

유전자편집 작물의 개발 현황 및 농업생명공학기술의 국가 경쟁력 강화

이신우

Strengthening the competitiveness of agricultural biotechnology through practical application of gene editing technology

Shin-Woo Lee

Received: 3 July 2018 / Revised: 4 September 2018 / Accepted: 12 September 2018
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract In this paper, mechanisms of gene editing technologies including ZFN, TALENS and CRISPR were briefly discussed with mutual advantages and disadvantages. Classification criteria of gene edited, site-directed mutagenesis (SDN) crops for regulatory purpose were also discussed. The number of studies using CRISPR technology was high and studies conducted on *Arabidopsis thaliana* and rice were highest, followed by tobacco, tomato, wheat, and corn. It has been applied to a variety of plants such as other grain crops, flower crops, vegetable crops, and fruit trees. The number of studies focused on practical application or commercialization in the future were also increasing yearly, and the scope of studies also expanded to include research on metabolic engineering for mass production of useful proteins or substances, development of disease resistant crops against viruses, bacteria, and fungi, abiotic environmental stress-resistant crops, and increased yields. In addition to this, it was revealed that application range is becoming more diversified, including the development of parthenocarpic tomatoes, hybrid rice lines using male sterility and increased shattering resistance *Brassica napus*. It was also revealed that the number of CRISPR gene edited crops permitted by the USDA (APHIS) increases yearly, to be released in the international seed market soon.

Keywords Gene Editing, SDN, Publications, Practical Application, Agricultural Biotechnology

서론

1980년대에 유전자변형기술로 만든 최초의 상업화작물인 물러지지 않은 토마토(Flavr Savr™)가 시장에 출시된 이후 30여년이 지난 현재 우리는 유전자편집 또는 가위기술(gene 또는 genome editing technology)이라는 새로운 기술로 만든 작물의 상업화 시대를 맞이하고 있다. 지난 수십 년 동안 국내에서도 농업생명공학을 체계적으로 육성하여 국가경쟁력을 높여 해마다 증가하고 있는 유전자변형작물의 세계시장에서 우리 독자적으로 개발한 유전자변형 종자를 출시하기 위하여 지속적인 R&D투자를 하여 왔으나 우리기술로 만든 유전자변형작물이 상업화에 성공한 사례는 아직까지 단 한건도 없었다. 반면에 최근 미국에서는 유전자편집기술로 만든 갈변 방지 버섯은 ‘transgene-free’이기 때문에 기존의 유전자변형생물체에 해당되지 않으므로 허가를 하였으며 이어서 다양한 종류의 유전자편집 작물이 허가되고 있는 실정이다(<https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/biotechnology>).

뿐만 아니라 오랫동안 유전자변형작물의 수입을 반대하여 온 유럽연합(EU)의 과학기술자문 위원회(European Academic Science Advising Council, EASAC)는 지난 20년 동안 유전자변형작물을 재배하고 사료용, 식용 또는 가공용으로 사용하여 온 결과 아무런 위해성을 발견할 수 없었으며, 오히려 보다 많은 장점을 내포하고 있다는 연구 보고서를 제출함과 동시에 유전자편집기술로 만든 작물들은 기존의 유전자변형작물처럼 엄격한 규제에 인하여 또 다시 죽은 기술로 과소평가하는 실수를 범하지 말 것을 경고하였다(Glover 2013). 또한 유전자편집기술로 만든 작물이 외래DNA를 포함하지 않는

S.-W. Lee (✉)
경남과학기술대학교 생명과학대학 농학·한약자원학부
(Dept. of Agronomy & Medicinal Plant Resources, Gyeongnam National University of Science & Technology, JinJu, Korea)
e-mail: shinwlee@gntech.ac.kr

‘transgene free’작물일 경우에는 유전자변형생물체에 해당되지 않으므로 기존 법령에 의하여 규제를 받을 필요가 없다고 주장하였다(EASAC 2015). 특히 유전자편집기술로 만든 작물들은 형질과 산물(trait and product)이 규제 대상이 되어야 하며 기술(technology) 그 자체가 규제 대상이 되어서는 안 된다고 주장하였다. 이는 과학적인 사실(evidence-based)에 근거하여 규제가 되어야 한다는 주장은 이미 지난 20년간 유전자변형작물의 안전관리와 위해성평가과정에서 축적되어 온 과학적인 사실에 근거한 결과이다(Heap 2013; Swiss National Science Foundation 2012; Hartung and Schiemann 2014).

한편 국내의 유전자편집기술에 관한 연구는 세계적인 선두그룹인 유전체교정연구단(단장 김진수)을 중심으로 인체 세포(Lee et al. 2010a; Lee et al. 2012; Cho et al. 2013a), 쥐(Sung et al. 2014a; Sung et al. 2014b), zebrafish(Sung et al. 2014b), *Caenorhabditis elegans*(Cho et al. 2013b) 등 동물을 대상으로 한 선도적인 연구결과를 발표하였으며, Cas-OFFinder라고 명명된 Cas9 RNA-guided 핵산가수분해효소의 잠재적인 off-target sites를 예측할 수 있는 알고리즘의 개발에 관한 연구결과도 발표하였다(Bae et al. 2014). 뿐만 아니라 식물분야에서도 애기장대의 *FLOWERING LOCUS T (FT)*와 *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 4* 유전자를 target로 CRISPR-Cas9 시스템을 이용한 유전자편집을 시도하여 개화기가 늦은 개체를 확인하였고(Hyun et al. 2015), 애기장대, 담배, 상추, 벼의 원형질체 시스템을 사용하여 preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins을 이용하는 유전자편집기술도 확립하였다(Woo et al. 2015). 또한 새로운 핵산가수분해효소인 Cpf1을 이용한 식물 유전자편집기술도 확립하였으며(Kim et al. 2016), 포도의 흰가루병(powdery mildew disease)과 사과화상병(fire blight disease)에 대한 각각의 감수성 유전자인 *MLO-7*, *DIPM-1*, *DIPM-2*, *DIPM-4* 등을 목표로 한 작물의 실용화를 위한 응용 연구결과도 발표하였다(Malnoy et al. 2016). 또한 미세조류(*Chlamydomonas reinhardtii*)를 대상으로 한 유전자편집기술의 확립 및 zeaxanthin 함량과 광합성 효율이 증진된 계통도 확보하여 향후 이를 이용한 유용물질 대량생산기반도 확립하였다(Shin et al. 2016; Baek et al. 2016).

따라서 본 논문에서는 유전자편집기술들의 발달과정과 기술별 차이점, 안전성평가와 관련한 기술 분류 방법 등을 논하고 2016년부터 2018년 5월까지의 식물의 유전자편집과 관련된 논문의 발표 현황을 기술별, 식물별로 조사하였다. 또한 실용화가 가능한 작물의 개발에 관한 연구논문들을 병저항성 작물, 유용단백질 또는 물질의 대량생산, 가뭄 등의 환경스트레스 저항성, 다수확작물 개발 등으로 분류하여 검토하였다. 또한 미국 USDA의 동·식물검역청(APHIS)에서 승인된 유전자 편집 작물들의 현황과 향후 실용화 또는 상용화가 가능할 것으로 전망되는 작물들에 관하여 조사하였다.

유전자편집기술의 발전 현황

기존의 유전자변형작물의 안전성 평가의 핵심은 특정 유전자변형작물에 도입된 새로운 외래 DNA 단편과 이를 도입하기 위하여 사용한 운반체 DNA 단편이 유전자변형작물에 내재 하면서 이들이 인체 및 환경에 미치는 잠재적인 위해성에 관한 것으로 끊임없는 논란이 지속되고 있다. 따라서 지난 수십 년간 과학자들은 이들 외래 DNA가 잔존하지 않는 유전자변형작물을 개발하기 위한 연구를 진행하여 왔다. 그 결과 Beetham 등(1999)은 합성한 oligonucleotides를 이용하여 게놈의 특정한 위치에 염기의 치환 또는 삽입을 통한 돌연변이를 유발 할 수 있는 oligonucleotide-mediated mutagenesis (OMM) 또는 oligonucleotide-directed mutagenesis (ODM) 기술을 발표하여 최초로 인위적인 유전자편집기술의 가능성을 제시하였으며, 옥수수, 벼, 밀, 담배 등의 작물을 대상으로 제초제 저항성을 성공적으로 유도한 연구결과들이 발표되었다(Beetham et al. 1999; Dong et al. 2006; Iida and Terada 2005; Kochevenco and Willmitzer 2003; Okuzaki and Toriyama 2004; Zhu et al. 1999; Zhu et al. 2000). 그러나 ODM 기술은 주로 상동성 의존 수선기작(homology-dependent repair, HDR) 기작에 의하여 DNA 수선을 하는 세균, 효모, 동물의 배아줄기세포 등과 비교하여 식물의 경우에는 그 효율성이 현저하게 떨어진다는 것이 문제점이었다. 그 이유는 식물의 체세포는 비상동성말단연결(non-homologous end joining, NHEJ)에 의존하고 있으며 유전자편집 효율 또한 극히 낮을 뿐만 아니라 이중나선의 절단(Double strand breaks, DSBs) 주변의 삽입 또는 결실의 돌연변이가 일어나는 등의 부정확성 때문인 것으로 알려졌다(Puchta and Fauser 2013; Steinert et al. 2016).

따라서 식물의 게놈 내 목표로 하는 특정 DNA 단편만 인식하여 편집할 수 있는 정확도를 높이는 site-directed nuclease (SDN) 기술을 접목하기 위한 연구가 활발하게 진행되었다. 이 기술은 기본적으로 목표로 하는 DNA 단편만 정확하게 인식하는 분자와 이 부위를 절단하는 핵산가수분해효소(nuclease)로 구성되어 있다. SDN 기술이 작물에 응용되기 시작하면서 European Food Safety Authority (EFSA)의 GMO 패널 그룹에서는 “게놈의 목표로 하는 특정 DNA 단편의 이중나선을 자르고 그 위치에 돌연변이를 유발하거나 특정 카세트를 삽입하는 모든 기술들”을 총칭하여 SDNs 기술에 포함하기로 하였으며 현재까지 개발된 zinc finger nuclease (ZFN), transcription activator-like effector nuclease (TALEN), clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) 기술 뿐만 아니라 향후 개발될 것으로 전망되는 모든 관련된 새로운 기술들을 포함하도록 하였다(EFSA, 2012).

현재까지 개발된 SDN 기술을 편의상 개발된 순서대로 ZFN 기술을 1세대 TALEN 기술은 2세대, CRISPR 기술은 3세대 기술로 구분할 수 있다. 1세대와 2세대인 ZFN과 TALEN 기술은

목표로 하는 DNA단편만 정확하게 인식하는 각각의 독특한 도메인과 이 부위를 절단하는 핵산가수분해효소(FokI endonuclease)로 구성되어 있다. ZFN단백질은 고등생물에 존재하는 것으로 DNA결합도메인은 3개의 zinc finger구조를 함유하고 있으며 각각의 zinc finger는 3 bp의 염기를 인식한다. 그리고 FokI endonuclease는 2개의 단량체(monomer)가 1쌍으로 작용하며 각각의 monomer는 3개에서 6개의 zinc finger단백질로 구성되어 9~18 bp DNA염기서열을 인식하기 때문에 1쌍의 ZFN은 약 18~36 bp DNA를 인식하여 자른다(Kim et al. 1996; Laity et al. 2001). 이러한 기작을 이용하여 옥수수의 *IPK1* 유전자에 돌연변이를 유도한 결과 파이틴산의 함량이 낮은 옥수수를 개발하는데 성공하는 등 다양한 식물에 응용되기 시작하였다(Shukla et al. 2009).

