

최 종 보 고 서

편집순서 1 (표지)

<p>(뒷면)</p> <div data-bbox="183 1411 391 1523" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: 80px;"> <p>주 의 (편집순서 8)</p> </div> <p style="text-align: center;">(15 포인트 고딕체열)</p> <p style="text-align: center;">↑ 6cm ↓</p>	<p>여 러 주 요 꿀 벌 질 병 으 로 유 기 되 는 휘 발 성 물 질 분 석 과 향 후 조 기 진 단 에 의 응 용</p> <p>농 림 축 산 식 품 부</p>	<p style="text-align: right;">(앞면)</p> <div data-bbox="614 470 877 560" style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 10px;"> <p style="text-align: center;">발간등록번호</p> <p style="text-align: center;">11-1543000-000234-01</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>여러 주요 꿀벌 질병으로 유기되는 휘발성물질 분석과 향후 조기진단에의 응용</p> <p>Analysis of volatile chemicals induced by honeybee diseases and its application to early diagnosis in the future</p> <p>서울대학교 산학협력단</p> <p>농림축산식품부</p> </div>
---	---	---

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “생명산업기술개발사업” 과제(세부과제 “여러 주요 꿀벌질병으로 유기되는 휘발성 물질 분석과 향후 조기 진단에의 응용에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2013 년 10 월 17 일

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 권형욱

세부연구책임자 :

연 구 원 : 김진희

연 구 원 : 박건웅

연 구 원 : 박두리

연 구 원 : 연경아

요 약 문

I. 제 목

여러 주요 꿀벌질병으로 유기되는 휘발성 물질 분석과 향후 조기 진단에의 응용

(Analysis of volatile chemicals induced by honeybee diseases and its application to early diagnosis in the future)

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 꿀벌이 집단 내에서 발병된 질병에 따른 특이적 냄새를 감지하여 집단 수준으로 전염이 되지 않도록 감염 개체에 대해 청소 행동을 보이는 신경행동학적 기전을 연구하고, 화학물질을 동정함으로써 꿀벌의 질병을 조기 진단할 수 있는 원천적 정보를 구축하는데 목적을 지니고 있다. 현재까지 꿀벌의 대표 질병으로 인해 개체에서 유도되는 화학자극원의 성분 분석과 이를 감지하여 집단 밖으로 내보내는 꿀벌들의 화학감각 정보 처리 및 행동 양식에 대한 연구는 알려진 바가 거의 없는 실정이며, 질병의 발병 유무를 확인할 수 있는 현재의 형태학적, 분자생물학적 방법의 시간적 불리함에 대한 대안으로서 화학물질 감지의 중요성은 날로 증가하고 있다. 따라서 본 연구에서는 유충 및 성충에서 분비되는 질병 화학물질의 민감도 (Sensitivity), 특이도 (Specificity), 진단 검정 통계량, 양성 예측도 (Predictive value of positive test), 음성 예측도 (Predictive value of negative test), 정확도 (Accuracy) 등 정확한 통계분석을 위한 질병에 감염된 여러 봉군의 소비 수집을 통해 질병을 조기에 진단할 수 있고, 꿀벌 사회를 유지하는 개체 상호간의 화학감각 의사소통에 대한 행동 메커니즘을 밝히고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 많은 곤충 사회에서는 기생자 및 감염원의 침입에 대응하기 위한 다양한 방어 기작 및 행동방식을 발달시키는 방향으로 진화했음.
- 많은 개체가 집단을 이루어 살아가는 사회적 곤충의 경우 높은 유전적 근연관계와 서로간의 잦은 접촉(contact)으로 인해 병원성 감염에 취약한 생태적 환경을 보인다. 따라서, 이들 사회적 곤충은 집단을 유지하기 위한 행동적 방어와 소독 및 청소 행동 등의 사회적 면역(social immunity)을 발달시키는 방법을 진화적으로 선택하게 되었음.
- 질병에 걸린 성충과 유충을 집단 밖으로 버리는 청소 행동은 외부의 감염원을 감지 · 인식하고 적절한 방어시스템을 가동하는 시작점 역할을 한다고 할 수 있으며, 꿀벌의 경우 병에 걸린 유충이 분비하는 화학물질(chemical stimuli)을 인식하여 감염된 유충을 버리는 청소행동을 보이게 됨.
- 발병 초기에 화학감각 자극을 조기에 효과적으로 인지하고 병의 대발생 이전에 감염된 개

체를 제거하는 청소 행동은 집단을 유지하는 중요한 전략 중의 하나라고 할 수 있으며, 질병에 걸린 개체가 분비하는 화학물질을 동정하고 이를 감지하는 개체의 화학감각 정보처리 메커니즘 및 청소 행동을 분자신경생리학적 방법으로 연구하는 것은 매우 중요한 과제이며 질병을 진단하는 기존 방식의 시간적 불리함을 극복할 수 있는 대안이 될 수 있음.

○ 본 연구는 사회성 곤충에서 나타나는 특이적 면역 행동을 이해하기 위해 꿀벌을 모델로 접근하고자 하며, 대표 질병에 걸린 개체가 분비하는 화학성분을 분석, 동정하고 감각모에서 특이적 냄새 성분에 대한 후각반응의 특성을 밝혀 청소 행동으로 이어지는 개체들의 신경행동 기전을 연구함으로써 특정 질병의 대발생 이전의 효율적인 조기 진단 방식을 마련하고자 함.

연구 접근방법으로 꿀벌의 인지 및 학습능력을 이용하여

▶ 꿀벌의 대표적 질병인 노제마, 낭충봉아부패병, 날개불구병이 걸린 꿀벌 개체에서 분비하는 화학자극원을 수집, 구성 성분을 동정

▶ 전기생리학적 방법을 이용한 더듬이에 있는 화학감각기관 및 단일 감각모에서의 질병 특이적 냄새 성분에 대한 후각반응 측정(Electroantennogram 및 Single sensilla recording)

- 더듬이신경생리활성측정법 (Electroantennogram)와 단위감각모신경생리활성측정법 (Single sensilla recording)은 식물의 향기성분, 페로몬, 자극성 화학물질 등과 같은 향기성분 뿐만 같은 감각세포에서의 반응을 감각 신경에서의 전위 변화로 측정 할 수 있는 전기생리학적 장비이다. EAG와 SSR기록 시스템은 곤충에서의 감각적 인지 작용과 민감성을 신경학적, 분자적 측면에서 그 메커니즘을 밝히기 위하여 사용됨.

IV. 연구개발결과

○ 꿀벌 집단 내 대표적인 질병인 Nosema 곰팡이균과 Sacbrood virus (SBV) 에 의해 감염된 서양벌 및 토종벌 성충과 유충에서 질병 특이적 화학물질 분비가 이루어지고 있음을 기체크로마토그래피 질량분석법으로 확인하였고, 화학물질을 동정하였음.

○ 노제마 균에 감염된 꿀벌 성충의 경우 Oleic acid의 분비 현상이 나타났으며 이 물질의 분비현상은 꿀벌 뿐만이 아니라 동일한 벌목 내 개미 집단 내에서도 일어나고 있다는 기존의 연구결과가 보고되었음.

○ SBV에 감염된 유충은 Benzyl alcohol의 분비가 급격히 높아지고 있음을 확인하였음. 이는 꿀벌의 또다른 주요 질병인 Chalkbrood 병에 감염된 꿀벌 집단에서도 동일한 물질이 분비된 연구보고가 있음.

○ 질병특이적 화학물질에 대한 화학감각수용체를 동정하기 위해 토종벌 내 화학감각기 수용체 유전체 정보를 확보하였음. 이러한 결과는 기존에 알려진 서양벌의 유전체 정보와 함께 토종벌 중 특이적 감각수용체 정보 확보, 특정 화학물질에 대한 수용체 동정 및 기능 분석 등의 연구에 매우 중요한 생물 유전학적 정보가 될 것임

○ 위의 결과를 토대로 실제 꿀벌 미각 수용체를 이종 발현하여 화학물질에 반응하는 수용체를 동정하였고 기능분석 연구를 진행하고 있음.

○ 생체 후각 및 감각 정보 기반의 고감도 바이오 센서 진단 키트 연구 및 개발을 위해 국내 연구진과 협력하고 있고 향후 꿀벌 질병 특이적 화학감각물질을 조기 진단 할 수 있는 진단 키트 개발을 도모하고자 함.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구는 꿀벌에 위해한 질병의 조기 진단을 위해 질병에 걸린 개체들이 유도하는 화학감각

물질들을 동정하고, 이를 인지하여 청소행동을 보이는 개체들의 신경기관에서 후각 정보처리 및 행동의 관계를 규명하는 것을 주목표로 한다. 이러한 화학성분과 감각기관의 반응으로 나타나는 면역행동에 대한 근본적 지식의 축적은 병의 대발생을 막기 위한 빠른 초기 진단을 가능하게 하고 시기적절한 방제 대책을 수립하는 토대를 마련할 수 있다. 질병에 따른 특이적 냄새 인지 반응은 생물의 감각정보 처리와 면역반응 상호 작용에 따른 고유한 내재 행동 방식은 역할에 따른 계급 집단을 구성하는 사회성 동물의 진화 방식을 설명할 수 있는 주요한 단서가 될 것이다. 본 연구를 통해서 사회성 곤충의 특이적 사회성 면역에 따른 신경기관에서의 화학감각수용 및 행동제어, 정보전달 및 정보처리 등의 지식을 배가시키고, 이러한 연구결과를 국제수준의 저명한 학술지에 게재함으로써, 우리나라의 과학의 위상 및 관련분야의 전문 연구인력 양성이 기대됨.

SUMMARY

This research project mainly focus on the identification of induced chemicals by honey bee diseases or pathogens from individual bees as well as honey bee hives. Honey bees are thought to communicate each other with less- or non-volatile compounds due to crowded environment in the hives. However, these chemicals are not yet identified to identify or diagnose the status in the honey bee health in the colony. Recently many quick-diagnosis analysis of honey bee diseases and pathogens by PCR applications, but more fast detection application protocols are needed to prevent the fast spread of diseases in the hives.

