

암모니아 산화 고세균의 독립성장에 필요한 결손 유전자 예측

한상수¹, 이진영¹, 이성근², 김근중^{1*}

Prediction of Genes Lacking in an Ammonia Oxidizing Archaeon for Independent Growth

Sang-Soo Han¹, Jin-Young Lee¹, Sung-Keun Rhee², and Geun-Joong Kim^{1*}

접수: 2011년 5월 4일 / 게재승인: 2011년 5월 30일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: As a number of archaea are ubiquitously found in non-extreme habitats, elucidation of their functional roles becomes currently an emerging issue. However, most of them are unable to grow in pure culture and so it remains to be established. In order to find genes lacking in the genome of an ammonia-oxidizing archaeon (AOA), we here report on the comparative analyses of an AOA genome with those of experimentally or theoretically established minimal genomes for independent growth. We assessed the genes lacking in AOA using logic of clusters of orthologous groups (COG), remote homology, consensus sequence weight matrix, function-based motif or domain, and then further excluded genes encoding hypothetical or archaea-specific proteins. The results of these combination analyses revealed 19 candidate genes lacking in the genome of an AOA. Thus, our results provide a possibility of inducing independent growth of AOA when supplemented with product (s) of the lacking gene (s), and also give a chance for finding new proteins with novel sequence or structure space even if the predicted lacking-genes will be found using another algorithms or biochemical studies.

Keywords: Archaeon, Ammonia, Nitrification, Minimal

¹전남대학교 생물학과

¹Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
Tel: +82-62-530-3403, Fax: +82-62-530-3409
e-mail: gjkim@chonnam.ac.kr

²충북대학교 미생물학과

²Department of Microbiology, Chungbuk National University, 12 Gaeshin-dong, Heungduk-gu, Cheongju 361-763, Korea

genome, Mycoplasma

1. 서론

고세균은 archaeon domain 단세포생물로 핵막이나 소기관이 존재하지 않으며 원형의 염색체와 일부 종은 plasmid를 지닌다 [24]. 표현형질이 진정세균과 많은 연관성이 있지만 [1,2,8,29], 세포막 성분이나 복제와 전사, 단백질 합성에 이용되는 기구나 기작은 진핵생물에 가깝다. 이를 근거로 진정세균에서 분리되어 독특한 분류학적 위치를 차지하고 있다 [8,21,26]. 최초 발견 이후, 고세균은 고온이나 강산과 같은 극한생태계에 적응해 사는 특이한 생물 종으로 인식되었다 [2]. 하지만 해양에서 고세균 16s rRNA 서열들이 발견된 후, metagenomics 기법을 통해 고세균이 비극한 환경 생태계 전반에 존재하고 있음이 확인되었다 [19,27]. 따라서 생태계에 제한적인 역할을 할 것이라던 기존의 인식과 달리, 전 생태계를 구성하는 주요 균주로서 고세균의 역할 규명이 매우 중요한 화두가 되고 있다.

해양미생물은 대기의 이산화탄소나 질소원의 순환과 해양으로 유입되는 다양한 유기물의 분해와 같은 물질대사의 중요한 주체이며, 기후에 일정한 영향을 미치는 것으로 보고되었다 [6]. 이러한 해양 생태계에 고세균이 풍부하며, 16s rRNA 분석결과로 단일 종이 우점하는 사실이 규명되면서 이들의 생태학적 역할 규명에 많은 연구가 진행 중이다 [13,27]. 우점 종은 주변환경에 가장 잘 적응했다는 것을 의미하며 제한된 영양분을 두고 다른 미생물과의 경쟁에 유리한 효율적인 수송과 대사, 기질 친화성이 높은 효소를 지닌다는 것을 의미한다. 이미 여러 연구를 통해 질소원 순환의 중요한 기여자로 고세균이 보고되고, 질화작용에 필수적인 *amo* 유전자의 고세균 비율이 높다는 결과는 이를 증명하고 있다 [18,25,30].

