

119052-03

조류인플루엔자 저항성 닭 육성 기반 연구

2021

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( ) 발간등록번호( O )  
가축질병대응 기술개발사업 2022년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004130-01

# 조류인플루엔자 저항성 닭 육성 기반 연구: 유전적 빅데이터에 기반한 조류인플루엔자 저항성 닭 품종 개발

2022.06.30

주관연구기관 / 중앙대학교 산학협력단

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “조류인플루엔자 저항성 닭 육성 기반 연구: 유전적 빅데이터에 기반한 조류인플루엔자 저항성 닭 품종 개발”(개발기간 : 2019. 05. 27 ~ 2021. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.06.30

주관연구기관명 : 중앙대학교 산학협력단 (대표자) 고 중 홍



주관연구책임자 : 고 재 홍

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

최종보고서										보안등급	
										일반[ <input checked="" type="checkbox"/> ], 보안[ <input type="checkbox"/> ]	
중앙행정기관명						사업명					
전문기관명 (해당 시 작성)						사업명		내역사업명 (해당 시 작성)			
공고번호						총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)					
						연구개발과제번호					
기술분류	국가과학기술 표준분류		LB0601		25%		LA0204		25%		
			LB0710		25%		LA0402		25%		
	농림식품과학기술분류		AB0101		40%		RB0202		30%		
		PA0302		30%							
총괄연구개발명 (해당 시 작성)			국문								
			영문								
연구개발과제명			국문		조류인플루엔자 저항성 닭 육성 기반 연구: 유전적 빅데이터에 기반한 조류인플루엔자 저항성 닭 품종 개발						
			영문		Research on Breeding of Avian Influenza Resistant Chickens						
주관연구개발기관			기관명		중앙대학교 산학협력단		사업자등록번호		108-82-05979		
			주소		(우)06974 서울특별시 동작구 흑석로 84		법인등록번호		115071-0004394		
연구책임자			성명		고재홍		직위		부교수		
			연락처		직장전화		휴대전화				
					전자우편		국가연구자번호				
연구개발기간			전체		2019. 05. 27 - 2021. 12. 31(2년 8개월)						
			단계		1단계		2019. 05. 27 - 2019. 12. 31(2년 8개월)				
연구개발비 (단위: 천원)			정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금		합계		연구개발비 외 지원금
			현금		현금 현물		지방자치단체 기타( )		현금 현물		
총계			480,000						480,000		480,000
1단계			1년차		120,000						
			2년차		180,000						
			3년차		180,000						
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)			기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편
											비고
											역할
											기관유형
연구개발기관 외 기관											
연구개발담당자 실무담당자			성명		김영원		직위		연구전담교수		
			연락처		직장전화		휴대전화				
					전자우편		국가연구자번호				

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

2022 년 6 월 30 일

연구책임자: 고재홍

주관연구개발기관의 장: 중앙대학교 산학협력단장 (직인)



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명					총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)				
내역사업명 (해당 시 작성)					연구개발과제번호				
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0601		25%	LA0204		25%		
		LB0710		25%	LA0402		25%		
농림식품 과학기술분류	AB0101	40 %	RB0202		30 %	PA0302		30%	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)									
연구개발과제명	조류인플루엔자 저항성 닭 육성 기반 연구: 유전적 빅데이터에 기반한 조류인플루엔자 저항성 닭 품종 개발								
전체 연구개발기간	2019. 05. 27 - 2021. 12. 31(2년 8개월)								
총 연구개발비	총480,000천원 (정부지원연구개발비: 480,000천원, 기관부담연구개발비: 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)								
연구개발단계	기초[ ] 응용[ <input checked="" type="checkbox"/> ] 개발[ ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]			기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준( ) 종료시점 목표( )			
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)									
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)									
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	1) 조류인플루엔자 바이러스에 대한 저항성을 가지는 우수한 항바이러스 유전자를 색출하여 특징화 2) 질병의 전파를 차단시키는 닭 품종 모델을 개발 3) 궁극적으로 조류인플루엔자 감염을 방지하는 프로젝트/인프라를 함께 구축							
	전체 내용	<b>[1단계. 항조류인플루엔자 바이러스 유전자 특징화]</b> <u>항바이러스 활성을 가지는 선천면역 유전자형 선별</u> ▷ 지역별 인플루엔자 발병현황을 분석하고 실험 그룹 선정 및 청정지구 지정 ▷ 사람에서 인터페론 유도형 선천면역 유전자와 조류인플루엔자 감염 사례의 RNA-seq 프로파일링을 통해 후보유전자를 선별 ▷ 실험동물에서 조류인플루엔자 감염으로 인한 유전자 발현 프로파일링 ▷ 유정란 초대 섬유아세포로부터 재조합 바이러스 및 유사자극에 의해 발현이 조절되는 유전자 그룹 선별 ▷ 구조 분석을 통해 면역단백으로서의 특징을 구분 짓고 항바이러스 활성 관찰 ▷ 항바이러스 유전자의 구조적 특징화를 통해 바이러스 저항성 그룹 선별 <b>[2단계. 강력한 저항성 모델/품종 개발]</b> <u>항바이러스 활성을 나타내는 유전자형을 보유한 숙주를 중심으로 생물학적 방어 모델 제작</u> ▷ 유정란으로부터 분리 배양된 세포에 저병원성/고병원성 바이러스를 이용하여 항바이러스 활성을 검증 ▷ 후보유전자가 항바이러스 활성을 나타내는 닭 품종 선별 ▷ 상품으로서의 가치(맛, 크기, 색깔 등)를 보완하고 글로벌 상품화 전략 수립 ▷ 기타 가축전염병에 대한 기술력 지원							

연구개발성과	▷ 후보유전자 발굴 및 특징화를 통하여 조류인플루엔자 저항성 닭 품종 마커 선별 ▷ 국내 조류인플루엔자 저항성 닭 품종의 과학적 근거를 제공 ▷ 닭 품종 표준화 확립의 기초 자료 제공												
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<SAVE 효과> ▷ 유전자 모니터링과 프로파일링을 통해 식품안전관리 및 정책에 과학적 기반 제공하고 기타 인수공통전염병을 근본적으로 차단시키는 연구의 표본 -> <b>Scientific</b> ▷ 궁극적으로 생물학적 방어벽을 구축함으로써 사람이 최종 숙주가 되는 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 감염을 원천적으로 봉쇄하는 예방적 효과 -> <b>Antiviral</b> ▷ 국내 축산물 유전정보를 활용한 우수한 농축산 식품브랜드를 확보함으로써 국제 위상을 높임과 동시에 항생제 내성의 공포로부터 안전지대를 구축 -> <b>Valuable</b> ▷ 바이러스 전파로 야기되는 막대한 규모의 농축산 산업의 손실을 예방하고 안전한 먹거리 조성을 통해 고부가가치를 창출하는 등 지역경제 활성화 -> <b>Economic</b>												
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	
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)	조류인플루엔자			선천 면역		유전자 프로파일링		항바이러스 활성		유전자 발굴			
영문핵심어 (5개 이내)	Avian influenza			Innate immunity		Gene profiling		Antiviral activity		Gene discovery			

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 ... 5
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 ... 8
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 ... 10
4. 목표 미달 시 원인분석 ... 25
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 ... 26
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 ... 26

별첨 자료 (참고 문헌 등)



# 1. 연구개발과제의 개요

‘반복되는 조류인플루엔자 피해 과학적인 근본대책은 없는가?’

<자연계로부터의 바이러스 감염을 원천적으로 차단하는 강력한 대책마련이 시급>

- ▷ 바이러스 감염에 저항성을 나타내는 중간 숙주계의 유전자형을 발굴
- ▷ 바이러스 감염에 저항성을 갖는 중간숙주로의 전면적인 교체
- ▷ 항생제 남용을 없애고 건전한 먹거리를 주도하기 위한 범국가적 정책의 수립



## 역대 치명적 독감 사례

연도	독감명	바이러스	사망자수
1948년	스페인독감	H1N1	4천~5천만명
1957	아시아독감	H2N2	2백만명
1968	홍콩독감	H3N2	1백만명
1997	조류인플루엔자(AI)	H5N1	257명사망
2002	사스		800명

그림 1. 역대 치명적 독감 예

조류독감을 일으키는 인플루엔자 바이러스는 인간에게 치명적인 위협을 줄 수 있는 대표적인 ‘RNA 바이러스’에 속함 (그림 1). RNA 바이러스가 변질된 복제체를 만드는 경로는 돌연변이, 유전자간 재조합, 그리고 유전자 재구성 등 세 가지. 이러한 바이러스는 항생제가 잘 듣지 않는데 인간이 바이러스를 상대하기 힘든 이유이기도 함 (그림 2). 전염성 바이러스는 어떤 지역이나 국가를 휩쓸면서 심할 경우 특정 민족을 말살시킬 만큼 강력한 힘을 발휘함. 인플루엔자 A형 바이러스는 야생 조류를 통해 닭, 오리 등 가금류에 감염되고 호흡기는 물론 전신으로 퍼져 나갈 수 있는 형태로 자신을 변질시켜 심각한 질환을 일으킴. 이렇게 동물에 기생하던 바

이러스가 갑자기 변성하면서 종의 경계를 뛰어넘어 사람으로 숙주를 바꾸는 경우 무서운 치명적 결과를 초래함

바이러스 감염질환은 최근 일어난 일시적 현상이 아니라 과거부터 지금까지 주기적으로 발생해 왔고 돌연변이 등을 통해 인류 건강을 지속적으로 위협해옴. 바이러스 감염질환의 대유행 주기가 반복되면서 무병장수의 꿈을 실현하기 위한 인류의 노력도 한층 가속화됨. 우리나라를 포함한 일각에서는 감염 바이러스의 안전성과 효능을 높이기 위한 백신 개발에 역점을 둠. 인플루엔자 바이러스는 돌연변이가 심하고 면역력이 약한 사람에게 백신의 효능이 저하된다는 문제점 때문에 이런 맹점들을 극복할 수 있는 기술개발에 총력을 기울이고 있는 상황. 하지만 백신 접종을 한 소와 돼지에게서도 구제역이 발생하는 것은 백신이 아직 불완전한 상태라고 설명되어짐

■ 신종 플루에 대한 타이플루 내성률 (2008년 4분기~2009년 1월 말, 단위 %)



자료: 세계보건기구(WHO)

그림 2. 타이플루 내성

세포 내 면역유전자들의 연구를 통하여, 특정 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 나타내는 특수한 부위가 존재하고 이러한 유전자형이 품종에 따라서 단일 염기배열 다양성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 보이며 각기 다른 형태로 존재하고 있다는 것이 시사됨. 다시 말해, 바이러스 감염에 대하여 강한 저항성을 나타내는 품종이 존재하고, 이들의 유전자적 특이성을 규명하는 연구가 활발히 진행되어야 할 필요성이 강조됨. 동물숙주세포에는 특이한 유전자의 발현에 의해 감염 바이러스의 증식을 억제하는 기구가 존재함. 세포에 발현되면서 1차적으로 세포면역을 담당하는 대표적인 단백질로 protein kinase R (PKR), 2',5'-oligoadenylate synthetase (OAS), 그리고 Mx 등이 알려짐 (그림 3). 이러한 단백질은 바이러스, 또는 인터페론(interferon, IFN) 자극에 의해 세포 내에서 발현하여 바이러스의 감염에 대하여 저항성을 발휘한다

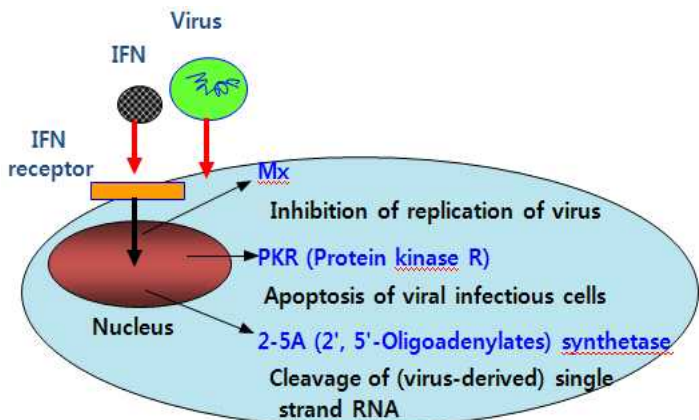


그림 3. 바이러스 감염에 의해 제1형 IFN으로 활성화되는 세포 내 면역유전자

는 것이 보고됨. 하지만 구체적인 면역방어기전이 불분명한 상태이고 인위적으로 바이러스를 합성하는 단계까지 이르렀지만 바이러스가 가지고 있는 생체 내 변환 능력 때문에 그 해석에 많은 난항을 겪고 있음. 조류나 돼지는 자연계에서 인간으로 바이러스를 감염시키는 가장 대표적인 중간숙주 또는 매개인자라 할 수 있음. 바이러스 감염에 대한 이러한 중간숙주의 면역기전을 밝히고 생물학적/유전학적/면역학적 정보를 활용하는 것이야말로 인간이 바이러스의 공포로부터 해방될 수 있는 유일한 탈출구가 될 수 있다고 확신함

본 연구진의 선행연구 결과 일본 국내에서 품종유지가 잘 이루어진 다수지역 닭들의 Mx유전자에 SNP가 존재하며, 이들 중 전염성이 매우 강력한 인플루엔자 바이러스인 H5N1에 대하여 강한 저항성을 나타내는 Mx isotypes이 존재함을 밝힘 (그림 4). 또한, 상기 실험으로 밝혀진 아미노산 SNP를 이용하여 다시 돌연변이를 제작하고, 바이러스 실험을 통해 선천면역유전자 특수 부위의 변이가 항바이러스 활성을 조절한다는 사실을 검증 (그림 5). 현재까지도 이 부분의 SNP 결과를 토대로 많은 국가에서는 지역별로 닭의 항바이러스 저항성을 검증하는 자료로 활용하고 있으며 지속적으로 논문을 통해 보고함. 아울러, 후속 연구에서도 대표적 RNA 바이러스 중 하나인 vesicular stomatitis virus (VSV)에 대해 저항성을 나타내는 PKR isotypes도 함께 보고함으로써, 자연계에는 치명적 바이러스 감염에 대하여 선천면역 유전자에 의한 1차 저항을 나타낼 수 있는 세포 내 방어체계가 존재하고 있음을 시사함 (그림 6)

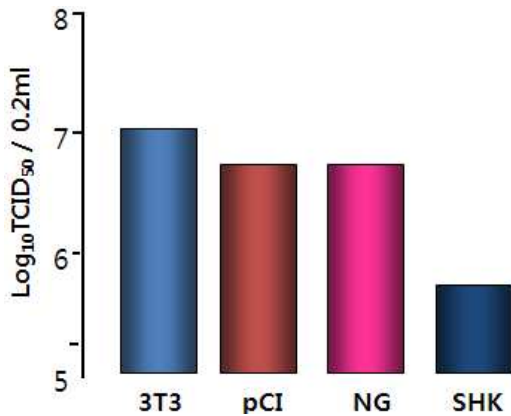


그림 4. Chicken Mx를 이용한 H5N1 저항성 실험 결과(신청자 실험 결과)

