유래 미생물, 난배양성 미생물 및 메타게놈 탐색을 위한 기반 기술을 확보함.
- 난배양성, 특수환경 및 상호작용 관련 미생물을 10,000주 이상 수집, 확보함.
- 메타게놈자원 1,000메가 염기쌍 이상을 수집, 확보함.
- 확보된 신규 미생물자원 100종 이상(20종 이상 등록)을 수집, 보존함.
- 확보된 미생물 및 메타게놈 자원을 안정적으로 보존, 유지함.
- 확보된 미생물 및 메타게놈 자원을 산학연의 연구자에게 분양 지원함.
- 미생물 및 메타게놈 자원의 체계적 수집, 보존 및 분양을 위한 균주관리 시스템 개발 및 활용

### 제 3 절. 연차별 연구개발 목표 및 내용

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도 (2002)	미생물다양성 및 메타게놈 자원의 확보 및 분양 지원	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 난배양성 미생물 및 메타게놈 탐색 기반기술 확보</li> <li>• 난배양성, 특수환경 및 상호작용 관련 미생물 2,000주 이상, 메타게놈자원 200메가 염기쌍 이상, 신규 미생물자원 20종 이상(5종 이상 등록) 수집</li> <li>• 확보된 미생물 자원의 안정적 보존 및 산학연에 분양 지원</li> </ul>
2차년도 (2003)	미생물다양성 및 메타게놈 자원의 확보 및 분양 지원	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 난배양성 미생물 및 메타게놈 탐색 기반기술 확보</li> <li>• 난배양성, 특수환경 및 상호작용 관련 미생물 4,000주 이상, 메타게놈자원 400메가 염기쌍 이상, 신규 미생물자원 40종 이상(7종 이상 등록) 수집</li> <li>• 확보된 미생물 자원의 안정적 보존 및 산학연에 분양 지원</li> </ul>
3차년도 (2004)	미생물다양성 및 메타게놈 자원의 확보 및 분양 지원	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 난배양성 미생물 및 메타게놈 탐색 기반기술 확보</li> <li>• 난배양성, 특수환경 및 상호작용 관련 미생물 4,000주 이상, 메타게놈자원 400메가 염기쌍 이상, 신규 미생물자원 40종 이상(8종 이상 등록) 수집</li> <li>• 확보된 미생물 자원의 안정적 보존 및 산학연에 분양 지원</li> </ul>

제 4 절. 연구개발 내용 및 결과

연구 내용	연구 결과
<p>○ 특수환경, 난배양성 미생물 및 메타게놈 탐색 기반 기술 확보 및 신규 미생물 자원 확보</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 국내의 해수, 갯벌 및 특수환경 (고염지역, 고알칼리 지역, 고산성 지역) 등으로부터 확보한 시료를 대상으로 다양한 pH, 온도, 배지 조건 등의 인자를 고려한 분리방법을 활용하여 국내 고유의 다양한 미생물을 탐색, 분리 및 확보함</li> <li>• 최신의 미생물 분류동정 기술을 활용하여 확보된 미생물에 대해 분류동정연구를 수행한 결과 지금까지 학계에 보고되지 않은 신규 유용 세균 4 속(genus), 45 종(species) 이상을 확보하여 분자계통분류 분야의 국제적으로 저명한 학술지인 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology(IJSEM)에 발표함</li> <li>• 다양한 환경으로부터 large sized-환경 DNA의 추출할 수 있는 기술을 확립하고 BAC, Fosmid vector를 이용하여 유용 메타게놈 라이브러리 구축 기술을 확보함.</li> </ul>
<p>○ 난배양성, 특수환경 및 상호작용 관련 미생물, 메타게놈자원, 신규 미생물자원 수집 및 확보</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 수집, 확보된 다양한 미생물 및 메타게놈 자원의 등록을 효율화 할 수 있는 시스템(<a href="http://www.microbe.re.kr">http://www.microbe.re.kr</a>)을 구축함.</li> <li>• 1분야 미생물다양성분야 연구책임자로부터 분리된 미생물자원 11,000여 균주 이상을 수집, 확보 및 보존함.</li> <li>• 1분야 미생물다양성분야 연구책임자로부터 메타게놈자원 10,000메가 염기쌍 이상을 수집, 확보 및 보존함.</li> <li>• 신규 미생물자원 300 종 이상(62종 이상 등록)을 수집, 보존함.</li> <li>• 수집, 확보된 미생물 및 메타게놈 자원에 대한 사업단 고유번호 부여 (미생물, M000001부터 시작, 메타게놈자원 G200001부터 시작). 번호는 균주 등록과 함께 자동 부여 되도록 시스템 구현함.</li> <li>• 수집, 확보된 미생물 및 메타게놈 자원의 데이터베이스를 구축함.</li> </ul>
<p>○ 확보된 미생물 자원의 안정적 보존 및 산학연에 분양 지원</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기탁, 수집된 미생물 및 메타게놈자원의 안정적 보존을 위한 시스템을 구축, 활용함.</li> <li>• 바코드 시스템을 활용한 미생물 및 메타게놈 자원의 체계적 관리를 위한 시스템 구축함.             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 보존 균주에 고유 바코드 부착</li> <li>- 균주 등록 및 DB 시스템과 link되도록 설계</li> <li>- 균주 재고/출고 시스템 구현</li> <li>- 거래처 정보 입력 및 관리 시스템 구현</li> </ul> </li> <li>• 산학연 연구자들을 대상으로 한 미생물 자원 및 메타게놈 자원의 분양체계를 확립하고 분양을 수행함.</li> </ul>

## 1. 국내 특수환경 지역으로부터 미생물의 탐색

저영양성 배지, diffusion 방법, 상호작용에 기초한 방법, 다양한 배지의 사용 등 최신의 미생물 탐색 기술을 활용하여 약 1,000 균주이상을 분리, 확보하였고, 이들을 대상으로 분류학적 연구를 수행 신규 유용 미생물을 다수 확보하였다.

## 2. 유용 미생물 탐색을 위한 화학분류 및 분자계통학적 분석법의 활용

### 가. MIDI 시스템을 이용한 지방산(fatty acid) 분석

다양한 미생물의 표준균주 및 분리주에 대해 MIDI를 이용한 균체 지방산 분석 연구를 수행하였으며 미생물로부터 지방산을 추출하는 방법은 Fig. 3에 간략히 나타내었다. 균체는 적정한 배지에 배양한 후 균체만 회수한다. 회수한 균체 약 50mg (wet weight)을 Teflon-lined screw cap tube (13×100mm, pyrex)에 옮긴 후, reagent 1을 1ml 넣고 100℃에서 30분간 가열하여 실온에서 식힌다. 여기에 reagent 2를 2ml 첨가하여 80℃에서 10분간 가열하여 급냉한 후 1.25ml의 reagent 3을 넣고 10분간 잘 섞어준다. 실온에 정치한 후 반응액이 2개의 층으로 분리되면 하등액을 제거하고 3ml의 reagent 4를 첨가하여 5분간 섞어준 후, 반응액 중 상등액의 2/3정도를 septum-capped sample vial (12×32mm, Alltech Associates, Inc., IL, U.S.A)로 옮겨 capping 하여 시료로 사용한다. FAMES의 분석에는 Hewlett Packard series II Gas Chromatograph model 6890A (Microbial ID, Inc., Delaware, USA)가 이용되며 separation column은 25m×0.22mm×0.33m methyl phenyl silicone fused silica capillary column (HP 19091B-102)을 사용한다. FAMES profile은 Microbial Identification System Software (Microbial ID, Inc., Delaware, USA)를 이용하며 standard calibration 용액 (Microbial ID, Inc., Delaware, USA)과의 비교에 의해 peak의 동정, retention time, peak의 면적, 면적 비율을 구한다. 분석에 이용되는 Gas Chromatography의 조건은 다음과 같다. Carrier Gas, Hydrogen; Column Head Pressure, 10psi; Split Ratio, 100:1; Split Vent, 50ml/min; Septum Purge, 5ml/min; FID Hydrogen, 30ml/min; FID Nitrogen, 30ml/min; FID Air, 400ml/min; Initial Temperature, 170℃; Program Rate, 5℃/min; Final Temp, 270℃; FID Temperature, 300℃; Injection Port, 250℃; Injection volume, 2 $\mu$ l.

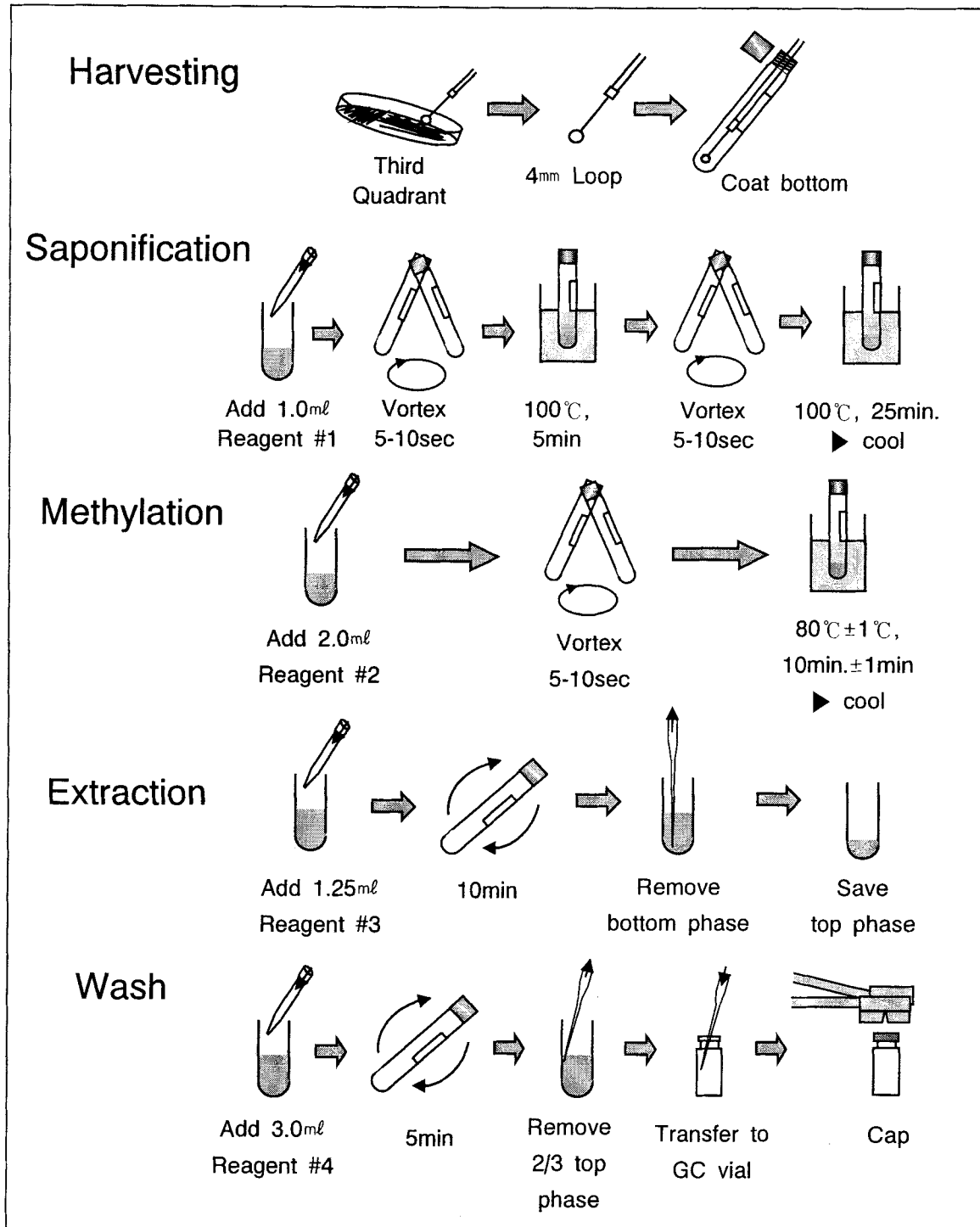


그림 1. Schematic diagram for extraction of cellular fatty acids.

#### 나. Isoprenid quinone 분석

실험 하고자 하는 미생물 균주의 생육이 정지기 초기에 도달하면 집균하여, 50mM의 potassium-phosphate buffer로 2회 세척한 후, isoprenoid quinone 분석에 이용하거나 -20°C에 보존하여 분석시 사용한다. 이 균체에 chloroform : methanol (2:1, v/v) 용액 약 20ml을 넣고 5분간 잘



흔들어, 세포막에 존재하는 isoprenoid quinone을 유기용매 속으로 추출한다 (Hiraishi *et al.*, 1992). 추출 유기용매는 종이여과지(Size No. 2, Whatman, England)를 이용하여 균체를 여과한 후, 여과액을 vacuum rotary evaporator에서 농축한다. 이 과정을 3번 반복하여 isoprenoid quinone을 세포막으로부터 유기용매로 완전히 추출한다. 농축한 evaporator flask에 hexane 4ml와 증류수 3ml 정도를 넣고 흔들면서 flask 벽면에 붙어 있는 농축 isoprenoid quinone이 hexane 층으로 추출되게 한다. 이 flask를 1분 정도 정치하면 hexane 층과 수층으로 양분되며, hexane 층만을 다른 evaporator flask에 옮겨 농축한다. 이때 균에 따라서는 hexane 층과 수층 사이의 명확한 구분이 생기지 않는 것도 있다. 이럴 경우에는 hexane과 물을 조금씩 더 넣어서 층의 분획을 쉽게 한다. 이러한 과정을 3번 반복하여 isoprenoid quinone을 농축한다. 3번째 농축할 때에는 hexane을 완전히 dry 시킨다. 농축시킨 isoprenoid quinone을 다시 acetone으로 추출하기 위하여 evaporator flask에 acetone을 3-4 방울 넣고 추출한 후, acetone 농축액을 silica-gel의 thin layer chromatography(TLC) (Merck Kiesel-gel 60 F254, 20×20 cm, 0.5mm thickness)에 spot 한다. Ubiquinone과 menaquinone의 standard도 함께 spot 한다. TLC plate를 petroleum benzene/diethylether (9:1, v/v) 전개액 100ml가 들어 있는 전개조에 넣고 전개액이 TLC plate의 윗 부분에서 약 3cm 정도의 높이까지 전개되면 TLC plate를 꺼집어내어 공기 중에 건조시킨다. UV 254nm에서 isoprenoid quinone band가 나타나는 지점을 확인하여 연필로 가볍게 band 주위를 표시한 후, 그 band를 긁어내어 eppendorf tube에 넣고 여기에 acetone 약 1ml 정도를 넣어 잘 흔들어 isoprenoid quinone을 추출하여 4℃에서 15,000 rpm으로 약 5분간 원심분리한다. 원심분리 후, 상등액만을 깨끗한 glass tube에 옮긴 후, 다시 acetone을 넣어 추출한다. 이러한 과정을 3번 반복하여 모은 acetone 추출액을 질소가스로 농축하여 유리로 된 microtube에 옮겨서 high performance liquid chromatography(HPLC)로 성분을 분석한다. HPLC 사용법은 각 회사의 기종에 따라 다르지만, 일반적으로 다음과 같은 조건으로 isoprenoid quinone을 분석한다. HPLC 분석시 column은 일반적으로 ODS 계통으로, size는 4.6×250mm 정도의 것이 분리능이 우수하다. 그 외의 조건은 다음과 같다. Eluent; methanol : isopropyl ether (3:1, v/v for ubiquinone); methanol : isopropanol (7:5, v/v for menaquinone), 275nm for ubiquinone, 270nm for menaquinone, flow rate; 1ml/min, column temperature; 30℃. 이러한 조건으로 약 5 $\mu$ l 정도를 HPLC에 loading 하여 retention time으로 peak의 동정을 행한다 (Shin *et al.*, 1996). Isoprenoid quinone을 분석하기 위하여 필요한 standard는 Sigma Chemicals사에서 구입하거나, 기존의 보고되어진 균주에서 추출하여 사용하였다.

#### 다. Diaminopimelic acid 분석

DAP isomers 분석은 전균체 가수분해와 TLC(thin-layer chromatography) 분석의 두 단계로 이루어진다. 동결 건조 균체 약 3mg을 screw-capped tube에 넣고 여기에 6N HCL 1ml을 첨가하여 100℃에서 18시간 동안 가수분해한다. 이 반응액을 실온에서 식힌 후 1차적으로 여과하고, 남은 여과지에 증류수 1ml을 첨가하여 다시 여과한다. 이 여과액을 vacuum rotary evaporator에서 농축시킨 후, 농축물에 1ml 증류수를 첨가하여 vacuum rotary evaporator에서 다시 농축시킨다. 최종적으로 농축물에 0.3ml의 증류수를 첨가하여 시료로 사용한다. 이 시료중 3 $\mu$ l를 cellulose TLC plate(20cm×20cm, Merck No. 5716, E. Merck, Darmstadt, Germany)에 spot하였고, 0.01M DL-diaminopimelic acid(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) 1 $\mu$ l를 standard로서 함께 spot하였다. TLC는 methanol : water: 6N HCl : pyridine (80:26:4:10, v/v)의 전개 용매로 3시간 이상 전개하였다. 전개 후 TLC에 ninhydrin solution (0.2% ninhydrin in water-saturated n-butanol)을 spray하여 100℃에서 5분간 발색시킨 후 DAP isomers의 spot을 분석하였다. DAP isomers의 sport

는 진녹색 (dark-green)을 나타내며,  $R^f$  0.29에서는 LL-isomer가,  $R^f$  0.24에서는 meso-isomer가 나타난다. 그리고 3-hydroxy-isomer는  $R^f$  0.20에서 나타난다.

#### 라. Polar lipid 의 분석

Screw-capped tube에 50mg 정도의 동결건조 균체를 넣고 2ml Hexan 및 10ml 의 0.3% NaCl 용액과 100ml의 methanol을 섞은 용액 2ml을 넣고 15분간 잘 섞어준다. 약한 속도로 원심분리하여 상등액을 제거하고 다시 1ml의 hexane을 첨가하여 잘 섞은 후 원심분리하여 상등액을 제거한다. 균체가 남아있는 tube는 끓는 물에 5분간 놓아두었다가 37°C water bath에서 식힌다. Chloroform: methanol : 0.3% NaCl 용액(w/v) = 90 : 100 : 30 (v/v)로 섞은 용액 2.3ml을 첨가한 후 1시간동안 tube rotator에서 잘 섞어준다. 약한 속도로 원심분리한 후, supernatant를 다른 tube에 옮기고, 원래의 tube에 chloroform : methanol : 0.3% NaCl용액(w/v) = 50 : 100 : 40(v/v)로 섞은 용액 0.75ml 을 첨가한 후 30분 동안 tube rotator에서 잘 섞어준다. 약한 속도로 원심분리한 후, 상등액을 이전 상등액과 잘 섞는다. 상등액에 1.3ml chloroform 과 0.3% NaCl 용액 1.3ml 을 넣고 섞은 다음 원심분리하여 상등액은 제거하고 남은 부분을 37°C에서 질소가스로 건조시킨다. 건조된 시료를 chloroform : methanol = 2 : 1(v/v)용액 50 $\mu$ l에 용해하고, 5 $\mu$ l를 silica gel로 coating된 TLC plate (6x6cm, Merck 5554)의 baseline위 약 1cm에 spotting한 후 건조시킨다. 첫번째 방향으로 chloroform : methanol : water (65 : 25 : 3.8, v/v)의 solvent 하에서 전개시킨 후, hood 안에서 적어도 30분 동안 건조시킨다. 건조시킨 TLC plate는 chloroform : methanol : acetic acid : water (40 : 7.5 : 6 : 1.8, v/v)의 solvent하에서 두번째 방향으로 전개시킨다. 전개가 끝난 plates는 hood안에서 잘 건조시킨 후, 다양한 spray 용액을 이용하여 spot을 확인한다.

#### 마. DNA G+C mol%의 분석

DNA G+C 함량(mol%)을 분석하기 위해서 Tamaoka & Komagata (1984)의 방법을 사용하였다. 분리, 정제된 DNA는 멸균 증류수 10 $\mu$ l (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)에 용해시켜 100°C에서 5분간 열처리하여 DNA를 변성시킨 후, 얼음속으로 옮겼다. 열 변성된 DNA에 Nuclease PI을 처리하여 nucleotide로 만든 뒤 HPLC를 이용하여 270nm 파장에서 흡광도를 측정하여 G+C함량을 측정하였다.

#### 바. chromosomal DNA의 분리

배양한 균체 3g 을 10ml 의 TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH 8.0)에 현탁한 후 lysozyme 100mg 넣은 다음 37°C에서 30분간 배양한다. 시료에 10% SDS(sodium dodecyl sulfate) 2ml을 첨가한 후 세포질이 용출된 것이 확인되면 phenol 10ml과 5M NaCl 1.5ml을 첨가한 다음 20분간 섞어준다. 반응액을 6000rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 취하여 chloroform으로 2 번 추출한다. 상등액은 isopropanol로 침전시킨 후 유리봉을 이용하여 DNA를 회수한다. 회수한 DNA는 공기중에서 건조시킨 후 TE buffer 10ml에 현탁한 후 RNase A를 20 $\mu$ g/ml의 농도로 첨가한 후 37°C에서 1 시간 동안 반응시킨 다음 proteinase K 를 100 $\mu$ g/ml의 농도로 첨가한 후 37°C에서 1 시킨 동안 반응시킨다. 반응이 끝난 용액은 앞서와 같이 phenol로 1 회, chloroform으로 2 회 추출한다. 상등액 속의 DNA 는 isopropanol로 침전시킨 후 유리봉을 이용하여 회수한 후 공기중에서 건조시킨 다음 최종적으로 TE buffer에 현탁시킨다.

### 사. 16S rRNA 염기서열 결정 및 분자계통학적 분석

16S rDNA 는 두 개의 알려진 universal primer를 사용하여 증폭하였다. 두 universal primer의 염기서열은 다음과 같다; Forward primer 는 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (*E. coli* 16S rRNA positions 9-27), Reverse primer 는 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3' (*E. coli* 16S rRNA positions 1542-1525). PCR 증폭은 총 반응액 100 $\mu$ l로 수행하였으며 이 반응액은 각각의 primer 0.5 $\mu$ M, dNTP mixture 200 $\mu$ M, DNA 200ng, reaction buffer 10 $\mu$ l와 Taq DNA polymerase 2.5U 를 포함하였다. PCR을 위한 각 반응의 온도 조건은 다음과 같다; DNA의 denaturation 을 위해 95 $^{\circ}$ C에서 1 분, primer 의 annealing 을 위해 60 $^{\circ}$ C 에서 1 분, DNA strand 의 합성을 위해 72 $^{\circ}$ C 에서 1 분 또는 2 분의 과정을 35회 반복하는 조건을 사용하였다. 반응이 끝난 PCR product는 1% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색한 후 확인하였다 (그림. 2).

증폭이 확인된 PCR 산물은 염기서열 반응을 위해서 QIAquick PCR purification kit (Qiagen사)를 사용하여 추천된 방법을 사용하여 정제하였으며 유전자 내부에 존재하는 universal primer를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열 결정 반응은 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems) 를 사용하여 추천된 방법을 사용하여 수행하였다. 염기서열 반응을 위해 반응 tube에 16S rDNA 90ng, Terminator ready reaction mix 4 $\mu$ l, primer 3.2 $\mu$ M을 첨가한 후 멸균된 증류수로 20 $\mu$ l로 맞추었다. 염기서열 반응을 위한 각각 반응의 온도 조건은 다음과 같다; 96 $^{\circ}$ C에서 10초, 50 $^{\circ}$ C에서 5 초, 60 $^{\circ}$ C에서 4 분의 과정을 25회 반복하는 조건을 사용하였다. 반응이 끝난 반응산물은 95% ethanol을 이용하여 침전시킨 후 70% ethanol로 세척 과정을 거친 후 vacuum dryer로 건조시킨다. 이 반응 산물은 최종적으로 자동염기서열분석장치 (Applied Biosystems models 310 or 377 automatic DNA sequencer)를 사용하여 염기서열을 결정하였다.

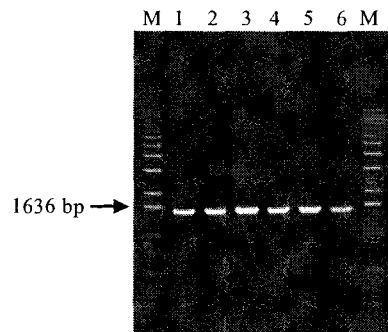


그림 2. Agarose gel electrophoresis of 16S rDNAs amplified by PCR. Lanes: M, 100 bp DNA ladder (BRL); 1-6, 16S rDNAs from different strains.

위의 방법으로 결정된 염기서열은 미국 NCBI의 BLAST 검색방법을 사용하여 기존에 등록된 다양한 세균들의 상응하는 염기서열과 비교하여 높은 상동성을 나타내는 세균 그룹을 1차적으로 선별하였다. 각각의 균주들의 정확한 계통학적 분석을 위해서 결정된 염기서열은 선별된 기존에 알려진 균주들의 상응하는 유전자의 염기서열과 CLUSTAL W software (Thompson *et al.*, 1994)를 사용하여 비교(alignment) 되었고 얻어진 비교 결과는 5', 3'의 gap을 제거하거나 적당히 수정되었다. 각각의 균주의 16S rDNA 염기서열간의 상동성 값은 자체 개발하여 활용중인 Pairpro 프로그램

을 이용하여 계산하였다. 분자계통학적 계통수의 작성은 PHYLIP 프로그램 패키지를 사용하여 수행하였다 (Felsenstein, 1993). 분자진화거리의 DNADIST 프로그램속의 Jukes & Cantor (1969)의 알고리즘을 이용하여 계산하였고 최종적인 계통수는 NEIGHBOR 프로그램 속의 neighbor-joining method (Saitou & Nei, 1987)에 기초해서 작성하였다. 16S rDNA의 direct 염기서열 결정 및 분석 방법에 대한 간략한 모식도는 그림 3과 같다.

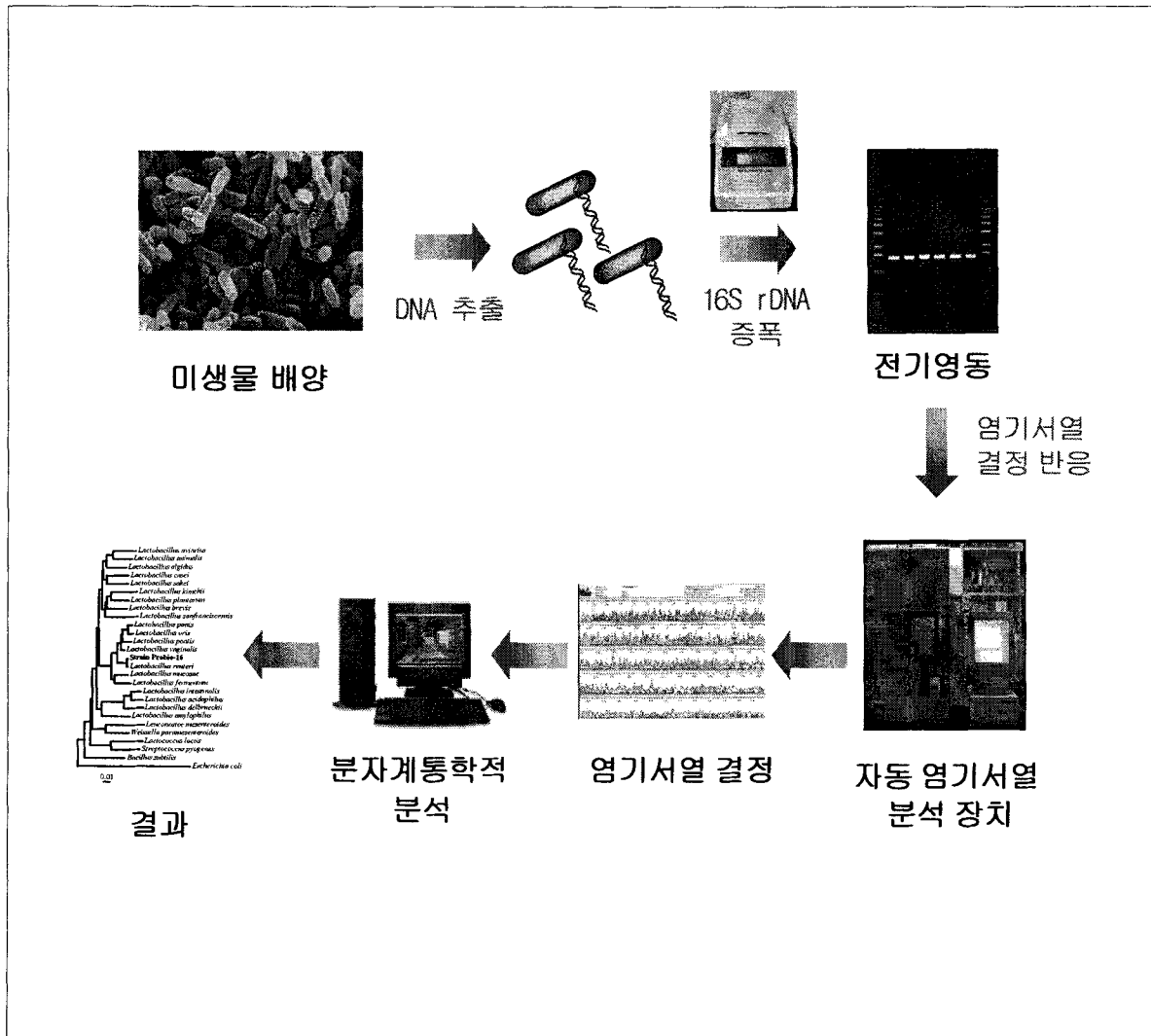


그림 3. Overview of 16S rDNA sequencing and phylogenetic analysis

#### 아. DNA-DNA hybridization

DNA-DNA hybridization 실험은 Ezaki 등(1989)의 fluorometric 방법을 사용해서 수행하였다. 실험방법은 다음과 같이 간략히 기술할 수 있다. 정제된 DNA (200g/ml) 25 $\mu$ l를 5분간 끓여서 변성시킨 후 0.1M MgCl<sub>2</sub> 를 포함하는 차가운 PBS buffer 를 가지고 10g/ml의 농도로 희석한다. 희석된 DNA 현탁액은 microplate (Nunc 사) 각각의 well 에 100 $\mu$ l씩 5개의 well에 주입한 후 30 $^{\circ}$ C에서 8시간 동안 배양한다. DNA 용액은 버린 후 45 $^{\circ}$ C 에서 30분간 microplate를 건조시킨다. 건조된 microplate는 prehybridization 용액을 첨

가한 후 37°C에서 10 분간 prehybridization 시킨 다음 prehybridization 용액을 버린다. Microplate에 biotinylated DNA 를 함유하는 hybridization 용액을 주입한 후 45°C에서 10 시간 동안 hybridization 반응을 수행한다. 반응이 끝난 microplate는 1×SSC 용액으로 3 회 세척한 후 각각의 well 에 streptoavidin-D-galactosidase 용액 (0.5% bovine serum albumin을 포함하는 PBS buffer 로 1000배 희석) 100 $\mu$ l를 첨가한다. 이 microplate는 다시 37°C에서 30 분간 배양한 후 1×SSC 용액으로 3 번 세척해준다. 세척이 끝난 microplate에는 4-methylumbelliferyl-D-galactopyrano- side용액 (dimethylform- amide 용액 1ml에 기질 10mg 을 포함하는 용액을 PBS buffer로 100 배 희석) 100 $\mu$ l를 첨가한 후 37°C에서 30 분간 배양한다. Fluorescence 강도는 fluoroskan II (Labsystems 사) 을 가지고 360 (excitation), 450 (emission)의 파장에서 측정하였다. 5개의 수치 중 가장 높은 값과 가장 낮은 값을 제거한 3 개의 값의 평균을 이용하여 상동성 값을 결정하였다.

