발 간 등 록 번 호
11-1543000-002 340-01

세포내 기생 난치성 산업동물 주요 병원균의 핵심 병원성 유전체 분석과 이를 이용한 제어기술 개발

최종보고서

2018. 10. .

주관연구기관 / 경상대학교

협동연구기관 / 중앙대학교

협동연구기관 / ㈜인트론바이오테크놀로지

농 림 축 산 식 품 부

세포내 기생 난치성 산업동물 주요 병원균의 핵심 병원성 유전체 분석과 이를 이용한 제어기술 개발 R&D Report

세포내 기생 난치성 산업동물 주요 병원균의 핵심 병원성 유전체 분석과 이를 이용한 제어기술 최종보고서

2018 농림축산식품부

11-1543000-002340-01

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “세포내 기생 난치성 산업동물 주요 병원균의 핵심 병원성 유전체 분석과 이를 이용한 제어기술 개발”(개발기간 : 2014. 8. ~ 2018. 8.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 8. .

주관연구기관명 : 경상대학교 (대표자) (인)
협동연구기관명 : 중앙대학교 (대표자) (인)
협동연구기관명 : ㈜인트론바이오테크놀로지 (대표자) (인)

주관연구책임자 : 김 석
협동연구책임자 : 이 강석
참여기관책임자 : 손 지수

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td></td><td>해 당 단 계
연 구 기 간</td><td></td><td>단 계 구 분</td><td>(해당단계)/
(총 단 계)</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>단 위 사 업</td><td colspan="4">농식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td>사 업 명</td><td colspan="4">포스트게놈 다부처유전체사업</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4">(해당 없음)</td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4">세포내 기생 난치성 산업동물 주요 병원균의 핵심 병원성 유전체 분석과 이를 이용한 제어기술 개발</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2"></td><td>해당단계
참여연구원
수</td><td>총: 11명
내부: 11명
외부: 명</td><td>해당단계
연구개발비</td><td>정부: 180,000천원
민간: 70,000 천원
계: 250,000천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간
참여연구원
수</td><td>총: 11명
내부: 11명
외부: 명</td><td>총 연구개발비</td><td>정부: 760,000천원
민간: 280,000천원
계: 1,040,000천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소 속 부 서 명</td><td colspan="2"></td><td colspan="3">참여기업명
㈜인트론바이로테크놀로지</td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="2">상대국명:</td><td colspan="3">상대국 연구기관명:</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="2">연구기관명:</td><td colspan="3">연구책임자:</td></tr>
</table>

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 갈음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술요약 정보	소프트웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정보	생물자원	정보	실물
등록·기탁번호	19	3									

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

○ **연구개발 목표 및 성과**

◦ 국내 산업동물에서 막대한 경제적 손실을 유발하는 주요 세포내 기생성 세균(브루셀라 균, 살모넬라 균)의 유전체 분석을 이용하여 핵심 병원성 인자를 규명하고, 이들 병원균의 병원성 인자와 숙주세포와의 상호작용에 기초한 발병기전 및 숙주 내재성 제어기전 해석을 통해 산업동물의 피해를 최소화하며, 예방 및 치료가 어려운 난치성 세균성 질병을 근절하기 위한 토대 구축하고자 본 과제를 수행하였으며, 본 과제 수행을 통해 국제 전문 학술지 (SCI급) 18편, 전문학술지 (학진등재급) 1편의 논문을 투고하였고, 4건이상의 지적재산권(특허등록)과 2건의 기술이전을 수행하였음.

○ **연구내용 및 결과**

◦ 산업동물 주요 세포 기생성 세균의(브루셀라, 살모넬라) 세포 및 동물 감염 시 발현되는 병원성 유전자 발현양상 규명
- 탐식세포 감염시 발현되는 브루셀라 및 살모넬라 균의 병원성 유전자 발현양상 규명
- 실험동물(마우스) 및 목적동물(소/돼지) 감염시 발현되는 브루셀라 및 살모넬라 균의 병원성 유전자 발현양상 규명

◦ 산업동물 주요 세포 기생성 세균의 세포 및 동물 감염 시 나타나는 전사체(transcriptome), 단백체(proteome), 대사체(metabolome) 등 기본적인 오믹스 및 생체분자 상호작용체(interactome)와 RNA 구조체(RNA structure seq) 분석
- 탐식세포 감염시 발현되는 브루셀라 및 살모넬라 균의 오믹스 분석
- 실험동물(마우스) 및 목적동물(소/돼지) 감염시 발현되는 브루셀라 및 살모넬라 균의 오믹스 분석

◦ 산업동물 주요 세포 기생성 세균의 세포 및 동물 감염 시 발현되는 인자를 이용한 진단용 바이오 마커 발굴
- 탐식세포 및 실험동물(마우스) 및 목적동물(소/돼지) 감염시 발현되는 병원성 유전자의 진단적 가치 평가

◦ 산업동물 주요 세포 기생성 세균의 세포 및 동물 감염 시 발현되는 인자와 질병간의 상관관계 및 숙주 제어기전 규명
- 감염 시 발현되는 인자 유도 탐식세포 및 실험동물(마우스) 및 목적동물(소/돼지)의 면역반응 규명
- 감염 시 발현되는 인자 활성 및 억제를 통한 탐식세포 및 실험동물(마우스) 및 목적동물(소/돼지)의 제어기전 규명

◦ 고면역원성 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재 개발
- 시험관내 단백질 합성시스템을 이용한 항원성 최적화
- 주사용/경구용 백신 개발을 위한 단백질 항원 발현 재조합 균주 제작

163

○ **연구성과 활용실적 및 계획** ◦ 균-숙주 상호작용에 기초한 병원성 인자 발굴 및 발병기전 해석 ◦ 산업동물 질병 저감에 의한 농가 소득 증대 ◦ 숙주 내재성 제어기전을 이용한 난치성 세균성 질병 치료방법 개선 및 예방기법 구축 ◦ 세포내 기생성 균의 숙주세포내 침입 및 증식 기전 해석 ◦ 타 감염성 질병의 치료제 개발에 모델 시스템 제공 ◦ 고면역원성 기생성 세균 유발 병원균 제어 단백질 백신 제품 개발 ◦ 300억 달러 규모의 세계 백신시장에서의 경쟁력 확보	

<요약문>

연구의 목적 및 내용	○ 국내 산업동물에서 막대한 경제적 손실을 유발하는 주요 세포내 기생성 세균(브루셀라 균, 살모넬라 균)의 유전체 분석을 이용하여 핵심 병원성 인자를 규명하고, 이들 병원균의 병원성 인자와 숙주세포와의 상호작용에 기초한 발병기전 및 숙주 내재성 제어기전 해석을 통해 산업동물의 피해를 최소화하며, 예방 및 치료가 어려운 난치성 세균성 질병을 근절하기 위한 토대 구축.				
연구개발성과	○ 산업동물 주요 세포 기생성 세균(브루셀라, 살모넬라)의 세포 및 동물 감염 시 발현되는 병원성 유전자 발현양상 규명 - 산업동물 주요 세포 기생성 세균의 세포 및 동물 감염 시 나타나는 전사체(transcriptome), 단백체(proteome), 대사체(metabolome) 등 기본적인 오믹스 분석 - 병원성 인자의 상호작용체(interactome) 분석 - 병원성 관련 RNA 결합단백질의 RNA 구조체(RNA structure seq) 분석 - 병원성 관련 인자 동정 및 생리적 기능 규명 - 병원성 인자의 항원성 탐색 ○ 산업동물 주요 세포 기생성 세균의 세포 및 동물 감염 시 발현되는 인자와 질병간의 상관관계 및 숙주 제어기전 규명 - 기생성 세균에 의한 숙주세포의 생리활성 변화 및 관련인자 규명 - 기생성 세균에 의한 숙주세포의 생리활성 변화 경로 규명 - 진단용 바이오 마커 발굴 ○ 고면역원성 기생성 세균 유발 병원균 제어 단백질 백신 소재 원천기술 개발 - 시험관내 단백질 합성시스템을 이용한 항원성 최적화 - 주사용/경구용 백신 개발을 위한 단백질 항원 발현 재조합 균주 제작				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	○ 균-숙주 상호작용에 기초한 병원성 인자 발굴 및 발병기전 해석 ○ 산업동물 질병 저감에 의한 농가 소득 증대 ○ 숙주 내재성 제어기전을 이용한 난치성 세균성 질병 치료방법 개선 및 예방기법 구축 ○ 세포내 기생성 균의 숙주세포내 침입 및 증식 기전 해석 ○ 타 감염성 질병의 치료제 개발에 모델 시스템 제공 ○ 고면역원성 기생성 세균 유발 병원균 제어 단백질 백신 제품 개발 ○ 300억 달러 규모의 세계 백신시장에서의 경쟁력 확보				
국문핵심어 (5개 이내)	브루셀라균	살모넬라균	병원성 유전자	오믹스분석	바이오마커
영문핵심어 (5개 이내)	Brucella	Salmonella	Virulence factor	Omics analysis	Biomarker

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 ····· 1
2. 연구수행 내용 및 결과 ····· 15
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 ····· 133
4. 연구결과의 활용 계획 등 ····· 136
붙임. 참고 문헌 ····· 137

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

본문 작성요령(제출 시 삭제할 것)

가. 본문의 순서는 장, 절, 1, 가, (1), (가), ①, ㉮ 등으로 하고, 장은 17 포인트 고딕계열, 절은 15포인트 명조계열, 본문은 11 포인트 명조계열로 합니다. 다만, 본문의 내용중 중요부문은 고딕계열을 사용할 수 있습니다.
나. 장은 원칙적으로 페이지를 바꾸어 시작합니다.
다. 본문은 11 포인트 횡으로 작성합니다.
라. 쪽 번호는 하단 중앙에 표기하되, 11 포인트로 합니다.
마. 각주는 해당 쪽 하단에 8포인트로 표기하며, 본문과 구분하도록 합니다.
바. 쪽 수는 편집순서 2의 제출문부터 시작합니다. 이 경우 삽입물이 있을 때에는 그 삽입물의 크기에 관계없이 1면을 한 쪽으로 하여 일련번호를 붙입니다.
사. 한글·한문·영문을 혼용합니다.
아. 뒷면지에 주의문을 넣습니다.
자. 참고문헌(reference) 인용의 경우 본문 중에 사용처를 반드시 표시하여야 합니다.

<뒷면지>

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 00000사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 OOOOO사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

<본문작성 양식>

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

○ 국내 산업동물에서 막대한 경제적 손실을 유발하는 주요 세포내 기생성 세균(브루셀라 균, 살모넬라 균)의 유전체 분석을 이용하여 핵심 병원성 인자를 규명하고, 이들 병원균의 병원성 인자와 숙주세포와의 상호작용에 기초한 발병기전 및 숙주 내재성 제어기전 해석을 통해 산업동물의 피해를 최소화하며, 예방 및 치료가 어려운 난치성 세균성 질병을 근절하기 위한 토대 구축하고자 함. 또한 본 과제 수행에 있어서 단백체 및 전사체 전문 분석 단위과제와(사료첨가제분야 미생물 유전체연구팀 등)의 공동연구 수행으로 보다 우수한 결과도출을 유도하며, 결과물을 분야별 상위 10% 전문 학술지에 2편 이상, 국제 전문학술지 (SCI급) 16편 이상의 논문을 투고하고, 4건 이상의 지적재산권(특허등록) 확보함.

1-2. 연구개발의 필요성

가. 연구의 개요

○ 국내 산업동물에서 막대한 경제적 손실을 유발하는 주요 세포내 기생성 세균(브루셀라 균, 살모넬라 균)의 유전체 분석을 이용하여 핵심 병원성 인자를 규명하고, 이들 병원균의 병원성 인자와 숙주세포와의 상호작용에 기초한 발병기전 및 숙주 내재성 제어기전 해석을 통해 산업동물의 피해를 최소화하며, 예방 및 치료가 어려운 난치성 세균성 질병을 근절하기 위한 토대를 구축 하고자 함.

나. 국내 • 외 연구동향

○ *Brucella* spp. 균과 *Salmonella* spp. 균의 특징 중 하나는 세포내 기생하면서 질병을 유발하는 원인체 중 하나임으로, 숙주세포 내 침입에 관여하는 요인과 숙주세포 내 증식에 관여하는 요인이 병원성 인자로서의 핵심임.

○ *Brucella* spp. 균에 대한 병원성 인자 발굴에 대한 연구는 다양하게 진행되고 있으며 이에 대한 방법으로는 polar mutation 방법, transposon mutation 방법 등 여러 가지가 소개되고 있으나 그중 transposon mutation 방법이 가장 일반적인 방법으로 알려짐.

○ 최근까지 알려진 *Brucella* spp. 균의 병원성 인자로는 Type IV secretion system, zinc uptake system, pyrazinamidase, DNA/RNA metabolism, cytochrome oxidase, stringent response 등이 밝혀졌으나 이외에도 다양한 인자가 있을 것으로 예측되어져 많은 연구가 진행되고 있음.

○ 최근까지 알려진 *Brucella* 균의 세포내 침입에 관여하는 요인으로는 균측 요인으로 Lipopolysaccharide (LPS), Type IV secretion system(virB), stringent response regulator 등이 밝혀졌고, 숙주 세포 측 요인으로는 lipid rafts-associated molecules로서 GPI anchored protein, GM1 ganglioside, cholesterol, scavenger receptor, prion protein 등이 밝

혀졌으나 이외에도 다양한 요인이 작용할 것으로 예상되어져 많은 연구가 진행되고 있음.

○ 미국과 국내의 연구기관에서는 transposon을 이용한 변이주 작성 및 세포내 생존능 등에 대한 작성 변이주의 특성 등에 대한 조사가 진행 되고 있음.

○ 미국과 국내의 연구기관에서는 interferon regulatory factor 1-deficient mice (IRF-1-/- mice)을 이용하여 *B. abortus* 의 virulence을 결정하기 위한 criteria을 설정하였고 (Rajashekara 등, 2005), *B. abortus*에서 intergrase/recombinase xerD와 monofunctional biosynthesis peptidoglycan transglycosylase 유전자가 in vitro 와 in vivo 에서의 병원성의 관련성을 규명 하였음.

○ 프랑스의 한 대학에서는 Siderophore 2,3-dihydroxybenzoic acid가 *B. abortus* 가 세포내에서의 생존에 중요한 역할을 함을 규명하였음.

○ 영국과 미국의 연구소에서는 cyclic b-1,2 glucan이 *Brucella* 균의 세포내 성장에 중요한 병원성 인자의 역할을 규명하였고, *B. abortus*의 유전체 분석 확립과 *B. melitensis, B. suis* 의 sequence 와 비교 분석 하였음.

○ 국내 발생 부르세라병의 발생원인에 대한 역학적 특성분석을 실시하여 왔으나, 부르세라 분리균주의 분자 생물학적 기법을 이용한 전파요인의 규명 등에 대한 연구는 이루어지지 않고 있음.

○ PCR, FPA (Florescence polarized assay) 등을 이용한 부르세라병의 특이적이고 신속한 진단기법을 개발하였거나, 개발중에 있음.

○ 본 연구실을 포함한 몇몇의 연구기관들이 일부 병원체에 대하여 변이주 작성등을 통한 병원성인자 동정, 분석등에 대한 연구가 진행중에 있으나 부르셀라의 숙주와의 감염기전에 분자생물학적인 연구가 아직 진행되지 않고 있음.

○ 한편, 국내 축산업 규모의 외적 성장에도 불구하고 다수의 영세농장과 열악한 시설 등으로 인하여 소모성 질환의 만성적 폐해가 만연되고 있으며, 특히 살모넬라와 같은 소화기성 질환으로 인한 피해는 심각한 수준임

○ 살모넬라 감염증은 인수공통 전염병의 대표적인 원인체 중 하나이며, 사람에서는 식중독과 수계전염병을 유발하고, 동물에서는 다양한 소화기성 질병을 유발하여 막대한 경제적 손질을 초래함

○ 살모넬라 균의 숙주영역은 상당히 넓어, 사람은 물론, 개, 고양이와 같은 애완 동물, 조류, 소, 말, 파충류 등에 이르기까지 거의 모든 동물에 감염하여 질병을 유발하며, 특히 국내 식중독의 20%이상을 차지할 정도로 공중보건학적으로 상당히 중요한 원인체임

○ 살모넬라 균의 특성중 하나는 세포내 기생하는 세균으로 치료가 상당히 어렵고, 항생제 남용에 의한 항생제 내성을 습득하고 있어, 근절에 상당한 어려움을 갖고 있음

○ 이러한 중요성에도 불구하고, 현재까지 국내 축산농가 살모넬라 감염증의 원인체인 살모넬라 속균에 대한 특성 분석 및 병원성 요인에 대한 자료가 미흡하고, 관리프로그램의 부재로 인하여, 농가의 피해는 심각한 수준이며, 이에 대한 대책 마련이 시급한 실정임

○ Ubiquitination에 대한 연구는 선진국에서 시작되어 세포주기, 세포자살, 신호전달, 세포활성화 등 세포조절전반에 걸치는 세포의 post-translation과정을 밝히는 일환으로 2005년 이후 본격적인 연구매개체로 주목받고 있음.

○ 현재 Ubiquitin에 대한 항체가 상업 출시되어 앞으로 이를 이용한 연구가 활발히 진행될 것으로 예상되어지며, 다양한 분야에서 기존에 알려지지 않은 세포의 Ubiquitination,

Deubiquitination에 따른 세포의 분자생물학적인 연구가 이루어질 것으로 전망되어지고 있음.

○ 감염병의 효과적인 관리를 위해서는 원인 병원체의 총체적인 분석을 바탕으로 진단, 백신 및 치료제 개발에 응용될 수 있는 분자 생물학적 표적을 발굴하는 것이 중요함.

○ 최근 대용량 분석 기법의 발달로 병원체에 관한 방대한 양의 생물정보자료가 쏟아져 나오고 있고, 이에 대응하여 생물정보학을 통한 생물정보의 선택적 분석과 관리 시스템 운용의 중요성이 크게 증가하고 있으며, 생물정보학적인 분석 및 관리시스템은 이제 단순한 서열비교 및 기능 예측 분석을 뛰어 넘어 후성 유전체학, 단백체 상호작용 그리고 병원체-숙주 상호작용을 총괄 분석하는 시스템 생물학(System Biology)은 질병의 발병기전 및 치료법 개발에 있어서 핵심적인 학문으로 자리 잡음

다. 연구의 필요성 및 중요성

1) 국내 발병 및 피해 현황

○ 축산업의 연간 총생산액은 약 12조5000억원(2012년 농림수산식품부)에 달하며 그 중에서 양돈 및 양계의 생산액이 약 8조 원에 달하며, 전체 농업에 있어 단일 업종으로는 벼 생산 다음으로 가장 많은 부분을 차지하고 있음 (그림 1).

<그림 1>. 국내 축산업 연간 총 생산액 추이 (2012년 농림수산식품부)

○ 우리나라 축산업은 2010년 기준으로 약 18조원을 차지하며, 그중 돼지산업 (5조 3천억), 한우 (4조 6천억), 양계 (2조 1천억), 오리 (1조 3천억)이며, 축산업은 국민의 식생활 개선과 건강증진에 지대한 기여를 하고 있음 (그림 2; 2013년, 월간 피그).

<그림 2> 우리나라의 종목별 농업 생산액 (2013년, 월간 피그)

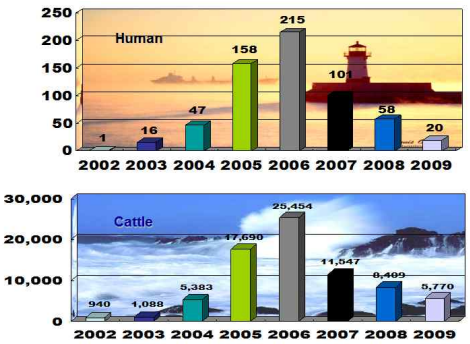
○ 축산농가의 규모가 전업화 • 기업화 • 대형화되고 또한 사육시설이 기계화 및 자동화됨에 따라 관리인 1인당 관리 두수의 증가로 인하여 돼지, 오리 및 닭에 대한 세밀한 관리와 관찰이 어렵기 때문에 질병 발생 가능성이 과거보다 증가된 것으로 판단되며, 전염병 발생 시 대규모로 확산될 가능성이 매우 높아질 것으로 우려됨.

○ *Brucella* 및 *Salmonella* 감염증은 대표적인 인수공통 전염병의 하나이며 국내는 물론 전 세계적으로 공중보건학적, 경제학적 심각한 문제를 야기함

○ 최근 국내에서 본 감염증이 인체와 가축에서도 폭발적인 증가를 보이고 있어 국민적 관심사는 물론 이에 대한 대책이 시급한 실정임 (그림 3).

○ 현재 브루셀라 감염증 진단법의 민감도가 떨어져, 감염된 소의 시중 유통 가능성이 높음.

○ 브루셀라 및 살모넬라균에 감염된 소의 경우 신체 각 부위(특히 간, 비장, 임파절, 혈액 등)에서 균이 높은 농도로 존재하게 되며, 우리나라의 식문화 특성상 육회, 간, 비장, 위 등을 날것으로 섭취하는 경향이 높아 이들 균에 대하여 심각하게 노출되어 있고, 이에 대한 국가적 대책 마련이 시급한 실정임.



<그림 3> 국내 *Brucella* 감염증 발병 추이 (2012 농림축산검역본부, 질병관리본부 통계자료).

2) 병인체 특성

○ 브루셀라균은 **세포내에서 증식**하며 발병을 일으키기 때문에 인체감염의 경우 짧게는 수주에서 길게는 수년간의 항생제 치료가 필요하며, 다량의 항생제 복용으로 인한 후유증 등으로 인하여 치료방법에 대한 개선이 시급한 실정이며, 완치로 판단되었어도 수년 이내에 재발되는 경우가 많아 지속적 관찰이 요구되는 심각한 질병임.

○ 브루셀라 감염증의 원인체는 ***B. abortus***(소), ***B. melitensis***(양, 염소), ***B. canis***(개), ***B. ovis***(양), ***B. suis***(돼지) 등이 보고되고 있고, 모두 인체에 감염하여 심각한 질병을 초래하며, 국내에서 문제가 되고 있는 원인체는 *B. abortus*에 의한 감염이 주를 이루고 있음.

○ 브루셀라 감염증의 증상은 인체에 감염될 경우 **10% 미만의 치사율**을 보이고, 지속적 발열, 두통, 식욕부진, 원기쇠약을 보이다가 **심내막염**, **뇌척수염**, **관절염**등 중증 질병으로 진행하게 되며, 감염된 동물에서 보이는 증상은 특별한 외부 증상이 없이 암컷에서의 태반염, 자궁 내막염 등으로 인한 **유산**과 수컷에서 고환염, 기형정자 등으로 인한 **불임**을 유발함.

○ 특히, 감염축은 특별한 외부 증상 없이 균을 장기간 보균하며, **지속적으로 균을 배출**하여 인체와 건강한 동물에 감염증을 유발함으로써 감염율의 폭발적 증가를 유발함.

○ 브루셀라균의 **세포내 탐식기전 및 세포내 증식기전**에 대한 해석이 미흡하여 본 질병의 **근절이** 어려운 실정임

○ 현재까지 브루셀라 감염증에 대한 **안전한 vaccine과 유효한 치료 방법은 없는 실정임**

○ 브루셀라 감염증의 경우 백신부재 및 면역형성이 어려운 관계로 비면역상태에서 감염이 100%이루어지고 있기 때문에 이러한 비면역상태에서의 연구가 진행되어야 발병기전을 해석할 수 있음.

○ 살모넬라 병은 온혈 및 냉혈동물과 곤충류의 위장관 내에 서식하는 장 내 세균의 일종인 살모넬라 세균에 의하여 일어나는 전염성 질병임

○ 대부분의 살모넬라 균종은 식품이나 환경 등 자연에 널리 서식하나 일부는 특정 숙주에만 적응하는 특징을 보이기도 함

○ 살모넬라균은 식품 중에는 특히 식육을 비롯하여 계란 및 우유 등 축산식품이 살모넬라에 오염되어 있는 경우가 많고 이들 오염식품이 사람의 급성위장염을 일으키는 원인이 되므로 식품위생상 매우 중요한 질병임

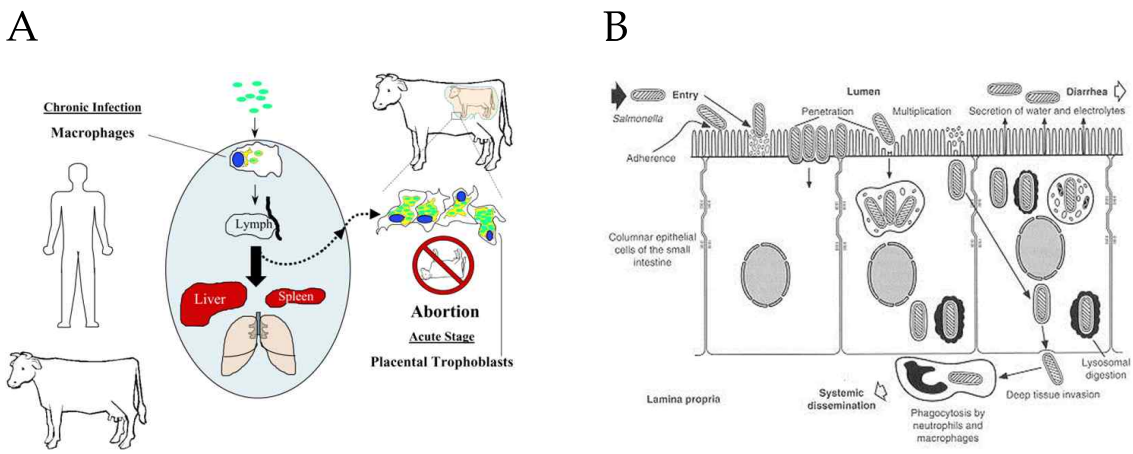
○ *Salmonella* 속 균의 균종 분류는 현재까지도 완전하지 않으며 지금까지 2,400종 이상의 혈청형이 보고되고 있음. 이들 혈청형 중 S. typhymurium은 대부분의 산업동물 (소, 돼지, 닭, 메추리, 오리 등)에 감염보고가 되어 있으며, 돼지를 포함한 국내 산업동물 감염증의 대부분이 본 균에 의해 감염되는 것으로 보고되어 이에 대한 대책 마련이 시급한 실정임 (월간 피그앤포크, 2011).

○ 살모넬라 균은 그람 음성의 간균으로 극소수(*Salmonella* Pullorum 및 *S. Gallinarum*)를 제외하고는 모두가 균체 주위에 편모를 가져 운동성이 있으며 또한 아포를 형성하지 않으며 통성혐기성균으로 분류됨

○ 동물에서 살모넬라는 온혈 동물과 냉혈 동물의 장관 내에 서식하므로 소, 돼지, 닭 등 각종 가축 및 가금과 개 등의 애완동물, 집쥐 및 들쥐 등 설치류, 거북 및 뱀 등의 파충류, 야생 조수류에 감염할 정도로 숙주 영역이 매우 넓음

○ 살모넬라 병은 위장관의 질병이므로 설사(때로 혈액성)가 가장 흔히 관찰되는 임상 증상임

○ 살모넬라균은 자연에 넓게 분포하므로 모든 식품을 오염으로부터 이들 균을 배제하는 것은 사실상 불가능하며, 예방이 어렵기 때문에 이들 균으로부터의 감염기전 및 숙주 내제성 제어기전의 해석은 본 질병으로 인한 피해를 최소화 할 수 있음



<그림 4> 브루셀라 (A) 및 살모넬라 (B) 감염증의 발병기전

3) 차세대 경제동물용 백신 소재 개발의 필요성

○ 세계 가축백신 시장에서 경쟁력을 갖춘 새로운 백신 소재의 개발이 필요함

- 동물약품 세계시장규모는 2008년을 기준으로 볼 때 $17,000 million(약 19조) 수준으로 이중 백신류는 전체 매출액의 약 24%(약 4조원)를 점하고 있음. 시장의 나머지 45%는 동남아시아와 남미, 중동지역 등이 차지하고 있는데, 이 지역들은 주로 가축중심의 백신이 주를 이루며, 현재 동남아시아를 중심으로 점점 동물백신의 시장이 커져가고 있는 상황임.
- 국내 동물의약품 시장은 2008년 기준 5,663억원이고 이중 동물백신시장은 1,171억원으로 시장규모가 작은 편임. 하지만 최근 동물백신시장이 급속히 커지고 있으며, 매년 ~25%의 성장세를 보이고 있음. 이는 항생제에 대한 규제강화로 인한 대체효과와 치료대신 예방이라는 인식의 변화로 인해 최근 동물백신에 대한 수요가 커진 것으로 보여짐.
- 일반적으로 화학제제에 비하여 상대적으로 고가의 제조설비와 전문기술이 요구되는 백신류 제조는 대개 소수의 다국적 선도기업이 주류를 이루는 것이 국제적인 추세로 보여지며 국내상황도 대동소이하여 제조업소는 5개업체에 불과한 반면 수입업은 28개 업소가 등록되어 있음.

○ 기존의 불활화백신 생산기술로 다양한 가축 전염병 변이체 인자에 대해 신속하게 가축을 예방할 수 없으므로 이를 대체할 새로운 백신생산 기술이 필요함

- 2010년 하반기부터 국내에 창궐한 구제역 전염병으로 약 3조원의 물질적인 피해와 이보다 더 심각할 수 있는 환경과 국민정신건강에 대한 피해를 고려해 볼 때, 매년 새로운 변종이 생기는 구제역과 조류인플루엔자 바이러스 등에 신속하게 대처할 수 있는 가축전염병 예방용 백신 개발기술이 절실함.
- 현재 사용되고 있는 동물 질병 백신들은 대부분 불활화백신으로 백신의 투여가 오히려 감염을 초례할 수 있다는 단점을 가지고 있으며, 특히 구제역과 조류인플루엔자 바이러스에 대한 불활화 백신은 연구시설의 부재와 고감염성 가축전염병 관련 연구 규제에 의해 국내 생산이 불가능함.

○ 국가재난형 가축전염병의 효과적인 방제기술의 일부로 새로운 가축용 백신소재의 개발이 절실함

- 기동물용 백신은 가축질병의 예방뿐만 아니라 전 세계적으로 이슈화되고 있는 생물무기

(두창, 탄저균 등), SARS(급성 중증 호흡기 증후군), AI(조류인플루엔자) 등 이른바 Pandemic Zoonosis에 대한 가장 효과적인 관리방안으로 인식되고 있음.

4) 기존연구의 문제점

○ 국내 브루셀라감염증 및 살모넬라 감염증에 의한 피해는 전 세계적으로 가장 심각한 수준임(수천억 이상 추정)

○ 이러한 문제로 인하여 국내의 연구는 진단, 역학 및 예방분야에 집중되어 있으며, 숙주와 균의 상호작용에 기초한 연구는 전무한 실정이며, 기존의 균측 인자 해석에 중점을 둔 발병기전 해석과 감염시 숙주의 반응에 기초한 오믹스 분석은 기초단계로 미흡한 실정이며, 실험동물 및 목적동물 감염 후 나타나는 시스템 생물학(System Biology)분석이 미흡하여 이에대한 대책이 요구되고 있음

○ 브루셀라균 및 살모넬라균은 세포내 기생하며 질병을 유발하기 때문에 숙주와 균의 상호작용에 기초한 연구가 필수적인 사안임

○ 전 세계적으로 브루셀라균 및 살모넬라균의 탐식기전 및 세포내 증식기전에 대한 연구는 진행되고 있으나, 브루셀라균의 탐식세포 내 탐식기전 및 증식기전 연구는 미흡한 실정임

○ 브루셀라균 및 살모넬라균의 숙수 세포 및 감염동물에서 발현되는 병원성 인자 및 발병기전에 대한 연구가 미흡한 실정임

○ 최근 병원체-숙주 상호작용을 총괄 분석하는 시스템 생물학(System Biology)은 질병의 발병기전 및 치료법 개발을 위해 활발하게 진행되고 있으며, 이를 토대로 한 세포내 기생성 세균 감염증 발병기전 해석이 기대되고 있음

○ 선진국의 경우 숙주의 수용체 매개 내재성 제어기전을 이용한 난치성 세균 감염병 치료 및 예방법의 개발에 박차를 가하고 있으며, 이는 감염의학의 획기적 발전을 구축할 것으로 기대 됨

○ 국내의 경우 브루셀라 및 살모넬라 관련 전문가의 부족, 편향된 연구, 정책적 지원 부족 등으로 인하여 본 질병에 의한 피해가 매년 되풀이 되고 있으며, 국민보건에 상당한 위협을 초래하고 있음

5) 연구의 중요성 및 국가 연구개발비 지원의 필요성

○ 국내 브루셀라 및 살모넬라 감염증은 최근 인체감염증 뿐만 아니라 가축에 폭발적으로 증가하여 국민보건을 심각하게 위협하고 있음

○ 국내의 경우 소브루셀라병을 박멸하기 위한 정책으로 브루셀라 양성우에 대한 살처분 (도태) 보상비용을 년간 수 천억원씩 지출하고 있음

○ 국내 브루셀라 및 살모넬라 감염증에 대한 전문가가 극소수에 불과하며, 또한 균주 취급상의 어려움과 위험성으로 인하여 연구를 기피하여 관련 연구자들이 극소수이며, 질병에 대한 이해와 대책 마련은 상당히 미흡한 실정임

○ 2013년 기준 국내에서 사육되고 있는 한우와 육우의 개체수가 2,317,648두이고, 사육농가수가 201,121농가, 축산업관련 종사자 수가 200만 이상이며(2013년 농림수산식품부 통계자료), 육회를 즐겨 먹는 국내의 식문화 등을 감안하면 브루셀라 및 살모넬라로 인한 경제적 손실과 감염 노출로 인한 국민건강의 위협은 실로 심각한 수준임

○ 브루셀라 및 살모넬라 감염증을 근절하는데 있어 그만큼 어렵고 장기간의 대책과 국가적

정책의 뒷받침이 마련될 때 얻어지는 결과임

○ 브루셀라 및 살모넬라 균은 탐식 세포내 침입하고 증식하여 발병하는 특징을 갖고 있는데, 본 균의 침입 및 증식 기전에 대한 정확한 해석은 아직까지 확립되어 있지 않을 뿐만 아니라 유효 치료방법의 부재, 유효 예방법 부재로 인한 본 질병의 근절을 위한 프로그램의 확립 및 정책수립에 상당한 어려움에 직면해 있음

○ 따라서 본 과제의 수행은 브루셀라 및 살모넬라 감염증에 대한 연구에 있어 국제적 경쟁력을 고취할 수 있으며, 이를 토대로 브루셀라 감염증의 발병 기전 및 근절을 위한 확고한 토대가 마련됨

○ 브루셀라 및 살모넬라 감염증의 정확한 이해를 위해서는 균 측 병원성 인자 뿐 아니라 숙주세포와의 유기적 관계를 이해함은 필수적임. 따라서 본 연구팀은 선행연구에서 규명된 균 측 병원성 인자의 해석, 균-숙주 상호작용을 이용한 발병기전, 감염숙주의 내재성 제어기전의 규명이 가능하며, 이는 국가의 경제적, 정책적 지원이 뒷받침이 될 때 가능한 사안임.

1-3. 연구개발 범위

가. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

□ 연구개발의 최종목표

○ 국내 산업동물에서 막대한 경제적 손실을 유발하는 주요 세포내 기생성 세균(브루셀라 균, 살모넬라 균)의 유전체 분석을 이용하여 핵심 병원성 인자를 규명하고, 이들 병원균의 병원성 인자와 숙주세포와의 상호작용에 기초한 발병기전 및 숙주 내재성 제어기전 해석을 통해 산업동물의 피해를 최소화하며, 예방 및 치료가 어려운 난치성 세균성 질병을 근절하기 위한 토대를 구축 하고자 함.

□ 연구개발의 중요내용

○ 산업동물 주요 세포 기생성 세균의(브루셀라, 살모넬라) 세포 및 동물 감염 시 발현되는 병원성 유전자 발현양상 규명

- 탐식세포 감염시 발현되는 브루셀라 및 살모넬라 균의 병원성 유전자 발현양상 규명
- 실험동물(마우스) 및 목적동물(소/돼지) 감염시 발현되는 브루셀라 및 살모넬라 균의 병원성 유전자 발현양상 규명

○ 산업동물 주요 세포 기생성 세균의 세포 및 동물 감염 시 나타나는 전사체(transcriptome), 단백체(proteome), 대사체(metabolome) 등 기본적인 오믹스 및 생체분자 상호작용체(interactome)와 RNA 구조체(RNA structure seq) 분석

- 탐식세포 감염시 발현되는 브루셀라 및 살모넬라 균의 오믹스 분석
- 실험동물(마우스) 및 목적동물(소/돼지) 감염시 발현되는 브루셀라 및 살모넬라 균의 오믹스 분석

○ 산업동물 주요 세포 기생성 세균의 세포 및 동물 감염 시 발현되는 인자를 이용한 진단용

바이오 마커 발굴

- 탐식세포 및 실험동물(마우스) 및 목적동물(소/돼지) 감염시 발현되는 병원성 유전자의 진단적 가치 평가

○ 산업동물 주요 세포 기생성 세균의 세포 및 동물 감염 시 발현되는 인자와 질병간의 상관관계 및 숙주 제어기전 규명

- 감염 시 발현되는 인자 유도 탐식세포 및 실험동물(마우스) 및 목적동물(소/돼지)의 면역반응 규명
- 감염 시 발현되는 인자 활성 및 억제를 통한 탐식세포 및 실험동물(마우스) 및 목적동물(소/돼지)의 제어기전 규명

○ 고면역원성 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재 개발

- 시험관내 단백질 합성시스템을 이용한 항원성 최적화
- 주사용/경구용 백신 개발을 위한 단백질 항원 발현 재조합 균주 제작

나. 과제별(세부・협동) 연구개발의 목표 및 내용

□ 제 1세부: 브루셀라균의 오믹스 분석 및 발병기전 규명(경상대)

○ 브루셀라균의 세포 및 동물 감염 시 발현되는 병원성 유전자 발현양상 규명

- 탐식세포 감염시 발현되는 브루셀라균의 병원성 유전자 및 면역반응 유전자 발현변화 규명
- 실험동물(마우스) 및 목적동물(소) 감염시 발현되는 브루셀라균의 병원성 유전자 및 면역반응 유전자 발현변화 규명

○ 브루셀라균의 세포 및 동물 감염 시 나타나는 유전체(transcriptome), 전사체(transcriptome), 단백체(proteome), 대사체(metabolome) 등 기본적인 오믹스 분석

- 탐식세포 감염시 발현되는 브루셀라 및 살모넬라 균의 오믹스 분석
- 실험동물(마우스) 및 목적동물(소) 감염시 발현되는 브루셀라 및 살모넬라 균의 오믹스 분석

○ 브루셀라균의 세포 및 동물 감염 시 발현되는 인자를 이용한 진단용 바이오 마커 발굴

- 브루셀라균의 탐식세포 및 실험동물(마우스) 및 목적동물(소) 감염시 발현되는 병원성 유전자의 진단적 가치 평가

○ 브루셀라균의 세포 및 동물 감염 시 발현되는 인자와 질병간의 상관관계 및 숙주 제어기전 규명

- 감염 시 발현되는 인자 유도 탐식세포 및 실험동물(마우스) 및 목적동물(소)의 면역반응 규명
- 감염 시 발현되는 인자 활성 및 억제를 통한 탐식세포 및 실험동물(마우스) 및 목적동물(소)의 제어기전 규명

○ 발병인자들의 경제동물 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증 (제2협동과제 공동)

- 진단용 마커로서의 유용성 검사
- 예방용 표적분자로서의 유용성 검사

○ 발병인자들과 상호작용하는 숙주세포 인자들의 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증

- 진단용 마커로서의 유용성 검사 (제2협동과제 공동)
- 예방용 표적분자로서의 유용성 검사

○ 고면역원성 경제동물 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재의 예방/치료용 소재로서의 효능 검증 (제2협동과제 공동)

- 단백질 백신 소재의 안전성/안정성 검사, 편리성 평가

□ 제 1협동: 살모넬라균의 오믹스 분석 및 발병기전 규명(중앙대)

○ 살모넬라균의 세포 및 동물 감염 시 발현되는 병원성 유전자 발현양상 규명

- 탐식세포 감염시 발현되는 살모넬라균의 병원성 유전자 및 면역반응 유전자 발현변화 규명
- 실험동물(마우스) 및 목적동물(돼지) 감염시 발현되는 살모넬라균의 병원성 유전자 및 면역반응 유전자 발현변화 규명
- 살모넬라균 특이적 분비시스템(예, MdsABC 펌프)에 의한 발병기전 규명

○ 살모넬라균의 세포 및 실험동물(마우스) 및 목적동물(돼지) 감염 시 나타나는 유전체(transcriptome), 전사체(transcriptome), 단백체(proteome), 대사체(metabolome) 등 기본적인 오믹스 및 생체분자 상호작용체(interactome)와 RNA 구조체(RNA structure seq) 분석

- 탐식세포 감염시 발현되는 살모넬라 균의 오믹스 분석
- 실험동물(마우스) 및 목적동물(돼지) 감염시 발현되는 살모넬라 균의 오믹스 분석

○ 병원성 관련인자들의 특성 및 생리적 기능 분석

- 병원성 관련인자들의 유전자 결실 또는 과발현 균주 제작
- 병원성 관련인자들의 생화학적 및 생리적 기능 분석

○ 살모넬라균의 세포 및 동물 감염 시 발현되는 인자를 이용한 진단용 바이오 마커 발굴

- 탐식세포 및 실험동물(마우스) 및 목적동물(돼지) 감염시 발현되는 병원성 유전자의 진단적 가치 평가

○ 살모넬라균의 세포 및 동물 감염 시 발현되는 인자와 질병간의 상관관계 및 숙주 제어기전 규명

- 감염 시 발현되는 인자 유도 탐식세포 및 실험동물(마우스) 및 목적동물(돼지)의 면역반응 규명
- 감염 시 발현되는 인자 활성 및 억제를 통한 탐식세포 및 실험동물(마우스) 및 목적동물(돼지)의 제어기전 규명

○ 고면역원성 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재 원천기술 개발

- 시험관내 단백질 합성시스템을 이용한 항원성 최적화
- 주사용/경구용 백신 개발을 위한 단백질 항원 발현 재조합 균주 제작

○ 발병인자들의 경제동물 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증 (제2협동과제 공동)

- 진단용 마커로서의 유용성 검사
- 예방용 표적분자로서의 유용성 검사

○ 발병인자들과 상호작용하는 숙주세포 인자들의 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증

- 진단용 마커로서의 유용성 검사 (제2협동과제 공동)

- 예방용 표적분자로서의 유용성 검사

○ 고면역원성 경제동물 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재의 예방/치료용 소재로서의 효능 검증 (제2협동과제 공동)

- 단백질 백신 소재의 안전성/안정성 검사, 편리성 평가

□ 제 2협동: 기생성 세균의 오믹스 데이터 비교분석 및 진단/예방 원천기술 사업화 탐색 ((주) 인트론바이오테크놀로지)

○ 기생성 세균의 오믹스 데이터 분석 및 표준화

- 세부 및 협동연구기관에서 생산한 다양한 오믹스 데이터의 분석 및 표준화
- 브루셀라균과 살모넬라균의 오믹스 데이터 비교분석

○ 발병인자들의 경제동물 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증

- 진단용 마커로서의 유용성 검사
- 예방용 표적분자로서의 유용성 검사

○ 발병인자들과 상호작용하는 숙주세포 인자들의 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증

- 진단용 마커로서의 유용성 검사
- 예방용 표적분자로서의 유용성 검사

○ 고면역원성 경제동물 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재의 예방/치료용 소재로서의 효능 검증 및 사업화

- 단백질 백신 소재의 안전성/안정성 검사, 편리성 평가
- 단백질 소재의 예방/ 치료용 사업화

다. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	세부 및 협동	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도 (2014)	제1 세부	브루셀라균의 발병 관련 인자의 유전체 분석	○ Microarray를 이용한 탐식세포 감염시 발현되는 브루셀라균의 병원성 유전자 발현양상 규명: professional 및 nonprofessional phagocyte 감염을 통한 감염균의 유전자 발현양상및 및 면역반응 유전자 발현변화 규명 ○ Microarray를 이용한 동물 (마우스) 감염시 발현되는 브루셀라균의 병원성 유전자 발현양상 규명: 마우스 감염을 통한 비장 및 실질장기 내 감염균의 발현 유전자 발현 양상 및 면역반응 유전자 발현변화 규명
	제1 협동	살모넬라균의 유전체 및 발병관련 인자 분석	○ RNA-seq을 이용한 탐식세포 감염시 발현되는 살모넬라균의 병원성 유전자 발현양상 및 및 면역반응 유전자 발현변화 규명 - 병원성 관련인자 및 및 면역반응 유전자 프로파일링 및 탐색 ○ 살모넬라균 특이적 분비시스템(예, MdsABC 펌프)에 의한 발병기전 규명 ○ RNA 안정성 조절인자에 의한 발병기전 규명 - RNA 내부분해효소(예, RNase G)에 의한 병원성 유도 - RNA 내부분해효소 활성조절자(예, RraASt)에 의한 병원성 유도
	제2 협동	기생성 세균의 유전체 분석 표준화 발병인자의 표적화	○ 기생성 세균의 오믹스 데이터 분석 및 표준화 - 세부 및 협동연구기관에서 생산한 다양한 오믹스 데이터의 분석 및 표준화 - 브루셀라균과 살모넬라균의 오믹스 데이터 비교분석
2차년도 (2015)	제1 세부	브루셀라균의 숙주환경에서의 유전체 비교 분석	○ 브루셀라균의 세포 및 동물(마우스)감염 시 나타나는 오믹스 분석 - 탐식세포 감염시 발현되는 브루셀라균의 유전체(genome), 전사체(transcriptome), 단백체(proteome), 대사체(metabolome) 규명 - 동물 감염시 발현되는 브루셀라균의 유전체(geome), 전사체(transcriptome), 단백체(proteome), 대사체(metabolome) 규명 ○ 발병인자들의 경제동물 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증(제 2협동과제 공동) - 진단용 마커로서의 유용성 검사 - 예방용 표적분자로서의 유용성 검사

	제1 협동	살모넬라균의 숙주 환경에서의 유전체 비교 분석 및 병원성 관련인자 분석	○ 살모넬라균의 세포 및 동물 (마우스) 감염 시 나타나는 다양한 오믹스 분석 및 병원성 관련인자 탐색 - 유전체, 전사체, 단백체, 대사체 등 기본적인 오믹스 및 생체분자 상호작용체(interactome)와 RNA 구조체 (RNA structure seq) 분석 ○ 병원성 관련인자들의 특성 및 생리적 기능 분석 - 병원성 관련인자들(분비시스템, RNA 안정성 조절인자)의 유전자 결실 또는 과발현 균주 제작 및 생리적 기능 분석 - 병원성 관련인자들의 정제 및 생화학적 분석 ○ 발병인자들의 경제동물 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증 (제2협동과제 공동) - 진단용 마커로서의 유용성 검사 - 예방용 표적분자로서의 유용성 검사
	제2 협동	기생성 세균의 발병인자의 표적화 탐색	○ 발병인자들의 경제동물 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증(제1 세부, 제 1협동과제 공동) - 진단용 마커로서의 유용성 검사 - 예방용 표적분자로서의 유용성 검사
3차년도 (2016)	제1 세부	브루셀라균의 숙주 환경에서의 유전체 비교 분석 및 바이오 마커 발굴	○ 브루셀라균의 세포 및 목적동물 (소)감염 시 나타나는 오믹스 분석 - 탐식세포 감염시 발현되는 브루셀라균의 유전체(genome), 전사체(transcriptome), 단백체(proteome), 대사체(metabolome) 규명 - 동물 감염시 발현되는 브루셀라균의 유전체(genome), 전사체(transcriptome), 단백체(proteome), 대사체(metabolome) 규명 ○ 브루셀라균의 세포 및 목적동물 감염 시 발현되는 인자를 이용한 진단용 바이오 마커 발굴 - 탐식세포 및 동물 감염시 발현되는 병원성 유전자의 진단적 가치 평가 - 기존 진단법과의 비교분석 (TAT, ELISA, rose-bengal 등) ○ 발병인자들과 상호작용하는 숙주세포 인자들의 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증 (제2협동과제 공동) - 진단용 마커로서의 유용성 검사 - 예방용 표적분자로서의 유용성 검사
	제1 협동	살모넬라균의 유전체 분석 및 발병기전 규명	○ 살모넬라균의 세포 및 목적 동물(돼지)감염 시 발현되는 인자를 이용한 진단용 바이오 마커 발굴 - 탐식세포 및 동물 감염시 발현되는 병원성 유전자의

			진단적 가치 평가 ○ 병원성 관련인자들의 특성 및 상호작용 인자 분석 - 병원성 관련인자들의 정제 및 생화학적 분석 - CLIP(cross-linking and immunoprecipitation), ligand fishing 등을 통한 상호작용인자 동정 ○ 발병인자들과 상호작용하는 숙주세포 인자들의 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증 (제2협동과제 공동) - 진단용 마커로서의 유용성 검사 - 예방용 표적분자로서의 유용성 검사
	제2 협동	발병인자 상호작용 숙주세포 인자들의 표적화 탐색	○ 발병인자들과 상호작용하는 숙주세포 인자들의 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증(제1협동과제 공동) - 진단용 마커로서의 유용성 검사 - 예방용 표적분자로서의 유용성 검사
4차년도 (2017)	제1 세부	브루셀라균의 숙주세포 반응인자 규명 및 활용	○ 브루셀라균의 세포 및 목적동물 (소) 감염 시 발현되는 인자와 질병간의 상관관계 및 숙주 제어기전 규명 - 감염 시 발현되는 인자 유도 탐식세포 및 동물의 cytokine 분비 측정 - 감염 시 발현되는 인자 활성 및 억제를 통한 탐식세포 내 균의 침입 및 증식능력 평가 - 감염 시 발현되는 인자 활성 및 억제를 통한 감염동물 내 균의 침입 및 증식능력 평가 ○ 고면역원성 경제동물 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재의 예방/치료용 소재로서의 효능 검증 (제2협동과제 공동) - 단백질 백신 소재의 안전성/안정성 검사, 편리성평가
	제1 협동	살모넬라균의 숙주세포 반응인자 규명 및 활용	○ 살모넬라균의 세포 및 목적동물 (돼지) 감염 시 발현되는 인자와 질병간의 상관관계 및 숙주 제어기전 규명 - 감염 시 발현되는 인자 유도 탐식세포 및 동물의 cytokine 분비 측정 - 감염 시 발현되는 인자 활성 및 억제를 통한 탐식세포 내 균의 침입 및 증식능력 평가 - 감염 시 발현되는 인자 활성 및 억제를 통한 감염동물 내 균의 침입 및 증식능력 평가 ○ 고면역원성 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재 원천기술 개발 - 시험관내 단백질 합성시스템을 이용한 항원성 최적화 - 주사용/경구용 백신 개발을 위한 단백질 항원 발현 재조합 균주 제작

			○ 고면역원성 경제동물 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재의 예방/치료용 소재로서의 효능 검증 (제2협동과제 공동) - 단백질 백신 소재의 안전성/안정성 검사, 편리성평가
	제2 협동	고면역성 경제동물 기생성 세균 제어 소재 산업화 탐색	○ 고면역원성 경제동물 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재의 예방/치료용 소재로서의 효능 검증(제1협동과제 공동) 및 사업화 - 단백질 백신 소재의 안전성/안정성 검사, 편리성 평가 - 단백질 소재의 예방/ 치료용 제제의 경제성 평가 - 단백질 소재의 예방/ 치료용 사업화

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구개발의 추진전략・방법 및 추진체계

가. 연구개발의 추진전략

○ 정보수집 및 소재개발

- 정기적으로 Internet, 전문 서적, 전문 학술지, 관련 국제 및 국내 학회를 통한 기술정보 수집.
- *Brucella* 및 *Salmonella* 관련 국제 전문가 및 전문 연구소 방문등을 통한 최신 기술 정보를 수집할 계획임.
- 전문가확보를 위해 국제 및 국내 전문가는 학회 및 학술지를 통하여 발표되는 논문을 통하여 전문가와 접촉하고, 국내 전문가는 *Brucella* 및 *Salmonella* 에 대한 연구를 많이 진행하는 국립수의과학검역원 및 국립보건원의 연구원들과 주기적인 접촉을 통한 확보 방안이 마련되어 있고, 국제 전문가는 현재 국제적으로 *Brucella* 및 *Salmonella* 에 대한 연구를 많이 진행하고 있는 University of Wisconsin-Madison 의 Gary Splitter 교수, 미국 NADC(National Animal Disease Center) 의 Steven Olsen 박사, 일본 야마구치 대학의 Masahisa watarai 교수 등에 대하여는 오랫동안 연구주제에 대한 토의 및 공동연구를 수행하고 있고, 이들을 통한 정보 확보 방안이 마련되어 있음.
- 본 연구팀은 지난 10여 년간 *Brucella* 및 *Salmonella* 감염증의 발병 기전 및 숙주세포와의 상호작용에 대하여 연구를 수행하여, 병원성 관련 유전자 및 숙주 수용체를 다수 발견, 규명하여 국제 유수 학회지에 발표한 경험을 바탕으로 소재개발을 진행할 계획임

○ 시료 수집 및 분석

- *Brucella* 및 *Salmonella* 감염증의 발병기전을 해석하기 위한 병원성 유전자 해석을 위해 transposon mutation 방법을 이용하여 수십종의 신규 병원성 인자를 확보하고 있으며, 이를 토대로 microarray/RNA seq 분석이 가능함.

- 세포내 기생성 세균의 발병기전 해석을 위해 *Brucella* 분석은 제 1세부과제에서 수행하며, *Salmonella* 분석은 제1 협동과제에서 수행하고 얻어진 결과는 상호 정보교환을 통해 우수한 결과도출을 유도하도록 하며, 제 2협동과제는 제 1세부과제와 제1협동과제와 공동으로 *Brucella* 및 *Salmonella* 감염증의 진단, 백신개발을 공동으로 수행하여 산업화를 확립함.
- 각 과제 수행을 통해 얻어진 오믹스 데이터 분석 및 표준화는 제2협동과제에서 수행하며, 제1 세부과제 책임하여 상호 정보교환과 정기적 워크샵을 통해 데이터분석의 정확성 및 과학성 등을 평가함.
- 본 연구과제 팀은 최근에 브루셀라균과 살모넬라균의 감염경과에 따른 고면역원성 항원에 대한 분석이 이루어져 있고, 이들 고면역원성 항원의 재조합 단백을 대량 생산 할 수 있는 기술이 확립되어 있어, 균과 숙주의 면역반응 분석이 가능하며, 질병의 발병기전 해석에 상당한 자료를 확보하고 있음. 또한, 대학원생 및 학부학생들이 충분히 트레이닝되어 있어서 본 과제를 충분히 수행할 연구자원이 확보되어 있음.
- *Brucella* 및 *Salmonella* 균은 인수공통전염병으로서 취급상의 주의를 요하는 중요한 병원체로서 고도의 숙달된 기술이 없다면 취급할 수 없는 균의 하나이나, 본 연구팀의 구성원 모두는 수의학의 기본이 되는 병원성 미생물을 취급할 수 있도록 훈련이 되어 있으며, 학부생부터 철저한 교육과 숙련된 기술을 바탕으로 수년간 *Brucella* 및 *Salmonella* 관련 연구를 수행하고 있어 본 과제의 수행이 적합함.

○ 연구네트워크 구축
- 타기관과의 협조방안은 국내의 인수공통전염병 위원회, 국립수의과학검역원, 국립보건원등과 같이 공동 연구를 진행할 수 있는 체제가 구축되어 있고, 외국의 경우 University of Wisconsin -Madison, University of Minnesota, University of Yamaguchi 등과도 공동연구를 추진 할 수 있는 학술 교류협정이 맺어져 있어서 이러한 경로를 통한 협조체제를 구축할 수 있음.
- 국제적 우수한 *Brucella* 및 *Salmonella* 연구그룹과의 교류, 학술 문헌 및 자료를 수집하여 보다 광범위한 데이터를 구축함
- 연구성과 교류와 대국민 홍보 등을 목적으로 하는 심포지엄을 연 1회 개최함.

○ 안전성 및 효능평가
- 각 연구실에서 구축한 소재 및 제형에 대한 실험마우스 기반 파일럿 분석은 경상대학교와 중앙대학교동물 사육실을 사용하여 진행할 계획이며, 동물 사육과 관리에 전문성을 가진 연구원을 본 과제의 수행에 참여시킴.
- 산업화 가능성이 큰 소재는 한국화학연구원 부설 안전성 평가연구소에 위탁하여 진행할 계획임.

○ 제품개발 및 산업화
- 제1세부과제와 제1협동과제에서 도출되는 오믹스 데이터의 비교분석 및 표준화, 발병인자와 숙주세포 반응인자들의 진단/예방/치료용 소재로서의 타당성 및 산업화를 모색하기 위해 (주)인트론바이오테크놀로지가 제2협동과제를 수행함. (주)인트론바이오테크놀로지는 동물용의약품 및 사람 대상 바이오 신약 등의 제품화를 위한 다수의 비임상 및 임상시험을 수행한 바 있는 기업으로, 이러한 경험 및 노하우들이 본 과제를 수행하는데 실질적인 도움이 될 것으로 판단함

나. 연구개발의 추진방법

○ Reagents and antibodies : PAF, AG490, anti-TLR4 antibody, JAK2, ERK1/2(Thr183/Tyr 185), STAT1(Tyr701), p38α, Cdc42, anti-pan-actin, Phalloidin 등 이용하여 브루셀라균의 세포내 감염후 나타나는 신호전달 과정을 확인

○ Bacterial strains and Bacterial culture : *B. abortus*균 및 *S. enterica*균을 모델균주로 이용하며, LB, brucella broth 및 agar에서 계대배양과 기본적인 연구를 진행하며, 다양한 변이체 균주의 특정환경에서의 생리활성 변화를 규명하기 위해 최소배지 등 다양한 배지환경에서 배양

○ Mammalian cell culture : murine macrophage cell line RAW 264.7 cells 이용하며, RPMI 1640 세포배양용 배지에 FBS 10%를 첨가하여 세포를 배양하여 시험에 사용함

○ Mice and Bone marrow-derived macrophages : TLR4, RGS2, PAFR 등 mutants mouse 및 control mice을 이용하며 BMM은 상기마우스의 대퇴골 및 경골로부터 채취하여 이용함

○ Bacterial infection and internalization survival assay : 브루셀라 균의 internalization을 분석하기 위하여, 탐식세포에 균을 감염(MOI 20) 시킨 후 시간의 경과에 따른 세포내 internalization을 측정함. 이를 위해 탐식세포에 균을 감염 시키고, 0분, 15분, 30분 간격으로 gentamicin 포함 배지로 교환하여 외부 균을 사멸시킴. 30분간 incubation 후 탐식세포를 lysis 시키고 lysate를 plate에 도말하여 시간 경과에 따를 internalization을 측정하고, 측정은 3회 반복실험을 통하여 얻어진 평균값을 internalization 균수로 정함.

○ Target molecules inhibition or/and neutralization assay: target molecules 활성을 저해하기 위하여 target specific inhibitor (AG490 등)을 전처리 한 후 브루셀라 균을 감염시켜 세포내 침입 및 증식능을 확인함. Target molecule 유도 브루셀라 균의 탐식기전을 규명하기 위하여 Target molecule에 대한 antibody를 전처리 하여 neutralization 시킨 후 브루셀라 균의 탐식세포 내 침입 및 증식기전 규명함.

○ Phagocytic pathway의 기전 분석: 야생주의 탐식 경로를 분석하기 위하여 균이 세포내 internalization 된 후 형성된 phagosome과 탐식세포의 lysosome과의 fusion을 분석함. 이를 위해 균 감염 후 2시간 incubation 하고, 고정, permeabilization, 균 염색 등을 위의 과정과 동일하게 실시한 후 균을 포함한 phagosome위에 LAMP-1 protein 과의 fusion이 형성되었는가를 측정하고, 탐식경로를 해석하기 위하여 감염시간에 따른 phagosome에 형성된 molecules를(EEA1, Rab5, CathepsinD 등)을 비교 분석하여 감염경로를 해석하고, 균 감염 후 나타나는 숙주세포의 Ubiquitin molecules, MAPKK, MKKs, IKKs 등을 조사하여 post translational modification을 조사함(Kim suk et al. 2004).

○ Immunofluorescence staining, western blot and confocal microscopy: 브루셀라균을 탐식세포에 감염시킨 후 세포내로 침입하지 않은 외부의 균을 제거하기 위해 PBS로 3회 세척을 실시하고 gentamicin이 첨가된 배지로 교환하여 30분간 incubation. 그 이후에 세포와 균은 4% periodate-lysine-paraformaldehyde-sucrose로 고정하고, -20℃의 methanol 처리하여 permeabilization시킴. 그 뒤 앞서 언급한 각각의 항체를 처리하여, 형광현미경 하 탐식세포 내 브루셀라균의 탐식경로 및 탐식기전을 각각의 항체를 이용하여 규명함.

○ Bioinformatics: MIT 대학에서 운영중인 TargetScan 5.1 (http://www.targetscan.org)에서 RGS2의 3‘ UTR에 존재하는 miRNA를 search하고 human, mice 및 rat에서 conserved된

특이적인 miRNA를 동정함. 또한 New York University의 Rajewsky 실험실에서 운영중인 PicTar (http://pictar.mdc-berlin.de)에서 이들 miRNA를 반복하여 검정 함.

○ Construction of miRNA-target validation vector: 본 construct는 네바다 대학교 노승일 교수로부터 분양 받았음(Ro S et al, 2007). 아래 그림에서와 같이 UTR sequence에 XbaI를 사용하여 cloning 함. 2차로 예상되는 각 각의 pre-miRNA 약 90bp를 XmaI를 사용하여 cloning 함. 적절한 E coli에 transformation 후에 Endofree maxi-PREP (QIAGEN 사)를 사용하여 plasmid를 제조함.

○ Small RNA 추출: 각 각의 세포에서 Small RNA의 추출은 mirVana miRNA isolation kit를 사용하여 Ro S. 등의 방법 (2006, 2007)에 따라 분리함. 간단히 설명하면 조직 혹은 적절한 수의 세포에 10 volume의 Lysis/ Binding buffer를 첨가한 후 10분간 얼음에 정체시킨 다음 1/10 volume의 miRNA homogenate Additive를 첨가하여 얼음에서 10분간 반응시킴. 동량의 Phenol/Chloroform extraction과정을 통해 total RNA 분리한 다음 각 각의 filter cartridge를 사용하여 small RNA와 total RNA를 추출하고 spectrophototmeter를 사용하여 RNA 농도를 결정함.

○ Small RNA cDNA libraries의 제조: 각각의 세포에서 분리한 small RNA 0.5 μg에 Ambion사의 1.5 U poly(A) polymerase를 사용하여 polyadenylation 시킴. Phenol/chloroform 추출 후 약 2 μg과 1 μg의 RTQ primer를 혼합하여 65℃에서 10분간 반응후 4℃에서 20분간 annealing 함. 역전사효소에 의해 역전사반응 후 시료는 Quiagen kit를 사용하여 정제후에 conventional PCR 혹은 정량적인 real time PCR를 수행 함 (Ro S et al, 2006).

○ Semi-quantitative RT-PCR analysis of miRNAs: 위에서 제조한 cDNA를 template (25ng/μl)를 사용하여 PCR를 수행 함. 각각의 miRNA에 대한 특이적인 primer와 RTW-UNIr universal reverse primer를 사용하여 PCR 증폭을 실시함.

○ adenoviral miRNA plasmids 제조: 동정된 miRNA를 primary cell에 효율적으로 transfection시키기 위해 각각의 miRNA에 대한 adenoviral construct를 제조함. adenoviral construct는 (주) 바이로메드 의뢰하여 제조하며 GFP 및 YFP 등을 tagging하여 transfection efficiency 확인함 (Ro et al, 2005).

○ miRNA의 knockdown: 위의 실험에서 동정한 각 각의 miRNA을 억제시키기 위해서 우리는 국내의 Panagen 사 및 Ambion 사로부터 miRNA inhibitor를 주문 제작하여 사용할 예정임.

○ shRNA의 전달 및 타겟 miRNA의 knockdown: 본 연구진이 개발한 동물세포로의 핵산전달 시스템(Kim et al., 2010, 2011)을 활용하여 primary cell을 포함한 다양한 숙주세포로의 shRNA 및 타겟 miRNA에 대한 안티센스 DNA의 전달. 이 시스템은 금나노입자를 DNA 올리고(cargo DNA)로 기능화시켜서, 다양한 핵산을 cargo DNA와의 단순한 혼성화(hybridization)을 통해 탑재하고 동물세포에 처리함으로서, 고효율의 transfection 효능이 검증되었음.

○ Western blot: 적절한 cell lysis buffer (PRO-PREP)를 사용하여 세포의 단백질을 분리하여 농도를 결정후 SDS-PAGE 및 blotting을 실시함. Membrane를 blocking 후 숙주 발현 단백질 반응 항체를 첨가후 결합된 단백질 검출함.

○ Fluorocytometry를 이용한 apoptotic activity 측정: cell apoptosis는 annexin V apoptosis

kit (BD)를 사용함. 간단히 설명하면, 세포를 분리후에 annexin V binding buffer에 세포를 부유시킨 다음 PI 및 annexin V 를 첨가하여 실온에서 15분간 반응시킴. FACScan cytometer (BD)를 사용하여 총 10,000개의 세포를 counting하여 세포의 apoptotic 상태를 결정함.