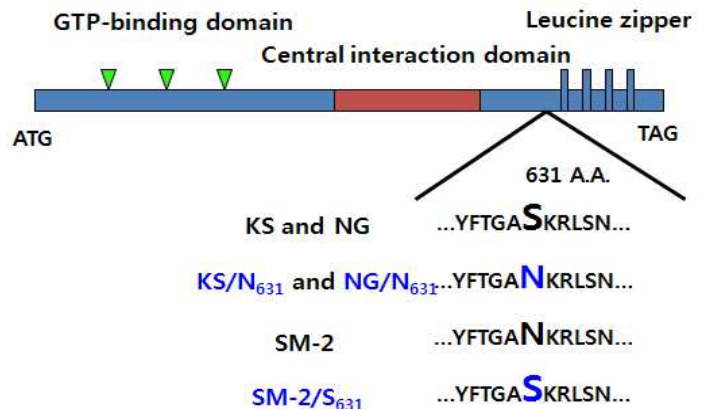


그림 5. Chicken Mx의 631번 아미노산 치환 돌연변이 제작(신청자 실험 결과)

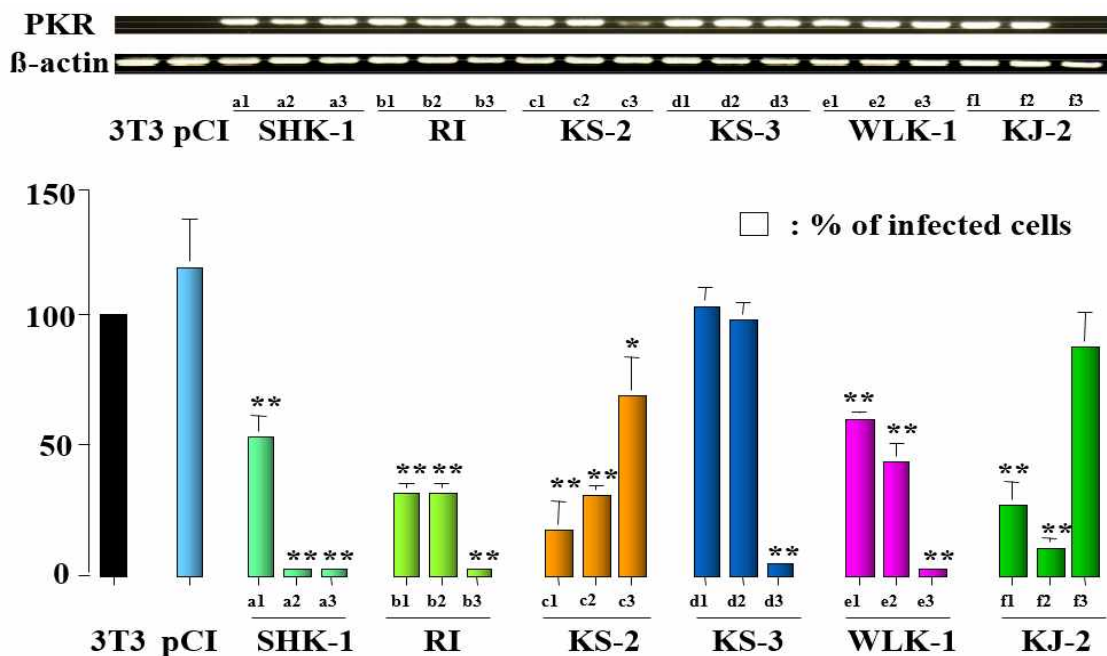


그림 6. Chicken PKR 유전자 도입 세포주를 이용한 항바이러스 활성 실험



조류는 자연계에서 인간으로 바이러스를 감염시키는 가장 대표적인 중간숙주/매개인자라 할 수 있다. 바이러스 감염에 대한 이러한 중간숙주의 면역기전을 밝히고 올바르게 활용하는 것이야말로 인간이 바이러스의 공포로부터 궁극적으로 해방될 수 있는 유일한 탈출구라는 점에서 본 연구 분야는 중요한 가치를 지님

A형 바이러스는 8개의 유전자가 섞여 새로운 바이러스로 변이해 독감과 같이 계속 바뀌는 특징을 보이는데, 중국에서 A형 바이러스의 진화로 복잡해져 교차방어가 되고 있지 않음. 중국, 일본, 몽골, 대만 등 주변 국가에서 A형이 이미 반복적으로 발생하고 있고 철새의 국내 진입으로 인해 오리 및 산란계 조류독감 발생은 불가피한 상황. 여기에 대처하는 방법으로 우리나라에서는 현재까지 백신 투여에 전적으로 의존하고 있으나, 백신접종 후 변이로 인한 효능 감소, 백신 접종 개체와 아외 감염개체의 감별 어려움, 백신 사용 국가에서의 인체감염 사례 발생 등의 피할 수 없는 한계점을 가짐. 실제로 이집트의 경우 A형 백신을 접종했지만 위생적으로 취약한 구조에서 잘못된 백신접종과 잦은 바이러스 접촉으로 인체감염이 발생됨. 그밖에도 백신에 의한 조류독감 방지 대책은 타겟 백신 개념 도입, 효과적인 생독백신 개발, 바이러스 변형 시 새로운 백신에 대한 허가를 능동적으로 대처하는 플랫폼 허가제 도입 등의 많은 개선 사항을 안고 있음

2003년 본 연구진에 의하여 닭의 저항성 Mx유전자를 발표한 이래, 전 세계적으로 닭 면역유전자의 특징을 규명하고 조류독감에 대해 저항성을 나타내는 품종개발의 가능성을 제시하는 연구들이 지속적으로 보고되고 있음에도 불구하고 아직까지 조류독감에 완벽하게 대응할 수 있는 유전자지도가 완성되지 않고 있음. 국내에서도 2008년 농촌진흥청 주도로 A형 저항성 닭 품종 개발에 착수하였지만 특정 유전자를 기반으로 하는 저항성 닭은 아직까지 현실화되지 않음. 최근 영국에서는 치명적인 조류독감의 발생을 막기 위해 첨단 생명공학 기술인 유전자 편집(CRISPR)을 이용하여 조류독감에 완전한 저항성을 갖도록 디자인된 유전자 편집 닭을 개발하려는 시도가 이루어짐. 국내에서도 최근 미니항체를 통해 특정 단백질의 발현을 유도하여 조류독감 바이러스를 파괴하는 방식의 새로운 조류독감 바이러스 저항성 닭 개발을 시도. 독감 바이러스가 야생조류에서 닭으로 건너오는 것을 방지하여 대유행을 차단하려는 목적은 본 연구와 근본적으로 동일하지만, 일부 전문가들은 변이를 계속하는 조류 독감 바이러스가 단순히 유전자 편집이나 단일 단백질 발현 조절만으로 해결될 수 없다는 견해를 보임

본 연구에서는 국내에서 바이러스 저항성을 나타내는 세포 내 면역관련 유전자형의 유무를 관찰하고, 이를 토대로 바이러스에 높은 저항성을 나타내는 중간숙주 그룹을 필드에 일괄 정착시킴으로써 바이러스 감염을 최종숙주(인간) 이전 수준에서 차단하는 생물학적 안전지대 구축을 목적으로 함. 자연계에 존재하는 무수한 바이러스들의 위협에 대항하는 방법의 일환으로 제시되는 본 연구의 목표는 바로 '생물학적 방어시스템의 구축' 임. 인간의 식생활을 유지하기 위해 길러지는 다양한 가축들이 오히려 인간에게 병을 옮기는 대표적인 예가 '인플루엔자' 인 것을 감안하면, 가축을 이용한 바이러스 감염경로의 차단이야말로 가장 근본적인 대책이라고 할 수 있음. 또한, 아직까지 우리나라에서 유지되고 있는 가축을 통한 바이러스성 전염병 관리 규정은 오로지 해당지역의 가축을 도살하고 매립하는 방법에 의존하고 있으며, 이는 지역경제 및 국가적 손실은 물론 해당 농축산관련업자와 정부기관 간에 마찰을 조장하는 원인이 됨. 본 연구를 통해 생물학적 방어 시스템이 구축되고 바이러스성 질환에 강한 품종이 식생활에 대체된다면 상기 문제들에 대한 근본적인 해결책이 될 수 있음. 아울러 항생제 남용의 근절과 함께, 중간숙주의 다양성이 주는 산업성과 예방의학적인 가치를 고려하여,

- 식품안전정책의 과학적 기반 마련을 위한 식품안전관리 정책연구 추진
- 사전 예방적 식품안전관리체계 정착 및 유통식품 안전수준을 국제적 수준으로 향상
- 항생제 내성을 감소를 위한 범부처 연계 국가항생제내성안전관리사업 지속 수행
- 식품 안전관리 및 국민 건강증진을 위하여 식품 위해요소에 대한 과학적 기준규격 설정, 안전성 평가, 사전 예방적 안전관리 체계 구축 및 관련 정책 수립 기반 마련

등의 실현을 가능하게 함

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 2-1. 연차별 개발 목표 및 내용

전염성 바이러스 감염이나 IFN 자극에 의해 유도 및 활성화되는 세포 내 면역유전자를 중심으로,

- ▶ 바이러스에 대한 저항성 검사와 더불어 면역단백의 특징을 규명하고 (characterization)
- ▶ 상기 자료를 토대로 우수한 항바이러스 유전자를 색출하여 질병의 전파를 차단시키는 동물모델을 개발함으로써 (new model & development)
- ▶ 궁극적으로는 인간으로의 바이러스 감염을 방지하는 프로젝트/인프라를 함께 구축함

### 2-2. 연차별 개발 목표 및 내용(그림 7 참고)

#### [1차, 2019년도] 후보 유전자 발굴

- ▶ 국내 조류독감 발병 현황을 분석하고, 발생이 빈번한 지역과 발병 보고가 없는 지역을 구분
- ▶ 발병의 지역 및 환경적 요인을 분석
- ▶ 각 지역별 농가 유지 품종을 구분하여 유전적 요인의 존재 유무 확인
- ▶ 지역을 대표하는 육계, 산란계 및 토종닭의 유정란을 입수하여 태아섬유아세포 배양 후 냉동보관
- ▶ 바이러스 유사 자극-IFN 또는 poly(I):(C)-이나 재조합 바이러스 처리 후 세포면역 후보유전자를 분리하고 염기서열 특징 규명
- ▶ 단일 후보 유전자 분석과 병행하여 자극 전후의 RNA-seq 분석을 실시하여, 세포 내 유전자 변화 패턴을 분석
- ▶ 실제 조류독감 감염자(사람)의 치료 전후 유전자 빅데이터 자료를 입수하여 프로파일링 분석 수행
- ▶ 상기 유정란, 실험동물 및 사람의 자료 분석을 통해 후보유전자 범위 설정

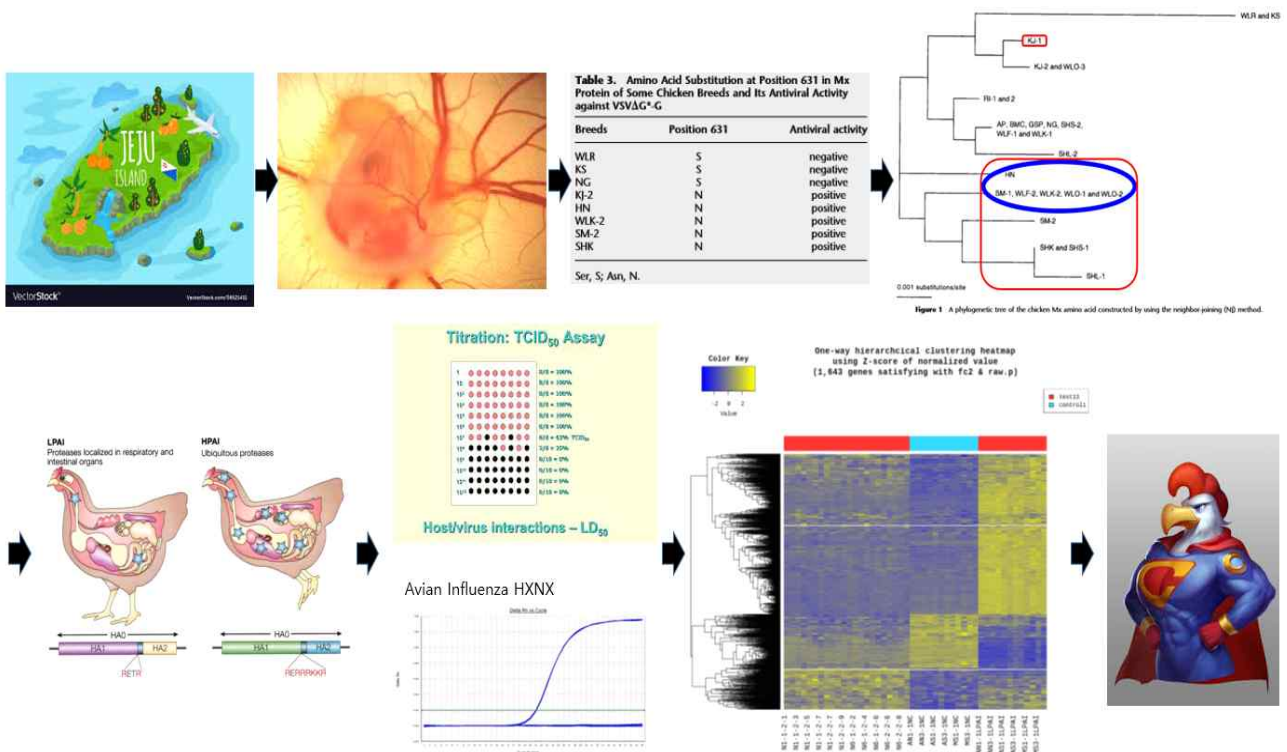


그림 7. 본 연구개발과제의 흐름도

**[2차, 2020년도] 후보 유전자 발굴/특징화 및 품종 개발**

- ▶ 후보 면역 유전자 풀링을 구축하고 변이율이 높은 고위험성 바이러스에 대하여 완벽한 유전적 방어벽을 설계
- ▶ 데이터 신뢰성을 확보하기 위해 논문을 통한 이슈 확보 및 전문가와의 교류를 병행하여 후보유전자 선택 상 오류를 최소화함
- ▶ 숙주유전자 상동성 검색을 통해 후보유전자의 일부 증폭을 위한 universal primer 제작
- ▶ 바이러스 유사 자극-IFN 또는 poly(I):(C)-이나 재조합 바이러스 처리 후 면역 단백질로서의 기능 확인
- ▶ 각 후보유전자를 genome DNA 레벨에서 감수성 또는 저항성 유전자형으로 스크리닝 할 수 있도록 PCR-RFLP 검사용 프라이머/효소를 설계하여 검증
- ▶ 후보유전자가 항바이러스 활성을 나타내는 닭 품종 선별
- ▶ 조류독감 발병 보고가 없는 청정지역의 농가 또는 연구용 시설을 이용하여 후보유전자 일부 또는 전체를 포함할 수 있는 새로운 품종 개발

**[3차, 2021년도] 품종 우수성 검증 및 실용화**

- ▶ 바이러스 자체가 보유하는 위험성을 감안하여 in vitro 실험을 위주로 하여 검증하는 방법을 우선적으로 채택
- ▶ 저위험성 AI 바이러스 감염 실험을 수행하는 등 안전성 확보에 중점을 두는 항바이러스 활성 실험을 통해 간접적으로 증명하는 체계를 구축
- ▶ 감염성 미생물분류 상 제3위험군에 속하는 조류독감 바이러스 실험을 위해 생물안전 3등급 밀폐 실험실을 갖춘 기관과 협력하여 in vitro 감염실험 수행
- ▶ 언론 및 지역 설명회를 통해 공개하여 희망하는 지역농가 또는 산업체를 모집/선정
- ▶ 면역유전자 기반 품종의 우수성이 확립되면 농가와 산업체의 피드백을 통해 맛, 크기, 색깔 등 상품의 질적 향상을 도모할 수 있는 품종으로 점진적 개량을 시도

