

## 식물에서의 상동재조합을 이용한 효율적인 진타겟팅 시스템

권용익 · 이효연

# An efficient gene targeting system using homologous recombination in plants

Yong-Ik Kwon · Hyo-Yeon Lee

Received: 22 March 2015 / Revised: 11 May 2015 / Accepted: 12 May 2015  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** The plant breeding technology was developed with genetic engineering. Many researchers and breeders have turned from traditional breeding to molecular breeding. Genetically modified organisms (GMO) were developed via molecular breeding technology. Currently, molecular breeding technologies facilitate efficient plant breeding without introducing foreign genes, in virtue by of gene editing technology. Gene targeting (GT) via homologous recombination (HR) is one of the best gene editing methods available to modify specific DNA sequences in genomes. GT utilizes DNA repair pathways. Thus, DNA repair systems are controlled to enhance HR processing. Engineered sequence specific endonucleases were applied to improve GT efficiency. Engineered sequence specific endonucleases like the zinc finger nuclease (ZFN), TAL effector nuclease (TALEN), and CRISPR-Cas9 create DNA double-strand breaks (DSB) that can stimulate HR at a target site. RecQ14, Exo1 and Rad51 are effectors that enhance DSB repair via the HR pathway. This review focuses on recent developments in engineered sequence specific endonucleases and ways to improve the efficiency of GT via HR effectors in plants.

**Keywords** Gene editing, Gene targeting, Homologous recombination, Engineered endonucleases

## 서론

식물은 인간의 식재료 및 심미적 목적에 맞게 육종되어 왔다. 과거에는 전통육종 방법인 교배를 통한 식물체의 개량이 주된 방법이었다. 그러나 유전공학의 발달과 더불어 분자유종 기술도 함께 발달하면서 유전자를 변형시켜 식물을 개량하는 방법들이 주목 받기 시작하였다. 각종 유전자의 기능분석 및 신품종 개발을 위해 유전자변형 기술을 활용한 연구개발이 진행되어 왔다. 유전자의 변형에는 화학적 돌연변이 처리, 방사선 조사, transfer DNA (T-DNA)의 삽입 등 다양한 방법이 이용되고 있다 (Kaul and Bhan 1977; Alonso et al. 2003; An et al. 2003). 그러나 변이된 식물로부터 유전자의 변이를 찾는 forward genetics는 모래밭에서 바늘 찾기과 같이 많은 노력과 시간이 필요하다. Forward genetics의 대안으로 유전자 분석을 먼저 시도하여 표현형을 밝히는 reverse genetics이 대두되었다. 대표 기술로는 특정 유전자의 발현을 억제하여 목표유전자의 변이를 유발하는 RNA interference (RNAi)가 있다 (Schwab et al. 2006). RNAi를 이용하여 많은 연구성과가 도출되었지만 특정 유전자에 따라 발현 억제가 충분한 효과를 보지 못하거나 안정성에 문제가 발생하는 경우가 있다. 유전자 기능이 억제된 돌연변이를 제작하는 것과는 다르게 특정 유전자가 식물체내에서 과발현하여 기능이 강화된 작물을 제작하는 방법도 있다. 그 결과물로 인간에게 유리한 제초제저항성 및 해충저항성 등 기능이 강화된 유전자변형작물(genetically modified organisms: GMO)이 개발되어 재배되고 있다 (James 2013). 그러나 과발현구조가 삽입된 위치를 분석해야 하며 삽입위치에 따라 효과가 다르게 때문에 최적 이벤트의 선점이 어려운 경우도 있다.

최근 유전공학은 무작위적인 돌연변이 유도 및 유전자 삽입, 그리고 불완전한 발현 억제 기술을 넘어서 목표 유

Y.-I. Kwon (✉) · H.-Y. Lee  
제주대학교 아열대원예산업연구소  
(Subtropical Horticulture Research Institute, Jeju National  
University, Jeju 690-756, Korea)  
e-mail: yongikk@jejunu.ac.kr

