

918012-4

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( )발간등록번호( O )  
포스트게놈 다부처 유전체사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004026-01

# 농식품 유용 미생물의 다중오믹스 기반 유용 유전자원 발굴 및 가치제고화 기술 개발

2022.03.24

주관연구기관 / 연세대학교

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

농식품 유용 미생물의 다중오믹스  
가치제고화 기술 개발 및  
2021

농림식품기술기획평가원  
농림축산식품부

최종보고서						보안등급		
						일반[ ], 보안[ ]		
중앙행정기관명			사업명	사업명		포스트게놈 다부처 유전체사업		
전문기관명 (해당 시 작성)				내역사업명 (해당 시 작성)				
공고번호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		연구개발과제번호		918012-4	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	식물미생물 생리/유전 LB0302	20 %	식품 미생물학 LB1702	15 %	시스템 생물학 LA0705	15 %	
	농림식품과학기술분류	식품미생물·발효 PA0102	30 %	식물 미생물 생리·독성 RA0302	30 %	수의미생물·기생생물 RB0104	40 %	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문						
		영문						
연구개발과제명		국문	농식품 유용 미생물의 다중오믹스 기반 유용 유전자원 발굴 및 가치제고화 기술 개발					
		영문	Multi-omics based gene function network analysis of food and agricultural microorganisms					
주관연구개발기관		기관명	연세대학교 산학협력단	사업자등록번호	110-82-10500			
		주소	(우)	법인등록번호				
연구책임자		성명	반용선	직위	교수			
		연락처	직장전화		휴대전화			
			전자우편		국가연구자번호	10158770		
연구개발기간		전체	2018. 04. 25 - 2021. 12. 31 (3년 9개월)					
		단계 (해당 시 작성)	1단계	YYYY. MM. DD - YYYY. MM. DD( 년 개월)				
			n단계	YYYY. MM. DD - YYYY. MM. DD( 년 개월)				
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비	그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체 기타( )		합계		연구개발비 외 지원금
		현금	현금 현물	현금 현물	현금 현물	현금 현물	합계	
총계		1,905,500				1,905,500	1,905,500	
1단계	1년차	375,000				375,000	375,000	
	2년차	500,000				500,000	500,000	
1단계	3년차	514,000				514,000	514,000	
	4년차	516,500				516,500	516,500	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고	
공동연구개발기관		연세대학교 산학협력단	이동우	부교수			공동	대학
		연세대학교 산학협력단	조현수	교수			공동	대학
위탁연구개발기관		서울대학교 산학협력단	손호경	조교수			위탁	대학
		건국대학교 산학협력단	윤성호	부교수			위탁	대학
연구개발기관 외 기관								
연구개발담당자 실무담당자		성명	장유병		직위		대학원생	
		연락처	직장전화	02-2123-7299		휴대전화		
			전자우편			국가연구자번호		11885682

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

2022 년 2 월 8 일

연구책임자: 반 용 선

주관연구개발기관의 장: 연세대학교 산학협단장 (직인)  
공동연구개발기관의 장: 연세대학교 산학협단장 (직인)  
위탁연구개발기관의 장: 서울대학교 산학협단장 (직인)  
위탁연구개발기관의 장: 건국대학교 산학협단장 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “농식품 유용 미생물의 다중오믹스 기반 유용 유전자원 발굴 및 가치제고화 기술 개발”(개발기간 : 2018. 04. 25. ~ 2021. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.03.24

주관연구기관명 : 연세대학교 산학협력단 (대표자) 김지현 (인)



주관연구책임자 : 반 용 선

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

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	포스트게놈 다부처 유전체사업		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)				
내역사업명 (해당 시 작성)			연구개발과제번호	918012-4			
기술분류	국가과학기술 표준분류	식품미생물 생리/유전 LB0302	20 %	식품 미생물학 LB1702	15 %	시스템 생물학 LA0705	15%
	농림식품 과학기술분류	식품미생물·발효 PA0102	30 %	식품 미생물 생리·독성 RA0302	30 %	수의미생물·기생생물 RB0104	40%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명	농식품 유용 미생물의 다중오믹스 기반 유용 유전자원 발굴 및 가치제고화 기술 개발						
전체 연구개발기간	2018. 04. 25 - 2021. 12. 31 (3년 9개월)						
총 연구개발비	총 1,905,500 천원 (정부지원연구개발비: 1905,500천원, 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)							

	최종 목표	<p>본 연구는 전 단계 미생물유전체전략연구사업의 연구를 통해 구축한 대용량 기능유전체 진균 변이군주 라이브러리와 전장유전체 분석을 통해 선별된 농·식품 유용 미생물(세균 및 진균)을 대상으로 <b>다중오믹스(유전체, 전사체, 단백질 및 표현형질체)분석을 통한 통합적인 유전자 기능 네트워크 맵 규명 및 제어기술</b>을 개발하고자 함. 이를 통해 농·식품 유용미생물 유래의 <b>유용 유전자원 발굴 및 가치제고화</b>는 물론 <b>도출될 DB, 다중오믹스 분석 인프라, 가치제고화 플랫폼 기술</b>을 사업단내 타과제팀의 사업화/실용화 조기성과팀에 <b>공유 및 지원</b>하여 <b>본 사업단의 연구역량강화에 기여</b>하고자 함.</p>
연구개발 목표 및 내용	전체 내용	<p>상기 연구개발의 최종목표를 달성하기 위해 본 연구팀은 총 3개의 세부과제와 2개의 위탁과제를 구성하여 아래와 같이 과제별 연구 목표 및 내용을 수행할 예정임.</p> <div style="text-align: center;"> </div>

	<p>□ 제 1 세부 (단위) - 다중오믹스 분석 기반 동·식물 진균 유용유전자 기능 통합 네트워크 맵 구축 및 유용 유전자원 발굴</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1단계 연구를 통해 구축한 동·식물 유용 진균 모델의 주요 신호전달인자 기능유전체 라이브러리를 활용한 다중오믹스 분석기반 통합적 신호전달 네트워크 규명</li> <li>• 통합된 신호전달 네트워크의 주요 동·식물 진균으로의 확대 적용 및 제어기술 개발</li> <li>• 농축산식품 분야 활용 가능 유용 진균 유전자원 발굴 및 관련 소재 개발</li> </ul> <p>□ 제 2 세부 - 농·식품 유용 세균의 다중오믹스 분석 기반 유전자 기능 네트워크 분석 및 유용 유전자원 발굴</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1단계에서 확보한 농·식품 유용 세균의 전장유전체 정보를 활용한 다중오믹스 분석을 통한 적응진화기작 규명 및 관련 유용 유전자원 발굴</li> <li>• 농·식품 유용유전자원 탐색 및 개량을 위한 다중오믹스 분석 및 대사회 재설계를 통한 초고속 스크리닝 플랫폼 기술개발</li> <li>• 농·식품 유용 미생물의 다중오믹스 DB기반 유전자 조절 네트워크 분석을 통한 산업적 유용 유전자원 발굴</li> </ul> <p>□ 제 3 세부 - 다중오믹스 플랫폼 기반 농·식품 유용 유전자원의 산업적 가치제고화</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1단계 사업을 통해 발굴한 항진균제 표적 단백질의 구조 규명을 통한 동·식물 병원성 진균제어 기술 개발</li> <li>• 농·식품 유용 세균의 다중오믹스 분석을 통해 발굴된 유용 단백질의 구조규명</li> <li>• 다중오믹스 플랫폼 기술을 통한 사업단 내 타 과제에서 발굴된 유용 유전자원의 가치제고화 및 원천기술 제공</li> </ul>	
	1단계 (해당 시 작성)	<p>목표</p> <p>내용</p>
	n단계 (해당 시 작성)	<p>목표</p> <p>내용</p>

연구개발성과	<p>○ (유전체정보생산) 다중오믹스 분석을 통한 유용유전자원 발굴 32건</p> <p>○ 미생물 병 발생기작 규명 5건</p> <p>○ (유전체정보등록) NABIC 등록 7건</p> <p>○ (학술) SCI급 논문 36편</p> <p>○ (지적재산권) 특허출원 14건, 특허등록 5건</p> <p>○ 학술발표 212건, 교육지도 8건, 기술이전 1건, 인력양성 12건, 홍보전시 7건</p>
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<p>○ 경제적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 미생물 유전체 정보 및 다중오믹스 기술을 활용한 농·식품 유용 미생물의 기능유전체학 기반 정보인프라 구축은 국내 농·식품산업체 및 중소 바이오기업의 사업 경쟁력 강화의 기반 요소 기술 확보는 물론 글로벌 경쟁력을 지닌 빅데이터로써 잠재적인 상업적 가치를 지님.</li> <li>• 도출된 농·식품 미생물 유래 유용유전자원의 신규한 기능성 발굴 및 고부가가치화 기술은 외국에 의존한 기존 농·식품 상용화 기술의 수입대체효과는 물론, 미래 농·식품 빅데이터기반 신규시장창출이 가능할 것으로 기대됨.</li> </ul> <p>○ 과학기술적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 유전체, 전사체, 단백질체 및 표현형질체 등의 다중오믹스 분석 플랫폼기술의 개</li> </ul>

	<p>발 및 DB구축을 통한 농·식품 유용 미생물의 빅데이터 제공은 농·식품 분야에서의 최첨단 융복합 기술사례임.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>다중오믹스 분석기반 통합적 신호전달 네트워크 규명, 우수 형질 유전자군 발굴, 발현 제어, 신속하고 효율적인 유전체 편집기술, 유전체기반 발효공정 최적화, 세포성장기반 초고속 유전자원 분자진화기술은 국내 첨단 농·식품생명공학 기술의 대표적인 성과가 될 것임</li> </ul> <p>○ 사회적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>농·식품 유용 미생물 및 이들 유래의 소재에 대한 고품질 유전체 DB 및 다중오믹스 기반 유전자 기능 네트워크 분석 시스템을 확립하여 첨단 바이오기술을 이용한 상업화 전략은 물론 표준화된 검증체계를 마련하기 위한 기초 자료를 제공</li> <li>농·식품 유용 미생물 자원화 및 체계화를 통해 농·식품용 바이오 소재의 신속한 탐색 및 고부가가치화를 위한 기반기술을 제공하여 혁신적인 농·식품 소재의 첨단화, 고급화 및 다양화를 통한 농업생명과학분야는 물론 국내 농·식품 산업의 고도화, 가속화 및 활성화에 기여</li> </ul>
--	---

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
	36	19						45				
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)	농·식품 유용 미생물		다중오믹스		기능유전체		유전자 기능 네트워크		유용 유전자원			
영문핵심어 (5개 이내)	Microorganism useful for agriculture and food		Multi-omics		Functional-genomics		Gene functional network		Useful genetic resources			

## 〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요.....	8
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용.....	33
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도.....	115
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성).....	154
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도.....	155
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획.....	157
별첨 자료 (참고 문헌 등).....	160



# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발의 개요

### 가. 연구개발 목적

- 본 연구는 농·식품 유용 세균 및 진균 미생물을 대상으로 유전체, 전사체, 단백질체 및 표현형질체 분석을 아우르는 다중오믹스 분석을 통한 통합적 유전자 기능 네트워크 맵 규명 및 제어기술 개발을 통해 농·식품산업분야에 지속적으로 적용가능한 유용 유전자원 발굴을 최종목표로 함.
- 세부적으로 1단계 미생물유전체전략연구사업의 선행연구를 통해 구축한 대용량 기능유전체 진균 변이균주 라이브러리와 전장유전체 분석을 통해 선별된 농·식품 유용세균에 대한 통합적 다중오믹스 분석을 통한 유용 유전자원 발굴과 기능 네트워크 맵을 구축함. 이와 함께 농·식품 유용 미생물의 다중오믹스 DB, 분석 인프라 및 가치제고화 플랫폼 기술을 공유 및 지원하여 사업단내 사업화/실용화 조기성과 창출 기술을 지원하는 것을 목표로 함 (그림 1).

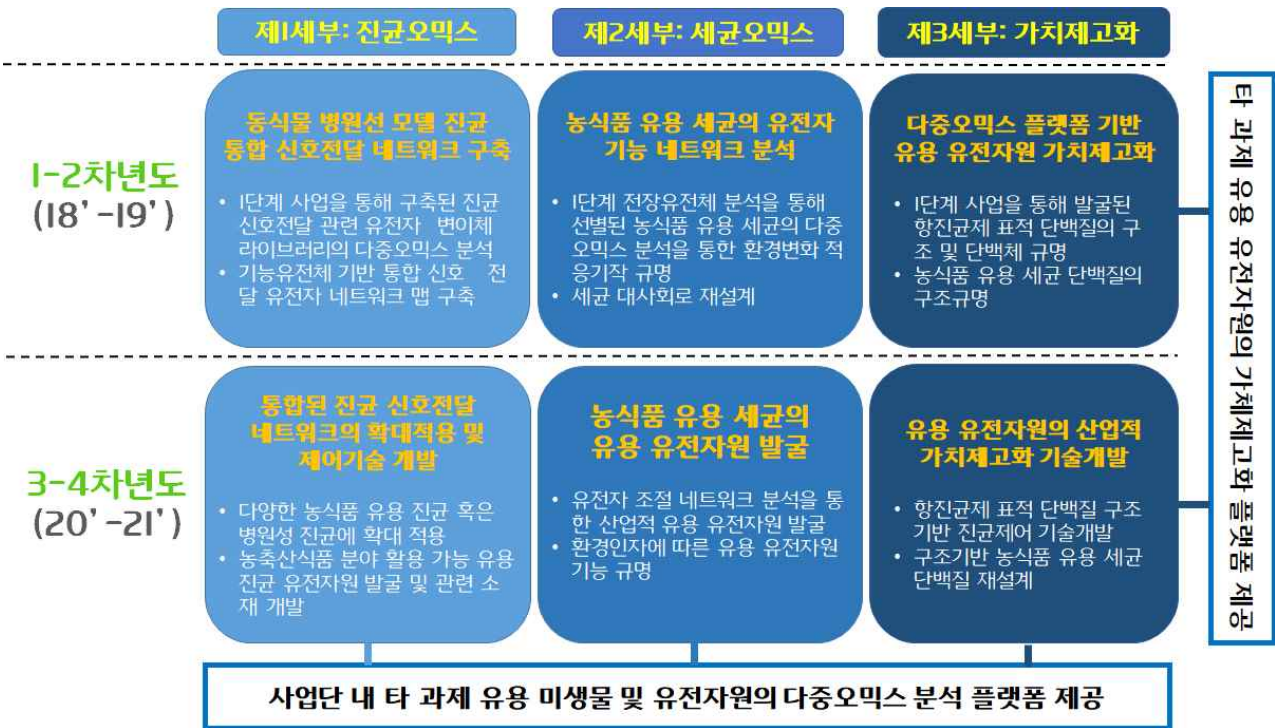


그림 1. 본 연구개발팀의 최종목표

○ 상기 연구개발의 최종목표를 달성하기 위해 본 연구팀은 총 3개의 세부과제를 구성하였고, 다음과 같은 세부 연구 목표 및 내용을 제시함.

○ 제 1 세부 (단위) - 다중오믹스 분석 기반 동·식물 진균 유전자 기능 통합 네트워크 맵 구축 및 유용 유전자원 발굴

: 농·축산·식품 유용 주요 동·식물 모델 진균의 다중오믹스 분석을 통한 통합 신호전달네트워크 구축 및 유용유전자원 발굴(제 1 위탁연구 포함)

[주요 연구내용]

- 1단계 연구를 통해 구축한 동·식물 유용 진균 모델의 주요 신호전달인자 기능유전체 라이브러리를 활용한 다중오믹스 분석기반 통합적 신호전달 네트워크 규명
- 통합된 신호전달 네트워크의 주요 동·식물 진균으로의 확대 적용 및 제어기술 개발
- 농축산식품 분야 활용 가능 유용 진균 유전자원 발굴 및 관련 소재 개발

◎ 제 2 세부 - 농·식품 유용 세균의 다중오믹스 분석 기반 유전자 기능 네트워크 분석 및 유용 유전자원 발굴

: 농·축산·식품 유용 유전자원 생산균주의 다중오믹스 분석 기반 대사회로 재설계를 통하여 유용유전자원 탐색, 개량 및 대량생산 플랫폼 기술을 개발(제 2 위탁연구 포함)

[주요 연구내용]

- 1단계에서 확보한 농·식품 유용 세균의 전장유전체 정보를 활용한 다중오믹스 분석을 통한 환경인자에 따른 적응기작 규명 및 관련 유용 유전자원 발굴
- 농·식품 유용유전자원 탐색 및 개량을 위한 다중오믹스 분석 및 대사회로 재설계를 통한 초고속 스크리닝 플랫폼 기술개발
- 농·식품 유용 미생물의 다중오믹스 DB기반 유전자 조절 네트워크 분석을 통한 산업적 유용 유전자원 발굴

◎ 제 3 세부 - 다중오믹스 플랫폼 기반 농·식품 유용 유전자원의 산업적 가치제고화

: 농·축산·식품 유용 유전자원 단백질체 구조 분석 기반 산업적 가치제고화를 위한 활성 억제 및 증진 돌연변이체 개발 및 구조 플랫폼 제공

[주요 연구내용]

- 1단계 사업을 통해 발굴한 항진균제 표적 단백질의 구조 규명을 통한 동·식물 병원성 진균제어 기술 개발
- 농·식품 유용 세균의 다중오믹스 분석을 통해 발굴된 유용 단백질의 구조규명
- 다중오믹스 플랫폼 기술을 통한 사업단 내 타 과제에서 발굴된 유용 유전자원의 가치제고화 및 원천기술 제공

◎ 공통 연구내용 적용목표

- 사업단 내 타 과제에 대한 다중오믹스 및 유전체 네트워크 분석 플랫폼 제공
- 사업단 내 타 과제에 대한 유용 미생물 및 유전자원 가치고도화 플랫폼 제공

나. 연구개발의 추진배경 및 필요성

(1) 추진 배경

□ 바이오 신기술은 타 분야 기술들과 융합을 지속하여 2030년경 세계 경제에 대규모 변화를 가져오는 바이오경제시대로 진입할 것으로 전망[OECD, 2009]

○ 바이오기술은 21C 인류가 직면한 보건, 식량, 에너지, 환경문제의 4대 문제를 해결하는데 핵심적인 역할을 할 것으로 기대

- 지구온난화 등 환경 문제가 심각하게 대두되면서 녹색산업인 농업의 가치가 재조명받는 4차 농업혁명의 시대가 올 것으로 예상[농진청 2012 「농업생명공학이야기」]
- 글로벌 화학 기업들이 바이오분야를 개척하는 이유는 바이오기반 작물보호제 시장이 화학기반 작물보호제 시장보다 급격히 성장하기 때문으로, 화학기반 작물보호제의 시장 성장률(CAGR)이 3% 인데 비해 바이오기반 제품은 16%를 보임[Cropnosis 2011 Agrochemical products database).

□ 미생물은 바이오경제를 지원하는 미래 바이오산업의 핵심소재

- 미생물은 바이오 분야의 발전과 혁신을 위한 필수적인 연구소재이며 질병, 에너지, 환경, 농업, 식량 등 인류난제 해결은 물론 고부가가치 경제적 이윤을 창출할 수 있는 핵심생물소재
  - 미생물생명공학기술은 미래 대체에너지, 환경 복원, 식량 위기, 질병 극복 등 인류가 당면한 문제들을 해결할 수 있는 핵심열쇠임[미국 국가정보위원회 「글로벌트렌드 2025」].
  - 생물다양성협약 등 국제협약의 발효로 세계 각국이 미생물을 국가 자원으로 인식하여 자원 선점을 위한 경쟁이 치열해지고 있음. 특히, 농·식품 유용 미생물은 고부가가치 창출이 가능한 핵심원료로 활용가치도 높아 세계 각국에서 미생물 자원을 확보하여 상품화하려고 함.

#### □ 농·식품 미생물 연구는 고부가가치 창출의 핵심

- 미생물로부터 생체활성물질, 동·식물용 생육 조절물질, 정밀 생화학물질 등 많은 유용물질들을 탐색하여 식량 및 농업, 환경, 자원, 에너지 및 의약품 등 산업분야에 활용되고 있음.
  - 현재 지구에 존재하는 미생물종의 1%이하만 밝혀져 있어 무한한 활용 가능성이 존재하기에 이들의 새로운 용도 및 가치의 발굴여하에 따라 신산업 창출의 기회가 무궁무진함.
  - 고품질 안전 농산물의 소비가 증가하고 건강의 중요성이 커지면서 친환경 농산물과 기능성 식품에 대한 소비자의 인식이 변화됨에 따라, 미래농업은 먹거리 생산 위주의 1차 산업에서 IT, BT, NT가 융·복합된 고부가가치 산업으로 도약할 것임.

#### □ 미생물자원의 산업적 유용성 탐색 및 경제적 가치를 부여할 지식기반 첨단 가치제고화 연구는 필수

- 국내 미생물자원의 보유수(세계 신종 미생물 발굴 수: 2004년 이후 7년 동안 세계 1위)는 세계적 수준이나 활용성 및 미생물 자원의 가치제고 분야는 매우 미흡
  - 기후변화, 물 부족 등 농업 환경 악화 속에서도 충분한 농산물을 확보하기 위해서는 농업 미생물생명공학기술의 적용이 필요함. 이는 노동 집약기술 중심의 농업을 지식기반 첨단 산업으로 탈바꿈하고 친환경농업을 뒷받침하여 고부가가치산업으로 전환되어야 함을 시사
  - 미생물자원의 유용성 및 효율성 가치의 제고를 이루기 위해서는 체계적인 첨단 다중오믹스 기술 및 네트워크 분석 툴을 이용한 미생물 유전체 빅데이터의 신속한 확보 및 분석을 통해 국내 농·식품 유용미생물 자원의 활용성 극대화는 물론 미생물기반 바이오 신소재 개발을 위한 막대한 시간 및 비용 낭비를 혁신적으로 줄여야 함.

## (2) 연구개발 필요성

### (가) 농·식품 미생물 빅데이터 분석에 대한 시대적 요구

- 미생물은 고부가가치 경제적 이윤을 창출할 수 있는 핵심 생물소재로, 미생물을 활용한 산업용 효소의 세계시장규모는 2014년 기준 약 30억 달러로 매년 8%씩 성장하고 있으며 최근 유전체 정보를 활용한 기술이 발달함에 따라 농림·축산·식품·동·식물 등 모든 분야에서 다양하게 활용되고 있음.
- 다중오믹스 분석은 유전체, 전사체, 단백질체 등 여러 생물학적 데이터들의 총체적이고 통합적인 분석을 의미함. 기존의 단일오믹스 분석으로는 표준균주와 유용미생물 간의 유전적, 생리적 차이를 밝혀내는데 한계가 있음. 따라서 체계적이고 종합적인 다중오믹스 연구가 필수적임. 다중오믹스 기술을 활용해 산업적 가치창출에 있어서 결정적인 요소기술(key-technology) 및 접근성이 어려운 신규 효소자원의 인프라를 제공하여 유용미생물 유전체 정보를 자원화하고 실용화·산업화로 연계하여 생명산업과 바이오 경제 활성화에 기여하고자 함.

### (나) 농·식품 미생물 빅데이터 분석에 대한 시대적 요구

#### □ 농·식품 미생물 유전체분야 기술 확보를 통한 산업 경쟁력 확보 시급

- 유전체 연구는 농업, 식품, 수산, 환경 및 에너지, 보건의료, 국방 등 거의 모든 산업 영역에 막대한 파급효과를 미치는 핵심 기반 기술로 인식

- 농·식품, 산업(에너지 및 환경), 보건의료, 등 모든 BT 연구개발은 유전체 연구를 중심으로 통합적 발전을 이룰 것으로 전망됨.
- 유전체 연구는 단일 생물계 중심에서 집단 또는 복합 계에 대한 통합적인 연구로 추진되고 있어 유전체 정보의 생산·분석·활용 분야의 핵심 원천기술 개발은 물론 다학제간 융복합연구에 대한 기반 마련 필요(그림 2)

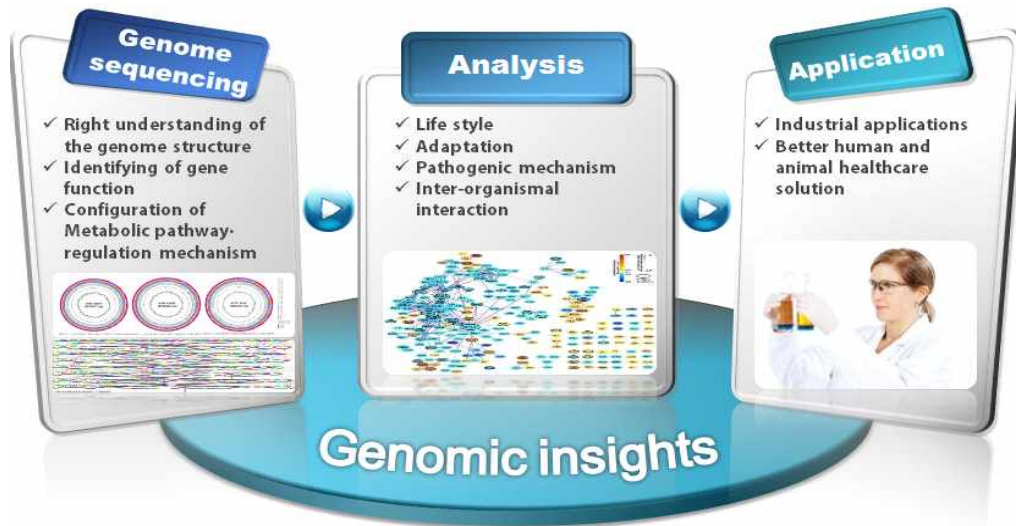


그림 2. 유전체 정보를 통한 부가가치 창출 흐름도

- 농생명자원에 대한 유전체 연구의 경우 작물과 가축 등에 한정되어 시행
  - 유전체 연구를 통해 생산된 유전체 정보, 유전자, 분자마커 등은 고품질 신품종 육성 및 육종효율 증진 등 고부가 산업창출의 기반을 제공하는 핵심 요소로 작용함. 현재까지 벼, 벼 흰잎마름병균, 벼 도열병균, 배추, 팽이버섯, 고추 등이 있으며 현재 인삼, 무, 녹두 박과, 제주감귤 등이 있음[농진청 2014].
  - 현재 “차세대 유전체 연구 사업단”에서 수행하고 있는 농업유용 미생물 및 비교유전체 사업은 벼 도열병균, 벼 이삭균, 식물병원성 붉은 곰팡이 등 병원성 미생물이나 버섯, 동충하초 등의 진균류에 대한 연구, 혹은 발효 관련 미생물의 다양성연구나 식물근권의 메타게놈 연구가 주된 표적으로 실제 기능이 입증된 유용미생물에 관한 연구는 미미한 수준임[농진청 2014 「차세대유전체연구사업단 총람」].
  - 식품 미생물 관련해서 김치, 된장 등 발효관련 산업에 국한되어 있으며, 현재 활발히 진행되는 미생물의 분류 및 군집분석 연구에 비해 표준 균주(Type strain)와 효능을 지닌 유용미생물 간의 유전적, 생리적 차이를 밝혀낼 수 있는 체계적이고 종합적인 유전체 및 오믹스 연구가 매우 부족함.
  - 토양미생물, 천적 미생물, 미생물 비료 등을 현장 농업에 적용하기 위한 균주의 배양조건 및 생리활성의 구현을 위해서는 복합적인 미생물 유전체 정보 분석 및 공유, 보급이 필요한 실정임.

#### (다) 농·식품 유용 미생물의 활용성 증대를 위한 첨단 플랫폼 기술의 필요성

##### □ 다중오믹스 기반 기능유전체 분석 플랫폼

- 미생물의 기능유전체 및 다중오믹스 분석을 통한 통합 유전자 기능 네트워크 맵을 구축하여 농·식품 유용 미생물의 산업적 활용을 위한 기반지식 제공이 필요
  - 최근 급속도로 발전하고 있는 NGS 기술로 인해 많은 생명체의 유전체 염기 서열 분석을 통하여 Bacteria, Eukarya, Archaea를 포함한 다양한 생명체의 유전체 분석이 완료되고 있음. 대표적인 농·식품 유용 미생물인 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)에 대해서는 유전체 분석이 완료되었고, 다양한 젖산균(*Lactobacillus* species)에 대해서도 유전체 분석이 활발하게 수행되고 있는 등 유용 미생물의 유전체와 관련된 방대한 데이터가 축적되고 있음.
  - 게놈 염기서열 분석을 통해 얻어진 유전체 정보를 활용하기 위해서는 유전체 정보를 바탕으로 유

전자의 기능을 연구해야 함. 유전자의 기능을 밝히기 위해서는 유전체 수준에서 유전자와 그 산물인 단백질의 기능을 연구하는 기능유전체(functional genomics)연구가 수행되어야 함.

- 기능유전체 연구는 크게 생물학적 접근법과 생화학적 접근법을 통해 수행됨. 전자는 대상 유전자가 제거된 결손변이균의 생리작용 변화를 통해 기능을 분석하는 방법으로 주로 특정 유전자의 결손 변이균을 제조하고, 제조된 결손 변이균의 형질을 분석함으로써 유전자가 어떠한 기능을 가지는지를 확인하는 접근법임. 후자의 경우 유전자로부터 만들어지는 단백질을 추적하고 그 구조와 기능을 밝히는 방법임. 최근 기능유전체 연구는 제조된 결손변이균의 유전체, 전사체, 단백질체 및 표현형질체 분석을 포함하는 다중오믹스 기법을 포함함. 따라서 기능유전체 연구를 위해서는 위에 기술한 두 종류의 접근법에 대한 표준 분석플랫폼 구축이 필요함(그림 3).

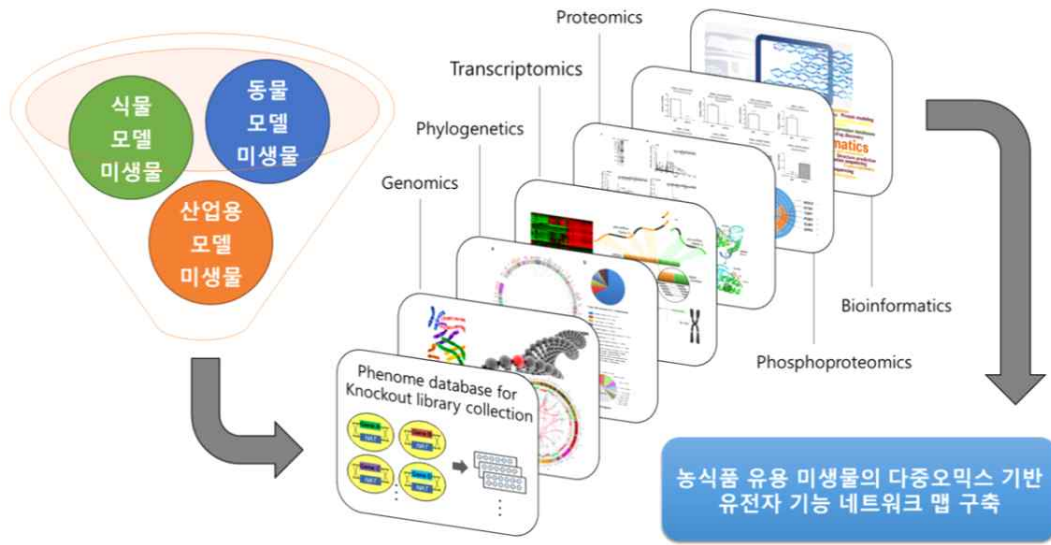


그림 3. 농·식품 유용 미생물의 다중오믹스 기반 유전자 기능 네트워크 맵 구축 전략

### □ 유전자 기능 네트워크 맵

- 시스템생물학은 생명체를 개별 구성성분이 아닌 전체 시스템 차원에서 분석하고 재해석하는 연구 분야로서 한 균주 혹은 세포를 유전자, 단백질, 대사물질 등이 서로 유기적으로 연결된 통합 시스템으로 간주하여 그 시스템이 거동하는 기본 작동원리, 즉 네트워크 구조나 동역학을 탐구함.
- 고처리량 기술의 발달, 오믹스 기술 발달 등으로 축적된 엄청난 양의 데이터를 체계적으로 통합·분석하여 균주 개량에 적용하기 위해서 게놈 수준에서의 수학적 모델링, 시뮬레이션, 데이터베이스 구축 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음. 많은 유기체의 게놈 염기 서열 분석이 완료되면서, Bacteria, Eukarya, Archaea를 포함한 다양한 인실리코-셀 모델이 구축되고 있으며, 이러한 인실리코-셀 모델이 세포의 시스템 수준에서의 분석을 위한 중요한 도구로 주목받고 있음.
- 인실리코 생체네트워크 분석 및 설계 기술은 생물시스템의 공학적 활용을 가능케 하며, 세계적으로 생물공학 분야의 새로운 패러다임을 형성하고 있음(그림 4).
- 지식과 상품 및 서비스의 생산을 위해 과학과 기술을 생명체 및 그로부터 기인한 부품과 생산물 및 모델에 시스템적으로 적용하는 시스템 생명공학의 발달로 미생물 이용을 위한 유전체 정보의 필요성이 증가됨.
- 세포내 유전자 회로의 조작 및 설계를 통해 유용 산업물질의 생물학적 대량 생산을 도모함으로써 화학 및 의약품 생산을 획기적으로 개선시킬 수 있음. 따라서 시스템 생명공학의 핵심 연구 활동인 *in silico* modeling과 simulation을 구현하기 위한 핵심 기반 정보인 part list와 대사 경로·조절 경로·상호 작용 데이터는 유전체 정보를 비롯한 대용량 오믹스 실험 데이터가 필수임.

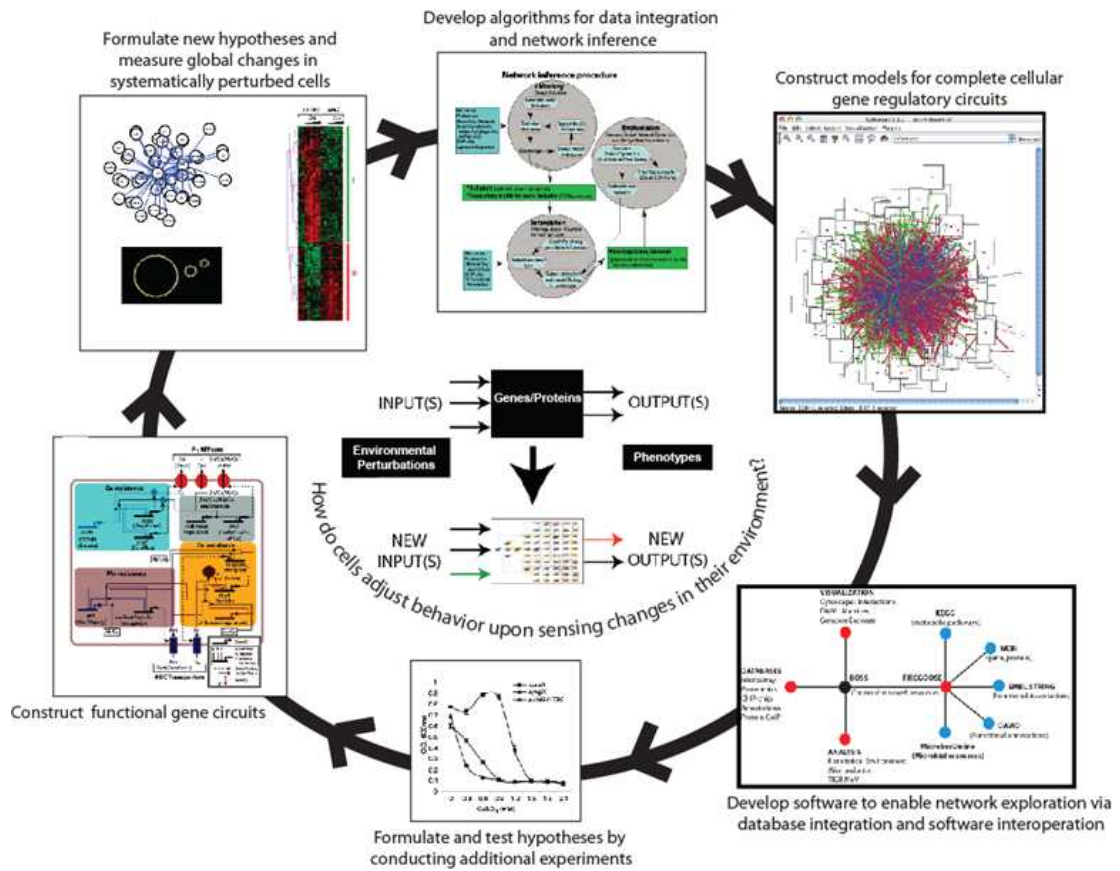


그림 4. 인실리코 생체네트워크 모식도

□ 농·식품 유용 유전자원의 발굴 및 스크리닝 시스템

○ 농·식품 유용미생물의 신속하고 정확한 유전체 해독, 비교유전체 및 다중오믹스 분석을 통한 유용 유전자원의 실제 산업화 적용을 위한 초고속 탐색, 개량 및 검증 시스템 개발이 요구됨.

- 농·식품 미생물자원의 참조 유전체 해독은 이들의 유전학적 구조 및 생물학적 기능에 대한 폭넓은 이해는 물론, 유전체 수준에서의 근연군주와의 비교 및 다중오믹스 분석을 통한 유용 유전자원의 발굴 및 기능 검증이 가능하기에 신규 농·식품 유용 자원 확보 및 환경친화적인 생물공정 개발을 위한 새로운 연구 접근법으로 주목받고 있음(그림 5).
- 특히, 현대인의 친환경 농업 및 안전한 먹거리에 대한 선호는 환경 생태계 및 인체에 대하여 심각한 피해를 야기하는 화학공정을 대체할 환경 친화적인 생물공정 개발이 매우 요구됨. 따라서, 실제 농·식품산업현장에서 실질적으로 접근하기 어려운 고품질의 참조 유전체 및 다중오믹스 DB를 활용한 유용 유전자원 및 산업현장 적용 플랫폼 호스트 개발이 매우 시급한 실정임.
- 현재 FDA에서 GRAS (generally recognized as safe)균주로 승인된 미생물의 유전체 분석 및 유전자 재조합을 통한 유용 유전자원의 성능 및 생산수율 향상을 위한 발효균주 개발은 국내 농·식품 산업의 신소재 발굴 및 시장 창출에 시급히 요구되는 필수적인 실용화 기술임. 그러나, 유용물질(바이오에탄올, 희귀당, 기능성 펩타이드)생산 및 세균의 모델균주로 각광받는 *Bacillales* 조차도 이에 관련한 대사 및 조절기작에 대한 체계적인 이해가 매우 부족한 실정임.

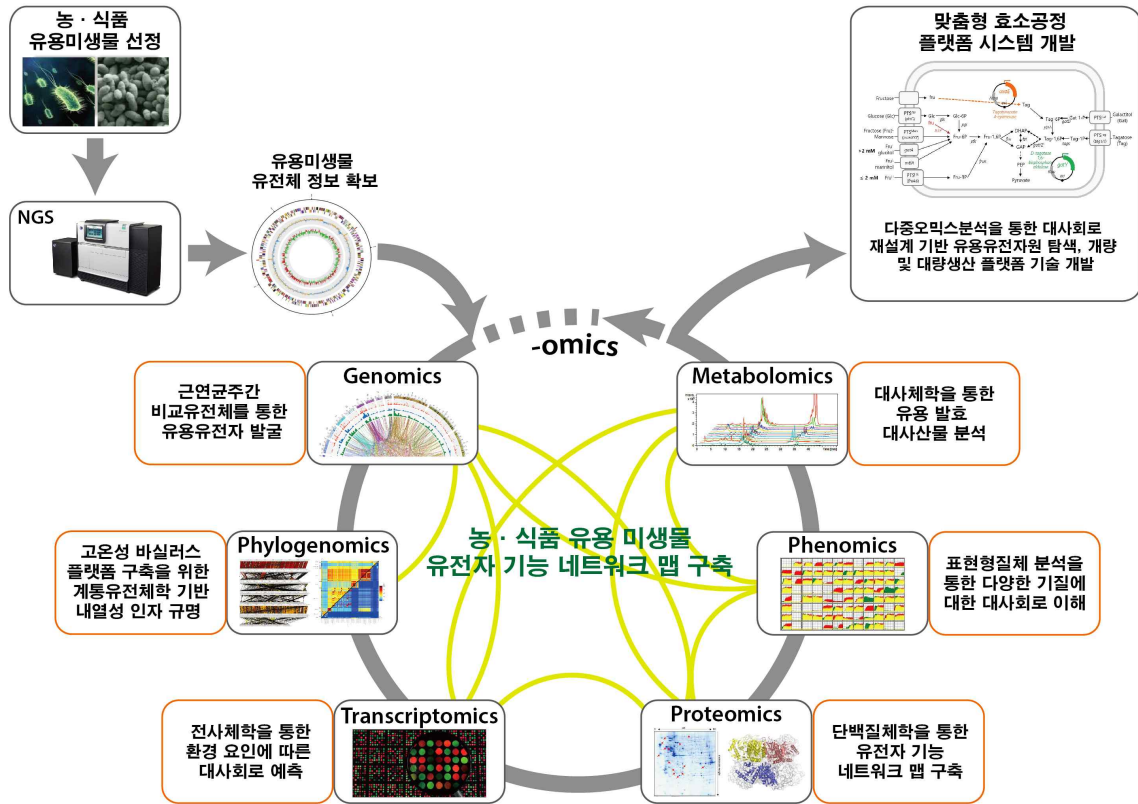


그림 5. 다중오믹스 분석기반 농식품 유용유전자원의 발굴, 개량 및 대량생산 연구 전략

○ 농식품 유용소재의 대량생산이 지속 가능한 플랫폼 호스트 균주의 개발이 필요함.

- *Escherichia coli* BL21(DE3)는 의약품 단백질 등의 외래 단백질을 고효율로 대량 생산하기 위한 숙주로 널리 이용되고 있음. *E. coli* BL21(DE3)는 특정 단백질 분해 효소가 없고, 고농도 세포배양 시 acetate 생성이 적으며, 단백질 분비능이 타 대장균에 비해 높은 점 등 외래 단백질 대량 생산에 유리한 특성을 가지고 있음. 하지만, *E. coli* BL21(DE3)는 그 산업적 중요성에도 불구하고, 오믹스 및 시스템생물학 연구가 많이 이루어지지 않음.
- 미생물 발효공정시 대두되는 단점(부산물 생성으로 인한 생산물로의 낮은 전환율, 다양한 요인으로 인한 오염의 위험성, 발효조의 냉각에 필요한 비용)을 극복하기 위해 내열성이 우수한 플랫폼 호스트 개발이 요구됨. 특히 GRAS균주인 *Bacillus*는 우수한 발효 특성을 갖고 있고 최대 리터당 20-25 g의 높은 단백질 분비 능력이 있어 친환경 생태계 및 고효율의 실용화·사업화를 추구할 수 있음. 따라서, 실제 산업현장에서 적용 가능한 균주의 개발은 물론 다양한 배양조건에서 다중오믹스 분석을 기반한 유전자 조절 네트워크(*in silico* gene regulatory network)를 규명함으로써, 각종 재조합 단백질 및 농식품 신소재 제품 생산에 적합하고 효율적인 미생물을 개발해야 함.

## (라) 농·식품 유용 미생물 및 유전자원의 가치제고화 기술개발의 필요성

### □ 미생물 및 유전자원의 가치제고화 범위 및 필요성

- 미생물자원의 활용도 제고를 위한 제반활동을 의미하며 이는 기본적인 정보(특성, 유전자, 유전체)는 물론 인간의 건강 및 환경에 미치는 영향에 관련한 고급화된 정보의 제공을 포함함.
- 가치제고화 기술의 개발과 통해 미발굴 유용특성 조사를 통해 신규 활용분야에 대한 정보 제공은 물론, 다양한 기질에 대한 미생물자원의 특성정보 제공 시 농업, 식품, 의료, 바이오에너지, 산업공정 등 활용분야의 다양화 및 차별화를 통해 미생물자원 활용성 극대화 및 부가가치 상승 기대
- 현재 다양한 미생물 및 자연환경시료의 학술적 연구로의 활용은 물론 산업계의 요구사항에 대한 적극적 대응을 위해 미생물자원의 가치제고를 위한 기술개발이 절실히 필요함. 이에 부합하고자 다양한 생물자원으로부터 산업적 가치가 높은 미생물 및 유전자원을 신속하고 효율적으로 탐색 및

통합화된 포트폴리오를 마련할 수 있는 연구기술개발을 통하여 미생물자원의 유용성 및 효율성 가치의 제고를 이루어야 함.

**□ 구조기반 단백질 분석을 통한 농·식품용 유전자원의 기능성 발굴 및 고부가가치화 기술의 필요성**

- 전 세계적으로 생명공학 시장 및 제품 개발의 상당수는 미생물 유래의 유전자원(효소)으로부터 이루어지고 있어 효소는 고부가가치 경제적 이윤을 창출할 수 있는 21세기 국가성장동력으로 발전할 미래의 핵심 생물소재임.
- 효소산업은 친환경 녹색산업의 핵심생산기술로서 바이오매스를 친환경적으로 가공하여 농생명 바이오소재, 의약품제 및 바이오매스를 가공하여 다양한 농축산폐기물의 고부가가치 바이오소재로의 전환이 가능함. 특히 농·식품가공효소는 식품산업에 막대한 영향을 줄 수 있는 녹색산업이며, 효소산업 및 농·식품가공효소는 국내 중화학산업의 현장경험과 바이오기술을 접목하여 21세기 국가 성장 동력으로 발전할 미래 산업임에도 불구하고, 국내 효소시장은 법적인 제한으로 다국적기업이 독점함.
- 따라서 선진국 주도의 효소시장에 국내 바이오효소기술개발이 선도형 연구로 전환하기 위해서는 농·식품산업 수요자 요구를 반영한 효소자원의 가치제고가 필수적임. 따라서 구조기반의 단백질 분석을 통한 산업용 효소로의 개량화 연구개발을 통하여 농·식품산업 환경에 절대적인 역할을 할 것임(그림 6).
- 미생물자원으로부터 단시간 내에 보유한 자원의 효소다양성 및 표적 효소 유무의 탐색이 가능할 경우 큰 파급효과가 있을 것으로 전망됨. 따라서 미생물자원의 확대 및 응용성을 높이기 위해 초기 탐색 소요시간, 노동력이 고려된 경제적 적절성을 확보할 수 있는 적절한 형태로 생물자원의 가치 제고를 통하여 학계는 물론 산업계로의 공급 없이는 현실적으로 어려움.

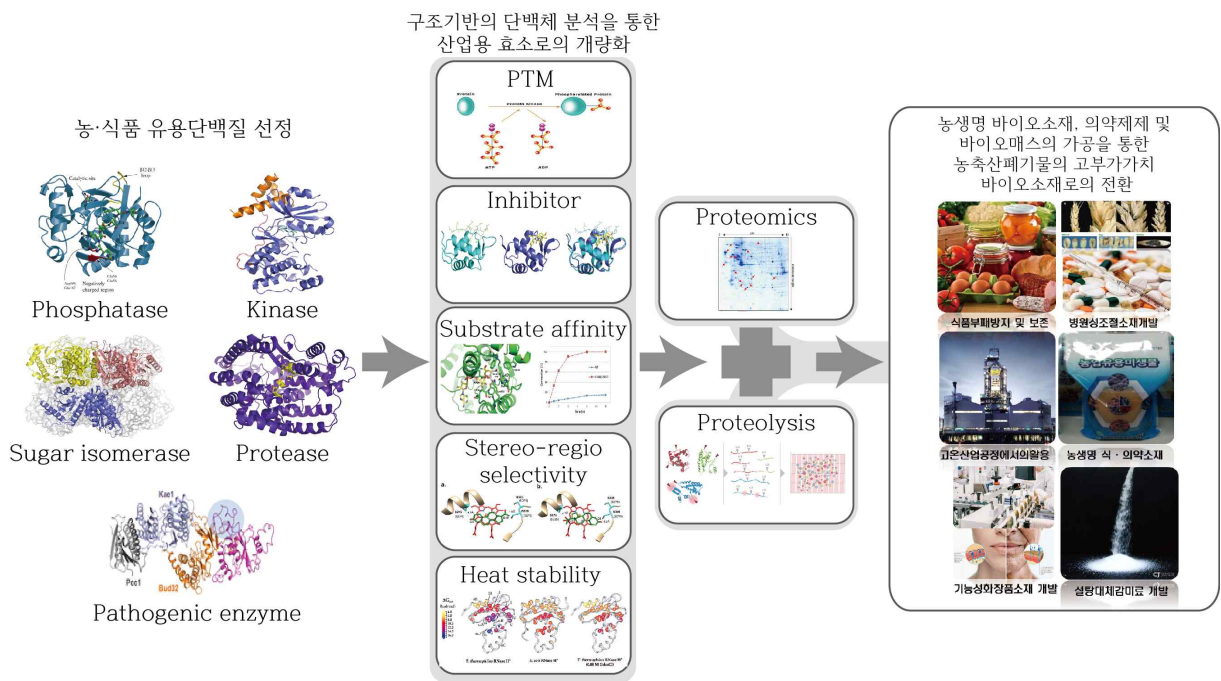


그림 6. 구조기반 단백질 분석을 통한 유용자원 고부가가치화 모식도



## 1-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

### 가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

#### □ 국내 정책 동향

- 전 세계적으로 활발히 진행되는 미생물분야 유전체 연구에 발맞추어 과학기술부에서는 미생물 유전체 기능 규명 및 고부가가치 미생물자원의 발굴 활용을 위한 핵심기반기술 확립을 목표로 2002년부터 2012년까지 총 1,104억 원의 연구비를 투자하여 21C 프론티어 사업의 일환으로 「미생물유전체 활용기술개발사업」을 추진하였으며, 농림수산식품부에서는 농림기술개발사업을 통해 「유전체 분석을 활용한 전통발효식품의 기능성 표준화 연구」 과제를 선정하여 2009년부터 2014년까지 총 25억 원의 연구개발비를 지원한 바 있음.
- 산업적 측면에서 활용도가 높은 미생물의 유용유전자 발굴 및 사업화를 위한 *de novo* 유전체 시퀀싱 및 오믹스 기법 활용 등에 대한 연구역량 강화가 요구됨. 이와 같은 배경을 통해 농·식품 유전체 연구의 전주기적 역량강화 및 실용화·산업화를 통한 농·식품산업국가 경쟁력 강화를 목표로 「농림축산식품 미생물유전체 전략연구사업」을 추진하여 2014년부터 2021년까지 총 383억 원이 투입될 예정이며, 특히 사업의 전략분야 중 조기성과 창출 단위과제로 김치 분야 미생물 유전체 연구가 집중적으로 이루어지고 있음.

#### □ 다중오믹스 기술 기반 유용유전자원 탐색 및 발굴 현황

- 한국생명공학연구원에서 플랫폼 미생물 세포공장의 오믹스/시스템 분석 기반 메타지놈 탐색 및 바이오신소재 발굴 원천기술 개발을 주관함. 본 연구는 NGS를 이용하여 막단백질 고생산 대장균 2종의 유전체 해독 및 분석과 식물유용 미생물 2종의 유전체 초안 작성 및 향생물질 생합성 유전자를 분석하여 고초균 이용 리포펩티드 계열 향생제 고효율 유도체 개발 시스템을 구축함.
- 2017년 이동우 교수팀(연세대)은 이하나 교수팀(고려대)과의 공동연구를 통하여 국내 최초로 현재 농·식품 산업에 적용가능한 유용미생물 90종을 선별하여 이들의 전장 유전체 해독 및 주석화를 완료하여 국내(NABIC) 및 국외(NCBI)에 유전체 서열을 등록함. 특히, *Geobacillus* 균주, 산업용 효소 생산균주인 *Bacillus* sp., 항곰팡이능을 지닌 *Lactobacillus* sp., 사업단내 타과제 공동연구균주인 *Cryptococcus neoformans*에 대한 비교유전체 및 표현형질체 분석을 실시하여 농토양 환경개선용 탈질능 (J. Biotechnol., 2017) 및 항곰팡이능을 선별 및 검증할 수 있는 균주 탐색용 바이오마커를 발굴함.
- 2016년 이동우 교수팀(연세대)은 (주)천랩과 공동연구를 통하여 차세대 염기서열분석법을 활용한 환경시료로부터 농·식품산업에 사용되고 있는 유용 효소균 10종에 대한 비배양 초고속 신규 유전자원 탐색법을 개발하여 2천만 개의 유용 유전자원 서열 및 색인화를 한 달 내에 신속하고 정확하게 수행할 수 있는 특허기술(10-1811737)을 보유함으로써, 농·식품 이용기술에 근간이 될 빅데이터를 제공하여 국내 농·식품 산업의 고도화, 가속화 및 활성화를 선도하고 있음.

#### □ 대사회로 조절 및 재설계 및 플랫폼 호스트 개발

- 우리나라는 유전체, 분자공학, 시스템생물학, 유전자회로, 최소유전체 분야의 개별 과학자를 중심으로 세계적 경쟁력을 보유하고 있으며, 염기서열 분석 및 유전자(올리고)합성 등은 산업적으로 세계적 수준에 도달해 있음. 하지만, 유전자회로 디자인, 생물시스템의 거동을 이해하고 예측하기 위한 수학적 분석 방법 및 전산모사 방법 개발은 초기 단계에 머무르고 있음. 이러한 기술 한계를 극복하기 위해서는 시스템생물학 기술을 이용하여 생체 네트워크를 분석하여 단순 생산경로 도입이 아닌 미생물의 대사 불균형을 해소하는 기술을 접목시켜야 함.
- 2013년 카이스트 이상엽 교수팀은 오믹스 데이터를 기반 시스템 대사공학을 통해 세계 최초로 미생물을 이용하여 휘발유를 생산하는 원천기술을 개발함. 생산 효율이 낮지만 미생물을 대사공학적으로 개량해 휘발유를 생산할 수 있는 추가 대사반응과 생물체 내에 없는 식물 유래의 신규 효소를 포함하는 합성대사경로를 도입한 플랫폼 호스트를 개발함.
- 미생물 오믹스 융합기반 바이오 에너지 생산 및 온실가스 저감 기술 개발 연구에서는 바이오에탄올 생산 통합공정용 초우량 균주 개발을 위하여 대사체학을 이용함. Furfural, HMF, 에탄올, 고온 내성

유전인자(*dfg5*, *ssk2*)의 표현형으로의 발현을 규명하고 내성 유전인자와 세포 대사간의 상관관계를 찾아내어 이러한 내성을 대사적으로 향상시키기 위한 대사공학적 표적을 제공함.

- 본 연구팀의 건국대 윤성호 교수는 미생물 유전체 정보 웹 포털(GEM, <https://www.gem.re.kr>)을 개발·운영하여 미생물 연구자에게 정보를 제공함으로써 국내 미생물 유전체 기능 연구 및 산업적 개발을 촉진하였음. 축적된 유전체 분석 체계를 바탕으로 국내 연구진들에게 유전체 해독 및 분석 서비스를 제공하여 유전체 정보를 활용한 미생물이 조절기작과 대사회로 등의 연구와 유용 유전자의 연구에 기여하였음. 대표적인 특화된 데이터베이스 개발로는 병원성 유전자 부위 데이터베이스 및 예측 시스템인 PAIDB (pathogenicity island database)를 들 수 있음. 다양한 미생물 균주의 유전체 내에서 병원성 유전자 군을 컴퓨터상에서 찾아낼 수 있는 알고리즘을 개발하였고 (BMC Bioinformatics 2005), 기존에 알려진 병원성 및 항생제 내성 유전자군을 체계적으로 조사, 정리하여 데이터베이스화함으로써 병원성 유전자의 빠른 검색 및 분석이 가능한 시스템인 PAIDB (pathogenicity island database)를 개발하였음 (<http://www.paidb.re.kr>; Nucleic Acids Res 2007; Nucleic Acids Res 2015).
- 본 연구팀의 건국대 윤성호 교수는 산업용 모델 균주인 *E. coli* B 균주의 유전체 서열 해독 및 관련 시스템 생물학 연구를 통해 이들의 산업적 활용을 위한 주요 오믹스 정보들을 획득하고 데이터베이스화 하였으며, 유전체 칩 제작 등을 통해 국내 *E. coli* 관련 연구의 전체적인 수준 향상에 기여해 왔음. (*E. coli* 균주들의 진화 및 분리 역사, Nature 2009; 산업용 모델 균주, *E. coli* B REL606/BL21(DE3)의 유전체 서열 해독, J Mol Biol 2009) 또한, 대장균 B와 K-12 균주의 각종 오믹스 정보를 시스템 수준에서 통합적으로 분석하고, 컴퓨터 시뮬레이션을 통해 생체 네트워크를 재구성함. 이러한 통합적 시스템 분석 방식은 생명체의 생리와 대사에 대한 체계적인 이해를 가능하게 하며 균주의 배양 조건과 재조합 균주를 디자인하는데 중요하게 이용될 수 있음 (Genome Biol 2012). 유전체 구조와 전사체 구조를 규명함으로써 *E. coli* BL21(DE3)의 네트워크 이해 및 맞춤형 유전체 설계를 통한 최적의 발효 및 생산 전략을 수립할 수 있는 기틀을 마련함 (Nucleic Acids Res 2017).
- 본 연구팀의 건국대 윤성호 교수는 메탄생성균인 *Methanococcus maripaludis*의 생체부품목록을 완성하고 (Genome Res 2011), 메탄생성경로에 관여된 모든 유전자들을 규명하고 이들이 어떻게 발현이 조절되고 주위환경에 영향을 받는 가에 관한 가상세포 모델을 세계 최초로 개발하였음 (Genome Res 2013). 전체 유전자 조절 네트워크를 통한 메탄생성경로의 조절 기작 설명은 복잡한 생명현상을 컴퓨터 상의 가상세포모델을 이용하여 밝힐 수 있음을 입증하는 대표적 연구 사례이며, 메탄생성균과 같이 실험이 까다롭고 균주조작이 어려운 생명체인 경우 그 효용가치가 증대됨.

#### □ 다중오믹스 정보 분석 기반 고부가가치 산업에의 적용

- 해양미생물인 비브리오 균에서 한천 무수당을 분해할 수 있는 효소들을 발굴하고 대사 경로를 규명하여 대장균에서 바이오 에탄올의 생산이 가능한 새로운 대사기작을 확립한 연구사례와 대장균을 이용한 가솔린 생산을 목적으로 지방산의 길이를 줄여줄 수 있는 효소와 신규 대사경로를 도입하여 탄소수가 12개 이하인 짧은 사슬 알케인(short-chain alkane)을 생산한 연구 사례가 있음.
- 한국과학기술원(KAIST) 이상엽 교수팀과 서울대 박영환 교수팀이 비교 단백질 분석 등 시스템 대사공학 기법을 이용하여 거미 실크 단백질을 생산할 때 대장균 내에 글리실-tRNA의 부족 현상이 일어남을 밝혀냈고, 이 문제의 해결을 위해 관련 유전자들을 증폭 또는 제거 하는 등 대장균의 대사를 재구성함으로써 대장균으로부터 세계 최고 수준의 반복단위수를 가진 285 kDa에 달하는 거미실크 단백질을 성공적으로 합성함.

#### □ 동물 병원성 진균의 다중오믹스 기반 기능유전체학적 연구

- 본 단위과제의 연구책임자인 반응선 교수 연구팀은 세계 최초로 동물 병원성 모델 진균인 *Cryptococcus neoformans*에서 총 178개의 전사인자/인산화효소 연구를 통해 병원성과 스트레스 반응, 약물 저항성 등에 관여하는 유전자 네트워크를 본 연구진이 밝힌 바 있음(Jung et al. 2015

Nat Commun & Lee et al. 2016 Nat Commun).

- 국내에서 수행된 본 연구는 담자균류에서 최초로 이루어진 대용량 라이브러리 연구로 뇌수막뇌염 유발 병원성 진균인 *C. neoformans*의 병원성 조절 신호전달기작을 유전체 수준에서 이해하고 이를 통한 새로운 치료표적을 발굴하기 위해, 세포내 유전자의 발현을 관장하는 155개의 전사인자에 대한 총 322개 유전자변이균주를 제조하고 이들에 대한 병원성을 비롯한 30여개의 다양한 형질(생육, 분화, 병원성인자 생성능, 각종 스트레스 반응, 항진균제 저항성, 병원성 등)에 대한 통합적 분석을 실시하여 유전체 수준의 전사인자 네트워크를 규명하였음.
- 뿐만 아니라 담자균류 최초로 뇌수막염 진균 유전체의 생명정보학적 분석을 통해 183개의 인산화효소 유전자를 발굴하고, 이 중 129개 인산화효소에 대한 264개 대용량 변이균주 라이브러리를 생성하여 기능유전체학적 역할 분석이 가능하게 하였음. 대용량 변이균주 라이브러리는 30여개의 생장, 분화 및 스트레스 조건에서 표현형질을 분석하였고, 약물개발 표적이 될 수 있는 주요 인산화효소의 세포 내 기능을 규명하였음.

□ 동물 병원성 진균의 웹기반 데이터베이스 서비스

- 본 단위과제의 연구책임자인 반응선 교수 연구팀의 선행연구결과로 구축한 병원성 진균 *C. neoformans*의 TF와 kinase에 대한 library의 비교형질분석 결과는 웹 기반 데이터베이스를 구축하여 연구자료로 활용될 수 있도록 하고 있음. 인터넷을 통해 접근할 수 있는 이러한 데이터베이스는 30가지의 다양한 스트레스조건에서 분석된 *in vitro* 데이터는 물론 모델마우스와 모델곤충을 통한 *in vivo* 데이터로 구성되어 표현형질을 이용한 신호전달기작의 분석과 예측이 가능함. 이 데이터베이스를 이용하여 다양한 종간 신호전달기작의 분석과 여러 각도에서의 약물표적 예측 및 분석이 가능해졌고, 모든 library는 약물표적 스크리닝을 위해 공개되고 있음(그림 7).

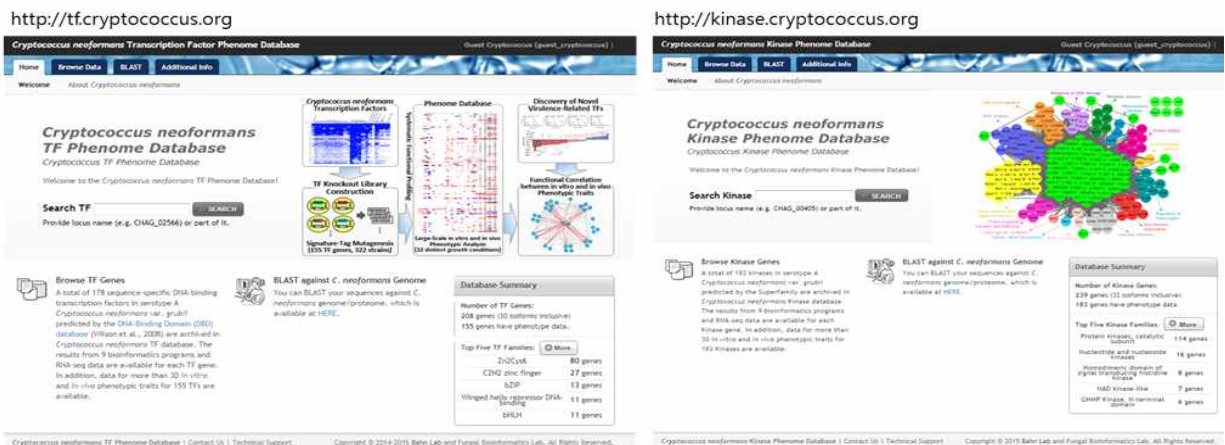


그림 7. 선행연구된 네트워크 라이브러리의 웹기반 데이터베이스 구축 현황

- 이러한 데이터베이스구축을 통해 high-throughput data의 분석 및 이용이 용이하게 하였고, 이번 연구를 통해 얻어질 phosphatase의 형질분석 데이터 뿐만 아니라 kinase, TF, phosphatase를 망라한 Fungal pathogenic signaling network역시 웹기반 데이터베이스를 구축하여 다양한 동/식물 병원성 진균은 물론 네트워크기반으로 한 신호전달 연구에 이르기까지 범위 넓은 연구의 기반으로 사용될 수 있도록 하여 사회·경제적 시너지 창출은 물론 과학적·산업적으로 가치 있게 사용될 수 있도록 고 부가가치의 서비스를 제공하고 있음.

□ 식물 병원성 진균의 다중오믹스 기반 기능유전체학적 연구

- 서울대학교 이용환 교수 연구팀은 벼 도열병균을 대상으로 대량의 전방향유전학 연구를 통해 559개의 병원성관련 변이체를 선별하여 다양한 후속 연구를 수행해 오고 있음(Jeon et al 2007 Nat Genet). 특히 진균을 대상으로 한 게놈 분석도구(CFGP, Park et al. 2007 Nucleic Acids Res), 전사인자 데이터베이스(FTFD, Park et al. 2008 Bioinformatics), 후생유전인자 데이터베이스(dbHiMo, Choi et al. 2015 Database), Cytochrome P450 데이터베이스(Park et al. 2008 BMC

Genomics), 분비단백질 데이터베이스(Kim et al. 2016 Front Plant Sci) 등 다중오믹스 연구를 위한 기반을 구축하고 있음. 이를 바탕으로 게놈수준의 전사인자 전사량 분석 연구(Park et al. 2013 PLOS Pathog)와 전체 bZIP 전사인자에 대한 표현형질체 연구(Kong et al. 2015 Environ Microbiol)를 수행함.

- 순천향대 윤성환 교수 연구팀은 *F. graminearum*의 유성생식 핵심 전사조절인자인 MAT 단백질들의 하위 유전자 조절 메커니즘을 비교전사체 분석과 106개의 유전자 변이체 제작을 통해 규명하였음 (Kim et al. 2015 PLoS Genet).
- 본 단위과제의 1세부 위탁과제 책임자인 손호경 교수 연구팀은 식물 병원성 모델 진균인 *F. graminearum*을 대상으로 국내·외 연구그룹 중 가장 큰 규모로 표현형질체 기반 기능유전체 연구를 수행해 오고 있음. 특히 *F. graminearum*의 전사인자 675개 대한 변이균주 및 표현형질체를 데이터베이스화 하였으며(Son et al. 2011 PLOS Pathog), 이를 기반으로 다학제간의 후속 기능유전학 연구를 수행해 오고 있음(SCI논문 16편 게재). 최근에는 102개의 cytochrome P450 유전자(Shin et al 2017 Environ Microbiol), 32개의 peroxidase 유전자(Lee et al. 2018 Mol Plant Pathol), 152개의 WD40 유전자에 대한 변이 균주를 확보하는 등 후속 기능유전체 기반 다중오믹스 분석 연구를 위한 우수한 인프라를 구축하고 있음.

#### □ 병원성 세균의 다중오믹스 기반 관련 단백질 구조 연구 사례

- 본 과제의 제3세부 담당교수인 조현수 교수팀은 해양세균 유래 막단백질 중 하나인 light-driven chloride-pumping rhodopsin의 구조를 세계 최초로 규명하여 해양생물의 생체 내 항상성 조절을 위한 염소의 세포 내로의 이동 경로 작용기전 및 그 과정에 중요하게 작용하는 NTQ 모티프의 역할을 밝힌 사례가 있음 (Kim et al. 2016 Nat Commun).
- 본 과제의 제3세부 담당교수인 조현수 교수팀은 세브란스 소속 신전수 교수 및 미국 캔자스 주립대학의 Philip R. Hardwedge 교수팀과의 공동연구를 통하여 병원성 세균인 EPEC/EHEC *E. coli* 및 *Salmonella* 유래 effector 단백질 중 하나인 NleB/SseK 단백질 군 중 총 3종의 구조를 규명하였음. 이를 바탕으로 세계 최초로 arginine 당화반응의 화학적 작용기전을 규명한 바 있음 (논문 작성 중). 이는 당화반응의 새로운 패러다임으로 제시될 수 있으며 현재 추가적으로 구조기반 약물개발을 위한 연구를 진행 중에 있음.
- 본 과제의 제3세부 담당교수인 조현수 교수팀은 omega-transaminase의 구조를 기반으로 활성부위 돌연변이를 통하여 효소의 활성을 향상시키는데 성공하였음. 해당 연구를 통하여 약물 및 화학물질 공정 과정에서 핵심적으로 요구되어지는 동질성 있는 반응물의 생산성을 약 1만 배 향상시키는데 성공한 사례가 있음 (Han et al. 2017 ACS Catalysis).
- KAIST 소속 오병하 교수팀은 병원성 세균 유래 인체 감염에 중요하게 작용하는 T4SS의 구조를 세계 최초로 규명하여 effector 단백질의 인체 내로의 이동경로에 DotL 단백질의 ATPase 도메인이 중요하게 작용함을 밝힌 사례가 있음 (Kwak et al. 2017 Nat Microbe).

#### 나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

##### □ 미생물 유전체 정보를 활용한 기능유전체학 인프라 구축의 강화

- 대표적으로는 Keio컬렉션이 있으며 대장균(*E. coli* K-12 BW25113)의 유전체 중 비필수 유전자 3985개의 개별 유전자를 각각 제거시킨 단일유전자결핍 돌연변이체를 모아둔 균주는행임.
- 개발된 게이오 컬렉션은 예일대학의 the *E. coli* Genetic Stock Center (CGSC)(공급업체: Thermo Fisher Scientific Inc.)와 일본의 National Institute of Genetics에서 학술적인 목적으로 전 세계 연구원들에게 제공하고 있음(<http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/top/top.jsp>).
- 단일유전자가 제거된 균체는 각 미생물유래 유전자의 기능적 특성 연구는 물론 포스트게놈시대 이후의 다양한 미생물 유전체 및 유전자의 기능 탐색 및 신기능 발굴 연구 분야의 활성화를 촉진시킴으로써 학문적, 산업적 유용성이 매우 큼.

## □ 다양한 유전자 라이브러리를 구축하여 연구자들이 유전체 연구를 쉽게 할 수 있도록 제공

- 코하라 클론(Kohara clones)은 대장균의 유전체의 유전자를 수십 kb씩의 크기로 람다 박테리오파지 클론 라이브러리로 제작한 것으로 476개의 클론은 대장균 유전체 전체를 커버할 수 있는 minimal set을 이룸.
- ASKA(A complete Set of *E. coli* K-12 ORF Archive) library는 연구자들이 유전자산물의 기능과 상호작용 등을 유전체 수준에서 연구할 수 있도록 만든 유전자 라이브러리로 코하라 클론을 대체
  - His-tag가 있어 단백질을 손쉽게 정제 분리하며 형광단백질을 이용하여 세포내의 단백질 위치를 관찰이 용이하고 단백질-단백질 상호작용의 분석에 응용할 수 있는 장점이 있음.

## □ 다중오믹스 관련한 연구 및 기술현황

- 다양한 미생물을 모델로 하여 게놈 수준의 기능유전체 연구가 진행됨. Genome sequencing 기술의 비약적인 발달과 함께 genome 서열에 대한 유전자 정보가 비교적 정확히 annotation 되었고, DNA 서열이 RNA로 전사되고 단백질로 발현되는 과정 중에 특정 유전자가 어떠한 역할을 하는지에 대한 종합적인 분석 접근인 기능유전체 연구가 가능하게 됨.
  - 원핵 미생물인 *E. coli*의 expression analysis를 통해 4,290개 유전자의 전사 정도를 비교분석 하여 glucose와 acetate 대사에 관여하는 유전자를 발견함(Tao et al. 1999 J Bacteriol). *B. subtilis*에서는 단백질체 및 전사체 분석을 통해 긴축 감응에 관여하는 유전자군을 발굴함(Eymann et al. 2002 J Bacteriol).
  - 진핵 미생물인 *Chlamydomonas reinhardtii*에서 진핵생물의 광합성에 관여하는 유전자들의 기능을 분석함(Dent et al. 2005 Plant Physiol). 진핵 미생물인 *Aspergillus fumigatus*에서 total RNA 비교 분석을 통해 1,827개 유전자가 스트레스 반응에 조절되는 것을 발견하고, 면역반응에 관여하는 유전자에 대한 기능을 증명함(Cortez et al. 2006 Infect Immun).
  - 진핵 미생물인 *Neurospora crassa*에서는 *Neurospora* genome project의 일환으로 43-Mb의 genome을 분석한 이후 10,000여개 유전자에 대해 3단계로 나누어 유전자 기능을 분석할 예정으로 연구가 수행되고 있음(Dunlap 2007 Adv Genet). 모델 효모인 *S. cerevisiae*에서는 96%에 해당하는 유전자 변이균주를 생성하여 6개의 다른 성장 조건에 대한 mRNA를 비교 분석하였고, 특이적으로 조절되는 7%의 유전자군을 발굴함(Giaever 2002 Nature). 분열 효모(Fission yeast)인 *Schizosaccharomyces pombe*와 *S. octosporus*, *S. cryophilus*에서는 기능유전체 연구를 통해 세포 분열과 스트레스 반응에 관여하는 기능 모듈과 조절자를 발굴함(Rhind et al. 2011 Nature). *Ustilago maydis*에서는 6,902개의 단백질 발현 유전자를 연구하여 기능을 밝히고 데이터베이스를 공개함(Kamper et al. 2006 Nature).
  - 최근 *C. neoformans*에서는 1201개 유전자 변이균주를 제조하여 게놈 수준의 기능유전체 연구가 진행됨(Liu et al. 2008 Cell). 이 외에도 RNA간섭을 활용한 기유전체 연구방법을 접근하는 등(Liu et al. 2002 Genetics) 진핵 미생물 모델로서 연구가 활발함.
  - 최근 다양하게 진행된 오믹스 연구 결과 붉은 곰팡이를 대상으로 한 분자유전학적 연구 기법들은 비약적으로 발달함(Geng et al. 2014 Biotechnol Adv; Jia 2015 New Phytol). 특히 전 세계적으로 진행된 기능유전체 연구 결과 상위 신호전달체계 뿐만 아니라 게놈 수준의 전사인자(Son et al. 2011 PLOS Pathog), 인산화효소(Wang et al. 2011 PLOS Pathog), 탈인산화효소(Yun et al. 2015 New Phytol) 등에 대한 결손돌연변이체가 제작되었으며 형질, 발현 정보 등 양질의 유전자원이 확보됨. 따라서 붉은 곰팡이 연구는 경제적인 가치 외에도 사상성곰팡이, 반활물기생(hemibiotrophic) 곰팡이, 병원성곰팡이의 기능유전학 연구모델로 각광받음.
- 이와 같이 다양한 미생물 종에서 기능유전체 연구가 활발하지만 미생물 전체에 적용시킬 수 있는 방법론적인 플랫폼이 부족함. 새로운 미생물종에 기능유전체 연구 방법을 도입하여 연구하고 비교 분석할 수 있도록 유전체 정보의 해독, 이를 기반으로 한 다중오믹스 분석 및 네트워크 분석 체계를 구축해야함.

## □ 다중오믹스 정보 분석 기반 유전자 발현 조절 분석 사례

- Janet Jansson과 공동연구원들은 다중오믹스를 통해서 Metagenomics, Metatranscriptomics, Metaproteomics를 통합하였으며, 알래스카 피트지대의 동토에서의 미생물 유전자 발현에 대해서 분석함. 이를 통해 동토 지대에서 계절적으로 녹는 지역으로의 자연적인 기온기가 생기며, 이를 따라서 미생물 개체 집단도 변화함을 확인하였으며, 이를 따라서 탈질소화, 질소 환원, 철 환원, 그리고 메탄 산화와 같은 생물 지질 화학적 순환에 대한 변화도 크게 일어난다는 사실을 확인함.
- 녹조 문제가 해결된 것으로 여겼던 미국에서는 2000년대 들어 남조류에 의한 녹조가 이리호(Lake Erie)를 중심으로 다시 발생하면서 환경, 보건 문제를 야기함. 다양한 분야의 전문가가 협력하면서, 녹조 부활의 원인, 양상 등을 연구하게 되었는데, 생물학적 연구에서는 오믹스 기법 적용을 통해 Microcystis가 우점하는 조건과 Anabaena, Planktothrix가 우점하는 조건이 다름을 밝히고, 각 남조류의 어떤 유전자 발현의 차이가 이러한 결과를 초래하는지 규명함(Harke et al. 2016 Environ Sci Technol).

## □ 다중오믹스 기반 플랫폼 세포 이용사례

- Liping Jin와 공동연구원들은 다중오믹스 기반 lignocellulose 유래 당으로부터 L-lactic acid를 생산하는 바실러스를 이용한 열 안정성 플랫폼 세포를 개발하였으며 에탄올과 아세트산 대사회로에 관여하는 유전자 AdhB, AckA, AlsS, AlsD의 결여는 lactic-acid 생산량을 6.2% 증가시킴. 최종적으로 고순도(95.3%) 및 고생산량(121.9g/L)의 lactic-acid를 얻음(Li et al. 2017 Biotechnol Biofuels).
- 이와 같이 다양한 미생물 중에서 기능유전체 연구가 활발하지만 유용미생물 전체에 적용시킬 수 있는 방법론적인 플랫폼이 부족함. 새로운 미생물종에 기능유전체 연구 방법을 도입하여 연구하고 비교 분석할 수 있도록 유전체 정보의 해독, 이를 기반으로 한 다중오믹스 분석 및 네트워크 분석 체계를 구축해야함.

## □ 생체 네트워크 분석 및 활용 연구

- 지금까지 개발된 많은 생체반응 모델링 기법 중 실제 생물공정 개발에 이용되는 것은 유전체 수준의 대사 네트워크를 재구성하고 생화학적, 환경적 제약을 부과하여 시뮬레이션을 통해 대사흐름을 분석하는 기법임. 가령 인위적으로 세포 내 대사회로를 바꾸기 위해 특정 유전자를 제거하거나 새로운 유전자를 도입하였을 때의 영향을 미리 *in silico*로 예측함으로써 목적 대사회로와 유전자의 선택이 컴퓨터 상에서 가능해지고 최적화된 배양환경을 제시할 수 있어 실제 실험에 드는 시간·노력과 비용을 획기적으로 줄일 수 있음. 대사흐름 최적화 기법으로 여러 목적에 따라 다양한 방법들이 개발되어 왔음. 최적화 기법 자체로는 flux balance analysis, MOMA 등이 있고, 제거되어야 할 대사과정을 찾기 위해 OptKnock, OptForce 등을 이용할 수 있으며, 증폭되어야 할 대사과정은 FSEOF, EMILiO 으로 찾을 수 있음. 또한, 지금도 새로운 방법론들이 계속 제시되고 있음. 이렇듯 많은 대사 네트워크 시뮬레이션 기법은 모두 대사 과정을 표현한 대사 네트워크 반응계수행렬 (stoichiometric coefficient matrix)을 기반으로 하기 때문에 그 예측능은 대사 네트워크가 실제 균주의 모든 대사과정을 얼마나 반영하느냐에 달려 있음.
- 유전자간의 조절 네트워크를 구성하기 위해서 시계열 전사체(time-series transcriptome) 데이터를 이용하여 유전자간 조절관계를 규명하는 모델링 기법들이 제시되고 있음. 제시된 대표적인 모델링 방법으로는 regression-based network approach를 이용하여 유전자 조절 네트워크를 구성하는 방법(J Bioinform Comput Biol 2009)과 통계학적 학습 방법과 복잡계 시뮬레이션 방법을 이용한 모델링방법(Genome Biol 2006)등이 있음.
- 유전자 조절 네트워크를 대사 네트워크와 통합시킬 경우, 생산균주의 거동을 보다 정확히 예측할 수 있어, 유용화학물질 생산에 관련된 유전자들이 어떠한 메커니즘으로 조절, 발현되는 지에 대한 단서를 제공할 수 있기 때문에 보다 정확한 균주 디자인을 기대할 수 있음. 하지만, 조절 네트워크에서 전사인자가 cis-regulatory element에 결합하여 해당 유전자서열이 mRNA로의 발현으

로 이어지는 데 수 분이 걸리는데 반해, 대사 네트워크는 효소의 빠른 turnover로 인해 sub-second 단위에서 작동함. 즉, 대사과정과 조절과정은 반응시간이 다르기 때문에 이 둘을 하나의 모델로 통합하는 데 어려움. 현재 두 네트워크의 통합으로 제시된 방법으로는 전사인자의 유전자 발현을 세포내외의 환경에 따라 on/off의 Boolean 규칙으로 두고, 대사회로 상의 효소유전자들의 발현유무를 정하고 FBA를 수행하는 Regulatory FBA (rFBA) (Herrgard et al., 2006), 전사인자의 조절여부를 확률적으로 표현한 Probabilistic Regulation of Metabolism (PROM) (Chandrasekaran and Price, 2010)등이 개발되었음.

□ 인산화효소(kinase)와 탈인산화효소(phosphatase)의 생물학적 중요성 및 항진균 약물 표적으로서의 가치

- 인산화효소와 탈인산화효소는 세포 내 신호전달을 조절할 뿐 아니라 기질 단백질들의 활성화, 반감기, 세포 내/외로의 위치이동 등을 조절함. 단백질 인산화는 가장 널리 연구되고 있는 post-translational modification으로 생리학적으로 매우 중요하며, 특히 세포내 신호전달 항상성 유지 측면에서 큰 의미가 있음 (Bauman and Scott et al. 2002 Nature). 인산화효소는 탈인산화효소보다 훨씬 앞서서 약물의 표적이 되었으며, 많은 제약회사의 표적 단백질 중 약 30%가 인산화효소일 정도로 대표적인 표적이 되었음 (Cohen et al. 2002 Cell). 아래 표에서와 같이 이미 인산화효소는 표적 약물 발견의 큰 성공 사례가 수차례 존재하며 또한 현재 수많은 인산화효소 표적 약물들이 임상 시험을 거쳐 약물로서의 가치 유무를 증명 받는 중에 있음. 이는 인산화효소와 탈인산화효소는 생물체 내에서 중요한 기능을 담당하는 만큼 항진균 약물 개발 측면에서 충분히 좋은 표적이 될 수 있음을 시사함.

□ 인산화효소와 탈인산화효소 표적 약물의 성공 사례

표 1. 인산화효소 표적 약물의 대표적 성공 사례

표적 Kinase	질환	치료제
BCR-ABL	chronic myeloid leukemia	imatinib (Gleevec)
BCR-ABL	gastrointestinal tumor	imatinib (Gleevec)
mTORC	immunosuppression	rapamycin (Sirolimus)
EGFRK	non-small cell lung cancer	gefitinib (Iressa)

표 2. 탈인산화효소 표적 약물의 대표적 성공 사례

표적 Phosphatase	질환	치료제
Calcineurin	immunosuppression	cyclosporin A
Calcineurin	immunosuppression	FK506

### 1-3. 연구개발의 중요성

#### □ 미생물의 다중오믹스 및 생체네트워크 분석의 중요성

- 고처리량 기술의 발달, 오믹스 기술 발달 등으로 축적된 엄청난 양의 데이터를 체계적으로 통합·분석하여 균주 개량에 적용하기 위해서 게놈 수준에서의 수학적 모델링, 시뮬레이션, 데이터베이스 구축 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음.
- 최근 급속도로 발전하고 있는 차세대 유전체 서열 해독 기술(Next Generation Sequencing, NGS)로 인해 많은 생명체의 게놈 염기 서열 분석이 완료되면서, Bacteria, Eukarya, Archaea를 포함한 다양한 인실리코-셀 모델이 구축되고 있으며, 이러한 인실리코-셀 모델이 세포의 시스템 수준에서의 분석을 위한 중요한 도구로 주목받고 있음.
- 기존의 무작위 돌연변이 도입이나 유전자 단위의 도입 또는 개별 유전자 파쇄를 통한 플랫폼 균주 개발 방식은 비용 및 시간이 막대하게 소요됨. 최근에는 다중오믹스 데이터를 통합한 시스템적 접근 방식으로 대사공학 균주를 개발하려는 시도가 이루어지고 있음. 즉, 산업미생물의 생체네트워크를 재설계를 통해 미생물 세포공장을 개발함으로써 유용 바이오소재를 생산하려는 연구의 관심이 점차 고조되고 있다. 이러한 시스템생물학적 연구방법은 기초생물 연구 뿐 아니라 유용물질 생산공정 개발에 이용되어 획기적인 비용, 시간을 절감시킬 수 있음.