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1단계	<b>CHARACTERIZATION</b> 후보 유전자 발굴 및 특징화	우리나라에서 발생하는 조류독감의 원인 바이러스와 지역별 발병현황을 분석하고, 이를 바탕으로 청정지구를 설정하여 연구수행 및 관찰의 기점 마련 (외부환경과의 차단 및 통제가 수월하여 신뢰성 높은 데이터 확보 및 효과적인 in vivo 실험 수행 가능) 바이러스 저항성 유전자 후보군 설정을 위한 유전자 프로파일링 -사람에서 조류독감 감염사례와 선천면역유전자 프로파일링 -기타 실험동물 및 유정란에서 분리 배양된 섬유아세포에 저병원성/고병원성 조류인플루엔자(LPAI/HPAI) 바이러스를 감염시킨 후 RNA-seq 분석 조류에서 보고된 항바이러스성 면역유전자 및 IFN 유도 면역유전자군을 중심으로 사람 및 기타 실험동물 프로파일링 자료와 매칭 숙주세포에서 발현되는 바이러스 면역유전자를 분리/동정하고 구조 및 기능을 해석→면역단백으로서의 특징을 구분 지음
2단계	<b>NEW MODEL</b> 모델품종 개발	유전자형 스크리닝을 위한 PCR-RFLP용 프라이머/효소를 설계 역학조사를 통해 항바이러스 효과 평가에 이용할 AI 바이러스 유형 결정 항바이러스 활성을 보이는 유전자를 바탕으로 바이러스에 저항성을 나타내는 숙주그룹 선별 세포 내 AI 저항성 유전자도입 및 AI 바이러스를 이용한 감염실험을 통해 항바이러스 효과 검증
3단계	<b>DEVELOPMENT</b> 산업화 및 실용화	각 유전자 단위별 특성을 갖춘 닭 품종에 대하여 특허 출원/등록 및 품종 등록 다수 후보유전자 특성을 모두 갖춘 닭 품종에 대하여 특허 출원/등록 및 품종 등록 유전자 모니터링 기술 및 유전자 모니터링 분석 프로그램(소프트웨어) 특허 출원/등록 지역 농가 및 사업체 중심으로 발표논문 및 지식재산권 자료 공유 기존 유통라인을 중심으로 생산/판매/소비 현황 파악 및 사업 정보 공유 맛, 크기, 색깔 등 상품으로서의 가치를 보완하고 글로벌 상품화 전략을 수립 기타 가축전염병에 대한 기술력 지원

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

###### ▶ 청정지구 설정

- 2017년 11월 이후 22건의 HPAI 발생, 모두 H5N6 형으로 확인, 이로 인해 140호 6,539천수 [닭 99호(5,811천수), 오리 40호(696천수), 메추리 1호(32천수)]의 가금류가 살처분, 발생지역으로는 경기, 충남, 충북, 전남, 전북이 해당
- 야생조류 HPAI 검출 지역에 제주가 포함. 국내에 잠재적 청정구역 존재가 흔들림(2018년 4월 25일 기준, 농림축산식품부 보도자료)
- 따라서, 종계의 계통 유지·관리가 가능하고 상대적으로 외부와의 격리가 수월한 지역인 제주를 청정지구로 설정, 그 곳에서 사육되고 있는 우리나라 유래 종계를 연구 대상으로 선정
- 닭의 경우, 동물품종 등록 보호법이 따로 존재하지 않고, 유전적 계통이 확립되어 있지 않아 사육능가를 기준으로 종계를 분류

###### ▶ 유정란 확보

- 일본 고유 품종에 대한 유전자 분석은 기존 발굴 자료를 적용
- 제주 유래 닭 품종 4종(BJ, JD, HL, LA)과 국내 토종닭 1종(MC)의 유정란을 입수하여 계태아 섬유아세포(CEFs, chicken embryo fibroblasts) 초대배양을 실시

###### ▶ 시험관 내 감염조건 설정

- 대형마트에 시판 중인 제주 W농가 토종닭(그림 8A)와 제주 JD 농가의 재래닭(그림 8B)의 CEF에 바이러스 감염조건과 유사한 상태가 되도록 poly(I):(C) 100 µg/mL로 처리하고, *Mx* 유전자의 mRNA 발현 변화를 확인한 결과, 자극 후 개체 별로 *Mx* 유전자의 발현 차이를 확인하였으며, 이는 제주에서 사육되는 제주 유래 닭에서 저항성을 가진 개체가 존재할 수 있음을 시사(그림 8)

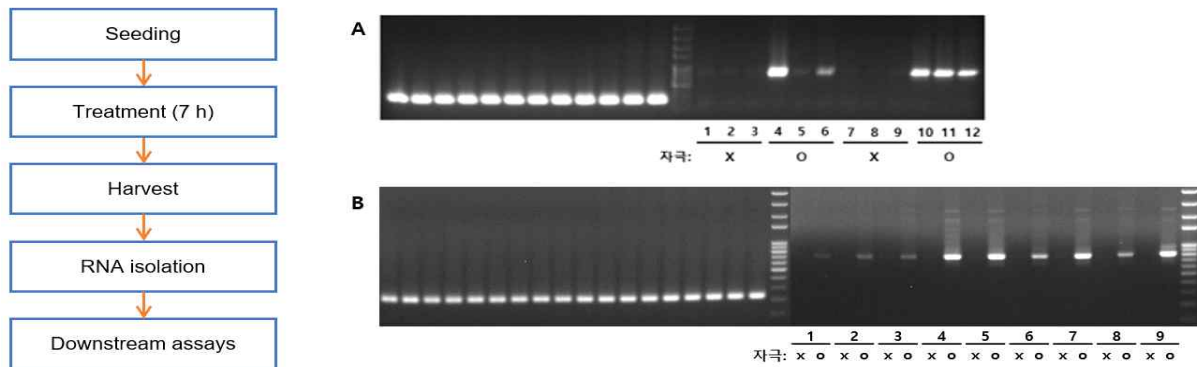


그림 8. Poly (I):(C) 처리 시 *Mx1* mRNA 발현 변화 확인

- 3 시간 1 회 온열 자극에 의해 *Mx* 유전자의 발현이 약간 증가되지만, 6 시간 동안 지속되면 그 발현이 감소. 3 일 동안의 반복된 3 시간 온열 자극을 통해 *Mx* 유전자 발현이 다시 상승(또는, 감소되지 않음)(그림 9)

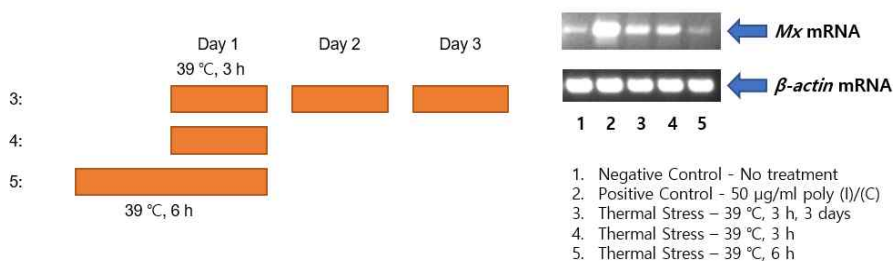


그림 9. 3 가지 온열자극 조건 및 *Mx* 유전자 발현 변화

- 제주 JD농가 재래닭에서 mRNA 발현 차이를 보이는 개체를 대상으로 *Mx* 대립유전자를 확인하여 항바이러스 활성부위인 2032 번 째 뉴클레오티드 서열(631 번 째 아미노산)의 치환 여부를 확인. Mismatch-PCR과 제한효소 절편길이 다형성(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)를 수행하여 확인 결과, 동형접합 민감성 *Mx* 대립 유전자(S/S)는 존재가 다수였으며, 이형접합 *Mx* 대립유전자(N/S)도 확인. 하지만, 동형접합 저항성 *Mx* 대립유전자(N/N)은 확인되지 않음(그림 10)

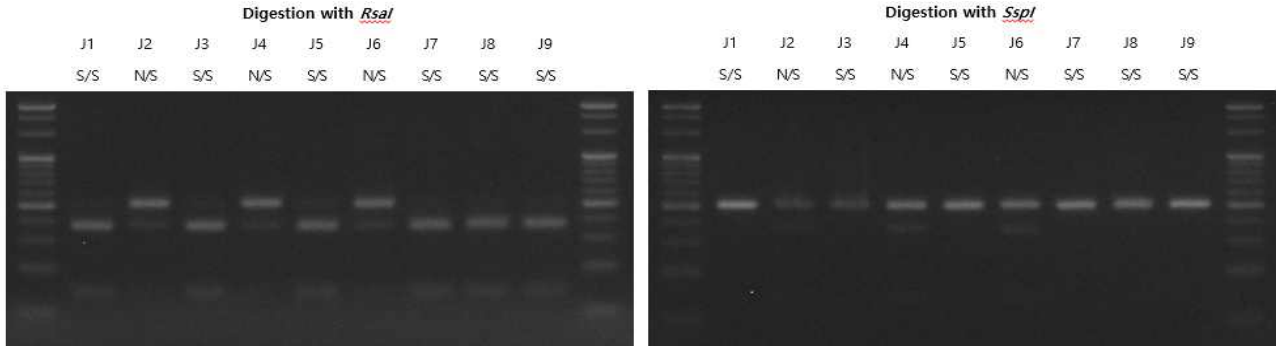


그림 10. 제주 JD농가 재래닭 유래 계태아 조직의 *Mx* 대립유전자 확인

▶ *Mx* 유전자 염기서열 분석 결과

- 제주 JD농가 재래닭 유래 계태아 조직의 *Mx* 유전자를 클로닝하여 전장 cDNA 염기서열을 분석한 결과, 33개의 염기 치환이 확인되었고, 이 중 5 개는 제주 JD 재래닭 특이적인 치환으로 확인됨(그림 11)
- 연구자에 의해 기존에 수행되었던 일본 닭 *Mx* 유전자의 항바이러스 활성실험 결과와 비교해 보았을 때, 제주 JD 재래닭 *Mx* 유전자는 그림 12에 파란색 원으로 표시된 것과 같은 그룹에 속할 것으로 예상
- 해당 그룹은 항바이러스 활성을 나타내는 유전자형을 갖고 있는 것(그림 12, 빨간색 박스)으로 보고되었으므로 항바이러스 실험을 통해 품종 개발 후보로의 가능성 여부를 평가할 필요가 있음

▶ RNA-seq 분석 및 사람에서 조류독감 감염사례 자료 확보

- 사람의 경우 AI 바이러스 저항성 *Mx* 유전자형이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 닭과는 달리 AI 감염 전후의 시료분석을 통해 유전자 분석 자료를 도출하거나 기존의 빅데이터 자료를 활용할 수 있으므로 AI 저항성에 관여하는 새로운 선천면역유전자 후보군을 발굴하는데 매우 유리한 조건을 가짐

Nucleotide	118	153	202	262	265	296	394	421	491	691	694	709	735	745	836	932	953	1062	1155	1343	1388	1461	1469	1579	1595	1685	1783	1887	1940	2032	2159	2259	2322	Size (bp)	
Ref	A	T	A	G	C	A	T	A	T	A	A	C	G	G	G	C	G	A	G	C	G	T	C	A	C	G	C	G	C	G	G	A	A	2320	
J4-1-1	G	C	A	C	T	T	T	G	T	A	A	C	G	C	G	T	A	A	G	A	A	T	T	A	C	G	C	A	C	G	G	C	A	2320	
J4-1-2	G	C	A	C	T	T	T	G	T	A	A	C	G	C	G	T	A	A	G	A	A	T	T	A	T	A	T	A	C	A	G	A	A	2320	
J4-1-3	G	C	A	C	T	T	T	G	T	A	A	C	G	C	G	T	A	A	G	A	A	T	T	G	C	G	C	A	C	G	G	C	A	2320	
J4-1-4	G	C	A	C	T	T	T	G	T	A	A	C	G	C	G	T	A	A	G	A	A	T	T	A	C	G	C	A	C	G	G	C	A	2320	
J5-1-5	G	C	A	G	C	A	T	G	C	A	A	C	G	G	G	T	A	A	G	A	G	T	C	A	T	A	C	A	T	G	G	A	A	2121*	
J5-1-6	G	C	A	C	T	T	T	G	T	A	A	T	G	C	G	T	A	A	G	A	A	T	T	A	C	G	C	A	C	G	G	A	A	2320	
J5-1-8	G	C	A	G	C	A	T	G	T	A	A	C	G	C	G	T	A	A	G	A	A	T	T	A	C	G	C	A	C	G	G	A	A	2320	
J5-2-1	A	C	A	C	T	T	T	G	T	A	A	C	G	C	G	T	A	A	G	A	A	T	T	A	C	G	C	A	C	G	G	C	A	2320	
J5-2-2	A	C	A	G	C	A	T	G	C	A	A	C	G	G	G	T	A	G	A	A	G	G	C	A	T	A	C	A	C	G	G	A	A	2320	
J5-2-3	A	C	A	G	C	A	T	G	C	T	A	C	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	T	C	A	T	A	C	A	C	G	G	A	del	2064*
J5-2-4	A	C	A	C	T	T	T	G	T	A	A	C	G	C	G	T	A	A	G	A	A	T	T	A	C	G	C	A	C	G	G	C	A	2320	
J7-1-1	G	C	A	G	C	A	T	G	C	A	A	C	G	G	G	T	A	A	G	A	A	T	T	A	C	G	C	A	C	G	G	C	A	2320	
J7-1-2	G	C	A	C	T	T	T	G	T	A	A	C	G	C	G	T	A	A	G	A	A	T	T	A	C	G	C	A	C	G	G	C	A	2320	
J7-1-3	G	C	A	C	T	T	T	G	T	A	A	C	G	C	G	T	A	A	G	A	A	T	T	A	C	G	C	A	C	G	G	C	A	2320	
J7-1-4	G	C	A	C	T	T	T	G	T	A	A	C	G	C	G	T	A	A	G	A	A	T	T	A	C	G	C	A	C	G	G	C	A	2320	

그림 11. 제주 J농가 재래닭 유래 계태아 조직의 *Mx* 유전자 염기서열

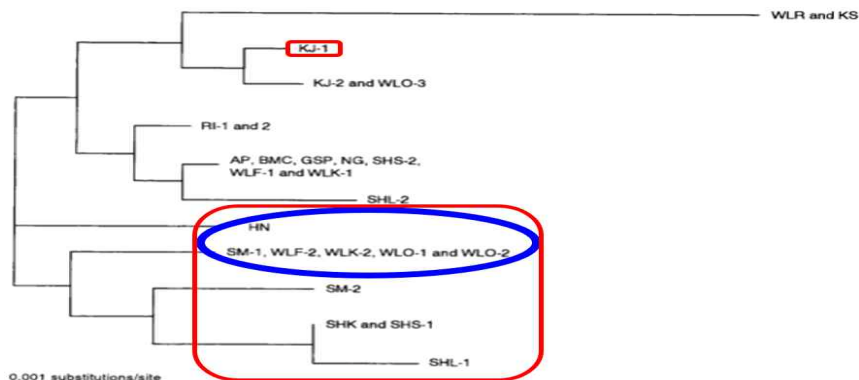


그림 12. 제주 제동 재래닭 *Mx* 유전자형 예측을 위한 계통도 비교 결과



- GEO 데이터베이스(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 검색을 실시한 결과에서 AI 감염 사람 환자의 기관 또는 점막에 대한 RNA-seq 자료는 현재까지 없는 것으로 확인
- 2018년에 보고된 연구(Guan *et al.*, J Infect Dis. 2018;218(8):1238-1248. doi:10.1093/infdis/jiy317)에 따르면 H7N9에 감염된 환자를 대상으로 말초혈액을 이용한 microarray 분석 결과에서 H7N9 감염초기에는 세포주기조절(cell cycle regulation)과 백혈구 기능(leukocyte functions)이 활성화 되는 반면에 T-cell과 관련된 기능과 대사진행이 비활성화 되지만, 회복기에는 이 반응이 역전되는 것으로 나타났음, 또한 하기도의 바이러스 양(virus load)이 증가함에 따라 *IFN27* 같은 인플루엔자 감염 특이적 바이오마커의 상향조절이 관찰되며, 호전된 환자에서 T-cell과 natural killer (NK) cell의 모집 및 항체유도가 더 좋았음, 따라서 AI 저항성에 관여하는 새로운 선천면역유전자 후보군의 발굴에 이용 가능할 것으로 보임

