

918020-4

소 요네병원인체, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*,
신규병원성인자 규명 및 조절기법이용 새로운 방제 기법 개발

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)

포스트게놈다부처유전체사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004039-01

소 요네병원인체, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*,
신규병원성인자 규명 및 조절기법이용
새로운 방제 기법 개발

2022.04.08.

서울대학교 산학협력단

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “소 요네병원인체, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, 신규병원성인자 규명 및 조절기법이용 새로운 방제 기법 개발”(개발기간 : 2018. 4. 25 ~ 2021. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 04. 08

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단 단장 (최해천) (인)



주관연구책임자 : 서울대학교 산학협력단 유 한 상



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

최종보고서							보안등급 일반[<input checked="" type="checkbox"/>], 보안[<input type="checkbox"/>]	
중앙행정기관명				사업명	사업명			
전문기관명 (해당 시 작성)				사업명	내역사업명 (해당 시 작성)			
공고번호				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)				
				연구개발과제번호		918020-4		
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0701	50 %	LA0705	25 %	LA0204	15 %	
	농림식품과학기술분류	RB0201	70 %	RB0104	30 %		%	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문							
	영문							
연구개발과제명	국문	소 요네병원인체, <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> , 신규병원성인 자 규명 및 조절기법어용 새로운 방제 기법 개발						
	영문	Development of new control measures against bovine Johne's disease using novel pathogenic genes of <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>						
주관연구개발기관	기관명	서울대학교		사업자등록번호		1198203684		
	주소	(우) 08826		법인등록번호				
연구책임자	성명	유한상		직위		교수		
	연락처	직장전화	02-874-2738		휴대전화			
		전자우편			국가연구자번호			
연구개발기간	전체	2018. 04. 25 - 2021. 12. 31(3 년 9 개월)						
	단계 (해당 시 작성)	1단계						
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비	그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체 기타()				합계	연구개발비 의 지원금
	현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	
총계	770,000						770,000	770,000
1단계	1년차	150,000					150,000	150,000
	2년차	200,000					200,000	200,000
	3년차	210,000					210,000	210,000
	4년차	210,000					210,000	210,000
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고 역할 기관유형		
공동연구개발기관								
위탁연구개발기관	울산과학기술원	김동혁	부교수			위탁	대학	
연구개발기관 외 기관								
연구개발담당자 실무담당자	성명	이준호		직위		학생		
	연락처	직장전화	02-874-2738		휴대전화			
전자우편				국가연구자번호				

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2022년 3월 22일

연구책임자: 유한상

주관연구개발기관의 장: 서울대학교 산학협력단장 최해천 (직인)

위탁연구개발기관의 장: 울산과학기술원 총장 이용훈 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)					
내역사업명 (해당 시 작성)		연구개발과제번호					
기술 분 류	국가과학기술 표준분류	LB0701	50 %	LA0705	25 %	LA0204	15%
	농림식품 과학기술분류	RB0201	70 %	RB0104	30 %		%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		소 요네병원인체, <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> , 신규병원성 인자 규명 및 조절기법이용 새로운 방제 기법 개발					
전체 연구개발기간		Development of new control measures against bovine Johne's disease using novel pathogenic genes of <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>					
총 연구개발비		총 770,000 천원 (정부지원연구개발비: 770,000천원, 기관부담연구개발비 : 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)					
연구개발단계		기초[<input checked="" type="checkbox"/>] 응용[<input type="checkbox"/>] 개발[<input type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[<input type="checkbox"/>]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 소의 만성, 소모성질병인 요네병(Johne's disease)의 효율적인 방제대책을 수립하고자, 비교유전체학 및 기능유전체학을 기반으로 하여 요네병의 원인균인 <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) 의 병원성/신규유전자원을 발굴. ○ Host-pathogen 의 cross-talk의 분석을 통하여 발병기전을 규명. ○ 감염초기 잠복감염개체의 효율적인 검출기법을 개발 및 병원성유전자의 조절을 통한 백신후보주를 개발하고자 함 					
	전체 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 소 요네병 원인균 MAP의 유전자원발굴 : 국내,외분리 MAP의 WGS, Pan-genome 분석 등을 통해 MAP의 유전체 데이터베이스 구축 및 신규 발굴 유전자의 특성 분석 ○ <i>In vitro</i> 감염모델을 활용한 병원체-숙주 작용체 (interactome) 분석 및 유전체 발현양상 분석을 통한 병원성유전자의 전사기작 규명 및 중요 신규 병원성 유전자 발굴 <ul style="list-style-type: none"> - Co-culture system 구축을 통한 MAP 감염 <i>in vitro</i> 모델 확립 및 interactomes 분석 - 병원체 (MAP) 및 숙주의 대용량 기능 유전체 분석으로 통한 유전자기능 및 network 분석 ○ <i>In vivo</i>에서 MAP 감염 동물에서 준임상형(잠복감염) 및 감염단계별 특성 분석; RNA-seq, microRNA, 대사체 분석을 통한 감염단계별 특이 발현 물질 발굴 및 미세병리기전 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 모델 동물에서 잠복감염 및 감염단계별 특이 발현 물질 및 면역병리학적 특성규명 - 목적동물 (자연감염우) 에서 준임상형 및 임상감염단계별 혈액 및 감염부위 조직에서 병원체 및 숙주의 유전체 발현양상분석 - MAP 감염우와 미감염우의 장내 microbiota 비교 분석 					

		<ul style="list-style-type: none"> ○ MAP 감염 초기 잠복감염개체 검출을 위한 진단기법 개발 및 백신 후보물질 발굴 <ul style="list-style-type: none"> - MAP 감염 단계별 발굴 특이 물질 (유전체, 단백질, 대사체)을 이용한 진단기법 개발 - 병원성 유전자 결손변이주 (mutants) 제작 및 변이주의 유전적, 면역학적 특성 분석: 숙주에서 cytokines 발현 유도능 및 유전체 발현분석을 통한 면역발현기전분석 - 병원성 유전자 결손변이주의 백신 효능 평가를 통한 백신 후보물질 발굴 				
	1단계 (해당 시 작성)	<table border="1"> <tr> <td>목표</td> <td></td> </tr> <tr> <td>내용</td> <td></td> </tr> </table>	목표		내용	
목표						
내용						
	n단계 (해당 시 작성)	<table border="1"> <tr> <td>목표</td> <td></td> </tr> <tr> <td>내용</td> <td></td> </tr> </table>	목표		내용	
목표						
내용						

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 소 요네병 원인체인 MAP 국내 분리주 확보 및 유전학적 특성 규명을 통한 MAP 유전체 데이터베이스 구축, 신규 병원성 유전자 발굴, 병원성 유전자 발현 기전 규명 ○ MAP 감염 모델 구축 및 감염 모델 활용 Host-pathogen 상호작용 규명, 감염 단계별 특이 발현 유전체, 단백질의 발굴로 감염 초기 잠복감염개체의 검출을 위한 진단 후보물질 발굴 ○ 다양한 병원성 미생물 및 장내 미생물 연구의 발병 기전 규명 및 예방 기법 개발에 적용 가능한 활용할 수 있는 co-culture system 및 질병 감염 모델 구축 ○ MAP-Host 상호작용 규명 및 MAP 유전자 데이터베이스를 통해 발굴한 유전체, 단백질 등을 활용한 감염 초기 준임상형 MAP fecal shedder의 검출을 위한 진단법 개발 ○ 신규 병원성 유전자 결손 mutants 제작 및 유전, 면역학적 특성 분석을 통한 소 요네병 예방을 위한 백신 후보물질 발굴 ○ 신규 진단법을 활용 국내 MAP 감염 근절을 위해 효율적인 MAP 예방 기법 개발 ○ MAP 감염 확인을 위한 바이오마커 개발 및 요네병균에 감염된 소 혈청을 수집하여 단백질 추출을 통한 바이오마커 후보물질 탐색 ○ MAP 감염우와 미감염우의 장내균총 확인 후, 감염 유무에 따라 특이적으로 차이는 나는 미생물을 선별한 후 이들의 상대적 풍부도 값을 이용 및 지표화하여 MAP 특이적, 미생물학적 바이오마커 제시 ○ MAP 국내 분리주에 대한 전장 유전체 분석 및 RNA-seq 기법을 이용하여 국내 분리 요네병균의 특성 분석을 위한 전사체 분석 수행 ○ 단일세포 유전체 분석을 이용하여 숙주 세포에 대항하는 요네병균 감염에 대한 초기 반응 분석 및 Dual RNA-seq 분석을 사용하여 숙주 세포와 MAP 사이의 전사체 프로파일을 기반으로 하는 숙주-병원체 상호작용체 분석 수행
--------	---

<연구개발성과 유형>

구분	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 · 장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
예상성과 (N/Y)	Y	Y						Y			

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ MAP의 숙주 세포에 감염 기전 및 감염 단계별 숙주 세포의 유전, 면역학적 기전을 규명함으로써 소 요네병 발병 기전에 대한 이해 증대 ○ 난치성 질병인 세포 내 기생 병원성 세균에 의한 질병 예방을 위한 진단 및 치료 물질 발굴을 위한 모델 구축 및 신규 진단, 치료 물질 발굴로 관련 산업에 기여 ○ microRNA 및 백신 후보 유전자원들은 향후 소 요네병의 제어 및 예방 백신 개발을 위한 자원으로 활용함으로써 백신 시장의 세계적인 수요 창출
---------------------------	---

	<ul style="list-style-type: none"> ○ MAP 감염기전 이해 및 예방기법 확립으로 국내 소 산업에 경제적 피해 감소로 관련산업의 국제경쟁력 확보 및 공중보건학적으로 축산물 안전성 확보에 기여 ○ 본 연구를 통해 MAP의 pathogenesis 관련분야에서 세계적으로 학문연구를 선도함으로써 국가 이미지 제고 												
연구개발성과의 비공개여부 및 사유													
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종		
								생명 정보	생물 자원		정보	실물	
	16	2						99					
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호				
국문핵심어 (5개 이내)	소 요네병		숙주병원체		잠복감염		진단		예방후보물질				
영문핵심어 (5개 이내)	Johne's disease		Host-pathogen		Latent infection		Diagnosis						

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 -----	7
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 -----	10
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 -----	16
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)	
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 -----	175
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 -----	175
7. 참고문헌 -----	176

1. 연구개발과제의 개요

- 요네병(Johne's disease, Paratuberculosis)은 *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP)의 감염에 의해 발생하는 소, 면양, 산양 등 반추동물의 만성·소모성 질병으로 만성적 설사, 쇠약, 산유량 감소, 도태 및 폐사 등과 함께 감염된 개체에서는 급격한 체중 및 산유량의 감소도 나타나 축산농가에 막대한 경제적 피해를 주고 있다. 질병의 진행양상 및 병리기전은 결핵 등 다른 병원성 마이코박테리아 감염증과 유사하고, 사람의 크론병(Crohn's disease)과의 연관성이 지속적으로 대두되고 있어 잠재적인 인수공통감염병 원인체로도 큰 중요성을 가진다.
- 국내에서 1967년에 첫 요네병 발생이 보고된 이후 1980년대부터 국가적인 방역 대책을 수립하여 근절 노력을 하고 있으나, 실제 현장에서 소 요네병에 대한 실질적인 관리는 매우 미흡한 실정이며, 실제로 지난 10년간 요네병과 관련하여 매년 400여 건 내외의 발생 보고가 존재하고, 이는 임상증상 의심우, 병성감정 등 수동적인 검사에 의한 결과로 최근 축산의 형태 변화 및 연구 결과 등을 고려할 때 실질적으로는 훨씬 많은 수준의 감염이 이루어져 있을 것으로 추정된다. 국내뿐만 아니라 해외의 사례의 경우, 낙농 선진국이라 할 수 있는 미국조차 지역에 따라 개체별로 5~20%의 소가 요네병에 감염되어있는 것으로 추정되고 있고 농장별로는 최대 50~60%까지 감염되어있는 것으로 보고되고 있다. 이러한 감염된 목장에서의 손실액은 감염된 개체 1두 당 연간 40 달러로 추정하였으며 이에 따른 전체적인 피해액이 연간 2.2억 달러일 것으로 추정하고 있다. 이를 통해 국내 및 해외에서 지속 및 확산되고 있는 요네병은 축산업뿐만 아니라, 공중보건학적으로도 매우 중요 중요한 질병이라고 할 수 있다.
- 요네병의 가장 큰 특징은 다른 보통의 감염병들과는 다르게 감염된 직후 바로 증상을 나타내는 것이 아니라 긴 잠복기(평균 2 ~ 5년)를 거친 후 증상을 발현한다는 점이다. 또한 요네병의 원인체인 MAP는 세포 내 기생성 등의 특성을 가지기 때문에 임상증상을 보이지 않는 개체에서도 균의 전파가 지속적으로 이루어지며, 이러한 점 때문에 농장에 한 번 유입되면 근절이 매우 어려운 질병이다. 이러한 특성 때문에 농장에서 요네병의 감염양상은 '빙산현상'으로 나타나는데 (그림 1), 만약 요네병의 증상을 나타내는 소가 한 마리 발견이 되었다면 그 농장에는 잠복감염된 개체나 준임상형(진단법을 통해 양성으로 진단으로 되지만 증상을 나타내지는 않는 형태)의 개체들이 다수 존재하고 있다는 것이다. 하지만 현재까지 개발된 진단기술로는 이러한 감염 초기의 무증상 감염 개체를 효과적으로 진단할 수 없어 본 질병의 근절이 매우 어려운 실정이다.

- 요네병은 질병의 특성상 만성경과를 보이기 때문에 감염 후 특이적인 임상증상이 없고, 혈청학적으로 음성인 준임상형 균배출우(subclinical shedder)에 의한 지속적인 감염을 유발하고 있기 때문에, 근절을 위해서는 준임상형 균배출우의 검색을 통해 감염고리의 차단이 필수적이다. 특히 무증상 잠복감염된 개체들은 우유, 정액 등으로 균을 배출하여, 이 질병 확산의 주요 원인으로 작용하고 있다. 특히, 이 균들은 우유의 저온살균에 저항성을 가지고 있어서 우유 위생에서도 매우 중요한 병인체중 하나이다. 이에 공중보건학적 측면에서도 무증상 잠복감염개체의 조기검출을 통한 질병 확산의 예방이 매우 중요하다.

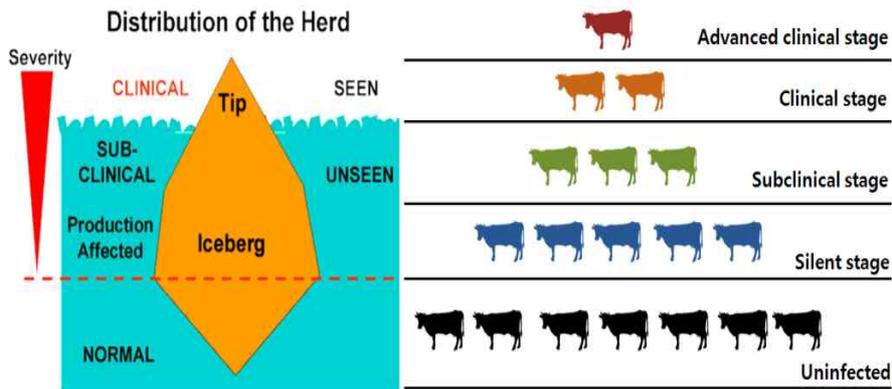


그림 1. 소 요네병의 농장 내 감염 모식도

- 앞서 언급한 문제점에서 알 수 있듯이, 요네병을 완전히 근절하는 것은 현실적으로 매우 어렵다. 요네병의 확실한 진단을 위해 여러 가지 진단법이 무증상 또는 준임상형의 감염개체들을 검색하기 위해서 사용되고 있지만, 혈청 ELISA 검사법의 경우 진단 민감도가 낮고 감염 후기에 항체가 올라가는 경우가 많아 분변 배설 개체들을 효과적으로 진단하기에는 부족하다. 분변으로부터 균을 직접 검출하는 PCR 방법 등도 사용되고 있으나 PCR의 경우 살아있는 균을 직접 분리하는 것이 아니기 때문에 확실한 감염이 아닌 경우도 있을 수 있으며, 감염된 개체라고 하더라도 개체의 면역상태나 다른 여러 가지 요인에 따라 분변으로 균을 배설할 때가 있기도 하고 하지 않을 때가 있기도 하다(간헐적 배설). 현재 국내에서 소 요네병 진단은 혈청학적 진단에 의한 항체양성우를 대상으로 도태권고를 하고 있지만, 의무적인 검사대상도 병성감정으로 의뢰되었을 경우 또는 종모우 선발을 위한 경우로 한정되어 있다.
- 또한 요네병의 원인체인 MAP 는 facultative intracellular bacteria로서 감염시기에 따라 Th1 면역반응과 Th2 면역반응의 switching 등 특이적이고, 다양한 면역반응을 나타내기 때문에, 현재 진단법인 혈청학적 진단법으로는 지속적으로 균을 배출하여 전파를 확산시키는 무증상 잠복감염개체의 검출이 어려운 실정이다. 따라서 질병의 예방 및 근절을 위한 새로운 진단법 및 예방기법 개발에 대한 집중적인 연구가 요구되고 있으며, 더하여 이러한 개체들을 조기에 검출할수 있는 새로운 진단법의 개발을 통한 방제 대책의 수립이 지속적으로 요구되어지고 있다.

○ 이에, 새로운 MAP 제어 기술 개발을 위해서는 세포·분자 수준에서의 감염 초기 숙주-병원체 상호작용에 대한 심층적인 이해가 필수적이라고 할 수 있다. 감염 초기 숙주와 병원체의 상호작용을 확인하기 위해서는 요네병 감염 초기 상황을 잘 재현할 수 있는 감염모델이 필수적이며, 어떤 상호작용이 일어나는지를 확인하기 위해서 RNA-Seq 방법을 사용하여 감염 시 시간에 따라 숙주에서 발현하는 모든 유전자와 병원체가 발현하는 모든 유전자들의 변화를 측정하고 감염되지 않은 상황 대비 감염 시 어떤 유전자들이 발현이 증가하는지, 또는 감소하는지를 확인하는 것이 중요하다 할 수 있다. 이러한 이해를 통해 조기검출을 위한 새로운 진단법의 개발과 방제대책을 수립하고자, 본 연구에서는 MAP 균 자체 및 감염시 숙주에서의 반응을 비교유전체학 및 기능유전체학적 접근 방법을 통하여 요네병에 대한 새로운 방제대책을 수립하고자 한다.

○ 이에 이러한 연구목적 달성을 위하여 아래와 같은 연구목표를 설정하였다.

1. 표준 MAP 균주 및 국내 유래 MAP 분리주의 pan-genome 분석 등을 통해 MAP 유전체 데이터베이스를 구축하고, 국내 발생균주의 유전적인 특성규명을 통한 신규 병원성유전자를 규명함.
2. *in vitro* 및 *in vivo* 감염 모델을 구축하여 병원체-숙주간 상호작용을 유전체, 단백질 및 대사체 수준에서 분석하여, 특히 발현 유전자, 단백질, 대사체, 발병기전, 면역기전 및 장내 microbiota 를 규명함.
3. 이 과정을 통해 발굴된 신규 유전자들에 대한 mutants 제작을 통해 이들 유전자의 병원성 등 특성 및 숙주세포에 대한 상호작용을 규명함.
4. 위에서 규명된 유전체, 단백질, 대사체의 정보를 활용하여 감염개체의 조기검출을 위한 새로운 진단법 및 예방 백신 후보물질을 개발하고자함. 또한 효율적인 MAP 제어 기법을 개발하고자함.

○ 이상의 연구들로 새로운 진단 및 예방후보물질을 발굴하게 되면 중요 만성 소모성 질병으로서 세계적으로 낙농산업에 막대한 경제적 피해를 입히는 소 요네병에 대한 조기 검색 및 예방에 대한 기초자료를 제공할 수 있게 된다. 이를 통해 보다 나은 요네병의 근절 정책이 수립가능할 것으로 생각되며, 이는 궁극적으로 농가의 생산성 향상으로 이어져 국내 낙농산업의 국제적인 경쟁력 향상으로 이어질 수 있을 것이다.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2018)	소 요네병원인체, <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> , 신규병원성인 자 규명 및 조절기법이용 새로운 방제 기법 개발	Co-culture system을 이 용한 MAP 감염 초기의 in vitro 모델 구축	- Transwell 및 collagen 이용하여 MDBK와 bovine PBMCs의 co-culture system 구축	- 구축된 co-culture system 에서 MAP 감염 후 cytokine 발현 분석
		병원체 및 숙주의 대용량 기능유전체학 분석	- in vitro co-culture 모 델에서 숙주-병원체 RNA-seq 분석	- MAP 감염 시 cytokine 분 석 결과를 참고하여 RNA-seq 수행
		MAP 감염의 숙주특이성 분석	- 인간, 마우스, 소 유래 세포들에서 병원체- 숙주 RNA-seq 결과 비교 분석	- Bovine PBMC에 MAP를 감 염시킨 후 RNA-seq 분석 수행
		MAP 핵심 병원성 인자 발 굴	- 데이터 베이스에서 mycobacteria에 대한 신규 병원성인자들을 검색하고 후보군을 도 출	- PubMed와 Google에서 mycobacteria 감염 관련 검색하여 문헌 검색 및 정 리 - 도출된 MAP감염 관련 관심 유전자의 적용
	MAP 국내 분리주 확보	- 국내 사육소 농장에서 요네병 검색	- 소에서 MAP 분리주 획득 및 감염개체 혈청 등 샘플 확보	
	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 균주에서 유전체/전사체 분석	국내 분리 MAP 균주 특성 분석을 통한 전장 유전체 분석 대상균주 선발	- 국내 분리주의 역학 적, 유전적 특성 비교 분석을 통한 대상균주 선발	- MIRU-VNTR, MLSSR 등 분자역학적 분석을 통한 국 내 분리주 5주 선발 대상균주의 표현형적 특성 분 석 수행(growth rate, intracellular survival 등)
		전장 유전체 시퀀싱을 이 용한 5종의 신규 균주의 유전체 확보	- 전장 유전체 시퀀싱을 통해 국내 분리주 5주 의 유전체를 만들기 위한 데이터 확보	- RAST 기술을 이용하여 5 개 균주 시퀀싱 및 유전체 복원 완료
		유전체가 공개된 199종의 <i>M. avium</i> 의 genome 분 석	- 비교 유전체 분석을 통한 pan-genome 분 석	- <i>M. avium</i> 에서 보존된 유전자 군 확보
		비교 유전체 접근 방법을 이용한 pan-genome 분 석	- 비교 대상이 되는 MAP 균주 37건, <i>Mycobacterium</i> <i>avium</i> 균주 188건 유 전체 염기서열 확보 - COG (cluster of orthologous groups) 분석을 통한 core/accessory/uniq ue 유전체 기능 분석	- 비교 대상이 되는 균주들의 유전체 염기서열 확보하여 자체 제작한 알고리즘과 BPGA를 이용하여 pan-genome 분석 - 자체 제작한 알고리즘과 diamond를 이용한 COG 분석

2차 년도 (2019)	소 요네병원인체, <i>Mycobacteriu m avium subsp. paratuberculo sis</i> , 신규병원성인 자 규명 및 조절기법이용 새로운 방제 기법 개발	마우스 모델을 활용한 MAP 감염 시기별 병원체 및 숙주의 미세병리기전 규명	- C57BL/6 마우스에 MAP 표준주 경구투여 또는 복강접종 - 감염 후 6주, 12주, 18주 후 비장, 간, 소 장 등 조직샘플 채취 - RNA-seq 분석 통한 숙주와 병원체의 유전 체발현양상 분석	- 동물실험 수행 - 마우스모델에서 박테리아 의 RNA를 확보하기 위한 조건 수립
		목적동물(소)의 MAP 감염 단계별 병원체 및 숙주의 유전체 발현 양상 분석	- 요네병 균 감염개체의 감염 단계에 따른 혈 청 proteome 분석	- 각 혈청 샘플당 3반복 이상 2-DE 분석을 실시하였고, 이미지 분석을 통해 유의적 인 spots 선정 - 요네병 비감염 대조군에 비 교하여 요네병 감염군에서 발현이 증가한 spots 59개 를 선정하여 MALDI-TOF/ MS 분석 및 동정
		miRNA-Seq 이용한 숙주 면역반응 조절인자 규명	- 목적동물(소)의 혈청 에서 miRNA 추출 기 법 확립 - MAP 감염 시기별 자 연감염우 확보	- 소 혈청으로부터 miRNA 추출기법 확립 - miRNA-Seq 분석을 위한 RNA quality check 완료
		신규 병원성 유전자를 이 용한 돌연변이 주 제작(계 속)	- 본 연구에서 유전체 분석을 통해 신규 발 굴된 병원성 유전자 포함하여 돌연변이 제 작	- pNitET-SacB-kan vector 를 이용한 대립유전자교환 방법을 채택하였고, 본 vector의 MAP 형질전환 조 건을 최적화 - 돌연변이 제작할 병원성 인 자 목록 작성
		MAP 국내 분리주 확보(계 속)	- 국내 사육 소 농장에 서 요네병 검색 - 분변 PCR 및 혈청 ELISA test를 통해 요 네병 양성농장 및 음 성농장 선별 - 국내에 존재하는 다양 한 genotype 균주 확 보	- 한우농장 50두에 대한 분 변 PCR 검사 수행 - 육종농장 121두에 대한 혈 청 ELISA 검사 수행 - 젖소 및 한우농장에서 20 두에 대한 분변 PCR 및 혈 청 ELISA 수행하여 양성개 체로부터 균 분리 수행 - 송아지 20두의 분변 PCR 검사 수행하여 양성개체에 대한 균 분리 수행
	MAP 유전체 전사 단위 정의 및 RNA-Seq 분석 파이프라인	신규 분리 균주의 기능성 유전체 재구성을 위한 전 사 단위 발굴	- 분석용 파이프라인 구 축 - 대조용 표준 MAP주 RNA-seq 분석	- RNA-seq 분석용 자동화 파이프라인 완성
	MAP 감염우와 감염동거 우의 장내미생물균총 분석	- 분석 파이프라인 구축 대조군용 비감염우(젖	- 장내미생물균총 분석 자동 화 파이프라인 완성	

			소, 한우) 분변을 통해 장내미생물균총 분석	- 차후 감염군과 비교 가능한 대조군 분석 완료
	구축	MAP 균주 검출을 위한 바이오마커 발굴	- pan-genome 분석 결과 기반으로 MAP 특이 유전자 도출 - 도출한 유전자를 활용한 PCR 마커 개발	- MAP 특이 유전자 후보군 확인 - 각 type 별 MAP 검출 가능한 PCR 용 프라이머 제작
3차년도 (2020)	소 요네병원인체, <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> , 신규병원성인자 규명 및 조절기법이용 새로운 방제 기법 개발	마우스모델을 활용한 host-MAP 상호작용 분석	- 감염경로에 따른 병리학적 특성 분석 - 감염경로에 따른 면역학적 특성 분석	- MAP를 복강 또는 구강경로를 통해 접종하여 병리학적, 면역학적 특성 확인 - 감염된 마우스에서 특이적인 병변 확인 - Real-time PCR을 활용하여 조직 내 MAP 검출 - TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-17 등 splenocyte 상층액에서 cytokine 발현 수준 측정
		MAP의 병원성 유전자원 발굴	- 마우스에 감염된 MAP의 RNA-seq 데이터 분석	- 병원성 유전자 후보군 발굴
		miRNA-seq 분석	- miRNA isolation - miRNA-seq 분석 - DEG 분석	- 요네병에 자연감염된 소의 감염 단계별 혈청으로부터 miRNA 추출 - 추출된 miRNA를 sequencing 하여 DEG 분석 - 유의적인 발현차이를 보인 miRNA를 바이오마커로 활용 또는 면역조절기전 분석에 활용
		장내미생물균총 분석	- 국내사육 젖소와 한우 분변으로부터 16S-seq - 요네병에 자연감염된 소들의 분변으로부터 16S-seq - OTU 분석 및 diversity 분석	- 건강한 젖소와 한우 각각 10마리로부터 장내미생물균총 분석을 수행 - OTU 분석결과 두 그룹간 다양성 차이는 없었으나 Prevotellaceae에서 유의적인 비율 차이 확인 - 요네병에 자연감염된 소들을 감염 단계별로 분류하고 분변 내 장내미생물균총 분석 - Diversity에서 눈에 띄는 차이는 발견되지 않았으나 Bifidobacterium의 비율이 ELISA 양성 그룹에서 약간 높은 것을 확인

				<ul style="list-style-type: none"> - 분석 그룹을 다양하게 하여 추가적인 분석 수행
		장내미생물균총 분석 파이프라인 업데이트	<ul style="list-style-type: none"> - 파이프라인 분석 과정 개선 - 공유 및 배포를 위해 라이브러리화 	<ul style="list-style-type: none"> - 분석 파이프라인의 접근성 향상
		MAP 균주 검출을 위한 바이오마커 발굴	<ul style="list-style-type: none"> - 업데이트된 데이터로 pan-genome 분석 - 분석 결과로 새로운 바이오마커 발굴 	<ul style="list-style-type: none"> - 국내주 특이적 large gap 확인 - 새로운 Tandem repeat 발굴
		배양조건에 따른 MAP 유전자 발현 차이 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 국내주 분석 - 표준주 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 발현량 차이를 보이는 유전자 후보군 확인
		요네병 감염 초기 진단마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 감염 개체와 비감염 개체의 혈청 내 단백질 profile 비교 분석 - 혈청 단백질 바이오마커 발굴 	<ul style="list-style-type: none"> - 감염단계에 따른 자연감염 우의 혈청 내 단백질 profile 비교 분석을 통해 바이오마커 선정 - 세 가지 바이오마커를 선정하여 ELISA 기법으로 유효성 확인
		MAP의 신규 병원성유전자 발굴	<ul style="list-style-type: none"> - 신규 병원성 유전자를 이용한 돌연변이 주 제작 	<ul style="list-style-type: none"> - CRISPR-Cas9 기법을 활용한 돌연변이 제작기법 구축 - 11종의 병원성 유전자를 선정하여 돌연변이 제작 중
		국내분리주 확보 및 진단기법 최적화	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 분리주 확보 - 진단기법 최적화 	<ul style="list-style-type: none"> - 2020년 현재 지속적인 검사로(1,273두) 분리주 확보 중 - 시판중인 ELISA kit간 상호 비교 및 fecal PCR 결과와 비교를 통해 농장 내 요네병 근절을 위해 필요한 전략 제시
4차년도 (2021)	소 요네병원인체, <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> , 신규병원성인자 규명 및	요네병 감염 초기 host-pathogen interactome 분석	<ul style="list-style-type: none"> - MAP의 대식세포 감염에 따른 감염 초기 유전체 발현 변화 분석 - Single cell RNA-seq 분석기법을 활용한 대식세포의 감염 초기 반응 분석 - 유전체발현 변화 분석 결과를 통한 MAP 감염 초기 병원성/신규 유전자 도출 	<ul style="list-style-type: none"> - Human THP-1 cell 및 MAP K-10의 감염 후 total RNA로부터 dual RNA-seq 분석 - DEG 분석을 통한 MAP K-10의 host responsive mRNA 발현패턴 분석 및 해당 유전자들의 VFDB, KEGG database 기반 enrichment 분석 - 기타 operon 예측기반 및 비교유전체학 기반 MAP 특이 유전자들 중 기능이 알려지지 않은 신규 유전자 목록 작성

조절기법이용 새로운 방제 기법 개발			<ul style="list-style-type: none"> - Human monocytic cell line인 THP-1의 PMA 처리에 따른 분화과정을 scRNA-seq 기법을 통해 분석하고 MAP 감염에 따른 각 세포 cluster들의 DEG 분석 수행 - Classically differentiated macrophage cluster 특이적인 MAP 감염에 대한 주요 반응 확인 - MAP 감염에 대한 반응성 확인 및 THP-1으로부터 분화한 새로운 type의 cell 확인 - Dual RNA-seq 기반 DEG 분석 결과를 통해 two component system, sigma factors, type VII secretion system, arginine biosynthesis 등 metabolism 관련 등 감염 초기 주요 병원성유전자 도출
	마우스 모델을 활용한 host-MAP 상호작용 분석	- MAP 감염에 대한 마우스의 유전체 발현 양상 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 복강 및 구강접종군의 감염 후 6주차 장간막림프절과 비장에서 RNA-seq 수행 - DEG 분석 수행 - GO 분석 수행 - Canonical pathway 분석 수행
	혈청 microRNA 분석 기반 바이오마커 발굴	<ul style="list-style-type: none"> - miRNA-sequencing을 통한 요네병 감염 단계별 DEGs 확인 및 발현 양상 분석 - 혈청 microRNA 기반 요네병 진단 biomarker 후보 도출 	<ul style="list-style-type: none"> - 시퀀싱 진행결과, 음성그룹 대비 모든 감염그룹에서 2 배이상 유의적으로 발현변화가 나타난 8개의 바이오마커 후보군을 선정하였음 - 이들의 네트워크 분석을 진행하여 MAP 감염시에 나타나는 전반적인 면역반응과 연관되어 있음을 확인하였으며, 이후 qRT-PCR을 통해 실제 유전자 발현량을 확인한 결과 총 4개의 miRNAs가 시퀀싱 데이터와 일치하는 패턴을 보였음
	신규 병원성 유전자를 이	- CRISPRi system을 이	- 기존의 선행논문들에서 병

	용한 돌연변이 주 제작	<p>용한 MAP 병원성 유전자들의 돌연변이 제작</p> <ul style="list-style-type: none"> - 돌연변이주의 생리적 특성 분석 	<p>원성과 관련된 유전자 13개를 최종적으로 선정하였음</p> <ul style="list-style-type: none"> -선정한 유전자들을 대상으로 발현억제 돌연변이주를 제작하고 각 유전자들의 균의 성장에 대한 essentiality를 평가하였음
	요네병 감염우 장내균총 분석기반 미생물학적 바이오마커 탐색	<ul style="list-style-type: none"> - 요네병 감염우, 동거우, 비감염우 간의 장내균총 분석 - 요네병 감염에 따른 장내균총의 다양성 및 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> -요네병 감염우의 장내균총이 미생물 풍부도, 균등도, 다양성이 감소하는 방향으로 확인한 변화를 보임을 확인함 -민감하게 반응하는 주요 미생물들을 통계분석, 기계학습 등의 방법을 이용하여 선별하였고, 이를 활용하여 예비 감염지표 5종 및 매우 높은 수준의 정확도 (0.9)를 지닌 요네병 감염 분류 모델을 설계하였음
	국내 소 요네병 관리지침 작성	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 소 요네병 발생 및 관리 상황분석 - 국외 소 요네병 발생 및 관리 상황분석 - 국내 관리지침 작성 	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 소 요네병 발생, 관리 상태 분석 및 문제점 도출 - 국외 소 요네병 관리 지침 분석 및 국내 적용가능사항 도출 - 소 요네병 국내 관리 지침 작성

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

1. MAP 국내분리주 확보 및 유전적 특성 규명

가. MAP 국내분리주 확보 및 유전적 특성 규명

(1) 소 사육농장에서 요네병 검진

- 2019년 한 해 동안(11월 현재) 4개 농장 245두를 대상으로 요네병 ELISA 및 분변 PCR 검진을 수행함. 이 중 송아지 20두를 대상으로 한 분변 검사에서 PCR 양성을 보인 개체가 확인됨 (표 1). ELISA 검사 결과 전 두수에서 양성을 나타내는 개체는 확인할 수 없었음.

표 1. 대규모 젖소목장 송아지 20두의 분변 PCR 검사 결과

No.	Sample No.	1차		2차		3차		4차	
		IS900	ISMap02	IS900	ISMap02	IS900	ISMap02	IS900	ISMap02
1	46xx	36.26	37.49						
2	07xx								
3	06xx								37.83
4	13xx							37.41	
5	59xx							37.33	36.78
6	08xx						36.92		
7	52xx			36.52		36.19		36.98	
8	94xx		36.77						
9	06xx							36.43	
10	88xx	36.81					37.01		
11	50xx			38.61					
12	94xx					35.53		36.41	
13	11xx			35.84					40.16
14	52xx								38.61
15	53xx								
16	44xx			37.64	37.69			35.86	
17	08xx		36.58		36.79				
18	12xx			44.89	37.86				
19	52xx								
20	08xx			35.62	36.97	38.07		35.62	

표 2. 국내 사육소의 요제병 검사 결과 (2019)

	검사두수	양성개체수	음성개체수
Fecal PCR	427	36	391
ELISA	272	6	266

- 양성 개체들로부터 VersaTREK-ParaJEM 이용하여 균 분리배양 실시하였음.
- 국내 사육 젖소 및 한우 농장에서 혈청학적 검사 및 분변검사 수행
- 분변검사 양성 및 의양성 샘플은 분리, 배양검사 시행
- 혈청학적 양성 샘플은 진단법개발에 활용 : 혈청 단백질분석 , miRNA, 정책제안자료

표 3. 국내 사육소 혈청학적검사, 분변검사 및 분리균주수 (2018 ~ 2021)

구분	2018		2019		2020		2021	
	양성	음성	양성	음성	양성	음성	양성	음성
혈청 (ELISA)	9	10	6	266	19	511	3	631
분변 (Fecal PCR)	3	16	36	391	8	1130	5	867
분리균주수	22		7		11		7	

(2) MAP 국내 분리주 및 표준균주 growth 특성 분석

- 국내 분리주의 분자역학적 특성 분석 결과 B-type과 C-type의 두 가지 타입의 분리주들이 확인되었음. 해당 타입의 분리주들이 배지의 첨가성분에 따라 성장특성이 다르다는 사실을 최초로 발견함. B-type의 균주들은 공통적으로 mycobacteria 성장배지인 7H9 broth에서 Tween-80을 첨가하고 glycerol을 첨가하지 않았을 경우 성장하지 않는 특성을 보였는데 표준주를 포함한 C-type 균주들은 Tween-80만 첨가한 환경에서 성장이 관찰됨 (그림 1). Growth curve 측정은 McFarland 탁도계를 확인하여 측정되었음.
- 즉, MAP의 성장을 위해 보통 첨가되는 glycerol이 B-type 균주들에는 생장에 필수적이며, C-type 균주들은 glycerol 대신 Tween-80을 탄소공급원으로 사용할 수 있는 것으로 보임. 해당 내용은 국내 분리주들의 pan-genome 결과 분석에서 확인된 accessory gene 비교를 통해 관련있는 유전자들을 추려낸 후 돌연변이 제작을 통해 B-type과 C-type 간의 표현형적 차이를 분석하고자 함.
- 추가적으로 glycerol 대신 Tween-80만 첨가한 배지에서는 C-type 균주들도 McFarland=4.0 정도의 수준에서 stationary phase로 접어든 것을 확인하였으며, 이를 통해 Tween-80의 첨가 만으로는 영양소의 고갈 또는 세포벽 합성에 필요한 탄소원이 충분히 공급되지 않은 것으로 추측할 수 있었음.

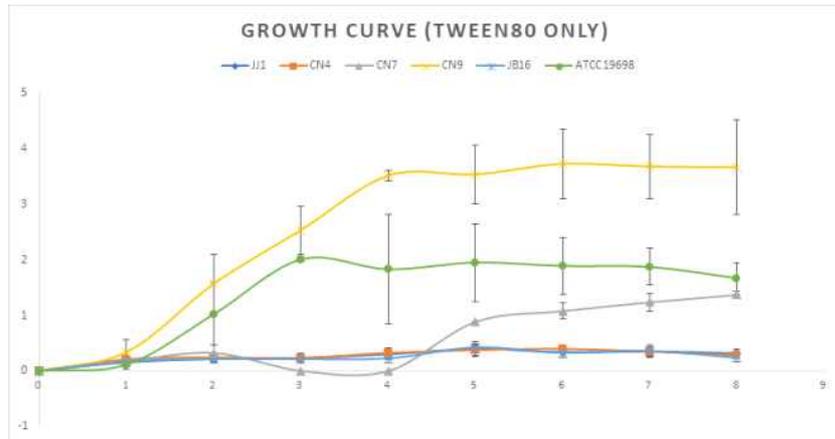


그림 1. B-type과 C-type 국내 분리주 및 표준주의 Tween-80 첨가 7H9 broth에서 growth curve 분석. C-type 균주: CN7, CN9, ATCC19698, B-type 균주: JJ1, CN4, JB16.

(3) 배지의 구성성분에 따른 성장특성 분석

- 7H9 broth에서 glycerol의 첨가 유무에 따른 표현형의 차이 및 Tween-80 첨가에 따른 액체 배지에서의 성장특성 차이 등이 관찰됨. 앞서 언급하였듯, B-type 균주들은 glycerol이 첨가되지 않은 배지에서 성장하지 않았으며 또한 Tween-80이 첨가되었을 때 clump가 배양 후 약 4주 정도까지는 형성이 억제되는 경향을 보였음.
- 이에 따라 배지의 구성성분에 따른 표준주에서의 성장곡선이 분석되었음. 7H9 broth에 각각 1%의 glycerol과 0.5%의 Tween-80이 모두 첨가된 배지에서 MAP ATCC19698 균주의 growth curve가 측정되었음. 측정은 1주일 간격으로 spectrophotometer를 이용하여 OD600 값이 측정되었으며, 해당 시기별로 7H11 agar plate에서의 cfu 측정도 병행되었음.
- 7주간 측정 결과 OD600 값은 5주 이후부터 증가가 멈추는 경향을 보였으며, 이 시기부터 clump의 형성이 눈에 띄게 관찰되었음 (그림 2). 7주차에는 OD값의 감소가 관찰되었으며 종합적으로 볼 때 2-3주차가 log phase인 것으로 보이며 5주 이후부터는 plateau를 형성하는 것으로 확인됨. 가장 높은 OD값은 1.0 전후로 그 이상의 성장이 관찰되지는 않았음.

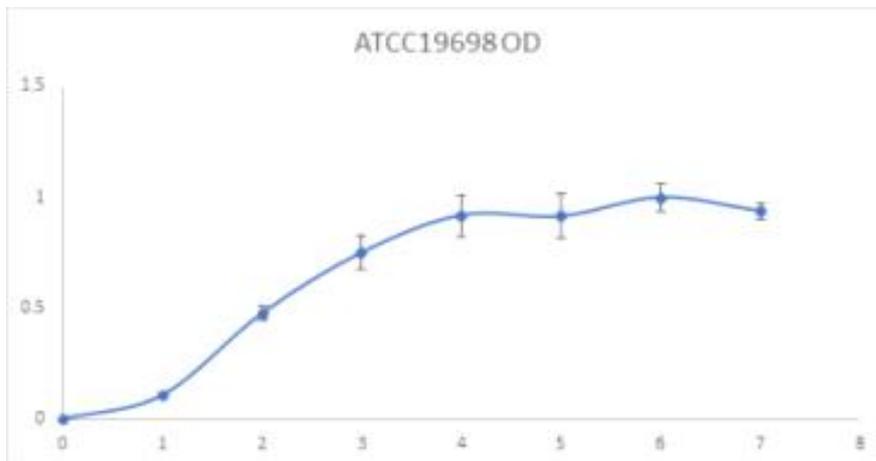


그림 2. MAP ATCC19698의 7H9 broth (glycerol+Tween-80)에서의 growth curve (optical density at 600nm) 측정

- 현재까지 4주차까지의 cfu 측정 결과가 확보되었음 (그림 3). CFU의 경우 기존에 알려진 바에 의하면 OD600=1.0일 때 10^8 cfu/ml 정도를 나타내는 것으로 알려져 있었음. 그러나 본 연구에서 7H9 broth (glycerol+Tween-80) 배지에서의 cfu를 측정한 결과 OD600=1.0 정도에서는 2.73×10^9 cfu/ml 정도로 측정되었음. Log phase에 해당하는 2주차 및 3주차의 OD600 값은 각각 0.48과 0.75였으며, 상응하는 cfu값은 각각 9.85×10^8 cfu/ml 및 2.11×10^9 cfu/ml로 나타났음. 이를 통해 기존 연구들에서 알려진 낮은 cfu값은 clump의 형성과 관련이 있는 것으로 추측할 수 있음. 본 연구 결과를 통해 추후 MAP 감염 실험에서 보다 정확한 방법으로 정확한 수의 박테리아를 감염시킬 수 있는 기초자료를 확보함.

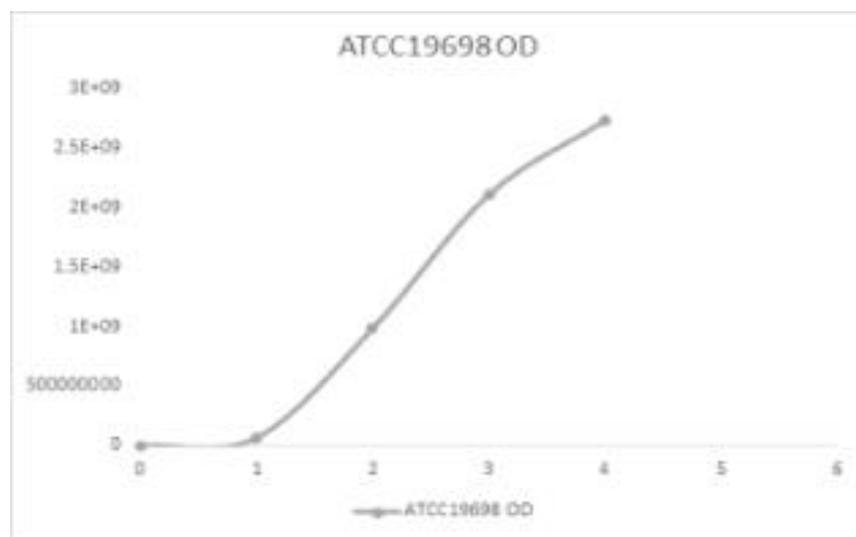


그림 3. MAP ATCC19698의 7H9 broth (glycerol+Tween-80)에서의 growth curve (cfu) 측정

(4) 국내 사육 소 농장에서 요네병 검색

- 10월 말 현재 국내 대형 젖소사육 농장의 협조를 받아 전 두수의 소를 대상으로 ELISA 검사를 수행하였으며 양성의 개체에 대해서는 분변 및 혈청 샘플을 확보받아 fecal-shedding 검사 수행.
- 기확보된 MAP 분리주에 대해서는 IS1311 PCR-REA, MIRU-VNTR, MLSSR 기법을 활용하여 분자역학적 분석을 수행함 (표 4, 5, 6, 7, 그림 4).
- 분석 결과에 따라 국내분리주를 5개의 strain으로 구분하였고 5개의 strain에 대해 whole genome sequencing candidate로 사용함.

표 4. 국내 분리주 및 해외유래 분리주의 IS1311 PCR-REA typing

Country	Province	Herd location	Herd ID	Isolates /DNA	No. of isolates /DNA	Genotype (IS1311 PCR-REA)
Korea	Gyeong-gi	Region 1	A	DNA	1	Cattle
		Region 2	B	DNA	1	
	Chung-nam	Region 3	C	Isolates	2	Cattle
					Isolates	11
	Jeon-buk	Region 4	D	Isolates	3	Bison
	Gang-won	Region 5	E	DNA	1	Cattle
				DNA	1	Bison
			F	DNA	2	Cattle
		Region 6	G	DNA	1	Cattle
				DNA	4	Bison
	Jeju	Region 7	H	Isolate	1	Bison
				Isolate	1	
DNA				1		
Isolate				1		
Australia	Unknown	Region 8	Unknown	Isolate	2	Cattle
		Region 9	Unknown	Isolate	1	
Czech Republic	Unknown	Region 10	Unknown	Isolate	1	
				Unknown	Isolate	
			Unknown	Isolate	1	
			Unknown	Isolate	1	
Slovakia	Unknown	Region 11	Unknown	Isolate	1	

표 5. 국내 분리주 및 해외유래 MAP의 MIRU-VNTR typing

INMV group	No. of isolates (%)	No. of copies of MIRU-VNTR								Numerical code
		292	X3	25	47	3	7	10	32	
INMV 1	4 (14.8)	4	2	3	3	2	2	2	8	42332228
INMV 2	5 (18.5)	3	2	3	3	2	2	2	8	32332228
INMV 5	1 (3.7)	4	2	3	3	2	2	1	8	42332218
INMV 68	17 (62.9)	2	2	5	3	2	2	2	8	22532228

표 6. 국내분리주 및 해외유래 MAP의 MLSSR typing

MLSSR types	No. of isolates (%)	MLSSR locus										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	8 (29.6)	7	>11	5	5	5	4	4	4	4	5	5
2	5 (18.5)	7	11	5	5	5	4	4	4	4	5	5
3	4 (14.8)	7	10	5	5	5	4	4	4	4	5	5
4	1 (3.7)	7	11	5	5	5	5	5	5	5	5	5
5	1 (3.7)	>11	9	5	5	5	5	5	5	5	5	5
6	3 (11.1)	7	>11	5	5	5	5	5	5	4	5	5
7	1 (3.7)	7	9	5	5	5	4	5	4	4	5	5
8	1 (3.7)	7	10	5	5	5	4	5	4	4	5	5
9	1 (3.7)	7	>11	5	5	5	4	6	4	5	5	5
10	1 (3.7)	7	11	5	5	5	4	6	4	5	5	5
11	1 (3.7)	7	10	5	5	5	4	6	4	4	5	5

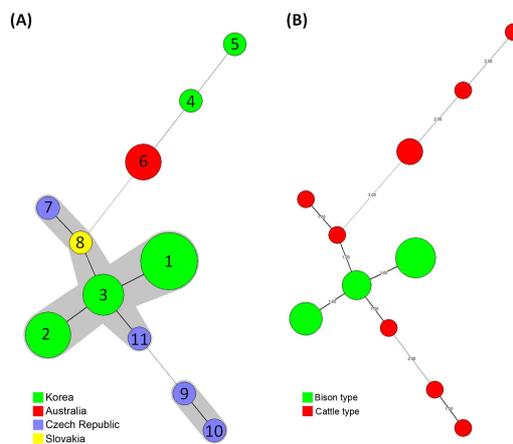


그림 4. 27개 MAP 분리주들의 MLSSR genotype 기반 minimum spanning tree 분석

나. 비교유전체학 정보를 이용한 신규 MAP 유전자원 발굴

(1) 전장 유전체 시퀀싱을 이용한 5개의 신규 균주의 유전체 확보

(가) NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) 기술을 이용하여 유전자 정보 분석

- 국내 분리주 5개 균주 모두 시퀀싱 완료.
- 모든 균주의 유전체가 1개의 contig로 assembly 된 것으로 보아 sequencing 결과가 좋은 것으로 예측됨.
- 이에 NCBI PGAP 기술을 이용하여 5개 균주의 유전체가 가진 유전자들을 예측 (표 8).
- 각 균주에 대한 유전체 정보는 Accession No.를 통해 NCBI에서 열람 가능함.

표 7. 27개 MAP 분리주들의 MIRU-VNTR, MLSSR 타입에 따른 지역적 분포

Country	Herd location	Herd ID	MIRU-VNTR	MLSSR	No. of isolates
South Korea	Region 3	C	INMV 68	Type 1	5
			INMV 68	Type 2	3
			INMV 68	Type 3	3
			INMV 2	Type 4	1
			INMV 2	Type 5	1
	Region 4	D	INMV 68	Type 1	1
			INMV 68	Type 2	1
			INMV 68	Type 3	1
	Region 7	H	INMV 68	Type 1	1
			I	INMV 68	Type 1
J			INMV 68	Type 2	1
Australia	Region 8	Unknown	INMV 2	Type 6	2
	Region 9	Unknown	INMV 2	Type 6	1
Czech Republic	Region 10	Unknown	INMV 1	Type 7	1
		Unknown	INMV 1	Type 8	1
		Unknown	INMV 1	Type 9	1
		Unknown	INMV 1	Type 10	1
Slovakia	Region 11	Unknown	INMV 5	Type 11	1

표 8. 5개 신규 분리 MAPK 유전체 정보

Genus_Species_sp.	Accession_No.	Genome_Size	N_No.	GC_contents	contig_No	Genes	CDSs	RNA		
								tRNA	rRNA	ncRNA
MAPK_CN4/13	GCF_003815795	4,836,546	0	69.3%	1	4,610	4,558	46	1, 1, 1 (5S, 16S, 23S)	3
MAPK_CN7/15	GCF_003713025	4,837,149	0	69.3%	1	4,593	4,541	46	1, 1, 1 (5S, 16S, 23S)	3
MAPK_CN9/16	GCF_003713045	4,831,261	0	69.3%	1	4,586	4,534	46	1, 1, 1 (5S, 16S, 24S)	3
MAPK_JB16/15	GCF_003815815	4,838,766	0	69.3%	1	4,609	4,557	46	1, 1, 1 (5S, 16S, 24S)	3
MAPK_JJ1/13	GCF_003816035	4,838,649	0	69.3%	1	4,610	4,558	46	1, 1, 1 (5S, 16S, 24S)	3

(2) 확보한 5개 신규 균주의 유전체 정보 분석

(가) 유전체 정보 분석 및 원형 표현

- NCBI PGAP를 통해 각 균주들이 가진 유전자들을 Coding Sequences (CDSs) 및 RNA로 구별, 각 유전자들의 개수 및 위치를 원형으로 표현.
- MAPK_CN4/13 균주의 genome size는 4,836,546 bp이며 해당 균주가 가진 CDSs의 수는 4,330개 (forward: 2,252, reverse: 2,078) 로 확인 (그림 5A).

- MAPK_CN7/15 균주의 genome size는 4,837,149 bp이며 해당 균주가 가진 CDSs의 수는 4,321개 (forward: 2,252, reverse: 2,069) 로 확인 (그림 5B).
- MAPK_CN9/13 균주의 genome size는 4,831,261 bp이며 해당 균주가 가진 CDSs의 수는 4,330개 (forward: 2,074, reverse: 2,256) 로 확인 (그림 5C).
- MAPK_JB16/15 균주의 genome size는 4,838,766 bp이며 해당 균주가 가진 CDSs의 수는 4,336개 (forward: 2,080, reverse: 2,256) 로 확인 (그림 5D).
- MAPK_JJ1/13 균주의 genome size는 4,838,649 bp이며 해당 균주가 가진 CDSs의 수는 4,337개 (forward: 2,085, reverse: 2,252) 로 확인 (그림 5E).
- 5개 MAPK 균주들 공통적으로 69.3%의 GC contents와 49개의 RNA (46 tRNA, 3 rRNA)를 갖는 것으로 확인 (그림 5, 표 7).

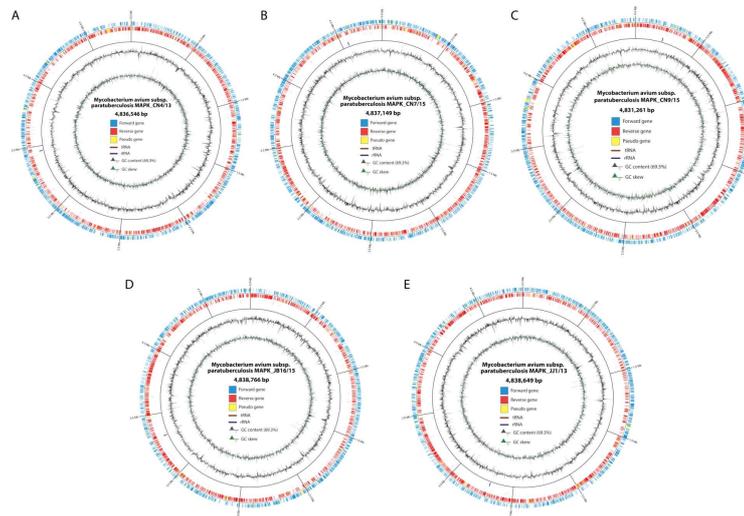


그림 5. 5개 신규 분리 MAPK 유전체 원형 표현

(3) 비교 유전체 접근 방법을 이용한 pan-genome 분석

(가) 비교 대상이 되는 MAP 및 *M. avium* 균주 유전체 염기서열 확보

- NCBI 기등록된 MAP 균주 40건, *M. avium* 균주 194건의 유전체 염기서열 확보.

(나) 5개 신규 균주를 MAP와 비교

- Genome size 대비 CDS의 수를 MAP 및 *M. avium*와 비교, MAPK의 분포를 확인 (그림 6A).
- 다른 MAP에 비하면 큰 크기의 유전체를 갖지만 적은 수의 CDS를 갖는 것으로 확인.
- 5개 MAPK 균주의 종 및 속을 계략적으로 확인하기 위해 다른 MAP들과 rRNA cluster (small subunit, large subunit, 둘 사이의 Internal Transcribed Spacer (ITS)) 전체를 활용하여 phylogenetic tree 분석을 통해 계통수 확인 (그림 6B).
- 다른 MAP들 사이에서 발견되며 동시에 그 사이의 거리가 0으로 측정되는 것으로 확인. *M. avium* subsp. *paratuberculosis*에 속하는 것으로 추정.
- 또한, MAPK 5개 균주가 한 곳에 밀집되어 나타나는 것으로 보아 서로 간에 가까운 계통임을 추가적으로 확인.

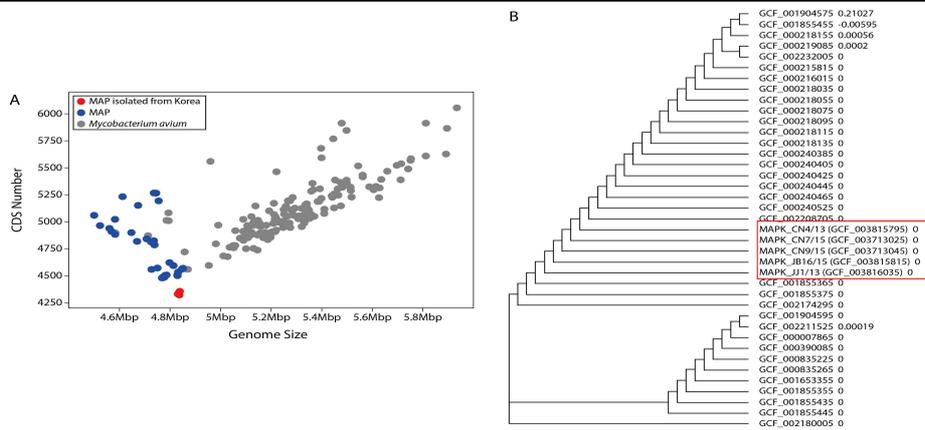


그림 6. MAP 사이에서 MAPK의 분포도 및 위치

(다) 5개 MAPK 균주 간의 pan-genome 분석

- 자체 제작한 알고리즘과 Bacterial Pan Genome Analysis pipeline (BPGA) 프로그램을 이용하여 MAPK 균주 5건의 pan-genome 분석 (그림 7).
- 비교 유전체 분석 결과 MAPK 5개 균주가 가진 유전자 (pan-genome)의 수는 4,344개로 확인되었음.
- 5개 MAPK 균주들의 core-genome은 4,195개로 확인되었으며 동시에 accessory-, unique-genome은 138개, 11개로 확인되었음.
- 해당 분석 결과 MAPK 간의 보존 정도가 상당히 높음을 확인.

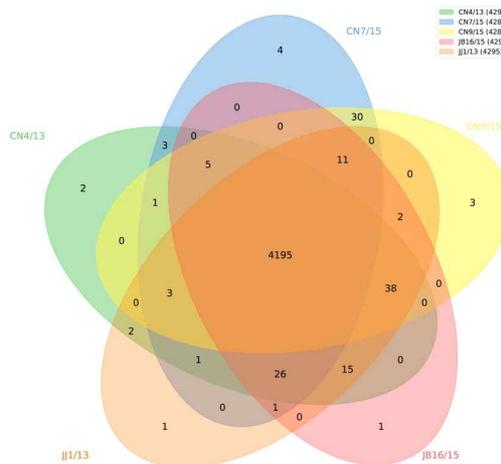


그림 7. MAPK 사이의 비교 유전체 분석 결과

(라) MAPK pan-genome의 기능 유전체 분석

- 비교 유전체 분석 결과 (core-, accessory-, unique-genome)를 갖고 기능 유전체 분석을 진행 (그림 8).
- NCBI Cluster of Orthologous Groups (COGs) database를 활용하여 진행.
- protein-protein align 분석을 위해 DIAMOND 프로그램을 사용.

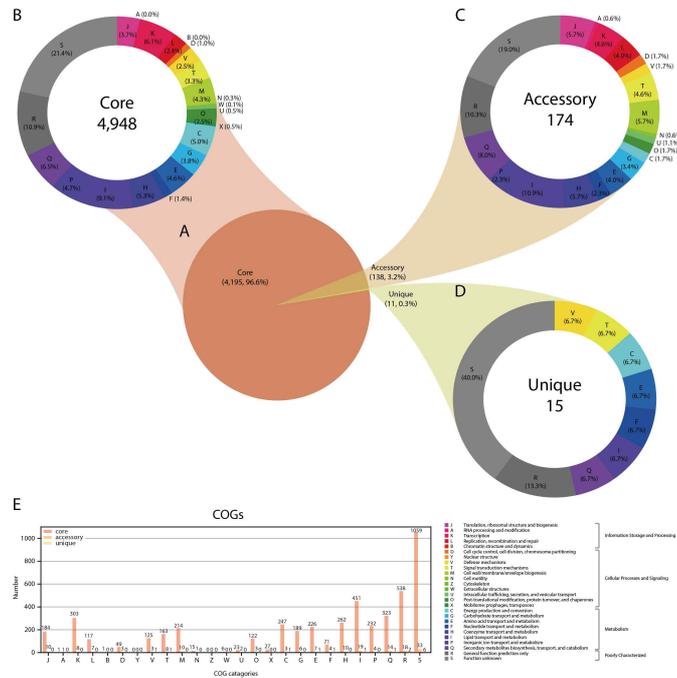


그림 8. MAPK 각 그룹에 대한 기능 유전체 분석 결과

(4) 45개 MAP 유전체 정보를 이용한 pan-genome 분석

(가) MAP 균주 40건과 MAPK 균주 5건 유전체의 pan-genome 분석

- 자체 제작한 알고리즘과 BPGA를 이용하여 MAP 균주 40건과 국내 분리주 5개 균주의 pan-genome 분석(그림 9).
- BPGA를 이용하여 MAP 균주 40건과 MAPK 5개 균주 pan-genome의 pan-core plot을 통하여 유전체 개수에 따른 pan-, core-genome의 증감 경향성을 분석(그림 9A).
- 분석하는 유전체 개수가 증가함에 따라 pan-genome 개수는 증가하지만 core-genome 개수는 감소.
- 자체 제작한 알고리즘을 이용하여 MAP 균주 40건과 MAPK 5개 균주 pan-genome의 core-, accessory-, unique-genome의 비율을 분석(그림 9B).
- 분석 결과 MAP 균주 40건과 MAPK 5개 균주 pan-genome의 유전자 수는 4,545개로 확인.
- 그중 core-genome이 2,196개, accessory-genome이 2,264개, unique-genome이 85개로 확인.

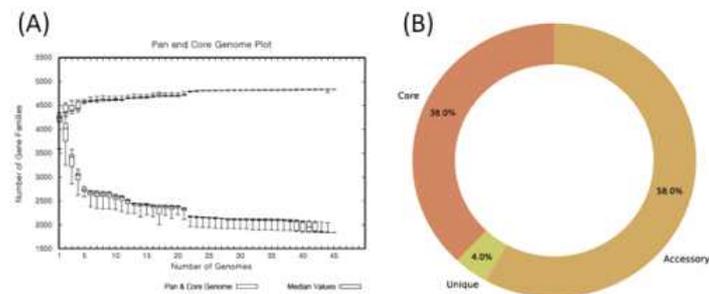


그림 9. MAP 45개 균주 pan-genome 분석 결과

(나) MAP 균주 40건과 MAPK 균주 5건 유전체에 대한 기능 유전체 분석

- MAPK 5개 균주에 대한 기능 유전체 분석 방법과 동일한 방법 사용.
- 각 core-, accessory-, unique-genome에 속한 유전자들 COGs의 분포 및 개수는 (그림 10)과 같음.

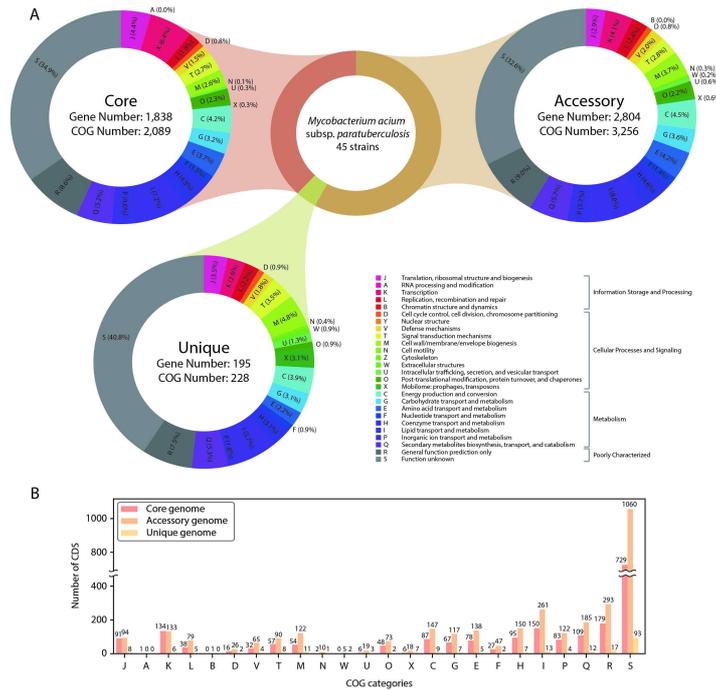


그림 10. MAP 45개 균주 기능 유전체 분석 결과

(5) *M. avium* 199개 대상 pan-genome 및 COG 분석

(가) *M. avium* 균주 199건 유전체의 pan-genome 분석

- 요네병을 일으키는 MAP 특이 유전자 및 MAP 검출을 위한 바이오 마커 발굴을 위해 MAP 균주 40건 및 MAPK 5개 균주를 포함하는 *M. avium* 균주 총 199건에 대해서 위와 같은 분석 수행.
- 자체 제작한 알고리즘과 BPGA를 이용한 pan-genome 분석(그림 11).
- BPGA를 이용한 *M. avium* 균주 199건의 유전체 개수에 따른 pan-core의 증감 경향성 분석(그림 11A).
- MAP 분석과 동일하게 유전체 개수가 증가함에 따라 pan-genome 개수는 증가하지만 core-genome 개수는 감소.
- 자체 제작한 알고리즘을 이용하여 *M. avium* 균주 190건의 core-, accessory-, unique-genome의 비율을 분석(그림 11B).
- 분석 결과 *M. avium* 균주 199개 균주 pan-genome의 총 유전자 수는 11,699개로 확인.
- 그 중 core-genome이 667개, accessory-genome이 7,622개, unique-genome이 3,410개로 확인.
- Mycobacterium 내에서 *M. avium* 균주들의 분포를 보기 위해 산포도 분석 (그림 11C).
- BPGA 분석 결과 *M. avium* 199건의 phylogenetic tree 상에서 MAPK의 위치는 (그림 11D)과 같음.
- 균주의 수를 늘렸음에도 서로 간에 밀집되어 있음을 확인 가능함.

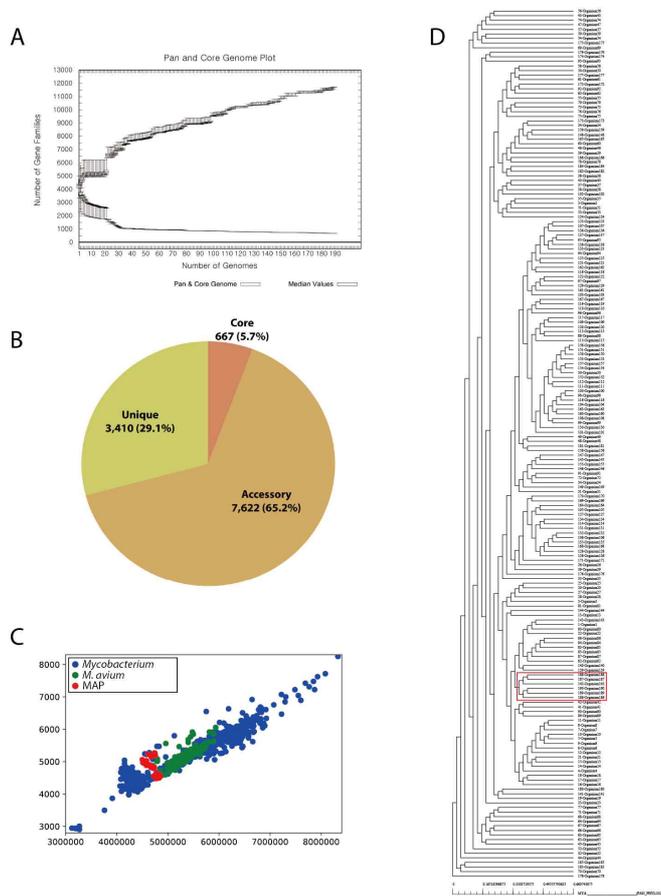


그림 11. *M. avium* 199개 균주 pan-genome 분석 결과

(나) *M. avium* 199개 유전체에 대한 기능 유전체 분석

- 위에서 수행했던 기능 유전체 분석 방법과 동일한 방법 사용.
- 각 core-, accessory-, unique-genome에 속한 유전자들 COGs의 분포 및 개수는 (그림 12)와 같음.

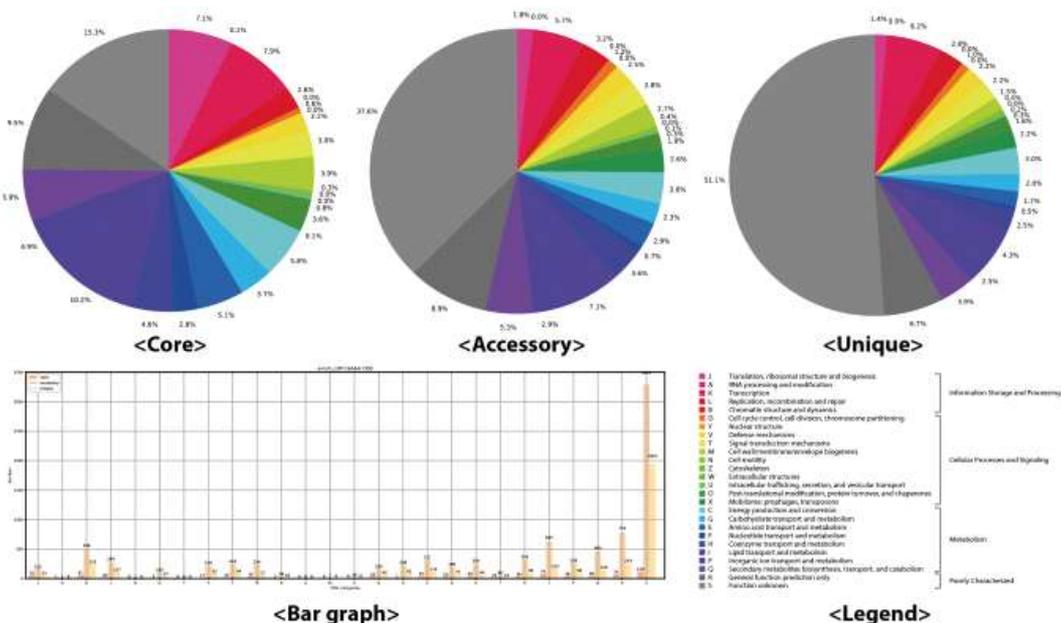


그림 12. *M. avium* 199개 균주 기능 유전체 분석 결과

(6) 비교유전체정보 기반 바이오마커 개발

(가) MAP 특이 유전자 발굴

- Pan-genome 분석 결과 세부 조사

1차년도에서 분석한 pan-genome 분석 내용을 기반으로 MAP 균주들에서만 공통적으로 발견되는 accessory-genome을 분석하여 바이오마커로 활용한다. 이에 해당하는 후보 유전자들은 총 68개가 발견되었다. 정확도와 범용성을 확보하기 위해 후보 유전자 중 단순 Open Reading Frame(ORF)로 예측된 것이 아닌, 기능이 예측된 유전자를 이용하기로 하였다. 또한, 이중 검정을 위해 NCBI의 web BLAST를 한번 더 활용하여 해당 유전자가 실질적으로 MAP 특이 유전자인지 확인하였다. 그 결과, 아쉽게도 MAP 특이 유전자는 찾을 수 없었다. *M. avium* 내에 특이적으로 보였으나 다른 genus 혹은 species에서 발견되었기 때문이다.

하지만, 특정 유전자에서 바이오마커로 개발할 수 있는 서열들을 발견하였다. 유전자 전체가 특이적이지는 않지만, 특정 부분이 MAP 특이적인 것으로 확인되었기 때문이다. 한 유전자는 모든 MAP에서 공통적으로 확인된 서열이었으며, 다른 한 유전자는 MAP의 type(S-, C-, B-)에 따른 서열 차이를 보였다.

- MAP 특이 유전자 서열을 통한 감염 진단 바이오마커 개발

GAP family protine으로 예측된 단백질은 (그림 13A)의 빨간 박스에 해당하는 서열이 MAP 특이적으로 형성되어 있다. 해당 단백질을 전사하는 유전자의 서열은 (그림 13B)의 빨간 박스에 해당한다. 해당 부분을 각각 forward와 reverse 프라이머 부분으로 설계하여 실험을 진행하였다.