Therefore, this research project is to challenge to identify marker chemicals in the major honey bee diseases. Moreover, we try to seek for the potential chemosensory receptors responding to marker chemicals to apply to high sensitive nano-detectors in the near future. This research project was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through the Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

CONTENTS

1. Background of Research
2. Current R&D Situations
3. Significance and results of the Research
4. Progress of the Research Project and Contributions
5. Outcome of Research Project and Future Directions
6. Oversea R&D information collected through Present Research Project
7. Research Facility and Equipment
8. Reference

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

1 절. 연구개발의 필요성

1. 꿀벌의 경제적 가치

(가) 꿀벌은 농작물의 화분매개라는 공익적 가치와 벌꿀, 화분, 로얄젤리, 봉독, 프로폴리스 생산이라는 산업적 가치를 지닌 사회성 곤충으로, 국내에서 6조원 규모의 경제적 가치를 지니고 있음.

(나) 우리나라 꿀벌사육 규모는 2008년 기준으로 약 190만 통으로 세계 11위이며, 벌꿀 생산은 2만 7천 톤으로 세계 15위를 기록하고 있으며, 산업적 육성을 도모하고 공익적 기능을 확대하기 위한 계획이 수립되고 있음.

(다) 최근 세계적으로 꿀벌산업은 붕괴현상(CCD:colony collapse disorder)이 발생하여 전례 없는 어려움을 맞고 있으며, 국내에서는 붕괴증상을 제외한 여러 질병으로 인하여 농가에 경제적 손실을 유발하고 있음.

(라) 이러한 국제적 꿀벌 위기에 대응력을 높이기 위한 국가적 대응체계 구축이 시급하며, 꿀벌의 가치를 이해하고 양봉산업을 육성하기 위한 연구 분야를 강화해야 함.

Table 1. 2008년 전국 꿀벌 사육현황

구분	재래종(토봉)	개량종(양봉)	합계	재래종(토봉) 비율
사육농가(호)	13,883	20,219	34,102	40.7%
사육군수(군)	314,511	1,544,063	1,858,574	16.9%

출처. 농림수산식품부

2. 꿀벌의 대표 질병

(가) 꿀벌의 질병인 노제마병은 *Nosema apis* 균에 의해 발생하며, 국내에서는 60년대 후반에 처음 발생하여 70년대부터 전국일원으로 큰 피해를 끼쳤고, 현재도 전국적인 규모에서 산발적으로 발생하여 양봉가에 피해를 입히고 있음.

(나) 노제마병도 다른 미생물들처럼 포자형(휴식형)과 발육형으로 존재하며 미국부저병과 백목병의 포자처럼 자재에서 일 년 이상, 꿀에서는 3~4개월 잠복할 수 있음. 감염된 벌은 포자와 발육형을 모두 가지고 있는 것이 보통임 (Tom Webster, 2010).

(다) 낭충봉아부패병 (Sacbrood Virus)는 양봉과 토종벌에서 발병하는 바이러스성 질병으로써, 중국낭충봉아부패병바이러스(Chinese Sacbrood Virus)가 국내의 토봉에 많은 피해를 입힌 원인체가 됨. 이 병이 발생한 양봉가에서는 약 한 달 안에 모든 봉군이 감염되어 약 두 달이면 모두 폐사하게 되며 현재로서는 예방과 치료가 불가능하고 확산방지를 위해서는 반경 6km 안의 모든 꿀벌을 살처분해야 할 것으로 보임.

(라) 날개불구병(Deformed Wing Virus)는 국내에서 2005년도 처음으로 진행되어진 바이러스 질

병으로서 세계적으로 가장 많이 발병하며, 꿀벌 응애에 의해 매개되는 것으로 알려져 있음 (Bowen-Walker et al., 1998). 이는 꿀벌이 번데기에서 성충으로 가는 시기에 꿀벌 발육에 영향을 끼쳐 성충의 날개 기형을 발생시키며 봉군형성에 심각한 영향을 주는 것으로 생각되어지고 있음. (Genersch et al., 2006)

Table 2. 토종별 사육농가 피해 현황(* 10.7 현재)

지역	사육규모	피해상황	피해율	피해규모	피해액 산출내역
강원	34,068군	16,412군	48.2%	4,267백만원	16,412×260천원
전남	215,000	56,511	26.2	14,560	56,000×260천원
전북	131,108	80,076	61.1	20,800	80,000×260천원
충북	14,682	1,500	10.2	390	1,500×260천원
경남	22,723	12,150	53.5	2,126	12,150×175천원
합계	417,581	166,649	39.9	42,143	

Table 3. 지역별 피해조사 결과

지역	조사 농가수	사육 군수	피해군수					
			완전폐사	%	부분폐사	%	폐사	%
강원	5	484	351	72.5	100	20.6	451	93.1
경기	7	384	80	46.8	99	25.7	179	72.6
충남	5	680	80	26.4	178	26.1	258	52.6
충북	4	864	40	4.6	12	1.3	52	6.0
전북	3	1,040	820	78.8	60	5.7	880	84.6
전남	3	847	482	56.9	255	30.1	737	87.0
경북	2	2,060	1,174	56.9	636	30.8	1,810	87.8
경남	5	1,600	960	60.0	440	27.5	1,400	87.5
합계	34	7,959	4,187	52.6	1,780	22.3	5,967	74.9

3. 꿀벌 질병 진단 방법 및 문제점

(가) 꿀벌의 세가지 대표적 질병을 진단하는 방법으로는 현미경을 이용한 노제마 검정, 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 통한 노제마, 낭충봉아부패병, 날개불구병 유전자 확인, 등온증폭법을 통한 낭충봉아부패병 검정이 있음.

(나) 현미경을 이용한 노제마 검정은 400배 광학 현미경을 이용하여 단경 2.3~3 μ s, 장경 4.4~5.0 μ s 쌀알 모양의 포자를 확인하고 질병 유전자 서열을 이용한 중합효소 연쇄 반응(PCR)으로 유전자를 증폭시켜 노제마, 낭충봉아부패병, 날개불구병을 진단하는데 이용함.

(다) 하지만 현미경 및 중합효소 연쇄반응, 등온증폭법은 전문가가 실시해야 하며 발병 후 진단이 확인이 가능하며 빠른 진단이 불가능한 시간적 문제점을 갖고 있음.

(라) 국내의 꿀벌질병 전문가 및 체계적인 진단 및 방역을 주도적으로 담당할 기관과 조직 역시 매우 미약한 실정이고, 현재 꿀벌 질병의 진단을 양봉인에 의한 자가진단이 주를 이루지 못하여 극히 비효율적으로 진행되고 있을 뿐임.

(마) 따라서 정확하고 신속하게 진단을 내릴 수 있는 방법이 필수적으로 존재해야 하며 오진에 의한 치료제의 오용 및 남용으로 인한 보다 심각한 문제를 방지하여야 함.

(바) 외국의 연구진에 의해 병원성 곰팡이인 *Ascophaera apis*에 감염된 유충으로부터 수집되고

성충 꿀벌에 의해 감지되는 세 가지 휘발성 화합물들을 분석하여 건강한 유충에는 존재하지 않는 세 가지 화합물, phenethyl acetate, 2-phenylethanol과 benzyl alcohol 중 phenethyl acetate가 *Ascosphaera apis*에 감염된 유충과 관련되어 위생적인 활동을 유도하는 핵심 물질임을 밝혀짐. (Jodi A. I et al., 2009)

(사) 본 연구진은 노제마, 낭충봉아부패병, 날개불구병 질병에 감염된 유충으로부터 분비되는 화학물질을 수집하여 기체 크로마토그래피 질량분석기(gas chromatography-mass)를 통해 화합물의 질량분석, 정성, 정량분석, 동위원소 존재비 분석을 하려고 함. 각 질병에 따른 특이적 화학물질을 동정하여 이를 꿀벌 감각기에서의 후각반응과 청소 행동으로 이어지는 신경행동 기전을 밝혀 질병 발생 이전의 효율적인 조기 진단을 마련하여 적절한 방제를 이루고자 함. 이는 신속하고 정확한 질병 진단을 위한 방법을 보급하고 오진에 의한 치료제의 오용 및 남용을 막아 적절한 방법의 방제를 위한 기준을 설정하는데 이바지할 것으로 예상됨.

2 절. 연구개발의 최종목표

본 연구는 질병에 감염되어 분비되는 유충의 화학물질(chemical stimuli)을 수집 및 동정하여 질병 감염 개체에 대한 청소 행동의 신경행동학적 기전을 연구하고, 이를 꿀벌의 질병을 조기 진단할 수 있는 정보를 구축하는데 목적이 있음. 현재까지 알려지지 않은 꿀벌의 대표 질병에서 유도되는 화학물질의 성분을 분석하여 이를 감지하여 발생하는 청소행동 즉, 꿀벌간의 화학감각 정보 처리 및 행동 양식에 대한 연구를 이뤄 신규 후각 수용체를 찾아 신경정보전달 메커니즘을 밝혀내려 함. 따라서 본 연구진에서는 꿀벌 사회의 유지를 위한 개체 상호간의 화학감각 의사소통에 대한 행동 메커니즘을 밝히고, 이를 통해 시간적 불리함을 지닌 형태학적, 분자생물학적 방법의 진단을 대안으로 질병의 조기 진단을 신속하게 진행하고 올바른 방제를 이룰 수 있는 방법을 제시하고자 함 (그림 1).