**▶새로운 후보유전자 예측**

- 관련 연구 결과를 통해, 염기서열 분석 및 저항성 유전자형 발굴에 사용될 후보 유전자군 선별
- 지금까지 알려진 AI 감염에 영향을 미치는 인자는 숙주의 나이와 건강상태, 바이러스 유형, 조직친화성 등이 있음, 이와 관련된 면역 관련 유전자(*TLR3, TLR7, OASL, MX1, IFITM5*), 헤모글로빈 관련 유전자(*HBA1, HBAD, HBZ*), 세포 부착 분자 관련 유전자(*CLDN1, ESAM*)를 이 보고되고 있음
- 또한, 국내종의 특이적 후보 유전자군을 확대 또는 그룹화가 더욱 필요하여 제주 유래 닭 품종을 이용한 RNA-seq의 수행이 필수적

**▶유전자형 스크리닝을 위한 PCR-RFLP용 프라이머/효소 설계**

- Genome DNA 레벨에서 AI 감수성 또는 저항성 유전자형으로 스크리닝할 수 있도록 *Mx* 유전자를 마커로 하여 PCR-RFLP 검사용 프라이머/효소를 설계하여 검증
- 본 연구진에 의해 진행되었던 *Mx*의 조류 인플루엔자(H5N1) 및 변형 구내염 바이러스(VSV) 항바이러스 활성 실험 결과 분석으로부터, 631번째 아미노산이 항바이러스 활성에 매우 중요한 위치에 있음을 확인(그림 13)

Breeds	Position of amino acid		Antiviral activity
	631		
WLR	S		Negative
KS	S		Negative
NG	S		Negative
KJ-2	N		Positive
HN	N		Positive
WLK-2	N		Positive
SM-2	N		Positive
SHK	N		Positive

그림 13. 631번 아미노산과 항바이러스 활성 관계

- 631번째 아미노산은 인트론과 엑손이 이어지는 영역에 해당되어, 각 품종별 *Mx* gDNA 스크리닝을 위해서는 프라이머 설계 시 N-terminal 쪽 프라이머는 인트론을, C-terminal 쪽 프라이머는 엑손을 포함하도록 제작(그림 14)
- 하지만, 631번 아미노산의 SNP를 감별하기 위해서 사용될 수 있는 제한효소는 존재하지 않기 때문에 PCR-RFLP법을 이용한 *Mx* 유전자 스크리닝을 위해 일부 올리고머를 치환시킨 mismatched primer를 제작. 2가지 타입을 서로 반대로 인식하도록 2개의 제한효소가 각각 인식할 수 있도록 2개의 C-terminal mismatched primer를 제작(그림 15)
- 7개 농장에서 입수한 닭 근육조직과 5개 농장에서 입수한 유정란의 *Mx* 유전자형 분석 결과 631 번째 아미노산이 세린(S) 또는 아스파라긴(N)인 것을 확인, 특히 BJ 농장에서 입수한 유정란 및 조직에서는 N/N-homo, N/S-hetero, S/S-homo가 모두 관찰(그림 16, 17)



그림 14. 631번 아미노산의 염기서열과 위치

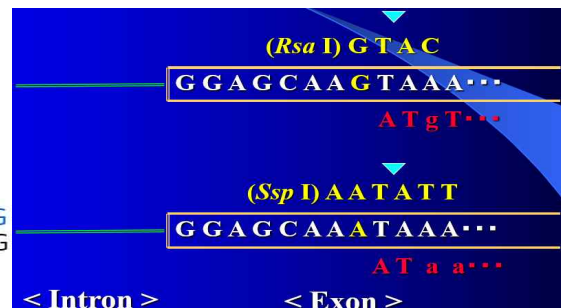


그림 15. Mismatched primers 설계

- 또한, 염기서열분석을 이용하여 PCR-RFLP의 결과와 비교하였을 때, 그림의 초록색 화살표에서 보이는 것과 같이 N/N-homo, N/S-hetero, S/S-homo가 모두 관찰되어 PCR-RFLP와 동일한 결과를 확인하였음 (그림 18)

- 7개 농장에서 입수한 닭 근육조직과 5개 농장에서 입수한 유정란의 *Mx* 유전자형 분석 결과 631번 째 아미노산이 세린 (S) 또는 아스파라긴(N)인 것을 확인, 특히 BJ 농장에서부터 입수한 유정란 및 조직에서는 N/N-homo, N/S-hetero, S/S-homo가 모두 관찰, 선행 연구결과에서 AI 저항성을 보이는 품종과 유사함 (그림 18)

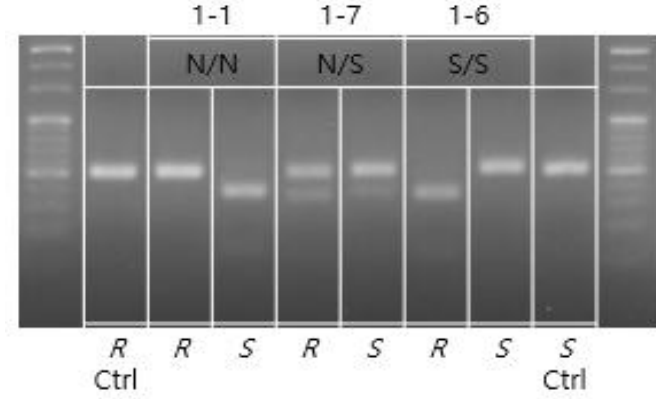


그림 16. PCR-RFLP 대표그림

No.	Breed	N/N	N/S	S/S	Total
1	BJ	1	5	4	10
2	MC	0	0	10	10
3	MW	0	5	5	10
4	LA	0	4	6	10
5	HL	0	0	10	10
6	LC	0	8	2	10
7	HH	0	0	10	10

No.	Breed	N/N	N/S	S/S	Total
1	BJ	1	6	10	17
2	MC	0	0	10	10
3	LA	0	5	5	10
4	HL	0	0	10	10
5	JD	0	3	6	9

그림 17. 제주 유래 닭 근육(위)과 유정란(아래)의 *Mx* 유전자형

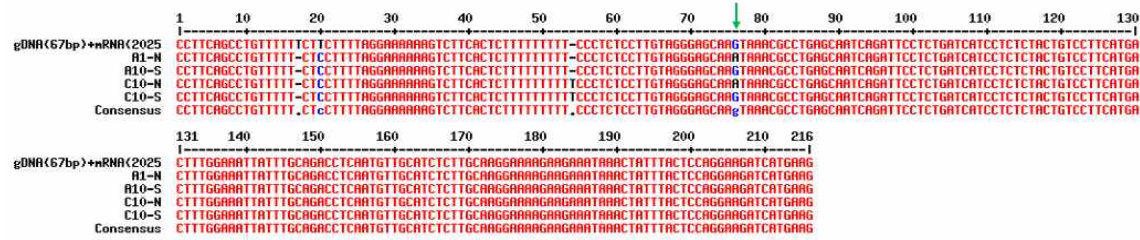


그림 18. BJ농장 유정란의 *Mx* 유전자 염기서열분석(좌)과 PCR-RFLP(우) 비교

▶ 유전자 구조와 기능 해석

- 제주에서 사육되는 우리나라 유래 종계(제주 재래닭과 국내 토종닭 2종)를 이용하여 *Mx* 유전자에 대한 특징화를 위한 전장 cDNA 라이브러리를 확보(그림 19)

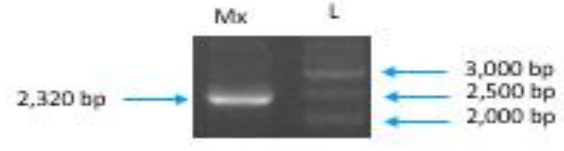


그림 19. 제주 유래 *Mx* gene full-length cDNA

- 그들의 염기서열을 분석한 다음 각각의 뉴클레오티드에 해당하는 아미노산으로 번역하여 서열유사성(sequence homology)을 관찰한 결과 다수의 SNP가 확인됨(그림 20)



그림 20. 제주 유래 닭 품종의 *Mx* 단백질 서열의 유사성

- 이전 연구(Wang B *et al.*, Front Microbiol. 2021;12:593202. doi: 10.3389/fmicb.2021.593202)에 따르면 H5N6 감염은 닭에서 높은 사망률을 유발하는 반면, 오리에서는 임상증상이 나타나지 않을 수 있음. 이는 닭과 면역 관련 유전자의 발현 차이에 기인하여 과도한 닭의 병원성 및 염증 효과를 이끌기 때문인 것으로 보고 있음

- 따라서, 면역단백으로서의 특징 구분하여 AI 저항성을 나타낼 수 있는 반응을 탐색, 일반적으로 AI 감염의 저항성을 보이려면 항바이러스 상태를 유도하거나 염증을 제어하는 기작이 작동되어야 하며, 특히 발병 후 수일 내에 폐사가 일어나기 때문에 선천면역과 관련된 반응의 비교가 중요한 것으로 알려져 있음

**▶ 바이러스 저항성 숙주그룹 선별**

- 본 연구진의 일본 닭을 이용한 결과를 포함하여 제주 유래 닭 품종 간의 유전적 유연관계를 분석을 **그림 21**의 계통수로 나타냄 -> 붉은색 상자는 AI 저항성 일본 닭 품종, 파란색 상자는 AI 민감성을 보인 일본 닭 품종, 연두색 타원형으로 표시한 것은 제주 농가에서 사육되는 닭 품종

- 제주 유래 닭 품종은 일본의 AI 저항성을 보인 닭 품종과 유전적 거리가 가까워 공통점이 많은 것을 알 수 있음

**▶ 감염실험을 통해 항바이러스 효과 검증**

- 농림축산식품부 보도 자료와 제주 위생시험소에서 제공받은 자료를 분석, 국내 발병사례를 중심으로, 특히 야생에서 자주 검출되면서, 닭에 취약한 고병원성 조류인플루엔자(H5N1, H5N6, H5N8)과 저병원성 조류인플루엔자(H7N7)가 대상 병원체로 타당성 확인(데이터 공개 불가, 기관 대외비)

- 하지만, COVID-19 국가재난사태로 BLC3 시설이용이 극도로 제한되고, 선정 병원체의 수의자원 분량이 어려워(기탁자 거부, 특허 등) H5N1, H5N6, H9N2를 대상으로 진행

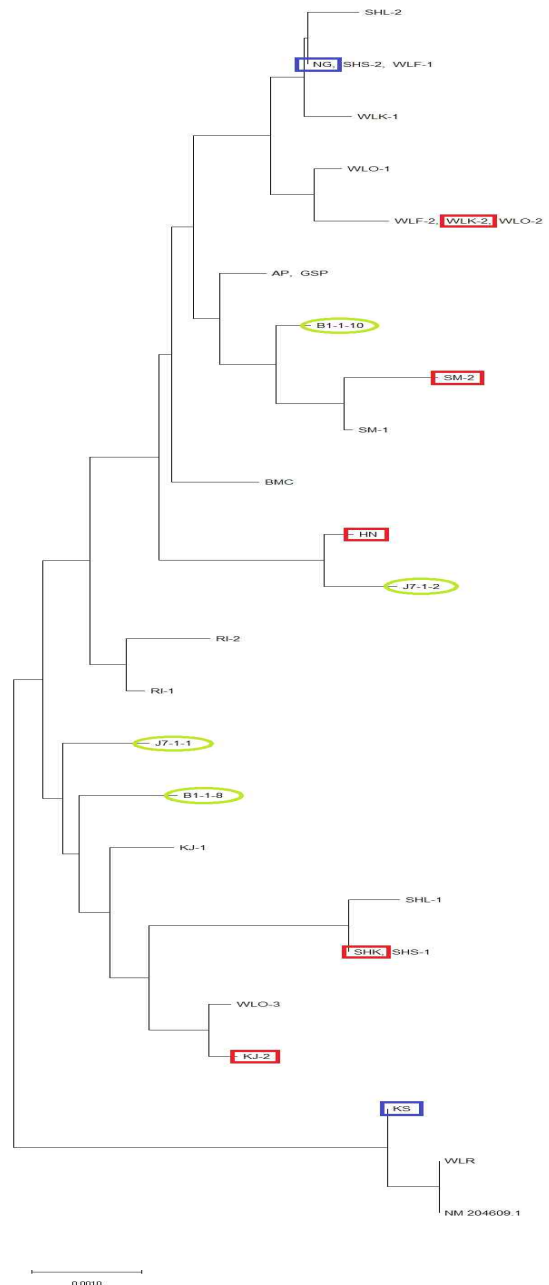
- 저병원성 조류인플루엔자(H9N2)에 대한 연구는 G대학교 수의과대학 감염학교실과, 고병원성 조류인플루엔자 바이러스(H5N1, H5N6)는 J대학교 Z연구소와 연구 협력하여 진행

**▶ 저병원성 조류인플루엔자 감염실험**

- H9N2 감염실험을 먼저 수행. 실험 전 각 군별 세포 중 하나를 무작위로 선택하여 세포 배양 조건 및 바이러스 역가를 확인 후 바이러스 주입량을 설정(**그림 22**)

- 12개의 CEF에서 감염실험을 수행. 실험군은 크게 Mx 유전자와 농장을 기준으로 하여 크게 3 군으로 나누고, 각 군별로 대조군을 두어 24개의 샘플 세트를 제작(**그림 23A**)

- 바이러스 접종 1시간 후 PBS로 씻어낸 다음 7시간 동안 배양시킨 세포들을 수거하여 RNA-Seq 수행, 48시간 배양시킨 세포의 세포 배양 상층액을 수거하여 M gene PCR를 수행함으로써 세포 감염 후 배출된 바이러스가 있는지 확인(**그림 23B**)



