GOVP 12018483 660.6
L293 7

최 종
연구보고서

최 종 보 고 서

극한 미생물성 핵산 및 불포화지방산대사 관련 유용유전자원의 개발

Development of the gene resources related to pyrimidine and polyunsatulated fatty acids metabolisms from extremophiles

Pyrimidine 대사관련 유용유전자원의 개발

Pyrimidine metabolism related gene resources from thermophiles

고도불포화지방산 대사관련 유용유전자원의 개발

Gene resources related to polyunsatulated fatty acids metabolism from psychrophiles

주 관 연 구 기 관
경 북 대 학 교

농 림 부

대한민국
기중등록
2000. 12. 30
00851195
특허청

최 종 보 고 서

1997년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 극한 미생물성 핵산 및 불포화 지방산대사 관련 유용유전자원의 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부
2. 최종보고서 디스켓 1매

2000년 10월 31일

주 관 연 구 기 관 : 경북대학교

총괄연구책임자 : 송 방 호 (인)

주관연구기관장 :

농 림 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "극한 미생물성 핵산 및 불포화 지방산대사 관련 유용유전자원의 개발에 관한 연구" 과제 (1세부과제 "Pyrimidine 대사 관련유전자 산물의 작용기구 및 그 실용화에 관한 연구와 2세부과제 고도불포화 지방산 생성균주의 분리 및 EPA 합성 유전자군의 클로닝에 관한 연구")의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 10. 31.

주관연구기관명 : 경북대학교
총괄연구책임자 : 송 방 호
세부과제책임자 : 김 종 국
연 구 원 : 서 영 배
연 구 원 : 이 해 영
연 구 원 : 김 사 열
연 구 원 : 한 명 숙

요 약 문

I..제목

극한미생물성 핵산대사 및 불포화지방산 대사관련 유용유전자원의 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

I) 지구상에는 생물이 서식하기 어려운 극한 환경 즉 심해의 솟아나는 온천, 지상의 펄펄 끓는 온천물이나 화산에서 서식하는 초 고온성 세균, 남극이나 북극, 또는 만년설 속의 토양에서 서식하는 초저온 세균, 해양환경 또는 해양생물에 서식하는 저온세균, 유전지대 토양의 탄화수소 자화세균, 사해와 같은 염분호수나 염전지대, 강산, 강알카리성 폐수 배출공장의 하수도 등에서 서식하는 호산, 호염, 호알카리성 세균 등, 극한 환경에서 증식하는 미생물은 새로운 자원으로 부각되고 있다.
ii) 최근 이들 극한환경미생물로부터 효소, 저분자 향료, 생리활성 물질 등의 개발은 의학 및 생물산업에 획기적인 변화를 초래하고 있다. 극한내열성 세균으로부터 개발된 DNA중합효소에 의한 유전자단편의 증식은 새로운 감식법으로써 범죄수사에까지 이용되고 있으며, 1997년 한해에만 선진국에서 생의학에 투자한 돈은 25억불에 달한다(Medigan and Marrs, Scientific Amer. April, 66, 1997).
iii) 그러나 현재의 기술 수준에서 시험관 배양이 가능한 미생물은 전체 미생물의 1%에 지나지 않고 있으며, 이는 가장 잘 보존되고 있는 rRNA의 단편을 probe로 하였을 때 99%의 hybridized microbes가 더 있음이 확인됨으로써 알려진 것인데 현실적으로 99%의 배양되지 않는 미생물이 새로운 생명공학의 부존자원으로써 엄청난 가능성이 내포되어 있음을 시사하고 있다.
iv) 더욱이 동식물 및 곤충(식물 246,000종, 동물 280,000종, 곤충 750,000종)에 비해 엄청난 다양성이 미생물에 내재되어 있음이 발견되어 그 자원으로써의 효용가치가 극대화되고 있다 (Service, Science, 275, 1740, 1997).

제1세부과제에서는
v) 생육적온이 100℃인 극한 내열성균 *Methanopyrus kandreli* (Huber

et al., 1987)나 적온 72℃인 *Bacillus caldolyticus* (Bartolomeo et al., 1991) 로부터 NTP를 dNTP로 전환하는 nucleotide reductase를 코드하는 nrd 유전자, cytidine을 deoxycytidine으로 전환하는 cytidine deaminase의 코딩 유전자 *cdd* 등 pyrimidine 대사관련 유전자 또한 그 상업성을 무시할 수 없는 단계이다.

vi) 극한 내열성 nucleotide reductase가 개발되면 내열성 DNA polymerase에 의한 PCR법에의 응용에 버금가는 정도로 유전공학산업을 획기적으로 전환시킬 수 있으리라 생각된다. 이론적인 면에서도 진화과정에서 RNA world로 부터 DNA world에로의 변환성, 분자진화의 해석등에 이바지할 것이며, 산업적으로는 이들 핵산대사관련효소의 의약및 생화학용 제재로써의 생산에 중요한 의의를 부여할 것으로 생각된다.

vii) 실제 nucleotide reducataase 연구과정에서 새로이 발견된 강력한 저해제는 천연 항암성 물질로써 레스베라트롤이라는 사실을 알게 되었고 이 레스베라트롤은 강력한 항암성 성분임이 확인되었다. 이 레스베라트롤은 생체내 또 다른 필수 효소인 nonacistronic genes 의 산물인 atpase의 저해제로써도 작용함을 알게 되었다. 연구의 중반단계에서 발견된 이 항암성물질을 다량 함유한 포도를 개발하기 위하여 포도의 재배단계에서 그 환경요인을 면밀히 검토 분석하였으며, 시판 포도주가운데 수입품보다 오히여 국산 포도주에 항암성성분이 우세할 정도로 다량 함유되어 있어서 포도농가의 수익산업을 증진시키는 방향에서 연구가 추진되었다.

viii) 건강과 질병에 있어서 기능성 식품(functional foods)으로서의 불포화지방산에 대한 이해 및 관심은 날로 심화되고 있다. 이것은 에스키모인들에게 동맥경화, 뇌경색, 심근경색 등의 질병 발생율이 매우 낮은 것은 고도불포화지방산과 깊은 관련이 있음을 알게 되었다. 따라서 고도불포화지방산을 무엇으로부터 어떻게 확보하느냐 하는 것도 중요한 과제가 되었다. 그 중에서도 eicosapentaenoic acid(EPA)와 docosahexaenoic acid(DHA)는 특이하게도 화학 합성이 용이하지 못하여 천연물에서 얻어져야 된다.

한편 2세부과제에서는

viiii) 극한 내한성 미생물로부터 현재 각광을 받고있는 고도불포화지방

산 즉, docosahexanoic acid (DHA), eicosahexanoic acid (EPA)등의 대량생산을 위하여 이들 물질의 생산균주의 분리, 발효조건개선에 의한 생산성 향상, 이들 물질의 생합성 유전자군의 분리 및 증폭발현에 의한 대량생산, 등을 시도하여 응용하고자 하였다.

x) 성인병 환자나 유아, 노인등은 불포화 지방산 생합성이 저하하므로 이들 PUFA를 함유하는 유지를 기능성 식품으로 공급할 경우 EPA는 폐쇄성 동맥경화 예방제로의 약효가 인정되었으며, DHA는 콜레스테롤 및 중성지방 저하, 항암, 항알러지, 학습기능 향상, 건뇌 및 노인성 치매등에 대한 효과가 인정되었다.

xi) 이와같이 약효가 탁월한 EPA를 생산하기 위하여 그 유전자원의 확보는 중요한 과제가 되고있으며, 심해의 등푸른 생선들의 내장에서 서식하는 세균들을 대상으로 하여 EPA나 DHA의 생산능력이 탐색되어 왔으나, 이들의 생산유전자는 복수의 유전자로 구성되어 있으므로 그 크기가 상당히 큰 편이어서 클론닝 실험은 대단히 어려운 것이 현실이다.

xii) 그러나 본연구과제에서는 불포화지방산 유전자원의 개발이라는 목표를 세우고, 고도불포화 지방산의 생합성에 관련된 미생물의 확보 및 불포화지방산 생성 유전자의 클론닝 및 생산조건의 연구등을 수행하고자 하였던 바, EPA 강력 생산성 해양미생물을 분리하여, Shewanella hanedaiKMG427로 동정하였으며 이균의 EPA 생산관련 유전자의 일부를 클로닝하였다.

xiii) 동시에 Isochrysis galbana (조류)를 대량배양하여 큰민어와 조피볼락에 섭식시킴으로써 횟감의 어육조직에 EPA가 다량 함유되도록 연구를 수행하였다.

해산어류에서 필수지방산으로 알려진 고도불포화지방산류인 DHA, EPA 등을 풍부하게 함유한 조류를 해산 양식어류인 조피볼락 및 큰민어의 실험사료에 첨가하여 DHA, EPA 등이 어류의 체내에 축적되는지를 기기분석을 통하여 조사한다. 그래서 본 과제는 해산 양식어류인 조피볼락 및 큰민어의 사료원료인 해조류 첨가효과를 구명하고 이를 기초로 성장과 사료효율이 우수하고 안정적인 고도불포화지방산을 다량 함유한 DHA양식어를 생산하여 영양식품개발에 기여하며 횟감의 소비증대를 통한 양식경영의 안정 , 어업인 소득 증대와 국민건강에 기여하고자 수행되었다.

III. 연구개발내용 및 범위

극한 내열성미생물로부터 핵산대사관련효소의 생산, 의약 및 생화학용 제재로써의 응용, 그저해제의 항암효과, 천연항암성분 레스베라트롤 다량함유 포도 및 포도주, 포도가공식품의 개발 및 포도재배환경 조건 검색, EPA 생산성 세균 및 관련 유전자의 분리 및 응용, EPA 생산성 조류를 섭식시킨 어류에서의 EPA 함량검정 등의 개발내용이 포함되어 있다.

1. 극한 내열성 *Methanopyrus kandleri*(생육최적온도 100℃)의 NTP를 dNTP로 전환하는 *nrd* (ribonucleotide reductase)유전자 분리
2. *Bacillus caldolyticus*(생육최적온도 72℃)로 부터 핵산 pyrimidine 대사계의 *cdd* 유전자 cytidine deaminase(cytidine/deoxycytidine을 uridine/deoxyuridine으로 전환)의 분리 및 그 산물의 정제
3. 필수효소인 ATPase (ATP synthesis와 hydrolysis) 코딩 유전자의 분리 및 동정.
4. Nrd의 저해제로써 발견된 resveratrol이 포도유래성 천연항암성분으로 확인되었기에 이 물질을 한국산 포도 혹은 포도주에서 증폭 방안 확립.
5. 저온성 세균을 해양어류로부터 고도불포화 지방산인 DHA, EPA 등의 생산균주를 탐색, 분리, 동정하고, 그 생성유전자의 분리. 고도불포화지방산의 생산조건 탐색, 고도불포화지방산 생산 관련 유전자의 클론닝 등
6. 생식용(횟감) 해양어류, 조피볼락이나 큰민어에 EPA를 다량생산하는 조류 *Isocrysis galbana*를 배양, 미량, 소량 구분 섭식시키므로써 어류에서의 영양효과(성장 및 체성분) 및 근육 조직에서의 EPA의 축적, 유도 생산 및 증폭, 등의 분석.
7. 이를 위하여 사료 원료의 영양학적 평가, 원료(단백질원 및 해조분말)의 성분분석

사료 설계 및 제조, 해조분말 첨가효과, 고도불포화지방산을 함유한 해조분말 첨가에 의한 조피볼락 및 큰민어 전어체 또는 근육내 축척 정도를 측정

.IV 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

연구개발결과는 다음과 같다.
연구개발 결과는 국제논문 5편, 국내논문 3편, 특허 1편, 국외학회 프로시딩, 2편, 국내학회 9편으로 발표되었으며 향후 약 5편을 투고할 예정이다.

---

i) 생육적온 110C인 Methanopyrus kandreri에서 필수효소인 nucleotide reductase를 코드하는 nrd유전자를 클로닝하였으나 유전자의 전 구조 (약 5-6 Kb 예상)는 확인되지 않았다.
ii) 생육적온 75C의 Bacillus caldolyticus에서 cytidine deaminase를 코딩하는 cdd유전자를 클로닝하여 염기배열을 결정하고 그 구조를 해석하였으며 그 증폭생산방안을 확립한 후 대량생산, 정제하여 항HIV재제 Lamivudine의 생산에 응용하였다.
iii) Salmonella typhimurium에서 필수효소인 atpase 의 코딩유전자 *atp*를 클로닝하였던바 nonacistronic operon으로 구성되어 있음을 확인하였으며 아미노산 배열에서 Escherichia coli와 약 98%이상의 상동성을 나타내었다.
iv) 천연 항암성분 레스베라트롤이 다량 함유시킬 수 있는 포도의 재배환경조건을 검토하였다.
v) 포도 또는 국내시판 포도주(국산 및 외산)에서 천연 항암성분 레스베라트롤의 함량을 검정 국산포도주가 세계적으로 가장 많은 함량을 가진 프랑스산 포도주에 버금가는 것을 확인하였다
vi) 포도의 품종별 레스베라트롤 함량은 MBA가 가장 높았다.

제2세부과제연구결과요약

-.EPA 생합성 세균을 해양생물의 장내에서 분리
-.분리된 EPA생산성 균주는 Shewanella hanedaiKMG427로 동정.
분리된 균의 EPA생산 최적 배양온도는 20℃,EPA유도생산 최적 온도는 4℃였으며, 최적 pH는 8, 최적 NaCl의 농도는 1% 이었다.
-.불포화지방산 생합성 유전자중 3-oxoacyl ACP synthase gene(fabB), malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase (fabD), 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase(fabG), 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase Ⅱ(fabF)와 acyl carrier

protein(acp) 유전자를 클론닝.
클론닝된 FabG gene으로부터 추정되는 아미노산의 배열은 대장균과 Salmonella typhimurium과는 70%, Vibrio cholerae와는 66%, Vibrio harvey와는 67%, Haemophilus influenza RD 및 Neisseria meningitidis와는 65%, Moritella marina와는 63%의 배열상동성을 나타내었으며,
ACP유전자로부터 추정되는 아미노산의 배열은, Moritella marina와는 73%, Vibrio harvey와는 68%, Haemophilus influenza RD와는 69%, Vibrio cholerae와는 67%, Psudomonas aeruginosa와는 63%, 대장균과는 64%의 배열상동성을 나타내었으며,
fabF 유전자는 , Vibrio cholerae와는 80%, Photobacterium profundum과는 75%, 대장균과는 80%, Vibrio harvey와는 77%, Neisseria meningitidis와는 71%, Psudomonas aeruginosa와는 62%의 상동성을 나타내었다.
-.클론닝된 EPA 합성유전자는 Shewanella SCRC-2738균주의 EPA 생합성 유전자와 73%, Moritella marina와는 36%의 상동성을 나타내었다.
호염성 관련 유전자는 염농도가 0.05 M에서 1 M까지 증가함에 따라 diacylglycerol kinase유전자의 발현이 증가하였으나, 1.5M 인 경우에는 감소하였다.
Shewanella sp. SCRC-2738균주의 EPA 생합성 유전자 cluster는 37.8kb이고, Vibrio marinus 의 경우 40kb 이므로, 이들 EPA 생합성 유전자의 전구조는 아직 구명하지 못하였다.
viiii) EPA 생산성 조류 Isochrysis galbana를 대량배양하여 큰민어, 조피볼락에서 섭식시켰을 그 영양효과를 검토하였으며 EPA 생산성에는 극히 미약한 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

구분		특허건명	출원일자	/출원번호	주요내용
출원	국내	내열성 시티딘 디아미나제 발현용 재조합 균주와 이로부터 얻은 재조합 시티딘 디아미나제	1999. 11.09	10-1999-0049517	내열성 시티딘 디아미나제 발현용 재조합균주 형성과 이로부터 얻은 재조합 시티딘 디아미나제의 응용. 즉 내열성 균주 B. caldolyticus유래의 시티딘 디아미나제 생산 유전자로 형질전환된 재조합 균주로부터 얻은 시티딘 디아미나제를 정제하여 이를 항 HIV재제 라미부딘의 생산에 용하는 방법

연구논문 발표실적

구분	논문제목 저자명(공동집필자포함)	학술지명	권 Vol	호 No	수록면 (PP.)	발행 년도
SCI또는 국제 학술지 게재논문	Purification and characterization of the thermostable cytidine deaminase encoded by the Bacillus caldolyticus cdd gene, Ju-HyungWoo, Sa-Youl Ghim, Jong-Guk Kim and Bang-Ho Song.	Enzyme Microbial Technol.(USA) submitted,				2000
	Enantioselective deamination of (+)-2′,3′-dideoxy-3′-thiacytidine by thermostable Bacillus caldolyticus cytidine deaminase, Biotechnology Ju-Hyung Woo, Hyun-Jeung Shin, Tae-Ho Kim, Sa-Youl Ghim, Lak-Shin Jeong, Jong-Guk Kim and Bang-Ho Song	, Biotechnology Letters(England) accepted, in printing				2000
	Identification of psychrophile *Sheuanella hanedai* KMG427 as eicosapentaenoic acid producing isolate Won-Hae Lee, Ki-Woong Cho, Soo-Young Park, Kee-Sun Shin, Dong-Sun Lee, Seon-Kap Hwang, Sa-Youl Ghim, Bang-Ho Song, AND Jong-Guk Kim	FEMS Letter submittted				2000
	High level of trans-resveratrol, a Natural Anti-Cancer Agent, Found in Korean Noul Red Wine. Kim, Kwang Seok, Sa-Youl Ghim, Young-Bae Seu, Bang-Ho Song	J. Microbiology & Biotechnology	9	5	691-693	1999
	A rearrangement of the CDD gene at the 5′ UTR produces two types of transcripts that contain a natural antisense region Haesook Jung-Ha, Youngsun Lee, Daesoo Kim & Bang-Ho Song	Molecular Biology Reports	25		205-210	1998
국내논문	Ribonucleotide reductase: 구조, 기능 및 응용 송방호, 김복환, 김사열	생물산업		11	3	45-51
	HIV/AIDS의 기원과 진화 및 그 유전자 발현 조절 관련 치료제의 개발 송방호, 허노준, 김사열	생물산업		12	1	14-23
	Eicosapentaenoic acid(EPA) 및 docosahexaenoic acid(DHA)의 특성, 생리작용 및 그 응용성 김종국, 한명숙, 김사열, 송방호	생물산업		11	4	54-65

구분	논문제목 저자명(공동집필자포함)	학회명	발표일자/장소
국학대발논 제술회표문	Anti-HIV agent, Lamivudine, production via enantioselective deamination by thermostable Bacillus caldolyticus cytidine deaminase. Woo, Ju-Hyung ; Shin, Hyun-Jeung ; Ghim, Sa-Youl ; Jeong, Lak-Shin ; Kim, Jong-Guk ; Song, Bang-Ho	ps-sb1611550 Annual Conf. Japanese Soc. for Mol. Biol.	2000.12.17 Kobe, Japan
	Structural variation of the nonacistronic Salmonella typhimurium atp operon compared with the Escherichia coli one. Kim, Hai-Kyung ; Heo, No-Jun ; Ghim, Sa-Youl ; Song, Bang-Ho	ps-sb1611975 Annual Conf. Japanese Soc. for Mol. Biol.	2000.12.17 Kobe, Japan
	Multimedia Center for Creative Intelligence Bang-Ho Song	Int'l Seminar for Science Edu. Tech.	2000.2.07 Jerusalem, Israel
국학대발논 내술회표문	Lamivudine: antiretroviral activity, therapeutic efficacy, and enzymatic manufacture 송방호, 우주형, 신현정, 손명화, 김사열, 정낙신	한국산업미생물학회	2000.10.28 전북대학교
	ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SHEWANELLA HANEDAI KMG427 PRODUCING EICOSAPENTAENOIC ACID 박수영, 이원해, 박은경, 신기선, 김사열, 조기웅, 김종국, 송방호	한국산업미생물학회	1999.10.30 영남대학교
	TRANSITION OF RACEMIC MIXTURE OF 3TC, ANTI-HIV AGENT, BY THERMOSTABLE BACILLUS CALDOLYTICUS CYTIDINE DEAMINASE 우주형, 신형정, 김사열, 정낙신, 홍순덕, 송방호	한국산업미생물학회	1999.10.30 영남대학교
	CONCENTRATION OF TRANS-RESVERATROL, NATURAL ANTI-CANCER AGENT OF GRAPES, PEAKED AT AN EARLY RIPENING PHASE 김광석, 서영배, 김사열, 한명숙, 권덕기, 송방호	한국산업미생물학회	1999.10.30 영남대학교
	Identification and characterization of ketoacyl ACP synthase gene from the psychrophilic aeromonas sp. producing EPA 이원해, 김사열, 김종국, 송방호	한국산업미생물학회	1999.4.23 서강대학교
	Molecular structure of the nona-cistronic ATP genes encoding ATP synthase in S. typhimurium 김해경, 허노준, 김사열, 송방호	한국산업미생물학회	1999.4.23 서강대학교
	Characterization of thermostable cytidine deaminase encoded by the B. caldolyticus cdd gene 우주형, 신현정, 홍순덕, 송방호	한국산업미생물학회	1999.4.23 서강대학교
	Simultaneous production of both mesophilic and thermophilic cytidine deaminase in B. subtilis 손명화, 김사열, 송방호	한국산업미생물학회	1999.4.23 서강대학교
	High level of resveratrol, a natural cancer chemotherapeutic agent, found in the Korean Noul Red Wine. 김광석, 서영배, 김사열, 송방호	한국산업미생물학회	1999.4.23 서강대학교

Summary

I. Title

Development of gene resources related to the pyrimidine and unsturated fatty acids synthesis from extremophiles

II. Outline

Extremophiles is utilized as a new resources for the biotechnological industry. This study described about the development of the gene resources related to the pyrimidine and polyunsatulated fatty acids metabolism in extremophiles. The ribonucleotide reductase, cytidine deaminase, atpase encoded by the *nrd, cdd* and *atp* genes, respectively, were cloned, sequenced, and characterized. Resveratrol, a natural anti-cancer component of grapes and wines, was discovered by screening the inhibitors of ribonucleotide reductase and atpase. Especially the wines produced from Kyungsan area, the resveratrol contents were almost the same level with the France wines which were the best bevrages because of the high contents of resversatrol in the world. Search the method to increase of this components were studied extensively.

Marine bacterial isolate from sea fishes as psychrophile was used as a donor gene source for the cloning for polyunsaturated fatty acids synthesis, especially eicosapentaenoic acid(EPA). Synergistic nutrition effect by feeding the powder of the *Isocrysis galbana,* an EPA producing microalgae, to the juvenile Giant Croaker (*Nibea japonicus*) and Black rockfish (*Sebastes schlegeli*) was analyzed and the EPA contents from the fishes muscles after feeding were analyzed. Details about the experiments were summarized as follows

III. Pyrimidine metsbolism related gene resources from extremophiles

Rebonucleotide reductase from extreme thermophile Methanopyrus kandleri

Ribonucleotide reductase (EC 1,17,4,1) encoded by the *nrd* gene and converts the ribonucleotides to the corresponding 2′-deoxyribonucleotides was isolated partially, sequenced and analyzed from the extreme thermophile Methanopyrus kandreri(Optimal growth temperature 110 °C). Full stretch for the coding region was not recovered yet.

Nonacistronic Atpase has coupled roles for ATP synthesis and hydrolysis

The *atp* operon encoding atpase which has important roles in energy transduction processes by coupling the ATP synthesis and was studied extensively related with cell survival, carcinoma prevention, and the repair of DNA double strand breaks. A 8.0 kb DNA stretch of *Salmonella typhimurium* chromosome containing whole nonacistrons encoding the nine subunits of F0F1-type ATPase (EC 3.6.1.3) was isolated by PCR amplification and the deduced polypeptides were characterized after sequencing. The genes were located near *ori*C at 84.6 min as a counter-clockwise orientation in the order of *atpIBEFHAGDC*. Organization of the gene structure was almost the same as that of the *Escherichia coli atp* operon. Deduced polypeptides revealed more than 98% identities with the corresponding *E. coli* ones and the key residues such as 210-Arg and 103, 122, 143-Pro of the *a* subunit and 41-Arg, 61-Asp of the *c* subunit were conserved in both bacteria.

Cytidine deaminase application for the production of anti-HIV agent, Lamivudine.

A 565 bp DNA stretch coding for the *Bacillus caldolyticus* DSM405 *cdd* gene was also cloned by PCR amplification and sequenced. Nucleotide sequence analysis to the cloned DNA stretch

revealed an open reading frame of 396 bp encoding a deduced polypeptide of 132 amino acids with a molecular mass of 14,235 Da. Comparison of the deduced polypeptide of the *B. caldolyticus cdd* gene to that of the *Bacillus subtilis cdd* showed a 71% sequence homology. Thermostable cytidine deaminase expressed in *Escherichia coli* JF611/pCJH53 was purified through rapid procedures consisting of anionic-exchange column chromatography and FPLC. Finally purified enzyme showed 167.5 unit of specific activity, corresponding to about 94-fold purification with respect to the crude extract. Molecular mass of the monomer was estimated to be about 14-kDa by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and tetrameric configuration of the native enzyme was supposed to be gel filtrating calculation. Optimal deamination occurred at 70~75℃ and pH 7.5-8.0, and the activity was inhibited by ferric, cupper, mercury ions, and p-chloromercuribenzoic acid. The enzyme was thermostable and the apparent Km and Vmax values for the cytidine were 2.1 X 10-3 M and 36.4 mM min-1mg-1, respectively. To decrease the costs of producing the anti-HIV drug lamivudine, an enzymatic conversion process was developed instead of the traditional chemical method. This thermostable cytidine deaminase was applied to the lamivudine production.

IV. Natural anti-cancer agent "Resveratrol" was discovered as an inhibitor for ribonucleotide reductase and atpase.

It has been suggested that coronary heart disease and cancer can be preventive by regular consumption of red wine in moderate amounts. Resveratrol, a stilbene derivative of natural phenol compounds, was implicated in this beneficial action of red wine because of its ability to function as an inhibitor of platelet aggregation, an antioxidant and an anticarcinogenic agent. Recently, resveratrol was also shown to have anti-tumor activity through apoptosis and anti-allergic activity by inhibition upon the release of β-hexosaminidase. As an inhibitor to essential enzymes of

ribonucleotide reductase and atpase, the resveratrol is supposed to be a unique regulator in biological metabolism.

It has been established that resveratrol is produced by a restricted number of plant species and is especially abundant in the leaf epidermis and the skin of grape berries of *Vitis* species, to resist pathogen invasion, UV irradiation, or ozone exposure.

Resveratrol (*trans*-3,5,4′-trihydroxystilbene), a phenolic substance as natural anti-cancer agent, is present in both grapes and wines. Resveratrol occurs in the *cis* and *trans* isomeric forms and its 3-β-glucoside, piceid, which are all physiologically important. It has been established that the resveratrol content in grapes would be affected by sunlight exposure, mold infection, grape cultivars, soil compositions, and weather situations. Content of the resveratrol varied with ripening phase of grapes and peaked at an early ripening phase commonly in various cultivars of grapes cultivated in Kyungsan area. Variety in the resveratrol level from different grape cultivars, as *Vitis labruscana* cv. Kyoho, *V. labruscana* cv. Campbell Early, *V. labrusca* cv. Sheridan, and *V. labruscana* cv. Muscat Bailey A, was also observed.

The 9 red wine samples including the Korean red wine (Noul) and 30 imported red wines were randomly purchased from retail liquor stores. All samples were protected from light to avoid light-induced isomerization during sample treatment. Using an ethylacetate-phase extraction followed by high performance liquid chromatographic analysis, the concentration of *trans*-resveratrol was measured. The Noul red wine of the 1998 vintage had *trans*-resveratrol concentration 3.3 mg/L, which is rather higher concentration determined for the rest of wines (0.19-2.45 mg/L) with an exception of the French wine J. P. Chenet (3.39 mg/L). In addition, grape berries of *Vitis labrusca* cv. Sheridan cultivated in Kyungsan area showed a *trans*-resveratrol content of 6.4 mg/kg.

V. *Shewanella hanedai KMG427* was isolated as an EPA producing psychrophile.

An eicosapentaenoic acid (EPA) has important physiological and pharmacological roles in anti-coagulation of platelets (thrombolysis), anti-atherosclerosis, lowering plasmatriglyceride, blood viscosity, and blood pressure; anti-inflammation, and anti-tumorigenesis. The lipids in blue-backed fish such as *Pacific mackerel* are rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs), and have been used as main sources for EPA. Extremely pure EPA has been used in pharmaceuticals with high safety and fewer adverse effects than total fish oils, and the medicinal market has evaluated the EPA for its pharmaceutical efficacy and staple commodities. Because of unpleasant-smell, purification difficulty and irregular supply of the EPA from fish oil, EPA production has been required from other sources, such as microorganisms. The EPA is produced mainly by lower fungi and marine algae, and PUFAs are rarely produced by prokaryotes. However, the bacterial EPA production appears to be limited to a minority of marine representatives from the genera *Flexibacter*, *Vibrio*, *Shewanella*.

This study describes the isolation of a new EPA-producing bacterium from the guts of marine animals, and identifies it as the genus *Shewanella* along with the morphological, biochemical, and physiological characteristics. Phylogenetic analysis based on a 16S rDNA sequence and searching the optimal conditions for EPA production were also performed. An isolate from holothurians as an eicosapentaenoic acid (EPA)-producing bacterium KMG427 characterized by EPA synthesis efficiency was identified by thin layer and gas chromatographic analysis. The EPA production was maximized to more than 10% of the total fatty acids by incubation at 4° C after the cell proliferation at 16° C to 20° C. The isolated bacterium was categorized as rod-shaped, gram-negative, aerobic, and motile with a single polar flagellum. According to phylogenetic

analysis based on morphological and physiological specificities as an EPA-producing bacterium, the isolate KMG427 was identified as *Shewanella hanedai*. Further evidence for this, the 16S rDNA of KMG427 revealed to be a 97% of sequence identity to that of *S. hanedai* CIP103207. Therefore, the isolate might be classified and identified as *S. hanedai* KMG427.

VI. EPA detected from the fish muscles by feeding powdered *Isochrysis galbana*.

To develop practical feeds for juvenile Giant Croaker (*Nibea japonicus*) and Black rockfish (*Sebastes schlegeli*) the feeding experiment was carried out. To evaluate the effect of highly unsaturated fatty acids (HUFA), DHA and EPA, microalgae fed diets to fishes, and monitored the growth and body component variation. The juvenile and young black rockfish averaging 284 g and 3.6 g, and juvenile giant croaker averaging 5.9 g were fed one of two isonitrogenous (42%) and isolipidic (13%) diets containing 1% dried *Isochrysis* powder. Moisture, protein and lipid contents of whole-body of fishes were not influenced by the dietary dried *Isochrysis* powder supplementation. Whole-body lipid contents including DHA and EPA in giant croaker fed diet with or without *Isochrysis* were not varied so much.

CONTENTS

Part 1. Introduction
Chapter 1. Purpose and Contents
Chapter 2. Requirement, Research and Problems
Chapter 3. Research project
Chapter 4. Summary

Part 2. Development and application of the genes encoding pyrimidine metabolism related enzymes from extreme thermophiles.
Chapter 1. Preface
Chapter 2. Materials and Methods
1. Isolation, sequencing and structural analysis of the ned gene
   a. Resource for the isolated nrd gene
   b. DNA techniques
   c. Isolation of the nrd gene
2. Isolation, sequencing and structural analysis of the cdd gene
   a. Resource for the isolated cdd gene
   b. Media and culture
   c. DNA techniques
   d. Purification of the cytidine deaminase
   e. Properties of the cytidine deaminase
3. Isolation, sequencing and structural analysis of the cdd gene
   a. Resource for the isolated atp gene
   b. Media and culture
   c. Structural analysis
   d. DNA techniques
Chapter 3. Results and Discussion

1. Isolation, sequencing and structural analysis of the nrd genes from Methanopyrus kandleri and Bacillus caldolyticus
   a. Isolation of B. caldolyticus nrd gene
   b. Isolation of M. kandleri nrd gene
2. Relations between ribonuleotide reductase and FoF1-atpase
   a. Isolation of atp operom from Salmonella typhimurium
   b. Sequencing and homology search of the sequence
   c. Comparative analysis of the catalytic sites of the atpase
3. Isolation, sequencing and structural analysis of the cdd gene from
   Bacillus caldolyticus
   a. Isolation of the cdd gene from B. caldolyticus
   b. Domains for the thermostability
   c. Gene expression and amplification for the mass production of
      the gene product
   d. Isolation and purification of the cytidine deaminase
   e. Purification of the cytidine deaminase
4. Mass production of the enzymes related to the pyrimidine metabolism
   a. Transformation of the cdd gene in B. subtilis
   b. Construction of the integration vector pIJH53 AND pGMH2
   c. Integration of the B. caldolyticus cdd gene into the B. subtilis chromosome and gene amplification

   References

Part 3. Searching the ribonucleotide reductase inhibitor from grapes and wines
Chapter 1. Preface
Chapter 2. Materials and Methods
1. Resveratrol contents of grapes and wines
a. Resveratrol contents of grapes
b. Resveratrol contents of wines
Chapter 3. Results and Discussion
1. Physiology of ribonucleotide reductase
2. Resveratrol contents in Korean grapes and wine
a. Resveratrol contents in Korean grapes
b. Resveratrol contents in Korean red wine
c. Resveratrol contents of wines in Domestic markets
3. Factors for concentration and induced synthesis of resveratrol
a. Factors for resveratrol synthesis in grapes
b. Resveratrol concentration in grapes ripening
c. Resveratrol inducement in stored grapes
4. Environmental factors for resveratrol inducement in grape cultivation
5. Contribution for the resveratrol announcement to the Korean wine factory
References

Part 4. Isolation of the poly unsatulated fatty acids producing bacteria and cloning of the related genes.
Chapter 1. chapter outline
Chapter 2. Materials and Methods
1. Medium for marine bacteria
2. Screening and isolation of the EPA and DHA producing strains

3. Cloning of the gene clusters related to the poly unsatulated fatty acids synthesis
   a. Primes design for desaturase encoding gene
   b. Primes design for elongase encoding gene
   c. Primes design for β-oxoacyl ACP synthase encoding gene
   d. Cloning of the gene encoding malonyl CoA ACP transacylase
   e. Cloning of the genes encoding fab gene clusters
   f. Cloning of the genes related EPA synthesis
4. Induction of EPA synthesis
5. Characterization of the EPA producing isolate
6. Phylogenetic analysis by 16S rRNA
7. Sequencing and gene expression of a gene under high salt concentration
8. Other DNA techniques

Chapter 3. Results and Discussion

1. Isolation, identification and culture coditions for the EPA producing bacteria
   a. Isolation for the EPA producing bacteria
   b. Induction of the EPA synthesis
   c. Mophological and physiological characteristics for strain No 3010
   d. Phylogenetic analysis of 16S rRNA
   e. Identification of isolated strain
2. Cloning of the genes related to EPA synthesis in Shewanella hanedai KMG427
   a. Cloning the 3-oxoacyl ACP synthase coding gene
   b. Cloning the EPA synthesis gene in the fab clusters
   c. Cloning the genes related to EPA synthesis
3. Cloning the gene stable under high salt concentration

References

Part 5. Nutrition effect of dried *Isochrysis* powder to juvenile Giant Croaker (*Nibea japonicus*) and Black rockfish (*Sebastes schlegeli*)

Chapter 1. Introduction

Chapter 2. Materials and Methods

1. Effects of dried *Isochrysis* powder micro-supplementation
   a. Feeding resources
   b. Feeds composition
   c. feedings and breeding
   d. Analysis of the nutrition effect
2. Effects of dried *Isochrysis* powder) macro-supplementation
   a. Feeds composition
   b. feedings and breeding
   c. Analysis of the nutrition effect

Chapter 3. Results and Discussion

1. Effects of micro-supplementation of dietary microalgae on growth and body composition
2. Effects of macro-supplementation of dietary microalgae on growth and body composition
3. EPA and DHA contents in the fishes muscles

References

목 차

제1장 서 론 ---------- 1
제1절. 연구목적 및 내용 ---------- 1
제2절. 연구의 필요성, 추진방향과 문제점 ---------- 3
제3절. 연구추진계획 ---------- 5
제4절. 연구결과 요약 ---------- 6

제2장 1세부과제 "Pyrimidine 대사 관련유전자 산물의 작용기구 및 그 실용화에 관한 연구분야 - 10
제1절 서론 ---------- 10
제2절 재료 및 방법 ---------- 13
1. *nrd* gene의 분리, 염기배열결정, 구조해석 ---------- 13
가. *nrd* 유전자 분리원 ---------- 13
나. 사용된 유전자 재조합 기술 ---------- 13
다. *nrd*의 *염색*체에서의 파괴 ---------- 16
2. *cdd* gene의 분리, 염기배열결정, 구조해석 ---------- 16
가. *cdd* gene의 분리균원 ---------- 16
나. *cdd* gene의 분리균의 배양 ---------- 17
다 사용된 유전자 재조합 기술 ---------- 17
라. Cytidine deaminase의 정제. ---------- 18
마. 효소의 성질 ---------- 18
3. *atp* gene의 분리, 염기배열결정, 구조해석 ---------- 19
가. *atp* gene의 분리균원 ---------- 19
나.ATP 생산균주의 배양 ---------- 19
다 *atp* gene의 구조해석 ---------- 19
라. 사용된 유전자 재조합기술 ---------- 20
제3절 결과 및 고찰 ---------- 21
1. *Methanopyrus kandleri*, *Bacillus caldolyticus*의 *nrd* genes의 분리, 염기배열 결정, 구조분석 - 21
가. 극한 내열성균에서 *nrd* gene의 분리 ---------- 21
1). *B. caldolyticus nrd gene*의 분리 ---------- 21

2). *M. kandleri nrd gene 분리* ---------- 23
2. Ribonucleotide reductase(RNR)와 ATP합성 효소 FoF1-ATPase의 기능적 연관성 ----- 26
가. *Salmonella typhimurium*의 *ATP* synthase (*atp*) *operon*의 분리 - 26
나. 염기서열결정과 아미노산 배열상의 상동성 검색 ---- 26
다. ATPase 효소의 작용기구 및 활성단 ---------- 27
3. Pyrimidine 대사관련효소 *cdd* gene의 분리, 염기배열 결정 - 29
가. *Bacillus caldolyticus cdd* 유전자의 분리 -------- 29
나. *Pyrimidine* 대사관련효소의 내열성 domin의 검색 -- 29
다. 유전자 발현의 극대화 및 유전자 산물의 대량생산 -- 31
라. 유전자 산물의 분리 및 정제 ---------- 31
마. Cytidine deaminase의 효소학적 성질 ---------- 32
4. Pyrimidine대사 관련 효소의 대량생산 ---------- 34
가. *Bacillus subtilis 에서의* 형질전환 효과 ---------- 34
나. 통합용 벡터 pIJH53과 pGMH2의 구성 ---------- 35
다. *Bacillus subtilis 염색체*상에서의 증폭 ---------- 35
참 고 문 헌 ---------- 37

제3장 포도 및 포도주로부터 ribonucleotide reductase 저해제의 검색 - 75
제1절 서론 ---------- 75
제2절 재료 및 방법 ---------- 76
1. 포도 및 포도주에서 resveratrol 함량분석. ---------- 76
가. 포도에서의 resveratrol 함량분석 ---------- 76
나. 포도주에서의 resveratrol 함량분석 ---------- 76
제3절 결과 및 고찰 ---------- 79
1. Ribonucleotide reductase 저해제의 생리적 의의 ------ 79
2. Resveratrol의 한국산 포도주에서의 발견 및 함량 ----- 80
가. 한국산 포도의 레스베라트롤(*trans*-resveratrol) 함량분석 - 80
나. 한국산 적포도주에 다량 함유된 레스베라트롤 성분 - 80
다. 국내시판에서의 Resveratrol 함량조사 ---------- 83
3. Resveratrol의 증폭 요인 분석 및 성분강화(항암성 포도주 개발) - 86

가. 포도에서의 Resveratrol 증폭요인분석 ---------- 86
나. 포도생장과정중에서의 Resveratrol 천이도 조사 ---- 86
다. 수확포도에서 resveratrol 생합성의 인위적 증폭 ---- 90
4. 포도재배조건에서 resveratrol의 함량증폭을 위한 환경요인분석 - 94
5. 본 연구 결과가 국산 포도주 공장의 소득 증대에 기여한 내용 - 95
참고문헌 ---------- 99

제4장 고도불포화 지방산 생성균주의 분리 및 EPA 합성 유전자군의 클로닝 - 101
제1절 서론 ---------- 101
제2절 재료 및 방법 ---------- 103
1. 해양미생물의 균원 채취용 배지 ---------- 103
2. EPA, DHA 생성균의 검색 및 분리 ---------- 104
3. 고도 불포화 지방산 생성 유전자의 분리 및 클로닝 ---- 107
가. desaturase 유전자의 클론닝을 위한 PCR용 Primer의 합성 - 107
나. Elongase 유전자의 클론닝을 위한 PCR primer의 제작 -- 110
다. 3-oxoacyl:ACP synthase 유전자의 클론닝을 위한 primer의 제작 - 111
라. malonyl CoA ACP transacylase 유전자의 클로닝 -- 112
마. *fab* gene cluster의 클로닝 ---------- 113
바. EPA 생산 유전자의 클로닝 ---------- 114
4. EPA 유도합성 ---------- 117
5. EPA 분리균주의 특징 ---------- 118
6. 16S rRNA 유전자의 분석 ---------- 118
7. 호염성 관련 유전자의 염기배열 결정 및 발현 ------- 119
8. 기타 유전자 재조합 실험방법 ---------- 122
제3절 실험결과 및 고찰 ---------- 123
1. 고도불포화 지방산 생성 미생물의 분리, 동정 및 배양조건 확립 - 124
가. 고도불포화 지방산 생성균의 분리 ---------- 124
나. EPA 유도합성 ---------- 126
다. Strain No. 3010 균주의 형태적, 생리적 특징 ----- 127
라. 16S rRNA의 구조 분석 ---------- 128
마. 3010 균주의 동정 ---------- 129
2. 고도불포화 지방산 EPA 생산균주 *Shewanella hanedai KMG427*로부터 불포화지방산 생성관련 유전자의 클로닝 129

가. 3-oxoacyl ACP synthase gene의 클로닝 -------- 129
나. fab gene cluster내의 지방산 생합성관련 유전자의 클로닝 130
다. EPA생산성 유전자의 클로닝 ---------- 131
3. 호염성 관련 유전자의 클로닝 및 발현 ---------- 132
참 고 문 헌 ---------- 133

제5장 큰민어와 조피볼락용 사료에 해조분말 첨가 효과 ---- 160
제1절 서론 ---------- 160
1. 사료에 해조분말의 미량 첨가가 큰민어의 성장 및 체성분에 미치는 효과 162
2. 사료에 해조분말의 소량 첨가가 큰민어 및 조피볼락의 성장 및 체성분에 미치는 효과 166
제2절 재료 및 방법 ---------- 170
1. 사료에 해조분말의 미량 첨가가 큰민어의 성장 및 체성분에 미치는 효과 170
가. 사료 원료 ---------- 170
나. 실험사료 ---------- 170
다. 실험어 및 사육관리 ---------- 171
라. 측정 및 성분분석 ---------- 172
2. 사료에 해조분말의 소량 첨가가 큰민어 및 조피볼락의 성장 및 체성분에 미치는 효과 173
가. 실험사료 ---------- 173
나. 실험어 및 사육관리 ---------- 173
다. 측정 및 성분분석 ---------- 174
제3절 결과 및 고찰 ---------- 175
1. 사료에 해조분말의 미량 첨가가 큰민어의 성장 및 체성분에 미치는 효과 175
2. 사료에 해조분말의 소량 첨가가 큰민어 및 조피볼락의 성장 및 체성분에 미치는 효과 176
3. *Isocrysis galbana* 분말 섭식시 EPA, DHA 함량분석 - 179
참 고 문 헌 ---------- 181

제1장 서 론

제1절. 연구목적 및 내용

지구상에는 생물이 서식하기 어려운 극한 환경에서도 잘 자라는 미생물이 있으며 이들로부터의 새로운 자원의 개발은 새로운 산업으로써 각광을 받고 있다. 심해의 솟아나는 온천, 지상의 펄펄 끓는 온천물이나 화산에서 서식하는 초 고온성 세균, 남극이나 북극, 또는 만년설 속의 토양에서 서식하는 초저온 세균, 해양환경 또는 해양생물에 서식하는 저온세균, 유전지대 토양의 탄화수소 자화세균, 사해와 같은 염분호수나 염전지대, 강산, 강알카리성 폐수 배출공장의 하수도 등에서 서식하는 호산, 호염, 호알카리성 세균등, 극한 환경에서 증식하는 미생물은 새로운 자원으로 부각되고 있다. 최근 이들 극한환경미생물로부터 효소, 저분자 향료, 생리활성 물질등의 개발은 의학 및 생물산업에 획기적인 변화를 초래하고 있다. 극한내열성 세균으로부터 개발된 DNA중합효소에 의한 유전자단편의 증식은 새로운 감식법으로써 범죄수사에까지 이용되고 있으며, 1997년 한해에만 선진국에서 생의학에 투자한 돈은 25억불에 달한다(Medigan and Marrs, Scientific Amer. April, 66, 1997). 그러나 현재의 기술 수준에서 시험관 배양이 가능한 미생물은 전체 미생물의 1%에 지나지 않고 있으며, 이는 가장 잘 보존되고 있는 rRNA의 단편을 probe로 하였을 때 99%의 hybridized microbes가 더 있음이 확인됨으로써 알려진 것인데 현실적으로 99%의 배양되지 않는 미생물이 새로운 생명공학의 부존자원으로써 엄청난 가능성이 내포되어 있음을 시사하는 것이다. 더욱이 동식물 및 곤충(식물 246,000종, 동물 280,000종, 곤충 750,000종)에 비해 엄청난 다양성이 미생물에 내재되어 있음이 발견되어 그 자원으로써의 효용가치는 극대화를 치닫고 있다 (Service, Science, 275, 1740, 1997).

제1세부과제에서는 극한 내열성미생물에서 반응하는 각종 핵산대사 관련 효소 및 이들의 코딩 유전자를 탐색 분리하여 미래 첨단산업에 응용하고자 하였다. 생육적온이 100℃인 극한 내열성균 *Methanopyrus kandreli* (Huber et al., 1987)나 적온 72℃인 *Bacillus caldolyticus* (Bartolomeo et al., 1991) 로부터 NTP를 dNTP로 전환하는 nucleotide reductase를 코드하는 nrd 유전자, cytidine을 deoxycytidine으로 전환하는 cytidine deaminase의 코딩 유전자 *cdd* 등 pyrimidine 대사관련 유전자 또한 그 상업성을 무시할 수 없는 단계이다. 극한 내열성 nucleotide reductase가 개발되면 내열성 DNA polymerase에 의한 PCR법에의 응용에 버금가는 정도로 유전공학산업을 획기적으로 전환시킬 수 있으리라 생각된다. 이론적인 면에서도 진화과정에서 RNA world로 부터 DNA world에로의 변환성, 분자진화의 해석등에 이바지 할 것이며, 산업적으로는 이들 핵산대사관련효소의 의약및 생화학용 제재로써의 생산에 중요한 의의를 부여할 것으로 생각된다.

실제 nucleotide reducataase 연구과정에서 새로이 발견된 강력한 저해제는 천연 항암성 물질로써 레스베라트롤이라는 사실을 알게 되었고 이 레스베라트롤은 강력한 항암성 성분임이 확인되었다. 이 레스베라트롤은 생체내 또 다른 필수 효소인 nonacistronic genes 의 산물인 atpase의 저해제로써도 작용함을 알게 되었다. 연구의 중반단계에서 발견된 이 항암성물질을 다량 함유한 포도를 개발하기 위하여 포도의 재배단계에서 그 환경요인을 면밀히 검토 분석하였으며, 시판포도주가운데 수입품보다 오히여 국산 포도주에 항암성성분이 우세할 정도로 다량 함유되어 있어서 포도농가의 수익산업에도 크게 공헌할 수 있으리라 생각된다.

제2세부과제에서는 극한 내한성 미생물로부터 현재 각광을 받고있는 고도불포화지방산 즉, docosahexanoic acid (DHA), eicosahexanoic acid (EPA)등의 대량생산을 위하여 이들 물질의 생산균주의 분리, 발

효조건개선에 의한 생산성 향상, 이들 물질의 생합성 유전자군의 분리 및 증폭발현에 의한 대량생산, 식품 발효균에서의 이들 유전자의발현 및 생산을 시도하여 응용하고자 함이 그 목적이었다.

해양 저온미생물에서 고도 불포화 지방산 (polyunsaturated fatty acid, PUFA)생산이 알려지면서 "Single Cell Oil"산업에 대한 관심도는 크게 높아지게 되었다. 체내대사에서 다양한 기능을 나타내는 PUFA 가운데 EPA와 DHA는 그 탁월한 약리작용이 알려지면서 일본을 비롯한 수산선진국에서 대량생산을 위한 시도가 활발히 진행되고 있다. 성인병 환자나 유아, 노인등은 불포화 지방산 생합성이 저하하므로 이들 PUFA를 함유하는 유지를 기능성 식품으로 공급하고자 한다. EPA는 폐쇄성 동맥경화 예방제로의 약효가 인정되었으며, DHA는 콜레스테롤 및 중성지방 저하, 항암, 항알러지, 학습기능 향상, 건뇌 및 노인성 치매등에 대한 효과가 인정되었다. 본 과제는 이와같이 약효가 탁월한 PUFA를 생산하는 해양미생물을 분리하여, Shewanella hanedai로 동정하였으며 이균의 EPA 생산관련 유전자의 일부를 클로닝하였다. 동시에 Isochrysis galbana (조류)를 대량배양하여 큰민어와 조피볼락에 섭식시킴으로써 횟감의 어육조직에 EPA가 다량함유되도록 연구를 수행하고자 하였던바 대조군에 비해 극 미량의 EPA가 축적될 수 있음이 확인되었다.

제2절. 연구의 필요성, 추진방향과 문제점

극한 내열성의 archaebacteria인 *Methanopyrus kandleri*(최적 생육 온도 100℃) 혹은 고초균속 중에서 극한 내열성균인 *Bacillus caldolyticus*(최적 생육 온도 72℃)나 저온성균인 *B. psychrosaccharolyticus*(최적 생육 온도 20℃)에서는 *nrd* 유전자에 대한 연구는 본 연구에서 처음시도되었다. 임상의학 혹은 기능성 식품 분야에서 *nrd* 저해제에 관심을 가지게 된 것은 극히 최근의 일로써

DNA의 복제에 관여하는 *nrd* 유전자는 그 크기가 상당히 큰 편이어서 그 연구가 극히 어려운 상황이었다. 국내에서는 본 세부책임자가 *S. typhimurium*에서 연구 보고한 것(Song et al., Mol. Cells 5:253-259, 1995)이 유일한 경우였다. 본 연구에서 nrd를 연구하든 과정에서 그 저해제로 resveratrol이 있음을 알게 되었으며 이는 임상의학 분야에서 항암효과, 심혈관계질병 예방 효과가 있음을 알게 되었다. 그리하여 이 물질을 다량생산하는 방향으로 nrd연구의 추진방향을 전환하게 되었다.

그 결과 한국산 포도 혹은 포도주에서 이물질의 함량을 조사하였으며 실제로 농촌의 포도생산 농장과 포도주 생산공장(경상포도조합, 경북 경산시 소재)에 본 기술을 도입할 수 있는 기초적인 연구를 추진하게 되었다.

최근 신문 기사(매일신문, 1998년 10월 29일자)에 따르면, 경북 영천지역 포도농가 7400여세대에서 1999년 4만3천톤 이상의 포도를 생산하여 전국 최대 포도집산지로 떠올랐지만, 가공산업 육성이 제대로 되어 있지 못한 상황이어서 안정적인 농가소득을 보장해 주지 못하고 있는 실정이다. 농산물에 대한 국제적 개방이 강요되어 가는 현시점에서 우리 농산물이나 농산가공품이 국민들에게 각광받기 위하여는 기능성 식품으로서의 효능이 인위적으로 부가될 수 있도록 노력하였다.

해양세균 *Shewanella putrefacience*에서 세포전체지방산의 25-45%의 수율로 생산하였으며, EPA는 부작용이 적은 의약품으로서 1994년도에 일본에서 250억엔을 넘는 시장을 형성하였다. 이러한 EPA 연구의 출발점은 1970년대 Dyerberg 등이 수행한 어유와 역병과의 관계 연구에서 출발하였는데, 생선을 매일 먹고있는 사람들은 그렇지 않은 사람보다 남자는 35%, 여자는 25%의 사망률이 낮다는 점에서 였다. 고도 불포화지방산은 화학합성이 곤란한 관계로 천연 어유를 추출 정제하여 공업화하여 왔으며 근년에 single cell oil의 중요성이 주목되면서 생리활성지방산의 미생물생산에 관한 연구가 진전되었다. 일반적으로 EPA

의 기원은 조류, 식물성 플랑크톤-동물성 플랑크톤-소어-어류 및 해산 동물 등으로 이동되는 경로를 추정할 수 있으므로, 저온고압하의 해양 환경을 생각하면 생산능을 가진 미생물의 분리가 가능하여, EPA 생산성 해양세균이 1987년에 이미 그람음성 호기성균 *Shewanella (She.) putrefacience*로 확인되었다.

Docosahexaenoic acid(DHA) 또는 Eicosapentaenoic acid(EPA)는 건강식품과 의약품으로서 콜레스테롤 및 중성지방 저하, 항암, 항혈전, 항염증, 항알러지, 학습기능 향상, 각막에의 기능, 건뇌용 및 노인성 치매 등에 대한 효과가 증명되어 항응고제, 항염증제, 항암제, 기능성건강식품 등으로 많이 개발되어 이용되고 있다. EPA생산성 유전자는 일본의 Sagami 화학연구센터에서 관련 유전자를 형질전환시킨 대장균으로부터 38kb의 insert가 확인되어 염기배열을 결정한 바 8개의 ORF(1.6-5.6kb)가 밝혀졌으나 이를 대장균에 클로닝한 경우 그 생산성이 극히 미약하였다. 그리하여 본 연구에서는 EPA를 다량 생산하는 조류 Isochrysis galbana를 대량배양하여 이를 횟감으로 사용하는 어류에 섭식시킨 후 어육조직에 그 함유여부를 검정하였다.

제3절 연구추진계획

제1세부과제에서는 극한 내열성 미생물인 *Methanopyrus kandleri*(생육최적온도 100℃) *Bacillus caldolyticus*(생육최적온도 72℃)로 부터 핵산 pyrimidine대사계 관련유전자를 분리동정한다. 한국산 포도 혹은 포도가공식품으로부터 ribonucleotide reductase 저해제인 레스베라트롤의 함량을 측정한다.

제2세부과제에서는 저온성 세균을 해양어류로부터 분리하여 고도불포화 지방산 DHA, EPA 등의 생산균주를 탐색하고, 그 생성유전자를 분리하여 유전자 증폭을 시도하므로써, 생산균주 동정과 대량생산을 시

도한다. 횟감으로 사용하는 해양어류에 조류를 섭식시켜 EPA, DHA가 어육조직에 함유되는가의 여부를 검정하고자 한다.
본 추진계획서는 3차년도 협약서에 기재된 내용임

제4절. 연구결과 요약

극한 내열성미생물로부터 핵산대사관련효소의 생산, 의약 및 생화학용 제재로써의 응용, 그저해제의 항암효과, 천연항암성분 레스베라트롤 다량함유 포도 및 포도주, 포도가공식품의 개발 및 포도재배환경 조건 검색, EPA 생산성 세균 및 관련 유전자의 분리 및 응용, EPA 생산성 조류를 섭식시킨 어류에서의 EPA 함량검정 등의 실험을 수행하였던바 다음과 같은 결과를 얻었다.

i) 생육적온 110C인 *Methanopyrus kandreri*에서 필수효소인 ribonucleotide reductase를 코드하는 *nrd*유전자를 클로닝하였으나 유전자의 전 구조 (약 6Kb 예상)는 확인되지 않았다.

ii) 생육적온 75C의 *Bacillus caldolyticus*에서 cytidine deaminase를 코딩하는 *cdd*유전자를 클로닝하여 염기배열을 결정하고 그 구조를 해석하였으며 그 증폭생산방안을 확립한 후 대량생산, 정제하여 항HIV재제 Lamivudine의 생산에 응용하였다.

iii) *Salmonella typhimurium*에서 필수효소인 atpase 의 코딩유전자 *atp*를 클로닝하였던바 nonacistronic operon으로 구성되어 있음을 확인하였으며 아미노산 배열에서 *Escherichia coli*와 약 98%이상의 상동성을 나타내었다.

iv) 천연 항암성분 레스베라트롤이 다량 함유시킬 수 있는 포도의 재배환경조건을 검토하였다.

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (1998)	1세부: 극한 환경 세균에서 핵산 pyrimidine대사관련 유용유전자의 분리 2세부: 고도불포화 지방산생성균주의 분리 및 관련 유전자의 검색	· 극한환경세균의 pyrimidine대사관련 유용 유전자의 탐색 · pyrimidine대사관련효소 유전자의 클로닝 · 분리된 유전자의 염기배열결정 · 해양미생물의 채취 및 순수분리 · 고도불포화지방산생성균의 분리 · 고도불포화 지방산생성균의 보존체계 확립 · 고도 불포화 지방산생성 유전자의 검색 · 고도 불포화 지방산생산 관련 유전자의 cDNA제작 · 호염성관련 유전자의 클로닝
2차년도 (1999)	1세부: Pyrimidine 대사관련유전자 산물의 대량생산 2세부: 고도불포화 지방산의 분석,생산균주의 동정및관련유전자의분리	· Pyrimidine대사 관련효소의 내열성 domain의 검색 · 유전자 발현의 극대화 및 유전자 산물의 대량생산 · 유전자산물의 분리 및 정제 · 포도 및 포도가공식품으로부터 ribonucleotide reductase 저해제의 검색 · 고도 불포화지방산의 성분조사 · 고도불포화지방산관련유전자의 클로닝 · 고도 불포화지방산생산균주의 동정 및 배양조건 확립 · 호염성관련 유전자의 염기배열결정 · EPA 혹은 DHA 생성 조류의 사료화 및 양식 해양어류에의 섭식
3차년도 (2000)	1세부: Pyrimidine 대사 관련유전자산물의 작용기구 및 그 실용화 2세부: 고도불포화지방산의 대량생산 및 관련 유전자 산업의 실용화	· dNTP 생산용 *nrd* 및 *cdd* 산물 (효소) 생산 기술 개발 · 정제된 단백질의 아미노산 서열분석 · Pyrimidine대사 관련 효소의 생산방안확립 · 극한 내열성 효소의 catalytic group동정 · resveratrol이 포도 및 포도주에서의 증폭 요인 분석 및 성분 강화 · EPA 생산 균주의 사료화 및 해양 양어용 어류의 EPA 다량 함유 사육법 확립 · 고도불포화지방산관련유전자의 염기서열 및 구조분석 · EPA 고 생산성 변이주의 개발 및 발효 생산에 의한 고생산성 조건 확립 · 고도 불포화 지방산 발현 vector의 개발 및 대량생산 방법의 개발 · 고도 불포화 지방산의 실용화

v) 포도 또는 국내시판 포도주(국산 및 외산)에서 천연 항암성분 레스베라트롤의 함량을 검정 국산포도주가 세계적으로 가장 많은 함량을 가진 프랑스산 포도주에 버금가는 것을 확인하였다

vi) 포도의 품종별 레스베라트롤 함량은 MBA가 가장 높았다.

vii) EPA를 다량 생산하는 해양저온 세균을 분리하여 *Shewanella hanedai* KMG427로 동정 명명하였다. 이 균은 최적 조건에서 ug/g의 EPA를 생산하였다.

viii) *Shewanella hanedai* KMG427의 EPA 생산관련 유전자중 fab gene cluster내의 3-oxoacyl (acyl carrier protein) reductase를 클로닝하였고 *E. coli*에서 형질전환, 염기배열을 결정하였다.

viiii) EPA 생산성 조류 *Isochrysis galbana*를 대량배양하여 큰민어, 조피볼락에서 섭식시켰을 때 그 영양효과를 검토하였으며 어육조직의 EPA 함량을 검정, EPA생산성에 미치는 영향을 검토하였다.

o 연구개발목표 및 내용

1. 극한 내열성 *Methanopyrus kandleri*(생육최적온도 100℃)의 NTP를 dNTP로 전환하는 *nrd* (ribonucleotide reductase)유전자 분리
2. *Bacillus caldolyticus*(생육최적온도 72℃)로 부터 핵산 pyrimidine대사계의 *cdd* 유전자 cytidine deaminase(cytidine/deoxycytidine을 uridine/deoxyuridine으로 전환)의 분리 및 그 산물의 정제
3. 필수효소인 ATPase (ATP synthesis와 hydrolysis) 코딩 유전자의 분리 및 동정.
4. 포도유래성 천연항암성분인 resveratrol이 Nrd의 저해제로써 발견되었기에 이 물질의 한국산 포도 혹은 포도주에서 증폭방안 확립.
5. 저온성 세균을 해양어류로부터 고도불포화 지방산인 DHA, EPA 등의 생산균주를 탐색, 동정하고, 그 생성유전자의 분리.
6. 생식용(횟감) 해양어류, 조피볼락이나 큰민어에 EPA, DHA를 다량생산하는 조류 Isocrysis galbana를 배양, 섭식시키므로써 어류근육 조직에서 EPA, DHA가 증폭생산 여부의 분석.

o 연구결과

1. 극한 내열성 *Methanopyrus kandleri*(생육최적온도 100℃)의 NTP를 dNTP로 전환하는 *nrd* (ribonucleotide reductase)유전자 분리
2. *Bacillus caldolyticus*(생육최적온도 72℃, Heinen & Heinen, 1972)로 부터 핵산 pyrimidine대사계의 *cdd* 유전자 cytidine deaminase(cytidine/deoxycytidine을 uridine/deoxyuridine으로 전환)의 분리 및 그 산물의 정제

3. Nrd와 같이 필수효소인 ATPase (ATP synthesis와 hydrolysis) 코딩 *atp* 유전자의 분리 및 동정.
4. 포도유래성 천연항암성분(항암제, 항산화제, 항알레르기제재)인 resveratrol이 Nrd의 저해제로써 발견되었기에 이 물질의 한국산 포도 혹은 포도주에서 증폭방안 확립.
5. 저온성 세균을 해양어류로부터 고도불포화 지방산인 DHA, EPA 등의 생산균주를 탐색, 분리하여 Shewanella hanedaiKMG427로 동정.
6. 분리된 균의 EPA생산 최적 배양온도는 20℃,EPA유도생산 최적 온도는 4℃였으며, 최적 pH는 8, 최적 NaCl의 농도는 1% 이었다.
7. 불포화지방산 생합성 유전자중 3-oxoacyl ACP synthase gene(fabB), malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase (fabD), 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase(fabG), 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase II(fabF)와 acyl carrier protein(acp) 유전자를 클론닝.
8. 클론닝된 EPA 합성유전자는 Shewanella SCRC-2738균주의 EPA 생합성 유전자와 73%, Moritella marina와는 36%의 상동성을 나타내었다.
9. 호염성 관련 유전자는 염농도가 1 M까지 증가함에 따라 diacylglycerol kinase유전자의 발현이 증가하였으나, 1.5M 인 경우에는 감소.
10. 생식용(횟감) 해양어류, 조피볼락이나 큰민어에 EPA, DHA를 다량생산하는 조류 Isocrysis galbana를 배양, 섭식시키므로써 어류근육 조직에서 EPA, DHA가 증폭생산 여부의 분석.

o 연구성과 활용실적 및 계획

1. 연구성과는 국제논문 2편, 국내논문 3편, 특허 1편, 국외학회 프로시딩, 2편, 국내학회 8편으로 발표되었으며 향후 약 5편을 투고할 예정이다.
2. Ribonucleotide reductase, Atpase의 유전자를 분리, 구조해석, 생리기능을 구명, 이 과정에서 포도유래성 천연항암성분 resveratrol은 그 항암효과가 탁월함을 발견.

-. 포도 및 포도가공식품등에 본 항암성분을 강화한 식품을 개발하며

-. Ribonucleotide reductase, Atpase의 저해능과 연관지어 그 타겟트를 명확히 구명하며 효소의 산업적 생산을 도모한다.

-. 새로운 식품/재제로써 항암성분이 다량 함유된 "비하티니"를 생산 시판할 예정.

3. EPA 생산관련유전자의 클로닝을 완성, 그 구조를 해석하며 산업적 이용을 도모
4. 횟감어류인 큰민어와 조피볼락에 EPA생산조류를 섭식, 어육조직에서 이를 축적하는 방안을 모색.

제 2 장 1세부과제 "Pyrimidine 대사 관련 유전자 산물의 작용기구 및 그 실용화에 관한 연구분야

제1절 서론

지구상에는 생물이 서식하기 어려운 극한 환경에서도 잘 자라는 미생물이 있으며 이들로부터의 새로운 자원의 개발은 새로운 산업으로써 각광을 받고 있다(Adams M.W.W., 1995, FEMS, 1996). 심해의 솟아나는 온천, 지상의 펄펄 끓는 온천물이나 화산에서 서식하는 초 고온성 세균(T.D. Brook, 1978), 남극이나 북극, 또는 만년설 속의 토양에서 서식하는 초저온 세균, 해양환경 또는 해양생물에 서식하는 저온세균, 유전지대의 토양의 탄화수소 자화세균, 사해와 같은 염분호수나 염전지대, 강산, 강 알카리성 폐수 배출공장의 하수도 등에서 서식하는 호산, 호염, 호 알카리성 세균등, 극한 환경에서 증식하는 미생물은 새로운 자원으로 부각되고 있다(R. E. Amelenxen and A. L. Murdock, 1978). 최근 이들 극한환경미생물로부터 효소, 저분자 향료, 생리활성 물질 등의 개발은 의학 및 생물산업에 획기적인 변화를 초래하고 있다(Ghim SY, et al., 1994, Glaser P, et al., 1993). 극한내열성 세균으로부터 개발된 DNA중합효소에 의한 유전자단편의 증식은 새로운 감식법 으로써 범죄수사에까지 이용되고 있으며, 작년 한해에만 선진국에서 생의학에 투자한 돈은 25억불에 달한다(Medigan and Marrs, Scientific Amer. April, 66, 1997). 그러나 현재의 기술 수준에서 시험관 배양이 가능한 미생물은 전체 미생물의 1%에 지나지 않고 있음이 추측되고 있다. 이는 가장 잘 보존되고 있는 rRNA의 단편을 probe로 하였을 때 99%의 hybridized microbes가 있음이 확인되므로써 알려진 것인데 현실적으로 99%의 배양되지 않는 미생물이 새로운 생명공학의 부존자원으로써

대한민국국회도서관장서

엄청난 가능성이 내포되어 있음을 시사하는 것이다. 더욱이 동식물 및 곤충(식물 246,000종, 동물 280,000종, 곤충 750,000종)에 비해 엄청난 다양성이 미생물에 내재되어 있음이 발견되어 그 자원으로써의 효용가치는 극대화를 치닫고 있다 (Service, Science, 275, 1740, 1997).

본 연구의 제1세부과제에서는 극한 내열성미생물에서 반응하는 각종 핵산대사관련 효소 및 이들의 코딩 유전자를 탐색 분리하여 미래 첨단산업에 응용하고자 한다. 생육적온이 100℃인 극한 내열성균 *Methanopyrus kandreli* (Huber et al., 1987)나 적온 72℃인 *Bacillus caldolyticus* (Bartolomeo et al., 1991) 로부터 NTP를 dNTP로 전환하는 nucleotide reductase를 코드하는 nrd 유전자나(송방호, et al.,1998), uracil을 uridine을 거치지 않고 UMP로 직접 전환하는 효소 uracil phosphoribosyl-transferase의 코딩 유전자 *upp,* cytidine을 deoxycytidine으로 전환하는 cytidine deaminase의 코딩 유전자 *cdd* 등 pyrimidine 대사관련 유전자 또한 그 상업성을 무시할 수 없는 단계이다(Ghim SY, et al., 1994, Glaser P, et al., 1993, P. Nygaard. et al., 1993, Van de Casteele M. et al., 1997). 극한 내열성 nucleotide reductase가 개발되면 내열성 DNA polymerase에 의한 PCR법에의 응용에 버금가는 정도로 유전공학산업을 획기적으로 전환시킬 수 있으리라 생각된다. 이론적인 면에서도 진화과정에서 RNA world로 부터 DNA world에로의 변환성, 분자진화의 해석 등에 이바지할 것이며, 산업적으로는 이들 핵산대사관련효소의 의약 및 생화학용 제재로써의 생산에 중요한 의의를 부여할 것으로 생각된다(Chimploy K., et. al. 2000, Zhu C., et. al. 2000, Advani SJ., et. al. 2000, Nakano K., et. al. 2000, Geffen DB. & Horowitz J. 2000, Hall IH., et. al. 2000, Pawlik TM., et. al. 2000).

1. 연구개발 목표

극한 내열성 미생물인 *Methanopyrus kandleri*(생육최적온도 100℃, Kurr *et al.,* 1991)나 *Bacillus caldolyticus*(생육최적온도 72℃, Heinen & Heinen, 1972) 또는 저온성균인 *Bacillus psychrosaccharolyticus*(생육최적온도 2

0℃, Larkin & Stokes, 1967) 등으로 부터 핵산 pyrimidine대사계 관련유전자를 분리한 후 유전자 증폭에 의한 이들 유전자산물의 대량생산을 시도한다.

Ribonucleotide reductase (RNR)는 ribonucleotide를 상응하는 deoxyribonucleotide로의 전환을 촉매하는 효소로써 모든 생물의 DNA replication과 repair system에 deoxyribonucleotide를 균형적으로 공급하는 필수적인 효소이다. 촉매과정에 이용되는 radical의 형태와 요구되는 cofactor의 종류에 따라 세 가지 class가 있다(Eliasson R, et al., 1996). Classs I은 cofactor로 nonheme di-iron center와 tyrosyl radical 생성에 산소를 요구하는 Ia(Guittet O., et. al. 2000, Liu A. & Graslund A. 2000), Ia와 유사하지만 다른 종류의 thioredoxin을 필요로 하며, cofactor로 manganese를 요구하는 Ib(Fieschi F, et al., 1998, Jordan A, et al. 1994, Jordan A, et al., 1994, Jordan A, et al., 1996, Jordan A, et al., 1995, Scotti C, et al., 1996)로 나뉘어진다. Class II는 cofactor로 adenosylcobalamine을 요구하며(Jordan A, et al., 1997, Sirovatka JM. & Finke RG. 2000), cofactor로 iron-sulphur와 glycyl radical 형성에 S-adenosylmethionine을 요구하는 class III등이 있다(Andersson J., et. al. 2000, Andersson J. et al. 2000). 이들 다른 종류의 *ribonucleotoide reductase*의 존재는 진화과정의 해석에 중요한 관심사가 되고 있으며, 항암 또는 항virus활성의 target 효소로써, 의약 및 생화학용 시약으로써 산업적으로 주요한 의의를 갖는 효소이다(송방호, et al.,1998). 이를 코드하는 *nrd* 유전자나, cytidine을 deoxycytidine으로 전환하는 cytidine deaminase의 코딩 유전자인 *cdd,* ATP synthesis와 hydrolysis를 수행하는 *atp* 등의 핵산 대사 관련 유전자들의 산업적 이용은 획기적인 방안의 하나이다.

산업적 응용의 분야로서, ribonucleotide reductase의 저해제인 resveratrol이 항암성분이 있음이 알려지고 이 물질이 한국산 포도 혹은 포도주로부터도 검출되는가를 확인하고자 관련 기초연구를 수행하였다. 항암제, 항산화제, 항알레르기제재 등의 기능을 가진 것으로 알려져 온 resveratrol의 함량을 포도나 포도주에서 증가시키는 것은 국

내의 포도재배 농가나 관련 포도주 생산업체의 소득증대에 절대적으로 공헌할 수 있을 것이다.

제2절 재료 및 방법

1. *nrd gene*의 분리, 염기배열결정, 구조해석

가. nrd 유전자 분리원

***nrd* 공여체 *M. kandleri* chromosome** : *M. kandleri nrd* gene 분리를 위한 *M. kandleri* chromosome은 독일 Regensburg대학(Karl. O. Stetter교수)으로 부터 분양을 받아 nrd gene 분리원으로 사용하였다.

***M. kandleri*의 genomic library**: 제한효소 BamHI으로 부분 처리된 *M. kandleri*의 genomic DNA를 동일한 제한효소로 완전히 처리한 λ DashII vectot에 삽입한 *M. kandleri*의 genomic library를 KIST(유연규 박사)로부터 분양 받아 사용하였다.

나. 사용된 유전자 재조합 기술

DNA cloning과 염기서열 분석: 일반적인 DNA실험과 염색체 혹은 플라스미드 DNA의 분리는 Sambrook 등에 의해 서술되어진 방법에 의해 수행되어졌다. 제한효소와 T4 DNA ligase 반응은 제조회사의 방법에 따랐다. Gene amplification PCR 반응 수행결과 합성된 DNA단편들을 동일한 양의 클로로포름으로 정제 후 에탄올 침전으로 회수하여 NOVOGEN사의 cloning vector pT7 Blue T-vector에 삽입하여 *Escherichia coli* DH5α에 형질전환 시킨 trandformants를 Sanger(1977)등의 [α-^{35}S]dATP를 사용한 dideoxy chain termination 방법으로 염기서열을 결정하였다. 염기서열 결정에 사용한 플라스미드는 Qiagen kit에 의해 추출하였다. 단일 가닥 DNA 7 μℓ에 2 M

NaOH, 2 mM EDTA solution을 처리한 1/10의 볼륨에 primer 1 $\mu\ell$, 5 X reaction buffer 2 $\mu\ell$를 혼합하였다. 그 혼합물은 56℃에서 10분 동안 annealing하여 준비되어졌고, 37℃에서 cooling 하였고, 15 μCi ^{35}S-dATP, 2 $\mu\ell$ dNTP, 1 $\mu\ell$ DTT, 2 $\mu\ell$ T_7 DNA polymerase (1.6 unit/$\mu\ell$)을 첨가한 후 5분동안 room-temperature에서 배양하였다. 혼합물을 배양한 후에 2.5 $\mu\ell$ ddNTP를 첨가한 각각의 termination tube로 옮겨서 37℃에서 5분 동안 더 배양하였다. 종결반응 후에 4 $\mu\ell$ BPB-formamide solution을 첨가하여 반응을 정지하였다. 반응 혼합물을 열처리한 후에 8 M urea가 첨가된 5.5% polyacrylamide gel (40 x 30 x 0.02 ㎝)에서 1800 V, 40 mA로 전기영동하여 80℃에서 1시간동안 vacuum 건조하여 -70℃에서 4일동안 Autoradiography 하였다. 결정된 염기서열과 추론되어진 polypeptide의 상동성은 National Center for Biotechnology Information내 databases의 BLASTN, BLASTX, Clustal W softwares의 프로그램에 의해 분석하였다.

PCR 방법에 의한 gene amplification : *M. kandleri*에서 ribonucleotide reductase (RNR)을 코딩하는 *nrd* gene 분리하고자 이미 *nrd* gene의 염기서열이 알려져 있던 archaebacteria인 *Archaeoglobus fulgidus, Methanobacterium thermoautotrophicum, Pyrococcus furiosus, Thermoplasma acidophilum nrd* gene의 ORF 양말단에서 conserved sequence를 조사하였고 이를 바탕으로 8종의 primer들을 제작하였다(Table 1-1, Okamoto *et al.* 1993)). 또한 일차로 분리된 단편의 염기서열을 바탕으로 확장된 gene을 PCR 방법으로 회수하기 위해 pMK41에 삽입된 단편의 DNA 염기서열에서 3종의 primer를, *M. thermoautotrophicum*와 *M. jannaschii*의 *nrdD*와 *nrdG* gene 각각의 conserved된 염기서열에서 2종의 primer를, 단편의 external 배열과의 상보결합을 유도하기 위한 random primer 2종을 제작하였다(Table 1-2). 또한 *Bacillus. caldolytidus*의 *nrd* gene을 분리하고자 *Bacillus subtilis nrd* EF gene의 염기서열을 바탕으로 *nrd EF* gene의 전체염

기배열을 포함하는 5'말단과 3'말단에서 각각의 primer를 제작하였고, 또한 *nrdE, nrdF* 각각의 ORF에서 5'말단과 3'말단의 primer를 각각 합성하였으며 그 염기배열과 위치는 Table 1-3과 Fig. 1-1에 나타내었다. 이와 같이 제작된 primer로써 목적하고 있는 극한미생물인 *Methanopyrus kandleri* (최적온도가 110℃)보다 최적온도가 낮은 세균인 *Bacillus stearothermophilus* (55℃)와 *Bacillus caldolyticus* (75℃) 및 대조구로써의 상온균 *Bacillus subtilis*(37℃)의 chromosomal DNA를 분리하여 PCR 반응을 수행하여(K.B. Mullis et al 1987, S.J. Scharf et al 1986) nrd gene의 분리를 시도하였다..

Southern Hybridization : 사용된 probe는 rnadom primed DNA labeling kit(Boehringer Mannheim Co.)를 사용하여 DIG-표지를 하였다. Prehybridization은 Dig-labeling detection kit(Boehringer Mannheim Co.)의 hybridization buffer(5X SSC, 1% BLOCKING REAGENT, 0.1% N-LAUROYLSACASINE, 0.1% NaCl, 0.2% SDS)로 65℃에서 4시간 동안 수행하였다. Hybridization은 Dig-labeling detection kit(Boehringer Mannheim Co.)의 hybridization buffer(5X SSC, 1% BLOCKING REAGENT, 0.1% N-LAUROYLSACASINE, 0.1% NaCl, 0.2% SDS, labeled probe DNA)로 65℃에서 16-20시간 동안 수행하였다. 반응이 끝난 membrane은 2X SSC+0.1% SDS SOLUTION에서 5분간 2회, 68℃ 0.1X SSC+0.1% SDS SOLUTION에서 15분간 2회 세척 후 ANTI-DIG-AP-CONJUGATE(75mU/㎖)를 probe DNA에 결합 세척 후, X-레이 필름에 감광시켰다(Sambrook et al., 1989).

Plaque hybridization: Genomic library를 E. coli MRA(P2) strain에 형질도입 시킨 후 생성된 plaque를 nylon membrane을 plate 표면에 1분간 덮어두어 membrane(Thomas P.S., 1980)으로 옮긴 후 상온에서 10-20분간 건조시키고, 건조한 membrane을 0.2M NaOH, 1.5M NaCl용액으로 처리, 0.4M Tris-Cl(pH7.6), 2X SSC 용액에서 1-2분동안 처리

후 membrane위의 DNA를 UV irradiation으로 cross-linking하였다. Cross-linking 후 Southern Hybridization과 동일한 방법으로 detection 하였다.

극한내열성 chromosomal fragment의 gene library 구축: 극한내열성 *Bacillus caldolyticus* 및 *Methanopyrus kandreli* 주를 입수하여 우선 *Bacillus* 염색체 DNA 추출 법에 따라 이 균의 세포벽 또는 세포 표층 파괴 방법을 확립한 후 염색체 DNA를 분리하였다. 우선 *Bacillus caldolyticus*에서 핵산대사관련 유용유전자를 분리하기 위해 그 염색체를 분리하여 *Eco*RI, *Pst*I, *Ava*I, *Hind*III, *Sau*IIIA 등의 제한단편을 pDIA5304, pBluescript, pUC18등의 vector 에 삽입한 후 이들 단편이 삽입된 cloned vector 500여종을 회수하였다. 이때의 host cell은 *E. coli* TP610, XL1, TG1, JM109, DH5-α 등을 사용하였다. 이들 gene library에 삽입된 다양한 크기의 DNA단편으로부터 핵산대사 관련 효소 유전자 단편의 회수를 시도하였다.

다. *nrd*의 염색체에서의 파괴

nrd 유전자에 spectinomycin(Sp) cassette를 삽입한 vector를 제작한 후 이 hybrid vector를 염색체 DNA에 통합시키므로써 이들 유전자의 발현을 *in vivo* 에서 정지시켰을 때 생리작용을 검정하고저 한다. Sp cassette의 양단에 있는 *Eco*RI제한절단부위를 이용하여 *nrd* 유전자내에 존재하는 *Eco*RI 좌위(가상)에 이들 cassette를 삽입함과 동시에 *in vivo*에서 *nrd*의 융합단백이 합성될 때의 생리작용 또는 영양요구성에 대한 검토를 하고자 한다.

2. cdd gene의 분리, 염기배열결정, 구조해석

가. cdd gene의 분리균원

분리균원: *cdd* 유전자의 공여균으로서 내열성 *B. caldolyticus*

DSM405와 cloning을 위한 숙주로서 *E. coli* JF611 (*pyrE*, *cdd*, *thi*-1, *argE*3, *his*-4, *proA*2, *thr*-1, *leu*-6, *mtl*-1, *xyl*-5, *ara*-14, *galK*2, *lacY*1, *rpsL*31, lambda-*supE*44)을 사용하였다.

Chromosomal integration vector: Chromosome integration vector로는 pDIA5304, pDIA5305, pUHE series를 사용하여 chromosome에 integration하는 데 사용하였다.

나. cdd gene의 분리균의 배양

*B. caldolyticus*는 Luria broth를 사용하여 70℃에서 배양하였으며, 재조합 *E. coli* JF611/pCJH53는 37℃에서 LB나 0.2% glucose 와 0.2% vitamin-free casamino acids를 첨가시킨 AB최소배지에서 성장시켰다. 필요에 따라 thiamine (1 ㎍/㎖), cytidine (40 ㎍/㎖) 과 ampicillin (100 ㎍/㎖)을 첨가하였다.

다 사용된 유전자 재조합 기술

DNase I protection 검정: DNase I protection 검정은 Schmitz와 Galas 방법(1979)에 준하여 행하였다.

Primer extension experiment 및 Northern Blotting: *B. substilis cdd* 유전자의 transcription start site를 알기 위하여 primer extension mapping에 의한 전사개시 부위를 동정하였다. 이때 total RNA 의 추출은 Masadek *et al.*(1993)의 방법을 도입하였다.

Chromosomal integration vector: Chromosome integration vector로는 pDIA5304, pDIA5305, pUHE series를 사용하여 chromosome에 integration하는 데 사용하였다.

B. *caldolyticus cdd* 유전자의 클로닝: *cdd* 유전자를 클로닝하기 위해 다양한 bacterial *cdd* 유전자의 보존적 부위를 기초로 프라이머를

합성한 후, *B. caldolyticus* DSM405의 DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. *Bam*HI site를 가지는 5′-ACAGGATCCAATTCTAATTT TTCTGTTACATTTTTG-3′인 5′-primer와 *Pst*I site가 포함된 5′-ACACTGCAGGATTTTCCTACGTTCGGTCTTCC-3′인 3′-primer를 PCR primer로 고안했다. 생성된 PCR 단편은 DNA의 염기서열과 *cdd* 상보성 테스트와 효소활성측정에 의해 Cytidine deaminase를 코드하는 유전자 단편임을 확인할 수 있었다.

Primer extension: 전사개시부위를 찾기 위한 Primer extension은 avian myeloblastosis virus의 역전사효소를 사용하여 수행하였으며, *E. coli* JF611/pCJH53로부터의 Total RNA의 회수는 제조회사의 방법에 준하였다. primer extension을 위한 primer는 137-115에 상보적인 염기배열으로 [W1 (24mer: 5-cttcgagtacggcacgtaggcgag-3)] 고안되어졌다.

라. Cytidine deaminase의 정제.

E. coli JF611/pCJH53은 5 L의 AB 최소배지에서 배양하여 흡광도 660에서 1.0일때 세포를 원심분리로 회수하여 Tris-EDTA (100 mM Tris-Cl, pH 7.5 and 2 mM EDTA) buffer로 두 번 세척하여, 1 mM DTT가 포함된 Tris-EDTA로 세포를 현탁시킨 후 4℃에서 45초 동안 2회 초음파 파쇄하였다. 초음파 파쇄한 원심상등액을 30-70% 염석하여 회수한 후 투석하였으며, 이를 50 mM Tris-Cl (pH 8.0) 평형화한 DEAE-Sepharose column (2.2 x 20 cm)에 적용시켜 final 0.5 M NaCl gradient로 elution 하여 분획한 효소를 Sephacryl S-200 column (2 x 90 cm) 적용시켰다. 마지막 정제과정으로 Bio-Scale Q2 Columns (BIO-RAD)을 이용한 FPLC를 수행하여 효소를 정제하였다.

마. 효소의 성질

분자량 결정:정제된 효소의 분자량은 Sephacryl S-200 column을 이용한 gel filtration에 의해 결정하였다. 정제된 cytidine deaminase와 표준

마커로서 chymotrypsinogen A (MW. 25 kDa) 와 bovine serum albumin (MW. 45 kDa and 68 kDa)을 분당 0.5 ml의 유속으로 elution 시켜 분자량을 측정하였다.

Cytidine deaminase의 효소활성 측정과 kinetics: Cytidine deaminase 효소활성은 Song and Neuhard [18] 방법을 준하였으며, 1 unit는 37℃ 및 65℃에서 분당 1 mmol 의 cytidine을 탈아미노화하는 효소활성으로 정의 한다. cytidine deaminase의 최적 활성온도를 측정하기 위해 pH 7.5의 다양한 온도에서 결정되어졌고, 최적 활성 pH를 측정하기 위해 효소 최적 활성 온도에서 citric acid (pH 4.0 - 7.0), acetate (pH 5.0 - 5.5), phosphate (pH 6.0 - 8.0), Tris-Cl (pH 7.0 - 9.0), borate (pH 8.0 - 10.0)의 100 mM buffer를 사용하여 상대활성도를 측정하여 비교하였다.

정제된 효소의 열안정성을 측정하기 위해 37 - 90℃에 두고 70℃에서 효소활성을 측정하였으며, 금속이온과 sulfhydryl agent에 대한 효과를 측정하기 위해 37℃에서 10분 동안 금속이온과 저해제 1-10 mM을 포함하고 있는 Tris-Cl (pH 7.5)내에서 미리 반응 시켜 그 효소활성을 비교하였다. K_m 과 V_{max} 값을 측정하기 위해 다양한 농도의 cytidine을 사용하여 효소활성을 측정하여 Michaelis-Menten식에 따른 Lineweaver-Burk plotting에 의해 계산되어 졌다.

3. *atp* gene의 분리, 염기배열결정, 구조해석

가. *atp* gene의 분리균원

E. coli K-12 유도체 DH5α (Hanahan 1983; Bethesda Research Laboratories 1986)와 JM109 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)는 형질전환의 숙주로 사용하였고, pUC19를 형질전환 벡터로 사용하였다.

나. ATP 생산균주의 배양

E. coli 형질전환은 변형된 Sambrook *et al.* (1989)의 calcium chloride 방법을 사용하였다. LB 배지에서 하룻밤 배양한 세포를 새 LB배지에 2% 접종하고 37℃에서 OD_{660nm} 0.6될 때, 세포를 회수하여 세척하고 70 mM $CaCl_2$에 현탁시켰다. spin down후에 상등액은 버리고 0.2 ㎖ 의 70 mM $CaCl_2$로 재현탁시킨다. Ligate되어진 플라스미드 DNA에 competent cells을 첨가하고, 그 혼합물을 얼음에 약 한 시간정도 두었고, 42℃에서 3분 동안 열처리하였다. 형질 전환된 세포를 37℃에서 한 시간동안 1 ㎖ LB에서 첨가하여 생육시켰다. spin down 한 상등액 0.2 ㎖를 ampicillin (50 ㎍/㎖)이 첨가된 LB배지에 도말하였다. 삽입 단편을 detection하기 위하여 plate당 0.1 mM IPTG 과 0.004% X-gal이 첨가되어진 LB plate를 사용하였다.

다 atp gene의 구조해석

유전자의 염기배열이 밝혀진 단편은 EMBL, Genbank등의 database에서 nucleotide sequence analysis, restriction enzyme sites, open reading frames display, sequence homology searches등을 하였다. 특히 Gene construction kit, Genework, DNAsis 등의 software program을 이용하여 염기배열을 analysis하였다.

라. 사용된 유전자 재조합기술

PCR에 의한 유전자 증폭: *S. typhimurium* 염색체를 Template로 XL PCR Kit (Perkin Elmer)를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응에 사용된 primer는 *E. coli* ATPase의 염기서열을 기초로 제작된 PG(5′-CTTA TTGCCTACGTGAATATGCTGC-3′)와 PE(5′-CCGTAGAGCATTAAAATGTCT TCACC-3′)로 Takara Shuzo Co.에서 합성하여 사용하였다.

DNA techniques: 모든 제한효소 분해과 T4 DNA ligase반응은 제조회사의 방법에 따라 수행하였다. subclone, 벡터와 DNA 단편은 클로로포름 처리에의 의해 비활성화 되어진 후에 적절한 제한효소와 65℃

에서 10분 동안의 열처리에 의해 완전히 분해되었다. 벡터와 DNA를 적절한 비율(1:1)로 혼합한 후에 T4 DNA ligase를 사용함으로서 Ligation을 수행하였고 16℃에서 밤새 배양하였다. 플라스미드를 분리하기 위해 단일 colony를 항생제를 첨가한 3 ㎖ LB배지에서 37℃ 밤새 배양하였다. 회수한 세포로부터의 플라스미드 분리는 변형된 alkaline/SDS lysis 과정 (Birnboim and Doly, 1979)에 의해 수행되어졌다. DNA 는 표준방법 (Meniatis *et al.*, 1989)에 따라서 agarose gel 전기영동에 의해 분석되었다. 플라스미드와 제한효소 단편은 TAE buffer를 사용한 0.7-1.5% gels에서 ethidium bromide 0.5 ㎍/㎖로 gel을 염색하여 분석하였다. gel 내에서의DNA elution은 Geneclean kit에 의해 수행되어졌다.