#### □ 유용미생물 유전체 DB 급증에 따른 정확하고 신속한 기능 분석의 중요성

- 인간과 자연에 존재하는 수많은 미생물이 인간의 건강과 농식품 산업 등에 어떤 영향을 끼치는지에 관한 연구가 국가 주도 혹은 다 국가 주도의 대규모 연구 프로젝트로 활발하게 진행되고 있음.
- 폭발적으로 증가하는 유전체 정보를 가공·처리하고, 기능이 밝혀져 있지 않은 유전자의 기능주석화를 하기 위한 대사회로 재설계 기반 인프라 구축과 유전체 정보로부터 생산된 결과를 산업화하는데 필요한 기술·정보 제공을 위한 온·오프라인 협력 네트워크 구축이 중요함.
- 모든 유기체는 외부환경과 끊임없이 반응하고 소통하기 위해 조절네트워크가 환경에 따라 변화함. 이에 다중오믹스 기반 유용미생물의 유전체 및 전사체 프로파일링을 통해 생리활성 및 대사회로의 연계성 이해가 필수적임.
- 대량 유용유전자원의 초고속 탐색 및 발굴을 가능하게 하며 분자진화-단백질 공학기술연구의 효율성을 높일 수 있음.

#### □ 유전자 조절 네트워크 분석 및 다중오믹스 정보기반 유용 유전자원 생산 호스트 개발의 필요성

- 유전자 조절 네트워크는 시공간적으로 세포 내 생리작용을 조절하여 자원 활용을 최적화하고, 유전정보를 통합하여 다양한 환경 변화에 유기체가 적응하여 살아갈 수 있도록 해 줌. 거의 모든 유기체는 외부환경과 끊임없이 반응하고 소통하기 위해 조절네트워크가 환경에 따라 변화하기 때문에, 유기체의 조절네트워크의 특성 및 거동 예측은 균주 개량에 매우 유용하게 이용가능함.
- 내열성 적응기작 및 인자에 대한 정설이 없으며 다중오믹스를 통한 내열성 유전인자의 발굴 및 규명을 통한 농·식품 발효 생물공정의 적용을 통해 기존의 중온공정과 화학공정에서 필요했던 냉각 비용, 오염으로 인한 생산비용의 절감은 물론, 균질화를 통한 수득율 개선이 가능하게 하는 농·식품 미래 생명공학산업의 근간에 기여함.
- 화학 공정을 통한 유용유전자원으로 부터의 대사산물은 회수 과정에서 부산물 발생으로 인한 환경문제가 대두되기에, 시대가 요구하는 환경친화적 저에너지 고효율의 녹색생물공정으로의 전환이 절실히 요구되며 친환경 생태계 구축에 기여함.

#### □ 동·식물 병원성 진균을 이용한 다중오믹스 연구의 중요성

- 현재까지 비병원성 진균에서 이루어진 다양한 연구는 병원성 진균의 병원성을 이해하기에 한계가 있음. 이에 *S. cerevisiae*나 *S. pombe*와 같은 모델 진균에 비해 연구가 많이 이루어지지 않은 병원성 진균, 그 중에서도 모델이 될 수 있는 동·식물 병원성 진균에서 이루어지는 연구는 매우 중요



하다고 할 수 있음.

- 동물 병원성 진균인 *C. neoformans*는 인수공통 기회감염성 진균으로 주로 면역력이 결핍된 동물 및 환자에게서 감염되며, 국소부위의 피부감염 혹은 호흡기를 통한 폐 감염과 전신감염 형태의 크립토코쿠스증을 일으키며 가장 심한 감염형태로는 뇌수막염과 뇌 감염을 일으킬 수 있음.
- 식물 병의 대부분은 사상성 진균과 세균에 의해 일어난다고 해도 과언이 아닌데, 농작물에 피해를 주는 주요 병원성 진균인 벼도열병균(*Magnaporthe oryzae*), 벼문고병균(*Rhizoctonia solani*), 토마토잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 감자역병균(*Phytophthora infestans*)과 고추탄저병균(*Colletotrichum coccodes*) 등에 의한 농작물 피해가 심각함. 특히 농산물의 생육기간 및 저장, 유통 중에 곰팡이에 의해 생성되는 곰팡이독소(mycotoxin)은 비교적 열에 안정하여 식품의 원료가 오염되면 가공 후에도 소실되지 않고 잔존하여 매우 위험한 것으로 보고되고 있음. 현재까지 200여개의 곰팡이독소가 발견되었는데, 이들 곰팡이독소의 대부분은 *Aspergillus* 속, *Fusarium* 속 및 *Penicillium* 속 곰팡이에 의해 생산되는 독소들이며 주로 쌀, 보리, 콩, 땅콩, 옥수수 등의 주요 곡물에서 잘 발생함(서정희 2000 한국소비자보호원 소비자안전국 연구자료).
- 현재까지 개발된 상용 항진균제 중 크립토코쿠스증에 가장 많이 이용되는 방법은 아졸계열의 플루코나졸(FCZ)과 폴리엔계열의 암포테리신(AMB)의 혼용치료 방법임. 아졸계열 약물의 경우 병원성 진균의 성장을 일시적으로 저해하는(fungistatic) 특성으로 약물 저항균 문제가 심각하며 고용량 투여시 인체에 간 독성을 보임. 폴리엔계열의 약물의 경우 병원성 진균을 억제하는(fungicidal) 약물 효과는 뛰어나지만 인체 내에서 심각한 신장독성을 보임.
- 전 세계적으로 진균에 의한 질환 발병률은 매우 높아지고 특히 *C. neoformans*같은 침습성 진균의 경우 60%가 넘는 매우 높은 사망률을 보임. 하지만 질병에 적용 가능한 약물의 숫자가 현저하게 부족한 상황이며 약물개발추이 역시 한계치를 보임. 이를 반증하듯이 약물 독성이 심한 두 약물인 FCZ과 AMB의 약물상승작용(drug synergism)을 이용하여 치료하는 방법이 가장 보편되고 발전한 치료 형태임을 알 수 있음. 이에 병원성 진균을 치료할 수 있는 새로운 항진균 약물표적을 발굴하고 저해물질을 스크리닝하는 연구는 매우 전략적이라 할 수 있음.
- 농·식품·축산에 영향을 미치는 동·식물 병원성 진균 역시 아졸계열/폴리엔계열 약물에서 크게 벗어나지 못한 범주의 약물로 조절되고 있음. 전 세계 항진균제 시장은 2025년까지 126억 달러로 전망되는 만큼 병원성 진균을 저해할 수 있는 새로운 약물표적 단백질 개발 전략이 매우 요구되며 중요하다고 할 수 있고, 특히 본 연구진이 제안하는 모델 병원성 진균에서의 다중오믹스 분석 방법은 가장 전략적이고 고도화된 개발 방식이라 할 수 있음.

## □ 구조생물학 기반의 약물 개발전략의 중요성

- 인산화효소 및 탈인산화효소의 활성부위만을 직접 상보적으로 결합하는 화합물의 개발에서 최우선으로 극복해야 할 문제는 표적특이성을 극대화하는 것임. 인체에 감염된 진균만을 표적할 수 있는 약물이어야 효과를 보장할 수 있을 뿐만 아니라 부작용을 최소화할 수 있기 때문임. 따라서 표적 생체분자의 구조를 기반으로 활성조절 물질을 디자인하는 것이 가장 빠르고 효과적임.
- 아래 그림은 실제로 병원성 진균의 병원성을 조절하는 인산화효소 중 하나인 CDK2 표적 활성조절 물질 개발 과정에서 사용된 구조기반 약물 개발의 사례를 보여주고 있음. 상보성을 극대화하기 위하여 화합물 fragment들의 첨가/변형을 유도하여 IC<sub>50</sub> 값을 극대화하는 과정을 거침. 위의 과정은 글로벌 제약회사에서도 주로 사용하고 있는 Structure-based drug design (SBDD)를 의미함.
- SBDD과정을 거친 후 최종 활성조절물질 후보군을 선별하는 과정에서 생화학적 실험기법이 추가적으로 요구되어지며, 위에서 언급한 바와 같이 위와 같은 약물개발 방법은 가장 효과적이며 빠르다고 알려져 있음. SBDD과정에서 선행되어야 할 가장 중요한 과정은 단백질의 3차원 구조를 확보하는 것임. 화합물이 표적해야 할 활성 잔기, 활성 부위 혹은 단백질-단백질 상호작용 부위를 알아야만 상보결합을 기반으로 표적 가능한 약물을 디자인할 수 있기 때문임.

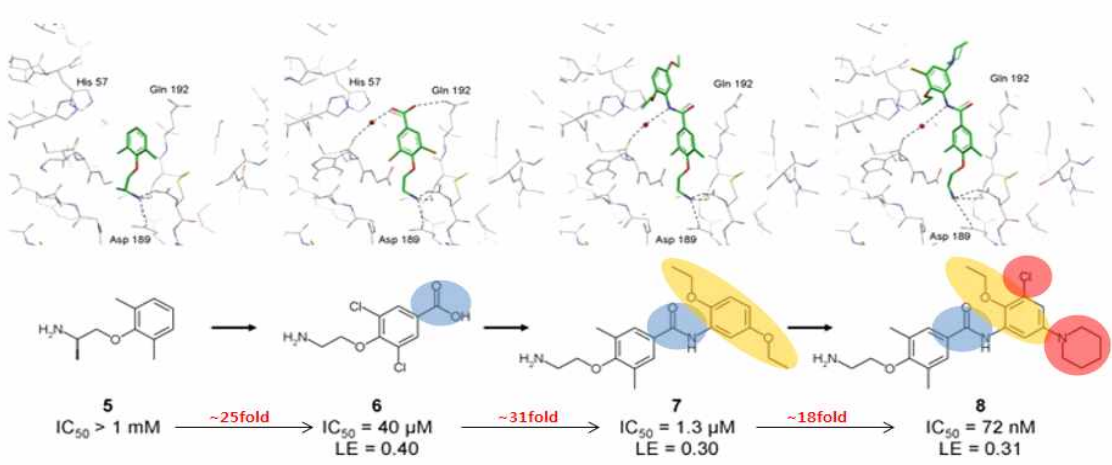


그림 8. CDK2 표적 구조기반 활성조절 물질 개발의 사례

- 단백질 구조 규명 방법 중 본 연구실에서는 X-ray를 이용한 구조결정학(X-ray crystallography)적 방법을 주로 사용함. 이는 가장 고해상도의 단백질 분자를 원자 수준에서 관찰할 수 있으며, 따라서 화합물과 효소 사이의 화학적 상호작용을 원자 수준에서 분석해낼 수 있다는 장점을 가지고 있음.
- 단백질 결정구조 및 컴퓨터를 이용한 *in silico* 모델링을 통하여 얻어낸 항진균 표적 kinase 및 phosphatase의 구조를 인간의 상동단백질과 비교/분석한다면 약물 표적부위를 원자 수준에서 제시할 수 있음. 이는 위에서 언급한 SBDD 과정에서 필수적으로 요구되어지는 단백질 구조 플랫폼으로 사용 가능함.

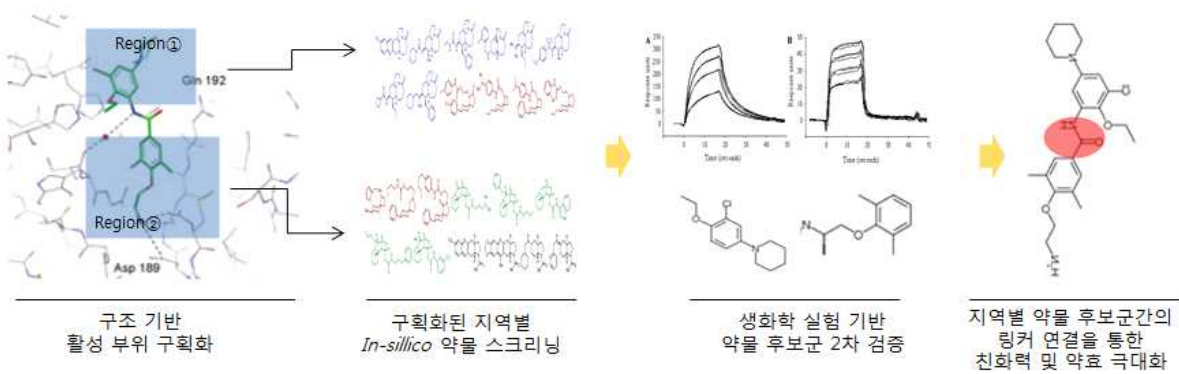











그림 9. Crystallographic fragment based drug development 흐름도

## 1-4. 선행연구 내용 및 결과

### □ 본 참여 연구진의 연구성과 요약 및 대표성과

- 본 연구진은 포스트게놈 다부처 유전체 사업의 미생물유전체전략연구사업단을 통해 ‘농·식품 미생물의 기능유전체 기반 다중오믹스 정보 네트워크 분석’ 연구를 수행한 바 있음(1단계 연구). 연구를 통해 표준화된 참조유전체 정보를 제공함은 물론, 유용 유전자원 및 미생물 유래 바이오 소재를 발굴함. **핵심 연구성과인 우수한 연구기반지표(SCI급 논문게재) 및 사업화지표(지식재산권) 성과를 목표치 대비 초과 달성하였고, 전략성과인 원핵미생물 참조유전체 해독 및 분석과 유용 유전자원확보 성과를 보유하고 있음.**
  - ✓ 전체 29편의 논문 게재(해당분야 상위 5% 6편, 상위 20% 20편)
  - ✓ 유용 유전자원 확보 85건
  - ✓ 표준 유전체 해독 90건(NABIC등록 완료)
  - ✓ 특허 출원 횟수 6회(국내 4건, 국제 2건), 등록 2건
  - ✓ 기타(학술발표 40건, 교육지도 2건, 인력양성 17건, 홍보전시 2건)
- 이 중 논문 성과의 경우 양적 뿐 아니라 질적으로 매우 우수한 성과를 나타냄. 과제를 통해 게재한 논문성과 중 각 분야 상위 15%에 해당하는 논문 게재지와 편수는 다음과 같음.

저널표식	저널명	편수	상위그룹	IF
	Nature Communications	4	MULTIDISCIPLINARY SCIENCES (상위 4.69%)	12.124
	Nucleic Acids Research	2	BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY (상위 4.83%)	10.162
	Molecular Plant Pathology	1	PLANT SCIENCES (상위 8.02%)	4.697
	mBio	1	MICROBIOLOGY (상위 8.80%)	6.956
	ACS Synthetic Biology	1	BIOCHEMICAL RESEARCH METHODS (상위 8.97%)	5.382
	PLOS Genetics	1	GENETICS & HEREDITY (상위 9.58%)	6.100
	PLOS Pathogens	1	MICROBIOLOGY (상위 10.40%)	6.608
	Environmental Microbiology	1	MICROBIOLOGY (상위 14.40%)	5.395
	Scientific Reports	5	MULTIDISCIPLINARY SCIENCES (상위 15.63%)	4.259

### □ 동·식물 모델 미생물의 기능유전체 변이균주 라이브러리 구축 현황

- 본 연구 과제를 통해 구축한 동/식물 병원성 모델 미생물의 기능유전체 라이브러리를 활용하여 다중오믹스 정보 분석을 수행할 계획임. 동물 병원성 모델 미생물인 *Cryptococcus neoformans*의 114개 탈인산화효소에 대한 유전자 변이균주 라이브러리를 구축하였으며, 식물 병원성 모델 미생물인 붉은곰팡이(*Fusarium graminearum*)의 119개 P450 중 102개 유전자, 32개 peroxidase 유전자, 157개 WD40 유전자(152주)에 대한 결손변이체 라이브러리를 구축하였음(그림 10).
- 본 연구진은 또한 선행연구를 통해 *C. neoformans*의 155개의 전사인자(transcription factor) 유전자에 대한 322개 균주의 변이체 라이브러리와 114개의 인산화효소(kinase) 유전자에 대한 226 균주의 변이체 라이브러리를 보유하고 있으며, 이들 548개의 균주를 대상으로 게놈 수준의 형질분석(Phenomics analysis)

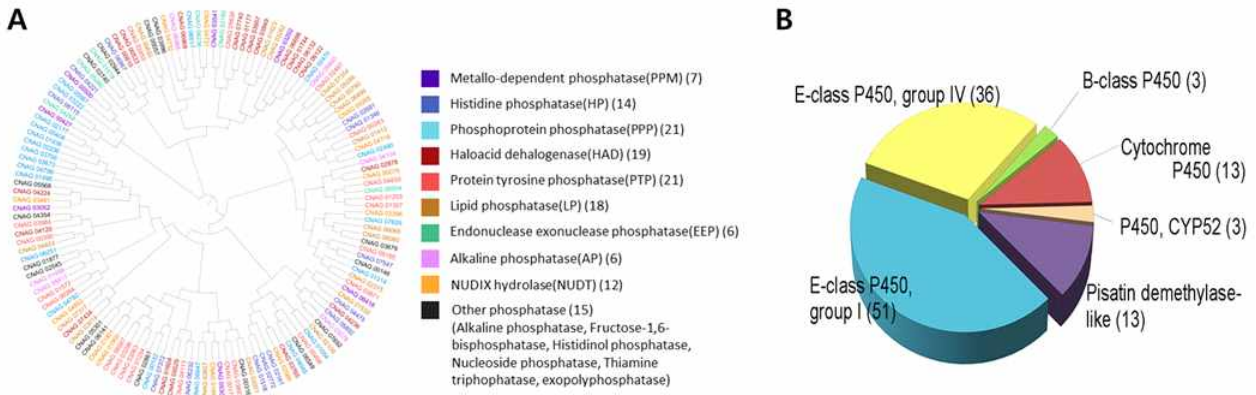


그림 10. 과제를 통해 구축한 기능유전체 라이브러리 현황 (A) 크립토코쿠스 탈인산화효소 (B) 붉은곰팡이 P450 유전자에 대한 결손변이균주 라이브러리

을 실시함. 또한 동물 및 곤충모델을 활용하여 대용량 *in vivo* 병원성 관여도를 측정하였고, 30가지의 *in vitro* 형질을 분석하여 미생물의 생육, 분화, 스트레스 반응, 약물 저항성 및 동물 병원성 등에 관여하는 기능유전체 네트워크 분석 결과를 세계적인 학술지에 발표함. 이를 통해 진행 미생물의 주요 신호전달인자에 대한 기능유전체 네트워크를 얻을 수 있었고, 주요 신호전달인자에 대한 다중오믹스 분석이 진행될 수 있음(그림 11).

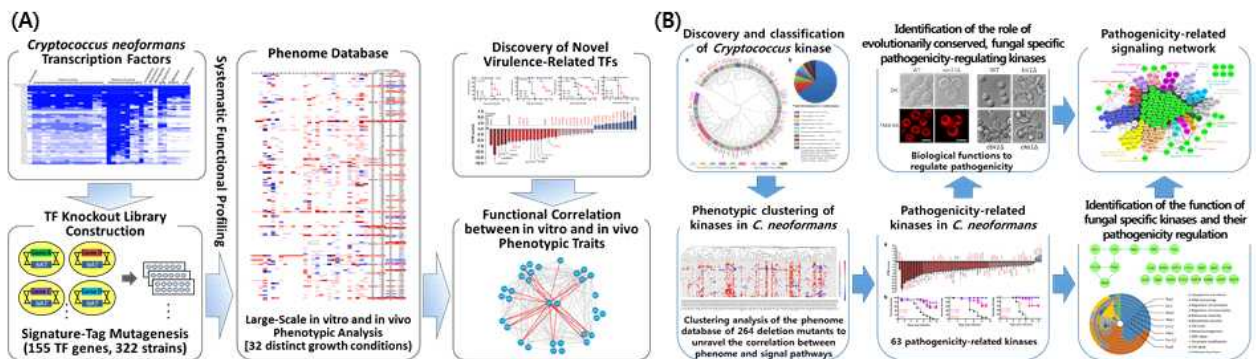


그림 11. 크립토코쿠스 전사인자(A) 및 인산화효소(B)의 라이브러리 및 네트워크 구축 (Jung KW, et al. 2015 *Nat Commun*; Lee KT, et al. 2016 *Nat Commun*)

- 본 연구진은 *F. graminearum*을 대상으로 한 선행연구에서도 675개의 전사인자에 대한 변이체 라이브러리를 확보하여 식물병원성을 포함한 곰팡이의 주요 발달과정과 다양한 스트레스 반응에 대한 형질을 분석하여 세계적인 학술지에 발표함(Son et al. 2011 PLOS Pathog). 또한 확보한 전사인자 라이브러리를 활용하여 DNA손상복구(Son et al. 2016 Sci Rep), 열충격(Bui et al. 2016 Sci Rep), 산화스트레스 반응(Lee et al. 2018 Mol Plant Pathol) 등에 관련된 다중오믹스 기반 신호전달 네트워크를 성공적으로 구축함. 이러한 본 연구진의 선행연구 결과와 축적된 노하우를 바탕으로 식물병원성곰팡이에 대한 분자유전학 연구 모델로서 *F. graminearum*을 활용한 전사인자, 인산화효소, 탈인산화효소, WD40 유전자 등에 대한 다중오믹스 분석이 진행될 수 있음.

#### □ 고부가가치 농·식품 유용미생물 90종 선정 및 전장유전체 분석

- 농업(살충, 살균, 축산폐자원에 적용 가능한 유용 미생물 22균주), 식품 유용성(인체 장건강, 면역증강, 화장품기능성 등에 적용 가능한 유용 미생물 17균주), 산업 유용성 미생물(42균주), 신종유전자원 미생물(14균주), 비교유전체학 유용 미생물(9균주) 및 외부로부터 유전체 분석 추천 미생물(14균주)을 포함한 총 125종의 원핵 미생물 선별 및 균주 확보함(그림 12). 균주선정위원회를 구성하여 위원회 추천 혹은 공모 요청된 균주 9종을 포함하였음.
- 1단계에 선정한 90종의 농·식품 유용미생물의 유전체 해독을 위해 PacBio RSII를 이용하여 염기서열을 분석하여 각 균주들의 전장유전체 해독을 완료함(그림 12). 총 1종의 유전체 해독 완료(85종 전장

유전체 해독)함. 확보된 90건의 CLgenomics software(43)/SMRT portal(47)기반 참조유전체 정보를 NCBI 및 NABIC에 등록완료함.

- 해독된 유전체 정보는 90건의 참조유전체 수준의 유전체 정보로 NABIC등록을 통해 공개하였으며, 관련분야 활용도가 매우 높음. 본 과제에서는 선별된 유용미생물의 참조유전체 정보를 적극 활용할 계획임(그림 12)

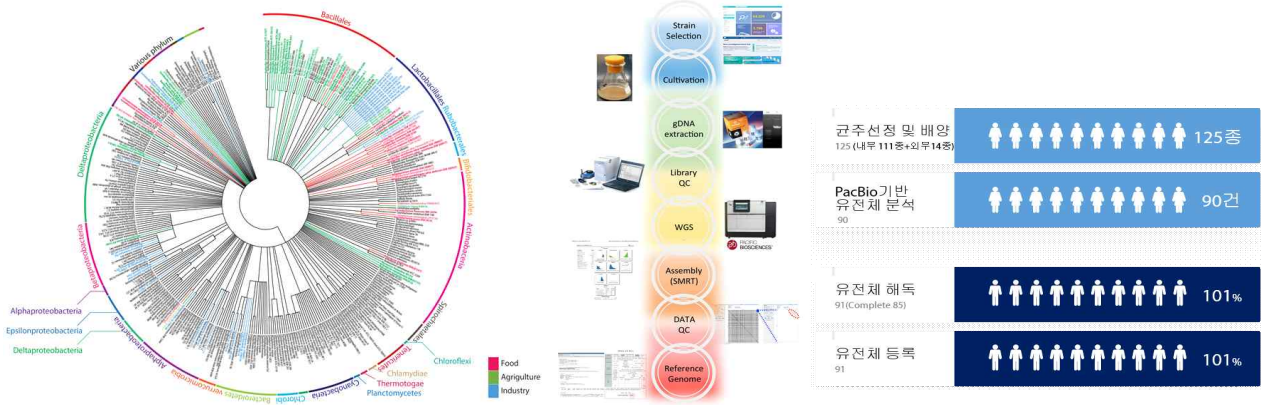


그림 12. 본 연구진이 1단계에 선정한 농·식품 유용 미생물 90균주의 분류학적 계통도(좌) 및 유전체 해독을 위한 염기서열분석 흐름도(중) 및 전장유전체 분석 결과(우)

### □ 비교유전체학 및 게놈 수준의 표현형질체 (phenomics) 분석 데이터 기반 농식품 유용 미생물 및 유전 자원 발굴

- 내열성 Bacillales 목의 전장 유전체 정보를 확보하여 농식품 발효공정에 유용한 Bacillales 목의 보유 균주(*Geobacillus*, *Bacillus*)의 80여종에 대한 비교유전체(pan-genome/core-genome) 내열성 유전 인자 후보군 발굴을 위한 기능유전체 분석을 수행함. 확보한 참조유전체 중 중온 및 고온 균주들이 분포하는 Bacillales 목에 속하는 균주들의 Phylogenomics분석을 통한 고온 적응 진화에 관련된 특성을 확인하고자 유전자의 상관성을 분석함. 이를 통해 발효균주의 내열성 향상을 위한 주요 유전자원 발굴 및 확보(그림 13).

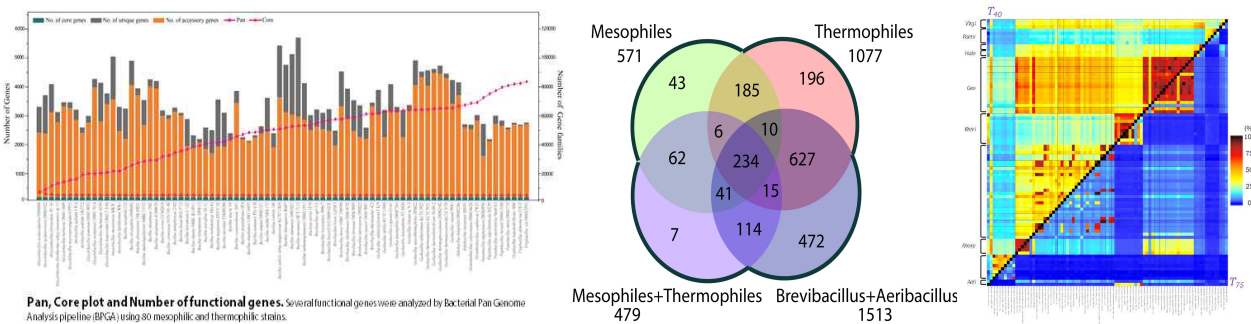


그림 13. Bacillales 목의 비교유전체 및 계통유전체학 비교를 통한 고온특성의 core 유전자 확보

### □ NGS 분석기반 농·식품 유용유전자원의 Mega-throughput 탐색기술개발

- 농·식품 관련 유용 미생물 및 자연환경시료(메타지놈)로부터 유용한 유전자원 확보를 위하여 차세대 염기서열 방법을 이용한 새로운 초고속 유용유전자원 탐색법을 개발하였음. 1단계 연구수행을 통해 다양한 환경에 서식하는 미생물의 다양성 정보를 확보한 후, NGS기반 효소 탐색법(NGS-Based Definitive Enzyme Research(FINDER))을 적용하여 신규한 천연희귀당 생산 및 전환능을 지닌 설탕 대체감미료 생산용 당이성화 효소균의 계통수 분석을 통해서 다양한 환경에 서식하는 효소의 물리화학적 특성 예측을 통해 그에 따른 구조기반 범주화가 가능하여 공정조건에 따른 맞춤형 유용유전자원을 제공할 수 있음을 확인함.

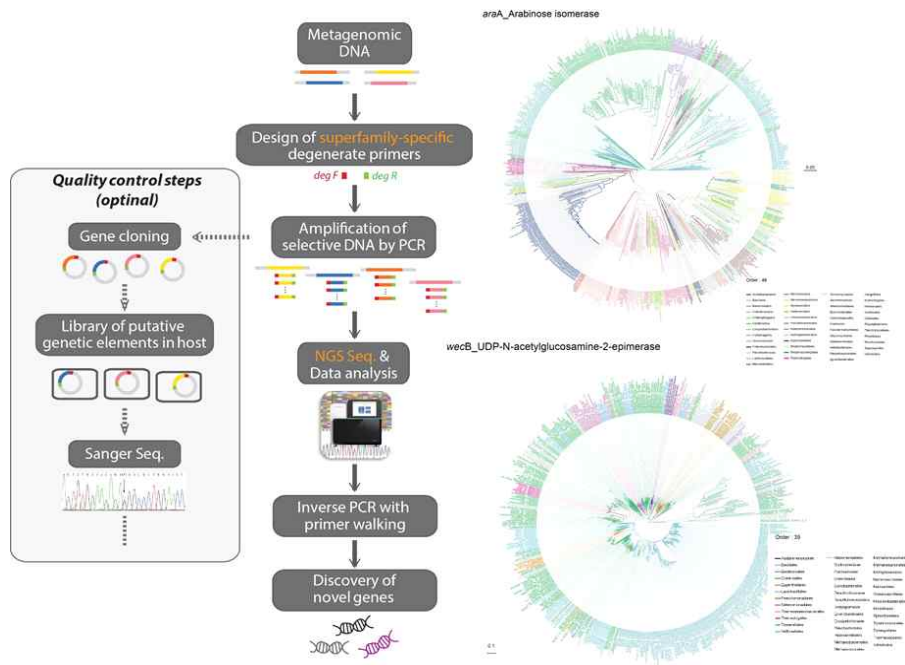


그림 14. FINDER strategy를 이용한 효소 탐색법 모식도 및 빅데이터 기반 다양한 환경의 미생물유래 당이성화효소 계통수분석

#### □ 농·식품 유용 미생물의 오믹스 연구

- *E. coli* BL21(DE3)의 유전체 염기서열을 해독하고(J Mol Biol 2009)과 *E. coli* B 균주의 실험진화를 통해 진화와 돌연변이의 상관관계를 규명하였음(Nature, 2009). 대장균 B 균주와 K-12 균주의 각종 오믹스 정보를 시스템 수준에서 통합적으로 분석하고, 컴퓨터 시뮬레이션을 통해 대사 네트워크 모델을 개발하였음(Genome Biol 2012). *E. coli* BL21(DE3)의 유전체 구조와 전사체 구조를 규명하여 최신 유전체 정보를 확보하였음(Nucleic Acids Res 2017).

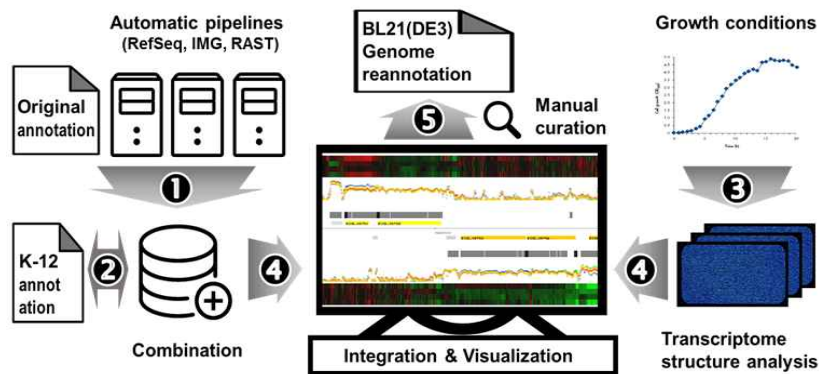


그림 15. *E. coli* BL21(DE3) 유전체 및 전사체 통합분석

- *E. coli* BL21(DE3) 유래 조절유전자를 이용하여, 생산시기 및 발현량을 정확히 조절 가능하며, 다양한 대장균 숙주에 이용될 수 있는 단백질 발현시스템을 개발하였음(ACS Synth Biol 2017). 대장균의 고농도배양(high cell density culture)에서 전사체와 단백질체 변화를 통합분석하였음(Biotechnol Bioeng 2003). 대장균의 부탄올 내성 메커니즘을 이해하기 위해 전사체, 형질체 데이터를 분석하고, 관련된 단백질 상호작용 네트워크를 분석함(J Microbiol Biotechnol 2017).

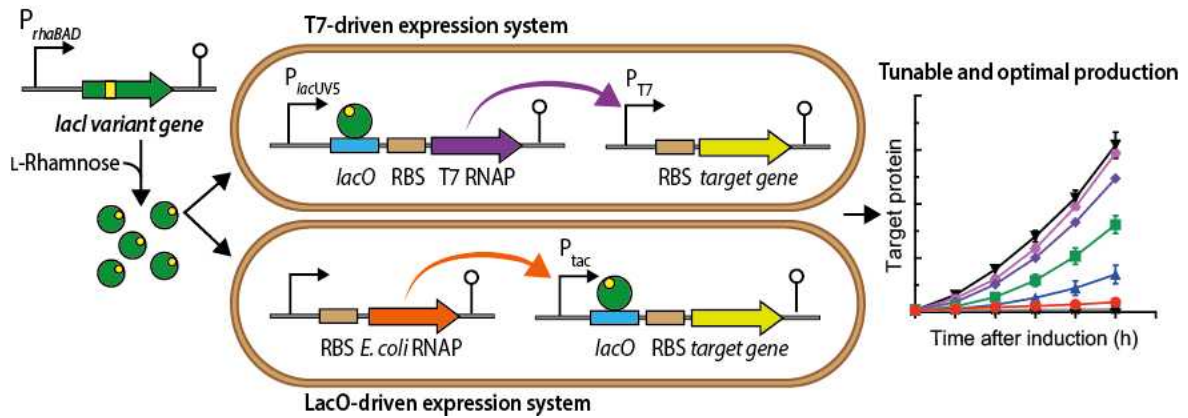


그림 16. LacI 변이체를 이용한 단백질 발현시스템 개발

□ 유전자 조절 네트워크 모델 개발 및 활용 연구

- 유전자 발현 정보로부터 유전자 조절 네트워크를 구성하는 알고리즘을 개발하였음(Bioinformatics, 2007). 메탄생성균인 *Methanococcus maripaludis*의 생체부품목록을 완성하고(Genome Res 2011), 메탄생성경로에 관여된 모든 유전자들을 규명하고 이들이 어떻게 발현이 조절되고 주위환경에 영향을 받는 가에 관한 유전자 조절 네트워크 모델을 개발하였음(Genome Res 2013). 메탄생성을 조절하는 중요 전사인자를 발굴하고 그 기능을 유전자 결손실험을 통해 검증하였음. 수소와 formate를 electron source로 이용하였을 때의 메탄생성경로의 regulation 차이점을, 모델링을 통해 예측하고 실험적으로 검증하였음(J Bacteriol 2013).

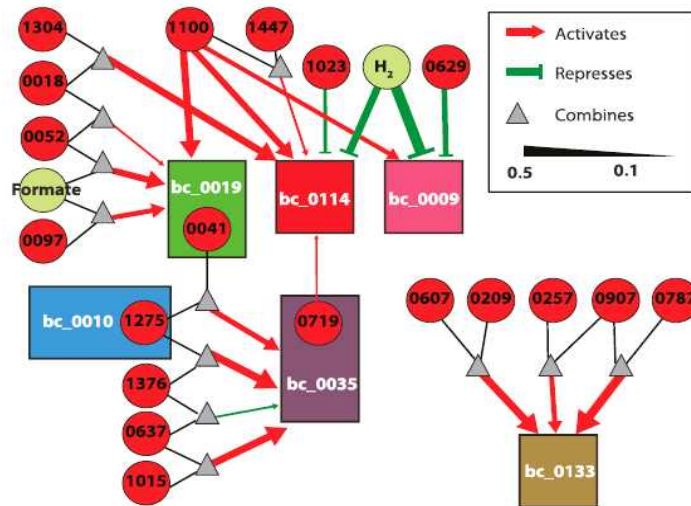


그림 17. 메탄생성경로 관련 gene regulatory network

□ 해양성 세균 *N. marinus* S1-08 유래 CIR 구조 연구 사례

- 세균의 막 단백질 중 하나인 CIR은 세포 내 항상성조절을 위하여 세포 외부에 존재하는 염소이온을 세포 내로 수송하는 역할을 담당하는 수송체임. 본 연구실은 해당 단백질의 구조를 최초로 규명하여 NTQ 모티프에 의하여 염소 이온이 어떻게 세포 내부로 이동하는지에 대해 밝혔음. 이를 바탕으로 optogenetics 어플리케이션으로써의 활용 적용 가능 여부를 알아보기 위한 추가 실험을 수행 중에 있음 (Kim et al. 2016 Nat Commun)

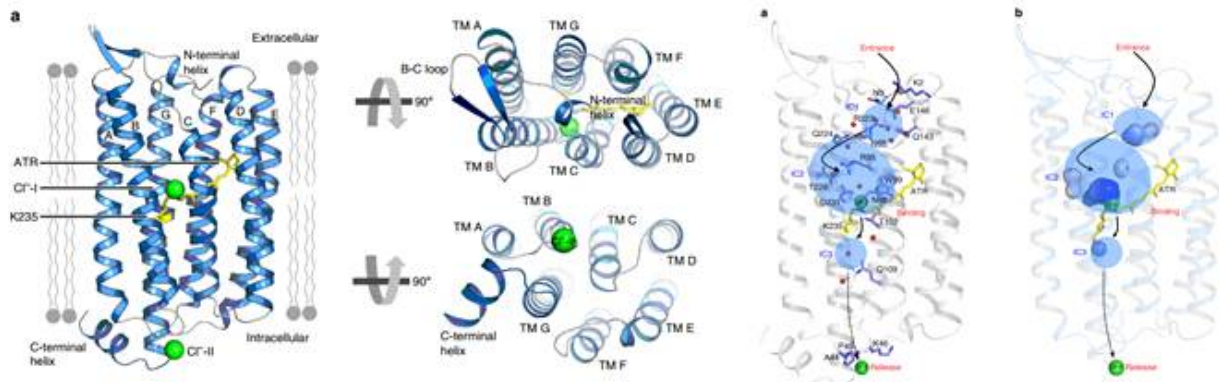


그림 18. CIR의 전체 구조 (좌) 및 NTQ 모티프를 통한 염소이온 수송과정 모식도 (우)

□ 동물 병원성 진균 *C. neoformans* (cn) 유래 Bud32의 구조예측 및 약물 표적부위 동정

- Bud32 표적 약물 개발을 위한 플랫폼 제공을 위해 cnBud32의 구조를 예측하였고, 그 결과 *Methanococcus jannaschii* (mj), *Saccharomyces cerevisiae* (sc)의 결정구조와는 달리 cnBud32만이 독특하게 가지고 있는 extended loop 부분을 발견하였음(그림 19). Bud32는 KEOPS 복합체를 이뤄 tRNA modification을 조절한다고 알려져 있음. 기존에 알려진 KEOPS 복합체와는 달리 Bud32의 extended loop이 KEOPS 복합체에 추가적으로 존재함을 밝혔고, 이것의 생물학적 의미를 분석하는 과정에 있음(그림 19). 해당 부분이 KEOPS 복합체를 조절한다는 결과가 도출된다면 해당 부위는 약물 표적부위로써의 가치를 지닌다고 예측할 수 있음.

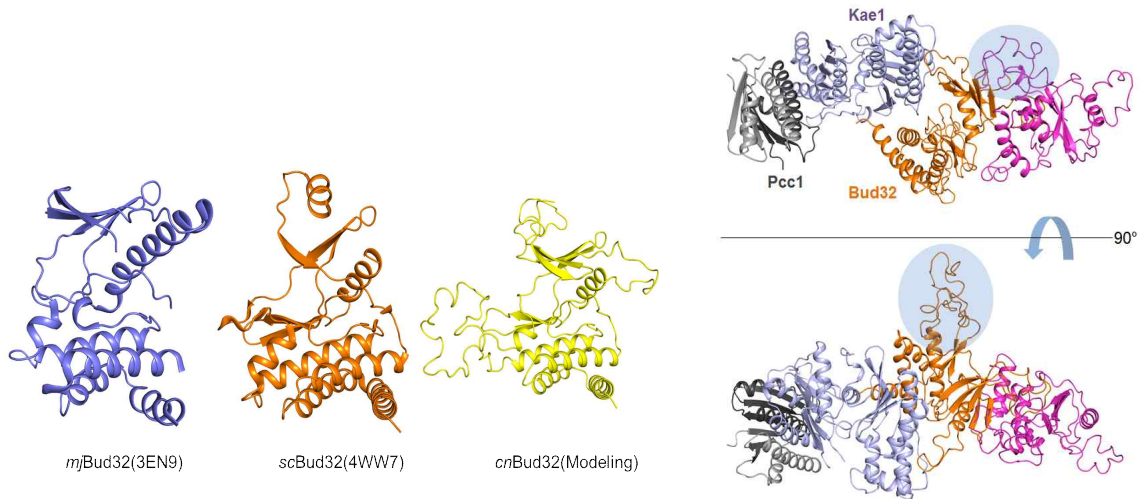


그림 19. 기존에 규명된 Bud32 및 cnBud32의 예측구조 비교(좌) 및 Bud32 약물 표적 부위로써의 가치를 파악하기 위한 cnKEOPS 복합체 구조 예측(우)

□ 동물 병원성 진균 *C. neoformans* (cn) 유래 CMGC/CK2(상) 및 IRE LD(하)의 구조예측 및 약물 표적 부위 동정

- 선행연구를 통해 cnCK2가 *C. neoformans* 표적 kinase 중 하나로 선정되었으며, 이것의 약물개발을 위한 단백질 구조 플랫폼을 제공하기 위하여 관련 연구를 진행 중에 있음. *E. coli* 재조합단백질 과발현 시스템을 이용했을 때 insoluble한 성격을 가지고 있음을 확인하였으며, 단백질의 N-말단에 Trx fusion 단백질을 연결하여 해당 문제를 해결하였음. 현재 95% 이상의 순도를 가지는 단백질 획득 및 단백질 결정화에 성공하였음(그림 20). Synchrotron에서 제공하는 양질의 X-ray를 이용하여 단백질 결정 회절 실험을 계획 중에 있음 (자세한 연구 과정은 ‘연구개발 추진방법’ 참조). Bud32와 마찬가지로 CMGC/CK2의 구조가 규명됐을 경우 사람의 상동단백질 구조와 비교하여 아미노산 잔기 수준에서의 약물 표적 부위 분석이 가능함.
- 선행연구를 통해 cnIRE의 luminal domain(LD)이 *C. neoformans* 표적 생체분자 중 하나로 선정되었



으며, 이것의 약물개발을 위한 단백질 구조 플랫폼을 제공하기 위하여 관련 연구를 진행 중에 있음. *E. coli* 재조합단백질 과발현 시스템을 이용했을 때 CMGC/CK2와 비슷하게 insoluble한 성격을 가지고 있음을 확인하였으며, 따라서 단백질의 N-말단에 Trx fusion 단백질을 연결하여 해당 문제를 해결 하였음. 현재 95% 이상의 순도를 가지는 단백질 획득 및 단백질 결정화에 성공하였음(그림 20). Synchrotron에서 제공하는 양질의 X-ray를 이용하여 단백질 결정 회절 실험을 계획 중에 있음 (자세한 연구 과정은 ‘연구개발 추진방법’ 참조). Bud32, CMGC/CK2와 마찬가지로 IRE LD의 구조가 규명됐을 경우 사람의 상동단백질 구조와 비교하여 아미노산 잔기 수준에서의 약물 표적 부위 분석이 가능함.

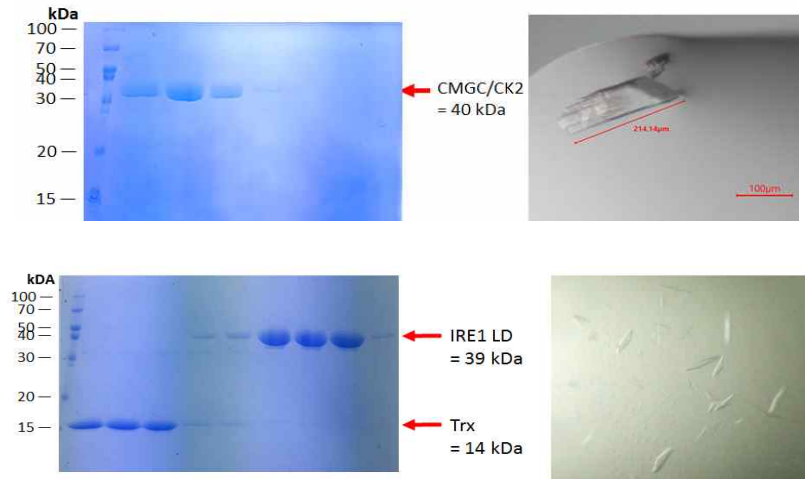


그림 20. cnCMGC/CK2 (상) 및 cnIRE LD (하) 정제 결과 (좌) 및 단백질 결정 형성 결과 (우)

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 2-1. 연차별 연구개발과제의 수행 내용

- 단위/제1세부 연구(연세대 반응선) 및 제1위탁 연구(서울대 손호경): 농/축산/식품 유용 주요 동·식물 모델 진균의 유용유전자 발굴 및 다중오믹스 분석 플랫폼 적용

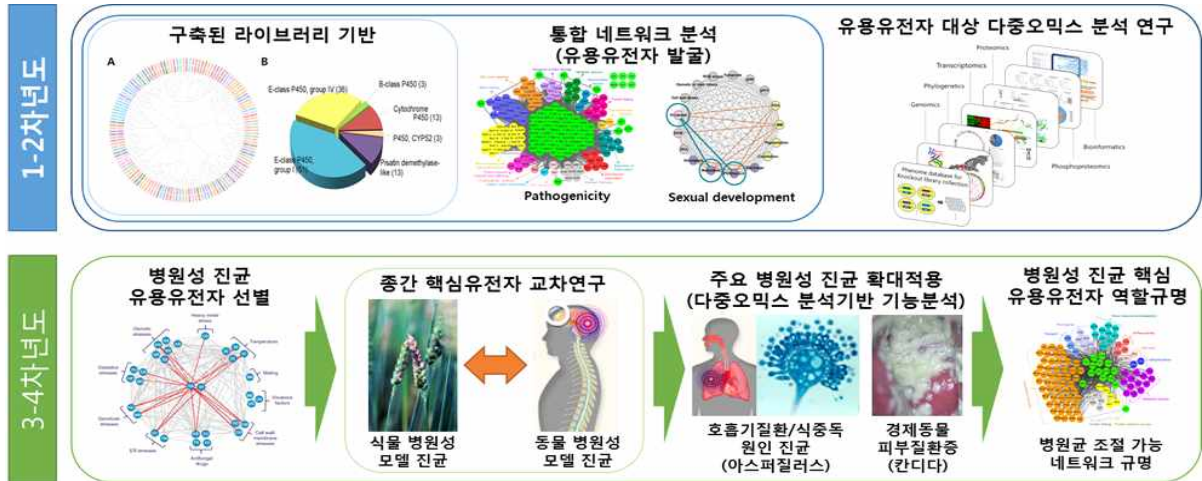


그림 21. 2단계 단위연구과제 플랫폼

#### [제1세부]

- 동물 병원성 모델 진균에서 구축된 탈인산화효소 라이브러리를 활용한 다중오믹스 네트워크분석

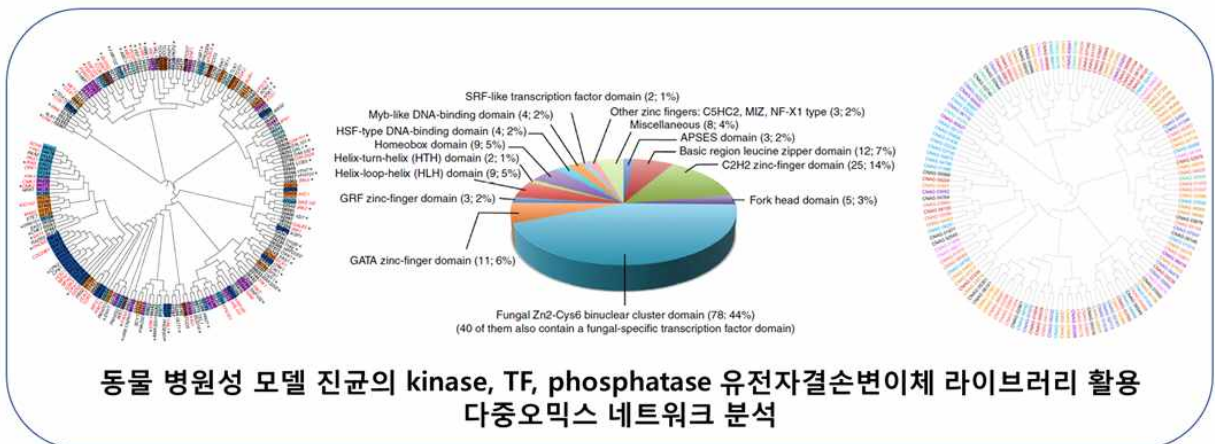


그림 22. 유전자결손변이체 라이브러리 활용 다중오믹스 네트워크 분석

- 139개 탈인산화효소 유전자 중 82%에 해당하는 114개 유전자의 결손변이체를 제작하였고, 이 중 18%에 해당하는 25개 유전자는 essential 유전자로 분류해 유전자 결손변이체 제작을 완료함.
  - 전체 탈인산화효소 결손변이체에 대해 30여개 조건에서 in vitro 형질분석 진행함.
  - In vivo 병원성 조절능력 검증을 위해 곤충모델에서의 병원성 관여 여부 확인함.
  - 병원성 조절 탈인산화효소 Ymr1에 대해 phosphoproteomics 수행.
  - 병독성인자인 멜라닌 생성능에 변화를 보이는 23개의 결손변이체에 대해 2가지 다른 멜라닌 생성 촉진 배지에서 표현형 추가 확인 및 병독성인자 생성 핵심 탈인산화효소를 발굴함.
  - 25개의 생장필수 추정 유전자들의 생장필수 여부에 대해서 추가 검증 수행함.
  - In vivo 병원성 조절능력 검증을 위해 대용량 마우스모델 병원성 실험(signature-tagged mutagenesis) 수행, 24개 병원성 조절 탈인산화효소 발굴 및 분자생물학적 기능 분석 진행중임.

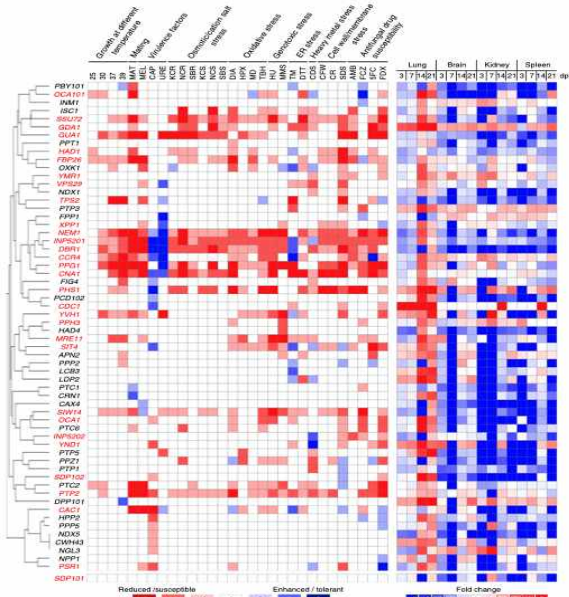


그림 23. 탈인산화효소 결손변이체 라이브러리의 형질 heat map

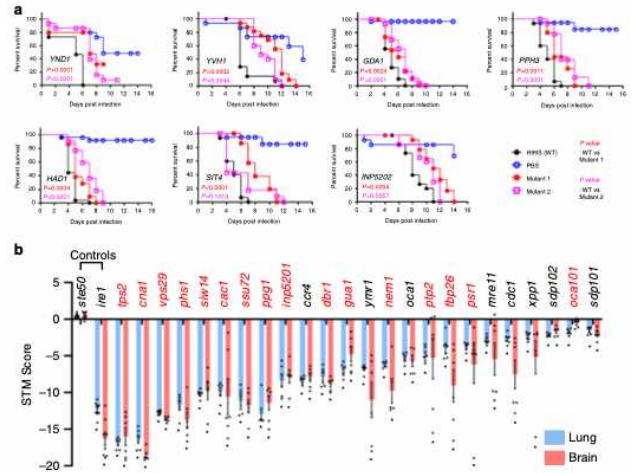


그림 24. 병독성 조절 탈인산화효소

□ 주요 동·식물 병원성 진균에서의 주요 신호전달인자 기능 및 다중오믹스 연구



그림 25. 중간 핵심유전자 교차 연구 및 다중오믹스 기능분석

- 동물병원성 진균 *Cryptococcus neoformans*의 뇌 감염에 중요한 것으로 알려진 전사인자 Hob1의 숙주 환경 모방 조건에서의 전사체 분석과 ChIP(chromatin immunoprecipitation) assay 방식을 이용하여 하위신호전달인자를 발굴함.
- 진균 병원성 조절 유용 전사인자 Hap2의 하위신호전달인자 발굴을 위한 ChIP assay를 수행함.
- 단백질체 분석 기술을 사용해 항진균제 타겟 후보인 인산화효소 Cka1이 이루는 CK2 복합체의 단백질간의 상호작용을 규명함.
- 식물병원성 모델 진균인 *Fusarium graminearum*에서 발굴한 병원성 및 유성분화를 조절하는 핵심 WD40 유전자를 동물병원성 진균에서 이종상동유전자 동정을 통해 발굴하였고, 이들의 기능 연구를 위한 상동유전자 발굴 및 8개의 유전자에 대한 결손변이균주를 제작함.
- 동물병원성 진균 *Candida auris*에서 cAMP 신호전달기작과 병원성 조절 능력의 상관관계를 알아내기 위한 변이균주 제작 및 유전자 변이에 따른 표현형질 변화를 확인함.

□ 동물병원성 진균 유용 유전자 조절물질 스크리닝

○ 인산화효소 저해제 라이브러리를 활용한 항진균제 타겟 발굴

- 인산화효소 저해제 라이브러리를 이용하여 동물병원성 진균(*C. neoformans*, *C. albicans*, *A. fumigatus*, *C. glabrata*, *C. auris* 등)을 억제할 수 있는 효능을 스크리닝하고, 진균의 병원성을 조절하는 물질의 타겟 단백질을 발굴하고 약물-단백질 결합구조를 규명하는 연구를 진행하고 있음.

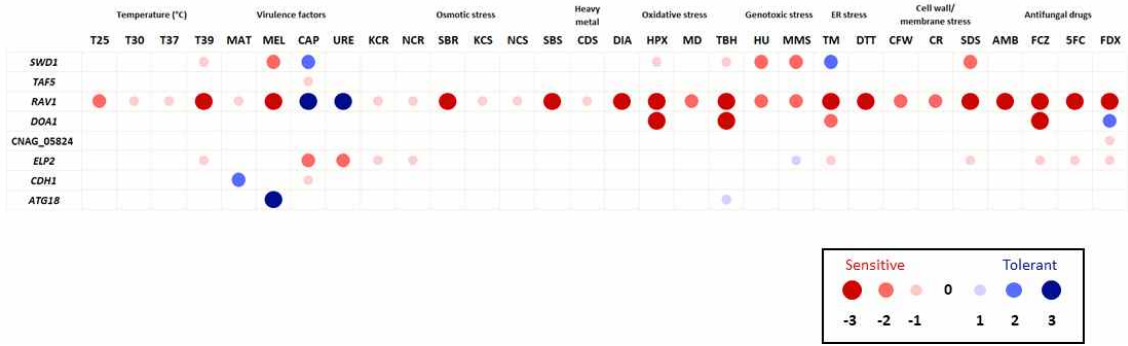


그림 26. WD40 유전자 결손변이체의 표현형 분석

□ 바이오매스 유용 미생물에서 구축된 유전체 정보 및 조작기술 활용 연구

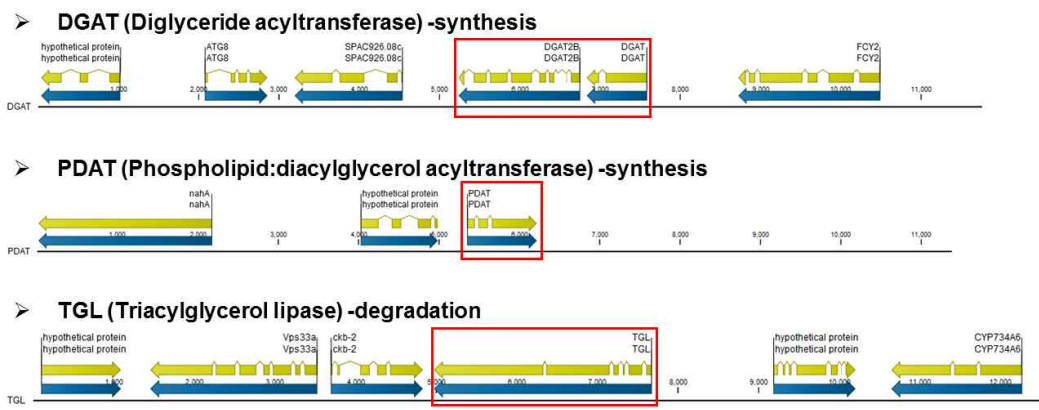


그림27. *Cryptococcus curvatus* triacylglycerol 합성 (*DGAT/DGAT2b* 및 *PDAT*) 및 분해 유전자 (*TGL*) genome 위치

○ 바이오매스 핵심 유전자 조작

- Triacylglycerol (TAG) 합성 및 분해 관련 유전자의 프로모터 부분을 세포 내 유전자 발현양이 일정하게 높은 histone H3와 같은 유전자의 프로모터로 치환된 유전자 과발현 균주를 제작함.
- Oil Red O 염색 기법을 이용한 TAG 정량 방법을 사용하여 제작된 변이균주의 TAG 발현양 변화 정도를 측정함.
- 유질성 효모 *C. curvatus*의 유전체 정보 및 유전자 조작기술을 활용한 바이오에너지/바이오매스 유용 생산 진균 개발
- 기존 결손변이체 제작 과정에서 생성된 균주들의 Southern blot 분석 결과 배수체(diploid) 또는 홀배수체(aneuploid)로 예상이 되어 야생형 균주의 배수성을 알아보기 위한 FACS (Fluorescence-activated cell sorting) 분석을 수행하였고, *C. curvatus*의 유전체가 단수체(haploid)로 존재한다는 것을 확인함.

□ 동물 병원성 모델 진균에서 구축된 탈인산화효소 라이브러리를 활용한 다중오믹스 네트워크분석

- 발굴된 주요 전사인자, 인산화효소 및 탈인산화효소와 관련된 유용유전자의 타 주요 동·식물 병원성 진균 (*Candida*, *Aspergillus*, 및 *Fusarium*) 내의 기능 분석 및 다중오믹스 연구
- 동물 병원성 진균 *C. neoformans*에서 casein kinase 2의 구성요소인 *CKA1*, *CKB1*, *CKB2* 유전자의 결손변이체를 이용하여 세포 표면과 내부 모습을 주사전자현미경과 투과전자현미경을 이용하여 관찰함.
- Cka1의 경우 본 연구진의 약물 스크리닝을 통해 CX-4945에 의해 저해된다는 것을 확인하였고, 사람유래 CK2와 비교할때 저해능 측면에서 큰 차이를 보이는 것을 보고한 바 있음. 현재 주요 병원성 진균들의 Cka1을 조사하여 고품이 특이적인 구조적 특징을 관찰하고 있음.
- 선행 연구를 통해 동물 병원성 진균 *C. albicans*에서 yeast casein kinase인 *YCK2* 유전자가 효모

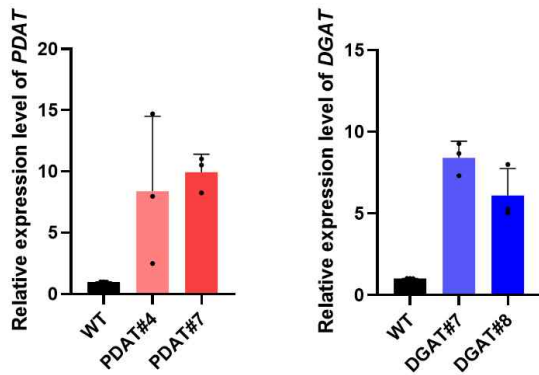


그림 28. PDAT와 DGAT 과발현 균주의 유전자 과발현 확인

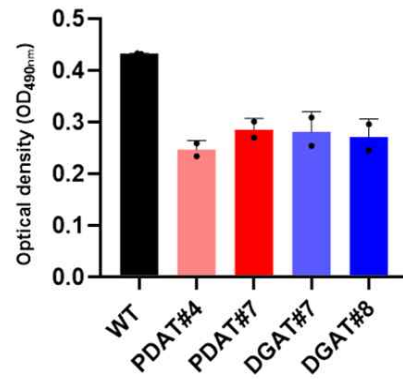


그림 29. PDAT 및 DGAT 과발현 균주의 TAG 정량 결과

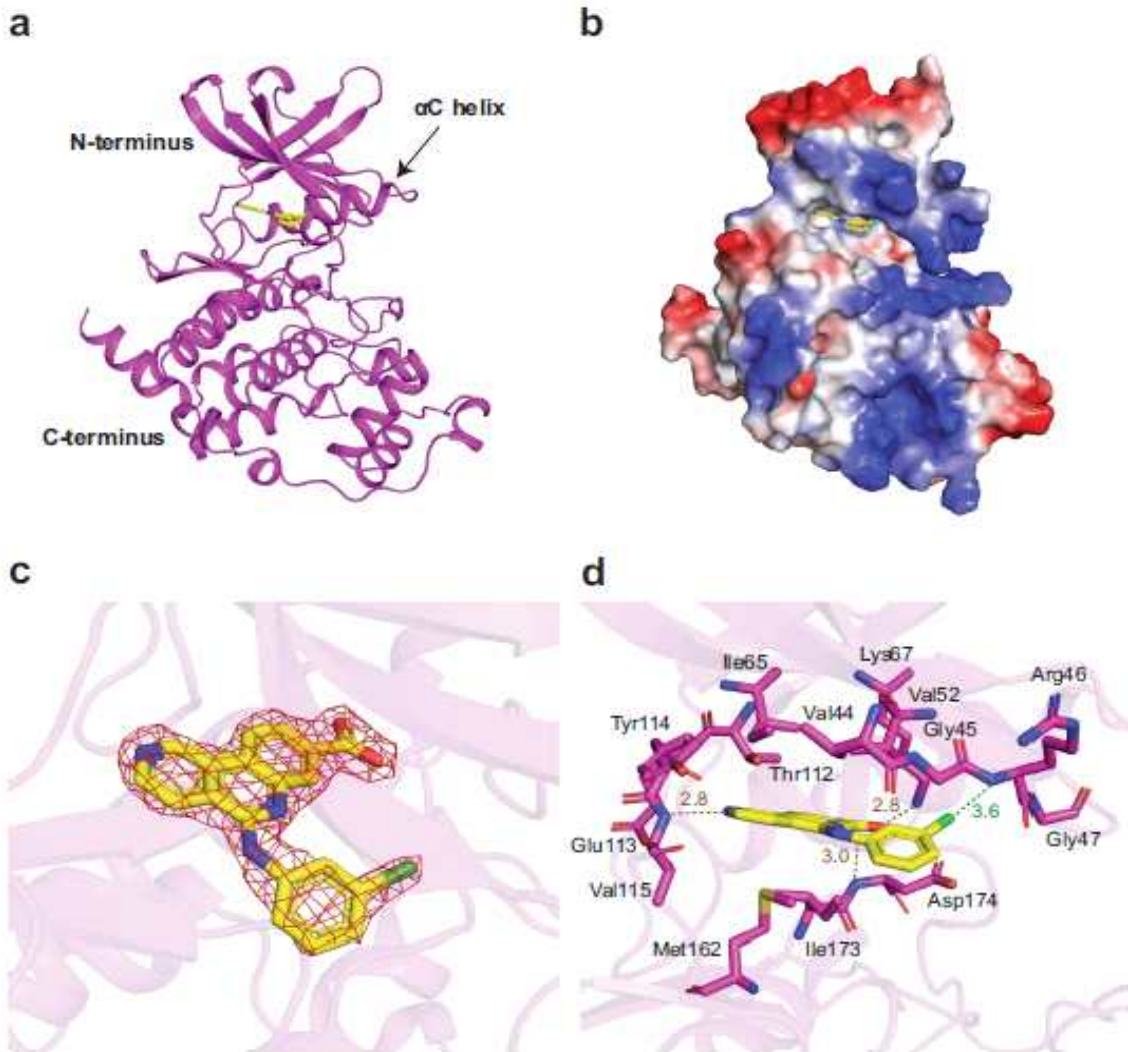


그림 30. *C. neoformans* Cka1과 CX-4945의 복합체 구조. (a) 전체적인 단백질 구조 cartoon 모델. (b) vacuum electrostatics를 이용한 단백질 표면 전하 분포도. (c) 인산화효소 활성 자리에 CX-4945 화합물이 결합하였음을 나타내는 2Fo-Fc map 결과. (d) CX-4945와 상호작용하고 있는 Cka1의 잔기들.

에서 균사로의 전환을 조절한다는 것이 밝혀졌지만, 그 조절 기전이 밝혀지지 않았음. 따라서 *YCK2* 유전자 결손변이체를 사용하여 전사체 및 대사체 분석을 통해 형태학적 전환에 대한 *YCK2* 유전자의 역할을 규명하였으며, 추가적으로 진균의 탄소 대사에 관여한다는 것을 알 수 있었음. 해당 내용은 2021년 3월 국제적 학술지 *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*에 게재함.

- *C. neoformans*에서 캡슐 유도 배자인 LIT과 FBS에서 *YAP1*, *BZP4*, *GAT201*, *ADA2* 결손변이체의 캡슐생산 관련 유전자의 발현을 확인함.

- MAPK(Mitogen-Activated Protein Kinase) 신호전달인자의 상호작용 연구를 위해 5개의 MAPK(Hog1, Mpk1, Mpk2, Cpk1, Cpk2)에 대한 이중 및 삼중 결손변이체를 제작하고, 고온 및 세포벽 스트레스 조건에 대한 반응이 MAPK에 의해 조절되는 것을 확인함. 또한, 고온 스트레스에서 6종의 전사인자(*HSF1*, *CRZ1*, *ADA2*, *SRE1*, *PZF1*, *ESA1*)가 세포벽 스트레스 하에서 세포벽 생합성과 관련된 4개 유전자(*CHS4*, *CHS7*, *CSR2*, *CDA1*)의 발현량이 MAPK에 의해 조절받음을 quantitative RT-PCR를 통해 확인함.

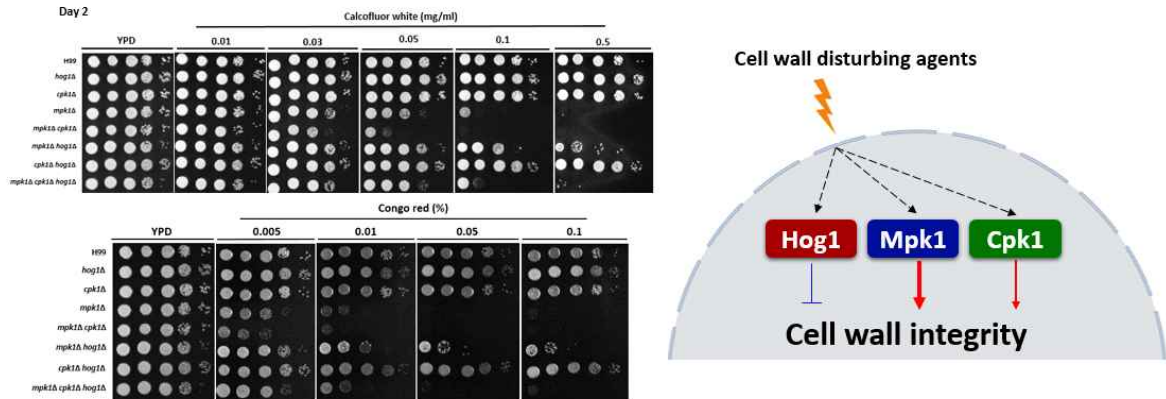


그림 31. 세포벽 스트레스에서의 결손변이체 형질 변환 관찰

- 주요 동·식물 병원성 진균에서 생성한 유전자 변이균주를 활용한 다중오믹스 비교분석 연구
  - *C. neoformans*에서 KEOPS 복합체 중에서 ATP 가수분해효소 역할을 하는 Kae1의 결손균주와 인산화효소의 역할을 하는 Bud32 결손균주, Bud32의 ATP가 결합하는 부분의 아미노산을 치환한 균주인 Bud32<sup>K54A</sup> 변이균주를 야생형 균주와의 전사체 분석을 진행함.
  - *C. neoformans*의 병원성과 세포벽 스트레스 저항성에 관여하는 전사인자 *ZFC2*의 결손변이체의 외형 및 내형을 주사전자현미경과 투과전자현미경을 이용하여 관찰함. 관찰 결과 *ZFC2* 결손변이체의 경우 야생형에 비해 캡슐 형성이 증가하는 것을 확인함. 전사체분석 결과 캡슐 관련 유전자 발현은 차이가 없음을 확인함.
- 동·식물 병원성 진균의 병원성/스트레스 반응성 조절 공통 신호전달 네트워크 발굴
  - 동물병원성 진균 *C. auris*에서 cAMP 신호전달기작과 병원성 조절 능력의 상관관계를 알아내기 위한 결손변이체를 대상으로 유전자 회복균주를 제작하였으며, 표현형질 회복을 확인을 통해 결손변이체의 표현형을 검증함. 또한 결손변이체의 병원성 실험을 진행하기 위해 마우스 모델에서의 병독성 실험 플랫폼을 확립함.

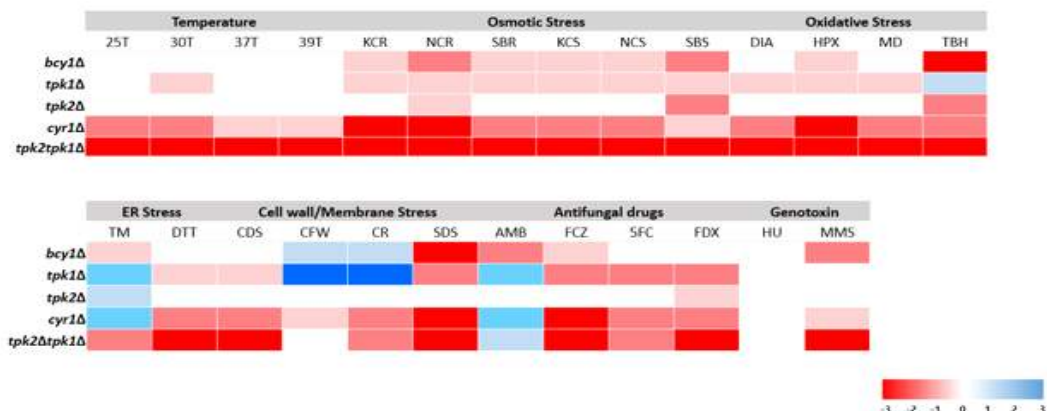


그림 32. 결손변이체의 스트레스 반응성에 대한 heat map

- 단백질-단백질 상호작용을 조절하는 WD40 도메인을 포함한 유전자를 대상으로 식물병원성 모델 진균인 *Fusarium graminearum*과의 중간교차연구를 위하여 동물병원성 모델 진균인 *C. neoformans*에서 WD40 도메인을 가진 유전자 132개를 발굴하였고, 이들의 기능 연구를 위해 28

개의 유전자에 대한 결손변이체를 제작함.

- 인체모사 neurovascular 칩을 이용하여 동물 병원성 진균의 혈관-뇌 장벽 통과 및 신경세포선호도에 관여하는 유전자를 발굴하였으며, 이러한 병 발생기작을 조절하는 메커니즘을 발굴함.
- 본 연구에서 밝힌 병원성 조절 탈인산화효소 Yvh1의 탈인산화효소 도메인 기능을 밝히기 위해 유전자의 도메인 서열을 변이시킨 균주를 제작하여 표현형질체 분석을 수행함. Yvh1 유전자의 기능은 탈인산화효소 도메인과 관련 없다는 것을 밝힘.

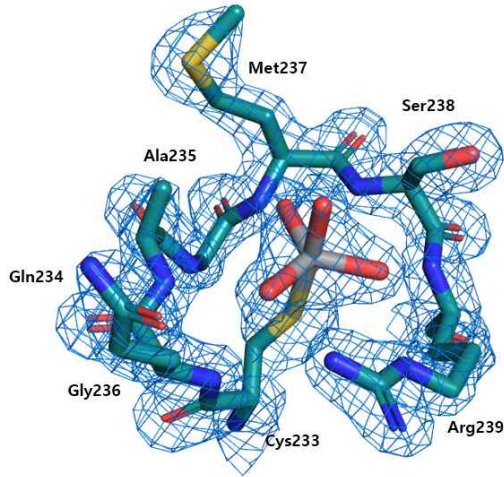


그림 33. *C. neoformans* 유래 탈인산화 효소 Yvh1 효소 활성 부위와 VO4의 2Fo-Fc map

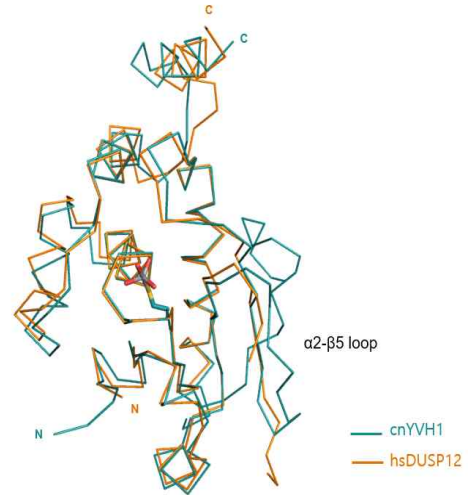


그림 34. *C. neoformans* 유래 탈인산화 효소 Yvh1 효소 활성 도메인과 *H. sapience* 유래 DUSP12의 Cα 기준 전체 구조 비교

□ 동·식물 병원성 진균 유용 유전자 조절물질 스크리닝

○ 동·식물 병원성 진균 유용성유전자를 표적하는 활성물질 스크리닝 시스템 활용

- 합성 화합물 라이브러리 업체 Selleckchem에서 제공하는 887개의 인산화효소 저해제 라이브러리를 사용하여 약물 후보물질을 발굴하기 위한 스크리닝을 진행하였으며, 대표적인 병원성 진균인 *C. neoformans*, *C. albicans*, *C. auris*, *C. glabrata*, *A. fumigatus*에 대한 MIC(Minimal inhibitory concentration) 측정을 진행하였고, 이 중 유의미한 결과가 나온 26개의 인산화효소 저해제를 확인함.
- 인체모사 neurovascular 칩을 활용한 약물 스크리닝 가능성을 제시하였으며, 칩에 형성된 선택적 투과막인 혈관-뇌 장벽을 통과하는 물질에 대한 스크리닝을 진행 중임.

표 1. 인간 병원성 진균에서 큰 효과를 나타내는 항진균 물질 후보

Rank	MIC (uM) of fungal species						Human kinase target
	1st batch		2nd batch				
	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. auris</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>A. fumigatus</i>	
9	6.25	12.5	6.25	12.5	12.5	12.5	Chk
6	12.5	6.25	12.5	12.5	12.5	6.25	Akt
12	12.5	12.5	12.5	50	25	12.5	Aurora Kinase
5	6.25	6.25	12.5	25	12.5	12.5	IκB/IKK
3	-	3.125	1.5625	12.5	3.125	6.25	CaMK

[제1세부위탁]

□ 붉은곰팡이의 핵심 WD40 유전자의 기능유전학 연구

- 본 연구팀은 1단계 연구기간동안 단백질 간의 상호작용에 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려진 WD40 유전자들에 대한 기능 유전체 라이브러리를 구축하였음. 결손돌연변이체 라이브러리는 붉은곰팡이(*Fusarium graminearum*)의 전체 157개의 WD40 유전자 중 120개의 유전자에 해당하는 결손변이균주를 포함함. 결손변이 균주는 1차적으로 co-dominant PCR을 통해 최종적으로는 Southern blot hybridization을 통해 확정되었음(그림 35).

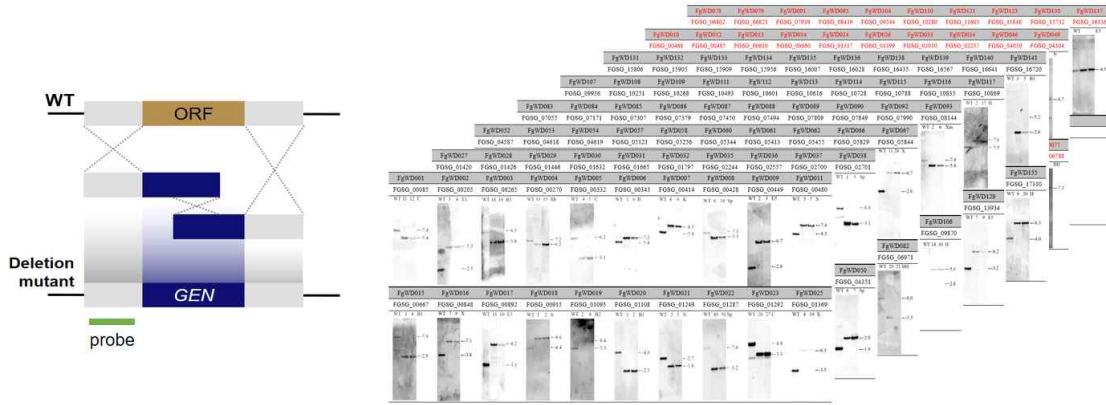


그림 35. WD40 유전자 결손변이체 제작 전략(왼쪽) 및 Southern blot hybridization 결과(오른쪽)

- 확보된 결손돌연변이체들을 대상으로 형질정보를 심도 있게 분석함. 17개의 형질을 기준으로 형질데이터(phenome)를 확보하여 데이터베이스화 하였음. 형질 정보의 획득은 붉은곰팡이의 생장을 관찰할 수 있는 완전배지, 영양요구성을 결정할 수 있는 최소영양배지, 자낭각의 수와 성숙도 및 자낭포자를 관찰할 수 있는 당근배지, 무성포자 생성능을 확인 할 수 있는 carboxymethyl cellulose(CMC) 배지, DON, ZEA 등의 곰팡이 독소생성능을 확인 할 수 있는 쌀배지 등을 통해서 얻음(그림 36).
- 병원성은 붉은곰팡이에 감수성 밀 품종인 은파미를 이용해 곰팡이의 포자 현탁액을 화기에 접종 한 후 확인함. 각종 스트레스에 대한 저항성 및 감수성을 확인하기 위해서는 산화스트레스(과산화수소, menadione), 이온 및 삼투스트레스(NaCl, KCl, sorbitol, FeSO<sub>4</sub>), 산 및 염기 스트레스(pH4, pH11), 세포벽 스트레스(Congo Red, SDS), 항진균물질 테스트(iprodione, fludioxonil) 등을 이용함.

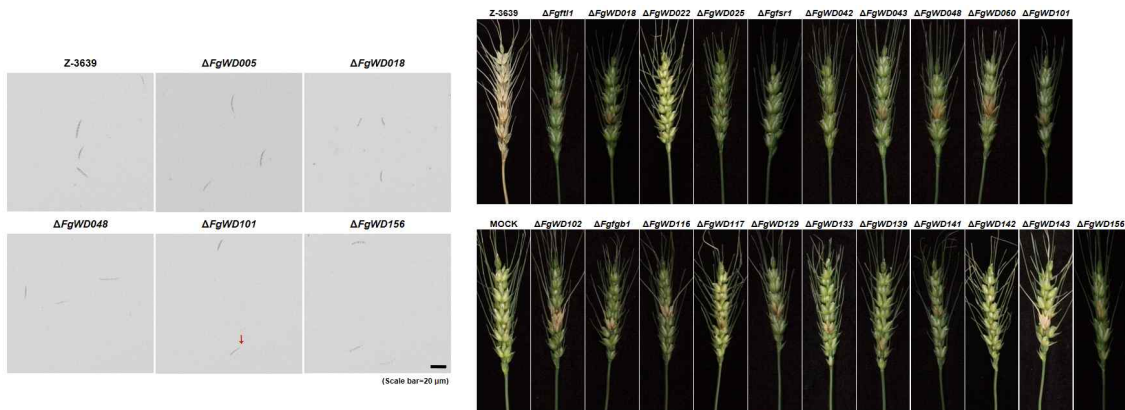


그림 36. WD40 유전자 결손변이체 포자생성 및 병원성 표현형 예시

- 본 연구기간동안 식물병원성곰팡이인 붉은곰팡이의 WD40 유전자 결손변이체 라이브러리 중 후속 메커니즘 연구를 위해 유성생식과 병원성에 동시에 장애를 보이는 결손변이체들 25개를 선발함(표2). 이들 결손돌연변이 균주를 대상으로는 해당 유전자에 형광단백질유전자(GFP)를 표지하여 상동유전자치환방법을 활용한 각각의 유전적 복원균주 대부분을 확보함(그림 37).