**그림 21. 제주 닭과 일본 닭의 Mx 단백질 계통수**



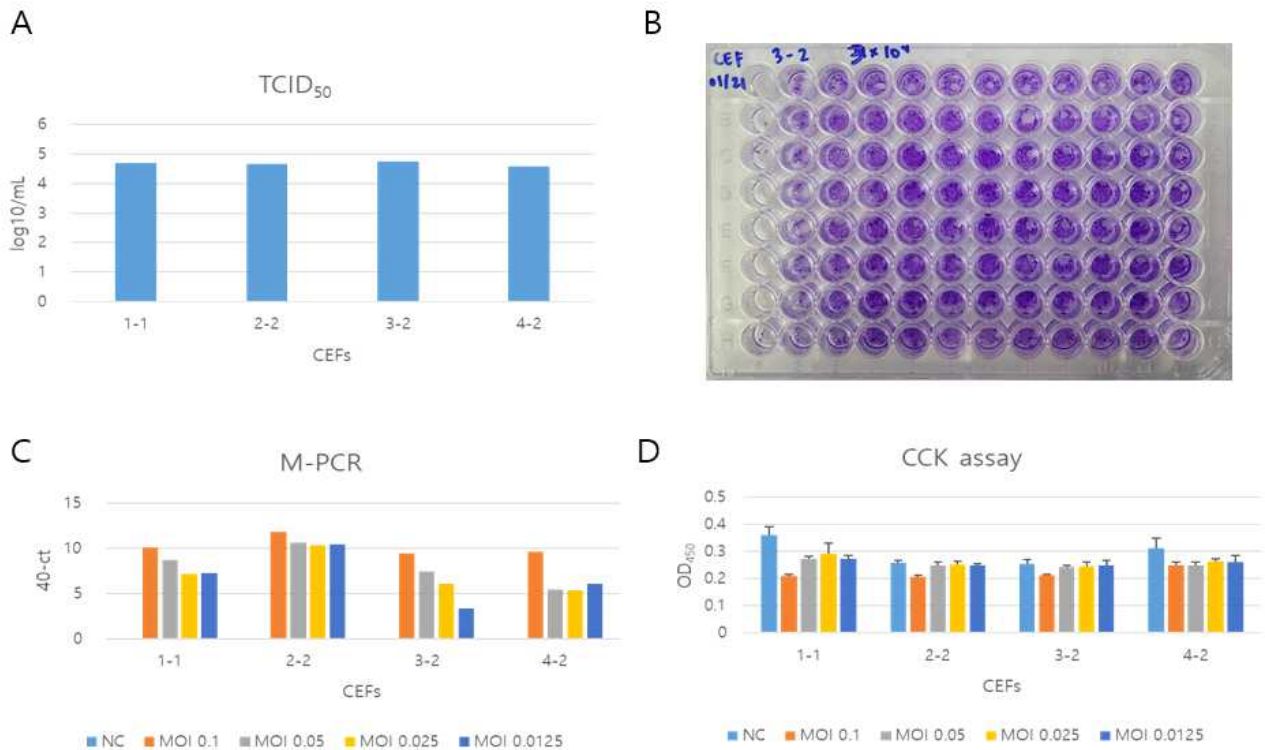


그림 22. 저병원성 조류인플루엔자 H9N2의 접종량 설정을 위한 분석 결과

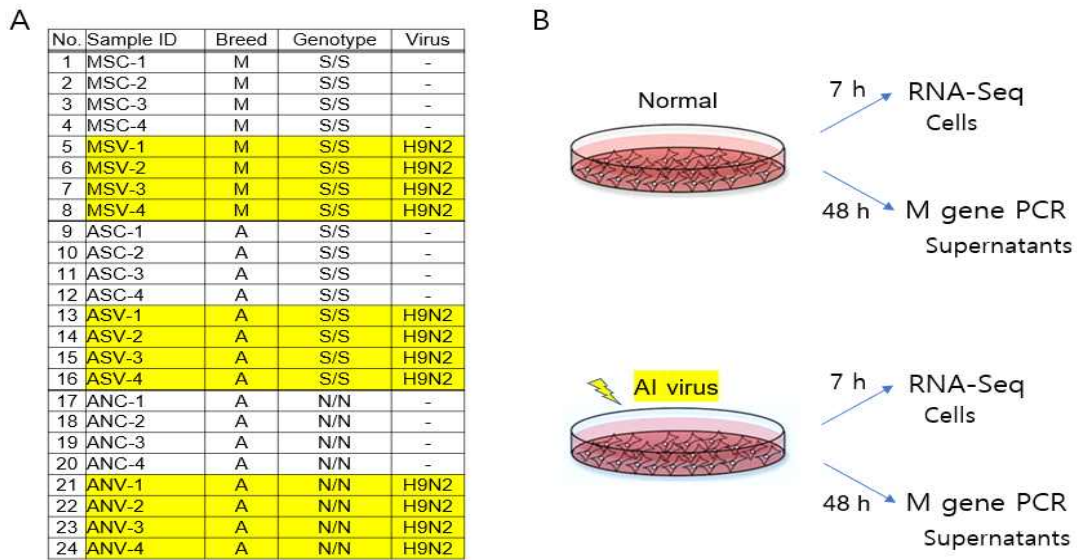


그림 23. 저병원성 조류인플루엔자 감염실험 군구성(A)과 실험 디자인(B)

- Taqman type real-time PCR로 M gene PCR을 수행. M gene은 바이러스 주입한 배양접시의 상층에서만 검출되었음. 이는 CEF에 감염된 바이러스가 배지로 배출된 것을 나타냄 (그림 24)  
 - RNA-Seq 결과, CEF의 mRNA 을 정량화 하여 총 10,653개 유전자가 발현되는 것을 확인(그림 25A)  
 - 미처리 대조군을 기준으로 발현변화의 차이를 보이는 유전자(DEG, Differentially Expressed Genes)는  $|FC| > 2$  & raw p-value  $< 0.05$ 를 만족하며, 총 5,692개가 이에 해당(상향 조절된 유전자 2,847개, 하향 조절된 유전자 2,845개)(그림 25B)

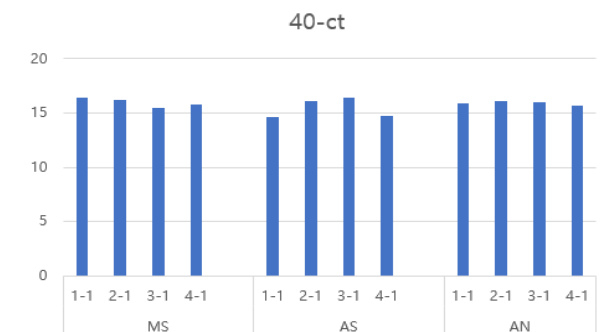


그림 24. H9N2 48 h 감염 후 M gene PCR 결과

- DEG 리스트에 대하여 발현 정도가 유사한 샘플 및 유전자를 hierarchical clustering analysis (Euclidean Distance, Complete Linkage)를 통하여 그룹화, 바이러스 감염 여부에 따라 계층화 됨(그림 25C)

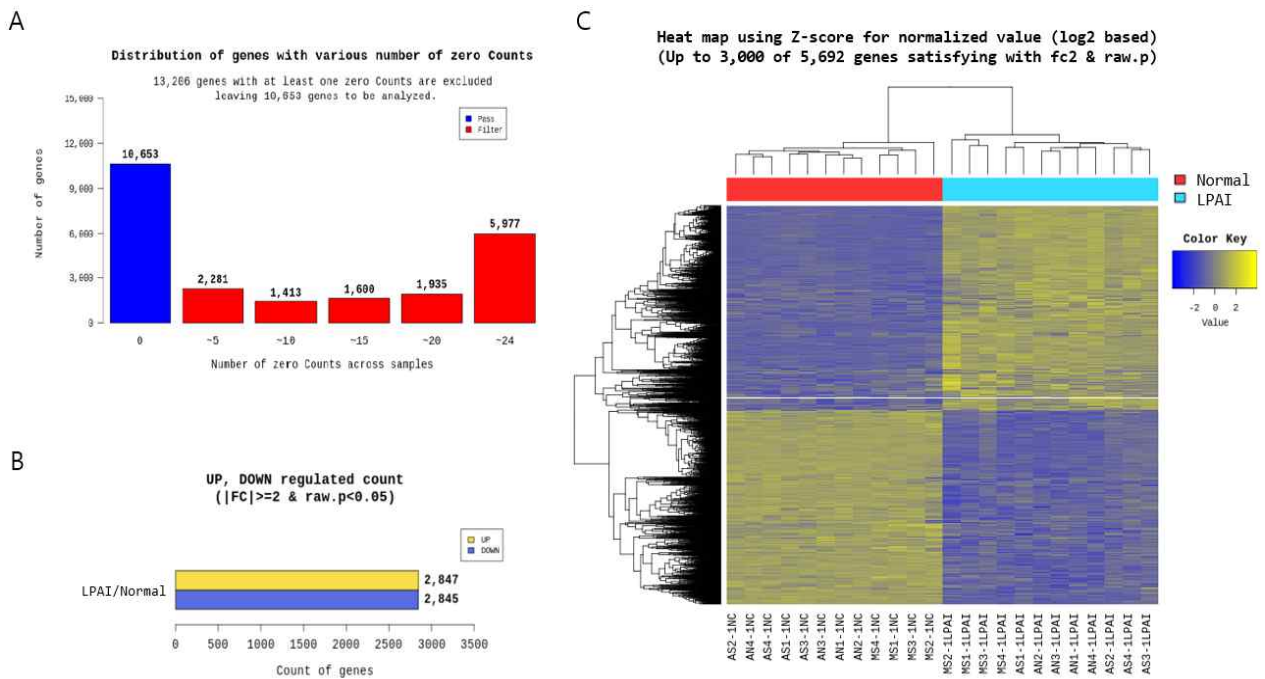


그림 25. H9N2 감염시 차별 발현 유전자 선별 결과

- KEGG pathway map를 기반으로 gene-set enrichment test를 수행하여 상위 10위의 pathway와 해당 pathway에 매핑된 유의한 DEG 수를 나타냄 (그림 26). 특히, 그림 26은 바이러스는 증식하기 위해 숙주 세포에 의존하여 비리온 복제 및 조립에 필요한 거대분자 생성을 위한 다양한 숙주의 대사 변화가 반영된 결과로, ribosome (MapID:03010, FDR=1.05349×10<sup>-43</sup>), endocytosis (MapID:04144, FDR=2.935819×10<sup>-30</sup>), spliceosome (MapID: 03040, FDR=2.02423×10<sup>-20</sup>) 등이 유의한 차이를 보임

- Gene Ontology 분석에서 DEG 비율이 유의하게 향상된 상위 20위 term id를 각 카테고리별 (biological process, molecular function,

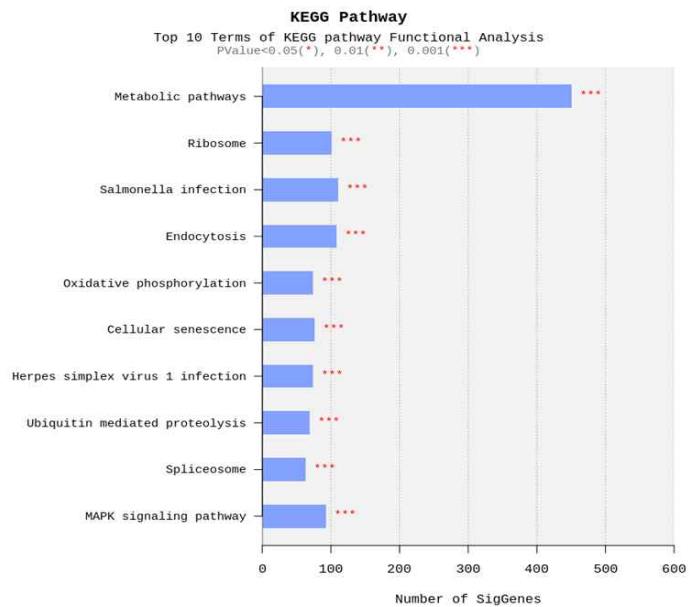


그림 26.H9N2 대한 KEGG pathway와 DEG 수

cellular component)로 순위화 하였음. Amide biosynthetic process (GO:0043604, p=9.2075×10<sup>-16</sup>), regulation of catabolic process (GO:0009894, p=5.0006×10<sup>-19</sup>), transcription factor binding (GO:0008134, p=1.7467×10<sup>-10</sup>), chromatin binding (GO:0003682, p=4.0913×10<sup>-5</sup>), nuclear body (GO:0016604, p= 2.1115×10<sup>-18</sup>), intracellular protein-containing complex (GO:0140535, p=4.7429×10<sup>-12</sup>) 등이 유의한 차이를 보임. 이는 바이러스가 숙주 유전자의 발현을 변경하는 전사 조절에 관여하여 숙주의 감염을 유도하려는 특성을 나타냄(그림 27)

- 위의 결과는 국내 토종닭 1종과 제주 유래 재래닭 1종의 CEF에서 H9N2는 감염 후 일반적인 복제주기를 거쳐 증식할 것을 시사하며, 이를 바탕으로 LPAI 감염 제어를 위한 바이러스/숙주 상호작용을 이해하는데 도움이 될 뿐 아니라 HPAI 감염실험과 비교분석을 통하여 HPAI에 더욱 저항성이 강한 품종 개발에 유용한 자료를 제공할 것임



### ▶ 고병원성 조류인플루엔자 감염실험

- 실험 전 세포들 중 무작위로 선택하여 바이러스 역가를 확인 후 바이러스 주입량을 설정 (그림 28)
- 11 또는 12개의 CEFs로 감염실험을 수행, 저병원성 조류인플루엔자 감염실험과 동일하게 진행, 실험군은 크게 Mx 유전자와 농장을 기준으로 하여 크게 3 군으로 나누고, 각 군별로 대조군을 두어 33개의 샘플 세트를 제작 (그림 29)
- 세포는 바이러스 접종 1시간이 지나면 PBS로 세척 후 새로운 배양액으로 교체, 이 세포를 추가 배양하여 실험에 사용
- RNA-Seq를 위하여 7 시간 배양한 샘플 세트는 Trizol reagent를 이용하여 세포를 수거하였으며 -70°C 초저온 냉동고에 24 시간 이상 보관하여 세포 내 바이러스를 실험 시켜 BL3 외부로 반출함