토양에서 AOB (Ammonia Oxidizing Bacteria)보다 AOA *amo*가 낮은 암모니아 농도에서 증가한다는 결과도 이러한 사실을 지지한다. 결국, 일반적인 생태계 전반, 특히 해양에 존재하는 고세균은 탄소와 질소 순환에 큰 기여를 한다는 것을 의미하며 [3,15], 새로운 수송이나 대사경로의 존재 가능성이 매우 높은 것이다. 이러한 사실로 고세균 역할에 다양한 예측이 가능하지만, 생리/생화학적 특성 및 기작 규명에 큰 진전을 보이지 못하고 있다. 이를 위해서는 독립배양을 통한 지속적인 분석과 충분한 세포 양이 필요하나 많은 비극한 고세균의 영양요구성이나 생리적인 특성을 알지 못해 독립배양이 어렵기 때문이다. 분리배양이 보고된 *Nitrosopumilus maritimus* SCM1 [16] 이후, 해양 고세균의 배양 사례는 sulfur-oxidizing bacteria와 co-culture로 성공한 경우가 전부이다 [23]. 전자의 경우도, 유전체의 정보 (ORF와 synteny)가 거의 같은 고세균의 순수배양이 불가능한 것으로 알려져 확실한 증거는 없다. 따라서 관련된 고세균의 순수배양이나 고농도 배양기술은 시급히 해결해야 할 과제이다. 특정 환경 균주를 배양하는 전형적인 방법은 다양한 배지에서 성장여부를 확인하거나 생태조건을 모사해 enrichment를 시도하는 것이다. 하지만 이러한 방법으로 배양 가능한 균주는 전체 미생물의 극히 일 부라고 알려져 있다. 많은 종류의 생물성장에 균주 사이의 영양분이나 신호 교환이 매우 중요한 인자이기 때문이다 [12,27].

이론적으로 미생물 독립성장 유도에 필요한 영양학적 접근은 최소 유전체를 규정하는 작업과 관련이 있다. 다양한 유전체의 크기와 유전자를 지니더라도 독립성장에 필요한 필수 유전자는 제한적이라는 사실에서 출발한 이러한 노력은, 컴퓨터를 이용한 독립세균간의 염색체 비교와 최소 유전체 구현을 위한 deletion analyses, transposon을 이용한 knock out mutant의 분석을 통해 많은 정보가 축적되었다 [10,11,20]. 특히 독립성장이 가능한 최소한의 유전자 세트에 가장 가까운 것으로 알려진 *Mycoplasma*의 존재는 중요한 지표가 되고 있다.

본 연구는 미생물의 독립성장에 필수적이라고 알려진 유전자 (essential genes)정보를 이용해 해양 비극한 AOA 염색체와 비교하는 방법으로, 독립성장이 불가능한 해양생태 우점 종의 결손된 필수유전자를 유추해 배양유도 가능성을 확인하는데 목적을 두고 있다.

2. 재료 및 방법

2.1. 해양 고세균과 비교에 사용된 박테리아 유전체 서열

본 연구에 사용된 해양 고세균 genome은 GenBank에 등록된 *N. maritimus* SCM1 (CP000866, 1997 ORF)의 것을 이용하였고, 최소 유전체에 가까운 유전체 서열을 지닌 *Mycoplasma genitalium* G37 (L43967, 524 ORF)과 *Mycoplasma mycoides subsp. capri* GM12 (CP001621, synthetic genome) [9]의 data를 비교과정에 이용하였다. 상기 과정에 이론적으로 규정된 최소 유전체 정보를 대조군으로 활용하였다 [10,11].

2.2. 유전체 비교 분석 과정

최소 유전체 정보와 비교과정을 통해 독립성장에 필수적인

유전자 중, 해양 고세균에 존재하지 않거나 counterpart가 불분명한 유전자의 규정 과정은 다음과 같다 (Fig. 1). 우선, GenomeBLAST web server (<http://bioinfo-srv1.awh.unomaha.edu/genomeblast>)를 이용해 해양 고세균과 *Mycoplasma* genome 간의 COG를 분류하고자 cut-off (coverage 80%과 identity 35%)를 설정하여 유전자들을 비교하였다 [22]. 추가적으로 SEED viewer (<http://seed-viewer.theseed.org>)의 기능/구조 분석 기법을 수행하여 해양 고세균의 모든 유전자를 보고된 필수유전자들과 비교하였다. 뚜렷한 상동성을 지니지 않으나 기능이 같은 유전자 쌍, 즉 remote homology (twilight zone)에 해당하는 상동성을 지닌 유전자를 조사하기 위해 coverage 50%, identity 20%로 설정하여 GenomeBLAST를 수행하였다. 위 과정을 통해 *Mycoplasma*나 이론적인 최소 유전체 유전자 중, *N. maritimus* SCM1에서 counterpart가 불분명한 유전자를 일차로 선별하였다. 탐색된 유전자중 서열 다양성이 큰 family와 생리학적 특성 규명이 어려운 일부 막 단백질군, 진정세균과의 직접비교가 어려운 archaea 특이 유전자를 분류해 제외하였다. 상기 과정에서 선별된 유전자들의 존재 가능성 여부는, 고세균과 분자진화상의 거리가 비교적 가까운 진정세균이나 독립배양이 가능한 고세균에서 알려진 유전체 서열과 아미노산 서열을 이용해 weight matrix (Wconsensus, <http://ural.wustl.edu/consensus/html/Html/main.html>)를 제작한 후, 해양 고세균 genome을 바탕으로 PSI (Position-Specific Iterated) BLAST나 ClustalW를 이용해 재분석하고, CDD (Conserved Domain Database) search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 확장을 통해 극단적으로 diverse 하거나 convergent evolution 가능성이 있는 유전자를 고려하는 방법으로 확인하였다.