다. 연구개발의 추진체계

2-2. 연구결과

가. 제1세부과제 결과
[경상대학교 - 브루셀라균의 오믹스 분석 및 발병기전 규명]

□ 브루셀라균의 대식세포 감염 후 발현되는 브루셀라균의 병원성 유전자 발현양상 규명

1) 브루셀라균의 대식세포 감염 후 활성되는 유전자 발현양상

○ 3차에 걸친 실험을 통해 브루셀라균의 대식구 감염 후 활성화 되는 유전자 203개가 규명됨

Gene name	Product	Fold change	Brucella control	Brucella infection
B977_00001	hypothetical protein|null	29.49307564	35.3751	1043.3205
B977_00034	biopolymer transporter exbD|null	7.338231038	153.7455	1128.22
B977_00039	efflux transporter, RND family, MFP subunit|null	5.386217042	446.9505	2407.3724
B977_00042	hypothetical protein|null	29.35088917	32.6539	958.421
B977_00043	hypothetical protein|null	14.07495274	353.0705	4969.4506
B977_00045	hypothetical protein|null	8.748060432	396.609	3469.5595
B977_00047	adenylosuccinate synthetase|null	6.245066306	737.4343	4605.3261
B977_00062	protein TolQ|null	6.389339533	246.265	1573.4707
B977_00071	elongation factor P|null	13.32584608	108.1661	1441.4048
B977_00076	50S ribosomal protein L31|null	43.06620997	330.6209	14238.5891
B977_00077	UPF0082 protein|null	9.641976408	189.8009	1830.0558
B977_00081	hypothetical protein|null	7.276761392	148.3032	1079.167
B977_00117	hypothetical protein|null	6.913397034	1898.0089	13121.6891
B977_00118	ferredoxin-2|null	6.804036001	700.6986	4767.5785
B977_00123	50S ribosomal protein L32|null	87.81382727	163.9499	14397.0682
B977_00141	hypothetical protein|null	15.97331925	634.0302	10127.5668
B977_00146	ATP synthase subunit delta|null	5.197661107	102.7238	533.9235
B977_00166	30S ribosomal protein S16|null	19.39215999	89.7983	1741.383
B977_00168	signal recognition particle protein|null	11.68264978	304.0896	3552.5723
B977_00186	GTPase obg|null	5.067895601	114.2887	579.2032
B977_00187	hypothetical protein|null	6.040176535	401.3711	2424.3523
B977_00188	hypothetical protein|null	41.26048246	94.5603	3901.6036
B977_00189	hypothetical protein|null	127.6297389	131.296	16757.2742
B977_00190	50S ribosomal protein L27|null	54.77112059	531.9867	29137.5077
B977_00191	50S ribosomal protein L21|null	56.42092749	810.2253	45713.6629
B977_00218	comF family protein|null	6.214262965	36.7357	228.2853
B977_00219	hypothetical protein|null	7.68482237	89.118	684.856
B977_00242	succinate dehydrogenase, cytochrome b556 subunit|null	8.298598901	176.8754	1467.818
B977_00244	3-isopropylmalate dehydratase large subunit|null	14.62378101	789.8166	11550.105
B977_00264	malate dehydrogenase|null	18.50362345	1140.8462	21109.7885
B977_00324	inorganic pyrophosphatase|null	8.382353469	211.5702	1773.4562
B977_00343	hypothetical protein|null	9.045042212	400.6908	3624.2652
B977_00344	50S ribosomal protein L28|null	40.76676508	206.1278	8403.1636
B977_00347	heavy metal translocating P-type ATPase|null	9.520662815	908.187	8646.5422
B977_00409	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase|null	6.072782247	172.1134	1045.2072
B977_00444	hypothetical protein|null	25.08880453	58.5049	1467.818
B977_00445	translation initiation factor IF-3|null	11.46956248	230.6183	2645.091
B977_00446	hypothetical protein|null	6.862770355	40.1371	275.4517
B977_00447	50S ribosomal protein L35|null	98.31491057	89.118	8761.6282
B977_00448	50S ribosomal protein L20|null	112.4057479	108.8464	12234.961
B977_00449	hypothetical protein|null	131.7087856	40.1371	5286.4087
B977_00486	ribosome maturation factor rimP|null	13.82133737	250.3467	3460.1262
B977_00492	30S ribosomal protein S15|null	48.89129368	544.9122	26641.4624
B977_00493	polyribonucleotide nucleotidyltransferase|null	9.922573755	1777.5975	17638.3423
B977_00511	30S ribosomal protein S20|null	88.95529651	72.1107	6414.6287

B977_00585	hypothetical protein|null	5.597974178	36.7357	205.6455
B977_00596	hypothetical protein|null	8.011783706	104.0844	833.9017
B977_00624	outer membrane autotransporter barrel domain-containing protein|null	8.372011252	144.9018	1213.1195
B977_00647	tryptophanyl-tRNA synthetase|null	5.074774083	195.9235	994.2675
B977_00675	ribonuclease PH|null	8.563206089	155.1061	1328.2055
B977_00676	hypothetical protein|null	6.643050411	58.5049	388.651
B977_00678	nucleoside-triphosphatase|null	9.202351939	179.5965	1652.7102
B977_00707	hypothetical protein|null	10.53958959	374.8397	3950.6566
B977_00708	hypothetical protein|null	31.05129095	308.1713	9569.1167
B977_00709	hypothetical protein|null	42.45035725	110.8873	4707.2055
B977_00710	hypothetical protein|null	65.25414587	487.0876	31784.4853
B977_00728	hypothetical protein|null	19.8296762	185.7192	3682.7516
B977_00771	hypothetical protein|null	44.25747137	1584.3952	70121.3252
B977_00772	hypothetical protein|null	42.57941352	1068.7355	45506.1308
B977_00786	UPF0243 zinc-binding protein|null	5.08440273	40.8174	207.5321
B977_00787	maf-like protein BruAb1_0276|maf-like protein|null	9.684004712	208.849	2022.4947
B977_00788	translation initiation factor IF-1|null	6.621048871	205.4476	1360.2786
B977_00803	urease subunit gamma 1|null	9.70659549	25.851	250.9252
B977_00805	urease subunit beta 1|null	11.84958307	14.9664	177.3456
B977_00812	efflux transporter, RND family, MFP subunit|null	13.50925595	332.6618	4494.0134
B977_00829	efflux pump periplasmic linker BepD|null	12.73349082	174.8345	2226.2535
B977_00837	acetylornithine aminotransferase|null	6.938780474	342.8661	2379.0726
B977_00860	hypothetical protein|null	10.9074269	406.1331	4429.8671
B977_00917	hypothetical protein|null	15.63138715	74.8319	1169.7264
B977_00918	hypothetical protein|null	55.44419602	171.4331	9504.9704
B977_00919	hypothetical protein|null	27.38160597	633.3499	17342.1374
B977_00946	hypothetical protein|null	5.562562938	118.3704	658.4428
B977_00947	hypothetical protein|null	10.93589093	95.9209	1048.9805
B977_00948	hypothetical protein|null	6.458395057	297.967	1924.3886
B977_00962	hypothetical protein|null	9.671510955	1721.1335	16645.9615
B977_00973	50S ribosomal protein L9|null	16.18839175	117.0099	1894.2021
B977_00974	hypothetical protein|null	5.333292187	106.1252	565.9967
B977_00975	30S ribosomal protein S18|null	73.31377495	42.178	3092.2284
B977_00976	30S ribosomal protein S6|null	50.42115572	127.8945	6448.5885
B977_00997	hypothetical protein|null	5.199486373	500.0131	2599.8113
B977_01065	HTH-type transcriptional regulator BetI|null	5.196649517	641.5134	3333.7203
B977_01077	hypothetical protein|null	13.34045143	251.027	3348.8135
B977_01084	hypothetical protein|null	5.700688976	36.7357	209.4188
B977_01085	hypothetical protein|null	5.315501929	16.327	86.7862
B977_01116	hypothetical protein|null	14.05883782	1275.5436	17932.6606
B977_01117	hypothetical protein|null	29.96119888	1159.214	34731.4412
B977_01120	cytochrome c-type biogenesis protein CcmI|null	5.029646103	780.9728	3928.0168
B977_01124	peptidase Do|null	25.82888629	1942.908	50183.1498
B977_01125	hypothetical protein|null	10.51765219	288.4429	3033.7421
B977_01154	dihydrodipicolinate synthase|null	5.324757643	255.1087	1358.392
B977_01158	DNA-directed RNA polymerase subunit omega|null	5.117558255	967.3723	4950.5841
B977_01182	cysteinyl-tRNA synthetase|null	18.76352227	345.5873	6484.435
B977_01198	nucleoside diphosphate kinase|null	18.8923033	134.0171	2531.8917
B977_01205	outer-membrane immunogenic protein|null	12.49089352	15358.9054	191846.4519
B977_01206	hypothetical protein|null	16.72653655	152.3849	2548.8716
B977_01250	hypothetical protein|null	12.09326351	648.9966	7848.4869
B977_01254	ribonuclease D|null	5.871936198	231.9789	1362.1653
B977_01269	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase 1|null	6.167844139	255.1087	1573.4707
B977_01289	30S ribosomal protein S9|null	10.58518518	493.8905	5227.9224
B977_01290	50S ribosomal protein L13|null	28.61832093	368.7171	10552.0643
B977_01293	hypothetical protein|null	9.462397184	216.3322	2047.0212
B977_01301	NADH-quinone oxidoreductase subunit A 1|null	6.571798664	318.3757	2092.301
B977_01327	30S ribosomal protein S4|null	20.92831283	212.9307	4456.2803
B977_01350	acyl carrier protein AcpXL|null	6.440651019	206.8081	1331.9788
B977_01361	nicotinate-nucleotide-dimethylbenzimidazolephosphoribosyltransferase|null	5.631301757	178.236	1003.7007
B977_01387	methylenetetrahydrofolate-tRNA-(uracil-5-)-methyltransferase TrmFO|null	5.682125842	417.698	2373.4126
B977_01397	leucyl/phenylalanyl-tRNA-protein transferase|null	7.501150771	71.4304	535.8102
B977_01427	hypothetical protein|null	5.034054809	761.9247	3835.5707
B977_01455	hypothetical protein|null	5.071187978	23.8102	120.746
B977_01459	hypothetical protein|null	9.18061779	19.7284	181.1189
B977_01463	hypothetical protein|null	27.35058211	217.0125	5935.4182
B977_01464	hypothetical protein|null	21.51495554	2402.1037	51681.1543
B977_01465	hypothetical protein|null	43.12533251	1628.6141	70234.5246

B977_01466	queuine tRNA-ribosyltransferase|null	10.3760125	78.9136	818.8085
B977_01478	hypothetical protein|null	6.008893353	4.0817	24.5265
B977_01486	hypothetical protein|null	9.060751714	99.3223	899.9347
B977_01487	beta-(1-2)glucan export ATP-binding/permease NdvA|null	15.01311789	1155.1323	17342.1374
B977_01532	xanthine phosphoribosyltransferase|null	7.106611613	152.3849	1082.9403
B977_01538	hypothetical protein|null	9.233333124	1652.4242	15257.3831
B977_01557	threonyl-tRNA synthetase|null	12.23857536	492.5299	6027.8643
B977_01558	hypothetical protein|null	6.446571436	308.1713	1986.6483
B977_01629	glutamyl-tRNA synthetase 2|null	5.728811359	93.1997	533.9235
B977_01642	elongation factor Ts|null	5.041263017	459.1957	2314.9263
B977_01662	NADPH-dependent 7-cyano-7-deazaguanine reductase|null	5.800942829	155.7864	903.708
B977_01684	50S ribosomal protein L17|null	33.50416326	235.3803	7886.22
B977_01685	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha|null	25.38497645	585.7296	14868.7321
B977_01686	30S ribosomal protein S11|null	36.72304801	222.4548	8169.2183
B977_01687	30S ribosomal protein S13|null	51.89282623	419.7389	21781.4378
B977_01690	50S ribosomal protein L15|null	6.115112651	491.1693	3003.5556
B977_01691	50S ribosomal protein L30|null	5.76464946	216.3322	1247.0793
B977_01697	50S ribosomal protein L5|null	5.922063879	532.667	3154.488
B977_01698	50S ribosomal protein L24|null	8.349075482	388.4455	3243.1608
B977_01699	50S ribosomal protein L14|null	12.11071319	534.0276	6467.4551
B977_01700	30S ribosomal protein S17|null	10.26641944	328.58	3373.3401
B977_01711	hypothetical protein|null	16.73116348	165.3105	2765.837
B977_01713	elongation factor G|null	15.61426464	1622.4914	25334.0101
B977_01714	30S ribosomal protein S7|null	26.91414504	304.0896	8184.3116
B977_01715	30S ribosomal protein S12|null	42.26931305	278.9189	11789.7103
B977_01719	50S ribosomal protein L7/L12|null	9.166428497	637.4317	5842.9721
B977_01720	50S ribosomal protein L10|null	10.7548998	1020.4349	10974.6751
B977_01724	preprotein translocase, SecE subunit|null	5.689500262	514.9795	2929.976
B977_01743	hypothetical protein|null	6.063515321	1748.3451	10601.1173
B977_01748	hypothetical protein|null	7.229598949	576.2056	4165.7354
B977_01763	hypothetical protein|null	8.20749481	50.3415	413.1776
B977_01791	hypothetical protein|null	8.961519644	364.6354	3267.6873
B977_01792	hypothetical protein|null	36.86063418	548.994	20236.267
B977_01806	hypothetical protein|null	52.33179859	4195.3479	219550.1013
B977_01808	hypothetical protein|null	7.329463485	95.2406	698.0625
B977_01853	acetolactate synthase, large subunit, biosynthetic type|null	10.78740745	1270.7816	13708.4389
B977_01902	hypothetical protein|null	7.988959564	165.3105	1320.6589
B977_01929	hypothetical protein|null	14.86966836	127.8945	1901.7488
B977_01931	hypothetical protein|null	9.041967248	969.4131	8765.4015
B977_01932	hypothetical protein|null	8.523478927	74.1516	632.0296
B977_01934	periplasmic immunogenic protein|null	17.64060783	931.3169	16428.9962
B977_01935	hypothetical protein|null	68.10502795	997.305	67921.4849
B977_01949	cold shock protein CspA|null	9.808050818	446.2702	4377.0408
B977_01951	aspartate aminotransferase|null	10.39078046	929.276	9655.9029
B977_01958	hypothetical protein|null	5.263854101	173.4739	913.1413
B977_01969	hypothetical protein|null	37.863188	1120.4375	42423.3357
B977_01976	hypothetical protein|null	6.607007828	46.2597	305.6382
B977_01986	peptidyl-tRNA hydrolase|null	5.22837424	165.9907	867.8615
B977_02011	hypothetical protein|null	15.03750688	61.2261	920.6879
B977_02017	cation diffusion facilitator family transporter|null	5.013816909	138.0989	692.4026
B977_02069	hypothetical protein|null	7.525756395	149.6638	1126.3333
B977_02087	elongation factor Tu|null	13.32918887	2552.4478	34022.0588
B977_02088	hypothetical protein|null	29.49307564	35.3751	1043.3205
B977_02098	high-affinity zinc uptake system protein znuA|null	10.44661376	131.296	1371.5986
B977_02184	hypothetical protein|null	6.271178697	75.5122	473.5505
B977_02198	tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence|null	7.251051941	326.5392	2367.7527
B977_02199	hypothetical protein|null	31.13177376	277.5583	8640.8822
B977_02200	pentapeptide MXKDX repeat protein|null	491.4306479	74.8319	36774.6891
B977_02201	sigma-70 family RNA polymerase sigma factor|null	37.51720539	109.5267	4109.1357
B977_02215	magnesium-translocating P-type ATPase|null	56.78639838	610.2201	34652.2017
B977_02217	hypothetical protein|null	9.429244174	37.416	352.8046
B977_02218	protein MgtC|null	8.701446162	128.5748	1118.7867
B977_02273	hypothetical protein|null	12.21392697	996.6247	12172.7013
B977_02335	hypothetical protein|null	39.27414578	631.9893	24820.8399
B977_02345	hypothetical protein|null	5.601537201	68.7093	384.8777
B977_02440	30S ribosomal protein S21|null	24.55501498	689.814	16938.3931
B977_02441	hypothetical protein|null	6.944490134	757.1627	5258.1089
B977_02503	hypothetical protein|null	5.093574227	1028.5984	5239.2423

B977_02518	aspartate-semialdehyde dehydrogenase|null	11.04875373	381.6426	4216.6751
B977_02520	peroxiredoxin, Ohr subfamily|null	7.185009376	221.0942	1588.5639
B977_02527	magnesium transporter|null	30.94477924	210.8899	6525.9414
B977_02554	hypothetical protein|null	24.03498457	2.0409	49.053
B977_02646	hypothetical protein|null	6.264711647	228.5774	1431.9715
B977_02696	hypothetical protein|null	12.93848152	172.7936	2235.6868
B977_02725	hypothetical protein|null	12.43508984	778.932	9686.0894
B977_02740	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase|null	5.50428028	178.236	981.0609
B977_02770	hypothetical protein|null	9.655622268	536.7487	5182.6427
B977_02771	hypothetical protein|null	5.611622344	87.0771	488.6438
B977_02774	50S ribosomal protein L33|null	32.00263531	301.3684	9644.583
B977_02803	hypothetical protein|null	8.142921035	31.9736	260.3585
B977_02841	hypothetical protein|null	17.57530805	857.1653	15064.9442
B977_02854	hypothetical protein|null	9.109722708	312.9334	2850.7365
B977_02896	hypothetical protein|null	12.24234632	341.5055	4180.8286
B977_02931	glycerol kinase|null	5.343341383	129.9354	694.2892
B977_02942	hypothetical protein|null	5.806112116	116.3296	675.4227
B977_03054	hypothetical protein|null	9.826239925	2034.0668	19987.2284
B977_03055	FGGY-family pentulose kinase|null	5.114144902	898.663	4595.8928
B977_03102	ribonuclease P protein component|null	8.076331731	100.6829	813.1485

2) 브루셀라균의 대식세포 감염 후 억제되는 유전자 발현양상

○ 3차에 걸친 실험을 통해 브루셀라균의 대식구 감염 후 억제 되는 유전자 103개 규명됨

Gene name	Product	Fold change	Brucella control	Brucella infection
B977_00023	hypothetical protein|null	12.46738855	3716.4238	298.0916
B977_00138	4-hydroxyproline epimerase|null	5.408697029	2459.248	454.684
B977_00139	hypothetical protein|null	8.384493457	2815.72	335.8247
B977_00182	iojap-like ribosome-associated protein|null	5.369096945	50729.2188	9448.3708
B977_00213	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase|null	8.101730835	40184.7251	4960.0173
B977_00217	glutaredoxin 3|null	7.344756637	33395.4318	4546.8398
B977_00224	hypothetical protein|null	6.621647654	4497.3966	679.196
B977_00282	hypothetical protein|null	13.18591365	1268.7407	96.2194
B977_00330	aquaporin Z|null	6.719617348	1495.9575	222.6254
B977_00360	hypothetical protein|null	13.19441613	17275.9623	1309.3389
B977_00361	hypothetical protein|null	15.17319533	715.665	47.1664
B977_00367	hypothetical protein|null	23.20824258	481.6453	20.7532
B977_00402	hypothetical protein|null	5.006659864	13309.1919	2658.2976
B977_00527	hypothetical protein|null	8.458344825	941.5212	111.3127
B977_00528	similar to isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial|isovaleryl-CoA dehydrogenase|null	10.14250531	4324.603	426.3841
B977_00530	overlaps another CDS with the same product name|acetoacetyl-coenzyme A synthetase|null	8.950874721	287.0823	32.0731
B977_00613	sulfate ABC transporter, sulfate-binding protein|null	5.633442451	1551.7413	275.4517
B977_00658	integration host factor subunit beta|null	7.532172973	9350.5849	1241.4193
B977_00659	signal peptide peptidase SppA, 36K type|null	7.059132108	14583.3749	2065.8878
B977_00693	hypothetical protein|null	5.905649428	1738.1407	294.3183
B977_00703	overlaps another CDS with the same product name|acetaldehyde dehydrogenase 2|null	182.3091872	2675623.0842	14676.2932
B977_00704	overlaps another CDS with the same product name|acetaldehyde dehydrogenase 2|null	13.9391387	10598.2366	760.3222
B977_00749	hypothetical protein|null	5.352891959	848.3215	158.4791
B977_00762	hypothetical protein|null	7.211580253	136.058	18.8666
B977_00821	hypothetical protein|null	9.737290345	8101.5726	832.0151
B977_00831	hypothetical protein|null	22.69112059	12757.4767	562.2233
B977_00877	tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence|null	9.099895271	3914.3882	430.1575
B977_00894	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit II|null	5.315513421	1785.0807	335.8247
B977_00933	hypothetical protein|null	14.52064698	13177.2156	907.4813
B977_00956	hypothetical protein|null	5.730746975	17504.5397	3054.4953
B977_00986	cytochrome c oxidase, subunit II|null	5.500128582	9453.3086	1718.7432
B977_00987	cytochrome c oxidase subunit 1|null	6.12985675	5053.8738	824.4685
B977_01181	hypothetical protein|null	7.126548221	38762.9192	5439.2278
B977_01185	protein RarD|null	5.952570857	33028.7555	5548.6539
B977_01232	hypothetical protein|null	5.416773539	15513.3312	2863.9431

B977_01240	hypothetical protein|null	6.062249163	1097.9879	181.1189
B977_01326	hypothetical protein|null	7.196578158	325.8589	45.2797
B977_01351	hypothetical protein|null	8.175017806	987.1007	120.746
B977_01430	hypothetical protein|null	12.95398859	11144.5094	860.3149
B977_01461	hypothetical protein|null	7.817470202	25648.2903	3280.8939
B977_01533	hypothetical protein|null	16.02004685	23484.2881	1465.9313
B977_01569	hypothetical protein|null	5.346722809	2582.3805	482.9838
B977_01570	hypothetical protein|null	25.77311375	72499.8566	2813.0034
B977_01590	hypothetical protein|null	115.124166	149216.15	1296.1323
B977_01607	hypothetical protein|null	5.914035496	1528.6114	258.4718
B977_01651	ATP-dependent Clp protease adapter protein ClpS|null	5.177760836	11927.523	2303.6064
B977_01669	hypothetical protein|null	37.49911402	21507.3656	573.5433
B977_01675	hypothetical protein|null	17.13494484	2359.9257	137.7259
B977_01784	cobalt transporter subunit CbtB (proposed)|null	8.362021467	662.6024	79.2395
B977_01827	hypothetical protein|null	10.57700828	1257.1758	118.8593
B977_01844	hypothetical protein|null	8.858423811	24634.6583	2780.9302
B977_01943	hypothetical protein|null	8.903483555	7256.6525	815.0352
B977_01971	hypothetical protein|null	6.823385906	3359.9519	492.4171
B977_02012	hypothetical protein|null	11.92239498	2091.8915	175.459
B977_02123	hypothetical protein|null	14.66988688	525.8641	35.8465
B977_02171	hypothetical protein|null	9.745400404	12245.2184	1256.5126
B977_02243	type IV secretion system protein virB2|null	5.093189414	999.3459	196.2122
B977_02263	molybdate ABC transporter, permease|null	8.555229442	3066.7469	358.4646
B977_02312	hypothetical protein|null	5.230344981	917.7111	175.459
B977_02322	flagellar basal-body rod protein FlgC|null	11.29810954	63.9473	5.66
B977_02346	hypothetical protein|null	5.525847312	2470.813	447.1374
B977_02361	hypothetical protein|null	5.949569344	471.4409	79.2395
B977_02420	hypothetical protein|null	5.266966593	1719.0926	326.3914
B977_02421	hypothetical protein|null	12.22568609	13931.6571	1139.5399
B977_02427	diguanylate cyclase (GGDEF) domain-containing protein|null	5.081817646	1025.8772	201.8721
B977_02471	hypothetical protein|null	5.369358586	557.1574	103.7661
B977_02473	N-formylglutamate deformylase|null	9.014487706	357.1522	39.6198
B977_02474	histidine ammonia-lyase|null	6.577848574	819.0691	124.5193
B977_02475	imidazolonepropionase|null	9.133906968	2653.811	290.545
B977_02476	formiminoglutamate deiminase|null	7.050396687	1130.6418	160.3657
B977_02480	D-amino acid dehydrogenase small subunit|null	5.737838729	6083.8327	1060.3004
B977_02486	hypothetical protein|null	5.880231586	144.2215	24.5265
B977_02494	formyltetrahydrofolate deformylase|null	7.392991267	2273.5289	307.5249
B977_02495	hypothetical protein|null	48.39689947	63185.3271	1305.5656
B977_02496	hypothetical protein|null	25.21154466	38385.3583	1522.531
B977_02508	hypothetical protein|null	5.083667946	2042.9106	401.8576
B977_02511	thioredoxin|null	5.976900139	15099.0346	2526.2317
B977_02607	hypothetical protein|null	14.39353942	8255.3181	573.5433
B977_02641	hypothetical protein|null	6.209983569	105.4449	16.9799
B977_02644	hypothetical protein|null	10.80678699	1386.4308	128.2926
B977_02661	lectin-like protein BA14k|null	19.01435427	15569.1149	818.8085
B977_02673	hypothetical protein|null	7.630046899	1166.0169	152.8191
B977_02712	hypothetical protein|null	7.035549372	2256.5216	320.7314
B977_02713	hypothetical protein|null	90.68586248	7185.9024	79.2395
B977_02752	hypothetical protein|null	8.445713615	20172.6368	2388.5059
B977_02778	ribonuclease R|null	8.309898808	20820.2728	2505.4785
B977_02865	hypothetical protein|null	8.004870611	1812.2923	226.3987
B977_02869	hypothetical protein|null	5.007429717	4855.9094	969.7409
B977_02916	biofilm growth-associated repressor|null	7.917519798	6363.4318	803.7153
B977_02928	hypothetical protein|null	11.16010219	58196.7612	5214.7158
B977_02929	hypothetical protein|null	5.117703006	8255.3181	1613.0905
B977_02939	hypothetical protein|null	8.232924713	2966.7443	360.3512
B977_02964	hypothetical protein|null	16.68191794	3336.1417	199.9855
B977_02977	hypothetical protein|null	7.389113498	906.1462	122.6326
B977_02978	hypothetical protein|null	17.43895881	361.9142	20.7532
B977_02979	catalase|null	19.26954972	38463.5917	1996.0815
B977_02990	chaperone-like protein hdeA|null	8.039240216	249198.3584	30997.75
B977_03025	hypothetical protein|null	22.1636361	5017.8184	226.3987
B977_03081	hypothetical protein|null	6.710445078	11723.4361	1747.043
B977_03095	hypothetical protein|null	6.751138214	2712.9962	401.8576
B977_03155	hypothetical protein|null	15.90537967	12213.2448	767.8688
B977_03181	hypothetical protein|null	5.817714205	1470.7868	252.8118

□ 브루셀라균의 대식세포 감염 후 발현되는 대식세포의 유전자 발현양상 규명

1) 브루셀라균의 대식세포 감염 후 활성되는 대식세포 유전자 발현양상

○ 브루셀라균의 대식구 감염 후 활성화 되는 대식세포 유전자 328개 규명됨

Gene name	Contig	BMM-Control	BMM-Infection	Fold change
Col19a1	chr. 1	0.0	17.0284	
AC123072.1	chr. 1	0.0	119.1985	
Gm5526	chr. 1	1.8792	6.3856	3.39804172
Stat1	chr. 1	3498.1637	30697.881	8.775427233
9130227L01Rik	chr. 1	0.0	8.5142	
Ifi204	chr. 1	1019.4756	8508.86	8.346310593
RP24-147G7.2	chr. 1	0.0	3.1928	
Gm7329	chr. 1	0.9396	3.1928	3.39804172
Igfbp2	chr. 1	0.9396	3.1928	3.39804172
Plcd4	chr. 1	0.9396	7.4499	7.928799489
Wnt6	chr. 1	16.913	178.7978	10.57161946
Gm29539	chr. 1	0.9396	6.3856	6.79608344
Epha4	chr. 1	29.1279	162.8337	5.590300022
Kcne4	chr. 1	5.6377	18.0926	3.209216524
Gm15433	chr. 1	2.8188	59.5993	21.14350078
Gm7609	chr. 1	7.5169	118.1343	15.715827
Gm2666	chr. 1	1.8792	34.0567	18.12297786
Gm7592	chr. 1	1.8792	18.0926	9.627820349
Gm29371	chr. 1	0.0	7.4499	
Ugt1a6b	chr. 1	171.0088	982.3237	5.744287428
Ugt1a2	chr. 1	0.0	8.5142	
Serpinb2	chr. 1	608.8665	1975.2901	3.24420887
Marco	chr. 1	6136.5853	33179.7648	5.40687747
Ikbke	chr. 1	4188.7762	17553.0492	4.19049583
RP23-304O9.1	chr. 1	1.8792	9.5785	5.097115794
Chil1	chr. 1	2.8188	9.5785	3.398077196
Lad1	chr. 1	22.5506	510.8509	22.65353915
Tnnt2	chr. 1	0.0	9.5785	
Ptgs2	chr. 1	633.2964	2360.5568	3.727412314
Cacna1e	chr. 1	11.2753	114.9415	10.19409683
Ankrd45	chr. 1	0.0	3.1928	
Fmo2	chr. 1	0.0	3.1928	
Sell	chr. 1	1.8792	195.8262	104.2072158
Pyhin1	chr. 1	199.1971	3004.4418	15.08275873
Ifi204	chr. 1	1019.4756	8508.86	8.346310593
RP23-428M4.4	chr. 2	0.0	5.3214	
Il1f9	chr. 2	14.0941	208.5974	14.80033489
Il1f6	chr. 2	1.8792	36.1853	19.25569391
Entpd2	chr. 2	0.0	5.3214	
Adamts13	chr. 2	1.8792	8.5142	4.530757769
Ptges	chr. 2	388.0585	23412.9345	60.33351801
Ass1	chr. 2	1657.47	12060.3379	7.276353659
Lcn2	chr. 2	233.9626	5981.2124	25.56482275
Ttc16	chr. 2	0.0	4.2571	
Traf1	chr. 2	149.3978	1439.9609	9.638434435
Ly75	chr. 2	204.8347	886.5391	4.328070879
Gm13571	chr. 2	1.8792	29.7996	15.85759898
Erich2os	chr. 2	0.0	5.3214	
Ube2l6	chr. 2	828.735	6634.6758	8.005786892
Nr1h3	chr. 2	749.8079	3530.1925	4.708129242
Ehf	chr. 2	0.0	6.3856	
Rasgrp1	chr. 2	61.0746	701.3557	11.48359056
Pla2g4b	chr. 2	2.8188	21.2855	7.551262949
Acoxl	chr. 2	0.9396	4.2571	4.530757769
Gm14023	chr. 2	0.9396	7.4499	7.928799489
Il1a	chr. 2	85.5044	1353.7548	15.8325747
Il1b	chr. 2	56.3765	3052.334	54.14195631
Adam33	chr. 2	36.6447	297.9964	8.132046381
Siglec1	chr. 2	3816.6911	28640.6419	7.504050275
Erv3	chr. 2	0.0	3.1928	

Ism1	chr. 2	0.9396	5.3214	5.663473819
Cst7	chr. 2	25.3694	378.8811	14.93457078
Fam83c	chr. 2	0.9396	4.2571	4.530757769
Mroh8	chr. 2	1.8792	9.5785	5.097115794
Slpi	chr. 2	503.6303	6793.2525	13.48856989
Mmp9	chr. 2	11896.3874	59913.2301	5.036254124
Cd40	chr. 2	105.2362	711.9984	6.7657175
Zbp1	chr. 2	241.4795	8126.7861	33.65414497
Tubb1	chr. 2	1.8792	13.8355	7.362441464
Gm16685	chr. 3	4.698	37.2495	7.928799489
Tnfsf10	chr. 3	32.8863	328.8603	9.999917899
Gm15952	chr. 3	0.0	4.2571	
Slc7a11	chr. 3	197.3179	1936.9763	9.816526022
Arhgef26	chr. 3	0.9396	6.3856	6.79608344
Il12a	chr. 3	0.0	62.7921	
Rapgef2	chr. 3	762.0228	4674.2856	6.134049532
1700113A16Rik	chr. 3	1.8792	13.8355	7.362441464
S100a8	chr. 3	115.5719	1038.7301	8.987739234
S100a9	chr. 3	0.9396	4.2571	4.530757769
Pglyrp3	chr. 3	0.0	4.2571	
6330549D23Rik	chr. 3	0.0	4.2571	
Phgdh	chr. 3	141.8809	634.3065	4.470696901
Kcna3	chr. 3	39.4636	153.2553	3.883459695
Gbp7	chr. 3	146.579	2002.9612	13.66472141
Gbp3	chr. 3	231.1438	5012.7243	21.68660505
Ifi44	chr. 3	1653.7115	29000.3661	17.53653288
Ifi44l	chr. 3	130.6056	1386.7473	10.6178242
Runx1t1	chr. 4	0.9396	5.3214	5.663473819
Ddx58	chr. 4	1324.8485	10145.7114	7.658016294
Gm12505	chr. 4	0.9396	3.1928	3.39804172
Gm12573	chr. 4	8.4565	153.2553	18.12278129
Slc31a2	chr. 4	2819.7661	12222.1074	4.334440151
Orm1	chr. 4	3.7584	93.656	24.91911452
Orm2	chr. 4	0.9396	24.4783	26.05183057
Astn2	chr. 4	2.8188	37.2495	13.21466582
Fam154a	chr. 4	0.0	12.7713	
Ifnb1	chr. 4	0.0	3.1928	
Gm12715	chr. 4	0.0	4.2571	
RP23-406B13.9	chr. 4	0.9396	3.1928	3.39804172
Cyp4a14	chr. 4	0.9396	4.2571	4.530757769
Gm12840	chr. 4	66.7122	422.5163	6.333418775
Artn	chr. 4	1.8792	6.3856	3.39804172
Gm12867	chr. 4	0.0	4.2571	
Mycl	chr. 4	0.9396	3.1928	3.39804172
Spocd1	chr. 4	9.3961	57.4707	6.116441928
1700003M07Rik	chr. 4	4.698	68.1135	14.49840358
Fabp3	chr. 4	263.0905	1179.2141	4.482161462
Gm26624	chr. 4	0.0	7.4499	
Draxin	chr. 4	1.8792	83.0133	44.17480843
Tnfrsf9	chr. 4	36.6447	234.14	6.389464234
Isg15	chr. 4	198.2575	6944.3792	35.02706934
Fzd1	chr. 5	70.4707	216.0474	3.065776273
Gm28685	chr. 5	0.0	7.4499	
Il6	chr. 5	6.5773	124.5199	18.93176531
Gm26647	chr. 5	0.0	6.3856	
4930431F12Rik	chr. 5	0.0	9.5785	
Kit	chr. 5	0.9396	10.6427	11.32684121
Csn3	chr. 5	1.8792	7.4499	3.964399745
Cxcl5	chr. 5	23.4902	543.8433	23.15192293
Cxcl3	chr. 5	19.7318	1792.2352	90.82978745
Cxcl1	chr. 5	67.6518	2720.281	40.21003137
Cxcl2	chr. 5	113.6927	3869.6954	34.03644561
U90926	chr. 5	1.8792	42.5709	22.65373563
Cxcl9	chr. 5	0.0	26.6068	
Cxcl11	chr. 5	0.9396	131.9698	140.4531716
Plac8	chr. 5	24.4298	432.0947	17.6871976
Gbp9	chr. 5	182.2841	1714.5433	9.405885099
Gbp4	chr. 5	22.5506	691.7772	30.67666492
Gbp6	chr. 5	155.9751	7849.011	50.32220528
Gbp11	chr. 5	2.8188	30.8639	10.94930467

Gm26711	chr. 5	0.9396	7.4499	7.928799489
Oasl2	chr. 5	1027.9321	15428.7609	15.00951366
Oasl1	chr. 5	327.9235	5475.6829	16.6980497
Srrm4	chr. 5	0.9396	3.1928	3.39804172
Tbx3	chr. 5	20.6714	62.7921	3.037631704
Oas3	chr. 5	1260.9551	14961.5452	11.86524818
Oas1g	chr. 5	618.2626	5426.7264	8.777381003
Wdr66	chr. 5	29.1279	171.3479	5.882603964
Dnah10	chr. 5	0.0	4.2571	
Upk3b	chr. 5	0.0	6.3856	
Pilra	chr. 5	1398.1379	7262.5967	5.194478098
Ankrd61	chr. 5	0.0	6.3856	
Baiap2l1	chr. 5	2.8188	9.5785	3.398077196
Rxfp2	chr. 5	3.7584	22.3497	5.946599617
Herc6	chr. 6	646.4509	4998.8887	7.732820389
Gm4761	chr. 6	0.0	14.8998	
9530026P05Rik	chr. 6	0.9396	3.1928	3.39804172
Slc6a12	chr. 6	31.0071	229.8829	7.413879402
Clec4e	chr. 6	526.1809	64657.7577	122.8812329
Tead4	chr. 6	0.9396	3.1928	3.39804172
Klrb1c	chr. 6	0.0	7.4499	
Cd69	chr. 6	92.0817	948.267	10.29810484
Olr1	chr. 6	35.7051	181.9906	5.097047761
Klrk1	chr. 6	15.0337	354.4028	23.57389066
Gm20400	chr. 6	1.8792	8.5142	4.530757769
Isg20	chr. 7	46.9804	705.6128	15.01930167
Tarm1	chr. 7	1.8792	43.6352	23.22009366
Gp6	chr. 7	0.0	35.121	
Nlrp2	chr. 7	0.9396	3.1928	3.39804172
Ifitm3	chr. 7	3666.3537	29307.9409	7.993757094
Gipr	chr. 7	0.0	8.5142	
Irf7	chr. 7	1026.9925	36896.205	35.92646003
Ppm1n	chr. 7	8.4565	103.2345	12.20771005
Ceacam19	chr. 7	23.4902	147.9339	6.297685843
Gm26920	chr. 7	0.0	14.8998	
Atp4a	chr. 7	1.8792	7.4499	3.964399745
Ffar2	chr. 7	0.0	8.5142	
Klk9	chr. 7	1.8792	11.707	6.229778629
Spib	chr. 7	10.3357	140.484	13.59211277
Saa3	chr. 7	30706.4166	257818.9906	8.396257823
Mrgpra2b	chr. 7	0.0	3.1928	
Gm8979	chr. 7	0.0	112.8129	
Adm	chr. 7	63.8934	232.0114	3.631226386
Rassf10	chr. 7	11.2753	73.4348	6.51289101
Nupr1	chr. 7	118.3907	497.0153	4.198094107
Mcemp1	chr. 8	15.9734	406.5522	25.45182616
Slc7a2	chr. 8	326.0443	3240.7103	9.93947847
Asb5	chr. 8	2.8188	13.8355	4.90829431
Hp	chr. 8	317.5878	17576.4632	55.34363474
Gm27021	chr. 8	0.9396	4.2571	4.530757769
Mmp3	chr. 9	5.6377	37.2495	6.607215709
9230110C19Rik	chr. 9	0.9396	3.1928	3.39804172
Piwil4	chr. 9	7.5169	25.5425	3.398009818
Mpzl2	chr. 9	1.8792	7.4499	3.964399745
Gsta1	chr. 9	0.0	3.1928	
Rps27a-ps2	chr. 9	0.0	5.3214	
Adamts7	chr. 9	9.3961	36.1853	3.851097796
Gm29408	chr. 9	0.0	14.8998	
4930500F10Rik	chr. 9	0.9396	6.3856	6.79608344
Camp	chr. 9	0.9396	60.6635	64.56311196
Zcwpw2	chr. 9	0.0	3.1928	
Plekhg1	chr.10	11.2753	54.2779	4.813876349
Rgs17	chr.10	0.0	3.1928	
Vnn3	chr.10	8.4565	141.5483	16.73840241
Vnn1	chr.10	0.0	4.2571	
Arg1	chr.10	440.6765	1411.2256	3.202407208
Susd2	chr.10	15.0337	460.8301	30.65313928
Zfp781	chr.10	0.0	19.1569	
Gls2	chr.10	0.0	5.3214	
Gal3st1	chr.11	0.0	3.1928	

Upp1	chr.11	59.1954	1134.5147	19.16558888
Efemp1	chr.11	0.9396	5.3214	5.663473819
Il12b	chr.11	1.8792	125.5842	66.82854406
Ifi47	chr.11	642.6924	4283.6975	6.665237523
Igtp	chr.11	587.2555	5243.6715	8.929114329
Irgm2	chr.11	598.5308	3769.6538	6.298178473
Sox30	chr.11	2.8188	11.707	4.153185753
Csf2	chr.11	0.0	4.2571	
Acsl6	chr.11	2.8188	8.5142	3.02050518
Gria1	chr.11	0.9396	3.1928	3.39804172
Nlrp3	chr.11	491.4154	2967.1922	6.038052939
F930015N05Rik	chr.11	0.9396	3.1928	3.39804172
Smtnl2	chr.11	0.9396	3.1928	3.39804172
Nos2	chr.11	63.8934	1619.823	25.35196124
Ccl2	chr.11	1130.3494	4282.6332	3.788769384
Ccl12	chr.11	35.7051	318.2175	8.912382265
Heatr9	chr.11	0.0	6.3856	
Ccl5	chr.11	141.8809	16283.3719	114.7678926
Wfdc21	chr.11	0.9396	71.3063	75.8900596
Csf3	chr.11	0.9396	195.8262	208.4144317
Dnaic2	chr.11	0.9396	3.1928	3.39804172
Socs3	chr.11	197.3179	2313.7288	11.7258941
Nfkbia	chr.12	1997.6084	9101.6599	4.556278348
4930447C04Rik	chr.12	0.9396	8.5142	9.061515539
Ifi27l2b	chr.12	0.9396	8.5142	9.061515539
Itgb8	chr.12	6.5773	63.8564	9.708603834
Hist1h2bj	chr.13	0.0	3.1928	
1700011B04Rik	chr.13	0.0	4.2571	
Tpbpa	chr.13	0.0	3.1928	
Irx1	chr.13	0.0	3.1928	
Irx2	chr.13	0.9396	3.1928	3.39804172
Nr2f1	chr.13	0.9396	3.1928	3.39804172
Gm2897	chr.14	0.0	3.1928	
Gm3667	chr.14	0.0	3.1928	
Gnrh1	chr.14	0.0	4.2571	
Lrrc63	chr.14	1.8792	7.4499	3.964399745
Olfm4	chr.14	0.0	5.3214	
Pcdh9	chr.14	0.9396	4.2571	4.530757769
Pdzd2	chr.15	5.6377	18.0926	3.209216524
Cdh6	chr.15	1.8792	57.4707	30.58253512
Enpp2	chr.15	169.1296	510.8509	3.020470101
Ly6i	chr.15	5.6377	1325.0195	235.0283804
Ly6a	chr.15	588.1951	4674.2856	7.946828527
Ly6c1	chr.15	3.7584	28.7354	7.645647084
Ly6c2	chr.15	3.7584	75.5634	20.10520434
Apol9a	chr.15	29.1279	128.777	4.421087686
Apol9b	chr.15	11.2753	136.2269	12.08188696
Maff	chr.15	76.1083	229.8829	3.020470829
Sgsm3	chr.15	0.0	15.9641	
Pdzrn4	chr.15	0.9396	3.1928	3.39804172
Amigo2	chr.15	0.9396	4.2571	4.530757769
2310068J16Rik	chr.15	0.9396	3.1928	3.39804172
Socs1	chr.16	28.1883	234.14	8.306283103
Rtp4	chr.16	697.1898	6935.865	9.9483168
Uts2b	chr.16	0.0	14.8998	
Gm5483	chr.16	2.8188	34.0567	12.08198524
Stfa3	chr.16	2.8188	81.949	29.07230027
Ifitm7	chr.16	4.698	32.9925	7.022669221
Nfkbiz	chr.16	1113.4365	5929.0631	5.325012338
Gbe1	chr.16	744.1702	2785.2016	3.742694346
Robo2	chr.16	19.7318	167.0908	8.468097183
Gm21970	chr.16	0.0	13.8355	
Mx1	chr.16	203.8951	5808.8003	28.48916085
Mx2	chr.16	69.5311	1879.5055	27.03114865
Gm15590	chr.17	0.9396	4.2571	4.530757769
Acat3	chr.17	0.9396	12.7713	13.59227331
Sod2	chr.17	2256.0008	35734.0193	15.83954195
Fpr1	chr.17	1655.5908	16321.6857	9.858526455
Fpr2	chr.17	461.3479	9641.2461	20.89799498
Fpr3	chr.17	22.5506	464.0229	20.57696469

Zfp811	chr.17	96.7797	908.8889	9.391317601
H2-Oa	chr.17	0.9396	35.121	37.37867178
Ly6g6f	chr.17	0.9396	17.0284	18.12303108
Tnf	chr.17	1610.4895	10926.8875	6.784823807
H2-Q6	chr.17	2868.6258	13848.316	4.827508698
Ier3	chr.17	367.3871	1554.9024	4.232327156
H2-T23	chr.17	2916.5458	14336.8172	4.915683889
H2-T22	chr.17	1270.3511	7904.3531	6.222179915
Gm6034	chr.17	0.9396	14.8998	15.85759898
Gm20478	chr.17	0.0	4.2571	
H2-M2	chr.17	11.2753	690.713	61.25894655
Ptchd4	chr.17	0.9396	4.2571	4.530757769
Nfkbie	chr.17	463.2272	2006.154	4.330820815
Kpna2-ps	chr.17	0.0	7.4499	
Trem3	chr.17	13.1545	145.8054	11.08407009
Gm7334	chr.17	0.0	24.4783	
Emr4	chr.17	10.3357	55.3422	5.354470428
Lrg1	chr.17	2.8188	18.0926	6.418546899
C3	chr.17	3663.5348	55338.9861	15.10535292
Kcng3	chr.17	0.0	4.2571	
Rnf125	chr.18	0.9396	3.1928	3.39804172
Pcdha10	chr.18	0.0	3.1928	
Pcdhb2	chr.18	0.9396	3.1928	3.39804172
Iigp1	chr.18	37.5844	652.3992	17.35824438
Spink5	chr.18	0.9396	7.4499	7.928799489
Gm4951	chr.18	35.7051	485.3083	13.5921283
Gm5970	chr.18	0.0	15.9641	
Gm4841	chr.18	0.0	8.5142	
F830016B08Rik	chr.18	3.7584	88.3346	23.50324606
Iigp1	chr.18	37.5844	652.3992	17.35824438
Arhgef37	chr.18	6.5773	108.5558	16.50461436
Lipg	chr.18	0.0	3.1928	
F830208F22Rik	chr.18	0.9396	17.0284	18.12303108
9330132A10Rik	chr.18	0.0	3.1928	
Cdc42ep2	chr.19	61.0746	665.1704	10.89111349
Best1	chr.19	0.9396	8.5142	9.061515539
AW112010	chr.19	226.4457	8205.5423	36.23624692
Gm28935	chr.19	0.9396	3.1928	3.39804172
Ms4a4c	chr.19	44.1616	4883.9473	110.5926257
Ms4a4d	chr.19	1.8792	10.6427	5.663420605
Ifit1	chr.19	273.4262	12674.4233	46.35409226
Ifit2	chr.19	593.8328	33417.0976	56.27358004
Ifit3	chr.19	589.1347	24096.1976	40.9009987
I830012O16Rik	chr.19	170.0692	5407.5695	31.79628939
2010002M12Rik	chr.19	9.3961	490.6297	52.21631315
Nfkb2	chr.19	1538.1397	5975.8911	3.885141967
Gm15249	chr.X	0.9396	11.707	12.45955726
Pim2	chr.X	267.7885	2683.0314	10.01921815
Rhox8	chr.X	0.9396	5.3214	5.663473819
Aff2	chr.X	7.5169	51.0851	6.796032939
Gabre	chr.X	0.9396	3.1928	3.39804172
Il2rg	chr.X	785.513	5471.4258	6.96541725
Tsx	chr.X	0.9396	7.4499	7.928799489
Gm7340	chr.X	0.0	7.4499	
Drp2	chr.X	0.9396	3.1928	3.39804172
Il13ra2	chr.X	15.0337	90.4632	6.017360996
Nhs	chr.X	107.1154	652.3992	6.090620023

2) 브루셀라균의 대식세포 감염 후 억제되는 대식세포 유전자 발현양상

○ 브루셀라균의 대식구 감염 후 억제되는 대식세포 유전자 332개 규명됨

Gene name	Contig	BMM-Control	BMM-Infection	Fold change
Prex2	chr. 1	5.6377	0.0	
Slco5a1	chr. 1	9.3961	2.1286	4.414215917
DST	chr. 1	13.1545	0.0	

Gulp1	chr. 1	6.5773	1.0643	6.179930471
Slc40a1	chr. 1	2007.0045	187.312	10.71476734
Gm10561	chr. 1	10.3357	0.0	
Gm26813	chr. 1	23.4902	3.1928	7.357241293
Cd28	chr. 1	504.5699	53.2136	9.481972654
Nyap2	chr. 1	8.4565	1.0643	7.945598046
Gm9747	chr. 1	14.0941	2.1286	6.621300385
Gm6136	chr. 1	11.2753	0.0	
Gbx2	chr. 1	9.3961	1.0643	8.828431833
Ramp1	chr. 1	31.9467	6.3856	5.002928464
RP24-79F8.1	chr. 1	6.5773	0.0	
Gm4204	chr. 1	5.6377	0.0	
Kif14	chr. 1	43.222	4.2571	10.152921
Gm4788	chr. 1	6.5773	1.0643	6.179930471
Rgs2	chr. 1	6562.2281	1352.6906	4.851241001
Gm20631	chr. 1	6.5773	1.0643	6.179930471
Shcbp1l	chr. 1	7.5169	0.0	
Teddm2	chr. 1	7.5169	2.1286	3.531382129
Gm29291	chr. 1	9.3961	0.0	
Serpinc1	chr. 1	14.0941	4.2571	3.31072796
Tnfsf18	chr. 1	6.5773	0.0	
Ildr2	chr. 1	7.5169	1.0643	7.062764258
Pcp4l1	chr. 1	469.8044	93.656	5.016276587
Kcnj9	chr. 1	8.4565	2.1286	3.972799023
Kcnj10	chr. 1	2151.7042	675.8132	3.183874183
Kmo	chr. 1	15.9734	5.3214	3.001728868
Gm16432	chr. 1	48.8597	15.9641	3.060598468
B230369F24Rik	chr. 1	3.7584	1.0643	3.53133515
Cenpf	chr. 1	126.8472	23.414	5.417579226
RP23-82P18.2	chr. 1	28.1883	4.2571	6.621479411
Gm13270	chr. 2	5.6377	1.0643	5.297096683
Plxdc2	chr. 2	2486.205	188.3763	13.19807747
4930447M23Rik	chr. 2	5.6377	0.0	
Sapcd2	chr. 2	6.5773	0.0	
Gm996	chr. 2	38.524	6.3856	6.032949136
Aif1l	chr. 2	4.698	1.0643	4.414168937
AI182371	chr. 2	6.5773	1.0643	6.179930471
Ptgs1	chr. 2	1951.5675	250.1041	7.803020822
Gm13509	chr. 2	8.4565	0.0	
Slc4a10	chr. 2	3.7584	0.0	
Klhl41	chr. 2	5.6377	1.0643	5.297096683
Gm13625	chr. 2	3.7584	0.0	
Itga6	chr. 2	2667.5495	850.3539	3.136987435
Gpr155	chr. 2	1056.1203	173.4765	6.087973299
Ttc30a2	chr. 2	5.6377	0.0	
Ypel4	chr. 2	13.1545	0.0	
Bmf	chr. 2	286.5807	88.3346	3.24426329
Disp2	chr. 2	5.6377	0.0	
Capn3	chr. 2	32.8863	9.5785	3.433345513
Gm26899	chr. 2	18.7922	3.1928	5.885805563
Gm14046	chr. 2	5.6377	0.0	
Slc4a11	chr. 2	7.5169	2.1286	3.531382129
Slc24a3	chr. 2	260.2717	48.9565	5.316386997
Cfap61	chr. 2	3.7584	0.0	
Dusp15	chr. 2	7.5169	1.0643	7.062764258
Efcab8	chr. 2	3.7584	0.0	
Tox2	chr. 2	18.7922	1.0643	17.65686367
Gm14302	chr. 2	3.7584	0.0	
Gm14439	chr. 2	5.6377	0.0	
Gm14288	chr. 2	77.9875	0.0	
Gm14406	chr. 2	6.5773	0.0	
Dnajc5b	chr. 3	3.7584	0.0	
RP24-393I15.4	chr. 3	5.6377	0.0	
DNAJC19;	chr. 3	5.6377	0.0	
Slc25a31	chr. 3	5.6377	0.0	
Trpc4	chr. 3	7.5169	2.1286	3.531382129
P2ry12	chr. 3	279.0638	44.6995	6.243107865
Gm20691	chr. 3	6.5773	0.0	
Bche	chr. 3	6.5773	1.0643	6.179930471
Gm10702	chr. 3	7.5169	1.0643	7.062764258

Gm16740	chr. 3	6.5773	1.0643	6.179930471
AC092202.4	chr. 3	10.3357	2.1286	4.85563281
Cd2	chr. 3	3.7584	1.0643	3.53133515
Tspan2	chr. 3	9.3961	1.0643	8.828431833
Fam19a3	chr. 3	12.2149	0.0	
Adora3	chr. 3	4.698	0.0	
Slc16a4	chr. 3	5.6377	1.0643	5.297096683
Gm12522	chr. 3	3.7584	0.0	
S1pr1	chr. 3	7149.4836	1923.1407	3.717608181
Lef1	chr. 3	7.5169	2.1286	3.531382129
Slc9b2	chr. 3	145.6394	44.6995	3.25818857
Adh1	chr. 3	4.698	1.0643	4.414168937
Mcoln3	chr. 3	5.6377	0.0	
Eltd1	chr. 3	62.0142	18.0926	3.427600234
Depdc1a	chr. 3	33.8259	4.2571	7.945761199
4930412C18Rik	chr. 4	5.6377	1.0643	5.297096683
Fsbp	chr. 4	17.8526	0.0	
Gm10604	chr. 4	3.7584	0.0	
4930412L05Rik	chr. 4	3.7584	1.0643	3.53133515
Cyp2j9	chr. 4	44.1616	11.707	3.772238831
Gm12750	chr. 4	7.5169	0.0	
Zmynd12	chr. 4	5.6377	1.0643	5.297096683
Maneal	chr. 4	20.6714	3.1928	6.474379855
Gm12928	chr. 4	11.2753	0.0	
Gm13033	chr. 4	3.7584	0.0	
Gm29294	chr. 4	262.1509	87.2704	3.0038925
RP23-332E2.7	chr. 4	4.698	0.0	
RP23-426N4.8	chr. 4	5.6377	1.0643	5.297096683
Fbxo2	chr. 4	8.4565	2.1286	3.972799023
Plch2	chr. 4	9.3961	1.0643	8.828431833
Lrrc17	chr. 5	3.7584	1.0643	3.53133515
Nos3	chr. 5	3.7584	1.0643	3.53133515
Asb10	chr. 5	24.4298	1.0643	22.95386639
Gareml	chr. 5	5.6377	1.0643	5.297096683
Cenpa	chr. 5	377.7228	44.6995	8.450269019
Gm9903	chr. 5	8.4565	1.0643	7.945598046
Zfyve28	chr. 5	305.3729	58.535	5.216928333
Gm15513	chr. 5	97.7193	26.6068	3.672719004
Yipf7	chr. 5	11.2753	0.0	
Abcg3	chr. 5	101.4778	13.8355	7.334595786
RP24-116M4.4	chr. 5	4.698	1.0643	4.414168937
Gm17122	chr. 5	4.698	0.0	
Gm10401	chr. 5	16.913	0.0	
Ccdc63	chr. 5	3.7584	0.0	
Fkbp6	chr. 5	4.698	0.0	
Smok3a	chr. 5	3.7584	0.0	
Nxpe5	chr. 5	464.1668	122.3914	3.792478883
Slc46a3	chr. 5	280.0034	23.414	11.95880243
Gm29264	chr. 5	7.5169	0.0	
Pdk4	chr. 6	115.5719	27.6711	4.176628323
Kcp	chr. 6	26.3091	7.4499	3.531470221
Plxna4	chr. 6	148.4582	18.0926	8.205465218
Dgki	chr. 6	31.9467	10.6427	3.001747677
Rpl30-ps1	chr. 6	69.5311	19.1569	3.629559062
Klrg2	chr. 6	6.5773	1.0643	6.179930471
Hoxa11	chr. 6	7.5169	1.0643	7.062764258
Pde1c	chr. 6	159.7335	5.3214	30.01719472
Eva1a	chr. 6	20.6714	4.2571	4.85574687
Gm17034	chr. 6	10.3357	1.0643	9.711265621
Slc4a5	chr. 6	7.5169	1.0643	7.062764258
Cd207	chr. 6	50.7389	8.5142	5.959326772
Gm28720	chr. 6	6.5773	1.0643	6.179930471
Lmod3	chr. 6	8.4565	1.0643	7.945598046
Tuba8	chr. 6	5.6377	0.0	
Cdca3	chr. 6	182.2841	43.6352	4.177455357
Cd4	chr. 6	168.19	47.8923	3.51183802
Cd9	chr. 6	4098.5737	1138.7718	3.599117663
Clec7a	chr. 6	726.3176	161.7695	4.489830283
1700101I11Rik	chr. 6	7.5169	1.0643	7.062764258
Emp1	chr. 6	6890.1516	1025.9589	6.715816394

Eps8	chr. 6	107.1154	11.707	9.149688221
Rep15	chr. 6	6.5773	0.0	
Gm20504	chr. 7	5.6377	0.0	
Pnmal2	chr. 7	5.6377	1.0643	5.297096683
Cyp2s1	chr. 7	4.698	0.0	
Thap8	chr. 7	5.6377	0.0	
Gm21982	chr. 7	35.7051	0.0	
Cebpa	chr. 7	3440.8475	886.5391	3.881213474
Rps12l1	chr. 7	1251.559	325.6674	3.8430589
AU020206	chr. 7	483.8986	146.8696	3.294749901
Fsd2	chr. 7	15.9734	3.1928	5.002944124
Gm15501	chr. 7	49.7993	0.0	
Slco2b1	chr. 7	41.3428	1.0643	38.84506248
Xrra1	chr. 7	12.2149	3.1928	3.825764219
Ucp3	chr. 7	9.3961	0.0	
Dnajb13	chr. 7	15.0337	2.1286	7.062717279
Trpc2	chr. 7	18.7922	0.0	
Hbb-bh1	chr. 7	5.6377	1.0643	5.297096683
Mrvi1	chr. 7	5.6377	1.0643	5.297096683
Xylt1	chr. 7	490.4758	112.8129	4.347692507
Chp2	chr. 7	31.9467	1.0643	30.01663065
Sult1a1	chr. 7	235.8418	41.5066	5.682031291
Gm15676	chr. 7	5.6377	0.0	
Itgax	chr. 7	545.9127	174.5407	3.127710041
Rgs10	chr. 7	2556.6756	717.3198	3.564206091
Fgfr2	chr. 7	31.9467	6.3856	5.002928464
Stk32c	chr. 7	4.698	0.0	
Gm4459	chr. 7	4.698	0.0	
Gm15542	chr. 7	28.1883	5.3214	5.297158642
Mrpl23	chr. 7	24.4298	6.3856	3.825764219
Kcnq1	chr. 7	10.3357	1.0643	9.711265621
Gas6	chr. 8	2660.9722	614.0853	4.33322895
Lrp2bp	chr. 8	8.4565	1.0643	7.945598046
Lpl	chr. 8	30790.0417	6359.0292	4.841940606
Mef2b	chr. 8	3.7584	0.0	
Pde4c	chr. 8	7.5169	0.0	
Ankle1	chr. 8	23.4902	1.0643	22.0710326
Rnf150	chr. 8	2733.3221	238.3971	11.46541674
Gm10645	chr. 8	10.3357	0.0	
Gm10643	chr. 8	11.2753	2.1286	5.297049704
Rps26-ps1	chr. 8	3.7584	0.0	
Gm17344	chr. 8	56.3765	1.0643	52.97049704
Gm6793	chr. 8	3.7584	1.0643	3.53133515
RP23-246H16.1	chr. 8	10.3357	3.1928	3.237189927
Cbfa2t3	chr. 8	20.6714	0.0	
Mmp12	chr. 9	20739.0461	4440.1456	4.67080316
Fat3	chr. 9	309.1313	67.0492	4.610514369
Gm26592	chr. 9	5.6377	0.0	
Fez1	chr. 9	4.698	0.0	
Grik4	chr. 9	7.5169	0.0	
Cadm1	chr. 9	7711.3697	2007.2183	3.841819148
2700012I20Rik	chr. 9	9.3961	2.1286	4.414215917
Pif1	chr. 9	13.1545	1.0643	12.35976698
Ccnb2	chr. 9	97.7193	21.2855	4.590885814
Gm10642	chr. 9	12.2149	3.1928	3.825764219
Fam214a	chr. 9	1088.067	170.2836	6.389734537
Myo5c	chr. 9	4.698	1.0643	4.414168937
Gm8093	chr. 9	6.5773	1.0643	6.179930471
Cd109	chr. 9	627.6587	187.312	3.350872875
Ttk	chr. 9	111.8135	24.4783	4.567862147
Slc9a9	chr. 9	2707.9527	276.7109	9.786216228
Paqr9	chr. 9	93.0213	19.1569	4.855759544
Bfsp2	chr. 9	6.5773	1.0643	6.179930471
Tmie	chr. 9	8.4565	2.1286	3.972799023
Vipr1	chr. 9	12.2149	2.1286	5.738466598
Kif15	chr. 9	127.7868	35.121	3.638472709
Tmem158	chr. 9	36.6447	4.2571	8.607902093
Ccr1l1	chr. 9	11.2753	1.0643	10.59409941
Ccr3	chr. 9	100.5381	31.9282	3.148880927
Myct1	chr.10	11.2753	1.0643	10.59409941

Il22ra2	chr.10	3.7584	0.0	
Arhgap18	chr.10	3963.27	935.4957	4.236545395
Mical1	chr.10	609.8061	144.7411	4.213081841
Chst3	chr.10	67.6518	7.4499	9.080900415
S100b	chr.10	10.3357	0.0	
Gm3055	chr.10	15.0337	0.0	
Stab2	chr.10	83.6252	11.707	7.143179294
Kitl	chr.10	93.0213	8.5142	10.92543046
Gpr182	chr.10	7.5169	2.1286	3.531382129
Pik3ip1	chr.11	247.1171	53.2136	4.643871116
Havcr2	chr.11	1996.6688	444.866	4.488247697
Gm12248	chr.11	9.3961	2.1286	4.414215917
Fam64a	chr.11	58.2558	12.7713	4.561462028
Aspa	chr.11	9.3961	0.0	
Gm10392	chr.11	14.0941	2.1286	6.621300385
Omg	chr.11	6.5773	2.1286	3.089965235
Tbx2	chr.11	7.5169	1.0643	7.062764258
Ppm1e	chr.11	37.5844	7.4499	5.044953624
Tmem100	chr.11	6.5773	0.0	
Srcin1	chr.11	6.5773	2.1286	3.089965235
Igfbp4	chr.11	4737.5077	1022.766	4.632054351
Jup	chr.11	135.3037	34.0567	3.972895201
Abca9	chr.11	21.611	3.1928	6.768667001
Sox9	chr.11	6.5773	1.0643	6.179930471
Cd300lb	chr.11	7452.0376	1801.8136	4.135853786
Trim47	chr.11	541.2147	176.6693	3.063433771
St6galnac2	chr.11	8.4565	1.0643	7.945598046
Gm26508	chr.11	21.611	0.0	
Nptx1	chr.11	78.9271	4.2571	18.54010946
Myadml2	chr.11	5.6377	0.0	
Map3k9	chr.12	559.0673	139.4197	4.009959138
Acot1	chr.12	22.5506	3.1928	7.062954147
Unc79	chr.12	5.6377	0.0	
Gm26912	chr.12	21.611	4.2571	5.076460501
Jag2	chr.12	25.3694	6.3856	3.972907793
Ighm	chr.12	1120.0137	278.8394	4.016698142
Hist1h2ae	chr.13	7.5169	0.0	
Gm26735	chr.13	41.3428	4.2571	9.71149374
Rnf144b	chr.13	533.6978	103.2345	5.169762047
Susd3	chr.13	1662.168	457.6373	3.632064082
Mxd3	chr.13	23.4902	4.2571	5.517887764
Gm26965	chr.13	10.3357	0.0	
Lrrc14b	chr.13	6.5773	0.0	
Sv2c	chr.13	6.5773	0.0	
Rgs7bp	chr.13	8.4565	0.0	
Rps3a3	chr.13	5.6377	1.0643	5.297096683
Dnase1l3	chr.14	11.2753	2.1286	5.297049704
Plau	chr.14	9110.4472	2419.0918	3.766060966
Hesx1	chr.14	7.5169	2.1286	3.531382129
Peli2	chr.14	724.4384	233.0757	3.108167861
A930018M24Rik	chr.14	4.698	0.0	
Rnase6	chr.14	22.5506	7.4499	3.026966805
Atp8a2	chr.14	8.4565	1.0643	7.945598046
Sox7	chr.14	127.7868	35.121	3.638472709
Rcbtb2	chr.14	8720.5096	1276.0629	6.833918297
Lpar6	chr.14	1988.2123	503.401	3.949559695
Gpr183	chr.14	231.1438	22.3497	10.34214329
Gm9522	chr.15	9.3961	2.1286	4.414215917
Anxa13	chr.15	4.698	1.0643	4.414168937
Npcd	chr.15	8.4565	0.0	
Pdgfb	chr.15	1874.5196	575.7715	3.255665833
Mapk12	chr.15	6.5773	1.0643	6.179930471
Abcd2	chr.15	450.0726	96.8488	4.647167544
Slc38a4	chr.15	3.7584	0.0	
Pou6f1	chr.15	15.0337	2.1286	7.062717279
Smagp	chr.15	634.236	134.0984	4.729631375
Gm26675	chr.16	47.9201	0.0	
Gm15983	chr.16	7.5169	1.0643	7.062764258
Shisa9	chr.16	23.4902	3.1928	7.357241293
Ypel1	chr.16	48.8597	10.6427	4.590912081

Gm10241	chr.16	44.1616	0.0	
BC106179	chr.16	6.5773	1.0643	6.179930471
4632428C04Rik	chr.16	4.698	1.0643	4.414168937
Itgb5	chr.16	16593.4919	4381.6106	3.787075899
Epha3	chr.16	4.698	0.0	
Gm7976	chr.16	11.2753	1.0643	10.59409941
Zdhhc14	chr.17	1676.2622	444.866	3.768015987
Tmem181c-ps	chr.17	6.5773	1.0643	6.179930471
Gm3355	chr.17	3.7584	0.0	
Tcte3	chr.17	3.7584	0.0	
Prss29	chr.17	8.4565	1.0643	7.945598046
Neurl1b	chr.17	15.9734	1.0643	15.0083623
Pram1	chr.17	173.8276	40.4424	4.298152434
Btnl2	chr.17	3.7584	0.0	
Msh5	chr.17	459.4687	101.1059	4.544430147
G6b	chr.17	7.5169	2.1286	3.531382129
Spdya	chr.17	8.4565	1.0643	7.945598046
Rasgrp3	chr.17	183.2237	7.4499	24.59411536
Plekhh2	chr.17	92.0817	18.0926	5.089467517
Epas1	chr.17	345.7761	106.4273	3.248941766
Gm26734	chr.17	5.6377	0.0	
Dsc2	chr.18	7.5169	1.0643	7.062764258
Pcdhgc4	chr.18	208.5932	20.2212	10.3155698
Slc14a1	chr.18	35.7051	8.5142	4.193594231
Gm17552	chr.19	12.2149	2.1286	5.738466598
RP24-245M20.4	chr.19	15.9734	0.0	
RP24-458F14.4	chr.19	9.3961	0.0	
Trpm3	chr.19	3.7584	0.0	
Mamdc2	chr.19	67.6518	6.3856	10.59443122
Tmem252	chr.19	8.4565	0.0	
Pgm5	chr.19	114.6323	23.414	4.895887076
Prkg1	chr.19	21.611	4.2571	5.076460501
1500017E21Rik	chr.19	8.4565	0.0	
Entpd1	chr.19	1629.2817	183.0549	8.900508536
Arhgap19	chr.19	485.7778	58.535	8.298928846
Gm19557	chr.19	11.2753	3.1928	3.531477073
Gpr34	chr.X	53.5577	6.3856	8.387261964
Gpr82	chr.X	10.3357	0.0	
Slc9a7	chr.X	252.7548	83.0133	3.04475066
AW822252	chr.X	5.6377	0.0	
Vsig4	chr.X	65.7726	4.2571	15.45009514
Col4a5	chr.X	72.3499	12.7713	5.665038015
Kctd12b	chr.X	677.458	109.6201	6.180052746
Gm15157	chr.X	9.3961	0.0	
Gm15201	chr.X	3.7584	1.0643	3.53133515
Arhgap6	chr.X	240.5399	63.8564	3.766887892
mt-Atp6	mito	3119.5013	531.0721	5.873969467
mt-Co3	mito	3377.8937	650.2706	5.194596988

□ 브루셀라균의 대식세포 감염 후 발현되는 대식세포 면역반응인자의 특성규명

1) 브루셀라균 감염 후 발현되는 NF-kB 특성 분석

○ 브루셀라균의 대식구 감염 후 발현되는 대식구의 NF-kB의 활성이 증대됨을 확인함 (그림 5)

그림 5. 브루셀라 감염에 따른 NF-kB의 활성이 확인됨

○ 브루셀라균의 대식구 감염 후 발현되는 대식구의 NF-kB의 활성이 브루셀라균의 세포내 사멸에 중요한 역할을 담당함 (그림 6)

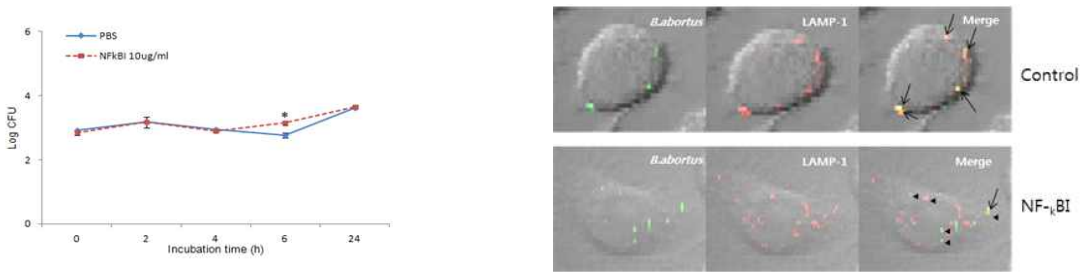


그림 6. 브루셀라 감염에 따른 NF-kB의 활성으로 인해 대식구내 균포섭 phagosom이 lysosome과 융합이 증가됨이 확인 됨

○ 브루셀라균의 대식구 감염 후 대식구의 NF-kB의 활성이 유도되어 초기 브루셀라 균을 억제 하는데 있어 NF-kB가 세포의 세포질로 분포하며 균의 세포내 증식을 억제하는 것으로 나타남(그림 7)

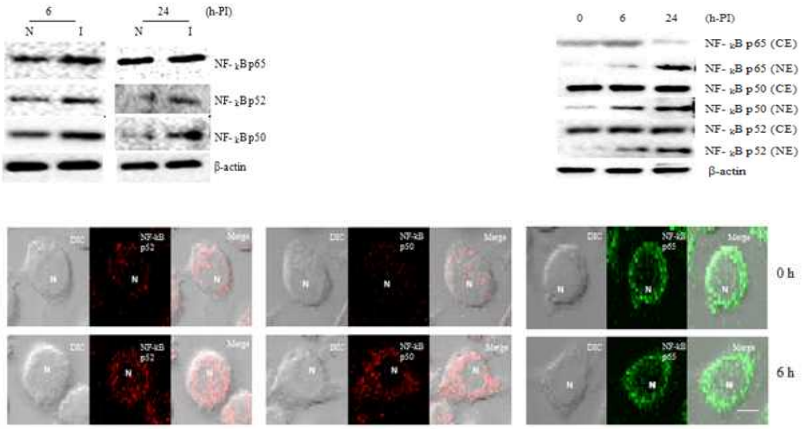


그림 7. 브루셀라 감염에 따른 대식구내 NF-kB의 활성과 핵에서 세포질로의 이동이 균 감염에 의해 유도됨이 확인 됨

□ 브루셀라균의 대식세포 감염 후 발현되는 브루셀라균의 병원성 유전자 발현양상 규명

1) 대식세포 감염 후 활성되는 브루셀라 균의 유전자 발현양상

○ 3차에 걸친 실험을 통해 브루셀라균의 마우스 유래 대식구(BMM) 감염 후 활성화 되는 유전자 203개가 규명되었으며, 그 중 비감염 대조군과 비교하여 약 7배 이상의 대량발현 유전자 65개가 확인되어 각각의 특성에 따라 구분하였음(Table 1).