전자를 직접 조작할 수 있는 유전자 편집기술까지 발달하게 되었다. 유전자 편집기술로는 상동재조합(Homologous Recombination: HR)을 이용하여 목표한 내재유전자(endogenous gene)의 특정 염기서열을 조작하는 진타겟팅(gene targeting: GT)이 있다. GT은 특정 유전자만을 조작하는 유용한 기술이다. 식물에서는 담배에서 처음으로 GT을 성공하였으며(Paszowski et al. 1988), 다른 다양한 식물에서도 HR을 이용한 GT에 대한 연구가 활발하게 수행되고 있다(Terada et al. 2007; Puchta and Fauser 2013; Voytas 2013; Endo and Toki 2014). 하지만 식물에서는 HR을 이용한 GT가 이루어지는 빈도가 동물에 비해 매우 낮기 때문에 보편적으로 이용되기 어려웠다(Lee et al. 1990; Terada et al. 2002; Hohn and Puchta 2003; Endo et al. 2006b; Endo et al. 2007). 최근에 이 문제를 해결 하기 위한 방법으로 HR은 DNA가 절단된 부위에서 발생한다는 점을 착안하여 특정 염기서열을 인식하여 절단 할 수 있는 유전자 가위(engineered sequence specific endonuclease)가 주목 받고 있다. 유전자 가위는 Zinc Finger Nucleases (ZFN)을 시작으로 Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN)을 거쳐, 최근에는 높은 효율로 유전자를 절단하는 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR-Cas9)까지 빠른 속도로 기술이 발달하여 GT을 비롯한 유전자 편집기술에 많은 기여를 하고 있다(Puchta and Fauser 2013; Voytas 2013; Gaj et al. 2013). 유전자 가위는 목표유전자를 절단하여 비상동말단재조합(Non-Homologous End Joining: NHEJ) 과정을 이용해 삽입-결실(indel)을 만들거나 HR 과정을 통해 GT가 이루어지도록 유도하기 때문에 유전자편집기술에 있어서 매우 유용한 도구이다. 본 리뷰에서는 최근 주목을 받고 있는 유전자가위와 함께 GT을 이용하여 목표 유전자를 직접 다룰 수 있는 유전자편집 기술에 관한 동향을 살펴보고자 한다.

### Positive-negative selection system을 이용한 GT

Positive-negative selection system을 이용한 GT은 쥐의 knockout 돌연변이를 효율적으로 만드는 방법으로 개발되었다(Mansour et al. 1988). 이 시스템은 HR을 통해 결합된 목표유전자에는 positive marker만 삽입되고, 무작위적으로 삽입된 비 목표유전자에는 negative marker도 함께 삽입된다. 작동 방식은 먼저 positive marker를 이용하여 유전자가 삽입된 개체를 선발하고, 다음으로 negative marker를 이용하여 negative marker가 삽입된 개체는 고사시켜 최종적으로 HR을 통해 목표유전자에만 삽입된 변이체를 선발하는 시스템이다. 식물에는 kanamycin, geneticin (G418)에 저항성을 보이는 *NPTII* 유전자와 hygromycin에 저항성을 보이는 *HPT* 유전자가 positive marker로 사용되며, 식물의 생존에 영향을 미치는 치사유전자인 cytosine deaminase를 번역하

는 *codA* 유전자와 diptheia toxin A fragment를 번역하는 *DT-A* 유전자가 negative marker로 사용된다 (Iida and Terada 2005). 벼에 이 시스템을 적용하여 Waxy (Terada et al. 2002; Iida and Terada 2004; Iida and Terada 2005; Ozawa et al. 2012), Alcohol dehydrogenase2 (ADH2) (Terada et al. 2007), Methyltransferase1a (Met1a) (Yamauchi et al. 2009), Repressor of silencing1 (ROS1) (Ono et al. 2012), Domains rearranged methylase1 (DRM2) (Moritoh et al. 2012), 그리고  $\beta$ 1,2-xylosyltransferase (Ozawa et al. 2012) 의 변이체가 제작되었다 (Table 1). 그러나 상동재조합을 통한 진타겟팅의 성공율은 positive selection된 개체 중 약 1.1%만 negative selection에서 생존하였다(Ono et al. 2012). 즉, 벼의 형질전환율이 20%라고 가정하였을 때 20% 중에서 1%가 성공하였으므로 0.002%가 진타겟팅의 효율이다.

Positive-negative selection system은 HR을 통한 GT가 이루어진 후에 positive marker가 남아 있어 변형된 작물의 실용화에 있어서 이를 제거해야 하는 문제점이 있다. Positive marker를 제거하기 위해 *Cre/loxP* system과 같은 위치특이성 재조합(site-specific recombination) 방법을 적용하여 모델식물과 작물식물에서 성공한 사례가 보고되었으며(Wang et al. 2010), GT가 이루어진 DNA위치에서도 positive marker를 제거하는데 성공하였다(Terada et al. 2010). 그러나 *Cre/loxP* system은 positive marker가 제거된 자리에 불필요한 염기서열이 남는 문제가 있다. 이 문제를 해결하기 위해 곤충에 이용되고 있는 piggyBac transposon이 적용되었다. PiggyBac transposon은 TTAA 서열에 삽입되고 제거되는 과정에 불필요한 염기서열을 남기지 않는다(Cary et al. 1989). 최근에 piggyBac transposon을 벼에 적용하여 높은 빈도로 marker를 제거한 사례가 보고되었다(Nishizawa-Yokoi et al. 2014). PiggyBac transposon은 불필요한 염기서열을 남기지 않는 장점이 있지만 목표유전자부분에 적절한 TTAA 서열이 존재하지 않으면 적용하기 어려운 단점이 있다. 따라서 positive-negative selection system을 이용한 GT 이후에 positive marker를 제거하기 위해서는 앞서 서술한 위치특이적 재조합, piggyBac transposon 그리고 HR 등의 방법을 상황에 맞게 적용해야 할 것이다.