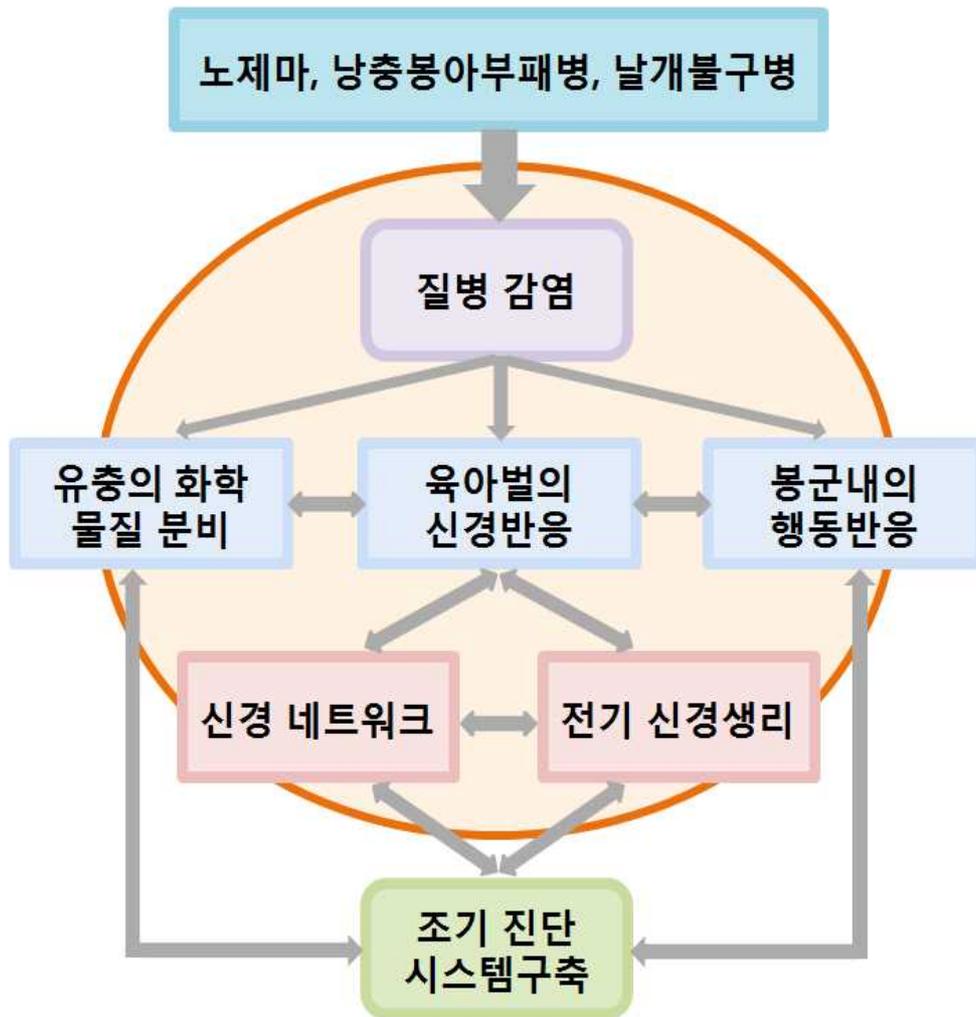


그림 1 연구 추진 전략

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1절 국내외 연구동향

1. 최근 미국을 비롯한 유럽 등 글로벌 연구는 곤충의 후각 수용체를 이용한 바이오 센서를 만들기 위한 노력을 하고 있음. 2011년 유럽의 신기술 발표회에서는 SF9 cell (나방 유래 곤충 세포)를 통하여 초파리의 후각 수용체를 이중 발현 시켜 SAW resonator에 부착시켜 성장과 생존을 관찰함.
2. 독성을 가지는 화학물질, 고에너지 화학물, 고반응성 물질, 제약 성분등을 이용하여 초파리의 화학감지 수용체 중 후각 수용체 스크리닝을 진행하여 각 화학물에 대한 반응성의 크기와 민감도를 측정하여 초파리의 후각 수용체가 화학물을 감지할 수 있는 하나의 생물 소재로 이용가능하다는 것을 보고하였음.
3. 곤충에서 화학물질을 인지하는 생체 물질이 포유류가 화학물질을 인지하는 시스템인 후각 시스템과 동일하다는 것이 보고 되었고, 2004년 제2의 화학 감지 수용체의 발견으로 노벨 의학상을 수상 하고 난 이후로 후각이라는 화학감지 메커니즘 연구가 시작되었음.
4. 곤충의 유전체 사업이 진행 된 이후 초파리, 나방, 모기, 꿀벌의 후각 시스템을 이용하여 곤충 모델을 형성하여 화학감지의 기반을 마련함.
5. 꿀벌의 후각 기관은 공기중 분자 10억개 내의 화학분자 1개를 인지 할 수 있을 정도로 민감한 반응성을 나타내는 것을 보고 함으로서, 바이오-센서의 화학 감지 물질에 곤충의 화학 수용체가 가장 적합하다는 것을 간접적으로 보여줌.
6. 특히 곤충의 화학감지 수용체는 화학물질에 대하여 매우 민감하게 반응 하고, 그 종류 역시 매우 다양하여 수많은 화학물질 및 화합물질을 감지할 수 있는 반응체로 적합함.
7. 사람을 비롯한 꿀벌 등, 동물이 질병에 걸릴 경우 여러 다양한 냄새 성분을 분비한다고 알려져 있으며 이는 인공 바이오 센서 제작에 필요한 생체 감각 정보 기반의 과학적 근거를 제공하고자 많은 연구가 최근에 이루어지고 있음.
8. 하지만 가축 질병에 대응하기 위한 여러 진단 기법 개발이라는 관점에서 특이적 화학물질을 동정하여 질병 초기에 조기 진단을 위한 chemical based 인공 센서 진단 키트에 대한 국내 연구는 미비한 실정임.
9. 미국 애리조나에 위치한 USDA 꿀벌 reserch 연구소에서는 질병 및 농약등에 의해 피해를 받고 있는 꿀벌 집단의 소비에서 분비되는 화학물질을 찾기위한 실험등이 진행 중에 있음.
10. 본 연구 결과를 위한 연구진이 보유한 기술수준은 신경세포 화학감지 수용체 연구방법론 (칼슘이미징, Single sensilla recording, Patch clamp 등) 면에서 국내 최고 수준이며 세계 수준에서 결코 뒤떨어지지 않음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1 절. 이론적 및 실험적 접근방법

1. 기술정보수집

(가) 연구개발에 필요한 문헌 및 최신 정보가 수록된 논문은 서울대학교 중앙도서관에서 제공하고 있는 web-based CD database를 활용하고 특허와 같은 시장 및 기술 동향에 관한 내용은 특허청을 이용하며 관련 선도 연구자들의 시각 및 정보는 학회 참석을 통해 수집할 예정이다.

(나) 다른 기관과의 협조방안: 본 연구개발에 필요한 장비 및 인력은 본 연구팀이 소속된 기관에서 확보하고 있어 그 활용에 있어 별다른 문제가 없으나, 시험 재료로서 확보되지 못한 질병에 감염된 꿀벌을 현재 본 연구진과 구축되어 있는 국내 양봉 및 토봉 농가와와의 인프라를 통해 협조 받아 이용 가능함.

2. 연구개발방법론(접근방법)

(가) 선행연구와의 연계성

- 관련연구결과1. Olfactory responses in a gustatory organ of the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*.(PNAS, 2006, 제1주저자): 모기 주둥이에서 세계 최초로 후각기능을 발견, 전기생리학, 분자신경생물학, 곤충뇌해부학, 세포생물학적 연구방법
- 관련연구결과2. Genomics and transcriptome profile of the odorant receptor gene family in arbovirus vector mosquito *Aedes aegypti*. (Insect Molecular Biology, 2007, 공저자): 탕기열매 개모기인 *Aedes aegypti*에서의 새로운 후각수용체 유전자의 발굴 연구, Bioinformatics
- 관련연구결과3. Floral components 관련 후각 반응 : 연령에 따른 후각의 반응의 차이를 Electroantennogram을 이용하여 확인

2 절. 연구내용

1. 추진계획 및 전략

(가) 노제마, 낭충봉아부패병에 감염된 곤충 시료 확보 (그림 2. 대전광역시, 경기도 이천, 경상북도 예천, 전라남도 광주, 경상남도 밀양)

① 노제마 : 서양벌, 토종벌

② 낭충봉아부패병 : 토종벌

③ 유충 및 성충에서 분비되는 질병 화학물질의 민감도 (Sensitivity), 특이도 (Specificity), 진단 검정 통계량, 양성 예측도 (Predictive value of positive test), 음성 예측도 (Predictive value of negative test), 정확도 (Accuracy) 등 정확한 통계분석을 위한 질병에 감염된 여러 봉군의 소비 수집.

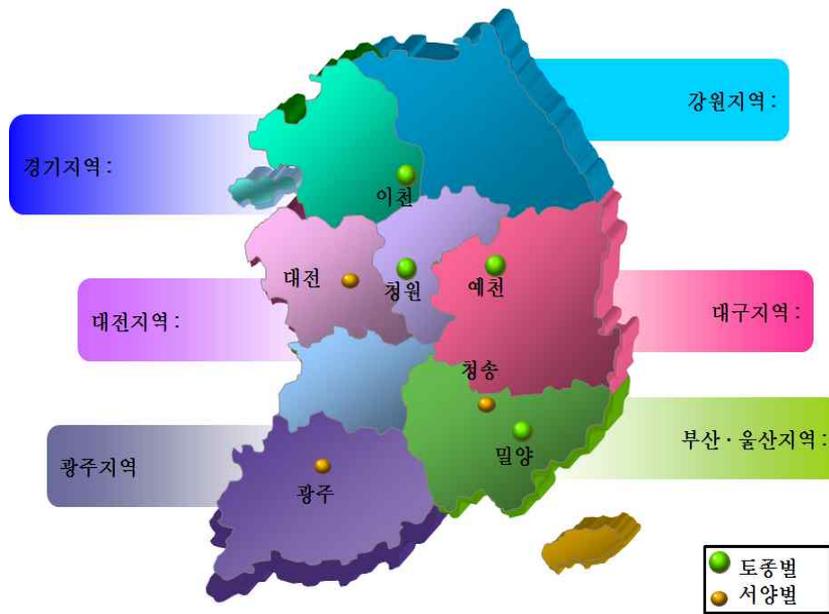


그림 2 국내 토종벌과 서양벌 양봉가와의 인적 인프라

(나) 질병에 감염된 소비로부터 유충에서 분비되는 화학물질 수집.