Table 1. *B. abortus* genes upregulated at intracellular replicative phase within BMM

Category	Accession No.	Protein	Fold
Transcription	B977_01685	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	25.38
	B977_01949	cold shock protein CspA	9.81
Translation, Ribosomal structure and biosynthesis	B977_00071	elongation factor P	13.32
	B977_00445	translation initiation factor IF-3	11.47
	B977_00493	polyribonucleotide nucleotidyltransferase	9.93
	B977_00675	ribonuclease PH	8.56
	B977_01182	cysteinyl-tRNA synthetase	78.77
	B977_01466	queuine tRNA-ribosyltransferase	10.38
	B977_01557	threonyl-tRNA synthetase	12.24
	B977_01713	elongation factor G	15.61
	B977_00076	50S ribosomal protein L31	43.06
	B977_00123	50S ribosomal protein L32	87.81
	B977_00166	30S ribosomal protein S16	19.39
	B977_00191	50S ribosomal protein L21	56.04
	B977_00344	50S ribosomal protein L28	40.77
	B977_00448	50S ribosomal protein L20	112.36
	B977_00511	30S ribosomal protein S20	88.92
	B977_00975	30S ribosomal protein S18	73.31
	B977_00976	30S ribosomal protein S6	50.42
	B977_01327	30S ribosomal protein S4	20.92
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	B977_01124	peptidase Do	25.83
	B977_01397	leucyl/phenylalanyl-tRNA-protein transferase	7.51
	B977_02098	high-affinity zinc uptake system protein znuA	10.45
	B977_02201	sigma-70 family RNA polymerase sigma factor	37.52
Cell wall, membrane, envelope biosynthesis	B977_00812	efflux transporter, RND family, MFP subunit	13.51
	B977_00829	efflux pump periplasmic linker BepD	12.73
	B977_01205	outer-membrane immunogenic protein	12.49
Intracellular trafficking, secretion	B977_00168	signal recognition particle protein	11.68
Defense mechanism	B977_01487	beta-(1-2)glucan export ATP-binding/permease NdvA	15.01
Energy production and conversion	B977_00264	malate dehydrogenase	18.52
Cell cycle control, cell division	B977_00787	maf-like protein BruAb1_0276|maf-like protein	9.68
	B977_03102	ribonuclease P protein component	8.08
Replication, recombination and repair	B977_02087	elongation factor Tu	13.32
Amino acid transport and metabolism	B977_00244	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	14.61
	B977_00803	urease subunit gamma 1	9.71
	B977_00805	urease subunit beta 1	11.85
	B977_01853	acetolactate synthase, large subunit, biosynthetic type	10.78
	B977_01951	aspartate aminotransferase	10.39
Coenzyme transport and metabolism	B977_02198	tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence	7.25
	B977_02200	pentapeptide MXKDX repeat protein	491.32
	B977_02518	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	11.05
Inorganic ion transport and metabolism	B977_00347	heavy metal translocating P-type ATPase	9.52
Nucleotide transport and metabolism	B977_00678	nucleoside-triphosphatase	9.21
	B977_01198	nucleoside diphosphate kinase	18.89
Carbohydrate transport and metabolism	B977_02215	magnesium-translocating P-type ATPase	56.74
Function unknown	B977_02218	protein MgtC	8.7
	B977_00486	ribosome maturation factor rimP	13.82
	B977_01934	periplasmic immunogenic protein	17.64
	B977_02527	magnesium transporter	30.9
	B977_00001	hypothetical protein	29.49
	B977_00042	hypothetical protein	29.35
	B977_00043	hypothetical protein	14.07
	B977_00045	hypothetical protein	8.78
	B977_00081	hypothetical protein	7.27
	B977_00141	hypothetical protein	15.97
	B977_00188	hypothetical protein	41.62

	B977_00189	hypothetical protein	127.64
	B977_00343	hypothetical protein	9.04
	B977_00444	hypothetical protein	25.09
	B977_00449	hypothetical protein	171.79
	B977_00708	hypothetical protein	31.05
	B977_00709	hypothetical protein	42.44
	B977_00710	hypothetical protein	62.23
	B977_00771	hypothetical protein	44.26
	B977_00962	hypothetical protein	9.67

○ 3차에 걸친 실험을 통해 브루셀라균의 대식구 감염 후 억제 되는 유전자 103개 규명 규명되었으며, 그 중 비감염 대조군과 비교하여 약 5배 이상의 발현이 억제되는 유전자 29개가 확인되어 각각의 특성에 따라 구분이 되었음(Table 2).

Table 2. *B. abortus* genes downregulated at intracellular replicative phase within BMM

Category	Accession No.	Protein	Fold
Cell wall, membrane, envelope biosynthesis	B977_02473	N-formylglutamate deformylase|null	9.01
	B977_02916	biofilm growth-associated repressor|null	7.92
Replication, recombination and repair	B977_00658	integration host factor subunit beta|null	7.53
Cell cycle control, cell division	B977_02474	histidine ammonia-lyase|null	6.58
Posttranslational modification, protein turnover and chaperones	B977_00217	glutaredoxin 3|null	7.34
	B977_01651	ATP-dependent Clp protease adapter protein ClpS|null	5.17
	B977_02494	formyltetrahydrofolate deformylase|null	7.4
	B977_00659	signal peptide peptidase SppA	7.06
Secondary metabolites biosynthesis	B977_00877	tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence|null	9.1
Amino acid transport and metabolism	B977_00138	4-hydroxyproline epimerase|null	5.41
	B977_02778	ribonuclease R|null	8.31
Coenzyme transport and metabolism	B977_00213	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase|null	8.1
Carbohydrate transport and metabolism	B977_00330	aquaporin Z|null	6.72
	B977_02990	chaperone-like protein hdeA|null	8.04
Lipid transport and metabolism	B977_00528	similar to isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial|isovaleryl-CoA dehydrogenase|null	10.14
Inorganic ion transport and metabolism	B977_00613	sulfate ABC transporter, sulfate-binding protein|null	5.63
Energy production and conversion	B977_00894	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit II|null	5.31
	B977_00986	cytochrome c oxidase, subunit II|null	5.5
	B977_00987	cytochrome c oxidase subunit 1|null	6.12
	B977_02979	catalase|null	19.26
Function unknown	B977_01185	protein RarD|null	5.95
	B977_01784	cobalt transporter subunit CbtB (proposed)|null	8.36
	B977_02243	type IV secretion system protein virB2|null	5.09
	B977_02263	molybdate ABC transporter, permease|null	8.55
	B977_02427	diguanylate cyclase (GGDEF) domain-containing protein|null	5.08
	B977_02475	imidazolonepropionase|null	9.13
	B977_02480	D-amino acid dehydrogenase small subunit|null	5.73
	B977_00182	iojap-like ribosome-associated protein|null	5.36
	B977_02661	lectin-like protein BA14k|null	19.01

2) 브루셀라균의 마우스 대식세포 감염 후 활성되는 대식세포의 유전자 발현양상

○ 3차에 걸친 실험을 통해 브루셀라균의 마우스 유래 대식구(BMM) 감염 후 활성화 되는 대식세포 유전자 328개가 규명되었으며, 그 중 비감염 대조군과 비교하여 약 5배 이상의 대량발현 유전자 102 개가 확인되어 각각의 특성에 따라 구분하였음(Table 3).

Table 3. BMM gene expression increased by *B. abortus* infection

Category	Gene symbol	Protein	Fold
Transcription	Stat1	signal transducer and activator of transcription 1	8.78
	Pyhin1	pyrin and HIN domain family, member 1	15.08
	Ifi204	interferon activated gene 204	8.34
	Irf7	interferon regulatory factor 7ined_intron	35.92
	Spib	Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)	13.59
	Nupr1	nuclear protein transcription regulator 1	5.21
	Csf3	colony stimulating factor 3 (granulocyte)	208.41
	Nfkbia	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, alpha	5.56
	Nfkbie	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, epsilon	5.33
	Nfkb2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 2, p52/p100	5.89
Signal transduction mechanism	Epha4	Eph receptor A4	5.59
	Ikbke	inhibitor of kappaB kinase epsilon	8.19
	Cd69	CD69 antigen	10.29
	Ppm1n	protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1N (putative)	12.27
	Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	114.78
	Socs3	suppressor of cytokine signaling 3	11.75
	Socs1	suppressor of cytokine signaling 1	8.31
	Fpr1	formyl peptide receptor 1	9.85
	Fpr2	formyl peptide receptor 2	20.89
	Fpr3	formyl peptide receptor 3	20.57
	Arhgef37	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 37	16.5
	Pim2	proviral integration site 2	10.02
Intracellular trafficking	Marco	macrophage receptor with collagenous structure	5.41
	Cacna1e	calcium channel, voltage-dependent, R type, alpha 1E subunit	10.2
	Sell	selectin, lymphocyte|isoform 2 precursor is encoded by transcript variant 2	104.21
	Lcn2	lipocalin 2	25.57
	Cd40	CD40 antigen	6.77
	Slc31a2	solute carrier family 31, member 2	5.33
	Tnfrsf9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	6.39
	Clec4e	C-type lectin domain family 4, member e	122.89
	Klrk1	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1	23.58
	Cdh6	cadherin 6	30.58
	Rtp4	receptor transporter protein 4	9.95
	H2-T22	histocompatibility 2, T region locus 22	6.22
	H2-M2	histocompatibility 2, M region locus 2	61.25
Cytokine	Il1f9	interleukin 1 family, member 9	14.8
	Il1f6	interleukin 1 family, member 6	19.25
	Il1a	interleukin 1 alpha	15.82
	Il1b	interleukin 1 beta	54.14
	Tnfsf10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	10.1
	Il6	interleukin 6	18.93
	Cxcl5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	23.15
Cytokine	Cxcl3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	90.83
	Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	40.21
	Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	34.03
	Cxcl11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	140.45
	Il12b	interleukin 12b	66.83
	Tnf	tumor necrosis factor	6.78
Metabolism	Ugt1a6b	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A6B	5.74
	Ass1	argininosuccinate synthetase 1	7.37
	Slc7a11	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system),member 11	9.82
	Slc7a2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	9.94
	Upp1	uridine phosphorylase 1	19.16
	Sod2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	15.83
	Slc6a12	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, betaine/GABA), member 12	7.42
RNA processing	Traf1	TNF receptor-associated factor 1	9.64
Adhesion	Ceacam19	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 19	9.3
Defense mechanism	Nos2	nitric oxide synthase 2, inducible	25.35

Posttranslational modification	Ube2l6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	8.01
	Cst7	cystatin F (leukocystatin)	14.92
	Mmp9	matrix metallopeptidase 9	5.03
	Isg15	ISG15 ubiquitin-like modifier	35.06
	Oasl2	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2	15.02
	Oasl1	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1	16.69
	Oas3	2'-5' oligoadenylate synthetase 3	11.87
	Saa3	serum amyloid A 3	8.39
	Hp	Haptoglobin	55.34
	Mmp3	matrix metallopeptidase 3	6.61
Cytoskeleton	Rasgrp1	RAS guanyl releasing protein 1	11.48
	Tubb1	tubulin, beta 1 class VI	7.36
Other	Wnt6	wingless-type MMTV integration site family, member 6	10.57
	Lad1	Ladinin	22.65
	Ptges	prostaglandin E synthase	60.33
	Isg20	interferon-stimulated protein	15.01
	Slpi	secretory leukocyte peptidase inhibitor	13.48
	Zbp1	Z-DNA binding protein 1	33.65
	S100a8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	8.98
	Gbp7	guanylate binding protein 7	13.67
	Gbp3	guanylate binding protein 3	21.66
	Ifi44	interferon-induced protein 44 44|processed_transcript	17.53
	Ifi44l	interferon-induced protein 44 like|	10.61
	Plac8	placenta-specific 8	17.69
	Gbp9	guanylate-binding protein 9	9.41
	Gbp4	guanylate binding protein 4	30.64
	Gbp6	guanylate binding protein 6	50.32
	Oas1g	2'-5' oligoadenylate synthetase 1G	8.78
	Herc6	hect domain and RLD 6	7.73
	Mcemp1	mast cell expressed membrane protein 1	25.45
Other	Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3	7.99
	Rassf10	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N- terminal) member 10	6.51
	Il2rg	interleukin 2 receptor, gamma chain	6.96
	Camp	cathelicidin antimicrobial peptide	64.56
	Vnn3	vanin 3	16.72
	Susd2	sushi domain containing 2	30.65
	Ifi47	interferon gamma inducible protein 47	6.66
	Igtp	interferon gamma induced GTPase	8.92
	Irgm2	immunity-related GTPase family M member 2	6.29
	Ly6i	lymphocyte antigen 6 complex, locus I	235.67
	Ly6a	lymphocyte antigen 6 complex, locus A	7.94
	Ly6c2	lymphocyte antigen 6 complex, locus C2	20.1
	Apol9b	apolipoprotein L 9b	12.08
	Mx1	MX dynamin-like GTPase 1	28.48
	Mx2	MX dynamin-like GTPase 2	27.03
	Zfp811	zinc finger protein 811	9.39
	Trem3	triggering receptor expressed on myeloid cells 3	11.08
	Iigp1	interferon inducible GTPase 1	17.35
	Cdc42ep2	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 2	10.89
	Ms4a4c	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4C	110.58
	Ifit1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	46.35
	Ifit2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	56.22
	Ifit3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	40.92

○ 3차에 걸친 실험을 통해 브루셀라균의 마우스 유래 대식구(BMM) 감염 후 억제 되는 대식세포 유전자 332개가 규명되었으며, 그 중 비감염 대조군과 비교하여 약 5배 이상의 발현이 억제되는 유전자 75 개가 확인되어 각각의 특성에 따라 구분하였음(Table 4).

Table 4. BMM gene expression decreased by *B. abortus* infection

Category	Gene symbol	Protein	Fold
	Rgs2	regulator of G-protein signaling 2	4.85

Transcription	Cebpa	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	6.88
	Rgs10	regulator of G-protein signalling 10	5
	Havcr2	hepatitis A virus cellular receptor 2	5.49
	Pdgfb	platelet derived growth factor, B polypeptide	6.18
Intracellular trafficking, secretion	Ramp1	receptor (calcitonin) activity modifying protein 1	5.1
	Ildr2	immunoglobulin-like domain containingreceptor 2	7.06
	Pcp4l1	Purkinje cell protein 4-like 1	5.01
	Slc4a11	solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like, member 11	5.53
	P2ry12	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 12	6.24
	S1pr1	sphingosine-1-phosphate receptor 1	5.71
	Plxna4	plexin A4	8.2
	Cd9	CD9antigen	5.59
	Clec7a	C-type lectin domain family 7, member a	6.49
	Emp1	epithelial membrane protein 1	6.71
	Cadm1	cell adhesion molecule 1	5.84
	Cd300lb	CD300 antigen like family member B	5.13
	Lpar6	lysophosphatidic acid receptor 6	7.94
	Gpr183	G protein-coupled receptor 183	10.34
	Smagp	small cell adhesion glycoprotein	5.72
	Pcdhgc4	protocadherin gamma subfamily C, 4	10.31
Chromatin structure	Cd28	CD28 antigen	9.48
	Cenpa	centromere protein A	8.45
Energy production, conversion	mt-Atp6	mitochondrially encoded ATP synthase 6	5.87
	mt-Co3	mitochondrially encoded cytochrome c oxidase III	5.19
Cell cycle control, cell division	Cdca3	cell division cycle associated 3	6.18
	Rcbtb2	regulator of chromosome condensation (RCC1) and BTB (POZ) domain containing protein 2	6.84
Cytoskeleton	Kif14	kinesin family member 14	10.15
	Mical1	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 1	5.21
Posttranslational modification, protein turnover and chaperones	Klhl41	kelch-like 41	5.29
	Capn3	calpain 3	5.43
	Cd4	CD4 antigen	5.11
	Rnf150	ring finger protein 150	11.46
	Mmp12	matrix metallopeptidase 12	6.67
	Rnf144b	ring finger protein 144B	5.16
	Plau	plasminogen activator, urokinase	5.29
	Entpd1	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	8.9
Signal transduction mechanisms	Pdk4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	6.17
	Eps8	epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	9.14
	Ttk	Ttk protein kinase	5.56
	Map3k9	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 9	7.94
	Mapk12	mitogen-activated protein kinase 12	7.06
RNA processing, modification	Igfbp4	insulin-like growth factor binding protein 4	6.77
	Bmf	BCL2 modifying factor	6.18
Carbohydrate transport and metabolism	Slc46a3	solute carrier family 46, member 3	11.95
Lipid transport and metabolism	Ptgs1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1	7.83
	Bche	butyrylcholinesterase	6.17
Inorganic ion transport and metabolism	Slc40a1	solute carrier family 40, member 1	10.71
	Slc24a3	Solute carrier family 24, member 3	5.31
	Slc9b2	solute carrier family 9, subfamily B, member 2	5.25
	Slco2b1	solute carrier organic anion transporter family, member 2b1	38.83
	Trpc2	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 2	18.89
	Slc9a9	solute carrier family 9, member 9	9.78
Other	Cenpf	centromere protein F	5.41
	Plxdc2	plexin domain containing 2	13.19
	Gpr155	G protein-coupled receptor 155	6.09
	Maneal	mannosidase, endo-alpha-like	6.47
	Zfyve28	zinc finger, FYVE domain containing 28	5.21
	Nxpe5	neurexophilin and PC-esterase domain family, member 5	5.79
	Klrg2	killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 2	6.17
	Pde1c	phosphodiesterase 1C	30.01
	Cd207	CD207 antigen	5.95
	Rps12l1	ribosomal protein S12-like 1	5.84

	Xylt1	xylosyltransferase 1	5.34
	Sult1a1	sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1	5.68
	Lpl	lipoprotein lipase	6.84
	Fat3	FAT tumor suppressor homolog 3 (Drosophila)	5.61
	Fam214a	family with sequence similarity 214, member A	6.39
	Cd109	CD109 antigen	6.17
	Arhgap18	Rho GTPase activating protein 18	5.23
	Ighm	immunoglobulin heavy constant mu	5.07
	Susd3	sushi domain containing 3	5.52
	Abcd2	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2	7.35
	Arhgap19	Rho GTPase activating protein 19	8.29
	Kctd12b	potassium channel tetramerisation domain containing 12b	6.18

3) 브루셀라균의 소 대식세포 감염 후 활성 되는 브루셀라 균 유전자 발현양상

○ 3차에 걸친 실험을 통해 브루셀라균의 소 유래 대식구(MDBK) 감염 후 활성화 되는 유전자 219개가 규명되었으며, 그 중 비감염 대조군과 비교하여 약 7배 이상의 대량발현 유전자 48개가 확인되어 각각의 특성에 따라 구분하였음 (Table 5).

Table 5. *B.abortus* genes upregulated for 24h postinfection in MDBK

Category	Accession No.	Protein	Fold
Transcription	B977_RS116080	Fis family transcriptional regulator	9.23
	B977_RS115215	Fur family transcriptional regulator	13.57
	B977_RS114390	Transcription elongation factor GreA	7.49
	B977_RS114380	AbrB family transcriptional regulator	11.13
	B977_RS108350	Putative L-lactate dehydrogenase operon regulatory protein	10.64
	B977_RS107720	GntR family transcriptional regulator	17.84
	B977_RS107710	aldehyde dehydrogenase	11.32
	B977_RS107655	GntR family transcriptional regulator	7.41
	B977_RS106775	RpiR family transcriptional regulator	8.29
	B977_RS106620	transcriptional regulator	7.23
	B977_RS105895	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YidP	7.95
	B977_RS105765	MarR family transcriptional regulator	9.76
	B977_RS105675	TetR family transcriptional regulator	7.37
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	B977_RS113485	Putative arginyl-tRNA--protein transferase	11.07
Defense mechanism	B977_RS119425	MFS transporter	7.34
Energy production and conversion	B977_RS118655	Aldehyde dehydrogenase family 2 member B4	14.52
	B977_RS114775	Cytochrome c oxidase subunit 1+2	10.25
Replication, recombination and repair	B977_RS110120	DNA methyltransferase	7.66
	B977_RS116150	Methylated-DNA--protein-cysteine methyltransferase	15.63
	B977_RS106070	Transposase|Uncharacterized protein y4jD	23.62
Amino acid transport and metabolism	B977_RS118750	Usg family protein	71.64
	B977_RS115580	Dihydropyrimidine dehydrogenase subunit A	8.37
	B977_RS107745	Urocanate hydratase	57.35
	B977_RS107740	N-formylglutamate amidohydrolase	75.27
	B977_RS107735	Histidine ammonia-lyase	72.56
	B977_RS106785	Pyruvate decarboxylase	7.32
Coenzyme transport and metabolism	B977_RS116180	Siroheme synthase 1	8.04
Inorganic ion transport and metabolism	B977_RS117800	Lead, cadmium, zinc and mercury-transporting ATPase	11.89
	B977_RS116520	Sulfate-binding protein	7.66
	B977_RS116165	Phosphoadenosine phosphosulfate reductase	9.81
	B977_RS108615	Iron ABC transporter substrate-binding protein	7.81
	B977_RS106815	Iron ABC transporter substrate-binding protein	8.08

Nucleotide transport and metabolism	B977_RS107725	N-formimino-L-glutamate deiminase	22.73
Carbohydrate transport and metabolism	B977_RS115915	Sugar transporter substrate-binding protein	10.16
	B977_RS107770	Sugar-binding periplasmic receptor ChvE	8.55
	B977_RS106925	Putative binding protein BruAb2_0484	7.91
	B977_RS106780	5-dehydro-2-deoxygluconokinase	9.48
Function unknown	B977_RS118755	Fusaric acid resistance protein FusB	12.78
	B977_RS107730	Histidine ammonia-lyase	46.48
	B977_RS107210	ABC transporter substrate-binding protein	12.45
	B977_RS105275	Spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein	7.79
	B977_RS112495	Hypothetical protein	12.31
	B977_RS111260	Hypothetical protein	32.31
	B977_RS110395	Hypothetical protein	13.11
	B977_RS107750	Hypothetical protein	53.17
	B977_RS106975	Hypothetical protein	11.25
	B977_RS02335	Hypothetical protein	19.66
	B977_RS105565	Hypothetical protein	14.35

○ 3차에 걸친 실험을 통해 브루셀라균의 소 유래 대식구(MDBK) 감염 후 억제 되는 유전자 179개가 규명되었으며, 그 중 비감염 대조군과 비교하여 약 7배 이상의 발현 억제 유전자 96개가 확인되어 각각의 특성에 따라 구분하였음 (Table 6).

Table 6. *B.abortus* genes down regulated for 24h postinfection in MDBK

Category	Accession No.	Protein	Fold
Transcription	B977_RS119120	Transcriptional regulator	16.02
	B977_RS118580	N-acetyltransferase GCN5	12.05
	B977_RS117585	Transcription termination factor Rho	13.44
	B977_RS111325	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	8.05
	B977_RS110225	Cold shock protein CspA	15.28
Replication, recombination and repair	B977_RS117870	Exodeoxyribonuclease III	7.27
	B977_RS116440	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase CshB	32.09
	B977_RS112160	ATP-dependent RNA helicase-like protein	30.45
	B977_RS109550	Uncharacterized 31 kDa protein	58.05
	B977_RS106085	Transposase	13.44
Translation, ribosomal structure and biosynthesis	B977_RS119150	Elongation factor P	25.01
	B977_RS118575	Uncharacterized N-acetyltransferase p20	19.77
	B977_RS117330	Translation initiation factor IF-3	15.04
	B977_RS117105	Ribosome-binding factor A	7.23
	B977_RS117090	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	35.69
	B977_RS116355	Tryptophanyl-tRNA synthetase	7.83
	B977_RS113850	Cysteine--tRNA ligase	7.06
	B977_RS112905	Serine--tRNA ligase	7.09
	B977_RS112765	Peptide chain release factor 2	38.45
	B977_RS112635	Valine--tRNA ligase	8.82
	B977_RS112425	Methionine--tRNA ligase	9.67
	B977_RS111685	Elongation factor Ts	16.96
	fusA	Elongation factor G	28.91
	tuf	Elongation factor Tu	28.41
	B977_RS118900	50S ribosomal protein L32	13.05
	B977_RS118690	30S ribosomal protein S16	23.78
	B977_RS118565	50S ribosomal protein L21	18.52
	B977_RS117815	50S ribosomal protein L28	21.72
	B977_RS117320	50S ribosomal protein L35	42.71
	B977_RS117005	30S ribosomal protein S20	27.63
	B977_RS114840	50S ribosomal protein L9	54.01
	B977_RS114830	30S ribosomal protein S18	112.85
	B977_RS114825	30S ribosomal protein S6	201.85
	B977_RS113155	30S ribosomal protein S4	104.23
Posttranslational modification, protein turnover and chaperones	B977_RS118135	Peptidylprolyl isomerase	12.75
	B977_RS117325	Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase	16.71
	B977_RS111980	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	9.97
	groEL	Molecular chaperone GroEL	11.45
	B977_RS108265	Molecular chaperone GroES	11.22
	B977_RS105230	Glutaredoxin-like protein NrdH	8.21
	B977_RS118810	ATP synthase epsilon chain	11.67

Energy production and conversion	B977_RS118805	ATP synthase subunit beta	25.19
	B977_RS118800	ATP synthase subunit gamma	16.62
	B977_RS118790	ATP synthase subunit delta	30.12
	B977_RS118220	Dihydrolipoamide succinyltransferase	9.58
	sucA	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	17.48
	sucC	Succinyl-CoA ligase subunit beta	18.04
	B977_RS118200	Malate dehydrogenase	9.56
	B977_RS117910	Inorganic pyrophosphatase	20.97
	B977_RS116810	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 3	8.53
	B977_RS113230	NADH-quinone oxidoreductase subunit K	7.23
	B977_RS113060	NADPH:quinone oxidoreductase	16.92
Category	Accession No.	Protein	Fold
Nucleotide transport and metabolism	B977_RS113105	Phosphoribosylformylglycinamidine synthase subunit PurS	7.37
	B977_RS113075	Adenylosuccinate lyase	9.74
	B977_RS112190	Xanthine phosphoribosyltransferase	8.12
	ndk	Nucleoside diphosphate kinase	36.06
	B977_RS105375	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	11.36
	nrdI	Protein NrdI	8.96
Amino acid transport and metabolism	B977_RS116890	3-phosphoshikimate 1-Carboxyvinyltransferase	10.03
	B977_RS116670	Argininosuccinate synthase	8.38
	B977_RS115505	Acetylornithine aminotransferase	19.47
	B977_RS110705	Ketol-acid reductoisomerase	12.19
	B977_RS109890	Anthranilate synthase	7.48
	B977_RS108680	Antizyme inhibitor 2	14.16
	B977_RS105460	Leu/Ile/Val-binding protein homolog 8	7.03
Coenzyme transport and metabolism	B977_RS117430	Adenosylhomocysteinase	18.77
	B977_RS117135	S-adenosylmethionine synthase	8.86
	B977_RS116025	Thiamine-phosphate synthase	7.81
	B977_RS113825	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase	9.18
Carbohydrate transport and metabolism	B977_RS119145	Inositol-1-monophosphatase	21.65
	B977_RS119075	Transketolase	13.52
	gapA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B	8.94
	B977_RS108745	2-dehydro-3-deoxy-phosphogluconate aldolase	13.23
	B977_RS104685	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	12.36
Lipid transport and metabolism	B977_RS114805	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2	7.24
Inorganic ion transport and metabolism	B977_RS116030	4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine phosphate synthase	8.99
Defense mechanisms	B977_RS116060	Multidrug resistance protein homolog 65	32.96
	B977_RS116050	ABC transporter	29.07
	B977_RS111795	Preprotein translocase subunit SecG	11.15
	B977_RS104810	Membrane protein insertase YidC	7.71
Function unknown	B977_RS118225	Membrane protein	9.45
	B977_RS117915	Membrane protein	7.88
	B977_RS117310	Serine/threonine protein kinase	29.75
	B977_RS117125	Ribosome maturation factor RimP	15.45
	B977_RS115390	Murein hydrolase transporter LrgA	20.11
	B977_RS115170	Polysaccharide deacetylase	8.17
	B977_RS114075	AP endonuclease	11.13
	B977_RS115390	Murein hydrolase transporter LrgA	20.11
	B977_RS116645	Hypothetical protein	17.89
	B977_RS113300	Hypothetical protein	8.35
	B977_RS112355	Hypothetical protein	10.31
	B977_RS110130	Hypothetical protein	9.89
	B977_RS109645	Hypothetical protein	9.91
	B977_RS107895	Hypothetical protein	10.08
	B977_RS107330	Hypothetical protein	21.61
	B977_RS113120	Hypothetical protein	10.93

□ 오믹스 분석을 통한 브루셀라균의 대식세포 감염 후 발현되는 대식세포 발현 인자의 특성규명

○ 브루셀라균의 대식구 감염 후 대식구의 NF-kB을 억제 한 결과 NO 산생이 억제 되는 것이 확인 되어 대식구 감염세어 초기 브루셀라 균을 억제 하는데 있어 NF-kB가 핵심

적인 요소로 작용하는 것이 확인 됨(그림 8).

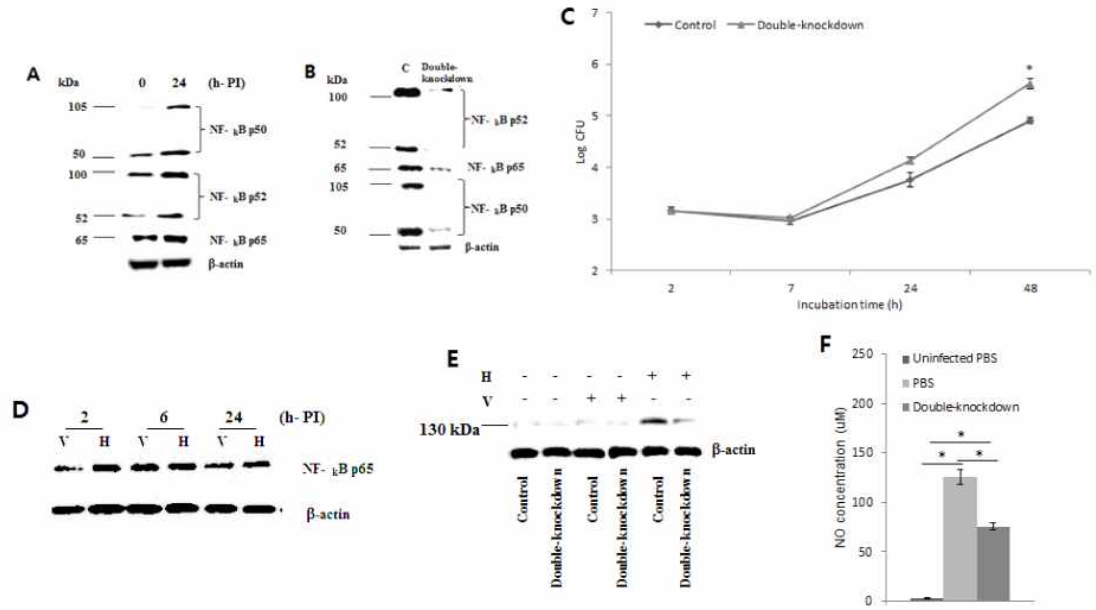


그림 8. 브루셀라 감염 후 Western blot analysis (대식구의 p50, p52 and p65) (A). siRNAs(p50 and p52) 처리한 후에 48시간 경과 후 transfection efficiency 확인(B). Double-knockdown macrophages 에 *B. abortus* 균 감염 후 세포내 증식현황(C), culture supernatant에서의 시간 경과별 NO생산량 (F). siRNAs 처리 또는 처리 하지 않은 macrophages 에 대하여 virulent or heat-inactivated *B. abortus*.균 감염처리 후 발현되는 p65 (D)과 iNOS (E)생산량 변화

○ 브루셀라균의 대식구 감염 후 대식구의 NF-kB가 pro-inflammatory cytokine생산에 중요한 역할을 담당하는 것이 확인 됨 (그림 9).

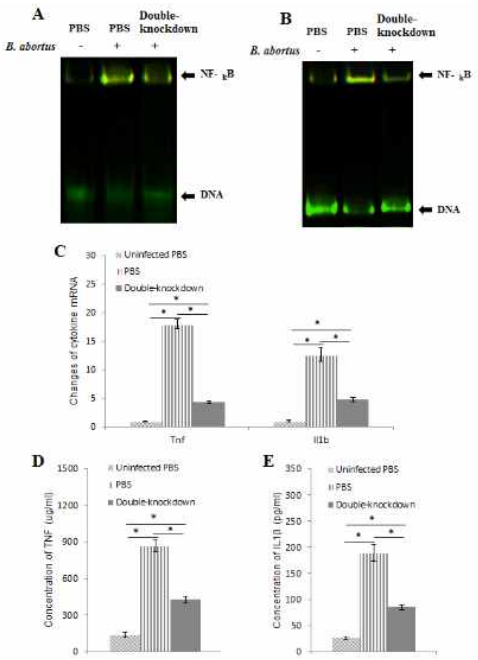


그림 9. 브루셀라 감염 후 NF-kB 발현 변화

○ 브루셀라균의 탐식세포 내 생존에 있어서 균-NF-kB 상호작용에 기초한 증식이 중요한 역할을 담당하는 것이 확인 됨(그림 10).

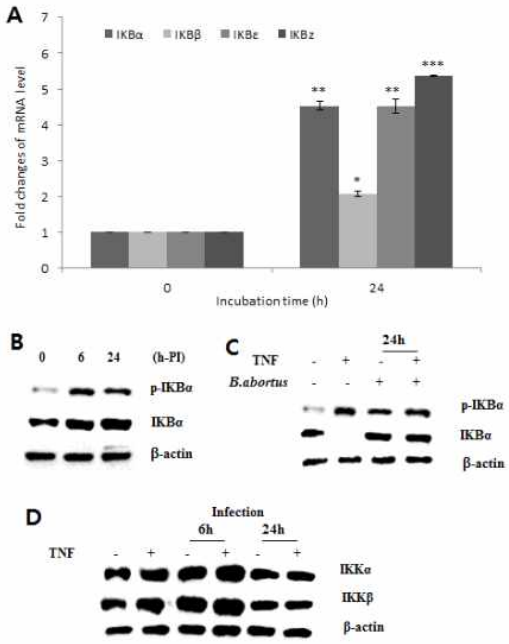


그림 10. 브루셀라 감염 후 대식구의 RNA를 추출하여 IkB family 유전자발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 확인함 (A). 대식구에 대해 TNF 전처리 또는 비처리 후 total 그리고 phosphor (Ser32/36)-IkBα (B, C) or IKKα, IKKβ (D)를 면역블롯팅 법으로 분석수행

2) 브루셀라균 감염에 있어서 IL1b pathway가 브루셀라균의 생존에 미치는 영향분석

○ 현재까지 숙주의 IL1B와 브루셀라균과의 상호작용 및 면역반응에서의 역할이 규명되지 않았음. 본 연구를 통하여 숙주의 브루셀라균 감염시 IL1b가 활성화 되는 것이 확인되어 숙주의 방어기전으로 예상하였으며, 브루셀라 균을 macrophage RAW 264.7 세포에 감염시 IL1b의 생산이 급격히 증가되는 것이 확인 됨(그림 11).

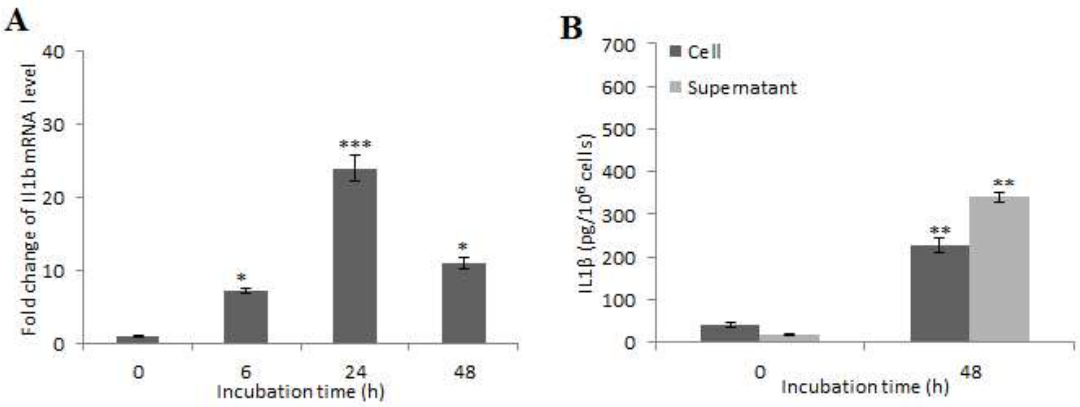


그림 11. 브루셀라 감염에 따른 IL1b생산량 (A; RT-PCR, B; ELISA)

○ 숙주의 IL1b를 억제 하였을 때 대식세포 내 브루셀라 균의 증식이 급격히 증가되는 것이 확인 되어 IL1b는 브루셀라균의 숙주내 증식 억제에 필수적인 요소로 작용하는 것이 확인 됨(그림 12).

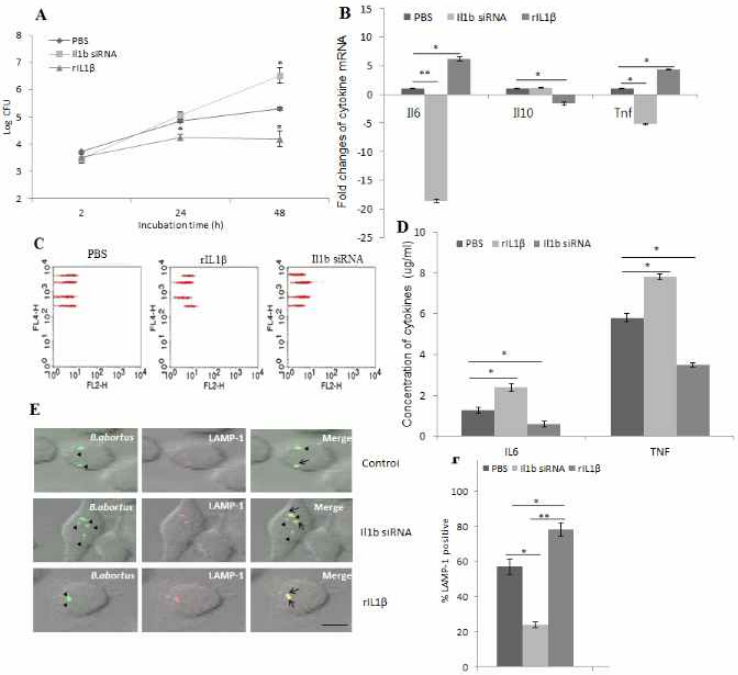


그림 12. 숙주의 IL1b 억제에 따른 브루셀라 균의 세포내 생존 능력 (A), cytokine 생산능력 (B; RT-PCR), cytometry (C, D). LAMP-1 융합정도 (E, F).

○ 숙주의 IL1b 경로는 MyD88n 경로에 의존적이며, NF-kB pathway and NO production 과는 비의존적인 경로를 취하는 것이 확인 됨 (그림 13).

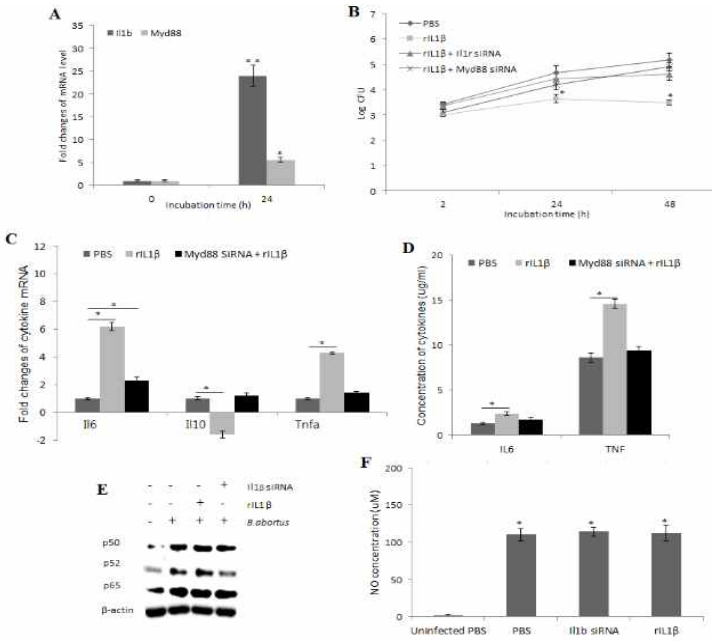


그림 13. IL1b 및 Myd88 genes의 tanscriptional profile을 RT-PCR로 분석 (A). Macrophage는 *B. abortus*,에 감염 후 Log CFU를 확인하였고 (B), cytokine production (C,D), NF-kB proteins과 (E), NO production(F)이 분석 됨.

○ 숙주의 IL1b 경로는 숙주 대식세포의 ROS production 및 apoptosis 유도에 의해 증식을 억제하는 것이 확인 됨 (그림 14).

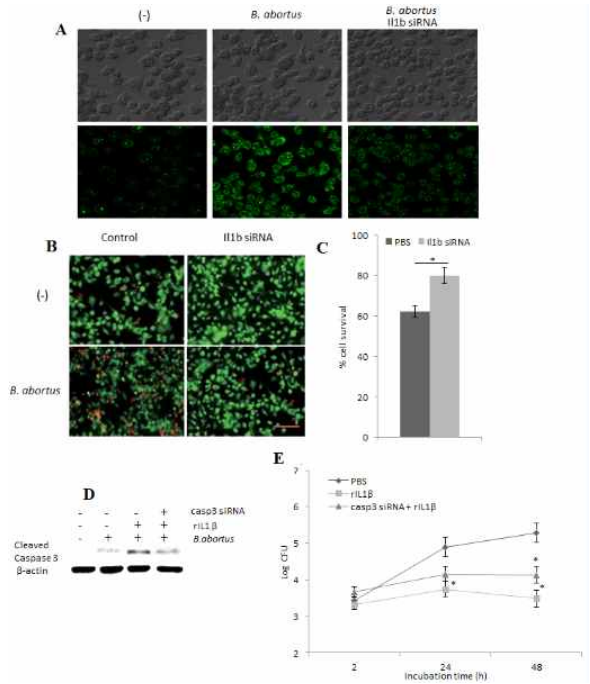


그림 14 Macrophage는 *B. abortus*에 감염 후 ROS 산생 (A), apoptosis (B, C)를 측정하였고, rIL1b and caspase 3 siRNA 처리 및 비처리 후 면역 블롯팅 cleaved-caspase 3; D), Log CFU (E)를 확인 함

○ 숙주의 IL1b는 숙주 대식세포의 ROS production 및 apoptosis 유도하지만 phagosome과의 융합을 조절하는 것은 TNF에 의해 유도되는 것이 확인 됨 (그림 15).

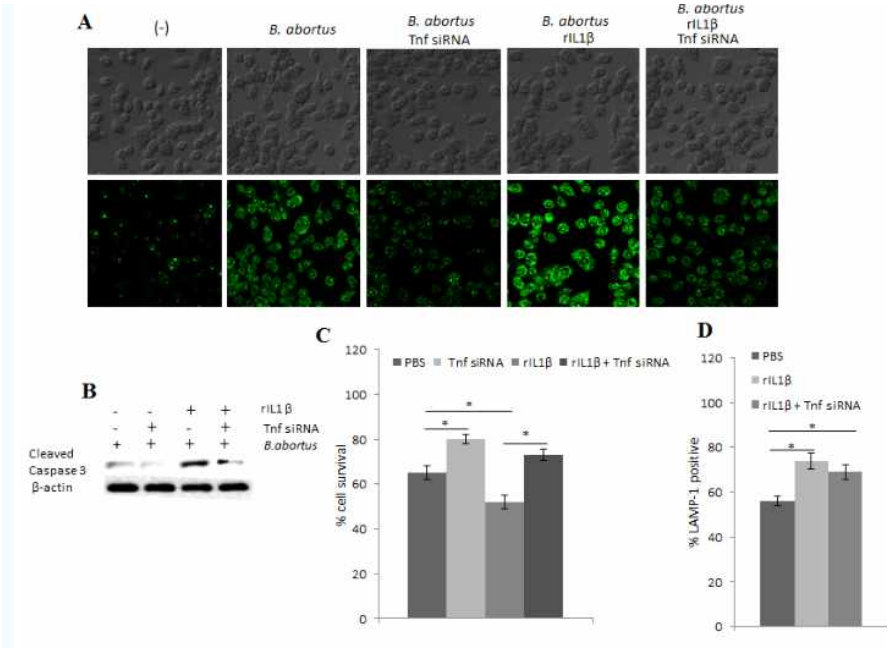


그림 15. Macrophage는 *B. abortus*에 감염 후 ROS 산생 (A), apoptosis (C), LAMP-1 colocalization (D)를 측정하였고, caspase 3 활성도 (B)는 Western blot을 통해 확인 함

○ 숙주의 IL1b의 전사조절기전을 밝혀냄 (그림 16)

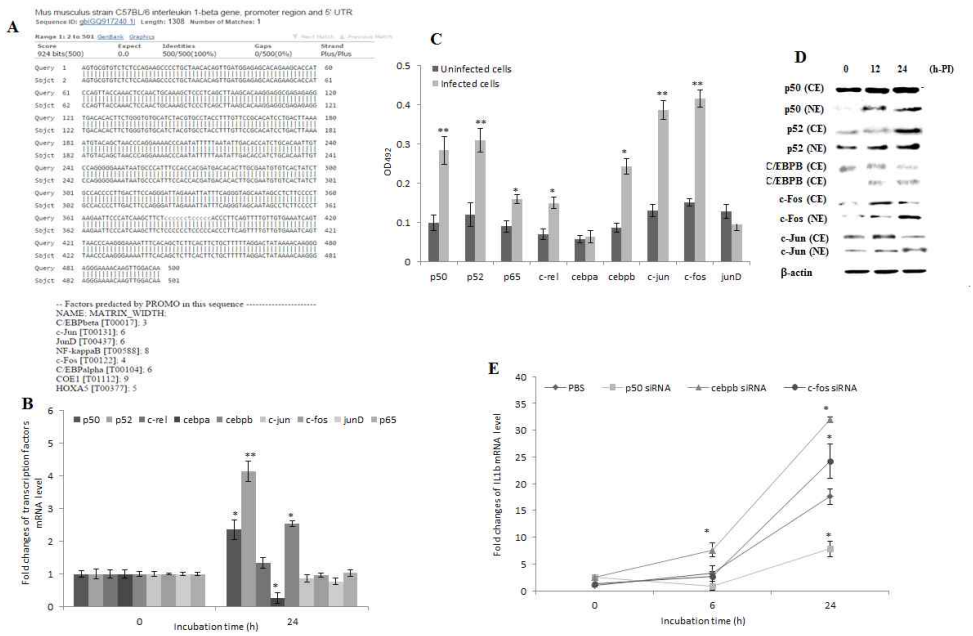


그림 16. PROMO program에 의해 IL1b promoter region의 transcriptional factors binding position 분석 (A). RT-PCR에 의한 all potential transcriptional factors 분석 (B), ELISA (C), western blot (D). Macrophage IL1b knock down 하였을 때 브루셀라 감염이 생산에 미치는 영향 분석(E).

3) 브루셀라균 감염에 있어서 대식구의 초기 분열 및 면역반응이 브루셀라 생존에 미치는 영향

○ 현재까지 브루셀라 감염과 숙주의 대식세포 분열증식과의 상관관계가 규명되지 않았으나, 전사체 분석을 통해 브루셀라 균이 대식구의 분열에 미치는 인자를 활성하게 됨을 확인 하고 분열증식과 브루셀라균의 생존관계를 규명하게 되었으며, 이를 통해 브루셀라균의 감염이 대식세포의 분열, apoptosis가 영향을 받는 것이 확인 되었고, cyclin D1과 cyclin D2의 변화가 관찰 됨(그림 17).

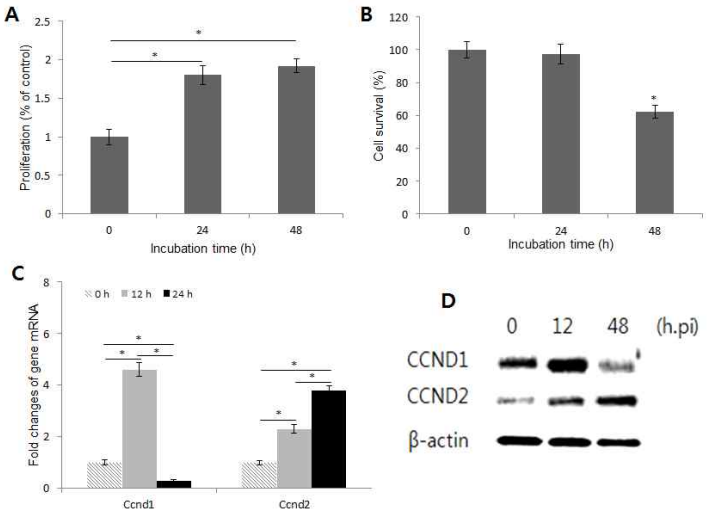


그림 17. RAW 264.7는 브루셀라에 감염 후, cell proliferation (A), apoptosis (B) 를 측정하였고, cyclin D1와 cyclin D2 는 RT-PCR (C) 및 immunoblotting (D)에 의해 분석됨

○ 숙주의 대식세포 분열증식을 억제 하였을 경우, 브루셀라 균의 세포내 증식이 확연히 억제되는 것이 확인 되어, 숙주의 분열이 브루셀라균의 세포내 증식에 중요한 역할을 하는 것으로 확인 됨 (그림 18).

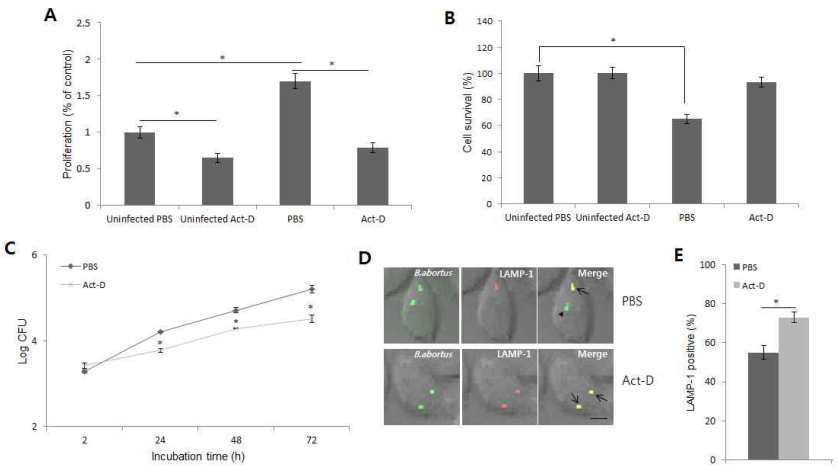


그림 18. RAW 264.7는 브루셀라에 감염 전, proliferation inhibitor (Act-D)를 처리 한 후 cell proliferation (A), apoptosis (B) (C), Log CFU (C), LAMP1 colocalization (D, E) 을 분석함

○ 숙주의 대식세포 초기 분열증식을 억제 하였을 경우, ROS 산생과 pro-inflammatory cytokines이 증가되지만, anti-inflammatory cytokine 및 NO production 산생은 억제됨(그림 19).

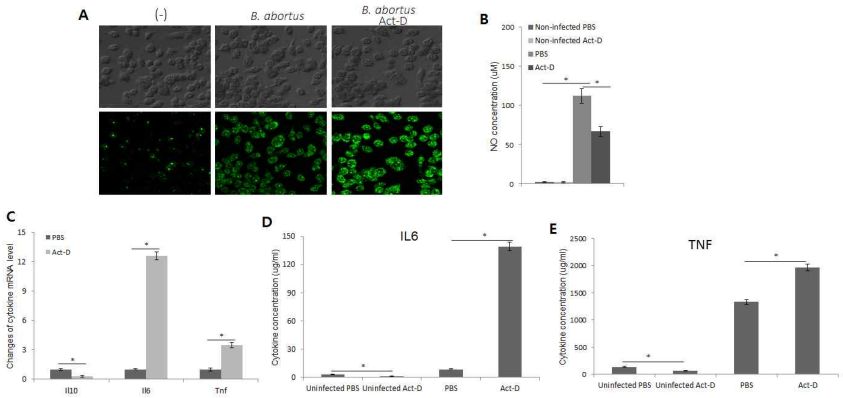


그림 19. 브루셀라 감염 또는 비감염RAW 264.7는 Act-D를 처리 한 후 상층액으로부터 ROS (A), NO (B) production을 측정함. Cytokine production 은 RT-PCR (C), flow cytometry (D, E)를 이용하여 분석함

○ 숙주의 대식세포의 pro-inflammatory cytokines이 브루셀라균의 탐식세포내 제거에 효과적이며 숙주의 방어작용에 핵심임이 확인 됨(그림. 20)

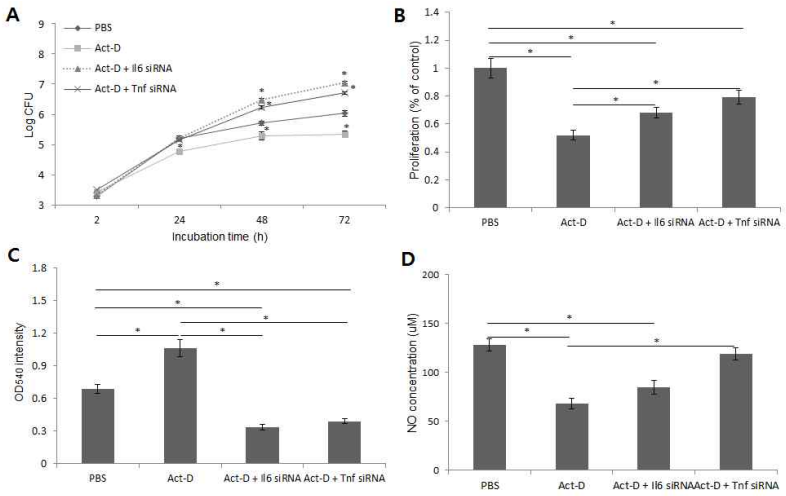


그림 20. 브루셀라 감염 또는 비감염RAW 264.7는 Act-D를 처리 한 후 IL6 or TNF siRNA 처리를 하고 Log CFU (A), cell proliferation (B), ROS (C) 및 NO (D) production을 분석함

○ 숙주의 대식세포의 Ccnd1 expression에 중요한 역할을 하는 c-fos의 억제는 대식세포의 early proliferation을 억제하고 이는 bactericidal activity와 cytokine production을 증가하는 것으로 확인 됨(그림 21)

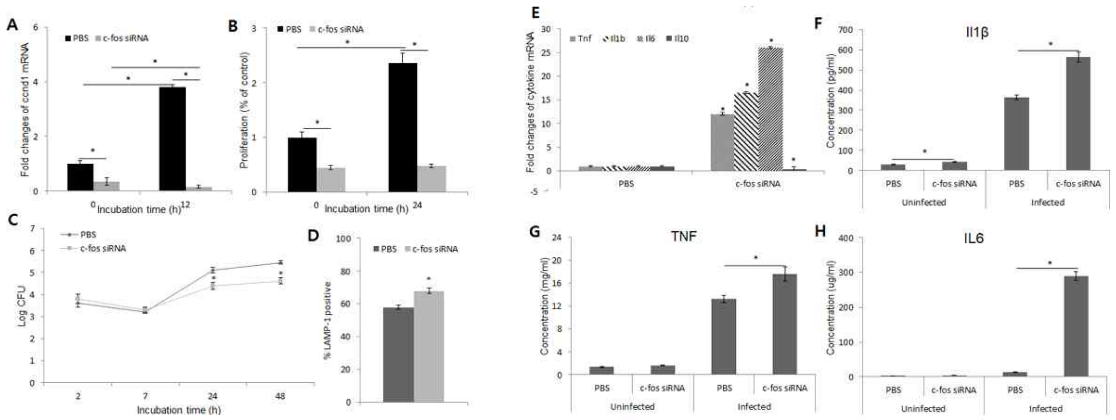


그림 21. 각 유전자 knock down 후에 브루셀라 감염 후 ccnd1 gene 발현을 RT-PCR로 측정 (A). 그후, cell proliferation (B), Log CFU of bacteria (C), percentage of LAMP1 colocalization with BCVs (D) 및 expression of proinflammatory cytokines (E-H)를 측정함.

○ 숙주의 대식세포의 pro-inflammatory cytokines (TNF and IL6)는 anti-inflammatory cytokine IL10 expression 억제를 통해 bactericidal activity 가 증가되는 것이 확인 됨(그림 22).

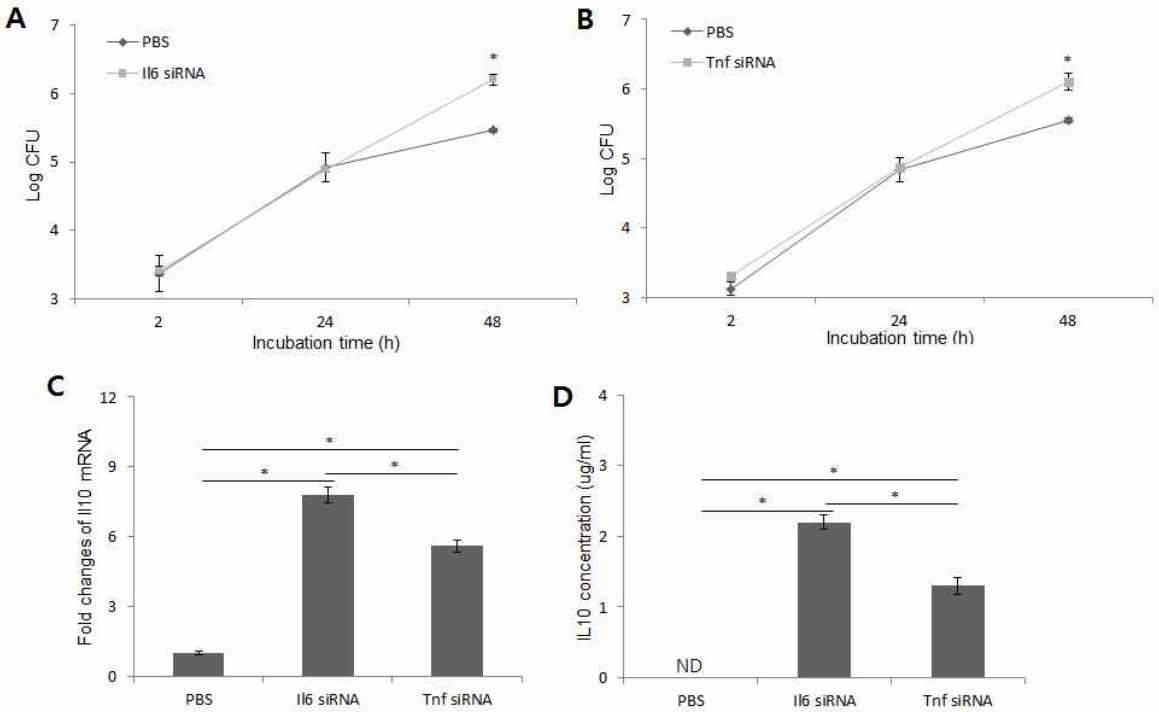


그림 22. 각 유전자 knock down 후에 브루셀라 균의 세포내 증식경향과 (A, B), IL10 발현 현황 (C, D)

○ 숙주의 대식세포의 anti-inflammatory cytokine (IL10)은 대식세포내로의 침입은 억제하나 대식세포내에서의 생존을 증가시기는 역할을 하는 것으로 확인 됨(그림 23).

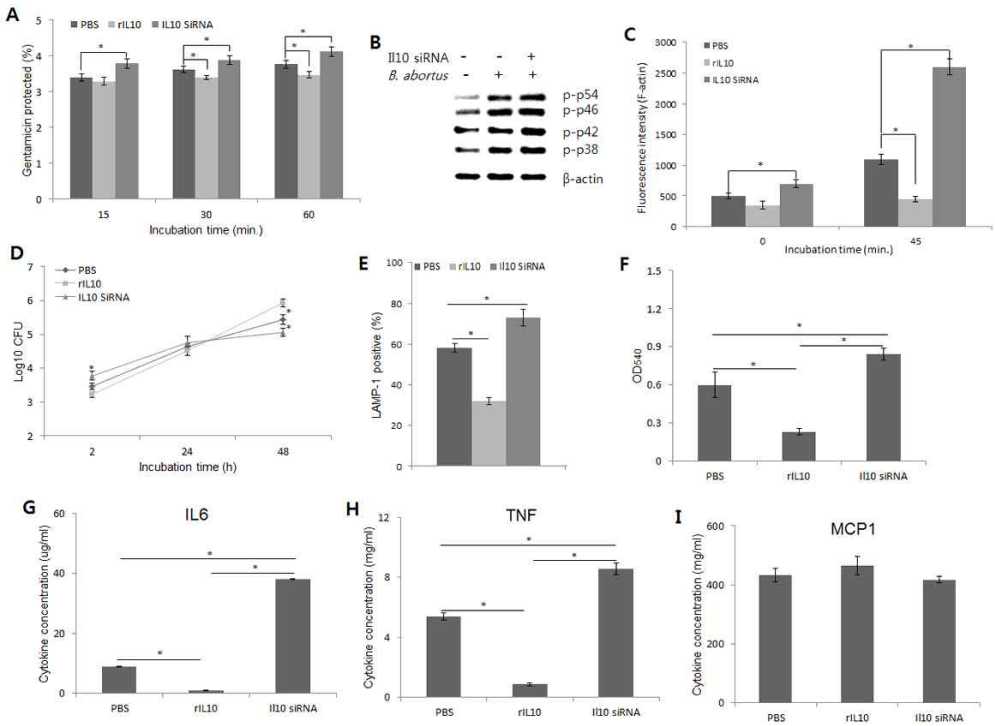


그림 23. 각 유전자 knock down 후에 브루셀라 균의 세포내 증식경향과 (A, B), IL10 발현 현황 (C, D)

4) 대식구의 PAFR(platelet activiting factor receptor) 활성이 브루셀라 감염에 미치는 영향

○ 브루셀라 균 감염시 발현되는 숙주의 대식세포의 PAFR은 브루셀라균의 대식세포내로의 침입에 있어 핵심적인 역할을 하며 숙주 면역반응에 핵심적으로 작용됨이 확인 됨 (그림 24).

