

초고온성 극한미생물 omics 연구 및 유용소재 개발

이현숙, 강성균, 이정현

한국해양연구원

1. 서론

극한미생물들은 지구상 위에서 생물이 서식하기 어려운 극한환경에 적응하여 살아가는 미생물을 총칭하며, 그 생육하는 환경에 따라, 고온성 미생물(Thermophiles), 저온성 미생물(Psychrophiles), 호산성 미생물(Acidophiles), 호알칼리성 미생물(Alkalophiles), 호염성 미생물(Halophiles), 심해저 환경에서 생육하는 고압성 미생물(Piezophiles), 건조내성 미생물(Xerophiles) 등으로 분류할 수 있다. 이러한 극한환경에 존재하는 미생물들은 생존에 필요한 필수효소들이 극한환경에 적응되어 있기 때문에 연구와 응용의 대상이 되어왔다. 이러한 극한미생물을 이용한 효소의 응용 및 개발에 대해서는 학회 총설 등으로 소개된 바 있다(4, 11, 12, 37, 45). 본 총설에서는 여러 극한미생물 중 특히 초고온성 극한미생물 유래의 효소 개발에 대해 살펴보고, 최근에 활발히 진행 중인 유전체 연구에 대해 소개하고자 한다.

2. 초고온성 극한미생물

서론에서 언급된 바와 같이 다양한 극한환경은 새로운 미생물과 효소를 탐색하기 위한 좋은 장소들이다. 특히 지구상에는 초고온 극한미생물을 함유하고 있는 다양한 환경이 존재하고, 다양한 pH 조건의 온천, 천해나 심해의 열수구환경

의 초고온환경으로부터 다양한 극한미생물들이 발견되었다. 발견된 극한미생물 중에는 *Thermotoga*, *Aquifax*와 Taq DNA polymerase로 유명한 *Thermus* 속 미생물, 바실러스 등의 세균성 극한미생물이 포함되지만, 대부분 archaea(고세균)가 주류를 이루고 있다.

1977년 우즈박사는 진핵생물, 일반 세균, 메탄생성균을 분석한 결과, 메탄생성균들이 계통적으로 다른 종류의 세균과는 다르다는 결론을 내리고 이런 종류의 미생물들을 아키타테리아(고세균)로, 기존의 세균들은 유박테리아(진정세균)로 분류할 것을 제안하고, 3개의 도메인, Archaea, Bacteria, Eukarya를 제안하였다(47). 이후 300 여종의 고세균이 다양한 극한환경에서 발견되었으며, Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota, Nanoarchaeota 4 종류로 크게 분류된다. 이들 분류는 16S rDNA 염기서열 이외에 종류별로 생리학적 공통적인 특성을 나타내는 것은 아니다. Crenarchaeota에는 현재까지 동정된 미생물 중에서 최고의 온도(113°C)에서 자라는 것으로 알려진 *Pyrolobus fumarii*(6)와 지구상에서 가장 높은 온도에서 자라는 것으로 보고된 strain 121(121°C) (20) 등, *Aeropyrum*, *Acidilobus*, *Pyrobaculum*, *Pyrodictium*, *Pyrolobus*, *Sulfolobus* 등이 속한다. Euryarchaeota에는 *Archaeoglobus*, *Methanococcus*, *Picrophilus*, *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Thermoplasma* 등 초호열균, 메탄생성균, 호염균, *Thermoplasma* 등의 다

양한 아키아들이 속해 있다. Korarchaeota는 대부분 uncultured 미생물로서 environmental DNA에서 분리한 16S rDNA의 서열을 통해 알려진 미생물들이다. Nanoarchaeota는 Stetter 박사(17) 연구진이 해저 열수 분출구에서 발견한 *Nanoarchaeum equitans*가 대표적으로 Crenarchaeota의 하나인 *Ignicoccus* 속에 기생하는 것으로 알려져 있다(12, 42).

3. 초고온성 극한미생물의 활용

극한미생물의 발견과 미생물의 극한환경 적응기작을 활용한 연구는 독성물질(toxic compound)의 분해부터 의약품 생산까지 다양한 분야에서 이루어지고 있고, 극한환경에서 활성을 나타내는 효소나 유전자원들을 산업적으로 이용하려는 연구들도 활발하게 진행되고 있다(14). 초고온성 극한미생물 유래의 효소들은 thermostable한 특성을 이용하여 전분, cellulose, chitin, xylan의 분해, PCR 반응, 단백질전환, 광학특이적 가수분해, 생물전환 반응 등 다양한 분야에서 연구되고 있다.