TALEN기술에 사용되는 TAL effector는 식물병원균인 *Xanthomonas*가 식물 세포의 핵으로 주입되어 식물 유전자의 프로모터에 존재하는 특정 인자를 인식하여 식물의 감염을 유도하는데 필요한 식물유전자들의 발현을 촉진하는 것으로 밝혀진 단백질이다(Kay et al. 2007; Römer et al. 2007; Bogdanove et al. 2010). TAL effector 단백질의 DNA결합 도메인은 33개에서 35개의 잘 보존된 아미노산 반복서열을 포함하고 있으며 이중 12번과 13번은 다형성 보이는 repeat-variable di-residue (RVD)로 특정 염기에 결합하기 위한 특이성을 부여하기 때문에 특정 DNA에 결합할 수 있도록 적절한 RVD를 조합할 수 있으며 반복수와 RVD영역의 염기에 따라 인식할 수 있는 DNA의 길이와 특정 염기서열에 결합할 수 있도록 디자인이 가능하다. 하나의 TALENS의 DNA결합 도메인은 12에서 30개의 RVDs를 포함하여 12~30개의 염기를 인식할 수 있다(Boch et al. 2009; Moscou and Bogdanove 2009). ZFN과 마찬가지로 TALENS의 경우에도 *Flavobacterium okeanokoites*에서 알려진 FokI endonuclease를 사용하며 두 개의 DNA 결합부위 사이에 이량체로 작용하여 절단하도록 디자인하여 사용한다. TALEN기술을 이용하여 세균마름병(bacterial blight)에 대한 감수성유전자(*OsSWRRT 14*)내에 3~55 bp에 해당하는 염기의 삽입 또는 삭제를 유도하여 저항성벼를 개발하는데 성공하는 등 다양한 식물에 응용되기 시작하였다(Li et al. 2012). 그러나 ZFN과 TALENS기술의 가장 큰 문제점은 높은 비율의 “off-target”으로 인하여 세포손상이 일어날 수 있다는 사실이 이미 동물 세포 등을 통하여 밝혀졌다(Cornu et al. 2008; Gabriel et al. 2011; Pattanayak et al. 2011). 뿐만 아니라 재조합된 ZFN 또는 TALE 단백질 발현하는 DNA단편을 식물에 도입하여야 하는 과정에서 이들 작은 DNA단편의 클로닝을 포함한 여러 가지 후속단계의 취급이 어려우며 식물체 내 도입된 이들 단백질의 과 발현에 의한 유전자침묵현상(gene silencing)등도 문제점으로 대두되었다(Kim et al. 1996; Chen and Gao 2013; Gaj et al. 2013; Pauwels et al. 2014; Osakabe and Osakabe 2015; Jaganathan 2018).

3세대 기술인 CRISPR기술은 절단하고자 하는 DNA영역을

single-guide RNA (sgRNA)가 인식한다는 점이 앞서 설명한 두 가지 기술과 비교하여 가장 크게 다르다. CRISPR라는 용어는 Clustered Regulatory Inter-spaced Short Palindromic Repeat의 약어로서 Jansen 등(2002)이 발표한 논문에 처음 사용되었는데 대장균의 *iap*유전자의 하위영역에 존재하는 비 반복서열 다음에 인접해 있는 tandem repeat를 지칭한다(Ishino et al. 1987). 이 반복서열의 염기서열과 상동성이 높은 DNA단편이 플라스미드나 바이러스의 파지 DNA염기서열과 상동성이 높다는 사실이 밝혀지고 그들의 기능을 연구하는 과정에서 세균이 외부 DNA의 침입을 막기 위한 면역시스템에 관여한다는 사실이 알려지면서 유전자편집 시스템에 차용하는 연구가 구체화되기 시작하였다(Mojica et al. 2005). 동물세포를 대상으로 CRISPR기술을 응용한 최초의 성공적인 연구 논문이 발표되었다(Jinek et al. 2012).

CRISPR 기술은 목표로 하는 DNA를 인식하여 결합하는 짧은 단편(20개의 염기서열)의 RNA가닥과 인식부위를 절단하는 핵산가수분해효소가 필요하다. RNA가닥은 목표로 하는 염기서열을 대상으로 제작하며 핵산 가수분해효소는 Cas9과 Cpf1 등을 사용한다. Cas9은 *Streptococcus pyogenes* 으로부터 처음 분리된 다음 *Neisseria meningitidis* (Nmecas9), *Staphylococcus aureus*, (Sacas9) (Ran et al., 2015), *Streptococcus thermophilus* (st1cas9과 st3cas9) (Muller et al. 2016) 등이 알려졌다며 이들은 유전자편집을 목표로 하는 생물체의 종류 및 그 특성에 따라 “off-target” 비율을 현저하게 감소시킬 수 있다는 보고가 발표되었다. 또한 *Streptococcus pyogenes*에서 분리한 spcas9 단백질의 일부 아미노산 서열을 변형시킨 경우에도 특이성을 현저하게 높인다는 연구결과도 발표되었다(Hu et al. 2018; Jaganathan 2018). Cpf1은 *Prevotella*와 *Francisella*에서 분리된 것으로 class II, V type의 핵산가수분해효소이며, 단일가닥 RNA(single RNA guided, crRNA)복합체가 DNA 단편의 절단에 필요하고 절단면이 cohesive ends를 형성하여 DNA단편의 삽입이 용이하다는 등의 장점을 내포한다(Zetsche et al. 2015; Zetsche et al. 2017). 특히 Kim 등(2016)에 의하면 Cpf1 단백질과 함께 콩의 *FAD2*와 담배의 *AOC*유전자를 targets로 하여 제작한 crRNA를 도입한 결과 “off-target”율이 현저하게 감소하였다고 하였다. 이 외에도 “off-target”을 감소 등 여러 가지 특징을 나타내는 새로운 핵산가수분해효소를 찾거나 기존의 알려진 효소를 변형시키는 연구결과가 진행 중에 있으며 현재까지 약 53종류에 달하는 후보들이 알려졌다(Zaidi et al., 2017).

CRISPR-Cas9 또는 Cpf1 시스템을 동물 또는 식물 등의 생물체에 차용하기 위하여 다음과 같은 실험 단계들 즉 목표로 하는 유전자 내 Protospacer adjacent motif (PAM)염기서열 확인, 단일가닥 RNA (sgRNA)합성, 적합한 운반체 내 클로닝, 숙주세포로의 도입, 스크리닝, 검정 등이 필요하다. CRISPR 기술의 가장 큰 장점은 PAM영역의 다양한 돌연변이 유발, target RNA의 합성, 운반체 내 클로닝 등의 바이오 부품 제작

등의 기술이 지속적으로 개발되고 있어 제작이 용이하고 효율성과 정확도가 높다는 점이다. 또한 다양한 위치에 다양한 유전자편집을 동시에 유도할 수 있는 multiplexing-editing의 적용이 가능하다는 점이다. 무엇보다도 특정 DNA염기서열들에 결합하기 위해 단백질-DNA결합이 아닌 RNA-DNA결합을 사용하기 때문에 지속적인 논란의 대상이 되고 있는 외래 DNA가 도입되지 않은 DNA-free작물의 개발이 보다 용이하다는 점이 가장 큰 장점이다.

안전성평가를 위한 유전자 편집 기술의 분류 동향

European Food Safety Authority (EFSA, 2012)는 안전성평가를 용이하게 하기 위하여 ZFN 기술을 ZFN-1, ZFN-2, ZFN-3기술로 분류하고 각각을 다음과 같이 정의하였다. ZFN-1은 NHEJ 기작에 의하여 단일염기의 변화, 짧은 염기의 삽입 또는 결실이 일어난 것으로 이중나선의 절단 후 교정과정에서 주형가닥(repair template)을 사용하지 않아야 한다고 정의하였다. 또한 삽입이 일어난 경우에 삽입된 염기는 반드시 자신의 게놈으로부터 유래된 것이어야 하고 외부에서 삽입되지 않아야 한다. ZFN-2는 상동성재조합기작(homologous recombination, HR)에 의하여 특정단일 또는 작은 수의 염기가 변화, 삽입, 결실 등이 일어나는 점 돌연변이의 경우로 한정하였다. ZFN-2는 점 돌연변이를 도입하기 위하여 target DNA와 상동성이면서 도입하기를 원하는 점 돌연변이를 포함하는 DNA 주형가닥을 사용한다. ZFN-3는 상동성재조합(HR)기작을 이용하여 외래 DNA단편 또는 유전자 카세트를 도입한 것으로 정의하였다. 이때 도입된 DNA단편의 길이는 수 천 염기쌍(kilo base pairs, kbps)까지 포함한다고 하였다. 그리고 실제로는 HR뿐만 아니라 NHEJ 기작에 의하여도 특정 외래 DNA 단편의 도입도 일어날 수 있으며 이 경우를 특별히 ZFN 3-NHEJ로 구분하였다. EFSA는 이러한 등급 구분 체계는 TALENS와 CRISPR 그리고 앞으로 새로이 개발되는 모든 유전자편집기술에도 동일하게 적용하여 이들 site-directed nuclease (SDN)기술을 SDN-1, SDN-2, SDN-3로 구분하고 특히 SDN-3에 해당하는 것들은 외래 DNA단편을 사전에 알고 있는 위치(predefined region)에 삽입한다는 것 외에는 기존의 유전자변형생물체와 동일한 것으로 간주하고 안전성평가 과정을 필하여야 한다고 주장하였다.

한편 Hilscher 등(2017)은 공여(donor) DNA의 사용 유무에 따라 SDN-1은 공여 DNA를 사용하지 않은 경우, SDN-2는 공여DNA를 사용하여 작은 수의 돌연변이 유발, SDN-3는 공여 DNA를 사용하여 비교적 길이가 긴 외래 DNA단편이 삽입된 경우로 다시 정의하였다. 그러나 이러한 구분은 기술적인 측면이 아니라, 안전성평가 관리 측면에서 법적으로 구분을 시도한 것으로 이들 3종류의 산물들에 대한 규제는 기존의 유전자변형생물체의 정의를 어떻게 수정하느냐에 따라 운명이 달라질 수 있다고 하겠다. 또한 SDN-2와 SDN-3의 경계

가 명확하지 않고 임의적으로 해석될 소지가 다분하여 관련 규정을 수정할 때 세심한 검토가 필요한 부분이다.

유전자편집기술을 이용한 작물의 개발에 관한 논문 발표 현황

Hilscher 등(2017)은 2005년부터 2015년까지 발표된 유전자 편집식물에 관한 논문을 분석한 결과 ZFN과 TALENS기술에 관한 논문은 5건 미만을 유지하였으나 CRISPR기술에 관한 논문은 2014년도에는 약 20건 그리고 2015년도에는 약 50건 이상이 발표되었다고 하였다. 식물의 종류도 벼와 애기장대가 각각 22건과 19건으로 많았으며, 그 외 담배, 콩, 감자, 밀, 옥수수 등 다양한 종류의 식물에 적용되고 있는 것으로 보고되었다. 따라서 본 연구에서는 Pubmed database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)를 이용하여 Plants, ZFN, TALEN, CRISPR 등을 각각 키워드로 사용하여 2016년부터 2018년 5월 현재까지 발표된 논문을 조사하여 분석하였다. 그 결과 예상한 바와 같이 ZFN과 TALEN기술을 이용한 논문 발표 건수는 2016년도는 각각 3건과 14건, 2017년도에는 각각 3건과 4건이 발표되었으나 2018년도 5월까지의 각각 1건과 3건으로 낮은 수준을 유지하였다. 반면에 CRISPR기술을 이용한 논문은 2016년도에 65건, 2017년도에는 100건으로 거의 두 배 가까이 증가하였으며 2018년도 5월까지 조사에서도 48건으로 향후 지속적으로 늘어날 것으로 예상되었다(Fig. 1).