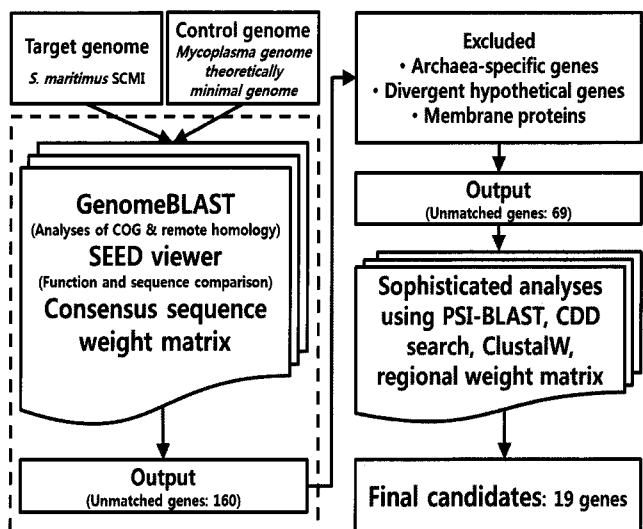


Fig. 1. Comparative analytical procedure of genetic information between an archaeon and minimal genomes.

2.3. 결손 추정 유전자가 관여하는 대사 경로 분석과 대사물 첨가에 의한 세포 성장 분석

해양 고세균에서 뚜렷한 상동유전자나 counterpart가 없는 것으로 확인된 19개의 유전자를 KEGG (kyoto encyclopedia

of genes and genomes, <http://www.genome.jp/kegg>)에 적용해 우회/대체경로를 포함한 대사경로를 분석하였다. 분석된 경로에 필요한 기질과 생성물을 분석하여 실제로 *N. martimus* SCM1과 같은 유전형질을 지니며, 진정세균과의 공생으로만 성장한다고 알려진 AR enrichment culture [23]의 독립성장 유도 가능성을 확인하였다. AOA (AR culture)를 배양하기 위한 기본 배지 조성 (filtrated seawater, 1 mM ammonium chloride, 1 mM sodium thiosulfate, 2.5 mM sodium bicarbonate, 0.1 mM potassium phosphate, 1X trace elements and vitamin solution)은 참고문헌과 같다 [23]. AOA는 기본 배지에 5% 접종한 후, 25°C (dark condition)에 정치해 14일간 배양하였다. 성장 영향 분석을 위한 기질 (CMP, UMP, TMP)은 각각 10, 50, 100 µM을 첨가하였다. 14일간 배양을 유도하며 0, 3, 7, 10, 14일의 간격으로 배양액 (1 mL)을 취해 정량 PCR과 ammonia 산화에 따른 nitrite 생산 정도를 비교하였다. 정량 PCR에는 archaea 16s rDNA 서열을 증폭할 수 있는 primer를 활용하였고 (Table 1), 검증에는 archaea 16s rDNA 서열을 지닌 plasmid를 제작해 이용하였다. Nitrite는 원심분리로 회수한 상층액을 10배 희석한 후, 0.1 mL을 sulfanilamide, *N*-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride 와 1:1:1로 반응시켜 흡광도 (544 nm)로 정량하였다 [23].

3. 결과 및 고찰

3.1. 결손 유전자 탐색에 이용한 *N. martimus* SCM1과 AR enrichment culture와의 연관성

메타지노믹과 생지화학적 연구 기법, 분자 생물학적 접근법의 개발로 다양한 비극한 고세균의 존재가 확인되어 연구되고 있지만, 전형적인 재조합 숙주에서 발현 가능한 유전자로 제한된 결과만을 얻고 있어 생태/생리/생화학적 특성 규명에는 크게 부족한 실정이다 [4,5,14], 가장 확실하고 직접적인 방법은 순수배양을 통해 관련된 인자를 규명하는 것이지만, 비극한 고세균의 영양요구성이나 community interaction factor의 규명이 어려워 배양이 어렵다. 2005년 수족관 침전물 층에서 암모니아를 산화하며 이산화 탄소를 고정하는 *N. martimus* SCM1이 최초로 분리 배양된 후 [16], 유전체 분석이 성공적으로 완료되었지만 [28], 이후에 발표된 결과에서 순수배양의 확실한 증거는 불분명하다. 이와는 달리 유사한 특성 (16s rRNA나 *amo* 그리고 *nirK*와 같은 분자생물학적 지표)을 지닌 다른 고세균이나, 최근 해양 (한국 동해의 침전물)으로부터 enrichment culture 가 보고된 고세균 (AR culture)의 경우는 bacteria와의 동시배양을 통해 성장하는 것으로 알려져 있다. AR과 *N. martimus* SCM1의 16s rRNA는 99% 이상이