3.1. Starch-processing enzymes: amylase, glucoamylase, pullulanase

많은 고세균 유래 효소 중 glycosyl hydrolase family에 속하는 효소는 전분액화(liquefaction), 당화(saccharification), 이성화(isomerization)에 관여함으로써 산업적 개발 대상이 되어왔다. 특히 전분을 dextrin, glucose, fructose, trehalose 등으로 만드는 공정은 전분의 액화를 위한 고온공정으로 인해 초고온성 효소가 요구되므로, 초고온성 amylase(EC 3.2.1.1), glucoamylase(EC 3.2.1.3), pullulanase, glucosidase 등 다양한 효소의 개발로 이어졌다. *Pyrococcus* sp.에서 개발된 α -amylase는 130°C에서도 활성을 나타내며, 120°C에서 4시간동안 autoclave 한 후에도 활성이 살아있는 것으로 보고되고 있다. 최근에는 antibody, vaccine, hormone 등의 단백질 의약품의 안정성을 위해 trehalose 생산을 위한 효소 개발에 많은 연구가 수행되고 있다. 또한 Cyclodextrin glycosyltransferase(CGTases; EC 2.4.1.19)도 polysaccharides

내에 있는 α -1,4-linkage를 공격하여 intramolecular transglycosylation reaction에 의해 전분을 환상으로 전환시켜 여러 가지 물질을 포입하여 복합체를 형성하게 함으로써 다양한 식품공업에 유용하게 사용되고 있다(12).

3.2. Cellulose-degrading enzymes

Cellulose는 자연에서 가장 풍부한 유기고분자물질로 glucose의 β -1,4-glycosidic bonds가 직선으로 연결된 polymer이다. Cellulose는 endoglucanase(EC 3.2.1.4), exoglucanase(EC 3.2.1.91), β -glucosidase(EC 3.2.1.21) 등의 적어도 세 가지 효소들의 연속적인 작용에 의해 glucose로 분해될 수 있다. β -glucans과 cellulose의 β -1,4-bonds 분해할 수 있는 내열성 endoglucanase는 *Pyrococcus*, *Sulfolobus* 등에서 보고되었으며(2), *Pyrococcus furiosus*에서 분리된 endoglucanase는 대장균에 클로닝되어 특성이 밝혀졌다. Cellulose는 높은 온도에서 알칼리를 통한 전처리 과정을 통해 ethanol 발효에 이용되므로 초고온성 cellulase는 이에 가장 적합한 효소로 부각되고 있다(12).

3.3. Xylan-degrading enzymes

식물 세포벽의 hemicellulose(xylan)을 분해하는 xylanase는 식품, 제지산업에서 품질개선에 대한 요구로 최근에 많은 연구가 이루어지고 있다. Xylan을 완전히 분해하기 위해서는 endo- β -1,4-xylanase(EC 3.2.1.8)와 endo- β -1,4-xylosidase(EC 3.2.1.37) 활성이 필요하며 *Pyrodictium abyssi*와 *T. zilligii* AN1(37) 등에서 보고되고 있다(12).

3.4. Chitin-degrading enzymes

N-acetyl-glucosamine으로 구성된 불용성 고분자물질인 chitin은 해양환경에서 다양한 해양생물들에 의해 생산된다. 초고온성 chitin 분해활성은 고세균에 아주 드물게 관찰되는데, *Thermococcus chitonophagus*(1), *Thermococcus kodakaraensis* KOD1(18,44), *P. furiosus*(13)가 endochitinase (EC 3.2.1.14) 활성을 가지고 있는 것으로 보고되었다.

