

Review

극지 생물의 저온적응 기작과 저온 생물학적 응용 연구

강성호 · 주형민 · 박승일 · 정웅식 · 흥성수 · 서기원 · 전미사 · 최한구 · 김학준*

한국해양연구원 부설 극지연구소 극지응용연구부
(406-840) 인천시 연수구 송도동 7-50 송도테크노파크 갯벌타워

Cryobiological Perspectives on the Cold Adaptation of Polar Organisms

Sung-Ho Kang, Hyung Min Joo, Seungil Park, Woongsic Jung, Sung Soo Hong,
Ki-Won Seo, Mi Sa Jeon, Han-Gu Choi, and Hak Jun Kim*Korea Polar Research Institute, KORDI
Songdo Techno Park, Incheon 406-840, Korea

Abstract : The survival strategies of polar organisms at permanently or extremely cold temperatures and their application to cryobiology were reviewed here. In addition, ongoing studies on psychrophiles also were described. Psychrophiles are extremophiles that can grow and reproduce in cold temperatures, typically at -10 to 20°C . These organisms developed various mechanisms of adaptation to extremely cold environments. Polar organisms cope with these extreme physicochemical conditions using strategies such as avoidance, protection and partnership with other organisms. Understanding on the strategies adopted by polar organisms may provide insight on the physiological process that cells can go through during freezing. Cryopreservation may be able to take advantage of the findings described above. Currently, genomes of many cold-loving organisms have been sequenced and comparative genomics has revealed, at a molecular level, the characteristics of these organisms. The investigation of microorganisms on the polar glaciers may expand our understanding on the origin of life on Earth and other planets.

Key words : cold adaptation, cryobiology, cryopreservation, psychrophile

1. 서 론

극지는 북극과 남극 주변에 위치한 지역으로, Fogg (1998)는 극지역을 지구 자전축과 태양 공전 궤도면사이의 각도에 대응하여 북극권을 북위 $66^{\circ}33'$ 이북으로 남극권을 남위 $66^{\circ}33'$ 이남 지역으로 각각 정의하였다(Fig. 1). 극지역은 지구 표면의 16.5%에 해당하는 8400만 km^2 의 광대한 지역으로 오늘날 지구 온난화와 오존층 파괴와 같은 전지구적 환경변화에 가장 민감하게 반응하는 지역이므로 환경변화 연구의 과학적 실험장으로 국제적인 주목을 받고 있다.

극지는 기온이 매우 낮고, 급격한 일사량의 변화와 같은 환경특징을 갖고 있다. 남극해의 경우 표층수의 온도는 연중 대개 2°C 에서부터 $3^{\circ}\text{C}\sim 5^{\circ}\text{C}$ 사이의 범위를 보이며, 수심 200 m~300 m 이하의 심층수의 온도가 표층수보다 오히려 약간 높은 경우가 많다. 연중 바다가 얼어있는 해역과 계절의 변화에 따라 sea ice가 얼고 녹는 해역이 존재하며 다양한 환경변화를 보이고 있다. 북극해의 경우에도 비슷한 수온을 보이나 염분의 농도가 대륙으로 이루어진 남극해에 비해 약간 높으며, 심층수의 영향으로 충분한 영양염의 공급을 받는 남극해와 달리 하계 기간동안 식물플랑크톤의 대발생에 의한 영양염 고갈이 이루어지는 차이를 보이고 있다(Deming 2002; Elster and Benson 2004).

*Corresponding author. E-mail : hjkim@kopri.re.kr

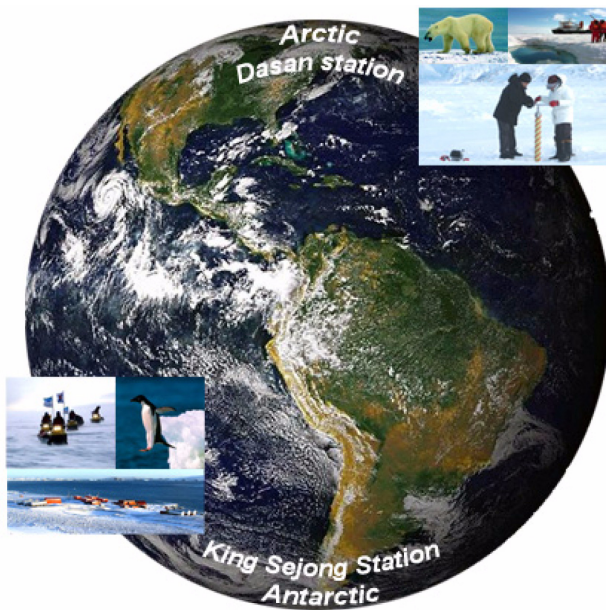


Fig. 1. Geographical location of Antarctic and Arctic, and Korean stations on both poles. Antarctic includes Antarctic continent and Southern Ocean (60°S), while Arctic is surrounded by North America above 62°N and the Eurasian continent. King Sejong station is located in the South Shetland Islands (62°13'S, 58°47'W), and Arctic Dasan station is in the Svalbard Islands (78°55'N, 11°56'W).

북극권과 남극권은 지리학적 역사, 생물의 다양성, 에너지 균형 등 상당한 차이를 보이는 환경이지만 양극 주변에 서식하고 있는 극지생물들은 극한의 저온환경에서 생존해야 한다는 공통점을 가지고 있다(Elster and Benson 2004). 북극권은 전(全) 지구 환경변화에 의해 급격한 빙하 및 해빙(海氷)의 변화가 일어나는 지역으로 구(舊)소련의 개방정책 이후 새롭게 연구가 시작된 지역이다. 남빙양으로 둘러싸여 외부환경과 오랜 기간 차단되어 있는 남극권과는 달리 북극권은 주변이 러시아, 캐나다, 그린란드 등 육상으로 둘러싸인 지역으로 남극권에 비해 육상, 대기, 해양을 통한 생물(유전체)의 유입이 잘 이루어져서 더 높은 생물다양성을 보인다. 극지의 육상과 해양 환경은 계절별로 많은 차이를 보인다. 빙하, 설원, 토양 등의 육상환경의 대기온도는 -50°C~8°C의 계절별 차이를 보이나, 해양의 수온은 보통 -2°C에서 최대 6°C 정도의 계절별 차이를 보이는 비교적 안정적인 환경이라 할 수 있다(Deming 2002). 이러한 극지의 환경에서 서식하는 저온생물들은 제각기 다른 생태학적, 생리학적 생존 적응반응을 일으킨다(Fuller et al. 2004). 극지 생물들의 생존 원리를 이해하기 위해서 저온 환경과 그 환경의 변화 양상을 인지할 필요가 있다. 예를 들면 극지 생물들이 겪어야

할 거시적 환경 변화로 극지의 짧은 여름, 낮은 복사열과 빛 에너지 등을 들 수 있으며, 미시적 변화로 저온으로 인한 세포 내 물의 액체에서 고체(얼음/눈)로의 물리적 상변화를 들 수 있다.