또한 CRISPR기술이 적용된 식물의 종류를 조사하여 본 결과를 Figure 2에 요약 하였다. 그 결과를 보면 애기장대와 벼가 각각 46건으로 가장 높은 건수가 발표되었다. 이는 Hilscher 등(2017)이 2005년부터 2015년까지 발표된 논문에서 조사한 결과와 유사하였다. 이어서 담배와 토마토가 각각 15건이 발표되었으며 밀(11), 옥수수(10), 콩(6) 그리고 유채, 목화, 포도나무, 포플라 등이 각각 5건, 감자와 보리가 각각 4건, 알팔파, Chlamydomonas, 페튜니아 등이 각각 3건, Citrus, Moss, Camelina, 사과, Japanese morning glory 등이 각각 2건 발표되었다. 이 외에 Peanut, Silene latifolia, Sugarcane, Flax, Sorghum, Strawberry, Lettuce, Liver wort, Kiwifruit, Green

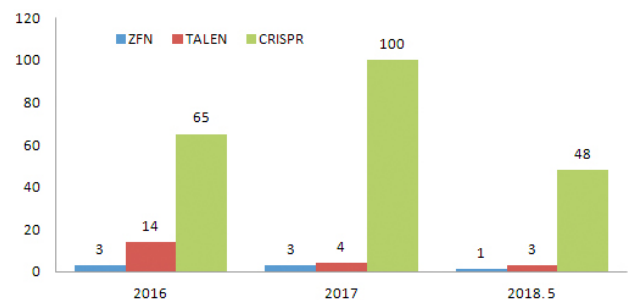


Fig. 1 Articles presenting experimental data of ZFN, TALEN and CRISPR/Cas9 technology in plants 2016-May 2018. Publications regarding genome edited plants were included in the PubMed database

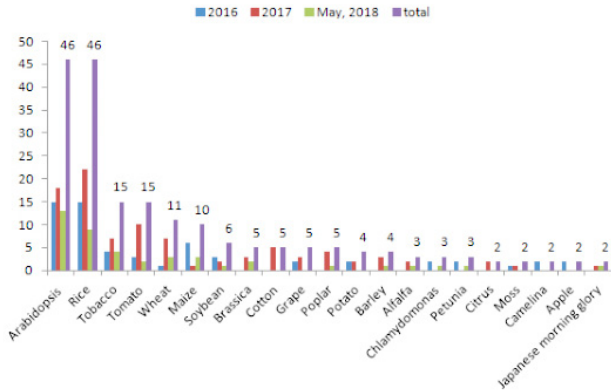


Fig. 2 Crop species successfully gene edited using the CRISPR/Cas9 system 2016- May 2018. Publications were included in the PubMed database

algae, Sweet potato, Switch grass, Banana, Cassava, Papaya, *Salvia miltiorrhiza*, Orchid, Chrysanthemum, Watermelon, *Lotus japonicus*, *Physcomitrella patens*, Cucumber 등이 각각 1건으로 발표되어, Jiang 등(2013)이 CRISPR 편집기술을 단자엽과 쌍자엽 식물에서 성공적으로 작용한다는 사실을 발표한 이후 모델식물인 애기장대를 비롯하여 벼, 밀, 보리 등의 주곡작물과 담배, 화훼, 채소, 과수 등으로 다양하게 늘어나고 있음을 알 수 있었다.

한편 이들 발표논문들의 연구목적에 대한 내용을 조사한 결과를 Figure 3에 제시하였다. 연구 목적 또는 내용을 protocol 확립, gene function 연구, 안전성에 관한 연구, 실용화와 관련된 연구 등 크게 4 그룹으로 분류하여 계수한 다음 실용화관련 연구는 다시 세분하여 유용단백질 또는 물질의 생산을 위한 대사공학연구, 병 저항성 작물 개발에 관한 연구, 가뭄 등의 환경스트레스 저항성연구, 수량증대와 관련된 연구 그리고 기타 등으로 구분하여 조사하였다. 그 결과 첫째로 protocol 확립 즉 식물별 실험조건, 효율증진, “off-target”을 감소, PAM 영역과 target RNA 합성, 운반체 내 클로닝 등의 바이오 부품 제작, multiplexing-editing조건 설정 등에 관한 연구 건수가 110건으로 가장 많았으며 이들 연구 중에는 제초제 저항성유전자인 5'-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) (Sauer et al. 2016)와 Acetolactate synthase (ALS) (Sun et al. 2016; Shimatani et al. 2018; Butler et al. 2016) 유전자를 report 유전자로 사용하여 상동성재조합에 의한 유전자편집기술 (homology directed repair, HDR)로 SDN-2작물 개발에 관한 기초 연구와 single-stranded oligonucleotides (ssODNs)와 CRISPR-Cas9시스템을 동시에 적용한 유전자편집 기초 기술 확립 등에 관한 연구들도 포함되었다.

두 번째로는 특정 유전자의 knock-out으로 기능을 확인하는 functional genomics에 해당하는 연구 건수가 많았다. 이러한 추세는 향후 CRISPR기술을 이용한 식물의 발달, 구조, 생식 등 다양한 세포, 생화학적 기능을 해석하는 연구 추세가 급

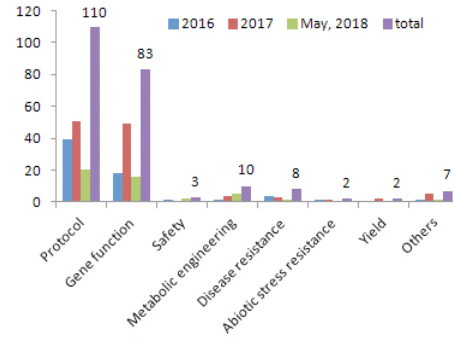


Fig. 3 Publication numbers of CRISPR/Cas9 genome edited plants by their purpose and practical application. Publications were included in the PubMed database

격하게 증가할 것으로 예측할 수 있다. 그 다음은 농업적으로 유용한 형질을 도입하여 향후 실용화 또는 상업화를 목적으로 한 연구로서 구체적으로 보면 유용단백질 또는 물질의 생산을 위한 대사공학연구건수가 10건, 병 저항성 작물 개발에 관한 연구가 8건, 가뭄 등의 환경스트레스 저항성이 2건, 수량증대와 관련된 연구건수가 2건, 그리고 화색변경, 저장수명 연장, 단위결실 등에 관련된 기타건수가 7건이 발표되었다. 이들은 연도별로 증가하는 추세를 나타내었다(Fig. 3).

CRISPR기술을 이용한 실용화 작물 개발 연구현황

Figure 3에서 언급한 농업적 실용화를 목표로 한 연구논문들을 작물별로 target 유전자, 개량된 작물의 농업적 형질 등에 관하여 심도 있게 조사한 결과를 Table 1에 요약하였으며 개별 논문에 대한 주요 결과를 보면 다음과 같다.

유용단백질 또는 물질의 생산을 위한 대사공학 작물 개발

대사공학 기술을 이용한 지방산 조성을 변경한 작물들은 이미 RNAi기술 등 기존의 유전자변형기술로 개발되어 상업화된 이벤트가 많이 있다. CRISPR유전자편집기술을 이용한 지방산 조성변경에 관한 연구 역시 쌀(Abe et al. 2018), *Camelina sativa*, *Arabidopsis* (Jiang et al. 2017), *Brassica napus* (Okuzaki et al. 2018) 등 4종류의 작물에 대하여 FAD유전자를 knock-out 시킨 결과들이 발표되었다. 보다 구체적으로 보면 쌀의 *OsFAD2-1* 유전자를 knock-out시켜 쌀겨(rice bran)에 oleic acid 함량이 높고 linoleic acid 함량이 낮은 계통에 관한 연구, 애기장대와 유류작물인 *Camelina sativa* 종자에 oleic acid 함량이 16에서 50%까지 증가하고 linoleic acid 와 linolenic acid 함량은 상대적으로 그만 큼 감소한 계통에 관한 연구, 그리고 유채(*Brassica napus* cv. Westar)의 경우에도 FAD2유전자에 대한 편집기술을 통하여 oleic acid 함량이 현저하게 증가한 연구 결과들이 발표되었다.

이와 함께 카로티노이드 또는 플라보노이드 화합물 등의

Table 1 Research articles on development of CRISPR gene edited crops for practical application in agriculture

	Crop	Target gene	Trait	Reference
Metabolic engineering	Rice	<i>FAD2</i>	High oleic acid	Abe et al. 2018
	<i>Camelina sativa</i>	<i>FAD2</i>	High oleic acid	Jiang et al. 2017
	<i>Brassica napus</i>	<i>FAD2a</i>	High oleic acid	Okuzaki et al. 2018
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>CpFTSY</i> <i>ZEP</i>	High Zeaxanthin, photosynthetic activity	Baek et al. 2016
	Tomato	<i>SLMYB12</i>	Pink-fruited tomato	Deng et al. 2018
	Tomato	<i>LCY-E</i>	High lycopene	Li et al. 2018a
	Tomato	<i>SlySSAD</i>	High GABA	Li et al. 2018b
	Wheat	<i>a-gliadin</i>	Low gluten	Sánchez-León et al. 2018
	Rice	<i>SBEI</i> , <i>EIIb</i>	High amylose	Sun et al. 2017
	Tobacco cell	<i>XylT</i> , <i>FucT</i>	Biotherapeutic proteins	Hanania et al. 2017
Disease resistance	Cucumber	<i>eIF4E</i>	Virus resistance	Chandrasekaran et al. 2016
	Arabidopsis	<i>eIF(iso)4E</i>	Potyvirus	Pyott et al. 2016
	Rice	<i>eIF4G</i>	Rice tungro spherical virus	Macovei et al. 2018
	<i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>Arabidopsis</i>	<i>3'-UTR of CMV</i>	CMV or TMV	Zhang et al. 2018
	Rice	<i>OsERF922</i>	Rice blast disease	Wang et al. 2016
	Citrus	<i>CsLOB1</i>	Citrus canker	Jia et al. 2017
	Citrus	<i>CsLOB1 promoter</i>	Citrus canker	Peng et al. 2017
	Grape, apple	<i>MLO-7</i> , <i>DIPM</i>	Powdery mildew fire blight disease	Malnoy et al. 2016
Abiotic stress resistance	Arabidopsis	<i>OST2</i>	Enhanced stomatal response	Osakabe et al. 2016
	Maize	<i>ARGOS8</i>	Draught stress resistance	Shi et al. 2017
Yield	Tomato	<i>J2</i> , <i>EJ2</i> , <i>SEP4</i>	Higher yielding hybrids	Soyk et al. 2017a
	Tomato	<i>SELF-PRUNING 5G (SP5G)</i>	Early flowering and yield	Soyk et al. 2017b
Others	Tomato	<i>SIWUSCARG</i> , <i>SICLV3</i> , <i>S</i>	Fruit size, branching, etc	Rodríguez-Leal et al. 2017
	Tomato	<i>SIIAA9</i>	Parthenocarpic	Ueta et al. 2017
	Tomato	<i>SLALC</i>	Long-shelf life	Yu et al. 2017
	Japanese morning glory	<i>DFR-B</i>	Flower color changes	Watanabe et al. 2017
	Japanese morning glory	<i>EPHEMERAL1</i>	Delay in petal senescence	Shibuya et al. 2018
	Rice	<i>TGMS</i>	Breeding hybrids	Zhou et al. 2016
	<i>Brassica napus</i>	<i>ALCATRAZ (ALC)</i>	Shatter resistance	Braatz et al. 2017