### 3. 최신의 미생물 탐색 및 분류동정 기술을 활용한 신규 미생물자원의 확보

#### 가. 국내 염전으로부터 신규 미생물속 렌티바실러스(*Lentibacillus*)의 발견

국내의 다양한 자연환경으로부터 미생물 균주를 탐색, 분리해오던 과정에서 한국 서해에 위치하고 있는 염전으로부터 높은 염농도에서도 잘 성장할 수 있는 세균들을 다수 확보하였으며 그들 중에서 1 균주(균주명 SF-20<sup>T</sup>)는 16S rDNA 염기서열 분석을 수행한 결과 지금까지 학계에 보고된 세균 그룹과 계통학적으로 구분될 뿐만 아니라 다른 분류학적 특징에서도 다르다는 것을 확인하였다. 상기 균주에 대해서 앞서 수행한 바와 같이 형태학적, 생리·생화학적, 화학분류학적 연구를 추가적으로 실시하여 다상분류학적 분류체계를 적용한 결과 지금까지 기존 학계에 보고되지 않은 신규 세균 속으로 확인한 후 렌티바실러스(*Lentibacillus*)란 속 (genus) 이름과 종 이름으로는 염전을 의미하는 *salicampi*란 이름을 세계 최초로 명명하여 국제적으로 저명한 계통분류학술지인 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology에 발표하였다. *Lentibacillus*라는 신규 속은 간균의 형태를 지니는 세균으로 구형의 내생포자를 형성하는 특징을 가진다 (그림 4). 이러한 포자형태는 계통학적으로 가장 유연관계가 높은 *Salibacillus*, *Virgibacillus*와 구별되는 주요 특징이다 (표 1). *Lentibacillus* 속은 또한 *Bacillus* 속 및 관련 속과 비교할 때 성장 속도가 느린 것이 큰 특징으로 속명을 결정할 때 이 특징에 근거하여 Lenti-(라틴어로 성장이 느리다의 의미)를 사용하였다. *Lentibacillus* 속은 화학분류학적으로 meso-DAP에 기초한 세포벽 peptidoglycan을 가지고 있으며 주요 isoprenoid quinone으로 MK-7을, 주요 지방산으로 anteiso-C<sub>15:0</sub>과 iso-C<sub>16:0</sub>를 가지고 있다. 신규 *Lentibacillus salicampi*의 주요 특징은 다른 관련된 속과 비교하여 표 1에 나타내었으며 16S rDNA 염기서열에 기초한 분자진화계통학적 위치는 그림 5에 나타내었다.

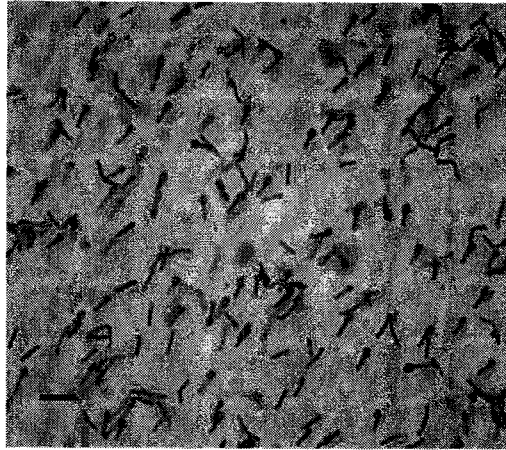


그림 4. Light micrograph of *Lentibacillus salicampi* SF-20<sup>T</sup> from exponentially growing culture. Bar, 4 M.

표 1. *Lentibacillus*, *Salibacillus*, *Virgibacillus* 속의 주요 표현형 특징

특성	<i>Lentibacillus</i>	<i>Salibacillus</i>	<i>Virgibacillus</i>
Cell morphology	spherical or oval	ellipsoidal	spherical or ellipsoidal
Spore position	terminal	central or subterminal	terminal or subterminal
Anaerobic growth	-	-	+
NaCl range (%)	2-23	5-25	0-10
Maximum temp. for growth	40°C	45-50°C	50°C
Major fatty acids	anteiso-C15:0 iso-C16:0	iso-C15:0, anteiso-C15:0	anteiso-C15:0 iso-C15:0 or anteiso-C17:0
Polar lipids	PG, DPG	PG, DPG	PG, DPG, PE
G+C mol%	44	40-41	37

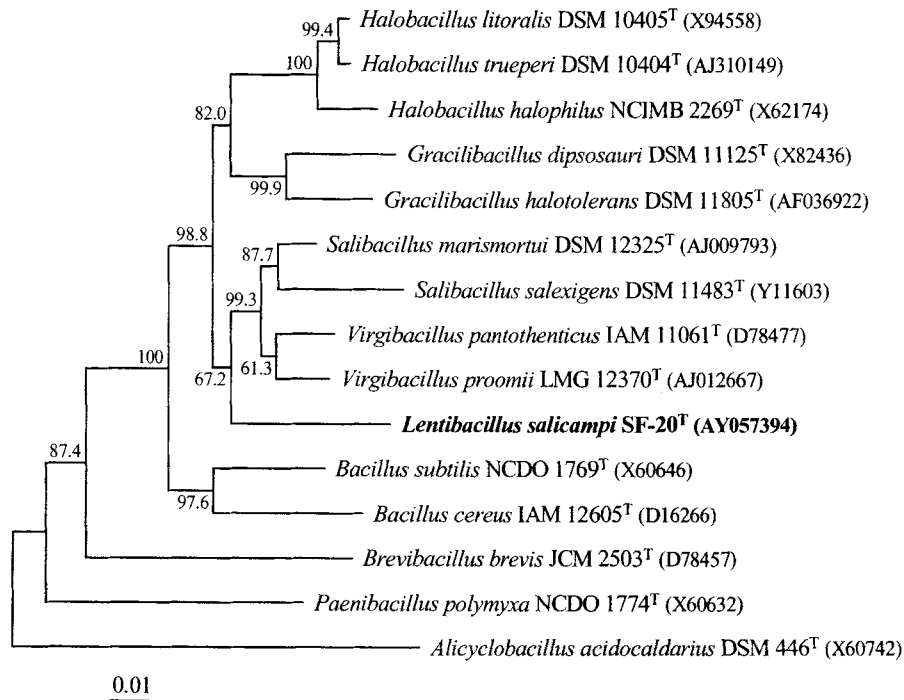


그림 5. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic positions of *Lentibacillus salicampi* and the representatives of some other related taxa based on 16S rDNA sequences. Scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide position. Bootstrap values (expressed as percentages of 1000 replications) greater than 50% are shown at the branch points.

#### 나. 젓갈로부터 신규 미생물 속 젓갈리코커스(*Jeotgalicoccus*)의 발견

한국 고유의 식품인 젓갈로부터 다양한 균주들을 확보하여 분류학적 연구를 수행한 결과 2개의 구균형 균주(균주명 YKJ-101<sup>T</sup>, YKJ-115<sup>T</sup>) 또한 16S rDNA 염기서열 분석을 수행한 결과 지금까지 학계에 보고된 세균들과 다르게 진화해온 사실을 확인하였다. 상기 2 균주에 대해서 형태학적, 생리·생화학적, 화학분류학적 연구를 수행한 결과 지금까지 기존 학계에 보고되지 않은 신규 세균 속의 서로 다른 2개 종으로 확인되어 젓갈리코커스(*Jeotgalicoccus*)으로 명명한 신규 속의 2개 신규 종으로 *halotolerans*와 *psychrophilus*로 명명하여 국제적으로 저명한 계통분류학술지인 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 에서 발표하였다. *Jeotgalicoccus*라는 신규 속의 2개 종은 구균의 형태를 지니는 세균으로 포자를 형성하지 않는다(그림 6). *Jeotgalicoccus* 속은 화학분류학적으로는 L-Lys-Gly<sub>3-4</sub>-L-Ala(Gly)에 기초한 A3a 형의 특이한 세포벽 peptidoglycan 구조를 가지고 있으며 주요 isoprenoid quinone으로 MK-7을 함유하고 있고 주요 지방산으로 anteiso-C<sub>15:0</sub>와 iso-C<sub>15:0</sub>를 가지고 있다. *Jeotgalicoccus*속의 2종은 polar lipid로 phosphatidylglycerol과 diphosphatidylglycerol을 가지고 있으나 계통학적으로 유연관계가 높은 *Salinicoccus* 속 및 *Staphylococcus* 속과 달리 glycolipid는 가지고 있지 않다(그림 7). 신규 속에 속하는 *Jeotgalicoccus halotolerans*, *Jeotgalicoccus psychrophilus*의 주요 표현형 특징은 표 2와 같으며 16S rDNA 염기서열 분석에 기초한 분자진화계통학적 위치는 그림 8과 같다.

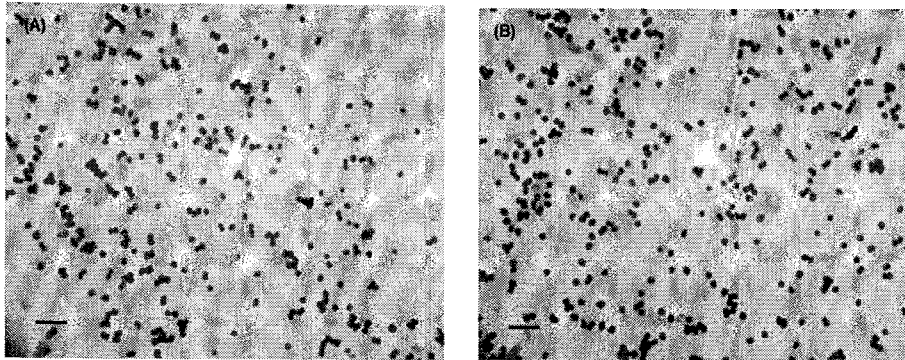


그림 6. Light micrographs of *Jeotgalicoccus halotolerans* YKJ-101<sup>T</sup> (A) and *Jeotgalicoccus psychrophilus* YKJ-115<sup>T</sup> (B) from the exponentially growing culture. Bar, 5M.

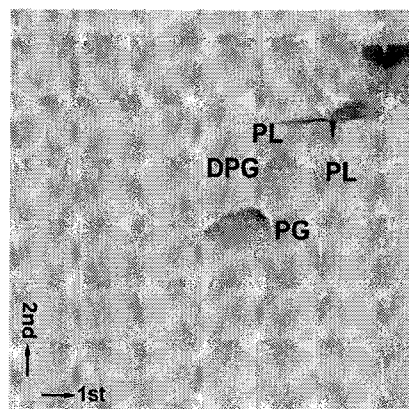


그림 7. Two-dimensional thin-layer chromatogram of polar lipids of *Jeotgalicoccus halotolerans* YKJ-101<sup>T</sup>. Abbreviations: PG, phosphatidylglycerol; DPG, diphosphatidylglycerol; PL, unidentified phospholipid. The same pattern was obtained for *Jeotgalicoccus psychrophilus* YKJ-115<sup>T</sup>.



표 2. *Jeotgalicoccus halotolerans*와 *Jeotgalibacillus psychrophilus*의 주요 표현형 특징

특성	<i>Jeotgalicoccus halotolerans</i>	<i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i>
Cell morphology	cocci	cocci
Anaerobic growth	+	+
Acid production from Arabinose	+	+
D-mannitol	-	-
Growth at 0% NaCl	+	-
Growth at 20% NaCl	+	-
Optimum growth temp.	30-35 °C	20-25 °C
Temperature range for growth	4-42 °C	4-34 °C
Peptidoglycan type	L-Lys-Gly <sub>3-4</sub> -L-Ala(Gly)	L-Lys-Gly <sub>3-4</sub> -L-Ala(Gly)
Predominant menaquinone	MK-7	MK-7
G+C mol%	42	42

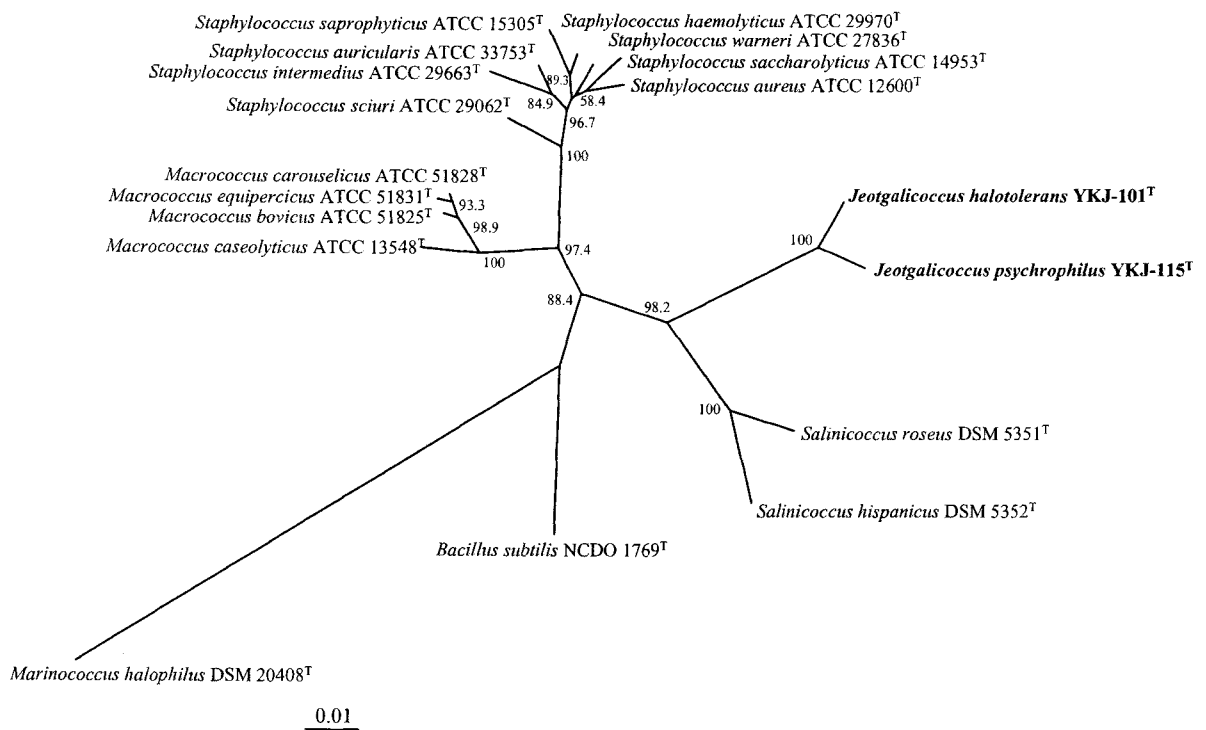


그림 8. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic positions of *Jeotgalicoccus halotolerans* YKJ-101<sup>T</sup>, *Jeotgalicoccus psychrophilus* YKJ-115<sup>T</sup> and the representatives of some other related taxa based on 16S rDNA sequences. Scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide position. Bootstrap values (expressed as percentages of 1000 replications) greater than 50% are shown at the branch points.

#### 다. 서해 갯벌로부터 분리한 신규미생물 속 *Kangiella*의 발견

최신의 분자 생태분류 기술을 활용하여 서해 갯벌로부터 2 균주(균주명 SW-125<sup>T</sup>, SW-154<sup>T</sup>)를 확보하여 16S rDNA 염기서열 분석을 수행한 결과 지금까지 학계에 보고된 세균 속 및 종과 분류학적으로 다르게 진화해온 사실을 확인하였다. 두 균주에 대해서 형태학적, 생리·생화학적, 화학분류학적 연구를 추가적으로 병행한 결과 지금까지 기존 학계에 보고되지 않은 신규 세균 속의 서로 다른 두 종인 것으로 확인되어 *Kangiella koreensis*, *Kangiella aquimarina* 란 이름을 세계 최초로 명명하여 국제적으로 저명한 계통분류학술지인 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology에 발표하였다. *Kangiella* 속은 간균의 형태를 지니며 내생포자는 형성하지 않았다. 주요 isoprenoid quinone으로 ubiquinone-8, 주요 지방산으로 iso-C<sub>15:0</sub>를 가지고 있었으며 DNA의 G+C 함량은 44 mol% 이었다. *Kangiella* 속의 주요 표현형 특징 및 다른 진화적으로 관련된 속과의 차이는 표 3과 같고 16S rDNA 염기서열에 기초한 신규 *Kangiella koreensis*, *Kangiella aquimarina*의 분자진화계통학적 위치는 그림 9와 같다.

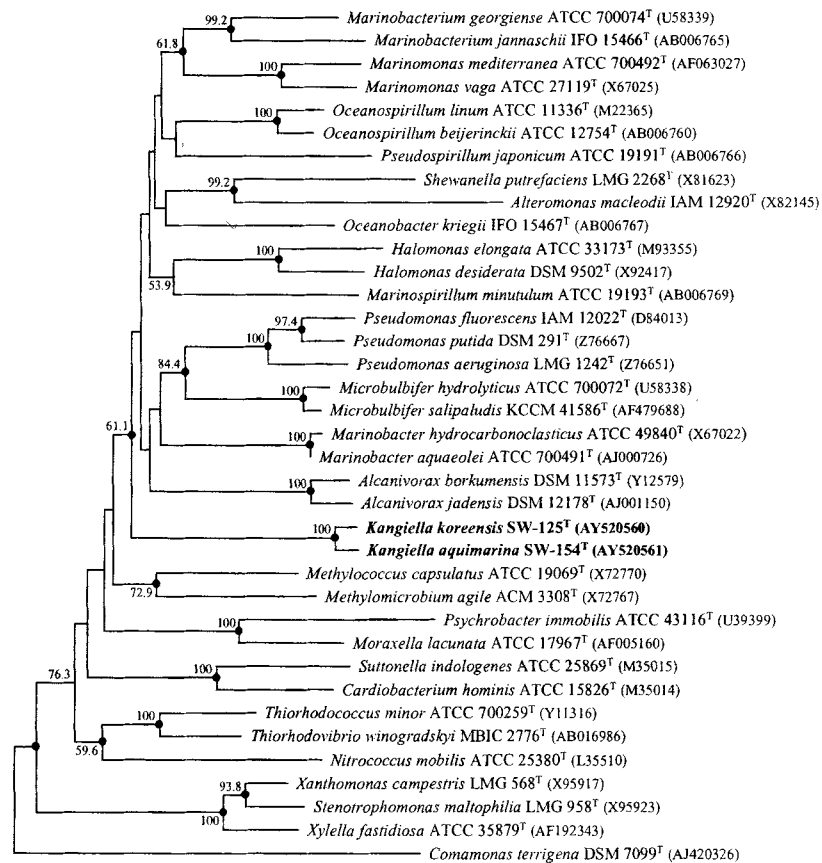


그림 9. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the positions of *Kangiella koreensis* and *Kangiella aquimarina*.

표 3. Differential phenotypic properties of the genus *Kangiella* and other related genera.

Genus: 1, *Kangiella*; 2, *Alcanivorax*; 3, *Marinobacter*; 4, *Microbulbifer*; 5, *Marinobacterium*; 6, *Oceanobacter*

Characteristic	1	2	3	4	5	6
Cell shape	Rods	Rods	Rods	Rods or cocci	Rods	Rods
Motility	-	v	+	v	+	+
Nitrate reduction	+	v	v	- or ND	v	-
Anaerobic growth	+	v	-	-	-	-
Hydrolysis of:						
Aesculin	-	-	- or ND	v	ND	ND
Gelatin	+	-	v	+	-	-
Starch	-	-	v	+	-	-
Tween 80	+	+	+ or ND	+	+	+
Growth at 45 °C	v	-	v	v	-	-
Growth at 4 °C	v	v	v	-	v	-
Growth at 10 % NaCl	+	+	+	v	+	ND
Optimum growth temp. (°C)	30-37	25-30	20-45	25-37	37	20-30
Predominant ubiquinone	Q-8	ND	Q-9	Q-8	Q-8	Q-8
Major fatty acid(s)	iso-C <sub>15:0</sub>	C <sub>16:0</sub> , C <sub>18:1</sub> w7c, C <sub>16:1</sub> w7c	C <sub>18:1</sub> w9c, C <sub>16:0</sub>	iso-C <sub>15:0</sub> , iso-C <sub>17:1</sub> w9c, iso-C <sub>17:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:1</sub> , C <sub>18:1</sub>
DNA G+C content (mol%)	44	53-66	53-64	58-60	55-60	54-56

+, positive; -, negative; v, variable reaction; ND, not determined.

라. 서해 갯벌로부터 분리한 신규미생물 속 *Marinicola* 발견

최신의 분자 생태분류 기술을 활용하여 서해 갯벌로부터 1 균주(균주명 SW-152<sup>T</sup>)를 확보하여 16S rDNA 염기서열 분석을 수행한 결과 지금까지 학계에 보고된 세균 속 및 종과 분류학적으로 다르게 진화해온 사실을 확인하였다. 두 균주에 대해서 형태학적, 생리·생화학적, 화학분류학적 연구를 추가적으로 병행한 결과 지금까지 기존 학계에 보고되지 않은 신규 세균 속의 서로 다른 두 종인 것으로 확인되어 *Marinicola seohaensis* 란 이름을 세계 최초로 명명하여 국제적으로 저명한 계통분류학술지인 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology에 발표하였다. *Marinicola* 속은 호기성의 간균의 형태를 지니며 내생포자는 형성하지 않았다. 주요 isoprenoid quinone으로 menaquinon-7, 주요 지방산으로 iso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>15:1</sub>, 주요 인지질로는 phosphatidylethanolamine, diphosphatidylglycerol, DNA의 G+C 함량은 40.3 mol% 이었다. *Kangiella* 속의 주요 표현형 특징 및 다른 진화적으로 관련된 속과의 차이는 표 4와 같고 16S rDNA 염기서열에 기초한 신규 *Marinicola seohaensis* 의 분자진화계통학적 위치는 그림 10과 같다.

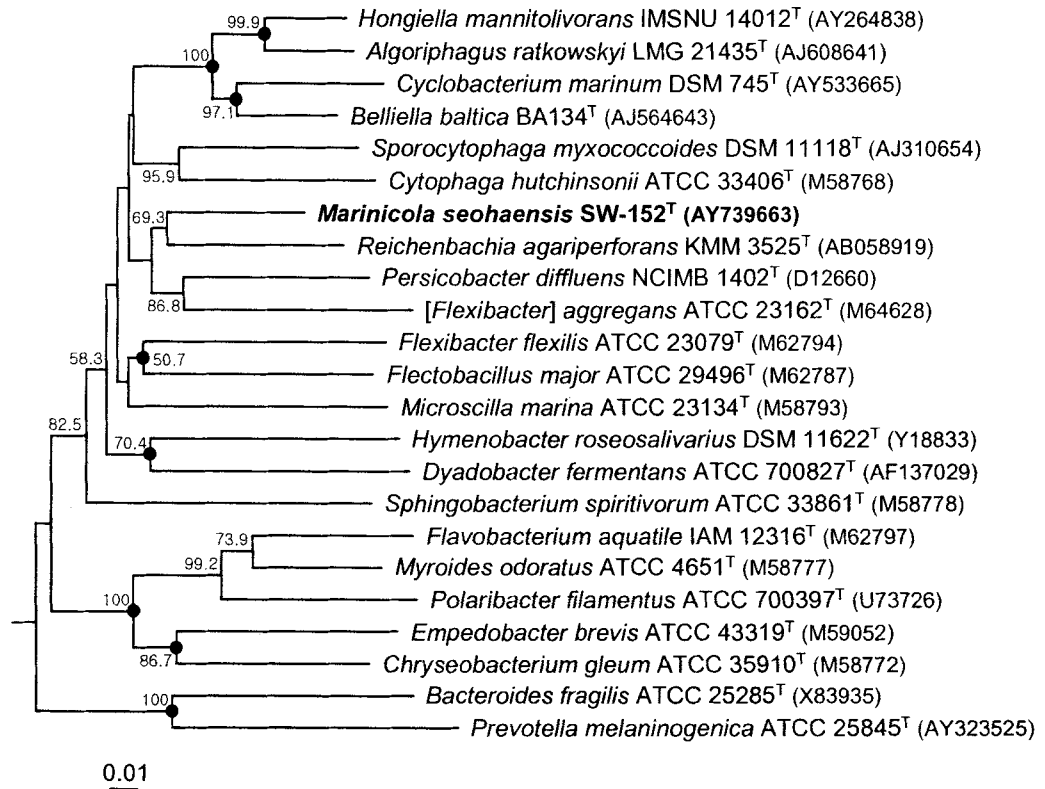


그림 10. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the positions of *Marinicola seohaensis*.

표 4. Differential phenotypic properties of the genus *Kangiella* and other related genera.

+, positive; -, negative; ND, not determined.

Characteristic	<i>Marinicola</i>	<i>Reichenbachia</i>	<i>Persicobacter</i>	[ <i>Flexibacter</i> ] <i>aggregans</i>
Pigment colour	Strong orange	Orange	Pink to orange	Yellow
Catalase	+	+	-	+
Flexirubin	+	+	-	-
Optimal growth temperature (°C)	30	25-28	25-30	ND
Maximum growth temperature (°C)	40	35	< 45	35-45
Growth at 4 °C	+	+	-	-
Max. NaCl tolerance (%)	8	6	6	ND
Carbohydrate utilization	-	-	+	+
Hydrolysis of:				
Agar	-	+	+	+
Gelatin	-	+	+	-
Starch	-	+	+	-
Predominant menaquinone	MK-7	MK-7	MK-7	ND
Major fatty acids	iso-C <sub>15:0</sub> , iso-C <sub>15:1</sub>	iso-C <sub>15:0</sub> , C <sub>16:1</sub>	ND	ND
DNA G+C content (mol%)	40.3	44.5	40-42 (42)	37-42 (37)

마. 다양한 자연 환경으로부터 신규 미생물 종(species)의 발견

국내의 다양한 자연환경 및 식품 등으로부터 미생물 균주를 탐색, 분리, 분류동정을 통해 산업적 유용성 및 학술적 신규성을 지니고 있는 다양한 세균 종을 60종 이상 확보하여 한국의 지명 및 식품 이름 등을 붙여 세계적으로 지명한 학술지인 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 등에 발표 하였다. 확보 및 발표된 신규 종에 대한 증명 및 주요 특징은 표5와 같다.

표 5. 신규 종 및 주요 특징

종 (Species)	주요 특징
<i>Lentibacillus salicampi</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain SF-20<sup>T</sup> (= KCCM 41560<sup>T</sup> = JCM 11462<sup>T</sup>)</li> <li>• 염전으로부터 분리한 호염성, 간균형의 신규 속 및 종</li> </ul>
<i>Microbulbifer salipaludis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain SM-1<sup>T</sup> (= KCCM 41586<sup>T</sup> = JCM 11542<sup>T</sup>)</li> <li>• 영산강 하구 바다쪽 토양으로부터 분리한 호염성 신규 종</li> </ul>
<i>Paenibacillus kribbensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain AM49<sup>T</sup> (= KCTC 0766BP<sup>T</sup> = JCM 11465<sup>T</sup>)</li> <li>• Algal cell의 harvesting을 위한 bioflocculating bacterium</li> </ul>
<i>Paenibacillus terrae</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain AM141<sup>T</sup> (= KCCM 41557<sup>T</sup> = JCM 11466<sup>T</sup>)</li> <li>• Algal cell의 harvesting을 위한 bioflocculating bacterium</li> </ul>
<i>Psychrobacter jeotgali</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strains YKJ-103<sup>T</sup> (= KCCM 41559<sup>T</sup> = JCM 11463<sup>T</sup>) and YKJ-105 (= KCCM KCCM 41558 = JCM 11464)</li> <li>• 젓갈로부터 분리한 구균형의 신규 종</li> </ul>
<i>Marinobacter litoralis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain SW-45<sup>T</sup> (= KCCM 41591<sup>T</sup> = JCM 11547<sup>T</sup>)</li> <li>• 동해 정동진 해안 해수로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Jeotgalicoccus halotolerans</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain YKJ-101<sup>T</sup> (= KCCM 41448<sup>T</sup> = JCM 11198<sup>T</sup>)</li> <li>• 젓갈로부터 분리한 구균형의 신규 속 및 종</li> <li>• L-Lys-Gly<sub>3-4</sub>-L-Ala(Gly)형의 특이한 peptidoglycan 구조를 가짐</li> </ul>
<i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain YKJ-115<sup>T</sup> (= KCCM 41449<sup>T</sup> = JCM 11199<sup>T</sup>)</li> <li>• 젓갈로부터 분리한 구균형의 신규 속 및 종</li> <li>• L-Lys-Gly<sub>3-4</sub>-L-Ala(Gly)형의 특이한 peptido-glycan 구조를 가짐</li> </ul>
<i>Halobacillus salinus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain HSL-3<sup>T</sup> (= KCCM 41590<sup>T</sup> = JCM 11546<sup>T</sup>)</li> <li>• 동해 화진포 주변 호수로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Erythrobacter flavus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strains SW-46<sup>T</sup> (= KCCM 41642<sup>T</sup>) and SW-52</li> <li>• 동해 화진포 해수로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> <li>• <i>Erythrobacter</i> 속에서 노란색 색소를 나타내는 종</li> </ul>
<i>Bacillus marisflavi</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain TF-11<sup>T</sup> (= KCCM 41588<sup>T</sup> = JCM 11544<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 갯벌로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Bacillus aquimaris</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain TF-12<sup>T</sup> (= KCCM 41589<sup>T</sup> = JCM 11545<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 갯벌로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Alteromonas marina</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strains SW-47<sup>T</sup> (= KCCM 41638<sup>T</sup>) and SW-49 (KCCM 41639)</li> <li>• 동해 화진포 해수로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Planococcus maritimus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain TF-9<sup>T</sup> (= KCCM 41587<sup>T</sup> = JCM 11543<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 갯벌로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Nocardioides aquiterrae</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain GW-9<sup>T</sup> (= KCCM 41647<sup>T</sup>)</li> <li>• 국내의 지하수로부터 분리한 LL-DAP 함유 신규희귀 방선균 종</li> </ul>

표 5. 신규 종 및 주요 특징 (계속)

종 (Species)	주요 특징
<i>Shewanella gaetbuli</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain TF-27<sup>T</sup> (= KCCM 41648<sup>T</sup> = JCM 11814<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 갯벌로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Halobacillus locisalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain MSS-155<sup>T</sup> (= KCCM 41687<sup>T</sup> = KCTC 3788<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 염전으로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Microbulbifer maritimus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain TF-17<sup>T</sup> (= KCCM 41774<sup>T</sup> = JCM 12187<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 갯벌로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain SW-72<sup>T</sup> (= KCCM 41640<sup>T</sup> = JCM 11807<sup>T</sup>)</li> <li>• 동해 해수로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Alteromonas litorea</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain TF-22<sup>T</sup> (= KCCM 41775<sup>T</sup> = JCM 12188<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 갯벌로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Marinibacillus campisalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain SF-57<sup>T</sup> (= KCCM 41644<sup>T</sup> = JCM 11810<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 염전으로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Marinobacter flavimaris</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain SW-145<sup>T</sup> (= KCTC 12185<sup>T</sup> = DSM 16070<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 해수로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Marinobacter daepoensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain SW-156<sup>T</sup> (= KCTC 12184<sup>T</sup> = DSM 16072<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 해수로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Kangiella koreensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain SW-125<sup>T</sup> (= KCTC 12182<sup>T</sup> = DSM 16069<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 갯벌로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Kangiella aquimarina</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain SW-154<sup>T</sup> (= KCTC 12183<sup>T</sup> = DSM16071<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 갯벌로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Hongiella marincola</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain SW-2<sup>T</sup> (= KCTC 12180<sup>T</sup> = DSM 16067<sup>T</sup>)</li> <li>• 동해 해수로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Erythrobacter aquimaris</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strains SW-110<sup>T</sup> (= KCCM 41818<sup>T</sup> = JCM 12189<sup>T</sup>), SW-116 and SW-140</li> <li>• 서해 갯벌로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Janibacter melonis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strains CM2104<sup>T</sup> (= KCTC 9987<sup>T</sup> = DSM 16063<sup>T</sup> = JCM12321<sup>T</sup>) and CM2110</li> <li>• 국내 부패 참외로부터 분리한 신규 방선균 종</li> </ul>
<i>Porphyrobacter donghaensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strains SW-132<sup>T</sup> (= KCTC 12229<sup>T</sup> = DSM 16220<sup>T</sup>) and SW-158</li> <li>• 동해 해수로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Shewanella marisflavi</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain SW-117<sup>T</sup> (= KCCM 41822<sup>T</sup> = JCM 12192<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 해수로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Shewanella aquimarina</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain SW-120<sup>T</sup> (= KCCM 41821<sup>T</sup> = DSM 12193<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 해수로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Halomonas koreensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain SS20<sup>T</sup> (= KCTC 12127<sup>T</sup> = JCM 12237<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 염전으로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Erythrobacter seohaensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain SW-135<sup>T</sup> (= KCTC 12228<sup>T</sup> = DSM 16221<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 갯벌로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Erythrobacter gaetbuli</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain SW-161<sup>T</sup> (= KCTC 12227<sup>T</sup> = DSM 16225<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 갯벌로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>

