

dsRNA를 이용한 해충방제 기술

김용균*

안동대학교 식물학과

Insect Pest Control Technique Using dsRNA

Yonggyun Kim*

Department of Plant Medicals, Andong National University, Andong 36729, Korea

ABSTRACT: Gene silencing using double-stranded RNA (dsRNA) has been widely used in functional genomics in biological organisms. Its principle stems from RNA interference (RNAi), a post-transcriptional control of gene expression. Suppression of specific gene expression using dsRNA may give significant lethal effect. Insect pest control exploits this molecular process to develop novel insecticides using specific dsRNAs. This review explains core principles of RNAi using dsRNA. Then it illustrates various examples to control insect pests using dsRNAs. It also discusses limitations to control insect pests using dsRNAs. Finally, it provides several breakthroughs to develop dsRNA insecticides.

Key words: RNA interference, dsRNA, Insect pest, Control, Insecticide

초록: 이중나선형 RNA (dsRNA)를 이용한 유전자 발현 억제기술이 다양한 생명체에서 기능 유전체학을 연구하는 데 이용되고 있다. 이 기술의 원리는 전사후 단계에서 유전자 발현을 조절하는 RNA 간섭에 기인된다. dsRNA를 이용하여 특정 유전자의 발현 억제는 심각한 치사효과를 줄 수 있다. 이러한 분자기작을 해충 방제에 적용하여 특정 dsRNA를 이용한 새로운 살충제를 개발하고 있다. 본 종설은 dsRNA를 이용한 RNA 간섭 원리를 설명하고 이를 이용한 해충 방제를 구현한 여러 예를 살펴본다. 그리고 해충방제를 실현시키기 위해 현재 이 기술이 담고 있는 한계를 고찰하고 이에 대한 대응 방안을 본 종설에서 제공하고자 한다.

검색어: RNA 간섭, dsRNA, 해충, 방제, 살충제

농작물을 안정적으로 생산하기 위해서 해충 관리는 필수적이고, 여기에 합성 화합물을 이용한 방제 기술은 보편화되어 있다. 1940년대 유기염소계 DDT 살충제를 필두로 전개되어온 화합물살충제 개발은 유기인계, 카바메이트계 및 피레스로이드계 살충제로 이어졌다. 그러나 이러한 화합물에 대항하여 다양성이 높은 해충은 저항성 집단을 출현시켜 효과적 방제에 어려움을 주어 새로운 작용점을 갖는 네오니코티노이드계 및 디아마이드계 등의 합성 살충제를 개발하게 하였다(Nauen, 2006; Bass et al., 2015). 이들은 모두 곤충의 신경계 작용을 억제하는 것으로 유사한 신경생리를 갖는 인축에게도 위협을 주

는 독성물질로 작용하게 된다. 이를 극복하기 위한 노력의 일환으로 곤충성장조절제 및 생물농약 개발에 연구력을 집중하게 되었다. 곤충의 탈피와 변태를 교란하는 곤충성장조절제는 높은 선택성으로 친환경 해충관리 기술로 주목을 받아왔으나, 본질적으로 합성화합물을 자연계에 살포한다는 점에서 보다 안전한 생물농약으로 개발 관심을 옮기게 되었다. 생물농약의 종류를 살펴보면 미생물농약, 생화학농약, 천적 그리고 유용유전자를 이용한 농자재를 포함하고 있다(Kim, 2014). 최근 double-stranded RNA (dsRNA)를 이용한 해충 방제는 살충의 목적으로 표적해충에 특정 유전자를 이용한다는 점에서 넓은 의미에서 생물농약의 범주에 속할 수 있다.

곤충을 포함한 진핵생명체는 유전자 발현 조절에서 원핵생명체와 차이를 보이게 된다. 주로 전사과정을 조절하여 전체적 유전자 발현을 조절하는 원핵생명체와는 달리 진핵생명체는

*Corresponding author: hosanna@anu.ac.kr

Received February 25 2017; Revised March 26 2017

Accepted April 15 2017

전사 이후의 과정도 중요한 유전자발현 조절단계에 포함된다. 여러 전사후조절과정 가운데 비교적 반감기가 긴 진핵생명체 mRNA에 있어서 이들의 수명을 조절하는 방식이 주요 조절 기작으로 포함되게 된다. 예를 들어, 철(Fe^{++})을 저장하는 단백질인 ferritin의 경우 IRP (iron response protein)가 이 유전자의 mRNA 말단에 붙어 다양한 RNase에 의한 가수분해 반응을 억제하여 반감기를 늘려주어 유전자 발현을 증가시키는데, 이는 mRNA 수명조절이 유전자발현에 큰 영향을 줄 수 있다는 것을 의미한다(Kühn, 2015). 그러나 보다 적극적으로 mRNA의 수명을 조절하는 방식이 RNA 간섭(RNA interference: RNAi)이다.

RNA는 단백질 합성에 관여하는 mRNA, tRNA 및 rRNA가 알려져 있다. 여기에 분자 크기가 작은 small RNA가 추가된다. RNA 간섭은 micro RNA (miRNA)와 같은 small RNA에 의해 상보적인 mRNA의 발현을 억제하는 현상으로 2006년 Andrew Fire와 Craig Mello가 노벨 생리의학상을 수상하면서 다양한 분야의 과학자들로 부터 관심을 받게 되었다. 또 다른 축의 RNA 간섭 현상은 dsRNA에 반응하여 유기되는 과정이다. 이 과정을 통해 특정 mRNA의 수명을 단축시켜 유전자 발현을 억제하는 것으로 본 논문에서 관심을 갖는 dsRNA 살충제 개발의 근본 원리가 된다. Fire et al. (1998)은 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)에 dsRNA를 처리하면서 이 RNA와 유사한 염기서열을 갖는 유전자의 발현이 억제된다는 것을 발견하고 이를 RNAi로 불렀다. 이러한 억제과정을 식물에서는 전사후 유전자억제(post-transcriptional gene silencing) 그리고 진균에서는 소멸(quelling)로 각각 명명하였다(Bologna and Voinnet, 2014). 이 RNAi 기술은 이후 유전자 기능연구(Kim et al., 2015a,c)는 물론이고 의학에서는 암치료와 바이러스 질환 치료 기술로서 관심을 받기 시작했다(Mansoori et al., 2014). 또한 농업에 있어서도 해충 방제에 이 기술 도입을 제안하였다(Price and Gatehouse, 2008). 곤충 유전자 발현에 dsRNA 효과는 대부분 이를 혈강에 주입하여 표적 유전자의 발현을 특이적으로 억제하는 데 초점이 모아졌다. 그러나 곤충의 중장의 경우 소화된 먹이를 흡수하려는 다양한 장치를 포함하고 있다. 예를 들어, 흡수를 촉진시키기 위해 중장 표면적을 넓히려는 미세용모 구조와 여기에 여러 이온채널 및 엔도사이토시스(endocytosis) 기작들은 구강으로 섭취된 dsRNA가 중장세포 및 체강으로 흡수해 들어 갈 수 있는 경로를 제공하고 있다(Hakim et al., 2010). 실제로 경구를 통한 dsRNA의 효과가 다양한 곤충 및 무척추동물에서 일어났다(Zhou et al., 2008; Li et al., 2011; Attasart et al., 2013). 이러한 dsRNA의 경구 효과는 해충 방제에 dsRNA를 이용할 수 있다는 근거를 제시하게 되었다.

본 중설은 dsRNA를 이용한 새로운 해충 방제 기술을 소개

하고 향후 개발 방향에 대해서 고찰하였다. 이를 위해 이 기술의 원리를 설명하고, dsRNA를 제작하는 기술 및 적용 사례를 차례로 소개하였다. 끝으로 이 기술을 농산업에 적용하기 위해 해결해야 할 연구과제들을 나열하면서 dsRNA 살충제 개발에 대한 전망을 피력하였다.

RNAi 종류

RNAi는 세포 자율적(cell-autonomous) RNAi와 세포 비자율적(non-cell-autonomous) RNAi로 나뉘게 된다(Whangbo and Hunter, 2008). 세포 자율적 RNAi는 세포 스스로 형성한 dsRNA 또는 외부로부터 주입된 dsRNA에 의해 자체 세포내에서만 RNAi 과정이 국한될 경우이다. 반면에 세포 비자율적 RNAi는 dsRNA를 합성하지 않는 세포에서 RNAi 반응이 일어나는 경우이다. 이러한 세포 비자율적 RNAi는 다시 환경(environmental) RNAi와 전신(systemic) RNAi를 포함하게 된다. 환경 RNAi는 특정 세포가 주변으로부터 dsRNA를 획득하여 RNAi 반응을 일으키는 경우이다. 전신 RNAi는 dsRNA를 이웃하는 세포 또는 원거리 세포로 전달하는 경우이다. 따라서 다세포동물의 경우 전신 RNAi가 가능하면, 표적세포 이외의 세포는 환경 RNAi를 통해 dsRNA를 획득하고 세포내에서는 세포 자율적 RNAi 반응이 일어나게 된다. 해충 방제 측면에서 보면 경구를 통해 들어온 dsRNA는 환경 RNAi를 통해 중장세포로 침입하게 되고, 이 중장세포가 다시 dsRNA를 혈강으로 내보내는 경우에 이 곤충은 전신 RNAi 기작을 가진다고 할 수 있다. 추가적으로 어미에 주입된 dsRNA가 어미는 물론이고 차세대 자손에 이르기까지 RNAi 효과를 유발하는 경우 이를 부모(parental) RNAi라 칭하게 된다(Bucher et al., 2002).