### 유전자가위를 이용한 GT

DNA가 절단되었을 때 NHEJ과 HR 경로로 DNA를 복구하게 되며, 이 과정에서 GT 및 indel이 일어나게 된다. 목표 유전자를 절단하는 유전자 가위는 DNA 복구를 촉진시켜 GT의 효율을 높일 수 있는 도구로 주목 받게 되었다. 유전자 가위의 첫 세대인 ZFN는 특정 염기서열을 인식하는 zinc finger domain에 가위역할을 하는 *FoKI* 제한효소를 결합한 것으로(Kim et al. 1996), 식물에서도 ZFN을 이용한 GT가 보고되었다. 담배의 acetolactate synthase (*ALS*)

유전자(Townsend et al. 2009), 옥수수의 inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase (*IPK1*) 유전자(Shukla et al. 2009), 그리고 애기장대의 *ADH11*, *TT4* 유전자(Zhang et al. 2010)에 ZFN를 적용하여 성공하였다(Table 1). 유전자 가위의 다음 세대로 등장한 TALEN은 식물병원균인 *Xanthomonas*에서 유래한 단백질인 Transcription Activator-Like Effector를 이용한 것으로 특정염기서열을 인식하는 TALE domain에 ZFN와 동일하게 *FokI*를 결합하여 특정염기서열을 절

단하게 된다. 벼의 *SWEET14*유전자(Li et al. 2012), *BADH2* 유전자(Shan et al. 2013a), 담배의 원형질체에 *ALS*유전자에 TALEN을 적용하여 GT가 성공하였다(Zhang et al. 2013)(Table 1).

ZFN는 세 개의 염기서열을 인식하는 모듈의 조합으로 목표 염기서열에 결합하여 절단하게 된다(Liu et al. 1997). 반면 TALEN은 하나의 모듈이 하나의 염기서열을 인식할 수 있어 모듈의 조합이 ZFN 보다 자유로워 다양한

**Table 1** List of examples of gene editing in plants

Modification type	Plant	Gene	Method	Gene delivery	Reference
Point mutant <sup>a)</sup>	Arabidopsis	<i>PPO</i>	spontaneously GT	Agrobacterium (intact plants)	Hanin et al. 2001
	Arabidopsis	<i>ALS</i>	spontaneously GT	Agrobacterium (intact plants)	Endo et al. 2006b
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>PDS</i>	CRISPR-Cas9	Electroporation (protoplasts)	Li et al. 2014
	Rice	<i>ALS</i>	spontaneously GT	Agrobacterium (callus)	Endo et al. 2007
	Rice	<i>ASA2</i>	spontaneously GT	Agrobacterium (callus)	Saika et al. 2011
	Rice	<i>PDS</i>	CRISPR-Cas9	Electroporation (protoplasts)	Shan et al. 2013
	Tobacco	<i>ALS</i>	ZFN	Electroporation (protoplasts)	Townsend et al. 2009
Knockout <sup>b)</sup>	Arabidopsis	<i>ADH11</i> , <i>TT4</i>	ZFN	Agrobacterium (intact plants)	Zhang et al. 2010
	Arabidopsis	<i>PDS3</i>	CRISPR-Cas9	Electroporation (protoplasts)	Li et al. 2013
	Maize	<i>IPK</i>	TALEN, CRISPR-Cas9	Agrobacterium (immature embryos), Electroporation (protoplasts)	Liang et al. 2014
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>PDS</i>	CRISPR-Cas9	Agroinfiltration (leaf)	Nekrasov et al. 2013
	Rice	<i>SWEET14</i>	TALEN	Agrobacterium (callus)	Li et al. 2012
	Rice	<i>BADH2</i> , <i>DEP1</i> , <i>CKX2</i>	TALEN	Agrobacterium (callus)	Shan et al. 2013
	Rice	<i>BADH2</i> , <i>MPK2</i>	CRISPR-Cas9	Bombardment (callus)	Shan et al. 2013
Tobacco	<i>PDS</i>	CRISPR-Cas9	Agrobacterium (leaf discs)	Gao et al. 2014	
Knock-in of GUS <sup>a)</sup>	Rice	<i>Met1a</i>	Positive-negative selection	Agrobacterium (callus)	Yamauchi et al. 2009
	Rice	<i>ROS1</i>	Positive-negative selection	Agrobacterium (callus)	Ono et al. 2012
	Rice	<i>DRM2</i>	Positive-negative selection	Agrobacterium (callus)	Moritoh et al. 2012
Knock-in of HPT <sup>a)</sup>	Rice	<i>Waxy</i>	Positive-negative selection	Agrobacterium (callus)	Terada et al. 2002
	Rice	<i>ADH2</i>	Positive-negative selection	Agrobacterium (callus)	Terada et al. 2007
	Rice	<i>XYL</i>	Positive-negative selection	Agrobacterium (callus)	Ozawa et al. 2012
Knock-in of NPTII <sup>a)</sup>	Arabidopsis	<i>ADH1</i>	CRISPR-Cas9	Agrobacterium (intact plants)	Schimpl et al. 2014
Knock-in of PAT <sup>a)</sup>	Maize	<i>IPK1</i>	ZFN	Whisker-mediated transformation	Shukla et al. 2009
Knock-in of YFP <sup>a)</sup>	Tobacco	<i>ALS</i>	TALEN	Electroporation (protoplasts)	Zhang et al. 2013

