

지렁이에서의 전사체 분석과 유용성 유전자 탐색에 관한 연구

박 순 철 (중앙대학교 생명과학과)

1. 지렁이 연구의 중요성

지렁이는 토양생태계의 유지에 매우 중요한 역할을 하고 있을 뿐만 아니라 농업생산성 향상에도 큰 역할을 하고 있는 매우 유용한 토양 무척추동물로 인식되고 있다. 이러한 지렁이의 토양생태계에 대한 중요성의 인식은 고대 그리스의 아리스토텔레스까지 거슬러 올라가며 그는 지렁이의 운동 모습이 동물 창자의 움직임과 유사하고 그 중요성을 감안하여 지렁이를 "지구의 창자 (intestine of the earth)"라고 비유하여 표현하였다. 이후 19세기에 들어서서 찰스 다윈은 그의 저서 "The Formation of Vegetable Mould through the Action of Worms, with Observation on Their Habits"에서 지렁이가 토양생태계 특히 토양유기물질 순환에 매우 중요한 생태학적 지위를 갖고 있다고 보고하였다. 근래에 들어와서 지렁이에 의한 토양생태계의 유지와 농업생산성의 증가는 생물학적으로 연구되고 증명되었는데 이의 주된 원인은 지렁이가

- ① 심토와 표토의 순환을 매개하고
- ② 토양의 함수성 및 통기성을 증가시키며
- ③ 고분자 유기물질(식물의 잎, 줄기 및 뿌리 등)을 일차적으로 분해하고
- ④ 분변토에 식물이 직접 흡수할 수 있는 다량의 무기성 인과 질소를 포함하고 있기 때문인 것으로 생각된다.

실제로 한 연구에서 지렁이의 일종인 *Lumbricus terrestris*는 10월에서 다음 해 2월까지 ha 당 약 2000 kg의 낙엽을 소비하는 것으로 나타났으며 이것은 조사대상 과수원의 총 낙엽량 중 98.6%를 차지하는 양에 해당하는 것으로 조사되었다. 또한 지렁이는 토양에 일년에 ha 당 약 63 kg의 질소를 공급해 주는 것으로 평가되었으며 이 양은 조사대상 농경지에서 작물이 흡수한 총 질소량의 38%는 해당되는 것으로 조사된 바 있다. 또 다른 주요 비료 성분인 무기인의 경우 지렁이의 분변토를 통해 목초지의 경우 일년에 ha 당 약 9 kg의 무기인을 배출하는 것으로 보고된 바 있으며 열대초지에서는 일년에 ha 당 약 55 kg의 무기인이 지렁이 분변토를 통해 토양에 유입되는 것으로 밝혀진 바 있다. 이러한 질소와 인의 증가는 일부 토양미생물에 의한 것으로 생각되기도 하지만 대부분 지렁이 장에서 분비되는 효소에 의해 증가하는 것으로 알려져 있다. 또한 지렁이 장에서 분비되는 여러 endo- 및

exo-glucanase와 ligninase는 식물체의 주성분인 셀룰로오즈나 리그닌을 효과적으로 분해할 수 있는 것으로 밝혀졌으며 이 효소들은 지렁이가 흡수한 고분자 유기물질의 C:N 비를 20:1 이하로 낮추어 이들의 무기물화를 촉진하는 것으로 사료된다.

이와 같이 지렁이는 자신의 생존을 위한 활동을 하면서 토양생태계의 건전성을 유지시키고 농업생산성을 향상시키는 대표적인 토양 무척추동물이다. 그러나 이러한 지렁이의 역할을 보다 효과적으로 이용하기 위해서는 위에서 언급한 여러 기능에 관계되는 단백질 또는 효소의 종류를 파악하고 이들의 특성을 연구함으로써 그 유용성을 판단하며 이에 따라 단백질을 순화, 정제하는 연구가 수행되어야 한다고 생각된다. 그러나 이러한 연구를 보다 효율적으로 수행하고 유용하다고 판단된 단백질을 경제적인 방법으로 대량 생산하여 그 경제적 부가가치를 극대화하기 위해서는 이 단백질들을 생성하는 유전자에 관한 연구가 필수적으로 수행되어야 한다고 사료된다. 이에 관한 연구에 있어서 가장 효과적인 방법은 현재 거의 완성단계에 있는 인간유전체사업과 같이 지렁이에서 발현되고 있는 유전자의 데이터베이스를 구축하여 이로부터 위와 같은 유용성 유전자를 탐색하고 기능을 연구하는 방법이 가장 효과적이라고 판단되며 더욱이 이 방법을 통하여 현재까지 알려져 있지 않은 고유 유전자의 발견 및 이용가능성에 관한 연구도 함께 수행할 수 있을 것으로 판단된다.