RNAi 작동 과정

여러 small RNA 종류 가운데 살충제 개발을 위해 dsRNA가 우선 고려되었다. 일단 dsRNA가 세포내로 들어오면, RNase III의 일종인 Dicer 2 (Dcr2)가 약 20 bp 크기의 이중나선형 small interference RNA (ds siRNA)로 절단하게 된다(Fig. 1). 이 절단된 siRNA는 RNA-induced silencing complex (RISC)에 의해 인식되고, 단일가닥의 siRNA (ss siRNA)로 풀리고 이 가운데 한 가닥은 guide RNA가 되어서 표적 mRNA와 상보적으로 결합하게 된다. 결합된 RNA 복합체는 RISC의 한 구성 성분인 Argonaute 2 (Ago2)에 의해 대상 mRNA가 절단되게 된다. Ago2는 PAZ (PIWI Argonaute and Zwillig)와 PIWI의 특징적 영역을 포함하는 데, PAZ는 RNA와 결합하는 데 작용하고,

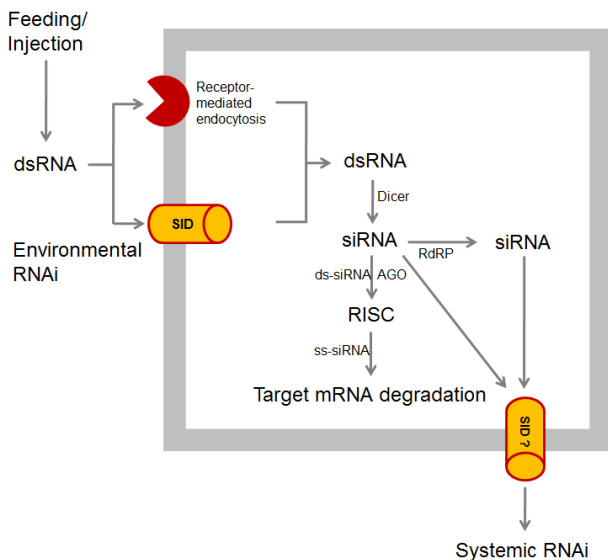


Fig. 1. Process of RNA interference (RNAi). Exogenous dsRNA enters cells through a cell membrane channel protein, systemic RNA interference deficient (SID). Alternatively, dsRNA enters cells through a specific receptor via endocytosis. Within cells, Dicer (a RNase III) cuts it into 20-25 bp fragments to become double-stranded small interfering RNA (siRNA), which is recognized by Argonaute (AGO) and form RNA interference silencing complex (RISC). The resulting single stranded siRNAs form a complementary binding to target mRNAs, which are then digested by RNase activity of RISC. Even though no RdRP (RNA-dependent RNA polymerase) is reported in insects, nematodes can amplify siRNA using RdRP and accomplish systemic RNAi by dissipate the siRNAs to other cells.

PIWI 영역은 RNase H와 유사하게 대상 mRNA를 절단하는 데 관여한다. 따라서 *Dcr2* 또는 *Ago2* 유전자의 발현을 억제할 경우 RNAi 과정이 작동하지 않을 수 있다. 이를 현재 가장 많이 이용되고 있는 *vATPase* dsRNA를 표준 살충력으로 설정하고 다양한 RNAi 관여 인자를 유전적으로 무기능화하면서 RNAi 관여 인자를 동정하고 있다(Velez et al., 2016). 여러 생명체에 존재하는 RNA-dependent RNA polymerase (RdRP)는 siRNA를 다시 제2차 증폭할 수 있어 RNAi 효율을 극대화한다. 그러나 곤충의 경우는 RdRP를 가지고 있지 않아 RNAi 효율이 좋은 곤충류의 경우에는(Yu et al., 2013) 아직 확인되지 않은 경로로 siRNA의 증폭을 유도할 것으로 추정하고 있다.

환경 RNAi 기작

환경 RNAi 기작은 세포 밖의 dsRNA가 세포내로 이동하는 기작을 의미한다. 특정 세포가 dsRNA를 획득하는 방식은 크게 3가지 기작을 가진다고 알려져 있다. 첫째로 세포막에 존재하는 dsRNA 전용 운송채널이다. 가장 잘 알려진 대상은 예쁜꼬마선

충에 존재하는 SID-1 (systemic RNA interference deficiency-1)으로 dsRNA를 세포내로 이동하는 데 관여하게 되며 이 유전자가 결여되면 RNAi가 일어나지 않게 된다(Winston et al., 2002). 그러나 SID-1은 dsRNA를 세포 밖으로 운송시키는 데는 관여하지 않는다(Jose et al., 2009). 또 다른 통로단백질은 SID-2로서 SID-1의 dsRNA 운송을 활성화시킨다(Winston et al., 2007). 이들 단백질들의 기능적 협력 관계에 대한 가설로서 SID-2가 SID-1의 구조를 변형하여 dsRNA 운송 능력을 높이거나, 직접 dsRNA를 SID-2가 결합하여 SID-1에 전달하거나 또는 SID-2가 엔도사이토시스를 활성화하는 기작이 제시되었다(Whangbo and Hunter, 2008). 곤충 계통 정보를 이용하여 SID-1 유전자의 존재를 살펴본 결과(Huvenne and Smagghe, 2010), 파리목을 제외하고 다른 곤충 종류에서 발견되었다. 그러나 이들의 존재와 RNAi 효율 사이에 직접적 관계성을 찾기 어렵다. 예를 들어, 전신 RNAi가 잘 알려진 거릿쌀도둑거저리 (*Tribolium castaneum*)의 경우 3개의 SID 유사 유전자가 존재하지만 이들의 발현을 각각 억제하는 경우에도 RNAi 효율에 영향을 주지 않았다(Tomoyasu et al., 2008). 유사하게 3개의 SID 유사 유전자를 가지고 있는 누에(*Bombyx mori*)의 경우에는 RNAi 효율이 매우 낮다(Xu et al., 2016). 반면에 SID 유전자가 없는 모기류에서는 오히려 전신 RNAi가 일어났다(Boisson et al., 2006; Volz et al., 2006).

둘째로 dsRNA가 세포로 침입하는 경로로 엔도사이토시스를 이용하는 방식이다. 초파리의 경우 SID 유전자가 없어도 환경 RNAi가 일어나게 된다. 예를 들어, 혈장으로 주입된 dsRNA는 혈구세포의 RNAi를 유발한다(Roignant et al., 2003; Gordon and Waterhouse, 2007; Miller et al., 2008). 또한 초파리 유래 세포주인 S2 세포의 경우에도 배양액에 존재하는 dsRNA에 대해서 RNAi 반응을 일으키게 된다(Saleh et al., 2006; Ulvila et al., 2006). 이는 SID 이외의 경로로 dsRNA가 세포 내로 들어갔다는 것을 의미하게 된다. 이를 탐색하기 위해 Saleh et al. (2006)은 S2 세포주를 이용하여 2,000개의 발현유전자들을 대상으로 dsRNA를 각각 실시하여 RNAi에 관여하는 인자들을 분석하였다. 즉, 우선 세포치사를 일으키는 dsRNA를 처리한 후 RNAi에 관여할 것으로 의심되는 유전자에 특이적 dsRNA 처리하여 RNAi 과정에 관여하는 것을 탐색하였다. 이 결과 *clathrin heavy chain* 유전자가 선발되었다. 이 유전자의 산물은 엔도사이토시스에 관여하는 것으로 dsRNA가 S2 세포에 들어갈 때 이 경로를 이용하는 것으로 추정되었다. 이를 증명하기 위해 엔도사이토시스에 관여하는 *vacuolar H⁺ ATPase*에 대한 특이적 억제자인 *bafilomycin*을 처리한 결과 RNAi 효과를 억제할 수 있었다. 또한 예쁜꼬마선충에서도 *clathrin heavy chain*

유전자의 발현을 억제할 경우 RNAi를 억제할 수 있었다. 이러한 결과는 엔도사이토시스가 dsRNA를 세포내로 전달하는 데 여러 생명체에서 공통적으로 일어나는 경로라는 것을 의미하였다. 엔도사이토시스에 의해 dsRNA가 세포내로 들어가는 과정을 직접 관찰하기 위해 dsRNA에 형광물질을 붙여 거짓쌀도둑거저리의 중장세포 내로 이동을 분석한 결과 엔도사이토시스 특이적 억제자의 처리에 따라 세포 내 이동이 억제되는 것을 관찰하였다(Xiao et al., 2015). 더욱이 “RNAi of RNAi” 연구전략을 이용하여 엔도사이토시스에 관여하는 유전자들이 dsRNA 이동에 관여하는 역할을 증명하였다. 이동성메뚜기류(*Schistocerca gregaria*)에서는 이러한 엔도사이토시스에 scavenger receptor (SR)가 dsRNA의 특이적 수용체로서 관여하는 것으로 보여주었다(Wynant et al., 2014). SR-CI과 Eater의 두 종류 SR 단백질이 이러한 엔도사이토시스에 관여하는 데(Ulvila et al., 2006), SR-CI은 포유동물의 class A 속한 SR 단백질로서 이들은 음극성을 다수 띤 물질의 운송에 관여하는 것으로(Pearson et al., 1995) 이는 곤충류에서 SR-CI이 다수의 음극성을 띤 dsRNA에 대한 친화성을 가져 dsRNA 엔도사이토시스에 관여한 것으로 설명하고 있다.