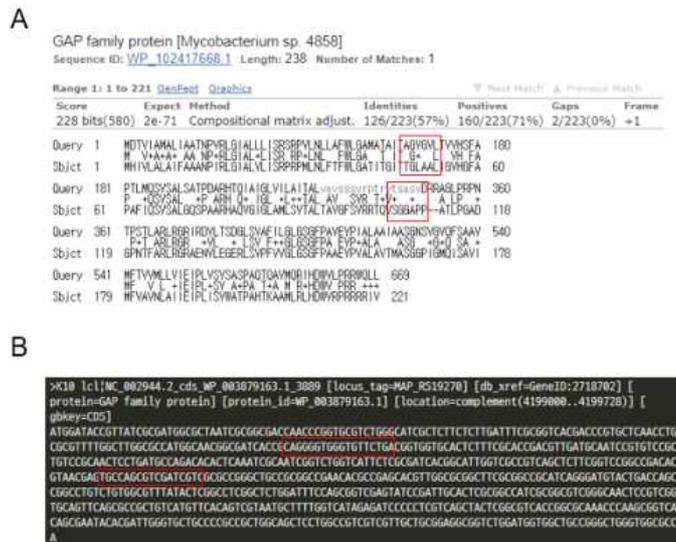


그림 13. GAP family protein의 단백질 및 유전자 서열

- Real-Time PCR용 프라이머 제작

Real-Time PCR로 GAP family protein 유전자의 MAP 특이 서열을 이용한 감염을 확인하기 위한 프라이머를 제작하였다. Forward 프라이머의 서열은 'CAG GGG TGG GTG TTC TGA' 이고, Reverse 프라이머의 서열은 'ACG ATC GAC GCT GGC A'이다.

- 제작한 프라이머를 통한 Real-Time PCR 실험 예상도

MAP에서만 발견되는 특이적 유전자 서열을 이용한 PCR 실험이므로, MAP 균주들에서만 증폭이 확인되고 다른 균주에서는 증폭이 감지되어서는 안된다.

- Real-Time PCR 실험 조건

모든 PCR 실험은 20 uI가 되도록 만들어서 진행한다. 총합 20 uI의 용액에 20 pg의 DNA, 10 uI의 2X THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix, 각각 1 pg의 프라이머가 포함되도록 섞어준다. PCR 실험의 조건은 95°C에서 3분간 초기 denature, 이후 95°C에서 30초간 denature, 54°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 elongation의 과정을 40번 반복한다. 실험은 Applied Biosystems QuantStudio 3 Real Time PCR systems을 이용하여 진행되었으며, 96 well plate의 구성은 한 샘플당 3개의 프라이머, 한 프라이머 당 3번 반복실험으로 구성하였다. 실험에 사용된 MAP들은 국내목장에서 분리한 여러 균주 중, B-type이 4개, C-type이 4개 균주들이 이용되었다. Non-MAP 균주들로는 *Mycobacterium*에는 속하지만 다른 species로 구분된 균주 22개를 이용하였다.

- Real-Time PCR 실험 결과

PCR 실험 결과, 모든 샘플에서 성공적인 실험결과를 얻을 수 있었다. MAP 균주들은 type에 상관없이 증폭이 잘 확인되었으며(그림 14, 15), Non-MAP 균주들에서는 증폭이 감지되지 않았다(그림 16).

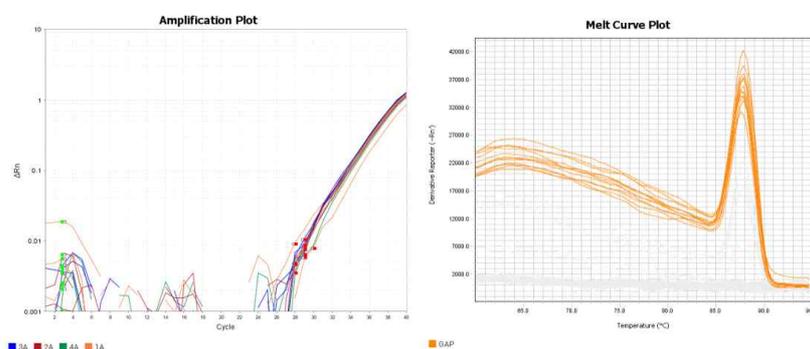


그림 14. C-type MAP 균주들(4) PCR 실험 결과

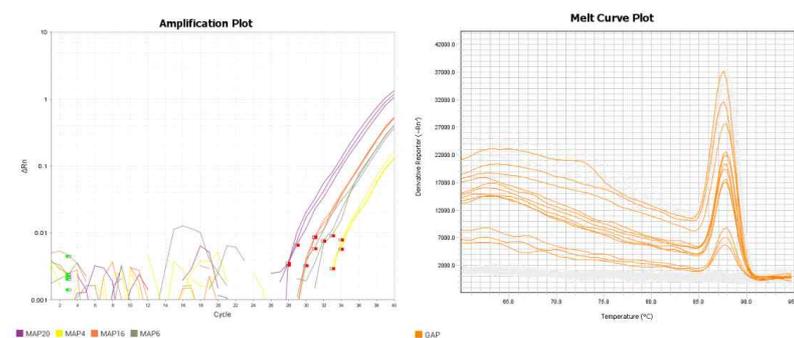


그림 15. B-type MAP 균주들(4) PCR 실험 결과

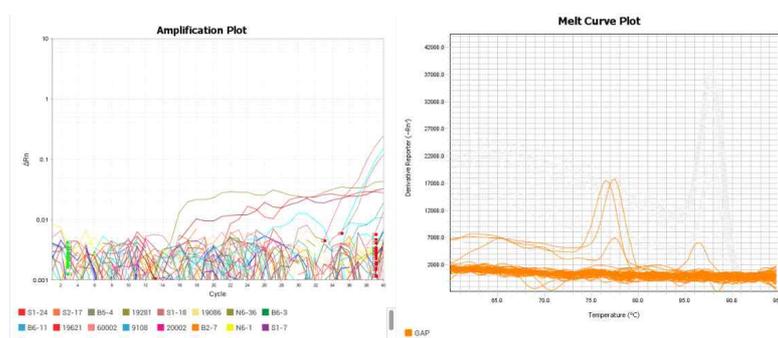


그림 16. Non-MAP 균주들(22) PCR 실험 결과

- Real-Time PCR 실험 조건

모든 PCR 실험은 20 u1가 되도록 만들어서 진행한다. 총합 20 u1의 용액에 200 pg의 DNA, 10 u1의 2X THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix, 각각 1 pg의 프라이머가 포함되도록 섞어준다. PCR 실험의 조건은 95°C에서 3분간 초기 denature, 이후 95°C에서 30초간 denature, 60°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 40초간 elongation의 과정을 40번 반복한다. 실험은 Applied Biosystems QuantStudio 3 Real Time PCR systems을 이용하여 진행되었으며, 96 well plate의 구성은 한 샘플당 3개의 프라이머, 한 프라이머 당 3번 반복실험으로 구성하였다. 실험에 사용된 MAP들은 국내목장에서 분리한 여러 균주 중, B-type이 5개, C-type이 5개 균주들이 이용되었다. S-type의 균주는 국내분리주 중에 부재 및 확보하지 못하였다. 하지만 MAA 101과 MAH 104가 MAP는 아니지만 해당 유전자가 S-type의 형태를 보이기 때문에 S-type 대응으로 활용하기로 하였다.

- Real-Time PCR 실험 결과

PCR 실험 결과, 모든 샘플에서 (그림 18)과 같이 기대했던 결과가 도출되었다. B-type의 균주들(그림 19-23)은 RS, RC, RB, 세 쌍의 프라이머 모두 동시에 증폭됨을 확인하였다.

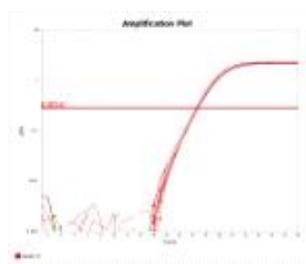


그림 19. MAP 12 (B-type) PCR 실험 결과

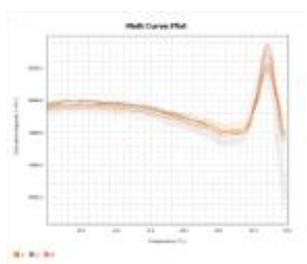


그림 20. MAP 13 (B-type) PCR 실험 결과

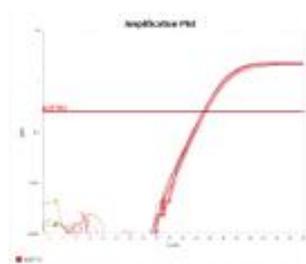


그림 21. MAP 15 (B-type) PCR 실험 결과

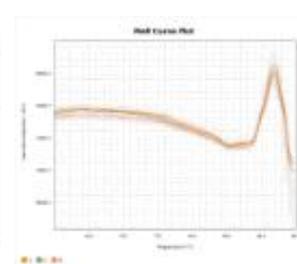


그림 22. MAP 17 (B-type) PCR 실험 결과

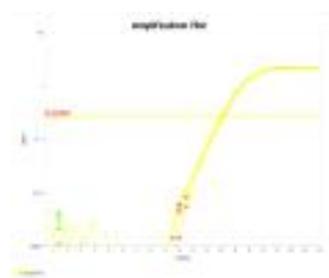
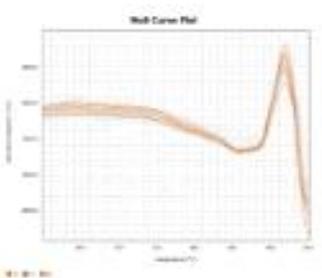


그림 23. MAP 18 (B-type) PCR 실험 결과



C-type의 균주들(그림 24-28)은 RS와 RC 프라이머가 먼저, 그 후에 RB 프라이머가 증폭됨을 확인하였다.

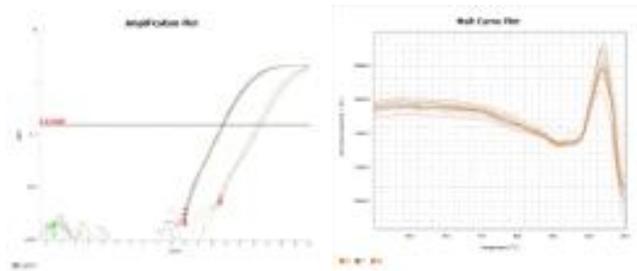


그림 24. MAP 9 (C-type) PCR 실험 결과

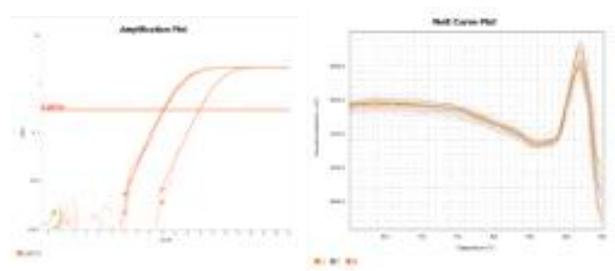


그림 25. MAP 25 (C-type) PCR 실험 결과

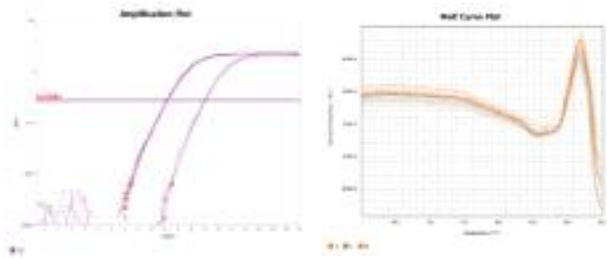


그림 26. MAP Q2 (C-type) PCR 실험 결과

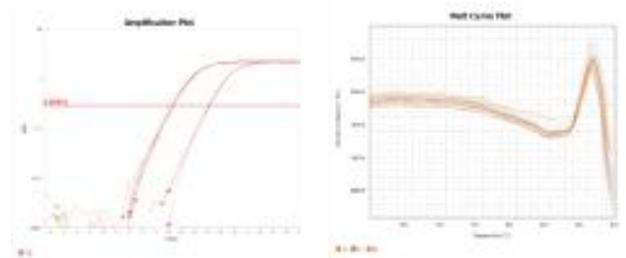


그림 27. MAP Q5 (C-type) PCR 실험 결과

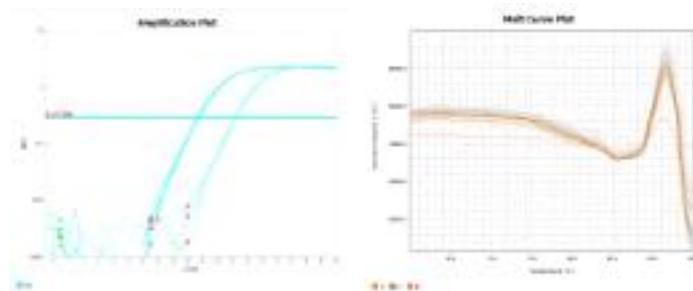


그림 28. MAP Q6 (C-type) PCR 실험 결과

S-type 대응으로 사용한 균주들(그림 29, 30)은 RS 프라이머만 먼저, 뒤이어 RC와 RB 프라이머가 증폭됨을 확인하였다.

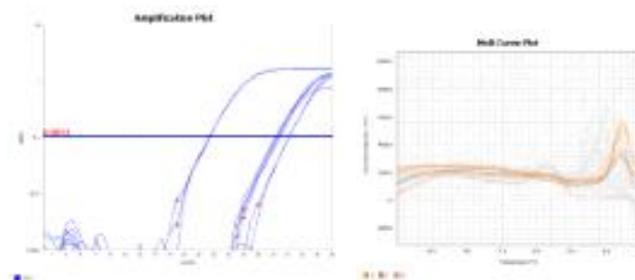


그림 29. MAA 101 (S-type 대응) PCR 실험 결과

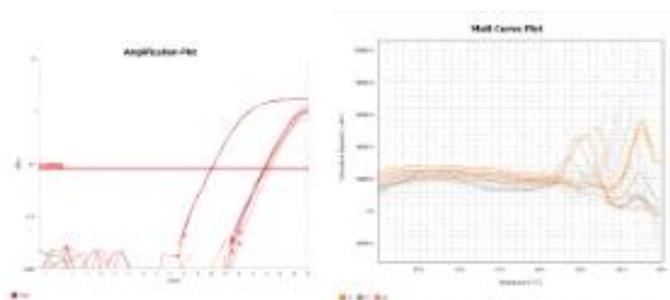


그림 30. MAH 104 (S-type 대응) PCR 실험 결과

다. MAP의 특성 및 주요 병원성 유전자 규명

(1) 비교유전체학 분석을 통한 국내분리주의 특성 분석

(가) Pan-genome 분석 데이터 업데이트

- 기존 과제에서 분석에 사용된 데이터들이 분석 이후 업데이트 되었다. 이로 인해 업데이트 된 데이터로 새로 분석을 진행하였다. 새로 진행하는 분석에서 좀 더 정확한 결과를 얻기 위해서 NCBI에 등록된 MAP 균주들 중 퀄리티가 좋은 40개만 뽑아서 분석하였다 (표 9). 그 외 분석 방법 및 과정은 기존 과제와 동일하게 진행하였다.

표 9. 새로운 분석에 사용된 MAP 균주 40개

Strain	Genome length	Genome coverage	Contigs	GC contents	CDS	Isolation country	Type
K-10	4,829,781	-	1	69.3	4,708	USA	C
MAPK_CN4	4,836,546	84.0	1	69.3	4,703	South Korea	B
MAPK_CN7	4,837,149	137.0	1	69.3	4,721	South Korea	C
MAPK_CN9	4,831,261	102.0	1	69.3	4,705	South Korea	C
MAPK_JB16	4,838,766	120.0	1	69.3	4,701	South Korea	B
MAPK_JJ1	4,838,649	107.0	1	69.3	4,703	South Korea	B
E1	4,781,002	653.1	1	69.3	4,751	Egypt	2
E93	4,786,065	782.5	1	69.3	4,732	Egypt	2
FDAARGOS	4,832,268	383.0	1	69.3	4,708	USA	-
JII-1961	4,829,728	37.0	1	69.3	4,697	Germany	C
TANUVAS	4,829,781	30.0	1	69.3	4,703	India	-
MAP4	4,829,424	18.0	1	69.3	4,702	-	C
4B	4,738,595	68.7	479	69.1	4,994	-	2
DT 3	4,725,169	65.1	531	69.1	5,037	-	2
Env 210	4,736,143	64.1	538	69.2	5,066	-	2
JTC 1281	4,755,085	42.9	1,030	69.2	5,476	-	2
JTC 1285	4,745,157	55.5	1,115	69.2	5,545	-	2
Pt139	4,647,327	100.0	752	69.1	5,145	Australia	2
Pt144	4,582,918	366.0	838	69.0	5,153	Australia	2
Pt145	4,568,858	370.0	916	69.0	5,178	Australia	2
Pt146	4,582,551	100.0	955	69.0	5,296	Australia	2
Pt154	4,500,072	100.0	1,077	68.9	5,350	Australia	2
Pt155	4,560,778	370.0	957	69.0	5,210	Australia	2
Pt164	4,669,710	70.0	592	69.2	5,038	Australia	2
NL 89C	4,777,365	1000.0	98	69.3	4,698	Canada	-
NL 93B	4,768,495	1000.0	90	69.3	4,699	Canada	-
NL 95A	4,776,830	1000.0	94	69.3	4,699	Canada	-
NL 95B	4,772,864	1000.0	90	69.3	4,689	Canada	-
NL 95E	4,774,273	1000.0	97	69.3	4,712	Canada	-
NL 96E	4,771,797	1000.0	90	69.3	4,692	Canada	-
2015WD-1	4,750,273	200.0	259	69.3	4,836	China	C
2015WD-2	4,727,050	150.0	240	69.3	4,798	China	C
A3	4,847,731	230.0	51	69.3	4,825	Portugal	C
C4A4	4,851,414	180.0	58	69.3	4,820	Portugal	C
CLIJ623	4,523,318	50.0	915	69.0	5,198	Australia	2
CLIJ644	4,707,985	100.0	636	69.2	5,088	Australia	2
CLIJ361	4,612,386	100.0	1,147	69.0	5,524	Australia	1
Telford	4,907,428	80.0	1	69.2	4,812	Australia	S
JIII-386	4,850,274	1500.0	6	69.0	4,779	Germany	S
S397	4,813,711	24.0	176	69.3	4,825	USA	S

(나) 새로운 바이오마커 발굴

- Whole Genome Sequence (WGS) 데이터 전체 비교:

새로 분석을 진행하면서 기존 분석에 추가적으로 국내주와 표준주의 전체 genome을 비교해 보았다. 해당 분석은 Mauve 라는 프로그램을 이용하였으며 각 genome들 간의 Single Nucleotide Polymorphism (SNP)나 gap을 찾을 수 있는 분석 프로그램이다. 국내주 혹은 특정 그룹에만 존재하는 특징을 찾는다면 이를 바이오마커로 활용할 수 있을것으로 기대된다.

- 표준주 대비 국내주에 존재하는 large gaps:

Mauve를 이용하여 국내주 및 표준주의 WGS 전체를 비교해본 결과, 국내주에서만 관찰되는 gap들을 발견할 수 있었다(그림 31). 다양한 크기의 여러가지 gap들 중에서 1 Kb 이상이 되는 gap은 3개로 확인되었고 해당 gap들의 크기는 각각 1,452 bp, 2,026 bp, 6,204 bp로 확인되었다.

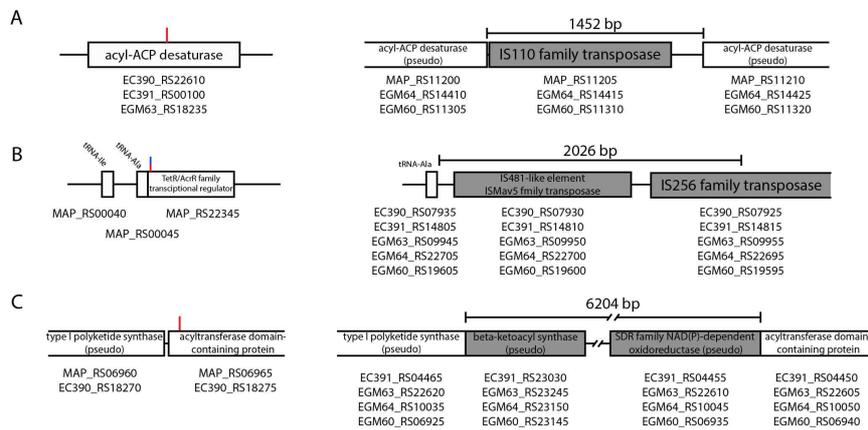


그림 31. 국내주에서 발견된 3개의 large gaps

이번 분석에서 발견한 gap들의 염기서열은 Insertion Sequence (IS)와 유사하였으며 해당 gap 부분에는 transposase 단백질이 위치하였다. 또한 gap들이 위치한 주변의 유전자들은 IS와 transposase의 genetic translocation에 의해 psuedogene으로 변화된 경우도 발견되었다.

- 새로운 Tandem repeat 후보 발견:

Mauve를 이용해 발견한 gap들 중 일부는 tandem repeat (TR)으로 보이는 것들이 관찰되었다. 그 중 5개의 gap들이 TR임을 확인하였고 이는 새로운 마커로 사용 가능할 것으로 보인다 (그림 32, 표 10).

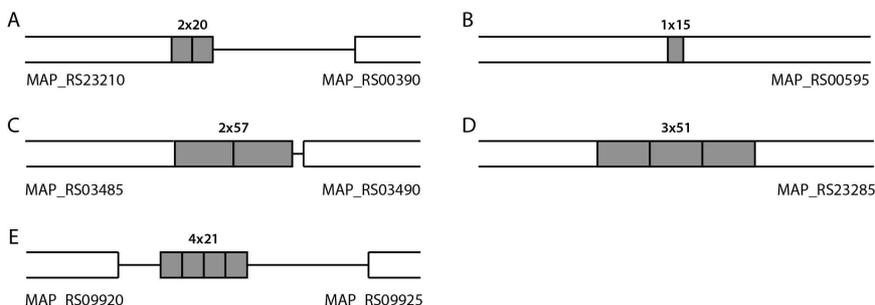


그림 32. 새롭게 발견한 5개 Tandem repeat (K-10 기준)

표 10. 새롭게 발견한 5개 Tandem repeat 위치 및 서열 정보 (K-10 기준)

Name of TR	Position of TR on K-10 genome		Length (bp)	Sequence information
	Start	End		
MAPK_TR_1	83,156	83,195	20	AATTAACGATATCGAATTG
MAPK_TR_2	127,386	127,400	15	CCGCCGACCAGCTCT
MAPK_TR_3	703,849	703,948	57	ACGACCATTAAACAAGGAGTGATCGCGAGCGCGGGCGAAGCCCGG GTGAAGCGGGTC
MAPK_TR_4	1,798,372	1,798,524	51	CCCGGCGGGCGGTGGCAGCATCCCCGGTGGCCCGACCGGTGGC GGCGGC
MAPK_TR_5	2,156,149	2,156,235	21	CGCCGCGCCCGTCGAGCGTCA

- 새로운 TR을 이용한 *in silico* typing:

위에서 새로 발견한 5개의 TR을 이용하여 국내주와 표준주를 포함한 complete genome 13개를 대상으로 *in silico* typing을 수행하였다 (표 11). 새로운 5개의 TR을 사용하여 13개 genome들의 discriminatory index (DI) 값을 계산해본 결과 0.795로 기존에 사용하는 8개의 MIRU-VNTR을 이용하면 나오는 0.628보다 높은 값을 보였다. 추가로 기존의 MIRU-VNTR과 새로운 TR을 합쳐 13개의 TR을 같이 이용하면 DI 값은 0.872로 상승하였으며 이는 새로운 TR의 활용 가능성을 보여주는 결과로 사료된다.

추후 새로 발견한 TR을 확인하는 실험적 방법을 설계하여 해당 TR들이 새로운 바이오마커로 활용할 수 있는지 확인할 예정이다.

표 11. 새롭게 발견한 5개 Tandem repeat을 이용한 typing 결과

Genome name	MAPK_TR_1	MAPK_TR_2	MAPK_TR_3	MAPK_TR_4	MAPK_TR_5	Type
Telford	1	1	1	1	2	S
MAPK_JB16	1	1	3	3	3	B
MAPK_JJ1	1	1	3	3	3	B
MAPK_CN4	1	2	3	3	3	B
MAPK_CN7	2	1	2	2	3	C
MAPK_CN9	2	1	1	3	3	C
K-10	2	1	2	3	4	C
MAP4	2	1	2	3	3	C
E1	2	1	2	3	4	C
E93	2	1	2	3	4	C
FDAARGOS	2	1	2	3	4	C
JII-1961	2	1	2	3	4	C
RANUVAS	2	1	2	3	4	C

2. 병원체-숙주 상호작용체 (interactome) 분석을 통한 발병기 전 규명

가. Co-culture system을 이용한 MAP 감염 초기의 *in vitro* 모델 구축

(1) Transwell을 이용한 co-culture system 구축 (Approval no. SNUIBC-R190109-1)

- 기존 요네병 연구에서 사용된 co-culture 모델은 epithelial cells와 함께 MDMs을 활용하여 감염 초기 epithelial processing에 초점을 맞춘 모델이었으나, 본 연구에서 사용된 모델은 collagen을 세포외기질로 활용하여 epithelial cells와 함께 PBMCs를 사용함으로써 균의 epithelial processing 이후 대식세포에서 MAP의 생존기전과 같은 숙주-병원체 상호작용을 효과적으로 관찰할 수 있도록 설계함(그림 33).

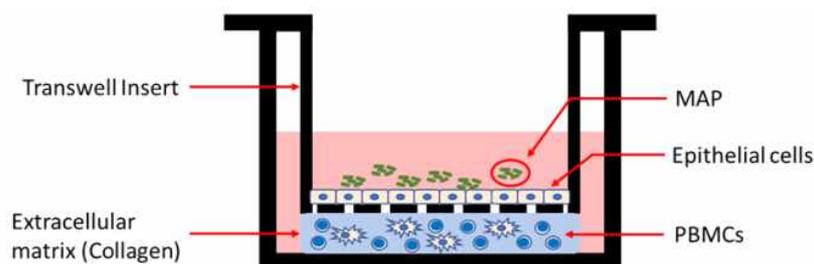


그림 33. Extracellular matrix(Collagen) 이용한 MDBK와 PBMCs의 co-culture 모델 구축

(2) Co-culture system에서 MAP 감염 시 감염 초기 면역반응 분석

- Co-culture system에서 MAP 감염에 시 감염 초기 숙주세포 면역반응의 변화를 관찰함. MAP 감염 후 0시간에서 120시간까지 시간의 변화에 따른 cytokine 유전자 발현 변화를 분석함.
- MAP 감염 시간별 MDBK 주요 cytokine 발현 변화 측정 결과, IFN- γ 발현은 72시간까지 test 그룹에서 control 그룹에 비해 유의적으로 높은 수준을 유지하였으며 72시간에서 가장 발현 정도가 높았음. 염증성 cytokine인 IL-1 β 는 감염 6시간 이후부터 전 시간대에서 test 그룹이 control 그룹에 비해 발현 정도가 유의적으로 높았으며 72시간 까지 비슷한 수준으로 유지됨. Th1 type 면역반응을 대표하는 cytokine인 IL-12는 감염 후 12시간과 24시간 샘플에서 test 그룹에서 control 그룹에 비해 유의적으로 높은 수준의 발현을 보였으며 나머지 시간대에서는 유의적인 차이가 없었음. MAP 감염 초기 특징적으로 발현되는 것으로 알려진 IL-10의 발현 수준은 감염 후 12시간 샘플에서는 test 그룹에서 control 그룹에 비해 유의적으로 높은 수준의 발현을 보였으나 72시간 후에는 오히려 control 그룹이 더 높은 수준의 발현을 나타내는 것으로 관찰됨(그림 34).

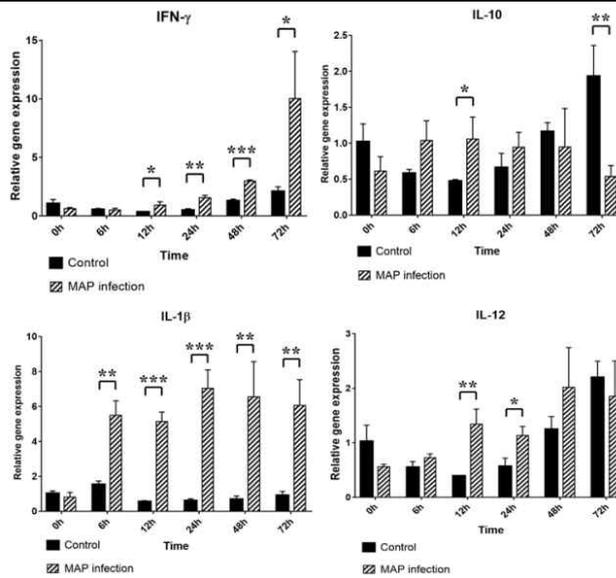


그림 34. MDBK에서 MAP 감염 시 시간대별 주요 cytokine 유전자 발현 변화

- MAP 감염 시간별 PBMCs 주요 cytokine 발현 변화 측정 결과, IFN- γ 발현은 72시간부터 test 그룹에서 control 그룹에 비해 유의적으로 높은 수준을 유지하였으며 120시간째에는 서서히 줄어드는 경향을 나타냄. 염증성 cytokine인 IL-1 β , TNF- α , IL-6는 감염 후 약 12시간부터 test 그룹에서 control 그룹에 비해 유의적으로 높게 나왔으며 시간이 지남에 따라 서서히 줄어드는 경향을 나타내었음. IL-12와 IL-10에 대한 유의적인 경향성 차이는 나타나지 않음(그림 35).

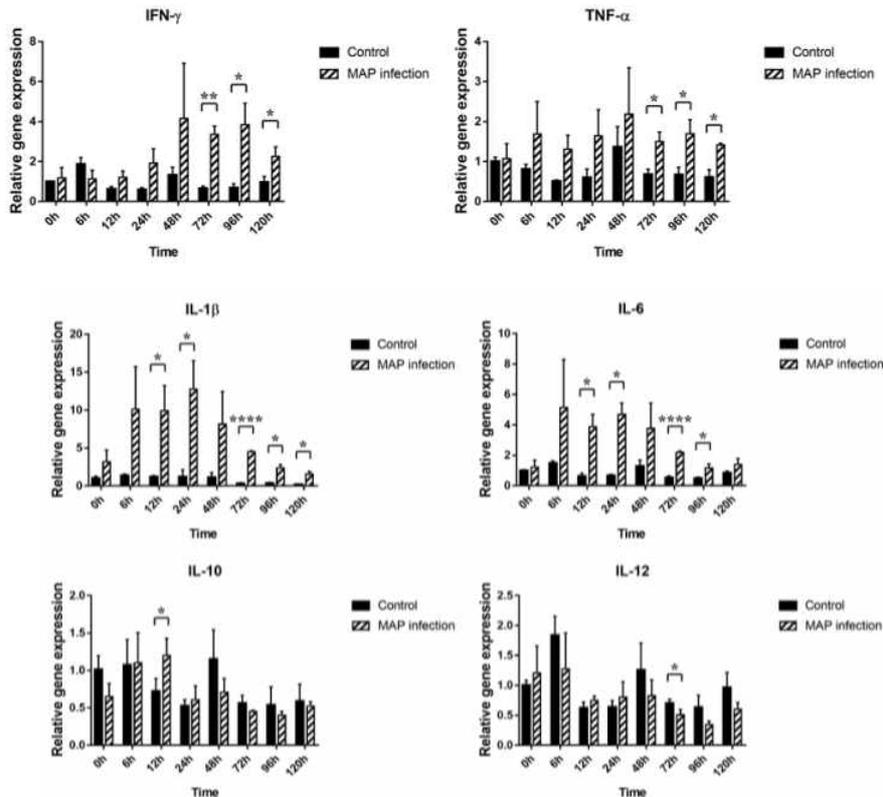


그림 35. PBMCs에서 MAP 감염 시 시간대별 cytokines 유전자 발현 변화

- MDBK와 PBMCs의 각각 감염 시간대별 total RNA 내에 존재하는 MAP의 상대적인 숫자를 확인하기 위해 IS900 gene에 대한 real-time PCR을 수행함. PCR 방식은 TaqMan 방식으로 검출 특이도를 높였으며 real-time PCR을 통한 검출 정도는 다음 그림과 같음(그림 36).

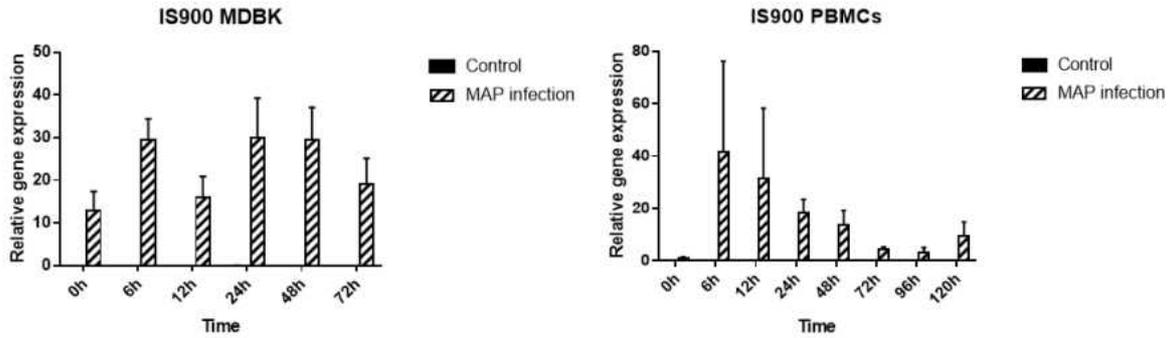


그림 36. Co-culture 모델에서 MAP 감염 시 각각의 세포 내 MAP 유전자 검출 정도 비교

- MDBK에서는 감염 6시간까지 검출정도가 증가하였고 이후 일정수준으로 유지되는 경향을 나타내었으며, PBMCs는 감염 후 6시간에 검출 정도가 가장 높았고 시간이 갈수록 점점 감소하다가 120시간 이후 다시 증가하였음. PBMCs에서 검출된 균 수와 cytokine 발현 변화를 짝지어 보면 MAP가 숙주의 innate immune response에 의해 제거되지만 일부가 살아남아 증식을 하는 것으로 생각해볼 수 있음. 120시간 이후 경향성을 확인하지 못하였으므로 이후 기간을 더 늘려서 추가적으로 분석해볼 필요가 있음.

나. Culture passage model 이용한 MAP 감염 초기의 *in vitro* model 구축

(1) Culture passage model 구축 (Approval no. SNUIBC-R190109-1)

- 감염 초기의 epithelial processing을 재현하기 위한 방법으로 *in vitro* culture passage 모델을 구축함 (그림 37). 자연숙주인 소 유래 상피세포주인 MDBK cell에 MAP를 4시간 동안 감염시킨 후 분별원심분리기법을 이용하여 live MAP를 재분리함. 이후 젯소로부터 분리한 PBMCs에 wild type MAP와 MDBK processed MAP를 각각 접종하여 24시간, 72시간, 120시간동안 감염시킨 후 total RNA를 추출함.
- 이는 1차년도에서 구축한 co-culture 모델을 보완한 것으로, MDBK cell과 PBMCs 간에 발생 가능한 allo-response를 배제할 수 있고 또한 epithelial cell에 감염된 많은 수의 MAP를 높은 효율로 재분리하여 직접 PBMC에 감염시켜줌으로써 co-culture 모델에서 단점이었던 MAP의 낮은 epithelial barrier 통과율을 극복하였음.

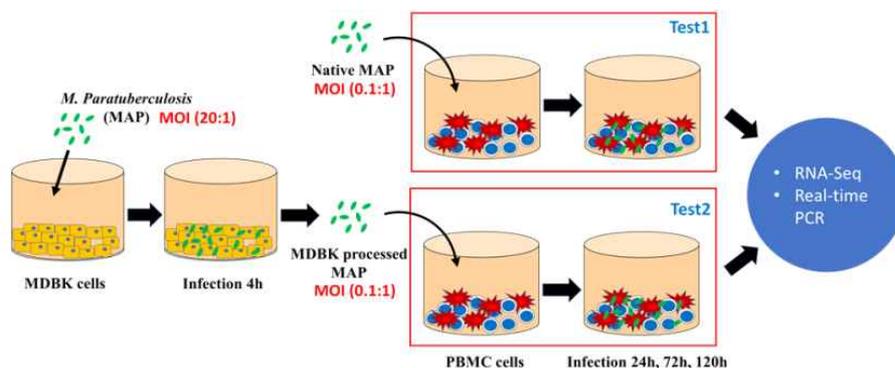


그림 37. *in vitro* culture passage model의 모식도

(2) RNA-seq 분석

- MDBK cell에서 비감염 대조군과 감염 후 4시간 샘플에서 total RNA를 확보하여 RNA-seq 분석 수행
- PBMC cell에서는 native MAP를 감염시킨 그룹(test1)과 MDBK processed MAP를 감염시킨 그룹(test2)으로부터 감염 후 24시간, 72시간 샘플에서 RNA-seq 분석 수행
- Illumina TruSeq RNA sample prep kit를 사용하여 library가 제작되었고 시퀀싱은 Illumina NovaSeq 6000을 이용하여 paired-end 형태로 수행됨.
- DEG 분석은 Cuffdiff를 이용하여 분석됨.

(3) Epithelial processing에 따른 PBMC의 RNA-seq 분석

(가) 각 비교 조합에서 fold change가 2.0 이상이고 p-value가 0.05 미만인 유전자의 개수

- 각 그룹별로 특이 발현 유전자들을 volcano plot으로 분석함 (그림 38). 각 test그룹의 시간대별 대조군 대비 증가 및 감소한 유전자들의 개수는 test1의 24시간 그룹에서는 278개의 유전자가 증가하였고 547개의 유전자가 감소함. Test2의 24시간 그룹에서는 301개의 유전자가 증가하였고 443개의 유전자가 감소하였음. Test1의 72시간 그룹에서는 298개의 유전자가 증가하였고 904개의 유전자가 감소하였음. Test2의 72시간 그룹에서는 285개의 유전자가 증가하였고 638개의 유전자가 감소하였음 (그림 39).
 - Venn diagram 분석에서 네 그룹 모두에서 공통으로 발현이 변화한 유전자는 282개로 전체 1684개의 발현이 변화한 유전자들 중 적은 부분을 차지하였으며 이는 hierarchical 분석에서 나타는 바와 같이 감염 후 24시간과 72시간에서 다른 패턴으로 발현의 변화가 나타났기 때문으로 분석됨 (그림 40). 감염 후 24시간에서는 test1 대비 유의적으로 변화한 test2의 유전자 개수가 직접 비교 시 19개 증가, 17개 감소한 것으로 나타나 유사한 유전자 발현 패턴을 보이는 것으로 나타났으며, 72시간에는 test1 대비 test2에서 증가한 유전자 218개, 감소한 유전자 45개로 나타나 감염 후 시간이 지날수록 epithelial processing에 따른 유전자 발현 차이가 나는 것으로 보임. 72시간에서 차이를 보이는 DEG는 test1에서 감소한 유전자가 test2에 비해 더 많은 것으로 나타났음.
-

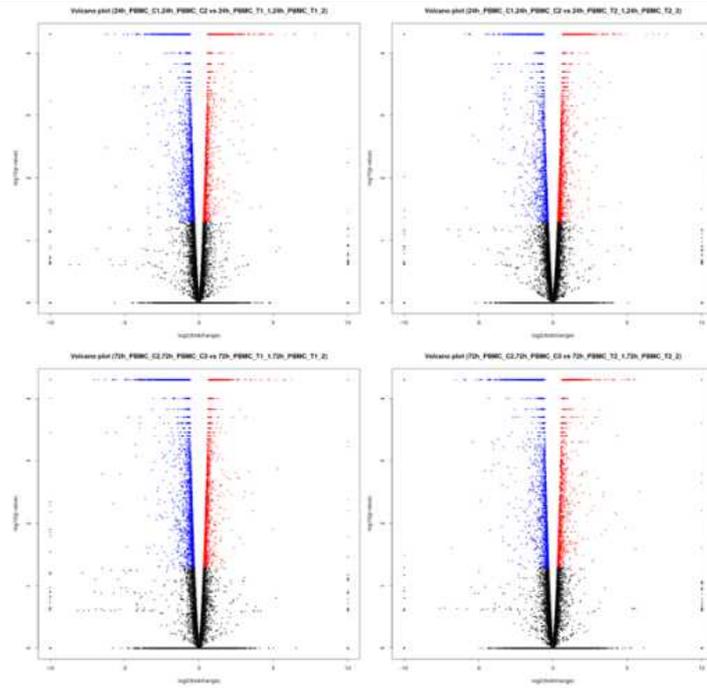


그림 38. Test1(24h, 72h)과 test2(24h, 72h)의 대조군 대비 DEG 분석 (volcano plot)

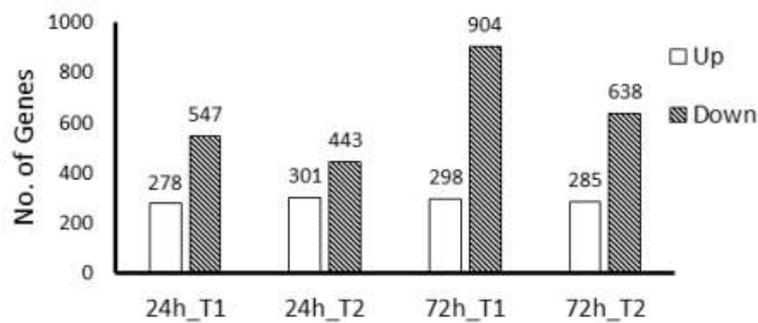


그림 39. 각 그룹의 up-regulated 및 down-regulated된 유전자의 수

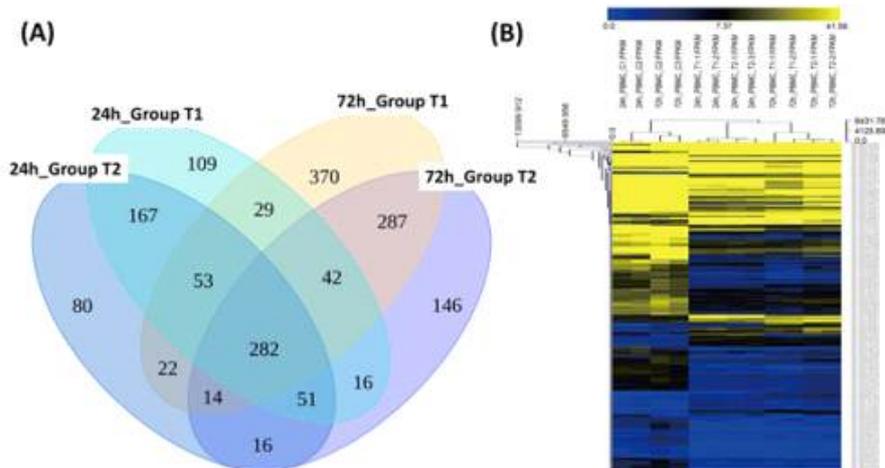


그림 40. 각 그룹의 DEG 분석결과.

(A) venn-diagram을 이용한 그룹별 DEG 수. (B) Hierarchical clustering 분석을 통한 각 그룹별 유전자발현 패턴 비교

(나) Gene ontology(GO) 분석

- 각 그룹에서 발현이 변화한 유전자들의 기능 분류를 위해 Panther classification system (<http://www.pantherdb.org/>) 이용하여 Biological functions classification을 수행함. GO term 중 'Biological Process'에 해당하는 term을 정리한 결과 네 가지 그룹 모두 cellular process와 관련된 term이 가장 높은 비율로 분류됨 (그림 41).

(다) Ingenuity Pathway Analysis

- Fold change가 2.0 이상이고 p-value가 0.05 미만인 DEG들을 대상으로 Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen, Germany) 소프트웨어를 이용하여 감염 초기 epithelial processing 및 PBMC 감염에 따른 숙주의 면역반응 및 대사 등 전반적인 유전체 발현 변화를 분석함.
- Comparison 분석을 통한 각 그룹별 유의성이 높은 canonical pathway들을 정렬하고 각각의 그룹에서 pathway activation과 suppression 패턴을 분석하였음.

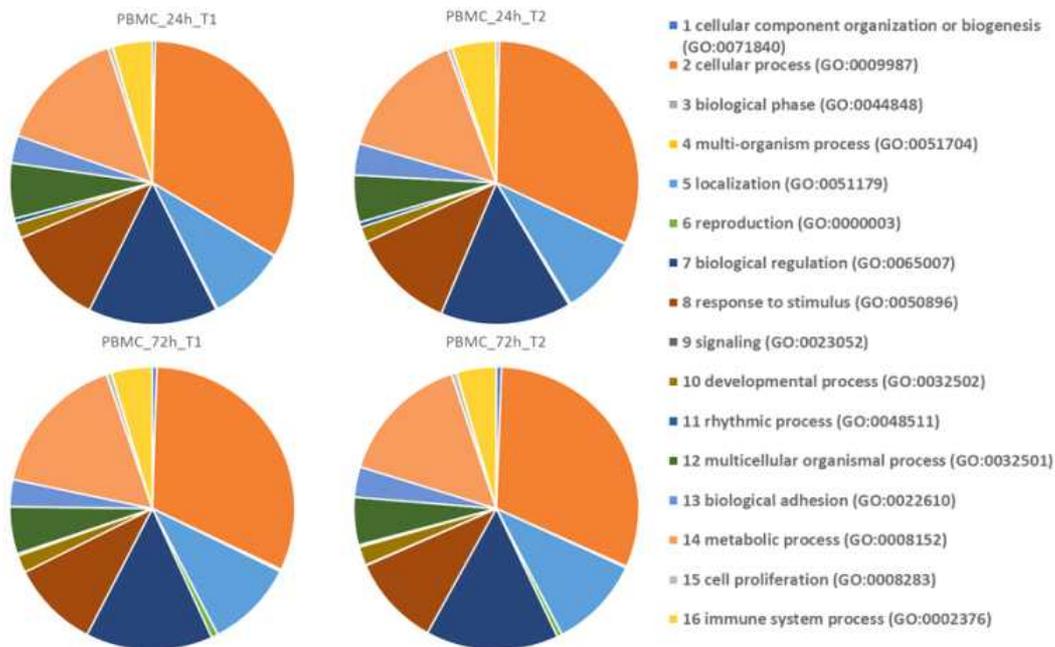


그림 41. Panther classification을 이용한 gene ontology 분석.

- P-value에 따른 유의성이 높은 canonical pathway를 정렬한 결과 'Granulocyte Adhesion and Diapedesis', 'T helper cell Differentiation', 'Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses' 순으로 나타났음 (그림 42). 이는 주로 monocyte들의 cell surface receptor와 관련된 유전자들의 변화와 관련된 canonical pathway들이 주로 확인되었으며, 또한 T cell 분화와 관련된 pathway들도 높은 유의성을 나타내었음. 특징적으로 LXR/RXR activation pathway가 높은 유의성을 나타내었음.
- Z-score에 따른 canonical pathway가 정렬되었음 (그림 43). Top 50 canonical pathway를 정리한 결과 test1, test2 그룹 모두에서 24시간에 비해 72시간에서 대체적인 down-regulation pattern들이 관찰되었음.

-
- Comparison analysis를 통해 각 그룹에서 발현이 변화된 주요 유전자들이 T cell 관련 pathway와 Cell surface receptor 관련 pathway인 것으로 확인되었음. T cell 관련 pathway들 중에서는 'IL-23 signaling pathway', 'Th17 activation pathway', 'IL-8 signaling', 'Th1 pathway' 등이 주요한 pathway로 확인되었고, cell surface receptor 관련 pathway들 중에서는 'Role of Pattern Recognition Receptors', 'TREM-1 signaling', 'Dendritic Cell Maturation', 'Complement System' 등이 확인됨.

 - T cell differentiation pathway 분석 결과 test1과 test2에서 공통적인 변화가 관찰되었으며, 감염 후 24시간에는 Th1 cell들의 활성화가 관찰되었으나 72시간에는 억제되는 패턴을 나타내었음 (그림 44). Th17 cell은 감염 전반적으로 활성화되는 패턴을 나타내었으며, IL-17A와 IL-17F cytokine gene의 real-time PCR 결과 감염 후 120시간 샘플에서 test1에 비해 test2가 유의적으로 높은 gene expression 수준을 나타냄 (그림 45). 따라서 epithelial processing에 따른 host의 특징적인 변화 중 하나는 IL-17이 감염 후 늦은 시간까지 유지되는 것임을 확인함. IL-17 cytokine은 chemokine 분비를 자극하여 면역세포들을 감염부위로 끌어오는 역할을 함. 따라서 IL-17 cytokine이 감염 후 120시간 까지 유지되는 것은 병원성 mycobacteria 감염의 특징인 육아종 형성과 관련이 있는 것으로 판단됨. 그 외에도 Treg cell의 활성화와 관련이 있는 FOXP3, ROR γ t, CTLA4와 같은 유전자들의 발현이 증가된 것이 확인되었음. 이는 phagocytic cell들의 72시간 이후 surface receptor 유전자들의 발현 감소와 관련이 있을 것으로 추측되며, 이를 통해 MAP의 감염 초기 병원성 기전은 Th17 및 Treg cell들의 활성화로 인한 육아종 형성 및 phagocytic cell maturation 억제로 인한 지속감염으로 추측해볼 수 있음.
-

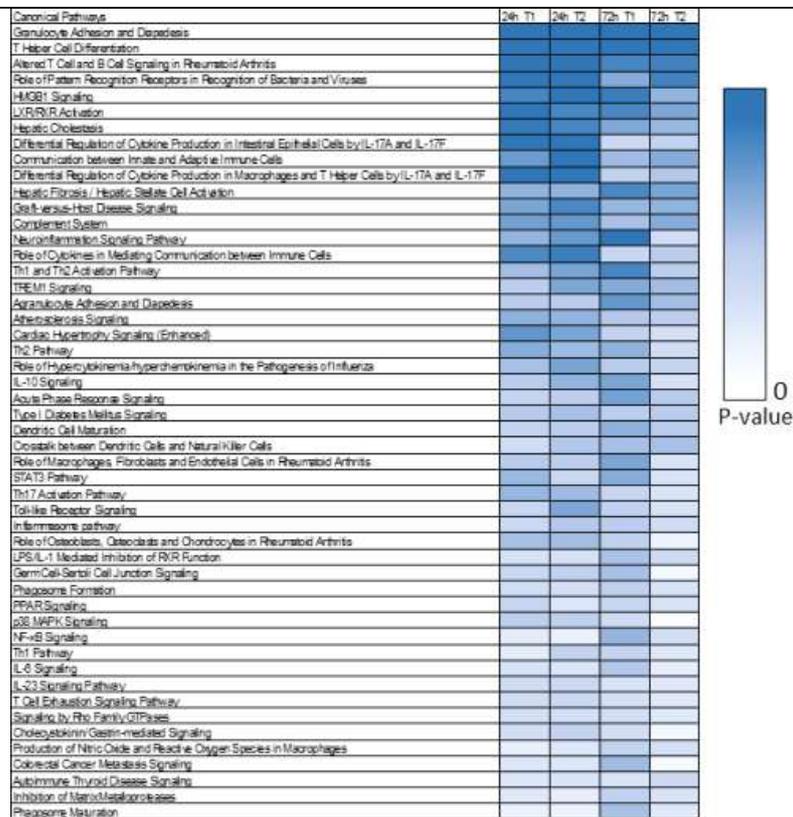


그림 42. Canonical pathway의 comparison analysis (p-value).

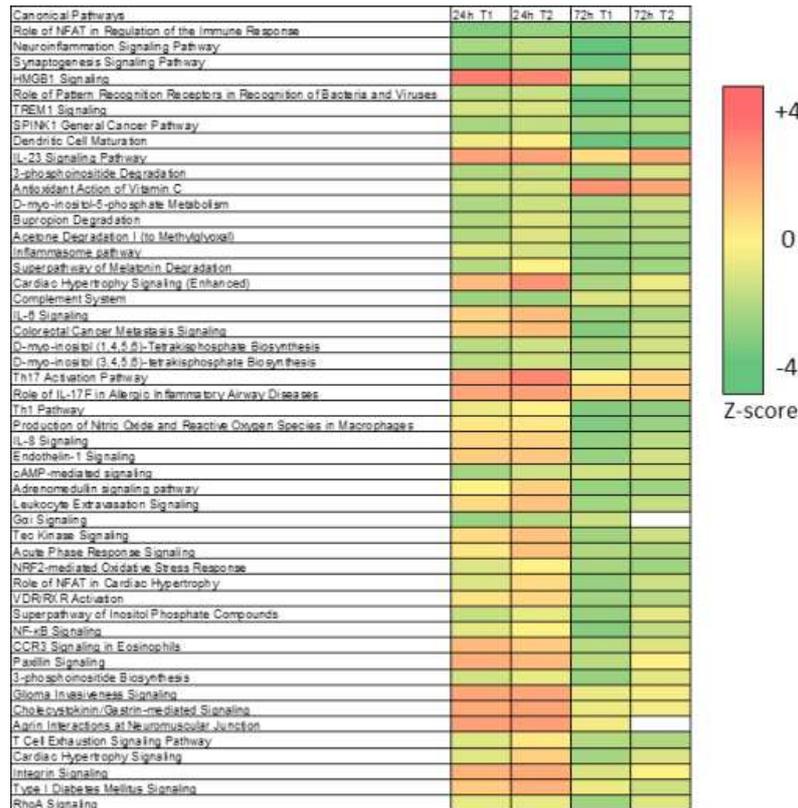


그림 43. Canonical pathway의 comparison analysis (Z-score).

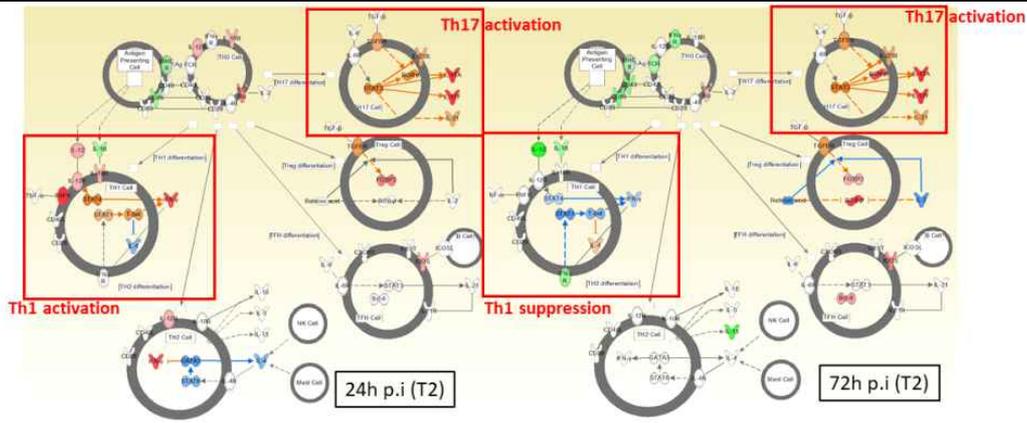


그림 44. T helper cell differentiation pattern 분석 (IPA analysis).

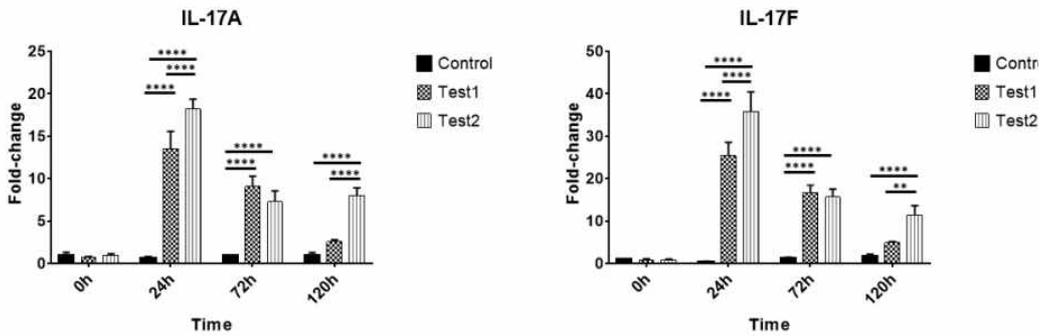


그림 45. 각 test그룹의 감염 후 24시간, 72시간, 120시간 경과에 따른 IL-17 gene real-time PCR

- 감염 후 72시간 경과 후 test1과 test2 그룹에서 보인 공통적인 변화 중 하나는 cell surface receptor 유전자들의 발현 감소임. IPA canonical pathway 분석 결과 이와 관련 있는 'TREM-1 signaling', 'Dendritic Cell Maturation' 등의 pathway들이 억제된 경향으로 나타났음 (그림 46, 47).
- TREM-1은 neutrophil이나 monocyte에서 발현되는 중요한 signaling receptor로서 전신감염에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있음. TREM-1은 스스로 염증반응을 유도하거나 TLR, NLR과 같은 다른 surface receptor 등이 유도하는 염증반응을 증폭하는 역할을 함. 따라서 TREM-1 signaling pathway의 감소는 염증반응의 억제와 관련이 있는 것으로 판단됨.
- 'Dendritic Cell Maturation pathway'와 관련된 유전자들인 TLR2/4, TREM1, TREM2, DAP12, CD40, CD86, HLA-DR 등의 유전자들이 test1과 test2에서 감염 후 72시간에서 공통적으로 발현이 감소되었음. 이를 통해 병원체를 인식하는 pattern recognition receptor들이 전반적으로 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었음. 또한 receptor protein과 상호작용 하는 down-stream 유전자들의 발현이 함께 감소된 것으로 확인되었는데, 이를 통해 phagocytic cell들의 기능이 전반적으로 억제되는 것으로 추측할 수 있음. 따라서 MAP가 host cell에 침입하면 host cell들은 TLR과 같은 surface receptor의 발현을 감소시킴으로써 과도한 염증반응이나 immunopathology로 발전되는 것을 막는 것으로 생각할 수 있으며, 반대로 MAP가 host cell 내에서 지속적으로 생존하기 위해 host cell의 활성화 switch를 끄는 것으로 생각해볼 수도 있음.

- Liver X receptor/Retinoid X receptor(LXR/RXR) pathway의 감소.

감염 후 test1과 test2 그룹에서 공통적으로 LXR/RXR pathway의 down-regulation이 관찰되었음 (그림 48). 관련된 유전자들 중 ABCA1, ABCG1, APOE, CD36, SR-A, IL-36B, CYP27A1 등의 유전자들에서 발현 감소가 관찰되었음. LXR/RXR pathway의 억제에는 cholesterol transport의 억제와 관련이 있음. LXR/RXR pathway는 down-stream 유전자인 ABCA1, ABCG1, APOE 등의 유전자 발현을 조절함. ABCA1, ABCG1, APOE는 cholesterol efflux 역할을 하는 transporter로 해당 유전자들의 발현 감소는 cholesterol의 host cell 내 축적과 관련이 있을 것으로 생각됨. Cholesterol은 pathgenic mycobacteria의 macrophage 내 생존에 필수적인 탄소원이기 때문에, 해당 결과를 통해 MAP가 해당 pathway를 억제시킴으로써 cholesterol의 축적을 조절하는 것으로 추측할 수 있음. LXR signaling은 또한 cholesterol의 생합성을 조절하는 역할을 하기 때문에 해당 signaling의 억제가 host cell의 cholesterol 대사에도 관련이 있음. 결론적으로 MAP가 LXR/RXR signaling pathway를 억제시킴으로써 자신의 생존에 필요한 cholesterol을 숙주세포로부터 축적한다는 가설을 확립할 수 있음 (그림 48).

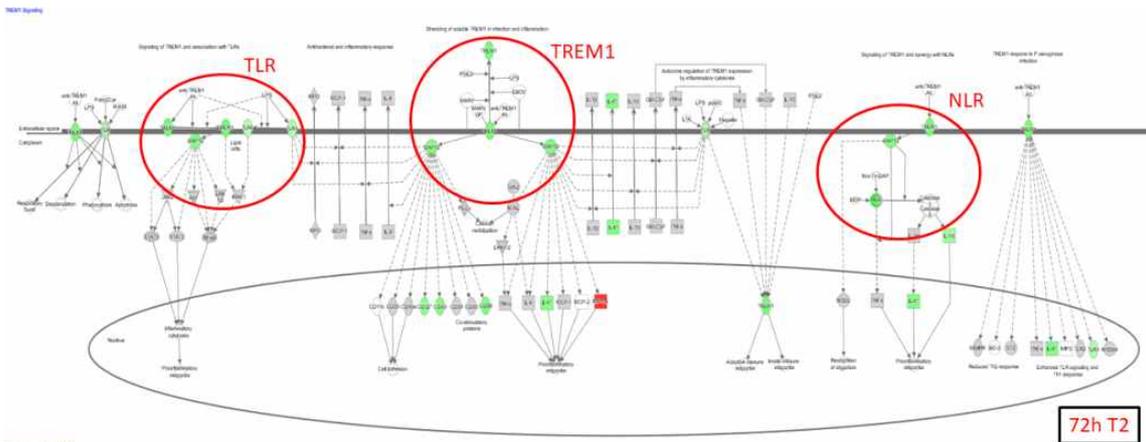


그림 46. TREM-1 signaling pathway

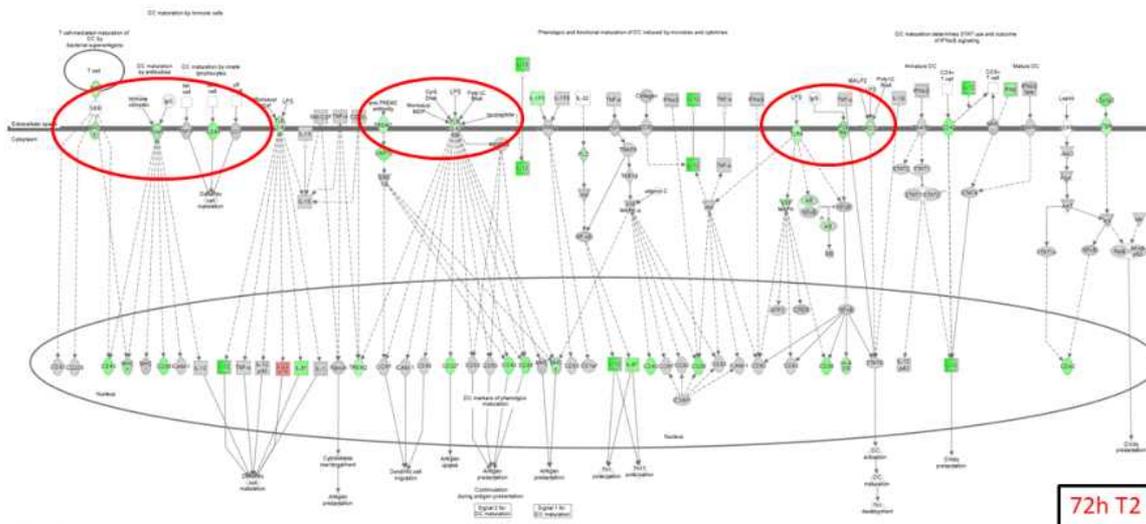


그림 47. Dendritic maturation pathway

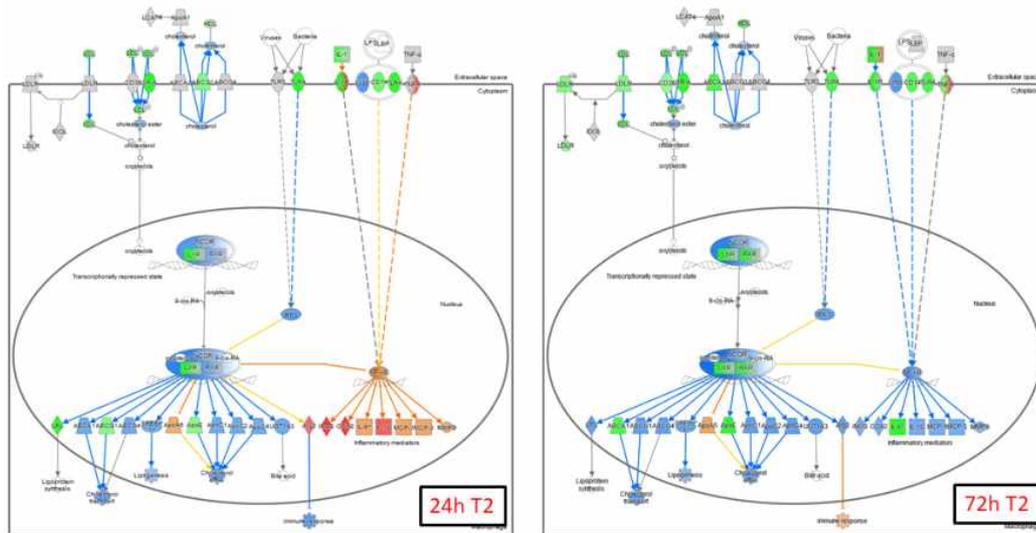


그림 48. LXR/RXR pathway

다. *In vitro* Microfold cell (M cell) 분화기법을 통한 MAP 감염 모델 구축

많은 병원체가 점막을 통하여 감염되기 때문에 이러한 병원체들과 숙주의 상호관계를 연구하기 위해서 점막에서 문지기과 같은 역할을 하는 Microfold cells (M cells)에 대한 연구가 활발하게 이루어져 왔음. 점막 상피에 있는 M 세포는 항원, 병원체 그리고 공생 미생물 등의 외래물질을 점막 아래로 통과시키는 것에 특화된 세포임. M 세포는 gut-associated lymphoid tissue(GALT)의 Peyer's patches (PP) 등에서 관찰할 수 있으며, 이는 외래물질에 대한 점막의 인식 및 면역 반응을 개시하는데 중요한 역할을 함. 기존의 M 세포의 연구는 M 세포를 분리하는 기술적인 어려움뿐만 아니라 종 간의 다양한 표현형 변화 등의 다양한 한계점을 가지고 있었음. 그러나 Gullberg et al.에 의한 *in vitro* M 세포 모델의 개발을 통해 미생물의 translation, 유전자 발현 연구, 그리고 인터루킨 6 (IL-6) 및 종양 괴사 인자- α (TNF- α) 등의 B 세포 방출 사이토 카인에 대한 연구가 가능해졌으며, *in vitro* M 세포 모델은 점막을 통해 감염되는 병원체 분석에 유용한 새로운 모델로써 제시되고 있음. 본 연구팀은 이러한 *in vitro* M 세포 모델을 확립하였으며 향후 병원체 및 숙주 상호관계 분석에 이용할 예정임.

(1) *in vitro* M cell 분화

- Caco-2 세포는 10 % FBS 및 항생제-항진균제를 넣어준 DMEM 에서 5 % CO₂, 37 °C 조건에서 배양하였음. Raji B세포는 10 % FBS 및 항생제-항진균제를 넣어준 RPMI에서 5 % CO₂, 37 °C 조건에서 배양하였음. Caco-2 세포 (5×10^5)는 Transwell (pore 크기 3.0; Costar, Cambridge, MA)의 insert에서 14 일 동안 배양하였으며 그 후 Raji B세포 (5×10^5)를 transwell의 아래 well에 넣어 4 일동안 co-culture 하였음. 배지는 격일로 교체되었음. Raji B세포 없이 Caco-2 세포 단일 배양 한 well을 을 대조군으로 하였음.

(2) 주사전자현미경 (SEM)을 이용한 M세포의 형태 관찰

- 단일 배양 및 co-culture된 Caco-2 세포를 buffered glutaraldehyde (2.5 %; pH 7.4)에 처리한 후, 에탄올 (30 %, 50 %, 70 %, 90 % 및 100 %)을 이용해 연속 탈수를 하였음. 샘플을

critical point drying 방법으로 건조시키고, 백금으로 코팅 한 후 주사전자현미경 (FE-SEM, Supra 55VP, Carl Zeiss, Germany)을 사용하여 M 세포 형태를 관찰 하였음.

- M 세포의 형태를 확인하기 위해서 SEM으로 caco-2세포를 촬영하였으며 단일배양된 Caco-2 세포가 규칙적인 미세 융모를 갖는 상피 유사 단층을 형성 하는 것을 보여 주었음 (그림 49). 또한 co-culture된 Caco-2 세포는 M 세포의 대표적인 특징인, 수가 적고 불규칙한 형태의 짧은 미세 융모를 보였음.

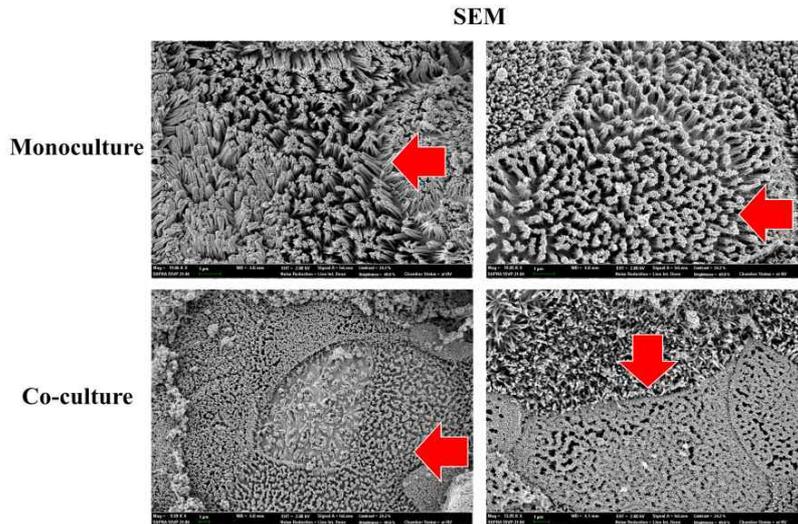


그림 49. SEM으로 촬영한 Caco-2 세포

(3) Immunocytochemistry를 이용한 M 세포 marker 발현 분석

- M 세포의 marker인 Sialyl Lewis A (CA19-9)의 발현을 confocal 형광 현미경을 이용하여 확인하였음. 단일 배양 및 co-culture된 Caco-2 세포를 실온에서 10 분 동안 4 % paraformaldehyde로 고정 한 후, 실온에서 10 분 동안 0.5% Triton X-100에 처리하였음. 0.1% Tween 20 in phosphate-buffered saline (PBS-T)으로 3 회 세척 한 후, 샘플을 blocking buffer (1% bovine serum albumin in 0.1% PBS-T)에 1 시간 동안 RT에서 처리하였음. 1 차 항체로 CA19-9 (Santa Cruz)를 1:50 비율로 희석하여 밤새 4 °C에서 처리한 후 PBS-T로 3 회 세척하고, 1: 200으로 희석된 Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG2b (Invitrogen, USA) 항체를 실온에서 1 시간 동안 처리하였음. 세포를 0.1 % PBS-T에서 세척하고, Vectashield mounting medium with 4,6-diamidino-2-phenylindole (Vector Laboratory, Burlingame, CA)를 이용하여 mounting하였으며 confocal 형광 현미경 (Zeiss LSM 800, Germany)으로 이미지를 촬영 하였음.
- *in vitro* M 세포 모델을 확인하기 위해서 Caco-2 세포 단일 배양 및 co-culture된 caco-2 세포에서 confocal 현미경을 측정하였음. 그림 50A에서 confocal 현미경 사진으로 나타난 것과 같이, Sialyl Lewis A (녹색 형광)의 발현은 단일 배양 및 co-culture된 세포의 표면에서 발현이 확인되었고 핵은 DAPI로 청색으로 염색되었음. 그림 50B는 co-culture된 세포에서 Sialyl Lewis A의 발현이 2 배 이상 증가한 것을 나타냈음. 그러나, Caco-2 세포가 단일 배양 또는 co-culture된 것과 상관없이 30 % 이상이 Sialyl Lewis A를 발현하는 것이 확인되었음 (그림 50).

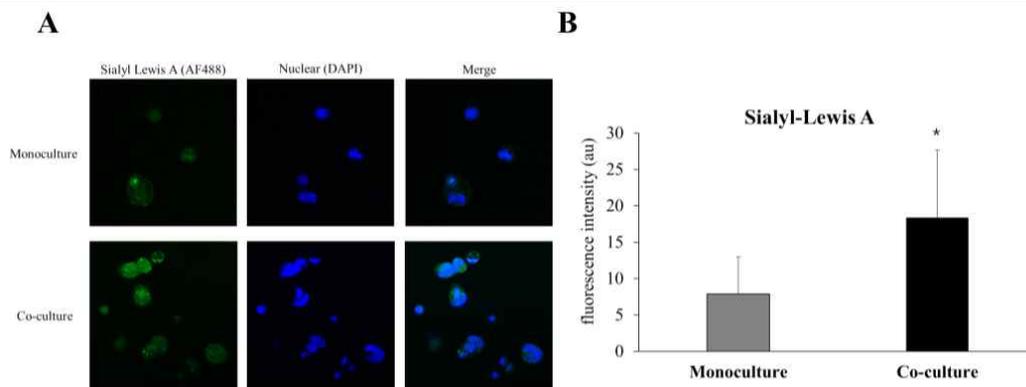


그림 50. confocal 현미경을 이용한 *in vitro* M 세포 모델의 확인

(4) quantitative real-time PCR을 이용한 M cell marker 발현 분석

- Sialyl Lewis A 외의 M 세포의 potential marker를 확인하기 위해 이들 marker의 mRNA 발현을 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 통해 분석하였음. 먼저 Quantitect Nova Reverse Transcription Kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 mRNA를 reverse transcription 시켰으며 Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen) 를 이용하여 샘플을 준비, Rotor-Gene Q Real-Time PCR Cycler (Qiagen)를 사용하여 qRT-PCR을 수행 하였음. 프라이머는 마크로젠에 의해 합성되었음 (표 12). 조건은 다음과 같음: 95°C for 5 min for one cycle followed by 45 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 45 sec. Gapdh 유전자는 대조군으로 사용되었음. 상대적인 발현은 CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 방법을 사용하여 계산되었음.