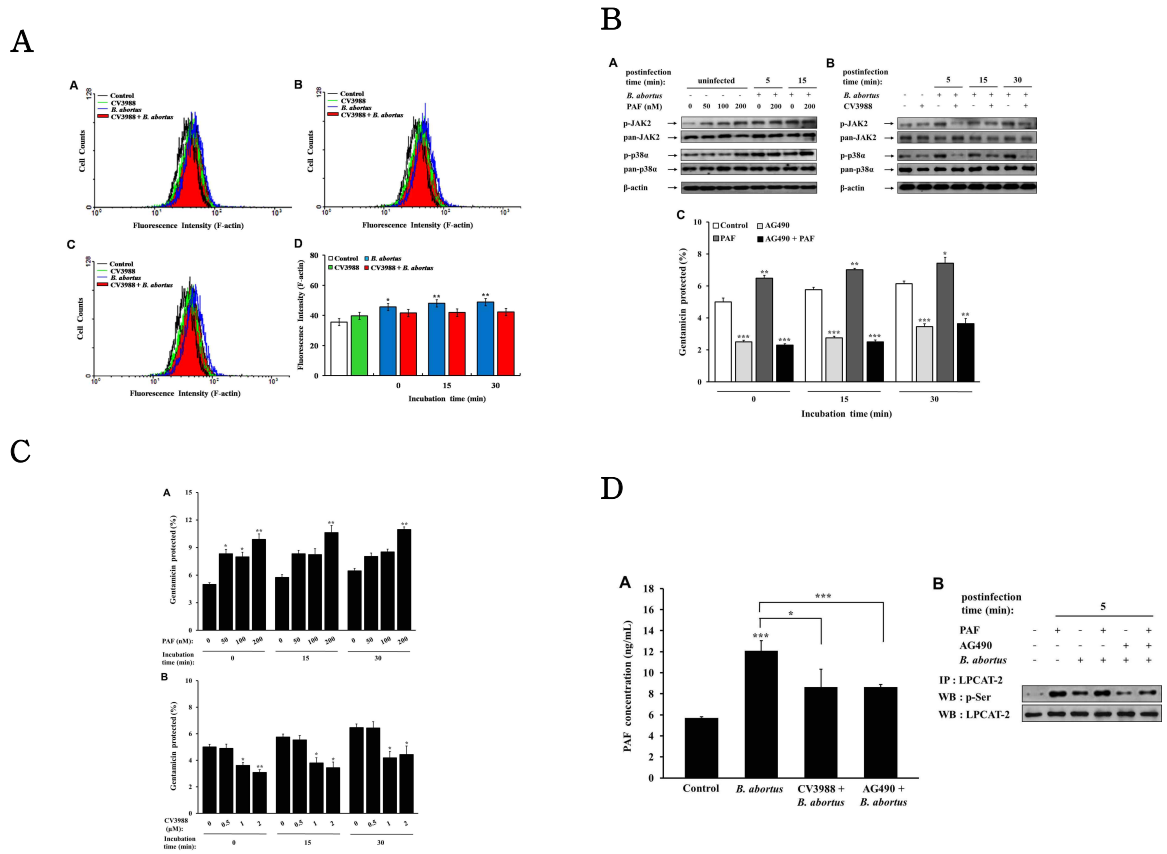


그림 24. 브루셀라 감염에 따른 숙주 면역세포 변화 (A), PAF pathway (B), 세포내 탐식기전(C) 및 감염에 따른 PAF 발현량 (D)

□ 브루셀라균의 대식세포 감염 후 발현되는 브루셀라균의 병원성 유전자의 특성 규명

1) 브루셀라균 Ndk 특성 분석

○ 브루셀라균의 대식구 감염 후 발현되는 병원성 인자 중 하나인 Ndk의 재조합 단백을 제작하였으며, 마우스 감염 혈청에 대한 면역원성을 규명함 (그림 25)

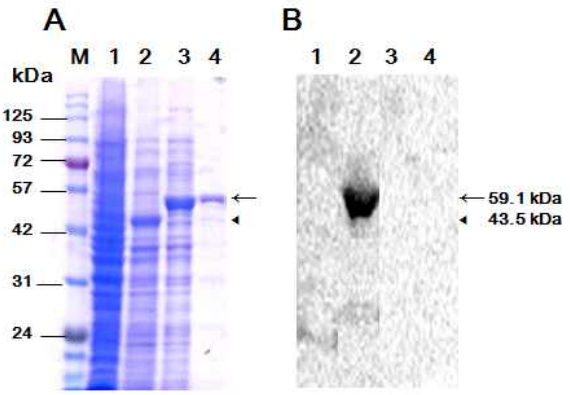


그림 25. Ndk 재조합 단백 발현 및 마우스 감염혈청에 대한 면역원성 규명

○ Ndk의 재조합 단백의 마우스 면역활성 규명함 (그림 26, 표 6)

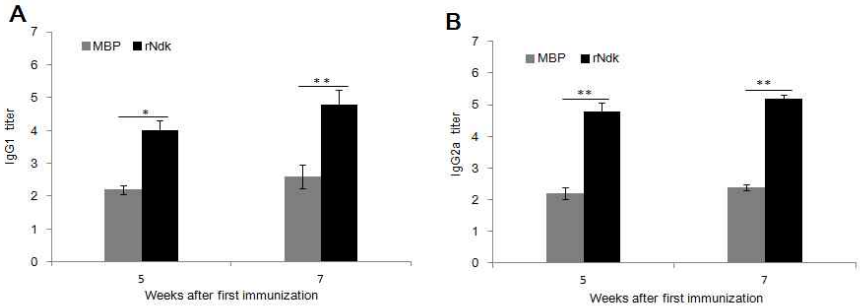


그림 26. Ndk 재조합 단백의 마우스 면역활성 규명

표 6. Ndk 재조합 단백 접종 후 마우스 cytokine 분석

Cytokine	Concentration (pg/ml) of cytokines in mice vaccinated with:					
	PBS		MBP		rNdk	
	5*	7	5	7	5	7
IL-12p70	0.23 ± 0.04	0.38 ± 0.09	0.15 ± 0.1	0.29 ± 0.05	0.17 ± 0.08	0.41 ± 0.08
TNF	1.51 ± 0.12	1.46 ± 0.2	4.29 ± 0.41[a]	4.79 ± 0.24[a]	4.46 ± 0.27[a]	11.45 ± 0.54[a,1]
IFN- ɣ	0	0	0	0.1 ± 0.04	4.52 ± 0.21[a,1]	8.67 ± 0.41[a,1]
MCP-1	12.48 ± 0.52	14.93 ± 1.13	14.17 ± 0.35	16.89 ± 1.06	54.37 ± 2.14[a,1]	99.28 ± 6.22[a,1]
IL-10	0	0	0	0	2.98 ± 0.09[a,1]	2.42 ± 0.04[a,1]
IL-6	0	0	0	0	2.02 ± 0.15[a,1]	2.35 ± 0.09[a,1]

*; Weeks after first vaccination.

[a]; Significantly different from PBS-immunized group *($p<0.05$)*

[1], Significantly different from MBP-immunized group *($p<0.05$)*

○ Ndk의 재조합 단백의 병원성 균 감염 예방효과 규명함 (그림 27)

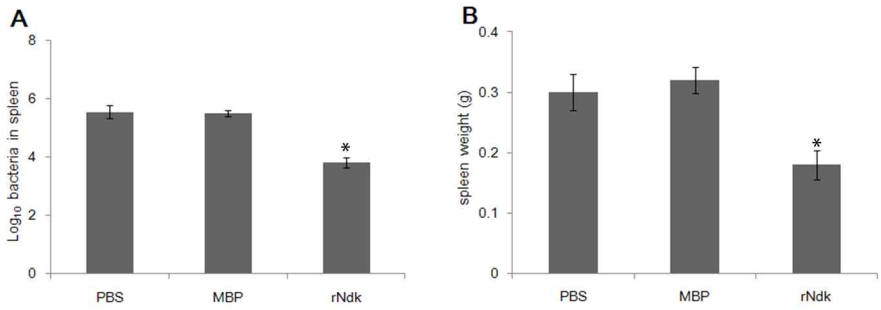


그림 27. Ndk 재조합 단백의 병원성 브루셀라균 접종 예방효과 규명

2) 브루셀라균 OmpA 특성 분석

○ 브루셀라균의 병원성 인자 중 하나인 OmpA의 재조합 단백을 제작하였으며, 마우스 감염 혈청에 대한 면역원성을 규명함 (그림 28)

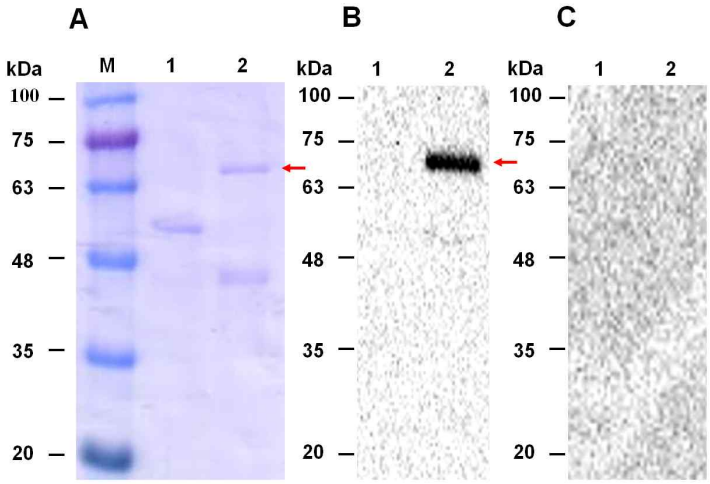


그림 28. OmpA 재조합 단백 발현 및 마우스 감염혈청에 대한 면역원성 규명

○ OmpA의 재조합 단백의 마우스 면역활성 규명함 (그림 29, 표 7)

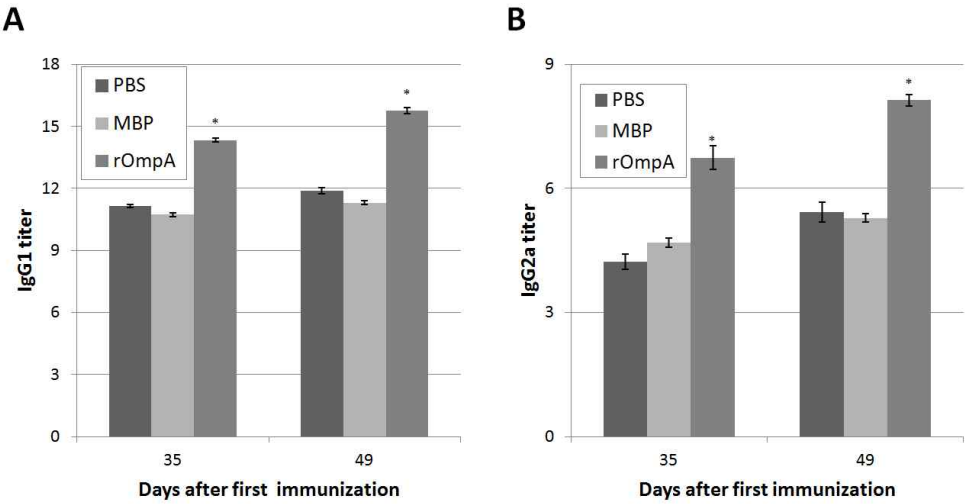


그림 29. OmpA 재조합 단백의 마우스 면역활성 규명

표7. OmpA 재조합 단백 접종 후 마우스 cytokine 분석

Cytokine	Concentration (pg/ml) of cytokines in mice vaccinated with:					
	PBS		MBP		rOmpA	
	35	49	35	49	35	49
TNF-α	3.4±1.49	3.71±1.52	0	3.94±3.23	3.18±2.28	9.2±0.66[ab]
IFN-ɣ	0.99±0.67	1.74±1.15	0	1.41±0.91	0.64±0.01	4.92±2.8[ed]
MCP-1	23.89±12.7	36.67±23.0	27.8±10.55	33.64±12.99	28.38±7.46	37.14±12.14

IL-12p70	0	0.75±0.07	0	0.82±.064	0	2.54±1.38[ab]
IL-10	2.21±0.24	11.06±11.04	3.04±0.05	7.49±5.53	4.37±0.01[a]	25.22±10.79[e] [b]
IL-6	0.61±0.25	1.91±1.7	0.00	1.37±0.71	1.9±0.24	3.66±1.09[eb]

[a]; ($P < 0.005$) [c];($P < 0.01$) [e];($P < 0.05$) Significantly different from PBS-immunized group

[b]; ($P < 0.005$) [d];($P < 0.01$) [f];($P < 0.05$) Significantly different from MBP-immunized group

○ OmpA의 재조합 단백의 병원성 균 감염 예방효과 규명함 (그림 30)

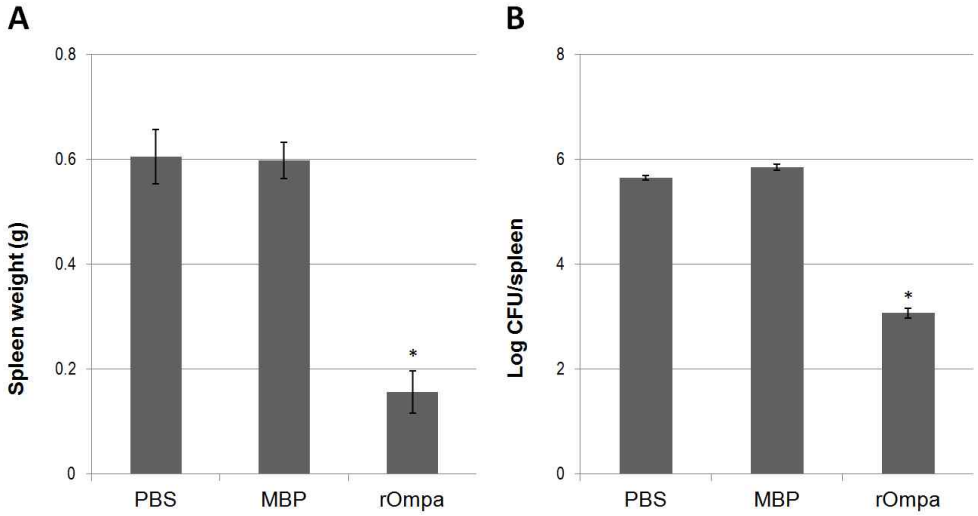


그림 30. OmpA 재조합 단백의 병원성 브루셀라균 접종 예방효과 규명

□ 대식세포 및 마우스 면역조절물질이 브루셀라 병원성 발현이 미치는 영향 규명

1) 마우스 대식세포의 대표적 면역조절인 V-set immunoglobulin-domain-containing 4 (VSIG4) KO 대식세포 감염 후 발현되는 대식세포 유전자 발현양상

○ 3차에 걸친 실험을 통해 브루셀라균의 마우스 유래 대식구(BMM) 및 VSIG4 KO 대식구 감염 후 활성화 및 억제 되는 유전자 46,202개가 규명되었으며, 그 중 BMM과 비교하여 VSIG4 KO 대식세포 감염 후 발현되는 유전자 중 약 2배 이상 높은 발현을 나타내는 유전자 164개가 확인됨(Table 8).

Table 8. VSIG4-KO-BMM genes up-regulated compared to BMM

Gene name	Contig	BMM	VSIG4-KO-BMM	Fold change
Pcdhga10	chromosome 18	21.8809	44.2639	2.022947
Slc5a11	chromosome 7	27.589	55.8568	2.024604
Svip	chromosome 7	39.0051	79.0427	2.026471
Zfp507	chromosome 7	28.5403	57.9646	2.030974
LOC105245043	chromosome 9	23.7836	48.4795	2.038358
Gm4604	chromosome 6	83.7182	171.7861	2.051956

Kcnj13	chromosome 1	14.2702	29.5093	2.067897
Fut10	chromosome 8	15.2215	31.6171	2.077134
LOC105245265	chromosome 10	31.3943	65.3419	2.08133
Tmem144	chromosome 3	36.151	75.881	2.099001
Gm13840	chromosome 5	20.9296	44.2639	2.114895
Gm31332	chromosome 12	197.8794	420.507	2.125067
Gm31109	chromosome 11	25.6863	54.8029	2.133546
Mab21l3	chromosome 3	13.3188	28.4554	2.136484
Gm6313	chromosome 6	13.3188	28.4554	2.136484
Tef	chromosome 15	82.7669	177.0556	2.139208
Ulbp1	chromosome 10	329.1648	705.0605	2.141968
Ccl8	chromosome 11	16.1728	34.7788	2.15045
Gm34148	chromosome 6	155.069	334.087	2.154441
B4galt4	chromosome 16	39.9564	86.42	2.162858
Isoc2b	chromosome 7	84.6696	185.4868	2.190713
4933424M12Rik	chromosome 4	14.2702	31.6171	2.215603
Gm4262	chromosome 16	12.3675	27.4015	2.215605
Xlr4a	chromosome X	28.5403	63.2341	2.215607
Gm35473	chromosome 1	21.8809	48.4795	2.215608
Zfp750	chromosome 11	46.6158	103.2824	2.215609
Gm13238	chromosome 4	13.3188	29.5093	2.215613
Dock3	chromosome 9	23.7836	53.749	2.259919
Gm36872	chromosome 6	21.8809	49.5334	2.263773
Hpn	chromosome 7	131.2854	301.416	2.295884
Fam117a	chromosome 11	69.4481	161.247	2.321835
Tuft1	chromosome 3	54.2266	126.4683	2.332219
Col9a3	chromosome 2	8.5621	20.0241	2.33869
Rad9b	chromosome 5	8.5621	20.0241	2.33869
Gm17757	chromosome 7	39.9564	93.7973	2.347491
Txnrd1	chromosome 10	15.2215	35.8327	2.354085
Gm15531	chromosome 6	78.9615	186.5407	2.362426
Fry	chromosome 5	11.4161	27.4015	2.400251
P2ry1	chromosome 3	19.0269	46.3717	2.437165
Gm33641	chromosome 3	9.5134	23.1859	2.437183
Dqx1	chromosome 6	9.5134	23.1859	2.437183
Scd2	chromosome 19	910.4355	2237.4342	2.457543
Gm31728	chromosome 1	8.5621	21.078	2.461779
Macrod2	chromosome 2	8.5621	21.078	2.461779
Gm31482	chromosome 12	34.2484	84.3122	2.461785
M1ap	chromosome 6	7.6108	18.9702	2.492537
Spint2	chromosome 7	7.6108	18.9702	2.492537
2310034P14Rik	chromosome 7	7.6108	18.9702	2.492537
Il17rd	chromosome 14	7.6108	18.9702	2.492537
Erdr1	chromosome Y	170.2904	425.7765	2.500297
Mlph	chromosome 1	31.3943	79.0427	2.51774
Xlr4c	chromosome X	9.5134	24.2398	2.547964
Fsbp	chromosome 4	11.4161	29.5093	2.584885
LOC105246807	chromosome 8	879.0412	2310.1535	2.628038
Zhx2	chromosome 15	89.4263	235.0202	2.628088
Cd22	chromosome 7	86.5722	227.6429	2.629515
Ldhd	chromosome 8	19.0269	50.5873	2.658725
Egr3	chromosome 14	7.6108	21.078	2.769485
9830147E19Rik	chromosome 7	24.7349	68.5036	2.769512
LOC102635781	chromosome 2	38.0537	106.4441	2.797208
Gbp10	chromosome 5	8.5621	24.2398	2.831058
Smoc1	chromosome 12	6.6594	18.9702	2.848635
Cnot8	chromosome 11	14.2702	41.1022	2.880282
Gm18868	chromosome 16	27.589	81.1505	2.941408
Hist1h2bq	chromosome 13	5.7081	16.8624	2.954118
Hist1h2br	chromosome 13	5.7081	16.8624	2.954118
Gm10406	chromosome 14	8.5621	25.2937	2.954147
Plb1	chromosome 5	7.6108	23.1859	3.046447
Lrrc14b	chromosome 13	10.4648	32.671	3.12199
Ffar2	chromosome 7	17.1242	53.749	3.138774
Gm17222	chromosome 14	15.2215	48.4795	3.184936
G530011O06Rik	chromosome Y	42.8105	142.2768	3.323409
Gm7334	chromosome 17	21.8809	72.7193	3.323414
LOC105245930	chromosome 15	4.7567	15.8085	3.323417
LOC105246098	chromosome 16	4.7567	15.8085	3.323417
LOC105247170	chromosome 4	1698.1477	5813.3242	3.423332

Tmem198	chromosome 1	4.7567	16.8624	3.544979
Immp2l	chromosome 12	4.7567	18.9702	3.988101
Gm36327	chromosome 6	3.8054	15.8085	4.154228
Pla2g2e	chromosome 4	4.7567	20.0241	4.209662
Gm31623	chromosome 12	8.5621	36.8866	4.308125
LOC105243508	chromosome 9	12.3675	54.8029	4.431203
Bcl2l15	chromosome 3	4.7567	21.078	4.431223
LOC100861615	chromosome 14	4.7567	21.078	4.431223
Cd177	chromosome 7	2.854	12.6468	4.431254
Snhg10	chromosome 12	2.854	12.6468	4.431254
LOC101055995	chromosome 18	2.854	14.7546	5.169797
Rtel1	chromosome 2	8.5621	45.3178	5.292837
Fam154b	chromosome 7	1.9027	10.539	5.538971
Mcf2	chromosome X	1.9027	10.539	5.538971
Pgam2	chromosome 11	2.854	15.8085	5.539068
Haghl	chromosome 17	2.854	15.8085	5.539068
Igkv5-43	chromosome 6	1.9027	13.7007	7.200662
Gm32888	chromosome 8	1.9027	13.7007	7.200662
Gm18588	chromosome 3	3.8054	29.5093	7.754586
Gm13561	chromosome 2	0.9513	8.4312	8.862819
Gpat2	chromosome 2	0.9513	8.4312	8.862819
Gm31914	chromosome 3	0.9513	8.4312	8.862819
Syna	chromosome 5	0.9513	8.4312	8.862819
Cdhr4	chromosome 9	0.9513	8.4312	8.862819
LOC105242793	chromosome 11	0.9513	8.4312	8.862819
Hist1h1a	chromosome 13	0.9513	8.4312	8.862819
Fbln1	chromosome 15	0.9513	8.4312	8.862819
LOC105246648	chromosome 1	0.9513	10.539	11.07852
Gm10575	chromosome 7	3.8054	44.2639	11.63187
Mtus2	chromosome 5	0.9513	11.5929	12.18638
F830016B08Rik	chromosome 18	0.9513	11.5929	12.18638
Nbea	chromosome 3	7.6108	94.8512	12.46271
Gm15950	chromosome 16	0.9513	13.7007	14.40208
4930592I03Rik	chromosome 18	8.5621	183.379	21.41753
Xlr3b	chromosome X	1.9027	46.3717	24.37152
LOC105244479	chromosome 3	0.9513	25.2937	26.58856
LOC105243520	chromosome 9	0.9513	27.4015	28.80427
Gm14210	chromosome 2	0.9513	45.3178	47.63776
LOC105244113	chromosome 2	0.9513	68.5036	72.01051
Gm6195	chromosome 1	0.0	103.2824	103.2824
Gm35443	chromosome 1	0.0	14.7546	14.7546
Gm35243	chromosome 1	0.0	6.3234	6.3234
Dlx1	chromosome 2	0.0	7.3773	7.3773
Pla2g4b	chromosome 2	0.0	17.9163	17.9163
Jade1	chromosome 3	0.0	9.4851	9.4851
Hmgb1-ps5	chromosome 3	0.0	9.4851	9.4851
Hist2h2aa2	chromosome 3	0.0	21.078	21.078
Bach2os	chromosome 4	0.0	9.4851	9.4851
Nfia	chromosome 4	0.0	9.4851	9.4851
LOC105244696	chromosome 4	0.0	7.3773	7.3773
Rsc1a1	chromosome 4	0.0	150.708	150.708
Ttll10	chromosome 4	0.0	8.4312	8.4312
Perm1	chromosome 4	0.0	42.1561	42.1561
Gm36185	chromosome 5	0.0	34.7788	34.7788
LOC105246774	chromosome 5	0.0	10.539	10.539
Stag3	chromosome 5	0.0	47.4256	47.4256
Gm5294	chromosome 5	0.0	6.3234	6.3234
LOC105242585	chromosome 5	0.0	89.5817	89.5817
Gm13717	chromosome 6	0.0	13.7007	13.7007
Gm19078	chromosome 6	0.0	35.8327	35.8327
Gm30891	chromosome 7	0.0	26.3476	26.3476
Rpl14-ps1	chromosome 7	0.0	315.1167	315.1167
Nav2	chromosome 7	0.0	64.288	64.288
LOC105242941	chromosome 7	0.0	29.5093	29.5093
Rpl30-ps2	chromosome 8	0.0	6.3234	6.3234
Gm3336	chromosome 8	0.0	6.3234	6.3234
Exoc3l	chromosome 8	0.0	12.6468	12.6468
LOC105243298	chromosome 8	0.0	7.3773	7.3773
Mir135a-1	chromosome 9	0.0	11.5929	11.5929
Gm12118	chromosome 11	0.0	7.3773	7.3773

Rab11fip4	chromosome 11	0.0	27.4015	27.4015
LOC105242916	chromosome 11	0.0	14.7546	14.7546
Mpp3	chromosome 11	0.0	7.3773	7.3773
Gm20511	chromosome 11	0.0	6.3234	6.3234
Gm7020	chromosome 11	0.0	14.7546	14.7546
Bahcc1	chromosome 11	0.0	18.9702	18.9702
5430427M07Rik	chromosome 12	0.0	46.3717	46.3717
Gm32641	chromosome 13	0.0	20.0241	20.0241
Spata13	chromosome 14	0.0	9.4851	9.4851
Gm15712	chromosome 16	0.0	24.2398	24.2398
Zbtb11	chromosome 16	0.0	15.8085	15.8085
Gm34321	chromosome 17	0.0	83.2583	83.2583
LOC105246232	chromosome 17	0.0	7.3773	7.3773
Gm5970	chromosome 18	0.0	45.3178	45.3178
Myoz3	chromosome 18	0.0	6.3234	6.3234
Zfpl1	chromosome 19	0.0	18.9702	18.9702
Calhm1	chromosome 19	0.0	9.4851	9.4851
Vsig4	chromosome X	0.0	60.0724	60.0724

○ BMM과 비교하여 VSIG4 KO 대식세포 감염 후 발현이 억제되는 유전자 378개가 확인됨 (Table 9).

Table 9. VSIG4-KO-BMM genes down-regulated compared to BMM

Gene name	Contig	BMM	VSIG4-KO-BMM	Fold change
Mir6897	chromosome 1	171.2418	0.0	0
Map2	chromosome 1	13.3188	0.0	0
Unc80	chromosome 1	9.5134	0.0	0
Cps1	chromosome 1	7.6108	0.0	0
Rbm44	chromosome 1	20.9296	0.0	0
Apoa2	chromosome 1	28.5403	0.0	0
Mllt10	chromosome 2	30.443	0.0	0
Al182371	chromosome 2	8.5621	0.0	0
Gm35128	chromosome 2	13.3188	0.0	0
Gm28042	chromosome 2	23.7836	0.0	0
Gm14117	chromosome 2	7.6108	0.0	0
Gm18767	chromosome 2	62.7887	0.0	0
Gcnt7	chromosome 2	5.7081	0.0	0
Gm9833	chromosome 3	7.6108	0.0	0
Car2	chromosome 3	5.7081	0.0	0
Igsf10	chromosome 3	6.6594	0.0	0
Gm10292	chromosome 3	7.6108	0.0	0
Fgg	chromosome 3	9.5134	0.0	0
Fga	chromosome 3	10.4648	0.0	0
Fgb	chromosome 3	9.5134	0.0	0
Gm36724	chromosome 3	21.8809	0.0	0
Slc6a17	chromosome 3	6.6594	0.0	0
Aldob	chromosome 4	5.7081	0.0	0
Mup7	chromosome 4	70.3994	0.0	0
Mup2	chromosome 4	14.2702	0.0	0
Mup9	chromosome 4	58.0319	0.0	0
Mup1	chromosome 4	64.6913	0.0	0
Mup10	chromosome 4	32.3457	0.0	0
Mup11	chromosome 4	15.2215	0.0	0
Gm21320	chromosome 4	41.8591	0.0	0
Mup14	chromosome 4	37.1024	0.0	0
Mup15	chromosome 4	62.7887	0.0	0
Mup16	chromosome 4	6.6594	0.0	0
Mup17	chromosome 4	39.0051	0.0	0
Mup19	chromosome 4	35.1997	0.0	0
Mup-ps21	chromosome 4	6.6594	0.0	0
Mup3	chromosome 4	31.3943	0.0	0
LOC105242444	chromosome 4	12.3675	0.0	0
Mir5122	chromosome 4	83.7182	0.0	0
Gc	chromosome 5	22.8322	0.0	0

Alb	chromosome 5	179.8039	0.0	0
Gm32853	chromosome 5	5.7081	0.0	0
Hpd	chromosome 5	5.7081	0.0	0
LOC102633883	chromosome 5	44.7131	0.0	0
Cyp3a11	chromosome 5	13.3188	0.0	0
Snca	chromosome 6	6.6594	0.0	0
Igkv9-120	chromosome 6	7.6108	0.0	0
Fabp1	chromosome 6	14.2702	0.0	0
Adamts9	chromosome 6	5.7081	0.0	0
Mug1	chromosome 6	9.5134	0.0	0
Pzp	chromosome 6	18.0755	0.0	0
2810047C21Rik1	chromosome 7	6.6594	0.0	0
1700008O03Rik	chromosome 7	9.5134	0.0	0
LOC105243016	chromosome 7	200.7334	0.0	0
Gm18853	chromosome 7	77.0588	0.0	0
LOC105243045	chromosome 7	91.329	0.0	0
Mcf2l	chromosome 8	14.2702	0.0	0
Ces3a	chromosome 8	5.7081	0.0	0
Lcat	chromosome 8	9.5134	0.0	0
Cnn1	chromosome 9	10.4648	0.0	0
Apoa1	chromosome 9	21.8809	0.0	0
Apoc3	chromosome 9	6.6594	0.0	0
Ppcdc	chromosome 9	7.6108	0.0	0
Plscr2	chromosome 9	9.5134	0.0	0
Gm35691	chromosome 9	24.7349	0.0	0
Mir26a-2	chromosome 10	179.8039	0.0	0
A430046D13Rik	chromosome 10	7.6108	0.0	0
Erlec1	chromosome 11	5.7081	0.0	0
Ranbp17	chromosome 11	6.6594	0.0	0
Sgcd	chromosome 11	5.7081	0.0	0
Gm35001	chromosome 11	8.5621	0.0	0
Vtn	chromosome 11	5.7081	0.0	0
Gm11419	chromosome 11	5.7081	0.0	0
Apoh	chromosome 11	5.7081	0.0	0
Apob	chromosome 12	12.3675	0.0	0
Psma6	chromosome 12	5.7081	0.0	0
Serpina1b	chromosome 12	22.8322	0.0	0
Serpina1d	chromosome 12	5.7081	0.0	0
Serpina1a	chromosome 12	26.6376	0.0	0
Serpina1c	chromosome 12	39.0051	0.0	0
Serpina3k	chromosome 12	32.3457	0.0	0
Ighg1	chromosome 12	5.7081	0.0	0
Cmah	chromosome 13	25.6863	0.0	0
Gm29842	chromosome 13	94.183	0.0	0
Bhmt	chromosome 13	6.6594	0.0	0
Gm32703	chromosome 13	19.9782	0.0	0
Tmem254c	chromosome 14	74.2048	0.0	0
Arhgef3	chromosome 14	66.594	0.0	0
Gm5801	chromosome 14	11.4161	0.0	0
Stc1	chromosome 14	8.5621	0.0	0
Gm21464	chromosome 14	9.5134	0.0	0
Gm35248	chromosome 15	5.7081	0.0	0
Has2	chromosome 15	8.5621	0.0	0
LOC105245974	chromosome 15	5.7081	0.0	0
Xrcc6	chromosome 15	8.5621	0.0	0
ChkbCpt1b	chromosome 15	19.9782	0.0	0
Ahsg	chromosome 16	19.0269	0.0	0
Kng1	chromosome 16	11.4161	0.0	0
Masp1	chromosome 16	7.6108	0.0	0
Golgb1	chromosome 16	55.1779	0.0	0
Zbtb20	chromosome 16	6.6594	0.0	0
Gm5812	chromosome 17	138.8961	0.0	0
LOC105246187	chromosome 17	11.4161	0.0	0
LOC102639315	chromosome 17	5.7081	0.0	0
Rps2	chromosome 17	5.7081	0.0	0
LOC105246252	chromosome 17	98.9397	0.0	0
Cyp4f39	chromosome 17	6.6594	0.0	0
Capn11	chromosome 17	6.6594	0.0	0
Ccnd3	chromosome 17	6.6594	0.0	0
LOC105246340	chromosome 17	8.5621	0.0	0

Prkce	chromosome 17	11.4161	0.0	0
Gm31704	chromosome 17	7.6108	0.0	0
Gm7497	chromosome 18	11.4161	0.0	0
Cdh2	chromosome 18	8.5621	0.0	0
Ttr	chromosome 18	19.0269	0.0	0
LOC105246393	chromosome 18	50.4212	0.0	0
Gm6756	chromosome 18	5.7081	0.0	0
Mir6359	chromosome 18	11.4161	0.0	0
Cd248	chromosome 19	7.6108	0.0	0
Zfp91Cntf	chromosome 19	7.6108	0.0	0
Aldh1a1	chromosome 19	10.4648	0.0	0
Rbp4	chromosome 19	6.6594	0.0	0
Cyp2c50	chromosome 19	6.6594	0.0	0
Gm35587	chromosome X	7.6108	0.0	0
Gm32262	chromosome X	6.6594	0.0	0
Gm1971	chromosome X	7.6108	0.0	0
Mid1	chromosome X	290.1597	0.0	0
Gm34192	chromosome Y	122.7233	0.0	0
Rpl34-ps1	chromosome 6	1125.4391	1.0539	0.000936
Gm14434	chromosome 2	117.0152	4.2156	0.036026
LOC102642778	chromosome 4	171.2418	6.3234	0.036927
Gbp2b	chromosome 3	55.1779	2.1078	0.0382
Gm4184	chromosome 10	23.7836	1.0539	0.044312
Mir1955	chromosome 2	82.7669	4.2156	0.050933
Tacc2	chromosome 7	19.0269	1.0539	0.05539
LOC105243744	chromosome X	188.366	11.5929	0.061545
Gm7120	chromosome 13	31.3943	2.1078	0.06714
Gm15711	chromosome 16	31.3943	2.1078	0.06714
Lgr6	chromosome 1	14.2702	1.0539	0.073853
Car3	chromosome 3	13.3188	1.0539	0.079129
0610031O16Rik	chromosome 3	38.0537	3.1617	0.083085
Col10a1	chromosome 10	12.3675	1.0539	0.085215
Vps13d	chromosome 4	22.8322	2.1078	0.092317
Wnt9a	chromosome 11	11.4161	1.0539	0.092317
Prox2	chromosome 12	11.4161	1.0539	0.092317
LOC105242584	chromosome 5	97.9884	9.4851	0.096798
E130112N10Rik	chromosome 6	10.4648	1.0539	0.100709
LOC105244943	chromosome 8	10.4648	1.0539	0.100709
Ptprk	chromosome 10	10.4648	1.0539	0.100709
Atp13a4	chromosome 16	10.4648	1.0539	0.100709
LOC102636360	chromosome 8	9.5134	1.0539	0.110781
Acat3	chromosome 17	9.5134	1.0539	0.110781
Apln	chromosome X	9.5134	1.0539	0.110781
Nid1	chromosome 13	27.589	3.1617	0.1146
Serping1	chromosome 2	8.5621	1.0539	0.123089
Esam	chromosome 9	8.5621	1.0539	0.123089
5033421B08Rik	chromosome 12	8.5621	1.0539	0.123089
Tmem45a	chromosome 16	8.5621	1.0539	0.123089
Cyp2e1	chromosome 7	24.7349	3.1617	0.127823
Grem2	chromosome 1	16.1728	2.1078	0.13033
Gm15551	chromosome 3	16.1728	2.1078	0.13033
Cxcl12	chromosome 6	16.1728	2.1078	0.13033
Gm14548	chromosome 7	1854.168	244.5053	0.131868
Grb14	chromosome 2	7.6108	1.0539	0.138474
Lpin3	chromosome 2	7.6108	1.0539	0.138474
Gpr153	chromosome 4	7.6108	1.0539	0.138474
Apold1	chromosome 6	7.6108	1.0539	0.138474
Gsg1	chromosome 6	7.6108	1.0539	0.138474
Muc5b	chromosome 7	7.6108	1.0539	0.138474
LOC102636338	chromosome 9	7.6108	1.0539	0.138474
LOC102641779	chromosome X	7.6108	1.0539	0.138474
Gm32527	chromosome Y	7.6108	1.0539	0.138474
Lama4	chromosome 10	15.2215	2.1078	0.138475
Scd1	chromosome 19	30.443	4.2156	0.138475
Ksr2	chromosome 5	22.8322	3.1617	0.138475
Myl4	chromosome 11	14.2702	2.1078	0.147706
Ptchd1	chromosome X	20.9296	3.1617	0.151064
Arhgap24	chromosome 5	110.3558	16.8624	0.1528
LOC105244127	chromosome 2	13.3188	2.1078	0.158258
Wwtr1	chromosome 3	13.3188	2.1078	0.158258

Gse1	chromosome 8	26.6376	4.2156	0.158258
Ddr1	chromosome 17	13.3188	2.1078	0.158258
Gm35768	chromosome 6	113.2099	18.9702	0.167567
LOC105242648	chromosome 6	12.3675	2.1078	0.170431
Paqr9	chromosome 9	12.3675	2.1078	0.170431
Cemip	chromosome 7	61.8373	10.539	0.170431
Cald1	chromosome 6	58.9833	10.539	0.178678
Mapre2	chromosome 18	45.6645	8.4312	0.184634
LOC102639518	chromosome 2	11.4161	2.1078	0.184634
Gm5106	chromosome 5	11.4161	2.1078	0.184634
Atp6v0e2	chromosome 6	11.4161	2.1078	0.184634
Wnt5a	chromosome 14	11.4161	2.1078	0.184634
Cracr2b	chromosome 7	48.5185	9.4851	0.195495
Shank1	chromosome 7	16.1728	3.1617	0.195495
Gm33470	chromosome 1	10.4648	2.1078	0.201418
Cubn	chromosome 2	10.4648	2.1078	0.201418
Prtg	chromosome 9	10.4648	2.1078	0.201418
Notch4	chromosome 17	10.4648	2.1078	0.201418
Camk4	chromosome 18	10.4648	2.1078	0.201418
Gpc4	chromosome X	15.2215	3.1617	0.207713
Rwdd3	chromosome 3	73.2534	15.8085	0.215806
Eif3j2	chromosome 18	43.7618	9.4851	0.216744
Dio2	chromosome 12	48.5185	10.539	0.217216
Gm32029	chromosome 7	163.631	35.8327	0.218985
Gm9869	chromosome 9	28.5403	6.3234	0.22156
Gm20752	chromosome 3	9.5134	2.1078	0.221561
LOC105242751	chromosome 6	9.5134	2.1078	0.221561
Dpep1	chromosome 8	9.5134	2.1078	0.221561
Gm527	chromosome 12	9.5134	2.1078	0.221561
Gm34758	chromosome 14	9.5134	2.1078	0.221561
Penk	chromosome 4	37.1024	8.4312	0.227241
Tnc	chromosome 4	134.1394	30.5632	0.227847
Lrrc32	chromosome 7	27.589	6.3234	0.2292
Cyr61	chromosome 3	68.4967	15.8085	0.230792
Cxcl13	chromosome 5	108.4531	25.2937	0.233222
1700071M16Rik	chromosome 17	680.2104	160.1931	0.235505
Ambp	chromosome 4	13.3188	3.1617	0.237386
Yap1	chromosome 9	13.3188	3.1617	0.237386
Apoc1	chromosome 7	21.8809	5.2695	0.240826
Rpl39l	chromosome 16	43.7618	10.539	0.240826
Mmp3	chromosome 9	86.5722	21.078	0.243473
Plxdc2	chromosome 2	34.2484	8.4312	0.246178
Gm11478	chromosome 11	17.1242	4.2156	0.246178
Rab11fip4os1	chromosome 11	38.0537	9.4851	0.249256
Gm15448	chromosome 7	194.074	48.4795	0.249799
Gm10705	chromosome 3	136.9934	34.7788	0.253872
Ptpn14	chromosome 1	12.3675	3.1617	0.255646
Snai2	chromosome 16	12.3675	3.1617	0.255646
Clip3	chromosome 7	109.4045	28.4554	0.260094
Gm36644	chromosome 15	32.3457	8.4312	0.260659
Ism1	chromosome 2	16.1728	4.2156	0.26066
F5	chromosome 1	19.9782	5.2695	0.263763
Dach1	chromosome 14	19.9782	5.2695	0.263763
Stfa3	chromosome 16	27.589	7.3773	0.2674
Fkbp10	chromosome 11	35.1997	9.4851	0.269465
Ptpn3	chromosome 4	19.0269	5.2695	0.27695
Hdc	chromosome 2	15.2215	4.2156	0.27695
LOC105244356	chromosome 2	15.2215	4.2156	0.27695
Col8a1	chromosome 16	30.443	8.4312	0.27695
Gm36445	chromosome 13	26.6376	7.3773	0.276951
Gm5483	chromosome 16	22.8322	6.3234	0.276951
Timp3	chromosome 10	121.7719	33.7249	0.276951
Flrt3	chromosome 2	66.594	18.9702	0.284864
Ccr1	chromosome 9	247.3493	71.6654	0.289734
Cnn3	chromosome 3	39.9564	11.5929	0.290139
LOC102633047	chromosome 1	14.2702	4.2156	0.295413
Gm10451	chromosome 12	14.2702	4.2156	0.295413
LOC105246138	chromosome 16	14.2702	4.2156	0.295413
Prrx1	chromosome 1	42.8105	12.6468	0.295414
Gm10693	chromosome 7	78.0102	23.1859	0.297216

Vgll3	chromosome 16	20.9296	6.3234	0.302127
Zfp30	chromosome 7	31.3943	9.4851	0.302128
Fam20a	chromosome 11	17.1242	5.2695	0.307722
Tmem254a	chromosome 14	17.1242	5.2695	0.307722
Rgs16	chromosome 1	23.7836	7.3773	0.310184
G530011O06Rik	chromosome X	175.9985	54.8029	0.311383
Cxcl3	chromosome 5	141.7502	44.2639	0.312267
Selenbp2	chromosome 3	32.3457	10.539	0.325824
Tnfaip8l3	chromosome 9	16.1728	5.2695	0.325825
Gm34656	chromosome 10	16.1728	5.2695	0.325825
Matk	chromosome 10	16.1728	5.2695	0.325825
Gm19151	chromosome X	41.8591	13.7007	0.327305
Ddr2	chromosome 1	28.5403	9.4851	0.332341
Trem1	chromosome 17	28.5403	9.4851	0.332341
Acta2	chromosome 19	286.3543	95.9051	0.334918
Mmp12	chromosome 9	1455.5552	487.9567	0.335238
Nt5e	chromosome 9	21.8809	7.3773	0.337157
Map1b	chromosome 13	21.8809	7.3773	0.337157
Pkp2	chromosome 16	43.7618	14.7546	0.337157
Timp1	chromosome X	187.4146	64.288	0.343026
Col5a1	chromosome 2	107.5018	36.8866	0.343125
Kcna2	chromosome 3	472.8176	162.3009	0.343263
Smoc2	chromosome 17	27.589	9.4851	0.3438
Ptk7	chromosome 17	27.589	9.4851	0.3438
Cetn4	chromosome 3	45.6645	15.8085	0.346188
Spint1	chromosome 2	36.151	12.6468	0.349833
Actg2	chromosome 6	18.0755	6.3234	0.349833
Frk	chromosome 10	18.0755	6.3234	0.349833
LOC105246535	chromosome 19	18.0755	6.3234	0.349833
Inhba	chromosome 13	129.3827	45.3178	0.350262
Tagln	chromosome 9	132.2367	46.3717	0.350672
Grem1	chromosome 2	78.0102	27.4015	0.351255
Hspg2	chromosome 4	59.9346	21.078	0.351683
Zfp518a	chromosome 19	50.4212	17.9163	0.355333
Acsbg1	chromosome 9	26.6376	9.4851	0.356079
A730098P11Rik	chromosome 16	218.809	77.9888	0.356424
Fermt2	chromosome 14	29.4916	10.539	0.357356
9330154K18Rik	chromosome 15	212.1496	75.881	0.357677
Gm20482	chromosome 7	61.8373	22.1319	0.357905
Pira1	chromosome 7	1085.4827	396.2672	0.365061
Gpatch2	chromosome 1	460.4501	168.6243	0.366216
Misp	chromosome 10	17.1242	6.3234	0.369267
Gm3219	chromosome 14	17.1242	6.3234	0.369267
Dusp5	chromosome 19	17.1242	6.3234	0.369267
Sod3	chromosome 5	37.1024	13.7007	0.369267
Abtb2	chromosome 2	74.2048	27.4015	0.369269
Mill2	chromosome 7	96.0857	35.8327	0.372924
U90926	chromosome 5	155.069	57.9646	0.373799
Cav1	chromosome 6	95.1343	35.8327	0.376654
Tm4sf1	chromosome 3	44.7131	16.8624	0.377124
Arhgef2	chromosome 3	108.4531	41.1022	0.378986
Ltbp2	chromosome 12	116.0639	44.2639	0.381375
Ctgf	chromosome 10	254.0087	96.959	0.381715
Gpc2	chromosome 5	52.3239	20.0241	0.382695
Col12a1	chromosome 9	142.7015	54.8029	0.384039
Rasgrp3	chromosome 17	46.6158	17.9163	0.38434
Plcl1	chromosome 1	21.8809	8.4312	0.385322
Bmp2	chromosome 2	21.8809	8.4312	0.385322
Ighg2c	chromosome 12	43.7618	16.8624	0.385322
3300002I08Rik	chromosome 2	19.0269	7.3773	0.38773
Loxl1	chromosome 9	19.0269	7.3773	0.38773
2010005H15Rik	chromosome 16	57.0806	22.1319	0.387731
Cyp1b1	chromosome 17	114.1612	44.2639	0.387732
Lilra6	chromosome 7	552.7304	216.0499	0.390878
Lamb1	chromosome 12	32.3457	12.6468	0.390989
Gm13861	chromosome 6	110.3558	43.21	0.391552
Tpcn2	chromosome 7	45.6645	17.9163	0.392346
Bgn	chromosome X	286.3543	113.8214	0.397485
LOC105243897	chromosome 1	23.7836	9.4851	0.398808
Magi1	chromosome 6	23.7836	9.4851	0.398808

Npdc1	chromosome 2	34.2484	13.7007	0.400039
Gm10045	chromosome 17	421.4451	169.6782	0.40261
Il1b	chromosome 2	1458.4092	589.1313	0.403955
Col1a1	chromosome 11	344.3863	140.169	0.407011
Gm17212	chromosome 3	25.6863	10.539	0.410297
Fn1	chromosome 1	618.3731	253.9904	0.41074
Vcan	chromosome 13	89.4263	36.8866	0.41248
Zfp781	chromosome 10	56.1293	23.1859	0.41308
Fzd1	chromosome 5	53.2752	22.1319	0.415426
Gm11007	chromosome 2	68.4967	28.4554	0.415427
Robo2	chromosome 16	35.1997	14.7546	0.419168
Cacnb3	chromosome 15	27.589	11.5929	0.4202
Spats2l	chromosome 1	52.3239	22.1319	0.422979
Adam23	chromosome 1	794.3716	336.1948	0.423221
Gm15590	chromosome 17	525.1415	222.3734	0.423454
Tnn	chromosome 1	49.4699	21.078	0.426077
Cd34	chromosome 1	49.4699	21.078	0.426077
Msrb3	chromosome 10	24.7349	10.539	0.426078
Nynrin	chromosome 14	34.2484	14.7546	0.430811
Col1a2	chromosome 6	390.0507	169.6782	0.435016
Zfp932	chromosome 5	356.7537	155.9775	0.437213
Gm7591	chromosome 14	42.8105	18.9702	0.44312
Dpysl3	chromosome 18	38.0537	16.8624	0.443121
Gm17828	chromosome 9	76.1075	33.7249	0.443122
Thbs1	chromosome 2	6512.896	2896.1231	0.444675
Gm35290	chromosome 17	79.9128	35.8327	0.448398
LOC100534330	chromosome 16	70.3994	31.6171	0.44911
Serpinb2	chromosome 1	1163.4928	522.7355	0.449281
Chst3	chromosome 10	25.6863	11.5929	0.451326
LOC102633627	chromosome 17	25.6863	11.5929	0.451326
Ifi27l2b	chromosome 12	51.3725	23.1859	0.451329
Pvrl3	chromosome 16	32.3457	14.7546	0.456153
1500017E21Rik	chromosome 19	80.8642	36.8866	0.456155
Draxin	chromosome 4	119.8693	54.8029	0.457189
Sparc	chromosome 11	306.3325	140.169	0.457571
Serpine1	chromosome 5	541.3143	248.7209	0.459476
Serpinh1	chromosome 7	118.9179	54.8029	0.460847
4931406H21Rik	chromosome 14	57.0806	26.3476	0.461586
Fstl1	chromosome 16	230.2251	106.4441	0.462348
Bcar3	chromosome 3	40.9078	18.9702	0.463731
LOC105246933	chromosome 5	40.9078	18.9702	0.463731
Gnao1	chromosome 8	36.151	16.8624	0.466444
Id3	chromosome 4	400.5155	187.5946	0.468383
LOC105242939	chromosome 7	31.3943	14.7546	0.469977
Col5a2	chromosome 1	335.8242	158.0853	0.470738
Lif	chromosome 11	38.0537	17.9163	0.470816
Ptpre	chromosome 7	114.1612	53.749	0.470817
Igfbp7	chromosome 5	185.5119	87.4739	0.471527
Id1	chromosome 2	91.329	43.21	0.473125
Aebp1	chromosome 11	179.8039	85.3661	0.474773
Tjp1	chromosome 7	271.1328	129.63	0.478105
Tnfsf14	chromosome 17	28.5403	13.7007	0.480048
Edil3	chromosome 13	37.1024	17.9163	0.482888
Gm15927	chromosome 7	52.3239	25.2937	0.483406
Atp6v0d2	chromosome 4	135.0907	65.3419	0.483689
Nr4a3	chromosome 4	81.8155	40.0483	0.489495
Gm20616	chromosome 19	357.7051	176.0017	0.49203
Arg1	chromosome 10	76.1075	37.9405	0.498512

2) 브루셀라균의 VSIG4-KO BMM 대식세포 감염 후 활성화 및 억제되는 대식세포 유전자의 기능적 분류

○ 브루셀라균의 VSIG4-KO BMM 감염 후 활성화 되는 유전자 164개와 억제되는 유전자 378개를 대상으로 각각의 특성에 따라 구분하였음 (Table 10).

Table 10. Functional category of VSIG4-KO-BMM genes up-regulated compared to BMM

Category	Contig	Gene	Protein	Fold
Chromatin structure and dynamics	chromosome 13	Hist1h2bq	Histone cluster 1, H2bq	2.954118
	chromosome 13	Hist1h2br	histone cluster 1 H2br	2.954118
	chromosome 13	Hist1h1a	histone cluster 1, H1a	8.862819
	chromosome 3	Hist2h2aa2	histone cluster 2, H2aa2	21.078
Energy production and conversion	chromosome 8	Ldhd	lactate dehydrogenase D	2.658725
Cell cycle control	chromosome X	Mcf2	mcf.2	5.538971
Nucleotide transport and metabolism	chromosome 11	Mpp3	membrane protein, palmitoylated 3	7.3773
Carbohydrate transport and metabolism	chromosome 11	Pgam2	phosphoglycerate mutase 2	5.539068
	chromosome 8	Rpl30-ps2	hypothetical protein	6.3234
	chromosome 9	Mir135a-1	microRNA 135a-1	11.5929
Lipid transport and metabolism	chromosome 19	Scd2	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	2.457543
	chromosome 2	LOC102635781	hypothetical protein	2.797208
	chromosome 4	Pla2g2e	phospholipase A2	4.209662
	chromosome 2	Gpat2	glycerol-3-phosphate acyltransferase 2	8.862819
	chromosome 2	Pla2g4b	phospholipase A2	17.9163
	chromosome 11	LOC105242916	hypothetical protein	14.7546
Translation, ribosome structure and biogenesis	chromosome 1	Gm35443	hypothetical protein	14.7546
Transcription	chromosome 12	Gm31332	hypothetical protein	2.125067
	chromosome 15	Tef	thyrotroph embryonic factor	2.139208
	chromosome 6	Gm34148	hypothetical protein	2.154441
	chromosome 6	Gm15531	hypothetical protein	2.362426
	chromosome 2	Dlx1	distal-less homeobox 1	7.3773
	chromosome 4	Bach2os	BTB and CNC homology 2	9.4851
	chromosome 4	Nfia	nuclear factor I/A	9.4851
	chromosome 5	Gm5294	hypothetical protein	6.3234
	chromosome 6	Gm19078	hypothetical protein	35.8327
Replication, recombination and repair	chromosome 6	Dqx1	DEAQ RNA-dependent ATPase	2.437183
	chromosome 8	LOC105246807	hypothetical protein	2.628038
	chromosome 12	Gm31623	hypothetical protein	4.308125
Cell wall/membrane/envelope biogenesis	chromosome 8	Gm3336	predicted gene 3336	6.3234
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	chromosome 8	Fut10	fucosyltransferase 10	2.077134
	chromosome 3	Mab21l3	mab-21-like 3	2.136484
	chromosome 7	Hpn	hepsin	2.295884
	chromosome 7	Spint2	serine protease inhibitor, Kunitz type 2	2.492537
	chromosome 15	Fbln1	fibulin 1	8.862819
	chromosome 3	LOC105244479	hypothetical protein	26.58856
	chromosome 2	LOC105244113	hypothetical protein	72.01051
	chromosome 3	Hmgb1-ps5	hypothetical protein	9.4851
	chromosome 4	Rsc1a1	hypothetical protein	150.708
	chromosome 11	Zfp750	zinc finger protein 750	2.215609
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	chromosome 7	Isoc2b	isochorismatase domain containing 2b	2.190713
Cytoskeleton	chromosome 11	Gm31109	hypothetical protein	2.133546
	chromosome 3	Tuft1	tuftelin 1	2.332219
	chromosome 1	Mlph	melanophilin	2.51774
	chromosome 11	LOC105242793	hypothetical protein	8.862819
	chromosome 5	Mtus2	microtubule associated tumor suppressor candidate 2	12.18638

	chromosome 5	Gm36185	hypothetical protein	34.7788
	chromosome 7	Nav2	neuron navigator 2	64.288
	chromosome 7	LOC1052 42941	hypothetical protein	29.5093
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	chromosome 3	P2ry1	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 1	2.437165
	chromosome 14	Il17rd	interleukin 17 receptor D	2.492537
	chromosome 7	Cd22	CD22 antigen	2.629515
	chromosome 4	LOC1052 47170	hypothetical protein	3.423332
	chromosome 12	Immp2l	IMP2innermitochondrialmembranepeptidase-like	3.988101
	chromosome 9	Cdhr4	hypothetical protein	8.862819
	chromosome 6	Gm13717	hypothetical protein	13.7007
	chromosome 8	Exoc3l	exocyst complex component 3-like	12.6468
	chromosome 11	Gm12118	predicted gene 12118	7.3773
	chromosome 19	Calhm1	calcium homeostasis modulator 1	9.4851
General function	chromosome 7	Slc5a11	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11	2.024604
	chromosome 7	Zfp507	zinc finger protein 507	2.030974
	chromosome 2	Macrod2	MACRO domain containing 2	2.461779
	chromosome 4	Fsbp	fibrinogen silencer binding protein	2.584885
	chromosome 14	Egr3	early growth response 3	2.769485
	chromosome 7	9830147 E19Rik	RIKEN cDNA 9830147E19 gene	2.769512
	chromosome 5	Gbp10	guanylate-binding protein 10	2.831058
	chromosome 12	Smoc1	SPARC related modular calcium binding 1	2.848635
	chromosome 5	Plb1	phospholipase B1	3.046447
	chromosome 13	Lrrc14b	leucine rich repeat containing 14B	3.12199
	chromosome Y	G530011 O06Rik	RIKEN cDNA G530011O06 gene	3.323409
	chromosome 9	LOC1052 43508	hypothetical protein	4.431203
	chromosome 17	Haghl	hydroxyacylglutathione hydrolase-like	5.539068
	chromosome 8	Gm32888	hypothetical protein	7.200662
	chromosome 3	Gm18588	predicted gene, 18588	7.754586
	chromosome 3	Gm31914	hypothetical protein	8.862819
	chromosome 7	Gm10575	hypothetical protein	11.63187
	chromosome 3	Nbea	neurobeachin	12.46271
	chromosome 18	4930592I 03Rik	RIKEN cDNA 4930592I03 gene	21.41753
	chromosome 9	LOC1052 43520	hypothetical protein	28.80427
	chromosome 7	Gm30891	hypothetical protein	26.3476
	chromosome 18	Gm5970	predicted gene 5970	45.3178
	chromosome 19	Zfpl1	zinc finger like protein 1	18.9702
Function unknown	chromosome 18	Pcdhga1 0	protocadherin gamma subfamily A, 10	2.022947
	chromosome 7	Svip	small VCP/p97-interacting protein	2.026471
	chromosome 6	Gm4604	hypothetical protein	2.051956
	chromosome 1	Kcnj13	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13	2.067897
	chromosome 10	LOC1052 45265	hypothetical protein	2.08133
	chromosome 3	Tmem14 4	transmembrane protein 144	2.099001
	chromosome 5	Gm13840	hypothetical protein	2.114895
	chromosome X	Xlr4a	X-linked lymphocyte-regulated 4A	2.215607
	chromosome 9	Dock3	dedicator of cyto-kinesis 3	2.259919
	chromosome 11	Fam117a	family with sequence similarity 117, member A	2.321835
	chromosome 2	Col9a3	collagen, type IX, alpha 3	2.33869
	chromosome 5	Rad9b	RAD9 homolog B	2.33869
	chromosome X	Xlr4c	X-linked lymphocyte-regulated 4C	2.547964
	chromosome 16	Gm18868	predicted gene, 18868	2.941408
	chromosome 7	Ffar2	free fatty acid receptor 2	3.138774
	chromosome 1	Tmem19 8	transmembrane protein 198	3.544979

chromosome 3	Bcl2l15	BCLl2-like 15	4.431223
chromosome 7	Fam154b	family with sequence similarity 154, member B	5.538971
chromosome 16	Gm15950 LOC1052	predicted gene 15950	14.40208
chromosome 5	42585	hypothetical protein	89.5817
chromosome 11	Rab11fip 4 5430427	RAB11 family interacting protein 4 (class II)	27.4015
chromosome 12	M07Rik	RIKEN cDNA 5430427M07 gene	46.3717
chromosome 18	Myoz3	myozenin 3	6.3234
chromosome X	Vsig4	V-set and immunoglobulin domain containing 4	60.0724
chromosome 2	Gm14210	hypothetical protein	47.63776
chromosome 1	Gm6195 LOC1052	hypothetical protein	103.2824
chromosome 5	46774	hypothetical protein	10.539
chromosome 13	Gm32641	hypothetical protein	20.0241
chromosome 17	Gm34321 LOC1052	hypothetical protein	83.2583
chromosome 9	45043	hypothetical protein	2.038358
chromosome 6	Gm6313	predicted gene 6313	2.136484
chromosome 10	Ulbp1	UL16 binding protein 1	2.141968
chromosome 11	Ccl8	chemokine (C-C motif) ligand 8	2.15045
chromosome 16	B4galt4 4933424	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 4	2.162858
chromosome 4	M12Rik	hypothetical protein	2.215603
chromosome 16	Gm4262	predicted gene 4262	2.215605
chromosome 1	Gm35473	hypothetical protein	2.215608
chromosome 4	Gm13238	predicted gene 13238	2.215613
chromosome 6	Gm36872	hypothetical protein	2.263773
chromosome 7	Gm17757	predicted gene, 17757	2.347491
chromosome 10	Txnrd1	thioredoxin reductase 1	2.354085
chromosome 5	Fry	furry homolog	2.400251
chromosome 3	Gm33641	hypothetical protein	2.437183
chromosome 1	Gm31728	hypothetical protein	2.461779
chromosome 12	Gm31482	hypothetical protein	2.461785
chromosome 6	M1ap 2310034	meiosis 1 associated protein	2.492537
chromosome 7	P14Rik	hypothetical protein	2.492537
chromosome Y	Erdr1	erythroid differentiation regulator 1	2.500297
chromosome 15	Zhx2	zinc fingers and homeoboxes 2	2.628088
chromosome 11	Cnot8	CCR4-NOT transcription complex, subunit 8	2.880282
chromosome 14	Gm10406	predicted gene 10406	2.954147
chromosome 14	Gm17222	predicted gene 17222	3.184936
chromosome 17	Gm7334 LOC1052	predicted gene 7334	3.323414
chromosome 15	45930 LOC1052	hypothetical protein	3.323417
chromosome 16	46098	hypothetical protein	3.323417
chromosome 6	Gm36327 LOC1008	hypothetical protein	4.154228
chromosome 14	61615	alpha takusan-like	4.431223
chromosome 7	Cd177	CD177 antigen	4.431254
chromosome 12	Snhg10 LOC1010	small nucleolar RNA host gene 10	4.431254
chromosome 18	55995	hypothetical protein	5.169797
chromosome 2	Rtel1	regulator of telomere elongation helicase 1	5.292837
chromosome 6	Igkv5-43	immunoglobulin kappa chain variable 5-43	7.200662
chromosome 2	Gm13561	hypothetical protein	8.862819
chromosome 5	Syna LOC1052	syncytin a	8.862819
chromosome 1	46648 F830016	hypothetical protein	11.07852
chromosome 18	B08Rik	RIKEN cDNA F830016B08 gene	12.18638
chromosome X	Xlr3b	X-linked lymphocyte-regulated 3B	24.37152

	chromosome 1	Gm35243	hypothetical protein	6.3234
	chromosome 3	Jade1	jade family PHD finger 1	9.4851
	chromosome 4	Ttll10	tubulin tyrosine ligase-like family, member 10	8.4312
	chromosome 4	Perm1	PPARGC1 and ESRR induced regulator, muscle 1	42.1561
	chromosome 5	Stag3	stromal antigen 3	47.4256
	chromosome 7	Rpl14-ps 1	hypothetical protein	315.1167
	chromosome 8	LOC1052 43298	hypothetical protein	7.3773
	chromosome 11	Gm20511	hypothetical protein	6.3234
	chromosome 11	Bahcc1	BAH domain and coiled-coil containing 1	18.9702
	chromosome 14	Spata13	spermatogenesis associated 13	9.4851
	chromosome 16	Gm15712	predicted gene 15712	24.2398
	chromosome 16	Zbtb11	zinc finger and BTB domain containing 11	15.8085
	chromosome 17	LOC1052 46232	hypothetical protein	7.3773

Table 11. Functional category of VSIG4-KO-BMM genes down-regulated compared to BMM

Category	Contig	Gene	Protein	Fold
Amino acid transport and metabolism	chromosome 10	Arg1	arginase, liver	0.498511973
	chromosome 13	Bhmt	betaine-homocysteine methyltransferase	0
	chromosome 8	Dpep1	dipeptidase 1 (renal)	0.221561166
	chromosome 2	Hdc	histidine decarboxylase	0.276950366
Carbohydrate transport and metabolism	chromosome 4	Aldob	aldolase B, fructose-bisphosphate	0
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	chromosome 3	Cetn4	centrin 4	0.346187958
	chromosome 5	Gpc2	glypican 2 (cerebroglycan)	0.382695097
Cell wall/membrane/envelope biogenesis	chromosome 15	Has2	hyaluronan synthase 2	0
Chromatin structure and dynamics	chromosome 6	Cav1	caveolin 1, caveolae protein	0.376653846
Cytoskeleton	chromosome 9	Cnn1	calponin 1	0
	chromosome 3	Cnn3	calponin 3, acidic	0.290138751
	chromosome 7	LOC10524 3016	hypothetical protein	0
	chromosome 9	Gm35691	hypothetical protein	0
	chromosome 3	Fgb	fibrinogen beta chain	0
	chromosome 18	Mapre2	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2	0.184633578
	chromosome 7	Tacc2	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2	0.05539
	chromosome 9	Tagln	transgelin	0.350671939
Energy production and conversion	chromosome 19	Aldh1a1	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1	0
	chromosome 4	Atp6v0d2	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit D2	0.483689107
	chromosome 6	Atp6v0e2	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit E2	0.184633982
	chromosome 3	0610031O 16Rik	RIKEN cDNA 0610031O16 gene	0.083085219
Function unkown	chromosome 5	Hpd	4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase	0
	chromosome 6	Adamts9	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1	0

		motif, 9	
chromosome 4	Ambp	alpha 1 microglobulin/bikunin	0.237386251
chromosome 16	Ahsg	alpha-2-HS-glycoprotein	0
chromosome 1	Apoa2	apolipoprotein A-II	0
chromosome 9	Apoc3	apolipoprotein C-III	0
chromosome 6	Apold1	apolipoprotein L domain containing 1	0.138474273
chromosome 6	Cald1	caldesmon 1	0.178677694
chromosome 19	Cd248	CD248 antigen, endosialin	0
chromosome 1	Cd34	CD34 antigen	0.426077271
chromosome 5	U90926	cDNA sequence U90926	0.373798761
chromosome 7	Cemip	cell migration inducing protein, hyaluronan binding	0.170431115
chromosome 5	Cxcl13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	0.233222471
chromosome 5	Cxcl3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	0.312266932
chromosome 15	ChkbCpt1b	Chkb-Cpt1b readthrough transcript (NMD candidate)	0
chromosome 10	Col10a1	collagen, type X, alpha 1	0.085215282
chromosome 17	Ccnd3	cyclin D3	0
chromosome 13	Cmah	cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase	0
chromosome 14	Gm3219	hypothetical protein	0.369266885
chromosome 14	Gm5801	hypothetical protein	0
chromosome Y	Gm32527	hypothetical protein	0.138474273
chromosome 13	Gm36445	hypothetical protein	0.276950626
chromosome 17	LOC105246187	hypothetical protein	0
chromosome 9	LOC102636338	hypothetical protein	0.138474273
chromosome 7	Gm15927	hypothetical protein	0.483406245
chromosome 5	Gm5106	hypothetical protein	0.184633982
chromosome 6	Gm13861	hypothetical protein	0.39155169
chromosome X	Gm1971	hypothetical protein	0
chromosome 7	Gm20482	hypothetical protein	0.357905342
chromosome X	Gm32262	hypothetical protein	0
chromosome 10	Gm34656	hypothetical protein	0.325824842
chromosome 14	Gm34758	hypothetical protein	0.221561166
chromosome 4	LOC102642778	hypothetical protein	0.036926732
chromosome 7	LOC105242939	hypothetical protein	0.469977034
chromosome 15	LOC105245974	hypothetical protein	0
chromosome 17	LOC105246340	hypothetical protein	0
chromosome 5	Gm32853	hypothetical protein	0
chromosome 12	5033421B08Rik	hypothetical protein	0.123088962
chromosome X	Gm35587	hypothetical protein	0
chromosome 7	Gm32029	hypothetical protein	0.218984789
chromosome 10	A430046D13Rik	hypothetical protein	0
chromosome 5	LOC105242584	hypothetical protein	0.096798192
chromosome 11	Gm11478	hypothetical protein	0.246177924
chromosome 2	LOC105244356	hypothetical protein	0.276950366
chromosome 8	LOC105244943	hypothetical protein	0.100709044
chromosome 19	Gm20616	hypothetical protein	0.492030167
chromosome 7	Gm10693	hypothetical protein	0.297216261
chromosome 11	Gm11419	hypothetical protein	0
chromosome 8	LOC102636360	hypothetical protein	0.110780583
chromosome 1	LOC102633047	hypothetical protein	0.295412818
chromosome 15	Gm35248	hypothetical protein	0
chromosome 5	LOC10524	hypothetical protein	0.463730633