본 중설에서는 끊임없이 변화하는 극지의 저온환경에서 서식하고 있는 생물의 생존전략과 그 생물자원의 저온생물학적 활용 방안에 대해서 언급하고자 한다.

2. 극지 생물의 극한 환경 적응 전략

극지에서 수행된 많은 생리 생태학적인 연구에 의하면, 극지 생물이 저온에서 생존하기 위해 필수적인 것은 세포의 동결 방지이다(Lewis-Smith 1997; Elster 2002). 극지 생물들이 저온에서 생존하기 위해 선택한 세 가지 중요한 전략은 회피(avoidance) 전략, 보호(protection) 전략, 생활형 유대관계(partnerships) 전략이라고 할 수 있다(Fig. 2).

회피 전략

극지 저온 미생물, 미세조류, 지의류, 이끼류 등은 얼음의 형성으로 인한 세포 내 탈수현상에 저항할 수 있는 변습성(變濕性) 생명체(poikilohydric organisms)이다. 이들은 고등생물이 세포 내의 수분상태를 조절하기 위한 액포(vacuoles)를 가지고 있지 않기 때문에, 이들은 세포의 생리적 변이를 통해 동결을 회피함으로써 저온 환경과 물의 상변화로부터 생존할 수 있다. 세포의 운동성과 복잡한 생존주기 발달이 그 예이며, 이와 같은 회피 전략은 진화적

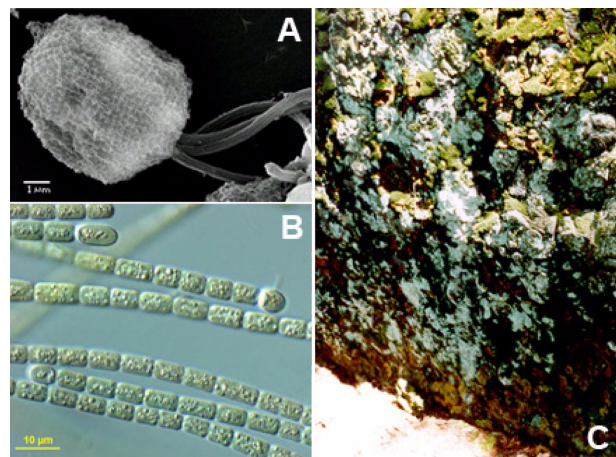


Fig. 2. Cold-adaptation strategies of polar organisms. (A) Avoidance strategy-*Pyramimonas gelidicola* isolated from Antarctic make has 4 flagellas which facilitate the movement. (B) Protection strategy- unidentified cyanophyta forms a resting spore to survive under severe environment. (C) Symbiosis strategy-Lichen is a holobiont composed of ascomycete and *Nostoc/Trebouxia* (Kappen 1993).

압력을 통해 발전되어 왔다고 생각된다(Tang *et al.* 1997; Vincent 2000).

극지 미생물과 미세조류는 편모라고 하는 세포기관이 발달해 있는데, 편모를 통한 운동성은 세포주변에 가해지는 물리적, 화학적, 생물학적 스트레스를 회피할 수 있는 주요한 생존 수단이다(Fig. 2A)(Wiedner and Nixdorf 1998). 편모는 진핵 미세조류의 이동의 주요 수단이지만, 실모양의 원핵 남조류는 세포주변에 점액물질을 분비하여 미끄러짐을 통해 이동하는 것으로 알려졌다(Van Liere and Walsby 1982). 복합적인 생존주기는 극지생물의 또 다른 회피 전략으로서 계절별 환경변화에 적응하기 위해 휴면상태, 성장, 생식 단계로 구성되어 있다. 눈 위에 서식하는 약 100여종의 극지 눈 조류(snow algae)의 복합적인 생존주기를 예로 들면(Ling and Seppelt 1998), 눈 조류들은 건조 기간 동안 휴면상태에 도달하는데 탈수 시 물 분자를 대신할 가용성 탄수화물을 고농도로 축적하게 되고, 이를 통해 거대분자의 생체막과 세포 조직의 구조와 기능이 안정화 된다(Crowe *et al.* 1984).

세포 내에 당을 합성함으로써 건조한 상태의 세포질을 안정하게 유리화 할 수 있다는 것이다(Bruni and Leopold 1991). 이 과정은 세포의 동결건조(Cryopreservation) 기작과 유사한데 이 기작을 통하여 세포 구성요소들이 안전하게 고정되며 유해한 화학적, 생화학적 반응들이 억제됨으로써 세포가 생존할 수 있게 된다(Sun and Leopold 1994a, 1994b).

보호 전략

극지생물들의 또 다른 생존 전략은 다중 세포막 형성과 세포 내·외부로 결빙방지 물질 분비 등을 통해 스스로를 보호하는 전략이다. 극지 미세조류나 미생물들은 세포의 탈수를 지연하는 점액질 층과 두터운 보호막을 형성하는 것으로 알려져 있는데(Whitton 1987), 이 물질들은 육상 식물의 휴면 꽃가루에서 합성되는 고분자 항산화 물질과 유사하다(Wiermann and Gubatz 1992). 남조류나 미세조류가 건조한 상태에 노출되었을 때 보호막을 형성하기 위해 끈적이는 점액물질과 다중 세포벽들이 만들어진다. 짧은 하계 동안 동결-해동을 반복하는 남극의 맥머도 담수 지역에서도 높은 농도의 점착성 다중매트를 형성하는 부착성 미세조류(남조류)가 유사한 생존전략을 가지고 있는 것으로 조사되었다(Vincent *et al.* 1993)(Fig. 2B). 염주말(*Nostoc*)은 세포들이 여러 겹의 점액질 막을 형성하면서 군체를 이루기 때문에 동결 건조 후 빠른 속도로 다시 원상태로 회복될 수 능력을 가지고 있음을 알게 되었다(Howes *et al.* 1993). 이는 염주말이 당-인산 농도가 높은 물질을 세포 내·외에 형성하여 동결과 건조에 따른 세포 손상을 최대한 억제할 수 있기 때문이다. 남극 경골 어류