표 12. M cell marker 발현 분석을 위한 qRT-PCR primer

Genes	Forward	Reverse
CCL20	GCTGCTTTGATGTCAGTGCT	TCAAAGTTGCTTGCTTGCTGCT TC
CD137	GTGCCAGATTTTCATCATGGG	CAACAGCCCTATTGACTTCC
CLDN4	GGGGCAAGGTGTACCAACT	CACCGGCACTATCACCATAA
MMP15	ACGGTCGTTTTGTCTTTTTCA	GTCAGCGGCTGTGGGTAG

- M 세포의 potential marker인 CCL20, CLDN4, CD137 및 MMP15의 유전자 발현을 qRT-PCR을 통해 확인하였음. 그 결과, 단일 배양된 caco-2세포와 비교하여, CD137를 제외한 CCL20, CLDN4 및 MMP15 유전자의 발현이 통계적으로 유의한 차이를 보였음 (그림 51).

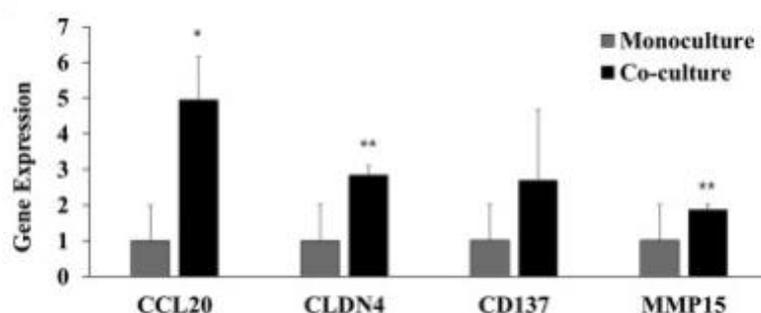


그림 51. M 세포의 marker 유전자 발현

(5) 미생물 transport assays

- M 세포는 *Salmonella* Typhimurium를 수송하기 위한 특정 수용체를 가지고 있다고 알려져 있음. 따라서, 분화된 *in vitro* M 세포 모델의 기능성을 확인하기 위해, 단일 배양 및 co-culture된 caco-2 세포에 *S. Typhimurium* (MOI = 100)을 접종하였으며 2 시간 감염시킨 후, 상층액을 수거하였음. 이어서, 전위된 균수를 측정하기 위해서 상층액 25 μ L을 LB agar에 도말하여 18 시간 동안 37 °C에서 배양하였음.
- 미생물 전위에 대한 M 세포의 기능성을 조사하기 위해, *S. Typhimurium* 을 이용하여 분화된 M 세포의 수송 능력을 확인하였음. M 세포를 통과한 *S. Typhimurium* 의 수는 CFU/mL 단위로 계산하였음. 결과는 단일 배양된 well보다 co-culture된 well에서 유의하게 더 많은 수의 *S. Typhimurium* 가전위됨을 보여 주었음 (그림 52).

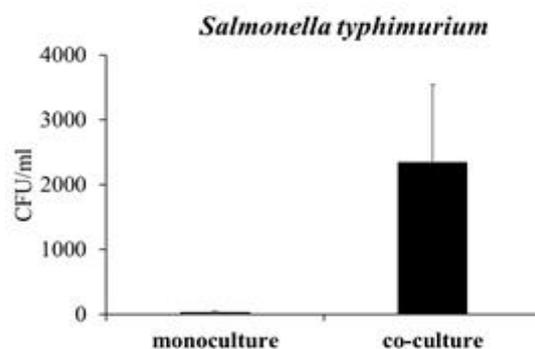


그림 52. M 세포에서 *S. Typhimurium* 수송능력 확인

라. Human THP-1에 감염시킨 MAP의 감염 초기 dual RNA-seq 분석

- Human THP-1 cell 및 MAP K-10의 감염 후 total RNA로부터 dual RNA-seq 분석을 수행함. PMA를 처리하여 대식세포로 분화시킨 THP-1 cell에 MAP K-10 strain을 MOI 10:1로 3시간 동안 감염시킨 후 total RNA를 추출하였다. MAP의 RNA 양이 THP-1에 비해 현저히 적은 비율을 가지고 있기 때문에 충분한 sequencing depth를 확보하기 위하여 lysis buffer에 녹인 후 원심분리를 통해 host RNA를 90% 정도 제거한 후 mechanical lysis 방식으로 total RNA를 추출하여 MAP RNA 추출 효율을 극대화 하였다. 추출된 total RNA는 double rRNA depletion method를 통해 eukaryotic 및 prokaryotic rRNA가 제거되었으며, library 제작 및 시퀀싱 분석이 수행되었다.
- 반복을 위해 각각 두 개의 샘플로 시퀀싱한 결과 MAP K-10의 mapping rate는 각각 0.42%와 0.54%였으며, read count는 각각 1,099,954와 1,431,536이었다. THP-1의 mapping rate는 각각 98.1%와 98.2%였다.
- Dual RNA-seq 데이터는 각각 미감염 THP-1 cell 및 broth cultured MAP의 시퀀싱데이터와 비교하여 DEG 분석이 수행되었다. 분석 결과 MAP K-10은 감염에 따라 총 334개의 유전자 발현이 상향조절되었고, 339개의 유전자 발현이 하향조절되었다 (cut-off: $|\log_2FC| > 1$ & adjusted p-value < 0.05). THP-1은 감염에 따라 상향 및 하향조절된 유전자가 각각 4,099개와 1,764개였다 ($|FC| > 2$ & raw.p-value < 0.05) (그림 53).

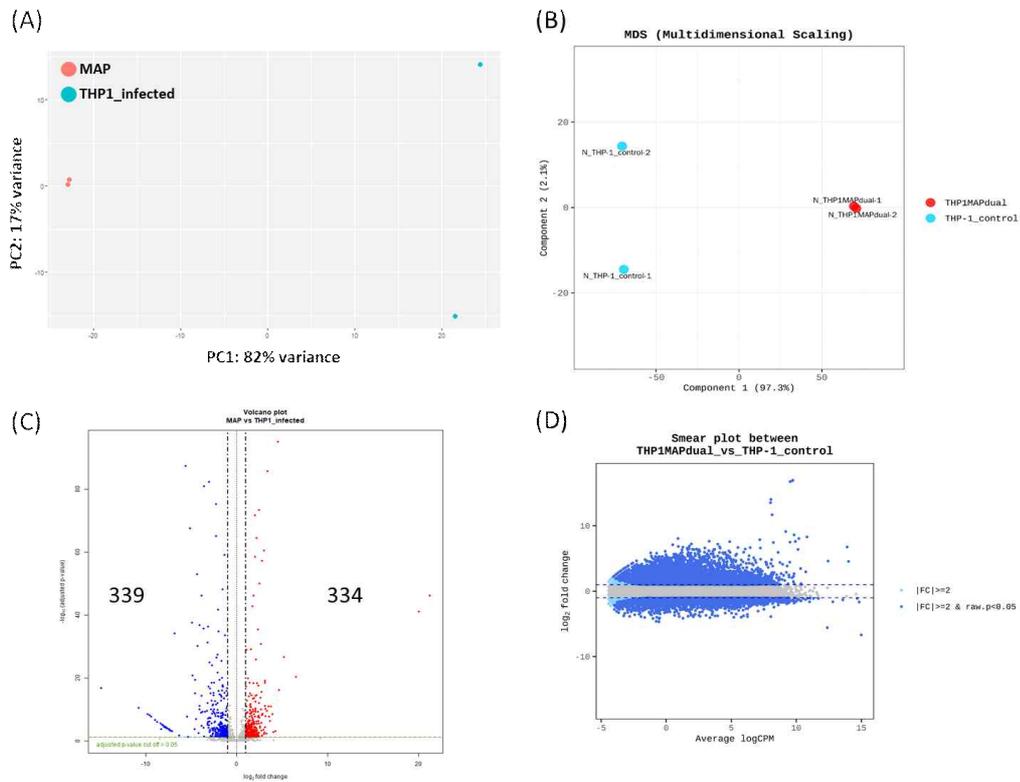


그림 53. Dual RNA-seq 데이터의 DEG분석 결과

(1) MAP의 대식세포 감염에 따른 감염 초기 유전체 발현 변화 분석

- MAP 및 THP-1의 DEG는 추후 enrichment 분석을 통해 기능적 분석이 수행되었다. MAP의 경우 KEGG pathway를 database화 한 후 GSEA tool (v4.1.0)을 이용하여 enrichment 분석을 수행하였다 (그림 54). 분석 결과 상향조절된 유전자들은 주로 ‘polyketide biosynthesis proteins’, ‘nitrogen metabolism’, ‘Two-component system’ 등으로 분류되었고 하향조절된 유전자들 중 가장 기능이 억제되었을 것으로 예측된 pathway는 ‘arginine biosynthesis’, ‘Pyrimidine metabolism’ 등으로 나타났다.
- KEGG enrichment 분석 결과를 Cytoscape의 enrichment MAP application을 이용하여 네트워크 분석을 수행한 결과 활성화 된 것으로 예측되는 pathway들의 집합 중 ‘Two-component system’ 관련 유전자들, ‘DNA repair’ 관련 유전자들이 공통으로 상향조절된 것을 확인할 수 있었다 (그림 55). 또한, 억제된 것으로 예측된 pathway들 중 Metabolism, lipid biosynthesis, ribosome, transporters, arginine biosynthesis 관련 유전자들은 공통으로 발현이 하향조절되어있어 감염 후 MAP의 metabolism 관련 기능이 전반적으로 억제된 것을 예측할 수 있었다 (그림 55). 이는 감염 직후 MAP가 stress환경에 노출됨에 따라 growth가 멈춘상태이며, 에너지의 사용을 최소화하기 위해 biosynthesis를 최대한 억제하는 것으로 보인다.

KEGG Pathway	Size	NES	NOM p-val	FDR q-val
Polyketide biosynthesis proteins		Red	Blue	Purple
Nitrogen metabolism	Light Pink	Orange	Blue	Purple
Nicotinate and nicotinamide metabolism		Orange	Blue	Purple
Two-component system	Light Pink	Orange	Blue	Purple
Mismatch repair		Orange	Blue	Purple
Steroid degradation	Light Pink	Orange	Blue	Purple
Two-component system	Red	Yellow	Blue	Purple
Protein kinases	Light Pink	Yellow		Purple
DNA replication proteins	Light Pink	Green	Blue	
Lipid biosynthesis proteins	Red	Green	Blue	
Peptidoglycan biosynthesis		Green	Blue	
Glycerolipid metabolism	Light Pink	Green	Blue	Light Purple
PPAR signaling pathway	Light Pink	Green	Blue	
Alcoholic liver disease	Light Pink	Green	Blue	Light Purple
Ribosome	Red	Green	Blue	Light Purple
Ribosome	Red	Green	Blue	Light Purple
Citrate cycle (TCA_cycle)	Light Pink	Green	Blue	Light Purple
Oxidative phosphorylation	Red	Green	Blue	
Pyrimidine metabolism	Light Pink	Green	Blue	Purple
Arginine biosynthesis		Green	Blue	Purple

그림 54. GSEA enrichment 분석을 통해 확인된 주요 KEGG pathway 변화(Top 20)

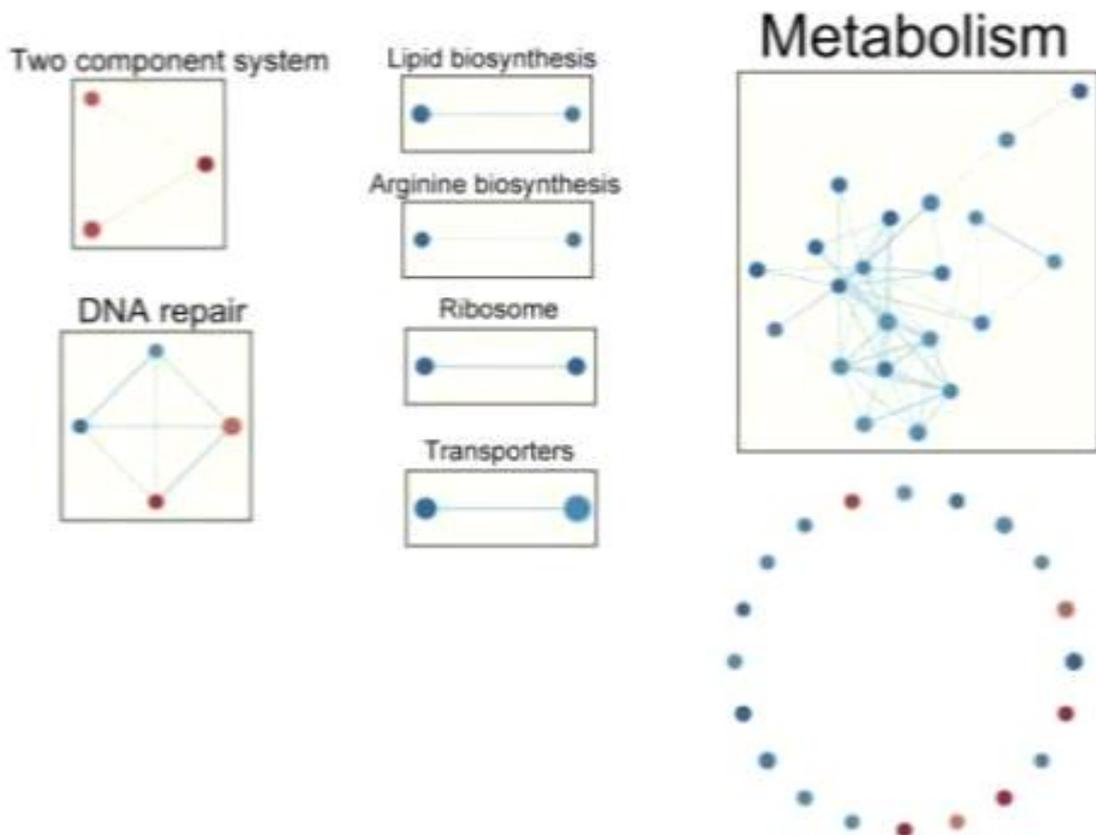


그림 55. Enrichment MAP 분석을 이용한 주요 KEGG pathway의 network 분석

(2) MAP의 병원성유전자에 대한 자체 데이터베이스 구축

- Virulence factor database(VFDB)를 이용하여 알려져 있는 박테리아의 병원성유전자 전체에 대한 데이터베이스를 이용하여 BLAST 분석을 통해 자체적으로 MAP의 병원성 유전자 목록을 작성하였다 (그림 56). 총 28,856개의 병원성유전자로부터 825개의 virulence factor gene의 목록이 작성되었으며, 기능적 단위로 classification되었다.



그림 56. VFDB로부터 BLAST 분석을 통해 작성한 MAP 병원성유전자 DB

- 작성된 VFDB를 dual RNA-seq 분석을 통해 얻은 DEG에 annotation하여 유의적으로 발현이 변화한 유전자들에 대한 기능적 분석을 수행하였다 (그림 57). 발현이 변화한 유전자들의 기능적인 분류 결과 secretion system, iron uptake, regulation 등 관련 병원성유전자들의 발현 변화가 가장 두드러지게 나타났다.
- Secretion system은 mycobacteria에 존재하는 type VII secretion system 중 esx-3와 esx-5 관련 유전자들이었다. Regulation 관련 유전자들 중 8개는 KEGG pathway에서 two-component system으로 분류되었으며, sigma factor 및 whiB3 유전자 또한 regulation에 속하는 유전자들이었다. Iron uptake 관련 유전자들은 mycobactin synthesis와 관련된 mbt gene들을 포함하고 있었다. 종합적으로, MAP는 숙주 대식세포에 감염된 이후 받는 스트레스에 대응하여 two-component system 및 sigma factor와 같은 조절기전을 활성화하고 iron uptake 및 secretion system을 통한 병원성기전을 활성화하는 것으로 보인다.

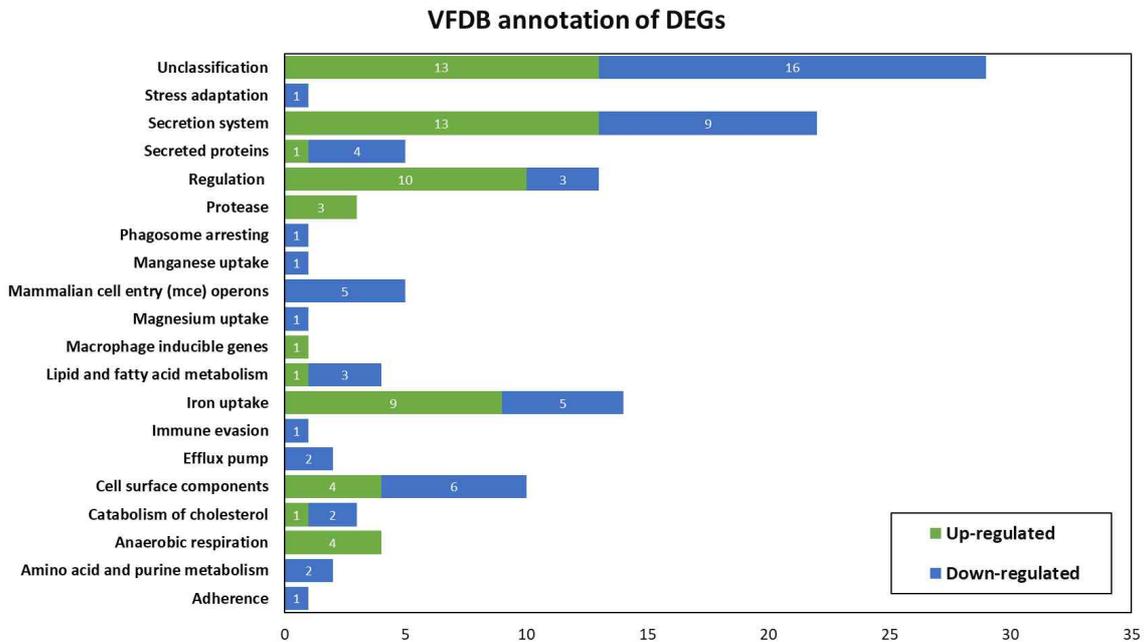


그림 57. 자체제작 virulence factor database에 의해 annotation된 MAP DEG의 classification

(3) Host-induced bacterial stress responses

- 앞서 VFDB와 KEGG pathway enrichment 분석을 통해 분류된 DEG들에 대해 대식세포 감염 초기의 MAP stress response가 주요 변화임을 확인하였으며, 이를 기반으로 주요 유전자들의 발현 정도를 분석하였다 (그림 58).
- Two component system 중 유의적으로 발현이 증가한 mprAB system은 결핵균에서 cell envelope stress에 대한 반응으로 주로 발현이 증가하는 것으로 알려져 있기 때문에 MAP 또한 대식세포 감염 초기 cell envelope stress 환경에 노출되는 것으로 보이며, 해당 regulatory system 활성화를 통해 하위에서 조절되는 sigma factor인 sigB의 발현 또한 조절된 것으로 보인다. Sigma factor 중에서는 sigL의 발현이 가장 크게 증가하였는데, 이는 이전의 연구에서 확인된 사실과 일치하는 것이었다. sigL의 deletion mutant를 이용한 연구를 통해 해당 sigma factor는 oxidative stress와 cell wall에 대한 damage로부터 생존을 하는 데 필수적인 기능을 한다는 사실이 확인되었다. sigL은 cell wall 합성에 중요한 polyketide biosynthesis protein 발현을 조절하는 역할을 한다고 알려져 있기 때문에, 이를 종합하면 MAP는 감염 초기 주로 cell wall에 damage를 입게되며, mprAB 및 sigL 등 cell wall stress에 대응하는 기전을 활성화시킴으로써 대식세포 내에서 생존할 수 있는 것으로 생각된다.

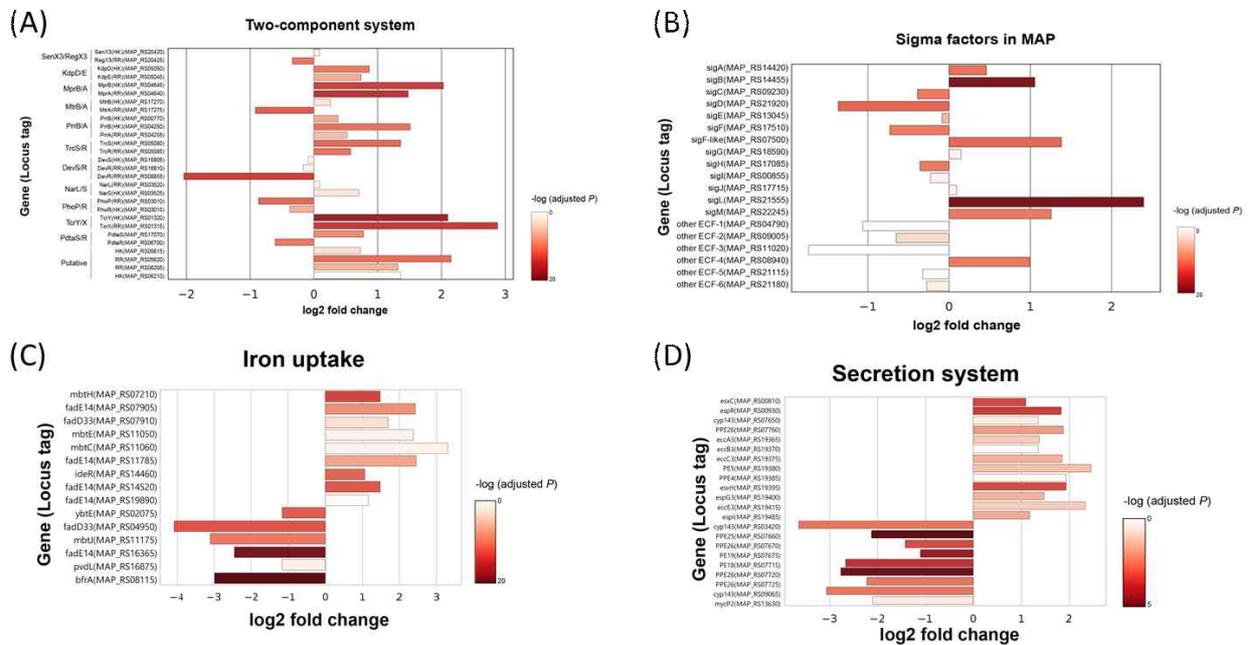


그림 58. MAP의 stress 관련 주요 유전자 발현 변화 양상

- Iron uptake 관련 유전자들 중 발현이 유의적으로 증가한 것들은 mycobactin 합성 관련 유전자들이었다. Mycobacteria가 철 결핍환경에 놓이게되면 mycobactin 합성을 증가시키고 철 저장 단백질인 bfr의 발현은 감소시킴으로써 이에 대응한다. 본 연구에서도 일치하는 현상이 관찰되어 MAP가 대식세포에 감염된 후 철결핍 stress를 경험하는 것으로 예측되었다. 다만, MAP에서 mbtA의 결손으로 인해 mycobactin이 외부에서 첨가되어야한다는 점을 고려하면 mbt gene의 발현 증가가 실제로 intracellular 환경에서 mycobactin gene의 생합성과 관련이 있는지 추가연구가 필요하다.
- Type VII secretion system 중 esx-3의 발현 증가가 관찰되었으며, esx-5의 PE 및 PPE protein의 발현 감소가 관찰되었다. esx-3는 철 결핍상황에서 mycobactin binding을 통한 철 수송을 위해 필요한 secretion system으로 알려져 있기 때문에 철 결핍 스트레스에 대한 반응으로 발현이 증가한 것으로 보인다. 그러나, mycobactin binding 역할 이외의 다른 병원성 인자들의 수송과도 연관이 있는 것으로 보고되고 있기 때문에 잠재적인 병원성인자로서의 esx-3의 발현 증가 또한 고려할 필요가 있을 것으로 판단된다. Esx-5를 통해 수송되는 PE 및 PPE protein들은 세포벽의 구성요소로 중요하다고 알려져 있으며, 결핵균을 이용한 연구에서 PE19의 deletion이 stress 감수성이 높은 돌연변이주에서 cell wall stress에 대한 저항성을 높이는 것으로 관찰되었기 때문에 본 연구에서 관찰된 esx-5의 전반적인 PE 및 PPE protein들의 발현 감소는 cell wall stress에 대한 반응으로 생각된다.

(4) Manipulation of metabolic process

- 숙주와 MAP 모두에서 감염 초기 arginine metabolism 관련 pathway의 억제가 예측되었다 (그림 59). MAP에서는 arginine biosynthesis 관련 유전자 발현 감소가 관찰되었고, THP-1에서는 arginine and proline metabolism pathway의 관련 유전자들 발현 감소가 관찰되었다. Arginine은 숙주세포에서 iNOS의 합성의 전구체로서 중요하다. 본 연구에서는

면역반응 관련 유전자들의 활성화에도 불구하고 NOS2 gene의 유의적인 발현 감소가 관찰되었는데, 그에대한 원인이 arginine metabolism 관련 경로의 억제에 따른 것으로 생각된다 (그림 60). MAP에서 arginine biosynthesis를 억제하고 macrophage 내의 arginine을 uptake하여 사용함으로써 iNOS 합성에 필요한 arginine이 고갈된다면 선천면역반응의 활성화 및 intracellular bacteria의 제거에 가장 중요한 요소 중 하나인 iNOS의 발현 저하를 일으킬 수 있을 것으로 예상된다.

- MAP는 nitrogen metabolism 관련 유전자들, 특히 narGHJI 및 nirBD의 발현 증가가 관찰되었다. narGHJI는 nitrate reductase로서 nitrate를 nitrite로 reduction하는 enzyme이다. Intracellular environment에서 broth culture 대비 발현이 증가한 것은 anaerobic respiration과 관련이 있는 것으로 보인다. MAP는 macrophage의 phagosome 내에서 hypoxia 상태에 놓이게 되고 에너지를 얻기 위한 과정으로 nitrate를 reduction 하는 기전이 활성화되는 것으로 해석할 수 있다. Anaerobic respiration 과정에서는 NO₃-를 reduction하는 과정에서 에너지를 얻는다. 이 과정에서 nitrite가 생성되는데, MAP는 nitrite를 nitric oxide 형태로 배출하기보다는 nirBD gene을 induction함으로써 에너지가 필요한 과정인 nitrite reduction을 활성화하는 것으로 보인다. Mtb의 in vitro dormancy model에서 nirBD의 유의적인 발현 증가가 확인되었고, nirBD mutant는 해당 감염 모델에서 wild type strain에 비해 생존율이 크게 떨어졌다. 이에 대한 원인은 dormancy 모델의 hypoxic한 환경에서 살아남기 위한 nirBD의 역할을 통해 설명가능했다.

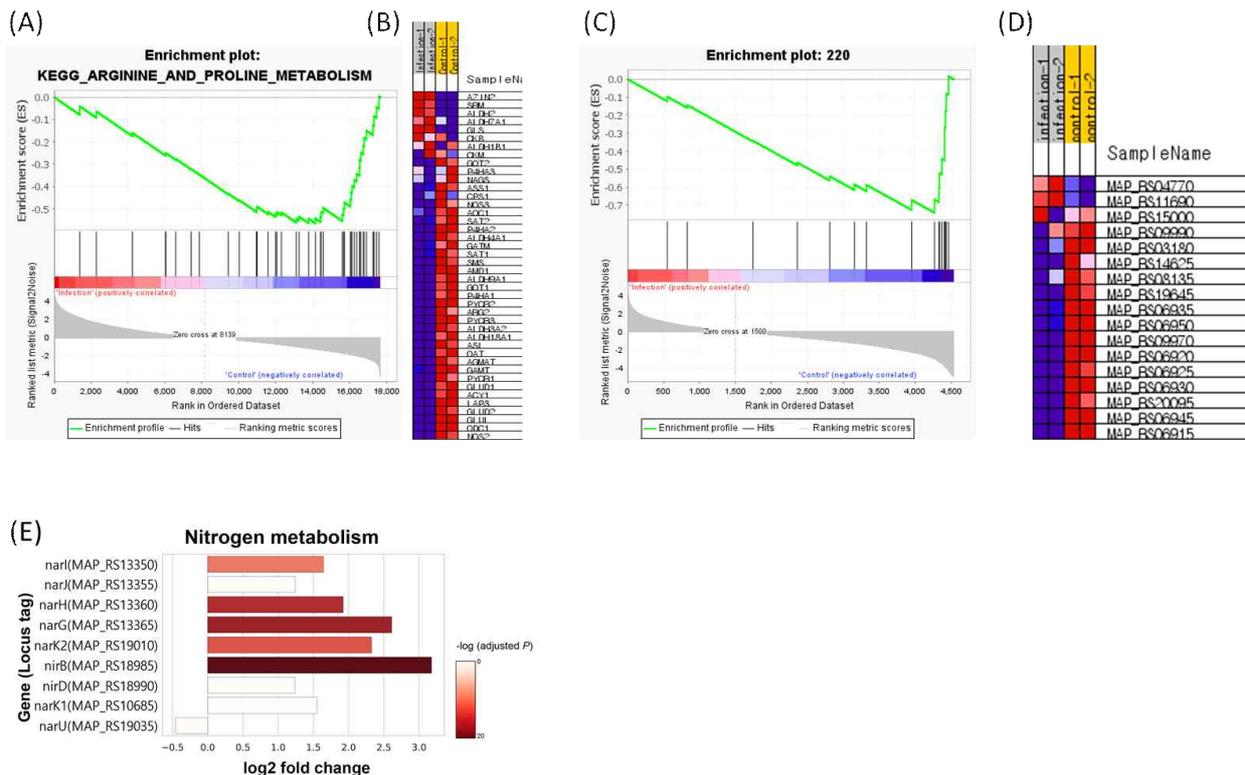


그림 59. MAP 및 THP-1의 metabolism 관련 유전자 발현 변화

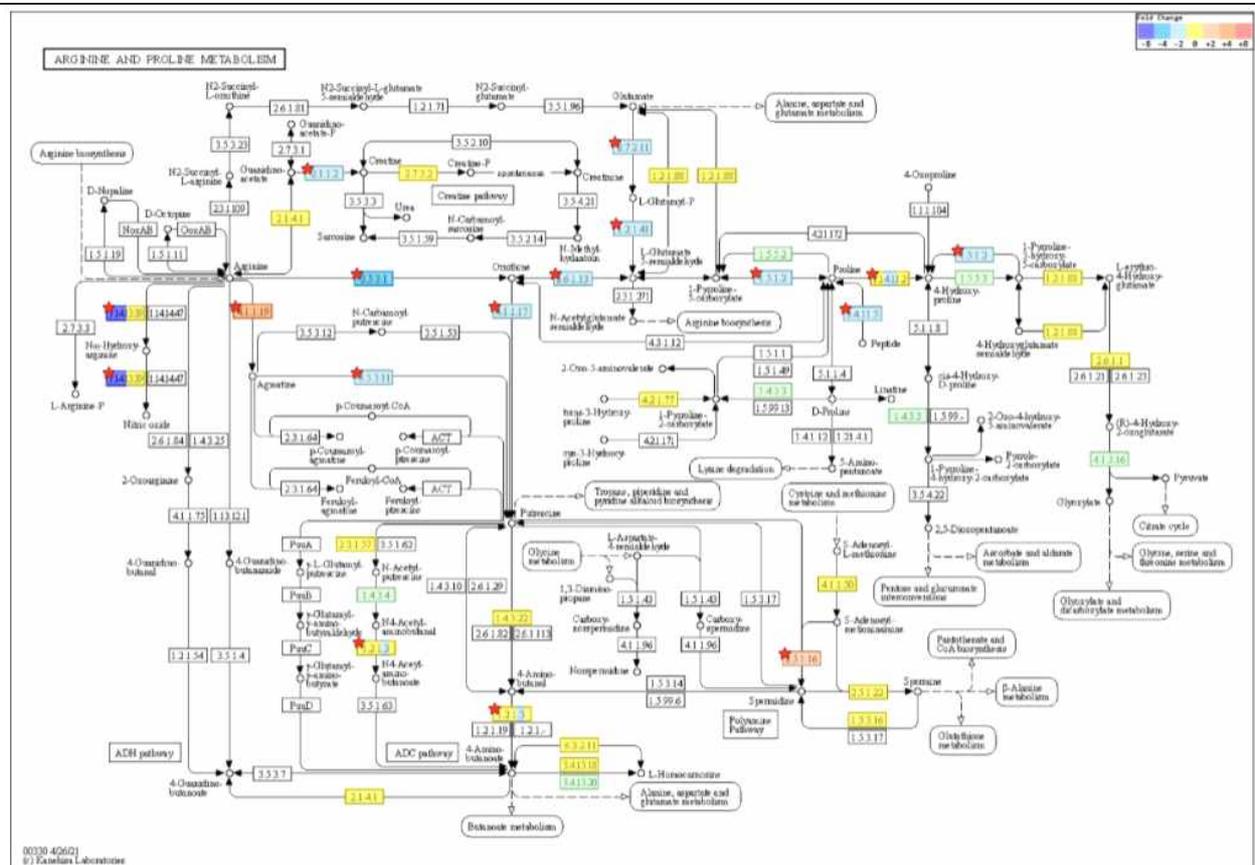


그림 60. Arginine and proline metabolic pathway (KEGG)

(5) Bacteria induced host immune responses

- THP-1 cell에서 MAP 감염에 대한 가장 주요한 면역반응은 pattern recognition receptor 활성화에 따른 cytokine 및 chemokine 발현 증가였다 (그림 61, 62). Up-regulation 된 cytokine 유전자들은 TNF- α , IL-1 β 였으며, chemokine은 IL-8, MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4) 등이었다. Co-stimulatory molecule로는 CD40, CD80의 발현 증가가 관찰되었다. 이 외에도 CXCL1, CXCL2, CXCL3등의 발현 또한 상향조절 되었다. Pattern recognition receptor gene들 중 발현의 상향조절이 관찰된 것은 c-type lectin receptor (DC-SIGN, Mincle)들이었다. TLR2나 TLR4 등의 활성화에 따른 NF- κ B 등 transcription factor의 발현 증가가 관찰되었고 inflammatory cytokine의 발현 증가가 함께 관찰되었다. 특히, c-type lectin pathway의 활성화가 예측되었는데, DC-SIGN이나 Mincle receptor의 활성화에 따라 IL-1 β , IL-23, IL-10 등의 발현이 증가된 것으로 예측되었다. 종합적으로, 해당 chemokine 및 cytokine 증가는 Th17 관련 면역반응을 활성화하는 신호로 생각되기 때문에, MAP의 감염이 대식세포에서 만성감염에서 관찰되는 Th17 관련 면역반응을 유도하는 것으로 판단된다.

- Sequencing 결과, 4개의 샘플들 모두 좋은 퀄리티를 확보하였다. 각 데이터 모두 30M 이상의 read 수와 3G bp 이상의 데이터를 확보하였으며 동시에 Q30 지수를 96% 이상 확보하였다. CN7-RLT 샘플의 GC content가 다른 샘플에 비해 작게 나왔으나 이후 분석 결과를 보았을 때 큰 문제는 아닌 것으로 확인되었다.

표 13. 국내주 RNA-seq 결과 정보

Sample ID	Total read bases (bp)	Total reads	GC (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
CN7-1	3,539,916,478	35,048,678	63.59	98.95	96.69
CN7-RLT	3,402,040,166	33,683,566	59.92	99.0	96.73
JJ-1	3,408,776,866	33,750,266	63.29	98.88	96.56
JJ-2	3,915,269,444	38,765,044	63.23	98.87	96.49

(나) 획득한 RNA-seq 데이터 분석

- 이전 과제에서 구축한 RNA-seq 분석 파이프라인을 이용하여 국내주 RNA-seq 데이터를 분석하였다 (표 14). Bowtie를 이용한 RNA-seq 데이터 mapping 결과, 4개 샘플 모두 95% 이상의 높은 mapping rate를 보였다. RNA-seq 데이터의 read 길이는 4개 샘플 모두 98 bp로 동일하였으며 paired-end 사이 insert size는 평균 184-194 bp로 확인되었다. 이후 동일 파이프라인의 samtools를 사용하여 분석 데이터를 정리 및 압축하였으며 해당 데이터는 이후 cufflinks를 활용하여 샘플 데이터간 비교 분석에 사용되었다.

표 14. 국내주 RNA-seq 데이터 분석 결과 정보

Sample ID	Mapped reads bases (bp)	Mapped reads	Properly paired reads (%)	Average read length (bp)	Average insert size (bp)
CN7-1	3,310,155,604	33,777,098	96.4	98	194.5
CN7-RLT	3,163,302,604	32,278,598	95.8	98	184.3
JJ-1	3,167,449,572	32,320,914	95.8	98	194.6
JJ-2	3,674,356,924	37,493,438	96.7	98	194.0

(6) 표준주 유전자 발현 분석

(가) ATCC19698 균주 RNA-seq 획득

- 국내주의 유전자 발현량을 비교 확인하기 위해 대조군으로 표준주(ATCC19698)를 선택하였다. 또한 성장배지 구성에 따른 유전자 발현을 확인하기 위해 동일 균주 대상으로 2개의 실험을 수행하였으며, 해당 실험에서 RNA-seq 데이터를 획득하였다 (표 15). 표준주 또한 국내주와 마찬가지로 실험의 오차 및 데이터의 신뢰도 향상을 위해 각 샘플들은 duplicate로 RNA를 추출하였다.
- Sequencing 결과, 4개의 샘플들 모두 좋은 퀄리티를 확보하였다. 각 데이터 모두 28M 이상의 read 수와 2.8G bp 이상의 데이터를 확보하였으며 동시에 Q30 지수를 94% 이상 확보하였다.

표 15. 표준주 RNA-seq 결과 정보

Sample ID	Total read bases (bp)	Total reads	GC (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
ATCC19698-1 (normal media)	3,938,842,642	38,998,442	64.08	98.16	94.78
ATCC19698-2 (normal media)	3,241,235,036	32,091,436	64.63	98.18	94.84
ATCC19698-1*	3,606,004,818	35,703,018	62.91	98.82	96.11
ATCC19698-2*	2,863,624,548	28,349,745	63.09	98.84	96.18

normal media: *mycobacteria* 성장에 일반적으로 쓰이는 7H9 broth 배지(Tween 80 미첨가)

*: 국내주와 동일한 조성의 배지(Tween 80 첨가)

(나) 획득한 RNA-seq 데이터 분석

- 이전 과제에서 구축한 RNA-seq 분석 파이프라인을 이용하여 국내주 RNA-seq 데이터를 분석하였다 (표 16). Bowtie를 이용한 RNA-seq 데이터 mapping 결과, 4개 샘플 모두 92% 이상의 높은 mapping rate를 보였다. RNA-seq 데이터의 read 길이는 4개 샘플 모두 98 bp로 동일하였으며 paired-end 사이 insert size는 평균 187-193 bp 로 확인되었다. 이후 동일 파이프라인의 samtools를 사용하여 분석 데이터를 정리 및 압축하였으며 해당 데이터는 이후 cufflinks를 활용하여 샘플 데이터간 비교 분석에 사용되었다.

표 16. 표준주 RNA-seq 데이터 분석 결과 정보

Sample ID	Mapped reads bases (bp)	Mapped reads	Properly paired reads (%)	Average read length (bp)	Average insert size (bp)
ATCC19698-1 (normal media)	3,523,409,484	35,953,158	92.2	98	189.4
ATCC19698-2 (normal media)	2,928,973,824	29,887,488	93.1	98	193.0
ATCC19698-1*	3,298,004,780	35,703,018	94.3	98	189.4
ATCC19698-2*	2,606,406,628	26,595,986	93.8	98	187.0

normal media: *mycobacteria* 성장에 일반적으로 쓰이는 7H9 broth 배지(Tween 80 미첨가)

*: 국내주와 동일한 조성의 배지(Tween 80 첨가)

(7) 국내주 및 표준주의 전사체 비교 분석

(가) 유전자 발현 변화 분석 방법 및 기준

- 배지 조성에 따른 유전자의 발현량 변화를 확인하기 위해, 위에서 분석한 데이터를 cuffdiff로 비교 분석하였다. 비교 방법은 분석 데이터의 Fragments Per Kilobase of transcript per Million (FPKM)를 비교한 수치에 \log_2 를 취한 값을 기준으로 판별하였다. 유전자 발현의 변화 판별 기준은 해당 계산한 값이 1 이상이면 up-regulated, -1 이하면 down-regulated로 하였다.

(나) 배양 조건에 따른 표준주의 유전자 발현 변화

- Cuffdiff를 사용하여 DEG를 분석하여 배양 조건(Tween 80 첨가 유무)에 따른 표준주의 유전자 발현 차이를 분석한 결과, up-regulated 유전자와 down-regulated 유전자의 수는 비슷하였다 (그림 63, 표 17).

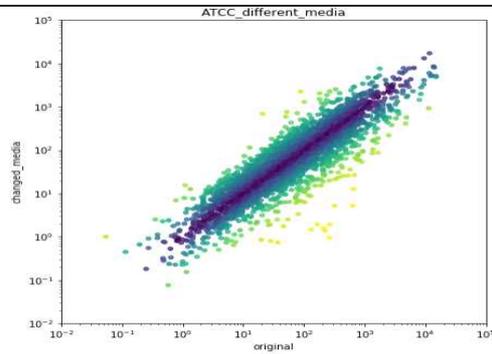


그림 63. 배양 조건(Tween 80 첨가유무)에 따른 표준주의 유전자 발현 차이

표 17. Tween 80 첨가에 따라 발현이 변화한 표준주 유전자의 개수

	log ₂ 값 (x)					
	$x \leq -3$	$-3 < x \leq -2$	$-2 < x \leq -1$	$1 \leq x < 2$	$2 \leq x < 3$	$3 \leq x$
$\frac{\text{changed media}}{\text{normal media}}$	93	124	448	511	72	21

- 표준주가 가진 4,562개 유전자 중 1,269개의 유전자의 발현량이 유의미한 변화를 보이는 것으로 확인되었다. 1,269개의 발현량 변화 유전자 중에 665개의 유전자는 normal media(Tween 80 미첨가)에서 발현량이 많았으며 604개의 유전자는 Tween 80 첨가 media에서 발현량이 많았다. 발현량이 변화한 유전자들은 많은 부분이 물질 대사와 관련된 유전자들이었다. Tween 80이 MAP의 성장에 있어 탄소원으로 사용되거나 세포벽의 합성 재료로 사용될 수 있는 것으로 알려져 있기 때문에 대사와 관련된 유전자들의 발현이 주로 변화된 것으로 판단된다. Tween 80 첨가 유무에 따른 표현형적 차이를 밝히는 데 도움이 될 수 있을 것으로 보인다. 그 외에도 MCE와 PPE 같이 virulence factor와 연관된 유전자들도 발견되었다.

(다) 표준주 대비 국내주 (CN7) 유전자 발현 비교

- Cuffdiff를 활용하여 국내주 MAPK_CN7 과 표준주간의 유전자 발현 양상을 비교하였다 (그림 64, 표 18).

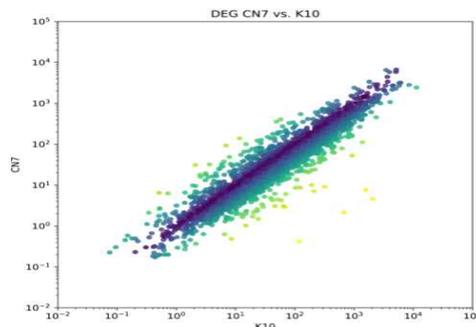


그림 64. 표준주와 국내주(CN7) 간의 유전자 발현 차이

표 18. 표준주 대비 국내주(CN7)에서 발현이 변화한 유전자 개수

	log ₂ 값 (x)					
	x ≤ -3	-3 < x ≤ -2	-2 < x ≤ -1	1 ≤ x < 2	2 ≤ x < 3	3 ≤ x
<i>MAPK_CN7</i> <i>ATCC19698</i>	32	83	1170	109	35	15

- MAPK_CN7 균주와 표준주 사이에는 4,213개의 ortholog를 갖는 것으로 확인되었으며 이 중 1,444개의 유전자가 발현량의 차이를 보이는 것으로 관찰되었다. 발현량에 변화를 보인 유전자들 중 대부분이 down-regulated 된 것으로 확인되었다. 1,285개의 많은 유전자가 down-regulated 된것에 비해 up-regulated 된 유전자는 159개 밖에 되지 않는 것으로 확인되었다.

(라) 표준주 대비 국내주 (JJ1) 유전자 발현 비교

- Cuffdiff를 활용하여 국내주 MAPK_JJ1과 표준주간의 유전자 발현 양상을 비교하였다 (그림 65, 표 19).

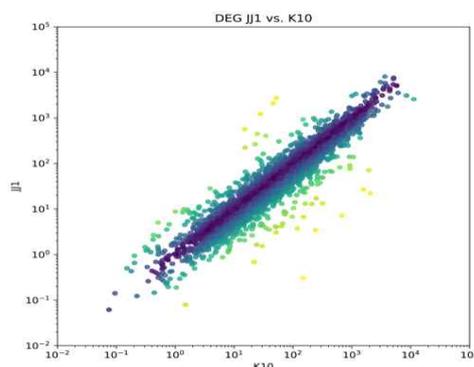


그림 65. 표준주와 국내주(JJ1) 간의 유전자 발현 차이

표 19. 표준주 대비 국내주(CN7)에서 발현이 변화한 유전자 개수

	log ₂ 값 (x)					
	x ≤ -3	-3 < x ≤ -2	-2 < x ≤ -1	1 ≤ x < 2	2 ≤ x < 3	3 ≤ x
<i>MAPK_JJ1</i> <i>ATCC19698</i>	29	66	556	111	29	21

- MAPK_JJ1 균주와 표준주 사이에는 4,219개의 ortholog를 갖는 것으로 확인되었으며 이 중 812개의 유전자가 발현량의 차이를 보이는 것으로 관찰되었다. 이번 분석 또한 CN7과 동일하게 발현량에 변화를 보인 유전자들 중 대부분이 down-regulated 된 것으로 확인되었다. 651개의 많은 유전자가 down-regulated 된것에 비해 up-regulated 된 유전자는 161개 밖에 되지 않는 것으로 확인되었다.

- 두 국내주, CN7과 JJ1, 모두 유전자 발현 차이를 표준주와 비교했을 때 차이를 보이는 유전자의 많은 부분이 up-regulated보다 down-regulated된 유전자가 많은 이유는 아직 찾지 못했지만 계속 분석을 진행하고 있다. 앞으로 이어질 분석을 통해 이유와 원인을 밝혀낼

수 있을 것으로 기대되며 이를 통해 국내주의 표현형적 특징을 유전형적으로 확인할 수 있을 것으로 기대된다.

마. THP-1 cell에서 single cell RNA-seq 이용한 MAP 감염 초기 반응 분석

(1) MAP 감염에 따른 THP-1 cell의 scRNA-seq 클러스터링 분석

- 72시간 동안의 PMA 처리를 통해 분화시킨 THP-1 cell의 scRNA-seq 결과를 clustering 분석을 통해 7개로 나누어지는 cluster를 확인하였다 (그림 66). 주요한 클러스터 구분은 cell cycle에 따라서 구분되었으며, 각각의 cell cycle phase에 따라 몇 개의 클러스터로 다시 세분화되었다 (그림 66). 또한 각 클러스터의 유전자 발현 특성을 이용하여 trajectory 분석을 수행한 결과 cluster 1에서부터 cluster 0 및 cluster 4로 시간이 감에 따라 분화 상태가 변화할 것이라고 예측되었다 (pseudotime). Cluster 분석 시 infection 및 control 그룹의 sequencing 결과를 integration한 결과 각각의 특이적인 클러스터는 존재하지 않았으며, 따라서 각 클러스터별 감염여부에 따른 DEG 분석이 수행 가능하였다.

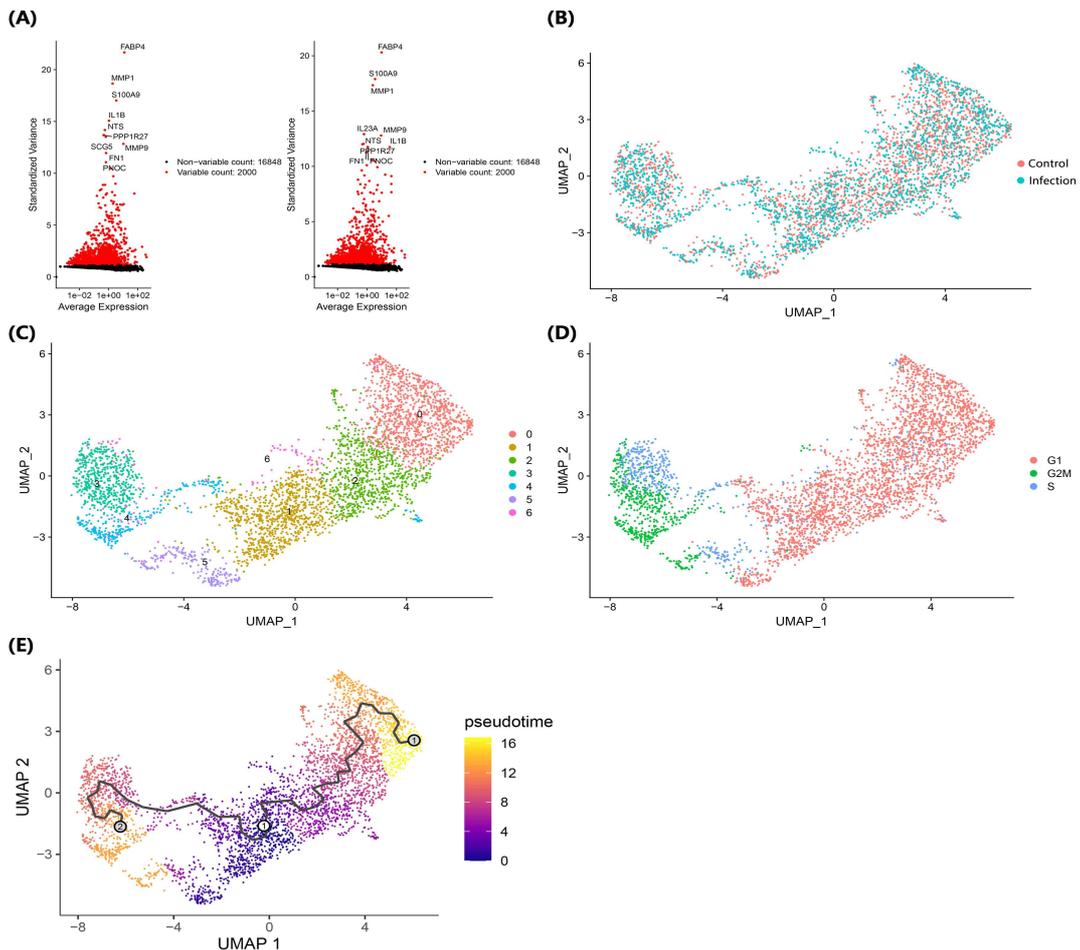


그림 66. THP-1 cell의 scRNA-seq clustering 분석

- 클러스터를 구분하는 주요 유전자 발현 차이를 찾기 위하여 marker analysis를 수행한 결과 가장 주요한 cluster인 cluster 0은 CD14의 발현이 다른 클러스터에 비해 높았고, TDO2, MMP9, SPP1 등의 유전자 발현 또한 높았다 (그림 67). CD14의 발현은 macrophage의 differentiation에 따라 시간이 감에따라 증가하기 때문에 cluster 0이 PMA 처리에 따른 가장 분화된 단계의 macrophage cluster로 분석되었다. Cluster 1은 PTGS1, RAMP1, CD52, ACP1 등의 유전자 발현이 다른 클러스터에 비해 높게 나타났다. Cluster 0과 cluster 1을 직접 비교하였을 때 유전자 발현의 패턴이 반대로 나타났다. Cluster 2는 이에 따라 cluster 0과 1의 사이에 있는 cluster로 예측되었다. Cluster 3과 4는 cell cycle 관련 유전자 발현이 주요 차이점으로 확인되었으며 cluster 5는 DHRS9, PPP1R27, CTSG 등의 유전자 발현이 특징적이었다. DHRS9는 regulatory macrophage의 stable marker로 제안되었기 때문에 monocytic THP-1 cell이 PMA 처리에 따라 분화될 때 Mreg cell type으로도 분화가 될 수 있음을 예측하였다.

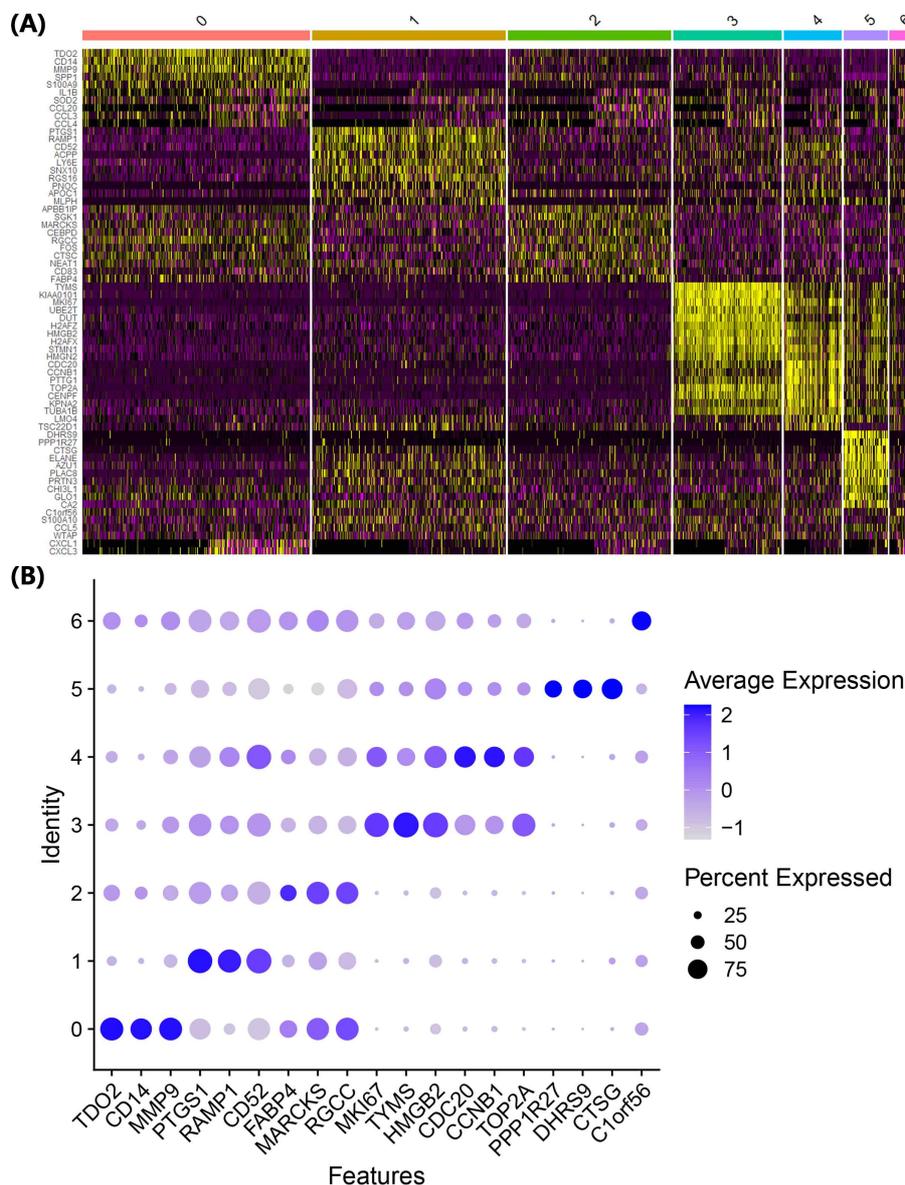


그림 67. Cluster-specific marker gene의 발현 분석

- 감염에 따른 주요 유전자의 발현 변화를 각 클러스터별로 나누어 분석한 결과 classically differentiated macrophage인 cluster 0에서는 IL1B, CCL4, CCL3, CCL20 등의 cytokine 및 chemokine의 발현 증가가 관찰되었다 (표 20). 해당 유전자들의 발현 증가는 innate response로서 neutrophil, T cell, 다른 macrophage들을 recruit 하는 역할로 중요하며, 특히 CCL3, CCL4, CCL5 등의 chemokine은 Th17의 분화에 중요한 역할을 하는 chemokine으로 알려져 있어 기존에 알려진 MAP 감염에 대한 주요 marker인 Th17 활성화를 잘 설명할 수 있는 반응을 human macrophage에서도 관찰할 수 있었다. 특히 IL23A의 cluster 0에서의 특징적인 발현 증가는 이를 뒷받침할 수 있었다 (그림 68).
- Cluster 0에서 해당 cytokine 및 chemokine을 활성화 시키는 요인을 찾기 위해 cluster별 pattern recognition receptor의 발현 정도를 비교한 결과 cluster 0에는 다른 cluster에 비해 TLR2의 발현이 증가하였으며, 따라서 TLR2의 발현 증가가 MAP에 대한 macrophage의 주요 면역학적인 변화를 일으키는 것으로 판단되었다 (그림 68).

표 20. Top 20 genes with upregulated expression in cluster 0 compared to other clusters among the infection group

	p_value	avg_log ₂ FC ^a	Pct ^b .cluster_0	Pct ^b .other_clusters	p_val_adjusted
IL1B	5.06E-157	3.002287	0.986	0.708	9.53E-153
CCL4	6.55E-163	2.766326	0.998	0.87	1.23E-158
CCL3	1.84E-155	2.766115	0.994	0.909	3.48E-151
CCL20	3.72E-109	2.378299	0.903	0.546	7.01E-105
MMP9	1.80E-104	2.326808	0.874	0.53	3.39E-100
CXCL3	4.80E-133	2.013032	0.832	0.298	9.04E-129
S100A9	1.17E-55	2.005273	0.623	0.255	2.20E-51
CXCL1	2.28E-100	2.000854	0.801	0.38	4.30E-96
TDO2	6.53E-117	1.995095	0.886	0.433	1.23E-112
SOD2	4.22E-155	1.905559	1	0.897	7.95E-151
IL8	9.87E-117	1.725436	0.994	0.868	1.86E-112
ATP2B1	4.59E-146	1.673085	0.951	0.57	8.66E-142
SPP1	8.21E-78	1.657379	0.972	0.869	1.55E-73
CCL3L3	5.17E-114	1.626342	0.777	0.263	9.74E-110
CD14	1.99E-117	1.50267	0.757	0.242	3.75E-113
TNFAIP6	3.70E-97	1.488727	0.722	0.245	6.97E-93
SAT1	1.17E-106	1.458414	0.99	0.904	2.20E-102
CTSB	6.74E-109	1.393309	0.998	0.952	1.27E-104
CTSL	4.66E-125	1.385936	0.994	0.864	8.78E-121
FTH1	2.67E-179	1.368585	1	1	5.03E-175

^aAverage log₂-fold-change;

^bProportion of cells expressing that gene

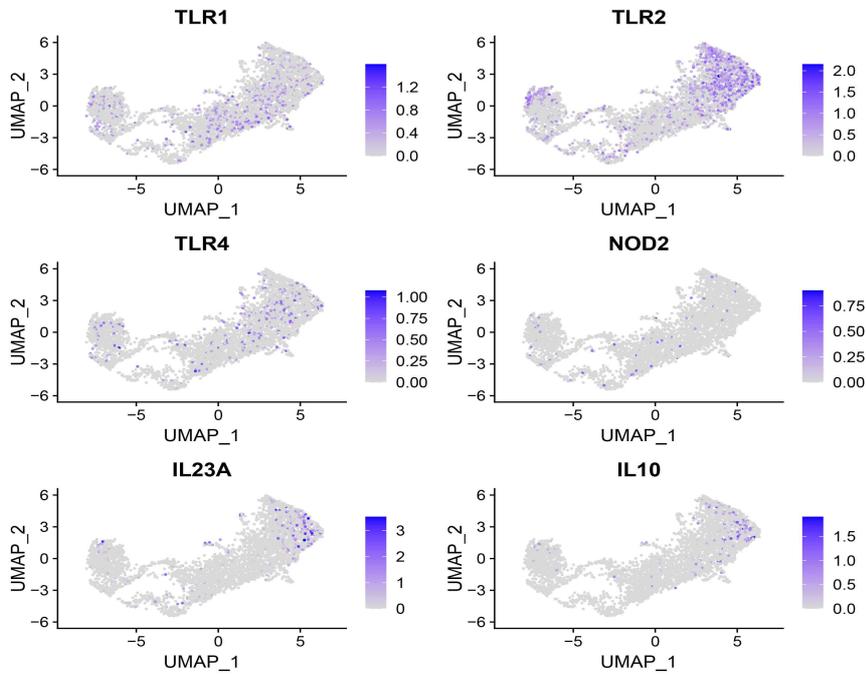


그림 68. 주요 pattern recognition receptor 및 cytokine의 cluster 별 발현 정도 분석

바. 마우스 모델 활용 MAP 감염 시기별 병원체 숙주의 미세병리기전 규명

(1) *In vivo* 감염모델에서의 MAP 감염 초기 미세병리기전 규명

(가) C57BL/6 마우스모델에서 감염 초기 미세병리기전 규명

- *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)의 병원성을 분석하기 위해서 다양한 연구가 진행되어 왔지만 아직까지 초기 MAP 감염 기전에 대한 정확한 해석은 확립되어 있지 않은 실정임. 더불어 요네병의 감염 초기 진단법 개발을 위한 실험동물모델도 확립이 필요한 실정임. 본 연구진은 마우스를 이용한 MAP 선행연구에서 육아종 형성 등 MAP 감염 특이적인 특징이 관찰되었던 것을 바탕으로 마우스를 유망한 MAP감염모델로 고려하여, 감염 초기에 일어나는 대사의 변화나 면역세포에서의 종합적인 유전체발현양상, 세균의 shedding 등 감염 특이적인 변화를 관찰하고 숙주-병원체의 관계를 종합적으로 평가할 계획임. 본 동물실험을 통해서 잠복기 또는 준임상형 상태에서 MAP 감염 기전을 관찰함으로써 소 요네병 진단법 및 예방기법 개발의 기초자료를 확보할 수 있을 것으로 기대됨.

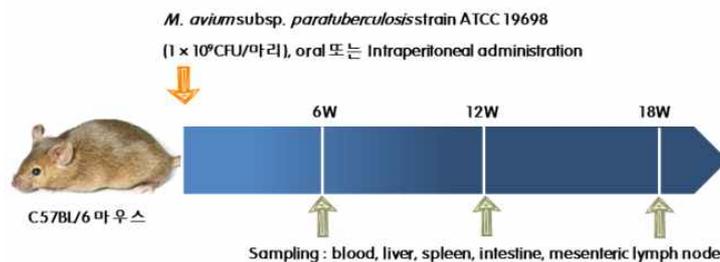


그림 69. 마우스 실험 접종 계획

- C57BL/6 마우스모델을 이용하여 MAP (1×10^9 cfu/300ul)를 복강 및 구강접종하고 6주/ 12주 / 18주 후 샘플을 채취하여 형태학적 변화 및 유전체 발현 변화 양상을 관찰할 예정임 (IACUC 승인번호 : SNU-190621-4, IBC 승인번호 : SNUIBC-R190109-1).

- 6주령 Female C57BL/6 마우스에 MAP (1×10^9 cfu/300ul)를 복강 및 구강접종.

(나) 샘플링

- 시기: 6주/ 12주/18주 (week post-infection; wpi)
- 샘플: 간, 비장, 소장, 장간막 림프절, Peyer's patch, 혈액
 - 간: 육아종 등의 병변 관찰, 크기 측정
 - 비장: 육아종 등의 병변 관찰, 크기 측정, 비장세포를 분리후 cytokine (IL-10, IFN- γ 등) 분석
 - 소장: 분변 분리 후 균의 cfu 측정, 소장내 병변 관찰
 - 장간막 림프절: RNA extraction 후 dual RNA-Seq 진행
 - Peyer's patch: RNA extraction 후 dual RNA-Seq 진행
 - 혈액: miRNA extraction

*각 조직샘플에서 균의 cfu 측정/ acid-fast 염색/ cytokine 면역염색

(다) 감염경로에 따른 병리학적 특성 분석

- C57BL/6 마우스에 MAP ATCC19698 표준균주를(10^9 cfu/ml) 복강 및 구강 접종하여 6주, 12주, 18주 이후 혈액, 간, 비장, 장간막림프절, Peyer's patch, 소장 등 조직을 샘플링하여 병리조직학적 분석을 수행하였다.
- 샘플링을 위한 육안적인 부검 소견에서 복강접종한 마우스는 감염 후 전 기간에 걸쳐 비장이 종대되어 있는 것을 확인하였으며 구강접종한 마우스에서는 특별한 변화가 관찰되지 않았다(그림 70).

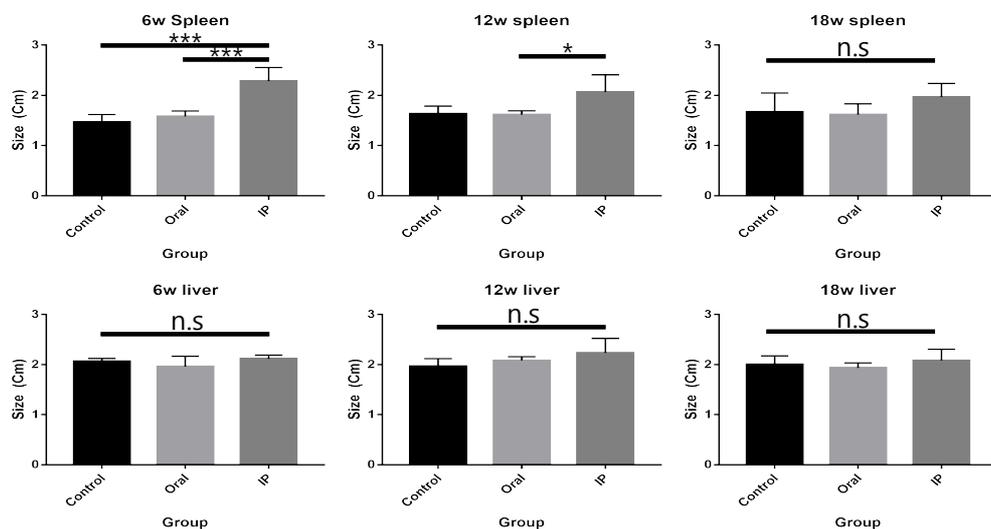


그림 70. MAP에 감염된 마우스의 감염 시기별 비장 및 간의 크기 변화

- H&E 염색을 통한 조직병리학적 변화 관찰

MAP를 복강 및 구강접종한 실험군 및 대조군 마우스의 간, 비장, 소장조직을 H&E 염색하여 MAP 감염의 특성인 granulomatous lesion을 관찰하였다. 감염 18주 후 구강접종된 마우스의 조직에서는 특별한 병변이 전혀 관찰되지 않았으나, 복강접종한 마우스의 조직에서는 감염 후 6주, 12주, 18주 모두에서 병변이 관찰되었다. 소장 조직에서는 복강 및 구강접종한 마우스 모두에서 특별한 병변이 관찰되지 않았다.

- 복강접종한 마우스에서 감염 시기별 간 및 비장에서의 병변의 변화 양상을 histopathologic scoring을 통해 평가하였다. 간에서는 각 조직샘플에서 관찰되는 granuloma의 빈도와 크기 등을 1단계에서 5단계 까지 구분하여 점수화 하였고 비장에서는 white pulp와 red pulp의 구조의 소멸 정도 및 macrophages가 침투한 정도에 따라 1단계에서 5단계 까지 점수화 하였다. Scoring 분석 결과 간에서는 시간이 갈수록 병변의 정도가 심각해지는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었으며 비장의 경우 감염 후 12주에서 가장 심각한 병변을 보였으며 6주와 18주 샘플간의 통계적인 차이는 관찰되지 않았다 (그림 71).

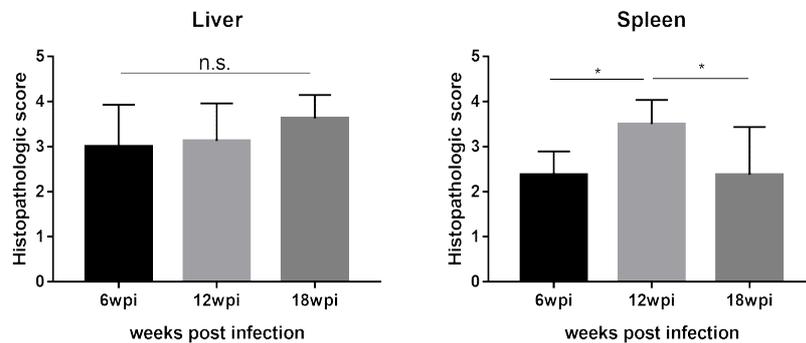


그림 71. H&E 염색을 통한 histopathologic scoring 결과

- Acid-fast 염색을 통한 조직에서의 MAP 분포 관찰:

병변이 확인된 복강접종군의 간 및 비장 샘플에 대해 acid-fast 염색을 수행하여 MAP균의 분포를 확인하고 그 정도에 따른 scoring을 실시하였다. 각 조직 샘플에서 무작위로 10군데의 병변을 확인한 후 그 속에 존재하는 acid-fast bacteria의 수를 단계별로 구분하여 1단계부터 5단계까지 수치화 하였다. Scoring 분석 결과 간 및 비장에서 모두 시간에 따른 유의적인 변화는 관찰되지 않았으며, 특징적인 것은 개체간의 variation이 컸다는 점이다. 다만 비장의 경우 시간에따라 MAP 균수가 점차 증가하는 경향을 보였으며 간의 경우 감염 후 6주에서 평균적으로 가장 많은 수의 박테리아가 관찰되었다 (그림 72).

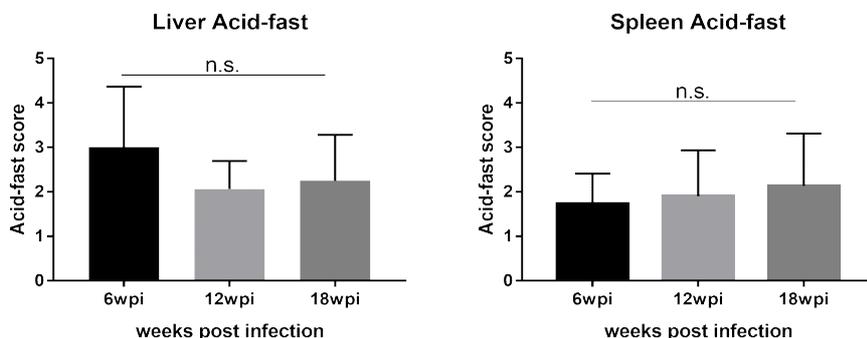


그림 72. Acid-fast 염색을 통한 MAP 감염 정도 scoring 결과

- Real-time qPCR을 통한 조직 내 MAP 분포 분석:

MAP 균을 감염시킨 마우스 각각의 조직에서부터 DNA를 추출하여 MAP 특이적인 유전자인 IS900을 증폭함으로써 각 조직에서 박테리아의 분포를 확인하였다(표 21). Ct값 분석 결과 복강접종군의 경우 전 기간에 걸쳐 간, 비장에서 많은 수의 MAP가 확인되었고 Peyer's patch, 장간막림프절에서도 IS900 유전자의 증폭이 관찰되었다. 또한 분변으로도 적은 수의 박테리아가 shedding 되는 것이 확인되었다. 따라서 MAP를 복강경로를 통해 접종하면 전신적인 감염을 유도하는 것으로 판단되었다. 구강접종군의 경우 감염 후 6주에서 장간막림프절, Peyer's patch, 분변으로부터 균이 검출되었으나 적은 수였으며 개체별로 검출되는 정도에서 차이를 보였다. 또한 간에서는 매우 미량의 균만이 검출되었고 비장에서는 전혀 검출되지 않아 장관내 국소적인 감염에 머무는 것으로 판단되었다. 그러나 감염 후 12주에서 구강접종한 마우스의 경우 적은 수이긴 하나 장간막림프절과 비장에서 균이 검출되어 눈에 띄는 병변이 존재하지 않더라도 개체 내에 감염이 지속되고 있는 것으로 판단되었다. 그러나 감염 후 18주에서는 다시 비장과 간에서는 균이 검출되지 않았고 장간막림프절에서만 소량 검출되었다.

표 21. 마우스 조직 내 MAP 검출을 위한 IS900 real-time PCR Ct값

Tissue	6wpi		12wpi		18wpi	
	Oral	IP	Oral	IP	Oral	IP
Feces	33.73	34.38	N.D	37.51	37.51*	36.30
MLN	33.30	27.35	35.84	27.03	35.12	34.05
Peyer's patch	35.96	30.49	N.D	30.92	36.29	33.75
Liver	37.31	24.31	N.D	25.22	36.77*	28.83
Spleen	35.80*	25.31	35.13	26.07	N.D	30.97

N,D: not detected. *: 1개 샘플에서만 증폭됨.