- 아리조나 투산에 위치한 Carl Hayden USDA 꿀벌연구소에서 사용되는 화학물질 수집기를 이용하여 각 질병에 따라 유충에서 분비되는 화학물질 수집 (그림 3)

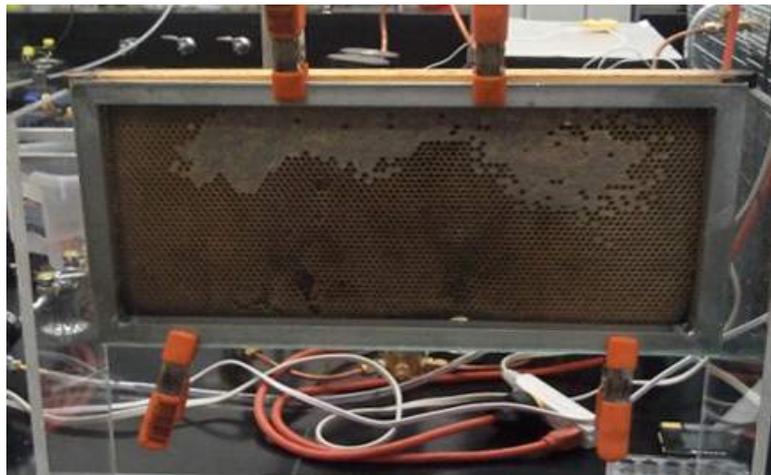


그림 3 꿀벌소비로부터 휘발성 화학물질 수집 기기장치
(아리조나 투산에 위치한 Carl Hayden USDA 꿀벌연구소)

(다) 기체 크로마토그래피 질량분석기 (gas chromatography-mass)를 이용한 화학물질 분석

- GC-MS를 이용한 연구 대상 질병에 감염된 유충으로부터 분비되는 특이적 화학물질 (chemical stimuli)의 질량분석, 정성, 정량분석, 동위원소 존재비 분석. 아리조나 투산에 위치한 Carl Hayden USDA 꿀벌연구소에서 제공하는 화학물질 정보를 이용한 질병에 따른 다양 및 특이적 화학물질 분석

(라) 꿀벌 감각기에서의 특이적 화학물질에 대한 후각반응 측정

: GC-MS를 이용한 분석된 화학물질을 이용하여 꿀벌 감각기에서의 후각반응 측정(그림 4)

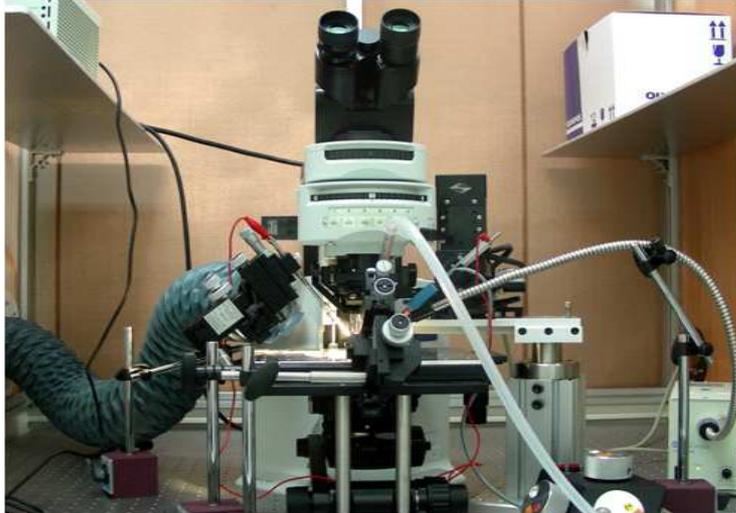


그림 4 전기생리학적장비 (더듬이신경생리활성측정법)

(마) 꿀벌의 인지능력 분석 (Proboscis Extension Response)

: GC-MS에서 분석된 화학물질을 이용한 꿀벌의 인지능력을 분석

3 절. 연구결과

1. 노제마 및 Sacbrood virus에 감염된 곤충 시료 확보:

(가) 노제마균: 2012년 9~11월 사이 대전광역시와 광주 지역의 농가에서 시료 수집. 서울대학교 농업생명과학 대학 옥상(그림 5)에서 사육 중인 서양벌 성충을 이용하여 Nosema feeding assay 를 실내 배양기(그림 7)에서 진행

(나) Sacbrood virus: 서울대학교 농업생명과학대학 옥상에서 사육중인 토종벌 유충을 이용하여 SBV feeding assay를 실내 배양기(그림 8)에서 진행.



그림 5 서울대학교 농업생명과학 옥상 내 사육 중인 꿀벌 봉군

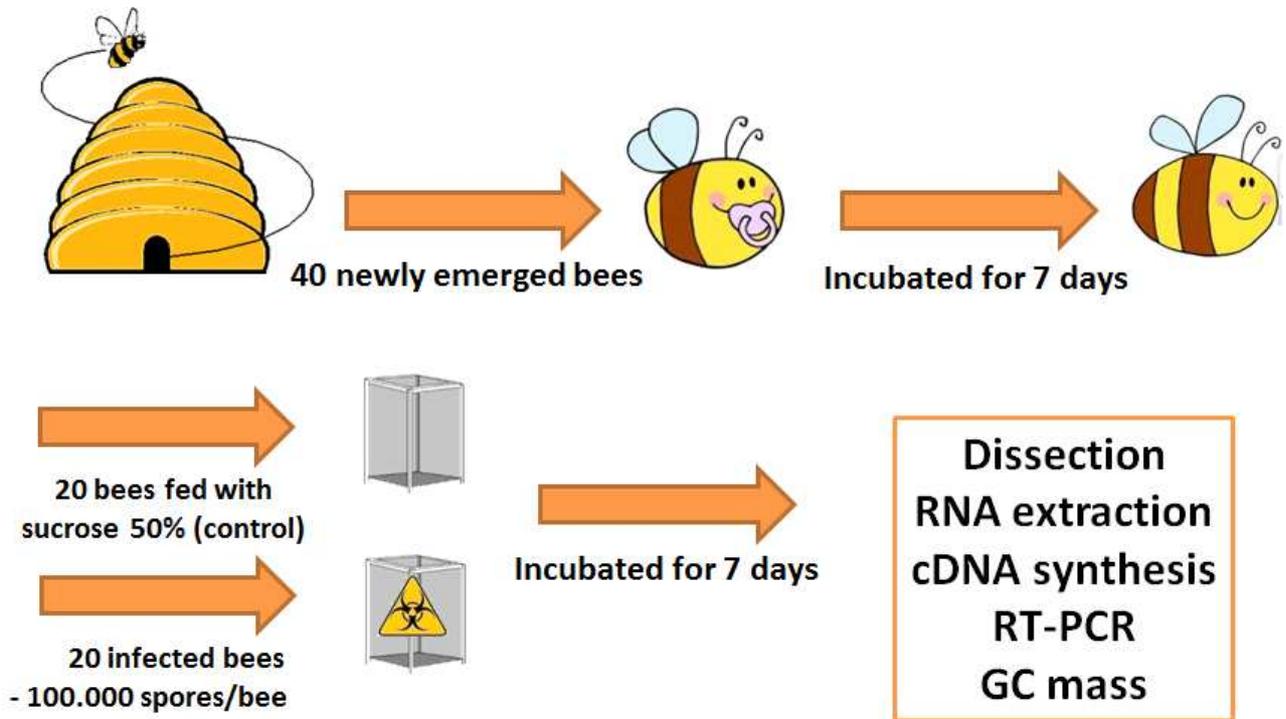


그림 6 노제마균 섭식 감염 실험 모식도

2. SBV 및 노제마 시료 확인

서양벌 성충 외역봉에 내재적으로 감염된 노제마균을 collection (그림 9)하여 정제한 후 이를 다시 새롭게 태어난 성충군에 7일 동안 섭식 감염 함. 감염 7일 후 샘플을 채집하여 실제로 노제마균이 감염되었는지 확인(그림 10) 후 GC mass 분석 시행.



그림 7 실내 배양기에서 사육 중인 꿀벌 성충(좌)과 노제마균을 섭식 감염시킨 꿀벌 성충 집단(우).

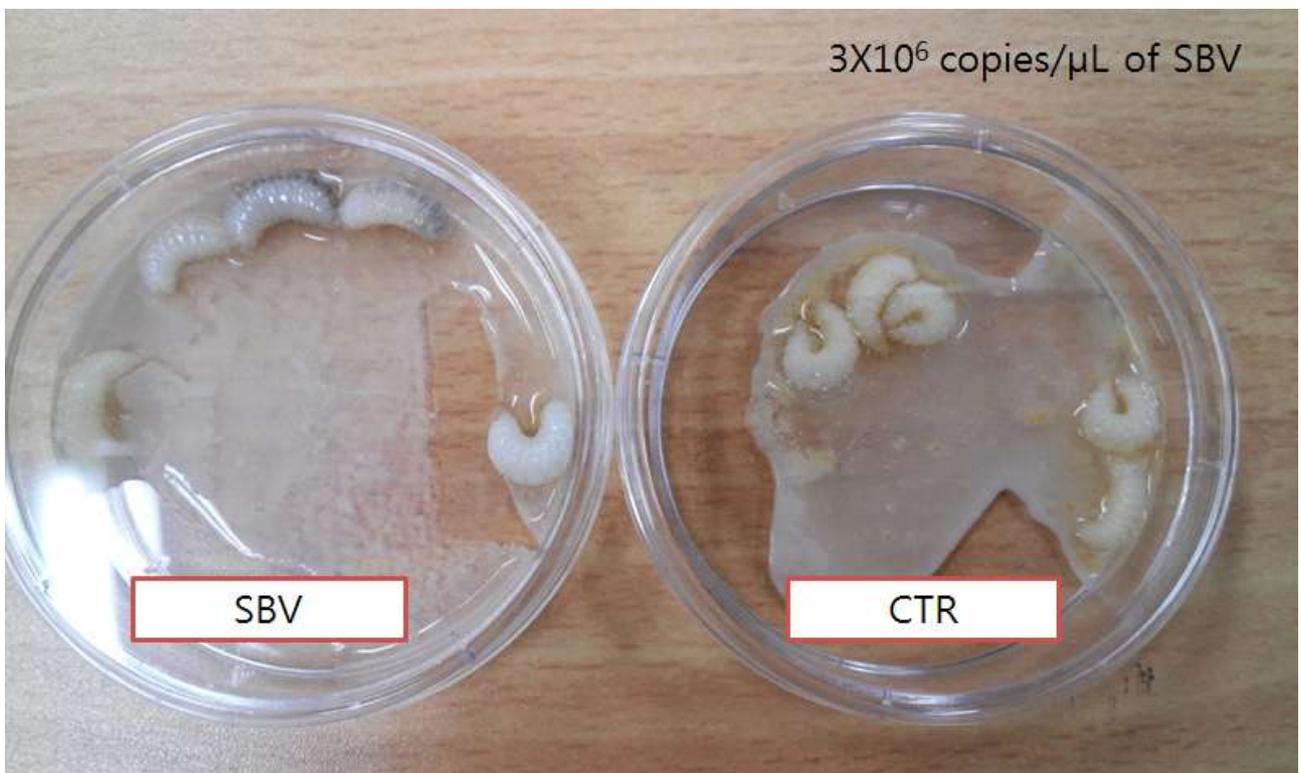


그림 8 Sacbrood virus feeding assay를 통해 감염 발생시킨 토종벌 유충군(좌)과 일반 먹이 섭식을 통한 control 유충군(우)



22 Low=0 High=4095 G

그림 9 서양벌 외역봉에서 수집한 노제마균(좌)과 *Nosema cerana* 유전자 발현 확인(우)