들은 혈액 내 결빙방지 단백질(Antifreeze Protein, AFP)이라 불리는 단백질을 합성·분비하여 체액의 어는점을 낮춤으로써 저온의 해양에서 성공적으로 살아남을 수 있게 진화되었다(Chen *et al.* 1997a, 1997b). 극지생물 중 대부분은 이처럼 영하의 온도에 노출되는 것을 피할 수 없다. 초저온 환경에 서식하는 극지생물들은 동결로부터 보호하는 전략으로 크게 다음과 같은 3가지의 생화학적 냉동 보호물질을 합성·분비한다: 1. 탄수화물(당, 당 알코올, 폴리올), 2. 얼음 결정핵 생성 단백질, 3. 결빙방지 단백질.

탄수화물(Carbohydrates)

극지 무척추동물, 지의류, 이끼류, 미세조류, 관다발 현화식물 등의 계절별 가용성 탄수화물의 구성 변화를 분자 수준에서 분석한 결과(Montiel 2000) 총 가용성 탄수화물 농도는 저온 반응과 서로 관련이 있을 수 있으며, 봄과 여름에 채집된 시료(-2°C~10°C)에 비해 겨울철 시료(-30°C~0°C)에서 높은 농도 증가를 보였다. 지의류나 미세조류의 경우, 폴리올(Polyol)이 주요 탄수화물 구성 물질이었으나, 현화식물과 이끼류의 경우 포도당, 자당, 과당 등이 주요 구성 성분이었다. 당의 일종인 트레할로스(trehalose)는 겨울철에 획득한 몇몇 무척추동물과 지의류 시료의 주요 탄수화물 구성 물질이었다(Fig. 3A, B, C). 트레할로스 합성은 극지 저온 냉동 보호전략의 하나로 온도와 탈수 내성에 핵심적인 역할을 하는 것으로 생각된다(Montiel 2000). 탈수를 견디는 은화식물(Poikilohydric cryptogams)이 합성하는 탄수화물은 겨울철에는 삼부분해물로 작용하고 봄과 여름에는 생리적 완충제로 작용한다(Montiel 2000). 추운 겨울을 나는 무척추동물이 만들어내는 가용성 탄수화물은 겨울 동안 농도가 증가하여 세포 내 수분량이 감소하는 결과를 낳는다고 여겨진다.

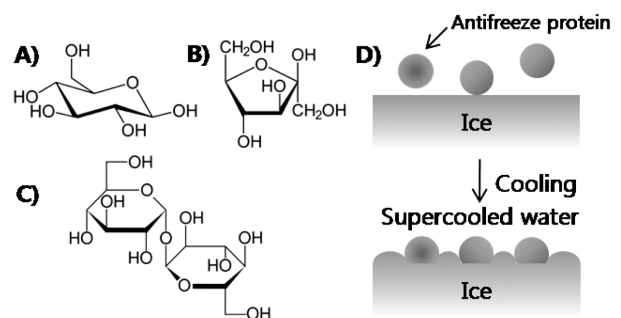


Fig. 3. Structures of natural cryoprotectants and mechanism of antifreeze proteins. Chemical structures of (A) Glucose, (B) Fructose, (C) Trehalose. (D) Antifreeze proteins bind to ice through hydrogen bonds with ice crystals, inhibiting the growth of ice. Curvature of ice front is formed due to the interactions (Knight and DeVries 1994).

얼음 결정핵 생성 단백질(Ice Nucleating Proteins, INPs)

세포가 과냉각된(supercooled) 상태에서 고속으로 동결이 일어나게 되면 삼투압 스트레스가 높아져서 세포에 심각한 손상을 줄 수 있다. 이러한 고속 동결로 인한 손상을 완화하는 전략으로 어는 점 부근의 온도에서 얼음 결정을 형성하는 방법이 있다. 대부분의 곤충과 같은 극지 무척추 동물들은 세포의 동결 손상을 피하기 위해 오히려 체내에 INPs를 통해 얼음 결정 핵의 생성을 유도한다. 이들은 특정 부위에 INPs를 분비해 일부분에서만 얼음 결정이 형성되도록 하기도 한다. 생물체의 전체가 아닌 특정 부분에서만 얼음 결정핵화가 일어남으로써 생체 내 동결 탈수 현상이 서서히 일어나 안전하게 몸체의 수분 함유량을 60% 이상 줄일 수 있게 된다(Wharton and Block 1997). Worland *et al.*(1996)은 얼음 결정핵의 크기, 냉각속도 등이 얼음 결정핵화 활동성에 미치는 영향을 정량화하기 위해 남극 남조지아 섬에 서식하는 19개의 저온 육상식물을 대상으로 물방울-동결 방법(droplet-freezing method)을 이용하여 조사하였다. 이 비교 연구 결과 지의류 > 이끼류 > 현화식물 순으로 257,000부터 16,220 nuclei/gram 정도의 얼음 결정핵화가 일어남을 밝혀냈다. 이처럼 얼음 결정핵화와 얼음생성 조절 능력은 극지생물의 중요한 생존 전략인 것이다(Storey and Storey 1992).

결빙방지 단백질(Antifreeze Proteins, AFPs)

저온 환경에 노출된 극지생물의 세포 내 얼음 결정핵화는 얼음의 초기 형성과 관련이 있는 반면, 극지생물의 저온 적응물질인 결빙방지단백질(AFPs)은 얼음 결정핵화 이후 얼음결정의 발달과 구조 변화와 관련이 있다. AFPs는 얼음 결정 주변에 흡착하여 얼음 결정의 크기, 모양, 발달 방향 등에 영향을 미친다(Fig. 3D). 이들은 특정한 AFPs 농도에서 용액의 어는 점의 온도 변화를 일으킨다.