셋째로 dsRNA가 세포로 침입하는 경로로 면역 작용에 관여하는 패턴 인식 SR을 이용하는 방식이다(Saleh et al., 2009). 이는 항바이러스 기작과 관련성을 갖는다. 즉, 바이러스에 감염된 세포가 바이러스 유래 dsRNA를 세포 밖으로 내 보내면 이웃하

는 세포가 이를 패턴 인식 scavenger receptor에 의해 세포내로 이동시켜 자율세포 RNAi 기작으로 제거시키게 된다.

dsRNA 제조기술

크게 세 가지로 나뉘는 dsRNA 제조기술을 Fig. 2에서 요약하여 도해하였다. 이들 각각의 제조 과정에 대해서는 다음과 같이 설명된다.

기내(*in vitro*) 제조기술

dsRNA의 제작은 대상 유전자의 특정부위에 대한 PCR 클로닝으로 부터 시작된다. 이때 정방향 및 역방향 프라이머의 5' 말단에 T7 프라이머를 부착시켜 PCR을 실시한다. 결과적으로 얻은 PCR 증폭물은 기내 조건에서 T7 RNA polymerase를 첨가하면서 상보적 두 가닥의 RNA가 합성되도록 한다(Fig. 2A). 이후 주형 DNA와 single-stranded RNA를 각각 DNase와 RNase로 제거한 후 정량 분석하여 실험에 이용하게 한다.

형질전환 세균을 이용한 dsRNA 제조기술

세균 발현 dsRNA 제조 기술은 Timmons et al. (2001)의 방식을 기준으로 제작된다. 기내 제조기술과 동일하게 대상 유전

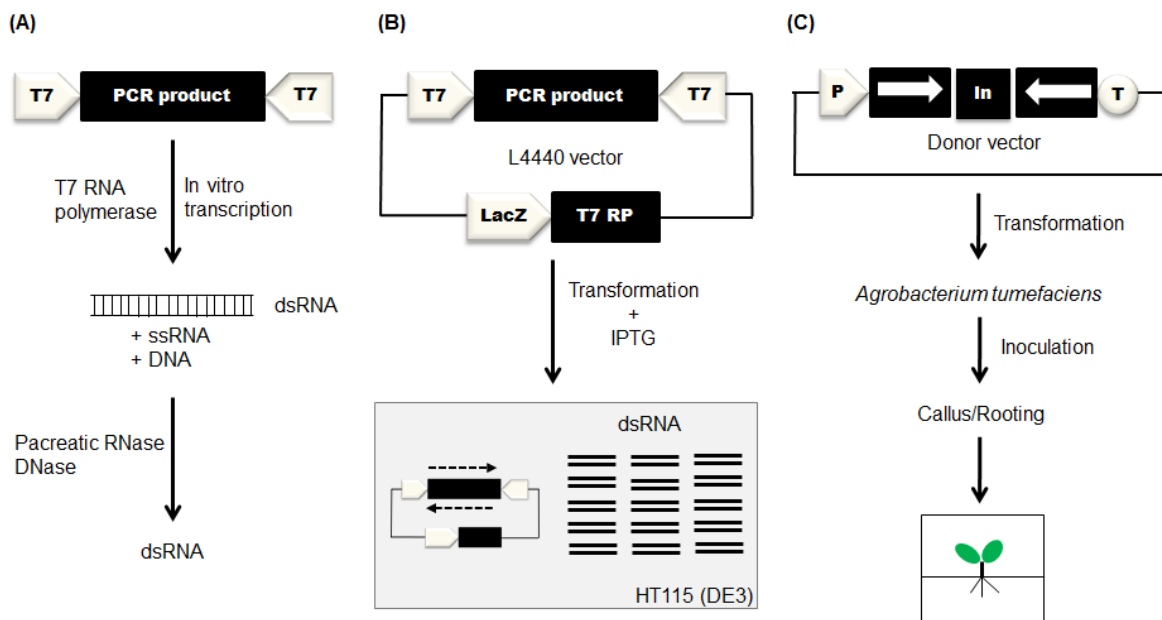


Fig. 2. Three different methods of dsRNA synthesis. (A) *In vitro* transcription (B) Recombinant bacteria expressing dsRNA. (C) Transgenic plant expressing dsRNA. Abbreviations are T7 RNA polymerase (T7), single-stranded RNA (ssRNA), T7 RNA polymerase (T7 RP), promoter (P), intron (In), terminator (T), and isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG).

자의 PCR을 실시한다. 이후 TA 클로닝벡터에 재조합한 후 L4440 벡터의 클로닝 위치에 상응한 제한효소로 삽입부를 잘라낸 후 다시 L4440 벡터에 재조합시킨다(Fig. 2B). 반면에 PCR 증폭물을 바로 L4440 벡터에 TA 클로닝을 위해서는 이 벡터를 EcoRV로 제한효소 처리 후 terminal transferase에 의해 T-tailing하여 사용할 수 있다(Kamath and Ahringer, 2003). 이 삽입부위는 두 개의 T7 프로모터 사이에 위치하게 된다. 재조합 L4440 벡터를 다시 RNase III가 결여된 대장균 HT115 (DE3)에 형질전환한다. 이렇게 형질전환된 대장균은 isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) 첨가에 의해 유도 발현되어 다량의 dsRNA를 생산하게 된다. 재조합 세균에서 생성된 dsRNA를 추출한 후 전기영동으로 분리하고, ethidium bromide 용액으로 염색한다. 이때 기내 조건에서 생성된 표준 dsRNA 양을 기준으로 Image Analyzer를 이용하여 정량화하여 과발현 세균 밀도에 따른 dsRNA 생성량을 산출한다. 이후 dsRNA 절대량은 세균 밀도와 회귀분석을 통해 계량화된다.

형질전환작물을 이용한 제조기술

형질전환된 식물체에서 dsRNA를 합성하게 한 후 이 작물의 해충이 섭식하면 곤충 체내에서 표적 유전자의 RNAi가 일어나 작물체가 해충저항성을 갖게 하는 기술이다. 형질전환 작물체를 제조하는 기술은 비티(*Bacillus thuringiensis*) 독소단백질을 작물 유전체에 삽입하여 제조하는 기술(Kim et al., 2015b)과 동일하다. 그러나 차이점은 유전자의 삽입구조에 있다. 즉, dsRNA를 만들기 위해서 앞에서 기술한 형질전환 세균의 재조합벡터 구조를 가질 필요가 없다. 이 보다는 머리핀(hairpin) 구조의 dsRNA를 만들어 식물체 핵내에서 miRNA 처리과정과 같이 dsRNA를 형성하게 하는 것이다. 따라서 머리핀 구조의 dsRNA를 만들기 위해 대상 유전자 조각의 상보적 가닥을 직렬로 연결하되 이들 사이에 일부 조각 DNA (20-30 bp)를 삽입하여 머리핀의 루프 모양을 갖게 한다(Fig. 2C). 이 구조에 5' 말단에 발현율이 높은 프로모터를 연결하고 3' 말단에는 전사종료 신호를 장착시키게 된다. 이러한 구조를 지닌 발현벡터를 근두암종병 세균(*Agrobacterium tumefaciens*)에 형질전환시킨다. 형질전환된 세균은 식물체 callus를 유도하고 이는 다시 식물체 뿌리를 형성하여 형질전환된 식물 개체를 만들게 한다.

dsRNA 처리 기술

제조된 dsRNA는 여러 방법으로 대상 세포 또는 생명체에 처리되어 질 수 있다. 단순한 침지법으로 dsRNA가 담긴 용액

에 세포 또는 개체를 담그면서 처리하는 방법으로 부터 혈강 주입 및 섭식을 통하는 방법까지 다양하다.

세포 처리 기술

세포배양액에 dsRNA를 혼합하여 세포에 환경 RNAi 기술로 도입시키는 방법이다. 예를 들어, Sf21 세포주에서 특정 유전자의 기능을 알아보기 위해 대상 유전자에 특이적 dsRNA 10 μ g을 150 μ l의 serum-free 배양액과 혼합한 후 이 세포가 포함된 각 well에 처리하고 27°C에서 2 시간동안 환경 RNAi를 유도하게 된다(Sivakumar et al., 2007). 이후 정상 세포배양액을 첨가한 후 일정 기간 동안 배양한 후 표적 유전자의 발현 억제를 분석하게 된다.