(라) 감염경로에 따른 면역학적 특성 분석

- ELISA를 이용한 cytokine 발현 분석:

복강 및 구강접종한 마우스로부터 비장을 추출하여 splenocyte를 분리하였다. 이후 분리된 splenocyte에 MAP의 whole cell lysate를 자극하여 12시간, 24시간 후 상층액을 샘플링하였다. ELISA기법을 이용하여 상층액에 존재하는 cytokine의 발현량을 측정하였다 (TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-17).

- TNF- α 의 경우 감염 후 6주에서는 대조군에 비해 복강 및 구강 접종군 모두에서 유의적인 발현 증가를 보였으며 감염 후 12주에서는 복강접종군만 유의적인 발현 증가가 관찰되었다. 감염 후 18주에서는 복강접종군에서 지속적인 발현 증가가 관찰되었으며 구강접종군에서 다시 대조군에 비해 유의적으로 높은 발현이 관찰되었다 (그림 73).

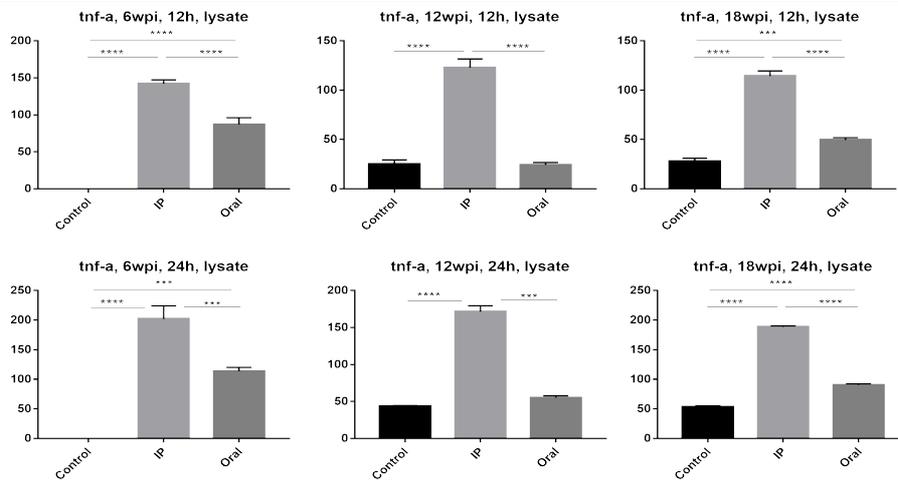


그림 73. MAP의 감염에 따른 감염 시기별 splenocyte 상층액 cytokine 발현 측정(TNF- α)

- IFN- γ 의 경우 감염 후 6주에서는 복강접종군이 다른 군에 비해 유의적으로 높은 발현이 관찰되었으나 감염 후 12주와 18주에서는 모든 군에서 유의적인 발현 차이가 관찰되지 않았다. 자극 24시간에 대한 결과 감염 12주와 18주 샘플에서 구강접종군이 다른 군에 비해 유의적으로 낮은 발현값을 나타내었다 (그림 74).

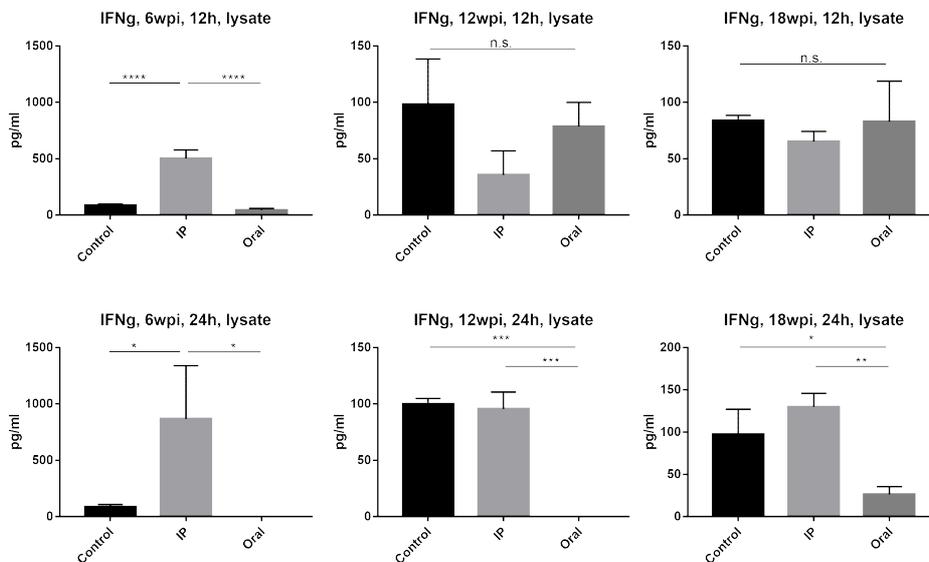


그림 74. MAP의 감염에 따른 감염 시기별 splenocyte 상층액 cytokine 발현 측정(IFN- γ)

- IL-10의 경우 감염 후 6주에는 대조군 대비 복강접종 및 구강접종군 모두에서 유의적으로 높은 발현이 관찰되었고 감염 후 12주와 18주에서는 복강접종군에서만 유의적으로 높은 발현값이 유지되었다 (그림 75).

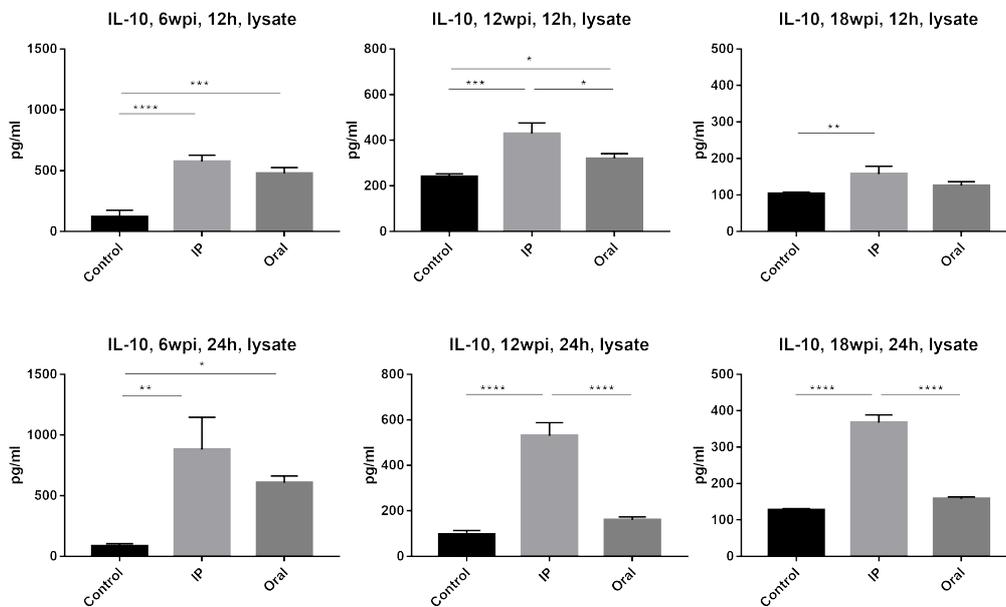


그림 75. MAP의 감염에 따른 감염 시기별 splenocyte 상층액 cytokine 발현 측정(IL-10)

- IL-17의 경우 감염 후 6주와 12주에서 구강접종군에서 다른 군에 비해 유의적으로 높은 발현이 관찰되었으나 전체적으로 발현량이 적게 나타났다 (그림 76).

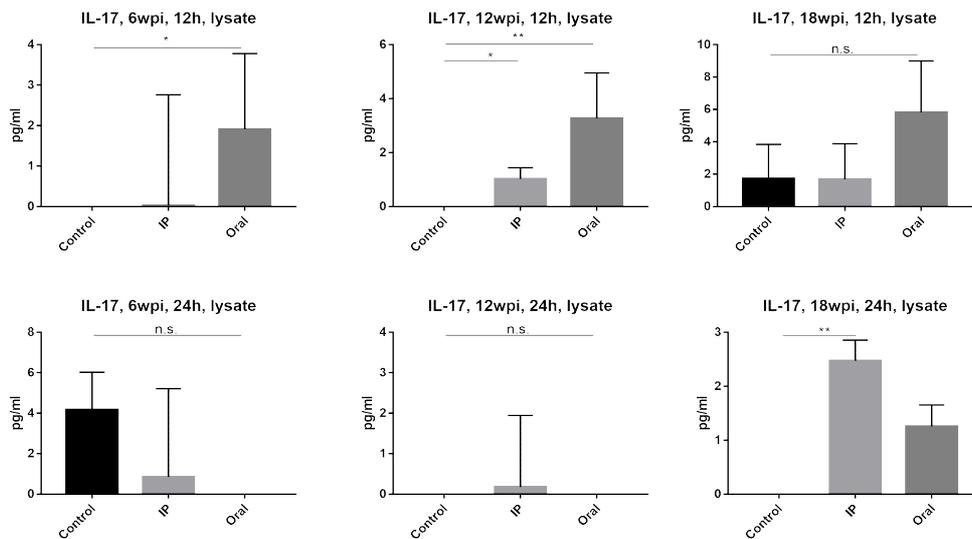


그림 76. MAP의 감염에 따른 감염 시기별 splenocyte 상층액 cytokine 발현 측정(IL-17)

※ 정리하자면, i) 복강접종군에서는 병리학적인 평가 결과 간과 비장에서 MAP 감염의 특징적인 병변인 granuloma가 관찰되었으며 감염 후 18주까지 병변이 지속되는 특징을 보였다. 그러나 주요한 면역반응의 경우 감염 후 6주까지는 IFN- γ 의 발현 증가가 관찰되었으나 이후에는 대조군과의 차이가 없었으며 TNF- α 와 IL-10의 경우 지속적으로 대조군에 비해 높은 발현을 보였다. 이를 통해 주요한 면역반응이 시간이 경과함에 따라 달라지는 것을 확인하였다.

ii) 구강접종군에서는 병리학적인 평가 결과 간과 비장에서는 특징적인 병변이 전혀 관찰되지 않았으며 감염 후 6주에서 qPCR을 통해 매우 적은 수의 균이 감염되어 있음을 관찰할 수 있었다. 따라서 구강을 통한 감염은 효과적으로 병변을 유도할 수 없음을 확인하였다. 그러나, 면역반응의 경우 감염 후 6주까지는 TNF- α 와 IL-10에서 대조군에 비해 유의적으로 높은 발현을 보였다. 이는 복강접종군에서와 유사한 경향이었다.

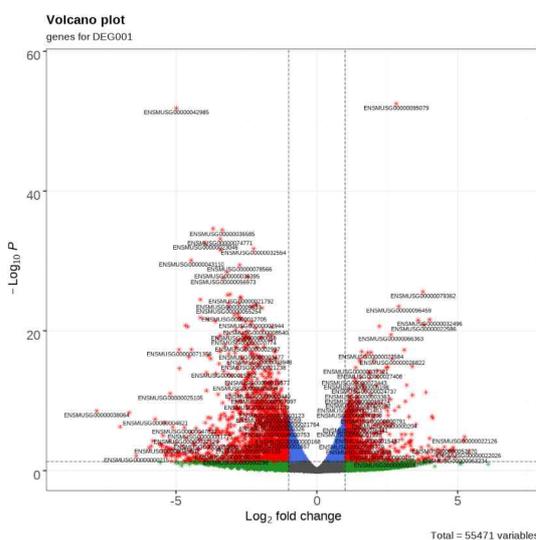
(마) MAP 감염에 따른 마우스의 유전체 발현양상 분석

- MAP 표준주 ATCC19698을 각각 복강 및 구강으로 접종한 마우스의 감염 후 6주차 비장, 장간막림프절로부터 total RNA를 추출하여 RNA-seq 분석을 수행하였다.
- Illumina TruSeq RNA sample prep kit를 사용하여 library가 제작되었고 시퀀싱은 Illumina NovaSeq 6000을 이용하여 paired-end 형태로 수행되었다.
- DEG 분석은 Cuffdiff를 이용하여 분석되었다.
- Canonical pathway 분석은 IPA tool을 이용하여 분석되었다.

① DEG 분석 결과

- DEG 분석은 각각 대조군 대비 실험군의 유전자 발현 차이를 fold-change가 2.0 이상이고 p-value가 0.05 미만인 조건으로 분석하였다 (그림 77, 78).

A)



B)

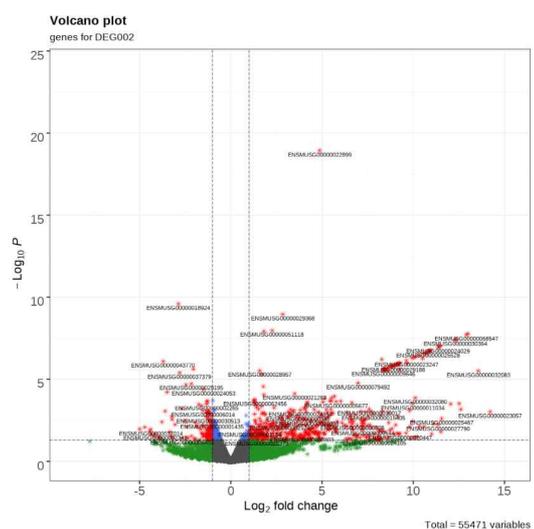


그림 77. MAP 감염 6주 후 장간막림프절에서의 DEG에 대한 volcano plot 분석.

A) 복강접종군. B) 구강접종군

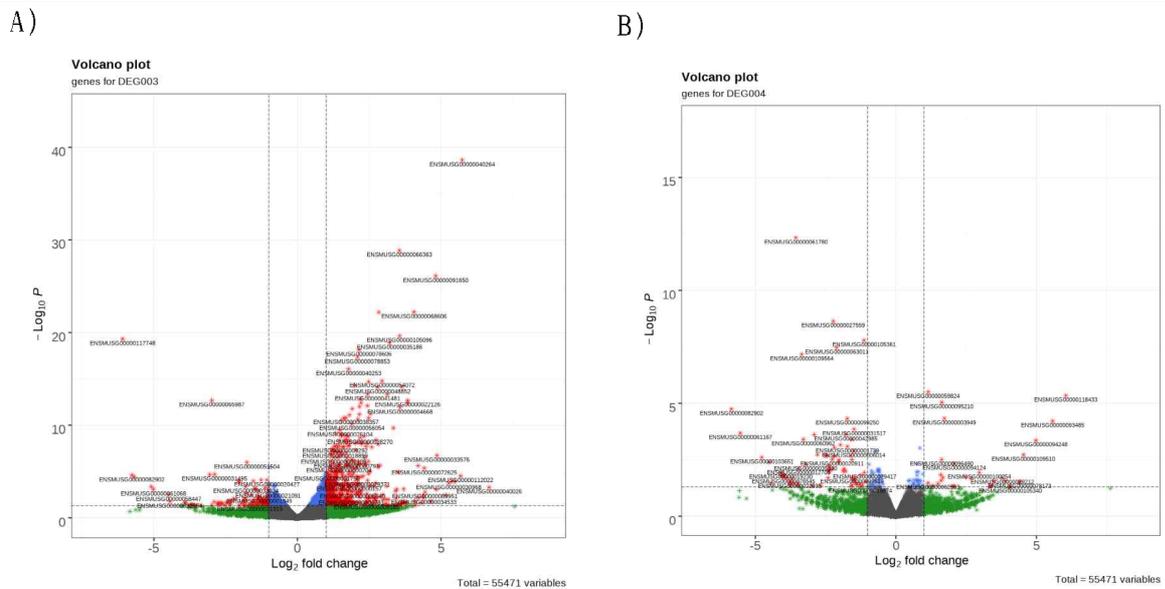


그림 78. MAP 감염 6주 후 비장에서의 DEG에 대한 volcano plot 분석.
A) 복강접종군. B) 구강접종군

- DEG 분석 결과 6주차 복강접종군의 장간막림프절에서는 대조군 대비 735개의 유전자 발현이 증가되었고 1725개의 유전자 발현이 감소되었다. 구강접종군의 장간막림프절에서는 462개의 유전자 발현이 증가되었고 119개의 유전자 발현이 감소되었다.
- 6주차 복강접종군의 비장에서는 대조군 대비 494개의 유전자 발현이 증가되었고 103개의 유전자 발현이 감소되었다. 구강접종군의 비장에서는 29개의 유전자 발현이 증가되었고 69개의 유전자 발현이 감소되었다.

② GO 분석 결과

- 각 그룹에서 발현이 변화한 유전자들의 기능 분류를 위해 gene ontoloy (GO) 분석이 수행되었다. 각 그룹별 DEG에서 enrichment된 GO term이 biological process, cellular component, molecular function의 세 가지 구분에 의해 정리되었다 (표 22).

표 22. 각 그룹별 GO enrichment 분석

No.	그룹명	DEG 수	Biological process	Cellular component	Molecular function
1	6w-IP-MLN	2,460	604/11.987 (5.039)	74/1.697 (4.361)	184/3.993 (4.608)
2	6w-Oral-MLN	581	355/11.987 (2.962)	59/1.697 (3.477)	148/3.993 (3.706)
3	6w-IP-Spleen	597	457/11.987 (3.812)	46/1.697 (2.711)	142/3.993 (3.556)
4	6w-Oral-Spleen	98	161/11.987 (1.343)	25/1.697 (1.473)	35/3.993 (0.877)

- Biological process (BP)의 term을 분석한 결과 6주차 복강접종군의 장간막림프절에서는 p-value에 따라 BP term을 정렬한 결과 주로 면역반응과 관련된 term들이 mapping되었다 (표 23). 6주차 구강접종군의 장간막림프절에서도 마찬가지로 면역반응과 관련된 term들이 주로 mapping 되었으나 주목할만한 부분은 cholesterol efflux 관련 term이 mapping되었다는 점이다 (표 24). Cholesterol은 pathogenic mycobacteria의 intracellular survival에 필수적인 탄소원으로 알려져 있기 때문에 해당 유전자들의 발현을 자세히 분석하여 병원성 기작을 규명하고자 한다.

표 23. MAP 감염 6주차 복강접종군 장간막림프절의 top 10 GO term(biological process)

ID	Term	# Genes	$-\log_{10}(p)$	z-score
GO:0030593	neutrophil chemotaxis	69	31.451	3.873
GO:0009617	response to bacterium	143	25.621	-0.961
GO:0006955	immune response	147	20.757	4.086
GO:0061844	antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide	60	18.731	-1.508
GO:0006635	fatty acid beta-oxidation	41	16.196	-3.795
GO:0006954	inflammatory response	287	14.735	3.9
GO:0050873	brown fat cell differentiation	33	14.418	-2.611
GO:0070098	chemokine-mediated signaling pathway	46	14.15	2.53
GO:0006911	phagocytosis, engulfment	28	13.89	1.89
GO:0050728	negative regulation of inflammatory response	93	13.837	0.422

표 24. MAP 감염 6주차 구강접종군 장간막림프절의 top 10 GO term(biological process)

ID	Term	# Genes	$-\log_{10}(p)$	z-score
GO:0051673	membrane disruption in other organism	11	21.528	2.53
GO:0050829	defense response to Gram-negative bacterium	63	17.849	1.236
GO:0061844	antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide	60	17.242	1.511
GO:0002227	innate immune response in mucosa	29	15.645	1.512
GO:0019731	antibacterial humoral response	33	14.825	1.616
GO:0033344	cholesterol efflux	24	13.649	3.266
GO:0072378	blood coagulation, fibrin clot formation	5	12.783	0.447
GO:0050892	intestinal absorption	16	12.699	1.5
GO:0032532	regulation of microvillus length	6	11.666	2.449
GO:0009617	response to bacterium	143	11.532	2.366

- 감염 6주차 복강접종군의 비장에서는 염증반응과 관련된 term이 가장 유의성이 높게 mapping되었고 나머지 top 10의 term 또한 면역반응과 관련된 term들이었다 (표 25). 감염 6주차 구강접종군의 비장에서는 상대적으로 낮은 p-value가 관찰되었는데 그 이유는 DEG 자체가 거의 확인되지 않았기 때문으로 보인다 (표 26). Mapping 된 GO term들도 대부분 억제와 관련있는 것으로 확인되어 추가적인 분석이 필요할 것으로 사료된다.

표 25. MAP 감염 6주차 복강접종군 비장의 top 10 GO term(biological process)

ID	Term	# Genes	$-\log_{10}(p)$	z-score
GO:0006954	inflammatory response	287	39.657	5.02
GO:0009617	response to bacterium	143	39.645	2.708
GO:0030593	neutrophil chemotaxis	69	35.299	2.734
GO:0042742	defense response to bacterium	116	28.054	1.86
GO:0071222	cellular response to lipopolysaccharide	158	25.795	2.927
GO:0006955	immune response	147	23.612	3.455
GO:0035458	cellular response to interferon-beta	30	21.979	2.268
GO:0045087	innate immune response	301	21.714	2.36
GO:0070098	chemokine-mediated signaling pathway	46	20.429	1.897
GO:0071346	cellular response to interferon-gamma	91	20.176	1.919

표 26. MAP 감염 6주차 구강접종군 비장의 top 10 GO term(biological process)

ID	Term	# Genes	$-\log_{10}(p)$	z-score
GO:0009617	response to bacterium	143	18.802	-2.437
GO:0030595	leukocyte chemotaxis	28	9.855	-1.961
GO:0060706	cell differentiation involved in embryonic placenta development	6	8.945	-0.816
GO:0070098	chemokine-mediated signaling pathway	46	8.408	-1.718
GO:0045471	response to ethanol	107	8.249	-0.923
GO:0030593	neutrophil chemotaxis	69	7.107	-2.324
GO:0010243	response to organonitrogen compound	17	6.932	-2.668
GO:0071347	cellular response to interleukin-1	82	6.449	-0.459
GO:0045638	negative regulation of myeloid cell differentiation	25	6.097	0.0
GO:0010714	positive regulation of collagen metabolic process	1	6.024	-1.0

③ Canonical pathway 분석을 통한 molecular mechanism 규명

- Canonical pathway 분석은 각 그룹의 대조군 대비 실험군의 유전자 발현 차이를 fold-change가 2.0 이상이고 p-value가 0.05 미만인 조건으로 분석하였다. 이때 분석을 위해 접종 경로와 샘플 (비장, 장간막림프절)에 따라 ‘장간막림프절(복강 경로 vs 구강 경로), 비장(복강 경로 vs 구강 경로), 복강 경로(장간막림프절 vs 비장)’의 3가지 그룹으로 나누었다.
- 이때 각각의 그룹마다 p-value가 0.05 이하인 유의적인 pathway 중에서 면역반응 및 lipid metabolism과 관련되어 공통으로 활성화된 pathway를 찾기 위해 비교 분석을 수행하였고, IPA tool을 이용하여 상위 50개의 canonical pathway를 정렬하였다. 또한 상위 50개의 canonical pathway의 z-score를 비교함으로써 해당 pathway의 up-regulate, down-regulate level의 차이를 분석하였다.
- Canonical pathway 정렬 결과, 세 그룹 모두 공통적으로 면역반응 관련 pathway인 ‘TREM1 signaling’ (그림 79, 80)과 ‘Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages’ (그림 81, 82)가 발견되었다. 해당 pathway의 up-regulation을 통해 MAP의 침투에 따른 host cell(macrophage)의 감염은 IFN- γ , TNF- α , IL-1 β 등 pro-inflammatory cytokine 분비의 증가를 발생시켰음을 알 수 있다.

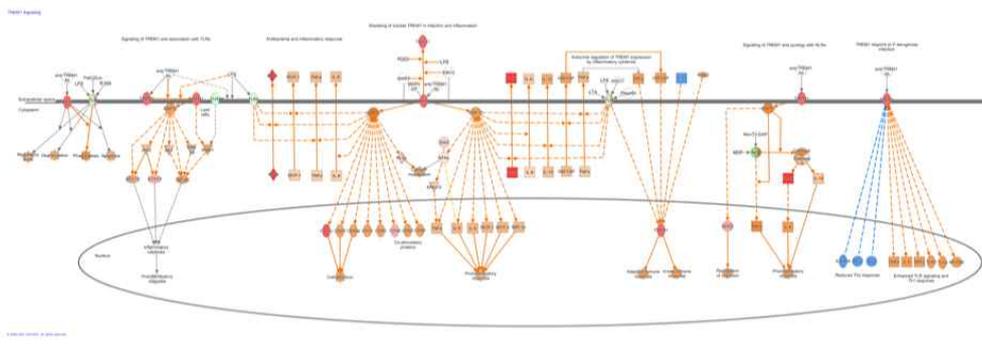


그림 79. MAP 감염 6주 후 장간막림프절의 복강 경로 접종 시 ‘TREM1 signaling’ pathway

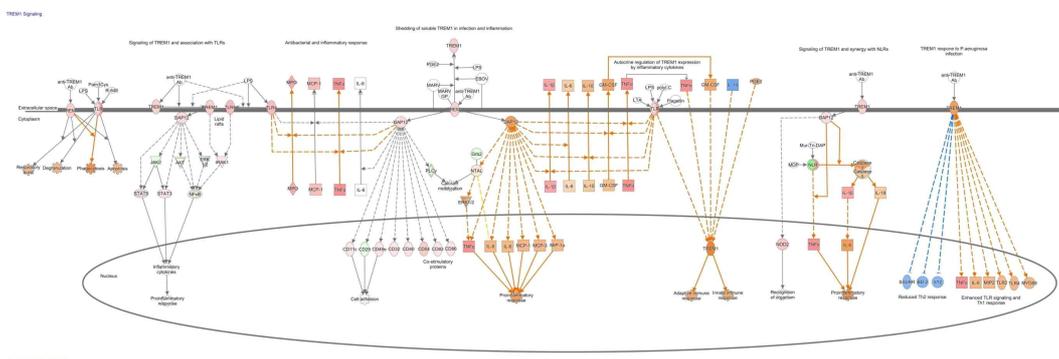


그림 80. MAP 감염 6주 후 비장의 복강 경로 접종 시 ‘TREM1 signaling’ pathway

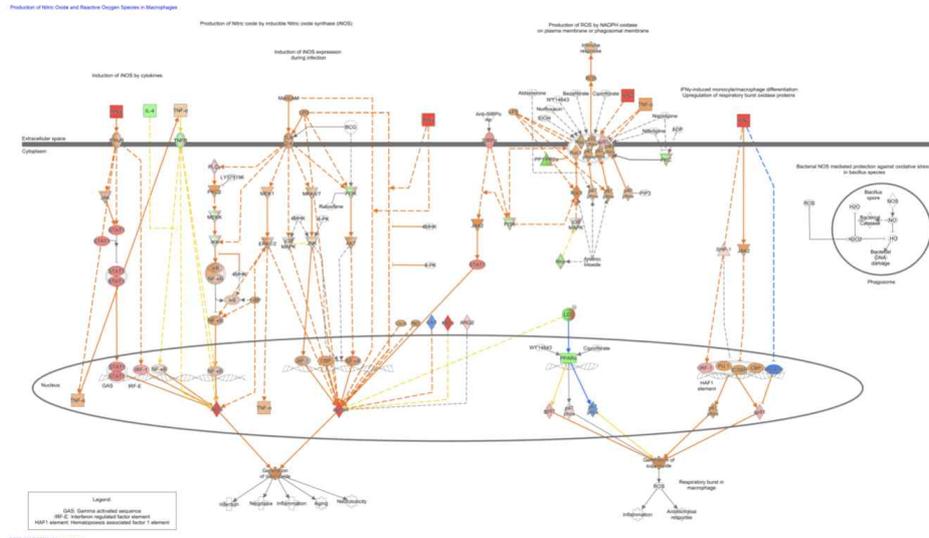


그림 81. MAP 감염 6주 후 장간막림프절의 복강 경로 집중 시 'Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages' pathway

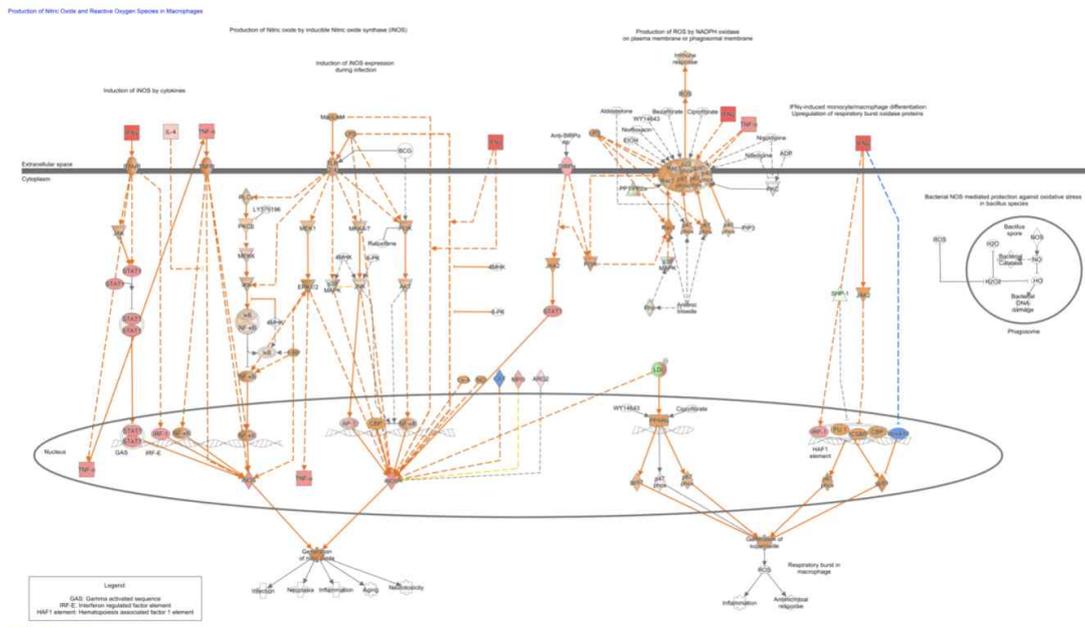


그림 82. MAP 감염 6주 후 비장의 복강 경로 집중 시 'Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages' pathway

- Lipid metabolism과 관련한 canonical pathway 정렬 결과로는 세 그룹 모두 공통적으로 'LXR/RXR Activation' (그림 83), 'Oxidative Phosphorylation' (그림 84), 'Fatty Acid β -oxidation I' (그림 85)이 발견되었다. 해당 pathway의 down-regulation은 MAP가 ATP를 생성하지 못하도록 'B-oxidation \rightarrow TCA cycle \rightarrow Oxidative phosphorylation' 순서를 통해 ATP 생성 과정을 감소시켜, ATP 사용을 막는 것으로 생각된다.

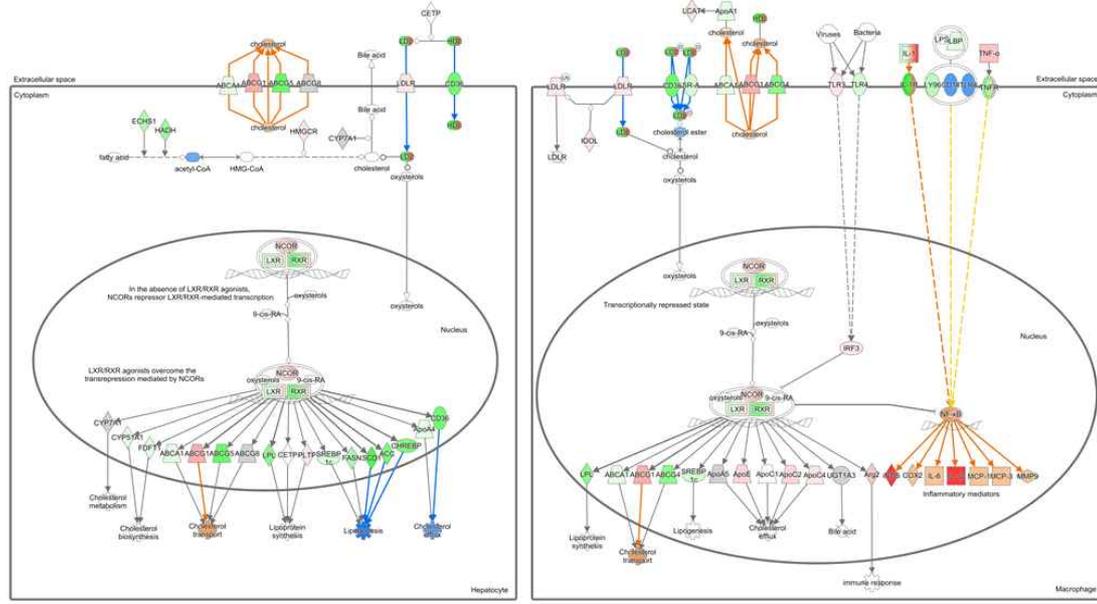


그림 83. MAP 감염 6주 후 장간막림프절의 복강 경로 접종 시 'LXR/RXR Activation' pathway

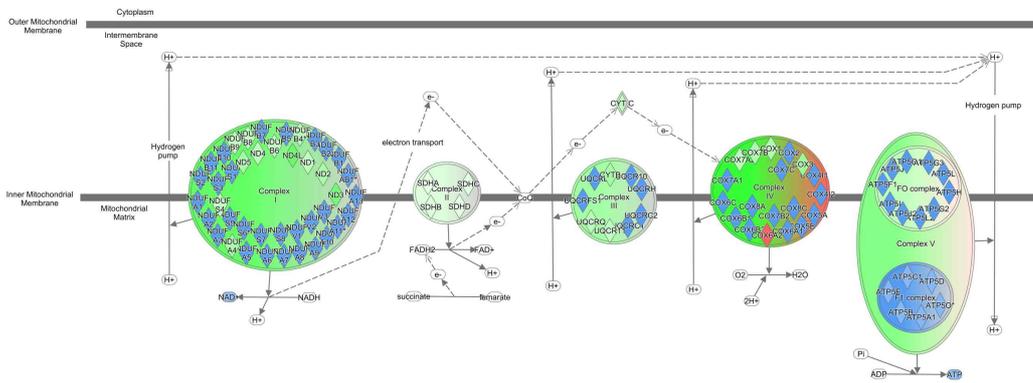


그림 84. MAP 감염 6주 후 장간막림프절의 복강 경로 접종 시 'Oxidative Phosphorylation' pathway

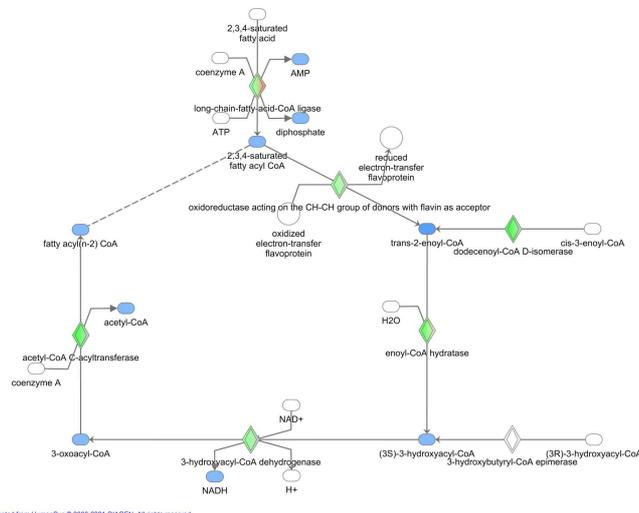


그림 85. MAP 감염 6주 후 장간막림프절의 복강 경로 접종 시 'Fatty Acid β -oxidation I' pathway

- Canonical pathway 분석 결과, 면역반응과 관련하여 6주차 장간막림프절(복강 경로 vs 구강 경로) 그룹의 비교를 통해 복강 경로로 MAP를 접종했을 때만 pathway의 up-regulation이 발생하거나 구강 경로와 비교했을 때 up-regulation level이 더 높았으며, 이에 따른 host cell 내 pro-inflammatory cytokine의 증가가 더 높았다. 비장(복강 경로 vs 구강 경로)의 경우도 복강 경로로 MAP를 접종했을 때만 면역반응 관련 pathway의 up-regulation이 발생하거나 구강 경로에 비해 up-regulation level이 더 높았다. 따라서 장간막림프절과 비장 내 복강 경로와 구강 경로의 비교를 통해 복강 경로로 MAP를 접종했을 때 면역반응과 관련된 pathway의 level이 더 증가했음을 알 수 있다.
- 앞선 두 그룹의 비교를 바탕으로 복강 경로(장간막림프절 vs 비장) 그룹을 분석했을 때, 장간막림프절의 면역반응 관련 pathway가 비장의 면역반응 관련 pathway보다 up-regulation level이 더 높았고, 최종적으로 장간막림프절로 복강 경로를 통해 MAP를 접종했을 때 면역반응이 더 높게 나타났음을 알 수 있다.
- Lipid metabolism과 관련한 canonical pathway 분석 결과로는 장간막림프절, 비장의 복강 경로 vs 구강 경로 그룹을 비교했을 때 모두 복강 경로로 MAP 접종 시 down-regulation level이 높았음을 확인하였다. 이를 기반으로 복강 경로(장간막림프절 vs 비장) 그룹에 적용시켰을 때 장간막림프절로 복강 경로를 통해 MAP를 접종했을 때 pathway의 down-regulation level이 더 높게 나타났다.
- 최종적으로 면역반응과 lipid metabolism 관련 canonical pathway 모두 구강 경로보다는 복강 경로에서 더 높은 up-regulation 및 down-regulation level이 관찰되었으며, 이를 기반으로 복강 경로 접종 시 장간막림프절과 비장을 비교했을 때 장간막림프절에서 더 높은 up-regulation 및 down-regulation level이 관찰되었다.
- 위 분석을 기반으로 MAP와 host cell의 상호작용을 분석해봤을 때, MAP의 침투에 따른 host cell(macrophage)의 감염은 IFN- γ , TNF- α , IL-1 등 pro-inflammatory cytokine의 secretion의 증가를 발생시키고, 저혈당(hypoglycaemia)을 유발할 수 있으며, 이는 host cell 내 glucose 가용성을 감소시켜 MAP가 cholesterol을 대체 에너지원으로 활용하게 할 수 있게 함을 알 수 있다. 그리고 이는 cell의 metabolic profile을 변화시켜 MAP가 에너지원으로 glucose 대신 cholesterol을 이용하는 'Energy Switch'가 일어나 host immune system을 회피 할 수 있게 된다 (그림 86). 더불어 MAP는 cholesterol을 탄소원 τ (carbon source)으로 이용하여 ATP를 생성하고, 에너지를 얻게 된다. 이를 위해 MAP가 host cell 내에 에너지 사용을 위해 cholesterol 축적을 진행하게 되면 host cell은 스스로 내부에 cholesterol이 너무 많다고 인식하여 negative feedback 작용으로 cholesterol transport, cholesterol efflux 등을 통해 cholesterol을 외부로 내보낸다. 또한 MAP가 cholesterol을 통해 ATP를 생성하지 못하도록 B-oxidation \rightarrow TCA cycle \rightarrow Oxidative phosphorylation을 통한 ATP 생성 과정을 down-regulation 시켜, ATP 사용을 막는 것으로 생각된다.

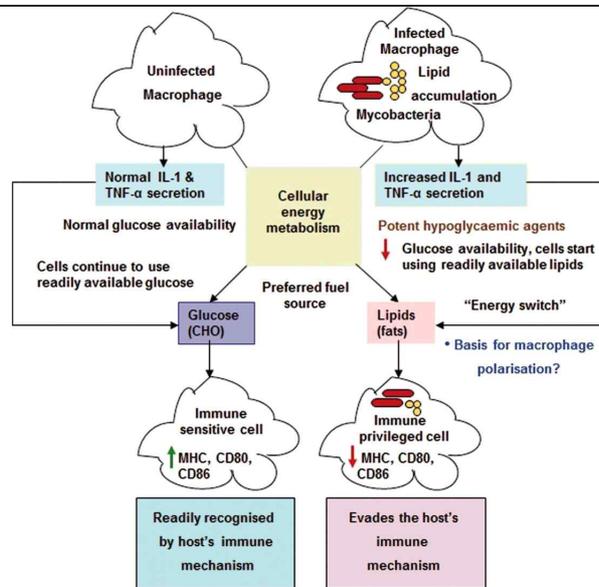


그림 86. Mycobacteria의 energy switch 작용을 통한 생존 전략

3. 장내 미생물균총과 소 요네병의 상관관계 규명

가. 장내미생물균총 분석 파이프라인 구축

(1) 전사 단위 분석을 위한 파이프라인 구축

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*(MAP)의 전사 단위(transcriptional unit) 발굴을 위해서는 MAP의 RNA를 분석해야 한다. RNA-seq을 통해 전사체(transcriptome)를 분석하기 위해서는 여러 프로그램을 사용해야 하고 동시에 상당한 시간이 소요된다. 이를 위해 one-click으로 각 단계가 순차적으로 넘어가면서 동시에 여러 샘플을 분석할 수 있는 자동화 파이프라인을 구축하였다. 파이프라인 구동을 위한 프로그램으로는 'bowtie', 'samtools', 'cufflinks'가 활용되었다.

- 자동화 분석 파이프라인 구축

구축된 파이프라인에서 먼저 진행할 단계는, 분리 및 sequencing을 통해 획득한 RNA sequence가 MAP의 reference genome에서 어디에 위치하는지 알아내는 것이다. 해당 작업은 'mapping'이라 불리며 'bowtie' 프로그램을 통해 진행된다. 해당 단계의 결과물로 Sequence Alignment MAP(SAM) 파일을 획득할 수 있으며 이후 해당 파일을 이용하여 다음 분석이 진행된다.

'samtools' 란 프로그램은 이름처럼 sam 파일을 다룰 수 있는 프로그램이다. 해당 프로그램을 이용하면 sam 파일을 'bam' 파일로 변환시킬 수 있다. bam 파일은 0/1 로 표현된 binary 파일로 컴퓨터가 보다 다른 형식의 파일을 처리할 때 보다 더 빠르게 분석을 진행할 수 있다.

'cufflinks'는 파이프라인의 마지막 단계에 사용되는 프로그램으로 위 단계에서 생성된 bam 파일을 통해, 각 base pair(bp) 별 발현량을 gff 형식의 표시해 준다. 해당 파일은 이후 자체 제작한 시각화 툴인 'MetaScope' 이용해서 유전자의 발현을 분석할 수 있다. 또한, cufflinks 에 있는 다른 명령어는 'cuffdiff'는 서로 다른 샘플의 bam 파일을 비교하여서 샘플 간에 발현량 차이를 확인할 수 있다.

```
#bowtie
sam_file = rna_seq_folder + "/alignment/%s.sam" % sample_name
unaligned = fastq_dir + "unaligned_%s" % sample_name
bowtie_command = "bowtie -X 1000 -n 2 -p 4 -3 3 -5 %s -1 %s -2 %s > %s --un %s" % (
    indexed_file, fastq_left, fastq_right, sam_file, unaligned)
print bowtie_command, "\n"
start_time = time.time()
!$bowtie_command
print "\n" bowtie time consume = %, time_consume(start_time), "\n"

#samtools
unsorted_bam_file = sam_file.replace(".sam", ".unsorted.bam")
samtools_command = "samtools view -bS %s -o %s" % (sam_file, unsorted_bam_file)
print samtools_command, "\n"
start_time = time.time()
!$samtools_command
print "\n" samtools time consume = %, time_consume(start_time), "\n"

#samtools_sort
sorted_bam_file = unsorted_bam_file.replace(".unsorted", "")
samtools_sort_command = "samtools sort %s -o %s" % (unsorted_bam_file, sorted_bam_file)
print samtools_sort_command, "\n"
start_time = time.time()
!$samtools_sort_command
os.remove(unsorted_bam_file)
print "\n" samtools_sort time consume = %, time_consume(start_time), "\n"

#cufflinks
cufflinks_out = rna_seq_folder + "/cufflinks/cufflinks_%s" % sample_name
cufflinks_command = "%s --library-type fr-firststrand -p 4 -G %s %s -o %s" % (
    cufflinks, gff_file, sorted_bam_file, cufflinks_out)
print cufflinks_command, "\n"
start_time = time.time()
!$cufflinks_command
print "\n" cufflinks time consume = %, time_consume(start_time), "\n"

#make_gff
gff_file = rna_seq_folder + "/gff/%s" % sample_name
makegff_command = "python %s --separate_strand --chromosome_size %s %s %s" % (
    makegff, chromosome_size, sorted_bam_file, gff_file)
print makegff_command, "\n"
start_time = time.time()
!$makegff_command
print "\n" make_gff time consume = %, time_consume(start_time), "\n"
```

그림 87. RNA-seq 분석 파이프라인 명령어 일부

- 자동화 분석 파이프라인 분석 결과

RNA-seq 분석 파이프라인을 사용하게 되면 분석 단계별로 5개의 폴더에 파일들이 저장된다. 'reference' 폴더에는 초기 분석에 사용된 reference의 genome이 저장되어있으며, 'alignment' 폴더안에 mapping 결과 파일과 samtools의 결과 파일들이 저장되어있다. 'cufflinks'와 'cuffdiff' 폴더에는 각각 해당 명령어를 수행할 결과 파일이 들어있으며, 'gff' 폴더에는 gff 형식으로 유전자들의 발현량을 정리한 파일들이 들어있다.

(2) MAP 의 RNA 정보 확보 및 분석

- 유전자 발현량 비교를 위한 RNA 정보 확보

Whole Genome Sequencing(WGS)과 annotation 과정을 통해 얻은 정보에서 실제로 발현되는 유전자의 정보 및 감염 여부에 따른 해당 유전자의 발현량 변화를 찾기 위해서는 두 가지 (비감염우, 감염우)의 RNA 정보가 필요함. 또한 표준주(ATCC19698)와 국내분리주 간의 발현 차이를 확인하기 위해 여러 샘플의 분석을 진행하기로 하였음. 각 RNA-seq 은 분석의 정확성을 위해 2 반복(duplicate)를 사용함.

- 분석 대상은 표준주(ATCC19698), B-type 국내분리주(MAPK_JJ1/13) 및 C-type 국내분리주(MAPK_CN7/15)의 3종임. 현재 표준주의 분석을 위해 ATCC19698로부터 RNA-seq 분석이 수행중이며 나머지 국내 분리주들에 대한 분석 예정임. 다만, MAP의 느리게 자라는 특성(6-8 주 소요) 및 두꺼운 세포벽 때문에(acid-fast) integrity가 높은 RNA를 분리하는 데 어려움이 있으며, 현재 mechanical disruption 조건 최적화 및 RNA extraction kit 종류, MAP 분리주의 최적화된 성장상태 조건 분석 등을 통해 RNA extraction 효율을 높이는 조건을 설정 중임.

나. 국내사육 젖소와 한우의 장내미생물균총 분석

(1) 소 분변 샘플을 통한 장내미생물균총 분석

- 구축한 분석 파이프라인을 활용한 장내미생물균총 분석

건강한 비감염우, 한우와 젖소에서 각 10마리씩, 총 20마리의 분변에서 미생물 샘플을 확보하고 장내미생물균총을 확인하기 위해 회사에 sequencing을 의뢰하였다.

표 27. 장내미생물균총 분석 대상 개체 정보

No.	개체번호	축종	Group	생년월일	최근분만일	산차	비고	사육정보
1	K8	한우	A	2014-02-22	2019-07-01	4		한우번식우 알파(카길배합 사료) +연맥
2	K10	한우	A	2014-04-02	2018-06-12	3		
3	K15	한우	A	2016-03-20	2018-03-14	1		
4	K19	한우	A	2016-02-09				
5	K25	한우	A	2016-02-25	2018-07-08	1		
6	K28	한우	A	2016-03-20				
7	K29	한우	A	2016-03-20	2018-10-29	1		
8	K31	한우	A	2016-09-25	2019-02-23	1		
9	K33	한우	A	2017-02-25				
10	K34	한우	A	2017-03-08				
11	23	젖소	B	2012-08-27	2019-03-21	4		퓨라텍오메가(카길배합사료) +TMR+연맥
12	38	젖소	B	2014-04-21	2018-11-14	2		
13	81	젖소	B	2015-02-04	2019-06-21	3		
14	123	젖소	B	2014-07-30	2019-03-30	3		
15	157	젖소	B	2015-04-25	2019-03-30	2		
16	196	젖소	B	2015-08-06	2019-06-19	2		
17	198	젖소	B	2015-09-10	2018-08-16	1	임신중	
18	226	젖소	B	2016-02-12	2018-10-28	1		
19	228	젖소	B	2016-03-18	2018-04-07	1	임신중	
20	229	젖소	B	2016-03-24	2018-10-23	1	임신중	

- 20개의 fastq 파일의 Q20/Q30 비율은 평균적으로 92%와 84%로 잘 완료되었음을 확인할 수 있었다. 그 외에 샘플들의 평균적인 reads 수는 277,800개, GC contents는 52% 정도로 산출되었다.
- 구축한 분석 파이프라인은 이용하여 sequencing 회사를 통해 얻은 fastq 파일들을 분석하였다. 20개의 fastq 파일들을 분석한 결과 총 415,971개 서열이 확인되었으며, 1,893개의 OTU가 정의되었다. OTU 중 가장 많은 것은 39,918개였으며 OTU들의 평균 개수는 219개였다.
- 장내미생물균총 분석 파이프라인의 결과물을 통해 각 taxonomy level 별로 분포를 확인하고 샘플 별 차이를 쉽게 비교할 수 있었다.
- 그림은 선명도의 한계로 Phylum과 Class 수준에서의 분포만 첨부.

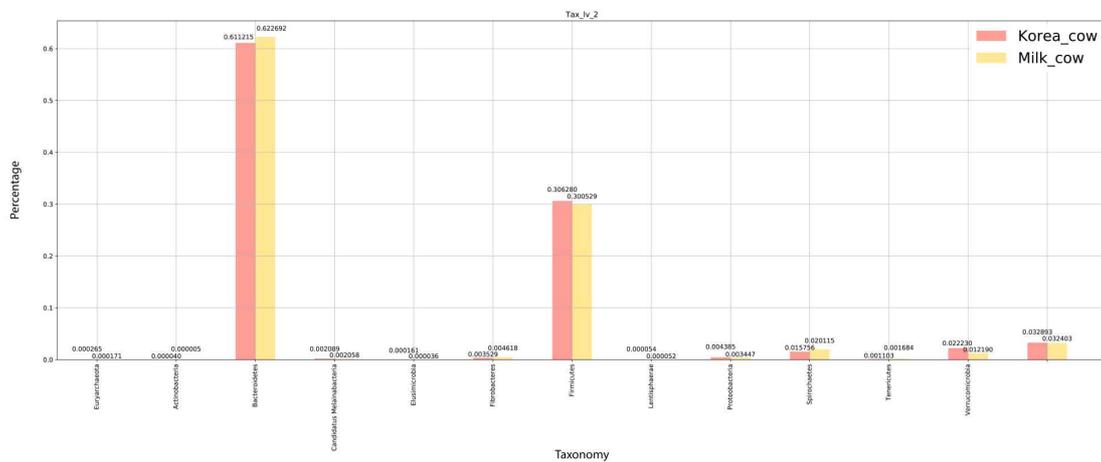


그림 88. Phylum 수준에서의 한우 및 젖소의 장내미생물균총 분포 비율

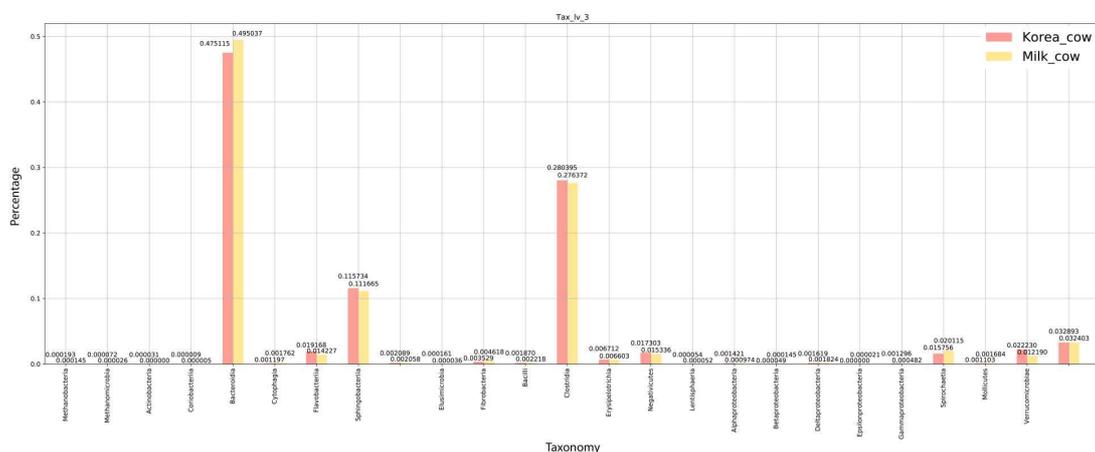


그림 89. Class 수준에서의 한우 및 젖소의 장내미생물균총 분포 비율

(3) 소 분변 샘플을 이용한 장내미생물균총 분석

- 건강한 젖소와 한우 각각 10마리로부터 분변을 채취하여 16S-seq 분석을 수행하였다. 이후 각각을 두 그룹으로 나누어 장내미생물균총에 차이가 있는지를 확인하였다.
- 그룹별 α -diversity 분석 결과 그룹에 따른 유의미한 다양성의 차이는 확인할 수 없었다 (그림 90).

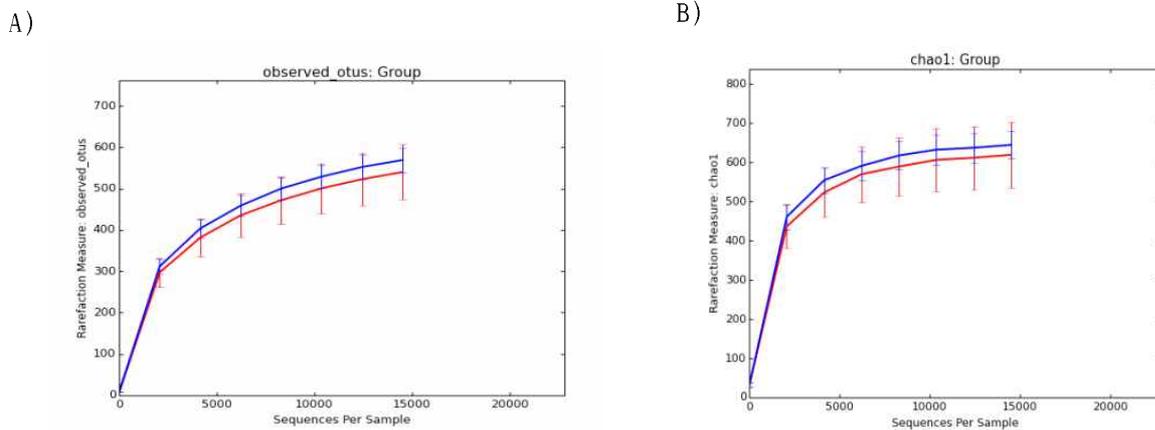


그림 90. 각 그룹의 α -diversity 분석. Red: 한우, Blue: 젖소.

- 그룹별 β -diversity 분석을 통한 다양성군집의 유사성을 분석한 결과 그룹별로 유의미한 카테고리 나누어지지 않았다 (그림 91).

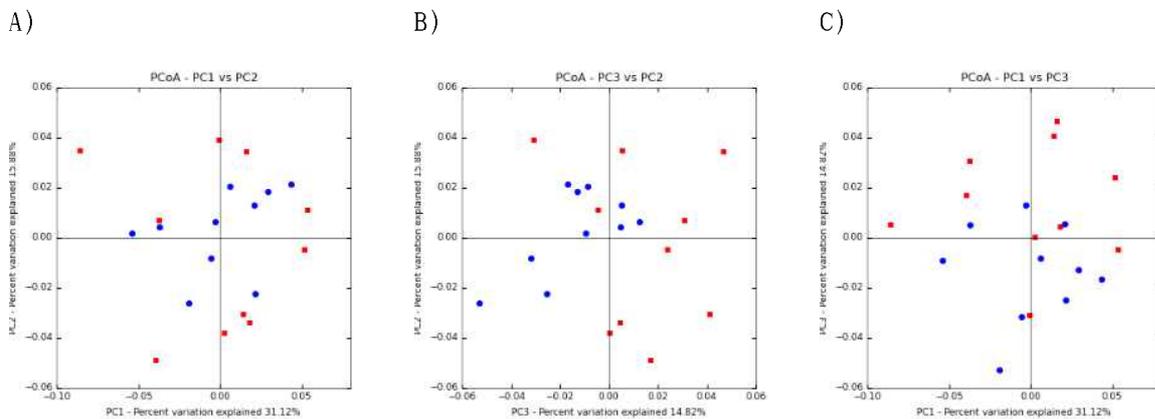


그림 91. Weighted unifrac-PCoA 분석을 통한 그룹별 β -diversity 분석. Red: 한우, Blue: 젖소. A) PC1 vs PC2, B) PC3 vs PC2, C) PC1 vs PC3.

- Taxonomic assignment:

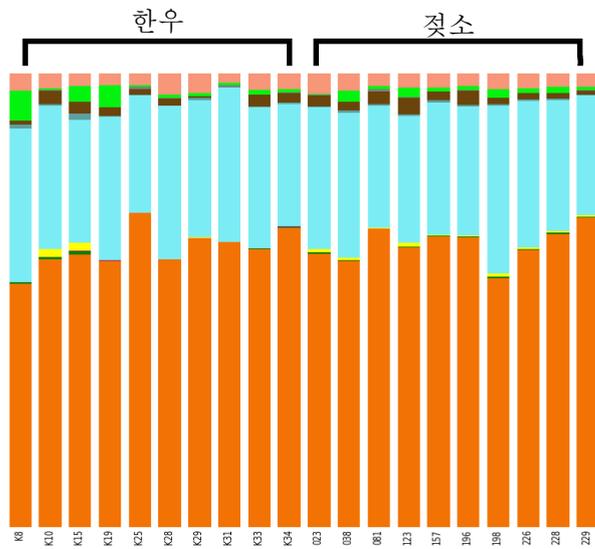


그림 92. Phylum level에서의 taxonomic assignment.

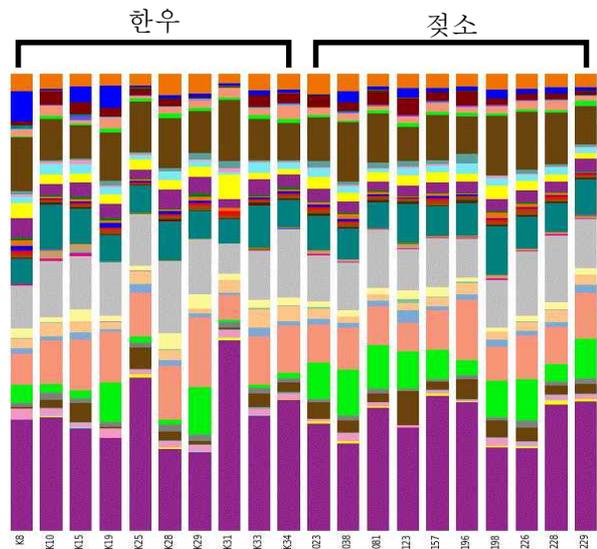


그림 93. Family level에서의 taxonomic assignment.

Phylum level과 family level 각각에서 OTU들의 taxonomy를 분석하여 taxon들의 비율을 그림으로 나타내었다(그림 92, 93). Phylum level에서는 한우와 젃소 간에 유의적인 비율 차이를 확인할 수 없었으나 family level에서는 Prevotellaceae가 젃소에서 유의적으로 높은 비율을 차지하고 있는 것을 확인할 수 있었다(그림 94). Prevotellaceae는 섬유질의 분해와 관련이 있는 미생물군집으로 사료 내 조섬유 비율이 높은 젃소에서 한우보다 높은 비율을 가지는 것으로 추측할 수 있다. 결론적으로 한우와 젃소 간의 눈에 띄는 장내미생물균총의 차이는 없으나 사료 성분에 따른 차이가 일부 존재할 수 있다고 판단된다.

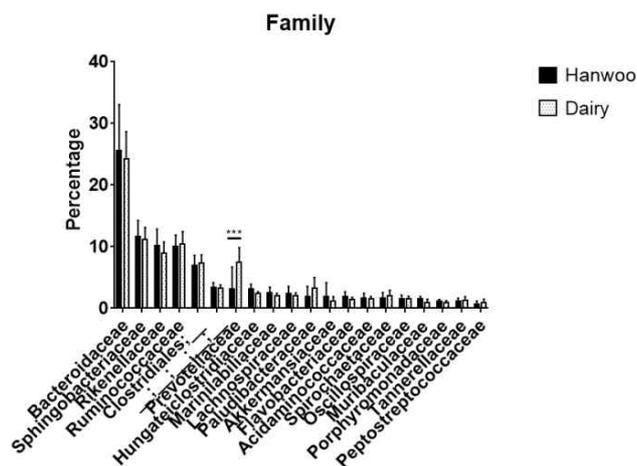


그림 94. Family level에서의 젃소와 한우 그룹간의 taxon 비율 차이 비교

다. 요네병 감염우의 장내미생물균총 분석

(1) 장내미생물균총 분석을 위한 분변 샘플 확보

- 요네병 감염이 확인된 목장으로부터 감염 단계별 개체들의 분변을 확보하였다 (표 28). 감염 단계는 ELISA 검사와 fecal PCR 모두에서 양성인 개체(Group 1), ELISA검사에서만 양성인 개체(Group 2), fecal PCR에서만 양성인 개체(Group 3), 양성 개체이나 현재 검사에서는 음성으로 확인된 개체(Group 4) 등 4가지 그룹으로 나누어 총 16개 샘플에 대한 16S rRNA 시퀀싱을 수행하였다.

(2) 16S rRNA 시퀀싱 분석 결과

- 총 16개 분변 샘플에 대한 시퀀싱이 완료되었다 (표 29).

표 28. 장내미생물균총 분석에 사용된 샘플 리스트

그룹	개체 번호	출생일	산차수	최근 분만일	착유 여부	IS 900	IS Map02	S/P ratio	Culture	비고
1	134	2011-09-22	4	2019-10-31	착유	21.67	22.71	57.5	+	Heavv shedder
	188	2014-03-04	4	2019-10-19	착유	28.18	29.73	175.9	+	High shedder
	202	2015-01-27	3	2019-09-10	착유	33.53	35.29	93.4	+	
	167	2013-05-24	3	2019-02-04	착유	-	-	76.4	-	
2	10	2013-06-05				-	-	115.4	-	2019년11월 fecal PCR 양성
	11	2013-04-11				-	-	148.5	-	
	17	2015-01-27				-	-	163.3	-	Both의 202번
	97	2011-08-05	5	2018-07-20	건유	35.63	36.88	1.2	+	
3	224	2014-09-09	2	2018-07-20	건유	34.47	35.26	2.4	(+)	
	237	2016-03-12	1	2018-05-06	건유	34.3	36.81	3.4	(+)	

	82	2011-05-07	5	2019-11-14	착유	31.38	32.84	0.1	(+)	
	13	2014-03-04				-	-	2.7	-	High shedder 였으나 음성
4	9	2013-05-24				-	-	40.6	-	ELISA 양성이었 으나 음성
	181	2013-04-11	4	2019-01-30	착유	-	-	20.0	-	20년에 ELISA 추가확진
	168	2013-06-05	3	2018-10-17	착유	39.35	35.62	7.6	(+)	19년 PCR, 20년 ELISA
	52	2017-03-08						45.8	-	doubt

표 29. 16개 분변 샘플의 16S rRNA 시퀀싱 결과

Sample Name	Total Bases	Read Count	N (%)	GC (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
134	23,620,659	52,524	0	52.19	97.89	92.45
188	25,971,044	57,798	0	52.66	97.67	91.91
202	29,344,777	65,152	0	52.28	97.67	91.85
167	18,968,052	42,244	0	52.73	97.55	91.57
010	25,610,806	57,564	0	53.48	97.73	92.07
011	29,211,806	65,169	0	52.69	97.73	92.04
017	25,166,155	56,062	0	52.61	97.8	92.24
097	22,710,796	50,547	0	52.47	97.73	92.01
224	30,732,915	68,347	0	52.31	97.65	91.84
237	25,781,327	57,404	0	52.33	97.48	91.54
082	20,805,511	46,205	0	52.33	97.78	92.17
168	25,530,038	56,820	0	52.83	97.79	92.17
013	27,765,433	61,900	0	52.62	97.63	91.86
009	26,690,661	59,481	0	53.06	97.75	92.05
181	29,694,522	66,081	0	53.04	97.66	91.97
052	19,883,565	44,279	0	52.46	97.71	91.89

- OTU 분석 결과 총 163,330개의 서열이 확인되었으며 *de novo* 방식에 의해 총 OTU는 778개로 정의되었다. 평균 OTU counts는 336개였다 (그림 95).

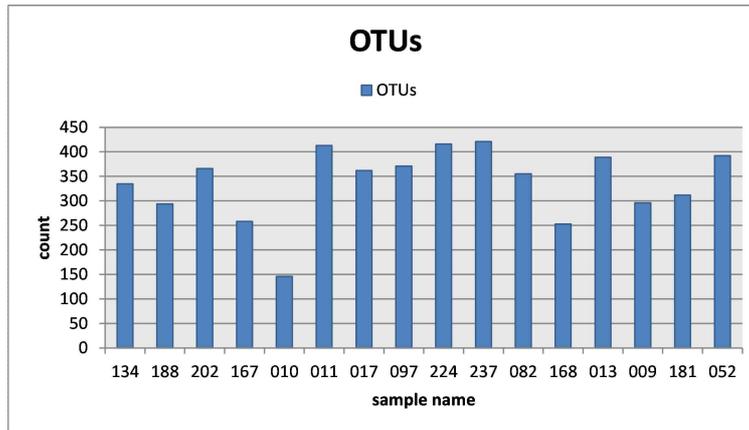


그림 95. 장내미생물균총의 OTU counts

- 그룹별 α -diversity 분석 결과 그룹에 따른 유의미한 다양성의 차이는 확인할 수 없었으나 PCR에서만 양성인 개체, 감염되었으나 현재는 음성인 개체, 둘 모두에서 양성인 개체 순으로 richness의 차이를 보였다(그림 96).

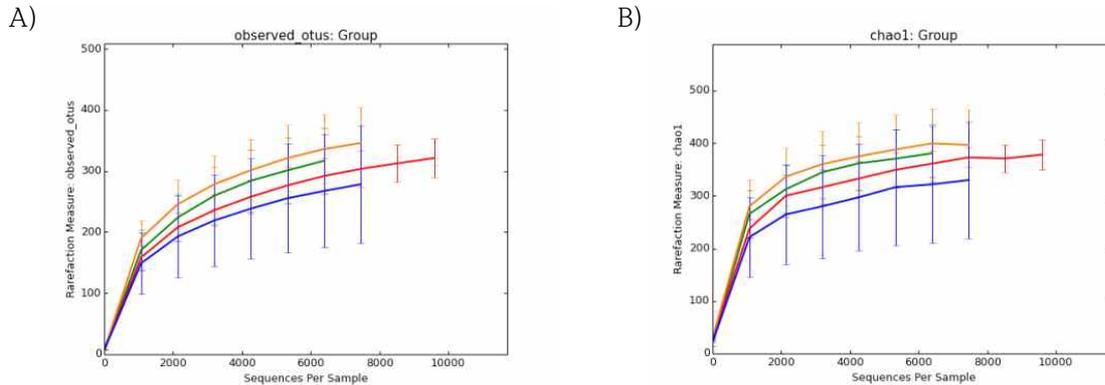


그림 96. 각 그룹의 α -diversity 분석. Red: Group 1, Blue: Group 2, Orange: Group 3, Green: Group 4. A) Observed OTUs, B) chao1 index.

- 그룹별 β -diversity 분석을 통한 다양성군집의 유사성을 분석한 결과 그룹별로 유의미한 카테고리로 나누어지지 않았다(그림 97).

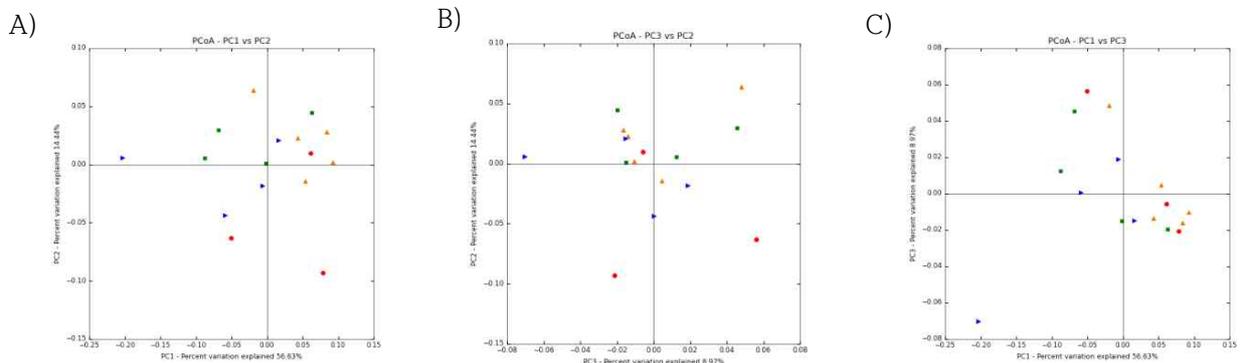


그림 97. Weighted unifrac-PCoA 분석을 통한 그룹별 β -diversity 분석. Red: Group 1, Blue: Group 2, Orange: Group 3, Green: Group 4. A) PC1 vs PC2, B) PC3 vs PC2, C) PC1 vs PC3.

- Taxonomic assignment:

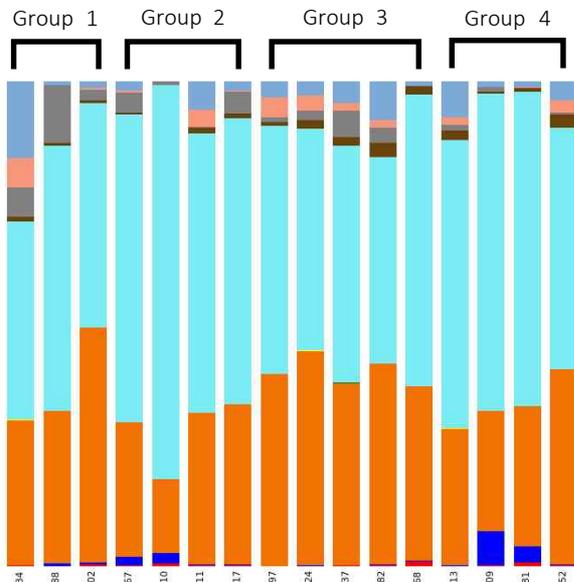


그림 98. Phylum level에서의 taxonomic assignment

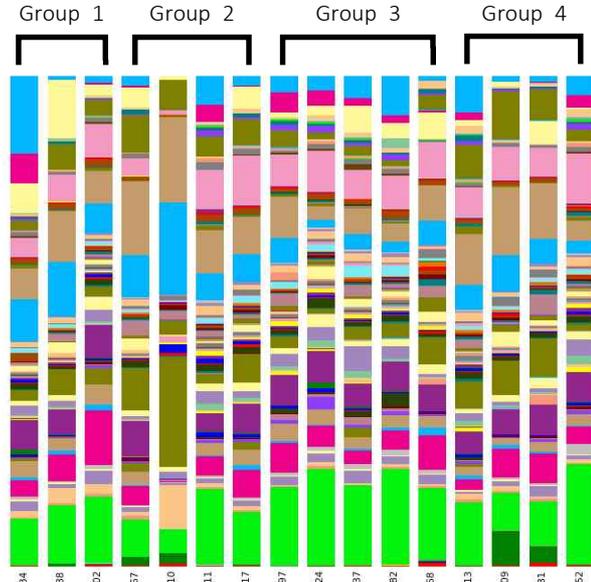


그림 99. Genus level에서의 taxonomic assignment

- Phylum level과 genus level 각각에서 OTU들의 taxonomy를 분석하였다(그림 89, 90). 10 번 샘플의 경우 α -diversity 분석에서 낮은 수의 OTU들이 관찰되었는데 phylum level에서 taxonomic assignment 결과 Firmicutes의 비율이 다른 샘플에 비해서 유의적으로 높은 비율을 차지했다. 이는 같은 그룹의 다른 샘플들과의 비교에서도 해당 샘플만의 특징으로 나타나 요네병 감염 여부와는 상관없이 장내미생물균총에 영향을 주는 다른 요인들의 영향을 받은 것으로 판단된다. 이외에 Actinobacteria의 비율이 상대적으로 높은 샘플이 존재했다. Actinobacteria로 확인된 OTU들 중 많은 수는 genus level에서 확인했을 때 Bifidobacterium으로 확인되었다. 추가적인 통계적 분석이 필요하긴 하나 높은 Bifidobacterium의 비율은 fecal shedding 개체보다 ELISA 양성과 관련있는 개체들에서 대체적으로 높게 나타났다(Fecal shedding 개체는 168번을 제외하고는 모두 0.0%였으며 ELISA 양성이거나 ELISA에 양성이었다가 음성으로 바뀐 샘플 등에서는 0.0% 이상인 개체들이 다수 관찰되었다).

- 추후 기확보중인 요네병 음성농장으로부터 얻은 장내미생물균총 정보와 비교 분석하여 1) 감염개체 vs 비감염개체, 2) 감염농장 vs 비감염농장, 3) 감염우 vs 감염동거우, 4) shedding vs non-shedding 등 여러 그룹으로 나누어 추가적인 분석을 실시할 예정이다.