AFPs는 세포 내에서 “열적 이력현상(thermal hysteresis)” 즉 녹는 온도에 영향을 주지 않지만 어는점을 낮추게 하는 현상을 통해 극지생물이 저온환경에서 얼지 않고 생존할 수 있게 하는 물질이다(Griffith and Ewart 1995). 다른 동결보존제가 높은 농도에서 그 기능을 발휘하는데 비해, AFPs는 낮은 농도에서도 얼음의 재결정화를 억제할 수 있다는 특징을 가지고 있다. AFPs는 얼음 표면에 수소결합을 통해 결합하여 얼음 결정 성장을 억제하는데, 다른 동결보존제에 비해 500배 가까이 효과적인 것으로 알려졌다(Fletcher *et al.* 1999). AFPs는 현재 극지의 미생물, 미세조류, 식물, 곤충, 어류 등에서 널리 발견되고 있으며 구조에 따라 크게 5종류로 나뉜다(Table 1)(Fletcher *et al.* 1999). 극지뿐만 아니라 혹독한 겨울이 있는 온대 및 고위도 지역에 서식하는 식물에서도 AFPs가 존재하는데 약 30종의 속씨 식물은 한겨울 추위에 대한 순화 후에 AFPs가 만들어져 추위로부터 살아남을 수 있으며 우리 주변에서 식품으로 이용되는 호밀, 밀, 보리, 귀리, 감자, 당근 등에서도 일시적 냉해 방지 물질로 AFPs가 존재한다는 사실이 알려져 있다(Fletcher *et al.* 1999). 결빙방지당단백질(Antifreeze glycoproteins, AFGPs)은 남극의 빙어, 대구류, 가자미 등에서 발견되었다(Fletcher *et al.* 1999). 남극 빙어 중 *Notothenioides* 종은 남극해의 우점 어류종으로 혈액 내 AFGPs 작용으로 어는점이 $-0.7 \sim -1.0^{\circ}\text{C}$ 로 낮아져서 극지의 저온 해양에 성공적으로 살아남을 수 있게 진화되었다(Chen *et al.* 1997a, 1997b). 남극 어류의 AFGPs 유전자는 500만~1500만 년 전에 채장의 트립시노겐으로부터 진화되었다고 생각하고 있다(Chen *et al.* 1997; Chen and Chen 1999).

생활형 유대관계 전략

생물의 상호공생과 같은 생활형 유대관계는 극지생물

Table 1. Characteristics and types of antifreeze proteins (Fletcher *et al.* 1999).

| Characteristics | AFGP | AFP Type I | AFP Type II | AFP Type III | AFP Type IV |
|----------------------------|--|--|----------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| Molecular weight (Daltons) | 2,600-33,000 | 3,300-4,500 | 11,000-24,000 | 6,500 | 12,229 |
| Primary structure | (Ala-Ala-Thr) _n disaccharide | Ala-rich multiple of eleven aa repeats | Cys-rich S-S linked | general | 17% Gln, no S-S bridges, general |
| Glycosylation | modified | unmodified | unmodified | unmodified | unmodified |
| Secondary structure | expanded | alpha helical amphiphilic | beta sheet | beta sandwich | amphipathic alpha helical |
| Biosynthesis | multi-protein | prepro AFP | prepro AFP | pro AFP | no post-translational modifications |
| Known proteins | 8 | 7 | 2-6 | 12 | 1 |
| Copy number | unknown | 80-100 | 15 | 30-150 | unknown |
| Resources | Antarctic notothenioids Northern cods | flounders sculpins (shorthorn) | sea raven smelt herring | ocean pout wolffish | Longhorn sculpin |

의 중요한 생존전략 중 하나라 할 수 있다. 극지 환경에서 가장 성공적인 공생관계를 유지하는 생물체가 지의류이다(Fig. 2C). 지의류는 진균류와 미세조류가 서로 공생하면서 물리적 보호, 생리적·물질 대사적으로 상호 이득을 제공하면서 진화되어 왔다. 극지의 자낭균 지의류(*Ascomycetous lichens*)에 공생하는 녹조 미세조류는 극지의 저온 육상생태계의 가장 중요한 일차 생산자이다(Kappen 1993). 육상의 건조한 환경으로부터 보호받기 위해 진균류와 공생하는 미세조류의 생존전략은 극지에서 발견되는 가장 성공적인 생존 전략들 중 하나라고 말할 수 있다.

3. 적응전략의 저온 생물학적 응용

극지생물의 저온 환경에서의 생태·생리학적 적응 기작을 통해 밝혀진 동결 손상에 대응하는 보호 전략은 동결 회피 또는 동결 내성이다. 이런 생존전략 연구를 통해 일반적인 세포 또는 기관이 저온에서 겪게 될 스트레스와 생리적 변화 등에 대한 이해를 높일 수 있을 것이다(Elster and Benson 2004). 최근 혈액, 정·난자, 제대혈세포, 배아 줄기세포 등을 냉동 보존하여 의학적, 생명 공학적으로 이용하려는 시도가 활발히 진행되고 있다. 또한 생물종 다양성을 유지하기 위해 생물 동결보존에 대한 관심이 높아지면서 극지생물들이 초저온의 극한상황에서 어떻게 적응하는 지(한계 생존온도 및 최적 생존온도)에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 특히 동결상태에 내성이 있는 극지 고유 서식종의 적응 전략을 밝히는 데 많은 연구가 진행되고 있으며, 이를 통해 저온생물을 활용하기 위한 저온생물학적 연구가 수행되고 있다(Fuller *et al.* 2004). 극지생물의 얼음의 결정·재결정화에 대한 방어 시 세포내의 구성 물질과 농도 변화 양상을 깊이 연구한다면, 세포, 조직, 기관 등을 초저온으로 냉동할 때 저온 손상으로 부터 세포를 어떻게 보호해야 할 지 더 잘 이해할 수 있을 것이다. 세포들을 초저온(액체 질소, -196°C) 상태에서 안전하게 냉동보존하기 위해서는 세포 내 얼음결정 형성을 피하고 유리화(vitrification)를 돕기 위한 물질이 물 대신에 세포 내에 구성되어 있어야 한다(Fuller *et al.* 2004). 앞서 언급한 물질들이 실제 동결보존에 어떻게 활용되고 있는 지 기술하면 다음과 같다. 세포 동결시 동결손상으로부터 보호하기 위해서 쓰이는 물질을 동결보존제(Cryoprotectants, CPAs)라고 하는데, 크게 고분자로 구성된 세포 보호형 동결보존제와 저분자로 구성된 세포 침투형 동결보존제로 나눌 수 있다(Table 2). 세포 보호형 속일성 동결보존제(colligative cryoprotectants)는 세포 밖의 얼음결정 형성을 억제하는 작용을 한다(Fuller *et al.* 2004). 세포 침투형 동결보존제는 전자와 달리 세포막을 침투할 수 있는 저분자