3.5. DNA processing enzymes

분자생물학 연구에 있어 내열성 효소의 중요성을 가장 부각시킨 것은 바로 Taq DNA polymerase로 PCR의 자동화를 가능하게 한 것이다. Taq DNA polymerase 이후 많은 *Thermus* 속으로부터 다양한 DNA polymerase들이 분리되어 PCR에 적용되고 있다(19,34). 최근에는 Taq DNA polymerase 계통이 3'-5' exonuclease activity의 활성부재로 높은 error rate를 보여, 이를 개선하기 위한 다양한 high-fidelity DNA polymerase 개발에 많은 연구가 이루어지고 있다(23,31,32,40,43,49). 하지만, 이들 proofreading polymerase들은 낮은 증폭 신장률로 인해 Taq DNA polymerase를 완전히 대체하지는 못하고 있다. 이런 문제들 때문에 높은 신장성과 낮은 error rate를 갖는 신규 내열성 DNA polymerase의 지속적인 개발과 더불어 돌연변이 유도에 의한 활성의 최적화, domain fusion에 의한 신장성과 정확한 증폭 활성 도입, DNA shuffling(family shuffling) 등의 방법에 의한 내열성 DNA polymerase의 개량 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근에 개발된 KOD1 DNA polymerase는 낮은 error rate를 가지고 높은 진행성, 높은 신장률을 보이는 것으로 보고되고 있다(43). 또한 한국해양연구원의 NA1 DNA polymerase도 KOD1 DNA polymerase와 유사하게 낮은 error rate, 높은 진행성, 높은 신장률을 보이는 것으로 보고되고 있다(21).

또한 DNA polymerase 외에도 다양한 초고온 환경에서 안정한 thermostable DNA processing enzyme들이 많이 개발되고 있다. DNA polymerase와 함께 사용하여 PCR 효율을 개선할 수 있는 dUTPase(9, 10, 16), dITPase(22), pyrophosphatase(46), PCNA, replication factor C 등에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다. 이외에도 ligase-chain reaction을 위한 DNA ligase, thermostable alkaline phosphatase 등도 연구되고 있다.

3.6. 단백질 분해효소

고세균에서 발견되는 대부분의 단백질 분해효소들은 serine 계열이 대다수를 이루며, 고온에서 활성을 보이며 다양한 유기용매에서도 안정성을 보여 가정용 세제 첨가물, 피혁산업, 높은 온도나 극단적인 pH 조건하에서 반응을 촉매할 수 있

는 산업적 응용에 사용되고 있다. 하지만 초고온성 고세균의 유전체 분석을 통하여 serine, cysteine, metal-dependent protease 등 많은 단백질 분해효소들이 존재함을 알게 되었고, 유전체 분석 결과 *P. furiosus*에서만으로도 7종의 단백질 분해효소가 특성분석 되었다고(4, 15), 국내의 한국해양연구원에서 5종의 단백질 분해효소가 *Thermococcus onnurineus* NA1에서 특성분석 되었다(25-29). 이러한 고온성 단백질 분해효소는 중온성 단백질 분해효소와 다른 독특한 아미노산 서열과 구조적 특성을 가진 것들이 많이 밝혀지고 있어서 단백질이 고온에서 안정한 기작을 구조적으로 설명하는데 좋은 재료로 활용되고 있다(4).

3.7. 기타

고온 환경에서 사용가능한 생촉매로서 alcohol dehydrogenases(EC 1.1.1.1), esterases, C-C bond-forming enzymes(aldolases), nitrile-degrading enzymes, aminoacylases 등 다양한 효소들이 개발되고 있다(12).

4. Omics 연구

4.1. 유전체 연구

아키아의 유전체 연구는 1993년 *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Pyrococcus furiosus* 3종이 시작되어 이 중 *M. jannaschii*의 유전체가 1996년 보고되었다(7). 현재까지 보고된 바에 의하면 게놈 분석이 완료된 53종의 고세균은 다음과 같다 (Table 1, <http://www.genomesonline.org/gold.cgi>).

이러한 고세균 외에도 현재 90여종의 고세균의 유전체 연구가 진행되고 있는 것으로 알려지고 있다. 이러한 유전체 분석은 극한생물의 극한환경에 대한 적응기작과 실험을 통하여 알지 못했던 다양한 생리적인 특성에 대해 새로운 정보를 제공하고 있다. 또한 이러한 유전체 정보를 이용하여 post-genomics 연구가 한창인데 특히 초고온성 고세균을 이용한 comparative genomics, transcriptomics, proteomics, structural genomics에 대한 연구가 활발히 진행 중이다.