제3절 결과 및 고찰

1. Methanopyrus kandleri, Bacillus caldolyticus의 nrd genes의 분리, 염기배열 결정, 구조분석

가. 극한 내열성균에서 *nrd* gene의 분리

1). *B. caldolyticus nrd* gene의 분리

가). PCR방법에 의한 gene amplification (Okamoto et al. 1993) :

*B. subtilis*의 유전자인 *nrd EF* gene의 5'말단과 3'말단과 *nrdE, nrdF* 각각의 ORF에서 5'말단과 3'말단의 primer를 각각 합성하였으며 *M. kandleri*보다 최적온도가 낮은 세균인 *B. stearothermophilus* (55℃)와 *B. caldolyticus* (75℃) 및 대조구로써의 상온균 *B. subtilis*(37℃)의 chromosomal DNA를 분리하여 PCR 반응을 수행하여(K.B. Mullis et al 1987, S.J. Scharf et al 1986) nrd gene의 분리를 시도하였다.

B. subtilis, *B. stearothermophilus* (55℃)와 *B. caldolyticus* (75℃)에

서 각각의 염색체를 분리하여 PCR반응의 template로 이용하였다. PCR 반응은 95℃, 65℃, 그리고 72℃에서 각 1 분간씩 30 cycle 반복하였다. *B. caldolyticus* (75℃)에서 primer NF, NEB 및 NFF, NFB를 첨가하여 PCR을 수행하였든 바 NF, NEB에서는 3개 이상의 밴드가 검출되었으나(Fig. 1-2, lane 2), NFF, NFB를 primer로 사용한 경우는 single band로 나타났다(Fig. 1-2, lane 4). 이 반응은 annealing을 53 ℃로 낮추어 수행하였든 경우에도 그 반응산물이 검출되었다(Fig. 1-3, lane 4). 대조구로 사용한 *B. subtilis* chromosome의 경우, primer NEF, NEB 및 NFF, NFB를 가하여 PCR을 시도한 경우, 그 반응 산물은 각각 2.4 Kb (Fig. 1-2, lane 1)와 1.4 Kb (Fig. 1-2, lane 2)로써 실제 ORF보다 크게 나타났는데 이는 제작된 primer의 위치가 ORF의 개시점과 종결점보다 5'말단과 3'말단 방향으로 각각 약 150bp씩 추가되어 합성되었기 때문이다.

PCR을 수행한 결과 나타난 PCR products들을 cloning vector pGEM-T 에 cloning하여 58개의 trandformants를 selection하였다(Fig. 1-3). 이들중 일부인 18개의 trandformants를 sequencing하였다(Fig. 1-4.). 그 sequence data를 GENE BANK의 data base에서 homology 검색을 하였을 때 *B. caldolyticus* chromosome에서 NF/NEB primer 조합에서 나타난 product를 cloining한 pBCE7의 sequence가 *B. subytilis nrd*F ORF의 start codon주위와 homology가 있는 것으로 (Fig. 1-5), 그리고 *M. kandleri* chromosome에서 NFF/NFB primer 조합에서 나타난 product를 cloining한 pMCF18은 *Archaeoglobus fulgidus*의 Valyl-tRNA synthetase 그리고 pMCF25 sequence는 *M. thermoautotrophicum*의 Isoleucyl-tRNA synthetase에서 homology가 있는 것으로 나타났다(Data not shown.).

***B. subtilis nrd F* gene을 probe로 사용하였을 때의 Southern blotting:** *B. subtilis* chromosome에 primer NFF, NFB를 첨가한 반응의 산물인 1.4 Kb단편, 즉 *nrd* F gene을 probe로 사용하여 *B.*

stearothermophilus, B. caldolyticus 및 *Methanopyrus kandleri* chromosome에 대한 blotting을 시도하였다. 그 결과 *B. stearothermophilus, B. caldolyticus* 및 *Methanopyrus kandleri* chromosome을 분리후 EcoRI과 PstI 제한단편을 전기영동한 후, *B. subtilis nrd F* gene을 probe로 사용하여 blotting하였든 바, *B. stearothermophilus, B. caldolyticus* 및 *Methanopyrus kandleri* chromosome 단편에서 blotting이 되는 밴드는 아직 발견되지 않았다. Hybridization온도를 45C로 하강하였을 경우에 *B. caldolyticus*에서 약한 밴드가 검출되었으나(Fig.1-8, lane3 & 7) 이는 현재 더 심도있는 실험이 지속 요구되고 있다. 대조구로 사용한 *B. subtilis* chromosome 단편에서는 hybridization 조건이 65C, 55C, 45C이었을 경우 공히 그 hybridization 밴드들이 나타났다(Fig. 1-6, lanel, 2, 5, & 6, Fig. 1-7, lanel, 2, 5, & 6, Fig. 1-8, lane 1 & 5). Hybridization bands가 나타나지 않음은 이들 균들의 *nrd* gene이 *B. subtilis*의 *nrd* gene과 유연성이 멀다는 것을 의미한다고 생각되나, 이 부분을 계속 추적하여야 명확한 해석이 가능하리라 생각된다.

2). *M. kandleri nrd* gene 분리

***M. kandleri nrd* gene의 분리:** 제작된 primer를 이용 *M. kandleri*의 chromosome을 template로 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응은 95℃에서 1분간 변성, 53℃에서 1분간 annealing, 그리고 72℃에서 1분간 extention시키는 반응을 30 cycle 반복하였다. THF와 THB primer를 조합한 반응에서는 1.4 kb 그리고 MTF와 MTB primer를 조합한 반응에서는 0.5 kb, 0.6 kb 단편이 합성되었다(Fig. 1-9). PCR 반응에서 합성된 DNA단편들을 cloning vector pT7 Blue T-vector에 삽입하여 *Escherichia coli* DH5α에 형질전환 시킨 결과 0.6, 0.5, 1.4 kb의 단편을 회수였다(Fig. 1-10). 분리된 단편의 염기배열을 결정한 후 NCBI data bank에서 검색을 하였던 바, pMK41에 삽입된 0.6 kb 단편

의 아미노산 배열에서 *Methanococus jannaschii*의 Nrd와 49%, *Methanobacterioum thermoautoterophicum*의 Nrd와 46%, 그리고 *Pyrococus horikoshii*의 Nrd와 36%의 homology를 anaerobic-*ribonucleotoide reductase α* subunit의 중간부위에서 나타내었기에 pMK41에 삽입된 단편이 *M. kandleri*의 *nrd* gene의 일부임을 확인하였다(Fig.1-11).

***M. kandleri nrd* gene의 extension**: 아미노산 배열 가운데 ORF의 중간부위가 *M. jannaschii, M. thermoautotrophicum* 그리고 *P. horikoshii*의 Nrd와 상동성을 나타내었기에 양방향으로 염기배열을 동시에 확장하면서 유전자 전체를 회수하기 위하여, pMK41에 삽입된 DNA sequence에서 3종의 primer(Fig 1-12)를, *M. thermoautotrophicum*와 *M. jannaschii*의 *nrdD*와 *nrdG* gene 각각의 conserved된 염기서열에서 2종의 primer를, 단편의 external 배열과의 상보결합을 유도하기 위한 random primer 2종을 제작하였다(Table 1-2). 여러 가지 primer의 extension으로 회수된 DNA단편 중(Fig. 1-13) pMK52의 단편이 *M. thermoautotrophicum* 등의 *nrd*D gene에 의해 코딩되는 anaerobic-*ribonucleotoide reductase α* subunit의 중간부위와 40-47 %의 homology를 나타내었고 pMK41 단편의 염기배열과 약70bp 겹쳐져 5' 방향으로 약 0.5 kb 연장되었음을 확인하였다. 그러나 3' 방향으로 연장된 단편의 회수는 되지 않았다. pMK41과 pMK52 단편의 염기배열을 종합하여 얻어진 1.0 kb 단편은 *M. thermoautotrophicum*의 anaerobic-*ribonucleotoide reductase*과 44%, *M. jannaschii*와는 47%, *E. coli*와는 30%의 상동성을 나타내었다. 종합한 염기배열에서 145번째 염기부터 Valine으로 번역이 되는 것으로 추정되는 ORF를 동정하였다(Fig 1-14). 이 아미노산 배열은 ribonucleotide의 2번 탄소의 deoxylation에 관여하는 dithiol기 중의 하나인 conserved cys^{105}(T4 phage의 경우 cys^{79})과 γ-phosphate의 결합에 관여하는 His^{92}와 His^{94}(T4 phage의 경우 His^{64}와 His^{66})가 포함된

conserved motif들이 발견되었다(Fig. 1-15).

***M. kandleri* genomic library의 plaque hybridization:** PCR 방법으로는 *M. kandleri*의 *nrd* gene 전체가 포함된 DNA 단편을 회수하는데 어려움이 있어, 제한효소 BamHI으로 부분 처리된 *M. kandleri*의 genomic DNA를 동일한 제한효소로 완전히 처리한 λDashII vectot에 삽입한 *M. kandleri*의 genomic library를 KIST의 유연규 박사로부터 분양 받아 *M. kandleri*의 *nrd* gene을 찾는데 사용하였다. Genomic library를 *E. coli* MRA(P2) strain에 형질 도입한 후 형성된 plaque를 대상으로 pMK41을 probe로 southern blotting을 하였다. 그 결과 signal과 동일한 위치에 있는 SQ1 plaque를 분리하였고(Fig. 1-16A), DNA를 추출하여 pMK41을 probe로 southern blotting을 하였을 때도 signal이 나타나 SQ1 plaque가 *M. kandleri*의 *nrd* gene을 포함하고 있음을 확인하였다(Fig. 1-16B). SQ1 plaque에 포함되어 있는 *M. kandleri*의 *nrd* gene을 범위를 좁혀 회수하고자, poly cloning site의 양 말단에 위치한 T3와 T7 promotor의 염기배열을 primer로 제작(Table 1-2)하였다. 제작된 primer와 MP3 primer를 조합하여 SQ1 plaque DNA를 template로 한 PCR 반응에서 합성된 DNA 단편들을 pT7 Blue T-vector에 삽입한 후 *E. coli* DH5α에 형질전환 시켜 pMKn 11을 회수하였다. 이 단편의 염기배열을 결정한 후 NCBI data bank에서 검색한 결과 *M. thermoautotrophicum*과 *M. jannaschii*의 anaerobic-*ribonucleotoide reductase* α subunit의 중간부위와 각각 48 % 그리고 43 %의 homology를 나타내, pMK41과 52를 종합한 염기배열에서 C 말단 쪽으로 0.5 kb 연장됨과 pMKn11까지 종합한 약 1.5kb의 단편의 염기배열을 NCBI data bank에서 검색한 결과 *M. thermoautotrophicum*과 *M. jannaschii*의 anaerobic-*ribonucleotoide reductase* α subunit의 중간부위와 각각 48 %, 47 % homology와 radical 형성에 관여하는 glycyl아미노산이 포함된 conserved motif가

나타내 *nrd* gene의 일부임을 확인하였다(Fig. 1-17, 18).
현재, MP3와 G1 primer(Fig. 1-19, lane 1), MP1 primer와 Forward(Fig. 1-19, lane 2), Reverse primer(Fig. 1-19, lane 3) 각각의 조합으로 *M. kandleri*의 chromosome을 template로 PCR 반응을 수행하여 합성된 DNA단편들을 pT7 Blue T-vector에 삽입한 후 *E. coli* DH5α에 형질전환 시켜 단편의 회수를 시도함과 동시에 genomic library에서 *M. kandleri*의 *nrd* gene을 포함한 genomic DNA단편을 검색하는 실험도 수행하고 있는 중이다.

2. Ribonucleotide reductase(RNR)와 ATP합성 효소 FoF1-ATPase의 기능적 연관성

가. *Salmonella typhimurium*의 ATP synthase (*atp*) operon의 분리

S. typhimurium 의 *atp* operon에서 이미 분리된 4.0 kb를 포함하는 전체 8.0 kb를 분리하기 위하여 *E. coli*의 *atp* operon의 염기배열과 동일 추정 영역에서 5'-CTTATTGCCTACGTGAATATGCTGC-3'(PG, 5'-CCGTAGAGCATTAAAATGTCTTCATC-3' (PE)를 primer로 합성하였다. 이 primer들을 사용하여 long range PCR 반응을 실시한 결과, PG와 PE primer에 의하여 증폭되어진 8.0 kb 단편을 얻어, 이 단편에서 이미 분리된 4.0 kb를 제외한 나머지 부분을 단일 또는 중복 제한효소 처리하여 동일한 제한효소로 절단한 pUC19에 삽입시켜 총 11개의 subclone을 얻었다.

나. 염기서열결정과 아미노산 배열상의 상동성 검색

회수된 subclone의 염기배열 결정과 *E. coli*와 아미노산 배열상의 상동성을 검색한 결과 membrane-bound ATP synthase(EC 3.6.1.3)를 encoding하는 *atp* 오페론으로 확인되었다. 8개의 complete gene과 1개의 truncated gene으로부터 추론된 polypeptide(Fig. 1-21)는 *E. coli*의

atp 오페론에 상응하는 gene들과 95% 이상의 homology를 보였다. Nona-cistronic 구조인 *S. typhimurium*의 *atp* 오페론의 gene들은 *oriC-atpIBEFHAGDC*의 순서로 추정되며(Fig. 1-22), *S. typhimurium atpIBEFHAGDC* 유전자들로부터 유추된 polypeptide 각각의 분자량은 14.1 kDa, 30.3 kDa, 8.3 kDa, 17.3 kDa, 19.3 kDa, 54.8 kDa, 31.6 kDa 및 50.3 kDa 등으로써 *E. coli*의 상보적인 gene과의 비교에서 100%, 100%, 100%, 97%, 94%, 93%, 93%, 및 99% 의 아미노산 배열상의 상동성을 각각 나타내었다(Table 1-4).

다. ATPase 효소의 작용기구 및 활성단

ATPase는 ATP hydrolase와 ATP synthase 두가지 기능이 있는데 생리적 조건에 따라 이들 가운데 어느 한쪽의 활성을 나타내며 이는 F-type(F; F1F0) 와 V-type(V; vacuole)로 나누어 진다. F-type는 F1F0 ATPase로써 *Escherichia coli*를 포함한 대부분의 진정세균이나 미토콘드리아, 엽록체 등에서 나타나며, V-type는 archebacteria로부터 유래되어 대부분의 진핵세포의 vecuolar vesicle에서 나타난다.

F1F0-type ATPase는 E. coli의 경우 nonacistronic operon에 의해 코드되는 복합 효소으로써 *atp*(또는 *unc*) *IBEFHAGDC*순서로 된 하나의 operon으로 구성되어 있다. *atp B, F, E, A, D, G, H,* and *C*에 의해 코드되는 a, b, c, α, β, γ, δ, ε의 nonidentical subunit로 구성되어 있다. *atp I* 유전자는 전사는 되나 그 단백산물은 F1F0에서 발견되지 않기 때문에 필수적은 아닌 것으로 추정된다. a, b, c subunit 단백은 막내부에 존재하는 단백으로써 F0부분을 형성하며 나머지 subunit단백은 peripheral 단백으로써 복합체의 F1-ATPase 부분을 형성한다. 한편 V-type ATPase는 archeal progenitor로부터 진화된 것으로 추정되며 vocuole에서 acidifying 효소로써의 기능이 있다. F0부분은 a1b2c12 stoichiomeric 비율로 구성되어 있으며, F1은 bovine mitochondria 에서 α3β3γ로 구성되어 있어 *E. coli*의 counterpart와 상동성이 상당히 높다.

*E. coli*나 *S. typhimurium*에서는 ATPase가 nonacistronic single operon으로 되어 있으나, *Rhodospirillum*이나 *R. seudomonas* blastica에서 F0 gene(IBEF)와 F1 gene(HAGDC)가 유전자선상에서 분리되어 있고 *Cyanobacteria synechococci*에서는 IBEFHAG와 DC가 분리되어 있다.

그 활성단은 F1 sector에서 $\alpha 3\beta 3$ 복합체의 중심에 γ단백의 C-terminal이 막에 매몰되어 있는 F0 sector의 a1b2c12 복합체에 닻을 내려 활성을 나타내며 b2 단백이 F1의 δ단백과 결합되어 활성을 나타내는 것으로 생각된다. 이 과정에서 각 subunit의 활성단에 관련된 아미노산이 S,. typhimurium의 ATPase와 비교한 결과는 다음과 같다.

a-subunit에서 *Escherichia coli* F_0F_1-ATPase의 proline 잔기(Pro-103, Pro-122, Pro-143)들은 a-subunit 구조를 안정화시키는 역할을 하는데 Pro-103은 transmembrane helix내에 있을 것으로 추측되며, Pro-122와 Pro-143은 membrane의 바깥 즉, 전하쌍의 형태를 가지는 두 개의 잔기 (Asp-124와 Arg-140)가까이에 위치한다.

Salmonella typhimurium F_0F_1-ATPase의 a-subunit를 *E. coli* 와 비교해본 결과 F_0F_1-ATPase a-subunit의 기능적인 안정을 위해 103, 122, 143 위치에 Pro이 역시 존재하였으며, 그 가까이에 Asp-124와 Arg-140이 동일하게 발견되었다. 그러나 a-subunit의 경우 *E. coli* 의 Val-258이 *S. typhimurium*에서는 Ala-258로 치환되어 나타났다. *Escherichia coli* F_0F_1-ATPase의 γ-subunit 와 *S. typhimurium*의 그것을 비교해본 결과는 Asp-6이 Glu-6로, His-58이 Arg-58로, Asn-127이 Asp-127로 각각 치환되어 나타났다(Fig. 1-21). 또 *Escherichia coli* F_0F_1-ATPase의 β-subunit 와 *S. typhi.*을 비교해본 결과 단지 Ile-374만이 Val-374로 치환되어 나타났다(Fig. 1-21). 분자 전체의 아미노산 치환결과를 해석하면 c subunit의 Gln-42, Asp-61, ε의 Glu-31, γ의 Tyr-206, a의 Arg-210등 catalytic site의 핵심영역에 위치하는 아미노산들은 거의 치환되지 않음을 볼 때 *E. coli*와 *S.*

*typhimurium*의 작용기작은 거의 동일할 것으로 추정된다(Fillingame & Divall., 1999).

3. Pyrimidine 대사관련효소 *cdd* gene의 분리, 염기배열 결정

가. *B. caldolyticus cdd* 유전자의 분리

B. caldolyticus DSM405의 *cdd* 유전자는 다양한 세균의 *cdd* 유전자의 보존적인 염기배열을 기초하여 *Bam*HI 또는 *Pst*I 제한효소 site를 가지는primer를 (Table 2-5) 이용한 PCR에 의하여 cloning되었다. PCR 결과 다른 세균의 *cdd* 유전자 크기와 일치하는 약 600 bp의 단편을 획득하였으며, 이 *Bam*H1-*Pst*I 단편을 가지는 pCJH53은 (Fig. 2-23) 대장균 JF611 *cdd*-deletion mutants를 통한 상보성 시험과 염기서열 결정 및 Southern blotting 결과로부터 clone된 단편은 *B. caldolyticus* 염색체로부터 기원한 *cdd* 유전자임을 알 수 있었다. (Fig. 2-24).

cdd 공여자로서 극한내열성 *B. caldolyticus*, 중온성 *Bacillus subtillis*, 재조합 대장균 JF611/pCH53으로부터 cytidine deaminase의 비활성이 37℃, 65℃에서 비교되었다. *B. caldolyticus*의 시티딘 디아미나제 활성이 65℃에서 중온성 *Bacillus subtillis* 효소활성과 비교할 때 4배 많은 수준으로 높게 나타났다 (Table 2-6). 이러한 결과는 또한 PCR증폭에 의해 클론된 단편이 *B. caldolyticus* DSM405로부터 정확히 기원됨을 제안한다.

나. Pyrimidine 대사관련효소의 내열성 domin의 검색

1). *B. caldolyticus cdd* 유전자

극한내열성 *B. caldlyticsu*에서 *cdd*유전자의 분리는 이미 1차년도 보고서에 보고하였다. 분리된 극한 내열성 *cdd* 유전자는 염기배열결정 결과 132개의 아미노산을 코드하는 open reading frame을 갖고 있으며

B. subtilis cdd 유전자의 아미노산과 약 72%의 상동성을 보여주었고, *cdd* 돌연변이 균주에서의 상보성 검증에 의해서 *B. caldolyticus*의 유전자로 추정되었고 효소의 내열성 분석을 통하여 확실하게 고온성 cytidine deaminase 임이 판명되었다.

데이터베이스내의 알려진 Cdd 폴리펩티드 서열의 비교에서 CAE와 PCGACRQ의 2개의 보존적 지역이 53-55, 85-91 위치에서 나타났다 (Fig. 2-25). 비록 대장균 *cdd* 유전자에 있어서 아미노산 'H'의 하나가 *Bacillus*에 있어서 'C'로 치환되었다 할지라도, 이러한 보존적 지역은 대장균 효소와 같은 아연 결합 도메인임을 나타낸다. Fig. 2-25 에서와 같이, *cdd* ORF로 부터 추론된 폴리펩티드는 *Bacillus subtillis, Bacillus psychrophilus* 유전자와는 63%와 68%의 상동성을 나타낸다

이러한 결과는 다른 세균의 기원인 다양한 cytidine deaminase가 촉매 활성과 관련된 동일한 폴리펩티드 도메인을 보존하기 때문에 같은 기작에 의하여 탈아미노화 반응을 촉매한다는 것을 제안한다. 결과적으로, 다양한 세균의 *cdd* 유전자는 하나의 활성부위에 있어서 동일한 기능의 도메인이 존재함에 의해 동일 조상으로부터 유래되었다고 추측할 수 있다. 인간 *cdd* 유전자는 세균과 같은 도메인을 보존하기 때문에 같은 조상으로부터 유래되었으리라 추측된다.

2). *B. caldolyticus cdd* 유전자의 염기배열결정

Fig. 2-26 에서 보듯이 565 bp 단편내에 *cdd* 유전자의 ORF는 110위치의 GTG 코돈에서 시작되어, 508위치의 TAA 코돈으로 끝나며, 14,235 달톤의 분자량을 가지는 132 아미노산의 추론된 폴리펩티드를 구성한다. 강력한 Shine-Dalgano sequences인 'GAAAGGAAGA'가 번역개시코돈의 12개 뉴클레오타이드의 상류지역에 위치함을 발견하였다.

전사개시부위를 찾기 위한 프라이머 확장 분석을 통해 전사가 번역개시코돈인 GTG로부터 39 상류위치의 G에서 개시됨을 알 수 있었다 (Fig. 2-27). 암호화된 서열의 G+C함량은 56.1%이며 이러한 *cdd* 유전

자의 염기배열 결정 결과는 AF187304로 NCBI의 유전자은행에 등록되었다.

다. 유전자 발현의 극대화 및 유전자 산물의 대량생산

극한 내열성 효소인 cytidine deaminase의 대량생산: 재조합 균주 *E. coli* JF611/pCJH53의 효소 생산성을 높이기 위해 배양조건을 개선하여 그 효소활성을 비교하여 보았다. ampicillin과 cytidine이 첨가된 최소배지인 AB와 M9 배지에서 발현을 시켜 본 결과, M9 배지에 20% glucose와 20% tryptone을 첨가한 조건에서 높은 효소활성을 보였으며, 동일조건의 M9 배지에 3배의 phosphate salt를 첨가한 조건에서 더 높은 효소활성을 보였다 (Fig. 2-28, 29). 또한 *Bacillus*에서 cytidine deaminase의 안정한 생산과 항생제 첨가 농도에 따른 발현 양상의 극대화를 위해 (Jung *et al.* 1998, Tangney *et al*, 1995) *Bacillus* intergration vector인 pDL을 이용하여 *cdd* 유전자를 삽입한 pIJH53을 제조하여, *B. subtilis amyE*좌로 double-crossover시켜 극한내열성 *cdd* 유전자가 삽입된 재조합체 *B. subtilis* SM1 mutant를 제작하였다. 이 SM1 strain과 *B. subtilis*와 *B. caldolyticus*에서의 *cdd* 효소활성을 37℃와 60℃에서 각각 비교하였던 바, 재조합체는 타 균주보다 37℃, 60℃에서 월등히 높은 활성을 보였으며 37℃보다 60℃에서 약 3배 정도 높은 효소활성을 보였다.

라. 유전자 산물의 분리 및 정제

극한 내열성 cytidine deaminase의 정제 및 특성: *B. caldolyticus* DSM405 cytidine deaminase는 대장균 JF611/pCJH53의 초음파 파쇄액으로부터 정제되었고, DEAE ion exchange, Sephacryl S-200 column chromatography 및 FPLC를 통하여 순수 정제하였다. 전체의 정제 절차는 Table 2-7와 Fig. 2-30에 나타내었으며 정제된 효소는 마지막단

계에서 167.5 u/mg의 비활성이 나타났고, 원래의 초음파파쇄액보다 약 94배 정제되었다.

극한 내열성 cytidine deaminase의 분자량 결정: 정제된 단백질은 SDS-PAGE에서 약 15 kDa의 단일 밴드로 나타났고 (Fig. 2-31A) 이러한 값은 14,235 달톤인 추론된 폴리펩티드의 분자량과 일치한다. gel filtration을 통한 native 분자량은 약 57 kDa으로 나타났다(Fig. 2-31B). 이러한 결과는 *B. caldolyticus* cytidine deaminase의 57 kDa은 바실러스 서브틸리스 (58 kDa, 4×14.8 kDa), 인간 태반 (52 kDa, 4×13.5 kDa), 단핵구 세포 (64.4 kDa, 4×16.1 kDa) 효소에서 발견된 14 kDa monomer로부터 같은 subunits의 4량체로 구성되지만, *E. coli* (63.0 kDa, 2×31.5 kDa), *Hemophilus influenza* (63 kDa, 2×31.5 kDa) cytidine deaminase와는 다르게 구성됨을 알 수 있었다. 2량체와 4량체의 cytidine deaminase 두 타입의 존재를 설명하기 위하여 유전자를 암호화하는 조상의 2량체의 cytidine deaminase는 중복될지도 모르며, 그람음성세균인 대장균의 염색체에서 integration될지도 모른다고 추정하였다 (Bett *et al.*).

염기배열 결정 결과에서 추정된 cytidine deaminase의 분자량은 약 14,235 Da이며, gel filteration, liquid chromatograpy에 의하여 정제된 효소의 SDS-PAGE상에서의 결과와 일치하는 것으로 나타났으며, gel filteration에서 나타난 native 상태의 분자량이 약 57 kDa임을 감안할 때 이 효소는 분자량 15 kDa의 4개의 subunit가 중합된 tetramer 일 것으로 추정되었다.

마. Cytidine deaminase의 효소학적 성질

Hydrophobicity 비교: *B. psychrophilus, B. subtillis,* 및 *B. caldolyticus cdd*에 의해 코딩되는 아미노산배열의 hydrophobicity를 비교한 바 5'말단에서 최적생육온도가 높아질수록 hydrophobicity가 증가하는 것으로 보아 hydrophobicity와 내열성과의 연관 관계가 매우 높을

것으로 추정된다.

Cytidine deaminase에 대한 최적의 조건, 안정성, 역동학: 50mM Tris-Cl, pH 7.5에 있어서 50 mM cytidine과 정제된 효소의 반응혼합물이 다양한 온도 (37 ~ 90℃) 에서 30분 동안 incubation되었다. 효소활성은 표준 조건아래에서 70℃에서 최대로 나타났으며 (Fig. 2-32A), cytidine 탈아미노화에 대한 최적 pH는 7.5로 나타났다 (Fig. 2-32B).

효소의 열안정성을 측정하기 위해 37-90℃, pH 7.5에서 상대활성도를 측정하여 비교하였다 (Fig. 2-33). 효소는 70℃에서 3시간동안 열처리 후에도 그 활성이 유지되었으며, 75℃에서 150분 동안 열처리 한 후에는 초기활성의 약 50%의 효소활성이 소실되었고, 80℃에서는 60분동안 효소의 처리시에는 열안정성의 반감기가 나타났다. 이러한 결과는 정제된 cytidine deaminase가 다른 알려진 cytidine deaminase와 비교시 현저한 열안정성을 가진다는 것을 나타내며 내열성 유래의 효소임을 알 수 있었다.

Fig. 2-34 에서와 같이, cytidine에 대한 K_m, V_{max} 값은 각각 2.1 X 10^{-3} M, 36.4 mM $min^{-1}mg^{-1}$을 나타내었다.

Thin Layer Chromatography에 의한 cytidine deaminase 활성도 검정: 이 유전자 산물의 활성도를 TLC로 검정하기 위하여 silicagel plate에 기질과 효소의 반응액을 30분간 반응시킨 후 그 반응액을 spot하여 70% acetonitrille을 전개하였다. 그 결과 표준으로 사용한 cytidine 밴드가 상실되면서 uridine밴드위치에 전환되어 나타났음이 확인되었기에 본 효소는 기질인 cytidine을 deamination하여 uridine으로 전환하였든 것으로 확인되었다. 즉 본 효소는 transforming host인 *E. coli*에서 발현시 내열성을 가지며 cytidine을 uridine으로 deamination시킬 수 있음을 재확인 하였다.

Cytidine deaminase 활성의 effector: 금속이온에 대한 효소의 효과를 알아보기 위해 Table 2-8과 같이 다양한 2가 양이온에 대한 효소활성을 비교하여 보았다. 효소활성은 1 mM Fe^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}, Fe^{3+} 이온

의 저해로 유의하게 감소되었으나, Li^{2+}, Ba^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+} 이온의 위와 같은 농도에서 효소의 활성은 저해되지 않았다 (상대 활성 > 90%)

또한 효소는 pCMB (p-chloromercuribenzoic acid)에 의해 현저하게 저해되었다. Table 2-9에서 나타난것과 같이, 10^{-2} mM pCMB 처리시에 7%의 효소활성이 존재하였다. 이러한 결과는 *B. subtillus*와 인간 태반 cytidine deaminase에서도 일치되는 저해 효과가 관찰되었다.

monomer의 폴리펩티드내에 존재하는 6개의 thiol radical은 4량체의 구조형성에 중요한 역할을 한다. 효소는 pCMB를 제외하고 다른 sulfhydryl reagents에서는 충분히 저해되지 않는다. 이러한 이유는 아직 잘 알지 못하나, sulfurhydryl가 소수성 도메인 내에 위치하여 촉매활성을 가짐으로서 이러한 결과가 나타나는 것 같다.

4. Pyrimidine대사 관련 효소의 대량생산

가. *B. subtilis* 에서의 형질전환 효과

*Bacillus*에서 내열성 cytidine deaminase의 안정한 생산과 항생제 첨가 농도에 따른 발현 양상의 극대화를 위해 *Bacillus*를 이용한 형질전환실험을 수행하였다 (Chung and Miller, 1988.) Fig. 2-35 에서 나타난 것과 같이 형질전환 빈도는 SPI 배지에서 세포를 회수하는 시기와 SPII 배지에서 DNA를 첨가하는 시기를 조절함으로서 조절 될 수 있다. *B. subtilis* 를 SPI 배지에서 T1.0 point에서 회수한 후 SPII 배지에서 희석하여 90분 동안 더 배양하였을 때 최상의 형질전환 빈도를 나타내었다. 이 point에서 DNA를 세포에 첨가하였을 때 transformation 효과가 최대로 나타났다.

B. subtilis 168의 세포는 T1.0 point에서 회수되어 Spizizen 최소배지에 옮긴 후 pHPS9 형질전환 벡터를 첨가하였다. DNA를 첨가한 후 15, 30분 간격으로 세포를 회수하여 적당한 antibiotics를 첨가한 LB-agar medium에 spreading하였고, 형질전환 빈도는 Fig. 2-36 에서와 같이

전체 colony를 세어 결정하였다. 형질전환 효율은 세포들이 두 번째 단계에서 SPII에서 60분 후에 회수되었을 때 낮게 나타났다. 결과적으로 세포들은 성장기의 T1.0 point에서 새로운 배지를 이용하여 90분 동안 배양한 후 후 pHPS9을 첨가하였을 때 최대화되었다.

Bacillus subtilis 168을 이용한 형질전환은 3단계로 나타낸다.

1단계 성장배지에서의 T1.0

2단계 DNA를 첨가하기 이전의 형질전환 배지에서의 90분

3단계 DNA 접촉 기간에서의 30분

B. subtilis 168 형질전환에 대한 최적의 조건은 성장곡선 (Fig. 2-37)에서와 같다.

나. 통합용 벡터 pIJH53과 pGMH2의 구성

내열성 cytidine deaminase를 암호화하는 *cdd* 유전자를 포함하는 pCJH53으로부터 *Bam*HI/*Eco*RI 단편의 580개 염기쌍은 Fig. 2-38 에서처럼 통합벡터인 pDL의 동일한 부위로 삽입되어 잡종 플라스미드 pIJH53을 만들어, transformation을 통해 chloramphenicol 내성에 의해 selection 되었다.

또한 pCJH53으로부터 분리된 580bp *Xba*I/*Eco*RI 단편이 통합벡터인 pGEM7Zf(+)-*erm*에 ligation되었고, erythromycin 내성으로서 selection 되었다. 하나의 transformants로부터 *cdd* 유전자 단편이 삽입된 pGMH2를 분리하여 580bp *Xba*I/*Eco*RI 가 삽입됨을 검증하였다.(Fig. 2-39)

다. *B. subtilis* 염색체상에서의 증폭

E. coli MC1061로부터 준비된 hybrid pIJH53은 상기의 최적화된 형질전환 방법으로 *B. subtilis* 168로 형질전환 시켰다. host로 삽입된 hybrid pIJH53은 1차 double-crossover, 2차 single cross에 의해*B. subtilis* 168염색체의 *amy*E 좌위 (28°)에 tandem repeated 형식으로

삽입하였으나 cytidine deaminase 활성이 E. coli에서의 plasmid에 의한 증폭에 비해 크게 상승하지 않았다(Data not shown).

유전자 통합은 플라스미드를 포함하는 균주들과 비교함으로서 통합물의 더 높은 안정성과 유전자 산물의 효과적인 secretion, 효과적인 gene expression, 유전자 약제 효과에 의한 amplification으로 병합된 목표의 효소를 대용량 생산을 위한 장점을 가질지도 모른다. (Kallio *et al.*, 1987; Shendye and Rao, 1993). 내열성 cytidine deaminase의 생산은 이러한 방법으로 발전되었으며, 이 효소는 가까운 미래에 항 HBV 제제와 3TC, (lamivudine)의 항 HIV 제제로서의 생산에 기여하게될 것이다.

참고 문헌

Adams M.W.W., and R.M.Kelly :Enzymes isolated from microorganisms that grow in extreme environments, Chemical engineering news, 73, 51 32-42, 1995

Andersson J., Westman M., Hofer A., Sjoberg BM. 2000 Allosteric regulation of the class III anaerobic ribonucleotide reductase from bacteriophage T4. *J Biol Chem.* 275:19443-8.

Andersson J., Westman M., Sahlin M, Sjoberg BM. 2000 Cysteines involved in radical generation and catalysis of class III anaerobic ribonucleotide reductase. A protein engineering study of bacteriophage T4 NrdD. *J Biol Chem.* 275:19449-55.

Betts L, S. Xiang, S. A. Short, R. Wolfenden, C. W. Jr. Carter. Cytidine deaminase. The 2.3 Å crystal structure of an enzyme: Transition-state analog complex. *J. Mol. Biol.* 235: 635-656, 1994.

Belitsky BR. et al., An lrp-like gene of Bacillus subtilis involved in branched-chain amino acid transport., J Bacteriol. 1997 Sep; 179(17): 5448-5457.

Bradford MM., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., Anal Biochem. 1976 May 7; 72: 248-254.

Eliasson R, et al., Allosteric regulation of the third ribonucleotide reductase (NrdEF enzyme) from enterobacteriaceae., J Biol Chem. 1996 Oct 25; 271(43): 26582-26587.

Extremophiles, special issue of Federation of european microbiological Societies (FEMS) Microbiological Review, 18, 2-3, 1996

Fieschi F, et al., The manganese-containing ribonucleotide reductase of Corynebacterium ammoniagenes is a class Ib enzyme., J Biol Chem. 1998 Feb 20; 273(8): 4329-4337.

Fillingame R.H., & S. Divall., Bacteril reporters to pH. Wiley, Chiobester(Norvatis Foundation Symposium 221p218-234 (1999)

Fontecave, M., M. Lepoivre, E. Elleingand, C. Gerez, and O. Guittet. 1998. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. FEBS Letters 421:277-279.

Ghim SY, et al., Molecular characterization of pyrimidine biosynthesis genes from the thermophile Bacillus caldolyticus., Microbiology. 1994 Mar; 140(Pt 3): 479-491.

Glaser P, et al., Bacillus subtilis genome project: cloning and sequencing of the 97 kb region from 325 degrees to 333 degrees., Mol Microbiol. 1993 Oct; 10(2): 371-384.

J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis(1989), Molecular Cloning, Cold Spring Harber Laboratory Press, N. Y.

Jang, M., L. Cai, G. O. Udeani, K. V. Slowing, C. F. Thomas, C. W. W. Beecher, H. H. S. Fong, N. R. Farnsworth, A. D. Kinghorn, R. G. Mehta, R. C.

Jordan A, et al. Cloning and sequencing of the genes from Salmonella typhimurium encoding a new bacterial ribonucleotide reductase., J Bacteriol. 1994 Jun; 176(11): 3420-3427.

Jordan A, et al., B12-dependent ribonucleotide reductases from deeply rooted eubacteria are structurally related to the aerobic enzyme from Escherichia coli., Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Dec 9; 94(25): 13487-13492.

Jordan A, et al., Cloning and sequencing of the genes from Salmonella typhimurium encoding a new bacterial ribonucleotide reductase., J

Bacteriol. 1994 Jun; 176(11): 3420-3427.
Jordan A, et al., Promoter identification and expression analysis of Salmonella typhimurium and Escherichia coli nrdEF operons encoding one of two class I ribonucleotide reductases present in both bacteria. Mol Microbiol. 1996 Feb; 19(4): 777-790.
Jordan A, et al., Two different operons for the same function: comparison of the Salmonella typhimurium nrdAB and nrdEF genes., Gene. 1995 Dec 29; 167(1-2): 75-79.
Kallio, P., Palva, A., and Palva, I.:1987. Enhancement of α-amylase gene of *Bacillus. amyloliquefaciens* in the genome of *B. subtilis. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27: 64-71.
Lazarevic V, et al., Introns and intein coding sequence in the ribonucleotide reductase genes of Bacillus subtilis temperate bacteriophage SPbeta., Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Feb 17; 95(4): 1692-1697.
Madigan, M.T. and B.L. Marrs, Extremophiles, Scientific american, April, 66-71, 1997
Monteilhet C, et al., Purification and characterization of the in vitro activity of I-Sce I, a novel and highly specific endonuclease encoded by a group I intron., Nucleic Acids Res. 1990 Mar 25; 18(6): 1407-1413.
Mullis KB, et al., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction., Methods Enzymol. 1987; 155: 335-350.
Nygaard, P.(1993) Purine and pyrimidine salvage pathway, In A.L. Sonenshein, J.A. Hoch, and, R. Losick(ed), Bascillus subtilis and other gram-positive bacteria ; Bioochemistry, physilogy, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington D.C. 359-378.
R. E. Amelenxen and A. L. Murdock(1978), In Microbial Life in Extreme envionments, ed. D.J. Kushner, Academic press, London, 217-278
Scotti C, et al., The Bacillus subtilis genes for ribonucleotide reductase are similar to the genes for the second class I NrdE/NrdF enzymes of Enterobacteriaceae., Microbiology. 1996 Nov; 142(Pt 11): 2995-3004.
Service R.E, Microbiologists explore life's rich, hidden kingdoms, Science, 275, 1740, 1997).
Stetter, K. O. Hyoerthermophiles in the history of life, Evolution of hydrothermal ecosystems on earth (and Mars?), (G.R.Bock and J.A. Goode Ed), John Wiley & Sons , 1996
T.D. Brook(1978), thermophile Microorganisms and Life at High Temperature, Springer, N.Y.
Thomas P.S., Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose., Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 Sep; 77(9): 5201-5205.
Van de Casteele M. et al., Structure and expression of a pyrimidine gene cluster from the extreme thermophile Thermus strain ZO5., J Bacteriol. 1997 Jun; 179(11): 3470-3481.
Song, BH, BH. Kim, SY Kim 1998. Ribonucleotide reductase: Structure, Function, and Application, Bioindustry, 11(3):45-51.
Shendye A. and Rao, M. 1993. Chromosomal gene integration and enhanced xylanqse production in an alkalophilic thermophilic *Bacilius* sp.(NCIM59), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 195: 776-784.
Song B. H., and J. Neuhard. Chromosomal location, cloning and nucleotide sequence of the *Bacilus subtilis cdd* gene encoding cytidine/deoxycytidine deaminase. *Mol. Gen. Genet.* 216: 462-468, 1989.

Song B. H., M. S. Yoon, K. H. Kim, J. S. Yeo, and J. Neuhard. Enzymatic properties of cytidine deaminase encoded by *cdd* gene in *Bacillus subtilis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 16(6): 468-475, 1988.

Neuhard J. Utilization of preformed pyrimidine bases and nucleosides., In : Munch-Petersen A., (ed) Metabolism of nucleotides, nucleosides, and nucleobases in microorganisms. Academic Press, London, pp 95-148, 1983.

Janniere, L., Niaudet, B. and Ehrlich, S. D.1985. Stable gene amplification in the chromosome of *Bacillus subtilis*. *Gene 40*: 47-55

Tangney, M,. Jorgensen, P. L., Diderichsen, B., Jorgensen, S. T. (1995). A new method for integration and stable DNA amplification in poorly transformable bacilli. *FEMS Microbiol. Lett.*, 125: 107-114.

Kyung Hwa Jung, Dae-Hee, Ki-Hong Yoon and Seung-Hwan Park (1998). Integration and amplification of the Bacillus sp. 70-23 cellulase gene in the *Bacillus subtilis 168* chromosome. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 44 107-111

Mahmoudian, M., B. S. Baines, C. S. Drake, R. S. Hale, P. Jones, J. E. Piercey, D. S. Montgomery, I. J. Purvis, R. Storer, M. J. Dawson and G. C. Lawrence. 1993. Enzymetic production of optically pure(2'R-*cis*)-2'-deoxy-3'-thiacytidine(3TC, Lamivudine): a potent anti-HIV agent. *Enzyme Microb. Technol.*, 15: 749-755.

Chung, C. T., and R. H Miller, 1988. *B. subtilis* was transformed by the Method of Anagnostopoulos and Spizizen. *Nucleic Acids Res.* 16: 3580-3592.

Balzarini J. Effect of antimetabolite drugs of nucleotide metabolism on the anti-human immunodeficiency virus activity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors.

Chimploy K., Tassotto ML., Mathews CK. 2000 Ribonucleotide reductase, a possible agent in deoxyribonucleotide pool asymmetries induced by hypoxia. *Pharmacol Ther.* 87:175-187.

Zhu C., Johansson M., Karlsson A. 2000 The subcellular location of nucleoside analog phosphorylation is a determinant of synergistic effects of hydroxyurea. *Biochem Biophys Res Commun.* 16:179-82.

Advani SJ., Weichselbaum RR., Roizman B. 2000 The role of cdc2 in the expression of herpes simplex virus genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:10996-1001.

Nakano K., Balint E., Ashcroft M., Vousden KH. 2000 A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73. *Oncogene.* 19:4283-9.

Geffen DB., Horowitz J. 2000 Gemcitabine-induced severe extremity edema with muscle contractures and subsequent prevention with prednisone. *Isr Med Assoc J.* 2:552-3.

Hall IH., Lackey CB., Kistler TD., Ives JS., Beraldo H., Ackerman LJ., West DX. 2000 The cytotoxicity of symmetrical and unsymmetrical bis(thiosemicarbazones) and their metal complexes in murine and human tumor cells. *Arch Pharm (Weinheim).* 333:217-25.

Pawlik TM., Nakamura H., Yoon SS., Mullen JT., Chandrasekhar S., Chiocca EA., Tanabe KK. 2000 Oncolysis of diffuse hepatocellular carcinoma by intravascular administration of a replication-competent, genetically engineered herpesvirus. *Cancer Res.* 60:2790-5.

Braess J., Wegendt C., Jahns-Streubel G., Kern W., Keye S., Unterhalt M., Schleyer E., Hiddemann W. 2000 Successful modulation of high-dose cytosine arabinoside metabolism in acute myeloid leukaemia by haematopoietic growth factors: no effect of ribonucleotide reductase inhibitors fludarabine and gemcitabine. *Br J Haematol.* 109:388-95.

Lombardi A., Summa CM., Geremia S., Randaccio L., Pavone V., DeGrado WF: 2000 Inaugural article: retrostructural analysis of metalloproteins: application to the design of a minimal model for diiron proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:6298-305.

Liehr S., Barbosa J., Smith AB 3rd, Cooperman BS. 1999 Synthesis and biological activity of cyclic peptide inhibitors of ribonucleotide reductase. *Org Lett.* 1:1201-4.

Lori F., Lisziewicz J. 2000 Rationale for the use of hydroxyurea as an anti-human immunodeficiency virus drug. *Clin Infect Dis.* 2:S193-7.

Kotchetkov R., Krivtchik AA., Cinatl J., Kornhuber B., Cinatl J Jr. 1999 Selective cytotoxic activity of a novel ribonucleoside diphosphate reductase inhibitor MDL-101,731 against thyroid cancer in vitro. *Folia Biol (Praha).* 45(5):185-91.

Lori F., Lisziewicz J. 2000 Role of immune modulation in primary HIV infection. *J Biol Regul Homeost Agents.* 14:45-8.

Spear MA., Sun F., Eling DJ., Gilpin E., Kipps TJ., Chiocca EA., Bouvet M. 2000 Cytotoxicity, apoptosis, and viral replication in tumor cells treated with oncolytic ribonucleotide reductase-defective herpes simplex type 1 virus (hrR3) combined with ionizing radiation. *Cancer Gene Ther.* 7:1051-9.

Tamarit J., Gerez C., Meier C., Mulliez E., Trautwein A., Fontecave M. The activating component of the anaerobic ribonucleotide reductase from Escherichia coli. An iron-sulfur center with only three cysteines. *J Biol Chem.* 275:15669-75.

Guittet O., Decottignies P., Serani L., Henry Y., Le Marechal P., Laprevote O., Lepoivre M. 2000 Peroxynitrite-mediated nitration of the stable free radical tyrosine residue of the ribonucleotide reductase small subunit. *Biochemistry.* 39:4640-8.

Huque Y., Fieschi F., Torrents E., Gibert I., Eliasson R., Reichard P., Sahlin M., Sjoberg BM. The active form of the R2F protein of class Ib ribonucleotide reductase from Corynebacterium ammoniagenes is a diferric protein. *J Biol Chem.* 275:25365-71.

Liu A., Graslund A. 2000 Electron paramagnetic resonance evidence for a novel interconversion of 3Fe-4S(+) and 4Fe-4S(+) clusters with endogenous iron and sulfide in anaerobic ribonucleotide reductase activase in vitro. *J Biol Chem.* 275:12367-73.

Sirovatka JM., Finke RG. 2000 Hydrogen abstraction from thiols by adenosyl radicals: chemical precedent for thiyl radical formation, the first catalytic step in ribonucleoside triphosphate reductase from Lactobacillus leichmannii. *J Inorg Biochem.* 78:149-60.

Table 2-1. Primer sequences for isolation of *Methanopyrus kandleri nrd* gene.
Table 2-2. Primer sequences for isolation of extended *Methanopyrus kandleri nrd gene.*
Table 2-3. Primer sequences for isolation of *Bacillus caldolyticus nrd* gene.
* Restriction site was denoted by bold and italic.
Table 2-4. Comparison of the *S. typhimurium atp* genes with the corresponding *E. coli ones.*
Fig. 2-1. Diagram of primer design and the genetic structure of the *B. subtilis nrd* gene.
Fig. 2-2. Amplified *B. caldolyticus* and *M. kandleri* chromosomal segments by using PCR primers complemented from *B. subtilis nrd* genes. *B. subtilis* (lane 1,2), *B. caldolyticus* (lane 3,4) and *M. kandleri* (lane 5,6) chromosomal DNA were subjected to the primers NEF/NEB and NFF/NFB respectively, except substitution of NF/NEB in lane 3. M represents 1kb ladder as a size marker.
M : 1kb ladder
1 : *B. subtilis* - NEF/NEB 4 : *B. caldolyticus* - NFF/NFB
2 : *B. subtilis* - NFF/NFB 5 : *M. kandleri* - NEF/NEB
3 : *B. caldolyticus* - NF/NEB 6 : *M. kandleri* - NFF/NFB
Fig. 2-3. Isolation of *B. caldolyticus* nrd F by amplifying the genes with PCR using various probes. The primers were designed by synthesizing complementary sequences of the B. subtilis nrd E and F vicinity region. Abbreviations; Lane 1; Primer NF/NFB, 2; Primer NF/NEB, 3; Primer NEF/NEB, 4; Primer NFF/NFB, and M; 1Kb ladder
Fig. 2-4. Various chromosomal segments of putative *B. caldolyticus nrd* genes by PCR amplification. Various fragments were recovered by shot-gun cloning from the PCR products.
Fig. 2-5. Nuclotide sequence of various B. caldolyticus chromosomal DNA segments. B. caldolyticus and M. kandleri DNAs recovered from using primers Nf/Er(pBCE), Ff/Fr(pBCF), Ef/Eb(pMCE), and Ff/Fr(pMCF) were represented at sequence markers.
Fig. 2-6. Nucleotide sequence alignment of pBCE 7 and *B. subtilis nrd*F. Same nucleotide was denoted by astrisk. Start codon of *B. subtilis nrd*F was denoted by shaded box.
Fig. 2-7. Southern blotting of the *nrd* gene by probing the *B. subtilis nrd* F gene.
The blotting was performed at 65℃. The *EcoR*I fragments of *B. subtilis* chromosome (lane 1 & 2), *B. stearothermophilus* (3), *B. caldolyticus* (4), and the PstI fragments of *B. subtilis* chromosome (lane5 & 6), *B. stearothermophilus* (7), *B. caldolyticus* (8), and 1Kb ladder as a marker (M), were blotted with the B. subtilis nrdF gene.,
Fig. 2-8. Southern blotting of the *nrd* gene by probing the *B. subtilis nrd* F gene at different conditions, 55℃. All

abbreviations were the same as Fig. 2-7.

Fig 2-9. Southern blotting of the *nrd* gene by probing the *B. subtilis nrd* F gene at different conditions, 45℃. The *EcoR*I fragments of *B. subtilis* chromosome (lane 1), *B. stearothermophilus* (2), *B. caldolyticus* (3), *M. kandleri* (4) and the PstI fragments of *B. subtilis* chromosome (lane5), *B. stearothermophilus* (6), *B. caldolyticus* (7), *M. kandleri* (8) and 1Kb ladder as a marker (M), were blotted with the *B. subtilis nrdF* gene.,

Fig.2-10 PCR for *M. kandleri nrd* gene isolation.

Fig.2-11 Isolation of pMK3,4.
Each plasmids were double digested by *Eco*R I and *Pst* I.

Fig. 2-12. The BLAST search result of pMK 41

Fig. 2-13 Determined nucleotide sequence of pMK41 was included partial *nrd*D *gene* of *M. kandleri.*
Primer 1, 2, and 3 were indicated by underline. DNA synthesize direction was indicated by arrow, below each primers.

Fig. 2-14 Result of PCR for partial *M. kandleri nrd* gene extention.

Fig. 2-15 Nucleotide and derived amino acid sequence of partial *M. kandleri nrd*D gene's complementing region.

Fig. 2-16 Alignment of partial NrdD from *M. kandleri* with classIII RNRs.
The NrdD sequence are from *E. coli*(ECOL), *H. influenzae*(HINF), phage T4(PHT4), *L. lacticus*(LLAC), *M. thermoautotrophicum*(MTHE), *M. jannishi*(MJAN), and *M. kandleri*(MKAN). Residues conserved in all sequence are marked by asterisks. A consensus motif is underlined. Three conserved cysteine residues are boxed.

Fig. 2-17. Results of plaque hybridization and southern hybridization with pMK41.
SQ1 plaque hybridization with pMK41 at 65℃(A). SQ1 plaque λ DNA extracted and hybridization with pMK41(B).

Fig. 2-18. A result by the BLAST search for an ORF of *M. kandleri nrd* gene.

Fig. 2-19. Alignment of partial NrdD from *M. kandleri* with classIII *ribonucleotoide reductase*s.
The NrdD sequence are from *E. coli*(ECOL), *H. influenzae*(HINF), phage T4(PHT4), *L. lacticus*(LLAC), *M. thermoautotrophicum*(MTHE), *M. jannishi*(MJAN), and *M. kandleri*(MKAN). Residues conserved in all sequence are marked by asterisks. A consensus motif is underlined. Three conserved cysteine residues are boxed. The potential radical sites are indicated in boldface.

Fig. 2-20. Various chromosomal segments of putative *M. kandleri nrd* genes by PCR amplification.

Fig. 2-21. Sequence identity of *atp* gene of *E. coli* vs. *S. typhimurium*. The *atp* B(a) gene(A), *atp*G(γ) gene(B),

and *atp* D(β) gene(C), were compared with each other.

Fig. 2-22. Structure of *atp operon* (about 8.0 kb) in *S. typhimurium*.

Fig. 2-23. Construction of pCJH53 harboring the *B. caldolyticus cdd* gene encoding cytidine deaminase
A) Diagram of pCJH53. A 565 bp DNA fragment containing the *cdd* gene of thermophile *B. caldolyticus* was inserted into the *Bam*HI/*Pst*I site of pDIA5304, and designated as pCJH53. B) Restriction fragment of pCJH53. *Bam*HI/*Pst*I insert was identified as 600 bp.

Fig. 2-24. Southern hybridization of *B. caldolyticus* genomic DNA with deduced *cdd* gene PCR product.
A, 1% agarose gel electrophoretic pattern. B, Southern blot pattern. Lane M, λ DNA digested with *Hind*III; lane 1, chromosomal DNA digesed with *Ava*I; lane 2, chromosomal DNA digesed with *Eco*RI; lane 3, chromosomal DNA digesed with PstI; lane 4, chromosomal DNA digesed with *Sal*I; lane 5, chromosomal DNA digesed with *Bam*HI-*Pst*I; lane 6, chromosomal DNA digesed with *Eco*RI-*Pst*I; lane 7, chromosomal DNA digesed with *Bam*HI-*Eco*RI; lane8, chromosomal DNA digesed with *Sau*3AI; lane 9, chromosomal DNA digesed with *Bam*HI. Arrows indicate the bands which are specifically hybridized with the PCR clone.

Fig. 2-25. Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of cytidine deaminase from several *Bacillus* sp. : Bcal; *B. caldolyticus,* Bste; *B. stearothermophilus,* Bsub; *B. subtilis* (U18532), Bpsy; *B. psychrophilus* (AJ237978) Exposed regions indicate active domains and arrows denote the conserved cysteines involved in Zn binding. Asterisks represent conserved residues found in all members of the cytidine deaminase family.

Fig. 2-26. Nucleotide and deduced amino acid sequence for the *B. caldolyticus cdd* gene
The deduced amino acid sequence of the *cdd* gene is shown below the nucleotide sequence by single letter designations. The -35, -10 box, SD sequence and the transcription start point (+1) are indicated by an underlined and an arrow, respectively. The underlined sequence, GTG is a start codon of *cdd* gene and the TAA stop codon is indicated with asterisks below the sequene. The right numbers indicate the position of the nucleotide and amino acid, respectively. The sequence data have been submitted to the GenBank nucleotide sequence database under accession number AF187304.

Fig. 2-27. Identification of the transcriptional initiation site by primer extension
Oligonucleotide primer W1 (24mer : 5'-cttcgagtacggcacgta ggcgag-3') was used. The sequencing was performed with the same primer and the ladder indicates G,A,T,C

and G reactions from left to right. Extended primers complement to the mRNA indicate in lane 1 and the sequence of matched area denote in right side. The start sites marked by asterisks.

Fig. 2-28. Variation of the cytidine deaminase activity from sonic extracts of the cells cultured in differant medium.
In AB and M9 media with combinatorial supplementation of glucose/glycerol and tryptone/casamino acid (CAA), the cells were cultured and the CDase activity were compared.

Fig. 2-29. Variation of cytidine deaminase activity according to the growth pH and phosphate concentration.
An M9 medium containing glucose and tryptone was varied by supplementing three fold high concentration of phosphate salt and decreasing the acidity to pH 6.3.

Fig. 2-30. Column chromatogram of *E. coli* JF611/pCJH53 cytidine deaminase.
A) DEAE-Sepharose column chromatogram was previously equilibrated with 50 mM Tris-HCl (pH 8.0). Sonic lysate was applied to the column after ammonium sulfate precipitation and adsorbed components was eluted by a linear gradient of NaCl. B) Fraction containing enzyme from A was recovered and subjected to Sephacryl S-200 column (2 x 90 cm) equilibrated with 50 mM Tris-HCl (pH 8.0). The column was eluted with the same buffer at a flow rate of 50 drops/fraction. C) Fraction containing enzyme from B was recovered and subjected to FPLC-Q2 column. Elution methods are described in Materials and Methods. --●--, absorbancy at 280 nm; --■--, cytidine deaminase activity; -----, NaCl concentration.

Fig. 2-31. Electropherogram of purified cytidine deaminase.
A) Plasmid-coded polypeptide of *E. coli* JF611/pCJH53 by homogeneous preparation was separated in 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Arrows indicate that 15-kDa of the plasmid-coded polypeptide in electropherogram. B) Chromatogram of the native enzyme by Sephacryl S-200 column. Void volume (V_o) with blue dextran, and protein density at 280 nm absorbancy were determined. Molecular markers used as standards were as follows: bovine serum albumin (a, MW. 68 and b, 45 kDa), chymotrypsinogen A (c, MW. 25 kDa), cytidine deaminase (arrow), and other proteins. A Sephacryl S-200 column (1.3 x 65 cm) was used by elution with Tris-Cl (pH 7.0). Arrows indicate 57 kDa of the native enzyme in gel filtration.

Fig. 2-32. Optimum temperature and pH on the cytidine deaminase activity
Relative activity of the cytidine deaminase was determined at various temperatures (37 ~ 100℃) at pH 7.5. Relative activity of the cytidine deaminase was

measured at various pHs (3.5 ~ 9.0) using 100 mM buffers of citric acid (pH 4.0 ~ 7.0), acetate (pH 5.0 ~ 5.5), phosphate (pH 6.0 ~ 8.0), Tris-Cl (pH 7.0 ~ 9.0), and borate (pH 8.0 ~ 10.0) at optimal temperature.

Fig. 2-33. Thermostability of purified enzyme
Purified enzyme in Tris-buffer (50 mM, pH 7.5) was incubated at various temperatures and residual activities at various time intervals were assayed by the standard assay method.

Fig. 2-34. Determination of K_m value for cytidine by Lineweaver-Burk plot. The plot is based on the rearrangement of the Michaelis-Menten equation into a linear form. Reaction mixture of purified cytidine deaminase and various concentrations of substrate were incubated at 70℃ for determination of the conversion rate of cytidine into uridine.

Fig. 2-35. Transformation efficiency depending on the time of incubation of the cultures in SPI medium.
At the indicated time, *B. subtilis* 168 cells grown in SPI medium were transferred to fresh SPII medium and 90 min in SPII medium, and subsequently exposed to the pHPS9 (10 μg/ml) for 30 min. The symbol Tn means n hours after the end of the log phase.

Fig. 2-36. Transformant variation after interals addition of DNA (10 μg/mL) for 15 min interval during the second growth phas
After the strains was transferred to the SPII medium, DNA was added the cells for 15-min intervals. Five hundreds microliter of culture in SPII medium was incubated with transforming pHPS9 (10 μg/ml) for 30 min. The number of transformants were determined by the colony count on LB agar with Cm 5μg/ml after 24 hr of incubation following plating.

Fig. 2-37. The growth phase of *B. subtilis* 168 under the optimal conditions for competent cell transformation.
The curve depict growth during the $T_{1.0}$ at the first medium and 10-fold dilution in fresh medium at the second growth. First phage : Growth during the first stage ($T0_{1.0}$), Second phage : Growth during the second stage (90 min) DNA added to after 90 min in second medium.

Table 2-1. Used primer sequences

Primer	Sequence	Source
PYF	5'-GGTATAATAACCAATGACCCAAC-3'	Takara shuzo co.
PYB	5'-GGATCAAGAGAAATAGAGAAGAAAA-3'	〃
MTF	5'-GCCAACAGAGAAATAGATAAGGC-3'	〃
MTB	5'-GCCAGGGAAAAGATTAGCATG-3'	〃
THF	5'-CATGGCATTGTTATGAATAAACAATG-3'	〃
THB	5'-GAGGAGAATACTGAGCGATCAC-3'	〃
ARF	5'-GTAACTACCAATAATGATGAGAGCC-3'	〃
ARB	5'-CCTTCAATAGATGCTCTCGAAGG-3'	

Table 2-2. Used primer sequences.

Primer	Sequence	Source
MP1	5'-GTGCTTGGCGGGCTTGCTC-3'	Takara shuzo co.
MP2	5'-CTTCCTAGAGGACGAGCCC-3'	〃
MP3	5'-GAGCTCGCCTTCGAAGTC-3'	〃
RD1	5'-NAATATN-3'	〃
RD2	5'-NNGAATTC-3'	〃

Table 2-3. Used primer sequences.

Primer	Sequence	Restriction site	Source
NF	5-'CTAG***GAGCTC***GGGCCCTAATGAGTCTGCCC-3'	SacI	Takara shuzo co
NEF	5'-CTAG***GAGCTC***GAGCGGCAACAAAGTATGGGG-3'	SacI	〃
NEB	5'-CTAG***CCCGGG***GCAATCTCTTCCGGAAGCCAG-3'	SmaI	〃
NFF	5'-CTAG***GAGCTC***GACACAATGACGACCCGAG-3'	SacI	〃
NFB	5'-CTAG***CCCGGG***CGTCCATTTTTCCCATGGG-3'	SmaI	〃

* Restriction site was denoted by bold and italic.

Table 2-4. Comparison of the *S. typhimurium atp* genes with the corresponding *E. coli ones.*

atp gene	*E. coli*	*S. typhimurium*	Sequence homology
	bp/a.a M.W(kDa)		Nucleotide/amino acid(%)
I	393/130 14.07	393/130 14.07	100/100
B	816/271 30.30	816/271 30.30	100/100
E	243/79 8.25	243/79 8.25	100/100
F	471/156 17.23	471/156 17.33	94/97
H	534/177 19.33	534/177 19.34	91/94
A	1542/513 55.33	1536/511 54.81	93/93
G	864/287 31.58	864/287 31.55	93/93
D	1383/460 50.33	1383/460 50.31	99/99
C	420/139 15.07	N.D.*	N.D.*

* Not yet determined.

Table 2-5. Primer design for PCR cloning from *B. subtilis and B. stearothermophilus cdd* gene.

	Primer sequence
5'-Primer	P1 : 5'-ACA*GGATCC*GGGTTGCTGTCATCATCGGGGCGCTG-3'
	P2 : 5'-ACA*GGATCC*AATTCTAATTTTTCTGTTACATTTTTG-3'
3'-Primer	P3 : 5'-ACA*CTGCAG*GATTTTCCTACGTTCGGTCTTCC-3'
	P4 : 5'-ACA*CTGCAG*GCGCCACTTTCATCATAAAATCGCC-3'

Table 2-6. Cytidine deaminase activity in crude extracts of various bacteria at different assay temperatures*

Strain / Plasmid	*cdd* genotype**	Enzyme activity***	
		37℃	65℃
*B. subtilis*168	cdd^{+}_{BS}	132	124
*B. caldolyticus*DSM405	cdd^{+}_{Bc}	46	129
E. coliJF611/pCJH53	$cdd^{-}_{Ec}/cdd^{+}_{Bc}$	1752	6713

* : Strains were grown in minimal medium at 37℃ for *E. coli* and *B. subtilis* and at 65℃ for *E. coliJF611*/pCJH53. Cells during exponential growth were harvested and sonicated. CDase activity from various cell extracts were assayed at 37℃ and 65℃.

** : cdd^{+}_{BS}, the wild-type *B. subtilis cdd* gene; cdd^{+}_{Bc}, the wild-type *B. caldolyticus cdd* gene; and cdd^{-}_{Ec}, the *E. coli cdd* recombinant.

*** : Specific activity is defined as the amount of enzyme which will deaminate 1 mmol of cytidine/min at 37 and 65℃.

Table 2-7. Purification of the cytidine deaminase from *Bacillus caldolyticus*

Purification step	Total protein (㎎)	Total activity (U)[a]	Specific activity (U/㎎)	Purification (fold)	Yield (%)
Cell-free extract	350	621.1	1.8	1	100
$(NH_4)_2SO_4$ precifitation	255	552.8	2.2	1.2	89.0
DEAE-Sepharose	18	292.6	16.3	9.2	47.1
Sephacryl S-200	8.3	141.0	16.9	9.4	22.7
FPLC	0.34	56.9	167.51	94.4	9.2

(U)[a] One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme which deaminated 1 mmol of cytidine per minuate at 65℃.

Table 2-8. Effect of metal ions on the cytidine deaminase ativity

Metal ions	Relative activity (%)	
	1 mM	10 mM
1. $LiCl_2$	94.4	102.7
2. $FeCl_2$	1.3	0.005
3. $BaCl_2 \cdot 2H_2O$	89.6	85.8
4. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	93.6	89.0
5. $ZnCl_2$	76.6	28.2
6. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	91.9	74.8
7. $CuCl_2$	0	1.6
8. $CoCl_2 \cdot 2H_2O$	78.2	7.2
9. $NiCl_2 \cdot 2H_2O$	75.5	41.9
10. $HgCl_2$	0	0
11. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0	0
12. $MnCl_2 \cdot 4H_2O$	88.1	61.3
13. EDTA	93.6	90.6
14. None	100	100

Table 2-9. Effect of sulphydryl reagents on the cytidine deaminase activity

Metal ions	Relative activity (%)	
	1 mM	10 mM
1. p-chloromercuri	10^{-2} mM	6.9
-benzoate	10^{-3} mM	94.9
2. Iodoacetate	101.3	0
3. Cystein	98.8	95.6
4. Dithiothreitol	86.3	85.5
5. Mercaptoethanol	98.9	99.6
6. Urea	84.6	81.4
7. None	100	100

Table 2-10. Cytidine deaminase activities in crude extracts of various Bacteria at different assay temperature.

a) Strain/ plasmid	b) *cdd* genotype	c) Cytidine deaminase specific activity	
		37 ℃	60 ℃
B. subtilis 168	cdd^{+}_{Bs}	96	86
B. subtilis SM1	$cdd^{+}_{Bs}/cdd^{+}_{Bc}$	84	175
B. subtilis SM2	$cdd^{+}_{Bs}/cdd^{+}_{Bc}$	172	178
B. caldolyticus	cdd^{+}_{Bc}	68	107

a) Strains were grown in rich medium containging of 0.8% nutrient broth 0.8%, yeast extract 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025%, KCl 0.1%at 37℃ for *B. subtilis* strains and at 65℃ for *B. caldolyticus*. Cells during exponential growth were harvested and sonicated. Cytidine deaminase cell extracts wereassayed at 37℃ and 65℃.

b) cdd^{+}_{BS} indicates the wild-type *B. subtilis* cwild-type *B. caldolyticus cdd* gene : $cdd^{+}_{Bc}/cdd^{+}_{BS}$, the *B. subtilis cdd* mutant gene.

c) The unit of specific activities are shown as nmol of product formed per mg protein per min

Fig. 2-1. Diagram of primer design and the genetic structure of the B. subtilis nrd gene.

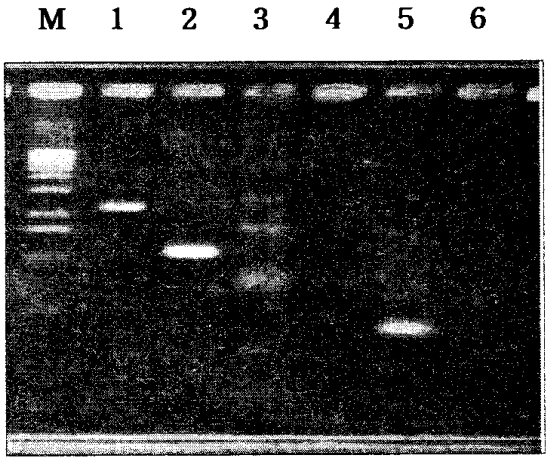


Fig. 2-2. Amplified B. caldolyticus and Methanopyrus kandleri chromosomal segments by using PCR primers complemented from B. subtilis nrd genes. B. subtilis (lane 1,2), B. caldolyticus (lane 3,4) and Methanopyrus kandleri (lane 5,6) chromosomal DNA were subjected to the primers NEF/NEB and NFF/NFB respectively, except substitution of NF/NEB in lane 3. M represents 1kb ladder as a size marker.

M : 1kb ladder
1 : *B. subtilis* chromosome - NEF/NEB
2 : *B. subtilis* chromosome - NFF/NFB
3 : *B. caldolyticus* chromosome - NF/NEB
4 : *B. caldolyticus* chromosome - NFF/NFB
5 : *M. kandleri* chromosome - NEF/NEB
6 : *M. kandleri* chromosome - NFF/NFB

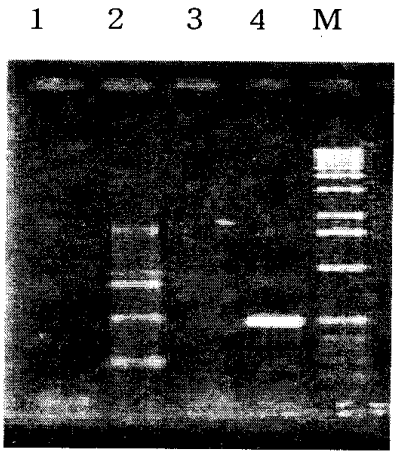
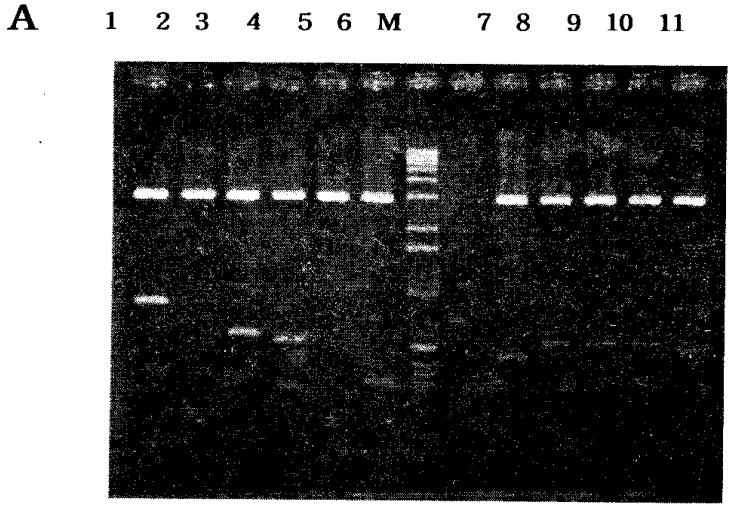
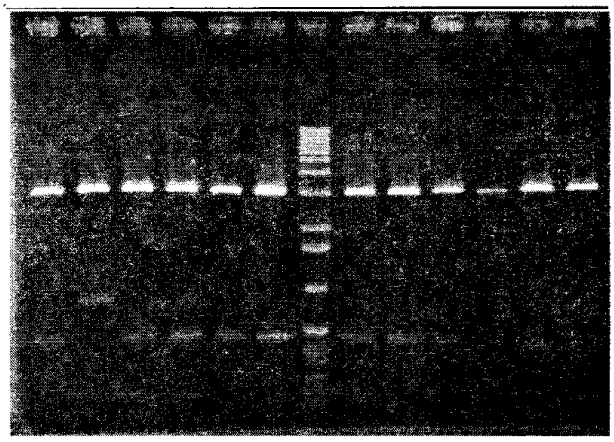


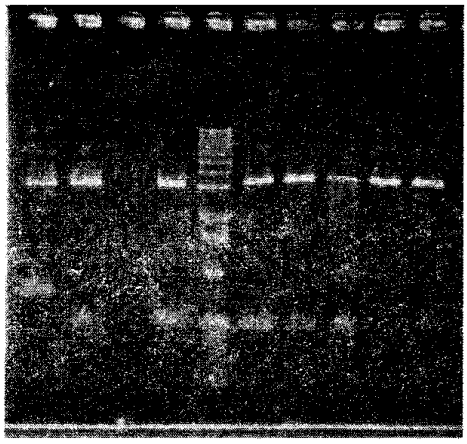
Fig. 2-3. Isolation of *B. caldolyticus* nrd F by amplifying the genes with PCR using various probes. The primers were designed by synthesizing complementary sequences of the B. subtilis nrd E and F vicinity region. Abbreviations; Lane 1; Primer NF/NFB, 2; Primer NF/NEB, 3; Primer NEF/NEB, 4; Primer NFF/NFB, and M; 1Kb ladder



12 13 14 15 16 17 M 18 19 20 21 22 23



B 1 2 3 M 4 5 6 7 8



C M2 1 2

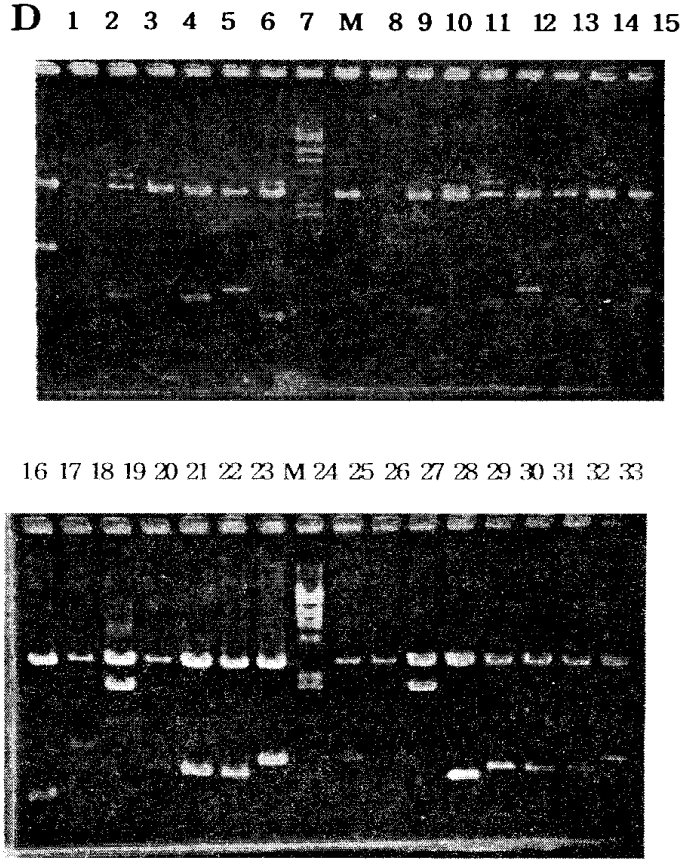


Fig. 2-4. Various chromosomal segments of putative B. caldolyticus nrd genes by PCR amplification. Various fragments were recovered by shot-gun cloning from the PCR products.

pBCE 7 1 2 3 4 5 6 7 8

GGGAATTCGATTCTAGCCCGGGGCAATCTCTTCCGGAAGCCAGGAGTGTACGAAGTGGCGGCGGACGCCCCGCGTTCGCGA

TGTTATCGCCCTAGCCGGCGGATTGACGGACGAGGCGGATGAAACGAAAATCAATCTGGCGGCAAAAGTGCGCGATGAGA

TGATGATTTACGTGCCGGCAAAAGAGGAGGCCGCACCAGCGTCAGATGCCGTCGGCGGGTCTCCAAGCGATGAGCTCGGG

CGGGCCGCAATGGCGGTCAATACGGCGACGAAAGATTATCCACTTCC

Fig. 2-5. Nuclotide sequence of pBEC7 DNA segment. B. caldolyticus and M. kandleri DNAs recovered from using primers Nf/Er(pBCE), Ff/Fr(pBCF), Ef/Eb(pMCE), and Ff/Fr(pMCF) were represented at sequence markers.

```
pBCE7          ----------------------------------------------GATTCTAGCCCG
B. Sub nrdF    TGATTAAAGGAGAGTTTATAGTGACAAAAATTTATGACGCAGCAAACTGGTCAAAGCATG
                                                             * *  *** *

pBCE7          GGGCAATCTCTTCCGGAAGCCAGGAGTGTACGAAGTGGCGGCGGACGCCCGCGTTCGCGA
B. Sub nrdF    AAGACGATTTTACCCAAATGTTCTAT--AACCAAAACGTGAAACAGTTCTGGCTTCCGGA
                 *    * * **  **      *   ** **  * *   *  * * ***  **

pBCE7          TGTTATCGCCCTAGCCGGCGGATTGACGGACGAGGCGGATGAAACGAAAATCAATCTGGC
B. Sub nrdF    AGAGATTGCTTTAAACGGCG-ATCTCCTCACATGGAAG-TACCTCGGAAA--AAATGAGC
                * ** **  **  ***** **   *  **  **  * *    ** *** **    **

pBCE7          GGCAAAAGTGCGCGATGAGA-TGAT--GATTTACG-TGCCGGCAAAAGAGGAGGCCGCAC
B. Sub nrdF    AGGACACTTATATGAAGGTACTGGCCGGACTTACGCTTCTTGACACAGAGCAGG--GGAA
                * * *  *   ** *  * **   ** ***** * *  *  * **** ***  * *

pBCE7          CAGCGTCAGATGCCGTCGGCGGGTCTCCAAGC-GATGAGCTCGGGCGGGCCGCAATGGCG
B. Sub nrdF    TACGG--GGATGCCGATCGTGGCTGAACACGTAGATGGCCACCAGCGGAAAGCGGTGCTG
                * *   *******   * ** *   ** *  ****  * *  ****   **  **  *

pBCE7          GTCAATACGGCGACGAAAGATTATCCACTTCC----------------------------
B. Sub nrdF    AACTTTATGGCGATGATGGAGAACGCTGTCCATGCGAAGTCGTACTCTAATATTTTCATG
                 * ** ***** **  **  *  *  * *
```

Fig. 2-6. Nucleotide sequence alignment of pBCE 7 and *B. subtilis nrd*F. Same nucleotide was denoted by astrisk. Start codon of *B. subtilis nrd*F was denoted by shaded box.

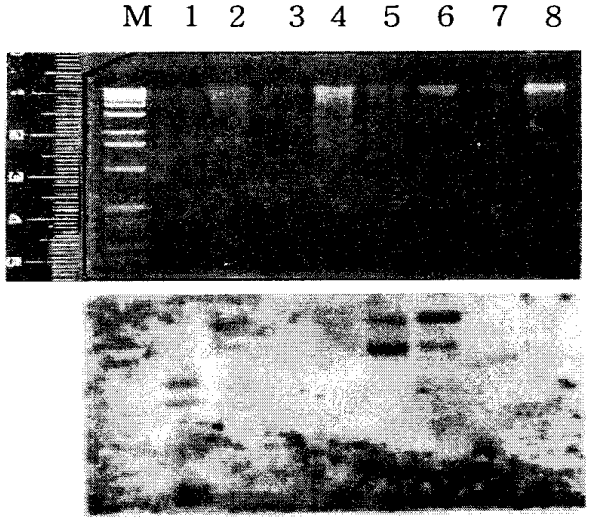


Fig. 2-7. Southern blotting of the *nrd* gene by probing the *B. subtilis nrd* F gene. The blotting was performed at 65℃. The *EcoR*I fragments of *B. subtilis* chromosome (lane 1 & 2), *B. stearothermophilus* (3), *B. caldolyticus* (4), and the PstI fragments of *B. subtilis* chromosome (lane5 & 6), *B. stearothermophilus* (7), *B. caldolyticus* (8), and 1Kb ladder as a marker (M), were blotted with the B. subtilis nrdF gene.,

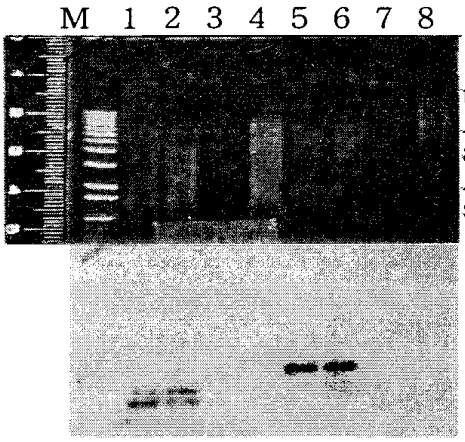


Fig. 2-8. Southern blotting of the *nrd* gene by probing the *B. subtilis nrd* F gene at different conditions, 55℃. All abbreviations were the same as Fig. 5.

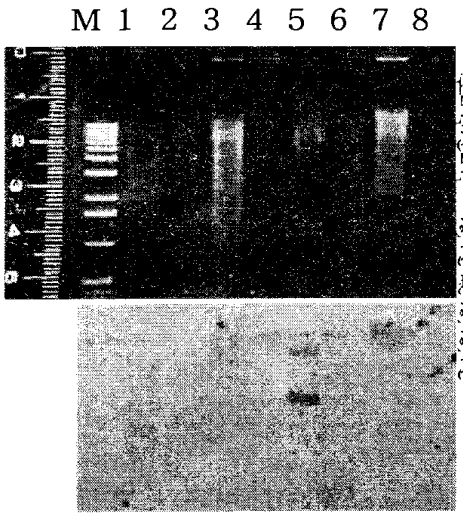


Fig 2-9. Southern blotting of the *nrd* gene by probing the *B.subtilis nrd* F gene at different conditions, 45℃. The *EcoR*I fragments of *B. subtilis* chromosome (lane 1), *B. stearothermophilus* (2), *B. caldolyticus* (3), *M. kandleri* (4) and the PstI fragments of *B. subtilis* chromosome (lane5), *B. stearothermophilus* (6), *B. caldolyticus* (7), *M. kandleri* (8) and 1Kb ladder as a marker (M), were blotted with the *B. subtilis nrdF* gene.,

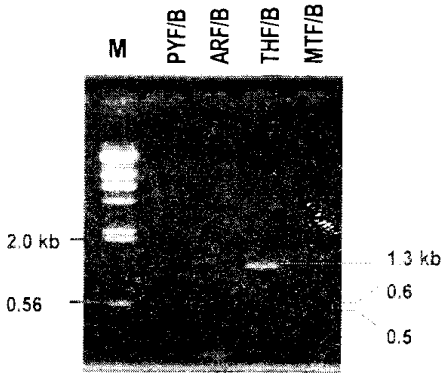


Fig.2-10 PCR for *M. kandleri nrd*

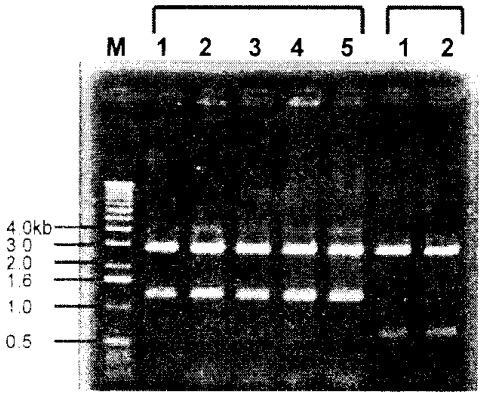


Fig.2-11 Isolation of pMK3,4 gene isolation.
Each plasmids were double digested by *Eco*R I and *Pst* I.

Methanococcus jannaschii Identities = 73/154 (47%), Positives = 94/154 (60%)

```
Query: 292 NANMLPTPEVISKIFQDRWQKRHFLKHVLDGKTARAHLEGYIHIHDLDYALTRSNCCQHD 471
           NAN++  PE I K   D   K++ L  +     A AH++G IH+HDL+YA TR  C QHD
Sbjct: 187 NANLMYNPESIHKWVADETMKQYALLAIFPKHIADAHIKGDIHLHDLEYAATRPVCLQHD 246

Query: 472 CRWVLKYGLYARNPIGRLTCVSKPAKHAEVAVLHILKWLMTSQNFFAGGQGQDFVNFLVA 651
            R  KYGL   +  G  T VSKPAKH EVA+ H  K +M +Q   +GGQ  D  N  +A
Sbjct: 247 LRPFFKYGLKV-DGTGLHTSVSKPAKHPEVAIQHAAKVMMAAQTNMSGGQSIDEFNVWLA 305

Query: 652 PYIAEEGLSYEEIRQLAQIMMFEATQDLVARGGQ 753
           PY+   GLSYE+I+QL Q+ ++E  Q  VARGGQ
Sbjct: 306 PYV--RGLSYEKIKQLMQMFIYELNQMYVARGGQ 337

Identities = 44/91 (48%), Positives = 62/91 (67%)

Query: 760 FTNVNLELTCPDFLEDEPAVGPGGEIVGTYGDFEEEAIMFARALLDVQLEGDAAGAPLKF 939
           F+++NLEL  P+FL+D+PAV   G   GTYGD+EEEA +   AL+DV +EGDA G P  F
Sbjct: 793 FSSINLELEIPEFLKDKPAV-IAGTTRGTYGDYEEEAKLILEALVDVMMEGDAMGKPFLF 851

Query: 940  PQIIVKVRP-GYDKETLELAFEV---AAENGAVYF 1032
             P  I+K+R   +  E  EL +++   +A+ G  YF
Sbjct: 852  PNFIIKLRENAFKDENKELMYKIHQLSAKFGIPYF 886
```

Fig. 2-12. The BLAST search result of pMK 41

1 2 3 4 5 6 7 8

GATGTACGGGCTGTACGCTCGGAACCCGATCGGTCGGCTGACCTGCGTGAGCAAGCCCGCCAAGCACGCGGAGGTGGCCG

MP1

TGTTACACATCCTGAAGTGGCTGATGACCTCGCAGAACTTCTTCGCGGGCGGCCAAGGTCAGGACTTCGTTAACTTCCTA

GTAGCCCCTTATATAGCCGAGGAGGGACTGTCTTACGAGGAGATACGGCAGCTCGCCCAGATCATGATGTTCGAGGCCAC

TCAGGACCTAGTGGCTCGAGGAGGGCAGCCCGCCTTCACGAACGTGAACCTCGAGCTCACGTGTCCGGACTTCCTAGAGG

ACGAGCCCGGCCGTCGGTCCTGGCGGGGAGATCGTGGGTACCTACGGCGACTTCGAGGAAGAAGCCATCATGTTCGCTCGA

MP2

GCCCTCCTGGACGTGCAGCTGGAGGGTGACGCCGCGGGGGCTCCGCTCAAGTTCCCGCAGATAATCGTGAAAGTCCGACC

CGGCTATGACAAGGAGACTCTGGAGCTCGCCTTCGAAGTCGCGGCCGAGAACGGGGCCGTGTACTTCGCCAAACATGCTA

MP3

ATCTTTTCCCTGGC

Fig. 2-13 Determined nucleotide sequence of pMK41 was included partial *nrd*D *gene* of *M. kandleri.*
Primer 1, 2, and 3 were indicated by underline. DNA synthesize direction was indicated by arrow, below each primers.

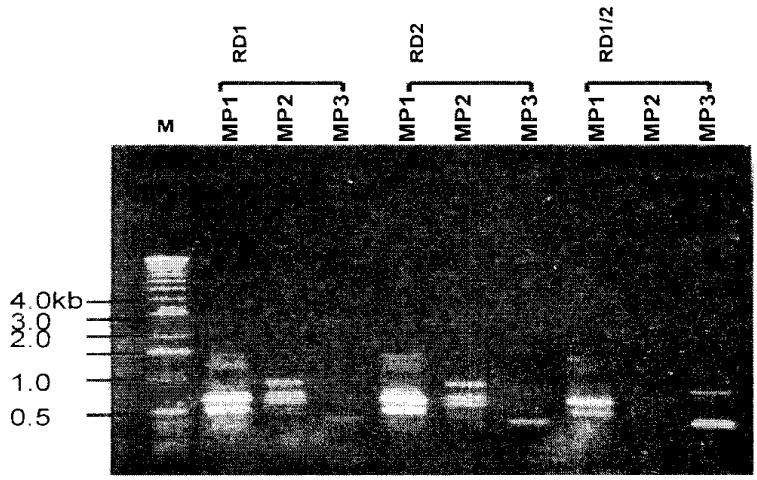


Fig. 2-14 Result of PCR for partial *M. kandleri nrd* gene extention.