Table 2. Examples of commonly used cryoprotectants (De Antoni 1989; Rudolph and Crowe 1995).

| Chemical name (Chemical formula) | Molecular weight | Permeability |
|--|------------------|--------------|
| Methanol (CH_3OH) | 32 | O |
| Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) | 46 | O |
| Ethylene glycol ($\text{C}_2\text{H}_4(\text{OH})_2$) | 62 | O |
| 1-2 Isopropanediol ($\text{C}_3\text{H}_6(\text{OH})_2$) | 76 | O |
| Dimethylsulfoxide ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) | 78 | O |
| Glycerol ($\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$) | 92 | O |
| Trehalose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | 342.3 | O |
| Polyvinyl pyrrolidone | 40,000 | × |
| Hydroxyethyl Starch | 97,000 | × |

물질로 세포막을 통과해 세포 내 수분을 치환하여 냉동시 얼음 결정이 형성되는 것을 억제하는 역할을 한다. 극지생물이 저온 적응에 이용하는 물질(가용성 당, 탄수화물, 폴리올, 글리세롤)을 냉동보존에 이용할 수 있는데(Chang *et al.* 2000; Dumet *et al.* 2000), 현재 트레할로스(trehalose)와 자당(sucrose)은 천연 동결보존제로 광범위하게 활용되고 있다. 트레할로스는 현탁 배양한 식물 세포의 조직을 냉동보존하기 위해 처음으로 사용되었다(Bhandal *et al.* 1985). 트레할로스만을 동결보존제(20~40% w/v trehalose)로 사용했을 때 대략 50% 내지 75%의 세포 생존율을 보였다. 또한 트레할로스는 호열 박테리아의 냉동보존을 위한 동결보존제로 사용되어 왔는데 트레할로스 0.3 M 농도로 사용하여 세포를 -60°C 에 보관하였을 때 세포 생존율이 가장 높았다(De Antoni 1989). 의학과 저온생물학 분야에서 당을 사용한 냉동보존 방법은 상당히 중요한 의미를 지닌다. Kravchenko와 Sampson(1998)는 0.25 M 자당, 1%(w/v) bovine serum albumin(BSA), 천연 식물 항산화제 silibor 등을 동결보존제로 이용해 0°C 에서 24시간 동안 쥐의 간 전체를 보존시키고 해동 후 생화학적으로 실험결과, 자당을 사용했을 때 가장 온전하게 보존되었다고 보고했다. Rudolph와 Crowe(1995)는 트레할로스와 프롤린(proline)을 혼합한 동결보존제를 사용했을 때 동물의 세포막이 더 잘 보존되었으며 이는 글리세롤과 Me_2SO 와 같은 동결보존제를 사용했을 때 보다 훨씬 더 안정된 세포막 보존 능력을 보여준다는 것을 증명하였다.

또 앞서 언급한 천연 부동액인 결빙방지단백질은 그 활용범위가 Table 3과 같이 다양한데, 천연 원료인 어류로부터 직접 추출해야 하기 때문에 다양으로 얻기가 힘들지만, 의료, 농업, 식품, 수산 분야에서 결빙방지 단백질의 응용 연구가 활발히 진행 중에 있다(Fletcher *et al.* 1999).

AFPs는 첨가하는 농도에 따라 세포 냉동 보존능과 세포 냉동 파괴능을 가진다고 알려져 있다. 낮은 농도에서는

Table 3. Application of antifreeze proteins.

| Cryopreservation | Examples |
|-----------------------------|---|
| Food | Supplements for improving frozen food texture |
| | Extension of expiration of frozen food |
| Cell, tissue and organ etc. | Long-term storage of organ and tissue |
| | Animal reproductive cells |
| | Cryopreservation of stem cells |
| Animal and plant | Improving cold resistance by gene transfer |
| | Cryosurgery |
| | Increased necrosis of malignant tumor |

얼음결정의 성장을 억제하는 결빙방지제로서 역할을 하지만, 높은 농도로 사용하면 오히려 얼음을 한 방향으로 성장시켜 바늘모양 얼음이 생성되도록 하여 세포를 파괴시키는 역할을 한다. AFPs를 냉동보존의 목적으로만 사용하려던 초창기에는 AFPs의 농도가 높으면 보존 효율이 높을 것으로 생각하였다. 그러나 Ekens *et al.*(1996)은 쥐의 간을 냉동보존하기 위해 낮은 농도(0.2 mg/ml)의 AFP I과 AFP III을 사용했을 때 냉동보존 효율이 높아진 것을 관찰했지만, 높은 농도(1 mg/ml)의 AFPs 사용시에는 얼음결정핵으로 작용하여 얼음 결정이 더 잘 만들어져 간 조직을 파괴하는 작용을 한다는 것을 알게 되었다. 이러한 파괴능을 이용하면 저온수술에 활용할 수 있는데 냉각율과 농도를 조절하여 세포를 제거하는 역할을 할 수 있다. 예를 들면 일반 수술을 통해 완전히 제거할 수 없는 암세포에 이 저온수술법을 적용하면 안전하게 제거할 수 있다는 장점을 가지고 있다고 보고된 바 있다(El-Sakhs *et al.* 1998). Pham *et al.*(1999)은 생쥐에 생긴 피부 암세포를 AFPs을 이용한 저온수술로 완전히 제거할 수 있다는 것을 보여주었다는데 AFP I을 동결 전에 10 mg/l로 생쥐 피부 암세포에 투여하여 피부 암세포 주변을 냉동시킨 결과 세포가 보존되지 않고 오히려 냉동파괴 되어 제거될 수 있었다. 사용 농도에 따라 얼음결정의 구조가 변화하는 AFPs의 양면성을 잘 이해한다면 AFPs는 냉동보존과 저온수술을 위한 첨가제로 활용할 수 있는 중요한 물질이 될 것이다(Pham *et al.* 1999). 곤충에서 추출한 AFPs의 경우 단지 얼음 재결정화를 방지하는 기능뿐만 아니라 동결된 세포조직에 남아있는 액체의 유동을 방지하는 기능도 포함되어 있다(Knight *et al.* 1995; Ramlov *et al.* 1996). 이와 같은 기능을 가진 AFPs를 인체 조직을 냉동보존하기 위해 의료 저온생물학에 적용할 수도 있을 것이다. 요약하면, 응용 저온생물학 연구에서 극저생물 AFPs를 적절하게 활용하기 위해서는 이들의 복합적인 기능(냉동방지와 냉동파괴)을 충분히 이해해야 할 것이다. 최근 체내혈세포, 난자, 줄기세포, 인체조직, 기관 등의 냉동보