혈강 주입 기술

미량주사기를 통해 대상 곤충의 혈강에 주입하는 기술이다. RNAi 효율 면에서 우수하여 대부분의 유전자 기능 연구에서 dsRNA를 이용하는 dsRNA 처리 기술이다. 곤충에서 최초로 dsRNA 주입에 성공한 사례는 초파리를 대상으로 보고되었다(Kennerdell and Carthew, 1998). 초파리 알을 대상으로 포배엽기에 dsRNA를 65-110 pL의 부피로 주입하여 *frizzled*과 *frizzled 2* 유전자들의 발현을 감소시켰다. 이러한 세포내 주입 방식에서 세포의 혈강 주입은 다시 초파리 성충을 대상으로 실시되어 성공하였다(Dzitoyeva et al., 2001; Tomoyasu et al., 2008). 특히 거짓쌀도둑거저리의 경우는 전신 RNAi가 일어나 RNA 간섭 효율이 매우 높다(Tomoyasu and Denell, 2004). 유충의 경우는 체절사이 얇은 체벽을 통해 주입하고 성충은 날개 아래 막질부를 통해 주입하게 된다.

섭식 처리 기술

dsRNA가 곤충의 체벽을 투과하여 체내로 들어갈 수 없기에 살충제 개발에 dsRNA를 적용하기 위해서는 먹이를 통해 섭식 처리가 이뤄져야 한다. 최초의 dsRNA 경구효과는 Timmon and Fire (1998)가 예쁜꼬마선충을 통해 증명하였다. 곤충에서 섭식을 통한 dsRNA 처리 효과는 다양한 해충에서 그 효과가 인정되었다. 크게 세 가지 방식으로 dsRNA 섭식 처리가 해충 방제에 이용될 수 있다.

첫째로 합성된 dsRNA를 작물 또는 미끼에 직접 처리하는 방식이다. 노출된 환경에서 dsRNA의 안전성을 주기 위해 기내 조건 또는 화학적으로 합성된 dsRNA를 나노제형화 기술을 포

함한다(Zhang et al., 2010). 이 기술은 키토산과 같은 폴리머를 이용하여 제형화하는 데 이는 키토산에 존재하는 아미노기와 RNA의 인산기 사이에 정전기적 인력에 의해 dsRNA를 폴리머에 부착시키고 이를 나노입자화하는 방법이다. 이를 통해 야외 조건에서 dsRNA의 화학적 안정성은 물론이고 곤충 체내로 들어간 후에도 중장 내강에서 다양한 RNase에 의한 분해(Fig. 3)를 막아줄 수 있는 장점을 갖게 된다.

둘째로 재조합세균을 이용하여 dsRNA를 발현시키고 균체를 처리하는 방식이다(Kim et al., 2015a). 이때 섭식 후 곤충 소화관에서 직접 또는 소화액의 도움으로 세균으로부터 빠져나온 dsRNA는 중장세포에 환경 RNAi 방식으로 세포내로 침입하게 되고, 중장세포에서는 다시 내부 혈강으로 배출하면서 전신 RNAi를 유발할 수 있다. 멸강나방(*Myrthimna separata*)을 대상으로 소화관에 발현 되는 *chinase* 유전자를 대상으로 dsRNA를 세균에서 발현시켜 처리한 결과 뚜렷한 살충효과 및 발육 지연 효과를 나타냈다(Ganbaatar et al., 2017). 이 연구에서는 섭식으로 처리된 dsRNA에 의해 대상 *chitinase* mRNA가 약 21 nt 영역에서 축적되는 것을 확인하였다. 오리엔탈과실파리(*Bactrocera dorsalis*)의 경우 서로 다른 4 가지 유전자를 대상으로 dsRNA 발현하게 하는 형질전환 대장균을 이용하여 각각 섭식 처리한 결과 35-100%의 발현 억제율 유도하였으며 이는 유의성있는 살충효과로 이어졌다(Li et al., 2011). 보다 뚜렷한 살충효과는 딱정벌레목 해충에서 나타났다. 콜로라도감자해충(*Leptinotarsa decemlineata*)의 경우 상이한 5개의 유전자를 대상으로 형질전환된 세균을 섭식시킨 결과 모두 뚜렷한 발

육억제 및 살충효과를 나타냈다(Zhu et al., 2011).

셋째로 dsRNA를 발현하는 형질전환 작물을 제조하는 방식이다. 이 기술을 특별히 식물유래(in planta) RNAi로 불린다. 이 식물유래 RNAi에서 dsRNA는 앞에서 기술한 바와 같이 머리핀 모양으로 발현시키게 된다. 이는 dsRNA를 발현시키는 유전자의 상보적 두 가닥을 한 가닥의 DNA에 놓고 발현시키기 때문이다. 이들 상보적 서열 사이에는 인트론과 같은 서열을 삽입하여 머리핀의 루프 모양이 되게 한다. 이렇게 제작된 작물은 담배(Mao et al., 2007), 목화(Mao et al., 2011), 벼(Zha et al., 2011) 및 옥수수(Baum et al., 2007)를 포함하고 있으며 각각 안정적인 dsRNA를 공급하여 이상적인 RNAi 효율을 보여주었다.

이러한 기술들로 제작된 dsRNA가 RNAi 효율을 보이는 데 비교적 공통적 특징을 지니게 된다. 첫 번째로 dsRNA 농도가 RNAi 효율에 영향을 주게 된다. 이상적 효율을 주는 dsRNA의 농도는 곤충 및 대상 유전자에 따라 상이하기에 이에 대한 유효 농도가 결정되어야 한다. 반면 유효농도를 초과하는 경우 RNAi 효율이 더 이상 증가하지 않아 RNAi의 유전자 발현 억제에 한계성을 나타낸다(Meyering-Vos and Muller, 2007; Shakesby et al., 2009). 둘째로 dsRNA의 길이도 RNAi 효율에 영향을 미친다. 초파리 S2 세포주의 경우 최소한 211 bp 이상의 길이를 요구하였다(Saleh et al., 2006). 반면에 길이가 길어지면 비교적 유전자에 대한 RNAi 가능성이 높아져 가장 이상적 길이는 300-500 bp 범위로 판단된다(Huvenne and Smagghe, 2010). 셋째로 dsRNA 염기서열 선정이 특이적 RNAi를 유도하는 데 변수로 작용한다. 비교적 중간 보존서열이 높은 영역을 dsRNA 제작에 이용될 경우 비교적 생명체에 대한 영향을 줄 수 있다(Kim and Kim, 2016). 넷째로 대상 곤충의 발육시기에 따라 RNAi의 효율은 상이할 수 있다. 비교적 어린 시기의 개체에서 RNAi 효율은 높은 것으로 알려졌다. 예를 들어, 유충기의 경우 어린 유충이 노숙 유충 보다 감수성을 보여 흡혈성 노린재(*Rhodnius prolixus*)의 경우 4령 유충 이후는 dsRNA에 크게 둔 감해졌다(Araujo et al., 2006). 또한 발육시기도 영향을 주어 밤나방(*Spodoptera frugiperda*)의 경우 성충 보다는 유충에서 dsRNA에 대한 감수성이 높았다(Griebler et al., 2008).

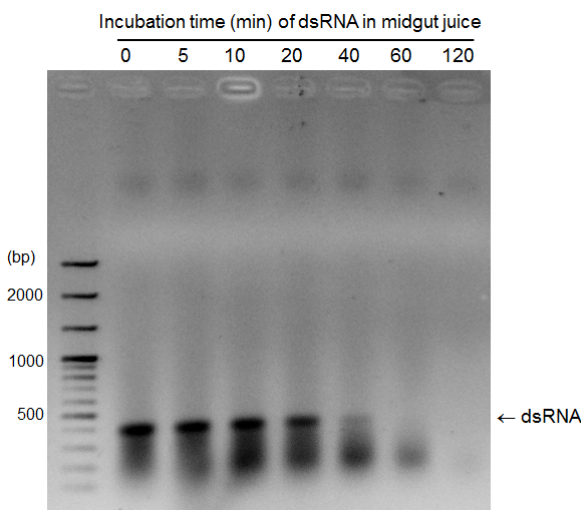


Fig. 3. Degradation of dsRNA in midgut lumen of *S. exigua*. dsRNA (400 ng) was incubated with gut juice extract for different incubation time at 25 °C. Gut juice was extracted from midgut of 5th instar larvae.

dsRNA를 이용한 해충 방제

기내 합성 기술로 제작된 dsRNA를 혈강 또는 섭식 방법으로 다양한 해충에 대해서 RNAi 효과가 검증되었다(Scott et al., 2013). 여기서는 dsRNA를 살충제로 개발하는 데 뚜렷한 방향성을 제시한 연구 결과들을 소개한다.