Table 1. 유전체가 완성된 고세균들(초고온성 고세균은 bold로 표기)

| Phylum | Organism | Classification | Genome size(kb) |
|----------------------|---|-------------------------|-----------------|
| Crenarchaeota | <i>Aeropyrum pernix</i> | Hyperthermophile | 1700 |
| Crenarchaeota | <i>Caldivirga maquilingsis</i> | Hyperthermophile | 1963 |
| Crenarchaeota | <i>Cenarchaeum symbiosum</i> | Psychrophile | 2017 |
| Crenarchaeota | <i>Hyperthermus butylicus</i> | Hyperthermophile | 1602 |
| Crenarchaeota | <i>Ignicoccus hospitalis</i> | Hyperthermophile | 1434 |
| Crenarchaeota | <i>Metallosphaera sedula</i> | Thermophile | 2256 |
| Crenarchaeota | <i>Nitrosopumilus maritimus</i> | Mesophile | 1795 |
| Crenarchaeota | <i>Pyrobaculum arsenaticum</i> | Hyperthermophile | 2298 |
| Crenarchaeota | <i>Pyrobaculum calidifontis</i> | Hyperthermophile | 2149 |
| Crenarchaeota | <i>Pyrobaculum islandicum</i> | Hyperthermophile | 1978 |
| Crenarchaeota | <i>Pyrobaculum aerophilum</i> | Hyperthermophile | 2605 |
| Crenarchaeota | <i>Staphylothermus marinus</i> | Hyperthermophile | 1570 |
| Crenarchaeota | <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> | Thermophile | 2292 |
| Crenarchaeota | <i>Sulfolobus tokodaii</i> | Hyperthermophile | 2825 |
| Crenarchaeota | <i>Sulfolobus solfataricus</i> | Hyperthermophile | 2977 |
| Crenarchaeota | <i>Thermofilum pendens</i> | Hyperthermophile | 1824 |
| Crenarchaeota | <i>Thermoproteus neutrophilus</i> | Hyperthermophile | 1966 |
| Euryarchaeota | <i>Archaeoglobus fulgidus</i> | Hyperthermophile | 2420 |
| Euryarchaeota | <i>Candidatus Methanoregula</i> | Mesophile | 2450 |
| Euryarchaeota | <i>Haloarcula marismortui</i> | Mesophile | 3412 |
| Euryarchaeota | <i>Halobacterium</i> sp. | Mesophile | 2075 |
| Euryarchaeota | <i>Halobacterium salinarum</i> | Thermophile | 2110 |
| Euryarchaeota | <i>Haloquadratum walsbyi</i> | Mesophile | 2610 |
| Euryarchaeota | <i>Methanobrevibacter smithii</i> | Mesophile | 1793 |
| Euryarchaeota | <i>Methanocaldococcus jannaschii</i> | Hyperthermophile | 1729 |
| Euryarchaeota | <i>Methanococcoides burtonii</i> | Psychrophile | 2273 |
| Euryarchaeota | <i>Methanococcus maripaludis</i> | Mesophile | 1826 |
| Euryarchaeota | <i>Methanococcus maripaludis</i> | Mesophile | 1788 |
| Euryarchaeota | <i>Methanococcus aeolicus</i> | Mesophile | 1490 |
| Euryarchaeota | <i>Methanococcus vannielii</i> | Mesophile | 1678 |
| Euryarchaeota | <i>Methanococcus maripaludis</i> | Mesophile | 1813 |
| Euryarchaeota | <i>Methanococcus maripaludis</i> | Mesophile | 1722 |
| Euryarchaeota | <i>Methanocorpusculum labreanum</i> | Mesophile | 1739 |
| Euryarchaeota | <i>Methanoculleus marisnigri</i> | Mesophile | 2489 |
| Euryarchaeota | <i>Methanopyrus kandleri</i> | Hyperthermophile | 1687 |
| Euryarchaeota | <i>Methanosaeta(Methanothrix)</i> | Thermophile | 1696 |
| Euryarchaeota | <i>Methanosarcina barkeri</i> | Mesophile | 3606 |
| Euryarchaeota | <i>Methanosarcina mazei</i> | Mesophile | 3370 |
| Euryarchaeota | <i>Methanosarcina acetivorans</i> | Mesophile | 4540 |
| Euryarchaeota | <i>Methanosphaera stadtmanae</i> | Mesophile | 1534 |
| Euryarchaeota | <i>Methanospirillum hungateii</i> | Mesophile | 3139 |
| Euryarchaeota | <i>Methanothermobacter</i> | Thermophile | 1873 |

Table 1. 이어집.