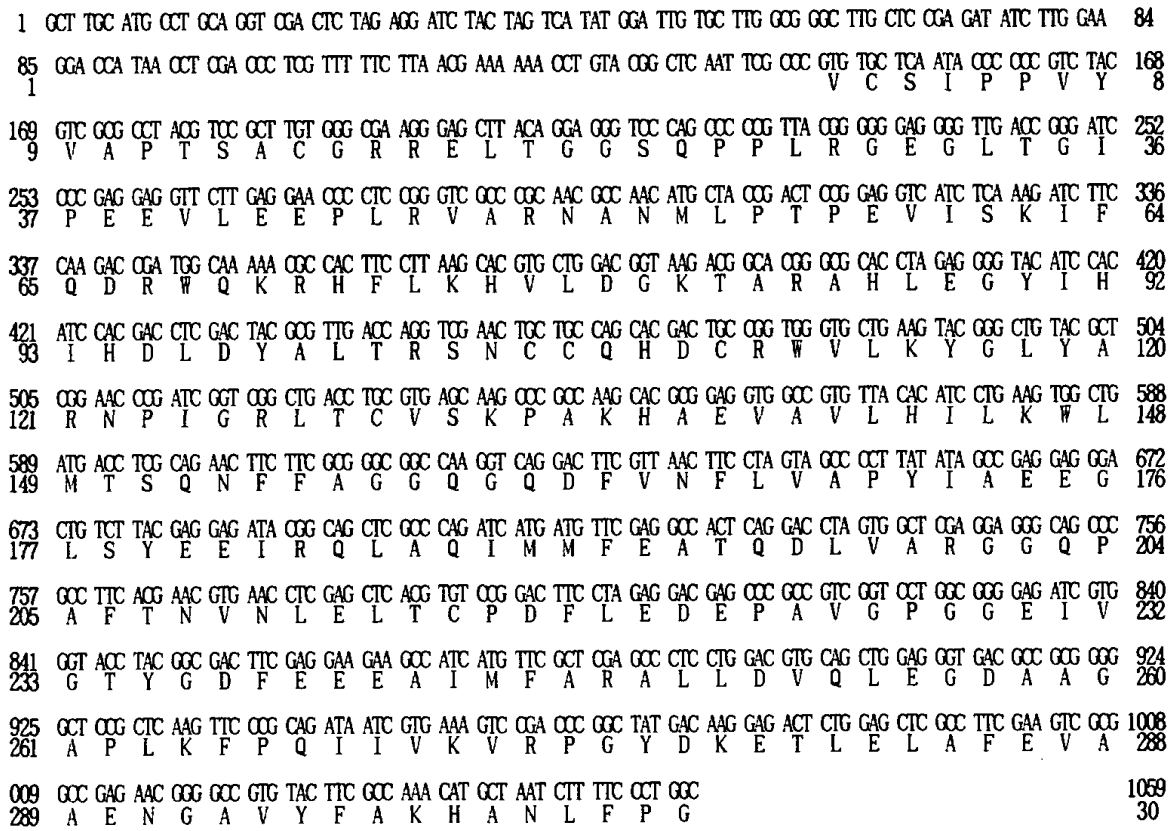
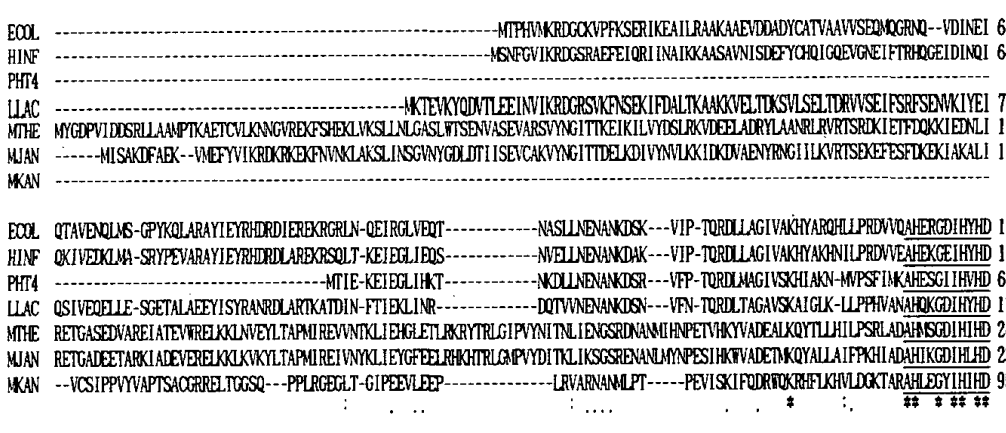


Fig. 2-15 Nucleotide and derived amino acid sequence of partial *M. kandleri nrd*D gene's complementing region.



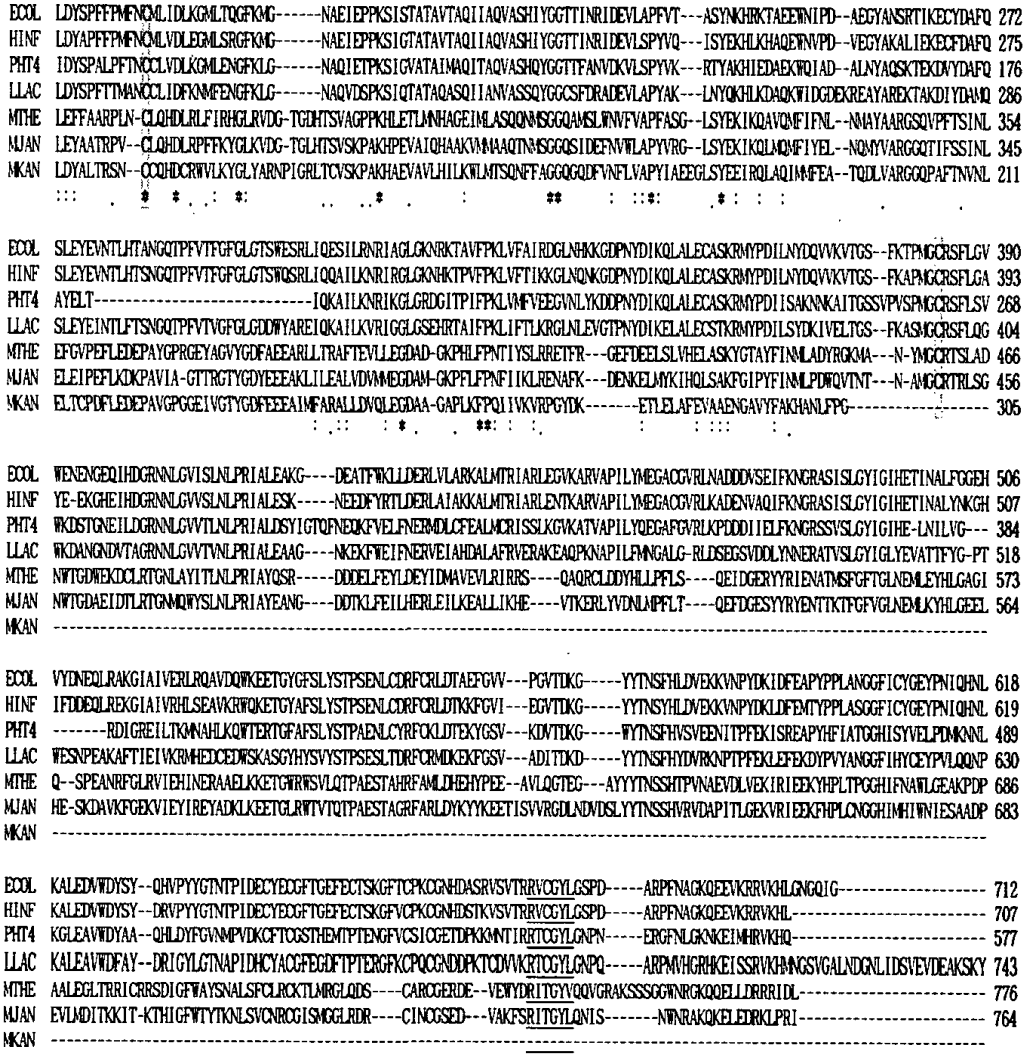


Fig. 2-16 Alignment of partial NrdD from *M. kandleri* with classIII RNRs. The NrdD sequence are from *E. coli*(ECOL), *H. influenzae*(HINF), phage T4(PHT4), *L. lacticus*(LLAC), *M. thermoautotrophicum*(MTHE), *M. jannishi*(MJAN), and *M. kandleri*(MKAN). Residues conserved in all sequence are marked by asterisks. A consensus motif is underlined. Three conserved cysteine residues are boxed.

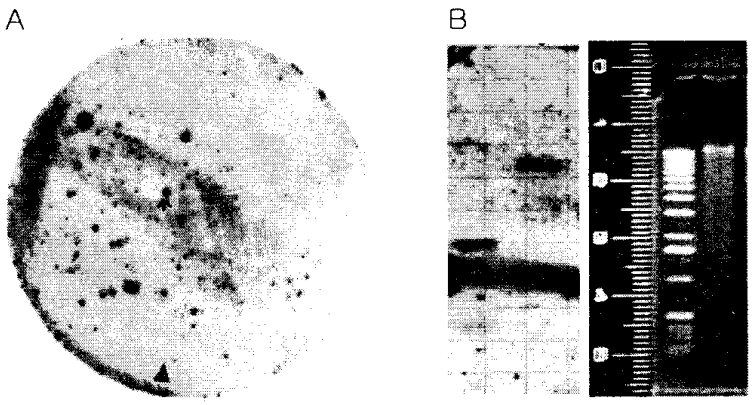
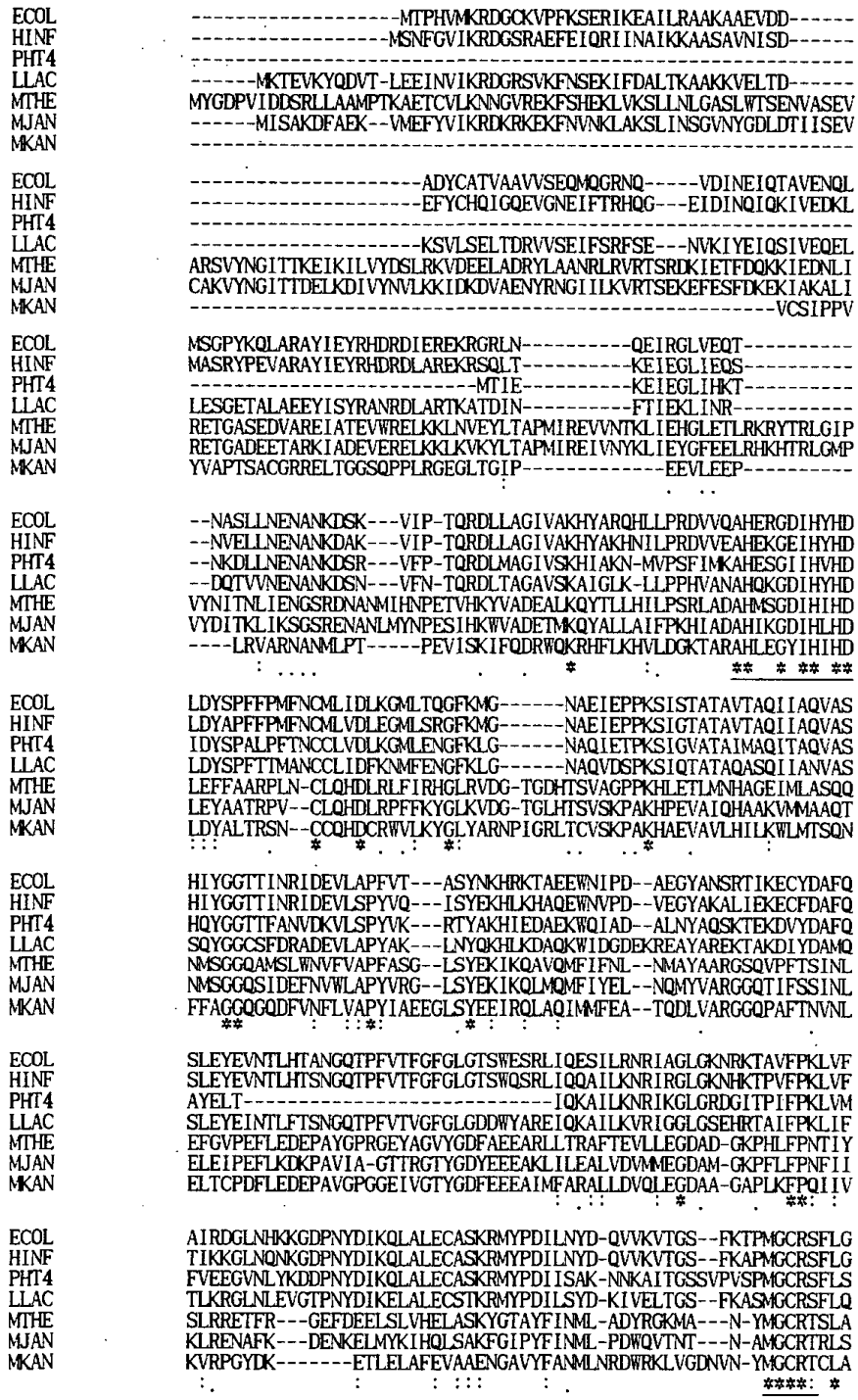


Fig. 2-17. Results of plaque hybridization and southern hybridization with pMK41. SQ1 plaque hybridization with pMK41 at 65℃(A). SQ1 plaque λ DNA extracted and hybridization with pMK41(B).

Methanobacterium thermoautotrophicum Identities = 116/272 (42%), Positives = 151/272 (54%)

```
Query: 242  NANMLPTPEVISKIFQDRWQKRHFLKHVLDGKTARAHLEGYTHTHDIDYALTRS-NCCQH 418
            NANM+  PE + K   D   K++ L H+L  + A AH+ G THTHDI++   R  NC QH
Sbjct: 195  NANMIHNPETVHKYVADEALKQYTLLHILPSRLADAHMSGDIHIHDLEFFAARPLNCLQH 254

Query: 419  DCRWVLKYGLYARNPIGRLTCVSKPAKHAEVAVLHILKWLMTSQNFFAGGQGQDFVNFLV 598
            D R  ++GL   +  G  T V+ P KH E  + H  + ++ SQ   +GGQ     N  V
Sbjct: 255  DLRLFIRHGLRV-DGTGDHTSVAGPPKHLETLMNHAGEIMLASQQNMSGGQAMSLWNVFV 313

Query: 599  APYIAEEGLSYEEIRQLAQIMMFEATQDLVARGGQPAFTNVNLELTCPDFLEDEPAVGPG 778
            AP+ +  GLSYE+I+Q  Q+ +F       ARG Q  FT++NLE   P+FLEDEPA GP
Sbjct: 314  APFAS--GLSYEKIKQAVQMFIFNLNMAYAARGSQVPFTSINLEFGVPEFLEDEPAYGPR 371

Query: 779  GEIVGTYGDFEEEAIMFARALLDVQLEGDAAGAPLKFPQIIVKVR----PGYDKETLELA 946
            GE  G YGDF EEA +  RA  +V LEGDA G P  FP  I  +R     G  E L L
Sbjct: 372  GEYAGVYGDFAEEARLLTRAFTEVLLEGDADGKPHLFPNTIYSLRRETFRGEFDEELSLV 431

Query: 947  FEVAAENGAVYFANMA*SGLAQARGRQRELHG 1042
             E+A++ G  YF NM    LA  RG+     G
Sbjct: 432  HELASKYGTAYFINM----LADYRGKMANYMG 459

Identities = 59/121 (48%), Positives = 75/121 (61%)

Query: 1020 GDNVNYMGCRTCLATNWTGDWEIDTIRTGNFEYVTLNLPLLAHESRDEDEFLEKIREYCE 1199
            G   NYMGCRT LA NWTGDWE D +RTGN  Y+TLNLP +A++SRD+DE  E + EY +
Sbjct: 452  GKMANYMGCRTSLADNWTGDWEKDCLRTGNLAYITLNLPRIAYQSRDDDELFEYLDEYID 511

Query: 1200 VAREALLARWRCVKKCLEAGLYDGCQRWKPDGEYYFRYEHTTWSLGFVGLAEAIEVLTGY 1379
            +A E L  R    ++CL+          + DGE Y+R E+ T S GF GL E +E   G
Sbjct: 512  MAVEVLRIRRSQAQRCLDDYHLLPFLSQEIDGERYYRIENATMSFGFTGLNEMLEYHLGA 571

Query: 1380 G 1382
            G
Sbjct: 572  G 572
```

Fig. 2-18. A result by the BLAST search for an ORF of *M. kandleri nrd* gene.


ECOL
HINF
PHT4
LLAC
MTHE
MJAN
MKAN

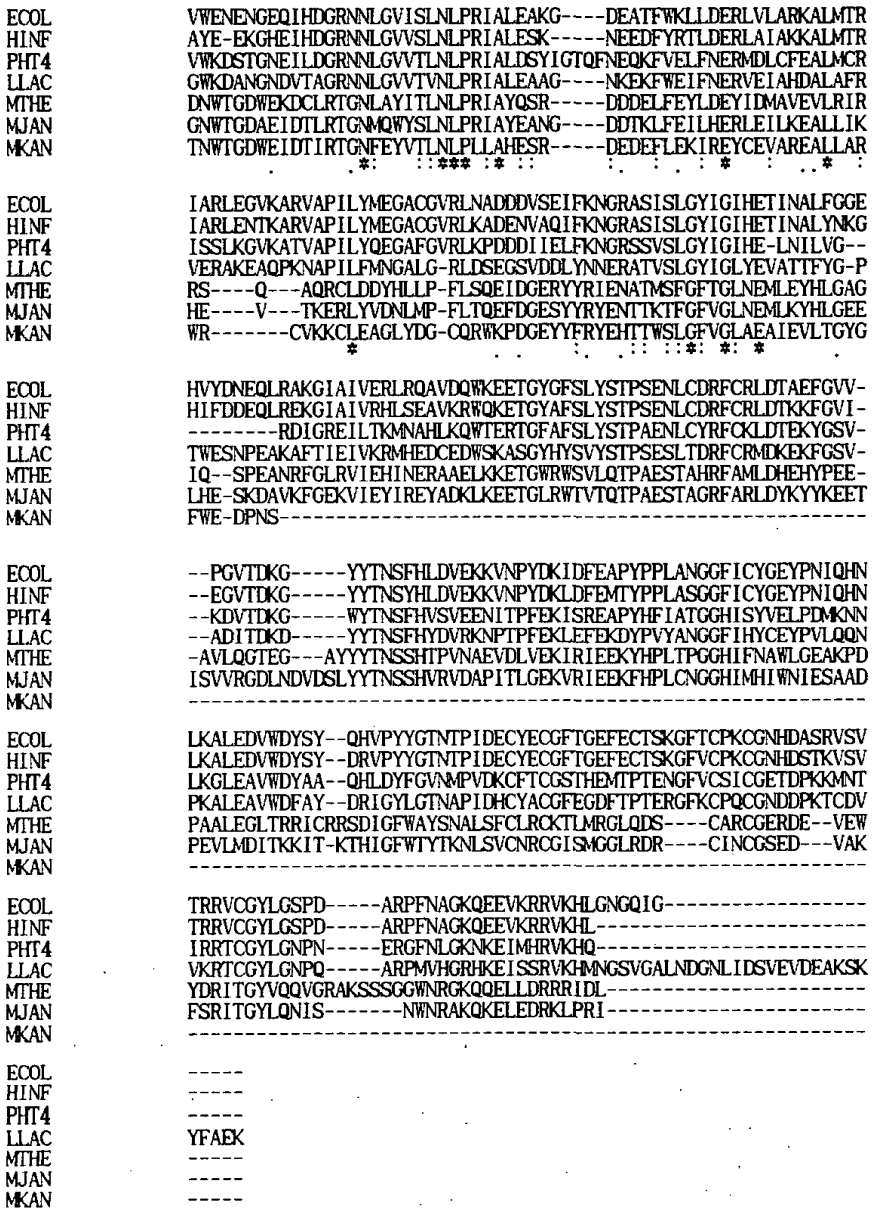


Fig. 2-19. Alignment of partial NrdD from *M. kandleri* with classIII RNRs. The NrdD sequence are from *E. coli*(ECOL), *H. influenzae*(HINF), phage T4(PHT4), *L. lacticus*(LLAC), *M. thermoautotrophicum*(MTHE), *M. jannishi*(MJAN), and *M. kandleri*(MKAN). Residues conserved in all sequence are marked by asterisks. A consensus motif is underlined. Three conserved cysteine residues are boxed. The potential radical sites are indicated in boldface.

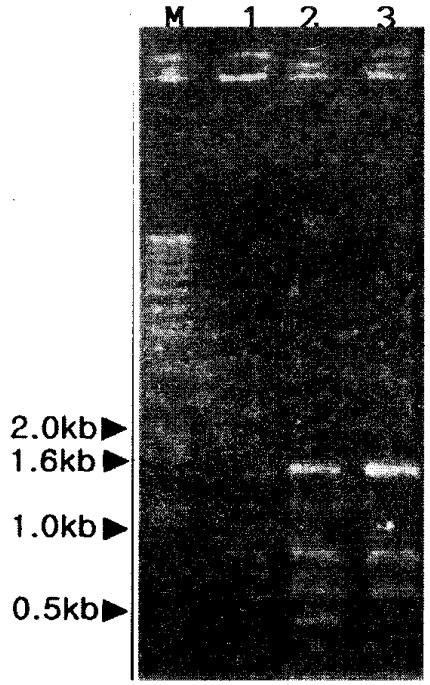


Fig. 2-20. Various chromosomal segments of putative *M. kandleri nrd* genes by PCR amplification.

A

```
STB     MASENMTPQDYIGHHLNNLQLDLRTFSLVDPQNPPATFWTINIDSMFFSVVLGLLFLVLF
ECB     MASENMTPQDYIGHHLNNLQLDLRTFSLVDPQNPPATFWTINIDSMFFSVVLGLLFLVLF
        ************************************************************
STB     RSVAKKATSGVPGKFQTAIELVIGFVNGSVKDMYHGKSKLIAPLALTIFVWVFLMNLMDL
ECB     RSVAKKATSGVPGKFQTAIELVIGFVNGSVKDMYHGKSKLIAPLALTIFVWVFLMNLMDL
        ************************************************************
STB     LPIDLLPYIAEHVLGLPALRVVPSADVNVTLSMALGVFILILFYSIKMKGIGGFTKELTL
ECB     LPIDLLPYIAEHVLGLPALRVVPSADVNVTLSMALGVFILILFYSIKMKGIGGFTKELTL
        ************************************************************
STB     QPFNHWAFIPVNLILEGVSLLSKPVSLGLRLFGNMYAGELIFILIAGLLPWWSQWILNVP
ECB     QPFNHWAFIPVNLILEGVSLLSKPVSLGLRLFGNMYAGELIFILIAGLLPWWSQWILNVP
        ************************************************************
STB     WAIFHILIITLQAFIFMALTIVYLSMASEEH
ECB     WAIFHILIITLQAFIFMVLTIVYLSMASEEH
        ******************.**************
```

```
B
STG     MAGAKEIRSKIASVQNTQKITKAMEMVAASKMRKSQDRMAASRPYAETMRKVIGHLARGN
ECG     MAGAKDIRSKIASVQNTQKITKAMEMVAASKMRKSQDRMAASRPYAETMRKVIGHLAHGN
        *****:**********************************************************:**
STG     LEYKHPYLEDRDVKRVGYLVVSTDRGLCGGLNINLFKKLLAEMKTWTDKGVQCDLAMIGS
ECG     LEYKHPYLEDRDVKRVGYLVVSTDRGLCGGLNINLFKKLLAEMKTWTDKGVQCDLAMIGS
        ************************************************************
STG     KGVSFFDSVGGNVVAQVTGMGDNPSLSELIGPVKVMLQAYDEGRLDKLYIVSNKFINTMS
ECG     KGVSFFNSVGGNVVAQVTGMGDNPSLSELIGPVKVMLQAYDEGRLDKLYIVSNKFINTMS
        *******:****************************************************
STG     QVPTISQLLPLPASDDDDLKHKSWDYLYEPDPKALLDTLLRRYVESQVYQGVVENLASEQ
ECG     QVPTISQLLPLPASDDDDLKHKSWDYLYEPDPKALLDTLLRRYVESQVYQGVVENLASEQ
        ************************************************************
STG     AARMVAMKAATDNGGSLIKELQLVYNKARQASITQELTEIVSGAAAV
ECG     AARMVAMKAATDNGGSLIKELQLVYNKARQASITQELTEIVSGAAAV
        ************************************************
C
STD     MATGKIVQVIGAVVDVEFPQDAVPRVYDALEVQNGNERLVLEVQQQLGGGIVRTIAMGSS
ECD     MATGKIVQVIGAVVDVEFPQDAVPRVYDALEVQNGNERLVLEVQQQLGGGIVRTIAMGSS
        ************************************************************
STD     DGLRRGLDVKDLEHPIEVPVGKATLGRIMNVLGEPVDMKGEIGEEERWAIHRAAPSYEEL
ECD     DGLRRGLDVKDLEHPIEVPVGKATLGRIMNVLGEPVDMKGEIGEEERWAIHRAAPSYEEL
        ************************************************************
STD     SNSQELLETGIKVIDLMCPFAKGGKVGLFGGAGVGKTVNMMELIRNIAIEHSGYSVFAGV
ECD     SNSQELLETGIKVIDLMCPFAKGGKVGLFGGAGVGKTVNMMELIRNIAIEHSGYSVFAGV
        ************************************************************
STD     GERTREGNDFYHEMTDSNVIDKVSLVYGQMNEPPGNRLRVALTGLTMAEKFRDEGRDVLL
ECD     GERTREGNDFYHEMTDSNVIDKVSLVYGQMNEPPGNRLRVALTGLTMAEKFRDEGRDVLL
        ************************************************************
STD     FVDNIYRYTLAGTEVSALLGRMPSAVGYQPTLAEEMGVLQERITSTKTGSITSVQAVYVP
ECD     FVDNIYRYTLAGTEVSALLGRMPSAVGYQPTLAEEMGVLQERITSTKTGSITSVQAVYVP
        ************************************************************
STD     ADDLTDPSPATTFAHLDATVVLSRQIASLGIYPAVDPLDSTSRQLDPLVVGQEHYDTARG
ECD     ADDLTDPSPATTFAHLDATVVLSRQIASLGIYPAVDPLDSTSRQLDPLVVGQEHYDTARG
        ************************************************************
STD     VQSILQRYQELKDVIAILGMDELSEEDKLVVARARKIQRFLSQPFFVAEVFTGSPGKYVS
ECD     VQSILQRYQELKDIIAILGMDELSEEDKLVVARARKIQRFLSQPFFVAEVFTGSPGKYVS
        **************:*********************************************
STD     LKDTIRGFKGIMEGEYDHLPEQAFYMVGSIEEAVEKAKKL
ECD     LKDTIRGFKGIMEGEYDHLPEQAFYMVGSIEEAVEKAKKL
        ****************************************
```

Fig. 2-21. Sequence identity of *atp* gene of *E. coli* vs. *S. typhimurium*. The *atp* B(a) gene(A), *atp*G(γ) gene(B), and *atp* D (β) gene(C), were compared with each other.

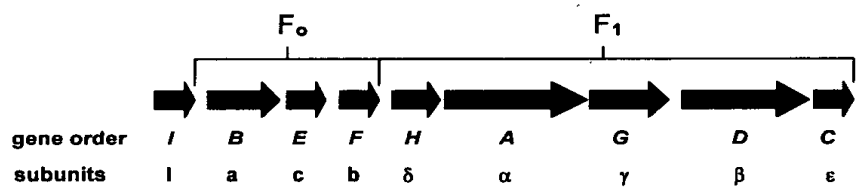


Fig. 2-22. Structure of *atp operon* (about 8.0 kb) in *S. typhimurium*.

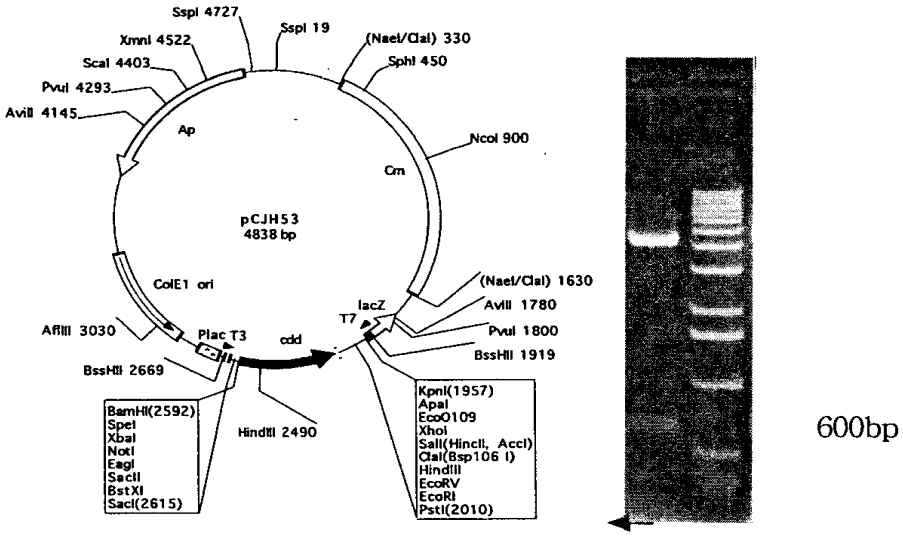


Fig. 2-23. Construction of pCJH53 harboring the *B. caldolyticus cdd* gene encoding cytidine deaminase

A) Diagram of pCJH53. A 565 bp DNA fragment containing the *cdd* gene of thermophile *B. caldolyticus* was inserted into the *Bam*HI/*Pst*I site of pDIA5304, and designated as pCJH53. B) Restriction fragment of pCJH53. *Bam*HI/*Pst*I insert was identified as 600 bp.

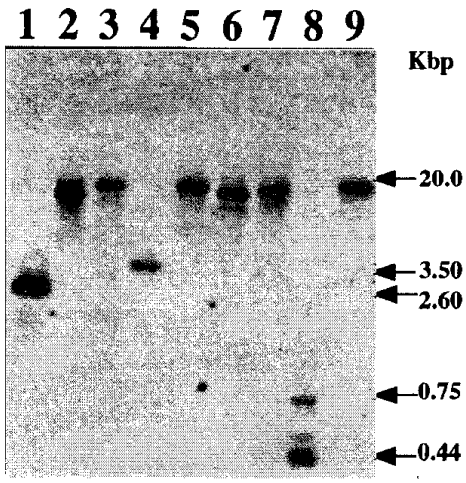


Fig. 2-24. Southern hybridization of *B. caldolyticus* genomic DNA with deduced *cdd* gene PCR product.

lane 1, chromosomal DNA digested with *Ava*I; lane 2, chromosomal DNA digested with *Eco*RI; lane 3, chromosomal DNA digested with PstI; lane 4, chromosomal DNA digested with *Sal*I; lane 5, chromosomal DNA digested with *Bam*HI-*Pst*I; lane 6, chromosomal DNA digested with *Eco*RI-*Pst*I; lane 7, chromosomal DNA digested with *Bam*HI-*Eco*RI; lane8, chromosomal DNA digested with *Sau*3AI; lane 9, chromosomal DNA digested with *Bam*HI. Arrows indicate the bands which are specifically hybridized with the PCR clone.

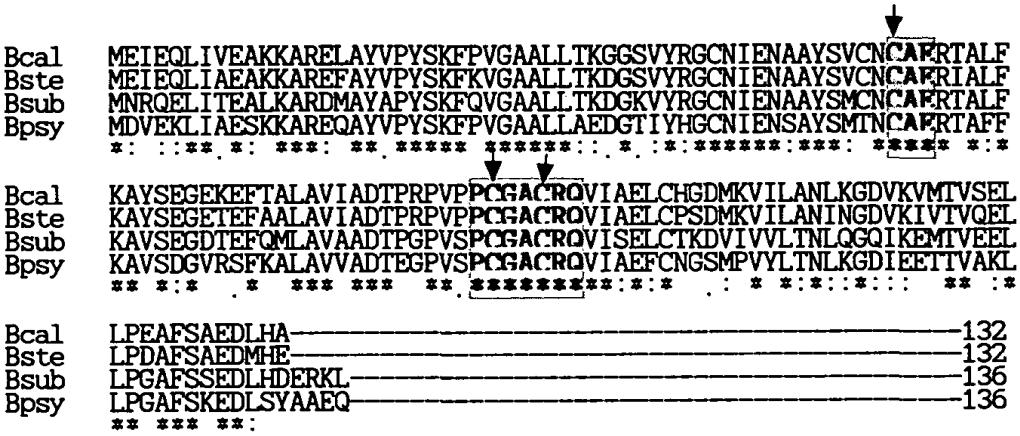


Fig. 2-25. Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of cytidine deaminase from several *Bacillus* sp. : Bcal; *B. caldolyticus*, Bste; *B. stearothermophilus*, Bsub; *B. subtilis* (U18532), Bpsy; *B. psychrophilus* (AJ237978)

Exposed regions indicate active domains and arrows denote the conserved cysteines involved in Zn binding. Asterisks represent conserved residues found in all members of the cytidine deaminase family.

Fig. 2-26. Nucleotide and deduced amino acid sequence for the *B. caldolyticus cdd* gene

The deduced amino acid sequence of the *cdd* gene is shown below the nucleotide sequence by single letter designations. The -35, -10 box, SD sequence and the transcription start point (+1) are indicated by an underlined and an arrow, respectively. The underlined sequence, GTG is a start codon of *cdd* gene and the TAA stop codon is indicated with asterisks below the sequene. The right numbers indicate the position of the nucleotide and amino acid, respectively. The sequence data have been submitted to the GenBank nucleotide sequence database under accession number AF187304.

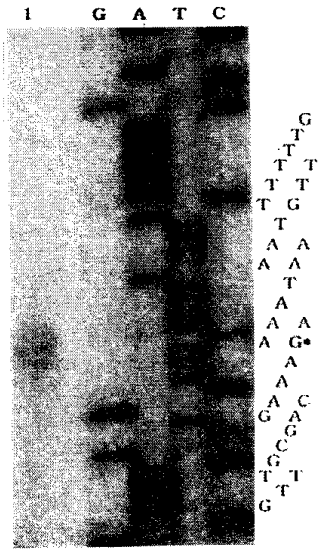


Fig. 2-27. Identification of the transcriptional initiation site by primer extension

Oligonucleotide primer W1 (24mer : 5′-cttcgagtacggcacgtaggcgag-3′) was used. The sequencing was performed with the same primer and the ladder indicates G,A,T,C and G reactions from left to right. Extended primers complement to the mRNA indicate in lane 1 and the sequence of matched area denote in right side. The start sites marked by asterisks.

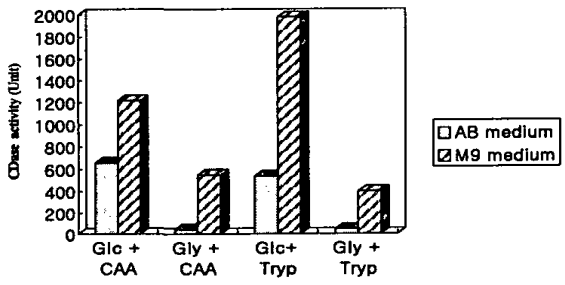


Fig. 2-28. Variation of the cytidine deaminase activity from sonic extracts of the cells cultured in differant medium. In AB and M9 media with combinatorial supplementation of glucose/glycerol and tryptone/casamino acid (CAA), the cells were cultured and the CDase activity were compared.

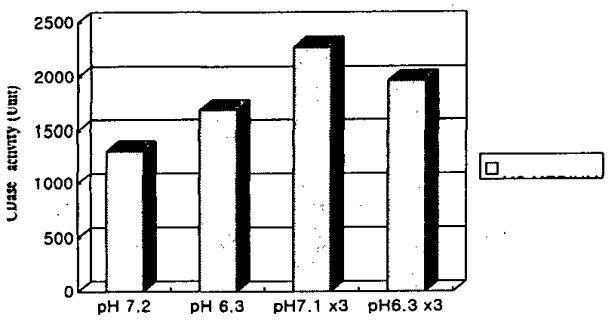


Fig. 2-29. Variation of cytidine deaminase activity according to the growth pH and phosphate concentration. An M9 medium containing glucose and tryptone was varied by supplementing three fold high concentration of phosphate salt and decreasing the acidity to pH 6.3.

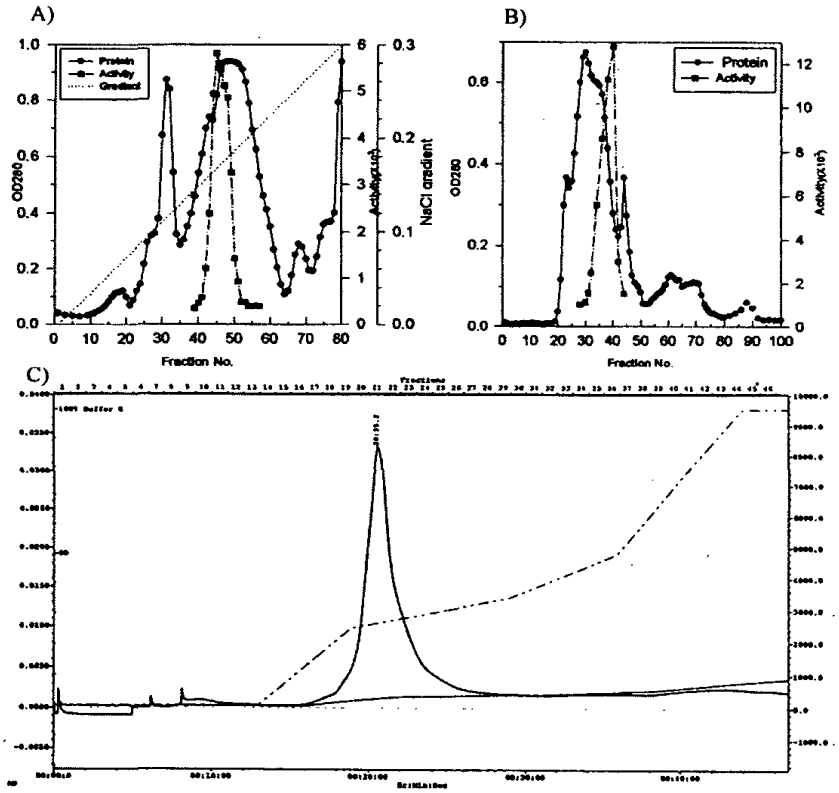


Fig. 2-30. Column chromatogram of *E. coli* JF611/pCJH53 cytidine deaminase.

A) DEAE-Sepharose column chromatogram was previously equilibrated with 50 mM Tris-HCl (pH 8.0). Sonic lysate was applied to the column after ammonium sulfate precipitation and adsorbed components was eluted by a linear gradient of NaCl. B) Fraction containing enzyme from A was recovered and subjected to Sephacryl S-200 column (2 x 90 cm) equilibrated with 50 mM Tris-HCl (pH 8.0). The column was eluted with the same buffer at a flow rate of 50 drops/fraction. C) Fraction containing enzyme from B was recovered and subjected to FPLC-Q2 column. Elution methods are described in Materials and Methods. --●--, absorbancy at 280 nm; --■--, cytidine deaminase activity; -----, NaCl concentration.

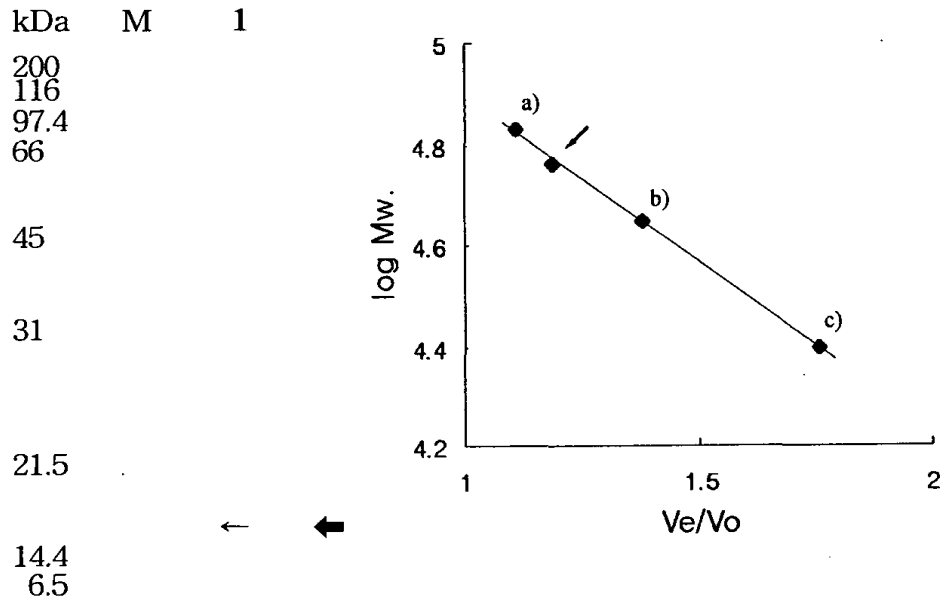


Fig. 2-31. Electropherogram of purified cytidine deaminase.
A) Plasmid-coded polypeptide of *E. coli* JF611/pCJH53 by homogeneous preparation was separated in 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Arrows indicate that 15-kDa of the plasmid-coded polypeptide in electropherogram. B) Chromatogram of the native enzyme by Sephacryl S-200 column. Void volume (V_o) with blue dextran, and protein density at 280 nm absorbancy were determined. Molecular markers used as standards were as follows: bovine serum albumin (a, MW. 68 and b, 45 kDa), chymotrypsinogen A (c, MW. 25 kDa), cytidine deaminase (arrow), and other proteins. A Sephacryl S-200 column (1.3 x 65 cm) was used by elution with Tris-Cl (pH 7.0). Arrows indicate 57 kDa of the native enzyme in gel filtration.

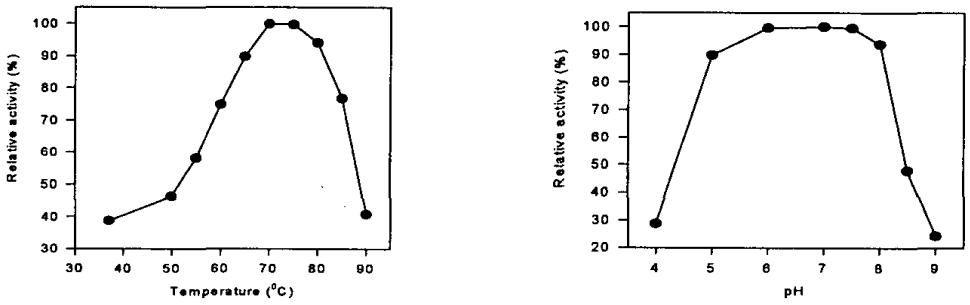


Fig. 2-32. Optimum temperature and pH on the cytidine deaminase activity Relative activity of the cytidine deaminase was determined at various temperatures (37 ~ 100℃) at pH 7.5. Relative activity of the cytidine deaminase was measured at various pHs (3.5 ~ 9.0) using 100 mM buffers of citric acid (pH 4.0 ~ 7.0), acetate (pH 5.0 ~ 5.5), phosphate (pH 6.0 ~ 8.0), Tris-Cl (pH 7.0 ~ 9.0), and borate (pH 8.0 ~ 10.0) at optimal temperature.

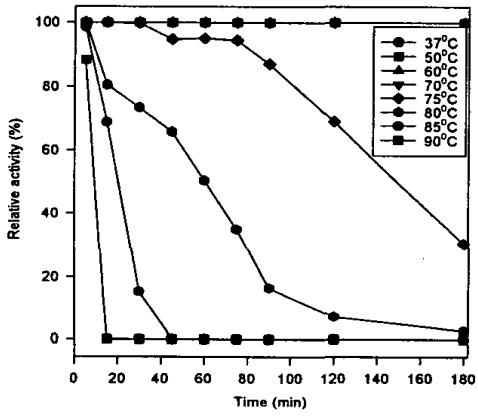


Fig. 2-33. Thermostability of purified enzyme
Purified enzyme in Tris-buffer (50 mM, pH 7.5) was incubated at various temperatures and residual activities at various time intervals were assayed by the standard assay method.

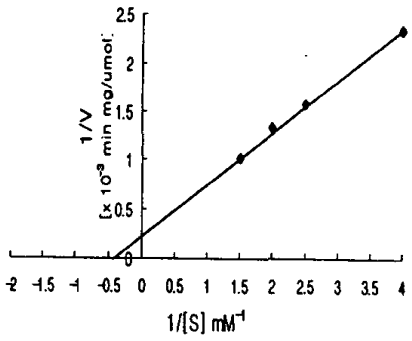


Fig. 2-34. Determination of K_m value for cytidine by Lineweaver-Burk plot. The plot is based on the rearrangement of the Michaelis-Menten equation into a linear form. Reaction mixture of purified cytidine deaminase and various concentrations of substrate were incubated at 70℃ for determination of the conversion rate of cytidine into uridine.

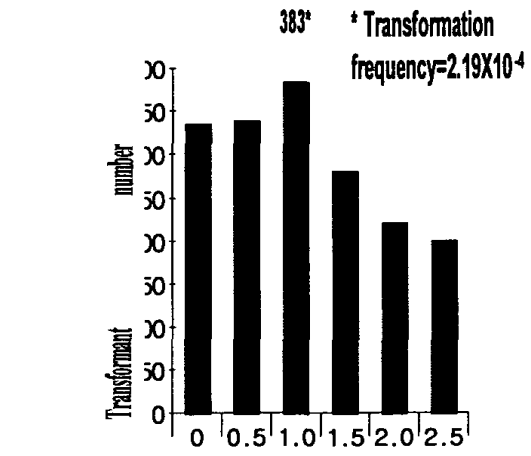


Fig. 2-35. Transformation efficiency depending on the time of incubation of the cultures in SPI medium. At the indicated time, *B. subtilis* 168 cells grown in SPI medium were transferred to fresh SPII medium and 90 min in SPII medium, and subsequently exposed to the pHPS9 (10 μg/ml) for 30 min. The symbol Tn means n hours after the end of the log phase.

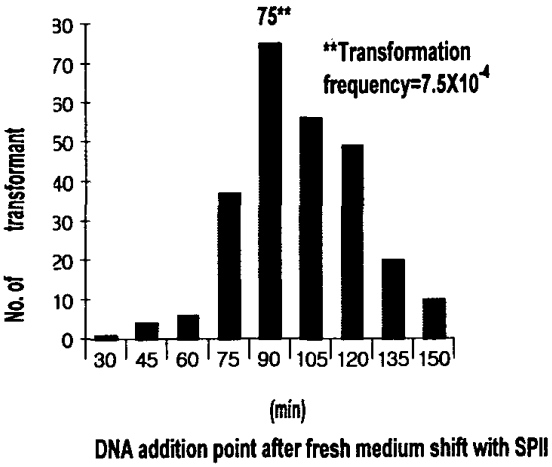


Fig. 2-36. Transformant variation after interals addition of DNA (10μg/mL) for 15 min interval during the second growth phas. After the strains was transferred to the SPII medium, DNA was added the cells for 15-min intervals. Five hundreds microliter of culture in SPII medium was incubated with transforming pHPS9 (10 μg /ml) for 30 min. The number of transformants were determined by the colony count on LB agar with Cm 5μg/ml after 24 hr of incubation following plating.

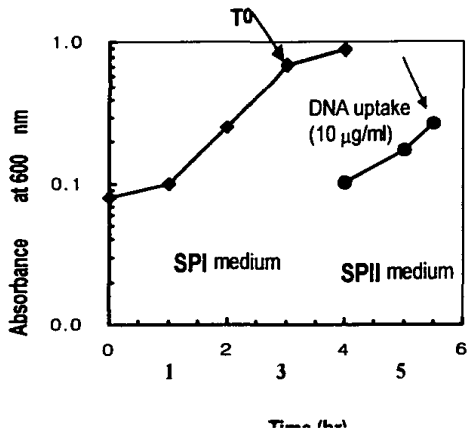


Fig. 2-37. The growth phase of *B. subtilis* 168 under the optimal conditions for competent cell transformation. The curve depict growth during the $T_{1.0}$ at the first medium and 10-fold dilution in fresh medium at the second growth. First phage : Growth during the first stage ($T0_{1.0}$), Second phage : Growth during the second stage (90 min) DNA added to after 90 min in second medium.

여 백

제3장 포도 및 포도주로부터 ribonucleotide reductase 저해제의 검색

제1절 서론

Ribonucleotide reductase은 거대분자 복합체의 일부로써 DNA 복제나 수복의 기능과 복합적으로 조절되면서 그 반응이 일어날 것으로 추정되므로, 그런 관점에서 Ribonucleotide reductase 저해제는 항암 혹은 항 바이러스 활성의 타깃 효소로 많은 연구의 관심을 끌어 왔다. 포도 혹은 포도주 속에 함유된 레스베라트롤(resveratrol)이라는 성분이 ribonucleotide reductase의 강력한 저해제로 밝혀진 것은 최근의 일이다(Fontecave *et al.*, 1998). 포도가 해충과 환경 스트레스로부터 자신을 방어하기 위하여 생산하는 phytoalexin의 일종으로 합성된 레스베라트롤이 ribonucleotide reductase의 저해제로써 발견되어 그 생리작용이 중요한 의의를 부여하게 되었다. 이 레스베라트롤이라는 성분이 중요한 관심을 불러일으킨 것은 적포도주를 마실 때 인체 속으로 흡수되어 심장병과 암의 예방작용을 한다는 사실 때문이다(Pace-Asciak, *et al.*, 1995; Jang *et al.*, 1997). 1997년 Jang *et al.*의 레스베라트롤 성분의 암 관련 연구결과가 <Science>에 발표되었을 때, 전세계적으로 적포도주가 한때 품귀되는 현상을 빚기도 하였다.

Resveratrol은 coumaroyl-CoA와 malonyl-CoA로부터 효소 stilbene synthase에 의하여 합성되는 복합페놀물질로써, 1980년대 초에는 병원체에 대한 저항성과 환경의 스트레스로부터 식물을 보호한다는 관점에서 활발히 연구 되어왔으나, 현재는 적포도주의 약물효과와 연관된 새로운 측면의 관심대상으로 많은 연구가 이루어지고 있다. 특히 resveratrol이 함유된 적포도주는 서양 음식문화에 있어 필수적인 것으로 마치 음료수처럼 상용하는데, resveratrol을 적절히 섭취할 경우 혈소판 응고로 인한

심장병 예방에 효과가 있을 것이며, 암세포의 시작, 증식, 전파와 연관된 세포활동을 억제하는 효과, HIV 증식 억제효과 등에도 쓰일 수 있다는 가능성을 시사하고 있기 때문에 resveratrol 함유식품에 대한 수요는 폭발적으로 증가할 것으로 생각된다.

따라서, 적포도주에 다량의 resveratrol이 함유되어 있으므로 포도에서 resveratrol의 함량이 높은 포도를 개발하면 일종의 건강식품으로의 기능을 가지므로 생포도의 소비 및 포도주와 같은 가공수요를 촉진시켜 포도의 시장을 대폭 확장시킬 수 있을 것이다.

제2절 재료 및 방법

1. 포도 및 포도주에서 resveratrol 함량분석.

가. 포도에서의 resveratrol 함량분석

포도는 흐르는 물에 잘 씻은 후 물기를 충분히 제거시킨 후 정확히 50g을 채취하여 homogenizer나 막자사발을 이용하여 껍질과 알맹이 및 씨를 으깬다. 50ml의 ethyl acetate를 이용하여 전 처리된 포도를 2-3번 추출한다. Ethyl acetate층을 분리하여 evaporator를 이용해 낮은 온도에서 감압 농축한다. 건조된 시료를 메탄올 5ml로 용해시켜 filter paper로 여과한다.

Guard column이 장착된 C18 reverse column을 사용하였고, acetonitrile 22%와 물 78%가 혼합된 용액을 flow rate 0.4ml/min, 검출기 UV detector를 이용한 305nm 파장에서 포도주의 조사방법과 동일한 조건으로 HPLC에서 resveratrol의 함량을 측정하였다. 준비되어 있는 메탄올 용액을 10$\mu\ell$를 microsylinge로 취하여 HPLC에 주입하여 측정하였다.

나. 포도주에서의 resveratrol 함량분석

포도주를 정확히 50ml로 측정하여 삼각플라스크에 담고 1N NaOH를 이용하여 pH7.0를 맞춘다. 포도주에 함유된 에탄올은 다른 유기용매에 잘 녹아 추출에 방해가 되므로 저온에서 감압농축함으로써 잔존 에탄올을 증발시킨다. 30ml의 ethyl acetate를 이용하여 에탄올이 제거된 포도주를 3회 추출한다. 배당체 piceid를 함유한 물층과 resveratrol을 함유한 유기용매층을 분리하고 유기용매층을 감압농축하여 ethyl acetate를 제거하면 resveratrol을 함유된 분말의 혼합물을 얻을 수 있다. 이 혼합물을 메탄올 5ml로 용해시켜 시료를 준비한다.

포도주에 존재하는 resveratrol의 함량을 측정하기 위해 *cis-* 및 *trans-* resveratrol과 catechin, rutin 등과 같은 페놀성 생리활성물질의 정확한 양을 측정할 수 있는 역상 HPLC 방법을 사용하였으며, resveratrol의 확인은 LC-mass를 이용하여 확인하였다.

HPLC 분석은 고정상으로 Econosphere C18 column을 사용하였으며, 이동상으로는 acetonitrile 22%와 물 78%가 혼합된 혼합용액을 사용하였다. 검출기는 UV detector를 사용하였으며, resveratrol의 UV 흡광도는 265, 280, 305, 317, 365nm에서 나타나며, 검출에 가장 적합한 305nm 파장에서 측정하였다. 준비된 시료를 microsylinge를 이용하여 10$\mu\ell$를 취한 후, 이동상 혼합 용매를 flow rate 0.4ml/min의 속도로 흘려 보내며 injector에 주입하여 검출하였다.

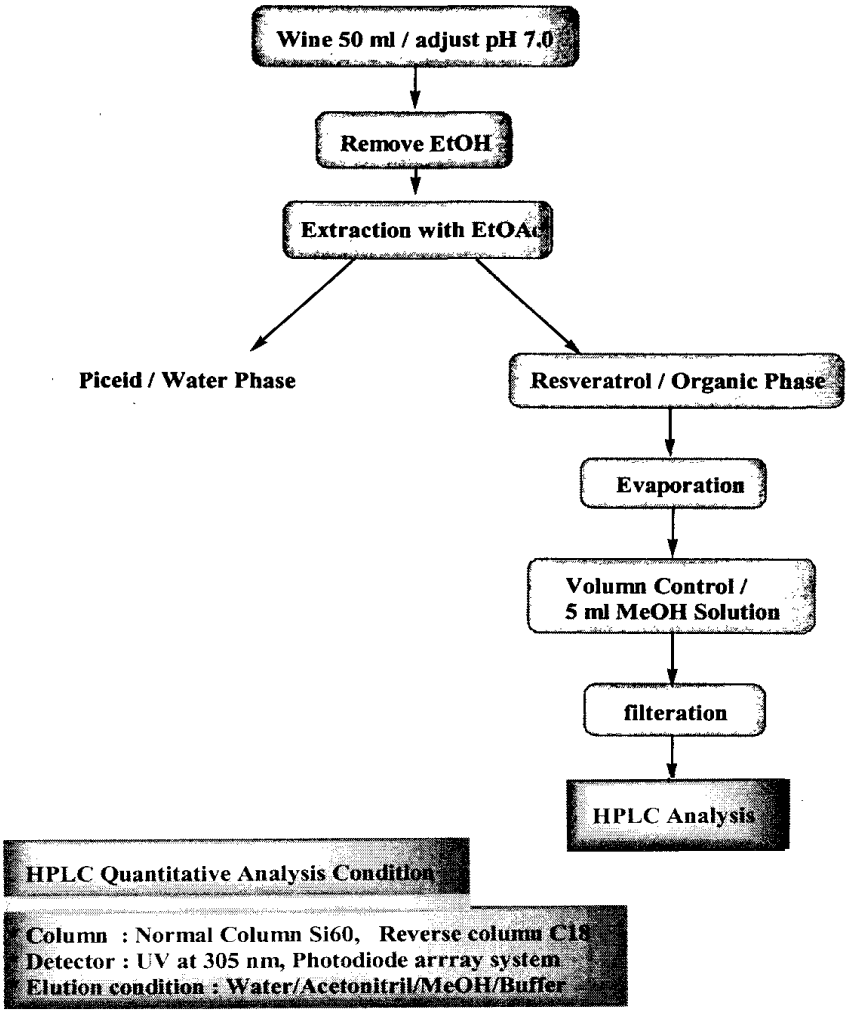


Fig.3-1 Isolation and Quantitative Analysis Procedure of Resveratrol

제3절 결과 및 고찰

1. Ribonucleotide reductase 저해제의 생리적 의의

생명현상에 있어서 유전의 본질적인 물질로 알려진 DNA는 그 합성의 원료로 deoxyribonucleotide가 이용되는데, 그것은 ribonucleotide로부터 한 종류의 효소인 ribonucleotide reductase(RNR 혹은 RR)에 의하여 전환되는 것으로 알려져 왔다(송방호 외, 1998). *ribonucleotoide reductase*은 ribonucleotide의 ribose 2'-carbon에 결합된 OH기를 환원하여 H기로 전환하는 효소로써 ribose에 결합된 4종류의 염기에는 비특이적으로 작용하나 결합된 인산기의 수에 따라 즉 di- 또는 tri-phosphate를 특이적으로 인식하여 어느 한 수준에서만 deoxy type의 nucleotide로 전환시키는 특징이 있다. 실제적으로 *ribonucleotoide reductase*은 purine 대사 경로에서 ADP를 dADP로, GDP를 dGDP로 바꿔주며, pyrimidine 대사 경로에서는 CDP를 dCDP로, UDP를 dUDP로 전환시켜 주게 된다.

*Ribonucleotoide reductase*은 거대분자 복합체의 일부로써 DNA 복제나 수복의 기능과 복합적으로 조절되면서 그 반응이 일어날 것으로 추정되므로, 그런 관점에서 *ribonucleotoide reductase* 저해제는 항암 혹은 항 바이러스 활성의 타깃 효소로 많은 연구의 관심을 끌어 왔다. 포도 혹은 포도주 속에 함유된 레스베라트롤(resveratrol)이라는 성분이 *ribonucleotoide reductase*의 강력한 저해제로 밝혀진 것은 최근의 일이다(Fontecave *et al.*, 1998). 포도가 해충과 환경 스트레스로부터 자신을 방어하기 위하여 생산하는 phytoalexin의 일종으로 합성된 레스베라트롤이 *ribonucleotoide reductase*의 저해제로써 발견되어 그 생리작용이 중요한 의의를 부여하게 되었다. 이 레스베라트롤이라는 성분이 중요한 관심을 불러일으킨것은 적포도주를 마실 때 인체 속으로 흡수되어 심장병과 암의 예방작용을 한다는 사실 때문이다(Pace-Asciak, *et*

al., 1995; Jang *et al.*, 1997). 1997년 Jang *et al.*의 레스베라트롤 성분의 암관련 연구결과가 <Science>에 발표되었을 때, 전세계적으로 적포도주가 한때 품귀되는 현상을 빚기도 하였다.

2. resveratrol의 한국산 포도주에서의 발견 및 함량 : 만약 한국산 포도나 포도가공식품에서도 레스베라트롤 성분이 확인된다면, 포도 농가나 관련 포도가공식품 공장에서는 상당한 이득이 발생할 것으로 예측되어, 본 연구 그룹에서는 이와 관련된 연구를 수행하고 그 결과를 아래와 같이 보고하고자 한다.

가. 한국산 포도의 레스베라트롤(*trans*-resveratrol) 함량분석

경북 경산 지역에서 1998년 가을에 수확한 *Vitis labruscana* B에 속하는 '엠비에이'와 '세리단'이라는 품명의 포도를 대상으로하여 LC-Mass Spectroscopy를 실시한 결과 확실하게 레스베라트롤 성분을 지니고 있음을 알 수 있었다.

특별히 '세리단'이라는 품종에 대하여 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 분석을 통하여 포도 1 kg당 6.1 mg의 *trans*-resveratrol을 함유하고 있음을 알았다. 포도 부위별 분석 결과, 포도껍질에는 5.3 mg/kg의 높은 함량이 존재하였다. 과육에서는 거의 검출되지 않았고, 씨앗 속에서는 미량이 존재함을 알 수 있었다. 이러한 한국산 포도에 대한 분석 결과는 외국에서 이미 밝힌 외국산 포도에 대한 레스베라트롤 성분 분석의 결과와 유사한 것이다. 4℃에서 4개월 정도 저장하였던 포도는 신선한 포도에 비해 다소 함량이 줄어든 감이 있었다.

나. 한국산 적포도주에 다량 함유된 레스베라트롤 성분

1998년 12월말 기준으로 시중에서 판매되고 있는 한국 회사의 레이블이 붙은 적포도주는 대부분이 20%의 포도주 원액에 80%의 설탕액이

혼합된 것이거나 유럽에서 생산되어 단순히 상표만 우리 것으로 붙은 것이고, 한국산

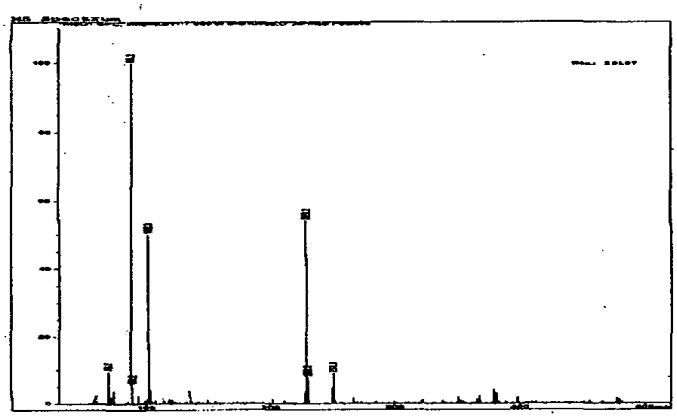


Fig.3-2 LC-MS Spectrum of *trans*-Resveratrol in the Korean Noul Red Wine

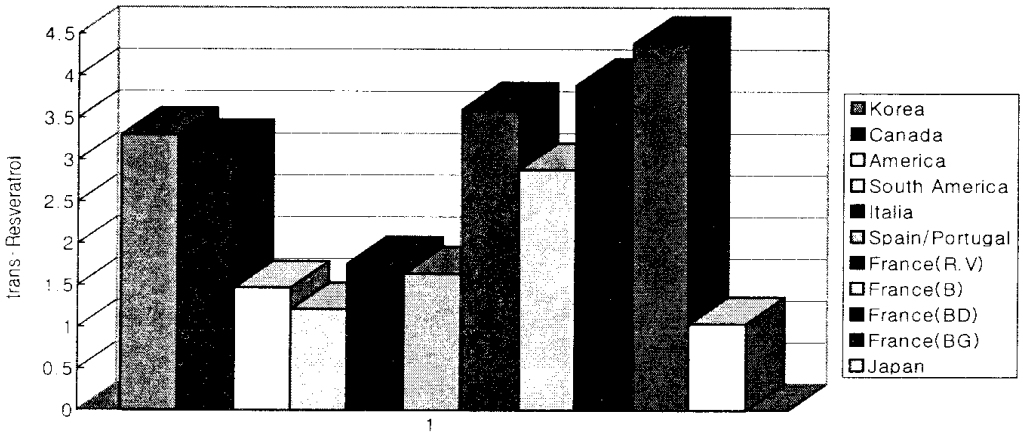


Fig.3-3 Reported Comparative Levels of *trans*-Resveratrol in Commercial Red Wines

포도를 발효시켜 100% 적포도주로 만든 것은 단지 한 종류만 있었다. 그것은 '영농법인 경상포도조합' (경북 경산시 유곡동 소재)에서 생산하여 시판중인 <노을와인>이었으며, 그 중 1998년산 10병을 구입하여

HPLC로 분석한 결과 평균 3.3 mg/L라는 비교적 높은 함량으로 레스베라트롤이 함유된것을 발견하였다. 비슷한 가격대의 외국산 적포도주를 시중에서 구입하여 같은 방법으로 분석해 본 결과(Fig. 3-3), 미국산과 이태리산 적포도주의 그것은 상대적으로 아주 낮은 편이었고, 불란서산 4종은 대체로 높은 편이었으되 그 중 단 한 종류만이 한국산 '노을와인'이 가진 레스베라트롤의 함량보다 약간 높았다.

외국산에 대한 그러한 결과는 비록 상표는 달랐지만 외국의 몇 그룹에 의하여 이전에 분석되어 보고된 결과와 크게 다르지 않았다(Goldberg *et al.*, 1995). 대부분의 외국산 적포도주에 함유된 레스베라트롤의 농도는 1.04-1.64mg/L의 범주에 속하였고, 불란서산은 2.88 - 4.39 mg/L로 상당히 높았다. 우리 나라와 인접한 국가인 일본산 적포도주의 경우는 전체 stilbene 화합물의 농도는 4.37 mg/L이었지만, 본 연구 그룹이 관심을 가지는 *trans*-resveratrol의 함량은 단지 1.04 mg/L에 불과하였다 (Sato *et al.*, 1997).

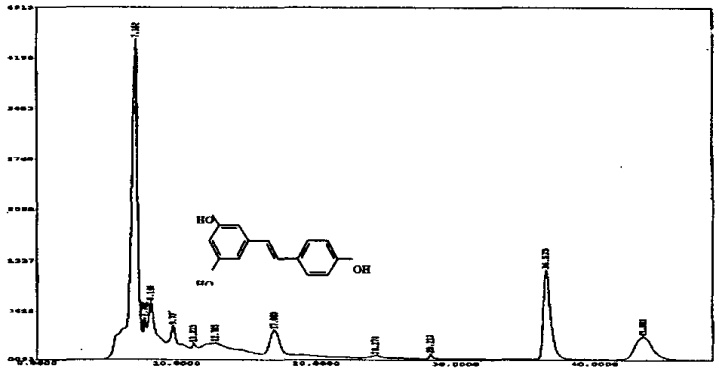


Fig.3-4 Chromatogram of Resveratrol Contents in the Korean Noul Red Wine (1998)

다. 국내시판에서의 Resveratrol 함량조사

Table 3-1 국산 포도주1의 Resveratrol함량

회 차 / 종 류	1st	2nd	Average (mg/l)	비 고
98년산-1	3.35	3.78	3.3	·적색색소 다량추출 ·침전물 有 ·gas 충진상태
98년산-2	3.05	2.95		
97년산-1	0.22	0.17	0.2	·적색색소 아주 소량추출 ·침전물 無 ·gas 無
97년산-2	0.27	0.25		
97년산 Chem	1.09	1.13	1.1	·적색색소 소량추출 ·침전물 소량 ·gas 無
96년산-1	0.26	0.23	0.2	·적색색소 아주 소량추출 ·침전물 無 ·gas 無
96년산-2	0.26	0.23		
H***	no	no	no	*증류주
생 산 : 국내포도조합산1				

Table 3-2 국산 포도주2의 Resveratrol함량

종 류	Resveratrol 함량
MaR	3.25 mg/l
MaS	0.24 mg/l
L'a(red wine)	1.26 mg/l
L'a(white wine)	0.20 mg/l
생 산 : 국산2 (시판품) (1999년 5월 6일 측정)	

Table 3-3 국산 포도주3의 Resveratrol함량

Name	Year	*Resveratrol* (mg/l)	Remark
ChaMa		*1.1*	시판품
ChaMa 켐벨	98년산	*0.5*	Sample
ChaMa 켐벨	99년산	*0.9*	Sample
ChaMa MBA	97년산	*0.3*	Sample
ChaMa MBA	98년산	*1.2*	Sample
생 산 : 국내포도조합산3 (2000년 5월 22일 측정)			

Table 3-4 국내수입산 포도주의 Resveratrol함량

Order	Name	Country	Year	Resveratrol (mg/l)	Remark
1	깔리나까버넷	칠 레	99	*1.2*	
2	아방가르데	독 일		*trace*	백포도주
3	케덤콩코드	미 국	99	*0.2*	
4	Plam Vineyards	미 국	94	0.6	
5	Kenwood	미 국	94	1.2	
6	1992카버네쇼비뇽	미 국	92	*0.6*	
7	래스베리	이태리		*0.3*	
8	란셀로타	이태리	99	*1.0*	
9	끼안띠클라씨	이태리		*1.6*	
10	Verazzano Chianti	이태리	96	2.0	
11	Chianti	이태리	96	2.7	
12	로휠드보르도	프랑스		*0.5*	
13	보졸레	프랑스		*0.9*	수입국산
14	쌩에스테페레드	프랑스	94	*1.1*	
15	꼬뜨드루베론	프랑스	98	*1.1*	
16	마주앙보졸레	프랑스		*1.2*	
17	밀리엄레드	프랑스	99	*1.6*	수입국산
18	알록스꼬동	프랑스	96	*2.1*	
19	말르상까버네	프랑스		*2.2*	
20	말르상보졸레	프랑스		*2.7*	
21	보르도 cordier	프랑스	99	*2.8*	
22	샤또삐뇽	프랑스	94	*3.4*	
23	샤또아티그아르노	프랑스	94	*5.0*	
24	Jacob's Creek	호 주	98	1.0	
25	Coonawarra	호 주	96	2.2	
26	Majuang Rioja	스페인	95	1.1	
생 산 : 시판수입품					

3. Resveratrol의 증폭 요인 분석 및 성분강화(항암성 포도주 개발)

가. 포도에서의 Resveratrol 증폭요인분석

Resveratrol 고함유 포도주의 생산은 근본적으로 그 원료가 되는 포도에서의 resveratrol 다량함유가 필수적이므로 포도의 단맛의 지표인 당도(sugar degree-brix)와 함께 포도종류별 resveratrol 함량 조사와 포도의 생장과정 중에 있어서 resveratrol의 천이도 변화를 조사하기 위하여 포도의 부위별로 resveratrol의 변화정도를 측정하였으며, 아울러 재배과정 중의 여러 factor(봉지씌우기, 유기농법 등)에 대하여도 조사하였다. 포도종류별 시료는 현재 포도농가에서 재배되고 있는 대표적인 캠벨(Campbell Early), 거봉(Kyoho), 세르단(Sheridan), MBA(Muscat Bailey A)등 4종은 경상북도 경산시 남천면에서 그리고 그 외 다품종은 경산시 경산포도시험장에서 입수하였으며, 기간별 천이도분석용 시료는 경산시 남천면의 한 유기농법농장에서 채취하였다.

나. 포도생장과정중에서의 Resveratrol 천이도 조사

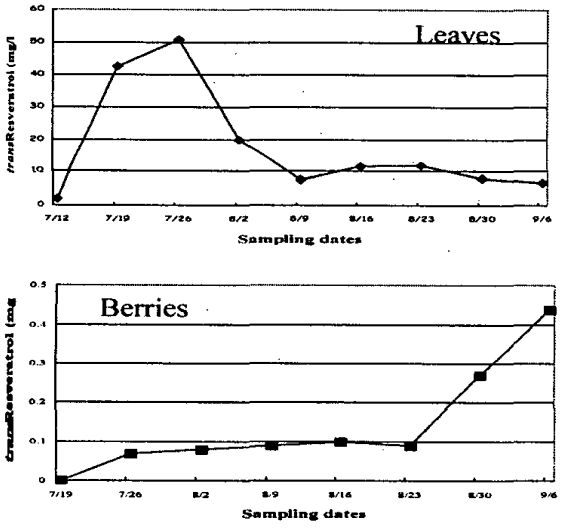
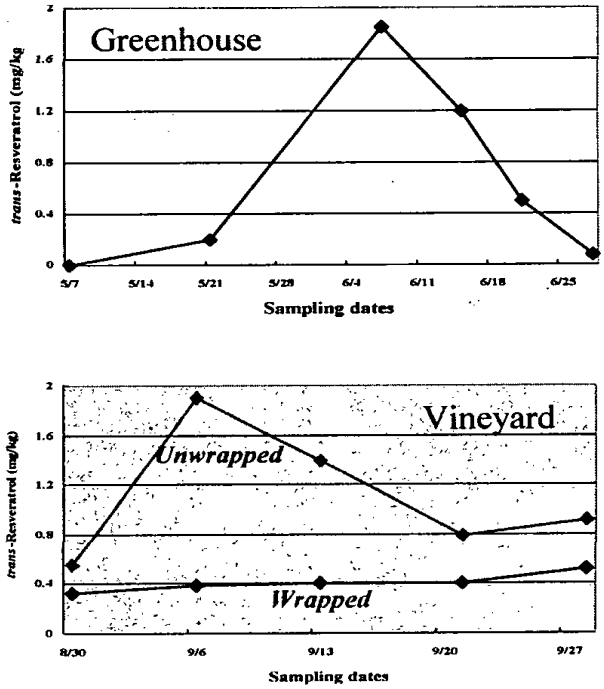


Fig.3-5 *trans*-Resveratrol Concent in Berries and Leaves of Campbell Early During Ripening



F i g . 3 - 6

Change in *trans*-Resveratrol Production of *V. labruscana* cv. Kyoho during Fruit Ripening

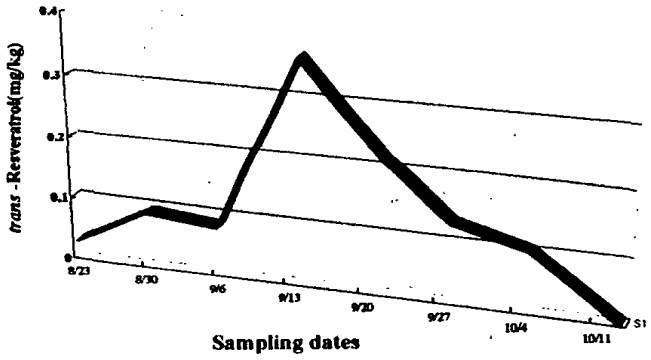


Fig.3-7 *trans*-Resveratrol content of Sheridan During Ripening

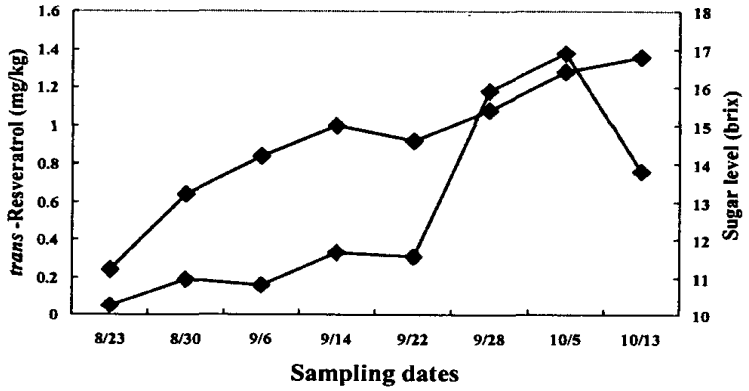


Fig.3-8 Correlation between Resveratrol Production of Grape Skin and Sugar Concent of Grape Juice in Muscat Bailey A During Ripening

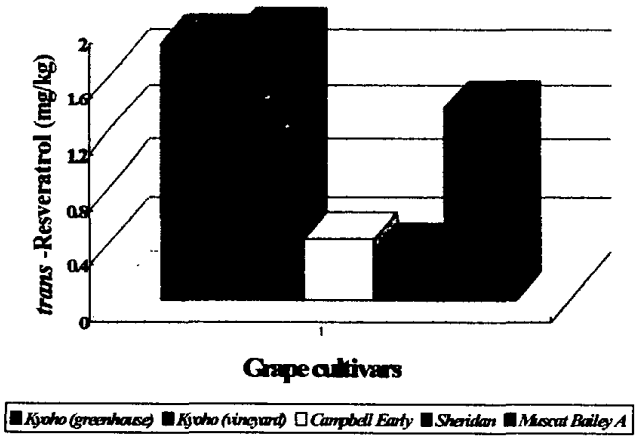


Fig.3-9 Maximal Concentrations of *trans*-Resveratrol from Various Grape Cultivars

Table 3-5 재배포도종류에 따른 *trans*-Resveratrol 함량 및 당도(brix)

일 시 / 종 류		2000/6/25	2000/7/12일	Remark
후지미모리		ND	0	상단 Resveratrol(/ 하단 brix.
		10	16	
이탈리아		trace		
		15		
홍산범		trace	0	
		18	17	
피오네		0.6		
		17		
이스카		trace	0	
		14	13	
거 봉		trace	0.1	
		17	15	
고 처		trace		
		16		
켐 벨		0.4		
		14		
비너스		nd		
		10		
자 옥		trace	0	
		17	17	
블랙올림피아드			0	
			14	
콩코드			0	
			14	
생 산 : 경산포도시험장				
(유기농법에 의한 재배)				
피오네	**배씨농장**	**1.7**		**상 동**
		15		
	김씨농장	**0.7**		
		19		
	허씨농장	**0.4**		
		19		

이상의 결과에서 보는바와 같이 resveratrol의 생합성 함량은 포도의 종류와 재배방법에 의존하지만 무엇보다도 수확시기 임시에 급격한 증가양상을 나타낸 후 maximum에 도달한 후는 다시 급격한 감소를 나타내므로 resveratrol 고함유 고급 기능성 포도의 생산은 수확시기가 가장 중요한 역할을 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 resveratrol의 함량을 간단히 check 할 수 있는 방법의 개발이 필요하다고 생각된다.

다. 수확포도에서 resveratrol 생합성의 인위적 증폭

Resveratrol은 포도에서 병을 일으키는 *Botrytis cinerea*나 *Plasmopara viticola*와 같은 곰팡이에 대한 저항성을 가지는 것으로 알려져 있다(G. Hill et al, 1981). 아마도 어떤 균의 침입이나 자극이 포도에서의 resveratrol의 생산을 촉진시킬 것이라는 예측을 하였다.

Table 3-6 재배 중 병원균 감염 포도에서 resveratrol 함량의 증가

종 류	Resveratrol 함량 (mg/Kg)	
	건 강	감 염(Infected)
Campbell	0.52	1.48
거 봉	0.05	0.43
MBA	0.50	1.36

예비실험으로 임의의 균을 감염시키지 않고 충분한 습도와 신선도를 유지하는 온도에서 방치해 둠으로써 포도에 자생하는 곰팡이를 관찰하며 생장시켰다. 곰팡이의 생장이 왕성한 포도에서는 resveratrol의 함량이 급격히 상승하였다.

그래서, 포도에서 resveratrol의 생산을 자극하는 균주를 분리하기 위해 포도에 자생하면서 생장한 곰팡이를 백금이를 이용하여 5ml의 멸균수에 희석한 후, PDA 배지(potato dextrose broth 2.4%, agar 1.8%)에 희석액을 부어 도말하였다. 28℃에서 이틀간 배양하였더니 여러 가

지의 균주를 얻을 수 있었다. 다시 각각의 균주를 PDA 배지에서 28℃, 이틀간 배양하여 8종류의 균주를 분리하였다.

포도의 껍질에 상처를 내어서 그 상처 난 부위에 각각의 균주군을 접종하여 10℃에서 1일주일간 배양하였다. 1주일 후 감염시킨 각각의 포도를 30g씩 취하여 ethyl acetate로 추출하여 reveratrol 함량을 측정하여 함량이 상승한 두 시료를 얻었다. resveratrol의 함량을 높인 두 균주군에서 순수분리를 위해서 colony를 각각 접종 후 10℃에서 1일주일간 PDA 배지에서 배양하면서 성장이 빠른 균주를 분리하였다. 순수분리된 균주는 colony를 먼저 생성한 후에 하얀 포자가 서서히 형성되는 것으로 저온 다습한 곳에서 성장이 잘 되었으며, 현재 이균주는 *Botrytis cinerea*나 *Plasmopara viticola* 균주는 아닌 것으로 판단되며, 미생물 stress에 의한 resveratrol의 생합성 증폭 현상에 대해서는 계속된 연구지원이 절실히 요구되는 바이다.

분리된 균주를 배양하여 2가지 방법으로 접종을 시도해 보았다. 첫 번째는 포자를 영양분이 많은 포도알과 가지 사이에 접종하는 방법이다. 두 번째는 분리된 균주를 potato dextrose broth에 접종하여 20℃, 이틀간 배양한 후, 그 배양액을 포도의 전 부분에 spray하였다. 선택된 균주를 사용하여 동일한 접종방법에서 4℃, 10℃, 20℃와 같이 온도를 달리하여 resveratrol의 함량변화를 주기적으로 측정하였다. 또한, 다른 외부의 요인이 균주 및 포도의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 밀폐된 공간에서 CO_2와 N_2를 충진 하에서 위 방법을 시도하였으나 특별한 상황은 관찰되지 않았다.

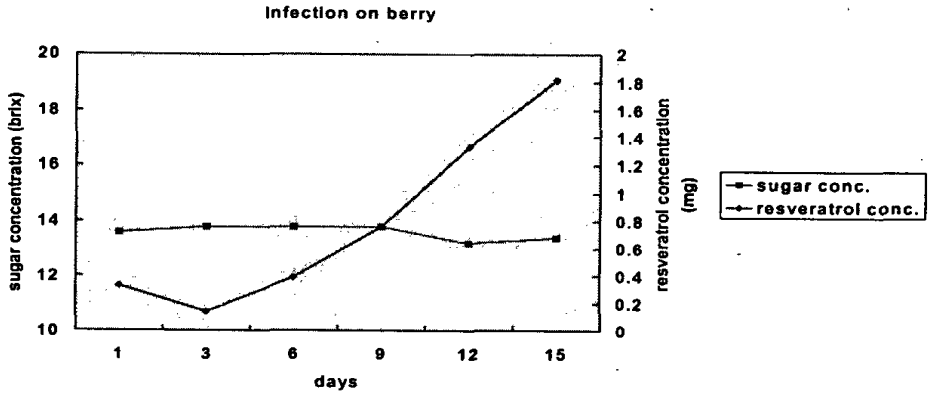


Fig.3-10 미생물 Stress case 1 :켐벨을 이용한 포도알에 인위적 미생물접종

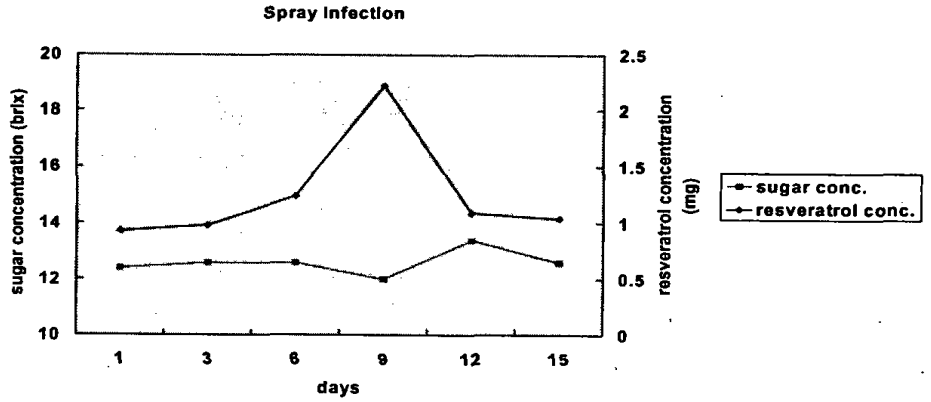


Fig.3-11 미생물 Stress case 2 :켐벨을 이용한 배양미생물 Spray 접종

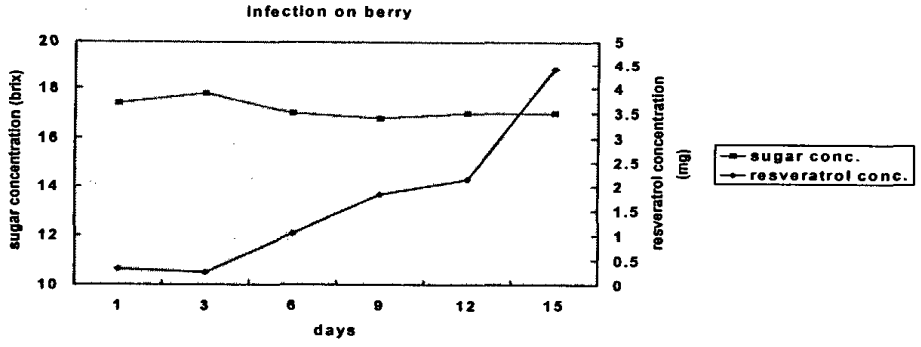


Fig.3-12 미생물 Stress case 3 :거봉을 이용한 포도알에 인위적 미생물접종

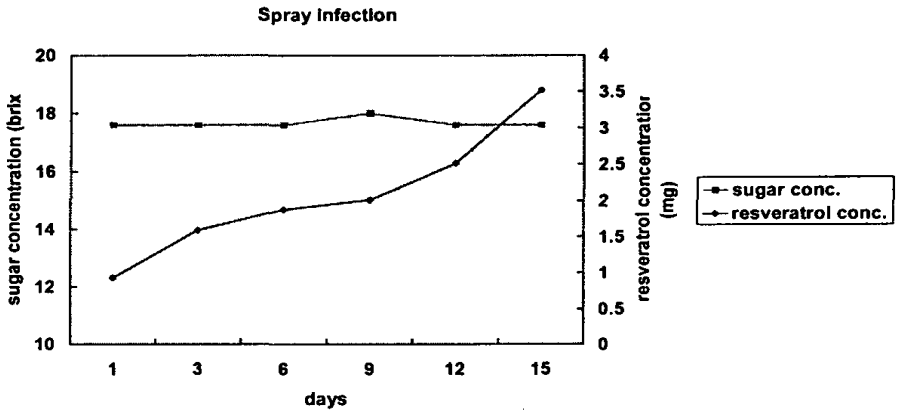


Fig.3-13 미생물 Stress case 4 : 거봉을 이용한 배양미생물 Spray 접종

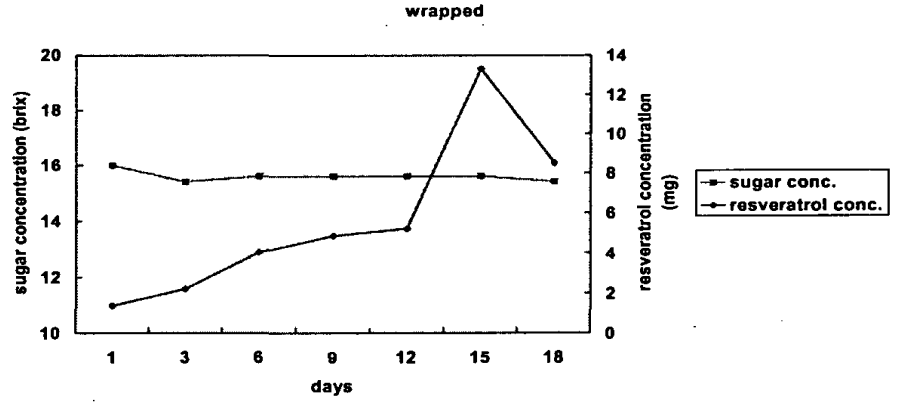


Fig.3-14 미생물 Stress case 5 :MBA을 이용한 포도알에 인위적 미생물접종-습도조절

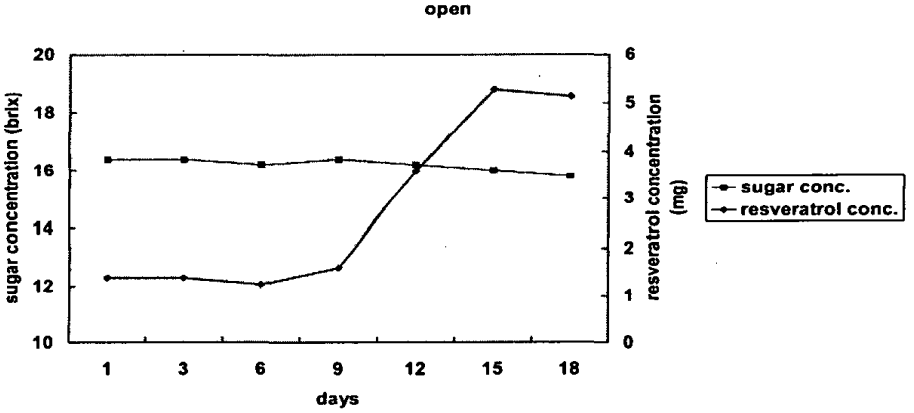


Fig.3-15 미생물 Stress case 6 :MBA을 이용한 포도알에 인위적 미생물접종-NO 습도조절

이상의 위 실험을 기초하여 거봉 포도에 대하여 본 연구팀에서 분리한 미생물을 이용하여 수확 포도에 대한 인위적 미생물 stress를 이용하여 resveratrol의 생합성증폭 유도를 실현시킴으로써 고급 기능성 포도의 제조 가능성을 제시하였으며, 이에 대한 추가연구는 가공용 고급기능성포도의 제조를 가능케 함으로 포도의 소비를 촉진시킬 수 있는 좋은 방법으로 사료되므로 계속적인 지원을 요청하는 바이다.

Table 3-7 미생물 Stress에 의한 Resveratrol 생합성 증폭

Sample(거봉)	Resveratrol 함량 (mg/Kg)	
	Flesh	*Infection*
Sample 1	0.54	*7.0*
Sample 2	1.17	*7.8*
Sample 3	1.55	*11.3*

4. 포도재배조건에서 resveratrol의 함량증폭을 위한 환경요인분석

MBA, 거봉, 세리단, 캠벨의 재배농원(경북경산소재)을 선정 토양분석을 표층과 심층으로 구분하여 각 조건에서 재배된 포도품종의 resveratrol함량의 비교분석을 시도하였으나 아직 이들 간의 정확한 연관성은 발견되지 않았다(Fig 3-16).

토양 시료의 채집 장소: 경상북도 경산시에 있는 포도밭 가운데, 서로 다른 4 종의 포도가 재배되고 있는 곳을 4 곳 즉산전리(MBA), 남산면(거봉), 양지리(쉐르단), 임당동(Campbell)을 선정하였다.

토양 시료의 채집: 선정된 채집지에서 3 곳을 무작위 선정하여, 표토와 10 cm 깊이의 작토층의 표토를 100 g씩 채취하였다.

시료 준비: 채취해 온 토양을 pH, 치환성 양이온, 수분함량, 작열 손실

량, 유기물, 총질소, 질산태 질소 분석 용으로 분류한 후, 분석용도에 따라 토양시료를 그대로 사용하거나, 실내(25 ± 3 ℃)에서 풍건시킨 후 체로 쳐서 준비하였다(농촌진흥청, 1988,토양화학분석법-토양·식물체·토양미생물).