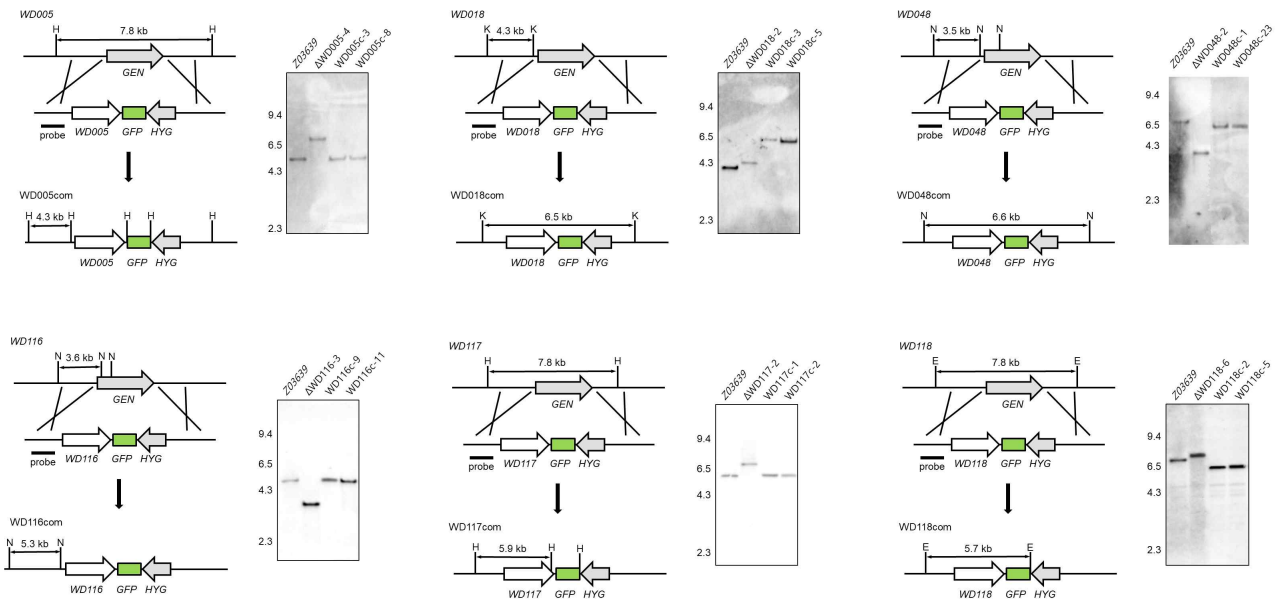


그림 37. 주요 WD40 유전자에 형광단백질 유전자 표지를 통한 상동유전자 치환방법 모식도와 Southern hybridization 결과 예시

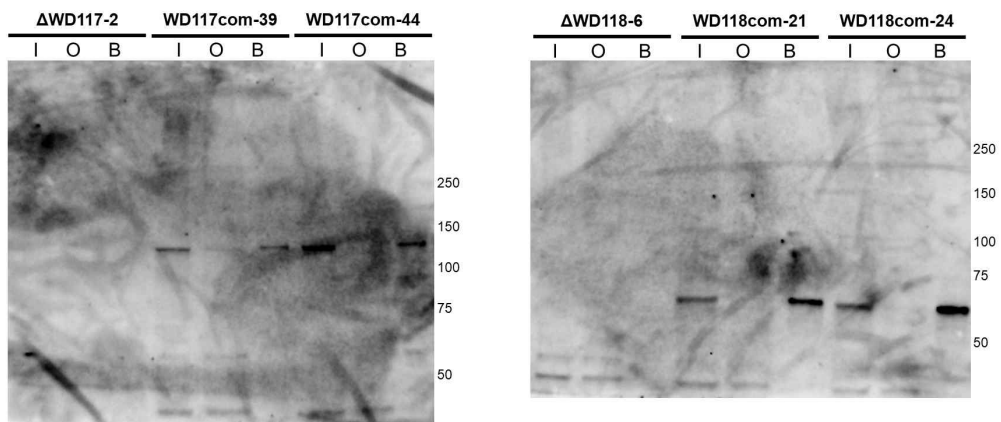


그림 38. 두 WD40 단백질에 대한 면역침강법(IP:Immunoprecipitation) 실험 결과 예시. I, input; O, output, B, binding/elution

- GFP 표지를 통한 유전적복원이 완료된 균주를 대상으로는 GFP antibody를 이용한 western blot 분석을 통해 해당 단백질 검출 및 세포소기관 내에서의 위치 관찰 등을 수행함. 이후 단백질을 분리하여 상호작용하는 대상 단백질을 동정하기 위해서 affinity purification mass spectrometry (AP-MS)분석을 수행을 시도하는 등 후속연구를 진행하였으나 일부 유전자들에 대해서는 단백질 발현양이 적어 1) 세포 상에서 GFP 형광이 관찰되지 않거나 2) 면역침강 단계 이후 단백질의 양이 너무 적어 실험의 실효성이 떨어지는 한계에 도달함(그림 38).
- Gap repair 원리를 활용한 yeast shuttle vector 시스템을 새로 구축 및 도입하여 매우 강한 프로모터인  $P_{RP27}$ 을 이용하여 해당 WD40 단백질을 발현한 결과, 기존 시스템보다 매우 강하게 단백질이 발현됨을 확인함.
- $FgWD101$ -GFP 과발현체를 이용한 AP-MS를 통해 상호작용 단백질군 탐색한 결과  $FgWD072$ 이 상호작용 후보 단백질로 밝혀짐.
- Doa1-Cdc48-Ufd1-Npl4 복합체를 구성하는 Doa1의 상동단백질로 예상되는  $FgWD43$ 을 대상으로 gap repair 원리를 활용한 yeast shuttle vector 시스템을 구축하여 매우 강한  $P_{RP27}$  프로모터로  $FgWD43$ 단백질을 발현한 결과 기존 시스템보다 매우 강하게 발현되는 것을 확인함. 본 연구에서 구축한 매우 효율적이고 실효성이 높은 단백질 발현 시스템을 지속적으로 활용 예정임(그림 39).

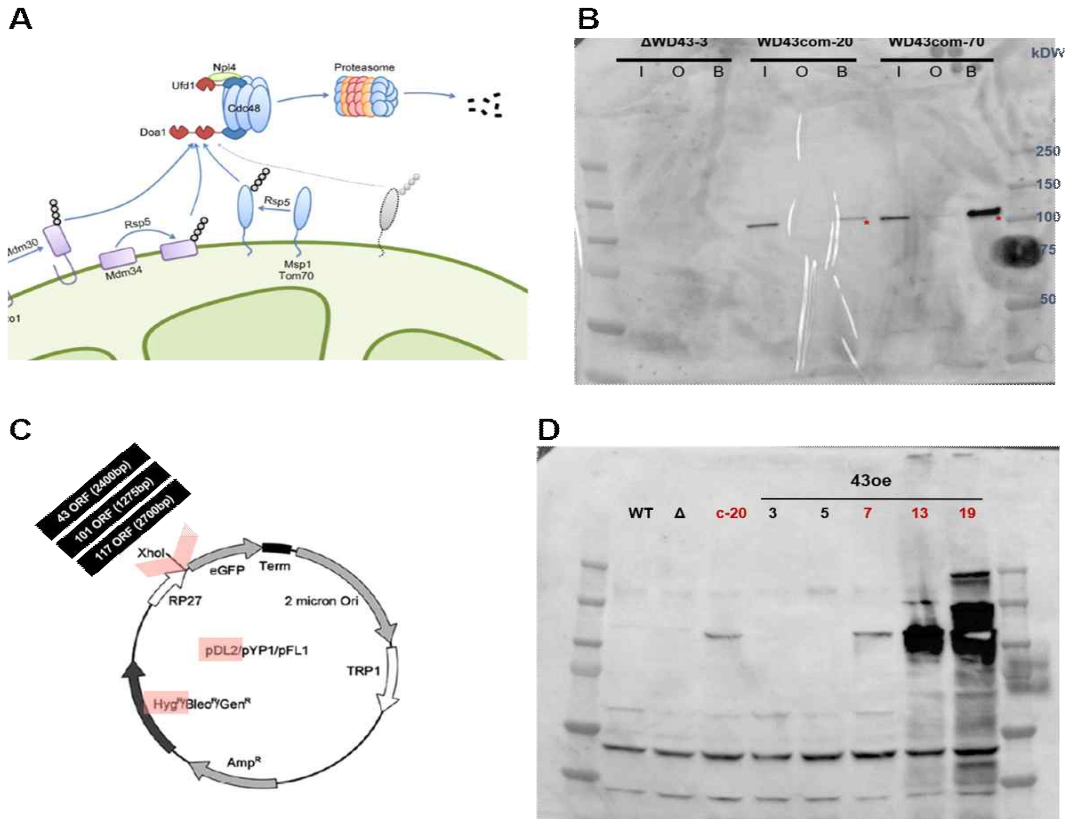


그림 39. Doa1-Cdc48-Ufd1-Npl4 복합체와 붉은곰팡이의 Doa1 상동 단백질인 WD43 단백질에 대한 affinity purification-mass spectrometry 분석을 위한 실험 전략. (A) Doa1-Cdc48-Ufd1-Npl4 작용 모식도. (B) 유전적복원균주를 대상으로 수행한 면역침강법(IP:Immunoprecipitation)실험 결과. (C) 유전자 과발현을 위해 도입한 yeast shuttle vector pDL2 system. (D) pDL2를 활용한 WD43 과발현체를 대상으로 한 Western blot 결과. I, input; O, output, B, binding/elution

표 2. 주요 WD40유전자와 형질복원체 제작 현황

유전자명	Locus	자낭각 생성	병원성	유전적복원 여부
<i>FTL1</i>	FGSG_00332	없음	없음	완료
<i>FgWD018</i>	FGSG_00915	없음	없음	완료
<i>FgWD022</i>	FGSG_01287	없음	없음	진행중
<i>FgWD025</i>	FGSG_01369	없음	없음	진행중
<i>FSR1</i>	FGSG_01665	없음	없음	-
<i>FgWD042</i>	FGSG_02801	없음	없음	완료
<i>FgWD043</i>	FGSG_02811	없음	없음	완료
<i>FgGPB1</i>	FGSG_04104	없음	없음	-
<i>FgWD048</i>	FGSG_04297	없음	없음	완료
<i>FgWD060</i>	FGSG_05344	없음	없음	완료
<i>FgWD071</i>	FGSG_06219	없음	야생형대비 10%미만	진행중
<i>FgWD101</i>	FGSG_09271	없음	없음	완료
<i>FgWD102</i>	FGSG_09420	없음	없음	완료
<i>FGB1</i>	FGSG_09870	없음	없음	-
<i>FgWD116</i>	FGSG_10835	없음	없음	완료
<i>FgWD117</i>	FGSG_10869	없음	없음	완료
<i>FgWD118</i>	FGSG_10870	야생형대비 10%미만	야생형대비 10%미만	완료
<i>FgWD129</i>	FGSG_13934	없음	없음	진행중
<i>FgWD133</i>	FGSG_15909	없음	없음	완료
<i>FgWD139</i>	FGSG_16567	야생형대비 10%미만	없음	-
<i>FgWD141</i>	FGSG_16720	없음	없음	완료
<i>FgWD142</i>	FGSG_16782	없음	없음	완료
<i>FgWD143</i>	FGSG_16815	없음	없음	-
<i>FgWD144</i>	FGSG_16841	없음	없음	완료
<i>FgWD156</i>	FGSG_17376	없음	없음	진행중

□ 붉은곰팡이의 핵심 전사조절인자(transcription factor) 복합체의 기능유전학 분석

- 많은 전사조절인자들은 개별적으로 작용하기보다 다른 전사조절인자 혹은 단백질들과 상호작용함으로써 세포내에서 기능을 한다고 알려져 있음. 그 중 CCAAT 전사조절인자 복합체는 진핵생물에서 중요한 발달과정 및 병원성에 관여하는 전사조절인자로서 이번 연구기간에는 붉은곰팡이의 CCAAT 전사조절인자 복합체를 규명하고자 하였음.
- 붉은곰팡이는 총 7개의 CCAAT 전사조절인자를 갖고 있으며 이들의 유전자 구조는 CCAAT-DNA 염기서열에 결합하는 도메인을 갖는 공통적인 특징이 있음(그림 40). 기존 연구에 따르면 분자생물학연구의 모델 곰팡이인 *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* 등에서는 Hap2/HapB, Hap3/HapC, Hap5/HapE가 CCAAT 복합체를 이루며 기능을 한다고 알려져 있으나 붉은곰팡이에서 병원성과 유성생식에 관여하는 두 CCAAT 전사조절인자는 *GzCCAAT002(FCT1)*와 *GzCCAAT004(FCT3)*로 본 연구를 통해 밝힘(그림 41).

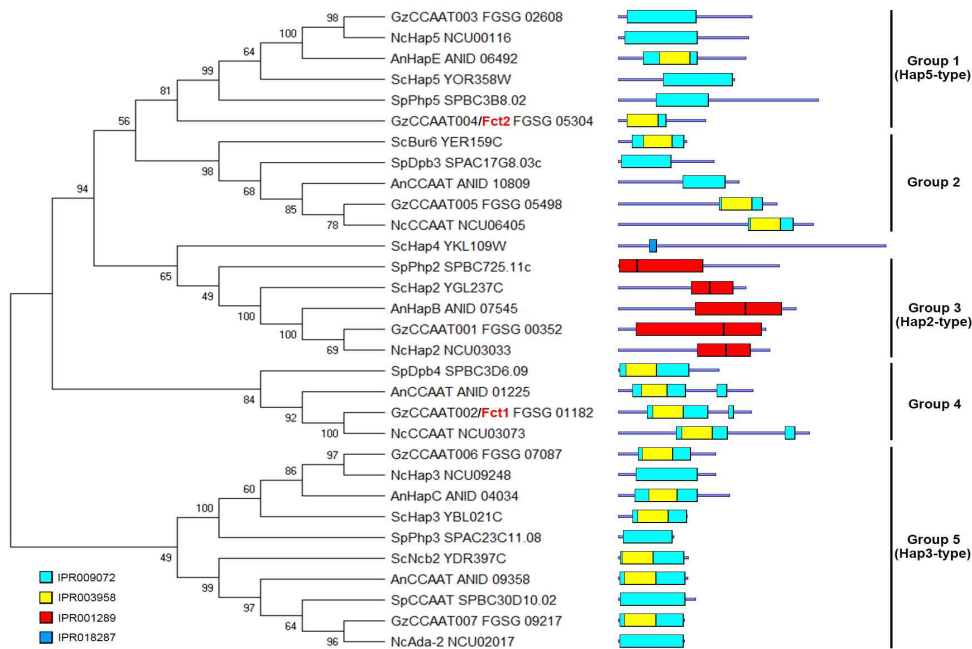


그림 40. 주요 사상성진균류의 CCAAT 전사조절인자에 대한 계통분류학적 분석

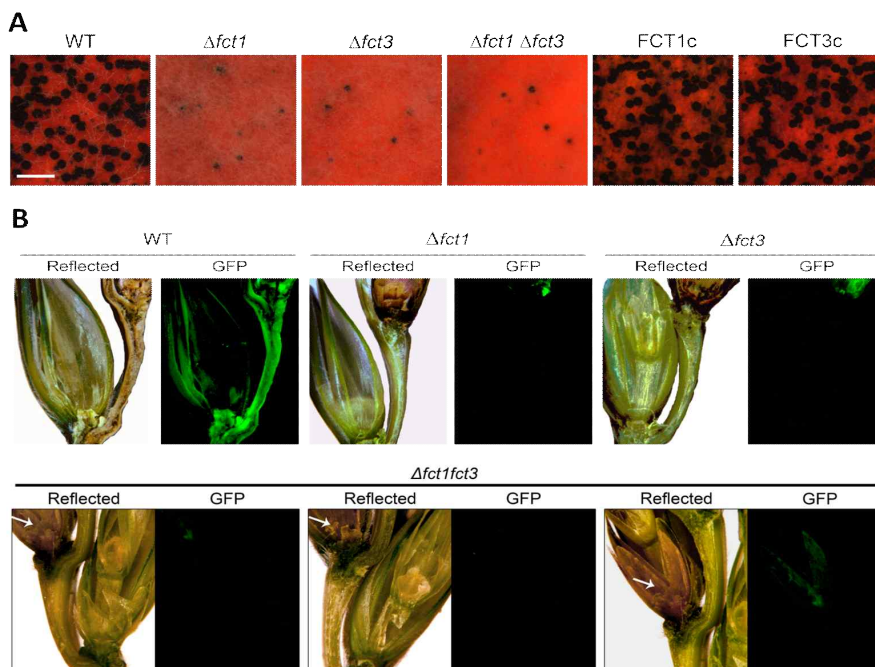


그림 41. 유성생식과 병원성에 모두 장애를 보이는 *FgCCAAT002(FCT1)*와 *FgCCAAT004(FCT3)* 결손변이체

- 두 전사조절인자는 효모의 단백질-단백질 상호작용(PPI) 모델을 바탕으로 한 붉은곰팡이 전사조절인자 PPI 예측분석을 통해서도 상호작용할 것으로 예측되었으며 Yeast Two-Hybrid 시스템을 이용하여 Fct1과 Fct3의 상호작용여부를 *in vitro* 상에서 확인함(그림 42). Fct3-Fct1 간의 상호작용과 Fct3와 상호작용할 가능성이 있는 전사조절인자를 동정하기 위해 상기 제작한 Fct3-GFP 균주와 GFP antibody를 이용하여 affinity purification-mass spectrometry 분석을 수행함(표 3).

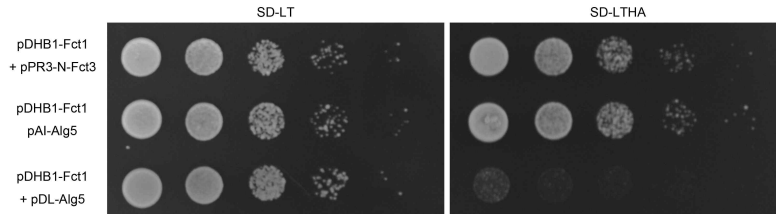


그림 42. Yeast Two-Hybrid(Y2H) 시스템을 이용한 Fct1과 Fct3의 상호작용

표 3. Fct3 상호작용 후보 전사조절인자

Locus ID	유전자 명	예상 기능	Score	Coverage	# PSMs
FGSG_03727	<i>GzZC297</i>	related to STB5 - transcription factor	89.80	1.98	37
FGSG_01182	<i>GzCCAAT002(FCT1)</i>	conserved hypothetical protein	23.01	21.38	5
FGSG_05304	<i>GzCCAAT004(FCT3)</i>	conserved hypothetical protein	17.65	22.53	5
FGSG_09495	<i>GzAT003</i>	related to Los1p	15.05	4.56	5
FGSG_06805	<i>GzAra005</i>	conserved hypothetical protein	10.55	9.29	3
FGSG_07075	<i>GzC2H048</i>	probable PYC2-pyruvate carboxylase 2	8.62	3.16	3

- 앞서 언급한 것처럼 각 유전자의 결손변이체(*fct1*, *fct3*)와 두 유전자 모두 결손된 변이체(*fct1 fct3*)의 형질을 확인해본 결과 균사생장, 유성생식, 병원성에서 모두 유사한 수준의 장애를 보였음. 이러한 현상은 Fct1-Fct3 복합체 형성이 붉은곰팡이의 주요 발달과정이 관여하며 각 각의 단백질이 모두 CCAAT 복합체 기능에 필수적인 역할을 함을 의미함. 특히 이번 연구에서는 CCAAT 복합체가 붉은곰팡이의 trichothecene 생합성 유전자의(*TRI5*, *TRI6*) 양성 조절자로 중요함을 밝힘(그림 43).

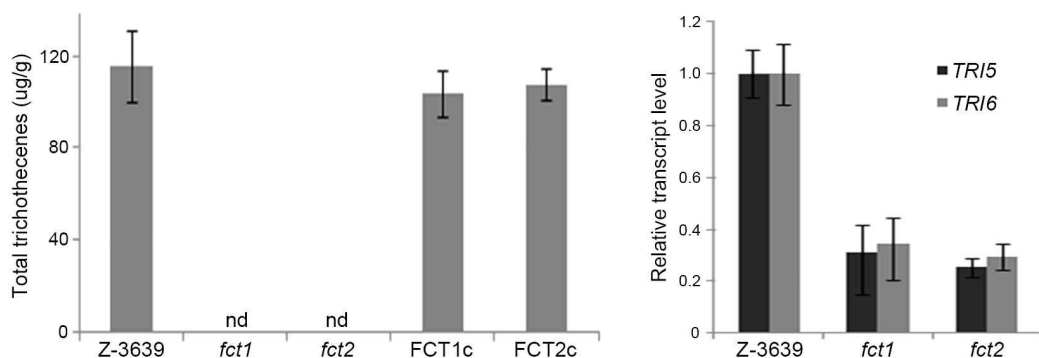


그림 43. 붉은곰팡이 균주들의 trichothecene 생합성과 생합성 유전자의(*TRI5*, *TRI6*) 전사량 비교

- 붉은곰팡이의 CCAAT 복합체는 기존의 모델 곰팡이가 세 개의 CCAAT 단위체로 구성되는 것과는 다른 양상을 보임. 계통분류학적으로도 Fct1과 Fct3는 다른 Hap 복합체 단위체와 완전히 한 그룹으로 분류되지는 않음. 하지만 Fct3-DsRed 단백질을 활용한 Protein binding microarray(PBM) 실험을 통해 Fct3가 CCAAT DNA염기서열에 우선적으로 결합함을 확인함(그림 44). 본 연구결과는 Scientific Reports에 2020년 3월에 게재됨.

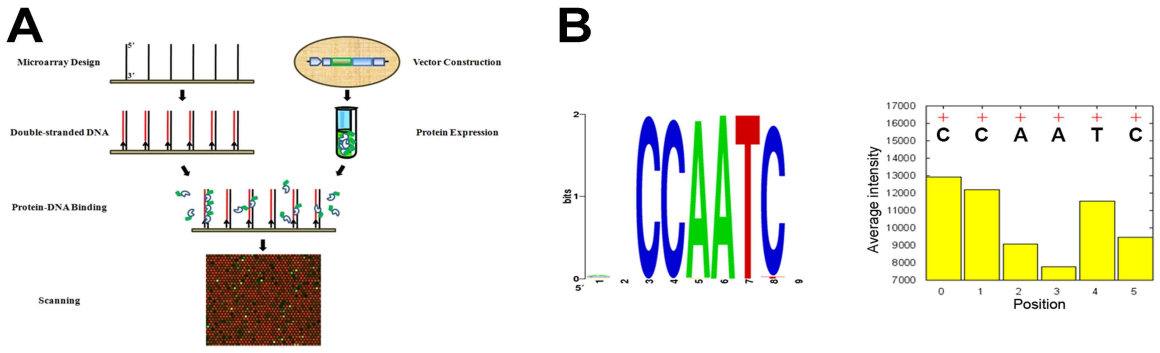


그림 44. Protein binding microarray (PBM) 모식도(A)와 Fct3-DsRed를 이용한 Fct2 DNA결합 염기서열 예측결과(B)

□ 붉은곰팡이의 *Ars2*-CBC 복합체의 기능유전학 분석

- Arsenite-resistance protein 2(*Ars2*)은 진핵생물의 다양한 RNA대사과정에 중요한 역할을 하는 단백질이지만 아직 사상성곰팡이에서 연구된 바는 없음. *ARS2* 유전자는 모든 연구된 진핵생물에서는 필수유전자로 알려졌으나 붉은곰팡이에서는 성공적으로 결손변이체를 제작할 수 있었음(그림 45). 특히 *ARS2* 유전자는 DNA 손상복구과정에 관여하는 것으로 사료되나 지금까지 모델 동·식물 연구에서는 알려진 바 없음.
- *ars2* 결손변이체는 유성생식과 병원성에 중요한 역할을 함. 특히 *ars2* 결손변이체는 유성생식 과정 중에서도 자낭각 생성은 아생형과 유사하지만 자낭포자의 생성과 분출에 특이적인 기능을 하고 있음. 또한 형광현미경 관찰을 활용한 병원성 실험을 통해 밀 이삭에서의 병 발생 초기에 핵심적인 역할을 함(그림 46).

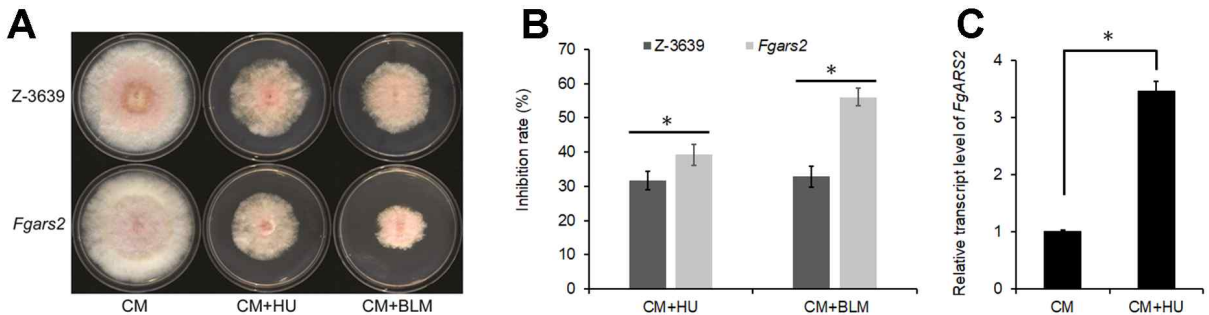


그림 45. DNA손상복구반응에 관여하는 *Ars2* 단백질의 기능. (A, B) Hydroxyurea(HU)와 bleomycin(BLM)에 감수성을 보이는 *ars2* 결손변이체. (C) HU처리에 따른 *ARS2* 전사량 변화

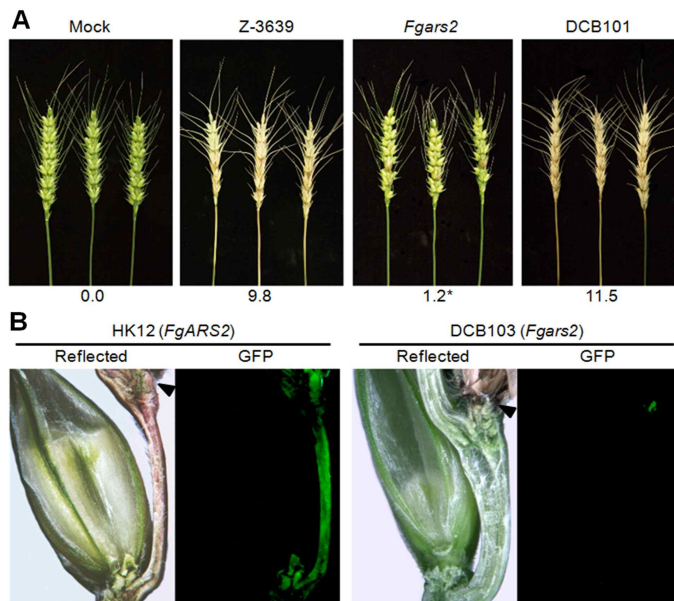


그림 46. 병원성에 장애를 보이는 *ars2* 결손변이체

- 일부 모델 생물에서는 *Ars2*가 small non-coding RNA의 생성과 RNA silencing에 관여한다고 알려짐. 본 연구에서는 선행 연구에서 붉은곰팡이의 유성생식과정 중에 특이적으로 생성된다고 알려진 대표적인 ex-siRNA(exonic small interfering RNA)와 miRNA(microRNA-like RNA)의 생성량을 야생형균주와 *ars2* 결손변이체간의 비교 분석을 수행한 결과 차이가 없음을 밝힘(그림 47).

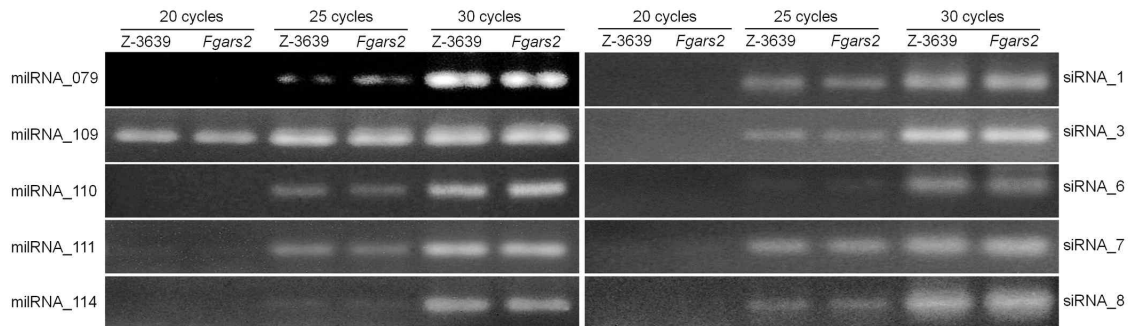


그림 47. 병원성에 장애를 보이는 *ars2* 결손변이체

- Ars2*는 cap binding complex (CBC)와 상호작용하여 *Ars2*-CBC (CBCA) 복합체를 생성함으로써 mRNA의 다양한 대사과정에 관여하기도 함. 이러한 복합체의 형성과 기능이 붉은곰팡이에서도 보존되어 있는지 확인하기 위해 두 개의 Cap binding protein 유전자(*CBP20*, *CBP80*)를 동정하여 *Ars2*와의 상호작용 여부를 Yeast Two Hybrid를 통해 확인함(그림 48). 흥미로운 것은 *cbp20*, *cbp80* 결손변이체는 유성생식에서는 야생형과 유사한 형질을 보였지만 병원성은 현저히 줄어들었음. 이러한 결과를 통해 *Ars2*-CBC (CBCA) 복합체 형성은 붉은곰팡이에서 병원성에 특이적으로 중요한 기능을 갖고 있는 것으로 예상됨. 본 연구결과는 *Frontiers in Microbiology*에 2019년 10월에 게재됨.



그림 48. 붉은곰팡이의 *Ars2*-CBC 복합체 형성과 병원성과의 관계. (A) Yeast Two Hybrid를 이용한 *Ars2*-CBC 복합체 생성 확인. (B) CBP 유전자와 병원성 상관관계

#### □ 붉은곰팡이의 유성생식 및 지질합성 관련 전사조절인자 기능연구

- 식물 병원성 진균의 유성생식과정은 병원균의 환경에서의 생존과 병원성과 밀접하게 관련되어 있는 것으로 알려짐. 선행 연구에서 구축한 전사조절인자 결손변이체 라이브러리로부터 자낭각을 과량 생성하는 유전자 중 FGSG\_06651를 *Fusarium graminearum* perithecia overproducing 1 (*FPO1*)로 명명함.
- fpo1* 결손변이체는 야생형 대비 병원성을 완전히 잃어버렸으며 유성생식 유도 시 자낭각의 생성량이 늘어나고 성숙이 빨라짐(그림 49). 현재까지 식물 병원성 진균에서 자낭각 생성량이 증가하는 결손변이체는 보고된 바가 없기에 관련 메커니즘을 이해하기 위해 유성생식 초기 단계에서 RNA-seq를 활용한 전사체분석을 수행함.
- 그 결과 탄소 및 지질대사 관련 유전자들이 *fpo1* 결손변이체에서 과발현되는 경향이 있음을 관찰함(그림 49). 실제로 *fpo1* 결손변이체는 야생형균주보다 지방산을 더 많이 축적하고 있었으며 특히 oleic acid를 과량축적함을 지방산 분석을 통해 밝힘.
- 이를 통해 *Fpo1*이 지질축적 특히 oleic acid의 음성적 조절과정에 관여함을 가정하고 oleic acid

축적이 관여하는 유전자 탐색을 위해 전사체분석을 통해 후보 유전자 20개에 대한 결손변이체 제작 및 형질분석을 수행함(그림 50). 그 결과 *Fg05321*과 *Fg02522*이 *Fpo1* 의존적 지질합성 대사에 관여함을 밝힐 수 있었음.

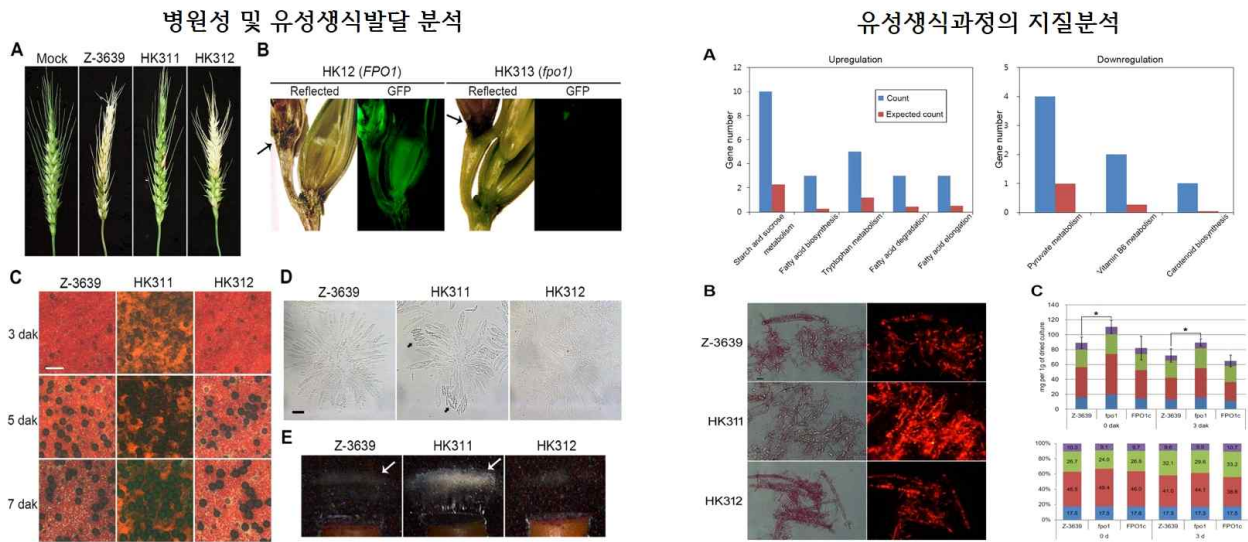


그림 49. [병원성 및 유성생식발달 분석] 병원성과 유성생식에 필수적인 *FPO1* 유전자의 기능. (A, B) 밀 이삭에서의 병원성. (C) 당근배지에서 유도한 자낭각. (D) 자낭각 내부에 생성된 자낭과 자낭포자. (E) 자낭포자 분출 비교. HK311, *fpo1* 결손변이체; HK312, *FPO1* 유전적 형질복원체. [유성생식과정의 지질분석] 지질대사 조절에 밀접하게 관여하는 *Fpo1* 전사조절인자. (A) 유성생식 초기단계에서 RNA-seq를 활용한 전사체 분석결과(KEGG pathway 분석). (B, C) 지질 합성량 비교, 분석.

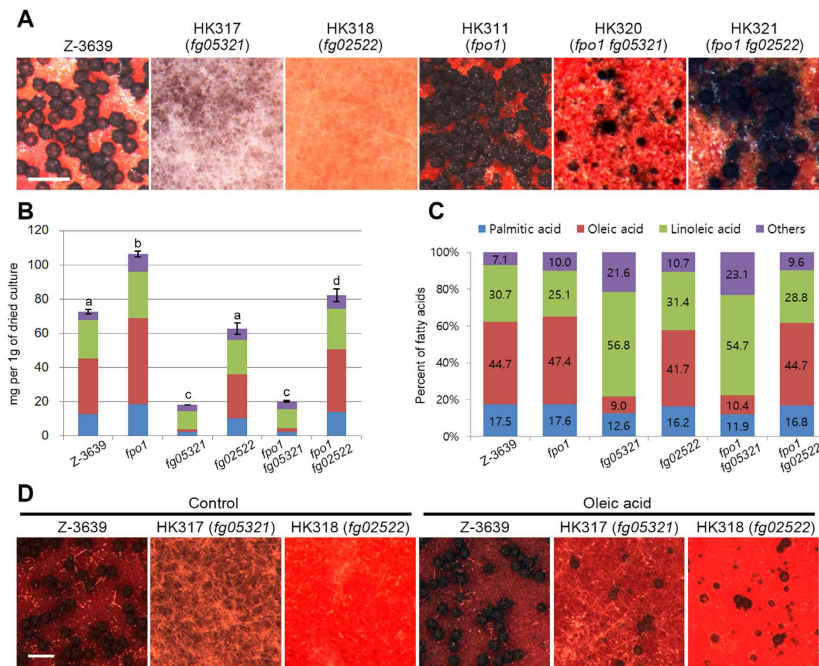


그림 50. *Fpo1* 유성생식 조절과정에서 지질합성과 관련된 하위 유전자인 *Fg05321*과 *Fg02522*에 대한 유전적 관련성 규명

#### □ 동물 병원성 모델 진균의 핵심 탈인산화효소 교차 연구

- 본 연구팀의 1세부 단위과제에서는 *C. neoformans*에 존재하는 31개의 탈인산화효소를 발굴한 바 있으며 그 중 8개는 붉은곰팡이에서 연구된 바 없음(Jin et al, 2020, Nat Comm; Yun et al, 2015, New Phytol). 본 연구팀은 이들에 대한 붉은곰팡이의 상동 유전자를 선별하고 이들에 대한 결손변이체를 제작함(표 4, 그림 51).

표 4. 동물 병원성 진균 연구로부터 발굴한 붉은곰팡이의 미발굴 탈인산화효소

<i>C. neoformans</i>		붉은곰팡이	예상기능
Locus ID	유전자	Locus ID	
CNAG_04354	<i>PPX1</i>	FGRAMPH1_01G16885	exopolyphosphatase
CNAG_06647	<i>CDC1</i>	FGRAMPH1_01G00763	cell division control 1
CNAG_07692	<i>YND1</i>	FGRAMPH1_01G14889	golgi apyrase
CNAG_03222	<i>DBR1</i>	FGRAMPH1_01G00807	lariat debranching enzyme
CNAG_02490	<i>MRE11</i>	FGRAMPH1_01G04133	double-strand break repair protein mus-23
CNAG_03996	<i>GDA1</i>	FGRAMPH1_01G17201	guanosine-diphosphatase
CNAG_04221	<i>FBP26</i>	FGRAMPH1_01G15061	fructose-2,6-bisphosphatase
CNAG_01877	<i>GUA1</i>	FGRAMPH1_01G07911	GMP synthase protein coding

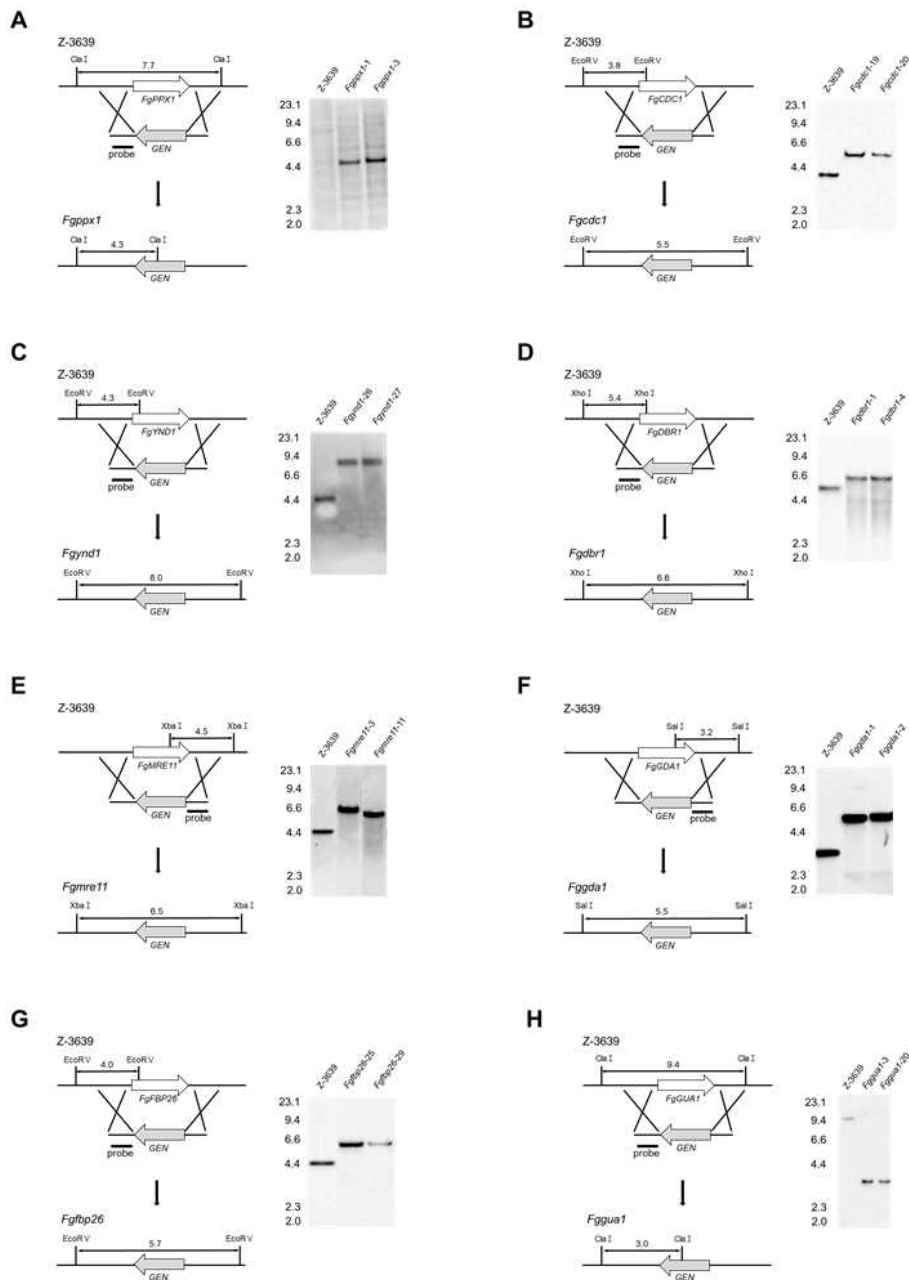


그림 51. 붉은곰팡이 미발굴 탈인산화효소 결손변이체 제작을 위한 모식도와 Southern hybridization 결과

- 일부 탈인산화 효소에 대해서는 연구 수행을 위해 유전적 복원 균주 제작 등의 후속연구를 수행함. 그 중 Gda1과 Ynd1은 *S. cerevisiae*, *C. albicans* 등의 모델 진균에서 golgi membrane에 존재하는 nucleoside diphosphate hydrolase로 단백질의 mannosylation에 중요한 역할을 한다고 알려짐.



- Gda1은 GDP에 높은 기질특이성을 보이는 반면 Ynd1은 기질특이성은 떨어지지만 더 넓은 기질에 대해 활성을 가짐. 붉은곰팡이에서 이 두 단백질이 glycosylation 과정에서 어떤 기능을 하며 병원성과 관련되는지 분석하기 위한 연구를 수행함.
- 또한 두 유전자가 일부 기능을 공유하고 있을 것으로 예상되어 두 유전자가 모두 결손된변이체를 제작하였고 형질을 확인해본 결과 균사생장을 거의 하지 못하는 것이 확인되었음(그림 52A).
- RP27 promoter를 이용하여 *GDA1* 유전자와 *YND1* 유전자가 붉은곰팡이내에서 과발현될 수 있는 vector를 제작하였고 이 vector를 이용하여 *GDA1* 유전자가 결손된 변이체에서 *YND1* 유전자가 과발현되는 균주와 *YND1* 유전자가 결손된 변이체에서 *GDA1*이 과발현되는 균주를 각각 제작하였음(그림 52B). 두 균주에서 형질을 확인해 본 결과, *gda1* 결손변이체에서 *YND1*이 과발현될 경우 *gda1* 결손 변이체에 비해 균사생장이 어느 정도 회복되는 것을 확인할 수 있었음. 반면 *ynd1* 결손변이체에서 *GDA1*이 과발현될 경우 *ynd1* 결손변이체와 비슷한 정도의 균사생장 정도를 보였음. 이러한 결과들을 통해 glycosylation 과정에서 Ynd1과 Gda1이 부분적으로 기능을 공유하고 있는 것으로 예상됨(그림 52C).

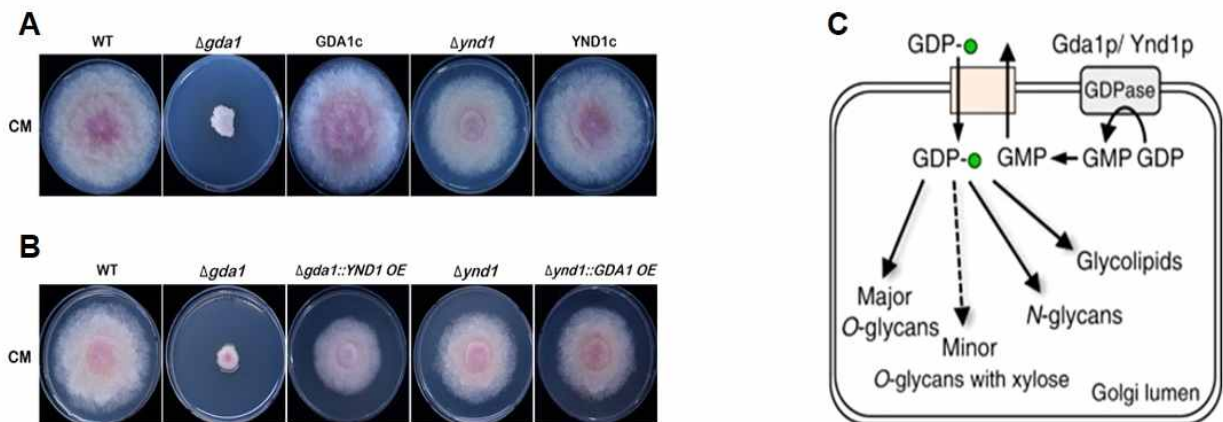


그림 52. *GDA1*, *YND1* 유전자에 대한 기능연구. (A-C) 유전적 복원균주 제작과 이들의 균사생장. (D) *GDA1*, *YND1* 유전자 과발현 균주 제작과 이들의 균사생장. (E) Gda1, Ynd1이 관여할 것으로 예상되는 glycosylation과정

- Dbr1은 진핵생물의 intron lariat를 debranching 하는 기능을 가지는 단백질로 mRNA processing 과정에서 만들어진 intron을 분해하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있음. 붉은곰팡이에서 *DBR1* 유전자에 대한 결손변이체를 만들어 형질을 확인해본 결과 균사생장과 유성생식에서 모두 장애를 보였음. 이 유전자의 결손변이체를 대상으로 유전적복원연구를 수행하여 형질 복원 여부를 확인하였음.
- 여러 모델 진핵생물에서 Dbr1이 제대로 기능을 하지 못하는 경우 intron lariat가 세포내에 축적된다는 것이 보고되었음.
- 붉은곰팡이에서도 같은 기능을 하는지 확인하기 위해 primer를 제작하여 세포내에 남아있는 intron lariat의 양을 측정하기 위해 qPCR을 수행하였음. FGSG\_02542, FGSG\_10264 두 유전자에 대해 qPCR을 수행한 결과 *dbr1* 결손변이체에서 야생형보다 훨씬 많은 intron lariat가 축적된 것을 확인할 수 있었음.
- 붉은곰팡이에서도 같은 기능을 하는지 확인하기 위해 primer를 제작하여 세포내에 남아있는 intron lariat의 양을 측정하기 위해 qPCR을 수행하였음. FGSG\_02542, FGSG\_10264 두 유전자에 대해 qPCR을 수행한 결과 *dbr1* 결손변이체에서 야생형보다 훨씬 많은 intron lariat가 축적된 것을 확인할 수 있었음.
- 뿐만 아니라 *dbr1* 결손변이체는 붉은곰팡이의 병원성 및 농업환경에서 생존과 직결되는 발달과정인 유성생식에 장애를 보였으며 밀 이삭에 접종하였을 때 접종된 부위에서 주변 이삭으로 거의 전반을 하지 못하는 것을 관찰함(그림 53a, b).
- *dbr1* 결손변이체의 비병원성의 메커니즘을 더 자세하게 이해하기 위해 녹색형광단백질을 발현하는

*DBR1* 야생형 균주(HK12)와 *dbr1* 결손변이체( $\Delta Fgdbr1-g$ )를 제작하여 병원성 초기단계에서 관찰해 본 결과 *dbr1* 결손변이체는 접종된 이삭에 감염 이 후 rachis node를 거의 통과하지 못하는 것을 확인함(그림 53c). 이러한 결과는 *DBR1*에 의한 생물학적 과정이 병원성 초기에 매우 중요한 역할을 함을 의미함.

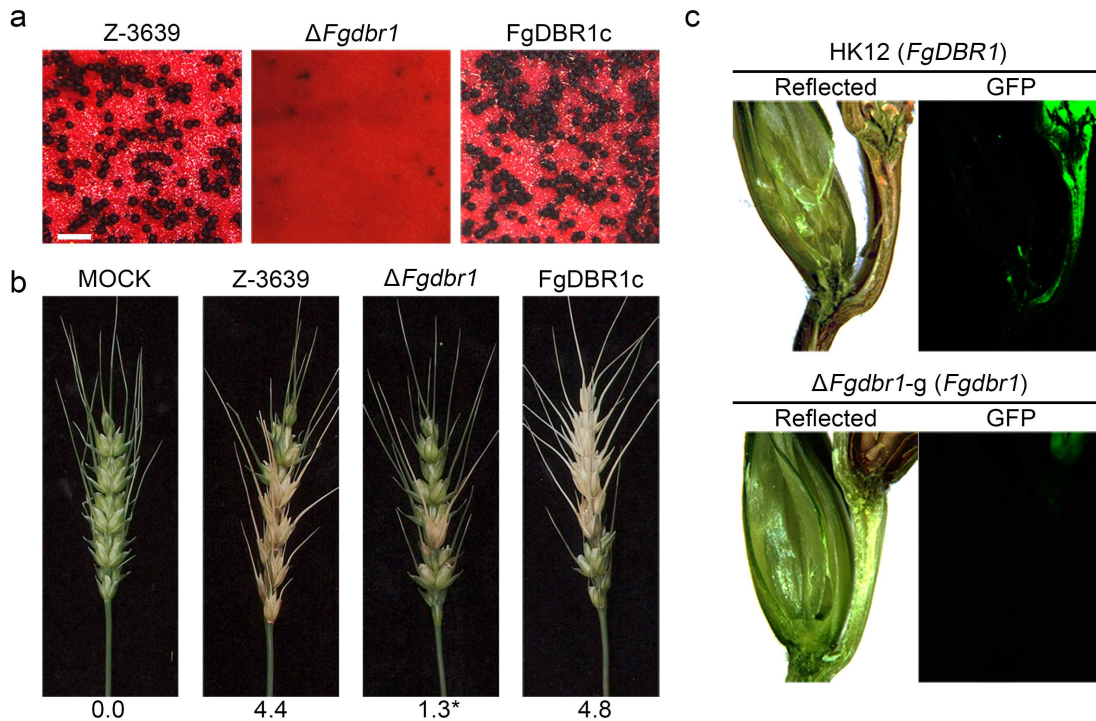


그림 53. 유성생식발달과 병원성에 필요한 *DBR1* 유전자에 대한 기능연구. (a) 관련 결손변이체의 유성생식발달 비교. (b) 밀 이삭에 대한 병원성 실험 결과. (c)df밀 녹색형광단백질을 발현하는 *DBR1* 야생형 균주(HK12)와 *dbr1* 결손변이체( $\Delta Fgdbr1-g$ ).

- *DBR1*이 가지는 기능을 알아보기 위하여 RNase R 처리 유무에 따른 RNA-seq을 다음과 같은 전략으로 수행함(그림 54a). RNA-seq결과 붉은곰팡이 게놈에 mapping된 서열이 RNase R 처리 시 *dbr1* 결손변이체에서 intron 영역이 더 컸으며 특히 RNase R 처리 후 결과에서는 절반 가량이 intron 지역에 mapping 됨(그림 54b). 이러한 결과는 intron으로부터 유래한 intron lariat을 포함한 circular RNA가 RNase R 처리에 의해 보호되어 더 높은 비율로 분석되며 *dbr1* 결손에 의해서도 야생형균주에 비해 더 많이 축적된다는 것을 의미함. 이러한 결과는 실험적으로도 증명됨(그림 54c).
- 야생형 균주와 *dbr1* 결손변이체의 전사체 분석결과 가장 눈에 띄는 차이는 *dbr1* 결손변이체에서 ribosome 혹은 translation과 관련된 유전자들 대다수의 발현양이 증가한 것이며 대표적인 유전자들의 전사량을 RT-qPCR을 통해 확정함(그림 55a, b). 반면 ribosome을 구성하는 ribosomal RNA의 발현량은 차이가 없음을 확인함(그림 55c). 이러한 결과는 ribosome 복합체를 구성함에 있어 심각한 불균형이 생길 수 있음을 의미함.
- Ribosome 혹은 translation과 관련된 유전자들이 과발현된 메커니즘을 알아보기 위하여 RNase R 처리한 샘플에서의 intron mapping 서열을 확인해본 결과 야생형 대비 *dbr1* 결손변이체에서 intron 축적량이 가장 많은 유전자들이 대부분 ribosome 혹은 translation과 관련되어 있음을 확인함(그림 55d, e).
- 실제로 축적된 intron이 intron lariat에 의한 것임을 확인하기 위하여 intron lariat을 생물정보학적 도구와 divergent 프라이머를 이용한 RT-PCR 및 RT-qPCR을 통해 확인함(그림 56).
- 앞선 결과를 통해 *dbr1* 결손변이체에서 ribosome 복합체를 구성함에 있어 심각한 불균형이 생긴다면 단백질 합성에서 야생형에 비해 장애를 보일 것이라는 가설을 세우고 단백질 합성 저해제로 알려진 hygromycin B와 cycloheximide 처리를 통해 단백질 합성정도를 정량하고자 함. 신규 단백질 합성

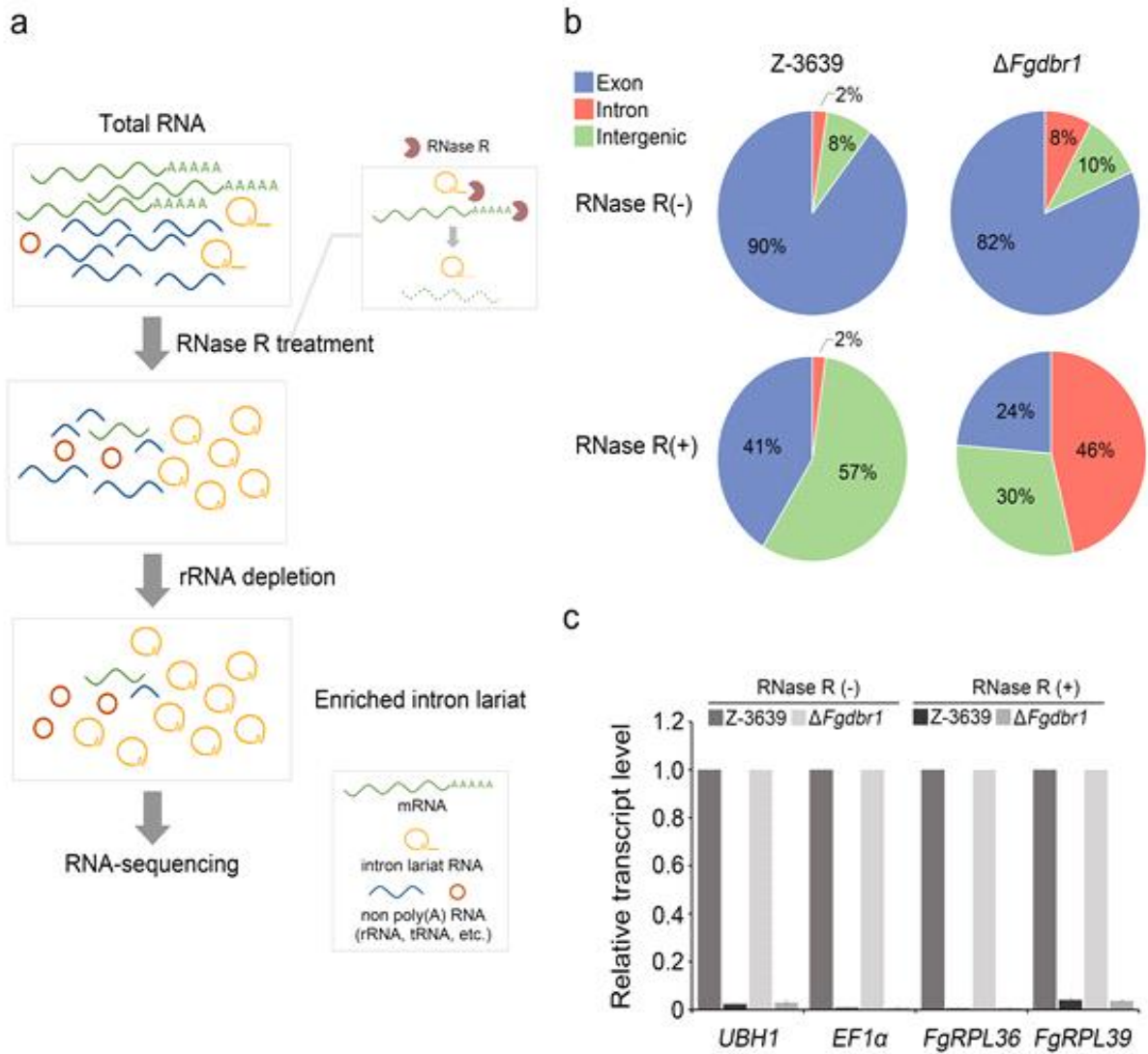


그림 54. RNase R 처리 유무에 따른 전사체 분석결과 분석. (a) RNA-seq 실험 모식도. (b) RNA-seq결과 게놈에 mapping된 서열 특성 분석. (c) RNase R에 의한 효과 실험결과 검증실험.

- 량은 신규 단백질 합성시 녹색형광을 나타내는 Click-iT protein synthesis assay kit 시스템을 활용함. 실험결과 dbr1 결손변이체는 단백질 합성 저해제 처리 시 신규 단백질 생성량이 야생형에 비해 유의미하게 줄어들음을 확인함.

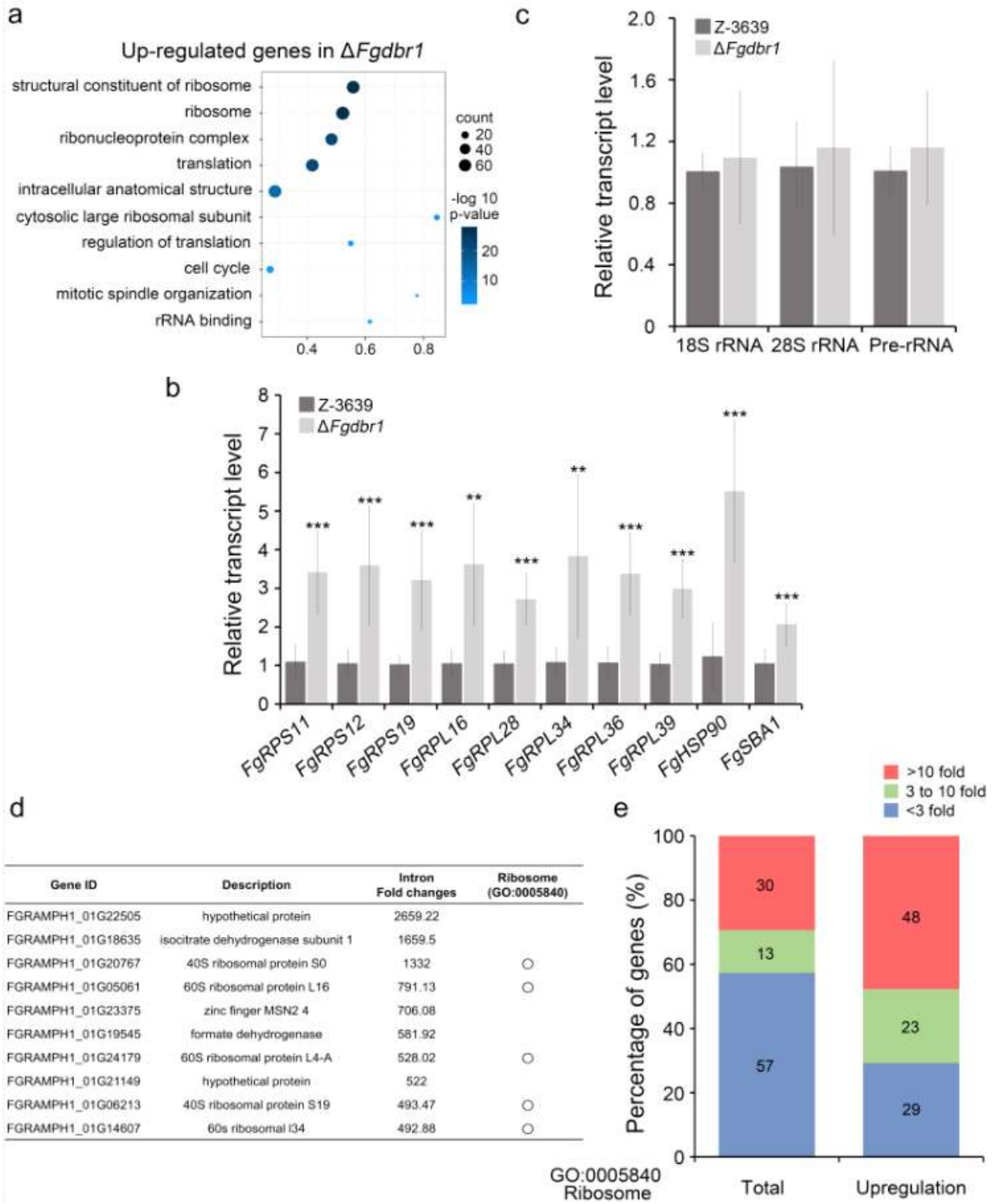


그림 55. 전사체 분석 결과. (a) *dbr1*에서 과발현 되는 유전자들의 Gene ontology (GO) 분석 결과. (b) “ribosome and translation”과 관련된 유전자들의 전사량 비교 결과. (c) ribosomal RNA 정량 비교 결과. (d) *dbr1*에서 intron lariat 축적 배율이 높았던 상위 10개 유전자. (e) “ribosome (GO:0005840)”에 해당하는 전체 유전자 및 *dbr1*에서 과발현되는 유전자의 intron lariat 발현배율 분석.

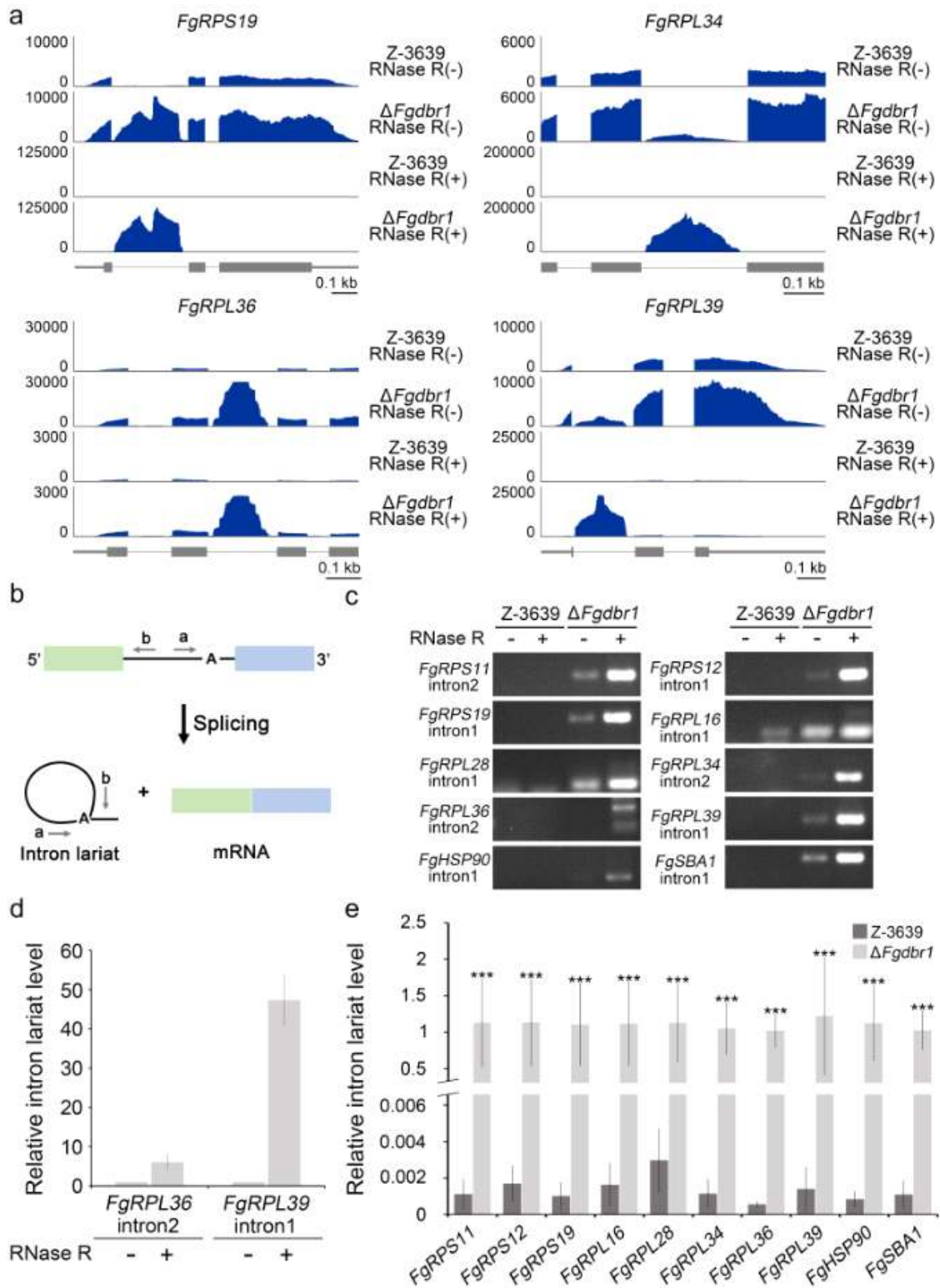


그림 56. 붉은곰팡이의 intron lariat 분석 결과. (a) Ribosome 관련 유전자들의 전사체 분석결과 시각화. (b) Intron lariat 분석을 위한 divergent 프라이머 디자인 전략. (c) RT-PCR을 이용한 intron lariat 검출. (d, e) RT-qPCR을 이용한 intron lariat 정량 분석.

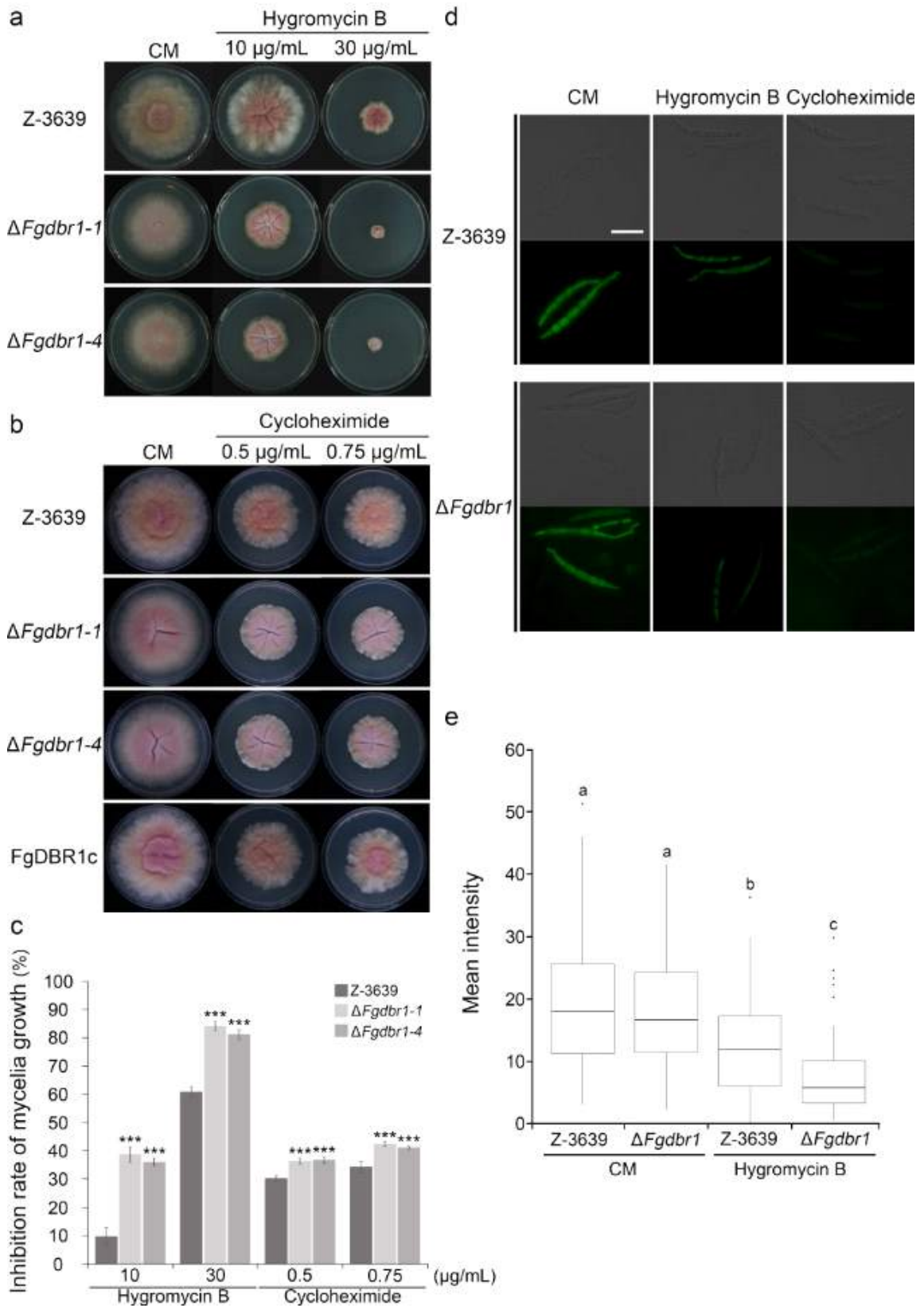


그림 57. 번역(translation)효율 분석 결과. (a, b) Hygromycin B 및 cycloheximide처리 유무에 따른 균사생장 변화. (c) 단백질 합성 저해제 처리에 따른 균사생장 저해율. (d) Click-iT protein synthesis assay kit를 활용한 신규 합성 단백질 시각화 실험 결과. (e) 형광 강도에 따른 신규 단백질 합성량 정량 분석결과.

[제2세부]

□ 농·식품 유용 세균의 전장유전체 정보를 활용한 다중오믹스 분석을 통한 적응진화기작 규명 및 관련 유용 유전자원 발굴

○ 1단계에서 확보한 Bacillales 유전체 정보 기반 계통유전체학 분석을 통한 고온성 바실러스의 내열성 적응 기작 규명 및 내열성 관련 유용유전자원 발굴

- 1단계에서 확보한 *Bacillales* 유전체 정보를 기반으로 공개되어 있는 *Bacillales* 유전체 데이터를 추가 수집하여 총 177 균주를 선별함. 이들의 분리 지역 및 균주의 생육환경(온도, pH)에 따라 분류 및 16S ribosomal RNA 계통수 분석을 통한 선택균주의 다양성 확인함(그림 58).

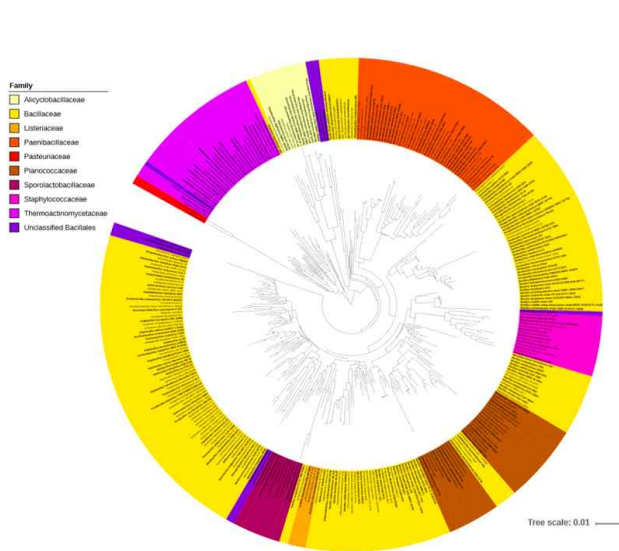


그림 58. 생육환경이 다양한 Bacillales 목의 16S rRNA phylogenetic tree

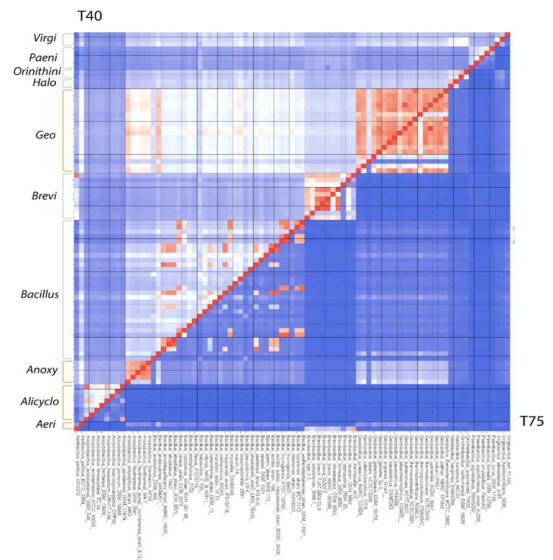


그림 59. 핵심유전체(core genome)에 기반한 Bacillales 목의 범유전체분석

- *Bacillales* 목 내 근연균주간의 범유전체(Pan-genome)분석을 통하여 핵심유전체(core genome) 및 부속유전체(accessory genome)를 구성하는 유전자들의 분자기능을 생태·생리적 측면에서 종합적으로 분석하여 해당 미생물 종의 분류학적 고유성 및 특이성을 파악함(그림 59).
- 특히, 핵심 공통유전체의 서열의 상동성 범위 (40~80%)에 따른 pair-wise analysis를 통해 고온성 *Bacillales* 속의 균주가 공통적으로 가지고 있는 균주생육온도에 관여하는 핵심유전자 후보 3종을 확보함.
- 고온성 바실러스 균주의 비교유전체(아미노산 서열, Codon usage, G+C ratio 및 세포막 구성성분 비교) 분석을 진행함. 이를 통해, 고온성균과 중온성균의 16S rRNA, 핵심유전자 연결서열 G+C contents와 pI value의 상관관계 분석을 통해 생육온도에 따른 생태분류학적 그룹화가 가능함을 확인(그림 60).

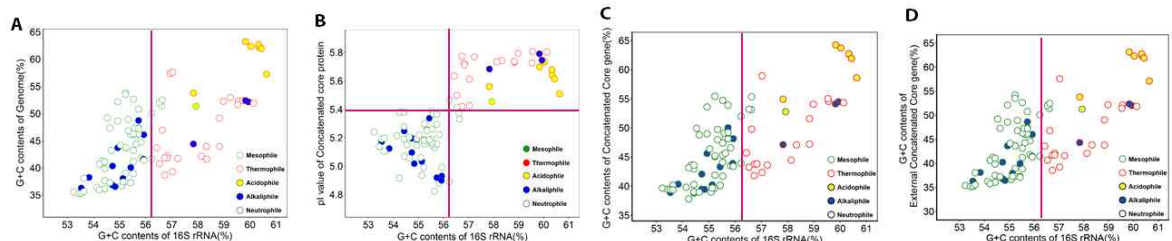


그림 60. 온도, pH에 따른 16S rRNA의 G+C contents와 Genome G+C contents (A), Core gene pI value (B), Concatenated core gene G+C contents (C) 및 External core-concatenated gene의 G+C contents (D)의 상관관계

- *Bacillales* order의 범유전체를 통한 핵심유전자 아미노산 이용빈도 확인 결과 호열성 바실러스 균주는 C, H, L, P, R, A, W, V가 상대적으로 많은 비율을 차지하며, 중온성 바실러스 균주는 N, T, S가 상대적으로 많은 비율을 차지함을 확인함(그림 61).

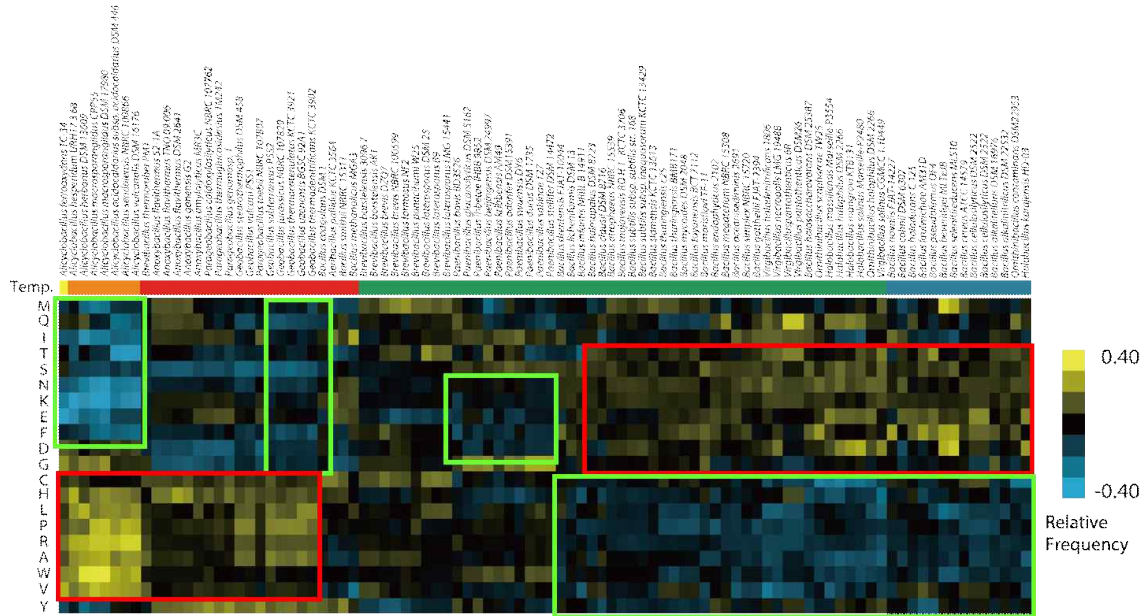


그림 61. *Bacillales* 목의 서식 온도, pH 환경에 따른 아미노산 사용 빈도

○ 내열성 유전자원 발굴 및 표적 유전자 선정

- *Bacillales* order의 온도에 따른 범주화를 통한 핵심유전자 비교를 통해 고온균과 중온균이 가지고 있는 대사경로 비교를 통한 내열성에 관련된 후보 유전자 3종 (heat-shock protein 2종, purine 대사관련 유전자 1종) 선정함. 고온균 유래의 내열성 후보 유전자를 *E. coli*에 과발현시켜 효과 시험분석함(그림 62).

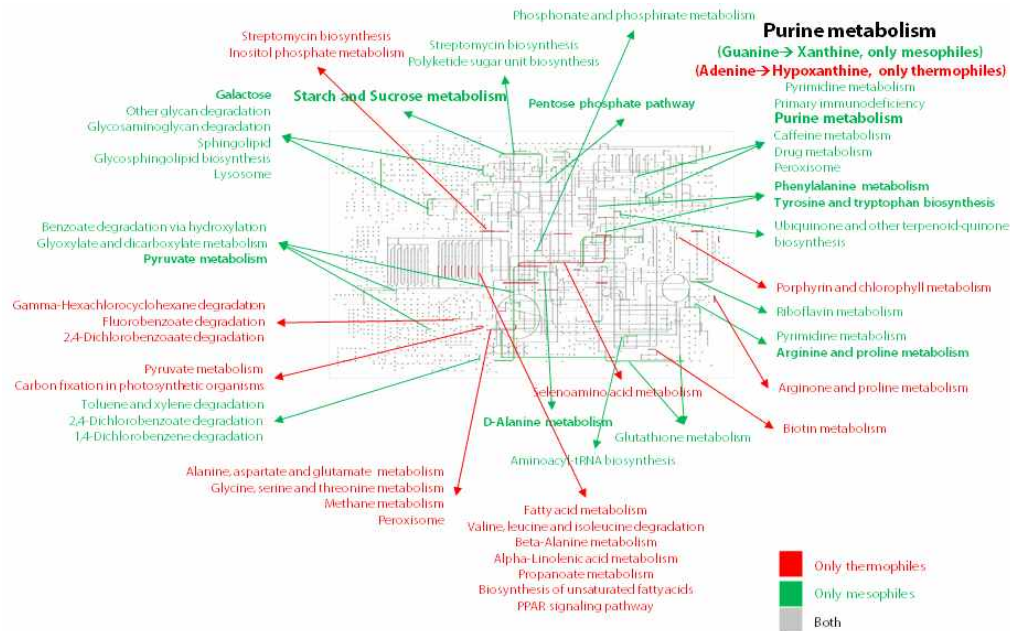


그림 62. 온도에 따른 *Bacillales* order의 범유전체 분석을 통한 중온균과 고온균의 차이나는 대사경로 확보

○ *Bacillales* 범유전체 분석을 통한 내열성 후보 유전자 2종 (Stress induced protein, 생합성 유전자)의 *E. coli* 도입을 통한 최적온도 변화 측정

- 1차년도에서 선별된 *Geobacillus* 유래 내열성 후보유전인자(생합성 관련 유전자, Stress induced



protein)들을 중온성 *E. coli* (BW25113 strain)에 도입(pBAD-X1, pBAD-X2) 및 K/O 변이균주(생합성 유전자 Y1, Y2)를 제작함.

- 대조군과 함께 성장곡선 표현형을 비교하여 내열성 유전인자의 유무에 따른 최적온도 변화 측정을 통해 내열성 유전자 유도에 따른 최대성장이 증가함을 확인함(그림 64 및 그림 65).

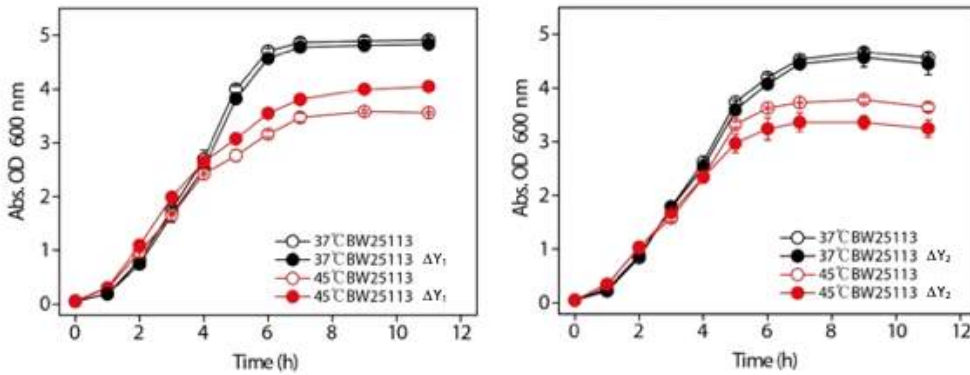


그림 64. 내열성 후보유전인자(생합성 관련 X1, X2) K/O에 따른 최적온도 변화

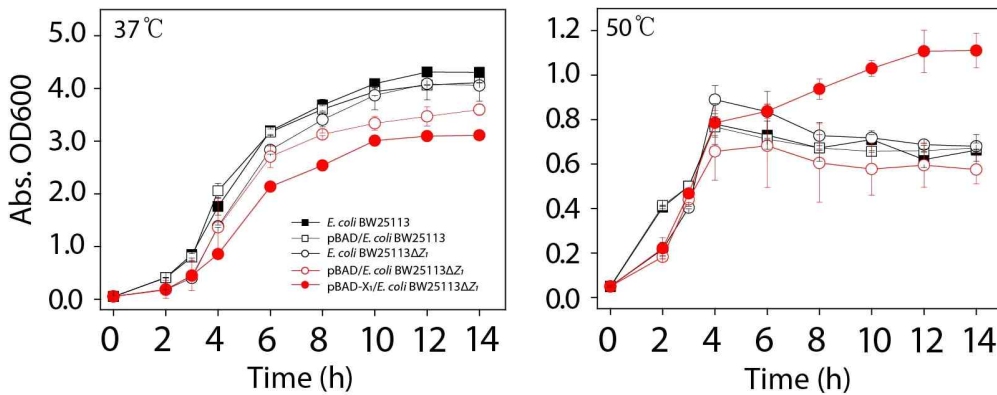


그림 65. 내열성 후보유전인자(Stress induced protein Y1, Y2) 도입 및 과발현에 따른 최적온도 변화

○ 고온성 바실러스 열안정성 인자 도입 후보 균주에 대한 온도에 따른 유전체 수준의 표현형 확인

- 중온성 *Bacillus subtilis*(str. 168, ATCC 11774, ATCC 21228)의 성장 최적 온도 37°C에서의 복합 배양조건 분석 데이터를 확보함(그림 66). 농·식품 유용미생물 *Bacillus subtilis*로의 내열성 유전인자 실제적용을 통해 내열성 농식품 발효플랫폼 호스트 개발을 위한 기반기술을 제공하고자 함.