| Phylum | Organism | Classification | Genome size(kb) |
|---------------|---|------------------|-----------------|
| Euryarchaeota | <i>Natronomonas pharaonis</i> | Mesophile | 2661 |
| Euryarchaeota | <i>Picrophilus torridus</i> | Thermophile | 1535 |
| Euryarchaeota | <i>Pyrococcus furiosus</i> | Hyperthermophile | 2125 |
| Euryarchaeota | <i>Pyrococcus abyssi</i> | Hyperthermophile | 1896 |
| Euryarchaeota | <i>Pyrococcus horikoshii</i> | Hyperthermophile | 1955 |
| Euryarchaeota | <i>Thermococcus kodakaraensis</i> | Hyperthermophile | 2306 |
| Euryarchaeota | <i>Thermoplasma volcanium</i> | Thermophile | 1499 |
| Euryarchaeota | <i>Thermoplasma acidophilum</i> | Thermophile | 1482 |
| Euryarchaeota | Uncultured methanogenic archaeon RC-I | | 3085 |
| Korarchaeota | <i>Candidatus Korarchaeum cryptofilum</i> | | 1602 |
| Nanoarchaeota | <i>Nanoarchaeum equitans</i> | Hyperthermophile | 536 |

4.2. Functional genomics and whole cell engineering

유전체 등의 활발한 연구에도 불구하고, 극한미생물의 산업적 활용 연구는 위에서 살펴본바와 같이 대부분 극한환경에서 활성을 나타내는 효소나 유전자원 등을 분리하여 이용하는 것이 대다수이고, 극한미생물 자체를 활용하거나 극한미생물을 이해하기 위한 functional study의 경우는 상대적으로 활발하지 못한 편이다. Transcription, replication, DNA damage 등 세포의 기능의 근간이 되는 central machinery 경우 진핵세포와의 유사성으로 인해 다양한 structural genomics의 연구대상이 되고 있지만, 극한미생물 자체에 대한 연구는 활발하지 못했다. 그 원인으로는 극한미생물의 배양 및 연구를 위한 실험방법이나 기기장비 면에서 많은 어려움이 있고, 극한미생물에서 functional study를 진행하기 위한 유전학적, 분자생물학적 지원 요소들이 미비했기 때문이었다. 하지만 최근에는 초고온 고세균을 중심으로 transformation이나 disruption을 위한 vector system들이 개발되어 유전자의 기능 등에 대한 functional study가 가능해지고 있다. *S. solfataricus*에서 viral infection이나 conjugation에 필요한 요소들이 보고되었고(8, 30, 39, 41), *P. abyssi*에서는 유전자를 도입하기 위한 shuttle vector가 제작되었다(30). 최근에는 *T. kodakaraensis* KOD1을 대상으로 disruption을 하기 위한 효율적인 방법이 개발되어 유전자의 기능연구가 활발히 진행 중이고(3, 35, 36), 또한 *S. solfataricus*에서도 disruption 연구가 가능하

게 되었다(48). 이러한 연구는 기존의 structural genomics에 머물렀던 고세균의 신기능 유전자의 연구에 생체내 기능에 대한 연구와 극한미생물의 metabolic engineering을 통한 whole cell biocatalyst 등의 개발이 가능해지지 않을까 사료된다.

5. 국내 초고온성 극한미생물 genomics/post-genomics 연구

미국·유럽·일본 등의 주요 기술선진국에서는 극한미생물 연구가 수행되어 극한미생물이 보유한 극한효소의 산업적 응용 연구가 활발히 진행되어 산업화되고 있다.

국내에서도 이러한 중요성을 인지해 극한미생물에 대한 연구가 이루어지고 있지만, 아직 국내의 극한환경으로부터 미생물의 탐색 및 분리, 극한미생물의 체계적인 보존 체계의 미비 등으로 극한 미생물의 학문적, 산업적 이용기술은 대부분 외국에서 분리한 균주를 사용하는 수준에 대부분 머무르고 있는 현실이다. 하지만, 국내에서도 이러한 극한미생물에 대한 중요성을 인지하고, 극한미생물을 분리하고, 응용하려는 연구들이 시도되고 있다. 특히, 최근 한국해양연구원은 서태평양 마누스 분지 탐사를 통해 Leg193근처(그림 1)에서 확보된 열수구 지역의 퇴적물에서 초고온성 고세균 두 종, *T. onnurineus* NA1(5)과 *Pyrococcus* sp. NA2(manuscript in preparation)을 분리하였는데 이 두 속은 해양의 열수 환