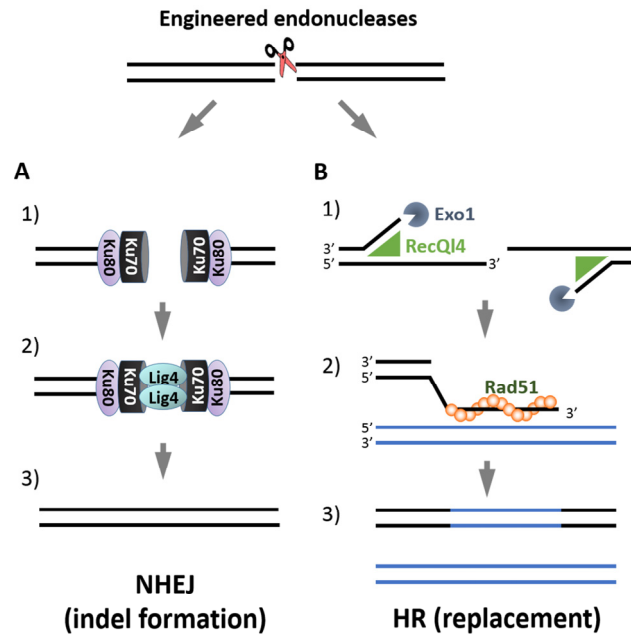
<sup>a)</sup>HR mediated GT. <sup>b)</sup>NHEJ mediated indel formation

DNA 염기서열에 결합 할 수 있기 때문에 모듈 조합의 자율성과 보다 긴 염기서열을 인식 할 수 있는 장점이 있다. 그러나 동일 목표 유전자를 인식하는 ZFN가 TALEN 보다 작은 크기로 식물체에 형질전환을 쉽게 할 수 있다는 장점이 있다. 각각의 장단점이 존재하므로 목표유전자에 맞게 적절하게 이용해야 할 필요성이 있다.

최근에 등장한 RNA-guided DNA endonuclease인 CRISPR-Cas9는 짧은 non-coding RNA (crRNA)가 목표 염기서열을 인식하고 Cas9 nuclease을 통해 절단된다(Terns and Terns 2011; Ran et al. 2013). CRISPR-Cas9 체계는 RNA에 기반하여 목표 염기서열에 결합하는 방식으로 단백질 형태로 목표 염기서열에 결합하는 ZFN, TALEN에 비해 크기가 작다. 즉, CRISPR-Cas9는 ZFN와 TALEN의 장점을 모두 갖추고 있는 형태이다. 그러나 인간세포에서 CRISPR-Cas9를 적용 하였을 때에 비목표 유전자에도 영향을 준다(off-target)는 보고가 있다(Fu et al. 2013). 식물에 CRISPR-Cas9를 이용하여 벼의 phytoene desaturase gene (*PDS*)가 성공되었으며(Shan et al. 2013b), 애기장대와 *Nicotiana benthamiana*의 *PDS3* 유전자가 성공되었다(Li et al. 2013). 또한 아그로박테리움 형질전환법으로 CRISPR-Cas9을 일시적으로 발현시켜 *Nicotiana benthamiana*의 *PDS3* 유전자 변이도 성공하였다(Nekrasov et al. 2013). CRISPR-Cas9을 이용하여 벼 *PDS* 유전자에서 돌연변이(indel 형성)율이 15%를 보였으며 형질전환된 원형질체 29 콜로니 중 2 콜로니에서 GT가 성공하였다(Shan et al. 2013b). 최근에는 *Nicotiana tabacum* (Gao et al. 2014) 과, 옥수수(Liang et al. 2014)에서도 성공한 사례가 보고되었으며, 애기장대(Schiml et al. 2014)에서 HR을 이용한 유전자삽입도 성공하였다(Table 1). 애기장대에서 동일한 목표유전자의 절단 효율이 CRISPR-Cas9가 TALEN보다 높으며 off-target 효과도 적다는 연구결과도 발표되었다(Johnson et al. 2014). 가장 최근에 CRISPR-Cas9 기작 및 식물 유전자 편집 적용에 관한 리뷰가 발표되었다(Bortesi and Fischer 2015; Belhaj et al. 2015). 이 결과들은 CRISPR-Cas9가 식물의 유전자편집에 있어서 매우 가치 있는 도구로 이용될 수 있음을 시사한다.