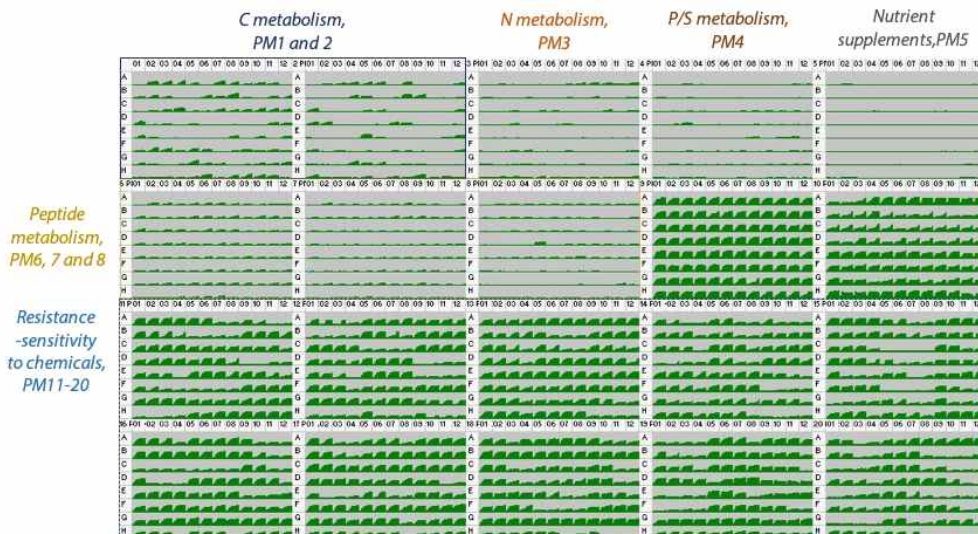


그림 66. *B. subtilis* str.168 균주의 표현형

○ 다양한 서식 환경에 따른 비교유전체학 기반 유용유전자원 발굴

- 비교유전체학 기반 FINDER strategy를 이용한 천연 희귀당 타가토스 생산 및 전환능을 지닌 유용유전자원(아라비노스 이성화효소)을 발굴함. 다양한 환경서식 미생물 유래의 유용유전자원의 서식환경을 비교분석하여 물리적, 생화학적 특징을 예측하고 그 특성에 따라 단백질을 범주화시킴으로써 공정하고자하는 목적에 따라서 유용유전자원을 선택할 수 있는 파이프라인을 구축함(그림 67).

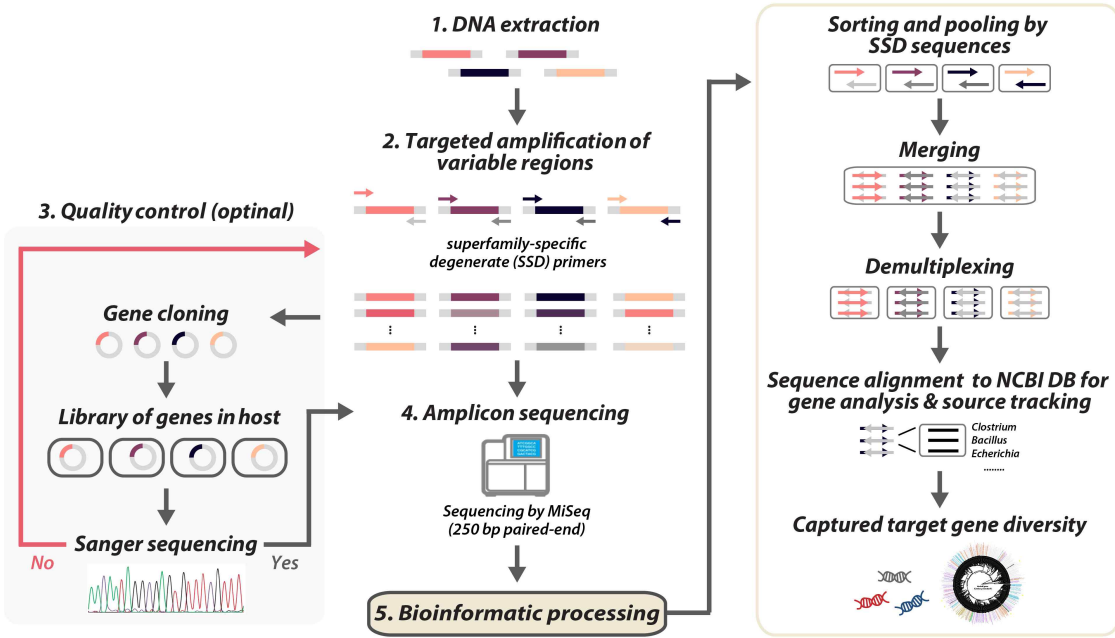


그림 67. FINDER strategy 기반 유용유전자원 초고속 탐색법 구축 및 검증

- 빅데이터 기반 Superfamily specific degenerate (SSD) primer를 제작하여 DNA library 확보와 발현 시스템 제작이 가능함. 고온균, 초고온균 혹은 중온균 목적에 맞는 스크리닝 호스트를 갖추면 시너지 효과를 낼 것으로 판단됨(그림 68)(*Biotechnol. Bioeng.*, 2021)

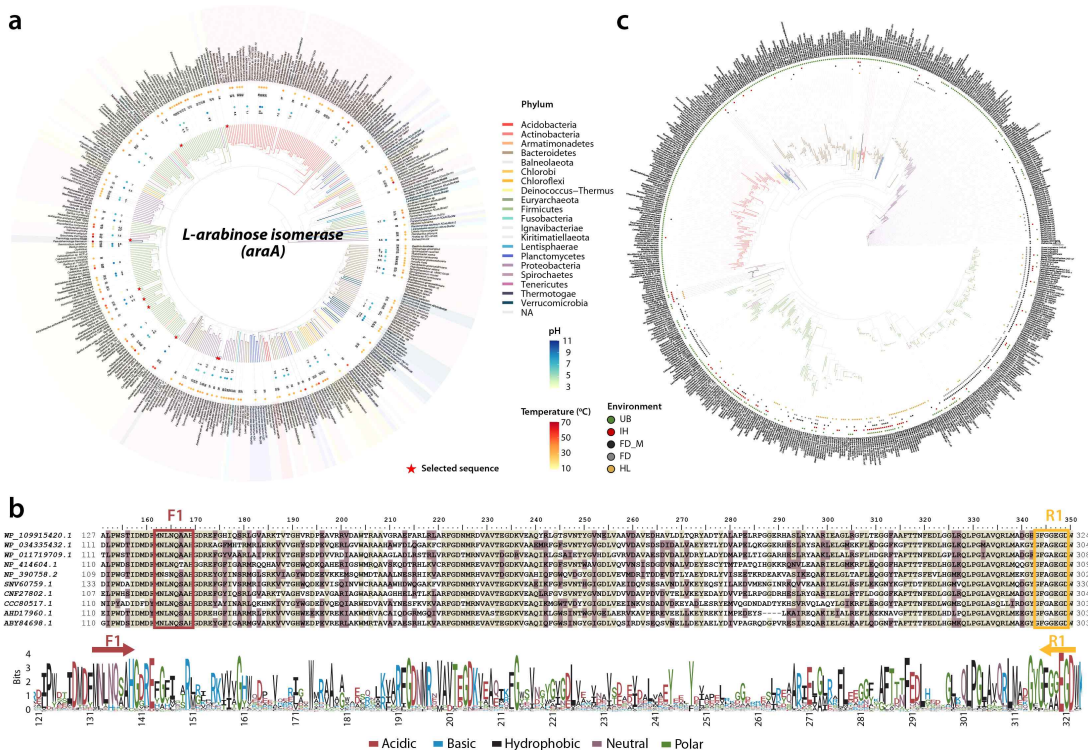


그림 68. FINDER strategy기반 타가토스생산 이성화효소 발굴 SSD primer 제작방법 및 환경에 따른 효소 분포 다양성 분석

- 유전체 맵 기반 고온성 호기 플랫폼 세포 유전자 조작 및 유전체 편집기술 개발 기반 구축
- 고온성 난분해성 바이오매스 분해 플랫폼 균주 개발
  - 기능유전체 분석 기반 적용 가능한 항생제 마커 검증 및 Pacbio SMRT 유전체분석 기반 R-M system 분석 완료함(그림 69, 표 5).

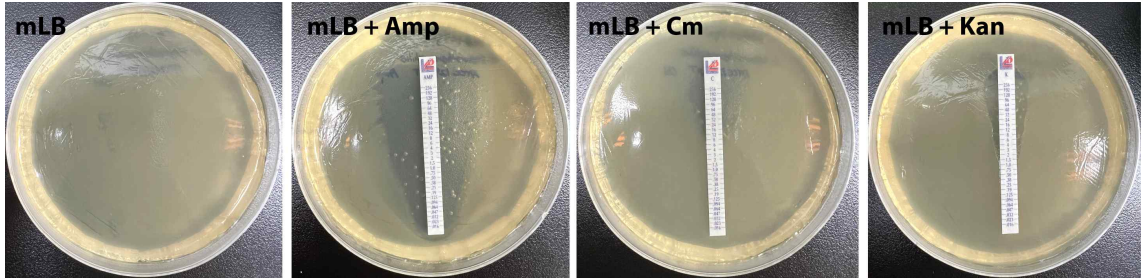


그림 69. 고온성 바실러스의 MIC test

표 5. 고온성 바실러스의 Restriction-Modification System

Detected Motif	Type (position)	Pacbio base analysis		Partner Motif
		% of Motifs Detected	Mean QV (Coverage)	
GATATC	m6A (2)	86.3% (1107/1282)	170.8 (110.9)	GATATC
GCCAT	m6A (4)	42.9% (5377/12526)	138.4 (120.9)	
GNGABNNNNNRTTB	m6A (4)	42.6% (791/1856)	162.4 (117.8)	
AGANNNNNNNTGG	m6A (3)	74.2% (611/823)	167 (117.8)	CCANNNNNNNTCT
CCANNNNNNNTCT	m6A (3)	74.7% (615/823)	166.6 (118)	AGANNNNNNNTGG
GNGAYNNNNNVTTT	m6A (4)	66.6% (692/1038)	165.3 (112.6)	
HAAAGNNNNNRTCNC	m6A (4)	41.4% (112/270)	143.9 (113.8)	
DNGNGAYNNNNNRTT T	m6A (6)	35.2% (204/578)	146 (130.9)	
AAAYNNNNNVWCNC	m6A (3)	23.4% (177/754)	139.8 (134.5)	

- 고온성 플랫폼 균주(*Geobacillus*)를 위한 열안정성 sfGFP 유전자, selection marker, promoter, Temperature sensitive (Ts) ori 등 고온성 genetic tool kit 확보함.
- 유전자 조작 및 유전체 편집기술을 이용한 고온성 바실러스 플랫폼 세포 개발 기반 구축 및 유전자도입 후보 선정
  - 고온성 바실러스의 Integration, knock-out을 위한 *E. coli*-*Bacillus* shuttle vector를 선정하고, pNW33N 기반 Ts ori와 selection marker로 pGK704-Cm<sup>R</sup>를 가지는 벡터를 구축함.
  - 또한, *groES* promoter를 도입하여 expression vector를 추가 구축함(그림 70).

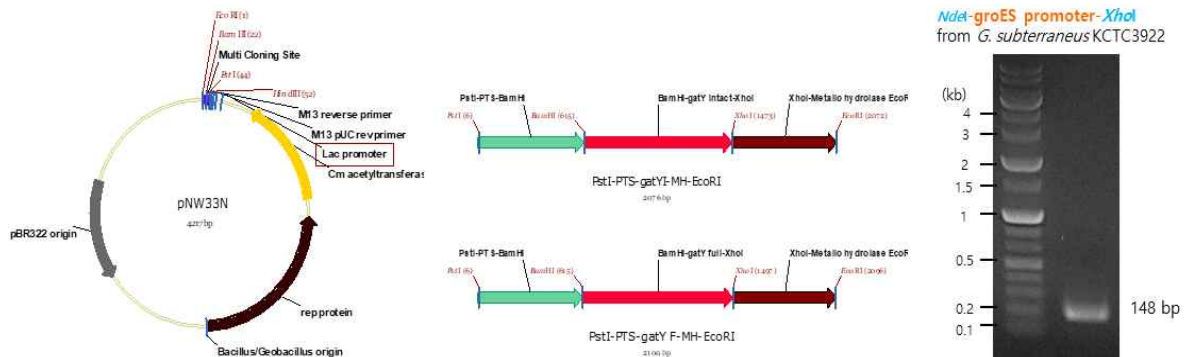


그림 70. pNW33N 기반 내열성 바실러스용 vector 제작

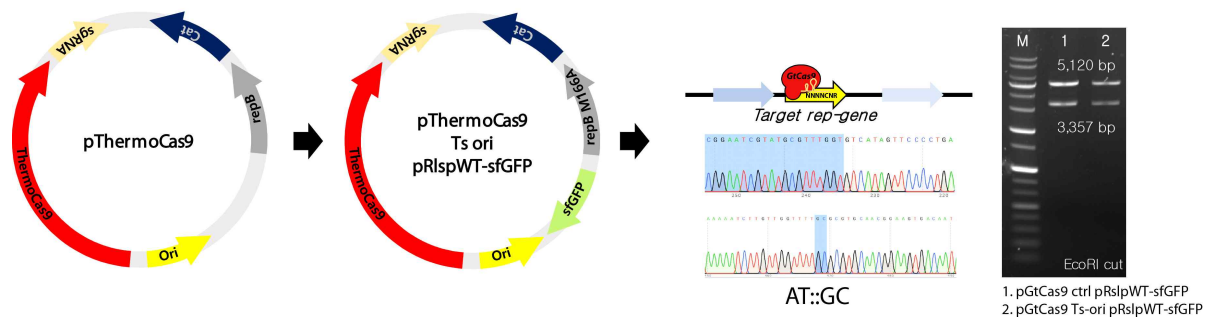


그림 71. pGtCas9 기반 내열성 바실러스용 vector 제작

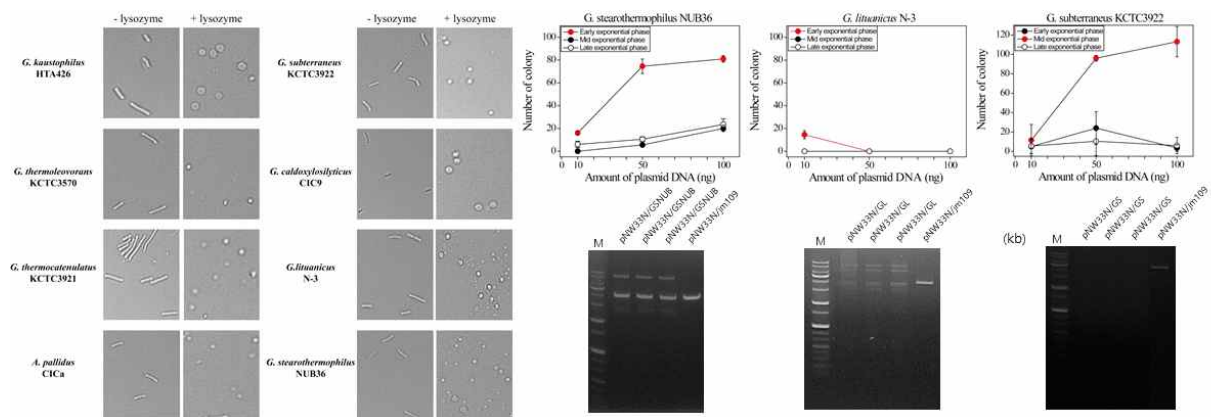


그림 72. 내열성 균주 *Geobacillus*의 protoplast 기반 유전자 조작기술 기반 확보



그림 73. 내열성 균주 *Geobacillus*의 electroporation 기반 유전자 조작기술 기반 확보

- *G. thermodenitrificans* 기반 내열성 바실러스 편집용 벡터를 추가 구축 및 개량함(그림 71).
- 내열성 그람양성 균주인 *Geobacillus*를 protoplast, electroporation, 및 natural competency를 통해 shuttle vector의 형질전환이 가능함을 확인하여 플랫폼 균주로서 형질전환기술 기반을 확보함(그림 72).
- Electroporation 기반 *Geobacillus* sp. 형질전환 조건 최적화 완료함( $>10^4$  CFU/ $\mu$ g of plasmid DNA) (그림 73).
- 1단계 연구에서 시행한 내열성 균주의 비교유전체 분석을 기반으로, 농식품 유용 효소(당이성화효소)의 개량, 스크리닝, 기능 주석화 플랫폼 제작에 요구되는 유전자 조작(integration, knock-out)이 내열성 균주에서 가능함을 검증함(내열성 후보 유전인자 3종).

○ 고온성 플랫폼 호스트로의 유용유전자원 도입을 통한 산업화 가능성 확인

- 산업화 가능성을 검증하고자 과발현용 *groES* promoter를 비롯하여 D-xylose, L-arabinose inducible promoter 와 regulator를 도입하여 형광표지 sfGFP 기반 조절 기능을 확인함.
- 산업용 유용유전자인 고온균 유래 단백질가수분해 효소 발현용 벡터 8종을 제작함(그림 74).

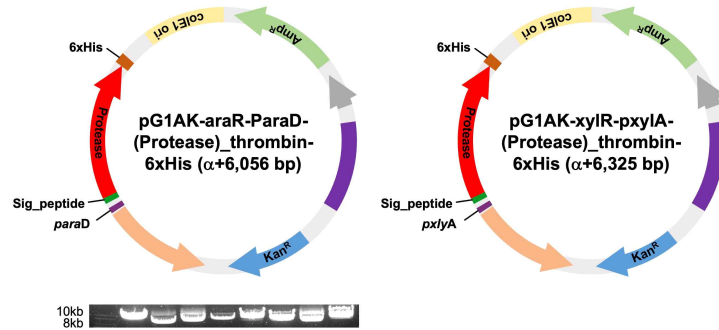


그림 74. 고온성 플랫폼 호스트의 산업용 발현 벡터 제작

○ 초호열성 바이오매스 분해균주 유전체 편집기술 도입을 위한 *in silico* 분석 및 DB 구축

- 초호열성, 혐기성 바이오매스 분해균주의 유전자 조작 기술 구축을 위해 shuttle vector를 제작함. 근연균주 *Thermotoga* sp. RQ7 유래의 cryptic plasmid 및 열안정성 selection marker를 선정하여 유전자 합성을 진행함.
- shuttle vector의 형질전환 진행에서 integration, knock-out 등 recombination 효율을 증진시키기 위해 초호열성 균주의 RM system을 분석함.
- REBASE database 및 Pacbio SMRT sequencing 기반 methylation kinetics 분석을 통한 4종의 methylation 패턴(DC<sup>m4</sup>C<sup>m4</sup>CCB, CAMC<sup>m6</sup>AG, <sup>m4</sup>CGC<sup>m4</sup>G, G<sup>m6</sup>ATC)을 확인함.

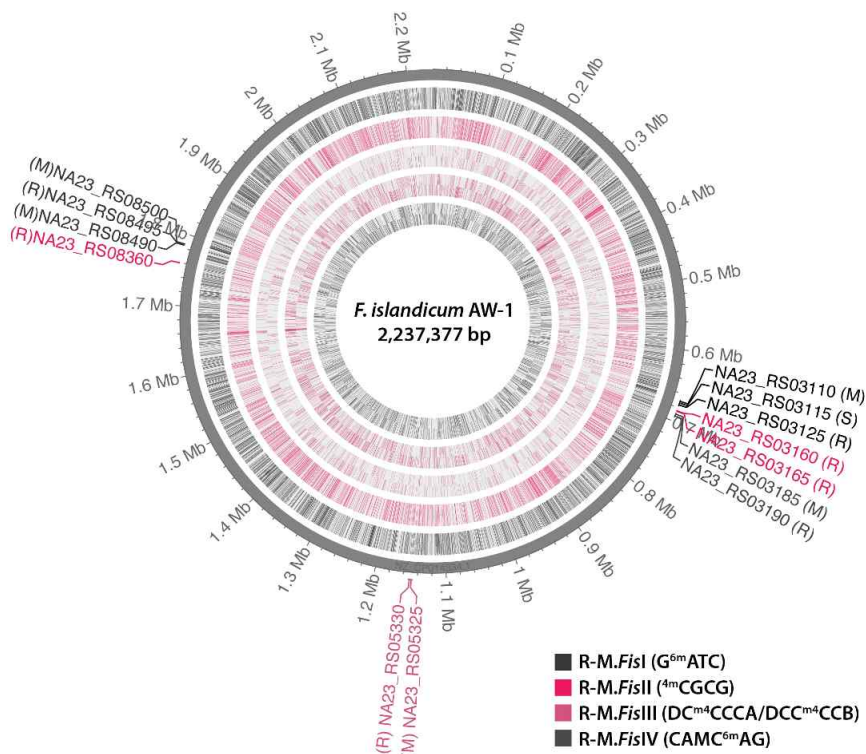


그림 75. 초호열성 바이오매스 균주 *F. islandicum* AW-1의 R-M system

- Genome 분석 기반 6종의 Methyltransferase와 6종의 Restriction nuclease 후보유전자를 확인함(표 6).

표 6. 초호열성 바이오매스 분해균주의 Restriction-Modification System

rebase note	rebase accession	locus tag	product	protein_id
putative Type I restriction-modification system N6-adenine DNA methyltransferase (M) subunit of unknown recognition sequence (I gamma)	M.FisAW1ORF3110P	NA23_RS03110	type I restriction-modification system subunit M	WP_052107067.1
Type III methyltransferase <sup>m6</sup> A (III beta) DC <sup>m4</sup> C <sup>m4</sup> CCB	M.FisAW1ORF3185P	NA23_RS03185	DNA methylase	WP_033192426.1
putative Type II N4-cytosine or N6-adenine DNA methyltransferase of unknown recognition sequence (II) CAMC <sup>m6</sup> AG (M=A or C)	M.FisAW1ORF5325P	NA23_RS05325	DUF1156 domain-containing protein	WP_033191786.1
Type II N4-cytosine DNA methyltransferase recognizing <sup>m4</sup> CGC <sup>m4</sup> G (mC4) (II beta)	M.FisAW1I	NA23_RS08360	site-specific DNA-methyltransferase	WP_033192215.1
putative Type IIS N4-cytosine or N6-adenine DNA methyltransferase probably recognizing G <sup>m6</sup> ATC (II a)(modification methylase)	M1.FisAW1ORF8470P	NA23_RS08490	DNA adenine methylase	WP_052107296.1
DNA methylase N-4 (II gamma)	M2.FisAW1ORF8470P	NA23_RS08500	site-specific DNA-methyltransferase	WP_033192238.1
Type I Specificity Subunit	S.FisAW1ORF3110P	NA23_RS03115	restriction endonuclease subunit S	WP_033191135.1
Type I restriction enzyme	FisAW1ORF3110P	NA23_RS03125	type I restriction endonuclease subunit R	WP_033191133.1
putative Type II restriction enzyme of unknown recognition sequence	R1.FisAW1ORF3160P	NA23_RS03160	DEAD/DEAH box helicase	WP_084384027.1
Type II restriction enzyme	R2.FisAW1ORF3160P	NA23_RS03165	hypothetical protein	WP_062946216.1
putative Type III restriction (R) subunit of unknown recognition sequence	FisAW1ORF3185P	NA23_RS03190	restriction endonuclease subunit R	WP_033191125.1
Type II restriction enzyme (DpnII)	fisAW1ORF8470MP	NA23_RS08495	restriction endonuclease	WP_033192237.1

□ 초호열성 바이오매스 분해균주 유전체 편집기술을 도입을 위한 기반기술 구축

○ 초고온성 난분해성 바이오매스 분해 플랫폼 균주 개발

- *F. islandicum* AW-1의 Methylation 패턴을 모방하고자 *E. coli* 기반 *in vivo* Plasmid artificial modification (PAM) 플랫폼 호스트를 제작하고자 함.
- Heterologous expression methyltransferase를 위해 *E. coli* 내의 Cytosine specific nuclease (*mcr*, *mrr*) 및 EcoKI 제한효소(*hscR*)를 모두 제거함.
- *endA*, *nupG*, *deoR* 및 *recA* 유전자 제거를 통한 DNA 안정성과 copy number 및 플라스미드 생산량을 일반 BL21(DE3) 대비 400% 증가시킴.

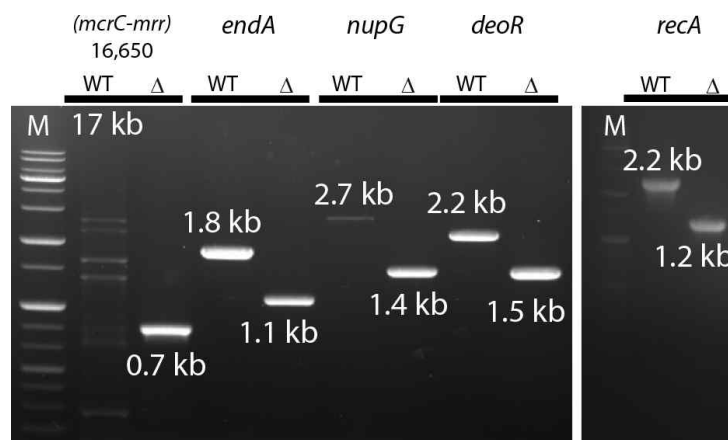


그림 76. *E. coli* BL21(DE3) 기반 PAM host

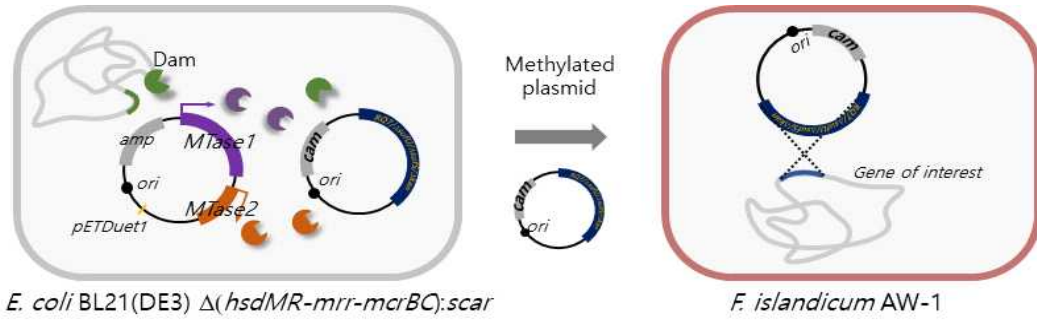


그림 77. RM system 적용을 위한 PAM host 모식도

- PAM 호스트내에 난분해성 바이오매스 분해 균주 유래의 6종의 Methyltransferase (MTase)를 발현함 (그림 78,좌). PAM호스트 유래 plasmid에 제한효소를 처리하여 *in vivo* methylation activity를 확인함 (그림 78).

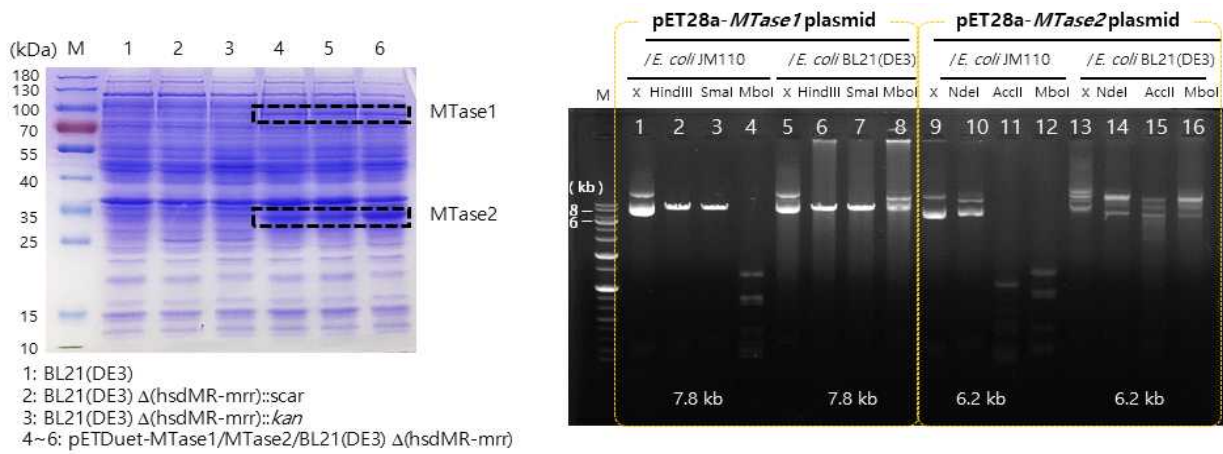


그림 78. methyltransferase 발현 (좌) 및 *in vivo* methyltransferase activity 확인 (우)

- 난분해성 바이오매스 분해 균주의 형질전환능 및 편집기술 도입 가능성을 확인하기 위해 4종의 vector를 제작함. 1종은 AW-1 내 플라스미드의 복제를 확인하기 위해, 초호열균 유래의 cryptic vector pRQ7 ori를 도입함. 1종은 AW-1 genome의 kanamycin resistance 유전자를 타겟으로 하고, 2종은 난분해성 바이오매스 분해에 중요한 역할을 할 것으로 예상되는 *suf* system을 타겟으로 하였음(그림 79).
- Chloramphenicol 저항성 유전자 고발현을 위한 *F. islandicum* AW-1 전사체 분석 기반 고효율 promoter (ppgk; RS01655 promoter, pS8; RS06755) 및 열안정성 혐기 reporter gene인 *CreI*LOV 및 sfGFP N39D를 도입함.

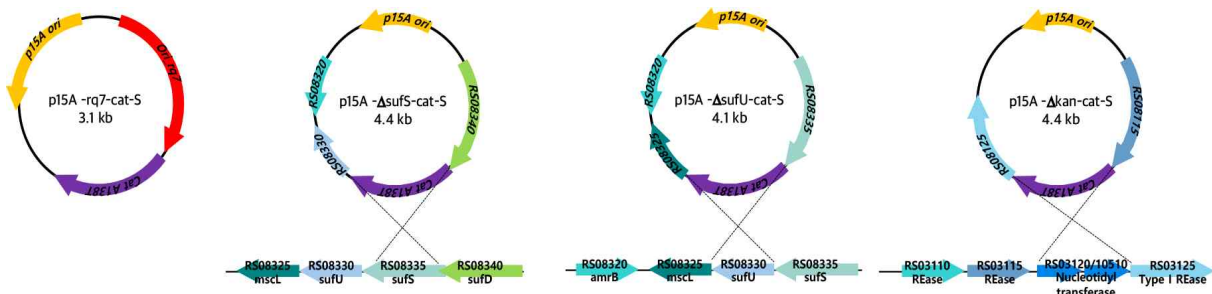


그림 79. 바이오매스 분해균주 *F. islandicum* AW-1의 유전체 편집용 vector 제작

- 초고온성 혐기 고체배지 최적화 및 균주 생존성, 형질전환 효율, MIC test를 진행하여 단일 colony 선별에 최적의 항생제 농도(50 µg/ml) 및 시간(2일)을 선정함(그림 80).

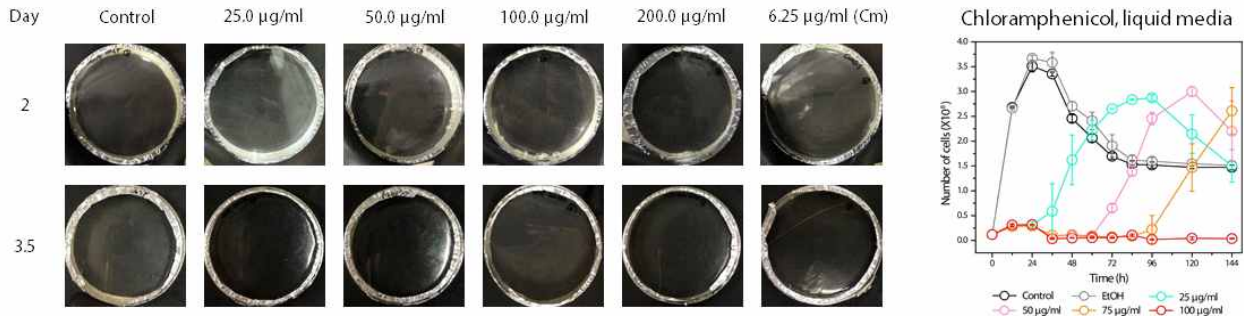


그림 80. 고체 및 액체 배지 기반 MIC test

- 다중오믹스(Genomics, transcriptomics) 데이터 기반 난분해성 바이오매스 분해균주의 CRISPR-Cas 시스템 유무 및 전사 여부 분석을 진행함.
- *in silico* 분석 결과 Cas 6, 8, 7, 5, 3, 4, 1, 2의 cluster로 구성된 Type I-B의 CRISPR-Cas 시스템을 확인함.
- 35 bp의 5'-TTTCCATCTCTTTCAGAGAGAATCACCTTTCCTAC-3'와 29 bp의 5'-ATTTACATCCCACATAGTTAATATAGAAC-3'의 반복서열이 존재함을 확인하여 추후 초호열균의 innate Cas system을 이용한 유전체 편집기술 도입 가능성을 확인함(그림 81).

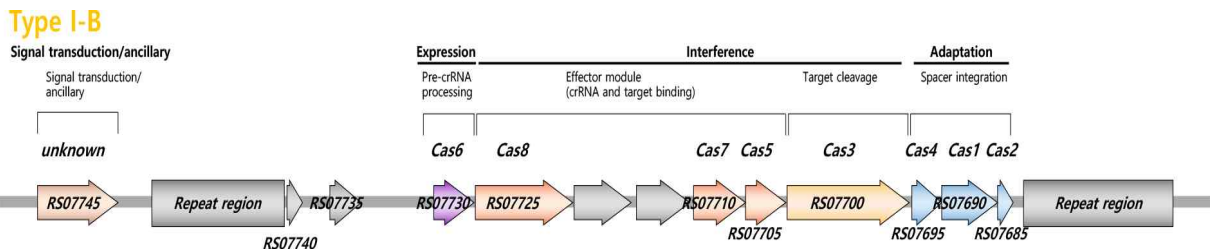


그림 81. *F. islandicum* AW-1의 Type I-B Cas system

- 다중오믹스 분석기반 천연 희귀당 생산, 전환 및 이화능을 지닌 유용유전자원 발굴 및 기능규명을 위한 대용량 초고속 스크리닝 플랫폼 세포개발
- 희귀당 이용성 적응진화 유도 유용유전자원의 발굴 및 대장균 세포 도입을 통한 타가토스 이화능 획득 세포 구축
  - 타가토스를 자화하지 못하는 대장균(*E. coli* BL21(DE3))(그림 27)과 이화 가능한 enteric bacteria의 comparative genomics를 통한 자화 유도 유전자 (*Bacillus licheniformis* tagatose 1,6-bisphosphate aldolase)를 발굴 함(그림 27).
  - 대장균에 자화 유도 유전자를 도입, 약 500시간 성장시켜 이용성을 획득시킨 후 연속 계대배양을 통한 이용성이 향상된 균주를 획득, 대용량 초고속 스크리닝 플랫폼 세포 개발 및 적응진화 추적 세포를 구축함(그림 82).



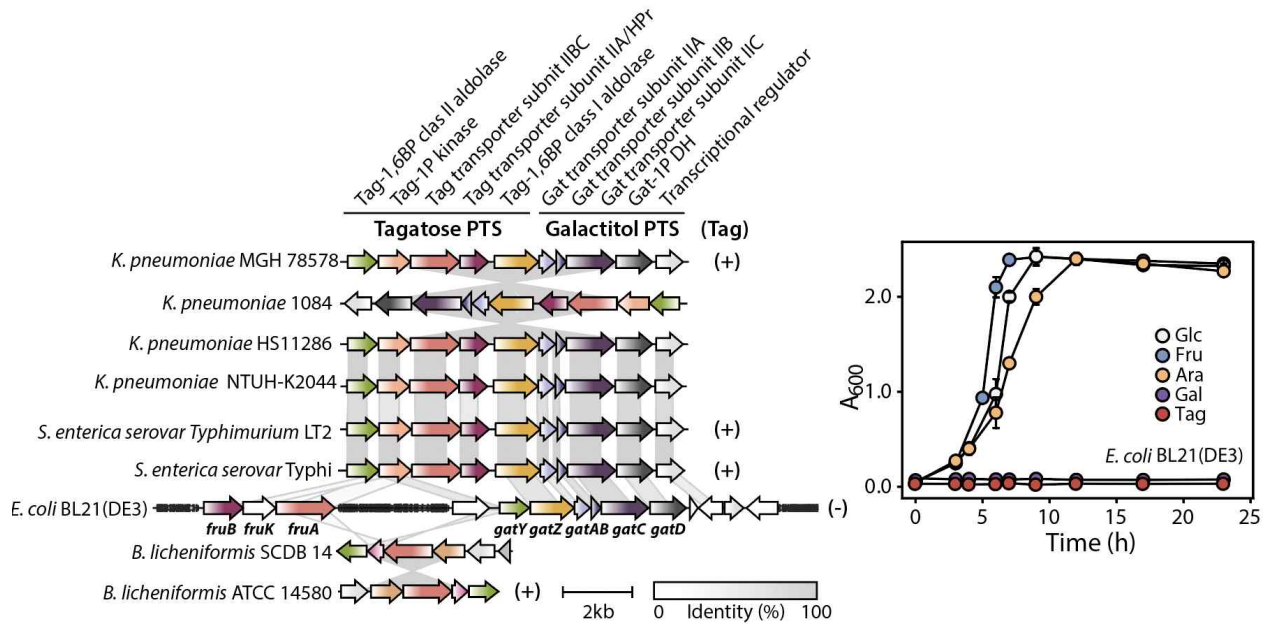


그림 82. 타가토스 이용성 보유 및 불용성 균주의 genetic cluster 비교(좌)  
대장균의 영양원별 성장곡선(우)

- 타가토스 자화능 획득 대장균에 대한 전장 유전체 Single Nucleotide Polymorphism(SNP) 분석을 통해 세포 내 타가토스 이화 대사에 필수 유전자 변이를 확보. 유전자 4종에서 돌연변이를 확인함(*fruK*, *to/Q*, ECD\_RS23075, ECD\_RS4076).

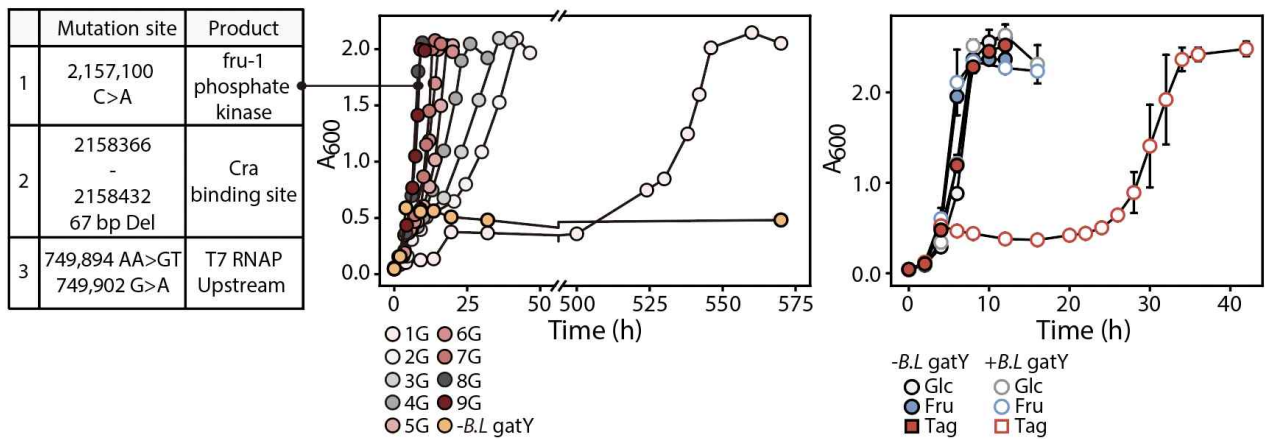


그림 83. 타가토스 자화능 획득 균주의 연속 계대배양 및 전장 유전체 분석(좌)  
*BLgaY* 유전자 curing 후 타가토스 이용성 확인(우)

- 다중오믹스 네트워크 맵 기반 플랫폼호스트의 타가토스 자화능 관련 유전자 규명을 위한 PTS관련 유전자 스크리닝
  - PTS 관련 유전자(*fruA*, *fruB*, *manX*, *manY*, *manZ*) 및 fructose 자화 유전자(*fruK*, *pfkA*) K/O *E. coli* K-strain(BW25113), B-strain(BL21(DE3))을 이용한 타가토스/프럭토스 이용성을 확인함(그림 84, 85).

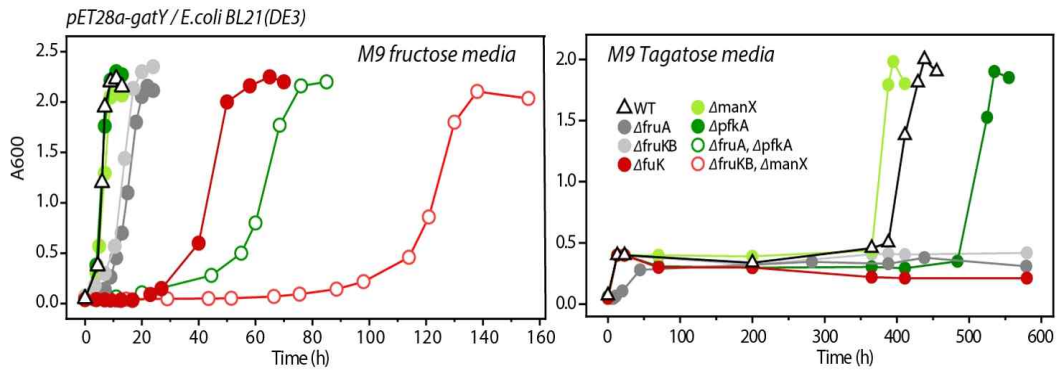


그림 84. *E. coli* B-strain PTS 관련 유전자 Knock-out에 따른 당이용성 변화

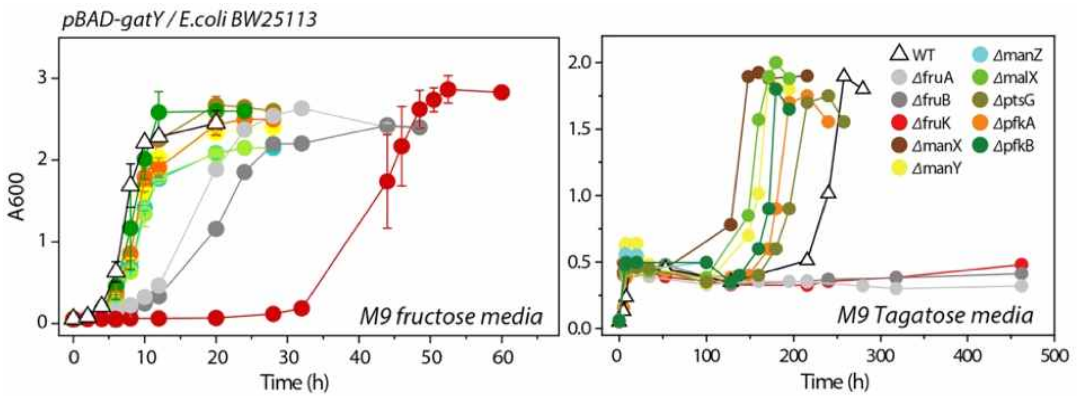


그림 85. *E. coli* K-strain PTS 관련 유전자 Knock-out에 따른 당이용성 변화

- 타가토스 선택배지에서 *E. coli* K-12 균주 (PTS관련 single gene knock-out strain)의 생육확인을 통해 타가토스와 프룩토스가 이화 대사회로를 공유할 것으로 추정함(그림 86).

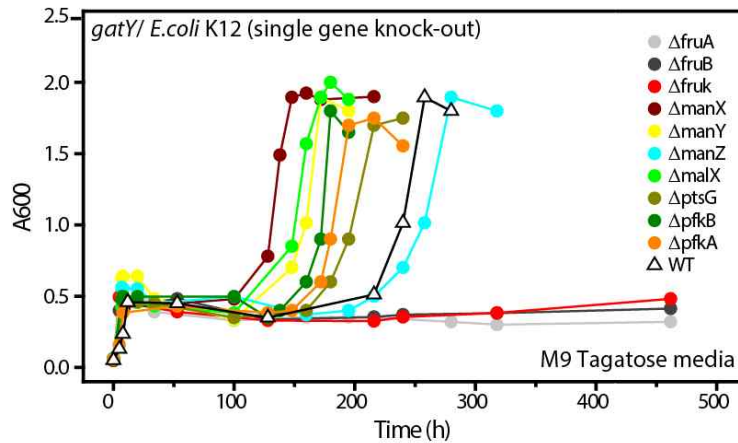


그림 86. *E. coli* K-12(single gene knock out) 균주에 타가토스 알돌레이즈 발현 및 타가토스 이용성 확인

○ *E. coli* 야생주에 Single-mutation 도입을 통한 타가토스 자화능 획득 분석 수행 및 PTS 관련 유전자 Knock-out strain을 통한 타가토스 자화능 연관 transporter 스크리닝

- 최초 타가토스 자화능 획득 *E. coli* 돌연변이체(BL21(DE3))의 전장유전체 1종을 추가 분석함.
- 타가토스 자화 핵심 예상인자 SNP 2종을 *E. coli* 야생주에 CRISPR-Cas9을 이용한 genome-editing을 통한 타가토스 자화능 획득 분석 수행함(그림 87).

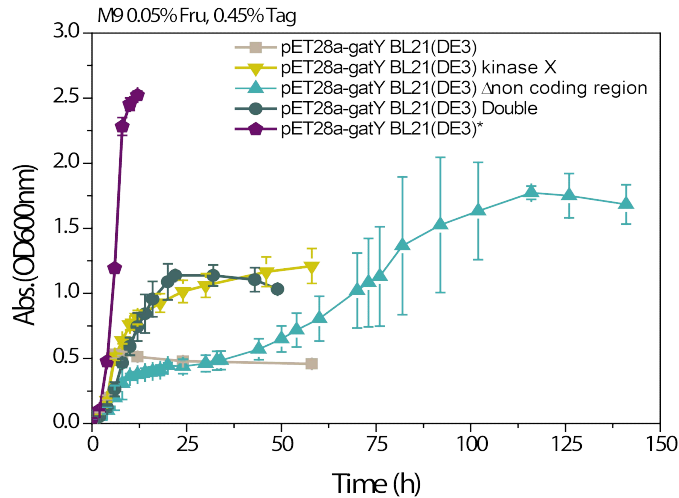


그림 87. *E. coli* 야생주에 타가토스 자화 핵심 인자 도입에 따른 타가토스 자화능 변화

- 대장균에서의 타가토스/프럭토스 에너지대사회로 유입, 타가토스 해당과정 규명 및 대사회로 재설계를 위한 qRT-PCR용 primer 23종 제작함.
- 타가토스 자화 돌연변이주(pET22b-ECAI WT BL21(DE3)\*)의 탄소원(타가토스, 갈락토스, 프럭토스, 글루코스)에 따른 RNA 추출을 통해 완전히 밝혀지지 않은 타가토스 자화 대사회로를 규명함(그림 88).

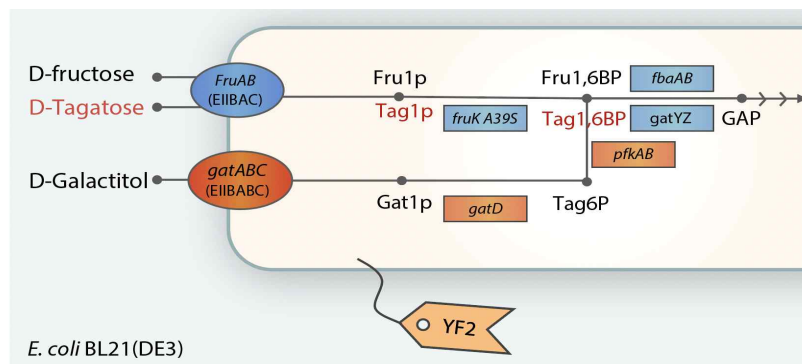


그림 88. 대장균의 신규 타가토스 대사회로 규명

○ 전장유전체 분석 기반 대장균의 타가토스 이화대사회로 규명

- 타가토스와 프록토스가 이화 대사회로를 공유할 것으로 추정됨(그림 88). 이를 통해 대장균의 타가토스 당 대사회로에 사용되는 후보 유전자를 선별함(표 7).

표 7. 타가토스 이화대사경로를 확인하기 위한 qRT-PCR타겟 유전자 리스트

#	gene	function	#	gene	function
1	<i>fruA</i>	fructose transporter subunit	16	<i>manX</i>	mannose transporter subunit
2	<i>fruB</i>		17	<i>manY</i>	
3	<i>fruK</i>	fructose kinase	18	<i>manZ</i>	
4	<i>pfkA</i>		19	<i>maK</i>	mannose kinase
5	<i>pfkB</i>	fructose aldolase	20	<i>gatA</i>	galactitol transporter subunit
6	<i>fbaA</i>		21	<i>gatB</i>	
7	<i>fbaB</i>		22	<i>gatC</i>	
8	<i>ptsH</i>	phosphotransferase	23	<i>mtA</i>	Mannitol transporter
9	<i>ptsI</i>		24	<i>gutA</i>	Glucitol transporter
10	<i>ptsG</i>	glucose transporter subunit	25	<i>toQ</i>	Tol-pal system protein TolQ
11	<i>crr</i>		26	catalase	catalase
12	<i>gatY</i>	tagatose aldolase	27	ECBD_4076	PEP--protein phosphotransferase
13	<i>gatZ</i>		28	GAPDH	housekeeping gene
14	<i>gaP</i>	galactose transporter, aldolase	29	sigma 70	
15	<i>gaE</i>		30	rpoD	

- 전장 유전체 분석기반 RNA-seq 데이터 및 qRT-PCR기반 대장균의 타가토스 대사회로 규명함. 이를 바탕으로 새로운 유용유전자원 발굴을 위한 플랫폼 호스트를 구축할 예정임(그림 89).

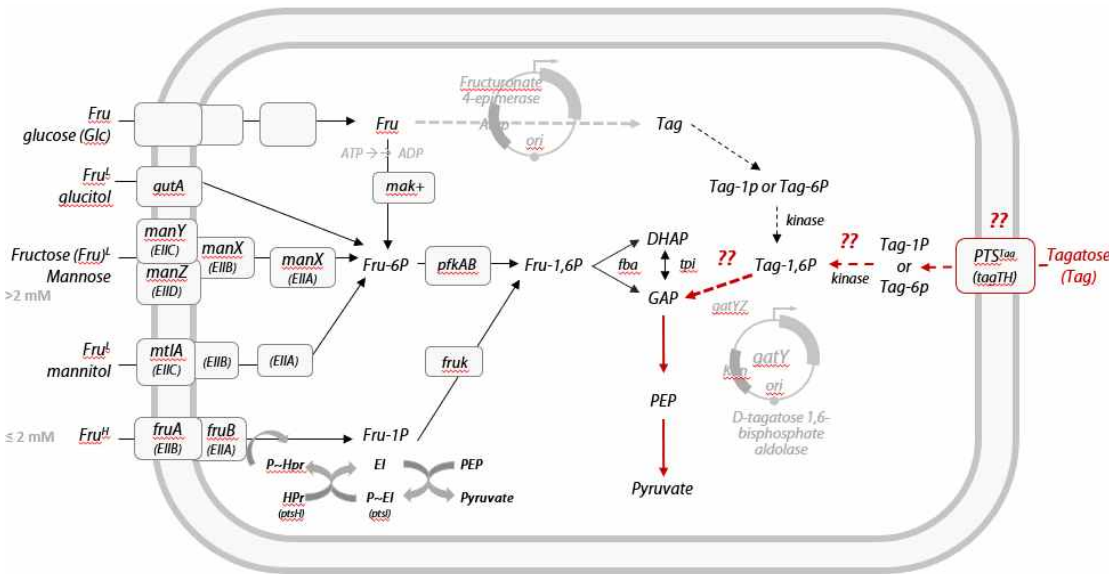


그림 89. 세포성장기반 맞춤형 플랫폼호스트 제작모식도

○ 재설계된 플랫폼 호스트의 다양한 탄소원에 따른 표현형 분석 및 희귀당전환효소 도입 및 성장곡선을 통한 성능 검증

- 희귀당전환효소(Fructose 4-epimerase)의 활성기반 초고속 스크리닝을 위해 재설계된 *E. coli* 균주의 당이용성 변화 및 희귀당전환효소의 도입에 따른 성장가속을 통한 성능검증 확인함(그림 90).

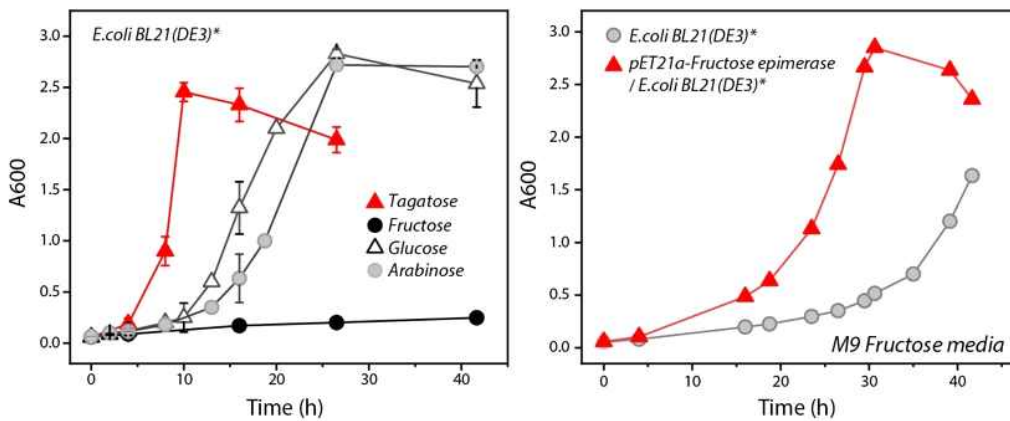


그림 90. 재설계된 플랫폼 호스트의 탄소원에 따른 성장곡선 확인 및 희귀당전환효소 도입을 통한 스크리닝 플랫폼으로써의 성능 검증

○ 다중오믹스 네트워크 맵 기반 플랫폼호스트의 타가토스 자화 유전자 규명을 통한 영양요구성 플랫폼 호스트 검증

- PTS 관련 유전자(*fruA*, *fruB*, *manX*, *manY*, *manZ*) 및 Fructose 자화 유전자(*fruK*, *pfkA*) K/O *E. coli* K-strain(BW25113), B-strain(BL21(DE3)) 균주의 탄소원(Fructose, Tagatose)별 세포성장 비교를 통한 Tagatose 대사회로 예측 유전자를 선별하고 이에 대해서 RT-qPCR을 수행함.
- 희귀당 대사 예상 유전자 32종을 타겟하여 제작한 프라이머를 사용하여 RT-qPCR을 진행, Tagatose 자화 돌연변이주(pET22b-ECAI WT BL21(DE3), YF2)의 탄소원별(D-Glucose, D-Fructose, D-Tagatose, D-Galactose) 전사량을 확인함(그림 42,좌). Tagatose에 특이적으로 과발현되는 해당과정 유전자를 확인하기 위해 Glucose 대비 전사량을 비교함(그림 91, 우).

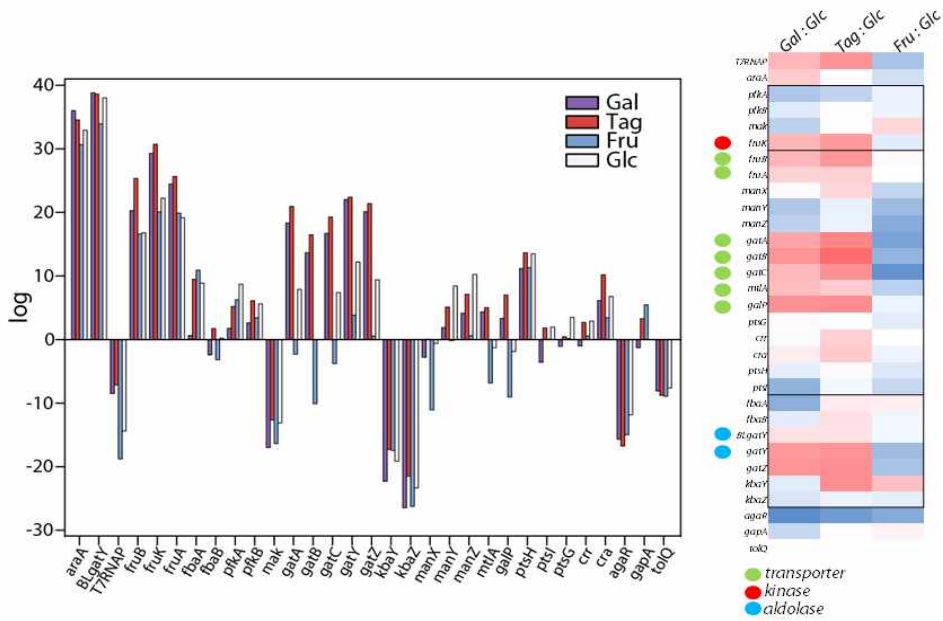


그림 91. qRT-PCR을 통한 *E. coli* BL21(DE3) 균주의 tagatose 대사회로 예상 유전자 32종의 전사량(좌), Glucose 대비 유전자 전사량 비교(우)

- D-tagatose를 함유한 배지에서 특이적으로 과발현 양상을 보이는 유전자를 확인하여 자화능 획득 *E. coli* BL21(DE3) 균주의 자화 핵심 유전자원 및 Tagatose 대사회로를 예측함(그림 92).

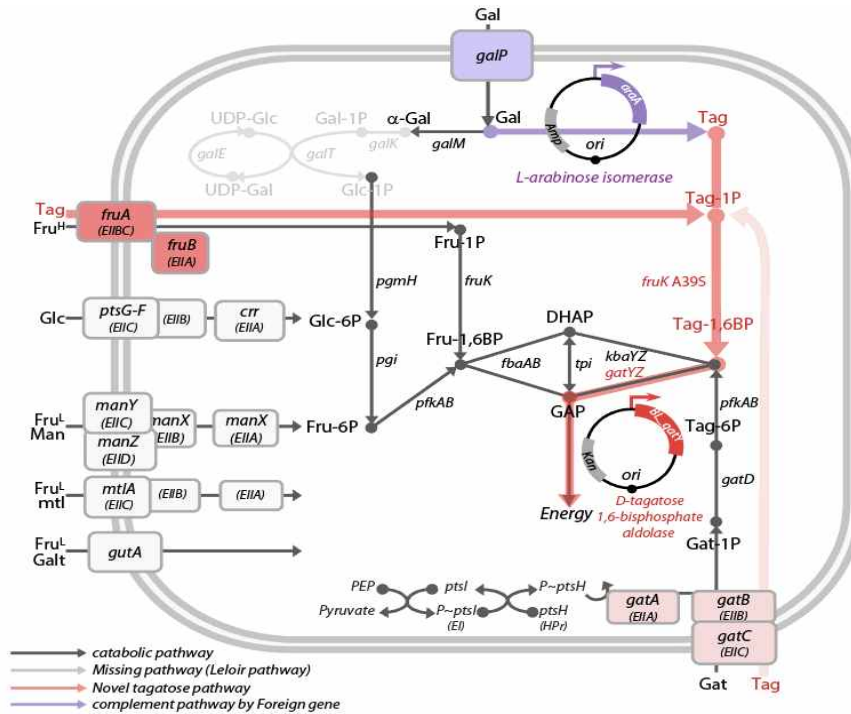


그림 92. qRT-PCR data 기반 희귀당(D-Tagatose) 대사회로 설계

- 예상 대사회로 규명을 위해 transporter(*fruA*, *gatABC*)와 endogenous-aldolase(*ECgaM*), hexokinase가 deletion된 균주를 제작하여 heterologous *BLgatY* 유전자를 형질전환 후 탄소원별 (D-glucose, D-fructose, D-tagatose, D-galactose) 성장곡선을 비교함(그림 93-95).
- fruA* 유전자가 삭제된 타가토스 자화능 획득 균주의 경우, Fructose와 Tagatose에 대해 성장곡선이 모두 지연되거나 혹은 이용하지 못하는 것을 확인하여 *fruA*가 주요한 희귀당 transporter임을 확인함(그림 93).

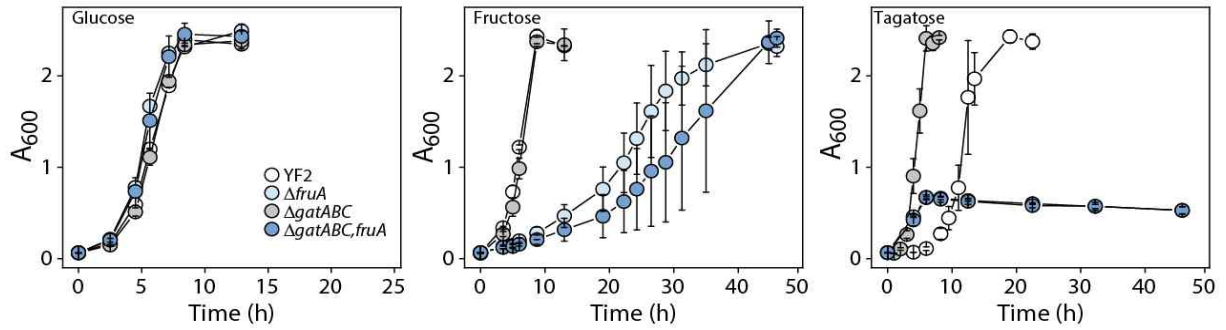


그림 93. Tagatose 대사 관련 transporter 후보유전자 삭제 균주의 당이용성 비교

- Screening host의 endogenous *ECgatY* 유전자가 knock-out 되었을 경우, 야생형 균주와 비교하여 탄소원별 성장속도의 차이가 없는 것을 확인, 타가토스가 포함된 배지에서 *E. coli*의 성장이 오직 heterogenous *BLgatY*의 발현에 의해서 자화할 수 있음을 확인함(그림 94).

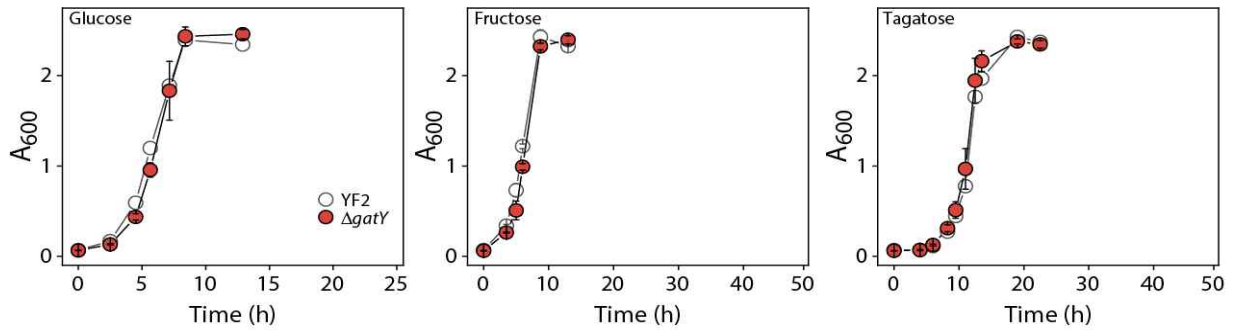


그림 94. Tagatose 대사 관련 aldolase 후보유전자 삭제 균주의 당이용성 비교

- qRT-PCR에서 타가토스 대사 관련 후보 kinase 중 유일하게 과발현되었던 hexokinase인 fruK knock-out 균주의 경우 glucose, fructose의 경우 모두 세포성장이 지연되는 것을 확인함. 반면에, tagatose의 경우 성장하지 않는 것을 확인함을 통해 fruK가 타가토스 대사에 주요한 hexokinase임을 확인함(그림 95).

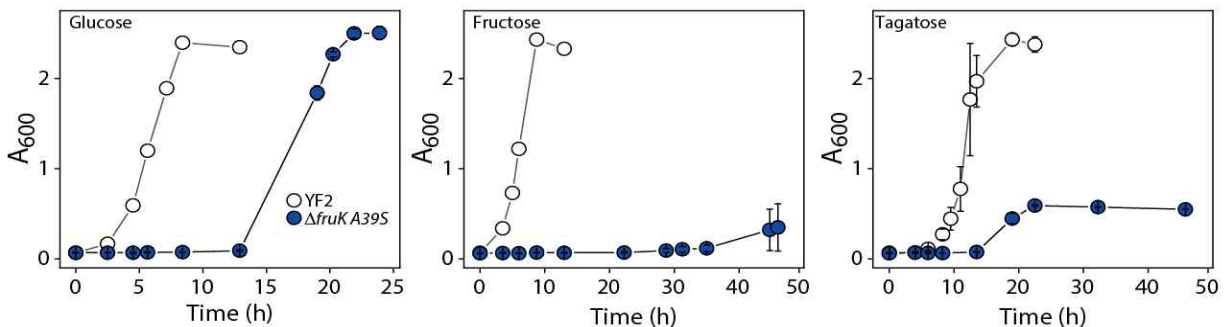


그림 95. Tagatose 대사 관련 hexokinase 후보유전자 삭제 균주의 당이용성 비교

○ 희귀당전환효소(Fructose 4-epimerase)의 대용량 돌연변이 라이브러리 제작

- 2차년도에 제작한 D-fructose/D-tagatose 전환효소인 fructose-4-epimerase(UxaE)의 mutant library를 맞춤형 플랫폼 균주에 도입하여 라이브러리를 제작하고, 초고속 대용량 스크리닝을 통해 시스템 검증을 시행함.
- Mutant library를 제작하기 위해 초호열균 유래 uxaE 유전자를 1 kbp 당 약 3-5개의 아미노산의 변이가 발생되도록 error-prone PCR을 수행하여  $1 \times 10^7$  이상의 다양성이 확보된 대용량 DNA 라이브러리를 확보함.

- BL21(DE3) 변이균주에 pET21a-uxaE 라이브러리 유전자를 형질전환시켜 고체배지에서  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ 개의 transformants(균주 라이브러리)를 확보함.
- 균주 라이브러리를 tagatose배지에서 활성화한 후, M9 fructose 제한배지에  $10^7$ 개의 균주 라이브러리 접종하여 fructose배지에서 연속적인 계대배양을 통해 야생형 포함 균주 대비 성장 속도가 증가한 균주로부터 플라스미드 시퀀싱을 통해 활성증가 변이체를 선별함(그림 96).

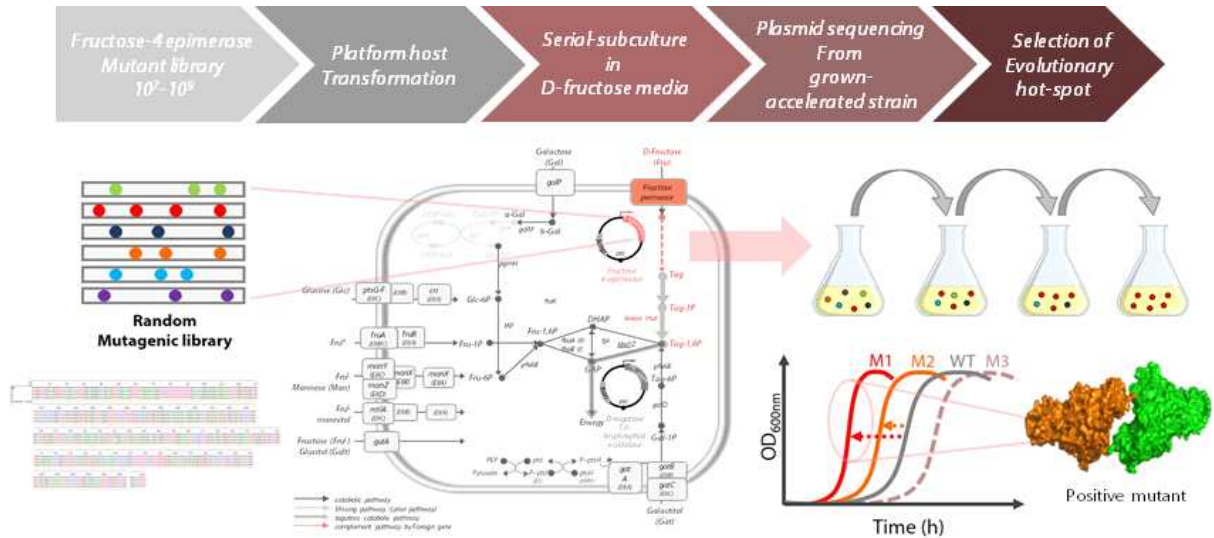


그림 96. 초고속 스크리닝을 위한 균주 라이브러리 제작 및 실험방법

○ 효소활성 의존형 세포성장기반 플랫폼 호스트를 이용한 당이성화효소의 초고속 대용량 스크리닝, 성능 검증

- 라이브러리 균주와 WT 균주간 fructose 배지에서 성장 속도를 비교하여 WT 대비 성장속도가 증가한 라이브러리 균주로부터 플라스미드를 추출한 후, 시퀀싱을 수행함.

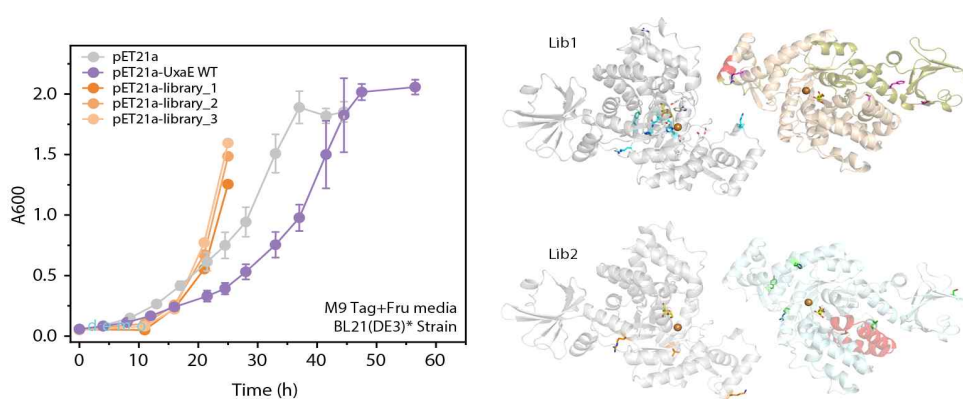


그림 97. UxaE 라이브러리 균주 성장곡선(좌), 구조기반 mutation site 분석(우)

- 하여 epimerase 활성이 증진된 것으로 확인되는 변이주 2종(Lib1: V16A/T105A/148S/R236S, Lib2: R92S/F95I/N129Y/K193E/K324N/H341L/H362)을 획득함(그림 97, 좌).
- 구조를 통해 선별된 uxaE mutant residue가 metal binding site에 인접해 있는 것을 확인함. 이 부위의 변이가 구조적으로 효소 활성 증진에 영향을 미쳤을 것으로 예측함(그림 97, 우).

○ 세포성장기반 단백질 기능 주석화를 통한 설탕 대체감미료 생산 유용유전자원 발굴

- T7 RNA polymerase를 포함하는 lac operon의 발현 프로모터 서열상의 돌연변이로(multi-nucleotide variations (MNVs)) 타가토스 제한 배지 내 외래유전자 *B. licheniformis* gatY의 단백질 발현 정도가

조절되는 것을 확인함에 따라 진화 유도를 매개하는 유전자원임을 확인(그림 98).

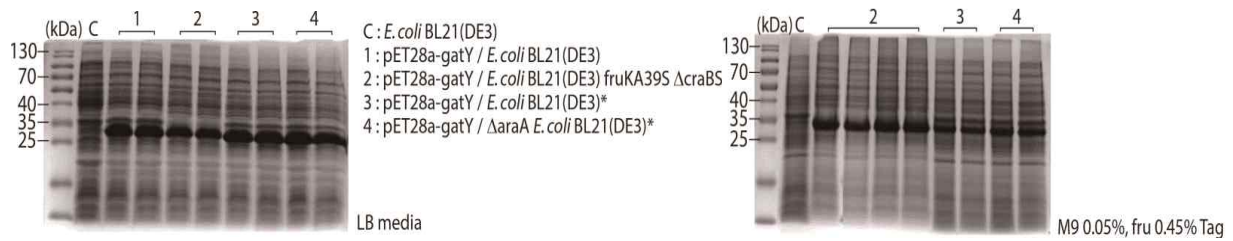


그림 98. 영양원별 *gatY* 발현량 변화

- 타가토스 제한 배지 내에서 연속 배양을 통해 적응진화가 진행되는 대장균의 세대별 phenotype, genotype 분석을 통해 진화과정을 추적함. 타가토스 자화능 획득의 순서는 발현정도의 조절 후 인산화효소의 돌연변이로 인한 미세조정이 순차적으로 진행됨을 확인
- 다중오믹스 분석을 통해 확인된 타가토스 자화능 플랫폼 호스트의 catabolite repressor binding site의 변화로 인한 대장균의 희귀당 자화 조절능 효과 검증
- 초고속 스크리닝을 통해 선별된 fructose/tagatose 이성화효소 변이체의 생·물리·화학적 특성을 규명하여 세포 성장 기반 활성 시스템을 검증

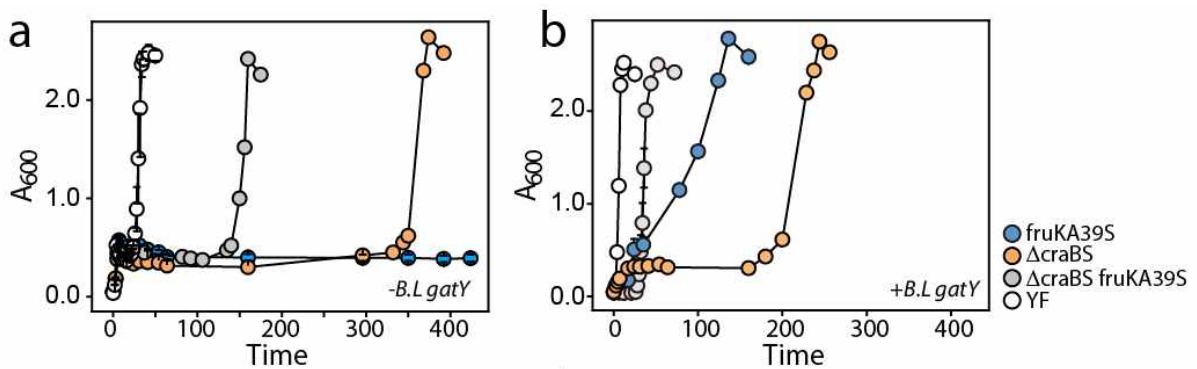


그림 99. 단일 돌연변이가 도입된 대장균의 타가토스 이용성 확인

- 타가토스 자화능 획득 균주의 tagatose 인산화 효소의 변이에 따른 생화학적 특성 변화를 규명하기 위해 HPLC를 통한 인산화 효소의 활성 측정을 시행함. 기질인 인산화 프룩토스(D-fructose-6P)에 대비하여 희귀당(D-tagatose-6P)에 대한 효소 활성이 증가함을 확인함

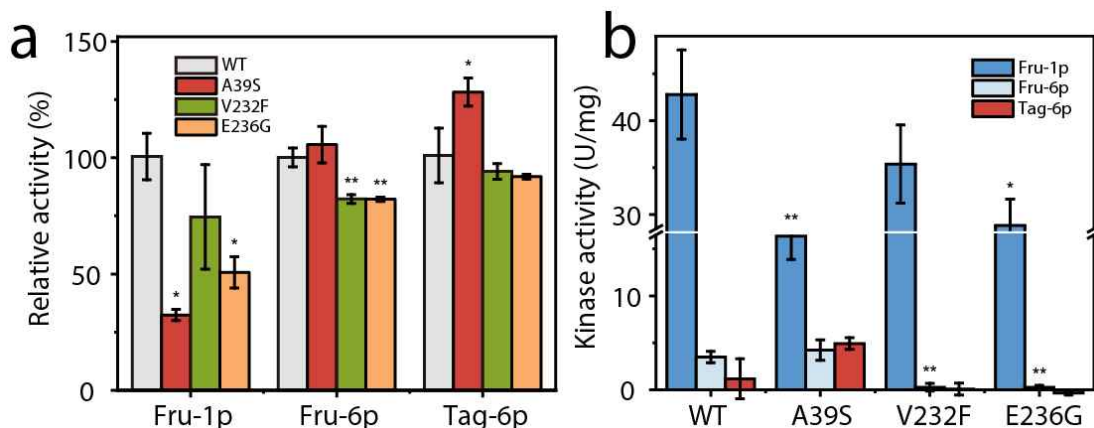


그림 100. FruK 효소의 야생형, 돌연변이의 기질 이용성 변화



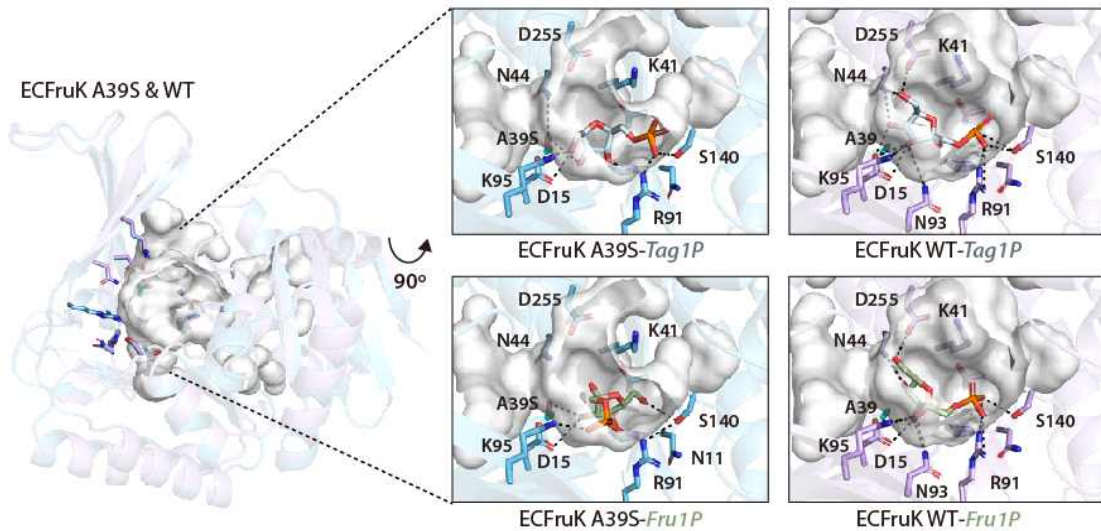


그림 101. FruK 효소의 야생형, 돌연변이의 3D-modeling

□ 다중오믹스 분석을 통한 난분해성 바이오매스 분해 유전자원 발굴 및 기능성 펩타이드 활용기술 개발

○ 유전체분석 기반 난분해성 protein biomass 분해 균주의 분석용 DB구축

- 초호열균의 난분해성 폐단백질 분해관련 유전인자를 발굴하기 위해 Thermotogales 목에 속하는 균주들간 범유전체를 비교분석하여 protein biomass 분해 및 비분해 균주의 Accessory, unique gene 및 관련 대사회로를 확인함. 그 결과, Amino acid transport and metabolism, Inorganic ion transport and metabolism 및 Post-translational modification, protein turnover, and chaperones 관련 대사에서 균주간 차이를 확인하였으며 protein biomass 분해 관련 유전인자가 관여할 것으로 예측함(그림 102).

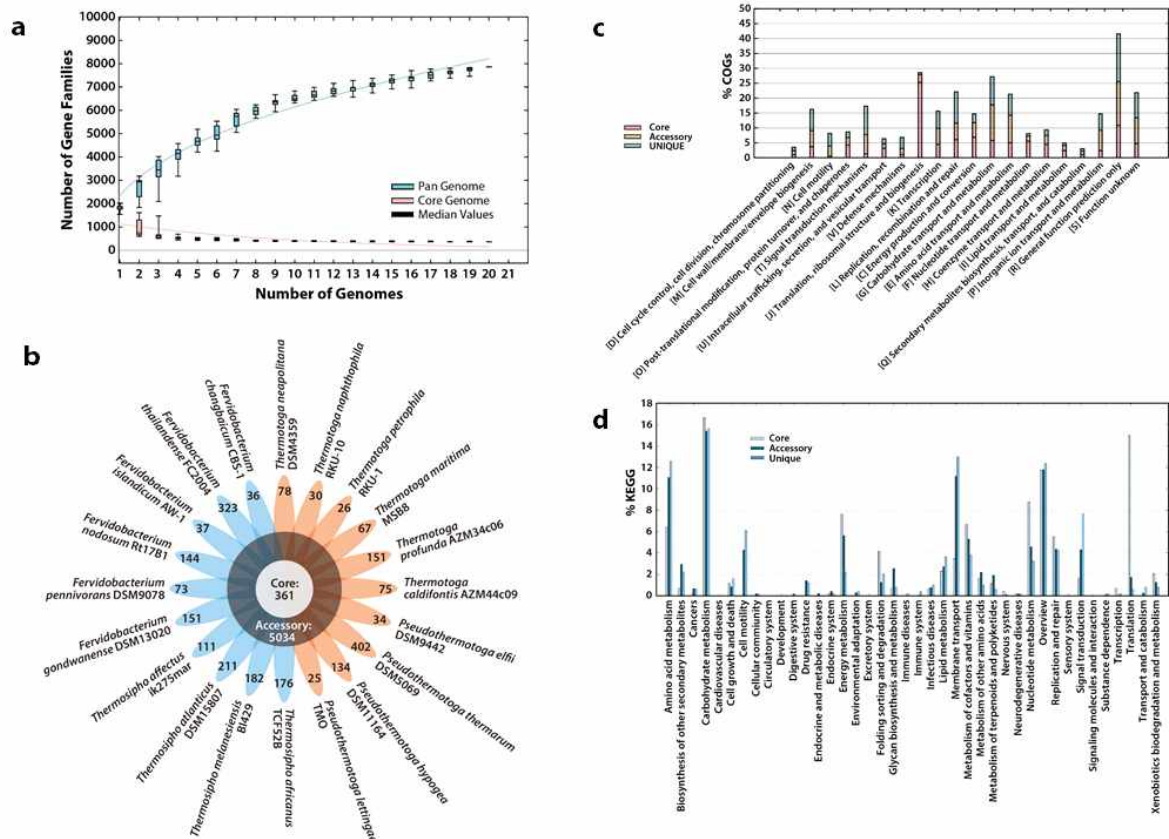


그림 102. Thermotogales 목의 범유전체 분석

- Protein biomass 분해 관련 유전자원을 발굴하기 위해 케라틴 분해균주 *F. islandicum* AW-1의 전장 유전체 정보를 활용하여 annotation-based protease list를 획득하였으며, MEROPS 분석을 통해 57개 protease의 *in silico* cleavage pattern을 확인하여 proteome 분석용 DB를 구축함(표 8).