첫 번째로 dsRNA를 해충방제 기술로 이용한 연구 결과는

왕담배나방(*Helicoverpa armigera*)의 해독효소를 dsRNA로 억제하는 연구에서 볼 수 있다(Mao et al., 2007). 목화를 가해하는 이 곤충은 목화에서 비롯된 내충 물질인 gossypol에 방어하는 특이적 산화효소인 cytochrome P450 유전자(*CYP6AE14*)를 과발현하여 식물을 가해한다. 이때 *CYP6AE14*에 특이적 dsRNA를 발현하는 형질전환식물을 제작하였다. 이 dsRNA를 발현하는 식물을 가해하는 왕담배나방은 *CYP6AE14* 발현이 억제되면서 gossypol에 감수성으로 전환되어 생존율이 크게 떨어지게 되었다. 즉, 식물을 가해함으로써 경구를 통해 들어온 dsRNA가 증장에서 주로 발현되는 *CYP6AE14* 발현을 억제하여 치사율을 높인 것으로 해석된다. 유사한 형질 전환 작물을 이용한 예가 옥수수 뿌리를 가해하는 딱정벌레인 *Diabrotica virgifera virgifera*로서 v-ATPase A에 대한 dsRNA를 발현하는 옥수수를 제작하여 검증한 결과 경제적피해수준 이하로 해충 밀도를 낮추어 옥수수 가해 정도가 격감되었다(Baum et al., 2007).

또 다른 방향의 dsRNA 살충제 처리 기술이 재조합 세균을 이용하여 개발되었다(Zhu et al., 2011). 이 기술을 감자를 가해하는 딱정벌레인 *L. decemlineata*에 처리한 결과 특정 액틴 유전자에 대한 특이적 dsRNA가 이 해충의 발육을 현격하게 억제하는 것으로 나타났다. 이 세균 발현 dsRNA 기술을 나비목 해충인 파밤나방(*S. exigua*)에 적용한 결과 키틴 합성효소를 대상으로 RNAi를 통해 뚜렷한 해충 방제 효과를 나타냈다(Tian et al., 2009). 세균발현 dsRNA 기술은 흡수형 구기를 가진 오리엔탈과실파리에서도 가능성을 보였다(Li et al., 2011).

dsRNA 살충제를 개발하는 데 또 하나의 방향성은 부모 RNAi를 이용하는 것이다. 딱정벌레류를 대상으로 주로 일어나는 현상으로 어미에게 dsRNA 처리한 결과 자식 세대에도 동일한 표적 유전자에 대한 RNAi 효과가 유발되는 데에서 비롯된다. 이 부모 RNAi를 이용하여 옥수수를 가해하는 *D. virgifera virgifera* 딱정벌레 배자 발육에 관여하는 호메오 유전자(예, *hunchback*) 또는 후생유전 조절 유전자(예, *brahma*)에 특이적 dsRNA를 어미에게 섭식 처리한 결과 어미는 물론이고 자손 세대에 이르기까지 RNAi 효과가 전달되어 배자 발육을 억제하는 살충효과를 나타냈다(Khajuria et al., 2015).

한편 특이적인 섭식 습관을 가지고 있는 해충에 대한 dsRNA의 미끼처리 기술이 또 다른 응용성을 지닌다. 예를 들어, 바퀴나 흰개미와 같이 주저에 피해를 주는 해충의 경우 다량의 dsRNA를 이들 해충의 미끼에 처리하여 RNAi 효율을 기대하는 것이다(Zhou et al., 2008). 이 경우에도 환경에 노출되어 dsRNA의 분해를 막기 위해 나노제제화 기술이 요구된다.

나비목 해충을 대상으로 dsRNA로 방제하려는 경우 산누에

나방과 곤충 또는 면역 유전자를 대상으로 하는 경우를 제외하고 비교적 다량의 dsRNA가 체내로 들어가야 유의성있는 RNAi 효과를 기대하게 된다(Terenius et al., 2011). 비록 일부 나비목 해충은 전신 RNAi가 보고되지만 근본적으로 제2차 siRNA의 증폭이 결여되어 있어 다량의 dsRNA가 체내로 이입되어야 효과적인 RNAi의 효과를 거둘 수 있기 때문이다(Lim et al., 2016). 이를 보완하기 위한 전략으로 비티 생물농약과의 혼합 처리가 개발되었다(Kim et al., 2015a). 파밤나방의 경우 증장 세포막에 존재하여 세포와 세포 사이를 연결하는 주는 인테그린(integrin) 단백질에 특이적인 dsRNA를 재조합세균으로 발현시키고, 여기에 비티의 Cry 독소단백질을 추가로 발현시킨 재조합대장균을 함께 처리한 결과 비티 단독의 살충효과보다 월등히 높은 방제 효과를 나타냈다. 유사하게 키틴합성효소(chitin synthase B)의 발현을 억제하는 dsRNA 처리도 비티 독소단백질에 대한 감수성을 높여주었다(Kim et al., 2017). 또 다른 나비목 해충인 조명나방(*Ostrinia furnacalis*)에서도 비티 독소단백질을 분해시켜 비티에 대한 저항성을 나타내는 개체에 dsRNA로 해당 분해효소(chymotrypsin)의 발현을 억제시킨 결과 비티의 살충력이 높아졌다(Guan et al., 2017). 이러한 혼합 처리 기술은 향후 비티에 저항성을 나타내는 나비목 해충에 대해서 dsRNA가 상승적 살충효과를 줄 수 있는 협력제로 개발이 가능하다는 응용 방향을 제시하였다.

dsRNA 이외에 small RNA를 이용한 해충 방제가 miRNA와 siRNA에서 각각 시도되었다. miRNA는 약 22 뉴클레오타이드 길이의 단일가닥 소형 RNA이다. miRNA는 non-coding RNA로서 특정 mRNA의 3' UTR 영역에 상보적 염기서열로 결합하여 대상 mRNA의 가수분해를 유도하거나 번역을 억제하여 유전자 발현을 조절하게 한다(Behura, 2007). 해충방제의 목적으로 특이적 유전자 조절 가운데 곤충의 날개 발달에 관여하는 miRNA에 관한 연구가 진행되었다(Ling et al., 2015). 노랑초파리의 경우 *let-7* 돌연변이체는 소형 날개를 형성하게 하고, *bantam* miRNA는 날개원기(wing disc)의 위아래면 연결부위에 영향을 주고, *miR-9a* 결실 돌연변이체는 날개 가장자리 결합을 보인다. 날개 분화 세포내 신호전달에 관해서 *iab-4* miRNA는 뒷날개 분화에 영향을 주고, *miR-315*와 *miR-8*은 Wingless 신호를 조절한다. 이에 반해 *miR-1*은 Notch 신호를 조절한다. 특히 관심을 갖는 miRNA가 miR-2인데 이들은 무척추동물에 특이적으로 곤충에게 공통적으로 보이는 miRNA이다. 노랑초파리에서 *miR-2*는 Notch 신호전달에 관여하여 시맥 및 날개 가장자리를 형성하는 데 영향을 준다. miR-2는 누에(*Bombyx mori*)에서도 발견되어 Notch 신호전달에 관여하는 *abnormal wing disc (awd)*와 *fringe (fng)* 두 전사체의 발현을

억제하였다. 이러한 연구는 UAS/GAL4의 특정 유전자 발현 시스템을 이용하여 miR-2 유전자 과발현을 통해 *awd*와 *fng*의 발현량 감소를 관찰하였고 더불어 누에 성충의 날개 발육 억제를 초래하게 하였다. 이러한 결과를 증명하기 위해 다시 *awd*와 *fng*를 각각 CRISPR/Cas9 유전자 가위 기술로 knock-out한 누에를 제작하고 이들이 동일한 날개 발육 억제를 초래하는 것을 관찰하여 이들이 miR-2의 대상 유전자들이라는 것을 재입증하였다. 실제로 miRNA를 섭식 처리하여 해충의 생존력을 낮추는 실험이 진행되었다(Jayachandran et al., 2013). 왕담배나방을 대상으로 miR-2002b의 유사체 합성물로 섭식 처리한 결과 트립신 소화효소 유전자의 발현을 억제하면서 약 40%의 유충 치사 효과 및 70% 생식력 감소 효과를 나타냈다.

siRNA를 이용한 해충 방제 기술이 시도되었다. dsRNA 살충제로 개발하는 데 가장 널리 이용되는 *coatamer β*와 *vATPase A* 유전자에 대해서 각각 siRNA를 제조하고 동시에 접종한 결과 이 두 유전자들에 대해서 RNAi 효과가 유발되었고 높은 살충력을 보여 주었다(Mao et al., 2015). 이러한 결과는 여러 종류에 대한 siRNA를 제조하여 처리하는 복합 RNAi 기술이 siRNA 처리에서 가능하여 이상적 살충효과를 줄 수 있는 가능성을 제공하였다. 더욱이 화학합성이 용이한 siRNA는 대량으로 제조하여 살포가 가능하기에 산업적으로 적용 가능성이 높다. 그러나 동일한 유전자를 대상으로 RNAi를 유도하지만 siRNA의 짧은 길이 때문에 제작 위치에 따라 RNAi 효율에 큰 차이를 보일 수 있다(Gong et al., 2013).