축적을 유도하기 위하여 CRISPR 기술을 적용한 연구 논문도 발표되기 시작하였다. Baek 등(2016)은 미세조류인 *Chlamydomonas reinhardtii*를 대상으로 *CpFTSY*와 *ZEP* 유전자를 동시에 knock-out시킨 결과 zeaxanthin의 지속적 집적과 함께 광합성 효율이 증진된 DNA-free 계통을 개발하였다고 보고하였으며, 특히 이는 기존의 유전자 변형 생물체 안전 관리 대상에서 제외될 수 있을 것이라고 전망하며 향후 미세조류를 이용한 제약, 기능성 식품, 동물 사료 등의 생산에 응용될 수 있

을 것이라고 하였다. 또한 Li 등(2018a)도 stay green 1(*SGR1*), lycopene ϵ -cyclase (*LCY-E*), beta-lycopene cyclase(*Blc*), lycopene b-cyclase 1 (*LCY-B1*), *LCY-B2* 등 5종의 유전자에 대하여 CRISPR/Cas9 multiplex genome editing을 도입한 결과 과실에 lycopene의 함량이 대조구에 비하여 5.1배까지 증대된 토마토 계통을 개발하였다. 그리고 토마토의 *SlyGABA-TP1*, *SlyGABA-TP2*, *SlyGABA-TP3*, *SlyCAT9*, *SlySSADH* 등 5종의 유전자에 대하여 역시 유사한 CRISPR/Cas9 multiplex genome editing 기술로 유

전자 편집을 수행한 결과 4종의 유전자에 동시에 knock-out 이 일어난 토마토의 잎에서 GABA의 함량이 19배 이상 증가된 결과를 발표하였다(Li et al. 2018b).

또한 Deng 등(2018)은 플라보노이드의 생합성대사에 관여하는 전사인자인 *SIMYB12* 유전자를 target로 하여 첫째 엑손 부위에 약간 긴 단편의 결실이 일어나도록 다지인한 CRISPR-Cas9 시스템을 도입하여 유전자편집을 시도한 결과 크고 작은 결실이 일어난 것을 확인하였으며 가장 긴 경우 약 83bp가 결실된 것을 확인하였다. 이들 토마토 과실은 *SIMYB12* 전사인자가 플라보노이드의 합성에 관여하는 *CHS1* 과 *CHS2* 유전자의 발현을 억제하여 yellow-colored flavonoid 인 naringenin chalcone의 축적이 감소되어 결국 토마토 과실은 pink색을 나타내었다고 하였다. 핑크색 토마토는 아시아인 특히 중국과 일본인들이 선호하는 계통으로 알려져 있으나(Lin et al. 2014), 전통 육종기술로는 5년 이상의 장시간이 소요되어 많은 어려움이 있었다. 본 연구는 유전육종학자들에 의하여 핑크색 토마토는 노란색인 naringenin chalcone이 축적되지 않은 결과이며 이는 Y유전자 즉 R2R3-MYB 전사인자를 암호하는 유전자가 knock-out된 결과라는 것이 밝혀졌기 때문에 가능하였다.

Sánchez-León 등(2018)은 제빵용 밀가루 반죽의 탄력적인 물성을 유지하여 주는 글루텐 단백질의 함량을 감소시킨 밀 계통을 개발하였다. 밀의 글루텐은 일부 민감한 사람에게만 만성 소화장애(coeliac disease)를 유발하기 때문에 이들은 밀가루 음식은 피하여야 한다. 연구자들은 글루텐 단백질의 주성분인 α -gliadins은 약 100여종의 유전자에 의하여 암호되어 있으며 이중 coeliac disease 증상에 주요한 immunodominant로 작용하는 것으로 알려진 33-mer 펩타이드를 목표로 하여 CRISPR 유전자편집을 시도한 결과 21개체에서 다양한 유전자에 돌연변이가 유발된 것을 확인하였으며 모든 개체가 낮은 α -gliadins 함량과 함께 면역반응도 85%이하의 수준으로 감소되었다고 하였다. 뿐만 아니라 이들도 “transgene free” 계통이어서 당연히 기존의 유전자변형작물에 해당하지 않는다고 주장하였다. 또한 Sun 등(2017)은 CRISPR/Cas9 기술을 이용하여 벼의 starch branching 효소 유전자인 *SEB1* 과 *SEB1b* 에 돌연변이가 일어나도록 유전자편집을 수행한 결과 아밀로스 함량이 대조구에 비하여 25%까지 현저하게 증가된 결과를 보고하였다. 아밀로스 함량이 증가된 쌀은 당뇨, 심장병, 직장암 등의 성인병 및 다이어트에 도움이 된다고 한다.

그리고 식물세포의 당단백질은 동물에는 존재하지 않는 독특한 $\alpha(1,3)$ -fucose와 $\beta(1,2)$ -xylose을 부가적으로 부착시킨 N-linked glycans을 생산한다(Tekoah et al. 2015). 따라서 식물세포를 이용하여 동물과 유사한 당단백질의 생산을 위하여 RNAi 기술 등을 이용하여 부가적인 당쇄사슬을 제거하는 연구가 많이 진행되어 왔다(Matsumura 2010). 이러한 연구목적에 따라 Hanania 등(2017)은 담배 현탁세포(BY2)의 $\beta(1,2)$ -xylosyltransferase (*XylT*)와 $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase (*FucT*) 유전

자에 대한 gene editing을 시도한 결과 N-linked $\beta(1,2)$ -xylose와 $\alpha(1,3)$ -fucose 잔기가 없는 당단백질을 확인하였다.

병저항성 작물 개발

주요 작물의 병·해충에 의한 피해규모는 해마다 증가하고 있다. 따라서 CRISPR 기술을 이용한 저항성 작물 개발에 관한 연구 논문도 지속적으로 발표되고 있다. 지난 2016년부터 발표된 논문들을 조사하여 보면 바이러스저항성에 관한 연구 건수가 4건, 벼 도열병(1), 감귤궤양병(2), 포도의 흰가루병(powdery mildew disease)과 사과의 화상병(fire blight disease) (1) 등이 발표된 것으로 조사되었다. 바이러스저항성 작물을 개발하기 위한 target 유전자의 하나로 단백질 생합성 과정에 관여하는 eukaryotic translation initiation factor를 암호하는 오이의 *eIF4E* 유전자에 대한 유전자편집 기술로 최초로 바이러스 저항성 작물이 보고되었다(Chandrasekaran et al. 2016). CRISPR-Cas9 시스템을 이용하여 eIF4E 단백질의 N-말단과 C-말단에 유전자편집이 일어나도록 디자인하여 도입한 결과 작은 크기의 결실 또는 단일염기의 삽입과 결실이 나타났으며, N-말단과 C-말단에 모두 유전자편집이 일어난 homozygous T3 세대를 선발하여 병저항성 검정을 하여 본 결과 *Cucumber vein yellowing virus (Ipomovirus)*, *potyviruses Zucchini yellow mosaic virus*, *Papaya ring spot mosaic virus-W*에 대하여 immunity 또는 저항성을 보였다고 하였다.

또한 Pyott 등(2016)은 potyvirus의 ‘VPg’ (viral protein genome-linked) 단백질이 숙주세포의 단백질번역 시스템을 점령하는 데 관여하며 숙주세포의 전령 RNA는 *eIF4E* 또는 *eIF(iso)4E* 인자 중 어느 하나에 결합하여 번역을 진행 시킬 수 있지만 potyvirus는 종에 따라 두 가지 인자 중 어느 하나에만 결합한다. 즉 Turnip mosaic virus (TuMV)의 경우 VPg 단백질이 애기장대의 *eIF(iso)4E*에만 특이적으로 결합하여 단백질합성을 진행한다는 것을 확인하였으며(Wittmann et al. 1997), 이후 *eIF(iso)4E* 돌연변이체들은 TuMV 바이러스에 저항성을 나타냄을 확인하여 이러한 사실을 증명하였다(Duprat et al. 2002; Lellis et al. 2002; Sato et al. 2005). 이러한 기존의 생리학적, 유전육종학적 연구결과를 바탕으로 Pyott 등(2016)은 CRISPR 기술을 적용하여 애기장대의 *eIF(iso)4E* 유전자 편집을 수행하여 TuMV에 완전한 저항성(complete resistance) 계통을 확인하였다. Macovei 등(2018)도 이와 유사하게 벼의 Rice tungro disease (RTD)를 유발하는 *Rice tungro spherical virus (RTSV)*와 *Rice tungro bacilliform virus*에 대한 저항성을 계통을 개발하기 위하여 RTSV에 감수성이며 아시아지역에서 많이 재배되고 있는 IR64 품종을 대상으로 *eIF4G* 유전자에 CRISPR-Cas9 유전자편집을 시도하여 저항성 계통을 확인하였다. 특이한 사항은 RTSV에 저항성과 감수성인 계통에 대한 단일염기다형성을 비교하여 YVY 아미노산 잔기에 결실 또는 치환 등의 돌연변이가 일어나 homozygous recessive

이면 저항성을 나타낸다는 사실이 이미 그 이전에 보고되었으며(Lee et al. 2010b), CRISPR-Cas9으로 유전자편집을 한 여섯은 다양한 개체들 중에서 YVV잔기와 인접한 SVLF-PNLAKS잔기에 돌연변이가 일어난 계통들에 한하여 저항성을 보였다고 하였다(Macovei et al. 2018). 바이러스 저항성 계통을 개발하기 위한 또 다른 접근 방법은 바이러스의 게놈 내 유전자를 knock-out시키는 방법이다. Zhang 등(2018)은 cucumber mosaic virus와 tobacco mosaic virus의 open reading frame이나 3'-말단의 비번역부위(UTR)에 존재하는 22개의 목표를 정하여 제작한 CRISPR-Cas9 시스템을 이용하여 애기장대와 담배에 유전자편집을 시도한 결과 동 바이러스의 감염에 대하여 현저하게 저항성이 증진되었음을 확인하였다.