토양 pH: 50 mL 삼각 플라스크에 5 g의 풍건세토에 25 mL의 증류수를 넣고, 1 시간동안 shaking하여 거른 후 pH를 측정하였다.

수분함량, 결합수의 함량, 총질소, 유기물(연소법)의 함량: 토양화학분석법(농촌진흥청, 1988)에 따라 정량하였다.

질산태 질소(NO_3^-)의 함량: 토양 추출액(5 g + 25 mL ddH_2O) 2.5 mL에 2.5mL의 질산태 질소 측정용 buffer를 넣은 후 NO_3^- 이온 선택전극(ORION 930700)을 이용하여 정량하였다.

치환성 양이온(Na^+, K^+, Mg^{2+})의 함량: 5 g의 풍건세토를 1 N 아세트산암모늄 용액 50 mL로 추출한 액을 ICP를 이용하여 분석·정량하였다.

5. 본 연구 결과가 국산 포도주 공장의 소득 증대에 기여한 내용

본 연구 그룹의 연구를 통하여, 암이나 심장병 예방이라는 기능성 식품의 측면에서는 레스베라트롤 성분을 다량으로 함유한 한국산 적포도주가 동일한 가격대의 수입산 적포도주보다 오히려 월등함을 알 수 있었다. 그래서 본 연구 그룹에서는 그 연구 내용을 1999년 3월 31일에 주요 일간지와 방송에 보도 의뢰한 결과, 상당히 비중있게 다뤄졌다(Table 4-1 참고).

또한 지난 4월 23일에는 서울의 서강대학교에서 열린<한국산업미생물학회> 춘계학술대회에서 그간의 연구 결과를 발표하였다(초록 5 참고).

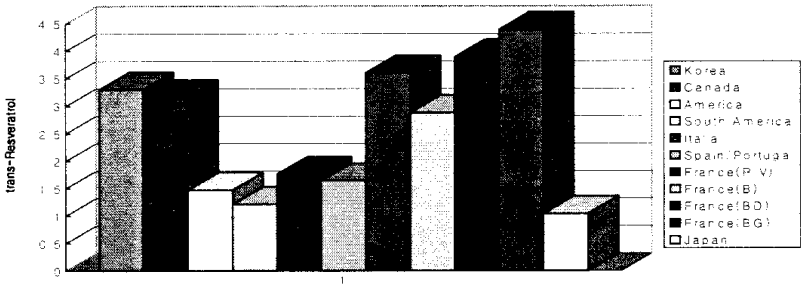


Fig. 4-2. Reported comparative levels of *trans*-resveratrol in commercial red wines (Goldberg et *al.*, 1995; Sato et *al.*, 1997).

Table 3-

1. 한국산 적포도주로부터 레스베라트롤 고농도 확인 언론 보도 현황

* 그 외 KBS, MBC, TBC 등의 라디오 방송에도 수회 뉴스로 다뤄졌음.

주요 언론에서의 보도 결과,

① <노을와인>을 생산하는 '영농법인 경상포도조합'에서는 큰 매출 증가를 기록하기에 이르렀다. 실제로 대구광역시에 위치하는 '대구백화점'과 '동아백화점'에서는 그 결과 발표 이전엔 모두 외국산 적포도주를 찾던 소비자들 중 40%가 <노을와인>을 지정하여 찾기에 이르러, <노을와인>에 대한 하루 매출액이 4월말 현재 150만원을 기록함으로써, '영농법인 경상포도조합'은 거의 '부도'라는 빈사 상태에서 공장이 정상적인 가동 상태로 돌아서 있다.

② 수입대체 효과가 기대된다. 향후 우리 나라의 적포도주 <노을와인>이 레스베라트롤의 함량을 더욱 증가시키고, 포장이나 맛을 개선하고 발효나 저장 공정을 개선하여 시장 장악력을 높일 수 있다면, 1997년말 통관기준(<무역통계연보>, 관세청/한국관세연구소 간행, 1998)으로 최소한 200억원 이상으로 추산되는 국내 포도주 시장이 한국산으로 차츰 대체될 수 있으리라 예측할 수 있겠다. 5년 후 약 750억원 규모로 추산되는 국내 시장 석권은 물론이며 건강에 높은 관심을 가진 선진국

국민들에게도 역수출될 수 있을 것으로 예상된다.

③ **포도 재배 농가의 안정적 수입이 보장될 수 있다**. 1997년 기준으로 전국 28,290 ha의 포도재배 면적에서 393,195 톤의 포도가 생산되었는데(<농림통계연보>, 농림부 간행, 1998), 포도 1 kg당 2,000원으로 환산하더라도 7,800억원이 넘는 엄청난 물량에 해당한다. 문제는 포도를 장기간 저장하는 기술이 아직 확립되어 있지 못하여 수확과 동시에 소비가 일어나야 하는 현실적인 어려움이 있어서 근년에 동시출하로 인한 가격의 폭락이 심각한 지경에 이르러 있음은 잘 알려진 일이다. 문제의 해결을 위하여 포도가공산업의 육성이 매우 중요한데, 현재 우리나라에서는 단지 5% 미만의 포도만이 가공되고 있을 뿐이며, 유럽의 대부분 국가에서 수확한 포도의 70-80%가 포도주로 만들어지는 사실과 큰 대조를 이룬다 하겠다. 앞으로 <노을와인>이 확실히 성공하여 많은 양의 포도를 적포도주로 가공할 수 있다면 포도 재배 농가의 안정적 수입이 보장될 수 있겠다.

보도일자	신문(보도면)	TV 방송	방영 시간/기타
1999년 3월 30일	동아일보(문화/생활면)		
3월 30일	매일신문(1면 톱)		
3월 30일	영남일보(1면 톱)		
3월 30일		YTN	뉴스전문 케이블 채널
3월 31일	중앙일보(19면)		
3월 31일	한겨레(23면)		
3월 31일	경향신문(19면)		
3월 31일	대구일보		
3월 31일	대동일보		
3월 31일	대구일일신문		
3월 31일		KBS	07:00
3월 31일		KBS	09:00
4월 1일		MBC	09:00
4월 1일		YTN.	24:00
4월 2일	경산자치신문		
4월 6일	경북대신문(3면)		
4월 7일	농민신문(13면)		

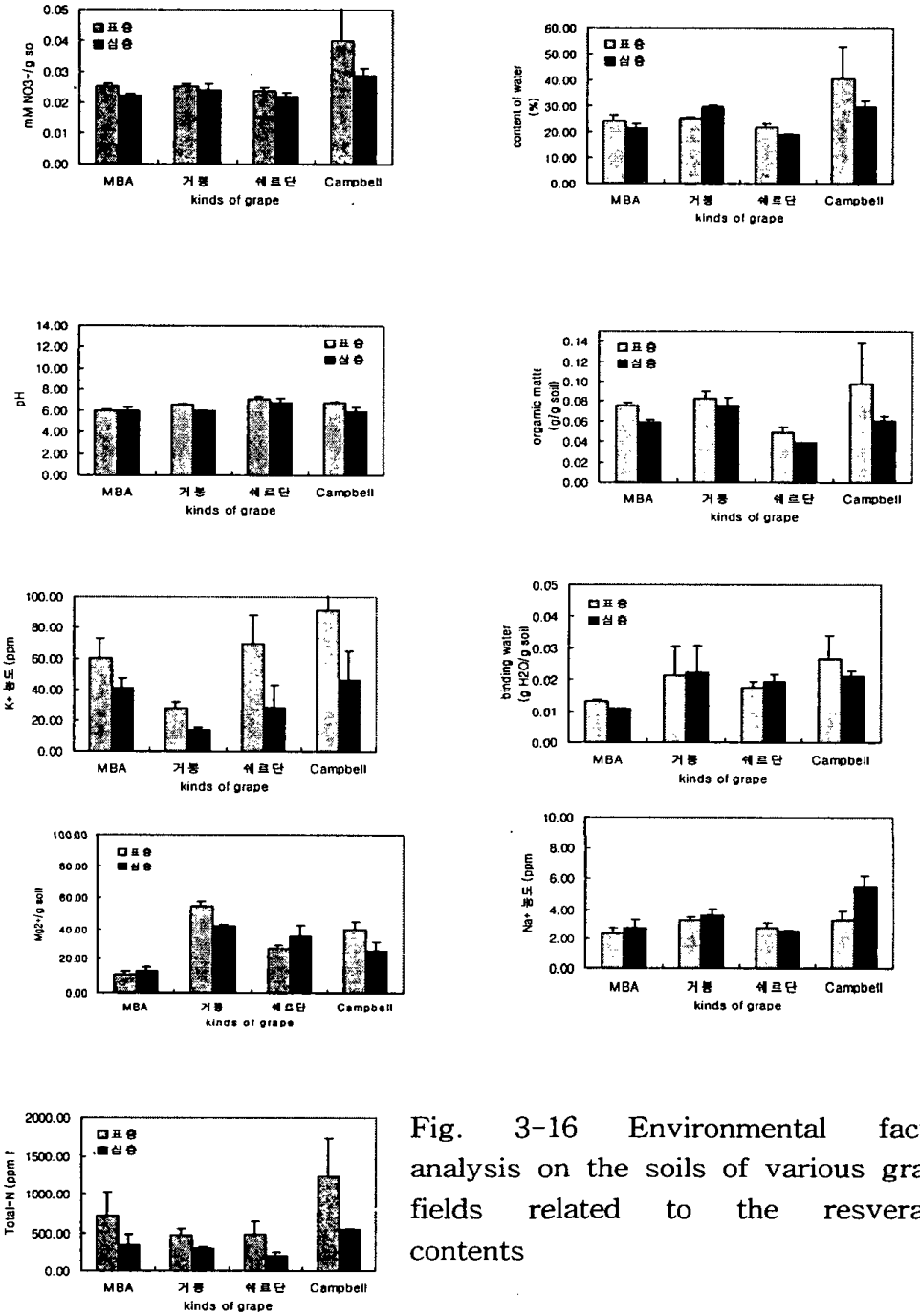


Fig. 3-16 Environmental factors analysis on the soils of various grapes fields related to the resveratrol contents

참고문헌

Adams M.W.W., and R.M.Kelly :Enzymes isolated from microorganisms that grow in extreme environments, Chemical engineering news, 73, 51 32-42, 1995

Fontecave, M., M. Lepoivre, E. Elleingand, C. Gerez, and O. Guittet. 1998. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. FEBS Letters 421:277-279.

Goldberg, D. M., J. Yan, E. Ng, E. P. Diamandis, A. Karumanchiri, G. Soleas, and A. L. Waterhouse. 1995. A global survey of *trans*-resveratrol concentrations in commercial wines. Am. J. Enol. Vitic. 46:159-165.

Jang, M., L. Cai, G. O. Udeani, K. V. Slowing, C. F. Thomas, C. W. W. Beecher, H. H. S. Fong, N. R. Farnsworth, A. D. Kinghorn, R. G. Mehta, R. C. Moon, and J. M. Pezzuto. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science 275:218-220.

Pace-Asciak, C. R., S. Hahn, E. P. Diamandis, G. Soleas, and D. M. Goldberg. 1995. The red wine phenolics *trans*-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. Clin. Chim. Acta 235:207-219.

Sato, M., Y. Suzuki, T. Okuda, and K. Yokotsuka. 1997. Contents of resveratrol, piceid, and their isomers in commercially available wines made from grapes cultivated in Japan. Biosci. Biotech. Biochem. 61:1800-1805.

Yazawa, K., K. Araki, N. Okazaki, K. Watanabe, C. Ishikawa, A. Inoue, N. Numao, and K. Kondo. 1988. Production of eicosapentaenoic acid by marine bacteria. J. Biochem. 103:5-7.

송방호, 김복환, 김사열. 1998. Ribonucleotide reductase: 구조, 기능 및 응용. 생물산업 11(3):45-51.

Table 3-1 국산 포도주1의 Resveratrol함량
Table 3-2 국산 포도주2의 Resveratrol함량
Table 3-3 국산 포도주3의 Resveratrol함량
Table 3-4 국내수입산 포도주의 Resveratrol함량
Table 3-5 재배포도종류에 따른 *trans*-Resveratrol 함량 및 당도(brix)
Table 3-6 재배 중 병원균 감염 포도에서 resveratrol 함량의 증가
Table 3-7 미생물 Stress에 의한 Resveratrol 생합성 증폭
Fig.3-1 Isolation and Quantitative Analysis Procedure of Resveratrol
Fig.3-2 LC-MS Spectrum of *trans*-Resveratrol in the Korean Noul Red Wine
Fig.3-3 Reported Comparative Levels of *trans*-Resveratrol in Commercial Red Wines
Fig.3-4 Chromatogram of Resveratrol Contents in the Korean Noul Red Wine (1998)
Fig.3-5 *trans*-Resveratrol Concent in Berries and Leaves of Campbell Early During Ripening
Fig.3-6 Change in *trans*-Resveratrol Production of *V. labruscana* cv. Kyoho during Fruit Ripening
Fig.3-7 *trans*-Resveratrol content of Sheridan During Ripening
Fig.3-8 Correlation between Resveratrol Production of Grape Skin and Sugar Concent of Grape Juice in Muscat Bailey A During Ripening
Fig.3-9 Maximal Concentrations of *trans*-Resveratrol from Various Grape Cultivars
Fig.3-10 미생물 Stress case 1 : 캠벨을 이용한 포도알에 인위적 미생물접종
Fig.3-11 미생물 Stress case 2 : 캠벨을 이용한 배양미생물 Spray 접종
Fig.3-12 미생물 Stress case 3 : 거봉을 이용한 포도알에 인위적 미생물접종
Fig.3-13 미생물 Stress case 4 : 거봉을 이용한 배양미생물 Spray 접종
Fig.3-14 미생물 Stress case 5 : MBA을 이용한 포도알에 인위적 미생물접종-습도조절
Fig.3-15 미생물 Stress case 6 : MBA을 이용한 포도알에 인위적 미생물접종-NO 습도조절
Fig. 3-16 Environmental factors analysis on the soils of various grapes fields related to the resveratrol contents

제4장 고도불포화지방산 생성균주의 분리 및 EPA 합성 유전자군의 클로닝

제1절 서론

건강과 질병에 있어서 기능성 식품(functional foods)으로서의 불포화지방산에 대한 이해 및 관심은 날로 심화되고 있다. 이것은 에스키모인들에게 동맥경화, 뇌경색, 심근경색 등의 질병 발생율이 매우 낮은 것은 그들이 생선과 바다표범을 주식으로 하는 것과 연관이 있으며, 그것은 고도불포화지방산과 깊은 관련이 있음을 알게 되었다. 따라서 고도불포화지방산을 무엇으로부터 어떻게 확보하느냐 하는 것도 중요한 과제가 되었다. 그 중에서도 eicosapentaenoic acid(EPA)와 docosahexaenoic acid(DHA)는 특이하게도 화학 합성이 용이하지 못하여 천연물에서 얻어져야 되는데, 지금까지 산업적으로 이들 고도불포화지방산은 주로 고등어, 꽁치, 참치, 전갱이, 정어리, 청어 등과 같은 등이 푸른 생선의 기름에서 추출되어 왔는데, 이들은 어류의 장내에서도 EPA 생산균이 공생하리라고 예측하여 각종 해양동물에서 EPA생산 미생물의 분리가 시도되고 있으며, 현재는 생물공학기술을 이용하여 박테리아나 조류에서 EPA와 DHA를 대량 생산하려는 연구가 진행되고 있다

고도불포화지방산(highly unsaturated fatty acid, HUFA)이란 불포화지방산 가운데에서 특히 이중결합을 4개 이상 가지는 다가불포화지방산(polyunsaturated fatty acid, PUFA)으로서 arachidonic acid(AA), EPA, DHA 등이 있다. 포유동물에서는 linoleic acid(18:2 ω-6)와 α-linolenic acid(18:3 ω-3)를 생성하지 못하나 이들이 다른 지방산의 합성에 필요한 전구체이기 때문에 반드시 외부로부터

섭취해야만 하는 필수 지방산으로 간주된다.

고도불포화지방산은 *de novo* 생합성, chain elongation, desaturation 등의 3가지 다른 경로로 합성되며, EPA나 ω-3 지방산들은 순환기계 질환에 대한 예방효과가 있는데, 특히 EPA는 1990년에 일본에서 의약품으로 개발되었으며, 정어리의 어유로부터 순도를 90% 까지 높인 EPA ethylester는 폐색성 동맥경화증에 대한 효과로 인하여 시판되었고, 4년후 동맥경화 예방개선제로서 승인을 받았으며, 임상의들로 부터도 부작용이 적으면서 사용하기 쉬운 의약품으로 평가되어 그 시장은 날로 확대되어 오고있다. 어유에 함유된 또 하나의 중요한 고도불포화지방산은 DHA인데, 뇌 및 망막과 관련된 고유한 생리활성을 가지고 있다.

고도불포화지방산이 많이 함유된 음식으로부터 EPA를 섭취하면 실질적으로 모든 세포에 있는 막 인지질(phospholipid)의 AA를 대체하게 된다. 그래서, 생선, 생선기름 혹은 해조류 등으로부터 EPA와 DHA를 섭취하면 항혈전성, 항주화성, 항혈관수축성 및 항염증성 등을 나타내는 leukotriene과 prostanoid 생성에 의하여 특정한 생리상태로 된다. ω-3 지방산이 eicosanoid만을 통하여 여러 가지 만성질환에 영향을 미칠 수 있다는 사실은 긍정적인 것으로 받아들여지고 있다.

고도불포화지방산은 지질을 감소시키는 효능(hypolipidemic effect)이 있으며, 특히 EPA와 DHA 같은 ω-3 지방산을 다량으로 섭취시키면, 여러 가지 유형의 악성종양이 억제되는 효능이 있었다. 그리고 심장병, 간경변, 위암, 췌장암, 자궁경부암, 담석증, 알츠하이머 등 거의 대부분의 현대적인 성인병에 있어서는 생선섭취에 의하여 예방 또는 발병률 저하가 가능한 것으로 보고되고 있다.

현재 대부분의 EPA 및 DHA는 생선 기름으로부터 생산하여 이용하고 있으나, 생선 기름으로부터 생산한 EPA 또는 DHA는 그 냄새가 좋지 않으며 또한 안정적인 생산도 기하기 어려우므로 미생물,

즉 조류, 곰팡이, 세균 등으로 부터의 생산이 시도되어 왔다.

EPA나 DHA를 대량으로 생산하기 위하여, 그 유전자원의 확보는 중요한 과제가 되고있으며, 심해의 등푸른 생선들의 내장에서 서식하는 세균들을 대상으로 하여 EPA나 DHA의 생산능력이 탐색되어 왔으나, 이들의 생산유전자는 복수의 유전자로 구성되어 있으므로 그 크기가 상당히 큰 편이어서 클론닝 실험이 쉽게 성공하지 못하였는데, 1996년에 일본의 Sagami 화학연구센터의 Yazawa 그룹에 의하여 최초로 EPA 생합성계 유전자군이 클로닝되었다.

EPA 혹은 DHA의 식물에서의 생산은 이론적으로 실현가능하지만 단순하게 접근할 수 있는 문제가 아닌 것으로 보이며, 다가불포화지방산의 생합성 기작, 형질전환, 육종, 재배에 적절한 작물의 선택 등에 대한 보다 심도있는 기초연구가 선결되어야 할 것이다.

이러한 연구배경하에서 본 연구그룹은 EPA 또는 DHA와 같은 불포화 지방산을 미생물을 이용하여 생산하기 위한 기초연구를 수행하였다. 즉, EPA 생합성 세균을 해양생물의 장내에서 분리하여, 이 세균을 형태적, 배양적 및 생리생화학적 특성 및 rRNA의 구조등에 기초하여 동정하였으며, 또한 이 분리된 EPA 생산성 세균의 EPA생산 최적 조건을 연구함과 동시에 불포화지방산의 생산에 관여하고 있는 3-oxoacyl ACP synthase gene(fabB), malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase (fabD), 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase(fabG), 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase II (fabF)와 acyl carrier protein(acp) 유전자 및 EPA 생산에 관여하는 유전자의 클론닝을 하였기에 이들 연구결과를 보고하는 바이다.

제2절 재료 및 방법

1. 해양미생물의 균원 채취용 배지

해양생물의 장내에서 고도불포화지방산균을 분리하기 위해서 사용된 배지의 종류 및 조성은 다음과 같다.

1) PYM-G (peptone-yeast extract-meat extract-glucose) media

peptone	1 g	
yeast extract	0.5 g	
meat extract	0.25 g	
glucose	2 g	
aged sea water	50%	pH 7.0 H_2O 1 L

2) Zobell media

peptone	0.5 g	
yeast extract	0.1 g	
aged sea water	50%	pH 7.0 H_2O 1 L

3) TY media

yeast extract	1 g	
trypose	1 g	
aged sea water	50%	pH 7.0 H_2O 1 L

4) Heart infusion

heart infusion	1 g	
tryptose	1 g	
aged sea water	50%	pH 7.0 H_2O 1 L

5) LB media

bacto tryptone	1 g	
yeast extract	0.5 g	
aged sea water	50%	pH 7.0 H_2O 1 L

6) 분리 균주의 보존- Glycerol stock
glycerol 20% (aged sea water 50%)

고도불포화 지방산 생성균의 보존: 현재 균주의 보존을 위해서는 20% glycerol stock과 사면배지에 계대 배양하는 등의 방법을 사용하고 있다.

2. EPA, DHA 생성균의 검색 및 분리

대구 칠곡의 수산시장과 부산 남천동 수산시장 및 강원도의 해안과 경북의 감포지역에서 수종의 바다어류를 구입하여 고도불포와 지방산 생

성균 분리용 시료로서 사용하였다. 강원도의 주문진, 묵호항 및 속초에서는 우럭, 광어, 놀래기, 히라스, 겨루치, 참망탱이, 오징어, 가리비, 아나고, 성게, 복어, 해삼, 멍게 등의 해산어류를 구입하여 사용하였으며, 경북 감포에서는 sea sand, 미역, 해초, 넙치, 도다리 등을, 대구칠곡 수산시장에서는 우럭, 넙치, 쥐치, 이면수, 장치, 돔, 아나고, 숭어, 겨루치, 히라스, 개상어, 참상어, 멍게, 전어, 고등어, 꽁치, 오징어, 참상어, 오도리, 전복 등을 부산남구 남천동에서는 깍다구, 술뱅어, 오랑치, 낙지, 해삼, 가오리, 도다리 등을 구입하여 이들의 내장으로부터 고도 불포화 지방산 생산균주의 분리를 수행하였다.

이상의 해양어류로부터 분리한 균주 총 1,241주로부터 EPA생성균주 19주, DHA 생성균주 5주를 TLC로 확인하였다. 이때 EPA 및 DHA의 표준품은 Sigma사의 제품을 구입하여 사용하였으며, 균체지방산의 분리는 앞에서 기술한 배지에서 25℃에서 이틀간 배양한 균체를 사용하여 세포로부터 지방산을 지방산 methyl ester의 형태로 추출하여 사용였다.

균체지방산의 분리 : 고체배지에서 24시간 배양한 균체 약 40mg을 teflon-lined screw cap tube에 옮겨 1ml의 reagent 1(NaOH 45g, methanol 150ml, 증류수 150ml)을 첨가하여 5-10초간 voltex하고 100℃에서 5분간 가열하였다. 그후 끓는 물에서 꺼내어 다시 5-10초간 강하게 voltex하여 100℃에서 강하게 가열하였다. sodium salt형태로 추출된 지방산을 methyl ester형태로 전환하기 위하여, 반응이 끝난 tube를 꺼내 흐르는 물에 식히고 reagent 2 (6N HCl 325ml, methanol 275ml)를 첨가하여 5-20초간 voltex 하여 80℃에서 10분간 처리하고 빠르게 얼음물로 옮겨 식힌후, reagent 3(hexane 200ml, methyl-tert butyl-ether 200ml) 1.25 ml를 첨가하고 실온에서 10분간 진탕후 정치하여 두층으로 분리된 시료에서 하층액을 제거하고 지방산 methyl ester가 함유된 상층액을 취하였다. 여기에 3ml reagent 4(NaOH 10.8g, 증류수 900ml)를 첨가한후 5분간 진탕하여 실온에서 방치하여 시료가

두층으로 분리되면 상층액을 박막크로마토그라피(TLC)로 확인하는 조작을 수행하였다.

TLC에 사용한 표준물질은 EPA-methyl ester(cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid methyl ester, Sigma Chemical Co.)를 사용하였고, 그외 n-hexane, diethylether, methanol, ethanol, acetyl chloride, chloroform, BHT(Butyl hydroxy toluene)들은 Merck사 제품을 사용하였으며 yeast extract, bactotryptone, bactopeptone, heart infusion media등 Difco사의 제품을, microalgal culture에 사용한 f/2 media(Guillard's marine water enrichment solution)는 Sigma chemical Co.를 사용하였다.

고도불포화지방산 검색을 위한 박막 크로마토그라피(TLC) : 농축된 n-hexane추출액내의 고도 불포화지방산검색을 일차적으로 박막 크로마토그라피(TLC)를 사용하여 수행하였다. 사용된 박막은 Merk사 제품인 silica gel 60 F254를 사용하여 위에서 준비된 지방산 methyl ester용액 약 10ul의 시료를 점적하여 n-hexane과 dimethylether의 9:1혼합액을 전개용매로 사용하여 30분간 전개시켰다. 결과의 판정은 전개종료후 박막 판을 말린후 요오드(I2)증기에 의한 지질의 착색법으로 검출하였다. 이 경우 밀폐된 유리상자안에 요오드 몇조각을 넣어 방치하여 요오드 증기로 포화시킨후, 전개종료후 말린 박막판을 넣고 방치하여 요오드가 지질에 짙은 갈색으로 착색되는 반점을 관찰하였다. 고도 불포화 지방산은 포화지방산과 단일 불포화 지방산보다 짧은 전개거리에서 관찰될 것을 예상하고 이 조작을 진행하였다.(그림 4-2)

기체 크로마토그래피: 준비된 시료의 지방산 조성분석에는 5% phenyl methyl silicone fused silica capillary column (25m x 0.2mm)이 장착된 기체 크로마토그래피(Shimadzu, Model G-17A)를 사용하고, 분석조건으로는 칼럼의 온도는 170 ℃에서 시작하여 300 ℃까지 분당 5 ℃씩 높이며, injector와 detector의 온도는 각각 250 ℃와 300 ℃로 하였다. 운반 기체로는 H2가스를 사용하고 유속은 30 ml/min, 시료의 주입량은

2.0 ul로 하였다.

또한 각 peak에 해당하는 지방산 methyl ester분자의 동정을 위하여 다양한 탄소수(9-22)를 가지는 표준물질을 사용하였다. EPA methyl ester의 retention time은 22.149분이었으며, DHA 의 retention time은 26.511분이었다. 샘플중에서는 retention time 22.150을 가지는 것이 확인되었다. 실험이 진행됨에 따라서 25m column으로는 EPA와 같은 고도 불포화 지방산의 분석에 어려움이 있음을 파악하였으므로 100m column을 구비하여 분석을 수행하였다.

지방산의 조성 분석 : 각 시료를 분석하여 얻어진 기체 크로마토그램의 결과를 토대로 균주들이 보유하고 있는 세포내 지방산의 종류와 함량비를 조사하였다. 이와 같이 조사한 지방산 분석결과를 수리적 분류방법을 기초로 multivariate Gaussian model을 사용하여 data를 비교하는 MIDI software program package(Micrbial ID, Inc., Newark, Del.)에 적용하여 각균주들 사이에 존재하는 분류학적 연관관계를 dendrogram과 2-dimensional plot로 나타내어 cluster를 분석하였다.

3. 고도 불포화 지방산 생성 유전자의 분리 및 클로닝

고도 불포화 지방산 생성에 관련되는 유전자는 현재 desatuase, elongase, 3-oxoacyl:ACP synthase, 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein]-reductase, malonyl CoA ACP transacylase등이 있는 것으로 알려져 있으며, 이들 유전자의 cloning을 위하여 desaturase등의 밝혀진 아미노산 서열을 바탕으로하여 해양조류로부터 고도불포화 지방산 EPA 및 DHA 생합성에 관련된 유전자의 검색을 시도하였다.

가. desaturase 유전자의 클론닝을 위한 PCR용 Primer의 합성

probe의 설계를 위해서 8종의 desaturase의 아미노산 서열을 검색하였고 이들을 정렬하여 6종의 PCR primer를 설계하였다.

CLUSTAL W(1.5) multiple sequence alignment

```
GMC_Glycin      MATWYHQKCGLKPLAPVIPRPRTGAALSSTSRVEFLDTNKVVAGPKFQPLRCNLRE---R
Nicotiana       MASWVLSECGLRPLPRIYPKPRTGAATSASSHIKLRISRTDLSGSAISLSNTNKE----R
Petroselin      MASWVISECGLRPLPRIYARPRSGASCFN--------SKNPVKNLRFLDENVKISMTGSR
Arabidopsi      MANLVLSECGIRPLPRIYTTPRSNFLSNNNKFRPSLSSSSYKTSSSPLSFGLNSRDGFTR
GME_Glycin      ------------------------------------------------------------
Vigna_radi      ------------------------------------------------------------
Brassica_n      ------------------------------------------------------------
Oryza_sati      ------------------------------------------------------------

GMC_Glycin      NWGLKVSAPLRVASIEEEQKSVDLTNGTNGVEHEKLPEFDPGAPPPFNLADIRAAIPKHC
Nicotiana       NWALRVSAPLRIQTVGEEES--------ERTNNSGGEFFDPGAPPPFKLSDIKAAIPKHC
Petroselin      NWGLRVSVPMSVPSVSEEEE-----RFESLVEEENE--FDPGAAPPFKLSDVRAAIPKHC
Arabidopsi      NWALNVSTPLTTPIFEE----------SPLEEDNKQRFDPGAPPPFNLADIRAAIPKHC
GME_Glycin      --MVKDTKPLAYAANNGYQQ----------K--GSSFDFDPSAPPPFKIAEIRASIPKHC
Vigna_radi      ---MIQAQTLQHFGNGARE----------GDQSYFDPGAPPPFKIADIRAAIPKHC
Brassica_n      ------------------------------------------------------------
Oryza_sati      ---MAASATQEADCKAS----------EDARLFFDAAKPPPFRIGDVRAAIPVHC

GMC_Glycin      WVKDPWRSMSYVVRDVIAVFGLAAAAAY---LNNWLVWPLYWAAQGTMFWALFVLGHDCG
Nicotiana       WVKNPWKSMSYVVRDVAIVFGLAAAAAY---FNNWVVWPLYWFAQSTMFWALFVLGHDCG
Petroselin      WVKDPVRSMSYVLRDVLIVFGLAVAASF---VNNWAVWPLYWIAQGTMFWALFVLGHDCG
Arabidopsi      WVKNPWKSLSYVVRDVAIVFALAAGAAY---LNNWIVWPLYWLAQGTMFWALFVLGHDCG
GME_Glycin      WVKNPWRSLSYVLRDVLVIAALVAAAIH---FDNWLLWLIYCPIQGTMFWALFVLGHDCG
Vigna_radi      WEKSTLRSLSYVLRDVLVVTALAASAIS---FNSWFFWPLYWPAQGTMFWALFVLGHDCG
Brassica_n      --------MSYVVRELAIVFALAAGAAY---LNNWLVWPLYWIAQGTMFWALFVLGHDCG
Oryza_sati      WRKTPLRSLSYVARDLLIVAALFAAAASSIDLAWAWAWPLYWARQGTMVWALFVLGHDCG
                         .*** *.. .  *  *          * .*   * ** ************

GMC_Glycin      HGSFSNNSKLNSVVGHLLHSSILVPYHGWRISHRTHHQHHGHAENDESWHPLPEKLFRSL
Nicotiana       HGSFSNNHKLNSVVGHILHSSILVPYHGWRISHRTHHQNHGHVENDESWHPIPEKIYNSL
Petroselin      HGSFSNDAKLNSVVGHILHSSILVPYHGWRISHRTHHQNHGHVENDESWHPLSEKLFNSL
Arabidopsi      HGSFSNDPKLNSVVGHLLHSSILVPYHGWRISHRTHHQNHGHVENDESWHPMSEKIYNTL
GME_Glycin      HGSFSDSPLLNSLVGHILHSSILVPYHGWRISHRTHHQNHGHIEKDESWVPLTEKIYKNL
Vigna_radi      HGSFSNSSKLNSFVGHILHSLILVPYNGWRISHRTHHQNHGHVEKDESWVPLTEKVYKNL
Brassica_n      HGSFSNDPRLNSVVGHLLHSSILVPYHGWRISHRTHHQNHGHVENDESWHPMSEKIYKSL
Oryza_sati      HGSFSDSAMLNNVVGHLLHSFILVPYHGWRFSHRTHHQNHGHIERDESWHPITEKLYWQL
                ***** **  *** *** ***** *** ******** *** * **** *. **.. *

GMC_Glycin      DTVTRMLRFTAPFPLLAFPVYLFSRSPGKTGSHFDPSSDLFVPNERKDVITSTACWAAML
Nicotiana       DLATKKLRFTLPFPLLAYPFYLWSRSPGKKGSHFDPNSDLFVPSEKKDVMTSTLCWTAMA
Petroselin      DDLTRKFRFTLPFPMLAYPFYLWGRSPGKKGSHYDPSSDLFVPNERKDVITSTVCWTAMA
Arabidopsi      DKPTRFFRFTLPLVMLAYPFYLWARSPGKKGSHYHPDSDLFLPKERKDVLTSTACWTAMA
GME_Glycin      DSMTRLIRFTVPFPLFVYPIYLFSRSPGKEGSHFNPYSNLFPPSERKGIAISTLCWATMF
Vigna_radi      DDMTRMLRYSFPFPIFAYPFYLWNRSPGKEGSHFNPYSNLFSPGERKGVVTSTLCWGIVL
Brassica_n      DKPTRFFRFTLPLVMLAYPFYLWARSPGKKGSHYHPDSDLFLPKERNDVLTSTACWTAMA
Oryza_sati      ETRTKKLRFTLPFTLLAFPWYRS---PGKTGSHFLPSSDLFSPKEKSDVIVSTTCWCIMI
                .  *.  *.. *  .  .* *     *** ***. * * ** * *.  .  ** **  .

GMC_Glycin      GLLVGLGFVMGPIQLLKLYGVPYVIFVMWLDLVTYLHHHGHEDKLPWYRGKEWSYLRGGL
Nicotiana       ALLVGLSFVMGPFQVLKLYGIPYWGFVMWLDLVTYLHHHGHDDKLPWYRGEEWSYLRGGL
Petroselin      ALLVGLNFVMGPVKMLMLYGIPYWIFVMWLDFVTYLHHHGHDDKLPWYRGKEWSYLRGGL
Arabidopsi      ALLVCLNFTIGPIQMLKLYGIPYWINVMWLDFVTYLHHHGHEDKLPWYRGKEWSYLRGGL
GME_Glycin      SLLIYLSFITSPLLVLKLYGIPYWIFVMWLDFVTYLHHHGHHQKLPWYRGKEWSYLRGGL
```

```
Vigna_radi      SVLLYLSLTIGPIFMLKLYGVPYLIFVMWLDFVTYLHHHGYTHKLPWYRGQEWSYLRGGL
Brassica_n      VLLVCLNFVMGPMQMLKLYVIPYWINVMWLDFVTYLHHHGHEDKLPWYRGKEWSYLRGGL
Oryza_sati      SLLVALACVFGPVPVLMLYGVPYLVFVMWLDLVTYLHHHGHND-LPWYRGEEWSYLRGGL
                 .*. *     *  .* ** .**   ***** ********    ****** **********
GMC_Glycin      TTLDRDYGWINNIHHDIGTHVIHHLFPQIPHYHLVEATEAAKPVFGKYYREPKKSAAPLP
Nicotiana       TTLDRDYGWINNIHHDIGTHVIHHLFPQIPHYHLVEATEAAKPVLGKYYKEPKK-SGPLP
Petroselin      TTLDRDYGWINNIHHDIGTHVVHHLFPQIPHYHLIEATEAAKPVFGKYYREPKK-SGPVP
Arabidopsi      TTLDRDYGLINNIHHDIGTHVIHHLFPQIPHYHLVEATEAAKPVLGKYYREPDK-SGPLP
GME_Glycin      TTVDRDYGWIYNIHHDIGTHVIHHLFPQIPHYHLVEATQAAKPVLGDYYREPER-SAPLP
Vigna_radi      TTVDRDYGWINNVHHDIGTHVIHHLFPQIPHYHLVEATKSAKSVLGKYYREPQK-SGPLP
Brassica_n      TTLDRDYGLINNIHHDIGTHVIHHLFPQIPHYHLVEATEAAKPVLGKYYREPDK-SGPLP
Oryza_sati      TTVDRDYGWINNIHHDIGTHVIHHLFPQIPHYHLVEATKAARPVLGRYYREPEK-SGPLP
                **.***** * *.*********.*************.*** .*. * * **.** . . *.*
GMC_Glycin      FHLIGEIIRSFKTDHFVSDTGDVVYYQTDSKINGSSKLE-----
Nicotiana       FYLLGVLIKSMKQDHYVSDTGDIVYYRTDPQLSGFQK-------
Petroselin      FHLLATLWKSFKKDHFVSDTGDVVYYQAHPEIAKTQK-------
Arabidopsi      LHLLEILAKSIKEDHYVSDEGEVVYYKADPNLYGEVKVRAD---
GME_Glycin      FHLIKYLIQSMRQDHFVSDTGDVVYYQTDSLLLHSQRD------
Vigna_radi      FHLLKYLLQSISQDHFVSDTGDIVYYQTDPKLHQDSWTKSK---
Brassica_n      LHLLGILAKSIKEDHFVSDEGDVVYYEADPNLYGEIKVTAE---
Oryza_sati      LHLFGVLLRTLRVDHFVSDVGDVVYYQTDHSLNGTDWAEDAKHK
                  *   . ..   **.*** *..*** .   .
```

이상 8종의 생물로부터 얻은 유전정보로부터 모든 구성원에서 동일한 배열을 가지는 부분 즉,

WALFVLGHDCGHGSFS, HHDIGTHV 및 HHLFPQIPHYHL배열로부터 , 수종의 혼합 probe를 합성하여 PCR에의한 고도불포화지방산 생성관련 desaturase유전자의 cloning을 시도하였다.

probe의 설계

```
          5'G   H    D    C    G   H3'
probe 1    GGA CAT GAC TGT GGA CAT
             T   C   T   C   T   C
             C
             G
          5'G   H    D    C    G   H3'
probe 2.   GGA CAT GAC TGT GGC CAT
             T   C   T   C   G   C
             C
             G
          3'H   Y    H    P    I    Q5'
probe 3.   ATG GTA ATG TGG TAT TTG
             T   A   G   A   G   C
                                 A
          3'H   Y   H   P   I   Q5'
probe 4.   ATG GTA ATG GGG TAT TTG
             T   A   G   C   G   C
```

```
                                          A
          3'T  G   I   D   H   H5'
probe 5.   GT ACC TAT GTC ATG ATG
              C   G   A   G   G
                  A
          3'T  G   I   D   H   H
probe 6.  GT GCC TAT GTC ATG ATG
              T   G   A   G   G
                  A
```

PCR 시의 primer의 조합은 primer1 + primer3, primer1 + primer4, primer2 + promer3, primer2 + primer4, primer2 + primer5, primer2 + primer6의 6가지 조합으로 수행하였다.

나. Elongase 유전자의 클론닝을 위한 PCR primer의 제작

CLUSTAL W (1.75) multiple sequence alignment

```
BN1             MTSINVKLLYHYVITNLFNLCFFPLTAIVAGKAYRLTIDDLHHLYYSYLQHNLITIAPLF
BN2             MTSINVKLLYHYVITNLFNLCFFPLTAIVAGKAY-LTIDDLHHLYYSYLQHNLITIAPLL
Arabidopsis     MTSVNVKLLYRYVLTNFFNLCLFPLTAFLAGKASRLTINDLHN-FLSYLQHNLITVTLLF
                ***:******:**:**:****:*****::****  ***:***: : **********:: *:

BN1             AFTVFGSVLYIATRPKPVYLVEYSCYLPPTHCRSSISKVMDIFYQVRKADPS-RNGTCDD
BN2             AFTVFGSVLYIATRPKPVYLVEYSCYLPPTHCRSSISKVMDIFFQVRKADPS-RNGTCDD
Arabidopsis     AFTVFGLVLYIVTRPNPVYLVDYSCYLPPPHLKVSVSKVMDIFYQIRKADTSSRNVACDD
                ****** ****.***:*****:*******.* : *:********:*:****.* ** :***

BN1             SSWLDFLRKIQERSGLGDETHGPEGLLQVPPRKTFAAAREETEQVIIGALENLFKNTNVN
BN2             SSWLDFLRKIQERSGLGDETHGPEGLLQVPPRKTFARAREETEQVIIGALENLFKNTNVN
Arabidopsis     PSSLDFLRKIQERSGLGDETYSPEGLIHVPPRKTFAASREETEKVIIGALENLFENTKVN
                .* ******************:.****::********* :******:**********:**:**

BN1             PKDIGILVVNSSMFNPTPSLSAMVVNTFKLRSNVRSFNLGGMGCSAGVIAIDLAKDLLHV
BN2             PKDIGILVVNSSMFNPTPSLSAMVVNTFKLRSNVRSFNLGGMGCSAGVIAIDLAKDLLHV
Arabidopsis     PREIGILVVNSSMFNPTPSLSAMVVNTFKLRSNIKSFNLGGMGCSAGVIAIDLAKDLLHV
                *::**********************************::**************************

BN1             HKNTYALVVSTENITYNIYAGDNRSMMVSNCLFRVGGAAILLSNKPGDRRRSKYELVHTV
BN2             HKNTYALVVSTENITYNIYAGDNRSMMVSNCLFRVGGAAILLSNKPRDRRRSKYELVHTV
Arabidopsis     HKNTYALVVSTENITQGIYAGENRSMMVSNCLFRVGGAAILLSNKSGDRRRSKYKLVHTV
                *************** .****:************************. ********:******

BN1             RTHTGADGKSFRCVQQGDDENGKIGVSLSKDITDVAGRTVKKNIATLGPLILPLSEKLLF
BN2             RTHTGADDKSFRCVQQGDDENGQTGVSLSKDITDVAGRTVKKNIATLGPLILPLSEKLLF
Arabidopsis     RTHTGADDKSFRCVQQEDDESGKIGVCLSKDITNVAGTTLTKNIATLGPLILPLSEKFLF
                ********.******** ***.*: **.******:*** *:.*****************:**

BN1             FVTFMGKKLFKDKIKHYYVPDFKLAIDHFCIHAGGRAVIDVLEKNLALAPIDVEASRSTL
BN2             FVTFMGKKLFKDEIKHYYVPDFKLAIDHFCIHAGGKAVIDVLEKNLGLAPIDVEASRSTL
Arabidopsis     FATFVAKKLLKDKIKHYYVPDFKLAVDHFCIHAGGRAVIDELEKNLGLSPIDVEASRSTL
                *.**:.***:**:************:*********:**** *****.*:***********

BN1             HRFGNTSSSSIWYELAYIEAKGRMKKGNKVWQIALGSGFKCNSAVWVALNNVKASTNSPW
```

```
BN2             HRFGNTSSSSIWYELAYIEPKGRMKKGNKVWQIALGSGFKCNSAVWVALNNVKASTNSPW
Arabidopsis     HRFGNTSSSSIWYELAYIEAKGRMKKGNKAWQIALGSGFKCNSAVWVALRNVKASANSPW
                ********************.**********.********************.*****:*****

BN1             ECHCIDRYPVKIDSDSGKSETRVQNGRS
BN2             EPHCIDRYVKIDSDSGKSETRVPNGRS
Arabidopsis     QPHCIDRYVKIDSDLSKSKTHVQNGRS
                :************** .**:*:* ****
```

Elongase의 서열을 이용하여 sequence정렬을 한결과 상기와 같이 보존영역이 많이 존재하므로 AFTVFG와 HCIDRY배열을 이용하여 primer를 제작하여 PCR을 수행하였다.

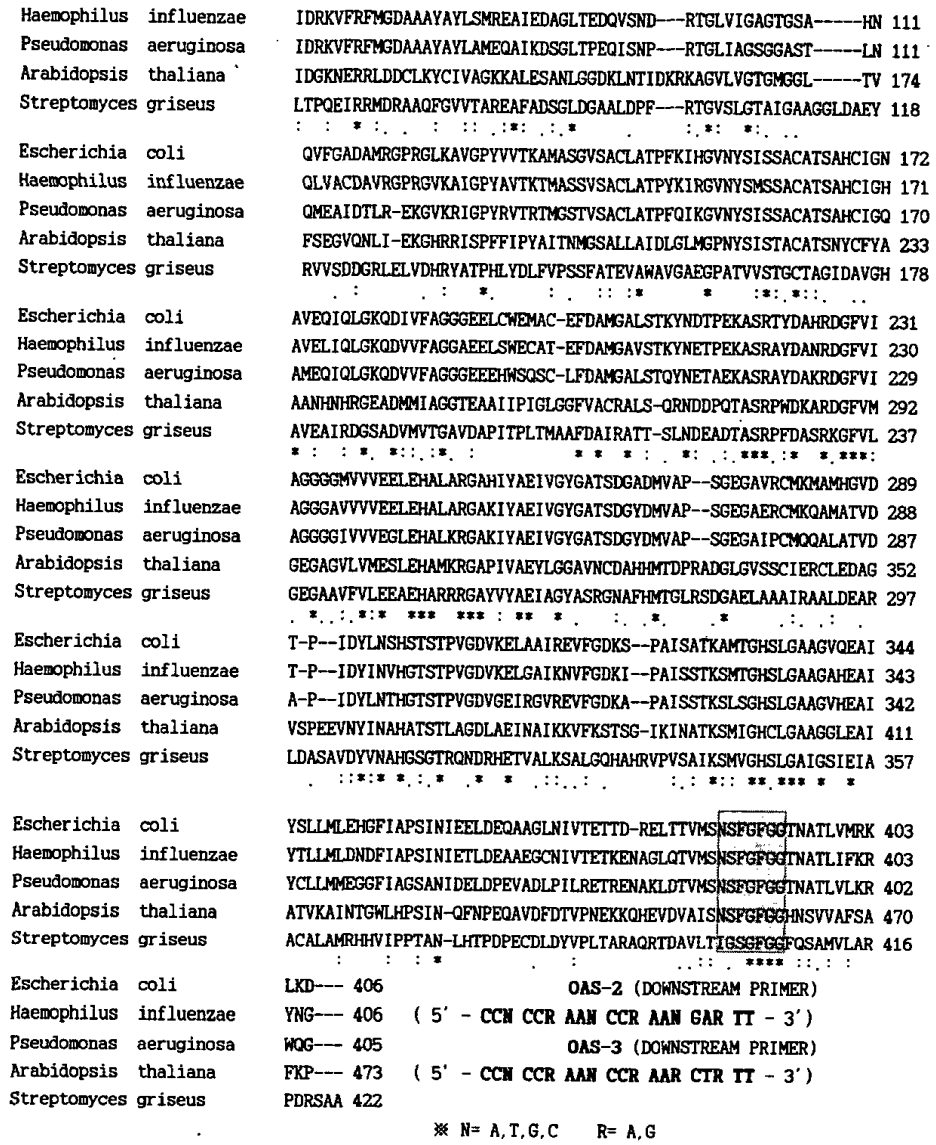
```
            A   F   T   V   F   G
primer 7   GCA TTT ACA GTA TTT GGA
             C   C   C   C   C   C
             G       G   G       G
             T       T   T       T
            Y   R   D   I   C   H
primer 8   ATA TCT ATC AAT ACA ATG
             G   C   G   G   G   G
                         T
```

위에서 제작한 primer를 이용하여 고도불포화 지방산 생성유전자를 클론닝하면서 필요할 경우 다음의 고도불포화지방산 생합성에 관련된 것으로 생각되는 유전자들의 클론닝에 이용하고자 한다.

다. 3-oxoacyl:ACP synthase 유전자의 클론닝을 위한 primer의 제작

5종류의 3-oxoacyl:ACP synthase 단백질의 a.a 배열을 분석하여 상동성이 높은 지역에서 다음 그림과 같이 OAS1과 OAS2, OAS3 primer를 제작하여 PCR 클론닝에 이용하였다.

```
Escherichia  coli          KRIVITGLGIVSSIGNNQQEVLASLREGRSGITFSQELKDSGMRSHVWGNVK-LDTTGL- 59
Haemophilus  influenzae    RRIVITGFGIISSIGNNKEEVLASLKAGKSGIEVVPEFVEMNMRSHVAGTIK-LNPSEH- 59
Pseudomonas  aeruginosa    RRVVITGLGIVSCLGNDKDTVSANLRAGRPGIRFNPSYAEMGLRSHVSGSVD-LNLEEL- 59
Arabidopsis  thaliana      KRVVITGMGLVSVCGNDVDAYYEKLLSGESGISLIDRFDASKFPTRFGGQIRGFSSEGY- 119
Streptomyces griseus       RRAVITGIGVCAPGGTGVDSFWELMCDGRTATRGITLFDPSPYRSRVAAEID-FDPRAHG 61
                           :*.****:*: :  *.. :    : *...           ::. . : :.
                             OAS-1 (UPSTREAM PRIMER)
                            ( 5' - GTN GTN RTN ACN GG - 3' )
Escherichia  coli          IDRKVVRFMSDASIYAFLSMEQAIADAGLSPEAYQNNP--RVGLIAGSGGGSP-----RF 112
```



라.malonylCoAACPtransacylase유전자의클론닝

이하의 아미노산 배열을 참고로하여 malonyl CoA ACP transacylase 유전자의 클론닝용 PCR primer를 제작하였다.

Escherichia coli.

```
   1 mtqfafvfpg qgsqtvgmla dmaasypive etfaeasaal gydlwaltqq gpaeelnktw
  61 qtqpalltas valyrvwqqq ggkapammag hslgeysalv cagvidfada vrlvemrgkf
 121 mqeavpegtg amaaiigldd asiakaceea aegqvvspvn fnspgqvvia ghkeaverag
 181 aackaagakr alplpvsvps hcalmkpaad klavelakit fnaptvpvvn nvdvkcetng
 241 dairdalvrq lynpvqwtks veymaaqgve hlyevgpgkv ltgltkrivd tltasalnep
 301 samaaalel

Hordeum vulgare
   1 mahclaavss fspsavrrrl ssqvanvvss rssvsfhsrq msfvsissrp sslrfkicca
  61 amgeaqakke tvdkvcmivk kqlavpdgtp vtaeskfsel gadsldtvei vmgleeefni
 121 tvdetsaqdi atvqdaanli eklvtekta

Hordeum vulgare var. distichum
   1 aamgeaqakk etvdkvcmiv kkqlavpdgt pvtaeskfse lgadsldtve ivmgleeefn
  61 itvdetsaqd iaa

Vibrio harveyi
   1 efnapqlpvi nnvdvaaetd pakikdalvr qlhspvrwte svqlmneqgv enllelgpgk
  61 vltgltkriv ktlstaavnd vasleaak
```

마. fab gene cluster의 클론닝

지방산 생합성에 관련된 유전자 cluster를 클론닝하기 위하여 fabD gene의 FPGQGS(primer 1) 부분과 fab F gene의 NSFGFGG부분(primer2)의 아미노산 배열을 참고로 하여 primer를 합성하였다.

```
Primer 1: GAAGTACCAACCAGTCGTCT
Primer 2:  GCA TTA GTA CCA CTA ACA CCA AA
             G   C   C   G   C  TC   G
                 T   T       T   T
                 G   G       G   G
```

이상의 Primer 1과 Primer 2를 이용하여, *Shewanella hanedai* KMG427 균주의 염색체 DNA 상에서 PCR을 수행했을 때 약 3.4 kb의 단편이 증폭되었다. 이 3.4 kb의 DNA 단편의 제한 지도를 결정하였던바, PCR 증폭산물의 중간에 Xho I과 HindⅢ로 절단되는 부분이 있음을 발견하고 PCR 증폭 DNA 단편을 HindⅢ 와 XhoI 으로 절단한 후 이 단편의 염기배열을 결정하고, 이어서 이 단편의 양단에서 DNIFLRM 배열에서 상류로 Primer를 합성하여 이것과 상기의 Primer I을 이용하여 PCR을 수행하여, 증폭된 단편의 염기배열을 결정하였으며, 하류에서도 GGMYMA 부위의 아미노산 배열을 참고로 하여 primer를 합성한 후 상기의 3.4kb의 PCR 증폭 DNA의 염기배열 결정을 수행하였다.

바. EPA 생산 유전자의 클론닝

EPA생산균으로 알려진 *Shewanella* sp. SCRC-2738균주의 EPA생산관련 유전자중 가장 긴 open reading frame(ORF-5)을 생성할 것이 기대되는 유전자의 구조를 조사했을 때 이 한 개의 유전자 내에는 KAS유전자와 상동성이 높은 부분과 MCT유전자와 상동성이 높은 부분이 포함되어 있음을 확인 하였다(그림 4-22). 그리하여 이 KAS유전자와 상동성이 높은 부분과 MCT유전자와 상동성이 높은 부분의 염기배열을 참고로하여 primer를 합성하여 (그림 4-23) PCR을 수행하여 EPA 생산성 유전자의 부분을 클론닝하였다.

1) Genomic Library 제작을 위한 in vitro packaging

Preparation of Host cells: Glycerol stock에서 host cell (Bacterial strain LE392)을 LB(Luria Broth) plates에 streaking해서 37℃에서 12시간 배양하였다. 배양된 plate에서 single colony를 획득하여 0.2%(v/v) maltose, 10mM $MgSO_4$가 첨가된 LB medium에 접종하여 37℃에서 4-6시간($OD_{600} \leq 1.0$) 배양하고. 이 배양액을 2000 rpm, 10분동안 원심분리하여 균체를 획득한후, 살균된 10mM $MgSO_4$를 초기배양액의 1/2부피로 첨가하여 균체를 부드럽게 현탁하고, 살균된 10mM $MgSO_4$로 OD_{600}=0.5가 되도록 균체를 희석하였다.

DNA Ligation: 분리된 EPA 생산균주인 *Shewanella hanedai* KMG427로부터 Genomic DNA를 추출, 정제하여(Sambrook *et al.*, 1989) 제한효소 *Sau3A* I 으로 partially digestion 하고, size가 9kb 이상되는 DNA를 회수하고, 회수된 DNA, EMBL3 BamH I Arms, Ligase 10X buffer, T4 DNA Ligase 를 혼합하여 22℃에서 3시간 동안 ligation 반응을 수행하였다.

Ligation된 DNA의 Packaging: Packagene Extract를 얼음위에서 녹인다음, 적절한 양의 ligated sample DNA를 첨가하여 반응튜브를 수회 부드럽게 tapping하여 혼합하고 22℃에서 3시간동안 incubation하였으

며, 반응이 끝난 packaging mix(55-60 μl)에 phage buffer(445 μl)와 chloroform(25 μl)를 첨가한 후에 부드럽게 inversion mixing하였다.

LB Plate에서 Titer의 체크: Packaging 반응산물을 phage buffer로 적절하게(1:1,000 또는 1:10,000) 희석하고, 희석된 phage 100 μl와 준비된 bacterial cell 100 μl를 5 ml tube에서 혼합한후, 37℃에서 30분동안 반응시켜 phage의 흡착을 유도하였다. 그리고, molten 45℃ LB top agar(1.0% Bacto-tryptone, 0.8% NaCl, 0.6% agarose) 3 ml을 첨가해서 혼합한후 37℃로 prewarming한 LB plate에 붓고, LB top agar가 굳으면 37℃에서 12시간 배양하였다. 생성된 Plaque 수를 count하고 phage의 적정농도를 계산하고, arms의 packaging efficiency를 계산하였으며, Genomic library의 증폭은 알려진 방법대로 수행하였다 (Sambrook *et al.* 1989).

probe DNA로 스크리닝하기 위해 파아지를 Nylon Membrane 으로 이동: Genomic library를 phage buffer로 1:10~1:5의 비율로 희석하였다. 희석된 genomic library 10 μl와 희석된 host cell 600 μl를 부드럽게 혼합한후 37℃에서 15분동안 반응시켰다. 그리고, molten 45℃ LB top agar(1.0% Bacto-tryptone, 0.8% NaCl, 0.6% agarose) 3ml을 첨가해서 혼합한후 37℃로 prewarming한 LB plate에 붓고난뒤에 적당한 plaque가 생성되도록 37℃에서 배양하고, 배양이 끝나면 4℃에서 1시간 이상 보관하였다. nylone membrane을 water insoluble pen으로써 표시한후에 한쪽끝으로부터 조심스럽게 plate위에 놓은후에 약 1-3분동안 실온에 두고, membrane의 방향성을 20-gauge needle로 비대칭적으로 표시하였다. 그리고, 핀셋으로 천천히 membrane을 plate로부터 제거해서 상온에서 10-20분동안 건조시키고, 건조한 membrane을 0.2 M NaOH, 1.5 M NaCl 용액으로 포화된 Whatman 3MM paper위에서 1-2분 동안 처리한후, 0.4 M Tris-HCl(pH 7.6), 2x SSC 용액에서 1-2분, 2x SSC 용액에서 1-2분동안 동일한 방법으로 처리하고, 그리고, membrane을 UV irradiation으로 cross-linking하였다.

2) Plaque hybridization을 위한 Probe DNA의 조제

Preparation of Probe DNA: EPA 생합성 gene cluster를 클론닝하기 위해 사용할 probe DNA를 얻기위해 PCR을 수행하였다. 사용된 두 개의 primer(5'-AGCTCATTTGGTTTTGGYGGCACYAAC-3', 5'-CTCACCRAARCTATGRCCKGC-3')는 알려진 균주들의 KAS와 MCT의 conserved amino acid sequence로부터 제작하였다. 반응조건은 95℃ 1분, 60℃ 1분, 72℃ 1분, 30 cycles로 수행하였다.

Plaque Hybridization: 사용된 DNA probe (PCR product)는 Random primed DNA labeling kit (Boehringer Mannheim 社)을 사용하여 방사선동위원소인 ^{32}P (Amersham 社)로 표식하였다. Prehybridization solution의 조성은 6 x SSC, 5 x Denhardt's reagent, 0.5% SDS, 100 μg/ml denatured fragmented salmon sperm DNA이고, 반응은 65℃에서 2-4시간 수행하였다. Hybridization solution은 6 x SSC, 0.5% SDS, 100 μg/ml denatured fragmented salmon sperm DNA, 방사선 동위원소로 표식된 probe DNA로 구성되었으며, 반응은 65℃, 16-20시간동안 수행되었다. 반응이 끝난후 membrane을 아래와 같은 순서로 washing하였다. 2 x SSC / 0.5% SDS로 상온에서 5분, 2 x SSC / 0.1% SDS로 상온에서 15분, 0.1 x SSC / 0.5% SDS로 37℃에서 30분, 0.1 x SSC/ 0.1% SDS로 68℃에서 1시간동안 처리하였다. 그리고, 적절한 시간동안 autoradiography를 수행하였다(Sambrook *et al.*, 1989).

2차 Screening: Hybridizaton 결과 추정되는 plaque를 stock plate로부터 획득한 후, 1 ml의 phage buffer와 20 μl의 chloroform에 넣어서 vortex한다. Second plate에서 450개정도의 plaque를 형성할 정도로 host cell을 적당히 희석한후에 획득된 plaque로 감염시켰다. 그리고, prehybridization과 hybridization을 이전과 동일한 방법으로 하였다.

3차 Screening: Second screening으로부터 얻어진 plaque를 secondary stock plate로부터 획득한후, 1 ml의 phage buffer와 20 μl의

chloroform에 넣어서 4℃에서 보관하였다.

Lysate의 조제: Plate에서 배양된 Host cell (Bacterial strain LE392)의 single colony를 5 ml LB medium (0.2% maltose, 10 mM $MgSO_4$)에 접종하고 37℃에서 12시간 배양하고, 배양된 host cell 100 μl와 1 x 10^5 plaque forming unit (pfu)을 형성할 정도의 적당한 phage를 혼합한후, 37℃에서 15분정도 배양하였다. 그리고, molten 45℃ LB top agar(1.0% Bacto-tryptone, 0.8% NaCl, 0.6% agarose) 2.5ml을 첨가해서 혼합한 후 LB plate에 첨가, LB top agar가 굳으면 37℃에서 6시간 배양하였으며, 배양한 plate에 2-3ml의 phage buffer를 첨가한 후 spatula로 top agar를 모으고 50ml 원심관에 담아서 잘게 부수어서 상온에서 30분 배양한 다음에 원심분리(10,000 rpm, 10분, 4℃)하고, 조심스럽게 상등액을 new tube에 옮기고 chloroform을 0.3%(v/v)가 되도록 첨가하였다.

재조합 Lambda DNA의 분리: 준비된 phage lysate로부터 miniprep 방법(Sambrook *et al.*, 1989)으로 recombinant lambda DNA를 분리, 정제하였다.

4. EPA 유도합성

배양최적조건: *S. hanedai* KMG427 균주의 생장속도 측정은 temperature gradient incubator를 이용하여 수행하였다. *S. hanedai* KMG-427 균주의 EPA생성 최적조건을 결정하기 위한 생육 최적온도를 검토하기 위해서 배양온도를 0℃ - 40℃의 범위에서 수행하였다.

EPA 유도 생산 최적조건: *S. hanedai* KMG427을 이용한 EPA 생산의 최적조건을 검토하기 위해서 이 균주를 BH medium을 사용하여 20℃에서 2일간 배양한후, 4℃, 12℃, 20℃, 25℃에서 3일간 incubation한 후 EPA 생산유도조건을 검토하였다.

5. EPA 분리균주의 특징

형태적 특징; 분리된 세포의 형태는 transmission electron microscopy와 scanning electron microscopy로 관찰하였다. negative staining으로는 일정량의 배양된 cell을 Pioloform과 탄소로 입혀진 동 막대에 놓고, potassium hydroxide로 적정된 1%의 patassium phosphotunstic acid(pH 6.5)로 염색하였다. 음화 염색된 세포는 Model JEM-1210 scanning electron microscopy(JEOL, Tokyo, Japan) 에서 15kV로 관찰하였다.

생화학적 및 생리학적 특징: 분리균주의 동정을 위해서, 그것의 생화학적 생리학적 특징들은 "Bergy's manual of Determinative Bacteriology", "Manual of methods for general Bacteriology" 및 "The prokaryotes"등에 따라서 조사하였다. 부가적인 생화학적 검사를 위해서는 API 20E and API 20NE test kit (BioMeriux. Lyon. France)를 이용하였으며, 세균을 차가운 인공 바닷물에 현탁한 후 지시사항에 따라 사용하였다.

6. 16S rRNA 유전자의 분석

16S rRNA 유전자의 PCR 증폭 및 sequencing: 16S rDNA를 증폭하기위한 PCR 장치로서는 MJ Research DNA thermal cycler(model PTC-100-60)를 사용하였으며, 증폭 프라이머로서는 universal primer인 EC 9F(5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 EC1542R(5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3')이 사용되었다.

증폭된 PCR 산물은 1.0% agarose gel에서 확인하였으며, 확인된 밴드는 GENE Clean Kit(Bio101 Inc., Vista, U.S.A.)를 사용하여 추출하였다. 정제된 PCR 산물은 pGEM-T easy vector (Promega Co., Madison, U.S.A.)에 클론닝하였으며, 1.5kb의 insert를 제한효소처리로 확인하였다. 도입된 PCR insert의 sequencing은 ABI Prison 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, New Jersey, USA)를 사용하여 양방

향으로 분석하였으며, 사용된 sequencing용 프라이머는 reverse primers (EC536R, 5′-GWATTACCGCGGCKGCTG-3′; EC926R, 5′-CCGTCAATTCMTTTRAG-3′; 그리고 EC1512R, 5′-ACGGHT AACCTTGTTACGACTT-3′) 그리고 M13 universal primer등이었다.

16S rRNA 유전자 sequence의 연관관계 분석: 밝혀진 16S rRNA 유전자의 염기서열은 GenBank와 RDP Database에 등록된 염기서열등과 비교 분석하였으며, 염기서열의 alignment는 multialignment program인 ClustalW(Higgins et al., 1992)에 의해 실행되었으며, 정렬된 16S rRNA gene 염기서열은 분석에 적절하지 않을 정도의 높은 변이를 나타내는 영역이나 불확실한 영역등의 위치를 수작업으로 제거하여 다시 분석하였다. 다른 종들과의 근연관계분석을 위해 사용한 Program 으로는 Phylip version 3.5c package(Felsenstein, 1993)를 사용하였으며, 분석된 트리의 상대적인 신뢰도 측정을 위해서는 100회의 bootstrapping을 실시하고, Dnadist, Neighbor, Dnapars등의 알고리즘으로 Phylogenetic tree를 만들었다.

7. 호염성 관련 유전자의 염기배열 결정 및 발현

*Bacillus butilis*로부터 cytidine deaminase(cdd) 유전자를 클론닝하여 cdd 유전자의 상류영역 약 3kb의 염기배열을 결정하였다. 그리하여 open reading frame(ORF)을 조사해본 결과 cdd의 상류에 phoH유전자의 일부분과 기능미지의 ORF1, ORF2, ORF3, ORF4 및 diacylglycerol kinase(dgk) 유전자가 발견되었다(그림 4-1). diacylglycerol kinase는 지질성 signal 분자이며 엄밀한 의미에서 second messenger인 diacylglycerol을 phosphatidic acid(PA)로 전환시키는 기능을 담당한다. 이때 diacylglycerol 의 target protein은 cPKC와 nPKC이며, PA의 target protein은 PA의존성 protein kinase 및 raf, PKCζ등이 거론되고 있다. 이와 같이 외부 환경신호전달에 관련된 diacylglycerol kinase유전자가 실재로 어떠한 signal에 대응

하여 발현되는지를 검토하기 위하여 NaCl, 온도, pH등의 조건을 여러 가지로 변경시킨 환경에서 배양하여 그 발현량을 mRNA의 전사 수준에서 검토하였다. 유전자 조작 system이 잘 개발되어있는 *B. subtilis*에서 호염성 관련 유전자의 구조 및 발현을 연구하고 이것을 참고로 하여 EPA 생산성 세균에서 호염성 관련 유전자의 검색을 하였다.

RNA 준비: 37℃에서 12시간 배양한 배양액 5ml을 원심분리(7000 r.p.m., 5분, 4°C)해서 균체를 회수한후 -70°C에 즉시 보관한 균체를 diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 처리된 2ml의 suspension solution (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.9% NaCl, 0.5mg/ml lysozyme)으로 현탁한후 3ml phenol, 0.24ml 10% SDS를 첨가한 후, 30초동안 vortex를 하고, 60°C 항온수조에서 최소한 10분동안 처리하였다. 이과정을 3회 반복한 후에 원심분리(15000 r.p.m., 10분, 4°C)한 후 상층액을 2ml phenol/chloroform으로 재추출하고 2배 부피의 ice-cold ethanol을 첨가한 후 -20°C에서 12시간동안 침전시켰다. 침전된 RNA를 원심분리(15000 r.p.m., 30분, 4°C)하여 RNA pellets을 획득한 후 70%(v/v) ethanol로 세척하고 건조시킨다. 적당히 건조된 RNA를 DEPC로 처리한 살균증류수로 녹인후 -70°C에서 보관하였으며, 실험에 사용된 모든 solution, plasticware들은 0.1% DEPC (sigma 社)로 12시간동안 처리하고 autoclaving 또는 200°C에서 12시간동안 건열살균해서 잠재적인 RNase activity을 제거시킨다(Farrell, 1993 ; Sambrook *et al.*, 1989). 이러한 과정으로 고순도(A_{260}/A_{280} > 1.8)의 분해되지 않은 RNA를 획득하여 실험에 사용하였다.

RNA Dot Blotting: RNA dot blot hybridization 실험을 위해서 RNA를 50% formamide와 7% formaldehyde를 포함하는 1 x SSC (0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate) solution에 담근후 68°C에서 15분동안 변성시킨후 얼음위에서 냉각하였다. 변성된 RNA를 35 μg, 20 μg, 5 μg 씩 nylone membrane위에 점적한 후에 washing, baking,

prehybridization, hybridization들은 Sambrook *et al.* 에 기술되어있는 방법에 따라 수행하였다. 실험에 사용된 DNA probe (purified fragment from plasmids pSO1 ; *Kpn* I - *Hind* III fragment for *dgk*)는 Random primed DNA labeling kit (Boehringer Mannheim 社)을 사용하여 방사선동위원소인 ^{32}P (Amersham 社)로 표식하였다(Song *et al.*, 1989).

Northern Hybridization: 획득한 전체 RNA를 65°C에서 15분동안 열처리하여 변성시킨후에 50% formamide, 2.2 M formaldehyde, 1 x MOPS buffer (20 mM MOPS, pH 7.0, 5 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)을 첨가하여 얼음위에서 1분동안 반응시켰다. 그리고, 1.0 % agarose / formaldehyde gel (1 x MOPS running buffer)에서 50 volts의 전압으로 4시간동안 전기영동하였다. 그리고, 전기영동된 RNA를 10 x SSC을 transfer solution으로 사용하여 capillary action으로 12시간동안 nylone membrane으로 transfer하고, 80°C에서 2시간동안 baking 한 후에 0.04% methylene blue로 5-10분동안 실온에서 염색하여 RNA를 확인하였다(Herrin,D.L and G.W.Schmidt, 1988). Prehybridization solution의 조성은 5 x SSPE (3.6 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.2 M sodium phosphate, pH 7.7), 50% formamide, 5 x Denhardt's solution, 100ug/ml denatured herring sperm DNA, 0.5 % SDS이고 42℃에서 4시간 반응하였다. 그리고, hybridization은 ^{32}P로 표식된 probe를 사용하여 42°C에서 20시간동안 반응하였다. 반응이 끝난 후 membrane을 첫 번째 washing solution (2 x SSC / 0.1 % SDS)으로 상온에서 10분씩 2회 처리하고, 두 번째 washing solution (0.2x SSC / 0.1% SDS)으로 45℃에서 30분간 1회 처리한후, 적절한 시간동안 autoradiography를 수행하였다(Farrell, 1993 ; Sambrook *et al.*, 1989).

PCR amplification: *dgk*와 *dgk* upstream ORF 2 유전자가 operon으로 전사되는가를 확인하기 위한 probe DNA를 얻기위해 PCR을 수행하

였다. *dgk* upstream region을 확보하기위해 특이적인 2개의 primer (5'-TGGTCAAATCTGTAAAGGACA-3', 5'-TGATCACAAGCAAA AGTGTTG-3')를 사용하였고, 반응조성은 1 x amplification buffer (5 mM Tris-Hcl, pH 8.0, 10 mM NaCl, 0.01 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 5% glycerol and 0.1% Triton X-100), 0.2 mM dNTP, 0.2 uM each of primers, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5 units of Taq DNA polymerase이고, 95°C에서 45초, 48°C에서 60초, 72°C에서 90초, 36 cycles 조건으로 200ul PCR용 microcentrifuge tube에서 PORFGENE (Techne Cambridge Ltd. Duxford) 기기를 사용하여 PCR을 수행하였다(Michael A. Innis et al., 1989).

8. 기타 유전자 재조합 실험방법

염색체 DNA의 분리: 세균으로부터의 genomic DNA분리는 MINI-BEADbeater를 사용하여 0.5ml glass bead로 1분간 파쇄하고, 500ul의 lysis buffer(50 mM Tris-HCl pH7.2, 50mM EDTA pH 7.2, 3% sodium dodecylsulfate and 1% 2-mercaptoethanol)를 첨가한 후 교반하였다. 65℃ 1시간동안 가열한후 완전히 lysis된 것을 확인한 후 동일 양의 chloroform:isoamyl alcohol(24:1)을 첨가하여 완전히 emulsion시킨 다음 즉시 11,000g에서 1분간 원심분리하고 상등액을 새로운 tube로 옮기고 chloroform:isoamyl alcohol(24:1) 처리조작을 세포 침전물이 보이지 않을 때까지 되풀이하였다. 여기에 95% EtOH를 2배 volume 넣어 온화하게 혼합하여 -20℃, 15분간 둔 다음, 1-5분간 원심분리 하여 침전물이 생기면, 80% ice-cold EtOH로 세척하여 vaccuum desicator로 30분간 EtOH를 제거한 후 20-500 ul의 0.1 x TE를 첨가하여 4℃에서 보관하였다.

PCR techniques: 500 $\mu\ell$의 microcentrifuge tube당 약 50~100 ng의 template DNA와 각 0.2 $\mu\ell$의 dNTP, 0.2 $\mu\ell$의 primer, 1.5 mM $MgCl_2$,

0.5 unit Taq DNA polymerase, 1 x amplification buffer를 혼합하고 H_2O를 첨가하여 50 $\mu\ell$ volume으로 하며 mineral oil을 각각의 tube에 첨가한다. thermocycler program은 Michael A Innis et al., 1989[35]의 방법에따라 95℃에서 2분, 55℃에서 1분, 72℃에서 2분의 조건에서 45 cycles로 setting하였다.

Southern Hybridization: Southern hybridization에 의한 제한효소 분해양식을 조사하였다. 우선, 분리된 genomic DNA를 다양한 제한효소 (예, BamHI, HindIII, EcoRI, PstI, XbaI, SphI, SmaI, HincII, KpnI 등)로 완전하게 분해하여 1 x TAE buffer에서 agarose gel 전기영동을 행한 후, 이를 positively charged nylon membrane에 alkaline transfer buffer(0.4 N NaOH, 1 M NaCl)를 사용해서 capillary transfer하여 UV crosslinker(254 nm)로써 공유결합을 형성시켰다. 그 다음 사용할 probe DNA 단편을 선택하여 제한효소 절단 및 전기영동을 통해 분리해서 random labeling kit를 사용하여 isotope로 labeling 하였다.

Prehybridization은 아래와 같은 조성의 solution을 사용하여 60℃에서 2 - 4시간 동안 행하며, hybridization은 prehybridization solution으로부터 5 x Denhardt's solution을 제외한 조성으로 만들어 동일한 온도에서 prewarm하여 첨가하였으며, 이때, probe DNA를 100℃, 5분간 열변성시켜 함께 첨가한다. Hybridization은 12 - 24 시간동안 행하였다. Membrane의 washing후 autoradiography를 행하였다.

염기배열 결정: Sanger's dideoxy chain termination방법으로 염기배열을 결정하였다. 염기배열결정에는 일반적으로 Taq Polymerase를 이용한 thermo cycle DNA sequencing 방법을 사용하여 2차구조형성에 의한 artifactual band를 제거하고 보다 많은 염기서열을 읽을수 있도록 하였다.

제3절 실험결과 및 고찰

1. 고도불포화 지방산 생성 미생물의 분리, 동정 및 배양조건 확립

가. 고도불포화 지방산 생성균의 분리

경북 감포, 대구 칠곡, 부산 남천동, 강원도 주문진, 묵호항, 속초 등에서 미역, 해초, 넙치, 도다리 등의 해산 자원으로부터 고도 불포화 지방산 생성균의 스크리닝을 수행한 결과는 Table 4-1와 같으며, 주로 생선류에서 1,241균주가 부리되었으며, 이 중에서 TLC 상에서 EPA 생성균이 19균주, DHA 생성균이 5균주가 확인 되었다. 균체 지방산의 분리는 재료 및 방법에서 소개한 배지를 사용하여 25℃에서 이틀간 배양한 균체를 사용하여, 세포로부터 지방산을 지방산 methylester형태로 추출하여 사용하였다. 이때 분리된 EPA 혹은 DHA와 같은 고도불포화 지방산 생성균으로 부터추출한 지방산의 methyl ester를 TLC한 결과는 그림 4-2와 같이 EPA 또는 DHA의 표준물질과 유사한 위치에서 spot가 존재함을 확인하였다.

1) 국내 해안 어류에서 고도 불포화 지방산 생성균의 분리: 24균주가 TLC에 의해서 EPA 혹은 DHA를 생산하는 것으로 확인되었으므로 이들 균주들을 대상으로 지방산을 추출하여 GC로 분석했을때의 결과는 그림 4-3과 같이, 샘플어류로 부터는 표준물질과 동일한 retention time에서 관찰되는 EPA 혹은 DHA와 같은 고도 불포화지방산의 량은 너무 적어서 무시될수 있을 정도로 만이 관찰되었다. 그리하여 본 연구그룹은 국내의 남해안과 동해안 에서는 고도 불포화 지방산 생성균의 분포빈도가 너무 낮아서 스크리닝의 가능성이 매우 희박하다고 판단하였다.

2) 남극에서 분리된 미생물에 의한 고도불포화 지방산의 생산

GC에 의한 남극유래 미생물의 고도 불포화지방산 분석: 이상과 같은 경과로 미루어볼 때 국내 해안에서 수집하여 사용한 어류로 부터는 고도 불포화 지방산 생산성 미생물이 분리될 가능성이 매우 낮다고 판단되어, 국내산 어류에서는 고도 불포화 지방산 생산성 미생물의 분리를 그만두기로 하고 그동안 남극유래의 미생물 자원을 보유하고 있는 한국해양연구소의 조기웅 박사팀에 문의하여본 결과 역시 그들의 연구팀도 국내의 어류자원에 대한 고도불포화지방산 생산성 미생물의 분리를 수년간 시도하였으나 매우 어려웠던 경험을 들려 주었으며, 우리 팀의 고충을 듣고 자신들이 보유하고 있던 남극 해양동물유래의 미생물을 분양해 주어서 본 연구의 재료로 사용하게 되었다.

남극 유래의 미생물균주를 분양 받아서(strain No. 3010과 strain No. 2778) 이균주의 지방산을 추출하여 GC에서 분석해 본 결과 EPA 생산성이 100m 칼럼에서 retention time 64.919분에서 매우 우수함이 확인되었다.(그림 4-3)

EPA($C_{20:5w3}$)은 3010 균주에서 유일한 고도 불포화지방산인데 이렇기 때문에 EPA의 정제가 매우 용이하게 진행될 가능성이 있다. EPA와 같은 고도 불포화지방산은 동맥경화증, 혈전증, 고혈압등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

이들 고도불포화지방산은 어유에 풍부하므로, 산업적인 면과 건강적인 측면에서 어유는 EPA의 주된 공급원이 되어왔다. 그러나 이들 어류 유래의 EPA는 정제가 매우 어려운데, 원인은 어류가 매우 복잡한 지방산 조성을 가지고 있기 때문이다. 현재에는 EPA가 어유로부터 제조되고 있으나 해수에 높은 중금속 오염과 포획가능한 어류량의 심한 기복, 비린내 나는 맛과 향기, 불안전성 및 복잡한 추출과정의 등의 면에서 볼 때 어유로부터 EPA의 제조에는 분명 문제가 있다고 볼 수 있다. 따라서 재래식 자원으로부터 ω-3 지방산의 공급은 부적절하므로 다른 자원을 모색할 필요가 있다. 여러 가지 질병에 EPA를 광범하게 하용하기

위해서는 광범위한 임상 실험도 필요로 하는데 이러한 일을 위해서는 표준적인 조성의 EPA가 대량으로 소요될 것이다. 그러므로 미생물에 기초한 EPA의 생산은 연구활동 및 임상적 응용에도 많은 경제적 잇점을 부여할것으로 기대된다.

따라서 EPA 생산성 분리균주 3010은 장래의 EPA의 공업적 생산에 중요하게 사용될 것이 기대된다.

나. EPA 유도합성

Strain No. 3010의 세포지방산 조성분석: Strain No. 3010의 전 지방산 조성은 table 4-2에 나타나 있다. 주된 지방산은 iso-$C_{13:0}$(17.15%), $C_{14:0}$(7.69%), iso(DH)-$C_{13:0}$(7.72%) iso-$C_{15:0}$(8.42%), $C_{15:0}$(9.33%), $C_{16:0}$(9.36%), $C_{16:1w7}$(10.93%), 그리고 $C_{20:5w3}$(11.22%)이었으며, 그외의 포화지방산으로 $C_{12:0}$(3.65%), $C_{13:0}$(2.99%), 및 $C_{17:0}$(0.7%)였으며, 분지형 지방산은 iso-$C_{14:0}$(0.35%), iso-$C_{18:0}$(0.43%)이었으며, 불포화기를 한 개 가지는 것은 C15:1w8(1.88%), C15:1w6(0.64%), C16:1w9(0.77%), $C_{17:1w8}$(2.74%), C17:1w6(0.25%), $C_{18:1w9}$(0.34%) 및 $C_{18:1}$(0.38%)였다.

Strain No. 3010의 배양최적온도: Strain No. 3010을 4℃, 12℃, 20℃, 및 25℃에서 배양시켜 배양액의 흡광도를 측정함으로서 이 균주의 생육최적온도를 결정하였는데 그림 4-4와 같이 20℃ 및 25℃에서 배양시켜 배양액의 흡광도를 측정함으로서 이 균주의 생육최적온도를 결정하였는데 20℃에서 생육이 최적임이 밝혀졌다.

Strain No. 3010의 EPA 유도 생산 최적온도: 저온성 세균인 3010 균주의 EPA 유도 생산성을 조사하기 위해서 이 균주를 20℃에서 2일간 배양한 후 4℃, 12℃, 20℃ 및 25℃에서 3일간 incubation 시켰을 때 그림 4-5와 같이 incubation 온도는 4℃가 최적임을 알수 있었다. 3010균주에서 지방산 조성에 미치는 온도의 영향은, 이 세균이 저온 환경에 적응하는데 관련이 있는 것 같다. EPA의 생리적 성질중

한가지는, 막지질 이중층의 상전이 온도를 낮춤으로서 세포막의 유동성을 증가시키기 위한 것으로 생각이 되며, 역시 심해 세균이 고농도의 EPA를 함유하고 있는 것은 높은 압력과 저온상태에서 막의 유동성과 기능을 유지하는데 유용하게 작용하기 위한 것 같다.

EPA의 생산에 미치는 NaCl의 영향: Strain No. 3010 균주의 EPA 생산에 미치는 NaCl의 영향을 조사하기 위해서 NaCl을 1%, 2%, 3% 및 4%를 배지를 첨가하여 배양했을 때, EPA의 생산은 그림 4-6와 같으며, NaCl 1%첨가시에 EPA의 생산량이 가장 많았다.

EPA의 생산에 미치는 pH의 영향: Strain No. 3010 균주의 EPA 생산에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해서 pH6, pH7, pH8 및 pH9에서 배양했을 때의 EPA의 생산경향은 그림 4-7과 같으며 pH8이 최적이었다.

다. Strain No. 3010 균주의 형태적, 생리적 특징

전자현미경관찰: 전자현미경으로 관찰했을 때 3010 균주는 간상이었으며, 크기는 0.4 - 0.6 x 2 - 4 ㎛였다(그림 4-8). Colony는 PYM-G agar에서 약한 붉은 색을 띄었으며, 또한 형광을 발하는것도 확인되었다.

생육가능온도: 이 균주 3010은 30℃ 이상에서는 생육이 불가능하였으나 4℃의 저온에서는 생육이 가능하였으므로 저온균임이 확인되었다.

생육에 미치는 NaCl의 영향: Strain No. 3010은 NaCl이 배지중에 없을때도 생육 불가능하였으며 또한 NaCl이 배지중에 6% 이상 함유되어 있어도 생육이 불가능하였다. 이 균주는 gelatinase와 chtinase의 생산이 가능하였으나, indole, β-glucosidase, urease, arginase dehydrolase, Lysine decarboxylase, Ornithine decarboxylase, Tryptophane deaminase 및 H_2S 등은 생성하지 않았으며 N-acetylglucosamine, citrate, malate 및 caprate는 이용가능하였으나

sucrose, maltose, melibiose, mannitol, sorbitol, arabinose, rhamnose, glucose, inositol, phenylacetate, mannose, adipate, amygdalin등은 이용 할 수 없었다.(Table 4-3)

라. 16S rRNA의 구조 분석

16S rRNA 유전자의 염기배열: 16S rRNA유전자는 염색체 DNA로부터 EC9F와 EC1542R primer를 이용한 PCR로부터 증폭되었으며, 이렇게 증폭된 단편은 EC536R, EC926R, 및 EC1512R Primer 및 M13 Universal primer를 이용하여 1,468bp의 염기배열이 그림 4-9와 같이 결정되었다.

16S rRNA유전자의 Accession Number: 위에서 결정된 염기배열은 GenBank database에서 accession No. AF187080으로 저장되어있다.

16S rRNA 유전자의 일차구조상의 상동성 분석: CLUSTALW Program을 이용하여 15종류의 16S rRNA 유전자의 배열과 비교 실험을 수행했는데 이때, 이들 배열은 GenBank에 저장되어 있는 정보를 이용하였으며, 이 경우 전배열에서 동일한 염기가 위치하도록 reference sequence와 정렬하였다.

분리균주 3010의 rRNA구조에 기초한 계통발생적인 관계: 계통수의 작성은 Phylip Package(3.5c)를 이용하여, most parsimony method에 따라 실행하였다. 이때 분리 균주의 16S rRNA gene의 배열을 GenBank에 저장되어 있는 다른 미생물 유래의 SSU rRNA gene과 비교하였는데, 이때 *Bacillus subtilis*와 *E. coli*를 outgroup으로 이용하였다. (KMG427, AF187080 ; *S. hanedai* 103207T, X82132; *S. woodyi* MS32, AF003549; *S. benthica* ATCC 43992T, X82131; *S. gelidimarin*a ACAM456, U85907; *Shewanella* sp. SQ10, AF026460; *Shewanella* sp. SQ26, AF026461; *Shewanella* sp. ANG.SQ2, AF022401; *Barophile* WHB 46 clone1, X54744; *B. subtlis,* K00637; *E. coli,* AE000452; *Vibrio* sp. str. DSS12, D21225; *Vibrio* sp. str.

DB172F, D63488; *Vibrio* sp. str. DB 172R, D63824; *Vibrio* sp. str. DB6906, D21223; and *Vibrio* sp. str. DB6101, D21221) 이렇게 작성된 계통수에서 3010균주는 *Shewanella* Genus에 가장 가깝게 위치하는 것으로 나타났으며, 모든 *Shewanella* 속과 91-97%의 상동성을 나타내었으며 작성된 계통수는 그림 4-10과 같다.

마. 3010 균주의 동정

이상의 형태적인 특징, 배양적인 특징, 생리 생화학적인 특징 및 16S rRNA 구조분석 및 계통수에 기초하여 동정을 했을 때, 3010 균주는 *Shewanella* Genus에 속하는 것으로 확인되었으며 특히 *Shewanella hanedai*와 성질이 가장 유사한 것으로 나타났다. 그리하여 3010균주는 *Shewanella hanedai* KMG427로 명명하였다.

2. 고도불포화 지방산 EPA 생산균주 Shew*anella hanedai KMG427*로부터 불포화지방산 생성관련 유전자의 클론닝

가. 3-oxoacyl ACP synthase gene의 클론닝

Desaturase, elongase, malonyl coA ACP transacylase(MCT) 유전자의 클론닝을 위하여 재료 및 방법에서 기술한 primer를 이용하여 이들 유전자의 증폭을 시도했으나 원하는 DNA 단편은 획득되지 않았다.

고도불포화지방산 EPA의 생산에 관여하는 효소로는 3-oxoacyl-ACP synthase(OAS), malonyl CoA ACP transacylase(MCT)등이 관여할 것이 예상되어, 3-oxoacyl-ACP synthase(OAS)유전자를 클론닝하고자 시도하였다. 그리하여 *E. coli, Haemophilus influenzae, Pseudomonas aeruginosa, Arabidopsis thaliana, Streptomyces griseus*등의 OAS의 아미노산 배열로부터 PCR primer OAS1(5′-GTNGTNRTNACNGG-3′) 과 OAS3 (5′ -CCNCCRAANCCRAARCTRTT- 3′)를 합성(재료

및 방법)하여 EPA 생산균 *Shewanella hanedai* KMG-427의 염색체 DNA를 주형으로하여 PCR을 실시하였을 때 1.2 kb위치에서 증폭된 band의 염기배열결정을 수행한 결과 1,166bp의 단편(그림 4-11)이었으며, β-ketoacyl ACP synthase(KAS) gene 의 부분임이 밝혀졌으며, *E. coli*의 KAS와는 68 %, *Haemophilus influenzae*의 KAS와는 69 %, *Pseudomonas aeruginosa*의 KAS와는 68 %의 배열유사성(그림 4-12)을 나타내었다.

그림 4-23의 화살표위치의 DNA단편을 probe로 사용하여 A. 2778과 3010균주의 염색체 DNA와 Southern hybridization을 수행한 결과는 그림 4-13와 같이, 제한효소 *Bam*H I, *Kpn* I, *Eco*R I, *Pst* I 및 *Xho* I 을 이용하여 분해한 DNA의 lane에서 각각 특정의 위치에서 signal이 관찰되었으므로 그림 4-23의 화살표위치의 DNA는 3010균주의 EPA 생산관련 유전자의 부분임을 알 수 있었다(그림 4-22).

그래서 KAS유전자를 포함하는 긴DNA단편을 클론닝하기 위하여 *S. hanedai* KMG-427균주의 DNA를 BamHI으로 부분분해한 후 vector에 ligation 하여 대장균에 형질전환시킨 후, 위의 1,166bp DNA단편을 probe로하여 colony hybridization을 수행하였을 때 16kb의 단편(그림 4-14)이 얻어졌다. 이 단편을 BamHI으로 절단하였을 때 7.5kb와 8.5kb의 단편으로 구성되어 있음이 밝혀졌는데 (그림 4-15), 이중에서 7.5 kb의 단편이 1,166bp의 probe와 hybridization됨(그림 4-15)이 밝혀져서 7.5kb단편의 염기배열을 결정했을 때 위의 1,166bp를 포함하는 약 1.9kb의 염기배열을 확인하였으며(그림 4-16), 이 배열내에는 1,297bp로 구성된 ORF가 존재하였는데 이것은 ATG를 번역개시 코돈으로 사용하고 UAA를 번역종결코돈으로 사용함이 확인되었으며, 지방산 생합성에 관련된 3-oxoacyl ACP synthase gene(*fabB* 유전자)임을 확인할 수 있었다.