표 5. 신규 종 및 주요 특징 (계속)

종 (Species)	주요 특징
<i>Photobacterium lipolyticum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain M37<sup>T</sup> (= KCTC 10562BP<sup>T</sup> = DSM 16190<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 갯벌로부터 분리한 호염성의 유용 lipase 생산 신규 종</li> </ul>
<i>Sphingopyxis flavimaris</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain SW-151<sup>T</sup> (= KCTC 12232<sup>T</sup> = DSM 16223<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 갯벌로부터 분리한 호염성 sphingoglycolipid 함유 신규 종</li> </ul>
<i>Psychrobacter alimentarius</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strains JG-100<sup>T</sup> (= KCTC 12186<sup>T</sup> = DSM 16065<sup>T</sup>) and JG-102</li> <li>• 젓갈로부터 분리한 호염성의 신규 세균 종</li> </ul>
<i>Psychrobacter cibarius</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strains JG-219<sup>T</sup> (= KCTC 12256<sup>T</sup> = DSM 16327<sup>T</sup>) and JG-220</li> <li>• 젓갈로부터 분리한 호염성의 신규 세균 종</li> </ul>
<i>Nocardioides alkalitolerans</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strains KSL-1<sup>T</sup> (= KCTC 19037<sup>T</sup> = DSM 16699<sup>T</sup>), KSL-9 and KSL-10</li> <li>• 알칼리 토양으로부터 분리한 알칼리 내성 신규 방선균 종</li> </ul>
<i>Tenacibaculum lutimaris</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strains TF-26<sup>T</sup> (= KCTC 12302<sup>T</sup> = DSM 16505<sup>T</sup>), TF-28, TF-42 and TF-53</li> <li>• 서해 갯벌로부터 분리한 호염성의 신규 종</li> </ul>
<i>Bacillus cibi</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain JG-30<sup>T</sup> (= KCTC 3880<sup>T</sup> = DSM 16189<sup>T</sup>)</li> <li>• 젓갈로부터 분리한 호염성의 신규 세균 종</li> </ul>
<i>Marinicola seohaensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain SW-152<sup>T</sup> (= KCTC 12312<sup>T</sup> = JCM 12600<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 해수로부터 분리한 호염성, 간균형의 신규 속 및 종</li> </ul>
<i>Algoriphagus yeomjeoni</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain MSS-160<sup>T</sup> (= KCTC 12309<sup>T</sup> = JCM 12598<sup>T</sup>) and MSS-161</li> <li>• 서해 염전으로부터 분리한 호염성의 신규 세균 종</li> </ul>
<i>Exiguobacterium aestuarii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain TF-16<sup>T</sup> (= KCTC 19035<sup>T</sup> = DSM 16306<sup>T</sup>) and TF-19</li> <li>• 서해 갯벌로부터 분리한 호염성의 신규 세균 종</li> </ul>
<i>Exiguobacterium marinum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strain TF-80<sup>T</sup> (= KCTC 19036<sup>T</sup> = DSM 16307<sup>T</sup>)</li> <li>• 서해 갯벌로부터 분리한 호염성의 신규 세균 종</li> </ul>

#### 4. 메타게놈 라이브러리의 구축

토양 시료 10g을 100 $\mu$ l의 proteinase K (10mg/ml)를 포함하는 20ml의 DNA 추출용 완충용액 (100mM Tris-HCl [pH8.0], 100mM EDTA, 1.5M NaCl, 1% CTAB [hexadecylmethylammonium bromide])에 현탁시킨 후, 37 $^{\circ}$ C, 250rpm의 조건에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 혼합액에 20% SDS용액 2ml을 첨가하여 65 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 반응시킨 후, 6,000xg로 30분간 원심분리하여 상등액을 모아 동량의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol

(25:24:1, v/v/v) 혼합액을 첨가하여 추출하였다. 원심분리하여 상층을 회수하고 그 부피의 0.6배의 isopropanol을 첨가하여 DNA를 침전시켰다. DNA 침전물을 15,000xg로 20분간 원심분리하여 모은 후 70% (v/v) ethanol로 세척하였다. 상층을 제거한 후 완전히 건조시켜 멸균수에 녹이고 토양내의 humic acid와 같은 불순물의 완전한 제거와 약 30~40kb정도의 DNA 단편으로 부분절단하기위해서 PFGE(Pulse Field Gel Electrophoresis)를 이용하여 전기영동하고 Gelase (Epicentre, USA)를 사용하여 겔 용출을 수행하였다. 약 30~40kb정도로 정제된 DNA는 end-repair 효소 혼합액(Epicentre, USA)을 이용하여 메타게놈 DNA말단을 blunt end로 수선하였다. 이 반응액으로부터 phenol extraction과 isopropanol을 이용한 침전 과정을 거쳐 DNA를 다시 회수하여 멸균수에 희석하였다. 이렇게 회수된 약 0.25 $\mu$ g의 DNA와 dephosphorylated 된 pCC1FOS (Epicentre, USA) 0.5 $\mu$ g을 섞어서 16 $^{\circ}$ C에서 12시간동안 ligation 반응을시키고 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 ligase의 활성을 제거하였다. ligation 반응액에 lambda packaging extract (Epicentre, USA) 50 $\mu$ l를 거품이 나지 않게 섞어준 후, 30 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 packaging 반응을 시켰다. 반응이 끝나면 phage dilution buffer (10mM Tris-HCl [pH8.3], 100mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>) 1ml과 chloroform 25 $\mu$ l를 순차적으로 가볍게 섞어준 후, 그 상층액 20  $\mu$ l를 10mM MgSO<sub>4</sub>와 0.2% (w/v) maltose가 첨가된 LB broth에서 OD<sub>600</sub>=0.8정도로 키운 *E. coli* EPI 300-T1<sup>R</sup> cell 200 $\mu$ l에 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 45분간 infection 반응을 하였다. Infection된 cell은 50 $\mu$ g/ml chloramphenicol이 첨가된 배지에 plating하여 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 약 30~40시간 후 콜로니가 충분히 자라면 라이브러리의 질을 검사하기위해 무작위로 몇 개의 클론을 선택하여 50 $\mu$ g/ml chloramphenicol이 첨가된 LB broth에 접종하여 밤새 배양한 후, 추출한 plasmid에 제한 효소 처리하여 삽입된 DNA의 크기와 다양성을 확인하였다.

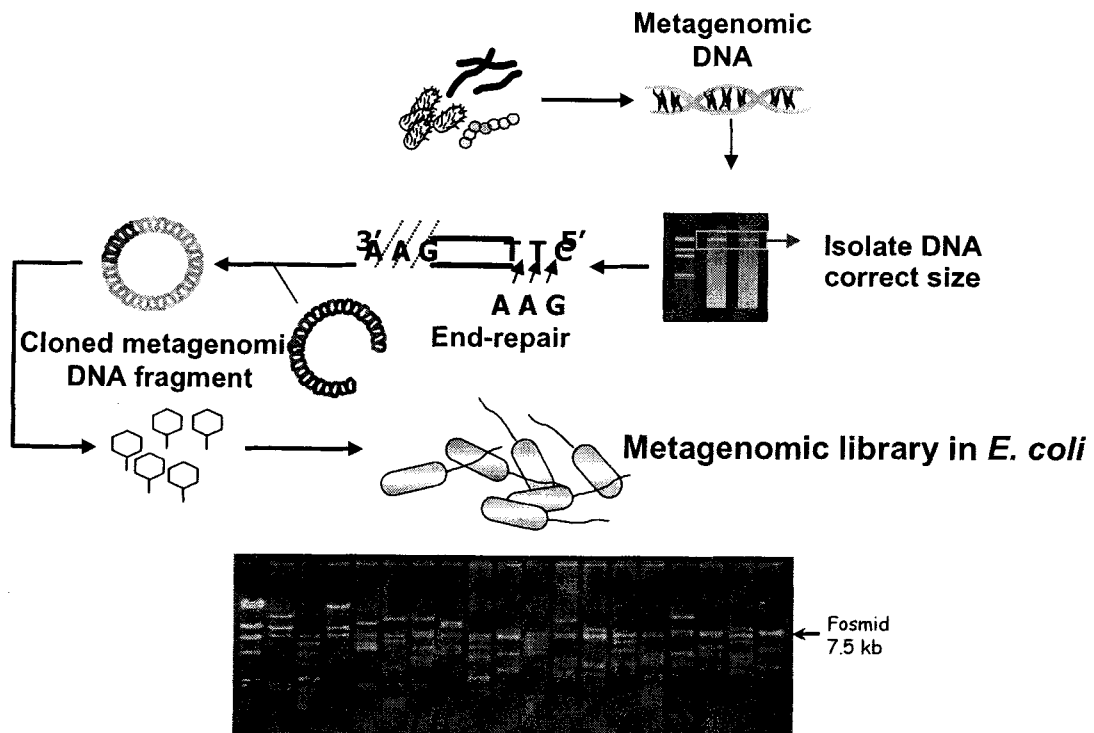


그림 11. 메타게놈 라이브러리 구축 개요.



5. 미생물 및 메타게놈 자원의 체계적 수집 및 보존 시스템 개발  
 가. 미생물 및 메타게놈 자원 수집, 등록을 위한 홈페이지  
 (<http://www.microbe.re.kr>)를 구축함.

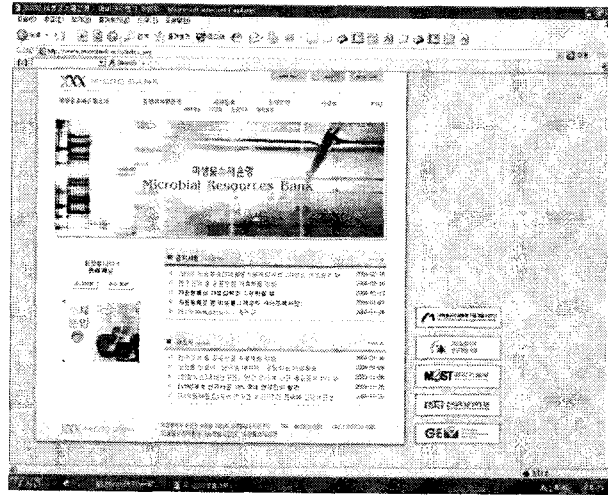


그림 12. 미생물소재은행 홈페이지(<http://www.microbe.re.kr>)초기 화면

구축된 홈페이지를 통하여 1 분야 연구책임자들이 확보한 미생물 및 메타게놈자원의 등록이 이루어지게 됨 (미생물, M000001부터 시작, 메타게놈자원 G200001부터 시작되며. 번호는 균주 등록과 함께 자동 부여되도록 시스템을 구축함).

나. 확보된 미생물 및 메타게놈자원의 보존

확보된 미생물 및 메타게놈자원은 Deep freezer, liquid nitrogen tank 에 주로 glycerol 상태로 안정적으로 보존되고 있으며 또한 동결건조된 앰플 상태로 -4 °C에 보관되고 있다.



그림 13 . 미생물 보존 현황

## 6. 미생물 및 메타게놈자원 분양

본 연구 과제를 통해 확보된 미생물 및 메타게놈자원은 국내 산학연 연구기관 또는 연구자의 효율적 연구수행을 위하여 지속적으로 분양되어 왔다. LG 생활건강, 한국생명공학연구원, 한국화학연구원 등 국내 기업, 연구소, 학교 등에서 미생물 및 메타게놈자원을 분양받아 고유의 연구에 활용하고 있다.

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 (프로테옴 분야)

### 제 1 절. 재료 및 방법

#### 1. 미생물 자원

가. 염기서열 암호 해독이 완료된 미생물 유전체의 확보

염기서열 암호 해독이 완료된 세균성 미생물 및 chromosome은 국내의 KCTC 및 미국의 ATCC로부터 구입하였고, 제공자가 제시한 방법에 의해 배양하여 genomic DNA 형태로 정제, 보관 하였다. 배양된 미생물의 유전체는 genomic DNA extract kit (Intron biotechnology, Korea)에 의해 정제되었다.

#### 2. 효소 확보를 위한 유전자 클로닝 및 발현

가. 효소 유전자를 확보하기 위한 클로닝

목적 효소 유전자들은 PCR 방법을 이용하여 다양한 미생물 유전체로부터 획득할 수 있었다. PCR을 수행시 사용한 primer의 경우, 정방향 primer에는 시작 코돈의 앞부분에 *EcoRI* 또는 *Sal I*의 제한효소 부위를, 역방향 primer에는 ORF의 C-terminal 끝부분에 *Hind III*, *Sal I* 또는 *Xho I*의 제한효소 부위를 삽입하였다. PCR 증폭은 pfu DNA polymerase를 사용하여 총 반응액 50 $\mu$ l로 수행하였으며 이 반응액은 각각의 primer 10 pmol, 주형 DNA 10ng, Perfect Premix(TaKaTa. co.) 25 $\mu$ l를 포함하였다. PCR을 위한 각 반응의 온도 조건은 다음과 같다; DNA의 denaturation 을 위해 94 $^{\circ}$ C에서 45초, primer 의 annealing 을 위해 60 $^{\circ}$ C에서 45초, DNA strand 의 합성을 위해 72 $^{\circ}$ C 에서 2 분의 과정을 30회 반복하는 조건을 사용하였다. 이 PCR 산물은 *AccuPrep Gel Purification Kit* (Bioneer, Korea) 정제하여 적당한 제한효소들로 자른 후, 미리 잘려진 C-말단에 6xHis tag이 달린 단백질을 생산하는 pET-21b(Novagen)발현 벡터와 N-말단에 GST 융합 단백질을 생산하는 pGEX-KG 발현벡터에 삽입하기 위하여 적절한 제한효소를 처리하였고 클로닝과정을 수행하였다.

나. 효소 유전자의 단백질 발현 및 정제

##### (1) 효소 유전자의 단백질 발현

효소의 대량 발현을 위해 DNA 수용성 균주로는 *E. coli* BL21(DE3)와 *E. coli* Rosetta gami (DE3)를 적절히 사용하였다. 형질전환을 통해 재조합된 균주는 ampicillin이 포함된 LB배지에 접종하여 호기적으로 37 $^{\circ}$ C에서 O.D.가 0.6 이 될 때까지 배양한 후 IPTG 0.25mM을 첨가하여 20 $^{\circ}$ C에서 14시간 동안 배양하여 단백질 발현을 유도하였다. 배양된 세포는 원심분리하여 pellet으로 준비하였고 저온에서 1ml당 5초씩 초음파 분쇄기로 파쇄 시킨 후 원심분리를 통해 수용성 단백질과 비수용성 단백질로 분획하였다. 이는 12%의 SDS-PAGE를 통해 분석 되었다.

##### (2) 효소 유전자의 단백질 정제

6xHis tag이 달린 단백질을 정제 시 수용성 단백질을 50mM potassium phosphate, 300mM NaCl, pH 7.0 버퍼로 평형화시킨 nickel-NTA column에 적용시킨 후 50mM potassium phosphate, 300mM NaCl, 200mM imidazole 버퍼를 이용하여 용출시킨다. GST tag이 달린 단백질의 경우에는 수용성 단백질을 50mM potassium phosphate, pH7.0 버

퍼에 미리 평형화 시킨 glutathion sepharose resin에 적용시킨 후 50mM potassium phosphate, 10mM reduced glutathion, pH8.0 버퍼를 이용하여 용출시킨다 분리 정제한 모든 단백질은 50mM potassium phosphate buffer, pH 7.0 버퍼에 저장하였다.

### 3. 목적 효소의 활성 측정 및 특성 분석

#### 가. Esterase 효소의 활성 탐색 및 특성 분석

##### (1) Tributyrin plate 활성 탐색법

정성적인 esterase 효소의 활성 탐색법에는 Tributyrin을 함유한 평판배지에서 기질이 분해되어 나타나는 현상인 halo-ring을 관찰함으로써 탐색 할 수 있다. 이는, 10ml의 tributyrin과 90ml의 Gum Arabic solution을 blender를 이용해 2분동안 교질화 하여, 1.5% agarose gel이 녹아있는 각각의 pH 50mM MES for pH 6.0, MOPS for pH 7.0, Tris-HCl pH8.0 and 9.0 and CAPS pH10.0 and 11.0 buffer를 90ml씩 혼합하여 페트리디쉬에 20ml씩 부어 굳힌 후 지름 0.7cm의 천공을 18개씩 뚫어 배지의 준비를 마친후, 50 $\mu$ l의 esterase 효소를 분주하여 주어진 온도에서 12시간 배양한다.

##### (2) Para nitrophenol 합성기질을 이용한 활성 탐색법

정량적인 esterase의 활성을 탐색하기 위해, 50mM Tris-HCl buffer (pH8.0), 4% ethanol, 0.1 mM *p*-nitrophenyl acetate(C2), *p*-nitrophenyl propionate(C3), *p*-nitrophenyl butyrate(C4), *p*-nitrophenyl caproate(C6) 그리고 *p*-nitrophenyl caprylate(C8)을 각각 최종 1ml로 혼합하여 30 $^{\circ}$ C에서 효소와 반응하였다. 반응속도는 spectrophotometer를 이용하여 405nm에서 측정하였다.

##### (3) Esterase의 온도와 pH에 대한 영향성

###### (가) pH에 대한 영향성

esterase의 pH에 대한 영향성은 37 $^{\circ}$ C에서 50mM MES(pH 6.0), 50mM MOPS(pH 7.0), 50mM Tris HCl (pH range 8.0~9.0), 50mM CAPS (pH range 10.0~11.0) buffer를 이용하여 상기 명시된 방법으로 측정하였다. 각각의 탐색 상황에서 측정된 흡광도는 각각 1,100  $M^{-1} cm^{-1}$  at pH 6.0, 8,500  $M^{-1} cm^{-1}$  at pH 7.0, 16,700  $M^{-1} cm^{-1}$  at pH 8.0, 17,400  $M^{-1} cm^{-1}$  at pH 9.0, 18,000  $M^{-1} cm^{-1}$  at pH 10.0, 17,800  $M^{-1} cm^{-1}$  at pH 11.0이다.

###### (나) 온도에 대한 영향성

선별된 esterase의 온도에 대한 영향 역시 상기 명시된 방법으로 탐색하였으며, 각각 30 $^{\circ}$ C~70 $^{\circ}$ C에서 수행하였다.

##### (4) SPRI를 기반으로한 단백질 칩 시스템 개발

###### (가) SPRI를 이용한 six-His-tagged esterase의 발현 과정 모니터링

Surface Plasmon Resonance Imaging(SPRI)를 이용하여 SDS-PAGE에서 분석 하던 단백질의 발현 양상을 모니터링하는 방법을 개발 하였다. 이는  $Ni^{2+}$ -IDA 로 코팅된 골드칩 표면위에 six-His-tagged esterase가 특별하게 결합하는 원리이며, 기존의 방법에 비하여 빠르고, 대량으로 분석할 수 있는 장점이 있다.

###### (나) 다양한 미생물 유래 Esterase의 빠른 탐색법 개발

상기 개발된 SPRI 시스템을 이용하여 six-His-tagged esterase 30개를  $Ni^{2+}$ -IDA 골드 칩에 tagging 함으로서 esterase의 발현 양상을 대량으로 고속으로 측정 할 수 있게 되었다.

## 나. Monooxygenase 효소의 활성 탐색법

Monooxygenase의 활성은 분광분석계를 이용하여 NAD(P)H의 산화를 340nm에서 측정하는 방법과 효소 반응 중 생성되는 산물을 측정하는 방법으로 측정될 수 있다.[4-6]

Monooxygenase 효소의 반응 중 NAD(P)H가 조효소로 이용되는 경우, 효소 활성은 반응에서 사용되는 NAD(P)H가 기질 의존적으로 산화되는 비율을 340nm에서 측정함으로써 분석하였다. sample cuvettes에는 1ml당 50mM potassium phosphate pH7.0, 100 $\mu$ M NAD(P)H, 200 $\mu$ M substrate 및 적절한 양의 효소를 포함하여 활성을 측정하였다. 1unit은 이 분석 조건에서 1분당 1 $\mu$ M의 NAD(P)H가 산화되는 효소의 양으로 정의 한다. 직접적으로 NAD(P)H의 산화를 관찰할 수 없는 효소의 활성은 반응 후 생성되는 산물의 양을 측정함으로써 분석될 수 있다. Nitrilrilotriacetate와 EDTA monooxygenase의 경우, sample cuvettes에는 1ml당 20mM HEPES pH 7.6m, 500 $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>, 10 $\mu$ M FMN, 30U catalase, 0.2U NAD(P)H:FMN Oxydoreductase, 1mM NADH 그리고 적절한 양의 효소를 포함하여 활성을 진행하였다. 이 반응에서는 생성되는 물질인 glyoxylate를 phenylhydrazine-K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> methods로 측정함으로써 이 효소의 monooxygenase 활성을 측정하였다. 1unit은 이 분석 조건에서 1분당 1 $\mu$ M의 glyoxylate가 생성되는 효소의 양으로 정의 한다. Alkanesulfonate monooxygenase는 Ellman's reagent(5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid))를 이용하여 생성되는 산물인 sulfite를 측정함으로써 활성을 분석할 수 있다. sample cuvettes에는 1ml당 10mM Tris-HCl pH 9.1, 250 $\mu$ M NADPH, 3 $\mu$ M FMN, 500 $\mu$ M sulfonated 기질, 0.2U NAD(P)H:Oxydoreductase 와 적절한 양의 효소를 포함하여 반응을 진행시키고, 이 반응 산물 중 200 $\mu$ l는 100 $\mu$ l의 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (1mg/ml in 100mM sodium phosphate buffer, pH 7.0)와 700 $\mu$ l의 DW와 혼합하여 실온에서 2분간 방치하고 430nm에서 흡광을 측정하여 활성을 분석하였다. 1unit은 이 반응조건에서 1분당 1 $\mu$ M의 sulfite를 형성하는 효소의 양으로 정의하였다. 정제된 효소의 반응 후 생성된 산물은 LC-MS를 통하여 확인하였다.

## 4. 자료 검색 및 분석

목적 효소의 DNA와 단백질 서열은 Comprehensive Microbial Resource genome database [7]에서 키워드 검색을 통하여 획득하였다. 클론화된 putative 단백질을 체계적으로 분석하고 분류하기 위하여, PSI-BLAST검색을 실시하였고, Clusters of orthologous group(COGs)사이트와 PROSITE database, Protein Database Bank (PDB) 사이트를 이용하여 단백질 families와 domain과 관련된 정보를 획득하였다. 다중 서열 정렬은 T-coffee program을 사용하였다.

## 제 2 절 연구 결과

### 1. Esterase 효소 bank 구축

#### (가) 선별된 esterase의 클로닝 및 발현

Esterase 유전자의 염기서열 정보는 Comprehensive Microbial Resource genome

database (The Institute for Genomic Research, MD)[1] 로부터 수집하였다.

총 35개의 염기서열 암호 해독이 완료된 균주 및 유전체로부터 189개의 putative esterase를 확보하였고, 대장균 내에서의 발현 정보 및 일반적인 특성은 데이터베이스화하여 실험의 기초 자료로 사용하였다 (그림 1, 2).

Gene ID	Gene Name	Length	Other Properties
1	...	...	...
2	...	...	...
...	...	...	...
189	...	...	...

그림 1. Data base construction of the esterase pool [1] and SDS-PAGE analysis confirming expression of the esterases. The *E. coli* cells harboring the expression vector were grown LB medium. The protein expression was induced by addition of 1mM IPTG at the optical density of the culture broth 0.4-0.8 at 600nm. This selected predicted esterase genes from the comprehensive microbial resource database.

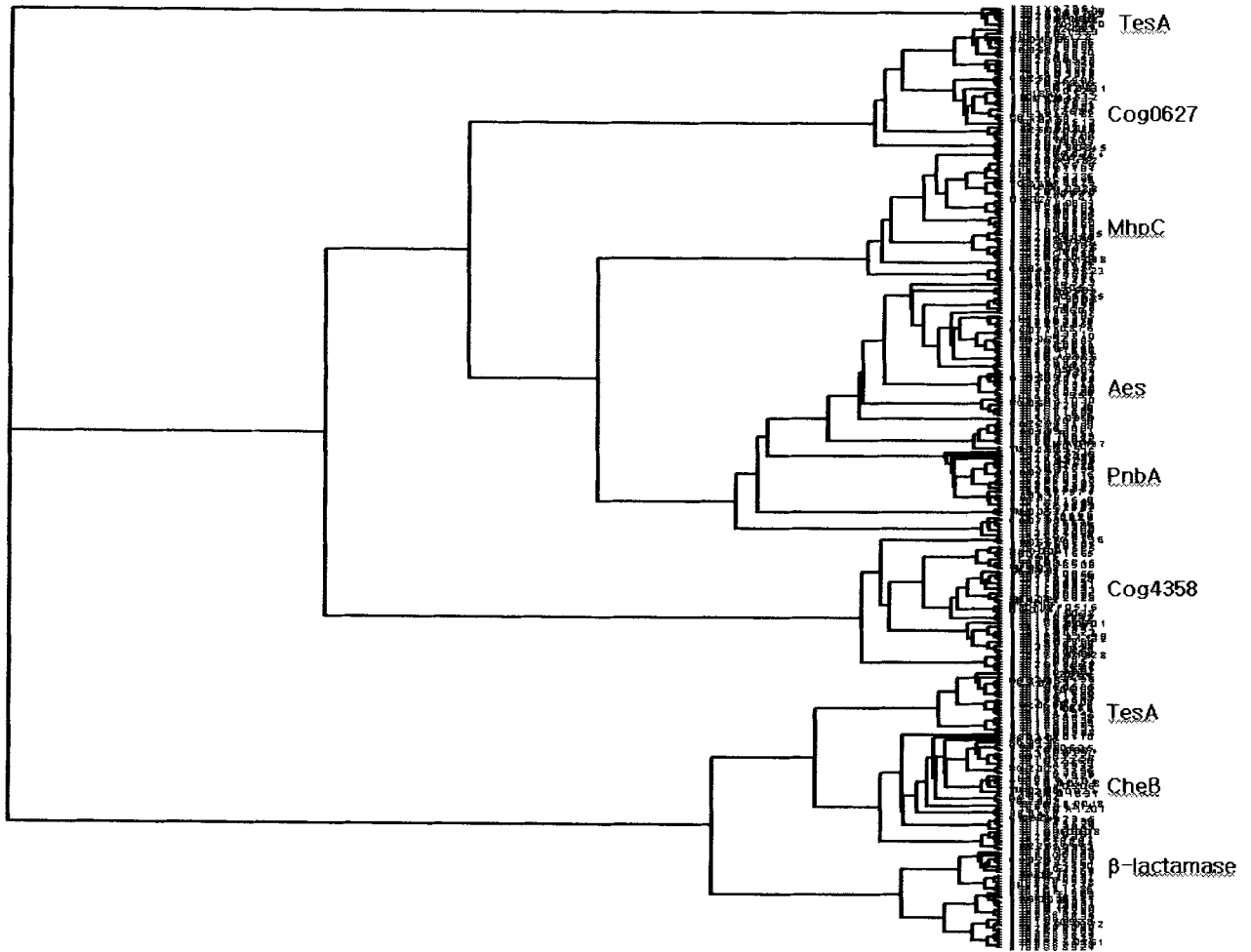


그림 2. Overview of phylogenetic analysis of esterases pool

이 189개의 클로닝된 putative esterase 유전자 집단으로부터 13개의 미생물에서 유래한 30개의 유전자를 선택하였고 (표 1), 이들을 각각 단백질로 발현시켜 SDS-PAGE로 확인하였다(그림 3).

Table 1. Selected predicted esterase genes from the comprehensive microbial resource database

No	Protein accession No	Gene name	Gene source <sup>a</sup>	Name
S1	NP_599594	<i>NCgl0336</i>	C.G.	Predicted esterase
S2	BAB98290	<i>Cgl0897</i>	C.G.	Esterase/lipase
S3	BAB99906	<i>Cgl2513</i>	C.G.	D-esterase
S4	NP_814963	<i>EF1236</i>	E.F.	Putative acetyl xylan esterase
S5	NP_415027	<i>b0494</i>	E.C.	Arylesterase
S6	NP_415212	<i>b0686</i>	E.C.	Putative esterase/lipase precursor
S7	NP_471876	<i>lin2546</i>	L.I.	Carboxylesterase precursor
S8	NP_470192	<i>lin0850</i>	L.I.	Similar to carboxylesterase
S9	NP_464108	<i>lmo0580</i>	L.M.	Phospholipase/carboxylesterase
S10	NP_251639	<i>PA2949</i>	P.A.	Esterase
S11	NP_252548	<i>PA3859</i>	P.A.	Probable carboxylesterase
S12	NP_459501	<i>STM0506</i>	S.T.	Arylesterase
S13	NP_460874	<i>STM1917</i>	S.T.	Protein-glutamate methylesterase
S14	NP_461139	<i>STM2194</i>	S.T.	Esterase
S15	NP_461995	<i>STM3079</i>	S.T.	Putative acyltransferase
S16	NP_459450	<i>STM0454</i>	S.T.	Putative esterase
S17	NP_459485	<i>STM0490</i>	S.T.	Acetyl esterase
S18	NP_353548	<i>AGR_C_916</i>	A.T.	Probable methyl esterase
S19	NP_354481	<i>AGR_C_2723</i>	A.T.	Esterase
S20	NP_384534	<i>SMc01093</i>	S.M.	Putative esterase/lipase
S21	NP_385554	<i>SMc01033</i>	S.M.	Arylesterase
S22	NP_435384	<i>SMa0259</i>	S.M.	Probable carboxylesterase
S23	NP_435970	<i>SMa1327</i>	S.M.	Carboxylesterase
S24	NP_436095	<i>SMa1561</i>	S.M.	Protein-glutamate methylesterase
S25	NP_607143	<i>spyM18_1005</i>	S.P.	Tributyryl esterase
S26	NP_274324	<i>NMB1305</i>	N.M.	Putative esterase
S27	NP_280298	<i>VNG1474G</i>	H.S.	Carboxylesterase
S28	NP_070544	<i>AF1716</i>	A.F.	Carboxylesterase
S29	NP_607425	<i>spyM18_1320</i>	S.P.	Protein-glutamate methylesterase
S30	NP_069874	<i>AF1041</i>	A.F.	Putative esterase

<sup>a</sup> The abbreviations used for the strains are: A.T., *Agrobacterium tumefaciens* C58 Cereon; A.F., *Archaeoglobus fulgidus* DSM4304; C.G., *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032; E.F., *Enterococcus faecalis* V583; E.C., *Escherichia coli* K12; H.S., *Halobacterium* sp. NRC-1; L.I., *Listeria innocua* CLIP 11262; L.M., *Listeria monocytogenes* EGD-e; N.M., *Neisseria meningitidis* MC58; P.A., *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; S.T., *Salmonella typhimurium* LT2; S.M., *Sinorhizobium meliloti* 1021; S.P., *Streptococcus pyogenes* MGAS8232.