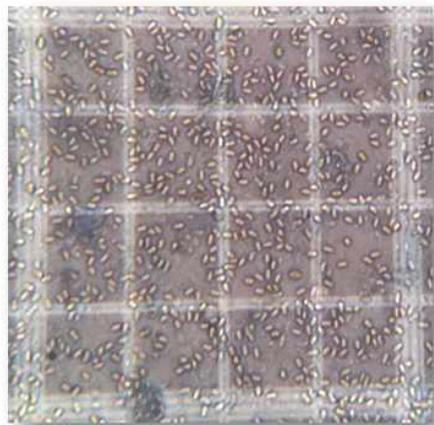
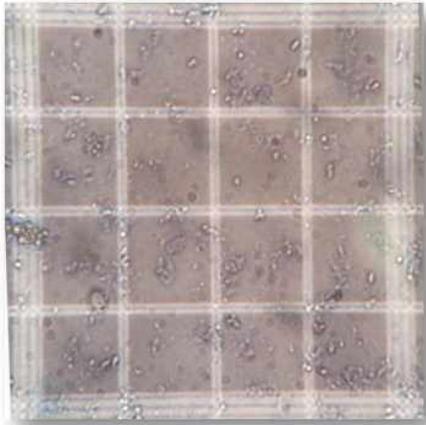


그림 10 서양벌 외역봉에서 수집한 노제마균을 섭식 감염시킨 서양벌에서 수집한 노제마균. Control(좌), 노제마 감염 성충군(우)

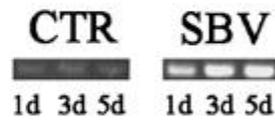


그림 11 SBV feeding을 통한 감염된 토종벌 유충(좌) 과 섭식 기간에 따른 유충에서의 SBV 유전자 발현양 확인

3. 기체 크로마토그래피 질량분석기(Gas chromatography-mass)를 이용한 화학물질 분석:
GC-mass 를 이용한 노제마균과 SBV 에 감염된 샘플로부터 분비되는 특이적 화학물질의 질
량분석 및 정량분석을 통해 화학물질 정보를 확인하고자 함.

(가) 대전, 광주지역에서 수집한 노제마균 감염 서양벌 성충: 노제마균에 감염된 서양벌 성충을
수집하여 GC-mass 분석을 시행한 결과 서양벌 및 토종벌 내,외역봉에서 분비되지 않았던
Oleic acid 가 특이적으로 분비되고 있음을 확인하였음 (그림 12). 이 결과를 토대로 실험실 내
에서 실내 사육을 통해 노제마균을 직접 섭식 감염시킨 서양벌 성충에서도 동일하게 oleic acid
가 분비함을 재확인 하였음 (그림 13). 이 결과는 동일한 벌목인 개미 사회에서도 나타나는 현
상으로 알려졌는데 노제마균과 같은 곰팡이병에 걸린 개미는 실제로 Oleic acid를 분비하고 이
를 인지한 집단 내 다른 개미들이 질병에 걸린 개미 및 그 사체를 버리는 행동을 한다고 보고
되었음.

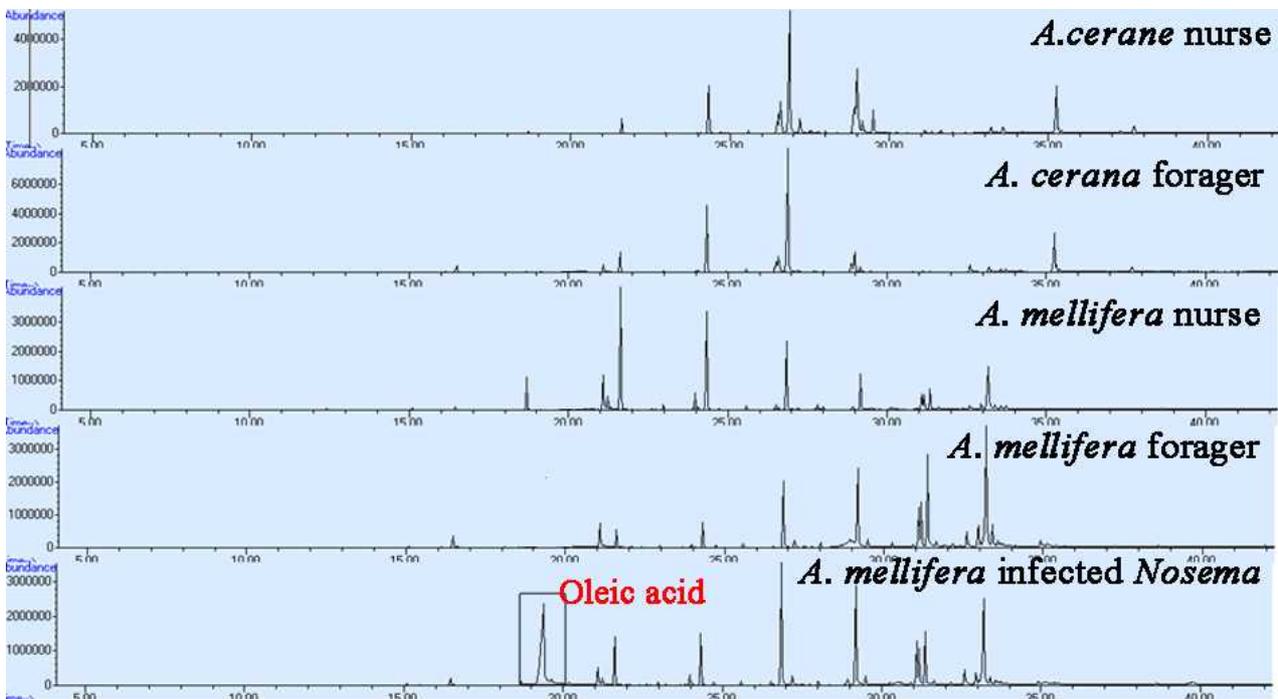


그림 12 노제마균 감염 서양벌 성충에서 토종벌 및 서양벌 내,외역봉에서 보이지 않던 Oleic acid가
분비하고 있음을 확인

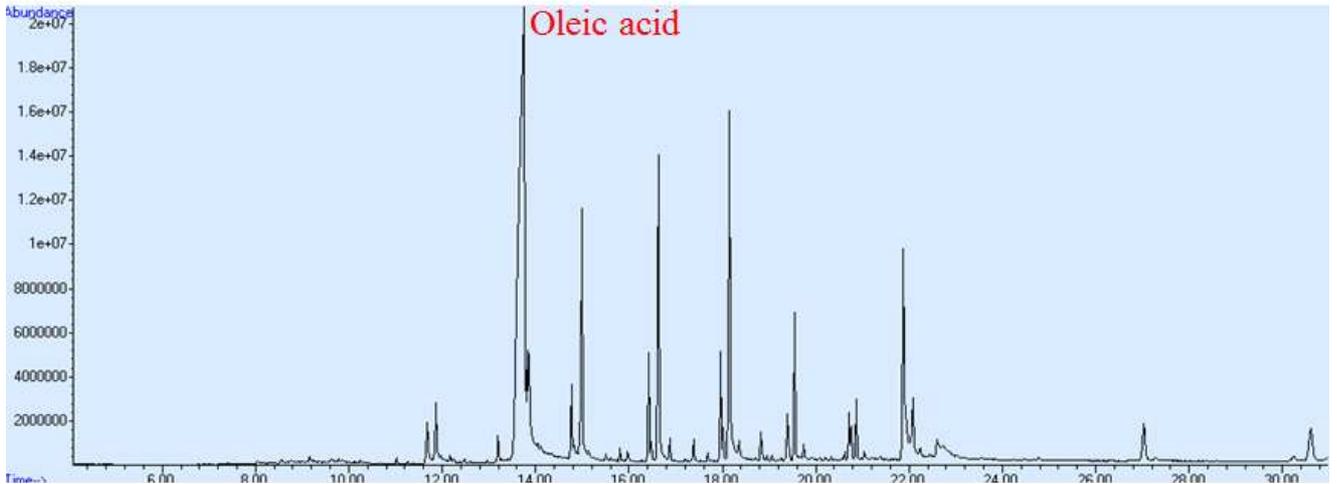


그림 13 노제마균을 섭식 감염시킨 서양벌 성충의 GC-mass 분석. 그림 12에서와 마찬가지로 Oleic acid 가 분비되고 있음.

(나) Sacbrood virus의 feeding assay를 통해 감염시킨 토종벌 유충: 서울대학교 농업생명과학대학 옥상에서 사육하는 토종벌 봉군에서 채집한 유충을 이용하여 SBV 감염을 진행하였음(그림 11). 5일간 SBV feeding을 통해 감염군에서는 control군에 비해 Benzyl alcohol의 분비량이 높은 결과가 나타남 (그림 14).

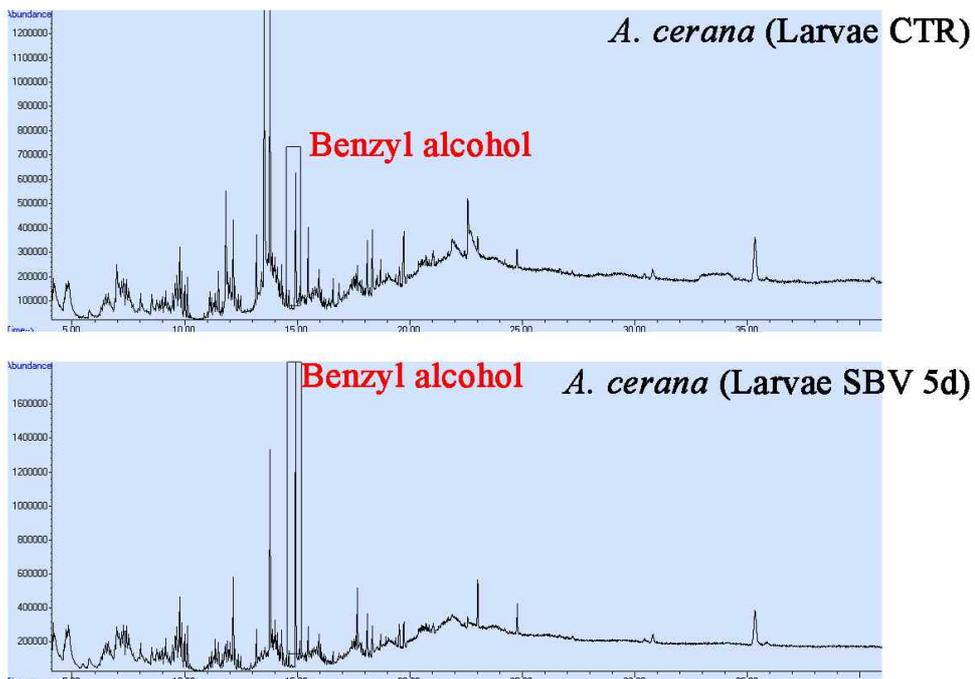


그림 14 Sacbrood virus를 섭식 감염시킨 토종벌 유충의 GC-mass 분석. 일반먹이를 먹은 control 군에 비해 감염군 유충에서 benzyl alcohol의 발현이 높은 결과를 보여 줌

4. 토종벌 전장분석을 통한 화학감각기 수용체 관련 유전체 분석: 꿀벌의 사회성 면역 및 집단 내 계급분화와 역할등에 중요한 기능으로 작용하는 여러 종류의 감각수용체군 (후각, 미각, 이온성수용체 등)을 유전체 분석을 통해 토종벌에서의 감각수용체의 종류와 개수, 서열을 확보함으로써 (그림 15, 16, 17) 향후 꿀벌의 감각수용체에 작용하는 특이적 화학물질을 identification 할 수 있음과 아울러 이를 토대로 감각수용체의 functional study가 원활히 이루어질 것으로 예상함.