dsRNA 살충제 개발 방향

최근 염기서열분석 기술의 획기적 발달에 힘입어 다양한 해충에서 주요 유전자의 탐색이 가능하여 전체 발현체를 대상으로 유용한 dsRNA 살충제 개발이 가능하다. 그러나 이를 산업화로 이어지게 하는 데에는 해결해야 할 여러 핵심 기술들이 남아 있다.

dsRNA 대상 유전자 스크리닝

dsRNA를 살충제로 개발하기 위해서는 필수적 단계가 RNAi 효율이 치사로 이어질 수 있는 대상 유전자를 선발하는 것이다(Yu et al., 2013). 또한 이 유전자가 대상 해충만 공격하는 선택성을 가져야 한다. 현재 선발된 dsRNA 살충제로 선발된 유전자는 비교적 다양한 생명체가 보유하고 있는 유전자들로서 비표적(off-target) 피해를 우려하고 있다. 이를 해결하기 위한 유전자 선발 방향으로 곤충에 고유한 변태에 관련된 유전자에 대

한 dsRNA 살충제 개발이 주목을 받아 왔다. 곤충은 다른 생명체와 뚜렷이 구분되는 생리 현상이 탈피와 변태이다. 이를 수행하기 위해서는 다양한 특이적 유전자들의 발현이 요구된다. 이 가운데 엑다이손 호르몬에 반응하는 유전자들은 비교적 곤충에게서 특이적으로 발현되는 유전자들로 구성된다. Zhu et al. (2012)은 엑다이손 수용체(ecdysone receptor)를 대상으로 dsRNA 기술을 적용하였다. 이 유전자에 특이적 dsRNA를 형질전환담배를 제작하여 섭식 처리한 결과 왕담배나방과 파밤나방 모두에게 살충효과를 주었다. 또 다른 곤충의 특이적 유전자로서 유약호르몬에스테라아제(JH esterase)가 RNAi의 대상으로 평가되었다(Chikate et al., 2016). 키틴은 일부 무척추동물인 갑각류와 곤충에 특이적으로 외골격을 이루게 하는 생체 물질이다. 이에 대한 RNAi는 선택성을 가질 수 있다. 또 다른 호르몬 수용체로서 탈피와 관련성이 높은 *HaHR3* 유전자의 dsRNA 처리도 왕담배나방의 발육을 억제하였다(Xiong et al., 2013). Tian et al. (2009)은 파밤나방을 대상으로 *chitin synthase A* 유전자에 특이적 dsRNA를 형질전환 세균을 통해 제작하고 처리한 결과 처리 농도에 비례하여 살충 효과를 나타냈다.

dsRNA의 효율적 전달 수단 개발

해충 방제를 위해 환경에 살포된 dsRNA의 화학적 안전성 및 체내로 이동이 용이한 제형화 기술이 dsRNA를 효과적인 살충제로 개발하는 데 요구된다(Zhang et al., 2013). 나노제형화는 물론이고 세균 또는 이스트 발현시스템에서 생산된 dsRNA는 모기 유충의 방제의 경우 수중 분해 작용을 억제하고 먹이원으로 섭취할 수 있게 한다(Airs and Bartholomay, 2017). 더불어 중장에서 dsRNA의 분해를 억제하는 기술이 환경 RNAi의 효율을 증가하여 살충력을 높여줄 것이다. 예를 들어, 감자해충인 *L. decemlineata*의 경우 중장에서 생성되어 분비되는 두 가지 핵산분해효소의 발현을 억제하여 준 결과 살충효과를 가진 dsRNA 처리에 대해서 중장 소화액에서 반감기를 늘려주고, RNAi 효율을 증가시키고 결국 살충효과를 현격하게 증가시켰다(Spit et al., 2017). 따라서 대상 해충의 중장에 분비되는 RNase의 종류를 파악하고 이들의 발현을 억제하거나 활성을 억제하여 주는 기술이 dsRNA 살충제 개발의 중요한 방향이 될 수 있다.

dsRNA 적용 대상 해충 선발

많은 주요 해충류에서 RNAi 효과가 입증되어 왔다. 이들 가운데에는 거저뽕도둑거저리와 같이 특별히 전신 RNAi 효과가

뚜렷이 나타나는 곤충이 있는 가하면 많은 나비목 해충의 경우는 특정한 분류군에서만 RNAi 효과를 기대할 수 있고 또 여기에서도 번역에 관련된 유전자들이 주로 의미있는 RNAi 효과를 보였다(Terenius et al., 2011). 눈여겨 볼 부분은 부모 RNAi가 일어나는 딱정벌레 해충이다. 옥수수뿌리를 가해하는 *D. virgifera virgifera*의 경우 어미에 처리한 dsRNA가 차세대 배자 발육에 영향을 주었다(Khajuria et al., 2015). 이러한 부모 RNAi에는 차세대 배자 발육을 교란하는 것을 목표로 하기에 특정 유전자를 표적하기 보다는 상위 수준에서 염색사 구조의 변화를 줄 수 있는 후생유전조절(epigenetic control)에 관련된 유전자들을 공략하게 된다. 이러한 전략이 두 해충에서 구현되었다. 미국의 Siegfried 연구실에서는 *D. virgifera virgifera*와 노린재류(*Euschistus heros*)를 대상으로 염색사구조 변형 인자인 *SWI/SNF*, *ISWI*, *CHD*, *Ino80* 등의 유전자들에 대한 특이적 dsRNA를 제조하여 처리한 결과 차세대에 이들 유전자의 발현이 억제되면서 살란효과를 초래하였다(Fishilevich et al., 2016).

dsRNA 살충제 저항성

살충제 저항성은 감수성 저하로 표현된다. dsRNA에 대한 감수성은 표적 세포에서 dsRNA를 단일가닥의 siRNA로 형성하는 Dicer와 RISC에 의해 이뤄진다(Runo et al., 2011). 아직 dsRNA 효과 규명과 해충 방제의 초기 단계이기에 dsRNA에 대한 저항성을 현장의 문제로 인식하고 있지 않지만, 일부 연구는 이에 대한 가능성을 야외 집단별 dsRNA 감수성 차이로 해석하였다. 비교적 dsRNA의 감수성이 높은 풀무치(*Locusta migratoria*)에서 지역별로 dsRNA에 대한 감수성이 상이한 것이 발표되었다(Sugahara et al., 2017). dsRNA에 대한 저항성과 감수성 집단으로 나누어 상호 교잡을 통해 이 dsRNA에 대한 저항성 유전현상을 분석한 결과 저항성 표현형이 우성인 것으로 나타났다. 그러나 아직 어떠한 유전적 인자가 dsRNA에 대한 저항성을 유발하는지는 밝혀지지 않았다.

dsRNA에 대한 저항성 인자를 찾으려는 연구가 dsRNA를 이용하여 해충 방제 가능성이 높은 딱정벌레를 대상으로 추적하였다(Velez et al., 2016). 옥수수뿌리를 가해하는 *D. virgifera virgifera*의 *Dicer 2* (*Drc2*) 유전자와 *Argonaute 2* (*Ago2*) 유전자를 각각 RNAi 처리한 후 살충력을 갖는 *vATPase A* 유전자에 특이적 dsRNA를 처리한 결과 이들 RNAi 기구에 RNAi 처리를 하지 않은 경우에 비해 살충력 크게 둔화되고 RNAi 효율에 뚜렷한 저하가 일어났다. 반면에 RNAi 기구가 아닌 유전자에 대한 RNAi 처리를 실시하면 *vATPase A* 유전자에 특이적 dsRNA의 살충력은 유지되었다. 이러한 결과는 *Drc2*와 *Ago2*

의 유전적 변형은 dsRNA 살충제에 대한 근본적 저항성 기작으로 작용할 수 있다는 것을 암시하고 있다.