2. 지렁이 전사체 연구의 필요성 및 목적

2-1. 연구의 필요성

현재 국내외에서 가장 활발하게 이뤄지고 있는 지렁이 산업화의 방향은 음식물찌꺼기와 같은 유기성폐기물을 사료로 지렁이를 사육하여 지렁이 생체 및 분변토를 판매하는 환경농업적 접근이라고 생각된다. 이와 같은 접근 방법은 현재 세계적 문제로 부각되고 있는 유기성폐기물을 환경친화적으로 처리할 수 있으며 그 부산물로 생산되는 지렁이와 분변토의 판매로 수익을 올릴 수 있다는 두 가지 측면에서 매우 실용적이고 경제적인 접근 방법이라고 생각된다. 현재 우리나라에서도 각 종 유기성 산업폐기물을 사료로 활용하여 지렁이를 사육하고 있는 농가의 수가 점차 증가하고 있으며 앞으로 음식물을 비롯한 유기성폐기물의 매립이 전면 금지되는 2003년 이후에는 오염원의 환경친화적 처리 및 자원화라는 측면과 농가소득의 증대라는 두 가지 이유에서 이 동물의 환경생물학적 이용 및 농가소득원으로써의 중요성이 한층 증대될 것으로 전망된다. 또한 이 동물을 이용한 유기성폐기물 처리 시스템을 개발하고 이를 국내외 지방자치단체에 공급하고자 하는 기업의 활동이 매우 활발하며 이와 관련된 핵심기술의 개발 및 확보에 많은 노력을 경주하고 있는 실정이다. 그러나 이러한 노

력에도 불구하고 지렁이를 이용한 환경산업적 및 환경농업적 이용은 그 한계점을 갖고 있다고 생각되며 그 주된 원인은

- ① 사육농가 및 기업의 영세성에 의한 기술, 연구 투자의 부족
- ② 생체 지렁이의 효율적 한계
- ③ 지렁이의 생태 및 생리학적 지식의 결여
- ④ 지렁이 유전자를 이용한 기술개발에 대한 인식 부족
- ⑤ 지렁이 유전자에 관한 체계적이고 종합적인 연구결과의 부족
- ⑥ 이에 따른 연구대상 유전자에 관한 정보 부족 등으로 사료된다.

또한 지렁이는 우리나라에서 예로부터 아주 유용한 한약재로 사용되어 오고 있다. 동의보감 등에 의하면 지렁이는 반신불수, 관절통 및 고혈압에 효험이 있고 혈액을 정화하는 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 복용 방법은 내장을 제거한 지렁이를 저온에서 건조하여 사용하는 것으로 나타나 있다. 이 밖에도 지렁이는 항세균 및 항진균제, 탈취제 등의 개발을 위한 재료로 사용되고 있다. 이러한 지렁이의 의약학적 이용가능성은 *Lumbricus rubellus*에서 혈전을 용해시키는 효소(Lumbricin)가 보고되어 그 효과의 일부가 과학적으로 증명되었으나 이 단백질을 이용한 일부 의약품도 지렁이를 동결건조하여 사용하는 수준에 머물러 있는 실정이다. 따라서 현재보다 지렁이를 보다 효과적으로 이용할 수 있는 대안은 위와 같은 효과를 나타내는 단백질을 만들어 내는 유전자를 규명하고 이 유전자를 클로닝 및 발현시켜 그 단백질을 생산해 내는 것이 가장 경제적이고 확실한 대안이라고 사료된다.