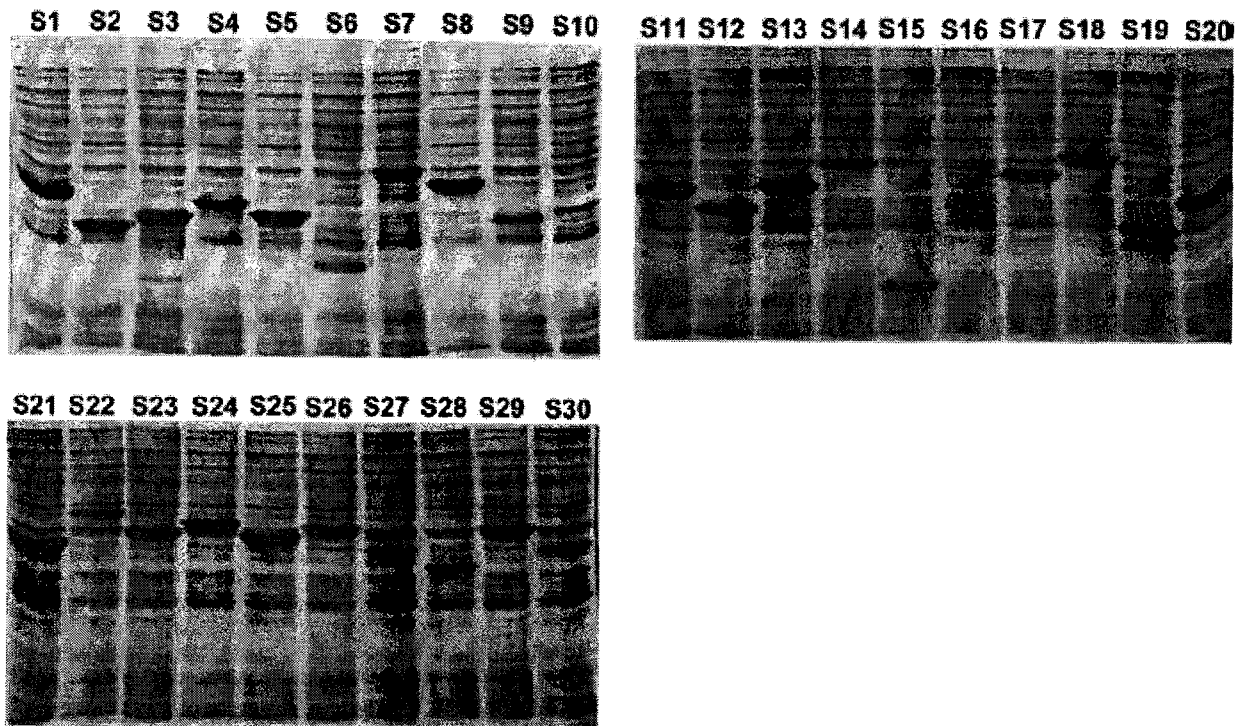


그림 3. SDS.PAGE analysis confirming expression of the esterases. The *E. coli* cells harboring the expression vector were grown in LB medium. The protein expression was induced by addition of 1 mM IPTG at the optical density of the culture broth 0.4-0.8 at 600 nm.

#### (나) Esterase의 활성 측정

구축된 esterase pool의 효소 활성을 시험하기 위해, tributyrine을 함유한 평판배지와 p-nitrophenyl esters를 이용한 spectrophotometer 방법을 이용하였다. 이 두 방법은 모두 일반적인 esterase의 탐색 및 characterization에 쓰이는 탐색 방법이다. 먼저 pH에 대한 영향을 시험하기 위해 4개의 각기 다른 pH buffer (pH 6, 7, 8, 9)를 이용하여 TBN 평판배지를 만들고, 30°C에서 12시간 동안 반응하였다. 그 결과, 그림 4에서와 같이 기질을 분해하여 생성된 halo ring을 관찰함으로써 pH에 대한 영향을 확인 할 수 있었다. 그 중 30개의 ORF중 9개의 esterase를 확보하였고, 또한 21개의 esterase라고 예상되는 효소들은 단백질 발현에 있어 비 수용성 단백질로 발현되어 효소활성이 나타나지 않은 것으로 사료된다. *E. coli* K12의 유전자 b0494에서 유래한 esterase S5, *S. typhimurium* LT2의 유전자 STM0506에서 유래한 S12, 그리고 *A. fulgidus* DSM4304의 유전자 AF1716에서 유래한 S28은 특히 알칼리성 pH 범위에서 강한 효소 활성을 보였다. 또한 *P. aeruginosa* PAO1의 유전자 PA3859에서 유래한 S11, *S. meliloti* 1021의 유전자 SMc01033에서 유래한 S21은 효소활성이 pH8.0 이상에서 약간 상승하는 경향을 보였다. esterase S13은 흥미롭게도 산성 pH에서 강한 효소활성을 보였다. 이러한 pH와 효소활성에 실험은 p-nitrophenyl butyrate를 이용한 spectrophotometer방법으로 더욱 상세히 보고 하였다 (그림 5). S11을 제외한 다른 esterase 모두 평판배지 측정법과 흡광도를 이용한 측정법에서 상동한 결과를 얻었고, esterase S13의 경우엔, 그림 6에서 보듯이 수용성 단백

질 생산에 실패하여 결과를 예측할 수 없었다.

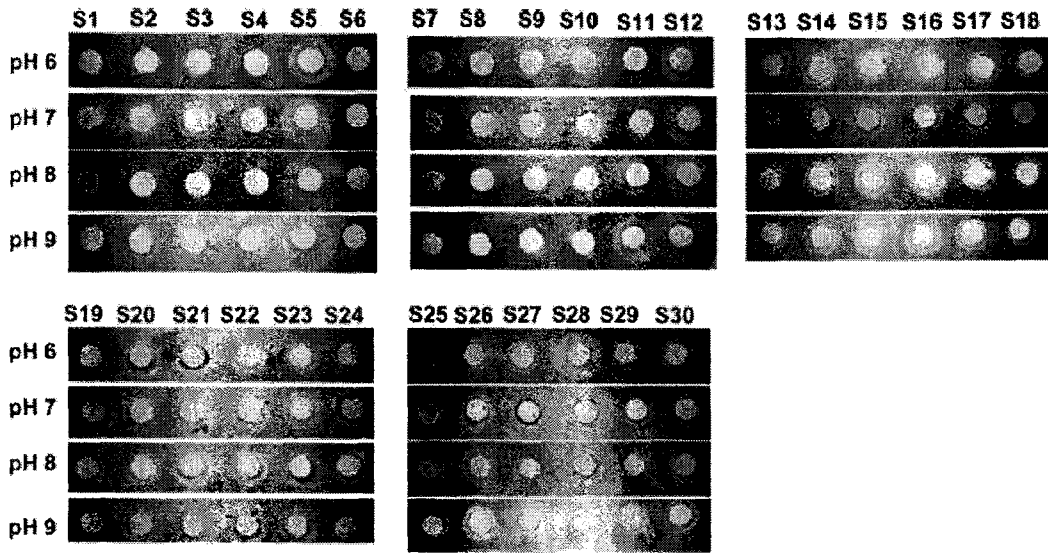


그림 4. Esterase activity assay on tributyrin plates. The crude cell extract of recombinant *E. coli* cells was added into each arrayed hole of the plate. The plate was prepared with four different buffers as described in the materials and methods. The plate was incubated at 30 or 50 C for 12 h. The size of the halo ring formed around the hole was measured and summarized in the table 2.

표 2 The tributyrin hydrolyzing activity of esterases

	30 °C				50 °C			
	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0
S1	-	-	-	-				
S2	-	+	+	-		No	activity	
S3 <sup>a</sup>	-	++	+	+				
S4	-	-	-	-				
S5	++	+++	+++	++++	+	++	+++	+++
S6	-	-	-	+				
S7	-	-	+	+				
S8	-	-	+	-		No	activity	
S9	+	-	-	+				
S10	+	+	+	+				
S11	-	-	+	+++				
S12	++	++	+++	++++	+	++	++	+++
S13	++	+	+	+				
S14	+	+	+	+				
S15	+	+	+	+				
S16	+	+	+	+		No	activity	
S17	+	+	+	+				
S18	+	+	+	+				
S19	+	++	+	+				
S20	+	+	+	+				
S21	+	+	+	+++	+	+	+	+++
S22	+	+	+	+				
S23	+	++	+	+				
S24	+	+	+	+		No	activity	
S25	+	+	+	+				
S26	-	+	+	+				
S27	+	+	+	+				
S28	+++	+++	+++	++++	+	++	+++	++++
S29	+	+	+	+		No	activity	
S30	+	+	+	+				

<sup>a</sup> Esterases exhibiting significant tributyrin hydrolyzing activity are in bold character.

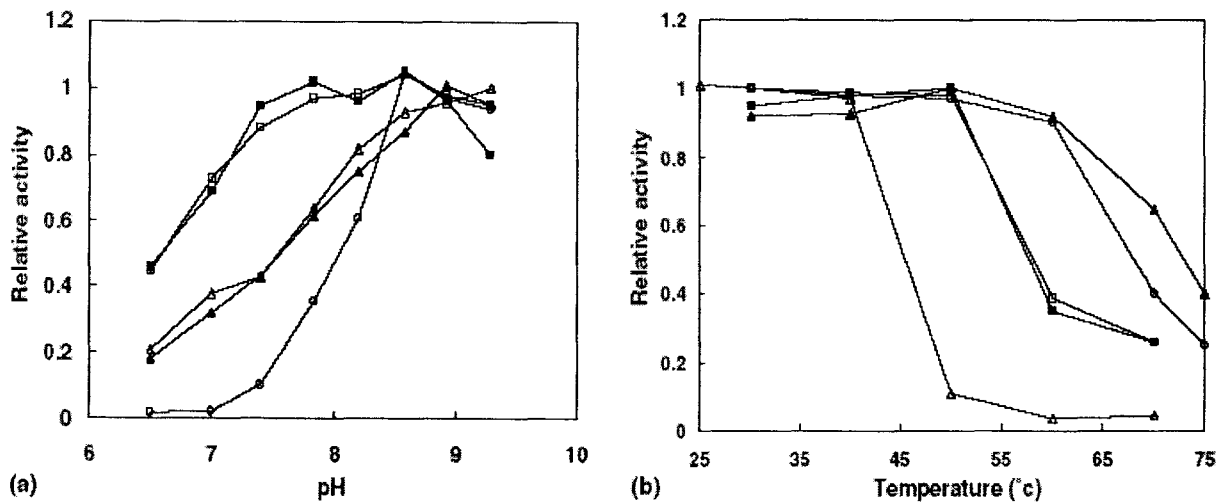


그림 5. The effects of pH and temperature on the ester-hydrolyzing activity of selected enzymes. (a) The pH vs. activity profiles of the ester-hydrolyzing enzymes S5 (■), S11 (△), S12 (□), S21 (○), and S28 (▲). The activity was assayed by measuring the initial rate of the hydrolysis of *p*-nitrophenyl butyrate at various pH values at 30 C. (b) The temperature vs. activity profiles of the enzymes S5 (■), S11 (△), S12 (□), S21 (○), and S28 (▲). The enzyme extracts were incubated for 20 min at given temperatures. The remaining activities of the pre-incubated enzyme extracts were measured using *p*-nitrophenyl butyrate as a substrate in 50 mM Tris.HCl (pH 8.0) at 30 C.

pH 활성 시험과 마찬가지로, 고온에서의 효소활성에 대한 영향 또한 50°C에서 12시간 배양 하여 상동한 실험 절차로 수행하였다. 표 2에서 나타난 결과에서 보듯이 S5, S12, S21 and S28 만이 TBN을 함유한 평판배지에서 활성이 나타났으며, 이들 모두 고온에서 안정한 효소활성을 나타내는 esterase로 간주된다. *p*-nitrophenyl butyrate를 이용한 spectrophotometer방법으로 더욱 상세히 고온에서의 효소활성을 실험한 결과 S5, S12, S21 그리고 S28 모두 50°C까지 안정한 내열성 효소임이 입증되었다. 한편 50°C에서 불활성을 보였던 esterase S11은 chromophoric 시험 결과 37°C이상에서 불안정한 효소 활성을 나타내는 것으로 판명되었다. esterase S5와 S12는 55°C까지 안정한 효소 활성을 보였고, S21과 S28은 60°C까지 안정한 효소 활성을 보였다. S28은 네 개의 효소 중 가장 높은 효소활성을 보였다.

**(다) 발현된 Esterase의 수용성**

확실히 효소활성을 가지고 있는 esterase(S3, S5, S11, S12, S13, S19, S21, S23 and S28)와 약한 효소활성을 보이는 esterase(S10 and S15)를 포함한 11개 esterase의 단백질 수용성을 확인한 결과 낮은 효소활성이 비수용성 단백질로 발현된 것에 기인한다는 사실을 알 수 있었다 (그림 6). 하지만 esterase S5와 S12는 비록 낮은 수용성 단백질을 생산하지만 효소활성은 강하게 나타나는 것은 주목할 만한 사실이다.

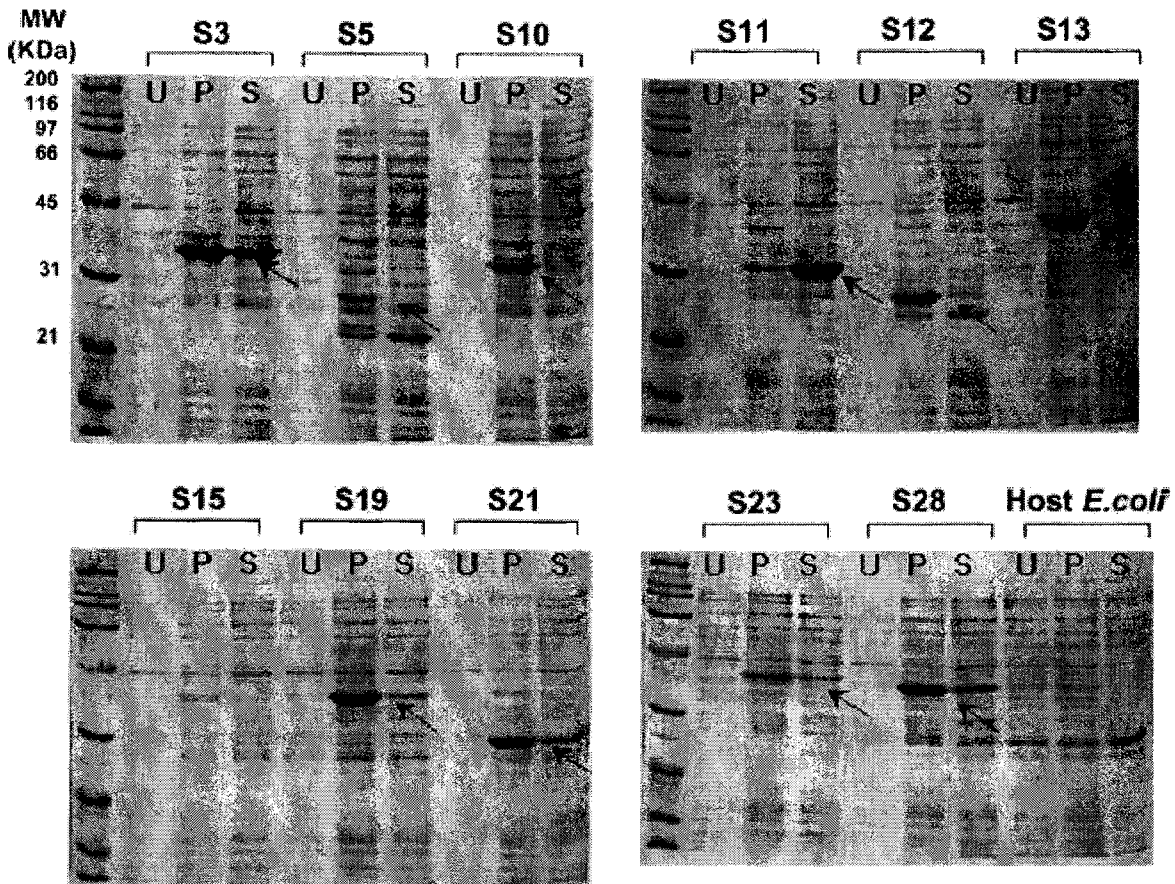


그림 6. Solubility of the selected esterases. Cells were sonified and the crude extract was centrifuged. The supernatant (lane marked S) and the pellet (lane marked P) were analyzed by 12% SDS.PAGE. Lane U is for the uninduced recombinant *E. coli* cell extract. Arrows indicate the position of the target proteins in the gel.

(라) 기질 특이성

선별된 5개의 esterase (S5, S11, S12, S21 and S28)는 *p*-nitrophenyl esters를 기질로 사용하여 기질 특이성을 확인 하였다. 그 결과 esterase S5, S11 그리고 S12는 *p*-nitrophenyl caproate (C6)에서 가장 강한 효소활성을 보였고, esterase S21과 S28은 짧은 사슬 (C2~C6)의 기질 뿐만 아니라 긴 사슬(C14, C16)의 기질에서도 약간의 효소 활성을 보였다 (그림 7)

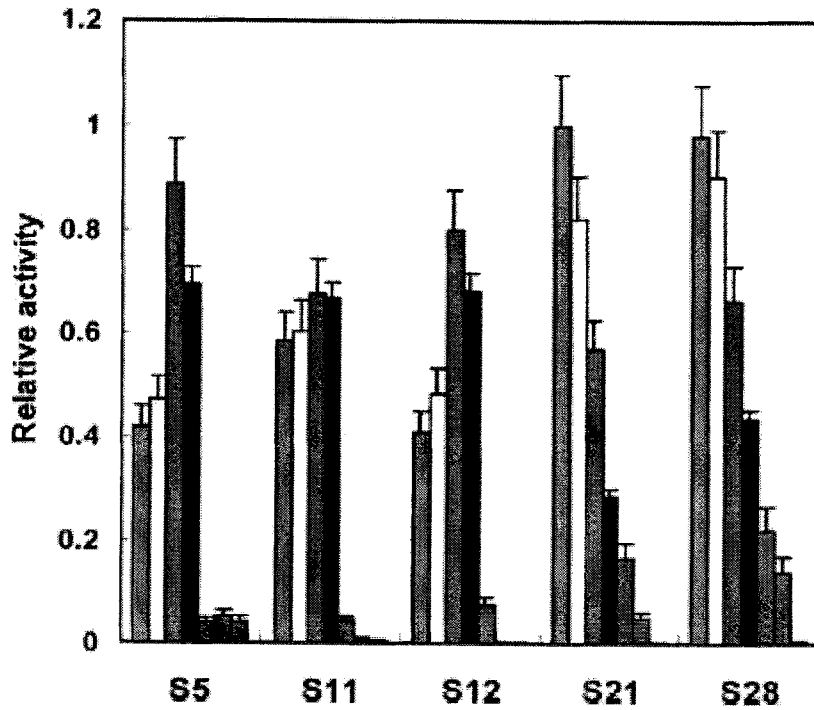


그림 7. Chain length specificity of esterases. Esterase activity was tested with various *p*-nitrophenyl substrates (*p*-nitrophenyl acetate (C2), *p*-nitrophenyl butyrate (C4), *p*-nitrophenyl caproate (C6), *p*-nitrophenyl caprylate (C8), *p*-nitrophenyl myristate (C14), *p*-nitrophenyl palmitate (C16), and *p*-nitrophenyl stearate (C18)). The columns (from left to right) refer to activity toward C2, C4, C6, C8, C14, C16 and C18 *p*-nitrophenyl esters. The activity was measured using 0.1 mM substrates in 50 mM Tris.HCl (pH 8.0) at 30 C. Each point of the data was averaged value of triple measurements. The upper limit of the deviation was shown as error bar.

**(마) SPRI를 이용한 six-His-tagged esterase의 발현 과정 모니터링**

$Ni^{2+}$ -IDA 로 코팅된 골드칩 표면위에 six-His-tagged esterase가 특이적으로 결합하는 원리로, Surface Plasmon Resonance Imaging(SPRI)를 이용하여 SDS-PAGE에서 분석하던 단백질의 발현 양상을 모니터링 하는 방법을 개발 하였다. 이는 기존의 방법에 비하여 획기적으로 빠르며, 대량으로 분석할 수 있는 장점이 있다. SDS-PAGE와 비교 실험한 결과 상동한 양상의 결과를 얻었다 (그림 8).

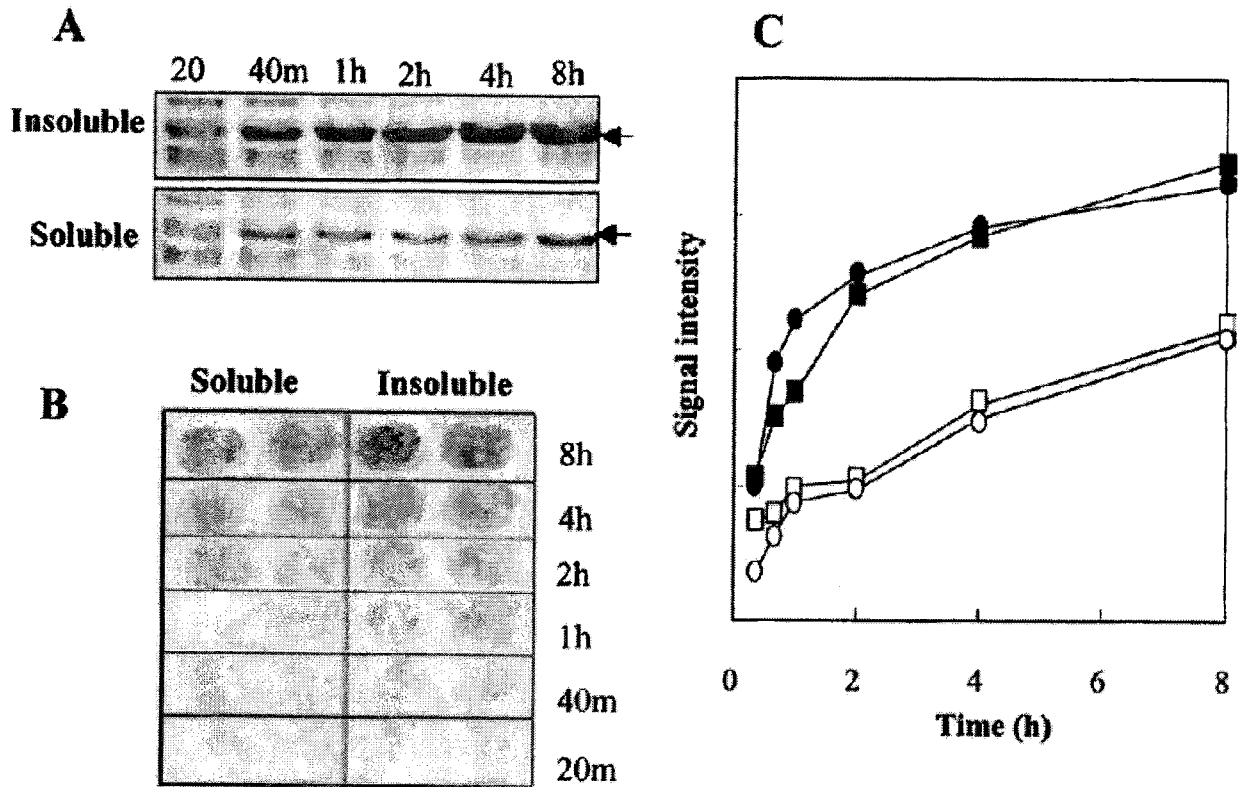


그림 8. Expression of esterase S21. Results of SDS-PAGE (A) and SPRI (B) analyses of the expressed protein are shown. The supernatants of the centrifuged cell lysate are marked "Soluble," and the pellets dissolved in 8 M urea are marked "Insoluble." Each arrow indicates the target protein. (C) Signal intensity-versus-time plot of the SDS-PAGE (F, E) and SPRI (■, ○) analyses. The open symbols are for the soluble fractions, and the closed symbols are for the insoluble fractions.

**(바) 다양한 미생물 유래 esterase의 빠른 탐색법 개발**

상기 개발된 SPRI 시스템을 이용하여 6xHis tagged esterase 30개를  $Ni^{2+}$ -IDA 골드 칩에 tagging 함으로서 esterase의 발현 양상을 관측 할 수 있었다. 이 기술의 의의는 nanoliter 수준의 단백질 시료를 이용한다는 점과 array 형태의 기술이기 때문에 대량의 시료를 한 번에 분석하여 확인할 수 있다는 점, 다른 표지 없이 단백질을 선별하여 분석할 수 있으며 SPR의 signal이 단백질의 농도와 비례하기

때문에 정량적인 분석이 용이하다는 것이다. 이와 같은 특징은 그림 9에서 확인 할 수 있다.

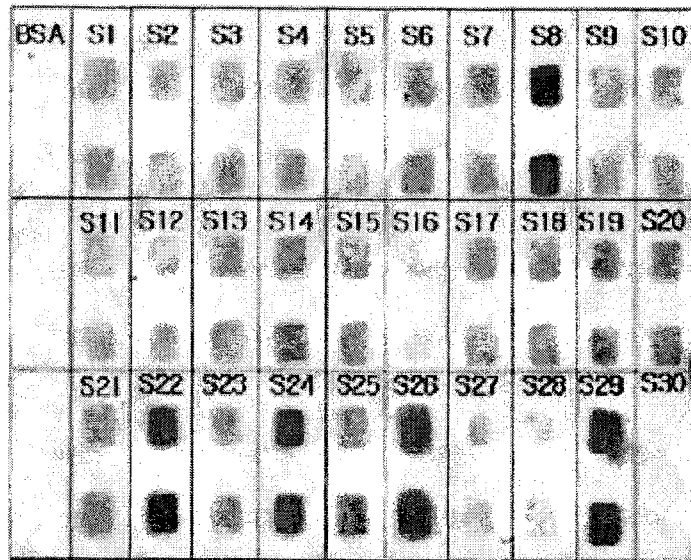


그림 9. SPRI analysis of the expression of 30 esterases from various microbial sources. Samples were prepared from our previous expression vector constructs [3]. BSA, bovine serum albumin.

## 2. Monooxygenase 효소 bank 구축

### (가) Putative monooxygenase의 클로닝과 발현

Comprehensive Microbial Resource genome database로부터 수집된 putative monooxygenase DNA서열 정보를 바탕으로 28개의 미생물 유전체로부터 120개의 monooxygenase ORF list를 작성하였다 (그림 10). 120개의 monooxygenase ORF를 획득하기 위하여 target gene specific 서열을 포함하는 PCR primer를 제작하였고, 정제된 미생물 유전체를 주형으로 하여 PCR을 실시하였다. 많은 양의 목적 유전자 산물을 얻기 위해 DMSO, Betain 그리고 GC-Rich enzyme mix와 같은 여러 가지 PCR 첨가제와 여러 가지 PCR 조건을 적용하였다. 그 결과 120개의 ORF 중 16개의 미생물 유전체로부터 51개의 putative monooxygenase 유전자를 획득하였고 그 결과를 표 3에 나타내었다.

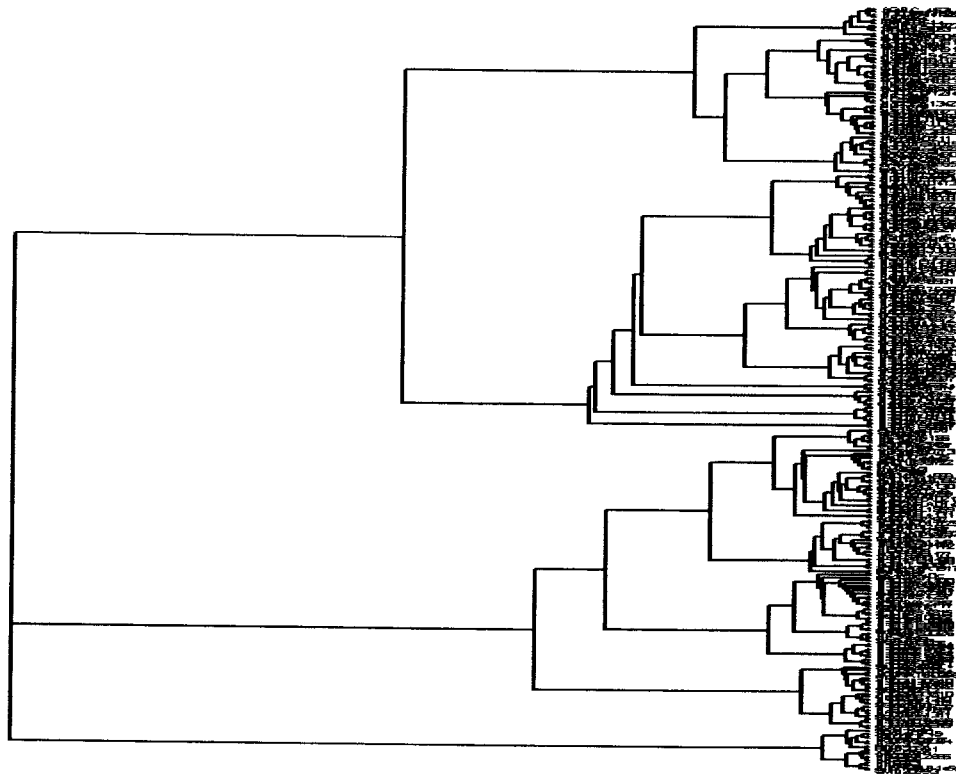


그림 10. Overview of phylogenetic analysis of monooxygenase pool

표 3. Construction of putative monooxygenase pool

No.	Organism	No. of cloned gene			No. of gene expressed as soluble protein <sup>1</sup>		
		6xHis tag only	GST tag only	All cloned as both	6xHis tag only	GST tag only	All expressed as both
1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 Cereon	0	0	5	0	4	1
2	<i>Bacillus halodurans</i> C-125	0	0	1	0	0	0
3	<i>Bacillus subtilis</i> 168	0	1	2	0	3	0
4	<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	0	0	2	0	1	0
5	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	0	1	3	0	1	1
6	<i>Escherichia coli</i> K12-MG1655	0	0	1	0	0	1
7	<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1	0	0	2	0	1	1
8	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	0	0	3	0	0	1
9	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv (lab strain)	0	0	1	0	1	0
10	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A Z2491	0	0	1	0	0	1
11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	1	0	3	0	2	1
12	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2 SGSC1412	0	0	2	0	1	0
13	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	0	0	2	0	2	0
14	<i>Streptococcus pyogenes</i> MGAS8232	0	0	1	0	1	0
15	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	1	0	15	0	5	1
16	<i>Sulfolobus solfataricus</i> P2	1	0	2	0	2	0
Total		3	2	46	0	24	8



각 PCR 산물은 정제하여 pET-21b벡터(6xHis tag)와 pGEX-KG 벡터(GST tag)에 각각 클로닝 하였다. 이 클론들을 *E. coli* Rosetta-gamiTM(DE3)에서 단백질로 발현시킨 결과, C-말단에 6xHis tag를 가진 단백질은 37.2%, N-말단에 GST tag를 가진 단백질은 68.6%의 비율로 발현된다는 것을 total extract를 이용한 SDS-PAGE 분석을 통하여 알 수 있었다.(그림 11). 또한, 발현된 단백질 중에서 soluble하게 발현된 부분을 분석한 결과 6xHis tag이 달린 단백질의 경우 17.6%, GST tag이 달린 단백질의 경우 62.7%가 soluble하게 발현되었다. 따라서 His tag과 GST tag이 달린 단백질 모두 포함하여 soluble하게 발현된 단백질은 32개로 나타났다.

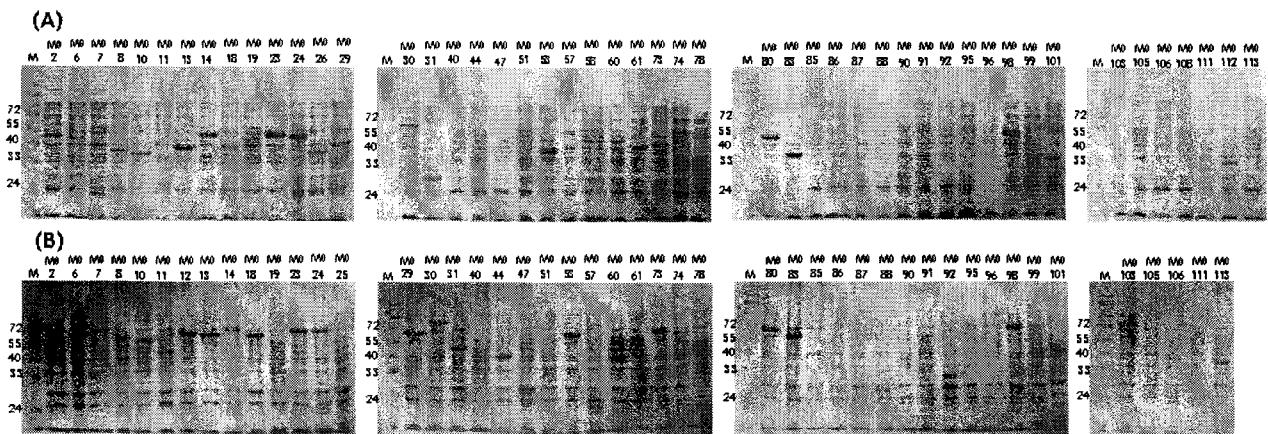


그림 11. Expression of the putative monooxygenase gene in *E.coli* Rosetta gami. SDS-PAGE and Coomassie Blue staining of total bacterial extracts expressing 6xHis-tagged (A) or GST-tagged (B) proteins.