세균이나 곰팡이병에 대한 저항성작물의 개발 연구 또한 활발하게 진행되고 있다. Wang 등(2016)은 벼의 ethylene responsive factors (ERF)를 암호 하는 유전자인 *OsERF922*에 대하여 CRISPR 유전자편집을 시도한 결과 삽입 또는 결실의 돌연변이체를 확보하였으며 이들의 후대교배육종을 통하여 transgene-free homozygous recessive 계통들을 선발한 후 도열병에 현저한 저항성을 보이는 계통들을 확인하였다. 또한 감귤궤양병(citrus canker)에 대하여 저항성 계통을 개발하기 위하여 Peng 등(2017)은 숙주 내 감수성 유전자(*CsLBO1*)의 프로모터 부위 그리고 Jia 등(2017)은 *CsLBO1* 유전자의 coding region을 각각 target로 하여 CRISPR 유전자편집 기술을 적용하여 저항성 계통을 개발하였다. 전자의 경우에는 *CsLBO1* 유전자의 프로모터 부위에 존재하는 effector binding element (*EBE_{PthA4}*)에 돌연변이를 유발하였기 때문에 병원균인 *Xanthomonas*가 생산하는 effector 역할을 하는 PthA4가 인식을 하지 못하여 감수성 유전자인 *CsLOB1* 유전자의 발현을 활성화하지 못하여 저항성을 보이는 경우에 해당한다. 그리고 후자의 경우에는 *CsLBO1* 유전자의 coding region 역시 병 저항성에 knock-out 될 경우 저항성을 나타낸 것을 증명하는 경우로 향후 식물-병 상호반응에 관여하는 수많은 작물 병의 방제에 응용이 될 수 있을 것으로 전망한다. Malnoy 등(2016)은 과수인 포도와 사과에 CRISPR 기술을 이용한 유전자편집 연구결과를 발표하였다. 저자들은 포도의 흰가루병(powdery mildew disease)을 일으키는 *Erysiphe necator*에 감수성인 유전자인 *MLO-7* 그리고 사과의 화상병을 일으키는 *Erwinia amylovora*에 감수성 유전자인 *DIPM-1*, *DIPM-2*, *DIPM-4*를 target로 각각 포도와 사과의 원형질체를 이용하여 CRISPR 유전자편집을 시도한 결과 성공적인 삽입 및 결실을 확인하였으며 향후 재분화식물체의 확보와 함께 병저항성 검정 등의 후속 연구결과가 기대된다.

무생물적 환경스트레스 저항성 작물 개발

Osakabe 등(2016)은 애기장대에서 엽록체의 stomata반응에 주요한 *OPEN STOMATA 2 (OST2) (AHA1)* 유전자를 target로

CRISPR유전자편집을 시도하여 가뭄 등의 환경 스트레스 내성 작물의 개발 가능성을 제시하였다. 애기장대에는 현재 11종의 plasma membrane H^+ -ATPase(AHA1-AHA11)가 알려져 있으며 세포질에 존재하는 N-말단과 C-말단, transmembrane 영역, nucleotide-binding영역으로 구성되어 있다. 사전 연구에 의하면 *OST2* 유전자에 돌연변이가 일어난 경우 스토마타가 ABA에 반응을 못하게 하여 지속적인 양성자(H^+)의 펌프가 유지되도록 한다고 알려져 있다(Merlot et al. 2007). Osakabe 등(2016)은 애기장대의 *OST2* 유전자를 target로 하고, Cas9핵산가수분해효소가 조직 특이적으로 발현되도록 디자인한 시스템을 사용하여 유전자편집을 수행한 결과 스토마타의 기능이 증진된 계통을 확인하였다. 또한 Shi 등(2017)은 가뭄에 강한 내한발 옥수수를 개발하기 위하여 에틸렌 생합성에 관여하는 *ARGOS8* 유전자의 발현양이 조직 특이적이고 절대적으로 낮아 이 유전자의 프로모터를 모든 조직과 모든 발달 시기에 발현양이 보다 높은 *GOS2* 유전자의 프로모터와 교체하기 위하여 DNA수선을 위한 주형가닥 즉 공여 DNA분자의 양쪽에 homology arm을 두고 *GOS2* 유전자의 프로모터 단편을 포함하도록 하여 HDR기작을 이용한 CRISPR유전자편집을 시도하였다. 다양한 유전자편집 옥수수 계통의 포장시험 결과 개화기에 가뭄스트레스를 준 경우에도 에이커 당 5 bushels까지 수확량이 증대한 계통을 확인하였다. 이 경우는 공여 DNA를 사용하여 400 bp에 해당하는 *GOS2* 유전자의 프로모터를 *ARGOS8* 유전자의 프로모터에 삽입하거나 치환한 경우에 해당한다.

작물의 수량증대 연구

Soyk 등(2017a)은 토마토의 *J2 (jointless)*, *EJ2 (enhancer-of-jointless2)*, *S(compound inflorescence 2) allele*를 target로 하여 CRISPR유전자편집기술을 적용하여 얻은 다양한 계통들 중 기존의 상업용품종과 비교하여 화서가지(inflorescence branching)가 적당하게 유지되어 착과수의 증가에 따른 현저한 수량증대효과를 확인하였다. 이 연구결과는 토마토 육종학자들이 지난 오랜 세월동안 경작에 알맞고 소비자가 선호하는 계통을 육성하기 위한 육종과정에서 원하지 않는 형질의 축적 때문에 오히려 수량이 감소되는 역효과에 대한 원인을 CRISPR 편집기술로 해결한 쾌거라고 할 수 있다. 토마토 과일은 성숙되면서 식물체로부터 쉽게 떨어질 수 있도록 하는 꽃자루 절단 부위(pediceal abscission zone)가 있어 꽃자루 부위에 볼트 모양으로 약간 튀어나온 조직이 있다. 이 조직 때문에 토마토의 기계수확이 어렵고 인력으로 수확을 하더라도 꼭지가 남아 수확 후 포장 및 운송과정에서 과실에 손상을 주어 품질을 떨어뜨린다(Rick and Butler 1956; Reynard 1961). 따라서 전통교배육종에 의하여 homozygous *j2 (jointless)* 돌연변이체로 이 조직이 없는 계통을 선호한다. 그러나 전통 교배육종 방법에 의하여 jointless형질을 다른 재배종에 도입하고자 할

경우에 과다한 화서가지(inflorescence branching)의 생성으로 인한 수확량 감소 등의 문제점이 발견되었다(Robinson 1980).

Soyk 등(2017a)은 이러한 부의 상위작용(negative epistasis) 현상을 분자생물학적으로 밝히기 위하여 수천 점에 달하는 재배용 토마토 품종과 야생종 등을 총 망라하여 유전육종 분석과 염기서열 분석 결과를 비교 조사하여 *enhancer-of-jointless2 (ej2)*의 locus를 확인 하였으며 유전자편집기술로 *J2*와 *EJ2*는 MADS-box유전자인 *SEPALLATA4 (SEP4)* family에 속한다는 사실을 밝혔다. 뿐만 아니라 제3, 제4의 *SEP4* family에 해당하는 *RIN*과 *LIN*유전자들을 확인하여 유전자편집기술을 적용하여 각각의 기능을 확인하였다. 이렇게 유전자 편집된 각각의 개체 간 교배를 통하여 각각의 유전자량(gene dosage) 비율이 적절하게 조합되어 수량이나 과일의 크기, 무게, 그리고 jointless특성을 보유한 토마토 계통을 확보하였다. 이러한 연구결과는 기존의 전통육종기술로 해결이 어려운 한계점을 최신 유전자편집기술로 해결한 경우로 전통육종전문가와 분자육종전문가와와의 협동에 의한 대표적인 성공사례라고 할 수 있겠다.

토마토의 육종에 또 다른 하나의 한계점은 일장에 따른 개화기 조절이다. 즉 재배지역에 따라 알맞은 광주기 반응을 하는 품종들을 육종하는데 한계가 있다. 따라서 Soyk 등(2017b)은 토마토의 *SELF-PRUNING 5G (SP5G)* 유전자의 첫 번째 exon 부위를 target로 하여 유전자편집을 시도한 결과 일장의 길이에 관계없이 조기개화를 하는 계통을 확인하였다. 저자들은 *SP5G* 유전자를 찾기 위하여 재배종 토마토 품종의 육종 모본인 야생종 즉 *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum cheesmaniae*, *Solanum galapagense*에 대한 수집 종을 대상으로 일장의 길이가 개화에 미치는 장일효과를 조사하였다. 그 결과 *S. galapagense*가 단일효과가 가장 높아서 단일 처리 하에 개화기가 빨랐으나 장일 처리 하에서는 개화기가 아주 늦은 것을 확인하였다. 따라서 *S. galapagense*와 재배종 토마토와의 교배조합 중 F₂ 집단을 장일 조건에서 재배한 후 조기에 개화하는 것과 개화기가 늦은 그룹별로 quantitative trait locus sequencing (QTL-seq)을 수행하여 단일염기다형성을 보이는 cDNA를 찾아 비교분석한 결과 개화기가 늦은 그룹에서 두 종류의 유전자, *SINGLE FLOWER TRUSS (SFT, encoding florigen)*와 이와 homolog인 *SP5G(Solyc05g053850)*를 찾았다. 저자들은 이미 기존에 개화 억제 기능을 보인 것으로 보고된 *SP5G* 유전자(Cao et al. 2016)에 대한 CRISPR 기술을 적용하여 성공적인 연구결과를 얻었다.

기타 실용화 연구

Rodríguez-Leal 등(2017)은 토마토를 대상으로 생산과 관련된 유전자들의 promoter를 target로 유전자편집을 시도하여 다양한 cis-regulatory 인자들의 돌연변이체조합을 제작하여

유용한 표현형 개체들을 선발하여 육종모본으로 이용하고자 하는 방대한 연구 방안을 제안하였다. 또한 Ueta 등(2017)은 토마토를 대상으로 단위결실의 조절에 핵심역할을 하는 *SIIA49* 유전자를 목표로 CRISPR-Cas9 유전자편집을 수행하여 얻은 재분화 식물체로부터 잎의 형태학적 특성이 변형이 되면서 종자가 없는 과실을 생산하는 즉 단위결실의 특성을 나타내는 개체를 확인하였다. 이 연구결과는 향후 다른 토마토 품종은 물론 다른 주요 원예작물의 단위결실 육종에 크게 이용될 것으로 전망한다. 또한 토마토의 경우 수확 후 저장기간에 신선도가 떨어지면서 품질이 저하되는 저장성이 큰 문제가 되고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 Yu 등(2017)은 토마토의 *ALC* 유전자를 target로 하여 단 하나의 염기만을 변경하기 위하여 NHEJ와 HDR 기작을 이용한 방법으로 유전자편집을 시도하여 수확 후 저장성이 아주 우수한 계통을 선발하였다.

이 외에도 관상용 화훼작물의 하나인 Japanese morning glory *Ipomoea (Pharbitis) nil*을 대상으로 Watanabe 등(2017)은 안토시아닌 생합성 대사에 관여하는 *dihydroflavonol-4-reductase-B (DFR-B)* 유전자를 target로 하여 유전자편집을 시도한 결과 조직배양과정 중에 식물체의 줄기의 색이 이미 변화된 것을 확인할 수 있었으며 이들 재분화 식물체로부터 핀 꽃은 안토시아닌의 함량이 낮거나 없어 흰색이나 보라색이 열리는 쪽으로 변화되었다. 저자들은 이 연구결과는 CRISPR 유전자편집기술로 화색을 변형시킨 최초의 연구결과라고 하였다. 또한 Shibuya 등(2018)은 Japanese morning glory의 *EPHEMERAL1 (EPHI)(NAC)* 전사인자로 꽃잎의 노화에 관여하는 핵심 조절인자를 target로 3가지 영역에 대하여 동시에 유전자편집을 수행한 결과 다양한 단일 염기의 결실 또는 삽입이 일어난 개체들을 확인하였으며 노화가 현저하게 지연됨을 확인하였다.