일치하며 morphology나 nitrification 기능이 같음은 물론 [23], 발표하지 않은 AR의 genome draft sequence는 *N. martimus* SCM1과 유전자의 수나 배열, 서열에서 극단적인 일치도를 지니 같은 종으로 판단 된다. 따라서, 본 연구에서는 발표된 *N. martimus* SCM1 서열을 기반으로 분석하고 draft 서열과도 비교함으로써 신뢰도를 높였으며, 결손 대사물에 의한 배양학적 특성 분석은 AR culture를 이용하였다.

3.2. 해양 고세균에서 결손된 것으로 보이는 필수 유전자 분석 도구와 비교 대상 유전체

AOA의 독립성장에 필요한 필수유전자의 비교분석은 진화 거리가 가깝고, 순수배양이 가능한 고세균의 유전체를 대조군으로 사용하는 것이 가장 좋은 분석결과를 도출할 수 있다. 하지만 배양 유무에 상관없이 진화적으로 가까운 archaea 유전체에 관한 보고는 존재하지 않는다. 진화적으로 먼 다른 고세균의 경우도, 고세균에 특이적인 많은 hypothetical protein이 존재해 이를 이용해 결손된 유전자를 찾는 것은 매우 어렵다 [25]. 따라서 독립성장에 필요한 대부분의 유전자를 지니고 있으며, 유전체 크기가 작고 필수유전자에 대한 연구가 지속적으로 진행된 종을 대조군으로 고려하였다. 따라서 computational analysis 및 transposon을 이용해 필수유전자를 규정한 *M. genitalium* [11]과 염색체의 합성과 이식과정에서 성장이 재현된 *M. mycoides subsp. capri* GM12를 대조군으로 선택하였다 [7,9]. *Nitrosopumilus*와 *Mycoplasma*는 계통도상의 유연관계는 크지 않다. 이외에 이론적으로 분석된 최소 유전체의 정보를 문헌과 web server에서 확인해 이용하였다.

활용 가능한 다양한 비교 유전체학 도구들 (ACT, MUMmer 등)이 운영되지만, 염기와 아미노산 서열을 이용한 단순 일치도 분석에 주로 활용됨으로 유전자간 상동성을 분석하는 경우에는 각각의 완전한 유전자 (intact ORF)를 재분석해야 한다. 따라서 유전체 간의 유전자 COG 및 remote homology를 판단하기 위한 coverage와 identity를 설정할 수 있는 GenomeBLAST를 분석도구로 이용하였다. 추가적으로 서열상의 상동성 외에 기능 관련성을 설정해 분석 가능한 SEED viewer와 재료 및 방법에서 명시한 다양한 분석도구를 보조 수단으로 활용하였다.

3.3. 해양 고세균 *N. martimus* SCM1 유전체에서 결손 유전자 탐색

극단적인 divergent evolution의 결과물이 아닌 대부분의 structural family protein 들은 유전자나 아미노산 서열을 이용해 상동성을 판단할 수 있다 [22]. 따라서 *N. martimus* SCM1과 대조군 genome 유전자들의 COG을 확인하기 위한 전형적인 cut-off value (coverage 80%와 identity 35%)로 1차 분

Table 1. Primers used in this work for quantitative PCR and cloning of a 16S rRNA

Primer name	Position	Sequence	Application	Reference
AQ_519F	519-533	5'CAGCMGCCGCGGTA3'	Quantification	
AQ_727R	712-727	GCTTTCRTCCCTCACCGT	Quantification	23
AC_20F	2-20	TTCCGGTTGATCCYGCCRG	Cloning	
AC_958R	958-976	TCCGGCGTTGAMTCCAATT	Cloning	