나. fab gene cluster내의 지방산 생합성관련 유전자의 클론닝

malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase유전자(FabD유전자) 부분과 3-oxoacyl-(acyl-carrier protein) synthase Ⅱ(FabF의 유전자) 부분을 참고로하여 재료 및 방법에서 기술한 primer를 사용하여 PCR을 수행한 결과 약 3.3kb의 단편이 얻어졌는데, 이 단편을 Xho I과 Hind Ⅲ로 절단하여 생성된 약 500bp의 단편의 염기배열을 결정한 결과, 3-oxoacyl acyl carrier protein reductase 유전자(FabG 유전자)의 절반 이상이 결정되었음을 알았으며, 계속하여 이 단편내에서 sequencing primer를 합성하여 염기배열을 결정한 결과 2,376bp의 염기배열이 결정되었는데(그림 4-17) 여기에는 fabD gene의 대부분(903bp)이 클론닝되었으며 종결코돈은 UAG를 사용하는 것이 확인되었으며 fabG gene은 663bp로 구성되어 있으며 종결코돈은 UAA를 사용하고 있는 것이 확인되었으며, acp gene 은 231 bp로 구성되어 있는데 종결코돈은 UAA를 사용하고 있음을 알았다. 또한 fabF gene은 상류의 123bp가 결정되었다.이들 fabD gene의 상동성 검색은 그림 4-18 에 나타내었으며, fabG gene의 상동성 검색은 그림 4-19에 나타내었으며 acp gene의 상동성 검색은 그림 4-20에 나타내었으며 fabF gene의 상동성 검색은 그림 4-21에 나타내었다.

다. EPA생산성 유전자의 클론닝

EPA생산균으로 알려진 *Shewanella* sp. SCRC-2738균주의 EPA생산관련 유전자중 가장 긴 open reading frame(ORF-5)을 생성할 것이 기대되는 유전자의 구조를 조사했을 때 이 한 개의 유전자 내에는 KAS유전자와 상동성이 높은 부분과 MCT유전자와 상동성이 높은 부분이 포함되어 있음을 확인 하였다(그림 4-22). 그리하여 이 KAS유전자와 상동성이 높은 부분과 MCT유전자와 상동성이 높은 부분의 염기배열을 참고로하여 primer를 합성하여 (그림 4-23) PCR을 수행하였여 EPA 생산성 유전자의 부분을 클론닝하였다. 약 700bp의 위치에서 band가

확인(그림 4-24)되었으며 이것의 염기배열을 분석(그림 4-25) 했을 때 704bp임이 확인 되었으며, *Shewanella* sp. SCRC-2738균주의 ORF-5 유전자와 84%, 94%, 및 90%의 상동성이 확인된 부분이 3군데 존재하였으며, *Moritella marina* 의 EPA gene cluster 와는 93%의 상동성을 나타내었으며(그림 4-26), 704bp로부터 추정되는 아미노산 배열을 *Shewanella* sp. SCRC-2738균주의 ORF-5 와 비교하였을 때 73%의 상동성이 확인되었다.(그림 4-27) 그러므로 이부분을 중심으로하여 EPA 생합성 유전자를 클론닝하고자 시도하여, *S. hanedai* KMG-427 균주의 염색체 DNA를 이용하여 in vitro packaging을 실시하여 유전자 library를 조제한 후 위의 704bp의 PCR산물을 probe로 사용하여 screening을 실시하고 있다(그림 4-28).

3. 호염성 관련 유전자의 클론닝 및 발현

먼저 호염성 유전자의 발현을 조사하기 위하여, 배지의 염의 농도를 0.05M, 0.12M, 0.5M, 1M 및 1.5M 로 조절된 배지에서 배양한 후 dgk유전자를 probe로 사용하여 Northern hybridization을 수행했을 때, 보통의 미생물의 배양에 가장 많이 사용되는 0.12M의 염농도에서 염의 농도를 증가시킴에 따라서 1M농도까지는 dgk유전자의 발현이 증가하였으며, 1.5M로 증가시켰을 때에는 dgk유전자의 발현량이 조금 감소함을 알았다(그림 4-29). 이상의 실험에서 dgk유전자는 어느정도까지는 염농도의 상승과 동반하여 mRNA의 발현량이 증가하므로, 호염성유전자라고 볼수 있다.

호염성유전자인 dgk유전자는 pH(그림 4-30) 및 온도(그림 4-31)의 변화에도 대응하여 발현됨이 확인되어 환경변화의 signal에 대응하여 발현되므로 변화하는 환경에 적응하는데 필요한 유전자임을 확인할 수 있었다.

참고문헌

Baumann, P. R. and H. W. Schubert. 1984. Vibrionaceae *In* N. R. Krieg and J. G. Holt (eds.). Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore.

Bowmann, J. P., S. A. McCammon, D. S. Nichols, J. H. Skerratt, S. M. Rea, P. D. Nichols, and T. A. McMeekin. 1997. *Shewanella gelidimarina* sp. nov. and *Shewanella frigidimarina* sp. nov., novel antarctic species with the (20:5ω3) and grow anaerobically by dissimilatory Fe (III) reduction. *Int. J. Microbiol.* 47: 1040-1047.

Brain, B. L. and E. L. Gardener. 1968. A simple procedure for detecting the presence of cyclopropane fatty acids in bacterial lipids. *Appl. Microbiol.* 16: 549-542.

Costlow, R. N. 1981. Growth. *In* P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, and G .B. Philips (eds.). Manual of methods for general bacteriology, pp. 65-207. American Society for Microbiology, Washington, D. C., U.S.A.

Cho, K. W. and S. J. Mo. 1999. Screening and characterization of eicosapentaenoic acid-producing marine bacteria. *Biotechnol. Lett.* 21: 215-218.

Cole, R. M. and T. J. Popkin. 1981. Electron microscopy. *In* P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, and G .B. Philips (eds.). Manual of methods for general bacteriology, pp. 34-51. American Society for Microbiology, Washington, D. C., U.S.A.

Cookson, B., H. Talsania, S. Chinn, and I. Philips. 1989. A quantitative and qualitative study of the cellular fatty acids of '*Streptococcus milleri*' with capillary gas chromatography. *J. Gen. Microbiol.* 135: 831-838.

Delong E. F. and A. A. Yayanos. 1986. Biochemical function and ecological significance of novel bacterial lipids in deep-sea prokaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 730-737.

Dyberg, J. 1986. Linoleate derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. *Nut. Rev.* 44: 125-134.

Farmer, J. J. 1992. The family *Vibrionaceae. In* M. P. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, and H. G. Schlegel (eds.). The Procaryotes. pp. 2939-2951. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Gauther G., M. Gauthier, and R. Christen. 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int. J. Syst. Microbiol.* 45: 755-761.

Jensen, M. J., B. M. Tebo, P. Baumann, M. Mandel, and K. H. Nealson. 1980. Characterization of *Alteromonas hanedai*(sp. nov), a nonfermentative luminous species of marine origin. *Curr. Microbiol.* 3: 311-315.

Johns, R. B. and G. J. Perry. 1977. Lipids of the marine bacterium *Flexibacter* polymorphous. *Arch. Microbiol.* 114: 267-271.

MacDonell, M. T. and R. R. Colwell. 1985. Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Syst. Appl. Microbiol.* 6: 171-182.

Makemson, J. C., N. A. Fulayfil, W. Landry, L. M. Vanert, C. F. Wimpee, E. A. Widder, and J. F. Case. 1997. *Shewanella woodyi* sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from Alboran sea.

Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 1034-1039.
Mortenson, J. Z., E. B. Schmidt, A. H. Nielson, and J. Dyberg. 1983. The effect of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids in haemostasis, blood pressure. *Thromb. Haemostas* 50: 543-546.
Nichols, B. W. and R. S. Appleby. 1969. The distribution and biosynthesis of arachidonic acid in algae. *Phytochem.* 8: 1907-1915.
Ratkwsky, D. A., R. K. Lowry, T. A. McMeekin, A. N. Stokes, and R. E. Chamdler. 1983. Model for bacterial growth throughout the entire biokinetic range. *J. Bacteriol.* 154: 1222-1226.
Sasser, M. 1990. Tracking a strain using the microbial identification system. MIDI Technical Note 102. Microbiol ID, Inc., Newark, Del, U.S.A.
Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U.S.A.
Seto, A., H. L. Wong, and C. W. Hesseltine. 1984. Culture conditions affect eicosapentaenoic acid content of *Chlorella minutissima*. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 61: 892-894.
Shimizu, S., H. Kawashima, K. Akimoto, Y. Shinmen, and H. Yamada. 1989. Conversion of linseed oil to an eicosapentaenoic acid containing oil by *Mortierella alpina* at low temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 1-4.
Urakaze, M., T. T. Hamazaki, Y. Soda, M. Miyamoto, F. Ibuka, S. Yano, and A. Kumagai. 1986. Infusion of emulsified trieicosapentaenoylglycerol into rabbits. The effects on platelet aggregation, polymorphonuclear leukocyte adhesion and fatty acid composition in plasma and platelet phospholipids. *Throm. Res.* 44: 673-682.
Venkateswaran, K., H. Nakano, T. Okabe, K. Takayama, O. Matsuda, and H. Hashimoto. 1989. Occurrence and distribution of *Vibrio* spp., *Listonella* spp., and *Clostridium botulinum* in the Seto Inland sea of Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 559-567.
Vogel, B. F., K. Jorgensen, H. Christensen, J. E. Olsen, and L. Gram. 1997. Differentiation of *Shewanella putrefaciens* and *Shewanella alga* on the basis of whole-cell protein profiles, ribotyping, phenotypic characterization, and 16s rRNA gene sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2189-2199.
Wirsen, C. O., H. W. Jannasch, S. G. Wakeham, and E. A. Cannel. 1987. Membarne lipids of a psychrophilic and barophilic deep-sea bacterium. *Curr. Microbiol.* 14: 319-332.
Yoon, J. H., S. T. Lee, and Y. H. Park. 1998. Inter- and intraspecific phylogenetic analysis of the genus *Nocardioides* and related taxa based on 16S rDNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 187-194.
Takahashi Y, Ide T., 2000. Dietary n-3 fatty acids affect mRNA level of brown adipose tissue uncoupling protein 1, and white adipose tissue leptin and glucose transporter 4 in the rat. *Br J Nutr.* 84(2): 175-84.
Sauer LA, Dauchy RT, Blask DE. 2000. Mechanism for the antitumor and anticachectic effects of n-3 fatty acids. *Cancer Res.* 60(18):5289-95.
Petrik MB, McEntee MF, Johnson BT, Obukowicz MG, Whelan J. 2000 Highly Unsaturated (n-3) Fatty Acids, but Not alpha-Linolenic, Conjugated Linoleic or gamma-Linolenic Acids, Reduce Tumorigenesis in Apc(Min/+) Mice. *J Nutr.* 130(10):2434-2443.
Oarada M, Furukawa H, Majima T, Miyazawa T. 2000 Fish oil diet affects on oxidative senescence of red blood cells linked to degeneration of spleen cells in mice. *Biochim Biophys Acta.* 1487(1):1-14.
Mori TA, Watts GF, Burke V, Hilme E, Puddey IB, Beilin LJ. 2000

Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on vascular reactivity of the forearm microcirculation in hyperlipidemic, overweight men. *Circulation.* 102(11):1264-9.
Wander RC, Du SH. 2000 Oxidation of plasma proteins is not increased after supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Am J Clin Nutr.* 72(3):731-7.
Guo X, Ota Y. 2000 Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by a yeast. *J Appl Microbiol.* 89(1):107-15.
Simopoulos AP. 2000 Human requirement for N-3 polyunsaturated fatty acids. *Poult Sci.* 79(7):961-70.
Fidler N, Koletzko B. 2000 The fatty acid composition of human colostrum. *Eur J Nutr.* 39(1):31-7.
Mantzioris E, Cleland LG, Gibson RA, Neumann MA, Demasi M, James MJ. 2000 Biochemical effects of a diet containing foods enriched with n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr.* 72(1):42-8.
Valk EE, Hornstra G. 2000 Relationship between vitamin E requirement and polyunsaturated fatty acid intake in man: a review. *Int J Vitam Nutr Res.* 70(2):31-42. Review.
Mori TA, Burke V, Puddey IB, Watts GF, O'Neal DN, Best JD, Beilin LJ. 2000 Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men. *Am J Clin Nutr.* 71(5):1085-94.
Almallah YZ, Ewen SW, El-Tahir A, Mowat NA, Brunt PW, Sinclair TS, Heys SD, Eremin O. 2000. Distal proctocolitis and n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs): the mucosal effect in situ. *J Clin Immunol.* 20(1):68-76.
Igarashi M, Miyazawa T. Do conjugated eicosapentaenoic acid and conjugated docosahexaenoic acid induce apoptosis via lipid peroxidation in cultured human tumor cells? 2000 *Biochem Biophys Res Commun.* 270(2):649-56.
Puri BK, Richardson AJ, Horrobin DF, Easton T, Saeed N, Oatridge A, Hajnal
JV, Bydder GM. 2000 Eicosapentaenoic acid treatment in schizophrenia associated with symptom remission, normalisation of blood fatty acids, reduced neuronal membrane phospholipid turnover and structural brain changes. *Int J Clin Pract.* 54(1):57-63.
Hansen J, Grimsgaard S, Nordoy A, Bonaa KH. 2000 Dietary supplementation with highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid does not influence PAI-1 activity. *Thromb Res.* 98(2):123-32.
Volker DH, FitzGerald PE, Garg ML. 2000 The eicosapentaenoic to docosahexaenoic acid ratio of diets affects the pathogenesis of arthritis in Lew/SSN rats. *J Nutr.* 130(3):559-65.
Watanabe T, Kuroda Y. 1999 The effect of a newly developed ointment containing eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in the treatment of atopic dermatitis. *J Med Invest.* 46(3-4):173-7.
Wensing AG, Mensink RP, Hornstra G. 1999. Effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids from plant and marine origin on platelet aggregation in healthy elderly subjects. *Br J Nutr.* 82(3):183-91.
Hashimoto M, Hossain S, Yamasaki H, Yazawa K, Masumura S. 1999. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on plasma membrane fluidity of aortic endothelial cells. *Lipids.* 34(12):1297-304.
Ziboh VA, Miller CC, Cho Y. 2000 Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and

antiproliferative metabolites. *Am J Clin Nutr.* 71(1 Suppl):361S-6S. Review.
Kremer JM. 2000 n-3 fatty acid supplements in rheumatoid arthritis. *Am J Clin Nutr.* 71(1 Suppl):349S-51S. Review.
James MJ, Gibson RA, Cleland LG. 2000 Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr.* 71(1 Suppl):343S-8S. Review.
Connor WE. 2000. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr.* 71(1 Suppl):171S-5S. Review.
Hsu HC, Lee YT, Chen MF. 2000. Effect of n-3 fatty acids on the composition and binding properties of lipoproteins in hypertriglyceridemic patients. *Am J Clin Nutr.* 71(1):28-35.
Retterstol K, Haugen TB, Christophersen BO. 2000 The pathway from arachidonic to docosapentaenoic acid (20:4n-6 to 22:5n-6) and from eicosapentaenoic to docosahexaenoic acid (20:5n-3 to 22:6n-3) studied in testicular cells from immature rats. *Biochim Biophys Acta.* 1483(1):119-31.
Kageyama K, Yamada R, Otani S, Onoyama Y, Yano I, Yamaguchi W, Yamaguchi Y, Kogawa H, Nagao N, Miwa N. 2000. Cytotoxicity of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in tumor cells and the dependence on binding to serum proteins and incorporation into intracellular lipids. *Oncol Rep.* 7(1):79-83.
Madsen L, Rustan AC, Vaagenes H, Berge K, Dyroy E, Berge RK. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid affect mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in relation to substrate preference. 1999. *Lipids.* 34(9):951-63.
Pakala R, Pakala R, Benedict C. 1999. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid selectively attenuate U46619-induced smooth muscle cell proliferation. *Lipids.* 34(9):915-20.
Nakayama M, Fukuda N, Watanabe Y, Soma M, Hu WY, Kishioka H, Satoh C, Kubo A, Kanmatsuse K. 1999. Low dose of eicosapentaenoic acid inhibits the exaggerated growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats through suppression of transforming growth factor-beta. *J Hypertens.* 17(10):1421-30.
Pakala R, Pakala R, Sheng WL, Benedict CR. 1999 Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid block serotonin-induced smooth muscle cell proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19(10):2316-22.
Simopoulos AP. 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr.* 70(3 Suppl):560S-569S. Review.
Mori TA, Bao DQ, Burke V, Puddey IB, Beilin LJ. 1999 Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and heart rate in humans. *Hypertension.* 34(2):253-60.

Table 4-1. 해양자원으로부터 EPA/DHA 생산균주의 분리
Table 4-2. Fatty acid composition of total membrane lipid extracted from S. hanedai KMG 427 and *S. hanedai* ATCC33224
[a]Fatty acids are abbreviated so that the number of carbon atoms precedes the colon and the number of double bonds follows the colon. The prefixes iso present of a branched-chain structure. [b]Fatty acid composition of *S. hanedai* was obtained from reference
Table 4-3. Biochemical and physiological properties of the isolated strain KMG427.
+, growth or positive; -, no growth or negative
[a]Data of *S. hanedai* was obtained from Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 1 [12] and reference
Fig. 4-1. Nucleotide sequence of upstream region of the *B. subtilis* cdd gene. Four complete and one truncated coding sequences were defined frem ORF searching by Genetyx software. Genetic organization of the six ORFs with start and end points of the reading frames were diagrammed. Restriction sites, ORFs with the single letters of amino acids residues, and SD sequence of the *dgk* gene were represented. Accession number is GenBank U29177.
Fig. 4-2. 지방산의 TLC
A, B: EPA 생성균 C: DHA 생성균 E: EPA methyl ester D: DHA methyl ester 1 - 10 : sample number
Fig. 4-3. GC peak of EPA(eicosapentaenoic acid) and other fatty acids from *aeromonas* sp.. Arrow indicates EPA peaks.
A; 2778 strain, B; 3010 strain.
Fig. 4-4. Growth curve of *Shewanella hanedai* KMG427. The optimal growth temperature was 20℃ in HI medium.
Fig. 4-5. Effect of induction temrerature on EPA production by *Shewanella hanedai* KMG427. S. hanedai KMG427 was grown in HI medium at 20℃ for 2 daysand incubated at 4℃, 12℃, 20℃, 25℃ for 3 days. TFA: total fatty acid. EPA: Eicosapentaenoic acid.
Fig. 4-6. EPA production of *Shewanella hanedai* KMG427 with different salinity. The optimal EPA production of *S. hanedai* KMG427 was 1% NaCl concentration in the medium.
Fig. 4-7. EPA production of *Shewanella hanedai* KMG427 with different pH conditions. The optimal pH of EPA production was pH 8 in the medium for 24 hours.
Fig. 4-8. Photograph of EPA producing bacterium KMG427 by Scanning Electron Microscope.
Fig. 4-9. The nucletide sequence of SSU rRNA from *Shewanella hanedai* KMG427. 1,446bp sequences were determined by ABI Prism 310 Genetic Analyzer.
Fig. 4-10. A Phylogenetic tree was established by the most parsimony method in Phylip Package(3.5c) with 100 bootstrap replicate. The SSU rRNA sequence of *Shewanella hanedai* KMG427 was analyzed with other SSU sequences retrieved from Genbank. *Bacillus subtlis, Escherichia coli* SSU sequences were used as out-group.
Fig. 4-11. Nucleotide sequence of PCR product by primer OAS 1 and OAS 3.
DNA sequence was determined by manual and auto sequencer.
Fig. 4-12. Alignment of deduced amino acid sequences with other amino acid sequences presented in Database.

All the sequences that showed high similarities with deduced amino acid sequence were β-ketoayl ACP synthases.

Fig. 4-13. Southern hybridization of *Shewanella hanedai* KMG427 DNA. a : Electrophoresis of *Shewanella hanedai* KMG427 DNA digested with several restriction enzymes. b : Hybridization pattern of blotted DNA with probe made of 1.2kb DNA fragment in Fig.4-11..

Fig. 4-14. Electrophoresis of recombinant plasmids obtained from colony hybridization. All of the recombinant plasmids screened by colony hybridization was digested with BamH I and electrophoresed on 0.7 % agarose gel. M : λ DNA digested by Hind III.

Fig. 4-15. Southern hybridization for finding DNA fragment including beta ketoacyl ACP synthase gene.
(A) Electrophoresis of recombinant DNA treated with several enzymes.
1: pOAS160/*Bam*HI. 2: pOAS160A/*Bam*HI. 3: pOAS160B/*Bam*HI. 4: pOAS160A/*Eco*RV. 5: pOAS160A/*Pst*I. M: λ DNA digested by HindIII.
(B) Southern blot signals. 1.2 kb PCR product was used as probe.

Fig. 4-16. DNA sequences of *fabB* gene from *Shewanella hanedai* strain KMG427.

Fig. 4-17. cloned fab gene cluster from the *Shewanella hanedai* KMG427 sequencing primer: red *xho* I , *Hin*dIII enzyme site: violet : ORF start

Fig. 4-18 The simililarity of fabD gene sequences from GenBank Database search.

Fig. 4-19. The simililarity of fabG gene sequences from GenBank Database search.

Fig. 4-20. The similality of acp gene sequences from GenBank Database search

Fig. 4-21. The simililarity of fabF gene sequences from GenBank Database search

Fig. 4-22. Schematic representation of the organization of an EPA gene cluster of *Shewanella* sp. SCRC-2738 on the basis of information obtained from the databases. Putative ORFs are represented by arrows. The regions that correspond to the enzymes and proteins for various steps in fatty acid biosynthesis in terms of their predicted amino acid sequences are indicated.

Fig. 4-23. Conserved amino acids in the KAS and MCT of some microorganisms and the corresponding regions of the EPA gene cluster. An adjacent KAS and MCT domain of ORF 5 of the EPA gene cluster of *Shewanella* sp. SCRC-2738 is shown in the middle. Corresponding regions of KAS and MCT from some microorganisms are shown at the top and bottom, respectively. Asterisks indicate the identical amino acids. Arrows indicate the regions in which the degenerated PCR primers were designed.

Fig. 4-24. Electrophotogram of PCR product using SCRC53 and SCRC55 primers. 1. lambda DNA digested with HindIII. 2. 700 bp DNA fragment of PCR. C53: 5'-CTCACCRAARCTATGRCCKGC-3' SCRC55: 5'-AGCTCATTTGGTTTTGGYGGCACYAAC-3'

Fig. 4-25. Sequence of amplified DNA fragment by SCRC53 and SCRC55

primers from the *Shewanella hanedai* KMG427.
Fig. 4-26. Comparison of DNA sequence from amplified DNA fragment of *Shewanella hanedai* KMG427 using GenBank BLAST tool. The nucleotide sequence of 700bp PCR product has 3 regions which showed 84%, 94% and 90% similarities with ORF-5 of SCRC-2738 and one region which showed 93% similarity with EPA gene cluster of *Moritella marina*. Query: nucleotide sequence of 704bp.
Fig. 4-27. Comparison of amino acid sequences deduced from the DNA fragment amplified from *S. hanedai* KMG-427 by PCR with EPA gene cluster of SCRC-2738.
Amino acid sequence deduced from the fragment amplified by PCR in *S. hanedai* KMG-427 showed 73% similarity with that of ORF deduced from EPA gene cluster of *Shewanella* sp. SCRC-2738. Query: Deduced amino acid sequence of ORF in 704bp.
Fig. 4-28. The Plaque Hybridization after in vitro packaging.
Fig. 4-29. Northern hybridzation using ORF2-specific probe.
(A) Transferred membrane(LSU and SSU ribosomal RNAs were stained). (B) Northern blot analysis. The amount of RNA in each lane was 25g. 1. 0.05M, 2. LB(0.12M), 3. 0.5M, 4. 1M, 5. 1.5M NaCl concentration
Fig. 4-30. Effect of pH on *dgk* transcription. (a) Transferred membrane(LSU and SSU ribosomal RNAs were stained). (b) Northern blot analysis. The amount of RNA in each lane was 25g. 1. pH 5, 2. pH 6, 3. normal LB(pH 6.7), 4. pH 7, 5. pH 8 LB medium
Fig. 4-31. Effect of temperature on *dgk* transcription.
Dot blot hybridization was carried out on RNA isolated cell grown various temperature. The amount of total RNA applied on the membranes is indicated in the upper side. Temperatures used are indicated on the left side.
Fig.4-32. 조류배양장치의 구조
1. Air pump 2. Gas purifier 3. Plant culture chamber 4. Culture column 5. Fluorescent lamp

Table 4-1. 해양자원으로부터 EPA/DHA 생산균주의 분리

No.	장소	시료	분리균주수	TLC 검색 EPA / DHA	비고
1	경북 감포	sea sand, 미역, 해초, 넙치, 도다리 등	34	-	
2	대구칠곡 (수산시장)	히라스 등	19	-	
3	대구칠곡 (수산시장)	우럭, 넙치, 쥐치, 이면수, 장치, 돔, 아나고, 숭어, 겨루치 등	95	-	
4	부산남구남천동 (해안시장)	깍다구, 술뱅어, 오랑치, 낙지, 해삼, 가오리, 도다리 등	38	-	
5	대구칠곡 (수산시장)	개상어, 참상어, 멍게, 전어 등	235	2 / -	
6	대구칠곡 (수산시장)	고등어, 꽁치, 오징어, 참상어, 오도리, 전복 등	351	17 / 3	
7	강원도 주문진, 묵호항, 속초	우럭(양식), 우럭(자연산), 광어, 놀래기, 히라스, 겨루치, 참망탱이, 오징어, 가리비, 아나고, 성게, 복어, 해삼, 멍게 등	469	- / 2	
총 계			1241	19 / 5	

Fatty acid(s)[a]	KMG427	ATCCC33224[b]
12:0	3.65	0.1-0.4
13:0(i)	17.15	5.1-7.7
13:0	2.99	0-0.3
14:0(i)	0.35	0.1-0.4
14:0	7.69	7.6-10.1
13:0(i 30H)	7.72	6.1-8.2
15:1(i)	0.48	0-0.2
15:0(i)	8.42	7.9-8.2
15:1 ω8c	1.88	0-0.1
15:1 ω6c	0.64	0-0.5
15:0	9.33	2.9-3.5
16:1 ω9c	0.77	0.7-1.3
16:1 ω7c	10.93	23.4-33.1
16:0	9.36	10.2-15.0
17:0(i)	0.20	0.8-2.4
17:1 ω8c	2.74	0.5-1.5
17:1 ω6c	0.25	0.3-0.5
17:0	0.70	0.6-1.0
18:0(i)	0.43	0-0.4
18:1 ω9c	0.34	0.6-1.0
18:1 ω7c	0.38	0.2-0.8
20:5 ω3	11.22	10.2-19.2

Table 4-2. Fatty acid composition of total membrane lipid extracted from S. hanedai KMG 427 and *S. hanedai* ATCC33224
[a]Fatty acids are abbreviated so that the number of carbon atoms precedes the colon and the number of double bonds follows the colon. The prefixes iso present of a branched-chain structure. [b]Fatty acid composition of *S. hanedai* was obtained from reference

Table 4-3. Biochemical and physiological properties of the isolated strain KMG427.

Characteristics	KMG427	*S. hanedai*	Characteristics	KMG427	*S. hanedai*
Cell shape	straight rods	straight rods	Utilization of		
Luminescence	+	+	Sucrose	-	-
Growth at			Maltose	-	-
4℃	+	+	Melibiose	-	-
30℃	-	-	N-acetylglucosamine	+	+
37℃	-	-	Citrate	+	-
NO^{-3} to NO^{-2}	+	+	Mannitol	-	-
Production of:			Sorbitol	-	-
Indole	-	-	Malate	+	+
Gelatinase	+	+	Arabinose	-	-
Chitinase	+	+	Rhamnose	-	-
β-glucosidase	-	-	Glucose	-	-
Urease	-	-	Caprate	+	+
Arginine dehydrolase	-	-	Inositol	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	Phenylacetate	-	-
Orinithine decarboxylase	-	+	Mannose	-	-
Tryptophane desaminase	-	-	Adipate	-	-
H_2S production	-	-	Amygdalin	-	-
Growth in NaCl (%)					
0%	-	-			
3%	+	+			
6%	-	-			

+, growth or positive; -, no growth or negative

[a]Data of *S. hanedai* was obtained from Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 1 [12] and reference

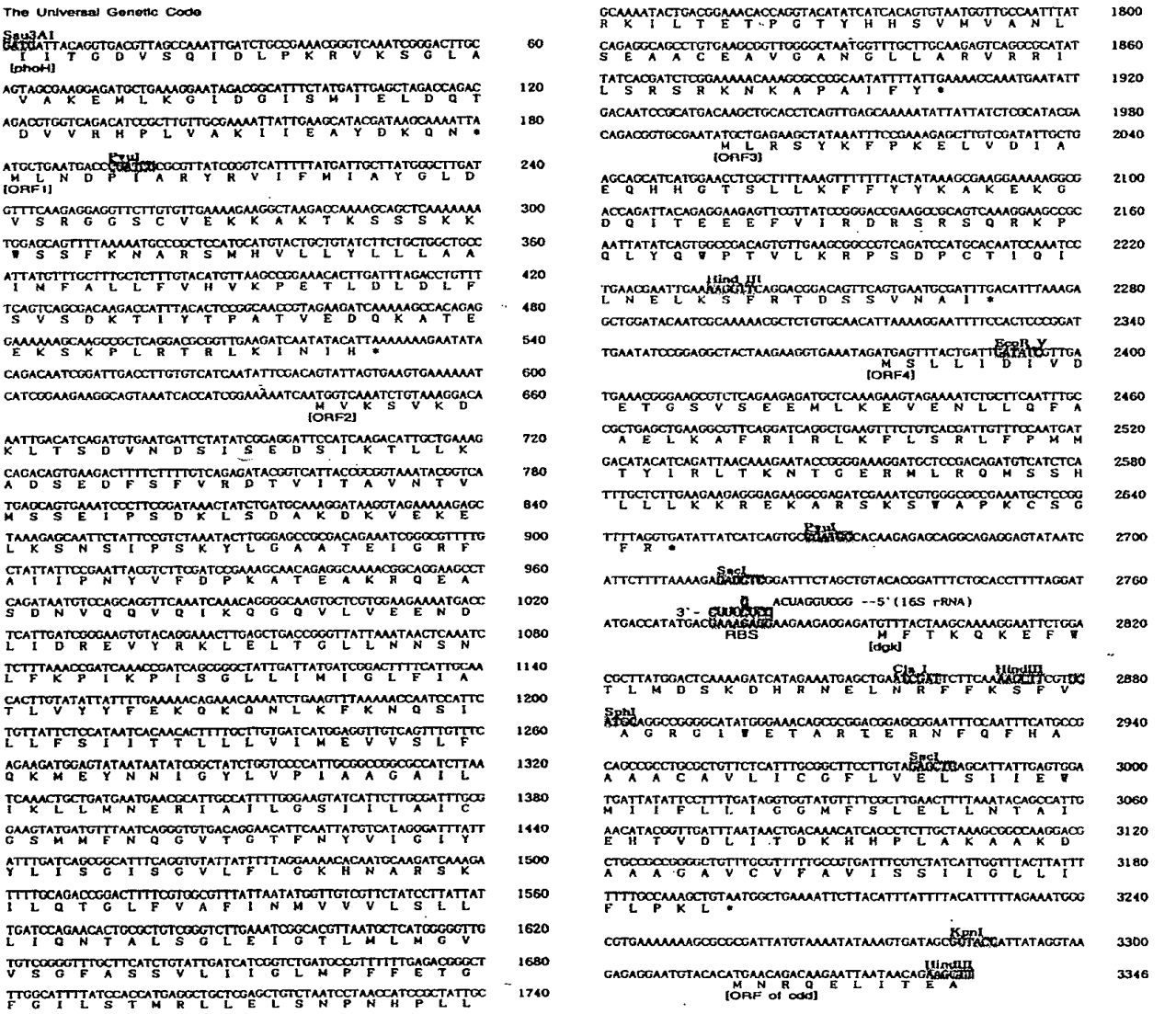


Fig. 4-1. Nucleotide sequence of upstream region of the *B. subtilis* cdd gene. Four complete and one truncated coding sequences were defined frem ORF searching by Genetyx software. Genetic organization of the six ORFs with start and end points of the reading frames were diagrammed. Restriction sites, ORFs with the single letters of amino acids residues, and SD sequence of the *dgk* gene were represented. Accession number is GenBank U29177.

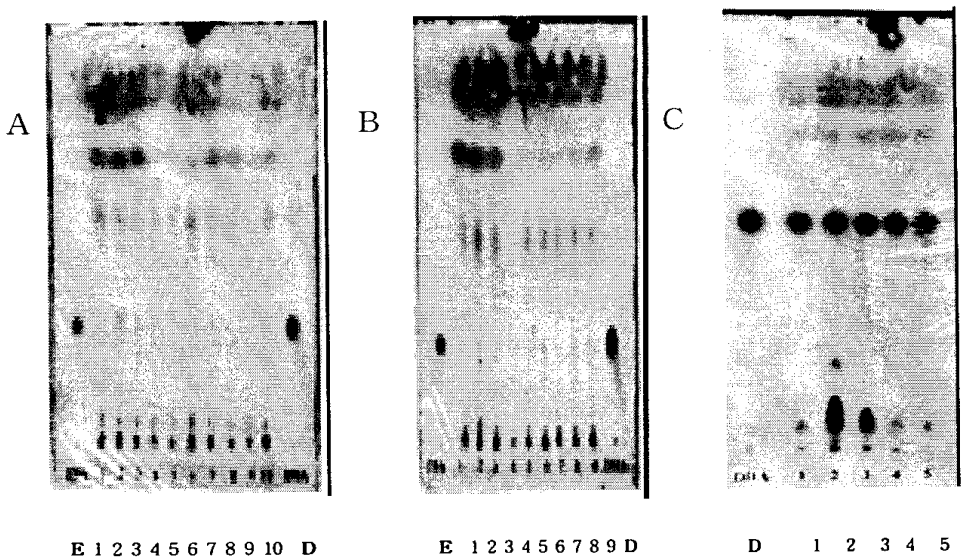


그림 4-2. 지방산의 TLC
A, B: EPA 생성균 C: DHA 생성균 E: EPA methyl ester D: DHA methyl ester 1 - 10 : sample number

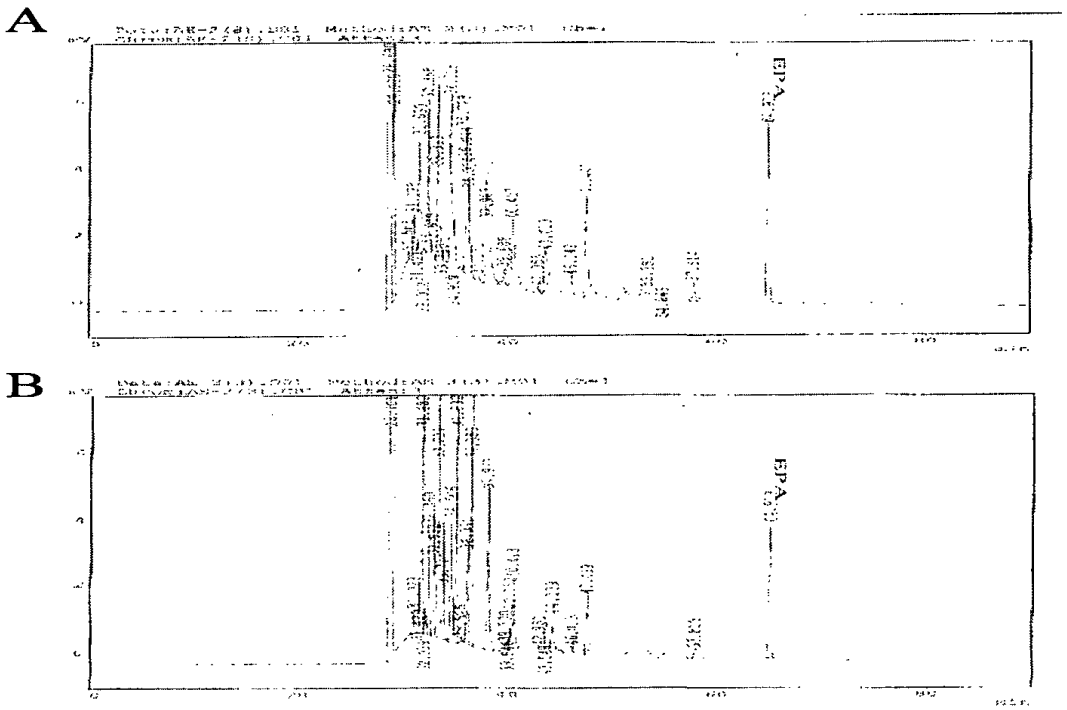


Fig. 4-3. GC peak of EPA(eicosapentaenoic acid) and other fatty acids from *aeromonas* sp.. Arrow indicates EPA peaks.
A; 2778 strain, B; 3010 strain.

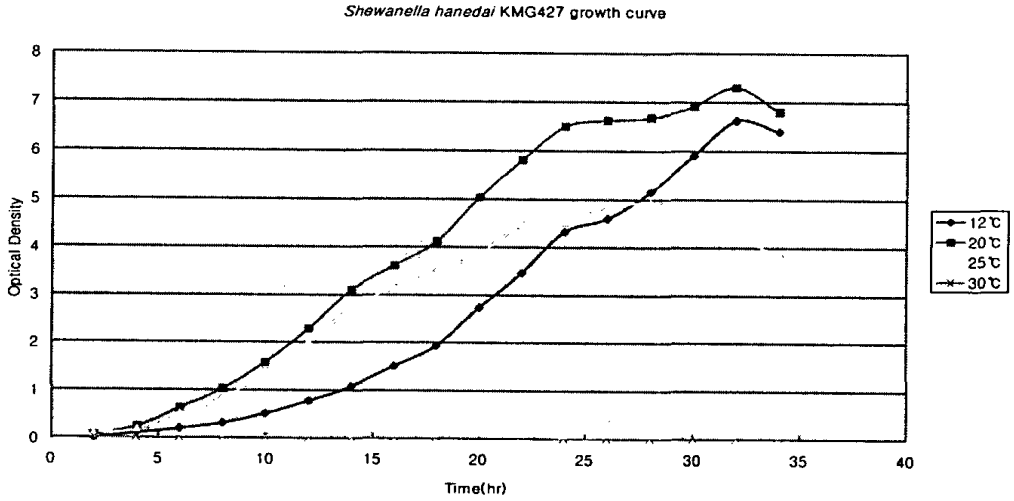


Fig. 7.

Fig. 4-4. Growth curve of *Shewanella hanedai* KMG427. The optimal growth temperature was 20℃ in HI medium.

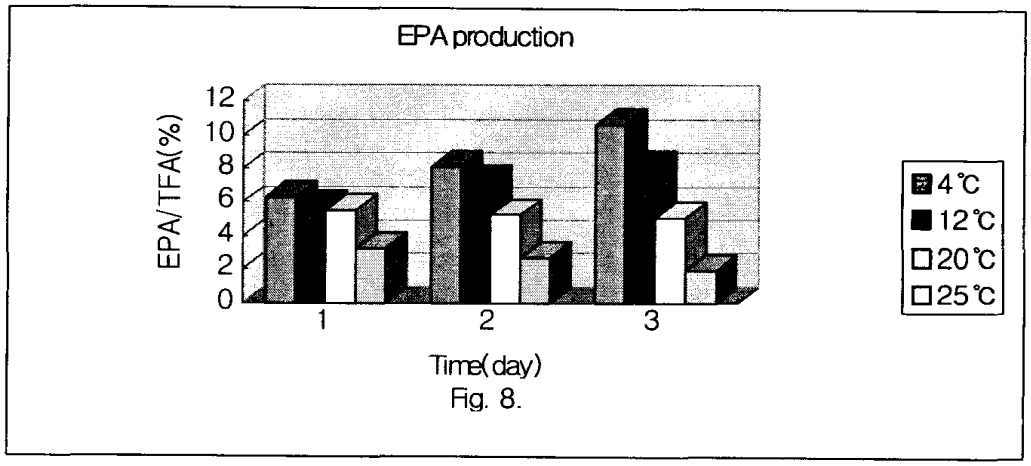


Fig. 8.

Fig. 4-5. Effect of induction temrerature on EPA production by *Shewanella hanedai* KMG427. S. hanedai KMG427 was grown in HI medium at 20℃ for 2 daysand incubated at 4℃, 12℃, 20℃, 25℃ for 3 days. TFA: total fatty acid. EPA: Eicosapentaenoic acid.

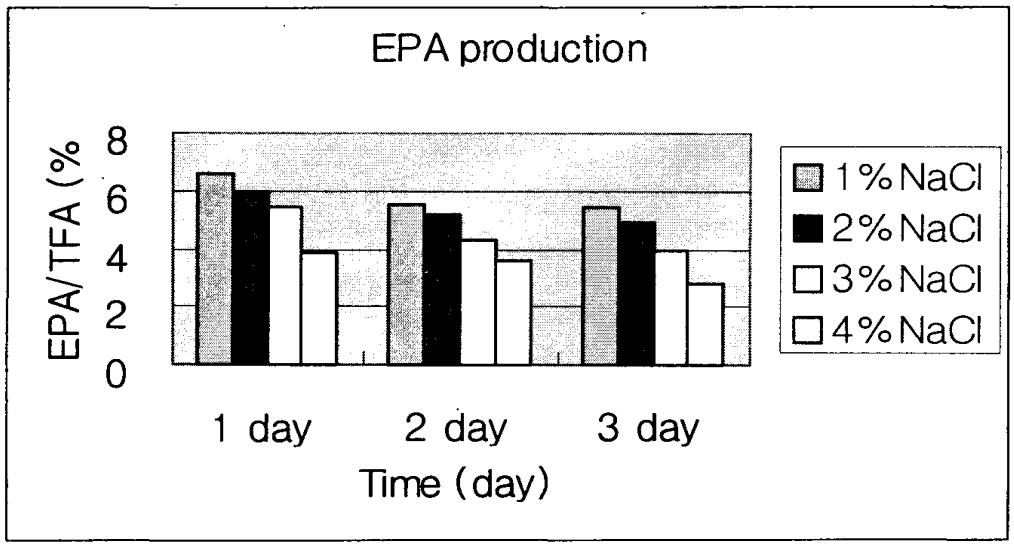


Fig. 4-6. EPA production of *Shewanella hanedai* KMG427 with different salinity. The optimal EPA production of *S. hanedai* KMG427 was 1% NaCl concentration in the medium.

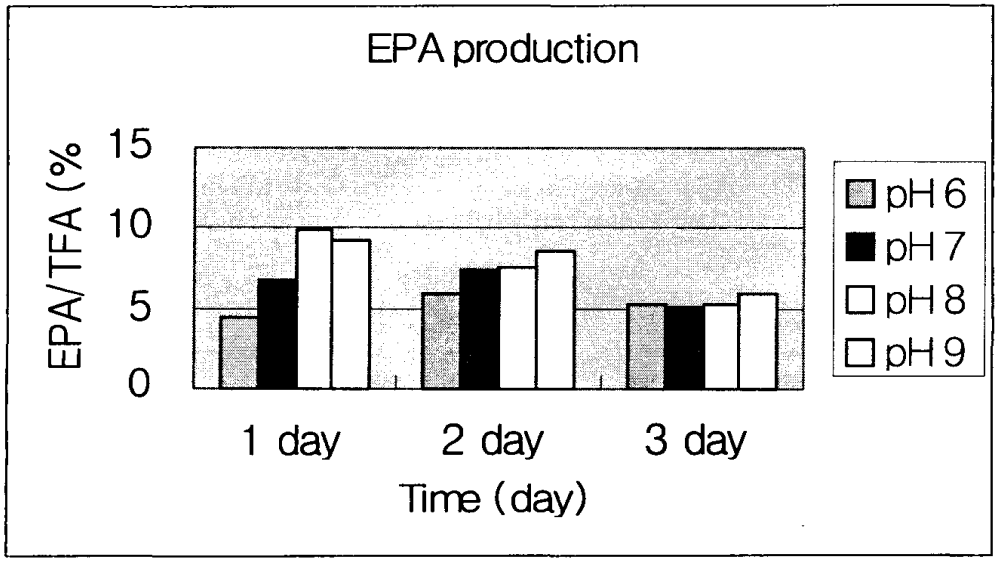


Fig. 4-7. EPA production of *Shewanella hanedai* KMG427 with different pH conditions. The optimal pH of EPA production was pH 8 in the medium for 24 hours.

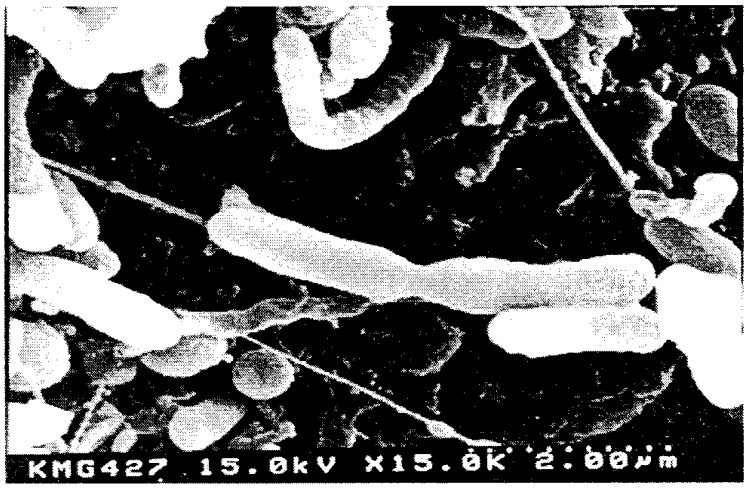


Fig. 4-8. Photograph of EPA producing bacterium KMG427 by Scanning Electron Microscope.

Shewanella hanadai **KMG427 16s rRNA sequencing result**

```
AGATTAACGC TGGCGGCAGG CCTAACACAT GCAAGTCGAG CGGAAACAGG 50
AANGTAGCTG CTACTTTCGC TGTCGAGCGG CGGACGGGTG AGTAATGCCT 100
AGATATCTGC CTAGTCGTGG GGATAACAGT TGGAAACGAC TGCTAATACC 150
GCATACGCCC TACGGGGGAA AGGAGGGACC TTCGGGCCTT TCGCGATTAG 200
ATGAGTCTAG GTGGGATTAG CTAGTAGGTG AGGTAAGGCT CACCTAGGCG 250
ACGATCCCTA GCTGGTCTGA GAGGATGATC AGCCACACTG GAACTAGACA 300
CGGTCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG GGGAATATTG CACAATGGGC 350
GAAACCTGAT GCAGCCATGC CGCGTGTGTG AAGAAGGCCT TCGGGTTGTA 400
AAGCACTTTC AGCAGGAGGA AAGGTAGGTA GTTAATAACT GCTTACTGTG 450
ACGTTACTCG CAGAAGAAGC ACCGGCTAAC TTCGTGCCAG CGCCGCGGTA 500
ATACGAGGGG TGCAAGCGTT AATCGGAATT ACTGGGCGTA AAGCGTACGC 550
GGCGGTTTGT TAAGCCANAT GTGAAAGCCC TGGGCTCAAC CTAGNAATTG 600
CATTTGGAAT GACAGACTAN AGTCTTGTAN AGGGGGGTAG AATTTCAGGT 650
GTAGCGGTGA AATGCGTAAG ATCTGAAGGA ATACCGGTGG CGAAGGCGGC 700
CCCCTGGACA AAGACTGACG CTCATGTCGA AAGCGTGGGG AGCAAACAGG 750
ATTAGATACC CTGGTAGTCC ACGCCGTAAA CGATGTTACT CGGAGTTTGG 800
TAACTTAGTT ATGGGCTCCC AAGCTAACGC ATTAAGTAGA CCGCCTGGGG 850
AGTACGGCCG CAAGGTTAAA CTCAAATGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG 900
CGGTGGAGCA TGTGGTTTAA TTCGATGCAC GCGAAGAACC TTACCTACTC 950
TTGACATCCA CAGAACTTAC CAGAGATGGT TTGGTGCCTC GGGAACTGTG 1000
AGACAGGTGC TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTTGTGAA ATGTTGGTTA 1050
AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CCTTATCCTT ATTTGCCAGC GAGTTATGTC 1100
GGGAACTTTA GGAGACTGCC GGTGATAAAC CGGAGGAAGG TGGGGACGAC 1150
GTCAAGTCAT CATGGCCCTA CGAGTAGGGC TACACACGTG CTACAATGGT 1200
CGGTACAGAG GGTCGCAAAG CCGCGAGGGG AGCTAATCCC ACAAAGCCGG 1250
TCGTAGTCCG GATCGGAGTC TGCAACTCGA CTCCGTGAGT CGGAATCGCT 1300
AGTAATCGTG GATCAGAATG CCACGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTTACA 1350
CACCGCCCGT CACACCATGG GAGTGGGCTG CACCAGAAGT AGATAGCTTA 1400
ACCNTCGGGG AGGGCGTTTA CCACGGTGTG GTTCATGACT GGGGTGAAGT 1450
CGTAACAAGG TAGTTATC 1468
```

Fig. 4-9. The nucletide sequence of SSU rRNA from *Shewanella hanedai* KMG427. 1,446bp sequences were determined by ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

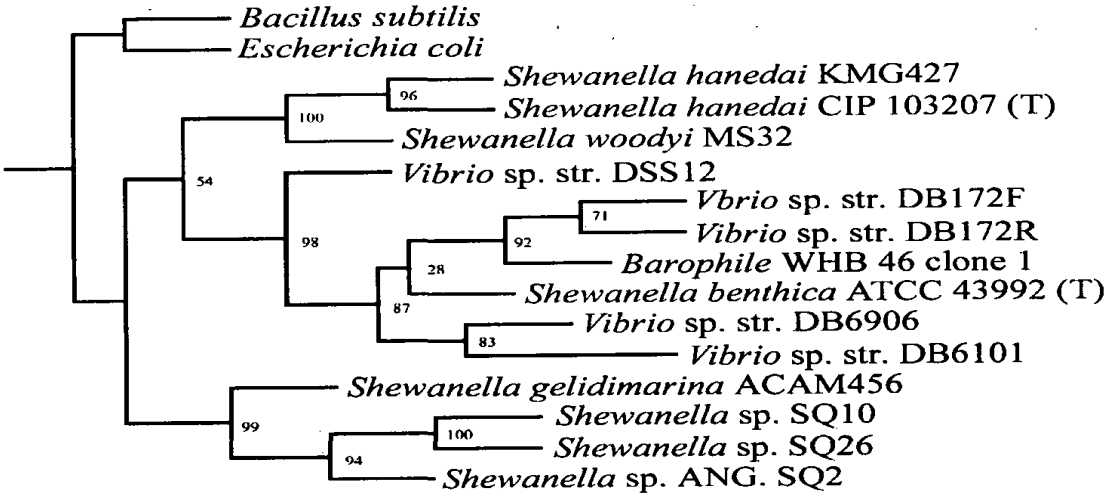


Fig. 4-10. A Phylogenetic tree was established by the most parsimony method in Phylip Package(3.5c) with 100 bootstrap replicate. The SSU rRNA sequence of *Shewanella hanedai* KMG427 was analyzed with other SSU sequences retrieved from Genbank. *Bacillus subtlis, Escherichia coli* SSU sequences were used as out-group.

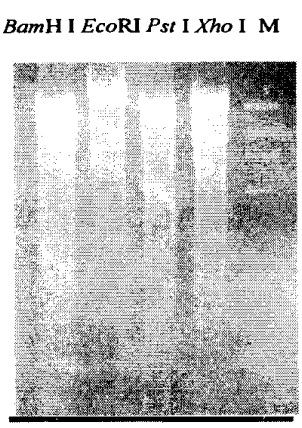
```
GTTGTGGTCA CCGGGCTTGG CGTAGTATCA AGTATTGGTA ACAATAAACA AGAAGTCACA GAGTCACTAA AAGCTGGCCG  80
AAGTAATATT ACTCATTCAG ATCAATTTGA AGAGATGAAG CTTCGCAGCC ATGTTTGGGG CGCTATCAAG TTAGATCCTA 160
AAGAGCATAT TGATCGTAAA GCGCTTCGCT TTATGGGCAA CGCTGCGGCG TACGCGTATA TCGCGATGGC AGAAGCGATT 240
GAAGATGCCG GATTAACTGA AGAGCAATAT TCAGACCCAC GAGTCGGTAT TATTGCCGGT TGTGGCGGTG CTTCTTCTGC 320
TAACCAAGTT CAAGCTGCTG ATATCCINCG TGAGAAAGGT GTTAAGCGCG TTGGGCCGTA TATAGTGCCT CGCATTATGT 400
CAAGCACGCG NAGTGCGTGT TTAGCCACGC CATTTAAAAT TAAAGGCATG AACTACTCAA TCAGTTCNGC TTGTGCTACA 480
AGCGCGCATT GTATTGGCCA TGCTGTTGAA CTTATCCAAC TGGGTAAACA AGATATCGTG TTTGCTGGTG GTGCTGAAGA 560
GGTCGATTGG ACCTTGACTA TGGGCTTTGA TGCCATGGGC GCATTATCAA CTAAATACAA TGACACTCCT GAAAAAGCAT 640
CTCGTACTTA TGATGCTGAC CGTGATGGAT TTGTTATCTC CGGTGGCGGC GGAATCGTCG TTGTTGAAGA GCTTGAACAT 720
GCATTAGCAC GTGGCGCAAA AATCTACGCT GAAGTCGTGG GTTACGGTGC ATCATCAGAT GGCTATGACA TGGTTGCACC 800
ATCAGGCGAA GGCGCTGTAC GTTGTATGCA AATGGCACTT GCTGATGTAG ATACGCCTAT CGATTACATC AACACTCACG 880
GCACATCGAC GCCAGTCGGC GATATGCGTG AGCTTGAAGC ATTACGTGAA ACCTTCGGCG ATGCTTTACC GCCAATTGCA 960
TCGACTAAGT CGCTGACCGG TCATGCATTA GGTGCTGCGG GTGCTCATGA AGCTATCTTC AGCTTGATCA TGATGGAAGA1040
AGGGTTTATC GCGCCGAGTA TCAATATCGA TAACTTGGAC GAAAAAGCTG TTGGCATGCC TGTTGTGACT GAATACCGTA1120
AAGCTGATCT TACGACTGTT ATGAGTAACA GCTTCGGCTT CGGCGG                                    1166
```

Fig. 4-11. Nucleotide sequence of PCR product by primer OAS 1 and OAS 3.
DNA sequence was determined by manual and auto sequencer.

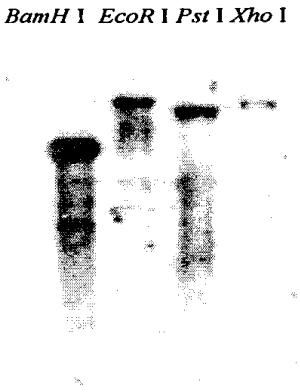
```
Haemophilus     MRRTVITGFGIISSIGNNKEEVLASLKAGKSGIEVVPEFVEMNMRSHVAGTIKLNPSEHI
Escherichia     MKRTVITGLGIVSSIGNNQQEVLASLREGRSGITFSQELKDSGMRSHVWGNVKLDTTGLI
Pseudomonas     MRRVVITGLGIVSCLGNDKDTVSANLRAGRPGIRFNPSYAEMGLRSHVSGSVDLNLEELI
oas             ---VVVTGLGVVSSIGNNKQEVTESLKAGRSNITHSDQFEEMKLRSHVWGAIKLDPKEHI
                   .*:**:*::*.:**::: *  .*: *:..*    .  :  :**** * :.*:    *

Haemophilus     DRKVFRFMGDAAAYAYLSMREAIEDAGLTEDQVSND-RTGLVIGAGTGSAHNQLVACDAV
Escherichia     DRKVVRFMSDASIYAFLSMEQAIADAGLSPEAYQNNPRVGLIAGSGGGSPRFQVFGADAM
Pseudomonas     DRKVFRFMGDAAAYAYLAMEQAIKDSGLTPEQISNP-RTGLIAGSGGASTLNQMEAIDTL
oas             DRKALRFMGNAAAYAYIAMAEAIEDAGLTEEQYSDP-RVGIIAGCGGASSANQVQAADIX
                ***..***.:*: **:::* :** *:**: :  .:  *.*:: *.* .*.  *: . *

Haemophilus     RGPRGVKAIGPYAVTKTMASSVSACLATPYKIRGVNYSMSSACATSAHCIGHAVELIQLG
Escherichia     RGPRGLKAVGPYVVTKAMASGVSACLATPFKIHGVNYSISSACATSAHCIGNAVEQIQLG
Pseudomonas     R-EKGVKRIGPYRVTRTMGSTVSACLATPFQIKGVNYSISSACATSAHCIGQAMEQIQLG
oas             R-EKGVKRVGPYIVPRIMSSTXSACLATPFKIKGMNYSISXACATSAHCIGHAVELIQLG
                *  :*:* :*** *.: *.*  *******::*:*:***:* **********:*:* ****

Haemophilus     KQDVVFAGGAEELSWECATEFDAMGAVSTKYNETPEKASRAYDANRDGFVIAGGGAVVVV
Escherichia     KQDIVFAGGGEELCWEMACEFDAMGALSTKYNDTPEKASRTYDAHRDGFVIAGGGGMVVV
Pseudomonas     KQDVVFAGGGEEEHWSQSCLFDAMGALSTQYNETAEKASRAYDAKRDGFVIAGGGGIVVV
oas             KQDIVFAGGAEEVDWTLTMGFDAMGALSTKYNDTPEKASRTYDADRDGFVISGGGGIVVV
                ***:*****.**  *  :  ******:**:**:*.*****:***.******:***.:***

Haemophilus     EELEHALARGAKIYAEIVGYGATSDGYDMVAPSGEGAERCMKQAMATVDTPIDYINVHGT
Escherichia     EELEHALARGAHIYAEIVGYGATSDGADMVAPSGEGAVRCMKMAMHGVDTPIDYLNSHST
Pseudomonas     EGLEHALKRGAKIYAEIVGYGATSDGYDMVAPSGEGAIPCMQQALATVDAPIDYLNTHGT
oas             EELEHALARGAKIYAEVVGYGASSDGYDMVAPSGEGAVRCMQMALADVDTPIDYINTHGT
                * ***** ***:****:*****:*** **********  **: *:  **:****:* *.*

Haemophilus     STPVGDVKELGAIKNVFGDKIPAISSTKSMTGHSLGAAGAHEAIYTLLMLDNDFIAPSIN
Escherichia     STPVGDVKELAAIREVFGDKSPAISATKAMTGHSLGAAGVQEAIYSLLMLEHGFIAPSIN
Pseudomonas     STPVGDVGEIRGVREVFGDKAPAISSTKSLSGHSLGAAGVHEAIYCLLMMEGGFIAGSAN
oas             STPVGDMRELEALRETFGDALPPIASTKSLTGHALGAAGAHEAIFSLIMMEEGFIAPSIN
                *******: *: .:::.***  *.*::**:::**:*****.:***: *:*:: .*** * *

Haemophilus     IETLDEAAEGCNIVTETKENAGLQTVMSNSFGFGGTNATLIFKRYNG
Escherichia     IEELDEQAAGLNIVTETTD-RELTTVMSNSFGFGGTNATLVMRKLKD
Pseudomonas     IDELDPEVADLPILRETRENAKLDTVMSNSFGFGGTNATLVLKRWQG
oas             IDNLDEKAVGMPVVTEYRK-ADLTTVMSNSFGFGX----------
                *: **  . .  :: *  .   * **********
```

Fig. 4-12. Alignment of deduced amino acid sequences with other amino acid sequences presented in Database.

All the sequences that showed high similarities with deduced amino acid sequence were β-ketoayl ACP synthases.



(a)



(b)

Fig. 4-13. Southern hybridization of *Shewanella hanedai* KMG427 DNA. a : Electrophoresis of *Shewanella hanedai* KMG427 DNA digested with several restriction enzymes. b : Hybridization pattern of blotted DNA with probe made of 1.2kb DNA fragment in Fig.4-11..

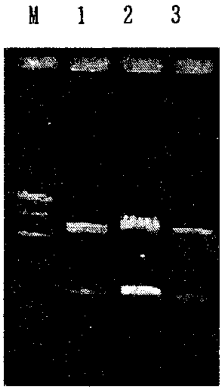
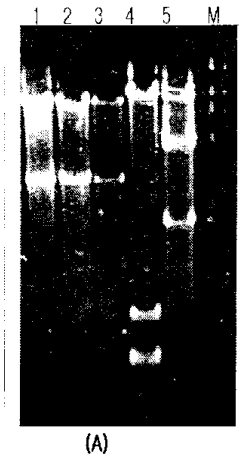


Fig. 4-14. Electrophoresis of recombinant plasmids obtained from colony hybridization. All of the recombinant plasmids screened by colony hybridization was digested with BamH I and electrophoresed on 0.7 % agarose gel. M : λ DNA digested by Hind Ⅲ.



(A)

(B)

Fig. 4-15. Southern hybridization for finding DNA fragment including beta ketoacyl ACP synthase gene.
(A) Electrophoresis of recombinant DNA treated with several enzymes.
1: pOAS160/*Bam*HI.
2: pOAS160A/*Bam*HI.
3: pOAS160B/*Bam*HI.
4: pOAS160A/*Eco*RV.
5: pOAS160A/*Pst*I.
M: λ DNA digested by HindⅢ.
(B) Southern blot signals. 1.2 kb PCR product was used as probe.

pOAS 160 A sequences

```
        ggatccccaaggtaaagatctaccacaaactggccatcatcaaatatcagcctttggcagcctgatatagccacaagattg
gcctttattagctgttgaataaaaggtgtctgcgcagcgttgagttccgttaacgaggcaagtgtagtgataaactcagtgatgacactt
aggtctgcctcaaagattttaagattgacgcgcaagggagaatcacttgctaaccaataatctcttaacgttagcagttgttgtaaagat
ccaaggccaagctgaccgcatgttaaaacctttttagcagtgttctctgcgggcaaaaggcgataaaatgaggctaaaggactaatatct
tggttcatttgtgtatttttctcacattcttgggtcaatgaatttactctgcgtcgcatattaggcattattttacctatgtttatggaa
agctgaccacttaaatacggtaaaagcgatattatagcccgcagcaaattggtactagacgtactaaatgtacaaaatggatagtaaata
atgaaaagagtcgtgatcaccgggcttggcgtagtatcaagtattggtaacaataaacaagaagtcacagagtcactaaaagctggccga
 M  K  R  V  V  I  T  G  L  G  V  V  S  S  I  G  N  N  K  Q  E  V  T  E  S  L  K  A  G  R
agtggtattactcattcagatcaatttgaagagatgaagcttcgcagccatgtttggggcgctatcaagttagatcctaaagagcatatt
 S  G  I  T  H  S  D  Q  F  E  E  M  K  L  R  S  H  V  W  G  A  I  K  L  D  P  K  E  H  I
gatcgtaaagcgcttcgctttatgggcaacgctgctgcgtacgcgtatatcgctatggcagaagcgattgaagatgccggattaactgaa

 D  R  K  A  L  R  F  M  G  N  A  A  A  Y  A  Y  I  A  M  A  E  A  I  E  D  A  G  L  T  E
gagcaatattcagacccacgagtcggtattattgccggttgtggcggtgcttcttctgctaaccaagttcaagctgctgatatccttcgt
 E  Q  Y  S  D  P  R  V  G  I  I  A  G  C  G  G  A  S  S  A  N  Q  V  Q  A  A  D  I  L  R
gagaaaggtgttaagcgcgttgggccgtatatagtgcctcgcattatgtcaagcacagcgagtgcgtgtttagccacgccatttaaaatt
 E  K  G  V  K  R  V  G  P  Y  I  V  P  R  I  M  S  S  T  A  S  A  C  L  A  T  P  F  K  I
aaaggcatgaactactcaatcagttctgcttgtgctacaagcgcgcattgtattggccatgctgttgaacttatccaaatgggtaagcaa
 K  G  M  N  Y  S  I  S  S  A  C  A  T  S  A  H  C  I  G  H  A  V  E  L  I  Q  M  G  K  Q
gatatggtgtttgctggtggttctgaagaggtcgattggaccttgactatgggctttgatgccatgggcgcactatcaactaaatacaat
 D  M  V  F  A  G  G  S  E  E  V  D  W  T  L  T  M  G  F  D  A  M  G  A  L  S  T  K  Y  N
gacactcctgaaaaagcatctcgtacttatgatgctgaccgtgatggatttgttatctccggtggcggcggaatcgtcgttgttgaagag
 D  T  P  E  K  A  S  R  T  Y  D  A  D  R  D  G  F  V  I  S  G  G  G  G  I  V  V  V  E  E
cttgaacatgcattagcacgtggcgcaaaaatctacgctgaagtcgtgggttacggtgcatcatcagatggctatgacatggttgcacca
 L  E  H  A  L  A  R  G  A  K  I  Y  A  E  V  V  G  Y  G  A  S  S  D  G  Y  D  M  V  A  P
tcaggcgaaggcgctgtacgttgtatgcaaatggcacttgctgatgtagatacgcctatcgattacatcaacactcacggcacatcgacg
 S  G  E  G  A  V  R  C  M  Q  M  A  L  A  D  V  D  T  P  I  D  Y  I  N  T  H  G  T  S  T
ccagtcggcgatatgcgtgagcttgaagcattacctgaaaccttcggcgatgctttacgccaattgcatcgactaagtcgctgaccggt
 P  V  G  D  M  R  E  L  E  A  L  P  E  T  F  G  D  A  L  P  P  I  A  S  T  K  S  L  T  G
catgcattaggtgctgcgggtgctcatgaagctatcttcagcttgatcatgatggaagaagggtttatcgcgccgagtatcaatatcgat
 H  A  L  G  A  A  G  A  H  E  A  I  F  S  L  I  M  M  E  E  G  F  I  A  P  S  I  N  I  D
aacttggacgaaaaagctgttggcatgcctgttgtgactgaatacgtaaagctgatcttacgactgttatgagtaacagttttggtttc
 N  L  D  E  K  A  V  G  M  P  V  V  T  E  Y  R  K  A  D  L  T  T  V  M  S  N  S  F  G  F
ggtggcactaacgcgaccttggtaatgcgtaagtacaagtaactttctatgtggaagtgctgcaatgcatgttgattgatgtgttacgat
 G  G  T  N  A  T  L  V  M  R  K  Y  K  *
aaacagagagggagctaaggctccctttttttgtgcctgactctctcggtagaaagtgatactctcgatctaaatcgataatatttcttatt
ttttccaataattatt
```

Fig. 4-16. DNA sequences of *fabB* gene from *Shewanella hanedai* strain KMG427.

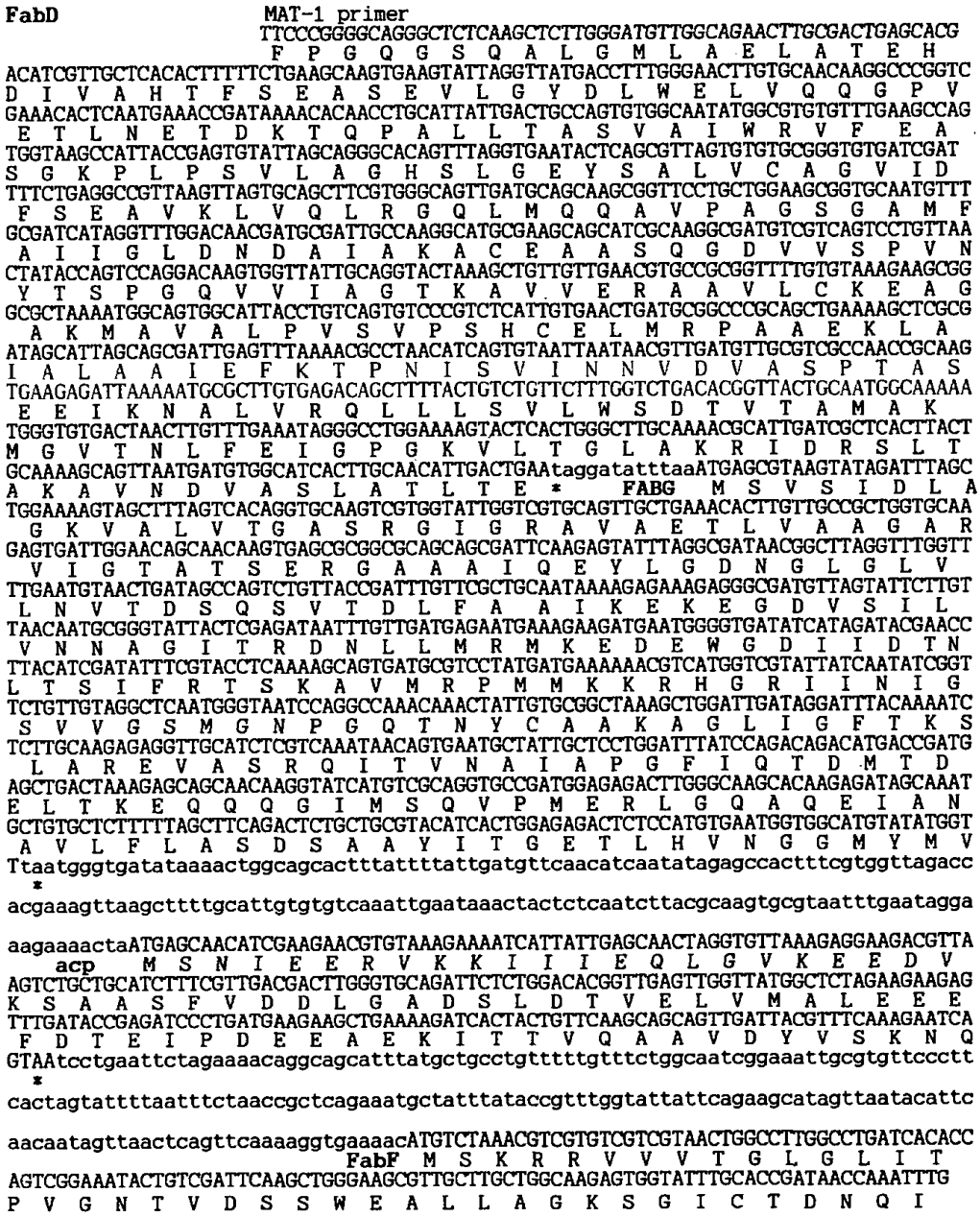


Fig. 4-17. cloned fab gene cluster from the *Shewanella hanedai* KMG427 sequencing primer: red *xho* I , *Hind*III enzyme site: violet : ORF start

```
>gb|AAF95170.1| (AE004276) malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase [Vibrio cholerae]
Length = 312 Score =  387 bits (983), Expect = e-107 Identities = 197/296 (66%), Positives =
231/296 (77%)

Query: 1   FPGQGSQALGMLAELATEHDIVAHTFSEASEVLGYDLWELVQQGPVETLNETDKTQPALL 60
           FPGQGSQA+GMLA+LA ++ +V  TF+EASEVLGYDLW LVQ GPVE LN+T +TQPALL
Sbjct: 13  FPGQGSQAVGMLADLAEQYAVVKQTFAEASEVLGYDLWALVQDGPVEDLNQTFRTQPALL 72

Query: 61  TASVAIWRVFEASGKPLPSVLAGHSLGEYSALVCAGVIDFSEAVKLVQLRGQLMQQAVPA 120
            ASVAIWRV++  G   P+VLAGHSLGEYSALVCAGVIDF +A+KLV+LRGQLMQQAVPA
Sbjct: 73  AASVAIWRVWQQLGLEQPAVLAGHSLGEYSALVCAGVIDFKQAIKLVELRGQLMQQAVPA 132

Query: 121 GSGAMFAIIGLDNDAIAKACEAASQGDVVSPVNYTSPGQVVIAGTKAVVERAAVLCKEAG 180
           G+GAM+AIIGL+++AIAKAC  A+QG+VVSPVN+ SPGQVVIAG K  VERA VLCKEAG
Sbjct: 133 GTGAMYAIIGLEDEAIAKACADAAQGEVVSPVNFNSPGQVVIAGQKDAVERAGVLCKEAG 192

Query: 181 AKMAVALPVSVPSHCELMRPXXXXXXXXXXXXXXXXTPNISVINNVDVASPTASEEIKNAL 240
           AK A+ LPVSVPSHC LM+P                P I VINNVDV + T   +IK+AL
Sbjct: 193 AKRALPLPVSVPSHCALMKPAADELAKTLAELEFNAPQIPVINNVDVVAETDPVKIKDAL 252

Query: 241 VRQLLLSVLWSDTVTAMAKMGVTNLFEIGPGKVLTGLAKRIDRSLTAKAVNDVASL 296
           +RQL   V W++ V  M+  GV  L E+GPGKVLTGL KRI ++L   AVNDVASL
Sbjct: 253 IRQLYSPVRWTECVEQMSAQGVEKLIEMGPGKVLTGLTKRIVKTLEGVAVNDVASL 308


>dbj|BAA85255.1|  (AB021978)  malonyl  Coenzyme  A-acyl  carrier  protein
transacylase(malonyl  CoA-ACP  transacylase  (MCT))  homolog  [Moritella
marina] Length = 307
Score =  360 bits (915), Expect = 8e-99 Identities = 179/297 (60%), Positives =
222/297 (74%)

Query: 1   FPGQGSQALGMLAELATEHDIVAHTFSEASEVLGYDLWELVQQGPVETLNETDKTQPALL 60
           FPGQGSQ +GMLA+LA EH +V  TF++ASE+LGYDLW+LVQ G VE L++T  TQPALL
Sbjct: 8   FPGQGSQTIGMLADLAAEHSVVEQTFAQASEMLGYDLWDLVQHGTVEELSQTHITQPALL 67

Query: 61  TASVAIWRVFEASGKPLPSVLAGHSLGEYSALVCAGVIDFSEAVKLVQLRGQLMQQAVPA 120
             SVA+WR+  A     P+++AGHSLGEYSALVCAGVI F +A+ LV+LRGQLMQQAVP
Sbjct: 68  ATSVALWRIAAAKEDFKPALVAGHSLGEYSALVCAGVIKFEDAIALVELRGQLMQQAVPQ 127

Query: 121 GSGAMFAIIGLDNDAIAKACEAASQGDVVSPVNYTSPGQVVIAGTKAVVERAAVLCKEAG 180
           G GAM A+IGLDNDAI  AC  A++ +VVS VN+ SPGQVVIAG KA V RA+ LC EAG
Sbjct: 128 GIGAMAAVIGLDNDAIIAACATAAEDEVVSAVNFNSPGQVVIAGNKAAVVRASELCVEAG 187

Query: 181 AKMAVALPVSVPSHCELMRPXXXXXXXXXXXXXXXTPNISVINNVDVASPTASEEIKNAL 240
           A+  + LPVSVPSHC LM+P                TP I +INNVDVA+P  +E IK+AL
Sbjct: 188 ARRVMPLPVSVPSHCSLMKPAADELKLALEKVTFNTPVIKLINNVDVAAPVDAESIKDAL 247

Query: 241 VRQLLLSVLWSDTVTAMAKMGVTNLFEIGPGKVLTGLAKRIDRSLTAKAVNDVASLA 297
           VRQL + V W++ + AMA+  +T L+E GPGKVLTGL KRID+++   AVN+ A++A
Sbjct: 248 VRQLYMPVRWTEVIEAMAQQEITALYEFGPGKVLTGLVKRIDKTIKGSAVNNQATIA 304
```

Fig. 4-18 The simililarity of fabD gene sequences from GenBank Database search.

```
>gb|AAA23739.1| (M84991) 3-ketoacyl-acyl carrier protein reductase [Escherichia
coli] Length = 244 Score =  335 bits (851), Expect = 2e-91 Identities = 171/244
(70%), Positives = 196/244 (80%)

Query: 5   IDLAGKVALVTGASRGIGRAVAETLVAAGARVIGTATSERGAAAIQEYXXXXXXXXXXXX 64
           ++  GK+ALVTGASRGIGRA+AETL A G +VIGTATSE GA AI +Y
Sbjct: 1   MNFEGKIALVTGASRGIGRAIAETLAARGGKVIGTATSENGAQAISDYLGANGKGLMLNV 60

Query: 65  TDSQSVTDLFAAIKEKEGDVSILVNNAGITRDNLLMRMKEDEWGDIIDTNLTSIFRTSKA 124
           TD  S+  +   I+ + G+V ILVNNAGITRDNLLMRMK++EW DII+TNL+S+FR SKA
Sbjct: 61  TDPASIESVLEKIRAEFGEVDILVNNAGITRDNLLMRMKDEEWNDIIETNLSSVFRLSKA 120

Query: 125 VMRPMMKKRHGRIINIGSVVGSMGNPGQTNYCAAKAGLIGFTKSLAREVASRQITVNAIA 184
           VMR MMKKRHGRII IGSVVG+MGN GQ NY AAKAGLIGF+KSLAREVASR ITVN +A
Sbjct: 121 VMRAMMKKRHGRIITIGSVVGTMGNGGQANYAAAKAGLIGFSKSLAREVASRGITVNVVA 180

Query: 185 PGFIQTDMTDELTKEQQQGIMSQVPMERLGQAQEIANAVLFLASDSAAYITGETLHVNGG 244
           PGFI+TDMT  L+ +Q+ GI++QVP  RLG AQEIANAV FLASD AAYITGETLHVNGG
Sbjct: 181 PGFIETDMTRALSDDQRAGILAQVPAGRLGGAQEIANAVAFLASDEAAYITGETLHVNGG 240

Query: 245 MYMV 248
           MYMV
Sbjct: 241 MYMV 244

>dbj|BAA85256.1| (AB021978) 3-oxoacyl-[acyl carrier protein] reductase homolog
[Moritella marina] Length = 244   Score =  300 bits (761), Expect = 7e-81
Identities = 154/243 (63%), Positives = 180/243 (73%)

Query: 5   IDLAGKVALVTGASRGIGRAVAETLVAAGARVIGTATSERGAAAIQEYXXXXXXXXXXXX 64
           +  + K  LVTGASRGIGRA+AE     GA VIGTATS +GA  I  Y
Sbjct: 1   MSFSSKTVLVTGASRGIGRAIAEHFAKLGATVIGTATSAQGAERIGAYLGDAGFGLELNV 60

Query: 65  TDSQSVTDLFAAIKEKEGDVSILVNNAGITRDNLLMRMKEDEWGDIIDTNLTSIFRTSKA 124
           T   SV  L+A IK + G + ILVNNAGIT DN+ +RMKEDEW ++IDTNLTS++R  K
Sbjct: 61  TSQDSVDALYAEIKTQVGHIDILVNNAGITADNIFLRMKEDEWCNVIDTNLTSLYRLCKP 120

Query: 125 VMRPMMKKRHGRIINIGSVVGSMGNPGQTNYCAAKAGLIGFTKSLAREVASRQITVNAIA 184
            +R MMK+RHGRIINIGSVVG+ GN GQ NY AAK+GL+GFTKSLA EVASR ITVNA+A
Sbjct: 121 CLRGMMKQRHGRIINIGSVVGTTGNGGQANYAAAKSGLLGFTKSLASEVASRGITVNAVA 180

Query: 185 PGFIQTDMTDELTKEQQQGIMSQVPMERLGQAQEIANAVLFLASDSAAYITGETLHVNGG 244
           PGFI+TDMT ELT+EQ+Q I++QVP  RLG   EIA  V FLASD A+YITGET+HVNGG
Sbjct: 181 PGFIETDMTAELTEEQKQTILAQVPTSRLGSTTEIAETVGFLASDGASYITGETIHVNGG 240

Query: 245 MYM 247
           MYM
Sbjct: 241 MYM 243
```

Fig. 4-19. The simililarity of fabG gene sequences from GenBank Database search.

```
>dbj|BAA85257.1| (AB021978) acyl carrier protein (ACP) homolog [Moritella marina]
Length = 78 Score =  101 bits (248), Expect = 1e-21 Identities = 54/73 (73%),
Positives = 57/73 (77%)

Query: 1  MSNIEERVKKIIIEQLGVKEEDVKSAASFVDDLGADSLDTVELVMALXXXXXXXXXXXXX 60
          MSN EERVKKIIIEQLGVKEE+VK+ ASFVDDLGADSLDTVELVMAL
Sbjct: 1  MSNFEERVKKIIIEQLGVKEEEVKNEASFVDDLGADSLDTVELVMALEEEFDTDIPDDEA 60

Query: 61 XKITTVQAAVDYV 73
           KITTVQAA+DYV
Sbjct: 61 EKITTVQAAIDYV 73

>sp|P02901|ACP_ECOLI ACYL CARRIER PROTEIN (ACP) (CYTOSOLIC ACTIVATING FACTOR)
(CAF)
 pir||AYEC acyl carrier protein - Escherichia coli
 gb|AAA23740.1| (M84991) acyl carrier protein [Escherichia coli]
 dbj|BAA35902.1| (D90745) Acyl carrier protein [Escherichia coli]
 gb|AAC74178.1| (AE000210) acyl carrier protein [Escherichia coli]
 gb|AAC24154.1| (AF072368) acyl carrier protein [synthetic construct] Length = 78

Score = 93.2 bits (228), Expect = 3e-19 Identities = 50/77 (64%), Positives =
58/77 (74%)

Query: 1  MSNIEERVKKIIIEQLGVKEEDVKSAASFVDDLGADSLDTVELVMALXXXXXXXXXXXXX 60
          MS IEERVKKII EQLGVK+E+V + ASFV+DLGADSLDTVELVMAL
Sbjct: 1  MSTIEERVKKIIGEQLGVKQEEVTNNASFVEDLGADSLDTVELVMALEEEFDTEIPDEEA 60

Query: 61 XKITTVQAAVDYVSKNQ 77
           KITTVQAA+DY++ +Q
Sbjct: 61 EKITTVQAAIDYINGHQ 77
```

Fig. 4-20. The similality of acp gene sequences from GenBank Database search

```
>sp|P39435|FABF_ECOLI 3-OXOACYL-[ACYL-CARRIER-PROTEIN] SYNTHASE II (BETA-KETOACYL-ACP SYNTHASE
II) (KAS II)
 pir||I41060 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase (EC 2.3.1.41) II - Escherichia coli
 emb|CAA84431.1| (Z34979) beta ketoacyl-acyl carrier protein synthase [Escherichia coli]
 gb|AAA83255.1| (U20767) beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II [Escherichia coli]
 gb|AAC74179.1| (AE000210) 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II [Escherichia coli]
 dbj|BAA35903.1| (D90745) 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase (EC 2.3.1.41)II [Escherichia
coli]          Length = 413

 Score = 62.8 bits (150), Expect = 4e-10  Identities = 28/35 (80%), Positives = 35/35 (100%)

Query: 1  MSKRRVVVTGLGLITPVGNTVDSSWEALLAGKSGI 35
          MSKRRVVVTGLG+++PVGNTV+S+W+ALLAG+SGI
Sbjct: 1  MSKRRVVVTGLGMLSPVGNTVESTWKALLAGQSGI 35

>pdb|1KAS|    Beta-Ketoacyl-Acp Synthase Ii From Escherichia Coli
 pdb|1B3N|A  Chain  A,  Beta-Ketoacyl  Carrier  Protein  Synthase  As  A  Drug
Target, Implications From The Crystal Structure Of A Complex With The Inhibitor
Cerulenin.  Length = 412
Score = 60.9 bits (145), Expect = 2e-09 Identities = 27/34 (79%), Positives =
34/34 (99%)

Query: 2  SKRRVVVTGLGLITPVGNTVDSSWEALLAGKSGI 35
          SKRRVVVTGLG+++PVGNTV+S+W+ALLAG+SGI
Sbjct: 1  SKRRVVVTGLGMLSPVGNTVESTWKALLAGQSGI 34

>dbj|BAA85258.1|  (AB021978)  3-oxoacyl-[acyl  carrier  protein]  synthase  II
homolog[Moritella marina] Length = 415
Score = 50.8 bits (119), Expect = 2e-06 Identities = 21/34 (61%), Positives =
30/34 (87%)

Query: 2  SKRRVVVTGLGLITPVGNTVDSSWEALLAGKSGI 35
          + RRVV+TGLG+++PVGNTV ++WEA+ +G SGI
Sbjct: 3  NNRRVVITGLGIVSPVGNTVATAWEAIKSGISGI 36
```

Fig. 4-21. The simililarity of fabF gene sequences from GenBank Database search

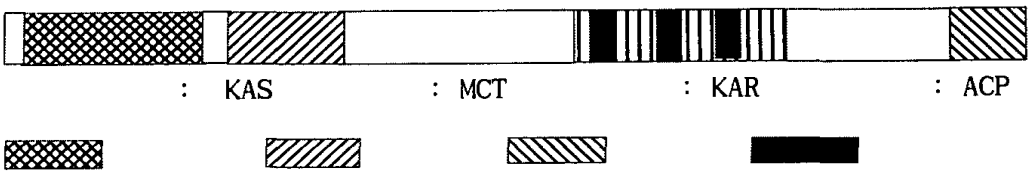


Fig. 4-22. Schematic representation of the organization of an EPA gene cluster of *Shewanella* sp. SCRC-2738 on the basis of information obtained from the databases. Putative ORFs are represented by arrows. The regions that correspond to the enzymes and proteins for various steps in fatty acid biosynthesis in terms of their predicted amino acid sequences are indicated.

SCRC53 primer

KAS *Escherichia coli* KAS1	349	MLEHGFIAPS INIEELDEQA AGLNIVTETT DRELTTVMSN SFGFGGTNAT LVMRKLKD	406
Mycobacterium tuberculosis KAS1	361	TLRDGVIPPT KNYETPDPEI DLDVVAGEPR YGDYRYAVNN SFGFGGHNVA LAFGRY	416
Escherichia coli	357	LRDQAVPPTI NLDNPDEGCD LDFVPHEARQ VSGMEYTLCN SFGFGGTNGS LIFKKI	412
adjacent KAS and *MCT* domain	431	INVSQPSPKL DIENSPFYLN TETRPWLPRV DGTPRRAGIS SFGFGGTNFH FVLEEYNQEH	412
Shewanella SCRC-2738 ORF 5 os the EPA cluster		SRTDSEKAKY RQRQVAQSFL VSASDKASLI NELNVLAASA SQAEFILKDA AANYGVRELD	490
		KNAPRIGLVA NTAEELAGLI KQALAKLAAS DDNAWQLPGG TSYRAAAVEG KVAALFAGQG	
		SQYLNMGRDL TCYYPEMRQQ FVTADKVFAA NDKTPLSQTL YPKPVFNKDE LKAQEATLTN	
	671	TANAQSAIGA ISMGQYDLFT AAGFNADMYA GHSFGELSAL CAAGVISADD YYKLAFARGE	730
MCT *Escherichia coli* MCT	60	WQTQPALLTA SVALYRVWQQ QGGKAPAMMA GHSLGEYSAL VCAGVIDFAD AVRLVEMRGK	119
Streptomyces coelicolor MCT	63	LVAAGILSAA LGTQTSVADA GPGFTPGAVA GHSVGEITAA VFAGVLDDTA ALSLVRRRGL	124

SCRC55 Primer

Fig. 4-23. Conserved amino acids in the KAS and MCT of some microorganisms and the corresponding regions of the EPA gene cluster. An adjacent KAS and MCT domain of ORF 5 of the EPA gene cluster of *Shewanella* sp. SCRC-2738 is shown in the middle. Corresponding regions of KAS and MCT from some microorganisms are shown at the top and bottom, respectively. Asterisks indicate the identical amino acids. Arrows indicate the regions in which the degenerated PCR primers were designed.