이와 같이 지렁이는 농업, 환경산업, 의약품 및 생활용품에 이르기까지 그 활용분야가 다른 어떤 동물보다 광범위하다고 할 수 있으며 생명산업육성을 위한 대상동물로 매우 가치가 높다고 생각된다. 그러나 현재까지의 연구개발 방향은 모두 지렁이 생체를 이용한 방법으로 사회적, 경제적 및 생물학적 관점에서 볼 때 비효율적 측면을 내포하고 있다. 그러므로 이러한 비효율성을 지양하고 보다 고부가가치의 생명사업을 창출해 내기 위해서는 지렁이 유전자 사업에 국가적 지원이 필요하다고 사료된다. 또한 현재 GenBank 등에 등록되어 있는 지렁이 유전자의 종류가 매우 제한적이라는 사실은 여타 선진국에서 이 동물에 대한 관심이 아직은 활발하지 않다는 사실을 반증하는 것으로 이른 바 유전자의 틈새시장 공략을 위해 매우 좋은 연구대상이라고 생각된다. 그러므로 본 연구과제가 성공적으로 수행된다면 이 동물의 유전자분야에 있어서만큼은 다른 나라에 앞서 기득권을 선점할 수 있는 좋은 기회라고 판단된다.

2-2. 연구목적

본 연구는 아직 밝혀지지 않은 다수의 유용성 유전자를 포함하고 있을 것으로 생각되는 지렁이의 발현유전자를 EST (Expressed Sequence Tag) 또는 SSH (Suppression Subtractive Hybridization) 방법에 의해 5'으로부터 약 300-500 bp의 염기배열순서를 밝혀내고 전체적인 목록을 작성하며 이에 대한 데이터베이스를 구축하는 것을 일차적인 목표로 한다. 또한 이미 보고된 다른 동물의 EST sequence 등과 그 염기배열순서를 비교 분석하여 지렁이 유전자의 기능을 분석하고 고유 유전자의 가능성을 탐색하고자 한다. 이러한 과정을 통하여 유전자 산업적으로 국제적 경쟁력과 경제적 부가가치가 있다고 판단되는 유전자를 선별하여 이를 클로닝, 발현 및 정제하고자 한다. 이와 같은 연구개발목표는 현재 급속도로 진행되고 있는 유전자 산업 경쟁에서 여타 선진국이 아직 그 중요성 및 필요성을 간과하고 있는 동물 종을 대상으로 그 유전자정보를 선점할 수 있는 좋은 기회를 제공할 수 있다고 생각되며 국가적으로도 무한한 경제적 부가가치의 잠재력을 갖고 있는 유전자군의 독점적 소유권을 보유하게 된다는 점에서 매우 유익하고 충분한 투자가치를 갖고 있다고 사료된다. 본 연구과제의 개발목표를 간단히 요약하면 다음과 같다.

- ① 지렁이 발현유전자의 목록작성 및 데이터베이스 구축
- ② 이를 이용한 지렁이 유전자 기능 분석 및 고유유전자 발견
- ③ 유용성 유전자의 탐색, 클로닝 및 발현
- ④ 지렁이 유전자의 산업적 이용 기반 구축
- ⑤ 지렁이 유전자 연구 및 산업화에 기득권 획득

3. 연구결과

본 연구는 유용성 유전자의 발굴 가능성이 높은 지렁이 중장, 재생 중인 지렁이 조직 및 몇 가지 스트레스 하에서 특이적으로 발현되는 유전자를 중심으로 연구하였으며 본 초록에서는 지면 관계 상 지렁이 중장을 중심으로 기술하고자 한다.

3-1. 지렁이 중장의 전사체 분석

지렁이 중장 유전자의 expression profile을 이해하기 위하여 약 1,500 개의 EST sequence를 염기서열분석하였고 이를 NCBI Blastx (nr) 또는 Blastn (nr) 프로그램을 이용하여 그 기능을 분석하였고 e-value가 10^{-5} 미만인 경우만을 선택하여 SeqManII 프로그램을 이용하여 contig 분석을 수행하였다. 그 결과 538개의 EST는 기존의 D/B에 보고된 하나 또는 그 이상의 유전자들과 유사성을 가지고 있는 것으로 나타났으며 563개의 EST는

다른 유전자와 유사성이 없는 잠재적 고유유전자로 사료된다. 나머지 EST는 삽입된 유전자의 길이가 150 bp 이하 (99개) 이거나 ribosomal RNA 유전자 (16개), 미토콘드리아 유전자 (32개) 및 염기서열분석이 신빙성이 없는 경우 등이었다 (Table 1).

Table 1. Composition of midgut ESTs analyzed by BLAST search

EST categories	No. of ESTs	% of ESTs
A. Sequences matched to known genes*	538	43.1
Blastx(nr) search matched	492	39.4
Blastn(nr and dbEST) search matched	46	3.7
B. Sequences had no match or matched insignificantly	710	56.9
Sequences that matched with unknown function	563	45.1
Sequences with no or short inserts**	99	7.9
Ribosomal RNA sequences	16	1.3
Mitochondrial Sequences	32	2.6
Total	1248	100.0

* E-value was less than 10^{-5} .