석하였다. 병행해 SEED viewer를 이용해 재검증하거나 다른 결과가 나오는 경우는 개개의 유전자를 alignment 하였다. 결과적으로 해양 고세균과 *Mycoplasma*, 그리고 이론적으로 정립된 최소 유전체 사이에서 211개의 COG가 확인되었다. 따라서 해양 고세균에는 최소유전체에서 발견되는 310~330개 유전자의 뚜렷한 counterpart가 존재하지 않았다. 이는 문헌을 통해 보고된 *M. genitalium*의 essential gene set (256~387개로 예측)에 해당되는 COGs가 적고, 지나치게 많은 수가 counterpart가 없는 결과이다 [11]. 유전자의 divergence가 큰 염색체의 비교에 일반적인 cut off value를 이용한 차이가 원인으로 추정되었다. 따라서 구조적인 특성으로는 remote homology (twilight zone)를 고려하고, functional family의 규정에 필요한 motif나 amino acid cluster의 분석이 필요하였다. *N. martimus* SCM1에서 기능이 예측된 유전자들과 대조군 genome 유전자를 규정된 기능으로 비교하며, remote homology 분석에 필요한 cut-off value를 조정 (coverage 50%와 identity 20%)한 결과 최소 유전체에 존재하는 160개의 유전자가 고세균 유전체에서 발견되지 않았다. 이때 임의로 설정한 cut-off value로 인해 각각의 genome에 속해있는 유전자들이 1:1이 아닌 1:다수의 유전자로 매치된 경우도 발생하였다. 이는 cut-off value가 intact ORF의 10% 수준의 identity를 지니도 검색되게 한 결과이지만, 이러한 낮은 수치에도 매치되지 않는 유전자들은 해양 고세균에서 결손 가능성이 큰 것으로 판단되었다. 또한 추론된 160개의 유전자에는 bacteria와 archaea의 생리/생태학적 차이, 즉 고세균의 몇몇 생리기작이 진핵생물에 보다 유사해 발생한 결과가 포함되어 있다.

*Mycoplasma*와 이론적인 최소유전체에는 존재하지만 *N. martimus* SCM1 genome에는 존재하지 않는 160개의 유전자는 기능이 알려진 유전자가 72개, putative 유전자 49개, hypothetical 유전자 39개이다. 이들 중 진정세균과 고세균의

근본적 차이 (DNA 복제와 전사 그리고 번역)로 인해 직접 비교가 의미가 없는 유전자는 우선 제외하였다. 진핵과 비교하면 기능과 구조에서 상동성이 발견된다. 다음으로 hypothetical/putative protein 중 고세균 특이적인 유전자와 관련된 것을 추가로 배제한 후, 고세균 막단백질이나 인지질 합성에 관련된 유전자를 제외한 69개를 해양 고세균 결손 유전자 후보로 2차 선별하였다. 위의 기준들로 제외한 유전자는 PTS (5종)와 lipoprotein 대사 (8종), 막단백질 관련 (24종) 유전자와 15종의 ribosomal protein, 그리고 39종의 hypothetical protein 들이다. 69개의 유전자를 대상으로 coverage가 적은 유전자간 상동성 비교에 유리한 PSI-BLAST에 적용해 고세균에서의 흔적 발견 가능성 유무를 재분석하였으며, CDD에 적용해 관련된 domain 이나 motif가 존재하는 지를 확인한후, 흔적이 발견된 경우 일/이차 구조 정렬 프로그램을 이용해 존재 가능성 여부를 재확인하였다. 결과적으로 분명한 COG는 물론 remote homology와 convergent evolution의 가능성을 고려해도 존재가 불분명한 19개의 유전자를 최종 후보로 규정할 수 있었다. 이들 대부분은 이론적으로나 *Mycoplasma* 유전체 분석과정에서 필수유전자로 추정된 후보들이다.

3.4. 결손 추정 유전자와 관련 있는 대사회로와 대사물

해양 고세균에서 결손가능성이 높은 19개 유전자의 생리기능을 확인하기 위해 KEGG metabolic pathway에서 분석하거나 효소명을 이용해 database에서 검색하였다 (Table 2). 이들 중 7개의 유전자는 DNA repair나 methylation, 혹은 단백질 modification에 관여하는 유전자임이 확인되었다. 이외에 2개의 유전자는 지방 대사, 3개는 해당과정과 관련된 효소들이었다. FAD/NAD 대사에 관련된 유전자 2개가 확인되었고, DNA/RNA 대사에 관련된 유전자는 5종 이었다.

DNA repair나 methylation, protein modification에 관련된 유전자는 이론적인 필수 유전자에 포함되지 않는 경우도

Table 2. List of candidate genes lacking in the genome of an AOA

Functional category	Gene name
N/A	adenine-specific DNA methylase, putative
N/A	hemolysin A
Lipid metabolism	dihydroxyacetone kinase 2 domain protein
N/A	adenine-specific DNA methylase, putative
N/A	HPr(Ser) kinase/phosphatase
N/A	DNA repair protein RecO
Lipid metabolism	phosphatidate cytidylyltransferase
Glycolysis	glucosamine-6-phosphate isomeras
FAD and NAD metabolism	nicotinate (nicotinamide) nucleotide adenylyltransferase/conserved hypothetical domain
Glycolysis	pyruvate dehydrogenase complex, E1 component, alpha subunit
N/A	N utilization substance protein B (nusB), putative
Nucleotide metabolism	arginine deiminase
Nucleotide metabolism	thymidine kinase
Glycolysis	phosphofructokinase
Nucleotide metabolism	uridine kinase
N/A	polypeptide deformylase
Nucleotide metabolism	purine nucleoside phosphorylase
Nucleotide metabolism	hypoxanthine phosphoribosyltransferase
FAD and NAD metabolism	riboflavin kinase/FAD synthetase family protein

N/A: Not included in typical metabolic pathway.