존에 대한 수요가 증가하면서 장기간, 안전하고, 효율적이며, 저비용으로 이들을 보관할 수 있는 방법을 찾는 노력이 진행 중에 있는데 이를 위해 천연의 AFPs를 활용하려는 연구가 진행되고 있다(Block 2002; Fuller *et al.* 2004; Kang and Raymond 2004).

4. 극저온생물의 연구 방향

본 단락에서는 현재 진행 중이거나 관심을 끌고 있는 극저온생물의 연구 방향, 즉 저온적응 효소, 냉반응(Cold-response), 천체 생물학(Astrobiology) 등에 대해 논하고자 한다.

지난 십여 년 동안 저온 적응 효소에 대한 많은 보고가 있었다. 효소의 저온 적응은 하나의 기작이나 메커니즘에 의해서가 아니라 복합적인 요소에 의해서 이루어지므로, 각 효소마다 저온 적응 전략에는 약간씩 차이가 있는 것으로 밝혀지고 있다. 식물에 가장 많이 포함되어 있는 효소로서 광합성에 없어서는 안 될 주요 효소들의 하나인 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase(RUBISCO)의 경우를 예로 들면, 호냉성 미세조류의 RUBISCO는 중온성 미세조류보다 낮은 촉매 효율을 보이지만, 세포내 RUBISCO의 생합성을 중온성 조류보다 증가시켜 낮은 효소활성을 상쇄한다고 밝혀져 있는데 이는 새로운 효소의 저온적응 기작 중의 하나라고 볼 수 있다(Devos *et al.* 1998). 일반적으로 저온적응 효소는 구조적 유연성이 높기 때문에 낮은 열안정성, 낮은 활성 엔탈피, 낮은 기질 친화성, 낮은 온도에서의 높은 비활성도(比活性度) 등의 특성을 가지고 있다(Gerday *et al.* 2000). 저온적응 효소의 이런 특성 때문에, 극한생물학에서 뿐만 아니라 단백질의 접힘과 촉매 활성에 대한 연구에도 중요한 초점이 되고 있다(Siddiqui and Cavicchioli 2006). 이러한 저온적응 효소를 생물기술 산업에 응용할 수 있는 가능성은 상당히 높다고 할 수 있다. 예를 들면, 세제, 식품 산업, 정밀 화학물질 생산, 환경 오염물의 생명공학적인 처리 등 그 활용 범위가 매우 넓다고 하겠다(Gerday *et al.* 2000).

저온의 환경에서 생명체의 신진대사를 위해서는 생체막의 기능이 잘 보존되어야 한다. 인지질의 지방산 구성에 따라 세포막의 유동성 정도가 결정된다. 따라서 불포화 지방산의 증가, 평균 고리길이의 감소 및 복합불포화 지방산(polyunsaturated fatty acids, PUFAs)의 증가 등은 저온 환경에서 세포막 흐름을 유지하는데 중요한 역할을 한다(Russell 1997). 최근 해빙에서 분리된 호냉성 박테리아에서 새로운 효소인 polyketide synthase가 발견되었는데(Metz *et al.* 2001), 이 효소는 저온에서 잘 작용하고 PUFAs의 생합성에 꼭 필요한 효소인 것으로 알려졌다. PUFAs는 저온 생물 자체에도 필요한 물질이지만, 물고기

나 포유동물이나 포식생물의 음식물을 구성하는 중요한 물질이기도 하다. 해빙서식 구조류의 경우 막지질의 구성을 조절하여 낮은 온도, 낮은 광조건 및 제한된 질산염 농도 하에서도 효율적인 전자전달이 이루어질 수 있도록 한다는 사실이 알려져 있다. 해빙서식 미소생물에서도 결빙과 탈수에 대한 식물의 내성 기작인 cold-response 경로가 관측된다(Thomashow 2001). 해빙 내에 생존하는 미소생물들이 얼음 결정에 의해 파괴되지 않고 보호되어, 급격한 pH와 염분 변화의 완충 역할을 하며, 다른 여러 가지 화학적 스트레스에 어떻게 반응하는 지에 대한 연구는 아직 시작 단계에 불과하며 저온적응에 대한 이해의 폭을 넓히기 위해서는 기초연구가 수행되어야 할 것으로 여겨진다.

또 다른 흥미로운 극지 저온생물 연구분야 중 하나는 “극지 얼음에 갇힌” 생명체에 대한 연구이다. 생태학적, 형태학적으로 다양한 미생물들이 수천, 수백만 년 동안 영구 동토층 안에 “냉동보존” 되어왔다(Gilichinsky *et al.* 1995). 이러한 미생물 연구를 통해 천체 생물학 연구에 이론적, 실제적 근거를 제공하고 있다. 초창기 우주 행성에 출현한 생명체가 얼음과 관계가 있다는 “눈덩이 지구 이론(Snowball Earth)”은 최근 천체 생물학자의 관심을 받고 있다(Walker 2003). 생명체가 존재하기 위해 필요한 물이 얼음형태로 존재한다는 것이 입증된 화성, 또 목성의 위성인 유로파 등은 남극대륙의 얼음 환경과 유사하기 때문에 극지에 생존하고 있는 저온 생명체가 다른 천체에도 존재할 가능성이 높은 것이다(Deming and Huston 2000; Baker 2001). 지구가 아닌 다른 천체 환경에 생존 가능한 생명체와 생명의 진화를 연구함에 있어 지구 극지의 저온 환경은 천연 실험실로서 중요한 역할을 할 것이다.