#### (나) Putative monooxygenase의 서열 분석과 분류

Putative monooxygenase 단백질을 체계적으로 분석하고 분류하기 위해 32개의 soluble하게 발현된 단백질을 선택하였다. 분석하고자 하는 단백질들의 서열은 Comprehensive Microbial Resource genome database에서 획득하였다. Conserved domain 검색과 PSI-BLAST 검색을 통하여 그들의 서열 유사성과 활성특징에 따라 이 32개의 단백질들이 서로 다른 형태의 기질을 이용하는 20가지의 monooxygenase로 분류된다는 것을 확인할 수 있었고 이를 표 4에 나타내었다.

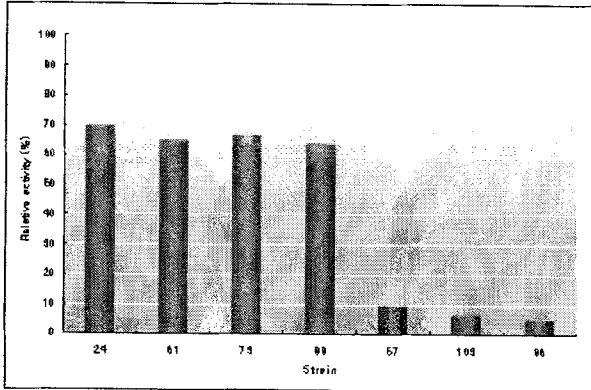
표 4. Construction of the monooxygenase clone pool from the comprehensive microbial resource database.

Classification	No.	Protein Accession No.	Putative Identification	Source Organism	MW (kDa)
FMN <sub>2</sub> utilizing Monooxygenase	2	AAK39944	EDTA monooxygenase	<i>Aerobacterium tumefaciens</i> C58 Cereon	48.39
	23	NP39949	Nitritotriacetate monooxygenase component A	<i>Cornebacterium elutanicum</i> ATCC 13652	52.16
	6	AAK30111	Alkanesulfonate monooxygenase	<i>Aerobacterium tumefaciens</i> C58 Cereon	42.84
	13	CAB12714	Alkanesulfonate monooxygenase	<i>Bacillus subtilis</i> 168	43.84
	29	AACT4021	Alkanesulfonate monooxygenase	<i>Escherichia coli</i> K12-MG1655	42.4
	83	AAL97786	Alkanal monooxygenase	<i>Streptococcus dysenteriae</i> MGAS2232	36.96
	12	CAB12311	Alkanal monooxygenase	<i>Bacillus subtilis</i> 168	35.63
106	CAB94561	Alkanal monooxygenase	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	38.07	
FAD dependent Mono-oxygenase	61	AAG07603	Salicylate 1-monooxygenase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	44.73
	73	AAL21079	Salicylate 1-monooxygenase	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2 SGSC1412	44.17
	99	CAB95795	Salicylate 1-monooxygenase	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	44.06
	24	NP600389	4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase	<i>Cornebacterium elutanicum</i> ATCC 13652	43.95
	78	AAK65802	4-aminobenzoate hydroxylase	<i>Smorhobium meliloti</i> 1021	46.28
Baeyer-Villiger Mono-oxygenase	96	CAB53657	Cyclododecanone monooxygenase	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	67.04
	103	CAB59668	4-hydroxyacetophenone monooxygenase	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	57.72
	57	AAG04927	4-hydroxyacetophenone monooxygenase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	58.6
Cytochrome P450 Mono-oxygenase	86	CAC45831	Cytochrome P450 monooxygenase	<i>Smorhobium meliloti</i> 1021	46.17
	10	AAK91113	Cytochrome P450 monooxygenase	<i>Aerobacterium tumefaciens</i> C58 Cereon	35.63
	14	CAB12890	Cytochrome P450 monooxygenase	<i>Bacillus subtilis</i> 168	55.38
Multicomponent phenol 2-hydroxylase	111	AAK41473	Toluene 4-monooxygenase system protein A, carboxy end fragment (fmoA)	<i>Salibolobus solifarius</i> P2	34.52
	113	AAK41477	Toluene 4-monooxygenase system protein D, (fmoD)	<i>Salibolobus solifarius</i> P2	12.87
	101	CAB92266	Monophenol monooxygenase	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	32.07
Flavin:NAD(P)H Reductase	7	AAK90113	Nitritotriacetate monooxygenase-component B	<i>Aerobacterium tumefaciens</i> C58 Cereon	19.53
	8	AAK90600	Nitritotriacetate monooxygenase-component B	<i>Aerobacterium tumefaciens</i> C58 Cereon	35.96
	44	NP101939	4-hydroxybenzylacetate 3-monooxygenase small chain	<i>Mesorhobium loti</i> MAFF303099	19.53
	66	AAG07479	4-hydroxybenzylacetate 3-monooxygenase small chain	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	18.98
N-hydroxylating Mono-oxygenase	30	AAG20876	lysine-N6-hydroxylase	<i>Halobacterium sp. NRC-1</i>	53.05
	98	CAB53328	L-ornithine N5-hydroxylase	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	50.17
Mono-oxygenase	18	AAK23377	L-lactate 2-monooxygenase	<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	43.51
	51	AAK47692	Alkane-1 monooxygenase	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv (lab strain)	47.17
	55	CAB85376	Putative monooxygenase = UbiH family protein (E.coli)	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A Z2491	43.84
	31	AAG20042	Peroxisredoxin	<i>Halobacterium sp. NRC-1</i>	23.64

(다) Monooxygenase 활성 측정 및 특성분석

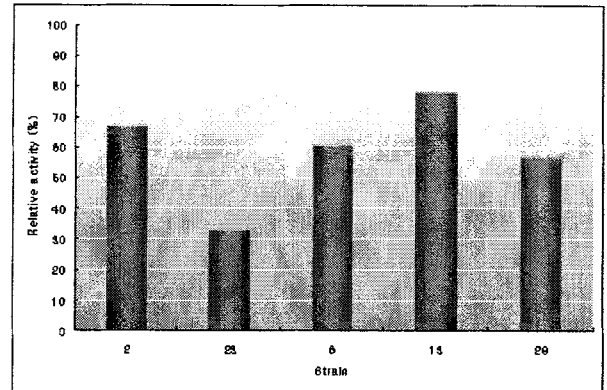
분류된 monooxygenase의 활성을 측정하기 위하여 GST tag가 달린 단백질 10개와 6xHis tag이 달린 단백질 2개를 선택하였다. 이 단백질들은 그들의 발현량, reference 단백질들과의 서열 유사성정도 그리고 예상된 기질에 대한 적합성 등을 고려하여 분류된 monooxygenase들 중에서 선택되었다. 12개의 putative monooxygenases는 먼저 정제하지 않는 crude extract인 상태에서 일반적인 monooxygenase 활성 측정법에 따라 활성을 분석하였다. 그 결과 9개의 예상된 monooxygenase가 그들의 활성에 따른 spectrophotometrical value의 변화를 확인할 수 있었다 (그림 12). Mo 24, Mo 61, Mo 73 그리고 Mo 99은 340nm에서 분광분석계를 이용하여 기질에 의존한 NAD(P)H의 산화 정도를 측정하였을 때 50%이상의 효소 활성을 보이는 것으로 측정되었다. Mo 2과 Mo 23은 기질을 oxygenation 함으로서 생성될 수 있는 생성물을 측정함으로써 활성을 분석하였고, 각각 67%와 33%의 상대적인 활성을 보이는 것으로 나타났다. Mo 6과 Mo13은 sulfonate 물질을 기질로 하였을 때 그들의 효소활성으로 인해 생성되는 sulfite를 측정하여 활성을 분석하였고, 50% 이상의 활성도를 보였다. 그 이외 3가지 단백질인 Mo 57, Mo 103 그리고 Mo 96은 각각의 기질에 대해 매우 낮은 정도의 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

A.



Mo 24; 4-hydroxybenzoate 3-Monooxygenase  
 Mo 61; Salicylate 1-Monooxygenase  
 Mo 73; Salicylate 1-Monooxygenase  
 Mo 99; Salicylate 1-Monooxygenase  
 Mo 57; 4-hydroxyacetophenone monooxygenase  
 Mo 103; 4-hydroxyacetophenone monooxygenase  
 Mo 96; Cyclododecanone monooxygenase

B.



Mo 2; EDTA Monooxygenase  
 Mo 23; Nitrilotriacetate Monooxygenase  
 Mo 6; Alkanesulfonate Monooxygenase  
 Mo 13; Alkanesulfonate Monooxygenase  
 Mo 29; Alkanesulfonate Monooxygenase

그림 12. Monooxygenase activity assay of crude extract. (A) The crude cell extract of recombinant *E.coli* of the putative monooxygenases was assayed spectrophotometrically by following the rate of enzyme-dependent oxidation of NAD(P)H at 340nm or 370nm. The activity was measured using 50 M substrates in various buffers. (B) The crude cell extract of recombinant *E.coli* of the putative monooxygenases was assayed spectrophotometrically by measuring the products in the enzyme reactions. Glyoxylate produced by the EDTA and Nitrilotriacetate monooxygenases was measured by the phenylhydrozine- $K_3Fe(CN)_6$  method, and sulfite produced by Alkanesulfonate monooxygenase was assayed by Ellman's reagent.

정제되지 않은 crude extract에서 효소 활성을 측정한 결과를 바탕으로 정제된 효소에 대한 특성을 확인하기 위하여 잠정적으로 높은 효소활성을 나타낼 것으로 기대되는 4개의 monooxygenase인 Mo 6, Mo 13, Mo 23, 그리고 Mo 24를 선택하게 되었다. 이들 중 Mo 24은 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032에서 유래한 유전자로 6xHis tag이 달린 단백질과 GST tag이 단백질 모두 heterogeneous 호스트인 *E.coli*에서 많은 양이 soluble한 형태로 발현되어 정제와 활성분석에 6xHis tag이 달린 단백질을 선택하였다. *Agrobacterium tumefaciens* str. C58에서 유래한 Mo 6, *Bacillus subtilis*에서 유래한 Mo 13 그리고 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032에서 유래한 Mo 23은 6xHis tag이 달린 단백질이 호스트인 *E.coli*에서 거의 soluble fraction을 얻을 수 없었고 GST tag이 달린 단백질에서는 비교적 많은 양의 soluble fraction을 얻을 수 있었기 때문 정제와 활성분석 시 GST tag이 달린 단백질을 사용하였다. 이들은 각각 Ni-NTA column과 glutathion sepharose resin을 이용하여 crude extract에서 간단히 분리하였다 (그림 13).

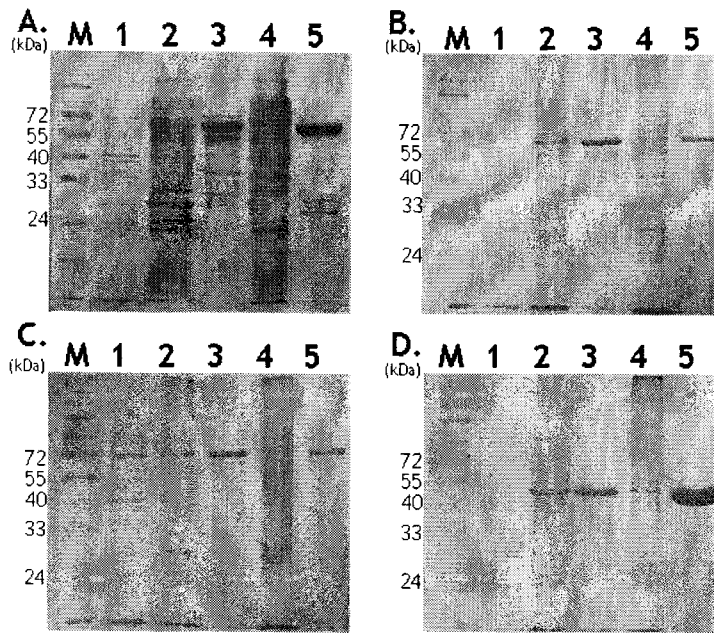


그림 13. SDS-PAGE analysis of purified monooxygenases. A : Mo 6-GST tagged protein (42.84kDa), B : Mo 13-GST tagged protein (41.84kDa), C : Mo 23-GST tagged protein (52.16kDa), D: Mo 24-6XHis tagged protein (43.95kDa) M ,molecular weight marker (with molecular masses indicated on the left in kDa); lane 1, total cell extract of uninduced *E.coli* Rosetta gami(DE3) cells ; lane 2, total cell extract of induced *E.coli* Rosetta gami (DE3) producing protein ; lane 3, insoluble cell pellet ;lane 4, soluble crude extract ; lane 5, Purified protein.

Mo 6과 Mo 13은 alkanesulfonate monooxygenase로 분류된 유전자로 PSI-BLAST 검색을 통하여 *E. coli* K12의 SsuD 유전자와 가장 유사한 서열을 가진 것으로 나타났으며, 각각 47%, 76%의 서열 유사성을 보였다. 이들의 monooxygenase 활성은 기본적으로 2-(4-Pyridyl) ethanesulfonic acid를 사용하여 sulfite의 형성을 측정하였고, 그 결과 specific activity는 Mo 6의 경우 4.078U/mg, Mo 13은 98.78U/mg로 나타났다. 따라서 Mo 6에 비하여 Mo 13의 효소활성이 약 24배가량 높다는 것을 알 수 있다. Mo 6과 Mo 13의 sulfonated 기질에 대한 범위를 조사하기 위해 18개의 substitute와 unsubstitute sulfonate 기질을 사용하여 효소 활성을 test하였다. 그 결과는 표 5에 나타내었다.

표 5. Substrate ranges of the Mo 6 from *Agrobacterium tumefaciens* str.C58 and the Mo 13 from *Bacillus subtilis*. ND<sup>a</sup> : Not detected.

Sulfonated substrate	Specific activity (U/mg)	
	Mo 13	Mo 6
Taurine	29.26	0.7
HEPES	20.35	1.25
MOPES	31.67	1.8
PIPES	27.06	2.2
2-(4-pyridyl)ethanesulfonic acid	98.78	3.04
Sulfoacetic acid	25.41	ND <sup>a</sup>
L-Cysteic acid	4.61	1.4
Isethionic acid	33.47	2.4
Methanesulfonic acid	39.62	1.2
Ethanesulfonic acid	30.52	1.0
Propanesulfonic acid	24.89	1.1
Butanesulfonic acid	11.24	1.2
Pentanesulfonic acid	51.44	1.4
Hexanesulfonic acid	52.1	1.6
Octanesulfonic acid	20.25	1.5
Decanesulfonic acid	22.59	1.4
Dodecanesulfonic acid	21.4	1.47
Tetradecanesulfonic acid	7.4	1.1

Mo 13은 C1에서 C10까지의 unsubstituted alkanesulfonates 기질과 다양한 substituted alkanesulfonated 기질에 대해 desulfonation 활성을 나타내는 것에 비해 Mo 6의 경우 2-(4-Pyridyl) ethanesulfonic acid를 제외하고는 전반적으로 낮은 활성을 나타냈으며 sulfoacetic acid에서는 활성이 나타나지 않는 것을 알 수 있었다. unsubstituted 기질에서 Mo 13의 효소 활성은 chain 길이가 hexanesulfonic acid까지 늘어날수록 증가했다가 octanesulfonic acid부터는 점차 감소하는 것이 나타났지만 Mo 6에서는 뚜렷한 변화를 발견할 수 없었다.

Mo 23은 nitrilotriacetate monooxygenase로 분류되었으며, PSI-BLAST검색을 통하여 *Chelatobacter heintzii*의 nitrilotriacetate monooxygenase의 component A와 56%의 서열 유사성을 보이는 것으로 나타났다. Mo 23의 효소 활성은 일차적으로 반응 후 산물을 분광분석계로 확인함으로써 분석될 수 있다.

이 효소의 기질로 사용되는 nitrilotriacetate는 효소 반응 후 glyoxylate와 imidodiacetate로 분리되고 분광분석계로는 glyoxylate의 생성을 확인할 수 있다. 이러한 과정을 통하여 Mo 23의 specific activity를 측정된 결과 1.602U/mg로 나타났다. Mo 23의 활성에 의한 또 다른 산물인 imidodiacetate는

LC-MS를 통해 확인하였다 (그림 14).

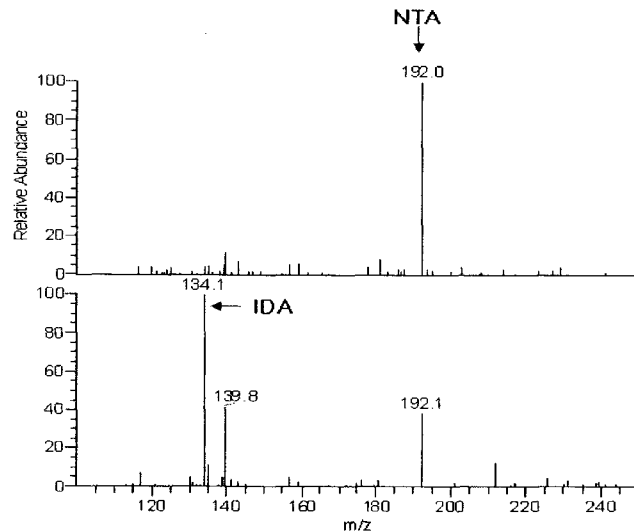


그림 14. LC-MS analysis of the end products of NTA degradation by NTA-Mo.

NTA monooxygenase는 효소 활성화 반응 시 metal ion을 필요로 하는 것으로 알려져 있다.[8] 따라서 Mo 23의 효소 활성화에 대한 다양한 metal ion의 영향을 조사하였고 그 결과를 표 6에 나타내었다.

표 6. Effect of metal ions on activity of the Mo 23 of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032.

Control and added metals	Specific activity (U/mg)
No metal added	0.5 ± 0.1.
CaCl <sub>2</sub>	0.7 ± 0.15
CuSO <sub>4</sub>	1.2 ± 0.2
MgCl <sub>2</sub>	3.5 ± 0.11
MnCl <sub>2</sub>	2.7 ± 0.24
CoCl <sub>2</sub>	4.1 ± 0.2
ZnSO <sub>4</sub>	4.2 ± 0.1

Mo 24는 4-hydroxybenzoate 3 monooxygenase로 분류되었으며, PSI-BLAST검색을 통하여 *Pseudomonas fluorescens*의 4-hydroxybenzoate 3 monooxygenase와 57%의 서열 유사성을 보이는 것으로 나타났다. Mo 24의 효소 활성화는 반응에 이용되는 NADPH의 산화정도를 분광분석계를 통하여 측정함으로써 분석될 수 있으며, specific activity는 138.68U/mg로 나타났다. Mo 24은 기질로 사용되는

4-hydrobenzoate를 oxygenation 시킴으로서 결과적으로 protocatechulate의 생성하게 되고, 이를 LC-MS 분석을 통하여 확인할 수 있었다 (그림 15).

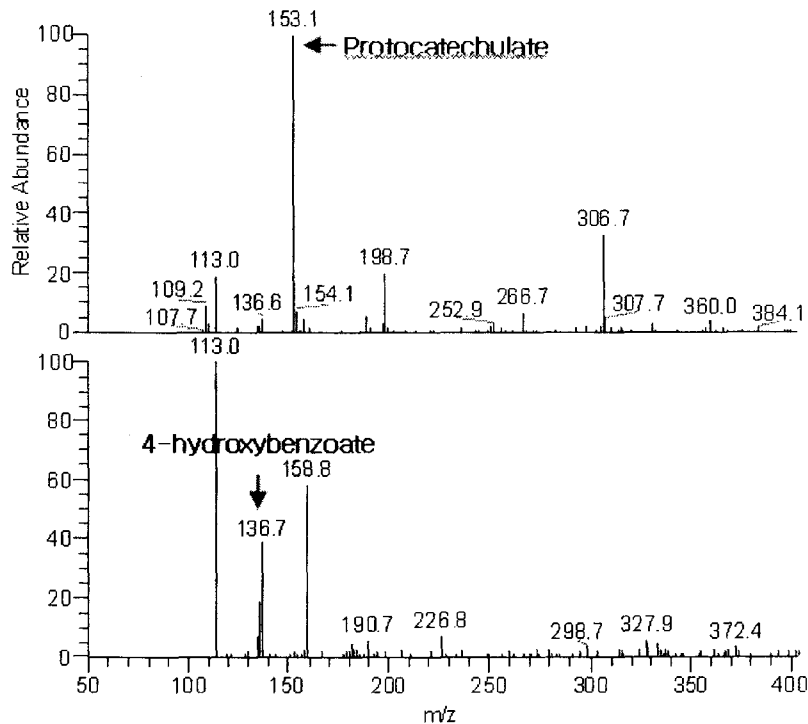


그림 15. LC-MS analysis of the oxidated product of 4-hydroxybenzoate by 4-hydroxybenzoate 3-Mo.

Mo 24의 kinetic parameter는 여러 가지 기질에 대하여 효소와 반응 시켰을 때 NADPH의 산화 속도를 기준으로 Lineweaver-Burk plot을 통하여 구하였다. 각각의 기질들에 대한 kinetic parameter는 표 7에 나타내었다.

표 7. Steady-state kinetic parameters of the Mo 24 from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. All experiments were performed in 20mM potassium phosphate buffer pH 7.0 at 25°C. Turnover rates ( $K_{cat}$ ) and Micharelis constants ( $K_m$ ) are determined at fixed concentrations of either 4-hydroxybenzoate(0.2mM) or NADPH (0.1mM).

일반적으로 알려져 있는 4-hydrobenzoate 3 Mo의 경우 효소 활성 시 halogen ion에 저해를 받는 것으로 나타났다.[9] 따라서 Mo 24의 효소 활성에서 몇 가지 halogen ion에 대한 영향을 조사하였다 (그림 16). 이 결과 효소 반응시 10mM의 NaF, NaCl, NaBr, NaI를 첨가하였을 때 Mo 24의 활성은 각각 66.7%, 98.2%, 56.9%, 49.8%까지 저하되는 것을 알 수 있었다.

Substrate	$K_m, \mu\text{M}$	$K_{cat}, \text{s}^{-1}$	$K_{cat}/K_m, \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
4-hydroxybenzoate	72.3	10.4	0.143
2,4-dihydroxybenzoate	121.4	32.2	0.26
4-aminobenzoate	264.3	11.8	0.044
3-fluoro-4-hydroxybenzoate	271.8	6.5	0.023
NADPH	60.4	8.4	0.139
NADH	214.4	5.2	0.024

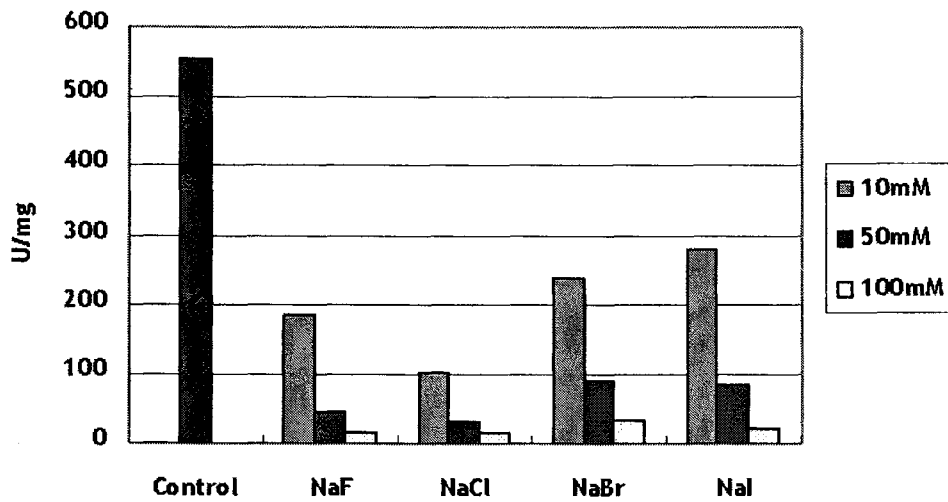


그림 16. Effect of halogen ions on activity of the he Mo 24 from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 (메타볼롬분야)

### 제 1 절 실험방법 및 내용

#### !-, Fraction 메타볼롬분야

##### 1.미생물자원

###### 가.토양유래방선균

국내 토양시료로부터 분리된 토양 방선균을 생명(연) 김창진 박사 연구팀으로부터 분양 확보하여 실험에 적용하였다. 총 1,900종 미생물 중 배양의 재현성이 있는 1,400종을 액체 배양하여 메타볼롬이 포함된 발효액을 확보하였고, 이중 메타볼롬의 생산 수율이 분획에 충분한 770종을 본 실험에 투입하였다. 분획이 적용된 균주 포함 810개 미생물을 이후 시료 재생산을 위해 glycerol stock으로 영하 70도에 장기 보관하였다.

###### 나.해양유래방선균

국내 해양 및 해안토양의 방선균류를 안양대학의 조기웅 박사팀으로부터 분양 확보하여 실험에 적용하였다. 총 1,542종의 미생물을 확보하고 순차적으로 배양 재현성이 확인된 순으로 884개를 저온 보관하고 이중 863개를 메타볼롬 생산을 위한 실험에 적용하였다. 대사물의 수율과, 중복성을 고려하여 5 35개의 미생물을 분획 메타볼롬 발생에 적용하였다.

###### 다.특수미생물

미생물 유전체 사업단에 기탁된 특수 환경 미생물을 연구에 적용하였다. 호염성 방선균 포함 72종의 호알칼리 방선균을 배양하여 40종을 분획에 적용하였다. 또한, 최근 각종 항암 및 생리활성 성분의 새로운 자원으로 각광받는 cyanobacteria 자원의 미생물도 시범적으로 17종에 대해 실험에 도입하였으나, high throughput으로 적용하기에는 공용 배지의 선정이 어려웠고, 또한 배양이 원활한 3종이 미생물도 메타볼롬 수율이 낮아서 분획에 적용하지는 않았다. 그리고 최고의 강력하고 효과적인 항암제 epothilone를 필두로 다양한 생리활성물질의 생산자원인 점액세균에 대해서도 분획 메타볼롬을 적용하였다. 점액세균의 경우 배양 시 비이온성 흡착제 XAD를 배지에 사용하므로 초기 순도가 높은 메타볼롬을 확보할 수 있어서 2단계 연구에 계속 활용할 예정이다. 한편, mycotoxin을 생산을 하는 진균류의 미생물 6종은 독특한 메타볼롬의 분획 조건에 적용되었다.

이상의 미생물의 수집, 배양, 보관 및 분획화 작업에의 적용별로 종합하면 표-5와 같다. 수집된 미생물은 평판 배지에서의 계대배양을 통해서 오염균 유무와 단일 콜로니 여부를 확인하며 이것을 통과한 약 65%의 균주에 대해서만 배양을 시작하였다. 배양과정에서 다시 배양 수율, 오염원의 확인을 거쳐서 처음 수집 균주의 50%에 해당하는 1,800여종만을 feed back 재현실험을 위해 균주의 장기보관을 실시하였다. 각 균주별로 glycerol stock을 3 내지 5개씩

제작하여 -70도에 장기 보관하고 있으며, 이중에 순차적으로 배양을 통해 처음 수집 미생물의 37%에 해당하는 1,348균주를 분획 메타볼롬 발생에 적용하였다(표-5).

Step	Microbial resources						Total
	Soil Streptomyces	Marine Streptomyces	Cyanobacteria	Extremophiles	Myxobacteria	Others (Fungi etc)	
Collection	1,900	1,542	17	72	101	7	3,639
Culture	1,400	863	3	47	64	6	2,383
Stock, -70℃	810	884	-	52	64	1	1,811
Fractionation	770	535	-	40	2	1	1,348

표 5. 미생물의 수집, 배양 보관 현황 (갯수)

## 2. 메타볼롬 생산을 위한 배양조건

### 가. Plate 관리배지

방선균류의 계대 배양, 선별, 단일 균종 분리를 위한 평판배지는 Bennett's agar media (glucose 10g, yeast extract 1g, tryptone peptone 2g, beef extract 1g, agar 17g, D.W 1L)와 SWC agar media(sea salt 15g, tryptone 5g, yeast extract 3g, glycerol 3ml, agar 15g, D.W 1L)를 사용하였다.

### 나. 변형된 GSS 배지 배양조건

Starch soluble(Sigma) 1.5%, glucose(Difco) 1%, soybean meal(Sigma) 1%, yeast extract(Difco) 0.5%, peptone(Difco) 0.25%, NaCl(Junsei) 0.05%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(Junsei) 0.025%, CaCO<sub>3</sub>(Junsei) 0.2%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(Junsei) 0.05%를 사용하였으며, 배양 온도는 26도를 주로 사용하였고, 실험조건에 따라서 30도까지 사용하였다. 배양 용기는 1리터 삼각플라스크, 5리터 삼각플라스크 및 일본 마루비시사의 14리터 발효기를 사용하여, 배지는 각각 200 ml, 1.5-2.0 리터, 8리터를 사용하였다. 한편, 거품 제거를 위한 소포제는 실리콘 계열의 비이온성 Antifoam-B (Sigma) 2.5 ml/L을 사용하였다.

### 나. 메타볼롬 수율을 높이기 위한 배지조건

기존의 GSS 배지보다 배양 시간을 단축하기 위한 속성배지로 T1배지를 재구성하여 사용하였다. 1주일 이내에 충분한 메타볼롬의 생산을 유도하기 위해 탄소원으로 dextrin을 사용하고, 해양방선균의 분리환경과 유사한 이온농도를 확보하기 위해 sea salt를 첨가하였으며, 2차 대사과정을 앞당기기 위해 인산농도 억제제인 인산마그네슘을 첨가하였다. 배지 조성은 다음과 같다; Malto dextrin(공업용) 25g, Soybean meal (Difco) 10g, Peptone (Difco) 2.5g, Yeast extract (Difco) 5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Junsei) 0.25g, CaCO<sub>3</sub> (Junsei) 2g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Junsei) 0.5g, sea salt (Sigma) 1g, Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O(Wako) 5g, Antifoam-B(Sigma)

2.5ml, D.W 1L. 또한 탄소원을 dextrin 20g으로 감소시킨 T2배지도 배양에 적용하였다.

### 3. 메타볼롬 정제를 위한 분획

#### 가. 단일용매 추출 농축

배양이 끝난 미생물 발효액에 메탄올 혹은 아세톤을 1:1로 첨가하여 30분 이상 진탕 추출하였다. 배지 잔존물 및 균체는 filter 및 원심분리에 의해 제거하고 50% 용매강도의 액상을 수합하여 rotary evaporator에 의해 용매층을 제거하였다. 이것을 다시 1:1의 에틸 아세테이트로 3번 추출하여 용매층을 모아 농축하였다. 농축물에서 메탄올에 녹는 부분을 모아 SpeedVac 혹은 Air-blower하에서 농축하고 무게를 확인하였다.

#### 나. 다중 실리카 컬럼에 의한 분획

50 mg 내지 최대 200mg에 해당하는 단일용매 추출액을 Samplet에 흡착시키고 감압 조건 혹은 상압에서 용매를 완전히 건조제거하여 dry loading을 준비하였다. 1회 작동에 4개의 시료를 동시에 다중 컬럼에 적용하여 분획을 시작하였다. Samplet의 loading후 gradient 조건 (표 참조)으로 용매를 흘려 메타볼롬을 용출 분획하여 각 시료당 50 ml씩 48개의 tube에 분획 물을 회수하였다. 각각의 tube 내용물을 TLC를 통해 분석하고, 용출시 on-line UV검출로 확인한 자료와 비교하면서 유사한 분획끼리 재구성/취합하여 분획을 나누었다. TLC 조건은 실리카에서 전개용매  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}(90:10)$ 의 조건으로 분석하였고, 점액세균의 경우  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{COCH}_3:\text{MeOH}(70:20:10)$  전개용매를 사용하였고, 다. Staing을 통해 각 spot을 확인하였다 ( $p$ -Anisaldehyde 5%,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5%, Acetic acid 2.5%, EtOH 87.5%). 분획에 사용한 다중컬럼은 [FLASH 12+M KP-Sil silica Cartridge] 및 Silica samplet, [FLASH 12+M C-18 Reverse Phase Cartridge] 및 C-18 samplet을 Biotage에서 구입하여 사용하였다. 다중컬럼의 분획 용출조건은 다음의 표-6과 같았다.