**HR을 이용하는 GT**

GT는 손상을 받은 DNA를 복구하는 과정을 이용한다. HR을 이용한 DNA 복구는 다음과 같은 과정으로 복구된다. 1) RecQ14 helicase와 Exo1 nuclease가 3' 말단 단일 DNA 가닥을 만들고, 2) 만들어진 단일 DNA 가닥에 Rad51이 중합되어 Rad51이 손상된 DNA와 상동성이 있는 DNA를 탐색한 다음, 3) Rad51이 중합되어있는 단일 가닥이 상동DNA의 염기서열을 복제하여 복제된 DNA 염기서열을 이용하여 손상된 DNA를 복구하게 된다(Heyer et al. 2010; Symington and Gautier 2011) (Fig. 1B). 그러나



**Fig. 1** Model of the NHEJ/HR-mediated DNA double stranded break (DSB) repair (A. The NHEJ-mediated DNA DSB repair is: 1) binding Ku70/80 on the DNA broken ends; 2) ligating via Lig4; 3) simply joining each other. B. The steps of HR-mediated DNA DSB repair are: 1) processing of DSBs to create a 3'-single-strand overhang via resection of 5'-ssDNA; 2) polymerized Rad51 on this ssDNA directed homology search; 3) strand invasion into undamaged homologous template duplex DNA (blue lines) and finally, the DNA broken lesion is repaired)

손상된 DNA부위를 간단히 접합하는 방식으로 복구하는 NHEJ 경로(Fig. 1A)로 대부분 복구되어 HR을 통한 DNA 복구 빈도가 매우 낮기 때문에 HR을 이용한 GT의 성공율은 형질전환체의  $10^3$ 에서  $10^6$ 에 그치고 있다(Lee et al. 1990; Terada et al. 2002; Hohn and Puchta 2003; Endo et al. 2007).

GT의 효율을 높이는 방법으로 인위적으로 DNA 손상을 유도하고 HR의 빈도를 높이는 전략이 시도되었다. 인위적으로 DNA 손상을 유도하는 전략은 앞서 서술한 유전자 가위를 이용한 것이다. HR의 빈도를 높이는 전략으로는 손상된 DNA복구에 관여하는 유전자를 이용하여 NHEJ으로의 복구 경로를 차단하고 HR으로의 복구 경로를 유도하는 방법이다(Fig. 1). 모든 진핵생물에서 Ku70, Ku80, Lig4는 NHEJ에 주요하게 관여한다고 보고되어 있다(Singh et al. 2010; Symington and Gautier 2011). 애기장대에서 AtLig4의 결손으로 *AGL4* 유전자의 GT 빈도가 증가되었으며(Tanaka et al. 2010), 벼에서는 Ku70/80과 Lig4의 억제제로 HR의 빈도가 증가되었다(Nishizawa-Yokoi et al. 2012). HR에는 다양한 유전자들이 관여하며(Schuermann et al. 2005), 그 중 실제로 HR 효율을 높이기 위해 시도된 몇 가지 사례를 소개한다. 상동DNA 찾기에 관여하는 Rad51C가 애기장대에서 기능을 상실하면 HR이 약 4배 감소하

**Table 2** List of modified DNA repair genes for improve HR

Relative pathway	Species	Gene	Method	Frequency of HR	Reference
NHEJ	Arabidopsis	<i>Lig4</i>	Knockout	× 2	Tanaka et al. 2010
	Rice	<i>Ku70/80, Lig4</i>	Knockdown	× 3	Nishizawa-Yokoi et al. 2012
HR	Arabidopsis	<i>Rad51C</i>	Knockout	× 0.25	Abe et al. 2005
	Arabidopsis	<i>CAF1</i>	Knockout	× 40	Endo et al. 2006a
	Chicken DT40 cell	<i>BLM, Exo1</i>	Overexpression	× 20	Kikuchi et al. 2008
	Rice	<i>RecQ14, Exo1</i>	Overexpression	× 30	Kwon et al. 2012