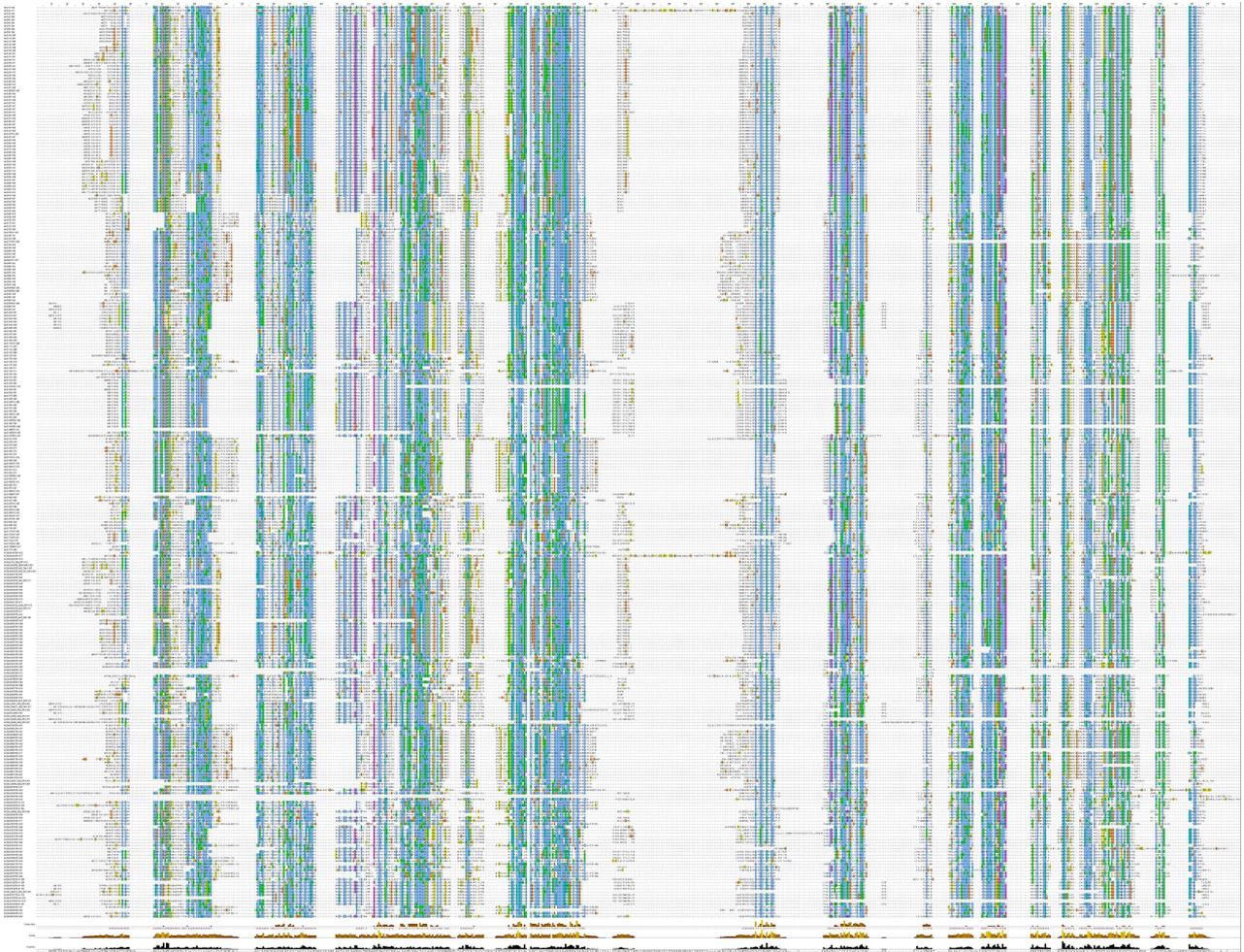


그림 15 토종벌의 후각 수용체 유전체군 정보

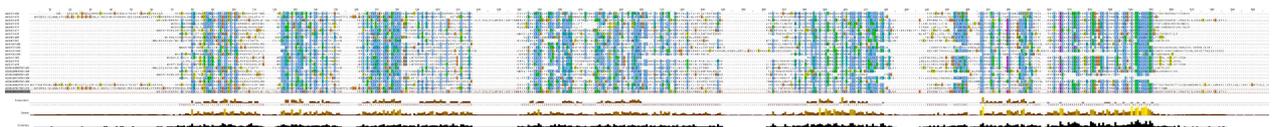


그림 16 토종벌의 미각 수용체군 유전체 정보

6. 특정 화학물질에 대한 꿀벌 더듬이에서의 냄새 인지 후각 반응 분석: 꿀벌이 각각의 화학감각물질을 더듬이에서 인지하는 확인하기 위해 Electroantennogram 기법을 이용하여 실험을 진행하였음. Oleic acid와 유사한 구조를 가진 oleate그룹에 대한 냄새 성분 인지 반응 분석 결과 꿀벌은 각각의 특이적 화학물질을 더듬이 수준에서 인지하고 있음을 확인할 수 있었고, 질병특이적 냄새물질 동정 정보를 토대로 화학감각반응이 꿀벌 개체군 내에서 이루어짐을 미루어 짐작할 수 있음 (그림 19).

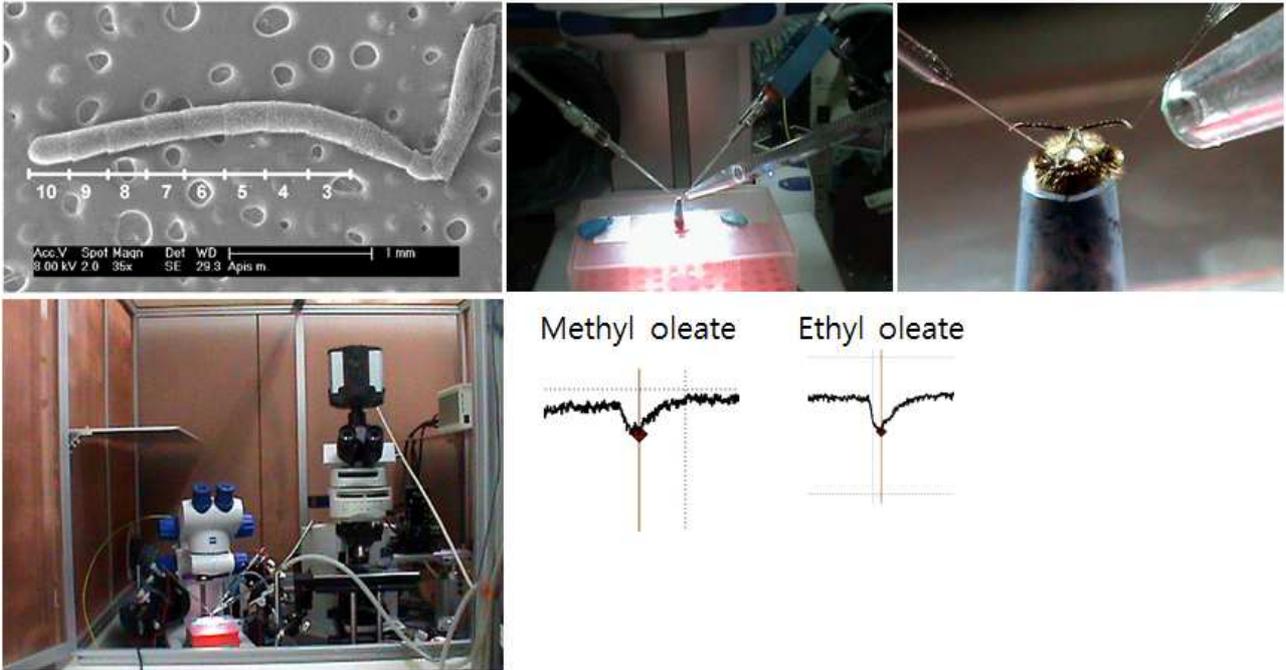


그림 19 꿀벌 더듬이에서의 화학감각물질 인지 반응을 확인하기 위한 전기신경생리 실험. 꿀벌은 더듬이에서 특이적 냄새성분에 대한 반응이 이루어지고 있음.

7. 화학감각기 수용체의 ligand 동정과 기능분석을 위한 실험 방법 구축: 꿀벌의 주요 식량인 화분과 꿀의 주요성분을 차지하는 당을 인지하는 미각수용체를 동정하였고, 실제로 미각 수용체에서 여러 당을 특이적인 농도로 detection 함을 *Xenopus oocyte*내에서 꿀벌의 미각 수용체를 heterologous expression을 통해 발현시키고 전기신경생리 실험을 통해 밝힘(그림 20). 이러한 실험 분석 기법의 원천기술 확보는 여러 주요한 물질에 대한 감각수용체의 기능분석에 필수적인 기술로 작용하며 향후 바이오센서 기술의 상용화를 위한 생물학적 정보 제공의 근거로써 매우 중요한 역할을 할 것으로 예상함.