(3) 미감염우, 동거우, 감염우 간 미생물 균총 분석

- 2, 3차 년도에서는 장 내 균총 파이프라인을 구축하고 이를 업데이트하면서 미감염우와 감염우에 대한 기본적인 장내 균총 양상 파악을 진행하였다. 이번 4차 년도에서는 추가로 확보된 소 유래 분변 샘플로부터 16S rRNA 시퀀싱 데이터를 생성하여 분석에 활용하고자 하였으며, 유의미한 지표를 발굴하기 위해 MAP 감염에 민감하게 반응하는 주요 미생물들을 선별하는 과정과 ELISA s/p ratio나 fecal PCR 결과 등 기존의 진단 방식의 결과값을 통합하여 분석을 진행하였다.

- 연구는 크게 샘플의 특성을 정리한 메타데이터 파일 생성, 장 내 균총 분석에 특화된 파이프라인을 활용한 미생물 군집 분석, 자체 제작한 알고리즘 등을 활용한 추가 분석의 단계로 진행되었다 (그림 100). 분석에 사용된 샘플은 총 52개 (감염우: 22, 동거우: 10, 미감염우: 20)로써 2차 년도부터 수집된 샘플을 모두 활용하였다. 장 내 균총 분석용 파이프라인은 가장 널리 사용되며 정확성을 가지고 있다고 알려진 QIIME2를 활용하여 α -diversity, β -diversity, 그리고 생물군 분류 지정 (taxonomy assignment)을 진행하였다. 이후 추가적으로 미생물 분류 단위인 ASV (amplicon sequence variant)의 상대적 풍부도(relative abundance) 값을 활용한 다양한 추가 분석과 PICRUST2를 활용한 집단유전체 예측 등을 통해 특성을 파악하고자 하였다.

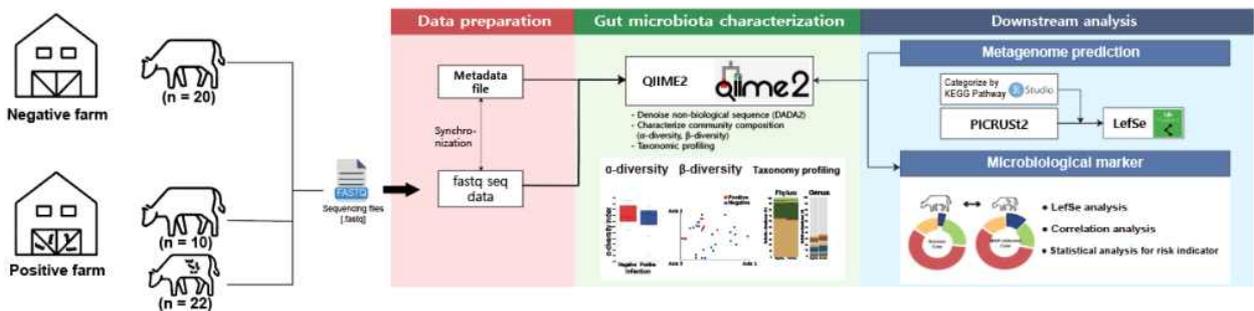


그림 100. 총 52개 샘플을 활용한 장내균총 분석 모식도

- MAP 감염 유무, 감염우와의 동거 유무, ELISA 혹은 fecal PCR 결과 등 샘플 별 특성에 따라 아그룹화(subgrouping) 및 통계적 분석을 진행할 수 있도록 메타데이터를 생성하였다 (표 30). 동일 개체인데 식별번호가 바뀐 경우에는 이를 혼동하지 않기 위해 1차 샘플링 시 식별번호에 2차 샘플링은 “.2”, 3차 샘플링은 “.3” 등으로 표기를 바꾸어 분석을 진행하였다.

표 30. 샘플 별 특성을 반영한 메타데이터

Sample ID	Infection result	Subgroup	ELISA s/p ratio	MAP_CFU (Fecal PCR)	Sampling	Farm	Lactation	Parity	Cow type	Age (yr)
23	Negative	Co-housing_negative	6.8	-	2021	Positive Farm	Dry	2	Dairy	6
28	Negative	Co-housing_negative	0.7	-	2021	Positive Farm	Lactation	4	Dairy	7
33	Negative	Co-housing_negative	1.6	-	2021	Positive Farm	Dry	3	Dairy	7
38	Negative	Co-housing_negative	7.9	-	2021	Positive Farm	Dry	2	Dairy	6
41	Negative	Co-housing_negative	1.9	-	2021	Positive Farm	Lactation	2	Dairy	6
42	Negative	Co-housing_negative	3.4	-	2021	Positive Farm	Lactation	2	Dairy	5
50	Negative	Co-housing_negative	4.6	-	2021	Positive Farm	Lactation	2	Dairy	5
61	Negative	Co-housing_negative	2.5	-	2021	Positive Farm	Dry	1	Dairy	4

81	Negative	Co-housing _negative	2.5	-	2021	Positive Farm	Lactation	1	Dairy	4
8221	Negative	Co-housing _negative	5.1	-	2021	Positive Farm	Lactation	1	Dairy	3
neg_123	Negative	Negative-f arm	3.95297 6	-	2019	Negative Farm	Unknown -negfarm	3	Dairy	5
neg_157	Negative	Negative-f arm	5.77516 5	-	2019	Negative Farm	Unknown -negfarm	2	Dairy	4
neg_196	Negative	Negative-f arm	6.12784 7	-	2019	Negative Farm	Unknown -negfarm	2	Dairy	4
neg_198	Negative	Negative-f arm	8.87582 7	-	2019	Negative Farm	Gestation	1	Dairy	4
neg_226	Negative	Negative-f arm	1.93240 3	-	2019	Negative Farm	Unknown -negfarm	1	Dairy	3
neg_228	Negative	Negative-f arm	6.43644 4	-	2019	Negative Farm	Gestation	1	Dairy	3
neg_229	Negative	Negative-f arm	4.18809 7	-	2019	Negative Farm	Gestation -miscarria ge	1	Dairy	3
neg_23	Negative	Negative-f arm	10.7641 4	-	2019	Negative Farm	Unknown -negfarm	4	Dairy	3
neg_38	Negative	Negative-f arm	2.90227 8	-	2019	Negative Farm	Unknown -negfarm	2	Dairy	5
neg_81	Negative	Negative-f arm	4.66568 7	-	2019	Negative Farm	Unknown -negfarm	2	Dairy	4
neg_K10	Negative	Negative-f arm	9.44893 5	-	2019	Negative Farm	Unknown -negfarm	3	Hanwo o	5
neg_K15	Negative	Negative-f arm	44.1440 1	-	2019	Negative Farm	Unknown -negfarm	1	Hanwo o	3
neg_K19	Negative	Negative-f arm	8.41293 2	-	2019	Negative Farm	Unknown -negfarm	0	Hanwo o	3
neg_K25	Negative	Negative-f arm	7.43570 9	-	2019	Negative Farm	Unknown -negfarm	1	Hanwo o	3
neg_K28	Negative	Negative-f arm	2.82880 2	-	2019	Negative Farm	Gestation	0	Hanwo o	3
neg_K29	Negative	Negative-f arm	4.35709	-	2019	Negative Farm	Unknown -negfarm	1	Hanwo o	3
neg_K31	Negative	Negative-f arm	6.25275 5	-	2019	Negative Farm	Unknown -negfarm	1	Hanwo o	3
neg_K33	Negative	Negative-f arm	5.89272 6	-	2019	Negative Farm	Gestation	0	Hanwo o	2
neg_K34	Negative	Negative-f arm	3.35782 5	-	2019	Negative Farm	Gestation	0	Hanwo o	2
neg_K8	Negative	Negative-f arm	3.19617 9	-	2019	Negative Farm	Unknown -negfarm	4	Hanwo o	5
134	Positive	Positive	57.5	2.46E+0 7	2019	Positive Farm	Lactation	4	Dairy	8
167	Positive	Positive	76.4	-	2019	Positive Farm	Lactation	3	Dairy	6
167.2	Positive	Positive	40.6	-	2020	Positive Farm	Lactation	4	Dairy	7

167.3	Positive	Positive	51.3	-	2021	Positive Farm	Lactation	4	Dairy	8
168	Positive	Positive	7.6	8.03E+00	2019	Positive Farm	Lactation	3	Dairy	6
168.2	Positive	Positive	115.4	-	2020	Positive Farm	Lactation	4	Dairy	7
181	Positive	Positive	148.5	-	2020	Positive Farm	Dry	4	Dairy	7
181.2	Positive	Positive	20	-	2019	Positive Farm	Lactation	4	Dairy	3
181.3	Positive	Positive	138.3	-	2021	Positive Farm	Lactation	5	Dairy	8
188	Positive	Positive	175.9	1.01E+05	2019	Positive Farm	Lactation	4	Dairy	5
188.2	Positive	Positive	2.7	-	2020	Positive Farm	Dry	4	Dairy	6
202	Positive	Positive	93.4	1.10E+03	2019	Positive Farm	Lactation	3	Dairy	4
202.2	Positive	Positive	163.3	-	2020	Positive Farm	Lactation	3	Dairy	5
224	Positive	Positive	2.4	4.95E+02	2019	Positive Farm	Dry	2	Dairy	5
237	Positive	Positive	3.4	5.72E+02	2019	Positive Farm	Dry	1	Dairy	3
32	Positive	Positive	3.1	4.09E+03	2021	Positive Farm	Lactation	2	Dairy	6
35	Positive	Positive	75.7	6.71E+04	2021	Positive Farm	Lactation	3	Dairy	6
58	Positive	Positive	154.3	-	2021	Positive Farm	Lactation	2	Dairy	4
68	Positive	Positive	10	1.14E+02	2021	Positive Farm	Lactation	1	Dairy	3
79	Positive	Positive	0	6.46E+03	2021	Positive Farm	Lactation	1	Dairy	3
8219	Positive	Positive	0.1	6.74E+03	2019	Positive Farm	Lactation	5	Dairy	8
97	Positive	Positive	1.2	1.86E+02	2019	Positive Farm	Dry	5	Dairy	8

- QIIME2의 세부 진행 과정은 크게 demultiplexing, trimming, denoising, diversity analysis & taxonomic assignment로 이루어진다 (그림 101). 먼저 복수의 FASTQ 파일들을 샘플 별로 정방향(forward, R1)과 역방향(reverse, R2)에 맞게 demultiplex를 한 뒤, 시퀀스 데이터의 질을 Q score>15인 부분만이 남도록 trimming하는 과정을 거친다. 이후 chimera sequence 등을 제거해주는 DADA2 기반의 denoising 작업을 진행하여 미생물 군집 분석에 활용할 feature table를 확보한다. 이후 각 feature들 간 유의관계를 파악하기 위한 phylogenetic tree를 제작하고, 샘플 별 sampling depth 등을 고려하여 diversity analysis를 진행한다. 또한, QIIME2에 내장된 Naive-Bayes classifier를 활용하여 각 feature들의 생물군 분류 지정 작업을 통해 taxonomy table 및 생물군 수준 (taxonomy level) 별 bar chart 등을 확보한다.

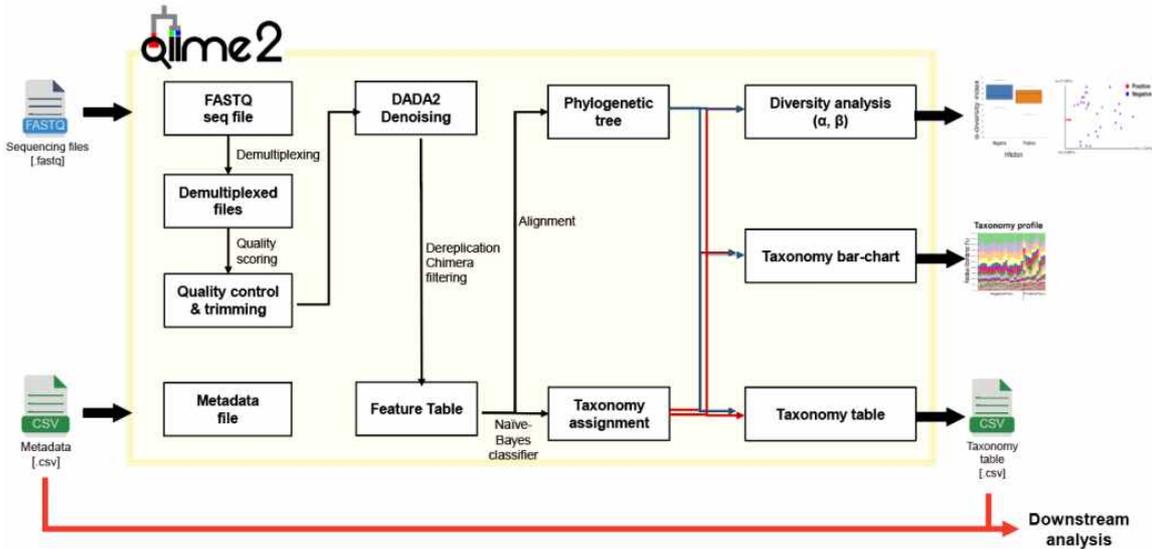


그림 101. QIIME2 분석 진행 상세 과정

- 가장 우선적으로 MAP 감염 유무에 따른 α -diversity, β -diversity 지표들의 변화를 통해 장 내 균총 변화양상을 확인해보았다. 먼저 α -diversity는 미생물 군집의 균등도 (evenness), 풍부도(richness), 그리고 다양성 (diversity)을 나타내는 여러 지표들을 통해 군집 내 개체 별 특성을 파악하였다 (그림 102). 흥미롭게도, 살펴본 5가지 지표 모두 MAP 감염군이 유의적으로 더 낮은 것을 확인하였다. 일반적으로 3가지 항목이 모두 높을수록 건강한 장내균총이라고 여겨지기 때문에 MAP 감염이 소의 장 내 균총에 악영향을 주었다는 것을 알 수 있다.

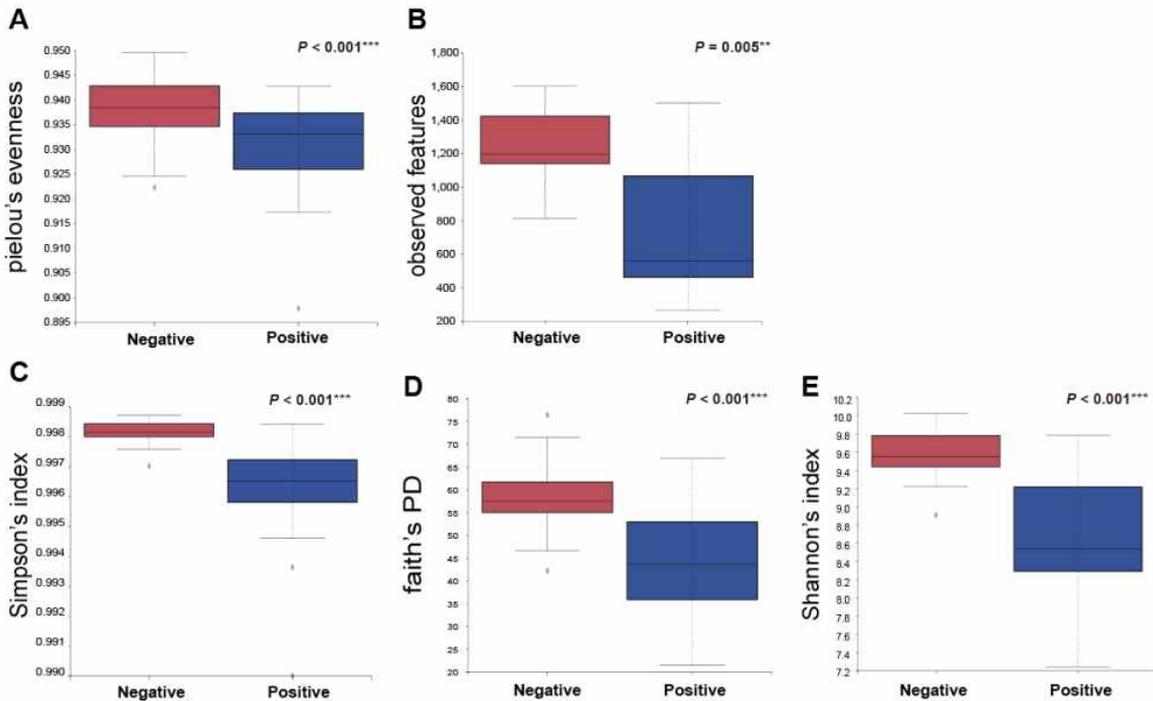


그림 102. MAP 감염 유무에 따른 α -diversity 지표의 변화

- (A) Pielou's evenness (균등도), (B) observed features (풍부도), (C-E) Simpson's index, faith's PD, Shannon's index (이상 다양성)

- 다음으로는, 샘플 간 차이를 확인하기 위해 β -diversity 지표 중 비-/가중 균간 유사거리 (un-/weighted UniFrac distance)를 이용한 PCoA (principal coordinates analysis) plot 을 그려 시각화하였다 (그림 103). 이 때 그룹 간 차이 확인이 용이하도록 감염군 (Positive, 파랑) 과 대조군 (Negative, 빨강)의 색깔을 다르게 라벨링하였고, 95% 신뢰 타원을 표시하였다 (그림 103A, C). 또한 대조군의 중심점(centroid)으로부터 각 샘플의 거리를 상자 그래프화하고 그 통계적 유의성(Mann-Whitney U test)을 파악하였다 (그림 103B, D). 결과적으로, 두 가지 지표 모두 PCoA plot에서도 그룹에 따라 군집화 (clustering)이 일어나며 통계적으로도 유의적인 차이가 있었다. 즉, MAP 감염이 장내 균총의 변화를 명백하게 유도하였다는 것을 뜻한다.

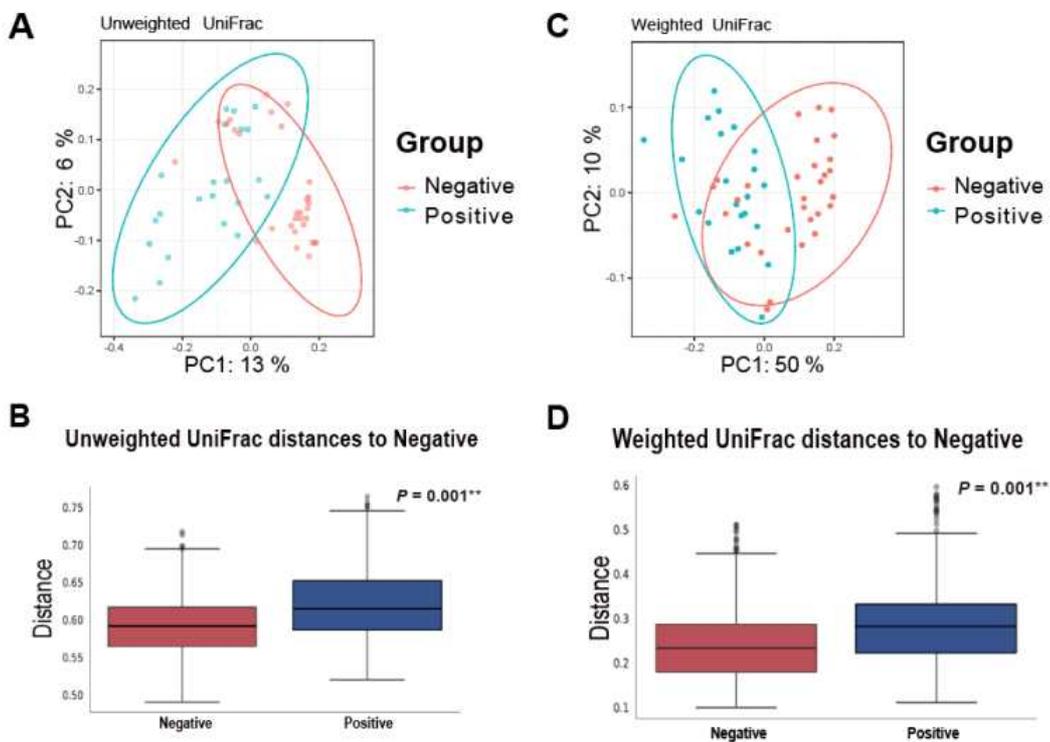


그림 103. MAP 감염 유무에 따른 β -diversity 지표의 변화

(A-B) 비가중 균간 유사거리 기반 PCoA plot (A)과 대조군 중심점으로부터 각 그룹 내 샘플 간 거리 (B)
 (C-D) 가중 균간 유사거리 기반 PCoA plot (C)과 대조군 중심점으로부터 각 그룹 내 샘플 간 거리 (D)

- 추가적으로, PICRUSt2를 이용해 예측한 장 내 집단유전체의 변화를 KEGG pathway 주석 정보를 활용하여 그룹 간 비교를 해보았다 (그림 104). LDA (linear discriminant analysis) 분석 (cut-off: \log_{10} [LDA score] > 3) 을 통해 그룹 별로 특히 활성화된 물질 대사를 확인해본 결과, 미감염군이 상대적으로 아미노산 대사, 유전적 정보 처리, 물질대사 등이 활성화되어있는 반면, 감염군에서 환경 정보 처리, 막 수송, 수송체 관련 대사가 활성화되어 있었다. 다양성 분석과 종합해봤을 때, MAP 감염은 장 내 균총 전반에 걸쳐 부정적인 방향으로 변화를 주었고 이에 의해 장 내 집단유전체의 대사 기능도 변화했음을 알 수 있다.

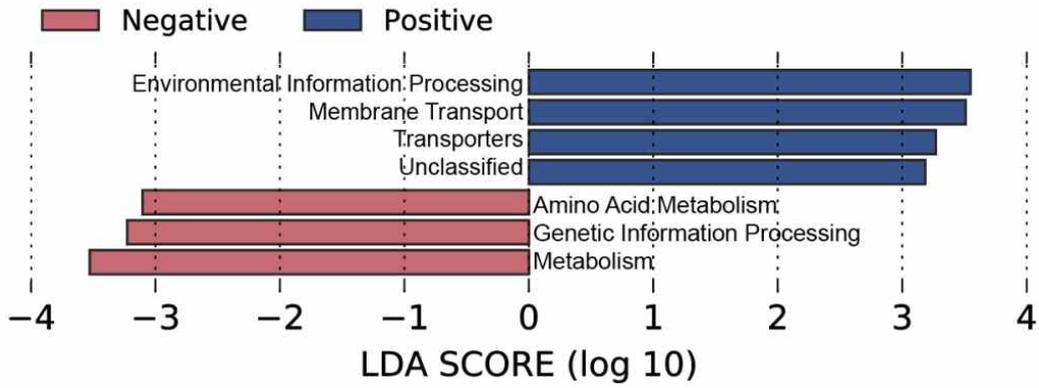


그림 104. MAP 감염유무에 따른 KEGG pathway 풍부도 차이

- MAP 감염이 개별 미생물에 미치는 미시적 영향을 파악하기 위해 각 미생물의 상대적 풍부도 값 정보를 기반으로 통계 분석 등을 진행하여 각 그룹에서 유의적으로 풍부한 미생물들 (감염군: 파랑, 대조군: 빨강)을 파악할 수 있었다 (그림 105). 또한, 각각의 값들은 ELISA s/p ratio 및 fecal PCR 결과와의 상관관계 분석, MAP 감염에 민감하게 반응하는 미생물을 선별하는 feature로써 활용하는 등 최종적인 지표 개발에 적극 활용되었다.

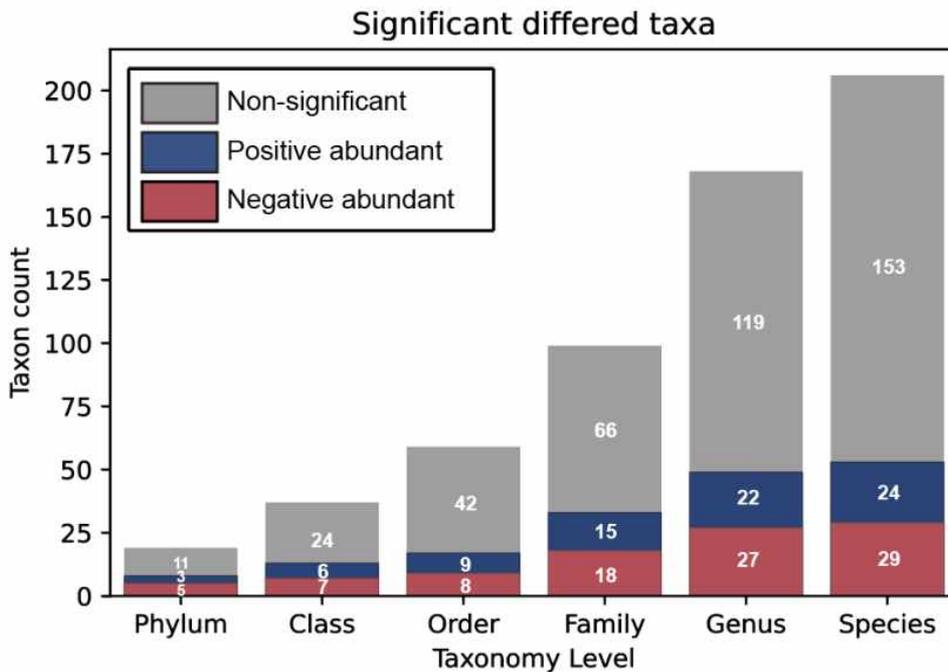


그림 105. 생물군 수준별 유의미한 변화가 확인된 미생물 분포

(4) MAP 감염 민감성 미생물 선별 및 미생물학적 감염 지표 개발

- MAP 감염에 민감하게 반응하는 미생물을 파악하기 위해서, 미생물의 상대적 풍부도값을 활용하여 그룹을 선정하여 LDA 분석(cut-off: \log_{10} [LDA score] > 2)을 진행하였다. 첫 번째로는 두 그룹 간 비교 (그림 106A, 양성농장 내 MAP 감염군과 대조군)를 하였고, 또한 농장 간 사료 조성, 개체 관리 방법 등의 차이를 배제하기 위해서 세 그룹 간 비교 [그림 106B; 양성농장 MAP 감염군 (Positive, 파랑); 양성농장 미감염 동거우군 (Co-housing negative, 초록); 음성농장 미감염군 (Negative, 빨강)]로 나누어 분석하였다. 두 그룹

간 유의적인 비교를 미생물군 수준별 계층 정보와 함께 반영한 분지도 (cladogram)을 통해 동일 환경에서 거주하는 개체들 간 MAP 감염 여부에 따른 미생물 분포 변화를 확인할 수 있었다 (그림 106A). 또한 음성농장의 개체들을 포함한 세 그룹 간 비교를 통해서도 농장 간 차이를 반영한 미생물 분포 변화를 확인할 수 있었다 (그림 106B)으로써, 두 가지 분석 결과를 종합하여 좀 더 정확한 MAP 감염 특이적 미생물들을 도출해낼 수 있었다. 그 결과, MAP 감염 군에서 특이적으로 많이 분포하는 *Clostridium difficile* 등 그룹 간 구별에 크게 관여하는 복수의 미생물들을 확인할 수 있었다.

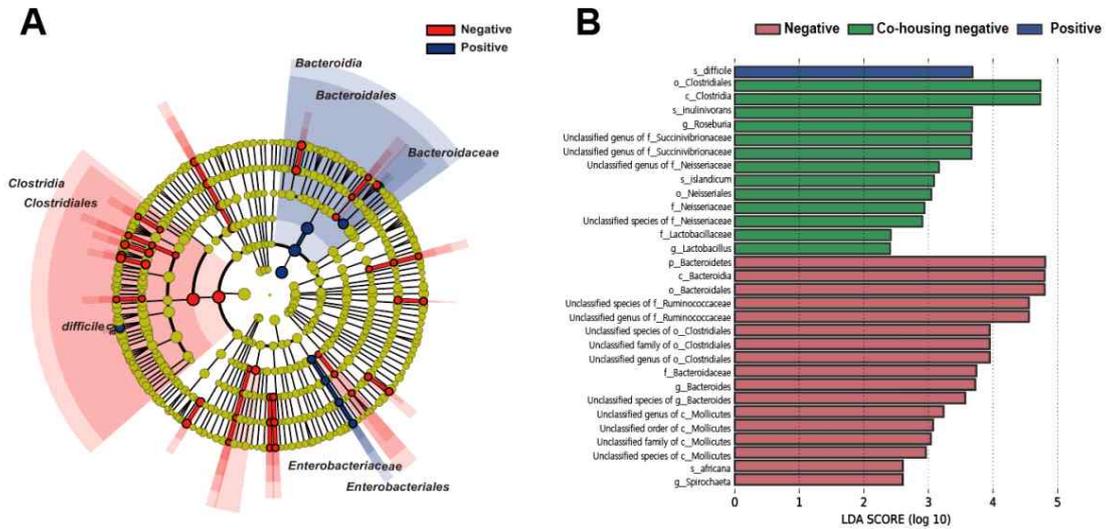


그림 106. MAP감염우, 동거우, 미감염우의 그룹 특이적 미생물 확인.

(A) 양성농장 내 감염군과 대조군 간 비교

(B) MAP감염우, 동거우, 미감염우 간 비교 (막대 그래프)

- MAP 감염과 연관있는 미생물들을 LDA 분석과는 독립적인 방식으로 확인하기 위해서, 각 개체 별 ELISA s/p ratio 및 fecal PCR 결과값들과 미생물 풍부도값 간에 상관관계 분석 (Spearman correlation analysis)을 진행하였다. ELISA s/p ratio의 경우 다음 표 23과 같이 상관관계를 가지는 미생물들이 선정되었다.

표 31. ELISA s/p ratio 값과 상관관계를 보이는 미생물 분류군

Taxonomy (Total num)	Type	Bacteria	Coefficient (ρ)	P
Phylum (19)	Positive-correlated	Firmicutes	0.723	1.38E-09
		Actinobacteria	0.717	2.25E-09
		Euryarchaeota	0.636	3.96E-07
	Negative-correlated	Bacteroidetes	-0.638	3.68E-07
		Unassigned phylum of Bacteria	-0.608	1.75E-06
Class (37)	Positive-correlated	Bacilli	0.8	1.12E-12
		Actinobacteria	0.681	2.78E-08
		Coriobacteriia	0.664	8.25E-08
		Methanobacteria	0.658	1.14E-07
		Clostridia	0.656	1.31E-07
		Gammaproteobacteria	0.549	2.50E-05
	Negative-correlated	Bacteroidia	-0.636	4.08E-07
		Unassigned class of Bacteria	-0.608	1.75E-06

Order (59)	Positive-correlated	Bacillales	0.777	1.26E-11
		Bifidobacteriales	0.708	4.47E-09
		Coriobacteriales	0.664	8.25E-08
		Methanobacteriales	0.658	1.14E-07
		Clostridiales	0.651	1.78E-07
		Aeromonadales	0.571	9.74E-06
		Lactobacillales	0.52	7.67E-05
	Negative-correlated	Bacteroidales	-0.636	4.08E-07
		Unassigned order of Bacteria	-0.608	1.75E-06
Family (99)	Positive-correlated	Peptostreptococcaceae	0.838	9.62E-15
		Bacillaceae	0.859	3.66E-16
		Clostridiaceae	0.781	8.82E-12
		Bifidobacteriaceae	0.708	4.47E-09
		Paraprevotellaceae	0.67	5.66E-08
		Coriobacteriaceae	0.664	8.25E-08
		Methanobacteriaceae	0.658	1.14E-07
		Lachnospiraceae	0.633	4.78E-07
		Succinivibrionaceae	0.571	9.74E-06
		Unassigned family of Clostridiales	0.537	4.06E-05
		Streptococcaceae	0.522	7.12E-05
	Negative-correlated	Ruminococcaceae	-0.729	8.81E-10
		Unassigned family of Bacteroidales	-0.696	1.03E-08
		Unassigned family of Bacillales	-0.675	3.97E-08
		Rikenellaceae	-0.649	1.92E-07
		Unassigned family of Clostridiales	-0.617	1.13E-06
		Unassigned family of Bacteria	-0.608	1.75E-06
		Bacteroidaceae	-0.534	4.53E-05
		S24.7	-0.519	8.04E-05
Genus (168)	Positive-correlated	Unassigned genus of Bacillaceae	0.859	3.66E-16
		[Clostridium](putative)	0.828	3.48E-14
		Clostridium (Peptostreptococcaceae)	0.811	3.30E-13
		Clostridium (Clostridiaceae)	0.781	8.82E-12
		Ruminococcus	0.759	6.89E-11
		Enterococcus	0.706	5.05E-09
		CF231	0.698	8.95E-09
		Methanobrevibacter	0.611	1.52E-06
		Unassigned genus of Veillonellaceae	0.597	2.97E-06
		Succinivibrio	0.585	5.22E-06
		Methanosphaera	0.577	7.40E-06
		Unassigned genus of Lachnospiraceae	0.546	2.78E-05
		Unassigned genus of Clostridiales	0.537	4.06E-05
		Streptococcus	0.522	7.12E-05

Species (206)		Unassigned genus of Bifidobacteriaceae	0.502	1.51E-04
	Negative-correlated	Unassigned genus of Bacteroidales	-0.696	1.03E-08
		Unassigned genus of Ruminococcaceae	-0.683	2.38E-08
		Unassigned genus of Bacillales	-0.675	3.97E-08
		Alistipes	-0.657	1.21E-07
		Unassigned genus of Ruminococcaceae	-0.618	1.08E-06
		Unassigned genus of Clostridiales	-0.617	1.13E-06
		Unassigned genus of Bacteria	-0.608	1.75E-06
		Bacteroides	-0.566	1.23E-05
		gut	-0.563	1.37E-05
		Oscillospira	-0.551	2.30E-05
		Unassigned genus of S24.7	-0.519	8.04E-05
	Positive-correlated	Unassigned species of Bacillaceae	0.859	3.66E-16
		Clostridium ruminantium	0.814	2.15E-13
		Unassigned species of Clostridium	0.804	7.20E-13
		Clostridium disporicum	0.797	1.62E-12
		Ruminococcus lactaris	0.755	1.03E-10
		Clostridium difficile	0.75	1.61E-10
		Unassigned species of Clostridium	0.719	1.89E-09
		Enterococcus casseliflavus	0.706	5.05E-09
		Unassigned species of CF231	0.698	8.95E-09
Clostridium paraputrificum		0.634	4.60E-07	
Unassigned species of Methanobrevibacter		0.601	2.49E-06	
Unassigned species of Veillonellaceae		0.597	2.97E-06	
Unassigned species of Succinivibrio		0.585	5.22E-06	
Unassigned species of Methanosphaera		0.577	7.40E-06	
Unassigned species of Lachnospiraceae		0.546	2.78E-05	
Unassigned species of Clostridiales		0.537	4.06E-05	
Streptococcus equi		0.522	7.12E-05	
Unassigned species of Bifidobacteriaceae		0.502	1.51E-04	
Negative-correlated		Unassigned species of Bacteroidales	-0.696	1.03E-08
	Unassigned species of Ruminococcaceae	-0.683	2.38E-08	
	Unassigned species of Bacillales	-0.675	3.97E-08	
	Unassigned species of Clostridium	-0.629	5.93E-07	
	Unassigned species of Ruminococcaceae	-0.618	1.08E-06	
	Unassigned species of	-0.617	1.13E-06	

		Clostridiales		
		Unassigned species of Alistipes	-0.616	1.17E-06
		Unassigned species of Bacteria	-0.608	1.75E-06
		Bacteroides nordii	-0.568	1.11E-05
		gut metagenome	-0.563	1.37E-05
		Oscillospira guilliermondii	-0.551	2.30E-05
		Alistipes finegoldii	-0.531	5.11E-05
		Unassigned species of S24.7	-0.519	8.04E-05
		Spirochaeta africana	-0.505	1.36E-04

- 한편, fecal PCR을 통해 역추산된 장 내 MAP의 cfu (colony forming unit) 값과의 상관관계 분석에는, 한 개의 ASV (*Enterobacteriaceae* family로 분류되는 한 종류)만이 상관관계를 보이는 것으로 나왔다 (표 32). 이는 fecal PCR 값 중 음성군과 일부 양성군들에서 다수 분포하는 결핵치들의 영향이 있을 것으로 사료된다.

표 32. Fecal PCR 기반 MAP cfu 값과 상관관계를 보이는 미생물 분류군

Taxonomy (Total num)	Type	Bacteria	Coefficient (ρ)	P
Order (59)	Positive-correlated	Enterobacteriales	0.520	7.78E-05
Family (99)	Positive-correlated	Enterobacteriaceae	0.520	7.78E-05
Genus (168)	Positive-correlated	Unassigned genus of Enterobacteriaceae	0.520	7.78E-05
Species (206)	Positive-correlated	Unassigned species of Enterobacteriaceae	0.520	7.78E-05

- 위에서 언급된 세 가지 결과 (그룹 간 미생물 상대적 풍부도의 통계적 분석, LDA 분석, 그리고 상관관계 분석)를 바탕으로 공통적으로 MAP 감염에 특이적 반응을 보이는 미생물을 수동으로 선별하는 과정을 거쳤다. 선별의 목적이 감염 지표 도출이었기에 선별에 사용한 기준은 각 분류군 수준에서 미지정된 (unassigned) 미생물은 제외하고, 감염군과 대조군에서 각각 한 번 이상 영 값 (zero value)이 나오는 경우는 제외하였다. 선별된 미생물들은 생물 분류군 수준별로 MAP 감염 시 그 분포가 증가하는 미생물과 감소하는 미생물을 짝지어 비율값으로 변환한 뒤, 그룹 간 통계적 유의차를 확인하였다. 결과적으로 문 (phylum, *Firmicutes* to *Bacteroidetes*), 강(class, *Clostridia* to *Bacteroidia*), 목 (order, *Clostridiales* to *Bacteroidiales*, *Enterobacteriales* to *Clostridiales*), 과 (family, *Enterobacteriaceae* to *Ruminococcaceae*) 수준에서 총 5개의 예비 감염 지표를 선정할 수 있었다 (그림 107).

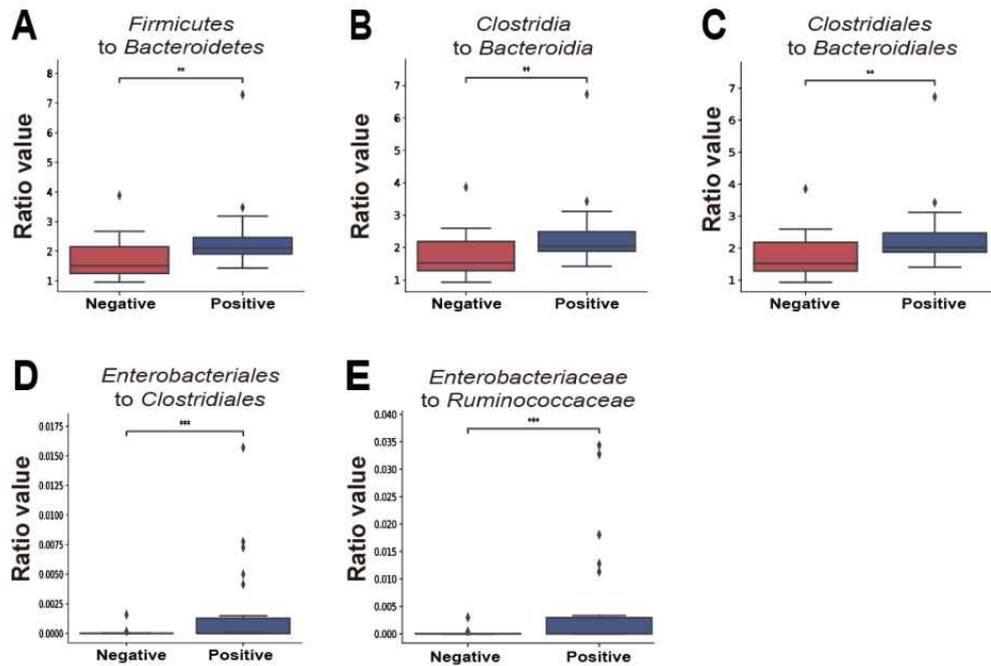


그림 107. 생물군 분류 수준별 잠재적인 MAP 감염 지표 5종
(A) 문 수준 (B) 강 수준 (C-D) 목 수준 (E) 과 수준

- 위 5가지 지표들은 비록 통계적 유의미성 등을 통해 선별한 미생물들을 활용하긴 하나, 사람의 주관이 적용되다 보니 최적의 분류 모델을 제시하지 못할 가능성이 있다. 또한 장내 미생물은 매우 다양한 미생물들간의 상호작용이 이루어지는 복잡계이기 때문에 특정 한 두 가지의 미생물로는 분류 성능이 제한적일 가능성이 있다. 이런 한계점을 극복하기 위해 각 미생물 분류군 별 상대적 풍부도 값을 수준에 관계없이 모두 동일한 하나의 feature로 가정하고, 전체 데이터 중 MAP 감염 유무에 따른 차이를 잘 나타내는 feature를 선정하는 작업을 하였다. 이 때 선별에 사람의 주관을 배제하기 위해서 Ridge, LASSO, ElasticNet 과 같은 정규화 회귀모형 및 Feature selector, Filtering method와 같은 데이터 내 feature 선별용 알고리즘을 활용하였다.
- 가장 먼저, 문 수준에서 종 수준까지의 미생물 분류군 588개를 나열한 다차원의 데이터 행렬을 생성한 후 분류 성능을 저해시킬 수 있는 값이 거의 일정한 (quasi-/constant value) feature를 제거하였다. 이를 통해 110개의 feature가 제거되었고 이후 과정에서는 478개의 feature만을 이용하여 분류모델을 만드는데 사용하였다. 제거 전 (Before)과 후 (After)의 데이터 행렬을 2차원으로 차원 축소를 하여 지도학습의 일종인 LDA, 비지도학습의 일종인 PCA (principal component analysis)를 이용하여 데이터의 보존 정도를 확인 해본 결과 매우 유사하게 시각화가 되는 것을 확인하였다 (그림 108). 또한 정량화 수치인 silhouette score (Before: 0.611358, After: 0.640311)과 calinski score (Before: 128.823863, After: 129.55748)가 거의 유사한 것을 통해서 제거 전후의 데이터 특성이 거의 동일함을 확인하여 이후 feature 선별에는 478개의 feature들만을 사용하였다.

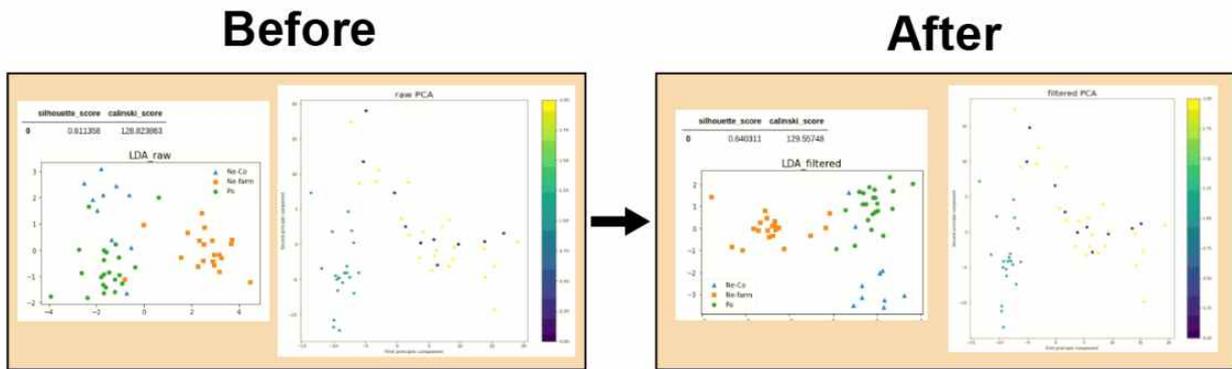


그림 108. 상수 값 제거 전(Before)과 후(After)의 LDA와 PCA plot 및 정량화 수치 (silhouette score, calinski score)

- 이후 분류 문제 (classification)에 대한 모델 생성 시 과적합(overfitting)을 방지하고자 자주 사용하는 정규화 (regularization) 회귀 방식인 Ridge, LASSO, ElasticNet 회귀 방식과 함께 최근 널리 사용되고 있는 Feature Selector, Filter Method 방식까지 총 5가지 방법을 통해서 주요 feature를 선별하고 기존 데이터를 얼마나 보존하고 있는지를 확인하였다. 이 때 기존 미생물 상대적 풍부도 값 자체를 사용하는 것 (이하 Raw data) 외에도 분류 성능 증진을 목적으로 데이터 간 분산을 증가시키하고자 기존 값에 1.5 거듭제곱을 해주는 거듭제곱 변환 (1.5 power transformation, 이하 1.5 power)과 자연 상수 e를 밑으로 하고 기존 값을 지수로 한 거듭제곱 변환 (exponential transformation, 이하 exp)을 한 값을 이용해서 분석을 진행하였다.

- 먼저 Raw data를 이용한 경우, Ridge 회귀모델은 기존 478개 중 중요한 feature를 선별해 내는데 실패했으며, LASSO는 36개, ElasticNet은 143개, Feature Selector는 12개 (cumulative importance = 0.95, correlation threshold = 0.99), Filter Method는 44개 (correlated factor > 0.5 기준)의 feature를 선별하였다 (그림 109).

Raw data (No transformation)

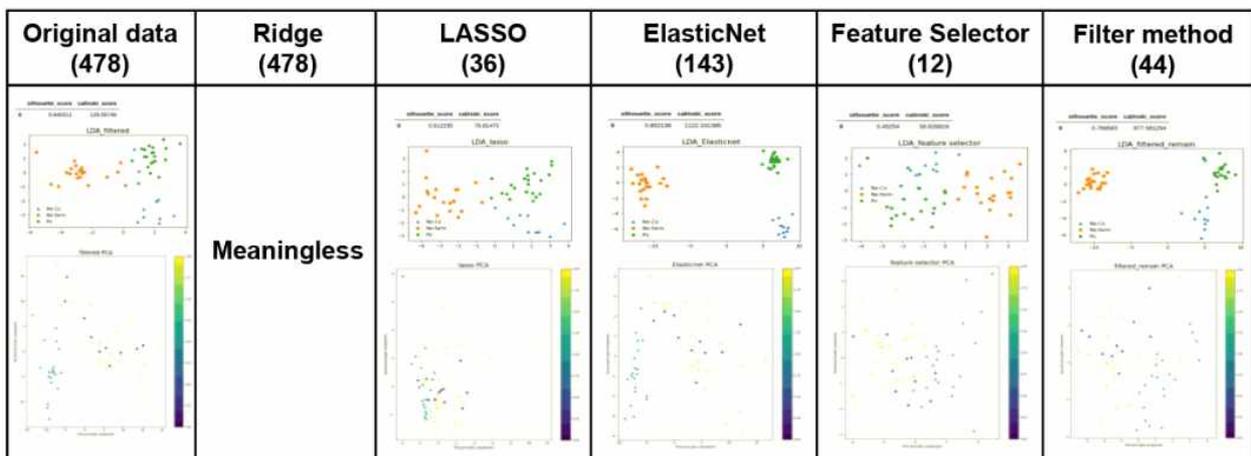


그림 109. 변환하지 않은 값을 이용하여 5가지의 feature 선별 방법으로 선별된 feature의 개수 및 이를 활용한 LDA, PCA 결과값 비교

- 1.5 power data를 이용한 경우, 기존 데이터에서 우선적으로 상수값을 제거하는 과정에서 311개의 feature만이 남았고, 이와 비교했을 때 Ridge 회귀모델은 중요한 feature를 추려내는데 실패했으며, LASSO는 67개, ElasticNet은 124개, Feature Selector는 13개 (cumulative importance = 0.95, correlation threshold = 0.99), Filter Method는 32개 (correlated factor > 0.5 기준)의 feature를 선별하였다 (그림 110).

1.5 power transformation

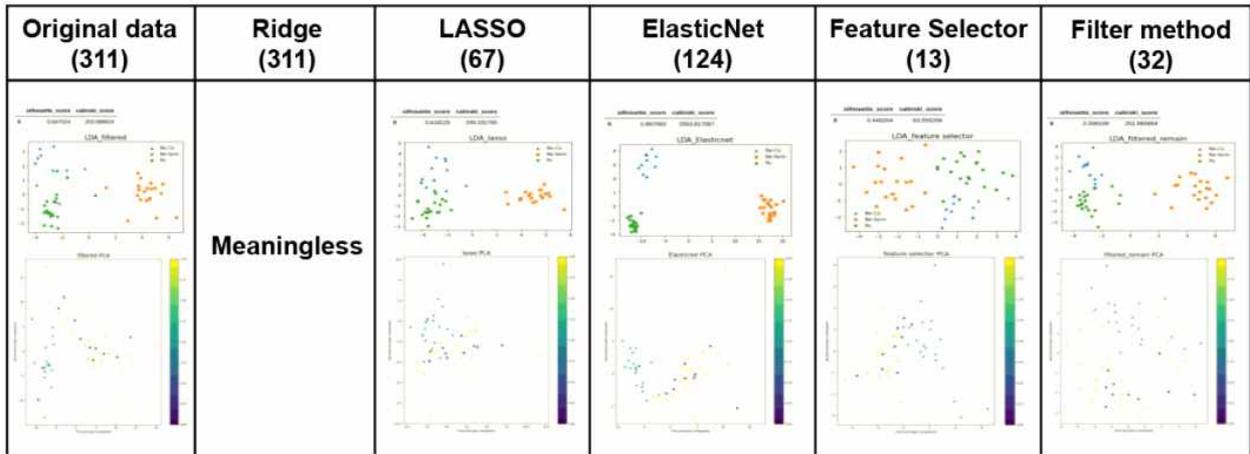


그림 110. 1.5 power 값을 이용하여 5가지의 feature 선별 방법으로 선별된 feature의 개수 및 이를 활용한 LDA, PCA 결과값 비교

- exp data를 이용한 경우, 기존 데이터에서 우선적으로 상수값을 제거하는 과정에서 387개의 feature만이 남았고, 이와 비교했을 때 Ridge 회귀모델은 중요한 feature를 추려내는데 실패했으며, LASSO는 76개, ElasticNet은 160개, Feature Selector는 13개 (cumulative importance = 0.95, correlation threshold = 0.99), Filter Method는 47개 (correlated factor > 0.5 기준)의 feature를 선별하였다 (그림 111).

Exponential transformation

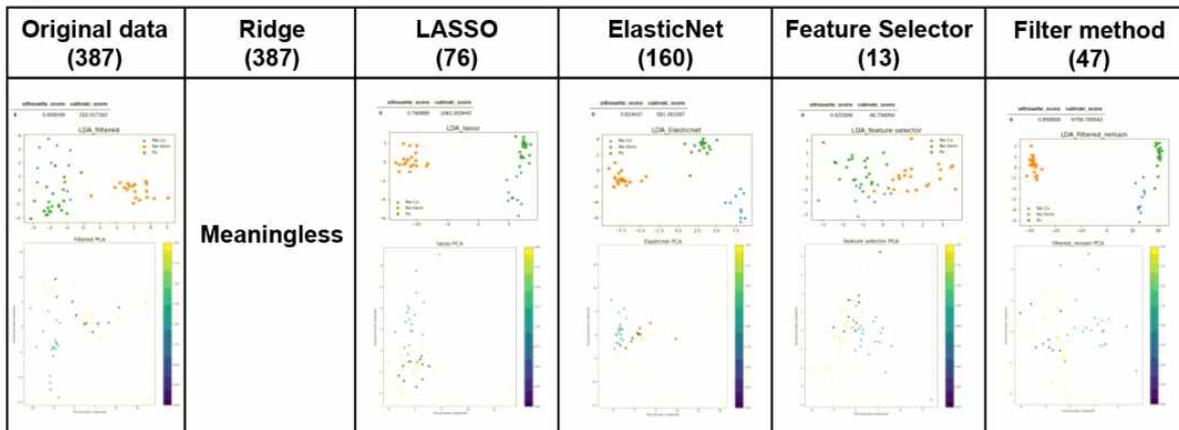


그림 111. exp 값을 이용하여 5가지의 feature 선별 방법으로 선별된 feature의 개수 및 이를 활용한 LDA, PCA 결과값 비교

- 세 가지 데이터에서 공통적으로 Feature Selector가 가장 적은 feature 개수를 선별하였고, 전체 데이터 대비 95% 가량을 표현할 수 있다 (cumulative importance = 0.95). 따라서, MAP에 민감하게 반응하는 미생물 집단을 선별해내어 감염 분류 모델을 만드는 데는 Feature Selector를 통해서 진행하기로 결정하였다. 이어서 파라미터 최적화 과정 (missing threshold=0.6, correlation threshold=0.98, task=classification, eval_metric=auc, cumulative importance=0.95)을 통해 최종 모델 설계 및 그 성능을 평가하는 과정을 진행하였다. 각각의 데이터 종류 별로 뽑힌 feature의 갯수는 Raw data 조건 10개, exp 조건 13개, 그리고 1.5 power 조건 14개였으며, 뽑힌 feature들의 종류와 그 중요도를 확인해보았다 (그림 112). 모든 경우에서 가장 중요한 feature로 선별된 미생물은 앞선 LDA분석 시 MAP감염군 특이적으로 분포가 증가한 것으로 확인되었던 *Clostridium difficile*이었으며, 그 외에 앞서서 예비 감염 지표 선정에 활용되었던 *Bacilli* 등도 일관되게 선별된 것을 확인할 수 있었다.

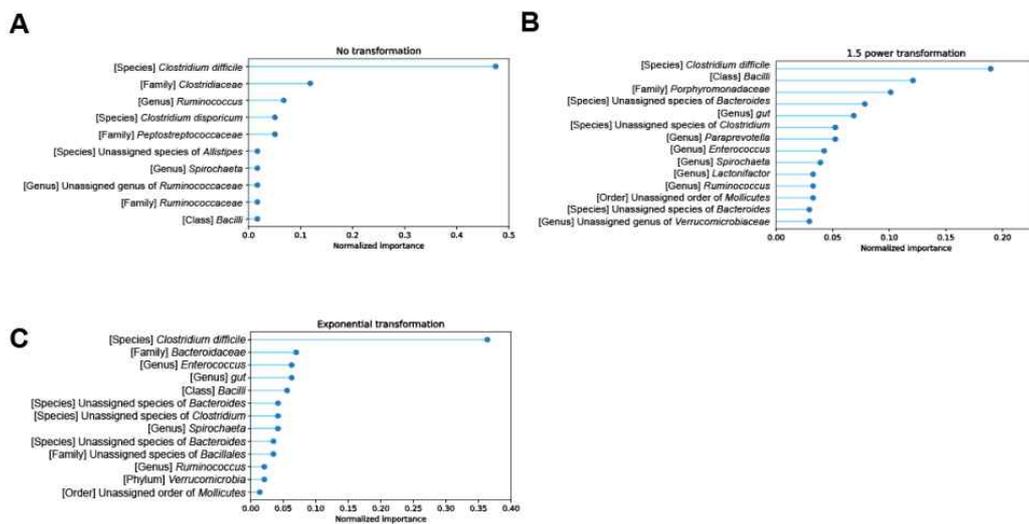


그림 112. 데이터 종류별 선별된 feature들의 중요도 평가

(A) Raw data (B) 1.5 power (C) exp

- MAP 감염 분류 모델은 선별된 feature들에 대한 현재의 52개 샘플 데이터를 이전 과정과 동일하게 raw data, 1.5 power, exp 형태로 준비하고, 각각의 사례별로 train set과 test set 7:3의 비율로 나누어서 전자는 모델 학습에 이용하고 후자는 성능 평가에 활용하는 방식으로 제작되었다. 일반적인 기계학습에 비해 상대적으로 적은 샘플의 개수인 상황을 고려하면서 편향된 검증 (biased validation)을 방지하기 위해서 무작위로 train과 test set을 선별하는 과정을 10회 독립 시행한 뒤 그 accuracy 등을 파악하여 모델의 성능을 평가하였다. 모델의 학습 알고리즘은 support vector machine (linearSVC, SVM), k-nearest neighborhood (KNN), random forest를 활용하였다. 그 결과, 전반적으로 random forest 알고리즘을 이용하였을 때 정확도의 평균값이 0.8 ~ 0.9로 준수한 성능을 보여주었으며 특히 exp 데이터를 활용한 경우 정확도의 평균값 (0.8875)이 최고치를 기록하였다 (그림 113).

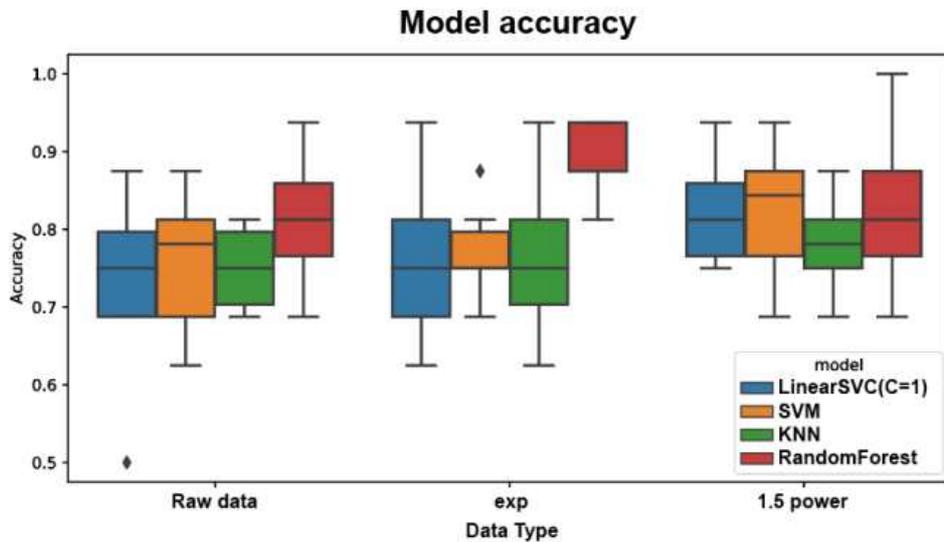


그림 113. 4가지 학습 알고리즘에 따른 각 데이터 종류별 모델 정확도 평가

- 추가적으로 진단 결과를 포함하였을 때, 모델의 분류 성능이 증가하는지를 보기 위해서, ELISA s/p ratio값과 fecal PCR 기반 MAP cfu count 값을 각각 추가하거나 혹은 함께 (both) 모델에 학습시켰을 때 예측 정확도를 확인해보았다 (그림 114). 그 결과 전반적으로 진단검사 지표가 추가되었을 경우 ELISA 결과 (그림 114A), PCR 결과 (그림 114B)가 활용된 사례 모두 기존 모델 대비 분류의 성능이 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 특히 가장 높게 나온 조건은 2가지 진단 검사 결과를 모두 포함 (그림 114C)하고 미생물 상대적 풍부도 데이터 종류는 exp 데이터를 활용하여 random forest 알고리즘을 활용한 경우 (0.9125)였다. 이를 종합적으로 고려해보았을 때, Feature Selector를 이용해 선별된 십수 개의 미생물들의 상대적 풍부도값을 자연상수를 밑으로 하는 지수변환 값만으로도 정확도 기준 0.8~0.9 수준의 높은 예측 모델을 만들 수 있다는 것을 확인하였고, 여기에 진단 검사 결과를 함께 반영한다면 더욱 그 성능을 높힐 수 있어서 보다 정확한 진단이 가능해질 수 있다.

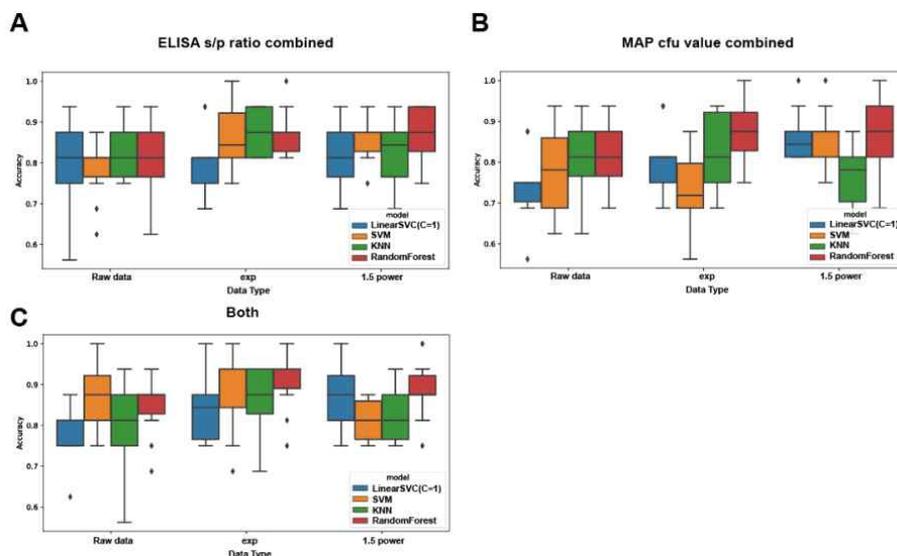


그림 114. ELISA, PCR 진단검사 결과를 학습 데이터로 추가하였을 때 모델 정확도 평가
(A) ELISA 결과 추가 조건 (B) PCR 결과 추가 조건 (C) 모두 추가 조건

- 정리해보자면, MAP 감염을 식별할 수 있는 미생물학적 바이오마커를 발굴하기 위해 총 52 개의 분변샘플을 양성농장 감염우, 양성농장 내 미감염 동거우, 음성농장 미감염우로부터 샘플링하여 각각의 장내균총 분포를 확인하였고, 감염 유무 등으로 그룹을 나누어 미생물 군집 다양성 분석 등을 통한 거시적 변화와 통계적으로 유의미한 상대적 풍부도값 변화 미생물들을 확인하였다. 그 결과, MAP 감염군의 장내균총 내 풍부도, 균등도, 다양성 등이 전반적으로 감소함으로써 미감염우에 비해 확연한 장내균총의 변화와 그에 따른 장 내 균총유래의 집단유전체 활성 대사도 바뀔 수 있음을 확인하였다. 또한, 통계적 유의미성을 기준으로 미생물들을 일부 선정하였고 다양한 생물 분류군 수준에서 MAP 감염의 지표로 활용할만한 비율값 5종을 제안하였다. 이외에도 보다 정확한 바이오마커를 발굴하기 위해서 실험자의 주관이 들어가지 않고 고차원의 데이터 내에서 주요한 feature를 선별해주는 다수의 알고리즘을 장내균총 데이터에 활용하여 결과적으로 *Clostridium difficile*, *Bacilli* 등의 십 수 개의 미생물 분류군을 선별해낼 수 있었다. 또한 이들 미생물들의 상대적 풍부도 값과 함께 ELISA, PCR 검사 결과를 함께 활용함으로써 보다 우수한 성능의 분류모델을 만들 수 있음도 확인하였다. 이번 연구에서 선별된 주요 미생물들의 상대적 풍부도값을 확인한다면, 기존 진단 방법들과 병용함으로써 보다 신속하고 정확한 진단이 가능할 것으로 기대된다.

4. 감염우 조기 진단을 위한 특이 biomarker 발굴

가. 요네병 감염 단계에 따른 혈청 내 biomarker 발굴

(1) 요네병 균 감염개체의 감염 단계에 따른 혈청 proteome 분석

- 모든 mycobacteria 감염에 있어서 활성감염과 잠복감염을 구분하여 진단하는 것은 중요한 부분을 차지함. 특히 MAP 잠복감염 개체들은 분변을 통해 균을 배출함으로써 다른 개체에 전염을 시킬 수 있는 중요 요인으로 여겨지고 있음. 그러므로 MAP 감염 개체를 조기색출하고 제어하기 위해 잠복감염 개체를 조기진단 할 수 있고 감염단계별 진단할 수 있는 바이오마커를 다양한 분석을 통해 도출할 필요가 있음. 임상개체에서 널리 이용되는 검체는 혈액과 분변임. 특히 혈액은 ELISA test를 통한 항체가 조사에 이용되고 있는데, 혈액에는 항체이외에도 다양한 정보를 나타낼 수 있는 성분들을 다수 포함하고 있음. 그러므로 본 연구에서는 MAP감염 단계에 따라 Proteomics를 통해 개체의 혈액 성분을 비교하고, 유의적인 성분 목록을 작성하고자 함.
- 비감염균 개체와 MAP 감염된 개체를 감염단계에 따라 구분하여 다음과 같이 총 4 그룹으로 확정함: (1) ELISA 음성, 분변내 균검출; (2) ELISA S/P ratio >55; (3) ELISA S/P ratio > 200; (4) 비감염 대조군. 혈액을 채취하여 혈청을 수거하였고, 그룹에 해당되는 임상개체들의 혈청을 각각 섞어 분석에 이용하였음. 혈청내 성분 분석을 위해 2-DE 분석을 실시하기 전에 1-DE 분석을 실시하였음. SDS-PAGE 분석 상에 혈청내 면역글로불린과 알부민이 대부분을 차지하는 것을 확인 함 (그림 115). 그리하여 Calbiochem ProteoExtract™ Removal Kits (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)를 이용하여 혈청 내 주요 단백질인 면역글로불린과 알부민을 제거함 (그림 116). 그림 116과 같이 kit를 통해 1번 제거한 샘플에서 알부민 및 글로불린이 다소 제거되었지만 여전히 남아있음을 확인함. kit 설명에 따르면 human proteins이 80%이상 제거되지만 bovine sample의 경우 30% 제거되는 것으로 나와 있었음. 그래서 우리는 column에 샘플을 2번 flow-through하여 알부민 및 글로불린 제거를 확인함 (그림 116).
- 위의 처리를 끝낸 샘플을 이용하여 2-DE (two-dimensional gel electroporesis) 분석을 실시하였고, 2-DE 분석 조건을 확립하였음. 각 샘플당 3반복 이상 2-DE 분석을 실시하고, gel을 silver staining을 통해 단백질 spot을 염색하였음 (그림 117). image analysis를 통해 유의적인 spot을 선정하였음 (supplementary data1. pdf 첨부)

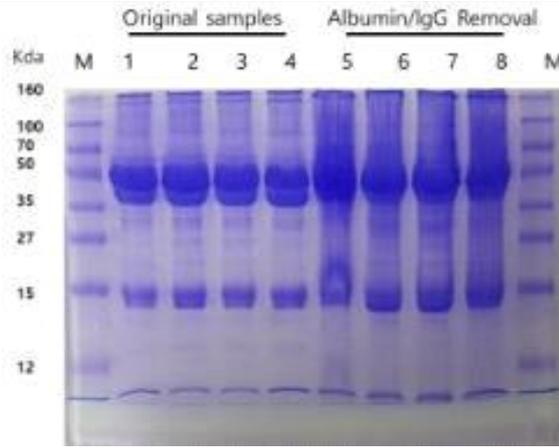


그림 115. MAP 감염단계에 따른 임상개체의 혈청을 이용한 SDS-PAGE 분석. M, pre-stained protein marker; 1, 5, 비감염군; 2, 6, ELISA 음성군; 3, 7, ELISA S/P ratio >55; 4, 8, ELISA S/P ratio > 200.

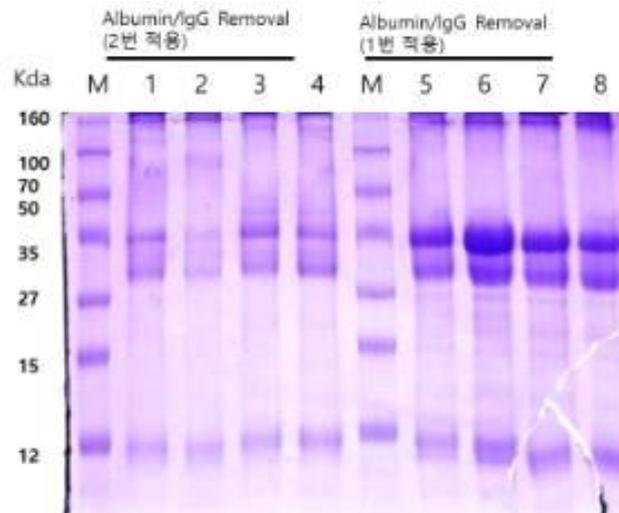


그림 116. Albumin/IgG removal kit를 이용 후 혈청 샘플 SDS-PAGE 분석. M, pre-stained protein marker; 1, 5, 비감염군; 2, 6, ELISA 음성군; 3, 7, ELISA S/P ratio >55; 4, 8, ELISA S/P ratio > 200.

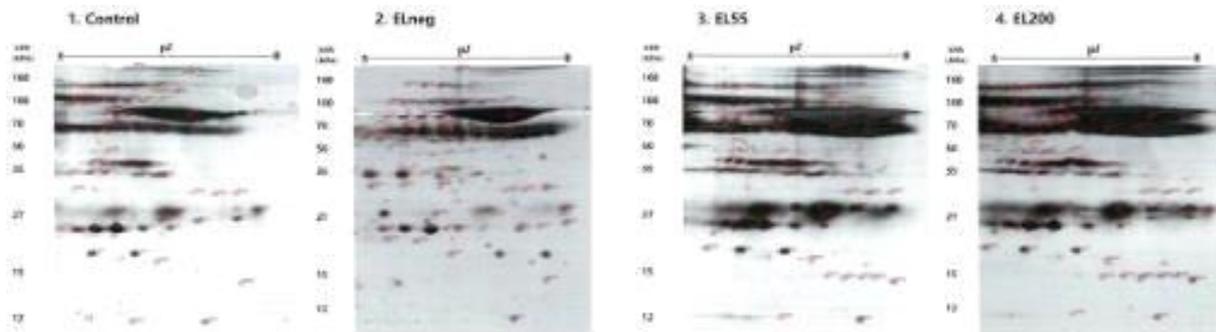


그림 117. MAP 감염단계에 따른 임상개체 혈청의 two-dimensional gel electrophoresis profiles 및 image 분석

-
- 이미지분석에서 visualization 된 total spots은 134개 임. control 그룹의 spot을 1로 보았을때 control에 비교하여 각 그룹의 일치하는 spot의 크기를 수치화하였음. 그룹에 따라 유의적인 발현 차이를 보이는 spot을 선정하였고, 아래 표에 정리함.
 - control 그룹에 비교하여 ELneg 그룹만 발현 혹은 증가한 spot (n=28, 표 33), control 그룹에 비교하여 EL55 그룹만 발현 혹은 증가한 spot (n=17, 표 34), control 그룹에 비교하여 EL200 그룹만 발현 혹은 증가한 spot (n=3, 표 35), control 그룹에 비교하여 ELneg와 EL55 그룹만 발현 혹은 증가한 spot (n=11, 표 36), control 그룹에 비교하여 ELneg와 EL200 그룹만 발현 혹은 증가한 spot (n=6, 표 37), control 그룹에 비교하여 EL55와 EL200 그룹만 발현 혹은 증가한 spot (n=5, 표 38), control 그룹에 비교하여 ELneg와 EL55, EL200 그룹 모두 발현 혹은 증가한 spot (n=9, 표 39), control 그룹과 발현에 모두 변화가 없는 spot (n=55, 표 40)을 구분하여 제시함.
 - 유의적인 spots은 MALDI-TOF/MS 분석을 통해 동정하여 유의미한 단백질 list를 작성 중임 (표 41). 특징적인 것은 control 그룹에 비교하여 요네균 감염그룹에서 증가한 단백질로는 alpha-1B-glycoprotein precursor, complement component C9 precursor 가 동정되었고, EL55와 EL200 그룹 즉, ELISA 상으로 양성인 그룹에서는 IgM heavy chain constant region 단백질이 동정되었음. 또한 ELneg와 EL200 그룹에서는 prepro complement component C3 단백질이 동정되었음. 그 밖에 hIgG1 heavy chain constant region나 bovine serum albumin이 동정된 것은 spots 수거시 2-DE gel 상에서 면역글로빈과 알부민이 다 제거되지 못해 동정되어 나온 것으로 여겨지고 있음. 현재 지속적으로 남은 spots에 대해 동정중임.