	6933		
chromosome 6	LOC10524 2751	hypothetical protein	0.221561166
chromosome 13	Edil3	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3	0.482887899
chromosome 9	Esam	endothelial cell-specific adhesion molecule	0.123088962
chromosome 11	Fam20a	family with sequence similarity 20, member A	0.307722405
chromosome 2	Flrt3	fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	0.284863501
chromosome 8	Gse1	genetic suppressor element 1	0.158257501
chromosome 16	Golgb1	golgi autoantigen, golgin subfamily b, macrogolgin 1	0
chromosome 2	Gm35128	hypothetical protein	0
chromosome 4	Mup-ps21	hypothetical protein	0
chromosome 4	Gm21320	hypothetical protein	0
chromosome 12	Ighg1	immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)	0
chromosome 12	Ighg2c	immunoglobulin heavy constant gamma 2C	0.385322359
chromosome 6	Igkv9-120	immunoglobulin kappa chain variable 9-120	0
chromosome 3	Igsf10	immunoglobulin superfamily, member 10	0
chromosome 10	Lama4	laminin, alpha 4	0.138475183
chromosome 7	Lrrc32	leucine rich repeat containing 32	0.229200043
chromosome 1	Lgr6	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 6	0.073853205
chromosome 11	Lif	leukemia inhibitory factor	0.470816241
chromosome 4	Mup1	major urinary protein 1	0
chromosome 4	Mup10	major urinary protein 10	0
chromosome 4	Mup11	major urinary protein 11	0
chromosome 4	Mup14	major urinary protein 14	0
chromosome 4	Mup15	major urinary protein 15	0
chromosome 4	Mup16	major urinary protein 16	0
chromosome 4	Mup17	major urinary protein 17	0
chromosome 4	Mup19	major urinary protein 19	0
chromosome 4	Mup2	major urinary protein 2	0
chromosome 4	Mup3	major urinary protein 3	0
chromosome 4	Mup7	major urinary protein 7	0
chromosome 4	Mup9	major urinary protein 9	0
chromosome 8	Mcf2l	mcf.2 transforming sequence-like	0
chromosome 18	Mir6359	microRNA 6359	0
chromosome 13	Map1b	microtubule-associated protein 1B	0.337157064
chromosome 1	Map2	microtubule-associated protein 2	0
chromosome X	Mid1	midline 1	0
chromosome 10	Misp	mitotic spindle positioning	0.369266885
chromosome 7	Muc5b	mucin 5, subtype B, tracheobronchial	0.138474273
chromosome 2	Mllt10	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)	0
chromosome 11	Myl4	myosin, light polypeptide 4	0.147706409
chromosome 9	Plscr2	phospholipid scramblase 2	0
chromosome 9	Ppcdc	phosphopantothenoylcysteine decarboxylase	0
chromosome 3	Gm10292	predicted gene 10292	0
chromosome 12	Gm10451	predicted gene 10451	0.295412818
chromosome 16	Gm15711	predicted gene 15711	0.067139576
chromosome 12	Gm527	predicted gene 527	0.221561166
chromosome 17	Gm5812	predicted gene 5812	0
chromosome 18	Gm6756	predicted gene 6756	0
chromosome 13	Gm7120	predicted gene 7120	0.067139576
chromosome 3	Gm9833	predicted gene 9833	0
chromosome 7	Gm18853	predicted gene, 18853	0
chromosome X	Gm19151	predicted gene, 19151	0.327305174
chromosome 3	Gm20752	predicted gene, 20752	0.221561166
chromosome 2	Gm28042	predicted gene, 28042	0
chromosome 12	Prox2	prospero homeobox 2	0.092316991
chromosome 9	Prtg	protogenin homolog (Gallus gallus)	0.201418087
chromosome 11	Rab11fip4os1	RAB11 family interacting protein 4 (class II), opposite strand 1	0.249255657
chromosome 5	Arhgap24	Rho GTPase activating protein 24	0.152800306
chromosome 17	Rps2	ribosomal protein S2	0
chromosome 19	1500017E	RIKEN cDNA 1500017E21 gene	0.456154887

	chromosome 7	21Rik 1700008O 03Rik	RIKEN cDNA 1700008O03 gene	0
	chromosome 7	2810047C 21Rik1	RIKEN cDNA 2810047C21 gene 1	0
	chromosome 6	E130112N 10Rik	RIKEN cDNA E130112N10 gene	0.100709044
	chromosome 1	Rbm44	RNA binding motif protein 44	0
	chromosome 3	Rwdd3	RWD domain containing 3	0.215805683
	chromosome 1	Spats2l	spermatogenesis associated, serine-rich 2-like	0.422978792
	chromosome 6	Snca	synuclein, alpha	0
	chromosome 1	Tnn	tenascin N	0.426077271
	chromosome 14	Tmem254 a	transmembrane protein 254a	0.307722405
	chromosome 14	Tmem254 c	transmembrane protein 254c	0
	chromosome 16	Tmem45a	transmembrane protein 45a	0.123088962
	chromosome 17	Trem1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1	0.332340585
	chromosome 17	Tnfsf14	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14	0.480047512
	chromosome 7	Tpcn2	two pore segment channel 2	0.392346352
	chromosome 1	Unc80	unc-80 homolog (C. elegans)	0
	chromosome 4	Vps13d	vacuolar protein sorting 13 D (yeast)	0.092316991
	chromosome 16	Vgll3	vestigial like 3 (Drosophila)	0.302127131
	chromosome 11	Wnt9a	wingless-type MMTV integration site family, member 9A	0.092316991
	chromosome 15	Xrcc6	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6	0
	chromosome 19	Zfp91Cntf	Zfp91-Cntf readthrough transcript (NMD candidate)	0
	chromosome 16	Zbtb20	zinc finger and BTB domain containing 20	0
	chromosome 19	Zfp518a	zinc finger protein 518A	0.355332678
General function prediction only	chromosome 19	Acta2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0.334917618
	chromosome 6	Actg2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	0.349832646
	chromosome 11	Aebp1	AE binding protein 1	0.47477335
	chromosome 2	Abtb2	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2	0.369268565
	chromosome 11	Apoh	apolipoprotein H	0
	chromosome 3	Bcar3	breast cancer anti-estrogen resistance 3	0.463730633
	chromosome 7	Cracr2b	calcium release activated channel regulator 2B	0.195494502
	chromosome 11	Col1a1	collagen, type I, alpha 1	0.407010964
	chromosome 2	Col5a1	collagen, type V, alpha 1	0.343125417
	chromosome 2	Gm11007	hypothetical protein	0.415427313
	chromosome 9	Gm9869	hypothetical protein	0.22156039
	chromosome 6	LOC10524 2648	hypothetical protein	0.170430564
	chromosome 2	LOC10524 4127	hypothetical protein	0.158257501
	chromosome 17	Gm31704	hypothetical protein	0
	chromosome X	LOC10524 3744	hypothetical protein	0.061544546
	chromosome 17	LOC10524 6252	hypothetical protein	0
	chromosome Y	Gm34192	hypothetical protein	0
	chromosome 5	LOC10263 3883	hypothetical protein	0
	chromosome 17	Gm35290	hypothetical protein	0.448397503
	chromosome 17	LOC10263 3627	hypothetical protein	0.451326193
	chromosome 2	AI182371	expressed sequence AI182371	0
	chromosome 14	Fermt2	fermitin family homolog 2 (Drosophila)	0.357355993
	chromosome 16	Fstl1	follistatin-like 1	0.462347937
	chromosome 1	Gpatch2	G patch domain containing 2	0.366216231
	chromosome 2	Gcnt7	glucosaminyl (N-acetyl) transferase family member 7	0
	chromosome 8	Gnao1	guanine nucleotide binding protein, alpha O	0.466443529
	chromosome 3	Gbp2b	guanylate binding protein 2b	0.038200076

	chromosome 5	Igfbp7	insulin-like growth factor binding protein 7	0.471527163
	chromosome 12	Ifi27l2b	interferon, alpha-inducible protein 27 like 2B	0.451329018
	chromosome 12	Ltbp2	latent transforming growth factor beta binding protein 2	0.38137526
	chromosome 2	Lpin3	lipin 3	0.138474273
	chromosome 2	Mir1955	microRNA 1955	0.050933405
	chromosome 6	Mug1	murinoglobulin 1	0
	chromosome 2	Npdc1	neural proliferation, differentiation and control 1	0.400039126
	chromosome 17	Notch4	notch 4	0.201418087
	chromosome 2	Plxdc2	plexin domain containing 2	0.246177924
	chromosome 2	Gm14117	predicted gene 14117	0
	chromosome 2	Gm14434	predicted gene 14434	0.036026089
	chromosome 17	Gm15590	predicted gene 15590	0.42345425
	chromosome 9	Gm17828	predicted gene, 17828	0.4431219
	chromosome 6	Pzp	pregnancy zone protein	0
	chromosome 9	Paqr9	progestin and adipoQ receptor family member IX	0.170430564
	chromosome 17	Rasgrp3	RAS, guanyl releasing protein 3	0.384339644
	chromosome 2	3300002I08Rik	RIKEN cDNA 3300002I08 gene	0.387730003
	chromosome 14	4931406H21Rik	RIKEN cDNA 4931406H21 gene	0.461585898
	chromosome 16	A730098P11Rik	RIKEN cDNA A730098P11 gene	0.356424096
	chromosome X	G530011O06Rik	RIKEN cDNA G530011O06 gene	0.311382767
	chromosome 16	LOC100534330	RNA binding motif protein 39 pseudogene	0.449110362
	chromosome 3	Selenbp2	selenium binding protein 2	0.325823834
	chromosome 7	Shank1	SH3/ankyrin domain gene 1	0.195494905
	chromosome 16	Snai2	snail family zinc finger 2	0.255645846
	chromosome 17	Smoc2	SPARC related modular calcium binding 2	0.343800065
	chromosome X	Timp1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	0.34302557
	chromosome 11	Vtn	vitronectin	0
	chromosome 7	Zfp30	zinc finger protein 30	0.302128093
	chromosome 10	Zfp781	zinc finger protein 781	0.413080156
	chromosome 5	Zfp932	zinc finger protein 932	0.437213405
Inorganic ion transport and metabolism	chromosome 16	Atp13a4	ATPase type 13A4	0.100709044
	chromosome 3	Car2	carbonic anhydrase 2	0
	chromosome 3	Car3	carbonic anhydrase 3	0.07912875
	chromosome 15	Gm36644	hypothetical protein	0.260659068
	chromosome 4	Mir5122	microRNA 5122	0
	chromosome 3	Kcna2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 2	0.343263237
	chromosome 3	Slc6a17	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 17	0
	chromosome 5	Sod3	superoxide dismutase 3, extracellular	0.369267217
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	chromosome 1	Adam23	a disintegrin and metallopeptidase domain 23	0.423221072
	chromosome 12	Apob	apolipoprotein B	0
	chromosome 18	Cdh2	cadherin 2	0
	chromosome 15	Cacnb3	calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit	0.42020008
	chromosome 10	Chst3	carbohydrate (chondroitin 6/keratan) sulfotransferase 3	0.451326193
	chromosome 9	Ccr1	chemokine (C-C motif) receptor 1	0.289733587
	chromosome 9	Col12a1	collagen, type XII, alpha 1	0.38403871
	chromosome 2	Cubn	cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	0.201418087
	chromosome 6	Gm35768	hypothetical protein	0.167566617
	chromosome 19	LOC105246535	hypothetical protein	0.349832646
	chromosome 13	Gm29842	hypothetical protein	0
	chromosome 11	Gm35001	hypothetical protein	0
	chromosome 3	Gm36724	hypothetical protein	0
	chromosome 18	LOC105246393	hypothetical protein	0
	chromosome 10	Gm4184	hypothetical protein	0.044312047
	chromosome 7	Gm15448	hypothetical protein	0.249799046

	chromosome 3	Fgg	fibrinogen gamma chain	0
	chromosome 5	Fzd1	frizzled homolog 1 (Drosophila)	0.415425939
	chromosome 4	Gpr153	G protein-coupled receptor 153	0.138474273
	chromosome 6	Gsg1	germ cell-specific gene 1	0.138474273
	chromosome 5	Gc	group specific component	0
	chromosome 12	Lamb1	laminin B1	0.390988601
	chromosome 7	Lilra6	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 6	0.390877542
	chromosome 7	Mill2	MHC I like leukocyte 2	0.372924379
	chromosome 7	Pira1	paired-Ig-like receptor A1	0.365060816
	chromosome X	Ptchd1	patched domain containing 1	0.151063565
	chromosome 16	Pkp2	plakophilin 2	0.337157064
	chromosome 16	Pvrl3	poliovirus receptor-related 3	0.456153368
	chromosome 7	Gm14548	predicted gene 14548	0.131867932
	chromosome 18	Gm7497	predicted gene 7497	0
	chromosome 11	Ranbp17	RAN binding protein 17	0
	chromosome 19	Rbp4	retinol binding protein 4, plasma	0
	chromosome 16	Robo2	roundabout homolog 2 (Drosophila)	0.419168345
	chromosome 11	Sgcd	sarcoglycan, delta (dystrophin-associated glycoprotein)	0
	chromosome 3	Tm4sf1	transmembrane 4 superfamily member 1	0.377124377
Lipid transport and metabolism	chromosome 17	Acat3	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 3	0.110780583
	chromosome 9	Acsbg1	acyl-CoA synthetase bubblegum family member 1	0.356079377
	chromosome 7	Clip3	CAP-GLY domain containing linker protein 3	0.260093506
	chromosome 8	Ces3a	carboxylesterase 3A	0
	chromosome 6	Fabp1	fatty acid binding protein 1, liver	0
	chromosome 8	Lcat	lecithin cholesterol acyltransferase	0
	chromosome 17	1700071M16Rik	RIKEN cDNA 1700071M16 gene	0.23550522
	chromosome 19	Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	0.138475183
Nucleotide transport and metabolism	chromosome 9	Nt5e	5' nucleotidase, ecto	0.337157064
	chromosome 1	Cps1	carbamoyl-phosphate synthetase 1	0
	chromosome X	LOC101641779	hypothetical protein	0.138474273
	chromosome 18	Dpysl3	dihydropyrimidinase-like 3	0.443121168
	chromosome 18	Ttr	transthyretin	0
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	chromosome 5	Alb	albumin	0
	chromosome X	Apln	apelin	0.110780583
	chromosome 9	Apoa1	apolipoprotein A-I	0
	chromosome 7	Apoc1	apolipoprotein C-I	0.240826474
	chromosome X	Bgn	biglycan	0.397484515
	chromosome 2	Bmp2	bone morphogenetic protein 2	0.385322359
	chromosome 17	Capn11	calpain 11	0
	chromosome 6	Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	0.130329937
	chromosome 1	Col5a2	collagen, type V, alpha 2	0.470738261
	chromosome 16	Col8a1	collagen, type VIII, alpha 1	0.276950366
	chromosome 3	Cyr61	cysteine rich protein 61	0.23079214
	chromosome 12	Dio2	deiodinase, iodothyronine, type II	0.217216113
	chromosome 14	Gm21464	hypothetical protein	0
	chromosome 17	LOC101639315	hypothetical protein	0
	chromosome 3	Gm10705	hypothetical protein	0.253872084
	chromosome 4	Draxin	dorsal inhibitory axon guidance protein	0.457188788
	chromosome 11	Erlec1	endoplasmic reticulum lectin 1	0
	chromosome 3	Fga	fibrinogen alpha chain	0
	chromosome 1	Fn1	fibronectin 1	0.41073973
	chromosome 11	Fkbp10	FK506 binding protein 10	0.269465365
	chromosome X	Gpc4	glypican 4	0.207712775
	chromosome 2	Grem1	gremlin 1	0.351255349
	chromosome 1	Grem2	gremlin 2 homolog, cysteine knot superfamily (Xenopus laevis)	0.130329937
	chromosome 2	Ism1	isthmin 1 homolog (zebrafish)	0.260659873
	chromosome 16	Kng1	kininogen 1	0
	chromosome 9	Loxl1	lysyl oxidase-like 1	0.387730003
	chromosome 16	Masp1	mannan-binding lectin serine peptidase 1	0
	chromosome 9	Mmp12	matrix metallopeptidase 12	0.335237509
	chromosome 9	Mmp3	matrix metallopeptidase 3	0.243473078

	chromosome 6	Magi1	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1	0.398808423
	chromosome 10	Msrb3	methionine sulfoxide reductase B3	0.426078133
	chromosome 1	Mir6897	microRNA 6897	0
	chromosome 13	Nid1	nidogen 1	0.114600022
	chromosome 4	Hspg2	perlecan (heparan sulfate proteoglycan 2)	0.351683335
	chromosome 16	Gm5483	predicted gene 5483	0.276950973
	chromosome 4	Penk	preproenkephalin	0.227241364
	chromosome 12	Psma6	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 6	0
	chromosome 16	2010005H15Rik	RIKEN cDNA 2010005H15 gene	0.387730683
	chromosome 11	Sparc	secreted acidic cysteine rich glycoprotein	0.45757143
	chromosome 12	Serpina1a	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1A	0
	chromosome 12	Serpina1c	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1C	0
	chromosome 12	Serpina1d	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1D	0
	chromosome 12	Serpina3k	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3K	0
	chromosome 1	Serpinb2	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 2	0.44928125
	chromosome 5	Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	0.459475946
	chromosome 2	Serping1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1	0.123088962
	chromosome 7	Serpinh1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade H, member 1	0.460846517
	chromosome 12	Serpina1b	serine (or cysteine) preptidase inhibitor, clade A, member 1B	0
	chromosome 2	Spint1	serine protease inhibitor, Kunitz type 1	0.349832646
	chromosome 14	Stc1	stanniocalcin 1	0
	chromosome 16	Stfa3	stefin A3	0.267400051
	chromosome 4	Tnc	tenascin C	0.227846554
	chromosome 2	Thbs1	thrombospondin 1	0.444675164
	chromosome 10	Timp3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3	0.276951415
	chromosome 13	Vcan	versican	0.412480445
	chromosome 14	Wnt5a	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	0.184633982
Replication, recombination and repair	chromosome 1	LOC105243897	hypothetical protein	0.398808423
	chromosome 16	LOC105246138	hypothetical protein	0.295412818
	chromosome 14	Nynrin	NYN domain and retroviral integrase containing	0.430811366
RNA processing and modification	chromosome 1	F5	coagulation factor V	0.263762501
	chromosome 6	Col1a2	collagen, type I, alpha 2	0.435015756
	chromosome 10	Ctgf	connective tissue growth factor	0.381715272
	chromosome 9	Tnfaip8l3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 3	0.325824842
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	chromosome 17	Cyp1b1	cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1	0.387731559
	chromosome 19	Cyp2c50	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 50	0
	chromosome 7	Cyp2e1	cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1	0.12782344
	chromosome 5	Cyp3a11	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 11	0
	chromosome 17	Cyp4f39	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 39	0
Signal transduction mechanisms	chromosome 18	Camk4	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	0.201418087
	chromosome 3	Gm15551	hypothetical protein	0.130329937
	chromosome 2	LOC102639518	hypothetical protein	0.184633982
	chromosome 14	Gm7591	hypothetical protein	0.443120263
	chromosome 1	Gm33470	hypothetical protein	0.201418087

	chromosome 7	LOC105243045	hypothetical protein	0
	chromosome 13	Gm32703	hypothetical protein	0
	chromosome 17	Ddr1	discoidin domain receptor family, member 1	0.158257501
	chromosome 1	Ddr2	discoidin domain receptor family, member 2	0.332340585
	chromosome 19	Dusp5	dual specificity phosphatase 5	0.369266885
	chromosome 10	Frk	fyn-related kinase	0.349832646
	chromosome 2	Grb14	growth factor receptor bound protein 14	0.138474273
	chromosome 5	Ksr2	kinase suppressor of ras 2	0.138475486
	chromosome 10	Matk	megakaryocyte-associated tyrosine kinase	0.325824842
	chromosome 1	Plcl1	phospholipase C-like 1	0.385322359
	chromosome 3	Gm17212	predicted gene 17212	0.410296539
	chromosome 17	Prkce	protein kinase C, epsilon	0
	chromosome 1	Ptpn14	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14	0.255645846
	chromosome 4	Ptpn3	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3	0.276950002
	chromosome 7	Ptpre	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	0.470816705
	chromosome 10	Ptprk	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	0.100709044
	chromosome 17	Ptk7	PTK7 protein tyrosine kinase 7	0.343800065
	chromosome 14	Arhgef3	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3	0
	chromosome 3	Arhgef2	rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	0.37898594
	chromosome 7	Tjp1	tight junction protein 1	0.478105194
Transcription	chromosome 14	Dach1	dachshund 1 (Drosophila)	0.263762501
	chromosome 4	LOC105242444	hypothetical protein	0
	chromosome 15	9330154K18Rik	hypothetical protein	0.357676847
	chromosome 13	Inhba	inhibin beta-A	0.350261666
	chromosome 2	Id1	inhibitor of DNA binding 1	0.473124637
	chromosome 4	Id3	inhibitor of DNA binding 3	0.468382872
	chromosome 2	Il1b	interleukin 1 beta	0.403954734
	chromosome 10	Mir26a-2	microRNA 26a-2	0
	chromosome 4	Nr4a3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	0.489495267
	chromosome 1	Prrx1	paired related homeobox 1	0.295413508
	chromosome 2	Gm18767	predicted gene, 18767	0
	chromosome 1	Rgs16	regulator of G-protein signaling 16	0.310184329
	chromosome 3	Wwtr1	WW domain containing transcription regulator 1	0.158257501
	chromosome 9	Yap1	yes-associated protein 1	0.237386251
Translation, ribosomal structure and biogenesis	chromosome 6	Rpl34-ps1	hypothetical protein	0.000936434
	chromosome 17	Gm10045	hypothetical protein	0.402610447
	chromosome 18	Eif3j2	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit J2	0.216743827
	chromosome 16	Rpl39l	ribosomal protein L39-like	0.240826474

○ 브루셀라균의 VSIG4-KO BMM 감염 후 증가 및 억제되는 유전자의 기능별 분류 결과를 토대로 추후 항원으로 활용 가능한 핵심 유전자 군의 발현 양상을 heatmap으로 도식화하면 다음과 같음 (그림 31).

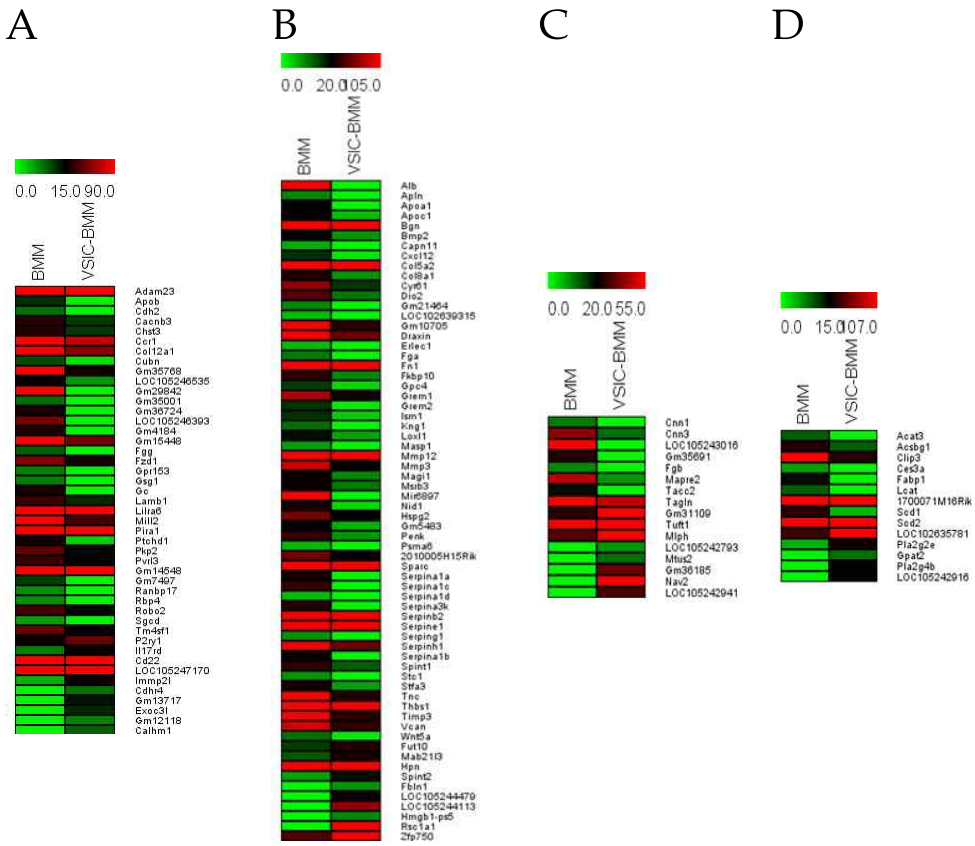


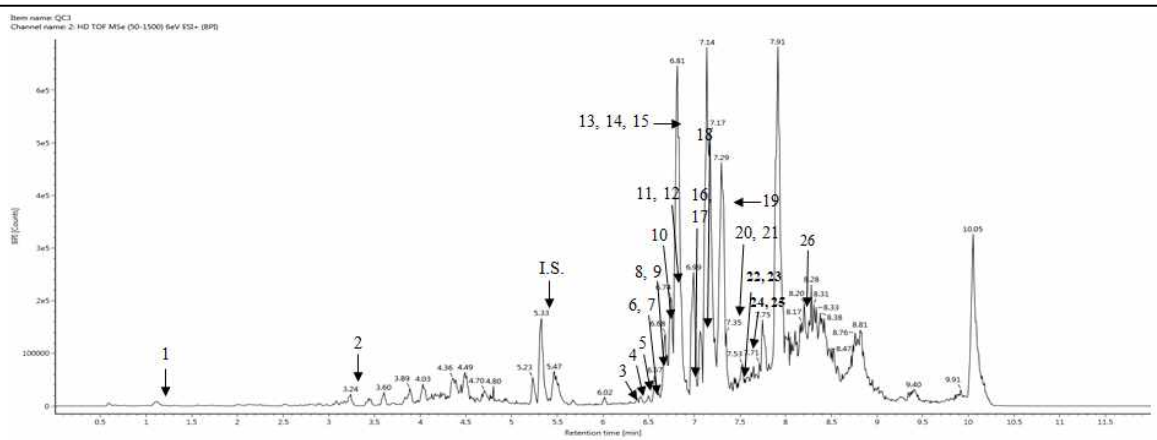
그림 31. 브루셀라균의 BMM 및 VSIG4-KO BMM 감염 후 변화되는 유전자들의 기능적 분류 결과

(A: Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport, B: Posttranslational modification, protein turnover, chaperones, C: Cytoskeleton, D: Lipid transport and metabolism)

□ 브루셀라균의 세포 및 목적동물 (소)감염 시 나타나는 오믹스 분석

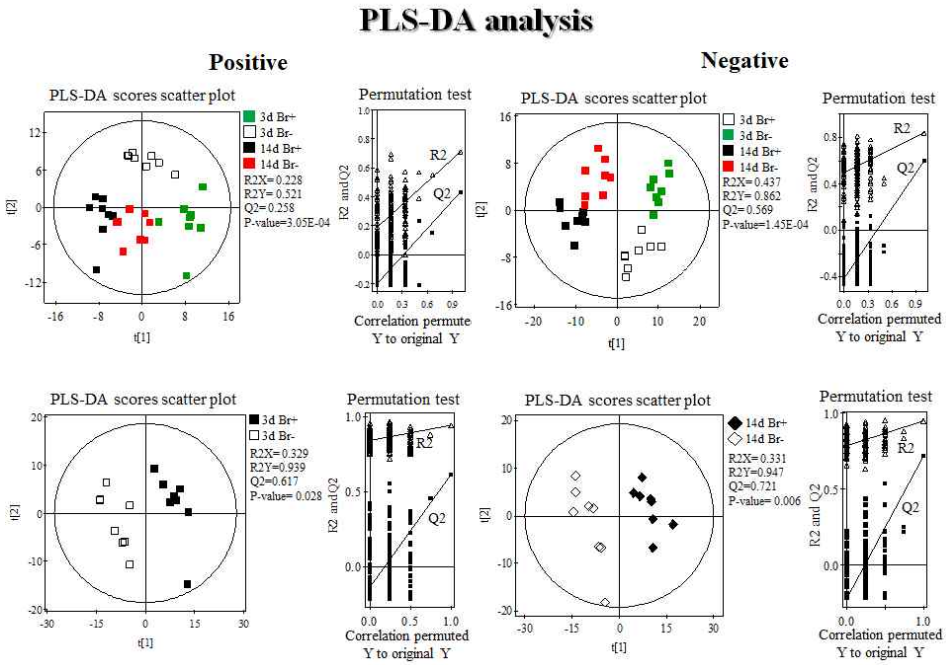
1) 탐식세포 감염시 발현되는 브루셀라균의 대사체(metabolome) 규명. 마우스 유래 대식구에 브루셀라균을 감염시킨 후 24시간 경과한 시점에서 발현되는 대사체에 대한 분석을 수행해 본 결과 다양한 대사체가 감염군과 비감염 군에서 차이가 나타나는 것이 확인 되어 이를 이용한 진단, 치료 및 발병기전의 해석에 중요한 역할을 담당할 것으로 예측 됨 (그림 32).

A



1, hydroxyxanthine; 2, unknown; 3, linolaidylcarnitine; 4, lysophosphatidylcholine(LPC)(C14:0); 5, LPC(C20:5); 6, LPC(C18:3); 7, palimitoylcarnitine; 8, LPC(C16:1); 9, vaccenylcarnitine; 10, LPC(C18:2) 2M; 11, LPC(C20:3);. 12, LPC(C22:6) 2M; 13, LPC(C15:0); 14, LPC(C20:4) 2M; 15, LPC(C18:2) 2M; 16, LPC(C22:5); 17, LPC(C17:1); 18, LPC(C20:3) 2M; 19, LPC(C18:1) 2M; 20, LPC(C22:4); 21, LPC(C15:0); 22, LPC(C20:2); 23, LPC(C17:1); 24,LPC(C17:1); 25, LPC(C17:0); 26, LPC(C17:0)

B



C

Identification of major metabolites contributing the separation among sample groups

No.	RT (min)	Compound	Exact mass (M+H)	MS Fragments	VIP	*p*-value
1	1.09	hydroxyxanthine	169.0360	141, 124	1.20	1.58 e-04
2	3.26	unknown	362.1964	344	0.96	3.06e-02
3	6.30	linoelaidylcarnitine	424.3421	85	1.89	5.13e-06
4	6.38	LPC(C14:0)	468.3088	450, 184, 104	1.41	5.91e-03
5	6.41	LPC(C20:5)	542.3248	524, 184, 104	2.00	1.38e-06
6	6.49	LPC(C18:3)	518.3246	184, 104	1.96	2.04e-06
7	6.51	palimitoylcarnitine	400.3424	85	1.92	6.31e-06
8	6.57	LPC(C16:1)	494.3249	476, 184, 104	1.72	2.63e-04
9	6.58	vaccenylcarnitine	426.3579	85	1.91	1.76e-05
10	6.67	LPC(C18:2) 2M	1039.6740	520, 184, 104	1.55	4.55e-03
11	6.72	LPC(C20:3)	526.2936	184, 104	1.59	1.33e-03
12	6.73	LPC(C22:6) 2M	1135.6730	568, 184, 104	1.73	2.96e-04
13	6.76	LPC(C15:0)	482.3243	184, 104	1.89	9.80e-06
14	6.78	LPC(C20:4) 2M	1087.6730	544, 184, 104	1.84	7.61e-06
15	6.81	LPC(C18:2) 2M	1039.6730	520, 184, 104	1.87	2.51e-04
16	6.93	LPC(C22:5)	570.3558	184, 104	1.87	1.69e-05
17	6.94	LPC(C17:1)	508.3401	184, 104	1.66	5.11e-04
18	7.07	LPC(C20:3) 2M	1091.7030	546, 184, 104	1.88	2.40e-06
19	7.30	LPC(C18:1) 2M	1043.704	522, 184, 104	1.79	4.02e-05
20	7.33	LPC(C22:4)	572.3710	184, 104	1.82	8.14e-05
21	7.36	LPC(C15:0)	482.3607	184, 104	2.12	1.25e-08
22	7.47	LPC(C20:2)	482.3607	184, 104	1.30	1.56e-03
23	7.48	LPC(C17:1)	508.3764	184, 104	2.05	1.79e-07
24	7.50	LPC(C17:1)	508.3766	184, 104	2.04	1.24e-07
25	7.52	LPC(C17:0)	510.3563	184, 104	1.59	1.49e-03
26	8.16	LPC(C17:0)	510.3923	184, 104	1.53	2.03e-03

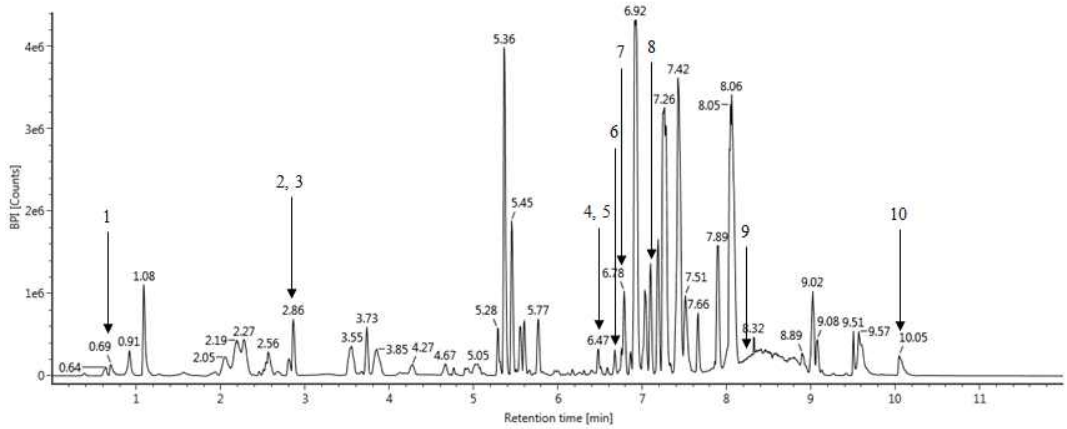
그림 32. 탐식세포 감염시 발현되는 브루셀라균의 대사체(metabolome) 규명. Chromatogram (A), PLS-DA analysis (B), 비감염 대조군과 차이를 보이는 대사체 분석 (C)

2) 목적동물 (소) 감염시 발현되는 브루셀라균의 대사체(metabolome) 규명. 브루셀라 감염개체로 확인된 소의 혈액을 채취하여 절대음성 소의 혈액과 대사체에 대한 분석을 수행해본 결과 다양한 대사체가 감염군과 비감염 군에서 차이가 나타나는 것이 확인 되어 이를 이용한 진단, 치료 및 발병기전의 해석에 중요한 역할을 담당할 것으로 예측 됨(그림 33)

A

Serum (Cattle)

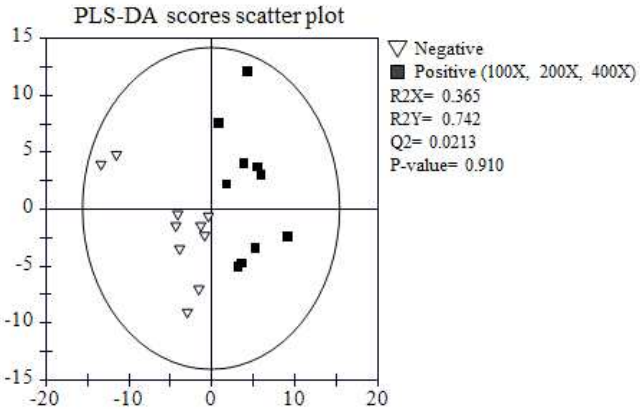
Chromatogram

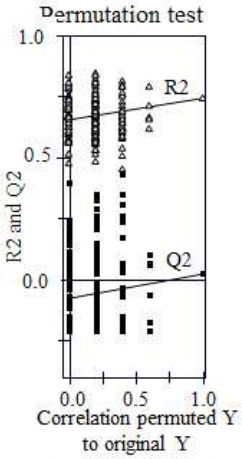


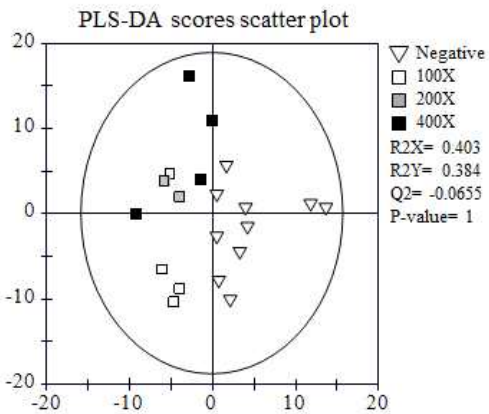
1, Ethyl aconitate; 2, tryptophan; 3, 3-Indolealdehyde; 4, LPC(C14:0); 5, LPC(C18:3); 5, LPC(C15:0); 6, LPC(C20:4); 7, LPC(C20:3); 8, SM(d18:1/16:1(9Z)); 9, PC(C17:1); 10, PC(C18:1)

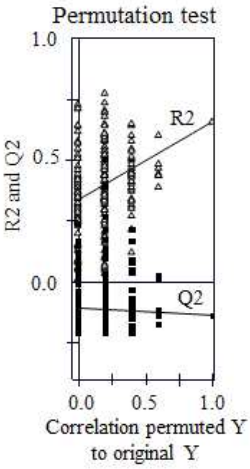
B

PLS-DA analysis









C

Identification of major metabolites contributing the separation among sample groups

No.	RT (min)	Compound	Exact mass (M+H)	MS Fragments	VIP	*p*-value
1	0.70	Ethyl aconitate	203.0533		1.44	0.055
2	2.86	Tryptophan fragment	188.0715		1.41	0.059
3	2.86	3-Indolealdehyde	146.0608		1.47	0.048
4	6.46	LPC(C14:0)	468.3086		2.64	1.38E-04
5	6.49	LPC(C18:3)	518.3243		1.79	0.017
6	6.72	LPC(C15:0)	482.3245		1.68	0.023
7	6.77	LPC(C20:4)	544.3398		2.27	7.64E-04
8	7.16	LPC(C20:3)	546.3558		1.82	0.011
9	8.19	SM(d18:1/16:1(9Z))	703.5750		1.63	0.026
10	8.22	LPC(C17:1)	508.3768		1.84	0.014
11	10.05	PC(C18:1)	786.8694		1.63	0.029

그림 33. 브루셀라균의 목적동물 (소) 감염시 발현되는 대사체(metabolome) 규명. Chromatogram (A), PLS-DA analysis (B), 비감염 대조군과 차이를 보이는 대사체 분석 (C)

□ 발병인자들의 경제동물 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증

1) Hypertonic saline의 브루셀라 감염증 치료효과에 미치는 영향분석

○ Hypertonic saline의 처치가 브루셀라 감염증에 효과적임을 규명함 (그림 34).

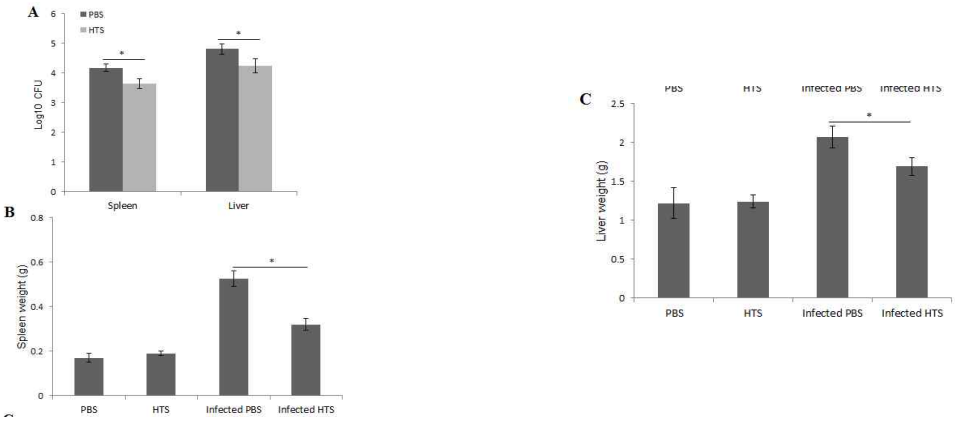


그림 34. 브루셀라 마우스 감염 후 Hypertonic saline과 PBS 를 14일간 주사한 후 비장 및 간의 Log CFU spleen and liver (A), 비장 무게 (B), 간 무게 (C)를 측정함

○ Hypertonic saline의 처치가 pro- and inflammatory cytokine secretion을 촉진함 (그림 34).

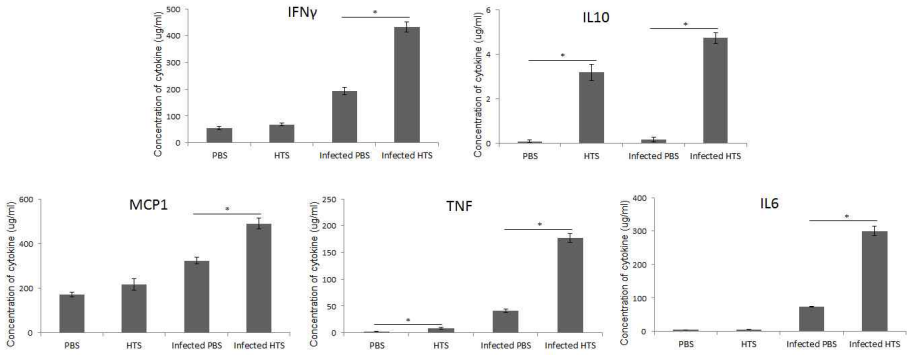


그림 35. 브루셀라 마우스 감염 후 Hypertonic saline과 PBS를 14일간 주사한 후 혈중 cytokine 농도를 측정함

○ Hypertonic saline의 처치가 Th1 activation을 증가시 키지만 Th2 cells을 억제함(그림 36).

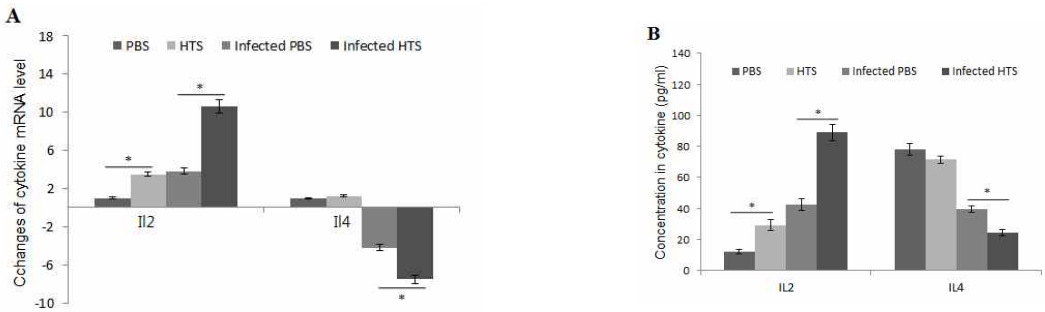


그림 36. 브루셀라 마우스 감염 후 Hypertonic saline과 PBS를 14일간 주사한 후 비장세포에서 IL2 과 IL4의 발현을 측정하였고(A), 혈중 농도를 측정함(B).

○ Hypertonic saline의 처치가 숙주의 NF-kB pathway를 활성화 하여 치료효과를 나타내는 것으로 확인 됨(그림 37).

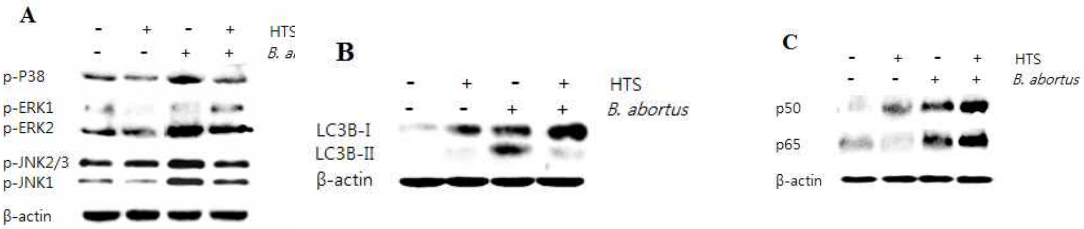


그림 37. 브루셀라 마우스 감염 후 Hypertonic saline과 PBS를 14일간 주사한 후 MAPK activation(A), phagocytic marker expression (B) 및 NF-kB proteins (C)을 웨스턴 블롯으로 규명함.

2) 브루셀라 감염증 치료법 개발

○ dextran sulfate가 브루셀라 감염증 치료효과를 나타내는 것으로 확인 됨(그림 38).

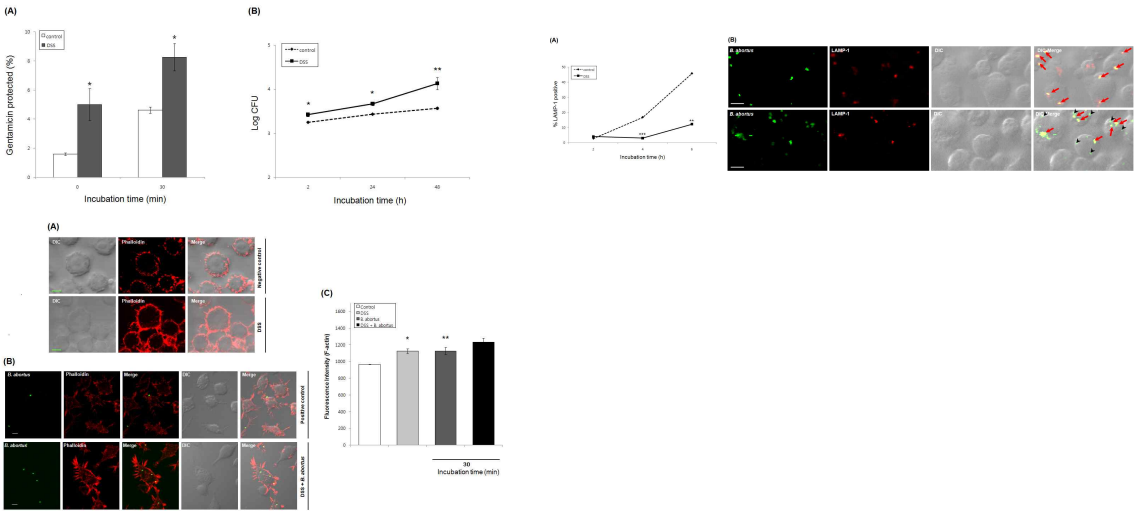


그림 38. 브루셀라 마우스 감염 후 dextran sulfate를 처치가 브루셀라 감염증에 효과적인 치료법임을 확인함

○ Methyl gallate가 브루셀라 감염증 치료효과를 나타내는 것으로 확인 됨(그림 39).

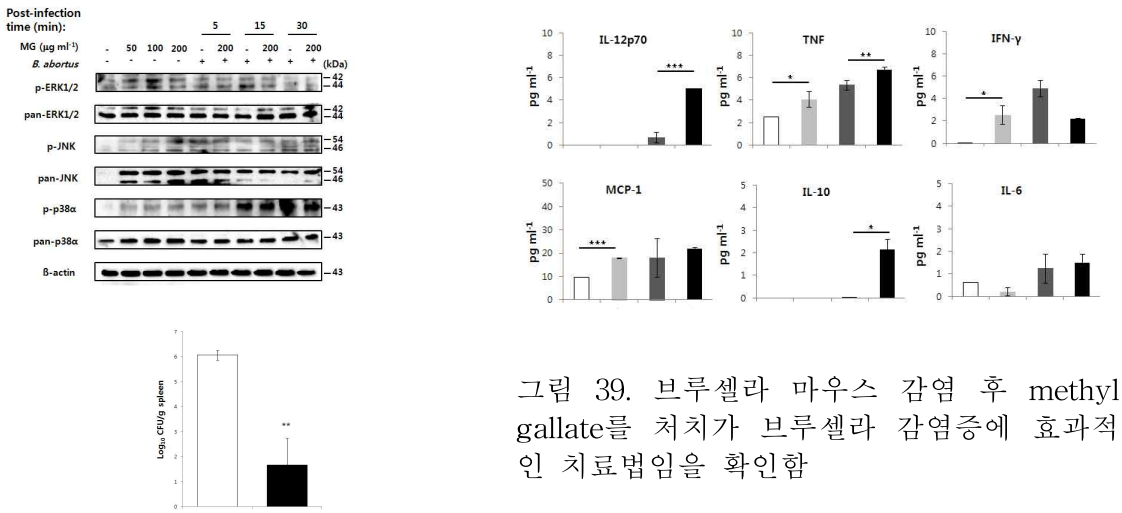


그림 39. 브루셀라 마우스 감염 후 methyl gallate를 처치가 브루셀라 감염증에 효과적인 치료법임을 확인함

○ red ginseng extract 성분이 브루셀라 감염증 치료효과를 나타내는 것으로 확인 됨(그림 40).

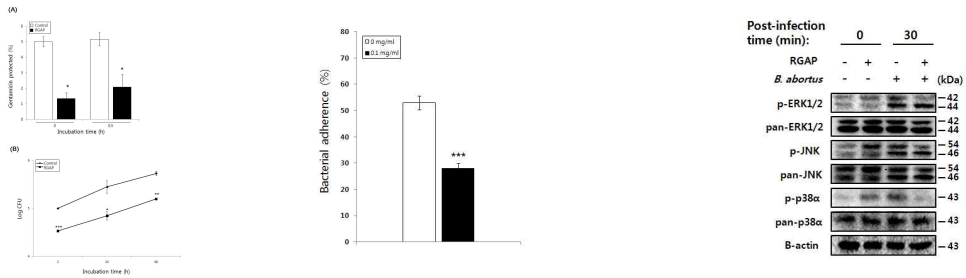


그림 40. 브루셀라 마우스 감염 후 red ginseng extract 성분 처치가 브루셀라 감염증에 효과적인 치료법임을 확인함

○ Formyl Peptide Receptor (FPR) family가 브루셀라균의 대식구내 생존에 필수적인 것이 확인 됨(그림 41).

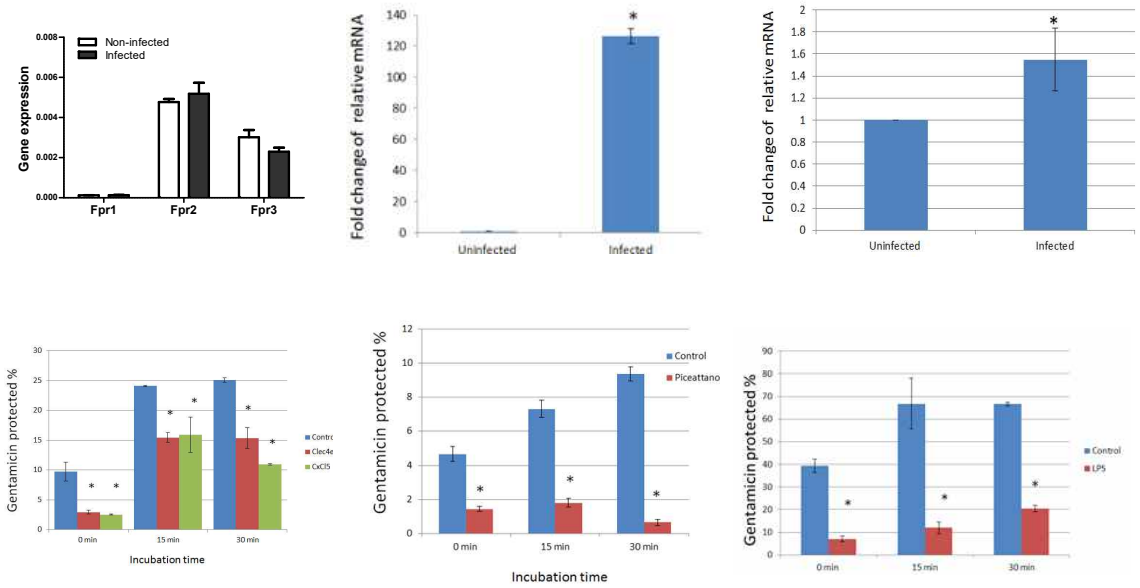


그림 41. 브루셀라 감염 대식구에서의 FPR 발현양상과 FPR activator 또는 inhibitor 처리 후 대식구내 브루셀라균의 침입정도 확인

○ Emodin의 브루셀라 감염증에 대한 치료효과가 규명됨 (그림 42).

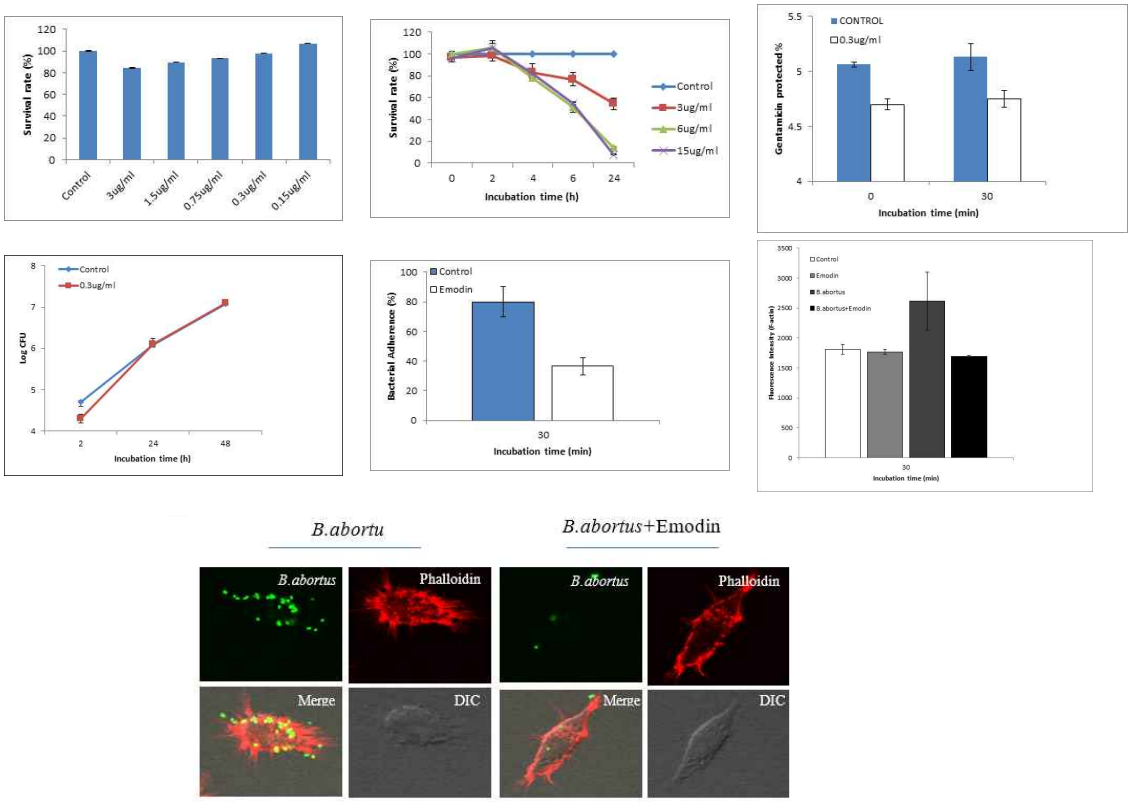


그림 42. 브루셀라 감염 대식구에서의 emodin 처리에 의한 항균효과, 대식세포 침입 능평가, 대식세포내 증식효과, 대식세포 부착능력에 미치는 영향이 규명 됨

○ 제 1협동과제와 공동으로 개발한 Antimicrobial peptides HPA3P and HPA3P2 을 이용하여 브루셀라 감염증에 대한 치료효과가 규명됨 (그림 43).

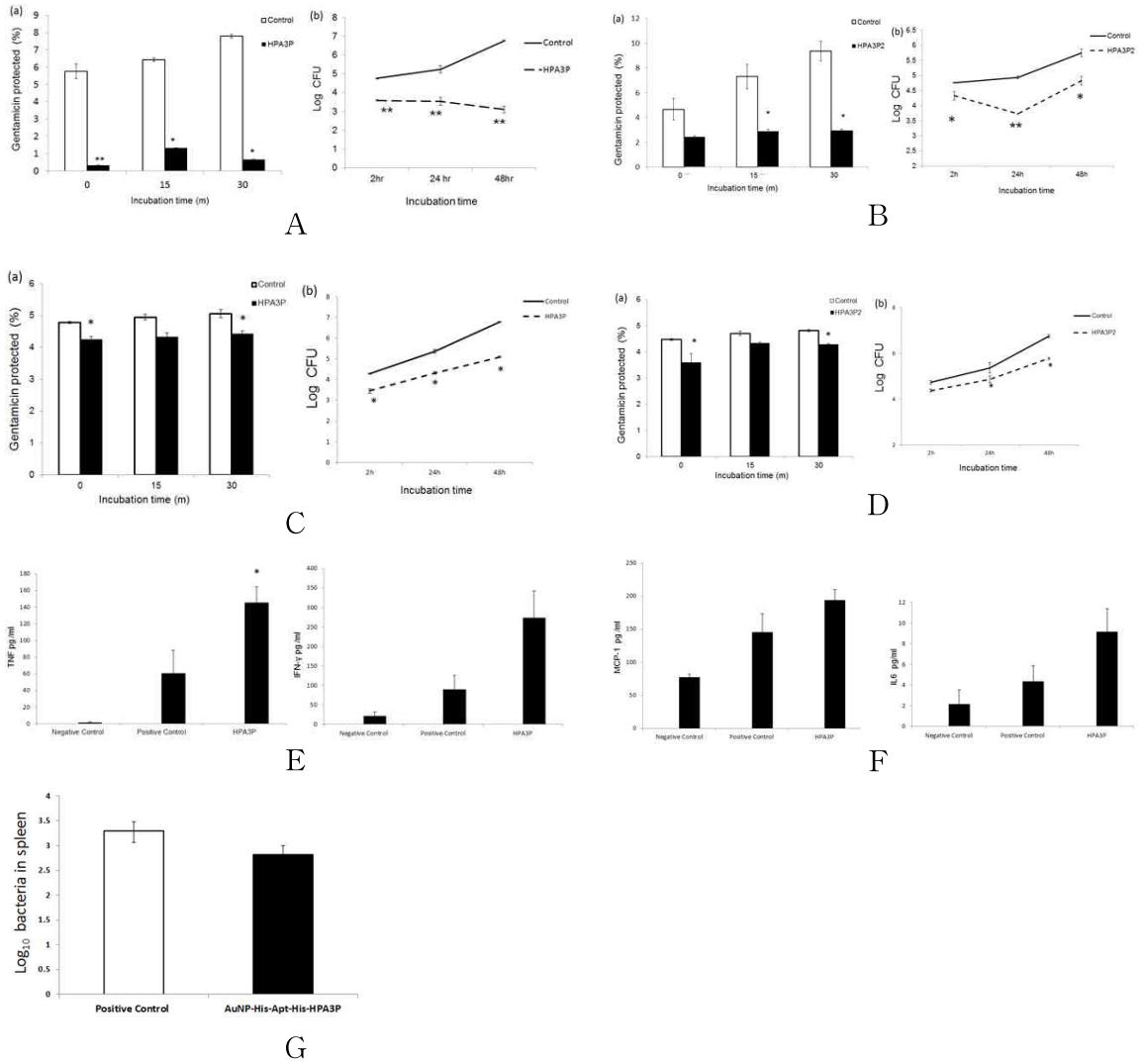


그림 43. 브루셀라 감염증 치료를 위한 Antimicrobial peptides HPA3P and HPA3P2의 치료효과 규명. A. 고농도 HPA3P의 균의 세포내 침입 및 증식에 미치는 영향, B. 고농도 HPA3P2의 균의 세포내 침입 및 증식에 미치는 영향, C. 저농도 HPA3P의 균의 세포내 침입 및 증식에 미치는 영향, D. 저농도 HPA3P2의 균의 세포내 침입 및 증식에 미치는 영향, E와F. mouse 균 감염 후 Antimicrobial peptides HPA3P가 숙주의 면역반응에 미치는 영향, G.마우스 감염 후 비장내 균수 저감 효과

○ 제 1협동과제와 공동으로 개발한 살모넬라 균 치료물질인 탄닌유도체를 용하여 살모넬라 감염증에 대한 치료효과가 규명됨 (그림 44).

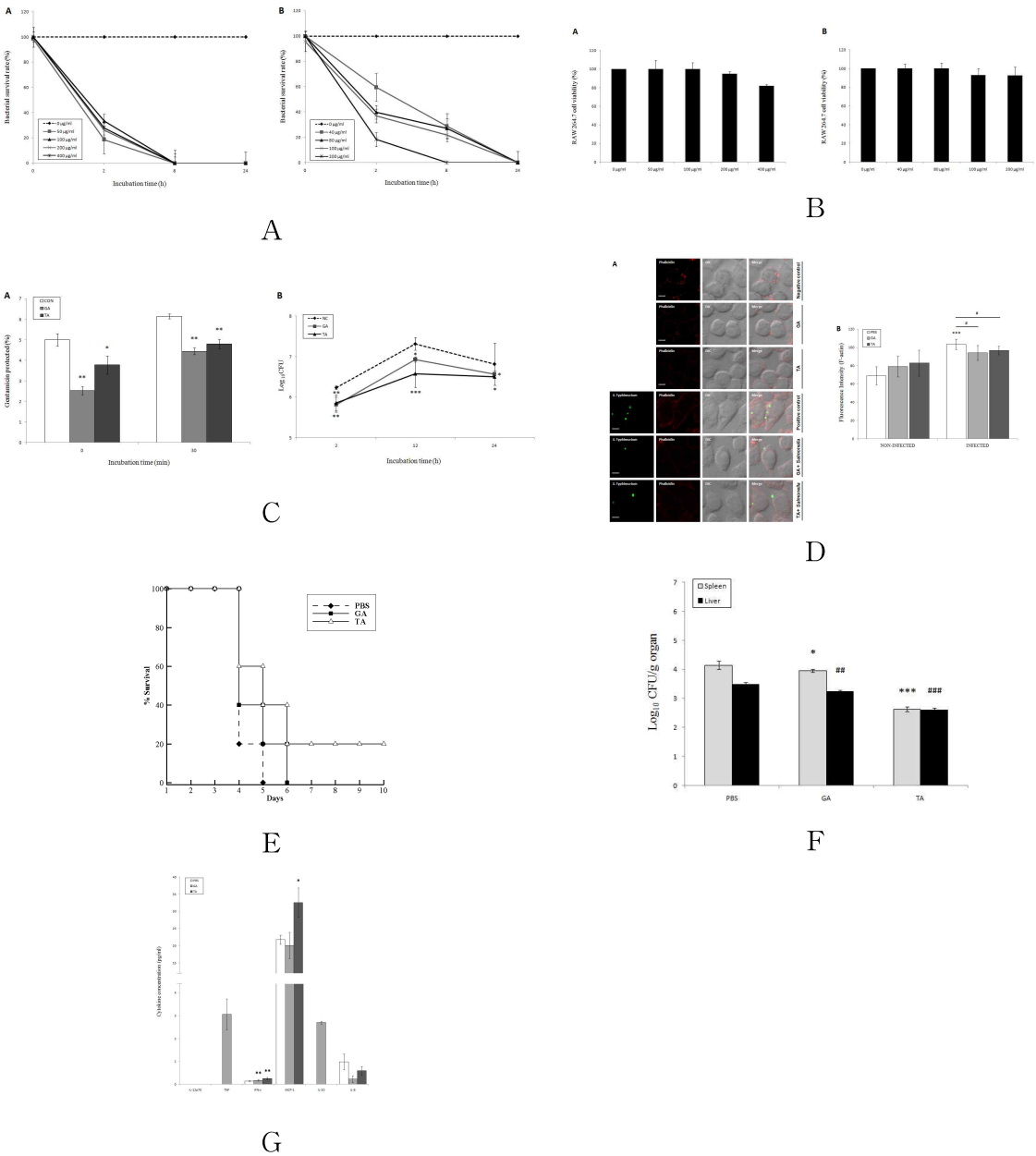


그림 44. 살모넬라 감염증 치료를 위한 탄닌유도물질의 치료효과 규명. A. 탄니유도물질의 살모넬라항균효과, B. 탄닌유도물질의 세포독성, C. 탄닌유도물질의 균의 세포내 침입 및 증식에 미치는 영향, D. 탄닌유도물질의 균의 세포내 부착에 미치는 영향, E. mouse 균 감염 후 생존평가, F. 마우스 감염 후 비장내 균수 저감 효과, G. 균감염후 탄닌유도체의 숙주 면역유도능 평가

○ 브루셀라균의 세포내 증식억제 관련 숙주의 방어기전 중 lipocalin 2에 의한 숙주의 방어기전이 해석 됨 (그림 45).

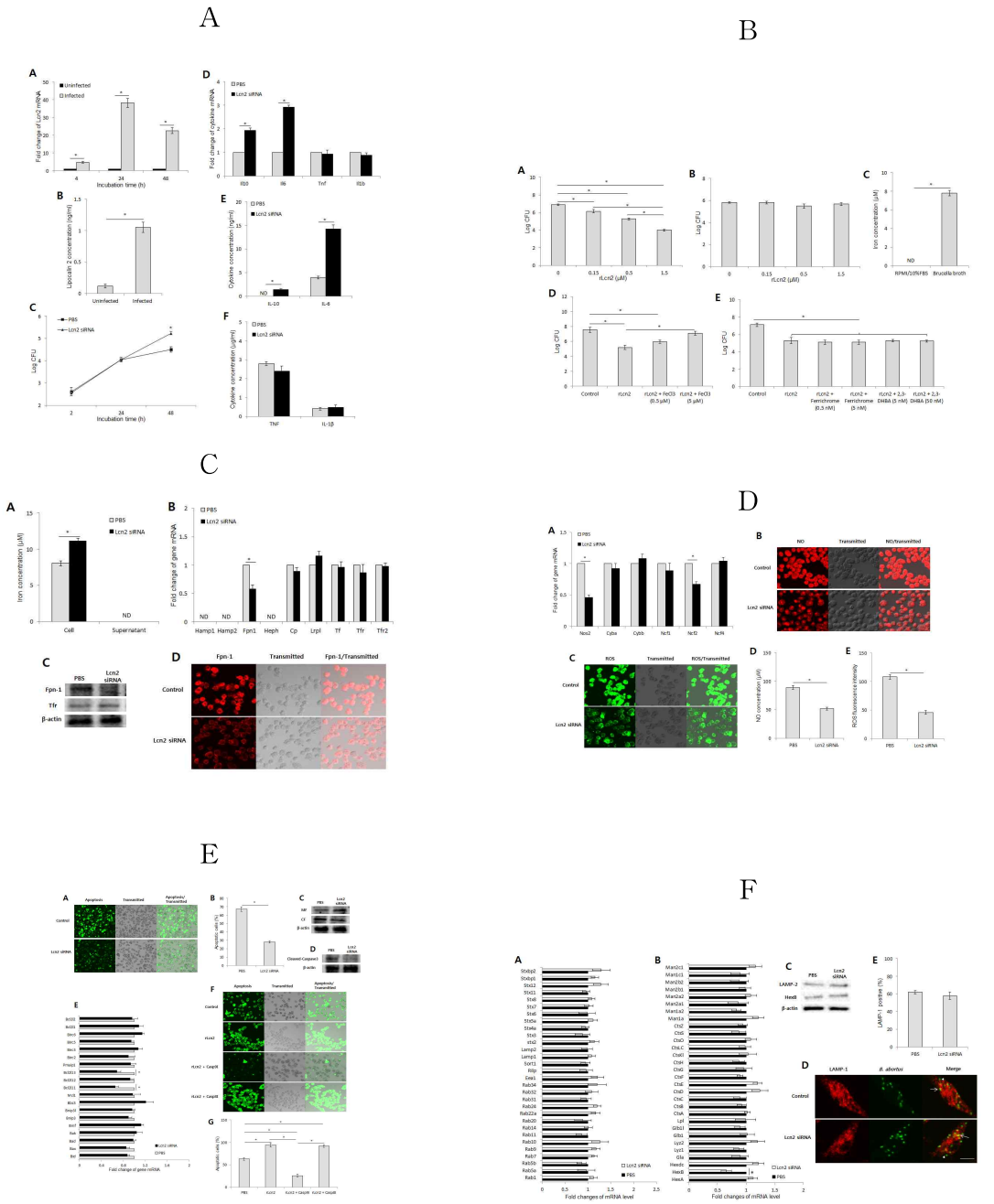


그림 45. 브루셀라 감염증의 방어에 있어서 숙주 Lcn2의 역할 규명. A. 균 감염에 따른 Lcn2의 발현 규명, B. Lcn2의 숙주 특이적 철 흡수 억제에 따른 균제어규명, C. Lcn2특이 억제 시험에 따른 브루셀라 균의 균새 증식규명, D. 균감염 후 Lcn2가 숙주세포의 ROS 및 NO 생산에 미치는 영향 규명, E. Lcn2가 숙주세포의 apoptosis에 미치는 영향 규명, F. Lcn2가 숙주세포내 침입 된 브루셀라균과의 phagosome fusion 유도에 미치는 영향 규명

○ 브루셀라균의 세포내 증식억제 관련 숙주의 방어기전 중 IL-10에 의한 숙주의 방어기전이 해석 됨 (그림 46).