있고, 해양생태계의 빈번한 LGT (lateral gene transfer)를 고려할 때 DNA 인자나 전사/구조 조절에 관여하는 methylase와 단백질 변형 기능은 redundant 한 범주에 속한다 [14,17]. 해당과정에 관련된 3개 유전자들은 결손된 기능을 보완할 수 있는 PPP (pentose phosphate pathway) 우회경로가 존재하는 것을 확인하였고, 해당과정의 최종산물인 pyruvate에서 acetyl-CoA로 전환하는 효소 유전자가 없는 것으로 보아, 본 연구의 해양 고세균에는 전형적인 TCA cycle이 존재하지 않는 것으로 판단되어 유전자의 존재여부는 의미가 적었다 [28]. 이들 해양 고세균이 microaerobic niche에서 생활하는 점이 이러한 대사경로와 관련 있을 것이다. FAD/NAD 대사에서 결손된 유전자는 다른 대체 유전자가 존재하였다. 하지만 DNA/RNA 대사에 관련된 유전자들 중, arginine deaminase를 제외한 4개의 유전자들을 대체 및 우회경로가 불분명하며 다른 counterpart도 없어 결손 가능성이 큰 것으로 분석되었다. 따라서 통상의 분자/유전 정보로는 확인할 수 없고 세포성장에는 반드시 필요하나 해양 고세균에서 흔적을 찾을 수 없는 것이 핵산 대사 관련 유전자 4종 이었다. 이들 효소의 산물로서 생리학적으로 중요한 화합물은 일인산 화합물 (UMP, TMP, CMP)이다.

예비 실험으로 이들 화합물을 배지에 첨가해 성장유도나 촉진 가능성 여부를 확인하였다. AOA의 배양 시 co-culture되는 bacteria는 초기 접종 시 혼합되어 들어가기 때문에 [23] 첨가된 화합물에 의해 AOA만이 선택적으로 영향을 받는지는 불분명하다. 하지만 다른 배양법이 없으므로 기존의 AOA (AR enrichment culture) 배지 [23]에 TMP/UMP/CMP를 각각 10, 50, 100 μM 의 농도로 첨가해 성장 차이를 관찰하였다. 정량 PCR을 통한 archaea의 성장은 초기 접종에서 3일까지 변동이 없었으나, 이후에는 nucleotide를 넣지 않는 대조군의 성장이 먼저 관찰되었다. 하지만 14일째에는 10~50 μM 의 nucleotide를 넣은 것이 넣지 않은 경우보다 빠르게 성장 (대략 2.5~3.4배)된 것이 확인되었다. 질화 미생물은 암모니아를 전자 전달계 donor로 이용하여 ATP를 합성하는 것으로 알려져 있고, AOA 또한 이 과정에 필수적인 *amoA* 유전자가 관찰된다 [24,28]. 실제로 AOA에 의한 질화작용이 보고되었기 때문에 반응산물인 nitrite를 측정해 성장 정도를 간접적으로 확인할 수 있다 [23]. 정량 PCR 결과와 유사한 nitrite의 생성이 확인되었으나 큰 유의성은 발견되지 않았다. 특히적으로 nucleotide의 농도가 10 μM 일 때 nitrite의 생성이 1.5배 증가하였다. 정량 PCR과 nitrite assay 모두에서 측정된 결과 값은 알려진 고세균 최대 성장치나 기질인 암모니아에서 생성될 수 있는 이론치의 20% 정도에 불과하였다. 따라서, 배지 조건의 재설정과 초기 접종량, 혼합물이 아닌 각각의 일인산 화합물이나 중간체 첨가, 기질첨가 시기의 조절 (박테리아가 먼저 자라고 고세균이 후에 자라는 문제와 기질 안정성과 결부)과 더불어, 배양 시간을 좀 더 (~25일) 늘려 본다면 보다 흥미로운 결과가 기대된다. 더불어 예측된 19개 유전자의 다른 산물들 (예를 들면 pyruvate나 acetyl-CoA)을 배지에 첨가해 결손된 유전자의 진위 여부와 성장 유도 가능성을 확인할 예정이다.