웅성불임계통은 잡종 벼(F1 hybrid)를 생산하는데 아주 중요한 역할을 한다. 그러나 벼의 경우에는 현재까지 알려진 웅성불임계통이 많지 않아 잡종을 육종하는데 많은 어려움이 있다. Zhou 등(2016)은 벼의 thermo-sensitive male sterility (TGMS)에 관여하는 것으로 알려진 *TMS5* 유전자를 target로 하여 유전자편집을 수행하여 11종의 상업적으로 유용한 “transgene clean” TGMS 계통을 단 1년 만에 선발할 수 있었다. 이러한 접근 방법으로 향후 웅성불임계통을 이용한 잡종 벼 품종 생산에 크게 응용될 것으로 기대된다. Braatz 등(2017)은 유체의 종자 탈립저항성을 증진시키기 위하여 2종의 *ALCATRAZ(ALC)* homoeologs를 target로 유전자편집을 수행하였다. T₀개체들의 후대교배육종으로 transgene-free homozygous knock-out line을 확보한 후 탈립성을 조사한 결과 대조 구에 비하여 저항성이 현저하게 증가한 것을 확인하였다. 이 연구결과 역시 향후 다른 우수 유체 재배종뿐만 아니라 수확하기 전에 종자가 탈립하는 경향이 강하여 손실을 가져오는 다른 작물에도 활용이 가능할 것으로 전망된다.

미국농무성의 CRISPR유전자편집작물의 승인 현황 및 향후 실용화전망

미국은 CRISPR기술 등 SDN기술이 적용된 작물들 중 특히 외래 유전자단편이 존재하지 않는 ‘transgene free’ 작물들은 유전자변형작물에 포함하지 않으므로 안전성 심사과정에서 제외된다. 이들은 미국 농무성(USDA)의 동·식물검역소 (APHIS)의 홈페이지에 개설된 “Am I regulated? process 프로그램”을 통하여 실험과정 또는 개발과정에 대하여 자료를 제출하고 심의를 받고 자문을 통하여 안전성 심사과정에서 제외될 수 있다. 이렇게 하여 허가를 받은 이벤트들은 USDA의 Animal and Plant Health Inspection Service; recorded under Regulated Letters of Enquiry (under 7 CFR part 340), <https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/biotechnology/am-i-regulated>에 업데이트 된다. Table 2는 2016년부터 2018년 5월 현재까지의 자료 중 CRISPR기술이 적용된 작물들만 요약하였다.

플로리다대학교는 토마토의 *J2* 유전자에 대한 편집기술로 만든 과일의 기계수확이 용이하고 꼭지가 남아 있지 않아 운송 과정에서 상처가 나지 않도록 제작한 계통을 개발하여 등록하였다. DuPont Pioneer 회사는 Northern leaf blight (NLB)에 저항성을 갖도록 옥수수의 *NLB18* 유전자편집을 시도한

계통과 *waxy* gene에 대한 유전자편집을 시도하여 아밀로펙틴전분만 함유한 찰옥수수를 등록하였다. USDA-ARS는 이중나선 RNA 결합단백질을 암호하는 *Drb2a*와 *Drb2b* 유전자 편집으로 제작한 내한발성 콩을 등록하였다. Yield 10 Bioscience 회사는 *Fatty Acid Desaturase (FAD)* 유전자 편집으로 올레인산 고 함유 아마(*flax*)를 등록하였으며, Donald Danforth Plant Science Center는 옥수수 *ID1* 유전자의 homolog를 target로 하여 유전자편집을 시도하여 개화기를 지연시킨 *Setaria viridis*를 등록하였다. 그리고 펜실베이니아 대학교에서는 *polyphenol oxidase* gene을 목표로 유전자편집기술을 통하여 수확 후 상처를 받아도 갈변이 되지 않는 버섯을 등록하였다. 그러나 등록된 작물들에 대한 제작 방법 및 관련 유전자 등에 대한 상세한 정보는 대부분의 자료가 기업비밀로 처리되어 있어 자세하게 제작 방법이나 기술들을 확인하는데 어려움이 많았다. 따라서 이들 작물들이 SDN-1, SDN-2, SDN-3 중 어느 부류에 속하는지는 판단하기가 어려웠다. 다만 외래유전자가 숙주식물에 남아 있지 않는 ‘transgene free’에 국한하여 허가를 한다는 정의에 따라 대부분이 SDN-1일 것이라고 추측은 가능하나 정확한 자료를 조사하기 전에는 판단하기 어렵다.

한편 Table 2에 등록된 유전자편집 작물들은 미국에서는

Table 2 Approved gene edited crops with CRISPR technology reported in the databases of USDA since 2016

Crops	Characteristics	Targeted locus	Applicants	Date
Tomato	No remained portion of the stem (pedicel) attached to the fruit,	<i>JOINTLESS 2, (J2)</i>	Univ. of Florida	May 2018
Maize	Northern leaf blight (NLB) disease resistance	<i>NLB 18</i>	DuPont Pioneer	Jan. 2018
Soybean	Enhanced drought tolerance	Double stranded RNA-binding protein (<i>Drb2a</i> and <i>Drb2b</i>)	USDA-ARS	Oct. 2017
Flax (<i>Camelina sativa</i> L.	High oleic acid content	Fatty acid desaturase gene	Yield 10 Bioscience	Aug. 2017
<i>Setaria viridis</i>	Delayed flowering time	Homolog of the <i>Zea mays ID1</i> gene	Donald Danforth Plant Science Center	April 2017
Maize	Waxy corn, with the starch composed exclusively of amylopectin	Waxy gene (<i>Wx 1</i>)	DuPont Pioneer	April 2016
Mushroom	Anti-browning	<i>Polyphenol oxidase</i> gene	Pennsylvania State Univ.	April 2016

승인을 받았다 하더라도 다른 국가에 수출을 하고자 할 경우에는 Biosafety Protocol에서 규정한 사전통보원칙과 자국의 유전자변형생물체 안전관리규정에 따라 수입여부를 결정할 수 있기 때문에 사실상 수입국의 안전관리규정에 따라 승인여부가 결정된다. 현재 EU국가 등을 중심으로 우리나라를 포함하여 다른 여러 국가들이 기존의 유전자변형생물체 안전관리 규정의 개정작업이 진행 중이며 유전자편집 작물이 기존의 유전자변형생물체에 포함되는지의 여부에 대한 찬반 논란이 팽팽한 상태이기 때문에 향후 그 추이가 주목되고 있다.

하지만 실용화를 위한 다양한 유전자편집 작물들이 지속적으로 발표되고 있으며 연구의 진척속도는 점점 가속화되고 있기 때문에 조만간에 포장시험을 포함한 안전성평가 시험까지 완료한 작물들의 실용화 또는 상업화 추진 건수가 많아 질 것으로 전망된다. 최근에는 Chemical & Engineering News (2017년 6월호)와 Food & Nutrition (2018년 3월호)에서 식품으로서 상업화가 임박한 유전자편집 작물들을 보도한 바 있다. 이들 작물들을 보면 갈변이 안되는 벼, 흰가루병 저항성 밀, 가뭄저항성 옥수수, 궤양병 저항성 감귤(citrus), 풍미가 우수한 토마토, 곰팡이병저항성 바나나 등을 발표하였다. 그러나 면밀히 분석한 결과 벼, 밀, 옥수수, 감귤은 본 논문의 실용화연구사례(Table 1)와 미 농무성의 승인 현황(Table 2)에서 이미 언급한 것들이었으나 바나나와 토마토는 본 연구에서 조사한바 아직까지는 유전자 편집기술을 적용한 연구결과 또는 논문이 공식적으로 발표되지는 않은 것으로 확인되었다.

벼의 경우는 이미 언급한 바와 같이 *polyphenol oxidase* 유전자편집으로 수확한 벼에 상처를 가한 후 실온에 두어도 갈변이 되지 않는 것으로 이는 기존의 유전자변형작물 범주에 해당되지 않기 때문에 안전성 평가 대상이 아니라는 결론을 얻었다(Waltz 2016). 밀은 중국의 Institute of Genetics & Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences에서 개발한 것으로 *MILDEW-RESISTANCE LOCUS (MLO)*에 해당하는 homeoalleles에 동시다발적으로 돌연변이를 유발한 결과 흰가루병(powdery mildew disease)에 저항성인 계통이다(Wang et al. 2014). 옥수수는 DuPont Pioneer 회사에서 개발한 내한발성 계통으로 에틸렌 생합성에 관여하는 *ARGOS8* 유전자의 프로모터를 *GOS2* 유전자의 프로모터와 교체한 것으로 이미 Table 1에서 설명하였다(Shi et al. 2017). 또한 중국의 Chinese Academy of Agricultural Sciences, National Center for Citrus Variety Improvement, Citrus Research Institute, Southwest University 등의 공동연구로 개발한 감귤궤양병(citrus canker)계통으로 Table 1에서 이미 설명한 바와 같이 감수성 유전자(*CsLBO1*)의 프로모터 부위에 CRISPR 유전자편집을 도입한 것이다(Peng et al. 2017).

그리고 토마토의 경우에는 풍미가 우수한 계통을 개발하기 위한 로드맵은 발표되었으나(Tieman et al. 2017) 아직까

지 유전자편집기술이 적용된 논문이나 자료들은 확인할 수 없었다. 이 로드맵은 중국(Chinese Academy of Sciences), 미국(플로리다 대학교), 스페인(Instituto de Biología Molecular Celular de Plantas), 이스라엘(히브리대학교) 등으로 구성된 국제공동연구 팀이 발표한 것으로 전 세계적으로 398여종의 상업용과 오랫동안 자가 채종으로 유지하여 온 계통 및 야생종 계통을 수집하여 조사한 결과 현재의 상업용 계통에는 거의 존재하지 않거나 사라져 버린 *guaiacol*, *methyl salicylate* 등을 포함한 13종의 향기성분을 확인하였으며 이들의 생합성 대사에 관여하는 유전자들을 확인하였다. 뿐만 아니라 현재까지 토마토의 육종 목표인 대과계통을 육성하기 위한 육종과정을 거치면서 토마토 과실내 당의 함량이 감소되는 결과를 초래하였다는 사실을 확인하였다. 이들 저자들은 향후 이러한 연구결과를 바탕으로 확인된 유전자들을 target로 CRISPR 유전자편집기술을 적용하면 풍미가 우수한 새로운 계통을 조기에 개발할 수 있을 것이라고 로드맵을 제시하였다.

결론

유전자편집기술은 1세대 기술인 ZFN, 2세대인 TALENs 그리고 3세대인 CRISPR 기술까지 발전되었다. 이러한 기술의 발전은 보다 정교하고 ‘off-target’는 최소화하고 ‘transgene free’한 생물체를 개발하여 기존의 유전자변형생물체의 규정에서 정하는 범주에 속하지 않는 유전자편집 생물체를 개발하는 것이 목적이다. 이러한 유전자편집기술로 제작한 ‘transgene free’작물의 개발 건수가 해마다 증가하고 있으며 조만간 미국을 중심으로 한 작물들이 국제곡물 시장에 출시될 것으로 전망된다. 특히 향후 몇 년간 SDN-1과 SDN-2에 해당하는 작물들의 개발이 집중될 것으로 예상된다.