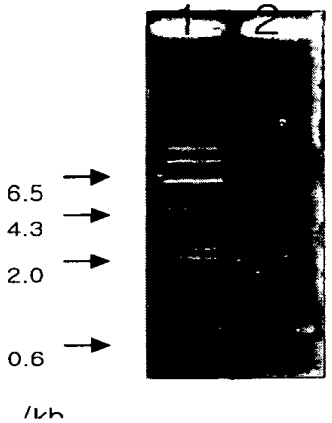


Fig. 4-24. Electrophotogram of PCR product using SCRC53 and SCRC55 primers. 1. lambda DNA digested with HindIII. 2. 700 bp DNA fragment of PCR. C53: 5′-CTCACCRAARCTATGRCCKGC-3′ SCRC55: 5′-AGCTCATTTGGTTTTGGYGGC ACYAAC-3′

```
ta GTGATTAGCTCATTTGGTTTTGGTGGCACTAACTTCCACTTCGTACTGGAAGAGTATGCG   60
    V  I  S  S  F  G  F  G  G  T  N  F  H  F  V  L  E  E  Y  A
   CCTGAGCACAATCGCATTGACAGTGAGAAAGCTAAATACCGTCAGCGCCAAGTAGCTCAA  120
    P  E  H  N  R  I  D  S  E  K  A  K  Y  R  Q  R  Q  V  A  Q
   AGCTTCCTTATTAACGCAGCAAGCAAAGATGCACTGATAAACGAGCTAAACACACTCGCC  180
    S  F  L  I  N  A  A  S  K  D  A  L  I  N  E  L  N  T  L  A
   GCATCAGCAACTCAAGTTGAGTTCAACTTAAAAGATGCCGCTGCCAACTATGCCCTGCGC  240
    A  S  A  T  Q  V  E  F  N  L  K  D  A  A  A  N  Y  A  L  R
   GAACTTGATGGTAATTCGACTCGCGTATTGGTTAGTGGTAAATACAAGAGAAGAGCTTGC  300
    E  L  D  G  N  S  T  R  V  L  V  S  G  K  Y  K  R  R  A  C
   AACCTCAATCAAACAAGTATCGCTAAACTGACAAGCGGTGATGATTATGTAAGCTGGCAG  360
    N  L  N  Q  T  S  I  A  K  L  T  S  G  D  D  Y  V  S  W  Q
   TTACCAGGTGGCACCAGCTACCTTGCAAGTGCTGTCGAAGGTAAAGTGGCCGCCTTGTTT  420
    L  P  G  G  T  S  Y  L  A  S  A  V  E  G  K  V  A  A  L  F
   AGCGGTAACCGGTTACAGTATCTGAATATGGGCCGGAATCTTGCCTGTTACTACCCAGAG  480
    S  G  N  R  L  Q  Y  L  N  M  G  R  N  L  A  C  Y  Y  P  E
   ATGCGTCAGCAGCTTGTCACCGCAGATAAAGTCTTCGCCGCTAATGGCAAAACGCCGCTG  540
    M  R  Q  Q  L  V  T  A  D  K  V  F  A  A  N  G  K  T  P  L
   TCACAAACCTTGTATCCAAAGCCTGTCTTTAATAAAGATGACTTAAAGGCACAAGAAACA  600
    S  Q  T  L  Y  P  K  P  V  F  N  K  D  D  L  K  A  Q  E  T
   GTACTAACCAACACTGCCAACGCGCAAAGTGCCATTGGCTTATCGCGATGGGATCAGTAT  660
    V  L  T  N  T  A  N  A  Q  S  A  I  G  L  S  R  W  D  Q  Y
   GAGTTGTTTACCGCTGCAGGCTTTAATGCCGACATGGTCGCAGG                  704bp
    E  L  F  T  A  A  G  F  N  A  D  M  V  A
```

Fig. 4-25. Sequence of amplified DNA fragment by SCRC53 and SCRC55 primers from the *Shewanella hanedai* KMG427.

```
gb¦U73935.1¦SSU73935 Shewanella sp. SCRC-2738 eicosapentaenoic acid (EPA)
synthesis gene cluster, complete sequence Length = 37895
Score = 125 bits (63), Expect = 2e-26 Identities = 135/159 (84%) Strand = Plus / Plus

Query: 441   tatctgaatatgggccggaatcttgcctgttactacccagagatgcgtcagcagcttgtc 500
Sbjct: 15742 tatctcaatatgggccgtgaccttacttgttattacccagagatgcgtcagcaatttgta 15801

Query: 501   accgcagataaagtcttcgccgctaatggcaaaacgccgctgtcacaaaccttgtatcca 560
Sbjct: 15802 actgcagataaagtatttgccgcaaatgataaaacgccgttatcgcaaactctgtatcca 15861

Query: 561   aagcctgtctttaataaagatgacttaaaggcacaagaa 599
Sbjct: 15862 aagcctgtatttaataaagatgaattaaaggctcaagaa 15900

Score = 81.8 bits (41), Expect = 3e-13 Identities = 50/53 (94%) Strand = Plus / Plus

Query: 6     attagctcatttggttttggtggcactaacttccacttcgtactggaagagta 58
Sbjct: 15310 attagctcatttggttttggtggcactaacttccatttgtactagaagagta 15362

Score = 50.1 bits (25), Expect = 0.001 Identities = 37/41 (90%) Strand = Plus / Plus

Query: 666   ttgtttaccgctgcaggctttaatgccgacatggtcgcagg 706
Sbjct: 15967 ttgtttactgcggctggctttaatgccgacatggttgcagg 16007

dbj¦AB025342.1¦AB025342 Moritella marina genes, complete cds, similar to
eicosapentaenoic acid synthesis gene cluster Length = 41587
Score = 48.1 bits (24), Expect = 0.004 Identities = 30/32 (93%) Strand = Plus / Plus

Query: 9     agctcatttggttttggtggcactaacttcca 40
Sbjct: 11415 agctcatttggttttggcggcaccaacttcca 11446
```

Fig. 4-26. Comparison of DNA sequence from amplified DNA fragment of *Shewanella hanedai* KMG427 using GenBank BLAST tool. The nucleotide sequence of 700bp PCR product has 3 regions which showed 84%, 94% and 90% similarities with ORF-5 of SCRC-2738 and one region which showed 93% similarity with EPA gene cluster of *Moritella marina*. Query: nucleotide sequence of 704bp.

```
pir||T30183 hypothetical protein 5 - Shewanella sp >gi|2529418|gb|AAB81123.1|
(U73935) unknown [Shewanella sp. SCRC-2738] Length = 2756
Score =  337 bits (854), Expect = 8e-92 Identities = 171/233 (73%), Positives =
192/233 (82%), Gaps = 1/233 (0%)

Query: 2   ISSFGFGGTNFHFVLEEYAPEHNRIDSEKAKYRQRQVAQSFLINAASKDALINELNTLAA 61
           ISSFGFGGTNFHFVLEEY  EH+R DSEKAKYRQRQVAQSFL++A+ K +LINELN LAA
Sbjct: 469 ISSFGFGGTNFHFVLEEYNQEHSRTDSEKAKYRQRQVAQSFLVSASDKASLINELNVLAA 528

Query: 62  SATQVEFNLKDAAANYALRELDGNSTRVLVSGKYKRRACNLNQTSIAKLTSGDDYVSWQL 121
           SA+Q EF LKDAAANY +RELD N+ R+ +          L + ++AKL + DD  +WQL
Sbjct: 529 SASQAEFILKDAAANYGVRELDKNAPRIGLVANTAEELAGLIKQALAKLAASDDN-AWQL 587

Query: 122 PGGTSYLASAVEGKVAALFSGNRLQYLNMGRNLACYYPEMRQQLVTADKVFAANGKTPLS 181
           PGGTSY A+AVEGKVAALF+G   QYLNMGR+L CYYPEMRQQ VTADKVFAAN KTPLS
Sbjct: 588 PGGTSYRAAAVEGKVAALFAGQGSQYLNMGRDLTCYYPEMRQQFVTADKVFAANDKTPLS 647

Query: 182 QTLYPKPVFNKDDLKAQETVLTNTANAQSAIGLSRWDQYELFTAAGFNADMVA 234
           QTLYPKPVFNKD+LKAQE +LTNTANAQSAIG     QY+LFTAAGFNADMVA
Sbjct: 648 QTLYPKPVFNKDELKAQEAILTNTANAQSAIGAISMGQYDLFTAAGFNADMVA 700

dbj|BAA89382.1| (AB025342) ORF8 [Moritella marina] Length = 2652
Score =  147 bits (368), Expect = 7e-35 Identities = 87/239 (36%), Positives =
121/239 (50%), Gaps = 12/239 (5%)

Query: 2   ISSFGFGGTNFHFVLEEYAPEHNRIDSEKAKYRQRQVAQSFLINAASKDALINELNT--- 58
           ISSFGFGGTNFH +LEEY P H+      + YR   V+Q+ LI+A  +  ++ ELN
Sbjct: 468 ISSFGFGGTNFHIILEEYRPGHD------SAYRLNSVSQTVLISANDQQGIVAELNNWRT 521

Query: 59  -LAASATQVEFNLKDAAANYALRELDGNSTRVLVSGKYKRRACNLNQTSIAKLTSGDDYV 117
            LA  A    F   +    + L+    N  R+    +    A  +  T++ +  +  D +
Sbjct: 522 KLAVDADHQGFVFNELVTTWPLKTPSVNQARLGFVARNANEAIAMIDTALKQFNANADKM 581

Query: 118 SWQLPGGTSYLASAVE--GKVAALFSGNRLQYLNMGRNLACYYPEMRQQLVTADKVFAAN 175
           +W +P G  Y  + ++  GKV ALFSG   QY+NMGR L C +P M       DK F+A
Sbjct: 582 TWSVPTGVYYRQAGIDATGKVVALFSGQGSQYVNMGRELTCNFPSMMHSAAAMDKEFSAA 641

Query: 176 GKTPLSQTLYPKPVFNKDDLKAQETVLTNTANAQSAIGLSRWDQYELFTAAGFNADMVA 234
           G   LS   +P PV+   + K QE  L  T +AQ AIG      ++ F  AGF AD  A
Sbjct: 642 GLGQLSAVTFPIPVYTDAERKLQEEQLRLTQHAQPAIGSLSVGLFKTFKQAGFKADFAA 700
```

Fig. 4-27. Comparison of amino acid sequences deduced from the DNA fragment amplified from *S. hanedai* KMG-427 by PCR with EPA gene cluster of SCRC-2738.
Amino acid sequence deduced from the fragment amplified by PCR in *S. hanedai* KMG-427 showed 73% similarity with that of ORF deduced from EPA gene cluster of *Shewanella* sp. SCRC-2738.
Query: Deduced amino acid sequence of ORF in 704bp.

Fig. 4-28. The Plaque Hybridization after in vitro packaging.

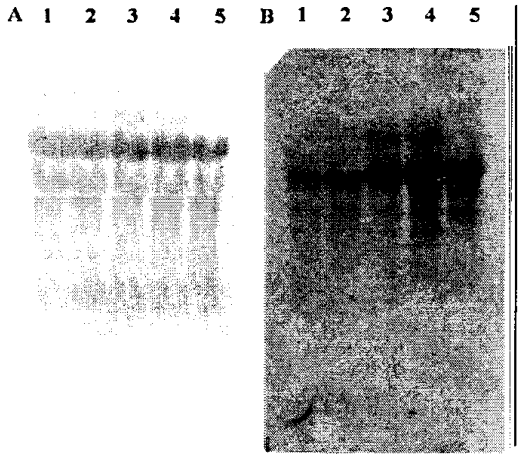


Fig. 4-29. Northern hybridzation using ORF2-specific probe. (A) Transferred membrane(LSU and SSU ribosomal RNAs were stained). (B) Northern blot analysis. The amount of RNA in each lane was 25g. 1. 0.05M, 2. LB(0.12M), 3. 0.5M, 4. 1M, 5. 1.5M NaCl concentration

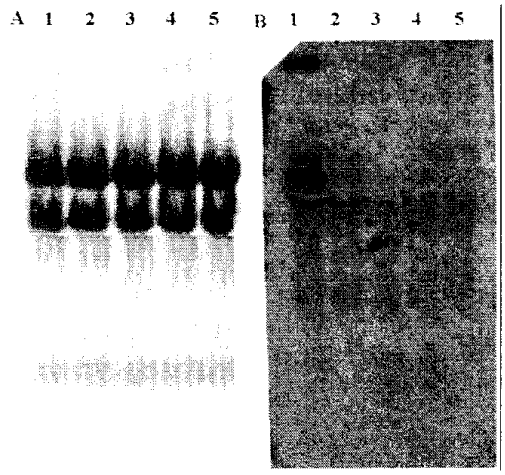


Fig. 4-30. Effect of pH on *dgk* transcription. (a) Transferred membrane(LSU and SSU ribosomal RNAs were stained). (b) Northern blot analysis. The amount of RNA in each lane was 25g. 1. pH 5, 2. pH 6, 3. normal LB(pH 6.7), 4. pH 7, 5. pH 8 LB medium

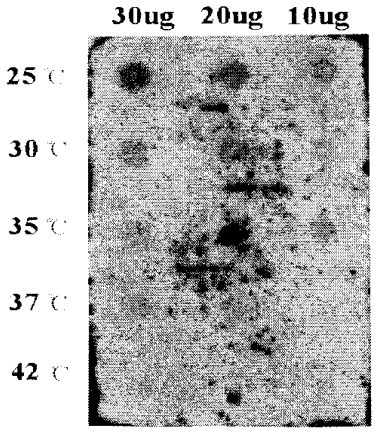


Fig. 4-31. Effect of temperature on *dgk* transcription.

Dot blot hybridization was carried out on RNA isolated cell grown various temperature. The amount of total RNA applied on the membranes is indicated in the upper side. Temperatures used are indicated on the left side.

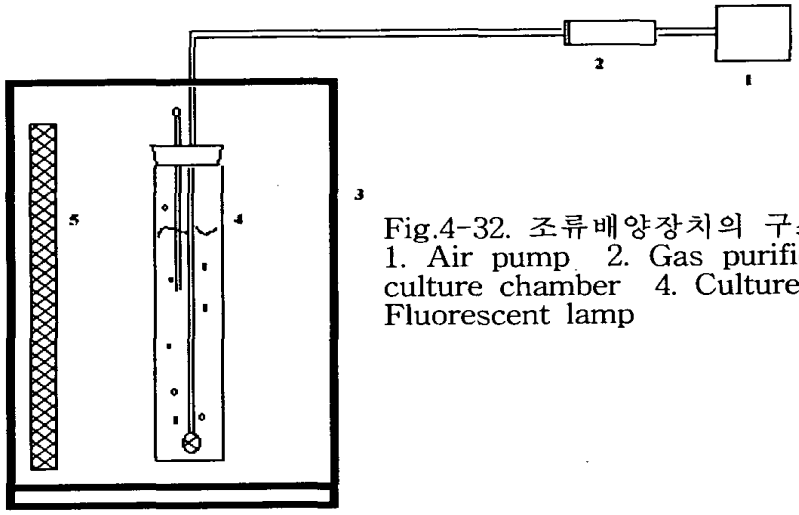


Fig.4-32. 조류배양장치의 구조
1. Air pump 2. Gas purifier 3. Plant culture chamber 4. Culture column 5. Fluorescent lamp

제 5 장 큰민어와 조피볼락용 사료에 해조분말 첨가 효과

제1절 서론

魚類에 필요한 營養素는 약 40여 가지가 되지만(NRC, 1993), 이 중에서도 우선적으로 밝혀져야 할 것이 蛋白質 要求量이다. 魚類의 성장은 결국 蛋白質 증가에 의한 성장이므로, 必須 아미노산 均衡이 잘 갖추어진 양질의 蛋白質을 적절히 공급하지 않으면, 成長이 정체되어 生産性이 낮아진다. 또한, 蛋白質은 養魚飼料의 營養成分 중 함유량이 가장 많고, 값이 제일 비싸기 때문에, 蛋白質 要求量에 관한 정확한 자료가 있어야만 經濟性있는 사료의 제조가 가능하다. 조피볼락의 사료내 適正 蛋白質 含量을 41% 전후로 추정하였다(Ikehara and Nagahara, 1980). 또한, 사료 중의 지질은 에너지원으로서 매우 중요할 뿐 아니라 에너지 가(價)가 높아 값비싼 사료 단백질을 절감시킬 수 있는 중요한 영양소이다. 특히 성장이 활발히 진행되는 비교적 어린 시기에 정상 성장을 위해서는 그 어종이 요구하는 지방산의 종류와 요구량이 사료에 첨가되어야 한다(Sargent et al., 1989). 특히 어류는 그들이 요구하는 지방산의 종류와 요구량이 수온이나 염분도 등에 영향을 받아 육상동물과는 많은 차이가 있다(Castell, 1979; Cowey and Sargent, 1979). 그래서 많은 연구자들은 양식대상 어종에 대하여 필수지방산의 종류와 요구량을 구명하기 위한 연구를 수행하여(Castell et al., 1972; Kanazawa et al., 1980; Takeuchi et al., 1983; Takeuchi et al., 1980), 담수어와 육상동물과는 달리 해산어는 EPA (eicosapentaenoic acid) 및 DHA (docosahexaenoic acid)와 같은 n-3 HUFA (highly unsaturated fatty acids)를 요구한다고 하였다 (이등, 1993a: Lee et al., 1994;

Gatesoupe et al., 1977; Kalogeropoulos et al., 1992; Leger et al., 1979; Watanabe, 1989). 이러한 지방산들은 체내에서 세포막의 효소활성 등 생리적인 기능에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되어 있다(이등, 1993b; Baud et al., 1989; German et al., 1987; Lokesh et al., 1989; Stubbs and Smith, 1984; Thomson et al., 1986).

큰민어는 어체가 크기 때문에 영명은 giant croaker, giant drum 또는 Japanese croaker라고 불리워지고, 일본명으로는 オオニベ라고 불리워진다. 일본의 千葉縣(북위 35.5°) 이남에서 동중국해까지 분포하는 민어의 일종으로서(阿部, 1989), 우리나라에서의 분포는 아직까지 알려져 있지 않고 있으나 일부 제주도 남방에서 어획한 바 있다는 어업인도 있다. 육질이 백색인 고급어로서 특히 겨울철에 가장 맛이 좋다고 알려져 있다(那須, 1987). 큰민어는 鄭(1977)의 분류에 의하면 농어목(Perciformes), 민어과(Sciaenidae), 민어속(*Nibea*)에 속하지만, 李와 朴(1992)의 분류 기준에 의하면 농어목, 민어과, 수조기속에 속하게 된다.

양식적 측면에서 본 큰민어의 장점은 다음과 같다(이, 1999).

● 체중 30kg 이상의 초대형 어종이며 성장이 빠르다

큰민어의 크기는 1.5 m, 30 kg까지 성장하는 초대형의 어류로서 동중국해에 분포하는 민어과 어류중 가장 크다. 단위 기간 동안의 성장도 매우 빨라서 남제주수산종묘시험장 실내 수조에서 1일 1회의 먹이 공급만으로도 1년에 약 1.5kg씩 성장시킬 수 있었다. 특히 1년어까지는 성장이 그리 빠른 편이 아니지만 2년생부터는 매우 빠른 성장을 보이는 특징이 있다. 현재 남제주수산종묘시험장에서 사육중인 10kg 정도의 어미도 1년에 1kg 이상씩 계속 성장이 이루어지고 있다. 이렇게 빠른 성장은 양식 경영상 매우 유리할 뿐만 아니라, 조기 산란군을 입식하여 사육할 경우는 월동이 불가능한 곳에서도 월동기 전에 식용 가능 크기까지 성장시킬 수도 있을 것으로 본다.

● 고수온에 대한 내성이 강하다

큰민어는 수온에 대한 내성이 큰 어종중의 하나이다. 특히, 고수온

에 대한 적응력이 매우 커서 32℃까지도 먹이를 잘 먹으며 빠른 성장을 보인다.

● 환경에 대한 적응력이 높다

큰민어는 저질이 니질이나 사니질로 구성된 곳의 중하층을 유영하는 어류로서 다소 혼탁한 곳에서도 잘 적응한다. 또한 질병에 대한 저항력도 강해서 누구나 손쉽게 양식이 가능할 것으로 본다.

● 해상가두리 뿐 아니라 육상수조에서의 양식도 가능하다

큰민어는 중층을 유영하는 어류이기 때문에 양식 방법상 해상가두리에서가 접합하다. 그러나 유영력이 그다지 크지 않고 온순하기 때문에 육상수조에서의 양식이 가능하다. 특히, 근년에 육상수조의 양식이 대형화되어 가고 수심도 깊어짐에 따라 좋은 양식 환경을 지니고 있다.

● 종묘생산이 쉽고, 종묘의 입식시기도 수온 상승기와 일치한다

큰민어 산란기는 3월에서 4월 사이로서 산란기 조절 없이도 종묘의 출하시기가 5월이면 가능하여 우리나라 해양의 수온 상승기와 일치하여 양식 경영상 매우 유리하다. 또한, 실내에서 자연산란이 성공됨에 따라 인공종묘생산이 가능하게 되었고, 종묘생산과정에서도 넙치나 도미류 등 기존 어종의 종묘생산 방법과 유사하거나 오히려 쉬운 편이므로 종묘의 확보가 용이하다.

그러므로 본 실험에서는 앞 연구들에 이어서 우리 나라의 주요 양식종인 조피볼락과 최근 유망 양식종으로 부각되고 있는 큰민어에 대하여 어분 및 대두박을 주요 단백질원으로 첨가한 배합사료를 제조하여 특히 해산어류에서 필수영양소로 알려진 고도불포화지방산을 다량 함유하고 있는 해조류의 미량 첨가효과에 대하여 조사하고자 하였다.

1. 사료에 해조분말의 미량 첨가가 큰민어의 성장 및 체성분에 미치는 효과

사료 중의 지질은 에너지원으로서 매우 중요할 뿐 아니라 에너지가(價)가 높아 값비싼 사료 단백질을 절감시킬 수 있는 중요한 영양

소이다. 특히 성장이 활발히 진행되는 비교적 어린 시기에 정상 성장을 위해서는 그 어종이 요구하는 지방산의 종류와 량이 사료에 첨가되어야 한다(Sargent et al., 1989). 특히 어류는 그들이 요구하는 지방산의 종류와 량이 수온이나 염분도 등에 영향을 받아 육상동물과는 많은 차이가 있다(Castell, 1979; Cowey and Sargent, 1979). 그래서 많은 연구자들은 양식대상 어종에 대하여 필수지방산의 종류와 요구량을 구명하기 위한 연구를 수행하여(Castell et al., 1972; Kanazawa et al., 1980; Takeuchi et al., 1983; Takeuchi et al., 1980), 담수어와 육상동물과는 달리 해산어는 EPA (eicosapentaenoic acid) 및 DHA (docosahexaenoic acid)와 같은 n-3 HUFA (highly unsaturated fatty acids)를 요구한다고 하였다 (이등, 1993a: Lee et al., 1994; Gatesoupe et al., 1977; Kalogeropoulos et al., 1992; Leger et al., 1979; Watanabe, 1989). 이러한 지방산들은 체내에서 세포막의 효소활성 등 생리적인 기능에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되어 있다(이등, 1993b; Baud et al., 1989; German et al., 1987; Lokesh et al., 1989; Stubbs and Smith, 1984; Thomson et al., 1986). 민어류인 red drum에 대해서는 Lochman et al., (1992)이 필수지방산의 종류와 요구량을 구명하기 위한 연구를 실시하여, red drum의 필수지방이 n-3와 n-6계의 고도불포화지방산이라고 하였으며, n-3HUFA 요구량이 약 1%라고 추정하였다. 또한, 경제적인 사료 설계시 첨가하여야 할 지질의 종류와 량을 결정하기 위한 연구에서 red drum 사료의 적정 지질 함량이 7~11%라고 보고한 바 있다(Williams and Robinson, 1988). 그래서 본 실험에서는 앞 연구들에 이어서 우리 나라의 주요 양식종으로 부각되고 있는 큰민어에 대하여 어분과 탈지대두박을 단백질원으로 첨가한 배합사료를 제조하여 dried *Isochrysis* powder의 첨가효과에 대하여 조사하였다.

참전복을 포함한 다양한 패류에서는 먹이생물로서 다양한 조류를 먹이로 섭취하면서 성장하기 때문에 많은 연구자들이 조류의 이용성에

관한 연구(Ioriya and Suzuke, 1987; Mai et al., 1994; Norman-Boudrean et al., 1986;, Ohgai et al., 1991; Yamada and Takano, 1987; 김, 1992; 김 등, 1993; 한, 1994)를 수행하여 왔다. 이들 전복이 점차 성장함에 따라 부착규조류만으로 양성하기 어렵기 때문에 각장 1cm 전후가 되면 미역, 다시마, 파래와 같은 해조류가 풍부한 지역의 암반지대에 방류하여 해조류를 주 먹이로 하여 양성시킨다. 하지만 이러한 천연 먹이는 성장과 생존율이 배합사료보다 저조하고 (Mai et al., 1995; Viana et al., 1993; 이 등, 1997a,b,c), 공급이 불안정하기 때문에 배합사료를 사용하는 곳이 현저히 증가되고 있다. 이와 더불어 경제적인 전복용 배합사료를 개발하기 위한 연구(이 등, 1997a,b,c; 정 등, 1994; Harada and Akishima, 1985; Ogino and Kato, 1964; Ogino and Ohta, 1963; Uki et al., 1985a,b; Uki et al., 1986a,b,c)가 진행되었다. 하지만 배합사료를 사용함에 따라 패각의 색깔이나 어체의 품질이 천연먹이와 차이가 생길 수 있다는 의문이 제기되고 있다. 현재까지 이에 대한 연구가 구체적으로 이루어지지 못했기 때문에 본 연구는 큰민어의 먹이로 이용가능하며 색소와 고도불포화지방산(DHA and EPA)을 풍부하게 함유한 *Isochrysis*를 사료에 첨가하여 큰민어의 성장, 체성분 및 체색에 미치는 영향을 조사하였다.

큰민어는 어체가 크기 때문에 영명은 giant croaker, giant drum 또는 Japanese croaker라고 불리워지고, 일본명으로는 オオニベ라고 불리워진다. 일본의 千葉縣(북위 35.5°) 이남에서 동중국해까지 분포하는 민어의 일종으로서(阿部, 1989), 우리나라에서의 분포는 아직까지 알려져 있지 않고 있으나 일부 제주도 남방에서 어획한 바 있다는 어업인도 있다. 육질이 백색인 고급어로서 특히 겨울철에 가장 맛이 좋다고 알려져 있다(那須, 1987). 큰민어는 鄭(1977)의 분류에 의하면 농어목(Perciformes), 민어과(Sciaenidae), 민어속(*Nibea*)에 속하지만, 李와 朴(1992)의 분류 기준에 의하면 농어목, 민어과, 수조기속에 속하게 된다. 양식적 측면에서 본 큰민어는 많은 장점을 가지고 있다. 즉, 체중 30kg

이상의 초대형 어종이며 성장이 빠르며, 고수온에 대한 내성이 강하다. 또한, 환경에 대한 적응력이 높아, 저질이 니질이나 사니질로 구성된 곳의 중하층을 유영하는 어류로서 다소 혼탁한 곳에서도 잘 적응한다. 또한 질병에 대한 저항력도 강해서 누구나 손쉽게 양식이 가능할 것으로 본다. 중층을 유영하는 어류이기 때문에 양식 방법상 해상가두리에서가 접합하다. 그러나 유영력이 그다지 크지 않고 온순하기 때문에 육상수조에서의 양식이 가능하다. 특히, 근년에 육상수조의 양식이 대형화되어 가고 수심도 깊어짐에 따라 좋은 양식 환경을 지니고 있다. 큰민어 산란기는 3월에서 4월 사이로서 산란기 조절 없이도 종묘의 출하시기가 5월이면 가능하여 우리나라 해양의 수온 상승기와 일치하여 양식 경영상 매우 유리하다. 또한, 실내에서 자연산란이 성공됨에 따라 인공종묘생산이 가능하게 되었고, 종묘생산과정에서도 넙치나 도미류 등 기존 어종의 종묘생산 방법과 유사하거나 오히려 쉬운 편이므로 종묘의 확보가 용이하다.

魚類에 필요한 營養素는 약 40여 가지가 되지만(NRC, 1993), 이 중에서도 우선적으로 밝혀져야 할 것이 蛋白質 要求量이다. 魚類의 성장은 결국 蛋白質 증가에 의한 성장이므로, 必須 아미노산 均衡이 잘 갖추어진 양질의 蛋白質을 적절히 공급하지 않으면, 成長이 정체되어 生産性이 낮아진다. 또한, 蛋白質은 養魚飼料의 營養成分 중 함유량이 가장 많고, 값이 제일 비싸기 때문에, 蛋白質 要求量에 관한 정확한 자료가 있어야만 經濟性있는 사료의 제조가 가능하다. 조피볼락의 사료내 適正 蛋白質 含量을 41% 전후로 추정하였다(Ikehara and Nagahara, 1980). 또한, 사료 중의 지질은 에너지원으로서 매우 중요할 뿐 아니라 에너지 가(價)가 높아 값비싼 사료 단백질을 절감시킬 수 있는 중요한 영양소이다. 특히 성장이 활발히 진행되는 비교적 어린 시기에 정상 성장을 위해서는 그 어종이 요구하는 지방산의 종류와 요구량이 사료에 첨가되어야 한다(Sargent et al., 1989). 특히 어류는 그들이 요구하는 지방산의 종류와 요구량이 수온이나 염분도 등에 영향을 받아 육상

동물과는 많은 차이가 있다(Castell, 1979; Cowey and Sargent, 1979). 그래서 많은 연구자들은 양식대상 어종에 대하여 필수지방산의 종류와 요구량을 구명하기 위한 연구를 수행하여(Castell et al., 1972; Kanazawa et al., 1980; Takeuchi et al., 1983; Takeuchi et al., 1980), 담수어와 육상동물과는 달리 해산어는 EPA (eicosapentaenoic acid) 및 DHA (docosahexaenoic acid)와 같은 n-3 HUFA (highly unsaturated fatty acids)를 요구한다고 하였다 (이등, 1993a: Lee et al., 1994; Gatesoupe et al., 1977; Kalogeropoulos et al., 1992; Leger et al., 1979; Watanabe, 1989). 이러한 지방산들은 체내에서 세포막의 효소활성 등 생리적인 기능에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되어 있다(이등, 1993b; Baud et al., 1989; German et al., 1987; Lokesh et al., 1989; Stubbs and Smith, 1984; Thomson et al., 1986). 그러므로 본 실험에서는 앞 연구들에 이어서 우리 나라의 주요 양식종인 조피볼락과 최근 유망 양식종으로 부각되고 있는 큰민어에 대하여 어분 및 대두박을 주요 단백질원으로 첨가한 배합사료를 제조하여 특히 해산어류에서 필수영양소로 알려진 고도불포화지방산을 다량 함유하고 있는 해조류의 첨가효과에 대하여 조사하고자 하였다.

2. 사료에 해조분말의 소량 첨가가 큰민어 및 조피볼락의 성장 및 체성분에 미치는 효과

사료 중의 지질은 에너지원으로서 매우 중요할 뿐 아니라 에너지 가(價)가 높아 값비싼 사료 단백질을 절감시킬 수 있는 중요한 영양소이다. 특히 성장이 활발히 진행되는 비교적 어린 시기에 정상 성장을 위해서는 그 어종이 요구하는 지방산의 종류와 량이 사료에 첨가되어야 한다(Sargent et al., 1989). 특히 어류는 그들이 요구하는 지방산의 종류와 량이 수온이나 염분도 등에 영향을 받아 육상동물과는 많은 차이가 있다(Castell, 1979; Cowey and Sargent, 1979). 그래서 많은 연구자들은 양식대상 어종에 대하여 필수지방산의 종류와 요구량을 구명하기 위한 연구를 수행하여(Castell et al., 1972; Kanazawa et al., 1980;

Takeuchi et al., 1983; Takeuchi et al., 1980), 담수어와 육상동물과는 달리 해산어는 EPA (eicosapentaenoic acid) 및 DHA (docosahexaenoic acid)와 같은 n-3HUFA (highly unsaturated fatty acids)를 요구한다고 하였다 (이등, 1993a: Lee et al., 1994; Gatesoupe et al., 1977; Kalogeropoulos et al., 1992; Leger et al., 1979; Watanabe, 1989). 이러한 지방산들은 체내에서 세포막의 효소활성 등 생리적인 기능에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되어 있다(이등, 1993b; Baud et al., 1989; German et al., 1987; Lokesh et al., 1989; Stubbs and Smith, 1984; Thomson et al., 1986). 민어류인 red drum에 대해서는 Lochman et al., (1992)이 필수지방산의 종류와 요구량을 구명하기 위한 연구를 실시하여, red drum의 필수지방이 n-3와 n-6계의 고도불포화지방산이라고 하였으며, n-3HUFA 요구량이 약 1%라고 추정하였다. 또한, 경제적인 사료 설계시 첨가하여야 할 지질의 종류와 량을 결정하기 위한 연구에서 red drum 사료의 적정 지질 함량이 7~11%라고 보고한 바 있다(Williams and Robinson, 1988). 그래서 본 실험에서는 앞 연구들에 이어서 우리 나라의 주요 양식종으로 부각되고 있는 큰민어에 대하여 어분과 탈지대두박을 단백질원으로 첨가한 배합사료를 제조하여 dried *Isochrysis* powder의 첨가효과에 대하여 조사하였다.

참전복을 포함한 다양한 패류에서는 먹이생물로서 다양한 조류를 먹이로 섭취하면서 성장하기 때문에 많은 연구자들이 조류의 이용성에 관한 연구(Ioriya and Suzuke, 1987; Mai et al., 1994; Norman-Boudrean et al., 1986;, Ohgai et al., 1991; Yamada and Takano, 1987; 김, 1992; 김 등, 1993; 한, 1994)를 수행하여 왔다. 이들 전복이 점차 성장함에 따라 부착규조류만으로 양성하기 어렵기 때문에 각장 1cm 전후가 되면 미역, 다시마, 파래와 같은 해조류가 풍부한 지역의 암반지대에 방류하여 해조류를 주 먹이로 하여 양성시킨다. 하지만 이러한 천연 먹이는 성장과 생존율이 배합사료보다 저조하고 (Mai et al., 1995; Viana et al., 1993; 이 등, 1997a,b,c), 공급이 불안정하기 때문에 배합사료를 사용하는 곳이 현저히 증가되고 있다. 이와

더불어 경제적인 전복용 배합사료를 개발하기 위한 연구(이 등, 1997a,b,c; 정 등, 1994; Harada and Akishima, 1985; Ogino and Kato, 1964; Ogino and Ohta, 1963; Uki et al., 1985a,b; Uki et al., 1986a,b,c)가 진행되었다. 하지만 배합사료를 사용함에 따라 패각의 색깔이나 어체의 품질이 천연먹이와 차이가 생길 수 있다는 의문이 제기되고 있다. 현재까지 이에 대한 연구가 구체적으로 이루어지지 못했기 때문에 본 연구는 큰민어의 먹이로 이용가능하며 색소와 고도불포화지방산(DHA and EPA)을 풍부하게 함유한 *Isochrysis*를 사료에 첨가하여 큰민어의 성장, 체성분 및 체색에 미치는 영향을 조사하였다.

큰민어는 어체가 크기 때문에 영명은 giant croaker, giant drum 또는 Japanese croaker라고 불리워지고, 일본명으로는 オオニベ라고 불리워진다. 일본의 千葉縣(북위 35.5°) 이남에서 동중국해까지 분포하는 민어의 일종으로서(阿部, 1989), 우리나라에서의 분포는 아직까지 알려져 있지 않고 있으나 일부 제주도 남방에서 어획한 바 있다는 어업인도 있다. 육질이 백색인 고급어로서 특히 겨울철에 가장 맛이 좋다고 알려져 있다(那須, 1987). 큰민어는 鄭(1977)의 분류에 의하면 농어목(Perciformes), 민어과(Sciaenidae), 민어속(*Nibea*)에 속하지만, 李와 朴(1992)의 분류 기준에 의하면 농어목, 민어과, 수조기속에 속하게 된다. 양식적 측면에서 본 큰민어는 많은 장점을 가지고 있다. 즉, 체중 30kg 이상의 초대형 어종이며 성장이 빠르며, 고수온에 대한 내성이 강하다. 또한, 환경에 대한 적응력이 높아, 저질이 니질이나 사니질로 구성된 곳의 중하층을 유영하는 어류로서 다소 혼탁한 곳에서도 잘 적응한다. 또한 질병에 대한 저항력도 강해서 누구나 손쉽게 양식이 가능할 것으로 본다. 중층을 유영하는 어류이기 때문에 양식 방법상 해상가두리에서가 접합하다. 그러나 유영력이 그다지 크지 않고 온순하기 때문에 육상수조에서의 양식이 가능하다. 특히, 근년에 육상수조의 양식이 대형화되어 가고 수심도 깊어짐에 따라 좋은 양식 환경을 지니고 있다. 큰민어 산란기는 3월에서 4월 사이로서 산란기 조절 없이도 종묘의 출하

시기가 5월이면 가능하여 우리나라 해양의 수온 상승기와 일치하여 양식 경영상 매우 유리하다. 또한, 실내에서 자연산란이 성공됨에 따라 인공종묘생산이 가능하게 되었고, 종묘생산과정에서도 넙치나 도미류 등 기존 어종의 종묘생산 방법과 유사하거나 오히려 쉬운 편이므로 종묘의 확보가 용이하다.

魚類에 필요한 營養素는 약 40여 가지가 되지만(NRC, 1993), 이 중에서도 우선적으로 밝혀져야 할 것이 蛋白質 要求量이다. 魚類의 성장은 결국 蛋白質 증가에 의한 성장이므로, 必須 아미노산 均衡이 잘 갖추어진 양질의 蛋白質을 적절히 공급하지 않으면, 成長이 정체되어 生産性이 낮아진다. 또한, 蛋白質은 養魚飼料의 營養成分 중 함유량이 가장 많고, 값이 제일 비싸기 때문에, 蛋白質 要求量에 관한 정확한 자료가 있어야만 經濟性있는 사료의 제조가 가능하다. 조피볼락의 사료내 適正 蛋白質 含量을 41% 전후로 추정하였다(Ikehara and Nagahara, 1980). 또한, 사료 중의 지질은 에너지원으로서 매우 중요할 뿐 아니라 에너지 가(價)가 높아 값비싼 사료 단백질을 절감시킬 수 있는 중요한 영양소이다. 특히 성장이 활발히 진행되는 비교적 어린 시기에 정상 성장을 위해서는 그 어종이 요구하는 지방산의 종류와 요구량이 사료에 첨가되어야 한다(Sargent et al., 1989). 특히 어류는 그들이 요구하는 지방산의 종류와 요구량이 수온이나 염분도 등에 영향을 받아 육상동물과는 많은 차이가 있다(Castell, 1979; Cowey and Sargent, 1979). 그래서 많은 연구자들은 양식대상 어종에 대하여 필수지방산의 종류와 요구량을 구명하기 위한 연구를 수행하여(Castell et al., 1972; Kanazawa et al., 1980; Takeuchi et al., 1983; Takeuchi et al., 1980), 담수어와 육상동물과는 달리 해산어는 EPA (eicosapentaenoic acid) 및 DHA (docosahexaenoic acid)와 같은 n-3 HUFA (highly unsaturated fatty acids)를 요구한다고 하였다 (이등, 1993a: Lee et al., 1994; Gatesoupe et al., 1977; Kalogeropoulos et al., 1992; Leger et al., 1979; Watanabe, 1989). 이러한 지방산들은 체내에서 세포막의 효소활성 등 생

리적인 기능에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되어 있다(이등, 1993b; Baud et al., 1989; German et al., 1987; Lokesh et al., 1989; Stubbs and Smith, 1984; Thomson et al., 1986). 그러므로 본 실험에서는 앞 연구들에 이어서 우리 나라의 주요 양식종인 조피볼락과 최근 유망 양식종으로 부각되고 있는 큰민어에 대하여 어분 및 대두박을 주요 단백질원으로 첨가한 배합사료를 제조하여 특히 해산어류에서 필수영양소로 알려진 고도불포화지방산을 다량 함유하고 있는 해조류의 소량 첨가효과에 대하여 조사하고자 하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 사료에 해조분말의 미량 첨가가 큰민어의 성장 및 체성분에 미치는 효과

가. 사료 원료

본 실험에서 사용한 원료인 북양어분(간접식 건조: steam dry, 고려원양 개척호), 대두박(탈지, 탈피, 분쇄입자: 0.25 ㎜) 및 소맥분은 사료회사에서 사용하고 있는 상품화된 것을 구입하였고, 해조류는 경북대(미량첨가시)또는 남해수산종묘시험장(소량첨가시)에서 수확된 것을 사용하였으며, 동결건조시킨후 분쇄하여 사료에 첨가하였다. 이들의 일반 성분을 분석하였다(Table 5-1).

나. 실험사료

북양어분, 대두박, 소맥분을 주 단백질원으로한 대조사료(Con)와 대조사의 셀루로즈의 일부를 냉동상태에서 진공건조된 **0.2%** 해조분말을 첨가하여 모든 배합사료의 단백질과 지질 함량이 각각 40% 및 12.5% 전후가 되도록 설계하였다(Table 5-2). 지질원으로는 옥수수유를 사용하였으며, 소맥분은 탄수화물원으로도 사용되었으며, 점결제로

는 Carboxymethyl Cellulose을 2% 첨가하였다. 이외 사료의 영양소가 조피볼락의 요구에 맞도록 하였다(이해영, 1999). 사료성형은 각 원료를 잘 혼합한 후 혼합물 100 g 당 물 40 g을 가하고 다시 혼합한 후 펠렛 제조기로 성형하였다. 사료는 냉동고에 보관하면서 사료 급여시마다 사용하였다. 또한, 시판되는 우럭용 배합사료와도 비교하였다.

실험에 사용된 실험사료의 조성표와 일반성분은 Table 2에 나타내었다. 실험사료는 단백질 함량이 40%내외가 되도록 설계하였다. 대조구는 어분 43.2%에 값싼 대체 단백원인 대두박 20%를 첨가한 경제적인 실험사료이고, **0.2% 해조분말 첨가구**는 동일한 단백질 종류와 함유량으로 사용하였다. 지질원으로 대두유를 첨가하였으며 필수지방산은 어분에서 제공하였으며 사료중의 지질 함량을 약 12.5%내외로 조절하였다. 탄수화물원으로는 소맥분을 18.8%첨가하여 적정 에너지 함량으로 조절되었으며, filler로서 cellulose가 첨가되었다. 모든 실험사료에는 비타민혼합물을 3% 첨가하였으며, 미네랄 혼합물은 3%를 첨가하였다. 또한, 사료의 수중에서 풀림을 방지하기 위한 점결제로는 2%의 CMC를 첨가하였다(Moon and Gatlin, 1994). 이와 같이 단백질, 지질 및 필수지방산, 에너지, 탄수화물, 미네랄 및 비타민을 조피볼락의 요구량에 맞도록 설계하였다(국립수산진흥원, 1996). 사료원료중 대두박과 콘글루텐밀은 각각 0.25 ㎜와 0.5 ㎜ screen이 부착된 분쇄기(RETSH GMBH 5657, Germany)로 분쇄한 후 사료에 첨가하였다. 사료제조를 위하여 분말상태의 사료원료를 혼합기(Twin-Shell Pin Intensifier Blender, Patterson-Kelly Co., England)에서 30분 동안 혼합한 후, 믹서기에서 지질을 첨가하면서 다시 혼합한 다음 원료의 약40%의 증류수를 첨가하여, 모이스트펠렛 제조기로 성형하였다. 제조된 사료는 냉동고(-25℃)에 보관하면서 급여 시마다 적절한 크기로 절단하여 급여하였다.

다. 실험어 및 사육관리

사육 실험은 1998년 5월에 생산된 1年生 조피볼락 미성어와 1999년 5월에 생산된 큰민어 치어의 2 group을 대상으로 하였다. 2톤 FRP 원

형수조를 이용하여, 유수식으로 1일 2회 먹이를 공급하여 예비사육 중이던, 동일 어미로부터 출산한 실험어의 평균 체중은 큰민어는 7 g으로서 실험 개시 전까지 시판 우럭용 펠렛을 먹여 키웠다. 한 水槽에 수용한 실험어는 조피볼락이 12마리, 큰민어가 16마리씩이었으며, 각 group마다 實驗區當 2개의 수조를 배치하였다. 큰민어의 사육기간은 44일간 이었다. 각 수조에 에어스톤을 설치하여, 용존산소를 5ppm 이상으로 유지하였다. 사육수온은 자연수온에 의존하였으며, 자연 광주기를 이용하였다. 고압모래여과장치로 여과된 자연해수를 실험시작시에 3L/min씩 흘려주었고, 실험어가 성장함에 따라 실험종료시에는 5L/min로 조절하였다.

라. 측정 및 성분분석

어체의 측정은 실험시작시 전 실험어의 중량을 측정하였고, 실험 종료 후에는 2일간 절식시킨 후 MS222 100 ppm에 마취시켜 각 실험수조에 수용된 실험어 전체 체중을 측정하였다.

근육은 −75℃에 보관후 실험구별로 5마리씩 무작위 추출하였으며, 각 조직의 영양성분 분석을 위하여 잘갈은 후 균질하게 혼합하여 일반성분 분석(AOAC, 1990)을 실시하였다. 수분은 상압가열건조법, 조단백질은 Kjeldahl 질소정량법(N×6.25), 조회분은 직접회화법으로 분석하였다. 조단백질(N×6.25)은 Automatic analyzer (Vapodest 5/6, Gerhardt)를 사용하여 분석하였고, 수분은 105℃의 dry oven에서 4시간 동안 건조후 측정하였다. 조회분은 550℃의 회화로에서 4 시간 동안 태운 후 정량하였다. 지질 및 지방산 분석을 위한 총지질의 추출은 Folch et al. (1957)의 방법을 사용하였고, 추출된 지질 14% BF3-Methanol 3㎖를 가한후 methylation 시킨후, gas chromatography(HP5890)로 지방산을 분석하였으며, 분석조건은 Table 3에 제시하였다. 표준지방산으로는 $C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{20:0}$, $C_{20:1}$, $C_{20:2}$, $C_{20:3}$, $C_{20:4}$, $C_{20:5}$, $C_{22:6}$ (Sigma, 순도 99%이상)을 사용하였다.

2. 사료에 해조분말의 소량 첨가가 큰민어 및 조피볼락의 성장 및 체성분에 미치는 효과

가. 실험사료

실험에 사용된 실험사료의 조성표와 일반성분은 Table 7에 나타내었다. 실험사료는 단백질 함량이 40%내외가 되도록 설계하였다. 대조구는 어분 43.2%에 값싼 대체 단백원인 대두박 20%를 첨가한 경제적인 실험사료이고, 해조분말 첨가구는 동일한 단백질 종류와 함유량으로 사용하였다. 지질원으로 대두유를 첨가하였으며 필수지방산은 어분에서 제공하였으며 사료중의 지질 함량을 약 12.5%내외로 조절하였다. 탄수화물원으로는 소맥분을 18.8%첨가하여 적정 에너지 함량으로 조절되었으며, filler로서 cellulose가 첨가되었다. 모든 실험사료에는 비타민혼합물을 3% 첨가하였으며, 미네랄 혼합물은 3%를 첨가하였다. 또한, 사료의 수중에서 풀림을 방지하기 위한 점결제로는 2%의 CMC를 첨가하였다(Moon and Gatlin, 1994). 이와 같이 단백질, 지질 및 필수지방산, 에너지, 탄수화물, 미네랄 및 비타민을 조피볼락의 요구량에 맞도록 설계하였다(국립수산진흥원, 1996). 사료원료중 대두박과 콘글루텐밀은 각각 0.25 ㎜와 0.5 ㎜ screen이 부착된 분쇄기(RETSH GMBH 5657, Germany)로 분쇄한 후 사료에 첨가하였다. 사료제조를 위하여 분말상태의 사료원료를 혼합기(Twin-Shell Pin Intensifier Blender, Patterson-Kelly Co., England)에서 30분 동안 혼합한 후, 믹서기에서 지질을 첨가하면서 다시 혼합한 다음 원료의 약40%의 증류수를 첨가하여, 모이스트펠렛 제조기로 성형하였다. 제조된 사료는 냉동고(-25℃)에 보관하면서 급여 시마다 적절한 크기로 절단하여 급여하였다.

나. 실험어 및 사육관리

사육 실험은 1999년 5월 및 2000년 4월에 생산된 조피볼락 미성어와 치어 , 그리고 2000년 5월에 생산된 큰민어 치어의 3 group을 대상으

로 하였다. 2톤 FRP 원형수조를 이용하여, 유수식으로 1일 2회 먹이를 공급하여 예비사육 중이던, 동일 어미로부터 출산한 실험어의 평균 체중은 조피볼락이 284 g과 3.6 g이었으며, 큰민어는 5.9 g으로서 실험개시 전까지 시판 우럭용 펠렛을 먹여 키웠다. 한 水槽에 수용한 실험어는 조피볼락 미성어와 치어가 각각 12마리와 50마리였으며, 큰민어가 20마리씩이었으며, 각 group마다 實驗區當 1개의 수조를 배치하였다. 조피볼락 및 큰민어의 사육기간은 7주간이었다. 각 수조에 에어스톤을 설치하여, 용존산소를 5ppm 이상으로 유지하였다. 사육수온은 자연수온에 의존하였으며, 자연 광주기를 이용하였다. 고압모래여과장치로 여과된 자연해수를 실험시작시에 3L/min씩 흘려주었고, 실험어가 성장함에 따라 실험종료시에는 5L/min로 조절하였다.

다. 측정 및 성분분석

어체의 측정은 실험시작시 전 실험어의 중량을 측정하였고, 실험 종료 후에는 2일간 절식시킨 후 MS222 100 ppm에 마취시켜 각 실험수조에 수용된 실험어 전체 체중을 측정하였다. 근육은 −75℃에 보관후 실험구별로 5마리씩 무작위 추출하였으며, 각 조직의 영양성분 분석을 위하여 잘갈은 후 균질하게 혼합하여 일반성분 분석(AOAC, 1990)을 실시하였다. 수분은 상압가열건조법, 조단백질은 Kjeldahl 질소정량법(N×6.25), 조회분은 직접회화법으로 분석하였다. 조단백질(N×6.25)은 Automatic analyzer (Vapodest 5/6, Gerhardt)를 사용하여 분석하였고, 수분은 105℃의 dry oven에서 4시간 동안 건조후 측정하였다. 조회분은 550℃의 회화로에서 4 시간 동안 태운 후 정량하였다. 지질 및 지방산 분석을 위한 총지질의 추출은 Folch et al. (1957)의 방법을 사용하였고, 추출된 지질 14% BF3-Methanol 3㎖를 가한후 methylation 시킨 후, gas chromatography(HP5890)로 지방산을 분석하였으며, 분석조건은 다음과 같다. 표준지방산으로는 $C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{20:0}$, $C_{20:1}$, $C_{20:2}$, $C_{20:3}$, $C_{20:4}$, $C_{20:5}$, $C_{22:6}$ (Sigma, 순도 99%이상)을 사용하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 사료에 해조분말의 미량 첨가가 큰민어의 성장 및 체성분에 미치는 효과

44일간 사육한 후, **큰민어 치어**의 최종평균체중 해조류 무첨가구가 32.8g이었으며 첨가구가 35.8 g으로 해조류 첨가에 의하여 성장은 높아지는 것으로 나타났다(Table 5-4). 이러한 경향은 증체율에서도 같은 경향을 보였다. 해조류 첨가에 의한 성장효과를 살펴보면, 44일간 사육한 후의 생존율은 100%로 해조첨가에 관계없이 높은 값을 유지하였다. 분쇄된 해조류를 건물로 환산하여 0.2%첨가한 배합사료로 사육한 결과, **큰민어 치어**에서는 평균체중 및 증체율은 높게 나타났지만 모든 실험구에서 생존율은 100%로 양호하였다(Table 5-4).

해조첨가사료를 섭식한 큰민어 치어의 근육은 수분이 약간 감소하면서 단백질과 지질의 함량이 증가하였지만, 회분함량은 동일하였다(Table 5). 실험 종료시의 해조류 첨가 실험사료를 섭취한 큰민어 치어의 지질 함량은 0.17% 증가하였다. 이처럼 해조류 첨가구의 지질 함량이 높아지는 것은 지질의 대사작용이 해조분말의 첨가에 의하여 달라졌기 때문인 것에 기인된 것으로 사려되며, 향후 이와 관련된 연구가 수행되어야만 정확한 설명이 될 것으로 생각된다. 큰민어 치어 근육의 EPA 및 DHA 함량은 해조류의 첨가에 의하여 큰 변화는 없었다. 근육지질의 지방산중 EPA와 DHA함량의 GC분석결과, EPA와 DHA함량에서는 차이가 없었다(Fig. 1). 큰민어 근육의 지질중 특정 지방산(EPA와 DHA)의 함량비는 일정하게 유지되는 것으로 생각된다.

2. 사료에 해조분말의 소량 첨가가 큰민어 및 조피볼락의 성장 및 체성분에 미치는 효과

7주간 사육한 후, **조피볼락 미성어**의 최종평균체중은 해조류 무첨가

구(M-4)가 289 g으로 높았으며, **조피볼락 치어**의 최종평균체중 해조류 무첨가구가 7.9 g으로 높은 값을 보였고, 첨가구가 5.9 g으로 낮은 값을 나타내었다(Table 5-9). 한편, **큰민어 치어**의 최종평균체중 해조류 무첨가구가 21.9 g으로 첨가구가 21.78 g으로 유사한 값을 나타내었다(Table 5-9). 이러한 경향은 증체율에서도 같은 경향을 보였다. 해조류 첨가에 의한 성장효과를 살펴보면, 7주간 사육한 후의 생존율은 **조피볼락 미성어**에서는 해조류 첨가에 의하여 생존율은 낮아졌지만(83 → 75%), **조피볼락과 큰민어 치어**에서는 해조류 첨가에 의하여 오히려 생존율이 높아졌다(각각, 74 → 86%, 75 → 90%).

분쇄된 해조류를 건물로 환산하여 1.0%첨가한 배합사료로 사육한 결과, **조피볼락 치어 및 미성어**에서는 평균체중, 증체율 및 사료효율이 저조한 값을 보였지만, 생존율은 높아졌다. **큰민어 치어**에서는 평균체중 및 증체율은 유사하였지만, 사료효율과 생존율은 유사하였다. 위의 결과로 보아 조피볼락용 배합사료에 해조류의 첨가는 미성어보다는 어린시기인 치어에 *Isochrysis*를 첨가하는 것이 더 생존율을 개선시킬 수 있을 것으로 생각된다. 하지만, 성장증진을 위하여는 적정 첨가량을 먼저 규명한후 첨가하여야 할 것 같다. 큰민어용 배합사료에 해조류의 첨가는 치어기에 사료효율과 생존율을 증가시킬 수 있었지만, 높은 성장을 위하여는 향후 먼저, 적정 첨가량이 규명되어야 할 것 같다.

*Isochrysis*를 첨가하였을 때 생존율이 높아지는 것에 대해서는 아직까지 확실히 그 원인을 구명하기 어렵지만, 첨가된 원료의 필수아미노산 조성의 측면에서 살펴보면, 단백질 및 필수 아미노산의 총량이 *Isochrysis*에서는 49%로 높게 나타났으므로(Table 5-6), Mai et al.(1994)과 이 등(1997b)의 연구에서 성장과 관련성이 높다고 지적된 필수아미노산인 Arg, His, Ile, Lys 및 Met의 함량과 관련이 있는 것으로 보아 필수지방산과 함께, *Isochrysis*의 아미노산에 대한 연구도 필요한 것으로 판단된다. 전복의 경우, 천연먹이 공급구에서도 이를 뒷

받침할 수 있는 결과가 보고되었는데, 이 등(1997c)은 천연 먹이로 미역과 다시마를 20주간 참전복에 공급한 결과, 미역 공급구가 다시마 공급구보다 좋은 성적을 보였다. 그러므로, 다른 해조류의 첨가에 대한 연구도 필요한 것으로 보인다.

전복에서 *Spirulina*를 5~15% 첨가한 실험구의 생존률, 평균체중, 증체율, 가식부 중량 및 평균 각장은 *spirulina* 첨가 함량에 영향을 받지 않았으며, 대조구와도 차이를 보이지 않았다($P<0.05$). 따라서 값비싼 *Isochrysis*도 *spirulina*처럼 성장개선 목적으로는 첨가할 필요가 없을 것으로 판단된다. 하지만 전복처럼, 양식어의 피부 색깔을 내기 위한 첨가제 등 특수한 목적으로 사용할 필요는 있을 것으로 기대된다. 사료의 단백질과 지질 함량이 동일함에도 불구하고 이처럼 해조류의 첨가로 조피볼락 치어 및 미성어의 성장이 약간 낮아지는 것은 사료효율 및 이와 관련된 인자들이 작용한 것으로 간주된다. 하지만 큰민어의 경우는 해조류가 첨가된 배합사료의 경우는 성장은 유사하였지만, 사료효율과 생존율은 해조류 무첨가로 좋은 결과를 보였다. 이러한 차이에 대해서는 차후 지속적으로 연구되어야 할 과제이다.

실험 종료시의 **조피볼락 치어 및 미성어와 큰민어 치어 전어체의 일반영양성분**은 **어종과 성장시기**에 따라서 다양한 차이를 나타내었다 (Table 5-10). **조피볼락 치어 및 미성어 전어체의 수분**은 70% 전후로 해조류 *Isochrysis*의 첨가로 해조류 *Isochrysis*무첨가구에 비해 증가되었지만, **큰민어 치어**에서는 감소하여, 어종에 따라 다른 양상을 나타내었다. **조피볼락 치어 및 미성어 전어체 단백질**의 경우 무첨가구 각각 16.03, 18.47%에서 해조류 첨가시에는 16.00, 14.66%로 모든 성장단계에서 감소하였지만, **큰민어 치어의 전어체**에서는 증가하였다. 해조류 첨가 실험사료를 섭취한 **조피볼락 치어 및 미성어 전어체의 지질** 함량은 해조류 첨가구에서 각각 약 2% 감소, 1% 증가하여 성장단계에 따라 다른 양상을 나타내었고, 큰민어 치어의 지질 함량은 조피볼락 치어처럼 감소하였다. 이처럼 해조류 첨가구의 지질 함량이 성장단

계에 따라 치어기에는 낮아지고, 미성어기에는 높아지는 것은 성장단계에 따른 지질의 양적, 질적 요구량이 다르며, 이와 관련된 대사작용의 차이에 기인된 것으로 사려되며, 향후 이와 관련된 연구가 수행되어야만 정확한 설명이 될 것으로 생각된다. 어종에 관계없이 치어기에는 지질함량이 해조류의 첨가에 의하여 전어체의 지질 함량은 낮아졌다. 해조류 첨가 실험사료를 섭취한 **조피볼락 치어 및 미성어 전어체의 지방산인 EPA와 DHA** 함량은 해조류 첨가에도 불구하고 유사한 경향을 나타내었다. 해조류 첨가 실험사료를 섭취한 **조피볼락 치어 및 미성어의 회분** 함량은 해조류 첨가구에서 각각 약 0.8%, 0.4%로 증가하여 성장단계에 관계없이 증가하는 경향을 나타내었다. 또한, 큰민어 치어의 회분 함량도 해조류 첨가구에서 약 0.6%로 증가하여 성장단계 및 어종에 관계없이 유사한 경향을 나타내었다. 천연먹이인 *Isochrysis*에는 단백질, 지질 및 회분과 같은 영양성분이 함유되어 있으므로 해산어류의 성장에도 영향을 미치지만, 생존율과 사료효율을 증진시킬 수 있는 인자가 포함된 것 때문으로 판단된다. 본문에 사진으로 나타내지는 않았지만 실험 종료시의 해조류, *Isochrysis*첨가구의 피부 색깔은 각각 첨가된 원료의 색을 그대로 반영하였다. 따라서 해산어류 먹이로 천연먹이를 이용하고자 할 때는 피부의 색을 조절하는 배합사료 첨가제로서의 유용성과 함께 영양소 균형을 고려하면서 그 첨가 범위가 연구되어야 할 것이다.

위의 결과를 종합하여 보면 해산어류용 배합사료에 천연해조류의 첨가는 어종에 따라 성장을 개선시킬 수 있을 것으로 생각되며, 우선 적정 첨가량을 구명하여야 할 것으로 사려된다. *Isochrysis*를 성장 개선 목적으로는 적정 첨가량이 구명되지 않고서는 첨가할 필요가 없을 것으로 판단된다. *Isochrysis*를 배합사료에 첨가할 때에는 1% 미만으로 첨가하는 것이 바람직 할 것으로 보인다. 또한 해산어류의 피부의 색깔을 의도적으로 내고자 할 때를 대비하여 차후 *Isochrysis*를 포함한 각종 원료의 적정 첨가량을 경제적인 측면 등을 고려하여

연구되어야 할 것이다.

실험 종료시의 **조피볼락 치어 및 미성어와 큰민어 치어 근육의 일반영양성분**은 **어종과 성장시기**에 따라서 다양한 차이를 나타내었다 (Table 5-12).

조피볼락 치어 및 미성어 근육의 수분은 77% 전후로 해조류 *Isochrysis*의 첨가보다 해조류 *Isochrysis*무첨가구에 비해 각각 다소 감소하거나 증가되었지만, **큰민어 치어**에서는 약간 감소하여, 어종에 따라 비슷한 양상을 나타내었다. 어종에 관계없이 조피볼락 및 큰민어 치어 근육의 수분은 조피볼락 미성어 보다 높게 나타났다. **조피볼락 치어 및 미성어 근육 단백질**의 경우 무첨가구 각각 19.86%에서 해조류 첨가시에는 19.82, 19.86%로 모든 성장단계에서 유사하였지만, **큰민어 치어의 근육**에서는 다소 증가하였다. 실험 종료시의 해조류 첨가 실험사료를 섭취한 **조피볼락 치어 및 미성어 근육의 지질** 함량은 해조류 첨가구에서 각각 약 1.3%, 0.5% 감소하여 성장단계에 따라 유사한 양상을 나타내었고, **큰민어 치어**의 지질 함량은 조피볼락 치어 및 미성어와는 달리 0.1% 증가하였다. 이처럼 해조류 첨가구의 지질 함량이 어종에 따라 조피볼락에서는 낮아지고, 큰민어에서는 높아지는 것은 어종에 따른 지질의 양적, 질적 요구량이 다르며, 이와 관련된 대사작용의 차이에 기인된 것으로 사려되며, 향후 이와 관련된 연구가 수행되어야만 정확한 설명이 될 것으로 생각된다. 성장시기에 관계없이 조피볼락에서는 근육의 지질함량이 해조류의 첨가에 의하여 낮아졌지만, 큰민어 치어 근육에서는 높아졌다.

3. *Isocrysis galbana* qnsakf 섭식시 EPA, DHA 함량분석

어체의 측정은 실험시작시 전 실험어의 중량을 측정하였고, 실험 종료후에는 2일간 절식시킨 후 MS222 100 ppm에 마취시켜 각 실험수조에 수용된 실험어 전체 체중을 측정하였다. 분석용으로 냉동 보관하던 어

체 중 실험구별로 5마리씩에서 전장, 체중을 측정한 후 Condition factor (CF = body weight (g)×100/[total length (㎝)]^3)를 계산하였고, 간, 복강내 지방조직, 장 및 근육을 분리하여 측정한 후, Hepatosomatic index (HSI = liver wt.×100/body wt.), Intraperitoneal fat (IPF = intraperitoneal fat wt.×100/body wt.), Intestinosomatic index (ISI = intestine wt.×100/body wt.), Muscle ratio (MR = muscle wt.×100/body wt.)을 계산하였다. 전어체 및 근육은 −75℃에 보관후 실험구별로 5마리씩 무작위 추출하여 상법에 따라 각 조직의 영양성분 분석(AOAC, 1990)을 실시하였든 바 Fig. 5-2에서 보는 바와 같이 EPA. DHA가 함유되어 있었음을 알 수 있었다.

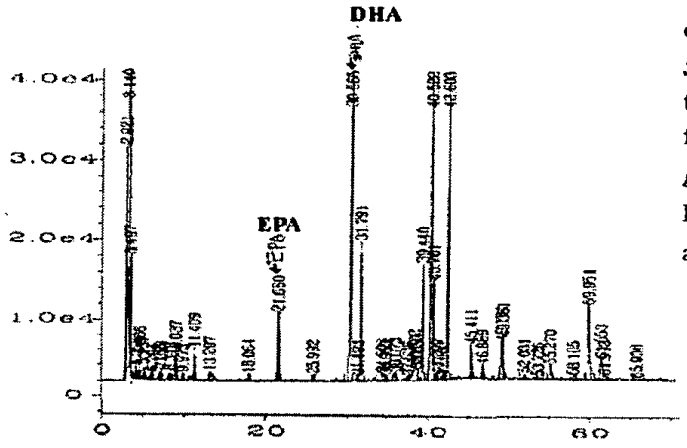


Fig. 5-2 Gas chromatographic detection of EPA and DHA from *Sebastes schlegeli* muscle tissue after 3 weeks feeding of *Isocrysis galbana* powder. DHA, EPA peak indicated by arrows.

참 고 문 헌

· 서론

高泰昇 · 金炳均 · 明正仁. 1990. 조피볼락 種苗量産試驗. 수진사업보고 86 : 59-62.

金伯均 · 洪承賢 · 金昌永. 1989. 조피볼락 種苗量産試驗. 수진사업보고 79: 23-26.

金相根 · 高昌淳 · 宋泉浩. 1987. 조피볼락 種苗生産 技術開發試驗. 수진사업보고 71 : 117-122.

김용구. 1992. 참전복(*Haliotis discus hannai* Ino) 種苗生産을 위한 부착성 규조류의 배양 및 먹이생물 효과. 부산수산대학 석사학위논문, 70 pp.

김윤 · 노섬 · 고창순 · 김승헌 · 김종화 · 지영주 · 양상근. 1987. 볼락류(조피볼락) 종묘생산기술 개발시험. 수진사업보고 71 : 167-168.

농림부, 1997. 전복 배합사료개발(최종보고서, 개발사업주관기관 : 국립수산진흥원). 245 pp.

佐佐木 攻. 1981. クロソイの養殖, 種苗生産と養成について. 養殖 18(7) : 90-95.

柳晟奎. 1989. 淺海養殖. 새로출판사. 부산. pp. 309~368.

이상민 · 이종윤 · 강용진 · 윤호동 · 허성범. 1993a. 조피볼락 *Sebastes schlegeli*의 n-3 계 고도불포화지방산 요구량. 한국수산학회지 26: 477-492.

이상민 · 이종윤 · 강용진 · 허성범. 1993b. 사료의 n-3계 고도불포화지방산 함량에 따른 조피볼락 *Sebastes schlegeli*의 성장 및 생화학적 변화 II. 혈액성분 변화 및 간세포 성상. 한국양식학회지, 6: 107-123.

이정의, 1999. 큰민어 인공종묘생산과 양식전망. 기르는 어업육성을 위한 신품종종묘생산워크숍. 국립수산진흥원, p167~208.

이해영, 2000. 홍민어의 환경 적응성과 양식전망. 풍요로운 바다를 위한 2000신품종양식워크숍. 국립수산진흥원, 199~220.

鄭文基. 1977. 韓國魚圖譜, 一志社, 서울, p.502.

草刈宗晴. 1988. クロソイの增養殖技術について. 育てる漁業 179 : 2-8.

해양수산부, 1996. 조피볼락 배합사료개발(최종보고서, 개발사업주관기관 : 국립수산진흥원). 294 pp.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia. 1298pp.

Duncan, D. B. 1955. Multiple-range and multiple F tests. Biometrics, 11: 1~42.

Castell, J.D. 1979: Review of lipid requirements of finfish. In: Proc. World Symp. on Finsish Nutrition and Fishfeed Technology, Vol. I. Hamburg 20-23 June, 1978. pp. 59-84.

Castell, J.D., R.O. Sinnhuber, J.H. Wales and D.J. Lee, 1972: Essential fatty acids in the diet of rainbow trout (*Salmo gairdneri*): growth, feed conversion and some gross deficiency symptoms. J. Nutr., 102: 77-86.

Cowey, C.B. and J.R. Sargent. 1979: Nutrition. In: W. S. Hoar, D.J. Randall and J.R. Brett (Eds), Fish Physiology, Vol. VIII. Academic Press, Orlando, FL, pp. 1-69.

Kalogeropoulos, N., M.N. Alexis and R.J. Henderson, 1992: Effect of dietary soybean and cod-liver oil levels on growth and body composition of gilthead bream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 104: 293-308.

Lee S. M., J. Y. Lee and S. B. Hur. 1994. Essentiality of dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. Bull. Korean Fish. Soc. 27: 721-726.

Moon, H. Y. L. and D. M. Gatlin, 1994. Effects of dietary animal proteins on growth and body composition of the red drum (*Siaenops ocellatus*). Aquaculture 120, 327~340.

NRC (National Research Council). 1993. Nutrient requirements of fish. National Acad. Press, Washington, D.C. 114pp.

Stubbs, C.D. and A.D. Smith. 1984: The modification of mammalian membrane

polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. Biochim. Biophys. Acta, 779: 89-137.
Takeuchi, T., S. Arai, T. Watanabe and Y. Shimma, 1980: Requirement of eel *Anguilla japonica,* for essential fatty acids. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 46: 344-353.
Takeuchi, T., S. Satoh and T. Watanabe, 1983: Requirement of *Tilapia nilotica* for essential fatty acids. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 49: 1127-1134.
Thomson, A.B.R., M. Keelan, M.T. Clandinin and K. Walker. 1986: Dietary fat selectively alters transport properties of rat jejunum. J. Clin. Invest., 77: 279-288.
Uki, N., M. Sugiura and T. Watanabe. 1986c. Requiremint of essential fatty acids in the abalone, *Haniotis discus hannai.* Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 52: 1013~1026.
Viana, M.T., L.M. Lopez and A. Salas. 1993. Diet development for juvenile abalone *Haliotis fulgens.* Evaluation of two artificial diets and macroalgae. Aquaculture, 117: 149~156.
Watanabe, T., M.S. Izquierdo, T. Takeuchi., S. Satoh and C. Kitajima, 1989: Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficacy in larval red seabream. Nippon Suisan Gakkaishi, 55: 1635-1640.

· 양식생물용 사료의 해조류(Isochrysis 및 spirulina 등) 첨가 효과

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia. 1298pp.
Duncan, D. B. 1955. Multiple-range and multiple F tests. Biometrics, 11: 1~42.
Harada K. and Akishima Y. 1985. Feeding attraction activities of proteins, amino acids, lipids and nitrogenous bases for abalone. Bull. Jap. Soc. Sci. fish., 51: 2051~2058.
Ioriya, T. and H. Suzuke. 1987. Changes of diatom on plastic plates used for rearing abalone, *Nordotis discus.* The Suisanzoshoku. 35: 81~98.
Mai, K., J. P. Mercer and J. Donlon. 1994. Comparative studies on the nutrition of two spescies of abalone, *Haliotis tuberculata* L and *Haliotis discus hannai* Ino. II. Amino acid composition of abalone and six species of macroalgae with an assessment of their nutritional value. Aquaculture, 128: 115~130.
Mai, K., J. P. Mercer and J. Donlon. 1995. Comparative studies on the nutrition of two spescies of abalone, *Haliotis tuberculata* L and *Haliotis discus hannai* Ino. IV. Optimum dietary protein level for growth. Aquaculture, 136: 165~180.
Norman-Boudreau, K., D. Burns, C.A. Cooke and A. Austin. 1986. A simple technique tor detection of feeding in newly metamorphosed abalone. Aquaculture, 51: 31 3~317.
Ogino, C. and E. Ohta. 1963. Studies on the nutrient of abalone, I . Feeding trials of abalone, *Haliotis discus* Reeve, with artificial diets. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 29: 69~670.
Ogino, C. and N. Kato. 1964. Studies on the nutrient of abalone, II. Protein requirements for growth of abalone, *Halitis discus* Reeve, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 30: 523~526.
Ohgai, M., M. Wakano, and S. Nagai. 1991. Effect of attached microalgae on the settlement of larvae and growth of juvenile in abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. Suisanzoshoku, 39: 263~266.
SPSS for Window. 1993. Base System User's Guide, Release 6.0, SPSS Inc., 444N. Michigan Avenue, Chicago, IL, 60611.
Uki, N., A. Kemuyama and T. Watanabe. 1985a. Development of semipurified test

diets for abalone. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 51: 1825～1833.
Uki, N., A. Kemuyama and T. Watanabe. 1985b. Nutrient evaluation of several sources in diets for abalone, *Haliotis discus hannai*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 51: 1835～1839.
Uki, N., A. Kemuyama and T. Watanabe. 1986a. Optimum protein level in diets for abalone. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 52: 1005～1012.
Uki, N., A. Kemuyama and T. Watanabe. 1986b. Effect of heat treatment of dietary protein source on their protein quality for abalone. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 52: 1190～1204.
Uki, N., M. Sugiura and T. Watanabe. 1986c. Requiremint of essential fatty acids in the abalone, *Haniotis discus hannai*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 52: 1013～1026.
Viana, M.T., L.M. Lopez and A. Salas. 1993. Diet development for juvenile abalone *Haliotis fulgens*. Evaluation of two artificial diets and macroalgae. Aquaculture, 117: 149～156.
Yamada, O and H. Takano. 1987. Acceleration of the growth of benthic diatoms by using gelled agar. Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab., 121: 29-34.
김병균 · 고태송 · 이창규. 1993. 참전복 치패의 성장률 향상을 위한 부착규조 배양에 관한 연구. 양식자료집 21: 95-102.
김용구. 1992. 참전복(*Haliotis discus hannai* Ino) 종묘생산을 위한 부착성 규조류의 배양 및 먹이생물 효과. 부산수산대학 석사학위논문, 70 pp.
김상근 · 송천호. 1993. 전복치패 수송과 방류의 기술적 방법에 관하여. 양식자료집 21: 137-144.
노섬, 유성규. 1984. 전복의 증식에 관한 연구. (III). 전복먹이로서 육상식물의 이용에 관한 연구. 수진연보, 33: 173～183.
이상민, 류진형, 이종윤. 1996. 조피볼락 사료의 어분 대체단백원으로서 대두박, 콘글루텐 밀, 육골분, 육분 및 혈분의 이용성. 한국영양사료학회지, 20: 21～30.
정성채 · 지영주 · 손팔원. 1994. 참전복 *Haliotis discus hannai* Ino의 육상사육수조에 관한연구. II. 먹이별 사육효과. 한국양식학회지, 7: 77～87.
조은섭 · 방극순. 1993. 전복 중간양성 및 방류효과 분석의 기술적 고찰. 양식자료집 21: 145-159.
한형균. 1994. 참전복 치패의 성장과 생존율 재고를 위한 부착성 규조류의 먹이 효율. 부산수산대학 석사학위논문, 61 pp.
菊地省吾 · 櫻井保雄 · 佐佐木實 · 伊藤富夫(1967) : 海藻20種のアワビ稚貝に對する餌料效果. 東北西水研報, 27 : 93～100.
浮永久(1981) : エゾアワビに對するコンブ目海藻の餌料價値. 東北水研究報告, 42 : 19～29.
盧暹 · 柳晟奎(1984) : 전복의 增殖에 관한 研究. (3) 전복먹이로서 陸上植物의 利用에 관한 研究. 水振研報, 33 : 173～183.
池榮洲 · 柳晟奎 · 盧暹 · 金承寔(1988) : 垂下式養殖採籠에 의한 참전복, *Haliotis discus hannai* Ino. 稚貝의 收容密度와 成長. 水振研報, 42 : 59～69.

Table 5-1. Chemical composition (% in dry matter) of the ingredients used to experimental diet

Table 5-2. Composition (%) of experimental diets

[1] Vitamin mix contained the following amount which were diluted in cellulose (g/kg mix): ascorbic acid, 200; α-tocopheryl acetate, 20; thiamin, 5; riboflavin, 8; pyridoxine, 2; niacin, 40; Ca-D-pantothenate, 12; myo-inositol, 200; D-biotin, 0.4; folic acid, 1.5; p-amino benzoic acid, 20; K_3, 4; A, 1.5; D_3, 0.003; choline chloride, 200; cyanocobalamin, 0.003.

[2] Mineral mix contained the following ingredients (g/kg mix): NaCl, 10, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 150; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 250; KH_2PO_4, 320; $CaH_4(PO_4)_2 \cdot H_2O$, 200; Ferric citrate, 25; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 4; Ca-lactate, 38.5; CuCl, 0.3; $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.15; KIO_3, 0.03; $Na_2Se_2O_3$, 0.01; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1.

Table 5-3. Operating conditions of gas liquid chromatography for fatty acid analysis.

Table 5-4. Chemical composition (% in dry matter) of the ingredients used to experimental diet in 2000

Table 5-5. Composition (%) of experimental diets

[1]Vitamin mix contained the following amount which were diluted in cellulose (g/kg mix): ascorbic acid, 200; α-tocopheryl acetate, 20; thiamin, 5; riboflavin, 8; pyridoxine, 2; niacin, 40; Ca-D-pantothenate, 12; myo-inositol, 200; D-biotin, 0.4; folic acid, 1.5; p-amino benzoic acid, 20; K_3, 4; A, 1.5; D_3, 0.003; choline chloride, 200; cyanocobalamin, 0.003.

[2]Mineral mix contained the following ingredients (g/kg mix): NaCl, 10, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 150; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 250; KH_2PO_4, 320; $CaH_4(PO_4)_2 \cdot H_2O$, 200; Ferric citrate, 25; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 4; Ca-lactate, 38.5; CuCl, 0.3; $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.15; KIO_3, 0.03; $Na_2Se_2O_3$, 0.01; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1.

Table 5-6. Operating conditions of gas liquid chromatography for fatty acid analysis.

Table 5-7. Performance of Giant croaker fed different experimental diets for 6weeks[1, 2]

[1]Means of two replicate group.

Table 5-8. Muscle composition of Giant croaker fed different experimental diets for days[1, 2]

[1]Means of two replicate groups.

[2]Values in the same column not sharing a common superscript are significantly different ($P<0.05$).

[3]Means of composite samples of five fish from each of two replicate groups expressed on a wet weight basis.

Table 5-9. Performance of giant croaker and black rockfish fed different experimental diets for 7 weeks

[1]Means of 12 black rockfish adult, 50 black rockfish juvenile, and 20 gaint croaker, respectively.

Table 5-10. Whole-body composition of giant croaker and black rockfish fed different experimental diets for 7 weeks[1, 2]

[1]Means of three replicate groups.

[2]Values in the same column not sharing a common superscript are significantly different ($P<0.05$).

[3]Means of composite samples of five fish from each of three replicate groups expressed on a dry-matter.

Table 5-11. Lipid (% as wet) and fatty acid (EPA and DHA) composition in the whole-body of giant croaker and black rockfish fed different experimental diets for 7 weeks[1, 2]

Table 5-12. Muscle composition (%) of giant croaker and black rockfish fed different experimental diets for 7 weeks[1, 2]

[1]Means of three replicate groups.

[2]Values in the same column not sharing a common superscript are significantly different ($P<0.05$).

[3]Means of composite samples of five fish from each of three replicate groups expressed on a dry-matter.

Table 5-13. Lipid and Fatty acid (EPA and DHA) composition (% wet weight) in the muscle of giant croaker and black rockfish fed different experimental diets for 7 weeks[1, 2]

Fig. 5-1. 근육 지방산중 EPA와 DHA함량의 GC분석결과

Table 5-1. Chemical composition (% in dry matter) of the ingredients used to experimental diet

Ingredient	Moisture	Protein	Lipid	Ash
White fish meal	6.40	69.43	10.41	16.10
Soybean meal	11.92	49.90	1.80	6.21
Isochrysis powder	-	22.05	9.68	33.00

Table 5-2. Composition (%) of experimental diets

Ingredients	Experimental diets		Commercial diet
	Control	Algae Supplemented	
White fish meal	43.2	43.2	- Closed -
Soybean meal	20.0	20.0	
Wheat flour	18.8	18.8	
Soybean oil	8.0	8.0	
Vitamin premix[1]	3.0	3.0	
Mineral premix[2]	3.0	3.0	
CMC	2.0	2.0	
Cellulose	2.0	1.8	
***Isochrysis* powder**	**0.0**	**0.2**	

[1] Vitamin mix contained the following amount which were diluted in cellulose (g/kg mix): ascorbic acid, 200; α-tocopheryl acetate, 20; thiamin, 5; riboflavin, 8; pyridoxine, 2; niacin, 40; Ca-D-pantothenate, 12; myo-inositol, 200; D-biotin, 0.4; folic acid, 1.5; p-amino benzoic acid, 20; K_3, 4; A, 1.5; D_3, 0.003; choline chloride, 200; cyanocobalamin, 0.003.

[2] Mineral mix contained the following ingredients (g/kg mix): NaCl, 10, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 150; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 250; KH_2PO_4, 320; $CaH_4(PO_4)_2 \cdot H_2O$, 200; Ferric citrate, 25; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 4; Ca-lactate, 38.5; CuCl, 0.3; $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.15; KIO_3, 0.03; $Na_2Se_2O_3$, 0.01; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1.

Table 5-3. Operating conditions of gas liquid chromatography for fatty acid analysis.

Column	High Performance Capillary Column (U.S.A.) HP-INNOWax (Crosslinked Polyethylene Glycol) HP Part Number : 19091N-213 Film Thickness : 0.5 um Length : 30 m Phase Ratio : 160 Column ID : 0.32 mm U.S. Patent # 4,293,415
Carrier gas Column temperature Injector Detector Intergrator	Nitrogen FID, 195℃ (3min) → 6℃/min → 225℃ (29min) 220℃ 270℃ Chemstation

Table 5-4. Performance of Giant croaker fed different experimental diets for 44 days[1]

Diet	Initial body wt. (g)	Final body wt. (g)	Weight gain (% of initial wt.)	Feed efficiency (g gain/g feed)	Survival (%)
Control	7.06	32.8	365.0	0.73	100.0
Algae-supp.	7.07	35.8	421.7	0.88	100.0

[1]Means of two replicate group.

Table 5-5. Muscle composition of Giant croaker fed different experimental diets for days[1]

Diet	Moisture	Muscle composition (%)[2]		
		Protein	Lipid	Ash
Control	79.22	18.71	1.38	1.27
Algae- supp.	79.03	19.03	1.55	1.27

[1]Means of two replicate groups.
[2]Means of composite samples of five fish from each of two replicate groups expressed on a wet weight basis.

Table 5-6. Chemical composition (% in dry matter) of the ingredients used to experimental diet in 2000

Ingredient	Moisture	Protein	Lipid	Ash
White fish meal	6.40	69.43	10.41	16.10
Soybean meal	11.92	49.90	1.80	6.21
Isochrysis powder	3.44	48.63	22.03	9.54

Table 5-7. Composition (%) of experimental diets

Ingredients	Experimental diets	
	Control	Algae Supplemented
White fish meal	43.2	43.2
Soybean meal	20.0	20.0
Wheat flour	18.8	18.8
Soybean oil	8.0	8.0
Vitamin premix[1]	3.0	3.0
Mineral premix[2]	3.0	3.0
CMC	2.0	2.0
Cellulose	2.0	1.0
***Isochrysis* powder**	**0.0**	**1.0**

[1]Vitamin mix contained the following amount which were diluted in cellulose (g/kg mix): ascorbic acid, 200; α-tocopheryl acetate, 20; thiamin, 5; riboflavin, 8; pyridoxine, 2; niacin, 40; Ca-D-pantothenate, 12; myo-inositol, 200; D-biotin, 0.4; folic acid, 1.5; p-amino benzoic acid, 20; K_3, 4; A, 1.5; D_3, 0.003; choline chloride, 200; cyanocobalamin, 0.003.
[2]Mineral mix contained the following ingredients (g/kg mix): NaCl, 10, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 150; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 250; KH_2PO_4, 320; $CaH_4(PO_4)_2 \cdot H_2O$, 200; Ferric citrate, 25; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 4; Ca-lactate, 38.5; CuCl, 0.3; $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.15; KIO_3, 0.03; $Na_2Se_2O_3$, 0.01; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1.

Table 5-8. Operating conditions of gas liquid chromatography for fatty acid analysis.

Column	High Performance Capillary Column (U.S.A.) HP-INNOWax (Crosslinked Polyethylene Glycol) HP Part Number : 19091N-213 Film Thickness : 0.5 um Length : 30 m Phase Ratio : 160 Column ID : 0.32 mm U.S. Patent # 4,293,415
Carrier gas Column temperature Injector Detector Intergrator	Nitrogen FID, 195℃ (3min) → 6℃/min → 225℃ (29min) 220℃ 270℃ Chemstation

Table 5-9. Performance of giant croaker and black rockfish fed different experimental diets for 7 weeks

Species[1]	Diet	Initial body wt.(g)	Final body wt.(g)	Weight gain (% of initial wt.)	Feed efficiency (g gain/g feed)	Survival (%)
Young Black rockfish	Control	289.33	289.33	0	0.21	83
	Algae-supp	279.08	279.08	0	-	75
Juvenile Black rockfish	Control	3.65	7.87	102	0.28	74
	Algae-supp	3.56	5.92	52	0.13	86
Juvenile Giant Croaker	Control	5.85	21.91	260	0.36	75
	Algae-supp	5.85	21.78	267	0.47	90

[1]Means of 12 black rockfish adult, 50 black rockfish juvenile, and 20 giant croaker, respectively.

Table 5-10. Whole-body composition of giant croaker and black rockfish fed different experimental diets for 7 weeks[1, 2]

Species[1]	Diet	Whole-body composition (% wet weight)			
		Moisture	Protein	Lipid	As h
Young Black rockfish	Control	68.59	18.47	8.12	5.10
	Algae-supp.	70.96	14.66	9.33	5.50
Juvenile Black rockfish	Control	68.88	16.03	9.88	3.85
	Algae-supp.	71.09	16.00	7.26	4.66
Juvenile Giant Croaker	Control	73.53	16.98	5.45	4.20
	Algae-supp.	72.54	17.72	5.20	4.83

[1]Means of three replicate groups.
[2]Means of composite samples of five fish from each group expressed on a wet-basis.

Table 5-11. Lipid (% as wet) and fatty acid (DHA and EPA) composition in the whole-body of giant croaker and black rockfish fed different experimental diets for 7 weeks[1, 2]

Species[1]	Diet	Lipid	Total fatty acid (%)[3]	
			EPA	DHA
Young Black rockfish	Control	8.12	2.0	2.2
	Algae-supp.	9.33	1.9	2.2
Juvenile Black rockfish	Control	9.88	3.0	3.9
	Algae-supp.	7.26	3.0	3.4
Juvenile Giant Croaker	Control	5.45	1.1	1.6
	Algae-supp.	5.20	1.0	1.6

Table 5-12. Muscle composition (%) of giant croaker and black rockfish fed different experimental diets for 7 weeks[1, 2]

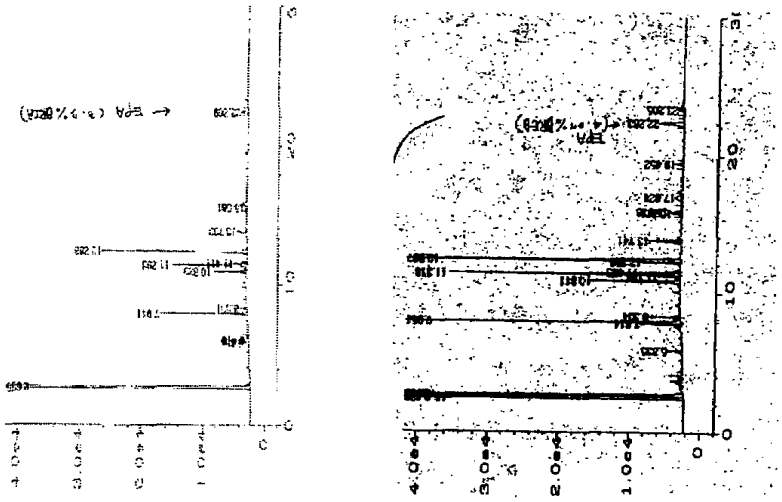
Species[1]	Diet	Moisture	Muscle composition (% wet weight)[3]		
			Protein	Lipid	Ash
Young Black rockfish	Control	77.32	19.86	2.10	1.16
	Algae-supp.	76.35	19.89	0.78	1.23
Juvenile Black rockfish	Control	78.41	19.86	2.29	1.40
	Algae-supp.	78.69	19.82	1.75	1.25
Juvenile Giant Croaker	Control	79.43	19.93	0.98	1.26
	Algae-supp.	79.22	19.95	1.11	1.55

[1]Means of three replicate groups.
[2]Means of composite samples of five fish from each group expressed on a wet bais.

Table 5-13. Lipid and Fatty acid (DHA and EPA) composition (% wet weight) in the muscle of giant croaker and black rockfish fed different experimental diets for 7 weeks[1, 2]

Species[1]	Diet	Lipid	Total fatty acid (%)[3]	
			EPA	DHA
Young Black rockfish	Control	2.10	-	-
	Algae-supp.	0.78	-	-
Juvenile Black rockfish	Control	2.29	-	-
	Algae-supp.	1.75	-	-
Juvenile Giant Croaker	Control	0.98	-	-
	Algae-supp.	1.11	-	-

Fig. 5-1. 근육 지방산중 EPA와 DHA함량의 GC분석결과.



J. Microbiol. Biotechnol. (1999), 9(5), 691–693

JOURNAL OF
MICROBIOLOGY
AND
BIOTECHNOLOGY

© The Korean Society for Applied Microbiology

High Level of *Trans*-Resveratrol, a Natural Anti-Cancer Agent, Found in Korean Noul Red Wine

KIM, KWANG-SEOK[1], SA-YOUL GHIM, YOUNG-BAE SEU[1], AND BANG-HO SONG*

[1]*Department of Microbiology, Department of Biology Education, Kyungpook National University, #1370 Sankyuk-Dong, Bug-Gu, Taegu 702-701, Korea*

Received: July 22, 1999

Abstract Resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene), a phenolic substance present in both grapes and wines, has been reported to have certain pharmacological effects. Using an ethylacetate-phase extraction followed by a high performance liquid chromatographic analysis, the concentration of *trans*-resveratrol was measured in 9 red wines commercially available in Korea, including the Korean red wine (Noul). Noul red wine with a 1998 vintage had a *trans*-resveratrol concentration of 3.3 mg/l, which was rather higher than the concentrations found in other wines (0.19–2.45 mg/l) with the exception of the French wine, J. P. Chenet (3.39 mg/l). In addition, the grapes of *Vitis labrusca* cv. Sheridan cultivated in the Kyungsan area showed a *trans*-resveratrol content of 6.4 mg/kg.