요약하면, 본 종설에서는 지구의 가장 추운 지역에서 식하는 극지 생물이 “동결 상태의 생명체”로 어떻게 생존하는지, 그리고 이들이 가지는 생태학적 의미와 생리학적 특성에 대해서 기술하였다. 극지 생물이 초저온의 “동결 상태”의 스트레스 요인에 대처하는 생화학적, 생리학적 생존 전략 또한 언급하였다. 그러나 응용 저온생물학에서 극지의 “생태학적” 지식의 활용은 아직 미흡한 상태이다. 극지생물의 저온적응 현상을 이해함으로써 생물자원의 냉동보존에 도움이 되는 “천연” 냉동보존 물질 탐색, 보존 시스템 개발, 복잡한 저온수술 등에 이르기까지 다양한 응용분야가 늘어날 전망이다. 따라서 극지연구는 “동결 상태의 생명”을 다학제적으로 연구하는 저온생물학에 흥미로운 기회를 제공해 줄 것이라 생각한다.

사 사

본 연구는 극지연구소 “기본연구사업(PE07060)”의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Baker, V.R. 2001. Water and the Martian landscape. *Nature*, 412, 228-236.
- Bhandal, I.S., R.M. Hauptman, and J.M. Widholm. 1985. Trehalose as a cryoprotectant for the freeze preservation of carrot and tobacco cells. *Plant Physiol.*, 78, 430-432.
- Block, W. 2002. Interactions of water, ice nucleators and desiccation in invertebrate cold survival. *Eur. J. Entomol.*, 99, 259-266.
- Bruni, F. and A.C. Leopold. 1991. Glassy state in soybean seeds: relevance to anhydrous biology. *Plant Physiol.*, 96, 660-663.
- Chang, Y., R.E. Barker, and B.M. Reed. 2000. Cold acclimation improves recovery of cryopreserved grass (*Zoysia* and *Lolium* sp.). *Cryo Lett.*, 21, 107-116.
- Chen, L., A.L. DeVries, and C.-H. Cheng. 1997a. Convergent evolution of antifreeze glycoproteins in antarctic notothenioid fish and Arctic cod. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 94, 3817-3822.
- Chen, L., A.L. DeVries, and C.-H. Cheng. 1997b. Evolution of antifreeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene in Antarctic notothenioid fish. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 94, 3811-3816.
- Chen, L., A.L. DeVries, and C.-H. Cheng. 1997. Evolution of antifreeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene in Antarctic notothenioid fish. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87, 9265-9269.
- Cheng, C.H. and L. Chen. 1999. Evolution of an antifreeze glycoprotein. *Nature*, 401, 443-444.
- Crowe, J.H., L.M. Crowe, and D. Chapman. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science*, 223, 701-703.
- De Antoni, G.L., P. Peres, A. Abraham, and M.C. Anon. 1989. Trehalose, a cryoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus*. *Cryobiology*, 26, 149-153.
- Deming, J.W. and A.L. Huston. 2000. An oceanographic perspective on microbial life at low temperatures with implications for polar ecology, biotechnology and astrobiology. p. 149-160. In: *Cellular Origins and life in Extreme Habitats*. ed. by P. Seckbach. Kluwer, Dordrecht.
- Deming, J.W. 2002. Psychrophiles and polar regions. *Curr. Opin. Microbiol.*, 5(3), 301-309.
- Devos, N., M. Ingouff, R. Loppes, and R.F. Matagne. 1998. Rubisco adaptation to low temperatures: a comparative study in psychrophilic and mesophilic unicellular algae. *J. Phycol.*, 34, 655-660.
- Dumet, D., W. Block, M.R. Worland, B.M. Reed, and E.E. Benson. 2000. Profiling cryopreservation protocols for