Elution condition, %			Code
Hexane	EtOAc	MeOH	
100	0	0	A
80	20	0	B
60	40	0	C
40	60	0	D
0	100	0	E
0	80	20	F
0	50	50	G
0	0	100	H

표 6 다중 실리카 컬럼의 용출조건

#### 다. Assay-ready plate 제작

각기 E-tube에 농축된 분획을 DMSO를 용매로 하여 96-well의 mother plate를 거쳐 assay plate로 분주하였다. 이 과정은 HTS 시스템 중의 Liquid handler()를 이용하여 자동적으로

로 진행되었으며, 최종 assay plate의 물질 농도는  $50\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ -DMSO/well로 조정하였다. 각 plate 마다 aluminium sealing tape 및 polypropylene sealing tape을 이용하여 밀봉 후 뚜껑을 씌워 보관 및 분량을 하였다.

미생물의 배양, 분리정제, 분획 분주에 사용된 기기는 다음과 같다; 4-channel purification system (FLASH Collector, QUAD UV<sup>TM</sup> Module, QUAD 12/25<sup>TM</sup> Cartridge Module, QUAD<sup>TM</sup> Pump Module, Biotage사 제품), Robotic Liquid Handling System (MultiPROBE<sup>R</sup> Packard사 제품), HPLC (HP 1100 series, HP사), SpeedVac (SPD111V, Thermo Savant사), Rotary evaporator (Prep용 및 소형, EYELA사), Air blower (용매건조, EYELA사), Shaking incubator, Fermentor (Marubishi사)

#### 4. 분획 메타볼롬을 적용한 활성 스크리닝

구성된 물질 분획 라이브러리의 효용성을 확인하고, 또한 실제적으로 의약활성물질을 스크리닝하기 위해서 다양한 스크리닝계에 분획된 메타볼롬을 투입하였다. Ras 변이에 의한 인체 고형암의 발생에 중요한 목표점인 파네실전이효소는 SPA-bead를 이용한 잘 확인된 스크리닝계가 구성되어 있으므로 분획 메타볼롬의 효용성을 확인하는 좋은 대상으로 사용하였다. 스크리닝 hit ratio 및 저해도를 기준으로 진행중인 분획작업이 효용성이 높음을 확인할 수 있었다.

한편, 외부로 분양된 분획 메타볼롬 라이브러리는 암전에 대한 중요한 목표점인 PRL-3의 저해제 탐색, 전사 및 전이 관련 목표점인 STAT-3 저해제 탐색에 사용되었고, cell-based 스크리닝인 zebra fish의 배아 실험, 허혈성질환 치료제 탐색계, 암세포주 이용한 HTS에 적용하였다.

## !-2, 메타볼롬 DB 분야

### 1. 메타볼롬 자원

미생물의 메타볼라이트 profiling을 수행하면서 새롭게 발굴된 메타볼라이트들을 포함시켜 나감으로써 지속적으로 그 수를 늘려가고 있다. 현재까지 640종의 미생물 유래 메타볼라이트를 확보하고 데이터베이스(dB)화 시켰으며, 이러한 dB를 기준으로 MS/MS 라이브러리를 구축하였다.

또한, 최근에 다양한 생리활성이 보고되어있어 많은 연구자들이 관심을 갖고있는 flavonoid류를 확보하여 dB를 구축하였다. 총 417종의 flavonoid류를 확보하고 순차적으로 LC-MS를 수행하였다.

## 2. 구조기반의 메타볼롬 라이브러리 생성을 위한 LC-MS/MS조건확립

### 가. 메타볼롬 농도

각각의 메타볼라이트에 대한 MS/MS 라이브러리 생성을 위한 표준물질은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구매하였다. LC-MS 수행을 위한 각 metabolite의 농도는 50% MeOH를 이용하여 각각 1mg/mL 로 조정하였으며, 20  $\mu$ l씩 C18 역상컬럼에 주입하여 수행하였다.

### 나. LC 수행조건확립

HPLC 수행을 위한 용출용매로는 극성 용매인 D.W (용매 A)와 유기 용매인 acetonitrile (용매 B)에 각각 0.1% formic acid를 첨가하여 사용하였으며, 메타볼라이트의 용출 조건은 그림-8과 같다.

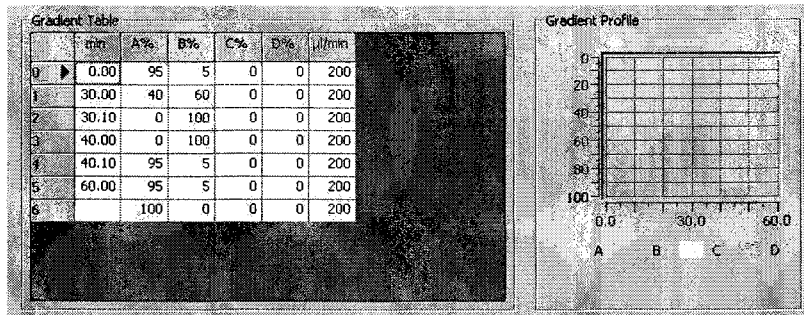


그림 47. C18 역상 컬럼 크로마토그래피 용출조건

### 다. MS/MS 스펙트럼 생성조건 최적화

질량분석기로부터 얻은 질량 스펙트럼은 매우 감도가 높으나 수행 조건에 따라 다양한 스펙트럼이 생성된다. 그러므로 다양한 종류의 메타볼라이트에 대해 재현성있는 질량 스펙트럼을 생성하기위한 조건을 최적화하는 실험을 수행하였다.

### 라. MS/MS 스펙트럼 라이브러리의 구축과 검색

확보된 메타볼롬을 구조, source, molecular weight, formula, activity의 정보를 포함하는 데이터베이스를 구축하고, 구축된 데이터베이스의 내용을 기준으로 각각의 메타볼라이트에 대한 MS/MS 스펙트럼을 Qual Browser 와 NIST mass spectral search program (version 2.0, FairCom Co., USA) 소프트웨어를 이용하여 스펙트럼 라이브러리를 구축하였다. MS/MS 스펙트럼 검색은 Xcalibur data system (version 1.4 SR1, Thermo Electron Co., USA)을 사용하였다.

## !-3, 메타게놈유래 메타볼롬 분야

### 1. 메타게놈 라이브러리 제작

메타게놈 라이브러리 제작을 위한 토양 샘플은 경기도 광릉 수목원의 산림 토양을 채취하였다. 채취한 토양으로부터 2mm 보다 큰 식물 뿌리와 기타 불순물을 제거한 뒤 직접추출 방법으로 토양으로부터 DNA를 추출하였다. 추출한 토양 DNA에 들어있는 humic acid, pulvic acid와 같은 불순물들은 펄스필드 전기영동법에 의해 제거함으로써 토양 DNA를 정제하였다. 정제된 토양 DNA는 다시 0.5% low-melting 아가로스젤에 전기영동을 하여서 25 kb 이상의 크기의 DNA만 선별하였다. 선별된 DNA와 Epicentre사의 EPIFos Fosmid library production kit를 사용하여 메타게놈 라이브러리를 구축하였다 .

### 2. PCR 증폭 및 클로닝

PKS 클론 선별을 위한 PCR은 미국의 Perkin-Elmer사의 GeneAmp PCR system 9700을 이용하여 실험을 수행하였다. 기 제작된 메타게놈 라이브러리의 클론 풀에서 플라스미드 DNA를 추출하여 이를 PCR을 위한 주형 DNA로 사용하였다. 프라이머는 여러 토양방선균의 type I PKS에 존재하는 ketoacyl synthase의 conserved active domain을 기초로 제작된 *set 1-sense* 5'-CCSCAGSAGCGGCTSTTSTCTSGA-3'과 *set 1-antisense* 5'-GTSCCGTSCCGTCSGISTCSA-3'를 사용하였다 (1). PCR은 바이오니아사의 AccuPower PCR premix에 플라스미드 DNA (100-300 ng)와 프라이머 (10 pmole)를 넣고 아래와 같은 조건에서 반응하였다. 95°C에서 15분간 initial denaturation을 한 후 95°C에서 1분간 denaturation, 65°C에서 1분간 hybridization, 72°C에서 1분간 extension의 과정을 30번 반복 수행한 후 72°C에서 10분간 final extension을 수행하였다. 증폭된 약 700 bp 크기의 산물은 Q-bio사의 Geneclean turbo kit를 이용하여 정제하여 pGEM-T easy vector에 클로닝 하여 시퀀싱을 수행하였다.

### 3. Colony hybridization 스크리닝

PCR을 통해 선별된 PKS I-positive 클론 풀에서 PKS I genes을 가진 클론을 선별하기 위하여 colony hybridization 방법을 사용하였다. Colony hybridization에 사용할 probe 제작을 위하여 PKS I-positive 클론 풀에서 플라스미드 DNA를 추출한 후 *set I-sense*, *set I-antisense* 프라이머를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 증폭된 산물을 Roche사의 DIG high prime DNA labeling kit를 이용하여 labeling하여 probe으로 사용하였다. PKS I-positive 클론 풀의 각각의 클론을 25 ug/ml 농도의 chloramphenicol이 들어있는 LB 배지에 평판 배양하였다. 적당한 크기로 자란 콜로니들은 nylon membrane으로 옮긴후 denaturation 용액 (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl), neutralization 용액 (1.5 M NaCl, 1.0 M Tris-HCl, pH 7.4), 2X SSC (0.3 M NaCl, 30 mM sodium citrate, pH 7.0)을 각각 처리하여 nylon membrane위에 DNA를 나출시킨 뒤 UV-cross linker를 이용하여 DNA를 membrane에 고정시켰다. 세포불순물을 제거하기 위하여 proteinase K (>30 U/ml)을 37°C에서 1시간 처리를 하였다. 이렇게 만들어진 membrane에 Roche사의 DIG Easy Hyb 용액을 이용하여 42°C에서 2시간 동안 prehybridization 반응을 시킨 후 DIG-labeled PCR product를 probe로 넣어서 42°C에서 12시간

동안 hybridization 반응을 시켰다. Hybridization 반응후에 membrane을 low stringency wash buffer (2X SSC, 0.1 % SDS)와 high stringency wash buffer (0.1X SSC, 0.1% SDS)로 각각 두 번씩 세척을 하였다. 세척후 Roche사의 NBT/BCIP 용액을 이용하여 발색반응을 시켜서 DIG-labeled probe와 target 사이의 hybridization을 시각적으로 관찰하였다.

#### 4. DNA 서열 분석

PKS 유전자 여부를 확인하기 위한 DNA 서열 분석은 미국의 National Center for Biotechnology Information의 BLAST 프로그램 (2)과 인도의 National Institute of Immunology의 SEARCHPKS 프로그램 (3)을 이용하였다. 시퀀스 얼라인먼트를 위해서는 ClustalX 프로그램을 이용하였다.

## 제 2 절 연구 결과

### !-, Fraction 메타볼롬분야

#### 1. 미생물 자원의 확보

미생물 확보의 전략 기준은, 당장 의약개발에 적용할 수 있는 분자라이브러리의 구축으로 설정하였는데, 이것은 의약개발의 역사에서 가장 중요한 미생물 자원인 방선균에 연구력을 집중하게 하는 결과를 가져왔다. 특히 기존에 확보한 토양미생물 자원뿐만 아니라, 미생물 다양성을 높이기 위해 해양 및 조간대의 미생물군락에서 분리한 방선균도 중요한 자원으로 활용하였다. 배양, 분획에 적용하기 위해 확보한 1단계의 방선균 숫자는 3,442종이며 실제 배양을 수행한 균주는 2,263종에 이르며, 이중에 배양 특성이 파악된 1,694종은 메타볼롬의 재현을 위해서 -70도에 장기 보관 균주를 확보하였고, 보관 균주 중 1,305종은 실제로 메타볼롬의 분획을 위한 배양액 생산에 활용되었다. 기타 cyanobacteris, 호염균, 호알칼리균, 곰팡이 일부를 확보하였으며, 특히 점액세균은 국내 중요한 부존자원으로서 미생물 유전체 사업단에 기탁된 균주를 중심으로 100여종을 실험에 적용하였다. 한편, 확보된 균주는 평판배지에서의 생육상태를 디지털 이미지로 dB화 하여 재현성 및 균주 확인을 위한 지표로 삼았다. 방선균의 이미지 dB(그림-3)와 점액세균의 dB(그림-4)을 예제로 아래에 표시하였다. 각 그림은 평판배지의 앞면(f)과 뒷면(b)을 표시하는 것으로 앞면은 포자 및 일반적 균주 외관을 나타내며, 뒷면은 가용성 색소에 의한 착색이 여러 가지로 확인되었다.

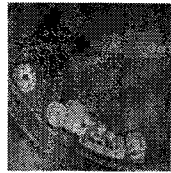
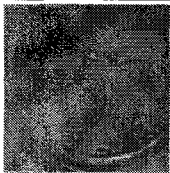
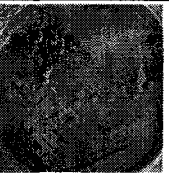
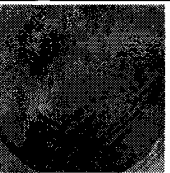
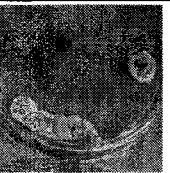

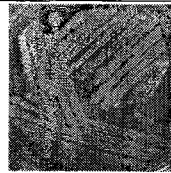
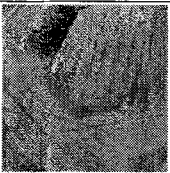
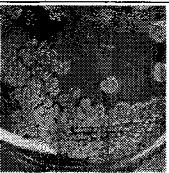
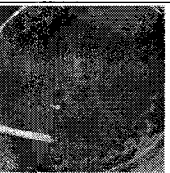
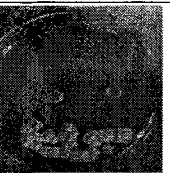



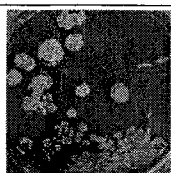

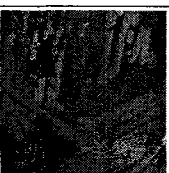





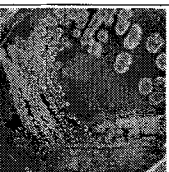




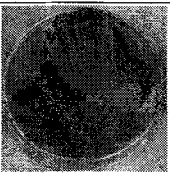




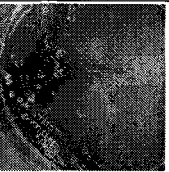



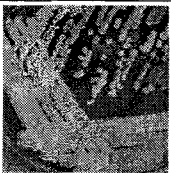

					
IZ2516-f	IZ2516-b	IZ2517-f	IZ2517-b	IZ2518-f	IZ2518-b
					
IZ2519-f	IZ2519-b	IZ2520-f	IZ2520-b	IZ2521-f	IZ2521-b
					
IZ2522-f	IZ2522-b				
					
IZ2529-f	IZ2529-b	IZ2530-f	IZ2530-b	IZ2531-f	IZ2531-b
					
IZ2532-f	IZ2532-b	IZ2533-f	IZ2533-b	IZ2534-f	IZ2534-b
					
IZ2535-f	IZ2535-b	IZ2536-f	IZ2536-b	IZ2537-f	IZ2537-b
					
		IZ2539-f	IZ2539-b	IZ2540-f	IZ2540-b
					
IZ2541-f	IZ2541-b				

그림 3. 메타볼롬 분석을 위해 확보된 해양유래 방선균의 평판배지에서의 생육 이미지



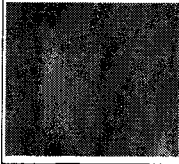

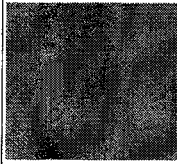
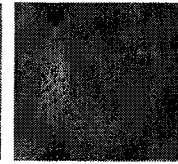
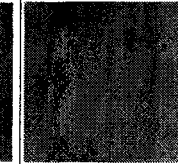
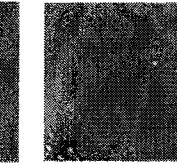
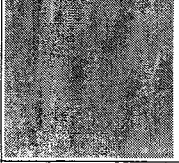
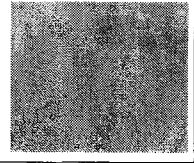
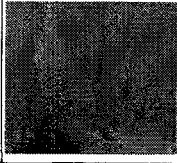
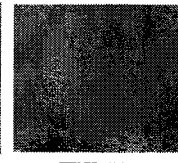
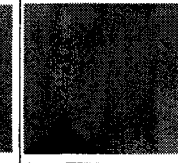
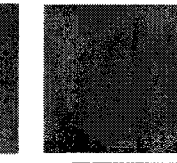
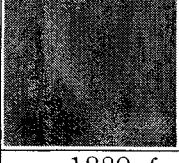
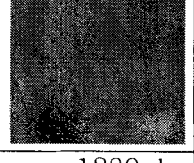

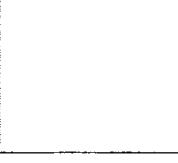
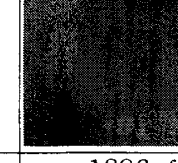
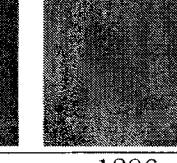

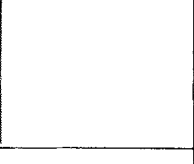
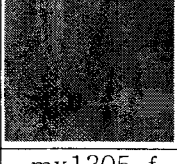
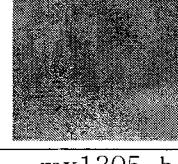
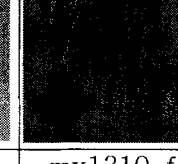
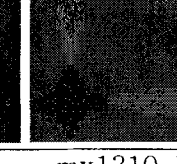
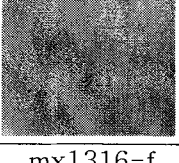
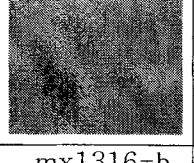
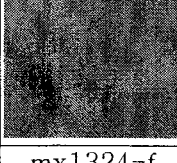
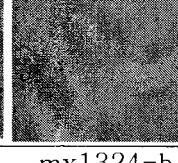
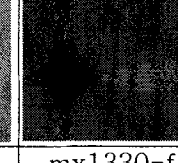
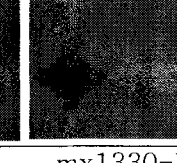
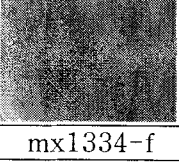
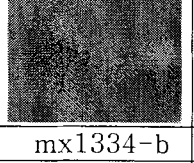
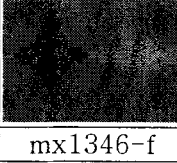
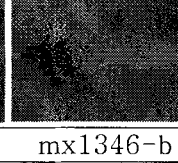
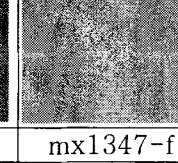

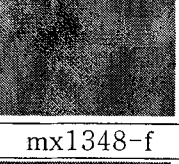
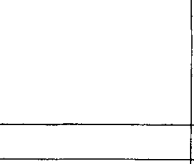
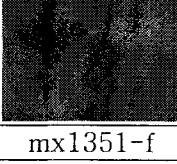
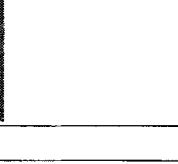
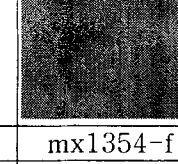
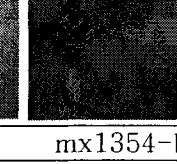
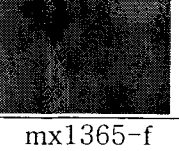


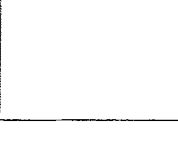
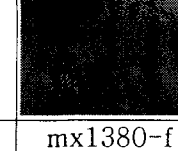
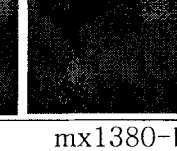
					
mx1015-f		mx1055-f	mx1055-b	mx1145-f	mx1145-b
					
mx1210-f	mx1210-b	mx1270-f	mx1270	mx1276-f	mx1276-b
					
mx1280-f	mx1280-b	mx1285-f		mx1296-f	mx1296-b
					
mx1300-f		mx1305-f	mx1305-b	mx1310-f	mx1310-b
					
mx1316-f	mx1316-b	mx1324-f	mx1324-b	mx1330-f	mx1330-b
					
mx1334-f	mx1334-b	mx1346-f	mx1346-b	mx1347-f	
					
mx1348-f		mx1351-f		mx1354-f	mx1354-b
					
mx1365-f		mx1374-f		mx1380-f	mx1380-b

그림 4. 메타볼롬 분석을 위해 확보된 국내 점액세균의 평판배지에서의 생육 이미지

## 2. 미생물 메타볼롬뱅크 발생의 전주기적 과정 구축

본 메타볼롬 라이브러리의 궁극적 활용 목표는 신약개발이며, 따라서 현대 신약개발의 핵심 방법론인 HTS에 적용할 수 있는 "HTS-compatible and assay-ready format"의뱅크 구축이 필요하였다. HTS에 적용할 라이브러리는 속도, 일관성에 있어서 기존의 one by one형태의 개별 미생물 대사물 실험과는 구별된 프로토콜을 필요로 한다. 따라서 균주의 확보에서 분획라이브러리의 발생까지를 하나로 묶는 통합적 관리가 필요하여, 본 과제에 적용한 실험법을 근간으로 전주기 과정을 구축하였다. 이것은, 국내 신약개발의 물질 라이브러리로 활용할 미생물 분획 메타볼롬뱅크 발생의 기준표이며, 미생물 뿐 아니라 식물, 곤충 등 천연물 유래의 활성물질 라이브러리 구축에 필요한 대량 고속 추출법, 정제법의 전주기 과정의 예시가 될 수 있다. 미생물 분획 메타볼롬 라이브러리 발생의 전체적인 과정은 아래의 표-7과 같으며, 전주기 관리의 결과 분획 메타볼롬 발생의 속도 결정단계는 a. 미생물 배양 단계와 b. 다중컬럼의 운용으로 발생된 분획물의 재분류를 위한 프로파일링 단계임을 알 수 있었다.

Step	Treatment	Time
Collection, culture	Flask culture (200 ml), Fermentor	7 days
Single solvent extraction	Acetone, Rotary evaporator	40 min
	Collected Ethyl acetate part	20 min
	Collected MeOH part, SpeedVac. (grouping, concentration, weighing)	4 hrs
Fractionation (4-channel system)	Samplet preparation (adsorption, dry)	4 hr
	Application on QUAD system	2 hrs
	①Installed 4 columns (silica or C18)	
	②Wash/warm up	
	③Samplet loading	
④Elution, continuous gradient solvent condition (5 min for 1 step fractions)		
⑤Washed out with MeOH		
Pre-profiling	Application TLC/UV detector for pre-profiling to fractions	
	Grouping the fractions and concentration (rotary evaporator)	6 hrs
	Collected into 10 ml tube and concentration (Speed Vac)	1 hr
Weighing	Sample dry in E-tube	3 hr
	Weighing	5 min
dB input, scanner	Numbering, Documentation	1 hr

표 7. 분획 메타볼롬 생성의 전주기

## 3. 미생물 자원의 배양 및 분획 정제 프로트콜 확립

전주기 과정을 화합물 분리의 관점에서 살펴보면, 여타의 천연물 라이브러리가 단일 용매 추출인데 비해 본 과제의 라이브러리는 정제과정이 포함된 질적 개선을 이룬 방법론이다. 단일 용매 추출물의 경우 예상되는 불순물인 지방산, 배지유래 플라보노이드, 극성물질을 Flashes 컬럼의 운용을 통해서 제거하였다. 또한 라이브러리 발생 수율을 높이기 위해, 동시 4가지 시료 처리가 가능한 다중컬럼을 적용하였고(그림-5), 수백 개의 fraction collector 시료를 농축하기 위해 multi-pin air blower를 프로토콜에 도입하여 초기 농축과정을 단순, 고속화 하였다.

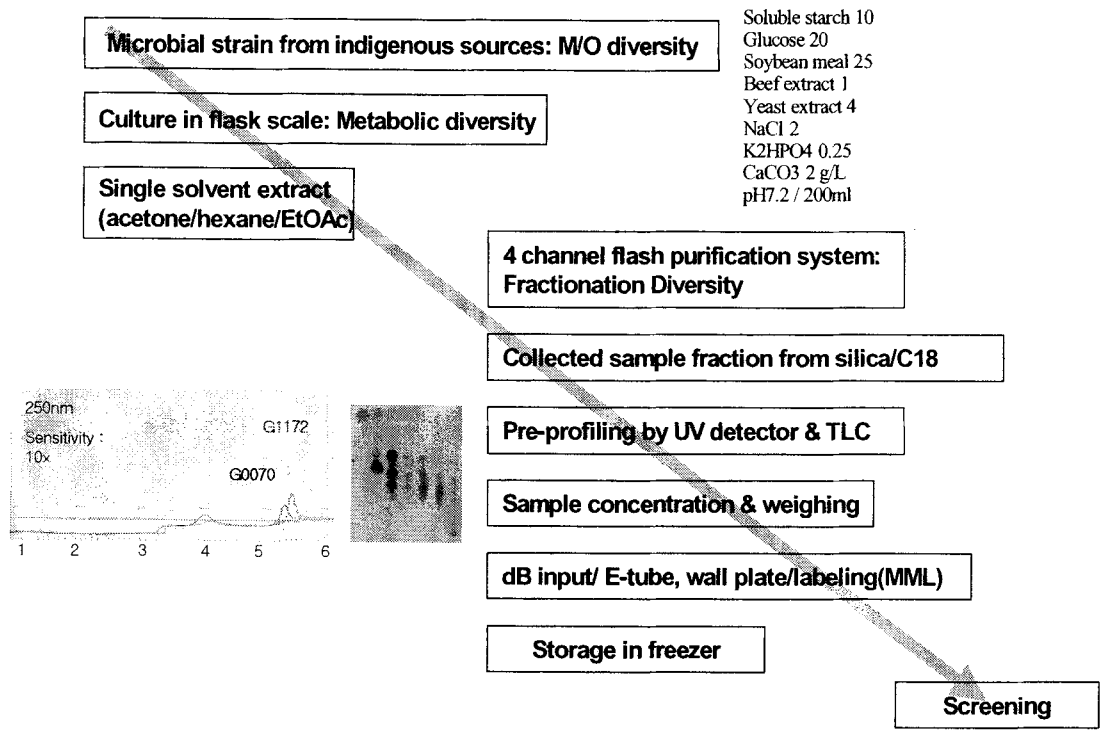


그림 5. 미생물 fraction 메타볼롬 라이브러리 발생 과정

분획과정의 핵심은 다중 컬럼을 이용한 고속 분리 정제이다. 50ml tube 48개를 기본으로 물질을 용출시켰으며, 흡광도, TLC 양상에 따라 물질군을 재분류하는 프로파일링을 수행하였다(그림-6).

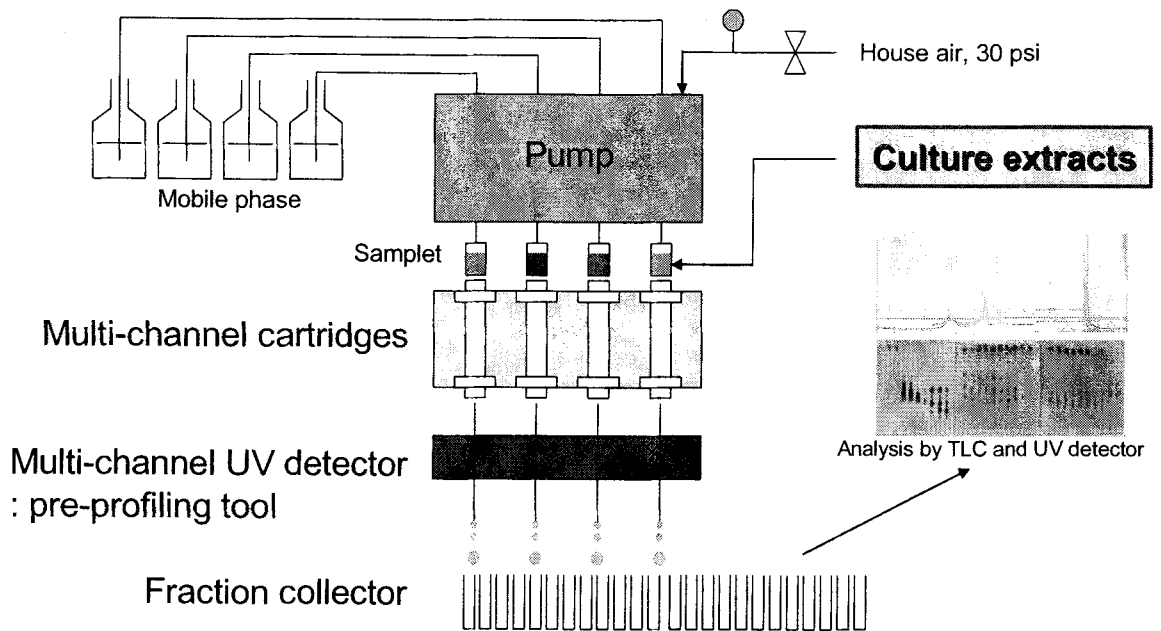


그림-6. Four-Channel QUAD purification system

이러한 분획과정이 중요한 것은, 합성물질과 달리 미생물 배양배지는 그 자체로도 false (+)반응을 보일 수 있는 각종 배지 성분을 포함하기 때문에, HTS등 스크리닝에 적용하기 위해서는 단일 용매 추출물을 벗어나 보다 정제된 형태가 요구되기 때문이었다.

#### 4. 미생물 자원의 재평가 작업

생물 다양성에 근거한 물질 다양성을 충분히 확보하기 위하여 mycotoxin을 비롯한 lead compound 발생이 독특한 곰팡이류, 전통적 의약개발 자원인 방선균, 신규항암물질의 보고로 알려진 cyanobacteria, 극한 미생물의 일종으로 새로운 다양성을 기대할 수 있는 호염 및 호알칼리 균주, 미생물을 먹이로 하면서 다양한 미생물-미생물 관계에 적용되는 저분자 물질의 생산이 기대되고 최근 강력한 항암제의 자원으로 부각된 점액 세균에 대한, 분획 과정의 적용을 통해서 각 미생물의 실제적 배양 형태, 메타볼롬 수율, 실험 접근성 등의 관점에서 미생물 자원을 재평가 하였다(표-8). 이 과정을 통해서 속도와 다양성이라는 상충되는 조건을 만족시키는 자원으로 방선균 및 점액균이 절대 유리함을 확인하였다. 특히 점액세균은 다른 자원에서 좀처럼 hit이 발생되지 않던 선택적 스크리닝계인 PRL-3(그림-7)에서도 상당한 반응을 보여줌으로써, 2단계에서는 보다 집중적 연구가 필요함을 알았으며, 라이브러리의 질적 수준을 높여주는 중요한 자원으로 확인되었다.

자원별	자원크기	장점	단점
토양방선균	크다	양적 확보	중균불안
호염호알칼리	적다	극한미생물	대사물 양적 부족
해양방선균	크다	다양성	양적문제
점액세균	중간	안정적 활성	배양, 양적문제
Symbiotics	더작다	희귀성(곤충관련)	활성미지수

표 8. 미생물 자원별 특성

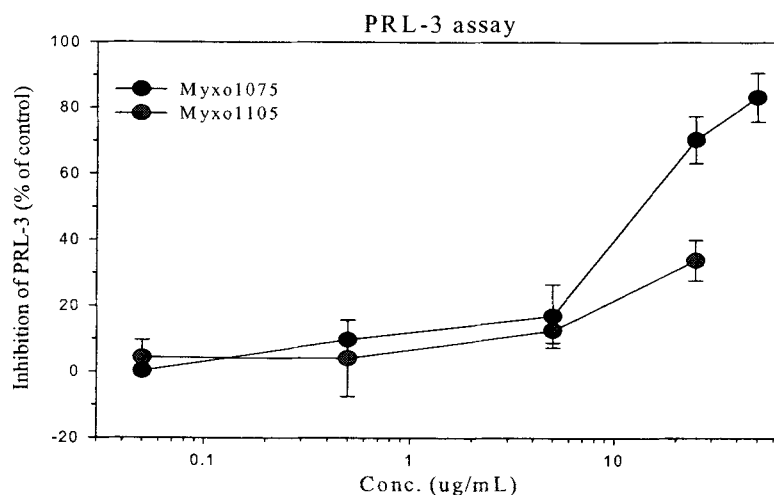


그림 7. PRL-3 스크리닝계에 활성을 보이는 점액세균 메타볼롬

### 5. 미생물 분획 메타볼롬의 평가

당뇨 스크리닝제인 PTP1B를 비롯하여 VHR (cell cycle), hypoxic ischemia, HT29(종양), HDAC/HAT(각종 암), PRL-3(전이)를 대상으로 분획 메타볼롬 라이브러리 12 plate, 960개의 라이브러리를 적용하여 각각의 hit ratio를 조사하였다(표-9). 각각의 스크리닝계에서 유의한 반응을 보이는 hit이 전혀 보이지 않는 것도 있었고, 어떤 경우는 10%이상의 hit으로 변별력이 적은 것도 확인하였지만, 2차 분양분에서는 5% 내외로 hit이 바뀌어 변별력이 높아짐을 알 수 있었다(표-10). 그러나 대개의 스크리닝계에서 1-2%의 hit을 나타내어, 구성된 분획 라이브러리가 매우 다양하고 변별력있는 물질군을 포함함을 알 수 있었다.