Key words: *trans*-Resveratrol, HPLC-analysis, red wine

It has been suggested that coronary heart disease and cancer can be prevented by the regular consumption of red wine in moderate amounts [13, 18, 20, 21]. Resveratrol, a stilbene derivative of natural phenol compounds, has been implicated in this beneficial action of red wine because of its ability to function as an inhibitor of platelet aggregation, an antioxidant, and an anticarcinogenic agent [17, 25]. A large number of studies demonstrated that resveratrol could act as an agonist for the estrogen receptor [9], an immunomodulating compound [6], a DNA-cleaving agent [8], and an arrestor of cell division cycle [19]. Recently, resveratrol was also shown to exhibit anti-tumor activity through apoptosis [1, 4, 12] and anti-allergic activity by inhibiting release of β-hexosaminidase [3].

It has been previously established that resveratrol is produced by at least 72 plant species [11, 12, 14, 15, 22] and is especially abundant in the leaf epidermis and skin of the grapes of the *Vitis* species, plus it is resistant to pathogen invasion, UV irradiation, and ozone exposure [7, 23]. The presence of *trans*-resveratrol in white and red wines was first reported by Siemann and Creasy [24]. Resveratrol occurs in *cis* and *trans* isomeric forms (Fig. 1) as well as a 3-β-glucoside, piceid [16], all of which are physiologically important.

Due to the lack of information on resveratrol in the commercial wines of Korea, the *trans*-resveratrol levels of these wines were determined.

The *trans*-resveratrol standard was supplied by Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.). The 9 red wine samples, including the only Korean red wine (Noul) and 8 imported red wines, were randomly purchased from retail liquor stores. Majuang Red and Majuang Special were not included in the selection, since they are mixed red wines produced in Korea and Europe. All samples were protected from light to avoid light-induced isomerization during sample treatment. A 50 ml sample of each wine was neutralized with 1 N NaOH, adjusted to pH 7.0, and concentrated to approximately 30 ml by rotary evaporation (20°C, *in vacuo*) to remove any ethyl alcohol. The concentrate was then extracted 4 times with 30 ml of ethyl acetate, evaporated, and dissolved in 5 ml of methanol.

Ten μl of the methanolic extracts were injected directly into a Hitachi L-6200 HPLC system with a photodiode array UV-visible detector coupled through an Econosphere C_{18} column (5 μm, 4.6×250 mm). An HPLC analysis was performed on a reversed-phase column with elution of a

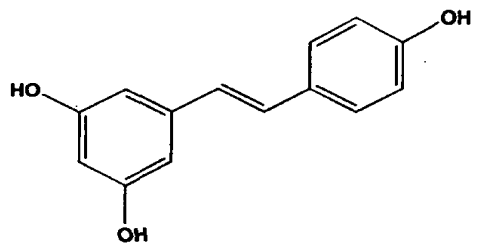


Fig. 1. Chemical structure of *trans*-resveratrol in red wine.

*Corresponding author
Phone: 82-53-950-5913; Fax: 82-53-955-0820;
E-mail: bhsong@kyungpook.ac.kr

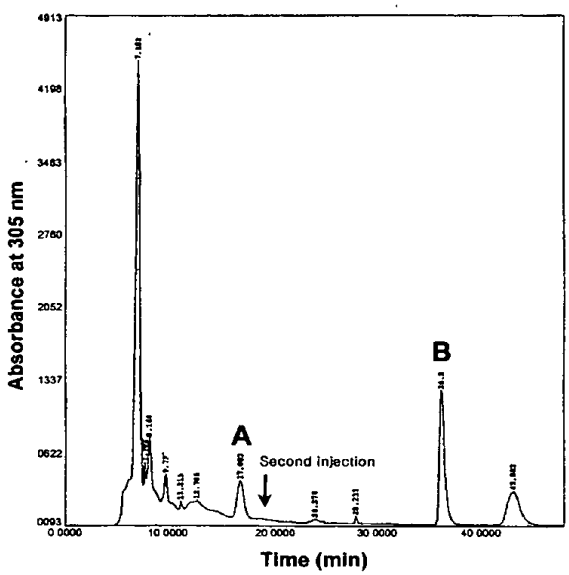


Fig. 2. HPLC chromatogram of red wine and *trans*-resveratrol standard at 305 nm.
The arrow indicates the second injection point, and the retention time for the *trans*-resveratrol was about 17 min. Peak A represents *trans*-resveratrol in the red wine extract; and peak B does the *trans*-resveratrol standard.

22% acetonitrile-78% water mixture at a flow rate of 0.4 ml/min. The typical HPLC profile of a red wine is shown in Fig. 2. Peaks were identified at 305 nm by comparing the retention time and peak areas to those of known amounts of the authentic standard.

Table 1 summarizes the results obtained from the analysis of *trans*-resveratrol in the 9 different red wines with various appellations and vintages. The levels of *trans*-resveratrol in these wines were similar to those described in a global survey [10]: 2.88-4.39 mg/l for French wines and 1.06-1.64 mg/l for other wines. The J. P. Chenet (3.39 mg/l) French wine showed the highest levels of *trans*-resveratrol among the all wines analyzed in the present experiment. The Korean Noul red wine contained a considerably high level of *trans*-resveratrol, averaging 3.3 mg/l compared to 0.19-2.45 mg/l for the rest. This is the first report on the presence of *trans*-resveratrol in a Korean red wine made from grapes cultivated in Korea. As for the content of *trans*-resveratrol, the J. P. Chenet and Noul red wines compare favorably with other wines analyzed.

Table 1. Concentration of *trans*-resveratrol in red wines.

Variety[a]	Vintage	Country	Resveratrol (mg/l)[b]
Noul	1998	Korea	3.3
Delicato	1994	USA	0.52
Sutter Home	1995	USA	0.79
Riunite	1996	Italy	0.33
Beaujolais	1996	France	2.45
Beaujolais-Village	1996	France	1.10
J. P. Chenet	1997	France	3.39
Medoc	1996	France	0.19
Merlot	1996	France	2.09

[a]10 bottles were analyzed for each wine.
[b]Results of HPLC analysis are expressed in milligrams per liter of *trans*-resveratrol equivalents based on the absorbance of the *trans*-resveratrol standard at 305 nm.

Red wines usually contain much larger amounts of *trans*-resveratrol than white or rose wines. It is already known that the grape cultivar, area of cultivation, climate, agronomic techniques, state of health of the grapes, and wine-processing conditions all influence the *trans*-resveratrol content in wines [2]. Accordingly, the content of *trans*-resveratrol was determined for grapes from *Vitis labrusca* cv. Sheridan collected in the Kyungsan area, which were used for manufacturing Noul red wine. Extraction and analysis of their berries and skins were followed by the method described for wine. The *trans*-resveratrol concentration of the Sheridan grapes was 6.4 mg/kg, which is significantly higher than the level reported for 5 UV-untreated cultivars grown in New York (less than 1 mg · cm^{-2}) [5]. Further research on other cultivars grown in Korea is needed to improve the amounts of *trans*-resveratrol in red wines.

In conclusion, these experimental results indicate that Noul red wine exhibits a higher level of *trans*-resveratrol than any of the other commercially available red wines in Korea thus far analyzed, with the exception of the French wine J. P. Chenet.

Acknowledgments

This work was funded by a grant (#297029-3) from the Ministry of Agriculture and Forestry, and supported by a grant from Kyungpook National University Post-Doc. Program (1998) for Dr. S.-Y. Ghim.

REFERENCES

1. Carbo, N., P. Costelli, F. M. Baccino, and F. J. Lopez-Soriano. 1999. Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumour growth in a rat tumour model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254:** 739-743.
2. Celotti, E., R. Ferrarini, R. Zironi, and L. S. Conte. 1996. Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and Amarone. *J. Chromatogr. A* **730:** 47-52.
3. Cheong, H., S.-Y. Ryu, and K.-M. Kim. 1999. Anti-allergic action of resveratrol and related hydroxystilbenes. *Planta Med.* **65:** 266-268.
4. Clement, M.-V., J. L. Hirpara, S.-H. Chawdhury, and S. Pervaiz. 1998. Chemopreventive agent resveratrol, a natural

product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood* **92:** 996-1002.

5. Creasy, L. L. and M. Coffee. 1988. Phytoalexin production potential of grape berries. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **113:** 230-234.
6. Ferrero, M. E., A. A. E. Bertelli, F. Pellegatta, A. Fulgenzi, M. M. Corsi, and A. Bertelli. 1998. Phytoalexin resveratrol (3-4'-5-trihydroxystilbene) modulates granulocyte and monocyte endothelial adhesion. *Transplant. Proc.* **30:** 4191-4193.
7. Fritzemeier, K.-H. and H. Kindl. 1981. Coordinate induction by UV light of stilbene synthase, phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase in leaves of Vitaceae. *Planta* **151:** 48-52.
8. Fukuhara, K. and N. Miyata. 1998. Resveratrol as a new type of DNA-cleaving agent. *Bioorgan. Med. Chem. Letters* **8:** 3187-3192.
9. Gehm, B. D., J. M. McAndrews, P.-Y. Chien, and J. L. Jameson. 1997. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94:** 14138-14143.
10. Goldberg, D. M., J. Yan, E. Ng, E. P. Diamandis, A. Karumanchiri, G. Soleas, and A. L. Waterhouse. 1995. A global survey of *trans*-resveratrol concentrations in commercial wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **46:** 159-165.
11. Han, Y. N., S. Y. Ryu, and B. H. Han. 1984. Antioxidant activity of resveratrol closely correlates with its monoamine oxidase A inhibitory activity. *Arch. Pharm. Res.* **32:** 801-804.
12. Huang, C., W. Ma, A. Goranson, and Z. Dong. 1999. Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis* **20:** 237-242.
13. Jang, M., L. Cai., G. O. Udeani, K. V. Slowing, C. F. Thomas, C. W. W. Beecher, H. H. S. Fong, N. R. Farnsworth, A. D. Kinghorn, R. G. Mehta, R. C. Moon, and J. M. Pezzuto. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275:** 218-220.
14. Langcake, P. and R. J. Pryce. 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* **9:** 77-86.
15. Mannila, E., A. Talvitie, and E. Kolehmainen. 1993. Anti-leukaemic compounds derived from stilbenes in *Picea abies* bark. *Phytochemistry* **33:** 813-816.
16. Mattivi, F., F. Reniero, and S. Korhammer. 1995. Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *J. Agric. Food Chem.* **43:** 1820-1823.
17. Pace-Asciak, C. R., S. Hahn, E. P. Diamandis, G. Soleas, and D. M. Goldberg. 1995. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta* **235:** 207-219.
18. Pendurthi, U. R., J. T. Williams, and L. V. M. Rao. 1999. Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells: A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19:** 419-426.
19. Ragione, F. D., V. Cucciolla, A. Borriello, V. D. Pietra, L. Racioppi, G. Soldati, C. Manna, P. Galletti, and V. Zappia. 1998. Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **250:** 53-58.
20. Renaud, S. and M. De Lorgeril, 1993. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **339:** 1523-1526.
21. Rimm, E. B., E. L. Giovannucci, W. C. Colditz, A. Aschrio, B. Rosner, and M. J. Stampfer. 1991. Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men. *Lancet* **338:** 464-468.
22. Rosemann, D., W. Heller, and H. Sandermann, Jr. 1991. Biochemical plant responses to ozone: II. Induction of stilbene biosynthesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Plant Physiol.* **97:** 1280-1286.
23. Schubert, R., R. Fischer, R. Hain, P. H. Schreier, G. Bahnweg, D. Ernst, and H. Sandermann Jr. 1997. An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence. *Plant Mol. Biol.* **34:** 417-426.
24. Siemann, E. H. and L. L. Creasy. 1992. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **43:** 49-52.
25. Subbaramaiah, K., W.-J. Chung, P. Michaluart, N. Telang, T. Tanabe, H. Inoue, M. Jang, J.-M. Pezzuto, and A. J. Dannenberg. 1998. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **273:** 21875-21882.

여 백

총설

Ribonucleotide reductase : 구조, 기능 및 응용

송방호[1]* · 김복환[2] · 김사열[1]
[1]경북대학교 사범대학 생물교육과, [2]한국방송통신대학교 보건위생학과

유전은 생명현상의 본질 가운데 하나이며, 그 본체는 DNA로 알려져 왔다. DNA는 그 합성의 원료로 *deoxyribonucleotides*가 이용된다. 생명체에서 이 deoxyribonucleotides는 ribonucleotides로부터 한 종류의 효소 즉 ribonucleotide reductase (RNR 혹은 RR)에 의하여 전환된다. RNR은 ribonucleotide의 2'-carbon에 결합된 OH기를 H기로 치환하는 효소로써 ribose에 결합된 4종류의 염기에는 비특이적으로 관여하나 결합된 인산기의 수에 따라 즉 di- 또는 tri-phosphate를 특이적으로 인식하여 어느 한 수준에서만 deoxy type의 nucleotides로 전환시키는 특징이 있다. 실제적으로 RNR은 purine 대사 경로에서는 ADP를 dADP로, GDP를 dGDP로 바꿔주며[1], pyrimidine 대사 경로에서는 CDP를 dCDP로, UDP를 dUDP로 전환시켜 주게 된다[2]. 이 효소의 존재는 기능적으로 RNA의 성분인 ribonucleotide를 DNA의 deoxyribonucleotide로 전환시키므로 RNA world에서 DNA world에로의 전환이 일어났다는 진화적 사실을 입증하는 결정적인 역할을 담당하고 있다[3].

그 동안 RNR에 관한 연구는 주로 *Escherichia coli* RNR을 표준형으로 하여 이루어져 왔다. 1970년대에 Thelander와 Reichard에 의하여 고안되었던 *E. coli* RNR의 가상적 모델[4]은 1990년대에 와서 구조생물학의 발전에 힘입어 그 구조가 정확하게 해명되었다[5, 6]. 최근에 와서는 RNR의 구조와 연관된 기능[7]과 조절[8]에 관해서도 소상히 알게 되었다. 그리고 RNR의 코드를 지정하는 nrd 유전자의 경우, 그 전체 크기가 대체로 3 kilobase 이상이고 기능적으로 세포의 생존에 필수적인 경우가 많아서 일단 해당유전자를 온전하게 확보하기가 어려웠고 연구에도 적지않은 제한이 뒤따라온 것이 사실이다. 그러나, 1995년 이후 genome sequencing project들이 속속 완결되면서 1997년 한해 동안에만 20여종 이상의 nrd 유전자의 확보가 용이해져서 그 연구에 박차를 가하게 되었다.

극한 환경을 포함한 어떤 환경에서도 생물은 유전정보의 본체로써 DNA(RNA를 본체로 하는 retrovirus의 경우는 예외로 간주됨)를 필수적으로 가지고 있음을 감안한다면 이 RNR은 모든 생물에서 동일한 한 종류의 효소로서만이 존재하여야 할 것으로 예측되어 왔다. 그러나, 실제 여러 종류의 생물에서 RNR을 검색하였던 바, 3가지의 다른 종류, 즉 tyrosine radical에 산소를 요구하는 class I, radical generator에 adenosylcobalamin을 요구하는 class II, glycyl radical을 요구하는 class III이 진화과정에서 분화되었다고 해석되고 있기에 이들 다른 종류의 RNR의 존재에 대한 진화과정에서의 해석이 중요한 관심을 자아내게 되었다. RNR은 또한 거대분자 복합체(supramolecular complex)의 일부로써 DNA 복제나 수복의 기능과 복합적으로 조절되면서 그 반응이 일어날 것으로 추정된다[3]. 이는 또한 항암 또는 항 virus활성의 target 효소이며 의약 및 생화학용 시약으로써 dNTP의 생산에도 산업적으로 중요한 의의를 갖는 효소이기도 하다. 본고에서는 이러한 RNR의 최근 연구결과를 종합적으로 고찰하여 보았으며, 특히 응용에 대한 가능성을 제시하고자 하였다.

종류, 구조 및 기능

Ribonucleotide reductase는 ribonucleotide를 deoxyribonucleotide로 전환시키는 효소로써 모든 생물의 핵산대사에 중심적인 역할을 나타낸다. 그러나 이들 효소는 그 활성단에 관여하는 필수적인 금속 보조인자가 진화적으로 보존되어 있지 않다는 점이다. 이 효소는 4종의 class로 나뉘어져 있다. *Table* 1에서 보는 바와 같이, class I은 tyrosine radical을 발생시키는 과정에 산소를 요구하며, 이는 Ia와 Ib로 나뉘어져 Ia는 diferric-tyrosyl radical[9], Ib는 manganese cluster-tyrosyl radical [10]을 발생시킨다. Class II는 class I과 III가 두 개의 분리된 단백으로 구성된 점에 비해 단일분자(single monomeric 또는 homodimeric 단백)로 되어 있으며 adenosylcobalamin(AdoCb 1)[11]을 radical generator로 요구한다. Class III은 편성 혐기성균을 혐기적 조건에서 배양시 발현되며 glycyl radical[12]을 보조인자로 요구하는 혐기성효소이다.

Class I RNR은 R1과 R2 subunit로 구성되어 있으며, 그 입체구조를 밝힌 바[5, 6], R2는 diferric-tyrosyl radical cofactor를 가진 radical 발생장치로서 small homodimer이며, R1은 thiyl radical로 되는 cysteine을 함유하여 catalytic 및 allosteric sites로 작용하는 large homodimer이다. Class I에는 Ia와 Ib 형으로 나뉘어져 있으며 Ia에는 *E. coli*의 *nrdAB*[13] 및 eukaryote의

Table 1. Characteristics of ribonucleotide reductases

Factor/function	Class I		Class II	Class III
	Ia	Ib		
Gene	*nrdAB*	*nrdEF*	*nrdJ*	*nrdDG*
Molecular structure	α2β2	α2β2	α(α2)	α2β2
Radical	Tyrosine	Tyrosine	Adenosyl-cobalamin	Adenosyl-methionine Glycine
Cofactor	Ferric	Ferric Manganese	Cobalt	Ferric Thiol
Reductant	Thioredoxin 1 Glutaredoxin	Thioredoxin 2 Glutaredoxin	Thioredoxin 1 Glutaredoxin	Formate
dATP	Inhibition	Stimulation	Stimulation	Inhibition
Oxygen	Aerobic	Aerobic	Aerobic Anaerobic	Anaerobic
Distribution	*E. coli* Eukaryote Virus	Eubacteria	Eubacteria Archaebacteria	Strict-anaerobe Archaebacteria

RNR이 포함된다. Ia class에 속하는 *Homo sapiens*[14], *Tripanosoma brucei*[15], *Saccharomyces cerevisiae*[16, 17], *E. coli*[13] 등을 대상으로 아미노산배열을 비교분석한 바, large subunit의 아미노산 배열 간에는 대체로 높은 상동성이 있었으나, small subunit에서는 그렇지 않았다. 구체적으로, large subunit의 아미노산 배열에서 진핵생물 간에는 55-58%의 상동성을 보여준 반면에, *E. coli*의 그것과는 24-25%의 상동성을 보여 주었다. Small subunit의 경우, *H. sapiens* RR2와 *T. brucei* RNR2 사이에는 64%의 매우 높은 상동성을 보여 주었고, *H. sapiens* RR2와 *S. cerevisiae* RNR2, *T. brucei* RNR2와 *S. cerevisiae* RNR2 사이에는 각각 44%, 43%의 높은 상동성이 있었으나 대조적으로 진핵생물과 *E. coli* 사이에는 비교적 낮은 13-18%의 상동성을 나타내었다.

Ib에는 *Salmonella typhimurium*에서 *nrdAB* 이외에 1994년에 새로이 발표된 *nrdEF*로써 염색체 선상에서 *nrdAB*와는 서로 다른 위치에 존재하며 크고 작은 두 개의 subunit를 구성하는 coding genes의 operon으로 각각 구성되어 있다[18]. *E. coli* 이외의 세균성 RNR이 여기에 포함되어 있으며 manganese 의존성으로 분류되고 있다. 아미노산의 상동성에서 Ia인 *nrdAB*와는 거리가 멀게 나타났으며 N말단의 51개의 아미노산 배열이 결실되어 있다[19]. *E. coli*의 Ia형 RNR인 *nrdAB*을 제외한 대부분의 세균성 RNR은 이 Ib형으로 분류되어 *nrdEF*로 표현되며, *E. coli*의 경우 Ia형은 타의 세균에 비해 극히 예외에 속하는 것으로 간주된다. 그람양성세균인 *Lactobacillus leichmannii*[11], *Corynebacterium ammoniagenes*[10]와 그람음성세균인 *Salmonella typhimurium*[18], *E. coli*[20] 등은 Ib class로서 그 large subunit인 NrdE를 대상으로 아미노산 배열을 비교분석한 결과, *C. ammoniagenes, S. typhimurium, E. coli* 등의 상호간에는 66-67%의 높은 상동성을 보여 준 반면에, 이들과 *L. leichmannii* NrdE 간에는 10-12%의 아주 낮은 상동성이 나타났다. Small subunit인 NrdF의 경우에는 *C. ammoniagenes*[10], *S. typhimurium*[18], *E. coli*[20] 등에서 65-87%라는 매우 높은 상동성을 보여 주었다.

Class II는 class I 및 III에 비해 분자의 크기가 작으며, *Bacillus subtilis*[21]와 *Mycobacterium tuberculosis*[22]에서 가장 많이 연구되었다. Single monomeric 또는 homodimeric 단백으로 구성되어 있고 S-adenosylcobalamin을 cofactor로 요구하는 성질이 특이적이며[23], class II 내에서는 배열상의 상동성이 높으나 class 간의 상동성은 거의 인정되지 않는 편이다. Class II에 속하는 *Pyrococcus furiosus*[24], *Pyrococcus horikoshii*[25], *Thermotoga maritima*[26], *M. tuberculosis*[22] 등의 RNR large subunit의 경우 동일한 archaebacteria에 속하는 두 *Pyrococcus* 사이에는 53%, 나머지 것들 사이에는 32-38%의 의미있는 상동성이 나타났다. *Mycoplasma pneumoniae*[27]와 *B. subtilis*의 NrdE 사이에는 43%의 상동성을 보여 주었으나, 전자의 그룹과 후자의 그룹 간에는 20% 미만의 낮은 상동성을 보여 주었다. Small subunit의 경우, *M. tuberculosis*[22], *M. pneumoniae*[27]와 *B. subtilis*[21] NrdF 아미노산 배열 간에는 34-46%의 상동성을 보여 주었다.

Class III는 혐기적 조건에서 발현되는 RNR로써 *E. coli*를 혐기적으로 배양할 때 발현되며 *nrdDG*에 의해 코드되는 단백으로 정의된다[28]. Monomeric polypepide로 구성되어 있으며, S-adenosylmethionine을 cofactor로 요구한다. Large subunit 내의 산소 감수성 glycyl radical과 small subunit 내의 4Fe-4S cluster가 thiyl radical의 형성에 관여한다. External 환원제로써 small protein이 아닌 formate가 관여하는 점이 특이적이다. Class III에 속하는 ribonucleotide reductase의 아미노산 배열간에는 전체적으로 매우 낮은 상동성을 나타낸다. 즉, *Archaeglobus fulgidus*[29], *Methanobacterium thermoautotrophicum*[30] 및 *Thermoplasma acidophilum*[31] 등의 RR 아미노산 배

열 사이에는 42-47%의 비교적 높은 상동성을 보인 반면에, 동일한 archaebacteria에 속하는 *Aquefex aeolicus*의 그것[32]과는 21-22%, *E. coli* NrdD와는 5-12%라는 매우 낮은 상동성을 보여 주기 때문이다.

환원반응 촉매기구

*E. coli*의 class Ia RNR의 3차원 구조의 해석에서 예측되었던 RNR 기구가 입증되었다. Ia의 large subunit RI은 redox-active cysteine이 small subunit RII에는 안정한 tyrosyl radical이 함유되어 있다. Cys225와 Cys462의 redox-active cysteines은 Cys439의 thiyl radical에 의하여 ribose의 C-3'으로부터 분리한 전자를 끌어당기게 함으로써 C-2'의 환원을 시도하는 것으로 설명되고 있다[6]. Ib의 *L. leichmannii*에서도 Cys408의 thiyl radical과 Cys119 및 Cys419의 redox-active cysteines에서 동일한 반응이 일어나는 것으로 입증되었다. Class I에서는 large subunit의 thiyl radical이 small subunit의 tyrosyl radical을 원거리 전자 전이에 의해 발생시키고 있다. 즉, small subunit의 tyrosyl기와 large subunit의 결정적인 cysteine에 의해 모든 class I 단백은 tyrosyl radical을 발생시키는데 요구되는 산소와 연결된 di-iron center를 small 단백에 생성하는 것으로 생각된다[33]. Class II RNR에서는 이때 adenosylcobalamin이 thiyl radical을 발생시키는 것으로 생각된다[7]. Class III에서는 Nrd가 alpha, beta 구조를 갖고 있다. 안정한 잔기는 large subunit에 산소-감수성 glycyl 잔기 형태로 존재한다. 한편 small subunit은 4Fe-4S cluster를 class I의 Fe-O-Fe 대신에 함유하고 있다[34]. 또한 cofactor로써 S-adenosylmethionine이 radical generation에 요구된다(이 경우 class II는 adenosylcobalamin을 요구). 즉 class III는 class I과 class II 효소의 기능을 동시에 보유하고 있는 것으로 생각되나 상세한 기구는 더 연구가 진전되어야 확실하게 설명할 수 있으리라 생각된다.

Class III의 경우 *E. coli*의 *nrdDG* knock-out mutant는 절대 혐기조건하에서 성장할 수 없었다. *E. coli*의 경우 혐기적 조건이 되면 Fnr protein이 혐기성 유전자의 발현을 자극하며[35], ArcAB 단백은 호기성 유전자의 발현을 전사레벨에서 감소시키는 기능을 갖고 있다[36]. 즉 *E. coli*를 혐기적 조건에서 배양하게 되면 *nrdAB* 시스템이 ArcAB에 의해 억제되면서 Fnr에 의해 *nrdDG*의 transcription이 활성화되어 class I에서 class III *nrd*의 발현으로 전환되는 것으로 해석된다[37].

*Lactobacillus lactis*의 *nrdEF* 유전자의 상류에는 *nrdH* 유전자가 있다[38]. 이는 NrdAB보다는 NrdEF에 대한 수소 공여체로써의 역할을 하는 것으로 알려져 있다 즉, 이 *nrdH*는 *L. lactis, E. coli, S. typhimurium* 등에서는 인정이 되나, 최근 전 게놈이 밝혀진 *M. genitalium*에서는 *nrdEF*는 확인이 되었으나 *nrdH*는 그 존재가 확인이 되지 않았다[39]. *E. coli* NrdEF의 경우는 또 하나의 전자 공여체로써 NrdI를 요구하는 것으로 추측되나 그 중요성은 연구가 더 진전되어야 밝혀질 것으로 생각된다[40].

Ribonucleotide reductase의 진화학적 해석

세 가지 다른 종류의 ribonucleotide reductase 가운데 어느 class의 RNR이 가장 먼저 만들어진 것일까? 이의 해답은 지구상에서의 산소의 출현과 병행하여 해석하지 않을 수 없다. 산소가 출현하기 이전, 즉 혐기적 조건하에서 생명체가 살기 위하여 당시 원시대기 중에 많이 존재하였던 iron-sulfur cluster를 이용하여 촉매에 glycyl radical을 generation하였을 것이며 이 때 adenosylcobalamin보다 구조가 간단한 adenosylmethionine을 cofactor로 이용한 class III RNR이 함유된 생명체가 가장 먼저 출현하였을 것이다[41]. 그 후 adenosylcobalamin을 cofactor로 요구하는 class II RNR이 하나의 polypeptide로 그 기능을 나타내었을 것이다. 그 후 가장 분화된 형의 classI RNR이 산소의 요구성을 나타내면서 최종적으로 출현하게 되어 현재의 모든 진핵세포에 존재하는 형태로 나타난 것으로 예측된다. Class II와 III간에는 요구하는 cofactor에서 현저한 차이가 있으며 또 산소의 요구성에도 차이가 있다. 절대 혐기성균에서만 출현하는 radical generating 기구는 먼저 pyruvate로부터 acetyl-CoA와 formate를 생성하는 pyruvate formate lyase로부터 도래되었을 것으로 추측되며[42], 이것이 class III RNR이 먼저 생성되었을 것이라는 이론적 근거의 하나이다. 이 반응은 혐기성균 대사의 필수적인 경로로써 ribonuclotide reduction보다 이전에 생성되었을 것으로 추측되기 때문이다. 그러나 이러한 진화의 설명가운데 iron-sulfur를 요구하는 class III의 RNR이 원시대기중의 혐기적 조건에서 가장 먼저 출현하였으며 산소의 존재하에서 발현되는 class I이 가장 늦게 출현하였다는 점은 설득력이 있으나, class II의 adenosylcobalamin이 class III의 adenosylmethionine에 대응하여 출현하였다는 점은 설명이 어렵다고 하겠다.

Replitase, supramolecular complex

대부분의 ribonucleotide reductase는 정제하면 그 활성이 DNA복제시의 *in vivo* 활성에 비해 현저히 감소함이 알려졌다. 이는 본 효소가 dNTP나 DNA합성계 관련효소들의 세포내 구성이 supramolecular 구조체인 "replitase"의 개념으로 설명될 수 있다. 즉, 세포 내외에서 RNR 활성의 차이는 DNA 전구체의 생합성이나, DNA 복제, dNTP의 DNA 복제 개시점과 연관된 세포내 고농도의 국재성 등과 연계성을 갖는 관련효소들이 복합체의 형태로 세포내에 존재할 가능성을 제시하는 근거가 되리라 생각된다. 물론 이 replitase 복합체는 포유동물의 세포에서는 그 존재가 확인되지 않았으나, T4 phage가 감염된 대

장균에서 확인되었고, DNA복제가 multienzyme 복합체에서 일어남을 볼 때 그 가능성은 충분히 있다고 여겨진다[43]. 대부분의 RNR이 정제된 상태에서 그 활성이 상실됨은 multienzyme 복합체에서 단백질-단백질의 상호활성에 의한 해당 효소의 활성자극이 상실되었기 때문으로 생각된다. *B. subtilis*에서 replisome이 정제되면서[44], "replitase"의 개념이 아직도 중요한 매력적인 과제로 dNTP합성과 연관되어 해석될 수 있으리라 기대된다[45]. 특히 본 그룹에서 수행중인 nona-cistron으로 구성된 *atp* gene cluster에 의해 발현되는 ATPase의 연구에서도 RNR과의 복합체 형성에 의한 활성자극이 중요한 의미를 부여할 수 있을 것으로 생각된다[46; Song *et al.*, unpublished data].

Nuleotide reductase는 세포주기 의존성 효소

동물세포에서 dNTP의 생산에 관련된 효소들은 DNA 복제가 일어나는 DNA합성(S)기에 그 활성이 현저히 항진된다. Thymidine kinase나 RNR은 S기에 활성이 증가하며, deoxycytidine kinase는 어느기에서나 활성화되어 있는 반면 thymidylate synthase는 세포주기에 관계없이 그 활성이 아주 미약하다. *De novo* 또는 salvage 경로에 관련되는 효소의 활성은 세포 주기에 따라 아주 항진되는 경우도 있고 전혀 변화가 없는 경우도 있다. CEM 세포에서 RNR은 S기에 약 70배 정도의 활성증가가 나타났으나 deoxycytidine kinase는 그렇지 못하였다. [5-^{3}H]deoxycytidine의 dCTP에의 도입은 G1기나 S기에서 거의 동량으로 나타났다. 이는 G1기에서 DNA수복이나 mitochondrial DNA의 합성에 nucleotides가 사용되었기 때문으로 생각된다[47].

세포내 deoxyribonucleotide의 pool이 일정하게 유지되기 위하여는 cell cycle에서 ribonucleotide reductase의 정확한 조절에 의한 복제의 제어가 필수적이다. 이때의 조절에는 유전자의 발현, 번역 제어, 단백질의 안정성, 번역후 활성화 및 비활성화, 세포내 ATP 및 dNTP pool의 크기에 의한 효소활성의 allosteric control등이 관련되어 있다. Nucleotide pool은 salvage, 이화작용, substrate cycle 등에 의하여도 조절된다. Ehrlich ascites 세포를 다른 농도의 산소압, 즉 2%에서 0.02%로 산소압을 점차 하강시키면서 배양하였을 경우 free radical level이 점차로 하강하였다. 하강된 조건에서 다시 공기를 공급하였을 때 dCTP pool은 연쇄적으로 변화가 일어났으나 dATP 또는 dGTP는 변하지 않았고 dTTP는 약한 변화성을 나타내었다. Free radical 농도의 변화는 dCTP의 pool에 연쇄적인 변화를 가함을 알 수 있었으며 아울러 RNR이 변화된 세포내 dCTP의 pool을 제어함으로써 핵의 복제기구에 직접적인 영향을 미침을 알 수 있었다[48].

또한 각 class의 RNR은 allosteric effector에 대한 감수성이 동일하게 나타났다. ADP는 dGTP에 의해 dADP에로의 환원력이 저해되었다. GDP는 dTTP, CDP는 ATP 또는 dATP에 의해 환원성이 감소된다는 점은 세가지 class에서 동일한 현상으로 나타났다.

Resveratrol : 적 포도주에서 분리된 ribonucleotide reductase의 저해제

Resveratrol(3,5,4'-trihydroxystilbene, schime 1)은 식물성 phytoalexin으로써 적 포도주에서 환경적 스트레스 및 병원체의 공격에 대응하기 위하여 생산되며[49], redical scavenger 혹은 cyclooxygenase 활성저해효과도 있다[50]. 포유동물에서 DNA의 합성저해 및 ribonucleotide reductase의 저해제로 혈소판 응고방지작용, 항세포증식 및 암세포의 initiation, promotion, progression에 대한 저해효과로써의 응용도 기대된다. 이는 심장병에 대한 저해능이 탁월하며, 항 HIV재제로써의 synergistic 효과도 있어서 향후 진전된 연구 결과의 추이가 주목된다[51].

포유동물의 ribonucleotide reductase R2는 oncogene의 발현을 조절

R1과 R2로 구성된 포유동물의 RR은 DNA합성이나 수복에 중요한 조절인자로 작용한다. 세포주기에 따라 RR의 활성은 다르게 나타나는데 R1과 R2는 G0-G1기에는 활성이 낮으나, G1-S 경계기에는 활성이 현저히 항진되고 G2-M기에는 반대로 그 활성이 감소되며 이는 mRNA 레벨은 R2가 현격한 차이를 보이는 반면 R1은 온화한 변화를 나타내고 있음이 대부분의 포유동물세포에서 확인되었다[52]. 특히 R2는 주기의존성과 제한성이 강하며 DNA 복제기간 중에 RR효소의 활성을 조절하기도 한다. 주기제한성 R2성분의 고도 발현은 Raf-1 단백질의 활성이나 mitogen에 의하여 활성화된 protein kinase 활성을 항진시키고 H-*ras*나 *rac*-1의 협력에 의한 악성종양의 결정인자로 작용하기도 한다. 세포의 형질전환과정에 R2 성분이 관여하면 세포내 위치가 다르고 다른 기능을 지닌 다양한 oncogene에의 영향을 미치게 된다. v-*fms*, v-*src*, A-*raf*, v-*fes*, c-*myc* 및 ornithine decarboxylase로 형질전환된 세포의 anchorage-비의존성 성장이 과잉발현된 R2 존재시에는 현저히 항진되었다. R2 단백질은 RR의 주기제한성을 나타내면서 여러 가지 oncogene에 의한 세포의 형질전환이나 암원성 가능성을 부여하는 조절인자로 작용하고 있는 것으로 확인되고 있다[53].

Ribonucleotide reductase의 분포

Class I은 지구상에 산소가 충분하게 존재시 분화된 것으로 예상되며, class Ia의 amino말단 50-60개의 아미노산 배열은 dATP에 의해 저해되는 조절기능이 있음이 알려져 있다. *E.*

Table 2. Classification of ribonucleotide reductases from various sources

Source	Class[a]				Reference
	Ia	Ib	II	III	
Archaebacteria					
Methanobacterium thermoautotrophicum				○	30
Archeoglobus fulgidus				○	29
Aquefex aeolicus				○	32
Thermoplasma acidophila			○		31
Pyrococcus horikoshii	○		○		25
Pyrococcus furiosus			○		24
Eubacteria					
Thermotoga maritima			○		26
Chloroflexus aurantiacus			○		26
Deinococcus radiodurans			○		26
Lactobacillus leichmannii		○			11
Salmonella typhimurium		○			19
Escherichia coli		○		○	13, 20
Corynebacterium ammoniagenes		○			10
Mycoplasma hyopneumoniae			○		56
Mycobacterium tuberculosis			○		22
Bacillus subtils			○		21
Eukaryote					
Saccharomyces cerevisiae	○				57
Tripanosoma brucei					15
Homo sapiens	○				14

[a]○ indicates organism has corresponding classes of ribonucleotide reductases.

*coli*의 경우 class Ib가 비활성화된 상태에서 Ia가 활성화됨은 동물숙주에서의 수평적 전이에 의한 것으로 예측된다. *E. coli*의 *nrdAB*와 *S. cerevisiae*, mouse 등 대부분의 진핵세포에서는 class I의 RNR을 생성한다. Class II는 extreme thermophile이, class III는 Methanogen이 생성하는 것이다. Extreme thermophile중 전 게놈의 염기배열이 밝혀진 것은 *Methanococcus jannaschii*[54], *M. thermoautotrophicum*[30], *A. fulgidus*[29], *A. aeolicus*[32], *P. horikoshii*[25] 등의 균주들로서 이들은 class III의 RNR을 생성한다. 특히 class II에 속하는 RNR 생성균주들로는 *B. subtilis*[21]와 *M. tuberculosis*[22] 외에도 *T. maritima, Chloroflexus aurantiacus, Deinococcus radiodurans* 등의 eubacteria[26]와 *P. furiosus*[24], *T. acidophila, Halobacterium cutirubrum, Haloferax volcanii* 등의 archaebacteria [31]가 있다(Table 2). *B. subtilis*에서는 두 종류의 RR이 존재한다. 그 중 NrdEF는 염색체 상에서 168°에 위치하며 삽입돌연변이를 유발하면 세포가 치사하게 되므로 그 기능이 세포에 필수적임을 알게 되었다[22]. 다른 하나는 YosO와 YosP이며, 180° 상에 위치하고 있는데, *B. subtilis* NrdEF와 아미노산 배열 분석시 각각 77%, 86%의 상동성을 나타내었다[55]. 특별하게도 *yosO*는 intein과 intron 구조가 각각 한 개씩 끼워져 있으며, *yosP*는 intron 구조를 한 개 포함하고 있다. 아마도 그것은 두 유전자가 위치하는 부위가 SPβ prophage인 것과 관련이 있는 듯하다.

*Pyrococcus*와 *Thermoplasma*의 RNR은 아미노말단의 100-150개의 아미노산 배열이 class III에 나머지 부분은 class Ia에 상동성이 높게 나타났다. Class II는 산소가 출현할 무렵에 분화되었으므로 호기성 및 혐기성조건에서 발현되는 RNRs가 혼합되어 있다. Class II과 class III는 진정세균과 고세균에서 발견되고 있음은 이들이 둘로 분화되기 이전부터 이미 존재하였음을 의미한다. 모든 class III는 절대혐기성의 *M. janaschii* 및 *M. thermoautotrophicum*[30, 54]에서 발견되어 carboxy말단에 RxxGYV/L이 있으며, glycyl radical을 형성하는 능력이 있다. 절대 혐기성의 극한 내열성균인 *P. furiosus*의 RNR은 구조내에 두 개의 intein 구조가 있다[24]. adenosylcobalamin을 요구하며 class II에 해당한다. 그러나 메탄 생성균주인 *M. jannaschii*은 class III에 해당된다[54]. 또 내열성 세균인 *T. acidophila*는 역시 adenosylcobalamin을 요구하면서 class II에 포함된다[31].

참고문헌

1. Nygaard, P. 1983. *Utilization of preformed purine bases and nucleosides*, pp. 27–93. In A. Munch-Petersen (ed.), Metabolism of nucleotides, nucleosides and nucleobases in microorganisms. Academic Press, London.
2. Mollgaard, H. and J. Neuhard. 1983. *Biosynthesis of deoxythymidine triphosphate*, pp. 149–201. In A. Munch-Petersen (ed.), Metabolism of nucleotides, nucleosides and nu-

cleobases in microorganisms. Academic Press, London.
3. Reichard, P. 1997. The evolution of ribonucleotide reduction. *TIBS* **22**: 81–85.
4. Thelander, L. and P. Reichard. 1979. Reduction of ribonucleotides. *Ann. Rev. Biochem.* **48**: 133–158.
5. Nordlund, P. and H. Eklund. 1993. Structure and function of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2. *J. Mol. Biol.* **232**: 123–164.
6. Uhlin, U. and H. Eklund. 1994. Structure of ribonucleotide reductase protein R1. *Nature* **370**: 533–539.
7. Licht, S., G. J. Gerfen, and J. Stubbe. 1996. Thiyl radicals in ribonucleotide reductases. *Science* **271**: 477–481.
8. Ericksson, M., U. Uhlin, S. Ramaswamy, M. Ekberg, K. Regnstrom, B.-M. Sjoberg, and H. Eklund. 1997. Binding of allosteric effectors to ribonucleotide reductase protein R1: reduction of active-site cysteines promotes substrate binding. *Structure* **5**: 1077–1092.
9. Sjoberg, B. M. and P. Reichard. 1977. Nature of the free radical in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **252**: 536–541.
10. Fieschi, F., E. Torrents, L. Toulokhonova, A. Jordan, U. Hellman, J. Barbe, I. Gibert, M. Karlsson, and B.-M. Sjoberg. 1998. The manganese-containing ribonucleotide reductase of *Corynebacterium ammoniagenes* is a class Ib enzyme. *J. Biol. Chem.* **272**: 4329–4337.
11. Booker, S. and J. Stubbe. 1993. Cloning, sequencing, and expression of the adenosylcobalamin-dependent ribonucleotide reductase from *Lactobacillus leichmannii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8352–8356.
12. Sun, X., R. Eliasson., E. Pontis, J. Andersson, G. Buist, B. M. Sjoberg, and P. Reichard. 1995. Generation of the glycyl radical of the anaerobic Escherichia coli ribonucleotide reductase requires a specific activating enzyme. *J. Biol. Chem.* **270**: 2443–2446.
13. Carlson, J., J. A. Fuchs, and J. Messing. 1984. Primary structure of the *Escherichia coli* ribonucleoside diphosphate reductase operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 4294–4297.
14. Pavloff, N., D. Rivard, S. Masson, S. H. Shen, and A. M. Mes-Masson. 1992. Sequence analysis of the large and small subunits of human ribonucleotide reductase. *DNA Seq.* **2**: 227–234.
15. Hofer, A., P. P. Schmidt, A. Graslund, and L. Thelander. 1997. Cloning and characterization of the R1 and R2 subunits of ribonucleotide reductase from *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 6959–6964.
16. Elledge, S. J. and R. W. Davis. 1990. Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes Dev.* **4**: 740–751.
17. Hurd, H. K., C. W. Roberts, and J. W. Roberts. 1987. Identification of the gene for the yeast ribonucleotide reductase small subunit and its inducibility by methyl methanesulfonate. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3673–3677.
18. Jordan, A., I. Gibert, and J. Barbe. 1994. Cloning and sequencing of the genes from *Salmonella typhimurium* encoding a new bacterial ribonucleotide reductase. *J. Bacteriol.* **176**: 3420–3427.
19. Jordan, A., E. Pontis, M. Atta, M. Krook, I. Gibert, J. Barbe, and P. Reichard. 1994. A second class I ribonucleotide reductase in *Enterobacteriaceae*: characterization of the *Salmonella typhimurium* enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 12892–12896.
20. Jordan, A., E. Aragall, I. Gibert, and J. Barbe. 1996. Promoter identification and expression analysis of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli nrdEF* operons encoding one of two class I ribonucleotide reductases present in both bacteria. *Mol. Microbiol.* **19**: 777–790.
21. Scotti, C., A. Valbuzzi, M. Perego, A. Galizzi, and A. M. Albertini. 1996. The *Bacillus subtilis* genes for ribobucleotide reductase are similar to the genes for the second class I NrdE/NrdF enzymes of *Enterobacteriaceae*. *Microbiology* **142**: 2995–3004.
22. Yang, F., S. C. Cuttan, L.-S. Li, D. Avarbock, J. D. Graf, M.-M. Chua, G. Lu, J. Salem, and H. Rubin. 1997. Characterization of two genes encoding the *Mycobacterium tuberculosis* ribonucleotide reductase small subunit. *J. Bacteriol.* **179**: 6408–6415.
23. Reichard, P. 1993. From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* **260**: 1773–1777.
24. Riera, J., F. T. Robb, R. Weiss, and M. Fontecave. 1997. Ribonucleotide reductase in the archaeon *Pyrococcus furiosus*: a critical enzyme in the evolution of DNA genomes? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 475–478.
25. Kawarabayasi, Y. and 30 coauthors. 1998. Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaebacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3 (Supplement). *DNA Res.* **5**(Suppl.): 147–155.
26. Jordan, A., E. Torrents, C. Jeanthon, R. Eliasson, U. Hellman, C. Wernstedt, J. Barbe, I. Gibert, and P. Reichard. 1997. B12-dependent ribonucleotide reductases from deeply rooted eubacteria are structurally related to the aerobic enzyme from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 13487–13492.
27. Himmelreich, R., H. Hilbert, H. Plagens, E. Pirkl, B.-C. Li, and R. Herrmann. 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4420–4449.
28. Sun, X., J. Harder, M. Krook, H. Jornvall, B.-M. Sjoberg, and P. Reichard. 1993. A possible glycine radical in anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*: nucleotide sequence of the cloned *nrdD* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 577–581.
29. Klenk, H.-P. and 50 coauthors. 1997. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon

Archaeoglobus fulgidus. Nature **390**: 364–370.

30. Smith, D. R. and 36 coauthors. 1997. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* **179**: 7135–7155.
31. Tauer, A. and S. A. Benner. 1997. The B_{12}-dependent ribonucleotide reductase from the archaebacterium *Thermoplasma acidophila*: an evolutionary solution to the ribonucleotide reductase conundrum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 53–58.
32. Deckert, G. and 14 coauthors. 1998. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus. Nature* **392**: 353–358.
33. Stubbe, J. 1998. Ribonucleotide reductases in the twenty-first century. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2723–2724.
34. Ollagnier, S., E. Mulliez, J. Gaillard, R. Eliasson, M. Fontecave, and P. Reichard. 1996. The anaerobic *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. Subunit structure and iron sulfur center. *J. Biol. Chem.* **271**: 9410–9416.
35. Iuchi, S. and E. C. Lin. 1993. Adaptation of *Escherichia coli* to redox environments by gene expression. *Mol. Microbiol.* **9**: 9–15.
36. Spiro, S. and J. R. Guest. 1990. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli. FEMS Microbiol. Rev.* **6**: 399–428.
37. Garriga, X., R. Eliasson, E. Torrents, A. Jordan, J. Barbe, I. Gibert, and P. Reichard. 1996. nrdD and nrdG genes are essential for strict anaerobic growth of *Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**: 189–192.
38. Jordan, A., E. Pontis, F. Aslund, U. Hellman. I. Gibert, and P. Reichard. 1996. The ribonucleotide reductase system of *Lactococcus lactis*: characterization of an NrdEF enzyme and a new electron transport protein. *J. Biol. Chem.* **271**: 8779–8785.
39. Fraser, C. M. and 28 coauthors. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium. Science* **270**: 397–403.
40. Jordan, A., F. Aslund, E. Pontis, P. Reichard, and A. Holmgren. 1997. Characterization of *Escherichia coli* NrdH: a glutaredoxin-like protein with a thioredoxin-like activity profile. *J. Biol. Chem.* **272**: 18044–18050.
41. Frey, P. A. 1993. Lysine 2,3-aminomutase: is adenosylmethionine a poor man's adenosylcobalamin? *FASEB J.* **7**: 662–670.
42. Knappe, J., S. Elbert, M. Frey, and A. F. Wagner. 1993. Pyruvate formate-lyase mechanism involving the protein-based glycyl radical. *Biochem. Soc. Trans.* **21** (Pt 3): 731–734.
43. Young, J. P. and C. K. Mathews, 1992. Interactions between T4 phage-coded deoxycytidylate hydroxymethylase and thymidylate synthase as revealed with an anti-idiotypic antibody. *J. Biol. Chem.* **267**: 10786–10790.
44. Laffan, J. J., I. L. Skolnik, D. A. Hadley, M. Bouyea, and W. Firshein. 1990. Characterization of a multienzyme complex derived from a Bacillus subtilis DNA-membrane extract that synthesizes RNA and DNA precursors. *J. Bacteriol.* **172**: 5724–5731.
45. Harder, J. 1993. Ribonucleotide reductases and their occurrence in microorganisms: a link to the RNA/DNA transition. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 272–292.
46. Kim, S.-O., J.-S. Chang, S. M. Lee, and B.-H. Song. 1995. Cloning of the *nrd* gene encoding nucleotide reductase in *Salmonella typhimurium. Mol. Cells* **5**: 253–259.
47. Bianchi, V., S. Borella, C. Rampazzo, P. Ferraro, F. Calderazzo, L. C. Bianchi, S. Skog, and P. Reichard. 1997. Cell cycle-dependent metabolism of pyrimidine deoxynucleoside triphosphates in CEM cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 16118–16124.
48. Brischwein, K., M. Engelcke, H.-J. Riedinger, and H. Probst. 1997. Role of ribonucleotide reductase and deoxynucleotide pools in the oxygen-dependent control of DNA replication in Ehrlich ascites cells. *Eur. J. Biochem.* **244**: 286–293.
49. Soleas, G. J., E. P. Diamandis, and D. M. Goldberg. 1997. Resveratol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.* **30**: 91–113.
50. Jang, M., L. Cai, G. O. Udeani, K. V. Slowing, C. F. Thomas, C. W. Beecher, H. H. Fong, N. R. Farnsworth, A. D. Kinghorn, R. G. Mehta, R. C. Moon, and J. M. Pezzuto. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**: 218–220.
51. Fontecave, M., M. Lepoivre, E. Elleingand, C. Gerez, and O. Guittet. 1998. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Letters* **421**: 277–279.
52. Kuo, M.-L. and T. J. Kinsella, 1998. Expression of ribonucleotide reductase after ionizing radiation in human cervical carcinoma cells. *Cancer Res.* **58**: 2245–2252.
53. Fan, H., C. Villegas, A. Huang, and J. A. Wright. 1998. The mammalian ribonucleotide reductase R2 component cooperates with a variety of oncogenes in mechanisms of cellular transformation. *Cancer Res.* **58**: 1650–1653.
54. Bult, C. J. and 39 coauthors. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii. Science* **273**: 1058–1073.
55. Ghim, S.-Y., S.-K. Choi, B.-S. Shin, and S.-H. Park. 1998. An 8 kb nucleotide sequence at the 3' flanking region of the *sspC* gene (184°) on the *Bacillus subtilis* 168 chromosome containing an intein and an intron. *DNA Res.* **5**: 121–126.
56. Fagan, P. K., S. P. Djordjevic, G. J. Eamens, J. Chin, and M. J. Walker. 1996. Molecular characterization of a ribonucleotide reductase (*nrdF*) gene fragment of *Mycoplasma hyopneumoniae* and assessment of the recombinant product as an experimental vaccine for enzootic pneumonia. *Infec. Immun.* **64**: 1060–1064.
57. Huang, M. and S. J. Elledge. 1997. Identification of RNR4, encoding a second essential small subunit of ribonucleotide reductase in *Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol.* **17**: 6105–6113.

여 백

HIV/AIDS의 기원과 진화 및 그 유전자 발현 조절 관련 치료제의 개발

송방호, 허노준, 김사열
경북대학교 생물교육과

특집 : AIDS 연구의 최첨단(I)

HIV/AIDS의 기원과 진화 및 그 유전자 발현 조절 관련 치료제의 개발

송방호, 허노준, 김사열
경북대학교 생물교육과

전 세계에 AIDS (후천성 면역결핍증후군, acquired immune deficiency syndrome) 감염자는 현재 4,700만명에 이르고 있으며 그 가운데 1,400만명이 이미 희생자가 되었고, 작년 한해에만 250만명의 새로운 감염자가 생겨나 여러 가지 질환 중 희생자가 네 번째로 많은 질병이 되었다. AIDS는 HIV (Human immunodeficiency virus)에 의해 야기되는 면역계의 질병으로 만성적 신경성질환을 수반하여 유발되며 그 본체가 RNA이기 때문에 역전사효소(RT, reverse transcriptase)가 HIV의 증식에 필수적인 것이어서 이 RT의 기능을 특이적으로 저해하므로써 HIV genome의 숙주염색체에의 통합을 억제하는 방법이 그 방어대책의 중심이 되어왔으나, 최근 protease 저해제, 백신 개발에 의한 면역 항체요법, 생체내에서 HIV virus를 선택적으로 공격하는 미사일요법 등이 개발되고 있다. 본보에서는 HIV/AIDS란 무엇이며 HIV는 어떻게 전염되고 누가 어떻게 감염되며 어떻게 막을 수 있는가에 대한 기본 지식을 기술하고, 이에 대한 항 HIV재제 개발의 새로운 전략을 유전자 발현 조절측면에서 고찰하고자 한다.

HIV 및 AIDS란? 그 기본적 개념

AIDS는 기회주의적 감염을 유발

AIDS는 HIV라는 바이러스에 의해 발생하는 면역계의 질환이다. 면역계는 질병에 의해 기능이 상실되면 인체를 보호하는 기능이 상실되어 암에 걸리게 되거나 때로는 죽음에 이르게 된다. AIDS는 생체의 방어능력을 약화시키기 때문에 기회주의적 감염(opportunistic infections)이라고도 불리는데 "AIDS에 걸려 죽었다"란 말은 아주 정확하다고는 할 수 없다. 왜냐하면 실제로 사람을 죽음에 이르게 하는 질병은 기회주의적 감염들에 의한 경우이며 AIDS는 이 감염의 원인이 되기 때문이다. 그러나, 1) AIDS는 예방 가능하고, 2) AIDS는 쉽게 감염되지 않으며, 3) 약간의 조심으로 예방될 수 있다. 라는 점이 중요하다.

HIV의 감염 및 그 방어 대책

HIV는 인체 외부에서는 생존할 수 없는 연약한 바이러스이므로 환자와 같이 접시나 식기를 쓰거나, 좌변기 시트에 앉거나 하여도 감염되지는 않는다. 하지만 한번 HIV가 인체 에 감염되면, 7-10년간에 걸쳐 "숨어"있게 된다. 그렇기 때문에 아주 건강해 보이는 사람들이 자각하지도 못하면서 바이러스에 감염될 수도 있으며, 다른 이들에게 전파할 수도 있다. 아직 이 바이러스에 감염된 사람들의 몇 퍼센트가 AIDS로 진행하는지는 모르나, HIV에 감염된 많은 사람들이 바이러스와 함께 오랫동안 살고 있으며, 당뇨와 같이 다룰 수 있는 만성적인 질병이 될지도 모른다.

HIV는 피, 정액, 질 분비물, 모유등과 같은 체액을 통해서는 전염되나 침, 눈물, 또는 땀을 통해서는 전염되지 않는다. 이는 점액층(mucous membranes, 직장, 질 벽, 또는 입과 목구멍의 내면) 또는 혈류와의 직접적 접촉을 통해 인체 내에 침입하나, 피부의 상처로 인하여 다른 사람의 체액이 혈류내에 침입하지 않는 한은 피부로는 침입하지 못한다. 또, 기침이나 재채기를 통해 공기중으로는 전염되지 않기 때문에 일상적 접촉으로는 절대적으로 감염되지 않는다.

HIV는 남자 동성애자(gay), 여자 동성애자(lesbian), 이성애자(heterosexual), 그리고 양성애자(bisexuals)들을 감염시켰다. 또 모든 인종, 국적, 나이의 사람들에서 골고루 감염되고 있으며, 미국에서는 남성동성연애자들이, 아프리카에서는 이성애자들이 압도적으로 우세하게 감염된다.

이 바이러스는 체액에 의해 전염되기 때문에, 라텍스(latex) 콘돔(고무)을 사용하면 감염을 막을 수 있다. 양가죽(lambskin)과 다른 "생체막(natural membrane)" 콘돔들은 라텍스만큼 좋지 않아 HIV가 투과할 수도 있다. Spermicidal(정자-죽이는) 윤활유 특히 nonoxynol-9을 함유한 제품들은, 콘돔과 같이 사용하면 훨씬 효과적이다. Oral섹스로도 HIV를 감염시킬 수 있으며 이때는 dental dam이나, 플라스틱 랩을 사용할 수도 있으나 절대로 이들을 재사용하지는 말아야 하며 이들 막에서 HIV가 투과할런지도 모른다. "높은 위험의 그룹(high-risk groups)"의 사람들 즉, 보호되지 않은 채, 즉 라텍스나 콘돔 없이 감염된 사람과 anal또는 vaginal섹스를 하는 그룹은 HIV에 걸리는 확률이 높으며 감염된 사람과 주사바늘을 같이 쓰거나 살균되지 않은 주사바늘로 어떤 물질을 주입하는 것은 가장 직접적인 감염원이 된다.

미국에서는 IV약물 사용자(IV drug user)와 주사바늘이나,

기구(works)나 요리 도구를 절대로 같이 써서는 안 되는 것으로 금지되어 있으며 깨끗한 주사바늘을 제공함으로써 약물 중독자가 HIV에 걸리는 것을 막고 있는 것이다. 미국에서의 수혈은 절대적으로 안전하다. 피를 뽑는 주사 바늘은 살균되었고 낱개로 포장되었으며, 사용 후에는 파기하도록 되어 있기 때문에 수혈과정에서 감염되기는 거의 불가능에 가깝다. 태아감염에서 바이러스는 출생 이전 또는 출생시, 또는 모유를 먹일 때 자식에게 전염될 수 있다. 신체를 건강한 상태로 유지하면 면역계가 강화되며, 다이어트, 휴식, 스트레스, 등은 건강에 영향을 미칠 수 있다.

HIV질병에 걸린 사람들은 죽음을 기다리는 사람들이 아니고 그 질병과 함께 살며 계속해서 사회에 공헌할 수 있다. 그들은 "회생자"가 아니고 다만 HIV 질병과 함께 하는 사람들로써 규정되고 있으며, HIV에 감염된 사람에게는 친구가 되어 주면서 HIV와 AIDS에 대한 진실을 전달하여야 하며, 감염자들에 대한 차별에 대해 개인적, 또는 사회적으로 맞서 싸우도록 노력하여야 한다. 지역의 AIDS기구에서 자원 봉사하거나, 기부를 하도록 유도하여야 하며 모두 HIV의 전파를 정지시키는 데 그 역할을 담당하여야 한다. HIV환자의 경우 국내에서는 대한 에이즈 예방협회 또는 대한 에이즈 퇴치협회가 있으며 미국에서는 GMHC Hotline이 있어서 상담에 응하고 있다[25].

HIV : 그 기원과 진화

HIV의 계통과 진화

HIV는 Retrovirus의 일종으로서 역전사효소의 높은 에러율 때문에 숙주 genome 에 비해 약 100만배 정도 초고속으로 진화한다[14]. 바이러스 계통간의 분자계통수에서 에이즈 바이러스는 retrovirus의 lentivirus아과에 속한다. 사람의 HIV와 원숭이의 SIV는 공통의 선조로부터 약 150-200년전에 나누어졌고, HIV는 다시 HIV-1과 HIV-2로 나누어진 것으로 추측된다.

사람 이외의 동물에서도 HIV와 아주 닮은 바이러스가 있다. HIV가 어떠한 종류며 AIDS 관련 바이러스와 어떠한 계통관계가 있는가를 알기 위하여 바이러스 유전자의 염기배열이나 아미노산 배열의 data를 분자진화학적 수법으로 해석하였든 바, HIV는 retrovirus 가운데 감염증의 진전이 늦은 lentivirus 아과, 암을 유발하는 oncovirus아과, fomyvirus로 알려진 spermavirus아과 가운데 lentivirus아과였음이 확인되었다[23]. Retrovirus는 *gag, pol, env* 등의 유전자가 있어서 각각 core단백질, 역전사효소, 외피단백질을 code하며, 바이러스의 복제효율이나 전사과정을 조절하는 제어유전자들도 있다[2]. Retrovirus는 숙주세포에 감염시 외피막을 벗어버리고 genome RNA, core단백질, 역전사효소등이 세포내에 들어간 후 게놈 RNA는 역전사효소에 의해서 DNA로 바뀌어져 이본쇄로 된 후 숙주 세포의 게놈 DNA에 삽입된다. 삽입된 바이러스의 게놈 DNA(Provirus)는 숙주세포의 단백질 합성계에 의해서 전사, 번역되어 바이러스 입자를 구축하는데 필요한 단백질과 바이러스 RNA genome을 합성하여 세포막 부근에서 새로운 자손 바이러스 입자들이 조립된 후 방출된다.

Table 1. HIV-1 염기치환속도[23]

유전자	염기치환속도(X10-3/부위/년)	
	동위좌위	비동위좌위
gag	13.08(6.8-26.0)	3.92(0.5-12.3)
env	15.8693.5-30.5)	8.85(3.9-19.7)

전 genome의 염기치환을 아미노산이 치환되지 않는 동의치환과 치환되는 비동의치환으로 나누어 속도를 계산하면 그 평균치가 각각 10.3×10^{-3}/부위/년과 3.9×10^{-3}/부위/년이 된다. 유전자 산물이 기능적 제약을 받고 있을 경우 동의치환이 비동의치환보다 그 속도가 더 빠르게 나타나는데 HIV-1의 *gag* 유전자와 *env*유전자 사이에서의 염기치환속도를 보면 동의좌위에서는 거의 유사하나, 비동의좌위에서는 env유전자쪽이 *gag*유전자보다도 높은 값을 나타냄을 알 수 있었다(Table 1). 이는 외피막 단백질의 아미노산배열이 더 쉽게 변화되었다는 의미로써 백신의 개발이 얼마나 어려운가를 짐작하게 한다. *env*유전자에 의해 코드되는 외피막 단백질가운데 계통간의 변이가 높은 빈도로 나타나는 V3 loop영역의 경우 그 치환속도를 추정하면 동의치환속도가 9.5×10^{-3}/부위/년, 비동의치환속도가 11.4×10^{-3}/부위/년으로써 V3 loop가 적응적인 진화를 하면서 항원결정기로서의 기능이 충분하게 있음을 알 수 있다.

HIV의 계통관계

HIV가 다른 retrovirus들과 어떤 계통관계가 있는가를 pol 유전자의 아미노산배열 비교에서 해석한 결과 HIV의 각 계통은 하나의 그룹에 포함되며, retrovirus의 대부분은 oncovirus족과 lentivirus족으로 대별되는데 그 가운데 HIV는 oncovirus족 보다도 lentivirus족에 더 가깝다는 사실이 밝혀졌다.

HIV에는 genome구조가 조금 다른 HIV-1형과 HIV-2형이 있다. HIV-1은 구미를 비롯하여 거의 전세계적으로 또 HIV-2는 주로 서아프리카에 널리 분포한다. 또 HIV와 닮은 SIV(simian immunodeficiency virus)는 mandrill, sooty mangabey, African green monkey, rhesus macaques, chimpanzee 등에서 발견되어 각각 SIV_{mnd}, SIV_{sm}, SIV_{agm}, SIV_{mac}, SIV_{cpz} 등으로 불리워진다. 아프리카에서 HIV의 감염율이 높다든가 HIV-2에 닮은 SIV가 존재함은 아프리카에서 HIV의 선조가 원숭이로부터 사람에 감염한 것이 아닌가를 추측하겠금 한다. HIV와 SIV의 분자계통수를 5영역 즉, 3' LTR, *gag, pol, env, nef* 등에서 작성하면, *gag*유전자의 염기배열 분석에서 HIV, SIV의 선조는 거의 동시기에 SIV_{mnd}, SIV_{agm}, HIV-2/SIV_{sm}/SIV_{mac}, HIV-1/SIV_{cpz}등의 4가지의 그룹으로 나

누어졌으며 그 시기는 약 150-200년 전으로 추정되었고, HIV-1과 SIV_{cpz}, HIV-2와 SIV_{sm}의 분지는 각각 약 30년전으로 추정되었다. HIV-1이 모두 병원성임에 비해 HIV-2와 SIV_{sm}및 SIV_{mac}는 병원성 및 비병원성이 혼재하고 있다. 서 아프리카의 어떤 건강한 농부의 HIV-2가 지금까지 보고된 HIV-2 보다도 SIVsm에 더 닮은 점에서 HIV-2, SIV_{sm}, SIV_{mac}는 다양성이 높은 하나의 그룹에 속하는 것으로 추정되었다. 또 야생의 스지이로만카베이의 서식지가 HIV-2의 전염지역이 일치하며, 이들의 약 10%가 SIV_{sm}에 감염해 있어 사람과의 접촉이 보고되어 있으며, 붉은털원숭이에는 병을 일으킨다는 점, 등에서 스지이로만카베이가 HIV를 사람에 감염시키는 원인이 되었음을 추측하게 하였다. HIV의 직접적인 감염원에 대해서는 아프리카 야생원숭이의 SIV로 추측되나 그 확인과정에는 다소 반론도 있다.

HIV의 증식과 그 유전자의 발현기구

HIV의 증식과 AIDS의 병증

HIV 감염자에 있어서 면역학적 바이러스학적 연구는 주로 말초혈액이 대상이 되고 있으나 실제 림프구의 수가 전체 혈액의 2%에 지나지 않는 말초혈에 비해서 림프절에서는 훨씬 많은 $CD4^+$세포가 있어 HIV 감염율이 높으며, 휴지기의 $CD4^+$ T세포 가운데 약 0.5%가 재조합이 안된 HIV DNA를 보유하며 그 1/10정도는 환상 DNA로써 역전사되지 않는다[17]. 한편 숙주세포의 DNA에 삽입된 바이러스는 0.05%정도로써 그 대부분은 결손 바이러스이며 실제로 증식 가능한 바이러스(replication-competent virus)는 그 1/10 즉 0.005%에 지나지 않는다. 이와 같이 적은 바이러스가 그 숙주세포에서 에이즈를 일으키는 것은 생각하기 어려우나 한번 가속화되기 시작하면 한 개의 감염세포에서 10^2~10^4 정도의 바이러스가 생산된다. 바이러스가 극히 적다는 점에서 유효한 병용요법이 개발된다면 에이즈의 치료가 가능하게 될 것이다[19].

HIV에 감염된 대부분의 사람의 혈청 중에는 바이러스가 10^7/ml 이상으로 되나, 개인차가 크며, 어떤 인자가 어떻게 하여 이를 결정하는 가는 잘 알려져 있지 않다. 일반적으로 CTL(cytotoxic T lymphocytes)을 중심으로 하는 면역반응이 일어나면 바이러스 양은 100~1000단위로 저하하여 6개월 이상이 되면 불안정한 시기를 거쳐서 혈청 RNA의 양이 안정화된다. 그 바이러스 양이 안정한 상태를 set-point라 하는데 어떻게 안정화되는가는 감수성이 있는 CD4세포와 macrophage 수, 숙주의 면역력, 바이러스의 tropism과 증식성 등에 의해서 결정되는 것으로 생각되나 소아에서는 HIV RNA가 때때로 아주 높은 레벨까지 상승해서 쉽게 저하하지 않고 set-point에 달하는데 1년 이상이 걸리는 경우도 있다. HIV 감염후 높은 레벨의 set-point RNA를 나타내는 환자는 낮은 레벨의 set-point를 나타내는 감염자에 비해 CD4세포가 보다 빨리 감소되면서 에이즈로 진행하며 먼저 사망하게 된다. Set-point에 달한 후는 비교적 안정한 RNA양을 나타내나 서서히 증가하여 발병기가 되면 급상승하게 된다[22].

항HIV제로 AIDS를 치료하면 2주간 이내에 혈장중의 RNA양은 1/100정도로 저하하여, 2.3~3.1년 정도면 몸에서 배제될 수 있다[19]. 혈액중의 비리온의 반감비가 6시간 이하이므로 보통의 HIV 감염자에서 나타나는 안정한 혈장 RNA양을 유지하기 위해서는 매일 10^9~10^{10}의 바이러스가 생산되는 셈이 된다. 항 HIV제 처리시 대다수의 감염세포에서 바이러스가 생산되는 기간은 평균 2일정도이나 감염세포는 평균 1.25일에 파괴된다. 새로운 표적세포에서 자손바이러스를 만드는데 2.5일이 걸리므로 감염자에서는 년 140회 이상 바이러스 증폭이 일어나는 셈이 된다. 항 바이러스제 처리시 반감기가 약 8일인 활성화 감염 $CD4^+$T세포에서는 초기의 2주간에 급속하게 감소하고 반감기가 약 2주간인 감염 macrophage에서는 바이러스가 그보다 훨씬 천천히 저하하며(8~28일) 이들은 약 1%에 지나지 않는다. 그러나 $CD45RO^-$란 메모리 세포의 마크를 가진 CD4세포의 replication competent provirus는 1.4×10^6/body에 지나지 않는다. 더욱이 이들 세포의 반감기는 22주가 되는 경우가 있어 바이러스의 감소가 2 hit가 아니고 3 hit curve로 일어나기도 한다.

가장 감도가 좋은 방법을 전혀 치료를 하지 않는 군에서 사용하면 처음부터 약 8주 이내에 바이러스 양이 검출한계 이하로 떨어진다. 3자 병용요법으로 치료한 경우는 16개월 이상에 걸쳐서 이 상태를 유지할 수 있다. 주로 말초혈액에 비해 림프절이나 뇌의 바이러스에 대해서는 아직 조사되어 있지 않았는데 혈액-뇌관문을 넘기 어려운 약물이 많은 현상에서 뇌가 성역으로서 바이러스의 증식을 막기는 어려워 약제의 투여 중지시 뇌의 바이러스가 증식되었다는 보고는 있다.

바이러스의 RNA레벨은 $CD4^+$T세포수나 P24항원 등과 비교하여 예후 판정이 가장 좋은 마커이다. 어떤 경우에 바이러스의 증식의 정도를 나타내는 RNA레벨은 저하함에도 불구하고 면역력의 정도를 나타내는 $CD4^+$T세포수는 증가하지 않는 경우도 있었다. 따라서 RNA레벨과 $CD4^+$T세포수를 동시에 측정하는 것이 가장 중요하다. 극히 효과적으로 바이러스 RNA레벨을 검출한계 이하로 조절하고 있는 3자 병용의 경우에도 많은 $CD4^+$T 세포수가 기대될 만큼 증가하지 않음은 면역반응을 나타내는 세포클론은 한번 상실되면 회복이 불가능함을 의미하는 것으로써 무증후 carrier의 조기 치료가 얼마나 중요한가를 의미한다. 결국 면역 시스템의 장애가 일어나기전에(clone이 남아있을 때에) 치료를 개시하여야 한다는 의미로 어느 정도 부작용이 적고 지속적으로 사용가능한 약제로써 조기치료를 하여야 한다는 것이다.

HIV의 생활사와 증식 저해

HIV는 RNA genome이 DNA (provirus)로 변환되어 숙주의 염색체에 삽입된 provirus DNA는 숙주세포의 전사, 번역 장치를 이용하여 바이러스 단백이 생산된 후 증폭된 virus RNA와 조립 성숙과정을 거쳐 방출된다[20]. 즉, pro-virus의 전사단계에서 세포의 전사인자인 NF-κB, 바이러스의 Tat단백, 전사후의 과정에서 바이러스 유래의 Rev단백 등이 작용하여 바이러스 구조단백과 genome RNA를 합성하므로써 바이러스가 증식된다. RNA를 주형으로 2본쇄 provirus를 합성할 때 역전사효소의 RNase활성에 의해서 마이너스쇄 DNA의 주형이 된 virus RNA를 분해하면서 plus쇄 DNA를 구성하므로 1 copy의 virus genome RNA에서 1 copy의 provirus DNA만이 만들어지게 되며[5], 또한 전구체 단백의 processing과정에서도 유전정보량은 증가되지 않는다.

이와 같이 유전정보량의 증가는 항 HIV요법의 표적이 되고 있는 역전사나 단백의 processing과정에서는 일어나지 않으나 전사의 과정에서는 가능하다. 세포의 유전자가 전사된 mRNA는 단백 합성에 사용된 후 분해되어 버리지만 virus RNA가 재감염된 세포에서는 provirus에서의 전사과정에서 유전자의 증폭이 일어날 수 있으므로 이 전사의 전단계인 역전사과정을 선택적으로 저해하면 세포내에 잠복하는 provirus의 증식을 봉쇄하여 장기간 감염자로부터 발증되지 않도록 할 수 있을 것이다.

HIV pro-virus LTR에서의 NF-κB에 의한 전사조절

HIV provirus의 mRNA전사량은 LTR(long terminal repeat)의 특이적 DNA배열에 결합되는 전사인자들에 의하여 결정된다. 이들 전사인자에는 숙주세포의 유도형 전사인자 NF-κB, 바이러스 유래의 Tat 전사인자, 숙주세포 유래 시그날에 의해서 활성이 유도되는 인자 등이 있다. HIV가 장기간 잠복 감염하는 단구 macrophage계 배양세포에서는 NF-κB가 필수적으로 간주된다. 또 바이러스유래의 전사인자는 mRNA전사 개시부위(cap부위)의 바로 하류의 TAR(Trans-Activation - Response region)영역에 결합하는 전사활성화 인자 Tat가 있어서 바이러스 유전자가 mRNA로 될 때 형성되는 안정한 stem-loop구조의 buldge부분에 결합되면 여기에 세포의 다른 복수의 인자가 결합하여 전사의 증폭이 일어난다. Loop부분에 결합하는 단백질이나 stem부분에 결합하는 단백질은 모두 세포유래의 것이다.

한편 전사개시 반응의 방아쇠역할은 TATA box에 결합된 TATA결합단백 (TBP)이 관여한다. 이 box의 상류에 NF-κB 등의 전사활성화인자가 결합하면 TBP의 TATA box에의 결합이 촉진되어, 전사량은 증가한다. 이때 보조활성화인자(coactivator)인 p300/CBP이 NF-κB에 결합하면 p300/CBP associated factor (P/CAF)가 추가 결합되어 복합체를 형성하므로써 근방의 histone이 acetyl화 된다. 그 결과 nucleosome 구조의 변화를 유도하여 TBP등의 기초전사인자의 결합을 촉진하게 된다. 또한 co-activator는 TBP-TAFs(TBP-assocaiated factors)복합체에 결합되어 안정화된 전사개시복합체를 형성하게 된다. TBP의 결합에 이어 숙주의 기초전사인자 TFIIB와 TFIIA가 결합하고 이어서 TFIIB는 TFIIF와 결합한다. TFIIF는 RNA polymeraseII와 결합하므로 TATAbox의 근방에 RNA polymerase가 결과적으로 도입되어 TFIIE와 TFIIH가 결합하게 되고 따라서 전사반응이 개시된다. 또 CHUK의 dominant negative 변이체가 TNF나 IL-1에서의 NF-κB활성화 신호를 저해하면 CHUK는 IκBα와 직접 결합하게 되고, NIK존재하에서 CHUK에 의한 IκBα의 인산화가 cascade기구로 촉진된다. 한편 NF-κB. IκB복합체에 serine kinase가 결합하여 p65 subunit의 인산화와 함께 NF-κB를 IκB로부터 유리시킨다[12].

또 산화환원반응이 signal을 전달하고 있음이 확인되었는데 TNF나 IL-1 receptor에서의 signal전달에 따르는 NF-κB의 활성화가 항 산화제의 투여에 의해 저해된다. 항산화제로써 중화된 활성산소가 NF-κB의 활성화 작용과 thioredoxin(Trx)을 유도하므로 signal전달계에 mediator로써 존재한다고 생각된다. NF-κB는 thioredoxin에 의해서 환원된 DNA와 결합하여 redox제어를 유발한다. Redox제어의 활성단은 Cys로써 NF-κB와 Trx는 cys 잔기로 접근하며 1가 금속이온에 의해 산화됨으로써 그 DNA와의 결합이 저해된다.

이와같이 NF-κB는 여러 가지 인산화 효소와 활성산소 및 Trx가 관여하는데 이 과정의 어느단계에서든 저해하면 잠복감염하고 있는 HIV provirus증식을 억제할 수 있을 것이다.

HIV mRNA의 Tat 에 의한 전사개시 및 연장

Tat는 14kDa의 단백으로써 HIV provirus의 전사를 선택적으로 증가시키는 작용을 갖고 있는 강력한 전사 활성화인자이다. 이 Tat가 존재시에는 RNA polymerase carboxy terminal domain(CTD)에 인산화가 일어나게 하여 그 활성을 증강시키며 부재시에는 RNA 합성효소가 도중에 이탈하게하여 RNA합성이 중단된다. HIV의 mRNA의 5' 말단부위에 있는 TAR에는 Tat의 전사활성화에 필수적인 여러 가지 인자가 결합된다. 이들 인자로써는 CAK(cyclin-dependent kinase activating kinase), TAK(Tat-associated kinase), cdk7 등이 있다. CAK는 cak가 cyclin H, mat1과 결합된 복합체이며 Tat와 TAK결합의 가교역할을 하는 Tat/SF1도 분리되어 있다. 어느 경우든 인산화는 RNA polymeraseII의 CTD에서 일어나며 인산화에 의하여 RNA polymerase의 processibility가 증가한다. Tat 혹은 그 결합세포인자 TFIIB 혹은 TAFs은 전사의 개시 혹은 신장과정에서 결합인자를 연속적으로 교체하면서 강력한 전사활성능을 가지게 된다.

HIV구조단백의 Rev에 의한 번역

NF-κB와 Tat 및 세포의 전사기구와의 상호작용에 의해 막대한 량의 virus 유전자발현이 가능하며, 이어서 Rev의 작용에 의해 virus 구조단백질이 번역되면 genome RNA가 공급되어 virus입자가 형성된다. Full size의 virus mRNA가 splicing이 된 후 얻어진 여러 가지의 virus mRNA는 선택적인 안정화와 핵에서 세포질로의 이동을 거쳐 번역된다. HIV provirus에서의 전사, 즉 전구체 mRNA가 splicing된 후에는 intron이 제거되었으므로 Tat, Rev, Nef 단백은 합성되나, virus 입자를 구성하는 구조단백은 코드되지 못한다. 구조단백의 유전정보는 Rev의 존재하에서 아미노산 배열로 번역된다. Rev는 virus RNA와 결합한 후 Rab 및 hRIP 세포인자와 결합하며, Rab/hRIP는 핵공을 형성하는 nucleoporin단백질과 구조적 유사성에 의해 상호간에 결합함으로써 virus mRNA가 선택적으로 핵에서 세포질로 이동된다. 그 결과 splicing되지 않는 중간단계의 *gag, pol, env* 등을 만드는 mRNA가 세포질로 이송되어 구조 단백을 만들게 된다[21]. 동일방법으로 genome RNA(full size 의 전구체 mRNA)가 부가되어 virus 입자가 완성된다.

HIV의 receptor/coreceptor

어떤 종의 chemokine receptor는 HIV의 세포감염에 있어서 제2의 receptor로 작용하는 것으로 알려져 있다. Coreceptor의 발견은 바이러스의 세포침입기구의 해명 뿐만아니라 HIV감염병증의 해석 새로운 감염동물 모델의 제작, 새로운 감염제의 표적 등의 관점에서 주목된다.

바이러스의 숙주세포에의 침입의 제1단계는 1986년에 표적세포 표면의 특정분자(receptor)에의 결합을 유도하는 CD4 단백을 매개로한 흡착현상에 의한 것임이 밝혀졌다. 몇가지의 실험결과 HIV의 세포내 침입성립에는 CD4 이외에도 타의 factor(cofactor) 혹은 제2의 receptor/coreceptor가 관여하는 것으로 생각되어 추적하였던 바, HIV-1의 coreceptor가 chemokine receptor임이 1996년에 밝혀졌다.

HIV의 receptor는 CD4 단백

HIV는 세포막에의 흡착, 융합, 침입, 탈각 등의 과정을 거치는 HIV의 생활사에서 가장 초기의 세포흡착반응에 관여하는 세포측 인자가 CD4분자이다. CD4는 면역 글로부린 super-family의 하나로써 세포표면에서 발현되며 분자량 55kD의 당단백이고 세포외로 4개의 면역 글로부린형 domain을 갖는다. CD4는 T세포 및 macrophage에서 발현되는데 T세포상의 CD4는 classII 조직적합항원상의 β-domain에 결합해서 T세포 receptor에 의한 항원인식을 높이는 기능을 갖고 있다[15].

CD4는 HIV-1의 receptor임이 1)항CD4 monoclonal항체는 HIV-1의 세포감염, 합포체형성, 바이러스 입자의 림프구에의 결합 저지, 2)HIV-1의 외피 당단백 gp120이나 CD4항원은 항체에 의해서 같이 침전된다는 점, 3)CD4가 발현되지 않는 사람의 세포에 CD4 cDNA를 도입 발현시킴으로써 HIV-1감염이 가능하다는 점, 등의 실험에서 입증되었다. 그러나 CD4만으로서는 HIV가 세포침입은 원활하게 이루어지지 않았다. 사람 CD4 cDNA를 마우스, 쥐의 세포주나 사람의 CD4-의 astroglioma유래의 U87세포주에 도입 발현시키면 발현한 CD4에의 바이러스의 흡착은 관찰되나 바이러스 입자와 세포막의 융합, 바이러스의 세포질내에의 침입은 인정되지 않았다[7]. 그러나 이 세포를 다른 CD4-의 사람의 세포와 융합시킨 경우에는 바이러스의 침입이 일어났기에 이 바이러스의 세포내 침입에는 CD4이외의 receptor가 필요한 것으로 추측되었다.

HIV의 coreceptor는 CXCR4

HIV의 세포에의 흡착, 융합, 침입 등에 관여하는 receptor는 galactosylcelebroside, LFA-1, Fc receptor와 보체 receptor, CD26 등이 있다. 세포막 당질인 galactosylcelebroside는 CD4 정도의 친화성을 갖고 gp120에 결합한다. Galactosylcelebroside는 신경세포나 astrocyte, 일부의 대장암유래 세포주에서 발현되는 점에서 HIV가 *in vivo*에서 일부의 중추신경계세포에의 기능저해와 관계가 있음을 시사한다.

gp120의 V3 loop에는 중화항체의 주요결정영역이 존재하며, 또 HIV의 표적세포와의 친화성이나, tropism을 결정하는 중요한 영역이 있으므로 이 영역과 상호관계가 있는 세포측에 cofactor가 있음을 유추할 수 있다. V3 loop는 고도로 쉽게 변이가 일어나는 곳으로 중앙부의 GPGRAFqoduf, N말단, C말단의 Cys 잔기부근의 1차구조는 많은 HIV의 1차구조에서 보존되어 있다.

Berger 등에 의해 발견된 제2의 receptor, CXCR-4는 1659bp의 cDNA에 의해 코드되는 352개의 아미노산으로 구성된 단백으로써 G단백과 공역하여 세포막을 7회 관통하는 receptor family에 속하는 것으로 동정되었다. 초기에는 세포융합(fusion)의 의미를 부여하여 fusin이라 명명하였으나 그후 이물질은 SDF-1/PBSF와 동일물질임이 알려졌다. SDF-1이 CXC chemokine인 점에서 fusin은 CXCR-4로 불리워지게 되었고 이것이 coreceptor로 작용함은 CXCR-4 cDNA를 발현시킴으로써 Env에 의한 세포융합, HIV감염이 가능하다는 점, CXCR-4항체나 SDF-1이 Env를 개입한 세포융합이나 HIV감염을 저지함에 의해 확인되었다. CXCR-4의 발견에 이어 MIP-1α, MIP-1β, CCR-5, CCR-2b, CCR-3, STRL33(Bonzo), Bob, US28 등이 HIV의 coreceptor로 알려지게 되었다.

Receptor/coreceptor를 매개로 한 HIV의 세포내 침입기구

HIV의 세포흡착, 융합, 침입 등에는 CD4, coreceptor

CCR5, CXCR4, HIV gp120 등의 상호작용이 필요함이 알려졌으나 명확하지 않는 부분은 아직 많이 남아 있다. HIV-1의 감염이 CCR5, CXCR4의 ligand에 의해 저지된다거나, CCR5 ligand의 결합이 가용형 CD4와 gp120의 상호작용에 의해서 저지된다는 점 등이다. 또 gp120이 CD4에 결합함으로써 CCR5 ligand의 receptor에의 결합이 항진된다거나, 항CD4 항체 혹은 항gp120 항체에 의해서 CD4, gp120, CXCR4 등의 단백이 동시에 침전된다는 점이다. V3 loop나 CD4 결합에 의해 유도되는 epitope를 함유한 여러 가지 gp120의 부위에 대한 중화항체는 gp120과 CD4의 결합에 영향을 나타내지 않고 gp120과 CCR5의 결합을 저지한다. 만들어진 여러 가지의 gp120변형바이러스를 사용한 실험결과 V3영역이 CCR5를 개재한 HIV감염에 주요하다[6]. CCR-2b와 CCR5의 chimera receptor를 제작하여 HIV감염에 필요한 CCR5의 부위를 해석하였던 바 CCR5의 세포외의 복수의 부위와 HIV의 상호작용이 감염에 필요하였다[3]. 또한 제작한 receptor중에는 chemokine(ligand)결합 후의 세포내 signal 전달능은 없으나 HIV감염이 가능한 변이 receptor도 존재하였다. 이상의 실험결과 HIV의 gp120이 세포막에서 CD4와 결합하면 gp120의 V3영역의 입체구조 변화가 일어나 V3 loop가 노출된다. 이 V3 loop와 CCR5 혹은 CXCR4가 복수로 세포외 부분에서 결합이 일어나 gp120과 CD4 coreceptor의 복합체가 형성되므로써 HIV입자가 세포막에 흡착된다. 이어서 gp120과 회합한 gp41이 세포막을 통과하여 세포막과 바이러스입자막의 융합이 일어나 바이러스가 세포내에 침입하게 된다[16].

Receptor/coreceptor의 병증

바이러스의 숙주역은 장기 세포 친화성(tropism)에 의해 바이러스와 숙주의 상호작용에 의해서 결정된다. 그 가운데 바이러스의 세포에의 흡착 침입과정은 세포친화성 숙주역을 결정하는 가장 중요한 요인 가운데 하나이다. HIV도 예외는 아니다. 극히 은밀한 숙주역(HIV는 사람과 침팬지에만 감염한다)을 가지고 바이러스주에 따라서 다른 세포친화성을 나타낸다. HIV중에는 말초혈단핵구와 macrophage에 강한 친화성을 나타내나 세포 합포체 형성능이 결손된 형(M-tropic, NS형), 말초혈단핵구나 장기간 연구실에 유지시킨 T세포주에 의해 강한 친화성을 나타내어 합포체 형성능이 높은 형(T-tropic, SI형), 양쪽에 친화성을 나타내는 dual-tropic형 등이 존재한다. 감염초기에는 M-tropic, NSI형 HIV가 우위로 되나, 병이 진행함에 따라서 T-tropic, SI형이 우위로 된다. HIV의 tropism은 gp120의 V1, V2, V3영역 특히 V3 loop의 구조에 의해서 규정된다. 이에 대응하는 숙주측 인자가 불명하나 복수의 다른 coreceptor의 발견에 의해서 HIV의 tropism은 coreceptor가 어떻게 사용되는가에 따라 이해가 가능하게 되었다. 즉, M-tropic HIV는 CCR5를, T-tropic HIV는 CXCR4를 사용하여 세포에 흡착 침입하는 것으로 생각된다. 말초혈활성화 T세포에는 M-tropic HIV도 T-tropic HIV도 감염 가능하게 된 것이 알려져 있으나 coreceptor로서는 CCR5도 CXCR4도 발현되고 있으며 림프절의 수상세포(dendritic cell)도 CCR5, CXCR4 양쪽의 receptor를 발현하고 있음이 알려져 있다.

HIV에 노출되어 있음에도 불구하고 감염하지 않는 사람들 중에는 대립유전자의 양측 CCR5유전자에 이상이 있음이 발견되었다. 즉 CCR5 대립유전자의 한쪽에 32염기대 결손이 인정된 사람은 백인 10~20%에 달하나 드물게 존재하는 양측 유전자 이상에는 CCR5가 정상으로 발현하지 않기 때문에 HIV감염에 저항성을 나타낸다. 한편 유전자만의 이상이 인정되는 경우 HIV감염에 대한 저항성이라든가 감염후의 병의 진행에 미치는 영향에 관해서는 보고가 일정하지 않다. HLA class 1 및 2 에서 heterozygosity가 높으면 높을수록 AIDS의 진행이 늦었으며 이때 AIDS-associated 대립유전자 B*35 및 Cw*04의 어느 한쪽 또는 양쪽의 결손 빈도가 높은 코카사스인 환자의 경우 HIV-1 감염시 28-40 %가 생존을 연장하였으며 병의 진행이 지연된 결과를 얻게 되었다[1].

HIV 감염자에는 citomegaro virus(CMV)에 의한 감염이 때때로 나타나 이것이 HIV감염증과 어떤 연관이 있을것으로 추측되었다. CMV genome의 어떤 부분에서 code되는 chemokine receptor과 상동성이 있는 US28단백이 HIV-1감염에 있어서 coreceptor로서의 기능이 있음이 *in vitro*에서 증명되었다. *in vivo*에 있어서 US28의 발현 가능 HIV-1 감염병태에 있어서 역할의 검토는 금후의 주요한 과제중의 하나이나 2가지의 다른 병원성 바이러스가 협력하여 숙주에 침입한다라는 것은 아주 새로운 세포의 감염현상으로서 흥미 깊은 현상이다.