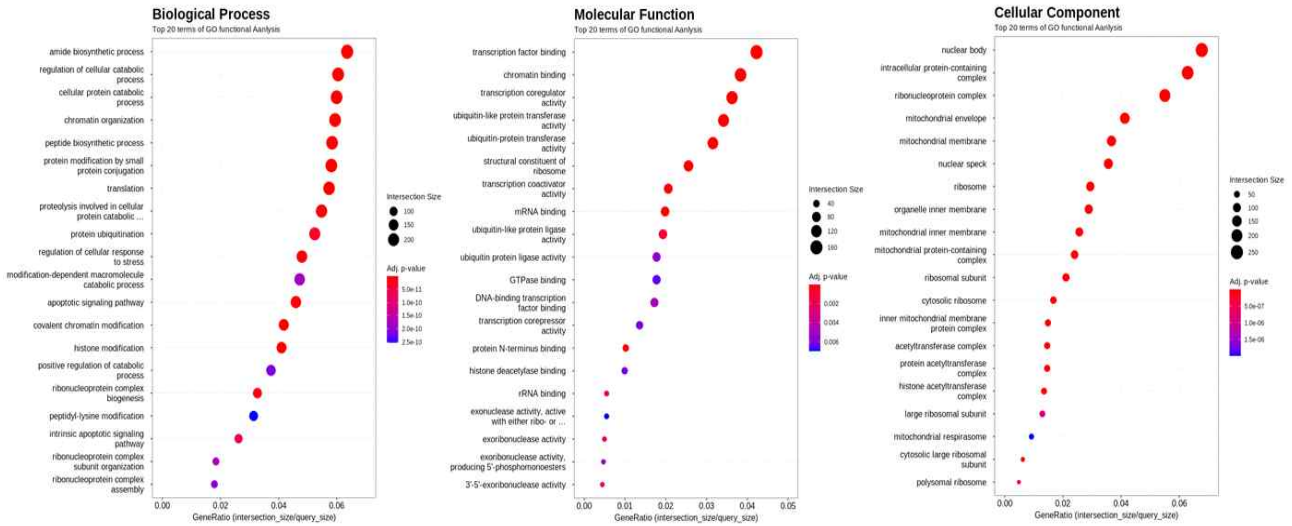


그림 27. Gene Ontology Enrichment 분석

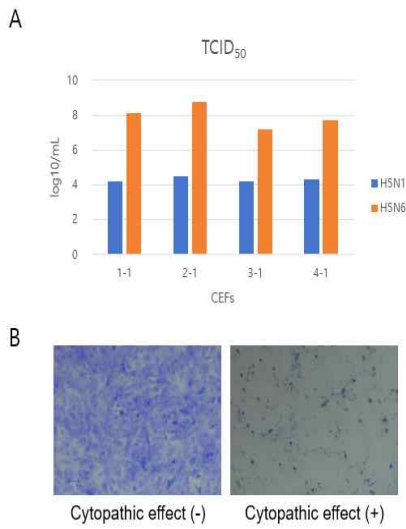


그림 28. H5N1 및 H5N6 바이러스 역가 확인

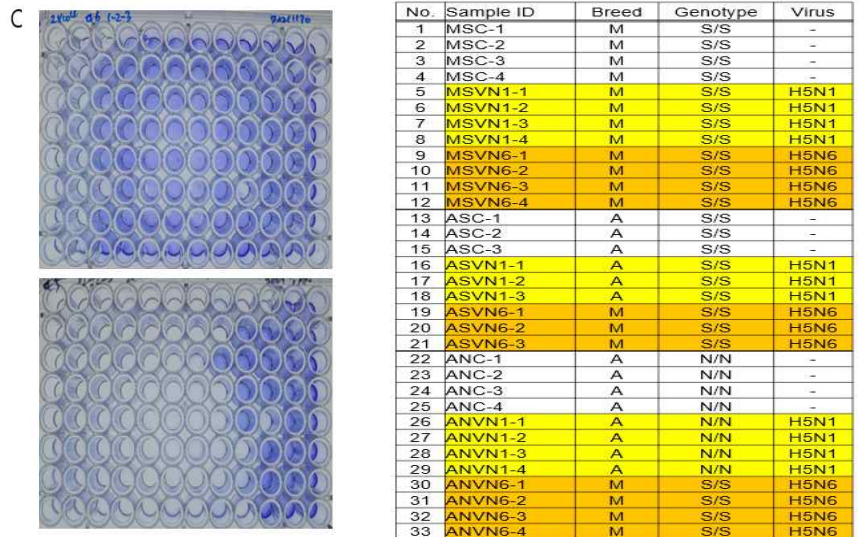


그림 29. H5N1 및 H5N6 감염실험 구성

- 총 48 시간 배양한 샘플 세트의 배지를 수거하여 Trizol reagent 처리하고 -70°C 초저온 냉동고에서 24 시간 이상 보관 후 BL3 외부로 반출. 배양액 내에 있는 바이러스 RNA를 분리하여 감염 후 CEF에서 복제/배출된 바이러스의 여부를 M gene PCR로 확인. M gene은 바이러스 주입한 배양접시의 상층에서만 검출되었음. 이는 CEF에 감염된 바이러스가 배지로 배출된 것을 나타냄 (그림 30A)

- 상대적으로 바이러스양이 많은 H5N6를 이용하여 전체 CEFs의 TCID<sub>50</sub>을 확인하였음. 이때, 저병원성 바이러스와 달리 유의하게 한 개체에서 낮은 TCID<sub>50</sub> 값을 나타냄. 이는 BJ농장의 AN4-1 개체는 다른 개체에 비하여 H5N6 감염에 대한 저항성을 보일 수 있음을 시사 (그림 30B)

- 따라서, RNA-Seq data에서 H5N6 AN4-1를 기준으로 하여 나머지 감염군들과의 차이를 분석함으로써 고병원성 조류인플루엔자 저항성 유전자를 색출하고자 함

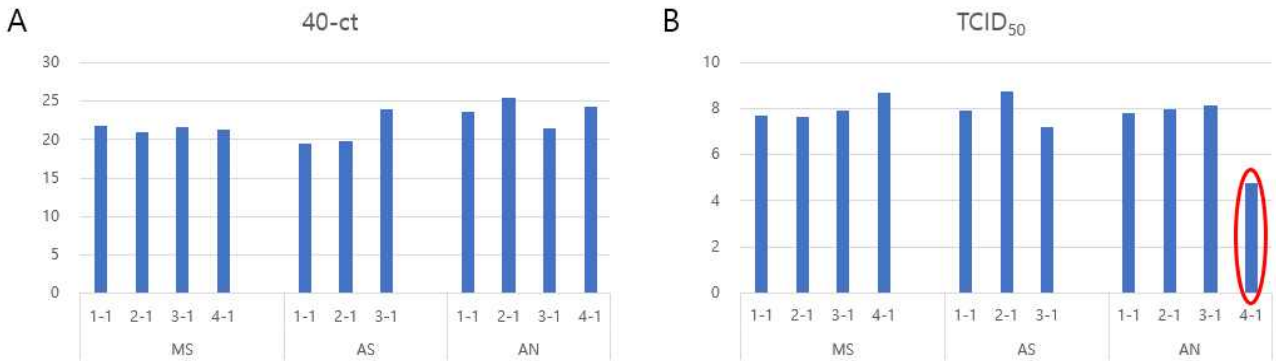


그림 30. H5N6 48 h 감염 후 M gene PCR 결과(A)와 TCID<sub>50</sub> 값

- RNA-Seq를 이용한 저항성 유전자 선별을 위한 흐름은 전체 전사체 발현량 확인 → cut-off 설정 → DEG 리스트업 → DEG를 대상으로 한 GO 및 KEGG database 분석 → 감염실험 연계 분석 → 최종 유전자 선별 순으로 진행함

- RNA-Seq 결과, CEF의 mRNA 을 정량화 하여 총 10,564개 유전자가 발현되는 것을 확인(그림 31A)

- 이중 미처리 대조군을 기준으로 발현변화의 차이를 보이는 DEG는 총 545 개이며, 상향 조절된 유전자 270개, 하향 조절된 유전자는 275개임. 정상 대조군에 대한 AN4-1의 DEG는 총 2,009개이며 상향 조절된 유전자 1,122개, 하향 조절된 유전자는 887개임(그림 31B)

- 발현 정도가 유사한 샘플 및 유전자를 hierarchical clustering analysis (Euclidean Distance, Complete Linkage) 를 통하여 그룹화, H5N6 AN4-1에서 유의하게 발현 변화를 보이는 유전자를 특징함(그림 31C)

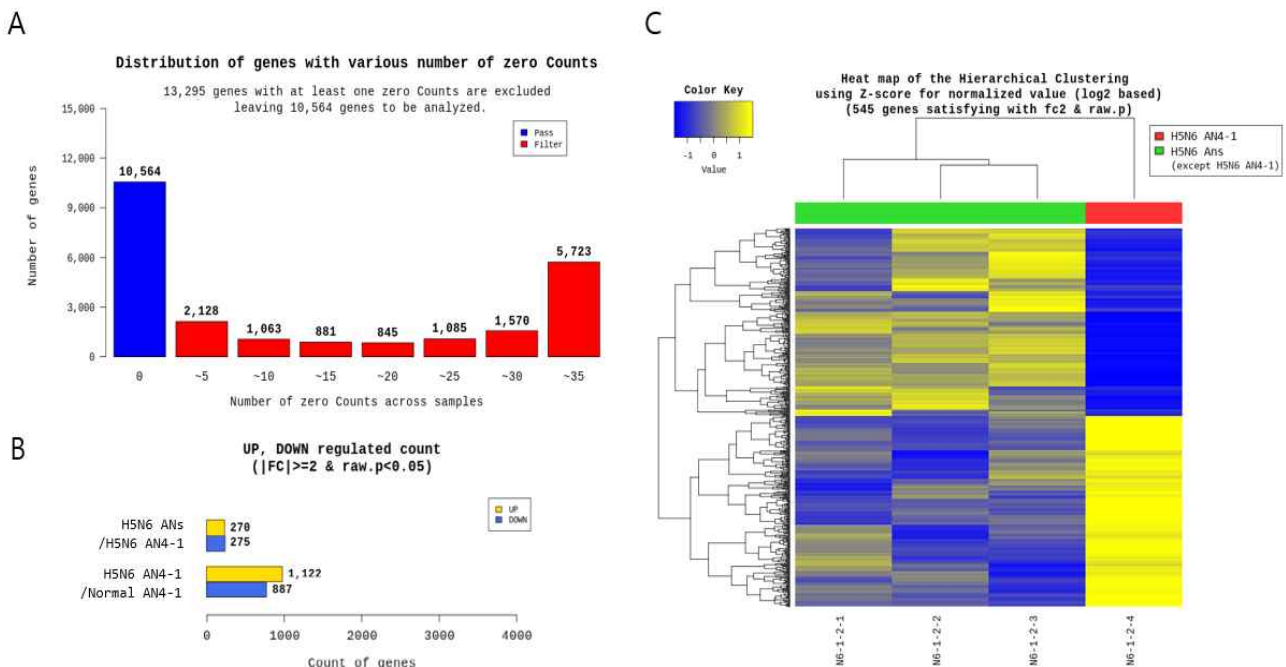


그림 31. 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 감염시 발현유전자수와 DEG 선별 결과

- 그림 31B의 H5N6 ANs/H5N6 AN4-1의 DEG 리스트에서  $\alpha$ -value (FDR adjusted p-value)가 0.05 이하인 170개 유전자(UP: 55개, Down: 135개)를 다시 선별, H5N6 AN4-1/Normal AN4-1의 DEG 리스트에는 존재하지 않으나 H5N6 ANs/H5N6 AN4-1에 서만 관찰되는 DEG(UP:12개, DOWN:30개)를 목록화하여 H5N6 저항성 후보 유전자를 제안(표 1). 해당 유전자들의 매핑되는 GOBP와 KEGG pathway를 확인(그림32)

표1. H5N6 저항성 후보 유전자

Gene ID	Gene Symbol	Test1/N6-1-2-4.fc	Test1/N6-1-2-4.logCPM	Test1/N6-1-2-4.raw.pval	Test1/N6-1-2-4.bh.pval
769256	IL17REL	91.798722	6.149419	5.26172E-09	2.0587E-06
427393	MARVELD2	7.991206	2.834950	5.54643E-05	0.005918434
419245	PPDPF	7.568151	5.450437	3.61751E-13	2.93965E-10
112531894	LOC112531894	6.425950	4.486278	3.2292E-09	1.36453E-06
107050437	LOC107050437	6.415423	4.605122	0.000122194	0.010939472
420985	TMEFF1	4.880061	3.261073	0.000340085	0.023401926
396248	CKB	3.877105	5.663817	3.86919E-06	0.000603324
417816	CD69L	3.478219	6.011865	7.97431E-07	0.000175501
395369	CRISPLD1	3.396025	3.408946	0.00079857	0.044635412
395429	POSTN	3.152442	10.710998	8.20441E-06	0.001125603
100859629	HH3L	2.739341	5.569443	0.000161325	0.013672067
396128	CSRP2	2.589048	9.402968	0.000207673	0.016250804
424819	CLSTN2	-11.321926	4.103544	3.92399E-18	1.38177E-14
419407	MMP23B	-7.252551	4.836555	1.90997E-12	1.34513E-09
423090	KCNQ1	-4.402543	2.539607	1.04118E-05	0.001374882
426846	LIPG	-4.242276	7.348192	1.31979E-13	1.16186E-10
423385	NRXN3	-3.624007	3.331473	0.000813746	0.04500739
107056877	LOC107056877	-3.571267	2.330806	0.000438959	0.027767421
419588	MAN1C1	-3.237105	5.852456	6.43154E-09	2.42653E-06
772163	PTPRQ	-3.124042	4.895646	0.000607433	0.035065134
395716	EYA4	-3.000305	4.063553	3.36924E-05	0.003827164
418389	TMEM45A	-2.733379	6.058416	2.93065E-06	0.000507531
428529	DSG2	-2.661740	4.101187	0.000175611	0.014570501
416291	ADAMTS2	-2.638867	7.380310	1.98527E-06	0.000374507
776594	LOC776594	-2.577498	5.263734	1.96904E-05	0.002363745
419533	LOXL2	-2.283478	8.531574	0.000201986	0.015923725
421839	PRSS35	-2.228459	8.323218	0.000471989	0.029503475
425972	PDK1	-2.212189	5.080477	0.000370587	0.024985318
424149	MAP3K20	-2.201225	8.076565	0.000128799	0.011433874
428066	VWA8	-2.197737	5.363006	0.000296261	0.021885988
423905	CCDC186	-2.196474	6.078680	0.000319295	0.022557635
422943	SLC4A11	-2.196101	6.824099	0.000263921	0.019914726
768530	PLA2G15	-2.192084	5.553119	8.56603E-05	0.008378848
421053	ARHGAP28	-2.164679	6.556338	0.000345809	0.023568562
418430	PROS1	-2.146013	9.657049	0.000875991	0.048197771
417742	HDAC10	-2.123716	4.928095	0.000497516	0.030735403
396474	LOX	-2.097164	6.924724	0.000308998	0.022305348
424815	PXYLP1	-2.094056	6.107671	0.000168499	0.014127131
421722	SERINC1	-2.093956	8.849912	0.000664034	0.037830083
100858913	SMAP1	-2.042980	6.211108	0.000278981	0.02075461
417632	YPEL2	-2.041205	5.805183	0.000520056	0.031377444
416774	YPEL1	-2.028444	5.799357	0.000467222	0.029379338

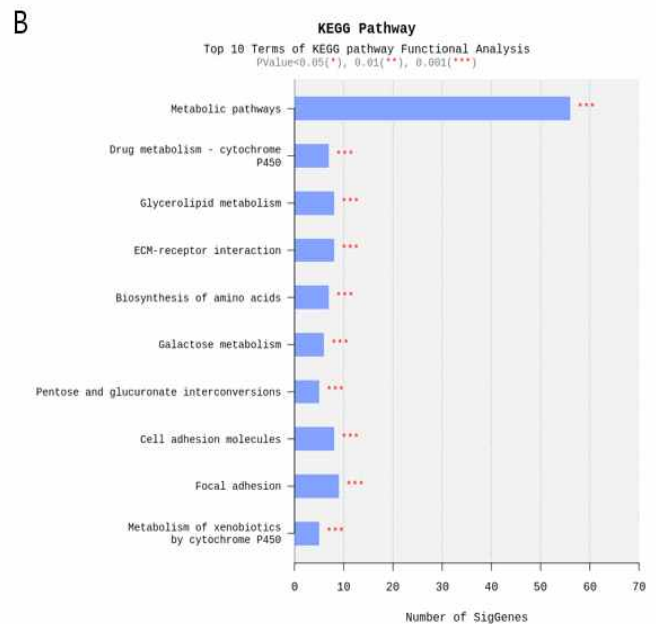
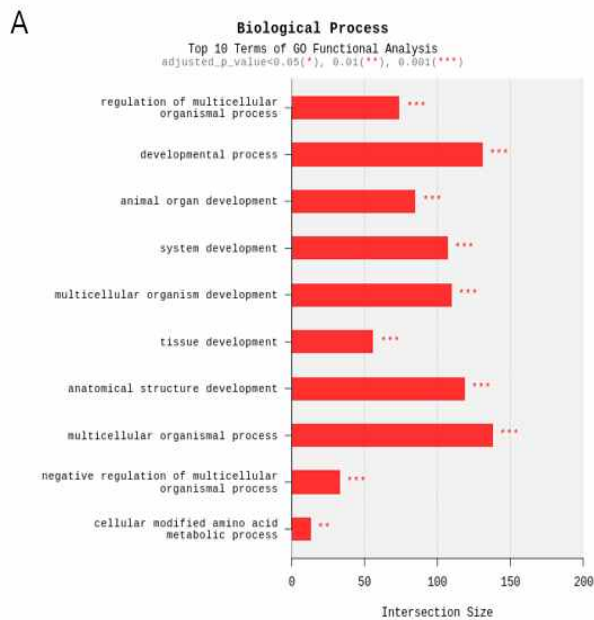