표 33. control 그룹에 비교하여 ELneg 그룹만 발현 혹은 증가한 spots

SSP	control		EL55		EL200		ELneg	
	CV	Ratio	CV	Ratio	CV	Ratio	CV	Ratio
2406	0.00%	1	0.00%	0.31	0.00%	0.49	113.10%	194.58
3504	0.00%	1	0.00%	0.31	0.00%	0.27	131.70%	183.94
7201	0.00%	1	0.00%	0.3	0.00%	0.26	0.00%	27.46
1304	0.00%	1	0.00%	0.05	0.00%	0.83	133.70%	10.26
4102	0.00%	1	0.00%	0.5	0.00%	1.94	0.00%	6.34
1203	11.10%	1	0.00%	0.01	0.00%	0.01	46.10%	3.59
8202	96.40%	1	0.00%	1.32	74.50%	0.4	68.50%	3.48
5503	65.00%	1	54.30%	1.34	51.50%	1.93	11.00%	3.45
7101	103.70%	1	102.40%	0.94	131.80%	0.89	51.30%	3.35
8102	0.00%	1	0.00%	0.26	0.00%	0.23	0.00%	3.33
2302	53.70%	1	0.00%	0.54	89.40%	0.56	76.40%	3.28
3403	55.40%	1	0.00%	0.29	132.20%	0.9	15.60%	3.19
1303	0.00%	1	32.70%	1.01	34.70%	1.24	69.90%	2.83
9010	0.00%	1	0.00%	0.22	0.00%	0.19	0.00%	2.79
8201	39.50%	1	47.10%	1.44	118.80%	0.98	116.60%	2.73
8103	0.00%	1	0.00%	0	0.00%	0.1	49.80%	2.73
3402	0.00%	1	0.00%	0	0.00%	0	111.80%	2.34
1505	54.60%	1	0.00%	0.01	0.00%	1.35	0.00%	2.08
3904	68.10%	1	0.00%	0.01	0.00%	0.29	0.00%	2.06
3001	0.00%	1	0.00%	0.16	0.00%	0.14	0.00%	2.02
2303	20.10%	1	0.00%	0.01	0.00%	0	72.30%	1.94
1704	12.90%	1	102.10%	0.55	0.00%	0.29	0.00%	1.84
8301	2.20%	1	23.50%	0.46	78.70%	0.9	61.50%	1.76
7001	45.10%	1	21.20%	1.01	58.00%	0.16	100.90%	1.96
2303	20.10%	1	0.00%	0.01	0.00%	0	72.30%	1.94
5101	54.80%	1	87.50%	1.21	56.80%	0.6	62.00%	1.86
1704	12.90%	1	102.10%	0.55	0.00%	0.29	0.00%	1.84
8301	2.20%	1	23.50%	0.46	78.70%	0.9	61.50%	1.76

표 34. control 그룹에 비교하여 EL55 그룹만 발현 혹은 증가한 spots

SSP	control		EL55		EL200		ELneg	
	CV	Ratio	CV	Ratio	CV	Ratio	CV	Ratio
6202	0.00%	1	0.00%	7.7	0.00%	0.02	0.00%	1.42
8402	77.70%	1	49.30%	3.38	28.30%	0.94	78.60%	0.78
6201	8.90%	1	35.90%	2.57	0.00%	0.07	0.30%	0.55
2701	39.30%	1	138.70%	62.74	0.00%	0.03	0.00%	0.46
5102	0.00%	1	0.00%	5.13	0.00%	0	0.00%	0.43
3301	0.00%	1	0.00%	3.07	0.00%	0.48	0.00%	0.39
5806	0.00%	1	0.00%	11.8	0.00%	0.02	0.00%	0.29
8101	0.00%	1	90.40%	3.26	56.30%	1.19	77.30%	0.24
705	17.90%	1	0.00%	2.58	6.90%	0.34	0.00%	0.21
6806	133.30%	1	0.00%	4.01	0.00%	0	0.00%	0.06
6402	0.00%	1	0.00%	12.17	0.00%	0	0.00%	0.04
1102	57.10%	1	66.50%	1.92	80.00%	1.02	59.60%	1.37
403	58.30%	1	0.00%	1.96	106.50%	0.3	43.70%	1.17
5202	63.80%	1	78.70%	1.76	80.10%	0.86	50.70%	0.77
103	29.00%	1	54.10%	1.53	81.50%	1.2	18.50%	1.18
1402	7.70%	1	0.00%	1.56	70.50%	0.04	82.30%	0.69
4202	105.70%	1	12.20%	1.67	0.00%	0	13.80%	0.33

표 35. control 그룹에 비교하여 EL200 그룹만 발현 혹은 증가한 spots

SSP	control		EL55		EL200		ELneg	
	CV	Ratio	CV	Ratio	CV	Ratio	CV	Ratio
2501	0.00%	1	0.00%	0.01	27.80%	9.19	45.70%	1.32
5404	25.80%	1	39.20%	1.02	88.30%	2.43	55.30%	1.11
3204	0.00%	1	0.00%	0.01	0.00%	2.03	98.50%	1.63

표 36. control 그룹에 비교하여 ELneg와 EL55 그룹만 발현 혹은 증가한 spots

SSP	control		EL55		EL200		ELneg	
	CV	Ratio	CV	Ratio	CV	Ratio	CV	Ratio
5204	0.00%	1	116.20%	137.15	0.00%	0.27	113.10%	194.58
3205	0.00%	1	0.00%	42.04	0.00%	0.27	131.70%	183.94
4602	0.00%	1	121.70%	2.27	0.00%	0.01	0.00%	27.46
7202	7.50%	1	21.00%	5.49	57.50%	0.96	133.70%	10.26
7403	0.00%	1	126.80%	840.36	0.00%	0.27	0.00%	6.34
2703	0.00%	1	0.00%	206.75	0.00%	0.27	46.10%	3.59
2405	0.00%	1	84.30%	7.76	0.00%	1.25	68.50%	3.48
3701	87.60%	1	170.80%	2.91	24.30%	1.15	11.00%	3.45
707	13.10%	1	111.00%	6.27	71.90%	0.65	51.30%	3.35
8104	89.90%	1	0.00%	3.79	14.50%	0.32	0.00%	3.33
7203	86.70%	1	0.00%	2.89	55.70%	1.47	15.60%	3.19

표 37. control 그룹에 비교하여 ELneg와 EL200 그룹만 발현 혹은 증가한 spots

SSP	control		EL55		EL200		ELneg	
	CV	Ratio	CV	Ratio	CV	Ratio	CV	Ratio
2103	0.00%	1	0.00%	0.31	0.00%	586.24	42.60%	117.43
501	0.00%	1	126.60%	0.2	99.10%	42.82	0.00%	3.24
102	54.60%	1	120.20%	0.31	102.30%	5.03	112.00%	3.18
3203	0.00%	1	0.00%	1.2	88.40%	4.44	53.10%	3
2301	0.00%	1	0.00%	0	22.10%	2.02	105.70%	2.83
3201	88.50%	1	69.20%	0.81	57.10%	2.17	94.60%	2.09

표 38. control 그룹에 비교하여 EL55와 EL200 그룹만 발현 혹은 증가한 spots

SSP	control		EL55		EL200		ELneg	
	CV	Ratio	CV	Ratio	CV	Ratio	CV	Ratio
6603	0.00%	1	0.00%	31.89	0.00%	380.99	0.00%	1.9
3505	100.60%	1	81.40%	6.01	57.40%	4.33	17.70%	1.16
5602	0.00%	1	29.90%	2.79	0.00%	2.09	0.00%	0.29
3604	94.20%	1	72.80%	5.06	26.60%	1.81	0.00%	0.64
2201	49.30%	1	64.10%	1.68	100.10%	1.74	70.40%	1.28

표 39. Control 그룹에 비교하여 ELneg와 EL55, EL200 그룹 모두 발현 혹은 증가한 spots

SSP	control		EL55		EL200		ELneg	
	CV	Ratio	CV	Ratio	CV	Ratio	CV	Ratio
9502	0.00%	1	62.10%	11.49	0.00%	25.92	65.10%	39.78
1503	0.00%	1	0.00%	2.24	100.30%	9.86	22.80%	17.67
1201	54.60%	1	77.90%	3.48	2.00%	8.83	91.40%	5.65
1504	117.30%	1	154.60%	7.82	71.50%	4.79	142.60%	3.83
104	3.90%	1	76.70%	5.94	87.40%	6.01	113.40%	2.05
8005	64.50%	1	0.00%	1.96	71.90%	3.74	41.50%	2.45
2404	45.90%	1	77.10%	1.5	45.40%	1.94	133.80%	2.79
2205	72.40%	1	24.00%	1.51	104.50%	2.06	84.70%	2.21
3502	110.30%	1	103.90%	2.51	32.00%	1.53	21.90%	1.86

표 40. control 그룹에 비교하여 모든 그룹에서 변화가 없는 spots

SSP	control		EL55		EL200		ELneg	
	CV	Ratio	CV	Ratio	CV	Ratio	CV	Ratio
5003	0.00%	1	0.00%	0.78	0.00%	0.96	0.00%	1.46
4206	0.00%	1	0.00%	0.01	0.00%	0.01	65.30%	1.42
1705	147.40%	1	129.70%	0.18	0.00%	0.15	81.50%	1.38
2502	90.70%	1	69.70%	0.43	104.50%	1.02	54.70%	1.35
1403	0.00%	1	54.30%	0.21	0.00%	0	46.00%	1.34
3101	0.00%	1	8.60%	1.31	0.00%	0	9.50%	1.34
1104	35.40%	1	80.80%	0.85	63.30%	0.59	85.60%	1.28
4101	55.80%	1	75.50%	1.42	81.30%	0.89	66.00%	1.27
5002	114.50%	1	7.50%	0.37	107.90%	0.26	99.20%	1.25
2603	74.70%	1	93.50%	1.38	32.00%	0.64	43.60%	1.16
7003	0.00%	1	0.00%	0.62	0.00%	0.72	0.00%	1.15
5203	49.40%	1	51.90%	1.25	83.90%	0.74	55.80%	1.13
8006	0.00%	1	78.40%	1.39	0.00%	0.95	72.60%	0.98
2203	0.00%	1	0.00%	0	0.00%	0	14.50%	0.94
1604	75.90%	1	54.60%	0.8	54.00%	0.13	89.20%	0.93
2102	86.90%	1	128.10%	0.54	89.80%	0.16	0.00%	0.92
8506	110.00%	1	0.00%	0.97	0.00%	0	0.00%	0.92
1605	122.80%	1	70.50%	0.29	151.20%	0.52	127.80%	0.88
3202	62.80%	1	0.00%	1.29	47.20%	0.51	86.50%	0.88
6001	0.00%	1	1.00%	0.55	64.40%	0.41	0.00%	0.87
5401	0.00%	1	0.00%	0	6.40%	1.18	0.00%	0.81
5703	0.00%	1	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0.74
3401	16.30%	1	69.80%	0.69	2.50%	0.42	97.90%	0.71
602	81.00%	1	149.40%	0.93	100.60%	0.79	0.00%	0.7
1401	91.50%	1	126.80%	0.97	79.70%	0.58	102.00%	0.69
4203	83.20%	1	86.30%	0.94	26.30%	0.24	87.50%	0.65
3002	75.10%	1	0.00%	0.48	93.50%	0.16	9.10%	0.63
4603	0.00%	1	0.00%	0.01	0.00%	0.65	10.30%	0.55

706	45.30%	1	102.10%	1.04	9.30%	1.25	21.00%	0.51
5502	18.20%	1	0.00%	0.04	0.00%	0.03	0.00%	0.47
404	96.30%	1	157.90%	0.41	11.50%	0.23	89.60%	0.44
5201	72.70%	1	63.30%	1.3	0.00%	0.35	57.10%	0.43
2702	152.30%	1	122.80%	0.19	51.40%	0.84	91.70%	0.4
201	68.50%	1	31.50%	0.28	93.90%	0.95	118.50%	0.39
2403	42.50%	1	0.00%	0.98	0.00%	0.24	81.80%	0.34
1701	129.90%	1	111.00%	0.06	70.90%	0.12	0.00%	0.33
2401	88.70%	1	83.80%	1.48	65.60%	0.71	150.60%	0.3
502	0.00%	1	30.90%	0.22	132.20%	0.44	2.20%	0.28
402	43.60%	1	122.50%	0.4	135.40%	0.36	47.90%	0.27
1202	66.80%	1	30.20%	0.52	81.90%	0.44	88.40%	0.23
301	0.00%	1	0.00%	0.02	0.00%	0.01	0.00%	0.21
604	29.20%	1	132.30%	1.14	86.70%	1.72	52.50%	0.18
1301	0.00%	1	0.00%	0.01	102.30%	0.31	0.00%	0.18
2202	80.00%	1	109.70%	1.02	139.20%	0.22	104.20%	0.15
202	53.20%	1	0.00%	0.01	0.00%	0.01	0.00%	0.14
7706	0.00%	1	0.00%	0.01	0.00%	0.01	0.00%	0.11
5805	0.00%	1	0.00%	0.01	0.00%	0.01	0.00%	0.1
7902	0.00%	1	0.00%	1	0.00%	0.01	0.00%	0.09
6601	31.60%	1	87.60%	0.65	0.00%	0.01	0.00%	0.09
4201	34.80%	1	50.90%	0.49	0.00%	0.57	40.10%	0.06
401	134.50%	1	0.00%	0.2	0.00%	0	0.00%	0.05
2204	0.00%	1	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0.05
9501	99.10%	1	0.00%	0	0.00%	0.07	0.00%	0.04
5705	107.10%	1	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0.01
6401	0.00%	1	0.00%	0	0.00%	0.41	0.00%	0

표 41. MALDI-TOF/MS 분석을 통해 동정된 단백질

Spot No.	MW(Da)/pI	Protein Name	ID(NCBI)	Unique peptides detected	Seq. coverage (%)	Expectation value	
1504	54091/5.29	alpha-1B-glycoprotein precursor	114053019	15	17	8.5e-014	table 7
3201	188715/6.41	prepro complement component C3	83764016	6	3	6.41	table 5
3502	63327/5.66	complement component C9 precursor	78369352	11	11	5.66	table 7
3505	48512/5.68	IgM heavy chain constant region	2232299	9	16	5.68	table 6
3604	68416/5.60	Chain A, Crystal Structure Of Bovine Serum Albumin	367460260	13	13	6.7e-016	table 6
5503	68416/5.60	Chain A, Crystal Structure Of Bovine Serum Albumin	367460260	20	23	3.4e-049	table 1
8301	36510/6.09	hIgG1 heavy chain constant region	7547266	10	24	2.7e-008	table 1

(2) 감염 개체와 비감염 개체의 혈청 내 단백질 profile 비교 분석

- 비감염군 개체와 MAP 감염된 개체를 감염단계에 따라 구분하여 (1) ELISA 음성, 분변 내 균 검출; (2) ELISA S/P ratio >55; (3) ELISA S/P ratio > 200; (4) 비감염 대조군, 총 4 그룹으로 구성하여 혈청 샘플을 분석하였다.
- 혈청 내 성분 분석을 위해 2-DE를 실시하고 MALDI-TOF/MS 분석을 통해 유의적인 단백질 spots 동정하였다(그림 118).

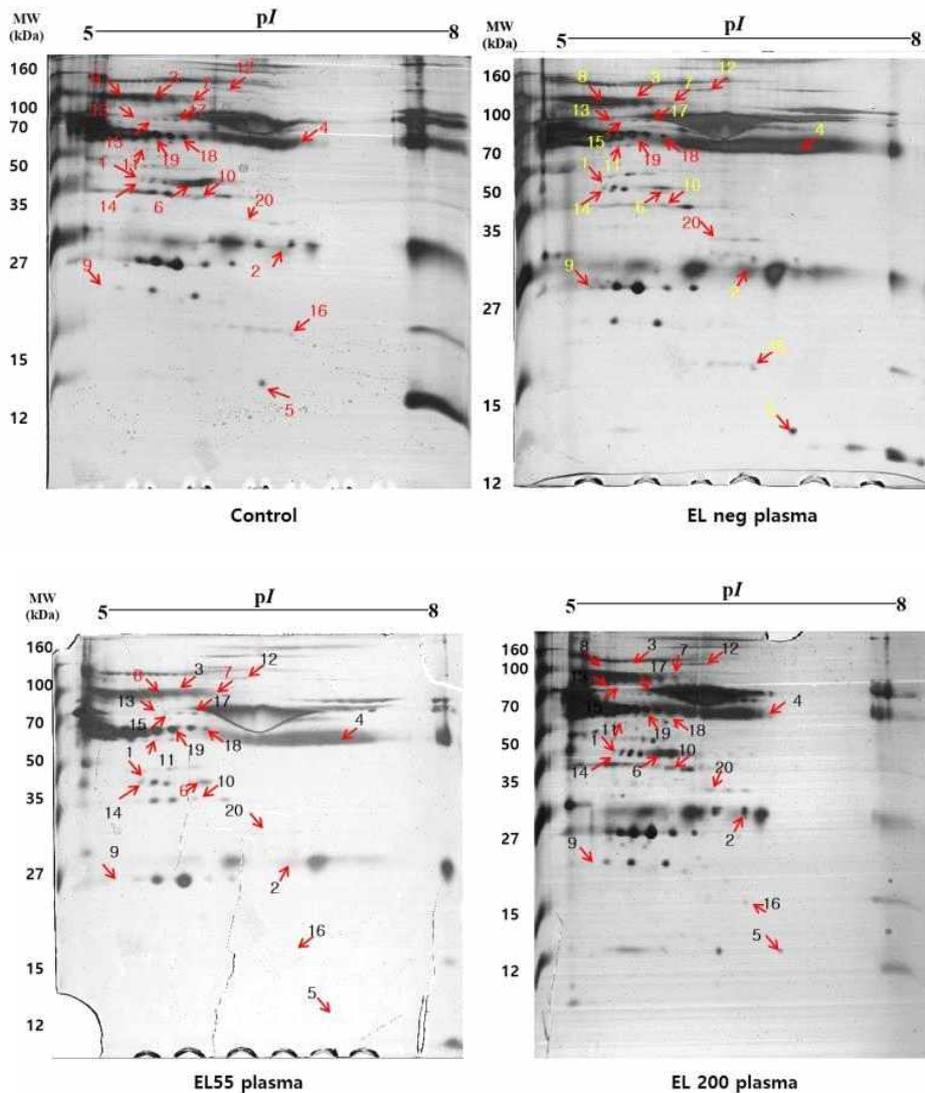


그림 118. MAP 감염단계에 따른 임상개체 혈청의 2-D gel electrophoresis profiles 및 image 분석

- 요네병의 준임상형 개체들은 임상증상을 보이지 않고 혈청 내에 항체도 가지고 있지 않아 기존의 진단방법으로는 탐색하기 어렵다. 또한 이러한 개체들은 분변을 통해 간헐적으로 균을 배출함으로써 다른 개체에 전염을 시킬 수 있는 중요 위험요인으로 여겨지고 있다. 그러므로 MAP 감염 개체를 조기에 진단하고 제어하기 위해 잠복감염 개체를 조기진단 할 수 있는 바이오마커를 다양한 분석을 통해 발굴할 필요가 있다. 요네병 비감염 대조군에 비교하여 감염단계에 따라 동정된 혈청단백질 동정 및 선별하였다(표 42).

표 42. MALDI-TOF/MS 분석을 통해 동정된 단백질

Spot No.	MW(Da) /pI	Name	ID(NCBI)	Uniqe nentides detected	Seuence coverage (%)	Exnec.t value	비고
1	43165 /5.74	Apolipoprotein A-IV	A0A3Q1M3N0	12	29	5.20E-05	ELneg
2	190190 /8.36	Complement C3	A0A4W2D411	18	9	0.00032	ELneg
3	134613 /5.75	Alpha-2-macroglobulin	R9QSM8	16	14	3.50E-03	ELneg
4	36510 /6.09	hIgG1 heavv chain constant region	7547266	10	24	2.70E-08	ELneg
5	15831 /5.91	Transthyretin	A0A4W2BU20	5	40	0.00024	ELneg
6	170639 /7.67	Complement C3	A0A4W2CZQ8	12	6	3.00E-02	ELneg와 EL55
7	134613 /5.75	Alpha-2-macroglobulin	R9QSM8	20	19	1.40E-04	ELneg와 EL55
8	101620 /6.22	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain	F1MMD7	14	12	5.00E-03	ELneg와 EL55
9	30258 /5.71	Apolipoprotein A-I preproprotein	V6F9A2	19	56	8.50E-20	ELneg와 EL200
10	34593 /6.68	Complement component 3d	Q693V9	20	48	1.10E-20	ELneg와 EL200
11	188715 /6.41	prepro complement component C3	83764016	6	3	6.41	ELneg와 EL200
12	48512 /5.68	IgM heavv chain constant region	2232299	9	16	5.68	ELneg와 EL200
13	54091 /5.29	Alpha-1B-glycoprotein	Q2KJF1	12	23	2.40E-05	ELneg와 EL55. EL200
14	42963 /5.3	Apolipoprotein A-IV	V6F7X3	24	0.41	6.70E-24	ELneg와 EL55. EL200
15	54091 /5.29	alpha-1B-glycoprotein precursor	114053019	15	17	8.50E-14	ELneg와 EL200
16	28249 /9.07	Kallikrein G	A0A1R3UGP4	10	42	0.034	ELneg와 EL200
17	63327 /5.66	complement component C9 precursor	78369352	11	11	5.66	ELneg와 EL55. EL200
18	41077 /5.16	Uncharacterized protein	A0A3Q1M3L6	9	26	7.90E-04	ELneg
19	41077 /5.16	Uncharacterized protein	A0A3Q1M3L6	7	13	0.052	ELneg
20	41077 /5.16	Uncharacterized protein	A0A3Q1M3L6	8	20	6.70E-07	ELneg와 EL55

- 본 연구에서는 MAP 감염단계에 따라 분석하였던 proteomic profile에 근거하여 선발한 3종의 바이오마커(Transthyretin, Alpha-2-macroglobulin, Alpha-1-beta glycoprotein)의 혈청 내 농도를 감염개체 및 비 감염개체에서 ELISA기법을 통해 확인하였다.
- 총 117두의 개체가 선발되었으며 PCR과 ELISA 검사 결과 및 임상형 감염개체와의 동거 여부에 따라 총 5개의 그룹으로 분류하였다. Group A는 PCR과 ELISA가 모두 음성이며 임상형 감염개체가 검출되지 않은 농장에서 선발하였다. Group B는 PCR과 ELISA가 모두 음성이지만 임상형 감염개체가 검출된 농장에서 선발하였다. Group C는 PCR은 양성이며 ELISA는 음성인 개체들을 선발하였으며 Group D는 PCR은 음성이지만 ELISA가 양성인 개체들을 선발하였다. 마지막 Group E는 PCR과 ELISA가 모두 양성인 개체들을 선발하였다.
- 각 개체의 혈청은 적절한 희석농도에 맞추어 희석하였고 희석된 혈청 샘플 내의 각 biomarker들의 농도를 MyBiosource 사의 ELISA kit를 이용하여 측정하였다(그림 119).
- 분석 결과 Alpha-2-macroglobulin 은 감염 개체와 비감염 개체 사이에서 유의적인 차이를 보였으며 다른 감염 단계인 그룹 사이에서의 차이도 확인되었다. 나머지 두 종류의 바이오마커는 1차로 검사한 72개 개체에서는 그룹 간의 유의적인 차이를 보이지 않았으며 현재 나머지 혈청 샘플 내에서의 농도를 분석하고 있다.

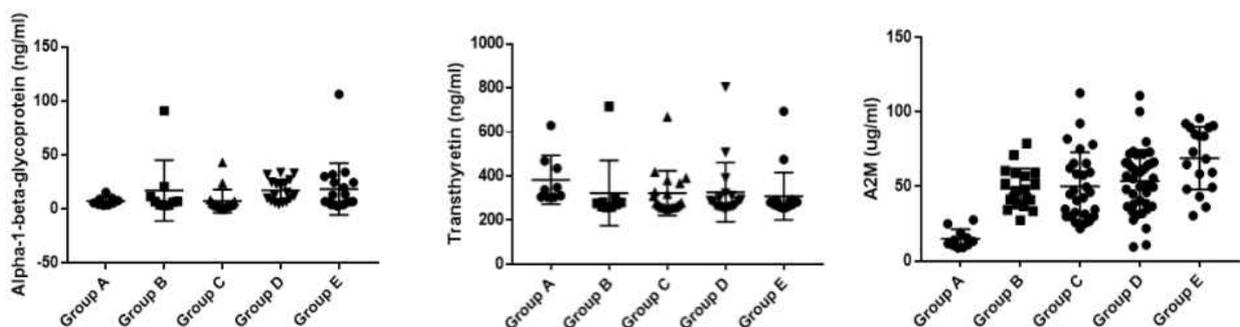


그림 119. MAP 감염단계에 따른 임상개체의 각 바이오마커의 혈청 내 농도

나. 혈청 microRNA 분석 기반 진단 바이오마커 발굴

(1) 준임상형 및 임상 단계의 자연감염우 혈액 및 조직 샘플 확보

- 기확보된 요네병 양성개체의 혈청으로부터 miRNA를 추출할 수 있는 기법을 수립하였음. 기확보된 요네병 양성혈청을 각각 ELISA 양성, fecal PCR 양성, ELISA+fecal PCR 모두 양성인 세 가지의 준임상형 그룹으로 나누고, 임상증상을 나타낸 개체의 혈청 및 음성대조군의 총 5 가지의 그룹으로 분류하였음 (표 43).

표 43. 각 그룹별 혈청 내역

	Group A	Group B	Group C	Group D
Fecal PCR	0	0	0	X
MAP isolation	0	0	X	X
Serum ELISA	0	0	X	X
Clinical sign	0	X	X	X
개체번호	60xx	61xx	120xx	20x
	60xx	70xx	130xx	5x
	80xx	81xx	100xx	50x
	100xx	100xx	101xx	4x
	61xx	110xx	110xx	16x
			130xx	3x
			80xx	27x
			91xx	22x
			100xx	17x
				0x
			21x	
			22x	
			18x	
			77xx	
			5x	
계	5	5	9	15

- 각각의 혈청 1ml로부터 miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen, Germany)을 사용하여 miRNA를 추출하는 조건을 설정 중임. 해당 키트로부터 충분한 양의 miRNA를 추출하기 위해 total volume을 늘려서 column을 사용하여 농축하는 방법을 사용함.

1. 혈청 200ul 당 1ml의 QIAzol reagent와 반응시킴 (해당 반응액을 5개 준비함).
2. Lysis 및 separation 과정 후 하나의 column에 준비한 5개의 반응물을 모두 반응시킴.
3. Washing step 후 RNA 농도를 측정하고 QC 분석.

- 샘플 혈청으로부터 miRNA 추출 및 QC 분석 완료하였음 (그림 120).

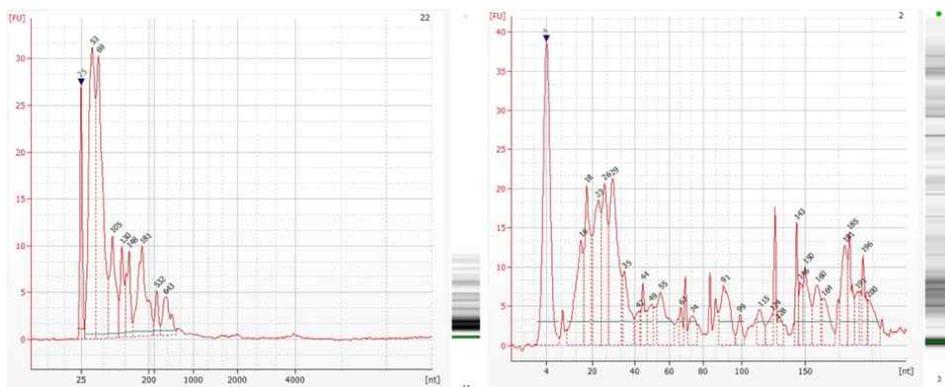


그림 120. 샘플 혈청 (52xx)으로부터 추출한 RNA의 bioanalyzer 분석

- 현재 혈청으로부터 그룹 별 miRNA를 추출 중이며 QC 분석 후 그룹별로 pooling하여 miRNA-seq 분석을 진행할 예정이다.

(2) miRNA isolation

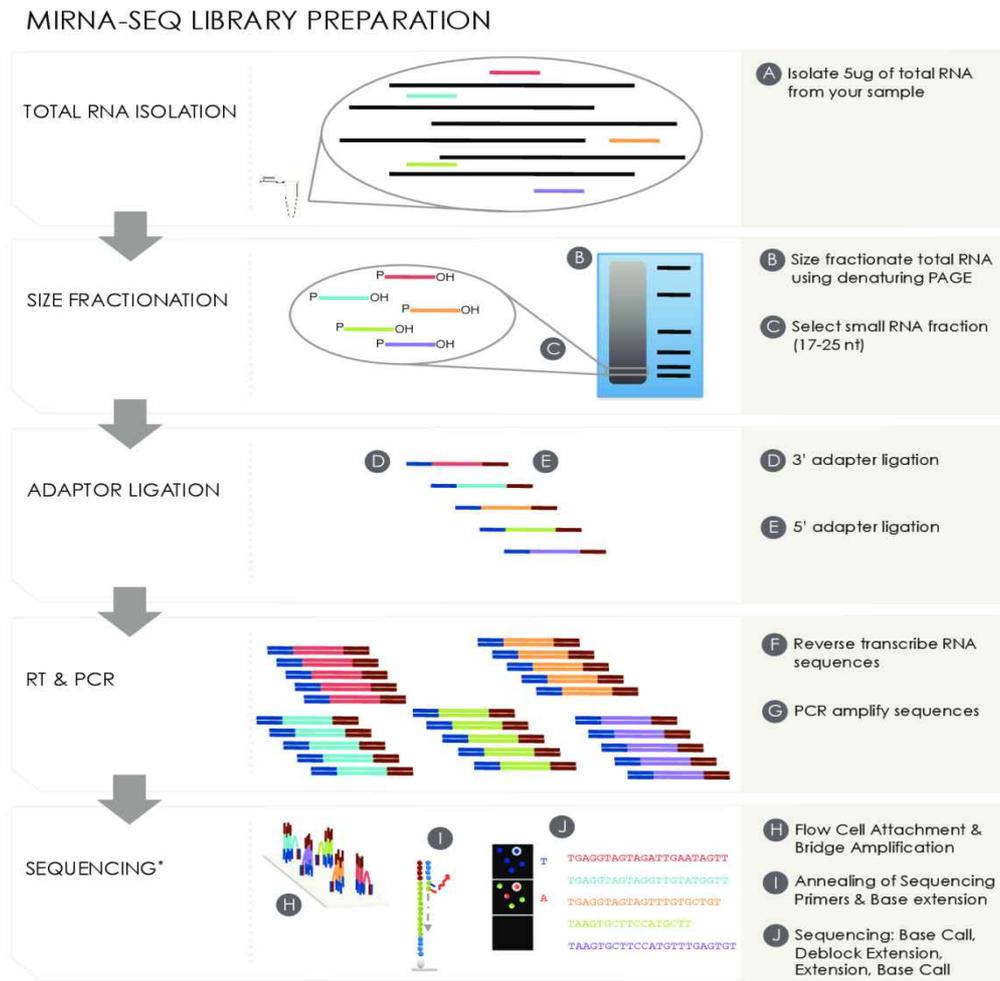
- MAP에 감염된 자연감염우들의 혈청을 표23과 같이 구별하여 group을 선별한 뒤, 각 group으로부터 혈청을 분리하여 miRNA를 추출하였다.
- 2차년도에 이어서 QC가 확보된 miRNA 추출 조건을 확립하였으며 각 혈청샘플로부터 Qiagen miRNeasy Serum/Plasma kit를 사용하여 miRNA를 추출하였다.
- 각각의 group으로부터 혈청 200ul를 이용하여 실험을 진행하였다.

표 44. MAP 양성혈청 분류

Group1 (PPP)	Group2 (PPN)	Group3 (PNN)	Group4 (Control)
• Fecal PCR (+) • Serum ELISA (+) • Clinical sign (+)	• Fecal PCR (+) • Serum ELISA (+) • Clinical sign (-)	• Fecal PCR (+) • Serum ELISA (-) • Clinical sign (-)	• Fecal PCR (-) • Serum ELISA (-) • Clinical sign (-)

(3) miRNA-seq 분석

- 그림 121과 같이 각각의 그룹에서 확보된 miRNA를 이용하여 sequencing을 진행하였다.



*Illumina sequencing method depicted however other sequencing platforms can also be used.

그림 121. small RNA sequencing의 실험과정

(4) MicroRNA-sequencing 정보 분석

- miRNA-seq 결과는 필터링, 서열 정리, seed 영역 변이 확인을 거쳐 mirdeep2를 이용하여 발현량을 측정하였다. 이후 특이발현 miRNA를 q-value를 기준으로 정렬하였다. 특이적인 발현이 확인된 miRNA들이 target 하는 유전자 정보 제공을 위해서 MICRORNA.ORG, TARGETSCAN-WORM, TARGETSCAN-VERT 등 총 14개 database 검색을 하였고, 그 결과로 각 miRNA가 target 하는 유전자에 대한 정보를 정리하였다(그림 122).

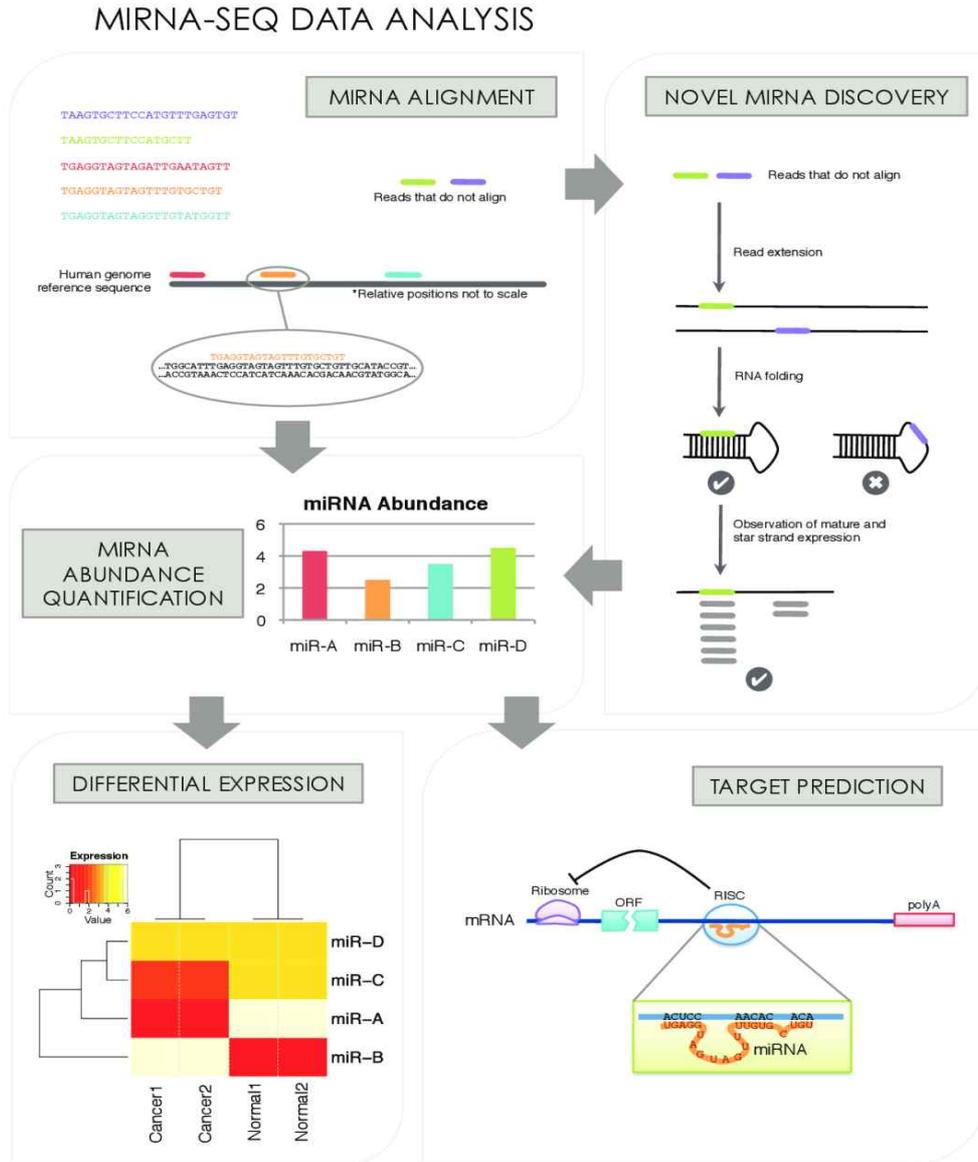


그림 122. 실험결과 분석과정

(5) DEG 분석

- RNA sequencing을 통하여 혈청에서 microRNA 유전자의 발현을 분석하고, Differentially Expressed Genes (DEG) 분석을 통하여 각 그룹별 발현 유전자의 차이를 비교 분석하였다.
- microRNA 분석은 다음과 같이 진행하였다.

- Group 1: Control vs PPP (PCR(+), ELISA(+), Clinical sign(+))
- Group 2: Control vs PPN (PCR(+), ELISA(+), Clinical sign(-))
- Group 3: Control vs PNN (PCR(+), ELISA(-), Clinical sign(-))
- Group 4: Control (PCR(-), ELISA(-), Clinical sign(-))

- 각 그룹별 유전자 발현량의 차이를 분석한 결과, 유의하게 발현된 유전자는 ($|Foldchange| \geq 1.5$) 를 기준으로 하여, 총 110개의 microRNA 가 확인되었다. 이 중, Group 1에서 총 109 개, Group 2에서 총 52개, Group 3에서 총 28개가 유의적으로 발현되었다.

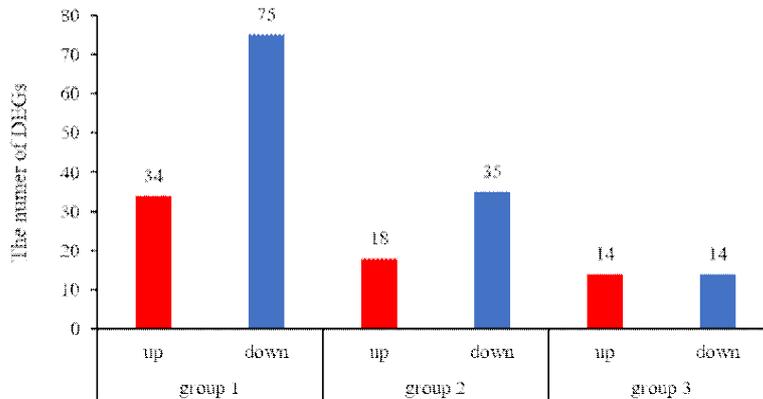


그림 123. 그룹별 유의적으로 발현한 microRNA 의 수

- 대조군인 Group4 와 비교하여, 각 그룹의 유의적으로 발현한 microRNA 의 군집분석 (clustering) 결과, Group 1 과 Group 2 의 microRNA 발현 양상이 Group 3에 비해 유사하게 나타났다.

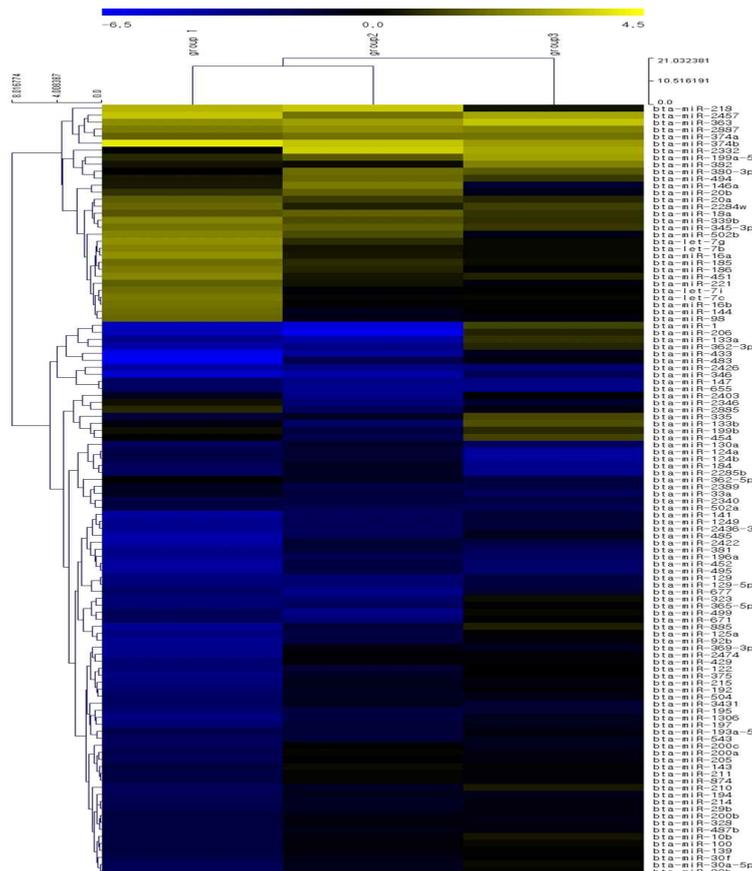


그림 124. 유의적으로 발현한 microRNA 의 군집분석 결과

- 유의적으로 발현된 microRNA의 수는 공통적으로 발현이 증가한 microRNA의 수가 23개였고, 공통적으로 발현이 감소한 microRNA의 수가 53개였다.

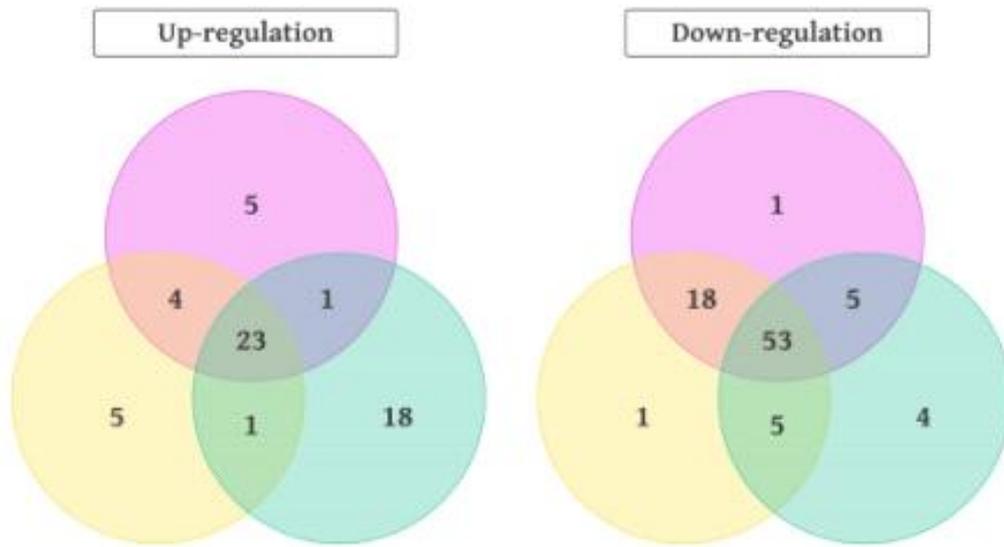


그림 125. 유의적으로 발현한 microRNA의 venn diagram 분석 결과

- 대조군과 비교하여 공통으로 발현이 증가한 microRNA의 목록은 다음과 같다

표 45. 전체 그룹에서 공통으로 발현량이 증가한 microRNA 목록

common	group 1	group2	group3
bta-miR-2332	0.113607	3.582037	2.945898
bta-miR-382	0.368268	0.227088	2.236736
bta-miR-494	0.428215	1.791525	0.995625
bta-miR-199a-5p	0.741219	1.582037	2.810116
bta-miR-18a	1.468747	1.689857	0.923874
bta-miR-20a	1.599564	1.026478	0.679552
bta-miR-374a	1.728556	1.992032	2.009279
bta-miR-2284w	1.799505	0.554163	1.134964
bta-miR-185	1.888713	0.767692	0.225842
bta-miR-345-3p	1.978204	1.611308	0.98128
bta-miR-16b	1.979996	0.037917	0.045297
bta-let-7c	2.108992	0.129444	0.148989
bta-miR-186	2.113343	0.669344	0.042253
bta-miR-2887	2.150467	2.487585	2.254279
bta-miR-339b	2.242266	1.328566	0.848503
bta-let-7b	2.257771	0.366512	0.173442
bta-miR-451	2.357241	0.38196	0.632151
bta-miR-363	2.491591	2.754906	3.40585
bta-miR-16a	2.511152	0.42973	0.143089
bta-let-7g	2.521975	0.804792	0.174119
bta-miR-218	3.136155	3.489076	0.338285
bta-miR-2457	3.39531	1.992032	2.879603
bta-miR-374b	4.017182	3.394767	2.696978

- 대조군과 비교하여 공통으로 발현이 감소한 microRNA의 목록은 다음과 같다.

표 46. 전체 그룹에서 공통으로 발현량이 감소한 microRNA 목록

common	group 1	group2	group3
bta-miR-483	-6.15745	-1.9764	-0.46102
bta-miR-433	-5.83182	-3.70279	-0.76641
bta-miR-346	-5.10471	-4.12648	-2.22904
bta-miR-485	-4.20832	-2.06182	-0.63458
bta-miR-2426	-4.15729	-3.19653	-2.98364
bta-miR-2422	-4.12429	-1.27105	-1.63692
bta-miR-141	-4.01685	-2.22907	-1.36506
bta-miR-452	-3.85024	-1.78104	-2.64627
bta-miR-495	-3.77509	-1.6647	-2.61488
bta-miR-92b	-3.61059	-1.62551	-0.26214
bta-miR-1249	-3.52786	-2.15274	-1.41275
bta-miR-2436-3p	-3.47136	-2.32485	-1.24668
bta-miR-2474	-3.47136	-0.00293	-0.24668
bta-miR-381	-3.47136	-1.45957	-2.24668
bta-miR-196a	-3.45316	-2.07974	-2.42981
bta-miR-369-3p	-3.42033	-0.35737	-0.89761
bta-miR-1306	-3.19234	-1.76169	-0.68125
bta-miR-125a	-3.1518	-1.74703	-0.05455
bta-miR-129	-3.13104	-2.8107	-1.72247
bta-miR-129-5p	-3.13104	-2.8107	-1.72247
bta-miR-215	-3.0821	-0.65046	-0.36058
bta-miR-122	-2.96101	-1.22485	-0.03119
bta-miR-429	-2.86065	-0.15493	-0.0541
bta-miR-365-5p	-2.85338	-2.42894	-0.20359
bta-miR-197	-2.80864	-1.39101	-0.71213
bta-miR-192	-2.73167	-0.77065	-0.18766
bta-miR-195	-2.71026	-1.63874	-1.24986
bta-miR-655	-2.54335	-3.58081	-3.40628
bta-miR-677	-2.51761	-3.4461	-1.31078
bta-miR-504	-2.50254	-0.85071	-0.48055
bta-miR-2285b	-2.49172	-0.97536	-3.52283
bta-miR-3431	-2.44902	-0.70335	-1.29154
bta-miR-147	-2.44561	-3.32485	-3.24668
bta-miR-543	-2.30298	-1.40358	-0.56798
bta-miR-184	-2.27661	-0.79473	-3.37826
bta-miR-130a	-2.25214	-1.05472	-2.44832
bta-miR-671	-2.2504	-2.8746	-0.0541
bta-miR-205	-2.13672	-0.04976	-0.36769
bta-miR-194	-2.09009	-0.58482	-0.60006
bta-miR-214	-1.97062	-0.97657	-0.39705
bta-miR-29b	-1.90704	-0.86311	-0.31116
bta-miR-124a	-1.85217	-1.32485	-3.83164

bta-miR-124b	-1.85217	-1.32485	-3.83164
bta-miR-193a-5p	-1.84236	-1.45184	-0.33329
bta-miR-487b	-1.72374	-0.58075	-0.32246
bta-miR-502a	-1.72208	-1.9478	-2.18152
bta-miR-2340	-1.71026	-1.63874	-1.59892
bta-miR-328	-1.6378	-0.30585	-0.44001
bta-miR-200b	-1.58038	-0.44712	-0.4261
bta-miR-2389	-0.84795	-1.8746	-1.66171
bta-miR-33a	-0.84374	-1.45957	-2.24668
bta-miR-2403	-0.84276	-3.35842	-0.01396
bta-miR-362-5p	-0.04966	-0.73989	-1.66171

- 대조군과 비교하여 각 그룹에서 공통으로 발현이 증가한 microRNA의 활성화 상태는 다음과 같다.

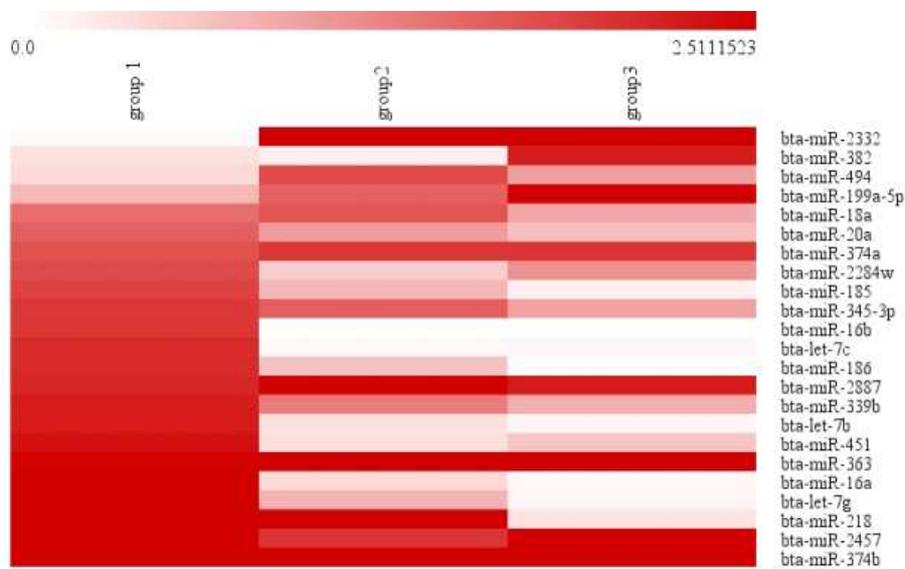


그림 126. 전체 그룹에서 공통으로 발현량이 증가한 microRNA의 활성화 상태

- 대조군과 비교하여 각 그룹에서 공통으로 발현이 감소한 microRNA의 활성화 상태는 다음과 같다.

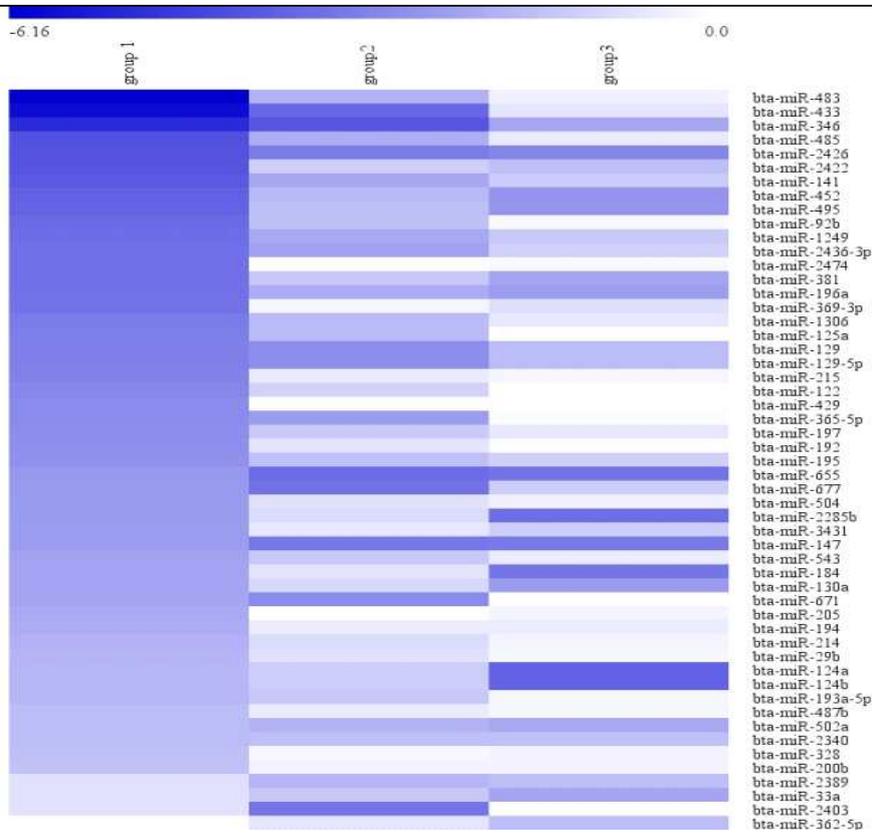


그림 127. 전체 그룹에서 공통으로 발현량이 감소한 microRNA 의 활성화 상태

(6) miRNA sequencing 결과 분석

- 2, 3차년도 실험결과에서는 소 혈청을 감염단계별로 나누어 음성그룹대비 시퀀싱 데이터를 분석하여, 차등발현된 miRNAs (Differentially Expressed miRNAs)들을 확인하였다 (표 47).

표 47. 시퀀싱 결과 감염그룹의 차등발현 miRNAs

Gene ID	Log2 fold change		
	Group A	Group B	Group C
bta-miR-374b	4.02	3.39	2.70
bta-miR-2457	3.40	1.99	2.88
bta-miR-218	3.14	3.49	0.34
bta-let-7g	2.52	0.80	0.17
bta-miR-16a	2.51	0.43	0.14
bta-miR-363	2.49	2.75	3.41
bta-miR-451	2.36	0.38	0.63
bta-let-7b	2.26	0.37	0.17
bta-miR-339b	2.24	1.33	0.85
bta-miR-2887	2.15	2.49	2.25
bta-miR-186	2.11	0.67	0.04
bta-let-7c	2.11	0.13	0.15
bta-miR-16b	1.98	0.04	0.05
bta-miR-345-3p	1.98	1.61	0.98
bta-miR-185	1.89	0.77	0.23
bta-miR-2284w	1.80	0.55	1.13
bta-miR-374a	1.73	1.99	2.01
bta-miR-20a	1.60	1.03	0.68
bta-miR-18a	1.47	1.69	0.92

bta-miR-199a-5p	0.74	1.58	2.81
bta-miR-494	0.43	1.79	1.00
bta-miR-382	0.37	0.23	2.24
bta-miR-2332	0.11	3.58	2.95
bta-miR-362-5p	-0.05	-0.74	-1.66
bta-miR-2403	-0.84	-3.36	-0.01
bta-miR-33a	-0.84	-1.46	-2.25
bta-miR-2389	-0.85	-1.87	-1.66
bta-miR-200b	-1.58	-0.45	-0.43
bta-miR-328	-1.64	-0.31	-0.44
bta-miR-2340	-1.71	-1.64	-1.60
bta-miR-502a	-1.72	-1.95	-2.18
bta-miR-487b	-1.72	-0.58	-0.32
bta-miR-193a-5p	-1.84	-1.45	-0.33
bta-miR-124a	-1.85	-1.32	-3.83
bta-miR-124b	-1.85	-1.32	-3.83
bta-miR-29b	-1.91	-0.86	-0.31
bta-miR-214	-1.97	-0.98	-0.40
bta-miR-194	-2.09	-0.58	-0.60
bta-miR-205	-2.14	-0.05	-0.37
bta-miR-671	-2.25	-2.87	-0.05
bta-miR-130a	-2.25	-1.05	-2.45
bta-miR-184	-2.28	-0.79	-3.38
bta-miR-543	-2.30	-1.40	-0.57
bta-miR-147	-2.45	-3.32	-3.25
bta-miR-3431	-2.45	-0.70	-1.29
bta-miR-2285b	-2.49	-0.98	-3.52
bta-miR-504	-2.50	-0.85	-0.48
bta-miR-677	-2.52	-3.45	-1.31
bta-miR-655	-2.54	-3.58	-3.41
bta-miR-195	-2.71	-1.64	-1.25
bta-miR-192	-2.73	-0.77	-0.19
bta-miR-197	-2.81	-1.39	-0.71
bta-miR-365-5p	-2.85	-2.43	-0.20
bta-miR-429	-2.86	-0.15	-0.05
bta-miR-122	-2.96	-1.22	-0.03
bta-miR-215	-3.08	-0.65	-0.36
bta-miR-129	-3.13	-2.81	-1.72
bta-miR-129-5p	-3.13	-2.81	-1.72
bta-miR-125a	-3.15	-1.75	-0.05
bta-miR-1306	-3.19	-1.76	-0.68
bta-miR-369-3p	-3.42	-0.36	-0.90
bta-miR-196a	-3.45	-2.08	-2.43
bta-miR-2436-3p	-3.47	-2.32	-1.25
bta-miR-2474	-3.47	0.00	-0.25
bta-miR-381	-3.47	-1.46	-2.25
bta-miR-1249	-3.53	-2.15	-1.41
bta-miR-92b	-3.61	-1.63	-0.26
bta-miR-495	-3.78	-1.66	-2.61
bta-miR-452	-3.85	-1.78	-2.65
bta-miR-141	-4.02	-2.23	-1.37
bta-miR-2422	-4.12	-1.27	-1.64
bta-miR-2426	-4.16	-3.20	-2.98
bta-miR-485	-4.21	-2.06	-0.63

bta-miR-346	-5.10	-4.13	-2.23
bta-miR-433	-5.83	-3.70	-0.77
bta-miR-483	-6.16	-1.98	-0.46
bta-miR-133b	-0.36	-2.64	1.41
bta-miR-335	-1.55	-0.92	1.23
bta-miR-1	-4.78	-5.34	1.20
bta-miR-454	-0.04	-2.03	1.16
bta-miR-133a	-3.42	-4.21	0.88
bta-miR-362-3p	-4.32	-3.36	0.67
bta-miR-206	-4.55	-6.00	0.63
bta-miR-885	-3.68	-1.45	0.57
bta-miR-210	-2.24	-0.89	0.49
bta-miR-10b	-1.73	-0.34	0.38
bta-miR-323	-2.97	-2.75	0.23
bta-miR-30a-5p	-2.11	-0.73	0.21
bta-miR-100	-1.77	-0.18	0.17
bta-miR-499	-2.22	-3.41	0.16
bta-miR-99b	-2.10	-0.66	0.08
bta-miR-139	-1.58	-0.31	0.05
bta-miR-30f	-1.86	-0.47	0.01
bta-miR-375	-3.22	-1.02	0.01
bta-miR-221	1.65	0.34	-0.38
bta-miR-502b	2.28	1.33	-0.60
bta-miR-20b	0.89	1.68	-0.60
bta-miR-146a	0.45	2.11	-1.31
bta-miR-143	-1.59	0.20	-0.10
bta-miR-200a	-1.90	0.14	-0.49
bta-miR-874	-1.70	0.12	-0.24
bta-miR-211	-1.81	0.08	-0.21
bta-miR-200c	-2.32	0.02	-0.76
bta-miR-199b	0.26	-1.59	0.71
bta-let-7i	1.90	-0.19	-0.03
bta-miR-144	1.88	-0.66	-0.02
bta-miR-98	1.77	-0.44	-0.44
bta-miR-2885	0.74	-2.39	-0.49
bta-miR-2346	0.29	-2.96	-1.21
bta-miR-380-3p	-0.01	1.89	1.58

- 유의미하게 차등발현된 ($|Foldchange| \geq 1.5$) miRNAs들 중 모든 감염그룹 (Group A, B and C)에서 공통적으로 2배 이상 발현 변화가 나타난 8개의 miRNAs를 후보군으로 선정하였다 (표 48).

표 48. 음성그룹 대비 유의적으로 공통 차등발현된 바이오마커 후보군

miRNA	Log2 fold change		
	Group A	Group B	Group C
bta-miR-363	2.49	2.75	3.41
bta-miR-374b	4.02	3.39	2.70
bta-miR-2887	2.15	2.49	2.25
bta-miR-147	-2.45	-3.32	-3.25
bta-miR-196a	-3.45	-2.08	-2.43
bta-miR-346	-5.10	-4.13	-2.23
bta-miR-655	-2.54	-3.58	-3.41
bta-miR-2426	-4.16	-3.20	-2.98

(7) miRNA의 타겟 유전자 기능 및 네트워크 분석

- 바이오마커 후보군인 8개의 차등발현 miRNAs들의 타겟 유전자들을 TargetScan tool을 이용하여 cumulative weighted context++ score ≤ -0.2 기준으로 예측하였다.
- 결과적으로 upregulated miRNAs (bta-miR-363, bta-miR-374b, bta-miR-2887)은 총 1240개의 유전자, downregulated miRNAs (bta-miR-147, bta-miR-196a, bta-miR-346, bta-miR-655, bta-miR-2426)은 총 1022개의 유전자를 예측하였다.
- 예측된 유전자들은 온라인 tool인 PANTHER classification system을 이용하여 gene ontology를 분석하였으며, DAVID bioinformatics tool을 이용하여 KEGG pathway 분석을 진행하였다.
- Gene ontology 분석 결과, upregulated miRNAs와 downregulated miRNAs는 molecular function과 biological processes에서 각각 8개와 20개의 term을 보여주었다 (그림 128).

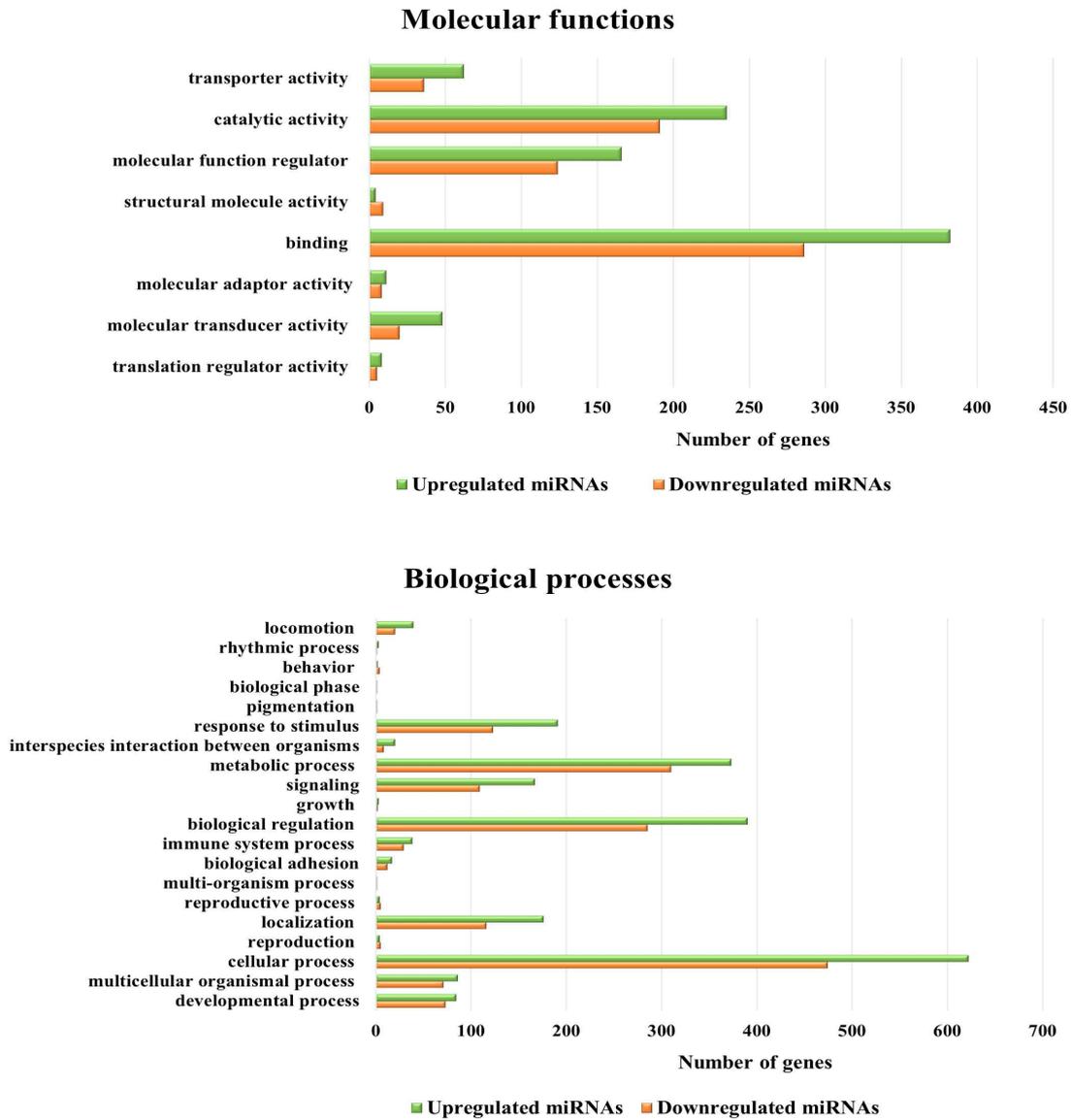


그림 128. 바이오마커 후보군들의 Gene ontology 분석 결과

- GO 분석을 진행한 결과 molecular function은 주로 binding, catalytic activity 및 molecular function regulator 등이 관련되어 있었으며, Biological processes에서는 주로 cellular process 및 metabolic process와 많이 관련되어 있다는 것을 확인할 수 있었다.
- KEGG pathway 분석 결과, upregulated miRNAs는 주로 PI3K-Akt, Ras, cAMP와 같은 signaling pathways들을 타겟하였으며, downregulated miRNAs의 경우에는 MAPK, Ras, Rap1, Wnt 와 같은 signaling pathways들을 타겟한것을 확인하였다 (그림 129).

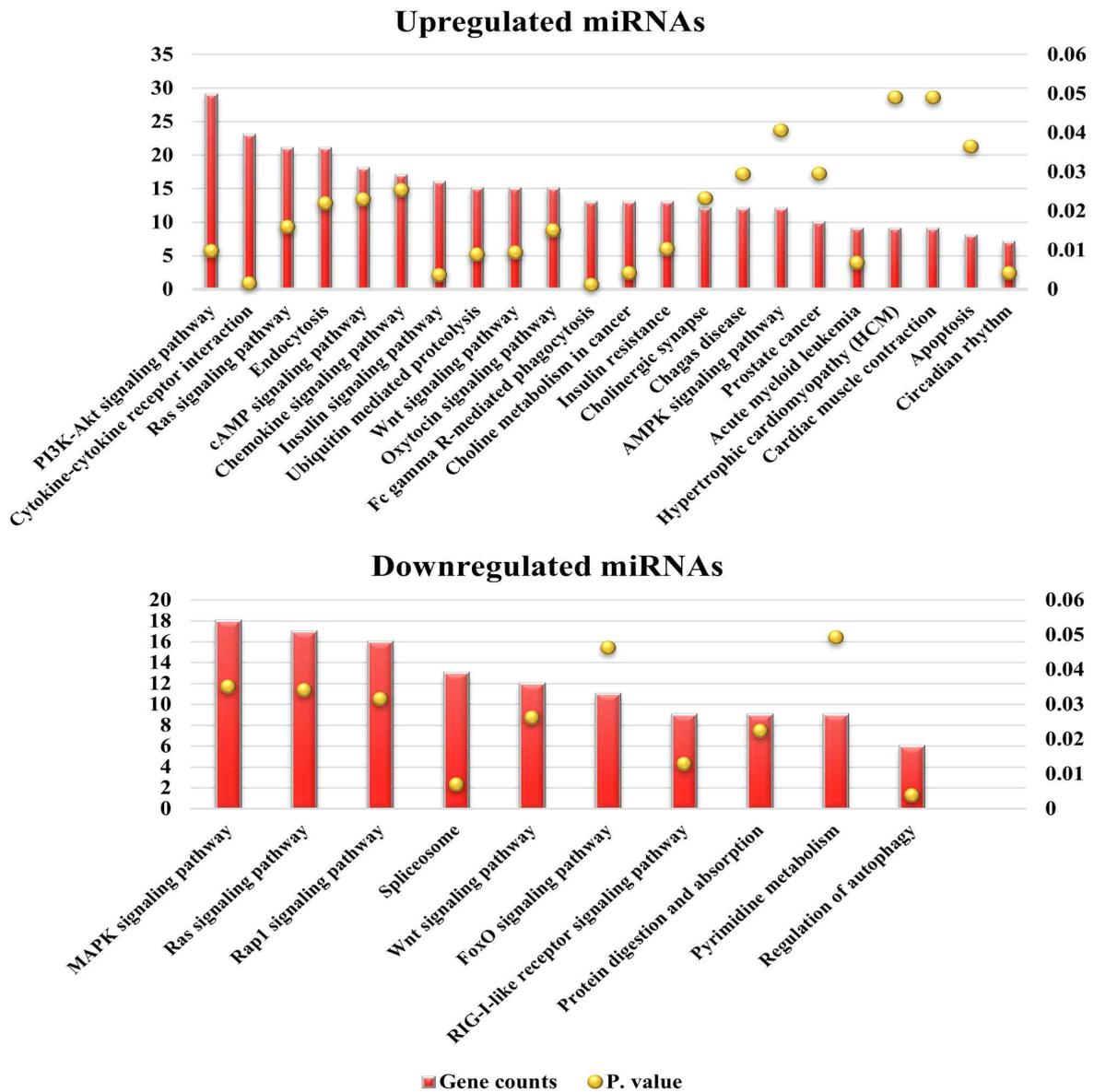


그림 129. 바이오마커 후보군들의 KEGG pathway 분석 결과

- Ingenuity pathway analysis (IPA) tool을 이용하여 후보 miRNAs와 관련된 유전자들의 네트워크 분석을 진행하였다.
- 네트워크는 MAP 감염 초기 면역반응에 주를 이루는 TNF와 이와 관련된 여러 T helper 1 관련 분자들이 활성화되어 있었으며, 이뿐만 아니라 준임상기에서 임상기로의 transition에 관여하는 regulatory t cell 및 이후 과정에서 주를 이루는 T helper 2 관련 분자인 TGFB-1 및 IL-10 등도 활성화 되는 것을 보여주었다 (그림 130).

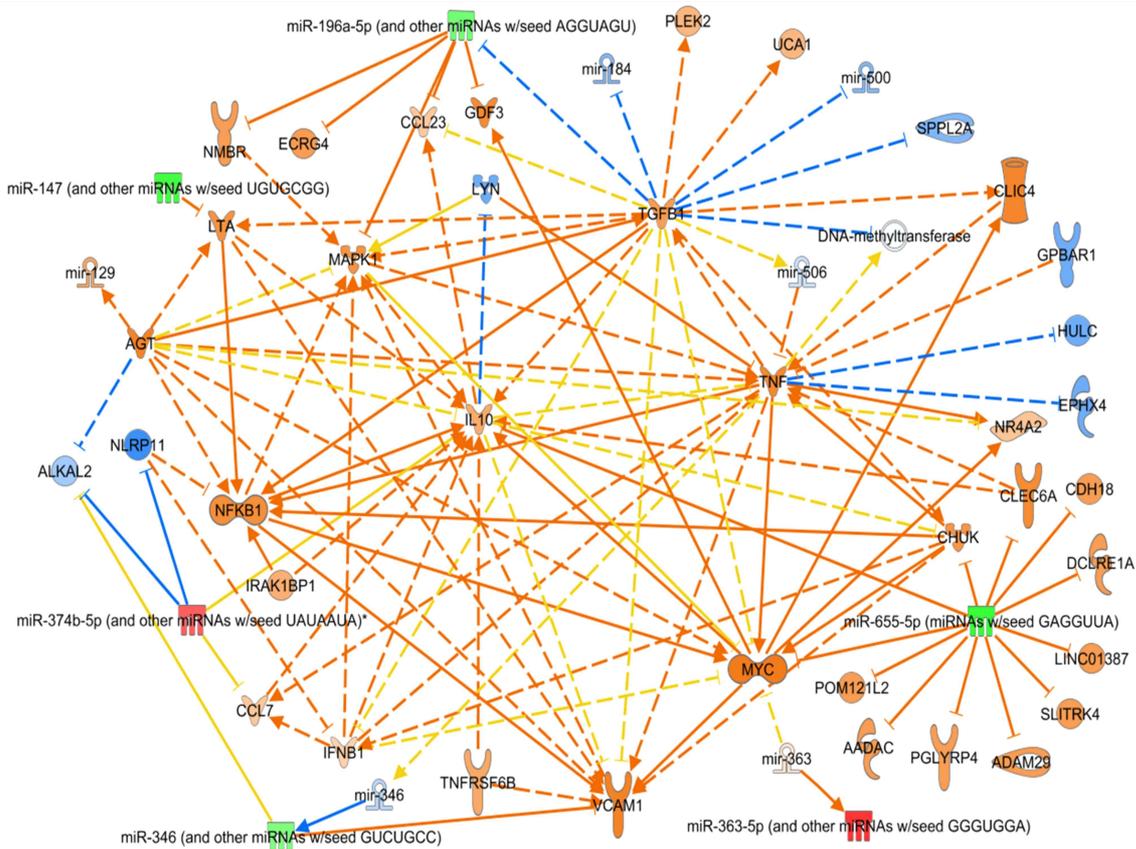


그림 130. MAP 감염 그룹의 공통발현 miRNAs로 형성된 네트워크

- 바이오마커 후보 miRNAs들을 qRT-PCR을 통하여 실제 유전자 발현을 확인하였다.
- 결과적으로 총 4개의 miRNAs가 sequencing data의 발현량과 일치하는 패턴을 보였다. 이 중 bta-miR-374b, bta-miR-2887의 경우 임상기인 Group A에서 좀더 유의적으로 발현이 증가하였으며, bta-miR-147, bta-miR-346의 경우에는 준임상기인 Group B와 Group C에서 유의적으로 발현이 감소된 것을 확인 할 수 있었다. (그림 131).