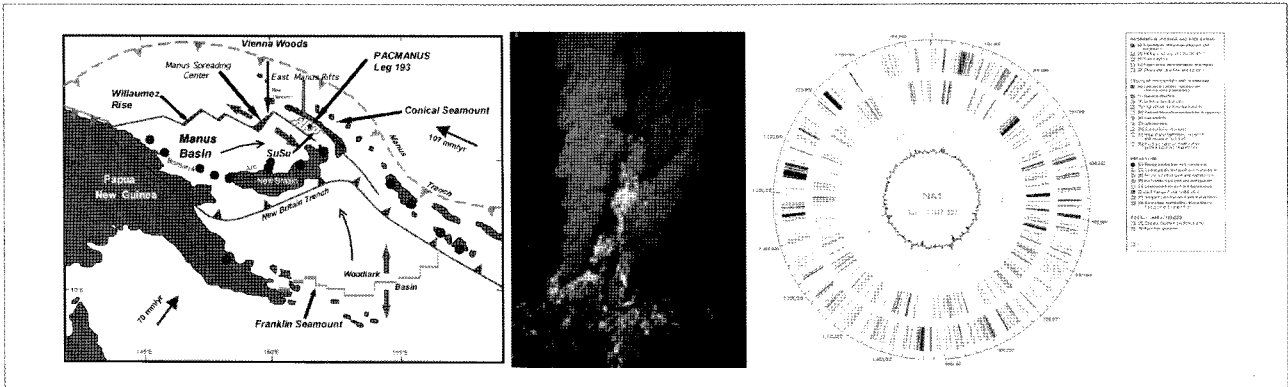


그림 1. 서태평양 PACMANUS분지 Leg193의 지질구조(왼쪽) 및 열수구(가운데)와 Thermococcus onnurineus NA1의 유전자 지도(오른쪽).

경에서 가장 많이 분리되고 존재하는 것으로 알려져 있으며 생태적인 기능과 역할도 매우 중요하고 유용성도 상당할 것으로 판단되고 있다.

T. onnurineus NA1은 1.85 Mbp 크기의 유전체 지도가 완성되었고(그림 1; manuscript in preparation), *Pyrococcus* sp. NA2의 유전체도 완성단계에 있으며, 이들 초고온성 고세균 유래의 다양한 효소 연구도 진행되고 있다(9,21,22,25-29). 특히 *T. onnurineus* NA1에서 high fidelity DNA polymerase를 분리하였고(21), 이로부터 다양한 돌연변이체를 유도하여 long and accurate PCR에 적용하거나 특이 primer를 활용할 수 있는 효소로의 개선을 이루어 (manuscript in preparation) 그 중 일부를 기술이전하기도 하였다. 또한 *T. onnurineus* NA1의 유전체 정보를 이용한 transcriptome, proteome 분석이 시도되고 있으며, 기능이 알려지지 않은 유전자의 신기능을 이해하기 위한 gene disruption과 structural genomics(24,33) 연구도 병행되고 있다.

현 21세기에 생물자원에 대한 관심이 여러 가지 이유로 높아지고 있다. 다양한 극한미생물의 탐색·분리·보존, 극한미생물의 계통적 분류, 극한미생물의 유전체 분석 및 유전체 정보 분석을 통한 유용 유전자 개발, 극한효소(extremozyme)의 분리 및 특성연구를 통한 산업적 이용, 극한미생물을 이용한 환경정화기술 등 극한미생물의 발견, 극한환경 적응 기작 이해, 응용에 대한 연구를 위하여 앞으로 극한생물 연구

분야에 대한 많은 투자와 관심을 기대해 본다.

참고 문헌

1. Andronopoulou E, Vorgias CE. 2004. Isolation, cloning, and overexpression of a chitinase gene fragment from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus chitonophagus*: semi-denaturing purification of the recombinant peptide and investigation of its relation with other chitinases, *Protein Expr Purif* 35:264-271.
2. Antranikian G, Vorgias C, Bertoldo C. 2005. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts, *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 96:219-262.
3. Atomi H, Matsumi R, Imanaka T. 2004. Reverse gyrase is not a prerequisite for hyperthermophilic life, *J Bacteriol* 186:4829-4833.
4. Atomi H. 2005. Recent Progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes, *Curr Opin Chem Biol* 9:166-173.
5. Bae SS, Kim YJ, Yang SH, Lim JK, Jeon JH, Lee HS, Kang SG, Kim SJ, Lee JH. 2006. *Thermococcus onnurineus* sp. Nov. a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent area at the PACMANUS field, *J Microbiol Biotechnol* 16:1826-1831.
6. Blochl E, Rachel R, Burggraf S, Hafenbradl D, Jannasch HW, Stetter KO. 1997. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C, *Extremophiles* 1:14-21.

7. Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L, Fleischmann RD, Sutton GG, Blake JA, FitzGerald LM, Clayton RA, Gocayne JD, Kerlavage AR, Dougherty BA, Tomb JF, Adams MD, Reich CI, Overbeek R, Kirkness EF, Weinstock KG, Merrick JM, Glodek A, Scott JL, Geoghagen NS, Venter JC. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*, Science 273:1058-73.
8. Cannio R, Contursi P, Rossi M, Bartolucci S. 1998. An autonomously replicating transforming vector for *Sulfolobus solfataricus*, J Bacteriol 180:3237-3240.
9. Cho Y, Lee HS, Kim YJ, Kang SG, Kim SJ, Lee JH. 2007. Characterization of a dUTPase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus onnurineus* NA1 and its application in polymerase chain reaction amplification, Mar Biotechnol(NY). 9:450-458.
10. Dabrowski S, Ahring BK. 2003. Cloning, expression, and purification of the His6-tagged hyper-thermostable dUTPase from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli*: application in PCR, Protein Expr Purif 19:107-112.
11. Demirjian DC, Moris-Varas F, Cassidy CS. 2001. Enzymes from extremophiles, Curr Opin Chem Biol 5:144-151.
12. Egorova K, Antranikian G. 2005. Industrial relevance of thermophilic Archaea, Curr Opin Microbiol 8:1-7.
13. Gao J, Bauer MW, Shockley KR, Pysz MA, Kelly RM. 2003. Growth of hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* on chitin involves two family 18 chitinases, Appl Environ Microbiol 69:3119-3128.
14. Gomes J, Steiner W. 2004. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes, Food Technol Biotechnol 42:223-235.
15. Guagliardi A, Cerchia L, Rossi M. 2002. An intracellular protease of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*, which has sequence similarity to eukaryotic peptidases of the CD clan, Biochem J 368:357-363.
16. Hogrefe HH, Hansen CJ, Scott BR, Nielson KB. 2002. Archaeal dUTPase enhances PCR amplifications with archaeal DNA polymerases by preventing dUTP incorporation, Proc Natl Acad Sci USA 99:596-601.
17. Huber H, Hohn MJ, Rachel R, Fuchs T, Wimmer VC, Stetter KO. 2002. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont, Nature 417:63-67.
18. Imanaka T, Fukui T, Fujiwara S. 2001. Chitinase from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1, Methods Enzymol 330:319-329.
19. Ito J, Braithwaite DK. 1991. Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. Nucleic Acids Res 19:4045-4057.
20. Kashefi K, Lovley DR. 2003. Extending the upper temperature limit for life, Science 301:934.
21. Kim YJ, Lee HS, Bae SS, Jeon JH, Lim JK, Cho Y, Nam KH, Kang SG, Kim SJ, Kwon ST, Lee JH. 2007. Cloning, purification, and characterization of a new DNA polymerase from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus* sp. NA1, J Microbiol Biotechnol 17:1090-1097.
22. Kim YJ, Ryu YG, Lee HS, Cho Y, Kwon ST, Lee JH, Kang SG. 2008. Characterization of a dITPase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus onnurineus* NA1 and its application in PCR amplification, Appl Microbiol Biotechnol. 79(4):571-8.
23. Kong H, Kucera RB, Jack WE. 1993. Characterization of a DNA polymerase from the hyperthermophile archaea *Thermococcus litoralis*. Vent DNA polymerase, steady state kinetics, thermal stability, processivity, strand displacement, and exonuclease activities, J Biol Chem 268:1965-1975.
24. Le BV, Lee HS, Cho Y, Kang SG, Kim DY, Kim YG, Kim KK. 2007. Crystallization and preliminary X-ray studies of TON_1713 from *Thermococcus onnurineus* NA1, a putative member of the haloacid dehalogenase superfamily, Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 63:1048-1050.
25. Lee HS, Cho Y, Kim YJ, Nam K, Lee JH, Kang SG. 2007. Biochemical characterization of deblocking aminopeptidase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus onnurineus* NA1, J Biosci Bioeng. 104:188-194.
26. Lee HS, Kim YJ, Bae SS, Jeon JH, Lim JK, Jeong BC, Kang SG, Lee JH. 2006. Cloning, expression, and characterization of a methionyl aminopeptidase from a hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. NA1, Mar Biotechnol(NY) 8:425-432.
27. Lee HS, Kim YJ, Bae SS, Jeon JH, Lim JK, Jeong BC, Kang SG, Lee JH. 2006. Cloning, expression, and characterization of aminopeptidase P from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. strain NA1, Appl Environ Microbiol. 72:1886-1890.
28. Lee HS, Kim YJ, Bae SS, Jeon JH, Lim JK, Kang SG, Lee JH. 2006. Overexpression and characterization of a carboxypeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. NA1, Biosci Biotechnol Biochem