새로운 미사일 재제의 개발

미사일 제재는 VSV(Vesicular stomatitis virus)에 HIV의 생체내 공격 target인 T cell의 receptor CD4와 coreceptor CXCR4(*chemokine receptors*) 유전자를 삽입하여 제작한 재조합체 VSV를 생체내에 주입하면 HIV-1 infected cell이 VSV를 CD4 T-cell인양 착각하여 선택적으로 공격하게 되므로 상대적으로 CD4 T-cell에 대한 직접적인 공격을 회석하여 화를 면하게 된다는 원리이다. 왜냐하면 재조합체 VSV가 HIV의 target세포인 항체생산세포 CD4 T-cell과 같은 receptor를 보유하고 있기 때문이다. 그러나 실제 이 방법에서도 VSV의 막구조 및 성분양상에서 CD4 T-cell과는 다르기 때문에 선택적 공격성이 많이 회석되어 낮은 공격효과를 나타내었기에 향후 이에 대한 개선책이 요구되고 있다.

본 연구진에서는 현재 재조합체 VSV와 같은 공격용 virus를 제작을 위한 적합한 virus의 선정, CD4 및 CXCR4유전자와의 재조합체 virus 제작을 시도하여 이를 HIV 감염 환자에게 투여하므로써 HIV virus를 생체내에서 직접 공격하여 선택

적으로 파괴하는 재조합체 virus의 개발을 시도하고 있다.

에이즈 치료제의 개발

에이즈는 다제 병용요법이 효율적

HIV 감염증과 같이 서서히 진행하는 감염증에 대해서 항바이러스제를 사용한 화학요법이나 치료법은 급진전하고 있다. 에이즈는 치료가능한 만성감염성질환이라고 정의를 내린다. 그러나 에이즈에 대한 다제병용요법은 아직 확립되어 있지 않고 구미에서의 여러 가지 치료경험에서 얻어진 가이드라인도 아직 불완전한 상태이다. 치료는 면역응답능이 비가역적인 변화를 거쳐서 진행되므로 단제투여는 금기 꼭 다제병용을 하여야 한다는 점, 치료에는 CD4 세포수와 유혈중의 바이러스양을 지표로 하면서 바이러스의 증식을 검증한계 이하로까지 억제하면 가장 효과적인 치료법을 개발할 수 있다[11]. 치료가 성공하지 못한 경우나 약재내성의 효과가 상실될 경우에는 적절하게 다른 요법으로 변경하여야 한다. 그러나 다제내성 HIV-1주의 출현이나 HIV-1이 새로운 class의 항바이러스성 protease저해제에 대해서도 급속하게 내성을 발현한다라는 사실, 다제병용시의 부작용, 연명하더라도 충분한 면역응답능의 개선이 이루어지지 않는다는 점 등의 문제가 지적되고 있다. 또한 다제병용요법에서 폭증하는 의료비는 감염자 개인과 사회의 경제부담을 가속화시킨다.

역전사효소저해제의 종류와 그 응용

NRTI(nucleoside reverse trascriptase inhibitor)에는 3′-Azido-2′, 3′-dideoxythymidine(AZT, zidovudine), 2′, 3′-dideoxyinosine 등이 있다. 어느 뉴클레오시드계 역전사효소 저해제도 임상적으로 부작용이 있음으로 단제로써 사용하는 경우는 내성 HIV-1이 비교적 조기에 출현하기 때문에 처음 치료에 있어서는 다제병용요법이 빈번히 사용되어 왔다[9].

현재 개발중인 NRTI로서는 9-(2-phosphonyl-methoxyethyl)-adenine(PMEA, adefovir)와 그 pro-drug (bis-POM-PMEA), 내산성으로서 HIV-1이 내성을 발현하기 어려운 2′-β-fluoro-2′, 3′-dideoxyadenosine (F-ddA), 중추신경계에의 투과율이 양호한 159U89등이 있다. F-ddA는 미국립암연구소에서 실시중인 제1상 임상치료에서 양호한 항바이러스 활성이 인정되었으며, in vitro에서는 다제내성 HIV-1에 대해서도 양호한 항바이러스 활성을 발휘하였다 (Table 2). 1592U89는 단독투여나 바이러스 복제수를 1.5~2 log 감소시켰다. HIV-1는 in vitro에서 1592U89에 노출되면 RT에 M184V, K65R, L74V, Y115F등의 아미노산 치환을 일으키나 1592U89는 M184V 치환 HIV-1에 의한 병증에서도 양호한 항HIV활성을 나타내며 부작용도 비교적 약하였다.

미국에서는 두 종류의 NNRTI(non-nucleoside reverse trascriptase inhibitor)가 처방약으로 사용되고 있다. NEVIRPINE(NVP)는 극히 높은 항바이러스 활성을 시험관내에서 발휘하나 단독으로 투여하면 수주간에서 수백배 높은 내성을 나타내는 HIV-1변이주가 나타나 그 임상효과는 단기간에 소실한다. 그러나 NVP는 AZT와 DDI와의 병용에서 처음 치료환자에 투여하면 양호한 성적을 나타내어 1996년 9월 비뉴클레오시드계 역전사효소 저해제로서 최초의 항HIV-1재제로서 인가되었다. 본제는 여러 가지 약재의 대사에 투여하는 cytochrome p450-3A4의 발현을 항진시켜 특히 protease 저해제의 최고혈중농도나 AUC(area under curve)를 감소시키기 때문에 protease저해제와의 병용은 장려되지 않고 있다. 가장 빈도가 높은 부작용은 발진으로서 복약중지를 하여야 하는 경우도 있다. 미국에서는 또 하나의 NNRTI, delavirdine(U-90152T)가 NRTI와의 병용투여를 조건으로 인가되어 있다. NNRTI 한가지 약제와 NNRT 두가지 약제의 조합이 치료개시의 제1선택요법으로서 유용성을 나타내는가 그렇지 않는가는 구미에서 전개되는 임상치료효과의 결과를 지켜보아야 한다.

다제병용요법의 실시시기

HIV-1의 복제수가 검출한계이하로 된 환자에서 다시 HIV-1이 검출된 경우 특히 2000~5000copy/ml이상이 된다든가, CD4세포수의 감소나 임상증상의 악화가 다시 나타나는 경우, 또는 약의 부작용이 강하든가 복용하기 어려운 등의 어려운 문제점이 나타날 때에는 단제투여의 경우와는 다른 여러가지 다제병용요법으로 변경하여야 한다[8]. 일단 개시한 다제병용요법을 가급적 변경하지 않도록 유의해야 한다. 치료개시시 HIV-1복제수가 높은 경우는 2-4주까지 현저하게 감소하나 그 후 서서히 저하하여 최대효과가 얻어질 때까지 3-6개월이 걸리므로 항바이러스제의 종류가 한정되어 있는 현재 치료의 변

Table 2. 다제내성(MDR) HIV-1 clone의 F-ddA등의 역전사효소저해제에 대한 감수성[11]

아미노산치환	HIV-1 clone에 대한 IC50(μM)				조환형역전사효소에 대한 IC50(μM)		
	F-ddA	AZT	ddI	PMEA	F-ddATP	AZTTP	ddATP
야생HIV-1주	5.8(1×)	0.013(1×)	1.5(1×)	1.4(1×)	76(1×)	0.023(1×)	4.3(1×)
Q151M	5.0(0.9×)	0.17(13.1×)	2.7(1.8×)	N.D.	115(1.5×)	0.19(8.3×)	11(2.6×)
F77L/F116Y/Q151M	18(3.1×)	0.71(54.6×)	11(7.3×)	1.9(1.4×)	178(2.3×)	0.88(38.3×)	37(8.6×)
A62V/V75I/F77L/ F116Y/Q151M	14(2.4×)	2.1(162×)	20(13.3×)	1.4(1.0×)	204(2.7×)	1.5(65.2×)	38(8.8×)

경에는 충분한 배려가 필요하다.

에이즈 치료제 3TC의 개발

에이즈에 대한 항HIV재제는 주로 역전사효소나 protease 등 HIV유래의 효소나 기능을 표적으로 하여 개발되어 왔다. 그 결과 AZT나 3TC 등의 역전사효소 저해제나, saquinavir, indinavir등의 protease저해제가 개발되어 이를 병용하므로써 병의 진행을 막을 수 있었다. AZT(Zidovudine, Retrovir, 3-azido-3-deoxythymidine)는 항 바이러스 활성은 좋았으나 강한 세포독성이 수반되었다. 여기에 3TC [Lamivudine, (2' R-cis)-2' -deoxy-3' -thiacytidine]를 AZT와 병용할 경우 항 바이러스 활성은 상승, 세포독성은 감소시키는 현저한 효과가 있었다(European Patent 9294006944). 또 protease 저해제인 indinavir를 병용 투여하였을 경우 20,000-1,000,000 RNA copies/ml of plasma까지 세포내 HIV virus가 저하하여 1년이상 유지됨이 90%이상의 환자에서 보고되었다. 3TC는 영국의 Glaxo회사에서 새로이 제품화되어 기존의 약제와의 복합처방에 의한 탁월한 치료상승효과가 인정되고 있으나[13] 값이 비싸서 그 생산과정에서 20여 단계의 화학합성 공정이 소요되므로 효소에 의한 염가의 생산공정 개발이 절실히 요구된다.

효소 cytidine deaminase 에 의한 3TC의 생산

본 연구진에서는 단기적으로는 항 HIV재제인 3TC의 생산공정에서 극한 내열성 *cdd gene*의 재조합체에 의한 cytidine deaminase(CDase)를 증폭생산 처리함으로써 기존의 *E. coli* 의 CDase를 사용한 방법보다 저렴하게 3TC를 생산하고자 하였다. HIV복제 저해능은 주로 핵산합성과정의 인산디에스테르결합이 방해되므로서 야기된다. 이때 리보스 3위치의 탄소 대신에 유황으로 치환하여 인산디에스테르결합이 일어날 수 없도록 하므로써 HIV의 복제가 차단되도록 한 것이 3TC이다.

이 3TC를 생산한 Glaxo회사는 합성공정에서 얻어진 3TC의 (+),(-)혼합이성체로부터 독성이 강한 (+)이성체는 제거하고 약효가 높은 (-)이성체만의 분리를 위해 *E. coli* 의 CDase를 사용하였다[10]. 본 연구에서는 이 단계에서 *E. coli*가 아닌 극한내열성균 *Methanococcus kandreli*(생육적온 100 C) 또는 Bacillus caldolyticus(75 C)의 CDase를 이용하므로써 그 정제과정의 단순성에 의해 3TC 생산비의 현저한 절감을 야기하고자 하였던 것이다. 3TC 전구체, 즉 (+),(-) 광학 이성체의 혼합물에 극한 내열성의 CDase를 처리함으로써 (+),(-)전구체로부터 (+)이성체만의 선택적인 deamination을 시도하였든 바 (-)이성체 즉, 3TC를 수율이 상당히 높게 얻을 수 있었다. 유전자 재조합체에 의한 극한 내열성 cytidine deaminase의 생산, 상세한 deamination조건 설정 및 deamination수율의 향상, 고순도의 (-)3TC제품의 생산 등이 현재 수행중에 있다.

특히 본 물질의 생산에 중요한 역할을 나타내는 CDase의 코딩유전자 cdd는 본 연구자가 Copenhagen대학부설 분자생물학연구소에서 *B. subtilis*로 부터 chromosomal mapping과 cloning, sequencing을 발표한 이래[18], 내열성균 *B. stearothermophilus*, 장내세균 *E. coli*, 및 *S. typhimurium* 등의 균으로 부터 동일한 cdd 유전자를 분리하여 그 효소학적 성질을 검토하였다. 그 후 *E. coli*의 *cdd* 유전자가 cloning, sequencing되었으며, 급기야는 결정화에 따른 3차 구조까지 발표되었다[24]. *E. coli, S. typhimurium, B. subtilis, B. stearothermophilus* 등의 CDase는 각각 33kDa, 27kDa, 14kDa 및 14kDa 이었으며, Stokes radius 및 sucrose density gradient centrifugation으로 측정한 native 상태의 분자량은 62kDa, 60kDa, 58kDa 및 58kDa. 등으로 나타났음을 볼때 enteric bacteria의 CDase는 dimer, Bacillus에서는 tetramer로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 기원이 다른 각 균주의 *cdd gene*의 sequence homology는 *B. subtilis*와 *B. stearothermophilus*에서 약 70%를 나타내었다.

결 언

HIV/AIDS의 기원과 진화 및 그 유전자 발현 조절 측면에서 관련 치료제의 개발에 대하여 고찰하여 보았다. HIV 연구의 전개는 사회적 요청이나 연구에 흥미도에 있어서 절대적이라 할 수 있으며 하나의 현상이 밝혀지면 이를 바탕으로 속속 새로운 사실들이 밝혀져서 가까운 장래에 그 치료법이 개발될 것으로 전망된다. 특히 HIV 체내 동태가 보다 선명하게 이해되었다는 점, HIV-1의 second receptor가 발견되었다는 점, HIV 요법의 진보 등의 큰 진전과 아울러 이들 변이된 바이러스의 폭발적인 증식을 가능하게 하는 기구를 정리하고 그 극복방안을 치료의 표적 측면에서 논하여 보았다. 특히 HIV-1감염증의 임상형태는 최근의 항바이러스제에 의한 화학요법과 치료법의 급속한 진보에 의해서 현저하게 변모하고 있다. 실제 치료에 있어서 화학요법을 감염의 어느 시기에 개시하면 최대의 효과가 얻어지는가? 적절한 병용요법을 부여함으로써 내성발현을 저지할 수 있는가? 등의 문제가 클로즈업 되고 있다.

에이즈 치료과정에서 내성 바이러스의 출현, 고가의 치료비, 부작용 등 해결해야 할 문제들이 적지않다. AIDS의 병태는 HIV와 면역응답의 사령관적인 역할을 하는 CD4세포의 수에 다이나믹한 전법으로 조절하여야 함이 확인되었다. HIV 생산량과 CD4 세포의 생산량은 어느 평형상태에서의 상호간의 전술의 차이에 기인한다고도 할 수 있다. 감염자 체내에서는 1일당 10^{10}개의 HIV입자가 새롭게 바뀌어 지고 있다. 체내에서의 전체량은 약 $0.24X10^{10}$개이므로 하루에 4회전하는 정도로 대량의 HIV가 생산되고 있는 셈이 된다. 이에 대응하여 CD4 세포의 증식도 촉진되고 있으며 세포주기의 회전은 HIV의 CD4 세포에의 감염을 촉진하고 CD4 세포의 turnover가 촉진되는

상황에서는 바이러스 감염도 촉진된다. 그 결과 에이즈는 정상 상태라 하드라도 수년 혹은 10년 정도 경과하면서 병증이 진행하게 된다. HIV의 폭발적인 증식에 따라 준종(quasispesis), 즉 다양성이 풍부한 바이러스 집단이 체내에 축적하므로써 약제 내성 바이러스가 발생하게 되는데 이러한 요인들이 왁친이나 면역학적인 예방이나 치료 방법을 어렵게 하고 있다. HIV 증식의 분자기구를 명확하게 하여 이를 억제하는 수단을 새로이 개발하는 의의가 여기에 있다.

최근 수년간 HIV감염증의 임상 예는 항바이러스제에 의한 화학요법과 감염증에 대한 치료법의 급속한 진보에 따라 현저하게 변모하였다. 그러나 실제 치료의 분야에서 적절한 다제 병용요법은 가장 효과적이다. 현행 에이즈의 화학요법에서 3제 병용도 일시적인 것으로서 장래에는 protease 2제에 NRTI 2제 혹은 NRTI 1제와 NNRTJ 1제, 계 4제를 사용한 다제병용이 도입될런지도 모른다. 여하튼 HIV의 내성발현과 한정된 항바이러스 활성 등의 한계를 생각하면 다수의 역전사효소 저해제, protease저해제, 제3, 제4의 새로운 class의 항바이러스제의 개발이 수행되어야만 에이즈의 완전한 치료가 가능할 것이다.

참고문헌

1. Carrington, M., G. W. Nelson, M. P. Martin, T. Kissner, D. Vlahov, J. J. Goedert, R. Kaslow, S. Buchbinder, K. Hoots, and S. J. O'Brien. 1999. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* **283**: 1748-1752.
2. Delwart, E. L., H. Pan, A. Neumann, and M. Markowitz. 1998. Rapid, transient change at the env locus of plasma human immunodeficiency virus type 1 populations during the emergence of protease inhibitor resistance. *J. Virol.* **72**: 2416-2421.
3. Doranz, B. J., Z.-H. Lu, J. Pucker, T.-Y. Zhang, M. Sharron, Y.-H. Cen, Z.-X. Wang, H.-H. Guo, J.-G. Du, M. A. Accavitti, R. W. Doms, and S. C. Peiper, 1997. Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **71**: 6305-6314.
4. Gohda, K., K.-I. Oka, K.-I. Tomita, and T. Hakoshima. 1994. Crystal structure of RNase T1 complexed with the product nucleotide 3'-GMP. *J. Biol. Chem.* **269**: 17531-17536.
5. Han, G. W., M. L. Kopka, D. Cascio, K. Grzeskowiak, and R. E. Dickerson. 1997. Structure of a DNA analog of the primer for HIV-1 RT second strand synthesis. *J. Mol. Biol.* **269**: 811-826.
6. Hill, C. M., H. Deng, D. Unutamz, V. N. Kewalramani, L. Bastiani, M. K. Gorny, S. Zolla-pazner, and D. R. Littman. 1997. Envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus types 1 and 2 simian immunodeficiency virus can use human CCR5 as a coreceptor for viral entry and make direct CD4-dependent interactions with this chemokine receptor. *J. Virol.* **71**: 6296-6304.
7. Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, and M. Markowitz. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**: 123-126.
8. Lafeuillade, A., C. Poggi, C. Tamalet, N. Profizi, C. Tourres, and O. Costes. 1997. Effects of a combination of zidovudine, didanosine, and lamivudine on primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Infectious Diseases* **175**: 1051-1055.
9. Larder, B. A., S. D. Kamp, and P. R. Harrigan. 1995. Potential mechanism for sustained anticreational efficacy of AZT-3TC combination therapy. *Science* **269**: 696-699.
10. Mahmoudian, M., B. S. Baines, C. S. Drake, R. S. Hale, P. Jones, J. E. Piercey, D. S. Montgomery, I. J. Purvis, R. Storer, M. J. Dawson, and G. C. Lawrencel. 1993. Enzymatic productidn of optically pure(2'R-*cis*)-2'-deoxy-3'-thiacytidine (3TC, Lamivudine): a potent anti-HIV agent. *Enzyme Microbiol. Technol.* **15**: 749-755.
11. Mitsuya, H. 1997. Recent advance and challenges in the therapy of AIDS. *Experimental Medicine* **15**: 2295-2301.
12. Okamoto, T. 1997. Regulation of HIV gene expression by Yat, Rev and NF-κB. *Experimental Medicine* **15**: 2265-2272.
13. Piras, G., M. Makino, and M. Baba. 1997. Sho-saiko-to, a traditional kampo medicine, enhances the anti-HIV-1 activity of lamivudine(3TC) *in vitro*. *Microbiol. Immunol.* **41**: 835-839.
14. Rezende, L. F., K. Curr, T. Ueno, H. Mitsuya, and V. R. Prasad. 1998. The impact of multidideoxynucleoside resistance-conferring mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase on polymerase fidelity and error specificity. *J. Virol.* **72**: 2890-2895.
15. Siliciano, R. F. 1995. CD4-positive T cell responses to HIV-1 infection. In Karn J. (ed.), HIV I. IRL Press, Oxford UK. pp. 221-227.
16. Uchiyama, T. 1997. HIV receptor/coreceptor. *Experimental Medicine* **15**: 2273-2277.
17. Schnell, M. J., J. E. Johnson, L. Buonocore, and J. K. Rose. 1997. Construction of a novel virus that targets HIV-1 infected cells and controls HIV-1 infection. *Cell* **90**: 849-857.
18. Song, B.-H., and J. Neuhard. 1989. Chromosomal location, cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis cdd* gene encoding cytidine/deoxycytidine deaminase. *Mol. Gen. Genet.*, **216**: 462-468.
19. Wei, X., S. K. Ghosh, M. E. Taylor, V. A. Johnson, E. A. Emini, P. Deutsch, J. D. Lifson, S. Bonhoeffer, M. A. Nowak, B. H. Hahn, M. S. Saag, and G. M. Shaw. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1

infection. *Nature* **373**: 117-122.

20. Wu, X., H. Liu, H. Xiao, J. A. Conway, E. Hunter, and J. C. Kappes. 1997. Functional RT and IN incorporated into HIV-1 particles independently of the Gag/Pol precursor protein. *EMBO J.* **16**: 5113-5122.
21. Wyatt, R, and J. Sodroski. 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens, *Science* **280**: 1884-1888.
22. Yamamoto, N. 1997. Recent development of HIV researches. *Experimental Medicine* **15**: 2262-2263.
23. Yamaguchi, Y., K. Ikeo, and T. Kojobori. 1997. Origin and evolution of HIV. In Abe (ed.), *Advanced Research of AIDS*. pp. 19-27, Yodosha Co., Toyocho.
24. Yang, C., D. Carlow, R. Wolfenden, and S. A. Short. 1992. Cloning and nucleotide sequence of the *Escherichia coli* cytidine deaminase (*cdd*) gene. *Biochemistry* **31**: 4168-4174.
25. ACTIS and ATIS. 1998. HIV/AIDS treatment information service: database search.

여 백

총설

Eicosapentaenoic Acid(EPA) 및 Docosahexaenoic Acid(DHA)의 특성, 생리작용 및 그 응용성

김종국[1] · 한명숙[2] · 김사열[2] · 송방호[2]*
경북대학교 [1]미생물학과, [2]생물교육과

총설

Eicosapentaenoic Acid(EPA) 및 Docosahexaenoic Acid(DHA)의 특성, 생리작용 및 그 응용성

김종국[1] · 한명숙[2] · 김사열[2] · 송방호[2]*
경북대학교 [1]미생물학과, [2]생물교육과

지난 사반세기 동안 역학조사, 임상적인 연구 및 동물실험을 통하여 건강과 질병에 있어서 기능성 식품(functional foods)으로서의 불포화지방산에 대한 이해의 정도는 날로 확장되어 온 추세이다. 이 분야에 대한 연구와 지식의 발전은 prostaglandin 물질대사, 막 구조와 기능, 불포화지방산의 유전자 발현에 대한 역할 및 에스키모인들에 대한 역학조사 등에서 비롯되었다[1]. 1970년대 초반에 시작된 덴마크의 Dyerberg 그룹의 역학조사 결과 에스키모인들에게 동맥경화, 뇌경색, 심근경색 등의 질병 발생율이 매우 낮은 것은 그들이 생선과 바다표범을 주식으로 하는 것과 연관이 있으며, 그것은 고도불포화지방산과 깊은 관련이 있음을 알게 되었다[2]. 그후, 일본, 미국 등지에서도 비슷한 역학조사의 결과가 나옴으로써 고도불포화지방산에 대하여 다양한 측면에서 관심이 집중되기에 이르렀다.

고도불포화지방산의 중요성이 재기됨과 동시에 그것을 무엇으로부터 어떻게 확보하느냐 하는 것도 중요한 과제가 되었다. 그 중에서도 eicosapentaenoic acid(EPA)와 docosahexaenoic acid(DHA)는 특이하게도 화학 합성이 용이하지 못하여 천연물에서 얻어져야 되는데, 지금까지 산업적으로 이들 고도불포화지방산은 주로 고등어, 꽁치, 참치, 전갱이, 정어리, 청어 등과 같은 등이 푸른 생선의 기름에서 추출되어 왔다. 흔히 어유의 지방산은 먹이사슬에 의하여 해양미생물, 즉 조류나 식물성 플랑크톤으로부터 기원하는 것으로 알려져 있다[3]. 그러나 일부 연구자들은 먹이사슬을 통해서 뿐만 아니라 등푸른 어류의 장내에서도 EPA 생산균이 공생하리라고 예측하였다. 그에 따라 각종 어류와 해양동물의 장내에서 세균을 분리 배양하여 EPA 생산능력을 검사한 결과 실제로 많은 종류의 EPA 생산균이 분리되었다[4, 5]. 조류의 경우, 해조류(marine algae)가 고도불포화지방산의 함량이 높고, 담수조류(freshwater algae)는 몇몇 종류만이 EPA 함량이 높은 것으로 관찰되었다(Table 1 참고). EPA의 함량이 높은 조류로 Bacillariophyceae에 속하는 *Phaeodactylum tricornutum* 및 Rhodophyceae에 속하는 *Porphyridium cruentum* 등이 있으며, EPA와 DHA가 동시에 함량이 높은 조류로는 Chrysophyceae에 속하는 *Isochrysis galbana*가 보고되었다[6, 7]. 현재는 생물공학기술을 이용하여 박테리아나 조류에서 EPA와 DHA를 대량 생산하려는 연구가 활발히 진행되고 있다[8, 9].

EPA 및 DHA의 생합성

고도불포화지방산(highly unsaturated fatty acid, HUFA)이란 불포화지방산 가운데에서 특히 이중결합을 4개 이상 가지는 다가불포화지방산(polyunsaturated fatty acid, PUFA)으로서 arachidonic acid(AA), EPA, DHA 등이 있다(Fig. 1). EPA 또는 DHA는 지방산의 말단 메칠기에서 세 번째와 네 번째 탄소원자 사이에서 첫 번째의 이중결합이 시작되므로 ω-3(또는 n-3) 지방산이라 하며 이는 타의 지방산 ω-6(또는 n-6)와는 구별된다. ω(omega)명명법은 Ralph Holman 박사에 의해 처음 주창

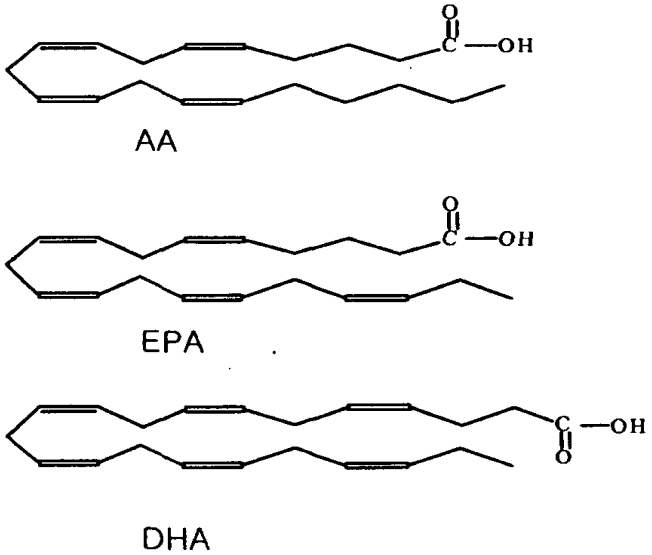


Fig. 1. Structural formulas for saturates, ω-3 and ω-6 fatty acids. Abbreviations: AA, arachidonic acid (all-*cis*-9, 12, 15-octadecatrienoic acid); EPA, (all-*cis*-5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acid); and DHA, (all-*cis*-4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoic acid).

Table 1. Production of EPA/DHA by fungi and algae

Source		% of total fatty acid:	
Division/Class	Species	EPA	DHA
Fungi			
Oomycota	*Thraustochytrium aureum*	6	34
Algae			
Rhodophyceae	*Batrachospermum* sp.	52	–
	Corallina officinails	52	–
	Gloiopeltis furcata	47	–
	Gracilaria. gigas	38	–
	Laurencia pinnatifida	35	–
	Odonthalia dentatya	38	–
	Porphyra yezoensis	52	–
	Porphyridium cruentum	36	–
Dinophyceae	*Amphidinium carteri*	20	24
	Gonyaulax polyedra	14	23
	Peridinium triquentum	2	19
Bacillariophyceae	*Bidulphia anrita*	26	–
	Nitzsyhia angularis	21	–
	Phaeodactylum tricornutum	25	–
Phaeophyceae	*Ectocarpus confervoides*	–	24
	Hizikia fusiformis	–	12
	Sargassum hornerii	–	17
	Undaria pinnatifida	–	12
Xanthophyceae	*Monodus subterneus*	31	–
	Tribonema aequale	29	–
Haptophyceae	*Hymenomonas carterae* Plymouth 156	9	16
	Pavlova lutheri	19	7
Chrysophyceae	*Isochrysis galbana* Plymouth1	3	11
Eustigmatophyceae	*Nannochloropsis oculata*	45	–
Chlorophyceae	*Dunaliella tertiolecta*	10	–
	Cladophora albida	12	–

Adapted from Araki & Kayama [81].

된 후 1985년 "The Health Effects of Polyunsatulated Fatty Acids in Seafoods"에 관한 학회에서 "n-" 보다는 "ω-"란 기호로써 이중결합을 표시하는 오메가 명명법을 쓰기로 결정하였으나 일부에서는 아직도 "n-" 명명법이 혼용되고 있다.

생물계의 지방산 생성을 보면 대부분의 세균은 포화된 C_{16}, C_{18} 지방산과 단일불포화지방산을 생성하나, 동물과 식물은 C_{16}과 C_{18}의 포화지방산과 C_{18}과 C_{20}의 불포화지방산을 동시에 생성하는 경우가 많다. 포유동물에서는 linoleic acid(18:2 ω-6)와 α-linolenic acid(18:3 ω-3)를 생성하지 못하나 이들이 다른 지방산의 합성에 필요한 전구체이기 때문에 반드시 외부로부터 섭취해야만 하는 필수 지방산으로 간주이다.

고도불포화지방산은 *de novo* 생합성, chain elongation, desaturation 등의 3가지 다른 경로로 합성된다. de novo 생합성 체계는 acyl carrier protein(ACP)를 요구하고 acetyl-CoA로부터 유도되는 이탄소 단위들의 연속적인 첨가에 의해 최종산물로 palmitoyl-과 palmitoleoyl-acyl carrier protein을 생성한다. Chain elongation 반응도 역시 ACP를 요구하는데 *de novo* 생합성을 통하여 생성된 palmitoyl-, palmitoleoyl-, stearoyl-, oleyl-CoA 등에 탄소가 두개씩 첨가되어 사슬길이가 늘어난 acyl-ACP가 생성된다(Fig. 2). Desaturation 반응은 혐기적 및 호기적 경로가 있는데, 혐기적 경로에서는 hydroxy decanoyl thioester dehydrase에 의하여 탈수 반응과 이중결합 이성질화가 일어나는 비 산화경로이다. 호기적 경로에서는 완성된 acyl chain에서 두 개의 수소가 제거되는 반응으로써 O_2, NADPH, NADH 등이 요구되며 이때 작용하는 desaturase는 그 기원에 따라 다른 기질 특이성을 가진다. 세 가지 다른 종류의 aerobic desaturase로 포유동물에서의 acyl-CoA desaturase[10], 식물에서의 acyl-ACP desaturase[11], 조류[12]와 cyanobacteria[13]에서의 acyl-lipid desaturase 등을 들 수 있다. 이들은 모두 동일하게 acyl-acyl carrier protein을 기질로 반응하며 ferredoxin과 ferredoxin $NADP^+$ reductase의 공존시에는 그 활성이 증가한다[14].

고도불포화지방산인 EPA와 DHA는 이중결합을 가진 지방산 전구체로부터 호기성 조건하의 desaturation 경로를 통하여

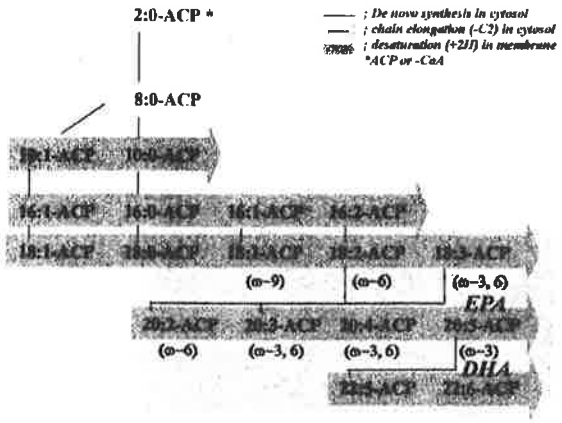


Fig. 2. Pathways of polyunsaturated fatty acids synthesis in microorganisms. Figure adapted from Watanabe *et al.* (14). Abbreviations: ACP, acyl carrier protein; CoA, coenzyme A; 16:0, palmitic acid; 18:0, stearic acid; 18:1, oleic acid; 18:2, linoleic acid; 18:3, linolenic acid; 20:4, arachidonic acid; 20:5, eicosapentaenoic acid; and 22:6, docosahexaenoic acid.

생성되는데[14], 이 과정은 대장균에서 생성되는 ω-7의 monoenoic fatty acid를 생성 경로와는 다르다(Fig. 2, 3). 즉, ω-3 경로에서 oleic acid로부터 desaturation에 의해서 linoleic acid(18:2 ω-6)를 거쳐 α-linolenic acid(18:3 ω-3)로 전환되는데 이중결합의 위치는 oleic acid의 12, 13 위치와 15, 16 위치에서 생긴다. Chain elongation과 2회의 desaturation이 계속 진행되면서 all-*cis*-5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acid(EPA)를 생성한다. 이러한 경로로 지방산이 합성되는 것은 적조류인 *Porpiridium yezaensis narawaaensis*에서 주로 나타난다[15]. 또한 *Mortierella alpha*[16], *Chaetoceras gracilis, Chlorella stimatophora, Nannochlopsis salina, Chlorella* sp. 및 *Crypthecodinium cohnii* 등에서도 이와 동일한 경로로 지방산이 합성된다[17, 18]. DHA는 EPA로부터 chain elongation 및 desaturation에 의해서 생성되는 것으로 추정된다. 또한, ω-6 경로는 AA까지의 생산 경로로써 역시 두 가지 반응으로 일어나지만 부가적인 이중결합은 분자의 carboxy 말단 쪽에서 도입된다. AA는 두가지 다른 경로에 의해 합성된다. Desaturation에 의하여 linoleic acid로부터 γ-linolenic acid(18:3 ω-6)가 생성된 후 chain elongation과 desaturation에 의해 AA(20:4 ω-6)를 생성하는 경로와, carboxy 말단의 desaturation 결과 얻어진 linoleic acid가 elongation을 통하여 11,14-eicosadienoic acid를 생성한 후, ω-6경로를 경유하여 AA가 합성되는[19, 20] 경우를 들 수 있다. 전자는 Cryptomonad인 *Orchromonas danica*, 적조류인 *Prophyridium cruentum*[19]에서 주로 일어나며, 후자는 Euglenoids인 Euglena gracilis와 Asteria longa에서 주로 일어나는 반응이다.

EPA나 ω-3 지방산들의 대사는 순환계에서 여러 가지 prostaglandin(PG), thromboxanes(TX), leucotrienes(LT) 등의 eicosanoid

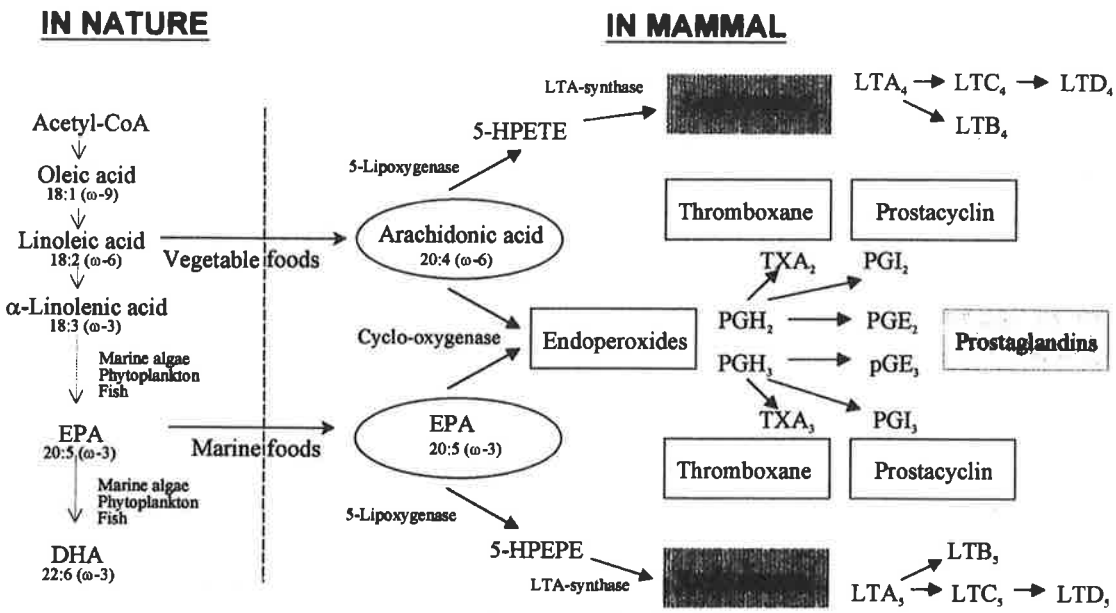


Fig. 3. Metabolic pathways of omega-3 and omega-6 fatty acids and oxidative metabolism of arachidonic acid and EPA in mammal. Abbreviations: EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid; 5-HPETE, 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid; and 5-HPEPE, 5-hydroxyeicosapentaenoic acid. Figure adapted from Simpoulos [1] and Bajpai and Bajpai [7].

로 전환되어 대부분의 질환에 대한 치료와 예방효과가 있다.

AA 유래의 혈소판 응집제인 thromboxane A_2(TXA_2)의 합성은 EPA에 의하여 저해되나, 한편 약한 응집제인 thromboxane A_3(TXA_3)는 EPA가 전구체가 되어 합성이 촉진되기도 한다(Fig. 3). 또 prostaglandin I_3(PGI_3)로 전환되는 prostaglandin$_3$(PG_3)는 강력한 항응집제로서 혈관벽에서 EPA로부터 생합성된다[21]. AA로부터 5개 또는 6개 원자로 되어 있는 고리상 구조의 TX와 PG는 "cyclic" 경로로, 직선 구조인 LT는 "linear" 경로로 합성되는데, 전자는 aspirin(acetylsalicylate), ibuprofen등에 의하여 저해되고, 후자는 이들에 의하여 저해되지 않는다. 이와같이 ω-3 지방산에 의해 유도합성되는 여러 가지 호르몬성 eicosanoid는 혈액점도를 낮추고 막 유동성과 변형성을 증가시키는 생리활성이 있다.

DHA 및 EPA의 생리기능 및 임상효과

1970년대에 에스키모인을 대상으로 한 역학조사가 시발이 되어 깊은 관심을 끌어 온 고도불포화지방산중 EPA가 1990년에 일본에서 의약품으로 개발되기에 이르렀다. 정어리의 어유로부터 순도를 90% 까지 높인 EPA ethylester는 폐색성 동맥경화증에 대한 효과로 인하여 시판되었고, 4년후 동맥경화 예방개선제로서 승인을 받았으며 임상의들로 부터도 부작용이 적으면서 사용하기 쉬운 의약품으로 평가되어 그 시장은 날로 확대되어 오고있다.

어유에 함유된 또 하나의 중요한 고도불포화지방산은 DHA인데, 이는 사람 뇌의 전두엽에 있는 회백질에 존재하는 인지질 즉, phosphatidyl ethanolamine(PE) 및 phosphatidyl serine(PS)과 같이 혼합되어 DHA가 20-25% 정도 함유되어 있었다. 이 인지질에는 EPA가 존재하지 않았으며, 망막에도 동일한 지방조성으로 구성되어 있으므로, DHA는 뇌 및 망막과 관련된 고유한 생리활성을 갖고 있으며, 이를 주목하는 것은 당연하다고 볼 수 있다[22].

그러한 점에서 1970년대 이래 불포화지방산의 기능성에 관해 다양한 측면에서 연구가 진행되어 온 것은 필연적인 결과이다. 사실 불포화지방산의 생물학적 및 기능적 효과는 관상심장질환, 고혈압, 비인슐린성 당뇨병, 감염성 및 자동면역 질환, 그리고 아마도 암 등에서 근원적으로 이로운 물질대사의 인자로서 적지않은 영향이 나타나고 있다[23, 24, 25, 26].

Fig. 3에 표시한 바와 같이, 불포화지방산인 EPA와 AA는 포유동물의 체내에서 일반적으로 PG, prostacyclin 등이 포함된 prostanoid와 LT가 포함된 eicosanoid로 대사된다. EPA에서 유래한 것은 3-시리즈의 prostanoid, 5-시리즈의 leukotriene인 반면에, AA에서 유래한 것은 2-시리즈의 prostanoid와 4-시리즈의 leukotriene으로 알려져 있다.

고도불포화지방산이 많이 함유된 음식으로부터 EPA를 섭취하면 실질적으로 모든 세포에 있는 막 인지질(phospholipid)의 AA를 대체하게 된다. 그래서, 생선, 생선기름 혹은 해조류 등으로부터 EPA와 DHA를 섭취하면 항혈전성, 항주화성, 항혈관수축성 및 항염증성 등을 나타내는 leukotriene과 prostanoid 생성에 의하여 특정한 생리상태로 된다[27, 28]. ω-3 지방산이 eicosanoid만을 통하여 여러 가지 만성질환에 영향을 미칠 수 있다는 사실은 긍정적인 것으로 받아들여지고 있다.

혈관계 질환에 대한 효능

고도불포화지방산은 지질을 감소시키는 효능(hypolipidemic

Table 2. Effects of ω-3 fatty acids on factors involved in the pathophysiology of atherosclerosis and inflammation

Factor	Function	Effect of ω-3 fatty acid: increase	decrease
Arachidonic acid	Eicosanoid precursor; aggregates platelets; stimulates white blood cells		V
Thromboxane A_2	Platelet aggregation; vasoconstriction; increase of intracellular Ca^{++}		V
Prostacyclin ($PGI_{2/3}$)	Prevents platelet aggregation; vasodilation; increase cAMP	V	
Leukotriene (LTB_4)	Neutrophil chemoattraction; vasodilation; increase of intracellular Ca^{++}		V
Platelet activating factor (PAF)	Activates platelets white blood cells		V
Oxygen free radicals	Cellular damage; enhance LDL uptake via scavenger pathway; stimulate arachidonic acid metabolism		V
Lipid hydroperoxides	Stimulate eicosanoid formation		V
Interleukin 1 and tumor necrosis factor	Stimulate neutrophil O_2 free radical formation; stimulate lymphocyte proliferation; stimulate PAF; express intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells; inhibit plasminogen activator-thus procoagulants		V
Endothelial-derived relaxation factor (EDRF)	Reduces arterial vasoconstrictor response	V	
VLDL	*Related to LDL and HDL level*		V
HDL	Decreases the risk for coronary heart disease	V	

Adapted from Simopoulos [1].

effect)이 있다. 실제로 생선 혹은 생선기름 속에 함유된 EPA와 DHA를 섭취하면 vascular low density protein(VLDL)의 생성이 감소되어 세포내 triglyceride의 수준을 저하시킨다고 알려져 있다(Table 2) [7, 29]. 매일 20 g에 해당하는 다량의 ω-3 지방산을 섭취하면 high density lipoprotein(HDL)은 줄지 않으나 혈청의 콜레스테롤 양은 저하시킬 수 있다고 한다. 이와 상반되게 ω-6 지방산은 HDL 콜레스테롤을 지속적으로 감소시켜 관상심장질환에 걸리지 않도록 해주는 효과가 있다.

Table 2에 표시하였듯이, 생선기름의 항혈전적 효과(antithrombotic effect)는 혈소판 응고감소[30], TXA_2 저하[31] 및 PGI_2와 PGI_3 생성 증가[31], 전체 혈액의 점성저하[32] 등에 의하여 출혈시간을 증가시켜 주기 때문으로 해석되었다[30, 33]. 만약 우리가 ω-6 지방산이 다량 함유된 음식을 취하게 되면, Fig. 3에 표시된 경로대로, 체내에 AA로 부터의 eicosanoid 대사 산물, 특히 PG, TX, LT, hydroxy fatty acid 및 lipoxin 등이 대량으로 합성되며, EPA와 같은 ω-3 지방산으로부터 합성되는 eicosanoid가 상대적으로 적게 된다. AA로 부터합성되는 eicosanoid는 극히 적은 양만으로도 생물학적인 활성이 나타난다. 만약 다량이 생성되면 혈전과 피부에 atheroma가 형성되고, 민감한 사람에게는 알레르기성 및 염증성 질병이 유발되며, 세포의 증식에도 기여하게 된다[29]. 그래서 많은 양의 ω-6 지방산이 섭취될 시에는 혈액 점성, 혈관경련 및 혈관수축현상 등이 증가되고 출혈시간이 감소되는 prothrombus 및 pro-aggregation의 증세가 나타나는 것이다. EPA와 DHA는 혈압강하 효과(hypotensive effect)가 있어서 고혈압 환자의 혈압을 낮추어 준다. 아마도 그것은 내피세포층 유래 완화인자(endotherial-derived relaxing factor : EDRF)의 생성물인 PGE_2를 감소시키고[34] PGI_2를 증가시키기 때문이다[35]. 실제적으로 다량의 생선기름으로 영양을 보충하면 최고혈압 6 mmHg, 최저혈압 3 mmHg 정도를 감소시키는 것으로 보고되었다[36]. 이 경우에도, 평상식에 매주 3번 정도 생선을 먹은 실험대상자의 평균 혈압은 그다지 변화하지 않았고, 습관적으로 훨씬 많은 양의 생선을 섭취한 대상자에 있어서는 혈압이 기준선 이하로 내려 갔다. 이와 같이 일차적인 예방의 관점에서 일상적으로 생선유를 섭취하는 것은 매우 중요한 것이다.

ω-3 지방산을 섭취하면 혈관의 재협착(restenosis)을 방지한다고 알려져 있다. 재협착은 주로 혈소판 응고, 평활근 세포의 증식 및 관상 혈관경련 등에 의하여 야기된다. 비록 혈관성형술의 성공률은 높지만, 흔히 시술후 약 6개월이 지나면 확장된 병변의 25-40%에서 재협착이 일어난다. 이 경우 수술 전후에 ω-3 지방산을 다량 섭취시 재협착 예방의 효과가 인정되었고[37, 38], 수술 3주전에 EPA와 DHA 복용시에도 재협착이 감소되었다[39].

동물 실험에서 생선기름의 섭취는 부정맥(arrhythmia) 질환의 발생을 막거나 감소시키기도 한다[40]. 보통 부정맥은 인간의 급격한 사망과 관련이 있다고 알려져 있는데, 생선 혹은 생선유가 돌연사를 감소시킴이 확인되었다[41]. 신생쥐의 근세포 배양액에 EPA와 DHA를 15 μM 농도로 첨가하면 세포 속에서 EPA는 0.2%에서 7.6%로, DHA는 1.2%에서 6.5%로 각각 그 농도가 확실히 증가하였다. 부정맥형성제인 isoproterenol이나 고농도의 칼슘을 배양세포에 처리하면, EPA와 DHA의 처리에 의한 항부정맥 효과가 상쇄된다는 보고도 있었으나[42], 이때에도 unesterified 형태의 ω-3 지방산만은 심근세포를 부정맥 유도로부터 방어할 수 있음이 보고되었다.

항염증 효과

EPA와 DHA는 AA와 경쟁적으로 작용하여 cyclo-oxygenase 효소에 의한 LTB_4의 생성을 감소시킨다(Fig. 3). LTB_4는 염증, 주화성, 관절염(arthritis), 건선(psoriasis), 궤양성 대장염(ulcerative colitis) 등을 유발하는 경향이 있는데 이런 환자에게 생선유를 투여하면 대부분 그 심각성이 감소된다. 류마치스성 관절염 환자에서 EPA와 DHA는 LTB_4와 interleukin-1의 생성을 감소시키고, LTB_5와 interleukin-2를 증가시킨다고 한다[43, 44]. ω-3 지방산을 투여한 환자들에게서 임상적으로 확실히 개선의 효과가 있었는데, 그들의 관절에서 통증과 부종이 줄어들고 문제가 생긴 관절의 수가 감소하였다. 변화된 AA 물질대사가 건선치료 효과도 있어 건선환자의 환부에서 AA와 lipoxygenase 산물인 LTB_4와 12-HETE가 비정상적으로 높았다. 그런 환자들에게 EPA와 DHA를 투여하면 건선 병변에서 LTB_4를 감소시키며, 혈청, 과립상백혈구 및 표피에서 EPA와 AA의 함량이 증가하였다. 표피 EPA의 함량과 건선 병변의 홍반이나 가려움의 감소 사이에는 직접적인 관계가 있어 건선 환자의 약 60%가 이러한 반응을 보였다[45]. 궤양성 대장염 환자도 AA의 산물인 LTB_4와 PGE_2가 증가한다. 궤양성 대장염에서 LTB_4가 혈류로부터 점막에 호중구백혈구를 밀집시켜 염증의 중요한 매개체로 작용하며, LTB_4가 더 많이 증가하면 병세가 악화되는 것으로 해석된다. 이때 ω-3 지방산은 LTB_4의 생산을 감소시키기 때문에, 4개월 동안 생선기름 투여시 궤양성 대장염 환자의 치유효과가 있었다[46].

유전자 발현과 암에 대한 효능

EPA를 섭취하면 유전자 발현에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 실제적으로, 청어유는 mRNA의 양을 감소시킴으로써 지방산 생성효소(fatty acid synthase)의 합성량을 감소시킨다[47]. 실험용 쥐의 종양조직에서 옥수수유나 버터지질에 비하여 EPA나 DHA가 함유된 생선기름으로 키웠을 때 *c-myc*나 *ras*와 같은 종양유전자의 mRNA나 그 발현 단백질의 양이 감소되었다[48].

수많은 동물실험을 통하여 많은 양의 지질, 특히 ω-6 지방산을 음식물로 공급할 시, 유방암, 전립선암 및 결장암 등의 발병율이 높아진다고 한다[49, 50]. 반면에 EPA와 DHA와 같

Table 3. Total lipid and phospholipid fatty acid levels (mole %) in control and tumor brain tissue samples[a]

Fatty acid	total lipid[b] (%)		Total phospholipid[b] (%)	
	Control (n=3)	Tumor (n=13)	Control (n=3)	Tumor (n=13)
Linoleic acid (ω-6)	0.9±0.0	4.3±2.3	0.8±0.0	3.4±2.1
Arachidonic acid (ω-6)	9.8±1.5	9.0±3.2	9.5±1.3	10.8±2.3
EPA (ω-3)	0.1±0.1	0.2±0.3	ND[c]	0.1±0.1
DHA (ω-3)	9.2±1.0	4.8±2.9	9.6±0.8	4.6±2.1

[a]Each value is the mean±SD.
[b]The values do not add up to 100% because only the most prevalent and relating fatty acids are listed.
[c]ND=not detectable.
Table adapted from Martin *et al.* [52].

은 ω-3 지방산을 다량으로 섭취시키면, 여러 가지 유형의 악성종양이 억제되는 효능이 있었다[51]. 그것은 Fig. 3에서 볼 수 있듯이, EPA와 DHA는 cyclo-oxygenase와 lipoxygenase 대사경로의 저해시 생성된 eicosanoid가 면역기능항진, 종양유전자 발현억제, 성장조절인자에 의한 암세포의 유도와 확산 등의 기능을 나타내었기 때문으로 생각되었다[48].

신경교종(glioma) 환자의 경우, 뇌세포의 DHA 함량이 정상인의 그것에 비하여 현저히 감소되었다는 것이다(Table 3) [52]. 암환자와 정상인에서, AA나 EPA는 별로 차이가 없었으나, linoleic acid는 종양환자의 뇌세포에서 훨씬 많은 양이 검출되었다. ω-6 지방산함량이 높은 신경교종 환자는, 신경세포를 죽이는 free radical 발생으로 lipid peroxidation 대사경로를 차단하는 항암치료에 둔감해져 있으므로, ω-3 지방산을 음식물로 섭취 보충시키면, 그 항암치료가 상승됨을 알수 있었다[52].

그 외에도 고도불포화지방산과 관련하여 몇 가지 흥미로운 발견이 이루어졌다. 실제적으로, 생선류를 매일 섭취하는 사람과 매일 섭취하지 않는 사람을 비교할 시, 후자에서 남자가 35%, 여자가 25% 정도의 높은 사망률을 나타내었다. 또한 심장병, 간경변, 위암, 췌장암, 자궁경부암, 담석증, 알츠하이머 등 거의 대부분의 현대적인 성인병에 있어서는 생선섭취에 의하여 예방 또는 발병률 저하가 가능한 것으로 보고되고 있다[53].

EPA 및 DHA 생성균주의 배양 및 그 생성조건

현재 대부분의 EPA 및 DHA는 생선 기름으로부터 생산하여 이용하고 있으나, 생선 기름으로부터 생산한 EPA 또는 DHA는 그 냄새가 좋지 않으며 또한 안정적인 생산도 기하기 어려우므로 미생물, 즉 조류, 곰팡이, 세균 등으로 부터의 생산이 시도되어 왔다. 미생물에서 효과적으로 EPA와 DHA를 생산하기 위해서는 높은 균체농도를 얻어야 함과 동시에 생체내에 원하는 지방산의 함량을 높여야 한다. 미생물의 경우, 생장최적조건과 지방산 생산 최적조건이 동일하지 않으며 생육환경조건, 즉 온도, 빛, pH 및 CO_2 농도 등이 고도불포화지방산의 생산량에 강하게 영향을 미치고 있음을 알게 되었다.

온도의 영향

고도불포화지방산의 생산량은 저온에서 증가하며, EPA의 합성이 낮은 온도에서 증가하는 현상은 박테리아, 균류, 조류 등에서 일반적으로 관찰되었다. 장내 세균을 분리, 배양한 Yazawa 그룹[54]은 이들 세균이 4°C에서 총 지방산의 40%까지 EPA를 생산한다고 보고하였다. 균류 *Mortierella alpina* [55]는 12-15°C에서, *Phaeodactylum tricornutum*[56]의 경우는 21.5°C에서 배양시 EPA의 함량이 가장 높았다. Chlorella minutissima의 배양시 저온에서만 EPA가 축적되었는데, 이는 지방산 합성경로에서 desaturation과 chain elongation에 관여하는 효소활성이 열에 매우 불안정하기 때문이었다[57]. 고도불포화지방산의 다량 생산을 위한 저온 배양은 균체의 낮은 성장률과 높은 냉각비용 때문에 실질적으로는 유용한 방법이 아니라고 여겨진다. Bajpai & Bajpai[7]는 Mortierella 배양시, 배양온도의 변환과 함께 glucose를 공급해 줌으로써 단 시간에 높은 EPA함량을 지닌 균사를 수확하는 방법이 가장 효과적이라고 제안하였다.

빛의 영향

녹조류 *Chlorella minutissima*[57]와 홍조류 *Porphyridium cruentum*[58]은 강한 빛에서 배양시 EPA의 세포내 축적이 촉진되었으나, 규조류 *Cyclotella menaghiniana*와 *Nitzschia closterium*[59], 유글레나류 *Euglena gracilis*[60] 등에서는 낮은 빛세기가 EPA의 생산성과 세포내 축적능을 높여 주었다. 다수의 광합성 조류에서는 빛이 결여되었을 때, ω-6 지방산의 합성은 촉진되었으나, ω-3 지방산 즉 EPA는 합성이 저해되었다[61]. 빛의 질, 즉 파장도 몇몇 해양조류의 AA 합성에 영향을 미치게 되어 녹조류 *Enteromorpha intestinalis*에서는 백색광이, *Sargarsam salicifolium*에서는 적색광이 더욱 효과적이었다[62].

pH의 영향

균류와 조류에서는 EPA가 pH 6.0-7.6에서 가장 많이 생산

되었으며[56, 63], *Thraustochytrium aureum*은 배양초기 pH가 6일경우 DHA 생산량이 최대였다[64]. 황조류인 *Isochrysis galbana*의 경우 배양초기 pH를 8로 하였을 때 균체내의 EPA와 DHA 생산량이 최대이었고 배양초기 pH가 그 이상 증가할수록 그 함량이 감소하였다[65].

CO_2 및 aeration의 영향

CO_2가 균체 성장 및 고도불포화지방산의 생산에 영향을 미친다[66]. *Isochrysis galbana*의 경우, CO_2 농도 0.03-1%에서 균체의 성장률이 가장 높았다. CO_2 농도가 증가할수록 그 성장률이 낮아졌으며, 세포내 총지방산, EPA 및 DHA 등의 함량 또한 감소하였다[65]. 미생물은 고도불포화지방산의 생합성 과정중 desaturation 반응에서 산소를 필요로 하며, 이는 생산되는 지방산의 불포화도를 결정하는 요인이 된다[61]. *Euglena gracilis*는 혐기적상태에서 배양하면 포화지방산의 형성이 유도된다[67]. *Isochrysis galbana* 배양시 air/CO_2 혼합기체의 공급이 많으면 최종 균체 농도는 증가하지만 균체 내의 총지방산, EPA와 DHA 등의 함량은 감소하는 경향이 있었다. 이와 같이 높은 공기공급률은 균체성장에 필요한 산소를 충분히 공급하게되어 세포의 농도를 극대화시키지만 높은 산소 분압에 의한 지방의 과산화 촉진반응이 나타나므로 고도불포화지방산을 포함한 총지방산의 함량은 감소하는 것으로 추론하였다[7].

고도불포화지방산 생합성 유전자의 클로닝

EPA나 DHA를 대량으로 생산하기 위하여, 그 유전자원의 확보는 중요한 과제가 되어 왔다. 물론 조류와 곰팡이 등에서도 꾸준히 시도되어 왔지만, 비교적 다루기 손쉬운 세균에서 관련 유전자들을 분리하기 위하여 우선적으로 심해의 등푸른 생선들의 내장에서 서식하는 세균들을 대상으로 하여 EPA나 DHA의 생산능력이 탐색되어 왔다(Table 4). 그러나, 이들의

Table 4. Production of EPA/DHA by marine bacteria isolated from sea fish

Strain	Production of[a]		Reference
	EPA	DHA	
Shewanella frigidimarina	+	−	5
Shewanella gelidimarina	+	−	5
Shewanella benthica	+	−	5
Shewanella hanedai	+	−	5
Shewanella putrefaciens	+	−	68
Vibrio sp. (T3615)	+	+	81
Unidentified (SCRC-21406)	+	+	82
Unidentified (SCRC-8132)	+	−	83
Unidentified (SCRC-2738)	+	−	14

[a]+, present; −, absent.

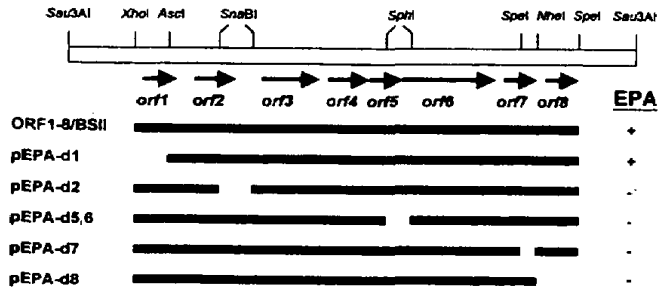


Fig. 4. EPA productivity of deletion mutants of pEPA. The pEPA contains a 38 kb genome DNA fragment from SCRC-2738 in the 8.8 kb cosmid pWE15. Figure adapted from Yazawa (68).

생산유전자는 복수의 유전자로 구성되어 있으므로 그 크기가 상당히 큰 편이어서 클로닝 실험이 쉽게 성공하지 못하였으나, 1996년에 드디어 일본의 Sagami 화학연구센터의 Yazawa 그룹[68]에 의하여 수행되었다. 그들은 EPA 생산균인 *Shewanella putrefaciens* SCRC-2738의 genomic DNA library를 제작하여 *Escherichia coli* 390에 도입한 후, 생성된 지방산을 Thin Layer Chromatography 및 Gas Chromatography 분석으로 확인하여 최초로 EPA 생합성계 유전자군을 클로닝하게 되었다.

형질전환체로부터 얻어진 플라스미드를 맵핑한 바, 8.8kb의 벡터에 38kb의 염색체 단편이 삽입된 클론이 회수되었다. Fig. 4에 표시하였듯이, 분석 결과 8개의 open reading frame (ORF)으로 구성된 cluster 가운데 ORF1은 EPA 합성에 관여하지 않을 가능성이 높았으며, ORF2, ORF5, ORF6, ORF7, ORF8 등이 결실되었을 때에는 EPA가 검출되지 않았다. 전 ORF 가운데 ORF3는 대장균의 3-oxoacyl-ACP synthase와 26.9%의 아미노산 배열 유사도를 나타내었으며, 대장균의 malonyl CoA-ACP transacylase와도 아미노산 배열 유사도가 29.1% 이었다. ORF4는 *Saccharopolyspora erythraea*의 3-oxoacyl reductase와 30.5%, ORF6는 보리 엽록체의 3-oxoacyl-ACP synthase와 29.1% 및 대장균의 3-hydroxy decanoyl-ACP dehydratase와 31.0%의 유사도를 각각 나타내었다. 이들 ORF의 염기배열은 아직 미공개중이나, 이들 유전자의 발현은 cyanobacteria에서 수행되었다[9].

식물에서 EPA 및 DHA 생산 가능성

식물에서의 지방산 생합성

식물세포의 지방산은 plastid와 세포질에서 합성된다(Fig. 5). Plastid에서의 지방산 생합성은 동물세포와 효모세포에서 일어나는 type I 시스템과는 달리 세균에서와 같이 type II 시스템을 통하여 acteyl-CoA로부터 C16:0-, C18:0- 및 C18:1-ACP를 생합성하여 세포질로 이동시키며, 세포질에서는 desa-

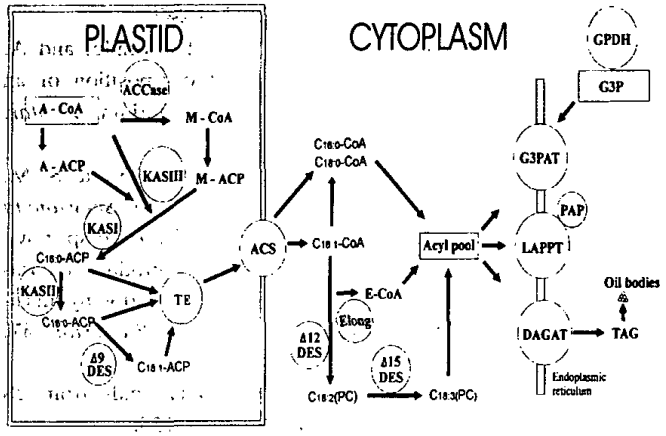


Fig. 5. Schematic outline of the biosynthesis of storage lipids. De novo fatty acid biosynthesis from acetyl-CoA occurs exclusively in the plastid. Products of de novo fatty acid biosynthesis are exported into the cytoplasm where they can be further modified. ACCase, acetyl-CoA carboxlyase; ACP, acyl carrier protein; KAS, β-ketoacyl-ACP synthase; TE, acyl-ACP thioesterase; ACS, acyl-CoA synthetase; CoA, coenzyme A; Elong, elongase; Δ9DES, Δ9-stearoyl-ACP desaturase; Δ12DES, Δ12-oleate desaturase; Δ15DES, Δ15-linolate desaturase; PC, phosphatidylcholine; DAGAT, diacylglycerol acyltransferase; G3P, glycerol-3-phosphate; G3PAT, G3P acyltransferase; GPDH, G 3P dehydrogenase; LAPPT, lysophosphatidic acid acyltransferase; PAP, phosphatidic acid phosphatase; A-CoA, acetyl CoA; M-CoA, malonyl CoA; M-ACP, malonyl-ACP, E-CoA; erucoyl CoA; TAG, triacylglycerol.

turation, elongation 및 hydroxylation 반응에 의하여 다양한 형태로 전환된다[69].

식물의 광합성의 산물로부터 유래한 acetate는 plastid 내로 이동되고 acetyl-CoA로 전환되어 C_2 단위의 공급원이 된다. 이는 바로 acetyl-CoA:ACP transacylase에 의하여 acetyl-ACP로 전환되거나 acetyl-CoA carboxylase(ACCase)에 의하여 malonyl-CoA의 형태로 전환되고, malonyl-CoA는 다시 malonyl-CoA:ACP transacylase의 작용으로 malonyl-ACP로 전환된다. 계속해서 β-ketoacyl-ACP synthase(KAS)에 의하여 acetyl-CoA와 malonyl-ACP의 축합반응(KAS III) 혹은 acetyl-ACP와 malonyl-ACP의 축합과 사슬연장반응(KAS I) 및 C16:0-ACP의 C18:0-ACP로의 전환반응(KAS II)이 일어난다. 여기서 KAS I과 II에 의한 지방산 사슬축합반응에는 malonyl-CoA로부터 C_2 단위가 첨가될 때마다 이어서 β-ketoacyl-ACP reductase(β-KR), β-hydroxyacyl dehydrase(β-HD) 및 enoyl-ACP reductase(EAR)가 순차적으로 관여한다고 알려져 있다. C18:0-ACP는 plastid내에 존재하는 Δ9-stearoyl-ACP desaturase(Δ9DES)의 작용을 받아 C18:1-ACP로 전환되어지며, C16:0-ACP, C18:0-ACP, C18:1-ACP 등은 acyl-ACP thioesterases(TE)의 작용을 받아 유리지방산이 되면 plastid막에 존재하는 acyl-CoA synthetase(ACS)에 의하여 plastid막을 통과하여 세포질로 이동된다. Acyl-CoA형태로 세포질로 이동된 지방산은 크게 두 가지 형태 즉, unsaturated fatty acid와 very long chain fatty acids (VLCFAs)로 전환되어진다(Fig. 5).

즉, unsaturated fatty acid는 일반적으로 지방산 함량 및 조성은 식물의 종류, 조직부위, 성숙시기 등에 따라 큰 차이를 보이는데, 특히 불포화지방산의 조성은 식물에 따라 다양하게 나타난다[70]. 종자식물에서의 desaturation 반응은, plastid로부터 유래한 oleoyl-CoA(C18:1)가 Δ12-oleate desaturase (Δ12DES)에 의하여 C18:2-phosphatidylcholine(PC)으로, 이것은 다시 Δ15-linolate desaturase에 (Δ15DES)의해 C18:3-phosphatidylcholine(PC)으로 전환된다[69]. 생합성된 포화지방산 및 불포화지방산은 acyl pool을 형성하며 수 종류의 acyltransferase[71]에 의하여 triacylglycerols(TAGs)가 만들어지고 이는 지방의 저장구조체인 oil body에 저장되어진다. Oil body는 phospholipid 단층막과 oleosin 단백질로 구성되는 외막내에 TAGs가 고도로 집적된 형태이며 종자가 건조되는 조건에서도 TAGs가 지속적으로 안정한 형태로 유지되도록 한다[72, 73].

VLCFAs의 연구결과 최근 탄소수 20개 이상의 지방산 (VLCFAs)의 생합성에 관여하는 β-ketoacyl-CoA elongase(β-ketoacyl-CoA synthase)유전자 *FAE*1이 T-DNA tagging방법으로 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 분리되어[74] 그 특성이 규명되었고[75], jojoba에서도 그 유사체가 분리되었다[76]. Plastid 유래의 C18:1-CoA는 FAE1에 의하여 erucoyl(C22:1)-CoA로 지방산사슬이 연장된다. 이는 세포질에서도 plastid에서와 같이 지방산 사슬연장에 관여하는 다른 효소들 β-ketoacyl-CoA reductase, β-hydroxyacyl-CoA dehydrase, enoyl-CoA reductase 등이 존재함을 의미한다. Plastid와 달리 세포질에서의 지방산 사슬연장에 관여하는 효소들은 acyl-CoA 형태의 지방산을 기질로 한다. VLCFAs는 대부분의 식물종의 상피층 wax를 구성하는 지방산으로써 몇 종류의 식물에서는 종자유에도 함유되어 있다고 알려져 있지만[76], 불포화도가 낮고 대부분의 식물종에서 미량으로 존재한다.

식물에서의 EPA와 DHA 생산 가능성

최근 유전자조작을 통해 식물의 지방산 함량 및 조성을 변화시키고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있으며[77, 78], 이미 수 종류의 형질전환식물(transgenic plants)로부터 추출한 유지가 상업화된 단계에 까지 이르렀다. 식물에서의 불포화지방산은 주로 oleic acid, linoleic acid(LA), linolenic acid 등이며, 이 중 linolenic acid는 대부분 α형(ALA)이나, 달맞이꽃(Evening primose) 종자에서는 γ형(GLA)이 다량 함유되어 있다. 그러나, ω-3 지방산의 다른 형태인 EPA 및 DHA가 식물에 존재한다는 보고는 아직까지 없다. 만약 비식물유래의 EPA 혹은

DHA 생합성 관련 유전자들을 분리하여 식물체에서 발현시킬 수 있다면 이들 물질의 대량생산이 가능할 것으로 예상된다. EPA나 DHA의 생합성 경로에 대한 명확한 연구가 없는 실정이지만, 최근의 연구결과들을 검토해보면 식물에서의 ω-3 지방산 생산 가능성이 증대됨을 알 수 있다. 즉, Cohen 그룹[79, 80]은 microalgae인 *Porphyridium cruentum*의 EPA생합성기작 연구결과로부터 모든 진핵 및 원핵생물에서의 EPA생산은 ω-6와 ω-3 경로를 통하여 전구체 C18:2-phosphatidylcholine(PC)로부터 desaturation과 elongation 반응의 반복에 의해 EPA가 생합성된다고 보고하였다. 따라서 식물에서 EPA 혹은 DHA의 생산을 위해서는 C18:2-PC로부터 EPA나 DHA에 이르는 과정에 필요한 효소들의 특성 구명과 그 유전자들의 분리 및 발현연구는 acyl-CoA의 elongase 및 elongation 관련 효소들, desaturases, EPA/DHA-specific acyltransferases 등에 대한 연구가 선행되어야 할 것이다. 최근 여러 종의 해양미생물과 조류에서 EPA와 DHA의 다량생산을 위한 배양조건, 효소특성 연구 및 관련 유전자들의 분리가 수행되어 식물에서의 DHA 및 EPA의 생산 가능성을 높여주고 있다.

식물에서 DHA나 EPA와 같은 ω-3 지방산을 생산하기 위해서는 식용유지생산용 작물로 재배되고 있는 대두, 팜, 목화, 평지, 유채, 해바라기, 참깨, 들깨 등이 그 재료가 될 수 있으며[70], 또한 비유지작물인 벼(*Oryza sativa*)의 경우는 그 부산물인 쌀겨(rice bran)를 사용하여 유지를 얻을 수도 있을 것이다. Rice bran oil은 palmitic acid(C16:0) 16.2%, stearic acid(C18:0) 1.8%, oleic acid(C18:1) 41.4%, linoleic acid(C18:2) 37.5%, linolenic acid(C18:3) 1.6% 등을 함유하고 있어, EPA혹은 DHA 생합성 관련 유전자를 종자특이적으로 도입하면 rice bran oil로부터 EPA 혹은 DHA의 생산이 가능할 것으로 생각된다[77, 78].

EPA 혹은 DHA의 식물에서의 생산은 이론적으로 실현가능하지만 단순하게 접근할 수 있는 문제가 아닌 것으로 보이며, 다가불포화지방산의 생합성 기작, 형질전환, 육종, 재배에 적절한 작물의 선택 등에 대한 보다 심도있는 기초연구가 선결되어야 할 것이다.

참고문헌

1. Simopoulos, A. P. 1994. Fatty acid, p.355-392. In I. Goldberg (ed.), *Functional foods: designer foods, phamafoods, nutraceuticals*. Chapman & Hall, New York, N.Y.
2. Dyerberg, J. and H. O. Bang. 1979. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet* **ii**: 433-435.
3. Takeyama, H., K. Iwamoto, S. Hata, H. Takano, and T. Matsunaga. 1996. DHA enrichment of rotifers: A simple two-step culture using the unicelluar algae *Chlorella regularis* and *Isochrysis galbana*. *J. Mar. Biotechnol.* **3**: 244-247.
4. Watanabe, K., C. Ishikawa, K. Yazawa, K. Kondo, and A. Kawaguchi. 1996. Fatty acid and lipid composition of an eicosapentaenoic acid-producing marine bacterium. *J. Mar. Biotechnol.* **4**: 104-112.
5. Bowman, J., S. McCammon, D. Nichols, J. Skerratt, S. M. Rea, P. D. Nichols, and T. A. McMeekin. 1997. *Shewanella gelidimarina* sp. nov. and *Shewanella frigidimarina* sp. nov., Novel antarctic species with the ability to produce eicosapentaenoic acid (20:5ω3) and grow anaerobically by dissimilatory Fe(III) reduction. Int. *J. System. Bacteriol.* **47**: 1040-1047.
6. Viso, A. C. and J. C. Marty. 1993. Fatty acids from 28 marine microalge. *Phytochemistry* **34**: 1521-1533.
7. Bajpai, P. and P. K. Bajpai. 1993. Eicosapentaenoic acid (EPA) production from microorganisms: a review. *J. Biotech.* **30**: 161-183.
8. Lopez Alonso, D., E. Molina Grima, J. A. Sanchez Perez, J. L. · Gracia Sanchez, and F. Gracia Camacho. 1992. Fatty acid variation among differnt isolates of a single strain of *Isochrysis galbana*. *Phytochemistry* **31**: 3901-3904.
9. Takeyama, H., D. Takeda, K. Yazawa, A. Yamada, and T. Matsunaga. 1997. Expression of the eicosapentaenoic acid synthesis gene cluster from *Shewanella* sp. in a transgenic marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. *Microbiology* **143**: 2725-2731.
10. Leikin, A. I. and R. R. Brenner. 1989. Microsomal D5 desaturation of eicosa-8,11,14-trienoic acid is activated by a cytosolic fraction. *Lipids* **24**: 101-104.
11. Jaworski, J. D. 1987. Biosynthesis of monoenoic acid and polyenoic fatty acids. p. 159-174. In P. K. Stumpf (ed.), *The Biochemistry of Plants*. Vol. 9. Academic press, Orlando.
12. Giround, C. and N. Eichenberger. 1989. Lipids of *Chlamidomdnas reinhardtii*. Incorporation of [^{14}C]palmitate and [14C]oleite into different lipids and evidence for lipid-linked desaturation of fatty acids. *Plant Cell Physiol.* **30**: 121-128.
13. Sakamoto, T., H. Wada, I. Nishida., M. Ohmori, and N. Murata. 1994. Δ9 acyl lipid desaturases of cyanobacteria. Molecular cloning and substrate specification in terms of fatty acids. *J. Biol. Chem.* **269**: 25576-25580.
14. Watanabe, K., K. Yazawa, K. Kondo, and A. Kawaguchi. 1997. Fatty acid synthesis of an eicosapentaenoic acid-producing bacterium: *de novo* synthesis, chain elongation, and desaturation systems. *J. Biochem.* **122**: 467-473.
15. Korn, E. D., C. I. Greenblatt, and A. M. Lees. 1989. Synthesis of unsatarated fatty acids in the slime mold *Physarium polycepharium* and the zooflagellates. *J. Lipids Res.* **6**: 43-50.
16. Shimizu, S., H. Kawashima, K. Akimoto., Y. Shimen, and H. Yamada. 1988. Fungal mycelia as novel source of eicosapentaenoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**: 335-341.

17. Ben-Amotz, A., R. Fishler, and A. Schnella. 1987. Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. *Marine Biol.* **95**: 31-36.
18. Henderson, R. J., J. W. Leftley, and J. R. Sargent. 1988. Lipid composition and biosynthesis in aging cultures of marine dinoflagellate *Crypthecodinium cohnii*. Phytochemistry **27**: 555-561.
19. Nichols, B. W. and R. S. Appleby. 1969. The distribution and biosynthesis of archidonic acid in algae. *Phytochem.* **8**: 1907-1915.
20. Hulanica, D., J. Erwin, and K. J. Blich. 1964. Lipid metabolism of *Euglena gracilis*. *J. Biol. Chem.* **239**: 2778-2787.
21. Fisher, S. and P. C. Weber. 1984. Prostaglandin I_3 is formed *in vivo* in man after dietry eicosapentaenoic acid. *Nature* **307**: 165-168.
22. Yazawa, K. and A. Yamada. 1995. Production of eicosapentaenoic acid from marine bacteria and its genetic engineering. 油化學 **44**: 787-793.
23. Connor, S. L. and W. E. Connor. 1997. Are fish oils beneficial in the prevention and treatment of coronary artery disease? *Am. J. Clin. Nutr.* **66**(suppl): 1020S-1031S.
24. Crawford, M. A., K. Codteloe, K. Ghebremeskel, A. Phylactos, L. Skirvin, and F. Stacey. 1997. Are deficits of arachidonic and docosahexaenoic acids responsible for the neural and vascular complications of preterm babies? *Am. J. Clin. Nutr.* **66**(suppl): 1032S-1041S.
25. Kinsella, J. E., B. Lokesh, and R. A. Stone. 1990. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* **52**: 1-28.
26. Simopoulos, A. P. 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**: 438-463.
27. Lewis, R. A., T. H. Lee, and K. F. Austen. 1986. Effects of omega-3 fatty acids on the generation of products of the 5-lipoxygenase pathway. p.227-238. In A. P. Simopoulos, R. R. Kifer, and R. E. Martin (eds.), *Health Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods*. Academic Press, Orlando, FL.
28. Weber, P. C., S. Fischer, C. von Schacky, R. Lorenz, and T. Strasser. 1986. The conversion of dietary eicosapentaenoic acid to prostanoids and leukotrienes in man. *Prog. Lipid Res.* **25**: 273-276.
29. Weber, P. C. and A. Leaf. 1991. Cardiovascular effects of ω3 fatty acids. Atherosclerosis risk factor modification by ω3 fatty acids. p.218-232. In A. P. Simopoulos, R. R. Kifer, R. E. Martin, and S. M. Barlow (eds.), Health Effects of ω3 *Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods*. Vol. 66, Karger, Basel.
30. Weber, P. C. 1989. Clinical studies on the effects of n-3 fatty acids on cells and eicosanoids in the cardiovascular system. *J. Intern. Med.* **225**(suppl):61-68.
31. Weber, P. C., S. Fischer, C. von Schacky, R. Lorenz, and T. Strasser. 1986. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids and eicosanoid formation in man. p.49-60. In A. P. Simopoulos, R. R. Kifer, and R. E. Martin (eds.), *Health Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods*. Academic Press, Orlando, FL.
32. Hostmark, A. T., T. Bjerkedal., P. Kierulf., H. Flaten, and K. Ulshagen. 1988. Fish oil and plasma fibrinogen. *Br. Med. J.* **297**: 180-181.
33. Lorenz, R., U. Spengler, S. Fischer, J. Duhm., and P. C. Weber. 1983. Platelet function, thromboxane formation and blood pressure control during supplementation of the western diet with cod liver oil. *Circulation* **67**: 504-511.
34. Vanhoutte, P. M., H. Shimokawa, and C. Boulanger. 1991. Fish oil and the platelet blood vessel wall interaction. p.233-244. In A. P. Simopoulos, R. R. Kifer, and R. E. Martin (eds.), *Health Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods*. Academic Press, Orlando, FL.
35. Knapp, H. R. and G. A. FitzGerald. 1989. The antihypertensive effects of fish oil. A controlled study of polyunsaturated fatty acid supplements in essential hypertension. *N. Eng. J. Med.* **320**: 1037-1043.
36. Bonaa, K. H., K. S. Bjerve, B. Straume, I. T. Gram, and D. Thelle. 1990. Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on blood pressure in hypertension. A population-based intervention trial from the Tromso Study. *N. Eng. J. Med.* **322**: 795-801.
37. Dehmer, G. J., J. J. Pompa., E. K. van den Berg, E. J. Eichhorn, J. B. Prewitt, W. B. Campbell., L. Jennings, J. T. Willerson, and J. M. Schmitz. 1988. Reduction in the rate of early restenosis after coronary angioplasty by a diet supplemented with n-3 fatty acids. N. Engl. *J. Med.* **319**: 733-740.
38. Grigg, L. E., T. W. H. Kay, P. A. Valentine, R. Larkins, D. J. Flower, E. G. Malonal, K. O'Dea, A. J. Sinclair, J. L. Hopper, and D. Hunt. 1989. Determinants of restenosis and lack of effect of dietary supplementation with eicosapentaenoic acid on the incidence of coronary artery restenosis after angioplasty. *J. Am. Coll. Cardiol.* **13**: 665-672.
39. Bairati, I., L. Roy, and F. Meyer. 1992. Double-blind, randomized, controlled trial of fish oil supplements in prevention of recurrence of stenosis after coronary angioplasty. *Circulation* **85**: 950-956.
40. Charnock, J. S. 1991. Antiarrhythmic effects of fish oils. p. 278-291. In A. P. Simopoulos, R. R. Kifer, R. E. Martin, and S. M. Barlow (eds.), *Health Effects of* ω3 *Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods*. Vol. 66, Karger, Basel.
41. Burr, M. L., A. M. Fehily, J. F. Gilbert, S. Rogers, R. M. Holliday, P. M. Sweetnam, P. C. Elwood, and N. M. Deadman. 1989. Effect of changes in fat, fish and fibre intakes

on death and myocardial reinfarction: Diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* ii: 757-761.

42. Weylandt, K. H., J. X. Kang, and A. Leaf. 1996. Polyunsaturated fatty acids exert antiarrhythmic actions as free acids rather than in phospholipids. *Lipids* **31**: 977-982.
43. Sperling, R. I., M. E. Weinblatt, J. L. Robin, J. Ravalese, R. L. Hoover, F. House, J. S. Coblyn, P. A. Fraser., B. W. Spur, D. R. Robinson, R. A. Lewis, and K. F. Austen. 1987. Effects of dietary supplementation with marine fish oil on leukocyte lipid mediator generation and function. *Arth. Rheumat.* **30**: 987-988.
44. Kremer, J. M., D. A. Lawrence, W. Jubiz, R. DiGiacomo, K. Rynes, L. E. Bartholomew, and M. Sherman. 1990. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis; clinical and immunological effects. *Arth. Rheumat.* **33**: 810-820.
45. Hammarstrom, A., M. Hamberg, B. Samuelsson, E. A. Duell, M. Srawiski, and J. J. Voorhees. 1975. Increased concentration of non-esterified arachidonic acid. 12L-hydroxy-5, 8,10,14-eicosatetraenoic acid, prostaglandin E_2, and prostaglandin F_{2a} in epidermis of psoriasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 5130-5134.
46. Stenson, W. F., D. Cort, J. Rodgers, R. Burakoff, K. DeSchryver-Kecskemeti, T. L. Gramlich., and W. Beeken. 1992. Dietary supplementation with fish oil in ulcerative colitis. *Ann. Intern. Med.* **116**: 609-614.
47. Clarke, S. D. and M. K. Armstrong. 1988. Suppression of rat liver fatty acid synthetase mRNA level by dietary fish oil. *FASEB J.* **2**: A852.
48. Fernandes, G. and J. T. Venkatraman. 1991. Modulation of breast cancer growth in nude mice by ω3 lipids. p.488-503. In A. P. Simopoulos, R. R. Kifer, R. E. Martin, and S. M. Barlow (eds.), *Health Effects of* ω3 *Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods.* Vol. 66, Karger, Basel.
49. Carroll, K. K., L. M. Braden, J. A. Bell, and R. Kalamegham. 1986. Fat and cancer. *Cancer* **58**(suppl): 1818-1825.
50. Reddy, B. S. 1986. Diet and colon cancer: Evidence from human and animal models. p.47-66. In B. S. Reddy and L. A. Cohens (eds.), Diet, Nutrition and Cancer; a Critical Evaluation. Vol. 1, CRC Press, Boca Raton.
51. Cave, W. T. 1991. ω3 fatty acid diet effects on tumorigenesis in experimental animals. p.74-86. In A. P. Simopoulos, R. R. Kifer, R. E. Martin, and S. M. Barlow (eds.), *Health Effects of* ω3 *Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods.* Vol. 66, Karger, Basel.
52. Martin, D. D., M. E. C. Robbins, A. A. Spector, B.-C. Wen, and D. H. Hussey. 1996. The fatty acid composition of human gliomas differs from that found in nonmalignant brain tissue. *Lipids* **31**: 1283-1288.
53. Nakahara, T. 1995. Physiological activity of docosahexaenoic acid and it's production by microbial culture. 油化學 **44**: 821-827.
54. Yazawa, K., K. Araki, N. Okazaki, K. Watanabe, C. Ishikawa, A. Inoue, N. Numao, and K. Kondo. 1988. Production of Eicosapentaenoic acid by marine bacteria. *J. Biochem.* **103**:5-7.
55. Shimizu, S., H. Kawashima, K. Akimoto, Y. Shinmen, and H. Yamada. 1988. Fungal mycelia as a novel source of eicosapentaenoic acid. Activation of enzyme(s) involves in eicosapentaenoic acid production at low temperature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**: 335-341.
56. Yongmanitchai, W. and O. P. Ward. 1991. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 419-426.
57. Seto, A., H. L. Wong. and C. W. Hasseltine. 1984. Culture conditions affect eicosapentaenoic acid content of *Chlorella minutissima. J. Am. Oil. Chem. Soc.* **61**: 892-894.
58. Rezanka, T., J. Doucha, P. Mares and M. Podojil. 1987. Effect of cultivation temperature and light intensity on fatty acid production in the red alga *Porphyridium cruentum. J. Basic Microbiol.* **27**: 275-278.
59. Sicko-Goad, L., M. S. Simmons, D. Lanzinskey, and J. Hall. 1988. Effect of light cycle on diatom fattty acid composition and quantitative morphology. *J. Phycol.* **24**: 1-7.
60. Constantopoulos, G. and K. Bloch. 1967. Effect of light intensity on the lipid composition of *Euglena gracilis. J. Biol. Chem.* **242**: 3538-3542.
61. Erwin, J. 1973. Comparative biochemistry of fatty acids in microorganisms. In p.41-143. J. Erwin (ed.), *Lipids and Biomembranes of Eucaryotic Microorganisms.* Academic Press, New York.
62. Radwan, S. S., A. S. Shaaban, and H. M. Gebreel. 1988. Arachidonic acid in lipids of marin algae maintained under different light colors. *Z. Nauturforsch. C: Biosci.* **43**: 15-18.
63. Bajpai. P., P. K. Bajpai, and O. P. Ward. 1992. Optimization of culture conditions for production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella elongata* NRRL 5513. *J. Ind. Microbiol.* **9**: 1-18.
64. Bajpai. P., P. K. Bajpai, and O. P. Ward. 1991. Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium aureum. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 706-710.
65. Oh, Y. K. 1997. Production of EPA and DHA from marine microalga *Isochrysis galbana* Parke. Thesis for the degree of Master of Science, Pusan National University, Pusan.
66. Tsuzuki, M., E. Ohnuma, N. Sato, T. Takaku, and A. Kawaguchi. 1990. Effect of CO_2 concentration during growth on fatty acid composition in microalgae. *Plant Physiol.* **93**: 851-856.
67. Yongmanitchai, W. and O. P. Ward. 1989. Omega-3 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochem.* **24**: 117-125.
68. Yazawa, K. 1996. Production of eicosapentaenoic acid from marine bacteria. *Lipids* **31**(suppl.): S297-S300.

69. Ohlrogge, J. and J. Browse. 1995. Lipid biosynthesis. Plant Cell 7:957-970.
70. Murphy, D. J. 1994. Designer oil crops: breeding, processing and biotechnology. VCH, Weinheim, Germany.
71. Murata, N. and Y. Tasaka. 1997. Glycerol-3-phosphate acyltransferase in plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1348**: 10-16.
72. Huang, A. H. C. 1996. Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol.* **110**: 1055-1061.
73. Napier, J. A., A. K. Stobart, and P. R. Shewry. 1996. The structure and biogenesis of plant oil bodies: the role of the ER membrane and the oleosin class of proteins. *Plant Mol. Biol.* **31**: 945-956.
74. James Jr., D. W., E. Lim, J. Keller, I. Plooy, E. Ralston, and H. K. Dooner. 1995. Directed tagging of the Arabidopsis *FATTY ACID ELONGATION1* (*FAE1*) gene with the maize transposon activator. *Plant Cell* **7**: 309-319.
75. Millar, A. A. and L. Kunst. 1997. Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. *Plant J.* **12**: 121-131.
76. Lassner, M. W., K. Lardizabal, and J. G. Metz. 1996. A jojoba β-ketoacyl-CoA synthase cDNA complements the canola fatty acid elongation mutation in transgenic plants. *Plant Cell* **8**: 281-292.
77. Kinney, A. J. 1996. Designer oils for better nutrition. *Nat. Biotechnol.* **14**: 946.
78. Zou, J., V. Katavic, E. M. Giblin, D. L. Barton, S. L. MacKenzie, W. A. Keller, X. Hu, and D. C. Taylor. 1997. Modification of seed oil content and acyl composition in the brassicaceae by expression of a yeast *sn*-2 acyltransferase gene. *Plant Cell* **9**: 909-923.
79. Khozin, I., D. Adlerstein, C. Bigongo, Y. M. Heimer, and Z. Cohen. 1997. Elucidation of the biosynthesis of eicosapentaenoic acid in the microalga *Porphyridium cruentum*. II: Studies with radiolabeled precursors. *Plant Physiol.* **114**: 223-230.
80. Araki, S. and M. Kayama. 1996. Distribution of polyunsaturated fatty acids in plants. p.11-43. In M. Kayama (ed.), *AA, EPA, DHA-Highly Unsaturated Fatty Acids*. Gouseisyagouseikaku, Tokyo.
81. Yano, Y., A. Nakayama, H. Saito, and K. Ishihara. 1994. Production of docosahexaenoic acid by marine bacteria isolated from deep sea fish. *Lipids* **7**: 527-528.
82. Watanabe, K., C. Ishikawa, I. Ohtsuka, M. Kamata, M. Tomita, K. Yazawa, and H. Muramatsu. 1997. Lipid and fatty acid composition of a novel docohexaenoic acid-producing marine bacterium. *Lipids* **32**: 975-978.
83. Akimoto, M., T. Ishii, K. Yamagaki, K. Ohtaguchi, K. Koide, and K. Yazawa. 1990. Production of eicosapentaenoic acid by bacterium isolated from mackerel intestines. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **67**: 911-915.