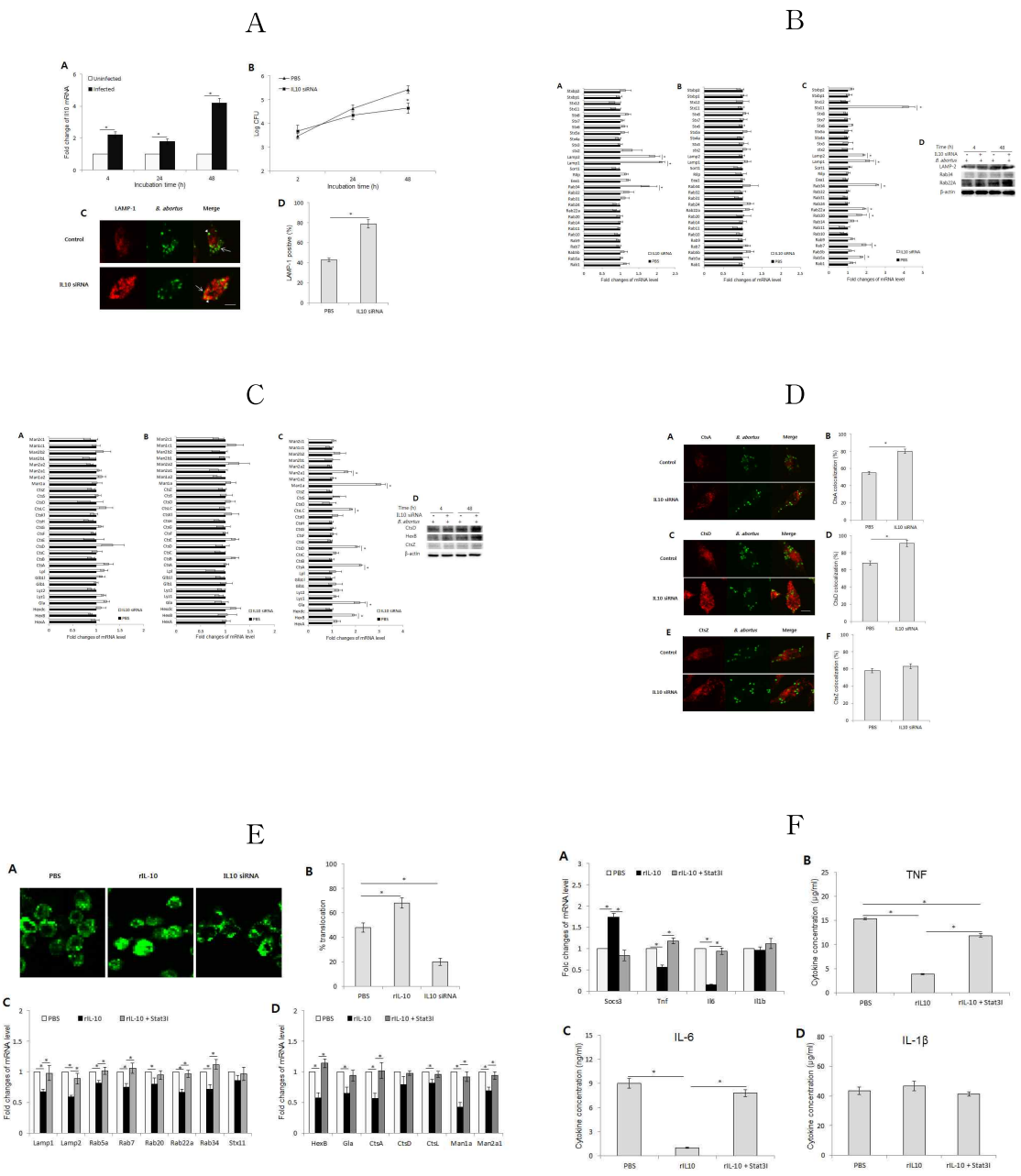
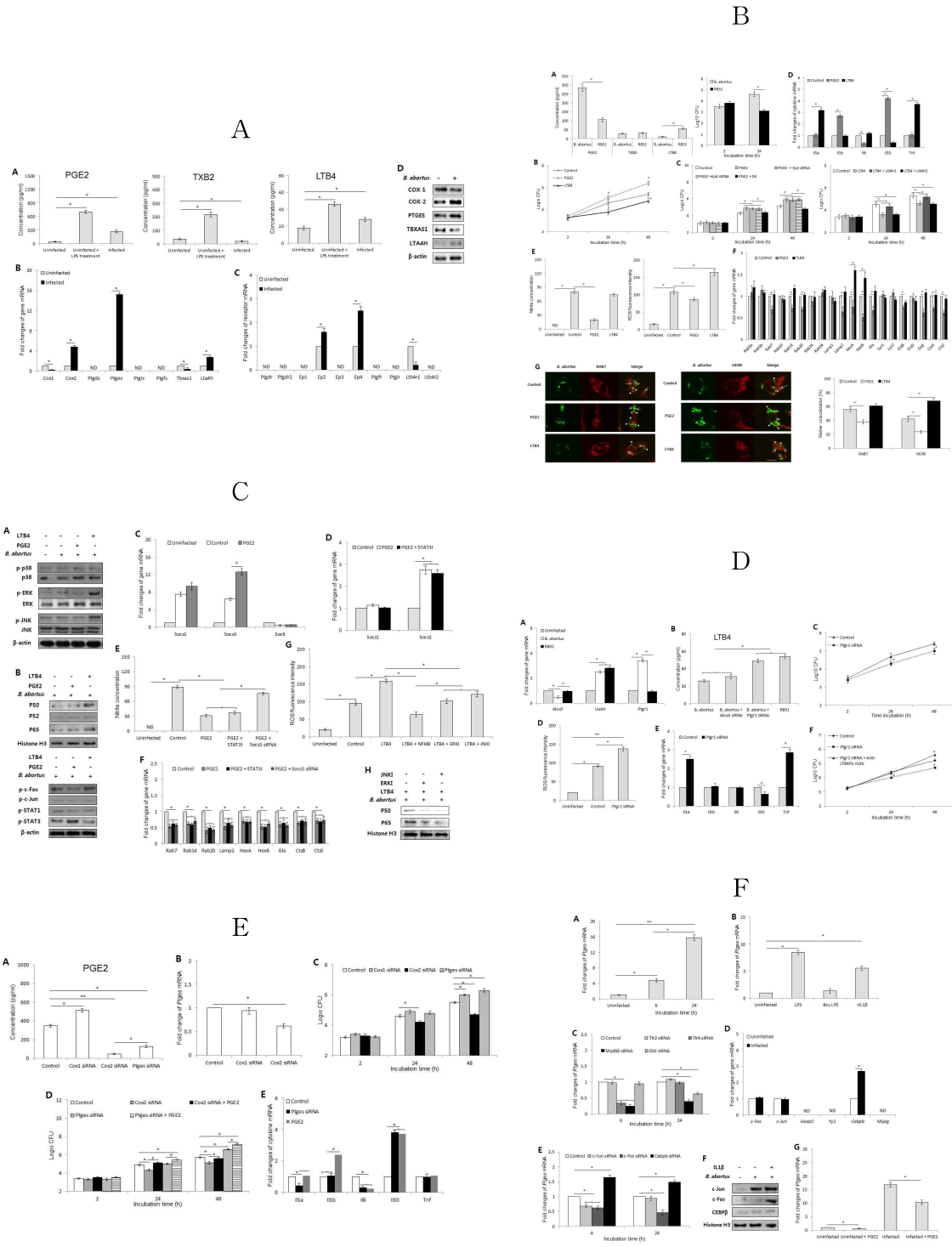


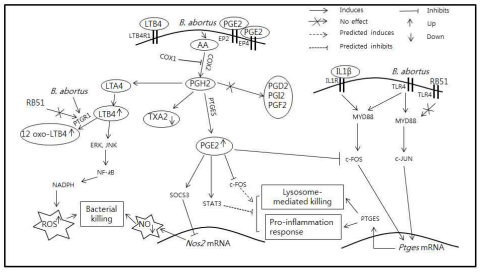
그림 46. 브루셀라 감염증의 방어에 있어서 숙주 IL-10의 역할 규명. A. 균 감염에 따른 IL-10의 발현 이 브루셀라균의 생존에 미치는 규명, B. IL-10의 발현이 브루셀라균의 침입에 있어서 막선별작용에 미치는 영향규명. C. IL-10이 균 탐식후 phagosome 내 hydrolase의 산생에 미치는 영향 분석, D. IL-10의 발현과 phagosome-lysosome fusion에 미치는 영향 분석, E. IL-10의 발현이 대식구내 브루셀라 탐식경로에 미치는 영향 규명, F. 균감염 후 IL-10의 발현과 숙주의 면역반응 변화에 미치는 영향 규명

○ 브루셀라균의 세포내 증식억제 관련 숙주의 방어기전 중 lipid mediator인 PGE2와

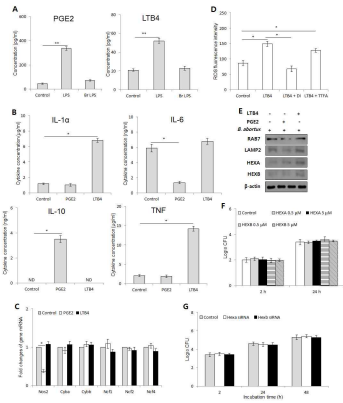
LTB4에 생산을 유도하여 브루셀라가 세포내 증식에 핵심적인 역할을 하는 것이 확인됨 (그림 47).



G



H



I

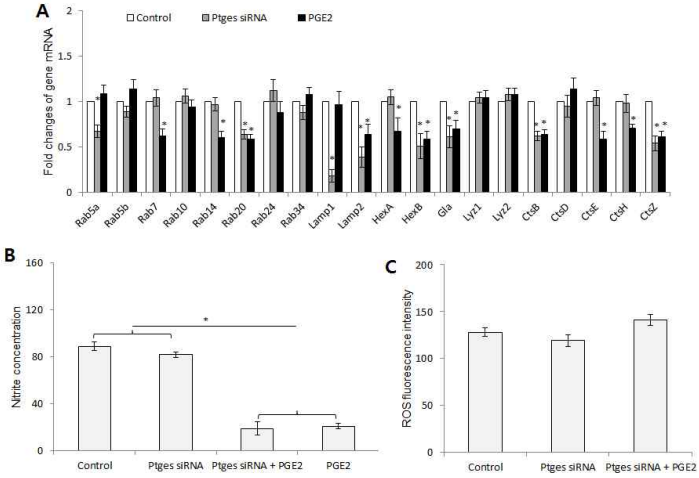


그림 47. 숙주 브루셀라균의 세포내 증식억제 관련 숙주의 방어기전 중 lipid mediator인 PGE2와 LTB4가 브루셀라균의 대식세포내 저항에 미치는 역할 규명. A. 브루셀라 균을 대식세포 감염시 lipid mediator생산에 미치는 영향 규명, B. 브루셀라균 대식세포 감염시 나타나는 PGE2와 LTB4의 상호작용에 기초한 세포내 탐식 저해기전 분석. C. PGE2와 LTB4 신호전달체계가 브루셀라균의 대식세포내 증식에 미치는 영향 분석, D. LTB4가 브루셀라균 세포내 탐식후 세포내 증식 저해요소로서의 작용기전 규명, E. PGE2신호전달체계에 기초한 PTGES의 활성과 브루셀라균 세포내 증식 저해기전 규명, F. c-FOS 활성에 의한 PGE2조절과 브루셀라균 대식구내 증식 저해기전 규명. G. 브루셀라균과 숙주 대식세포에서의 lipid mediator과의 상호작용 모식도. H.대식구에 대하여 대장균LPS와 브루셀라 LPS 처리를 통해 대식구에서 발현되는PGE2와 LTB4 양 비교 I. 브루셀라 감염 대식구에 대하여 PTGES 및 PGE2 siRNA 억제 후 발현되는 관련 유전자의 발현 양상 비교

○ 브루셀라균의 세포내 증식억제 관련 숙주의 방어기전 중 내재성 인자 중 IL-1α와 IL-1β의 역할 규명함. 이들 두 물질은 브루셀라균이 대식구에 침입후 다양한 신호전달체계를 이용하여 세포내 침입한 균에 대하여 반응하여 대식구에서의 침입균이 증식하

는 것을 억제 함은 물론, 대식구의 다양한 사이토카인 생성과 억제를 조절하여 브루셀라균의 대식구내 증식 조절에 핵심적인 역할을 담당하는 것으로 확인 됨. 또한, 대식구의 NO 산생과 ROS 산생에 영향을 미쳐 균의 세포내 증식을 조절하는 것이 확인 되었으며, 이는 브루셀라균에 대항하는 숙주의 대응기전을 규명한 최초의 사례에 해당함 (그림 48).

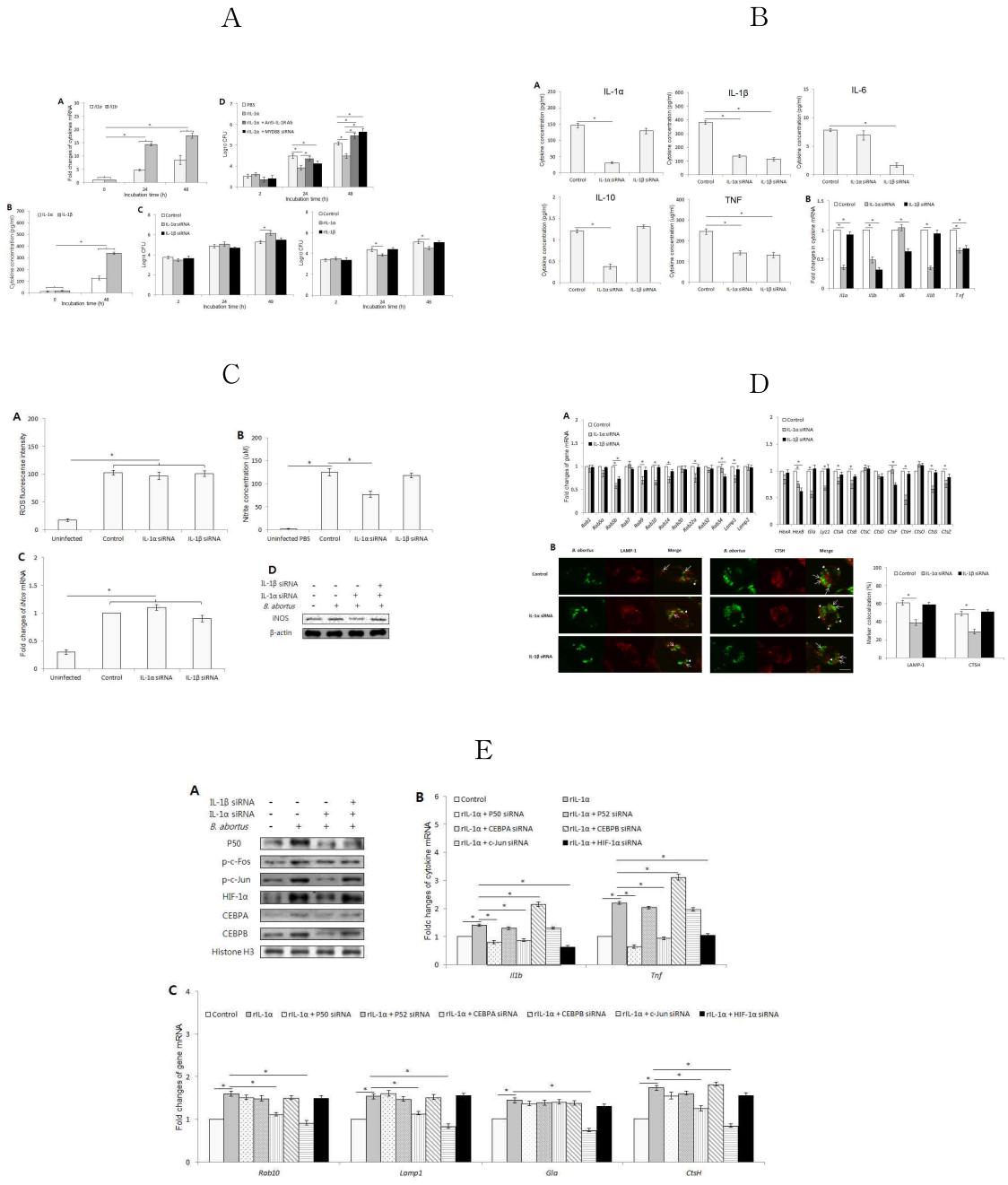


그림 48. 숙주 브루셀라균의 세포내 증식억제 관련 숙주의 방어기전 중 IL-1α와 IL-1β가 브루셀라균의 대식세포 내 저항에 미치는 역할 규명. A. IL-1α 유도 MyD 88 경유 IL-1R신호전달이 브루셀라 감염에 대응하는 숙주의 억제 기전. B. IL-1α와 IL-1β가 억제되었을 때 나나타는 브루셀라감염 대식구의 사이토카인 생산 분석. C.

IL-1α유도 브루셀라 감염 세포의 NO 산생에 미치는 영향 규명, D. IL-1α가 브루셀라균 세포내 탐식후 세포내 라이소좀 매개 브루셀라균 사멸에 미치는 영향 규명. E. IL-1α가 브루셀라균 세포내 탐식후 사이토카인 분비와 hydrolytic 효소 생성에 미치는 영향 분석

□ 브루셀라균의 세포 및 목적동물 (소) 감염 시 발현되는 인자와 질병간의 상관관계 및 숙주 제어기전 규명

1) 목적동물 (소)유래 대식구 (MDBK cell) 감염 시 발현되는 cytokine 분비 측정. 소 유래 대식구인 MDBK cell을 이용하여 브루셀라 병원성 균을 감염 시킨 후에 RT-PCR을 통해 발현되는 사이토카인을 (IL-1β, IL-12, IL-6, IL-4, IFN-γ) 분석 수행해본 결과, 48시간 경과한 시점에서 IL-1β, IL-4, IFN-γ 는 발현이 증가한데 비하여, IL-12와 IL-6의 발현은 감소한 것으로 나타나, 브루셀라의 소 감염증에 대응하는 사이토카인은 IL-1β, IL-4, IFN-γ 인 것으로 나타났음 (그림 49).

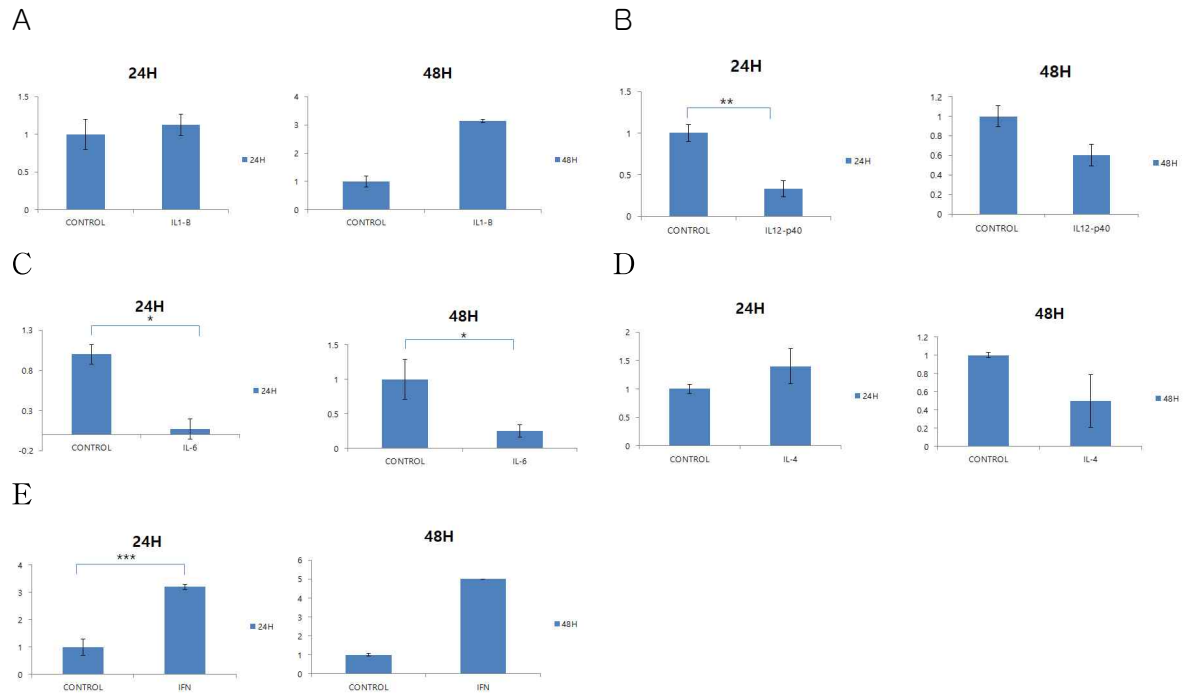


그림 49. 병원성 브루셀라균을 소 유래 대식구인 MDBK cell에 감염을 수행한 후, 24시간 및 48시간 경과한 시점에서 IL-1β (A), IL-12 (B), IL-6(C), IL-4(D) 및 IFN-γ (E)의 발현양상을RT-PCR을 통해 확인하고, 비감염 대조군과의 발현양상을 표기함

2) 목적동물 (소) 감염 시 발현되는 cytokine 분비 측정

○ 병원성 브루셀라균을 소에 인공적으로 감염을 수행한 후 (몽골 국립 수의학연구소 공동 수행), 시간 경과별 채혈을 수행하여 감염 혈청에 대한 cytokine 분석 결과 Tumor necrosis factor (TN F)-α의 경우 감염 29일에 최고점에 다다른 후 감염 70일 이후 점차 없어지는 것으로 확인 되었으며 (그림 50), Interferon (IFN)-γ의 경우 감염 초기부

터 감염 전기간에 걸쳐 비감염 대조군과 비교하여 큰 변화가 없는 것으로 확인 됨 (그림 51). 결론적으로, 브루셀라균의 감염에 대응하는 소의 면역반응 물질은 IFN-γ 보다는 TNF-α 에 영향을 받는 것으로 확인 됨.

A

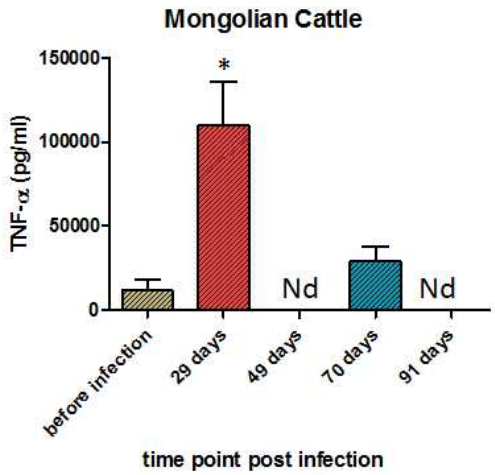


그림 50. 병원성 브루셀라균을 소에 인공적으로 감염을 수행한 후, 시간 경과별 TNF-α 생성변화 규명

B

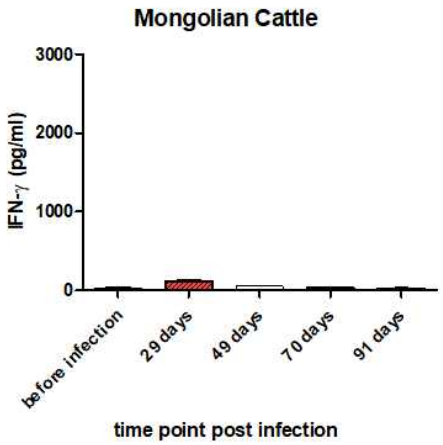


그림 51. 병원성 브루셀라균을 소에 인공적으로 감염을 수행한 후, 시간 경과별 IFN-γ 생성변화 규명

나. 제 1 협동과제 결과

[중앙대학교 - 살모넬라균의 오믹스 분석 및 발병 기전 규명]

□ 고면역원성 기생성 세균 유발 병원균 제어 단백질 백신 소재 원천기술 개발

1) 살모넬라균 제어를 위한 동물세포로의 단백질 전달시스템 개발

○ 금나노입자-DNA 앱타머를 기반으로 하는 동물세포로의 단백질 전달기술 개발

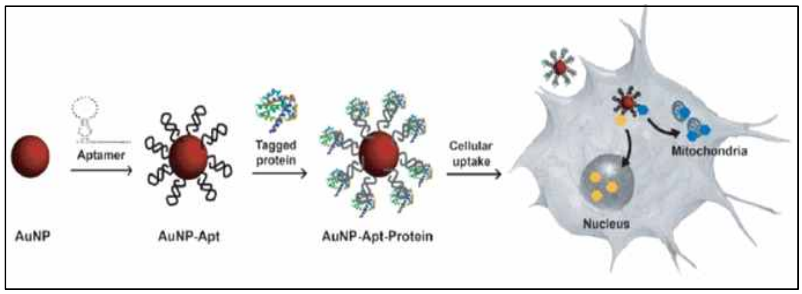


그림 1. 금나노 입자-DNA 복합체를 이용한 단백질 전달시스템 모식도

→ 금나노입자-DNA 복합체의 동물세포 내로의 전달기작을 연구하는 과정에서, 배양액에 존재하는 단백질들과 비특이적으로 결합하여 복합체와 함께 전달된다는 실험결과를 얻었으며, 이 결과를 바탕으로 금나노입자-DNA 앱타머를 기반 단백질 전달체 제작

○ 금나노입자-DNA 앱타머를 전달체로 다양한 단백질들(AcrA, BCL-xL, BIM, FOXL2 등)을 탑재하여, 인간 세포주로의 전달 확인 후 전달된 단백질의 세포 내에서의 기능 확인 (그림 2)

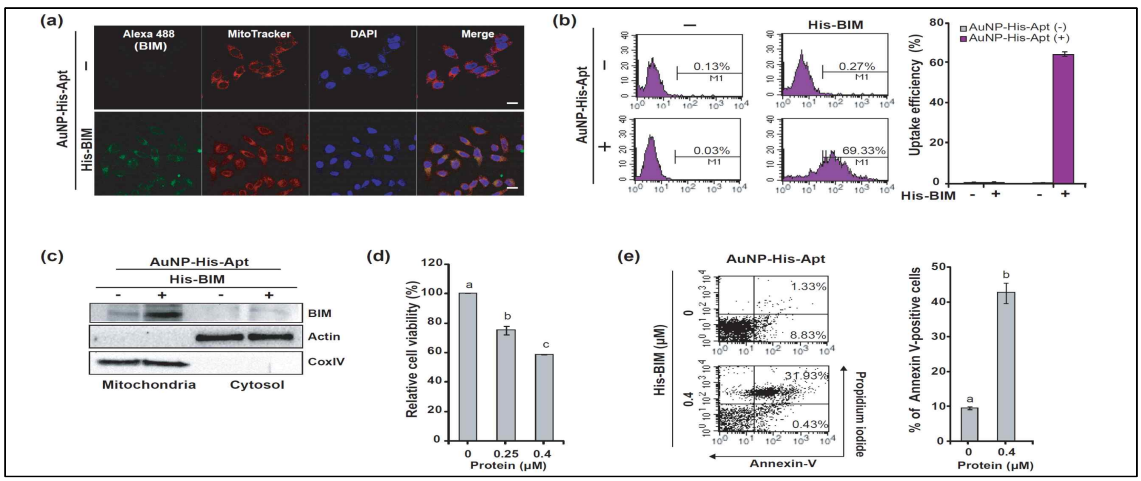


그림 2. 금나노 입자-DNA 앱타머를 이용한 Histidine 표지된 BIM 단백질의 세포내 전달. BIM단백질이 금나노 입자-DNA 앱타머를 통하여 세포안으로 효과적으로 전달 됨을 공초점 현미경 이미지(a), 유세포 분석기(b), 웨스턴 블롯(c)으로 확인하였고 전달된 BIM 단백질의 세포사멸과 관련된 관련 된 원래의 기능을 그대로 유지함을 확인하였다 (d, e).

○ 금나노입자-DNA 앱타머를 전달체로 BIM 단백질의 이형종양으로의 전달 및 세포사멸사 유도 확인 (그림 3)

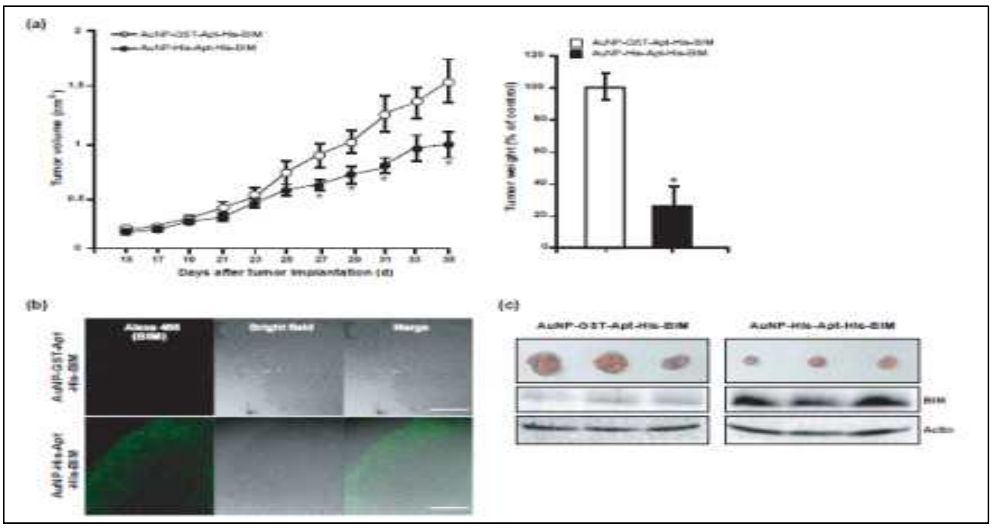


그림 3. 금나노 입자-DNA 앱타머에 결합한 BIM 단백질을 쥐의 이형종양내로 전달하여 종양 성장을 억제. 금나노 입자-DNA 앱타머에 결합한 BIM 단백질 전달하여 이형종양의 성장이 억제됨과 (a) 이형종양 조직 내로 전달되었음을 확인 (b, c) 하였고, BIM의 전달로 세포 사멸사가 조직내에서 일어났음을 TUNEL assay로 확인

○ 금나노입자-DNA 앱타머를 전달체로 BIM 단백질의 혈관을 통한 마우스 내 기관으로의 전달 확인: TEM과 live cell imaging system을 활용하여, 생체 내에서의 금나노입자-DNA 앱타머의 분포 및 잔여율 확인 (그림 4)

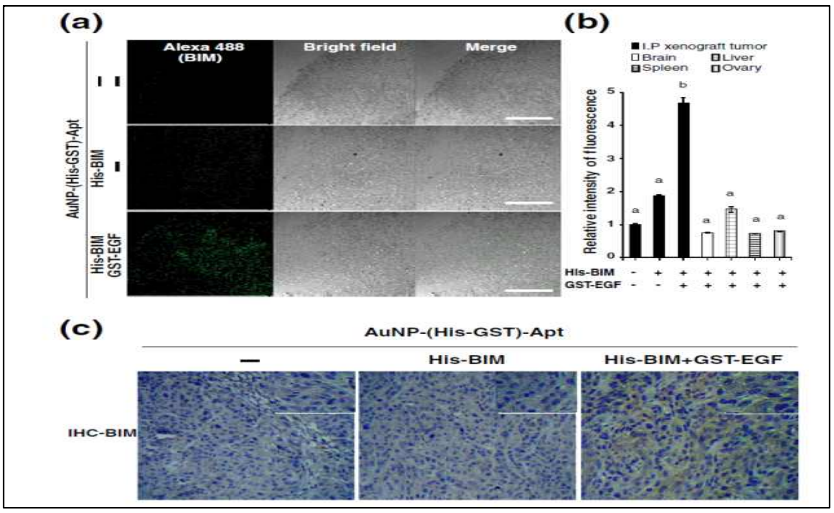


그림 4. 금나노 입자-DNA 앱타머에 결합한 BIM 단백질의 혈관을 통해서 쥐의 전체 기관으로 전달을 TEM 과 조직 염색으로 확인

2) 단백질 전달체 활용 살모넬라균 제어기술 개발

○ 살모넬라균 특이적 항미생물 펩타이드(AntiMicrobial Peptide, AMP)를 단백질 전달체에 탑재, 세포 내로 전달 확인 (그림 5)

○ 쥐 대식세포(Raw264.7)와 인간세포(HeLa) 내에 존재하는 살모넬라균의 제어효율 측정 (그림 6)

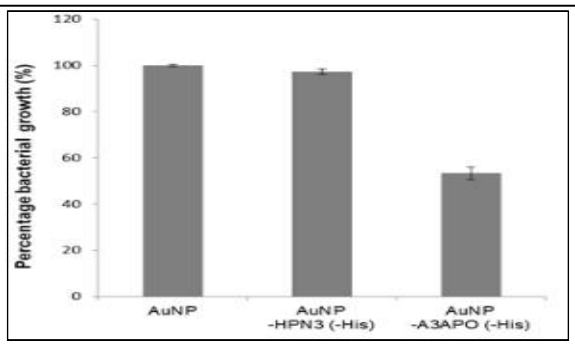


그림 5. HeLa 세포 내로 대조군 AMP(HPN3)와 실험군 AMP(A3APO)를 처리 하였을 때 세균의 성장 저해 차이 확인. 실험군 AMP(A3APO)를 처리한 세포는 세균의 성장이 억제됨.

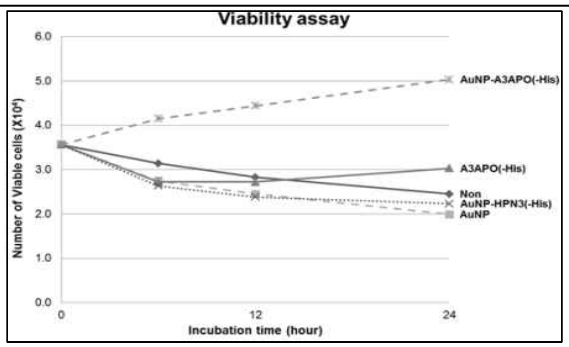


그림 6. 금나노입자에 결합한 AMP를 전달 하였을 때, 살모넬라를 처리한 HeLa 세포의 생존능이 증가함을 확인

3) 살모넬라균 특이적 다제내성 펌프의 기능 규명

○ MdsABC 펌프에 의한 시크리톰 분석을 통한 병원성 기작 규명

○ *mdsABC* 유전자가 제거된 살모넬라균의 secretome 분석결과, phosphatidylserine의 분

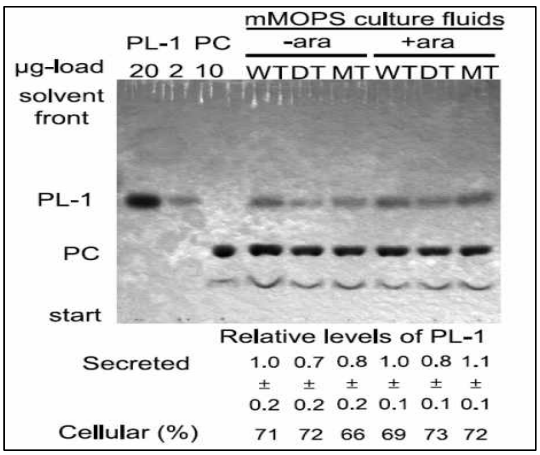


그림 7. TLC analysis를 통하여 세포내, 분비되는 phospholipid 의 양을 확인해본 결과 *mdsABC*가 결실된 (DT) 균주와 비교하였을 때 wild-type (WT)의 phospholipid compound의 외부 분비가 더 많은 것을 확인

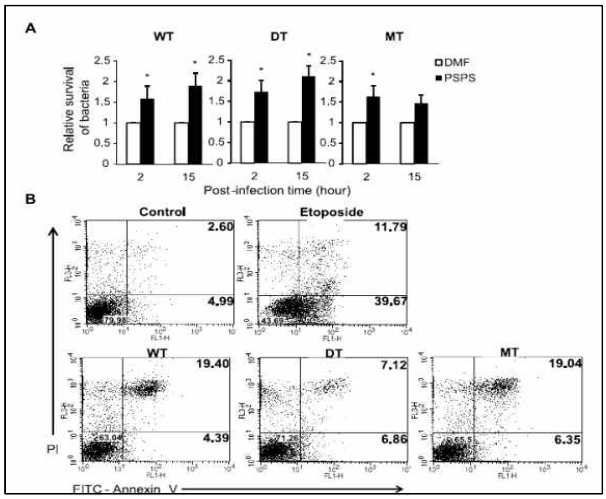


그림 8. MdsABC와 phosphatidylserine이 세균의 침투와 생존에 미치는 영향을 쥐 대식세포 RAW264.7에서 확인. phosphatidylserine은 RAW264.7세포의 감염에는 영향을 주지만 세포를 죽이지는 않음.

비정도가 감소됨을 확인 (그림 7)

○ 쥐 대식세포(Raw264.7)와 인간세포(HeLa)을 이용하여 phosphatidylserine이 살모넬라균의 병원성에 영향을 준다는 결과를 획득함 (그림 8)

4) RNA 분해효소에 의한 살모넬라균의 병인성 기작 규명

○ RNA-seq을 이용하여 RNase G를 코딩하는 *rng* 유전자가 결실된 살모넬라균의 전사체 분석 (그림 10)

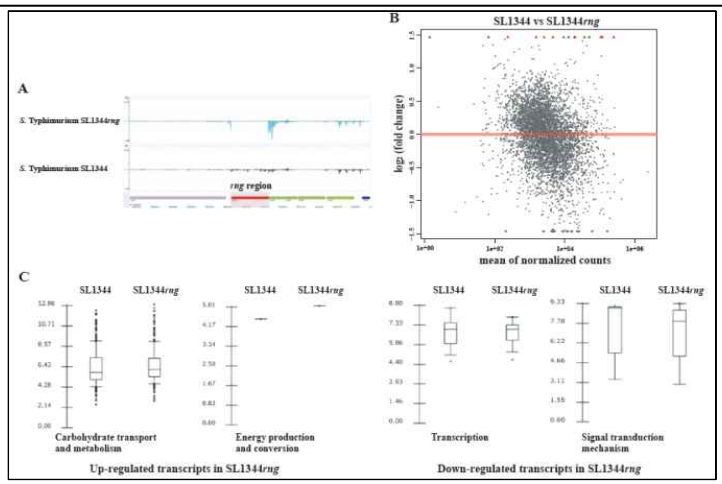


그림10. RNA-seq을 사용하여 살모넬라 wild type과 RNase G가 결실된 균주 사이의 target transcriptome 분석

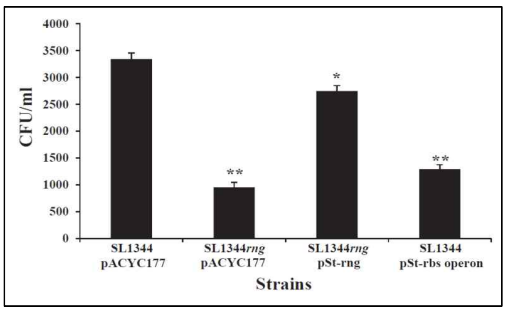


그림 11. *rbs* mRNA가 살모넬라균의 병원성에 영향을 주는 것을 쥐 대식세포(Raw264.7)에서 확인

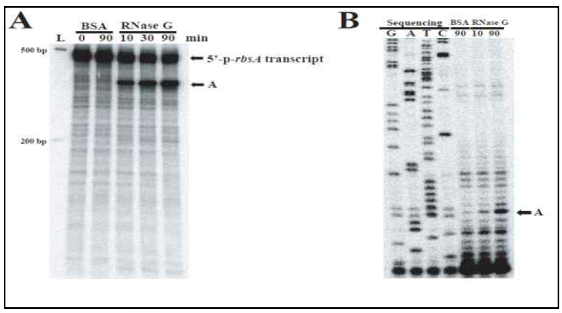


그림12. *rbs* mRNA의 mapping을 통하여 RNase G에 의한 분해자리 확인.

○ RNase G의 타겟 RNA 후보군 동정

○ 후보군 중에서 *rbs* mRNA가 살모넬라균의 병인성에 영향을 주는 것을 쥐 대식세포(Raw264.7)에서 확인 (그림 11)

○ RNase G에 의한 *rbs* mRNA의 분해경로 규명 (그림 12)

○마우스에서의 *rbs* 유전자 발현 정도에 따른 병원성 검증

□ 고면역원성 기생성 세균 유발 병원균 제어 단백질 백신 소재 원천기술 개발

1) 살모넬라균 제어를 위한 동물세포로의 단백질 전달시스템 개발

○ 살모넬라균 특이적 항미생물 펩타이드(AntiMicrobial Peptide, AMP)를 단백질 전달체에 탑재, 세포 내로 전달 확인:

→ AuNP-Apt^{His} 결합체를 세포내로 AMP전달을 위한 전달체로 활용하기 위해 먼저 AuNP-Apt^{His} 결합체의 AMP탑재 효율을 확인 함. 그 결과, 실험에 대조군으로 사용할 HPN3 펩타이드와, 실험군 A3-APO펩타이드 모두 AuNP-Apt^{His} 결합체에 잘 결합하는 것을 확인 하였고, 일반적으로 40-50%의 펩타이드가 AuNP-Apt^{His} 결합체에 결합한 것이 확인 됨 (그림 14)

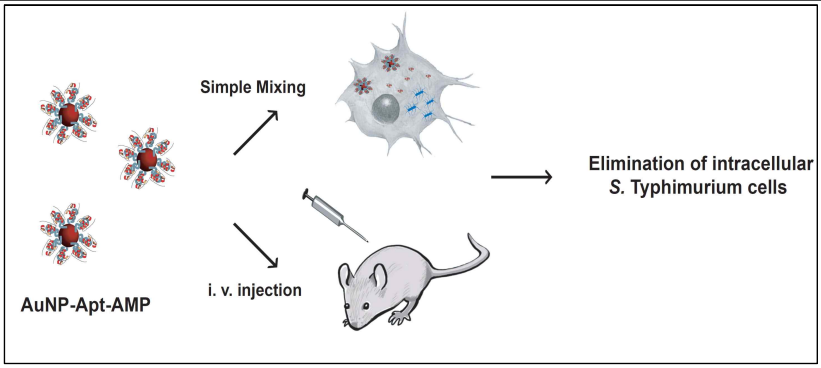


그림 13. 금나노 입자를 이용한 살모넬라균 제어 시스템 모식도

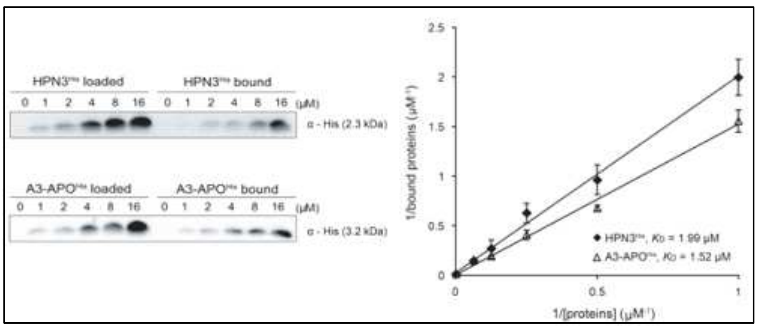


그림 14. AuNP-Apt^{His} 결합체의 AMP탑재 효율 확인

→ 다음으로 AuNP-Apt^{His} 와 결합한 AMP가 세포내로 잘 전달 되는지 확인 하기 위하여, AMP를 탑재한 AuNP-Apt^{His} 결합체를 사람 세포주인 HeLa 세포로 전달후 면역염색법을 수행한 후 공초점 현미경으로 확인 함. 그 결과, 실험에 대조군 HPN3 펩타이드와, 실험군 A3-APO펩타이드 모두 HeLa세포 안으로 성공적으로 전달 된 것을 확인 하였고, AuNP-Apt^{His} 결합체를 AMP의 세포내 전달을 위한 전달체로 사용할 수 있음을 확인 함. (그림 15)

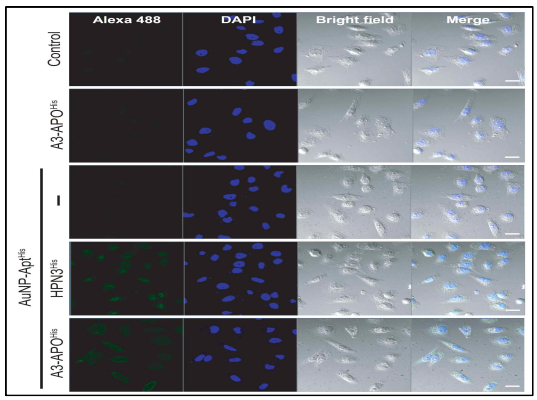


그림 15. AuNP-Apt^{His} 전달체를 이용하여, AMP를 사람 세포주인 HeLa 세포로 전달 확인.

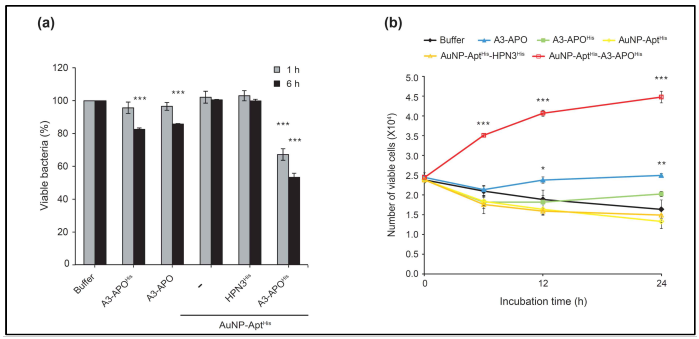


그림 16. AuNP-Apt^{His} 전달체를 이용하여 전달 된 AMP의 HeLa 세포에서 항 미생물 효과와 생존능 증가 확인.

○ 살모넬라 특이적 항미생물 펩타이드(AntiMicrobial Peptide, AMP)의 세포내효과 확인:

→ AuNP-Apt^{His}전달체에 AMP 탑재후 살모넬라 균에 감염된 HeLa세포에 전달 후 항

미생물 효과를 확인 함. 그 결과, 실험에 대조군으로 사용할 HPN3 펩타이드에 비해, 실험군 A3-APO펩타이드가 전달 된 세포의 살모넬라 수가 감소한 것을 확인 하였고, 이뿐만 아니라, 전달된 A3-APO에 의해서 HeLa세포의 생존능도 증가하는 것을 확인 함. 그리고, 전달된 A3-APO의 살모넬라 제어 효율은 처리한 농도, 시간에 비례 하는 것을 확인 함. (그림 16,17)

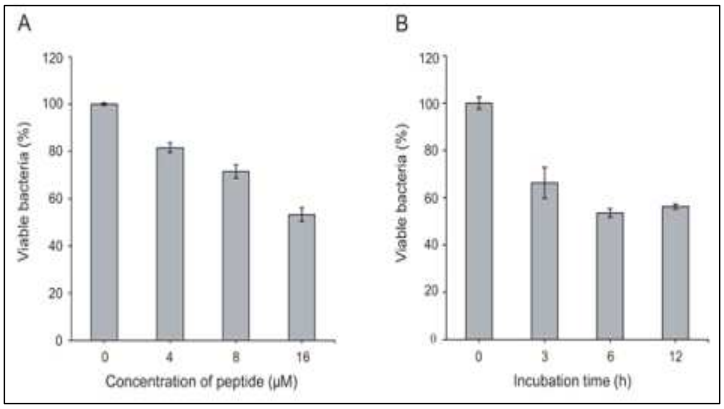


그림17. AuNP-Apt^{His} 전달체로 전달 된 AMP농도와 배양 시간에 따른 항미생물 효과

○ 살모넬라균 특이적 항미생물 펩타이드(AntiMicrobial Peptide, AMP)의 동물생체 내 효과 확인:

→ 먼저 AMP의 동물 생체내 효과를 확인 하기에 앞서 동물 조직 내로 AMP의 전달과 체내 반감기를 확인 함. 그 결과, 비장(Spleen), 간(liver) 등 살모넬라 감염과 연관된 주요 조직에 AMP가 효과적으로 전달 되며, 그 반감기가 약 28시간 인 것을 확인 하였다. 이를 토대로 AMP투약 시기는 24시간 간격으로 투약 함.(그림 18)

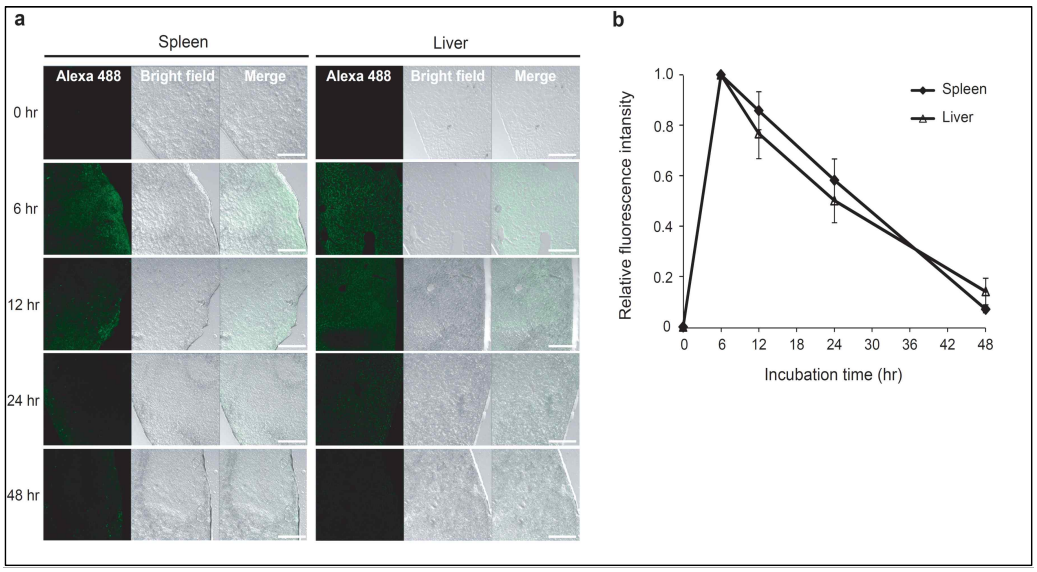


그림18. AuNP-Apt^{His} 전달체로 전달 된 A3-APO의 쥐 조직 안에 전달과 반감기 확인.

→ 이후, 살모넬라에 감염시킨 쥐의 경우 감염 후 최대 6일 안에 죽는 것을 확인 하였다. AuNP-Apt^{His}전달체에 AMP를 탑재 후 살모넬라 균에 감염된 쥐에 꼬리 정맥을 통하여 5회 전달 후 항 미생물 효과를 확인 함. 그 결과, 대조군으로 사용한 HPN3

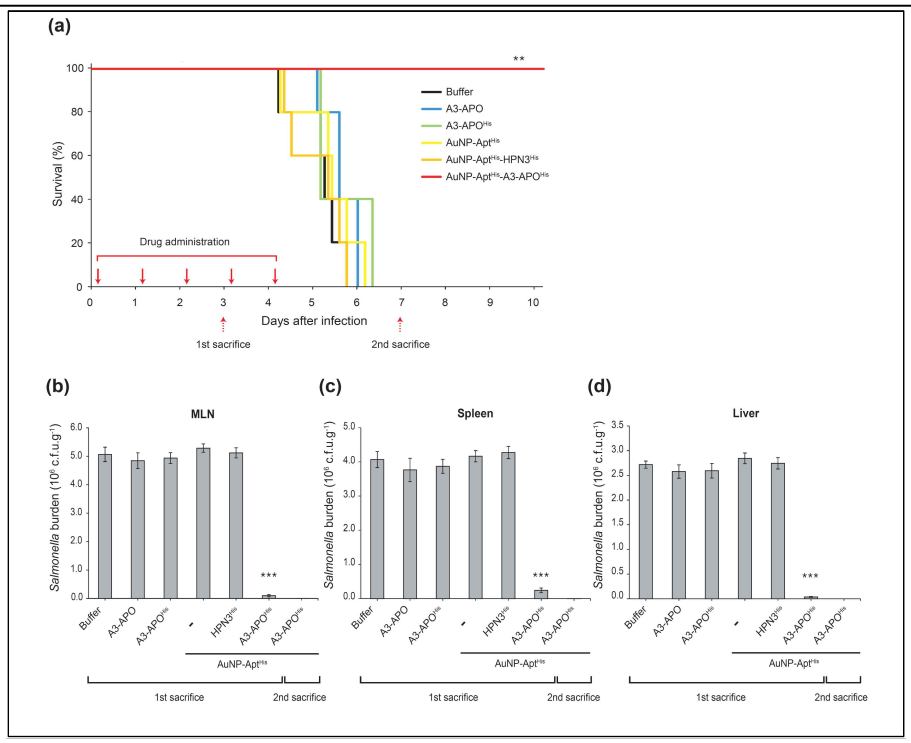


그림 19. AuNP-Apt^{His} 전달체로 전달 된 A3-APO에 의한 쥐의 생존일 증가와 조직 안에서 살모넬라 개체수 감소 확인.

펩타이드에 비해, 실험군 A3-APO펩타이드가 전달 된 쥐의 생존 일수가 증가 하는 것을 확인 하였고, 이뿐만 아니라, 전달된 A3-APO에 의해서 살모넬라에 감염된 쥐 조직 내의 살모넬라의 수도 급격히 감소하는 것을 확인 함.(그림19)

2) 살모넬라균 특이적 다제내성 펌프의 병원성 기작 규명

○ 살모넬라 특이적인 MdsABC pump의 경우 막 단백질인 PSPS의 영향을 받는데, 이 단백질의 활성은 살모넬라의 생장률에 영향을 받음.(그림 20, 21)

○ 전자 현미경으로 살모넬라에 감염된 대식세포에 미치는 PSPS의 영향은 pseudopodia와large vesicle 형성의 감소와 연관이 있음을 밝힘.(그림 22)

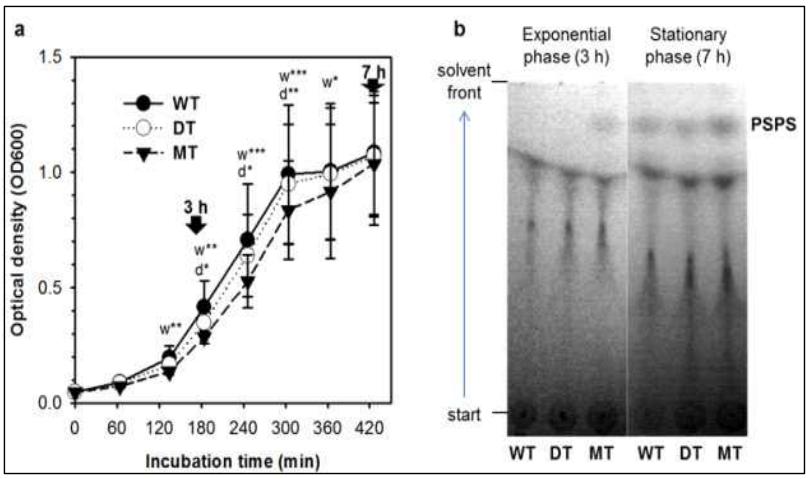
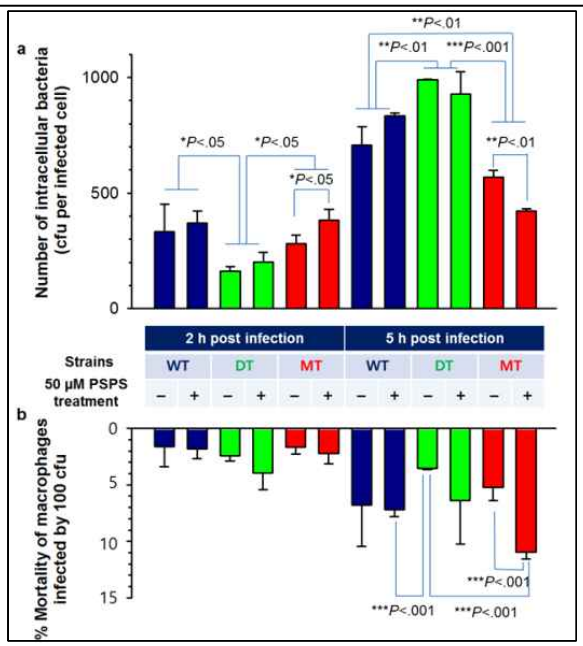


그림 20. 살모넬라 생장단계에 따른 PSPS 발현의 차이



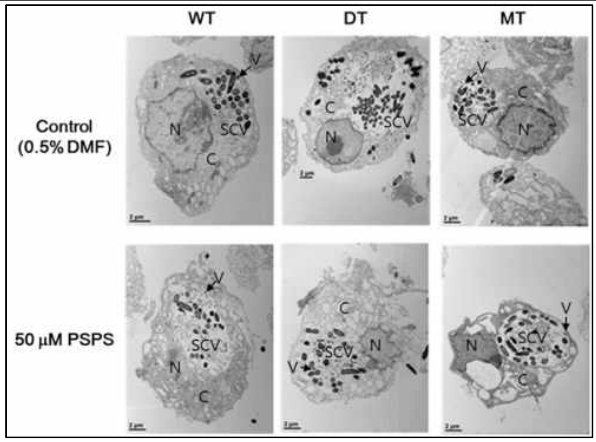


그림 22. 전자현미경으로 PSPS처리 후, 세포의 형태 변화 관찰.

그림 21. MdsABC와 PSPS 과발현에 따른 쥐 대식세포의 살모넬라 감염에 미치는 영향 확인

3) RNA 분해효소에 의한 살모넬라균의 병인성 기작 규명

○ RNase G가 결실된 살모넬라에서 병원성이 감소하는 것을 쥐 대식세포와 쥐의 생존시간을 통해 확인함. (그림 23)

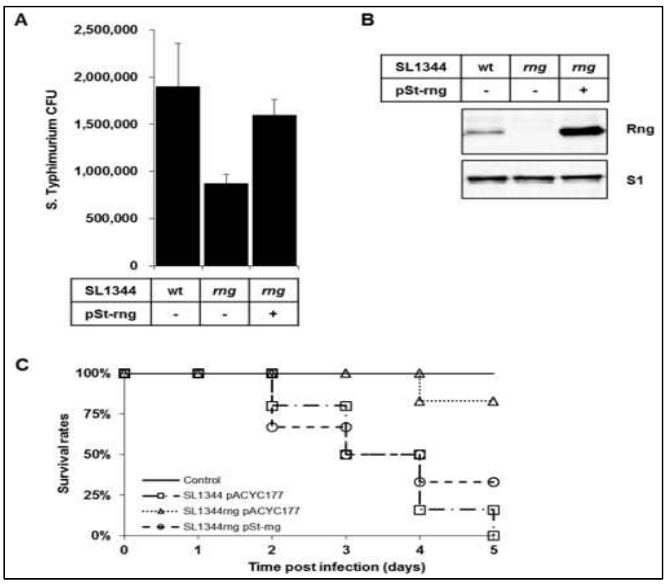


그림 23. 살모넬라의 RNase G 결실에 따른 병원성 감소

○ RNase G가 결실된 살모넬라를 쥐에 감염시킨후 쥐의 면역과 관련된 장기에서 관찰되는 살모넬라의 수가 감소하는 것을 확인. (그림 24)

○ 무산소, 고염 조건에서 invasion과 관련된 유전자들이 RNase G에 의해 강하게 조절되는 것을 확인. (그림 25)

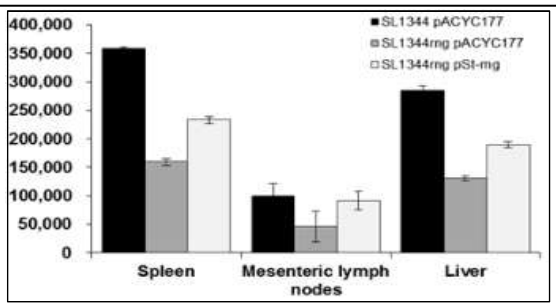


그림 24. RNase G가 결실된 살모넬라의 쥐의 장기에서 생존능 감소 확인

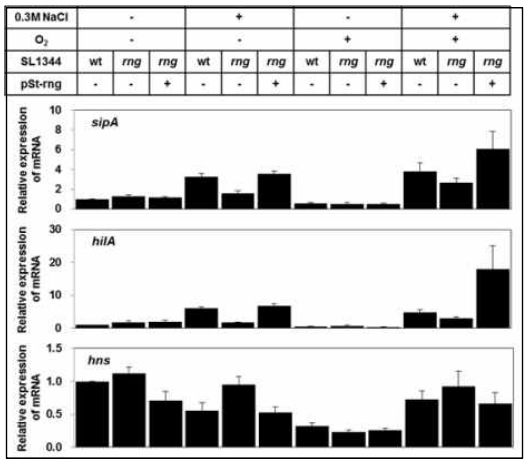


그림 25. 무산소, 고염 조건에서 invasion과 관련된 유전자들의 발현정도

○ RNase G의 타겟으로 예상 되어지는 *hns* mRNA의 분해 자리 확인 (그림 26)

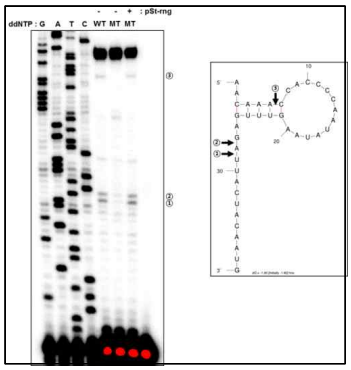


그림26. 생체내에서 hns mRNA의 RNase G 분해자리 확인

4) 살모넬라 RNase E/G 동족체의 multimer의 기능분석

○ **Small domain내 hyperactive NTH-Rne-E429G 돌연변이의 동정:** 기존의 야생형의 NTH-Rne를 과발현시키는 KSL2000 균주는 1 mM IPTG 존재 하 성장이 감소하는 것을 확인 함. 이는 과도한 ribonucleolytic activity 때문에 나타나는 일반적인 특징이므로, 정상적인 성장을 위해서 100μM IPTG로 야생형의 NTH-Rne를 발현시킴. 따라서

hyperactive NTH-Rne 돌연변이를 찾기 위해, 동일한 100 μM 농도의 IPTG 존재 하, 콜로니 형성이 억제되는 클론을 동정하기 시작함. 3000개의 클론을 확인 해 본 결과, 1-10 μM의 낮은 농도의 IPTG가 존재할 때에는 정상적인 성장을 보이지만 100-1000 μM의 IPTG가 존재할 때에는 극도로 성장속도가 줄어드는 한 개의 클론을 선별할 수 있었음. 이 클론은 더 적은 induction으로도 정상적인 세포 성장이 억제되었고, 이는 이 클론의 hyperactive한 성질 때문이라고 판단할 수 있었음. 이 후 염기서열 분석을 통해 이 클론은 429번째의 아미노산이 기존의 글루탐산에서 글라이신으로 치환된 돌연변이라는 것을 동정함.

○ **NTH-Rne-E429G multimer의 형성 효율:** NTH-Rne-E429G의 효소활성이 증가한 이유가 단백질의 multimer 형성이 증가된 것에 연유한 것인가를 알아보기 위해 NTH-Rne-wt, NTH-Rne-E429G를 발현하는 KSL2003균주에서 S30 세포추출액과 NTH-Rne-wt, NTH-Rne-E429G 단백질을 정제하여, gel filtration 및 cross-linking 실험을 수행함. 그 결과 NTH-Rne-E429G 단백질의 multimer 형성이 증가됨을 확인함.(그림 27)]

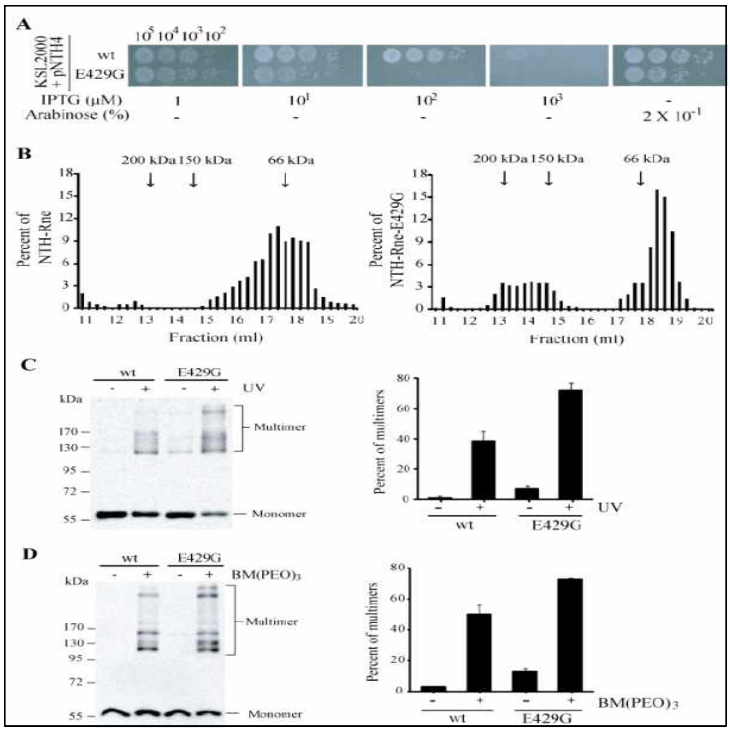


그림 27. NTH-Rne-E429G의 multimer 형성 증가 A. NTH-Rne의 효소활성 측정을 위한 플레이트 에세이. B. gel filtration 결과. C. UV crosslinking을 통한 NTH-Rne-E429G의 multimer 형성 측정. D. $BM(PEO)_3$ 시약을 이용한 chemical crosslinking을 통한 NTH-Rne-E429G의 multimer 형성 측정

○ **NTH-Rne의 구조분석을 통한 multimer 형성증가 기작 모델링 및 분석:** E429G 변이에 의한 multimer 형성 증가의 이유를 밝히기 위해, 이미 알려진 NTH-Rne의 구조를 바탕으로 변이가 일어난 주위의 구조를 분석함[그림 2]. 변이가 일어난 부분이 다른 프로토머의 RNase H 도메인에 존재하는 E272 잔기와 charge repulsion을 통해 dimer 형성을

방해할 수 있다는 가설을 세울 수 있었고, 이를 증명하기 위해 charge repulsion을 감쇄시키는 E429D(거리에 의한 감쇄)와 E429K(극성에 의한 감쇄)를 가진 변이체 NTH-Rne를 발현시키는 플라스미드를 제작하여 in vivo와 in vitro에서 효소의 활성 및 multimer 형성정도를 측정함. 실험결과, charge repulsion을 감쇄시키는 변이체 E429D(거리에 의한 감쇄)와 E429K(극성에 의한 감쇄)가 자연생에 비해 multimer 형성이 증가하였으며, RNA I과 p23RNA와 같은 긴 RNA 기질에 대한 분해능 또한 증가하였음을 확인하였음. 하지만, p-BR13이나 pBR10+hp10과 같은 짧은 올리고 RNA에 대해서는 2차구조의 존재와 상관없이 분해능이 증가하지 않음을 확인함.(그림28,29)

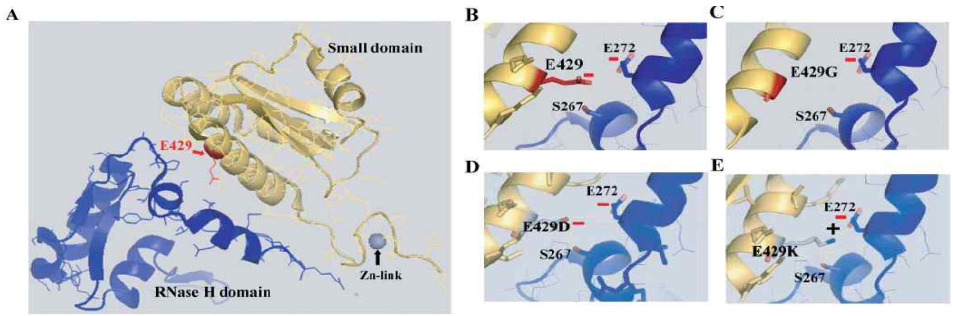


그림 28. A. 두 개의 프로토머에 각각 존재하는 Small 도메인과 RNase H 도메인 사이의 결합 모식도. B. 자연생 잔기(E429와 E272) 사이의 charge repulsion. C. E429G 변이체와 E272 사이의 결합. D. E429D 변이체와 E272 사이의 결합. E. E429K 변이체와 E272 사이의 결합.

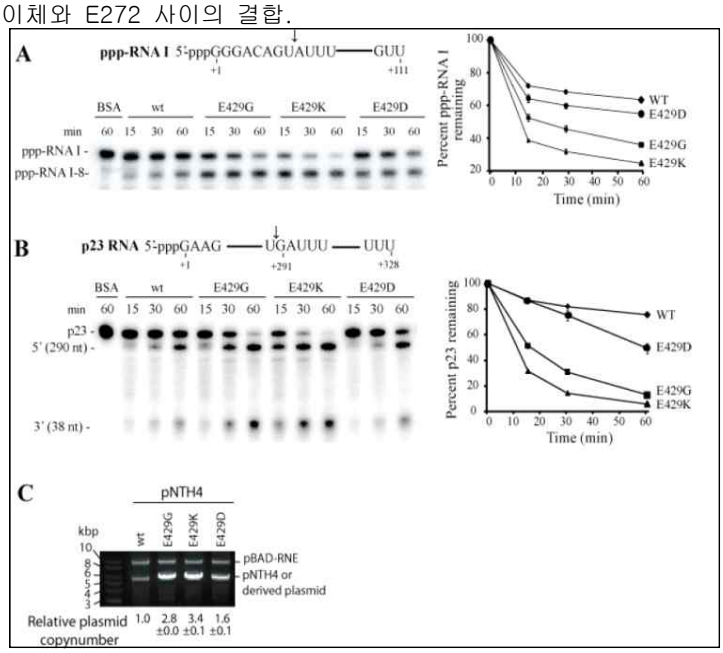


그림 29. E429 잔기 치환을 가진 변이제 NTH-Rne의 in vivo와 in vitro에서 효소의 활성. A. ppp-RNA I에 대한 활성. B. p23 RNA에 대한 활성. C. 생체 내에서 RNA I에 대한 활성.