표 8. *F. islandicum* AW-1 유래 57종의 protease database

No.	Gene name	Protein name	MEROPS ID	Cleavage pattern
1	NA23_RS00455	ribosomal-processing cysteine protease Prp		
2	NA23_RS00915	M48 family peptidase		
3	NA23_RS01070	insulinase family protein	M16.A05, M16.011	-, -/-/k/kdl +-/-/-/-
4	NA23_RS01075	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU	T01.006	-
5	NA23_RS01140	endopeptidase La	S16.001	-/-/-laf+s /-/-/-
6	NA23_RS01240	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	S14.001	A/p/-/ml+ay /L/V/P
7	NA23_RS02110	M23 family peptidase	M23.001	-/ayf /-/G+hl /fm /m/-
8	NA23_RS02205	PDZ domain-containing protein		
9	NA23_RS02290	ATP-dependent metallopeptidase FtsH /Yme1/Tma family protein		
10	NA23_RS02410	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	S14.001	A/p/-/ml+ay /L/V/P
11	NA23_RS03130	M48 family peptidase		
12	NA23_RS03580	aminopeptidase P family protein	M24.003, M24.004	-/-/-+P/-/-/-
13	NA23_RS03770	aminopeptidase	M18.001	-
14	NA23_RS04220	carboxypeptidase M32	M32.001	-
15	NA23_RS04280	M42 family peptidase		
16	NA23_RS04555	signal peptidase I	S26.001	-/A/-/A+a /ed /-/-
17	NA23_RS04625	aminopeptidase	M29.001	-
18	NA23_RS04640	NfeD family protein		
19	NA23_RS04740	ATP-dependent protease subunit HslV	T01.006	-
20	NA23_RS05345	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	S14.001	A/p/-/ml+ay /L/V/P
21	NA23_RS05350	tRNA (adenosine(37)-N6)-threonylcarbamoyltransferase complex transferase subunit TsaD		
22	NA23_RS05465	DUF1751 domain-containing protein	S54.016	-
23	NA23_RS05565	pyroglutamyl-peptidase I	C15.001	Glp +
24	NA23_RS05775	peptidase S8	S08.007	-/-/a/-+/-/-/-
25	NA23_RS06095	alpha/beta hydrolase	S09.001, S09.A47	p/pq /-/P+q /Pg /q/pl
26	NA23_RS06130	dipeptidase PepV	M20.004	-
27	NA23_RS06425	prepilin peptidase	A24.001	ar /Q/krs /G+F/T/L/L
28	NA23_RS06435	PDZ domain-containing protein	S01.273, S01.274	R or K+, V+
29	NA23_RS06495	PDZ domain-containing protein	M50.004	-
30	NA23_RS06750	peptidase S8	S08.021	-
31	NA23_RS06760	M42 family peptidase	M42.001, M42.002, M42.006	-
32	NA23_RS06770	M42 family peptidase		
33	NA23_RS06815	peptidase S8	S08.021	-
34	NA23_RS06975	ATP-dependent Clp endopeptidase proteolytic subunit ClpP	S14.001	A/p/-/ml+ay /L/V/P
35	NA23_RS07020	type I methionyl aminopeptidase	M24.001	-/-/-/M+sat /-/-/-
36	NA23_RS07390	site-2 protease family protein	M50.001, M50.002	-
37	NA23_RS07510	tRNA (adenosine(37)-N6)-threonylcarbamoyltransferase complex dimerization subunit type 1 TsaB		
38	NA23_RS07665	peptidase M3	M03.007	-/-/-l+g /p/l/-
39	NA23_RS07735	M15 family peptidase		
40	NA23_RS07755	S9 family peptidase	S09.001	p/pq /-/P+q /Pg /q/pl
41	NA23_RS07775	M15 family peptidase		
42	NA23_RS07975	peptidase	-	-
43	NA23_RS08100	beta-aspartyl-peptidase	M38.001	Isoaspartyl+glycine
44	NA23_RS08155	D-alanyl -D-alanine carboxypeptidase	S13.001	-
45	NA23_RS08385	M48 family peptidase	M48.003	-
46	NA23_RS08750	CPBP family intramembrane metalloprotease		
47	NA23_RS09140	hypothetical protein		
48	NA23_RS09535	rhomboid family intramembrane serine protease	S54.016	-
49	NA23_RS09555	peptidase M3	M03.007	-/-/-/lScissile bondg /p/l/-
50	NA23_RS09565	TldD /PmbA family protein	U62.002	-
51	NA23_RS09570	TldD /PmbA family protein	U62.002	-
52	NA23_RS09715	M42 family peptidase	M42.001, M42.002, M42.006	E+A (100%), D+A (74%)
53	NA23_RS09765	S41 family peptidase	S41.013, S41.004	-
54	NA23_RS09910	ATP-dependent protease	S16.005	-
55	NA23_RS09930	M23 family peptidase	M23.001	-/ayf /-/G+hl /fm /m /-
56	NA23_RS10350	LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein	M23.950	-
57	NA23_RS10455	peptidase M55	M55.001	D-Ala+D-Ala , D-Ala+Gly-Gly

○ 난분해성 protein biomass 균주의 기능비교유전체 기반 영양원에 따른 전사체 분석

- RNA sequencing을 통해 균주의 영양원별 배양에 따른 전사체 발현 패턴을 비교분석하여 protein biomass(feather keratin)를 분해하기 위해 특이적으로 발현되는 유전자 194개를 확인함(그림 103a).
- 질소원과 탄소원의 첨가에 따른 특이적 대사회로를 사용하는 것을 확인하였으며, 난분해성 바이오매스(Feather)는 질소원 중 펩톤과 가장 유사한 발현 패턴을 보임(그림 103b, c).
- 57종의 가수분해효소들은 영양원에 따른 발현 변화보다 phase에 따른 변화가 주요한 것을 확인함(그림 103d).
- 이를 기반으로, 난분해성 가수분해에는 feather에서 특이적으로 유도되는 가수분해효소를 비롯하여 sulfitolysis 등 부수적인 기능이 작용할 것으로 예측함.

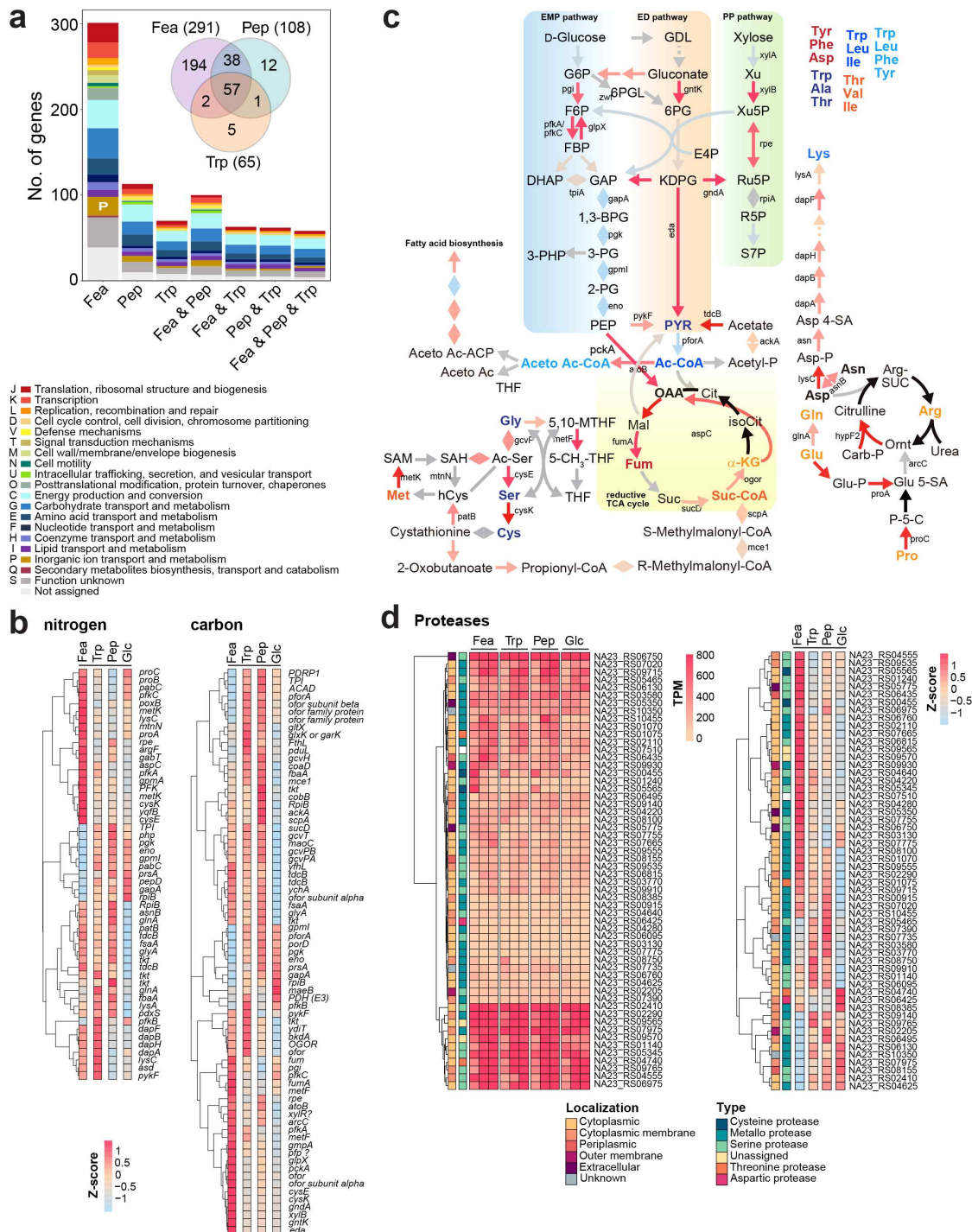


그림 103. 영양원에 따른 난분해성 가수분해 균주의 전사체 분석

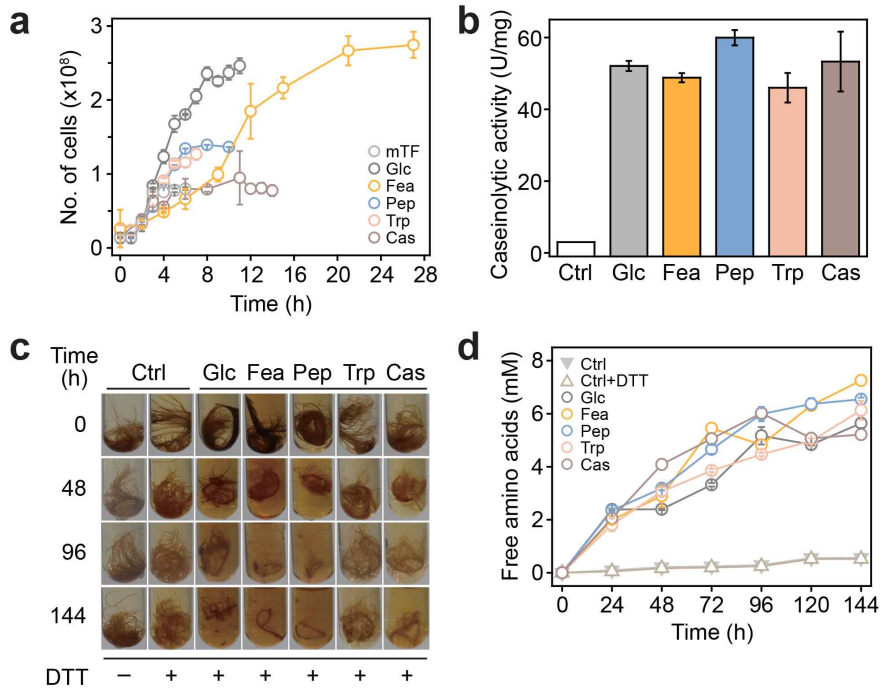


그림 104. *F. islandicum* AW-1 균주의 영양원별 성장곡선(a) 및 난분해성 바이오매스 분해도 측정(b,c,d)

- 영양원별 RNA seq. 분석 결과를 통해 protein biomass 분해능이 있을 것이라 여겨지는 후보 유전자군을 선별하였으며, 유전체 분석을 통해 확인된 57개의 protease 의 정량적 발현패턴분석을 위한 qRT-PCR용 프라이머를 제작함.

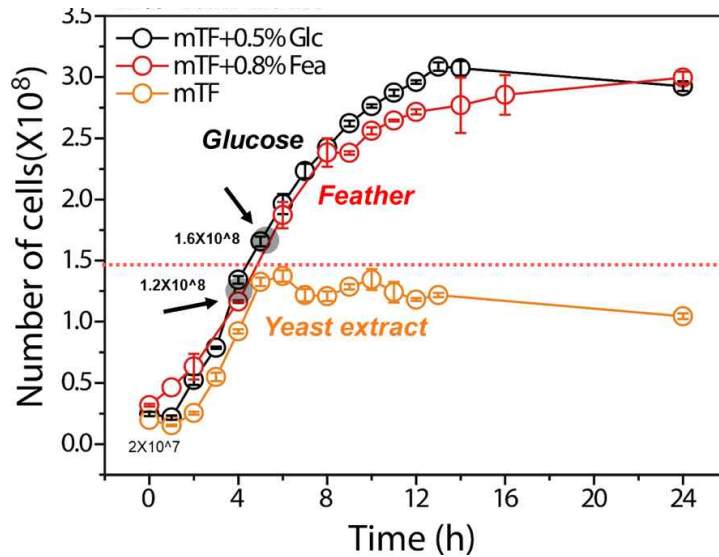


그림 105. 영양원의 고갈에 따른 biomass 분해 균주의 성장곡선 확인

- 선별된 유전자들을 대상으로 영양원별 최적 조건에서 배양한 균체를 초기대수기(세포수 약  $1.0 \times 10^8$ 개/ml), 후기대수기(세포수 약  $2.2 \times 10^8$ 개/ml) 및 정지기(세포수 약  $3.0 \times 10^8$ 개/ml)에서 회수하고 RT-PCR을 수행하여 타겟유전자군의 발현을 정량적 분석을 통해 균주의 성장주기별 케라틴 분해에 필수한 유전자군 발현 패턴을 분석함(그림 104, 105).

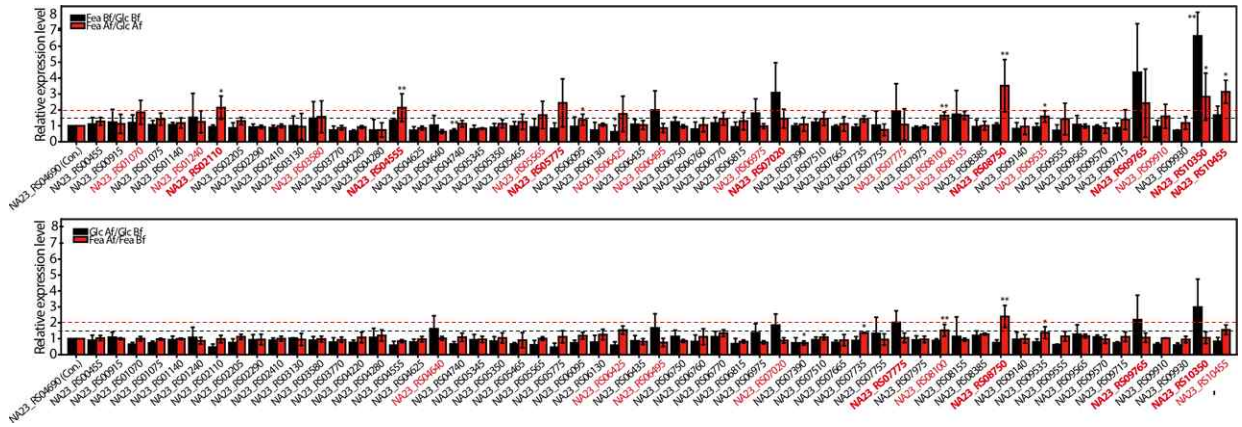


그림 106. RT-PCR을 통한 영양원별, 성장주기별 protein biomass분해효소 발현패턴 분석 결과

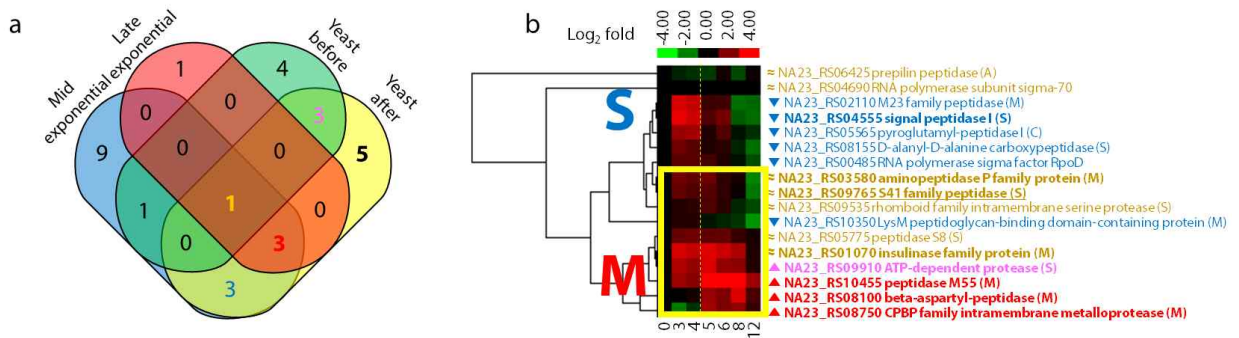


그림 107. Dynamic protease expression profiling을 통한 keratin degrader 후보 4종 선정

- protein biomass 단백질 가수분해효소군의 영양원별, 성장주기별 qRT-PCR 분석 결과, Glucose 대비 feather를 영양원으로 사용할 때 특이적으로 발현이 되며 yeast 고갈 후에 발현이 증가하는 protease 4종을 keratin degrader로 예측함(그림 107).

○ 다중오믹스 분석을 통한 난분해성 바이오매스 가수분해효소의 발현 프로파일링 및 바이오매스 분해 유전자 규명

- Protein biomass 가수분해 유전자 규명을 위한 qRT-PCR용 프라이머 22종 제작
- 영양원별 최적 조건에서 배양한 균체를 초기대수기(세포수 약  $1.0 \times 10^8$ 개/ml), 후기대수기(세포수 약  $2.2 \times 10^8$ 개/ml) 및 정지기(세포수 약  $3.0 \times 10^8$ 개/ml)에서 회수하고 선별된 유전자들을 대상으로 qPCR(Real-Time PCR)을 수행하여 균주의 영양원 및 성장주기별 발현산물의 정량적 분석을 실시한 후, 보다 구체적으로 시간대별 타겟 가수분해효소의 발현패턴을 분석하여 케라틴 분해에 필수적인 가수분해효소군을 발굴하였으며 분해기작을 제안함(그림 108 및 109).

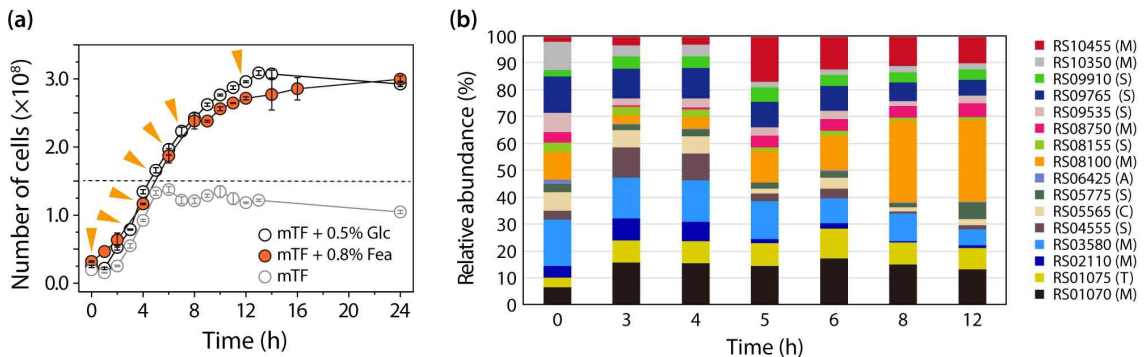


그림 108. 영양원별, 성장시기별, 시간대별 케라틴 가수분해효소 발현 패턴 변화

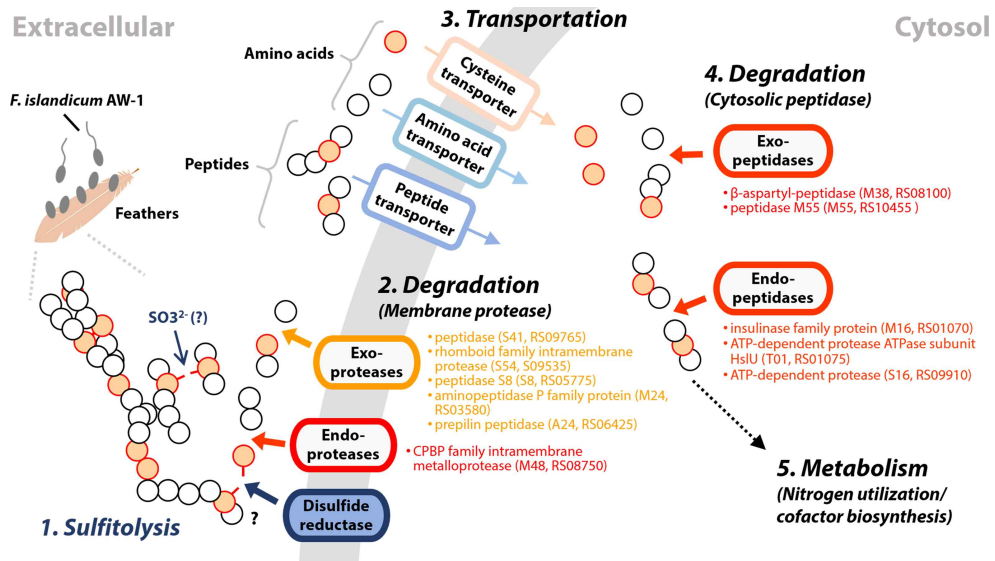


그림 109. *F. islandicum* AW-1 균주의 성장시기별 유전자 발현 프로파일링을 통해 예측한 케라틴 분해기작

○ Protein biomass 분해자로 예상되는 단백질 가수분해효소의 효과 검증

- qRT-PCR을 통한 발현산물의 dynamic profiling 결과 난분해성 케라틴 분해에 특이적으로 고발현되는 protease 4종(S16, M16, M38, M55)을 선정하였으며, 재조합 단백질을 발현, 정제 후 첨가하여 가수분해효소의 단독/혼합 처리로 인한 난분해성 케라틴 분해 시너지효과를 확인함(그림 110).

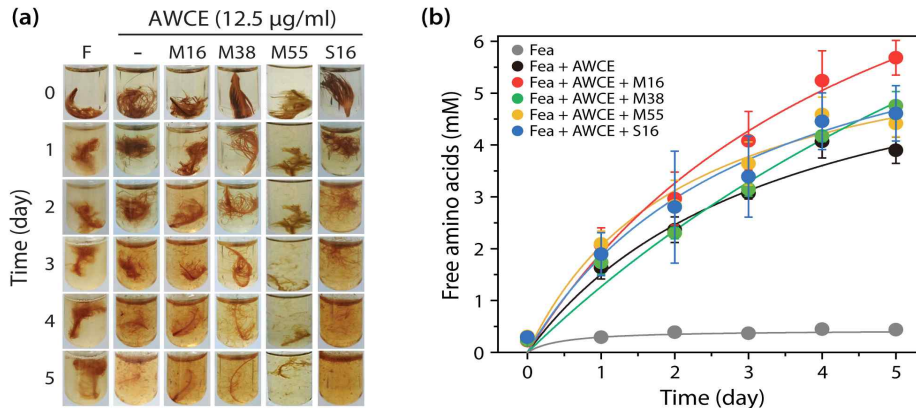


그림 110. 선정된 가수분해효소의 첨가로 인한 난분해성 케라틴 분해 시너지효과

- 균주 유래 조효소액에 정제된 가수분해효소를 첨가한 후 케라틴 분해에 따른 유리아미노산 생성량을 측정함. 그 결과, 가수분해효소 첨가 시 조효소액 단독처리 대비 평균 1.5배 이상 아미노산 함량이 증가하였으며, 선정된 효소의 케라틴 분해 효과를 검증하였음.
- 난분해성 바이오매스 분해를 위해 직접적으로 작용하는 단백질가수분해효소를 추가 선별하고, 선정된 유용유전자들의 재조합 단백질을 대장균에서 과발현 및 정제하여 기능성펩타이드 생산을 위한 효소의 특성분석을 진행함.

○ 난분해성 바이오매스 M38 가수분해효소의 생·물리·화학적 프로파일링 및 구조 규명

- 영양원별 최적 조건에서 배양한 균체의 qRT-PCR을 통해 제안된 가수분해 효소군의 분해 기작을 규명하기 위해 다중오믹스(유전체, 전사체, 단백질체) 분석을 시행함.
- 난분해성 케라틴 분해에 특이적으로 고발현되는 NA23\_RS08100 유전자의 기능적 특징을 예측하고자, *in silico* 기반 functional annotation을 통해 본 유전자는  $\beta$ -aspartyl peptidase (BAP) protease를 암호화하고 있음을 확인함. 이에 대해 50개의 BAP homologs와 phylogenetic analysis 및 sequence alignment를 시행함(그림 111).
- FBAP는 sequence alignment를 통해 active site에 metal binding을 위한 보존된 Glu residue를 가지는 Type I-ladA family에 속하며 초호열성균 유래의 BAP와 군집화되는 것을 확인함.

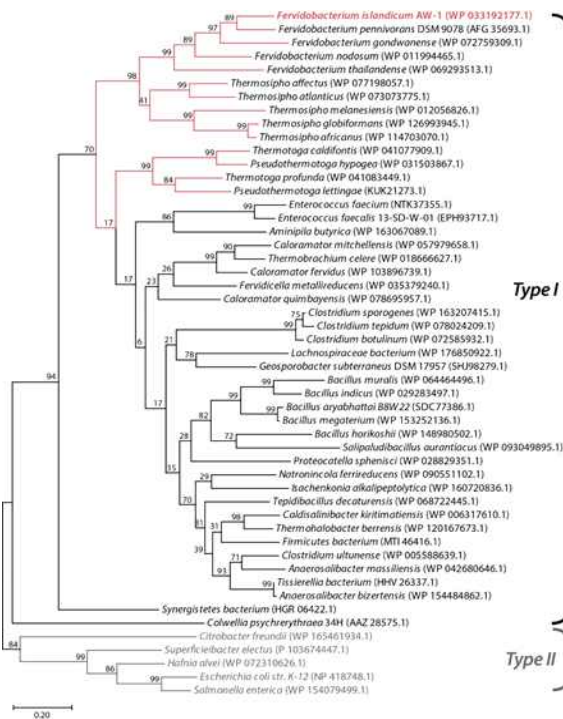


Figure 1. La et al.

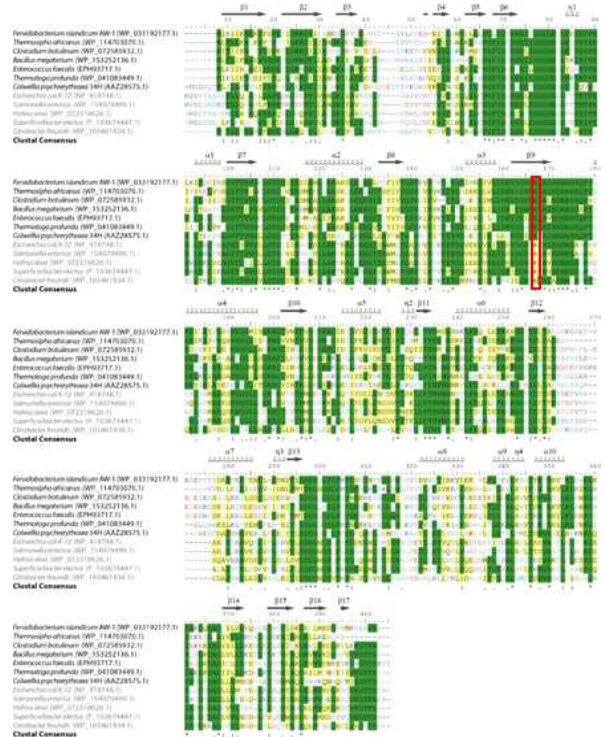


Figure S1. La et al.

그림 111. FBAP의 phylogenetic analysis와 시퀀스 비교분석

- FBAP의 생화학적 특성분석을 시행하고자 유전자의 재조합 단백질을 발현, 정제하여 SDS-PAGE를 통하여 recombinant protein의 42 kDa를 확인하였고(그림 55, 좌), size exclusion chromatography를 이용하여 octamer(~318 kDa)임을 확인함(그림 112, 우).

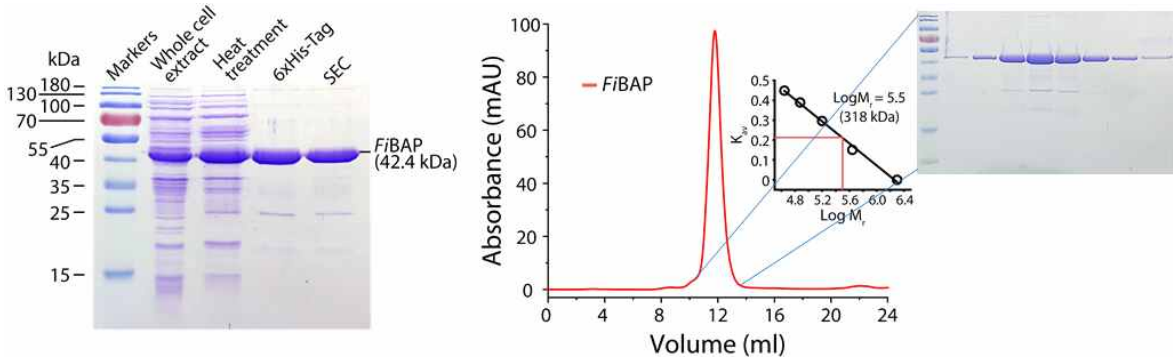


그림 112. FBAP의 SDS-PAGE 분석(좌), Size-exclusion chromatography(우)

- 재조합 단백질의 온도, pH 따른 최적활성을 비교하였고,  $\beta$ -Asp-Leu( $\beta$ -DL)을 기질로 하였을 때 80°C에서, 그리고 pH 7.0-8.0 범위에서 최적 활성을 가지는 것을 확인함.
- FBAP의 구조적 안정성을 확인하기 위해 DSC를 사용하여 열안정성을 측정함.  $T_{m1}=96.8 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ,  $T_{m2}=100.4 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 매우 안정한 효소임을 물리화학적으로 확인함(그림 113).

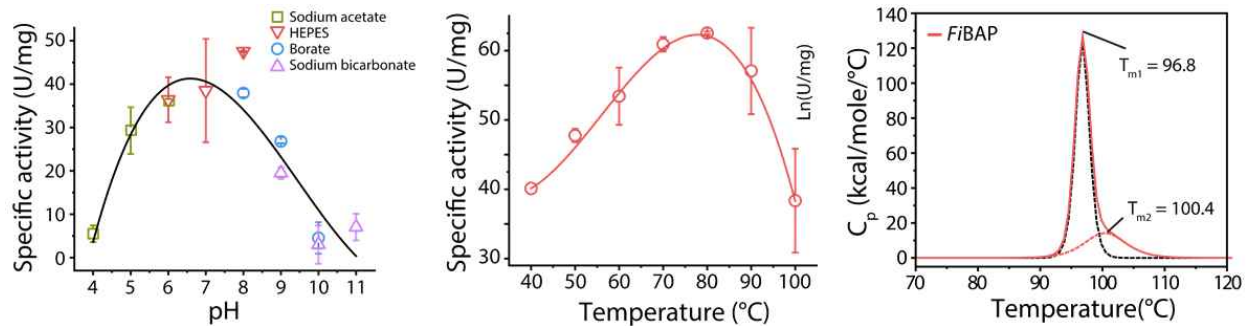


그림 113. pH, 온도에 따른 FBAP의 최적 활성 측정, FBAP의 DSC 분석

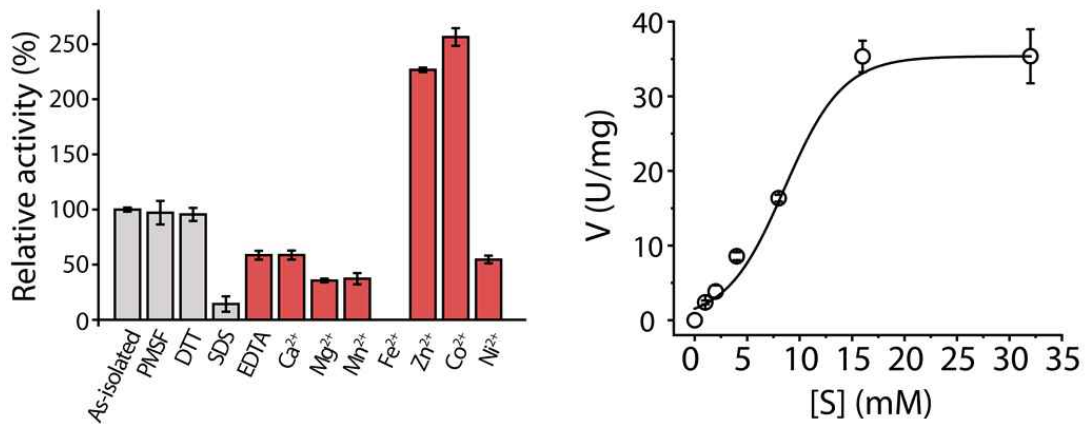


그림 114. divalent metal ions과 inhibitor 효과에 따른 FBAP의 활성 분석(좌), FBAP의 kinetic 분석(우)

- FBAP의 활성에 inhibitor와 divalent metal이 미치는 영향을 확인함(그림 114, 좌). 환원제 (DTT)와 serine protease inhibitor (PMSF)에 대해서 미미한 inhibitory effect를 가지며,  $\text{Zn}^{2+}$ 와  $\text{Co}^{2+}$ 가 처리되었을 때 가장 높은 효소활성을 가지는 것으로 보아 해당 효소가 metalloenzyme임을 확인함.
- $\beta$ -DL을 기질로 사용할 때 steady-state kinetics 분석을 통해  $K_m$ 과  $V_{max}$  값이 각각 3.27 mM, 200.5 U/mg임을 확인함(그림 114, 우).
- N-carbobenzoxy- $\beta$ -Asp-Leu (Cbz- $\beta$ -DL)을 inhibitor로 사용하여, ligand-bound (2.6 Å)형태와 ligand-free (2.6 Å)형태의 단백질 결정구조를 확보함(그림 58).
- size-exclusion chromatography를 통해 예상한 단백질 크기와 동일하게 native oligomeric state는 octamer구조임을 확인함(그림 115).
- EcBAP와 FBAP의 구조를 비교 분석하여 R143, K114, E107, 및 D149 잔기 사이에 추가적으로 형성되는 salt bridge가 열안정성에 기여함을 예측함(그림 115).
- 구조적으로 active site의 ligand와 함께 2개의 metal ( $\text{Zn}^{2+}$ )이 관여하며, metal coordination에 Glutamate 잔기가 포함되는 것을 통하여 FBAP가 type I BAP임을 재확인함 (그림 115).



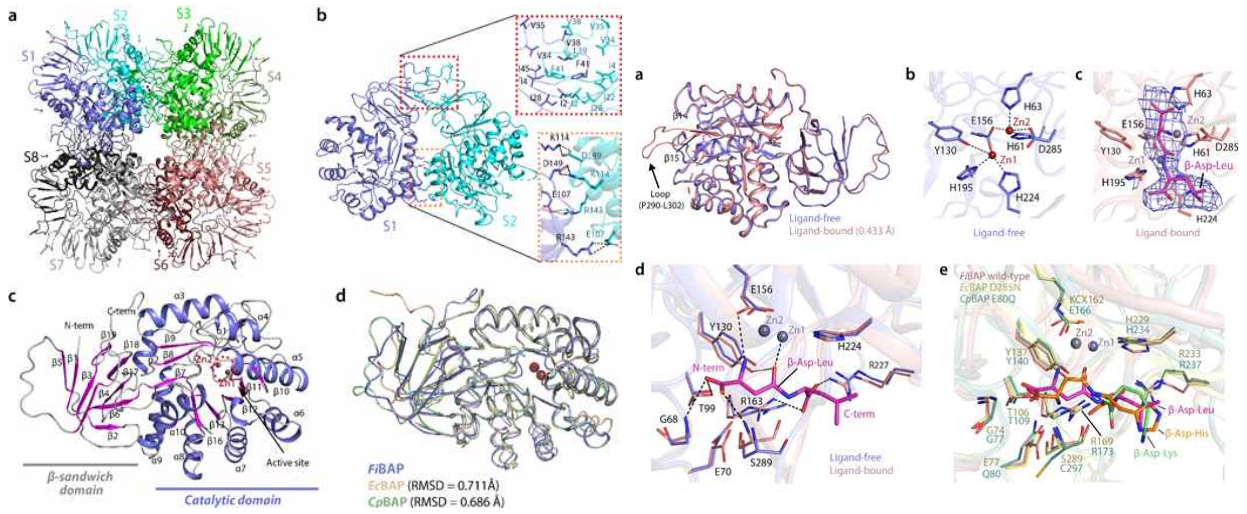


그림 115. *FBAP*의 단백질 결정구조 및 active site 분석

- 추가적으로, 세포 내 단백질의 비활성화, 응집, 노화의 주된 원인 중 하나인 isoaspartyl 펩타이드를 효과적으로 제거하는 내열성 원시 효소(*FcBAP*)로써 Quality control network (QCN)를 통해 내열성 기능 부여 가능성 및 2D-PAGE, LC-MS/MS 분석을 통해 *in vivo*에서 activity를 보고자 함.
- Leucine auxotrophic 대장균 균주를 제작하여 초열성 케라틴 분해균주 유래  $\beta$ -aspartyl peptidase (*FBAP*)의 생리학적 기능을 규명함. *FBAP*에 의해 isoAsp-Leu 기질이 분해되며 Leu lacking media에서 균체 성장이 일어나는 것을 확인하여 해당 효소의 *in vivo*상 기능을 검증함.
- 열처리 전/후 단백질 패턴 및 isoaspartate 함량을 비교분석한 결과, *FBAP*가 외부 환경 스트레스에 의해 변성되는 불용성 단백질의 수용성화에 도움을 주어 균체 성장 지연 완화에 도움을 주는 것을 확인. 이를 통해 효소의 bifunctional activity는 세포의 protein quality control에 중요한 역할을 담당하며, 극한 환경에서의 생존전략에 기여함을 제안함(*Front. Mol. Biosci.* 2020).

○ 난분해성 바이오매스 C15 가수분해효소의 구조 규명 및 열안정성 특성 분석

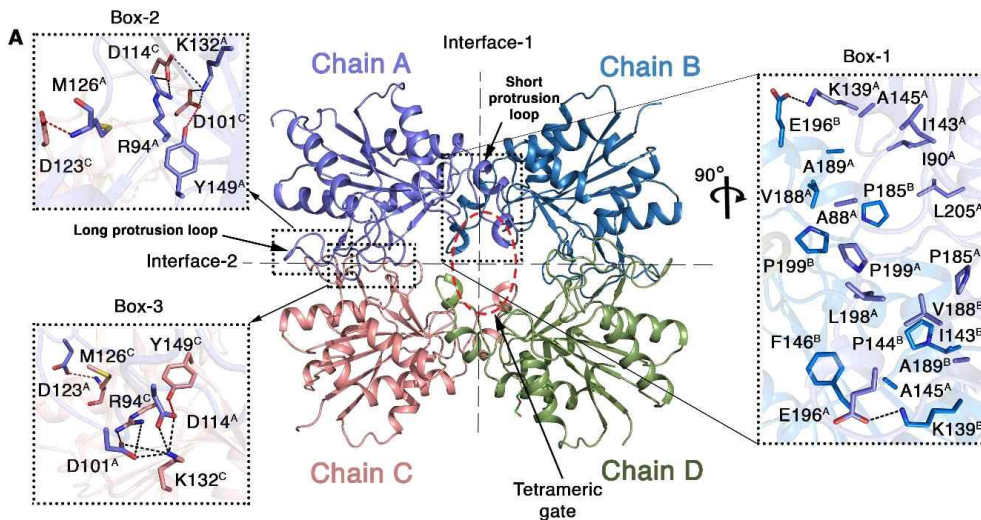


그림 116. *FPcp* 결정구조 및 active site 분석

- 난분해성 바이오매스 분해 균주 유래의 *FPcp*(Pyrrolidone carboxypeptidases)의 결정(1.85Å)을 얻음.
- 결정 구조에서 활성 시스테인(C156)이 자발적으로 시스테인 설펜산(C156-SO<sub>3</sub>H)으로 산화되어 분자 수준에서 비활성 *Pcp*가 존재함을 확인함. 이는 활성 시스테인의 산화환원 상태를 기반으로 하는 시스테인 가수분해효소의 조절 메커니즘을 이해하는데 구조적 기초 지식을 제공할 것임.

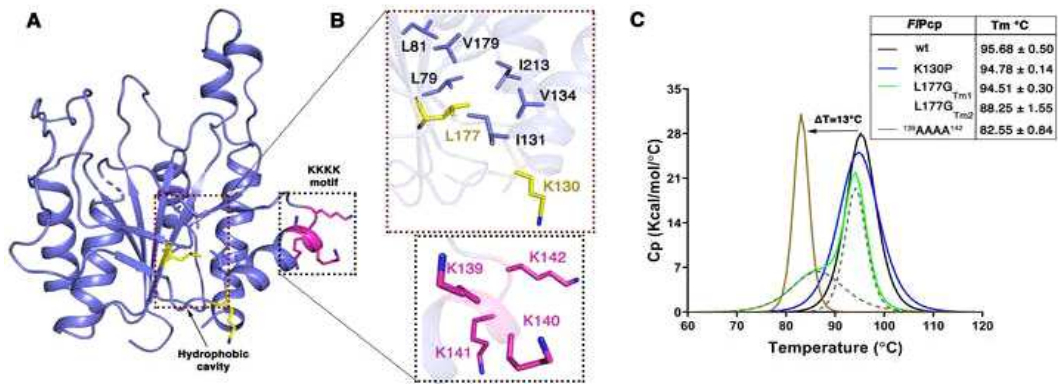


그림 117. 열안정성 FPcp의 특이적 KKKK 모티프

- 또한 FPcp 결정 구조는 열안정성에 기여하는 독특하고 새로운 <sup>139</sup>KKKK<sup>142</sup> 모티프를 발견하였으며, DSC 분석을 통해 해당 모티프의 구조적 변형이 FPcp의 열안정성을 13°C 이상 변형시킬 수 있음을 확인함(그림 117, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2021, 540: 101-107).

○ LC-MS/MS 기반 단백질가수분해효소의 P1 site 포트폴리오데이터 구축

- MEROPS 데이터 기반 *in silico* cleavage pattern을 분석하여 바이오매스 분해 균주 *F. islandicum* AW-1의 단백질가수분해효소 53종에 대한 단백질체 분석용 펩타이드 DB를 구축함.
- 기능성 펩타이드 생산을 위한 기반 지식 구축을 위해, LC-MS/MS를 통해 재조합 feather keratin에 대한 FBAP의 cleave pattern을 분석하여 P1 site를 확인함. FBAP는 beta-aspartyl peptidase 활성과 함께 α 펩타이드 결합에 대한 넓은 기질 특이성을 가지는 것을 확인함 (그림 118).
- 기능성 펩타이드 DB (BIOPEP, FEPTIDE)와 비교분석을 통한 기능성 펩타이드 활용 분석 기술 개발 및 고부가가치화 산물 생산 가능성 확인을 위한 파이프라인 구축 및 제안함 (*Crit. Rev. Environ. Sci.* 50.1 (2020): 72-103).

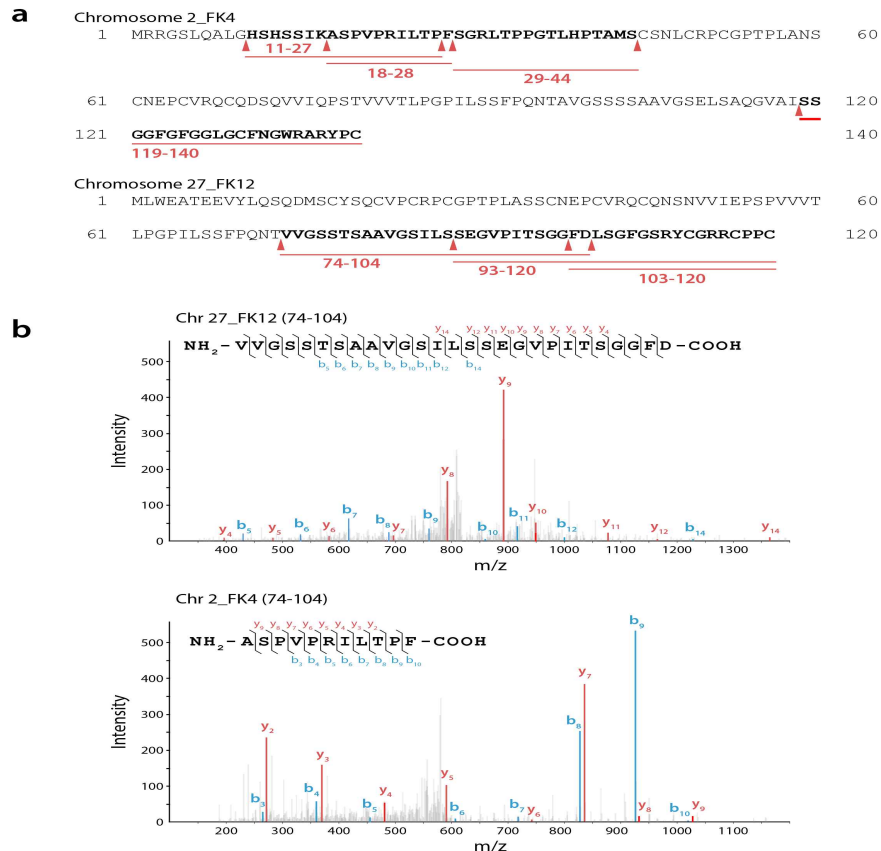


그림 118. 인공 keratin 분해를 통한 LC-MS/MS 분석 기반 FBAP의 P1 site 규명

○ Protein biomass 분해자로 예상되는 keratinosome 복합체 규명을 위한 단백질 발현패턴 분석

- 난분해성 케라틴 분해 균주 *F. islandicum* AW-1 유래 subcellular protein fraction의 SDS-PAGE 분석을 통해 막단백질 복합체(membrane protein complex)를 이루는 keratinosome을 얻기 위한 최적화된 분획 조건 확립함(그림 119).

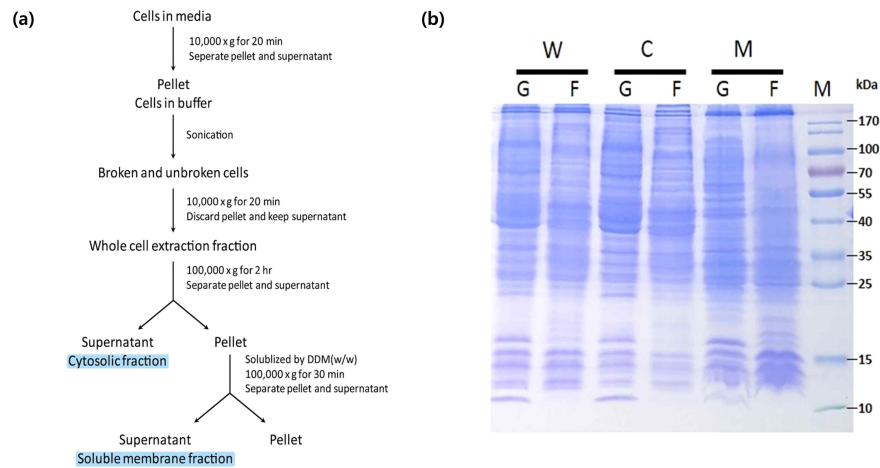


그림 119. 난분해성 단백질 분해 균주 *F. islandicum* AW-1 cell 분획화 및 membrane protein 추출과정

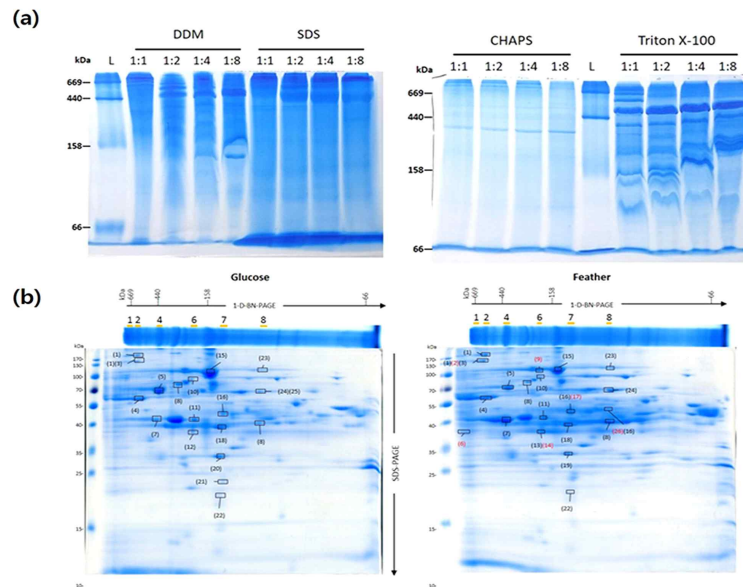


그림 120. High-resolution BN-PAGE를 위한 최적화된 detergent 선별 및 농도조건 확립

- 막단백질 복합체의 최적 분석 조건을 확립하기 위해 적합한 계면활성제(DDM, SSD, CHAPS, Triton X-100)의 선정 및 농도별 테스트를 진행하였음. High-resolution BN-PAGE 분석을 위한 최적 조건으로 DDM/protein 비율 1.0 (g/g)의 농도 조건을 확립함(그림 120a).
- 2D-BN/SDS-PAGE 분석을 통해 영양원(glucose 또는 feather)에 따른 *F. islandicum* AW-1의 cytosolic protein 발현 패턴 차이를 확인함(그림 120b).
- 기존 연구를 통해 *F. islandicum* AW-1 균주가 깃털에 부착하여 분해하며 membrane-associated protein이 케라틴 분해에 중요한 역할을 할 것으로 예상하여, 2D-BN/SDS-PAGE 및 LC-MS/MS 분석을 통해 Glucose 배지 대비 Feather 배지에서 특이적으로 발현되는 막단백질의 발현 패턴 차이를 분석하고, 해당 protein spot을 동정함.

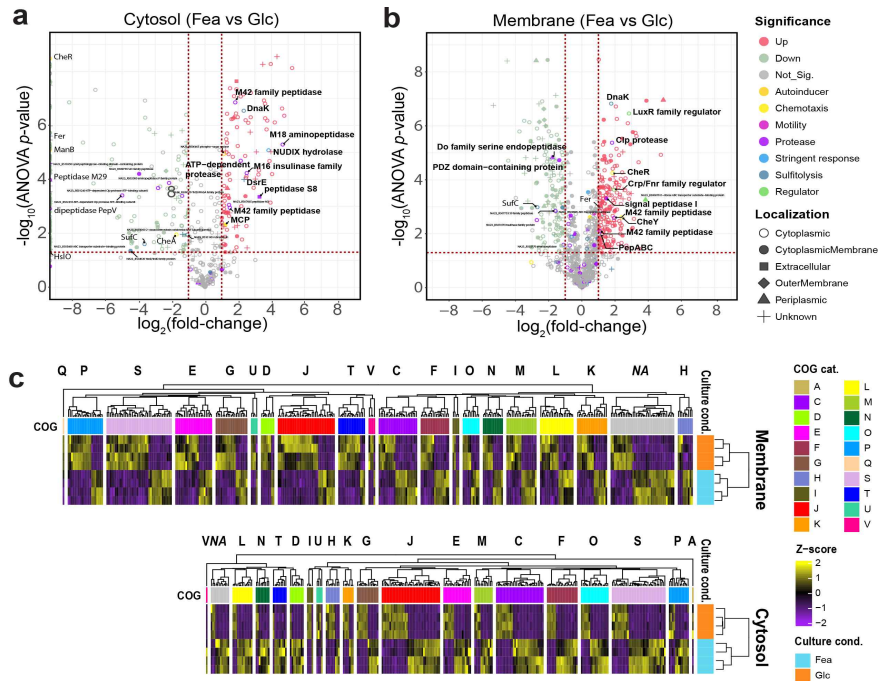


그림 121. 영양성분 및 분획에 따른 난분해성 분해균주의 단백질 분석

- LC-MS/MS 기반 단백질 분석을 통해 난분해성 바이오매스 분해를 위해 특이적인 단백질 가수분해 효소(peptidase S8, M16 insulinase protease, M18 aminopeptidase, M42 family protease, Clp protease, ATP-dependent protease, signal peptidase I)를 비롯하여 Sulfitolysis, Stringent response, Chemotaxis, Motility 연관 효소들이 고발현되는 것을 확인함(그림 121).

○ 다중오믹스 분석기반 난분해성 바이오매스 분해 메커니즘 제안

- 다중오믹스 분석(Comparative genomics, proteomics, transcriptomics) 기반 난분해성 바이오매스 분해 관련 후보유전자 28종을 선별함.
- Sulfur 이용 가능성에 따른 케라틴 분해정도 비교 및 선별된 28종의 qRT-PCR 분석 진행하여 sulfitolysis에 있어서 *suf* operon과의 연관성을 검증함(그림 122).

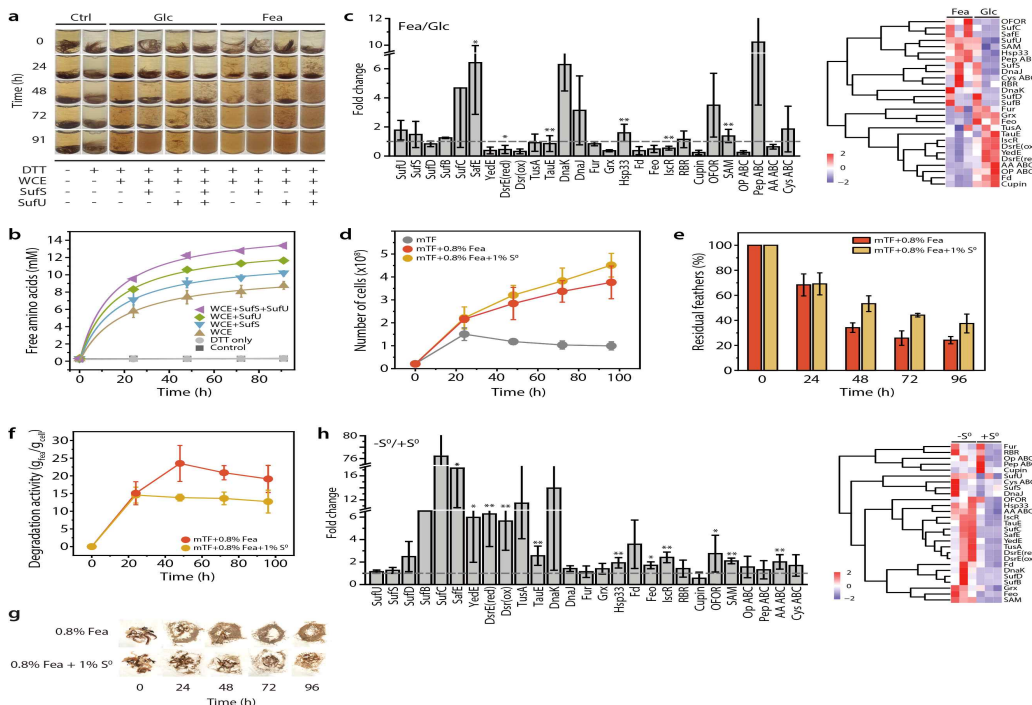


그림 122. sulfur 이용가능성과 난분해성바이오매스 분해 연관성 검증

○ Protein biomass 분해균주 배양 후 생산되는 대사산물 분석

- 난분해성 바이오매스 분해과정 중 생성되는 대사산물의 성장시기별, 세포 내외의 아미노산 조성 분석을 진행함(그림 123).
- 생장이 진행될수록 소수성 아미노산이 증가되는 것으로 feather 분해가 진행됨을 확인 및 세포 내외 아미노산조성 변화를 통해 cysteine-cystine recycling이 난분해성 바이오매스의 분해기작 중 sulfitolysis의 주요 인자로 예측함.

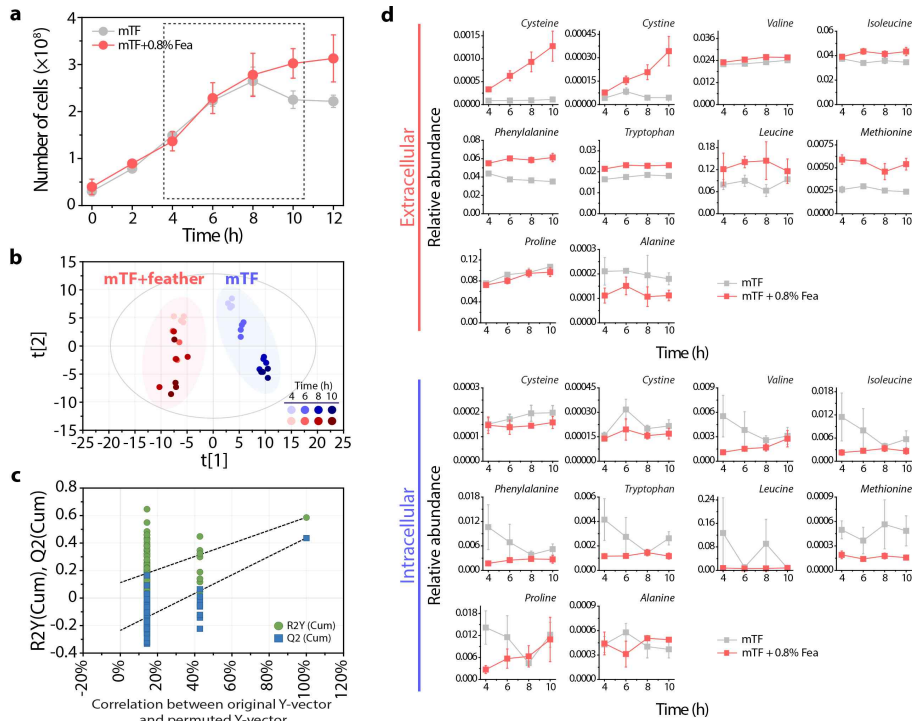


그림 123. 영양원별, 성장시기별 난분해성 바이오매스 분해균주의 대사산물 프로파일링

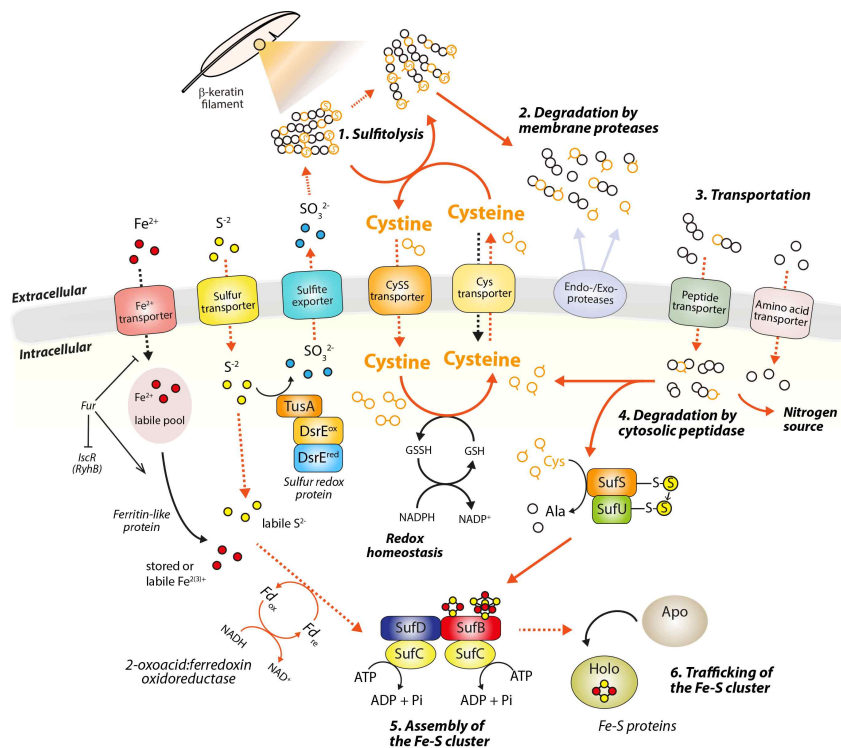


그림 124. Cysteine-cystine recycling과 난분해성 바이오매스의 sulfitolysis 메커니즘 제안

- 초호열성 케라틴 분해균주 유래 SufS-SufU complex의 생물리화학적 특성분석과 생장시기별 유전자 발현 및 대사체 분석을 토대로 sulfur 이용성과 cysteine-cystine recycling으로 인한 sulfitolysis 및 케라틴 분해에 대한 메커니즘을 제안함 (*Microb. Biotechnol.*, 2021).

○ 네트워크 통합모델 및 분석 툴을 통한 분해시스템 예측

- 기존 연구를 통해 *F. islandicum* AW-1 균주가 깃털에 부착하여 membrane-associated protein이 케라틴 분해에 중요한 역할을 할 것으로 예상, 2D-BN/SDS-PAGE 및 LC-MS/MS 분석을 통해 Glucose 배지 대비 Feather 배지에서 특이적으로 발현되는 막단백질의 발현 패턴 차이를 분석함(그림 125).
- 2단계에서 확립된 최적화된 막단백질 복합체(membrane protein complex) 분획 조건을 이용하여 난분해성 바이오매스 분해 균주의 핵심으로 예측되는 막단백질들을 LC-MS/MS를 통해 동정함(그림 125).

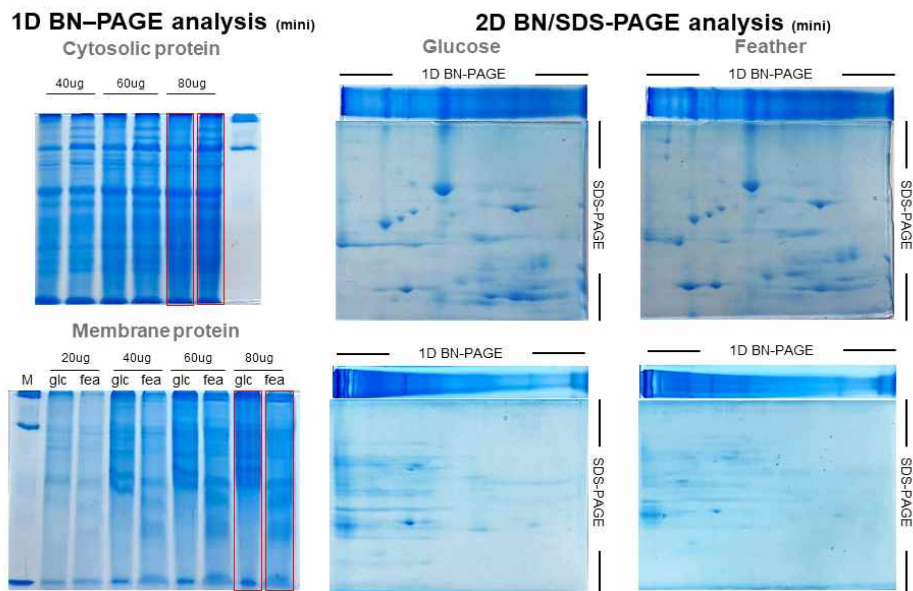


그림 125. 2D-BN/SDS-PAGE 분석을 통한 난분해성 단백질 분해 균주 *F. islandicum* AW-1의 영양원별 cell 분획 확인

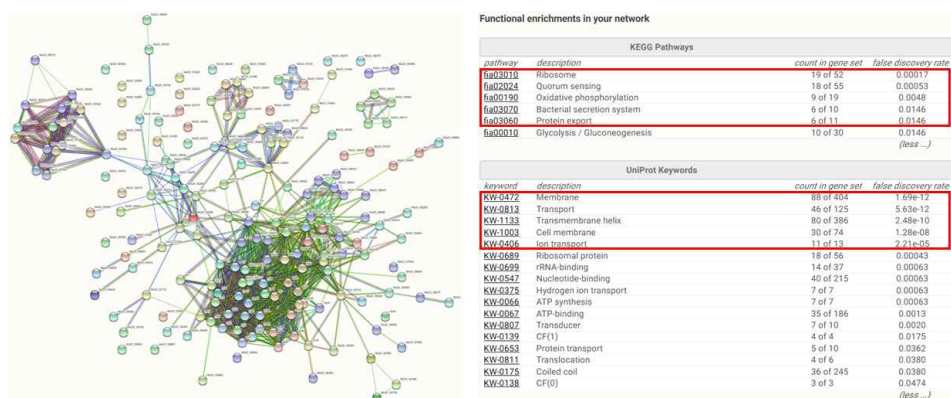


그림 126. *F. islandicum* AW-1 네트워크 통합모델 STRING을 이용한 membrane protein interaction 분석

- PSORTb DB를 통한 LC-MS/MS 분석 기반 세포분획 효율 측정 결과 cytosolic 92.8%, membrane 55.2%의 분획 수율을 확인함.
- 네트워크 통합모델 STRING를 통한 단백질 상호작용(PPI) 네트워크 맵을 이용하여 BN-PAGE의 LC-MS/MS 분석을 통해 막 복합체가 무너지지 않고 이루어지고 있음을 확인함(그림 126).
- 전사체, 단백질체 분석 기반 KEGG gene set enrichment analysis (GSEA)을 진행하여 네트워크 통

합모델 STRING의 단백질 상호작용(PPI) 기반 네트워크 맵을 이용하여 난분해성 바이오매스 분해 관련 인자를 군집화함(그림 127).

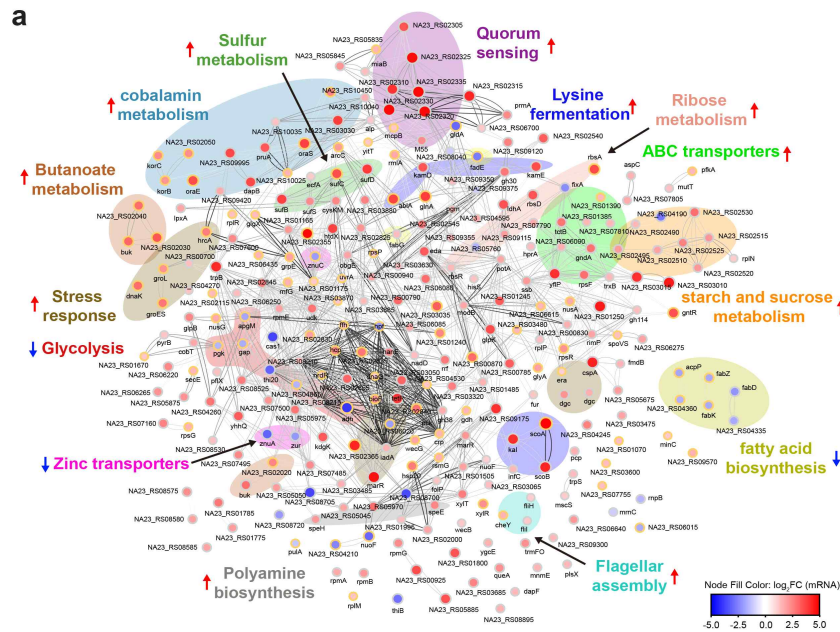


그림 127. STRING PPI 네트워크 맵 및 멀티오믹스 분석 기반 난분해성 바이오매스 분해 관련 인자 분석

- 멀티오믹스 분석 및 생리학적 분석을 종합하여 난분해성 바이오매스 분해의 촉진에는 starvation 혹은 stringent response가 필요한 것을 제안함. 이를 확인하기 위해 관련 유전자 39종을 feather 분해 phase에 따라 qRT-PCR을 통한 dynamic profiling을 진행함.
- 이러한 영양 결핍이 Stringent response, Flagellar synthesis, Chemotaxis, Signal transduction, Keratin degrading 순서의 순환과정을 거치면서 *F. islandicum* AW-1에게 잡식성 분해능을 부여하여 난분해성 바이오매스를 분해할 수 있게 되는 메커니즘을 제안함(그림 128).

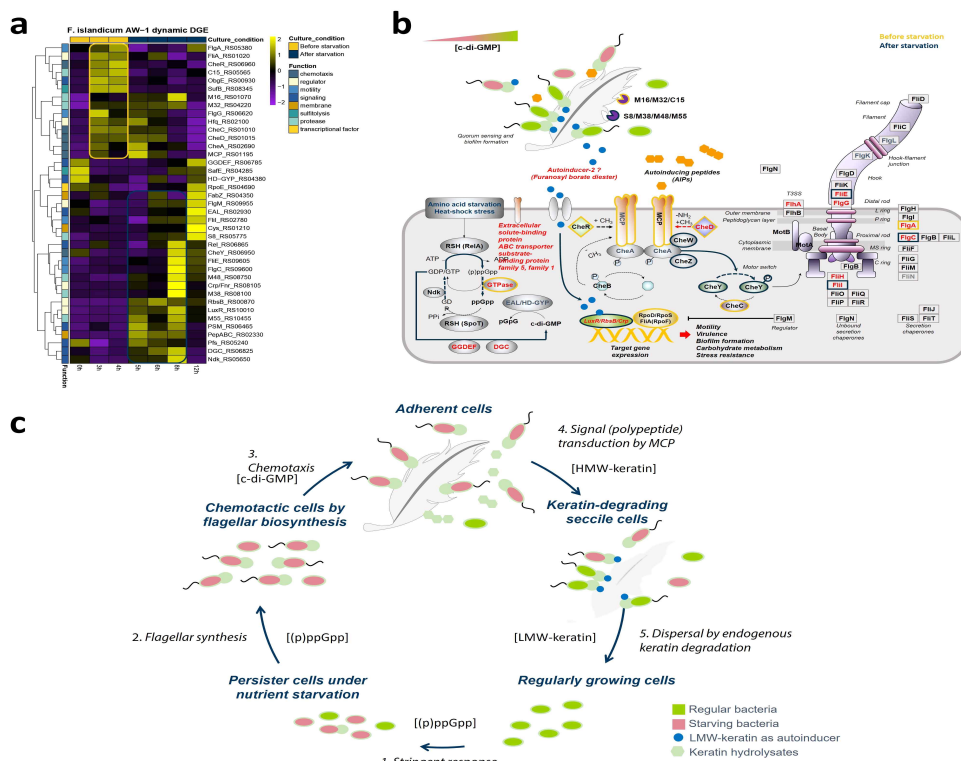


그림 128. 영양 결핍에 의한 난분해성 바이오매스 분해 촉진 메커니즘 제안

## [제2세부위탁]

### (연구 개요)

- *E. coli* BL21(DE3)은 바이오연료, 바이오리파이너리, 재조합 단백질 등을 대량생산하는 데 이용되는 대표적인 산업미생물임. 본 연구에서는 최신의 유전체 주석과 전사체 데이터를 기반으로 *E. coli* BL21(DE3)의 대사네트워크 모델을 개발하였음. 개발된 모델의 정확성은 phenotype microarray 실험결과를 시뮬레이션 결과와 비교하여 향상시킴.

### ○ *E. coli* BL21(DE3)의 대사 네트워크 모델 개발

- *E. coli* K-12 strain과 B strain은 유전체 구조가 비슷하고 대사반응 관련 유전자들의 대부분을 공유하고 있어, 최신의 K-12 대사네트워크 모델(iJO1366)을 참고함. 또한, 기존에 본 연구진에 의해 개발된 *E. coli* B REL606 대사네트워크도 참고함.
- K-12와 BL21(DE3)의 유전자 리스트들을 비교하여, BL21(DE3)에서 frameshift mutation 이나 nonsense mutation로 의해 pseudo gene이 된 유전자들은 iJO1366으로부터 제거함. BL21(DE3)에만 존재하는 유전자들, O7 antigen 관련 유전자, capsular polysaccharide 관련 유전자들을 추가함.
- K-12 MG1655와 BL21(DE3)간의 전사조절 유전자를 비교하여 BL21(DE3) 대사네트워크 모델에 반영하였다. 예를 들어, BL21(DE3)에는 K-12 MG1655와 달리 *dcuS*와 *IgoR0*이라는 transcriptional regulation에 관련된 유전자가 mutation되어 있기 때문에, C4-dicarboxylate transporter와 L-galactonate metabolism 관련 유전자가 해당하는 반응들을 inactivation시킴.
- 추가된 주요 대사반응: O7 antigen 및 lipid A core 반응, 3 and 4 hydroxyphenylacetate metabolism, D-arabinose metabolism, N-acetylgalactosamine metabolism 그리고 capsular polysaccharide biosynthesis 관련 metabolism
- 제거된 주요 대사반응: galactose metabolism, 6-phosphogluconolactonase (pentose phosphate pathway관련) 그리고 phenylacetic acid degradation pathway
- COncstrains-Based Reconstruction and Analysis for python (COBRAPy) tool을 이용해서 관련 대사물질, 반응, 유전자를 제거 및 추가하면서 BL21(DE3) 대사 네트워크 모델을 구성함.

### ○ Phenome data를 이용한 모델 성능 향상

- 개발된 BL21(DE3)의 대사네트워크의 정확성을 시뮬레이션 결과와 PM 실험 데이터를 비교하여 측정하고, 그 결과를 반영하여 모델을 향상시킴.
- PM 결과에서 실제로 자랐는데 모델 시뮬레이션 결과상에서는 자라지 않았다고 나온 결과(False negative)와 PM 결과에서는 자라지 않았지만 모델 시뮬레이션 상에서는 자란 결과(False positive)들을 통하여 놓친 유전적인 특징들이 존재하는지 여러 문헌들을 통해서 판단함.
- 모델을 개선할 때 기존의 transcriptome 분석에서 나왔던 MR 배지 및 LB 배지에서의 발현율을 참고해서 발현이 안 되었을 경우, 이를 뒷받침될 수 있는 다른 논문에 문헌적 근거가 있을 경우 turned off를 시킴.
- 개선된 모델과 iJO1366 모델의 anaerobic growth, ATP yield, biomass composition yield 그리고 phenotype phase planes등 여러 특징들 비교 후에 결과를 해석함.
- 기존에 자동화 기법으로 만들어진 BL21의 대사네트워크 모델(iECD\_1391)의 정확도도 측정함(79.5%). 본 연구에서 개발한 모델의 정확도가 84.2%로 가장 높았음. 흥미롭게도, 2013년에 처음 자동화 기법으로 만들어진 대사모델의 성능이 그 후 2016년에 업데이트된 모델보다 성능이 높음. 이는 처음에 자동화 기법으로 구축된 모델에 균주에는 실제로 존재하지 않는 다수의 대사반응이 포함되었기 때문으로 보임. 본 연구에서 업그레이드된 *E. coli* BL21(DE3) 대사네트워크 모델(iHK1487)은 1487개 유전자, 1877개 대사물질, 2701개 대사반응을 포함함(표 9).



Metabolic model	iECD_1391	iHK1487
<b>Genes</b>	1355	1487
<b>Reactions</b>	2747	2701
Metabolic reactions	1766	1650
Transport reactions	650	705
Exchange reactions	331	347
<b>Gene-reaction association</b>	2747	2701
Gene-associated reactions	2209	2205
Not gene-associated reactions	502	460
<b>Metabolites</b>	1924	1877
Cytoplasmic	1105	1062
Periplasmic	478	469
Extracellular	341	346
<b>Unique metabolites</b>	1225	1164

표 9. 본 연구에서 개발된 *E. coli* BL21(DE3) metabolic network (iHK1487)과 기존의 metabolic network (iECD\_1391) 비교

○ *E. coli* BL21(DE3) 성장 시뮬레이션

- 세포의 성장에 필수적인 대사 반응을 규명하기 위해, 모델에서 각각의 반응을 제거하여 metabolic simulation을 수행함, 명확히 규명되지 않은 대사반응에 대해선 추정치를 이용하여 분석하였고, 대사 반응들 중에서 simulation시 제거 할 경우 성장률이 야생형 균주의 예상 수치보다 기본 임계값의 5% 이하로 떨어진 경우는 필수적인 반응들로 간주함.
- BL21(DE3)의 대사네트워크 모델의 flux balance analysis를 수행하여 BL21(DE3)의 대사특성을 분석함. K-12 모델에 존재하는 pentose phosphate pathway 내 6-phosphogluconolactonase 유전자 (*pgl*)가 BL21(DE3)에는 없기 때문에 glycolysis 와 TCA cycle 상의 flux 값들이 BL21(DE3)에서 상대적으로 높았음. 또한, BL21(DE3)는 glucose uptake 능력과 anaerobic growth에서 K-12와 다른 대사능력을 갖는 것으로 예상됨.
- *E. coli* BL21(DE3)는 K-12 MG1655와 다르게 PGL reaction(oxidative pentose phosphate pathway의 일부분)이 없어 NADPH를 생산효율이 떨어짐. 그러나 PGL reaction이 없는 효과는 빨라진 glycolysis pathway와 TCA cycle로 이어짐. 기존의 실험들을 보면 빨라진 glycolysis와 TCA cycle은 향상된 ATP 와 NADH 생산을 유도함. 그러므로 PGL이 없는 효과가 energy적으로 효율적인지 알아보기 위해서 FBA로 생성되는 NADH, NADPH, 그리고 ATP 양을 비교하였음.
- 산화 환원 운반체 (NADH 및 NADPH)와 에너지 운반체 (ATP)의 주요 보조 인자의 생산 및 소비율을 계산함. *E. coli* BL21의 central metabolism에 큰 특징은 산화 PPP 관련된 PGL이 없기 때문에, iHK1487의 시뮬레이션 결과(야생형 BL21(DE3)를 표현하는) iHK1487에서 PGL 첨가한 것과 하지 않은 것을 비교함(그림 130).
- FBA의 경우, 포도당과 산소의 최대 흡수 속도는 각각  $10 \text{ mmol gDCW}^{-1} \text{ h}^{-1}$  및  $18.5 \text{ mmol gDCW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 로 설정함. 시뮬레이션 조건에서 최적 성장률은 두 경우 모두 유사하였음(iHK1487은  $0.82 \text{ h}^{-1}$ , iHK1487 + PGL은  $0.831 \text{ h}^{-1}$ ). Glucose의 호기성 성장에 관한 NADPH와 ATP의 총 생산율은 두 경우 모두 비슷하였음. 그러나, NADH의 총 생성 속도는 iHK1487( $40.5 \text{ mmol gDCW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )에서 iHK1487 + PGL ( $36.2 \text{ mmol gDCW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )보다 12 % 더 높았음. 총 ATP 생산 속도는 iHK1487 ( $78.3 \text{ mmol gDCW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )과 iHK1487 + PGL ( $79.4 \text{ mmol gDCW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) 둘 다 유사하였음. 이들 결과는 *E. coli* BL21(DE3)에서의 PGL 반응의 유무가 NADH/NADPH 생성에 영향을 미친다는 것을 입증함.

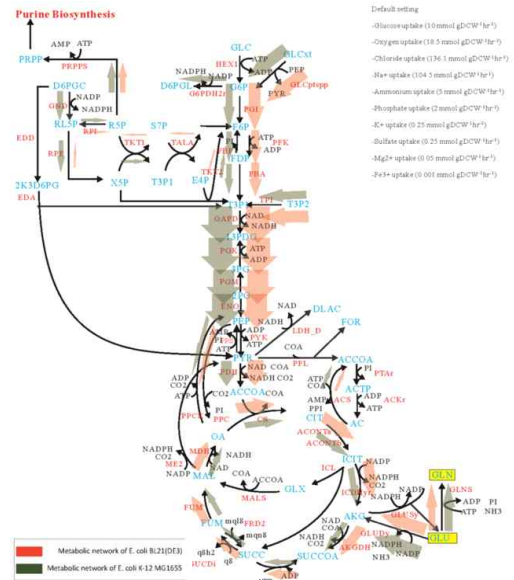


그림 129. *E. coli* BL21(DE3)와 K-12의 central metabolic pathway상의 flux 비교

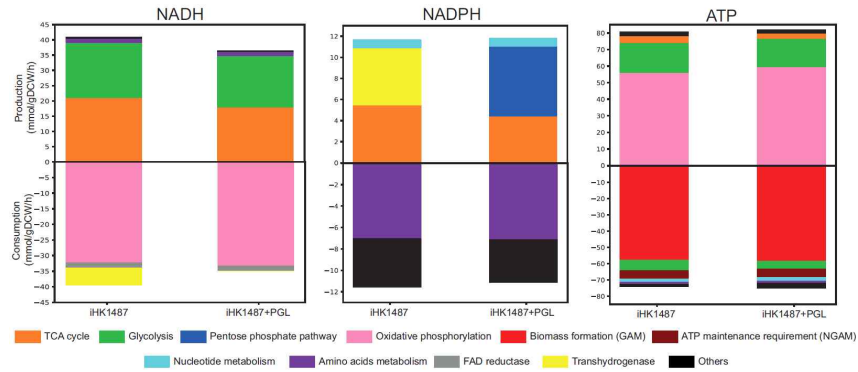


그림 130. Quantitative analysis of co-factor balances in FBA using iHK1487.

○ 결론

- *E. coli* BL21(DE3)의 대사 네트워크를 개발하고, 시뮬레이션하여 대사특성을 분석하였음. 개발된 대사 네트워크는 *E. coli* BL21(DE3)의 농·식품 유용물질 생산을 위한 균주 개발에 이용될 것임.

□ Probiotic *E. coli* Nissle 1917 대사 네트워크 모델 개발 및 전사체맵(transcriptome map) 분석

○ 대사 네트워크 모델 개발을 위한 유전체 분석

- Probiotic *E. coli* Nissle 1917(NZ\_CP007799)의 대사 네트워크 모델을 개발하기 위해, 해당 균주의 근연종인 *E. coli* CFT073(NC\_004431)과 *E. coli* ABU83972(CP001671), 그리고 *E. coli* K-12 MG1655( NC\_000913)와 비교 및 참고하여 유전체를 분석하였음.
- N-acethyl-D-galactosamine, 2-deoxy-D-ribose, L-sorbose 등과 같이 in vivo상에서 풍부할 것으로 예상되는 substrates들과 관련된 유전자들이 *E. coli* Nissle 1917과 *E. coli* CFT073에는 존재했으나, *E. coli* K-12 MG1655에는 없었음. 5-keto-D-gluconic acid는 해당 균주들 중 *E. coli* Nissle 1917에만 없었고, O-antigen 합성 유전자군은 균주들의 혈청형에 따라 차이가 있었음.

○ 대사 네트워크 모델 개발을 위한 표현체 분석

- PM plates(Biolog Inc. Hayward, CA, USA)는 총 20개의 96-well로 구성되고, carbon sources (PM1, PM2), nitrogen (PM3), phosphorus, sulfur (PM4), auxotrophic supplements(PM5 - PM8), salt(PM9). PM10 plate는 pH 스트레스를 PM11에서 PM20 까지는 항생제, 항 대사 물질 및 미생물 성장 억제제가 포함됨. PM3에서 PM8까지는 carbon source를 sodium succinate를 이용함. OmniLog incubator(Biolog Inc.)에서 37°C에서 120시간 배양을 후 데이터 분석에는 opm R package를 이용하였음.
- *E. coli* Nissle 1917 균주의 PM 실험 결과는 다음과 같음. Carbon source의 경우에는 PM 1 plate에 대부분 물질을 이용하여 성장하나, dulcitol, sodium formate, tween 20, D-aspartic acid, D-glucosaminic acid, 1,2-propanediol, tween 40, sucrose, m-tartaric acid, tween 80, α-hydroxy-glutaric acid-γ-lactone, adonitol, citric acid, myo-inositol, D-threonine, D-cellobiose, tricarballylic acid, acetoacetic acid, mono-methyl succinate, p-hydroxy-phenylacetic acid, m-hydroxy-phenylacetic acid, tyramine, glucuronamide, β-phenylethylamine, ethanolamine는 이용하지 못하였음. Nitrogen source에는 거의 모든 물질에서 성장을 했으나, urea, D-aspartic acid, D-glutamic acid, D-lysine, D-valine, N-acetyl-L-glutamic acid, N-phthaloyl-L-glutamic acid, L-pyroglutamic acid, hydroxylamine, methylamine, N-amylamine, N-butylamine, ethylamine, ethanolamine, ethylenediamine와 같이 주로 D형 아미노산을 이용하지 못하였음. PM 11 - PM 20 다양한 물질에서 배양 결과 대부분의 inhibitory compounds에 대해 성장하였으나, penicillin 계열 항생제나 galic acid 같은 항균 물질에서는 성장하지 않았음.
- PM test 결과를 모델에 반영하게 위해서 *E. coli* Nissle 1917의 대사적 특징을 *E. coli* K-12 MG1655와

PM test 결과를 비교하였음. 각각 PM1번 7개, PM2번 13개, PM3번 16개로 총 36개의 well에서 유의한 차이를 보였음. 그 중 단 7개의 well에서만 *E. coli* K-12 MG1655가 substrate의 활용이 뛰어났으며, 그 외 나머지 29개의 well에서는 *E. coli* Nissle 1917이 뛰어났음.