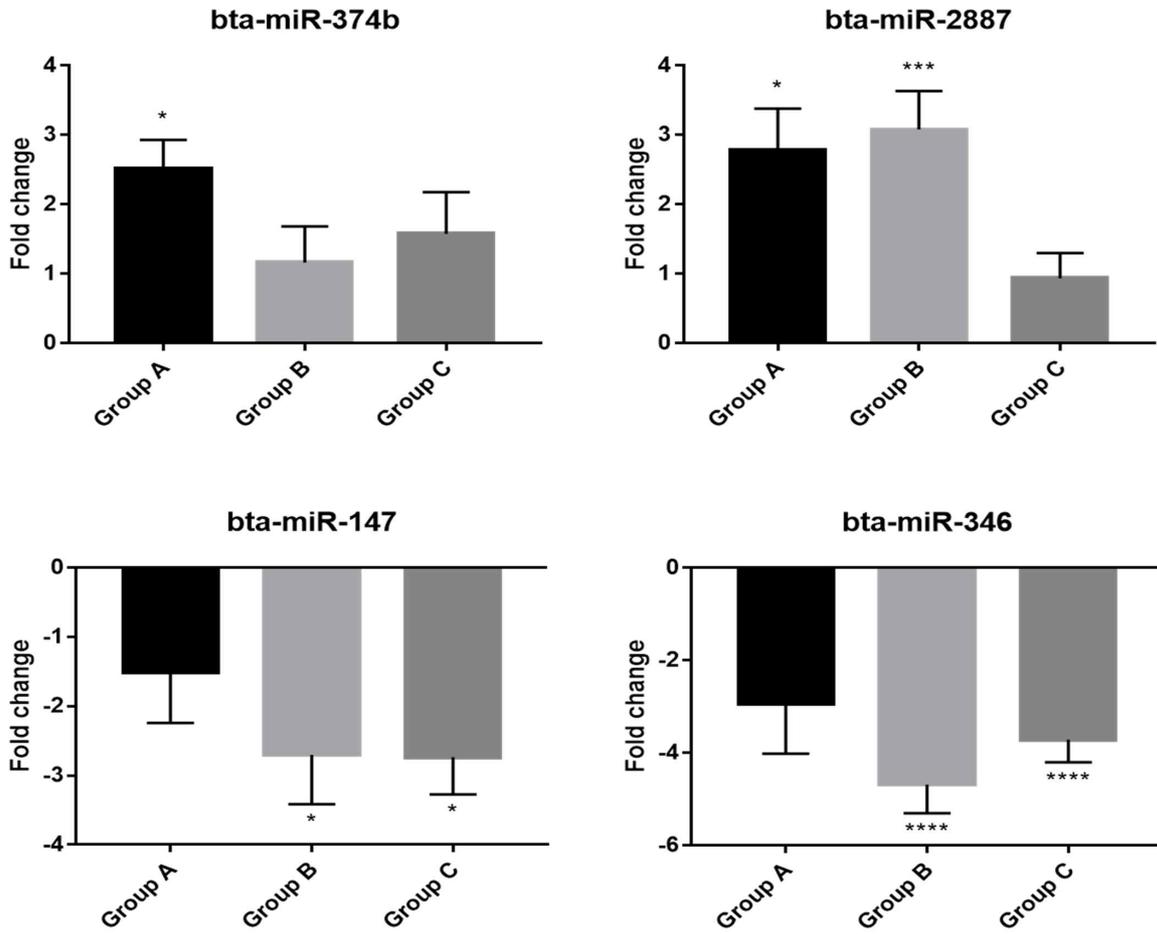


그림 131. 바이오마커 후보군들의 실제 유전자 발현값

5. MAP 핵심 병원성 인자 발굴 및 돌연변이체 작성

가. 생물정보학 활용 MAP 병원성인자 후보군 도출

(1) MAP 핵심 병원성 인자 분석 후보군 도출

- PubMed와 Google Scholar의 데이터베이스에서 mycobacteria에서 신규 병원성인자들을 검색하고 후보군을 도출하고자 하였음. 검색 키워드로는 <<Non-tuberculous mycobacteria>> or <<Mycobacterium avium>> 그리고 <<Biomarker>>, <<Biomarkers>>, <<Cytokines>>, <<Genes>>, <<Proteins>> or <<Metabolites>> 로 하고 2000년부터 2018년도 사이에 출판된 최신 문헌들을 검색함. 위의 기준을 토대로 검색된 연구는 PubMed 총 4,037개, Google Scholar 총 8,930개이며, 특허 및 관련 서지는 제외한 것임. 현재 도출된 문헌들을 연구 목적에 맞게 filtering 하고 정보를 정리중 임. PubMed에서 검색된 문헌 리스트는 따로 첨부함 (Supplementary data 1). 우선 현재까지 검색된 문헌들을 정리하는 내용 및 관심 유전자에 대하여 표 1에 표시함.
- 현재 GEO database에서 stress environments (hypoxic, acidic, nutrient deficiency, and oxidative stress) 나 invasive ability 등의 실험 조건으로 transcriptional, metabolic analysis을 한 정보를 검색중임. 본 주제의 연구는 위의 PubMed와 Google Scholar 검색에서도 확인된 경우 반대로 GEO accession 번호를 찾아 분석에 포함할 수 있음. 또한 핵심 병원성 인자 및 biomarker 관련 유전자는 균 및 숙주 유전자가 검색될 것이므로 균측 및 숙주측 인자로 나누어 정리하고 활용할 예정임.

(2) 도출된 MAP감염 관련 핵심유전자의 적용

- 위에 언급하였듯 여러 데이터베이스에서 도출된 mycobacteria 관련 핵심유전자들은 균측 및 숙주측 인자들로 나뉘게 됨. 균측 인자는 신규 병원성 유전자로 가능성을 가질 수 있으며, 숙주측 인자는 mycobacterial 감염에 대한 biomarker 로서 가능성을 확인할 필요가 있음. 표 1에서 정리된 타 연구에 의해 발굴된 숙주측 인자들 중 IFN- γ 가 감염 초기 발굴 및 기존의 tuberculin test를 대체하는 biomarker로 최근까지 이용되어 왔음.
- 잠재적인 mycobacterial 감염과 활성 mycobacterial 감염을 구별할 수 있는 진단 분석법의 개발은 mycobacteria 를 통제하고 효과적인 치료법을 제공할 수 있는 측면에 매우 중요함. mycobacteria 질병에는 여러 감염단계를 갖는데 각 단계의 개인이 나타내는 다양한 면역 마커의 mRNA 발현을 조사하고 이해하는 것이 기초연구가 될 수 있음. 그리하여 본 연구에서 MAP 감염된 소 혈액을 사용하여 Th-1 type chemokines인 CXCR3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 및 CXCL11을 IGRA (interferon (IFN) - γ release assay)에 적용하여 평가함. MAP 감염 단계에 따라 분류한 소 30마리 혈액을 채취하여 MAP (1×10^4 cfu/ml)을 자극하고 20시간 후 RNA를 분리하여 quantitative RT-PCR을 실시하였고, 본 연구에 이용한 primers는 표 2와 같음. 본 결과에 따르면 IFN- γ 는 MAP 특이적 항체를 형성한 개체들에서 유의적으로 증가하였고, CCL5나 CXCL10은 MAP이 검출되는 개체에서 유의적으로 발현이 증가함. 특히 CCL5의 발현은 MAP-특이적 항체 및 MAP DNA가 모두 검출된 개체들에서 유의적이었지만, CXCL10은 MAP-특이적 항체는 검출되지 않았지만 MAP DNA가 검출된 개체에서 특이적으로 발현이 증가하여 subclinical stage의 개체를 검출하는데 이용될 수 있을 것으로 기대되었음 (그림 132).

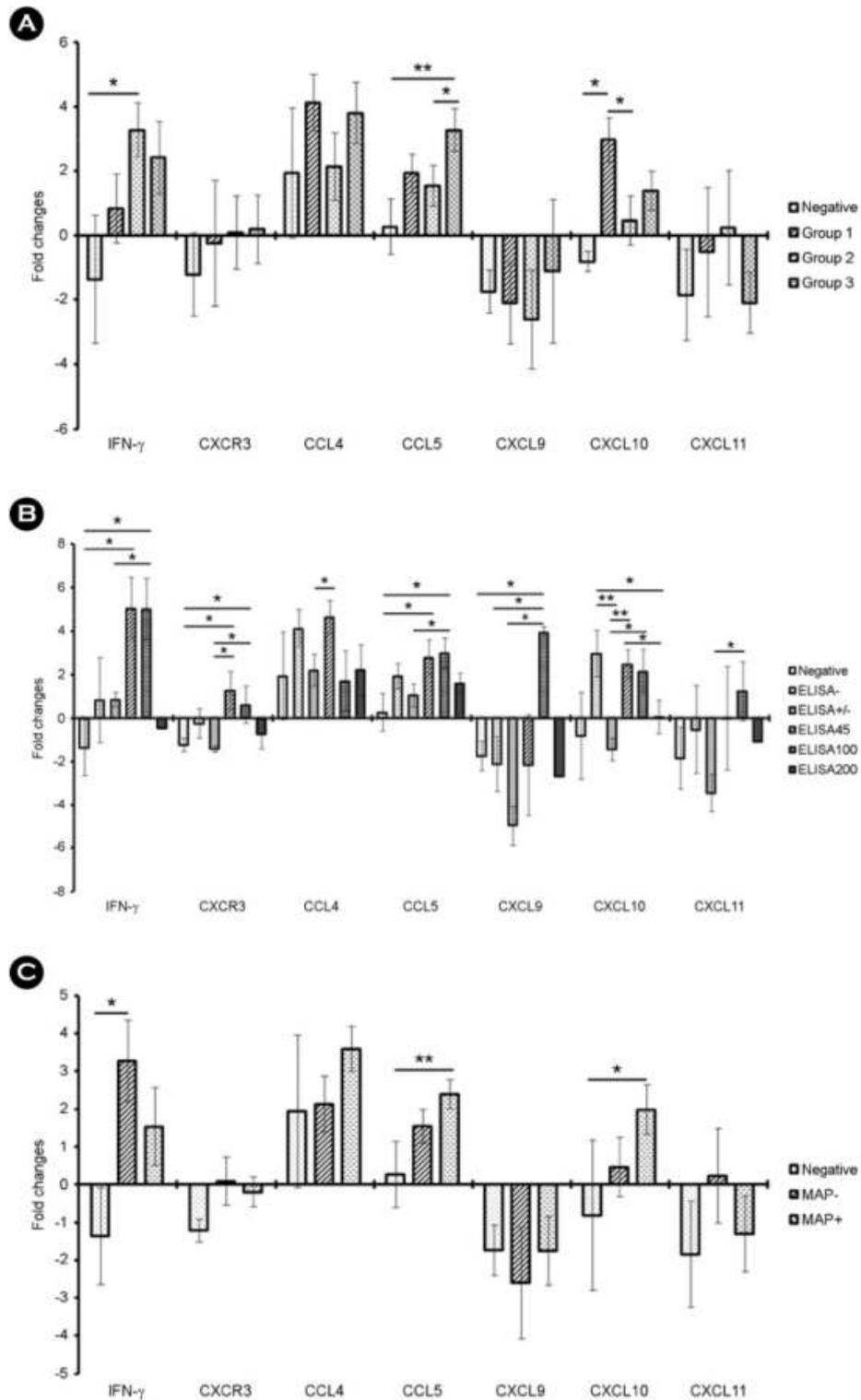


그림 132. MAP로 자극한 전혈에서의 Th1-type chemokine의 유전자 발현 변화 분석

표 49. Mycobacterium 관련 연구로부터 추출한 biomarker 후보물질 리스트

Gene	Target	Type of study	Samples used	Target animals	Description	Reference
IFN- γ	MAP	ELISA RT-PCR	non-stimulated whole blood	Cow		45, 46, 47
IL-5 GATA3 IL-4 TIMP1 TIMP2 MMP14	MAP	Gene expression	non-stimulated PBMC	subclinical MAP-infected cows	24-48 months of age MAP-ELISA IFN- γ response Intermittent and low-level bacterial shedding (\ll 100 CFU) in fecal culture	48
CD301. P-selectin	MAP	Gene expression	non-stimulated leukocytes	subclinical MAP-infected cows	immunological responses in subclinical MAP-infected cows	49
CXCL10. CSF3 and CC1.8 RSAD2. IFIT1. IFIT2. ISG12. ISG15. USP18. and HERC6	MAP	Gene expression	monocyte-derived macrophage	Red deer (<i>Cervus elaphus</i>)	red deer genotypically resistant or susceptible to MAP	50
IL-2 IL-9 IL-13 IL-17 TNF- α sCD40L VEGF-A	active TB, LTBI, and NTM	ELISA ELISpot	whole blood	Human (Children)	immunological responses in children at 3-8 years post-BCG vaccination	51
IL-17 osteonin	MAP	ELISA	non-stimulated PBMC plasma	Cow	Evaluating inflammatory status of JD-positive cows	47

표 50. RT-PCR에 사용된 primer 리스트

Gene	Sequence (5'-3')	
IFN- γ	Forward	CAAATTCGGTGGATGATCTGC
	Reverse	GGCAGGAGGACCATTACGTT
Cxcr3	Forward	ACATAGCCAAGTCGGTCACG
	Reverse	CTCGGAACCTGACACCCACA
CCL4	Forward	CCCAGCCAGCTGTGGTATTC
	Reverse	CTCGGAGCAGCTCAGTTCAA
CCL5	Forward	CTTCTGCCTCCCCATATGCC
	Reverse	ACTTCTTCTCTGGGTTGGCG
Cxc19	Forward	CTCTGACTGGAGTTCAAGGAGT
	Reverse	TCCCTTGGCTGGTGTGATG
Cxc110	Forward	CCACGTGTCGAGATTATTGCC
	Reverse	TGCCTCTTCCGTGTTCCGAG
Cxc111	Forward	AAGCATGAGTGTGAAGGGCA
	Reverse	AGGGAAACCTTGAACAATTGCAG

(3) 신규 병원성 유전자를 이용한 돌연변이 주 제작

- 기본적으로 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strain K-10 whole genome sequence를 바탕으로 신규 후보 병원성 유전자에 대한 돌연변이 주를 제작하며, 본 연구과제 1년차부터 최종년차까지 지속적으로 MAP 돌연변이주를 제작하여 주관 및 세부과제팀에 제공할 예정입니다. pYUB854 shuttle vector를 이용하여 대립 유전자 교환(allelic-exchange) 방법을 사용하여 제작할 예정입니다. 핵심유전자를 결손시킨 돌연변이주 제작뿐만 아니라 해당 핵심유전자를 pV16 mycobacterial expression vector (pvv16)에 클로닝하여 *M. smegmatis* mc2에 transformation하여 overexpression mutant를 생산하고 이와 동시에 재조합 단백질도 정제하여 단백질 고유의 기능과 특성을 연구할 수 있음. 본 연구진은 *M. avium*을 비롯한 non-tuberculous mycobacteria 핸들링 및 돌연변이 제작에 대한 노하우를 가지고 있으며, 다른 NTM에 비하여 MAP의 배양이 까다롭고 세대시간이 길어 현재 돌연변이주 제작을 위한 MAP 표준주를 분양해와 배양 및 핸들링 세팅중임.
- 기본적으로 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strain K-10 whole genome sequence를 바탕으로 신규 후보 병원성 유전자에 대한 돌연변이 주를 제작하며, 본 연구과제 최종년차까지 지속적으로 MAP 돌연변이주를 제작하여 주관 및 세부과제팀에 제공할 예정입니다. 본 연구에 이용될 pNitET-SacB-kan vector는 mycobacteria내 gene이 재조합될 수 있도록 recombinase를 제공하는 것으로, 본 vector를 이용하여 대립 유전자 교환(allelic-exchange) 방법으로 유의미한 gene list가 확정되면 돌연변이주 제작할 예정입니다.
- 본 vector를 MAP 적용 전 MAP 보다 배양 기간이 짧은 같은 *M. avium* 종의 다른 아종인 *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH) 104 를 이용하여 성공적인 transformation 조건을 확립함. pNiET-sacB-kan plasmid의 selective marker인 kanamycin resistance gene과 sacB gene을 이용하여 transformation 여부를 확인하였음. pNiET-sacB-kan vector가 transformation 되면 kanamycin 배지에서 자라고, Knock-out construct를 transformation 한 후 recombinase를 가진 pNiET-sacB-kan vector 는 sucrose 첨가된 배지에서 소실되게 됨.

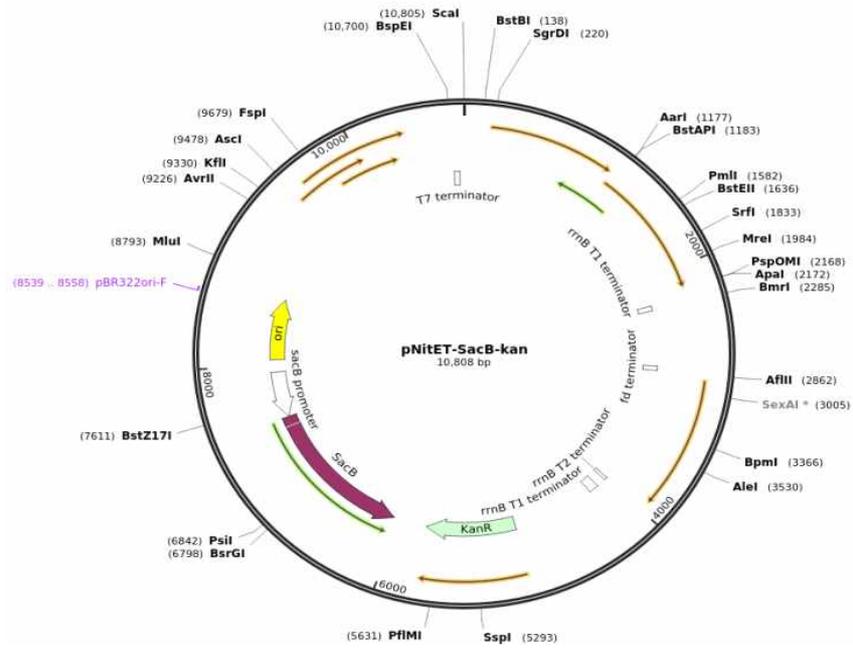
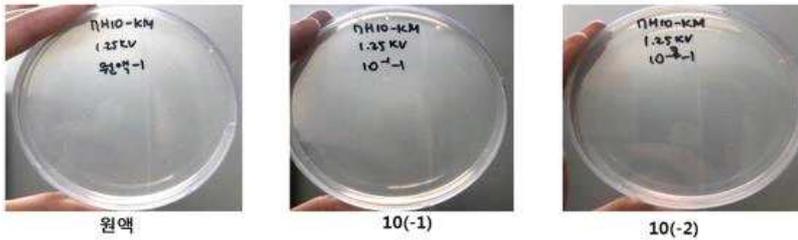


그림 133. MAP 돌연변이주 제작에 이용될 pNitET-SacB-kan vector map

- transformation 조건을 확립하기 위한 방법은 다음과 같음. MAH 104 균주를 7H10-ADS-glycine (Agar) 배지에 풀어 7일간 배양하고 액체배지에서의 안정화를 위해 7H9-ADS-Glycine (Broth) 배지에 옮겨줌. 이후 OD(600nm)=0.4-0.6 도달하면 Glycine 1.5% 포함시켜 24시간 더 배양하고 균을 수거하기 위해 centrifuge (8000rpm, 10min, 28도)한 후 미리 prewarmed 10% Glycine배지로 3번 세척하고 5ml 배지에 부유시켜 vector 와 섞은 후 electroporation 진행함. 즉시 10ml의 7H9-ADS-glycine (Broth) 배지에 옮겨 24h 배양한 후, 균을 수거하여 7H10-ADS-Glycine (Agar) control / 7H10-ADS-Glycine-KM (Agar) selective 배지에 희석배수에 따라 접종함.
- electroporation voltage (kv) (1.25, 2.5, 3.0 kv) 및 vector 농도 (5, 10 ug/ul)에 따른 transformation 효율을 확인함 (그림 134, 135, 136, 137). Electroporation voltage (kv)는 그림 에서 보듯이 2.5kv에서 콜로니를 확인 할수 있었음. 또한 vector 농도는 농도에 비례하지 않고 5ug/ul에서 콜로니가 형성 된 것을 확인하였음 (그림 137). 또한 recombinase 발현의 확인 및 이중 transformation 확인을 위해 5% sucrose 첨가 7H10 배지에서 배양하여 배양 5-7일까지 균이 자라지 않음을 확인하였음 (그림 138).
- 그 밖에도 배지의 Glycine 첨가와 고농도의 vector 사용은 transformation을 효율을 증가시켰으며, 액체배지에 안정화시키는 것 또한 transformation 효율에 중요함을 본 실험으로 확인함.

<pNiET-sacB-kan> 7H10-kan (selective) 조건 1.25kv

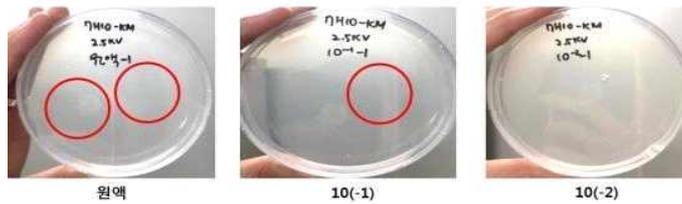


<pNiET-sacB-kan> 7H10 (Control), 조건 1.25kv



그림 134. Electroporation voltage (kv) (1.25 kv)에 따른 pNiET-sacB-kan vector의 transformation 조건 확립

<pNiET-sacB-kan> 7H10-kan (selective) 조건 2.5kv



<pNiET-sacB-kan> 7H10 (Control), 조건 2.5kv

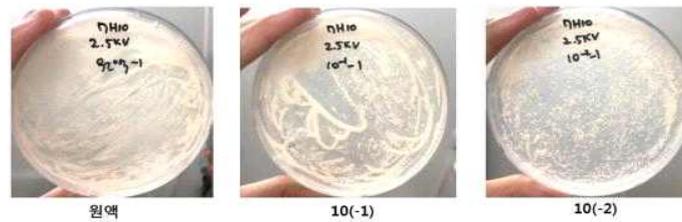
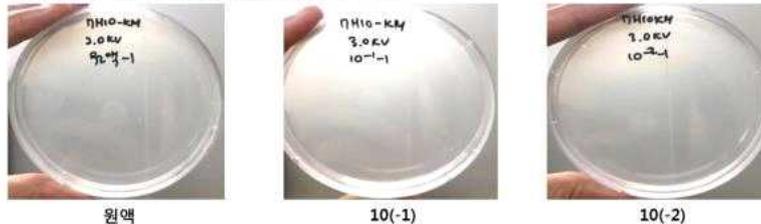


그림 135. Electroporation voltage (kv) (2.5 kv)에 따른 pNiET-sacB-kan vector의 transformation 조건 확립

<pNiET-sacB-kan> 7H10-kan (selective) 조건 3.0kv



<pNiET-sacB-kan> 7H10 (Control), 조건 3.0kv

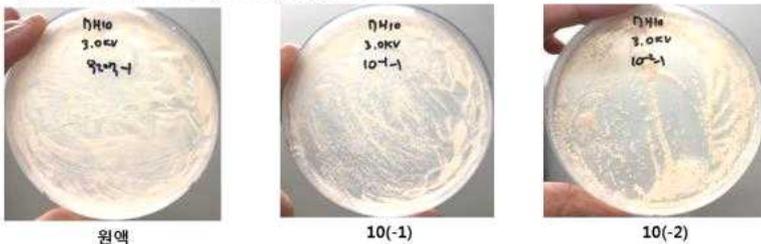


그림 136. Electroporation voltage (kv) (3.0 kv)에 따른 pNiET-sacB-kan vector의 transformation 조건 확립

<pNiET-sacB-kan> 7H10-kan (selective) 조건 2.5kv, plasmid : 5/ 10ug/ul



그림 137. pNiET-sacB-kan vector 농도 (5, 10 ug/ul) 에 따른 transformation 조건 확립

- 7H10-KM-sucrose agar 배지에서 확인

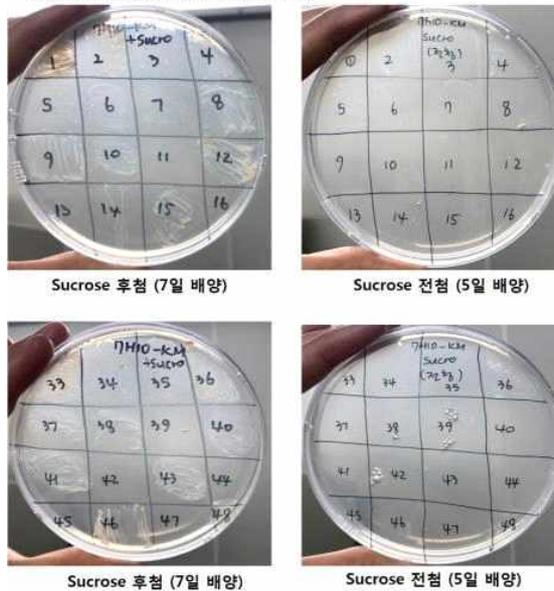


그림 138. pNiET-sacB-kan vector transformation 후 7H10-KM-sucrose 배지에서 확인

- 2차년도에 이어서 allelic exchange 기법을 이용한 돌연변이주 제작 방법에 추가적으로 CRISPR-Cas9기반 돌연변이 제작기법을 추가로 구축하였다.
- 기본적으로 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strain K-10 whole genome sequence를 바탕으로 신규 후보 병원성 유전자에 대한 돌연변이 주를 제작하며, 본 연구과제 최종년까지 지속적으로 MAP 돌연변이주를 제작하여 주관 및 세부과제팀에 제공할 예정이다. 본 연구에 이용될 pLJR962 및 pLJR965 plasmid는 mycobacteria 내의 특정 유전자 염기서열에 특이적으로 결합하여 유전자 발현을 억제할 수 있도록 고안된 것으로 본 vector를 이용하여 크리스퍼-카스9 억제 (CRISPRi) 기법으로 돌연변이주를 제작하고자 한다.

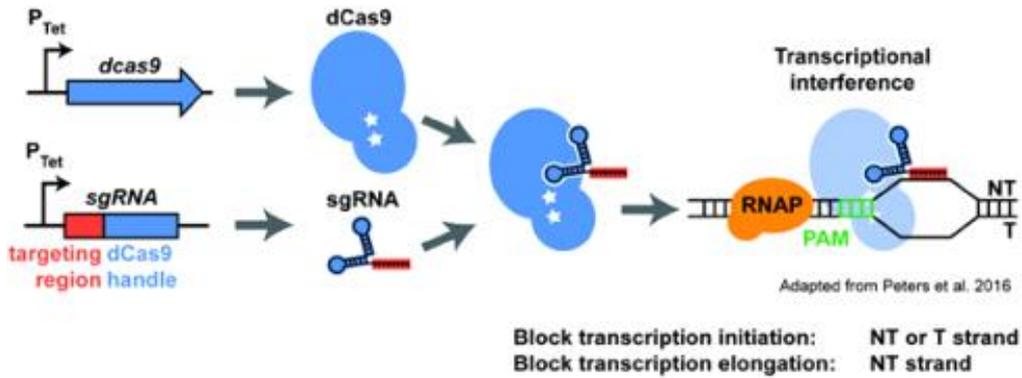


그림 139. CRISPR-dCas9를 기반으로 하는 유전자 발현 억제 기법의 작용기전

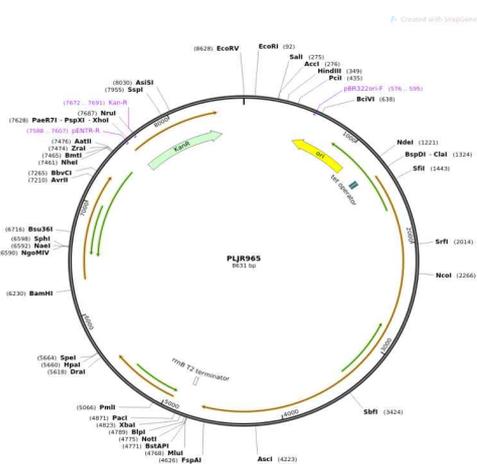


그림 140. MAP 돌연변이주 제작에 이용될 pLJR965 vector map

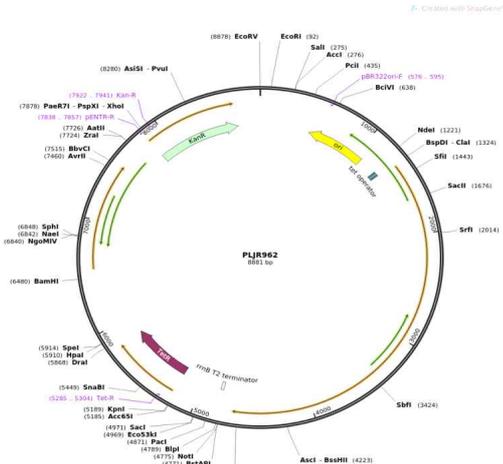


그림 141. MAP 돌연변이주 제작에 이용될 pLJR962 vector map

- 기존 논문에서 발굴된 유전자 중 mycobacteria의 병인기전과 관련된 기능이 규명되었거나 그렇지 않더라도 병인기전에 중요한 역할을 할 것으로 예상되는 유전자들을 검색하여 돌연변이 제작의 대상 유전자로 선정하였다.

표 51. MAP 돌연변이주 제작을 위한 대상 유전자 정보

Locus tag	Gene name	Function	특이사항
MAP2541c	Mdh	TCA cycle에 관여	Stress 조건에서 발현되며 수지상세포 활성화
MAP1981c	hypothetical protein	Nucleic acid binding protein	Th1 반응 유도, 수지상세포 활성화
MAP3893c	PknG	Protein kinase	준임상형 감염 개체에서 IFN- γ 생성 유도
MAP3961	Icl	TCA cycle에 관여	Mtb에서 세포 내 생존에 중요
MAP2693	Fum	TCA cycle에 관여	성장에 필수적, 마우스 실험에서 병원성과 관련
MAP1197	enoyl-CoA hydratase	mycobacteria의 대사 중 지방산의 beta oxidation에 관여	실험 감염된 송아지 개체의 혈청과 강하게 반응함
MAP2121c	hypothetical protein	major membrane protein	감염 개체 혈청과 강하게 반응
MAP3651c	acyl-CoA dehydrogenase family protein	mycobacteria의 대사 중 지방산의 beta oxidation에 관여	MAP specific, Stress 환경에서 발현, 자연 및 실험 감염 개체에서 CMI 유도
MAP1365	ornithine carbamoyl transferase	amino acid arginine 합성에 관여	MAP specific, 준임상형 감염 개체(양)에서 IFN- γ 생성 유도
MAP0076	mmpL4	membrane에서 물질의 transport에 관여	Mtb의 mouse 감염 모델에서 병원성 인자로 작용
MAP0232c	embC	LAM biosynthesis 에 관여	Mtb의 숙주 내 생존에 필수적

- 선정된 유전자들을 대상으로 발현억제 돌연변이주 제작을 위한 프라이머를 디자인하여 제작하였다. Construct 제작 및 본 실험을 위한 조건확립 과정은 다음과 같다. 먼저 pLJR962, pLJR965 plasmid를 정제하여 준비하고, 각 plasmid 2 μ g를 NEB buffer 3.1 및 BsmBI 제한효소와 함께 혼합한 뒤 55 $^{\circ}$ C에서 5시간 동안 반응시킨다. 이후 전기영동 한 뒤 플라스미드 부분만 잘라 정제하였다. 각 프라이머를 annealing buffer와 함께 혼합한 뒤 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 가열하였고 그 후 상온에서 서서히 냉각시켜 annealing이 되도록 하였다. Annealing 된 프라이머와 제한효소 처리된 플라스미드를 ligation 하였고 ligation된 반응물 2 μ l를 *E. coli* DH10B/R competent cell에 transformation 하였다. 이후 kanamycin-LB plate에 도말 한 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 배양하여 콜로니를 확인하였다.

표 52. 돌연변이주 제작을 위한 프라이머 목록

Primer name	Primer sequence (5' to 3')
MAP2541c 145F	GGGAGCCGATCTCGACGCCGGACAGCAG
MAP2541c 145R	AAACCTGCTGTCCGGCGTCGAGATCGGC
MAP2541c CtrlF	GGGAGGTTGTGGTCCAGGCGGGTCAGC
MAP2541c CtrlR	AAACGCTGACCCGCCTGGACCACAACC
MAP1981c 216F	GGGAGACCGGACCCCTTGACCCGCA
MAP1981c 216R	AAACTGCGGGTCAAGGGGTCCGGTC
MAP1981c CtrlF	GGGAGCACCACGTCGTCCTCGGCGGCC
MAP1981c CtrlR	AAACGGCCGCCGAGGACGACGTGGTGC
MAP3893c 216F	GGGAGCCCCACCGGTTTGCCGCAGTTCCA
MAP3893c 216R	AAACTGGAAGTGCGGCAAACCGGTGGGGC
MAP3893c CtrlF	GGGAGGTTCCGGCTGCTCGCTCTT
MAP3893c CtrlR	AAACAAGAGCGAGCAGCCGGAACC
MAP3961 216F	GGGACTCGAGGCCGTTACGGACCCG
MAP3961 216R	AAACCGGGTCCGTAACGGCCTCGAG
MAP3961 CtrlF	GGGATGTTGCCGGTCAGGGCGCCC
MAP3961 CtrlR	AAACGGGCGCCCTGACCGGCAACA
MAP2693 145F	GGGAGTTCAGGCCCGGCCCCGAGAT
MAP2693 145R	AAACATCTCGGGCCGGGGCCTGGAAC
MAP2693 CtrlF	GGGAGACCACGGTGTGCCACTCGC
MAP2693 CtrlR	AAACGCGAGTGGCACACCGTGGTC
MAP1197 216F	GGGAGCGGACTTGTGGTCCGGCGCCCGA
MAP1197 216R	AAACTCGGGCGCCGACCACAAGTCCGC
MAP1197 CtrlF	GGGAGATCCGCGCGCGATGGCGTAG
MAP1197 CtrlR	AAACCTACGCCATCGCCGCGCGGATC

(4) 신규 병원성 유전자를 이용한 돌연변이 제작 및 특성 분석

- 기존에 선행논문들에서 병원성과 관련된 유전자 13개를 선정하여 분류하였고, 선정된 유전자들을 대상으로 발현억제 돌연변이주 제작을 위한 프라이머를 디자인하여 제작하였음 (표 53). 이후 디자인된 프라이머 및 plasmid를 이용하여 construct를 제작하였고 이것을 1차적으로 *E. coli* DH5acompetent cell에 cloning 하였음.
- Construct가 포함된 *E. coli* DH5a를 배양 후 plasmid를 정제하고 이를 *M. avium paratuberculosis* K10 competent cell에 electroporation 한 다음 37°C에서 4-6주 동안 배양하였음. 4-6주 배양 후 나타난 집락들을 kanamycin이 포함된 7H9 broth에 접종하고 이를 다시 4-6주 동안 배양하였음. 이후 시간이 지난 뒤 성장이 확인된 균주들을 대상으로 PCR을 수행하여 plasmid의 존재를 확인하였음.

표 53. CRISPRi mutant 제작을 위한 MAP의 병원성 관련 유전자 선정 결과

Locus tag	Gene	Function	특이 사항	그룹
MAP2541c	Malate dehydrogenase (mdh)	Catalyzes the interconversion between malate and oxaloacetate	Stress 조건에서 발현되며 DC 활성화	A (결핵균에서 밝혀진 병원성 인자이며 MAP 감염에서 면역원성 보임)
MAP1197	Enoyl-CoA hydratase (ech)	Cholesterol catabolism	감염된 송아지의 혈청과 강하게 반응	
MAP3651c	Acyl-CoA dehydrogenase (fadE3)	Cholesterol catabolism	Stress 조건에서 발현 세포성 면역 유도	
MAP1981c	Hypothetical protein	DNA-binding protein	Th1 면역 유도 DC 활성화	
MAP2121c	Hypothetical protein	Major membrane protein	요네병 감염 개체 혈청과 강하게 반응	
MAP1365	Ornithine carbamoyl transferase (argF)	Production of citrulline from carbamoyl phosphate	준임상형 감염개체에서 IFN- γ 생성 유도	
MAP3893c	Protein kinase G (pknG)	Inhibition of phagosome-lysosome fusion	준임상형 감염개체에서 IFN- γ 생성 유도	
MAP3961	Isocitrate lyase (icl)	Catalyze the conversion between isocitrate and glyoxylate	Mtb의 세포 내 생존에 중요	B (결핵균에서 밝혀진 병원성 인자, stress에 반응) B
MAP2693	Fumarase (fum)	Catalyze the conversion between fumarate and malate	마우스 실험에서 병원성에 관련	
MAP3641c	Membrane major protein large 3 (mmpL3)	Cell wall biogenesis	균의 성장에 필수 유전자 Oxidative stress/hypoxia에 반응	
MAP0076	Membrane major protein large 4 (mmpL4)	Efflux pump	Mtb 마우스 모델에서 병원성 인자로 작용	
MAP0232c	embC	Cell wall biogenesis	Mtb 숙주 내 생존에 필수적	
MAP4265	groEL1	Mycolate synthesis Biofilm formation	Oxidative stress에 반응	

- 그룹 A (mdh, ech, fadE3, MAP1981c, MAP2121c, MAP1365, pknG)는 결핵균에서 기능이 밝혀진 병원성 인자이면서 MAP 감염에서 면역원성을 보인 유전자들로 선정하였음.
- 그룹 B (icl, fum, mmpL3, mmpL4, embC, groEL1)는 결핵균에서 기능이 밝혀진 병원성인자이고 주로 stress에 반응하는 유전자들로 MAP의 병원 기전에서는 역할이 아직 명확히 밝혀지지 않은 유전자들로 선정하였음.

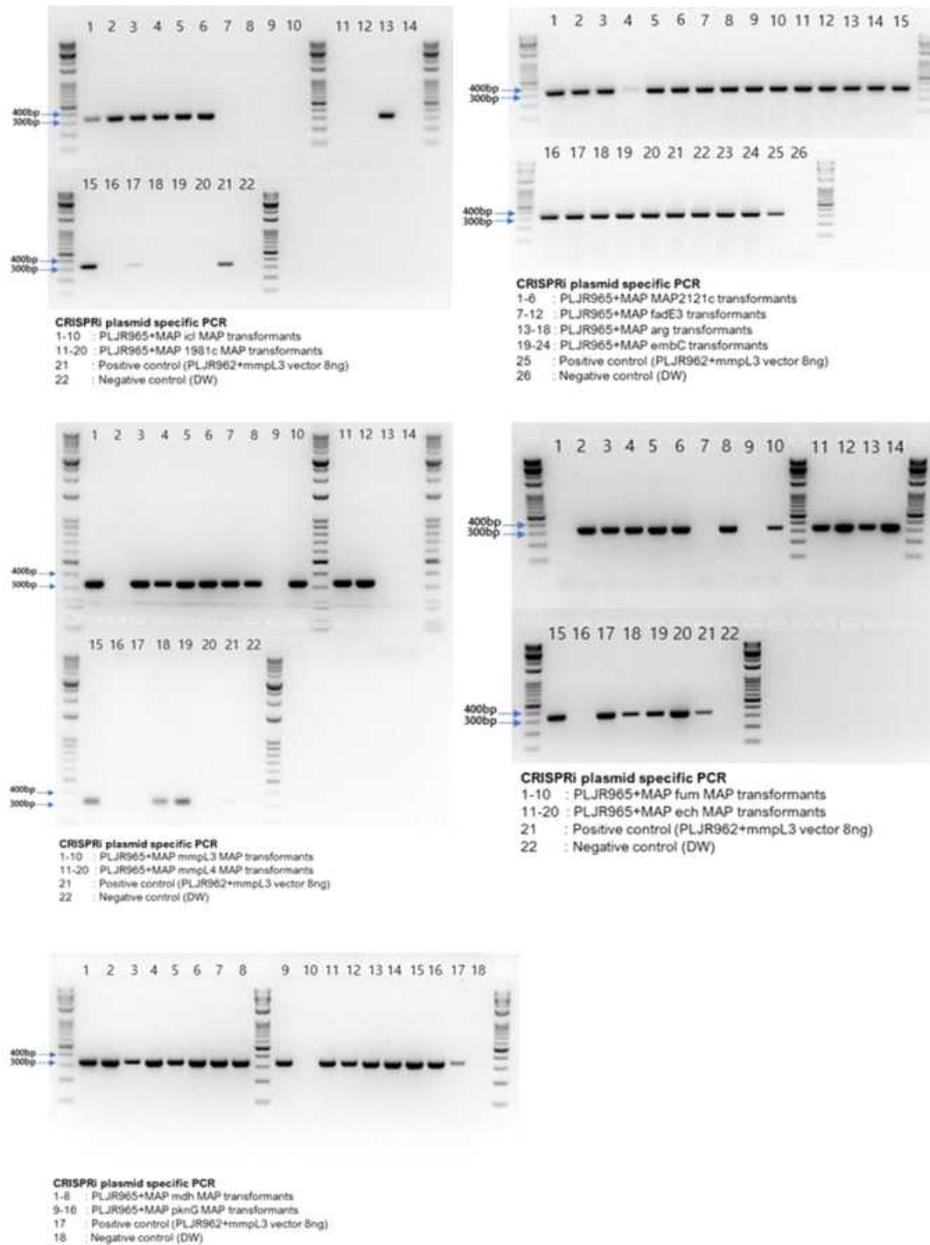


그림 142. 제작된 MAP mutant에서 CRISPRi plasmid의 확인 결과

- 제작된 13종의 MAP mutant를 OD600=0.5 정도까지 배양한 후 CRISPRi의 유도물질인 anhydrotetracycline (ATC)이 첨가된 7H10 agar와 첨가되지 않은 7H10 agar에 각각 일정 희석배수로 희석하여 접종 후 배양함. 이후 4주 동안 배양한 뒤 해당 유전자의 발현 억제가 성장에 미치는 영향을 분석하였음. 또한 돌연변이주의 유전자 발현 억제 정도를 ATC를 첨가하여 유도한 후 real-time PCR을 통해 확인하였음

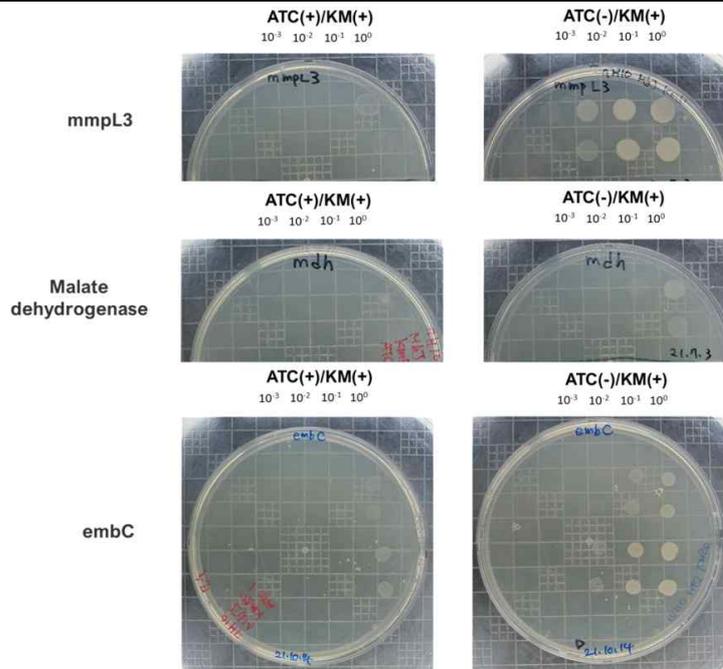


그림 143. MAP CRISPRi 돌연변이 주들의 유전자 발현 억제에 따른 성장의 변화 확인(감소)

- 제작된 돌연변이주를 대상으로 하여 CRISPRi의 유도물질인 anhydrotetracycline이 첨가된 7H10 agar와 첨가되지 않은 7H10 agar에 각각 배양한 결과 mmpL3, embC, 및 mdh 억제 돌연변이주는 CRISPRi를 활성화시켰을 때 증식이 억제되었음. 따라서 mmpL3, embC, 및 mdh는 MAP의 성장에 필수적인 유전자로 생각됨.

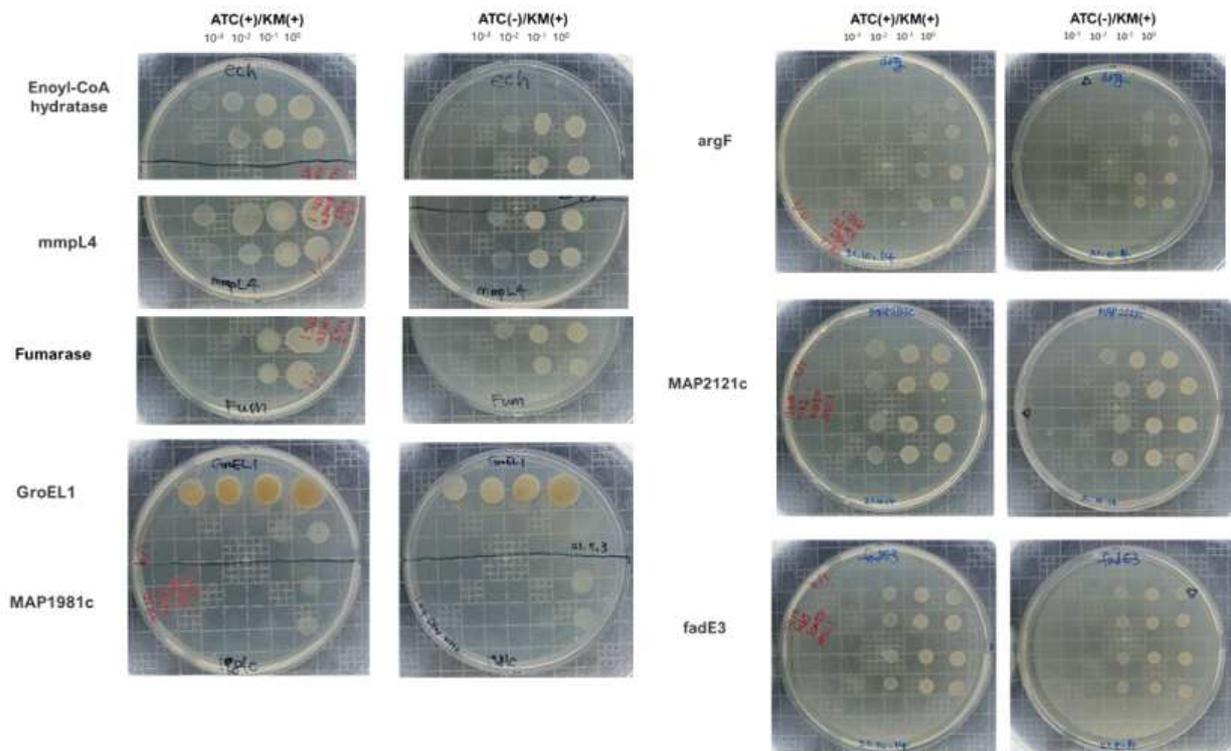


그림 144. MAP CRISPRi 돌연변이 주들의 유전자 발현 억제에 따른 성장의 변화 확인 (차이 없음)

- argF, MAP2121c, fadE3, Enoyl-CoA hydratase, fumarase, GroEL1, MAP1981c, mmpL4는 거의 차이가 없었음. 위의 유전자들은 기존 논문에서 병원성에 관련이 있을 것이라고 예상되었지만 균의 성장에 직접적인 영향을 주지는 않는 것으로 생각됨. 숙주 내에서의 발생할 수 있는 stress 반응에 관여할 것이라고 예상하고 있어 이후 stress 관련 실험에서 분석할 예정임.
- 또한 isocitrate lyase와 pknG는 CRISPRi를 활성화시켰을 때 성장이 다소 증가한 것으로 보임. 차후 CFU 측정 등을 통해 정량적으로 분석하여 정확한 변화의 정도를 확인할 수 있을 것으로 생각됨.

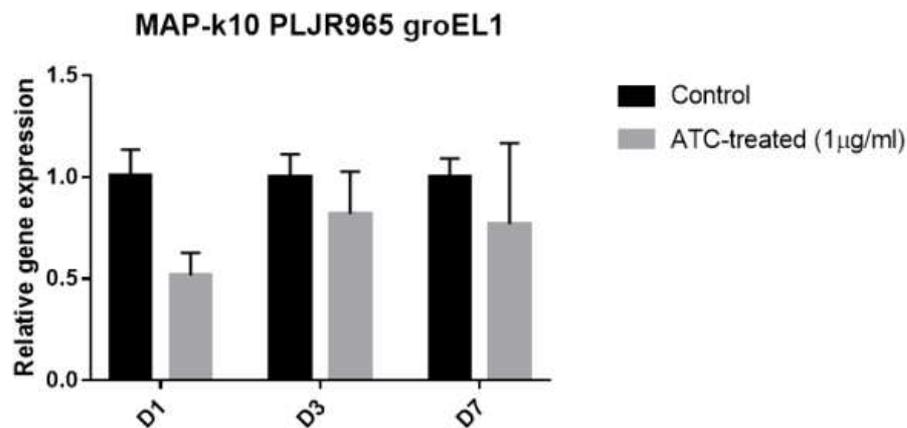


그림 145. MAP CRISPRi mutant의 유전자 발현 억제 정도 분석 결과

- GroEL1 돌연변이주를 대상으로 ATC를 첨가하여 유전자 발현 억제를 유도하고 이를 1, 3, 7일 후 수거하여 RNA를 정제하였고 이후 real-time PCR을 통해 발현 억제 정도를 확인하였음. ATC 첨가 후 1일 후에 가장 발현 억제 정도가 강했고, 이후 3일과 7일 후에는 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았음. 1일 차에 약 50% 정도의 발현 억제를 보였는데 차후 ATC 처리 농도나 기간 등의 조정을 통해 최적화가 필요할 것으로 생각됨.
- 13개의 유전자에 대해 제작된 돌연변이 주 중 발현 억제 시 성장이 감소된 것은 3개 (mmpL3, embC, mdh) 였으며, 성장이 증가한 것은 2개 (icl, pknG) 였고 나머지 유전자들은 성장의 차이가 없었음 (표 54). 성장이 증가/감소/차이가 없었던 돌연변이 주 중 선행 연구에서 숙주내부에서의 생존에 관련되어 있거나 강한 면역반응을 유도하는 것으로 확인된 5종의 유전자(protein kinase G, malate dehydrogenase, MAP1981c, isocitrate lyase, groEL1)들을 우선적으로 선정하였음. Malate dehydrogenase는 TCA cycle에서 malate를 oxaloacetate로 변환시키는 기능을 가진 단백질로 nutrient starvation이나 hypoxia 와 같은 stress 환경에서 발현되는 것으로 알려져 있음. 또한 MAP에 감염되었을 때, 숙주 내에서 수지상세포를 활성화시켜 Th1 면역반응을 유도하는 것으로 밝혀져 있음. 이와 비슷한 역할을 하는 것으로 알려진 MAP1981c는 nucleic acid-binding protein의 일종으로 크론병 환자의 혈청과 강하게 반응하는 것으로 알려져 있음. 선행연구에 따르면 MAP1981c는 숙주 내에서 수지상세포의 성숙을 유도하면서 Th1 면역반응을 강화하여 pro-inflammatory cytokine의 분비를 촉진하는 것으로 확인되

있음. Protein kinase G는 탐식 후 macrophage 내에서 phagosome-lysosome fusion을 억제하여 세포 내 생존에 기여하는 것으로 확인됨. Isocitrate lyase는 glyoxylate cycle에서 isocitrate를 succinate와 glyoxylate로 분해하는 효소로 주로 stress 환경에서 활성화되기 때문에 숙주 내에서의 생존에 중요한 인자인 것으로 예상됨. 또한 groEL1역시 stress 환경에서 활성화되는 단백질의 하나로 숙주 내에서 육아종 형성 및 cytokine 생성을 유도하는 것으로 확인되었음. 따라서 숙주내에서의 병원성과 관련된 5종의 유전자에 대한 돌연변이주를 우선적으로 선택하여 숙주 내에서의 stress 환경과 유사한 조건인 oxidative stress 및 acidic stress 조건에서의 돌연변이 주의 생존 정도를 분석하여 해당 유전자들의 기능을 분석하고자 함.

표 54. MAP CRISPRi mutant의 유전자 발현 억제에 따른 성장의 차이

발현 억제 시 성장 감소	발현 억제 시 성장 증가	차이 없음
mmpL3	icl	argF
embC	pknG	MAP2121c
mdh		fadE3
		groEL1
		MAP1981c
		fum
		ech
		mmpL4

6. 국내 요네병 발생상황 및 외국 방역사례를 통한 국내 방역에 대한 제언

가. 서론

요네병 (Johne's Disease)은 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) 에 의한 반추류의 만성, 소모성 질병으로 감염 되면 긴 잠복기 후 만성의 설사로 쇠약, 급격한 체중감소 및 산유량 감소 등의 임상증상 발현 후 폐사하는 질병이다 (1). 우리나라 뿐만 아니라 미국, 유럽 등 여러 나라에서 발병하고 있으며 생후 4개월 이내의 어린 송아지 시절에 주로 감염되어 긴 잠복기 (2~3년)를 거쳐 초기에 특별한 임상증상의 발현 없이 분변을 통해 다량의 균을 배출하여 주변 환경을 오염시켜 주요 오염원으로 작용한다 (2). 분변으로 배출된 요네병균은 목장 내의 물, 사료, 우유 및 주위 환경을 오염시켜 목장 내에 지속적으로 감염이 발생되며 한번 질병이 발생한 목장에서 질병을 근절하기는 매우 어렵다. 특히 요네병균은 외부환경에서 높은 저항성을 가지고 있어서 오랫동안 생존할 수 있는 특성을 가지고 있어 한번 환경이 오염되면 근절이 매우 어렵다. 질병의 전파는 주로 분변에 오염된 음수, 사료 등의 섭취에 의한 경구 감염이나, 그 외에도 임신우를 통한 태반감염, 감염된 숫소와의 교미 또는 감염된 정액에 의한 감염 등 다양한 방법으로 이루어진다 (1). 요네균의 감염은 크게 4단계로 나누어 볼 수 있는데, 1단계는 “잠복감염” 상태로 이 시기의 동물은 임상 증상을 전혀 보이지 않으며, 분변을 통해 균을 배출하지도 않는다. 2단계는 “준임상형”상태로 1단계와 마찬가지로 임상 증상을 전혀 보이지 않지만 분변을 통해 균을 환경으로 배출하여 질병의 전파에 중요한 매개체로 작용한다. 특히 이 단계에서 대부분의 개체들은 혈청학적으로도 양성을 나타내지 않는다. 3단계와 4단계는 “임상형”, “진행된 임상형” 상태로 분변을 통한 다량의 균배출과 함께 만성적인 설사, 쇠약을 비롯한 전형적인 임상증상을 보이면서 죽음에 이르게 된다 (3). 이러한 임상증상의 발현으로 요네병은 젖소와 육우에 있어서 산유량 감소, 성장률 저하 및 감염동물의 도태 등에 의한 많은 경제적인 손실을 유발하고 있다.

미국의 National Animal Health Monitoring System 의 조사에 의하면 감염된 목장에서의 손실액은 감염된 개체 1두 당 연간 40\$로 추정되며 이에 따른 전체적인 피해액은 연간 200\$에서 250\$로 추정된다 (4). 국내에서의 경제적 피해에 대해서는 아직까지 조사된 적은 없으나 외국의 사례와 비교할 때 막대한 경제적인 피해를 줄 것으로 생각된다. 주요 축산 선진국들에서는 요네병의 근절을 위한 정책적 대책과 질병 피해의 최소화 방안에 관한 연구가 오래 전부터 진행되어 왔다. 그러나 요네병 근절의 가장 문제로 제기된 준임상형 개체에 대한 검색이 현재의 진단법으로는 불가능하기 때문에 스웨덴을 제외한 세계 대부분의 나라에서 근절에 성공하지 못하고 있다. 그러나 지속적인 근절 프로그램 적용으로 감염을 감소 등 매우 긍정적인 효과를 거둔 나라들도 상당수 있다 (5). 본고에서는 국내 상황의 파악 및 일본, 미국, 호주, 네덜란드, 스웨덴의 요네병 근절 프로그램을 분석하여 한국형 요네병 근절을 위한 방역 프로그램을 제안하고자 한다.

나. 국내 요네병 발생 상황

국내에서 요네병의 발생은 1967년에 첫 발생이 보고된 이후 지속적인 감염율의 증가를 보여 왔다. 1968년 최초 혈청학적 검사에서 0.96%의 양성율을 나타내었고 (6), 그 이후 검사 결과 1994년에 6.7% (7), 2003년에 7.1%로 증가 추세를 나타내었다 (8). 또한 경남 지역의 목장을 대상으로 혈청학적 검사를 실시한 결과 전 개체의 3.3%, 목장의 13.8%가 요네병에 대한 혈청학적 양성율을 나타내었다 (9). 최근까지도 국내에서 KAHIS에 보고된 양성개체와 발생건수가 지속적으로 증가되어 온 것을 볼 수 있다 (그림 152). 현재 국내에서 요네병에 대한 대책은 혈청학적 양성개체의 검색 및 도태유도 정도이며 분변을 통해 균을 배출하는 주요 오염원으로 작용하는 준 임상형에 대한 조사 및 방역대책은 전무하다. 국내의 축산 상황은 다른 나라들과 다른 점이 많아 우리나라의 현실에 적합한 한국형 요네병 방역 정책의 개발 및 적용이 시급한 실정이다.

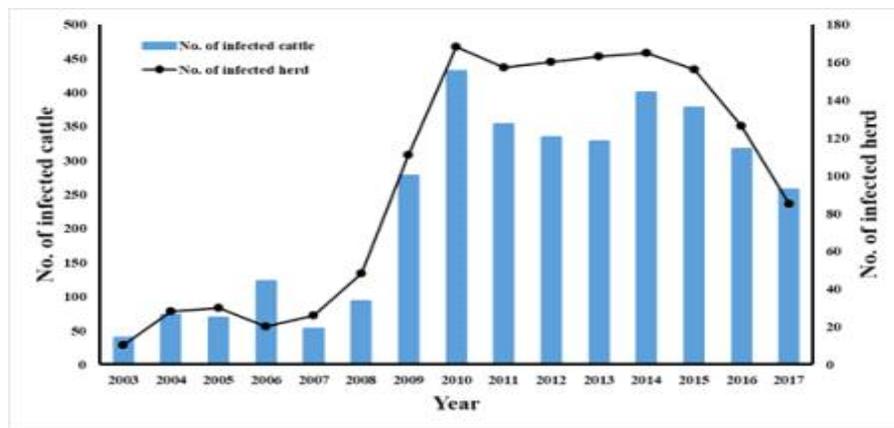


그림 146. 가축전염병발생통계(KAHIS)에 등록된 국내 소 요네병 발생건수 및 감염두수 (2003-2017).

다. 외국의 현황

(1) 일본

1959년에 미국에서 수입된 젖소에서 요네병의 발병이 처음 확진 되었으며 (10) 이후 1980년대 이전까지는 수입된 소와 송아지에 발병이 국한되었으나, 1980년대 이후에는 홋카이도, 도호쿠, 간토 지역의 일본 육우로의 확산 이후 일본 전역으로 확산되었다 (11). 본격적인 확산이 시작된 1980년대부터 지속적인 증가를 확인할 수 있으며, 1997년 이후부터 2000년대 중반까지 급격하게 증가하여 2006년에는 1179두가 감염되었다 (그림 143). 이에 일본에서는 요네병을 근절하기 위해 1998년 이후부터 5년을 주기로 모든 목장을 대상으로 요네병 검사를 시행하고 있으며 검사에서 양성으로 판정된 개체는 의무적으로 도태시켰다. 이러한 근절 정책을 시행한 결과 2007년 이후로는 감소하는 추세를 보여 2013년에는 573두가 감염된 것으로 확인되었다 (12).

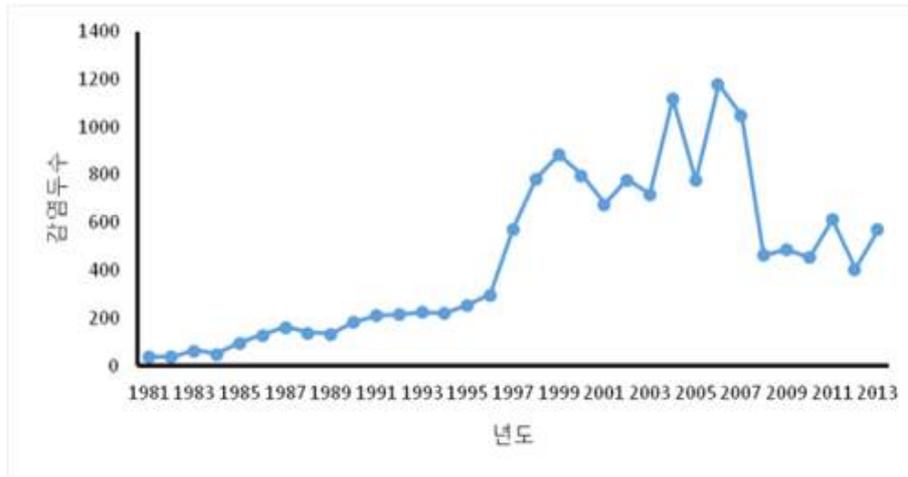


그림 147. 일본 내의 소 요네병 감염 두수: 1981-2013

일본은 요네병의 예방 및 통제를 위해 정기적인 검사를 통해 목장의 등급을 분류하여 관리하고 있다. 즉, 정기적인 검사 결과에 따라 청정 목장인 Category I 과 발생은 하였지만 통제되고 있는 Category II 로 분류하여 관리하고 있다 (13). Category I 목장은 정기적인 혈청 ELISA 검사와 세균 배양 검사 결과 양성인 개체가 없는 목장이며, Category II 는 정기적인 검사에서 요네병 양성 개체가 발견된 곳으로 혈청학적 검사 (ELISA) 및 분변검사 (세균배양 및 PCR) 를 통해 검사를 3개월 마다 수행한다. 만약 모든 검사에서 음성이 나오게 된다면 다시 Category I 으로 분류 된다. 그러나 한번이라도 감염이 확인된 목장은 각 지역에서 운영하는 가축위생시험소 (LHSCs) 에 의해 지속적으로 위생 상태를 검사 받게 된다 (13).

가축위생시험소는 각 지역마다 있으며, 충분한 숫자의 수의사들이 있어 목장주들을 대상으로 철저한 목장 위생 관리에 대한 교육을 실시한다. 이러한 위생관리교육은 축사와 목장 환경의 청결을 위한 목장 입구 및 장화 소독, 분변에 의한 시설이나 환경의 오염 방지, 진료 수의사와의 협조를 통한 목장 내 가축들에 대한 지속적인 관찰 및 기록, 분만실의 청결 유지, 도태 시 요네병 음성 목장에서 대체우 도입, 새로 태어난 송아지와 어미의 신속한 격리 등과 같은 내용을 포함하여 요네병을 근절하고자 한다 (13).

목장 내의 전파 외에도 감염된 개체의 이동에 따른 목장 간의 전파를 예방하려는 노력도 함께 이루어지고 있다. 즉, 요네병 근절을 위해 목장주가 외부농장에서 소를 구입시 지침을 설정하여 감염된 개체의 이동을 방지하고 있다. 즉, 소 구입은 가능하면 category I 목장에서 하고, 도입 시 ELISA 를 통해 혈청학적 음성을 확인한다. 만약 부득이하게 category II 목장에서 가축 구입시는 3달 간격의 ELISA 및 분변 배양을 시행하여 음성인 개체를 확인 후 구입한다. 또한 9개월 령 이하의 개체를 도입시는 2회 이상의 균배양 검사 후 도입을 권고하고 있다. 목장 내의 전파의 방지를 위해 도입된 개체는 두 번의 ELISA 검사결과에서 음성 판정이 내려질 때까지 격리시킨다. 판매 시에도 Category I 목장은 판매되는 개체가 ELISA 검사를 통해 음성이, Category II 의 목장에서는 3달 간격으로 2번 이상의 ELISA 검사에서 음성 및 배양 검사 결과에서 음성이 확인되어야 한다 (13).

요네병이 발생했을 때 시험소에서는 감염된 개체의 격리, 양성개체의 도태, 역학조사 및 목장의 소독과 같은 핵심적인 역할을 수행한다. 요네병의 진단은 다양한 검사법을 통해 이루어진다. 즉, 최소 2주 이상의 간격을 두고 ELISA를 통한 혈청학적 검사 및 분변에서 요네균의 분리도 함께 이루어진다. 임상증상을 보이는 경우 항산성 염색을 통해 분변 내의 균의 존재를 확인하여 진단한다. 6개월령 이하에서 감염이 의심되는 개체들은 피내 요닌 테스트를 통해 확인한다. 검사결과에서 감염이 확인된 양성개체들은 가축가격의 80%를 보상하고 모두 도태시킨다. 또한 질병의 발생 후 2차적인 전파를 방지하기 위해 처음 질병이 발생한 목장에서는 같은 축사에서 남아있는 동물을 대상으로 2년 동안 정기적인 검진을 시행하여 추가적인 감염 여부를 확인하고 있다. 그러나 기존의 진단법으로는 모든 감염된 동물을 진단할 수 없는 측면이 있기 때문에 자발적인 도태를 권고하고 있으며, 특히 분변을 통해 많은 양의 균을 배출하는 'High shedder'의 경우 우선적으로 도태를 권고하여 목장 내의 추가적인 오염을 방지하고 있다 (13).

(2) 미국

미국에서 전국적인 수준의 요네병 검사는 1996년에 National Animal Health Monitoring System (NAHMS)에 의해 처음 이루어졌으며, 전국적으로 21.6%의 젖소 목장이 양성으로 판정되었다 (14). 2007년에는 환경 내의 분변 시료를 대상으로 하여 검사한 결과 한 개 이상의 샘플에서 양성을 보인 젖소 목장이 68.1%이었다. 또한 500두 이상을 키우는 젖소 목장의 경우에는 95%가 양성으로 판정되었다 (15) 육우목장의 경우에도 1997년에 NAHMS에 의해 전국적인 조사가 이루어졌다. 총 21개 주에서 380개 목장의 10,372두의 육우가 조사 대상으로 선정되었으며, ELISA 검사 결과 0.4%의 육우와 7.9%의 목장만이 양성으로 판정되었다 (16). 2003년에서 2010년 사이에 3,100,000두 이상의 젖소와 692,000두 이상의 육우가 혈청 ELISA에 의한 요네병 검사를 받았으며 젖소의 경우에는 해마다 5~6.6%, 육우의 경우에는 해마다 2.1~3.6%의 양성률을 보였다 (17). 젖소 목장에서 우유를 대상으로 ELISA 검사를 한 결과 검사 숫자 및 양성률이 증가하고 있는 경향을 보였다. 2003년에 672두에서 2두 (0.3%)의 양성개체를 확인한 이후 2010년에는 약 131,334두에서 5,267두 (4%)가 양성으로 확인되었다. 또한 2003년에서 2010년 사이에 대략 514,000두의 젖소와 67,000두의 육우를 대상으로 분변 PCR과 배양 검사를 한 결과, 젖소는 7.2~14.1%, 육우는 2.8~16.9%의 양성률을 보였다 (17).

미농무성 (USDA)의 조사에 따르면 미국에서 요네병 발생에 따른 피해는 소 한 두당 약 100달러 정도의 추가적인 경제적 손실이 있는 것으로 밝혀졌다 (18). 따라서 이러한 경제적인 피해를 막기 위한 요네병 근절 정책들이 지속적으로 개발되어 왔다. 1993년에는 U.S. Animal Health Association (USAHA)에 의해 목장에 대한 요네병 청정 검증 프로그램이 개발되었으나 비용적인 측면 때문에 축산업계에 널리 도입되지는 못하였다 (19). 이후 1998년에는 자발적 요네병 목장 인증 프로그램 (VJDHSP; U.S Voluntary Johne's Disease Herd Status Program)이 개발되어 시행되고 있다. 이 정책은 Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program (VBJDCP)의 탄생에 기반이 되었다. 2002년에 VBJDCP는 미국 농림부 및 Plant Health Inspection Service (APHIS)의 주도 하에 탄생하게 되며, 크게 생산자 교육, 목장의 위해도 평가 및 관리, 목장의 분류를 중요 관리 요소로 시행하고 있다 (20).

VBJDCP 에서 이루어지는 교육은 생산자들에게 요네병의 위험성 (생산성 감소 및 질병 관리)을 이해시키고, 요네병의 예방, 통제 및 제거를 위한 정보를 제공하는 것을 주 목표로 하고 있다. 교육을 통해 요네병의 기본적인 지식, 목장 관리 방법, 진단 방법 및 결과의 활용법 등에 대한 지식을 목장주에게 전달하여 요네병 전파의 위험요인을 감소시킬 수 있게 하고 있다. 이러한 노력에 힘입어 목장주들의 요네병에 대한 인식도가 7.8% (1997년)에서 31.3% (2007년)으로 크게 증가하였다 (21, 22). 그러나 같은 기간 동안 요네병 검사를 한 생산자들의 비율은 0.7%에서 3.2%로 증가도가 낮았고, 프로그램에 대한 참여도 역시 1.4%밖에 되지 않는 한계를 나타내었다 (22). 젖소목장의 경우 매우 차이가 있어서 목장주의 인식도가 54.8% (1996년)에서 94% (2007년)로 증가도가 매우 높았다. 또한 참여 목장도 1% (1996년)에서 31% (2007년)로 크게 증가하였다 (23). 이처럼 생산자에 대한 적절한 교육은 프로그램에 대한 참여도를 높일 수 있는 중요한 요소 중 하나라고 생각된다.

목장의 위해도 평가 및 관리는 목장에서 요네병의 전파를 촉진시킬 수 있는 요인을 확인하여 목장을 평가하는 것을 주 목표로 하고 있다. 평가 대상은 목장의 모든 구역이며, 분만사 및 송아지 축사, 성체 축사 및 목장의 차단방역과 같은 부분들을 평가한다. 평가 항목으로는 분만에 사료나 음수의 노출 여부, 여러 동물의 분만사 사용, 다양한 연령대의 합사 등과 같은 요소 들이 포함된다. 이러한 위해도 평가 및 목장 관리를 통해 실제로 요네병의 전파 위험을 감소시키고 있는 것으로 확인되었다. 미네소타 대학의 연구결과에 따르면 1998년부터 2006년 12월까지 Minnesota Johnes' Disease Control Program (MJDCP) 에 자발적으로 참여하는 목장이 꾸준히 증가하였으며, 그 결과 젖소와 육우 농가 모두에서 위해도 정도를 감소시켜 요네병의 전파 위험을 낮추는데 성공하였다. 프로그램에 참여한 농가들은 평균적으로 처음 2년 동안 위해도 평가 점수를 18.1 포인트 감소시켰으며 이러한 경향은 프로그램을 진행하는 동안 계속 유지되었다 (24).

뉴욕 주에서는 New York State Cattle Health Assurance Program (NYSSCHAP) 가 시행되고 있으며 NYSSCHAP 에서는 목장을 세가지 등급으로 분류하여 관리하고 있다. 참여목장은 요네병 감염 유무를 모르는 목장이며, 대책수립 목장은 요네병의 감염 유무를 이미 알고 있는 농장, 인증 프로그램 목장은 요네병이 없으며 다른 목장에서 질병이 유입되는 위험도를 최소화하는 관리정책을 실행하고 있는 목장이다 (24, 25). 2005년에 시행된 설문조사에서는 등록된 목장 중 92개의 목장에서 응답을 하였으며, 그 중 76%의 목장이 축군의 건강이 향상되었다고 응답하였다. 또한 30%의 목장에서는 우유 생산량이 증가하였으며 35%의 목장에서 NYSSCHAP 프로그램이 목장에 이익을 가져다 주었다고 응답하였다 (26).

VBJDCP 에서는 최소한으로 요구되는 방역 조치를 규정하여 목장 내의 개체들이 요네병균에 노출될 위험을 감소시키고 있으며 방역 조치들은 다음과 같은 항목을 포함하고 있다. 분만사는 항상 청결하게 유지되어야 하며 각 개체가 분리된 분만실을 사용하는 것을 권고한다. 또한 송아지는 태어나는 즉시 모체로부터 격리하며, 요네병에 걸리지 않은 것이 확인된 동물의 초유만을 급여한다. 출생 이후에 송아지들은 연령에 따라 분리 사육되며, 성축과의 접촉은 엄격하게 금지된다. 외부로부터의 요네병의 전파를 막기 위해 동물은 반드시 요네병이 없는 목장에서 도입하며 도입 전 일정기간 격리하여 검사 후 도입한다. 만약 임상 증상을 보이는 개체가 나타난다면 즉시 격리하고 양성 확인시는 즉시 도태시켜야 한다 (17).

VBJDCP의 목장 분류 시스템은 VJDHSP 와 “Minimum Recommendations for Administering and Instituting State Voluntary Johne’s Disease Programs for Cattle”에 근거하여 수행되며, 수년간의 검사를 통해 MAP 에 의한 위험도를 평가하여 이루어진다 (27). 2010년에 APHIS에 의해 분류 기준이 좀더 유연성 있게 변경되었는데, 목장을 기존의 음성-양성이 아닌 1~6 단계로 분류하였고, 요네병 전파에 대한 위해 요소가 적을수록 분류 단계가 높아진다 (28).

젖소 목장의 경우 우유와 혈청을 시료로 한 ELISA 와 개체 별 분변 배양 및 PCR, 환경 샘플 검사 및 혼합한 분변 샘플 검사를 통해 목장을 분류하며, 육우 목장의 경우에는 우유를 시료로 한 ELISA와 개체 별 분변 배양 및 PCR, 혼합한 분변 샘플 검사를 통하여 분류하게 된다. (28) 모든 검사용 시료는 주 정부나 중앙정부의 동물 위생 공무원의 감독 하에서, 아니면 이들이 직접 채취하여야 한다. 또한 진단 검사는 NADC가 인증하는 실험실들에 의해 수행되기를 권고하며 주 정부산하의 수의 관련기관에 결과를 보고하도록 한다 (28).

(3) 호주

호주에서 요네병은 수입한 소의 검역과정에서 1911년에 처음 발견되었으며, 1925년에는 빅토리아주에서 발병이 확인되었다 (29). 요네병에 감염된 개체들은 1950년대부터 급격하게 증가하였고 대부분 젖소 목장에서 발병하였으며, 염소(Capra aegagrus), 알파카(Vicugna pacos) 에서도 발병이 확인되었다 (29). 호주의 소 요네병은 대부분 9500개 이상의 젖소 목장이 위치하고 있는 빅토리아 지역에서 발생하며, 호주의 서부 및 퀸즐랜드 지역의 소규모 젖소 목장에서는 거의 발병이 일어나지 않는다. 또한 육우목장에서는 비교적 적게 발생하는 것으로 알려져 있다 (30). 호주에서 요네병에 의한 직접적인 경제적 피해는 3,820,000 호주 달러로 예측되며 (30) 호주 내의 15.5%의 목장이 요네병에 양성인 개체를 가지고 있는 것으로 추정되어 낙농업에 미치는 영향이 매우 큰 것으로 판단되었다 (29).