** Inserts were <150 bp in length.

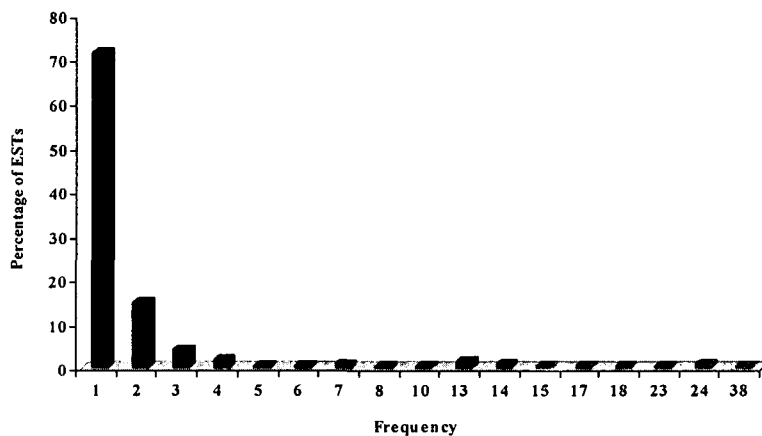


Fig. 1. Expression profiles and sequencing redundancy in the analysis of ESTs from the midgut of the earthworm *E. andrei*

기능분석이 가능한 538개의 EST는 다시 221개의 contig로 분석되었다. 이들 중 157개 (71%)의 EST는 한번의 빈도로 나타났으며 45개 (21.3%) EST는 2-5번의 빈도로, 13개 (5.9%) EST는 10번 이상의 빈도로 나타났다(Fig. 1). 한번의 빈도로 나타난 EST가 70% 이상인 반면에 출현빈도가 높은 상위 10개의 EST 출현빈도가 전체의 18.1%를 차지하는 것으로 나타나 유전자의 발현이 한쪽으로 치우쳐서 일어나는 양상을 보였다. 기능적으로 분류하면 가장 풍부하게 발현된 유전자들은 세포외 호흡색소 (6.3%), 세포호흡(5.2%), 및 단백질 분해효소(3.6%)와 관련된 것으로 나타났다 (Table 2).

3-2. 지렁이 중장의 유용성 유전자

지렁이 중장에서 분리된 유전자 중 의약학적 및 농업적 응용 가능성이 있는 유전자의 목록은 Table 3과 같다.

Table 2. The 17 most highly expressed genes in the midgut of the earthworm *E. andrei*

Number of matches (% Frequency)	Putative identification
38 (3.0%)	Fibrinolytic enzyme II
24 (1.9%)	Cytochrome c oxidase subunit I Globin III, extracellular
23 (1.8%)	Globin IV, extracellular
18 (1.4%)	Cytochrome c oxidase subunit II
17 (1.4%)	Globin II, extracellular
15 (1.2%)	Ferritin
14 (1.1%)	Globin I, extracellular
13 (1.0%)	NADH dehydrogenase subunit 2 Cytochrome c oxidase subunit III NADH dehydrogenase subunit 4 Actin
10 (0.8%)	Cytochrome b
8 (0.6%)	ATP synthase F0 subunit 6
7 (0.6%)	Serine proteinase
6 (0.5%)	Heat shock 70 KDa protein 8 NADH dehydrogenase subunit 1

Table 3. Novel Earthworm ESTs useful for therapeutic and agroecological application

putative identification	function/possible applications	cDNA 구분
destabilase	lysozyme and isopeptidase antagonist against transglutaminase	F
fibrinolytic enzymes I-VI	fibrin hydrolysis antithrombotic agents	F
antistasis I-IV	Factor Xa inhibitor antithrombotic agents	F
lysenin	antibacterial agent	P
antioxidant protein	immune-enhancing factor	P
peptidoglycan recognition protein	antibacterial agent	F
serine proteinase inhibitors I-III	antimetastatic or non-steroidal antiinflammatory agent	F
glutathion S-transferase	xenobiotics metabolism	P
cytochrome P-450	xenobiotics metabolism	P
cellulase	cellulose breakdown	F
ligninase	lignin breakdown	P
alkaline phosphatase	increase phosphate availability in soil	P
intestine musin	increase water holding capacity of soil	P

F: Full-length cDNA; P: Partial cDNA