○ **E429G 염기치환의 Full-length Rne에 대한 효과 분석:** 위와 같은 실험결과를 바탕으로, RNase E의 multimer 형성이 상대적으로 긴 RNA 기질을 더욱 효과적으로 분해하며, 짧은 올리고 RNA에 대한 분해능은 비슷하다는 결론을 내렸고, 이러한 현상이 생체 내에서도 일어나는지를 알아보기 위해 RNA I의 두 번째와 세 번째 stem-loop이 제거된

BR10+hpT를 생체내에서 발현시키는 플라스미들 제작하였고, 이를 이용해 자연생 RNase E와 E429G를 포함한 변이체 RNase E (Rne-E429G) 발현한 균주에서 RNA I과 BR10+hpT의 반감기를 측정하였다. in vitro cleavage assay의 결과와 같이, RNA I의 반감기는 multimer 형성에 따라 짧아졌으나, BR10+hpT의 반감기는 변함 (그림29).

□ 살모넬라균의 유전체 분석 및 발병기전 규명

1) 살모넬라균 제어를 위한 동물세포로의 단백질 전달시스템 개발

○ 금 나노 입자-DNA aptamer (AuNP-Apt) 접합체 기반 시스템을 살모넬라균 제어를 위한 동물 세포 내부로 전달시스템으로 사용하기위해 재조합 단백질 및 펩타이드를 크기, 등전점, 세포 위치에 따라 포유류 세포 전달 효율에 차이가 있는지 확인함.

○ 그 결과 단백질 및 펩타이드의 크기, 등전점, 세포 위치에 따라 관계없이 포유류 세포로 효율적으로 전달할 수 있으며(그림 30), 또한, AuNP-Apt 시스템에 의한 단백질의 전달은 일차 및 줄기 세포에 효과적 일 수 있으며, 이는 이의 사용이 빠른 분화 세포에만 국한되지 않음을 나타냄. (그림 31)

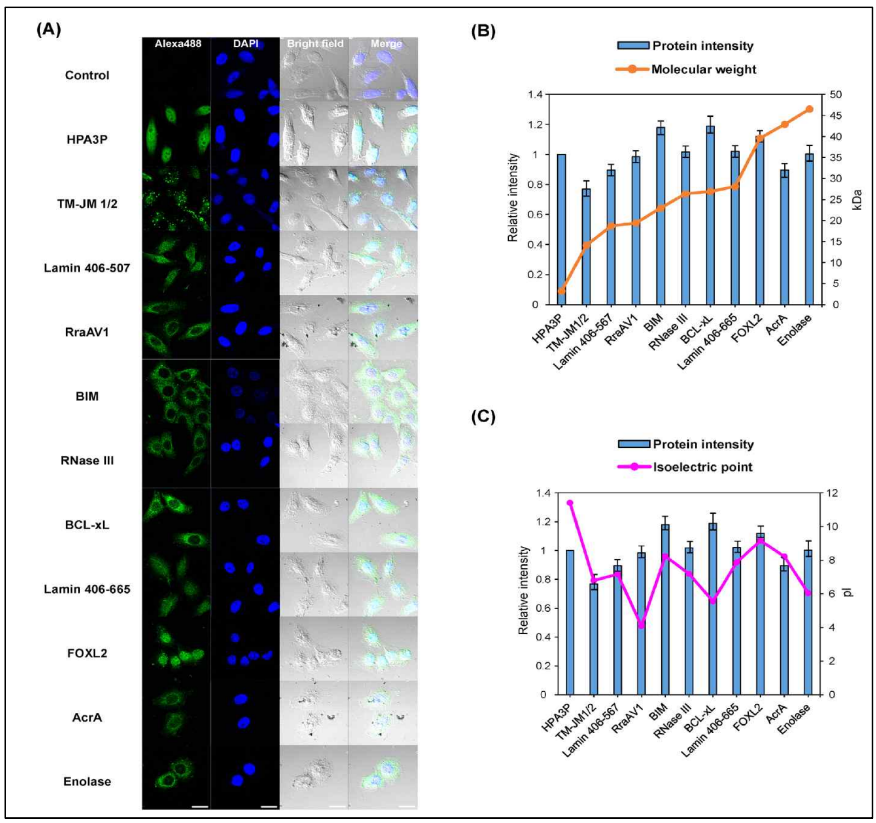


그림 30. AuNP-Apt 시스템을 이용한 다양한 단백질 및 펩타이드의 전달 확인.

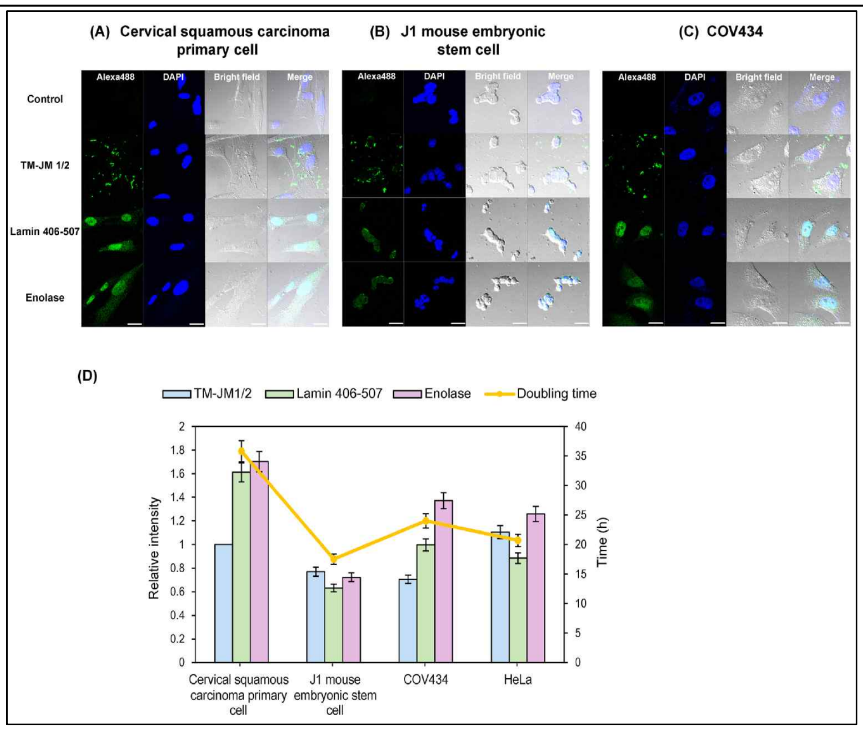


그림 31 다양한 포유동물 세포의 종류에 따른 단백질 전달능 확인

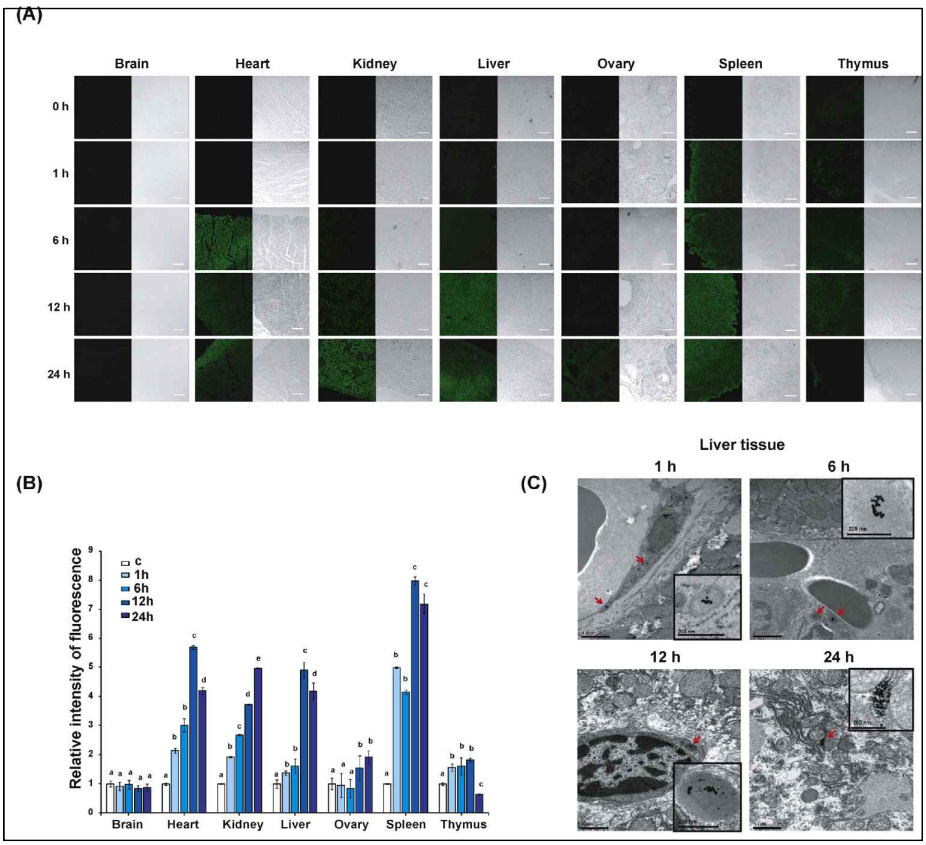


그림 32. AuNP-Apt 시스템을 이용한 단백질의 시스템적 전달 확인

○ 또한, 정맥 주사 된 AuNP-Apt 시스템이 단백질을 쥐의 기관에 시스템적으로 전달할 수 있음을 보고하였다. 이 결과는 이 시스템이 포유 동물의 생체 시스템에 재조합 단백질을 전달하기 위한 간단하고 효율적이며 다양한 플랫폼으로 사용될 수 있음을 보여줌.(그림 32)

2) 살모넬라균 특이적 다제내성 펌프의 병원성 기작 규명

○ 살모넬라 균 (*Salmonella* Typhimurium)은 전 세계적으로 인간과 동물 모두에서 위장병을 유발하는 주요 병원균임. 우리는 높은 수준으로 MdsABC를 과발현 하는 *S.* Typhimurium의 Secretome을 분석한 결과, PSPS가 세포 외부 및 세포질 면에서 선택적으로 과량 분포하는 것을 확인 함.

○ 공초점 현미경 분석에 의하면 과발현된 MdsABC는 세포막의 팽창에 의한 *S.* Typhimurium의 화막의 커다란 소포 형성을 촉진시켜 세포 파괴를 일으킨다는 것을 밝혀냄. (그림33)

○ MdsABC의 과발현과 PSPS의 외부 첨가는 모두 *S.* Typhimurium에 의한 대식세포 감염 동안 sipBCD 발현의 상향 조절을 유도하는데 효과적이었음.

○ MdsABC가 과발현 된 *S.* Typhimurium 세포는 생쥐에게 독성이 강했다. 이 연구는 MdsABC의 과발현이 비 고전적 분비 경로를 통한 세포 내 *S.* Typhimurium 감염의 병독성을 증가 시킨다는 것을 보여줌. (그림 34)

3) 살모넬라 RNase E/G 동족체의 기능을 저해하는 단백질 인자의 기능분석

○ RNase E는 대장균(*Escherichia coli*)에서 수많은 RNA의 가공 및 분해에 관여하는 필수적인 효소이다. RNase E의 효소 활성은 RraA와 RraB에 의해 조절됨. 그람양성균인 *Streptomyces coelicolor*는 RNase ES, RraAS1, RraAS2라고 명명되는 RNase E와 RraA의 동족체를 가지고 있음.

○ 이 연구에서는 *S. coelicolor* 유래의 RraAS1이 *E. coli*에서 RNase E의 효소활성을 저해하는지 연구하였다. 대장균에서 RraAS1의 발현은 RNase E의 과발현에 의해 감소된 세포생장을 더욱 저하시켰으며 (그림 35), RNase E의 기질인 *rpsO, ftsZ, rnhB* mRNA의 양을 감소시키는 것을 확인 하였다(그림 36). 이러한 RraAS1의 효과는 공동면역침전실험을 수행한 결과에서 유추할 수 있듯이, Rne 단백질과 RraAS1의 결합으로 유도되는 것으로 보인다(그림 37). 이러한 결과는 RraAS1이 대장균에서 RNase E의 리보핵산 가수분해 활성을 유도함을 시사한다.

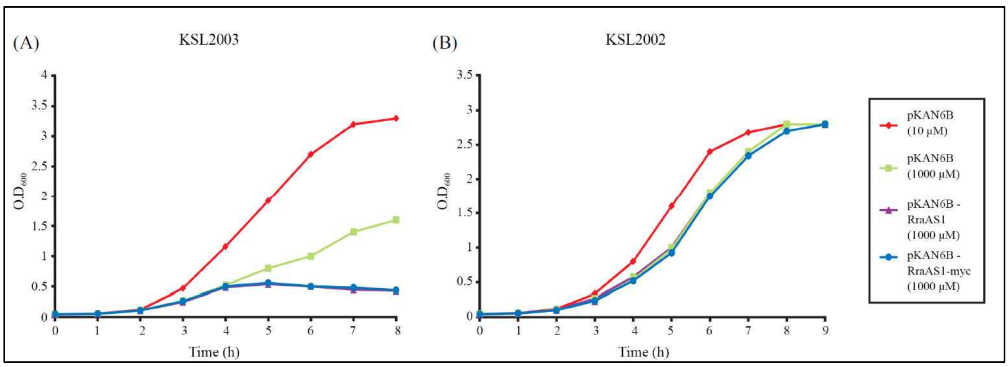


그림 35. 대장균 RNase E를 발현하는 세포(KSL2003)와 N-RNase E(KSL2002)를 발현하는 세포에서 RraAS1을 발현하였을때의 성장곡선

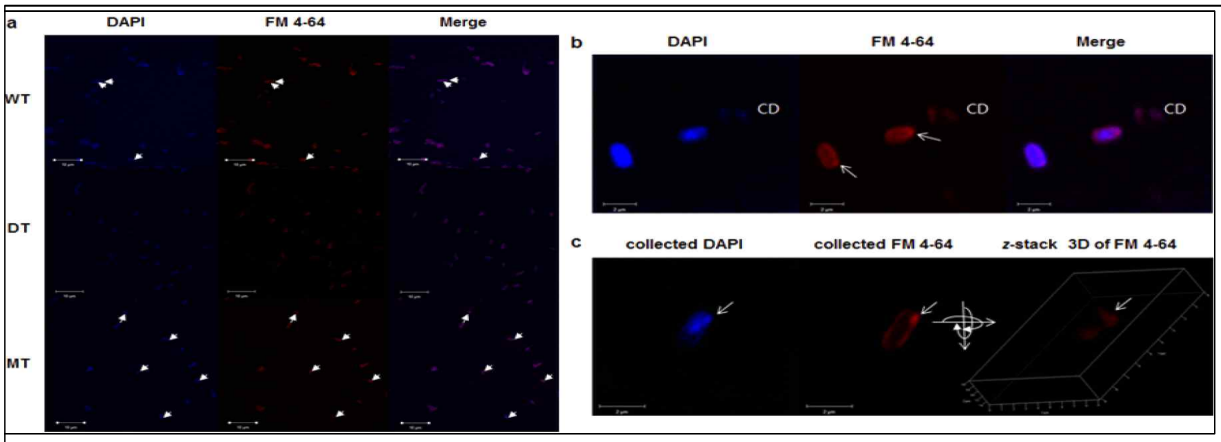


그림 33. S. Typhimurium strain 14028S의 exponential-phase 세포에서 막의 팽창.(a) 야생 형 (WT), mdsABC 결실 (DT) 및 mdsABC 과발현 (MT) 돌연변이 체의 공 촛점 스캐닝 이미지. FM 4-64 유성 염료 (적색)와 DAPI (청색)를 사용하여 세포막과 DNA를 이중으로 표지하면 DNA를 포함한 막 돌출부를 관찰 할수 있다. (b) MT 세포의 세포 파괴 (CD)를 야기하는 DNA를 포함한 막 돌출부를 보여준다. (c) DAPI로 염색 된 DNA를 가진 FM 4-64- 표지 된 막으로부터 구형 돌출부의 z- 스택 평면을 갖는 공 초점 현미경 이미지.

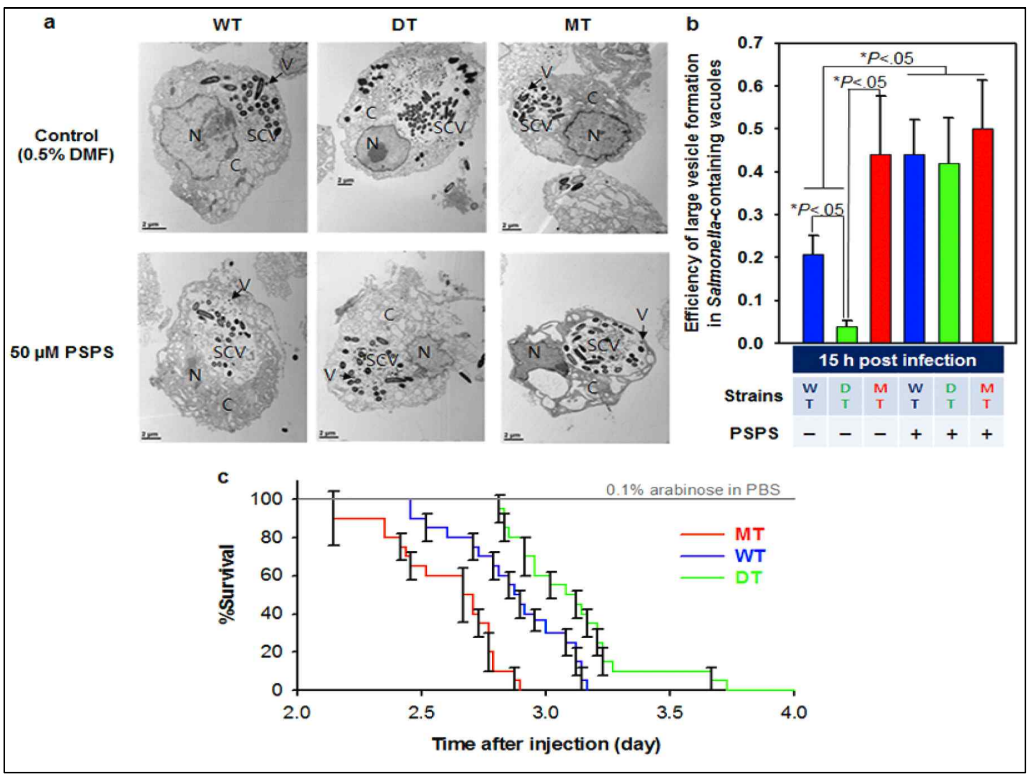


그림 34. macrophages와 쥐 모델에의 감염에 대한 MdsABC와 PSPS의 영향. (a) 50 μm의 PSPS 또는 0.5 % N, N'- DMF의 존재하에 RAW 264.7 세포의 감염 15 시간 후 전자 현미경 이미지. (b) 살모넬라 포함 vacuoles에서 큰 소포의 형성 효율. (c) 0.1 % arabinose로 처리 된 WT, DT 및 MT 균주의 5 x 10^4 cfu의 세포를 복강 내 주사 한 생쥐 (각 군에서 n = 10)의 생존 플롯.

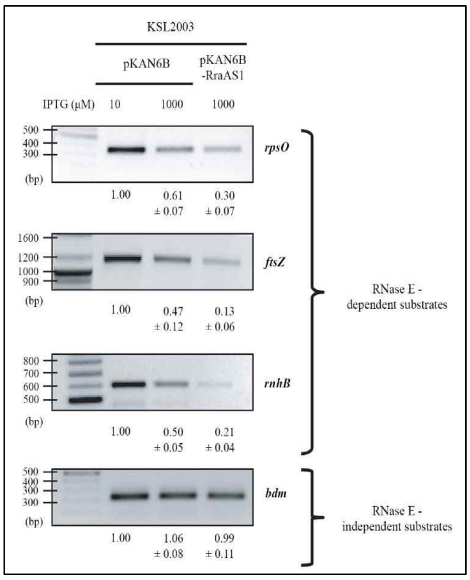


그림 36 RraAS1을 발현하였을 때 mRNA의 발현양 변화

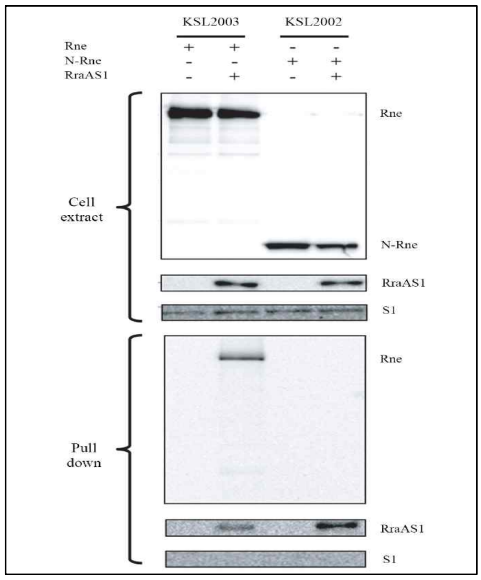


그림 37. Rne와 RraAS1의 상호작용 분석

4) RNA 분해효소에 의한 살모넬라균의 병인성 기작 규명

○ *hns* mRNA가 RNase G의 직접적인 표적임을 알아보기 위하여 진행한 northern blot 결과에서 RNase G가 제거된 돌연변이에서는 *hns* mRNA 양의 반감기가 야생형과 비교하여 약 2.5배 늘어난 것을 확인할 수 있음. 이 결과를 토대로 RNase G가 *S.* Typhimurium 내에서 *hns* mRNA를 조절한다는 것을 알 수 있음. (그림 38)

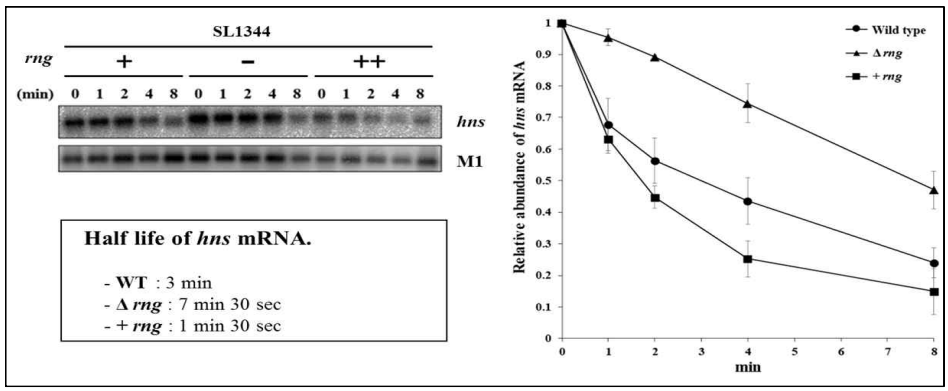


그림 38. RNase G에 의한 *hns* mRNA양 조절.

○ 대장 상피 세포내에서 RNase G의 발현과 *Salmonella* Pathogenicity Island(SPI) 유전자 발현 간의 상관관계를 알아본 결과, 감염하지 않았을 경우 시간의 흐름에 따른 *rng* mRNA의 양과 SPI 유전자 발현 변화에 연관이 없는 것으로 보이나, 감염을 일으킨 *Salmonella* 내에서는 RNase G의 발현에 따른 *hns, hilA, sipA* mRNA의 발현이 서로 유의하게 움직임을 알 수 있었음. 특이한 점은, 감염 후 4시간이 지났을 때 증가한 *hilA*의 양과는 반대로 계속 줄어드는 *sipA* 전사체의 양을 확인할 수 있었는데, 이는 *sipA*가 감염 극 초기(~160분)에 숙주 세포 내로 *Salmonella*가 침입할 수 있도록 하는 유전자이므로 4시간 후 부터는 그 전사량이 감소했을 것이라고 유추할 수 있음.(그림 39)

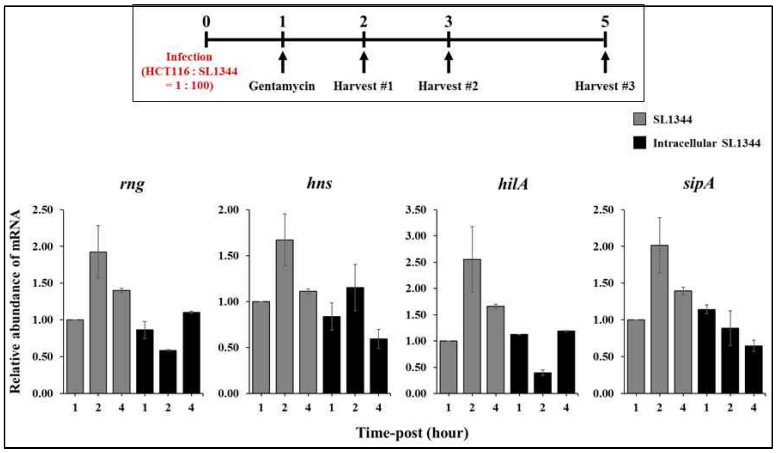


그림 39. 숙주 세포를 감염 한 *S.* Typhimurium 내에서 시간의 경과에 따른 mRNA 양의 변화

5) 목적동물 (돼지)의 세포주(IPEC-2J)를 이용한 살모넬라 감염시 발현되는 유전자 분석

○ 살모넬라균의 세포 및 목적 동물(돼지)감염 시 발현되는 인자를 이용한 진단용 바이오 마커 발굴을 위해 돼지유래 장상피세포주 (IPEC-J2)를 이용하여 microarray 분석을 ㈜ 천랩에 의뢰하여 수행 중임.

6) 살모넬라 감염시 발현되는 물질 유도 치료 및 예방기법 개발 (제 1세부 공동수행)

○ 살모넬라균의 감염에 따른 세포내 침입 및 억제 물질을 이용하여, 대식세포의 actin polymerization을 억제 하는 물질을 발굴하였으며, 이를 토대로 살모넬라 감염 치료 및 예방법을 구축함 (그림 40).

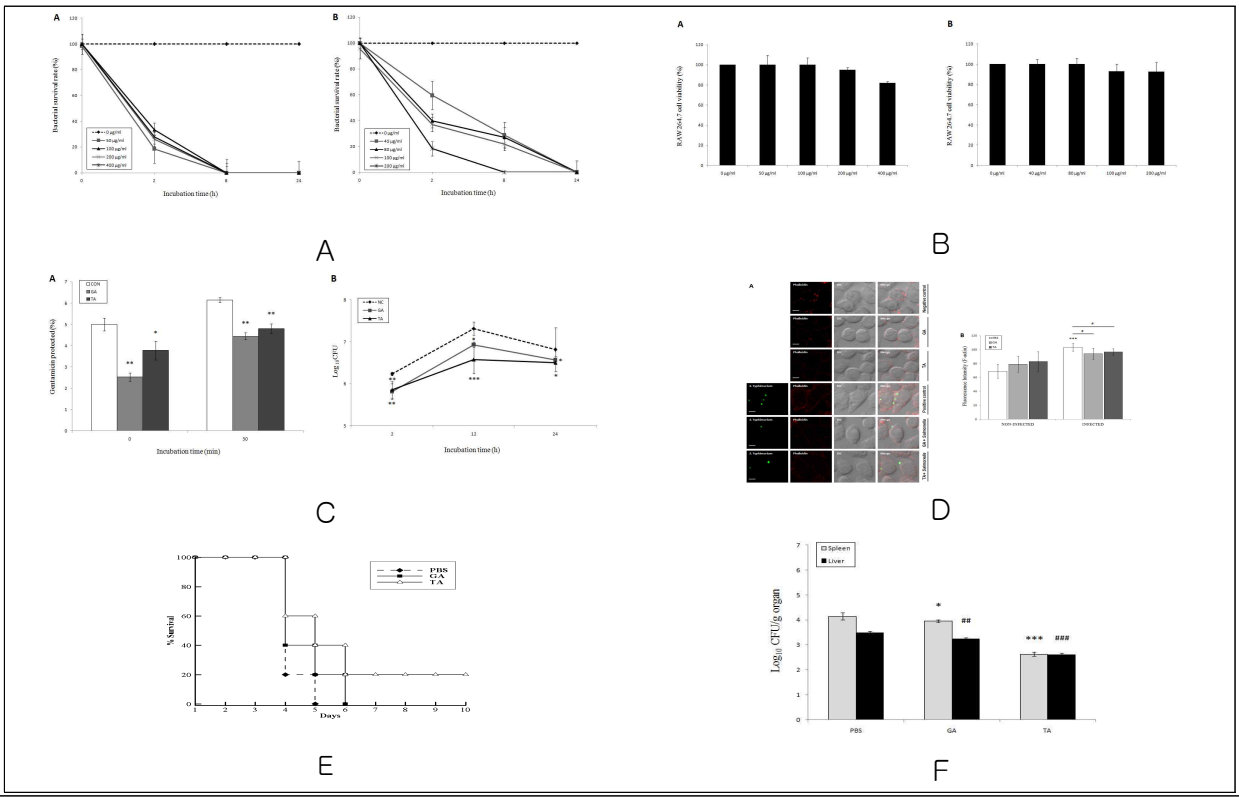


그림 40. 살모넬라 균의 숙주 대식세포내 침입에 영향을 미치는 탄닌 유도물질을 이용하여 균 대식세포내 침입을 억제하는 기전을 규명하였으며, 실험동물이 마우스 감염에서 탄닌유도물질의 치료효과가 규명되어 이를 이용한 대식세포 침입 억제, actin polymerization 억제 및 치료효과를 규명하였음

□ 살모넬라균의 유전체 분석 및 발병기전 규명

1) 살모넬라균 제어를 위한 병원성 유전자 탐색 및 병원성에 미치는 영향 분석

○ 대장균에서 편모 합성에 영향을 미친다고 알려진 biofilm-dependent modulation (bdm) 유전자는 이 유전자에 의해 암호화 된 단백질이 편모 조립에 대한 조절 경로와 밀접하게 연관되어 있음을 보여 주었다. 그러나 편모 생물 발생에서 Bdm의 구체적인 역할은 알려져 있지 않음.

○ 본 실험을 통해 Bdm이 FlgM과 상호 작용하고 대장균에서 깃털 계 후기 유전자의 전사를 유도하는 항-σ28 인자로서의 기능을 억제함을 확인 하였고 (그림 41), bdm 유전자의 Salmonella enterica serovar Typhimurium에 존재하는 상동 유전자인 yddX 유전자의 결실은 편모 합성과 관련된 하위 유전자의 하향 조절과 짧은 편모의 형성을 초래하여 생쥐의 병독성이 감소한다는 것을 확인함 (그림 42).

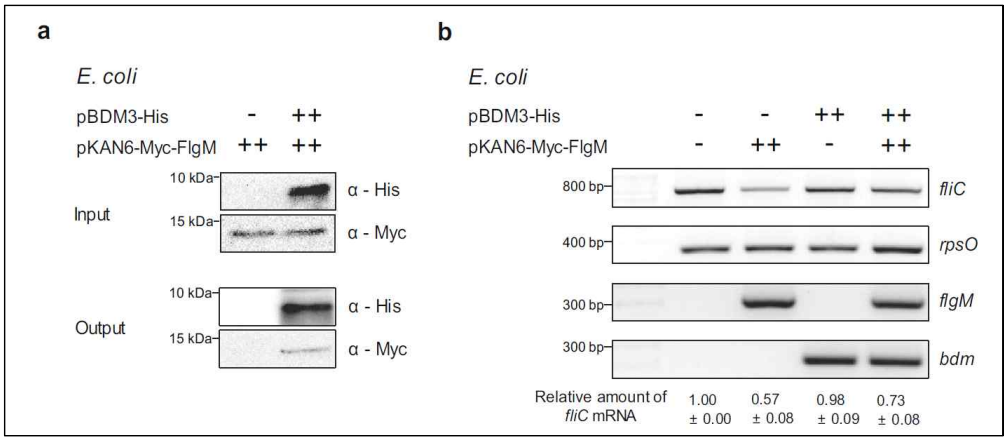


그림 41 항-σ28 인자로서의 Bdm의 특성 규명. a. Bdm과 FlgM 간의 상호 작용 b. Bdm과 FlgM 발현이 fliC 발현에 미치는 영향.

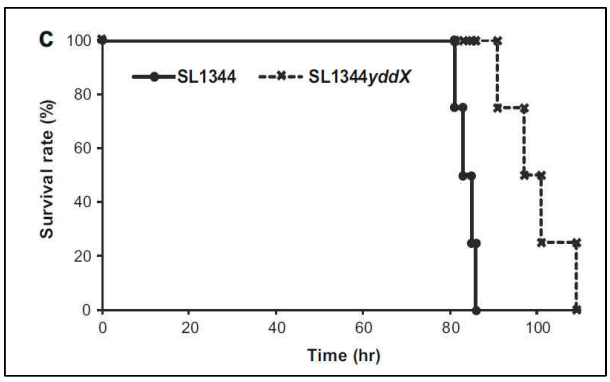


그림 42 yddX 유전자의 결실이 Salmonella 병원성에 미치는 영향

○ 또한, yddX가 외부에서 발현 될 때 yddX가 결실된 S. Typhimurium 세포에서 편모합성과

관련된 유전자의 발현 수준이 야생형으로 회복됨. (그림 43) 이러한 결과는 편모 조직의 Bdm 매개 조절이 Enterobacteriaceae 계통의 구성원들에서 보존 된 조절 경로이며 유전체 내 bdm의 동족체가 존재함을 시사함.

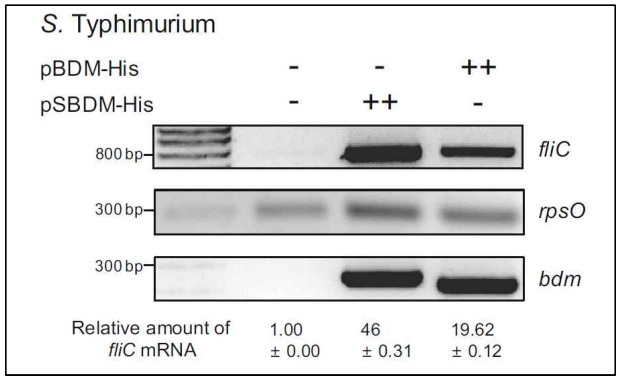


그림 43 Complementation assay. fliC의 mRNA 존재량을 Semi-quantitative RT-PCR로 측정 하였다.

2) 병원성 세균 제어를 위한 동물세포로의 단백질 전달시스템 개발

○ 기존에 살모넬라 균의 병원성 제어를 위한 단백질 전달 시스템을 이용하여 다른 병원성 세균인 Vibrio vulnificus의 감염에 대한 치료제 전달에 적용함. 금 나노 입자 -DNA aptamer (AuNP-Apt) 접합체 (AuNP-Apt-HPA3P^{His})에 항균 펩티드 (AMP) 인 HPA3P^{His}가 실험용 마우스 생체 내에서 V. vulnificus 감염에 효과적인 치료 도구임을 입증함 (그림 44)

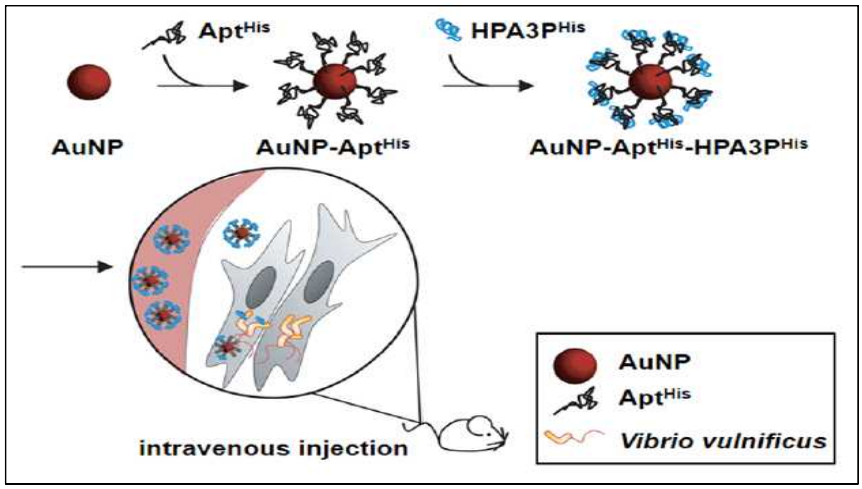


그림 44 AuNP-Apt-HPA3P^{His}를 통해 Vibrio vulnificus에 감염된 숙주에게 HPA3P^{His}를 전달하는 과정을 설명하는 모식도.

○ HPA3P^{His}는 V. vulnificus의 세포막 파괴를 통해 세균 세포 사멸을 유도했으며, V. vulnificus에 감염된 HeLa 세포에 AuNP-Apt-HPA3P^{His}를 도입하면 세포 내 감염된 V. vulnificus가 90% 까지 급격히 감소하여 세포의 생존율이 증가함 (그림 45).

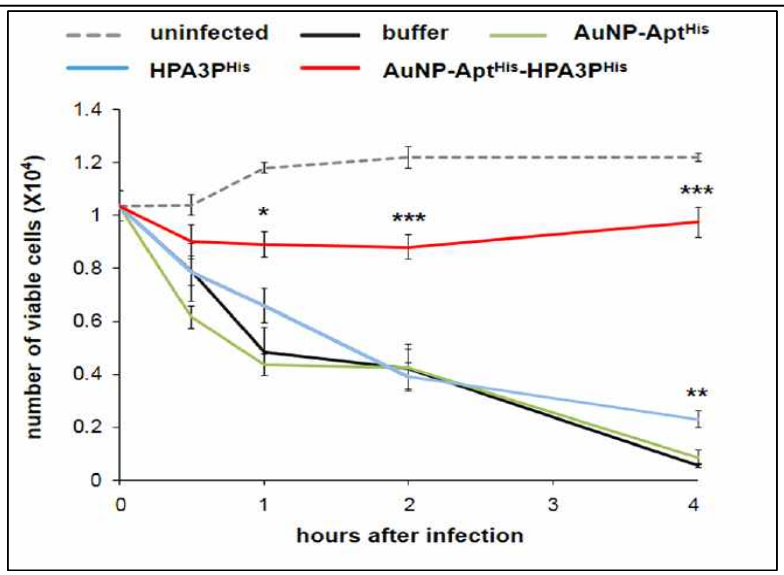


그림 45 AuNP-Apt-HPA3P^{His}의 살균 활성에 의한 V. vulnificus 감염 숙주 세포의 보호 효과. V. vulnificus 감염된 HeLa 세포에 대한 HPA3P^{His} 또는 AuNP-Apt-HPA3P^{His}의 보호 효과를 지시 된 기간 동안 항온 배양 후 세포 생존력을 측정하여 평가 하였다.

○ 또한, V. vulnificus가 감염된 마우스에 AuNP-Apt-HPA3P^{His}를 정맥 주사했을 때, 마우스 기관에서 V. vulnificus의 집락 형성이 완전히 억제되어, 처리 된 마우스의 생존율이 100 %로 높은 치료효과를 보임 (그림 46).

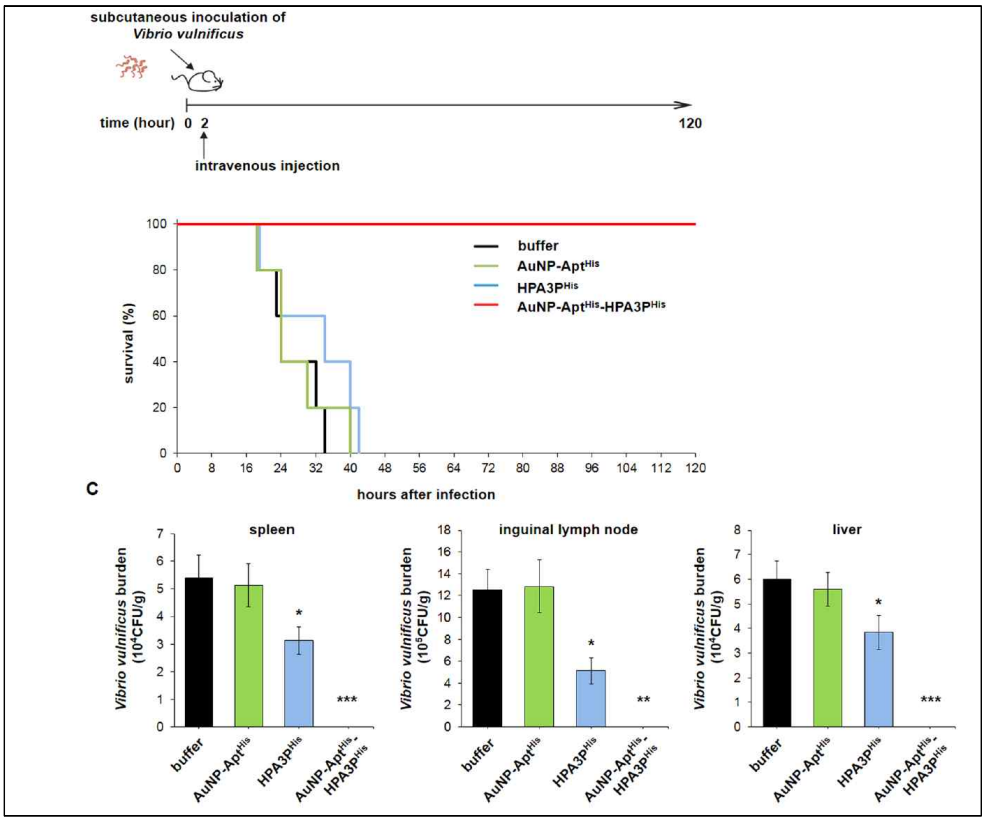


그림 46 AuNP-Apt-HPA3P^{His}의 전신 투여에 의한 Vibrio vulnificus 감염마우스에서의 사망으로부터의 완벽한 보호효과

○ 이 연구는 AuNP-Apt가 사람과 수생 동물의 주요 병원체 감염에 대해 효과적이고 신속한 치료 옵션으로 AMP 전달을 통한 치료 가능성을 입증함.

3) 살모넬라균 제어를 위한 병원성 유전자 탐색 및 기능 규명

○ 살모넬라의 mRNA 안정성에 영향을 미치는 유전자인 RraASt를 살모넬라 염색체 상에서 결실시킨 후 실험용 마우스에 야생형과 RraASt 결실형 살모넬라 균주를 감염 시킨 후 마우스의 생존능을 확인한 결과 RraASt를 결실한 마우스의 생존율이 야생형보다 증가한 것을 확인 함 (그림 47).

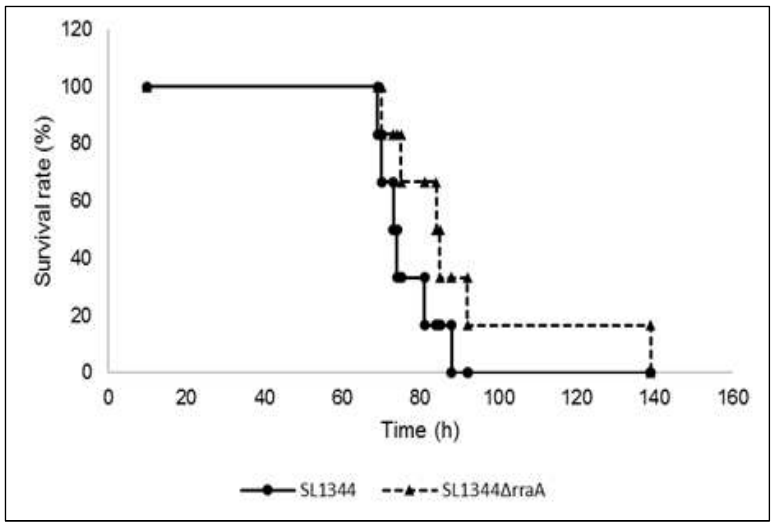


그림 47 실험용 마우스에 야생형(SL1344)과 RraASt 결실형(SL1344 ΔrraA) 살모넬라 균주를 감염 시킨 후 마우스의 생존능 확인

○ 이 균주를 사용하여 사람 세포인 HeLa cell과 HCT116 cell에 처리한 결과 RraASt가 결실된 살모넬라 균주를 감염시킨 경우의 invasion이 감소한 것을 확인 함 (그림 48). 이를 통하여 RraASt유전자가 사람세포의 감염성 및 병원성에 영향을 미칠 가능성이 있음을 확인하였음. 또한, 기생성 세균(살모넬라)의 목적동물(돼지) 세포유래 IPEC-J2 세포 감염을 통한 살모넬라균의 세포내 침입 및 증식효과를 규명함 (그림 49)

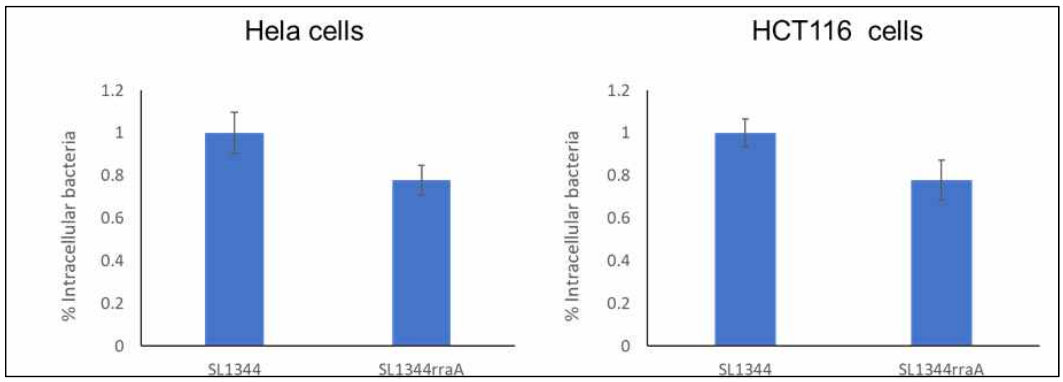
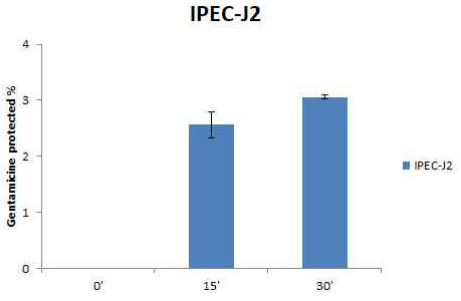


그림 48 야생형(SL1344)과 RraASt 결실형(SL1344ΔrraA) 살모넬라 균주를 감염 시킨 사람세포의 invasion test.

1) 기생성 세균(살모넬라)의 목적동물(돼지) 세포유래 IPEC-J2 세포 감염을 통한 살모넬라균의 세포내 침입 및 증식효과 규명

A



B

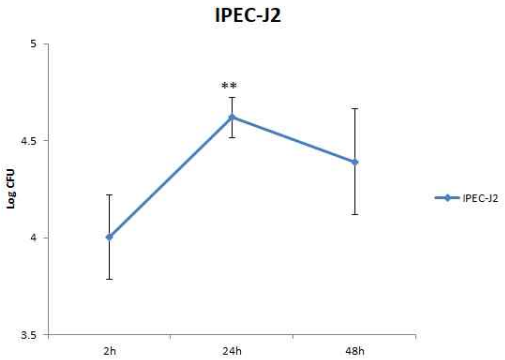


그림 49. 살모넬라 균의 돼지세포유래 상피세포인 IPEC-J2 cell 에서의 세포내 침입(A) 및 증식 (B)능력 평가

나. 제 2 협동과제 결과

[(주)인트론바이오테크놀로지 - 기생성 세균의 오믹스 데이터 비교분석 및 진단/예방 원천기술 사업화 탐색]

□ 기생성 세균의 오믹스 데이터 분석 및 표준화 (브루셀라균의 대식세포 감염 후 발현되는 브루셀라균의 병원성 유전자 발현양상 규명)

1) 오믹스 데이터 추가 분석을 통해 예방용 항원으로 활용될 수 있는 유전자들을 분석 수행함

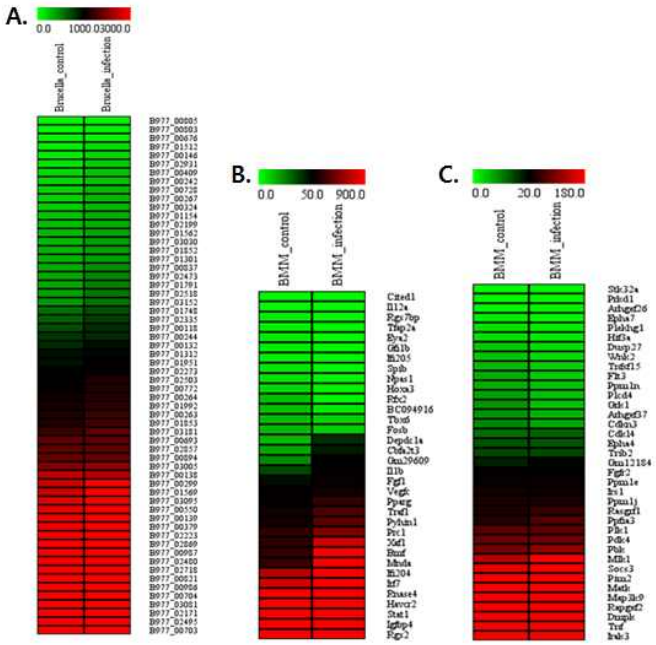


그림 1. 브루셀라(A) 및 감염 숙주의 BMM 세포(B, C)를 대상으로 추가 후보 유전자 분석. 고효율의 브루셀라 백신 개발을 위해, 기존과 다른 브루셀라 감염 숙주를 사용하여 브루셀라 감염을 유도한 후 브루셀라의 유전자 발현 양상을 RNA-Seq data 분석을 통해 확인한 결과 브루셀라의 병원성과 관련된 유전자들의 발현이 높아진 것을 확인할 수 있었음

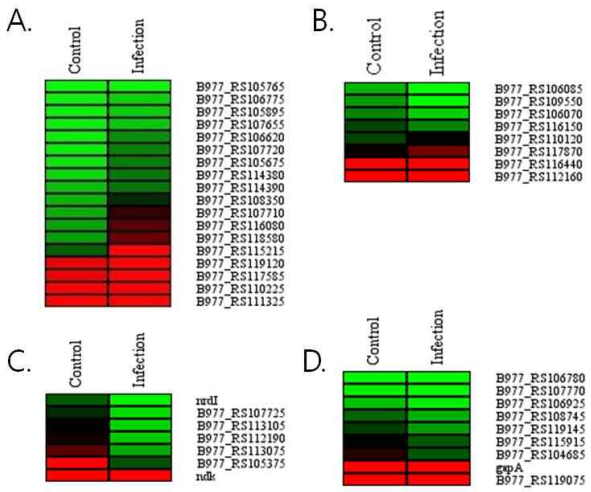


그림 2. 숙주 감염 시 브루셀라 유전자들의 기능적 분류 결과
(A: transcription, B: replication, recombination and repair, C: nucleotide transport and metabolism, D: carbohydrate transport and metabolism)

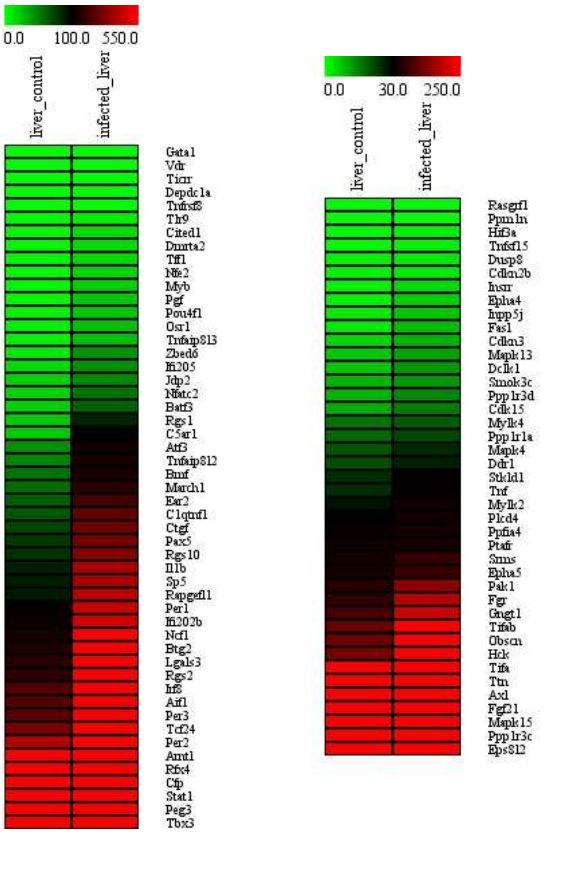


그림 3. 마우스 간에서의 유전자 발현 기능적 분류 (transcription/RNA processing and modification, signal transduction mechanism)

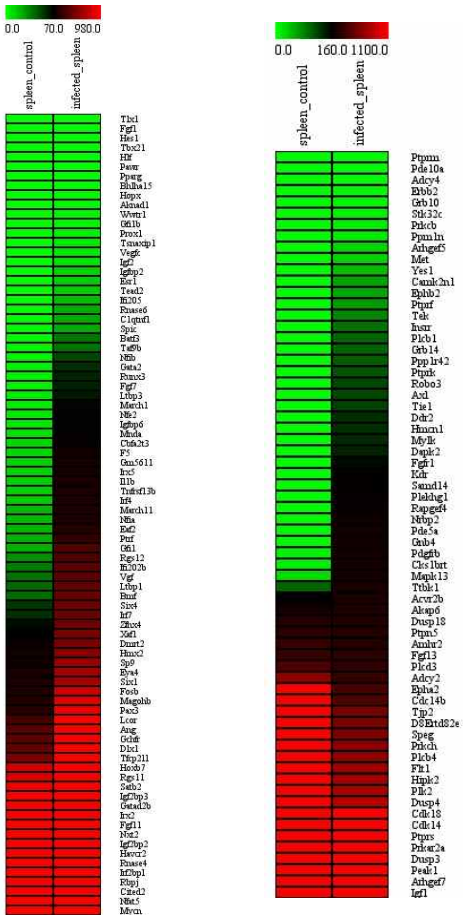


그림 4. 마우스 비장에서의 유전자 발현 기능적 분류 (transcription/RNA processing and modification, signal transduction mechanism)

□ 오믹스 데이터 분석을 통해 확보한 후보 유전자들을 대상으로 진단용 마커 및 예방용 표적분자로서의 유용성 검사

1) 브루셀라 재조합 Dps 항원의 면역원성 평가를 수행하여 예방용 표적분자로서의 가능성 확인

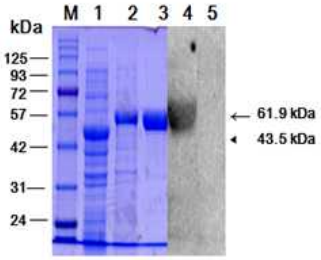


그림 6. Dps 재조합 단백의 브루셀라 감염혈청과의 면역반응 규명

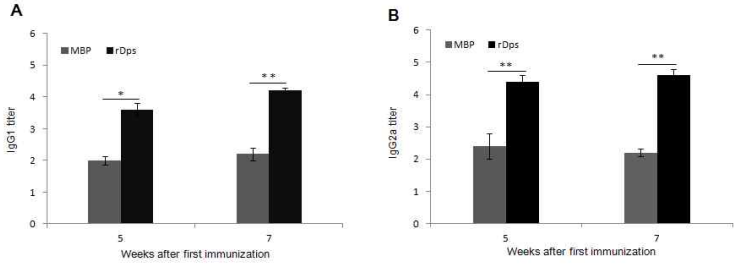


그림 7. Dps 재조합 단백의 마우스 면역 후 마우스의 면역반응 평가

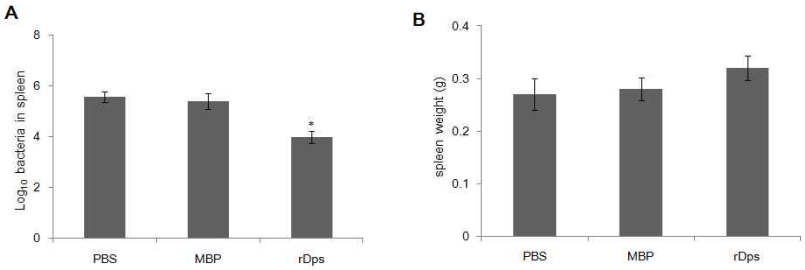


그림 8. Dps 재조합 단백의 마우스 면역 후 공격접종 방어효과 규명

2) 제1세부 연구기관과 공동으로 브루셀라 예방용 표적분자로 활용될 수 있는 Dps 항원의 과 발현 및 정제 순도 개선과 면역원성 평가를 수행함 (그림 6, 7, 8)

3) 브루셀라 재조합 mdh 항원의 면역원성 평가를 수행하여 예방용 표적분자로서의 가능성을 확인 함(그림 9, 10, 11)

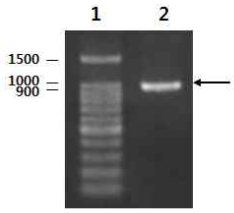


그림 9. Mdh 재조합 단백 작제 준비

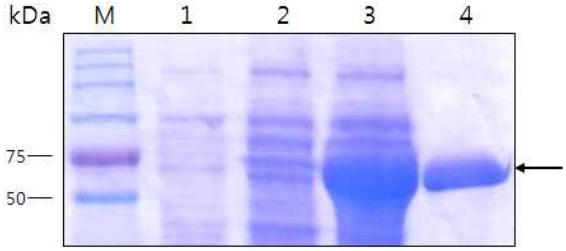


그림 10. Mdh 재조합 단백 발현

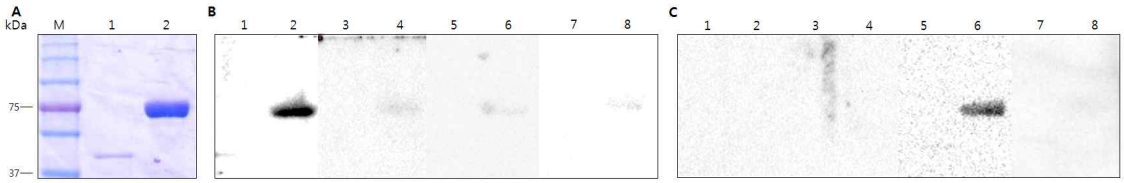


그림 11. Mdh 재조합 단백의 면역원성 확인

4) 진단용 마커로서의 고면역원성 *Brucella* 단백의 유용성 검사 (제 1세부 공동수행): 브루셀라 감염증의 진단용 마커를 개발하기 위하여 다양한 재조합 항원을 작제 하였으며, 특히 Tbp, AspC, rDps, InPB 재조합 단백의 면역원성을 감염혈청의 면역반응과 비교 확인함 (그

림 12, 13, 14, 15)

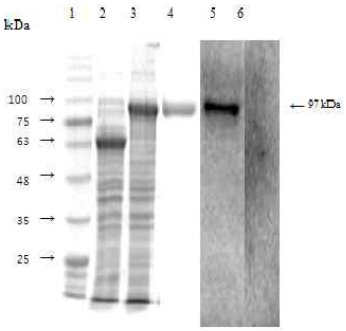


그림 12. TbpA 재조합 단백의 브루셀라 감염혈청과의 면역반응 규명

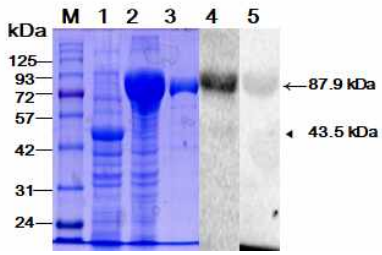


그림 13. AspC 재조합 단백의 브루셀라 감염혈청과의 면역반응 규명

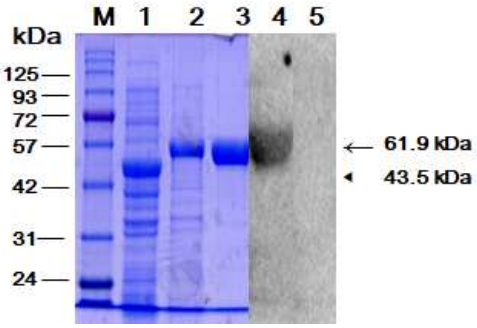


그림 14. rDps 재조합 단백의 브루셀라 감염혈청과의 면역반응 규명

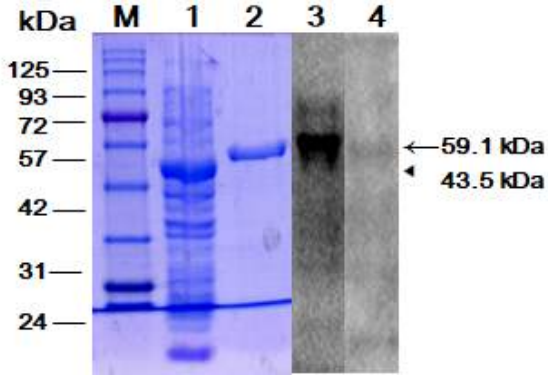


그림 15. InPB 재조합 단백의 브루셀라 감염혈청과의 면역반응 규명

5) 고면역원성 *Brucella* 단백인 TbpA를 이용한 진단적 효용성 평가 (제 1세부 공동수행): 지금까지 보고 된 바가 없던, Tbp 재조합 단백을 이용하여, 브루셀라 감염혈청에 대한 진단을 수행해본 결과, 양성에 대한 특이적인 반응이 확인 되어, 진단법 개발에 유용하게 활용 될 가능성이 제시됨 (Table 5, 6)

Table 5. Absorbance values of bovine sera using rTbpA antigens based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

	OD_{492}value			
Antigen	Negative (n=36)	TAT 400 (n=24)	TAT 200 (n=20)	TAT 100 (n=22)
rTbpA	0.094 ± 0.089	0.411 ± 0.147	0.285 ± 0.119	0.226 ± 0.075

Table 6. Evaluation of diagnostic values of rTbpA antigen based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) compared to a standard tube agglutination test (TAT)

	TAT positive	TAT negative

		(n=66)	(n=36)
ELISA	Positive	60	5
	Negative	6	31

Sensitivity= (60/66)*100=90.91 %; Specificity= (31/36)*100=86.11%;
Accuracy=(91/102)*100=89.21%

6) 고면역원성 *Brucella* 단백인 Ohr를 이용한 진단적 효용성 평가 (제 1세부 공동수행): 지금까지 보고 된 바가 없던, Ohr 재조합 단백을 이용하여, 브루셀라 감염혈청에 대한 진단을 수행해본 결과, 양성에 대한 특이적인 반응이 확인 되어, 진단법 개발에 유용하게 활용 될 가능성이 제시됨 (그림 16, 17, 18)(Table 7)

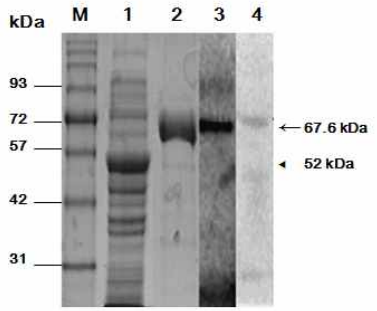


그림 16. Ohr 재조합 단백의 브루셀라 감염혈청과의 면역반응 규명

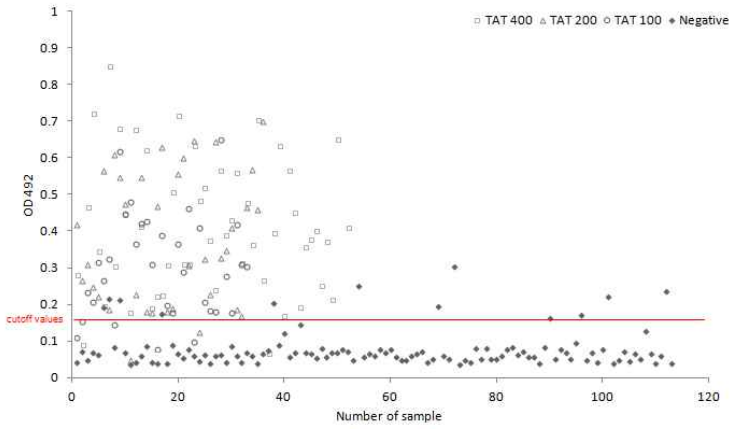


그림 17. Ohr 재조합 단백의 브루셀라 감염혈청과의 반응을 통한
진단적 가치 평가 수행

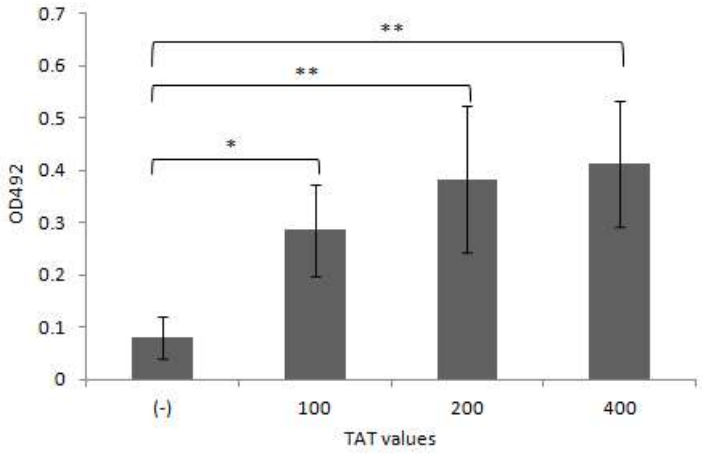


그림 18. Ohr 재조합 단백의 브루셀라 감염혈청 TAT 반응값에 따른 진단적 가치 평가

Table 7. Evaluation of diagnostic values of rOhr antigen based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) compared to a standard tube agglutination test (TAT)

		TAT positive (n=118)	TAT negative (n=114)
ELISA	Positive	109	12
	Negative	9	102

Sensitivity=(109/118)*100=92.37 %; Specificity=(102/114)*100=89.47%; Accuracy=(211/232)=90.95%

7) 예방용 마커로서의 유용성 검사 (제 1세부 공동수행): AspC, rDps, InPB 재조합 단백을 이용하여, 예방용 마커로서의 특성을 분석해본 결과, 2차례의 면역접종 후 도전감염 수행에서 높은 방어력이 확인 됨 (그림 19-22)

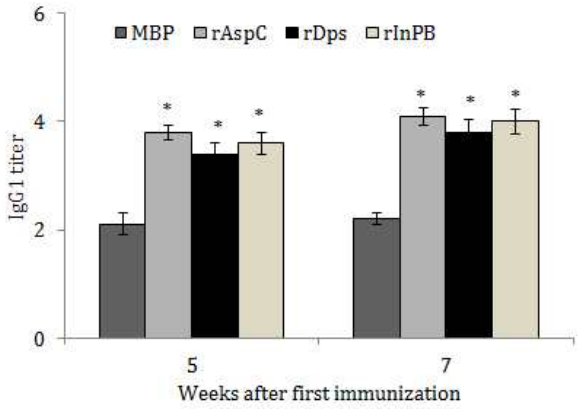


그림 19. AspC, rDps, InPB 단백을 정제 후 vaccination한 마우스의 면역반응 평가(IgG1)

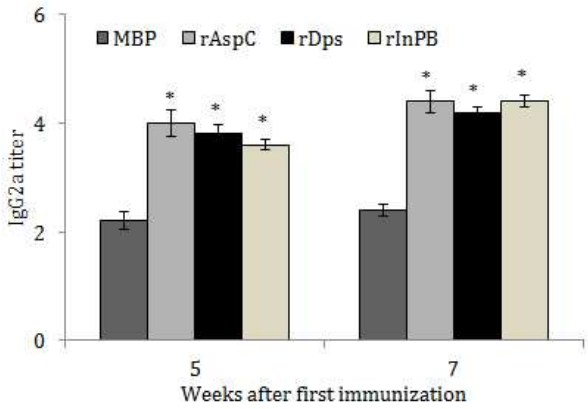


그림 20. AspC, rDps, InPB 단백을 정제 후 vaccination한 마우스의 면역반응 평가(IgG2)