그림 32. H5N6 저항성 후보 유전자군의 GOBP(A)와 KEGG pathway(B)



▶ 바이러스 저항성 숙주의 특성

- 본 연구진의 일본 닭을 이용한 결과를 포함하여 우리나라 유래 종계(제주 재래닭 4종과 국내 토종닭 1종) 간의 Mx 유전자의 유연관계를 분석을 그림 33의 계통수로 나타냄(붉은색 상자는 SI 저항성 일본 닭 품종의 Mx 유전자 서열, 파란색 타원형은 AN4-1의 Mx 유전자 서열)

- AN4-1은 H5N6에 저항성을 보였을 뿐 아니라 일본의 SI 저항성을 보인 닭 품종 중 하나인 SM-1, SM-2와 유전적 거리가 가까운 것으로 확인(그림 34)

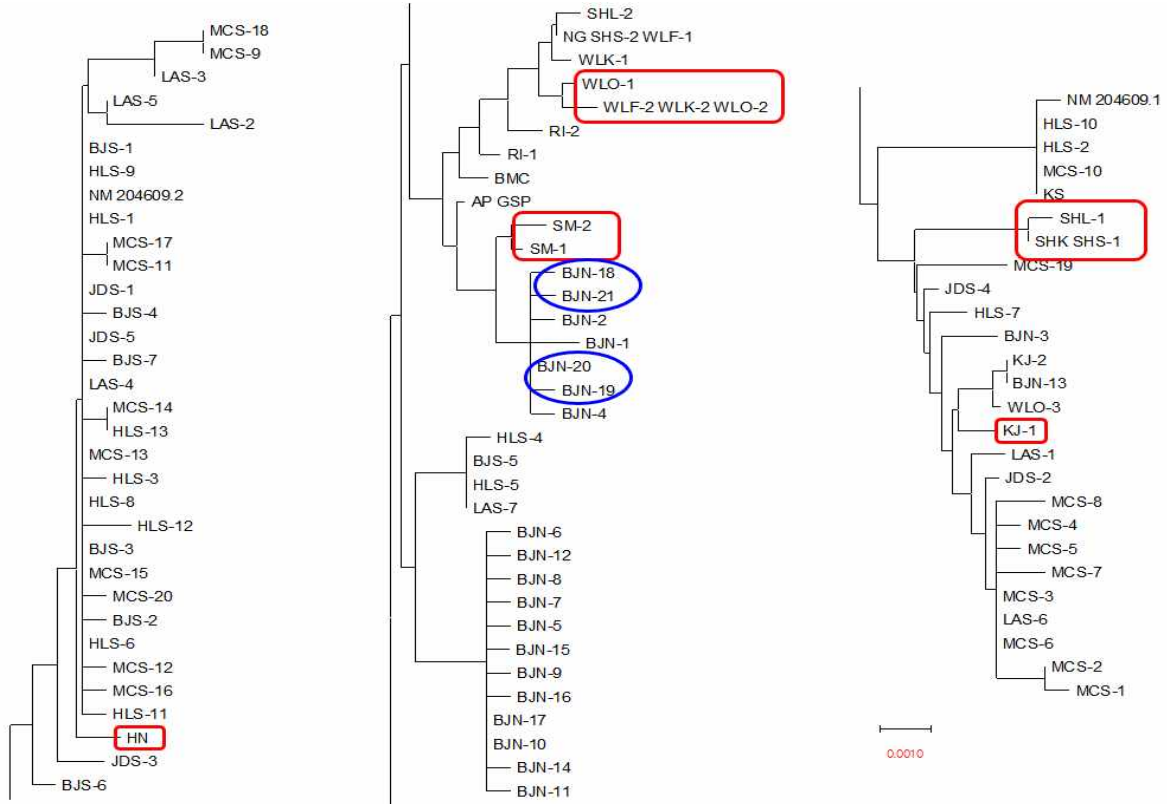


그림 33. 우리나라 닭 품종과 일본 닭 품종의 Mx 유전자 계통수

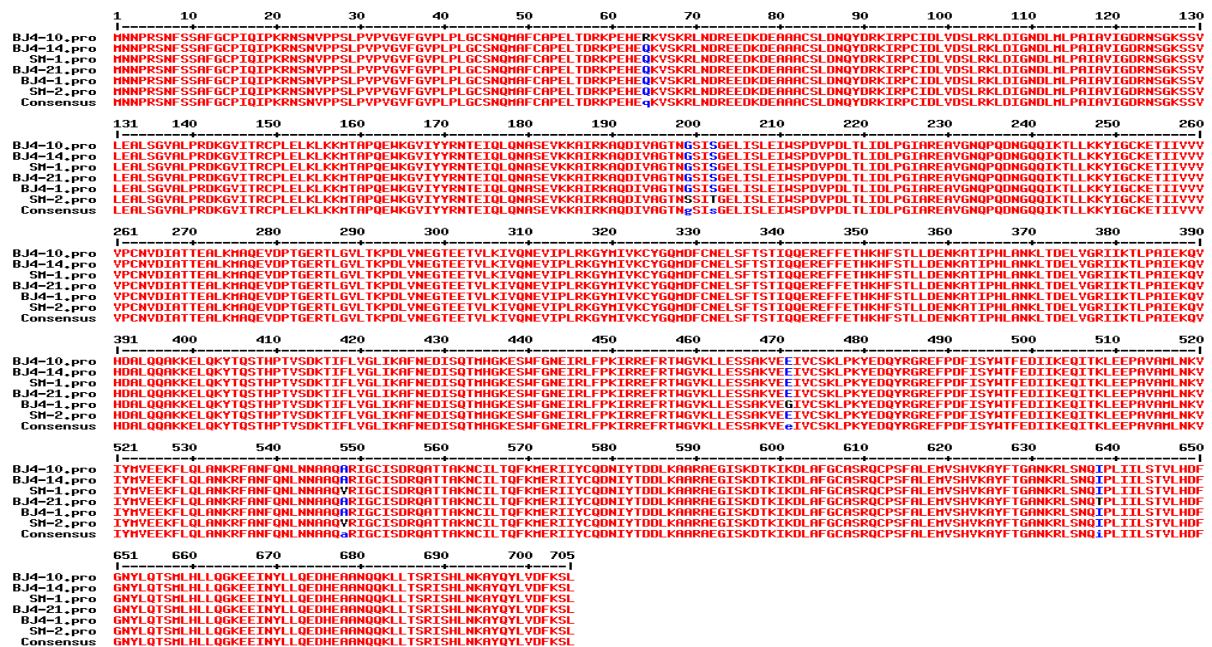


그림 34. AN4-1과 일본 닭 품종의 Mx 단백질 유사성

▶RNA-Seq 정보 활용을 위한 국내외 전문기관 협력체계 구축

- (국내) Bioinformatics 연구 관련 국내 최고의 권위를 가지고 있는 S대학교 L 교수팀과 현재 바이러스 감염실험 결과를 중심으로 AI 저항성 유전자 signature 발굴을 위해 새로운 알고리즘을 개발 중
- (국외) 유전자 프로파일링 분야에서 선두그룹에 있는 Z 교수팀과 AI 환자 유전체와 본 연구팀이 보유한 LPAI 및 HPAI 감염실험 빅데이터 결과를 비교분석하여 상관 유전자 발굴 및 프로파일링 작업 협력 중
- 상기 분석 협력을 통해 기존의 AI 바이러스 저항성 유전자 리스트를 새롭게 작성하고, 그동안 그 안에서 발굴되지 못했던 후보유전자들을 완벽히 도출하여 고병원성 AI 저항성 품종 개발의 산업적/정책적 지표를 마련

▶기타 후보 면역유전자에 대한 연구 수행

- 항바이러스 활성에 영향을 줄 수 있는 선천면역유전자 중 하나로서 protein kinase R (PKR)에 대한 연구 수행 착수(그림 35)
- 전장 염기서열 분석을 가능하게 하는 유전자 특이적 프라이머 설계 및 확인 성공(그림 36, 37)
- 세포 내 선천면역유전자 활성이 보고된 천연물을 이용하여 일부 품종의 PKR 활성을 확인(그림 38)

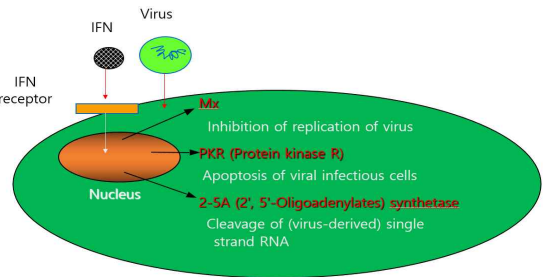


그림 35. 바이러스 자극에 의해 활성화되는 면역유전자와 작용기전

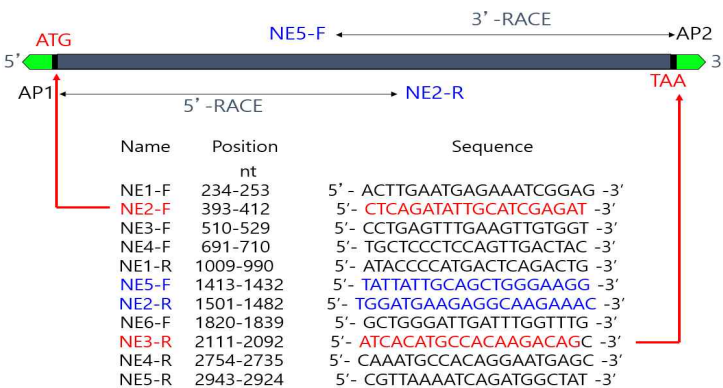


그림 36. PKR 특징화를 위한 PCR 프라이머 세트

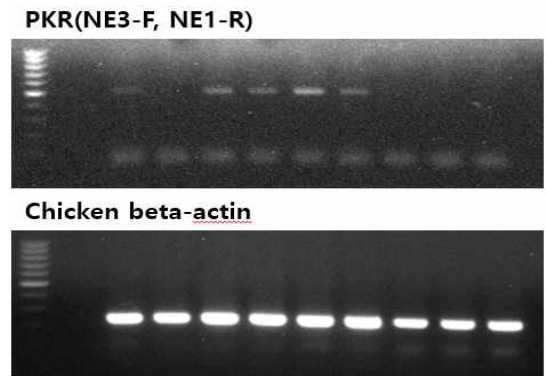
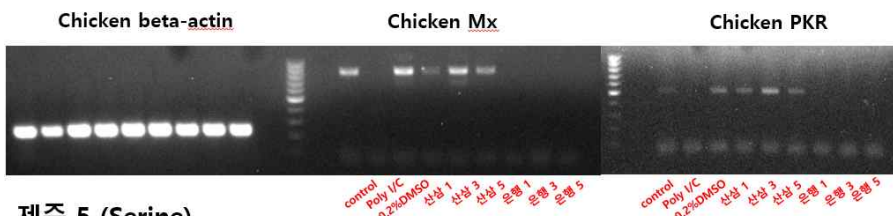


그림 37. Universal primer를 이용하여 국내 농장 일부 품종의 PKR 증폭에 성공

파주 5-4 (Hetero)



제주 5 (Serine)

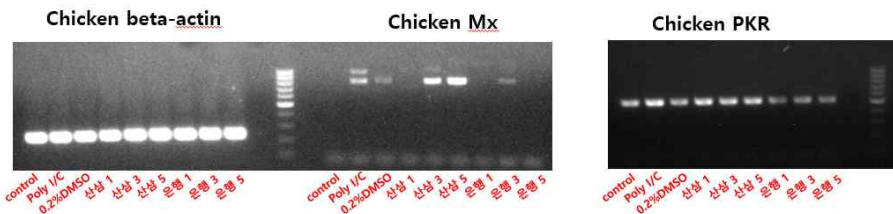


그림 38. 면역 활성 물질 자극에 대한 각 농장 유래 닭 품종의 Mx와 PKR 발현



(2) 정량적 연구개발성과

정량적 연구개발성과표

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	1단계 (2019~2021)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표	논문(SCIE)	목표	3	3	-
		실적	1	1	-
	논문(비SCIE)	목표	3	3	-
		실적	0	0	-
	평균 IF	목표	5	5	20
		실적	2	2	20
	학술발표	목표	5	5	20
		실적	6	6	20
	특허 출원	목표	2	2	-
		실적*	0 (2)	0	-
	특허 등록	목표	1	1	-
		실적*	0 (1)	0	-
	품종 등록	목표	1	1	-
		실적	0	0	-
연구개발과제 특성 반영 지표	교육지도	목표	3	3	10
		실적	2	2	10
	인력양성	목표	6	6	20
		실적	2	2	20
	정책활용	목표	2	2	20
		실적	1	1	20
	홍보(전시)	목표	2	2	10
		실적	0	0	10
	기술실시 (이전)	목표	1	1	-
		실적	0	0	-
	고용창출	목표	0	0	-
		실적	1	1	-
	기타	목표	0	0	-
		실적	1	1	-
계		목표	34	34	-
		실적	16	16	-

\* ( ) 예상 정량적 연구개발성과 기입

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Expression of potassium channel genes predicts clinical outcome in lung cancer	KOREAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY & PHARMACOLOGY	Ko, Eun-A; Ko, Jae-Hong	23(6)	대한민국	The Korean Physiological Society and The Korean Society of Pharmacology	SCI	2019.11	10.4196/kjpp.2019.23.6.529	30

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	제71회 대한생리학회 학술대회	Seongtae Kim, Jae-Hong Ko	2019.11.01.	영남대학교 의과대학	대한민국
2	제71회 대한생리학회 학술대회	Young-Won Kim	2019.11.01.	영남대학교 의과대학	대한민국
3	제71회 대한생리학회 학술대회	김영원, 서예림, 김성태, 고재홍	2019.11.01.	영남대학교 의과대학	대한민국
4	제71회 대한생리학회 학술대회	김영원, 서예림, 김성태, 고재홍	2019.11.01.	영남대학교 의과대학	대한민국
5	제71회 대한생리학회 학술대회	김영원, 서예림, 김성태, 고재홍	2019.11.01.	영남대학교 의과대학	대한민국
6	제71회 대한생리학회 학술대회	김영원, 서예림, 김성태, 고재홍	2019.11.01.	영남대학교 의과대학	대한민국

[경제적 성과]

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	0
		생산인력	0
	개발 후	연구인력	1
		생산인력	0

[사회적 성과]

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용
1	상호협력업무협약	제주 동물위생시험소 -제주 축산진흥원-중 양대학교 산학협력단 상호 협력 업무 협약	제주 동물위생시험소 -제주 축산진흥원	2020.4.14	제주 유래 재래닭 또는 토종닭 자원에 대한 상호 보완적 연구 협력 제주 유래 자원 및 AI 저항성 Mx 유전자 보유 여부와 이를 쉽게 판별할 수 있는 유전자 마커 개발 및 제주 재래닭 품종 구분 위한 유전자 마커 개발