- Ribes ciliatum* using differential scanning calorimetry. *Cryo Lett.*, 21, 367-378.
- Ekins, S., G.I. Murray, and G.M. Hawksworth. 1996. Ultrastructural and metabolic effects after vitrification of precision-cut rat liver slices with antifreeze proteins. *Cryo Lett.*, 17, 157-164.
- El-Sakhs, S., S. Shimi, E.E. Benson, L. Newman, and A. Cuschieri. 1998. Physical observations on rapid freezing of cells to -40°C using differential scanning calorimetry. *Cryo Lett.*, 19, 159-170.
- Elster, J. 2002. Ecological classification of terrestrial algae communities of polar environment. p. 303-326. In: *GeoEcology of Antarctic Ice-Free Coastal Landscapes*. eds. by L. Beyer and M. Bolter. Springer, Berlin.
- Elster, J. and E.E. Benson. 2004. Life in the polar terrestrial environment with a focus on algae and cyanobacteria. p. 111-149. In: *Life in the Frozen State*. eds. by B. Fuller, N. Lane, and E.E. Benson. Taylor and Francis, London.
- Fletcher, G.I., S.V. Goddard, and Y. Wu. 1999. Antifreeze proteins and their genes: From basic research to business opportunity. *Chemtech*, 30, 17-28.
- Fogg, G.E. 1998. *The Biology of Polar Habitats*. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Fuller, B.J., N. Lane, and E.E. Benson. 2004. *Life in the Frozen State*. Taylor and Francis, London.
- Gerday, C., M. Aittaleb, M. Bentahir, J.P. Chessa, P. Claverie, T. Collins, S. D'Amico, J. Dumont, G. Garsoux, D. Georgette, T. Lonhienne, M.A. Meuwis, and G. Feller. 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol.*, 18(3), 103-107.
- Gilichinsky, D.A., S. Wagener, and T.A. Visnivetskaya. 1995. Permafrost microbiology. *Permafrost Periglacial Proc.*, 6, 281-291.
- Griffith, M. and K.V. Ewart. 1995. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. *Biotechnol. Adv.*, 13, 375-402.
- Howes, I., C. Howard-Williams, and R.D. Pridmore. 1993. Environmental control of microbial communities in the ponds of the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Arch. Hydrobiol.*, 127, 271-287.
- Kang, J.S. and J.A. Raymond. 2004. Reduction of freeze-thaw-induced hemolysis of red blood cells by an algal ice-binding protein. *Cryo Lett.*, 25, 307-310.
- Kappen, L. 1993. Lichens in the Antarctic region. p. 433-490. In: *Antarctic Microbiology*. ed. by E.I. Friedman. Wiley Liss, New York.
- Kirst, G.O. and C. Wiencke. 1995. Ecophysiology of polar algae. *J. Phycol.*, 31, 181-199.
- Knight, C.A. and A.L. DeVries. 1994. Effects of a polymeric, nonequilibrium "antifreeze" upon ice growth from water. *J. Cryst. Growth*, 143, 301-310.
- Knight, C.A., D. Wen, and R.A. Laurensen. 1995. Non-equilibrium antifreeze peptides and the recrystallization of ice. *Cryobiology*, 32, 23-34.
- Kravchenko, S.I. and V. Sampson. 1998. Efficiency of the sucrose-containing solution on the cold preservation of whole liver. *Cryo Lett.*, 19, 231-236.
- Lewis-Smith, R.I. 1997. Oases as centres of high diversity and dispersal in Antarctica. p. 119-128. In: *Ecosystem processes in Antarctic ice-free landscapes*. eds. by L. Howard-Williams, and I. Hawes. Balkema, Rotterdam.
- Ling, H.U. and R.D. Seppelt. 1998. Snow algae of the Windmill Islands, continental Antarctica *Chloromonas polyptera* (Volvocales, Chlorophyta). *Polar Biol.*, 20, 320-324.
- Metz, J.G., P. Roessler, D. Facciotti, C. Levering, F. Dittrich, M. Lassner, R. Valentine, K. Lardizabalk, F. Domerque, A. Yamada, K. Yazawa, V. Knauf, and J. Browse. 2001. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science*, 293, 290-293.
- Montiel, P.O. 2000. Soluble carbohydrates (trehalose in particular) and cryoprotection in polar biota. *Cryo Lett.*, 21(2), 83-90.
- Nichols, D.S., J. Olley, H. Garda, R.R. Brenner, and T.A. McMeekin. 2000. Effect of temperature and salinity stress on growth and lipid composition of *Shewanella gelidimarina*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2422-2429.
- Pham, L., R. Dahiya, and B. Rubinsky. 1999. An *in vivo* study of antifreeze protein adjuvant cryosurgery. *Cryobiology*, 38, 169-175.
- Ramlov, H., D.A. Wharton, and P.W. Wilson. 1996. Recrystallization in a freezing tolerant Antarctic nematode, *Panagrolaimus davidi*, and an alpine weta, *Hemideina maori* (Orthoptera; Stenopelmatidae). *Cryobiology*, 33, 607-613.
- Raymond, J.A. 2000. Distribution and partial characterization of ice-active molecules associated with sea-ice diatoms. *Polar Biol.*, 23, 721-729.
- Rudolph, A.S. and J.H. Crowe. 1995. Membrane stabilization during freezing: The role of two natural cryoprotectants trehalose and proline. *Cryobiology*, 22, 367-377.
- Russell, N.J. 1997. Psychrophilic bacteria-molecular adaptations of membrane lipids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118(3), 489-493.
- Siddiqui, K.S. and R. Cavicchioli. 2006. Cold-adapted enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 403-33.
- Storey, K. and J. Storey. 1992. Biochemical adaptations for

- winter survival in insects. p. 101-140. In: *Advances in Low Temperature Biology*. ed. by P. Steponkus. JAI Press, London.
- Sun, W.Q. and A.C. Leopold. 1994a. The glassy state and seed storage stability: A viability equation analysis. *Ann. Bot.*, 74, 601-604.
- Sun, W.Q. and A.C. Leopold. 1994b. The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. *Physiol. Plantarum*, 90, 621-628.
- Tang, E.P.Y., R. Tremblay, and W.F. Vincent. 1997. Cyanobacterial dominance of polar freshwater ecosystems: Are high-latitude mat-formers adapted to low temperature? *J. Phycol.*, 33, 171-181.
- Thomas, D.N. and G.S. Dieckmann. 2002. Antarctic sea ice—a habitat for extremophiles. *Science*, 295, 641-644.
- Thomas, D.N., G. Kattner, R. Engbrodt, V. Giannelli, H. Kennedy, C. Haas, and G. Dieckmann. 2001. Dissolved organic matter in Antarctic sea ice. *Ann. Glaciol.*, 33, 297-303.
- Thomashow, M.F. 2001. So What's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiol.*, 125(1), 89-93.
- Van Liere, L. and A.F. Walsby. 1982. Interactions of cyanobacteria with light. p. 9-45. In: *The Biology of Cyanobacteria*. eds. by N.G. Carr and B.A. Whitton. Blackwell, Oxford.
- Vincent, W.F. 2000. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: Invasion, selection and endemism. *Antarct. Sci.*, 12(3), 374-385.
- Vincent, W.F., C. Howard-Williams, and P.A. Broady. 1993. Microbial communities and processes in Antarctic flowing waters. p. 543-569. In: *Antarctic Microbiology*. ed. by E.I. Friedmann. Wiley-Liss, New York.
- Walker, G. 2003. Snowball Earth, Bloomsbury, London. 269 p.
- Wharton, D. and W. Block. 1997. Differential scanning calorimetry studies on an Antarctic nematode (*Panagrolamus davidi*) which survives intracellular freezing. *Cryobiology*, 34, 114-121.
- Whitton, B.A. 1987. Survival and dormancy of blue-green algae. p. 109-167. In: *Survival and Dormancy of Microorganisms*. ed. by Y. Henis. Wiley, New York.
- Wiedner, C. and B. Nixdorf. 1998. Success of chrysophytes, cryptophytes and dinoflagellates over blue-greens (cyanobacteria) during an extreme winter (1995/96) in eutrophic shallow lakes. *Hydrobiologia*, 369/370, 229-235.
- Wiermann, R. and S. Gubatz. 1992. Pollen wall and sporopollenin. *Int. Rev. Cytol.*, 140, 35-72.
- Worland, M.R., W. Block, and H. Oldale. 1996. Ice nucleation activity in biological materials with examples from Antarctic plants. *Cryo Lett.*, 17, 31-38.

Received Jun. 9, 2007
Accepted Jul. 19, 2007