호주에서 국가 단위의 목장 인증 프로그램인 “Australian Johne’s Disease Market Assurance Program for Cattle (CattleMAP) 는 1996년에 시작되었으나, 요네병이 상재하는 지역인 호주 남동부 지역의 젖소 목장에서는 참여율이 저조하였는데 감염이 의심 또는 확인된 목장에게 불이익을 주었기 때문인 것으로 생각된다. 이로서 감염된 많은 목장들이 통제되지 않는 상태로 방치되었고, 이에 새로운 국가 단위의 요네병 근절 프로그램의 필요성이 대두되었다 (31).

1997년에 Animal Health Australia는 표준 진단법, 질병 예방 수칙, 역학조사와 같은 항목을 확립하여 새로운 국가 단위의 요네병의 근절 프로그램인 검사와 근절 프로그램 (Test and Control Program) 을 개발하였다. 검사와 근절 프로그램은 목장과 유제품을 요네병균의 오염으로부터 차단하고, 감염되지 않은 청정목장의 상태를 유지하며, 요네병의 지역 및 국가 수준에서의 경제적 영향을 감소시키는 것을 목표로 하였다 (29).

또한 낙농업계와 정부는 모든 젖소 목장의 요네병 감염상황에 관한 평가 시스템을 개발하였는데 (National Dairy BJD Score), 이 시스템을 통해 각 목장들은 0~10의 등급으로 분류하였다. 이 등급은 목장의 요네병 유무에 따라 분류되었으며 요네병에 대해 안전할수록 높

은 점수를 받게 된다. 많은 젖소 목장들이 요네병 검진에 대한 공식적인 기록을 가지고 있지 않았으며, 요네병 음성을 검사로 확인 받지 못하였다. 이런 상태의 목장들은 ‘평가 받지 않은 목장’으로 분류되며 이러한 목장들은 요네병의 전파에 큰 역할을 하고 있기 때문에 평가 시스템 상에서 ‘중간 정도로 감염된 목장’ (Score 3) 과 같은 수준으로 여겨진다. 또한 평가 받지 않은 목장들이 만약 계속 평가를 받지 않거나 3단계의 송아지 양육 계획을 따르지 않는다면 0단계로 강등되는 불이익을 받게 된다. 또한 이 정책에서는 12개월령 이하의 송아지에서 요네병 전파의 위험을 감소시키기 위한 지침을 시행하고 있으며 요네병에 노출된 개체와의 접촉을 차단시키는 것을 핵심으로 하고 있다. 즉, 송아지들은 출생 후 12시간 내에 어미로부터 격리되어야 하며, 송아지를 키우는 공간은 성체로부터 차단되어야 한다. 또한 송아지들은 12개월이 지나기 전까지는 목초지에서 방목하지 않아야 한다 (32)

호주에서의 요네병 근절 정책 중 주 단위에서의 정책은 빅토리아 지역에서 가장 먼저 시작되었다. 빅토리아 주의 요네병 예방 프로그램 (Test and Control Program) 은 1996년에 시작되었는데, TCP는 프로그램에 참여한 목장의 2세 이상의 모든 개체들을 대상으로 정기적인 ELISA 검사를 통한 양성측 도태, 송아지 사육 환경의 관리를 시행하였다. 그 결과 등록된 600여 개의 목장에서 임상증상을 보이는 개체들을 감소시켰으나 완전히 청정화는 이루지 못했다 (33). 2003년에 TCP는 송아지 시기의 감염을 차단하기 위한 Johne’s Disease Calf Accreditation Program (JDCAP) 이라는 송아지 관리 정책을 포함하여 TCP2로 새롭게 시작되었다. JDCAP의 내용을 살펴보면 목장 내에서의 전파와 목장 간의 전파를 차단할 수 있는 요소들을 모두 갖추고 있다. 청결한 공간에서 분만에서 이유까지 송아지가 사육되도록 하였고 분만 후 최대 12시간 이내에 모축과 송아지를 분리하여 사육하였으며 성축의 분변에 의해 송아지를 사육할 장소가 오염되지 않도록 통제하였고, 성축은 송아지와 같은 장소에 방목되지 않도록 관리하였다. 음수공급은 깨끗한 탱크를 통해서만 이루어 지도록 관리하였고 송아지 사육장을 들어갈 때에는 반드시 분변이 묻지 않은 장화, 작업복 등을 착용하여 병원체의 유입을 차단하였다. 또한, 목장에서 송아지의 분만 또는 구입에 대한 정확한 정보를 기록하도록 하였다 (34).

(4) 스웨덴

스웨덴에서는 1952년에 요네병이 Swedish Epizootic Act 프로그램에 의해 법정전염병으로 지정된 이후 요네병 근절을 위한 많은 노력을 기울여 왔다 (35). 1993년에는 1,576개의 목장에서 나온 4,000 마리의 소를 ELISA 를 통해 검사하였고, 48마리의 양성개체를 확인하였으며, 1996년에는 130개 목장에서 나온 Limousin breed 를 대상으로 분변 배양 및 ELISA 로 검사한 결과 2마리의 양성개체가 발견되었다 (36).

2009년에서 2014년까지 분변 PCR 및 배양을 통한 검사 결과 육우 및 젖소에서 요네병 양성 개체가 전혀 나오지 않은 것으로 알려져 있다 (37). 이처럼 스웨덴 내의 요네병 양성률은 매우 낮으며 발병은 대부분 수입된 소에 국한된 경우가 많았다. 스웨덴의 요네병 예방 프로그램은 Swedish Animal Health Service 에 의해 운영되며, 해마다 모든 목장의 24개월 이상의 개체들을 대상으로 분변 샘플을 채취하여 배양 및 PCR을 통하여 요네병균 검사를 하였다. 또한 다른 목장에서 도입된 개체의 경우 12개월령 이상의 개체들 역시 검사대상에 포함하고 있다 (36).

검사 후 목장들은 음성 결과 횟수에 따라 A(음성 결과 5번), B(음성 결과 3~4번), C(음성 결과 1~2번) 등급 세 가지로 분류되며 검사 결과를 확정하기 위해 검사 기간 중 다른 목장의 동물과 접촉하지 않았다는 사실도 또한 확인 받아야 한다. 프로그램에 참여하고 있는 목장들은 같은 등급의 통제되고 있는 목장에서만 동물을 도입할 수 있으며, 방목 시에도 같은 등급 내의 동물들만 허용된다. 프로그램에 참여하지 않고 있는 동물과의 접촉이나, 운송 등은 금지되어 있다. 이와 같은 정책을 통해 스웨덴에서는 요네병을 잘 통제하고 있어 젖소의 경우 전혀 발생하고 있지 않으며 육우의 경우 산발적으로 발생하는 경우가 있었지만 마지막 발생이 있었던 2005년 이후로는 발생이 없다 (38).

(5) 네덜란드

네덜란드에는 대략 4백만 마리의 소가 있는 것으로 알려져 있으며, 그 중 54%의 목장이 요네병양성으로 여겨진다 (39, 40). 네덜란드에서 요네병은 1919년에 처음 공식적으로 확인되었으며 (41), 1992년부터는 피내 검사를 이용하여 감염 초기에 감염동물을 탐색 하기 위한 요네병 근절 프로그램이 운영되었다 (39). 1942년부터는 138개의 젖소 목장이 참여하는 근절 프로그램이 시작되었으며 참여 목장의 동물들은 해마다 요닌 피내반응법과 분변 배양을 통해 요네병 감염 유무를 확인 받았다. 또한 1952년부터는 임상 증상을 보여 도태된 동물에 대한 경제적인 보상이 이루어졌으며, 검사에서 양성을 보인 동물들은 다른 농장에 판매하는 것이 법적으로 금지되었다. 1954년부터는 임상 증상을 보이는 동물과 요닌 피내반응법에서 양성을 보인 동물을 대상으로 보체결합반응법을 적용하였으며 1958년부터는 18개월 이상의 모든 동물이 보체결합반응법으로 검사를 받았다. 그 후 1979년에는 4-18개월의 소를 대상으로 요닌 피내반응법을 적용하여 조기에 감염개체를 확인하여 요네병을 근절하려고 하였다. 또한 18개월 이상의 동물은 요닌 피내반응법 양성개체에 한정하여 보체결합반응법을 적용하여 검사하였다 (39). 그러나 이러한 지속적인 노력에도 불구하고 근절이 실패 (115개 목장 중 단 2곳만 근절에 성공)하자 (42) 송아지를 대상으로 사균백신접종을 1983년에 시도하였고 그 결과 요네병 임상증상을 보이는 개체를 감소시키는 데 성공하였으나 목장 내에 지속감염이 발생하는 한계점을 보였다 (43).

네덜란드는 2006년에 요네병의 청정화 프로그램을 새롭게 개발하였고, 이 프로그램은 우유에서의 요네병 오염을 감소시키는 것을 주 목표로 하고 있다. 모든 착유우에서 나오는 우유를 대상으로 ELISA 검사를 시행하면서 동시에 3년령 이상의 모든 소를 대상으로 1년 간격으로 혈청 ELISA 검사를 수행하고 있다. 양성 판정을 받은 개체는 축주의 요청에 따라 분변 배양을 통해 양성 여부를 다시 확인하여 최종적으로 판정된다. 농장의 분류는 세가지로 이루어 지는데, ELISA 검사 상에서 음성 판정을 받은 목장은 “Status A”로 분류하였고, 양성 판정을 받은 후 양성개체를 제거한 목장은 “Status B”로, 양성개체가 목장 내에 남아 있는 목장은 “Status C”로 분류하였다. (34). 현재 네덜란드 젖소 목장에게 의무적인 참가가 요구되고 있으며 “Status C”로 판정 받은 목장은 우유 판매의 제한과 같은 불이익을 받게 된다 (44).

라. 외국으로부터의 시사점

일본의 경우 정기적인 검사와 목장의 등급을 설정하여 요네병 근절을 추진하였으며, 요네병이 한번이라도 감염되었던 목장에 대해 지속적으로 모니터링하여 관리하는 점이 질병의 감소에 많은 영향을 주는 것으로 판단된다. 또한 감염된 개체와 접촉하였던 개체들의 지속적인 검사 및 도태 권고 또한 목장 내에서의 2차적인 전파를 예방하는 것으로 생각된다.

호주의 경우 비교적 성공적으로 요네병을 통제하고 있다고 할 수 있으며, 요네병의 전파를 방지하는 가장 중요한 부분은 실제로 목장 내에서 시행되고 있는 방역조치라고 생각된다. 즉 송아지와 감염된 개체의 접촉을 원천적으로 차단시키는 것이 요네병의 전파를 방지하는 중요한 방법으로 제시되고 있다.

미국의 경우 중앙정부 차원에서의 기본적인 프로그램과 함께 주 단위의 VJDHSP에 의해 자발적인 참여목장의 수는 증가되고 있으며 아직까지는 미흡하지만 이 프로그램을 운영하는 주정부는 물론 참여하는 목장의 수가 점차 증가하고 있는 실정이다.

스웨덴의 경우 가장 성공적으로 요네병을 근절하였다. 젓소의 경우 발생한 경우가 전혀 없으며, 육우의 경우도 2005년에 마지막으로 발병하였다. 감염된 개체가 나온 목장의 모든 개체들을 도태시키며, 이후에도 지속적으로 모니터링 하여 재발 여부를 확인하는 정책이 요네병 근절에 효과를 나타낸 것으로 생각된다.

네덜란드의 경우 비교적 감염된 목장이 많은 실정이지만 체계적인 농장 분류 시스템을 갖추고 있다. 특히 요네병 개체가 목장 내에 남아 있는 목장의 경우 경제적인 제한을 통해 양성개체의 도태를 유도하여 근절을 시도하는 점과 모든 착유우를 대상으로 검진을 실시하는 점은 요네병의 전파의 감소에 효과적인 부분으로 생각된다.

마. 한국형 요네 근절 프로그램 제안

(1) 해외의 근절책의 공통점

해외의 사례들을 통해 각국의 요네병 예방 및 관리 프로그램의 공통점은 나라마다 차이는 있지만 ①정기적인 요네병 검진을 수행하고 있었으며, ②송아지가 태어난 후 즉시 성축과 분리 사육하여 송아지의 감염 가능성을 차단하였다. 또한 ③수직 감염의 위험성에 따라 요네병 음성으로 확인된 개체로부터 얻은 안전한 초유를 공급하여 송아지로의 수직 감염의 위험성을 차단하였다. ④목장 내의 환경을 청결하게 유지하는 것도 중요 정책 중 하나로 특히 분만사나 송아지를 기르는 공간은 청결하게 유지되도록 하였고, 최적의 위생적인 관리를 하도록 하였다. 특히 목장 내부에서 성축의 분변과 접촉된 기구 등은 송아지와 다시 접촉되지 않도록 하여 질병의 전파를 방지하였다. 즉, 사육환경의 전반적인 개선 및 송아지로의 감염 전파를 막기 위한 정책을 시행하고 있는 것으로 생각된다. 따라서 국내 역시 해외의 사례들과 마찬가지로 사육환경의 전반적인 개선 및 송아지로의 감염 전파를 막기 위한 적극적인 정책이 필요하다고 할 수 있다.

(2) 요네병 근절을 위한 중점 관리 기준 설정

해외의 사례를 종합하여 요네병 근절을 위한 중점 관리 기준을 요네병 양성개체, 송아지, 목장을 관리대상으로 하였으며 세부 사항은 표47과 같다.

표 55. 요네병 근절을 위한 관리 대상별 중점 관리 기준

관리 대상 별 구분	중점 관리 기준
요네병 양성개체	<ul style="list-style-type: none"> ○ 정기적인 검사를 통해 양성으로 판정된 개체의 즉각적인 격리 및 도태 ○ 준임상형 감염우의 다른 우군과의 분리 사육 ○ 외부로부터 개체 도입 시 일정 기간 격리하여 질병 유무 검사 ○ 감염된 개체의 번식 금지
송아지	<ul style="list-style-type: none"> ○ 송아지 분만 장소의 청결 유지 ○ 분만 후 송아지는 즉시 모축으로부터 분리 ○ 성우로부터 분리된 사육시설에서 사육 ○ 송아지의 방목은 1년령 이후에 실시 ○ 송아지 사육시설 청결 유지 (분변에 오염된 기구 사용금지) ○ 우유나 초유는 혼합하지 않은 것을 급여 (요네병 음성 개체에 서만 확보)
목장	<ul style="list-style-type: none"> ○ 입식하는 가축의 수와 목장의 정보 기록 및 관리 ○ 가축의 변동내역, 임상증상 발생 여부 등 기록 ○ 목장 내의 분변에 의한 사료, 음수, 장비 및 차량의 오염을 방지

요네병 양성개체의 경우 정기적인 검사를 통해 양성으로 판정된 이후 즉각적인 격리하며 이후 설사 등의 임상증상이 나타나게 되면 도태한다. 또한 임상증상을 보이지 않는 준임상형의 검색을 위한 진단법이 확립되어야 하며, 이들 개체는 다른 개체와 격리하여 사육하면서 다른 개체로의 전파를 차단해야 한다. 또한 외부로부터 새로운 개체를 도입하는 목장 내의 별도의 공간에 일정 기간 격리하면서 혈청 ELISA 및 분변 PCR을 통하여 요네병이 없음을 확인 후 입식 하도록 한다. 수직감염을 차단하기 위해 감염된 개체는 번식을 금지하고 도태시키도록 유도한다. 송아지는 청결한 장소에서 분만하도록 하며, 특히 다른 성체의 분변 및 체액으로 오염되지 않도록 항상 신경써야 한다. 분만 직후 송아지는 모축으로부터 격리되어야 하고 성우로부터 분리된 사육시설에서 사육한다. 송아지의 사육시설의 청결 유지 역시 중요한 부분으로 분변에 오염된 의복이나 장비를 사용하지 않도록 주의하여야 한다. 또한 송아지에 급여하는 초유나 우유는 여러 개체의 것을 혼합하여 쓰지 않고 요네병 음성 개체에서만 확보하여 급여하여야 한다. 목장에서는 입식 하는 가축의 수와 목장 내 가축의 요네병 유무 및 검사결과를 상세하게 기록하고 관리하여야 한다. 목장 내 요네병 양성축이 존재한다면 임상증상의 발생 여부 등을 관찰하여 기록하여야 한다. 또한 목장 내의 분변에 의한 사료, 음수, 장비 및 차량의 오염을 방지하여 질병 전파의 위험성을 낮추어야 한다.

(3) 목장의 등급 분류 및 사후 관리

요네병 검사 결과에 따른 목장의 등급 분류 및 인증을 위해 12개월에 한 번씩 검사를 시행하여 등급을 분류하도록 하며 등급 분류 후 한 번 이상 검사를 받지 않은 목장은 4등급으로 설정하도록 한다. 각 목장에 대한 등급은 1등급에서 4등급으로 분류하며 다음과 같이 정의한다.

- 1등급: 요네병이 발생한 적이 없거나 발생 후 2년 이상 청정 상태를 유지하고 있는 목장
- 2등급: 요네병이 발생한 적이 있으며 현재 양성축을 도태한 후 청정 상태가 2년 미만인 농장
- 3등급: 요네병이 발생한 적이 있으며 현재 양성축이 존재하는 목장
- 4등급: 등급 판정을 받지 않거나 받은 후 한 번 이상 검사를 받지 않은 목장

검사 대상은 18개월령 이상의 모든 개체를 대상으로 하며 송아지의 경우에는 18개월령 이상이 되었을 때 검사 대상에 추가하도록 한다. 검사 방법은 개체의 혈청을 대상으로 ELISA법을 사용하며, 또한 분변을 채취하여 IS900 유전자를 대상으로 PCR을 시행한 후 ELISA와 PCR의 두 가지 결과 중 하나 이상에서 양성이 나온 개체를 최종적으로 양성으로 판정한다. 등급 판정 이후에 양성 개체가 발견되게 되면 등급이 1단계씩 하향 판정을 받게 되며, 양성 개체는 즉각적인 격리 조치 후 빠른 시일 내에 도태시키도록 한다. 1등급 농장의 경우 양성 개체가 발생하여 2등급으로 하향된 후 양성 개체를 도태 처리하고 3개월간 격으로 8회 동안 검사를 하게 하며 만약 8회 동안 연속하여 음성 판정을 받게 된다면 원래의 등급을 회복하도록 한다. 2등급 농장은 양성 개체가 발생하였을 때 3등급으로 하향되며, 양성 개체를 도태 처리하면 다시 2등급으로 조정되게 된다. 또한 4등급의 목장에 대해서는 지속적으로 검사를 받도록 유도하여 참여하는 목장의 수가 증가하도록 유도한다.

바. 맺는말

본 연구에서는 국내 요네병 발생 상황의 파악 및 일본, 미국, 호주, 네덜란드, 스웨덴의 요네병 근절 프로그램을 분석하여 한국형 요네병 근절을 위한 방역 프로그램을 제안하였다. 국내의 상황을 살펴보면 요네병 발생 건수와 감염 두수가 최근까지도 지속적으로 증가하였으며 이에 따라 경제적 피해도 증가할 것으로 예상된다. 이에 따라 요네병 근절을 위한 방역 프로그램의 개발이 시급한 실정이다. 외국의 사례들을 종합해 보면 정기적인 요네병 검진, 송아지로의 수직 전파 차단 및 목장 내의 사육 환경 개선이 공통적으로 확인되었고, 이런 요소들이 요네병 근절에 핵심적인 역할을 하는 것으로 여겨진다. 따라서 이것을 기반으로 요네병 양성개체, 송아지, 목장을 관리 대상으로 중점 관리 요소를 설정하여 요네병 근절 프로그램을 제안하였다. 이 프로그램은 목장을 4등급으로 분류하며 정기적인 검진을 통한 양성개체의 조기 탐색 및 제거, 목장내의 위생관리를 통한 체계적인 관리정책을 제시하고 있다. 따라서 이 프로그램의 적용을 통해 요네병에 의한 경제적 피해를 최소화시키며 나아가 요네병을 완전히 근절할 수 있을 것으로 기대된다.

2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

○ 가. 미생물 유전체사업의 성과목표

성과목표		전략 미생물 해독	유용 유전 자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표					0			9	7	5
1차년도	목표							0	1	0
	실적							0	2	0
2차년도	목표							2	2	1
	실적							2	5	12
3차년도	목표							3	2	2
	실적							8	2	16
4차년도	목표				0			4	2	2
	실적				52			1	0	28
계	목표				0			9	7	5
	실적				52			11	7	46

○ 나. 기타 성과목표

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문 SC I	비 SC I	논문 평균 IF	학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치														33.3		33.3		33.3		
최종목표	2	1		1								5	2	2.83	7		7	2	4	
1차년도	목표														1		1		1	
	실적											2	1	1.33	1		2		1	
2차년도	목표											1	1	2.0	2		2		1	
	실적											1	1	2.4	5		2		2	
3차	목표	1										2	1	3.0	2		2	1	1	

년도	실적	1									4	1	2.97	6		3	0	1
4차년도	목표	1	1		1						2		3.0	2		2	1	1
	실적	1	0		0						6		3.11	5		3	2	2
소계	목표	2	1*		1#						5	2	2.83	7		7	2	4
	실적	2	0		0						13	3	2.83	17		10	2	6
종료 1차년도											1		3.0					1
종료 2차년도											1							1
종료 3차년도																		
종료 4차년도																		
종료 5차년도																		
소계											2		3.0					2
합계		2	1	1							7	2		7		7	2	6

* 출원후 수정하여 현재 등록 심사중, # 현재 산학협력단과 기업체간에 기술이전을 위한 행정절차 진행중.

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[미생물유전체사업 성과]

□ 메타유전체 분석

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) 감염우의 장내균총 데이터 기반 감염 16S rRNA (V3-V4) 시퀀스 데이터 : 개체번호 23	한우와 젓소가 포함된 20마리의 MAP 감염우와 32마리의 미감염우의 분별 샘플로부터 추출한 gDNA에서 16S rRNA의 V3-V4 부분을 증폭한 뒤 NGS로 시퀀스 정보를 생산한 장내균총 데이터 중 23번 샘플	2021. 12. 16	igem-0002369	
2	Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) 감염우의 장내균총 데이터 기반 감염 16S rRNA (V3-V4) 시퀀스 데이터 : 개체번호 28	한우와 젓소가 포함된 20마리의 MAP 감염우와 32마리의 미감염우의 분별 샘플로부터 추출한 gDNA에서 16S rRNA의 V3-V4 부분을 증폭한 뒤 NGS로 시퀀스 정보를 생산한 장내균총 데이터 중 28번 샘플	2021. 12. 16	igem-0002370	
3	Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) 감염우의 장내균총 데이터 기반 감염 16S rRNA (V3-V4) 시퀀스 데이터 : 개체번호 32	한우와 젓소가 포함된 20마리의 MAP 감염우와 32마리의 미감염우의 분별 샘플로부터 추출한 gDNA에서 16S rRNA의 V3-V4 부분을 증폭한 뒤 NGS로 시퀀스 정보를 생산한 장내균총 데이터 중 32번 샘플	2021. 12. 16	igem-0002357	
4	Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) 감염우의 장내균총 데이터 기반 감염 16S rRNA (V3-V4) 시퀀스 데이터 : 개체번호 33	한우와 젓소가 포함된 20마리의 MAP 감염우와 32마리의 미감염우의 분별 샘플로부터 추출한 gDNA에서 16S rRNA의 V3-V4 부분을 증폭한 뒤 NGS로 시퀀스 정보를 생산한 장내균총 데이터 중 33번 샘플	2021. 12. 16	igem-0002371	
5	Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) 감염우의 장내균총 데이터 기반 감염 16S rRNA (V3-V4) 시퀀스 데이터 : 개체번호 35	한우와 젓소가 포함된 20마리의 MAP 감염우와 32마리의 미감염우의 분별 샘플로부터 추출한 gDNA에서 16S rRNA의 V3-V4 부분을 증폭한 뒤 NGS로 시퀀스 정보를 생산한 장내균총 데이터 중 35번 샘플	2021. 12. 16	igem-0002347	

	감염 16S rRNA (V3-V4) 시퀀스 데이터 : 개체번호 neg_K8	rRNA의 V3-V4 부분을 증폭한 뒤 NGS로 시퀀스 정보를 생산한 장내균총 데이터 중 neg_K8번 샘플			
44	Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) 감염우의 장내균총 데이터 기반 감염 16S rRNA (V3-V4) 시퀀스 데이터 : 개체번호 neg_K10	한우와 젖소가 포함된 20마리의 MAP 감염우와 32마리의 미감염우의 분별 샘플로부터 추출한 gDNA에서 16S rRNA의 V3-V4 부분을 증폭한 뒤 NGS로 시퀀스 정보를 생산한 장내균총 데이터 중 neg_K10번 샘플	2021. 12. 16	igem-0002 390	
45	Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) 감염우의 장내균총 데이터 기반 감염 16S rRNA (V3-V4) 시퀀스 데이터 : 개체번호 neg_K15	한우와 젖소가 포함된 20마리의 MAP 감염우와 32마리의 미감염우의 분별 샘플로부터 추출한 gDNA에서 16S rRNA의 V3-V4 부분을 증폭한 뒤 NGS로 시퀀스 정보를 생산한 장내균총 데이터 중 neg_K15번 샘플	2021. 12. 16	igem-0002 391	
46	Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) 감염우의 장내균총 데이터 기반 감염 16S rRNA (V3-V4) 시퀀스 데이터 : 개체번호 neg_K19	한우와 젖소가 포함된 20마리의 MAP 감염우와 32마리의 미감염우의 분별 샘플로부터 추출한 gDNA에서 16S rRNA의 V3-V4 부분을 증폭한 뒤 NGS로 시퀀스 정보를 생산한 장내균총 데이터 중 neg_K19번 샘플	2021. 12. 16	igem-0002 392	
47	Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) 감염우의 장내균총 데이터 기반 감염 16S rRNA (V3-V4) 시퀀스 데이터 : 개체번호 neg_K25	한우와 젖소가 포함된 20마리의 MAP 감염우와 32마리의 미감염우의 분별 샘플로부터 추출한 gDNA에서 16S rRNA의 V3-V4 부분을 증폭한 뒤 NGS로 시퀀스 정보를 생산한 장내균총 데이터 중 neg_K25번 샘플	2021. 12. 16	igem-0002 393	
48	Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) 감염우의 장내균총 데이터 기반 감염 16S rRNA (V3-V4) 시퀀스 데이터 : 개체번호 neg_K28	한우와 젖소가 포함된 20마리의 MAP 감염우와 32마리의 미감염우의 분별 샘플로부터 추출한 gDNA에서 16S rRNA의 V3-V4 부분을 증폭한 뒤 NGS로 시퀀스 정보를 생산한 장내균총 데이터 중 neg_K28번 샘플	2021. 12. 16	igem-0002 394	
49	Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) 감염우의 장내균총 데이터 기반 감염 16S rRNA (V3-V4) 시퀀스 데이터 : 개체번호 neg_K29	한우와 젖소가 포함된 20마리의 MAP 감염우와 32마리의 미감염우의 분별 샘플로부터 추출한 gDNA에서 16S rRNA의 V3-V4 부분을 증폭한 뒤 NGS로 시퀀스 정보를 생산한 장내균총 데이터 중 neg_K29번 샘플	2021. 12. 16	igem-0002 395	
50	Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) 감염우의 장내균총 데이터 기반 감염 16S rRNA (V3-V4) 시퀀스 데이터 : 개체번호 neg_K31	한우와 젖소가 포함된 20마리의 MAP 감염우와 32마리의 미감염우의 분별 샘플로부터 추출한 gDNA에서 16S rRNA의 V3-V4 부분을 증폭한 뒤 NGS로 시퀀스 정보를 생산한 장내균총 데이터 중 neg_K31번 샘플	2021. 12. 16	igem-0002 396	
51	Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) 감염우의 장내균총 데이터 기반 감염 16S rRNA (V3-V4) 시퀀스 데이터 : 개체번호 neg_K33	한우와 젖소가 포함된 20마리의 MAP 감염우와 32마리의 미감염우의 분별 샘플로부터 추출한 gDNA에서 16S rRNA의 V3-V4 부분을 증폭한 뒤 NGS로 시퀀스 정보를 생산한 장내균총 데이터 중 neg_K33번 샘플	2021. 12. 16	igem-0002 397	
52	Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) 감염우의 장내균총 데이터 기반 감염 16S rRNA (V3-V4) 시퀀스 데이터 : 개체번호 neg_K34	한우와 젖소가 포함된 20마리의 MAP 감염우와 32마리의 미감염우의 분별 샘플로부터 추출한 gDNA에서 16S rRNA의 V3-V4 부분을 증폭한 뒤 NGS로 시퀀스 정보를 생산한 장내균총 데이터 중 neg_K34번 샘플	2021. 12. 16	igem-0002 398	

□ 병원성미생물진단마커 개발

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 감염 확인을 위한 바이오마커 개발	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) 감염을 확인할 수 있는 Real-Time PCR용 primer 제작 및 바이오마커 개발	2019. 11. 05	igem-0000 863	
2	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 타입 확인을 위한 바이오마커 개발	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP)의 세부 type (S-, C-, B-type)을 확인할 수 있는 Real-Time PCR용 primer 제작 및 바이오마커 개발	2019. 11. 05	igem-0000 809	
3	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	요네병 원인균인 MAP균의 genome의 다양성 및 역학적 조사를 위한 새로운	2020. 11. 03	igem-0002 025	

	균의 genotyping을 위한 새로운 바이오마커_MAPK_TR_1	바이오마커. 새로운 5개의 Tandem Repeat(TR)을 발견하였으며, 이를 이용하여 complete genome 13개에 in silico typing 수행하여 실요성 확인.			
4	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 균의 genotyping을 위한 새로운 바이오마커_MAPK_TR_2	요네병 원인균인 MAP균의 genome의 다양성 및 역학적 조사를 위한 새로운 바이오마커. 새로운 5개의 Tandem Repeat(TR)을 발견하였으며, 이를 이용하여 complete genome 13개에 in silico typing 수행하여 실요성 확인.	2020. 11. 03	igem-0002025	
5	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 균의 genotyping을 위한 새로운 바이오마커_MAPK_TR_3	요네병 원인균인 MAP균의 genome의 다양성 및 역학적 조사를 위한 새로운 바이오마커. 새로운 5개의 Tandem Repeat(TR)을 발견하였으며, 이를 이용하여 complete genome 13개에 in silico typing 수행하여 실요성 확인.	2020. 11. 03	igem-0002025	
6	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 균의 genotyping을 위한 새로운 바이오마커_MAPK_TR_4	요네병 원인균인 MAP균의 genome의 다양성 및 역학적 조사를 위한 새로운 바이오마커. 새로운 5개의 Tandem Repeat(TR)을 발견하였으며, 이를 이용하여 complete genome 13개에 in silico typing 수행하여 실요성 확인.	2020. 11. 03	igem-0002025	
7	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 균의 genotyping을 위한 새로운 바이오마커_MAPK_TR_5	요네병 원인균인 MAP균의 genome의 다양성 및 역학적 조사를 위한 새로운 바이오마커. 새로운 5개의 Tandem Repeat(TR)을 발견하였으며, 이를 이용하여 complete genome 13개에 in silico typing 수행하여 실요성 확인.	2020. 11. 03	igem-0002025	
8	요네병균에 감염된 소 혈청을 이용한 Biomarker 분석_Transthyretin	요네병균에 감염된 자연감염우로부터 감염 시기별 혈청을 수집하여 단백질을 추출하여 바이오마커 후보 물질을 탐색하였음.	2020. 12. 17	igem-0002115	
9	요네병균에 감염된 소 혈청을 이용한 Biomarker 분석_Alpha-2-macroglobulin	요네병균에 감염된 자연감염우로부터 감염 시기별 혈청을 수집하여 단백질을 추출하여 바이오마커 후보 물질을 탐색하였음.	2020. 12. 17	igem-0002115	
10	요네병균에 감염된 소 혈청을 이용한 Biomarker 분석_Alpha-1-beta glycoprotein	요네병균에 감염된 자연감염우로부터 감염 시기별 혈청을 수집하여 단백질을 추출하여 바이오마커 후보 물질을 탐색하였음.	2020. 12. 17	igem-0002115	
11	MAP감염 특이적인 상대적 풍부도 값 기반 미생물학적 바이오마커	MAP감염우와 미감염우의 장내균총을 확인한 후, 감염유무에 따라 특이적으로 차이가 나는 미생물을 선별한 후 이들의 상대적 풍부도값을 이용하여 지표화하여 최종적으로 5가지의 MAP 특이적 미생물학적 바이오마커를 제시함.	2021. 12. 16	igem-0002399	

□ 병원성미생물 정보 완성

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> MAPK_CN4/13의 전장유전체 해독	Genome sequence of <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> MAPK_CN4/13	2019. 11. 04	igem-0000799	
2	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> MAPK_JB16/15의 전장유전체 해독	Genome sequence of <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> MAPK_JB16/15	2019. 11. 04	igem-0000800	
3	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> MAPK_JJ1/13의 전장유전체 해독	Genome sequence of <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> MAPK_JJ1/13	2019. 11. 04	igem-0000798	
4	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Mycobacterium avium</i> subsp.	2019. 11. 06	igem-0000	

	subsp. <i>paratuberculosis</i> MAPK_CN7/15 전장유전체	paratuberculosis 국내 분리주에 대한 전장유전체분석		214	
5	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> MAPK_CN9/15 전장유전체	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 국내 분리주에 대한 전장유전체분석	2019. 11. 06	igem-0000 193	
6	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 국내 분리주 MAPK_CN7/15의 전사체 분석	국내 분리 요네병균의 특성을 분석하기 위하여 RNMA-seq 기법을 이용한 전사체 분석을 수행하였음.	2020. 10. 28	igem-0002 084	
7	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 국내 분리주 MAPK_JJ1/13의 전사체 분석	국내 분리 요네병균의 특성을 분석하기 위하여 RNMA-seq 기법을 이용한 전사체 분석을 수행하였음.	2020. 10. 28	igem-0002 083	

□ 미생물 병발생 기작 규명

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	in vitro culture passage 모델에서의 <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 감염 초기 PBMC에서의 유전체 발현 분석 : 24h_PBMC_C1	감염 초기 숙주-병원체 상호작용을 이해하기 위하여 in vitro culture passage 모델을 구축하였음. MAP 감염 후 24시간, 72시간 PBMC 세포에서 RNA를 추출하여 RNA-seq 분석 수행하였음.	2019. 11. 07	igem-0000 855	
2	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 감염 초기 PBMC에서의 유전체 발현 분석 : 24h_PBMC_C2	감염 초기 숙주-병원체 상호작용을 이해하기 위하여 in vitro culture passage 모델을 구축하였음. MAP 감염 후 24시간, 72시간 PBMC 세포에서 RNA를 추출하여 RNA-seq 분석 수행하였음.	2019. 11. 07	igem-0000 949	
3	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 감염 초기 PBMC에서의 유전체 발현 분석 : 24h_PBMC_T1-1	감염 초기 숙주-병원체 상호작용을 이해하기 위하여 in vitro culture passage 모델을 구축하였음. MAP 감염 후 24시간, 72시간 PBMC 세포에서 RNA를 추출하여 RNA-seq 분석 수행하였음.	2019. 11. 07	igem-0000 950	
4	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 감염 초기 PBMC에서의 유전체 발현 분석 : 24h_PBMC_T1-2	감염 초기 숙주-병원체 상호작용을 이해하기 위하여 in vitro culture passage 모델을 구축하였음. MAP 감염 후 24시간, 72시간 PBMC 세포에서 RNA를 추출하여 RNA-seq 분석 수행하였음.	2019. 11. 07	igem-0000 951	
5	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 감염 초기 PBMC에서의 유전체 발현 분석 : 24h_PBMC_T2-1	감염 초기 숙주-병원체 상호작용을 이해하기 위하여 in vitro culture passage 모델을 구축하였음. MAP 감염 후 24시간, 72시간 PBMC 세포에서 RNA를 추출하여 RNA-seq 분석 수행하였음.	2019. 11. 07	igem-0000 952	
6	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 감염 초기 PBMC에서의 유전체 발현 분석 : 24h_PBMC_T2-3	감염 초기 숙주-병원체 상호작용을 이해하기 위하여 in vitro culture passage 모델을 구축하였음. MAP 감염 후 24시간, 72시간 PBMC 세포에서 RNA를 추출하여 RNA-seq 분석 수행하였음.	2019. 11. 07	igem-0000 953	
7	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 감염 초기 PBMC에서의 유전체 발현 분석 :	감염 초기 숙주-병원체 상호작용을 이해하기 위하여 in vitro culture passage 모델을 구축하였음. MAP 감염 후 24시간, 72시간 PBMC 세포에서 RNA를 추출하여 RNA-seq 분석 수행하였음.	2019. 11. 07	igem-0000 954	

	72h_PBMC_C2			
8	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 감염 초기 PBMC에서의 유전체 발현 분석 : 72h_PBMC_C3	감염 초기 숙주-병원체 상호작용을 이해하기 위하여 in vitro culture passage 모델을 구축하였음. MAP 감염 후 24시간, 72시간 PBMC 세포에서 RNA를 추출하여 RNA-seq 분석 수행하였음.	2019. 11. 07	igem-0000 955
9	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 감염 초기 PBMC에서의 유전체 발현 분석 : 72h_PBMC_T1-1	감염 초기 숙주-병원체 상호작용을 이해하기 위하여 in vitro culture passage 모델을 구축하였음. MAP 감염 후 24시간, 72시간 PBMC 세포에서 RNA를 추출하여 RNA-seq 분석 수행하였음.	2019. 11. 07	igem-0000 956
10	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 감염 초기 PBMC에서의 유전체 발현 분석 : 72h_PBMC_T1-2	감염 초기 숙주-병원체 상호작용을 이해하기 위하여 in vitro culture passage 모델을 구축하였음. MAP 감염 후 24시간, 72시간 PBMC 세포에서 RNA를 추출하여 RNA-seq 분석 수행하였음.	2019. 11. 07	igem-0000 957
11	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 감염 초기 PBMC에서의 유전체 발현 분석 : 72h_PBMC_T2-1	감염 초기 숙주-병원체 상호작용을 이해하기 위하여 in vitro culture passage 모델을 구축하였음. MAP 감염 후 24시간, 72시간 PBMC 세포에서 RNA를 추출하여 RNA-seq 분석 수행하였음.	2019. 11. 07	igem-0000 958
12	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 감염 초기 PBMC에서의 유전체 발현 분석 : 72h_PBMC_T2-2	감염 초기 숙주-병원체 상호작용을 이해하기 위하여 in vitro culture passage 모델을 구축하였음. MAP 감염 후 24시간, 72시간 PBMC 세포에서 RNA를 추출하여 RNA-seq 분석 수행하였음.	2019. 11. 07	igem-0000 959
13	요네병균에 감염된 소혈청 miRNA를 이용한 miRNA-seq 분석 : group 4	요네병균에 감염된 자연감염우로부터 감염 시기별 혈청을 수집하여 miRNA를 추출하였음. miRNA-seq 분석을 통해 면역조절기전을 규명하고자 함	2020. 12. 17	igem-0002 099
14	요네병균 감염에 따른 마우스 조직에서의 전사체 분석 : 6w_Oral-4_MLN	요네병균에 복강 또는 구강경로를 통해 감염된 마우스의 감염 후 6주차 조직(spleen, mesenteric lymph node)으로부터 total RNA를 추출하고 RNA-seq을 통해 전사체 분석을 수행함.	2020. 12 .17	igem-0002 129
15	요네병균에 감염된 소혈청 miRNA를 이용한 miRNA-seq 분석 : group 2	요네병균에 감염된 자연감염우로부터 감염 시기별 혈청을 수집하여 miRNA를 추출하였음. miRNA-seq 분석을 통해 면역조절기전을 규명하고자 함	2020. 12 .17	igem-0002 097
16	요네병균에 감염된 소혈청 miRNA를 이용한 miRNA-seq 분석 : group 3	요네병균에 감염된 자연감염우로부터 감염 시기별 혈청을 수집하여 miRNA를 추출하였음. miRNA-seq 분석을 통해 면역조절기전을 규명하고자 함	2020. 12 .17	igem-0002 098
17	요네병균 감염에 따른 마우스 조직에서의 전사체 분석 : 6w_C-3_MLN	요네병균에 복강 또는 구강경로를 통해 감염된 마우스의 감염 후 6주차 조직(spleen, mesenteric lymph node)으로부터 total RNA를 추출하고 RNA-seq을 통해 전사체 분석을 수행함.	2020. 10. 30	igem-0002 086
18	요네병균 감염에 따른 마우스 조직에서의 전사체 분석 : 6w_IP-3_MLN	요네병균에 복강 또는 구강경로를 통해 감염된 마우스의 감염 후 6주차 조직(spleen, mesenteric lymph node)으로부터 total RNA를 추출하고 RNA-seq을 통해 전사체 분석을 수행함.	2020. 10. 30	igem-0002 087
19	요네병균 감염에 따른 마우스 조직에서의 전사체 분석 : 6w_IP-4_MLN	요네병균에 복강 또는 구강경로를 통해 감염된 마우스의 감염 후 6주차 조직(spleen, mesenteric lymph node)으로부터 total RNA를 추출하고 RNA-seq을 통해 전사체 분석을 수행함.	2020. 10. 30	igem-0002 088
20	요네병균 감염에 따른 마우스 조직에서의 전사체 분석 :	요네병균에 복강 또는 구강경로를 통해 감염된 마우스의 감염 후 6주차 조직(spleen, mesenteric lymph node)으로부터 total RNA를 추출하고	2020. 10. 30	igem-0002 089

	6w_Oral-5_MLN	RNA-seq을 통해 전사체 분석을 수행함.			
21	요네병균 감염에 따른 마우스 조직에서의 전사체 분석 : 6w_C-2_Spleen	요네병균에 복강 또는 구강경로를 통해 감염된 마우스의 감염 후 6주차 조직(spleen, mesenteric lymph node)으로부터 total RNA를 추출하고 RNA-seq을 통해 전사체 분석을 수행함.	2020. 10. 30	igem-0002090	
22	요네병균 감염에 따른 마우스 조직에서의 전사체 분석 : 6w_C-3_Spleen	요네병균에 복강 또는 구강경로를 통해 감염된 마우스의 감염 후 6주차 조직(spleen, mesenteric lymph node)으로부터 total RNA를 추출하고 RNA-seq을 통해 전사체 분석을 수행함.	2020. 10. 30	igem-0002091	
23	요네병균 감염에 따른 마우스 조직에서의 전사체 분석 : 6w_IP-2_Spleen	요네병균에 복강 또는 구강경로를 통해 감염된 마우스의 감염 후 6주차 조직(spleen, mesenteric lymph node)으로부터 total RNA를 추출하고 RNA-seq을 통해 전사체 분석을 수행함.	2020. 10. 30	igem-0002092	
24	요네병균 감염에 따른 마우스 조직에서의 전사체 분석 : 6w_IP-5_Spleen	요네병균에 복강 또는 구강경로를 통해 감염된 마우스의 감염 후 6주차 조직(spleen, mesenteric lymph node)으로부터 total RNA를 추출하고 RNA-seq을 통해 전사체 분석을 수행함.	2020. 10. 30	igem-0002093	
25	요네병균 감염에 따른 마우스 조직에서의 전사체 분석 : 6w_Oral-1_Spleen	요네병균에 복강 또는 구강경로를 통해 감염된 마우스의 감염 후 6주차 조직(spleen, mesenteric lymph node)으로부터 total RNA를 추출하고 RNA-seq을 통해 전사체 분석을 수행함.	2020. 10. 30	igem-0002094	
26	요네병균 감염에 따른 마우스 조직에서의 전사체 분석 : 6w_Oral-4_Spleen	요네병균에 복강 또는 구강경로를 통해 감염된 마우스의 감염 후 6주차 조직(spleen, mesenteric lymph node)으로부터 total RNA를 추출하고 RNA-seq을 통해 전사체 분석을 수행함.	2020. 10. 30	igem-0002095	
27	요네병균에 감염된 소 혈청 miRNA를 이용한 miRNA-seq 분석 : group 1	요네병균에 감염된 자연감염우로부터 감염 시기별 혈청을 수집하여 miRNA를 추출하였으며, miRNA-seq 분석을 통해 면역조절기전을 규명하고자 함	2020. 12. 17	igem-0002096	
28	요네병균 감염에 따른 마우스 조직에서의 전사체 분석 : 6w_C-1_MLN	요네병균에 복강 또는 구강경로를 통해 감염된 마우스의 감염 후 6주차 조직(spleen, mesenteric lymph node)으로부터 total RNA를 추출하고 RNA-seq을 통해 전사체 분석을 수행함.	2020. 10. 30	igem-0002085	
29	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 에 감염된 소 혈청 miRNA를 이용한 miRNA-seq 분석	요네병균에 감염된 자연감염우로부터 감염 단계별 혈청을 수집하여 miRNA를 추출하였으며, 이후 miRNA-seq 분석을 통해 면역조절기전을 규명	2021. 11. 10	igem-0002247	
30	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 에 감염된 THP-1 cell의 scRNA-seq 분석 : C0_S37	단일세포유전체분석을 이용하여 THP-1 세포의 요네병균 감염에 대한 초기 반응을 분석한다.	2021. 12. 29	igem-0002223	
31	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 에 감염된 THP-1 cell의 scRNA-seq 분석 : C0_S38	단일세포유전체분석을 이용하여 THP-1 세포의 요네병균 감염에 대한 초기 반응을 분석한다.	2021. 12. 29	igem-0002224	
32	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 에 감염된 THP-1 cell의 scRNA-seq 분석 : C0_S39	단일세포유전체분석을 이용하여 THP-1 세포의 요네병균 감염에 대한 초기 반응을 분석한다.	2021. 12. 29	igem-0002225	
33	<i>Mycobacterium avium</i>	단일세포유전체분석을 이용하여 THP-1 세포의 요네병균 감염에 대한 초기	2021. 12. 29	igem-0002226	

	subsp. <i>paratuberculosis</i> 에 감염된 THP-1 cell의 scRNA-seq 분석 : C0_S40	반응을 분석한다.			
34	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 에 감염된 THP-1 cell의 scRNA-seq 분석 : C0_S81	단일세포유전체분석을 이용하여 THP-1 세포의 요네병균 감염에 대한 초기 반응을 분석한다.	2021. 12. 29	igem-0002 227	
35	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 에 감염된 THP-1 cell의 scRNA-seq 분석 : C0_S82	단일세포유전체분석을 이용하여 THP-1 세포의 요네병균 감염에 대한 초기 반응을 분석한다.	2021. 12. 29	igem-0002 228	
36	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 에 감염된 THP-1 cell의 scRNA-seq 분석 : C0_S83	단일세포유전체분석을 이용하여 THP-1 세포의 요네병균 감염에 대한 초기 반응을 분석한다.	2021. 12. 29	igem-0002 229	
37	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 에 감염된 THP-1 cell의 scRNA-seq 분석 : C0_S84	단일세포유전체분석을 이용하여 THP-1 세포의 요네병균 감염에 대한 초기 반응을 분석한다.	2021. 12. 29	igem-0002 230	
38	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 에 감염된 THP-1 cell의 scRNA-seq 분석 : T1_S41	단일세포유전체분석을 이용하여 THP-1 세포의 요네병균 감염에 대한 초기 반응을 분석한다.	2021. 12. 29	igem-0002 231	
39	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 에 감염된 THP-1 cell의 scRNA-seq 분석 : T1_S42	단일세포유전체분석을 이용하여 THP-1 세포의 요네병균 감염에 대한 초기 반응을 분석한다.	2021. 12. 29	igem-0002 232	
40	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 에 감염된 THP-1 cell의 scRNA-seq 분석 : T1_S43	단일세포유전체분석을 이용하여 THP-1 세포의 요네병균 감염에 대한 초기 반응을 분석한다.	2021. 12. 29	igem-0002 233	
41	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 에 감염된 THP-1 cell의 scRNA-seq 분석 : T1_S44	단일세포유전체분석을 이용하여 THP-1 세포의 요네병균 감염에 대한 초기 반응을 분석한다.	2021. 12. 29	igem-0002 234	
42	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 에 감염된 THP-1 cell의 scRNA-seq 분석 : T1_S85	단일세포유전체분석을 이용하여 THP-1 세포의 요네병균 감염에 대한 초기 반응을 분석한다.	2021. 12. 29	igem-0002 235	
43	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 에 감염된 THP-1 cell의 scRNA-seq 분석 : T1_S86	단일세포유전체분석을 이용하여 THP-1 세포의 요네병균 감염에 대한 초기 반응을 분석한다.	2021. 12. 29	igem-0002 236	
44	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 에 감염된 THP-1 cell의 scRNA-seq 분석 : T1_S87	단일세포유전체분석을 이용하여 THP-1 세포의 요네병균 감염에 대한 초기 반응을 분석한다.	2021. 12. 29	igem-0002 237	
45	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	단일세포유전체분석을 이용하여 THP-1 세포의 요네병균 감염에 대한 초기	2021. 12. 29	igem-0002 238	

	에 감염된 THP-1 cell의 scRNA-seq 분석 : T1_S88	반응을 분석한다.			
46	THP-1 세포에 감염된 <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 의 dual RNA-seq 분석	Dual RNA-seq 분석을 사용하여 인간 THP-1 세포와 <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 사이의 전사체 프로파일을 기반으로 하는 숙주-병원체 상호작용체 분석	2021. 12. 29	igem-0002267	

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Prevalence and molecular characteristics of 16s rRNA methylase gene rmtB in amikacin resistant <i>Escherichia coli</i> isolated from South Korea	Korean journal of veterinary research	Kuastros Mekonnen Belaynehe	59(3)	한국	대한수의학회	비SCIE	2019.09.30	2466-1384	100%
2	Genetic diversity of bovine <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> discriminated by IS1311 PCR-REA, MIRU-VNTR, and MLSSR genotyping	Journal of veterinary science	Hong-Tae Park	19(5)	한국	대한수의학회	SCIE	2018.09.01	1229-845X	100%
3	Genetic Analysis of p17S-208 Plasmid Encoding the Colistin Resistance mcr-3 Gene in <i>Escherichia coli</i> Isolated from Swine in South Korea	Microbial drug resistance : MDR : mechanisms, epidemiology, and disease	Kuastros Mekonnen Belaynehe	2018	미국	Mary Ann Liebert Inc.	SCIE	2018.10.31	1076-6294	100%
4	Gene Expression Profiles of	Journal of Bacteriology and Virology	Min-Kyoung Shin	48(4)	한국	대한미생물학회	비SCIE	2018.12.01	1598-2467	100%

	Th1-type Chemokines in Whole Blood of <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> -Infected Cattle									
5	Genetic Analysis of p17S-208 Plasmid Encoding the Colistin Resistance mcr-3 Gene in <i>Escherichia coli</i> Isolated from Swine in South Korea	Microbial Drug Resistance	Kuastros Mekonnen Belayneh	25(3)	미국	Mary Ann Liebert Inc.	SCIE	2019.04.04	1076-6294	100%
6	Comparative analysis of serological tests and fecal detection in the diagnosis of <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> infection	Korean Journal of Veterinary Research	Hong-Tae Park	60(3)	한국	대한수의학회	비SCIE	2020.09.30	2466-1384	70%
7	Induction of systemic immunity through nasal-associated lymphoid tissue (NALT) of mice intranasally immunized with <i>Brucella abortus</i> malate dehydrogenase-loaded chitosan nanoparticle	Plos One	Soojin Shim	15(2)	미국	Public Library of Science	SCIE	2020.02.06	1932-6203	100%

8	les Induction of Th2 response through TLR2-mediated MyD88-dependent pathway in human microfold cells stimulated with chitosan nanoparticles loaded with <i>Brucella abortus</i> Mdh	Microbial Pathogenesis	Soojin Shim	142	한국	Elsevier BV	SCIE	2020.02.04	0882-4010	100%
9	epithelial processed <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> induced prolonged Th17 response and suppression of phagocytic maturation in bovine peripheral blood mononuclear cells	Scientific Reports	Hong-Tae Park	(2020)10	한국	Nature Publishing Group	SCIE	2020.12.03	2045-2322	100%
10	Genome-wide Identification of DNA-protein Interaction to Reconstruct Bacterial Transcription Regulatory Network	Biotechnology and Biosciences Engineering	Joon Young Park	25(6)	한국	한국생물공학회	SCIE	2020.12.29	1226-8372	50%
11	Alpha-2-macroglobulin as a new promising biomarker improving the diagnostic sensitivity of bovine <i>paratuberculosis</i>	Frontiers in Veterinary Science	Hyun-Eui Park	8	한국	Frontiers Media S.A.	SCIE	2021.03.05	2297-1769	50%

	culosis									
12	Biomarkers as diagnostic tools for mycobacterial infections in cattle	ANIMAL HEALTH RESEARCH REVIEWS	Hyun-Eui Park	22(1)	미국	CABI Publishing	SCIE	2021.06.01	1466-2523	100%
13	Identification of Nontuberculous Mycobacteria in Patients with Pulmonary Diseases in Gyeongnam, Korea, Using Multiplex PCR and Multigene Sequence-Based Analysis	CANADIAN JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES & MEDICAL MICROBIOLOGY	Min-Jeong Kim	2021()	캐나다	Pulsus Group Inc.	SCIE	2021.02.22	1712-9532	50%
14	Genomic diversity of <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> : pangenomic approach for highlighting unique genomic features with newly constructed complete genomes	VETERINARY RESEARCH	Jaewon Lim	52(1)	프랑스	BioMed Central	SCIE	2021.03.18	0928-4249	100%
15	Revealing immune responses in the <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> -infected THP-1 cells using single cell RNA-sequencing	PLOS ONE	Hong-Tae Park	16(7)	미국	Public Library of Science	SCIE	2021.07.02	1932-6203	50%
16	MicroRNA profiling in bovine serum according to the stage of	PLOS ONE	Sung-Won Choi	16(11)	미국	Public Library of Science	SCIE	2021.11.04	1932-6203	100%

<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> infection									
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	99th Conference of Research Workers in Animal Diseases	Suji Kim	2018.12.02	Chicago, USA	미국
2	2019 대한수의학회 춘계국제학술대회	Hong-Tae Park	2019.04.25	건국대학교 새천년관	한국
3	8th Congress of European Microbiologists	Han Sang Yoo	2019.07.08	Glasgow, UK	영국
4	8th Congress of European microbiologists	Hong-Tae Park	2019.07.08	Glasgow, UK	영국
5	2019 한국생물공학회 추계학술대회	Jaewon LIM	2019.10.11	대구 엑스코	한국
6	100th Conference of Research Workers in Animal Diseases	Han Sang Yoo	2019.11.04	Chicago, USA	미국
7	2020 한국생물공학회 추계학술발표대회 및 국제심포지엄	Jaewon Lim	2020.06.25	e-Conference	한국
8	한국미생물학회	Han Sang Yoo	2020.10.07	e-Conference	한국
9	2020 대한수의학회 추계학술대회	Hong-Tae Park	2020.11.19	강원 홍천군 소노벨 비발디파크	한국
10	2020 대한수의학회 추계학술대회	Sung-Woon Choi	2020.11.19	강원 홍천군 소노벨 비발디파크	한국
11	101th Conference of Research Workers in Animal Diseases	Hong-Tae Park	2020.12.05	e-Conference	미국
12	101th Conference of Research Workers in Animal Diseases	Soojin Shim	2020.12.05	e-Conference	미국
13	World Microbe Forum (An ASM & FEMS collaboration)	Hong-Tae Park	2021.06.20	e-Conference	미국
14	2021 대한수의학회 추계학술대회	Sung-Woon Choi	2021.10.28	군산새만금컨벤션센터	한국
15	대한 감염학회 ICIC 2021	Hong-Tae Park	2021.11.04	Virtual Conference	한국
16	102th Conference of Research Workers in Animal Diseases	Sung-Woon Choi	2021.12.03	e-Conference	미국
17	102th Conference of Research Workers in Animal Diseases	Hong-Tae Park	2021.12.03	e-Conference	미국

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	요네병균의 서브타입 판별용 바이오마커 및 이의 용도	한국	울산과학 기술원 외 1명	2020. 09. 10	10-2020 -011588 7	"	특허법인(유한)아이 시스	2020. 09. 10	1-1-202 0-09594 15-43	1/1	
2	알파-2-마크로글로불린 을 유효성분으로 포함하는 요네병 진단용 바이오마커 조성물 내지 이의 용도	한국	서울대학 교 산학협력 단 외 1명	2021. 06. 11	10-2021 -007589 0	"	특허법인 이룸리온	2021. 06. 11	1-1-202 1-06748 30-61	1/1	

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1		√					√			
2	√			√						

[사회적 성과]

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용
1	제안	소 요네병 최소화를 위한 진단법 개선	농림축산식품부	2021. 07. 02	<ul style="list-style-type: none"> ○ 농장의 요네병 검사 기준 변경 - 검사주기 및 검사방법 1. 검사대상 <ul style="list-style-type: none"> - 현행 <ul style="list-style-type: none"> ○ 고연령우, 의심증상 우 중심 ○ 육종농가의 종모우 <ul style="list-style-type: none"> - 개선 <ul style="list-style-type: none"> ○ 12개월령 개체 ○ 3-5세 중 의심증상 우 ○ 의심증상우의 동거 우 ○ 육종농가의 종모우 <ul style="list-style-type: none"> 2. 검사방법 <ul style="list-style-type: none"> - 현행 <ul style="list-style-type: none"> ○ 혈청학적 검사 (ELISA) <ul style="list-style-type: none"> - 개선 <ul style="list-style-type: none"> ○ 12개월령 개체 : 분 변검사 (PCR) ○ 의심증상우 : 혈청 학적 검사 및 분변검 사 ○ 의심증상우의 동거 우 : 혈청학적 검사 및 분변검사 3. 검사주기 <ul style="list-style-type: none"> - 현행 <ul style="list-style-type: none"> ○ 병성감정으로 의뢰 된 경우 ○ 육종농가의 종모우 <ul style="list-style-type: none"> - 개선 <ul style="list-style-type: none"> ○ 양성농장의 경우 2 년 주기로 검사 ○ 육종농가의 경우 모 든 사육 개체
2	제안	소 요네병 병원성인자 발현 기전 규명 및 통합관리 체계 개발	농림축산식품부	2021. 12. 22	<ul style="list-style-type: none"> ○ 병원성유전자의 숙 주내 발현양상규명, 병원형성 및 숙주면역 학적 반응규명 ○ 바이오마커를 이용

					한 소 요네병 잠복기 개체 진단기법 개발 및 평가 ○ 마이크로비옴 분석 및 유용미생물을 활용한 한 소 요네병균의 성장 또는 병원성인자 발현 억제제 발굴 ○ 빅데이터, 차세대통신망등을 활용한 소 요네병 통합관리프로그램 개발
--	--	--	--	--	---

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	의약보건 학계열	2018	1	1			1	1					
2	의약보건 학계열	2019	2					2					
3	의약보건 학계열	2020	1	2				3					
4	공학계열	2021		1			1						
5	의약보건 학계열	2022	1	1			1	1					

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	중앙전문지	데일리벳	[2018 실습후기 공모전] 서울대 전염병학실 / 서울대 이강혁	2018.11.28
2	외국홍보	University of Veterinary Medicine Budapest	Another important milestone was reached in the field of international relations and research	2019.07.17
3	월간잡지	월간 낙농.육우	소 요네병 세계적 발생동향 및 예방기법 개발 노력	2019.08.01
4	월간잡지	월간 낙농.육우	절실히 필요한 대동물(소) 임상 수의사!	2020.03.01
5	월간잡지	월간한우	요네병 관리 방안	2021.06.01
6	중앙전문지	축산신문	경제적 피해 막대 '소 요네병' 근절 새 장 열려	2021.12.03

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○소 요네병원인균인 <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) 의 유전자원 발굴	○ MAP 국내분리주 확보를 통한 국내 유전자원 확보, 국내분리주 5주에 대한 전장유전체 분석 및 데이터베이스 (DB)구축 및 Pan-genome 분석을 통한 국내 분리주의 유전적 특성 분석 및 신규유전자 발굴 ; 현재 까지 전 세계적으로 보고된 <i>M. avium</i> 의 전장유전체 와 비교 분석	100
○ In vitro 감염모델을 활용한 병원체-숙주 작용체 (Interactome)분석	○ Co-culture system 구축을 통한 MAP 감염 모델 확립 및 MAP 감염에 따른 작용체(interactome) 분석	100
○ 유전체 발현양상을 통한 병원성 유전자의 전사기작 규명	○ 병원체 (MAP) 및 숙주의 대용량 기능 유전체 분석을 통한 유전자 기능 및 network 분석	100
○ 중요 신규 병원성인자 발굴	○ MAP 감염에 따른 microenvironment 에서의 발병기전 규명	100

○ In vivo에서 MAP 감염동물 준임상형 및 감염단계별 특성분석	○ 모델동물에서 잠복감염 및 감염단계별 특이 발현유전자, 물질 및 면역병리학적 특성 규명 및 목적동물(자연감염우)에서 준임상형 및 임상단계별 병원체 및 숙주의 발현양성분석	100
○ MAP 감염초기 잠복감염개체 검출 진단기법 개발 및 백신후보물질 발굴	○ MAP 감염단계별 특이 발현 물질을 이용한 진단기법 개발 ; 소 혈청내에서 특이적으로 발현이 증가되는 물질 발굴, 감염단계별 microRNA 발현차이의 분석을 통한 진단기법 개발 및 병원성 유전자 결손 변이주 제작 및 변이주의 특성 분석	100

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 소 요네병은 만성, 소모성 질병으로 감염초기의 잠복감염개체인 준임상형 감염개체의 검출이 매우 중요함.
- 본 연구결과는 준임상형감염개체를 효율적으로 검출할수 있는 진단기법을 개발하였으며, 이 진단법을 야외적용시에 준임상형감염개체의 효율적인 검출로 소 요네병의 확산을 조기에 차단하여 양축농가의 소득증가뿐만아니라, 인체감염가능성을 감소시킴으로서 공중보건학적인 측면에도 크게 기여할수 있음.
- 소 요네병원인균 국내분리주의 유전적 특성분석으로, 소 요네병에 대한 국내 방역대책수립과 해외 유입시 추적원발굴을 위한 기초자료로 활용할수 있음.
- 본 연구에서 개발된 in vitro 실험모델을 활용하여 다른 장내감염성 질병의 발병기전을 할수 있으며, 이러한 연구를 통해서 가축전염병에 대한 새로운 방역대책을 수립하여 축산농가의 소득증대와 안전한 동물성단백질식품생산으로 국민보건 및 건강에 기여할수 있음.
- 본 연구에서 사용한 유전체, 전사체, 단백질체분석기법을 타 질병연구에 적용할수있음.
- 본 연구결과 규명한 소 요네병의 감염기전 및 숙주면역기전은 향후 소 요네병등 만성, 소모성 장내 감염병의 연구, 진단법개발 및 예방대책개발에 기초자료로 활용할수 있음.
- 본 연구결과는 소 요네병방제를 위한 국가 방역정책의 기초자료로 활용할수 있음.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 본 연구과제의 연구결과는 소 요네병에 대한 연구가 지속적으로 이루어질수 있도록 본 연구실과 관련 연구기관, 국가기관등과 상호협력하여 추후 연구를 위한 기초자료로 활용 및 현장 적용을 위한 연구를 지속적으로 실시하고자 함.
- 소 요네병의 발병기전등에 관한 기초자료 및 in vitro 실험모델등은 사람의 크론병연구를 위한 기초자료로 활용할수 하고자 함.
- MAP 감염을 조기차단할 수 있는 진단법 및 감염예방을 위한 면역활성물질 개발을 위한 기초자료로 활용하고자함.
- 마이코박테리움처럼 배양이 까다로운 균주들의 배양기법을 유사한 다른 병원체 및 질병연구에 활용하고자 함.

※ 참고문헌

1. Stabel JR. 1998. Johne's Disease: A Hidden Threat. J. Dairy Sci 81: 283–288.
2. Garcia AB, Shalloo L. 2015. Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. J Dairy Sci. 98(8):5019–39.
3. Tiwari A, VanLeeuwen JA, McKenna SL, et al. 2006. Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. Can Vet J 47: 874–882.
4. Groenendaal H, Galligan DT. 2003. Economic consequences of control programs for paratuberculosis in midsize dairy farms in the United States. J Am Vet Med Assoc. 223(12):1757–63.
5. Khol JL, Baumgartner W. 2012. Examples and suggestions for the control of paratuberculosis in European cattle. Jpn J Vet Res. 60 Suppl:S1–7.
6. Choi, C.S. Cha, Y.H. Mun, J.B. 1968. Studies on Johne's disease. II. Studies on the comparison of intradermal test with complement fixation test for diagnosis of Johne's disease. Res. Rep. RDA, 11(5) pp. 35–45
7. Kim, J.M. Ahn, J.S. Woo, S.R, et al. 1994. A survey of paratuberculosis by immunological methods in dairy and Korean native cattle. Korean J. Vet. Res., 34 pp. 93–97
8. Pak, S.I. Kim D., Salman M. 2003. Estimation of paratuberculosis prevalence in dairy cattle in a province of Korea using an enzyme-linked immunosorbent assay: application of Bayesian approach. J. Vet. Sci., 4(1), pp. 51–56
9. Lee K.W., Jung B.Y. 2009. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle in Korea. Vet. Rec., 165 pp. 661–662
10. Yokomizo, Y. 2001a. Epidemiological study for cleanup of bovine paratuberculosis (in Japanese). J. Vet. Epidemiol. 5:1–13.
11. Yokomizo, Y. 2001b. Current prevalence of paratuberculosis and control (in Japanese). J. Clin. Vet. Med. 19:18–26.
12. Statics on Animal Hygiene, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tokyo, Japan, 2014
13. Momotani E. 2012. Epidemiological situation and control strategies for paratuberculosis in Japan. Jpn J Vet Res. 60 Suppl:S19–29.
14. USDA. 1997. Johne's Disease on U.S Dairy Operations. Fort Collins: USDA-APHIS-VS-CEAH. #N245.1097.
15. USDA. 2009. Johne's Disease on U.S Dairy Operations. Fort Collins: USDA-APHIS-VS-CEAH. #N521.0408.
16. Dargatz DA, Byrum BA, Hennager SG, et al. 2001. Prevalence of antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* among beef cow-calf herds. J Am Vet Med Assoc. 219(4):497–501.
17. Carter MA. 2012. Prevalence and prevention of paratuberculosis in North America. Jpn J Vet Res. 60 Suppl:S9–18.
18. Ott SL, Wells SJ, Wagner BA. 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. Prev Vet Med. 40(3–4):179–92.

19. Whipple D. 1993. National paratuberculosis certification program. In *Proceedings of the 97th Annual Meeting of the US Animal Health Association*. Cummings Corporation and Carter Printing Co., Richmond, Virginia, pp. 311–316.
20. Kovich DA, Wells SJ, Friendshuh K. 2006. Evaluation of the Voluntary Johne's Disease Herd Status Program as a source of replacement cattle. *J Dairy Sci.* 89(9):3466–70.
21. USDA. 1998. Part III: Reference of 1997 Beef Cow–Calf Production Management and Disease Control. Fort Collins: USDA–APHIS–VS–CEAH. #N247.198
22. USDA. 2009. Beef 2007–08, Part II: Reference of Beef Cow–calf Management Practices in the United States, 2007–08 USDA:APHIS: VS, CEAH. Fort Collins, Co. #N512.0209.
23. USDA. 2008. Johne's Disease on U.S Dairies, 1991–2007. Fort Collins: USDA–APHIS–VS–CEAH. #N521.0408.
24. Wells SJ, Hartmann WL, Anderson PL. 2008. Evaluation of progress made by dairy and beef herds enrolled in the Minnesota Johne's Disease Control Program. *J Am Vet Med Assoc.* 233(12):1920–6.
25. Sockett DC. 1996. Johne's disease eradication and control: regulatory implications. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 12(2):431–40.
26. NYSOSC. 2005. Report by the New York State Office of the State Comptroller: Department of Agriculture and Markets: New York State Cattle Health Assurance Program. 2004–S–25; July 7
27. Bulaga LL. 1999. Minimum recommendations for administering and instituting state Voluntary Johne's Disease Control Programs. In: *United States Animals Health Association Proceedings: Report of the 103rd Annual Meeting of the United States Animal Health Association*. Minneapolis. p. 336–355.
28. USDA. 2010. Uniform Program Standards for the Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program. Riverdale: USDA–APHIS. #91–45–016.
29. Kennedy DJ, Allworth MB. 2000. Progress in national control and assurance programs for bovine Johne's disease in Australia. *Vet Microbiol.* 77(3–4):443–51.
30. Milner A, Wood P. 1989. Johne's disease: current trends in research, diagnosis and management In: GillIJ (ed), *The economic impact of Johne's disease in cattle in Australia*. 1sted, pp.36–40, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Melbourne.
31. Rogers J, Nosworthy P, Gilbert F. 2012. An industry and government cooperative approach to managing Bovine Johne's Disease in the dairy industry in South Australia. In: *Proc. 3rd ParaTB Forum*, pp. 63–66.
32. Ridge SE, Heuer C, Cogger N, et al. 2010. Herd management practices and the transmission of Johne's disease within infected dairy herds in Victoria, Australia. *rev Vet Med.* 95(3–4):186–97.
33. Jubb TF, Galvin JW., 2004. Effect of a test and control program for bovine Johne's disease in Victorian dairy herds 1992 – 2002. *Aust Vet J.* 82(4):228–32.
34. Geraghty T, Graham DA, Mallowney P, et al. 2014. A review of bovine Johne's disease control activities in 6 endemically infected countries. *Prev Vet Med.*

- 116(1-2):1-11.
35. Holmström A, Kyhlstedt U, Robertsson JA, et al. 2003. Control of paratuberculosis in Sweden. *Acta Vet Scand.* 44(3-4):285-6.
 36. Sternberg S, Viske D. 2003. Control strategies for paratuberculosis in Sweden. *Acta Vet Scand.* 2003;44(3-4):247-9.
 37. Surveillance of infectious diseases in animals and humans in Sweden, <http://www.sva.se/>
 38. Frössling J, Wahlström H, Agren EC, et al. 2013. Surveillance system sensitivities and probability of freedom from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in Swedish cattle. *Prev Vet Med.* 108(1):47-62.
 39. Benedictus G, Verhoeff J, Schukken YH, et al. 2000. Dutch Paratuberculosis programme history, principles and development. *Vet Microbiol* 77,399-413.
 40. Nielsen SS, Toft N. 2009. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet..Med.* 88:1-14.
 41. Hofman, J., Zandstra, P. 1995. Door boerenhand een gezond veebestand. Stichting Gezondheidsdienst voor Dieren in Noord, Drachten, Nederland.
 42. Benedictus G., 1984. Evaluation of organized control of bovine paratuberculosis in Friesland province, the Netherlands. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 109, pp. 905-916
 43. Dijkhuizen AA, Schaik GV, Huirne RBM, et al. 1994. A cost-benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. *Kenya Vet.*, 18, pp. 219-221
 44. Bakker, D. 2010. Paratuberculosis control measures in Europe. In: *Paratuberculosis Organism, Disease, Control*, 1st ed., pp. 306-318, Behr, M. A. and Collins, D. M. eds., Wallingford: CAB International.
 45. Wood, P.R., Kopsidas, K., Milner, A.R., Hill, J., Gill, I., Webb, R., Mack, W.N., Coates, K., 1989. The development of an in vitro cellular assay for Johne's disease in cattle. In: Milner, A.R., Wood, P.R. (Eds.), *Johne's Disease. Current Trends in Research, Diagnosis and Management.* CSIRO, Melbourne, Australia, pp. 164-167.
 46. Jungersen et al., 2002 G.Jungersen,A.Huda,J.J.Hansen,P.Lind Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*,9(2002), pp.453-460
 47. P.L.Dudemaine,G.Fecteau,M.Lessard,O.Labrecque,J.P.Roy,N.Bissonnette.2014. Increased blood-circulating interferon-gamma, interleukin-17, and osteopontin levels in bovine paratuberculosis. *J Dairy Sci* 97(6), 3382-3393.
 48. Coussens, P. M., C. B. Pudrith, K. Skovgaard, X. Ren, S. P. Suchyta, J. R. Stabel, and P. M. Heegaard. 2005. Johne's disease in cattle is associated with enhanced expression of genes encoding IL-5, GATA-3, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2, and factors promoting apoptosis in peripheral blood mononuclear cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*105:221-23.
 49. K. Skovgaard, S.N. Grell, P.M. Heegaard, G. Jungersen, C.B. Pudrith, P.M. Coussens. 2006. Differential expression of genes encoding CD30L and P-selectin in cattle with Johne's disease: progress toward a diagnostic gene expression signature *Vet Immunol Immunopathol*, 112, pp. 210-224
 50. B.J. Marfell, R. O'Brien, J.F. Griffin. 2013. Global gene expression profiling of

monocyte-derived macrophages from red deer (*Cervus elaphus*) genotypically resistant or susceptible to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. Dev Comp Immunol, 40. 210–217

51. Hur, Y. G. et al. 2014. Identification of immunological biomarkers which may differentiate latent tuberculosis from exposure to environmental nontuberculous mycobacteria in children. Clin Vaccine Immunol, 21, 133–142.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈다부처유전체사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈다부처유전체사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.