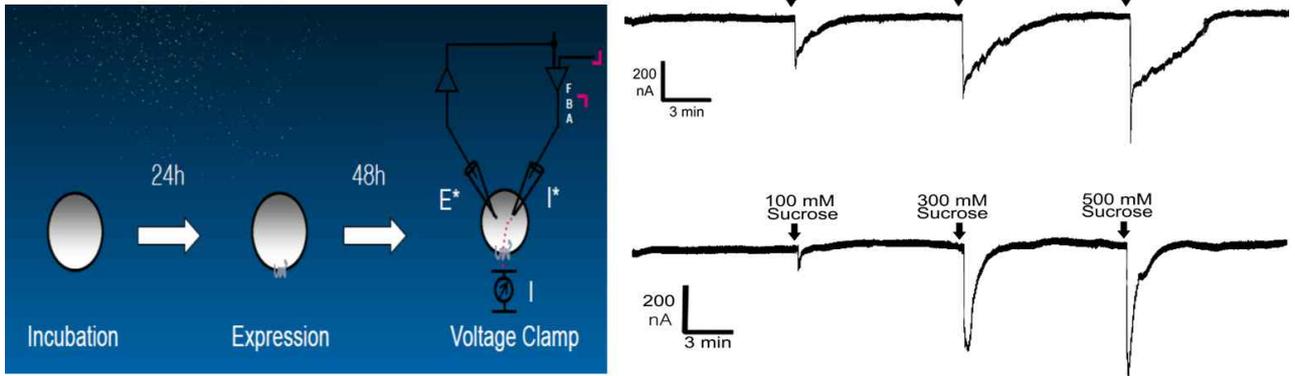


그림 20 Xenopus oocyte내 heterologous expression system 기법을 이용하여 꿀벌 감각수용체를 발현 시켜 감각 수용체의 ligands를 동정하였음.

8. 질병특이적 화학물질을 sensing할 수 있는 꿀벌의 감각수용체 단백질을 포함한 인공 감각 센서 제작을 위한 협력 방안 진행: 국내 연구진과 함께 carbon nanotube를 이용하여 인공 후각 센서를 비롯한 여러 감각센서 제작 원리 (그림21)를 공유하고 향후 조기 진단을 위한 chemical based-진단 키트를 상용할 수 있는 과학적 근거를 제공함.

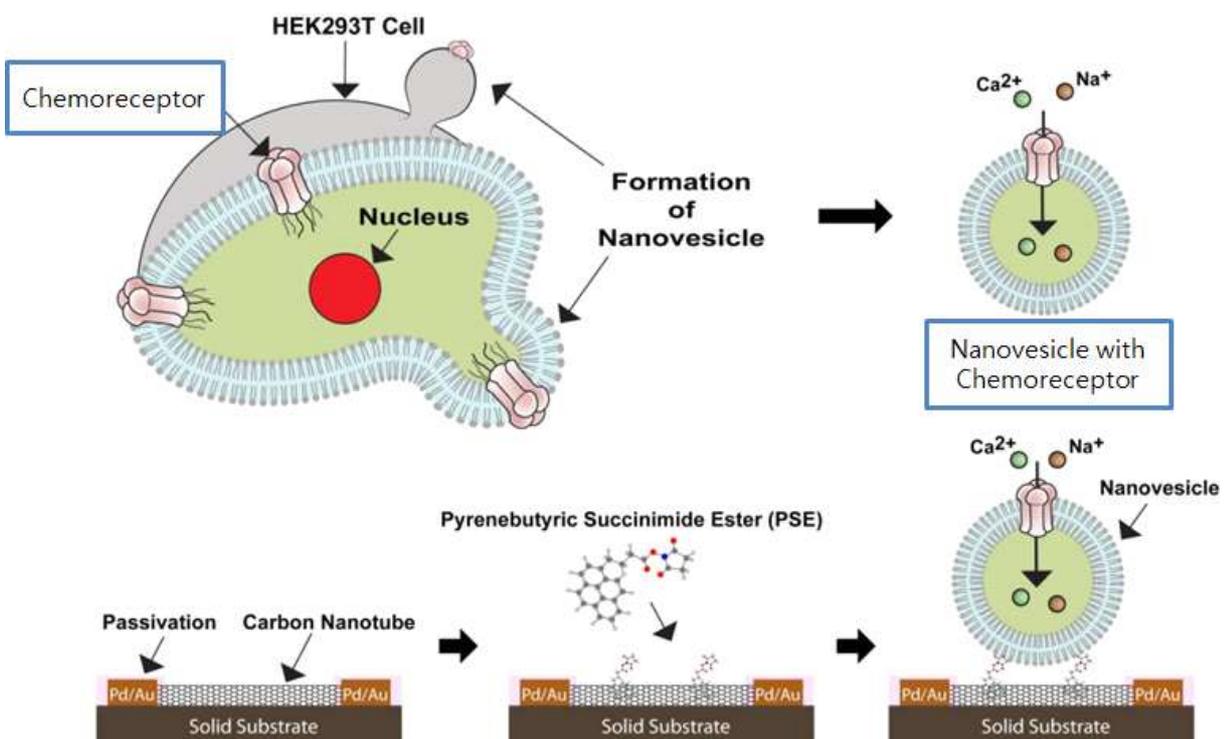


그림 21 탄소 나노튜브에 감각수용체가 발현된 세포를 vesicle화하여 감각수용체의 특이적 ligand에 반응할 수 있는 인공감각 센서 제작의 원리

9. 본 연구는 꿀벌의 대표 두 질병에 대한 질병특이적 화학물질에 대한 동정과 이를 전기신경 생리 실험으로 후각 반응을 알아보고 토종벌 유전체 연구를 통해 물질에 대한 꿀벌의 후각 수용체 및 이온성 수용체를 동정하여 기능분석을 규명하는 연구임. 본 연구 결과 노제마 병에 대해 특정 유기산의 농도가 높은 반면 SBV 감염 유충에서는 Chalkbrood병에 걸린 샘플에서 분비된 물질이 공통적으로 나타남. 따라서 낭충봉아부패병과 관련한 질병특이적인 물질 동정을 위해 다각도로 연구가 필요하다고 생각됨. 꿀벌과 병원균간의 상호작용에 연구 범위를 한정시키는 것이 아니라 병원균이 침투하게 된 매개체가 무엇인지, 보균상태의 병원균이 숙주내에서 급속도로 개체가 증가하게 된 환경에 대해 연구가 필요할 것으로 생각됨. 예를 들어 토종벌 낭충봉아부패병의 원인으로 지목되고 있는 왁스모스의 생리 및 생태에 대해 여러 곤충학자들과 연구 결과를 공유하고 왁스모스의 피해를 받은 봉군의 소비 및 유충의 샘플 확보하여 질병특이적 성분을 동정하고자 함.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1 절 연구목표 달성도

세부 연구 목표	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
꿀벌 대표 질병인 Nosema 균 및 Sacbrood virus 에 감염된 곤충 시료 확보	30	100	각 지역의 양봉 농가에서 질병에 걸린 꿀벌 시료를 채집하였고, 본 연구진에서 직접 꿀벌을 실제 사육하면서 섭식 감염 실내 실험 방식을 구축하는 등 성과 달성 가능한 시료를 충분히 확보하였음
질병에 감염된 성충 및 유충으로부터 분비되는 화학물질 수집 및 기체 크로마토그래피 질량분석기를 이용한 화학물질 분석	40	100	현 양봉 농가에 막대한 피해를 주고 있는 곰팡이 병과 낭충봉아부패병의 주요 원인으로 알려진 바이러스 발병 꿀벌 집단에서 질병 특이적 화학물질을 확인하고 동정하였음. 본 결과 질병 발병 진단의 새로운 방법론적 제시에 대한 근거로 이용될 것임
꿀벌 감각기에서의 특이적 화학물질에 대한 후각기능 측정	10	90	꿀벌 화학감각기에서의 전기신경생리실험을 통해 질병특이적 물질 및 여러 주요한 물질에 대해 꿀벌이 감각기 수준에서 인지하고 있음을 밝힘
화학물질에 대한 꿀벌 감각수용체정보 확보를 위한 유전체 분석 및 기능연구 기술 확보	20	100	화학감각 수용체의 기능분석을 위한 꿀벌 내 감각수용체의 유전자를 분석하고 현재 감각수용체의 functional genomics 연구기술을 확보하였음
합계	100		

2절 관련분야의 기술 발전에의 기여도

1. 학문적 측면의 기여도

본 연구과제의 결과에 대한 학문적 파급효과는 질병에 대한 꿀벌의 감각신경 및 신경계에서의 작용기전에 대한 분자신경생물학적인 이해와 시각이 새롭게 바뀔 것으로 예상하고 있으므로 그 파급효과는 실로 막대할 것. 따라서, 본 연구결과는 질병 피해에 따른 농가의 피해를 최소화하기 위한 발병 메커니즘과 보다 선제적이고 적극적인 방제 전략을 수립하기 위한 꿀벌의 행동 기작을 이해함으로써, 세계적으로 저명한 학술지에 게재될 것으로 판단되며 1편 이상의 논문이 국외의 우수 저널에 발표될 것임

2. 농림 및 경제·산업적 측면

꿀벌의 후각 프로세스 과정에 숨어 있는 신경 및 분자 기작들에 관해 보다 잘 이해하게 되면 향후, 꿀벌의 질병을 진단할 수 있는 방안 및 프로그램 개발에 필요한 핵심 정보의 제공이 가능하리라 예상함. 또한, 꿀벌 질병에서의 화학 물질 특이성과 청소 행동에 따른 감각기관의 기능을 이해함으로써, 미래 생물의 감각기를 이용한 산업분야에 활용할 수 있을 것으로 기대함. 또한 실제 생체 정보 기반의 초고감도 바이오 센서 키트 연구가 가능한 시대로 접어드는 상황에서 본 연구결과는 다양한 연구 분야와 협력 가능한 자료로 이용될 것임.