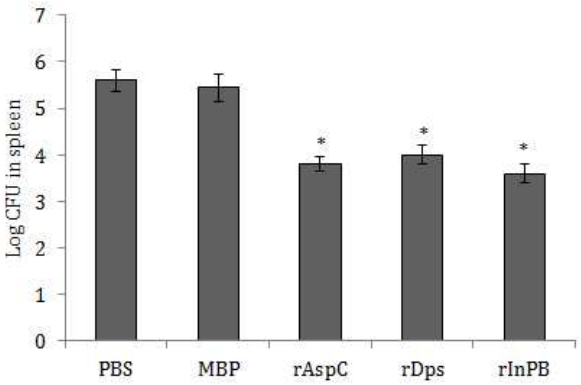


그림 21. AspC, rDps, InPB 단백을 정제 후 vaccination한 마우스의 도전감염에서의 방어효과 (비장내 균수 측정)

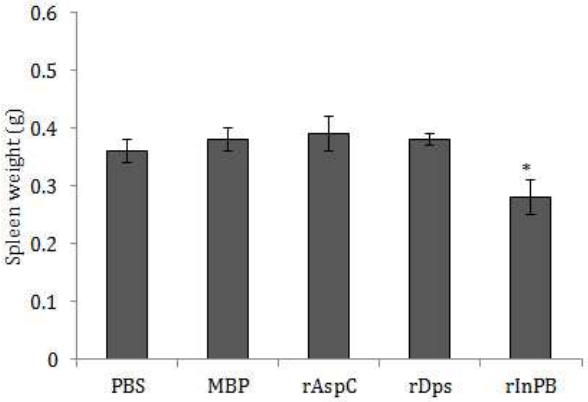


그림 22. AspC, rDps, InPB 단백을 정제 후 vaccination한 마우스의 도전감염에서의 방어효과 (비장 증식 평가)

8) 예방용 마커로서의 유용성 검사 (제 1세부 공동수행): SodC, ribH, Ndk, L7/L12, MDH 재조합 단백을 이용하여, 예방용 마커로서의 특성을 분석해본 결과, 2차례의 면역접종 후 도전감염 수행에서 높은 방어력이 확인 되었으며, 기존의 RB51 생균 백신주와 비교해 볼 때, 약간 낮은 방어력을 보였으나, 인체 감염과 백신접종 동물의 브루셀라 증상 발현과 같은 기존 생균백신의 문제점을 해결할 수 있을 것으로 예상됨 (그림 23-26). 아울러 본 백신의 경우 대장균 발현 단백질로서 대량생산이 가능하며, 백신으로 제조 될 경우 1두당 2000원 미만의 비용으로 생산이 가능할 것으로 예상 됨

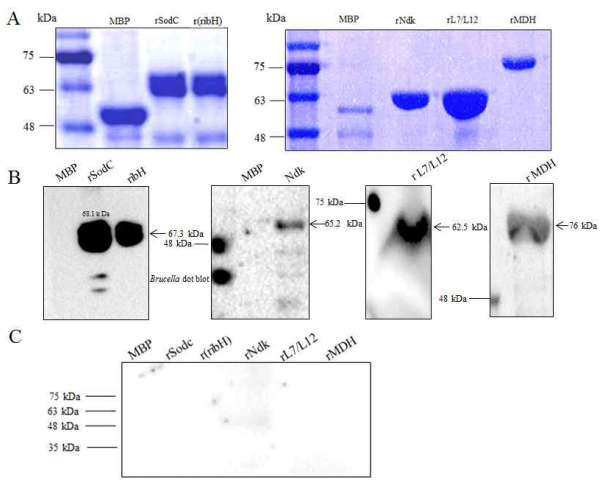


그림 23. SodC, ribH, Ndk, L7/L12, MDH 단백을 정제 후 vaccination한 마우스의 면역반응 평가

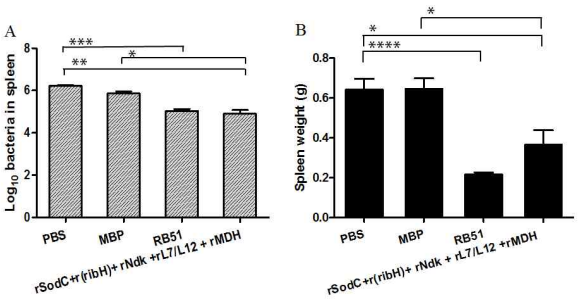


그림 24. SodC, ribH, Ndk, L7/L12, MDH 단백을 정제 후 vaccination한 마우스의 방어효능평가 (RB51과 대조)

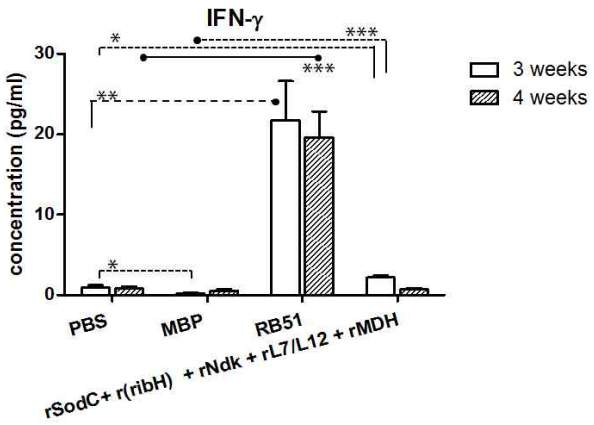


그림 25. SodC, ribH, Ndk, L7/L12, MDH단백을 정제 후 vaccination한 마우스의 도전감염에서의 방어효과 (마우스 혈중 사이토카인, IFN-γ 분석)

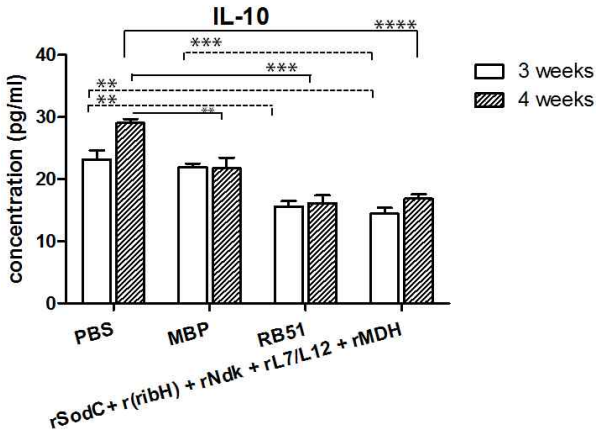


그림 26. SodC, ribH, Ndk, L7/L12, MDH 단백을 정제 후 vaccination한 마우스의 도전감염에서의 방어효과 (마우스 혈중 사이토카인, IL-10 분석)

□ 기생성 세균 제어 치료용 소재로서의 효능 검증

1) 기생성 세균(브루셀라) 치료 소재의 안전성/안정성 검사, 편리성 평가: 세포내 전달물질인 HPA3P를 이용하여 브루셀라 감염증에 대한 치료 효과를 조사해 본 결과, 통상적으로 브루셀라 감염증 치료에 사용되는 겐타마이신과 유사한 치료효과를 확인 하였으며, 마우스에서 안전성을 입증 함 (그림 27-33)

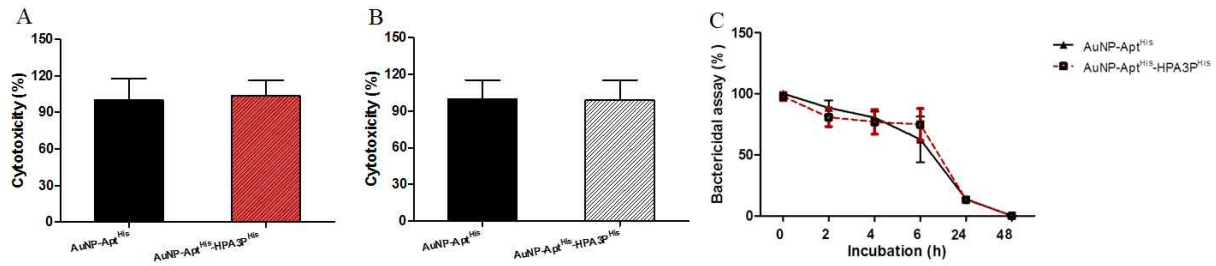


그림 27. 대식세포에 HPA3P 처치 후 세포독성에 미치는 영향 및 안정성/안전성에 미치는 영향을 분석한 결과, 세포독성 및 안전성에 영향이 없는 것을 확인 함

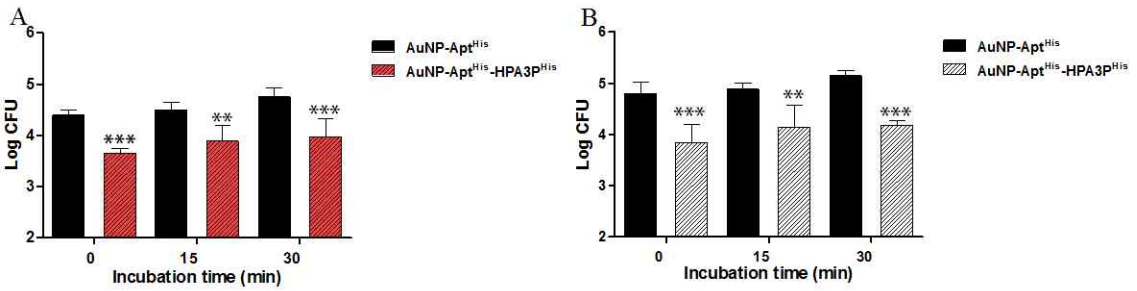


그림 28. 대식세포에 HPA3P 처치 후 브루셀라 균 침입 및 세포내 증식기전 억제 효과 규명

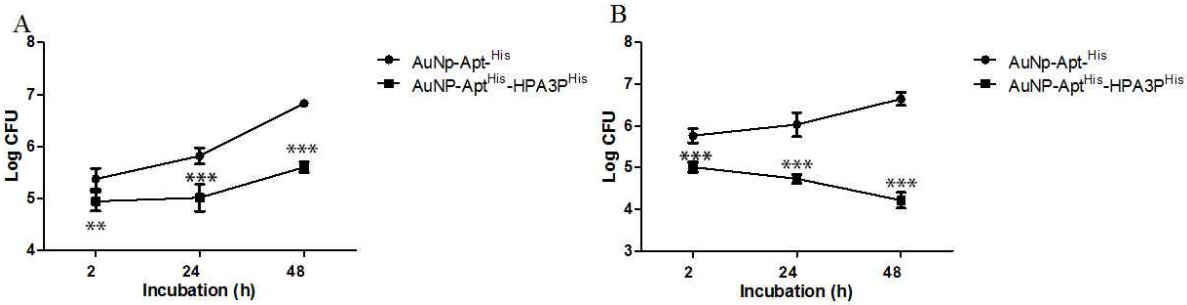


그림 29. 대식세포에 HPA3P 처치 후 브루셀라 균 침입 및 세포내 증식기전 억제 효과 규명

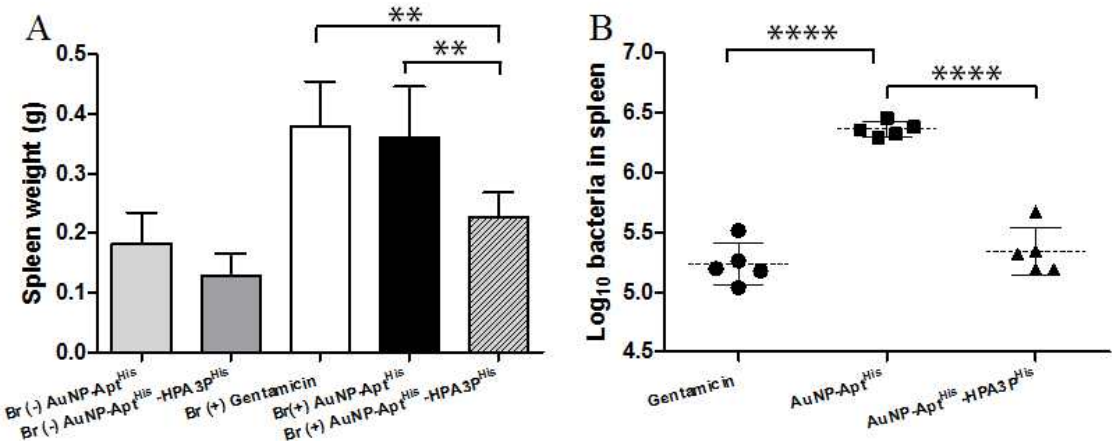


그림 30. 브루셀라 감염 마우스에 HPA3P 처치 후 치료효과 분석

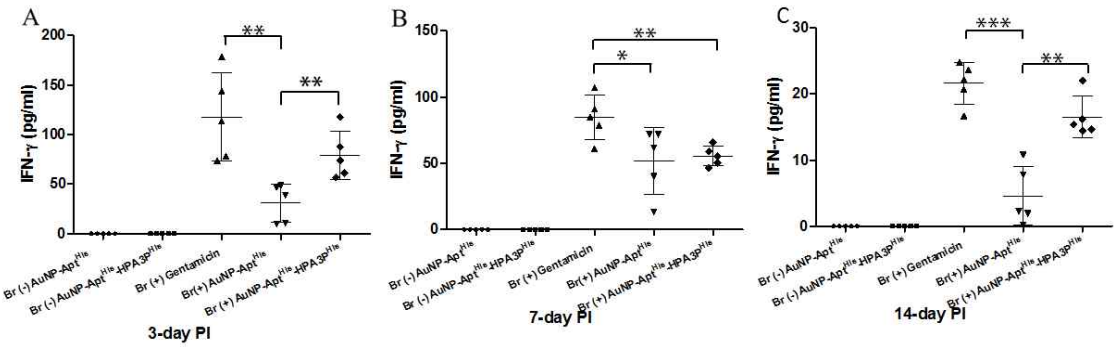


그림 31. 브루셀라 감염 마우스에 HPA3P 처치 후 면역반응 및 치료효과 분석

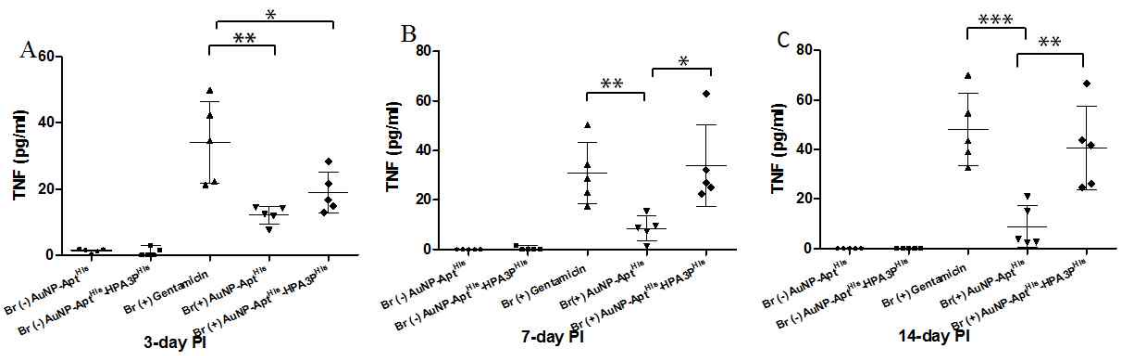


그림 32. 브루셀라 감염 마우스에 HPA3P 처치 후 면역반응 및 치료효과 분석

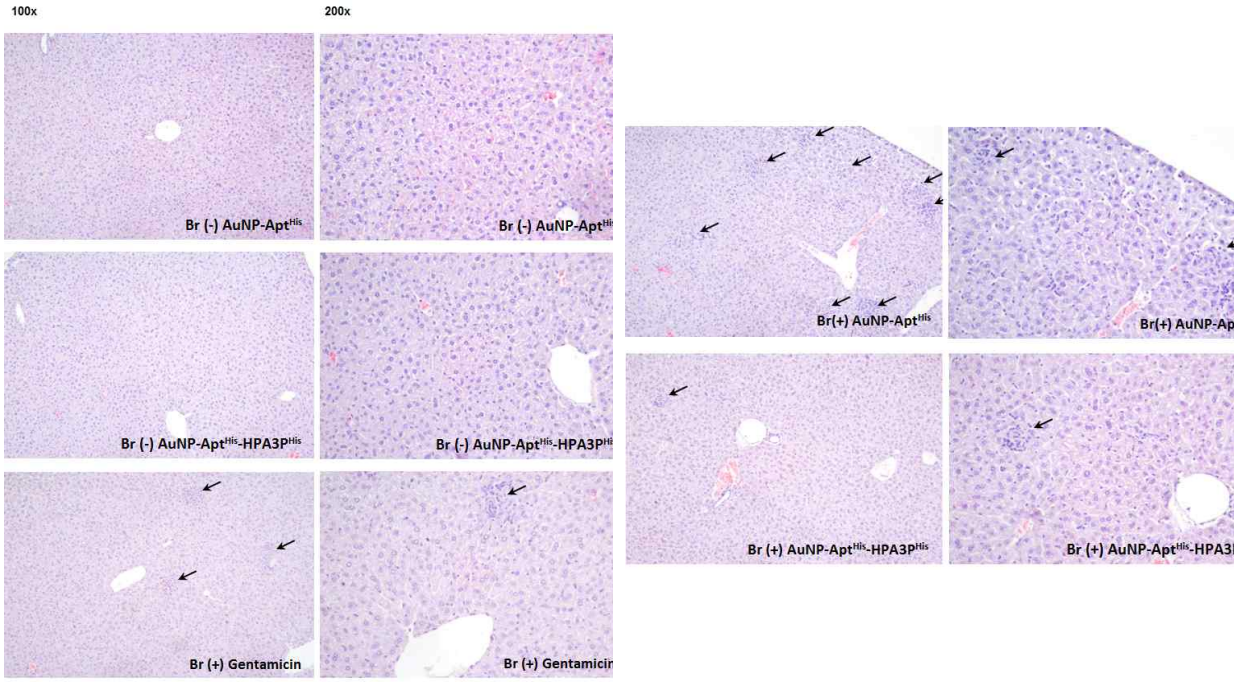


그림 33. 마우스 대상 HPA3P의 안전성과 브루셀라 감염 마우스 모델에서 HPA3P의 치료효과를 일반 항생제 (겐타마이신)과 비교하였을 때, 우수한 치료효과가 있는 것으로 확인되었음. 일반 항생제와 비교하여 소요 비용이 증대 되지만 (약 30만원/치료건수), 항생제 오남용 및 항생제 내성균 출현과 같은 문제점을 고려하면 충분히 치료제로서의 가치가 인정 될 것으로 예상 됨

2) 기생성 세균(살모넬라) 치료 소재의 안전성/안정성 검사, 편리성 평가: 세포내 전달물질인 HPA3P를 이용하여 살모넬라 감염증에 대한 치료 효과를 조사해 본 결과, 살모넬라 균에 직접적인 살균효과가 있는 것으로 확인 함 (그림 34-37)

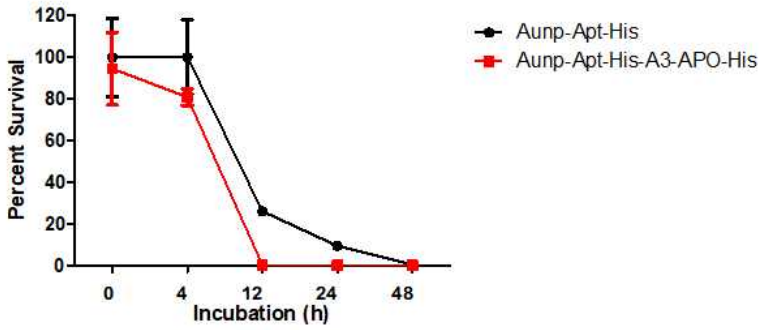


그림 34. HPA3P의 살모넬라 균에 대한 직접적인 살균효과 규명

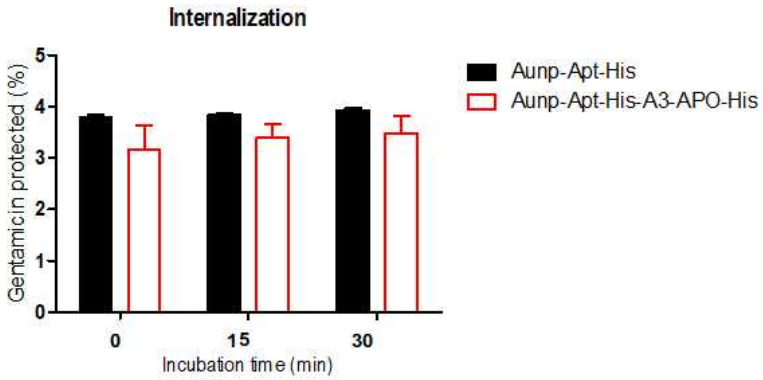


그림 35. 살모넬라 균의 대식세포내 침입 시에 HPA3P의 영향 분석

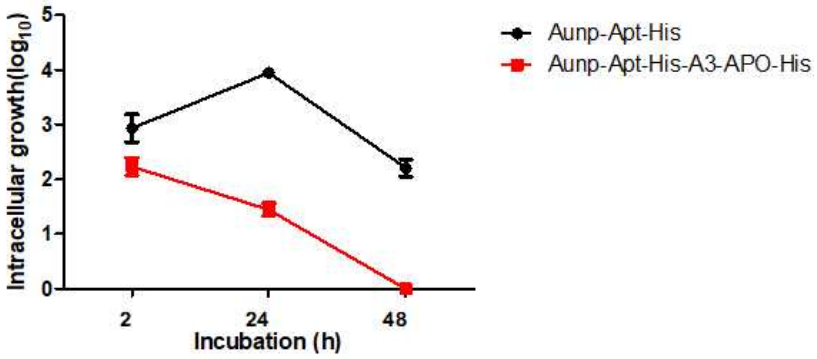


그림 36. 살모넬라 균의 대식세포내 증식에 있어 HPA3P의 영향 분석

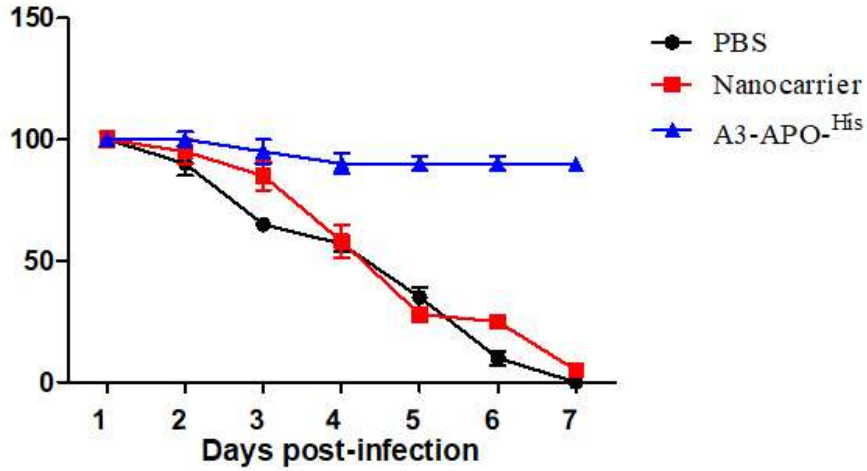


그림 37. 살모넬라 감염 마우스 모델에서의 HPA3P의 치료효과 규명

2-3. 연구개발 성과

가. 논문게재

1) 제 1세부과제 논문 성과

1. Immunogenicity and protective effect of recombinant *Brucella abortus* Ndk (rNdk) against a virulent strain of *Brucella abortus* 544 in BALB/c mice. FEMS Microbiol. lett. HT Hop, HL Simborio, AWB Reyes, LT Arayan, W Min, HJ Lee, DH Kim, HH Chang, S Kim (2015), 362, 1091-1097
2. Immune modulation of recombinant OmpA against *Brucella abortus* 544 infection in mice. Journal of microbiology and biotechnology.HLT Simborio, AWB Reyes, HT Hop, LT Arayan, W Min, HJ Lee, JJ Lee, HH Chang, S Kim (2016), 26, 603-606
3. Dextran sulfate sodium upregulates MAPK signaling for the uptake and subsequent intracellular survival of *Brucella abortus* in murine macrophages.Microbial pathogenesis, AWB Reyes, HLT Simborio, HT Hop, LT Arayan, W Min, HJ Lee, DH Kim, HH Chang, S Kim. (2016), 90, 68-73
4. Methyl gallate limits infection in mice challenged with *Brucella abortus* while enhancing the inflammatory response.Journal of applied microbiology, AWB Reyes, DG, Kim, HLT Simborio, HT Hop, LT Arayan, W Min, JJ Lee, HH Chang, S Kim. (2016), 120, 552-559.
5. Molecular cloning, purification and immunogenicity of recombinant *Brucella abortus* 544 malate dehydrogenase protein, Journal of Veterinary Science, AWB Reyes, HLT Simborio, HT Hop, LT Arayan, S Kim. (2016), 17, 119-122.
6. An evaluation of ELISA using recombinant *Brucella abortus* bacterioferritin (Bfr) for bovine brucellosis, CIMID, HT Hop, LT Arayan, AWB Reyes, HLT Simborio, W Min, JJ Lee, HH Chang, S Kim. (2016), 45, 16-19.
7. Influence of platelet-activating factor receptor (PAFR) on *Brucella abortus* infection: implications for manipulating the phagocytic strategy of B. abortus.BMC Microbiology, Lee JJ, Simborio HL, Reyes AW, Hop HT, Arayan LT, Lee HJ, Min W, Her M, Rhee MH, Watarai M, Chang HH, Kim S. (2016), 21, 217-225.
8. The in vitro and in vivo protective effects of tannin derivatives against *Salmonella enterica serovar* Typhimurium infection. Microbial pathogenesis, Reyes AWB, Hong TG, Hop HT, Arayan LT, Huy TXN, Min W, Lee HJ, Lee KS, Kim S. (2017), 109, 86-93.
9. Intracellular Trafficking Modulation by Ginsenoside Rg3 Inhibits *Brucella abortus* Uptake and Intracellular Survival within RAW 264.7 Cells, Journal of Microbiology and Biotechnology, Huy TX, Reyes AW, Hop HT, Arayan LT, Min W, Lee HJ, Rhee MH, Chang HH, Kim S (2017), 27, 616-623.
10. Inhibitory Effect of the Ethanol Extract of a Rice Bran MixtureComprising Angelica gigas, Cnidium officinale, Artemisia princeps, and Camellia sinensis on *Brucella abortus*

Uptake by Professional and Nonprofessional Phagocytes, Journal of Microbiology and Biotechnology, Huy TX, Reyes AW, Hop HT, Arayan LT, Min W, Lee HJ, Rhee MH, Chang HH, Kim S (2017), 27, 1885-1891.

11. Lipocalin 2 (Lcn2) interferes with iron uptake by *Brucella abortus* and dampens immunoregulation during infection of RAW 264.7 macrophages, Cellular Microbiology, Huynh Tan Hop, Lauren Togonon Arayan, Tran Xuan Ngoc Huy,Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes, Eun Jin Baek, Wongi Min, Hu Jang Lee, Man Hee Rhee, Kenta Watanabe, Hong Hee Chang, Suk Kim (2017), e12813 .
12. The immunomodulatory effect of antimicrobial peptide HPA3P restricts Brucella abortus 544 infection in BAMB/c mice, Veterinary Microbiology, Lauren Togonon Arayan, Tran Xuan Ngoc Huy,Alisha Wehdnesday Bernardo Reyes, Wongi Min, Hu Jang Lee, Man Hee Rhee, Kenta Watanabe, Hong Hee Chang, Suk Kim (2018), 225, 17-24.

2) 제 1협동과제 논문 성과

1. Gold nanoparticle - DNA aptamer composites as a universal carrier for in vivo delivery of biologically functional proteins. *Journal of Controlled Release*. S.M. Ryou, J.H. Yeom, H.J. Kang, M. Won, J.S. Kim, B. Lee, M.J. Seong, N.C. Ha, J. Bae, K. Lee (2014) 196, 287-294, SCI (IF=7.877, Pharmacology & Pharmacy 분야 상위 3.44%)
2. MdsABC-Mediated Pathway for Pathogenicity in *Salmonella enterica Serovar* Typhimurium. *Infection and immunity*. S. Song, B. Lee, J.H. Yeom, S. Hwang, I. Kang, J.C. Cho, N.C. Ha, J Bae, K Lee, Y.H. Kim (2015) 83(11), 4266-4276, SCI (IF=3.256)
3. Gold nanoparticle-DNA aptamer conjugate-assisted delivery of antimicrobial peptide effectively eliminates intracellular *Salmonella enterica serovar* Typhimurium. *Biomaterials*. J.H. Yeom, B Lee, D Kim, J. K. Lee, S Kim, J Bae, Y Park, K Lee (2016) 104, 43-51, SCI (IF= 8.806, Engineering, Biomedical 분야 상위 1.28%)
4. Intracellular delivery of recombinant proteins via gold nanoparticle - DNA aptamer composites is independent of the protein physicochemical properties and cell type. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry.* J.H. Yeom, M. Joo, B. Lee, K. P. Kim, N. C. Ha, Y. Park, J Bae, K Lee (2017) 45, 5-10, SCIE (IF= 4.841, Engineering, Chemical 분야 상위 10.21%)
5. Implications of *Streptomyces coelicolor* RraAS1 as an activator of ribonuclease activity of Escherichia coli RNase E. *Korean Journal of Microbiology.* J. Heo, S. Seo, B. Lee, J. H. Yeom, K. Lee. (2016) 52(3) 243-248, 국내 비SCI논문.
6. Bdm-Mediated Regulation of Flagellar Biogenesis in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica Serovar* Typhimurium. *Curr Microbiol.* J. Lee, D.J. Kim, J.H. Yeom, K. Lee.

(2017) 74, 1015-1020, SCI (IF=1.373)

7. Antimicrobial peptide-loaded gold nanoparticle-DNA aptamer conjugates as highly effective antibacterial therapeutics against *Vibrio vulnificus*. *Scientific Reports*. B. Lee, J. Park, M. Ryu, S. Kim, M. Joo, J.H. Yeom, S. Kim, Y. Park, K. Lee, J. Bae. (2017) 7, 13572, SCI (IF=4.122, Multidisciplinary science분야 상위 18.75%)

나. 특허 성과

1) 제 1세부과제 특허 성과

1. 대한민국 특허 출원: 브루셀라 어보투스 유래의 재조합 Ohr 단백질을 유효성분으로 포함하는 브루셀라 감염증 진단용 조성물 및 이의 용도. 김석. 출원일 2018. 07.04. 출원번호:10-2018-0077398

2) 제 1협동과제 특허 성과

1. 유럽 특허 출원: Protein transduction domain based ongold nanoparticle aptamer conjugate and method producing same, 이강석 배지현 한민수 하남출 성맹제 염지현 유상미, 출원일 2015. 09. 07. 출원번호 13875242.3
2. 대한민국 특허 등록: 금나노 입자 앱타머를 기반으로 하는 단백질 전달체 및 이의 제조 방법. 이강석 배지현 한민수 하남출 성맹제 염지현 유상미, 등록일 2016. 02. 16. 등록번호 110-1596552
3. 대한민국 특허 출원: 항균용 나노 구조체 및 이의 용도. 이강석 염지현 이보은 배지현 장진양 박윤경. 출원일 2016.12.05. 출원번호 10-2016-0164246

다. 기술이전

1) 제 1세부과제 기술이전 성과

1. 브루셀라 균 특이 재조합 단백질을 이용한 브루셀라 감염증 진단기술. 정액 기술료 5,000,000원 (2018.08.)

2) 제 1협동과제 기술이전 성과

1. 금나노입자-앱타머 결합체를 기반으로 하는 단백질 전달체 및 이의 제조 방법 (특허 제 10-1596552) 및 기술지도. 정액 기술료 20,000,000원 (2017.11.01.)

라. 연구개발 성과

1) 기술적 성과

1. 브루셀라균의 발병기전 해석을 위한 균측, 숙주측 발현 유전자에 대한 분석을 수행하였으며, 현재까지 밝혀지지 않았던 다수의 발현, 억제 유전자가 확인 되어 이를 이용한 브루셀라 발병기전 해석의 토대가 구축되었음.
2. 오믹스 분석을 통해 브루셀라감염증에 대응하는 숙주의 제어기전 규명이 가능하였으며, 특히, 목적동물의 면역반응과 대응 유전자 분석을 통해 신개념 치료법 및 제어기술이 확립 되었음
3. 현재까지 브루셀라 감염증에 대한 치료모델이 확립되어 있지 않았으나, 본 과제 수행을 통해 숙주 세포내까지 전달할 수 있는 전달 시스템을 이용하여, 브루셀라 균을 제어할수 있는 항균물질을 함께 전달 할 수 있는 시스템을 개발하였으며, 세포내 균제어 및 실험동물 내에 균제어 기술이 확보되어 브루셀라균을 제어할 수 있는 치료법이 개발 되었음
4. 브루셀라균은 현재까지 다양한 진단방법이 활용되고 있으나, 다른 균과의 교차오염 및 진단상의 오류가 많이 발생하여 현장에서 큰 어려움을 겪고 있는 질병 중 하나로 인식되었으나, 본 과제를 통해 면역교차반응이 없는 고면역원성 항원이 확립되었으며, 이를 이용한 예방백신 개발 및 혈청학적 진단기법의 개발이 가능할 것으로 판단 됨
5. 살모넬라균 제어를 위한 동물 세포의 생체 내 전달 시스템의 개발을 통해서 기존에 전달이 어려웠던 항 미생물 재제의 생체 내 전달을 가능하게 하는 기술적 발전이 있었음. 이를 응용하여 나노 분자를 생물의약분야에 사용을 위한 새로운 기회를 열어줄 수 있다. 특히 다양한 감염성 세균을 치료하는 표적 분자에 접합할 수 있는 나노 전달체에 관한 연구는 금 나노 입자가 세포 감염 치료에서 광범위하게 적용될 수 있는 가능성을 보여주고 있음.
6. 살모넬라균의 유전체 분석 및 발병기전 규명을 통해 살모넬라균의 병원성 유전자를 탐색하였고, 이를 통해 살모넬라가 감염 시 병원성에 미치는 영향 분석할 수 있었다. 이를 이용하여 감염성 세균 치료의 타겟 분자로 이용할 수 있음.

2) 경제적 성과

1. 브루셀라 균 감염증에 대한 비특이 반응을 최소화 한 고면역원성 항원 기반 혈청학적 진단기법이 개발 되어 브루셀라균의 위양성, 위음성과 같은 문제점을 해결할 수 있는 진단법 개발의 상용화를 준비할 수 있게 되어 이를 이용한 경제적 이익 창출이 가능할 것으로 사료됨
2. 브루셀라 감염증에 의한 경제적 손실이 감염축 보상비용, 방역비용, 축산물에 대한 인식저하, 공중보건학적인 문제야기 등에 비추어 매년 수십억에서 수백억에 이르는 만큼, 본 질병의 근본적인 해결을 위해 발병기전 해석 및 숙주의 제어기전 기반 구축을 통한 질병 근절을 위한 토대가 구축되어 경제적 손실을 최소화 하기 위한 기본 토대가 구축 된 것으로 평가됨.
3. 살모넬라균 제어를 위한 동물 세포의 생체 내 전달 시스템의 개발을 통해서 원천 기술을 개발 하였고, 이 기술의 이전을 통해 20,000,000원의 경제적 성과를 얻을 수 있었음.
4. 국내 및 국제적 약물 치료 전달체 시장 규모는 매년 비약적으로 성장할 것으로 예상된다. 또한 향후 의약품 시장에서 바이오의약품이 차지하는 비중은 궁극적으로는 화학의약품 규모

를 추월할 것으로 예상됨. 본연구의 성공적인 수행으로 개발되는 원천기술은 세계 약물 치료 전달체 시장을 선점할 수 있는 기술로 많은 경제적 가치를 가지고 있을 것으로 판됨.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

○ 국내 산업동물에서 막대한 경제적 손실을 유발하는 주요 세포내 기생성 세균(브루셀라 균, 살모넬라 균)의 유전체 분석을 이용하여 핵심 병원성 인자를 규명하고, 이들 병원균의 병원성 인자와 숙주세포와의 상호작용에 기초한 발병기전 및 숙주 내재성 제어기전 해석을 통해 산업동물의 피해를 최소화하며, 예방 및 치료가 어려운 난치성 세균성 질병을 근절하기 위한 토대 구축.

3-2. 목표 달성여부

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	가중치 (%)	달성도 (%)
1차 년도 (2014)	브루셀라균의 발병관련 인자의 유전체 분석 (제1세부)	브루셀라균의 대식구 감염 후 발현되는 유전체 분석	- RNA-seq을 이용한 탐식세포 감염시 발현되는 브르셀라균의 병원성 유전자 발현양상 및 면역반응 유전자 발현변화 규명	20	100
			-발현된 브루셀라 병원성 인자의 특성 규명	20	100
		브루셀라 감염 대식구의 유전체 분석	-RNA-seq을 이용한 브루셀라 감염 대식세포의 유전자 발현양상 및 면역반응 유전자 발현변화 규명	30	100
		브루셀라 감염 마우스(실험동물)의 유전체 분석(2년차 계속 수행)	-RNA-seq을 이용한 브루셀라 감염 마우스의 실질장기 내 유전자 발현양상 및 면역반응 유전자 발현변화 규명 (2년차 계속 수행)	30	100
	살모넬라균의 오믹스 분석 및 발병기전 규명 (제1협동)	살모넬라균의 유전체 분석	- RNA-seq을 이용한 탐식세포 감염시 발현되는 살모넬라균의 병원성 유전자 발현양상 및 면역반응 유전자 발현변화 규명	30	100
		살모넬라균의 발병관련인자 분석	- 살모넬라균 특이적 분비시스템(예, MdsABC 펌프)에 의한 발병기전 규명	30	100
			- RNA 안정성 조절인자에 의한 발병기전 규명	40	100
	기생성 세균의 유전체 분석 표준화 발병인자의 표적화 (제2협동)	기생성 세균의 오믹스 데이터 분석 및 표준화	세부 및 협동연구기관에서 생산한 다양한 오믹스 데이터의 분석 및 표준화	50	100
			브루셀라균과 살모넬라균의 오믹스 데이터 비교분석	50	100

2차 년도 (2015)	브루셀라균의 오믹스 분석 및 발병기전 규명 (제1세부)	브루셀라균의 세포 및 동물(마우스)감염 시 나타나는 오믹스 분석	- 탐식세포 감염시 발현되는 브루셀라균의 유전체(genome), 전사체(transcriptome), 단백체(proteome), 대사체(metabolome) 규명	30	100
			- 동물 감염시 발현되는 브루셀라균의 유전체(genome), 전사체(transcriptome), 단백체(proteome), 대사체(metabolome) 규명	30	100
		발병인자들의 경제동물 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증(제 2협동과제 공동)	- 진단용 마커로서의 유용성 검사 - 예방용 표적분자로서의 유용성 검사	40	100
	살모넬라균의 오믹스 분석 및 발병기전 규명 (제1협동)	살모넬라균의 숙주환경에서의 유전체 비교 분석	- 살모넬라균의 세포 및 동물 (마우스) 감염 시 나타나는 다양한 오믹스 분석 및 병원성 관련인자 탐색	30	100
		살모넬라균의 숙주환경에서의 병원성 관련인자 분석	- 병원성 관련인자들의 특성 및 생리적 기능 분석	30	100
			- 발병인자들의 경제동물 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증	40	100
	기생성 세균의 발병인자의 표적화 탐색 (제2협동)	발병인자들의 경제동물 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증(제1세부, 제1협동과제 공동)	진단용 마커 및 예방용 표적분자로서의 유용성 검사	100	100
3차 년도 (2016)	브루셀라균의 오믹스 분석 및 발병기전 규명 (제1세부)	-브루셀라균의 세포 및 동물(마우스)감염 시 나타나는 오믹스 분석	- RNA-seq - 면역 blotting - 미생물학적 특성분석 - 생화학적/생물학적 특성분석 - Microarray	50	100
		-발병인자들의 경제동물 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증(제 2협동과제 공동)	- 유전자 클로닝 - 유전자 발현 - 재조합단백 정제 - 정제 단백 특성 분석 - 정제 단백 진단/예방용 항원으로서의 가치평가	50	100
	살모넬라균의 오믹스 분석 및 발병기전 규명 (제1협동)	살모넬라균의 세포 및 목적동물(돼지)감염 시 발현되는 인자를 이용한 진단용 바이오 마커 발굴	- 탐식세포 및 동물 감염시 발현되는 병원성 유전자의 진단적 가치 평가/Blast 분석 수행	10	100
			- 감염 시 발현되는 인자 유도 탐식세포 및 동물의 cytokine 분비 측정	20	100

			- 감염 시 발현되는 인자 활성 및 억제를 통한 탐식세포 내 균의 침입 및 증식능력 평가	20	100
		고면역원성 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재 원천기술 개발	- 시험관내 단백질 합성시스템을 이용한 항원성 최적화	10	100
			- 주사용/경구용 백신 개발을 위한 단백질 항원 발현 재조합 균주 제작	20	100
		고면역원성 경제동물 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재의 예방/치료용 소재로서의 효능 검증 (제2협동과제 공동)	- 단백질 백신 소재의 안전성/안정성 검사, 편리성평가	20	100
	기생성 세균의 발병인자의 표적화 탐색 (제2협동)	발병인자들과 상호작용하는 숙주세포 인자들의 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증(제1협동과제 공동)	- 진단용 마커 및 예방용 표적분자로서의 유용성 검사	100	100
4차 년도 (2017)	브루셀라균의 발병관련 인자의 유전체 분석 (제1세부)	브루셀라균의 세포 및 목적동물 (소) 감염 시 발현 및 억제되는 인자와 질병간의 상관관계 및 숙주 제어기전 규명	- 유전체 및 transcriptome data의 심화 분석	10	100
			- 감염 시 발현되는 인자 유도 탐식세포 및 동물의 cytokine 분비 측정	10	100
			- 감염 시 발현되는 인자 활성 및 억제를 통한 탐식세포 내 균의 침입 및 증식능력 평가	10	100
			- 감염 시 발현되는 인자 활성 및 억제를 통한 감염동물 내 균의 침입 및 증식능력 평가	10	100
		고면역원성 경제동물 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재의 예방/치료용 소재로서의 효능 검증 (제2협동과제 공동)	- 진단마커(single 및 multiple 유전자) 검출	20	100
			- 단백질 백신 소재의 안전성/안정성 검사, 편리성평가	20	100
			- 사업화, 특허 및 기술이전 수행	20	100
	살모넬라균의 오믹스 분석 및 발병기전 규명 (제1협동)	살모넬라균의 세포 및 목적동물 (돼지) 감염 시 발현되는 인자와 질병간의 상관관계 및 숙주 제어기전 규명	- 감염 시 발현되는 인자 유도 탐식세포 및 동물의 cytokine 분비 측정	10	60
			- 감염 시 발현되는 인자 활성 및 억제를 통한 탐식세포 내 균의 침입 및 증식능력 평가	20	60
			- 감염 시 발현되는 인자 활성 및 억제를 통한 감염동물 내 균의 침입 및 증식능력 평가	20	60
		고면역원성 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재 원천기술 개발	- 시험관내 단백질 합성시스템을 이용한 항원성 최적화	10	100
			- 주사용/경구용 백신 개발을 위한 단백질 항원 발현 재조합 균주 제작	20	100
		고면역원성 경제동물 기생성 세균 제어 단백질 백신	- 단백질 백신 소재의 안전성/안정성 검사, 편리성평	20	100

		소재의 예방/치료용 소재로서의 효능 검증 (제2협동과제 공동)	가		
	기생성 세균의 발병인자의 표적화 탐색 (제2협동)	고면역원성 경제동물 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재의 예방/치료용 소재로서의 효능 검증(제1협동과제 공동) 및 사업화	- 단백질 백신 소재의 안전성/안정성 검사, 편리성 평가	25	100
			- 기존 백신과의 효능 평가	25	100
			- 단백질 소재의 예방/ 치료용 제제의 경제성 평가	25	100
			- 단백질 소재의 예방/ 치료용 사업화	25	100

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

가. 목표 미달성 내용 및 원인

- 제 1세부, 제 1협동 및 제2협동과제가 4년차에 공동으로 수행하고자 하였던 살모넬라균의 목적동물 (돼지) 감염 및 치료효능 평가의 목표치에 도달하지 못 하였음 (목표대비 60%). 그 이유는 연구개시 3차년도 연구비가 1차년도에 책정되었던 연구비에 비해 약 10% (20,000천원) 삭감되어 목적동물 실험 연구비 책정을 할 수 없었음. 따라서, 돼지 유래 세포를 이용한 실험으로 대체 하였으며, 돼지 감염실험이 불가하여 목표 달성이 이루어지지 않음. 살모넬라 감염증의 치료모델은 본 실험에서 실험동물 (마우스)에서 효과가 입증되었기 때문에, 후속연구가 진행 된다면, 목적동물인 돼지에서의 평가가 추후에 검증 된다면 본 과제의 완성도가 높아질 것으로 예상 됨

4. 연구결과의 활용 계획 등

4.1. 세포내 기생균 진단기법 활용

- 브루셀라 및 살모넬라균은 대표적인 인수공통전염병의 하나이며, 명확한 진단법의 구축이야말로 본 질병으로부터의 피해를 최소화 하는데 핵심적인 사안임. 특히, 브루셀라균은 세포내 기생성 균이면서 치료가 어렵고, 다른 일반적인 균과의 교차반응 문제점으로 인하여 명확한 진단을 확립하기가 매우 어려운 질병으로 알려짐. 본 과제를 통하여, 브루셀라 감염혈청과 교차반응을 유발하는 항원을 배제한 고민감도 진단기법이 확립되어, 기존에 문제를 일으켰던 의양성, 의음성과 같은 현장에서의 어려움을 개선 할 것으로 평가됨.
- 본 과제를 통해 얻어진 브루셀라 진단기법에 대하여 다양한 혈청형에 대한 보완 실험을 통해 상용화를 위한 토대를 구축할 예정임

4.2. 세포내 기생균 예방기법 활용

- 브루셀라 균의 경우 현재까지 인체에 사용될 수 있을 만큼의 안정성이 확보된 백신이 개발되어 있지 않음. 특히, 동물에서 일반적으로 사용되는 백신주는 생균이며, 이들 생균백신은 임신동물에서의 유산과 인체 감염을 유발하여 안전성에 문제가 있는 것으로 보고되고 있어서 백신의 사용에 상당한 어려움을 가지고 있음. 본 과제를 통하여 이러한 생균백신의 문제

점을 개선 할 수 있는 재조합 단백을 이용한 섭유닛 백신이 개발 되었으며 본 백신의 안전성과 효능을 증대 시킬 아쥬반트 등의 개발을 통해 기존에 사용되던 백신의 문제점을 개선할 신개념 브루셀라 백신 개발이 가능할 것으로 사료됨

4.3. 세포내 기생균 치료기술 활용

- 금 나노 입자는 자체가 갖고 있는 고유 한 특성 및 저독성으로 인해 생체 조직으로 전달을 위해 수많은 생체 분자와의 입자의 접합에 사용되고 있음. 금 나노 입자는 레이저에 의한 광 박리, 진단 이미징, 방사선 치료, 백신 개발, 산화 방지제 및 다기능 약물 전달체로서 사용을 포함한 다양한 응용 분야에 사용되고 있어서, 이를 이용하여 다양 한 약물을 금 나노 입자와 결합 시켜 질병의 치료 및 진단을 진보시키는 것을 목표로 하는 연구가 활발하게 진행 되고 있음.

붙임. 참고문헌

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

<table>
<tr><td>과 제 명</td><td colspan="5">(국문) 세포내 기생 난치성 산업동물 주요 병원균의 핵심 병원성 유전체 분석과 이를 이용한 제어기술 개발
(영문)Development of control method for major intracellular parasitic bacterial pathogens in domestic animal using essential virulence factors with genomic analysis</td></tr>
<tr><td>주관연구기관</td><td colspan="2">경상대학교 산학협력단</td><td>주 관 연 구
책 임 자</td><td colspan="2">(소속)경상대학교</td></tr>
<tr><td>참 여 기 업</td><td colspan="2">(주)인트론바이오테크놀로지</td><td colspan="2">(성명)김석</td></tr>
<tr><td rowspan="4">총연구개발비
(
1,040,000천
원)</td><td>계</td><td>1,040,000</td><td>총 연 구 기 간</td><td colspan="2">2014. 8. 23 - 2018. 8. 22 (48개월)</td></tr>
<tr><td>정부출연
연구개발비</td><td>760,000</td><td rowspan="3">총 참 여
연 구 원 수</td><td>총 인 원</td><td>11</td></tr>
<tr><td>기업부담금</td><td>280,000</td><td>내부인원</td><td>6</td></tr>
<tr><td>연구기관부담금</td><td></td><td>외부인원</td><td>5</td></tr>
</table>

○ 연구개발 목표 및 성과

◦ 국내 산업동물에서 막대한 경제적 손실을 유발하는 주요 세포내 기생성 세균(브루셀라 균, 살모넬라 균)의 유전체 분석을 이용하여 핵심 병원성 인자를 규명하고, 이들 병원균의 병원성 인자와 숙주세포와의 상호작용에 기초한 발병기전 및 숙주 내재성 제어기전 해석을 통해 산업동물의 피해를 최소화하며, 예방 및 치료가 어려운 난치성 세균성 질병을 근절하기 위한 토대 구축하고자 본 과제를 수행하였으며, 본 과제 수행을 통해 국제 전문 학술지 (SCI급) 18편, 전문학술지 (학진등재급) 1편의 논문을 투고하였고, 4건이상의 지적재산권(특허등록)과 2건의 기술이전을 수행하였음.

○ 연구내용 및 결과

◦ 산업동물 주요 세포 기생성 세균의(브루셀라, 살모넬라) 세포 및 동물 감염 시 발현되는 병원성 유전자 발현양상 규명
- 탐식세포 감염시 발현되는 브루셀라 및 살모넬라 균의 병원성 유전자 발현양상 규명
- 실험동물(마우스) 및 목적동물(소/돼지) 감염시 발현되는 브루셀라 및 살모넬라 균의 병원성 유전자 발현양상 규명

◦ 산업동물 주요 세포 기생성 세균의 세포 및 동물 감염 시 나타나는 전사체(transcriptome), 단백체(proteome), 대사체(metabolome) 등 기본적인 오믹스 및 생체분자 상호작용체(interactome)와 RNA 구조체(RNA structure seq) 분석
- 탐식세포 감염시 발현되는 브루셀라 및 살모넬라 균의 오믹스 분석
- 실험동물(마우스) 및 목적동물(소/돼지) 감염시 발현되는 브루셀라 및 살모넬라 균의 오믹스 분석

◦ 산업동물 주요 세포 기생성 세균의 세포 및 동물 감염 시 발현되는 인자를 이용한 진단용 바이오 마커 발굴
- 탐식세포 및 실험동물(마우스) 및 목적동물(소/돼지) 감염시 발현되는 병원성 유전자의 진단적 가치 평가

◦ 산업동물 주요 세포 기생성 세균의 세포 및 동물 감염 시 발현되는 인자와 질병간의 상관관계 및 숙주 제어기전 규명
- 감염 시 발현되는 인자 유도 탐식세포 및 실험동물(마우스) 및 목적동물(소/돼지)의 면역반응 규명
- 감염 시 발현되는 인자 활성 및 억제를 통한 탐식세포 및 실험동물(마우스) 및 목적동물(소/돼지)의 제어기전 규명

◦ 고면역원성 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재 개발
- 시험관내 단백질 합성시스템을 이용한 항원성 최적화

- 주사용/경구용 백신 개발을 위한 단백질 항원 발현 재조합 균주 제작

○ 연구성과 활용실적 및 계획

◦ 균-숙주 상호작용에 기초한 병원성 인자 발굴 및 발병기전 해석
◦ 산업동물 질병 저감에 의한 농가 소득 증대
◦ 숙주 내재성 제어기전을 이용한 난치성 세균성 질병 치료방법 개선 및 예방기법 구축
◦ 세포내 기생성 균의 숙주세포내 침입 및 증식 기전 해석
◦ 타 감염성 질병의 치료제 개발에 모델 시스템 제공
◦ 고면역원성 기생성 세균 유발 병원균 제어 단백질 백신 제품 개발
◦ 300억 달러 규모의 세계 백신시장에서의 경쟁력 확보

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

	과제번호				
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사 업 명	포스트게놈다부처유전체사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과 제 명	세포내 기생 난치성 산업동물 주요 병원균의 핵심 병원성 유전체 분석과 이를 이용한 제어기술 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	경상대학교			연구책임자	김석
연구기간 연 구 비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	12개월	200,000	70,000	270,000
	2차년도	12개월	200,000	70,000	270,000
	3차년도	12개월	180,000	70,000	250,000
	4차년도	12개월	180,000	70,000	250,000
	5차년도				
	계		760,000	280,000	1,040,000
참여기업	(주)인트론바이오테크놀로지				
상 대 국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2018. 08

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
경상대학교	교수	김 석

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	

Ⅰ. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

브루셀라 및 살모넬라균 제어를 위한 관련된 인자들의 분석을 위해 여러 유전학적 시스템을 개발하였고, RNA 가공 및 분해에 관련 인자들에 대한 탐색을 여러 다양한 방법으로 규명하였으며, 이를 통해 브루셀라 및 살모넬라균의 병원성 유전자를 탐색 하였고, 브루셀라 및 살모넬라 감염 시 병원성에 미치는 영향을 분석 할 수 있었음. 연구결과를 바탕으로 고등생물용 단백질 전달시스템을 개발하였으므로, 본 과제에 있어서의 연구개발의 질과 창의성은 우수한 것으로 자체평가 함.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

브루셀라균의 세포내 제어기술에 대한 연구가 미흡한 현실에서, 숙주 측 및 균 측 병원성 인자를 발굴하였으며, 균-숙주 상호작용에 기초한 제어기술이 확보 되었음. 또한, 살모넬라균 제어를 위한 동물 세포의 생체 내 전달 시스템의 개발을 통해서 기존에 전달이 어려웠던 항 미생물 재제의 생체 내 전달을 가능하게 하는 기술적 발전이 있었다. 이를 응용하여 나노 분자를 생물의약분야에 사용을 위한 새로운 기회가 마련됨. 특히 다양한 감염성 세균을 치료하는 표적 분자에 접합할 수 있는 나노 전달체에 관한 연구는 금 나노 입자가 세포 감염 치료에서 광범위하게 적용될 수 있는 가능성을 보여주고 있음.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구의 성공적인 수행으로 개발되는 원천기술은 브루셀라 고민감도 진단기술, 비교적 안전한 브루셀라 예방기술이 가능하며, 특히, 세포내 전달 기술을 이용한 신개념 치료법이 개발되어 세계 약물 치료 전달체 시장을 선점할 수 있는 기술로 많은 경제적 가치를 가지고 있을 것으로 판단됨.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

여러 국내외 학회의 참석을 통해 습득한 국내외 동향과 연구방법을 배우고 이미 확보된 다양한 분자생물학적 및 유전학적기법을 습득한 인력양성, 18편의 SCI급 논문 발표 등 관련된 연구를 매우 성실히 수행하였다고 자체평가 함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

지난 4년간의 연구결과를 Journal of Controlled Release, Biomaterials, Infection and immunity, Journal of Industrial and Engineering Chemistry, Current Microbiology, Scientific Reports, Cellular Microbiology 등과 같은 관련학문 분야의 최고 권위지에 교신저자로 18편의 논문을 발표하였으며, 결과를 활용해 고등생물용 단백질 전달시스템 등의 새로운 기술 등을 국내특허등록 1건, 국내특허출원 2건, 국제특허 출원 1건 및 기술이전실시 2건(25,000,000원)로 매우 만족할 만한 성과가 있었다고 자체평가 함.

Ⅱ. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)		비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
제 1세부: 브루셀라균의 오믹스 분석 및 발병기전 규명	브루셀라균의 대식구 감염 후 발현되는 유전체 분석	10	100	목표 수행 완료함
	브루셀라 감염 대식구의 유전체 분석	10	100	목표 수행 완료함
	브루셀라 감염 마우스(실험동물)의 유전체 분석	10	100	목표 수행 완료함
	브루셀라균의 세포 및 동물(마우스)감염 시 나타나는 오믹스 분석	10	100	목표 수행 완료함
	발병인자들의 경제동물 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증	10	100	목표 수행 완료함
	브루셀라균의 세포 및 동물(마우스)감염 시 나타나는 오믹스 분석	10	100	목표 수행 완료함
	발병인자들의 경제동물 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증	10	100	목표 수행 완료함
	브루셀라균의 세포 및 목적동물 (소) 감염 시 발현 및 억제되는 인자와 질병간의 상관관계 및 숙주 제어기전 규명	10	100	목표 수행 완료함
	고면역원성 경제동물 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재의 예방/치료용 소재로서의 효능 검증	20	100	목표 수행 완료함
합계		100	100	
제 1협동: 살모넬라균의 오믹스 분석 및 발병기전 규명	살모넬라균의 유전체 분석	10	100	목표 수행 완료함
	살모넬라균의 발병관련인자 분석	10	100	목표 수행 완료함
	살모넬라균의 숙주환경에서의 유전체 비교 분석	10	100	목표 수행 완료함

	살모넬라균의 숙주환경에서의 병원성 관련인자 분석	10	100	목표 수행 완료함
	살모넬라균의 세포 및 목적 동물(돼지)감염 시 발현되는 인자를 이용한 진단용 바이오 마커 발굴	10	100	목표 수행 완료함
	고면역원성 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재 원천기술 개발	10	100	목표 수행 완료함
	고면역원성 경제동물 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재의 예방/치료용 소재로서의 효능 검증 (제2협동과제 공동)	20	100	목표 수행 완료함
	살모넬라균의 세포 및 목적 동물 (돼지) 감염 시 발현되는 인자와 질병간의 상관관계 및 숙주 제어기전 규명	20	80	목표 수행 미완료
합계		100		
제 2협동: 기생성 세균의 오믹스 데이터 비교분석 및 진단/예방 원천기술 사업화 탐색	기생성 세균의 오믹스 데이터 분석 및 표준화	25	100	목표 수행 완료함
	발병인자들의 경제동물 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증(제1세부, 제1협동과제 공동)	25	100	목표 수행 완료함
	발병인자들과 상호작용하는 숙주세포 인자들의 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증(제1협동과제 공동)	25	100	목표 수행 완료함
	고면역원성 경제동물 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재의 예방/치료용 소재로서의 효능 검증(제1협동과제 공동) 및 사업화	25	100	목표 수행 완료함
합계		100		

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 과제를 통하여, 인수공통전염병의 원인체 이며, 산업동물에 심각한 경제적 손실을 야기하는 대표적인 세균성 병원체인 브루셀라균 및 살모넬라균의 유전체 분석을 수행하였으며, 이를 토대로 균 측, 숙주 측 인자를 규명하여 질병의 발병기전을 이해 할 수 있었음. 아울러 숙주 대응기전을 규명하여 균 감염에 대응하는 숙주의 방어기전 해석이 가능하였고, 세포내 전달 시스템을 이용한, 감염성 세균 치료의 타겟 분자로의 이용은 물론, 현재까지 접근이 용이하지 않았던 세포내 전달 시스템 활용 치료기법이 구축될 수 있었음. 본 연구진의 연구는 창의적으로 매우 성실하게 진행되었으며 이로 인한 연구결과는 학문적, 교육적 및 산업적으로 유용하다고 판단됨

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

연구를 진행한 4년 미만 동안에 생산한 본 연구진의 연구 성과는 매우 뛰어 나며, 그 동안의 연구결과를 바탕으로 향후 더욱 우수한 연구 성과와 기술개발이 이루어지리라 기대됨.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구의 성공적인 수행으로 개발되는 원천기술은 브루셀라 고민감도 진단기술, 비교적 안전한 브루셀라 예방기술이 가능하며, 특히, 세포내 전달 기술을 이용한 신개념 치료법이 개발되어 세계 약물 치료 전달체 시장을 선점할 수 있는 기술로 많은 경제적 가치를 가지고 있을 것으로 판단됨. 또한, 고등생물용 단백질 전달시스템의 개발에 대한 내용은 기술이전실시(20,000,000원)하였고, 현재 제품을 생산하여 판매중이며, 앞으로 추가적인 경제적 성과가 있을 것으로 기대됨.

Ⅳ. 보안성 검토

해당 없음.

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	■자유응모과제 □지정공모과제	분 야	
연 구 과 제 명	세포내 기생 난치성 산업동물 주요 병원균의 핵심 병원성 유전체 분석과 이를 이용한 제어기술 개발		
주관연구기관	경상대학교	주관연구책임자	김석
연 구 개 발 비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	760,000	280,000		1,040,000
연구개발기간	2014. 8. 23 - 2018. 8. 22 (48개월)			
주요활용유형	□산업체이전 □교육 및 지도 □정책자료 □기타( ) □미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표		당초연구목표 대비 연구결과
제 1세부: 브루셀라균의 오믹스 분석 및 발병기전 규명	① 브루셀라균의 대식구 감염 후 발현되는 유전체 분석	- RNA-seq을 이용한 탐식세포 감염시 발현되는 브루셀라균의 병원성 유전자 발현양상 및 면역반응 유전자 발현변화 규명
	② 브루셀라 감염 대식구의 유전체 분석	- RNA-seq을 이용한 탐식세포 감염시 발현되는 대식세포의 균체 대응 유전자 발현양상 및 면역반응 유전자 발현변화 규명
	③ 브루셀라 감염 마우스(실험동물)의 유전체 분석	- RNA-seq을 이용한 탐식세포 감염시 발현되는 마우스의 균체 대응 유전자 발현양상 및 면역반응 유전자 발현변화 규명
	④ 브루셀라균의 세포 및 동물(마우스)감염 시 나타나는 오믹스 분석	- RNA-seq 분석을 이용한 탐식세포 감염시 발현되는 마우스의 균체 대응 유전자 발현양상 및 면역반응 유전자 발현변화 규명
	⑤ 발병인자들의 경제동물 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증	- 진단/예방/치료적 가치 물질 발굴 및 특성분석 수행
	⑥ 브루셀라균의 세포 및 동물(마우스)감염 시 나타나는 오믹스 분석	- 대사체 분석을 이용한 탐식세포 감염시 발현되는 마우스의 균체 대응 유전자 발현양상 및 면역반응 유전자 발현변화 규명
	⑦ 발병인자들의 경제동물 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증	- 진단/예방/치료적 가치 물질 발굴 및 특성분석 수행
	⑧ 브루셀라균의 세포 및 목적동물 (소) 감염 시 발현 및 억제 되는 인자와 질병간의 상관관계 및 숙주 제어기전 규명	- 브루셀라 감염 소에 대한 숙주대응물질 발굴 및 균체 병원성 인자 발굴 및 특성규명
	⑨ 고면역원성 경제동물 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재의 예방/치료용 소재로서의 효능 검증	- 발굴물질의 예방/치료용 소재로서의 효능 평가
제 1협동: 살모넬라균의 오믹스	① 살모넬라균의 유전체 분석	- RNA-seq을 이용한 탐식세포 감염시 발현되는 살모넬라균의 병원성 유전자 발현양상 및 면역반응 유전자 발현변화 규명
	② 살모넬라균의 발병관련인자 분석	- 살모넬라균 특이적 분비시스템(예, MdsABC 펌프)에 의한 발병기전 규명

분석 및 발병기전 규명	③ 살모넬라균의 숙주환경에서의 유전체 비교 분석	- 살모넬라균의 세포 및 동물 (마우스) 감염 시 나타나는 다양한 오믹스 분석 및 병원성 관련인자 탐색
	④ 살모넬라균의 숙주환경에서의 병원성 관련인자 분석	- 병원성 관련인자들의 특성 및 생리적 기능 분석
	⑤ 살모넬라균의 세포 및 목적 동물(돼지) 감염 시 발현되는 인자를 이용한 진단용 바이오 마커 발굴	- 탐식세포 및 동물 감염시 발현되는 병원성 유전자의 진단적 가치 평가/Blast 분석 수행
	⑥ 고면역원성 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재 원천기술 개발	- 주사용/경구용 백신 개발을 위한 단백질 항원 발현 재조합 균주 제작
	⑦ 고면역원성 경제동물 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재의 예방/치료용 소재로서의 효능 검증 (제2협동과제 공동)	- 단백질 백신 소재의 안전성/안정성 검사, 편리성평가
	⑧ 살모넬라균의 세포 및 목적동물 (돼지) 감염 시 발현되는 인자와 질병간의 상관관계 및 숙주 제어기전 규명	- 감염 시 발현되는 인자 활성 및 억제를 통한 감염동물 내 균의 침입 및 증식능력 평가
제 2협동: 기생성 세균의 오믹스 데이터 비교 분석 및 진단/예방 원천기술 사업화 탐색	① 기생성 세균의 오믹스 데이터 분석 및 표준화	- 기생성 세균의 오믹스 데이터 분석 및 표준화
	② 발병인자들의 경제동물 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증(제1세부, 제1협동과제 공동)	- 진단/예방/치료 효과 공동 분석 수행
	③ 발병인자들과 상호작용하는 숙주세포 인자들의 진단/예방/치료용 표적분자로서의 타당성 검증(제1협동과제 공동)	- 발병인자들과 상호작용하는 숙주세포 인자들의 진단/예방/치료용 표적분자로서의 기능 검증 수행
	④ 고면역원성 경제동물 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재의 예방/치료용 소재로서의 효능 검증(제1협동과제 공동) 및 사업화	- 고면역원성 경제동물 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재의 예방/치료용 소재로서의 효능 평가 및 사업화 준비

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전자원 확보	사업화·실용화	표준 유전체 해독	메타지놈 분석	유전체 분석기술개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커개발	병원성 미생물 정보완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표			2				2	2		
연구기간 내 달성실적			2				3	1		
달성율(%)			100				150	50		

성과목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용 등)
												논문								
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI	논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치																				
최종목표	3	1										8	2		7		10			
연구기간내 달성실적	3	1		2	25							18	1	3.125	19	12	16			
달성율(%)	100	100										225	50		270		160			

4. 핵심기술

구분	핵 심 기 술 명
①	브루셀라 균 재조합을 이용한 브루셀라 혈청검사법 개발 기술
②	살모넬라균 제어를 위한 관련된 인자들의 분석을 위한 유전학적 시스템 개발
③	살모넬라균 병원성 관련인자들의 특성 및 생리적 기능 분석
④	고등생물용 단백질 전달시스템 개발

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술		√				√	√	√		
②의 기술	√									√
③의 기술	√									√
④의 기술	√					√	√			

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	브루셀라 혈청학적 진단기법 원천기술
②의 기술	다른 기생성 세균 제어를 위한 시스템 적용가능
③의 기술	고면역원성 기생성 세균 제어 단백질 백신 소재 원천기술
④의 기술	항 미생물 재제의 생체 내 전달을 가능하게 하는 원천기술

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전자원 확보	사업화·실용화	표준 유전체 해독	메타지놈 분석	유전체 분석기술개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커개발	병원성 미생물 정보완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표			2				2	2		
연구기간 내 달성실적			1				3	1		
연구종료 후 성과창출 계획			1					1		

성과목표	사업화지표										기술인증	연구기반지표								
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화						학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
												논문		논문평균IF	학술발표					
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI					정책활용	홍보전시	
단위	건	건	건	건	백만	건	백만	백만	명	백만	건	건	건		건		명			

					원		원	원		원										
가중치																				
최종목표	3	1										8	2							
연구기간내 달성실적	3	1		2	25							18	1	3.4	16	12	11			
연구종료후 성과창출 계획																				

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

1) 제 1세부과제

핵심기술명[1]	브루셀라 균 특이 재조합 단백질을 이용한 브루셀라 감염증 진단기술		
이전형태	□무상 ■유상	기술료 예정액	5,000천원
이전방식[2]	□소유권이전 □전용실시권 ■통상실시권 □협의결정 □기타( )		
이전소요기간	1년	실용화예상시기[3]	2019.12
기술이전시 선행조건[4]			

2) 제 1협동과제

핵심기술명[1]	금나노 입자-앱타머 결합체를 기반으로 하는 단백질 전달체 및 이의 제조방법		
이전형태	□무상 ■유상	기술료 예정액	20,000천원
이전방식[2]	□소유권이전 ■전용실시권 □통상실시권 □협의결정 □기타( )		
이전소요기간	2년	실용화예상시기[3]	2018.06
기술이전시 선행조건[4]			

1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)