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	학위인력 양성	2019		2			1	1	2				

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

No	프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
1	AI 저항성 닭 품종으로서 제주 재래닭의 가치	- AI 저항성 닭 품종으로 개발의 필요성 - AI 저항성 닭 품종으로서 제주 재래닭 이용 가능성	중앙대학교 산학협력단	1	1	9
2	제주 재래닭을 이용한 AI 저항성 닭 품종 개발 가능성	- 제주 재래닭의 AI 저항성 Mx 유전자 보유 여부와 이를 쉽게 판별할 수 있는 유전자 마커 개발 가능성	중앙대학교 산학협력단	1	1	4

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항

No	활용명칭	활용내역	활용년도	활용일
1	영농활용	제동목장에서 보유 중인 제주 재래닭이 AI 저항성을 가질 것으로 보이는 과학적 증거를 공유하고 생산성 및 경제성의 문제로 제주 재래닭 유지에 불투명했던 제동목장(책임자: 황경준 축산그룹장)으로부터 향후 재래닭 유지 및 상품화 의지를 이끌어냈으며, 본 연구의 최종 목표 달성을 위해 적극적으로 협조하기로 결의	2020	2020.3.18

## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도 (%)
(1단계) 후보유전자 발굴/특징화	<p>우리나라에서 발생하는 조류독감의 원인 바이러스와 지역별 발병현황을 분석하고 이를 바탕으로 청정지구를 설정하여 연구수행 및 관찰의 기점 마련</p> <p>-&gt; 1차 조사 및 지방기관과의 협의를 통해, 외부환경과의 차단 및 통제가 수월하며 신뢰성 높은 데이터 확보 및 효과적인 <i>in vivo</i> 실험 수행 가능한 제주도로 선정</p> <p>바이러스 저항성 유전자 후보군 설정을 위한 유전자 프로파일링 - 사람에서 조류독감 감염사례와 선천면역유전자 프로파일링 -&gt; 자료 확보 불가 확인</p> <p>- 기타 실험동물 및 유정란에서 분리 배양된 섬야아세포에 1회 복제 후 사멸하는 재조합 바이러스를 감염시킨 후 RNA-seq 분석 -&gt; 각 기관의 협조를 통해 저병원 1군, 고병원성 2군을 확보하여 감염실험 수행 후 QC 통과 샘플을 이용하여 RNA-seq 분석 수행</p> <p>조류에서 보고된 항바이러스성 면역유전자 및 인터페론 유도 면역유전자 군을 중심으로 사람 및 기타 실험동물 프로파일링 자료와 매칭 -&gt; 사람 데이터의 사용 불가로 빅데이터 비교 분석에 어려움이 있었지만, 빅데이터 분석 의뢰를 통해 닭을 포함하여 기타 실험동물과의 비교분석(피로파일링)이 가능해짐</p> <p>상기 자료를 토대로 새로운 후보유전자를 예측하고 RACE PCR 방법을 통해 유전자 발굴 -&gt; 감염실험과 빅데이터 분석을 통해 현재까지 발굴된 유전자들 중에서 상관관계 알고리즘이 높은 가장 신뢰도 높은 그룹을 재선별하는 과정에 있으므로 RACE PCR을 통해 전체 염기서열정보를 확인할 필요성이 해결됨</p> <p>숙주 세포에 발현되는 바이러스 면역유전자를 분리/동정하고 구조 및 기능을 해석 하여 면역단백으로서의 특징을 구분지음 -&gt; RNA-seq 빅데이터 분석으로 대치 가능해짐</p>	100%
(2단계) 모델품종 개발	<p>유전자형 스크리닝을 위한 PCR-RFLP용 프라이머/효소를 설계 -&gt; 후보유전자 중 Mx와 PKR에 대한 검증 및 설계 완료 -&gt; 빅데이터 분석 결과 도출되는 기타 후보유전자에 대해서도 동일하게 적용 예정</p> <p>소량의 혈액으로 저항성 품종을 식별할 수 있는 소프트웨어 개발 - 빅데이터 분석과 각 후보유전자에 대한 항바이러스 활성 실험의 결과를 바탕으로 AI 고저항성 닭을 스크리닝할 수 있는 quantitative PCR 용 프라이머 세트 제작 - Quantitative PCR 결과를 이용하여 AI에 대한 저항성 예측용 프로그램 설계 -&gt; 가장 핵심 기술인 mRNA 유전체 분석이 진행 중이며, 이들을 그룹화하는 알고리즘이 완성되는 대로 후보유전자 그룹 및 이들의 염기서열 정보를 이용하여 감염용 키트의 개발 및 결과해석 프로그램을 구축할 예정. mRNA-seq 분석 결과를 토대로 핵심유전자 상관관계분포도 작성이 가능해짐</p> <p>항바이러스 활성을 보이는 유전자를 바탕으로 바이러스에 저항성을 나타내는 숙주그룹 선별 -&gt; 일부 후보유전자의 염기서열 계통도와 제주축산진흥원 보유 재래닭의 분포 현황을 바탕으로 고병원성 AI에 항바이러스 활성을 나타내는 그룹 확정</p> <p>세포 내 유전자도입 및 재조합 바이러스를 이용한 감염실험을 통해 항바이러스 효과 검증 -&gt; 고병원성 AI의 확보 및 ABL3 시설 사용이 가능해짐에 따라 계획서보다 적극적인 감염실험 수행 기대</p> <p>역학조사 및 유전자 모니터링 분석을 통해 조류독감 청정지구 선정 -&gt; 감염실험 및 유전체분석 결과를 바탕으로 제주도를 기점으로 모델개발 및 청정화 가능성 확보</p> <p>선정된 청정지구를 중심으로 <i>in vivo</i> 감염실험 및 무항생제 실험을 병행하여 항바이러스 활성 검증 -&gt; <i>in vivo</i> 고병원성 AI 감염실험을 위해 전북대학교 인수공통전염병연구소 사용에 대한 협의를 마침 -&gt; 실제 농가 보급 전까지 필드 실험 및 개체 유지를 위해 제주농촌진흥원이 장소를 제공하도록 합의</p>	50%
(3단계) 산업화 및 실용화	<p>현재까지 2단계 연구가 진행 중에 있으며, 산업화와 관련하여 제주지방관공서(제주농촌진흥원, 도내 농가(웰빙 등), 유통기업(하림, 기타 도내 기반 유통업자 등)을 이미 확보하였거나 협의 중</p>	0%

## 4. 목표 미달 시 원인분석

### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- COVID-19 Pandemic으로 인한 HPAI 감염실험의 축소 -

본 연구 수행을 개시하는 시점에서 이미 ABL3 보유 기관과의 연구 협력을 약속 받았지만, 2019년 하반기부터 범국가적 재난에 해당하는 COVID19 창궐로 인해 정부기관으로부터의 긴급응역연구 의뢰가 진행되어 ABL3 보유 기관으로부터 연구협력지원이 중단되었으며 결과적으로 HPAI 감염실험이 크게 지연됨. 해당 사태로 인해 타 BL3 보유기관과도 긴급히 연락을 취했지만 모두 동일한 상황이라는 거절 통보를 받음. 이에 따라, 고병원성 AI 바이러스 유래 병원체를 이용한 In vivo 감염실험을 in vitro 실험으로 대체하고, 저병원성 AI 바이러스 in vitro 감염실험을 추가로 진행. 여기에서 도출된 감염실험 및 빅데이터와의 비교로 연구 방향을 일부 수정 됨. 연구기간 막바지에 해당하는 2021년 하반기에 들어서야 ABL3 시설 사용이 가능해짐에 따라 고병원성 감염실험이 진행되어 품종개발 및 상품화로의 중개연구 단계에서 연구기간이 종료됨. 하지만, 저병원성 AI 감염실험과 빅데이터 확보는 앞으로 진행해야 하는 고병원성 AI 저항성 품종개발에 더욱 신뢰도를 높이는 결과물로 활용될 것으로 기대됨

- 다년도 과제의 연구개발비 회수 조항에 의한 피해 -

"다년도 협약과제"인 본 과제의 특성상 연구기간이 단계별로 나뉘지며, 최초협약년도에 정해진 단가를 적용하여 총 연구기간을 대상으로 협약체결이 되었음. 연차 협약과제와 달리 각 단계별 연구기간이 상이하고, 특히, 본 연구의 경우는 연구 중 도출되는 결과들에 따른 변동이 존재하기 때문에 최초 과제선정 심사 시 이를 강하게 호소하였음에도 불구하고, 초기단계 연구개발비 중 연구에 가장 큰 중심을 차지하는 빅데이터 기반 실험에 필요한 비용(약 3천만 원)을 회수 조치 당함. 이와 같은 중간평가 및 수행기간 중 연구비 회수라는 연구자 관리 방식은 과제(특히, 본 과제처럼 타 기관 시설을 이용하는 감염실험 수행 및 빅데이터 분석이 후반에 집중되는 형태의 과제)가 성공적으로 마무리되는데 방해요소로 작용. 구체적으로, 늦은 과제 개시일 및 연구개발비의 지급 지연으로 인하여 연구원 선정, 연구수행 및 연구개발비 집행이 지연되었음을 상호 인지하였음에도 연구개발비 사용금액을 연구 실적으로 잘못 인식하여 연구개발비 이월한도를 설정하고 회수조치를 강행한 것은 연구지원기관으로서 평가 및 실적 위주 운영을 보여주는 것이라고 생각되며, 이로 인하여 해당 연구의 상당 부분 질적 저하를 초래할 것이 우려됨. 연구관리규정 및 제도 적용 시 과제의 성격이나 목적에 따라 전체 연구기간 동안 연구비총액 선정 예외조항을 두는 등 제도 개선이 필요하다고 사료됨

### 2) 자체 보완활동

고병원성 AI에 대한 새로운 저항성 유전자 후보 발굴의 결과를 바탕으로 새로운 품종의 닭을 개발하여 농가피해를 최소화하고 국가산업경쟁력을 증진시킬 수 있는 가능성 마련

- 본 과제를 수행하기 위해 지속적으로 접촉한 지자체 관련 기관 및 바이러스 보유 중앙기관 실무 담당자들로부터 해당 연구에 대한 이해와 협조를 얻음(제주 축산진흥원 및 동물위생시험소와 MOU 체결, 농림축산검역본부 보유 바이러스의 연구자 제공방법 활성화 등)

- 시료 제공 관련 다수 농가 및 유통업자로부터 본 사업에 대한 필요성 및 지원을 약속 받음

- 저병원성 AI에 대한 결과도 함께 도출함으로써 저병원성 vs. 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 감염의 유전체 변화를 추가적으로 분석 가능. 이는 고병원성 AI에 더욱 특화된 품종을 개발할 수 있는 요소로 작용 기대

- 감염실험 결과를 바탕으로 구축된 빅데이터를 다각적으로 분석하고 새로운 후보유전자 및 기전을 밝히는 데 결정적 도움을 줄 수 있는 국내외 전문기관과의 연구 협력 성사(국내-S대학교 L 교수팀, 국외-N대학교 Z 교수팀)

### 3) 연구개발 과정의 성실성

---

- 닭에서의 효율적인 후보유전자 그룹을 선정의 가장 주요한 핵심인 AI 감염실험 및 RNA-seq의 단계에서 뜻하지 않은 범국가적 재난으로 차질이 불가피하였으나, 저병원성 병원체 감염실험, 고병원성 병원체의 시험관 내 감염실험 등으로 선회하여 연구의 목적 달성에 도달하고자 하였음. 이와 관련하여 차선적으로 연구비 증액 없이 연구기간의 연장에 대한 협의를 고려해 보는 것을 제안함
  - 본 연구의 빅데이터를 근거로 후보유전자 범위와 관련 경로 중 바이러스 감염시 숙주 내에서 바이러스 증폭과 관련된 경로(ribosome, spliceosome, RNA transport 등)의 유전자 발현의 차이를 보임. 이는 AI가 숙주 핵 시스템과 그 구성요소를 직접 방해할 수 있음을 나타내며, 이를 효과적으로 제어할 수 있는 메커니즘을 확립함으로써 저항성 품종 개발에 근거를 추가할 수 있을 것으로 보임
  - 바이러스 감염 시 제주 재래닭의 품종별 유전자 발현 유사성이 확인되는 바 협동기관 및 참여기업을 지속적으로 타진하여 산업화를 꾀하고자 함
- 

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

---

- 현재까지 도출된 결과의 해석만으로도 최초 연구계획서 내용처럼 다음과 같은 효과를 기대할 수 있음 (SAVE 효과)
    - ▷ 유전자 모니터링과 프로파일링을 통해 식품안전관리 및 정책에 과학적 기반 제공하고 기타 인수공통 전염병을 근본적으로 차단시키는 연구의 표본 -> Scientific
    - ▷ 궁극적으로 생물학적 방어벽을 구축함으로써 사람이 최종 숙주가 되는 고병원성 조류인플루엔자 바이러스 감염을 원천적으로 봉쇄하는 예방적 효과 -> Antiviral
    - ▷ 국내 축산물 유전정보를 활용한 우수한 농축산 식품브랜드를 확보함으로써 국제 위상을 높임과 동시에 항생제 내성의 공포로부터 안전지대를 구축 -> Valuable
    - ▷ 바이러스 전파로 야기되는 막대한 규모의 농축산 산업의 손실을 예방하고 안전한 먹거리 조성을 통해 고부가가치를 창출하는 등 지역경제 활성화 -> Economic
- 

## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

---

본 연구 수행기간 동안 발생한 여러 자연적/인재적 네거티브 요소로 인해 현재까지의 결과만으로는 기초 연구와 산업화의 중간에 위치한 상황이지만, 1-2단계에서 확보해야 하는 대규모 데이터 확보 및 이를 분석하기 위한 전문 기관들과의 협력 유지, 그리고 산업화 달성을 위해 지원 받아야 하는 지방공무기관 및 농가/유통업자의 가세 등으로 인해 2-3단계 연구에 더욱 탄력을 받아 최종 목표 달성이 무난히 달성될 것으로 기대

### 학술적 활용

- 유전자 프로파일링 및 빅데이터 분석 전문기관과 연계하여 새로운 후보유전자 도출 및 이를 연결하는 알고리즘을 밝혀 국내외 학술지에 발표
- 상품화 이후 우리 품종 닭의 글로벌화에 도움이 되는 홍보 효과로 작용

### 산업적 활용

- 지방 공무 기관이 종계 또는 재래닭을 관리/공급하는 중심축을 이루어 지속적인 모니터링이 가능할 수 있도록 전문 노하우를 제공
- 지방 농가와 유통업자는 이러한 정보를 공유하고 필드에서의 임상적 효과를 피드백 해주는 유기적 시스템을 마련

### 인수공통전염병 예방적 활용

- 항생제 및 백신에 의지하는 후발 조치 예방시스템에서 벗어나 생물학적 방어벽이 구축됨으로 인해 자연계로부터의 전염병 유입으로부터 근본적으로 안전할 수 있도록 마련하는 정책 활용에 도움 제공
  - 조류 인플루엔자 이외에도 인수공통전염병 예방 정책을 수립하는데 있어서 좋은 모델로 활용
-

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	-	
	비SCIE	-	
	계	-	
국내논문	SCIE	2	
	비SCIE	0	
	계	2	
특허출원	국내	1	
	국외	0	
	계	1	
특허등록	국내	2	
	국외	0	
	계	2	
인력양성	학사	-	
	석사	-	
	박사	-	
	계	-	
사업화	상품출시	3	
	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		농가 교육 사육 교육	

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 연구개발보고서 초록
	2) 자체평가의견서
	3) 연구성과 활용계획서



### 주 의

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