○ *E. coli* Nissle 1917 대사 네트워크 모델 개발

- *E. coli* Nissle 1917의 대사 네트워크 모델은 근연종인 *E. coli* CFT073 (ic\_1306)과 *E. coli* ABU 83972 (iECABU\_c1320)의 기발표된 대사네트워크 모델들을 활용하여 구축하였음. ic\_1306과 iECABU\_c1320 두 모델을 보완하기 위해서 대장균의 strains 중, 가장 활발히 연구된 균주인 *E. coli* K-12 MG1655 (iML1515) 모델을 활용하였음.
- *E. coli* Nissle 1917의 초안 모델은 Phenotype Microarray test의 결과와 모델 시뮬레이션 결과를 비교함으로써 Phenotype Microarray test의 결과와 모델 시뮬레이션의 결과가 유사해지도록 수정하였고, 최종적으로 *E. coli* Nissle 1917 대사 네트워크 모델을 완성함 (표 10).
- PM test 결과에 따른 교정을 거친 이후, 총 86개의 reaction이 추가하였음. PM1-3과 관련한 draft 모델의 최초 정확도는 70.9% 였으나, 교정 이후에 84.2%로 교정 전과 비교하여 13.3% 증가하였음. 최종 개발된 모델 (iDK1463)은 2986개 대사반응, 1463개 유전자, 2112개 대사물질로 구성됨.

Metabolic model	iDK1463
<b>Genes</b>	1463
<b>Metabolic reactions</b>	2984
Enzymatic reactions	1633
Transport reactions	903
Exchange reactions	441
Demand reactions	7
<b>Gene-reaction association</b>	2986
Gene-associated reactions	2368
Not gene-associated reactions	578
Spontaneous reactions	40
<b>Metabolites</b>	2112
Cytoplasmic	1160
Periplasmic	509
Extracellular	443
<b>Unique metabolites</b>	1313

표 10. *E. coli* Nissle 1917 대사네트워크 모델 (iDK1463)

○ *E. coli* Nissle 1917 장내 성장 시뮬레이션

- iDK1463을 이용하여 *E. coli* Nissle 1917의 장 내에서의 주요기질에 대한 성장을 시뮬레이션 하였음 (그림 131). 혐기성 환경에서 단일 탄소영양분으로써 시뮬레이션에 사용된 장 내 영양분은 총 9가지이다 (N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine, N-acetylneuraminic acid, 2-deoxy-D-ribose, L-fucose, D-galactose, L-lactic acid, α-ketoglutaric acid, L-sorbose). 시뮬레이션 결과는 growth rate, ATP 생산량, NAD<sup>+</sup> 재생산량에 초점을 두고 분석되었음(그림 131B). 각 단일 탄소영양분에 대한 시뮬레이션에서 central metabolism으로 도달할 때, 탄소영양분들은 glycolysis의 활용유무로 나뉘어졌으며, 그에 따라 growth rate에서 유의미한 차이를 보였음.
- Growth rate의 분석에서 가장 높은 값을 차지한 탄소영양분은 N-acetylneuraminic acid(0.749 h<sup>-1</sup>)이었으며, 나머지 탄소영양분들의 growth rate 값은 N-acetylglucosamine(0.554) ≈ N-acetylgalactosamine(0.5) > D-galactose(0.455) ≈ L-sorbose(0.407) >

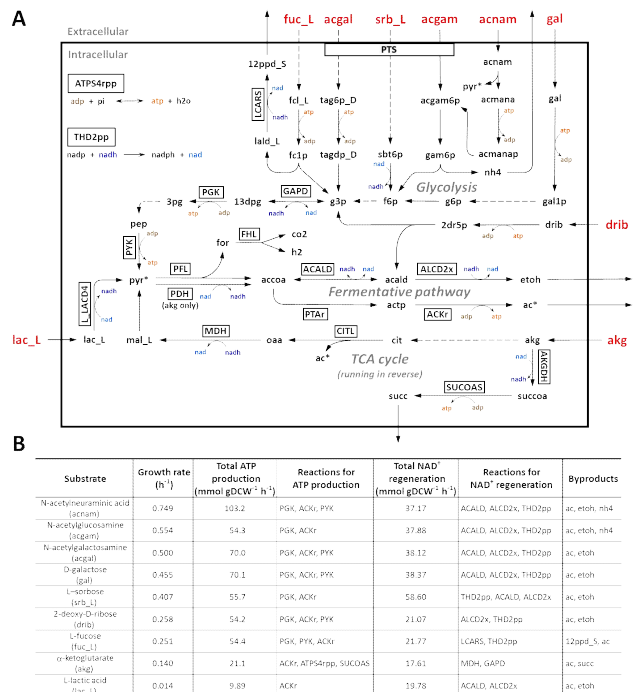


그림 131. 혐기조건에서의 장내 영양분을 이용한 성장 시뮬레이션

2-deoxy-D-ribose(0.258)  $\approx$  L-fucose(0.251) > AKG(0.14) > L-lactic acid(0.014) 순이었음. ATP 생산량 및 NAD<sup>+</sup> 재생산량 또한 growth rate에 따라 유사한 양상을 보였음.

- 시뮬레이션 결과를 통해, 혐기조건에서 growth rate를 결정하는 중요한 요인은 glycolysis 활용임을 확인할 수 있었으며, 9가지 장내영양분의 효율성을 예측하였음. 이 결과는 혐기조건에서 *E. coli* Nissle 1917 metabolism을 이해하고, 9가지 장 내 영양분의 효율성 및 그 기전을 예측하였음.

## □ 고온 스트레스에서의 *E. coli* BL21(DE3)의 전사체 데이터 확보 및 분석

### ○ 연구개요

- 고온에서의 균주의 스트레스 반응연구는 높은 열 저항성을 가진 균주개발에 중요한 정보로 이용되며, 이는 산업적 규모에서의 고농도 세포배양에서 발생하는 높은 열을 견딜 수 있는 균주를 개발할 수 있다는 점에서 매우 중요함. 지금까지의 열처리 반응 연구는 장기간 실험적 진화 또는 단기간 배양(보통 15 분 미만)에 집중적으로 보고되었고, 장시간의 heat shock 적응 의 전체 과정은 보고되지 않았음. 본 연구에서는 연속배양 기법(continuous culture 또는 chemostat)을 이용하여 열 충격 스트레스에서의 시간에 따른 *E. coli* BL21(DE3)의 전사체와 생리학적 변화를 40시간에 걸쳐 관찰하였음.

### ○ 실험방법

- 기존 오믹스 분석은 회분식 플라스크 배양에서 수행되었기 때문에 세포 반응 수행이 전적으로 열충격에 의한 것인지 아닌지에 대한 질문들이 계속 제기되어 왔음. 온도 상승은 생장률의 감소를 동반하여 그 자체로 전사 변화를 일으키고, 아세트산 및 젖산과 같은 부산물의 영양소 이용 및 축적의 변화로 해석을 훨씬 더 복잡하게 만들음.
- 연속배양 기법(continuous culture or chemostat)은 세포생장속도(growth rate), pH, 용존 산소 등을 일정하게 맞추어 줌으로 오믹스 분석을 위한 최적의 배양기법임. 고밀도 타일링 어레이 분석을 위해 정상 상태 조건의 전사체(2개)와 열처리에 대한 다이내믹한 세포 반응 조건 동안의 전사체(7개)를 샘플링하였음. 세포 배양은 상대적으로 전사체들의 변화를 계산하기 위한 기준으로 37°C에서의 정상상태(steady-state)를 대조군으로 이용하였음. 대장균을 37°C에서 연속 배양(continuous culture)하고, 대장균의 배양 단계가 정상 상태(steady-state)가 됨을 확인하면, 배양 온도를 42°C로 급격히 상승시키고 40 시간 동안 추가 배양하였음. 배양 온도를 42°C로 상승시킨 시점으로부터 2분, 10분, 30분, 60분, 2시간, 4시간, 8시간 및 40시간의 시점에서 각각 배양액을 채취하고, 고밀도 타일링 어레이 분석(tiling array)을 수행하여 대장균 내의 총 전사체를 분석하였음.
- 열처리 관련 세포 스트레스 및 죽은 세포의 비율 측정을 확립하였음. PI(propidium iodide)용액은 세포의 1) 손상된 세포막에 침투, 2) 세포 DNA를 삽입, 3) 적색 형광을 방출함으로써 죽은 세포 확인 가능한 형광 염색 염료임. 이를 이용해 유세포분석기의 670nm 레이저의 이용하여 형광을 띠는 죽은 세포 개체 측정하였음. 488 nm 레이저로 세포 상대 크기의 전방 산란(FSC) 및 세포 구조를 나타내는 측방 산란(SSC)을 2 개의 매개변수를 이용하여 지역화(gate)된 단일 세포 개체를 측정 후, 그 안의 죽은 세포의 개체를 비율(%)로 나타내었음.

### ○ 고온 적응에 따른 전사체 변화 패턴

- 열처리 조건하에서의 유전자 발현패턴을 시간에 따라 초기, 중기 말기로 분류하였음. 각 시간 간격에서의 차별발현유전자는 time-course microarray 실험을 위해 고안된 알고리즘(transcript time course analysis, TTCA)을 이용하여 분석하였음. 샘플의 hierarchical clustering 분석을 하여 열처리 후, 시간에 따른 반응 패턴은 세 그룹(초기(2, 10분), 중기(0.5, 1, 2시간), 말기(4, 8, 40시간))으로 나누어짐을 확인하였음.
- 37도에서 배양 샘플과 비교하여, 많은 전사변화를 나타내는 유전자 위치는 각 시간 간격(p-value < 0.05)으로 나타내었음. 이 분석은 온도 상승에 크게 영향을 받은 전사체로서 총 234 개의 유전자를 산출하였음. 초기, 중기, 말기의 DEG 수는 각각 122, 126, 140개 이었음 (p-value < 0.05). 초, 중, 말기중에 한 기간에만 특이적으로 유도되거나 억제되는 유전자가 존재하였음(초기 경우는 38개 유전

자, 중기의 경우는 38개의 유전자, 후기의 경우에는 66 개의 유전자가 존재).

- 열처리 반응에서 모든 시간 지점에 걸쳐 외부 막단백질(*ompX*), 알라닌 exporter(*alaE*) 및 기능미지 단백질(*ybfA*, *ypdK*, *yjb7*)을 코딩하는 5 개의 유전자만이 높은 전사 발현량을 보였음. 그러나 훨씬 많은 유전자 (39 개)가 열처리 반응을 통해 편모 생합성(*flgAMN*, *flgBCDEF*, *flgGHIJKL* 및 *flhBAE*) (FDR = 1.57E-11) 및 maltose 수송(*malEF*, *malK-lamB* 및 *treB*) (FDR = 4.76E-06)에 관련된 것들이 하향 조절되었음.
- 초기에 발현되는 유전자 집합은 단백질 folding을 돕는 샤페론 관련 유전자(*dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *ibpA*, *groESL*)와 (FDR = 2.36E-13) 비정상 단백질을 분해하는 protease(*htpG*, *hspQ*, *clpB*, *hslUV*) 유전자들이 있음. 막 결합 단백질을 코딩하는 protease 유전자(*ftsH*)도 비슷한 발현 양상을 보였음. 다른 초기 반응 유전자는 arginine 생합성 경로와 *metF*의 발현량이 2배 높았음. 또한, 이전에 알려지지 않은 기능의 4 개 유전자(*ybeD*, *ycjX*, *ycjF*, *yib*)가 열처리 초기 반응에서 급격히 과발현되었음. 이 중, *ybeD*, *ycjX*, *ycjF*는 *rpoH* 과발현이 있는 대장균에서 높게 과발현이 유도되었으며 *rpoH* regulon이다. 초기 10분 동안 급속히 하향 조절 된 유전자는 퓨린 생합성(*purB*, *purD*, *purE*, *purL*, *purT*), 갈락토스 신진 대사(*gatB*, *gatC*, *gatD*), sigma factor *rpoE*, *rpoE* regulon(*rseABC*, *yeaY*)과 non-coding RNA(*micA*)가 감소하였음.
- 열처리반응 후 두 시간 동안 높게 유도되거나 억압된 유전자는 초기 및 중간 반응 유전자(36 개)와 중간 반응 유전자들(20개)이었음. *metA*, *metBL*, *metJ*, *metR*, *metN*, *metK*, *ybdL*, 막 단백질(*ompA*, *ecnB*, *yneM*, *ybaY*) 및 biofilm의 repressor(*bssR*, *bssS*) 및 *mcbA*등이 있다. 퓨린 및 피리 미딘(*purC*, *purH*, *purK*, *purM*, *pyrD*)의 생합성에 참여한 유전자가 감소하였음. 중후반에는 phage shock proteion (*pspABCDE*, *pspG*), 샤페론 (*spy*, *htpX*, *cpxP*), 산화 스트레스 (*yhaK*, *yhcN*) 관련 유전자들이 고발현되었음.
- 열처리 반응 후 말기에 많은 수의 유전자가 과발현되었음. 과발현된 유전자는 enterobactin 생합성 (*entCEB*, *entD*, *fes-entF*) (FDR = 1.84E-08), 철 흡수 (*fhuA*, *fhuE*), 철결핍 관여(*fec*), 철의 항상성에 관여하는 sRNA(*ryhB*), bacterioferritin-associated ferredoxin(*bfd*)과 같은 인자들을 포함함. 캡슐 다당류 생합성(*kps* genes)에 대한 큰 유전자 클러스터(16.3 kb, ECD\_02813에서 ECD\_02828까지)도 역시 증가하였음. 말기에는 알데히드 탈수소 효소 활성화(*aldB*, *astD*, *patD*) 및 영양 수송체(*cynX*, *ycdV*, *glcA*, *garP*, *yhdW*, *ugpB*, *malG*)와 관련된 유전자가 억제되었음.

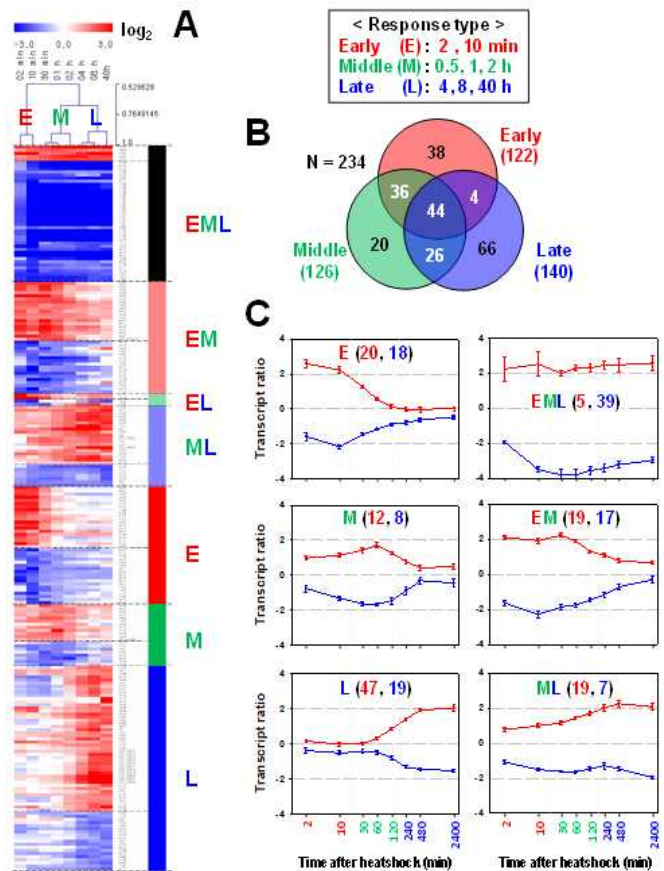


그림 132. Differentially expressed genes (DEGs) during temporal heatshock-responsive stages.

○ 고온 스트레스에서의 대장균 내 유전자 조절 기작 규명

- E. coli* BL21(DE3)을 고온 스트레스 배양 조건에서 연속배양(chemostat, continuous culture)하여 확보한 시계열 전사체/대사체 데이터를 분석하여 고온 스트레스에서의 대장균 내 유전자 조절기작을 규명하였음. 고온스트레스 초기(10 min)에는 TCA cycle 관련 에너지 대사가 억제되는 반면 일정 시간이 지나서 40시간이 경과 하였을 시 에너지 대사가 서서히 회복되었음. 공통적으로는 고온 스트레스 상황에서는 purine, pyrimidine 생합성이 억제되고 methionine 같은 아미노산의 생합성이 증가하였음(그림 133).

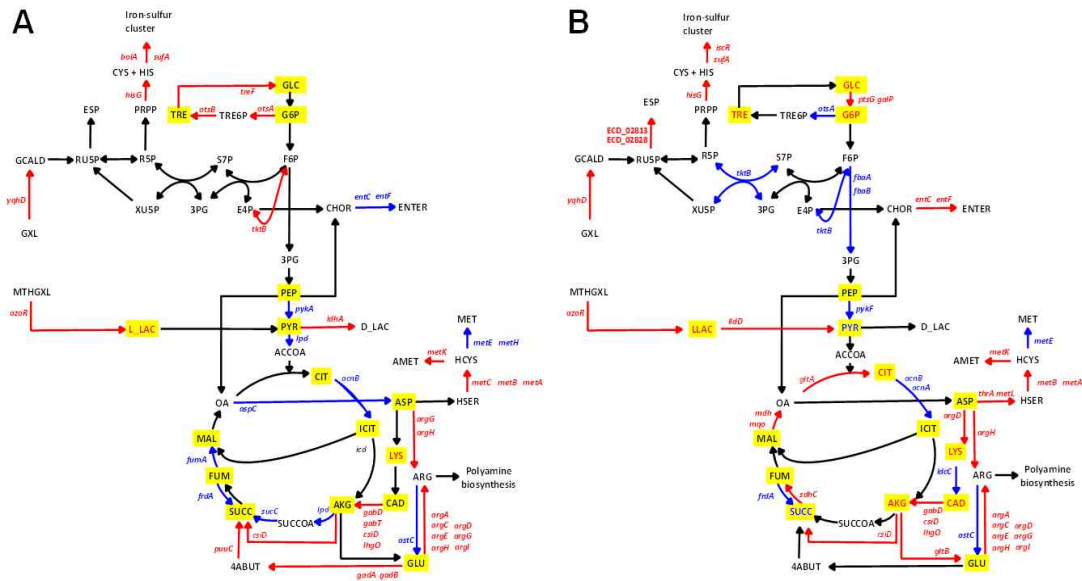


그림 133. 배양조건을 37°C 에서 42°C로 변화후 대장균의 주요 메타볼리즘 관련 유전자 및 대사물질 발현량 변화 (A) 10분 후 (B) 40시간 후. Compared to sample grown at 37 °C, genes and metabolites showing differences in mRNA and metabolite levels of  $\geq 1.4$ - or  $\leq 0.7$ -fold are colored red or blue, respectively; otherwise they are colored black. Metabolites (in capital letters) identified in this study are highlighted in yellow background.

- 전사체 및 대사체 분석을 통해 고온 스트레스에서의 조절 기작을 제시하였음(그림 134). 고온 스트레스로 인한 세포 내 활성산소가 증가하면서 방어기작으로 trehalose, cadaverine, enterobactin의 합성이 증가하였고, 새로운 방어기작으로 세포 외부의 보호를 위한 capsule gene cluster들의 발현도 증가하였음.

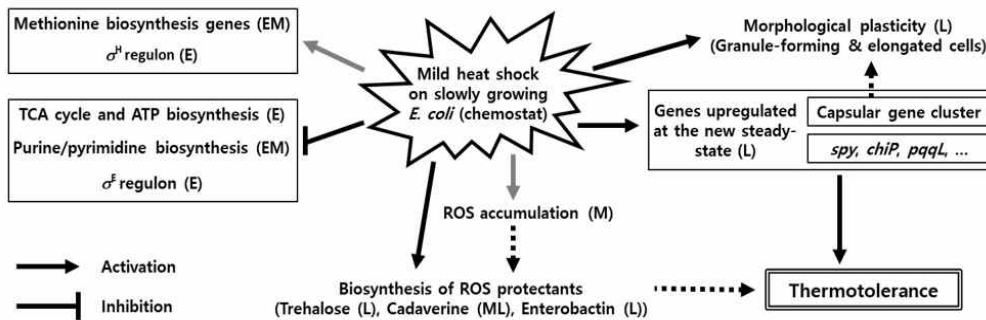


그림 134. 대장균의 고온스트레스 조절 기작

○ 결론

- 고온에서의 균주의 스트레스 반응연구는 높은 열 저항성을 가진 균주개발에 중요한 정보로 이용되며, 이는 산업적 규모에서의 고농도 세포배양에서 발생하는 높은 열을 견딜 수 있는 균주를 개발할 수 있다는 점에서 중요함. 고온에서의 적응 전 과정에서의 대장균 BL21(DE3)의 전사체의 변화 데이터는 고온 적응 유전자를 발굴하여, 플랫폼 숙주개발에 이용될 것임.

□ 고농도 삼투압 스트레스에서의 E. coli BL21(DE3)의 전사체 및 대사체 데이터 확보

○ 연구개요

- 대장균과 같이 재조합 단백질의 생산을 위해 널리 사용되는 숙주 세포는 대량 배양시 반응기 내부의 삼투압 등의 조건에 의해 균체 성장에 유의적인 영향을 미칠 수 있으므로, 미생물이 고삼투압 조건

에서도 내성을 가질 수 있도록 하는 것이 생물 공정개발에서 중요함.

- 강제공급에 의한 높은 기질/산물의 농도 차이로 인한 세포내 삼투압은 대장균 고농도 배양시 균주내 일어나는 스트레스로서 성장 및 유용물질 발현을 저해함. 또한, 대장균 배양이 진행되면 목적산물, 부산물들, 호흡과정에서 발생한 탄산 등이 배양액에 축적되어 pH가 낮아지고, 이를 중화하기 위해 NaOH등의 염기액을 투여하게 됨. 고농도 배양은 많은 경우 수일에 걸쳐 장시간 배양기를 운영하므로, 과량의 염기액 축적에 의해 삼투압이 상승하게 됨.

### ○ 전사체 데이터 확보

- E. coli* BL21(DE3)의 고삼투압 조건에서의 전사체 변화 분석과 유용 유전자 발견을 위해 열처리 조건에서와 마찬가지로 0.3M NaCl 고농도 삼투압 조건에서 연속배양 기법을 이용하였음.
- 전사체 분석을 위한 tiling microarray 실험을 위해 이전 연구에서 확립한 RNA를 추출법으로 샘플링하였음. 샘플링은 정상 상태 조건의 전사체와 고농도 삼투압 스트레스에 대한 다이나믹한 세포 반응 조건 동안의 전사체를 샘플링하였음. 상대적으로 전사체들의 변화를 계산하기 위한 기준으로 NaCl을 넣지 않은 MR배지에서의 정상상태를 대조군으로 이용하기 위해 RNA를 추출하였음. 37°C에서 연속 배양을 진행하면서 5번의 transfer를 거치고 대장균의 배양 단계가 정상 상태(steady-state)가 됨을 확인하면, 0.3M NaCl 고농도 삼투압 스트레스 환경으로 급격히 변화시켰음. 고농도 삼투압 스트레스를 받은 시점으로부터 1분, 5분, 10분, 20분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 6시간, 8시간, 10시간, 15시간, 20시간, 30시간, 40시간, 및 50시간의 시점에서 대사체를 분석하였음.

### ○ 대사체 데이터 확보

- GC-TOF-MS 기기를 이용하여 세포내 대사체를 분석하였음. 모든 시료의 농도를 맞추어 녹인 후, 100  $\mu$ L를 새 튜브에 옮겨 speed vacuum으로 농축하였음. 샘플이 잘 기화 할 수 있도록 Oximation 및 silylation 과정을 거쳐서 유도체화를 실시하여, GC-TOF-MS 분석하였음.
- GC-TOF-MS 분석 후, raw data를 cdf 파일로 변환하여 다변량 통계분석하였음. 다변량 통계분석 결과, 스트레스를 받지 않은 정상상태 지점과 3고농도 삼투압 스트레스 2 구간(30분, 50시간)에서 PCA 및 PLS-DA 모두 통계적으로 유의미한 그룹 간 차이를 보였음. 그룹 간 차이는 대사체의 경우 PLS-DA 기반 VIP>1.0 이상 및 ANOVA를 통한  $p < 0.05$  이하의 대사체들을 동정하였음(그림 136).
- 0.5M NaCl 고농도 삼투압 스트레스에서 대조군과 비교하였을 때, 시간 별 차이나는 당, 지질, 아미노산 계열의 동정 결과, 30개의 대사체가 차이가 있음을 보였음. 당 계열의 경우, 고농도 삼투압 스트레스에서 합성되는 대표적인 대사체인 trehalose가 시간이 지날수록 많이 생성됨을 확인하였다. 반면 TCA 관련 대사체들은 시간이 지날수록 줄어들었음.

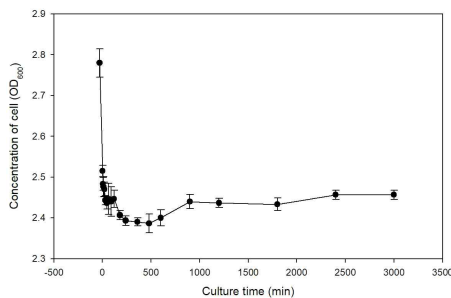


그림 135. Chemostat of *E. coli* BL21(DE3) under 0.3M NaCl osmo-shock

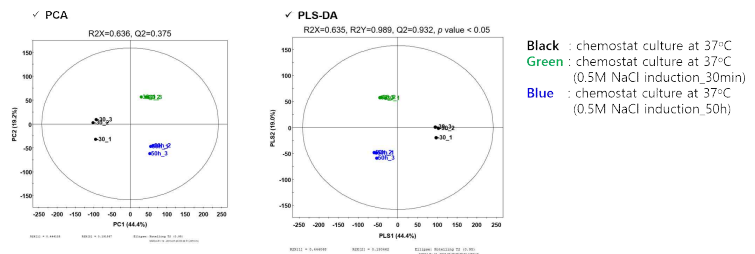


그림 136. Multivariate statistical analysis of intracellular metabolites (chemostat of *E. coli* BL21(DE3) under 0.5M NaCl stress) based on GC-TOF-MS

□ 재조합단백질의 과발현 스트레스에서의 *E. coli* BL21(DE3)의 전사체 데이터 확보

○ 연구개요

- 외래 단백질을 과발현 시 세포 내에는 대사 과부하가 초래되어 세포생장이 급격히 저해됨. 재조합 대장균 배양이 진행되면 목적산물, 부산물들, 호흡과정에서 발생한 탄산 등이 배양액에 축적되어 pH가 낮아지고, 외래 단백질의 축적 및 응집이 진행됨. 외래단백질의 대량생산 배양은 많은 경우 수일에 걸쳐 장시간 배양기를 운영하므로, 세포내 과량의 insoluble한 단백질이 축적되어 단백질 응집 및 독성이 상승함.
- 본 연구에서는 모델 단백질로서 인간 상피세포 성장인자(human epidermal growth factor, hEGF)의 발현을 IPTG로 유도(induction)하고 hEGF 발현 진행에 따른 전사체 변화를 관찰하였음.

○ 전사체 데이터 확보

- MBP-hEGF 단백질의 과발현을 위해 IPTG 1mM induction 조건에서 연속배양을 40시간까지 유지시켰음. 외래단백질의 대량생산으로 인한 스트레스를 받은 세포의 밀도는 약간 감소하다 8시간 후부터 세포가 새로운 정상상태로 성장하였음(그림 137). 또한 스트레스를 받은 시점으로 숙신산이 약간 증가하다가 점점 감소하였으며, 시간이 지날수록 미량의 아세트산이 축적됨을 보였음. PI 염색법을 통하여 8시간까지 세포의 치사율은 15% 증가하다가 서서히 감소하였음.
- IPTG iduction 후 MBP-hEGF 단백질 발현량은 20시간에 가장 많이 증가하였다가 40시간에 약간 감소하였지만, MBP-hEGF 단백질 과발현이 계속 유지되었음.
- 세포배양에서 상대적으로 전사체들의 변화를 비교하기 위한 기준으로 IPTG iduction을 하지 않은 MR배지에 서의 정상상태를 대조군으로 이용하기 위해 RNA를 추출하였음. 1mM IPTG iduction 후 MBP-hEGF 과발현 조건 스트레스를 받은 시점으로부터 2분, 10분, 30분, 1시간, 2시간, 8시간, 20시간, 40시간의 시점에서 각각 배양액을 채취하고, 고밀도 타일링 어레이 분석(tiling array)을 수행하기 위해 8개의 고품질의 total RNA를 추출하였음(RIN (RNA integrity number) >7.0).

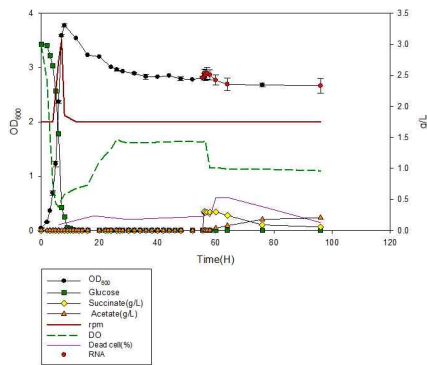


그림 137. Chemostat of *E. coli* BL21(DE3) producing MBP-hEGF protein.

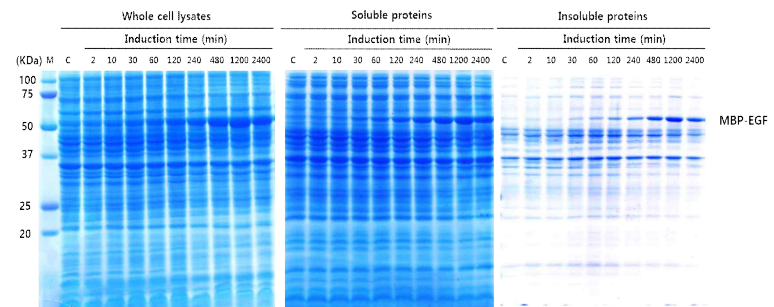


그림 138. SDS-PAGE of MBP-hEGF protein in *E. coli* BL21(DE3)

□ 고온 성장 유용 유전자 발굴을 통한 농·식품 유용물질 고효율 생산 숙주균 개발

○ 연구개요

- 대장균과 같이 재조합 단백질의 생산을 위해 널리 사용되는 숙주 세포는 대량 배양 시 반응기 내부의 온도 등의 조건에 의해 균체 성장에 유의적인 영향을 미칠 수 있으므로, 미생물이 고온 배양의 환경에서도 내성을 가질 수 있도록 하는 것이 생물 공정개발에서 중요함.
- *E. coli* BL21(DE3)의 고온에서의 전사체 변화 분석과 유전자변이실험을 통해 캡슐생성 관련 유전자가 고온생장에 중요함을 규명하였음.

○ 캡슐생성 관련 유전자의 고온 저항성 기능 규명

- 고온스트레스 조건에서 확보한 전사체 및 대사체 데이터 분석을 통해 신규 스트레스 저항 유전자를



발굴하였음. Capsular gene cluster(ECD\_02813-02819, ECD\_02825-02828)는 각각 7개, 4개의 발현 단위로 이루어져 있고 고온 및 여러 스트레스의 전사체 분석 결과 유전자들의 발현이 높았음(그림 139). 이는 대장균의 outer membrane의 capsular polysaccharide 합성 연관 유전자들로 스트레스 상황에서 세포의 외벽을 강화시키기 위한 defense mechanism과 연관되어 보임.

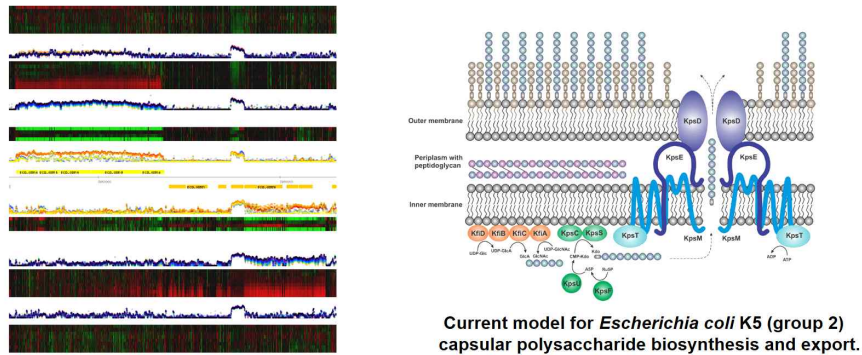


그림 139. 산업 균의 고온스트레스 저항성 후보 유용 유전인자 정보

- ECD\_02813-02819 발현이 안될 경우, 고온(46°C)에서는 생장을 못하는 반면, 이들을 과 발현시켰을 경우 성장하였으나, 37°C에서는 차이가 없었음. 이는 ECD\_02813-02819 발현이 고온생장에 필요함을 의미함 (그림 140).
- 해당 유전인자를 과발현시켜 단백질(HpaB) 대량생산에 적용하였는데, ECD\_02813-02819의 경우에는 외래 단백질 과발현시 세포생장을 촉진시키지 못했다. 이에 반해, ECD\_02825-02828의 과발현은 세포생장을 증진시켰음 (그림 141).
- ECD\_02813-02819 및 ECD\_02825-02828 중, ECD\_02825-02828 만이 고온 및 단백질 과발현 스트레스 조건에서 세포생장을 향상시켰음.

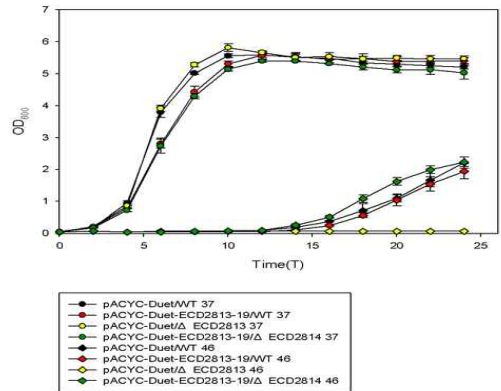


그림 140. 37°C, 46°C에서의 ECD\_02813-02819 균주성장

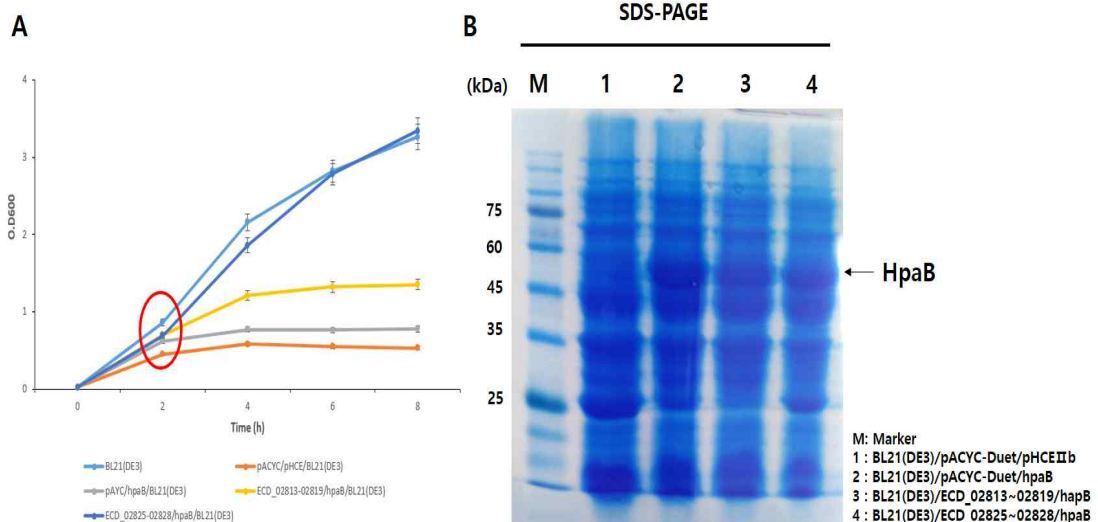


그림 141. ECD\_02813-02819 및 ECD\_02825-02828 발현이 외래 단백질 (HpaB)의 발현 및 균주 성장에 미치는 영향 (IPTG induction은 접종 후 2시간 후 진행, SDS-PAGE은 8시간 배양 후 sampling). 하늘색: BL21(DE3), 파란색: BL21(DE3)/ECD\_02825-02828/hpaB, 노란색: BL21(DE3)/ ECD\_02813-02819 /hpaB, 주황색: BL21(DE3)/pACYC-Duet/pHCE II b, 회색: BL21(DE3)/pACYC-Duet/hpaB.

○ 결론

- 캡슐관련유전자의 발현이 대장균의 고온생장에 유용함을 규명하였음. 높은 열 저항성을 가진 균주개발에 중요한 정보로 이용되며, 이는 산업적 규모에서의 고농도 세포배양에서 발생하는 높은 열을 견딜 수 있다는 점에서 중요함.

□ 고온 생장 유용 유전인자 발굴을 통한 농·식품 유용물질 고효율 생산 속주균 개발

○ 연구개요

- 대장균 고온 스트레스 전사체 분석과 유전자조작실험을 통해 고온생장에 유용한 캡슐생성 관련 유전자를 발굴하였으며, 이러한 capsule gene cluster의 발현을 조절하여 고온에서 재조합 단백질을 생산에 적용함

○ 온도범위에 따른 캡슐생성 관련 유전자의 고온 저항성 검증

- 대장균 BL21(DE3)에서 발굴된 스트레스 저항성 유전자인 capsule gene cluster(ECD\_02825-02828) 과발현(over-expression) 균주를 제작함. 유전자 과발현 균주 제작은 지속 가능한 발현에 의한 기능 검증을 위해, inducible vector가 아닌 constitutive vector (pHCE-II B)를 이용함.
- 유용 유전자원의 기능 검증을 위해, 고온 스트레스 두 조건(42°C, 46°C)에서 배양 실험을 진행함(그림 142). 실험 대상으로 야생균주(대장균 BL21(DE3)), 대조군(pHCE-II B), 그리고 실험군(pHCE-II B-ECD\_02825-02828)을 제작 및 사용함. 고온 스트레스 (42°C 또는 46°C) 상에서 ECD\_02825-02828 과발현 시, 실험군은 야생균주 및 대조군보다 높은 생장을 보임. 따라서 ECD\_02825-02828 과발현은 균주 생장에 도움을 줌.

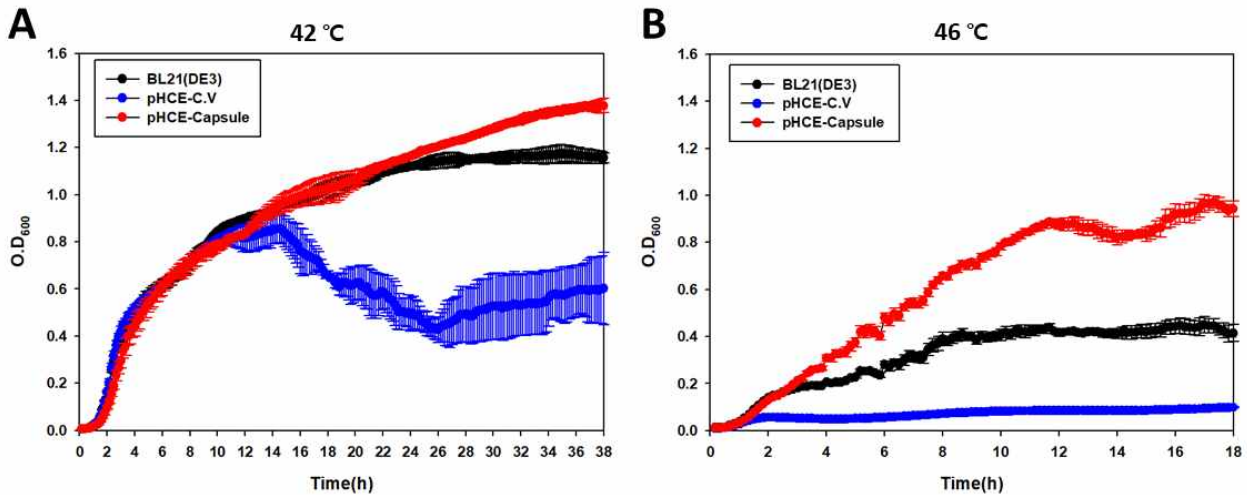


그림 142. ECD\_02825-02828 과발현 시 고온 스트레스 저항성 검증. (A) 42°C. (B) 46°C.

○ Vector 및 생산 단백질 종류에 대한 산업 대장균 생장 데이터 확보

- 외래단백질(transaminase)과 capsule gene cluster(ECD\_02825-02828) 과발현 균주의 co-expression 수행 및 분석을 통해, 스트레스 저항성 기능 검증 및 산업적 활용 가능성을 검토함. 유사한 산업 환경과 유사한 스트레스 환경을 위해, 고온 스트레스 두 조건 (42°C, 45°C)에서 외래단백질 과발현 시 배양 실험을 진행함 (그림 143). 실험 대상으로 야생균주 (대장균 BL21(DE3)), 대조군 (pACYCDuet), 실험군 (pACYCDuet-ECD\_02825-02828)을 제작 및 사용함. 이에 더하여 실험에 사용된 모든 균주는 pQE-80L vector로 transaminase(T.A.)를 과발현함. 고온 스트레스 및 외래단백질 과발현 시, 42°C와 45°C 모두 ECD\_02825-02828이 발현된 실험군이 그렇지 않은 야생균주 및 대조군보다 균주 생장에 우위를 가짐. 따라서 ECD\_02825-02828의 발현은 고온 스트레스뿐만 아니라, 외래단백질 과발현에도 저항성을 가짐.

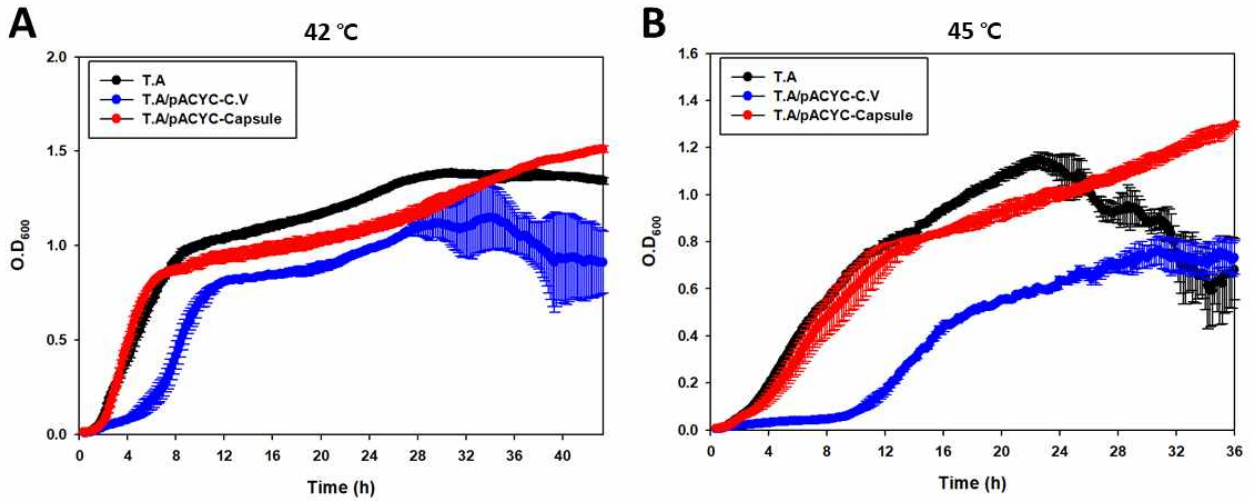


그림 143. ECD\_02825-02828과 transaminase (T.A.)의 co-expression 시 고온 스트레스 및 외래단백질 과발현 스트레스 저항성 검증. (A) 42 °C. (B) 45 °C.

- 유용 유전자원의 입증에 이어, 산업 대장균을 이용한 농·식품 유용물질의 고효율 대량 생산균주를 개발 및 최적화함.
- Inducible vector를 이용한 capsule gene cluster(pACYCDuet-ECD\_02825-02828) 발현 시, IPTG의 적정 농도를 확인함(그림 144A). 37 °C에서 IPTG 농도-의존적(0, 0.01, 0.1, 0.5, 및 1 mM) 배양 시, IPTG 0.1 mM가 대조군인 IPTG 0 mM과 가장 근사하게 성장함. 따라서 IPTG 0.1 mM를 적정 농도로 선정함. 산업적 활용 가능성 검증을 위해, constitutive vector(pHCE-II B)로 재조합 단백질 HpaB 과발현 시 성장을 관찰함(그림 144B). 실험균주로 야생균주(대장균 BL21(DE3)), 대조군(pACYCDuet), 및 실험군(pACYCDuet-ECD\_02825-02828)을 사용하고, 모든 실험균주에서 HpaB를 과발현함. 45 °C에서 실험균은 야생균주 및 대조군보다 높은 성장을 보임.
- Vector가 균주 성장에 미치는 영향을 최소화하기 위해, 단일 continuous vector(pHCE-II B)에 capsule gene cluster(ECD\_02825-ECD02828) 및 재조합 단백질(HpaB)을 삽입하고 발현 시, 균주 성장을 관찰함(그림 144). 실험 균주는 pHCE-II B, ECD\_02825-02828, *hpaB*, ECD\_02825-02828-*hpaB*를 사용함. ECD\_02825-ECD02828이 발현되는 두 균주가 타 균주에 비해 높은 성장을 보임. 재조합 단백질을 co-expression 하더라도, ECD\_02825-ECD\_02828 단일 발현 균주와 유사한 성장을 보임. capsule gene cluster(ECD\_02825-02828)의 스트레스 저항성을 최적화함.

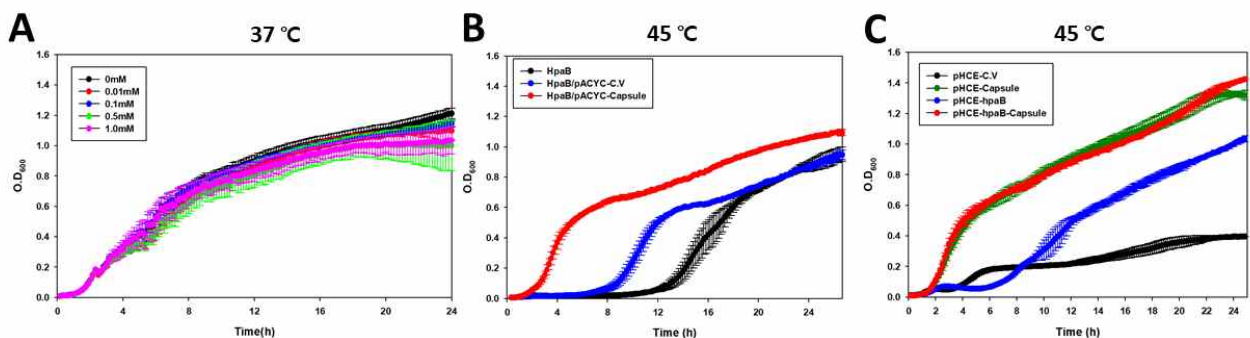


그림 144. IPTG 적정 농도 선정 및 inducible vector를 이용한 재조합 단백질 (HpaB) 과발현 시 균주 성장 측정. (A) IPTG 농도-의존적 배양. (B) 고온 스트레스 (45 °C)에서 inducible vector를 이용한 재조합 단백질 과발현 균주 배양. (C) 고온 스트레스 (45 °C)에서 단일 vector를 이용한 재조합 단백질 과발현 균주 배양.

### ○ 결론

- 고온 생장이 가능한 온도 범위부터 재조합 단백질 및 vector의 종류, 그리고 발현유도물질의 적정 농도를 최적화했으며, 이는 향후 농·식품 유용물질의 고효율 대량생산 숙주균 개발에 이용될 수 있음.

□ *C. neoformans* 유전자 조절 네트워크 구성 및 유전자 조절 유용인자 발굴

○ 연구개요

- 대표적 병원성 진균 *Cryptococcus neoformans*의 전사체 프로파일링 데이터를 이용하여 유전자 조절 네트워크를 구성함.

○ 유전자 조절 네트워크 구성

- 제1세부 과제에서 제공한 *C. neoformans*의 전사체 데이터를 이용하여 유전자 조절 네트워크를 구성함.
- cMonkey clustering algorithm을 적용하여, 전사체 정보에서의 유전자와 발현조건도 동시에 clustering 함으로써, 같은 조절인자(transcription factor)들에게 조절되는 유전자들(regulon)을 찾아냄(그림 145).

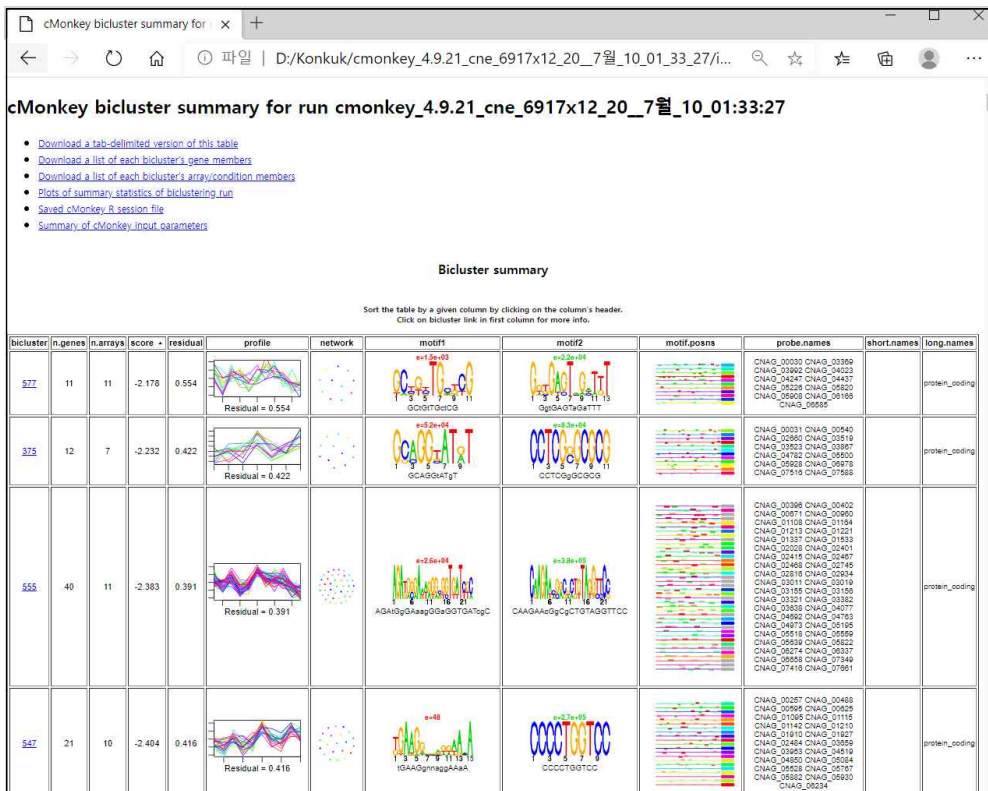


그림 145. 전사체정보와 유전자간 기능연관정보를 통합함으로써 *C. neoformans* 내 regulon과 cis-regulatory motif 추정 시스템 구축

- 유전자간 기능연관정보(operon, conserved chromosomal proximity, shared phylogeny)와 발현정보를 통합함으로써 약 450 여개의 conditional regulon을 예측 및 각 regulon의 cis-regulatory motif를 추정 함(그림 146).

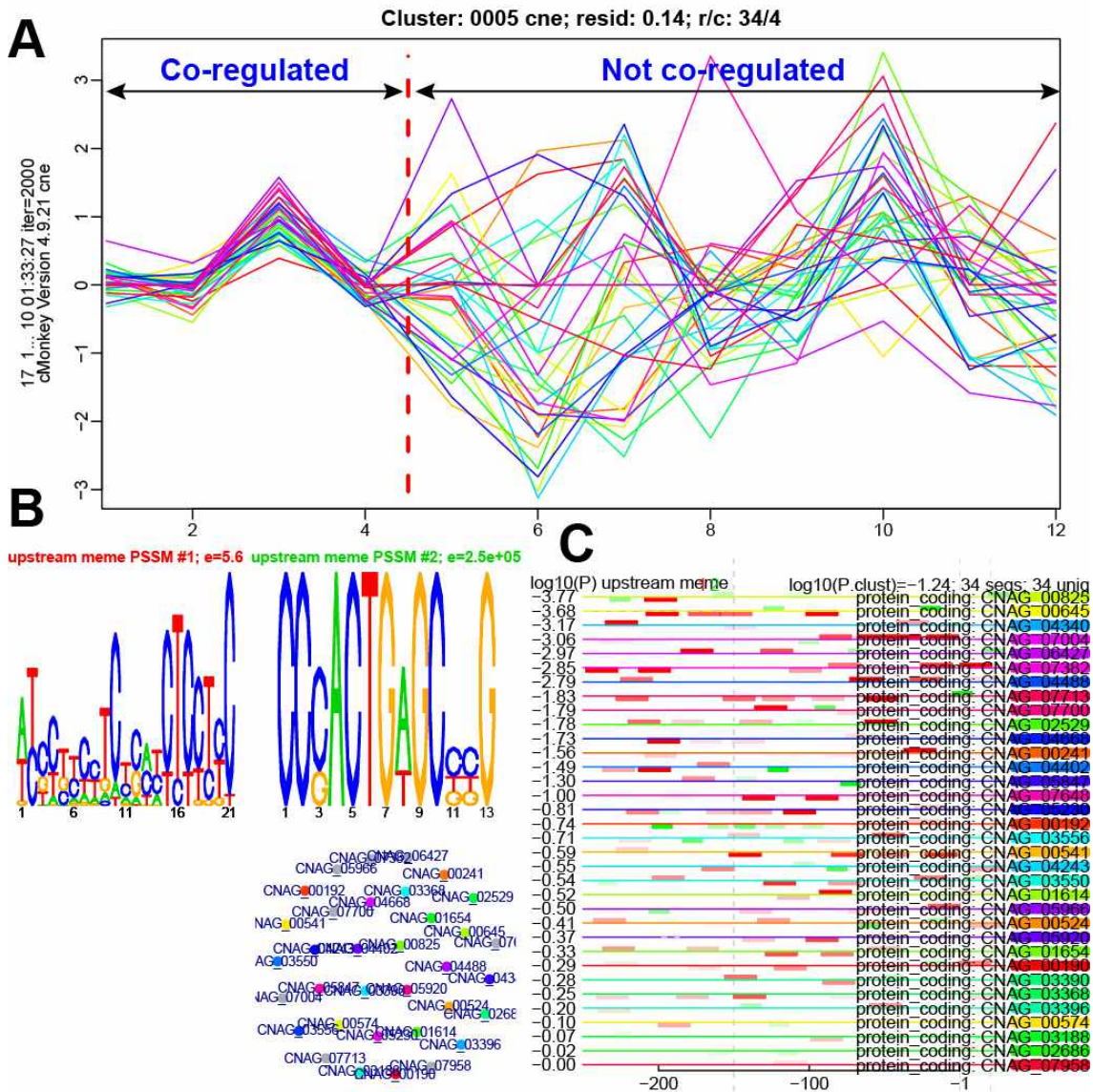


그림 146. *C. neoformans* 전사체 데이터를 이용하여 예측한 692 개 conditional regulon 중 5 번 cluster. (A) Biclustering 기법을 이용하여 34 개 유전자가 12 개의 발현조건 중 4 개의 조건에서 같은 발현패턴을 보임을 발견. (B) 34 개 유전자에서 발견된 cis-regulatory motif들. (C) 34 개 유전자의 upstream region에서 발견된 motif들의 위치.

### [제3세부]

#### □ *Cryptococcus neoformans* CKa1 단백질 분리 정제

- CKa1 단백질을 대장균에서 발현 및 정제하기 위해서 Trx와 히스티딘 태그가 있는 플라스미드에 클로닝하였고 형질전환하여 발현하였음. 단백질을 Ni-NTA 친화성 크로마토그래피 실험을 통해 1차 분리 정제하였고 후에 TEV 분해효소로 태그를 자르고 SEC 컬럼을 통해 최종 정제하였음.

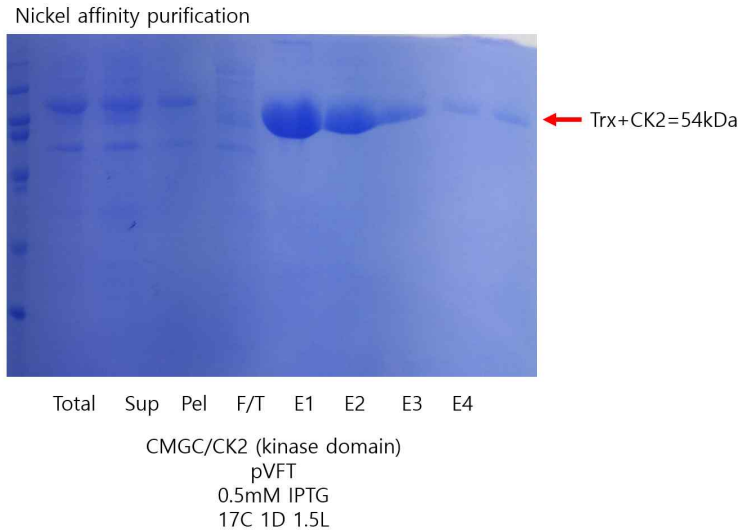


그림 147. CKa1 단백질 분리정제 결과

#### ○ *C. neoformans* CKa1 단백질 결정

- 정제된 단백질을 이용해서 initial screening을 진행하였고 X-ray 회절 실험을 하기에 적합한 결정을 얻을 수 있었음. 각각 Apo와 chemical이 결합 되어 있는 조건에서 다수의 결정을 얻었고 조건을 잡아서 얼린 후 회절 실험을 진행하였음.

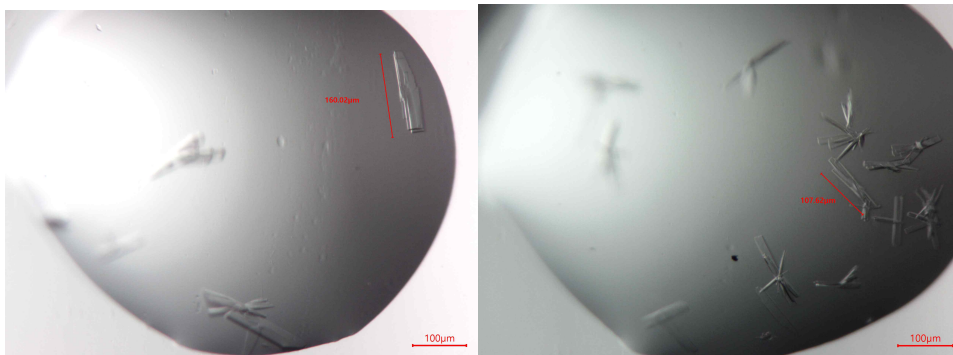


그림 148. Cka1 단백질 결정

#### ○ *C. neoformans* CKa1 구조 기반 신약 개발 모델 제시

- 동물 병원성 진균인 *C. neoformans* 유래 Cka1 단백질의 과발현 및 분리 정제에 성공하였음. 해당 단백질을 결정화 하는데 성공하였으며 고해상도 단백질 결정 구조 규명에 성공하였음. Cka1 단백질의 기질 analog인 AMPPNP와 Magnesium과의 결정 구조를 2.4Å 해상도로 규명함과 더불어 human CK2a의 저해제로 알려져 있는 CX-4945와의 결정 구조 역시 2.1Å의 고해상도로 규명 하는데 성공하였음 .

	<i>cn</i> Cka1-AMPPNP-Mg <sup>2+</sup>	<i>cn</i> Cka1-CX-4945
<b>Data collection statistics</b>		
Wavelength (Å)	0.97	0.98
Resolution range (Å)	46.67–2.4 (2.486–2.4)	47.7–2.09 (2.17–2.09)
Space group	C 2 2 2 <sub>1</sub>	C 2 2 2 <sub>1</sub>
<b>Unit cell dimensions</b>		
a, b, c (Å)	89.0, 95.8, 93.3	90.8, 95.4, 94.5
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Total reflections	31893 (3138)	47336 (3733)
Unique reflections	15949 (1554)	23768 (1908)
Multiplicity	2.0 (2.0)	2.0 (2.0)
Completeness (%)	99.5 (98.9)	96.8 (78.9)
Mean I/sigma(I)	10.6 (2.35)	15.69 (2.35)
Wilson B-factor	43.2	35.02
R-merge	0.0417 (0.286)	0.0251 (0.267)
R-meas	0.0590 (0.405)	0.0355 (0.378)
R-pim	0.0417 (0.286)	0.0251 (0.267)
CC <sub>1/2</sub>	0.998 (0.929)	0.999 (0.884)

그림 149. *C. neoformans* Cka1 단백질 결정의 데이터 수집 결과.

○ Cka1과 AMPPNP, Magnesium 양이온의 복합체 구조

- human CK2a의 저해제로 알려져 있는 CX-4945와 *C. neoformans* Cka1의 복합체 구조를 규명하였음을 통해 암세포의 성장에 관여하는 CK2a를 저해하여 항암제로의 효과를 가지고 있는 CX-4945 화합물이 *C. neoformans* Cka1과도 상호작용할 수 있음을 최초로 밝힘.

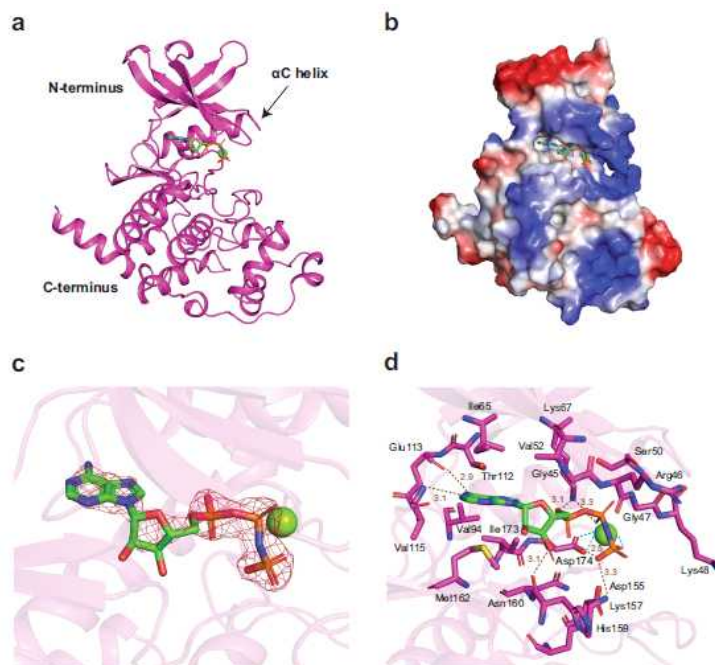


그림 150. *C. neoformans* Cka1과 기질 analog인 AMPPNP, Magnesium 양이온의 복합체 구조. (a) 전체적인 단백질 구조 cartoon 모델. (b) vacuum electrostatics를 이용한 단백질 표면 전하 분포도. (c) 인산화효소 활성 자리에 AMPPNP와 magnesium 양이온이 결합하였음을 나타내는 2Fo-Fc map 결과. (d) AMPPNP와 magnesium 양이온과 상호작용하고 있는 Cka1의 잔기들.

○ *C. neoformans* Cka1과 CX-4945의 복합체 구조

- human CK2a와 *C. neoformans* Cka1 인산화효소는 CX-4945 화합물과 동일하게 상호작용하지만 각각의 결합력은 10배에서 100배 정도의 큰 차이를 보임. 이는 SPR 실험을 통해 확인할 수 있었음. CX-4945의 저해제로써의 기능을 살펴보기 위해 1세부 연구팀과 협력하여 human CK2a와 *C. neoformans* Cka1 단백질의 IC50를 측정하였음. human CK2a에 비해 Cka1은 매우 낮은 IC50 값을 가지는 것으로 확인됨. human CK2a와 *C. neoformans* Cka1 인산화효소의 활성화 자리가 매우 잘 보존되어 있음에도 이러한 차이가 나는 것은 *C. neoformans* Cka1 특이적인 약물 개발이 가능하다는 것을 암시함.

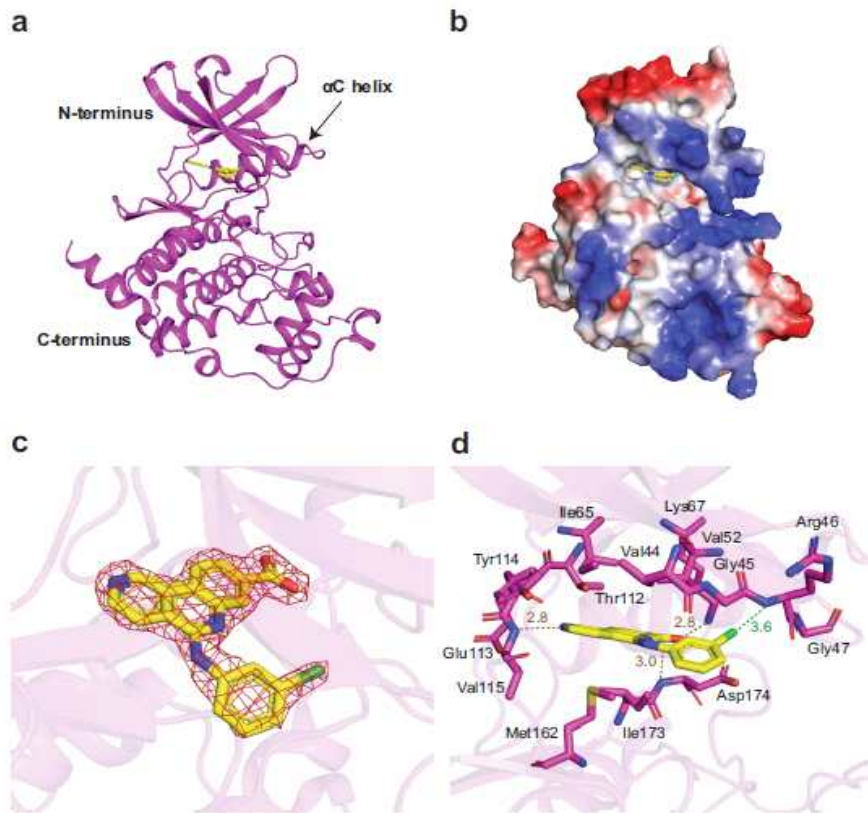


그림 151. *C. neoformans* Cka1과 CX-4945의 복합체 구조. (a) 전체적인 단백질 구조 cartoon 모델. (b) vacuum electrostatics를 이용한 단백질 표면 전하 분포도. (c) 인산화효소 활성 자리에 CX-4945 화합물이 결합하였음을 나타내는 2Fo-Fc map 결과. (d) CX-4945와 상호작용하고 있는 Cka1의 잔기

○ CX-4945 화합물에 대한 IC50 결과

- 결합력의 차이는 Cka1과 CX-4945의 복합체 구조에서도 잔기 수준으로 확인할 수 있음. 그림 7에서 확인할 수 있듯이 human CK2a와 Cka1은 아미노산 수준에서는 활성화 자리가 매우 유사함. 하지만 *C. neoformans* Cka1 기준 159번 histidine 잔기가 human CK2a와 다른 방향으로 존재함을 확인할 수 있음. 또한 human CK2a에서는 보이지 않는 46번 arginine의 amine 부분의 추가적인 수소결합이 가능한 것을 볼 수 있음. 마지막으로 human CK2a에서 113번 phenylalanine과 CX-4945간의 hydrophobic 결합이 Cka1에서는 threonine으로 치환되면서 일부 결합이 사라진 것을 확인할 수 있음. 이렇듯 두 단백질이 매우 유사한 활성화 자리를 가지고 있음에도 CX-4945 화합물의 결합력에 있어서 큰 차이를 보이는 것은 잔기 수준에서의 이해를 통해서만 가능함. 본 실험실에서는 이러한 내용을 Scientific Reports에 2019년 9월에 게재함.



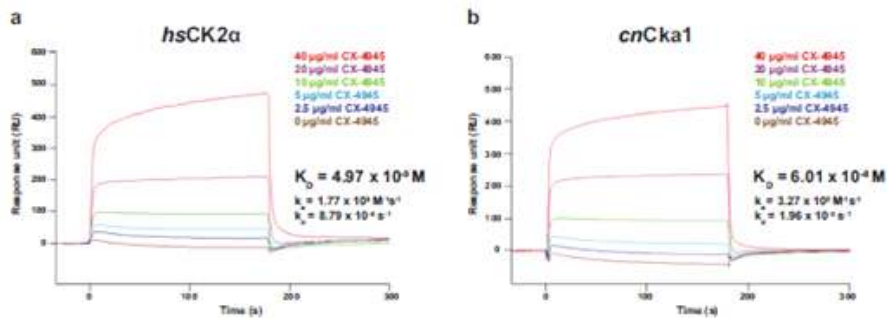


그림 152. human CK2α와 *C. neoformans* Cka1 단백질의 CX-4945 화합물 SPR 실험 결과. human CK2α의 Kd 값은 5nM로 매우 강한 결합을 하는 반면 비슷한 활성화 자리를 가지고 있음에도 *C. neoformans* Cka1의 Kd 값은 60nM로 낮은 것을 확인하였음.

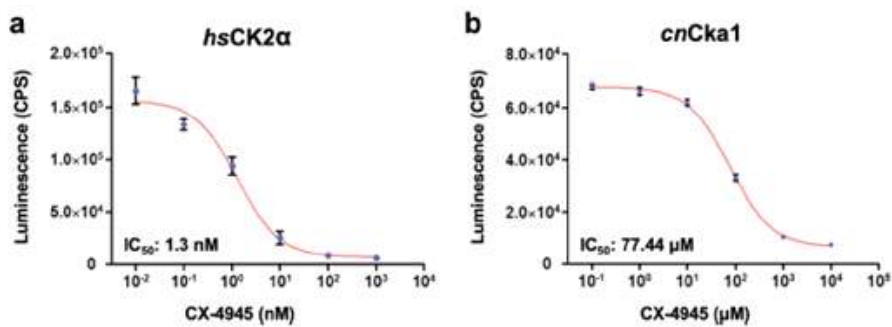


그림 153. human CK2α와 *C. neoformans* Cka1 단백질의 CX-4945 화합물에 대한 IC50 결과. human CK2α의 IC50는 1.3nM로 매우 높은 반면 Cka1은 77µM로 낮은 것을 확인할 수 있음. 해당 실험은 1세부 반응선 교수님 실험실과 협력하여 확인하였음.

○ CX-4945 화합물 결합 방식의 차이

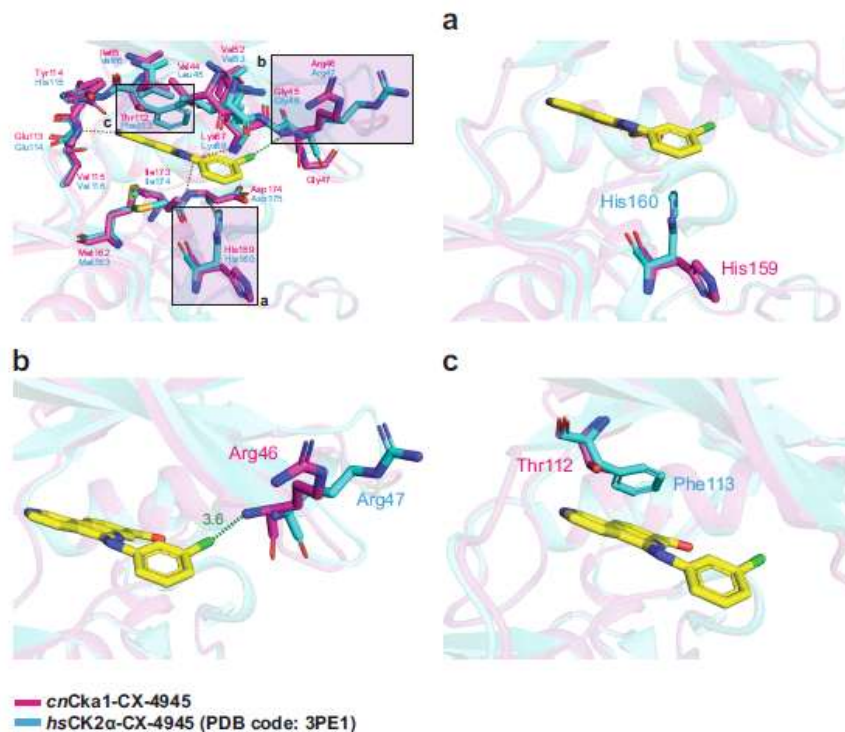


그림 154. human CK2α와 *C. neoformans* Cka1의 CX-4945 화합물 결합 방식의 차이를 보여주는 구조 중첩 결과.

○ 탈인산화효소 발현 및 정제 스크리닝

- 질병과 관련된 탈인산화효소 13가지를 2D, 3D 모델 예측을 통해서 construct 디자인하였고 각 단백질에 발현 및 정제를 도와줄 수 있는 MBP, Trx, His 태그를 붙여서 플라스미드를 제작하였음. BL21(DE3) 대장균에 형질전환하여 1.5L씩 17도에서 overnight 발현하였으며 induction은 IPTG를 이용하였음. 그 결과 Ni-NTA 친화성 크로마토그래피 실험에서 3가지 탈인산화효소에 대해 단백질이 정제되는 것을 확인할 수 있었음.

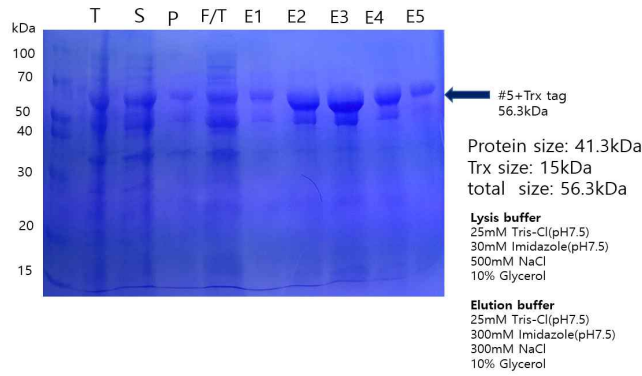


그림 155. CNAG\_01744 탈인산화효소 발현 정제 결과

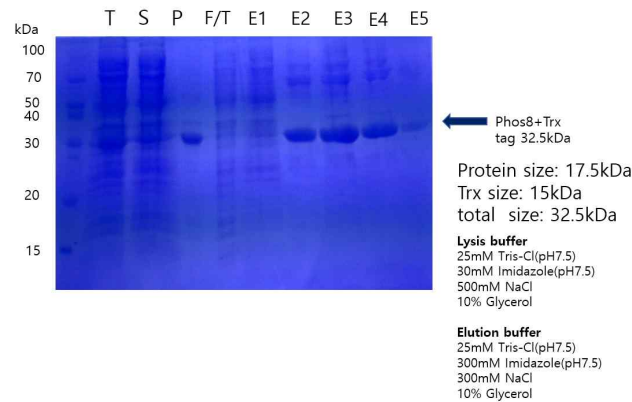


그림 156. CNAG\_03893 탈인산화효소 발현 정제 결과

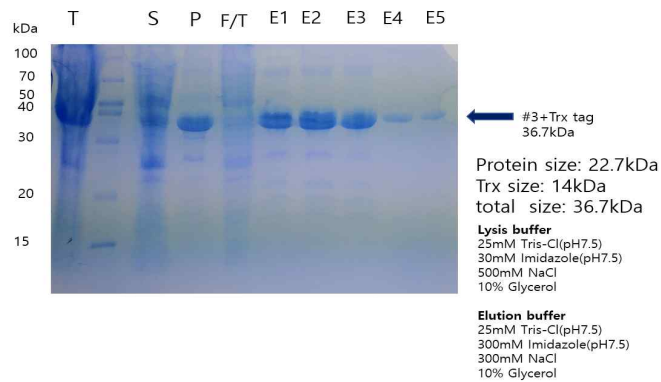


그림 157. CNAG\_01203 탈인산화효소 발현 정제 결과

○ DUSP12 단백질 발현 및 정제

- 탈인산화 효소 단백질 발현 정제 스크리닝 결과 가장 발현 및 정제가 잘 진행된 CNAG\_01203 유전자 탈인산화 효소인 DUSP12를 대장균에서 3L 다시 발현하여 정제하였음. Ni-NTA 친화성 크로마토그래피 진행 후에 TEV 단백질 분해 효소를 처리하고 SEC를 이용해 불순물을 최종적으로 제거하였음. 이 과정을 통해서 순수한 DUSP12 단백질을 정제할 수 있었음.

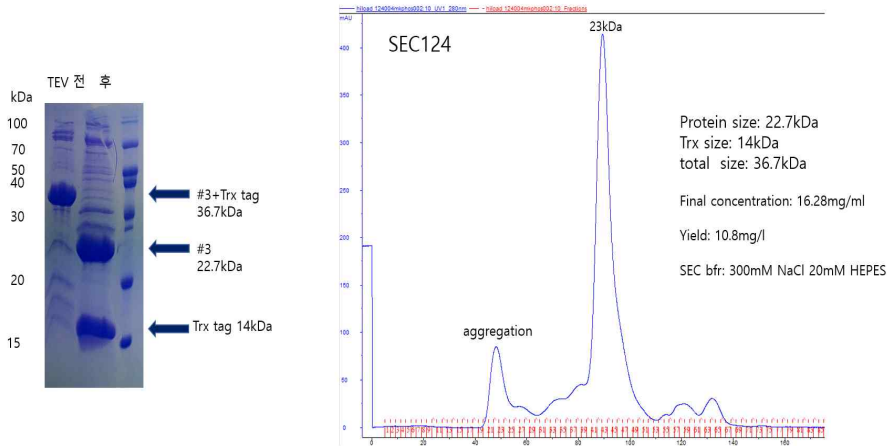


그림 158. DUSP12 단백질의 분리 정제 결과

○ DUSP12 단백질 결정화 및 X-ray 회절 실험

- 정제된 DUSP12 단백질을 initial screening을 통해 6가지 조건의 결정을 얻었고 포항가속기연구소 11C beam line에서 X-ray 회절 실험을 진행하였음. 얻은 회절 패턴 데이터를 이용해서 구조 규명에 이용하였음. XDS 및 Coot, CCP4 프로그램을 이용해 규명한 *C. neoformans* 유래 탈인산화효소 Yvh1의 구조를 phenix 프로그램을 통해 데이터 통계 값을 표로 얻었음. Completeness의 평균값이 94.60 % 이며 Mean I/ sigma 값이 2이상인 33.71을 가지고 있음. 또한 해상도가 1.8 Å에 R-merge 값은 평균 1%, 높은 resolution 범위에서는 21%의 값으로서 해당 해상도에서 상위 25%이내의 값을 가지고 있음. CC 1/2 값은 평균 1, 높은 resolution 범위에서 0.926의 값을 가지며 Ramachandran outlier 및 Rotamer outlier가 모두 0%로서 구조 규명에 있어서 문제가 없음을 볼 수 있음. 단백질 잔기는 179개가 확인되며 ligand로는 VO4와 결정 cryo 조건을 위해 추가로 넣어준 에틸렌글리콜이 확인되었음.

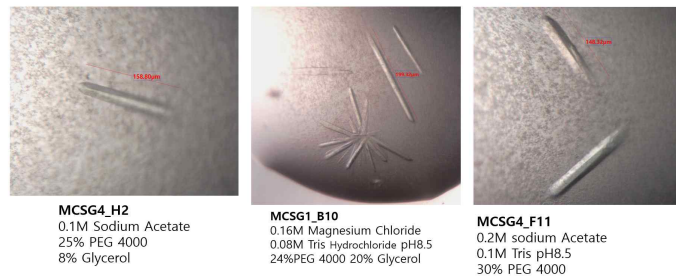


그림 159. DUSP12 단백질 결정화

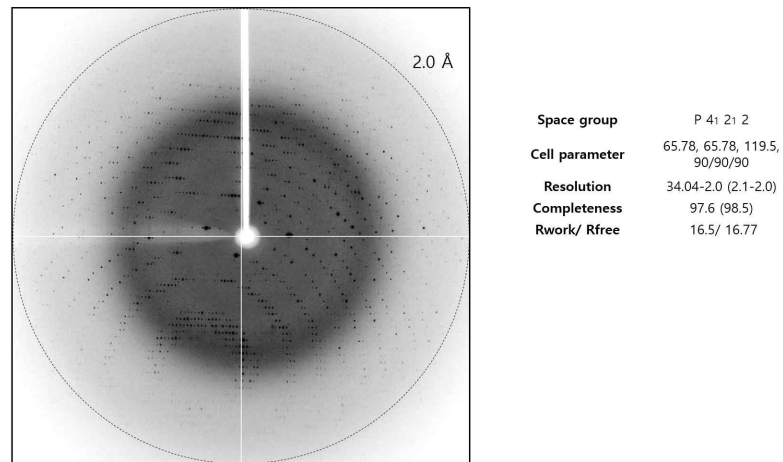


그림 160. DUSP12 단백질 결정 X-ray 회절 실험 패턴

Wavelength		Number of non-hydrogen atoms	1450
Resolution range	33.1 - 1.8 (1.864 - 1.8)		
Space group	P 41 21 2	macromolecules	1403
Unit cell	66.194 66.194 120.324 90 90 90	ligands	13
Total reflections	48282 (3396)	solvent	34
Unique reflections	24183 (1709)	Protein residues	179
Multiplicity	2.0 (2.0)	RMS(bonds)	0.014
Completeness (%)	94.60 (68.61)	RMS(angles)	1.55
Mean I/sigma(I)	33.71 (3.45)	Ramachdran favored (%)	96.57
Wilson B-factor	29.84	Ramachdran allowed (%)	3.43
R-merge	0.01125 (0.2128)	Ramachdran outliers (%)	0.00
R-meas	0.01592 (0.301)	Rotamer outliers (%)	0.00
R-pim	0.01125 (0.2128)	Clashscore	3.55
CC1/2	1 (0.926)	Average B-factor	33.79
CC*	1 (0.981)		33.75
Reflections used in refinement	24173 (1709)	macromolecules	
Reflections used for R-free	1802 (127)	ligands	36.64
R-work	0.1991 (0.2332)	solvent	34.23
R-free	0.2233 (0.2589)		
CC(work)	0.959 (0.915)		
CC(free)	0.968 (0.899)		

Statistics for the highest-resolution shell are shown in parentheses.

그림 161. DUSP12 Data collection and refinement statistics

○ DUSP12 결정 구조 validation 및 deposit

- CnYvh1 DUSP 도메인의 결정 구조를 규명한 후 PDB 사이트에 검증을 진행하였고 이슈가 발생하지 않아 최종 데이터를 제출하였음. 7EZN의 코드를 부여받았으며 추후 논문 발표에 맞춰 배포될 예정임.