### Screening with the 1<sup>st</sup> Lot of Metabolome Library

80ea / 96 well format, 5mg/ml-DMSO well /10ul

Plate No.	Bioactive Hits					
	PTP 1B (Diabetes)	VHR (Cell cycle)	Hypoxic Ischemia	HT29 (Tumor)	HDAC/HAT (Cancer)	PRL-3 (Metastasis)
1	8	2	-	-	2	-
2	9	3	5	-	1	-
3	6	5	1	2	-	-
4	8	8	-	1	1	-
5	1	4	-	-	-	-
6	8	6	2	-	1	-
7	6	4	-	4	1	-
8	10	5	3	3	1	-
9	8	2	-	7	1	-
10	15	7	-	3	-	-
11	8	7	-	-	3	-
12	19	2	2	-	3	-
Hit ratio	11.04 %	2.29 %	1.35 %	2.08 %	1.16 %	0 %

표 9. 1st lot 미생물 분획 메타볼롬의 스크리닝 적용.

Plate NO.	Bioactive HITs		
	PTP 1B (Diabetes)	VHR (Cell cycle)	Migration (cell migration)
13	12	-	-
14	7	-	-
15	1	-	-
16	7	-	-
17	-	-	-
18	2	-	-
19	3	1	-
20	8	1	-
21	7	-	-
22	-	-	-
23	1	-	-
24	1	-	2
Hit rate	5.104%	0.208%	0.208%

표 10. 2nd lot 미생물 분획 메타볼롬의 스크리닝 적용.

## 6. 구조기반의 미생물 라이브러리 평가

한편, 미생물 메타볼롬도 분획수준을 거쳐 궁극적으로는 단일 물질형태의 라이브러리로 이행되어야 진정한 HTS 재료로 도입될 수 있을 것이다. 이러한 과정은 HT-HPLC 등의 정제 속도를 통해 구현할 수도 있지만, 보다 양질의 라이브러리를 구축하기 위해서는 분획물 수준에서도 라이브러리에 대한 구조정보를 확인함으로써 중복 라이브러리의 방지 및 기능적 라이브러리의 구축에 활용할 수 있을 것이다. 이러한 방향에 따라 기존의 분획 라이브러리를 proton NMR을 통해 확인하였고, 순도와 물질의 다양성에서 매우 잠재력이 큰 것을 확인할 수 있었다(그림-8). 각종 미생물 자원 중 IZ2610이 독특한 영역(그림 참조, chemical shift 4 및 7 부분의 피크)에서 피크를 보여 이를 대상으로 세포주 활성화, 균주 동정을 확인하여 라이브러리의 적용성을 확인하였다. 이러한 개별 정도는 궁극적으로는 구조 기반의 미생물 메타볼롬 라이브러리 구축에 활용될 수 있을 것이다.

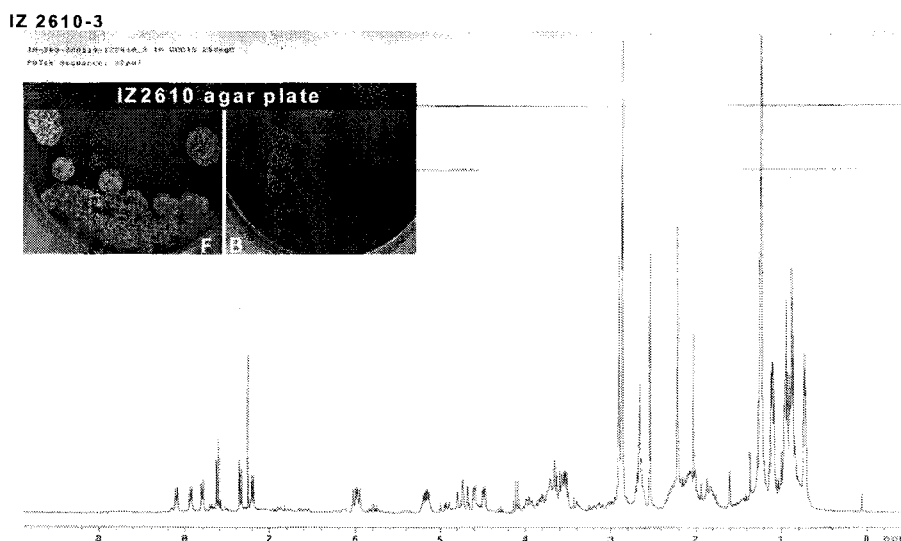


그림 8. 구조기반 라이브러리 구성을 위한 1H-NMR

미생물 배양 후 QUAD purification system으로 분획한 분획물에 대한 구조 기반의 분획물 프로파일링 분석을 위해  $H^1$ -NMR을 이용하였으며, druggable compound로 여겨지는 부분을 재배양, 재분리함으로써 재현성의 기술도 확보하였고, 구조분석에 충분한 물질을 얻어 각종 구조분석 기법을 이용하여 그 화합물을 밝혔다. 실제 분리정제에 사용된 과정은 아래의 그림-9와 같다 (HPLC; HP, J'sphere ODS-H80; 250X20mm I.D.; MeOH; Water =85:15; Flow rate = 4ml/min).

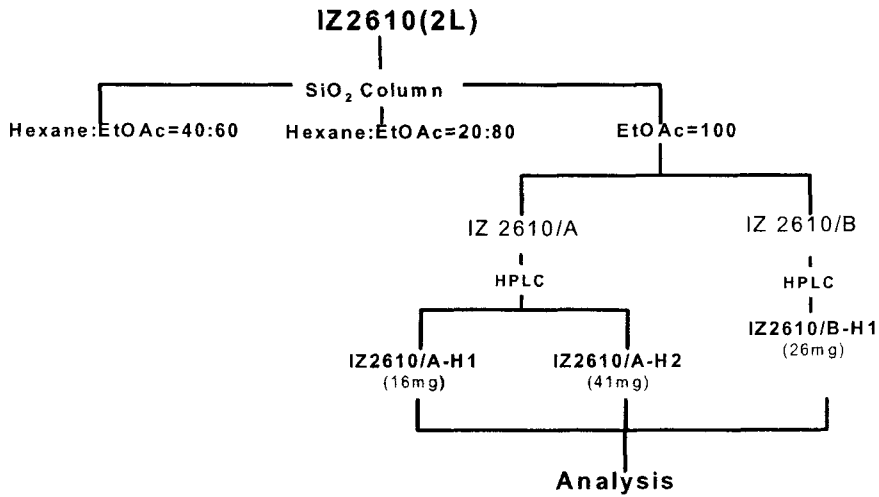


그림 9. 구조기반으로 확인한 2610 메타볼롬의 재현 분리과정

유기용매 Hexane, Ethyl acetate를 이용하여 crude extract를 column 하였으며, 이중 Ethyl acetate 100%로 용출된 부분을 TLC로 pre-profiling하여 IZ2610/A과 IZ2610/B로 나누었다. 이렇게 나누어 얻어진 compound를 HPLC를 이용하여 IZ2610/A-H1, IZ2610/A-H2, IZ2610/B-H1 의 3 compound를 얻을 수 있었다. 이 3 compound의 재분석  $H^1$ -NMR에서 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었는데(그림-10), 이들 화합물은 Actinomycines계열의 구조로 밝혀졌다.

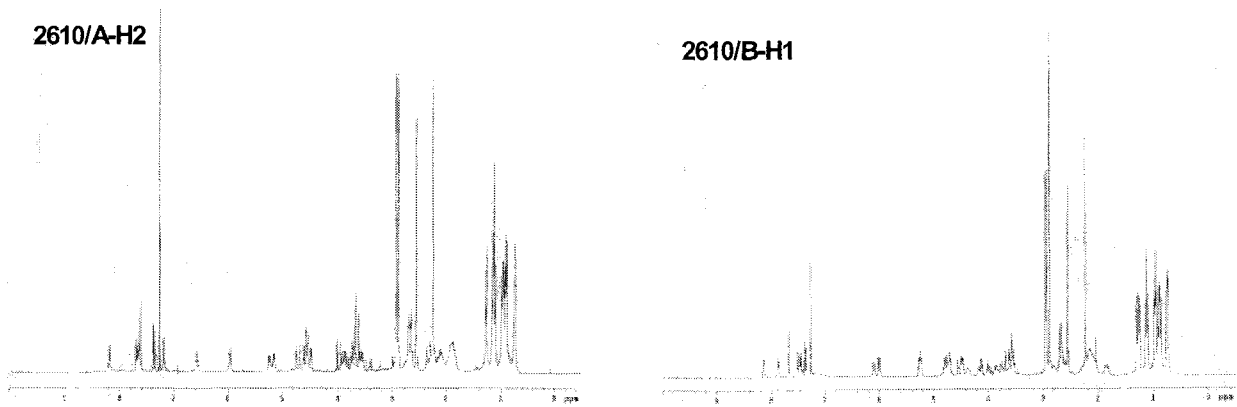
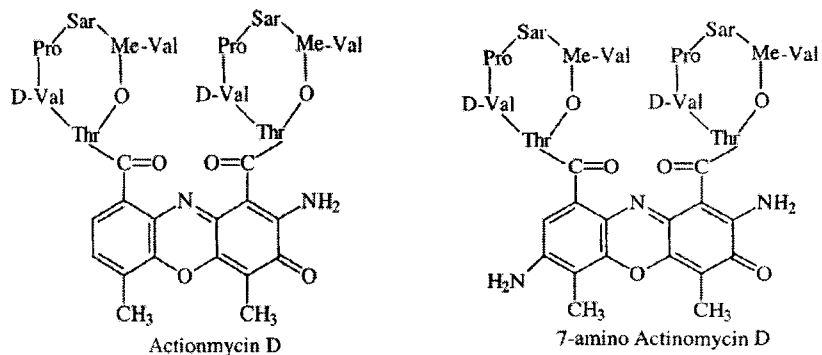


그림 10. 2610 메타볼롬의 구조분석



NMR 결과를 기준으로 선별된 균주에 대한 메타볼롬의 생물활성을 확인하였다. 즉, 그림-11처럼 두 가지 암세포주를 이용한 세포독성에 의한 항암제 연구에 적용된 IZ2610 메타볼롬 분획은 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 암세포주의 성장을 저해하는 활성을 보여주었다(anticancer activity;  $\text{GI}_{50}$  on SW620, colon and MDA-MB-231, breast cancer cells).

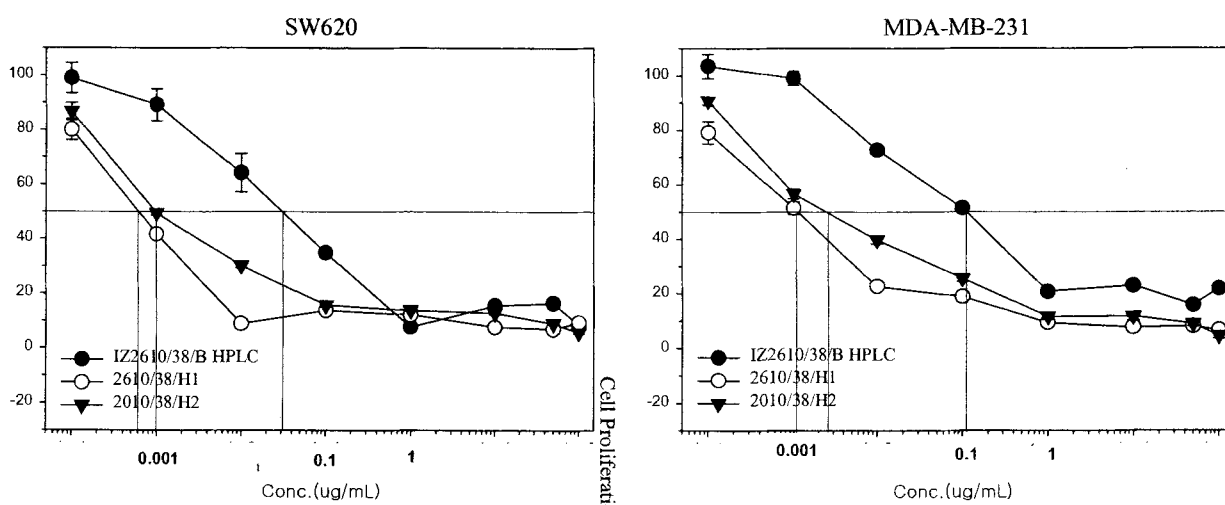


그림 11. IZ2610 showed anticancer activity ( $\text{GI}_{50}$  value) on SW620(colon) and MDA-MB-231(breast cancer) cells

한편, NMR 기준으로 선별된 균주의 동정결과 *Streptomyces griseus*와 미생물 분류특성이 유사한 균주로 확인되었다(그림-12).



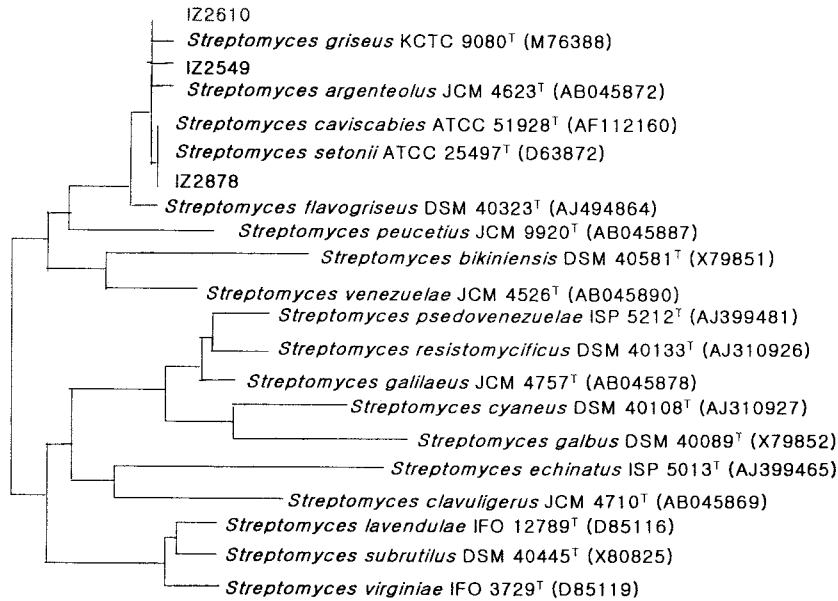


그림 12. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the positions of IZ2610, IZ2549 and IZ2878 and the representatives of some *Streptomyces* species.

## 7. 미생물 분획 메타볼롬이 구축과 활용

전주기적 라이브러리 발생 방법론이 확립되어 5차례에 걸쳐 8,645개의 라이브러리를 발생하였고 이중에 4차 x 12 plate x 80 = 3,840 well (4,486분획)의 라이브러리가 외부 연구자에게 공개되었다. 최종적인 사용균주는 1,300여개로 균주 당 약 7개의 분획이 확보되었음을 알 수 있다(표-11).

Step	No. of species	No. of fractionations
1st lot (Mar. 2003)	1 - 455	1 - 3,016
2nd lot (Nov. 2003)	456 - 681	3,017 - 4,566
3rd lot (May 2004)	682 - 892	4,567 - 5,692
4th lot (Dec. 2004)	893 - 1,101	5,693 - 6,824
5th lot (April. 2005)	1,102 - 1,298	6,825 - 8,645

표 11. 분획 메타볼롬 라이브러리 현황

2003년부터 총 23회의 분양이 있었으며(표-12), 분획된 fraction 메타볼롬의 분양을 통해 각각의 스크리닝에 적용하였고, hit 도출에 따른 후속 실험을 위해서 생산균 혹은 대량 분취물을 재분양하였다. 화학(연)의 경우 화합물은행과의 협력사업으로 copy plate를 분양하여 국가적 인프라 구축에 참여하였다. 또한 생명(연) 세포기능실의 phenotype-based assay계에 적

용하여 미생물 메타볼롬 라이브러리의 효용성을 1차로 추적 검사하는데 주로 활용하였다. 국내 분양된 실적은 아래의 표와 같으며, 항암제 등의 스크리닝 연구에 적용되었다.

소속기관 및 학교	분양plate#	screening 목적
한국생명공학연구원(Dr. A)	#1~24	phosphatase inhibitor screening
한국생명공학연구원(Dr. B)	#1~12	caspace활성
한국화학연구원	#1~12	화학연구원 기탁
한국생명공학연구원(Dr. C)	#1~12	항암제 screening(고형암)
대구카톨릭의대 (Dr. D)	#1~12	허혈조건에서 세포생존을 개선시키는 물질 screening
한국생명공학연구원(Dr. E)	#1~12	Non-mevalonate와 IPP이용한 항생제 발굴 target
한국생명공학연구원(Dr. F)	#1~12	HDAC 및 HAT저해제 탐색(histone acetylation관련)
한국생명공학연구원(Mr. G)	#1~24	cell migration
세종대(Dr. H)	#1~12	
한국생명공학연구원(Dr. E)	#1~36	Non-mevalonate와 IPP이용한 항생제 발굴 target
한국화학연구원	#1~36	화학연구권 기탁
서울대 (Dr. I)	#1~48	폐암 lead물질 screening

표 12. 분획 메타볼롬 라이브러리의 분양 예

목 표	달 성 도 (%)	내 용
<p>○ 특수환경, 난배양성 미생물 및 메타게놈 탐색 기반 기술 확보 및 신규 자원 확보</p>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 국내의 해수, 갯벌 및 특수환경 (고염지역, 고알칼리 지역, 고산성 지역) 등으로부터 확보한 시료를 대상으로 다양한 pH, 온도, 배지 조건 등의 인자를 고려한 분리방법을 활용하여 국내 고유의 다양한 미생물을 탐색, 분리 및 확보하였음.</li> <li>• 화학분류학적 분류동정 체계, 최신의 분자계통분류학적 방법 및 다상 분류체계를 이용하여 확보한 미생물(특히, 세균)의 분류체계를 확립하였고 신규 세균 4 속(genus), 45 종(species)을 확보하여 국제 저명학술지인 Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 등에 발표하였음.</li> <li>• 메타게놈 라이브러리의 효율적 구축을 위한 고순도의 환경 DNA의 추출 기술을 개발하고 BAC, Fosmid vector를 이용하여 메타게놈 라이브러리 구축 기술을 확보함.</li> <li>• 구축, 확보된 메타게놈자원을 대상으로 lipase 활성을 나타내는 클론들을 확보 유용한 신규 lipase 유전자를 확보함.</li> </ul>
<p>○ 난배양성, 특수환경 및 상호작용 관련 미생물, 메타게놈자원, 신규 미생물자원 수집 및 확보</p>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 다양한 미생물 및 메타게놈 자원의 관리, 자원등록 효율화를 위한 시스템(<a href="http://www.microbank.re.kr">http://www.microbank.re.kr</a>)을 구축하여 활용함.</li> <li>• 1분야 미생물다양성분야 연구책임자로부터 미생물자원 11,000여 균주, 메타게놈자원 10,000메가 이상을 기탁, 보존함으로써 당초 연구목표를 달성함.</li> <li>• 수집, 확보된 미생물 및 메타게놈 자원의 데이터베이스를 구축함.</li> </ul>
<p>○ 확보된 미생물 자원의 안정적 보존 및 산학연에 분양 지원</p>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기탁, 수집된 미생물 및 메타게놈자원을 위한 안정적 보존 시스템을 구축함..</li> <li>• 미생물 및 메타게놈 자원의 체계적 관리를 위하여 바코드 시스템을 구축하여 활용함.</li> <li>• 산학연 연구자들을 대상으로 하여 확보된 미생물 및 메타게놈 자원의 분양을 위한 체계를 확립함.</li> <li>• 메타게놈 자원 클론 및 클론 pool의 분양을 통해 국내 바이오관련 분야의 효율적 연구수행에 기여함.</li> </ul>

## !-2, 메타볼롬 DB 분야

### 1. 메타볼라이트의 확보 및 데이터베이스 구축

2005년 5월 현재까지 1000종 이상의 메타볼라이트를 확보하였고, 이에 대한 데이터베이스 구축을 완료하였다. 구축된 라이브러리의 일부를 그림-9 와 10에 나타내었다. 구축한 라이브러리에는 메타볼라이트의 구조를 기본으로 여러 가지 관련정보를 함께 포함하고 있어 연구자들에게 실질적인 정보를 제공할 수 있다.

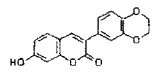
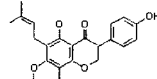
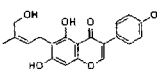
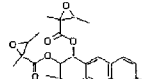
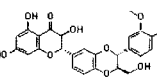
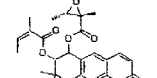
*** Flavonoid DB ***									
ID	Structure	MW	Activity (IC <sub>50</sub> )		Charge (z)	RT (min)	Scan (m/z)	RT (min)	Scan (m/z)
			(μg/ml)	(nM)					
IDRMB01 8		296.26	10.2	34.46	P/01	47.14	N/0	22.48	
IDRMB01 2		405.46	50.5	124.55	P	76.70			
IDRMB01 3		354.35	12.2	34.43	P/N	42.23	P/N	20.69	
IDRMB01 4		458.46	100	218.12	P	56.22	P	26.21	
IDRMB01 5		462.42	4	8.29	N	37.17	N	18.28	
IDRMB02 3		442.48	70	158.2	P	67.19	P	30.68	

그림 137. Flavonoid류의 메타볼라이트 데이터베이스

특히, flavonoid류의 dB에는 LC-MS 실행 후 얻어진 메타볼라이트의 이온화 특성과 최적화된 LC 운용조건에서의 머무름시간 (retention time)과 같은 정보를 포함하고 있어 향후 복잡한 시료로부터 각각의 메타볼라이트들을 규명하는데 많은 정보를 제공하고있다.

### 2. MS/MS 스펙트럼 생성조건 최적화

다양한 구조적 정보를 포함하는 MS/MS 스펙트럼을 얻기위해서 이미 normalized collision energy technology 와 wideband activation technology가 보고되었다[1-2]. 이 연구에서는 구조적으로 다양한 메타볼라이트들에 대해 재현성있는 MS/MS 스펙트럼 생성조건을 연구하였다.

A	B	C	D	E	F	G	H	I
1105	275	ID : MM26290	name : Adipamide	279	ID : MM16009	name : 9,10-cis-Epoxyoctadecanoic acid		
1106			class :			class :		
1107			source : green alga Rhizoctonium heterolyphicum			source : Cronartium fusiforme		
1108			M.W : 144.173			M.W : 296.466		
1109			Formula : C6H12N2O2			Formula : C18H34O3		
1110			Activity :			Activity :		
1111			amount :			amount :		
1112								
1113	276	ID : MM17230	name : N-Methylanthranilic acid	280	ID : MM16173	name : α-Aminoadipic acid		
1114			class :			class :		
1115			source : marine Streptomyces sp. B 7743			source : Cephalosporium sp.		
1116			M.W : 151.165			M.W : 161.157		
1117			Formula : C8H9NO2			Formula : C6H11NO4		
1118			Activity :			Activity :		
1119			amount :			amount :		
1120								
1121	281	ID : MM26329	name : 3,5-Dibromo-4-hydroxybenzaldehy	285	ID : MM16183	name : α-Resorcylic acid		
1122			class :			class :		
1123			source : red alga Polysiphonia sphaerocarpa			source : Cochliobolus lunata		
1124			M.W : 279.915			M.W : 154.122		
1125			Formula : C7H4Br2O2			Formula : C7H6O4		
1126			Activity :			Activity : tyrosin kinase inhib., IC50 0.43		
1127			amount :			amount :		
1128								
1129	282	ID : MM26332	name : ?Chamirane	286	ID : MM17606	name : Glutamine		
1130			class :			class :		
1131			source : wood-rotting basidiomycetes			source :		
1132			M.W : 204.356			M.W : 146.146		
1133			Formula : C15H24			Formula : C5H10N2O3		
1134			Activity :			Activity :		
1135			amount :			amount :		
1136								
1137	283	ID : MM26419	name : 2-Piperidone	287	ID : MM26757	name : 2-Hydroxy-4-methoxyacetophenone		
1138			class :			class :		
1139			source : cyanobacterium Aphanizomenon			source : fungus Gloeophyllum odoratum		
1140			M.W : 99.1322			M.W : 166.176		
1141			Formula : C5H9NO			Formula : C9H10O3		
1142			Activity :			Activity : odor component		
1143			amount :			amount :		

그림 138. 미생물 유래의 메타볼라이트 데이터베이스

Wideband activation mode에서 좀더 다양한 fragmentation을 생성한다고 보고되어있으나, 이 연구에서 수행된 flavonoid 류는 wideband activation off 조건에서 좀더 다양한 스펙트럼이 생성되는 독특한 특성을 확인하였다. 이러한 현상은 positive ion과 negative ion 모두 같은 결과를 나타내었다 (그림-11). 이와같은 결과는 이미 steroid class에서도 보고되었으며[3] flavonoid류의 MS/MS spectra database 구축에는  $[M + H]^+ - H_2O$  fragment 를 포함하는 스펙트럼이 유리함을 확인하였다. 또한, 30~ 60%까지 5% 간격으로 다양한 normalized collision energy를 가하면서 MS/MS fragment 생성을 관찰하였다. 30 ~ 40% 구간에서는 molecular ion의 조각화가 일어나기엔 에너지가 낮아서 fragmentation이 거의 일어나지 않았고, molecular ion ( $[M + H]^+$  or  $[M - H]^-$  ion)의 peak이 그대로 존재하고있다 (그림-11 30%). 그러나 50% 이상의 구간에서는 에너지가 너무 높아서 adduct ion ( $[M+H+H_2O]^+$ , 그림-11 . 60% ON)이 나타나고 전체적인 intensity가 감소되어 저급의 스펙트럼을 생성하였다. Intensity가 너무 감소되면 fragment들 간의 intensity 비율의 일정하게 유지되지않아 재현성있는 결과를 얻기 어렵다. 결론적으로 에너지 수준별로 fragmentation을 수행해본 결과 45%에서 가장 적절한 패턴을 보여주었으며, 이 조건을 MS/MS spectra dB 구성을위한 표준 LC-MS/MS 수행조건으로 선택하였다.

구조적으로 매우 유사할 뿐만 아니라 분자량까지 동일한 8개의 메타볼라이트를 최적화된 조건에서각각 LC-MS/MS로 분석한 결과 서로 구분가능한 독특한 패턴의 MS/MS 스펙트럼을 생성하였고(그림-12 ), 이 결과로 확립된 조건의 적절함을 확인하였다.

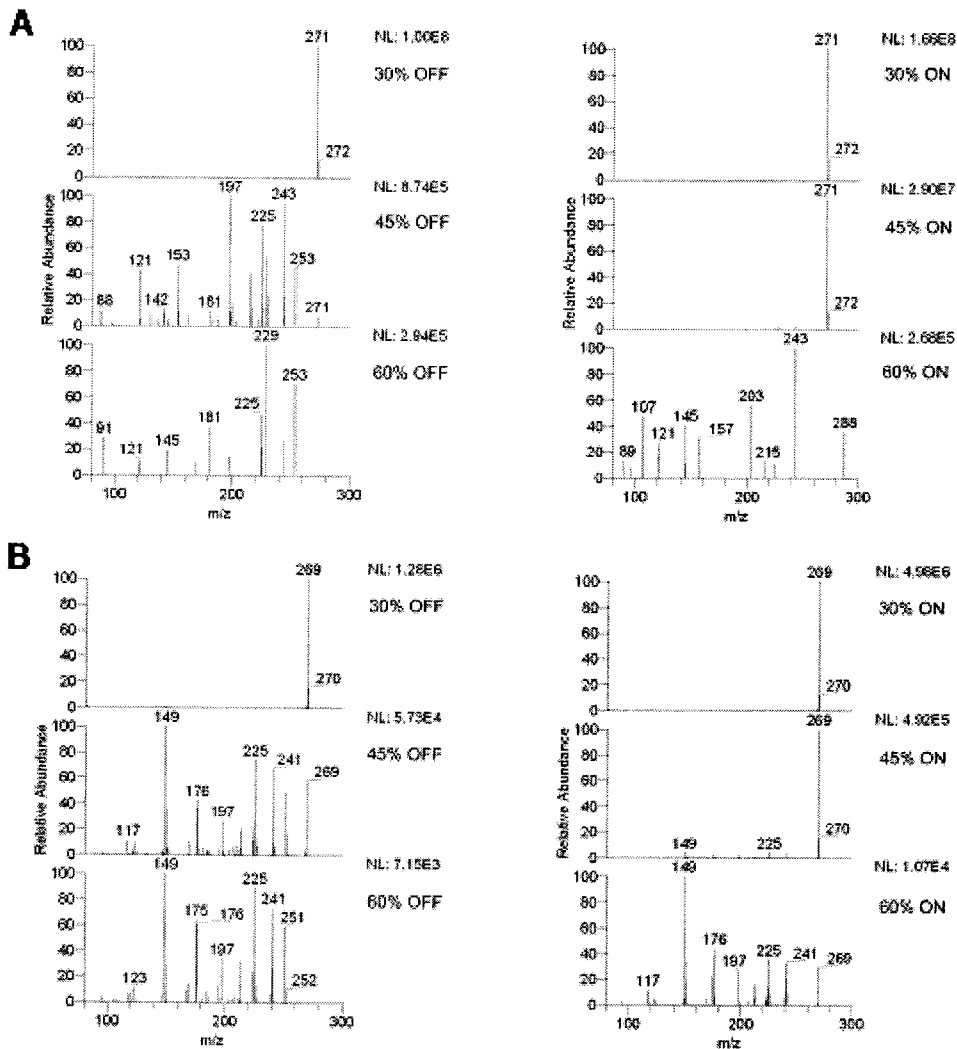


그림 139. 같은 물질을 다양한 조건에서 생성한 MS/MS 스펙트럼의 비교

### 3. 메타볼라이트의 MS/MS 라이브러리 구축

라이브러리 구축에는 NIST MS search program을 사용하였으며, QualBrowser에서 직접 등록시켰다. 그림-13에 구축된 라이브러리를 이용하여 복잡한 시료로부터 메타볼라이트를 검색한 결과를 나타내었다. 라이브러리에는 메타볼라이트의 MS/MS 스펙트럼 이외에 물질의 구조, 분자량, molecular formular, CAS number와 같은 정보도 함께 포함하고 있어 사용자가 물질을 확인하는데 다양한 정보를 제공한다.

스펙트럼 라이브러리는 검출된 이온의 이온화 경향에 따라 positive ion MS/MS library와 negative ion MS/MS library로 구분하여 구축하였다. 검출되어지는 메타볼라이트의 polarity는 물질의 고유한 특성이므로 유사한 메타볼라이트를 좀더 쉽게 구분 할 수 있게 해준다. dB의 update가 간편하여 새로운 물질의 스펙트럼을 등록하여 새롭게 확보된 메타볼라이트를 곧바로 dB로 활용이 가능하다.