결론

dsRNA를 이용한 살충제 개발은 기본적으로 특정 dsRNA를 세포 내로 운반하는 환경 RNAi 유발로 비롯된다. 선충류에서 필수적으로 작동하는 dsRNA 통로 단백질인 SID 유전자가 거짓쌀도둑거지러는 물론이고 노린재류, 벌목류, 나방류, 메뚜기류 및 이목 곤충류에서 발견되어 이에 대한 기대감을 넣어 주고 있다. 더욱이 여러 곤충류에서 dsRNA의 섭식을 통한 RNAi 효과 유발은 이를 뒷받침하여 주었다. 이 환경 RNAi를 가능하게 하는 새로운 전달 방식인 엔도사이토시스가 곤충은 물론이고 RNAi 효과가 처음 발견된 예쁜꼬마선충에서 작동한다는 사실로 인해 이러한 환경 RNAi의 기구가 다양한 생명체에서 공통적으로 작용하는 사실을 알게 되었다. 이러한 기작 바탕 위에 상이한 dsRNA를 발현하는 형질전환식물체를 제작하여 살충 효과를 보여 주었고, 해충방제제로서 dsRNA의 이용 가능성을 제시하였다. 현재 비티 독소에 의존한 형질전환작물은 이미 해충들의 빠른 저항성 발달로 방제효과가 낮아지고 있다. 이를 대체하기 위한 유전체로서 dsRNA는 더욱 크게 주목받고 있다. 그러나 dsRNA 살충제 기술을 다양한 해충 방제에 적용하기 위해서는 아직 해결되어야 할 숙제들이 남아 있다. 첫째로, 형질전환된 작물체를 처리할 수 없는 경우는 직접 dsRNA를 살포하여야 하는 데 이때 dsRNA의 환경 중 화학적 안정성이 문제가 되고 있다. 이를 해결하기 위한 보다 효율적인 나노제제화 기술 개발이 더욱 필요하다. 더불어 주거해충(예, 흰개미류) 또는 위생해충(예, 바퀴)의 경우는 dsRNA를 나노제제화하여 먹이의 미끼로 이용하는 살충제로 개발할 수 있다. 둘째로 나비목 해충의 방제에서 보듯 효과적인 살충효과를 얻으려면 대량의 dsRNA의 살포가 요구된다. 저렴한 dsRNA 대량 생산 기반이 갖추어져 산업적으로 가능한 dsRNA 살충제 개발이 이뤄져야 한다. 물론 형질전환작물을 개발하는 것이 보다 안정적 해충방제 기술로 여겨질 수 있다. 그러나 아직 비티 독소 단백질에서 보듯 높은 살충효과를 나타내지 못하는 한계를 보이고 있다. 나비목 해충의 경우는 dsRNA 발현 세균을 이용하여 기존 비티에 저항성을 보이는 해충에 대해서 협력제로 응용 가능성을 가지고 있다. 따라서 비티 독소단백질을 발현하는 형질전환작물에 추가적으로 dsRNA를 발현시켜 저항성을 극복하는 용도로 응용 가능성을 타진해 볼 필요가 있다. 셋째로 dsRNA로 살충성이 높은 특정 유전자의 스크리닝이 필요하다. 급속도로 발전하는 염기서열 분석 기술로 대상 해충의 전체 발현유전체의 정

보가 가능하다. 대상 해충의 전체 발현체를 대상으로 대량 스크리닝을 통해 살충효과가 높은 dsRNA를 탐색하게 하는 시스템이 필요하다. 끝으로 dsRNA 이외에 miRNA 또는 siRNA와 같은 small RNA도 RNAi 효과를 지니기에 이들을 이용한 차세대 dsRNA 살충제 개발 가능성도 지속적으로 탐색되어야 한다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 아젠다연구사업(과제번호: PJ011756)으로 지원되었다.

Literature Cited

- Airs, P.M., Bartholomay, L.C., 2017. RNA interference for mosquito and mosquito-borne disease control. *Insects* 8, 4.
- Araujo, R.N., Santos, A., Pinto, F.S., Gontijo, N.F., Lehane, M.J., Pereira, M.H., 2006. RNA interference of the salivary gland nitrophenol 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 683-693.
- Attasart, P., Namramoon, O., Kongphom, U., Chimwai, C., Panyim, S., 2013. Ingestion of bacteria expressing dsRNA triggers specific RNA silencing in shrimp. *Virus Res.* 171, 252-256.
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M.S., Nauen, R., 2015. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 121, 78-87.
- Baum, J.A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G.R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T., Roberts, J., 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 25, 1322-1326.
- Behura, S.K., 2007. Insect microRNAs: structure, function and evolution. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 3-9.
- Boisson, B., Jacques, J.C., Choumet, V., Martin, E., Xu, J.N., Vernick, K., Bourgouin, C., 2006. Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi. *FEBS Lett.* 580, 1988-1992.
- Bologna, N.G., Voinnet, O., 2014. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 473-503.
- Bucher, G., Scholten, J., Klingler, M., 2002. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Curr. Biol.* 12, R85-R86.
- Chikate, Y.R., Dawkar, V.V., Barbole, R.S., Tilak, P.V., Gupta, V.S., Giri, A.P., 2016. RNAi of selected candidate genes interrupts growth and development of *Helicoverpa armigera*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 133, 44-51.
- Dzitoyeva, S., Dimitrijevic, N., Manev, H., 2001. Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult *Drosophila* triggers RNA interference in the central nervous system. *Mol. Psychiatry* 6, 665-670.
- Fire, A., Xu, S.Q., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fishilevich, E., Vélez, A.M., Khajuria, C., Frey, M.L., Hamm, R.L., Wang, H., Schulenberg, G.A., Bowling, A.J., Pence, H.E., Gandra, P., Arora, K., Storer, N.P., Narva, K.E., Siegfried, B.D., 2016. Use of chromatin remodeling ATPases as RNAi targets for parental control of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) and Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 71, 58-71.
- Ganbaatar, O., Cao, B., Zhang, Y., Bao, D., Bao, W., Wuriyanghan, H., 2017. Knockdown of *Mythimna separata* chitinase genes via bacterial expression and oral delivery of RNAi effectors. *BMC Biotechnol.* 17, 9.
- Gong, L., Chen, Y., Hu, Z., Hu, M., 2013. Testing insecticidal activity of novel chemically synthesized siRNA against *Plutella xylostella* under laboratory and field conditions. *PLoS One* 8, e62990.
- Gordon, K.H.J., Waterhouse, P.M., 2007. RNAi for insect-proof plants. *Nat. Biotechnol.* 25, 1231-1232.
- Griebler, M., Westerlund, S.A., Hoffmann, K.H., Meyering-Vos, M., 2008. RNA interference with the allatopregulating neuropeptide genes from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and its effects on the JH titer in the hemolymph. *J. Insect Physiol.* 54, 997-1007.
- Guan, R., Li, H., Miao, X., 2017. RNAi pest control and enhanced Bt insecticidal efficiency achieved by dsRNA of chymotrypsin-like genes in *Ostrinia furnacalis*. *J. Pest. Sci.* 90, 745-757.
- Hakim, R.S., Baldwin, K., Smaghe, G., 2010. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 593-608.
- Huvenne, H., Smaghe, G., 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *J. Insect Physiol.* 56, 227-235.
- Jayachandran, B., Hussain, M., Asgari, S., 2013. An insect trypsin-like serine protease as a target of microRNA: utilization of microRNA mimics and inhibitors by oral feeding. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 398-406.
- Jose, A.M., Smith, J.J., Hunter, C.P., 2009. Export of RNA silencing from *C. elegans* tissues does not require the RNA channel SID-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 2283-2288.
- Kamath, R.S., Ahringer, J., 2003. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 30, 313-321.
- Kennerdell, J.R., Carthew, R.W., 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95, 1017-1026.
- Khajuria, C., Vélez, A.M., Rangasamy, M., Wang, H., Fishilevich, E., Frey, M.L., Carneiro, N.P., Gandra, P., Narva, K.E.,