여 HR에 중요한 요소라고 보고되었으며(Abe et al. 2005), DNA복제와 복구에 관여하는 상위 유전자 중 하나인 Chromosome Assembly Factor-1 (CAF-1) 돌연변이 애기장대에서는 HR 빈도가 약 40배까지 증가되었다고 보고되었다(Endo et al. 2006a). 또한 동물에서는 BLM (RecQ와 동일한 기능)과 Exo1이 DNA 이중나선 절단을 촉진한다고 보고되었으며(Nimonkar et al. 2008), 닭DT40 B lymphocytes 세포에서 BLM과 Exo1을 과발현 시켰을 때에는 GT 빈도가 약 20배 증가되었다(Kikuchi et al. 2009). 벼에서 BLM과 동일한 기능을 갖는 OsRecQ14가 보고되었으며(Kwon et al. 2013), DNA이중나선을 절단 하였을 때 OsRecQ14와 OsExo1의 일시적 과발현이 HR의 빈도를 약 30배 증가시켰다(Kwon et al. 2012) (Table 2). HR을 통한 GT을 효율적으로 성공시키기 위해서는 유전자 가위를 이용하여 목표 유전자를 절단하여 DNA 손상을 유도하고, 그 다음으로 보조인자(HR/NHEJ에 관여하는 유전자)를 이용하여 HR의 빈도를 높이는 전략이 필요하다.

## 결론

유전공학기술로 식물 유전자의 기능이 많이 연구되었고 이를 기반으로 식량부족, 기후변화에 대응하기 위하여 GMO와 같은 작물 개발을 진행하고 있다. 그러나 GMO에 삽입된 외래 유전자의 안전성 등의 문제로 GMO에 관한 규제가 이루어져 이를 완화하기 위해 전세계적으로 신식물육종기술(New plant Breeding Techniques: NBT)에 주목하고 있다. NBT는 유전자를 변형한 식물체내 위해 요소 발생을 억제하여 안정적으로 최종 산물을 개발하는 것으로 유전자 편집기술인 목표유전자를 절단하는 유전자 가위를 이용한 기술이 포함되어 있다(Lusser et al. 2012). 유전자 가위로 목표 유전자를 절단하여 NHEJ 경로로 절단된 유전자가 복구되는 과정에서 목표유전자에 indel을 형성(대부분 결손이 형성됨)하여knockout변이를 유도 할 수 있다(Fig. 1). 그러나 유전자 가위만으로 목표유전자의 다양한 변이를 만드는 것은 한계가 있다. HR을 이용한 GT

은 목표유전자에 편집된 염기서열로 바꾸어 넣을 수 있으며 다른 유전자의 삽입도 가능하여 목표유전자의 기능을 상실시키는 동시에 다른 유전자를 과발현 시키는 knock-in이 가능하다. 이처럼 다양한 방식으로 편집된 염기서열을 바꾸어 넣을 수 있는 기술적 이점이 있어 동물에서는 GT을 이용하여 기능이 상실된 유전자를 복구하는 유전자치료에 적용한 연구가 진행되고 있다(Kaufmann et al. 2013). 동물에서는 하나의 배아 세포에 mRNA 형태로 직접 ZFN을 주입하는 방법 등으로 그 효율이 높다(Rémy et al. 2010). 그러나 식물의 형질전환 효율은 10-20% 내외가 통념이며, 종류에 따라 형질전환 효율이 매우 낮은 식물도 있으며 GT은 유전자 가위와 편집된 염기서열(donor-vector)을 동시에 형질전환을 수행해야 하는 기술적 문제와 낮은 HR 효율 등 해결해야 할 부분이 있다. 또한 유전자가위가 지속적으로 식물체내에 발현하여 식물 발달에 영향을 미칠 가능성이 있으므로 유전자가위가 일시적으로 발현할 수 있도록 형질전환을 하거나  $\beta$ -estradiol induction system과 같은 유도프로모터를 이용(Kwon et al. 2012)하는 방안도 고려해야 한다. 유전자 조작을 통해 개발된 식물(GMO)을 상업화하기 위해서는 유전자변형생물체의 규정에 따른 위해성평가가 필요하다. 유전자 가위를 이용하여 NHEJ경로로 목표유전자의 짧은 염기서열을 삭제-삽입만 하여 얻어진 결과물과 HR을 이용하는 GT의 결과물은 자연상태에서 얻어진 돌연변이와 동일하게 인정 될 가능성이 있어 위해성평가를 피할 수 있다. 하지만 GT을 이용하여 새로운 유전자 삽입(positive-negative selection system의 positive marker가 삽입)도 가능하기 때문에 목표유전자의 변이 정도에 따라GMO로 분류될 가능성도 존재하며, NBT에 언급된 기술에 관하여도 계속적으로 논의 중이다(Hartung and Schiemann 2014; Araki and Ishii 2015). 그럼에도 불구하고 식물에서 목표유전자를 직접적으로 다루는 것이 가능하여 목표유전자 기능의 변화 및 기능이 상실된 유전자를 복구하는 유전자치료에 적용 가능한 HR을 이용하는 GT은 유전자가위와 함께 지속적으로 발전 할 것이다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(과제번호: PJ011280012015), 농림수산식품부(과제번호: 1110743)의 지원과 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2009-0094059).