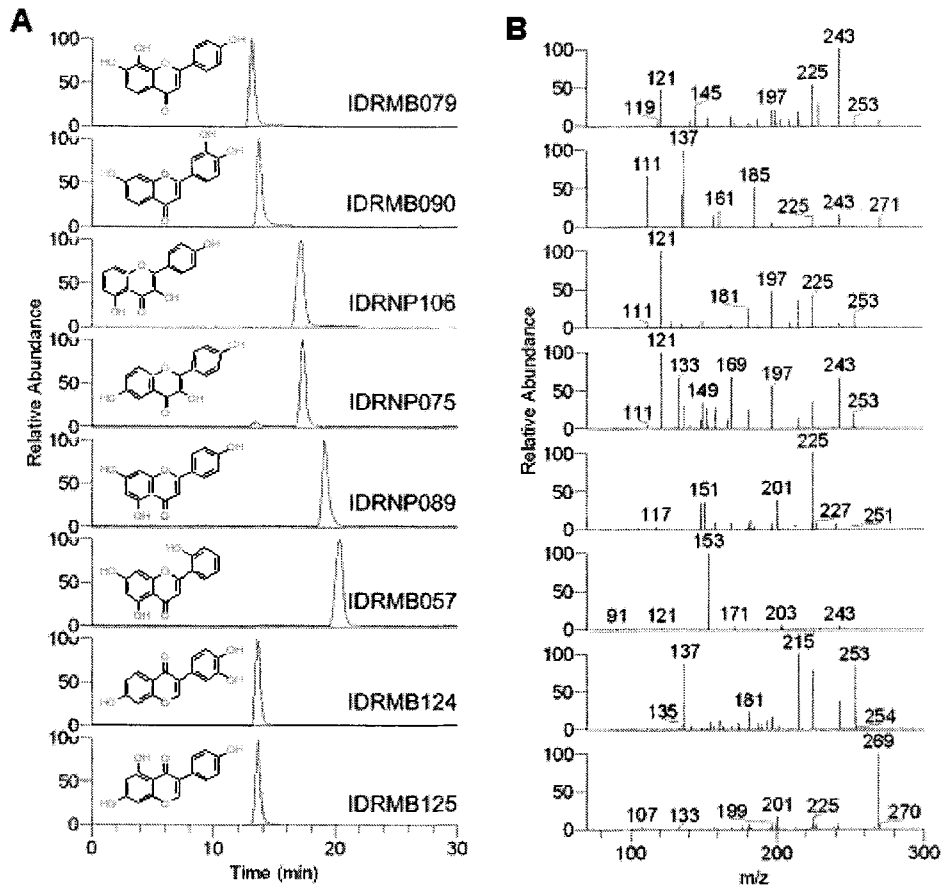


그림 140. LC-ESI-MS 크로마토그램과 메타볼라이트의 MS/MS 스펙트럼

#### 4. 미생물 메타볼라이트 라이브러리의 활용 및 응용

MS/MS 라이브러리 구축으로 전통적인 방법에 의해 메타볼라이트 구조분석을 할 경우 시간적 경제적으로 매우 많은 노력이 필요하였으나 질량분석기와 라이브러리를 사용하면 물질의 구조를 확인하는데 불과 수초만 필요로 하게 된다. 그리고 복잡한 시료로부터 한번의 실험으로 다양한 대사물질을 분석할 경우에도 분리 및 정제 과정 필요 없이 분석이 가능하다. 즉, 복잡한 추출물을 컬럼을 통과시켜 분리하면서 바로 질량분석기에 도입하여 질량 스펙트럼을 얻은 후 스펙트럼 자체를 라이브러리로부터 검색하여 분석하기 때문에 엄청난 시간적 경제적 절감을 가져올 수 있다.

이와같은 방법으로 매우 복잡한 식물(*Puerariae radix*, 갈근(葛根)) 추출물과 미생물(*Streptomyces armeniacus* AA030068) 추출물에서 메타볼라이트 검색을 실시해 보았다. 검색 결과에서 MS/MS 스펙트럼 라이브러리에 포함된 물질을 정확하게 찾아낼 수 있었으며, 그 결과를 그림-14와 15에 각각 나타내었다.

라이브러리를 이용한 메타볼라이트의 분석에 스펙트럼 이외에 얻을 수 있는 정보인 머무름시간과 질량분석기에서 이온화 되는 경향을 고려하면 더욱 정확한 구조분석이 가능하다. 구축된 dB를 이용

한 검색 시간은 일반 PC에서 수초만에 수행되어지며 복잡한 시료 중에서 다양한 메타볼라이트를 찾아 낼 때 많은 시간을 단축할 수 있다. NIST search program을 이용하면 dB에 등록되어있지 않은 메타볼라이트라 할지라도 유사한 MS/MS 스펙트럼 패턴을 갖는 후보물질을 찾아주기 때문에 유사한 골격구조나 미지 물질의 일부 구조를 예측하는데 도움을 받을 수 있다.

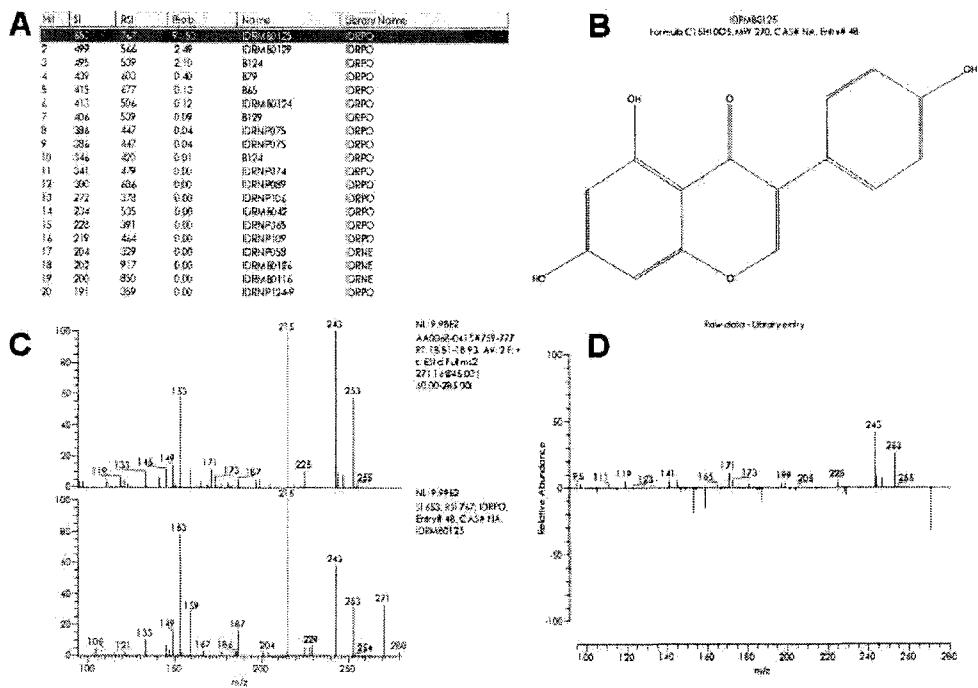


그림 141. MS/MS 라이브러리를 이용한 메타볼라이트 검색결과



### !-3, 메타게놈유래 메타볼롬 분야

#### 1. PKS 유전자를 가지는 클론 풀 선별을 위한 PCR 스크리닝

2003년 프랑스의 Courtois 연구그룹은 PKS I을 생산하는 방선균의 conserved ketoacyl synthase domain을 증폭할 수 있는 프라이머를 제작하였다 (1). 본 실험에서는 이 프라이머를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 먼저 프라이머의 유효성을 확인하기 위하여 PKS I을 생산하는 4종류의 방선균주의 genomic DNA와 2종의 PKS I 미생산 바실러스균주의 genomic DNA를 대상으로 컨트롤 실험을 수행하였다 (그림 1). 그림에서 1, 2, 3, 4번은 PKS I 생산 방선균주의 genomic DNA를 대상으로 한 실험 결과이고, 5,6번은 PKS I 미생산 바실러스균주, 7번은 대장균의 genomic DNA를 대상으로 한 결과이다. 예상했던 대로 PKS I 생산 방선균주에서는 700 bp 크기의 PCR 산물을 얻을 수 있었고, PKS 미생산바실러스 균주와 대장균에서는 PCR 산물을 얻을 수 없었다.

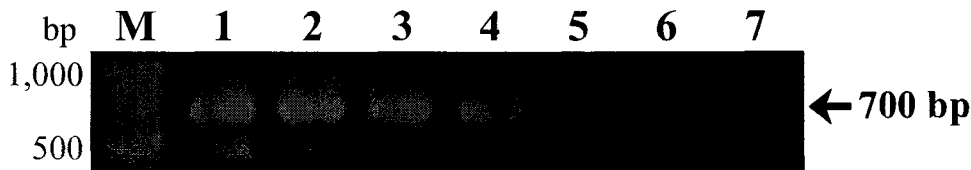


그림 1. 프라이머 유효성 확인을 위한 PCR 결과

이와 같은 결과를 토대로 기제작된 광릉수목원의 토양 DNA를 이용하여 만든 메타게놈 라이브러리의 36개의 클론 풀 (약 10,800 클론)을 PCR 방법으로 스크리닝하였다. 그림 2에서 보는 것과 같이, # 4, 11, 18, 20, 23, 36으로 명명된 6개의 클론 풀에서 PCR-positive 결과를 얻을 수 있었다. 이때 증폭된 700 bp 크기의 PCR 산물을 pGEM-T vector에 클로닝 하여 시퀀싱을 수행하여 PKS 유전자 여부를 확인하였다. 시퀀스 분석 결과 *Streptomyces coelicolor*, *Nostoc sp.* 등의 PKS I 유전자의 KS domain의 active site와 높은 identity를 나타내는 시퀀스로 확인되었다. 이와 같은 결과를 토대로 선별된 6개의 클론 풀을 가지고 colony hybridization 과정으로 실험을 진행하였다.

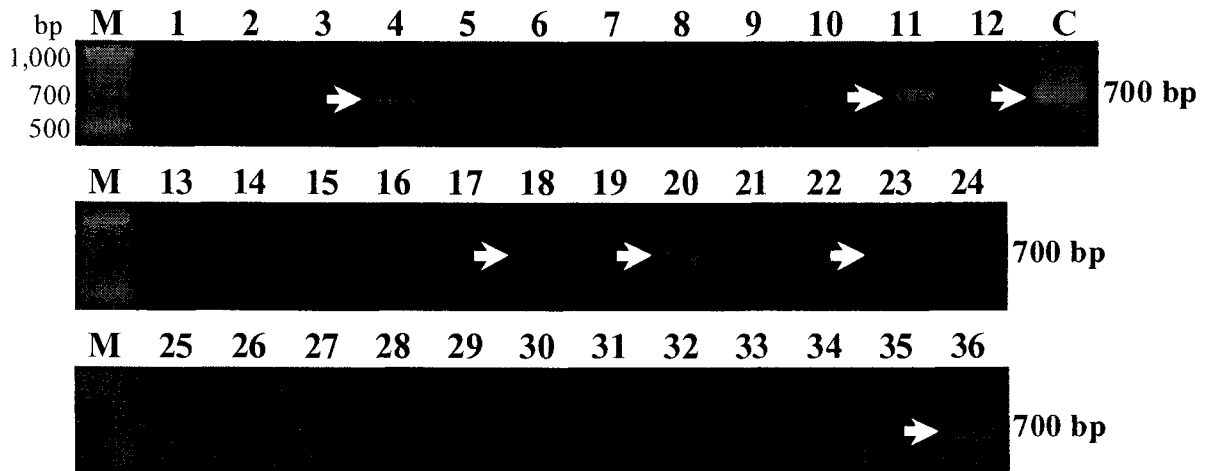


그림 2. 메타게놈 라이브러리 PCR 스크리닝 결과

## 2. Colony hybridization을 통한 타겟 클론의 선별

PCR에 의해 선별된 6개의 클론 풀을 상대로 colony hybridization을 수행하여 타겟 클론을 선별하고자 하였다. 6개의 클론 풀을 각각 LB 고체배지에 평판배양한 다음, 자란 콜로니를 nylon membrane에 옮겨 DNA만을 membrane에 나출시킨 후, DIG-labeled PCR products를 probe로 hybridization을 수행하였다. Colony hybridization 결과, 6개의 PCR-positive 클론 풀 중에서 4개의 클론 풀에서 positive 클론을 얻을 수 있었다 (각각 PKS4 from #4, PKS11 from #11, PKS20 from #20, PKS36 from #36으로 명명하였다). 그림 3에서와 같이, colony hybridization-positivet 클론의 membrane 위에 다른 콜로니와는 확연히 구분되는 진한 보라색의 spot를 형성하였다 (PKS20의 예임).

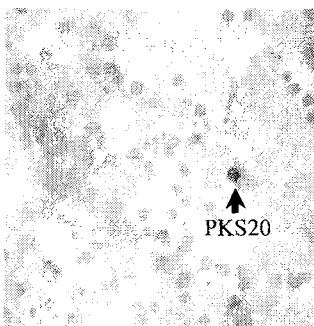


그림 3. #20 클론 풀의 colony hybridization 결과

그러나, #18과 #23, 이 두개의 클론 풀은 여러번의 시도에도 positive 클론을 찾을수가 없었다. 그림 2에서 보는 것과 같이 #18과 #23은 다른 4개의 클론 풀에 비해 약한 PCR 결과를 볼 수 있는데, 이와 같은 결과가 PCR 과정에서의 degenerate primer의 비특이적인 반응에 의한 결과라 생각되어지고, 또 이 같은 원인으로 인해 #18과 #23에서 positive 클론을 찾을 수

없었던 것으로 생각된다.

### 3. 선별된 4개의 클론 분석

Colony hybridization에 의한 선별된 4개의 클론을 대상으로 플라스미드 DNA의 크기 비교, BamHI-restriction profile, PCR confirmation을 수행하였다 (그림 4).

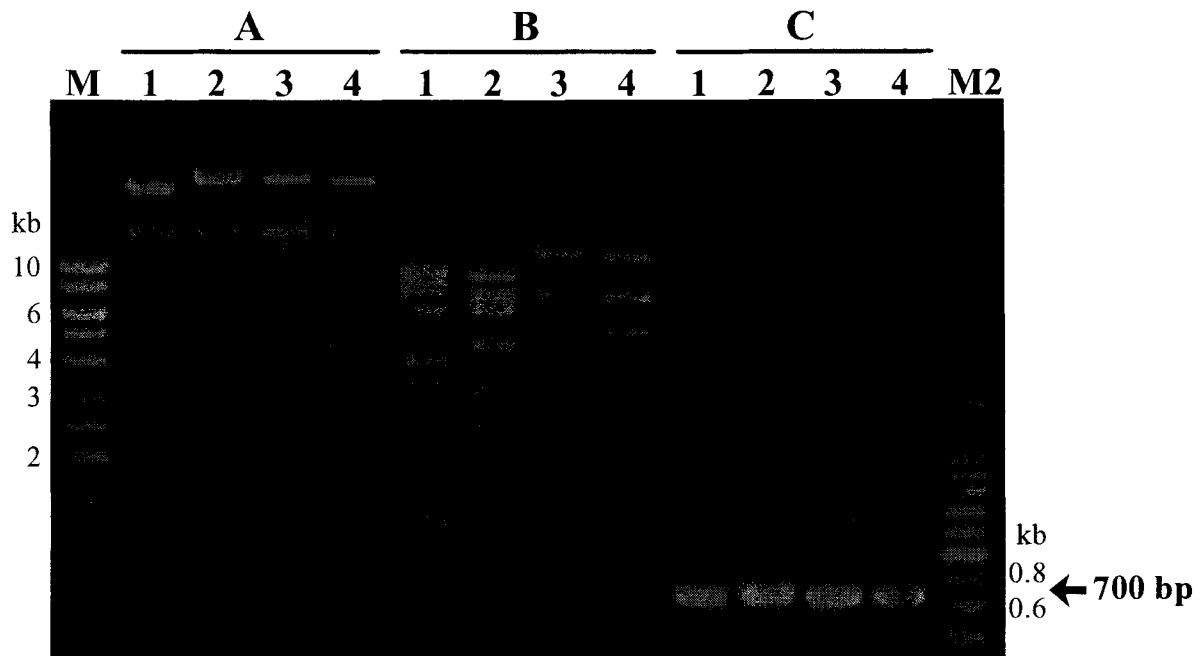


그림 4. 최종 선별된 4개의 클론에 대한 분석

그림 4의 B에서와 같이, 선별된 4개의 클론의 BamHI-restriction profiles이 각기 다른 것으로 보아 이들은 각각 서로 다른 insert를 가지고 있다. 또한 그림 4의 C에서 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T easy vector에 각각 클로닝하여 시퀀스 분석을 한 결과 (그림 5) 선별된 4개의 클론은 각각 PKS4는 *Nostoc punctiforme* PCC73102 polyketide synthase gene (226-amino-acid[aa] alignment; GenBank accession number ZP\_00110270.1)과 62% identity, PKS11은 *Lyngbya majuscula* CurI gene (225-aa alignment; GenBank accession number AAT70104.1)와 60% identity, ; PKS20은 *Nostoc* sp. strain PCC7120 polyketide synthase gene (224-aa alignment; GenBank accession number AI2140)와 53% identity, PKS36은 *Stigmatella aurantiaca* MtaD gene (228-aa alignment; GenBank accession number AAF19812.1)와 63% identity의 높은 identity를 가짐을 알 수 있었다.

*amino acid sequences  
of set 1-sense primer*

```

pfam00109 1 PQQRLALEAAWEALEDAGIDPASLEGSVRTGVFI GSGSGDYEEELQALDSGGGPRRVSPY- 60
PKS4          PQQRLLECSWAALE-AGYDPERYPGAV--GVFAGARMSWYLMN-VYSHPELVRAVGDLT
PKS11         PQQRVFLEVWCWEALENAGQS-GDVYGSS-TGVFAGVCSFDYAGLK-FASNR-QQAI DPY-
PKS20         PQQRLFLEVTHDALEDGGITRAELQRSN-VGVFI GAGSSDYMS---LDSGH-KEHVDGY-
PKS36         PQQRLFLECAWEALEDAACVPESFRGLI--GVFAGSGFCRYLLNNLATNPDLLPKLGDLQ
          ***** **      *** ..          *** *      *      :.

```

```

pfam00109 61 GTGAWMPSVAAGRISYRLGLRGPSTVDTACSSSLVALHAAVRSIPPGECDLALAGGVEA 120
PKS4          AQIANDKDYLATRVSYKLNLLGGPSVTVQACSTALVATHMACQALLSGECDIALAGGVAV
PKS11         FATGNAICAVSGRTSYVLGLKGP SLSIDTACSSSIVSVHYACQSLRNRECDMALAGGVNL
PKS20         YGIGNSHNLLAGRISYFLNLKGP SLAIDTACSSSITALHFAVQSLRQGEIDLAI VGGVNI
PKS36         IAIGNERDLSLCMVSYKLDLRG PSLAVQTF CSTSLVAVHLACQSLVNFEC DVALAGGVAI
          .      .      ** *.* ***:::* **::: * * :: : * * :*::***

```

```

pfam00109 121 PLTPGGFAGFSAAGALLSPDGPKAFDPFADG FVRGEGVGAVLLKELSEAY-----AV 180
PKS4          RLP-DYGYVFRQSD-INSPDGHVRAFDAGA QGTIFGNGMGAVVLKRLADALADGDTVRAV
PKS11         LLTPELSICFSQAG-MLSPEGR CRTFDARANGYVRSEGC GVVVLKRLSDAIAAGDNVIAL
PKS20         IVSPDLTLAFSQAK-MLSPSGRCKTFSADADG YGRAEGVGVIVVRCVADEDLEHHAIRCF
PKS36         DLPQEKGYLFTPGG-VLSPDGCCRTF DAEAQGSIMGN GVAIVTLKRLEDAIADRDP IRAV
          :.      *      : **.* ::*.. :* * . : : : :

```

```

pfam00109 181 IAGSAVNHDGAAHNGLTAPNGPAQARAIRAALADAGLDPEVDVYV EAHGTG 231
PKS4          VKGSAVTNDGSQKVGYTAPGVDGQYRVIRAALATAEVAPESVSYI ETHGTG
PKS11         IRGSAVNQDGPS-GGLTVPSGPAQEDVI-----PADVSYI DTHGTG
PKS20         VTATAVNQDGRS-NGIAAPNGNSQVRVIRAALDRAGLSPANIAYL DTHGTG
PKS36         IRGSAINNDGVQKVGYTAPGLDQAAVIAQALGSAGVDPGTVTYI ETHGTG
          : .:*** **      * :*. . * . *      * : *:::****

```

*amino acid sequences  
of set 1-antisense primer*

그림 5. 4개의 PKS 클론의 예상 아미노산 서열의 ClustalX 얼라인먼트 결과

현재 과학자들에 의해서 발견된 미생물 종은 지구상에 존재할 것으로 예상되는 전체 미생물 종의 약 1% 정도인 것으로 추정되고 있으므로 현재 자연계에 존재하는 미생물 종의 약 99%는 미발견된 상태로 남아 있다고 할 수 있다 (4, 5). 미생물은 유전적 다양성과 함께 기능적 다양성을 통해서 지구 생태의 핵심적인 위치를 차지하고 있을 뿐 아니라 인류에게는 없어서 안 될 엄청난 경제적 가치를 제공하고 있다. 미생물은 고부가가치 자원으로서 현재 생명공학 산업에서 이용되고 있는 핵심소재 중의 하나이다. 그러므로 미발견, 미배양 미생물은 새로운 유용 유전자와 천연물의 무한한 보고로 그 가치를 인정받고 있다. 메타게놈 기술은 이들 미발견, 미배양 미생물을 어떠한 배양 없이도 이들의 유전정보만을 이용하여 유용한 유전자 및 유용한 물질을 찾아내는 기술이다 (6, 7, 8). 자연계에 존재하는 아직 밝혀지지 않은 미생물 메타볼라이트 생산 유전자를 찾아내기 위해, 본 연구에서는 토양 메타게놈 라이브러리를 제작하였고 폴리키타이드 생합성에 관여하는 유전자를 가지고 있는 클론을 타겟으로 스크리닝을 수행하였다. 스크리닝 방법으로는 시간과 노력이 많이 요구되는 function-based 스크리닝 방법을 지양하고, PCR과 colony hybridization으로 대표되는 sequence-based 스크리닝 방법을 택하였다 (그림 6). 결과, 10,800개의 클론 중에서 4개의 putative PKS 유전자를 가지는 클론을 찾을 수가 있었다.

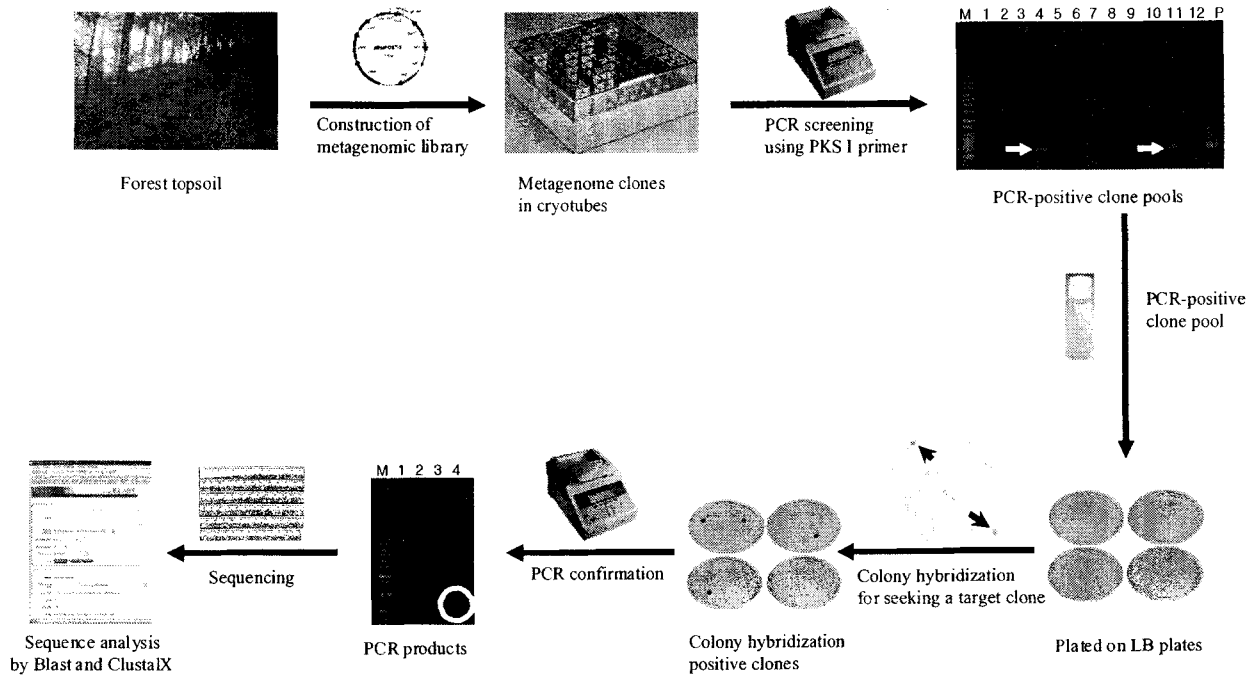


그림 6. 토양 메타게놈 라이브러리에서 PKS 유전자를 가지는 클론을 찾아내는 sequence-based 스크리닝 과정

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절. 추가 연구의 필요성

본 과제 수행을 통해 염전, 갯벌, 해수, 알칼리 토양 등 국내의 특수환경 지역으로부터 최신의 미생물 탐색 기술을 활용하여 다양한 미생물자원 및 메타게놈자원을 확보하여 왔으며 최신의 분류동정 기술을 적용 다수의 신규 미생물 속 및 종을 확보 및 발표하여 왔다. 그러나 확보된 미생물 중에서 신규성이 확인되었으나 아직 관련 데이터가 부족하거나 정확한 분류학적 위치를 결정하지 못한 신규 속 및 종 미생물들에 대한 지속적인 분류학적 연구를 수행하는 것이 필요하며 이는 국내 미생물다양성을 확보하여 선진국과 경쟁하는데 크게 기여할 것이다. 또한 확보된 미생물 중에서 예비실험을 통해 생물학적 활성을 나타내는 유용 균주들에 대해서 다른 연구팀 (기업, 학교 등)에 제공하거나 자체적으로 추가 연구를 실시하여 응용 및 실용화를 위한 개발이 지속적으로 이루어져야 한다. 21세기에 들어 세계적으로 미생물 게놈 연구가 본격화되어 활발히 진행되고 있는 시점에서 미생물다양성 및 미생물자원 활용 기술에 대한 필요성이 증대되고 있으므로 신규 유용 미생물 자원의 개발 및 확보에 대한 중요성이 갈수록 커질 것으로 예상된다. 그러나 국내의 특수환경 지역은 지극히 제한되어 있는 실정이므로 신규의 유용한 특수환경 미생물 또는 메타게놈 자원의 탐색을 위해서는 국외의 특수 환경 지역, 예를 들어 심해저, 고염분도의 염전, 저온 지대, 고온 지대, 동남아 남미의 오지, 열대우림, 해양 등으로부터 신규 유용 미생물자원을 탐색하는 연구도 활발히 이루어져야 한다. 이러한 국내외의 신규 유용 균주의 확보 및 개발을 위해서는 특정 연구기관 또는 연구팀 단독으로 진행하기는 어려우며 국내 산·학·연의 각 분야의 전문가 및 국외의 관련 연구기관의 체계적인 네트워크 구성을 통해 연구 역량을 강화하는 것이 필요하며 이를 기반으로 효율적인 유용 미생물 자원의 확보가 가능해질 것이며 나아가 국내 생물소재산업 분야의 국제 경쟁력이 더욱 강화되고 및 관련 제반산업의 활성화가 이루어질 것이다.

### 제 2 절. 활용방안

#### 1. 미생물자원 활용

본 연구 과제 수행을 통해 신규 유용 미생물 및 메타게놈자원을 탐색할 수 있는 기술이 확보되어 다양한 미생물 및 메타게놈 자원이 확보되었다. 신규 유용 미생물 및 메타게놈자원 탐색을 위한 기술은 지속적인 업그레이드와 병행하여 국내외의 유용 자연환경으로부터 미생물 및 메타게놈 자원을 탐색, 확보하는데 지속적으로 활용될 수 있다. 확보된 미생물 및 메타게놈자원들은 국내의 바이오 분야 관련 연구자 및 산학연 연구, 산업화 기관 등에 지속적으로 제공하거나 자체적으로 추가 연구를 수행하여 응용 및 실용화를 위한 연구개발에 지속적으로 활용할 수 있다. 최신의 미생물 분류동정 기술의 적용으로 발표된 신규 속 및 종의 미생물자원은 향후에도 국내의 연구팀이 국외의 균주보존 기관에 보유중인 미생물을 도입하여 활용할 수 있는 중요 기반이 될 수 있다. 확보한 신

규 미생물자원은 국내 미생물다양성 확보의 가치이외에도 향후 생물다양성 협약 체결 등으로 외국의 균주를 국내의 연구자가 이용하기 어려운 상황이 될 경우 외국의 미생물 자원을 국내로 도입할 수 있는 국내만의 고유 자원으로 활용 또는 무기화 할 수 있다.

## 2. 미생물 분류동정 기술의 활용

본 연구 과제 수행을 통해 확립된 선진국 수준의 계통학적 분류동정 체계 (화학분류학적, 분자계통학적 분류 및 다상분류)는 향후에도 미생물 관련 프로젝트를 통해 미생물다양성 확보 및 신규 미생물 자원 탐색 및 확보에 활용될 수 있으며 국내 산·학·연의 미생물 관련 연구자들에게 지속적으로 양질의 미생물 분류동정지원 서비스를 제공하거나 관련 기술을 보급함으로써 궁극적으로 국내 미생물 관련 산업의 발전에 활용할 수 있다. 확보한 다양한 분류동정 기술 및 관련 기술은 또한 현재 선진국을 중심으로 하여 활발히 개발 및 활용되고 있는 분류동정 및 분자 생태학적 연구를 새로운 기술의 확보 및 개발을 위한 기반기술이 되므로 향후 신 연구기술의 확보 및 신 연구분야의 개척에 중요한 기반이 될 수 있다.

# 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

## 제 7 장 참고문헌

\* 보고서 작성시 인용된 모든 참고 문헌을 열거한다

1. NIH molecular libraries initiatives. C. Austin, L.S. Brady, T.R. Insel & F.S. Collins. *Science*, 306, 1138-1139
2. A brief history of novel drug discovery technologies. L.J. Gershell & J.H. Atkins. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, 2, 321-327
3. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. K.H. Blericher, H.-J. Bolm, K. Muller & A.I. Alanine. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, 2, 369-378
4. Harnessing the power of the genome in the search for new antibiotics. J. Rosamond & A. Allsop. *Science*, 2000, 287, 1973-1976
5. The impact of the completed human genome sequence on the development of novel therapeutics for human disease. C.P. Austin. *Ann. Rev. Med.* 2004, 55, 1-13
6. Genomics and proteomics tools for compound mode-of-action studies in drug discovery. N. Kley, I. Ivanov & S. Meier-Ewert. *Pharmacogenomics*. 2004, 5, 395-404
7. The druggable genome. A.L. Hopkins & C.R. Groom. *Nature Review Drug Discovery*, 2002, 1, 727-730
8. Delivering the power of discovery in large pharmaceutical organizations. T. Peakman, S. Franks, C. White & M. Beggs. *DDT*, 2003, 8, 203-211
9. The NIH Roadmap. E. Zerhouni. *Science*, 2003, 302, 63-72
10. Property distributions: Differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry, M. Feher and J.M. Schmidt, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2003, 43, 218-227.
11. The evolving role of natural productions in drug discovery. F.E. Kohen & G.T. Carter. *Nature Reviews Drug Discovery* 2005, 4, 206-220
12. Rediscovering natural products. A.M. Rouhi. *Chem & Eng News*, 2003, 81(41), 77-91
13. Microbiology gaining ground after lean years. J. Knight. *Nature* 2004, 429, 332
14. Libraries from natural product-like scaffolds. A.M. Boldi. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004, 8, 281-286
15. What can a chemist learn from nature's macrocycles? - A brief, conceptual view. L.A. Wessjihann, E. Ruijter, D. Garcia-Rivera & W. Brandt. *Molecular Diversity*, 2005, 9, 171-186.
16. From protein domains to drug candidates-Natural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libraries. R. Breinbauer, I.R. Vetter & H. Waldmann. *Ang. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 2878-2890
17. Lessons from natural molecules. J. Clardy & C. Walsh. *Nature*, 2004, 432, 829-837
18. Biological mechanism profiling using an annotated compound library. D.E. Root, S.P Flaherty, B.P. Kelley & B.R. Stockwell. *Chem. Biol.* 2003, 10, 881-892
19. Marine natural products. J.W. Blunt, B.R. Copp, M.H.G, Munro, T. Northcote & M.R. Prinsep. *Nat. Prod. Rep.* 2004, 21, 1-49