우리나라도 이러한 추세에 대비하여 유전자편집 작물 연구단 또는 협의체 등의 설립이 필요하다고 하겠다. 본 연구단은 첫째, 작물별 유전자편집기술의 적용을 위한 기초기술들로서 원형질체, 캘러스, 현탁세포, 종자 등에 적용하기 위한 기초연구, HDR 또는 NHEJ의 효율성연구, ‘off-target’를 줄이기 위한 최적조건 연구, 유전자편집에 필요한 재조합 DNA 또는 RNA 운반체의 식물체 조직 내 도입 방법, 도입 운반체의 발현 조절 및 후대 안정성에 관한 연구(조직 또는 식물 발달 시기별 발현 유도 등)에 집중하여야 할 것으로 사료된다. 둘째, 실용화를 위한 연구로 작물별 육종전문가들에 의한 육종목표 설정 또는 기존의 전통 육종기술로 해결할 수 없는 한계점 등에 관한 도전과제의 발굴이 필요하다. 본 연구에서 검토한 바와 같이 현재까지 개발된 수많은 재배종 또는 야생종 토마토의 육종 역사 및 품종별 문제점을 파악하고 이들 수집 중에 대한 유전육종 분석 결과와 negative epistasis 현상 등을 일으키는 유전자들에 대한 분석 등을 체계적으로 수행한 결과 수량이 증대된 토마토 계통 또는 개화

기 조절이 가능한 토마토 계통을 개발할 수 있었다. 마지막으로 유전자편집 작물에 대한 안전성 평가체계 구축이다. ‘off-target’의 확인방법, 다면발현효과에 의한 비의도적 형질 발현, 모본과 상이한 농업적 형질 및 특성 조사, 포장시험 등이 동시에 수행되어야 한다. 또한 관련 정부 행정담당 부처와 함께 안전관리 관련 규정의 개정작업도 서둘러야 할 것이다. EU국가 등을 중심으로 국제적인 동향을 파악하여야 하며 우리나라와 같은 주요 곡물 수입 국가들과 공조체제를 유지하는 것 또한 중요하다.

적 요

본 논문은 현재까지 개발된 유전자편집 기술들의 작용기작 및 장·단점 등을 비교하고 이들 기술로 개발된 유전자편집 (site-directed mutagenesis, SDN)작물들의 안전성 평가를 위한 분류 기준 등을 살펴보았다. 또한 2016년부터 2018년 5월 현재까지 발표된 유전자편집 식물 개발과 관련된 논문들을 조사하여 ZFN, TALENS, CRISPR기술별 발표 논문 추세를 조사한 결과 CRISPR기술을 적용한 연구건수가 절대적으로 많았다. 또한 애기장대와 벼를 대상으로 수행한 연구건수가 가장 많았으며, 담배와 토마토, 밀, 옥수수 등이 그 뒤를 이었다. 하지만 발표건수는 아직 1~2건에 해당하지만 대상 식물들은 주곡작물을 포함하여 화훼, 채소, 과수 등으로 다양하게 그 응용 범위가 확대되고 있는 것으로 조사되었다. 특히 실용화 또는 향후 상업화를 목표로 한 연구건수도 해마다 증가하는 추세에 있으며 그 응용 범위도 유용단백질 또는 물질의 대량생산을 위한 대사공학 연구와 바이러스, 세균, 곰팡이 등에 대한 병저항성 작물의 개발, 가뭄 등의 무생물적 환경스트레스 저항성 작물, 수량이 증대된 작물 등의 개발에 집중되었다. 이 외에도 단위결실 토마토, 웅성불임성 이용 hybrid벼, 탈립 저항성 증진 등으로 응용 범위가 점점 다양화되어 가고 있음을 알 수 있었다. 또한 미국 농무성의 동·식물 검역소에서 허가를 득한 CRISPR유전자편집 작물의 건수도 해마다 증가하여 조만간 이들이 국제 종자시장에 출시될 것으로 전망된다.

References

- Abe K, Araki E, Suzuki Y, Toki S, Saika H (2018) Production of high oleic/low linoleic rice by genome editing. *Plant Physiol Biochem pii: S0981-9428(18)30191-8*. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.04.033
- Bae S, Park J, Kim JS (2014) Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* 30:1473-1475
- Baek K, Kim DH, Jeong J, Sim SJ, Melis A, Kim JS, Jin ES, Bae S (2016) DNA-free two-gene knockout in *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Scientific Reports* 6:30620, DOI: 10.1038/srep30620
- Beetham PR, Kipp PB, Sawycky XL, Arntzen CJ, May GD (1999) A tool for functional plant genomics: Chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause *in vivo* gene-specific mutations. *Proc Nat Acad Sci USA* 96:8774-8778
- Braatz J, Harloff HJ, Mascher M, Stein N, Himmelbach A, Jung C (2017) CRISPR-Cas9 targeted mutagenesis leads to simultaneous modification of different homoeologous gene copies in polyploid oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Physiol* 174:935-942
- Butler NM, Baltus NJ, Voytas DF, Douches DS (2016) Geminivirus-mediated genome editing in potato (*Solanum tuberosum* L.) using sequence-specific nucleases. *Front Plant Sci* 7:1045-1058 doi: 10.3389/fpls.2016.01045
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-Type III effectors. *Science* 326:1509-1512
- Bogdanove AJ, Schornack S, Lahaye T (2010) TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr Opin Plant Biol* 13:394-401
- Cao K, Cui L, Zhou X, Ye L, Zou Z, Deng S (2016) Four tomato *FLOWERING LOCUS T*-like proteins act antagonistically to regulate floral initiation. *Front Plant Sci* 6:1213-1226
- Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman M, Sherman A, Aarazi T, Gal-On A (2016) Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol Plant Pathol* 17:1140-1153
- Chen K, Gao C (2013) TALENS: customizable molecular DNA scissors for genome engineering of plants. *J Genet Genomics* 40:271-279 doi: 10.1016/j.jgg.2013.03.009
- Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS (2013a) Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 31:230-232
- Cho SW, Lee J, Carroll D, Kim JS, Lee J (2013b) Heritable gene knockout in *Caenorhabditis elegans* by direct injection of Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *Genetics* 195:1177-1180
- Cornu TI, Thibodeau-Beganny S, Guh E, Alwin S, Eichinger M, Joung JK, Cathomen T (2008) DNA-binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases. *Molecular Therapy* 16:352-358
- Deng L, Wang H, Sun C, Li Q, Jiang H, Du M, Li CB (2018) Efficient generation of pink-fruited tomatoes using CRISPR/Cas9 system. *J Gen Genom* 45:51-54
- Dong C, Beetham P, Vincent K, Sharp P (2006) Oligonucleotide directed gene repair in wheat using a transient plasmid gene repair assay system. *Plant Cell Rep* 25:457-465
- Duprat A, Caranta C, Revers F, Menand B, Browning KS, Robaglia C (2002) The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (*iso*)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J* 32: 927-934
- EASAC (European Academies Science Advisory Council) (2015) Statement on new breeding techniques. <http://www.easac.eu/GGTSPU-styx2.jki.bund.de-6690-9894523-KsiSqGBHn>

- PfPgtq-DAT/fileadmin/PDF_s/reports_statements/Easac_14_NBT.pdf. Accessed on 16 Feb 2016
- EFSA Panel on genetically modified organisms (2012) Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using Zinc Finger Nuclease 3 and other site-directed nucleases with similar function. EFSA J. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2943
- Gabriel R, Lombardo A, Arens A, Miller JC, Genovese P, Kaepffel C, Nowrouzi A, Wang J, Friedman G, Holmes MC, Gregory PD, Glimm H, Schmidt M, Naldini L, von Kalle C (2011) Genome-wide determination of double-strand breaks reveals high specificity of zinc finger nucleases. Human Gene Therapy 21:1371–1371
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends Biotechnol 31:397–405 doi: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004
- Glover A (2013) Euractiv-Interview. <http://www.euractiv.com/science-policymaking/chief-eu-scientist-backs-damning-new-s-530693>. Accessed on 16 Feb 2016
- Hanania U, Ariel T, Tekoah Y, Fux L, Sheva M, Gubbay Y, Weiss M, Oz D, Azulay Y, Turbovski A, Forster Y, Shaaltiel Y (2017) Establishment of a tobacco BY2 cell line devoid of plant specific xylose and fucose as a platform for the production of biotherapeutic proteins. Plant Biotechnol J 15:1120–1129
- 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
- Heap B (2013) Europe should rethink its stance on GM crops. Nature 498:409
- Hilscher J, Burstmayr H, Stoger E (2017) Targeted modification of plant genomes for precision crop breeding. Biotechnol J 12:1–4 DOI 10.1002/biot.201600173
- Hu X, Meng X, Liu Q, Li J, Wang K (2018). Increasing the efficiency of CRISPR-Cas9-VQR precise genome editing in rice. Plant Biotechnol J 16:292–297 doi: 10.1111/pbi.12771
- Hyun Y, Kim J, Cho SW, Choi Y, Kim JS, Coupland G (2015) Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using dividing tissue-targeted RGEN of the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles. Planta 241:271–284
- 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
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A (1987) Nucleotide sequence of the IAP gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. J Bacteriol 169:5429–5433. doi: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987
- Jaganathan D, Ramasamy K, Sellamuthu G, Jayabalan S, Venkataraman G (2018) CRISPR for crop improvement: an update review. Front Plant Sci 9:985 doi: 10.3389/fpls.2018.00985
- Jansen, R, Embden JDV, Gaastra W, Schouls LM (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Mol Microbiol 43:1565–1575 doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x
- Jia H, Zhang Y, Orbovic V, Xu, White FF, Jones JB, Wang N (2017) Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. Plant Biotechnol J 15:817–823
- Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP (2013) Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. Nucleic Acids Res. 41: e188. doi:10.1093/nar/gkt780
- Jiang WZ, Henry IM, Lynagh PG, Comai L, Cahoon EB, Weeks DP (2017) Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR/Cas9 gene editing. Plant Biotechnol J 15:648–657
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337:816–821 doi: 10.1126/science.1225829
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. Science 318:648–651
- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. Proc Natl Acad Sci USA 93:1156–1160
- Kim H, Kim ST, Ryu J, Kang BC, Kim JS, Kim SG (2016) CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. Nat Commun 8:14406, doi:10.1038/ncomms14406
- Kochevenko A, Willmitzer L (2003) Chimeric RNA/DNA oligonucleotide based site-specific modification of the tobacco acetolactate synthase gene. Plant Physiol 132:174–184
- Laity JH, Lee BM, Wright PE (2001) Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. Curr Opin Struc Bio 11:39–46
- Lee HJ, Kim E, Kim JS (2010a) Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. Gen Res 20:81–89
- Lee JH, Muhsin M, Atienza GA, Kwak DY, Kim SM, De Leon TB, Angeles ER, Coloquio E, Kondoh H, Satoh K, Cabunagan RC, Cabauatan PQ, Kikuchi S, Leung H, Choi IR (2010b) Single nucleotide polymorphisms in a gene for translation initiation factor (*eIF4G*) of rice (*Oryza sativa*) associated with resistance to rice tungro spherical virus. Mol Plant-Microbe Interact 23:29–38
- Lee HJ, Kweon J, Kim E, Kim SJ, Kim JS (2012) Targeted chromosomal duplications and inversions in the human genome using zinc finger nucleases. Gen Res 22:539–548
- Lellis AD, Kasschau KD, Whitham SA, Carrington JC (2002) Loss-of susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for *eIF(iso)4E* during Potyvirus infection. Curr Biol 12:1046–1051
- Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B (2012) High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. Nat Biotechnol 30:390–392
- Li X, Wang Y, Chen S, Tian H, Fu D, Zhu B, Luo Y, Zhu H (2018a) Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. Front Plant Sci 9:559–571 doi: 10.3389/fpls.2018.00559
- Li R, Li R, Li X, Fu D, Zhu B, Tian H, Luo Y, Zhu H (2018b) Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering

- of c-aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. Plant Biotech J 16:415–427
- Lin T, Zhu G, Zhang J, Xu X, Yu Q, Zheng Z, Zhang Z, Lun Y, Li S, Wang X, Huang Z, Li J, Zhang C, Wang T, Zhang Y, Wang A, Zhang Y, Lin K, Li C, Xiong G, Xue Y, Mazzucato A, Causse M, Fei Z, Giovannoni JJ, Chetelat RT, Zamir D, Stadler T, Li J, Ye Z, Du Y, Huang S, (2014) Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. Nat Genet 46:1220–1226
- Macovei A, Sevilla NR, Cantos C, Jonson GB, Slamet-Loedin I, Cermak T, Voytas DF, Choi IR, Chadha-Mohanty P (2018) Novel alleles of rice *eIF4G* generated by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis confer resistance to *Rice tungro spherical virus*. Plant Biotechnol J 1–10, doi: 10.1111/pbi.12927
- Malnoy M, Viola R, Jung M-H, Koo O-J, Kim S, Kim J-S, Velasco R, Kanchiswamy CN (2016) DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. Front Plant Sci 7:1904–1913 doi: 10.3389/fpls.2016.01904
- Matsumura KMAT (2010) Deletion of fucose residues in plant N-glycans by repression of the *GDP-mannose 4,6-dehydratase* gene using virus-induced gene silencing and RNA interference. Plant Biotechnol J 9:264–281
- Merlot S, Leonhardt N, Fenzi F, Valon C, Costa M, Piette L, Vavasseur A, Genty B, Boivin K, Müller A, Giraudat J, Leung J (2007) Constitutive activation of a plasma membrane H⁺-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. EMBO J 26:3216–3226
- Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Soria E (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. J Mol Evol 60:174–182 doi: 10.1007/s00239-004-0046-3
- Moscou MJ, Bogdanove AJ (2009) A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science 326:1501
- Muller M, Lee CM, Gasiunas G, Davis TH, Cradick TJ, Siksnys V, Bao G, Cathomen T, Mussolino C (2016) *Streptococcus thermophilus* CRISPR-Cas9 systems enable specific editing of the human genome. Mol Ther 24:636–644 doi: 10.1038/mt.2015.218
- Okuzaki A, Toriyama K (2004) Chimeric RNA/DNA oligonucleotide directed gene targeting in rice. Plant Cell Rep 22:509–512
- Okuzaki A, Ogawa T, Koizuka C, Kaneko K, Inaba M, Imamura J, Koizuka N (2018) CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the *fatty acid desaturase 2* gene in *Brassica napus* <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.025>
- Osakabe Y, Osakabe K (2015) Genome editing with engineered nucleases in plants. Plant Cell Physiol 56:389–400 doi: 10.1093/pcp/pcu170
- Osakabe Y, Watanabe T, Sugano SS, Ueta R, Ishihara R, Shinozaki K, Osakabe K (2016) Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants. Scientific Rep 6:26685 DOI: 10.1038/srep26685
- Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR (2011) Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. Nature Methods 8:765–U115
- Pauwels K, Podevin N, Breyer D, Carroll D, Herman P (2014) Engineering nucleases for gene targeting: safety and regulatory considerations. Nat Biotechnol 31:18–27 doi: 10.1016/j.nbt.2013.07.001
- Peng A, Chen S, Lei T, Xu L, He Y, Wu L, Yao L, Zou X (2017) Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. Plant Biotechnol J 15:1509–1519
- Puchta H, Fauser F (2013) Gene targeting in plants: 25 years later. Int J Dev Biol 57:629–637
- Pyott DE, Sheehan E, Molnar A (2016) Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants. Mol Plant Pathol 17:1276–1288
- Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS, Koonin EV, Sharp PA, Zhang F (2015) *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. Nature 520:186–191 doi: 10.1038/nature14299
- Reynard GB (1961) New source of the *j2* gene governing jointless pedicel in tomato. Science 134:2102
- Rick CM, Butler L (1956) Cytogenetics of the tomato. Adv Genet 8:267–382
- Robinson RW (1980) Pleiotropic effects of the *j-2* gene. TGC Report 30:32
- Römer P, Hahn S, Jordan T, Strauß T, Bonas U, Lahaye T (2007) Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. Science 318:645–648
- Rodríguez-Leal D, Zachary H, Lemmon ZH, Man J, Bartlett ME, Lippman ZB (2017) Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. Cell 171:470–480
- Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Gimenez MJ, Sousa C, Voytas DF, Barro F (2018) Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. Plant Biotechnol J 16:902–910
- Sato M, Nakahara K, Yoshii M, Ishikawa M, Uyeda I (2005) Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor *4E* family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. FEBS Lett 579:1167–1171
- Sauer NJ, Narváez-Vásquez J, Mozoruk J, Miller RB, Warburg ZJ, Woodward MJ, Mihiret YA, Lincoln TA, Segami RE, Sanders SL, Walker KA, Beetham PR, Schöpke CR, Gocal FFW (2016) Oligonucleotide-mediated genome editing provides precision and function to engineered nucleases and antibiotics in Plants. Plant Physiol 170:1917–1928
- Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte HR, Archibald RL, Yang M, Hakimi SM, Mo H, Habben JH (2017) *ARGOS8* variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. Plant Biotechnol J 15:207–216
- Shibuya K, Watanabe K, Ono M (2018) CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the *EPHEMERAL1* locus that regulates petal senescence in Japanese morning glory. Plant Physiol Biochem <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.036>
- Shimatania Z, Fujikuraa U, Ishiia H, Matsui Y, Suzuki M, Ueke Y, Taoka K, Terada R, Nishida K, Kondo A (2018) Inheritance of co-edited genes by CRISPR-based targeted nucleotide substitutions in rice. Plant Physiol Biochem <https://doi.org/10.1016>

- j.plaphy.2018.04.028
- Shin SE, Lim JM, Koh HG, Kim EK, Kang NK, Jeon S, Sohee Kwon S, Shin WS, Lee B, Hwangbo K, Kim J, Ye SH, Yun JY, Seo H, Oh HM, Kim KJ, Kim JS, Jeong WJ, Chang YK, Jeong BR (2016) CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. Scientific Reports 6:27810 DOI: 10.1038/srep27810
- Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, Worden SE, Mitchell JC, Arnold NL, Gopalan S, Meng X (2009) Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. Nature 459:437–441
- Soyk S, Lemmon ZH, Oved M, Fisher J, Liberatore KL, Park SJ, Goren A, Jiang K, Ramos A, van der Knaap E, Eck JV, Zamir D, Eshed Y, Lippman ZB (2017a) Bypassing negative epistasis on yield in tomato imposed by a domestication gene. Cell 169:1142–1155
- Soyk S, Müller NA, Park SJ, Schmalenbach I, Jiang K, Hayama R, Zhang L, Eck JV, Jiménez-Gómez JM, Zachary B Lippman ZB (2017b) Variation in the flowering gene *SELF PRUNING 5G* promotes day-neutrality and early yield in tomato. Nat Genet 49:162–170
- Steinert J, Schim S, Puchta H (2016) Homology-based double-strand break-induced genome engineering in plants. Plant Cell Rep 35:1429–1435
- Sun Y, Zhang X, Wu C, He Y, Ma Y, Hou H, Guo X, Du W, Zhao Y, Xia L (2016) Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of *acetolactate synthase* Mol Plant 9:628–631
- Sun YW, Jiao GA, Liu ZP, Zhang X, Li JY, Guo XP, Du WM, Du JL, Francis F, Zhao YD, Xia LQ (2017) Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. Front Plant Sci 8:298–313 doi:10.3389/fpls.2017.00298
- Sung YH, Baek IJ, Kim DH, Jeon J, Lee J, Lee K, Jeong D, Kim JS, Lee HW (2014a) Knockout mice created by TALEN mediated gene targeting. Nat Biotechnol 31:23–24
- Sung YH, Kim JM, Kim HT, Lee J, Jeon J, Jin Y, Choi JH, Ban YH, SJ, Kim CH, Lee HW, Kim JS (2014b) Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases 24:125–131
- Swiss National Science Foundation (2012) Benefits and risks of the deliberate release of genetically modified plants. National Research Programme NRP 59. http://www.nfp59.ch/e_index.cfm. Accessed on 16 Feb 2016
- Tekoah Y, Shulman A, Kizhner T, Ruderfer I, Fux L, Nataf Y, Bartfeld D, Ariel T, Gingis-Velitski S, Hanania U, Shaaltiel Y (2015) Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture—the protalix experience. Plant Biotechnol J 13:1199–1208
- Tieman D, Zhu G, Resende Jr. MFR, Lin T, Nguyen C, Bies D, Rambla JL, Beltran KSO, Taylor M, Zhang B, Ikeda H, Liu Z, Fisher J, Zemach I, Monforte A, Zamir D, Granell A, Kirst M, Huang S, Klee H (2017) A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. Science 355: 391–394
- Ueta R, Abe C, Watanabe T, Sugano SS, Ishihara R, Ezura H, Osakabe Y, Osakabe K (2017) Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. Scientific Reports 7: 507–515 DOI:10.1038/s41598-017-00501-4
- Waltz E (2016) Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. Nature 532:293
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu J-L (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. Nat Biotechnol 32:947–951
- Wang F, Wang C, Liu P, Lei C, Hao W, Gao Y, Liu YG, Zhao K (2016) Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *ERF* transcription factor gene *OsERF922*. PLoS ONE 11: e0154027. doi:10.1371/journal.pone.0154027
- Watanabe K, Kobayashi A, Endo M, Sage-Ono K, Toki S, Ono M (2017) CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the *dihydroflavonol-4-reductase-B (DFR-B)* locus in the Japanese morning glory *Ipomoea (Pharbitis) nil*. Scientific Reports 7:10028–10037 | DOI:10.1038/s41598-017-10715-1
- Wittmann S, Chatel H, Fortin MG, Laliberte J-F (1997) Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic Potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (*iso*) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two hybrid system. Virology 234:84–92
- Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe SH, Kim JS (2015) DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. Nat Biotechnol 33:1162–1165
- Yu QH, Wang B, Li N, Tang Y, Yang S, Yang T, Xu J, Guo C, Yan P, Wang Q, Asmutola P (2017) CRISPR/Cas9-induced targeted mutagenesis and gene replacement to generate longshelf life tomato lines. Scientific Reports 7:11874–11873, DOI:10.1038/s41598-017-12262-1
- Zaidi SS, Mahfouz MM, Mansoor S (2017). CRISPR-Cpf1: a new tool for plant genome editing. Trends Plant Sci 22:550–553 doi: 10.1016/j.tplants.2017.05.001
- Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin EV (2015) Cpf1 is a single RNA-guided 624 endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. Cell 163:759–771
- Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, Fedorova I, Kneppers J, DeGennaro EM, Winblad N, Choudhury SR, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Wu WY, Scott DA, Severinov K, van der Oost J, Zhang F. et al. (2017) Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. Nat Biotechnol 35:31–34 doi: 10.1038/nbt.3737
- Zhang T, Zheng Q, Yi X, An H, Zhao Y, Ma S, Zhou G (2018) Establishing RNA virus resistance in plants by harnessing CRISPR immune system. Plant Biotechnol J 16:1415–1423, doi: 10.1111/pbi.12881
- Zhou H, He, Li J, Chen L, Huang Z, Zheng S, Zhu L, Ni E, Jiang D, Zhao B, Zhuang C (2016) Development of commercial thermo-sensitive genic male sterile rice accelerates hybrid rice breeding using the CRISPR/Cas9-mediated *TMS5* editing system. Scientific Reports 6:37395, DOI: 10.1038/srep37395

Zhu T, Peterson DJ, Tagliani L, St. Clair G, Baszczynski CL, Bowen B (1999) Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Nat Acad Sci USA* 96:8768-8773

Zhu T, Mettenburg K, Peterson DJ, Tagliani L, Baszczynski CL (2000) Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat Biotechnol* 18:555-558