## 감사의 글

본 리뷰 작성에 많은 조언과 도움을 주신 Seiichi Toki, Masaki Endo와 국문 검토를 도와준 김우남, 홍민지에게 감사의 글을 전합니다.

## References

- Abe K, Osakabe K, Nakayama S, et al (2005) Arabidopsis RAD51C Gene Is Important for Homologous Recombination in Meiosis and Mitosis. *Plant Physiol* 139:896-908
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, et al (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science* 301:653-657
- An S, Park S, Jeong D-H, et al (2003) Generation and Analysis of End Sequence Database for T-DNA Tagging Lines in Rice. *Plant Physiol* 133:2040-2047
- Araki M, Ishii T (2015) Towards social acceptance of plant breeding by genome editing. *Trends Plant Sci* 20:145-149
- Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, et al (2015) Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Curr Opin Biotechnol* 32:76-84
- Bortesi L, Fischer R (2015) The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Adv* 33:41-52
- Cary LC, Goebel M, Corsaro BG, et al (1989) Transposon mutagenesis of baculoviruses: Analysis of Trichoplusia ni transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* 172:156-169
- Endo M, Ishikawa Y, Osakabe K, et al (2006a) Increased frequency of homologous recombination and T-DNA integration in Arabidopsis CAF-1 mutants. *EMBO J* 25:5579-5590
- Endo M, Osakabe K, Ichikawa H, Toki S (2006b) Molecular Characterization of True and Ectopic Gene Targeting Events at the Acetolactate Synthase Gene in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 47:372-379
- Endo M, Osakabe K, Ono K, et al (2007) Molecular breeding of a novel herbicide-tolerant rice by gene targeting. *Plant J* 52:157-166
- Endo M, Toki S (2014) Toward establishing an efficient and versatile gene targeting system in higher plants. *Biocatal Agric Biotechnol* 3:2-6
- Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 31:822-826
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas III CF (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 31:397-405
- Gao J, Wang G, Ma S, et al (2014) CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol* 87:99-110
- Hartung F, Schiemann J (2014) Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. *Plant J* 78:742-752
- Heyer W-D, Ehmsen KT, Liu J (2010) Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet* 44:113-139
- Hohn B, Puchta H (2003) Some like it sticky: targeting of the rice gene *Waxy*. *Trends Plant Sci* 8:51-53
- Iida S, Terada R (2005) Modification of Endogenous Natural Genes by Gene Targeting in Rice and Other Higher Plants. *Plant Mol Biol* 59:205-219
- Iida S, Terada R (2004) A tale of two integrations, transgene and T-DNA: gene targeting by homologous recombination in rice. *Curr Opin Biotechnol* 15:132-138
- James C (2013) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. ISAAA: Ithaca, NY., ISAAA Brief
- Johnson RA, Gurevich V, Filler S, et al (2014) Comparative assessments of CRISPR-Cas nucleases' cleavage efficiency in planta. *Plant Mol Biol* 87:143-156
- Kaufmann KB, Büning H, Galy A, et al (2013) Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med* 5:1642-1661
- Kaul MLH, Bhan DAK (1977) Mutagenic effectiveness and efficiency of EMS, DES and gamma-rays in rice. *Theor Appl Genet* 50:241-246
- Kikuchi K, Abdel-Aziz HI, Taniguchi Y, et al (2009) Bloom DNA Helicase Facilitates Homologous Recombination between Diverged Homologous Sequences. *J Biol Chem* 284:26360-26367
- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci* 93:1156-1160
- Kwon Y-I, Abe K, Endo M, et al (2013) DNA replication arrest leads to enhanced homologous recombination and cell death in meristems of rice *OsRecQ14* mutants. *BMC Plant Biol* 13:62
- Kwon YI, Abe K, Osakabe K, et al (2012) Overexpression of *OsRecQ14* and/or *OsExo1* Enhances DSB-Induced Homologous Recombination in Rice. *Plant Cell Physiol* 53:2142-2152
- Lee KY, Lund P, Lowe K, Dunsmuir P (1990) Homologous recombination in plant cells after *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Online* 2:415-425
- Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C (2014) Targeted Mutagenesis in *Zea mays* Using TALENs and the CRISPR/Cas System. *J Genet Genomics* 41:63-68
- Li J-F, Norville JE, Aach J, et al (2013) Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol* 31:688-691
- Li T, Liu B, Spalding MH, et al (2012) High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol* 30:390-392
- Liu Q, Segal DJ, Ghiara JB, Barbas CF (1997) Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within