3. 농학 및 타분야 인력양성 방안

질병 특이성에 따른 신경기관에서의 화학감각수용 및 행동제어, 정보전달 및 정보처리 등의 지식을 배가시키고, 이러한 연구결과들을 국제수준의 저명한 학술지에 게재함으로써, 우리나라의 과학 전문인력이 양성 가능함.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1 절 연구개발 결과의 우수성 및 창의성

1. 본 연구는 꿀벌의 주요 질병들에서 비롯되는 꿀벌의 개체수 감소로 인한 양봉가의 막대한 피해에 감소하기 위해 주요 질병 발병의 조기 진단을 위한 진단 시스템 개발의 새로운 모델을 제시할 수 있음.
2. 질병 특이적 화학물질을 실제로 동정은 꿀벌의 질병이 발병 시작 초기 단계에서 특정 화학물질의 인지가 가능할 수 있다는 점에서 기존의 진단법에서 나타난 단점(병 발생 진행이 상당 부분 진행된 후에 진단 가능하다)을 상당 부분 해소할 수 있는 새로운 연구 기반이 될 것으로 여겨짐.
3. 또한, 특정 화학물질에 대한 꿀벌의 생체 화학감각 수용체를 동정할 수 있는 유전체 정보와 수용체 기능분석이 가능한 전기신경생리 기술을 확보함으로써 꿀벌을 비롯한 여러 곤충 및 동물의 감각 수용체에 대한 기능연구 분야 확대 등 다양한 응용분야로의 확대가 가능함.
4. 국내 탄소 나노튜브를 이용한 세포의 vesicle 화학여 수용체의 ligand에 대한 친화성을 높인 바이오센서 기술을 확립한 국내 연구진과의 긴밀한 협조를 통해 미래의 인공 감각센서 제작이 가능한 인적, 기술적 네트워크를 구축하였음.
5. 기술적인 측면에서 국내의 경우 바이오센서가 국산화되어 있으나, 아직 외국 제품 의존성이 높은 실정임. 국내에서는 혈당 바이오센서 제품 외에는 시장이 매우 미미하나, 건강에 대한 관심이 고조되고 있으므로 혈당 바이오센서 이외에도 다양한 바이오센서 관련 수요가 커질 것으로 전망됨 (그림 22).
6. 본 연구 결과를 토대로 꿀벌의 다양한 질병에 대해 특이적 화학물질을 동정하고, 실제로 꿀벌이 특정 냄새에 반응하여 청소행동을 비롯한 사회성 면역행동을 보이는지에 대한 행동실험을 계획함으로써 구체적인 신경행동학적인 연구를 바탕으로 실질적인 응용이 가능할 수 있도록 진행할 것임. 또한 특정 물질에 대한 화학 감각 수용체의 기능 분석과 생물체의 유전체 정보 확보로 향후 꿀벌을 포함한 동물의 후각 프로세스 과정에 숨어 있는 신경 및 분자 기작들에 관해 보다 잘 이해하게 되면 향후, 꿀벌 및 동물의 질병을 진단할 수 있는 방안 및 프로그램 개발에 필요한 핵심 정보의 제공이 가능하리라 예상함.

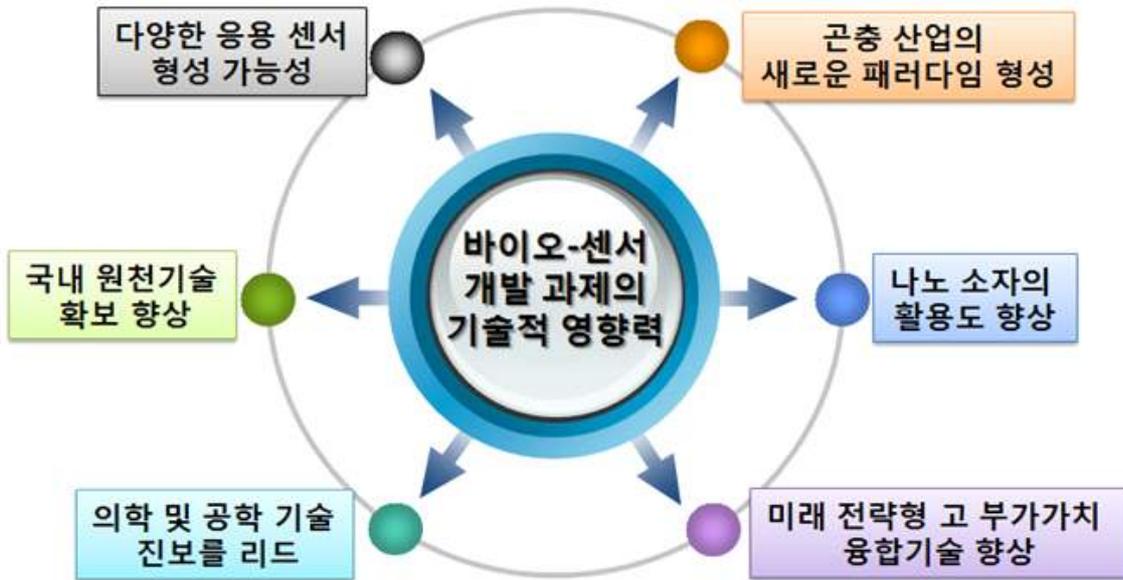


그림 22 바이오센서 개발과제의 기술적 영향력

2 절 향후 연구 방향

본 연구는 꿀벌의 대표 질병인 토종벌 낭충봉아부패병과 노제마병에 걸린 꿀벌 봉군에서 분비되는 특이적 화학 성분을 동정하였음. 동정한 질병한 특이적 화학물질에 대한 꿀벌의 신경행동학적 반응을 알아보기 위해 구체적인 행동 실험을 진행해야 함. 참고 논문에 따라 질병특이 유기산 및 화학물을 꿀벌의 소비에 묻혀 집단 내 내역봉이 냄새성분에 반응하여 청소행동을 실제로 보이는지 확인하는 실험을 계획하고 있음. 아울러 토종벌 낭충봉아부패병의 원인으로 지목되고 있는 왁스모스의 생리에 대해 연구하고 왁스모스의 피해를 받은 봉군의 소비 및 유충의 샘플 확보하여 질병특이적 성분을 동정하고자 함. 분자생물학적 방법으로는 유기산 및 단일 물질에 반응하는 꿀벌의 이온성 수용체 및 후각수용체를 발굴, 동정하여 꿀벌 질병의 조기 진단을 위한 인공센서 개발 연구에 과학적 근거를 제공하고자 함.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1절 해외과학 기술 정보

1. 미국 애리조나에 위치한 USDA 꿀벌 연구소에서는 농약등에 피해를 입은 꿀벌 집단에서 분비되는 화학물질을 동정하기 위한 실험을 진행 중에 있음.

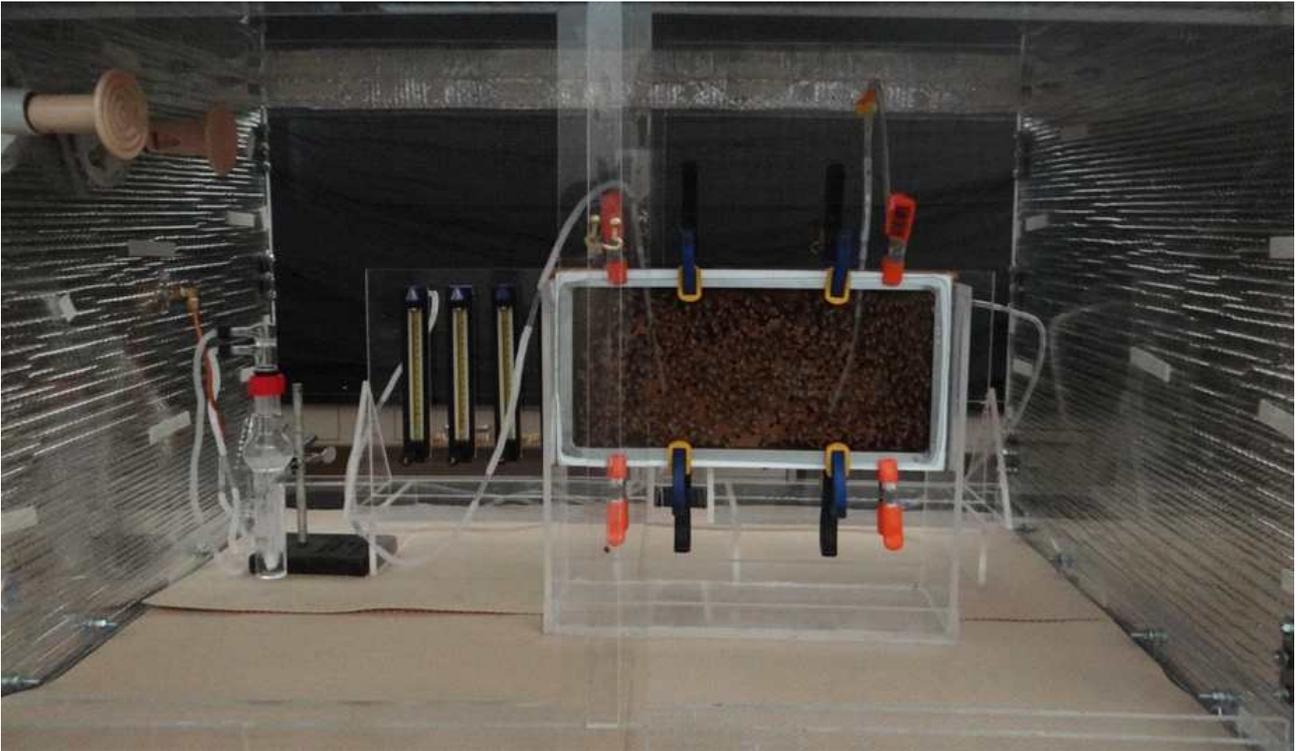


그림 23 꿀벌 소비에서 분비되는 특이적화학물질을 수집하기위한 실험 장비.

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항없음

제 8 장 참고문헌

1. Masterman R. et al., Olfactory and behavioral response thresholds to odors of diseased blood differ between hygienic and non-hygienic honey bees (*Apis mellifera* L.), J Comp Physiol A., 2001.
2. Spivak M. et al., Hygienic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.) and the modulatory role of octopamine, J Neurobiol., 2003.
3. Masterman R. et al., Brood Odor Discrimination Abilities in Hygienic Honey Bees (*Apis mellifera* L.) Using Proboscis Extension Reflex Conditioning., J. Insect behavior, 2000
4. Swanson JA. et al., Odorants that induce hygienic behavior in honeybees: identification of volatile compounds in chalkbrood-infected honeybee larvae, J Chem Ecol., 2009
5. HOWARD, D.F., and TSCHINKEL, W. R. 1976. Aspects of necrophoric behavior in the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. Behaviour, 1976.
6. SPIVAK, M. 1996. Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. Apidologie 1996.
7. FREE, J. B., and WINDER, M. E. 1983. Brood recognition by honeybee (*Apis mellifera*) workers. Anim. Behav.
8. GILLIAM, M. et al., Hygienic behavior of honey bees in relation to chalkbrood disease. Apidologie, 1983.
9. SPIVAK, M. et al., 1998. Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. Apidologie, 1998.
10. SPIVAK, M. et al.. 2001a. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies, *Apis mellifera*, bred for hygienic behavior. Apidologie, 2001.

편집순서 7

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.