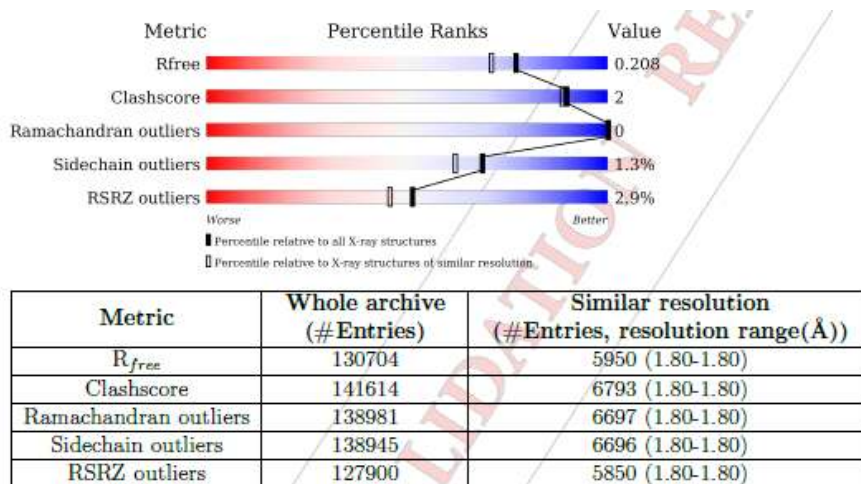


그림 162. CnYvh1 DUSP 도메인 결정 구조 validation 결과

○ DUSP12 단백질 구조 규명 및 구조 분석

- *C. neoformans* 유래 탈인산화효소 Yvh1 효소 활성 도메인은 VO4가 시스테인 233 잔기에 결합되어 있는 상태로 구조가 규명되었음. 6개의  $\alpha$  helix와 5개의  $\beta$  strand로 구성되어있으며  $\alpha$  helix가 중앙에 존재하는  $\beta$  strand를 감싸고 있는 형태로 존재함.  $\alpha$  helix 중 6번의 경우에는 사람의 Dual specific 인산화효소들과 비교했을 때 번이가 큰 부분으로서 다른 Dual specific 인산화효소에는 없지만 *C. neoformans* 유래 탈인산화 효소 Yvh1와 상동단백질인 Dual specific 인산화효소 12에만 존재하는 부분임. 또한  $\alpha 2$  helix와  $5\beta$  strand 사이에 존재하는 internal loop이 존재함. VO4는 결정화 단계에서 단백질과 같이 널

어주었고 탈인산화 효소의 저해제로 결정 구조를 안정화 시키는데 도움이 되어 많이 이용함. Yvh1 효소 활성 부위에서는 탈인산화 효소 활성화에 가장 중요한 영향을 미치는 P-loop의 key 잔기인 시스테인233에 VO4가 결합되어 있는 것을 전자 밀도 지도를 통해서 확인할 수 있음. 각각 바나듐과 산소의 원자간 거리는 1.8 Å을 가지고 있으며 시스테인의 황과는 2.3 Å의 거리를 가지고 공유결합하고 있음. 또한 VO4의 산소 원자 3개는 각각 Aspartic acid 168, Arginine 239과 2.8 Å의 가까운 거리를 가지고 상호 작용하고 있음.

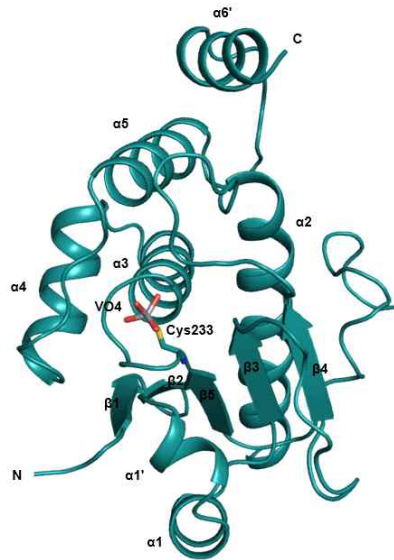


그림 163. *C. neoformans* 유래 탈인산화 효소 Yvh1 효소활성 부위의 전체적인 구조

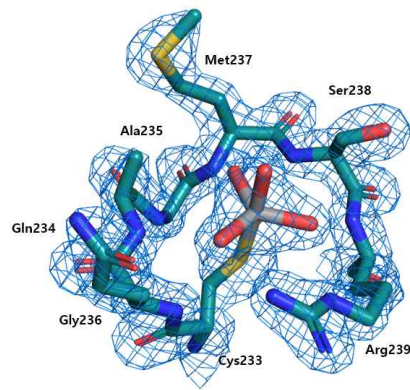


그림 164. *C. neoformans* 유래 탈인산화 효소 Yvh1 효소 활성 부위와 VO4의 2Fo-Fc map

- *C. neoformans* 탈인산화 효소 Yvh1 효소 활성 도메인과 *H. sapience* 유래 DUSP12의 구조 비교
  - *H. sapience*의 DUSP12와 전체적인 구조를 비교하면 6개의  $\alpha$  helix와 5개의  $\beta$  strand 되어있는 것은 동일하지만  $\alpha 2$  helix와  $5\beta$  strand 사이에 존재하는 internal loop이 다른 것을 볼 수 있음. *C. neoformans* 유래 탈인산화 효소 Yvh1 효소 활성 도메인의 경우에는 loop 부분이 매우 길며 유동성이 높아서 Glutamine194 부터 Lysine209번 까지 구조에서 잘 보이지 않지만 *H. sapience*의 DUSP12의 경우에는 이 부분에 helix 길이가 상대적으로 한 턴 짧게 존재하며 internal loop 부분도 존재하지 않는 것을 볼 수 있음.  $\alpha 2$  helix와  $5\beta$  strand 사이에 존재하는 internal loop의 경우 효소 활성화에 중요한 역할을 가지는 P loop 다음에 존재하는  $5\beta$  strand와 직접적으로 연결되어 있기 때문에 P loop의 활성화에 영향을 줄 수 있음.

- DUSP12 단백질 돌연변이 효소 활성 실험
  - WT, C233A, C233S, D168A, R239A 돌연변이 단백질을 이전 결정화에 사용 된 것과 동일한 pVFT3S 벡터에 클로닝 하였음. 이들 돌연변이 단백질은 Yvh1 PD WT 정제 과정과 동일한 절차를 사용하여 생산되고 정제되었음. 단백질 샘플을 5ml가 될 때까지 10kDa cut-off amicon 튜브를 사용하여 필터 원심 분리하고 45ml 완충액(25 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl)에 희석하여 이미다졸 농도를 낮추어 tag protein인 Trx를 제거

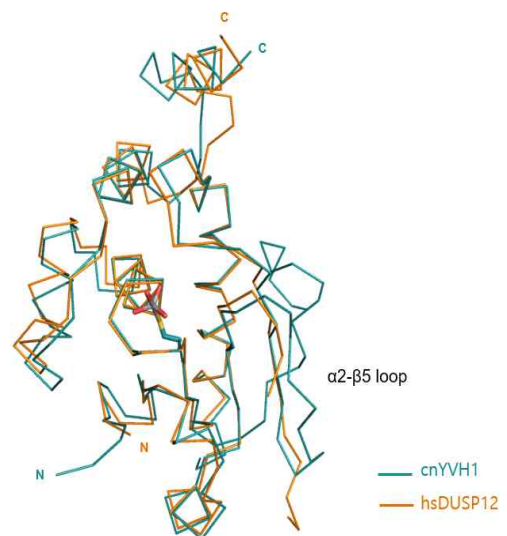


그림 165. *C. neoformans* 유래 탈인산화 효소 Yvh1 효소 활성 도메인과 *H. sapience* 유래 DUSP12의 C $\alpha$  기준 전체 구조 비교

하기 위해서 second Ni-NTA 크로마토그래피를 진행 시켰음. 단백질은 실험 진행 전까지 100% 글리세롤과 10 %의 비율로 혼합 한 후 200  $\mu$ l로 분주하여  $-80^{\circ}\text{C}$  냉동고에 저장하였음. Catalytic enzyme assay는 DiFMUP가 기질로 포함된 EnzChek Phosphatase Assay Kit를 사용하여 수행하였음. Standard curve는 Victor5(Perking Elmer, USA)에 의해 0-100 $\mu\text{M}$ 의 DiFMU를 이용하여 360nm/460nm 파장에서 정량적으로 얻어졌음. Catalytic enzyme assay는 200 $\mu\text{M}$ 의 DiFMUP가 들어간 50 $\mu$ l 0.1 M sodium acetate(pH 5.0)에서 정제된 각 재조합 단백질을 사용하여 10분 동안 반응을 진행하였음. 또한 재조합 단백질 20  $\mu\text{M}$ 에 대하여 DiFMUP 0-250  $\mu\text{M}$ 을 사용하여 50 $\mu$ l의 reaction buffer와 50 $\mu$ l의 재조합 단백질 용액에서 10분 동안 반응을 진행하였음.

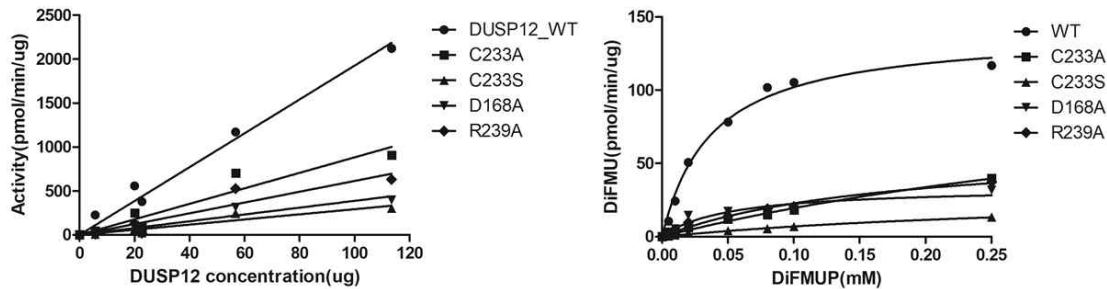


그림 166. DUSP12(cnYvh1) WT 및 중요 잔기 mutation form enzyme activity assay 결과

○ 인산화 아미노산에 대한 기질 특이성 실험

- 사용된 DUSP12(cnYvh1) 단백질은 구조 규명에 이용된 WT 단백질과 동일한 정제과정을 통해서 준비되었음. Phospho-serine, phospho-threonine phospho-tyrosine 이 실험의 기질로서 이용되었으며 Malachite Green Phosphate Assay Kit를 이용하여 탈인산화 실험을 진행하였음. Standard curve는 0-40 $\mu\text{M}$  free ortho-phosphate를 이용해서 말라카이트 그린과 molybdate가 형성한 녹색 복합체를 Victor5(Perking Elmer, USA)를 이용하여 620nm에서 정량적으로 얻어낼 수 있었음. 효소에 의하여 탈인산화 된 자유 인산기의 양은 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 30 분 동안 0-100 $\mu\text{M}$  각 인산화 아미노산에 20  $\mu\text{M}$ 의 재조합 단백질을 첨가하여 측정하였음.

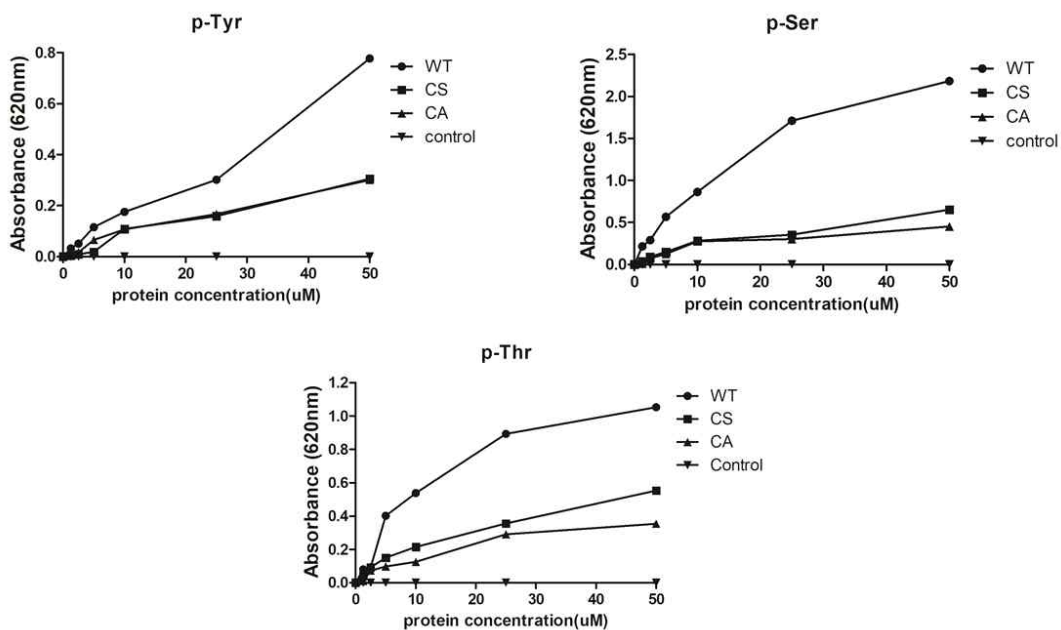


그림 167. DUSP12 (cnYvh1) 단백질의 인산화 아미노산에 대한 탈인산화 결과

- *Ferrodobacterium islandicum* AW-1 Insulinase family M16의 발현 및 정제, 결정화
- *Ferrodobacterium islandicum* AW-1 의 Insulinase family M16 유전자를 제2세부과제팀(이동우 교수 연구팀)에서 받았음. 규명되어 있는 *Thermus thermophilus*(strain HB8/ATCC 27634/DSM 579) 의 Zinc-dependent peptidase의 구조를 기반으로 construct design을 하였음. 단백질 발현을 위해 pET기반 6His tag+Trx를 가지는 pVFT3S vector에 삽입하였음. Trx와 단백질 서열 사이에는 6His tag+Trx 제거를 위한 TEV protease cleavage site가 존재함. DH5a cell에 transformation 한 후에 M16 유전자가 삽입된 pVFT3S vector를 얻어 발현에 사용하는 *E. coli* BL21(DE3) cell에 다시 transformation 하였음. .5L high salt 3L high salt Luria-Broth medium에 *E. coli* BL21(DE3) cell을 넣어 37°C에서 키운 뒤 O.D.600 값이 0.8이 되었을 때 온도를 17°C로 낮춤. 온도가 내려갔을 때 IPTG(isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside)를 induction 함. 16시간 뒤에 원심분리기를 이용해 cell pellet을 얻음. sonication을 이용해 세포를 파쇄한 뒤 high-speed centrifuge를 이용해 상층액을 분리함. 상층액을 0.45μm membrane filter함. Nickel affinity chromatography 실험을 위해 거른 상층액을 Ni-NTA bead와 섞어줌. Elution buffer(25mM Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl, 10% glycerol, 300mM Imidazole pH 7.5)를 이용해 6His tag를 가지고 있는 M16 단백질을 bead로부터 분리함. TEV protease를 처리하여 6His tag+Trx와 M16 단백질을 분리함(O/N, 4°C). 그 후에 anion-exchange chromatography column과 gel-filtration chromatography column을 이용해 추가 정제 과정을 거쳤음.

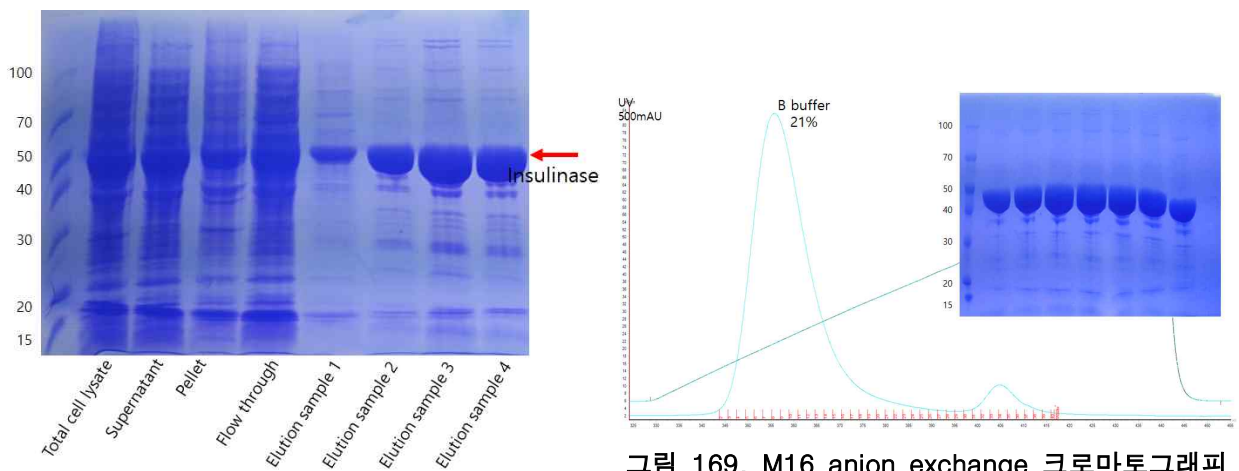


그림 169. M16 anion exchange 크로마토그래피 결과

그림 168. M16 Ni-NTA 크로마토그래피 결과

- ◆ 결정화 시도를 위해 최종 25mg/ml까지 농축하였음. MCSG, Index HT로 initial screening을 진행한 결과 M16 Apo drop, MCSG4 G4(0.1M tri-sodium citrate pH5.6, 10% isopropanol, 10% PEG 400)에서 결정이 확인되었음. *F. islandicum* AW-1을 이용해서 깃털 단백질을 분해시키고 남은 산물을 질량분석기를 이용해서 아미노산 서열을 분석하였을 때 M16 keratinase가 분해할 것으로 예상되는 서열의 후보 14가지 종류를 스크리닝 하였음. 그 결과를 바탕으로 가장 빈번하게 보여지는 펩타이드 서열을 4가지 선정하였음. 4가지의 펩타이드 서열의 평균 크기는 400-500Da이며 5.5 정도의 PI를 가지고 있음. DMSO에 녹아져 있는 각 합성 펩타이드를 insulinase family protease M16 단백질을 *E. coli*를 이용하여 발현 및 정제한 후에 결정화 스크리닝 단계에서 넣어주었고 TLP GPI 펩타이드를 넣은 조건에서 결정을 확인하였음. 결정의 크기가 매우 작아 x-ray 회절 실험 결과 0.2M potassium thiocyanate, 20% PEG 3350 조건에서 13A spot을 확인하였지만 구조 규명에는 실패하였음.



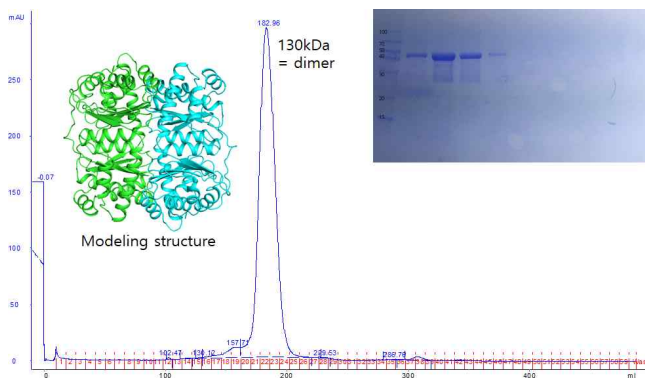
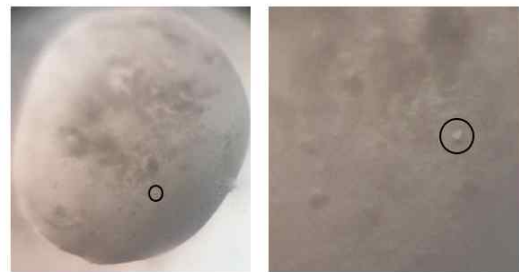


그림 170. M16 size exclusion 크로마토그래피 결과



MCSG 1 F6 0.2M Potassium Thiocyanate  
20%(w/v) PEG 3350

그림 171. insulinase family protease M16 단백질과 TLP GPI 펩타이드의 복합체 결정

○ *Pseudomonas fluorescens* lipase TliA 단백질 정제 및 결정화

- *Pseudomonas fluorescens* 로부터 hydrophobicity 컬럼을 이용하여 분리, 정제한 *Pseudomonas fluorescens* 지질분해효소 TliA 단백질을 gel-filtration chromatography column 를 이용하여 추가 정제 과정을 거친 후에 구조 규명을 위하여 단백질 결정화 (MCSG1-4, Index HT로 initial screening) 를 시도 하였지만 단백질 결정을 얻지 못하였음.

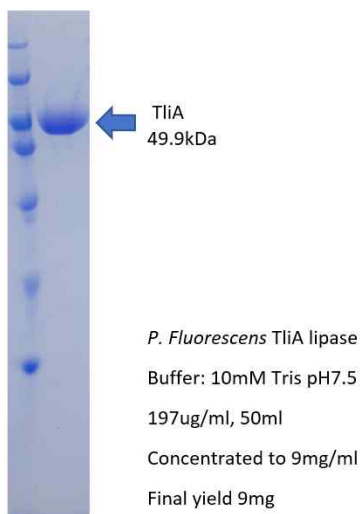
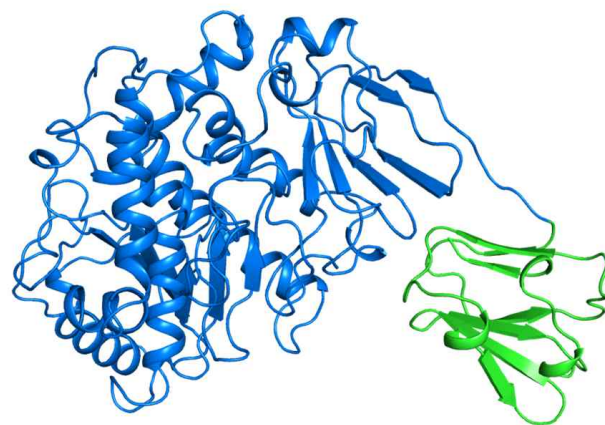


그림 172. TliA 단백질 최종 정제 결과



3D homology modeling structure of TliA  
(PDB code: 2Z8X)

그림 173. TliA 3D 구조 모델링

○ *P. fluorescens* Type I secretion system(T1SS) 인 TliDEF 단백질 복합체 발현 정제

- TliDEF는 *Pseudomonas fluorescens*에서 endogenous하게 발현을 진행하였음. 3가지 단백질 모두 막 관통 부위를 가지고 있기 때문에 DDM과 같은 detergent를 사용하여 solubilization으로 단백질을 *Pseudomonas fluorescens* 이중막에서 분리해내었음. TliD,E,F 단백질이 막에서 구조를 좀 더 안정적으로 이루어서 정제하기 위해서 내부에 분비할 수 있는 단백질이 같이 발현 돼야함. TliDEF가 *P. fluorescens*에서 분비한다고 알려진 TliA의 인식 서열인 LARD3, -30GFP-LARD3와 함께 *Pseudomonas fluorescens*에서 발현 테스트를 진행하였음. 또한 *Pseudomonas fluorescens*에서 발현한 TliDEF 단백질은 TliD에 있는 Histidine tag를 이용하여 Talon 친화성 크로마토그래피를 통해서 1차 정제하였음. 정제된 단백질을 최종적으로 superose 6 컬럼을 이용해서 크기별로 분리하였음. 또한 분리된 단백질을 western blotting을 통해 TliD의 His와 TliF의 Flag를 각각 확인하였음. SEC에서 해당되는 사이즈의 peak을 모아서 5mg/ml까지 농축한 후에 grid 제작에 이용하였음.

*Pseudomonas fluorescens* T1SS ABC transporter complex TliDEF

TliD: ABC, 4TM, 62kDa \* 2 = 124kDa  
 TliE: MFP, 1TM, 47kDa \* 6 = 282kDa  
 TliF: OMF, 53kDa \* 3 = 159kDa  
 566kDa

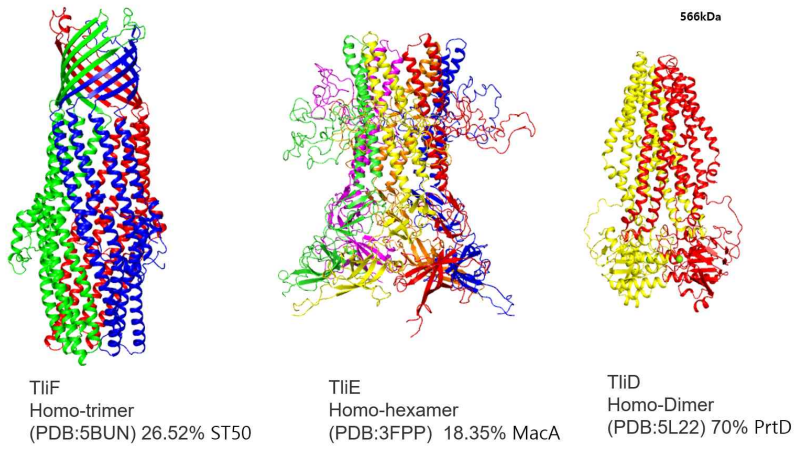


그림 174. TliDEF 3D 구조 모델링

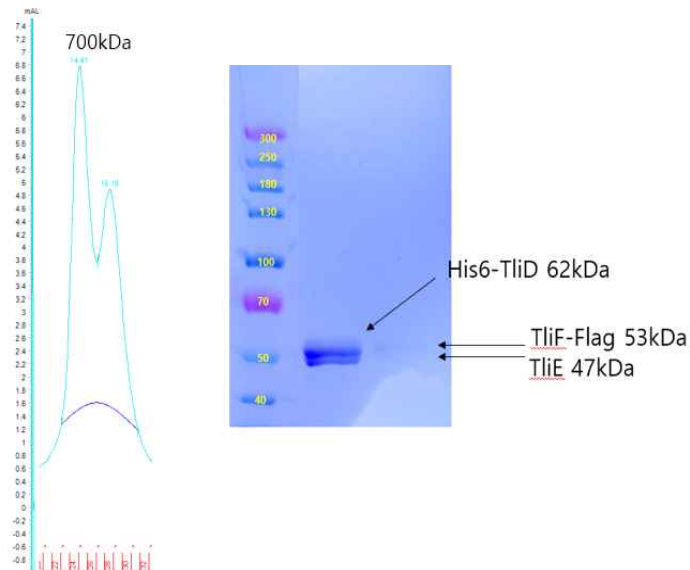


그림 175. TliDEF 단백질 superose 6 결과

○ TliDEF 단백질 복합체 Cryo-EM 스크리닝

- 농축된 TliDEF 단백질을 vitrobot을 이용하여 Cu 200mesh 1.2/1.3 grid에 4ul를 올리고 blotting하였음. Blotting time과 force 그리고 waiting time 들을 조절해 가면서 다양한 그리드를 제작하였음. 제작한 그리드를 Talos arctica 200kV TEM 기계를 이용해서 확인하였음. 얼음 두께와 입자의 분포를 전반적으로 고려하여 가장 적합한 그리드 조건을 결정하였음.

Instrument	Protein Concentration	Loading volume	Blotting Time	Blotting Force	Wait time	Temperature	Humidity
Vitrobot IV	5mg/ml	4ul	3s	0	0s	4C	100%

표 11. TliDEF의 최적 그리드 제작 조건

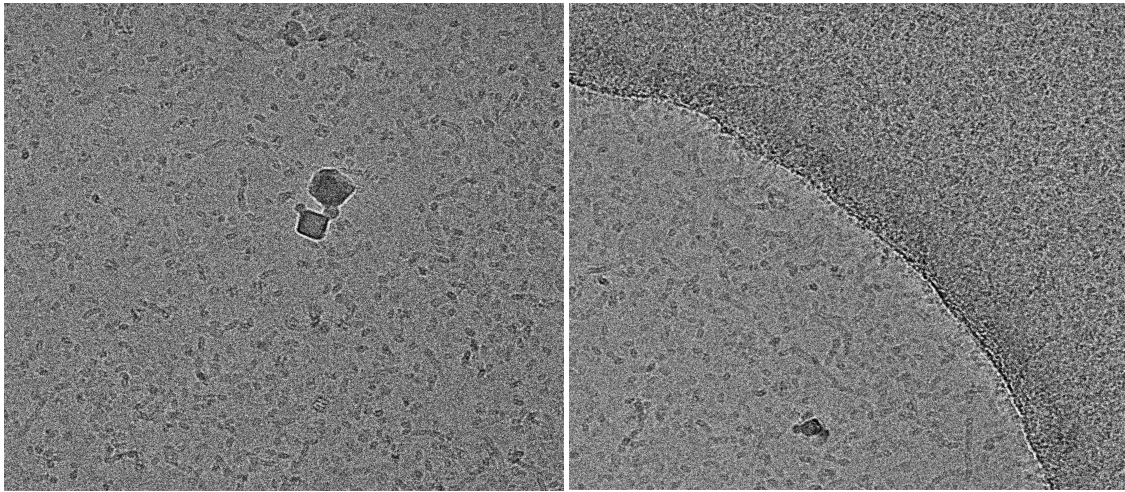


그림 176. TiiDEF의 그리드 스크리닝 결과

- 최적 조건으로 제작된 그리드를 이용하여서 Talos arctica 200kV TEM 기계로 데이터를 일부 수집하였음. 700장 정도의 micrograph를 얻었으며 초기 2D classification이 가능한지 알아보기 위해서 cryoSPARC 프로그램을 이용해서 프로세싱을 진행중임. 추후에 TiiDEF 입자를 확인할 수 있으면 데이터 수집량을 늘려 입자수를 충분하게 얻은 후 구조 규명에 이용하려고 함.

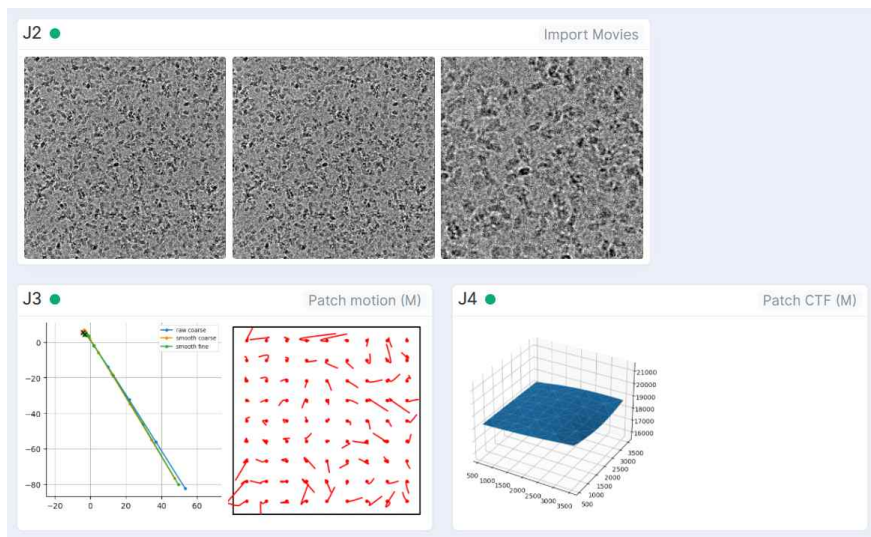


그림 177. TiiDEF 데이터 프로세싱

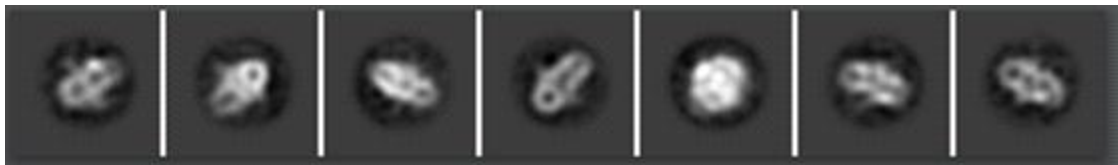


그림 178. TiiDEF 단백질의 Cryo-EM 2D classification 결과

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

---

본 과제는 수행 이전 목표했던 연구목표(유용유전자원 확보, NABIC 등록, 미생물 병 발생 기작 규명, 특허출원, 특허등록, SCI 논문 개수 및 논문 평균 impact factor, 학술발표, 교육지도, 인력양성, 홍보 전시)를 **모두 초과달성하는 성과를** 얻어 매우 우수한 성과를 수행하였음.

본 연구진은 다음과 같은 연구개발성과를 획득하였음.

##### 1. *C. neoformans* 병원성 조절 탈인산화효소 분류

- 크립토크쿠스에서 총 139개의 탈인산화효소 유전자를 분류한 후 114개의 결손 변이체를 제작하고 크립토크쿠스의 병원성을 조절하는 병원성 조절 탈인산화효소 23개를 발굴 및 분류함.

##### 2. *C. neoformans* 유용 유전자 다중오믹스 분석

- 병원성 조절 탈인산화효소에 대한 전사체, 인산화 단백질, 기능 유전체 분석을 수행하고 phosphoproteomics 및 ChIP assay를 통하여 하위 신호전달 인자를 발굴함.

##### 3. *C. neoformans* 유용 유전자 조절물질 스크리닝 시스템 구축

- 인산화효소 저해제 라이브러리를 이용한 병원성 진균 억제에 대한 효능 스크리닝 및 표적 단백질 스크리닝 시스템을 구축함.

##### 4. *C. neoformans* 유용 유전자의 주요 병원 균종 교차 연구

- KEOPS 복합체 중 Kae1과 Bud32 등 발굴된 유전자와 관련된 유용 유전자의 타 주요 동식물 병원성 진균(*Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* 등) 내의 기능 분석 및 다중오믹스 연구를 진행함.
- 단백질 상호작용에 중요한 WD40 도메인 유전자를 *F. graminearum* 및 *C. neoformans*에서 변이체 제작 및 기능연구를 수행함.

##### 5. *C. curvatus* 변이균주 생성 및 산업적 활용 방법 개발

- 유질성 효모 *C. curvatus*를 대상으로 NGS기반 유전자 alignment를 수행하고 TAG 합성 유전자 과발현 균주를 제작하여 TAG 발현량 변화를 측정함.

##### 6. 붉은 곰팡이의 핵심 단백질 상호작용 유전자 및 전사조절인자의 기능연구

- 전사조절인자 CBC-Ars2 복합체 기능 규명 및 CCAAT 전사조절인자 복합체 기능연구를 진행하였으며 병원성 관련 Fpo1 전사조절인자와 하위 조절 매커니즘 연구를 수행하였음.

##### 7. 동물 및 식물 병원성 모델 진균에서의 교차 유전학적 연구

- 동물 병원성 모델 진균 *C. neoformans*에서 확보된 탈인산화효소 유전자 결손변이체를 기반으로 식물 병원성 모델 진균 *F. graminearum* 상동유전자의 기능 규명을 수행함.

---

## 8. 다중오믹스 분석기반 농·식품 유용미생물의 환경인자에 따른 유용유전자원의 기능규명

- 계통유전체학 분석을 통한 고온성 바실러스의 내열성 적응 기작 규명 및 내열성 관련 유용유전자원 3종을 발굴함.
- 고온성 바실러스 플랫폼 도입 후보 유전자원에 대한 영양원 및 온도에 따른 유전체 수준의 표현형 확인함.
- 농·식품 유용 미생물의 오믹스 및 유전자 조절 네트워크 분석을 통한 산업적 유용 유전자원 발굴하고 다중오믹스 분석을 통한 protein biomass 분해 관련 유전자원 발굴, 기능 규명 및 기능성 펩타이드 활용기술을 확립함.
- 다양한 스트레스 조건에서의 전사체 데이터 분석을 통한 유용유전자원을 발굴함.
- 난분해성 protein biomass 분해균주의 다중오믹스 분석을 통한 분해기작을 제안함.

## 9. 다중오믹스 분석기반 농·식품 유용미생물의 환경인자에 따른 대사회로 재설계를 통한 대용량 초고속 스크리닝 플랫폼 세포개발

- 다중오믹스 분석기반 천연 희귀당 생산, 전환 및 이화능을 지닌 유용유전자원 발굴 및 기능규명을 위한 대용량 초고속스크리닝 플랫폼 세포를 개발함.
- 다중오믹스 분석을 기반으로 대사회로 재설계를 통한 대용량 초고속스크리닝 플랫폼 호스트를 개발함.
- 유전자 조작 및 유전체 편집기술을 이용하여 고온성 바실러스 플랫폼 세포를 구축함.
- 세포성장기반 효소활성 측정시스템이용 당이성화효소의 초고속 대용량 스크리닝하고 성능을 검증함.

## 10. 플랫폼 세포를 이용한 유용유전자원 검증, 조절 및 생산기술 개발

- 고온성 플랫폼호스트에서의 유용유전자원 대량발현시스템 적용을 통한 산업화 가능성을 검토함.
- 산업적 유용 유전자원의 플랫폼 세포로의 도입 및 성능평가를 통한 대체감미료 생산공정기술개발함.
- 대사 및 조절 회로 재설계 기반 농·식품 유용 플랫폼 세포 설계 및 제작함.

## 11. *C. neoformans* Cka1 단백질 분리 정제 및 약물복합체 규명

- *C. neoformans*의 항진균제 타겟인 인산화효소 Cka1를 대장균에서 정제 및 스크리닝하고 결정 획득함.
- K12의 유전자 리스트들을 비교하면서 BL21(DE3)만 가진 특징된 관련 유전자들을 추가 혹은 제거하였으며, 개발된 모델의 정확성은 phenotype microarray 실험결과를 시뮬레이션 결과와 비교하여 대사네트워크모델의 정확성을 향상시켰음.

## 12. 프로바이오틱스 대장균 Nissle 1917 인실리코 대사 네트워크 모델 개발

- 염증성 장질환(inflammatory bowel disease, IBD) 치료에 널리 이용되는 프로바이오틱스 *E. coli* Nissle 1917의 최신 유전체 주석과 전사체 데이터를 기반으로 대사네트워크 모델을 개발함.
- *E. coli* Nissle 1917의 유전체를 재주석화(re-annotation)하여 세포 내 모든 대사과정(metabolic reaction)들을 찾음. 개발된 모델의 정확성은 phenotype microarray 실험결과를 시뮬레이션 결과와 비교하여 대사네트워크모델의 정확성을 향상시켰음.
- 대사네트워크 시뮬레이션을 통해 장내혐기조건에서 성장속도를 결정하는 중요한 요인은 glycolysis 활용이었으며, 9가지 장내영양분의 대사과정을 예측함.

---

### 13. 대장균의 스트레스 조건에서의 전사체 실험기법 확립 및 분석기법 확립

- 다양한 스트레스 조건에서 연속배양기법을 확립하였음. 이 연속배양기법은 기존 회분식 플라스크배양을 이용한 스트레스 관련 연구들과 다르게, 산소포화도, pH 등의 변수를 통제하여 오직 스트레스에 따른 균주 전사체 변화 시료의 채취를 가능하게 함. 이를 통해 장시간(40 시간)동안 다양한 스트레스에 따른 균주내 시계열 전사체 데이터를 확보함.
- 시계열 (time-series) 전사체 데이터 분석기법을 확립했음. 연속배양으로 채취한 시료로부터 RNA 크기에 제한없이 전사체 확보함. Genome-wide tiling array를 통해 전체 유전체 염기서열의 발현을 정확히 측정할 수 있는 시계열 전사체 데이터를 확보함.

### 14. 산업대장균 BL21(DE3)의 고온 스트레스 반응 기작 규명

- 모든 배양조건이 완벽히 control된 연속배양(chemosta, continuous culture)을 이용하여 장시간(40h) 고온 노출 시의 스트레스 반응과 적응과정을 전사체 및 대사체 분석을 통해 규명함.
- *E. coli* BL21(DE3)의 고온 스트레스 배양 조건에서의 유전자 조절 기작을 규명하기 위해, 연속배양을 이용하여 37°C에서 42°C로 온도를 급격히 상승시킨 후, 전사체 및 대사체 변화를 관찰하였음. 이러한 시계열(time-series) 전사체/대사체 데이터를 분석하여 고온 스트레스에서의 대장균 내 유전자 조절 기작을 규명함.
- 다중오믹스 분석을 통하여 후보 열저항성 인자를 발굴하고, 유전자 결손 및 과발현 균주를 제작하고 배양 실험을 통하여 해당 유전자들이 고온생장에 유용함을 검증함.

### 15. 대장균의 고농도 삼투압 및 재조합 단백질 과발현에 따른 스트레스 반응 분석

- 연속배양기법 확립 및 시계열 전사체 데이터를 확보·분석함. 기존 회분식 플라스크 배양에서는 알 수 없었던 전사체 및 대사물질 변화 데이터를 확보함.
- hEGF 과발현 균주제작 및 hEGF 과발현시 시계열 전사체 데이터를 확보·분석하고 외래 단백질 과발현시 균주내 전사체 변화 양상을 파악함.
- 고농도 삼투압 스트레스에서 균주내 시계열 전사체 데이터를 확보·분석하고 고농도 삼투압 스트레스 노출시 균주내 전사체 변화 양상을 파악함.

### 16. 고온 성장 유용 유전인자 발굴을 통한 농·식품 유용물질 고효율 생산 숙주균 개발

- 대장균 고온 스트레스 전사체 분석과 유전자조작실험을 통해 고온생장에 유용한 캡슐생성 관련 유전자를 발굴하였으며, 이러한 capsule gene cluste의 발현을 조절하여 고온에서 재조합 단백질 고효율 생산에 적용함

### 17. *C. neoformans* 유전자 조절 네트워크 구성 및 유전자 조절 유용인자 발굴

- 대표적 병원성 진균 *Cryptococcus neoformans*의 전사체 프로파일링 데이터를 이용하여 유전자 조절 네트워크를 구성함.
- 전사체 정보에서의 유전자와 발현조건도 동시에 clustering 함으로써, 같은 조절인자 (transcription factor)들에게 조절되는 유전자들(regulon)을 찾아냄.

### 18. 산업대장균 BL21(DE3) 인실리코 대사 네트워크 구축

- 바이오연료, 바이오리파이너리, 재조합 단백질 등을 대량생산하는 데 이용되는 대표적인 산업미생물인 *E. coli* BL21(DE3)의 최신 유전체 주석과 전사체 데이터를 기반으로 대사네트워크 모델을 개발하였음.

---

**19. *C. neoformans* Cka1의 고해상도 단백질 분리 정제 및 AMP-PNP와 CX-4945와의 복합체 규명**

- *C. neoformans*의 병원성 관련 인산화효소 Cka1의 구조 예측 후, 정제 친화성 태그를 배치하여 Cka1의 발현을 최적화하고 X-ray 회절 실험을 진행함.
- Cka1 단백질에 AMP-PNP 및 마그네슘이 결합된 구조와 Cka1 억제제인 CX-4945의 복합체 구조를 규명하여 논문화 함.

**20. *C. neoformans*의 질병관련 탈인산화효소 Yvh1 정제 스크리닝 및 X-ray 회절실험**

- *C. neoformans*의 항진균제 타겟 탈인산화효소 후보군 13가지에 대하여 대장균에서 단백질을 정제 및 스크리닝함.
- 그 중 dual specificity phosphate 12 (DUSP12)인 cnYvh1을 단백질 발현 정제 최적화하여 결정화에 충분한 양과 순도의 단백질을 획득함.
- 정제된 DUSP12를 이용하여 포항 가속기 연구소에서 11C beam line에서 X-ray 회절실험을 진행하고, 구조 규명에 이용함.

**20. DUSP12 단백질 구조 규명 및 구조 분석과 DUSP 돌연변이 효소 활성 실험**

- 구조분석을 통하여 단백질의 탈인산화효소 기능에 중요한 잔기를 정하였고 point mutation을 진행하고(C233A, C233S, D168A, R239A), 야생형 단백질과 같이 발현 및 정제하여 효소 활성을 측정함.
- 상기 과정을 통하여 활성에 가장 중요하게 작용하는 잔기는 233번 시스테인이며 P loop에 존재하는 arginine과 D loop에 존재하는 aspartic acid 잔기 또한 활성에 큰 영향을 주는 것을 알 수 있었음. 또한, 인산화된 Ser, Thr, Tyr 순서대로 탈인산화 활성이 높은 것을 확인함.

**21. *Fervidobacterium islandicum* AW-1 Insulinase family M16 단백질의 발현, 정제, 결정화**

- M16 단백질 규명을 위하여 구조가 규명되어있는 *Thermus thermophilus*의 Zinc-dependent peptidase의 구조를 기반으로 construct 디자인하고 단백질을 정제함.
- 단백질의 결정화를 위해 단백질을 농축하고 펩타이드(TLPGPI)를 넣은 조건에서 crystal initial screening을 진행하였고 2가지 조건에서 결정을 확인함.

**21. *Pseudomonas fluorescens* lipase TliA 단백질 정제 및 결정화**

- TliA는 열안정성 리파아제로서 세포 내 영양소 공급을 위해서 T1SS인 TliDEF를 통해 세포 외부로 분비되는 단백질임. *P. fluorescens* lipase TliA을 분리 정제하고 SEC 컬럼으로 추가정제하여 농축시켜 결정화를 시도함.

**21. *P. fluorecens* 유래 Type I secretion system (T1SS) 인 TliDEF 단백질 복합체 발현 정제 및 Cryo-EM 스크리닝**

- TliA 단백질을 세포질에서 세포 외부로 분비해주는 secretion system인 TliDEF 단백질 복합체의 기작을 구조적으로 분석하기 위하여 TliDEF 단백질을 대장균과 *P. fluorecens* 자체에서 발현을 시도함. *P. fluorecens* 에서 발현하였을 때 복합체 형태로 정제가 가능하였고 이 단백질을 이용해 Cryo-EM grid 제작에 이용함.
- 정제된 TliDEF 단백질 복합체를 Cryo-EM 실험 진행을 위해서 다양한 grid 및 vitrification 조건에서 오창 KBSI, 대전 IBS에서 Talos arctica, glacios 200kV TEM 장비로 스크리닝하였고 700장 정도의 micrograph를 얻었으며 초기 2D classification을 통해 TliDEF 입자를 확인함.

(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 진단마 커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표			20				5			4
1차 년도	목표		5				-			1
	실적		1				1			2
2차 년도	목표		5				1			1
	실적		25				1			1
3차 년도	목표		5				2			1
	실적		10				4			1
4차 년도	목표		5				2			1
	실적		0				1			1
계	목표		20				5			4
	실적		36				7			5



○ 나. 기타 성과목표

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용 홍 보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I						
단위	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	10	10											30	20	10	10		10	
최종목 표	4	2		-	-							12	-	3	40	4	12		4
1 차 년 도	목 표	1	-									3		3	10	1	3		1
	실 적	0	-									3		6. 1	40	2	1		1
2 차 년 도	목 표	1	-									3		3	10	1	3		1
	실 적	3	2									13		4. 5	50	2	7		1
3 차 년 도	목 표	1	1									3		3	10	1	3		1
	실 적	1	2		1	55						7		6. 1	48	3	3		2
4 차 년 도	목 표	1	1									3		3	10	1	3		1
	실 적	10	1									13		7. 4	74	1	1		3
소 계	목 표	4	2		0	0						12		3	40	4	12		4
	실 적	14	5		1	55						36		6. 9	21 2	8	12		7
종료 1차년도		0	0									3		6. 1	40	2	1		1
종료 2차년도		3	2									13		4. 5	50	2	7		1
종료 3차년도		4	2		1	55						7		6. 1	48	3	3		2
종료 4차년도		14	1									13		7. 4	74	1	1		3
소 계		14	5		1	55						36		6. 9	21 2	8	12		7
합 계		14	5		1	55						36		6. 9	21 2	8	12		7

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[미생물유전체사업 성과]

□ 전략미생물 해독

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

□ 유용 유전자원 확보

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Hob1	동물 병원성 진균인 <i>C. neoformans</i> 의 BBB 통과에 관여하는 <i>ITR1a</i> , <i>ITR3c</i> , <i>MPR1</i> , <i>FZC9</i> , <i>FZC31</i> , <i>PDR802</i> , <i>SRE1</i> , <i>HXL1</i> , 및 <i>PHO4</i> 의 유전자 발현을 조절하는 핵심 전사인자 Hob1의 기능을 확인하였음.	2019.11.07	iGEM-0000985	0.004
2	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Rad53	동물 병원성 진균인 <i>C. neoformans</i> 의 Rad53가 DNA 손상반응 작용할 때 두 개의 PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) 인산화효소인 Tel1 및 Mec1에 의해 인산화 된다는 것을 밝힘.	2019.11.07	iGEM-0000986	0.00555
3	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Chk1	동물 병원성 진균인 <i>C. neoformans</i> 의 Rad53 및 Chk1에 의해 매개되는 DNA 손상반응이 중복적이면서도 서로 다르다는 것을 확인함.	2019.11.07	iGEM-0000987	0.004383
4	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Tor1	동물 병원성 진균인 <i>C. neoformans</i> 의 Tor1은 주요 독성 인자인 내열성과 및 DNA 손상 반응을 조절하는 음성 조절자라는 것을 확인하였음.	2019.11.07	iGEM-0000988	0.018332
5	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Tlk1	동물 병원성 진균인 <i>C. neoformans</i> 의 Tlk1은 Tor1과 달리 생장필수 유전자이지 않으며 <i>C. neoformans</i> 의 <i>tlk1Δ</i> 변이균주의 경우 특별한 in vitro 표현형이 없으나 숙주의 뇌 실질 안에서 진균의 생존에 중요한 역할을 하는 것을 밝힘.	2019.11.07	iGEM-0000989	0.010647
6	유전체 분석 기반 GRAS 균주 유래 Type II Asparaginase 발굴	유전체분석 기반 48164개의 bacterial asparaginae로부터 GRAS 유래 Type II Asparaginase를 발굴하여 활성을 발굴	2020.10.30	iGEM-0002102	-

7	유전체 분석 기반 GRAS 균주 유래 Type II Asparaginase 발굴 2	유전체분석 기반 48164개의 bacterial asparaginae로부터 GRAS 유래 Type II Asparaginase를 발굴하여 활성을 발굴	2020.10.30	iGEM-0002103	-
8	Tagatose SNP1	타가토스 이용성에 영향을 주는 대장균 BL21(DE3) SNP 분석	2019.11.06	iGEM-0000936	-
9	Tagatose SNP2	타가토스 이용성에 영향을 주는 대장균 BL21(DE3) SNP 분석	2019.11.06	iGEM-0000937	-
10	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Cac1	진균의 <i>CAC1</i> 유전자가 결손변이 되었을 때 마우스와 곤충 감염모델에서 병원성이 감소하는 것을 확인함.	2019.02.08	iGEM-0000366	0.01
11	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Cka1	동물 병원성 진균 <i>C. neoformans</i> 의 인산화효소 Cka1 서열 분석	2019.02.08	iGEM-0000368	0.01
12	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Cna1	진균의 <i>CNA1</i> 유전자가 결손변이 되었을 때 마우스와 곤충 감염모델에서 병원성이 감소하는 것을 확인함.	2019.02.08	iGEM-0000360	0.01
13	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Dbr1	진균의 <i>DBR1</i> 유전자가 결손변이 되었을 때 마우스와 곤충 감염모델에서 병원성이 감소하는 것을 확인함.	2019.02.08	iGEM-0000362	0.01
14	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Inp5201	진균의 <i>INP5201</i> 유전자가 결손변이 되었을 때 마우스와 곤충 감염모델에서 병원성이 감소하는 것을 확인함.	2019.02.08	iGEM-0000361	0.01
15	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Oca101	진균의 <i>OCA101</i> 유전자가 결손변이 되었을 때 마우스와 곤충 감염모델에서 병원성이 감소하는 것을 확인함.	2019.02.08	iGEM-0000358	0.01
16	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Phs1	진균의 <i>PHS1</i> 유전자가 결손변이 되었을 때 마우스와 곤충 감염모델에서 병원성이 감소하는 것을 확인함.	2019.02.08	iGEM-0000367	0.01
17	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Ssu72	진균의 <i>SSU72</i> 유전자가 결손변이 되었을 때 마우스와 곤충 감염모델에서 병원성이 감소하는 것을 확인함.	2019.02.08	iGEM-0000365	0.01
18	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Tps2	진균의 <i>TPS2</i> 유전자가 결손변이 되었을 때 마우스와 곤충 감염모델에서 병원성이 감소하는 것을 확인함.	2019.02.08	iGEM-0000359	0.01
19	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Vps29	진균의 <i>VPS29</i> 유전자가 결손변이 되었을 때 마우스와 곤충 감염모델에서 병원성이 감소하는 것을 확인함.	2019.02.08	iGEM-0000363	0.01
20	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Yvh1	동물 병원성 진균 <i>C. neoformans</i> 의 탈인산화효소 Yvh1 서열 분석	2019.02.08	iGEM-0000369	0.01
21	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Siw14	진균의 <i>SIW14</i> 유전자가 결손변이 되었을 때 마우스와 곤충 감염모델에서 병원성이 감소하는 것을 확인함.	2019.01.31	iGEM-0000357	0.01

22	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Psr1	진균의 <i>PSR1</i> 유전자가 결손 변이 되었을 때 마우스와 곤충 감염모델에서 병원성이 감소하는 것을 확인함.	2019.02.28	iGEM-0000364	0.01
23	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Psr1	진균의 <i>PSR1</i> 유전자가 결손 변이 되었을 때 마우스와 곤충 감염모델에서 병원성이 감소하는 것을 확인함.	2019.02.28	iGEM-0000364	0.01
24	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Xpp1	진균의 <i>XPP1</i> 유전자가 결손 변이 되었을 때 마우스와 곤충 감염모델에서 병원성이 감소하는 것을 확인함.	2020.11.11	iGEM-0002122	0.01
25	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Gda1	진균의 <i>GDA1</i> 유전자 결손에 따른 표현형질체 확인, 뇌-혈관장벽 통과에 관여하는 기능을 분석함.	2020.11.11	iGEM-0002121	0.01
26	병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Sit4	진균의 <i>SIT4</i> 유전자 결손에 따른 표현형질체 확인, 뇌-혈관장벽 통과에 관여하는 기능을 분석함.	2020.11.11	iGEM-0002120	0.01
27	동물 병원성 진균 <i>Candida auris</i> CYR1	진균의 <i>CYR1</i> 유전자 결손변이에 따른 표현형질체 확인, 고온 저항성, 고삼투압 반응, 산화적 스트레스 및 세포벽 온전성과 세포막 안정성에 관여하는 기능을 분석함.	2020.11.11	iGEM-0002119	0.01
28	동물 병원성 진균 <i>Candida auris</i> BCY1	진균의 <i>BCY1</i> 유전자 결손변이에 따른 표현형질체 확인, 산화적 스트레스와 항진균제 저항성에 관여하는 기능을 분석함.	2020.11.11	iGEM-0002116	0.01
29	동물 병원성 진균 <i>Candida auris</i> TPK1	진균의 <i>TPK1</i> 유전자 결손변이에 따른 표현형질체 확인, 산화적 스트레스 및 고삼투압 반응, 항진균제 저항성에 관여하는 기능을 분석함.	2020.11.11	iGEM-0002117	0.01
30	동물 병원성 진균 <i>Candida auris</i> TPK2	진균의 <i>TPK2</i> 유전자 결손변이에 따른 표현형질체 확인, 세포벽 온전성에 관여하는 기능을 분석함.	2020.11.11	iGEM-0002118	0.01
31	Functional dissection of the regulatory mechanism of the atypical AP-1-like transcription factor, Yap1, in <i>Cryptococcus neoformans</i>	동물 병원성 진균 <i>C. neoformans</i> 의 야생형 균주와 전사인자 <i>YAP1</i> 결실균주의 전사체 데이터 분석	2019.11.07	GSE136832	6
32	Rad53- and Chk1-Dependent DNA Damage Response Pathways Cooperatively Promote Fungal Pathogenesis and Modulate Antifungal Drug Susceptibility	동물 병원성 진균 <i>C. neoformans</i> 의 야생형 균주와 <i>RAD53</i> 결실균주의 전사체 데이터 분석	2018.12.04	GSE117227	16
33	Transcriptomic and Metabolomic Analysis Revealed Roles of Yck2 in Carbon Metabolism and Morphogenesis of <i>Candida albicans</i>	동물 병원성 모델 균주 <i>Candida albicans</i> 의 야생형 균주와 Yck2 결실균주의 전사체 데이터 분석	2019.09.26	GSE138069	6

34	Unravelling of the novel melanin biosynthesis–signalling networks in <i>Cryptococcus neoformans</i>	동물 병원성 진균 <i>C. neoformans</i> 의 야생형 균주와 <i>BZP4, HOB1, MBS1, USV101</i> 의 전사체 데이터 분석	2019.05.30	GSE131891	23
35	Effect of the ATB1651 towards to fungi	신규 항진균제 ATB1651의 성능평가 전사체 분석	2020.11.12	GSE161314	10
36	The TOR pathway plays pleiotropic roles in growth and stress responses of the fungal pathogen <i>Cryptococcus neoformans</i>	항진균제 rapamycin 처리 전후 야생형 균주 와 필수유전자 <i>TOR1</i> 의 과발현체의 전사체 분석	2019.04.03	GSE129227	6

□ 표준유전체 해독

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

□ 메타유전체 분석

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

□ 유전체 분석기술 개발

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일시	등록번호	생산량 (GB)

□ NABIC 등록

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	유전체	타가토스 영양요구성 <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)의 전장유전체 서열	2018.10.	iGEM-0000166	10.0
2	유전체	타가토스 영양요구성 대장균 BL21(DE3) 당 대사회로 유전자 최초 돌연변이 균주	2019.11.06	NG-1225 (iGEM-0000944)	12.7
3	난분해성 바이오매스 분해균주 (Feather) RNAseq	난분해성 바이오매스 분해균주의 Feather 배지 transcriptome 분석	2020.10.28	igem-0002076	1.3
4	난분해성 바이오매스 분해균주 (Peptone) RNAseq	난분해성 바이오매스 분해균주의 Peptone 배지 transcriptome 분석	2020.10.28	igem-0002079	1.3
5	난분해성 바이오매스 분해균주 (Tryptone) RNAseq	난분해성 바이오매스 분해균주의 Tryptone 배지 transcriptome 분석	2020.10.28	igem-002080	1.3
6	난분해성 바이오매스 분해균주 (Glucose) RNAseq	난분해성 바이오매스 분해균주의 Glucose 배지 transcriptome 분석	2020.10.28	igem-0002078	1.3
7	갈락토스 이성화효소 발현 유전자가 결여된 희귀당 자화균주의 전장유전체 서열	갈락토스 이성화효소 발현 유전자가 결여된 희귀당 자화균주의 전장유전체 서열	2021.11.10	igem-0002248	1.3

□ 병원성미생물진단마커 개발

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

□ 병원성미생물 정보 완성

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)

□ 미생물 병발생 기작 규명

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 병원성을 조절하는 인산화효소 Cka1	기능유전체 분석을 통한 병원성 관련 기작 및 표현형질체 분석, 단백질 구조구명	2019.02.08	iGEM-0000368	0.01
2	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 병원성을 조절하는 탈인산화효소 Yvh1	기능유전체 분석을 통한 병원성 관련 기작 및 표현형질체 분석, 단백질 구조구명	2019.02.08	iGEM-0000369	0.01
3	H99 및 R265의 야생형 및 <i>hob1Δ</i> 변이균주 전사체 분석	HMC(host-mimicking condition) 조건에서 비교 전사체 분석	2019.10.31	iGEM-0000797	17.6
4	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 병원성 및 뇌감염을 조절하는 탈인산화효소 신호전달체계	뇌혈관 장벽 모사 조건에서 탈인산화효소 라이브러리를 스크리닝 하였고, 뇌혈관 장벽 통과에 관여하는 유전자( <i>XPP1</i> , <i>SSU72</i> , <i>SIW14</i> , <i>SIT4</i> , <i>GDA1</i> ) 및 뇌혈관 장벽 부착에 관여하는 유전자( <i>XPP1</i> , <i>SSU72</i> , <i>SIW14</i> , <i>SIT4</i> )를 발굴하였고 이러한 유전자들이 진균의 뇌 감염과정에서 glucose 감지, RNA 처리 및 purine 대사와 관련된 기능 조절을 통해 병원성 진균의 병 발생을 조절한다는 것을 밝힘.	2020.11.11	iGEM-0002123	0.01
5	Human neurovascular unit chip with a functional blood-brain barrier models brain-infection mechanism of a fungal meningitis pathogen	혈관-뇌 장벽을 모사하는 neurovascular 칩을 구축하여 병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> 결실균주 라이브러리의 대용량 high throughput sequencing을 통해 뇌혈관장벽 통과 및 신경세포선호도에 관여하는 병 발생기작 조절 메커니즘을 발굴함.	2021.04.13	GSE171937	4.8

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Structural basis for arginine glycosylation of host substrates by bacterial effector proteins	<i>Nature Communications</i>	박준배	9	영국	Nature Research	SCI	2018-10-16	2041-1723	10%
2	Identification of Matrix Metalloproteinase-1-Suppressive Peptides in Feather Keratin Hydrolysate	<i>Journal of agricultural and food chemistry</i>	진현수	66(48)	미국	ACS Publication	SCI	2018-11-05	0021-8561	25%
3	Metabolic network reconstruction and phenome analysis of the industrial microbe, <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	<i>PLoS One</i>	김한설	13(9)	미국	Public library of science	SCI	2018-09-21	1932-6203	15%
4	Sho1 and Msb2 Play Complementary but Distinct Roles in Stress Responses, Sexual Differentiation, and Pathogenicity of <i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Frontiers in Microbiology</i>	소이슬	9	스위스	Frontiers Media SA	SCI	2018-12-04	1664-302X	30%
5	Unraveling Melanin Biosynthesis and Signaling Networks in <i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>mBio</i>	이동필	10(5)	미국	American Society for Microbiology	SCI	2019-10-01	2150-7511	35%
6	Rad53- and Chk1-Dependent DNA Damage Response Pathways Cooperatively Promote Fungal Pathogenesis and Modulate Antifungal Drug Susceptibility	<i>mBio</i>	정광우	10(1)	미국	American Society for Microbiology	SCI	2019-01-02	2150-7511	10%
7	Nutrient and Stress Sensing in Pathogenic Yeasts	<i>Frontiers in Microbiology</i>	Julian C. Rutherford, 반응선	10	스위스	Frontiers Media SA	SCI	2019-03-08	1664-302X	40%
8	<i>ARS2</i> plays diverse roles in DNA damage response, fungal development, and pathogenesis in the plant pathogenic fungus <i>Fusarium graminearum</i>	<i>Frontiers in Microbiology</i>	부이득 쿠웅	10:23 26	스위스	Frontiers Media SA	SCI	2019-10-15	1664-302X	40%
9	Structural Study of Monomethyl Fumarate-Bound Human GAPDH	<i>Molecules and Cells</i>	박준배	42(8)	한국	Korean Society for Molecular and Cellular Biology	SCI	2019-08-31	1016-8478	25%

10	Biosynthesis of Nonimmunosuppressive FK506 Analogues with Antifungal Activity	<i>Journal of Natural Products</i>	범지윤 , 정진아 , 이경태 , 황보아 름	82(8)	미국	ACS Publications	SCI	2019-08-23	0163-3864	10%
11	Fluorescence-based Quantification of Bioactive Keratin Peptides from Feathers for Optimizing Large-scale Anaerobic Fermentation and Purification	<i>Biotechnology and Bioprocess Engineering</i>	진현수	24(1)	한국	Korean Society for Biotechnology and Bioengineering	SCI	2019-03-16	1226-8372	25%
12	The TOR Pathway Plays Pleiotropic Roles in Growth and Stress Responses of the Fungal Pathogen <i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Genetics</i>	소이슬	212(4)	미국	Genetics Society of America	SCI	2019-08-01	0016-6731	40%
13	Structural analysis of fungal pathogenicity-related casein kinase $\alpha$ subunit, Cka1, in the human fungal pathogen <i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Scientific Reports</i>	Belinda X. Ong	9	영국	Nature Research	SCI	2019-10-07	2045-2322	40%
14	Minimization of energy transduction confers resistance to phosphine in the rice weevil, <i>Sitophilus oryzae</i>	<i>Scientific Reports</i>	김경남	9	영국	Nature Research	SCI	2019-10-10	2045-2322	50%
15	Characterization of the CCAAT-binding transcription factor complex in the plant pathogenic fungus <i>Fusarium graminearum</i>	<i>Scientific Reports</i>	김정은 , 남혜진	10	영국	Nature Research	SCI	2020-03-17	2045-2322	40%
16	New approaches towards the discovery and evaluation of bioactive peptides from natural resources	<i>Critical Reviews in Environmental Science and Technology</i>	강남주	50(1)	영국	Taylor&Francis Group	SCI	2020-01-02	1064-3389	25%
17	Identification of keratinases from <i>Feridobacterium islandicum</i> AW-1 using dynamic gene expression profiling	<i>Microbial Biotechnology</i>	강은주	13(2)	영국	John Wiley & Sons Ltd and Society for Applied Microbiology	SCI	2020-03-01	1751-7907	33%
18	Fungal kinases and transcription factors regulating brain infection in <i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Nature Communications</i>	이경태 , 홍추현 , 이동기	11(1)	영국	Nature Research	SCI	2020-03-23	2041-1723	20%



19	Genome-wide functional analysis of phosphatases in the pathogenic fungus <i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Nature Communications</i>	진재형 , 이경태	11(1)	영국	Nature Research	SCI	2020-08-24	2041-1723	30%
20	A Signature-Tagged Mutagenesis (STM)-based murine-infectivity assay for <i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Journal of Microbiology</i>	정광우	58(10)	한국	The Microbiological Society Of Korea	SCI	2020-09-29	1225-8873	50%
21	Heat-responsive and time-resolved transcriptome and metabolome analyses of <i>Escherichia coli</i> uncover thermo-tolerant mechanisms	<i>Scientific Reports</i>	김신연	10(1)	영국	Nature Research	SCI	2020-10-19	2045-2322	20%
22	The novel bZIP transcription factor Fpo1 negatively regulates perithecial development by modulating carbon metabolism in the ascomycete fungus <i>Fusarium graminearum</i>	<i>Environmental Microbiology</i>	신지영 , 부이득 쿠웅	22(7)	미국	Wiley-Blackwell on behalf of the Society for Applied Microbiology	SCI	2020-07-13	1462-2912	30%
23	Microbe Profile: <i>Cryptococcus neoformans</i> species complex	<i>Microbiology</i>	반용선	166(9)	영국	Microbiology Society	SCI	2020-09-21	1350-0872	25%
24	Transcriptomic and Metabolomic Analysis Revealed Roles of Yck2 in Carbon Metabolism and Morphogenesis of <i>Candida albicans</i>	<i>Frontiers in Cellular and Infection Microbiology</i>	Karl Liboro	11	스위스	Frontiers Media S.A	SCI	2021-03-16	2235-2988	25%
25	Functional characterization of primordial protein repair enzyme M38 metallo-peptidase from <i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	<i>Frontiers in Molecular Biosciences</i>	라재원 , 임마누엘 다나싱	7	스위스	Frontiers Media S.A	SCI	2020-12-17	2296889X	50%
26	The sulfur formation system mediating extracellular cysteine-cystine recycling in <i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1 is associated with keratin degradation	<i>Microbial Biotechnology</i>	진현수 , 임마누엘 다나싱	14(3)	영국	John Wiley & Sons Ltd and Society for Applied Microbiology	SCI	2021-03-15	1751-7915	16%

27	Development of a Genome-Scale Metabolic Model and Phenome Analysis of the Probiotic <i>Escherichia coli</i> Strain Nissle 1917	<i>International Journal of Molecular Sciences</i>	김도현 , 김영신	22(4)	스위스	MDPI	SCI	2021-02-20	1661-6596	20%
28	Current status and future prospects of biological routes to bio-based products using raw materials, wastes, and residues as renewable resources	<i>Critical Reviews in Environmental Science and Technology</i>	이지영 , 이성은	-	영국	Taylor and Francis Ltd	SCI	2021-09-01	1064-3389	20%
29	Structure of oxidized pyrrolidone carboxypeptidase from <i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1 reveals unique structural features for thermostability and keratinolysis	<i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i>	Immanuel Dhana singh	540	미국	ACADEMIC PRESS INC ELSEVIER SCIENCE	SCI	2021-01-15	0006-291x	50%
30	A large-scale metagenomic study for enzyme profiles using the focused identification of the NGS-based definitive enzyme research (FINDER) strategy	<i>Biotechnology and Bioengineering</i>	성재윤	118(11)	미국	John Wiley & Sons	SCI	2021-07-23	0006-3592	20%
31	NleB/SseKs ortholog effectors as a general bacterial monoglycosyltransferase for eukaryotic proteins	<i>Current Opinion in Structural Biology</i>	고은희	68	영국	Elsevier Ltd	SCI	2021-06-01	0959-440X	25%
32	A Novel Therapeutic Anti-ErbB3, ISU104 Exhibits Potent Antitumorigenic Activity by Inhibiting Ligand Binding and ErbB3 Heterodimerization	<i>Molecular Cancer Therapeutics</i>	홍미림 , 유영기	20(6)	미국	American Association for Cancer Research	SCI	2021-06-01	1535-7163	18%
33	Fungal brain infection modelled in a human-neurovascular-unit-on-a-chip with a functional blood-brain barrier	<i>Nature Biomedical Engineering</i>	김진, 이경태	5(8)	영국	Nature Research	SCI	2021-06-14	2157-846X	30%
34	Zinc-binding domain mediates pleiotropic functions of Yvh1 in <i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Journal of Microbiology</i>	진재형	59(7)	한국	The Microbiological Society Of Korea	SCI	2021-07-01	1225-8873	40%

35	Adenylyl Cyclase and Protein Kinase A Play Redundant and Distinct Roles in Growth, Differentiation, Antifungal Drug Resistance, and Pathogenicity of <i>Candida auris</i>	<i>mBio</i>	김지석	12(5)	미국	American Society for Microbiology	SCI	2021-10-19	2150-7511	20%
36	Development of a versatile copper-responsive gene expression system in the plant pathogenic fungus <i>Fusarium graminearum</i>	<i>Molecular Plant Pathology</i>	김시은	22	영국	Wiley-Blackwell on behalf of the British Society for Plant Pathology	SCI	2021-11-01	1464-6722	30%

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	MSK2018 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	이경태	2018-04-25	평창 알펜시아리조트 컨벤션 센터	대한민국
2	MSK2018 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	진재형	2018-04-26	평창 알펜시아리조트 컨벤션 센터	대한민국
3	MSK2018 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	소이슬	2018-04-26	평창 알펜시아리조트 컨벤션 센터	대한민국
4	MSK2018 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	김진영	2018-04-26	평창 알펜시아리조트 컨벤션 센터	대한민국
5	MSK2018 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	장은하	2018-04-26	평창 알펜시아리조트 컨벤션 센터	대한민국
6	MSK2018 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	이동필	2018-04-26	평창 알펜시아리조트 컨벤션 센터	대한민국
7	MSK2018 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	이승헌	2018-04-26	평창 알펜시아리조트 컨벤션 센터	대한민국
8	2018 KSM Spring International Meeting	소이슬	2018-05-10	양양 쉐비치호텔	대한민국
9	2018 KSM Spring International Meeting	장은하	2018-05-10	양양 쉐비치호텔	대한민국
10	2018 KSM Spring International Meeting	이승헌	2018-05-10	양양 쉐비치호텔	대한민국
11	2018 KSM Spring International Meeting	진재형	2018-05-10	양양 쉐비치호텔	대한민국
12	KMB 2018 45th Annual Meeting & International Symposium	소이슬	2018-06-27	여수 엑스포 컨벤션 센터	대한민국
13	KMB 2018 45th Annual Meeting & International Symposium	진재형	2018-06-27	여수 엑스포 컨벤션 센터	대한민국
14	KMB 2018 45th Annual Meeting & International Symposium	이승헌	2018-06-27	여수 엑스포 컨벤션 센터	대한민국
15	KMB 2018 45th Annual Meeting & International Symposium	장은하	2018-06-27	여수 엑스포 컨벤션 센터	대한민국
16	KMB 2018 45th Annual Meeting & International Symposium	반용선	2018-06-27	여수 엑스포 컨벤션 센터	대한민국
17	11th International Mycological Congress	이승헌	2018-07-17	산후안 푸에르토리코 컨벤션 센터	푸에르토리코
18	11th International Mycological Congress	이동기	2018-07-20	산후안 푸에르토리코 컨벤션 센터	푸에르토리코

19	11th International Mycological Congress	진재형	2018-07-20	산후안 푸에르토리코 컨벤션 센터	푸에르토리코
20	2018 International Symposium of SRC-MSS & CAU-RCBB	반용선	2018-08-24	서울 중앙대학교	대한민국
21	2018 International meeting of the federation of korean microbiological societies	장은하	2018-10-11	서울 더케이호텔	대한민국
22	2018 International meeting of the federation of korean microbiological societies	이경태	2018-10-11	서울 더케이호텔	대한민국
23	2018 International meeting of the federation of korean microbiological societies	진재형	2018-10-11	서울 더케이호텔	대한민국
24	2018 International meeting of the federation of korean microbiological societies	이승현	2018-10-11	서울 더케이호텔	대한민국
25	2018 International meeting of the federation of korean microbiological societies	소이슬	2018-10-11	서울 더케이호텔	대한민국
26	2018 International meeting of the federation of korean microbiological societies	김진영	2018-10-11	서울 더케이호텔	대한민국
27	2018 International meeting of the federation of korean microbiological societies	반용선	2018-10-12	서울 더케이호텔	대한민국
28	KBM2018 45th Annual Meeting and International Symposium	홍리나, 부이득쿠옹, 신지연, 박지연, 신유호, 장혜원, 최경자, 이인원, 손호경	2018-06-28	여수 엑스포컨벤션센터	대한민국
29	KBM2018 45th Annual Meeting and International Symposium	김정은, 남혜진, 이인원, 손호경	2018-06-28	여수 엑스포컨벤션센터	대한민국
30	2018 한국곰팡이독소연구회 심포지엄 및 총회	손호경	2018-07-05	오크우드 프리미어 코엑스 센터 서울	대한민국
31	2018 한국미생물학회연합 국제학술대회	박애란, 부이득쿠옹, 김정은, 임재윤, 신찬석, 최경자, 서정아, 이인원, 손호경	2018-10-11	더 케이호텔	대한민국
32	한국미생물학회	주윤희	2018-04-25	평창알펜시아	대한민국
33	한국미생물학회	진현수	2018-04-25	평창알펜시아	대한민국
34	한국미생물생명공학회	장현하	2018-06-27	여수엑스포	대한민국
35	한국미생물생명공학회	진현수	2018-06-27	여수엑스포	대한민국
36	Extremophiles 2018	진현수	2018-09-17	이스키아	이탈리아
37	Extremophiles 2018	주윤희	2018-09-19	이스키아	이탈리아
38	KMB 2018 45th Annual Meeting & International Symposium	김신연, 윤성호	2018-06-29	여수 엑스포컨벤션센터	대한민국
39	KMB 2018 45th Annual Meeting & International Symposium	김한설, 윤성호	2018-06-29	여수 엑스포컨벤션센터	대한민국
40	KMB 2018 45th Annual Meeting & International Symposium	김영신, 윤성호	2018-06-29	여수 엑스포컨벤션센터	대한민국
41	2019년 한국미생물·생명공학회 동계심포지움	이동기	2019-01-14	용평리조트	대한민국
42	2019년 한국미생물·생명공학회 동계심포지움	진재형	2019-01-14	용평리조트	대한민국

43	2019년 한국미생물·생명공학회 동계심포지움	이승헌	2019-01-14	용평리조트	대한민국
44	2019년 한국미생물·생명공학회 동계심포지움	김진영	2019-01-14	용평리조트	대한민국
45	2018 BK21 PLUS Research Symposium	이승헌	2019-01-29	연세대학교	대한민국
46	제22회 진균유전생물 컨퍼런스	이경태	2019-02-14	덕산 리솜리조트	대한민국
47	제22회 진균유전생물 컨퍼런스	진재형	2019-02-14	덕산 리솜리조트	대한민국
48	제22회 진균유전생물 컨퍼런스	이승헌	2019-02-14	덕산 리솜리조트	대한민국
49	제22회 진균유전생물 컨퍼런스	김진영	2019-02-14	덕산 리솜리조트	대한민국
50	BK21 플러스 시스템 생물학 기반 연구소 세미나	이경태	2019-02-22	연세대학교	대한민국
51	30 <sup>th</sup> Fungal Genetics Conference	반용선	2019-03-13	Pacific Grove, California	미국
52	30 <sup>th</sup> Fungal Genetics Conference	이경태	2019-03-13	Pacific Grove, California	미국
53	30 <sup>th</sup> Fungal Genetics Conference	진재형	2019-03-13	Pacific Grove, California	미국
54	30 <sup>th</sup> Fungal Genetics Conference	이승헌	2019-03-13	Pacific Grove, California	미국
55	30 <sup>th</sup> Fungal Genetics Conference	김진영	2019-03-13	Pacific Grove, California	미국
56	2019 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	반용선	2019-04-17	ICC Jeju	대한민국
57	2019 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	이경태	2019-04-17	ICC Jeju	대한민국
58	2019 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	진재형	2019-04-17	ICC Jeju	대한민국
59	2019 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	이승헌	2019-04-17	ICC Jeju	대한민국
60	2019 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	김진영	2019-04-17	ICC Jeju	대한민국
61	2019 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	이민재	2019-04-17	ICC Jeju	대한민국
62	2 <sup>nd</sup> Antifungal Drug Discovery Symposium	반용선	2019-05-09	Duke University	미국
63	46 <sup>th</sup> Annual Meeting & International Symposium	반용선	2019-06-23	ICC Jeju	대한민국
64	46 <sup>th</sup> Annual Meeting & International Symposium	장유병	2019-06-23	ICC Jeju	대한민국
65	46 <sup>th</sup> Annual Meeting & International Symposium	최예슬	2019-06-23	ICC Jeju	대한민국
66	Annual Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies	이경태	2019-10-25	세종대학교 컨벤션센터	대한민국
67	Annual Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies	진재형	2019-10-25	세종대학교 컨벤션센터	대한민국
68	Annual Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies	이승헌	2019-10-25	세종대학교 컨벤션센터	대한민국
69	Annual Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies	김진영	2019-10-25	세종대학교 컨벤션센터	대한민국

70	Annual Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies	이민재	2019-10-25	세종대학교 컨벤션센터	대한민국
71	Annual Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies	장유병	2019-10-25	세종대학교 컨벤션센터	대한민국
72	Annual Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies	최예슬	2019-10-25	세종대학교 컨벤션센터	대한민국
73	제22회 진균유전생물 컨퍼런스	김정은	2019.02.14	덕산 리솜스파캐슬	대한민국
74	제22회 진균유전생물 컨퍼런스	박지연	2019.02.14	덕산 리솜스파캐슬	대한민국
75	30th Fungal Genetics Conference	김시은	2019.03.13	Asilomar Conference Ground	미국
76	30th Fungal Genetics Conference	김정은	2019.03.13	Asilomar Conference Ground	미국
77	30th Fungal Genetics Conference	박지연	2019.03.13	Asilomar Conference Ground	미국
78	30th Fungal Genetics Conference	최소영	2019.03.13	Asilomar Conference Ground	미국
79	한국식물병리학회 추계 학술대회	최소영	2019.10.18	나주 증흥스파캐슬	대한민국
80	2019년도 한국미생물학회 창립 60주년 기념 국제학술대회	전민호	2019.04.18	제주국제컨벤션센터	대한민국
81	2019년도 한국식물병리학회 춘계 학술대회	김시은	2019.04.25	부산 웨스틴 조선호텔	대한민국
82	2019년도 한국식물병리학회 춘계 학술대회	박지연	2019.04.25	부산 웨스틴 조선호텔	대한민국
83	한국미생물생명공학회	라재원	2019.06.23.-25	제주	대한민국
84	한국미생물생명공학회	이지영	2019.06.23.-25	제주	대한민국
85	한국식품과학회	김경수	2019.06.26.-28	인천	대한민국
86	한국식품과학회	성재윤	2019.06.26.-28	인천	대한민국
87	Thermophiles 2019	박수영	2019.09.02.-06	후쿠오카	일본
88	Thermophiles 2019	라재원	2019.09.02.-06	후쿠오카	일본
89	2019년 한국구조생물학회 연례학술대회	박준배, 유영기, 최명경, 조현수	2019.07.04	제주도	대한민국
90	2019년 한국구조생물학회 연례학술대회	김국래, 차정석, 김호영, 장념평, 조현수	2019.07.04	제주도	대한민국
91	2020년 한국미생물·생명공학회 동계심포지움	반용선	2020.01.14	용평리조트 드래곤밸리호텔 그랜드볼룸	대한민국
92	2020년 한국미생물·생명공학회 동계심포지움	장유병	2020.01.14	용평리조트 드래곤밸리호텔 그랜드볼룸	대한민국
93	2020년 한국미생물·생명공학회 동계심포지움	이민재	2020.01.14	용평리조트 드래곤밸리호텔 그랜드볼룸	대한민국
94	2020년 한국미생물·생명공학회 동계심포지움	김진영	2020.01.14	용평리조트 드래곤밸리호텔 그랜드볼룸	대한민국
95	2020년 한국미생물·생명공학회 동계심포지움	최예슬	2020.01.14	용평리조트 드래곤밸리호텔 그랜드볼룸	대한민국
96	2020년 한국미생물·생명공학회 동계심포지움	진재형	2020.01.14	용평리조트 드래곤밸리호텔 그랜드볼룸	대한민국
97	제 23회 진균유전생물 컨퍼런스	반용선	2020.02.06	덕산 리솜리조트캐슬	대한민국
98	제 23회 진균유전생물 컨퍼런스	김진영	2020.02.06	덕산 리솜리조트캐슬	대한민국

99	제 23회 진균유전생물 컨퍼런스	이경태	2020.02.06	덕산 리솜리조트캐슬	대한민국
100	제 23회 진균유전생물 컨퍼런스	이민재	2020.02.06	덕산 리솜리조트캐슬	대한민국
101	제 23회 진균유전생물 컨퍼런스	장유병	2020.02.06	덕산 리솜리조트캐슬	대한민국
102	제 23회 진균유전생물 컨퍼런스	진재형	2020.02.06	덕산 리솜리조트캐슬	대한민국
103	제 23회 진균유전생물 컨퍼런스	최예슬	2020.02.06	덕산 리솜리조트캐슬	대한민국
104	15 <sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics	김진영	2020.02.18	Sapienza University of Rome	이탈리아
105	15 <sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics	이경태	2020.02.18	Sapienza University of Rome	이탈리아
106	15 <sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics	이민재	2020.02.18	Sapienza University of Rome	이탈리아
107	15 <sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics	장유병	2020.02.18	Sapienza University of Rome	이탈리아
108	15 <sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics	진재형	2020.02.18	Sapienza University of Rome	이탈리아
109	15 <sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics	최예슬	2020.02.18	Sapienza University of Rome	이탈리아
110	2020 (사)한국균학회 정기학술대회 및 임시총회	반용선	2020.08.21	소노벨 변산	대한민국
111	2020 (사)한국균학회 정기학술대회 및 임시총회	장유병	2020.08.20	소노벨 변산	대한민국
112	2020 (사)한국균학회 정기학술대회 및 임시총회	유성룡	2020.08.20	소노벨 변산	대한민국
113	2020 (사)한국균학회 정기학술대회 및 임시총회	최진태	2020.08.20	소노벨 변산	대한민국
114	2020 Annual Meeting of the Microbiological Society of Korea	반용선	2020.10.07	e-conference	대한민국
115	2020 Annual Meeting of the Microbiological Society of Korea	김지석	2020.10.07	e-conference	대한민국
116	2020 Annual Meeting of the Microbiological Society of Korea	김진영	2020.10.07	e-conference	대한민국
117	2020 Annual Meeting of the Microbiological Society of Korea	유성룡	2020.10.07	e-conference	대한민국
118	2020 Annual Meeting of the Microbiological Society of Korea	이경태	2020.10.07	e-conference	대한민국
119	2020 Annual Meeting of the Microbiological Society of Korea	이경태	2020.10.07	e-conference	대한민국
120	2020 Annual Meeting of the Microbiological Society of Korea	이승헌	2020.10.07	e-conference	대한민국
121	2020 Annual Meeting of the Microbiological Society of Korea	장유병	2020.10.07	e-conference	대한민국
122	2020 Annual Meeting of the Microbiological Society of Korea	진재형	2020.10.07	e-conference	대한민국
123	2020 Annual Meeting of the Microbiological Society of Korea	최예슬	2020.10.07	e-conference	대한민국
124	The 23rd Fungal Genetics and Biology Conference of the Microbiological Society of Korea	손호경	2020.02.06	덕산 리솜스파캐슬	대한민국