특정한 세균간의 유전체 비교는 database에 이미 분석된

전형적인 COG를 이용하는 것만으로 불확실하다. 실제로 본 연구의 고세균 유전체도 분석된 COG가 존재하지만 remote homology를 지니거나 convergent evolution이 진행된 유전자, 구조간의 특별한 유의성 없이 기능만이 일치하는 경우에는 다양한 방법으로 확인해야 유전자의 결손 여부를 판단할 수 있다. 따라서 본 연구에서 분석된 결손가능 유전자도 새로운 logic을 지닌 프로그램으로 분석하거나 진화적으로 가까운 유사종의 염색체가 분석되면 흔적이거나 대체 유전자를 찾을 수도 있을 것이다. 이러한 과정에서 결손유전자들이 발견된다 하더라도 이들은 기존의 것과 다른 새로운 sequence나 structure space를 지니고 있다는 것이므로 새로운 fold나 motif를 지닐 개연성이 높을 것이다. 현 상황에서 임의로 배제된 고세균 특이 유전자들이 독립성장에 필수적일 가능성을 완전히 배제할 수는 없다. 따라서, 염색체 분석이 완료된 고세균들이나 메타지노믹 서열내에 존재하는 고세균 특이 서열들의 추가확인이 필요하다.

4. 결론

알려진 바에 의하면 고세균은 생태계 전반에 걸쳐 존재하며 지구의 물질순환 (암모니아 산화와 이산화 탄소 고정)과 기후 (이산화탄소 고정과 N₂O 생성)에 영향을 미친다. 또한 인체를 포함한 동식물의 피부나 장기, 구강에도 널리 분포해 질병 유발이나 방어, 영양분 흡수에 중요한 기능을 할 수 있기에 이들의 생리나 생화학적 특성 분석은 많은 가치를 지니며, 생태계를 이해하는데 반드시 필요하다. 하지만 대부분의 중요한 고세균이 난배양성으로 분류되어 아직은 생태계나 관련 지식의 단면만을 보고 있는 실정이다. 이러한 문제 해결의 일환으로, 본 연구에서는 성장이나 영양, 행동에 관련된 정보를 지닌 유전체를 분석하여 부족한 대사과정이나 필요한 신호, 혹은 community factor를 분석한 후, 이들을 고려한 독립 배양 유도 가능성 여부를 확인하였다. 다양한 비교 유전체 기법을 활용해 최소 유전체에 가까운 *Mycoplasma*와 이론적인 minimal genome과의 비교에서 해양 고세균에 결손 가능성이 큰 유전자들을 발굴하였다. 최종 후보들은 대체 화합물이나 유전자를 통한 성장 유도 가능성 여부와 상관없이 새로운 서열이나 구조 특성을 지닌 protein 발굴에 일조할 수 있을 것이다.

감사

본 연구는 교육과학기술부 한국연구재단 기초연구사업 (2009-0087901) 지원을 받아 수행하였습니다.

References

1. Allen, E. E. and J. F. Banfield (2005) Community genomics in microbial ecology and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 489-498.
2. Allers, T. and M. Mevarech (2005) Archaeal genetics - The third