- 70:1140-1147.
29. Lee HS, Kim YJ, Cho Y, Kim SJ, Lee JH, Kang SG. 2007. Characterization of prolyl oligopeptidase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. NA1, J Biosci Bioeng 103:221-228.
 30. Lucas S, Toffin L, Zivanovic Y, Charlier D, Moussard H, Forterre P, Prieur D, Erauso G. 2002. Construction of a shuttle vector for, and spheroplast transformation of, the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*, Appl Environ Microbiol 68:5528-5536.
 31. Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ. 1991. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*, Gene 108:1-6.
 32. Mattila P, Korpela J, Tenkanen T, Pitkanen K. 1991. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase-an extremely heat stable enzyme with proofreading activity, Nucleic Acids Res 19:4967-4973.
 33. Nguyen CM, Lee HS, Cho Y, Lee JH, Ha SC, Hwang HY, Kim KK. 2008. Crystallization and preliminary X-ray studies of TON_0559, a putative member of the haloacid dehalogenase(HAD) superfamily from *Thermococcus onnurineus* NA1, Protein Pept Lett 15:235-237.
 34. Perler FB, Kumar S, Kong H. 1996. Thermostable DNA polymerases. Adv Protein Chem 48:377-435
 35. Sato T, Fukui T, Atomi H, Imanaka T. 2003. Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1, J Bacteriol 185:210-220.
 36. Sato T, Imanaka H, Rashid N, Fukui T, Atomi H, Imanaka T. 2004. Genetic evidence identifying the true gluconeogenic fructose-1,6-bisphosphatase in *Thermococcus kodakaraensis* and other hyperthermophiles, J Bacteriol 186:5799-5807.
 37. Schiraldi C, De Rosa M. 2002. The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles, Trends Biotechnol 20:515-521.
 38. Schiraldi C, Giuliano M, Rosa MDe. 2002. Perspectives on biotechnological applications of archaea, Archaea 1:75-86.
 39. Schleper C, Holz I, Janekovic D, Murphy J, Zillig W. 1995. A multicopy plasmid of the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus* effects its transfer to recipients by mating, J Bacteriol 177:4417-4426.
 40. Southworth MW, Kong H, Kucera RB, Ware J, Jannasch HW, Perler FB. 1996. Cloning of thermostable DNA polymerases from hyperthermophilic marine archaea with emphasis on *Thermococcus* sp. 9° N-7 and mutations affecting 3'-5' exonuclease activity, Proc Natl Acad Sci USA 93:5281-5285.
 41. Stedman KM, Schleper C, Rumpf E, Zillig W. 1999. Genetic requirements for the function of the archaeal virus SSV1 in *Sulfolobus solfataricus*: construction and testing of viral shuttle vectors, Genetics 152:1397-1405.
 42. Stetter KO. 1996. Hyperthermophilic procaryotes, FEMS Microbiol Rev 18:149-158.
 43. Takagi M, Nishioka M, Kakihara H, Kitabayashi M, Inoue H, Kawakami B, Oka M, Imanaka T. 1997. Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR, Appl Environ Microbiol 63:4504-4510.
 44. Tanaka T, Fujiwara S, Nishikori S, Fukui T, Takagi M, Imanaka T. 1999. A unique chitinase with dual active sites and triple substrate binding sites from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1, Appl Environ Microbiol 65:5338-5344.
 45. Van den Burg B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes, Curr Opin Microbiol 6:213-218.
 46. Vander Horn PB, Davis MC, Cunniff JJ, Ruan C, McArdle BF, Samols SB, Szasz J, Hu G, Hujer KM, Domke ST, et al. 1997. Thermo Sequenase DNA polymerase and *Thermoplasma acidophilum* pyrophosphatase: new thermostable enzymes for DNA sequencing, Biotechniques 22:758-762.
 47. Woese CR, Fox GE. 1997. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms, Proc Natl Acad Sci USA 74:5088-5090.
 48. Worthington P, Hoang V, Perez-Pomares F, Blum P. 2003. Targeted disruption of the α -amylase gene in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*, J Bacteriol 185:482-488.
 49. 김현규. 2002. 심해열수 유래 초고온성 효소의 산업화, 생물산업, 15:25-31.