125	15th European Conference on Fungal Genetics	문희지	2020.02.17	Sapienza University of Rome	이탈리아
126	한국식품공학회	이동우	2020.07.01	광주 (김대중컨벤션센터)	대한민국
127	한국식품공학회	주윤희	2020.07.01	광주 (김대중컨벤션센터)	대한민국
128	한국미생물생명공학회	라재원	2020.09.23	부산 (온라인)	대한민국
129	한국미생물생명공학회	이에나	2020.09.23	부산 (온라인)	대한민국
130	한국미생물학회	이동우	2020.10.7	군산 (온라인)	대한민국
131	IMS2020	김지석	2020.11.16	e-conference	대한민국
132	IMS2020	김진영	2020.11.16	e-conference	대한민국
133	IMS2020	유성룡	2020.11.16	e-conference	대한민국
134	IMS2020	이경태	2020.11.16	e-conference	대한민국
135	IMS2020	장유병	2020.11.16	e-conference	대한민국
136	IMS2020	진재형	2020.11.16	e-conference	대한민국
137	IMS2020	최예슬	2020.11.16	e-conference	대한민국
138	IMS2020	최진태	2020.11.16	e-conference	대한민국
139	IMS2020	반용선	2020.11.16	e-conference	대한민국
140	KMB2021 Winter Symposium	김지석	2021.02.18	부산 호텔아쿠아펠리스 오리온홀	대한민국
141	KMB2021 Winter Symposium	김진영	2021.02.18	부산 호텔아쿠아펠리스 오리온홀	대한민국
142	KMB2021 Winter Symposium	김태현	2021.02.18	부산 호텔아쿠아펠리스 오리온홀	대한민국
143	KMB2021 Winter Symposium	유성룡	2021.02.18	부산 호텔아쿠아펠리스 오리온홀	대한민국
144	KMB2021 Winter Symposium	최진태	2021.02.18	부산 호텔아쿠아펠리스 오리온홀	대한민국
145	KMB2021 Winter Symposium	이경태	2021.02.18	부산 호텔아쿠아펠리스 오리온홀	대한민국
146	KMB2021 Winter Symposium	이승헌	2021.02.18	부산 호텔아쿠아펠리스 오리온홀	대한민국
147	KMB2021 Winter Symposium	장유병	2021.02.18	부산 호텔아쿠아펠리스 오리온홀	대한민국
148	KMB2021 Winter Symposium	최예슬	2021.02.18	부산 호텔아쿠아펠리스 오리온홀	대한민국
149	2021년(사)한국균학회 춘계학술대회	김진영	2021.05.20	부산 벅스코	대한민국
150	2021년(사)한국균학회 춘계학술대회	유성룡	2021.05.20	부산 벅스코	대한민국
151	2021년(사)한국균학회 춘계학술대회	이승헌	2021.05.20	부산 벅스코	대한민국
152	2021년(사)한국균학회 춘계학술대회	장유병	2021.05.20	부산 벅스코	대한민국
153	2021년(사)한국균학회 춘계학술대회	최진태	2021.05.20	부산 벅스코	대한민국
154	2020 Annual Meeting of the Korean Society for Glycoscience	문희지	2021.01.07	e-conference	대한민국
155	2021 KSPG Spring Online Conference	손호경	2021.04.23	e-conference	대한민국



156	2021 KSPP Spring Online Conference	김시은	2021.04.23	e-conference	대한민국
157	2021 KSM Spring Meeting	손호경	2021.05.22	부산 BEXCO	대한민국
158	2021 KSM Spring Meeting	최예진	2021.05.22	부산 BEXCO	대한민국
159	한국생물공학회	성재운	2021.04.14	제주 라마다 호텔	대한민국
160	World Microbe Forum	유수진	2021.06.20	e-conference	미국/유럽
161	World Microbe Forum	김지석	2021.06.20	e-conference	미국/유럽
162	World Microbe Forum	김진영	2021.06.20	e-conference	미국/유럽
163	World Microbe Forum	유성룡	2021.06.20	e-conference	미국/유럽
164	World Microbe Forum	이경태	2021.06.20	e-conference	미국/유럽
165	World Microbe Forum	이승헌	2021.06.20	e-conference	미국/유럽
166	World Microbe Forum	이유진	2021.06.20	e-conference	미국/유럽
167	World Microbe Forum	장유병	2021.06.20	e-conference	미국/유럽
168	World Microbe Forum	최예슬	2021.06.20	e-conference	미국/유럽
169	World Microbe Forum	최진태	2021.06.20	e-conference	미국/유럽
170	KMB 2021 48th Annual Meeting & International Symposium	김지석	2021.06.23	부산 벅스코	대한민국
171	KMB 2021 48th Annual Meeting & International Symposium	김진영	2021.06.23	부산 벅스코	대한민국
172	KMB 2021 48th Annual Meeting & International Symposium	유성룡	2021.06.23	부산 벅스코	대한민국
173	KMB 2021 48th Annual Meeting & International Symposium	유수진	2021.06.23	부산 벅스코	대한민국
174	KMB 2021 48th Annual Meeting & International Symposium	이승헌	2021.06.23	부산 벅스코	대한민국
175	KMB 2021 48th Annual Meeting & International Symposium	장유병	2021.06.23	부산 벅스코	대한민국
176	KMB 2021 48th Annual Meeting & International Symposium	최예슬	2021.06.23	부산 벅스코	대한민국
177	KMB 2021 48th Annual Meeting & International Symposium	최진태	2021.06.23	부산 벅스코	대한민국
178	KMB 2021 48th Annual Meeting & International Symposium	이경태	2021.06.24	부산 벅스코	대한민국
179	World Microbe Forum	반용선	2021.06.24	e-conference	미국/유럽
180	한국미생물학회	주운혜	2021.08.27	창원 CECO	대한민국
181	한국미생물생명공학회	성재운	2021.06.23	부산 벅스코	대한민국
182	2021 한국미생물학회 국제학술대회	김지석	2021.08.25	창원컨벤션센터	대한민국
183	2021 한국미생물학회 국제학술대회	김진영	2021.08.25	창원컨벤션센터	대한민국
184	2021 한국미생물학회 국제학술대회	김태현	2021.08.25	창원컨벤션센터	대한민국
185	2021 한국미생물학회 국제학술대회	유성룡	2021.08.25	창원컨벤션센터	대한민국
186	2021 한국미생물학회 국제학술대회	유수진	2021.08.25	창원컨벤션센터	대한민국
187	2021 한국미생물학회 국제학술대회	이경태	2021.08.25	창원컨벤션센터	대한민국
188	2021 한국미생물학회 국제학술대회	이승헌	2021.08.25	창원컨벤션센터	대한민국
189	2021 한국미생물학회 국제학술대회	장유병	2021.08.25	창원컨벤션센터	대한민국
190	2021 한국미생물학회 국제학술대회	최예슬	2021.08.25	창원컨벤션센터	대한민국
191	2021 한국미생물학회 국제학술대회	최진태	2021.08.25	창원컨벤션센터	대한민국

192	2021 한국미생물학회 국제학술대회	진재형	2021.08.25	창원컨벤션센터	대한민국
193	2021년 한국균학회 추계학술대회 및 한일균학공동심포지움	유성룡	2021.10.28	전남대학교 광주캠퍼스 용봉홀	대한민국
194	2021년 한국균학회 추계학술대회 및 한일균학공동심포지움	장유병	2021.10.28	전남대학교 광주캠퍼스 용봉홀	대한민국
195	2021년 한국균학회 추계학술대회 및 한일균학공동심포지움	이경태	2021.10.28	전남대학교 광주캠퍼스 용봉홀	대한민국
196	47th Annual Meeting and Symposium	김지석	2020.09.24	e-Conference	대한민국
197	47th Annual Meeting and Symposium	최예슬	2020.09.24	e-Conference	대한민국
198	2021 제 6회 엠마이옴 국제 컨퍼런스	김지석	2021.12.10	연세대학교 백양누리	대한민국
199	2021 제 6회 엠마이옴 국제 컨퍼런스	유성룡	2021.12.10	연세대학교 백양누리	대한민국
200	2021 제 6회 엠마이옴 국제 컨퍼런스	장유병	2021.12.10	연세대학교 백양누리	대한민국
201	2021 제 6회 엠마이옴 국제 컨퍼런스	최예슬	2021.12.10	연세대학교 백양누리	대한민국
202	2021 제 6회 엠마이옴 국제 컨퍼런스	김태현	2021.12.10	연세대학교 백양누리	대한민국
203	2021 제 6회 엠마이옴 국제 컨퍼런스	유수진	2021.12.10	연세대학교 백양누리	대한민국
204	2021 제 6회 엠마이옴 국제 컨퍼런스	김진영	2021.12.10	연세대학교 백양누리	대한민국
205	2021 제 6회 엠마이옴 국제 컨퍼런스	최진태	2021.12.10	연세대학교 백양누리	대한민국
206	2021 제 6회 엠마이옴 국제 컨퍼런스	이승현	2021.12.10	연세대학교 백양누리	대한민국
207	2021 제 6회 엠마이옴 국제 컨퍼런스	김도현	2021.12.10	연세대학교 백양누리	대한민국
208	KBM2021 48th Annual Meeting & International Symposium	손호경	2021.06.24	부산 BEXCO	대한민국
209	KBM2021 48th Annual Meeting & International Symposium	최소영	2021.06.24	부산 BEXCO	대한민국
210	2021 제 6회 엠마이옴 국제 컨퍼런스	성재운	2021.12.10	연세대학교 백양누리	대한민국
211	2021 제 6회 엠마이옴 국제 컨퍼런스	주윤희	2021.12.10	연세대학교 백양누리	대한민국
212	2021 제 6회 엠마이옴 국제 컨퍼런스	이동우	2021.12.10	연세대학교 백양누리	대한민국

#### □ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

#### □ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	동물 병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Hob1	iGEM-0000985	iGEM	2019.11.07
2	동물 병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Rad53	iGEM-0000986	iGEM	2019.11.07
3	동물 병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Chk1	iGEM-0000987	iGEM	2019.11.07
4	동물 병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Tor1	iGEM-0000988	iGEM	2019.11.07
5	동물 병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i> Tlk1	iGEM-0000989	iGEM	2019.11.07
6	타가토스 자화능을 가진 최초 대장균의 유전체	igem-0000944	iGEM	2019.11.06
7	Tagatose SNP1	iGEM-0000936	iGEM	2019.11.06
8	Tagatose SNP2	iGEM-0000937	iGEM	2019.11.06
9	H99 및 R265의 야생형 및 <i>hob1Δ</i> 변이균주 전사체 분석	igem-0000797	iGEM	2019.10.31
10	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 병원성을 조절하는 탈인산화효소 <i>CAC1</i> 발굴	iGEM-0000366	iGEM	2019.02.08
11	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 병원성을 조절하는 인산화효소 <i>CKA1</i>	iGEM-0000368	iGEM	2019.02.08
12	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 병원성을 조절하는 탈인산화효소 <i>CNA1</i> 발굴	iGEM-0000360	iGEM	2019.02.08
13	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 병원성을 조절하는 탈인산화효소 <i>DBR1</i> 발굴	iGEM-0000362	iGEM	2019.02.08
14	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 병원성을 조절하는 탈인산화효소 <i>INP5201</i> 발굴	iGEM-0000361	iGEM	2019.02.08
15	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 병원성을 조절하는 탈인산화효소 <i>OCA101</i> 발굴	iGEM-0000358	iGEM	2019.02.08
16	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 병원성을 조절하는 탈인산화효소 <i>PHS1</i> 발굴	iGEM-0000367	iGEM	2019.02.08
17	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 병원성을 조절하는 탈인산화효소 <i>SSU72</i> 발굴	iGEM-0000365	iGEM	2019.02.08
18	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 병원성을 조절하는 탈인산화효소 <i>TPS2</i> 발굴	iGEM-0000359	iGEM	2019.02.08
19	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 병원성을 조절하는 탈인산화효소 <i>VPS29</i> 발굴	iGEM-0000363	iGEM	2019.02.08
20	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 병원성을 조절하는 탈인산화효소 <i>YVH1</i> 발굴	iGEM-0000369	iGEM	2019.02.08
21	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 병원성을 조절하는 탈인산화효소 <i>SIW14</i> 발굴	iGEM-0000357	iGEM	2019.01.31
22	타가토스 영양요구성 BL21 (DE3)의 전장유전체 서열	iGEM-0000166	iGEM	2018.11.20
23	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 병원성을 조절하는 탈인산화효소 <i>PSR1</i> 발굴	iGEM-0000364	iGEM	2019.02.28
24	유전체 분석 기반 GRAS 균주 유래 Type II Asparaginase 발굴	iGEM-0002102	iGEM	2020.10.30
25	난분해성 바이오매스 분해균주의 Glucose배지 transcriptome 분석	iGEM-0002078	iGEM	2020.10.28
26	유전체 분석 기반 GRAS 균주 유래 Type II Asparaginase 발굴 2	iGEM-0002103	iGEM	2020.10.30
27	난분해성 바이오매스 분해균주의 Peptone 배지 transcriptome 분석	iGEM-0002079	iGEM	2020.10.28
28	난분해성 바이오매스 분해균주의 Tryptone 배지 transcriptome 분석	iGEM-0002080	iGEM	2020.10.28
29	난분해성 바이오매스 분해균주의 Feather 배지 transcriptome 분석	iGEM-0002076	iGEM	2020.10.28
30	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 병원성 및 뇌감염을 조절하는 탈인산화효소 신호전달체계	iGEM-0002123	iGEM	2020.11.11
31	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 뇌 감염에 관여하는 탈인산화효소 <i>XPP1</i>	iGEM-0002122	iGEM	2020.11.11
32	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 뇌 감염에 관여하는 탈인산화효소 <i>GDA1</i>	iGEM-0002121	iGEM	2020.11.11
33	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 뇌 감염에 관여하는 탈인산화효소 <i>SIT4</i>	iGEM-0002120	iGEM	2020.11.11
34	동물 병원성 진균 <i>Candida auris</i> <i>CYR1</i>	iGEM-0002119	iGEM	2020.11.11

35	동물 병원성 진균 <i>Candida auris</i> BCY1	iGEM-0002116	iGEM	2020.11.11
36	동물 병원성 진균 <i>Candida auris</i> TPK1	iGEM-0002117	iGEM	2020.11.11
37	동물 병원성 진균 <i>Candida auris</i> TPK2	iGEM-0002118	iGEM	2020.11.11
38	갈락토스 이성화효소 발현 유전자가 결여된 희귀당 자화균주의 전장유전체 서열	iGEM-0002248	iGEM	2021.11.10
39	Functional dissection of the regulatory mechanism of the atypical AP-1-like transcription factor, Yap1, in <i>Cryptococcus neoformans</i>	GSE136832	NCBI	2019.11.07
40	Rad53- and Chk1-Dependent DNA Damage Response Pathways Cooperatively Promote Fungal Pathogenesis and Modulate Antifungal Drug Susceptibility	GSE117227	NCBI	2018.12.04
41	Transcriptomic and Metabolomic Analysis Revealed Roles of Yck2 in Carbon Metabolism and Morphogenesis of <i>Candida albicans</i>	GSE138069	NCBI	2019.09.26
42	Unravelling of the novel melanin biosynthesis-signalling networks in <i>Cryptococcus neoformans</i>	GSE131891	NCBI	2019.05.30
43	Effect of the ATB1651 towards to fungi	GSE161314	NCBI	2020.11.12
44	The TOR pathway plays pleiotropic roles in growth and stress responses of the fungal pathogen <i>Cryptococcus neoformans</i>	GSE129227	NCBI	2019.04.03
45	Human neurovascular unit chip with a functional blood-brain barrier models brain-infection mechanism of a fungal meningitis pathogen	GSE171937	NCBI	2021.04.13

## [기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록 일	등록 번호		
1	변형된 당 대사 경로를 갖는 재조합 균주 및 이를 이용한 당이성화 효소의 스크리닝 방법	대한민국	경북대학 교 산학협력 단	2017. 04.06	10-2017 -004474 0	10-1979 213	경북대학교 산학협력단	2019. 05.01	10-1979 213	33.3	활용예 정
2	뇌수막뇌염 유발 진균의 뇌-혈관 장벽 통과 및 뇌-내부 생존 관련 유전자의 용도	대한민국	연세대학 교 산학협력 단	2019-09 -18	10-2019 -011479 7					20	기술이 전완료
3	변형된 당 대사 경로를 갖는 재조합 균주 및 이를 이용한 당이성화 효소의 스크리닝 방법	유럽연합	경북대학 교 산학협력 단	2019.10. 04	1788291 7.2					33.3	활용예 정
4	변형된 당 대사 경로를 갖는 재조합 균주 및 이를 이용한 당이성화 효소의 스크리닝 방법	미국	경북대학 교 산학협력 단	2019.10 .04	16/603, 116					33.3	활용예 정
5	신규 화합물 및 이를 포함하는 진균감염 치료용 약학적 조성물	대한민국					이화여자대학 교 산학협력단, 연세대학교 산학협력단, 인트론바이오 테크놀로지	2020. 05.04	1021091 680000	6.6	활용예 정
6	진균 감염 치료 및 예방을 위한 신규 포스파타아제 및 이들의 용도	대한민국	연세대학 교 산학협력 단	2020-05 -08	1020200 055355					33	활용예 정
7	신규 화합물 및 이를 포함하는 신경계 질환 치료용 약학적 조성물	대한민국					주식회사 인트론바이오 테크놀로지	2020. 07.10	10-2134 782	4.95	활용예 정

8	변형된 당 대사 경로를 갖는 재조합 균주를 이용한 당이성화 효소의 스크리닝 방법	대한민국	경북대학교 산학협력단	2018.12.17	10-2018-0163575	10-2007890	경북대학교 산학협력단	2019.07.31	1020078900000	33.3	활용예정
9	크립토크코스 네오포르만스의 O-만노실화를 조절하는 포스파타아제 및 이를 이용한 항진균제 스크리닝 방법	대한민국	연세대학교 산학협력단	2021.04.01	10-2021-0042536					33	활용예정
10	크립토크코스 네오포르만스의 혈액뇌장벽 통과를 조절하는 포스파타아제 및 이를 이용한 항진균제 스크리닝 방법	대한민국	연세대학교 산학협력단	2021.04.01	10-2021-0042533					33	활용예정
11	크립토크코스 네오포르만스의 다당류 캡슐 생산을 조절하는 포스파타아제 및 이를 이용한 항진균제 스크리닝 방법	대한민국	연세대학교 산학협력단	2021.04.01	10-2021-0042532					33	활용예정
12	크립토크코스 네오포르만스의 세포막 안정성을 조절하는 포스파타아제 및 이를 이용한 항진균제 스크리닝 방법	대한민국	연세대학교 산학협력단	2021.04.01	10-2021-0042535					33	활용예정
13	크립토크코스 네오포르만스의 멜라닌 생산을 조절하는 포스파타아제 및 이를 이용한 항진균제 스크리닝 방법	대한민국	연세대학교 산학협력단	2021.04.01	10-2021-0042531					33	활용예정
14	크립토크코스 네오포르만스의 체온에 대한 내열성을 조절하는 포스파타아제 및 이를 이용한 항진균제 스크리닝 방법	대한민국	연세대학교 산학협력단	2021.04.01	10-2021-0042530					33	활용예정
15	크립토크코스 네오포르만스의 DNA 손상 반응을 조절하는 포스파타아제 및 이를 이용한 항진균제 스크리닝 방법	대한민국	연세대학교 산학협력단	2021.04.01	10-2021-0042534					33	활용예정
16	희귀당 비대사성 균주의 희귀당 자화능 결정 유전자군 제공방법	대한민국	연세대학교 산학협력단	2021.06.01	10-2021-0070803					40	활용예정
17	프록토오스 대사 유전체가 돌연변이된 균주	대한민국	연세대학교 산학협력단	2021.06.04	10-2021-0076939					40	활용예정
18	프록토오스/타가토오스에 피머화 효소가 돌연변이된 균주	대한민국	연세대학교 산학협력단	2021.06.14	10-2021-0076938					40	활용예정
19	퍼비도박테리움 아이슬란드icum AW-1 유래 신규한 케라틴 분해 효소 및 그의 이용	중국	경북대학교 산학협력단	2017.03.06	201580047833.6		경북대학교 산학협력단	2021.12.24	2021122100161240	-	활용예정

○ 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			√	√						
3			√	√						
4			√	√						
5			√	√						
6			√	√						
7			√	√						
8			√	√						
9			√	√						
10			√	√						
11			√	√						
12			√	√						
13			√	√						
14			√	√						
15			√	√						
16			√	√						
17			√	√						
18			√	√						
19			√	√						

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

표준화

○ 국내 표준

번호	인증구분 <sup>1)</sup>	인증여부 <sup>2)</sup>	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 <sup>3)</sup>	제안/인증일자

\* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제 표준

번호	표준화단계구분 <sup>1)</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2)</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3)</sup>	제안자	표준화 번호	제안일자

\* 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국

- 제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.  
 \* 2」 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.  
 \* 3」 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	전용실시권	뇌수막염 유발 진균의 뇌-혈관 장벽 통과 및 뇌-내부 생존 관련 유전자의 용도	(주)엠텍스바이오	2020.01.20	55,000,000 원	55,000,000 원

\* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

- \* 1」 기술이전 또는 자기실시  
 \* 2」 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등  
 \* 3」 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
	국외				
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			yyyy년	yyyy년	
합계					

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력		
		생산인력		
	개발 후	연구인력		
		생산인력		

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							



□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원
1	차세대 염기서열분석법(NGS) 의 개념과 이를 이용한 FINDER전략을 활용한 유용유전자원 탐색기술에 대한 소개와 현황	2018.04.30	바이오벤처타운	(주)뉴트리 (NEWTREE) 서울사무소 제1세미나실	10
2	Proteomic Analysis of Relationships between Atopic Dermatitis and the Enteric Microbiome in Pediatric Patients	2019.08.30	연구자	연세대학교 과학관 과B133	50
3	Systematic Functional Analysis of Fungal Pathogenicity-Relat ed Signaling Networks	2019.08.30	연구자	연세대학교 과학관 과B133	50
4	(주)엠틱스바이오 사의 항진균제 개발과 관련하여 항진균활성 효능평가를 위한 평가대상 진균과 활성 평가방법, 평가자료 분석에 대한 기술자문을 수행하였음.	2020.01.01.-2020.1 2.31	(주)엠틱스바이오 연구원	(주)엠틱스바이오	20
5	미래 바이오 분야의 차세대 성장 동경으로 주목받고 있는 마이크로바이옴을 이용한 치료제 개발과 기술 현황에 대한 워크샵을 진행함.	2020.07.09	관련 연구원	(주)리스크어바이오사 이언스 본점	20
6	(주)엠틱스바이오에 서 실습 진행중인 연세대학교 테크노프레너쉽 학생을 대상으로 병원성 진균에 대한 이해와 항진균제 개발 연구방법에 관한 교육지도 세미나를 진행하였음.	2020.07.20	(주)엠틱스바이오 연구원 및 연세대학교 테크노프레너쉽 현장실습 학생	(주)엠틱스바이오 회의실	20
7	항진균 약물 타겟 발굴전략 및 신규 항진균제 스크리닝 기술 교류 Systematic functional analysis of fungal pathogenicity signaling networks and development of novel antifungal drugs	2018.06.12	관련 연구원	CJ BLOSSOM PARK 3층 포럼룸	40

8	(주)엠텍스바이오의 항진균 개발과 관련하여 손발톱 무좀제형의 packaging 안정성 평가기준과 평가 방법, 자료분석에 대해 (주)엠텍스바이오의 연구원들을 대상으로 하여 기술자문을 시행하였음.	2021.05.14	(주)엠텍스바이오 연구원	(주)엠텍스바이오	20
---	---	------------	---------------	-----------	----

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	석사학위 (이동필, 김한설)	2018		2			2		2				
2	석사학위 (장은하, ONG XIANG YU BELINDA)	2019		2				2	2				
3	박사학위 (소이슬, 박준배)	2019	2				1	1	2				
4	바이오기업 이직 (이동기박사, 박수영 박사)	2019	2				1	1	2				
5	석사학위 (이민재, 김경수)	2020	2				1	1	2				
6	연구교수 (이경태박사)	2020	1				1		1				
7	박사학위 (진재형)	2021	1				1		1				

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	기타	식품저널뉴스	농식품부, 18일 농림축산식품과학기술대상 시상식	2018.10.17
2	지방전문지	농기자재신문	곰팡이 멜라닌 생합성 조절 신호전달 네트워크 규명	2019.10.11
3	Internet/PC 통신	국민체감형 연구성과	곰팡이는 어떻게 뇌로 갔을까?	2020.03.31
4	중앙일간지	이데일리	연세대 반응선 교수팀, 곰팡이 감염증 조절 탈인산화효소 발굴	2020.08.25
5	Internet/PC 통신	연합뉴스	필요한 물질만 선택적으로 투과시키는 혈뇌장벽 본뜬 칩 개발	2021.06.15
6	Internet/PC 통신	YTN 사이언스	혈뇌장벽 모사 인공 칩 개발..뇌염 유발 유전자 규명	2021.06.15
7	Internet/PC 통신	JTBC	인공 혈뇌장벽 칩 개발 ... 뇌수막염 유발 곰팡이 기전 확인	2021.06.15

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	수상	poster award	This award is presented to the above individual in recognition of his outstanding poster presentation entitled "systematic functional profiling of phosphatases in the human fungal pathogen <i>Cryptococcus neoformans</i> " during the 2018 International Meeting of the Microbiological Society of Korea held on April 25-27, 2018 in Pyeong Chang, Korea	진재형	2018.04.27	한국미생물학회
2	수상	우재 유주현 학술상	귀하는 생물소재 개발 및 산업화 연구 분야에서 창의적이고 탁월한 연구 활동으로 미생물생명공학 발전에 크게 이바지한 업적이 인정되어 우재학술상 수상자로 선정되었기에 이 상장을 수여합니다.	반용선	2018.07.30	한국미생물생명공학회
3	수상	농림축산식품기 술대상 장관표창	농림축산식품 과학기술 개발 및 보급을 통하여 농림축산식품 산업발전에 이바지한 공로	반용선	2018.10.19	농림축산식품부

4	수상	구두발표 장려상	상기 회원은 2019년도 동계 심포지움에서 "Genome-wide Functional profiling of phosphatase networks in Fungal Pathogen <i>Cryptococcus neoformans</i> "의 제목으로 우수한 논문을 발표하였으므로 이에 우수 구두 발표상을 드립니다.	진재형	2019.01.15	한국미생물생 명공학회
5	수상	Poster award	This award is presented to the above individual in recognition of outstanding poster presentation entitled "Unveiling of Complex Signaling Networks that are Involved in the Developmental Process of <i>Cryptococcus neoformans</i> , C024" at the International Meeting of the Microbiological Society of Korea held in ICC JEJU, Korea during April 17-19, 2019.	김진영	2019.04.19	한국미생물학 회
6	수상	Poster award	This award is presented to the above individual in recognition of outstanding poster presentation entitled "Identification and Functional Characterization of Essential Transcription Factors in Human Fungal Pathogen, D042" at the International Meeting of the Microbiological Society of Korea held in ICC JEJU, Korea during April 17-19, 2019.	이승헌	2019.04.19	한국미생물학 회
7	수상	우수포스터상	성명 및 소속: Kyoung Su Kim, Hyeon-Su Jin, Dong-Woo Lee Department of Biotechnology, Yonsei University, Korea 제목: Nutrient-dependent anaerobic fermentation profiles of mucin-degrading bacteria in the human gut 위 사람은 2019 한국식품과학회 국제학술대회의 포스터발표에서 창의력과 신선함이 돋보이는 우수한 연구 결과를 발표하였기에 상장을 수여합니다. 2019년 6월 28일 한국식품과학회 회장 박 종 현	김경수	2019.06.28	한국식품과학 회
8	수상	Outstanding Poster Award	This award is presented to the above individuals in recognition of their outstanding poster presentation entitled "Unwinding the Role of Pseudouridylation in an Opportunistic Fungal Pathogen <i>Cryptococcus neoformans</i> , E012" during the 2019 Annual Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies held on October 25, 2019 at Sejong University Convention Center, Seoul, Korea.	이승헌	2019.10.25	The Federation of Korean Microbiologica l Societies
9	수상	Best Research Award	위 사람은 연세대학교 BK21 PLUS 생체기능시스템사업단(8차년도)에서 논문 성과 산출에 크게 기여하였기에 이 상장을 수여합니다.	이경태	2020.08.13	BK21 plus 생체기능시스 템사업단
10	수상	Best Research Award	위 사람은 연세대학교 BK21 plus 생체기능시스템사업단(8차년도)에서 논문 성과 산출에 크게 기여하였기에 이 상장을 수여합니다.	진재형	2020.08.13	BK21 plus 생체기능시스 템사업단
11	수상	CJ포스터발표 상	한국미생물생명공학회에서 CJ포스터발표상을 수상함.	이예나	2020.09.23	한국미생물생 명공학회

12	수상	중견과학자상	귀하는 미생물 및 생명공학 분야에 탁월한 연구업적으로 해당 분야의 학술 발전과 우리 학회의 위상을 높이는데 기여하였기에 중견과학자상을 수여합니다. 연세대학교 반응선 교수 수상, 2020년 9월 23일	반용선	2020.09.23	사단법인 한국미생물생 명공학회
13	수상	우수 포스터발표상	상기 회원은 2020년도 정기학술대회 e-conference에서 "Identification of the Role of cAMP Pathway in the Emerging Fungal Pathogen <i>Candida auris</i> "의 제목으로 우수한 논문을 발표하였으므로 이에 우수 포스터발표상을 드립니다. 연세대학교 김지석 수상, 2020년 9월 25일	김지석	2020.09.25	사단법인 한국미생물생 명공학회
14	수상	Poster Awards	This award is presented to the above individual in recognition of outstanding poster presentation entitled. "Unveiling the Role of the Casein Kinase 2 in the Pathogenicity of the Human Fungal Meningitis Pathogen <i>Cryptococcus neoformans</i> , F012" at the Annual Meeting of the Microbiological Society of Korea held as a virtual conference on 7-8 October, 2020.	최예슬	2020.10.08	The Microbiologica l Society of Korea
15	수상	Excellent E-Poster Presentation Award	This certificate is awarded to Kyung-Tae Lee for the outstanding presentation entitled Host Mimicking Systems to Identify the Fungal Brain Infection at the International Union of Microbiological Societies 2020 Daejeon, Korea(IUMS2020).	이경태	2020.11.20	IUMS2020
16	수상	Excellent E-Poster Presentation Award	This certificate is awarded to Jae-Hyung Jin for the outstanding presentation entitled Systematic functional analysis of phosphatases in the pathogenic fungus <i>Cryptococcus neoformans</i> at the International Union of Microbiological Societies 2020 Daejeon, Korea(IUMS2020).	진재형	2020.11.20	IUMS2020
17	수상	우수성과상	귀하의 논문이 농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단 2단계 3차년도 자체중간평가 결과 우수성과 논문 분야에 선정되었기에 이 상장을 드립니다.	진재형	2020.12.11	농림축산식품 미생물유전체 전략연구사업 단
18	수상	우수논문상	위 사람은 통합학위과정 자연부문에서 아래의 연구업적으로 학술발전에 이바지하였다고 인정되어 이에 대학원생 우수논문상을 수여함.	진재형	2020.12.11	연세대학교
19	수상	Best Research Award	위 사람은 연세대학교 BK21 연세바이오시스템 교육연구단(1차년도)에서 논문 성과 산출에 크게 기여하였기에 이 상장을 수여합니다.	성재윤	2021.01.27	BK21 연세바이오시 스템 교육연구단
20	수상	우수포스터발표 상	This award is presented to the above individual in recognition of best poster presentation entitled "Adaptive Evolutionary Trajectory of Bacterial Cells toward Non-utilizable sugars, G026" at the International Meeting of the Microbiological Society of Korea held in CECO, Korea during August 25-27, 2021.	주윤희	2021.08.27	한국미생물학 회

21	수상	우수포스터상	This award is presented to the above individual in recognition of best poster presentation entitled "Elucidating the Roles of the Casein Kinase 2 in the Pathogenicity of the Human Fungal Meningitis Pathogen <i>Cryptococcus neoformans</i> , D035" at the International Meeting of the Microbiological Society of Korea held in CECO, Korea during August 25-27, 2021.	최예슬	2021.08.27	The Microbiological Society of Korea
22	수상	Recognition of Excellence	Recognition of Excellence is presented to Seong Ryong Yu Yonsei University in appreciation of your poster presentation entitled "Dissection of Host-derived Cues for the Systematic Regulation of Pathogenicity-related Transcription factors in <i>Cryptococcus neoformans</i> " at the 2021 Korea-Japan Joint Symposium on Mycology held in Yongbong Hall, Chonnam National University, Buk-gu, Gwangju, Republic of Korea on October 27~29, 2021	유성룡	2021.10.27	The Korean Society of Mycology

[인프라 성과]

연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

\* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

해당사항 없음.

## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 주요 동식물 모델 진균의 다중오믹스 분석을 통한 통합 신호전달 네트워크 구축 및 유용 유전자원 발굴</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 동물 진균 모델 <i>C. neoformans</i>의 탈인산화효소 결손변이체 라이브러리 제작</li> <li>○ 제작된 탈인산화효소 결손변이체 라이브러리를 활용한 형질분석을 통해 병원성 조절 및 병독성인자 생성에 관여하는 유용 유전자원 발굴 (Jin et al., <i>Nature Communications</i>, 2020)</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 주요 동식물 모델 진균의 유용유전자원 선별 및 주요 병원성 진균 중간 핵심유전자 교차연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 동물 모델 진균 <i>C. neoformans</i>의 뇌 감염 주요인자 Hob1의 숙주 모방환경 조건에서의 전사체분석 및 ChIP assay를 통한 하위신호전달인자 발굴</li> <li>○ 동물 병원성 진균의 병독성 조절 전사인자 Hap2의 하위신호전달인자 발굴을 위한 ChIP assay 진행</li> <li>○ 동물 병원성 진균의 항진균 타겟 후보인 인산화효소 Cka1가 이루는 CK2 복합체의 단백질 간 상호작용 규명</li> <li>○ 식물병원성 모델 진균 <i>F. graminearum</i>에서 발굴한 핵심 WD40 유전자를 동물병원성 모델 진균에서의 이종상동유전자 동정을 통한 총 132개의 WD40 유전자 발굴</li> <li>○ 발굴된 WD40 유전자 중 28개의 유전자를 대상 결손변이체 제작 및 표현형질 분석 진행</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 동식물 모델 진균 유용유전자원의 주요 병원성 진균 내의 역할 분석 및 병원성 진균 핵심 유용유전자 역할 규명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 병원성 진균 <i>C. auris</i>의 cAMP 신호전달기작 연구를 진행하여 cAMP 신호전달경로가 <i>C. auris</i>의 병독성을 조절함을 밝힘 (Kim et al., <i>mBio</i>, 2021)</li> <li>○ 동물 병원성 진균의 Casein Kinase2 구성 요소들의 결손변이체를 사용한 세포 표면 및 내부 관찰</li> <li>○ 동물 병원성 진균의 MAPK 신호전달인자의 상호작용 연구를 위한 주요 MAPK 유전자 (Hog1, Mpk1, Cpk1)의 단일/이중/삼중 결손변이체 제작</li> <li>○ 제작된 MAPK 신호전달인자 결손변이체를 사용하여 고온 및 세포벽 스트레스 조건에서 MAPK 신호전달인자의 반응 조절 확인 및 세포벽 생합성 유전자 조절 확인</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 동식물 모델 진균의 유전자 변이 균주를 활용한 다중오믹스 비교 분석 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 동물 병원성 진균의 KEOPS 복합체를 구성하는 Kae1, Bud32 결손변이체 및 아미노산 치환 균주와 야생형 균주와의 전사체 비교 분석 진행</li> <li>○ 동물 병원성 진균의 소포체 스트레스 저항성 관련 유전자 <i>ZFC2</i> 결손변이체 제작 및 세포 내/외부 전자현미경 관찰을 통한 캡슐 형성능 증가 확인 및 전사체 분석 진행</li> </ul>	100

<p>○ 동식물 병원성 진균의 병원성 또는 스트레스 반응성을 조절하는 공통 신호전달 네트워크 발굴</p>	<p>○ 전사체 및 대사체 분석을 통한 동물 병원성 진균의 Yck2 유전자 역할 규명 (Liboro et al., <i>Frontiers in Cellular and Infection Microbiology</i>, 2021)</p> <p>○ 인체모사 neurovascular 칩을 활용한 동물 병원성 진균의 혈관-뇌 장벽 통과 및 신경세포 선호도에 관여하는 유전자 발굴 및 관련 발병기작 메커니즘 발굴 (Kim et al, <i>Nature Biomedical Engineering</i>, 2021)</p> <p>○ 동물 병원성 진균의 Yvh1 탈인산화효소 도메인의 기능 규명을 위한 탈인산화효소 서열 변이체 제작 및 표현형질체 분석 연구 수행 (Jin et al., <i>Journal of Microbiology</i>, 2021)</p>	<p>100</p>
<p>○ 동식물 병원성 진균 유용유전자 조절물질 스크리닝</p>	<p>○ Selleckem에서 제공하는 887개의 인산화효소 저해제 라이브러리를 사용한 약물 후보 물질 스크리닝을 통해 총 26개의 인산화효소 저해제</p> <p>○ 인체모사 neurovascular 칩을 활용한 약물 스크리닝 가능성 제시 및 혈관-뇌장벽 통과 물질에 대한 스크리닝 계획</p>	<p>100</p>
<p>○ 바이오매스 유용 미생물 유전체 정보 및 조작기술 활용 연구</p>	<p>○ 바이오매스 생산 유용 미생물 <i>C. curvatus</i>의 유전체 정보를 기반으로 하여 바이오매스 생산 유전자 과발현 균주 제작 및 과발현 확인</p> <p>○ Oil Red O 염색을 통한 Triacylglycerol 정량 방법을 활용한 변이균주 TAG 발현량 변화 정도 확인</p> <p>○ FACS 기법을 사용하여 바이오매스 생산 유용 미생물 <i>C. curvatus</i>의 배수성 관찰을 진행하여 단수체 확인</p>	<p>100</p>
<p>○ 주요 동·식물 병원성 진균에서의 주요 신호전달인자 기능 및 다중오믹스 연구</p>	<p>○ 붉은곰팡이의 병원성과 관련된 것으로 알려진 WD40 유전자의 상동유전자 발굴 및 기능유전체 연구 수행</p> <p>○ 연구대상 WD40 유전자 선발 및 형질복원체 제작 후 대표 단백질(WD43, WD101 등)의 상호작용 단백질 탐색 연구 수행.</p>	<p>100</p>
<p>○ 붉은곰팡이의 핵심 단백질 상호작용 유전자 및 전사조절인자 기능연구</p>	<p>○ CBC-Ars2 (CBCA) 전사조절인자 복합체 기능규명 연구 수행, <i>Frontiers in Microbiology</i> 논문게재 (IF=5.640)</p> <p>○ CCAAT 전사조절인자 복합체 기능규명 연구 수행, <i>Scientific Reports</i> 논문게재 (IF=4.380)</p> <p>○ 병원성 관련 Fpo1 전사조절인자와 하위 조절메커니즘 연구 수행, <i>Environmental Microbiology</i> 논문게재 (IF=5.491)</p>	<p>100</p>
<p>○ <i>C. neoformans</i> 주요 유전자 <i>F. graminearum</i>에서의 교차 유전학연구</p>	<p>○ 동물병원성 모델 진균에서 확보된 8개의 phosphatase 유전자 결손변이체 제작 및 <i>YND1</i>, <i>GDA1</i>, <i>DBR1</i> 상동유전자 등에 대한 기능규명 연구 수행하여 논문 심사 중.</p>	<p>100</p>



<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 1단계에서 확보한 농·식품 유용 세균의 전장유전체 정보를 활용한 다중오믹스 분석을 통한 적응진화기작 규명 및 관련 유용 유전자원 발굴</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 계통유전체학 분석을 통한 고온성 바실러스의 내열성 적응 기작 규명 및 내열성 관련 유용유전자원 3종 발굴</li> <li>○ 고온성 바실러스 플랫폼 도입 후보 유전자원에 대한 영양원 및 온도에 따른 유전체 수준의 표현형 확인</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농식품 유용유전자원 탐색 및 개량을 위한 다중오믹스 분석 및 대사회로 재설계를 통한 초고속 스크리닝 플랫폼 기술개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유전자 조작 및 유전체 편집기술을 이용한 고온성 바실러스 플랫폼 세포 개발 기반 구축</li> <li>○ 고온성 플랫폼호스트에서의 유용유전자원 대량발현 시스템 적용을 통한 산업화 가능성 검증</li> <li>○ 다중오믹스분석을 기반으로 대사회로 재설계를 통한 대용량 초고속스크리닝 플랫폼호스트 개발 (국내 특허 등록2건, 국외출원 2건)</li> <li>○ 세포성장기반 효소활성 측정시스템이용 당이성화효소의 초고속 대용량 스크리닝, 성능 검증</li> <li>○ 산업적 유용 유전자원의 플랫폼 세포로의 도입 및 성능평가를 통한 설탕대체감미료 생산 공정기술개발 (Lee et al., <i>Crit. Rev. Environ. Sci.</i> 2020)</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농식품 유용 미생물의 다중오믹스 DB기반 유전자 조절 네트워크 분석을 통한 산업적 유용 유전자원 발굴</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 농·식품 유용미생물의 초고속 유용유전자 탐색법 구축 및 유용유전자원 발굴 (Sung et al., <i>Biotechnol. Bioeng.</i> 2021, US 특허 등록 결정)</li> <li>○ 다중오믹스 분석을 통한 protein biomass 분해 관련 유전자원 발굴 및 기능성 펩타이드 활용기술개발 (1) Jin et al., <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2018, 2) Kang et al., <i>Crit. Rev. Environ. Sci.</i> 2019)</li> <li>○ 다중오믹스를 통한 난분해성 biomass 단백질 가수분해효소군 발현 프로파일링 및 기능 규명, (1) Kang et al., <i>Mirob. Biotechnol.</i> 2019, 2) La et al., <i>Frontiers in Molecular Biosciences</i>, 2020, 3) Immanuel and Sung et al., <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>, 2021)</li> <li>○ 난분해성 protein biomass 분해균주의 다중오믹스 분석을 통한 분해기작 제안 (Jin et al., <i>Mirob. Biotechnol.</i> 2020)</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 대장균의 스트레스 조건에서의 전사체 실험기법 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 스트레스 조건에서의 연속배양기법 확립</li> <li>○ 다양한 스트레스 조건에서의 <i>E. coli</i> BL21(DE3)의 연속배양 (40시간 이상) 시계열 전사체 데이터 확보 및 분석</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 대장균의 스트레스 조건에서의 전사체 분석기법 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 시계열(time-series) 전사체 데이터 분석기법 확립</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 대장균의 고온 스트레스 조건에서의 전사체 확보 및 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Heatshock 조건에서의 시간에 따른 전사체 데이터 확보 및 분석 (9건)</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 대장균의 삼투압의 변화에서의 전사체 확보 및 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고농도 삼투압 스트레스에서의 전사체 데이터 확보 (11건)</li> <li>○ 고농도 삼투압 스트레스에서 대사체 분석 (3건)</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 대장균의 재조합 단백질의 과발현에의 전사체 확보 및 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 재조합 단백질 과발현 조건에서의 전사체 데이터 확보 및 분석 (11건).</li> </ul>	100

○ 확보된 전사체 데이터를 이용하여 대장균의 유전자 조절 네트워크 구성	○ 대장균의 고온 스트레스 배양 조건에서의 전사체 및 대사체 데이터를 이용하여 고온 스트레스에서의 대장균 내 유전자 조절기작 규명.	100
○ 전사체 데이터 및 시스템모델링을 통한 대장균 내 스트레스 저항성 관련 대사 및 조절인자 발굴	○ 산업대장균 <i>E. coli</i> BL21(DE3)의 대사 네트워크 모델 개발 ○ Probiotic <i>E. coli</i> Nissle 1917 대사 네트워크 모델 개발 ○ 열처리 전사체 및 대사체 분석을 통한 ROS 스트레스 및 고온 내성 유전자 발굴.	100
○ 유전자 조작을 통한 발굴된 유전자원의 유용성 규명	○ 대장균의 capsule gene cluster의 고온 스트레스 저항성을 실험적으로 증명.	100
○ 농·식품 유용물질을 고효율로 대량 생산할 수 있는 숙주균 개발	○ 대장균의 capsule gene cluster의 발현을 조절하여 고온에서 재조합 단백질 고효율 생산에 적용	100
○ <i>C. neoformans</i> 전사체 프로파일링 데이터를 이용한 유전자 조절 네트워크 구성	○ <i>C. neoformans</i> 의 전사체 데이터를 이용하여 유전자 조절 네트워크를 구성함.	100
○ <i>C. neoformans</i> 유전자조절 네트워크를 이용한 유전자 조절 유용인자 발굴	○ 전사체 정보에서의 유전자와 발현조건도 동시에 clustering 함으로써, 같은 조절인자 (transcription factor)들에게 조절되는 유전자들 (regulon)을 찾아냄.	100
○ <i>C. neoformans</i> 유래 인산화효소 Cka1 구조 규명 및 구조 분석 수행	○ 최종적으로 Cka1의 고해상도 단백질 구조 규명에 성공하였음. ○ Cka1 단백질의 AMPPNP와/CX-4945와의 복합체 구조를 규명하고 이를 통해 Cka1 인산화효소 특이적인 약물 결합 모델을 제시하여 논문화에 성공하였음.	100
○ 탈인산화 효소 cnDUSP12 발현 정제, 구조분석, 논문화	○ 13가지 탈인산화 효소에 관한 발현 정제 스크리닝을 통해서 cnDUSP12 단백질을 얻는 데 성공함. ○ cnDUSP12 단백질의 회절 실험 데이터를 바탕으로 단백질 구조 규명에 성공함. ○ cnDUSP12 단백질 구조를 바탕으로 탈인산화 활성 자리를 파악함. 탈인산화효소 활성화 자리인 Cysteine 잔기와 P-loop, WPD-loop을 확인함. ○ cnDUSP12의 초안 작성까지 완료함.	95
○ Insulinase family protease M16 단백질의 결정화 스크리닝 수행	○ M16 단백질 결정을 얻는데 성공함. ○ 고해상도 구조 규명을 위해서는 추가 회절 실험이 필요할 것으로 보임.	90
○ TliDEF 단백질 복합체 발현 및 Cryo-EM 스크리닝	○ <i>Pseudomonas fluorescens</i> 에서 안정적인 TliDEF 단백질 복합체를 발현 및 정제하는 것에 성공함. ○ TliDEF 단백질의 cryo EM 샘플링을 통해 최적 그리드 조건을 파악하였고 TliDEF 단백질의 단입자 구조 분석을 진행함.	90

## 4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

---

#### [제3세부]

먼저 해당 과제 초기에 계획했던 M16 단백질 경우 구조 규명을 위해 다양한 initial screening을 진행하였지만, 결정이 improve 되지 않아 X-ray 회절 실험이 불가능했고 초기 계획하였던 단백질 구조 규명을 진행할 수 없었음.

---

### 2) 자체 보완활동

---

본 연구진은 M16 단백질의 구조 규명을 위한 결정화 최적화를 위해서 Full length 단백질뿐 아니라 다양한 construct 디자인을 통해서 N-term, C-term 길이 조절을 통해 발현 형태를 변경하여 정제 스크리닝을 진행 시도하였음. 또한 M16 단백질의 초기 결정화 농도를 40mg/ml까지 높여서 다양한 조건에서 initial screening 실험을 진행하였음.

---

### 3) 연구개발 과정의 성실성

---

본 연구진은 케라틴 분해 효소인 M16 단백질의 구조 규명을 수행하지 못하였기 때문에 연구 목표를 변경하여 지질 분해 효소인 *Pseudomonas fluorescens* TliA를 분비하는 T1SS TliDEF 단백질의 Cryo-EM 구조를 규명하고 단백질을 인식 및 분비하는 기작을 구조적으로 분석하기 위해서 발현 정제 및 Cryo-EM 스크리닝 실험을 진행하였음.

---

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

---

- 연구인력 전체 12명 배출
    - 석사급: 6명(이동필, 김한설, ONG XIANG YU BELINDA, 장은하, 이민재, 김경수)
    - 박사급: 4명(소이슬, 박준배, 이동기, 이경태, 진재형)
    - 기타: 박사급 인력 기업연구소 입사 2명(이동기(연구교수), 박수영 박사)
  - 전체 212건의 국내외 학술대회 연구발표
    - 총 35건의 해외학술대회 연구발표 성과 보유
    - 성과 목표대비 530% 초과 달성
  - 총 7건의 홍보실적 보유 (기타 항목 참고)
    - 식품저널뉴스, 농기자재신문, 국민체감형 연구성과 각 1건
    - 이데일리, 연합뉴스, YTN사이언스, JTBC 홍보성과 각 1건
    - 성과 목표대비 175% 초과 달성
  - 총 7건의 NABIC 등록
    - 연구목표 대비 140% 초과달성
  - JCR 분야별 상위 10% 이상 논문 8편을 포함 총 SCI급 36편의 논문 게재 (평균 IF=6.9)
    - 논문 편수 300% 및 평균 IF 230% 초과달성
    - 게재된 논문 중 상위급 저널의 정보는 다음과 같음
      - ✓ 다학제분야 상위 5.6% *Nature Communications* (IF=14.919) 3편
      - ✓ 다학제 농학분야 상위 8.8% *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (IF=5.297) 1편
      - ✓ 환경과학 상위 2% *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* (IF=12.561)2편
      - ✓ 의생명공학 상위 1% (분야 전체 1위) *Nature Biomedical Engineering* (IF=25.671)1편
      - ✓ 식물과학 상위 8.1% *Molecular Plant Pathology* (IF=14.919) 1편
  - 특허 출원 및 등록
    - 국내 출원 12건 및 국제 출원 2건, 총 특허 출원 14건으로 350%의 성과 목표대비 초과 달성
    - 국내 특허 등록 5건으로 연구목표 대비 250% 초과달성
    - 국외(US) 특허 등록 결정 1건 (15/756,441.US)
  - 교육지도 8건 달성
    - 교육지도 8건을 달성하여 200% 목표 대비 초과 달성
    - 반응선 교수, 항진균제 개발과 진균의 활성 평가 방법 등의 내용으로 다수의 기업체에서 위크샵 및 기술자문
-

---

○ 전체 22건의 수상실적 보유

- 한국미생물학회 poster award 2018.04.27. 진재형
- 한국미생물생명공학회 우재 유주현 학술상 2018.07.30. 반응선
- 농림축산식품부 농림축산식품기술대상 장관표창 2018.10.19. 반응선
- 한국미생물생명공학회 구두발표 장려상 2019.01.15. 진재형
- 한국미생물학회 Poster award 2019.04.19. 김진영
- 한국미생물학회 Poster award 2019.04.19. 이승헌
- 한국식품과학회 우수포스터상 김경수 2019.06.28.
- The Federation of Korean Microbiological Societies Outstanding Poster Award 2019.10.25. 이승헌
- BK21 plus 생체기능시스템사업단 Best Research Award 2020.08.13. 이경태
- BK21 plus 생체기능시스템사업단 Best Research Award 2020.08.13. 진재형
- 한국미생물생명공학회 CJ포스터발표상 2020.09.23. 이예나
- 사단법인 한국미생물생명공학회 중견과학자상 2020.09.23. 반응선
- 사단법인 한국미생물생명공학회 우수 포스터발표상 2020.09.25. 김지석
- The Microbiological Society of Korea Poster Awards 2020.10.08. 최예슬
- IUMS2020 Excellent E-Poster Presentation Award 2020.11.20. 이경태
- IUMS2020 Excellent E-Poster Presentation Award 2020.11.20. 진재형
- 농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단 우수성과상 2020.12.11. 진재형
- 연세대학교 우수논문상 2020.12.11. 진재형
- BK21 연세바이오시스템 교육연구단 Best Research Award 2021.01.27. 성재윤
- 한국미생물학회 우수포스터발표상 2021.08.27. 주윤혜
- The Microbiological Society of Korea 우수포스터상 2021.08.27.
- The Korean Society of Mycology Recognition of Excellence 2021.10.27. 유성룡

## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

---

- 발굴한 병원성 진균 핵심 유용유전자 관련 신호전달 기작에 관한 연구결과를 연구개발 종료 5년 이내 국제학술지에 6편 게재할 예정임.
  - 본 과제의 지원으로 연구를 수행하여 출원하였던 특허에 관하여 연구개발 종료 5년 이내 5건 국내 및 해외 특허 등록 예정임.
  - 2건의 특허 출원 및 이를 바탕으로 기술이전 추진 계획이 있음.
  - 본 과제의 지원으로 학위과정 중 연구를 수행하였던 석사과정 학생 1명이 1년 이내에 석사학위 취득 예정이고, 석박사통합과정 학생 9명이 5년 이내에 박사학위 취득 예정임
  - 붉은곰팡이의 게놈수준의 WD40 유전자의 상동유전자 발굴 및 기능유전체 연구 수행연구 결과 및 동물병원성 모델 진균에서 확보된 8개의 phosphatase 유전자(*YND1*, *GDA1*, *DBR1*)에 대한 연구결과는 1년 내에 국제저명학술지에 연구논문으로 게재 될 예정임.
  - 본 과제의 지원으로 학위과정 중 연구를 수행하였던 석박사통합과정 학생 3명이 3년 내에 박사학위 취득 예정임.
  - 본 과제의 결과로 발굴한 유용유전자원을 데이터베이스화하여 국내외의 우수한 학자 및 기업체와 공유하고자 하며, 상기 언급한 특허 출원 및 기술이전을 통하여 실용화를 목적으로 함. 발굴한 유용유전자원 중 제1세부에서 발굴한 병원성 모델 진균의 유용 유전자는 이미 데이터베이스화하여 사이트를 제공함(<http://phosphatase.cryptococcus.org>).
  - 또한 추가적인 빅데이터 수집을 위하여 유용 유전자원에 대한 전사체를 포함하여 대사체 및 유전체를 포함하는 다중오믹스 데이터를 수집할 계획이며, 전장유전체 분석을 진행하고 유용미생물의 대사를 조절할 수 있는 염기서열을 분석 및 전장유전체 연관분석으로 빅데이터를 활용할 예정임.
-

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE	6
	비SCIE	
	계	6
국내논문	SCIE	
	비SCIE	
	계	
특허출원	국내	2
	국외	0
	계	2
특허등록	국내	2
	국외	3
	계	5
인력양성	학사	
	석사	1
	박사	9
	계	10
사업화	상품출시	
	기술이전	2
	공정개발	
제품개발	시제품개발	
비임상시험 실시		
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상
		2상
		3상
	의료기기	
진료지침개발		
신의료기술개발		
성과홍보		
포상 및 수상실적		
정성적 성과 주요 내용		

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
2.	1)
	2)

[뒷면지]

주 의

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



## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호		918012-4	
사업구분	포스트게놈 신산업육성을 위한 다부처유전체사업				
연구분야	기초 / 농림식품 융복합		과제구분	단위	
사업명	포스트게놈 다부처 유전체사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	농·식품 유용 미생물의 다중오믹스 기반 유용 유전자원 발굴 및 가치제고화 기술 개발		과제유형	기초	
연구개발기관	연세대학교 산학협력단		연구책임자	반용선	
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2018.04.25. -2018.12.31	375,000	-	375,000
	2차년도	2019.01.01. -2019.12.31	500,000	-	500,000
	3차년도	2020.01.01. -2020.12.31	514,000	-	514,000
	4차년도	2021.01.01. -2021.12.31	516,500	-	516,500
	5차년도	-	-	-	-
	계				
참여기업	참여기관 중 중소기업(0)개, 중견기업(0)개, 대기업(0)개				
상대국	-	상대국연구개발기관	-		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2022.02.08

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
연세대학교 산학협력단	교수	반용선

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	반용선
----	-----

## I. 연구개발실적

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

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (우수, 보통, 미흡, 극히불량)

본 연구는 연구 목표에 따라 체계적으로 수행하였으며, 그 내용에 해당하는 관련분야 저명 논문 게재 실적을 300% 달성함. 현재 총 36편의 출판된 논문 중 상위 10% 저널에 속하는 논문이 8편으로, 해당 목표치의 초과 달성으로 양적 부분으로 충분하며, 우수 저널지에 게재하여 질적 성과 달성을 나타내, 훌륭한 연구개발 결과를 이룸. 이에 본 연구개발결과의 우수성/창의성은 매우 우수하다고 평가할 수 있음.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수, 보통, 미흡, 극히불량)

본 연구개발에서 개발한 생명자원 및 생명정보는 총 45건으로 동·식물 유용 진균 모델의 주요 신호전달인자 및 유전자원 발굴하여 추후 농축산식품 분야 연구에 활용이 가능하며, 표적 물질에 대한 후속연구 진행할 예정임. 본 과제에서 개발된 파급효과는 매우 우수하다고 평가함.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수, 보통, 미흡, 극히불량)

본 연구에서는 대용량 기능유전체 진균 변이균주 라이브러리와 전장 유전체 분석을 통해 선정된 유용 미생물의 다중오믹스 분석을 최근 기술로 분석하여 발굴한 36건의 유용 유전자원은 병원성 진균 모델의 신규 중요 유전자 역할 기능, 희귀당 이용 관련 대장균 모델 분석 및 다양한 유용 미생물의 전사체 분석결과를 포함하고 있으며, 이를 논문 및 데이터베이스화하여 공유하고자 함. 또한, 추가적으로 실용화 목적을 위하여 본 과제의 결과를 혁신적인 농·식품 소재 개발에 활용(ex. 신규 항진균제 개발, 희귀당 생산 증대 등)해 특허 출원등록 및 기술이전을 진행하고 실용화하고자 함.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (우수, 보통, 미흡, 극히불량)

본 연구에서 논문, 특허 및 산업재산권, 인력양성 등 모든 영역에서 달성도가 매우 훌륭하며, 이에 따라 연구개발 수행노력의 성실도가 매우 우수함.

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수, 보통, 미흡, 극히불량)

전체 게재한 논문 36건 중 상위 10%에 해당하는 논문은 8편으로 전체 성과 중 22%에 해당함. 또한, 특허등록 5건, 특허출원 14건으로 각각 목표 대비 250%, 350% 초과 달성하였으며, 35건의 국제 학술발표를 포함한 212건의 학술발표 및 21건의 수상내역을 보유함. 이에 연구개발성과는 매우 우수하다고 평가함.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
다중오믹스 분석을 통한 유용유전자원 발굴 20건	10	190%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 다중오믹스 분석을 통하여 유용유전자원 38건을 발굴하여 목표대비 190%로 초과 달성</li> <li>• 병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i>의 병원성 조절 phosphatase 11개 발굴 및 기능 규명</li> <li>• 병원성 진균의 약물 및 병원성 스트레스 반응에 관여하는 5개의 유전자 기능 규명</li> <li>• 뇌감염 병원성 진균의 뇌감염에 관여하는 탈인산화효소 3개, 뇌 혈관장벽 통과능에 관여하는 인산화효소 5개의 유전자 기능 규명</li> <li>• 뇌수막염 병원성 진균의 뇌 감염 메커니즘을 규명할 수 있는 neurovascular unit chip 개발</li> <li>• 병원성 진균 <i>Candida auris</i>의 병원성 신호전달 인자 4개의 유전자 기능 규명</li> <li>• 유전체 분석기반 GRAS 균주 유래 Type II Asparaginase 발굴</li> <li>• Tagatose SNP1, SNP2 발굴</li> <li>• 병원성 진균의 병원성에 관여하는 유전자들의 기능을 규명하여 유용 유전자원 확보 및 병원성 진균의 감염 메커니즘을 밝힐 유전자원을 개발하여 이를 통합한 실용화 방안 가능</li> <li>• 유전체 분석을 이용하여 유용균의 효소 발굴하여 상업 및 실용화 가능</li> </ul>
미생물 병 발생기작 규명 4건	10	125%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 미생물 병 발생기작 규명 5건을 달성</li> <li>• 병원성 진균 <i>Cryptococcus neoformans</i>의 병원성을 조절하는 유전자의 병원성 기작, 표현형질 분석 및 단백질 구조 규명 2건</li> <li>• 병원성 진균의 병원성 균주 및 야생형 균주, 유전자 변이균주의 host-mimicking 조건 하에서 전사체 분석</li> <li>• 뇌 감염 진균의 뇌 감염 및 통과 유전자, 뇌 혈관 장벽 부착에 관여하는 유전자를 발굴하여, 병 발생 기작을 밝힘</li> <li>• 혈관-뇌 장벽 모사 칩을 개발하여 뇌감염 병원성 진균의 뇌 혈관 장벽 통과능 및 신경세포 선호도에 관여하는 발생기작 발굴</li> </ul>
NABIC 등록 5건	10	140%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NABIC 7건 등록으로 연구목표 대비 140% 초과달성</li> </ul>
논문 12건 이상 게재 및 평균 IF 3 이상 (JCR 분야별 상위 10% 논문 2 편 이상 포함)	30	논문 편수 300% 평균 IF 230%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• JCR 분야별 상위 10% 이상 논문 8편을 포함 총 SCI급 36편의 논문 게재 (평균 IF=6.9)</li> <li>• 논문 편수 300% 및 평균 IF 230% 초과달성</li> <li>• 게재된 논문 중 상위급 저널의 정보는 다음과 같음 <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 다학제분야 상위 5.6% <i>Nature Communications</i> (IF=14.919) 3편</li> <li>✓ 다학제 농학분야 상위 8.8% <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> (IF=5.297) 1편</li> <li>✓ 환경과학 상위 2% <i>Critical Reviews in Environmental Science and Technology</i> (IF=12.561) 2편</li> </ul> </li> </ul>

			<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 의생명공학 상위 1% (분야 전체 1위) <i>Nature Biomedical Engineering</i> (IF=25.671)1편</li> <li>✓ 식물과학 상위 8.1% <i>Molecular Plant Pathology</i> (IF=14.919) 1편</li> </ul>
특허출원 4건	10	350%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 국내 출원 12건 및 국제 출원 2건, 총 특허 출원 14건으로 350%의 성과 목표대비 초과 달성</li> </ul>
특허 등록 2건	10	250%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 특허 등록 5건으로 연구목표 대비 250% 초과 달성</li> </ul>
학술발표 40건	5	530%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 총 212건의 학술발표(국제발표 35건 포함)를 통해 성과 목표 대비 530% 초과 달성</li> </ul>
교육지도 4건	5	200%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 교육지도 8건을 달성하여 200% 목표 대비 초과 달성</li> <li>• 반응선 교수, 항진균제 개발과 진균의 활성 평가 방법 등의 내용으로 다수의 기업체에서 워크샵 및 기술자문</li> <li>• 교육 지도 및 워크샵 개최</li> </ul>
인력양성 12건	5	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 연구인력 전체 12명 배출 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 석사급: 6명(이동필, 김한설, ONG XIANG YU BELINDA, 장은하, 이민재, 김경수)</li> <li>- 박사급: 4명(소이슬, 박준배, 이동기, 이경태, 진재형)</li> <li>- 기타: 2명의 박사급 인력 기업연구소 입사(이동기 박사, 박수영 박사)</li> </ul> </li> </ul>
홍보 전시 4건	5	175%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 이데일리, 연합뉴스, YTN 사이언스, JTBC 홍보성과 각 1건, 식품저널뉴스, 농기자재신문, 국민체감형 연구성과 각 1건으로 홍보 전시 7건을 달성하여 목표대비 175% 초과 달성</li> </ul>
합계	100		

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

연구 목표 따라 체계적으로 진행되었으며, 모든 세부 목표의 목표치 초과 달성하여 정량 및 정성 모두 충분히 달성함.

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

연구 목표 달성 정도에 대한 양적, 질적 충족도 및 우수성

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

연구성과에 따른 활용 가치가 높으며, 후속 연구지원이 필요함

[별첨 1]

### IV. 보안성 검토

보안과제 해당 없음.

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

#### 1. 연구책임자의 의견

보안과제 해당 없음.

#### 2. 연구개발기관 자체의 검토결과

보안과제 해당 없음.

# 연구성과 활용계획서

## 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	기초 / 농림식품 융복합	
연구과제명	농식품 유용 미생물의 다중오믹스 기반 유용 유전자원 발굴 및 가치제고화 기술 개발			
주관연구개발기관	연세대학교 산학협력단		주관연구책임자	반용선
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	1,905,500 천원	-	-	1,905,500 천원
연구개발기간	2018. 04. 25 - 2021. 12. 31 (3년 9개월)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(      ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:      )			

## 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① <i>C. neoformans</i> 병원성 조절 탈인산화효소 분류	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 크립토코쿠스에서 총 139개의 탈인산화효소 유전자를 분류한 후 114개의 결손 변이체를 제작함.</li> <li>• 크립토코쿠스의 병원성을 조절하는 병원성 조절 탈인산화효소 23개를 발굴 및 분류함.</li> </ul>
② <i>C. neoformans</i> 유용 유전자 다중오믹스 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 병원성 조절 탈인산화효소에 대한 전사체, 인산화 단백질, 기능 유전체 분석 수행함.</li> <li>• 크립토코쿠스 네오포만스의 병원성 조절 유용 유전자 대상 phosphoproteomics 진행함.</li> <li>• 진균 병원성 조절 유용 전사인자 Hap2의 하위 신호전달 인자 Gpa2와 Crg1을 ChIP assay 수행하여 발굴함.</li> </ul>
③ <i>C. neoformans</i> 유용 유전자 조절물질 스크리닝 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 인산화효소 저해제 라이브러리 이용, 동물 병원성 진균을 억제할 수 있는 효능 스크리닝 및 표적 단백질을 발굴함.</li> </ul>
④ <i>C. neoformans</i> 유용 유전자의 주요 병원 균종 교차연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>• KEOPS 복합체 중 ATP 가수분해효소 역할을 하는 Kae1과 인산화효소 역할을 하는 Bud32 등 발굴된 주요 전사인자, 인산화효소 및 탈인산화효소와 관련된 유용 유전자의 칸디다, 아스페르길루스, 푸자리움 등의 타 주요 동식물 병원성 진균 내의 기능 분석 및 다중오믹스 연구를 진행함.</li> <li>• 신종 동물 병원성 진균 칸디다 오리스의 결손 변이체를 제작하고 표현형을 검증함.</li> <li>• 단백질 상호작용에서 중요한 WD40 도메인 유전자 식물 병원성 진균 푸자리움 그라미네룸에서는 WD40의 상동유전자 및 기능연구를 수행하여 그 중 대표적인 WD43, WD101 등의 상호작용 단백질 탐색하였으며, 동물 병원성 진균 크립토코쿠스 네오포르만스에서는 132개를 발굴, 47개의 유전자에 대한 결손 변이체를 제작함.</li> <li>• 상기 결과를 토대로 논문 3편을 발표함(<i>Nature Biomedical Engineering, Journal of Microbiology, mBio</i>).</li> </ul>

<p>⑤ <i>C. neoformans</i> 변이균주 라이브러리 기능적 클러스터링</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 병원성 조절 인산화효소와 탈인산화효소의 기능적 클러스터링 분석을 수행함.</li> </ul>
<p>⑥ 병원성 진균 종간 핵심 유전자 다중오믹스 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 붉은 곰팡이에서 발굴한 주요 WD40 유전자 FgWD043, FgWD101에 대한 과발현체 제작 및 단백질체 연구를 수행함.</li> <li>• 붉은 곰팡이의 병원성 및 유성생식 발달에 중요한 Fpo1 전사조절인자에 관한 다중오믹스 연구를 통한 기능 유전학 연구를 수행함.</li> <li>• 크립토코쿠스 네오포르만스에서 밝혀진 병원성 관련 탈인산화효소 유전자 중 붉은곰팡이에서 연구되지 않은 유전자 8개를 선별한 후 결손 변이체 제작을 진행함.</li> <li>• 면역 침강법을 이용한 3개의 WD40 단백질에 대한 과발현체 제작 및 AP-MS 분석을 통한 단백질체 연구, <i>GDA1</i> 및 <i>YND1</i>, <i>DBR1</i> 유전자의 기능 연구를 수행함.</li> </ul>
<p>⑦ <i>C. neoformans</i> 유용 유전자 조절물질 스크리닝</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 동·식물 병원성 진균 유용성 유전자를 표적 하는 활성물질을 발굴하기 위해 887개의 인산화효소 저해제 라이브러리를 사용해 약물 후보 물질을 발굴하기 위한 스크리닝을 진행함.</li> <li>• 크립토코쿠스 네오포르만스, 칸디다 알비칸스, 칸디다 오리스, 칸디다 글라브라타, 아스페르길루스 푸미가투스에 대한 MIC 측정 및 26개의 유의미한 결과를 보이는 인산화효소 저해제를 확인함.</li> </ul>
<p>⑧ <i>C. curvatus</i> 변이균주 생성 및 TAG생산량 비교분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 유질성 효모 크립토코쿠스 커바투스를 대상으로 NGS 기반 유전자 alignment를 수행하였음.</li> <li>• TAG 합성 및 분해 관련 유전자 프로모터의 histone H3 프로모터 치환을 통한 유전자 과발현 균주를 제작함.</li> <li>• Oil Red O 염색 기법을 이용한 TAG 정량 방법을 사용하여 제작된 변이 균주의 TAG 발현량 변화 정도를 측정함.</li> </ul>
<p>⑨ <i>C. curvatus</i> TAG생산 우량 균주 산업적 활용 방법 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 크립토코쿠스 커바투스의 유전체 정보 및 유전자 조작기술을 활용한 바이오에너지/바이오매스 유용생산 진균을 개발함.</li> <li>• 기존 결손변이체 제작 과정에서 생성된 배수체 및 흘배수체 균주의 배수성을 알아내기 위한 FACS 분석을 수행하여 크립토코쿠스 커바투스의 유전체가 단수체로 존재한다는 것을 확인함.</li> </ul>
<p>⑩ 붉은곰팡이의 핵심 단백질 상호작용 유전자 및 전사조절인자 기능연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CBC-Ars2 (CBCA) 전사조절인자 복합체 기능규명 연구 수행, <i>Frontiers in Microbiology</i>에 게재함.</li> <li>• CCAAT 전사조절인자 복합체에 대한 기능규명 연구 수행하여 <i>Scientific Reports</i>에 게재함.</li> <li>• 병원성 관련 전사조절인자 Fpo1과 하위 조절 매커니즘에 대한 연구를 수행하여 <i>Environmental Microbiology</i>에 게재함.</li> </ul>
<p>⑪ <i>C. neoformans</i> 주요 탈인산화효소를 <i>F. graminearum</i> 에서의 교차 유전학적 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 동물 병원성 모델 진균 <i>C. neoformans</i>에서 확보된 phosphatase 8개의 결손변이 균주를 이용, <i>YND1</i>, <i>GDA1</i>, <i>DBR1</i> 상동유전자 등에 대한 기능 규명 및 연구수행하여 논문 심사 중에 있음.</li> </ul>

<p>⑫ 농·식품 유용 세균의 전장유전체 정보를 활용한 다중오믹스 분석을 통한 적응진화기작 규명 및 관련 유용 유전자원 발굴</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>계통유전체학 분석을 통한 고온성 바실러스의 내열성 적응 기작 규명 및 내열성 관련 유용유전자원을 발굴함.</li> <li>고온성 바실러스 플랫폼 도입 후보 유전자원에 대한 영양원 및 온도에 따른 유전체 수준의 표현형을 확인함.</li> </ul>
<p>⑬ 농식품 유용유전자원 탐색 및 개량을 위한 다중오믹스 분석 및 대사회로 재설계를 통한 초고속 스크리닝 플랫폼 기술개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>유전자 조작 및 유전체 편집기술을 이용한 고온성 바실러스 플랫폼 세포 개발 기반을 구축함.</li> <li>고온성 플랫폼호스트에서의 유용유전자원 대량발현시스템 적용을 통한 산업화 가능성을 검토함.</li> <li>다중오믹스분석을 기반으로 대사회로 재설계를 통한 대용량 초고속스크리닝 플랫폼호스트를 개발함</li> <li>세포성장기반 효소활성 측정시스템이용 당이성화효소의 초고속 대용량 스크리닝, 성능을 검증함.</li> <li>산업적 유용 유전자원의 플랫폼 세포로의 도입 및 성능평가를 통한 설탕대체감미료 생산공정기술을 개발함.</li> </ul>
<p>⑭ 농식품 유용 미생물의 다중오믹스 DB기반 유전자 조절 네트워크 분석을 통한 산업적 유용 유전자원 발굴</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>농·식품 유용미생물의 유전자 조절 네트워크 분석을 통한 유용유전자원을 발굴함.</li> <li>다중오믹스 분석을 통한 protein biomass 분해 관련 유전자원 발굴 및 기능성 펩타이드 활용기술을 개발함.</li> <li>다중오믹스를 통한 난분해성 biomass 단백질 가수분해효소군 발현 프로파일링함.</li> <li>난분해성 protein biomass 분해균주의 다중오믹스 분석을 통한 분해기작을 규명함.</li> </ul>
<p>⑮ 대장균의 스트레스 조건에서의 전사체 실험기법 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>스트레스 조건에서의 연속배양기법을 확립함.</li> <li>다양한 스트레스 조건에서의 <i>E. coli</i> BL21(DE3)의 연속배양 (40시간 이상) 시계열 전사체 데이터 확보 및 분석함.</li> </ul>
<p>⑯ 대장균의 스트레스 조건에서의 전사체 분석기법 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>시계열(time-series) 전사체 데이터 분석기법을 확립함.</li> </ul>
<p>⑰ 대장균의 고온 스트레스 조건에서의 전사체 확보 및 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Heatshock 조건에서의 시간에 따른 9건의 전사체 데이터를 확보 및 분석함.</li> </ul>
<p>⑱ 대장균의 삼투압의 변화에서의 전사체 확보 및 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>고농도 삼투압 스트레스에서 11건의 전사체 데이터를 확보함.</li> <li>고농도 삼투압 스트레스에서 3건의 대사체를 분석함.</li> </ul>
<p>⑲ 대장균의 재조합 단백질의 과발현에의 전사체 확보 및 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>재조합 단백질 과발현 조건에서의 11건의 전사체 데이터를 확보 및 분석함.</li> </ul>
<p>⑳ 확보된 전사체 데이터를 이용하여 대장균의 유전자 조절 네트워크 구성</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>대장균의 고온 스트레스 배양 조건에서의 전사체 및 대사체 데이터를 이용하여 고온 스트레스에서의 대장균 내 유전자 조절기작을 규명함.</li> </ul>
<p>㉑ 전사체 데이터 및 시스템모델링을 통한 대장균 내 스트레스 저항성 관련 대사 및 조절인자 발굴</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>산업대장균 <i>E. coli</i> BL21(DE3)의 대사 네트워크 모델을 개발함.</li> <li>Probiotic <i>E. coli</i> Nissle 1917 대사 네트워크 모델 개발</li> <li>열처리 전사체 및 대사체 분석을 통한 ROS 스트레스 및 고온 내성 유전자를 발굴함.</li> </ul>
<p>㉒ 유전자 조작을 통한 발굴된 유전자원의 유용성 규명</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>대장균의 capsule gene cluster의 고온 스트레스 저항성을 실험적으로 증명함.</li> </ul>



<p>⑳ 농·식품 유용물질을 고효율로 대량 생산할 수 있는 숙주균 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>대장균의 capsule gene cluster의 발현을 조절하여 고온에서 재조합 단백질 고효율 생산에 적용함.</li> </ul>
<p>㉑ <i>C. neoformans</i> 전사체 프로파일링 데이터를 이용한 유전자 조절 네트워크 구성</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>C. neoformans</i>의 전사체 데이터를 이용하여 유전자 조절 네트워크를 구성함.</li> </ul>
<p>㉒ <i>C. neoformans</i> 유전자조절 네트워크를 이용한 유전자 조절 유용인자 발굴</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>전사체 정보에서의 유전자와 발현조건도 동시에 clustering 함으로써, 같은 조절인자 (transcription factor)들에게 조절되는 유전자들 (regulon)을 찾아냄.</li> </ul>
<p>㉓ <i>C. neoformans</i> 유래 인산화효소 Cka1 구조 규명 및 구조 분석 수행</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>최종적으로 Cka1의 고해상도 단백질 구조 규명에 성공하였음.</li> <li>Cka1 단백질의 AMPPNP와/CX-4945와의 복합체 구조를 규명하고 이를 통해 Cka1 인산화효소 특이적인 약물 결합 모델을 제시하여 논문화에 성공하였음.</li> </ul>
<p>㉔ 탈인산화 효소 cnDUSP12 발현 정제, 구조분석, 논문화</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>13가지 탈인산화 효소에 관한 발현 정제 스크리닝을 통해서 cnDUSP12 단백질을 얻는 데 성공함.</li> <li>cnDUSP12 단백질의 회절 실험 데이터를 바탕으로 단백질 구조 규명에 성공함.</li> <li>cnDUSP12 단백질 구조를 바탕으로 탈인산화 활성 자리를 파악함. 탈인산화효소 활성화 자리인 Cysteine 잔기와 P-loop, WPD-loop을 확인함.</li> <li>cnDUSP12의 초안 작성까지 완료함.</li> </ul>
<p>㉕ Insulinase family protease M16 단백질의 결정화 스크리닝 수행</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>M16 단백질 결정을 얻는데 성공함.</li> <li>고해상도 구조 규명을 위해서는 추가 회절 실험이 필요할 것으로 보임.</li> </ul>
<p>㉖ TliDEF 단백질 복합체 발현 및 Cryo-EM 스크리닝</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Pseudomonas fluorescens</i>에서 안정적인 TliDEF 단백질 복합체를 발현 및 정제하는 것에 성공함.</li> <li>TliDEF 단백질의 cryo EM 샘플링을 통해 최적 그리드 조건을 파악하였고 TliDEF 단백질의 단입자 구조 분석을 진행함.</li> </ul>

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

성과목표		전략 미생물 해독	유용 유전 자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커 개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표			20				5			4
1차년도	목표		5				-			1
	실적		1				1			2
2차년도	목표		5				1			1
	실적		25				1			1
3차년도	목표		5				2			1
	실적		10				4			1
4차년도	목표		5				2			1
	실적		0				1			1
계	목표		20				5			4
	실적		36				7			5

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활동등)	
	특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문 SCI	논문 비SCI			논문 평균 I F	학술발표		정책 활용
											백만원				백만원	백만원			명	
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	10	10												30	20	10	10		10	
최종 목표	4	2												12	3	40	4	12		4
당해년도	목표	4	2			-								12	3	40	4	12		4
	실적	14	5			1								36	6.9	212	8	12		7
달성률 (%)	350	250				-								300	230	530	200	100		175

#### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	동물 병원성 모델 미생물의 탈인산화효소 유전자 변이균주 라이브러리 구축 및 병원성 조절 인자 분류 기술
②	다중오믹스 분석 기술
③	유용유전자원 발굴 및 조절물질 스크리닝 시스템 구축
④	동물 병원성 모델 진균 유용 유전자의 주요 병원균 종별 기능 분석 및 교차 연구 기술
⑤	식물 병원성 모델 진균의 WD40 단백질 Gda1 및 Ynd1, Dbr1에 대한 과발현체 제작, 단백질체 및 유전체 정보 확보
⑥	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 병원성 조절 전사인자 Hap2의 하위 신호전달인자인 Gpa2와 Crg1의 결합 모티프 확보
⑦	최소 억제 농도 측정 기술을 통한 동물 병원성 모델 진균의 약물 후보 물질 발굴
⑧	유질성 효모를 이용한 유용 물질 생산 파이프라인 개발
⑨	유전자 조작을 통한 바이오에너지/바이오매스 유용생산 진균 개발 기술
⑩	유전체 및 표현형질체 기반 농·축산 식품 유용미생물 성능평가지표 발굴
⑪	정밀하고 체계적인 농·축산 식품 유용 미생물의 전장유전체 분석 파이프라인 구축

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 결	정책 자료	기타
①의 기술	v					v				
②의 기술					v	v		v		
③의 기술	v					v		v		
④의 기술	v									v
⑤의 기술	v									v
⑥의 기술	v									v
⑦의 기술					v	v				
⑧의 기술	v									v
⑨의 기술					v					v
⑩의 기술					v			v		
⑪의 기술				v				v		

\* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	후속연구 활용 및 학계 기초 연구자료로 이용될 수 있음.
②의 기술	분석 방법을 이용한 후속 연구 진행.
③의 기술	유용 유전자원 발굴 및 조절물질 스크리닝 기술을 응용한 빠르고 효율적인 대량 스크리닝이 가능할 것으로 기대됨.
④의 기술	다양한 병원성 종별 기능 분석을 통해 폭넓은 종간의 병원성 관련 기능 연구를 진행할 수 있어 넓은 스펙트럼의 표적약물 개발을 위한 연구자료로 사용 가능함.
⑤의 기술	식물 병원성 모델 진균의 WD40 단백질에 대한 단백질체 및 유전체 정보를 이용한
⑥의 기술	<i>Cryptococcus neoformans</i> 의 병원성 조절 전사인자 Hap2의 하위 신호 전달 인자인 Gpa2와 Crg1의 모티프 분석에 대한 정보는 기존에 전무하였으며, 본 연구성과를 통하여 병원성을 저하시키는 표적약물개발을 위한 자원으로 사용 가능함.
⑦의 기술	병원성 모델 진균의 약물 후보 물질을 발굴해 진균 감염 치료제를 위한 연구로 사용 가능함.
⑧의 기술	유질성 효모의 특징을 활용한 유용 물질 생산 파이프라인을 구축하여 추후 다양한 유용 물질 개발에 필수적인 학문적 기반을 제공함.
⑨의 기술	바이오 에너지 및 바이오 매스 대량 생산을 할 수 있는 진균을 개발하여 고품질 친환경 에너지 생산 기술로써 활용될 것으로 기대 됨.
⑩의 기술	향후, 친환경 농자재로서 농식품 유용미생물의 가능성을 신뢰할 수 있는 검증지표로 사용 가능할 것임.
⑪의 기술	유전체기반 농식품 유용미생물의 활성능 검증을 통한 신뢰할 수 있는 친환경 농식품 유용미생물의 농·축산 농가로의 보급 및 식품산업용 프로바이오틱스 균주의 학문적 기반을 제공함.

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전 자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커 개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		20				5			4
연구기간내 달성실적		36				7			5
연구종료후 성과창출 계획	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표										연구기반지표												
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)				
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출		투자유치	논문				학술 발표	정책 활용		홍보 전시			
											SCI		비SCI	논문평균 I F									
단위	건	건	건	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	명	건	건		건	명	건	건					
가중치	10	10			0									30	20	10	10		10				
최종목표	4	2			0									12	3	40	4	12	4				
연구기간내 달성실적	14	5			2									36	6.9	212	8	12	7				
연구종료후 성과창출 계획	2건 (5년 이내)	5건 (5년 이내)	없음	없음	2건 (5년 이내)	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음	없음	6건 (5년 이내)	없음	없음	없음	없음	10명 (5년 이내)	없음	없음	없음	없음

연구종료 후 게재 논문

- 없음 -

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>	최소 억제 농도 측정 기술을 통한 동물 병원성 모델 진균의 약물 후보 물질 발굴		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	55,000천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간	1년	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2023년
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	해당 없음		

핵심기술명 <sup>1)</sup>	유용유전자원 발굴 및 조절물질 스크리닝 시스템 구축		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	100,000천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input checked="" type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간	2년	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2024년
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	해당 없음		

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