- way. *Nat. Rev. Genet.* 6: 58-73.
3. Berg, I. A., D. Kockelkorn, W. Buckel, and G. Fuchs (2007) A 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in archaea. *Science* 318: 1782-1786.
 4. Bleichert, F., K. T. Gagnon, B. A. Brown, E. S. Maxwell, A. E. Leschziner, V. M. Unger, and S. J. Baserga (2009) A dimeric structure for archaeal box C/D small ribonucleoproteins. *Science* 325: 1384-1387.
 5. Dong, X. C., M. Y. Zhou, C. Zhong, B. Yang, N. Shen, and J. P. Ding (2010) Crystal structure of *Pyrococcus horikoshii* tryptophanyl-tRNA synthetase and structure-based phylogenetic analysis suggest an archaeal origin of tryptophanyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res.* 38: 1401-1412.
 6. Dore, J. E., R. Lukas, D. W. Sadler, M. J. Church, and D. M. Karl (2009) Physical and biogeochemical modulation of ocean acidification in the central North Pacific. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 12235-12240.
 7. Ferber, D. (2004) Synthetic biology: Microbes made to order. *Science* 303: 158-161.
 8. Gaasterland, T. (1999) Archaeal genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 542-547.
 9. Gibson, D. G., J. I. Glass, C. Lartigue, V. N. Noskov, R. Y. Chuang, M. A. Algire, G. A. Benders, M. G. Montague, L. Ma, M. M. Moodie, C. Merryman, S. Vashee, R. Krishnakumar, N. Assad-Garcia, C. Andrews-Pfannkoch, E. A. Denisova, L. Young, Z. Q. Qi, T. H. Segall-Shapiro, C. H. Calvey, P. P. Parmar, C. A. Hutchison, H. O. Smith, and J. C. Venter (2010) Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 329: 52-56.
 10. Gil, R., F. J. Silva, J. Pereto, and A. Moya (2004) Determination of the core of a minimal bacterial gene set. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 518-537.
 11. Glass, J. I., N. Assad-Garcia, N. Alperovich, S. Yooseph, M. R. Lewis, M. Maruf, C. A. Hutchison, H. O. Smith, and J. C. Venter (2006) Essential genes of a minimal bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 425-430.
 12. Han, S. S., J. Y. Lee, W. H. Kim, H. J. Shin, and G. J. Kim (2008) Screening of promoters from metagenomic DNA and their use for the construction of expression vectors. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 1634-1640.
 13. Herndl, G. J., T. Reinthaler, E. Teira, H. van Aken, C. Veth, A. Pernthaler, and J. Pernthaler (2005) Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2303-2309.
 14. Humbard, M. A., H. V. Miranda, J. M. Lim, D. J. Krause, J. R. Pritz, G. Y. Zhou, S. X. Chen, L. Wells, and J. A. Maupin-Furlow (2010) Ubiquitin-like small archaeal modifier proteins (SAMPs) in *Haloferax volcanii*. *Nature* 463: 54-60.
 15. Khomyakova, M., O. Bukmez, L. K. Thomas, T. J. Erb, and I. A. Berg (2011) A methylaspartate cycle in haloarchaea. *Science* 331: 334-337.
 16. Konneke, M., A. E. Bernhard, J. R. de la Torre, C. B. Walker, J. B. Waterbury, and D. A. Stahl (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437: 543-546.
 17. McDaniel, L. D., E. Young, J. Delaney, F. Ruhnau, K. B. Ritchie, and J. H. Paul (2010) High frequency of horizontal gene transfer in the oceans. *Science* 330: 50.
 18. Mincer, T. J., M. J. Church, L. T. Taylor, C. Preston, D. M. Kar, and E. F. DeLong (2007) Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre. *Environ. Microbiol.* 9: 1162-1175.
 19. Moissl-Eichinger, C. (2011) Archaea in artificial environments: their presence in global spacecraft clean rooms and impact on planetary protection. *ISME J.* 5: 209-219.
 20. Mushegian, A. R. and E. V. Koonin (1996) A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 10268-10273.
 21. Nather, D. J. and R. Rachel (2004) The outer membrane of the hyperthermophilic archaeon *Ignicoccus*: dynamics, ultrastructure and composition. *Biochem. Soc. Trans.* 32: 199-203.
 22. Orengo, C. A. and J. M. Thornton (2005) Protein families and their evolution - A structural perspective. *Ann. Rev. Biochem.* 74: 867-900.
 23. Park, B. J., S. J. Park, D. N. Yoon, S. Schouten, J. S. S. Damste, and S. K. Rhee (2010) Cultivation of autotrophic ammonia-oxidizing archaea from marine sediments in coculture with sulfur-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 7575-7587.
 24. Schleper, C., I. Holz, D. Janekovic, J. Murphy, and W. Zillig (1995) A multicopy plasmid of the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus* effects its transfer to recipients by mating. *J. Bacteriol.* 177: 4417-4426.
 25. Spang, A., R. Hatzepichler, C. Brochier-Armanet, T. Rattei, P. Tischler, E. Spieck, W. Streit, D. A. Stahl, M. Wagner, and C. Schleper (2010) Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum *Thaumarchaeota*. *Trends Microbiol.* 18: 331-340.
 26. Thomas, N. A., S. L. Bardy, and K. F. Jarrell (2001) The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 147-174.
 27. Venter, J. C., K. Remington, J. F. Heidelberg, A. L. Halpern, D. Rusch, J. A. Eisen, D. Y. Wu, I. Paulsen, K. E. Nelson, W. Nelson, D. E. Fouts, S. Levy, A. H. Knap, M. W. Lomas, K. Neelson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y. H. Rogers, and H. O. Smith (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66-74.
 28. Walker, C. B., J. R. de la Torre, M. G. Klotz, H. Urakawa, N. Pinel, D. J. Arp, C. Brochier-Armanet, P. S. G. Chain, P. P. Chan, A. Gollabgir, J. Hemp, M. Hugler, E. A. Karr, M. Konneke, M. Shin, T. J. Lawton, T. Lowe, W. Martens-Habbena, L. A. Sayavedra-Soto, D. Lang, S. M. Sievert, A. C. Rosenzweig, G. Manning, and D. A. Stahl (2010) *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 8818-8823.
 29. Woese, C. R. and G. E. Fox (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5088-5090.
 30. Wuchter, C., B. Abbas, M. J. L. Coolen, L. Herfort, J. van Bleijswijk, P. Timmers, M. Strous, E. Teira, G. J. Herndl, J. J. Middelburg, S. Schouten, and J. S. S. Damste (2006) Archaeal nitrification in the ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 12317-12322.