- complex genomes. *Proc Natl Acad Sci* 94:5525–5530
- Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodríguez-Cerezo E (2012) Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nat Biotechnol* 30:231–239
- Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR (1988) Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336:348–352
- Moritoh S, Eun C-H, Ono A, et al (2012) Targeted disruption of an orthologue of DOMAINS REARRANGED METHYLASE 2, *OsDRM2*, impairs the growth of rice plants by abnormal DNA methylation. *Plant J* 71:85–98
- Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, et al (2013) Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 31:691–693
- Nimonkar AV, Özsoy AZ, Genschel J, et al (2008) Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proc Natl Acad Sci* 105:16906–16911
- Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Osakabe K, et al (2014) Precise marker excision system using an animal-derived piggyBac transposon in plants. *Plant J* 77:454–463
- Nishizawa-Yokoi A, Nonaka S, Saika H, et al (2012) Suppression of *Ku70/80* or *Lig4* leads to decreased stable transformation and enhanced homologous recombination in rice. *New Phytol* 196:1048–1059
- Ono A, Yamaguchi K, Fukada-Tanaka S, et al (2012) A null mutation of *ROS1a* for DNA demethylation in rice is not transmittable to progeny. *Plant J* 71:564–574
- Ozawa K, Wakasa Y, Ogo Y, et al (2012) Development of an Efficient Agrobacterium-Mediated Gene Targeting System for Rice and Analysis of Rice Knockouts Lacking Granule-Bound Starch Synthase (*Waxy*) and  $\beta$ 1,2-Xylosyltransferase. *Plant Cell Physiol* 53:755–761
- Paszowski J, Baur M, Bogucki A, Potrykus I (1988) Gene targeting in plants. *EMBO J* 7:4021–4026
- Puchta H, Fauser F (2013) Gene targeting in plants: 25 years later. *Int J Dev Biol* 57:629–637
- Ran FA, Hsu PD, Lin C-Y, et al (2013) Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell* 154:1380–1389
- Rémy S, Tesson L, Ménoret S, et al (2010) Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. *Transgenic Res* 19:363–371
- Schiml S, Fauser F, Puchta H (2014) The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. *Plant J* 80:1139–1150
- Schuermann D, Molinier J, Fritsch O, Hohn B (2005) The dual nature of homologous recombination in plants. *Trends Genet* 21:172–181
- Schwab R, Ossowski S, Riester M, et al (2006) Highly Specific Gene Silencing by Artificial MicroRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* 18:1121–1133
- Shan Q, Wang Y, Chen K, et al (2013a) Rapid and Efficient Gene Modification in Rice and *Brachypodium* Using TALENs. *Mol Plant* 6:162–172
- Shan Q, Wang Y, Li J, et al (2013b) Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 31:686–688
- Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, et al (2009) Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 459:437–441. 2
- Singh SK, Roy S, Choudhury SR, Sengupta DN (2010) DNA repair and recombination in higher plants: insights from comparative genomics of *Arabidopsis* and rice. *BMC Genomics* 11:443
- Symington LS, Gautier J (2011) Double-Strand Break End Resection and Repair Pathway Choice. *Annu Rev Genet* 45:247–271
- Tanaka S, Ishii C, Hatakeyama S, Inoue H (2010) High efficient gene targeting on the *AGAMOUS* gene in an *Arabidopsis* *AtLIG4* mutant. *Biochem Biophys Res Commun* 396:289–293
- Terada R, Johzuka-Hisatomi Y, Saitoh M, et al (2007) Gene Targeting by Homologous Recombination as a Biotechnological Tool for Rice Functional Genomics. *Plant Physiol* 144:846–856
- Terada R, Nagahara M, Furukawa K, et al (2010) Cre-loxP mediated marker elimination and gene reactivation at the *waxy* locus created in rice genome based on strong positive & negative selection. *Plant Biotechnol* 27:29–37
- Terada R, Urawa H, Inagaki Y, et al (2002) Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. *Nat Biotechnol* 20:1030–1034
- Terns MP, Terns RM (2011) CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr Opin Microbiol* 14:321–327
- Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, et al (2009) High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature* 459:442–445
- Voytas DF (2013) Plant Genome Engineering with Sequence-Specific Nucleases. *Annu Rev Plant Biol* 64:327–350
- Wang Y, Yau Y-Y, Perkins-Balding D, Thomson JG (2010) Recombinase technology: applications and possibilities. *Plant Cell Rep* 30:267–285
- Yamauchi T, Johzuka-Hisatomi Y, Fukada-Tanaka S, et al (2009) Homologous recombination-mediated knock-in targeting of the *MET1a* gene for a maintenance DNA methyltransferase reproducibly reveals dosage-dependent spatiotemporal gene expression in rice. *Plant J* 60:386–396
- Zhang F, Maeder ML, Unger-Wallace E, et al (2010) High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci* 107:12028–12033
- Zhang Y, Zhang F, Li X, et al (2013) Transcription Activator-Like Effector Nucleases Enable Efficient Plant Genome Engineering. *Plant Physiol* 161:20–27