- Siegfried, B.D., 2015. Parental RNA interference of genes involved in embryonic development of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 63, 54-62.
- Kim, Y., 2014. Development and application of novel biopesticides using insect immunosuppression, in Park, Y.M., Chun, I.J., Kim, Y., Lim, U.T., Lim, J.H. (Eds.), *Horticultural crops: development and application of novel technologies*. ANU Ag. Sci. Tech. Institute, Andong, pp. 41-112.
- Kim, E., Kim, Y., 2016. A freeze-drying formulation and target specificity of double-stranded RNA-expressing bacteria to control insect pests. *Korean J. Appl. Entomol.* 55, 81-89.
- Kim, E., Park, Y., Kim, Y., 2015a. A transformed bacterium expressing double-stranded RNA specific to integrin $\beta 1$ enhances Bt toxin efficacy against a polyphagous insect pest, *Spodoptera exigua*. *PLoS One* 10, e0132631.
- Kim, Y., Kim, E., Park, Y., Kim, Y., 2015b. Construction of a transgenic tobacco expressing a polydnviral cystatin. *Korean J. Appl. Entomol.* 54, 1-9.
- Kim, Y.H., Issa, M.S., Cooper, A.M.W., Zhu, K.Y., 2015c. RNA interference: applications and advances in insect toxicology and insect pest management. *Pest. Biochem. Physiol.* 120, 109-117.
- Kim, H.S., Noh, S., Park, Y., 2017. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Ca toxicity against *Spodoptera exigua* (Hübner) by suppression of a chitin synthase B gene in midgut. *J. Asia Pac. Entomol.* 20, 199-205.
- Kühn, L.C., 2015. Iron regulatory proteins and their role in controlling iron metabolism. *Metallomics* 7, 232-243
- Li, X., Zhang, M., Zhang, H., 2011. RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. *PLoS One* 6, e17788.
- Lim, Z.X., Robinson, K.E., Jain, R.G., Chandra, G.S., Asokan, R., Asgari, S., Mitter, N., 2016. Diet-delivered RNAi in *Helicoverpa armigera* - progresses and challenges. *J. Insect Physiol.* 85, 86-93.
- Ling, L., Ge, X., Li, Z., Zeng, B., Xu, J., Chen, X., Shang, P., James, A.A., Huang, Y., Tan, A., 2015. MiR-2 family targets *awd* and *fng* to regulate wing morphogenesis in *Bombyx mori*. *RNA Biol.* 12, 742-748.
- Mansoori, B., Sandoghchian Shotorbani, S., Baradaran, B., 2014. RNA interference and its role in cancer therapy. *Adv. Pharm. Bull.* 4, 313-321.
- Mao, Y.B., Cai, W.J., Wang, J.W., Hong, G.J., Tao, X.Y., Wang, L.J., Huang, Y.P., Chen, X.Y., 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat. Biotechnol.* 25, 1307-1313.
- Mao, Y.B., Tao, X.Y., Xue, X.Y., Wang, L.J., Chen, X.Y., 2011. Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. *Transgenic Res.* 20, 665-673.
- Mao, J., Zhang, P., Liu, C., Zeng, F., 2015. Co-silence of the coatmer β and v-ATPase A genes by siRNA feeding reduces larval survival rate and weight gain of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 118, 71-76.
- Meyering-Vos, M., Müller, A. 2007. RNA interference suggests sulfakinins as satiety effectors in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.* 53, 840-848.
- Miller, S.C., Brown, S.J., Tomoyasu, Y., 2008. Larval RNAi in *Drosophila*? *Dev. Genes Evol.* 218, 505-510.
- Nauen, R., 2006. Insecticide mode of action: return of the ryanodine receptor. *Pest Manage. Sci.* 62, 690-692.
- Pearson, A., Lux, A., Krieger, M., 1995. Expression cloning of DSR-CI, a class-C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4056-4060.
- Price, D.R.G., Gatehouse, J.A., 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends Biotechnol.* 26, 393-400.
- Roignant, J.Y., Carre, C., Mugat, R., Szymczak, D., Lepesant, J.A., Antoniewski, C., 2003. Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform specific RNAi in *Drosophila*. *RNA* 9, 299-308.
- Runo, S., Alakonya, A., Machuka, J., Sinha, N., 2011. RNA interference as a resistance mechanism against crop parasites in Africa: a "Trojan horse" approach. *Pest. Manag. Sci.* 67, 129-136.
- Saleh, M.C., van Rij, R.P., Hekele, A., Gillis, A., Foley, E., O'Farrell, P.H., Andino, R., 2006. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature Cell Biol.* 8, 793-802.
- Saleh, M.C., Tassetto, M., van Rij, R.P., Goic, B., Gausson, V., Berry, B., Jacquier, C., Antoniewski, C., Andino, R., 2009. Antiviral immunity in *Drosophila* requires systemic RNA interference spread. *Nature* 458, 346-351.
- Scott, J.G., Michel, K., Bartholomay, L.C., Siegfried, B.D., Hunter, W.B., Smagghe, G., Zhu, K.Y., Douglas, A.E., 2013. Towards the elements of successful insect RNAi. *J. Insect Physiol.* 59, 1212-1221.
- Shakesby, A.J., Wallace, I.S., Isaacs, H.V., Pritchard, J., Roberts, D.M., Douglas, A.E., 2009. A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 1-10.
- Sivakumar, S., Rajagopal, R., Venkatesh, G.R., Srivastava, A., Bhatnagar, R.K., 2007. Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac. *J. Biol. Chem.* 282, 7312-7319.
- Spit, J., Philips, A., Wynant, N., Santos, D., Plaetinck, G., Vanden Broeck, J., 2017. Knockdown of nuclease activity in the gut enhances RNAi efficiency in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, but not in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 81, 103-116.
- Sugahara, R., Tanaka, S., Jouraku, A., Shiotsuki, T., 2017.

- Geographic variation in RNAi sensitivity in the migratory locust. *Gene* 605, 5-11.
- Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J.S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Kanginakudru, S., Albrechtsen, M., An, C., Aymeric, J.L., Barthel, A., Bebas, P., Bitra, K., Bravo, A., Chevalier, F., Collinge, D.P., Crava, C.M., de Maagd, R.A., Duvic, B., Erlandson, M., Faye, I., Felföldi, G., Fujiwara, H., Futahashi, R., Gandhe, A.S., Gatehouse, H.S., Gatehouse, L.N., Giebertowicz, J.M., Gómez, I., Gimmelikhuijzen, C.J., Groot, A.T., Hauser, F., Heckel, D.G., Hegedus, D.D., Hrycaj, S., Huang, L., Hull, J.J., Iatrou, K., Iga, M., Kanost, M.R., Kotwica, J., Li, C., Li, J., Liu, J., Lundmark, M., Matsumoto, S., Meyering-Vos, M., Millichap, P.J., Monteiro, A., Mrinal, N., Niimi, T., Nowara, D., Ohnishi, A., Oostra, V., Ozaki, K., Papakonstantinou, M., Popadic, A., Rajam, M.V., Saenko, S., Simpson, R.M., Soberón, M., Strand, M.R., Tomita, S., Toprak, U., Wang, P., Wee, C.W., Whyard, S., Zhang, W., Nagaraju, J., Ffrench-Constant, R.H., Herrero, S., Gordon, K., Swevers, L., Smaghe, G., 2011. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *J. Insect Physiol.* 57, 231-245.
- Tian, H., Peng, H., Yao, Q., Chen, H., Xie, Q., Tang, B., Zhang, W., 2009. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS One* 4, e6225.
- Timmons, L., Fire, A., 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395, 854.
- Timmons, L., Court, D.L., Fire, A., 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263, 103-112.
- Tomoyasu, Y., Denell, R.E., 2004. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Dev. Genes Evol.* 214, 575-578.
- Tomoyasu, Y., Miller, S.C., Tomita, S., Schoppmeier, M., Grossmann, D., Bucher, G., 2008. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biol.* 9, R10.
- Ulvila, J., Parikka, M., Kleino, A., Sormunen, R., Ezekowitz, R.A., Kocks, C., Ramet, M., 2006. Double-stranded RNA is internalized by scavenger receptor-mediated endocytosis in *Drosophila* S2 cells. *J. Biol. Chem.* 281, 14370-14375.
- Velez, A.M., Khajuria, C., Wang, H., Narva, K.E., Siegfried, B.D., 2016. Knockdown of RNA interference pathway genes in Western corn rootworms (*Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte) demonstrates a possible mechanism of resistance to lethal dsRNA. *PLoS One* 11, e0157520.
- Volz, J., Muller, H.M., Zdanowicz, A., Kafatos, F.C., Osta, M.A., 2006. A genetic module regulates the melanization response of *Anopheles* to *Plasmodium*. *Cell. Microbiol.* 8, 1392-1405.
- Whangbo, J.S., Hunter, C.P., 2008. Environmental RNA interference. *Trends Genet.* 24, 297-305.
- Winston, W.M., Molodowitch, C., Hunter, C.P., 2002. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* 295, 2456-2459.
- Winston, W.M., Sutherlin, M., Wright, A.J., Feinberg, E.H., Hunter, C.P., 2007. *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 10565-10570.
- Wynant, N., Santos, D., Van Wielendaele, P., Vanden Broeck, J., 2014. Scavenger receptor-mediated endocytosis facilitates RNA interference in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Mol. Biol.* 23, 320-329.
- Xiao, D., Gao, X., Xu, J., Liang, X., Li, Q., Yao, J., Zhu, K.Y., 2015. Clathrin-dependent endocytosis plays a predominant role in cellular uptake of double-stranded RNA in the red flour beetle. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 60, 68-77.
- Xiong, Y., Zeng, H., Zhang, Y., Xu, D., Qiu, D., 2013. Silencing the HaHR3 gene by transgenic plant-mediated RNAi to disrupt *Helicoverpa armigera* development. *Intl. J. Biol. Sci.* 9, 370-381.
- Xu, J., Wang, X.F., Chen, P., Liu, F.T., Zheng, S.C., Ye, H., Mo, M.H., 2016. RNA interference in moths: mechanisms, applications, and progress. *Genes* 7, 88.
- Yu, N., Christiaens, O., Liu, J., Niu, J., Cappelle, K., Caccia, S., Huvenne, H., Smaghe, G., 2013. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect Sci.* 20, 4-14.
- Zha, W., Peng, X., Chen, R., Du, B., Zhu, L., He, G., 2011. Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *PLoS One* 6, e20504.
- Zhang, X., Zhang, J., Zhu, K.Y., 2010. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Mol. Biol.* 19, 683-693.
- Zhang, H., Li, H.C., Miao, X.X., 2013. Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control. *Insect Sci.* 20, 15-30.
- Zhou, X., Wheeler, M.M., Oi, F.M., Scharf, M.E., 2008. RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 805-815.
- Zhu, F., Xu, J., Palli, R., Ferguson, J., Palli, S.R., 2011. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Manag. Sci.* 67, 175-182.
- Zhu, J.Q., Liu, S., Ma, Y., Zhang, J.Q., Qi, H.S., Wei, Z.J., Yao, Q., Zhang, W.Q., Li, S., 2012. Improvement of pest resistance in transgenic tobacco plants expressing dsRNA of an insect-associated gene EcR. *PLoS One* 7, e38572.